

[ノート]

観賞用ヒョウタンによる中毒の原因物質と推定される苦味成分 ククルビタシン B の分析

吉岡 直樹* 吉田 昌史

Determination of Cucurbitacin B by LC/MS in Food Poisoning Caused by Bottle Gourd

Naoki YOSHIOKA* and Masashi YOSHIDA

Health Science Research Division, Public Health Science Research Center, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Consumer Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan

We report a case of bottle gourd poisoning occurred in Hyogo prefecture in 2016. A male patient took bottle gourds grown in his garden and deep fried them with other vegetables. He ate them with two friends of his. About thirty minutes after eating, the symptoms such as nausea, vomiting and diarrhea were observed among three patients.

Cucurbitacins are poisonous substances contained in bottle gourd. We analyzed cucurbitacin B in the remaining food sample. The sample was extracted with methanol and diluted with 50% methanol, and analyzed by LC/MS. In the remaining food sample, 468 µg/g of cucurbitacin B was detected.

I はじめに

ヒョウタンを原因とする食中毒は日本では平成 22 年までの 50 年間で 3 件の報告例があり¹⁾、最近では平成 25 年に大阪府で、平成 26 年には奈良県での中毒事例が報告されている。ヒョウタン等の観賞用ウリ科植物には、苦味成分であるククルビタシン類を含むことがあり、実などを摂取すると、嘔吐や下痢の症状を引き起こすと言われている。

今回、平成 28 年 7 月、篠山市において発生した、観賞用ヒョウタンの誤食による中毒事例について、LC/MS を用いたククルビタシン B の分析法の検討を行い、喫食（調理）残品中の定量分析を行ったので報告する。

健康科学部

*別刷請求先：〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町 2-1-29
兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学研究センター
健康科学部 吉岡 直樹

II 方法

1. 事件の概要

- 1.1 発生年月 平成28年7月
- 1.2 喫食者数 3名（男性2名、女性1名）
- 1.3 有症者数 3名
- 1.4 発生状況

兵庫県篠山市在住の男性が自宅の庭で栽培したヒョウタンの実を、他の野菜とともに油で素揚げにして調理した。これらを自宅を訪ねてきた友人2名と喫食したところ、約30分後に3名全員が嘔気、嘔吐、下痢等の症状を呈し、医療機関を受診した。健康福祉事務所の調査によると、当該ヒョウタンの苗は「千成ひょうたん」という名称で「観賞用・加工用」として販売されていたことが判明した。

2. 試料

本事例の調理残品として、同一株から採取した観賞用



Fig. 1 Pictures of remaining food sample of the case. The fruit of bottle gourd (A) and its cross section (B)

ヒョウタンの果実 (Fig. 1) 及び、陰性対照として市販のキュウリ及びユウガオの果実 (新潟県産) を用いた。

3. 試薬及び試液

標準品として、ククルビタシンB (ChromaDex製) (Fig. 2) を用い、5 mgをメタノールに溶解して20 mLとし250 µg/mL 標準原液とした。これを50%メタノールで希釈し、0.05~1 µg/mLの検量線用標準溶液を調製した。メタノール及びアセトニトリル (高速液体クロマトグラフ用)、ギ酸アンモニウム (特級) は和光純薬製を用いた。シリンジフィルターはWhatman製PURADISC (PVDF製, 0.45 µm) を使用した。

4. 装置及び測定条件

装置 : Agilent 1200 Series LC + 6210 TOF
 カラム : ジーエルサイエンス Inertsil ODS-3 (150 mm × 3.0 mm, 3 µm)
 移動相 : アセトニトリル-10 mMギ酸アンモニウム (50:50)
 流量 : 0.4 mL/min カラム温度 : 40°C
 注入量 : 5 µL
 イオン化法及びキャピラリー電圧 : ESI (Positive, 4000 V)
 ネブライザ圧力 : 50 psi 乾燥ガス : 10 L/min (350°C)
 フラグメンター電圧 : 100 V
 スキャン範囲 : m/z 40-1050

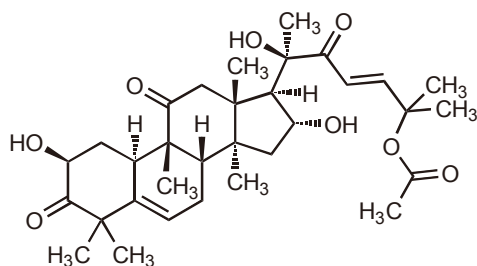


Fig. 2 Chemical structure of cucurbitacin B

リファレンスマス : m/z 121.0509 及び m/z 922.0098
 定量イオン : m/z 576.3531 確認イオン : m/z 499.3054

5. 試験溶液の調製

試料5 gを50 mL遠沈管に入れ、メタノール25 mLを加えて、1分間ホモジナイズし抽出した。ホモジナイザーの刃を水で洗い、この洗液と抽出液とを併せて水で50 mLにメスアップした。溶液の一部を採取し、遠心分離 (10000 rpm, 3分間) を行った上清をシリンジフィルターでろ過したものを、試験溶液とした。これを50%メタノールで適宜希釈し、LC/MSで分析した。

III 結果及び考察

1. 抽出法の検討

試験溶液の調製法は、大城らの報告²⁾ 及び山口らの報告³⁾ を参考としたが、試料が妨害成分の多い調理食品ではなく、果実であること、選択性の高いLC/MSで分析を行うことから、液液分配等の精製工程を省略し、メタノールで抽出を行う簡便な方法とした。

2. LC/MS 分析条件の検討

ククルビタシン類の分析について、吉岡ら⁴⁾ は移動相にアセトニトリル-水を用いて分析を行っている。山口ら³⁾ によると、ククルビタシンBはNa付加体よりも、アンモニウム付加体の方がMS検出器に対する感度が高いと報告されており、移動相としてギ酸アンモニウム水溶液を用いた。また、溶出方法はグラジエントではなくアイソクラティック溶出でも分析に問題がみられなかったため、移動相組成はアセトニトリル-10 mMギ酸アンモニウム水溶液(50:50)とした。MS条件については、定量イオンをククルビタシンBのアンモニウム付加体である m/z 576.3531 ($M + NH_4^+$) とし、確認イオンはアセトキシ基が脱離したと推測される m/z 499.3054 ($M - OCOCH_3^+$) を用いた。

3. 添加回収試験

ククルビタシンBを含有しないヒョウタンの入手が困難であったため、ヒョウタンと同一種である食用のユウガオ及びキュウリを陰性対照とした。ユウガオにククルビタシンBを1 µg/g相当添加し、回収試験を行った結果、ククルビタシンBの保持時間付近には妨害ピークは認められず、回収率も97.8±2.3% (n = 3) と良好であった。定量限界(S/N =10) はユウガオに添加した場合で0.3 µg/gと計算された。また、陰性対照のユウガオ及びキュ

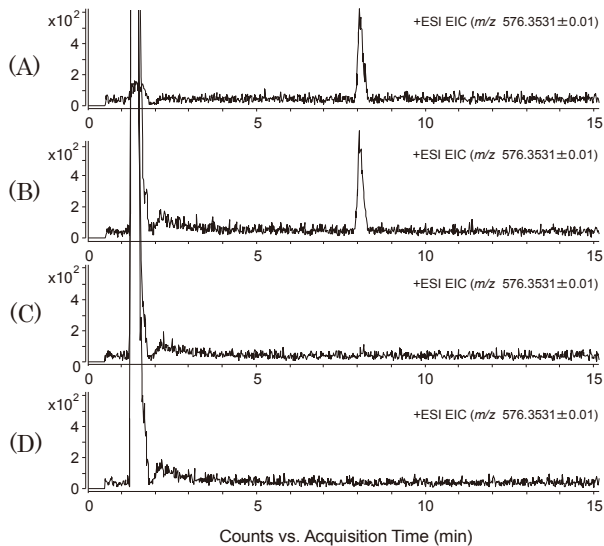


Fig.3 Extracted ion chromatograms obtained from 0.1 $\mu\text{g/mL}$ standard solution of cucurbitacin B (A) and edible bottle gourd (Yugao) fortified with cucurbitacin B at 1 $\mu\text{g/g}$ (B), edible bottle gourd blank (C) and cucumber (D)

ウリからは、ククルビタシンBは検出されなかった (検出限界:0.1 $\mu\text{g/g}$)。これらのLC/MSクロマトグラムをFig. 3に示した。

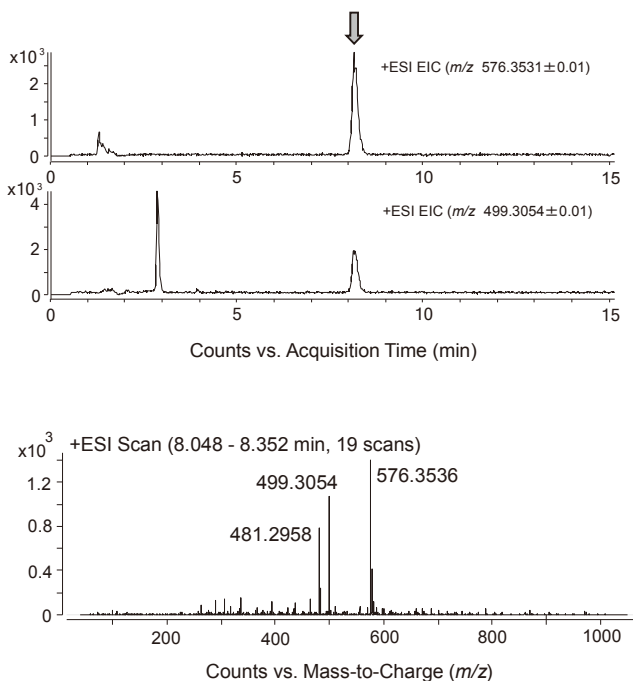


Fig.4 Extracted ion chromatograms obtained from remaining food sample of the case (100-fold diluted extract) and mass spectrum

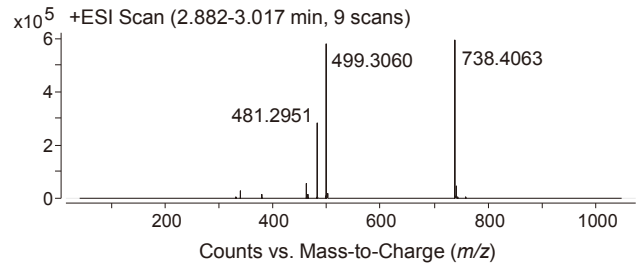


Fig.5 Mass spectrum of the unknown compound

4. 調理残品の分析結果

本中毒事例での調理残品である観賞用ヒョウタンを分析した結果、ククルビタシンBが468 $\mu\text{g/g}$ 検出された。Fig. 4にLC/MSクロマトグラム及びMSスペクトルを示した。

5. 他のククルビタシン類の含有の推定

調理残品の分析の際、確認イオン m/z 499.3054での抽出クロマトグラム (Fig. 4) において約3分付近に現れたピークについて、マススペクトルを解析した (Fig. 5)。その結果、ククルビタシンBのアンモニウム付加イオン (m/z 576.3531) よりも162.0532 Da ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$) 大きなイオン (m/z 738.4063) が観測されたこと、またフラグメントイオンのパターンもククルビタシンBのマススペクトルと類似していることなどから、本ピークはククルビタシンBの配糖体 (例: ククルビタシンB 2-グルコシド (アルベニンI)⁵⁾ 等) である可能性が示唆された。

IV 結論

ヒョウタンの有毒成分であるククルビタシンBの分析法を検討した結果、メタノールで抽出を行う簡便な抽出法でLC/MSによる定量分析が可能であった。

また、平成28年に兵庫県で発生した観賞用ヒョウタンの誤食による中毒事例の調理残品から、中毒の原因物質と推定されるククルビタシンBを検出した。

謝辞

試料採取、情報収集して頂きました県丹波健康福祉事務所及び県生活衛生課の関係者の方々に深謝致します。

文 献

- 1) 登田美桜, 畝山智香子, 春日文子: 過去 50 年間のわが国の高等植物による食中毒事例の傾向. 食衛誌, **55**, 55-63 (2014)
- 2) 大城直雅, 佐久川さつき: 沖縄県における化学物質と自然毒による食中毒および苦情事例—平成 20 年度—. 沖縄県衛生環境研究所報, **43**, 181-184 (2009)
- 3) 山口瑞香, 野村千枝, 清田恭平, 梶村計志: ヒヨウタンによる食中毒事例について. 大阪府立公衛研所報, **52**, 41-43 (2014)
- 4) 吉岡敏行, 赤木正章, 北村雅美, 浅田幸男, 難波順子: 食品と医薬品等に含まれる有害化学物質等の分析技術の開発に関する研究—ウリ科植物に含まれる苦味成分クルビタシン分析法の検討—. 岡山県環境保健センター年報, **39**, 153-157 (2015)
- 5) Yamada, Y., Hagiwara, K., Iguchi, K., Suzuki, S. and Hsu, H.Y.: Isolation and structures of arvenins from *Anagallis arvensis* L. (Primulaceae). New cucurbitacin glucosides. Chem. Pharm. Bull., **26**, 3107-3112 (1978)

(平成 29 年 3 月 15 日受理)