

[ノート]

ズッキーニによる有症苦情事例の原因物質の解明 — 苦味成分ククルビタシン類の一斉分析法の検討及び定量分析 —

吉岡 直樹* 野村 素行

Determination of Cucurbitacins and the Glycoside by LC/MS in Food Poisoning Caused by Zucchini

Naoki YOSHIOKA* and Motoyuki NOMURA

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

A rapid LC/MS method was developed for determination of cucurbitacin B, cucurbitacin D, cucurbitacin E, cucurbitacin I and elaterinide (cucurbitacin E 2-*O*- β -D-glucopyranoside) in zucchini. Cucurbitacins were extracted with methanol and diluted with 50% methanol, and the extract was passed through a syringe filter, and then analyzed by LC/MS. The recoveries of cucurbitacins spiked into zucchini at 1 μ g/g ranged from 96 to 102 %, and the limits of quantitation (LOQ) were 0.1 μ g/g (cucurbitacin B), 0.2 μ g/g (cucurbitacin E and cucurbitacin I), 0.3 μ g/g (cucurbitacin D) and 0.4 μ g/g (elaterinide). This method was applied to the remaining zucchini samples from a food poisoning case. Cucurbitacin B (0.19–2.3 μ g/g), cucurbitacin E (0.22–1.5 μ g/g) and elaterinide (650–1600 μ g/g) were detected in the remaining samples.

I はじめに

ウリ科植物の中には、苦味成分であるククルビタシン類を含むことがあり、嘔吐や下痢の症状を引き起こすことが知られている。国内では過去に、ユウガオ^{1,2)}、ヘチマ^{3,4)}、ズッキーニ⁵⁾等による中毒事例が報告されており、兵庫県においても、平成 28 年に観賞用ヒョウタンの誤食による中毒が発生した⁶⁾。

今回、平成 29 年に兵庫県内で発生したズッキーニによる有症苦情事例において、ククルビタシン B, D, E, I 及びエラテリニド (ククルビタシン E 2-*O*- β -D-グルコ

シド) の LC/MS を用いた分析法を検討し、喫食残品等の定量分析を行ったので報告する。

II 材料と方法

1. 事件の概要

- 1.1 発生年月 平成29年6月
- 1.2 喫食者数 6名
- 1.3 有症者数 5名
- 1.4 発生状況

平成29年6月、兵庫県内の福祉施設において、昼食として「ズッキーニの天ぷら」を喫食した6名のうち5名が、約5時間後に下痢等の症状を訴えた。

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

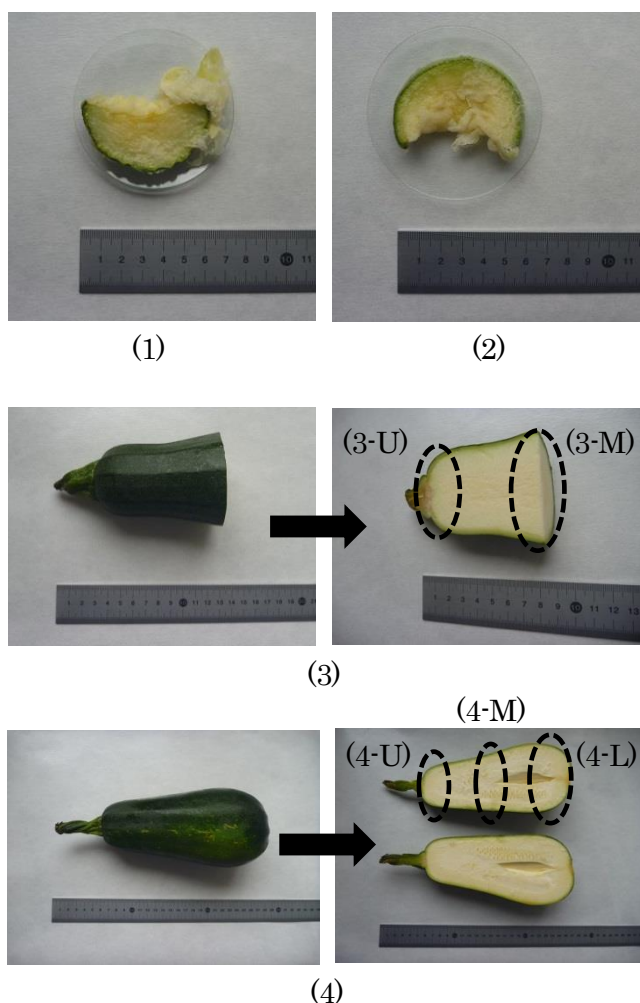


Fig.1 Pictures of remaining food samples of the case.
Zucchini tempura (1)(2) and zucchini (3)(4)

2. 試料

本事例の喫食残品である「ズッキーニの天ぷら」(1)及び保存検食の「ズッキーニの天ぷら」(2), 並びに調理に使用した残品であるズッキーニ(3)及び未使用のズッキーニ(4)をそれぞれ試料とした。(3)については図のように縦に半分に切断して上部(3-U), 中央部(3-M)とし,(4)についても半分に切断後, 上部(4-U), 中央部(4-M), 下部(4-L)とし, 点線で囲まれた部分を中心に試料のサンプリングを行った。また, 陰性対照として市販のズッキーニを用いた (Fig. 1)。

3. 試薬及び試液

標準品として, ククルビタシンB, ククルビタシンD, ククルビタシンE, ククルビタシンI (ChromaDex製)及び エラテリニド (Sigma-Aldrich製)を用いた (Fig. 2)。ククルビタシンは2 mg, エラテリニドは1 mgをメタノールに溶解して10 mLとし, それぞれ200 µg/mL,

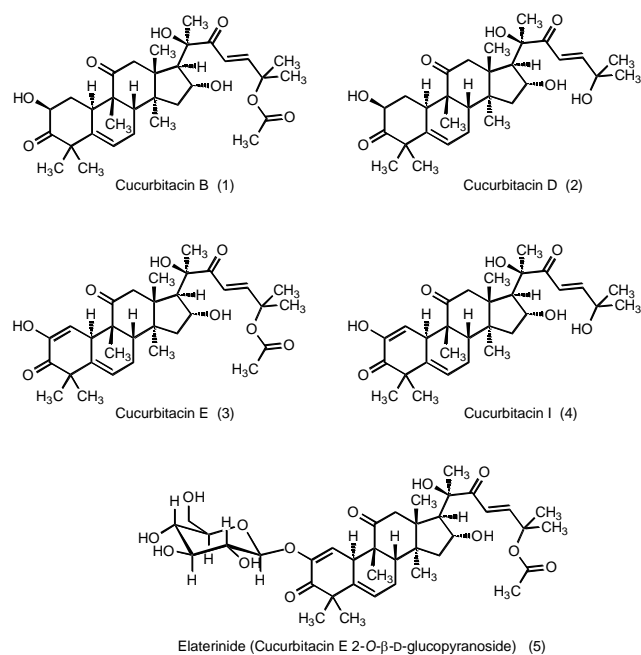


Fig.2 Chemical structures of cucurbitacins and the glycoside

100 µg/mL 標準原液とした。これらを混合して, 50% (v/v) メタノールで希釈し, 0.005 µg/mL~1 µg/mLの検量線用混合標準溶液を調製した。

β-グルコシダーゼ (アーモンド由来)は東京化成製を用い, 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)は関東化学製, 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GEヘルスケア製Puradisc13 (PVDF製, 0.45 µm)を使用した。

4. 装置

ホモジナイザーはIKA製ULTRA-TURRAX T8を使用し, 遠心機は日立工機製CF6RNを使用した。LC-MSはAgilent製1200 Series LC及び6210 TOF-MSDを用いた。

5. 測定条件

LC-MSの測定条件を表に示した (Table 1)。

6. 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。この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% (v/v)メタノールで適宜希釈し, LC/MSで分析した。

Table 1 LC/MS operating conditions

LC parameters	Column	GL sciences Inertsil ODS-3 (150 mm×3.0 mm, 3 μm)
	Mobile phase	A: 10 mmol/L ammonium formate B: acetonitrile
	Gradient elution	A:B = 60:40 (0 min) → 60:40 (3 min) → 30:70 (10 min) → 30:70 (20 min) → 60:40 (20.01 min)
	Flow rate	0.4 mL/min
	Column temperature	40°C
	Injection volume	5 μL
	MS conditions	Ionization mode
Capillary voltage		4000 V
Nebulizer pressure		50 psi
Drying gas		10 L/min (350°C)
Fragmentor voltage		100 V
Scan range (<i>m/z</i>)		40-1050
Target and qualifier ion (<i>m/z</i>)		Cucurbitacin B: 576.3531 [M+NH ₄] ⁺ and 499.3054 [M-OCOCH ₃] ⁺ Cucurbitacin D: 499.3054 [M+H-H ₂ O] ⁺ and 481.2949 [M+H-2H ₂ O] ⁺ Cucurbitacin E: 574.3374 [M+NH ₄] ⁺ and 497.2898 [M-OCOCH ₃] ⁺ Cucurbitacin I: 497.2898 [M+H-H ₂ O] ⁺ and 479.2792 [M+H-2H ₂ O] ⁺ Elaterinide: 497.2898 [M-C ₆ H ₁₀ O ₅ -OCOCH ₃] ⁺ and 736.3903 [M+NH ₄] ⁺
Reference mass (<i>m/z</i>)		121.0509 (purine) and 922.0098 (hexakis (1 <i>H</i> ,1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -tetrafluoropropoxy)phosphazine)

7. 試験溶液の酵素加水分解

50 mLにメスアップした調理残品のズッキーニ試料(3-U)からの抽出液を5 mL採り、ロータリーエバポレーターで濃縮後、水を5 mL加えて溶解し溶媒を置換した。この容器をナスフラスコに2 mLずつ採り、β-グルコシダーゼを20 mg添加したものと、添加しないもの(対照)を37°Cの恒温槽に入れ24時間放置した。反応後、それぞれロータリーエバポレーターで濃縮し、50% (v/v) メタノールを2 mL加えて溶解したものをシリンジフィルターでろ過し、LC/MS用試験溶液とした。

III 結果及び考察

1. 分析法の検討

試験溶液の調製法は、以前報告したヒョウタン中のククルビタシンBの分析と同様の方法⁹⁾を用い、メタノールで抽出を行ったものを水で希釈、定容し、シリンジフィルターでろ過したものを試験溶液とした。LC/MS分析においては、今回はククルビタシン類の複数成分の同時分析であるため、前報で用いたアイソクラティックではなく、アセトニトリル-ギ酸アンモニウム系のグラジエント溶出を用いた。

定量及び確認に用いたイオンについて、ククルビタシンB, Eは、アンモニウム付加体 [M+NH₄]⁺ を定量イオンとし、アセトキシ基が脱離した [M-OCOCH₃]⁺ を確認イオンとして用いた。また、ククルビタシンD, Iは、[M+H-H₂O]⁺ を定量イオンとし、さらにH₂Oが脱離した[M+H-2H₂O]⁺ を確認イオンとした。エラテリニドについては、糖及びアセトキシ基が脱離した [M-C₆H₁₀O₅-OCOCH₃]⁺ を定量イオンとし、アンモニウム付加体 [M+NH₄]⁺ を確認イオンとして用いた。

5種のククルビタシン類について、検量線は0.02 μg/mL (ククルビタシンB, Eは0.005 μg/mL) ~1 μg/mLの範囲で良好な直線性 (R²≥0.999) が得られた。

2. 試験溶液の酵素加水分解

喫食残品及び調理残品中のククルビタシンB, D, E, Iを予試験で分析したところ、ククルビタシンD, Iは検出されず、ククルビタシンB, Eも1 μg/g程度と、過去の中毒事例と比べて非常に低い値であった。しかし、これらのLC/MSクロマトグラム上約5分付近に、精密質量よりククルビタシン配糖体 (ククルビタシンBグルコシド: 738.4059 [M+NH₄]⁺, ククルビタシンEグルコシド: 736.3903 [M+NH₄]⁺) と推定されるピークが確認された。

そこで、調理残品であるズッキーニ(3)の上部(3-U)試料からの抽出液を、有機溶媒による酵素の失活を防止するために、溶媒を濃縮乾固した後、水で再溶解して水溶液とし、Kawaharaの条件⁷⁾を参考にβ-グルコシダーゼを用いて加水分解を行った。

LC/MS分析の結果、酵素加水分解を行った方は、β-グルコシダーゼを添加しなかった対照と比較し、ククルビタシンBは約7倍、ククルビタシンEは約190倍に増加したこと、またククルビタシンEグルコシドと推定されるピーク(736.3903 [M+NH₄]⁺)に明らかな減少が見られたことから、ククルビタシンB、Eのβ-グルコシドの含有が推定された(Fig.3, Table 2)。

3. 添加回収試験

ククルビタシンのグルコシドのうち、標準品が入手可能であったエラテリニド(ククルビタシンE 2-O-β-D-グルコシド)及びククルビタシンB, D, E, Iについて、市販のズッキーニに1 μg/g相当ずつ添加し、回収試験(n=5)を行った。その結果、回収率は96%以上と良好な結果が得られ、ククルビタシン及びエラテリニドの保持時間付近には妨害ピークは認められなかった(Table 3, Fig.4)。

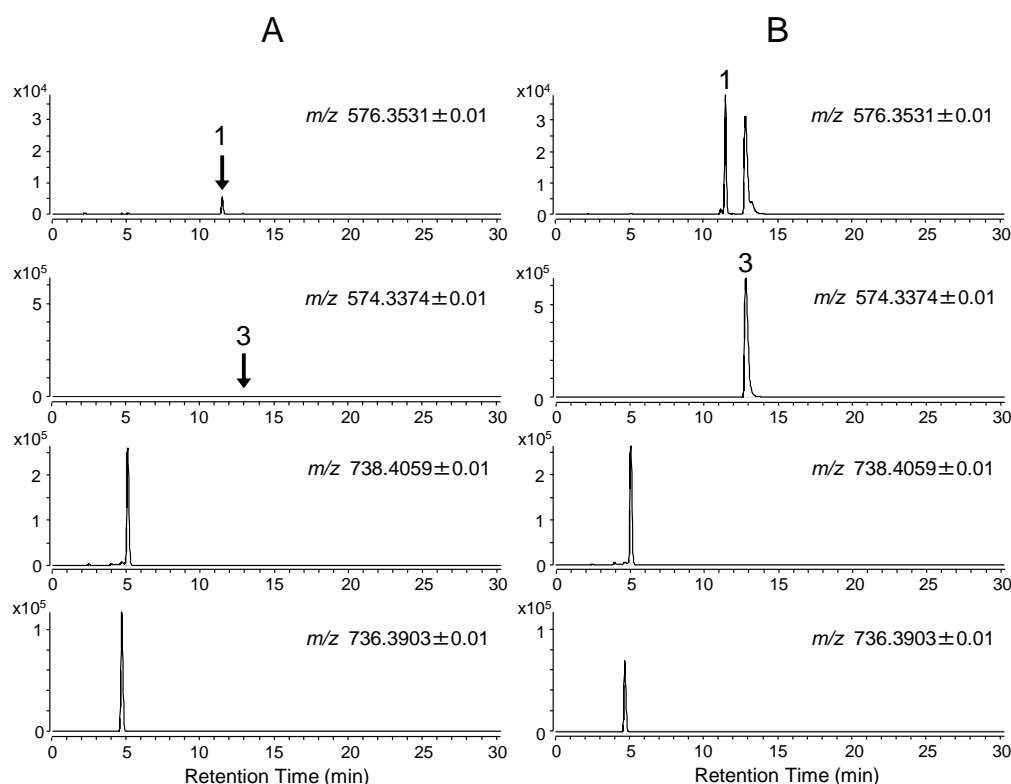


Fig.3 Extracted ion chromatograms obtained from negative control (A) and zucchini extract incubated with β-glucosidase (B). 1: cucurbitacin B, 3: cucurbitacin E

Table 2 Contents of cucurbitacins in zucchini after enzymatic hydrolysis

Compound	Concentration (μg/g)	
	Negative control	Incubated with β-glucosidase
Cucurbitacin B	1.8	12
Cucurbitacin E	1.1	210

Table 3 Recoveries of cucurbitacins spiked into zucchini at 1 μg/g

Compound	Recovery (%)	RSD (%)
Cucurbitacin B	100.9	1.4
Cucurbitacin D	102.1	2.6
Cucurbitacin E	101.7	2.3
Cucurbitacin I	96.3	4.1
Elaterinide	100.3	4.9

(n=5)

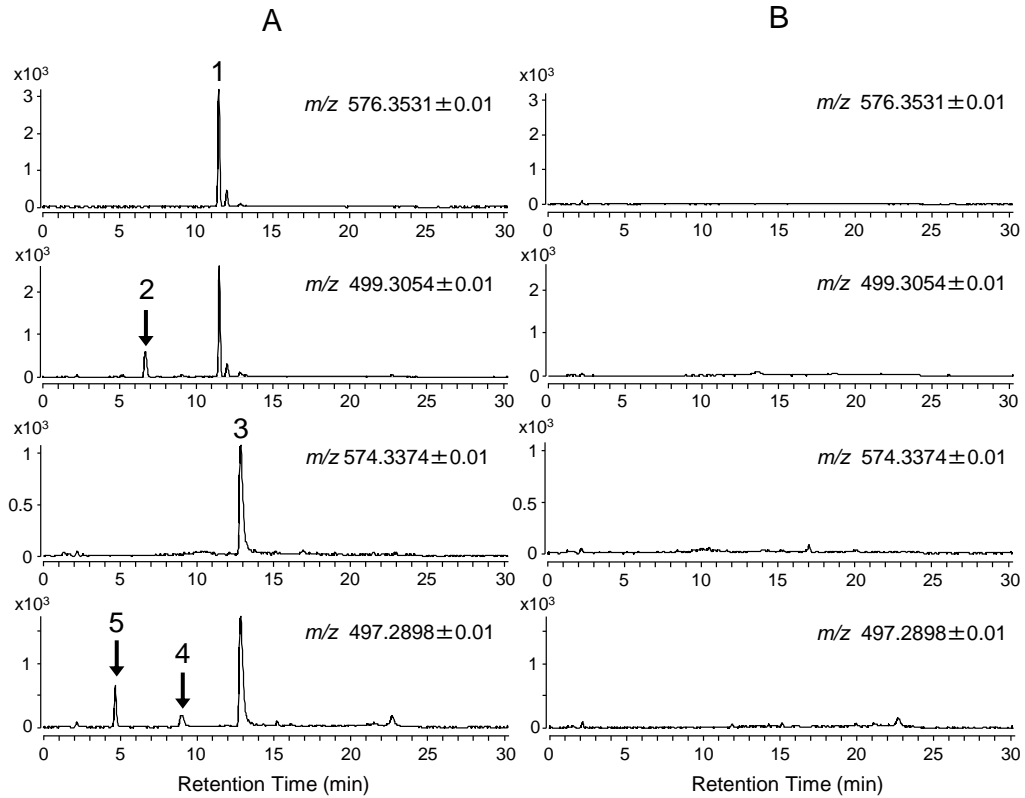


Fig.4 Typical extracted ion chromatograms obtained from zucchini spiked with cucurbitacins at 1 $\mu\text{g/g}$ (A) and blank zucchini (B). 1: cucurbitacin B, 2: cucurbitacin D, 3: cucurbitacin E, 4: cucurbitacin I, 5: elaterinide

また陰性対照のズッキーニからは、これらの化合物は定量限界未満であった。

定量限界($S/N=10$)は、ズッキーニに1 $\mu\text{g/g}$ 相当添加した試験溶液のクロマトグラムから、それぞれ0.1 $\mu\text{g/g}$ (ククルビタシンB), 0.2 $\mu\text{g/g}$ (ククルビタシンE, I), 0.3 $\mu\text{g/g}$ (ククルビタシンD), 0.4 $\mu\text{g/g}$ (エラテリニド) と算出された。

4. 喫食及び調理残品等の分析結果

本中毒事例での喫食及び調理残品等の分析結果について、喫食残品の「ズッキーニの天ぷら」(1)からはエラテリニドを790 $\mu\text{g/g}$, 保存検食の「ズッキーニの天ぷら」(2)からはククルビタシンEを0.22 $\mu\text{g/g}$, エラテリニドを

1200 $\mu\text{g/g}$ 検出したが、その他のククルビタシン類については定量限界未満であった。保存検食の「ズッキーニの天ぷら」(2)のLC/MSクロマトグラムを図に示した(Fig.5)。

また、調理に使用した残品であるズッキーニ(3)及び未使用のズッキーニ(4)からは、ククルビタシンBを0.19~2.3 $\mu\text{g/g}$, ククルビタシンEを0.70~1.5 $\mu\text{g/g}$ 検出したほか、エラテリニドを650~1600 $\mu\text{g/g}$ 検出した。これらの含量をズッキーニの採取部位別で調べると、上部(3-U, 4-U)及び中央部(3-M, 4-M)には特に含有量の差は見られなかったが、下部(4-L)においては、上部及び中央部よりも低い傾向があると推測された (Table 4)。

Table 4 Contents of cucurbitacins in sample from the food poisoning case

Compound	Concentration ($\mu\text{g/g}$)						
	Zucchini tempura (1)	Zucchini tempura (2)	Zucchini (3)		Zucchini (4)		
			3-U	3-M	4-U	4-M	4-L
Cucurbitacin B	ND	ND	1.9	0.35	1.3	2.3	0.19
Cucurbitacin D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cucurbitacin E	ND	0.22	1.5	0.70	0.75	0.94	ND
Cucurbitacin I	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Elaterinide	790	1200	1500	1600	1000	1600	650

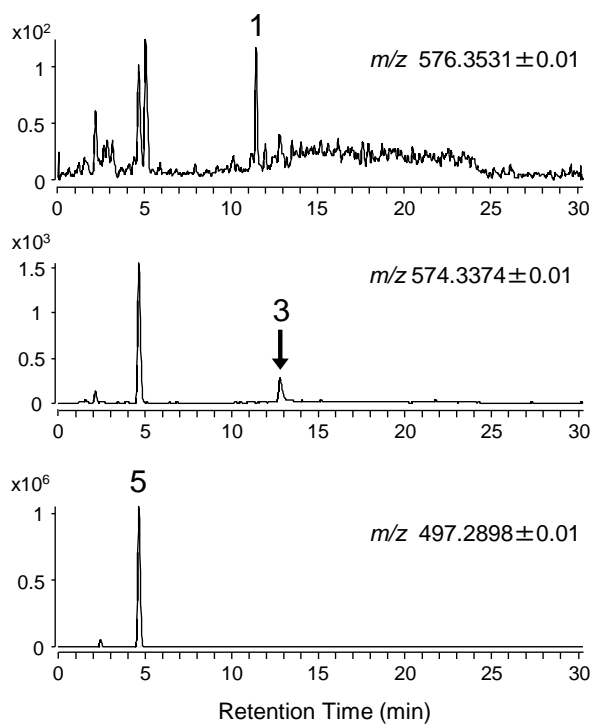


Fig.5 Extracted ion chromatograms obtained from the remaining food sample, zucchini tempura (2)
 1: cucurbitacin B (< LOQ), 3: cucurbitacin E,
 5: elaterinide

ククルビタシン類の急性毒性については、マウスの経口投与において、LD₁₀がククルビタシンBで5 mg/kg体重、LD₅₀がククルビタシンEで340 mg/kg体重、エラテリニドで40 mg/kg体重であったほか、ククルビタシンB及びククルビタシンEは5 mg/kg体重の投与、エラテリニドは2 mg/kg体重の投与でマウスに緩下作用 (laxative activity)を示したという報告⁹⁾があり、今回検出されたククルビタシン類の中ではエラテリニドの緩下作用が最も高かった。さらに、エラテリニドは「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」による劇薬に指定されている「コロシント実」(ウリ科植物「コロシントウリ」の果実であり、強い瀉下作用を示す)の主成分という報告⁹⁾がある。

ドイツにおけるズッキーニ入りシチューによる中毒事例では、調理残品及び生体試料の分析例が報告されている¹⁰⁾。本報告中の死亡事例においては、調理残品の生ズッキーニからククルビタシンB (28 µg/g)、E (221 µg/g)、I (63 µg/g) 及びエラテリニド (8.9 µg/g) が検出され、患者血清からはエラテリニドが、尿からはククルビタシンI及びエラテリニドが検出されている。また、別の中毒事例 (生存) においては、調理済みのズッキーニからククルビタシンB (118 µg/g)、E (681 µg/g)、I (74 µg/g)

及びエラテリニド (127 µg/g) が検出され、患者血清からエラテリニドが、尿からはククルビタシンB及びエラテリニドが検出されており、ズッキーニ中毒による分析においてはククルビタシンに加え、エラテリニドの分析も重要であると思われる。

今回のように、ククルビタシン類が低濃度である検体においても、エラテリニド等のククルビタシン配糖体を高濃度で含有する例があり、中毒事例の分析においては注意が必要であることが分かった。

IV 結論

ウリ科植物の苦味成分であるククルビタシンB, D, E, I及びエラテリニドの一斉分析法を検討した。平成29年に兵庫県で発生したズッキーニによる有症苦情事例の喫食及び調理残品等から、ククルビタシンBを0.19~2.3 µg/g、ククルビタシンEを0.22~1.5 µg/g検出したほか、エラテリニドを650~1600 µg/g検出した。

謝辞

試料採取、情報収集して頂きました県生活衛生課の関係者の方々に深謝致します。

文献

- 1) 田村行弘, 真木俊夫, 観公子, 永山敏廣, 直井家壽太: 化学物質及び自然毒による食中毒等事件例 (第1報) -昭和55年~昭和57年-. 東京衛研年報, **34**, 171-177 (1983)
- 2) 菊池哲, 藤田友嗣, 佐藤正幸, 小野寺誠, 藤野泰久, 井上義博: 出血性腸炎をきたしたククルビタシン中毒の一例. 中毒研究, **30**, 334-335 (2017)
- 3) 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)
- 4) 田中佳代子, 秋谷正人, 渡邊和彦, 辻亜由子, 坂田実穂, 山崎匠子: 苦情事例におけるへちま中のククルビタシンの検査について. 杉並衛試年報, **34**, 40-42 (2016)
- 5) 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

- 成分ククルビタシン分析法の検討ー. 岡山県環境保健センター年報, **39**, 153-157 (2015)
- 6) 吉岡直樹, 吉田昌史: 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. 兵庫県立健康生活科学研究所健康科学研究センター研究報告, **8**, 26-29 (2017)
- 7) Kawahara, N., Kurata, A., Hakamatsuka, T., Sekita, S. and Satake, M. : Two new cucurbitacin glucosides, opercurins A and B, from the Brazilian folk medicine “Buchinha” (*Luffa operculata*). Chem. Pharm. Bull., **52**, 1018-1020 (2004)
- 8) Le Men, J., Buffard, G., Provost, J., Tiberghien, R., Forgacs, P., Lagrange, E., Albert, O., Aourousseau, M. : Relations entre la structure de quelques cucurbitacines, leur toxicité et leur activité laxative. Chimie Thérapeutique, **6**, 459-465 (1969)
- 9) Yoshikawa, M., Morikawa, T., Kobayashi, H., Nakamura, A., Matsuhira, K., Nakamura, S. and Matsuda, H. : Bioactive saponins and glycosides. XXVII. Structures of new cucurbitane-type triterpene glycosides and antiallergic constituents from *Citrullus colocynthis*. Chem. Pharm. Bull., **55**, 428-434 (2007)
- 10) Bajcsik, N., Pfab, R. and Pietsch, J. : Simultaneous determination of cucurbitacin B, E, I and E-glucoside in plant material and body fluids by HPLC-MS. J. Chrom. B, **1052**, 128-134 (2017)
(平成 29 年 12 月 5 日受理)