

## 有毒植物フクジュソウ調理品中のシマリン残留量

Residual Cymarin Levels in Cooked Poisonous Adonis

佐藤 正幸 姉帯 正樹

Masayuki SATO and Masaki ANETAI

Key words : *Adonis ramose* (フクジュソウ) ; cymarin (シマリン) ; cooking (調理)

キンポウゲ科フクジュソウ属は北半球に広く分布し、わが国にはフクジュソウ *Adonis ramose*, キタミフクジュソウ *A. amurensis* 及びミチノクフクジュソウ *A. multiflora* の3種が分布している<sup>1)</sup>。早春に花を付けるため、数多くの園芸品種が正月用の鉢物や寄せ植えの材料として使われており<sup>2)</sup>、身近な植物の一つといえる。

フクジュソウは全草、特に根に強心配糖体のシマリン(図1)、シマロール、ソマリン等を含有している<sup>3)</sup>。乾燥した根及び根茎(福寿草根)は浸剤、チンキ剤とし、強心、利尿薬としてジギタリスの代用とされる。福寿草根は毒性が強く、心臓病の予防薬として煎じて飲み死亡した例もある<sup>3)</sup>。

花が終わった後に展開したフクジュソウの葉は、山菜のシャク(コジャク、セリ科)によく似ている。シャクはセリとミツバを合わせたような香りがし、葉のつけ根に白色のさや(はかま)をつけることで区別は可能である。しかし、十分な知識を持たない人はシャクと間違えフクジュソウを採取する恐れがある。シャクはおひたしやゴマあえ、油炒めなどにして食される<sup>4)</sup>。

そこで今回、フクジュソウをシャクと誤認し調理した時

のシマリン残留量に関する基礎的データを得るため、最も典型的調理法である油炒め及びおひたしにし、調理品中のシマリンを定量した。

### 方 法

#### 1. 試料

つぼみを有するフクジュソウのポット入り苗を1月及び3月に札幌市内の小売店より購入し、温室内で約1カ月間及び3週間育成した。花が終わり地上部が30 cm程になってから、9株を選び、その葉を用いた。

#### 2. 試薬

シマリンはSigma社製標準品(mp.170~172.5℃, 柳本微量融点測定装置MP-S3型使用)を用い、3,5-ジニトロ安息香酸(特級)は東京化成工業(株)製、酢酸(特級)はキシダ化学(株)製を用いた。アセトニトリル(高速液体クロマトグラフ用及びLC/MS用)、メタノール(高速液体クロマトグラフ用)、酢酸エチル(高速液体クロマトグラフ用)、ジクロロメタン(特級)、ギ酸(LC/MS用)、水酸化カリウム(特級)、塩化ナトリウム(特級)、無水硫酸ナトリウム(残留農薬・PCB試験用)、リン酸水素二ナトリウム・12水(特級)、リン酸二水素ナトリウム(特級)、酢酸ナトリウム三水和物(特級)及びリン酸(生化学用)は和光純薬工業(株)製を用いた。調理用の水を含め、水は蒸留脱イオン水を用いた。Oasis HLB Plusカートリッジ(225 mg, Waters社製、以下オアシスHLBプラスと略記)はあらかじめメタノール10 mL、水10 mLで順次洗浄した後、使用した。

Kedde試薬は3,5-ジニトロ安息香酸1 gをメタノール50 mLに溶解後、2N水酸化カリウム50 mLを加え調製した。

#### 3. 標準溶液

シマリン10.0 mgをメタノール10.0 mLに溶解し、シマリン標準原液(1,000 ppm)とした後、これをメタノールで適宜希釈し、使用した。

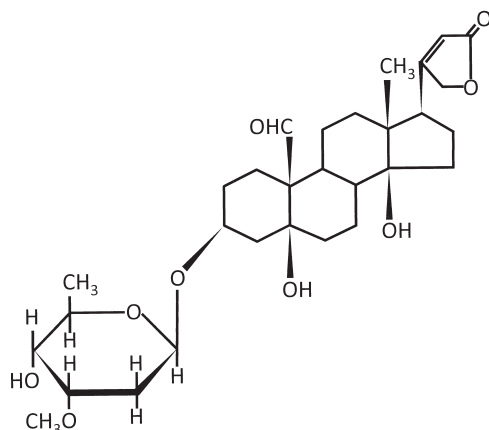


図1 シマリンの構造式

#### 4. 緩衝液

10 mMの緩衝液 (pH 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0及び7.0) を常法に従い調製した。

#### 5. 試料の調製

添加回収試験 (試料1) 及び調理試験 (油炒め: 試料2, おひたし: 試料3) に用いた試料は, それぞれ1株ごとに採取した葉2~10枚 (1枚当たり0.28~1.16 g) を各々縦に2等分し, 対照試料及び試験試料とした。

調理品の試料は以下のとおり調製した。

##### 1) 油炒め

ホットプレート (株象印マホービン製 EA-ZA45, 加熱温度250℃) 上にラード0.5 g及び試料2を載せ, 1分間炒めた後, ペーパータオルで試料表面の油を取り除いた。

##### 2) おひたし

ビーカーに水50 mLを加え, ホットプレート上で加熱した。水が沸騰後, 試料3を加え, 2分間茹でた後, 冷水20 mLを入れたビーカー内に移した。5分間放置後, 水切りした。

#### 6. 試験溶液の調製

##### 1) 未調理品及び調理品

試料にメタノール30 mLを加え, 5分間ホモジナイズ (株日本精機製作所製 Ace HOMOGENIZER, 5,000 rpm) した。吸引ろ過後, ろ液にメタノールを加え総量50 mLとした。この抽出液20 mLに水30 mLを加えた後, オアシスHLBプラスに注入した。流出液を捨てた後, メタノール/水 (2:3) 10 mLでカラムを洗浄した。メタノール/水 (4:1) 10 mLを注入し, カラムから溶出した液を試験溶液I~IIIとした (図2)。

##### 2) 冷水及び茹で汁

冷水全量及び茹で汁全量をそれぞれオアシスHLBプラスに注入し, 以下, 前項と同様に操作し, 試験溶液IV及びVとした。

#### 7. シマリン標準品の熱安定性試験

##### 1) 250℃に加熱

三角フラスコにシマリン標準溶液 (10.0 µg/mL) 1.0 mLを入れ, 窒素気流下で乾固後, ホットプレート上

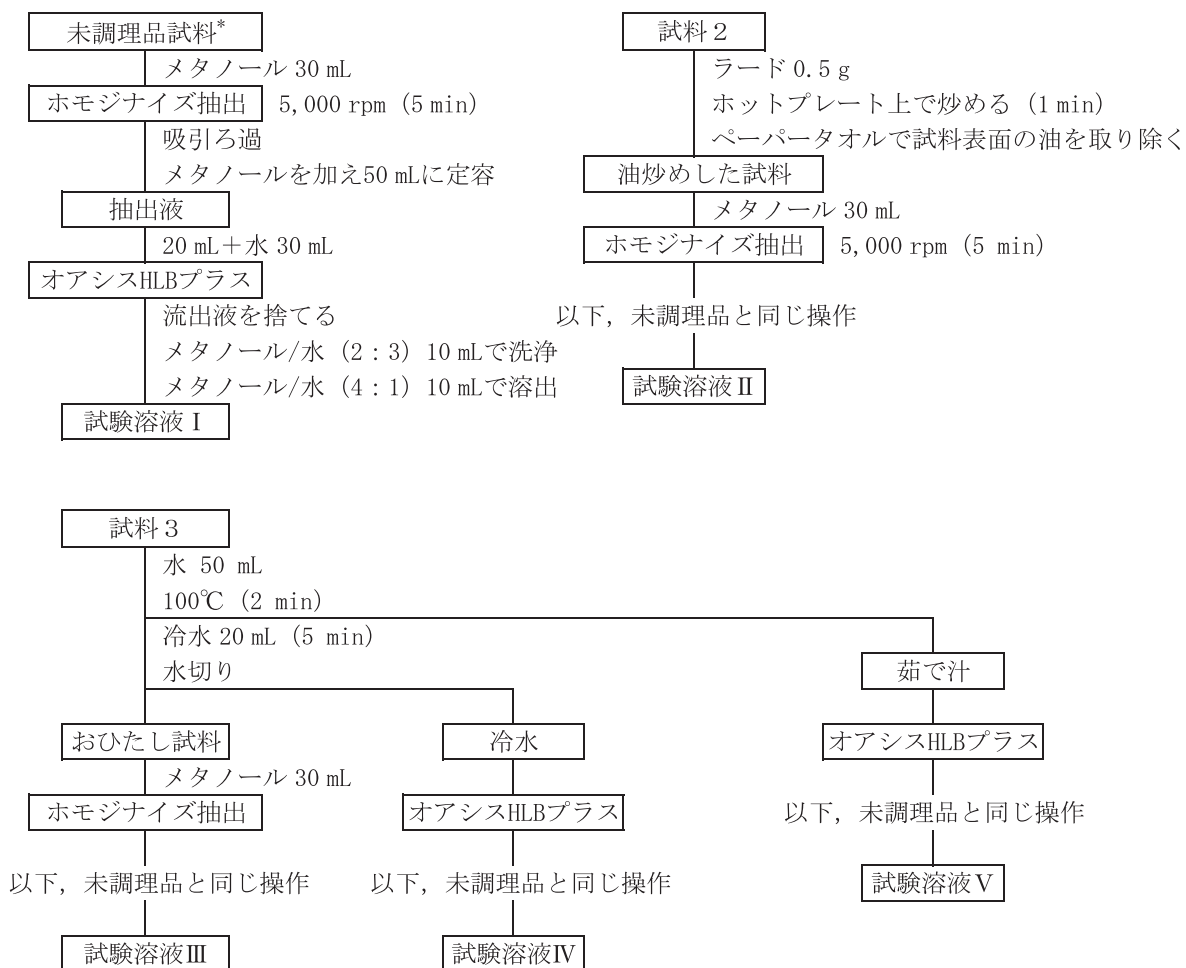


図2 フクジュソウ (未調理品及び調理品) 中のシマリン試験溶液の調製法

\* 試料1及び試料2, 3の未調理品

で1分間または5分間加熱した。冷後、メタノール10 mLに溶解し、LC-MS分析用試験溶液ⅥまたはⅦとした。

シマリン標準品1.96 mgをメタノール500  $\mu$ Lに溶解した後、100  $\mu$ Lを秤量瓶に入れ、自然乾燥後、ホットプレート上で5分間加熱した。冷後、秤量瓶をメタノールで洗浄し、減圧濃縮(乾固)後、メタノール100  $\mu$ Lに溶解し、TLC分析用試験溶液Ⅷとした。

## 2) 沸騰水中で加熱

ビーカーに水50 mL及びシマリン標準溶液(4.0  $\mu$ g/mL)2.0 mLを加え、ホットプレート上で加熱し、2分間沸騰後、以下、茹で汁と同様の操作を行い、試験溶液Ⅸとした。

## 8. 測定条件

### 1) HPLCの条件

装置：(株)島津製作所製LC-10システム及びクロマトパックC-R5A

カラム：インタクト(株)製Cadenza CD-C18 (4.6  $\times$  75 mm, 3  $\mu$ m)

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：アセトニトリル/水(7:18)

流速：0.6 mL/min

測定波長：218 nm(定量用), 230 nm(確認用)

注入量：5  $\mu$ L

### 2) LC-MSの条件

装置：(株)島津製作所製HPLC Prominence 20A シリーズ及びLCMS-2020

カラム：Waters社製Atlantis dC18 (2.1  $\times$  150 mm + 2.1  $\times$  20 mm, 3  $\mu$ m)

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相A液：0.1%ギ酸

移動相B液：0.1%ギ酸含有アセトニトリル

グラジエント 0~5分：B液10%

5~35分：B液10% $\rightarrow$ 100%

35~40分：B液100%

流速：0.2 mL/min

注入量：1  $\mu$ L

検出方法：ESIネガティブモード

SCAN法(定性)及びSIM法(定量, モニターマスイオン( $m/z$ ):593)

### 3) TLCの条件

固定相：Silica gel 60 F254アルミニウムプレート(Merck社)

移動相：ジクロロメタン/メタノール/水(87:12:1)

検出：紫外線(254 nm)照射及びKedde試薬噴霧

## 9. 添加回収試験

試料1(0.74~1.50 g)にシマリン標準原液(1,000 ppm)1 mLを添加後、直ちに抽出操作を開始した。試行数は無添加試料については1回、添加試料については3回とした。

## 結果及び考察

### 1. 分析法の検討

フクジュソウには数種類の強心配糖体が知られているが、標準品が市販されているシマリンを今回の分析対象とした。中山らはシマリン含有尿及びシマリン含有血清について、1 mLをオアシスHLBプラスカートリッジに注入後、5%メタノール1 mLで洗浄し、メタノール4 mLで溶出した液をLC-MSにより分析する方法を報告している<sup>5)</sup>。フクジュソウ地上部は色素等の夾雑物を多く含むこと、調理品については調理法によりさらに多くの夾雑物を含むことから、メタノール抽出液をオアシスHLBプラスによりクリーンアップする方法について検討した。

その結果、メタノール抽出液20 mLに水30 mLを加えカラムに注入した場合、シマリンはカラムに保持された。メタノール/水(2:3)10 mLでカラムを洗浄後、メタノール/水(4:1)10 mLを注入した場合、色素はほとんど溶出せず、シマリンの大部分が溶出することが明らかとなった。

また、調理法の違いにより抽出液のpHが大きく異なることが考えられたため、標準溶液20 mLに緩衝液30 mLを加え、オアシスHLBプラス処理におけるpHの影響について調べた。その結果、pH2.0~7.0において回収率は86~90%と良好な結果が得られた。そこで、シマリンをメタノールにより抽出した後、抽出液20 mLに水30 mLを加え、オアシスHLBプラス処理を行うことにした。

さらに、メタノールを用いたホモジナイズ抽出の回数について検討した。2回目に抽出されたシマリン量は1回目の量の1%程度であったことから、抽出は1回のみとした。試験溶液の調製法を図2に示す。

シマリンのLC-MS分析における移動相についてはいくつか報告されている<sup>5-7)</sup>。今回感度を考慮し、A液に0.1%ギ酸、B液に0.1%ギ酸含有アセトニトリルを用いることにした。本条件下では、図3に示すように、 $m/z$ 593のギ酸イオン付加体[M+HCOO]<sup>-</sup>が最も豊富なイオン量を有することが確認され、これをモニターイオンとしてLC-MS分析を行った。

HPLC及びLC-MS分析におけるシマリンの検量線はそれぞれ0.05~5.0  $\mu$ g/mL及び0.01~1.0  $\mu$ g/mLの範囲で原点を通る直線( $y = 9.44 \times 10^2x$ ,  $r = 0.999$ 及び $y = 3.94 \times 10^4x$ ,  $r = 0.999$ )となり、検出限界はそれぞれ0.02  $\mu$ g/mL及び0.003  $\mu$ g/mLであった。なお、HPLCによる定量値が定量限界値未満の場合には、LC-MSにより定量した。

### 2. 添加回収試験

試料1にシマリン1,000  $\mu$ gを添加し、回収率を算出した。その結果、回収率は91%(CV 8.4)と良好な結果が得られた。

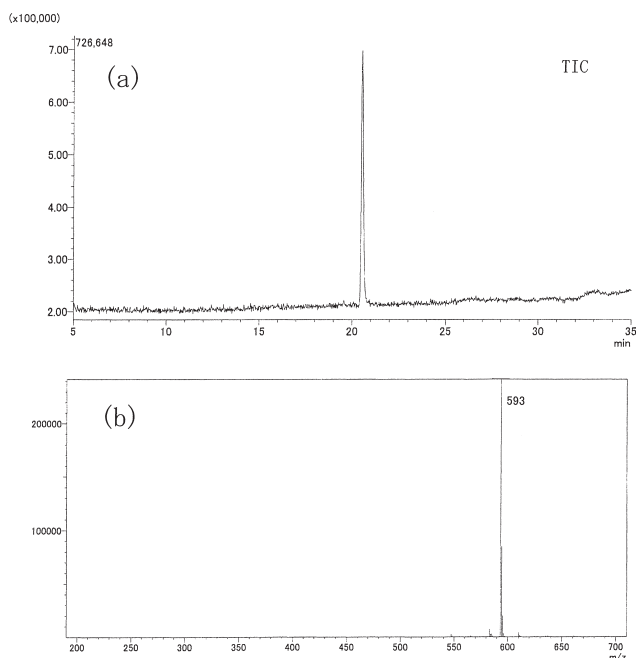


図3 LC-MSによるシマリンのトータルイオンクロマトグラム (a) とマススペクトル (b)

### 3. フクジュソウ調理品中のシマリン残留量

#### 1) 油炒め

フクジュソウを油炒めにした時の高速液体クロマトグラムを図4に示した。シマリンのピーク付近に妨害ピークは出現せず、定量可能であった。

シマリン残留量を表1に示した。未調理品から検出されたシマリンは18.34  $\mu\text{g}$ 、油炒めした試料からは6.73  $\mu\text{g}$ で、残存率は37%と100%を大きく下回った。この原因として、加熱によるシマリンの分解が考えられたため、シマリン標準溶液を窒素気流下で乾固後、ホットプレート上で1分間または5分間加熱した場合の回収率を算出した。その結果、1分間加熱した場合には82.9% (CV 4.0)、5分間加熱した場合には18.6% (CV 19.3)と加熱時間が長いほど残存量が低くなる傾向を示した。1分間加熱した場合の回収率は油炒めした時の残存率を上回ったが、三角フラスコ内部の温度が250℃に達するまで、時間を要したことが考えられた。なお、ホットプレート上で5分間加熱したシマリン標準品のTLC分析を行ったところ、シマリン以外のスポットが多数検出され(図5)、一部熱分解することが明らかになった。

さらに、シマリンはアルデヒド基を始めとする種々の官能基を有しており、加熱により細胞内に多数存在する他の化合物と反応する可能性がある。熱分解に加え、このことがシマリン含量の低下を招いたと推察される。

#### 2) おひたし

フクジュソウをおひたしにした時の高速液体クロマトグラムを図6に示した。シマリンのピーク付近に妨害ピークは出現せず、定量可能であった。

シマリンの残留量及び溶出量を未調理品中の含量と比較

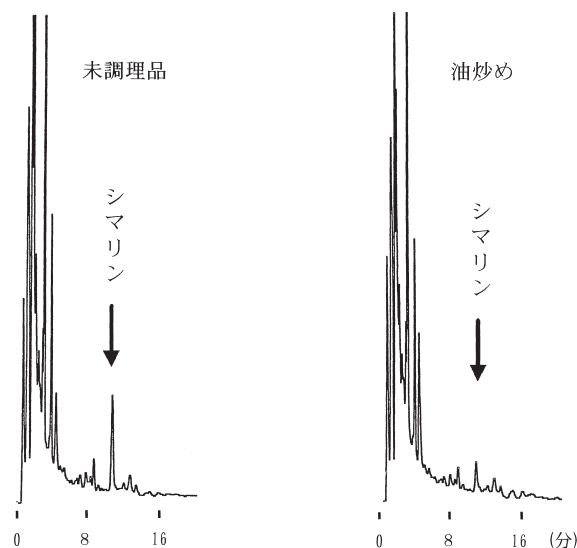


図4 フクジュソウを油炒めにした時の高速液体クロマトグラム

表1 フクジュソウを油炒めにした時のシマリン残留量

$n = 3$

シマリン ( $\mu\text{g}$ )		残存率 (%) <sup>*4</sup>
未調理試料 <sup>*1</sup>	油炒めした試料 <sup>*2</sup>	
18.34 $\pm$ 3.38	6.73 $\pm$ 1.54 <sup>*3</sup>	37

<sup>\*1</sup> 1.45  $\pm$  0.09 g, <sup>\*2</sup> 1.53  $\pm$  0.12 g (油炒め前)

<sup>\*3</sup> 未調理試料の採取量に換算した値

<sup>\*4</sup> 未調理試料中のシマリン含量に対する比率



図5 加熱処理したシマリン標準品のTLC分析

A: 標準品, B: 標準品+加熱 (250℃, 1 min) 標準品, C: 加熱標準品

破線はUV (254 nm) 吸収あり

表2 フクジュソウをおひたしにした時のシマリンの残留量及び溶出量

n = 3

未調理試料* <sup>1</sup>	シマリン (μg)			調理試料における割合 (%)		
	おひたし* <sup>2</sup>	茹で汁	冷水	おひたし	茹で汁	冷水
17.90 ± 6.19	1.39 ± 0.85* <sup>3</sup>	9.32 ± 2.47* <sup>3</sup>	0.19 ± 0.07* <sup>3</sup>	13	85	2

\*<sup>1</sup> 1.04 ± 0.11 g, \*<sup>2</sup> 0.95 ± 0.19 g (茹でる前), \*<sup>3</sup> 未調理試料の採取量に換算した値

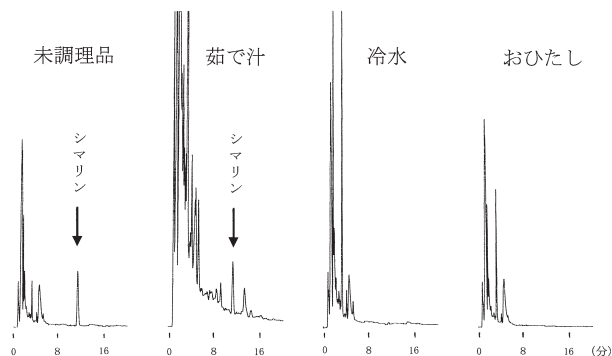


図6 フクジュソウをおひたしにした時の高速液体クロマトグラム

し、表2に示した。シマリンは未調理品から17.90 μg、おひたしにした試料から1.39 μg、茹で汁から9.32 μg、冷水から0.19 μg 検出された。調理試料（おひたし、茹で汁及び冷水）から検出されたシマリンの合計含量は10.90 μgであり、未調理品から検出された含量を下回った（61%）。これは油炒めの場合と同様に、加熱中における他の化合物との反応に起因すると推察される。

なお、シマリンは加水分解によりストロファンチジンとD-シマロースになることが知られている。そこで、水にシマリン標準溶液を加え、ホットプレート上で加熱し、2分間沸騰させた時のシマリンの安定性について調べた。その結果、回収率は95%（CV 1.6）とシマリンは沸騰水中で安定であった。

調理試料におけるシマリン含量の割合は、おひたし13%、茹で汁85%及び冷水2%であり、茹で汁が最も高い値を示した。シマリンは水にも溶解する（98.7 mg/L, 25℃）ことから<sup>8)</sup>、このことが茹で汁における割合の高さに反映されていると考えられた。

今回、調理品におけるシマリンの残存率は、油炒め37%、おひたし8%と、調理後においてシマリン含量の低下が認められた。残存率はおひたしよりも油炒めにした試料の方が高値を示したが、著者らが行ったイヌサフラン調理品中のコルヒチン分析においても、おひたし16%、油炒めにした試料78%と油炒めにした試料の方が高値を示

している<sup>9)</sup>。

フクジュソウの有毒成分であるシマリンはLD<sub>50</sub>が0.095 mg/kg（ネコ静注）と高い毒性を示し<sup>10)</sup>、根を煎じて飲み死亡したヒトの例もある<sup>3)</sup>。道内においてフクジュソウによる食中毒の報告はないが、花が終わった後の葉は山菜のシャクと似ていること、調理品からもシマリンが検出されたことから、誤食により重篤な中毒を起こす危険性がある。

有毒植物による食中毒を防止するため、北海道保健福祉部健康安全局、札幌市保健所及び当所では、毒草ハンドブックの配付、山菜展の開催、ホームページなどにより道民に対し、有毒植物に関する知識の普及を図っている。今後も今回のような基礎的データを基にした正しい知識の普及が必要と考える。

稿を終えるにあたり、有益な御助言をいただいた当所前食品薬品部長長南隆夫氏、前生物科学部主任研究員加藤芳伸博士に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 八尋洲東：朝日百科植物の世界 第8巻，朝日新聞社，東京，1997，pp.250-252
- 2) 伊藤道人：朝日百科世界の植物 第6巻，朝日新聞社，東京，1978，pp.1605-1607
- 3) 岡田 稔監修：新訂原色牧野和漢薬草大圖鑑，北隆館，東京，2002，p.82
- 4) 佐藤孝夫：北海道山菜図鑑，亜璃西社，札幌，1995，pp.110-111
- 5) 中山睦男，山本晃央，篠原亜耶子，藤田義彦，神原敬三，宮高秀樹：法中毒，20(1)，34-41（2002）
- 6) Grosa G, Allegrone G, Grosso ED : J. Pharm. Biomed. Anal., 38, 79-86 (2005)
- 7) Irie K, Sato T, Tanaka I, Nakajima J, Kawaguchi M, Himi T : J. Nat. Med., 63, 111-116 (2009)
- 8) ChemIDplus Lite  
http://chem2.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/
- 9) 佐藤正幸，姉帯正樹：道衛研所報，60，45-48（2010）
- 10) Chen KK, Bliss CI, Robbins EB : J. Pharmacol. Exp. Ther., 74, 223-234 (1942)