

学位論文

「ペンタフルオロフェニルカラムを用いたヒト血清中  
リコリンおよびガラントミンの高速液体クロマトグラフ  
タンデム質量分析法の開発」

指導教授名 佐藤 文子

申請者氏名 佐々木 千寿子

## 著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。



## 要 旨

### 【目的】

リコリンおよびガラントミンは、ヒガンバナ科植物に含まれるアルカロイドであり、摂取すると悪心、嘔吐、下痢、発熱、昏睡などの中毒症状をひき起こす化合物である。ヒガンバナ科植物の一つであるスイセンは、葉の形状がニラなどの野菜と類似しているため、誤食による中毒事例が発生している。摂取の証明には患者試料からリコリンおよびガラントミンを検出することが必須であるが、その分析法は確立されておらず、ヒト試料を材料とした定性定量分析法の開発が必要である。

自然毒誤食の軽症例では、毒物の血中濃度は低いことが予測されるため、高感度分析法が求められる。本研究では軽症例から致死例まで対応可能な血清中リコリンおよびガラントミンの高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計 (LC/MS/MS) を用いた定性定量法の開発を目的とした。薬毒物分析で用いる分析カラムは、疎水性相互作用により化合物を分離するオクタデシルシリル (ODS) カラムを用いることが一般的であるが、アルカロイドなどの極性化合物では保持が弱くピークテーリングを生じやすい。リコリンとガラントミンを ODS カラムで測定したところピーク割れが生じ定量不能であった。そこで極性芳香族化合物を保持する特徴をもつペンタフルオロフェニル (PFP) カラムを用いた分析法を検証した。

### 【方法】

#### [前処理]

5 mL 容バイアルに血清 0.2 mL、超純水 0.4 mL、内部標準物質 (IS) として 200 ng/mL ガラントミン- $d_6$  10  $\mu$ L および 4 mm ステンレスビーズ 1 個を容れ混和後、アセトニトリル 0.6 mL を加えボルテックスミキサーで混和した。QuEChERS AOAC パウダー (6.0 g 硫酸マグネシウム および 1.5 g 酢酸ナトリウム含有) 0.2 g を加え攪拌後、3,000 rpm で 10 分間遠心分離した。上清を試験管に採り、窒素気流下 60°C で溶媒を乾固した。残渣にメタノール 100  $\mu$ L を添加し再溶解し、15,000 rpm で 10 分間遠心分離した上清 1  $\mu$ L を LC/MS/MS に注入した。

#### [LC/MS/MS 条件]

装置は 1290 - 6460 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies) を使用した。カラムは CAPCELL CORE PFP (2.1 mm I.D.  $\times$  100 mm, 粒子径 2.7 $\mu$ m, 大阪ソーダ社) を用いた。カラム温度は 40°C に設定した。移動相は、A 液に 10 mM ギ酸アンモニウム 0.1% ギ酸水溶液、B 液にアセトニトリルを用いた。グラジエントプログラムは 10%B - (6 min) - 40%B - (4 min) - 100%B とし、その後すぐに 10%B に戻して次の測定まで 6 分間平衡化を行った。流速は 0.2 mL/min とした。

## 【結果】

リコリン、ガラントミンおよび IS のアセトニトリル溶液を測定したところ、保持時間はそれぞれ 3.1 分、3.9 分、3.9 分に検出され、いずれも良好なピーク形状が得られた。リコリンおよびガラントミン標準物質をブランク血清に添加し、前処理を行ったサンプルを MRM モードで測定したところ、いずれも夾雑ピークは見られなかった。

リコリン、ガラントミンともに検出下限値は 0.01 ng/mL、定量下限値は 0.05 ng/mL であった。検量線の決定係数はいずれも 0.999 以上であった。マトリックス効果はリコリンで 94.3～98.4%、ガラントミンで 87.8～91.1%、回収率はリコリンで 101.9～112.7%、ガラントミンで 95.6～107.1% であった。精度の日内日差変動はリコリンで 0.5～2.2%、ガラントミンで 0.4～2.0% であった。

## 【考察】

前処理法は、野菜等に含まれる残留農薬の抽出を目的に開発された QuEChERS AOAC 法を応用した。QuEChERS AOAC 法は、硫酸マグネシウムによる脱水と酢酸ナトリウムによる塩析作用を利用した液-液抽出である第一段階と、分散固相抽出を用いた第二段階から成る。本法は第一段階のみを用いた簡便かつ短時間で抽出可能な前処理法である。マトリックス効果の結果より、イオンサプレッションやイオンエンハンスメントは観察されず、本法の血清前処理法は夾雑物を良好に除去していることが示唆された。回収率は良好であり簡便な操作で血清から効率よく抽出されたことが確認された。前処理において抽出液を濃縮することで検出感度を上昇させ、検出下限値で 0.01 ng/mL、定量下限値で 0.05 ng/mL の低濃度の測定を実現し、スイセン中毒の軽症例にも対応可能となった。検量線の決定係数は 0.999 以上であり良好な直線性が得られた。日内日差変動は基準内であり安定した結果が得られ、定性定量検査として適合していることが確認された。

PFP カラムを用いたことにより、ODS カラムでは分離困難であったリコリンとガラントミンが良好に分離された。PFP カラムは疎水性相互作用に加え、 $\pi$ - $\pi$  相互作用、双極子-双極子相互作用を有しており高極性塩基性化合物の保持に優れた分離挙動を発揮する。本研究で塩基性化合物であるリコリンとガラントミンの分析に適していることが確認されたことから、今まで ODS カラムで分離困難であった他のアルカロイドにも有用であることが期待され、今後アルカロイドの一斉分析法へ発展させる次第である。

## 【結論】

極性化合物の保持に優れた PFP カラムを用いることにより、リコリンとガラントミンを良好に分離することに成功した。本研究によりヒト血清中リコリンおよびガラントミンの定性定量分析が可能となり、スイセン中毒の軽症から致死例に対応可能な分析法が確立された。

## 目次

	頁
1. 序論	1
2. 方法	
2-1. 試薬	1
2-2. 標準溶液およびバリデーション用サンプルの調製	2
2-3. LC/MS/MS 条件	
2-3-1. タンデム質量分析計の条件	2
2-3-2. LC 条件	2
2-4. 前処理法	3
2-5. メソッドのバリデーション	4
2-5-1. マトリックス効果および回収率	4
2-5-2. 検量線、検出下限値および定量下限値	4
2-5-3. 精度と真度	4
2-5-4. キャリーオーバー	4
2-6. 症例への適用	5
3. 結果	
3-1. LC/MS/MS 条件	
3-1-1. タンデム質量分析計の条件	5
3-1-2. LC 条件	5
3-2. バリデーション	6
3-3. 症例への適用	6
4. 考察	
4-1. LC 条件の検討	6
4-2. 前処理法とバリデーション	7
4-3. 症例への適用	8
4-4. 本研究の応用と今後の課題	8
5. 総括	9
6. 謝辞	9

7. 倫理基準の遵守	10
8. 引用文献	10
9. 業績目録	11
10. 図表	13



## 1. 序論

リコリンおよびガラントミンは、ヒガンバナ科植物に含まれるアルカロイドであり、摂取すると悪心、嘔吐、下痢、発熱、昏睡などの中毒症状をひき起こす化合物である [1-4]。ヒガンバナ科植物の一つであるスイセンは、根の形状が玉ねぎやニンニク、葉がニラやノビルなどの野菜と酷似しているため、誤食による中毒事例が発生しており [3-8]、厚生労働省によると、2008年から2015年に日本で発生した中毒件数は30件、患者総数は95人である[4]。海外でも中毒事例が発生しており、イギリスではスーパーマーケットで野菜の横に陳列されていたスイセンを購入した客が食用と間違えて摂取し中毒を起こした事例が報告されている [7]。

摂取の証明には血液などの患者試料からリコリンおよびガラントミンを検出することが必須であるが、その分析法は確立されておらず、ヒト試料を材料とした定性定量分析法の開発が必要となる。今回、スイセンと思慮される植物の葉をニラと間違えて摂取後に、腹痛、嘔吐等を発症し病院搬送された軽症患者の中毒原因物質を確定するにあたり、液体クロマトグラフタンデム質量分析計 (LC/MS/MS) を用いたヒト血清中リコリンおよびガラントミン分析法の開発を行うこととした。

一般的に自然毒誤食の軽症例では、毒物の血中濃度は低いことが予測されるため、高感度分析法が必要となる。本研究では軽症例から致死例まで対応可能な定性定量法の開発を目指した。救急患者にも対応可能である迅速な分析法を作成するため、液体クロマトグラフ (LC) の分離モードは、平衡化時間が比較的短く安定的である逆相クロマトグラフィーを用いた方法で検討した。薬毒物分析で用いる逆相モードの分析カラムは、疎水性相互作用により化合物を分離するオクタデシルシリル (ODS) カラムを用いることが一般的であるが、アルカロイドなどの極性化合物では保持が弱くピークテーリングを生じやすい。そこで ODS カラムのほか、保持メカニズムが異なるビフェニルカラムおよびペンタフルオロフェニル (PFP) カラムについて検証した。また、開発した分析法を用いて、23 種類のアルカロイドの一斉分析に応用した。

## 2. 方法

### 2-1. 試薬

リコリン塩酸塩一水和物 (純度 >98.0%) およびガラントミン臭化水素酸塩 (純度 >98.0%) は東京化成工業株式会社 (東京、日本) から購入した。内部標準物質 (internal standard, IS) として Galantamine-*O*-(methyl- $d_3$ )-*N*-(methyl- $d_3$ ) (ガラントミン- $d_6$ ) を Toronto Research Chemicals Inc. (Toronto, Canada) から購入した。リコリン、ガラントミンおよびガラントミン- $d_6$  の構造式を図 1 に示した。

アセトニトリル (LC/MS 用、純度 99.9+%)、メタノール (LC/MS 用、純度 99.7+%)、ギ酸 (特級)、ギ酸アンモニウム (和光特級、純度 95.0+%) および酢酸アンモニウム (試薬特級) は富士フイルム和光純薬株式会社 (大阪、日本) から購入した。QuEChERS AOAC

パウダー（硫酸マグネシウム 6.0 g、酢酸ナトリウム 1.5 g 含有）は Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) から購入した。

超純水は Direct-Q UV3 (Merck, Darmstadt, Germany) で作成した。ブランク血清として、凍結プール血清である L-コンセーラ® I EX「ニッスイ」を日水製薬株式会社（東京、日本）から購入した。ブランク血清は対象化合物が検出されないことを確認した後、実験に使用した。

## 2-2. 標準溶液およびバリデーション用サンプルの調製

リコリン塩酸塩一水和物とガラントミン臭化水素酸塩は、それぞれフリー体として 0.5 mg/mL となるようメタノールで溶解して標準溶液とし、使用まで -20℃ で保管した。ガラントミン-*d*<sub>6</sub> をメタノールで 1.0 mg/mL に溶解後、アセトニトリルで 200 ng/mL に希釈したものを IS 溶液とし、使用まで -20℃ で保管した。

LC/MS/MS 条件検討には、リコリンおよびガラントミンの標準溶液をアセトニトリルで希釈した溶液を用いた。

検量線用サンプルの調製は、各標準溶液をアセトニトリルで 1、2、10、20、50、100、200、500、1000、1500 および 2000 ng/mL に希釈し、この 10 µL をブランク血清 0.2 mL に添加した。マトリックス効果、回収率、精度および真度検証用のクオリティコントロール (QC) サンプルの調製は、各標準溶液をアセトニトリルで 10、100、1000 および 2000 ng/mL に希釈し、この 10 µL をブランク血清 0.2 mL に添加した。

## 2-3. LC/MS/MS 条件

### 2-3-1. タンデム質量分析計の条件

装置はトリプル四重極型質量分析計である Agilent 6460 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies) を用いた。イオン源は Agilent Jet Stream electrospray ionization (ESI) source を使用し、キャピラリー電圧：4000 V、ネブライザーガス (N<sub>2</sub>)：50 psi、ドライガス (N<sub>2</sub>)：10 L/min, 300℃、シースガス (N<sub>2</sub>)：12 L/min, 350℃ に設定した。

測定は multiple reaction monitoring (MRM) モードおよび product ion scan モードで行った。ソフトウェアは MassHunter Workstation Software (Agilent Technologies) を用い、パラメータの決定は Optimizer for 6400 series Triple Quadrupole (version B.07.00)、データ採取は LC/MS Data Acquisition for 6400 series Triple Quadrupole (version B.07.00)、解析は Qualitative Analysis (Version B.06.00) で行った。

### 2-3-2. LC 条件

装置は Agilent 1290 (Agilent Technologies) を用いた。オートサンプラー温度：4℃、カラムオープン温度：40℃、平衡化時間：6 分に設定した。分析カラムと移動相は以下の

各条件下で検討した。

LC 条件①: 分析カラム; ODS (ZORBAX Eclipse Plus C18, 2.1 mm I.D. × 100 mm, 1.8 μm, Agilent Technologies)、移動相 A; 10 mM ギ酸アンモニウム 0.1% ギ酸水溶液、移動相 B; アセトニトリル、グラジエーション条件; 10%B - (20 min) - 100%B

LC 条件②: 分析カラム; ODS (ZORBAX Eclipse Plus C18, 2.1 mm I.D. × 100 mm, 1.8 μm, Agilent Technologies)、移動相 A; 10 mM 酢酸アンモニウム、移動相 B; メタノール、グラジエーション条件; 10%B - (20 min) - 100%B

LC 条件③: 分析カラム; Biphenyl (Raptor Biphenyl, 2.1 mm I.D. × 100 mm, 2.7 μm, Restek Corporation, Bellefonte, PA, USA)、移動相 A; 10 mM ギ酸アンモニウム 0.1% ギ酸水溶液、移動相 B; メタノール、グラジエーション条件; 10%B - (20 min) - 100%B

LC 条件④: 分析カラム; Biphenyl (Raptor Biphenyl, 2.1 mm I.D. × 100 mm, 2.7 μm, Restek Corporation)、移動相 A; 10 mM 酢酸アンモニウム、移動相 B; メタノール、グラジエーション条件; 10%B - (20 min) - 100%B

LC 条件⑤: 分析カラム; PFP (CAPCELL CORE PFP, 2.1 mm I.D. × 100 mm, 2.7 μm, 大阪ソーダ株式会社、大阪、日本)、移動相 A; 10 mM ギ酸アンモニウム 0.1% ギ酸水溶液、移動相 B; アセトニトリル、グラジエーション条件; 10%B - (20 min) - 100%B

LC 条件⑥: 分析カラム; PFP (CAPCELL CORE PFP, 2.1 mm I.D. × 100 mm, 2.7 μm, 大阪ソーダ株式会社)、移動相 A; 10 mM ギ酸アンモニウム 0.1% ギ酸水溶液、移動相 B; アセトニトリル、グラジエーション条件; 10%B - (6 min) - 40%B - (4 min) - 100%B

#### 2-4. 前処理法

前処理法は、Kudo らの方法 [9] を改変し行った。5 mL 容スクリーキャップバイアルに、血清 0.2 mL、超純水 0.4 mL、IS 溶液 (200 ng/mL) 10 μL およびステンレスビーズ (4 mm) 1 個を容れ混和後、アセトニトリル 0.6 mL を加えボルテックスミキサーで攪拌した。QuEChERS AOAC パウダー 0.2 g を加え混和後、3,000 rpm で 10 分間遠心分離した。上清を φ13 mm のガラスチューブに分取し窒素下 60℃ で溶媒を乾固した。残渣をメタノール 100 μL で再溶解し 1.5 mL チューブに容れ、15,000 rpm で 10 分間遠心分離した上清を 100 μL ガラスインサート装着のバイアルに採り、この 1 μL を LC/MS/MS に注入した。



## 2-5. メソッドのバリデーション

メソッドのバリデーションは Scientific Working Group for Forensic Toxicology のガイドライン [10] に準じた。マトリックス効果、回収率、検出下限値 (lower limit of detection, LOD)、定量下限値 (lower limit of quantification, LOQ)、検量線の直線性、精度、真度およびキャリーオーバーについて検証した。

### 2-5-1. マトリックス効果および回収率

マトリックス効果と回収率は、血清中濃度 0.5、5、50 および 100 ng/mL 相当の 4 濃度について検証した。標準品メタノール溶液 (A)、ブランク血清抽出液に標準品を添加した溶液 (B)、各濃度の QC サンプルの抽出液 (C) を各 6 本測定し、ピーク面積を用いて下記の計算式で算出した。

$$\text{マトリックス効果 (\%)} = (B/A) \times 100$$

$$\text{回収率 (\%)} = (C/B) \times 100$$

### 2-5-2. 検量線、検出下限値および定量下限値

検量線用サンプルは、リコリンおよびガランタミン標準品を血清中濃度が 0.05、0.1、0.5、1、2.5、5、10、25、50、75 および 100 ng/mL となるようブランク血清に添加したものをを用いた (n=6)。本法の前処理を行った検量線用サンプルの抽出液を MRM モードで測定した。検量線は各化合物と IS の面積比を縦軸に、濃度を横軸にプロットし、回帰直線と決定係数 ( $R^2$ ) を求めた。 $R^2$  は 0.999 以上を適合とした。検量線は低濃度領域の 0.05 - 5 ng/mL と高濃度領域の 5 - 100 ng/mL に分けて作成した。

LOD はシグナル・ノイズ比が 3 以上で安定して検出される濃度とした。LOQ はシグナル・ノイズ比が 20 以上かつ直線性があり精度と真度が  $\pm 20\%$  以下である濃度とした。

### 2-5-3. 精度と真度

日内変動は、血清中濃度 0.5、5、50 および 100 ng/mL の QC サンプル各 6 本ずつを同日内に前処理および測定し、精度と真度を求めた。精度は変動係数 (Coefficient of variation, CV)、真度はバイアスを算出した。日差変動は同様の操作をそれぞれ別の日に 6 日間行い精度と真度を求めた。最低濃度 (0.5 ng/mL) において日内・日差変動が  $\pm 20\%$  以内、その他の濃度において  $\pm 15\%$  以内を適合とした。

### 2-5-4. キャリーオーバー

検量線範囲の最も高い濃度である 100 ng/mL の QC サンプル抽出液を測定し、直後にブランク血清抽出液を測定した。これを 6 回繰り返し、ブランク血清においてリコリン、ガランタミン、IS および夾雑物のピークが検出されるか否かを確認した。



## 2-6. 症例への適用

検証した方法を用いて、スイセン中毒が疑われた患者 3 名の血清を分析した。

症例：患者は 60 歳代男性（患者 1）、60 歳代女性（患者 2）、30 歳代女性（患者 3）の 3 名の家族である。自宅の庭に自生していたスイセンと思慮される葉およそ 80 g をニラと間違えて加熱調理し食した。摂取から約 30 分後に悪心、嘔吐、腹痛を訴え救急搬送された。3 名とも意識はありバイタルは正常で、3 時間の経過観察後、回復したため帰宅となった。患者が持参した葉を図 2 に示した。中毒症状の原因を確認するため、来院時に採取した血清を測定した。

## 3. 結果

### 3-1. LC/MS/MS 条件

#### 3-1-1. タンデム質量分析計の条件

リコリン、ガランタミンおよびガランタミン- $d_6$ の最適化されたタンデム質量分析パラメータを表 1 に示した。Product ion scan モードのフラグメンター電圧は 116 V、コリジョンエネルギーはリコリン：33 eV、ガランタミン：21 eV、IS：25 eV に設定した。MRM のモニタリングイオンは、リコリン：288→147、ガランタミン：288→213、IS：294→216 に設定した。

#### 3-1-2. LC 条件

LC 条件①～⑤でリコリンおよびガランタミン標準品のアセトニトリル溶液を product ion scan モードで測定したクロマトグラムを図 3～7 に示した。ODS カラムを用いた条件①および②ではリコリン、ガランタミンともにピーク割れが生じた（図 3、4）。ビフェニルカラムを用いた条件③および④ではガランタミンはシャープなピークが得られたが、リコリンはピーク割れが生じた（図 5、6）。PFP カラムを用いた条件⑤ではリコリンとガランタミンがともに良好なピーク形状で検出され（図 7）、シンメトリー係数はリコリンで 1.19、ガランタミンは 1.17 であった。以上より分析カラムは PFP カラム、移動相条件は 10 mM ギ酸アンモニウム 0.1%ギ酸水溶液とアセトニトリルを使用することに決定した。

条件⑤のグラジエーション条件を変更して測定時間を短縮させた条件⑥で測定したリコリン、ガランタミンおよびガランタミン- $d_6$ 溶液のプロダクトイオンクロマトグラムを図 8、各ピークにおけるプロダクトイオンスペクトルを図 9 に示した。条件⑤と同様に良好な保持が得られたことから、LC 条件は⑥を用いることに決定した。

リコリンおよびガランタミン標準品をブランク血清に添加したサンプルを前処理し LC 条件⑥で MRM 測定したクロマトグラムを図 10 に示した。保持時間はリコリンで 3.1 分、ガランタミンで 3.9 分、ガランタミン- $d_6$ で 3.9 分であり、夾雑ピークは見られなかった。

### 3-2. バリデーション

マトリックス効果はリコリンで 94.3~98.4%、ガラントミンで 88.5~91.1%、回収率はリコリンで 101.9~112.7%、ガラントミンで 95.6~107.1%であった(表 2)。表 3 に LOD、LOQ、検量線および  $R^2$  を示した。リコリンとガラントミンともに LOD は 0.01 ng/mL、LOQ は 0.05 ng/mL であった。検量線の直線性はリコリンにおいて低濃度領域で  $R^2$  が 0.9995、高濃度領域で 0.9991、ガラントミンにおいてそれぞれ 0.9996、0.9995 であった(表 3)。日内および日差変動を表 4 に示した。

キャリーオーバーの検証において、100 ng/mL の血清添加サンプルを測定した直後に注入したブランク血清からリコリン、ガラントミン、IS ならびに夾雑物のピークは検出されなかった。

### 3-3. 症例への適用

患者 3 名の血清を前処理し測定した MRM クロマトグラムを図 11~13 に示した。3 名全員からリコリンおよびガラントミンと保持時間が一致するピークが検出された。定量値は患者 1 でリコリン 1.13 ng/mL、ガラントミン 0.19 ng/mL、患者 2 でそれぞれ 0.20 ng/mL、定量下限値以下、患者 3 でそれぞれ 0.25 ng/mL、0.07 ng/mL であった(表 5)。

## 4. 考察

### 4-1. LC 条件の検討

逆相クロマトグラフィーで最も一般的な分析カラムは、シリカゲル等の担体に C18 を固定した ODS カラムであり、法医学や救命救急医学分野の薬毒物分析で汎用されている。はじめに ODS カラムを LC に装着し、移動相 A に 10 mM ギ酸アンモニウム 0.1%ギ酸水溶液、移動相 B にアセトニトリルを用いた LC 条件①でリコリンおよびガラントミン標準溶液を測定したところ、いずれも保持が弱く単一のピークが得られなかった(図 3)。移動相 A を中性領域である 10 mM 酢酸アンモニウム、移動相 B をメタノールに変更した LC 条件②で測定したところ、保持時間は後ろへシフトされるもピーク形状は改善されなかった(図 4)。ODS カラムは疎水性相互作用を利用して化合物を分離するため、極性化合物であるリコリンとガラントミンでは十分な保持が得られなかったと考えられ、今回の分析には不適合であると判断した。

次に、ODS カラムで保持が不十分であった際にセカンドカラムとしてよく用いられるビフェニルカラムを装着し、LC 条件③で測定したところ、ガラントミンは保持時間 6.1 分に良好なピーク形状で検出されたが、リコリンはピーク割れが生じており、良好な保持が得られなかった(図 5)。移動相を LC 条件④に変更するもリコリンのピーク割れは解消されなかった(図 6)。ビフェニルカラムはシリカゲル等の担体にビフェニル基を固定したカラムであり、疎水性相互作用に加え  $\pi$ - $\pi$  相互作用をもつカラムである。ビフェニル固定相と

化合物との間で $\pi$ - $\pi$ 相互作用が働いたことにより ODS よりも保持が改善されたと推測されたが、リコリンのピーク割れが解消されず、定量分析を行うには不適合であった。

そこで、ビフェニルと異なる挙動を示すフェニル基系カラムである PFP カラムを装着し、LC 条件⑤で測定したところ、リコリン、ガラントミンともに対称性のあるシャープなピークが得られた（図 7）。対象化合物が 5 分以内に検出されたことから、測定時間の短縮ならびに溶媒消費量の節約のため、6 分以降を短縮させた測定時間 10 分の条件⑥に改良し、平衡化時間を含め 1 分析 16 分間で測定可能な LC 条件を作成することが出来た。PFP カラムは、シリカゲル等の担体にペンタフルオロフェニル基を固定したカラムであり、疎水性相互作用、 $\pi$ - $\pi$ 相互作用のみならず水素結合性、双極子相互作用、静電的相互作用が働くと言われている [11]。極性化合物およびハロゲン化合物の分離や立体選択性に優れ、他のカラムと異なる保持挙動をもつ特徴があることから、ODS やビフェニルカラムで測定困難であったリコリンに優れた保持を示したと考えられた。塩基性芳香族化合物であるリコリンとガラントミンが良好に分離されたことから、PFP カラムは他のアルカロイドにも応用できる可能性が示唆された。

#### 4-2. 前処理法とバリデーション

標準品を添加した血清サンプルにおいて、MRM 測定で夾雑ピークは見られず（図 10）、リコリンとガラントミンのマトリックス効果は 87.8~98.4%（表 2）でイオンサプレッションやイオンエンハンスメントの影響がほぼ見られなかったことから、前処理において夾雑物が良好に除去されたことが示唆された。回収率は 95.6~112.7%（表 2）であり、目的化合物が効率良く抽出されたことが確認された。検量線はリコリン、ガラントミンともに  $R^2$  は 0.999 以上であり（表 3）、良好な直線性が得られ、軽症例から重症例まで対応可能な検量線をひくことが出来た。

リコリンおよびガラントミンの精度は、日内変動でそれぞれ 0.9~1.8% CV、0.7~2.0% CV、日差変動で 0.5~2.2% CV、0.4~1.7% CV でばらつきが少なく安定した結果が得られた（表 4）。リコリンおよびガラントミンの真度は日内変動でそれぞれ -3.9~0.7% bias、-9.7~-2.8% bias、日差変動で -5.6~0.1% bias、-11.3~-3.3% bias でいずれも許容範囲内であったことから、リコリンとガラントミンの定量の再現性が確認された（表 4）。

目的化合物の装置への吸着や夾雑物の残存によるキャリーオーバーは見られず、本条件で連続測定が可能であることが確認された。LC 移動相のグラジエーション条件において、目的物溶出後の 6 分以降に、有機溶媒である移動相 B の割合を 100% まで上昇させたことにより、血清由来のリン脂質等の脂溶性の夾雑物が分析カラムから有効に除去されたと考えられた。

誤食による自然毒中毒症例では、毒物の血液中濃度が低いことが予測されるため、低濃度でも検出できる分析法を作成する必要がある。当初、前処理法はアセトニトリル除タンパク法を試みたが、血清中濃度 0.5 ng/mL の検体で安定した検出が不可能であった。そ



ここでサンプルの濃縮が可能な QuEChERS 法を応用した。QuEChERS 法は、野菜等に含まれる残留農薬試験法として開発された抽出方法であり、第一段階で液-液抽出を行った後、第二段階で分散固相抽出を行うことで、従来よりも少ない検体量で複雑なマトリックスから効率よく農薬を検出することを可能にした前処理法である [12]。Lehotay は第一段階の液-液抽出で塩析と脱水を同時に行うよう改良し [13]、QuEChERS 法は食品のみならず動物やヒトの生体試料の抽出にも使用されるようになった [14-16]。さらに Kudo らは、Lehotay の方法の第一段階のみを用いたヒト生体試料の抽出法を報告した [9]。アセトニトリルで除タンパクを行った後に、QuEChERS AOAC パウダーを加えることで酢酸ナトリウムによる塩析効果で目的物が効率よく抽出され、硫酸マグネシウムによる脱水効果で溶媒の乾固・濃縮が可能となり、サンプルの最終濃度を高めることが出来る。今回、Kudo らの方法 [9] の溶媒量等を改変した前処理法を作成し、リコリンとガラントミンについて血清中濃度で 0.01 ng/mL での定性ならびに 0.05 ng/mL での定量が可能となった。本法は簡便な方法で酸性から塩基性まで幅広く抽出可能なことから、自然毒の一斉分析にも応用可能と考えられた。

#### 4-3. 症例への適用

スイセンとみられる葉を誤食し救急搬送された患者 3 名の血清について本法を用いて測定したところ、3 名ともリコリンおよびガラントミンが検出され (図 11~13)、患者が摂取した植物はヒガンバナ科植物であったことが確認された。MRM クロマトグラムにおいて目的物および IS ピークを妨害する夾雑物は見られず、本法は実サンプルでの定性検査に適用可能であることが確認された。

過去に報告されたスイセン摂取後に菌血症が悪化し死亡した事例において、親水性相互作用クロマトグラフィーで測定されたりコリンおよびガラントミンの血液中濃度はそれぞれ 24.7 ng/mL および 94 ng/mL で [8] 本症例より高濃度であった。本症例では摂取後約 30 分で嘔吐が生じていることから、血液中に大量に吸収される前に毒成分が体外に排出されたと推測された。3 名とも意識障害はなく数時間後に回復しており軽症であったことから、本症例の定量結果と症状に矛盾はないと考えられ、本法は実サンプルで定量可能であることが示唆された。

#### 4-4. 本研究の応用と今後の課題

幅広い化合物を抽出可能な QuEChERS 法と、極性化合物を保持する PFP カラムを用いたことでリコリンとガラントミンが測定可能となったことから、本法は今まで ODS カラムで測定困難であった他のアルカロイドにも適応できる可能性が示唆された。そこで誤食が起こりうるアルカロイド 23 化合物の一斉分析法の作成を試みた。対象化合物とタンデム質量分析パラメータを表 6 に示した。ブシジアルカロイドであるアコニチン、ヒパコニチン、

ジェサコニチン、メサコニチンはメタノール溶液で保存すると分解されることが報告されている [17] ため、前処理法の再溶解液をメタノールからアセトニトリルに変更した。移動相の有機溶媒はアセトニトリルよりもメタノールを用いた方がピーク面積が向上したため、メタノールに変更した。これはメタノールにすることで PFP カラムの $\pi$ - $\pi$ 結合が溶媒で消費されることなく効果が発揮されたためと考えられた。移動相 A に 10 mM ギ酸アンモニウム 0.1% ギ酸水溶液、移動相 B に 10 mM ギ酸アンモニウム 0.1% ギ酸メタノール溶液を用い、グラジエーション条件を 10%B - (10 min) - 100%B (5 min) に変更し血清添加したアルカロイド 23 化合物の一斉分析を行ったところ、全ての化合物において良好な保持が得られ(図 14)、アルカロイド 23 化合物のスクリーニング法を作成することが出来た。このスクリーニング法は American Journal of Analytical Chemistry 13 号 (2022 年) に掲載された [18]。アルカロイドの構造は多岐にわたるため、これまで個々の分析法は多く報告されてきたが、一斉分析法の報告は少なかった。今回開発したりコリンおよびガラントミンの分析法をもとに、アルカロイドスクリーニング法へ発展させることが出来たことは、法医学および救命救急医学で自然毒中毒の見逃しを防ぐうえで重要であり意義は大きいと考える。

今後の課題は他のアルカロイドや強心配糖体等の自然毒成分を対象化合物としたスクリーニング法に発展させることであり、より多くの自然毒を網羅した分析法を開発していく次第である。

## 5. 総括

スイセンに含まれるアルカロイドであるリコリンとガラントミンについて、PFP カラムを用いることで逆相モードでの LC/MS/MS 分析に成功した。血清の前処理に QuEChERS 法の第一段階を用いて試料を濃縮したことで低濃度での定性定量検査が可能となった。本研究によりスイセン中毒の軽症例から重症例まで対応可能なヒト血清中リコリンおよびガラントミンの分析法が確立された。また、本法を用いてのアルカロイド 23 化合物のスクリーニング法を作成することが出来た。

## 6. 謝辞

本研究においてご指導いただきました北里大学医学部法医学教授 佐藤文子先生、横浜薬科大学病態生理学研究室教授・北里大学医学部法医学客員教授 篠塚達雄先生に心より深謝申し上げます。資料の測定にご協力賜りました北里大学医学部救命救急医学 吉村久仁子様、丸橋孝昭先生、浅利靖教授に厚く御礼申し上げます。本研究を行うにあたり北里大学医学部法医学の皆様にご協力いただきましたことを心より感謝申し上げます。

## 7. 倫理基準の遵守

本研究は北里大学医学部・病院倫理委員会 観察・疫学研究審査委員会の審査と理事長の承認を得ている（承認番号 B20-082）。

本論文に際して、開示すべき利益相反関連事項はない。

## 8. 引用文献

1. Kretzing S, Abraham G, Seiwert B, Ungemach FR, Krügel U, Regenthal R. Dose-dependent emetic effects of the Amaryllidaceous alkaloid lycorine in beagle dogs. *Toxicol* 2011;57:117-124.
2. Kretzing S, Abraham G, Seiwert B, Ungemach FR, Krügel U, Teichert J, et al. In vivo assessment of antiemetic drugs and mechanism of lycorine-induced nausea and emesis. *Archives of Toxicology* 2011;85:1565-1573.
3. 宮崎茂：スイセン. *中毒研究* 2014;27:17-19.
4. 厚生労働省：自然毒のリスクプロファイル：高等植物：スイセン類.  
<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000075843.html>
5. 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. *食品衛生学雑誌* 2014;55:55-63.
6. Ageta K, Yakushiji H, Kosaki Y, Obara T, Nojima T, Gochi A, et al. A family intoxicated by daffodil bulbs mistaken for onions. *Acute Medicine & Surgery* 2020;7:e595.
7. Matulkova P, Gobin M, Evans M, Parkyn PC, Palmer C, Oliver I. Gastro-intestinal poisoning due to consumption of daffodils mistaken for vegetables at commercial markets, Bristol, United Kingdom. *Clinical Toxicology* 2012;50:788-790.
8. 新津ひさえ, 藤田友嗣, 熊谷礼子, 藤田さちこ, 中村祐貴, 筋浦立成, 他：スイセンの誤食後に死亡した一剖検例. *法医学の実際と研究* 2017;60:47-53.
9. Kudo K, Usumoto Y, Usui K, Hayashida M, Kurisaki E, Saka K, et al. Rapid and simultaneous extraction of acidic and basic drugs from human whole blood for reliable semi-quantitative NAGINATA drug screening by GC-MS. *Forensic Toxicology* 2014;32:97-104.
10. Scientific working group for forensic toxicology (SWGTOX) standard practices for method validation in forensic toxicology. *Journal of Analytical Toxicology* 2013;37:452-474.
11. 長江徳和, 塚本友康, 小山隆次：逆相カラム Biphenyl, PFP および PFP&C18 の分離特性. *ぶんせき* 2021;11:676-681.



12. Anastassiades M, Lehotay SJ. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International* 2003;86:412-431.
13. Lehotay SJ. Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. *Journal of AOAC International* 2007;90:485-520.
14. Usui K, Hayashizaki Y, Hashiyada M, Funayama M. Rapid drug extraction from human whole blood using a modified QuEChERS extraction method. *Legal Medicine* 2012;14:286-296.
15. Usui K, Hashiyada M, Hayashizaki Y, Igari Y, Hosoya T, Sakai J, et al. Application of modified QuEChERS method to liver samples for forensic toxicological analysis. *Forensic Toxicology* 2014;32:139-147.
16. Hasegawa K, Wurita A, Minakata K, Gonmori K, Yamagishi I, Nozawa H, et al. Identification and quantitation of 5-fluoro-ADB, one of the most dangerous synthetic cannabinoids, in the stomach contents and solid tissues of a human cadaver and in some herbal products. *Forensic Toxicology*, 2015;33:112-121.
17. Ohta H, Seto Y, Tsunoda N. Determination of Aconitum alkaloids in blood and urine samples. I. High-performance liquid chromatographic separation, solid-phase extraction and mass spectrometric confirmation. *Journal of Chromatography B* 1997;691:351-356.
18. Sasaki C, Shinozuka T, Satoh F. Screening method for 23 alkaloids in human serum using LC/MS/MS with a pentafluorophenyl column in dynamic multiple reaction monitoring mode. *American Journal of Analytical Chemistry* 2022;13:399-414.

## 9. 業績目録

### (I) 原 著

1. Chizuko Sasaki, Tatsuo Shinozuka, Fumiko Satoh. Screening method for 23 alkaloids in human serum using LC/MS/MS with a pentafluorophenyl column in dynamic multiple reaction monitoring mode. *American Journal of Analytical Chemistry* 2022;13:399-414 (Accepted: November 1, 2022).
- ◎2. Chizuko Sasaki, Tatsuo Shinozuka, Kuniko Yoshimura, Takaaki Maruhashi, Yasushi Asari, Fumiko Satoh. LC-MS/MS analysis of lycorine and galantamine in human serum using pentafluorophenyl column. *American Journal of Analytical Chemistry* 2022;13:300-313.

- 3. Takeshi Saito, Chizuko Sasaki, Akira Namera, Katsuyoshi Kurihara, Sadaki Inokuchi. Experimental study on external contamination of hair by synthetic cannabinoids and effect of hair treatment. Forensic Toxicology 2015;33:155-158.
- 4. Chizuko Sasaki, Tatsuo Shinozuka, Chikako Murakami, Wataru Irie, Kazuho Maeda, Toshimasa Watanabe, Naomi Nakamaru, Masataka Furukawa, Shigeki Nakamura, Katsuyoshi Kurihara. Simultaneous determination of 5 psychotropic drugs of various types in an autopsy case of acute multiple drug poisoning. Forensic Science International 2013;227:90-94.

## (Ⅱ) 著 書

1. 成松鎮雄、吉田武美、佐々木千寿子他：薬毒物試験法と注解 2017（Ⅱ-8 向精神薬試験法 8・6 ベンゾジアゼピン系薬物 定性試験 6・4 高速液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析(LC/MS/MS)、定量試験 6・1、8・11 抗うつ薬 定性試験 11・5 高速液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析(LC/MS/MS))。1 版、東京化学同人、東京、2017.

## (Ⅲ) 総説・講座

な し

## (Ⅳ) 症例・臨床治験・その他

- 1. Chizuko Sasaki, Takeshi Saito, Tatsuo Shinozuka, Wataru Irie, Chikako Murakami, Kazuho Maeda, Naomi Nakamaru, Momoko Oishi, Shigeki Nakamura, Katsuyoshi Kurihara. A case of death caused by abuse of a synthetic cannabinoid *N*-1-naphthalenyl-1-pentyl-1*H*-indole-3-carboxamide. Forensic Toxicology 2015;33: 165-169.
- 2. Chizuko Sasaki, Tatsuo Shinozuka, Wataru Irie, Takuma Nakamae, Chikako Murakami, Naomi Nakamaru, Masataka Furukawa, Shigeki Nakamura, Katsuyoshi Kurihara. A fatality due to inhalation of 1,1-difluoroethane (HFC-152a) with a peculiar device. Forensic Toxicology 2009;27:45-48.
- 3. Takuma nakamae, Tatsuo Shinozuka, Chizuko Sasaki, Akira Ogamo, Chikako Murakami-Hashimoto, Wataru Irie, Masaru Terada, Shigeki Nakamura, Masataka Furukawa, katsuyoshi Kurihara. Case report: Etizolam and its major metabolites in two unnatural death cases. Forensic Science International 2008;182: e1-e6.



## 10. 図表

表 1. リコリン、ガランタミンおよびガランタミン- $d_6$  (内部標準、IS) のタンデム質量分析パラメータ

Compound	Molecular weight	Precursor ion [M + H] <sup>+</sup>	Product ion (m/z)	Fragmentor voltage (V)	Collision energy (eV)	Polarity
Lycorine	287.12	288	147	116	33	Positive
Galantamine	287.15	288	213	116	21	Positive
Galantamine- $d_6$ (IS)	293.19	294	216	116	25	Positive

表 2. ヒト血清におけるリコリンとガラントアミンのマトリックス効果および回収率

Compound	QC concentration (ng/mL)	Matrix effect (%)	Extraction recovery (%)
Lycorine	0.5	98.4	101.9
	5	94.7	105.0
	50	95.6	109.8
	100	94.3	112.7
Galantamine	0.5	91.1	95.6
	5	88.9	101.0
	50	88.5	105.3
	100	87.8	107.1

QC: Quality control

表 3. ヒト血清におけるリコリンとガラントミンの検出下限値 (LOD)、定量下限値 (LOQ)、  
検量線および直線性

Compound	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Concentration Range (ng/mL)	Calibration curve equations	Linearity ( $R^2$ )
Lycorine	0.01	0.05	0.05 - 5	$y = 0.1071x + 0.0012$	0.9995
			5 - 100	$y = 0.12x - 0.0924$	0.9991
Galantamine	0.01	0.05	0.05 - 5	$y = 0.0947x + 0.001$	0.9996
			5 - 100	$y = 0.1034x - 0.0811$	0.9995

表 4. ヒト血清におけるリコリンとガラントミンの精度および真度

Compound	QC concentration (ng/mL)	Intra-day		Inter-day	
		Precision (% CV)	Accuracy (% bias)	Precision (% CV)	Accuracy (% bias)
Lycorine	0.5	1.4	-3.9	1.5	-5.6
	5	1.3	0.03	2.2	0.1
	50	1.8	0.7	1.3	-0.2
	100	0.9	-0.4	0.5	-0.6
Galantamine	0.5	2.0	-9.7	1.7	-11.3
	5	0.8	-4.3	0.9	-3.9
	50	1.3	-2.8	1.2	-3.3
	100	0.7	-3.0	0.4	-3.3

QC: Quality control

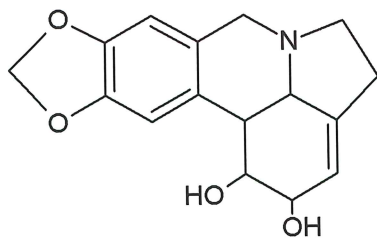
CV: Coefficient of variation

表 5. 患者 3 名の血清中リコリンおよびガラントミン定量結果

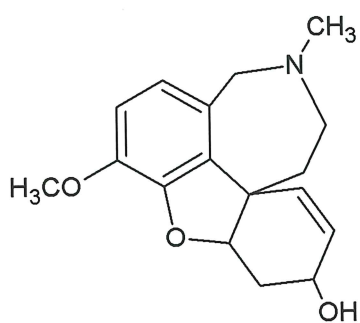
Patient No.	Age	Sex	Concentrations in serum (ng/mL)	
			Lycorine	Galantamine
1	60's	M	1.13	0.19
2	60's	F	0.20	< 0.05
3	30's	F	0.25	0.07

表 6. アルカロイド一斉分析の対象化合物および内部標準物質のタンデム質量分析パラメータ

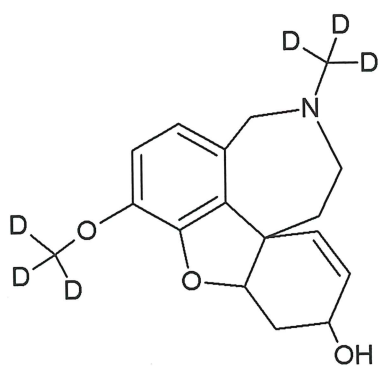
Compound	Molecular formula	Monoisotopic mass	Precursor ion [M + H] <sup>+</sup>	Product ion (m/z)	Fragmentor voltage (V)	Collision energy (eV)	Polarity
(-)-Cotinine	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	176.09	177	80	116	25	Positive
(-)-Nicotine	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub>	162.12	163	130	100	21	Positive
(+)-Bicuculline	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>6</sub>	367.11	368	307	116	21	Positive
14-Anisoylaconine	C <sub>33</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>11</sub>	633.31	634	135	180	50	Positive
Aconitine	C <sub>34</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>11</sub>	645.31	646	586	180	37	Positive
Atropine	C <sub>17</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub>	289.17	290	124	148	25	Positive
Benzoylhypaconine	C <sub>31</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>9</sub>	573.29	574	105	180	50	Positive
Benzoylmesaconine	C <sub>31</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>10</sub>	589.29	590	105	180	50	Positive
Cocaine	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	303.15	304	182	100	17	Positive
Colchicine	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub>	399.17	400	358	164	21	Positive
Ephedrine	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> NO	165.12	166	148	100	9	Positive
Galantamine	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub>	287.15	288	213	116	21	Positive
Galantamine- <i>d</i> <sub>6</sub> (IS)	C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> D <sub>6</sub> NO <sub>3</sub>	293.19	294	216	116	25	Positive
Hypaconitine	C <sub>33</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>10</sub>	615.3	616	556	180	33	Positive
Jesaconitine	C <sub>35</sub> H <sub>49</sub> NO <sub>12</sub>	675.33	676	135	180	50	Positive
Lycorine	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>4</sub>	287.12	288	147	116	33	Positive
Mesaconitine	C <sub>33</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>11</sub>	631.3	632	572	180	37	Positive
Morphine	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub>	285.14	286	165	148	45	Positive
Papaverine	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	339.15	340	202	148	25	Positive
Pilocarpine	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	208.12	209	95	132	41	Positive
Protopine	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>5</sub>	353.13	354	189	116	33	Positive
Reserpine	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	608.27	609	195	180	41	Positive
Scopolamine	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	303.15	304	138	100	21	Positive
Strychnine	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	334.17	335	184	164	41	Positive



Lycorine



Galantamine



Galantamine- $d_6$

図 1. リコリン、ガラントミンおよびガラントミン- $d_6$ の構造式



図 2. 患者が持参した誤食した葉



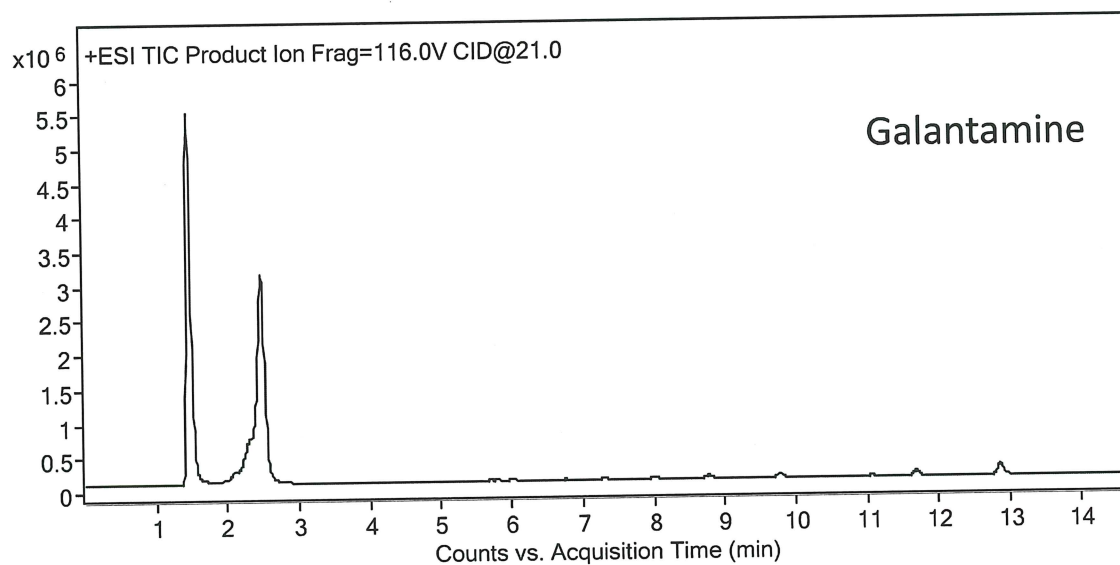
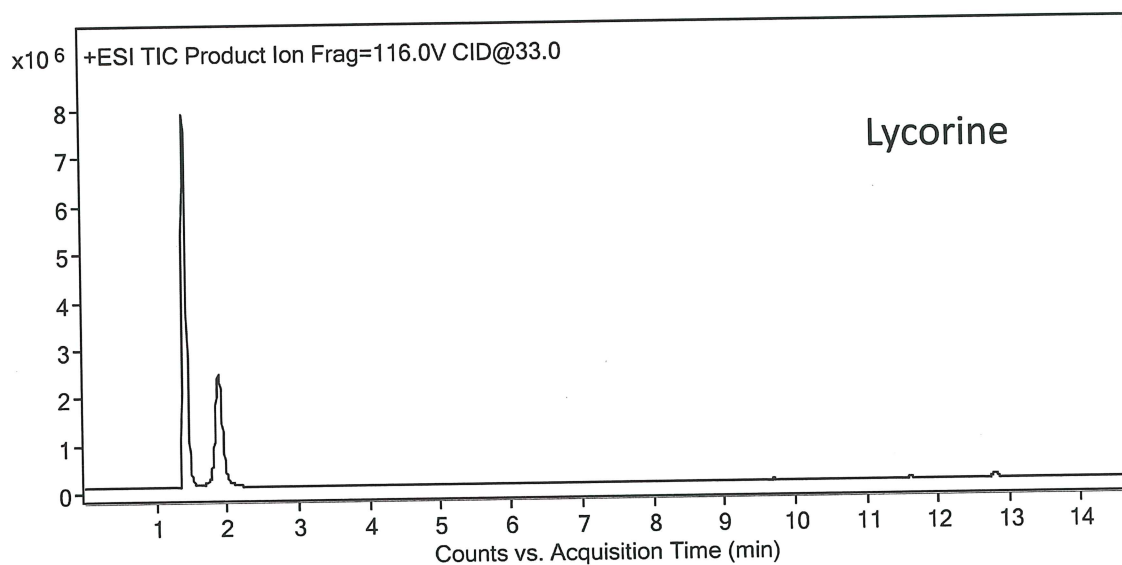


図 3. LC 条件①で測定したリコリンおよびガランタミン溶液のプロダクトイオンクロマトグラム

分析カラム ; ODS (ZORBAX Eclipse Plus C18, 2.1 mm I.D.  $\times$  100 mm, 1.8  $\mu$ m, Agilent Technologies)、移動相 A ; 10 mM ギ酸アンモニウム 0.1% ギ酸水溶液、移動相 B ; アセトニトリル、グラジエーション条件 ; 10%B - (20 min) - 100%B

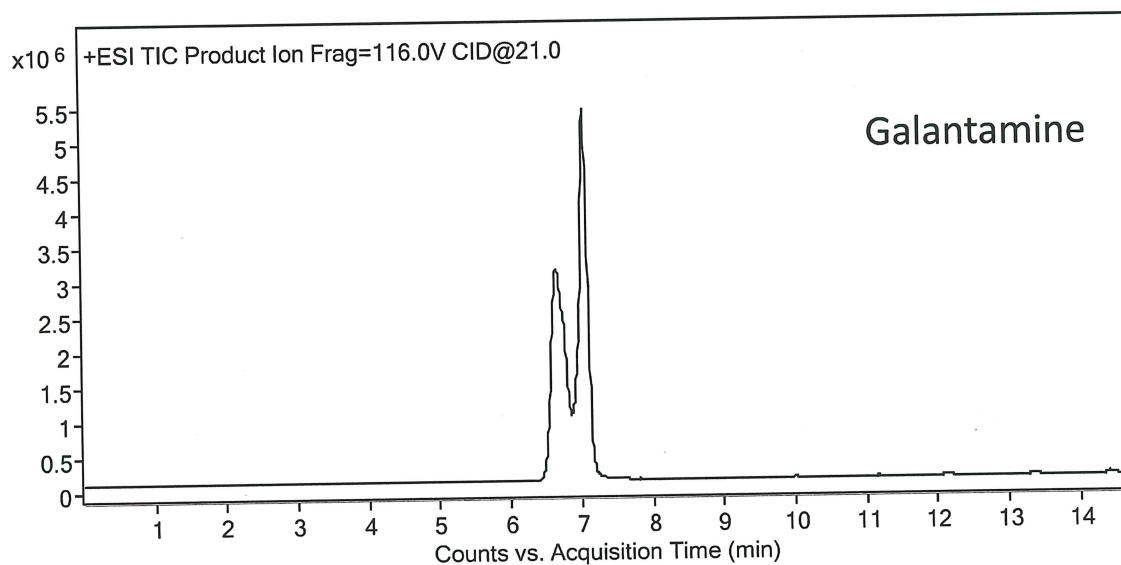
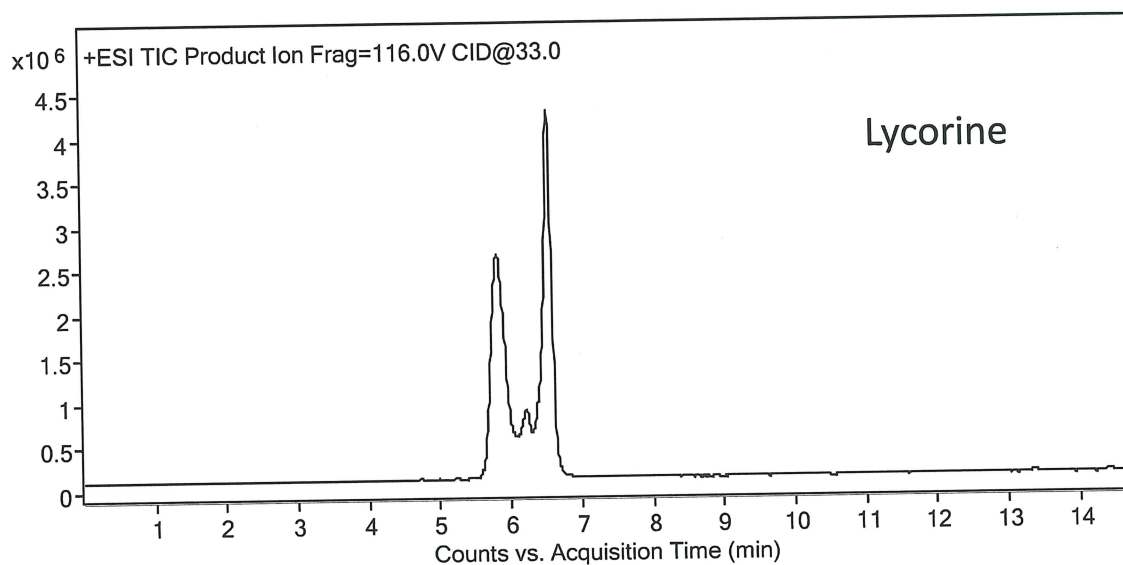


図 4. LC 条件②で測定したリコリンおよびガラントミン溶液のプロダクトイオンクロマトグラム

分析カラム ; ODS (ZORBAX Eclipse Plus C18, 2.1 mm I.D.  $\times$  100 mm, 1.8  $\mu$ m, Agilent Technologies)、移動相 A ; 10 mM 酢酸アンモニウム、移動相 B ; メタノール、グラジエーション条件 ; 10%B - (20 min) - 100%B

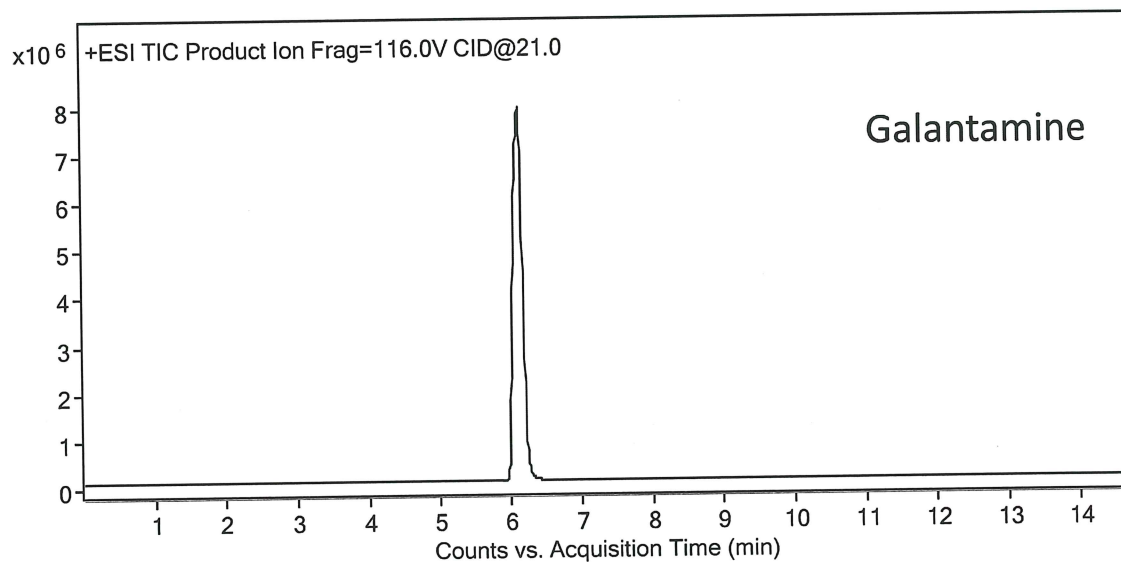
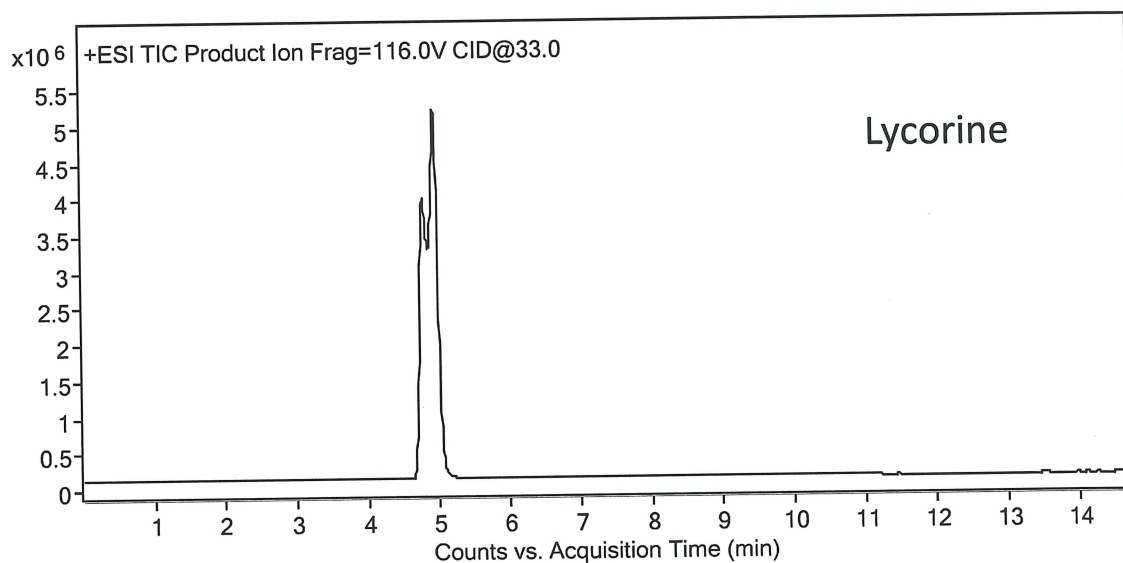


図 5. LC 条件③で測定したリコリンおよびガラントミン溶液のプロダクトイオンクロマトグラム

分析カラム ; Biphenyl (Raptor Biphenyl, 2.1 mm I.D.  $\times$  100 mm, 2.7  $\mu$ m、Restek Corporation, Bellefonte, PA, USA)、移動相 A ; 10 mM ギ酸アンモニウム 0.1% ギ酸水溶液、移動相 B ; メタノール、グラジエーション条件 ; 10%B  $\cdot$  (20 min)  $\cdot$  100%B

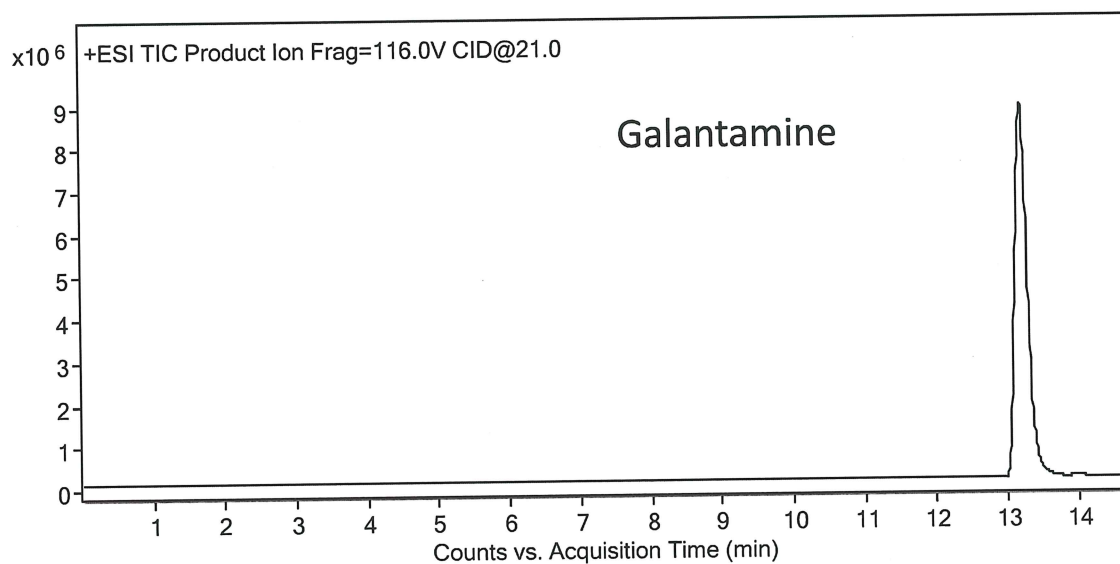
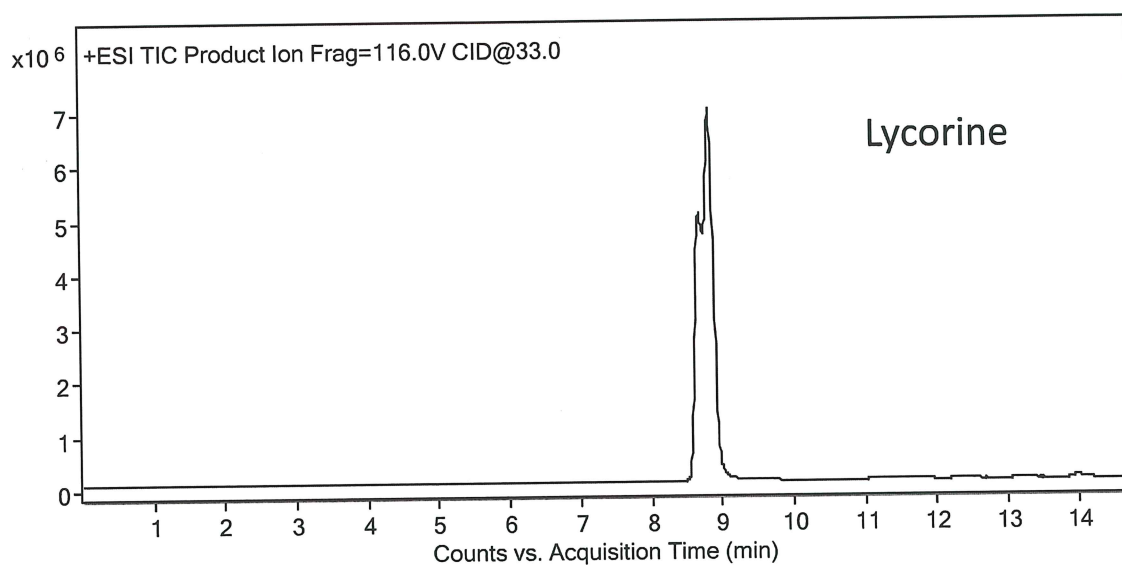


図 6. LC 条件④で測定したリコリンおよびガランタミン溶液のプロダクトイオンクロマトグラム

分析カラム ; Biphenyl (Raptor Biphenyl, 2.1 mm I.D.  $\times$  100 mm, 2.7  $\mu$ m、Restek Corporation)、移動相 A ; 10 mM 酢酸アンモニウム、移動相 B ; メタノール、グラジエーション条件 ; 10%B - (20 min) - 100%B

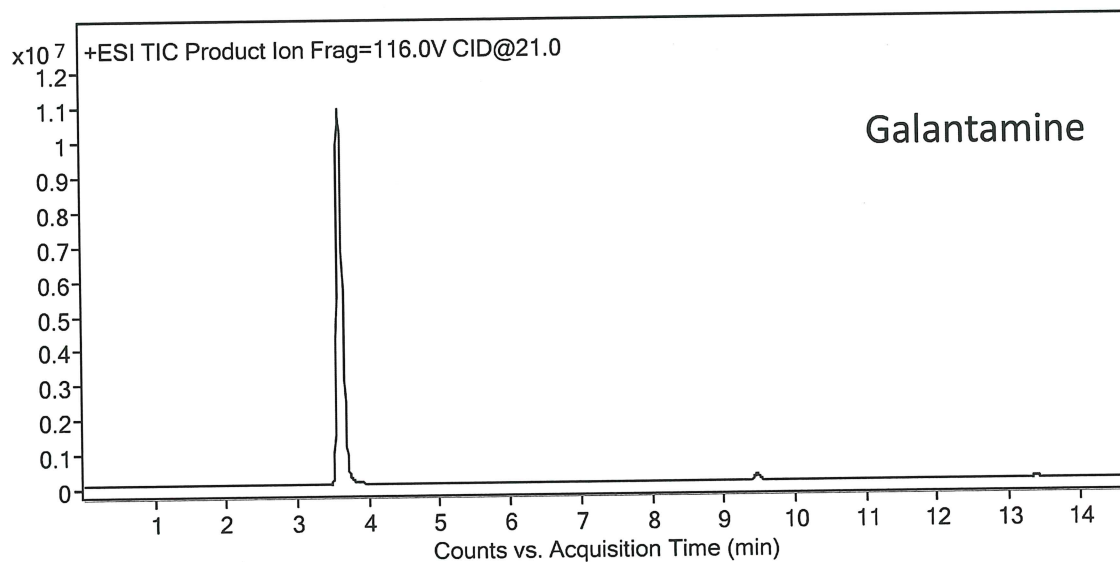
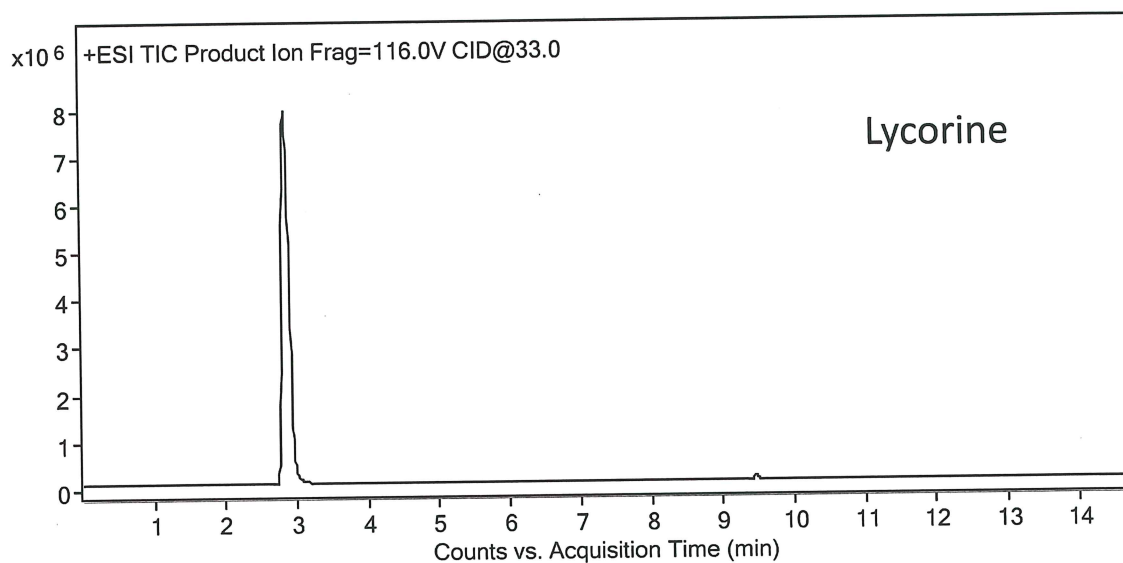


図 7. LC 条件⑤で測定したリコリンおよびガラントミン溶液のプロダクトイオンクロマトグラム

分析カラム ; PFP (CAPCELL CORE PFP, 2.1 mm I.D.  $\times$  100 mm, 2.7  $\mu$ m、大阪ソーダ株式会社、大阪、日本)、移動相 A ; 10 mM ギ酸アンモニウム 0.1% ギ酸水溶液、移動相 B ; アセトニトリル、グラジエーション条件 : 10%B - (20 min) - 100%B

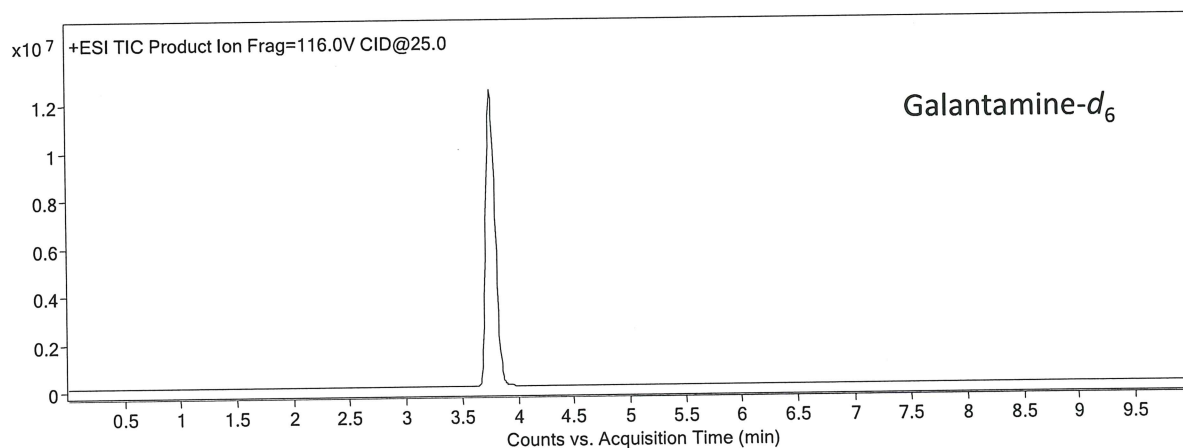
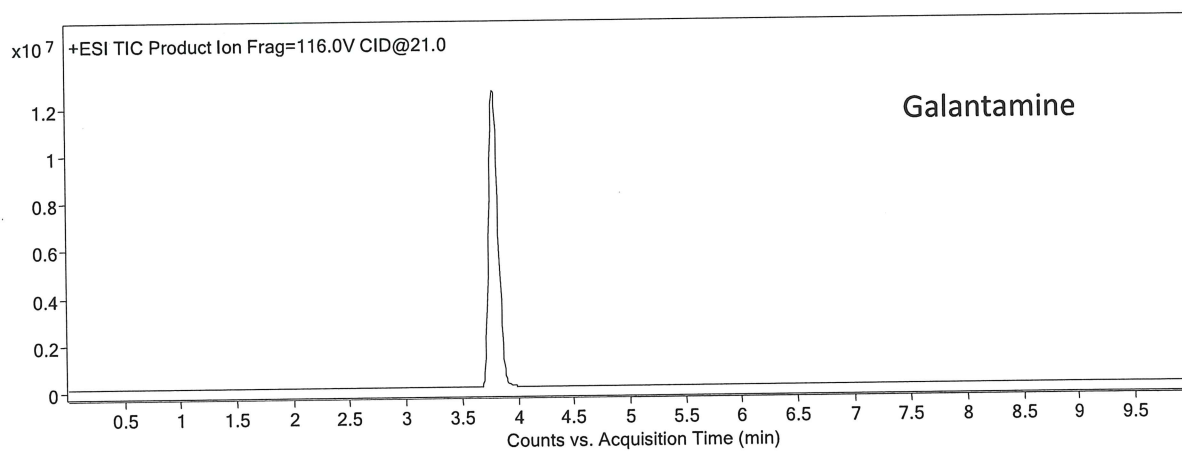
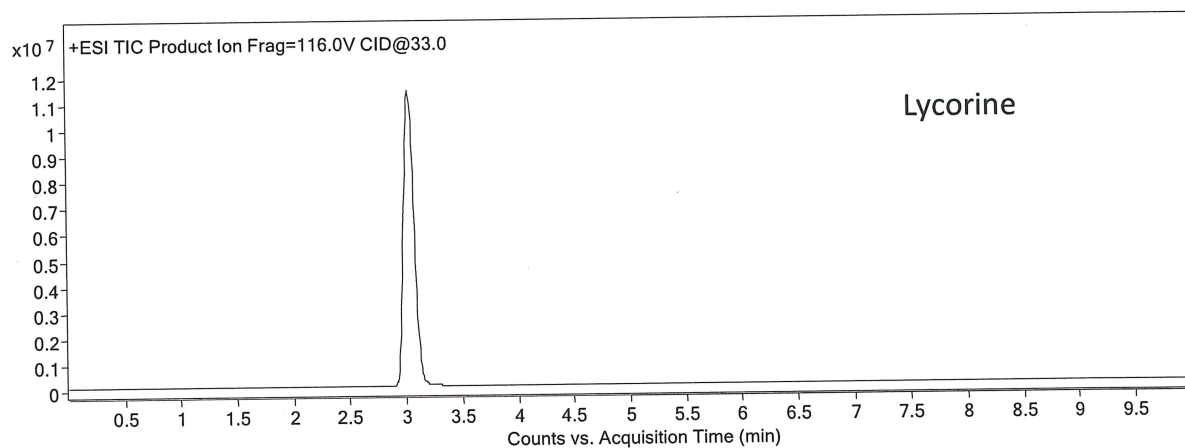


図 8. LC 条件⑥で測定したリコリン、ガランタミンおよびガランタミン- $d_6$  溶液のプロダクトイオンクロマトグラム

分析カラム ; PFP (CAPCELL CORE PFP, 2.1 mm I.D.  $\times$  100 mm, 2.7  $\mu$ m、大阪ソーダ株式会社)、移動相 A ; 10 mM ギ酸アンモニウム 0.1% ギ酸水溶液、移動相 B ; アセトニトリル、グラジエーション条件 ; 10%B - (6 min) - 40%B - (4 min) - 100%B

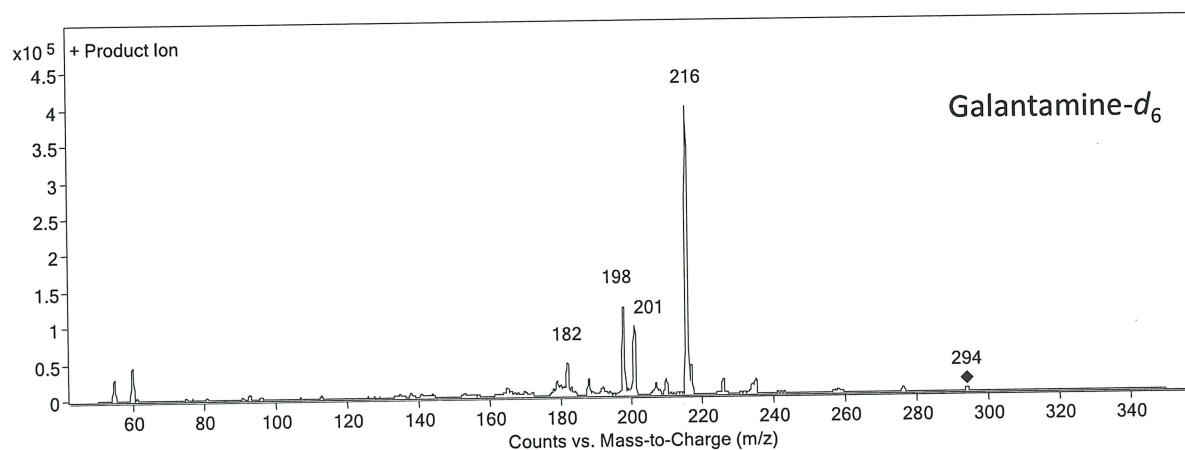
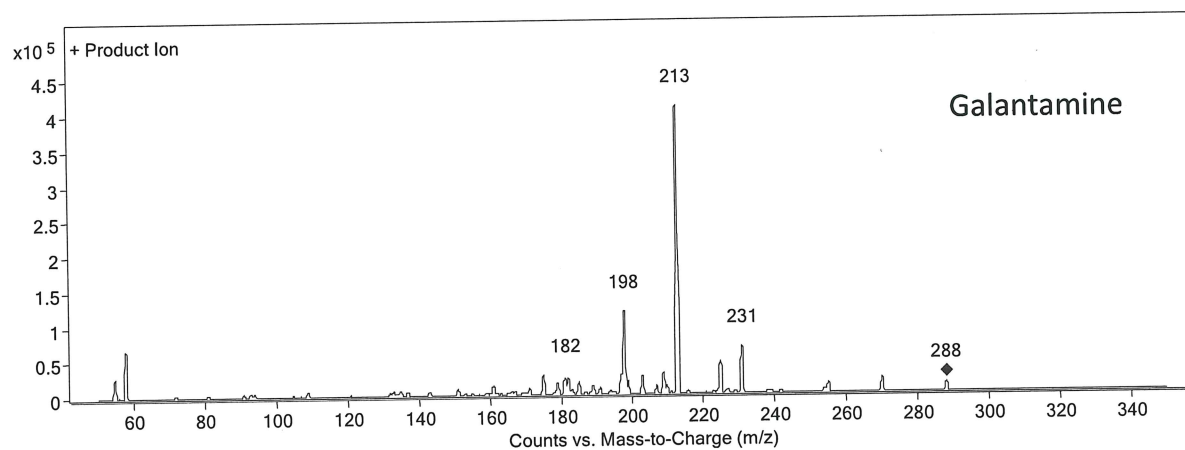
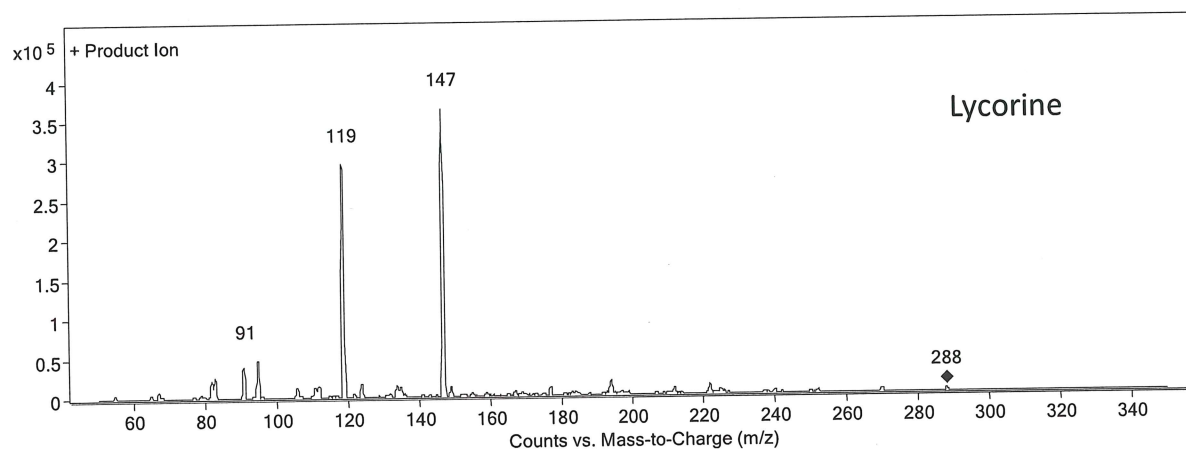


図 9. リコリン、ガラントミンおよびガラントミン-*d*<sub>6</sub> 溶液のプロダクトイオンスペクトル

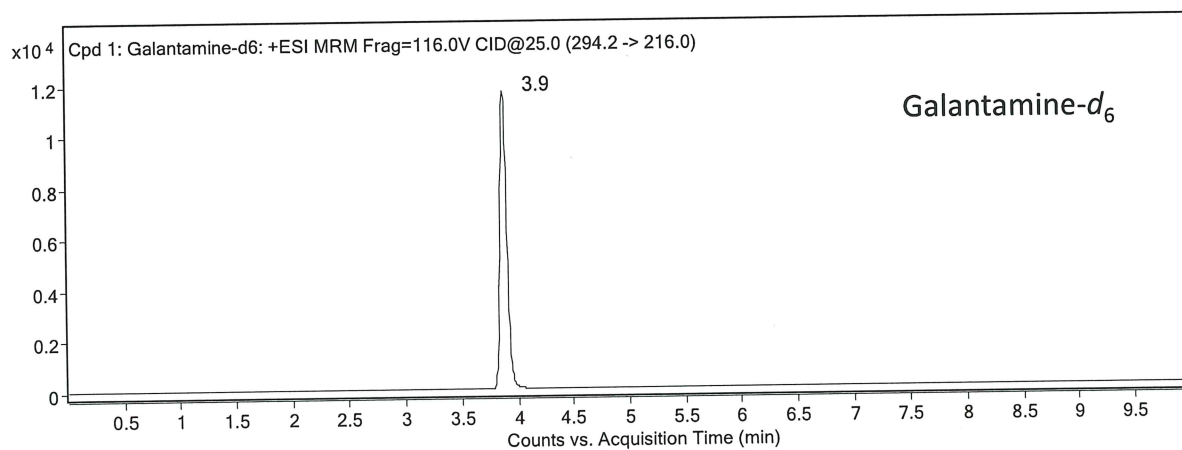
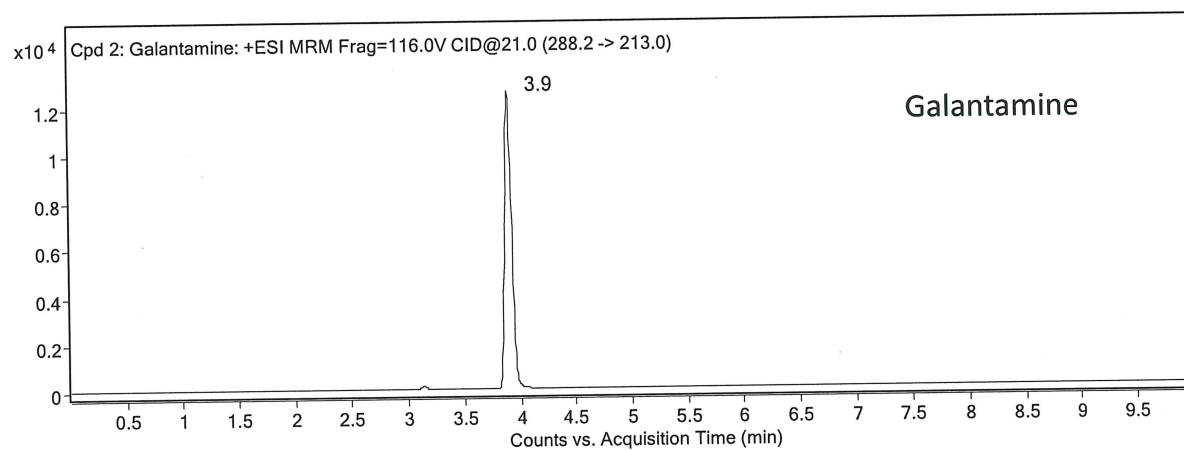
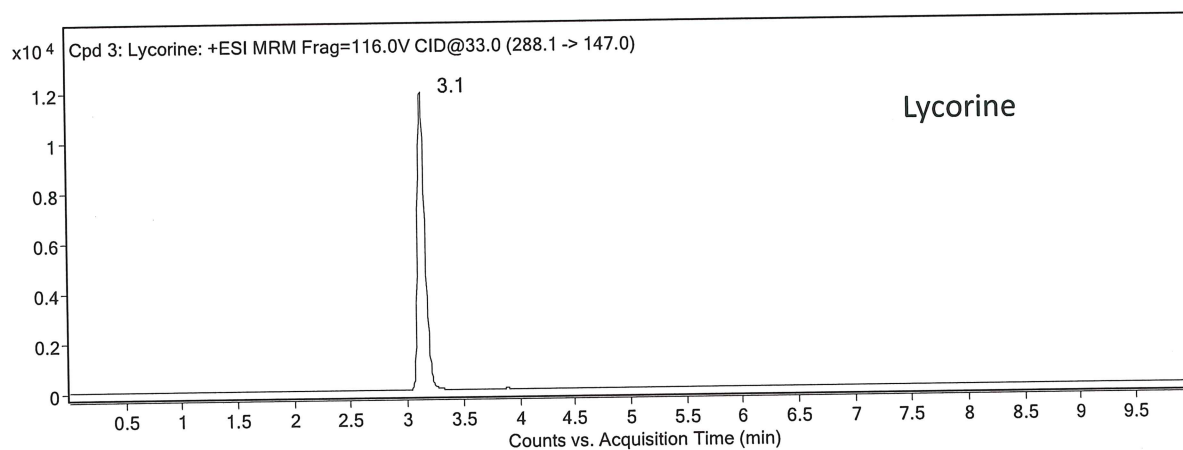


図 10. ブランクヒト血清に添加、抽出したリコリン、ガランタミンおよびガランタミン-*d*<sub>6</sub>の multiple reaction monitoring クロマトグラム



# Patient 1

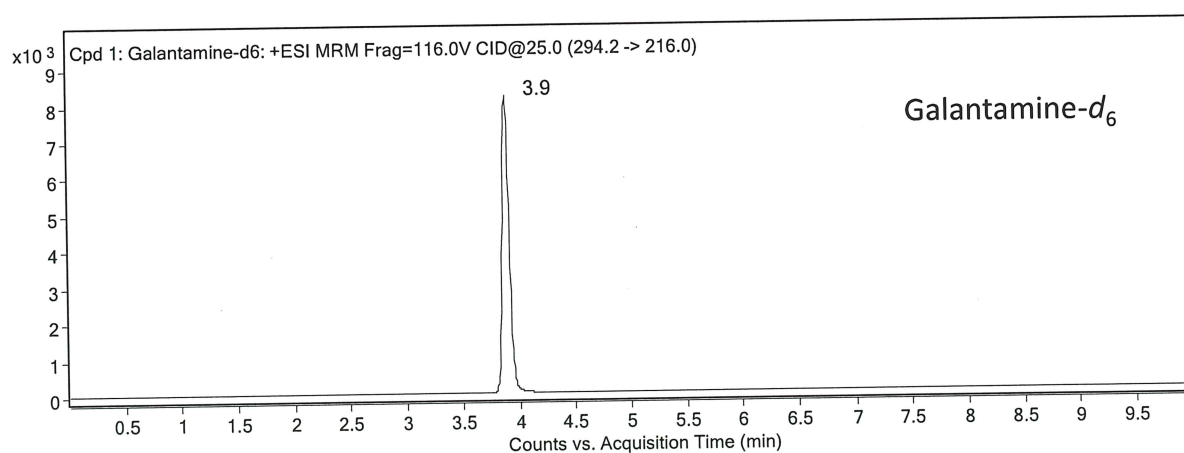
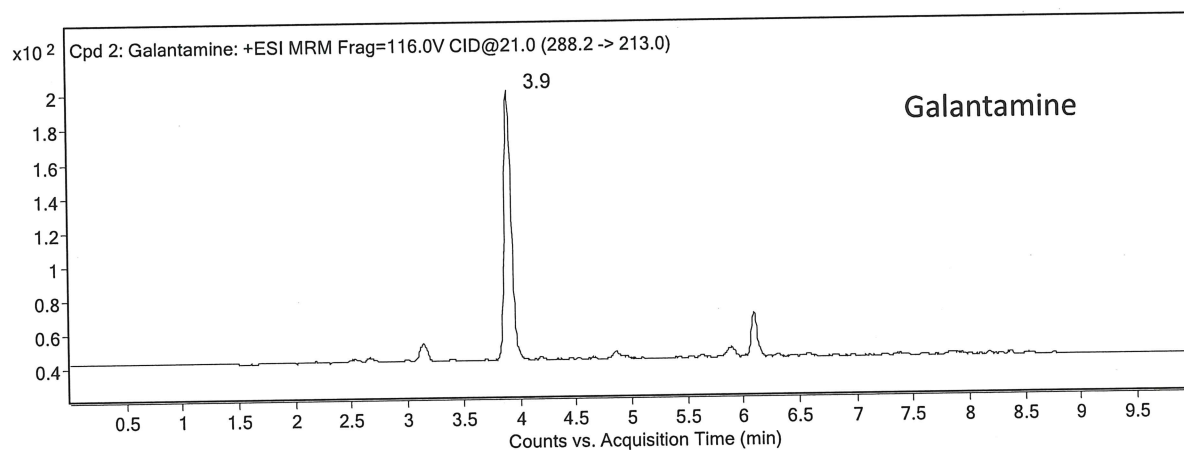
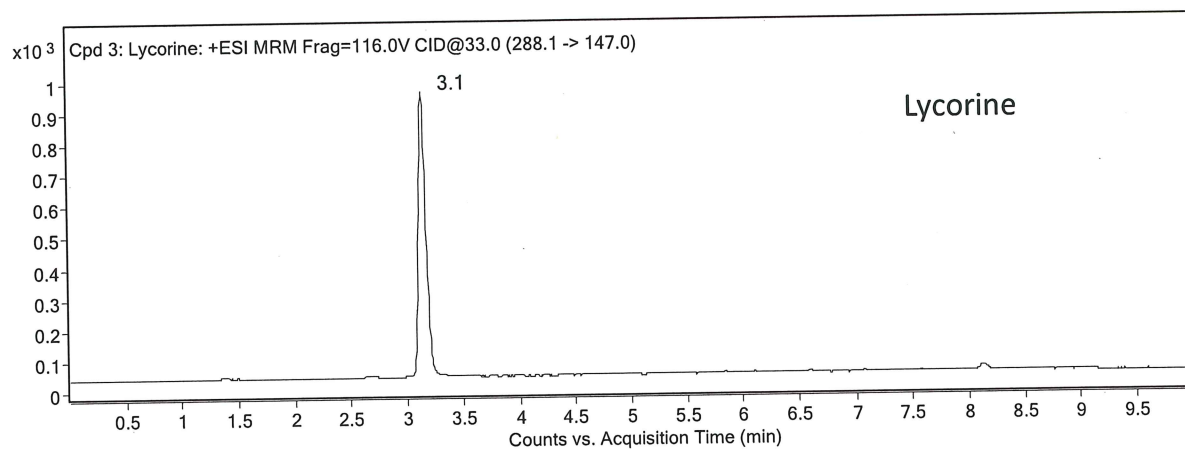


図 11. 患者 1 の血清抽出液の multiple reaction monitoring クロマトグラム

## Patient 2

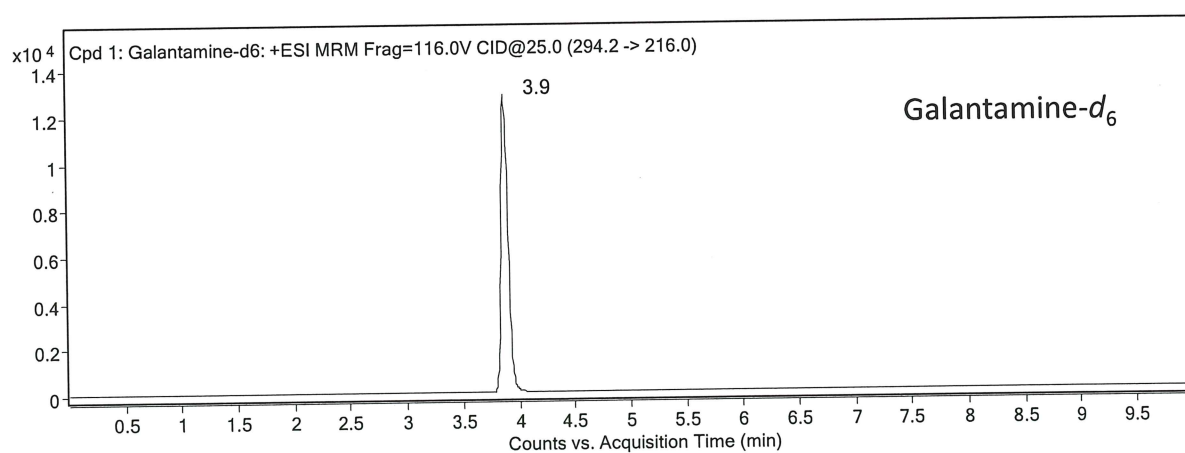
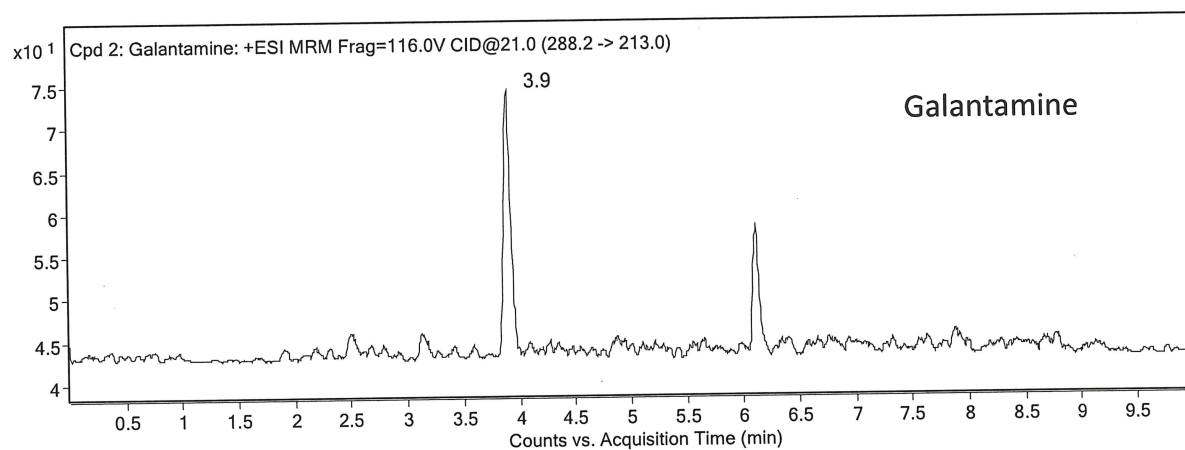
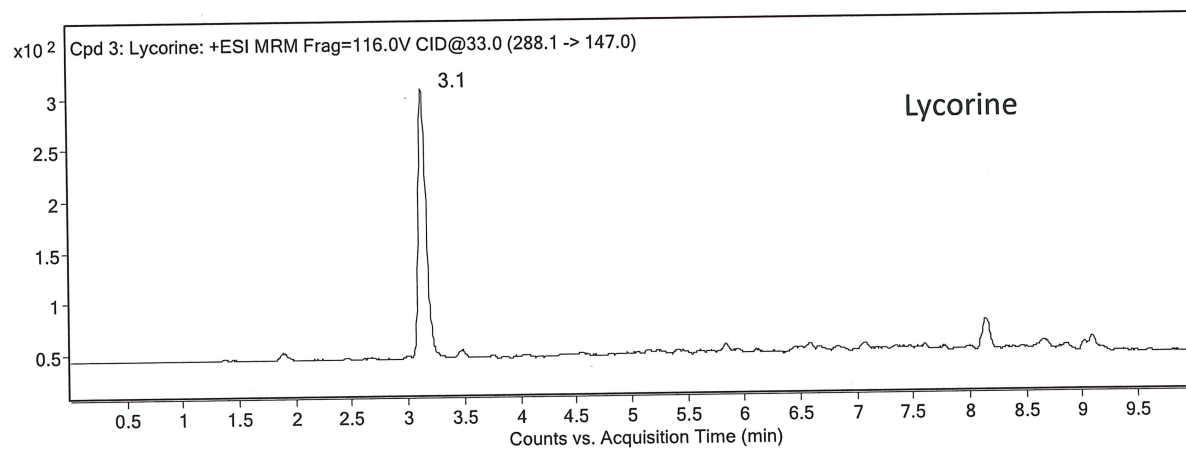


図 12. 患者 2 の血清抽出液の multiple reaction monitoring クロマトグラム

### Patient 3

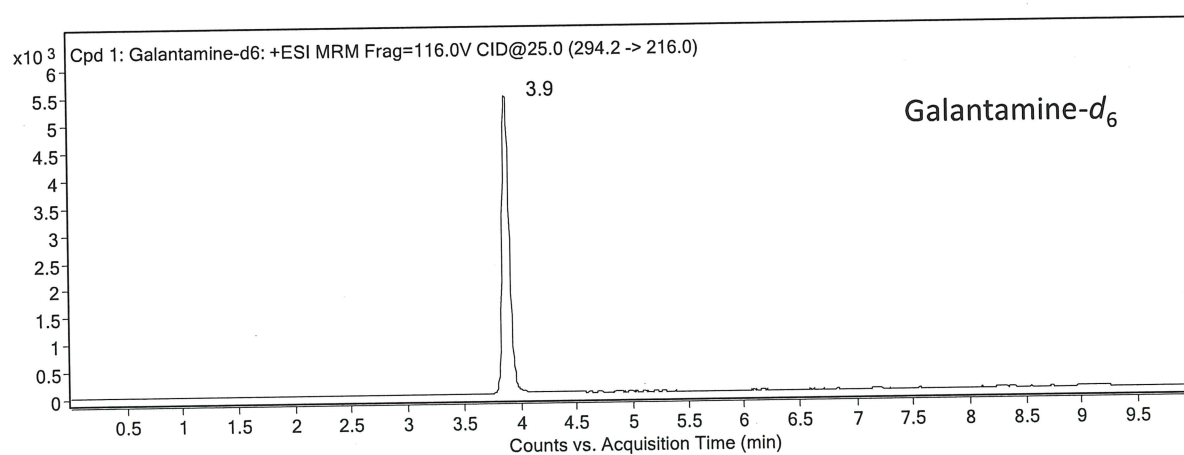
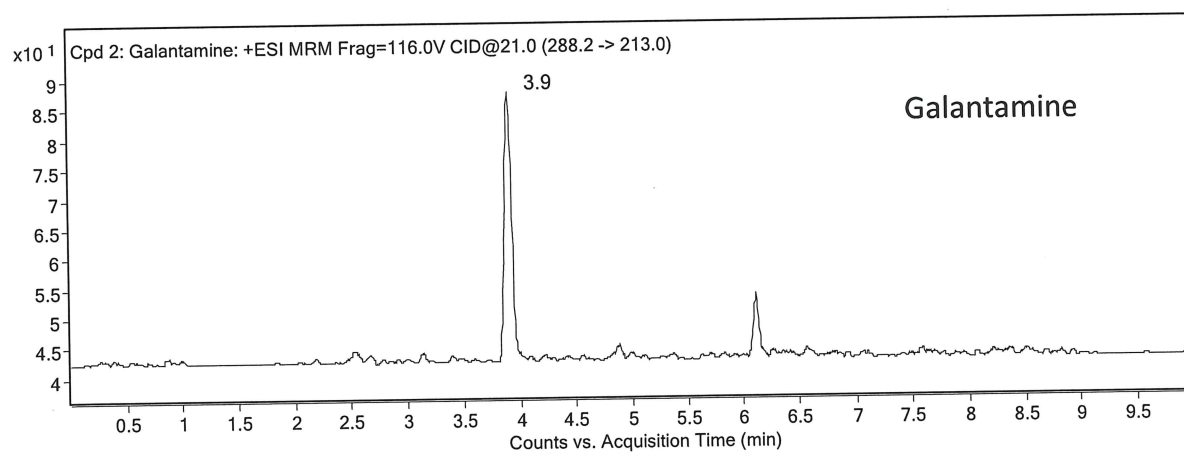
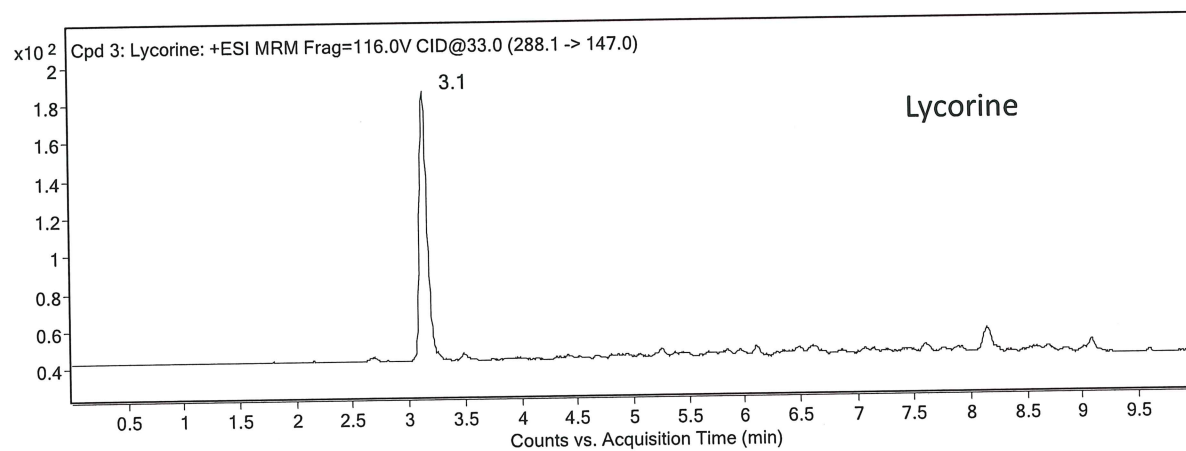


図 13. 患者 3 の血清抽出液の multiple reaction monitoring クロマトグラム

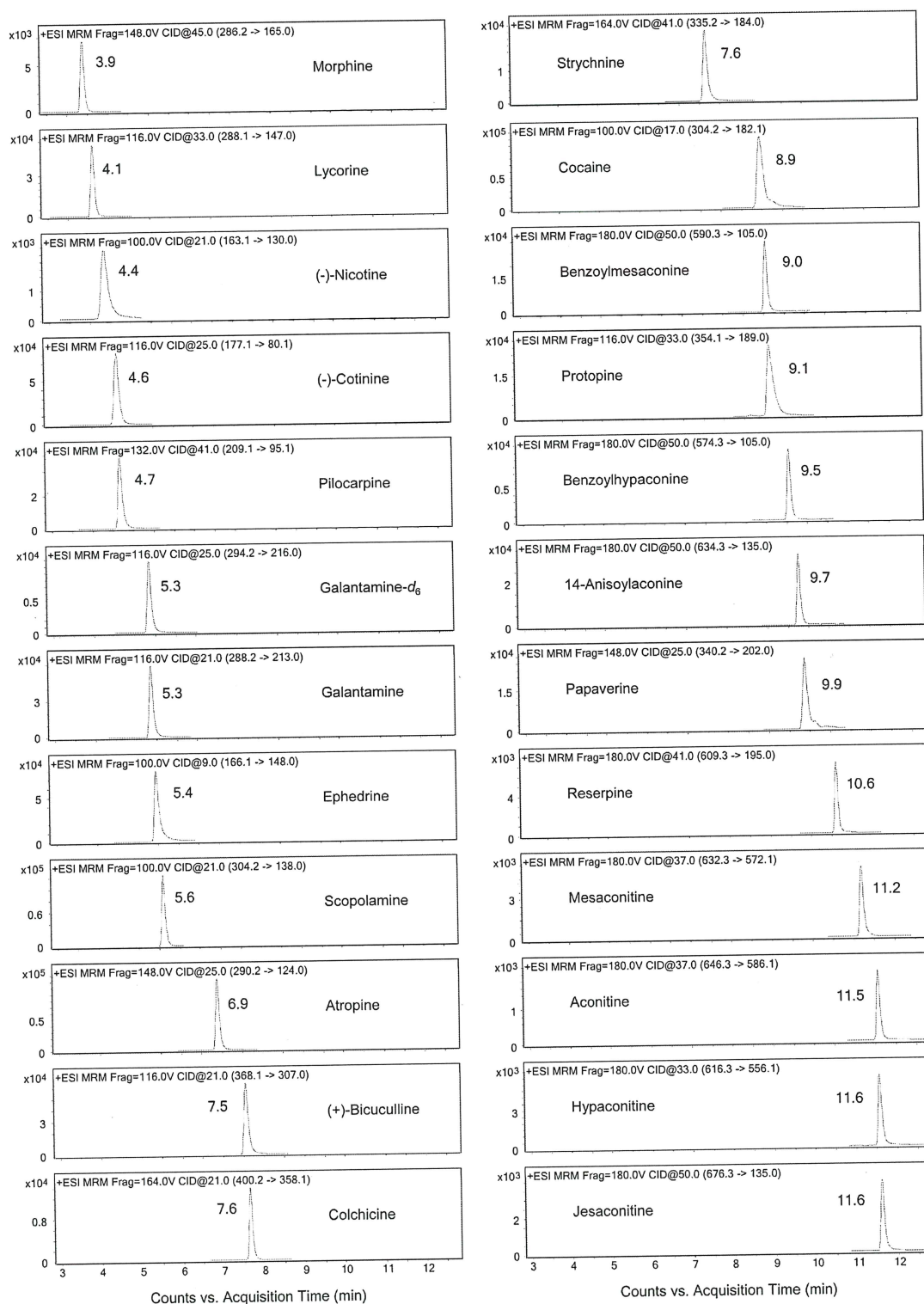


図 14. アルカロイド 23 化合物および内部標準物質のブランク血清添加サンプルを一斉分析した dynamic multiple reaction monitoring クロマトグラム