

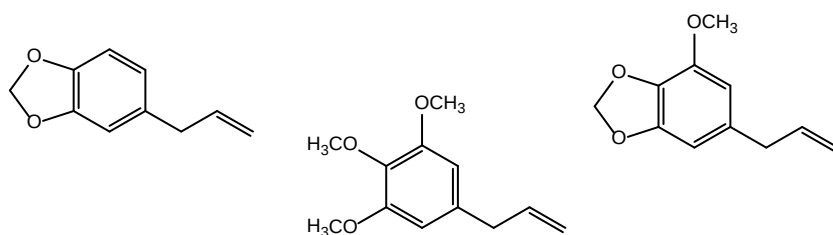
Application Note

No. 95

ライフサイエンス

GC-MS/MSを用いたナツメグに含有する 主要精神活性物質の分析

臼井聖尊^{1,2}、久保田永都¹、石井寿成³、坂本雄紀³



Life Science

■要旨

ナツメグはスパイスとしてさまざまな料理に使用されており、誰でも安価で購入できます。一方、若年層では娯楽目的でナツメグ粉末を過剰摂取し、幻覚作用を誘発するケースが増加しています。しかし、ナツメグの中毒事例における血中濃度とその経時変化に関する報告はほとんどありません。そこで、ナツメグ中の主要な精神活性物質(サフロール, ミリスチシン, エレミシン)の血中濃度と経時の変化を明らかにすることを目的に、GC-MS/MSを用いた分析法を考案し、ナツメグ中毒事例に応用しました。構築した方法の検出限界(LOD)および定量限界(LOQ)は、それぞれ0.14 ~ 0.16 ng/mLおよび0.5 ng/mL(検量線の最低点)でした。検量線は、0.5 ~ 300 ng/mL の範囲ですべての物質において $R^2=0.996 \sim 0.997$ の良好な直線性を示しました。QC (Low 1 ng/mL, Medium 120 ng/mL, High 240 ng/mL) および LOQ (0.5 ng/mL) における精度は日内変動($n=5$)において %RSD 2.4~11%, 日間変動(6日間)において %RSD 1.5~11% でした。また系統誤差は -2.6~2.1 % であり、良好な結果が得られました。

1. はじめに

ナツメグは *Myristica fragrans* の乾燥種子で、古代から香辛料や薬用目的として世界中で使用されており、安価で広く販売されています。ナツメグには主要な精神活性物質としてサフロール、ミリスチシン、エレミシン(図1)が含まれているため、幻覚や酩酊を誘発させる目的で意図的に大量に摂取されることもあります¹⁾⁻⁷⁾。さらに、意図的ではないがナツメグの誤った摂取法による中毒も最近問題になっています⁸⁾⁻¹⁰⁾。ナツメグの過剰摂取は、幻覚作用に加えて、吐き気、嘔吐、腹痛、興奮、眠気、めまい、頻脈、かすみ目、口渇、紅潮などの臨床症状と関連しています^{5), 9), 11)-14)}。しかし、ナツメグの過剰摂取事例の大部分は軽度であり、致命的になる可能性は低いとされています^{14), 15)}。ナツメグ中毒の症状は通常、摂取後2~8時間で現れ^{11), 15), 16)}、数日以内には治まるとされています^{3), 5), 9), 11), 13), 15)-17)}。ナツメグの摂取が関連した死亡事例は、これまでに世界的にも2件のみです^{15), 18)}。

最近の研究において、ナツメグパウダーを摂取したボランティアから生体サンプルを採取して、主要精神活性物質の代謝物の特定などが行われています¹⁹⁾⁻²³⁾、これまでにナツメグによる中毒事例は多く報告されているにもかかわらず、中毒時のサフロール、ミリスチシン、エレミシンなどの主要精神活性物質の血中濃度と半減期について評価した報告はありません。そこで、GC-MS/MSを用いた3種類の精神活性物質の分析法を構築し、ナツメグ中毒患者において、これらの主要物質の血中濃度を測定し、経時変化を評価しました。

1 東北大学大学院 医学系研究科 法医学分野

2 埼玉医科大学病院 臨床中毒センター

3 島津製作所 分析計測事業部 Solutions COE

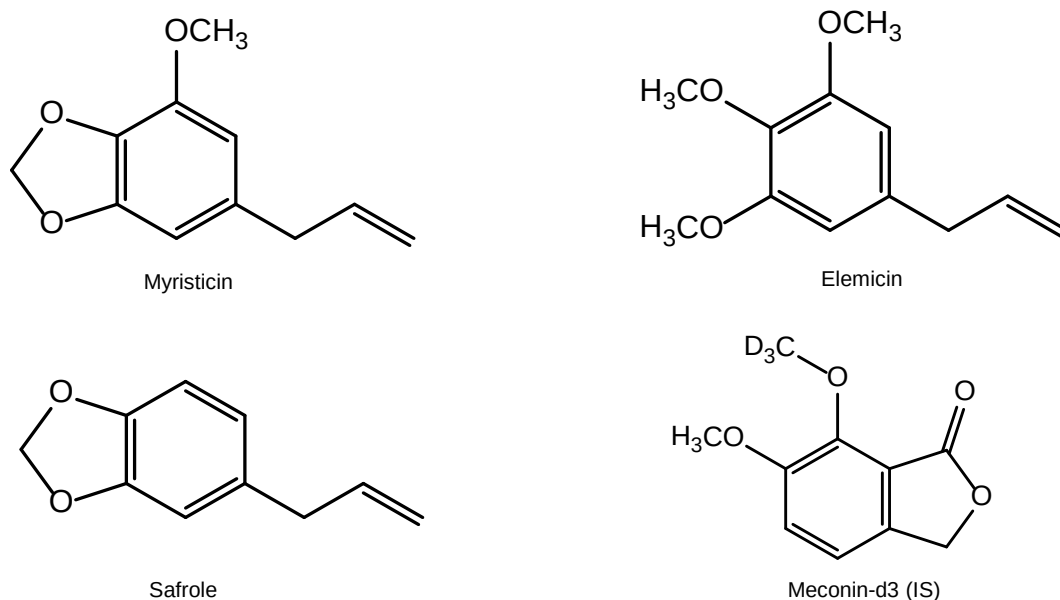


図1 ナツメグの主要な精神活性物質および内部標準物質の構造式

2. 実験

2.1 試薬とデバイス

実験に際して以下の試薬を使用しました。：酢酸エチル(残留農薬・PCB試験用、濃縮5000)、メタノール(LC/MS用)、エタノール(LC/MS用)、サフロール(chemical purity > 95%; 和光純薬)；メコニン-d3(chemical purity > 98%、isotopic purity > 99.6%; Toronto Research Chemicals)；ミリスチシン(chemical purity > 97%; Merck, Darmstadt, Germany)；エレミシン(chemical purity > 98%; Combi-Blocks, San Diego, CA, USA)；ロットの異なる5つのヒトプール血清(コスモ・バイオ株式会社)。なお、主要精神活性物質の血清からの抽出にはMonoSpin C18 FF カートリッジ(ジエルサイエンス)を使用しました。

2.2 標準溶液の調製

サフロール、ミリスチシン、エレミシンの混合標準原液(400 µg/mL)をエタノールで調製し、使用するまで

-30℃で保存しました。混合標準原液を精製水で希釈することにより、希釈標準溶液(0.25、2.5、5.0、10、15、25、40、80、100、および150 µg/mL)を調製しました。キャリアレーション標準液(0.5、5、10、20、30、50、80、160、200、および300 ng/mL)は、血清に適切な量の希釈標準溶液を添加することで調製しました。精度管理用(QC)サンプルは、血清に低濃度(1 ng/mL)、中濃度(120 ng/mL)、および高濃度(240 ng/mL)で添加することで調製しました。内部標準溶液としてメコニン-d3の水溶液(10 ng/mL)を精製水で調製し、使用するまで-30℃で保存しました。

2.3 抽出方法および分析

MonoSpin C18 FF カートリッジを、あらかじめ200 µLの酢酸エチル、メタノール及び精製水でコンディショニングしました(各2回)。その後、血清50 µLとメコニン-d3水溶液(10 ng/mL)450 µLの混合液をカートリッジにロードし、精製水200 µLで洗浄し、10,000×gで30 秒間遠心分離しました(3回)。100 µLの酢酸エチルを加えた後、2,000×gで30 秒間遠心分離してサフロール、ミリスチシンおよびエレマイシンを含む溶出液を回収しました。GC-MS/MSはGCMS-TQ™8040 NXを用い、分析カラムは、SH-I 5Si1 MS(30 m長さ、0.25 mm 内径、0.25 µm)を用いました。測定条件の詳細は表1に示します。この精製サンプル1 µLをGC-MS/MSに直接注入しました。

2.4 メソッドバリデーション

メソッドのバリデーションはPetersらの報告に従って実行しました²⁶⁾。選択性の試験にはロットの異なる全血サンプル(n = 5)を使用しました。検量線(0.5、5、10、20、30、50、80、160、200、および300 ng/mL)は、メコニン-d3を内部標準としたピーク面積比をプロットすることにより作成しました。精度管理の評価は、QC サンプル濃度(1、120、または240 ng/mL)を使用して精度と系統誤差を算出しました(各 QC サンプルを連続6日間、1日あたり5回測定)。日内および日間の精度は、一元配置分散分析により計算し、相対標準偏差(%RSD)として算出しました。検出限界(LOD)および定量限界(LOQ)は、LOD = 3.3 × SD/S および LOQ = 10 × SD/S として算出しました。算出されたLOQが検量線の下限濃度0.5 ng/mLよりも低かった場合、0.5 ng/mLをLOQとみなしました。5つの異なるロットの血清を用いてQCサンプルの低濃度(1 ng/mL)と高濃度(240 ng/mL)を作成し、Matuszewskiらの方法²⁷⁾に従って回収率、マトリックス効果、およびプロセス効率の値を決定しました。前処理後のサンプルの安定性は、QC サンプルを26℃で6.5 時間放置後に測定することで評価しました。また、凍結(-30℃で24時間)と解凍(室温)を3 サイクル繰り返して、凍結/解凍の安定性を評価しました。さらに長期安定性は、-30℃で23 日間保管した前後のQC サンプルを比較することによって評価しました。

表1 GC/MS分析条件

測定条件		
装置	GCMS-TQ™8040 NX	
カラム	SH-I 5Sil MS (30 m × 0.25 mm 内径, 0.25 μm 膜厚)	
オープン	60 °C (1 min)- 320 °C (10 °C/min)-320 °C (10 min)	
注入口温度	280°C	
トランスファーライン温度	280°C	
注入口モード	スプリットレス	
キャリアガス	ヘリウム	
流速	1.8 mL/min	
イオン化法	EI (70 eV)	
イオン源温度	200°C	
スキャン範囲 (プロダクトイオンスキャン)	<i>m/z</i> 40- 220 (dwell time 50 ms)	
MRM トランジション (<i>m/z</i>)	Safrole	162 > 104, 131, CE 15 V
	Myristicin	192 > 161, 91, CE 10 V
	Elemicin	208 > 193, 177, CE 10 V
	Meconin-d3	162 > 104, CE 5 V

3. 結果と考察

3.1 メソッドのバリデーション

サフロール、ミリスチシン、エレミシンおよび内部標準メコニン-d3の代表的な MRMクロマトグラム(各標準は120 ng/mL)とマススペクトルを図2に、各対象化合物の検量線を図3にそれぞれ示します。開発した分析法のバリデーション結果は表2 および表3 にそれぞれ示します。各化合物の検量線は、検量線範囲0.5 ~ 300 ng/mL で $r^2=0.996\sim0.997$ と良好な直線性が得られました(各検量点n=6)。算出された LOD はすべての対象化合物において0.14~0.16 ng/mL の範囲でした。また、LOQ は各化合物とも0.5 ng/mL でした(検量線の下限值)。

LOQ および QC サンプル (1、120、240 ng/mL) の系統誤差は -2.6% から 2.1%、日内および日間の精度は、それぞれ 2.4%~11%(日内)と 2.5%~11%(日間)の範囲内に収まりました。内部標準 (メコニン-d3) によって補正したマトリックス効果は、低濃度 (1 ng/mL) および高濃度 (240 ng/mL) の QC サンプルの両方で許容できるものでした(5つの異なるマトリックスを使用して算出)。QC サンプルの温度および長期安定性の結果は、対象化合物が実験条件下で長期間安定であることを示しました(表3)。

3.2 ナツメグ中毒事例への応用

構築した分析法を、実際にナツメグ大量摂取した中毒事例へ応用しました。今回、治療過程で採取した5つの血清サンプルを試料としました(入院時を0時間として退院直前まで94時間にわたって採取)。

患者血清サンプルを測定したMRMクロマトグラムを図4に示しました。このMRMクロマトグラムは入院後8時間40分後の検体を測定した結果ですが、構築した分析法により血清サンプルにはナツメグの主要精神活性物質(サフロール、ミリスチシン、エレミシン)が含まれていることが証明できました。

なお、ベンゾジアゼピン、抗うつ薬、殺虫剤、天然毒素、規制薬物、デザイナードラッグを含む約8,000化合物のスペクトルライブラリを使用した LC-Q-TOF-MS/MS によるスクリーニング検査では、患者血清サンプルから他の薬毒物は検出されませんでした。定量分析の結果、各化合物の血清レベルは時間の治療経過とともに減少していることが確認されました(表4)。入院時のサフロール、ミリスチシンおよびエレミシンはそれぞれ 16.7、388、および 844 ng/mL であり、患者はめまい、羞明、疲労などの症状を示していました。また、嘔気も強く 飲水・食事摂取が困難な状態でした。入院2~3 日目はめまいおよび嘔気が持続し、体動は少なくベッドで臥床して過ごしていました。この時のサフロール、ミリスチシン、エレミシンの血清レベルはそれぞれ2.7、65.2、30.6 ng/mL でした(入院後45.7時間)。入院後 93.7 時間で、各化合物の血清レベルは大幅に減少しており、軽度のめまいが続いたものの、身体症状はかなり軽減された状態でした。その後の経過は良好で、入院8日目に退院しました。

各精神活性化合物の生物学的半減期は、血清レベルを入院後の時間に対して対数プロットすることにより計算しました (図5)。中毒時におけるサフロール、ミリスチシン、エレミシンの生物学的半減期は、それぞれ 19.2、16.9、および 8.5 時間でした(表4)。

これまでに報告されている研究のほとんどは、ナツメグ主要精神活性物質の代謝に関するものが占めていましたが¹⁹⁾⁻²²⁾、ナツメグ中毒時におけるヒト血清中の主要精神活性物質の血中濃度、経時変化および毒性動態パラメーターに関する報告はほとんどありませんでした。これはナツメグの過剰摂取により中毒を起こすものの、死亡に至るケースがほとんどないためと考えられます^{15), 18)}。今回、我々が提示したのは1症例のみであり、摂取量や摂取時間も患者の申告のみに基づいているため、正確性に欠ける部分があるかもしれませんが、得られた血清濃度や生物学的半減期の値は、ナツメグ中毒をより深く理解するための貴重なデータになると考えられます。

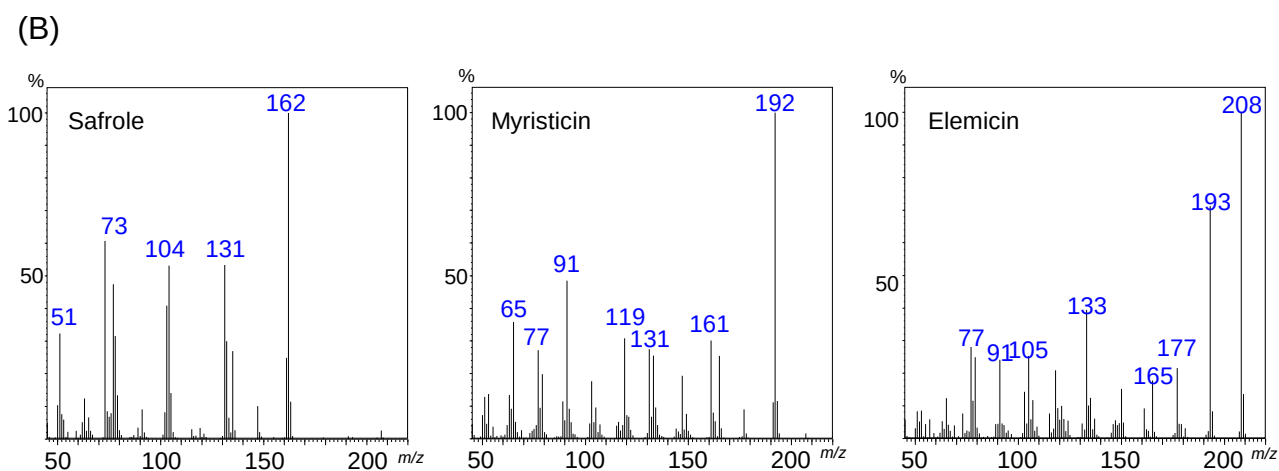
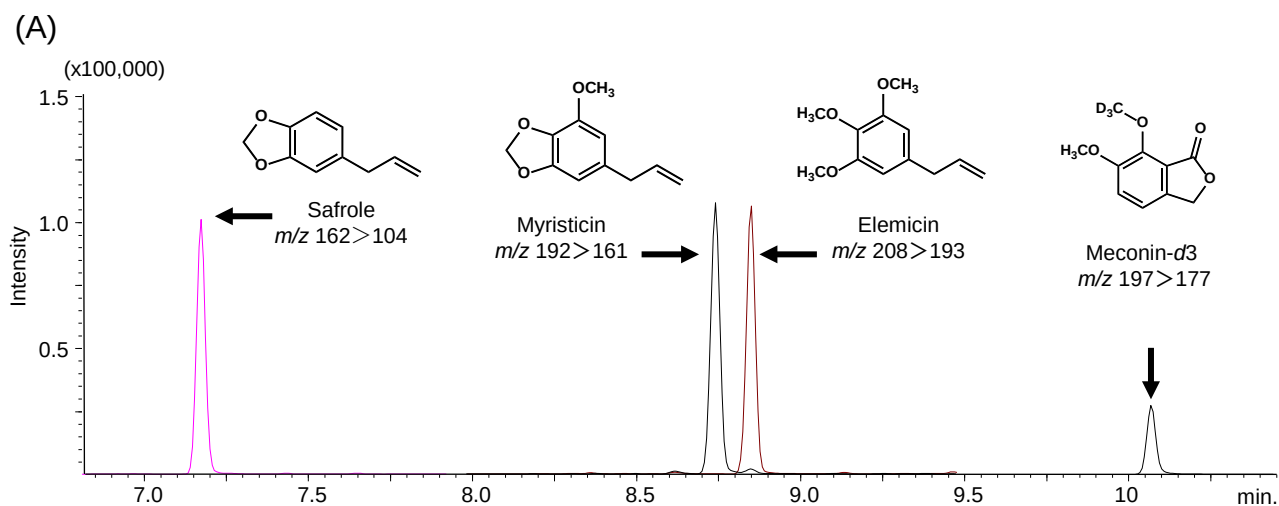


図2 (A) 標準品のMRMクロマトグラム(120 ng/mL) (B) 各化合物のマススペクトル

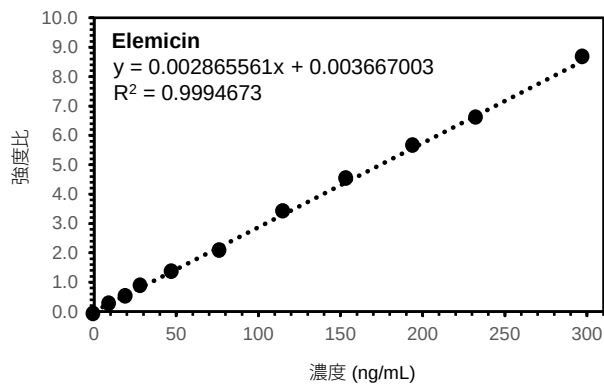
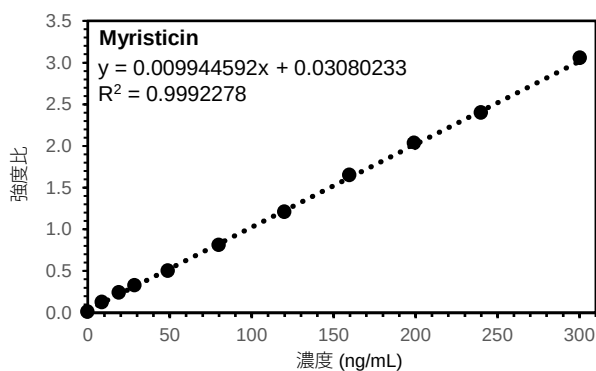
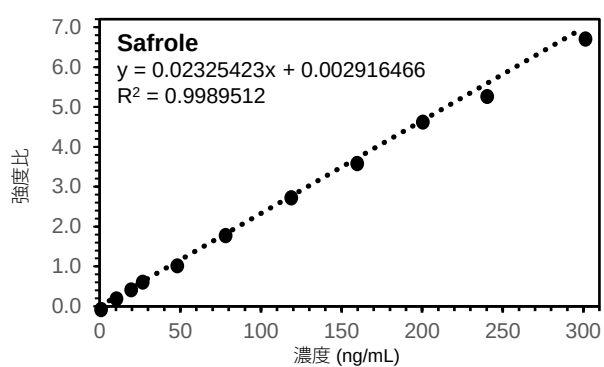


図3 対象化合物の検量線

表2 対象化合物の分析バリデーション結果

検量線範囲 (ng/mL)	0.5–300 (0.5, 5, 10, 20, 30, 50, 80, 160, 200, and 300)		
	SAF	MYL	ELE
	r ²	0.996	0.997

SAF: Safrole, MYL: Myristicin, ELE: Elemicin n = 6

	SAF	MYL	ELE
LOD (ng/mL)	0.14	0.16	0.15
LOQ (ng/mL)	0.5	0.5	0.5

QCs (ng/mL)	Precision (RSD%)						Bias (%)		
	Intra-day run			Inter-day run					
	SAF	MYL	ELE	SAF	MYL	ELE	SAF	MYL	ELE
LOQ (0.5)	5.4	11	4.9	7.9	8.7	8.8	-1.8	1.9	-2.2
Low (1)	4.0	7.9	2.7	8.6	5.2	11	1.1	2.1	0.5
Medium (120)	3.8	3.7	3.3	3.8	3.7	3.3	-1.1	-1.3	-0.4
High (240)	3.7	3.0	2.4	3.7	3.7	2.5	-2.6	-0.8	0.0

6 days, n = 5

QCs (ng/mL)	LOW (1)			High (240)		
	SAF	MYL	ELE	SAF	MYL	ELE
Recovery rate (%)	84.9	95.4	95.4	79.0	88.2	92.0
Matrix effect (%)	109.1	107.9	108.7	101.8	99.8	98.8
Process efficiency (%)	92.3	102.7	103.2	80.2	87.9	90.7

5 days, 5 matrices were used.

表3 対象化合物の長期安定性

	QCs (ng/mL)	Averaged remaining contents					
		SAF		MYL		ELE	
		Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)
Freeze/thaw stability (3 cycles, -30°C to RT)	1	102.2	3.0	101.2	3.2	97.8	1.8
	120	100.8	5.0	98.8	4.8	97.8	4.4
	240	103.6	2.0	102.8	2.2	101.5	2.1
Long-term stability (43 days, -30°C)	1	98.8	5.7	99.6	14.4	97.0	9.8
	120	100.3	0.6	99.3	1.6	100.8	1.9
	240	98.9	1.8	98.4	2.3	101.1	2.1

n = 5 (Freeze/thaw stability , Long-term stability)

Processed sample stability (6.5 h, 26°C)	QCs (ng/mL)	Averaged remaining contents mean (%)		
		SAF	MYL	ELE
	1	102.5	108.5	99.3
	120	100.2	100.0	99.6
	240	102.1	102.7	101.7

n = 1

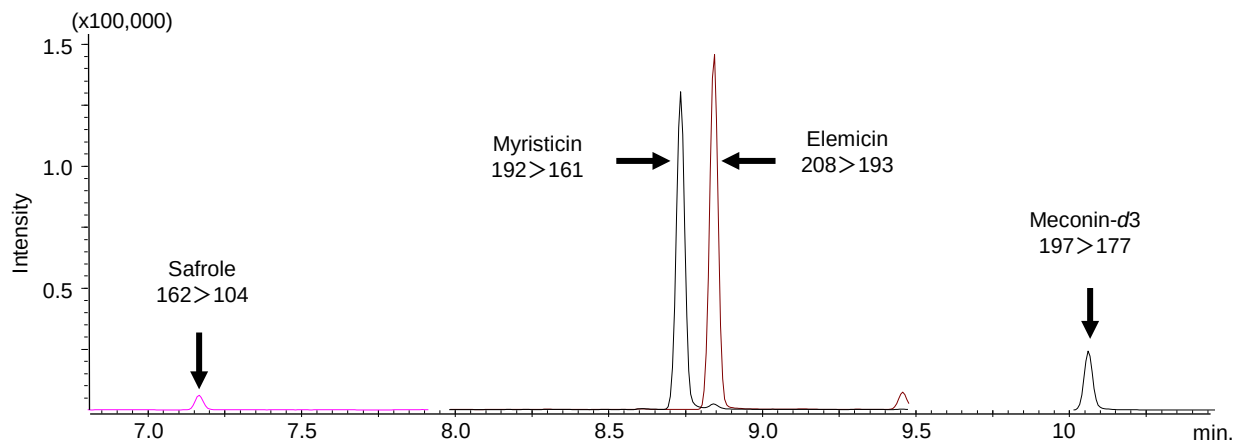


図4 血清サンプルにおけるMRMクロマトグラム

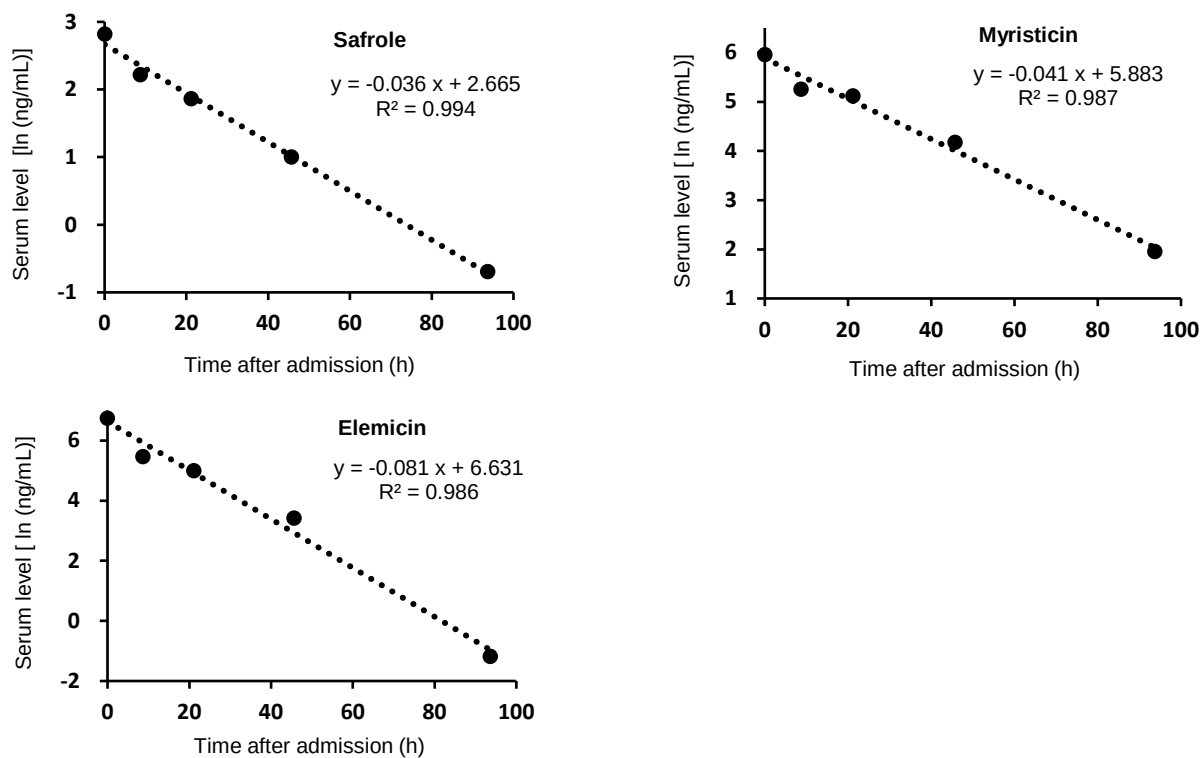


図5 入院後経過時間と対象化合物の血清中濃度の関係

表4 対象化合物の入院後経過時間における血清中濃度

Time after admission (h)	Serum level (ng/mL)		
	Safrole	Myristicin	Elemicin
0	16.7	388	844
8.7	9.2	192	236
21.2	6.5	167	147
45.7	2.7	65.2	30.6
93.7	0.50	7.1	0.30*

* < LOQ, estimated value

Compounds	K_{el}	$T_{1/2}$ (h)
Safrole	-0.036	19
Myristicin	-0.041	17
Elemicin	-0.081	8.5

K_{el} , 消失速度定数, $T_{1/2}$, 生物学的半減期

4. 結論

本研究では、ヒト血清中の精神活性物質であるサフロール、ミリスチシンおよびエレミシンを測定するための簡単な抽出方法と信頼性の高いGC-MS/MS法を構築しました。この方法のバリデーション結果は良好であり、実際のナツメグ中毒症例に応用することができました。本法を用いることにより、ナツメグ中毒症例における主要精神活性物質の血清中濃度の推移が明らかとなり、生物学的半減期を初めて算出することができました。今後、ナツメグ中毒症例の血中濃度データを蓄積することで、より正確なトキシコキネティックパラメータが明らかになるものと思われます。

<参考文献>

- 1) R.R. Atherton, The 'Nutmeg Challenge': a dangerous social media trend, Arch. Dis. Child. 106 (2021) 517-518. DOI: 10.1136/archdischild-2020-319407
- 2) B. Flam, E. Bendz, M. Jonsson Fagerlund, J. Höjer, Seizures associated with intentional severe nutmeg intoxication, Clin. Toxicol. (Phila) 53 (2015) 917. DOI: 10.3109/15563650.2015.1079324
- 3) A.K. Demetriades, P.D. Wallman, A. McGuiness, M.C. Gavalas, Low cost, high risk: accidental nutmeg intoxication, Emerg. Med. J. 22 (2005) 223-225. DOI: 10.1136/emj.2002.004168
- 4) B.D. Kelly, B.E. Gavin, M. Clarke, A. Lane, C. Larkin, Nutmeg and psychosis, Schizophr. Res. 60 (2003) 95-96. DOI: 10.1016/s0920-9964(02)00204-9
- 5) B.C. Sangalli, W. Chiang, Toxicology of nutmeg abuse, J. Toxicol. Clin. Toxicol. 38 (2000) 671-678. DOI: 10.1081/clt-100102020
- 6) G.I. Quin, N.F. Fanning, P.K. Plunkett, Nutmeg intoxication, J. Accid. Emerg. Med. 15 (1998) 287-288. DOI: 10.1056/NEJM196307042690108
- 7) N. Brenner, O.S. Frank, E. Knight, Chronic nutmeg psychosis, J. R. Soc. Med. 86 (1993) 179-180. DOI: 10.1177/014107689308600326
- 8) G. Lavy, Nutmeg intoxication in pregnancy. A case report, J. Reprod. Med. 32 (1987) 63-64.
- 9) J.E. Roeters van Lennep, S.C. Schuit, R.L. van Bruchem-Visser, B. Özcan, Unintentional nutmeg autointoxication, Neth. J. Med. 73 (2015) 46-48.
- 10) J.H. Scholefield, Nutmeg — an unusual overdose, Arch. Emerg. Med. 3 (1986) 154-155. DOI: 10.1136/emj.3.2.154
- 11) J. Reynoard, R. Torrents, B. Domange, M. Glaizal, L. de Haro, N. Simon, Nutmeg poisoning: Ten years (2008-2018) of experience from the Marseille Poison Control Center, Presse Med. 48 (2019) 994-996. DOI: 10.1016/j.jlpm.2019.08.016
- 12) J.E. Ehrenpreis, C. Deslauriers, P. Lank, P.K. Armstrong, J.B. Leikin, Nutmeg poisonings: a retrospective review of 10 years experience from the Illinois Poison Center, 2001-2011, J. Med. Toxicol. 10 (2014) 148-151. DOI: 10.1007/s13181-013-0379-7
- 13) D.G. Barceloux, Nutmeg (Myristica fragrans Houtt.), Dis. Mon. 55 (2009) 373-379. DOI: 10.1016/j.disamonth.2009.03.007
- 14) S.D. Carstairs, F.L. Cantrell, The spice of life: An analysis of nutmeg exposures in California, Clin. Toxicol. (Phila) 49 (2011) 177-180. DOI: 10.3109/15563650.2011.561210
- 15) U. Stein, H. Greyer, H. Hentschel, Nutmeg (myristicin) poisoning—report on a fatal case and a series of cases recorded by a poison information centre, Forensic Sci. Int. 118 (2001) 87-90. DOI: 10.1016/s0379-0738(00)00369-8
- 16) N.A.A. Rahman, A. Fazilah, M.E. Effarizah, Toxicity of nutmeg (myristicin): A review, Int. J. Adv. Sci. Eng. Inf. Technol. 5 (2015) 212-215. DOI: 10.18517/ijaseit.5.3.518
- 17) K. Medagoda, A family with nutmeg poisoning due to a home-made 'Covid treatment syrup', Natl. Med. J. India 35 (2022) 187. DOI: 10.25259/nmj-35-3-187
- 18) A.R. Cushny, Nutmeg Poisoning, Proc. R. Soc. Med. 1 (1908) 39-44.
- 19) M.A. Neukamm, H.M. Schwelm, S. Vieser, N. Schiesel, V. Auwärter, Detection of nutmeg abuse by gas chromatography-mass spectrometric screening of urine, J. Anal. Toxicol. 44 (2020) 103-108. DOI: 10.1093/jat/bkz054
- 20) J. Beyer, D. Ehlers, H.H. Maurer, Abuse of nutmeg (Myristica fragrans Houtt.): Studies on the metabolism and the toxicologic detection of its ingredients elemicin, myristicin, and safrole in rat and human urine using gas chromatography/mass spectrometry, Ther. Drug Monit. 28 (2006) 568-575. DOI: 10.1097/00007691-200608000-00013
- 21) M.S. Benedetti, A. Malnoë, A.L. Broillet, Absorption, metabolism and excretion of safrole in the rat and man, Toxicology 7 (1977) 69-83. DOI: 10.1016/0300-483x(77)90039-7
- 22) S.K. Manier, L. Wagmann, A.A. Weber, M.R. Meyer, Abuse of nutmeg seeds: Detectable by means of liquid chromatography-mass spectrometry techniques?, Drug Test. Anal. 13 (2021) 1440-1444. DOI: 10.1002/dta.3027
- 23) A.L. Dawidowicz, M.P. Dybowski, Simple and rapid determination of myristicin in human serum, Forensic Toxicol. 31 (2013) 119-123. DOI: 10.1007/s11419-012-0151-8
- 24) M.K. Woźniak, L. Banaszkiwicz, M. Wierowski, E. Tomczak, M. Kata, B. Szpiech, J. Namieśnik, M. Biziuk, Development and validation of a GC – MS/MS method for the determination of 11 amphetamines and 34 synthetic cathinones in whole blood, Forensic Toxicol. 38 (2020) 42-58. DOI: 10.1007/s11419-019-00485-y
- 25) L. Rivier, Criteria for the identification of compounds by liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-multiple mass spectrometry in forensic toxicology and doping analysis, Anal. Chim. Acta 492 (2003) 69-82. DOI: 10.1016/S0003-2670(03)00889-4
- 26) F.T. Peters, O.H. Drummer, F. Musshoff, Validation of new methods, Forensic Sci. Int. 165 (2007) 216-224. DOI: 10.1016/j.forsciint.2006.05.021
- 27) B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS, Anal. Chem. 75 (2003) 3019-3030. DOI: 10.1021/ac020361s

本アプリケーションノートは、執筆者の下記の論文を基に技術資料化したものです。

K. Usui, E. Kubota, Detection of major psychoactive compounds (safrole, myristicin, and elemicin) of nutmeg in human serum via GC-MS/MS using MonoSpin® extraction: Application in a nutmeg poisoning case. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Volume 234, 20 September 2023

GCMS-TQは、株式会社 島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
<https://www.an.shimadzu.co.jp/>

初版発行：2024年3月

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器、体外診断用医薬品として承認・認証を受けておりません。本文書に記載されている分析手法を治療診断目的およびその手続き上で使用することはできません。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。本文中に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。