

LC/MS/MS による下痢性貝毒（オカダ酸群）測定方法の検討

山口 玲子

(環境保健研究所 健康科学課)

要 旨 下痢性貝毒の測定は、従来マウス試験法で行われていたが、国際的な流れから平成 27 年に LC/MS/MS による測定方法が通知された。この通知を参考に LC/MS/MS による測定方法の検討、妥当性評価を行ったところホタテ、カキの測定が可能となった。

Key Words : 下痢性貝毒, LC/MS/MS

1. はじめに

下痢性貝毒は渦鞭毛藻プランクトンが産生する毒で、そのプランクトンを摂取したホタテガイ等の 2 枚貝が毒化し、食物連鎖によって人に中毒を起こす¹⁾。従来はマウス試験法²⁾により 0.05MU/g が規制値とされていたが、平成 27 年 3 月 6 日付食安発 0306 第 1 号「麻痺性貝毒等により毒化した貝類等の取扱いについて」により、オカダ酸（以下「OA」という）、ジノフィシトキシシン-1（以下「DTX-1」という）ジノフィシトキシシン-2（以下「DTX-2」という）並びにそれらのエステル化合物については機器分析を行い、毒性等価係数を用いて OA 等量に換算したものの総和を規制値とし、その値は 0.16mgOA 当量/kg と定められた。また、それに伴い平成 27 年 3 月 6 日付食安基発 0306 第 3 号食安監発 0306 第 1 号「下痢性貝毒（オカダ酸群）の検査について」（以下「通知」という）により、LC/MS/MS による試験法および妥当性評価の方法が示された。

当研究所では当初、LC/MS/MS の感度不足によりオカダ酸群の機器分析は行っていなかったが、機器更新によって測定可能になったことから、測定方法の検討と妥当性評価を行ったので報告する。

2. 試料

測定方法の検討には、オカダ酸群が検出されないことを確認したホタテガイを使用した。妥当性評価はホタテガイ、カキ、あさり、ムラサキイガイの 4 種について行った。

3. 試薬・試液・精製カラム

3.1 試薬・試液

(1) OA 標準液 (100ng/mL) : OA 認証標準品の表

示値を基にメタノールで適宜希釈して 100ng/mL とした。

(2) DTX-1 標準液 (100ng/mL) : DTX-1 認証標準品の表示値を基にメタノールで適宜希釈して 100ng/mL とした。

(3) DTX-2 標準液 (100ng/mL) : DTX-2 認証標準品の表示値を基にメタノールで適宜希釈して 100ng/mL とした。

(4) 90%メタノール

(5) 40%メタノール

(6) 5%メタノール

(7) 2.5mol/L 水酸化ナトリウム

(8) 2.5mol/L 塩酸

(9) アセトニトリルメタノール (9 : 1)

試薬は特級あるいは LC-MS 用を使用した。

3.2 精製カラム

精製方法の検討には以下のカラムを使用した。

(1) Oasis PRiME HLB 200mg/6mL (以下「HLB200」という)

(2) Oasis PRiME HLB 500mg/6mL (以下「HLB500」という)

(3) InertSep C18 FF 2g/12mL (以下「InertSep」という)

4. LC/MS/MS 測定条件

測定機器 : LCMS-8050 (島津製作所製)

LC

カラム : CORTECS UPLC C18 (Waters)
2.1mm×100mm 1.6um

カラム温度 : 40°C

流量 : 0.2mL/min (初期-12.5 分間ホールド) →

0.4mL/min (12.51-4.5 分間ホールド) →

0.2mL/min (17.01-1 分間ホールド)

グラジェント条件

移動相 A: 水 (2mM ギ酸アンモニウム 50 mM ギ酸含有)

移動相 B: 95%アセトニトリル (2mM ギ酸アンモニウム 50 mM ギ酸含有)

A:B=60:40 (初期-2.5 分間ホールド) →0:100 (7.5 分-5 分間ホールド) →60:40 (12.51 分-5.5 分間ホールド) 全 18 分

注入量: 5 μ L

MS/MS

ESI-Negative: MRM モード

インターフェイス温度 350 $^{\circ}$ C

DL 温度: 250 $^{\circ}$ C

ネフライザーガス流量: 3.00L/ min

ヒーティングガス流量: 15.00L/ min

ヒートブロック温度: 450 $^{\circ}$ C

ドライイングガス流量: 5.00L/ min

各項目の測定条件を以下に示す (表 1)。

表 1 各項目の測定条件

品目		プレカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
OA	定量	803.35	255.15	30	46	15
	確認	803.35	113.35	32	53	12
	確認	803.35	151.05	32	52	13
DTX-1	定量	817.35	255.10	32	48	18
	確認	817.35	208.95	30	48	26
	確認	817.35	113.25	32	55	13
DTX-2	定量	803.40	255.25	20	48	16
	確認	803.40	321.15	34	49	10
	確認	803.40	112.90	30	45	29

5. 検量線および定量限界値の検討

5.1 検量線直線性の確認

混合標準液を希釈し 10~0.1ng/mL の範囲で測定したところ 3 項目ともに相関係数 (R^2) が 0.999 以上となった。濃度幅を 10~1ng/mL (高濃度) と 1~0.1 ng/mL (低濃度) に分けた場合、DTX-1 および DTX-2 では低濃度において相関係数 (R^2) が 0.999 以下となった (表 2)。

表 2 相関係数 (R^2)

濃度 (ng/mL)	OA	DTX1	DTX2
10~0.1	0.9993	0.9997	0.9996
10~1	0.9990	0.9997	0.9995
1~0.1	0.9997	0.9979	0.9981

5.2 定量限界値

定量限界値はクロマトグラムの S/N 比から、3 項目ともに 0.5ng/mL とした (図 1)。

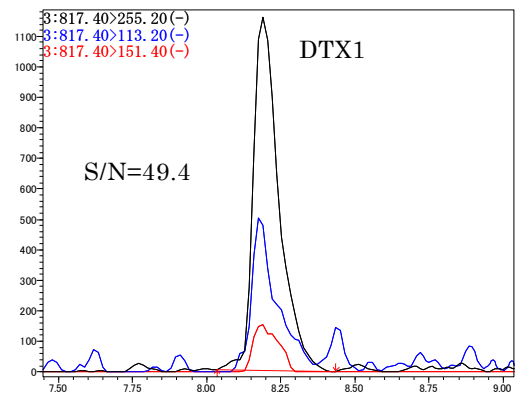
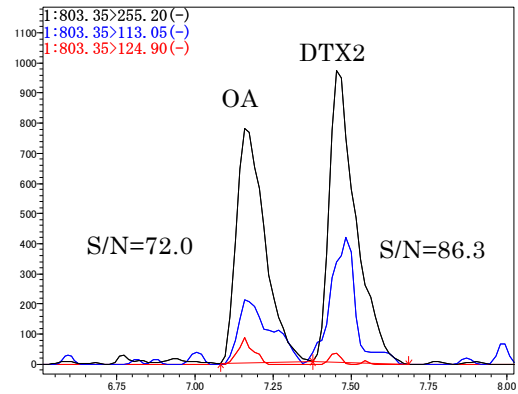


図 1 定量限界値クロマトグラム

相関係数 (R^2) と定量限界値から、検量幅を 10~1ng/mL とし検量線を作成した (図 2)。

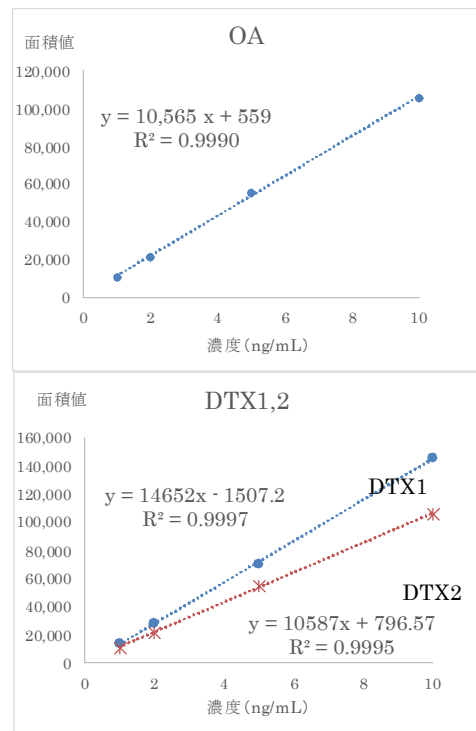


図 2 検量線

6. 測定カラムの検討

LC/MS/MS の測定カラムについて、予備調査では Titan C18 2.1mm×100mm 1.9 um (SUPELCO) を使用していたが、回収率が 120% を大きく超えてしまう項目と精製カラムの組み合わせが複数見られた。そこで測定カラムを CORTECS UPLC C18 2.1mm×100mm 1.6um (Waters) に変更したところ³⁾、添加回収率の改善が認められた (表 3)。

表 3 測定カラムの検討

精製カラム	添加回収率 (%)					
	CORTECS UPLC C18			Titan C18		
	OA	DTX1	DTX2	OA	DTX1	DTX2
HLB200	126	177	164	161	123	208
HLB500	123	146	140	210	139	217
InertSep	89	108	85	129	99	182

7. 精製方法の検討

3 種類の精製カラムについて、90%メタノールとアセトニトリルメタノール (9:1) の 2 種類溶出溶媒を使用し添加回収試験を行った。添加濃度は通知に基づき 0.05 mg/kg とした。

添加回収率については、溶出溶媒が 90%メタノールの場合、HLB200 と HLB500 の 2 項目で 120% 以上となり、InertSep では全項目で 70~120% の範囲内となった。一方、溶出溶媒がアセトニトリルメタノール (9:1) では 3 種類の精製カラムともに全項目で 70~120% の範囲内となった (表 4)。

表 4 精製カラムの検討

溶出溶媒	精製カラム	添加回収率 (%)		
		OA	DTX1	DTX2
90%メタノール	HLB200	136	177	116
	HLB500	127	157	114
	InertSep	106	93	98
アセトニトリルメタノール (9:1)	HLB200	115	116	111
	HLB500	100	92	96
	InertSep	109	105	99

添加回収率が 70~120% の範囲内となった精製カラム溶出溶媒の組み合わせについてクロマトグラムのピーク形状を比較すると、OA と DTX-2 で違いがみられた。溶出溶媒がアセトニトリルメタノール (9:1) では HLB200、HLB500 でピーク幅の拡大が見られた。また、InertSep では溶出溶媒が 90%メタノールの場合ピーク幅の拡大が見られた (図 3)。

以上の結果から精製カラムは InertSep を使用し、溶出溶媒はアセトニトリルメタノール (9:1) として妥当性評価を行った (図 4)。

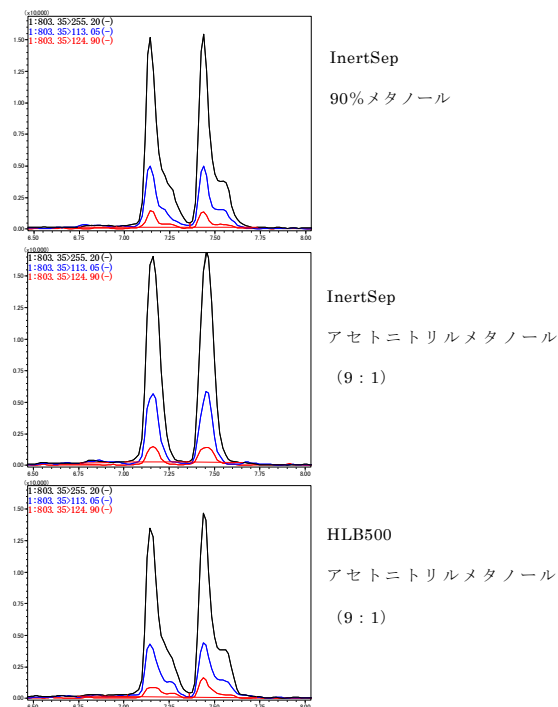


図 3 OA, DTX2 ピーク形状

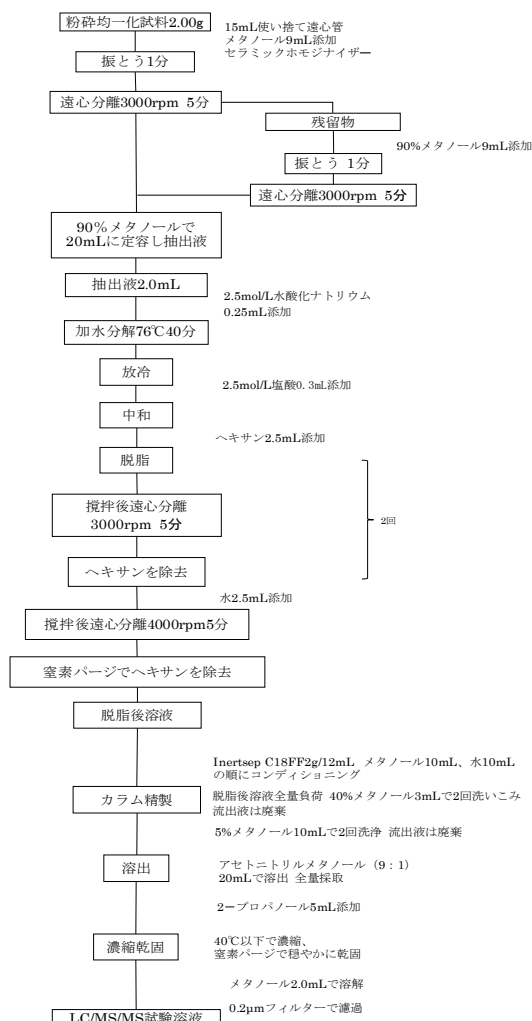


図 4 試験溶液調整方法

8. 妥当性評価

通知に従いホタテガイ、カキ、あさり、ムラサキイガイの4種について妥当性評価を実施した。あざりとムラサキイガイの真度測定では、DTX1で目標値を達成できなかったため(あざり=127%、ムラサキイガイ=137%)精度の測定はホタテガイ、カキについて実施した。

その結果、ホタテガイ、カキともに妥当性が確認された。なお、目標値は真度70~120%、併行精度<15%、室内精度<20%となっている(表5)。

表5 妥当性評価

項目名	検体名	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
OA	ホタテガイ	90	1.6	3.3
	カキ	94	2.3	2.3
	あざり	111	—	—
	ムラサキイガイ	105	—	—
DTX1	ホタテガイ	97	3.4	4.4
	カキ	94	2.6	5.6
	あざり	127	—	—
	ムラサキイガイ	137	—	—
DTX2	ホタテガイ	94	2.9	4.3
	カキ	96	3.0	4.3
	あざり	110	—	—
	ムラサキイガイ	102	—	—
	目標値	70~120	<15	<20

—: 実施せず

ホタテガイとカキについては、妥当性が確認されたことから標準作業書を作成し、令和元年度より行政検査を実施している。

9. 考察

予備試験の段階ではLC/MS/MS測定カラムにTitan C18 2.1mm×100mm (SUPELCO)を使用していたが、複数の項目と精製カラムの組み合わせで添加回収率が120%以上となり、充填剤がC18のカラムであっても製造会社による特性の違いが表れる結果となった。また、精製カラムについては、HLB200を使用した文献³⁾を参考に検討したが、通知法に従った溶出溶媒では添加回収率の目標値を達成できないこと、測定ピークの形状に問題があったことから、精製カラム、溶出溶媒ともに複数の検討を行った。

あざりとムラサキイガイについては、DTX1の真度について目標値を達成できなかった。この原因は貝類のマトリックスが多岐にわたるためと考えられ、精製カラムの変更や追加、試験溶液の希釈等でマトリックス効果を低減させる必要がある。しかし、試験溶液の希釈は定量限界値から難しいと考えられるため、今後は精製方法の検討を行っていきたい。

文献

- 1) 公益財団法人 日本中毒情報センター, “保健師・薬剤師・看護師向け中毒情報”, <http://www.j-poison-ic.or.jp> (2019. 3. 5 アクセス)
- 2) “下痢性貝毒の検査について”, 環乳第37号, 昭和56年5月19日
- 3) 安永 恵, 紙本 佳奈, 他 “LC/MS/MSを用いた下痢性貝毒の分析法適用の検討” 香川県環境保健研究センター所報 第17号: 2018, pp.76-78