

# 高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析による 下痢性貝毒分析法の検討

濱尾 誠 小石 智和 土田 貴正 浅井 紀夫

## Examination of a Determination Method of Diarrhetic Shellfish Toxins Using High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

Makoto HAMAO Tomokazu KOISHI Takamasa TSUCHIDA Norio ASAI

下痢性貝毒の分析法が、「麻痺性貝毒等により毒化した貝類の取り扱いについて」(平成27年3月6日厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 食安発0306第1号)において、マウス試験法から機器分析法に改正された。これに伴い機器分析法の検討を行ったところ、メタノール系移動相の使用及び固相抽出カラムのメタノール水溶液での洗浄により高感度の測定が可能となった。また本法は「下痢性貝毒(オカダ酸群)の検査について」(平成27年3月6日厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長及び厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知、食安基発0306第3号及び食安監発0306第1号)に示された妥当性評価における項目の条件をすべて満たしたことから、行政検査に適用できることが確認できた。

キーワード：下痢性貝毒、オカダ酸、ジノフィシストキシン、高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析  
Keywords：Diarrhetic shellfish toxin, Okadaic acid, Dinophysistoxin, High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

### はじめに

下痢性貝毒は二枚貝による食中毒の原因物質の一種で、植物プランクトンが産生する。二枚貝がこれらのプランクトンを摂食すると、体内にその毒が蓄積される。このようにして毒化した二枚貝をヒトが摂食すると、数時間程度で下痢、吐き気、嘔吐、腹痛を主とする消化器症状を呈することが知られている<sup>1)</sup>。下痢性貝毒の主要成分は、オカダ酸(OA)、ジノフィシストキシン-1(DTX1)、ジノフィシストキシン-2(DTX2)(図1)及びそのエステル化合物である。OA及びDTX1は、動物試験において毒性を有することが確認されており<sup>2,3)</sup>、DTX2にもOAと比較して弱いながらも毒性が確認されている<sup>3)</sup>。

下痢性貝毒の国内規制に係る分析法は、「麻痺性貝毒等により毒化した貝類の取り扱いについて」(平成27年3月6日厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知、食安発0306第1号、以下「通知」という)において従来のマウス試験法から機器分析法に変更され、これに伴い規制値は0.05 MU/gから0.16 mg OA当量/kgに変更された。

本通知において、分析操作例(以下、「操作例」という)が示されたが、この操作例及びその類似の測定条件では感度が十分でなく<sup>4,5)</sup>、さらに前処理方法において夾雑成分によるイオン化の促進または抑制を十分除去できない<sup>4-6)</sup>などの問題点が指摘されている。京都府においても二枚貝の出荷が行われており、機器分析法を用いた下痢性貝毒検査を導入する

ためにこれらの問題点を検討した。

佐藤ら<sup>7)</sup>は、下痢性貝毒の高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析(以下「LC-MS/MS」という)による機器分析法について、メタノール系移動相を使用することにより感度が向上したことを報告している。そこで本検討において、移動相にメタノール系溶媒を使用した場合と通知の操作例で提示されたアセトニトリル系溶媒を使用した場合の感度を比較した。

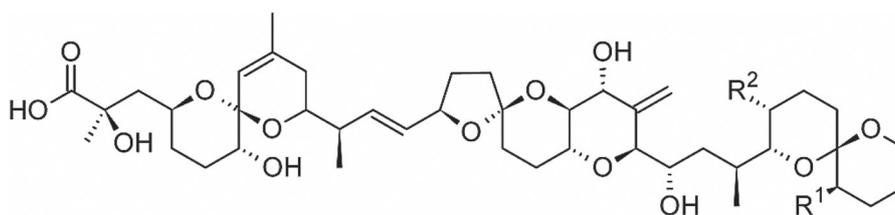
一方、前処理について、藤井ら<sup>5)</sup>や村上ら<sup>6)</sup>は操作例の固相抽出精製において使用されているオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムでは、本報で対象試料としているカキにおいて、夾雑成分の影響を受けて標準品添加回収率が通知の目標値の70-120%の範囲を逸脱するケースがあり、十分な精製が困難であると報告している。また、小池ら<sup>4)</sup>はホタテガイを試料とした分析において、ステレンジピニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム(Oasis PRiME HLB, Waters製、以下「HLBカラム」という)が、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムより夾雑成分の影響を除去する効果が高いと報告している。そこで、HLBカラムを使用して固相抽出精製を行うこととし、通液後のHLBカラムに残留した夾雑成分を目的物の溶出前に除去するための洗浄条件を検討した。さらに、これらの結果をもとに設定した方法により妥当性評価を実施したので報告する。

### 材料と方法

#### 1. 試料

試料は、京都府内産のマガキを用いた。全ての試料は、通

(令和2年1月8日受理)



オカダ酸 (OA) :  $R^1=H, R^2=CH_3$   
 ジノフィシストキシン-1 (DTX1) :  $R^1=CH_3, R^2=CH_3$   
 ジノフィシストキシン-2 (DTX2) :  $R^1=CH_3, R^2=H$

図 1. 下痢性貝毒の主要物質オカダ酸 (OA)、ジノフィシストキシン-1 (DTX1) 及びジノフィシストキシン-2 (DTX2) の構造式

表 1. 下痢性貝毒の主要成分測定のための高速液体クロマトグラフ - タンデム型質量分析計における測定条件

測定対象物質	定量イオン					確認イオン			
	プリカー サーイオン (m/z)	プロダクト イオン (m/z)	デクラスタ リング電圧 (V)	コリジョン 電圧 (V)	コリジョンエ ゲシット電圧 (V)	プロダクト イオン (m/z)	デクラスタ リング電圧 (V)	コリジョン 電圧 (V)	コリジョンエ ゲシット電圧 (V)
オカダ酸(OA)	803.3	254.9	-205	-60	-17	112.9	-205	-96	-9
ジノフィシストキシン-1(DTX1)	817.2	255.0	-145	-90	-7	112.8	-145	-94	-9
ジノフィシストキシン-2(DTX2)	803.3	254.9	-205	-60	-17	112.9	-205	-96	-9

知に従い、むき身を 200 g 以上採取し高速ホモジナイザーで均一化した。均一化した試料は、ポリエチレン製の袋に 1 回の試験に必要な量 (約 5-10 g) ずつ分包し、 $-30^{\circ}C$  にて冷凍保存した。

2. 試薬及び機器

試薬は、特に明記しない限り富士フィルム和光純薬製及び関東化学製 LC/MS 用または残留農薬・PCB 試験用を用いた。

塩酸及び水酸化ナトリウムは、富士フィルム和光純薬製特級を用いた。

OA 及び DTX1 の標準液は、産業技術総合研究所計量標準総合センター製認証標準物質 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を、DTX2 の標準液は、National Research Council of Canada 製認証標準物質 (3.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) をそれぞれ用いた。

高速液体クロマトグラフシステムは、Nexera X2 (オートサンプラー: SIL-30AC、ポンプ: LC-30AD、カラムオープン: CTO-20AC、デガッサー: DGU-20A5R、島津製作所製) を、タンデム型質量分析計は QTRAP4500 (AB Sciex 製) を用い、カラムは InertSustain C18 (100 mm  $\times$  3.0 mm, 5  $\mu\text{m}$ , ジーエルサイエンス製) を使用した。

3. 試験方法

LC-MS/MS による試料の測定において、試料注入量は 5  $\mu\text{L}$ 、流速は 0.2 mL/分、移動相 A に 0.1% (w/v) ギ酸水溶液、移動相 B にメタノールを使用した。グラジエント条件は、移動相 B を初期濃度 70% (v/v) とし、0.1 分から 20 分にかけて 70-98% (v/v) の濃度勾配を行い、98% (v/v) を 5 分間維持した後に初期濃度 70% (v/v) に戻す設定とした。LC カラム温度は  $40^{\circ}C$ 、測定時間は 35 分間とした。タンデム型質量分析計の測定条件及び定量に使用したイオンを表 1 及び表 2 に示す。

表 2. OA、DTX1、DTX2 測定のためのタンデム型質量分析計の測定条件

イオン化法	ESI negative
ターボガス温度	$300^{\circ}C$
ターボスプレー圧力	50 psi
測定モード	MRM (Multiple Reaction Monitoring)
ネブライザーガス圧力	80 psi
カーテンガス流量	30 mL/分
コリジョン反応ガス流量	9 mL/分
イオンスプレー電圧	-4500 V
エントランス電圧	-10 V

各化合物の定量は、OA、DTX1 及び DTX2 の標準液をメタノールで希釈した標準溶液のピーク面積値から作成した検量線を使用して算出した。

3-1. 移動相の検討

OA、DTX1 及び DTX2 それぞれの 1 ng/mL 標準液をタンデム型質量分析計に LC カラムを通さず直接導入し、ピーク強度を確認した。移動相 A は 0.1% (w/v) ギ酸水溶液、移動相 B にメタノールまたはアセトニトリルを使用した。移動相 B 濃度は、80% (v/v) とした。試料注入量は 5  $\mu\text{L}$ 、流速は 0.2 mL/分、測定時間は 1 分間とした。

3-2. 精製方法の検討

3-2-1. 固相抽出カラム洗浄条件の検討

40% (v/v) メタノール水溶液に溶解した各 2 ng/mL OA、DTX1 及び DTX2 溶液 1.5 mL を HLB カラム (以下、3 cc, 60 mg) に負荷し、次に 40% (v/v) メタノール水溶液 0.75 mL を 2 回添加し、流出液を廃棄した。さらに、5% (v/v) メタノール水溶液 1.5 mL 及び 40-90% (v/v) メタノール水溶液 1.5 mL にて洗浄後、溶出溶媒としてアセトニトリル-メタノール混液 (9:1, v/v) 1.5 mL を添加し、溶出液を回収した。

なお、この溶出溶媒組成は、カラムカートリッジメーカーのアプリケーションノート (<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005416ja.pdf>) においてリン脂質等の除去の効果が大きいとされる組成とした。得られた溶出液を窒素気流下で乾燥し、溶媒を完全に除去した後に残留物をメタノール 0.6 mL に溶解し、測定用溶液とした。

### 3-2-2. メタノール抽出、加水分解及びヘキサン洗浄

均質化した試料 2.00 g を秤量し、メタノール 9 mL を加え、10 分間振とうした後、遠心分離 (3000 rpm、室温、5 分間) し上清を採取した。沈殿に 90% (v/v) メタノール 9 mL を加え、1 分間振とうした後、遠心分離 (3000 rpm、室温、5 分間) し上清を採取した。得られた上清を合一し、これに 90% (v/v) メタノール水溶液を加えて 20 mL に定容した。このうち 2 mL を採取し、2.5 mol/L 水酸化ナトリウム 0.25 mL を加え、76°C で 40 分間加水分解した。放冷後、2.5 mol/L 塩酸 0.25 mL を加えて攪拌した。得られた液に、*n*-ヘキサン 2.5 mL を加えて 3 分間振とう後、遠心分離 (3000 rpm、室温、5 分間) し、*n*-ヘキサン層を除去する操作を 2 回繰り返した。

### 3-2-3. 固相抽出カラム洗浄等による夾雑成分除去効果の検討

前項で得られた液を水で 5 mL に定容し、そのうち 1.5 mL を HLB カラムに負荷して 3-2-1 項と同様の操作により測定用溶液 1 を作製した。ただし、HLB カラムの洗浄に使用するメタノール濃度は 5% (v/v) 及び 60% (v/v) とし、比較のため一部の検体については 40% (v/v) メタノール水溶液の添加及び 60% (v/v) メタノール水溶液による洗浄の、いずれかまたは両方を省略した。また、測定用溶液 1 を 0.1 mL 採取し窒素気流下にて乾燥させ、5 ng/mL 混合標準溶液 0.1 mL で再溶解したものを測定用溶液 2 とした。

測定用溶液の測定は、LC-MS/MS により行い、検量線濃度範囲は 0.1-20 ng/mL とした。

夾雑成分の除去効果は、標準品添加回収率として以下の式により算出した。

標準品添加回収率 (%) = { (測定用溶液 2 の定量値 - 測定用溶液 1 の定量値) / 添加した混合標準液の濃度 } × 100

### 3-3. 妥当性評価

通知に定義されたトレース試料を使用し、OA、DTX1 及び DTX2 を試料中 0.05 mg/kg 相当量としてそれぞれ添加した後 30 分間以上静置したものを妥当性評価試験に供した。すなわち、3-2-2 で得られた液に水 2.5 mL を加えて HLB カラム (以下、6 cc, 200 mg) に負荷し、さらに 40% (v/v) メタノール水溶液 2.5 mL で 2 回洗い込みながら HLB カラムに負荷した。負荷後の HLB カラムは、5% (v/v) メタノール水溶液 5 mL 及び 60% (v/v) メタノール水溶液 5 mL にて洗浄後、溶出溶媒としてアセトニトリル-メタノール混液 (9:1, v/v) 5 mL を添加し、溶出液を回収し、40°C で減圧濃縮及び窒素気流下で乾燥させ、溶媒を完全に除去した。残留物はメタノール 2 mL に溶解して測定用溶液とした。測定用溶液の測

定は LC-MS/MS により行い、検量線濃度範囲は 0.1-20 ng/mL とした。測定を 2 併行 5 日間実施し、通知に従い分析の妥当性 (選択性、真度、及び精度) について評価した。

## 結果

### 1. 高速液体クロマトグラフィーにおける移動相の検討

移動相に使用する溶媒を検討するため、OA、DTX1 及び DTX2 のタンデム型質量分析計におけるピーク強度をメタノール系移動相と通知の操作例に記載のアセトニトリル系移動相と比較した。結果を図 2 に示す。メタノール系移動相のピーク強度は、アセトニトリル系移動相に対して OA、DTX1 及び DTX2 でそれぞれ約 7 倍、4 倍、5 倍となり、高感度であった。この結果から、測定に使用する移動相はメタノール系移動相とした。

### 2. 固相抽出カラムの洗浄条件の検討

#### 2-1. 固相抽出カラム洗浄液におけるメタノール濃度の検討

試料液負荷後の HLB カラムの洗浄液として使用するメタノール水溶液の最適濃度を検討するため、標準液を負荷した HLB カラムを濃度の異なるメタノール水溶液で洗浄し、OA、DTX1 及び DTX2 の回収率を調べた。結果を図 3 に示す。洗浄液のメタノール濃度 40-60% (v/v) においては OA、DTX1 及び DTX2 の回収率がいずれも 90% 以上であったが、洗浄液のメタノール濃度 70% (v/v) 以上では回収率が低下し、メタノール濃度 90% (v/v) 以上ではほとんど回収できなかった。この結果から、以降の HLB カラム洗浄液のメタノール濃度を 60% (v/v) とした。

#### 2-2. 試料洗い込み及び HLB カラム洗浄効果の確認

試料を HLB カラムで精製する際の HLB カラムへの試料洗い込み操作を 40% (v/v) メタノール水溶液 2.5 mL × 2 回による HLB カラム洗浄を兼ねて実施し、この操作が測定精度の向上に寄与する効果を調べた。同様に、60% (v/v) メタノール水溶液洗浄による HLB カラム洗浄操作による効果も調べた。各操作による効果の評価は、マガキ試料を用いた標準品添加回収試験により行った。表 3 に結果を示す。40% (v/v) メタノール水溶液による洗い込みを行った場合には、行わない場合と比較して OA、DTX、DTX2 でそれぞれ標準品添加量に対して測定値が 6.5、1.6、7.4% 増加した。さらに 60% (v/v) メタノール水溶液による洗浄により DTX1 の測定値が 3.0% 増加した。

### 3. 試料における妥当性評価

構築した分析法について、試料における添加回収試験を実施し、その妥当性評価を実施した。通知に示されている妥当性評価の基準では、選択性は妨害ピーク面積が規制値ピーク面積の 1/10 を超えないこと、真度は 70-120% の範囲内であること、併行精度は 15% 以下であること、室内精度は 20% 以下であることとされている。表 4 に示すようにこの分析法は、OA、DTX1 及び DTX2 の全てについて通知に示された条

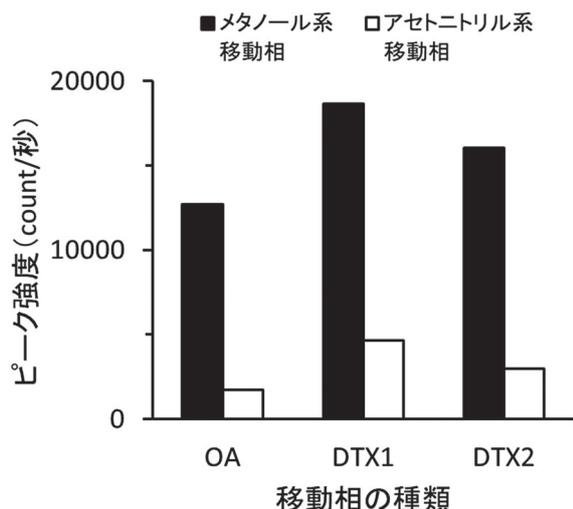


図2. メタノール系移動相及びアセトニトリル系移動相における測定対象物質 (OA, DTX, DTX2) のピーク強度

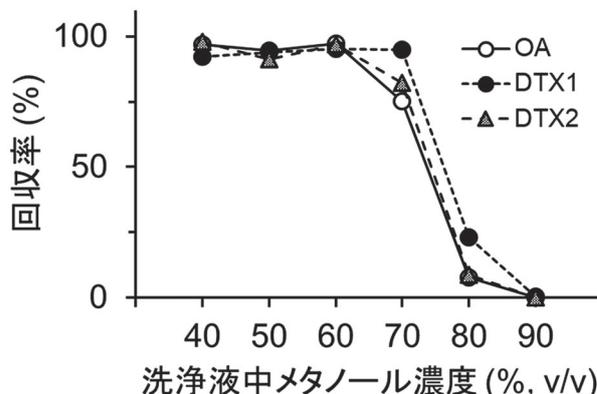


図3. OA, DTX, DTX2 の回収率に対する HLB カラム洗浄液中メタノール濃度の影響

表3. OA, DTX1, DTX2 の固相抽出過程において、40%メタノールによる洗い込み及び60%メタノールによる洗浄操作の有無が標準品添加回収率に与える影響

測定対象物質	標準品添加回収率 (%)		
	洗い込みなし	洗い込みあり	洗い込みあり+洗浄
OA	74.3	80.8	80.1
DTX1	83.7	85.3	88.3
DTX2	73.6	81.0	80.6

表4. マガキにおける OA, DTX1, DTX2 の測定方法に関する妥当性評価の結果

測定対象	定量イオン			確認イオン		
	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
OA	78.9	6.2	7.0	81.5	12.7	15.4
DTX1	77.7	7.3	19.4	82.1	11.5	19.9
DTX2	83.1	3.6	8.8	81.6	9.2	10.7

件を満たした。

### 考察

LC-MS/MS の移動相について、OA、DTX1 及び DTX2 の感度は通知の操作例で使用されているアセトニトリル系移動相よりもメタノール系移動相の方が4倍から7倍程度高いことがわかった。メタノールはプロトン性溶媒であるのに対して、アセトニトリルは非プロトン性溶媒である。一方、酸性化合物から脱プロトン化により生じた陰イオンはメタノールの方がアセトニトリルよりも強く溶媒和され安定化する。Henriksen ら<sup>8)</sup> は、酸性化合物のネガティブ条件エレクトロスプレーイオン化法において本検討の結果と同様に

感度が異なる事例を報告しており、メタノールが脱プロトン状態となって生じる陰イオンを強く溶媒和し、安定化させるためであると推測している。OA、DTX1 及び DTX2 も酸性化合物であることから、同じ理由によりメタノール系移動相において感度が向上したと考えられた。

HLB カラムの洗浄条件の検討においては、洗浄液のメタノール濃度 40-60% (v/v) においては OA、DTX1 及び DTX2 の回収率が 90% 以上で顕著な差は認められなかったことから、洗浄液濃度はこの濃度範囲では最も疎水性が高く、夾雑成分の洗浄力が高いと考えられる 60% (v/v) を採用した。

本検討の結果から、固相抽出に HLB カラムを使用して試料負荷後の HLB カラム洗浄に 60% (v/v) メタノール水溶液を使用し、LC-MS/MS の移動相にメタノール系溶媒を使用す

ることにより高感度で真度の高い測定を行えることがわかった。確立した試験法について妥当性評価を行った結果、全ての項目において通知における条件を満たし、本報において確立した試験法が行政検査に適應できることが確認できた。

## 引用文献

- 1) Yasumoto T., Oshima Y., Yamaguchi M.. 1978. Occurrence of a New Type of Shellfish Poisoning in the Tohoku District. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 44, 1249-1255.
- 2) Hamano Y., Kinoshita Y., Yasumoto T.. 1986. Enteropathogenicity of diarrhetic shellfish toxins in intestinal models. *Food Hygiene and Safety Science*, 27, 375-379.
- 3) European Food Safety Authority. 2008. Marine biotoxins in shellfish - okadaic acid and analogues - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. *EFSA Journal*, 589, 1-62.
- 4) 小池敬信, 北弘美, 笹川さゆ理. 2015. LC/MS/MSによる下痢性貝毒分析の検討. *新潟市衛生環境研究所年報*, 40, 30-32.
- 5) 藤井良昭, 橋本諭, 加賀岳朗, 上野健一, 高橋哲夫, 田沢悌二郎, 林玲子, 西村一彦. 2015. LC-MS/MSによる二枚貝中の下痢性貝毒オカダ酸群分析法の検討. *北海道立衛生研究所報*, 65, 45-48.
- 6) 村上紀子, 佐々木珠生, 小中ゆかり, 松室信宏, 福田裕. 2016. 機器分析法による下痢性貝毒の試験法の検討. *広島市衛生研究所年報*, 35, 45-47.
- 7) 佐藤智子, 千葉美子, 佐藤由紀, 高橋剛. 2017. LC-MS/MSによる下痢性貝毒(オカダ酸群)分析法の検討. *宮城県保健環境センター年報*, 35, 55-57
- 8) Henriksen T., Juhler R.K., Svensmark B., Cech N.B.. 2005. The relative influences of acidity and polarity on responsiveness of small organic molecules to analysis with negative ion electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 16, 446-455.