

LC/MS/MSを用いた下痢性貝毒分析の検討

佐藤真由美

要旨

平成 27 年 3 月 6 日付食安発 0306 第 1 号通知により、下痢性貝毒分析に機器分析法が導入された。これにより、オカダ酸（以下 OA）、ジノフィシストキシン-1（以下 DTX-1）、ジノフィシストキシン-2（以下 DTX-2）及びそれらのエステル化合物において、OA 当量に換算された総和として規制値が定められた。また、食安基発 0306 第 3 号食安監発 0306 第 1 号通知において、妥当性確認方法と操作例が示された。この方法を用いてハマグリ¹⁾の妥当性評価を実施し、OA、DTX-1 及び DTX-2 において真度及び精度が目的値に適合していることを確認した。

キーワード：下痢性貝毒、妥当性評価、LC/MS/MS

はじめに

ハマグリをはじめとする二枚貝は、有毒プランクトンを摂取することにより体内に毒を蓄積していくことが知られている¹⁾。昭和 55 年 7 月にマウス毒性試験法を公定法²⁾とし、可食部 1g あたり 0.05MU の規制値が制定された。

しかし、試験結果にマウス系統間のバラツキが寄与する、毒性成分を区別して定量ができないなどの問題があり、国際的に毒性成分を区別可能な機器分析法の導入がすすめられた。平成 27 年 3 月 6 日付食安発 0306 第 1 号通知³⁾(以下通知法という)に基づき平成 27 年 4 月 1 日より日本でも下痢性貝毒については、機器分析法が導入され、OA、DTX-1 及び DTX-2 に対して、0.16mgOA 当量/kg の規制値が定められた。

そこで、通知法³⁾を用いてハマグリ¹⁾の妥当性評価を実施した結果について報告する。

方法

1 試料

県内で販売されているハマグリを購入し、そのむき身（全量）を試料とした。

2 試験方法

通知法³⁾に準じ、均一化した試料 2.0g を量りとり、メタノール 9ml を加え、3 分間攪拌後 3000rpm で 10 分間遠心分離を行い、上澄み液を採取した。残渣に 90%メタノール 9ml を加え同様の抽出作業を行い、先の上澄みに合わせ 90%メタノールで 20ml に定容した。この溶液 2ml に 2.5mol/L 水酸化ナトリウム溶液 0.25ml を加え、76°C で 40 分加水分解を行う。放冷後、2.5mol/L 塩酸 0.25ml を加え攪拌し中和する。中和後の液に n-ヘキサン 2.5ml を加え振りませた後、n-ヘキサン層を除去する操作を 2 回繰り返す。メタノール層に水 2.5ml を加えて攪拌し、この液を固相カラムに注入し、容器を 40%メタノール 2ml で 2 回洗いこみし、この液も固相カラムに注入し、流出液は捨てる。固相カラムに水 3ml、40%メタノール 3ml を順次注入し、各流出液は捨てる。次に 90%メタノール 3ml を注入し、抽出液をナスフラスコにとりエバポレータを用いて 40°C で濃縮し、溶媒を完全に除去する。この残留物をメタノールを用いて 2ml に定容した。

表1 機器条件

カラム	Waters CSH C18 2.1×50mm 粒子径1.7 μm				
カラム温度	30°C				
注入量	5 μL				
移動相A	2 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				
グラジエント条件	Time(min)	0	7	9	11
	Flow(ml/min)	0.2	0.2	0.4	0.2
	A(%)	71.5	5	71.5	71.5
	B(%)	28.5	95	28.5	28.5
イオン化法	ESIネガティブ				
測定モード	MRM				

表2 分析条件

成分名	プリカサイオン (m/z)	コーン電圧 (V)	定量イオン		定性イオン	
			プロダクトイオン	コリジョン電圧	プロダクトイオン	コリジョン電圧
OA, DTX2	803	98	255	50	113	62
DTX1	817	96	225	56	113	68

3 標準品・試薬

OA 及び DTX1 の標準品には、産業技術総合研究所計量標準総合センター製を DTX2 は National Research Council Canada 製を使用した。これらの標準原液をメタノールで適宜希釈して混合標準液とした。

精製用のオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムには waters 製 Oasis®HLB6cc200mg を使用した。

試料調整及び標準溶液調整にはメタノール(LC/MS 用), n-ヘキサン(残留農薬分析用)を使用した。移動相にアセトニトリル(LC/MS 用), 超純水(LC/MS 用), ギ酸(LC/MS 用), ギ酸アンモニウム(特級)を用いて調整した。

4 装置及び測定条件

測定条件は小池ら⁵⁾の方法を参考とした。

測定装置

LC 部 Waters ACQUITY UPLC I-Class

MS 部 Waters XevoTQD

装置条件は表1のとおり、また測定条件は表2のとおりとした。

5 妥当性

通知法⁴⁾のとおり、加水分解前の90%メタノール溶液抽出液に各成分が0.05mg/kgとなるように試料に標準品を添加し、分析者1名が1日2併行、5日間実施した妥当性確認を行った。

結果と考察

通知法に基づき妥当性評価を実施したところ OA の真度が49%と目標値を大きく下回っていた。

この原因として、1. 試料のマトリックス成分が多く、固相カラムでは完全に除去できずマトリックス効果により目的成分の測定値が小さくなった、2. 固相カラムを用いて前処理した際に、カラムからの目的成分の溶出が不十分だった、の2つが考えられた。前者が原因の場合は、使用する固相カラムの充填量や素材の見直しが必要となり、後者の場合は溶出量を増やすことで対応できる。そこで、固相カラムの適応性を見るために、試料にマトリックス効果があらわれているかの確認を行った。

90%メタノールで20mlに定容した試料溶液から2ml分取し、水酸化ナトリウム溶液で加水

分解後、塩酸で中和した試料を希釈し測定を行った。その結果、各成分の真度は80%~90%となった。加水分解後の試料においてマトリックスの影響が大きくないこと、つまり今回使用した固相カラムでも夾雑物が十分に取り除かれていることが示唆された。

次に固相カラムへの成分の残留を確認するために、溶出液3mlから4mlに増やし測定を行ったところ、すべての成分で真度は80%~110%と改善した。このことから真度が目標値を下回った理由は、固相カラムからの溶出不足であることがわかった。よって今回の妥当性確認の前処理方法は、図1のとおり溶出液を4mlとし、この方法を用いた結果は以下のとおりである。

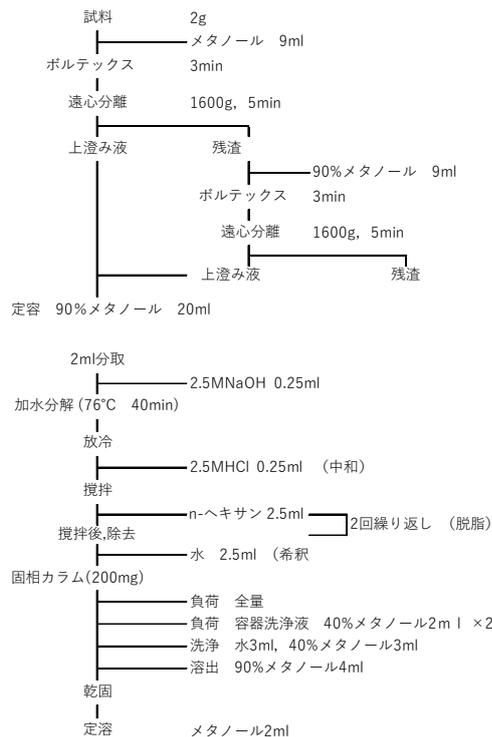


図1 前処理フローチャート

(1) 選択性

ハマグリを空白試料を分析法に従って分

析した。各成分の定量を妨害するピークがないことを確認した。

(2) 真度

ハマグリにおける OA、DTX1 及び DTX2 を分析得られた定量値は、表3のとおり94%~101%となり、全ての成分で通知法に示された真度を満たした。

(3) 精度

併行精度及び室内精度については、OA が5.9%, 11.3%, DTX1 が7.3%, 13.8%, DTX2 において8.5%、13.9%となり各目標値を満たした。

ハマグリでの妥当性確認の結果は表3のとおり、すべての項目で目標値を満たしていた。

表3 妥当性確認試験結果

	真度(%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
OA	97	5.9	11.3
DTX1	101	7.3	13.8
DTX2	94	8.5	13.9
目標値	70~120	≤15	≤20

しかし、貝の種類や採取時期によってマトリックスに差がある可能性がある。そのため、マトリックスの多い試料の際は今回の前処理方法では十分に精製できない可能性がある。今後はハマグリ以外の妥当性評価を行うとともに、十分に精製できない場合の精製方法の改良や測定条件の検討を続けていく。

文 献

1) 鈴木敏之・神山孝史・大島泰克(2017)『貝毒—新たな貝毒リスク管理措置ガイドラインと

その導入に向けた研究一』(水産学シリーズ
187)恒星社厚生閣

2) 昭和 55 年 7 月 1 日付け環乳第 29 号 厚生
省環境衛生局乳肉衛生課長通知 「麻痺性貝毒
等により毒化した貝類の取り扱いについて」

3) 平成 27 年 3 月 6 日付け 食安発 0306 第 1
号 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知
「麻痺性貝毒等により毒化した貝類の取り扱
いについて」

4) 平成 27 年 3 月 6 日付け 食安基発 0306 第 3
号, 食安監発 0306 第 1 号 厚生労働省医薬食
品局食品安全部基準審査課長, 厚生労働省医薬食
品局食品安全部監視安全課長通知 「下痢性
貝毒(オカダ酸群)の検査について」

5) 小池 敬信, 北 弘美, 笹川 さゆ理 :
「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(2017)