

〔報 文〕

下痢性貝毒の分析法の妥当性評価

石川県保健環境センター 健康・食品安全科学部

竹田 正美・萩原 明香・石本 聖
水口 竜人

〔和文要旨〕

下痢性貝毒検査は、平成27年3月6日付け通知により、機器分析法が導入された。そこで、真ガキを試料とし、下痢性貝毒の分析方法の検討をおこなった。精製に用いるカラムについて、Inert-Sep C18 500mgとOasis PRiME HLB 200mgを比較したところ、HLBカラムの方が精製効果が高く、LC-MSによるイオン化促進効果が低減された。HLBカラムを用いた分析法で、真ガキの妥当性評価試験を実施したところ、LC-MS、LC-MS/MSのいずれの測定機器においても、通知で示された妥当性確認の目標値を満たしていた。

キーワード：下痢性貝毒、妥当性評価

1 はじめに

下痢性貝毒の分析については、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の取扱いについて」¹⁾により、これまでのマウス試験法に代わり機器分析法が導入され、オカダ酸（以下「OA」という。）、ジノフィシストキシン-1（以下「DTX1」という。）およびジノフィシストキシン-2（以下「DTX2」という。）並びにそれらのエステル化合物に対して規制値が定められた。しかし、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「下痢貝毒（オカダ酸群）の検査について」²⁾に分析操作例（以下「通知法」という。）は示されているが、検査法については各検査機関で妥当性の確認を行うこととされた。

本県では、天然岩ガキの採取と、岩ガキ及び真ガキの養殖が行われており、食用二枚貝の安全性確保の観点から、下痢性貝毒の機器分析への対応が求められた。

しかし、通知法に示された精製方法では、岩ガキで夾雑物が多いため精製カラムの担体量が不足し保持が不十分となり真度が妥当性評価の目標値を下回ったという報告³⁾や、LC-MS/MSの測定においてカキで強いイオン化促進を示し、マトリックス添加標準溶液を用いて検量

線を作成する必要があるとの報告^{3),4)}がある。

そこで、今回真ガキについて抽出液の精製方法の検討を行い、改良した分析法により下痢性貝毒の妥当性評価を実施したので、その結果を報告する。

2 材料と方法

2.1 試料

市内に流通する県内産養殖真ガキのむき身を用いた。むき身全体を均質化し試料とした。

2.2 試薬等

標準品にはNational Research Council Canada製の認証標準品のOA、DTX1、DTX2を用いた。

各認証標準品を混合しメタノールで希釈し、1 μ g/mLの混合標準原液及び添加用溶液を調製した。この混合標準溶液を、メタノールで適宜希釈し検量線用標準溶液とした。

試薬には、関東化学(株)製の残留農薬・PCB試験用アセトニトリル、メタノール、n-ヘキサン、Fluka社製のLC/MS用アセトニトリル、和光純薬工業(株)製のメタノール、LC/MS用ギ酸、特級ギ酸アンモニウム、容量分析用5mol/L水酸化ナトリウム及び5mol/L塩酸を使用した。精製水は超純水（Milli-Q水）を使用した。

Validation Study for Analytical Method of Diarrhetic Shellfish Poison. by TAKEDA Masami and HAGIHARA Sayaka and ISHIMOTO Takashi and MIZUGUCHI Tatsuhito (Health and Food Safety Department, Ishikawa Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science)

Key words : Diarrhetic shellfish poison, Validation study

精製用カラムは、ジーエルサイエンス社製 Inert-Sep C18 500mg (以下「ODSカラム」という。)及び Waters 社製 Oasis PRiME HLB 200mg (以下「HLBカラム」という。)を用いた。

メンブレンフィルターは、Sartorius 社製の Minisart RC4 0.2 μ m を用いた。

2・3 装置及び測定条件

装置及び測定条件は表 1 のとおりとした。

表 1 LC-MS 及び LC-MS/MS の測定条件

	LC-MS	LC-MS/MS
高速液体クロマトグラフ		
機器	Agilent 1100	Agilent 1260
カラム	Poroshell 120 EC-C18 (2.1mm ϕ × 100mm, 粒子径 2.7 μ m)	
カラム温度	40°C	
移動相	A 液 2mM ギ酸アンモニウム + 50mM ギ酸含有水溶液 B 液 アセトニトリル A-B グラジエント分析 B : 50% (0-2分) → 90% (20-25分) → 50% (25.01-40分)	
流速	0.2mL/min	
注入量	10 μ L	3 μ L
質量分析装置		
機器	Agilent 1100 Series LC/MSD	Agilent 6460 Triple Quad LC/MSD
イオン化モード	ESI ネガティブ	ESI(AJS) ネガティブ
ドライガス温度	300°C	350°C
ドライガス流量 (N ₂)	10L/min	10L/min
Neblizer 圧力 (N ₂)	40psi	50psi
キャピラリー電圧	-3,500V	-4,500V
フラグメンター電圧	300V	200V
Seath Gas 温度	-	300°C
Seath Gas 流量	-	12L/min
測定イオン	OA, DTX2 DTX1	803 (定量), 804 (確認) 803.5 → 255.1 (定量), 803.5 → 113.1 (確認) 817 (定量), 818 (確認) 817.5 → 255.1 (定量), 817.5 → 113.1 (確認)

2・4 試験溶液の調製

試験溶液の調製は、通知法のカラム精製方法を変更した方法で行った。図 1 及び表 2 に試験溶液の調製方法を示した。

表 2 精製カラム別の精製方法

	通知法 (オクタデルシルル化 シリカゲルミニカラム 200mg)	ODSカラム (500mg)	HLBカラム
コンディショニング	①メタノール 10mL ②水 10mL	①メタノール 10mL ②水 10mL	なし
試料負荷		試料溶液 5mL	
洗浄	①水 3mL ②40%メタノール 3mL	①水 4mL ②40%メタノール 4mL	5%メタノール 5mL
溶出	90%メタノール 3mL	90%メタノール 5mL	アセトニトリル/メタノール (4:1) 5mL

2・5 妥当性評価方法

通知²⁾の「妥当性確認の方法」に従い実施した。

ブランク試料 2.00g に、混合標準原液 1 μ g/mL を 0.1mL 添加 (試料中換算濃度 0.05mg/kg) した。分析者 2 名が 1 日 2 併行試験を 3 日間実施する枝分かれ実験計画により行った。

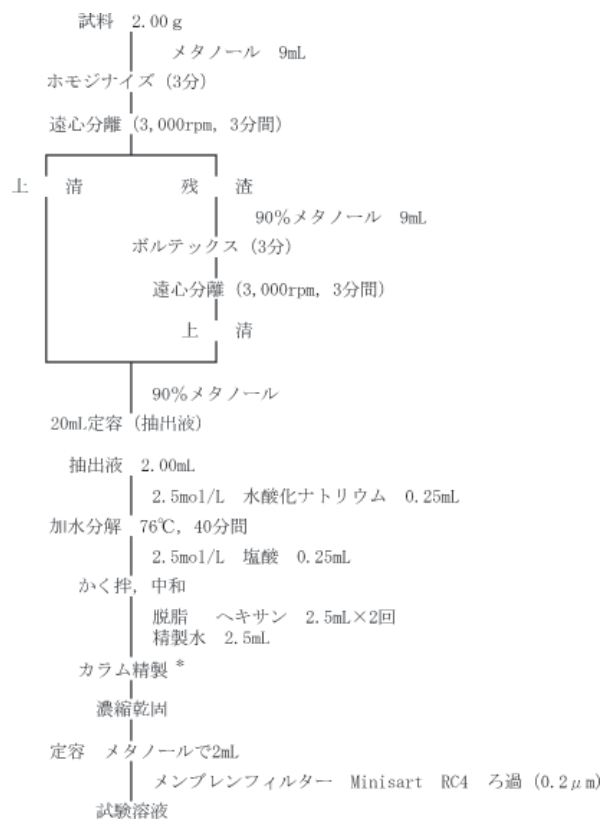


図 1 試験溶液の調整方法

*カラム別の精製方法は表 2 に記載

3 結果及び考察

3・1 分析条件の検討

LC の測定条件は、移動相には、測定感度と標準溶液のピークの分離が良好であった通知法のギ酸アンモニウム及びギ酸含有水溶液とアセトニトリルを採用した (表 1)。また、分離カラムにはピークの分離が良好であった Poroshell 120 EC-C18 (2.1mm ϕ × 100mm, 粒子径 2.7 μ m) を採用した (表 1)。

1ng/mL 標準溶液のクロマトグラムを図 2 に示した。注入量は LC-MS で 10 μ L, LC-MS/MS で 3 μ L とした。その結果、LC-MS においても、1ng/mL (定量限界 0.01mg/

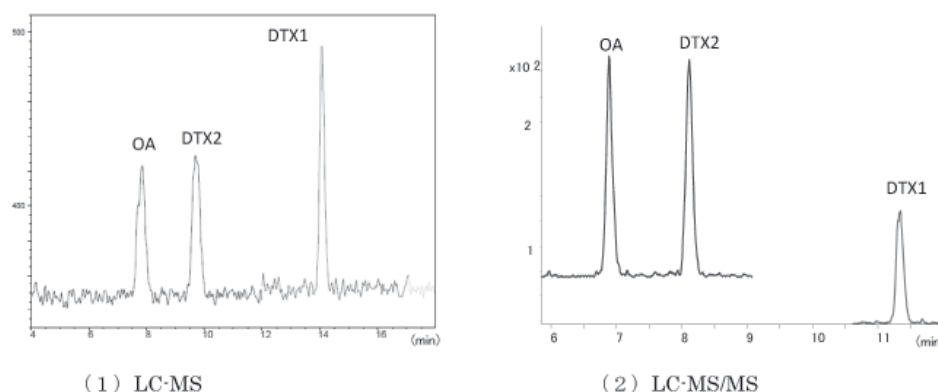


図 2 1ng/mL 標準溶液のクロマトグラム

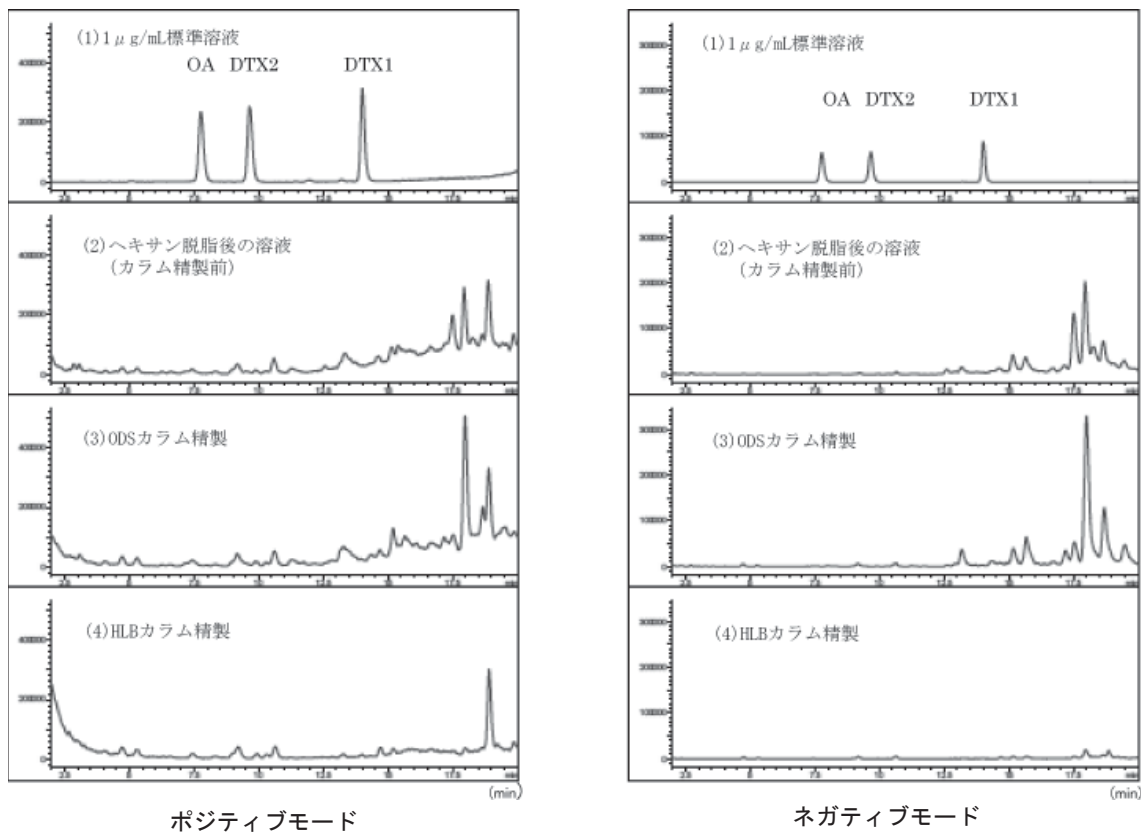


図3 ブランク試料溶液をLC-MS (Scan) で測定したクロマトグラム

kg相当)の標準溶液でS/N ≥ 10であった。

通知法では、LC-MS/MSで測定することになっているが、LC-MSにおいても、定量限界の1ng/mLの測定が可能であったため、精製法の検討はLC-MSで測定を行い、妥当性評価はLC-MSとLC-MS/MSの両方で測定を行うこととした。

3・2 精製方法の検討

通知法に示された200mgのODSカラムでは試料によって保持容量が不足するとの報告³⁾があり、担体量の多い500mgのODSカラムと、マトリックスであるリン脂質等の除去効果があり、LC-MS/MS測定でイオン化促進効果が低減されたとの報告⁵⁾があったHLBカラムについて検討を行った。

各カラムで精製したブランク試料溶液を、LC-MS (SIM) 測定したところ、OA、DTX1、DTX2の定量を妨害するピークは認められなかった。

精製効果を比較するため、LC-MS (Scan) のポジティブ及びネガティブモードで測定した、ブランク試料溶液のクロマトグラムを図3に示した。ODSカラムではHLBカラムに比較し夾雑物が多く、特にDTX1のピーク近辺にピークが認められた。

ブランク試料抽出液2.00mLに、混合標準原液1μg/mLを0.01mL添加(試料中換算濃度0.05mg/kg)し、各カラムで添加回収試験(n = 3)を行った結果を表3

表3 精製カラムによる回収率の比較

	ODSカラム		HLBカラム	
	回収率 (%)	標準偏差 (RSD%)	回収率 (%)	標準偏差 (RSD%)
OA	106.8	1.4	97.0	2.2
DTX1	134.0	17.4	96.5	7.8
DTX2	105.1	12.2	92.0	3.1

(n = 3)

に示した。ODSカラムでは全てで回収率が100%を超え、DTX1は回収率が134.0%と妥当性確認の目標値(70~120%)を超えていたが、HLBカラムでは回収率が92.0~97.0%と全て目標値を達成していた。

ODSカラムで回収率が高かった原因として、カキでイオン化促進効果があるとの報告^{3),4),5)}があり、試料中のマトリックスの影響によるものと推測された。

そこで、マトリックスの影響を確認するため、ブランク試料溶液に標準溶液を5ng/mLになるように添加したマトリックス添加標準溶液を測定し、5ng/mLの標準溶液のピーク面積と比較した(図4)。ODSカラムではOAが101.1%、DTX1が127.4%、DTX2が104.1%で、マトリックスによるイオン化促進効果が認められた。HLBカラムではOAが100.5%、DTX1が104.2%、DTX2が95.2%でイオン化促進が低減されていた。

この結果から、夾雑物の除去効果が高く、マトリックス

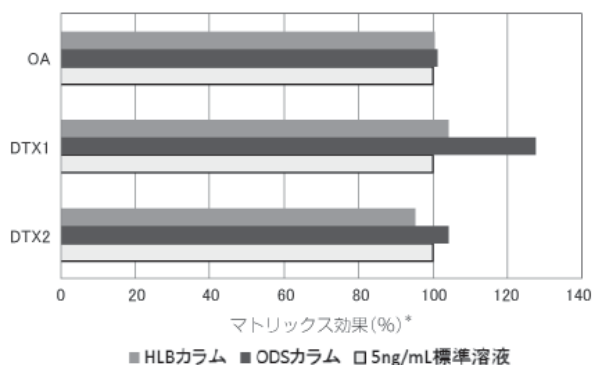


図 4 精製カラムによるマトリックスの影響

*マトリックス効果 (%) は、5ng/mL の標準溶液のピーク面積を 100% とし、マトリックス添加標準溶液 (5ng/mL) のピーク面積の比率で示した。

スによるイオン化促進効果の少ない HLB カラムを用いた精製方法を採用することにした。

3.3 妥当性評価結果

HLB カラムを用いた分析法で実施した、真ガキの妥当性評価試験の結果を表 4 に示した。

表 4 妥当性評価結果

		真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
LC-MS	OA	98.8	5.9	6.2
	DTX1	108.3	5.2	5.1
	DTX2	112.3	5.6	4.6
LC-MS/MS	OA	101.1	5.5	5.4
	DTX1	107.2	5.2	5.1
	DTX2	107.0	5.9	4.8
	目標値	70~120	≤ 15	≤ 20

LC-MS と LC-MS/MS のいずれの測定においても、DTX1、DTX2 の真度は 100% を超えイオン化促進効果が認められたが、妥当性確認の目標値 (70~120%) は満たしていた。この結果、マトリックス添加標準溶液を用いる必要はなく、標準溶液による検量線での測定が可能であった。

しかし、二枚貝は産地や採取時期により試料中の夾雑

物が異なることから、今後妥当性が確認できた方法で下痢性貝毒の検査を実施し、カキの採取海域によるマトリックスの影響について把握していく必要があると考えている。

4 まとめ

- (1) 下痢性貝毒 (OA, DTX1, DTX2) の分析方法について検討を行った。精製に用いるカラムについて比較したところ、HLB カラムは ODS カラムに比べマトリックスによるイオン化促進効果が低減され、絶対検量線での測定が可能であった。
- (2) HLB カラムを用いた分析法で、カキの妥当性評価試験を実施したところ、LC-MS と LC-MS/MS の測定において、通知で示された妥当性確認の目標値を満たしていた。

文 献

- 1) 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：麻痺性貝毒等により毒化した貝類の取扱いについて、平成 27 年 3 月 6 日
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長、監視安全課長通知食安基発 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、平成 27 年 3 月 6 日
- 3) 原田利栄, 萩野真由美, 林千恵子, 中村和宏, 本郷猛, 印南佳織, 渡邊さやか, 鶴岡則子: 下痢性貝毒 (オカダ酸群) の分析法の検討と妥当性評価, 第 53 回全国衛生化学技術協議会年会講演集, 120-121 (2016)
- 4) 藤井良昭, 橋本諭, 加賀岳朗, 上野健一, 高橋哲夫, 田沢梯二郎, 林玲子, 西村一彦: 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 (2015)
- 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 (2016)