

## LC-MS/MS を用いた下痢性貝毒（オカダ酸群）の分析法の検討

原田 利栄, 渡邊 さやか, 羽生 琢真, 鶴岡 則子

Study on Analytical Method of Diarrhetic Shellfish Poisons, Okadaic Acid Analogues, by LC-MS/MS

Rie HARADA, Sayaka WATANABE, Takuma HANYU and Noriko TSURUOKA

キーワード：下痢性貝毒、オカダ酸、ジノフィシストキシン、妥当性評価

Keywords : diarrhetic shellfish poison, okadaic acid, dinophysistoxin, validation study

(平成 30 年 6 月 5 日受付 平成 30 年 6 月 14 日受理)

### はじめに

下痢性貝毒による食中毒は、有毒プランクトンを捕食することで毒化した二枚貝等を喫食することで発生し、主な中毒症状は下痢、吐気、腹痛などの消化器症状である<sup>1)</sup>。

下痢性貝毒の検査は、平成 27 年 3 月 6 日付け食安発 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」により、これまでのマウスを用いた検査法<sup>2)</sup>に代わり、機器分析法が導入されることとなり、平成 27 年 3 月 6 日付け食安基発第 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、通知とする。)により、機器分析による検査法が例示された。機器分析法での検査を実施するためには、検査を実施する貝について、分析法が通知の性能基準を満たすことを各検査機関で確認する必要があり、既にいくつかの二枚貝については妥当性評価結果が報告<sup>3)</sup>されている。

千葉県では、岩ガキなどの二枚貝類を特産品として生産していることから、これら貝類の安全性を確認するため、マウスを用いた検査法を実施してきた。今回、機器分析法への移行を目的とし、分析法の検討と妥当性評価を行ったので報告する。

### 実験方法

#### 1. 試料

市販流通品の岩ガキ、アサリ及びホンビノスを用いた。通知に従って貝を開殻し、むき身を調製した。むき身はフードプロセッサーで均質化し、試料とした。

#### 2. 試薬等

認証標準物質：オカダ酸（以下、OA とする。）、ジノフィシストキシン-1（以下、DTX-1 とする。）及びジノフィシストキシン-2（以下、DTX-2 とする。）

は National Research Council Canada 製を用いた。

試薬等：アセトニトリル、メタノール、超純水及

びギ酸は和光純薬工業(株)製の LC/MS 用を用いた。1 mol/L ギ酸アンモニウムは和光純薬工業(株)製 HPLC 用を用いた。n-ヘキサンは和光純薬工業(株)製試薬特級を用いた。5 mol/L 塩酸及び 5 mol/L 水酸化ナトリウムは和光純薬工業(株)製容量分析用を用いた。固相抽出カラムはアジレント・テクノロジー(株)製 Bond Elut C18 6 cc 500 mg を用いた。メンブランフィルターにはアドバンテック東洋(株)製 DISMIC13HP020AN を用いた。

#### 3. 装置

フードプロセッサーはコンエアージャパン(同)製クイジナートを用いた。ホモジナイザーは Janke&kunkel GmbH&Co.KG 製 ULTRA TURRAX T25 を用いた。遠心分離機はクボタ(株)製ユニバーサル冷却遠心機 5922 を用いた。ドライサーモバスは AGC テクノグラス(株)製 THERMO ALMI BATH ALB-221 を用いた。LC-MS/MS は日本ウォーターズ(株)製 ACQUITY UPLC H-Class-Xevo TQ-S micro を用いた。

#### 4. LC-MS/MS 測定条件

##### 1) HPLC 条件

Table 1 流速及びグラジエント条件

時間 (min)	流速 (mL/min)	A(%)	B(%)	C(%)
0	0.2	80	20	0
5	0.2	5	95	0
6.5	0.2	5	95	0
6.6	0.4	0	0	100
8.5	0.4	0	0	100
8.6	0.4	80	20	0
11.4	0.2	80	20	0
11.5	0.2	80	20	0

分析カラム：日本ウォーターズ(株)製 ACQUITY UPLC BEH C18(2.1 mm i.d.×50 mm,1.7 μm)、カラム温度：30 °C、注入量：5 μL、移動相：A液：水(1 mM ギ酸アンモニウム及び25 mM ギ酸含有)、B液：アセトニトリル、C液：メタノール、流速及びグラジエント条件は Table 1 に示した。

## 2) MS/MS 条件

イオン化モード：ESI(-)、測定モード：MRM、キャピラリー電圧：-2.7 kV、ソース温度：120 °C、脱溶媒ガス温度：550 °C、脱溶媒ガス流量：1100 L/h、コーンガス流量：50 L/h、物質ごとの測定条件は Table 2 に示した。

## 5. 試験溶液の調製

均質化した試料 2.00 g を 50 mL のポリプロピレン製遠沈管に採取し、メタノール 9 mL を加えて 1 分間ホモジナイズした。室温、3000×g で 10 分間遠心分離を行い、上清を採取した。沈殿に 90 %メタノールを 9 mL 加えて 1 分間ホモジナイズした。室温、3000×g で 10 分間遠心分離を行い、上清を採取した。合わせた上清を 90 %メタノールで正確に 20 mL とし、これを抽出液とした。抽出液 2 mL を 15 mL ポリプロピレン製遠沈管に正確に量りとり、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 を加えて中和した。この液に、n-ヘキサン 2.5 mL を加えて振り混ぜた後、n-ヘキサンを除去する操作を 2 回繰り返した。メタノール層に水 2.5 mL を加えて攪拌し、この液をあらかじめメタノール 10 mL、水 10 mL でコンディショニングした固相抽出カラムに注入した。容器を 40 %メタノール 4 mL で洗いこみ、この液も固相抽出カラムに注入した。水 5 mL 及び 65 %メタノール 5 mL で固相抽出カラムを洗浄し、90 %メタノール 5 mL で溶出した。この溶出液を 90 %メタノールで正確に 20 mL とした。これをメンブランフィルターでろ過し、試験溶液とした。

## 6. 検量線の作成

OA、DTX-1 及び DTX-2 各 1 μg/mL の混合標準溶液を 90 %メタノールで希釈し、検量線用標準溶液を調製した。検量線範囲は 0.05 ng/mL ~ 2 ng/mL と

し、ピーク面積法で検量線を作成した。検量線の直線性は、いずれの成分も相関係数 0.99 以上と良好であった。

## 7. 妥当性評価方法

岩ガキでは試料 2.00 g に OA、DTX-1 及び DTX-2 が各 0.05 mg/kg となるよう OA、DTX-1 及び DTX-2 各 1 μg/mL の混合標準溶液を 100 μL 添加した。アサリ及びホンビノスでは、標準品が十分に入手できなかったため、通知に従い、抽出液 2 mL に 0.05 mg/kg となるよう 1 μg/mL の混合標準溶液を 10 μL 添加した。分析者 1 名が、同一の添加試料を 1 日 2 回、5 日間分析する枝分かれ試験を行った。通知に従い、真度、併行精度及び室内精度を推定し、評価した。

## 結果及び考察

### 1. 分析法の検討

岩ガキを検体とし、通知に従い試験溶液を調製し、マトリクス添加標準溶液で定量したところ、真度が妥当性評価の目標値である 70 %を下回った。このことから、岩ガキでは夾雑物質が多く、通知に示された固相容量 200 mg の ODS カラムでは保持が不十分であったと考えられた。そのため、固相容量 500 mg の Bond Elut C18 を用いたところ、真度が向上した。また、試験溶液に着色が認められたため、固相抽出カラムの洗浄液を通知に示された 40 %メタノールから 65 %メタノールに変更したところ、オカダ酸群が流出することなく着色が減少したことから、洗浄液は 65 %メタノールとすることとした。

しかしながら、イオン化促進効果が認められ、絶対検量線での定量では真度が妥当性評価の目標値である 120 %を超えていた。そのため、イオン化促進効果の低減を目的に、各種イオン交換ミックスモードカラムでの精製及び NH<sub>2</sub> カラムでの追加精製<sup>4)</sup>も検討したが、いずれもイオン化促進効果を十分に除去することができなかった。そのため、固相抽出カラムは洗浄液等の調製が簡便な Bond Elut C18 500 mg を採用し、試験溶液の希釈によるイオン化促進効果の低減を試みた。通知では、固相抽出カラムからの溶出液を減圧留去した後定容しているが、減圧留去を行わず、溶出液を全量採取し 20 mL に定容後測定したところ、イオン化促進効果の低減が認められ、絶対検量線での定量が可能となった。

### 2. 定量限界

定量限界値は通知に従い 0.01 mg/kg とし、0.1 ng/mL のマトリクス添加標準溶液のピークが S/N ≥ 10 であることを確認した。

### 3. 妥当性評価結果

選択性について、岩ガキ、アサリ及びホンビノスのブランク試料を分析したところ、ホンビノス中に

Table 2 OA, DTX-1, DTX-2の分析条件

	プリカー サーイオン (m/z)	プロダクト イオン*1 (m/z)	コーン 電圧 (V)	コリジョン エネルギー (eV)
OA	803.44	255.10	40	48
		113.00	40	60
DTX-1	817.44	255.10	45	48
		113.00	45	62
DTX-2	803.44	255.10	40	48
		113.00	40	60

\*1 上段が定量イオン、下段が確認イオン

Table 3 妥当性評価結果

	OA			DTX-1			DTX-2		
	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
岩ガキ	102.2	3.9	7.7	104.5	2.9	6.3	109.9	5.0	8.1
アサリ	96.9	2.4	4.6	96.2	5.1	5.4	93.5	4.3	4.7
ホンビノス	101.5	4.1	10.5	101.2	3.9	7.6	100.4	6.1	12.4

OA のピークが認められたが、その他に妨害ピークは認められなかった。なお、ホンビノスについてはブランク試料から OA が検出されたため、通知に従い添加試料と同様に操作し得られたブランク試料の値を、添加試料の値から差し引いた値の平均値を求め、真度を求めた。なお、ブランク試料に含まれる OA の濃度は添加濃度の 1/2 未満であることを確認した。岩ガキ、アサリ及びホンビノスの妥当性評価結果を Table 3 に示した。いずれの試料も、妥当性評価の目標値である真度 70 %~120 %、併行精度 15 %以下、室内精度 20 %以下を満たしていた。

### まとめ

岩ガキ、アサリ及びホンビノスについて LC-MS/MS を用いた下痢性貝毒（オカダ酸群）の分析法の妥当性評価を実施した。いずれも通知の求める性能基準を満たしていることから、本分析法は下痢性貝毒（オカダ酸群）の分析法として妥当であることが確認された。本研究の結果、これまで実施していたマウスを用いた検査法から機器分析法に移行することが可能となったことから、これまで以上に、流通する二枚貝類の安全性確保に努めていきたい。

### 引用文献

- 1) 自然毒のリスクプロファイル：二枚貝：下痢性貝毒(URL : [http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/poison/animal\\_det\\_10.html](http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/poison/animal_det_10.html))
- 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) 山口瑞香，山口貴弘，柿本健作，永吉晴奈，起橋雅浩，梶村計志：貝 9 種類の下痢性貝毒分析法の妥当性評価，食品衛生学雑誌，57，19-22 (2016)
- 4) 脇ますみ，福光徹，小菅教仁，林孝子，岸弘子：LC-MS/MS による下痢性貝毒（オカダ酸群）の分析法の検討，第 52 回全国衛生化学技術協議会年会講演集，100-101 (2015)