

LC-MS/MSによる下痢性貝毒（オカダ酸群）分析法の検討

Analysis of diarrhetic shellfish poison (okadaic acid group) analysis by LC-MS / MS

佐藤 智子 千葉 美子 佐藤 由紀 高橋 剛*1

Satoko SATO, Yoshiko CHIBA, Yuki SATO, Tuyoshi TAKAHASHI

下痢性貝毒（オカダ酸群（オカダ酸、ジノフィシストキシン-1、ジノフィシストキシン-2（以下 OA, DTX1, DTX2）並びにそれらのエステル化合物））について、ホタテガイの中腸腺を試料とし、LC-MS/MSを用いたマトリックス検量線を使用しない分析法を検討した。その結果、移動相にメタノールを使用することにより感度の向上が認められた。固相による精製方法を検討し、操作時間の短さ、簡便さ及び精製効率が優れている Z-Sep を用いることとした。確立した分析法により、試験溶液原液と原液をメタノールで5倍希釈した溶液について妥当性を確認した結果、全てのオカダ酸群について通知法で示された妥当性確認のガイドライン目標値を満たした。また、天然に毒化した試料を用いて、マトリックス効果の影響を受けない標準添加法と比較したところ、絶対検量線を用いた独自法でもマトリックスの影響がほとんど無いことが確認できた。

キーワード：下痢性貝毒；オカダ酸群；妥当性評価；液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計

Key words : diarrhetic shellfish poison ; okadaic acid ; validation study ; LC-MS/MS

1 はじめに

平成27年3月から下痢性貝毒（オカダ酸群（図1）の公定法に機器分析法が導入され、オカダ酸群に対し規制値が定められた¹⁾。しかし、検査法²⁾³⁾（以下通知法）については、分析操作例が示されただけであり、検査に用いる分析法については、各検査機関において妥当性を確認する必要がある。

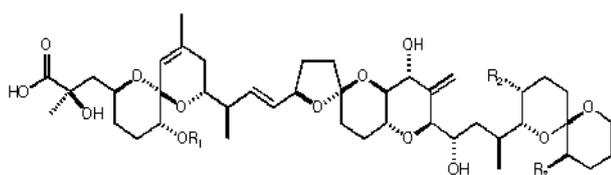
二枚貝はその産地や時期によって得られる試料中の夾雑物が多様であり、全ての試料において、機器分析時に同様のマトリックス効果を受けるとは限らない。

そこで今回、ホタテガイの中腸腺を試料とし、LC-MS/MSを用いたマトリックス検量線を使用しない分析法を検討し、その妥当性を確認したので報告する。

2 方法

2.1 試料

平成28年4月から8月に宮城県沿岸で養殖されたホタテガイを宮城県漁業協同組合から買い上げ、通知法に従い試料を調製した。



	R ₁	R ₂	R ₃
OA	H	CH ₃	H
DTX1	H	CH ₃	CH ₃
DTX2	H	H	CH ₃

図1 オカダ酸群の化学構造

2.2 試薬等

2.2.1 標準品

NRC(カナダ国立研究機構)製の CRM-OA, CRM-DTX1, CRM-DTX2を用いた。

2.2.2 試薬類

メタノールおよびアセトニトリルはLC用、n-ヘキサンは残留農薬試験用、その他の試薬は特級を用いた。

2.2.3 精製用固相

GL Sciences社製 InertSep C18 (200mg, 500mg : 以下 C18), Agilent Technologies社製 Captiva ND Lipids (以下 Captiva), Sigma-Aldrich社製 Supel QuE Z-Sep 2mL Tube (以下 Z-Sep) を用いた。

2.3 試験溶液の調製

通知法の分析操作例に従い試料の抽出を行い、脱脂以降は図2のとおり調製した。

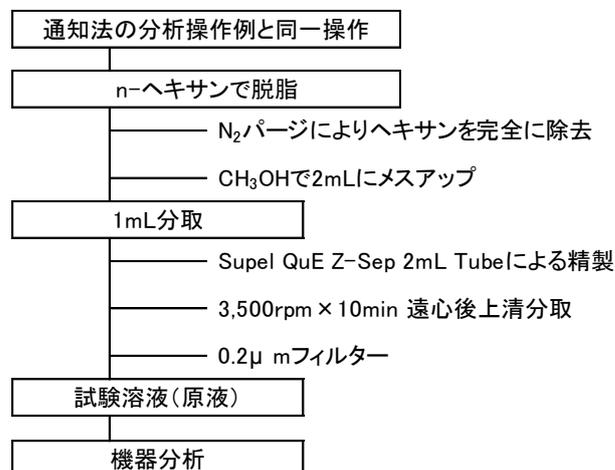


図2 試験溶液原液の調整

*1 前 保健環境センター副所長兼生活化学部長

表 1 分析条件

カラム	InertSustainSwift C18 (2.1mm×100mm , 3 μ m ,)						
カラム温度	40 °C						
移動相	A相 : 水 (2mMギ酸アンモニウム及び50mMギ酸含有)						
	B相 : 95%メタノール又は95%アセトニトリル (2mMギ酸アンモニウム及び50mMギ酸含有)						
溶出方法	グラジエント法						
	min	0	0.5	3.5	6.5	6.51	16.5
	A %	30	30	0	0	30	30
	B %	70	70	100	100	70	70
流速	0.2mL/min						
注入量	5 μ L						
イオン化法	ESI (Negative)						
イオンスプレー電圧 (IS)	-4500.00						
ヒーター温度 (TEM)	700.00						
定量イオン	OA及びDTX2	m/z 803.492 → 255.000					
	DTX1	m/z 817.503 → 255.000					
確認イオン	OA及びDTX2	m/z 803.492 → 113.027					
	DTX1	m/z 817.503 → 113.027					

2.4 使用機器及び分析条件

LC 部は Agilent Technologies 1260 Infinity series, MS/MS 部は AB SCIEX QTRAP4500 LC-MS/MS system を使用した。分析条件を表 1 に示す。

3 結果及び考察

3.1 分析法検討

3.1.1 移動相の検討

移動相に使用する溶媒について、2ng/mL 標準溶液を用いてアセトニトリル及びメタノールの感度の比較を行った。メタノールを使用することにより、アセトニトリルに比べてピーク面積が OA で 14%、DTX1 で 7%増加し、感度の向上が認められた。また、ピーク形状やベースラインのアバンダンス等については、いずれの溶媒においても差が認められなかったことから、移動相には、メタノールを選択した。

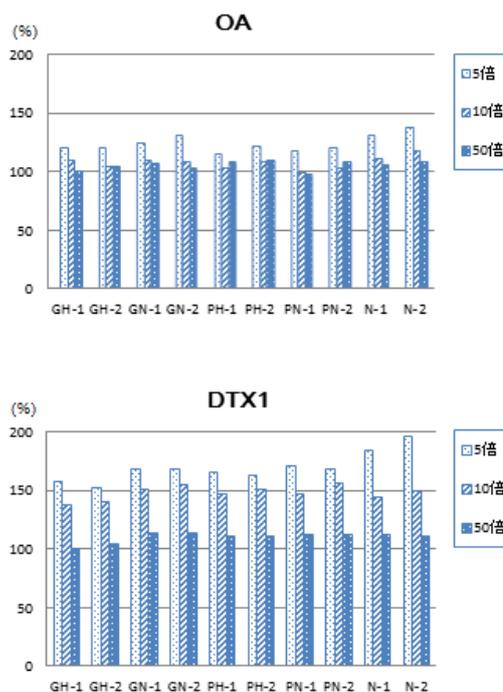
3.1.2 マトリックス効果の影響

通知法の分析操作例に従い調製した試験溶液について機器分析したところ、マトリックス効果によるイオン化促進が認められた。そこで、その軽減を図るため、メタノールによる試験溶液の希釈を検討した。

精製用固相を用いずに調製した試験溶液をメタノールで 5~50 倍に段階希釈し、標準品濃度が 2ng/mL となるように標準溶液を添加して、マトリックス効果の影響を確認した (図 3)。

OA では 5~10 倍に、DTX1 は 50 倍に希釈することで、マトリックス効果の影響を回避できた。

試料に用いたホタテガイにおける中腸腺の、可食部に占める割合は 7~14%程度である。可食部換算を考慮しても、試験溶液原液の希釈では 5~10 倍希釈が限度であり、希釈のみでは対応できないと考えられたことから、精製法の検討を行った。



GH : ガラス製試験管で加水分解+ヘキサン処理
GN : ガラス製試験管で加水分解のみ
PH : PP 製試験管で加水分解+ヘキサン処理
PN : PP 製試験管で加水分解のみ
N : 加水分解無し
※全て精製用固相未使用

図 3 マトリックス効果の影響

3.1.3 精製用固相の検討

C18 単独と C18 に Captiva 精製を追加する二つの方法を比較検討した (図 4)。

通知法の分析操作例に準じて調製した抽出液 (産地の異なる 2 試料、それぞれ n=3 で実施) に、試験溶液中の標準品濃度が 5ng/mL となるように標準溶液を添加し、各々の方法で精製した後、その濃度を測定した。その結果、試験溶液、その 2 倍希釈溶液、5 倍希釈溶液と希釈倍率の増加に伴い測定値が 5ng/mL に近似し、希釈によるイオン化促進の低減が認められた。また、精製過程に Captiva 精製を追加した方法は回収率が向上し、それは OA で顕著であった。

次に、上記と同様に、抽出液に標準溶液を添加して、C18 と Z-Sep の精製効果を比較した。C18、Z-Sep 共に、メタノール標準溶液と比較し、OA では約 10%測定値が高くなった。一方、DTX1 では、C18 で約 20%高値となったものの、Z-Sep では変わらなかった。また、色素除去効果についても Z-Sep の方が C18 より優れており (図 5)、さらに、コンディショニングや減圧濃縮操作も不要となることから、操作時間の短縮と精製効率を考慮し、Z-Sep を用いることとした。

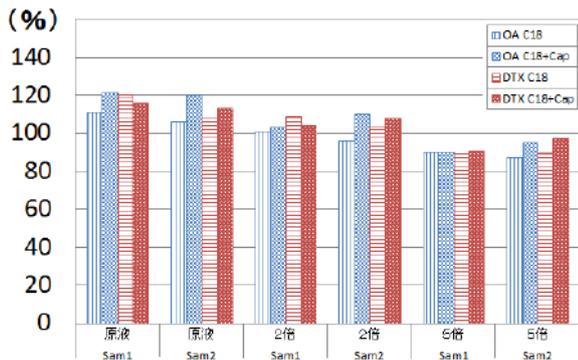


図4 C18のみとC18+Captiva精製の比較



Z-Sep C18

図5 C18とZ-Sepの色素除去効果の比較

3.2 妥当性確認

通知法に従い、各オカダ酸群につき0.05mg/kg添加したホタテ貝の中腸腺を試料とし、今回確立した分析法により分析者2人、2併行、3日間の試験を実施した。試験溶液原液と原液をメタノールで5倍希釈した溶液について、妥当性評価を実施した。その結果、全てのオカダ酸群について通知法で示された妥当性確認のガイドライン目標値を満たした。(表2)

3.3 標準添加法との比較

海域および採取日の異なる天然に毒化した試料を用いて、マトリックス効果の影響を受けない標準添加法と絶対検量線を用いた独自法を比較した。

標準添加法では、試験溶液中濃度を未知とし、溶液濃度が10 ng/mL, 20 ng/mL, 30 ng/mL, 40 ng/mL, 50 ng/mLとなる標準溶液を添加し、検量線を作成した。得られた検量線の直線性を確認し、切片から試験溶液の濃度を求めた。その結果、両法で求めた濃度に大きな差は無く (r=0.999)、絶対検量線を用いた独自法でもマトリックスの影響がほとんど無いことが確認できた。(表3)

表2 妥当性確認試験結果

	試料溶液 (原液)			5倍希釈溶液		
	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	87	6.3	9.2	71	7.4	14
DTX1	81	5.8	12	73	7.7	12
DTX2	90	8.1	11	76	8.1	14
添加濃度0.05mg/kgにおけるガイドライン目標値	70~120	<15	<20	70~120	<15	<20

表3 標準添加法との比較

海域	採取日	独自法	標準添加法
A	6月13日	0.211 mg/kg	0.196 mg/kg
	6月27日	0.039 mg/kg	0.036 mg/kg
B	6月20日	0.051 mg/kg	0.050 mg/kg
	6月27日	0.026 mg/kg	0.027 mg/kg
C	6月6日	0.096 mg/kg	0.091 mg/kg
	6月20日	0.015 mg/kg	0.010 mg/kg

4 まとめ

今回、通知法の分析操作例を改良し、独自にオカダ酸群の迅速検査法を確立した。確立した手法で天然に毒化した試料を検査し、その有用性を確認した。

今後は、確立した手法が可食部全体にも適応するか検討する予定である。

5 謝辞

本研究の実施にあたりご協力いただきました、宮城県漁業協同組合に感謝いたします。

参考文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食安発0306第2号 (平成27年3月6日付け)
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長通知：食安基発0306第4号 (平成27年3月6日付け)
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知：食安監発0306第2号 (平成27年3月6日付け)