

資料

LC/MS/MSによる二枚貝中の下痢性貝毒分析法の妥当性評価

Validity Evaluation of Method for Diarrhetic Shellfish Poisons by LC/MS/MS

茶 屋 真 弓 弓 場 香 純 吉 田 純 一

1 はじめに

下痢性貝毒は、有毒プランクトン（渦鞭毛藻）が産生する毒素であり、この有毒プランクトンを捕食し毒化した二枚貝を、ヒトが摂取することで下痢などの消化器症状を主徴とする食中毒を引き起こす。

下痢性貝毒については、「麻痺性貝毒等により毒化した貝類の取り扱いについて¹⁾」で機器分析法が導入され、オカダ酸群に対して規制値が定められ、さらに、「下痢性貝毒検査法²⁾」（以下「通知法」という。）が示された。しかし、二枚貝は貝種などにより夾雑物が異なることが知られており、貝種毎に操作法を検討する必要がある上、各検査機関における検査法の妥当性評価は必須となっている。

そこで今回、県内で養殖又は流通する二枚貝5種を用いて妥当性評価を実施したので報告する。さらに、平成29年度に厚生労働科学研究費補助金により実施された技能比較試験（下痢性貝毒）に参加したので、その結果についても併せて報告する。

2 方法

2. 1 試料

ホタテガイ、ヒオウギガイは、インターネットで購入し、ツキヒガイ、アサリ、カキは県内流通品を購入した。そのうち、アサリ、カキについては貝全体を、ホタテガイ、ヒオウギガイ、ツキヒガイについては貝全体と中腸腺に分離したものを試料とし、試験を行った。

2. 2 分析対象及び標準品

オカダ酸（以下「OA」という。）及びジノフィシトキシニン1（以下「DTX1」という。）を分析対象とした。OA及びDTX1は、農林水産省消費・安全局が実施した平成21年度海洋生物毒安全対策事業の一環で、財団法人食品分析センターから配布され、当センターで保管していた標

準品を使用した。

これらの標準品をメタノールに溶解し1 μ g/mL溶液を調製し、適宜希釈して混合標準溶液を調製した。

2. 3 試薬

2. 3. 1 抽出・精製

アセトニトリル（HPLC用）、メタノール（HPLC用）、n-ヘキサン（残留農薬試験用）は関東化学(株)製及び和光純薬工業(株)製を用いた。

2. 3. 2 LC移動相

ギ酸アンモニウム（HPLC用）は関東化学(株)製、ギ酸（HPLC用）、アセトニトリル（LC/MS用）は和光純薬工業(株)製を用いた。

2. 3. 3 その他の試薬等

水酸化ナトリウム、塩酸は関東化学(株)製の特級を用いた。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムはWaters(株)製Oasis PRiME HLB（200mg/6mL）、メンブランフィルターは(株)島津ジーエルシー製TORAST Disc（親水性PTFE, 13mm, 0.45 μ m）を用いた。

2. 4 装置

高速液体クロマトグラフはProminenceシリーズ（島津製作所社製）を使用し、送液ポンプはLC-20AD、オートサンプラーはSIL-20ACHT、カラムオーブンはCTO-20ACを用いた。

質量分析装置は4000QTRAP（ABSciex社製）を使用し、イオンソースはTurb Ion Sprayを用いた。

2. 5 LC/MS/MS測定条件

測定条件は、表1のとおり。また、化合物ごとのプリカーサーイオン（Q1）、プロダクトイオン（Q3）、MRMにおけるDP（Declustering Potential）、CE（Collision Energy）

及び保持時間 (RT : Retention Time) は表2に示す。

2. 6 試験溶液の調製

通知法に従い、図1に示すとおりに調製した。精製カラムの選定は、マトリックスマッチングを行わない溶媒標準でも良好な結果が得られたという、小池らの報告³⁾を参考に行った。

表1 LC/MS/MSの測定条件

LC条件 (株) 島津製作所製Prominenceシリーズ	
分析カラム	: ジェルサイエンス (株) 製 Inert Sustain C18 (内径2.1mm, 長さ75mm, 粒径3µm)
流速	: 0.2mL/min
注入量	: 5µL
カラム温度	: 40℃
移動相	: A : 2mMギ酸アンモニウム0.1%ギ酸水溶液 : B : アセトニトリル
グラジェント条件	: 40%(0min) → 40%(2.5min) → 95%(7.5min) (B%) → 95%(12.5min) → 40%(13min) → 40%(15min)
MS/MS条件 AB sciex社製4000QTRAP	
イオン化法	: エレクトロスプレーイオン化 (ESI・ネガティブ)
イオンスプレー電圧	: -4.5kV
イオンソース温度	: 600℃
測定モード	: MRM (Multiple Reaction Monitoring)

表2 化合物ごとのMS/MSパラメータ及び保持時間

化合物名	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	CE (V)	RT (min)
OA	803.5	254.8	-175	-66	8.3
		112.9	-175	-92	
DTX1	817.5	254.9	-175	-66	9.4
		112.8	-175	-92	

2. 7 妥当性評価のための実験計画

通知法に従い実施した。ブランク試料2.0gに対して、混合標準液1µg/mLを0.1mL添加 (試料中濃度0.05mg/kg) した。添加後は、30分放置した後に抽出操作を行った。分析者2名が2併行3日間実施する計画とした。

妥当性評価のパラメータは、通知法に基づき、定量限界、選択性、真度及び精度とした。

2. 8 平成29年度下痢性貝毒技能比較試験

当該試験法のパイロットスタディが厚生労働科学研究費補助金により実施され、食品衛生検査施設27機関が参加した。試験試料はホタテガイ均一化試料 (缶詰包装・常温保存) で、希望する機関には、認証標準物質 (OA及びDTX1 : 国立研究開発法人 産業技術総合研究所) が

同時に配布され、当センターはこの認証標準物質を用いて保有していた標準を標定し、試料中濃度を決定した。

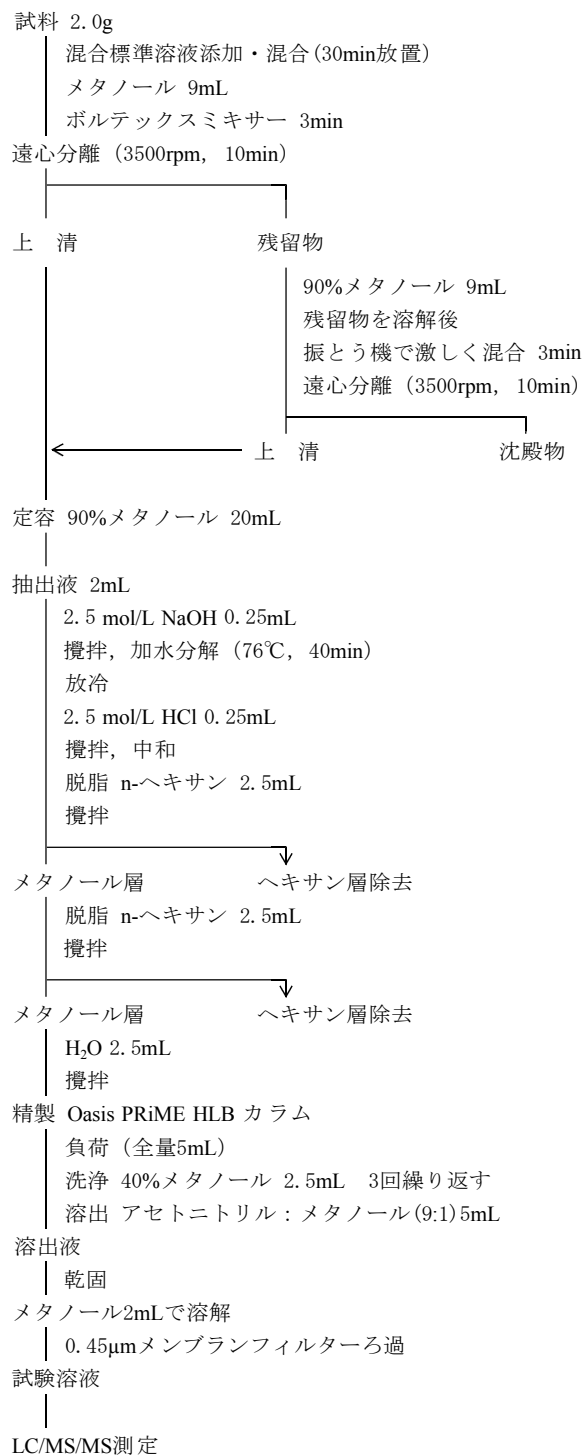


図1 試験フロー

3 結果及び考察

3. 1 検量線の直線性

検量線は、混合標準液を0.25~20ng/mLの範囲（8点）でメタノール希釈し調製したところ、いずれも良好な直線性（相関係数0.9999以上）が得られた。

3. 2 妥当性評価結果

3. 2. 1 定量限界

定量限界は、通知法に従い0.01mg/kgとし、1ng/mLの標準液のピークがS/N比 ≥ 10 であることを確認した。

3. 2. 2 選択性

ヒオウギガイ以外の各ブランク試料については、OA及びDTX1の定量を妨害するピークは検出されず、選択性は適合となった。

ヒオウギガイについては、DTX1の選択性は適合となったが、OAの選択性については貝全体、中腸線ともに妨害ピークの面積が基準値に相当するピーク面積の1/10以上となり不適合となった。これは、今回使用したヒオウギガイの試料がOAを保有していたためと考えられるが、ガイドラインによると、ブランク試料の入手が困難な場合は分析対象化合物の含有濃度が添加濃度の1/2未満の試料ブランク試料（以下「トレース試料」という。）として使用できることが示されている。ヒオウギガイ全体については当該濃度が1/2未満であったため、この試料を用いて選択性以外の他のパラメーターについても評価を実施した。ヒオウギガイ中腸線については1/2を超えていたため以後の評価は実施しなかった。

3. 2. 3 真度および精度

真度および精度の評価結果を表3に示す。ブランク試料としてトレース試料を用いたヒオウギガイについては、添加試料の定量値からトレース試料の定量値を差し引いた値の平均値と添加濃度の比から真度を算出した。

真度、精度ともに、全ての貝種で通知法の目標値を満たした。しかし、ツキヒガイ、特に中腸腺においては、OAの真度が約120%となったことから、精製方法の再検討やマトリックス検量線での定量についてさらなる検討が必要である。

3. 3 平成29年度下痢性貝毒技能比較試験

図1の試験フローに従い試験を実施したところ、定量結果は、OAが0.155mg/kg、DTX1は定量下限未満であった。

後日配布された研究分担報告書によると、供与試料は、OAのみ添加して調製しており、これをランダムに10缶抜き取り、それぞれ2回分析した結果の総平均はOA：0.146mg/kgであったとされている。

なお、参加機関の報告値の平均は0.126mg/kgであった。試料の付与値とHorwitz式から予測される室間精度を用いて計算したzスコアの範囲は-2.37~0.45であり、当センターのzスコアは0.29であった。

表3 妥当性評価結果

	OA			DTX1		
	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
ホタテ全体	96.4	8.5	8.7	90.0	7.8	8.2
ホタテ中腸	102.8	6.4	7.5	107.9	13.6	16.2
ヒオウギ全体	89.7	4.7	9.2	86.5	2.1	9.1
ツキヒ全体	108.3	8.1	9.2	90.6	6.5	7.3
ツキヒ中腸	119.6	5.0	5.8	95.4	3.1	6.6
アサリ	102.1	5.0	6.6	89.5	5.4	10.9
カキ	100.3	8.5	13.3	85.9	10.0	11.6
目標値*	70-120	≤ 15	≤ 20	70-120	≤ 15	≤ 20

※通知法に示す目標値

4 まとめ

- 1) 下痢性貝毒（OA, DTX1）の分析方法の妥当性評価を実施した結果、ホタテガイ、ツキヒガイ、アサリ、カキについて妥当性を確認でき、下痢性貝毒の分析について検査体制を確立することができた。さらに、パイロットスタディにより、実試料で当該分析法の精度も実証できた。
- 2) 妨害ピークにより選択性の妥当性を確認できなかったヒオウギガイについては、定量を妨害するピークの小さい試料を用いて、再度評価する必要がある。

参考文献

- 1) 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扱いについて（食安発0306第1号），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，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）の検査について（食安基発0306第3号，食安監発0306第1号），平成27年3月6日
- 3) 小池敬信，北弘美，他；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）