

トリプル四重極質量分析計を用いた EU規制対象脂溶性貝毒一斉分析

小林 まなみ

ユーザーベネフィット

- ◆ EU-RL-MB(European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins)に準拠した二枚貝中の脂溶性貝毒5成分の一斉分析が可能です。
- ◆ 塩基性移動相を使用し、イエソトキシン(YTX)が高感度に分析できます。
- ◆ オートサンプラーの前処理機能を利用し自動的にマトリクスマッチド検量線が作成できます。

はじめに

貝毒は、主に二枚貝が毒性の高い海産渦鞭毛藻を捕食し、体内に毒が蓄積することで発生します。毒化した貝をヒトが食べると中毒症状を引き起こすことがあります。

EUでは、脂溶性毒素について規制を設けており、規制(EC)853/2004、Annex III Section VII Chapter V では食用を目的として流通する二枚貝に含まれる脂溶性毒素の最大濃度を、オカダ酸、ディノフィシストキシン群及びペクテノトキシン群は160 µg/kg(オカダ酸当量)、アザスピロ酸群160 µg/kg(アザスピロ酸当量)のように定めています。また、EU規制786/2013のAnnex IIIにおいて生鮮二枚貝中のイエソトキシン群の許容限界は3.75 mg/kg(イエソトキシン当量)に引き下げられました。試験法については、(EU)No 15/2011において、生鮮二枚貝中の海洋生物毒を検出するための試験法としてEU-RLのLC-MS/MS法が脂溶性毒素群の標準検出法として設定されています。

日本では、食品衛生法に基づき貝毒に関する安全基準、規制値が設定されています(平成27年3月6日付け食安発0306第1号)。二枚貝等の可食部に含まれる毒量は、下痢性貝毒で0.16 mg オカダ酸当量/kg 以下と定められています。現在の検査法は、下痢性貝毒には平成27年3月6日付け食安基発0306第3号、酸性の移動相を使用したオカダ酸とディノフィシストキシン群を検査対象としたLC-MS/MSを使用した機器試験法が通知されています。

本稿では、EUに規制を有する5つの脂溶性毒素群(オカダ酸、ディノフィシストキシン群、ペクテノトキシン群、アザスピロ酸群およびイエソトキシン群)を代表する5つの標準化合物を既知量添加したホタテ貝の抽出溶液を塩基性移動相を使用したLC-MS/MS法で分析した事例をご紹介します。抽出と分析の手順は、EU-RL-MB(European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins) ver.5¹⁾の方法に則りました。オカダ酸、ディノフィシストキシン群の総量を得るためには、抽出後、加水分解処理が必要です。本試験では、加水分解なしと加水分解ありのホタテ貝抽出溶液を調製し、それぞれマトリクスマッチド検量線を作成、定量に使用しました。

化合物と構造

Okadaic acid(OA)、Dinophysistoxin-1(DTX1)、Pectenotoxin-2(PTX2)、Azaspiracid-1(AZA1)、Yessotoxin(YTX)の5化合物の一斉分析を検討しました。

図1には、YTXの構造を示します。

YTXは、シガトキシンに関連する脂溶性の硫黄含有ポリエーテル毒素群で、渦鞭毛藻類、特に *Lingulodinium polyedrum* と *Gonyaulax spinifer* によって産生されます。

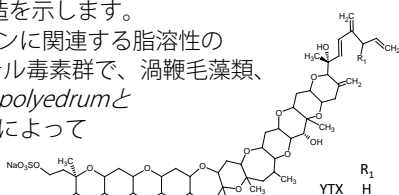


図1 YTXの構造

MRMトランジション

分析に使用したMRMのトランジションを表1に示します。OA、DTX1、YTXはネガティブモード、PTX2とAZA1はポジティブモードで検出しました。PTX2についてはプリカーサイオンに感度が良好な[M+NH₄]⁺イオンを使用しました。

表1 MRMトランジション

Compound	Polarity	Q1	Q3	CE (V)
		m/z	m/z	
OA	-	803.5	255.2	48
OA	-	803.5	113.0	55
DTX1	-	817.5	255.2	49
DTX1	-	817.5	113.0	55
YTX	-	1141.5	1061.3	33
YTX	-	1141.5	855.5	54
PTX2	+	876.5	823.5	-26
PTX2	+	876.5	805.4	-27
PTX2	+	876.5	213.2	-40
AZA1	+	842.5	824.4	-31
AZA1	+	842.5	806.4	-40

分析条件

LCとMSの分析条件を表2に示します。

表2 分析条件

[HPLC conditions] (Nexera™)	
Column	: ODS column resistant to high pH *1 (100 mm × 2.1 mm, 3.5 µm)
Mobile phases	: A) 2 mmol/L ammonium bicarbonate aqueous solution(pH 11) B) Acetonitrile: 2 mmol/L ammonium bicarbonate aqueous solution(pH 11)=9:1
Flow rate	: 0.3 mL/min
Column temp.	: 40 °C
Injection volume	: 5 µL
Time program	: B Conc. 25% (0-1 min) – B Conc. 100% (11.4-16.7 min) – B Conc. 25% (16.71-22 min)

The flow was loaded into the MS detector between 2.5 to 11 min using a flow switching valve.

[MS conditions] (LCMS™-8060)	
Ionization	: ESI Positive & Negative
Interface voltage	: +4 kV & -3 kV
Nebulizing gas flow	: 2.5 L/min
Heating gas flow	: 5 L/min
Drying gas flow	: 15 L/min
IF/DL/HB temp.	: 350/200/450 °C
CID gas pressure	: 270 kPa
ESI probe position	: +2 mm

*1 参考文献を参照

■ クロマトグラム

今回の分析は、オートサンプラの前処理機能を用いて、マトリクス溶液としてのホタテ貝抽出液を5 µL吸引した後、各濃度の混合標準溶液を同量の5 µL吸引、両溶液の注入動作を行うことで実施しました。実試料(標準溶液添加ホタテ貝抽出液)については、混合標準溶液の代わりにメタノール溶媒を吸引しました。検量線最小点における各化合物のクロマトグラムを図2に示します。AZA1、PTX2とYTXは加水分解なしの抽出液、OAとDTX1については加水分解ありの抽出液をマトリクス溶液として使用しました。

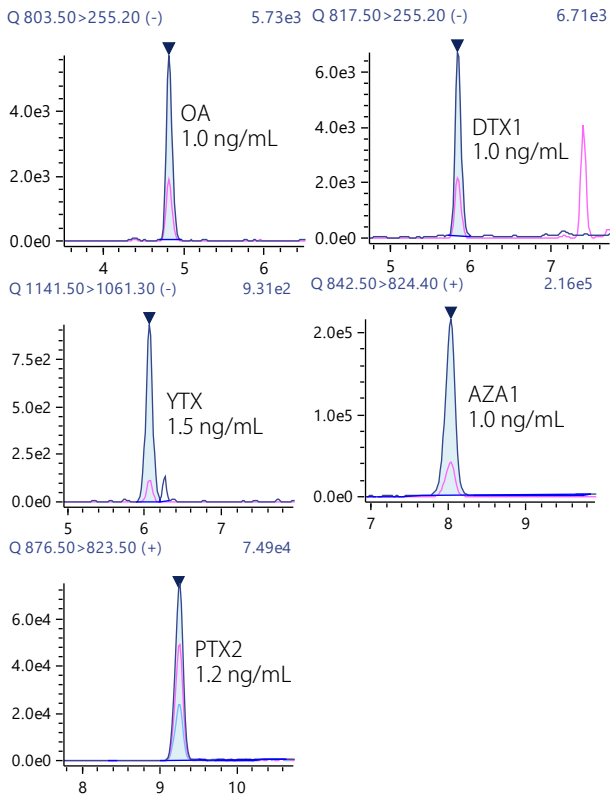


図2 各化合物のクロマトグラム

■ 検量線

図3に、各化合物の検量線を示します。

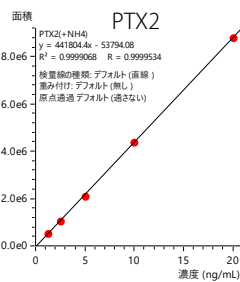
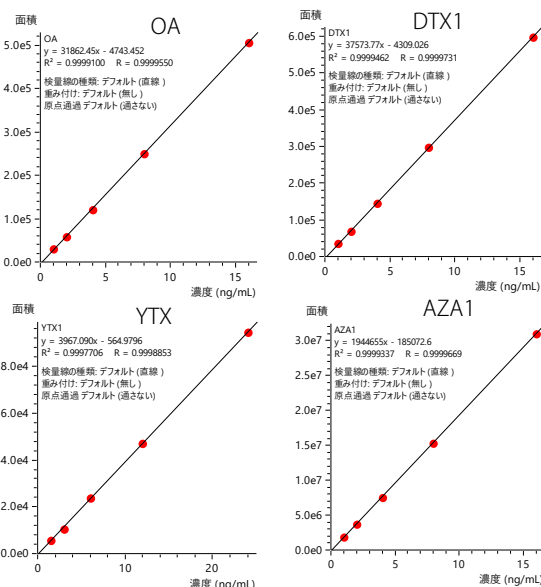


図3 各化合物の検量線

■ 定量結果

今回、ホタテ貝には最終抽出液中の濃度でOA、DTX1、AZA1は2 ng/mL、YTXは3 ng/mL、PTX2は2.5 ng/mLになるように混合標準溶液を添加しました。抽出液の加水分解処理は、自然界の貝中に存在するOAとDTX類のアシル化エステルを遊離のそれらに変換するための処理です。この処理で、PTX、AZA群は分解することがわかっています。

表3に、加水分解処理なしとありの抽出液で作成したマトリクスマッチド検量線の寄与率とそれら検量線で定量した標準溶液添加ホタテ貝抽出液の定量結果と回収率を示しました。PTX2とAZA1については、加水分解なしでは検出されているにもかかわらず、加水分解処理によって未検出(N.D.)となっていることが確認されました。これらPTX2とAZA1以外は、両処理でも回収率95~104%と非常に良好な回収率が得られました。

表3 定量結果(ng/mL)と回収率(%)

Compounds	加水分解なし			加水分解あり		
	R ²	定量値 (ng/mL)	回収率 (%)	R ²	定量値 (ng/mL)	回収率 (%)
OA	0.99977	2.06	103	0.99991	1.94	97
DTX1	0.99995	1.89	95	0.99995	1.99	100
YTX	0.99977	3.09	103	0.99980	3.13	104
PTX2	0.99991	2.44	98	0.99987	N.D.	-
AZA1	0.99993	1.96	98	0.99970	N.D.	-

■ まとめ

EU規制があるオカダ酸、ディノフィシトキシン群、ペクテノトキシン群、アザスピロ酸群およびイエットトキシン群、各々を代表する化合物としてOkadaic acid(OA)、Dinophysistoxin-1(DTX1)、Pectenotoxin-2(PTX2)、Azaspiracid-1(AZA1)、Yessotoxin(YTX)の5化合物の一斉分析を紹介しました。

感度、検量線の直線性、ホタテ貝試料による添加回収率試験において、いずれも良好な結果が確認されました。マトリクスマッチド検量線も、メソットにオートサンプラ前処理機能を設定する事で自動的かつ精度よく作成することができます。

参考文献

- 1) [EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of Lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS/MS, Version 5, January 2015](#)

謝辞

標準品、試料に関しまして、一般財団法人日本食品検査様の多大なるご協力をいただきました。心より、謝意を表します。

[HOME | JFIC 一般財団法人 日本食品検査 \(jffic.or.jp\)](http://www.jffic.or.jp)

LCMSおよびNexeraは、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

01-00376-JP 初版発行：2022年 03月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していません。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。

<https://www.an.shimadzu.co.jp/app/index.htm>

会員情報サービス Shim-Solutions Clubにご登録いただけますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。

新規登録は、<https://solutions.shimadzu.co.jp/> よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2022