

Application News

No. C200

LC/MS

トリプル四重極型 LC/MS/MS を用いた 下痢性貝毒（オカダ酸群）の分析

下痢性貝毒を含む貝類の取り扱い、「麻痺性貝毒等により毒化した貝類の取り扱いについて」（平成 27 年 3 月 6 日付け食安発 0306 第 2 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知）に基づき、機器分析法が導入されることとなりました。オカダ酸（以下略、OA）群に対して 0.16 mg OA 当量/kg の規制値が定められ、規制値を超える貝類は、食品衛生法第 6 条第 2 号の規定に基づいて販売等が禁止されています。

2016 年 4 月からは、国産の認証標準物質が安定して入手できるようになりました。これに伴い、2017 年 3 月 8 日付け生食基発 0308 第 2 号及び生食監発 0308 第 9 号『「下痢性貝毒（オカダ酸群）の検査について」の一部改正について』により、1981 年 5 月 19 日付け環乳第 37 号「下痢性貝毒の検査について」のマウス毒性試験は、2017 年 4 月 1 日をもって廃止されました。今回の改正では、ヒトへの毒性が認められる OA 群について規制値が導入され機器分析法の対象となりました。一方、下痢原性を持たない PTX 群、YTX 群は機器分析法の対象外となりました。OA 群は、植物性プランクトンにより産生される毒素であり OA の他に、類似化合物として、ジノフィシストキシン群（DTX 1、DTX2 及び DTX3）が含まれます。これら各化合物は、毒性の強さが異なるため、各化合物の毒性を OA の毒性に換算して計算します。その為に、毒性等価係数（TEF）が定められており、OA を 1 とすると、DTX1 が 1、DTX2 が 0.5 となります。OA、DTX1、DTX2 の各定量結果に、それぞれの TEF 値を乗じて OA 当量値に換算し、その総和を算出します。DTX3 は、ホタテガイの代謝物である脂肪酸とのエステル化合物であり、前処理操作の加水分解過程により、OA、DTX1 または DTX2 に変換されるため TEF 値の設定はありません。

本報では、OA 群の機器分析法（LC/MS/MS）を紹介します。

M. Kobayashi

■ 標準品の分析

OA と DTX1 の標準品は、国家計量機関である独立行政法人産業技術総合研究所計量標準総合センター（NMIJ/AIST）の認証標準物質を使用しました。また、DTX2 は、National Research Council Canada の CRM-DTX2 を使用しました。図 1 に、3 成分混合標準溶液（各 1 ppb）を 5 μ L 注入した時のクロマトグラムを、表 1 に保持時間および面積値の 5 回繰り返し再現性をそれぞれ示します。OA 類はエレクトロスプレーイオン化（ESI）法、ネガティブモードで検出が可能です。この時の分析法は通知法に準拠しており、詳細は表 2 に示しました。

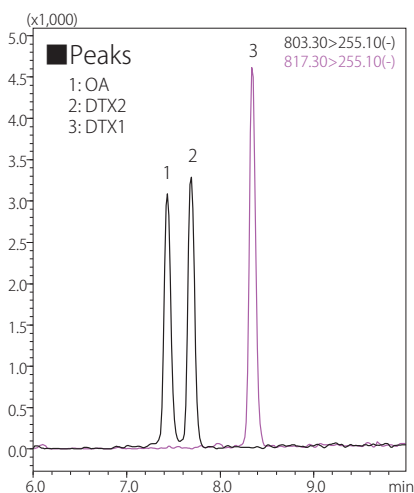


図 1 標準溶液の MRM クロマトグラム（各 1 ppb）

表 1 再現性（1 ppb、n=5）

	R.T. %RSD	Area %RSD
OA	0.0419	2.03
DTX2	0.0401	2.98
DTX1	0.0385	2.08

表 2 分析条件

Column	: Shim-pack Scepter™ C18 (100 mm × 2.0 mm I.D., 1.9 μ m)
Mobile Phases	: A 2 mmol/L ammonium formate water with 50 mmol/L formic acid B Acetonitrile / Water : 95 / 5 (v/v) including 2 mmol/L ammonium formate with 50 mmol/L formic acid
Time Program	: B conc. 40 % (0-2.5 min) → 100 % (7.5-12.5 min) → 40 % (12.51 - 17.5 min) (フロントカットバルブを使用し、6~10 min のみを MS へ導入)
Flow Rate	: 0.2 mL/min
Column Temperature	: 40 °C
Injection Volume	: 5 μ L (認証標準物質 ホタテガイ中腸腺試料分析の時は 2 μ L)
Probe Voltage	: -3.0 kV (ESI-negative mode)
IF/DL/BH Temperature	: 350 / 150 / 450 °C
NG / HG / DG Flow	: 3 / 5 / 15 L/min
ESI probe position	: +2 mm
MRM Transition	: OA 803.30>255.10, 803.30>113.10 DTX2 803.30>255.10, 803.30>113.10 DTX1 817.30>255.10, 817.30>113.10

■ 検量線の直線性

図 2 に各 3 成分の検量線を示します。各成分 0.1~10 ppb の濃度範囲で検量線を作成したところ、寄与率 $r^2=0.999$ 以上と良好な直線性が得られました。

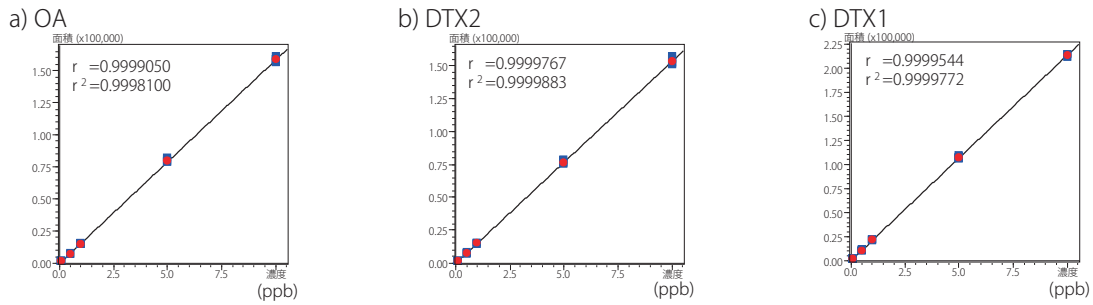


図2 検量線の直線性 (0.1~10 ppb)

■ 認証標準物質 ホタテガイ中腸腺の分析

認証標準物質 NMIJ CRM 7520-a ホタテガイ中腸腺^{*1} を使用し、通知法に準拠し、抽出、加水分解、精製の処理を実施しました (図3)。加水分解後の中和の為に、2.5 mol/L HCl を 300 μ L 添加しました (通知法別添では 250 μ L)。精製は、逆相系ポリマー固相抽出カラム (200 mg、6 cc) を使用しました。

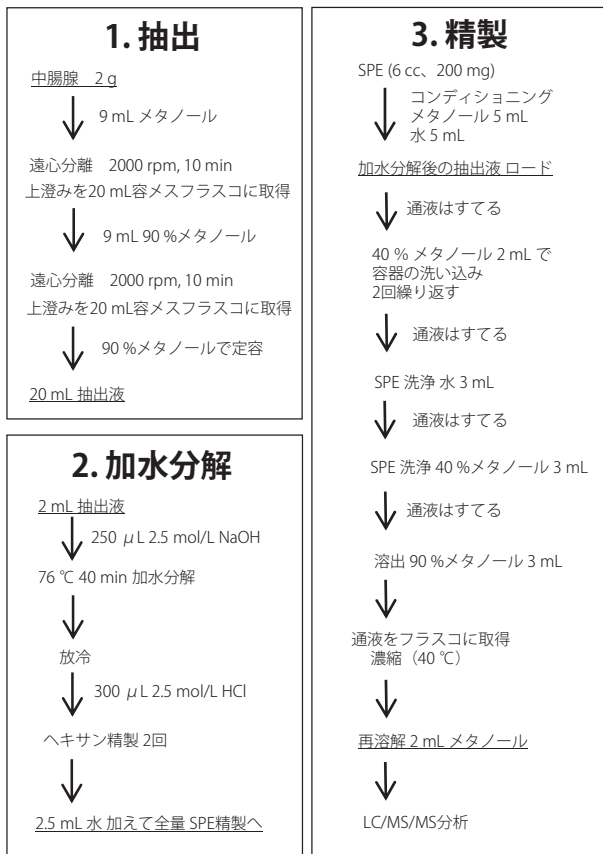


図3 前処理

表3 定量値と回収率

化合物	認証標準物質		抽出試料				
	認証値 (mg/Kg)	拡張不確かさ 質量分率 (mg/Kg)	定量値 (mg/Kg)	回収率 (%)	面積値 平均 (n=6)	標準偏差	面積値 %RSD (n=6)
OA	0.205	0.061	0.192	93	105424	2414.48761	2.29
DTX1	0.450	0.110	0.385	85	253677	1439.89408	0.57

ホタテガイ中腸腺由来夾雑物の LC/MS/MS へのマトリクス効果は大きいと一般的に知られています。測定試料を充分希釈する事により影響をなくす事はできますが、今回は様々な試料に対応可能である、標準添加法の方法を紹介します。購入した OA 類の標準品の量が少ないため、加水分解前の抽出液に LC/MS/MS 分析時の濃度として、10、20、50 ppb となるように標準品を添加し検量点を作成しました。図4にSPE精製後の中腸腺抽出液 (標準品未添加) のクロマトグラム、図5に検量線、表3に認証標準物質の各成分の濃度、定量値、添加回収率、中腸腺抽出液 (標準品未添加) の6回繰り返し面積値再現性を示しています。マトリクスが多いとされているホタテガイ中腸腺抽出液の各成分ピーク的面積再現性%RSDはOA 2.29、DTX1 0.57と良好で、OAとDTX1の回収率は93%と85%であり、通知法とLCMS-8060を使用し、下痢性貝毒の定量が可能であることが示されました。

*1 国立研究開発法人 産業技術総合研究所 計量標準総合センター 認証標準物質 NMIJ CRM 7520-a No.009 ホタテガイ中腸腺 (下痢性貝毒分析用)

認証値の不確かさは、合成標準不確かさと抱合係数 $k=2$ から決定された拡張不確かさであり、約95%の信頼の水準をもつと推定される区分の半分の幅を表す。

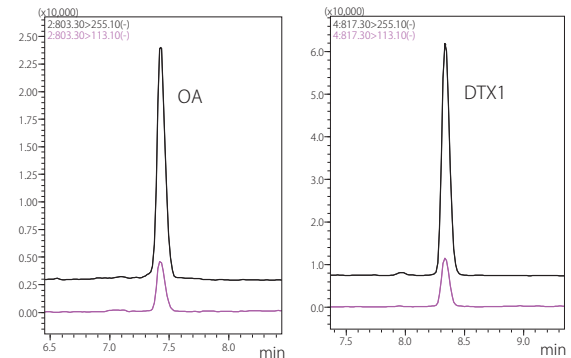


図4 認証標準物質のクロマトグラム

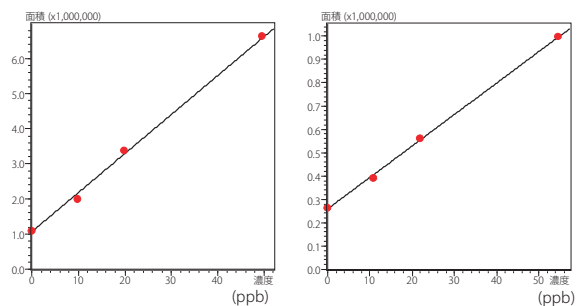


図5 標準添加法検量線

Shim-pack Scepter 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。その他、本書に掲載されている会社名、製品名、サービスマーク、およびロゴは、各社の商標および登録商標です。なお、本文中には TM、®マークを明記していない場合があります。

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

初版発行：2019年7月

島津コールセンター ☎0120-131691
(075) 813-1691

※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。改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。