

## LC/MS/MS を用いた下痢性貝毒の分析法適用の検討

## Examination into the Application of LC-MS/MS Analysis of Diarrhetic Shellfish Poisoning

安永 恵  
Megumi YASUNAGA

紙本 佳奈  
Kana KAMIMOTO

氏家 あけみ  
Akemi UJIKE

## 要 旨

下痢性貝毒を含む貝類の取扱いについては、平成 27 年 3 月 6 日付け通知により機器分析法が導入され、オカダ酸 (OA) 群について、0.16mgOA 当量/kg の規制値が定められた。また検査法については同日付けで妥当性確認の方法と分析操作例が示され、各検査機関で妥当性確認を行うことと通知された。これを受けて、LC/MS/MS による OA 群の分析法を検討し、市販の二枚貝加工品を用いて妥当性確認を行った結果、真度および精度の目標値を満たしており検査対応が可能となった。

キーワード：下痢性貝毒 OA DTX1 DTX2 LC/MS/MS 妥当性評価

## I はじめに

下痢性貝毒を含む貝類の取扱いについては、「麻痺性貝毒等により毒化した貝類の取扱いについて」(平成 27 年 3 月 6 日付け食安発 0306 第 2 号)<sup>1)</sup>により機器分析法の導入と、オカダ酸 (OA) 群についての規制値 0.16mgOA 当量/kg が定められた。対象物質は OA、ジノフィシトキシシン-1 (DTX1) 及びジノフィシトキシシン-2 (DTX2) 並びにそれらのエステル化合物で、毒性等価係数により OA 当量に換算する。検査法については同日付け食安基発 0306 第 4 号及び食安監発 0306 第 2 号「下痢性貝毒 (オカダ酸群) の検査について」<sup>2)</sup>にて検査法と妥当性確認の方法、分析操作例が通知された。国内で OA 群の認証標準物質の一般向け販売が開始されたことを受け、平成 29 年 3 月 8 日付けで通知が一部改正され、平成 29 年 4 月 1 日からの適用をもって、完全にマウス法から機器分析法に移行した。下痢性貝毒は *Dinophysis fortii* 等の浮遊性渦鞭毛藻が産生する毒素が、プランクトンの捕食者である二枚貝に蓄積したものであるとされている。<sup>3)</sup> 現時点では県内沿岸部で原因プランクトンの繁殖は見られず、毒化した二枚貝が採取された事例はないが、発生地域からの流入があった場合に迅速に対応するために、検査体制を整えておく必要がある。そこで、OA 群 (OA, DTX1, DTX2) 及びそのエステル化合物について、LC/MS/MS 条件の設定、二枚貝からの抽出、精製法を検討して分析法の妥当性確認を行うこととした。対象品については、国内での貝毒監視と出荷規制体制の厳重さから、生鮮状態での流入はほぼなく、県内沿岸部での原因プランクトン発生がない

ため自家採取による事故の可能性もまずないと予想されたため、殻付き生鮮品よりも輸入加工品を対象として優先することとし、冷凍あさり、冷凍ほたてを用いて試験法の妥当性確認を行ったので、その結果を報告する。

## II 方法

## 1 試料

市内の小売店で購入した中国産冷凍あさりおよび冷凍ベビーほたてを試料とした。予備試験で対象物質が検出されないことを確認後、妥当性評価試験用のブランク試料に供した。

## 2 試薬

標準品については、OA および DTX1 は、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が提供している認証標準物質を、DTX2 については National Research Council Canada 製の標準物質を用いた。添加用、検量線用標準液はこれらをメタノールで希釈して使用した。

精製用ミニカラムについては、Waters 製 Oasis PRiME HLB 200 mg を用いた。

## 3 装置及び測定条件

使用した装置及び分析条件を表 1 に示す。

## 4 試験溶液の調製

試験溶液の調製方法を図 1 に示す。通知法の分析操作例により抽出、加水分解を行った後、小池ら<sup>4)</sup>の方法を参考に精製を行った。添加回収試験については、加水分解前の抽出液に規定の 0.05 mg/kg 添加した。

表1 装置及び測定条件

装置: Waters ACQUITY UPLC TQ Detector											
カラム: CORTECS UPLC C18 1.6 $\mu$ m, 2.1 $\times$ 100mm											
移動相: A 水(2mMギ酸アンモニウム及び50mMギ酸含有)											
B アセトリル											
B液(%) 0(30%)–5.0min(95%)–9.0min(95%)–9.1min(30%)–11min(30%)											
流速 0.2ml/min–0.2ml/min–0.2ml/min–0.4ml/min–0.2ml/min											
カラム温度: 40 $^{\circ}$ C 注入量: 5 $\mu$ L 試料室温度: 5 $^{\circ}$ C											
イオン化モード: ESI(-) キャピラリー電圧: 2.7kV Source Temp: 150 $^{\circ}$ C											
desolvation Temp: 450 $^{\circ}$ C desolvation Gas: 900L/h Cone Gas: 50L/h											
MRM条件: 定量	pre	>	pro	Cone(V)	CE(V)	確認	pre	>	pro	Cone(V)	CE(V)
OA,DTX2	803.40	>	255.39	50	50	803.40	>	113.17	50	60	
DTX1	817.45	>	255.36	50	50	817.45	>	113.06	50	60	

### III 結果および考察

#### 1 試料の調製方法について

予備調査で通知の方法に従って試料調製を行ったところ、妨害成分の除去が不十分で、測定値が安定しなかった。十分希釈することでマトリックス効果を低減できる<sup>5)</sup>との報告もあったが、LC/MS/MSの感度が1桁良くないと定量限界 0.01 mg/kg 以下に対応できなかった。そこで、小池らが行った精製カラムの検討結果から、最も良好であったとされる PRiME HLB を精製に用いることにした。その結果、マトリックスの影響を低減でき、操作性も向上した。

#### 2 装置及び測定条件について

LC/MS/MSの分析カラムについては、予備調査では ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7  $\mu$ m, 2.1 $\times$ 100 mm) を使用していたが、マトリックスによるイオン化促進効果で回収率が 130 %を超え、マトリックス添加標準による定量が必要であった。そこで、カラムを CORTECS UPLC C18 (1.6  $\mu$ m, 2.1 $\times$ 100 mm) に変更したところ、マトリックスによる増強作用が殆どなくなり、溶媒標準の検量線で支障なく測定できた。表2に 25 ng/mL マトリックス添加標準の測定値を、図2に標準品、ブランク試料、添加試料の MRM クロマトグラム及びスペクトルを示す。

表2 25ng/mL マトリックス添加標準測定値の比較

カラム	アサリ		ホタテ	
	BEH	CORTECS	BEH	CORTECS
OA	52.10	23.73	45.21	23.86
DTX1	48.18	24.08	43.17	24.83
DTX2	46.41	22.70	44.44	24.92

単位: ng/mL

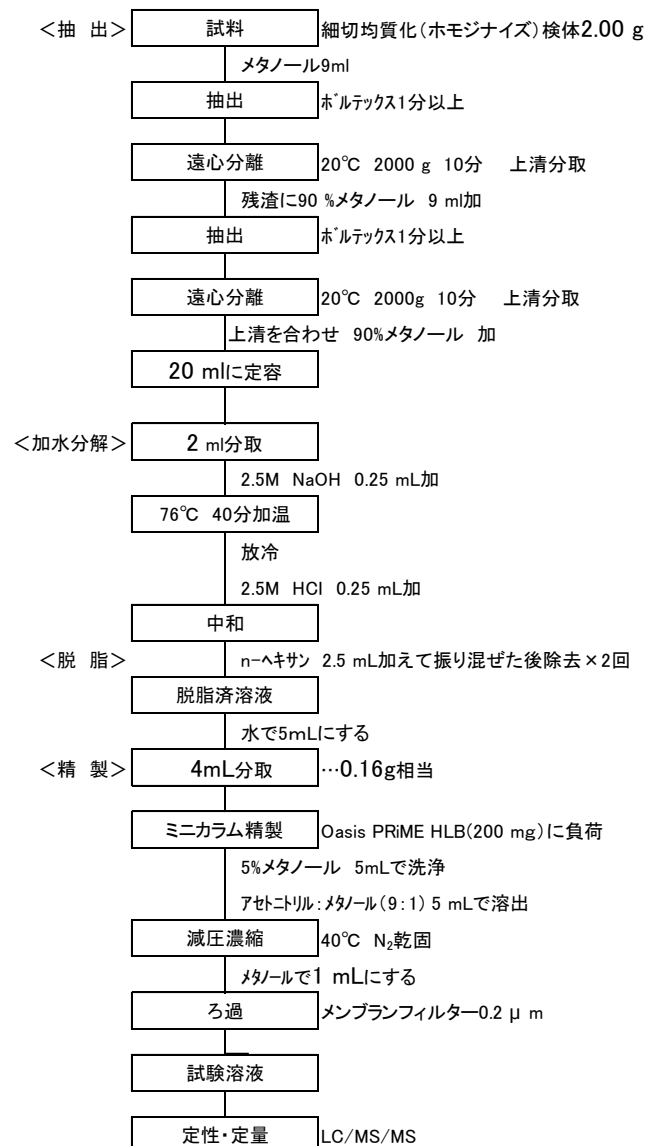


図1 試験溶液の調製方法

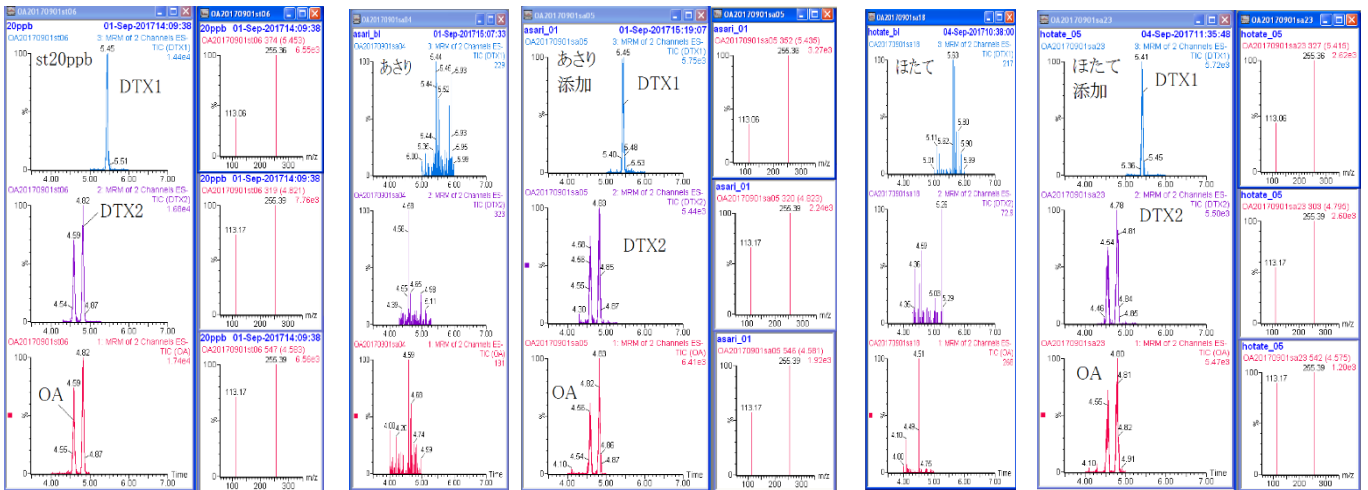


図2 標準品、ブランク試料、添加試料のMRM クロマトグラム及びスペクトル

### 3 添加回収試験について

通知法では添加濃度は原則 0.05 mg/kg とすることになっている。このとき、試料 2 g 当たり各 0.1  $\mu$ g の標準品が必要であるが、DTX2 は全量で 1.9  $\mu$ g 弱しかないため、注釈に従って加水分解前の抽出液に添加することとし、各 1  $\mu$ g/mL のメタノール混液を抽出液 2 mL 当たり 10  $\mu$ L ずつ添加し、加水分解以下の操作を行った。これを 2 併行で 5 日間繰り返し妥当性の確認を行った。その結果を表 3 に示す。冷凍ホタテ、アサリともに目標値を満たしており良好な結果であった。

表 3 二枚貝加工品妥当性評価結果

試料	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
OA	79.4	9.8	10.3
アサリ	DTX 1	74.1	8.1
	DTX 2	81.8	7.3
ホタテ	DTX 1	85.2	6.5
	DTX 2	87.8	13.4
目標値	70~120	$\leq 15$	$\leq 20$

### V まとめ

通知法の分析操作例に従って LC/MS/MS による下痢性貝毒（オカダ酸群）の分析法を検討した。精製・測定条件を変更し、結果が改善された。この試験法を用いて加工食品である冷凍アサリ、冷凍ホタテについて妥当性の確認を行った結果は良好であり、これらの検査対応が可能となった。今後は行政からの要望に沿って対象品目を追加していきたい。

### 文献

- 1) 厚生労働省通知：麻痺性貝毒等により毒化した貝類の取扱いについて（平成 27 年 3 月 6 日付け食安発 0306 第 2 号）
- 2) 厚生労働省通知：下痢性貝毒（オカダ酸群）の検査について（平成 27 年 3 月 6 日付け食安基発 0306 第 4 号及び食安監発 0306 第 2 号）
- 3) 「有毒プランクトンと貝毒発生（解説）」瀬戸内海区水産研究所 HP  
<http://feis.fra.affrc.go.jp/HABD/TPS/HTML/page006.html>
- 4) 小池敬信ら：LC/MS/MS 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（2015）
- 5) 村上紀子ら：機器分析法による下痢性貝毒の試験法の検討，広島市衛研年報，35，45-47（2016）