

LC/MS/MSによる二枚貝の下痢性貝毒（オカダ酸群）検査

武原弘和 坂口美鈴 汐田佳奈美 稲田裕司 小山信 甲斐勇* 藤井幸三

*生活衛生課

1 はじめに

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日付け食安発0306第1号「麻痺性貝毒等により毒化した貝類の取扱いについて」に基づき、検査法がマウス法から機器分析法に変更された。これに伴い下痢性貝毒（オカダ酸群）のLC/MS/MSによる検査法の検討を行った。

2 検査方法

(1) 試薬及び器具

オカダ酸・ジノフィシストキシン-1 (DTX1): 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製認証標準物質、ジノフィシストキシン-2 (DTX2): National Research Council Canada 製認証標準物質、メタノール (LC/MS用)、水酸化ナトリウム (特級)、塩酸 (特級)、1mol/L 酢酸アンモニウム (HPLC用)、PRiME HLB 60mg・200mg (Waters)

(2) 分析装置及び分析条件

液体クロマトグラフ質量分析装置 (LC/MS/MS): LCMS-8050 (島津製作所)

LC 条件

カラム: Shim-pack XR-ODS III 150×2.0mm 2.2µm、カラム温度 45、流速 0.3mL/min、注入量 5µL、移動相: A;1mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液、B;メタノール、グラジエント: B 濃度 40% 0.05分 60% 7.95分 75% 1分 95%(1分) 1分 100%(4分) 0.05分 40%(5分)

MS 条件

検出器: ESI(-)、ネブライザーガス: 3L/min、ヒーティングガス: 10L/min、ドライイングガス: 10L/min、インターフェイス温度 300、DL 温度 250、ヒートブロック温度 300、インターフェイス電圧 -3.0kV

MRM 条件

	オカダ酸	DTX1	DTX2
定量イオン	803.60/255.30	817.50/ 255.25	803.60/255.30
確認イオン 1	803.60/113.20	817.50/ 113.00	803.60/113.20
確認イオン 2	803.60/151.35	817.50/ 151.20	803.60/151.35

(3)試験溶液の調製

a)抽出

均質化した試料 2.00g を計り取り、メタノール 9mL を加え、ホモジナイズした後、遠心分離し上澄を得る。沈殿に 90%メタノール 9mL を加え、懸濁後 10 分間超音波抽出、遠心分離する。得られた上澄を合せて、90%メタノールで正確に 20mL とする。

b)加水分解

抽出液 2.00mL を取り、2.5mol/L 水酸化ナトリウム 0.25ml 加え、76 °C で 40 分間加水分解する。放冷後、2.5mol/L 塩酸 0.25mL 加えて中和する。

c)精製

加水分解液に水 3mL 加えて混和、PRiME HLB に注入。20%メタノール 2mL で 2 回洗浄する。次に 80%メタノール 4mL で溶出させる。溶出液を正確に 4mL とし、試験溶液とする。

(4)添加回収試験

加水分解前の抽出液 2.00mL に添加濃度 0.05mg/kg となるように各標準品を添加した。固相カラム PRiME HLB は 60mg、200mg の 2 種類を用いた。LC/MS/MS での測定において、試験溶液とマトリックス効果を確認するために試験溶液をメタノールで 5 倍に希釈したものを測定した。検量線についてはメタノールを溶媒とした標準液による絶対検量線を用いた。

3 結果

(1)添加回収試験

試料として、アサリ、ハマグリ、カキを用いて添加回収試験を実施した。

	PRiME HLB60mg 抽出			PRiME HLB200mg 抽出		
	オカダ酸	DTX1	DTX2	オカダ酸	DTX1	DTX2
アサリ	99.9%	93.1%	88.4%	93.4%	104.1%	81.3%
アサリ 5 倍希釈	84.3%	96.4%	85.5%	80.0%	99.4%	87.5%
ハマグリ	92.1%	- *1	86.8%	100.4%	109.3%	91.4%
ハマグリ 5 倍希釈	94.1%	- *1	88.7%	96.4%	103.4%	87.6%
カキ	98.0%	87.8%	92.1%	- *2	- *2	- *2
カキ 5 倍希釈	107.9%	92.9%	102.2%	- *2	- *2	- *2

*1 : 添加ミスのため削除、*2 : 未実施

結果は良好で、回収率は 80%から 110%の範囲内にあった。

アサリ・ハマグリにおいて、固相カラム PRiME HLB は 60mg と 200mg で差がほとんどない結果が得られた。

試験溶液と 5 倍希釈試験溶液との比較では、回収率にあまり差はなく、今回の条件で

はマトリックス効果は回避できていると考えられる。

(2) 妥当性評価試験

アサリについての妥当性評価を実施した。分析者 1 名が 2 併行 5 日間実施する計画とし、試験溶液を測定した。結果を下記の表に示す。

	PRiME HLB	真度(%)	併行精度(%)	室内精度(%)
オカダ酸	60mg	98.2 (96.6)	3.90 (1.28)	5.09 (7.54)
	200mg	99.7 (93.1)	3.23 (4.22)	5.47 (4.75)
DTX1	60mg	95.3 (95.4)	2.67 (2.83)	6.02 (5.51)
	200mg	103.2 (102.4)	1.16 (3.26)	4.74 (3.93)
DTX2	60mg	88.1 (89.3)	2.09 (1.28)	2.17 (4.67)
	200mg	90.8 (89.0)	3.13 (2.93)	7.23 (4.84)
目標値		70 ~ 120	15	20

括弧内は 5 倍希釈試験溶液の結果

真度、精度ともに妥当性ガイドライン¹⁾の目標値を満たしていた。

選択性においても各オカダ酸群 0.01mg/kg に相当する濃度での S/N 比は 10 以上を満たしていた。

オカダ酸群の定量下限値は 0.005mg/kg でガイドラインの 0.01mg/kg 以下を満たしていた。

以上の結果から、アサリのオカダ酸及び DTX1、DTX2 の分析には本測定法が適用できると考えられる。

4 まとめ

今回、LC/MS/MS による下痢性貝毒の測定法を検討したところ、アサリ、ハマグリ、カキにおいて良好な添加回収率が得られた。

アサリにおいて妥当性評価を実施し、ガイドラインの目標値を満たすことができ、本検査法が有用であることが判明した。

今後、ハマグリ、カキの妥当性評価の実施と、他の貝類の下痢性貝毒測定の検討が必要になると考える。

参考文献

- 1) 平成 27 年 3 月 6 日食安基発 0306 第 3 号、食安監発 0306 第 1 号「下痢性貝毒(オカダ酸群)の検査について」