

LC-MS/MS を用いた二枚貝中の麻痺性貝毒及び テトロドトキシン分析法の検討

高井靖智, 高良浩司*¹, 桑田真里*², 片田裕士, 新宅沙織, 樋下勝彦*³

Analysis of Paralytic shellfish toxins and Tetrodotoxin in Bivalves by LC-MS/MS

Yasutomo Takai, Koji Takara*¹, Mari Kuwata*², Yuji Katada, Saori Shintaku
and Katsuhiko Hinoshita*³

キーワード：麻痺性貝毒，テトロドトキシン，二枚貝，液体クロマトグラフタンデム質量分析装置

Key Word: Paralytic Shellfish Toxins, Tetrodotoxin, Bivalve, LC-MS/MS

はじめに

麻痺性貝毒はアレキサンドリウム属等の渦鞭毛藻類が産生する神経毒で，サキシトキシン (STX) をはじめゴニオトキシン (GTX) 群，デカルバモイルゴニオトキシン (dcGTX) 群，C トキシン群など 20 種以上の同族体が確認されている。これら麻痺性貝毒に汚染された渦鞭毛藻を捕食，蓄積することで起こる二枚貝の毒化は，日本近海において問題となっており，和歌山県沿岸でも有毒プランクトンの発生および二枚貝の毒化が度々確認されている。また近年，二枚貝から麻痺性貝毒と同じ神経毒であるフグ毒 (テトロドトキシン (TTX)) が検出される例が報告されており，二枚貝への新たな懸念も生じている。

当センターでは自然毒による食中毒に迅速に対応するため，平成 30 年度から調査研究で分析体制の整備を進めている^{1~3)}が，麻痺性貝毒分析法については検討できておらず，現状では食中毒への迅速な対応は難しい。また，麻痺性貝毒の公定法であるマウス毒性試験法は，毒成分を総合的に評価する手法であるため，各成分の詳細なデータを得ることができない等，様々な問題点がある。

そこで本研究では，これまで食中毒への対応が

難しかった二枚貝中の麻痺性貝毒および TTX (図 1) の検査体制を整備することを目的に，LC-MS/MS を使用した一斉分析法の検討を行ったので報告する。

実験方法

1. 試料

和歌山県内で流通していたアサリ，カキ

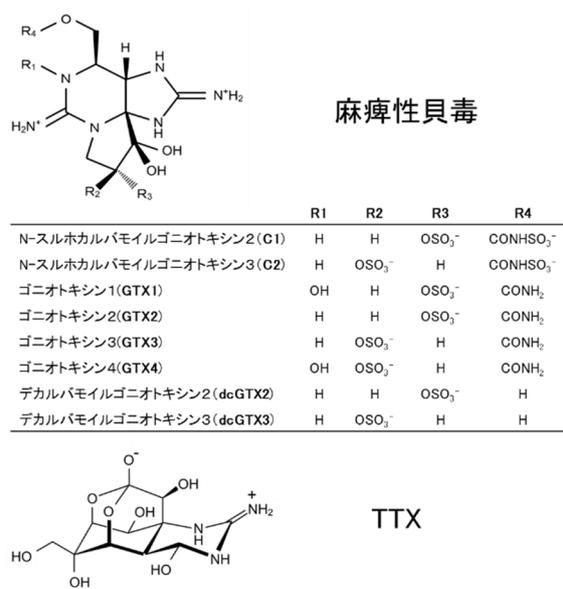


図 1. 測定対象とした麻痺性貝毒 8 成分および TTX の構造

2. 試薬

1) 標準品

(1) 標準品

測定対象とした麻痺性貝毒8成分については、National Research Council Canada 製の C1&2, GTX1&4, GTX2&3 および dcGTX2&3 を用い、TTX は和光純薬製を使用した (図1)。

(2) 標準溶液

C1&2, GTX1&4, GTX2&3 および dcGTX2&3 の標準品をアセトニトリルで希釈した標準液および TTX 標準品を 0.1%酢酸で溶解した標準液を混合し、アセトニトリルを加え9成分混合標準溶液を調製した。検量線用標準液は混合標準溶液を 0.25%ギ酸含有 50%アセトニトリルで適宜希釈して作成した。

2) 溶媒および試薬

アセトニトリル, メタノール, ギ酸および酢酸は富士フィルム和光純薬製 LC/MS 用, アンモニア水は富士フィルム和光純薬製特級, 1 mol/L ギ酸アンモニウム溶液は関東化学製 HPLC 用, 塩酸は関東化学製有害金属測定用を使用した。水は ELGA LabWater 製 PURELAB Chorus1 Analytical Research で精製した超純水を使用した。

3) 固相抽出カラム

固相抽出カラムとして, Waters 社製 Oasis PRiME HLB(60 mg/3 cc) (Oasis PRiME HLB カラム) および SUPELCO 社製 ENVI-Carb (500 mg/6 mL) (ENVI-Carb カラム) を使用した。

4) フィルター

遠心式限外ろ過フィルターとして Merckmillipore 社製 Amicon Ultra-0.5, 10kDa (Amicon Ultra-0.5) を使用した。

3. 装置条件

LC-MS/MS 条件を表1に, MRM 条件を表2に示した。

4. 試験溶液の調製

試験溶液の調製方法を図2に示した。

細切した試料 3 g に 0.1 N 塩酸 3 mL を加えボ

表1. LC-MS/MS 条件

LC: Agilent1200シリーズ
MS/MS: Agilent 6460QQQ
カラム: 東ソー TSKgel Amide-80(2.0×150 mm,2.0 μm)
カラム温度: 40°C
移動相: A液 5 mM HCOONH ₄ + 0.05%HCOOH aq B液 CH ₃ CN
グラジエント: B液%; 75%(0 min) → 70%(12.5 min) → 40%(25-30 min) → 75%(31-45 min)
流速: 0.175 mL/min
注入量: 5 μL
ドライガス流速及び温度: 10 L/min, 300°C
ネブライザーガス圧力: 50 psi
ソースガス流速及び温度: 12 L/min, 150°C
キャピラリー電圧: ±3000 V

表2. MRM 条件

成分名	ESI	プリカーサーイオン (m/z)	Frag (V)	定量イオン (m/z)	CV (V)	定性イオン (m/z)	CV (V)
C1	+	396.0	100	316.1	13	298.1	22
C2	+	396.0	100	298.1	16	316.1	7
GTX1	-	410.0	100	367.0	15	349.0	15
GTX2	-	394.0	100	351.0	10	333.0	18
GTX3	+	396.0	100	298.1	16	316.1	7
GTX4	+	412.0	120	314.1	18	332.1	11
dcGTX2	-	351.0	100	333.0	10	164.0	25
dcGTX3	+	353.0	100	255.1	16	273.1	6
TTX	+	320.1	100	301.9	26	161.9	44

均質化した試料 3 g
 | — 0.1 N HCl 3 mL
 ボルテックスで攪拌
 |
 沸騰水中で5分間加温
 |
 放冷(室温まで)
 |
 遠心分離 5000 × g ,10 min
 |
 上清(抽出液)を1 mL採取
 |
 0.28 %アンモニア水でpH7程度に調整
 |
 水で5 mLに定容(5倍希釈抽出液)
 |
 Oasis PRiME HLBカラム (コンディショニングなし)
 | — 5倍希釈抽出液 1 mL 負荷
 溶出液を500 μL採取
 |
 限外ろ過(Amicon Ultra-0.5) 10000 × g ,20 min
 |
 ろ液
 |
 ENVI-Carbカラム
 | (コンディショニング)
 | 0.25 %ギ酸含有50 %アセトニトリル 6 mL
 | 0.028 %アンモニア水 6 mL
 | — ろ液 400 μL 負荷
 | 水2.5 mLで洗浄
 | 0.25 %ギ酸含有50%アセトニトリル 4 mLで溶出
 LC-MS/MS(50倍希釈)

図2. 試験溶液の調製方法

ルテックスで攪拌後、沸騰水中で5分間加熱し、室温まで放冷後、遠心分離 (5000×g, 10 min) した (抽出液)。抽出液の上清 1 mL を採取し、0.28%アンモニア水で pH7 程度に調整した後、水で 5 mL に定容した (5 倍希釈抽出液)。

続いて、5 倍希釈した抽出液 1 mL を Oasis PRiME HLB カラムに負荷し、得られた溶出液 500 μL を限外ろ過 (Amicon Ultra-0.5, 10000×g, 20 min) した。次に、得られたろ液 400 μL をあらかじめ 0.25%ギ酸含有 50%アセトニトリル 6 mL および 0.028%アンモニア水 6 mL でコンディショニングした ENVI-Carb カラムに負荷した。水 2.5 mL でカラムを洗浄した後、0.25%ギ酸含有 50%アセトニトリル 4 mL で溶出した液を試験溶液とした。

結果および考察

1. LC-MS/MS 条件の検討

今回分析対象とした麻痺性貝毒 8 成分および TTX は極性が高いため、極性物質の測定に有効な HILIC 系のカラムを用いて測定条件を検討したところ、東ソー TSKgel Amide-80 (2.0×150 mm, 2.0 μm) を使用することで、分析対象 9 成分を分離、再現性ともに良好に測定できた (図 3)。

今回検討した条件において、C1 は 4.7~938 nM, C2 は 1.4~274 nM, GTX1 は 2.9~229 nM, GTX2 は 5.1~410 nM, GTX3 は 2.2~435 nM, GTX4 は 1.8~180 nM, dcGTX2 は 5.0~400 nM, dcGTX3 は 1.5

~294 nM, TTX は 0.8~157 nM の範囲でそれぞれ決定係数が 0.99 以上の良好な直線性が得られた。

2. 前処理条件の検討

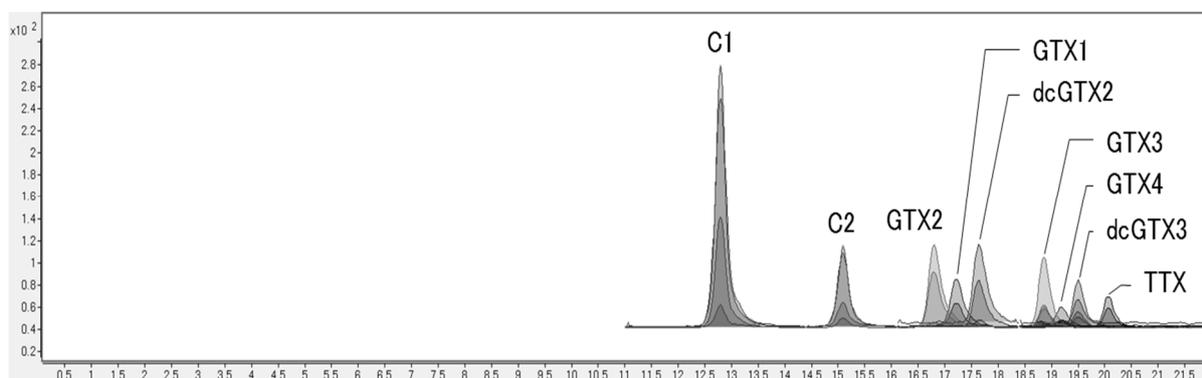
抽出操作は、公定法に準じた方法により実施することとし、二枚貝由来の夾雑成分 (マトリクス) による測定値への影響を軽減できる精製方法を種々検討した。

試料にアサリを用いて抽出操作を実施し得られた抽出液を沼野ら⁴⁾ および千葉ら⁵⁾ の方法を参考にした各方法 (表 3) で精製し、得られたブランク溶液に標準液を添加し調製したマトリクスマッチング標準液と同濃度の溶媒標準液の AREA 値を比較した。マトリクスマッチング標準液の AREA 値を溶媒標準液の AREA 値で除したものの割合 (マトリクス効果 (%)) を表 3 に示した。

今回検討した精製条件では、全ての成分がイオン化抑制を受ける結果となったが、その中でも最もマトリクスによる影響を軽減できたのが OASIS PRiME HLB カラムによる精製、Amicon Ultra-0.5 による限外ろ過および Envi-Carb カラムによる精製を併用する方法であったため、これらを使用する精製方法を採用した。

3. 添加回収試験

アサリおよびカキを対象とし、添加回収試験を実施した。なお、標準品を十分に入手できなかったため、試験溶液の調製方法に従って得られた 5 倍希釈抽出液に麻痺性貝毒および TTX の標準品を



各成分の濃度は、C1 は 94 nM, C2 は 27 nM, GTX1 は 57 nM, GTX2 は 103 nM, GTX3 は 44 nM, GTX4 は 18 nM, dcGTX2 は 100 nM, dcGTX3 は 29 nM, TTX は 16 nM

図 3. 混合標準液のクロマトグラム (重ね書き)

表 3. 各精製方法によるマトリクス効果 (%)

精製方法 [※]	C1	C2	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	dcGTX2	dcGTX3	TTX
① Oasis PRIME HLB +Amicon Ultra-0.5 (試料希釈倍率: 40倍)	32.7	24.1	38.0	29.9	62.2	65.5	41.5	62.2	42.9
②ヘキサン脱脂 +Oasis PRIME HLB +Amicon Ultra-0.5 (試料希釈倍率: 40倍)	33.0	22.5	33.9	27.8	63.4	64.4	37.9	62.7	42.7
③Oasis PRIME HLB +Amicon Ultra-0.5 +ENVI-Carb (試料希釈倍率: 50倍)	73.0	60.8	73.2	60.1	90.8	95.3	79.7	86.8	75.6

※各精製方法の詳細は次のとおり.

- ① 抽出液を水で 10 倍希釈した後, その内 0.5 mL を Oasis PRIME HLB カラムに負荷. 溶出液を限外ろ過 (Amicon Ultra - 0.5, 10000 ×g, 20 min) し得られた液 0.1 mL にアセトニトリル 0.3 mL を加えた液を試験溶液とした.
- ② 抽出液を水で 10 倍希釈した後, ヘキサン 3mL を加え液液分配し, ヘキサン層を除去する操作を 2 回繰り返した. その後, 得られた溶液 0.5 mL を Oasis PRIME HLB カラムに負荷. 溶出液を限外ろ過 (Amicon Ultra -0.5, 10000 ×g, 20 min) し得られた液 0.1 mL にアセトニトリル 0.3 mL を加えた液を試験溶液とした.
- ③ 試験溶液の調製方法 (図 2) のとおり.

表 4. 添加回収試験結果

試料	回収率 (%) (RSD%)								
	C1	C2	GTX1	GTX2	GTX3	GTX4	dcGTX2	dcGTX3	TTX
アサリ (n = 6)	73.0	62.5	72.8	55.5	89.9	97.7	76.5	88.0	77.5
	(4.5)	(4.0)	(3.3)	(3.6)	(3.9)	(4.2)	(3.8)	(5.6)	(4.4)
カキ (n = 3) (試験溶液を 2 倍希釈)	77.7	39.9	77.4	61.7	74.5	50.6	82.8	53.9	74.7
	(4.5)	(5.1)	(2.9)	(5.1)	(6.3)	(16.2)	(2.7)	(8.9)	(3.6)
添加濃度 ($\mu\text{mol}/\text{kg}$)	0.94	0.27	0.57	1.03	0.44	0.18	1.00	0.29	0.16

添加した. 標準品の添加濃度および溶媒標準検量線
線で算出した添加回収率を表 4 に示した.

アサリ (n=6) については, 全成分で 50%以上の回収率が得られ, バラツキも RSD (%) が 10%以内となり, マトリクス標準液による補正なしでも危機事象発生時に適用できると考えられた.

一方, カキ (n=3) については, 試験溶液をさらに 2 倍希釈して測定したが, C2 など一部成分でアサリに比べると回収率が低くなり, より強いマトリクス効果が示唆された. しかし, C2 の 39.9%を除き, その他成分の回収率は 50%を上回っていたため, スクリーニング分析法として十分使用できると思われた.

まとめ

今回, LC-MS/MS を使用した二枚貝中の麻痺性貝毒および TTX の一斉分析法を検討した. 本方法は, 精製方法に改善の余地はあるものの, 食中毒時のスクリーニング分析法として活用できると思

われた.

文 献

- 1) 高井靖智, 他: フルオレスカミン誘導体化 HPLC 法による不揮発性腐敗アミン一斉分析法の検討, 和環衛研年報, 67, 35-39, 2021
- 2) 高井靖智, 他: 植物性自然毒一斉分析法の検討, 和環衛研年報, 67, 40-43, 2021
- 3) 高井靖智, 他: LC-MS/MS を用いたシガトキシン類分析法の検討, 和環衛研年報, 67, 44-47, 2021
- 4) Satoshi Numano. et al. :Temporal Variation of the Profile and Concentrations of Paralytic Shellfish Toxins and Tetrodotoxin in the Scallop, *Patinopecten yessoensis*, Cultured in a Bay of East Japan, Mar. Drugs, 17, 2019
- 5) 千葉美子, 他: マボヤの麻痺性貝毒分析法の検討, 宮城県保健環境センター年報, 39, 49-52, 2021