

## 機器分析法による下痢性貝毒の試験法の検討

村上 紀子\*<sup>1</sup> 佐々木 珠生 小中 ゆかり 松室 信宏\*<sup>2</sup>  
福田 裕

平成 27 年 3 月に厚生労働省より発出された通知<sup>1)</sup>(以下「通知」という。)により、下痢性貝毒を含む貝類の取扱いについては、国際的に機器分析法の導入が進められている現状に鑑み、機器分析法が導入されることとなった。これを受け、当所において下痢性貝毒のうちオカダ酸(以下「OA」という。)及びジノフィシストキシン-1(以下「DTX1」という。)について機器分析法を検討した。通知を基にカキを用いた妥当性の確認を行った結果、性能評価基準を満たし、検査可能となった。

キーワード： 下痢性貝毒, LC-MS/MS, カキ, 妥当性評価

### はじめに

麻痺性貝毒及び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」(昭和 55 年 7 月 1 日付け環乳第 29 号)に基づき取り扱ってきたが、通知<sup>1)</sup>により、下痢性貝毒を含む貝類の取扱いについては、国際的に機器分析法の導入が進められている現状に鑑み、機器分析法が導入されることとなった。OA, DTX1 及び ジノフィシストキシン-2 並びにそれらのエステル化合物を分析対象化合物とし、毒性等価係数を用いて OA 当量に換算したものの総和を下痢性貝毒の規制値 0.16 mg OA 当量/kg と定められた。また、その試験法は性能評価基準を満たす方法とし、分析法の妥当性を評価した上で実施することと通知された。

当所では、広島県貝毒対策実施要領に基づくモニタリングとしての貝毒検査を実施しており、下痢性貝毒については年 1 回、マウス試験法により実施している。通知を受け、早急に機器分析法へ移行するため、LC-MS/MS を用いた試験法を検討したので、その概要について報告する。併せて、カキを用いて妥当性評価を行った結果についても報告する。

### 方 法

#### 1 検討試料及び妥当性評価対象試料

当所で実施している測定対象であるカキを使用

した。検討用試料について、対象項目の OA 及び DTX1 が検出されないことが確認されたため、妥当性評価対象試料としても同試料を用いることとした。

添加回収試験は、試料の 90%メタノール抽出液 2mL にそれぞれの添加濃度が 0.05mg/kg となるように添加し、30 分静置後、加水分解処理以降の操作を行った。

#### 2 試薬

標準原液は、OA 及び DTX1 は(独)産業技術総合研究所より配布された、認証標準物質により値付けされたものを用いた。各標準原液をメタノールで希釈して、それぞれ標準溶液(100 µg/L)を調製した。これらの標準溶液を混合し、添加回収試験用の混合標準溶液及び検量線作成用の混合標準液(50 µg/L)を調製した。

精製用のオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムには、Waters 社製 Sep-Pak VacC18(200 mg)を、あらかじめメタノール 3mL 次いで水 3mL でコンディショニングして使用した。

試験溶液や標準試料の調製に用いるメタノール及びヘキサンは関東化学(株)製残留農薬試験用を使用した。

LC-MS/MS で用いる試薬について、アセトニトリルは Sigma-Aldrich 社製高速液体クロマトグラフ用を使用した。また、ギ酸及び 1mol/L ギ酸アンモニウムは、それぞれ和光純薬工業(株)製 LCMS 用と高速液体クロマトグラフ用を用いた。

#### 3 装置

高速液体クロマトグラフ装置は(株)島津製作所

\*1：現 環境局業務部産業廃棄物指導課

\*2：現 衛生研究所生物科学部

製 Prominence, 質量分析装置は(株)エービー・サイエックス製 API-4000 を用いた。

#### 4 機器条件

##### (1) LC 条件

移動相:

A 液; 水(2mmol/L ギ酸アンモニウム・50mmol/L ギ酸含有)

B 液; 95%アセトニトリル(2mmol/L ギ酸アンモニウム・50mmol/L ギ酸含有)

グラジエント条件: 表 1 のとおり

流速: 0.15mL/min

カラム: phenomenex 社製 Kinetex C18(内径 2.1 mm, 長さ 100mm, 粒子径 2.6 μm)

ガードカートリッジ: phenomenex 社製 C18(内径 2.1 mm, 長さ 100mm, 粒子径 2.6 μm 用)

カラム温度: 40°C

注入量: 5 μL

##### (2) MS/MS 条件

各標準溶液を用いて, 各種パラメータの最適化を行った。

イオン化法: ESI

測定モード: MRM

測定条件: 表 2 のとおり

なお, 各化合物の定量イオンと確認イオンは表 3 のとおり。

#### 5 試験溶液の調製

通知法<sup>2)</sup>に準じて, 抽出, 加水分解, 精製を行った。ただし, 試験溶液の最終定容量を 10mL とした。

#### 6 検量線の作成

混合標準液をメタノールで希釈して検量線用標準液を調製した。ピーク面積法で検量線を作成した。濃度は 0.2~10 μg/L とした。

#### 7 枝分かれ試験

枝分かれ試験は, 実施者 1 名が, 同一の添加試料を 1 日 2 回(2 併行), 5 日間実施する実験計画で行った。

表 1 グラジエント条件

時間(分)	A 液(%)	B 液(%)
0.0	60	40
2.5	60	40
7.5	0	100
12.5	0	100
13.00	60	40
13.10	Stop	

## 結果と考察

通知法<sup>2)</sup>に準じて分析操作したところ, 回収率が 120%を超過する結果となった。これは, マトリックス効果によるものが大きいと考えられた。試験溶液をメタノールで希釈することにより, その影響が抑えられることが確認され, 定量下限値を考慮し, 最終試験溶液を 10mL とすることとした。これは, 90%メタノール抽出液 2mL に対して 5 倍希釈となる。

この分析条件において, 添加回収試験を行い, 妥当性評価を実施した結果は以下のとおりである。

### 1 選択性

検討用試料のカキを通知法に準じて処理し, 最終試験溶液を 10mL とし, 最適化した LC-MS/MS 条件により測定したところ, 標準溶液のピーク位置に妨害するピークは確認されなかった。

### 2 真度(回収率), 併行精度及び室内精度

表 4 のとおり。

### 3 定量限界

混合標準溶液を用いて濃度範囲 0.1~50 μg/L の検量線の直線性を確認した。しかし, 0.1 μg/L では確認イオンでのピークの S/N 比が 3 未満であったため, 最少濃度を 0.2 μg/L とした。また試験溶液での確認として, ブランク試料の試験溶液に, 濃度が検量線最少濃度となる 0.2 μg/L となるよう混合標準溶液を添加して測定を行い, 定量イオンでのピークの S/N 比が 10 以上であることを確認した。試験溶液濃度 0.2 μg/L は, 試料濃度として 0.01mg/kg に相当し, 性能評価基準を満足した。

これらの検討の結果, カキを対象試料とした OA 及び DTX1 の LC-MS/MS による機器分析法による検査を可能とした。

表 2 MS/MS 測定条件

	Negative
Polarity	Negative
Curtain Gas(psi)	20
Ion Source Gas1(psi)	40
Ion Source Gas2(psi)	30
IonSpray Voltage(V)	-4500
Temperature(°C)	600
Collision Gas	5
Entrance Potential	-10
Resolution Q1	Unit
Resolution Q3	Unit
Dwell Time(msec)	250

表 3 各化合物の定量及び確認イオン

化合物名	Q1 (m/z)	定量条件			定性条件				
		Q3 (m/z)	DP	CE	CXP	Q3 (m/z)	DP	CE	CXP
OA	803.45	255.00	-95	-66	-15	113.10	-95	-94	-17
DTX1	817.59	254.90	-75	-64	-15	113.00	-75	-92	-9

表 4 カキの真度(回収率)及び精度の結果

	回収率 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
OA	99.4	6.0	6.0
DTX1	97.8	7.1	7.1

ま と め

通知法に準じて試験操作を行った結果、最終試験溶液の定容量を 10mL とし、メタノールで希釈することによりマトリックス効果を低減することができた。これにより、カキを対象試料と

して妥当性評価を行った結果、性能評価基準を満足し試験法として適用可能となった。今後は、他の貝種について妥当性評価を実施する予定である。

文 献

- 1) 厚生労働省通知, 食安発 0306 第 1 号, 平成 27 年 3 月 6 日
- 2) 厚生労働省通知, 食安基発 0306 第 3 号, 食安監発 0306 第 1 号, 平成 27 年 3 月 6 日