

LC/MS/MS による下痢性貝毒オカダ酸群の分析

Analysis of Diarrhetic shellfish toxin okadaic acid analogues by LC/MS/MS

貝の毒化は、有毒プランクトンを摂取した貝類の体内に有毒成分が蓄積することで起こります。原因毒には、中毒症状により下痢性貝毒、麻痺性貝毒及び記憶喪失性貝毒等があり、このうち、下痢性貝毒には、オカダ酸(Okadaic acid)群、イエソトキシン(Yessotoxin)群、ペクテノキシン(Pectenotoxin)群等があります。従来、貝毒の分析には、マウス毒性試験法が用いられていましたが、2015年3月の厚生労働省通知(平成27年3月6日食安基発0306号第1号)により、LC/MS/MS法が公定法に採用されました。同時に、ヒトへの毒性が確認されていないイエソトキシン群とペクテノキシン群は、規制対象から外され、オカダ酸群のみが規制対象とされました。また、規制値も、0.05 MU/gから0.16 mg(オカダ酸当量)/kg 可食部へと改正されています。

本報では、通知法に準拠した前処理法及び分析法を用いて、アサリをモデル試料としてオカダ酸群の分析を行った例を紹介します。

分析種は、通知法記載の前処理(アルカリ加水分解)によって生じるオカダ酸(OA)、ジノフィシストキシン-1(DTX1)、ジノフィシストキシン-2(DTX2)の3種としました。各分析種の構造式を図1に示します。分離カラムには、TSKgel ODS-100V 3µm (2.0 mm I.D. x 75 mm, 3 µm)を使用し、ギ酸アンモニウムとギ酸を含む水/アセトニトリルのグラジエント溶離により分離しました。OAとDTX2は、メチル基の位置が異なるのみでモニターイオンが同一であるため、カラムによる分離が重要となります。今回の分析条件では、OAとDTX2は、分離度1.6となり完全分離されています。

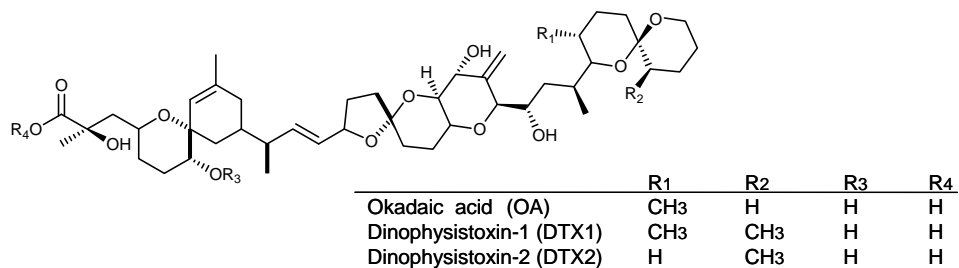


図1 オカダ酸群の構造式

表1 分析条件

Column:	TSKgel ODS-100V 3µm (2.0 mm I.D. x 75 mm, 3 µm)		
Eluent:	A; 2 mmol/L HCOONH ₄ + 50 mmol/L HCOOH B; 2 mmol/L HCOONH ₄ + 50 mmol/L HCOOH in (CH ₃ CN/H ₂ O (95/5))		
Gradient:	B conc(0-2.5 min) 40% → (7.5-15 min) 100% → (15.1 min) 40%		
Flow rate:	0.2 mL/min		
Column temp.:	40 °C		
Injection volume:	5 µL		
MS:	API-4000 (SCIEX)		
Ion source:	ESI(-)		
Mode:	SRM		
Precursor/Product Ions:	OA	803/255	
	DTX1	817/255	
	DTX2	803/255	

標準試料を用いて検量線を作成した結果、いずれの分析種も 0.5~10 µg/L の濃度範囲において、 $r^2 = 0.999$ 以上の相関係数を有する直線性が得られました。定量下限値 (LOQ) は、いずれも、0.5 µg/L であり、通知法に記載された前処理(図 2)を用いた場合、5 µg/kg 可食部に相当します。また、5 µg/L の標準試料の測定による再現性は、RSD (n = 6) で、1.1~1.3 %と良好でした。

アサリ可食部に、OA、DTX1 及び DTX2 の標準物質を各 50 µg/kg の濃度(オカダ酸としての規制値の約 1/3)になるように添加後、通知法に準拠した前処理を行って測定したクロマトグラムを図 3 に示します。各分析種の添加回収率は、OA: 107.1 %、DTX1:106.4 %、DTX2:103.1 %と良好な結果が得られました。

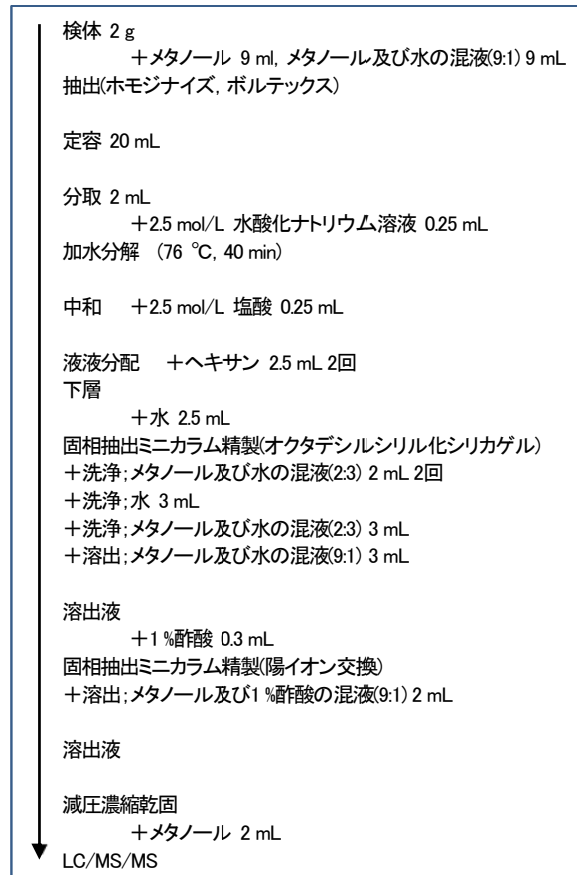


図 2 アサリ試料の前処理法

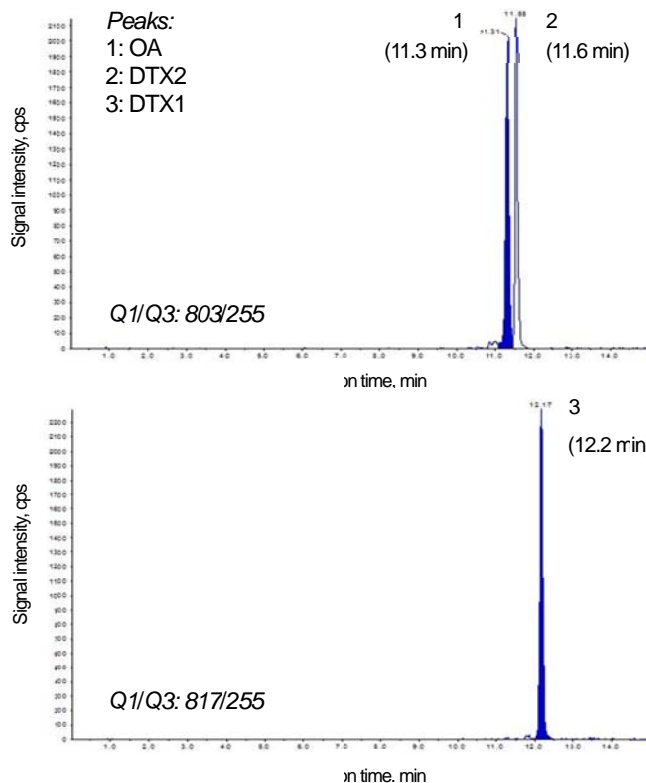


図 3 アサリのアルカリ加水分解物(50 µg/kg 添加試料)のクロマトグラム