

3) LC-MS/MS によるテトロドトキシン分析法の検討

島 絵里子 八木一真*1 中原優子*2 青木 愛 門田健太郎 田村香菜 今辻麻美

はじめに

本県では、平成 26 年から令和 5 年までの過去 10 年間で、フグによる食中毒が 6 件発生している¹⁾。フグによる食中毒は、食後 20 分から 3 時間程度の短時間で現れるとされ²⁾、重症の場合は呼吸困難を起し、他の食中毒に比べ致死率（患者数のうちの死亡者数の割合）が高いことが特徴である。そのため、迅速な食中毒検査が求められるが、食品衛生検査指針に示されているフグ毒（テトロドトキシン）の分析法はマウス検定法³⁾であることから、マウス管理の煩雑さや動物愛護に加えて、高感度、迅速化を目指し、機器分析による検査法の検討が各地でなされてきた^{4~8)}。

当所では、過去に、マウスを使用せず LC-MS/MS を用いた機器分析による迅速分析について報告したが^{9), 10)}、今回、LC-MS/MS の機種変更に伴い、新たな分析条件を検討したので、その結果を報告する。

分析方法

1. 試薬等

1.1 標準品

テトロドトキシン（生化学用）は富士フイルム和光純薬（株）製を用いた。

1.2 その他試薬等

酢酸（HPLC 用）、アセトニトリル（HPLC 用）、ギ酸（LC/MS 用）は富士フイルム和光純薬（株）製を用いた。

1.3 標準溶液等の調製

標準原液は、標準品 1 mg を水で 10 mL に定容し、100 µg/mL とした。検量線用標準溶液は、0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 及び 10 ng/mL となるよう標準原液を水：アセトニトリル（1：1）で適宜希釈した。

1.4 検討用試料

添加回収試験には、有毒部位を除去して市販されているフグ（トラフグ）の筋肉を使用した。

2. 試験溶液の調製

食品衛生検査指針の方法³⁾を参考に操作を行った。

均質化した試料 5.00 g を 100 mLPP 製遠心管に採り、0.1%酢酸 20 mL を加え、2 分間ホモジナイズした。0.1%酢酸でシャフトを洗いこみ、沸騰浴中で時々攪拌しながら 10 分間加熱抽出した。その後、室温になるまで放冷し、

3,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清をガラスろうと（11G2）でろ過した。沈殿物に 0.1%酢酸 15 mL を加え、5 分間振とうし、3,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清をろ過して先のろ液と合わせた。水で 50 mL に定容して抽出液とし、水：アセトニトリル（1：1）で 100 倍希釈し、0.2 µm のシリンジフィルター（Agilent Technologies 社、水系／非水系（兼用））に通し、試験溶液とした。分析フローを図 1 に示す。

3. 装置

Waters 社製の LC-MS/MS 装置にて分析を行った。

LC: ACQUITY UPLC H-Class Plus

MS/MS : Xevo TQ-XS

4. 添加回収試験

テトロドトキシンは毒力 10 MU/g 以下の場合は食用に供しても健康を害する恐れがないと判断されている³⁾。試料 5.00 g に 10 MU/g に相当する濃度である 2.2 µg/g になるようテトロドトキシン標準原液を添加し、30 分間放置した後、試験は 5 併行で実施した。

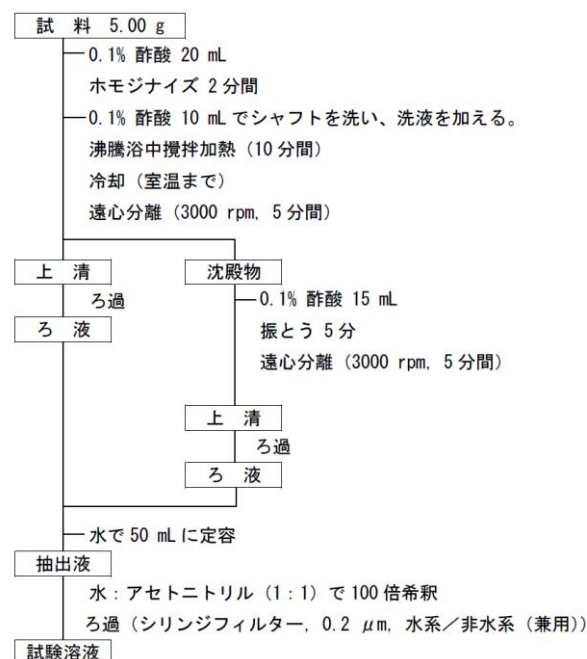


図 1 分析フロー

*1 元保健環境科学研究所職員 *2 現県北広域本部鹿本地域振興局保健福祉環境部

結果及び考察

1. 分析条件の検討

1.1 測定イオン等

テトロドトキシン標準溶液を用いて、インフュージョン分析によって最適条件を得た。得られた測定イオン等の条件を表 1 に示す。

1.2 カラムの検討

まず、当所で保有していた HILIC カラムでの検討を開始したが、保持時間が短く、夾雑物の影響を受けることが問題となった。

そのため、保持を強める効果を持つ他のカラムを選択することとした。テトロドトキシンの分子構造を考慮し、HILIC モードに加えて、カチオン性低分子化合物には陽イオン交換による保持も行うカラム、HILICpak VC-50 2D¹¹⁾での検討を行った。

1.3 移動相の検討

HILICpak VC-50 2D カラムにはギ酸水溶液及びアセトニトリルの相性が良い¹¹⁾ため、A 液 0.1%ギ酸、B 液アセトニトリルで検討した。A : B の比率を変更し、B の比率が高くなると溶出時間が遅れ、A<B になると 20 分以内に溶出されなくなった。なお、比率の変化によるピーク形状の変化はあまり見られなかった。他の夾雑成分の影響や分析時間を考慮し、溶出時間が 6 分程度となるよう A : B の比率を 60:40 に決定し、アイソクラティック分析とした。保持時間 5.4 分にテトロドトキシンのピークが確認された。

試料溶液の組成については、移動相の組成に近づけた方がピーク形状が改善されるとの報告¹²⁾から、最終溶液を水:アセトニトリル (1 : 1) で希釈することとした。また、検量線用標準溶液も同様に水:アセトニトリル (1 : 1) で希釈した。希釈用の水 : アセトニトリルの 10%程度 の比率変更によるピーク形状及び保持時間に差は見られなかった。LC-MS/MS の測定条件を表 2 に示す。

1.4 注入量の検討

当所の装置では、50 μ L まで注入可能であるため、5, 10, 20 μ L の注入量を検討したところ、5 μ L では定量下限値での感度が若干不足し、10 μ L 以上で S/N 比 10 以上の十分な感度のピークを得ることができたため、マトリックスの影響を考慮して注入量を 10 μ L に決定した。

2. 検量線

マトリックスによるイオン化阻害等の影響を確認するために、フグ筋肉を試験溶液と同様に 50 mL に定容後、100 倍に希釈し、このマトリックスを添加したテトロドトキシン 10 ng/mL 標準溶液と添加していない 10 ng/mL 標準溶液を測定した。その結果、マトリックス添加標準溶液で顕著なイオン化阻害は認められなかったため、絶対検量線

法を用いた。検量線を図 2 に示した。

検量線は 0.1~10 ng/mL の範囲において良好な直線性を示し、相関係数 0.999 以上であった。また、定量下限値は 0.1 ng/mL で、試料中濃度に換算すると 0.1 μ g/g であるため、フグ毒の毒力があるとされる 10 MU/g に相当する試料中濃度 2.2 μ g/g を十分に下回る値であった。

表 1 測定イオン等

Ch	Compound name	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone Voltage (V)	Collision Energy (eV)
1	Tetrodotoxin	320.01	162.02	62	36
2	Tetrodotoxin	320.01	301.65	62	22

表 2 LC-MS/MS 測定条件

LC	ACQUITY UPLC H-Class Plus (Waters社製)
Analytical Column	HILICpak VC-50 2D (2.0 mm i.d.×150 mm, 5 μ m, Shodex)
Temperature	40°C
Mobile Phase	(A) 0.1% HCOOH aq./ (B) CH ₃ CN = 60/40
Flow Rate	0.2 mL/min
Injection Volume	10 μ L
MS/MS	Xevo TQ-XS (Waters社製)
Ionization	ESI (positive)
Analysis Mode	MRM
Capillary Voltage	0.5 kV
Source Temperature	150°C
Desolvation Temperature	400°C
Cone Gas Flow	150 L/hr
Desolvation Gas Flow	800 L/hr

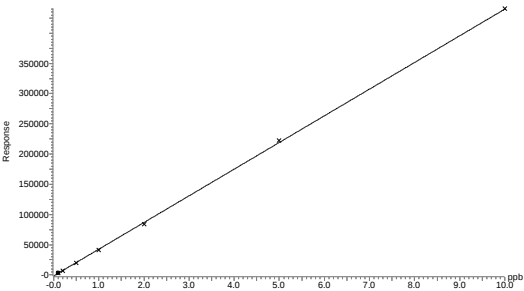


図 2 テトロドトキシンの検量線

3. 添加回収試験

試料中濃度 2.2 μ g/g となるようテトロドトキシンを添加し、添加回収試験 5 併行で実施したところ、平均回収率は 87.0%、標準偏差 0.046、併行精度 2.4 RSD%であった。

添加回収試験におけるテトロドトキシン標準溶液 2 ng/mL 及び試験溶液のクロマトグラムを図 3 に示す。試験溶液中のテトロドトキシンのピークは、S/N 比が 10 以上あり、十分な感度が得られた。また、マトリックス由来成分等による妨害ピークは見られなかった。

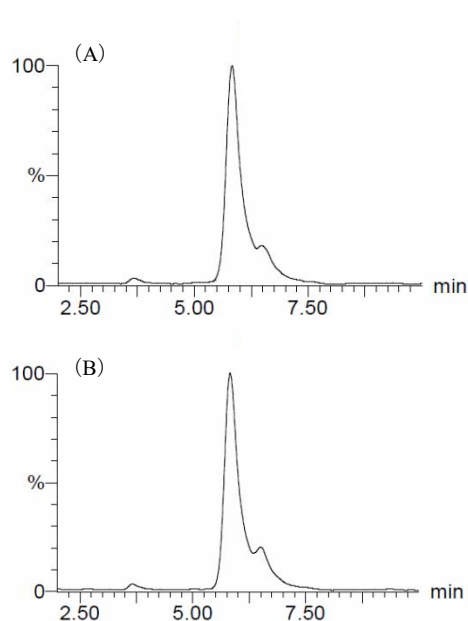


図3 テトロドトキシンのクロマトグラム
(A) 標準溶液 2 ng/mL, (B) 添加回収試験溶液

ま と め

今回, LC-MS/MS 装置の機種変更に伴い, フグ毒テトロドトキシンの分析条件を検討し, 分析に適したカラム及び移動相条件を新たに決定した。フグ(トラフグ)の筋肉を用いた添加回収試験を行ったところ, 平均回収率は 87.0%, 併行精度 2.4 RSD%であった。定量下限値は, 試料中濃度に換算すると 0.1 $\mu\text{g/g}$ であるため, フグ毒の毒力があるとされる 10 MU/g に相当する試料中濃度 2.2 $\mu\text{g/g}$ を十分に下回る値であった。これらの結果から, この分析法が食品中のテトロドトキシンの定量に有用であることが確認できた。

本県におけるフグによる食中毒は, フグの味噌汁やフグの煮付け等の調理品が原因となっているため, 今後は, 実際の食中毒に備えて, 当該調理品を想定した追加検討を行う予定である。さらに, 食中毒発生時には, 食品残渣だけでなく, 患者血清等の生体試料を検査するケースも想定されるため, 生体試料中のテトロドトキシンの分析について検討していくこととしている。

文 献

- 1) 熊本県健康危機管理課: 熊本県内におけるフグによる食中毒発生状況
<https://www.pref.kumamoto.jp/soshiki/30/4929.html> (2025 年 1 月閲覧)。
- 2) 厚生労働省: 自然毒のリスクプロファイル: 魚類: フ

グ毒

https://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/poison/animal_det_01.html (2025 年 1 月閲覧)。

- 3) 公益社団法人日本食品衛生協会: “食品衛生検査指針・理化学編”, p.661-666 (2005), (公益社団法人日本食品衛生協会)。
- 4) 立野幸治, 敷田行雄, 藤原美智子, 吹屋貞子: 山口県環境保健センター所報, 50, 47-49 (2007)。
- 5) 下堂菌栄子, 西村修一, 大小田修司, 福司山郁恵, 岩屋あまね, 榎元清美, 佐久間弘匡: 鹿児島県環境保健センター所報, 11, 98-101 (2010)。
- 6) 浦山豊弘, 肥塚加奈江, 赤木正章, 北村雅美, 大畠律子, 石井 学: 岡山県環境保健センター年報, 37, 133-136 (2013)。
- 7) 古井真理子, 藤井愛実, 松渕亜希子: 秋田県健康環境センター年報, 17, 34-36 (2021)。
- 8) 増田栞, 佐藤秀樹, 常松順子, 矢野智也, 松永美樹: 福岡市保健環境研究所報, 48, 69-74 (2023)。
- 9) 福島孝兵, 村川 弘, 吉田達雄, 吉元秀和, 飛野敏明: 熊本県保健環境科学研究所報, 38, 33-39 (2008)。
- 10) 西名武士, 飛野敏明, 吉田達雄, 山本理世, 村川 弘: 熊本県保健環境科学研究所報, 43, 70-76 (2013)。
- 11) Shodex HPLC Columns: Shodex 技術情報誌, No.005.
https://www.shodex.com/ja/catalog/technical_articles.html (2025 年 1 月閲覧)。
- 12) Shodex HPLC Columns: アプリケーションデータ, 試料溶解液の分離への影響 (NH2P-50 4E).
<https://www.shodex.com/ja/dc/03/02/45.html> (2025 年 1 月閲覧)。