

LC-MS/MSによるふぐ組織中のテトロドトキシン試験法の検討

山口県環境保健センター
立野幸治, 藤原美智子, 吹屋貞子, 三浦泉, 仙代真知子, 國吉香織, 片山弘子

LC-MS/MS Method for the Simultaneous Determination of Tetrodotoxin in Puffer-fish

Kouji TACHINO, Michiko FUJIWARA, Sadako FUKIYA, Izumi MIURA
Machiko SENDAI, Kaori KUNIYOSHI, Hiroko KATAYAMA
Yamaguchi Prefectural Institute of Public Health and Environment

はじめに

ふぐによる食中毒事件発生時、当センターでは行政依頼もあり、赤木ら¹⁾を参考にし平成19年度から公定法であるマウスバイオアッセイ法に加え、高速液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC-MS/MS) を使用し食品残品、患者尿のテトロドトキシン (TTX) を分析している。

今回、LC-MS/MSによるふぐ組織中のテトロドトキシン試験法のより確実な実施のため若干の検討を実施したので報告する。

実験方法

1 装置

高速液体クロマトグラフ：Agilent社製1100シリーズ、
質量分析装置：ABSCIEX社製API2000

2 試薬等

テトロドトキシン (TTX)：和光純薬工業(株)製

水：和光純薬工業(株)製超純水

酢酸：和光純薬工業(株)製特級

メタノール：和光純薬工業(株)製LCMS用

アセトニトリル：和光純薬工業(株)製LCMS用

ギ酸アンモニウム：和光純薬工業(株)製特級

ギ酸：和光純薬工業(株)製HPLC用

HPLC用カラム：XBridge Amide 2.1 mm i.d. ×150 mm

3.5 μm (Waters社製), Scherzo SM-C18 2.0mm i.d. ×150mm 3 μm (インタクト(株)製)

除粒子フィルター：アドバンテック(株)製DISMIC-13HP (0.2 μm)

限外濾過フィルター：ミホア(株)製Amicon Ultra-4 10 kDa

3 MS/MS条件

イオン化法は、ESI (Electron Spray thermo Ionization) を用い、MRM (Multiple Reaction Monitoring) 測定法の条件を検討した。

4 抽出法

(1) 抽出法 1

ふぐ組織 (肝臓、皮等) を、細切・磨砕後10 g分取。これに、0.1 %酢酸水溶液25 mlを加え、沸騰水浴中で攪拌しながら20分間加熱。No. 5Aのろ紙を桐山ロートにひき、減圧濾過。残渣を0.1 %酢酸水溶液で反復洗浄し、50 mlに定容。この液をマウスバイオアッセイ法に使用し、別に1 mlを正確に分取し、0.1 %酢酸水溶液で20mlに定容。この4 mlをとり、0.45 μmのメンブランフィルターを通し、限外ろ過 (Amicon Ultra-10K)。ろ液を0.20 μmのメンブランフィルターを通しLC-MS/

MS用試験溶液とした。

(2) 抽出法 2

ふぐ組織 (肝臓、皮等) を、細切・磨砕後5 g分取。これに、2 %酢酸水溶液80 mlを加え、沸騰水浴中で攪拌しながら20分間加熱。No. 5Aのろ紙を桐山ロートにひき、減圧濾過。残渣を2 %酢酸水溶液で反復洗浄し、100 mlに定容。1 mlを正確に分取し、水で20 mlに定容。0.20 μmのメンブランフィルターを通しLC-MS/MS用試験溶液とした。

5 HPLC条件

XBridge Amide 2.1 mm i.d. ×150 mm 3.5 μm (Waters社製), Scherzo SM-C18 2.0mm i.d. ×150 mm 3 μm (インタクト(株)製) の2種類のHPLCカラムを使用し、移動相溶媒等を様々変え、良好なピークが得られる条件を検討した。

6 添加回収試験

あらかじめ無毒を確認したトラフグの肝に10MU/gに相当するTTXを加え、抽出法1及び2で抽出し、5nで添加回収試験を実施した。

7 各種ふぐ組織抽出物のマウスバイオアッセイ法とLC-MS/MS試験法の比較

毒性が高いとされているマフグ (皮, 肝), ゴマフグ (皮, 肝), ヒガンフグ (肝, 卵巣), シマフグ (皮, 肝), ナシフグ (皮, 肝) の10種類のふぐ組織を用いてマウスバイオアッセイ法とLC-MS/MS試験法での毒力を比較した。

マウスバイオアッセイ法は、公定法²⁾にしたがって実施した。LC-MS/MS試験法は抽出法1で抽出した液を用い、XBridge Amideを使用しHPLC条件で、マトリックスク検量線を使用し、1 MUを0.22 μg TTXとしてマウスユニットに換算した。

結果及び考察

1 MS/MS条件

TTXの1 μg/mlの0.1%酢酸標準溶液をインフュージョン法により直接MS部に導入し、イオン化条件を検討した。ポジティブモードで、プロトン付加分子 $[M+H]^+$ が観測されたため、これをプリカーサーイオンとし、最も感度が高いプロダクトイオンを定量用に、2番目に感度が高いプロダクトイオンを確認用にし、DP (Decustering Potential), CE (Collision Energy), FP (Focusing Potential) などを、最適化した。

次いで0.1 μg/mlの0.1%酢酸標準溶液を用いFIA (フローインジェクションアナリシス) でCUR (Curtain

Gas), CAD(Collision Gas), IS(Ion Transfer Voltage), TEM(Temperature), GS1(Ion Source Gas 1), GS2(Ion Source Gas 2)などのイオンソースの最適化を行った。この結果をTable 1に示す。

2 HPLC条件

HPLC条件の検討にあたっては、2種類のHPLCカラム、XBridge Amide, Scherzo SM-C18について10mmolギ酸アンモニウム水溶液、ギ酸、アセトニトリル及びメタノール等を使用し、条件を種々変化させ、感度、ピーク形状について検討した。

良好なピークが得られたHPLC条件をXBridge Amideについては Table 2に示し、Scherzo SM-C18については Table 3に示した。

それぞれのTTX0.1 %酢酸溶液40 ppb濃度のTICを、XBridge Amideについては Fig. 1に、Scherzo SM-C18については Fig. 2に示した。

3 検量線の作成

抽出法1では、添加回収試験用試験溶液を絶対検量線法で測定したところ、回収率が50%以下となった。イオン化阻害の可能性があると考え、マトリックス添加のTTX 20 ppb標準溶液と、マトリックス非添加TTX 20 ppb標準溶液を測定した。この結果を Table 4に示した。また、ふぐ抽出物添加、非添加のTTX20 ppb溶液のMRMクロマトグラフをFig. 3に示した。この結果、抽出法1についてはマトリックス検量線を使用することした。

抽出法2では、顕著なイオン化阻害は認められなかったため、絶対検量線法を使用した。

検量線は、20 ppb~500 ppbの範囲でほぼ良好な直線性を示した。絶対検量線をFig. 5に示した。

4 添加回収結果

あらかじめ無毒を確認したトラフグの肝に10MU/gに相当するTTXを加え、抽出法1及び2で抽出し、5nで添加回収試験を実施した。

抽出法1で作成した試験溶液をXBridge Amideを使用する測定法で、マトリックス検量線を使用した結果は、平均回収率73.9%(STDEV 0.764, CV 4.70)であった。

抽出法2で作成した試験溶液Scherzo SM-C18を使用する測定法で、マトリックス検量線を使用した結果は、平均回収率85.4%(STDEV 0.428, CV 9.11)であった。

5 各種ふぐ組織抽出物のマウスバイオアッセイ法とLC-MS/MS試験法の比較

毒性が高いとされているマフグ(皮, 肝), ゴマフグ(皮, 肝), ヒガンフグ(肝, 卵巣), シマフグ(皮, 肝), ナシフグ(皮, 肝)の10種類のふぐ組織を用いてマウスバイオアッセイ法とLC-MS/MS試験法での毒力を比較した結果をTable. 5に示した。マトリックス検量線を使用してもイオン化阻害の影響が払拭できず、LC-MS/MS試験法の数値が低い傾向が見られた。例数は少ないが、単相関係数は、0.97であった。

Table 1. MS conditions for detamination of Tetrodotoxin

Ionization	Electron Spray thermo ionization(ESI), Positive				
Analysis mode	Multiple Reaction Monitoring(MRM)				
Ion Transfer Voltage	4,500 V				
Turbo gas temperature	500°C				
Monitor ion	Mmonoisotopic	Precursor ions	Product ions	DP ^{a)}	CE ^{b)}
Tetrodotoxin	(Da)	(m/z)	(m/z)	(V)	(eV)
	319.27	320.10	162.10 ^{c)}	56.00	49.00
			302.20 ^{d)}	51.00	33.00

^{a)} DP:Declustering potential

^{b)} CE:Collision energy

^{c)} Used for confirmation

^{d)} Used for quantitation

Table 2. HPLC conditions for Determination of Tetrodotoxin by XBridge Amide

Column	XBridge Amide 2.1 mm i.d. ×150 mm 3.5 μm
Column temp.	40°C
Flow rate	0.2 mL/min
Mobile phase	Solvent A:0.1 % Formate Aqueous Solution Solvent B:Acetonitrile
Gradient profile	0%B→15 min→15%B
Injection volume	10 μL

Table 3. HPLC conditions for Determination of Tetrodotoxin by Scherzo SM-C18

Column	Scherzo SM-C18 2.0mm i.d. ×150mm 3 μm
Column temp.	40°C
Flow rate	0.2 mL/min
Mobile phase	Solvent A:10 mmmol Ammonium Formate Aqueous Solution Solvent B:Methanol
Isocratic	A:B=1:9
Injection volume	10 μL

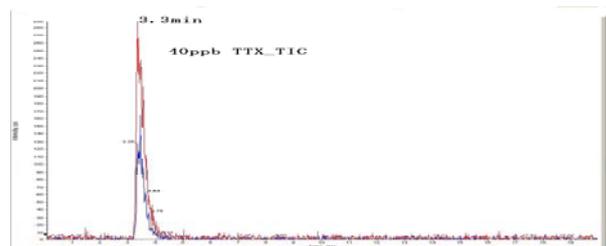


Fig.1 TIC Tetrodotoxin of XBridge Amide

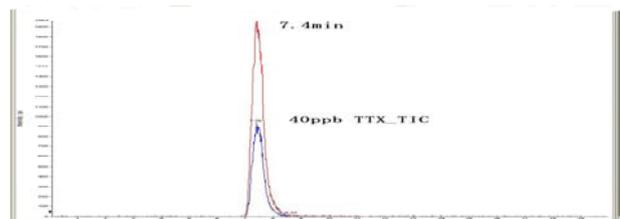


Fig.2 TIC Tetrodotoxin of Scherzo SM-C18

Table 4. Puffer-fish extract addition table, addition-less comparative of TTX 20 ppb standard

No.	MRM	TTX 20 ppb Retention Time (min)	0.1 % Acetic Acid Area (counts)	Height (cps)	TTX 20 ppb Retention Time (min)	0.1 % Acetic Acid add Puffer-fish extract Area (counts)	Height (cps)
1	TTX (320. 1/162. 1)	3. 10	1. 52e+003	8. 03e+002	3. 10	7. 87e+002	4. 31e+001
2	TTX (320. 1/302. 2)	3. 10	3. 04e+003	1. 68e+002	3. 10	1. 71e+003	1. 00e+002

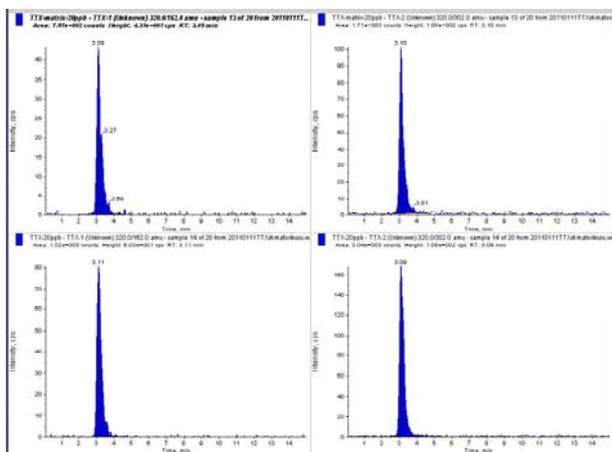


Fig. 4 MRM chromatograms of 20 ppb TTX 0.1% Acetic Acid and matrix add 20ppb TTX 0.1% Acetic Acid

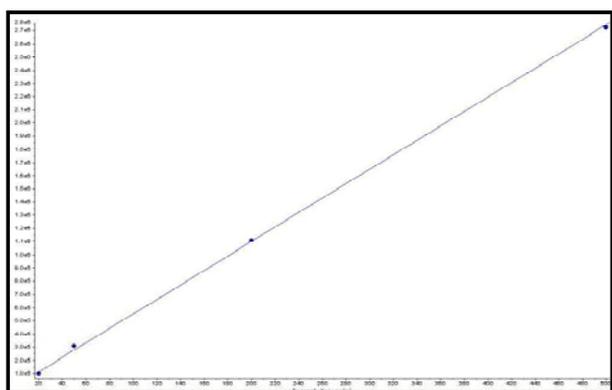


Fig. 5 Standard curve of TTX

Table 5. Comparison between mouse bioassay method and LC-MS/MS examination method of various Pufferfish organization extract

Species	part	Weight (g)	LC-MS/MS Method (MU/g)	bioassay method (MU/g)
Purple puffer	Skin	52.9	80.9	98.1
Purple puffer	Liver	40.7	245.9	240.7
Spotty puffer	Skin	111.3	19.6	22.9
Spotty puffer	Liver	105.5	78.6	72.8
Panther puffer	Skin	84.0	5.3	N. D.
Panther puffer	Liver	22.7	8.0	9.8
Striped puffer	Ovary	79.1	191.8	293.0
Striped puffer	Liver	107.1	265.9	355.5
Pear puffer	Skin	18.1	7.4	N. D.
Pear puffer	Liver	43.7	7.0	5<

まとめ

LC-MS/MSによるふぐ組織中のテトロドトキシン試験法のより確実な実施のためTTX試験法について検討を実施した。

- 1 TTXのLC-MS/MSによるMRM測定において2種類のHPLC用分析カラムを比較検討した。XBridge Amide, Scherzo SM-C18ともに、良好なピーク形状が得られたが、リテンションタイムは、XBridge Amideが3.3分、Scherzo SM-C18は7.4分であった。
- 2 公定法に準じた抽出法1では、当センター機器では、イオン化障害が発生し、マトリックス添加検量線の使用を余儀なくされた。食中毒事件など緊急時では、抽出法2の使用が当センターにおいては妥当と考えられた。
- 3 無毒のトラフグの肝に10 MU/g相当のTTXを添加した添加回収試験では、赤木らの報告¹⁾と同様に0.1%酢酸水溶液を使用する抽出法では回収率が73.9%であったが、2%酢酸水溶液を使用した抽出法2では、85.4%であった。
- 4 毒性の高いとされている10種類のふぐ組織を、公定法であるマウスバイオアッセイ法と、LC-MS/MS試験法で同時に測定したところ、例数が少ないがほぼ相関があると考えられる結果であった。

食中毒事件など緊急時には、迅速かつ正確な分析結果が求められる。今回の検討により当センター保有機器によるTTX分析手法が確立できたと考えられ、健康危機管理体制の強化を図ることができた。

なお、本報告の一部については、厚生労働科学研究費補助金により実施した。

参考文献

- 1) 赤木浩一, 畑野和広, LC/MS/MSによるフグ組織およびヒト血清・尿中のテトロドトキシンの分析, 食品衛生学雑誌 (日本食品衛生学会), 47巻, 2006, p. 46-50.
- 2) 厚生労働省監修 “食品衛生検査指針・理化学編” 日本食品衛生協会, 2005, p. 611-666.