

LC-MS/MS を用いたシガトキシン類分析法の検討

高井靖智, 河島眞由美*¹, 桑田真里, 樋下勝彦, 坂口勝規*²

Analysis of Ciguatoxins by LC-MS/MS

Takai Yasutomo, Kawashima Mayumi*¹, Kuwata Mari, Hinoshita katsuhiko
and Sakaguchi Katsunori*²

キーワード：シガテラ, シガトキシン類, 液体クロマトグラフタンデム質量分析装置

Key Word: Ciguatera, Ciguatoxins, LC-MS/MS

はじめに

シガテラは、主に熱帯・亜熱帯のサンゴ礁海域に生息する魚類を原因とする食中毒で、自然毒による食中毒としては世界最大規模と言われている。日本では、南西諸島を中心に毎年発生しているが、最近、地球温暖化の影響から九州や本州でとれた魚を原因とする事例が相次いで発生しており、2007年には本県で釣ったイシガキダイが原因の食中毒も発生している。中毒症状としては、下痢、おう吐などの消化器系障害、知覚異常、筋肉痛などの神経系症状、脈拍数や血圧の低下などの循環器障害など多岐に渡るが、最も特徴的な症状は、ドライアイスセンサーションと呼ばれる温度感覚の異常である。致死率は低いものの、症状が長時間持続することも多い。

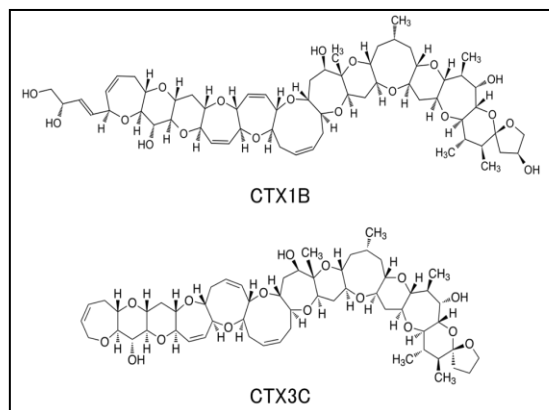


図1. CTX1BおよびCTX3Cの構造

この原因毒はシガトキシン(CTX)類で、20種以上の類縁体が確認されている。今回、その中で標準品が市販されているCTX1BおよびCTX3C(図1)を対象にLC-MS/MSを用いた分析法を検討したので報告する。

実験方法

1. 試料

市販のマダイ、マグロ

2. 試薬

1) 標準品

(1) 標準品

標準品には、富士フィルム和光純薬製のCTX1BおよびCTX3C(各100 ng)を用いた。

(2) 標準溶液

各標準品をメタノールで溶解し10 ng/mLに調製したものを適宜混合・希釈し、0.1~10 ng/mLの検量線用標準溶液を調製した。

2) 溶媒および試薬

アセトンおよびジエチルエーテルは富士フィルム和光純薬製特級、ヘキサンおよび酢酸エチルは富士フィルム和光純薬製残留農薬試験用、メタノールおよびアセトニトリルは富士フィルム和光純薬製LC/MS用を使用した。1 mol/L 硝酸アンモニウム溶

液は、関東化学製 HPLC 用を使用した。

3) 固相抽出カラム

固相抽出カラムとして、GL サイエンス社製 InertSep FL-PR(500 mg) および GL サイエンス社製 InertSep PSA(200 mg)を使用した。

4) フィルター

Millipore 社製 Millex-LH(0.20 μm)を使用した。

3. LC-MS/MS 条件

表 1 に示した。

表 1. LC-MS/MS測定条件

LC	: Agilent 1200シリーズ
MS/MS	: Agilent 6460QQQ
分析カラム	: SUPELCO AcsentisExpress C18 (2.1×100 mm, 2.7μm)
カラム温度	: 40℃
流速	: 0.3 mL/min
注入量	: 5 μL
移動相	: A液 5mM HCOONH ₄ + 0.1%HCOOH aq B液 CH ₃ OH
グラジエント	: B液%; 79%(0 min) → 95%(10-12 min) → 98%(12.1-20 min) → 79%(21-29 min)
イオン化モード	: ESI(+)
ドライガス流速, 温度	: 10 L/min, 300℃
ネブライザーガス圧力	: 50 psi
シースガス流速, 温度	: 11 L/min, 400℃
キャピラリー電圧	: 4000 V
ノズル電圧	: 0 V
測定イオン CTX 1B	: (定量) 1133.6 [Na ⁺ 付加体] > 1133.6 [Na ⁺ 付加体]
CTX 3C	: (定量) 1045.6 [Na ⁺ 付加体] > 1045.6 [Na ⁺ 付加体]
	: (定性) 1023.5 [H ⁺ 付加体] > 1005.4 [H ₂ O脱離体]

4. 試験溶液の調製

試験溶液の調製方法を図 2 に示した。ある程度細切した試料 5.0 g にアセトン 15 mL を加え、ホモジナイズした後、10 °C、3000 rpm で5分間遠心分離し、上清を採取した。さらに、残留物にアセトン 15 mL を加え、振とう機にて5分間振とうした後、10 °C、3000 rpm で5分間遠心分離し、上清を採取した。得られた上清を合わせ 5 mL 以下に減圧濃縮した後、ジエチルエーテル 5 mL を加え、軽く振とうした後、静置後ジエチルエーテル層を採取した。さらに、残留物に同様の操作を行い、得られたジエチルエーテル層を採取した。合わせたジエチルエーテル層に窒素ガスを吹き付け、完全に溶媒を除去した後、90%メタノールに溶解し、n-ヘキサン 3 mL 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。得られた液を窒素気流化で乾固した後、酢酸エチル-メタノール(=9 : 1) 2 mL で溶解し、予め酢

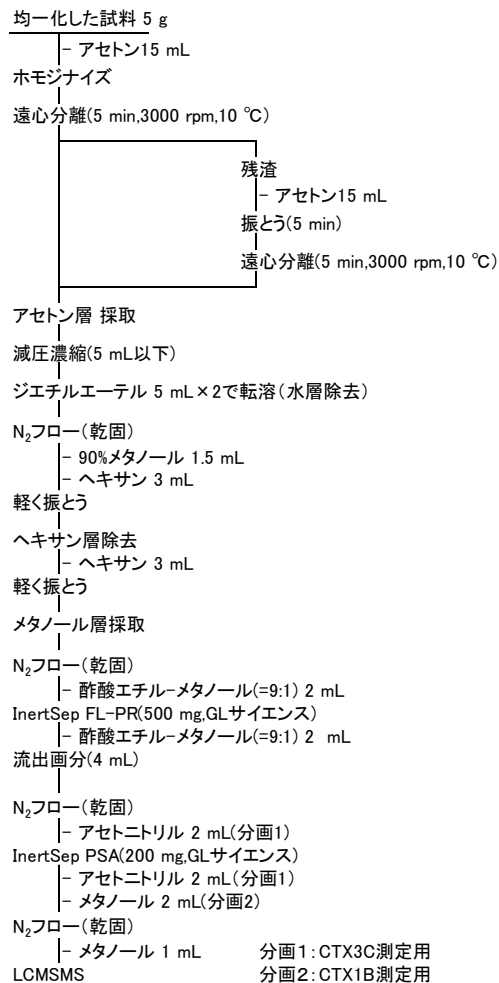


図 2. 試験溶液の調製方法

酸エチル-メタノール(=9 : 1) 8 mL でコンディショニングした InertSep FL-PR(500 mg)カラムに負荷した。さらに、酢酸エチル-メタノール(=9 : 1) 2 mL を加え、流出した液を全量採取した。流出液を窒素気流化で乾固した後、アセトニトリルで溶解した後、予めメタノール 3 mL 及びアセトニトリル 3 mL でコンディショニングした InertSep PSA(200 mg)に負荷し、アセトニトリル 2 mL を加え、流出した液を全量採取した(画分1)。さらに、メタノール 2 mL を加え溶出した液を採取した(画分2)。各画分を窒素気流化で乾固した後、メタノール 1 mL で溶解し、フィルター処理したものを試験溶液とした。

結果および考察

1. LC-MS/MS 条件の検討

購入した標準品の量がCTX1B, 3Cともに100 ngとごく少量であったため、通常より低濃度の2 ng/mLの標準液を用いて各種測定パラメーターを求めた。両成分の定量イオンには、プリカーサー、プロダクトイオンともにナトリウム付加体を選択し、CTX3Cについては、プロトン付加体（プロダクトイオンは水分子脱離体）も若干確認されたので、定性イオンとして測定することとした。

今回検討した条件（表1）において、CTX1Bは0.2～10 ng/mLの範囲で、CTX3Cは0.1～10 ng/mLの範囲で決定係数が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

CTX類は、魚肉中の含有量がppbレベル以下のごく微量で、しかも脂溶性であるため、脂質などの夾雑成分の影響が大きくなると予想された。そこで、與儀らの方法¹⁾を参考に、ヘキサン脱脂後、フロリジルカラムおよびPSAカラムによる精製を行うこととした（図2）。

また、最終溶液を画分1と画分2を混合すると、

CTX1Bに夾雑成分が重なることから、CTX1B用（画分1）とCTX3C用（画分2）に分けてそれぞれ測定することとした。

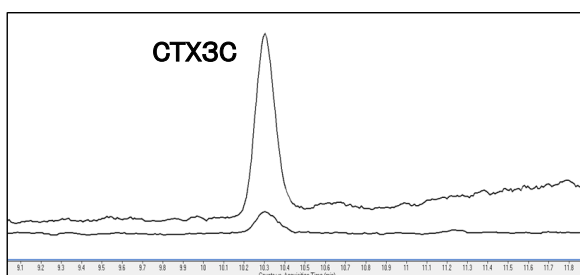
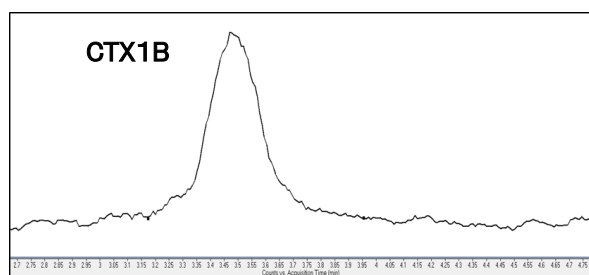
3. 添加回収試験

マダイおよびマグロを対象に、2種混合標準液を0.2 ng/g相当となるよう添加し、無添加試料と併せて試験溶液の調製方法に従い、回収試験を実施した。結果を表2に、標準液および添加試料（マダイ）のクロマトグラムを図3に示した。目的成分の妨害となるピークは検出されず、また両成分ともに回収率50%以上となり、健康危機管理事象発生時に本法が適用できる可能性が示唆された。

表2. シガトキシン類の添加回収試験結果

試料	回収率(%)	
	CTX1B	CTX3C
マダイ (n = 3)	62.4	76.9
マグロ (n = 2)	51.3	80.0

標準液 1 ng/mL



標準添加試料（マダイ）

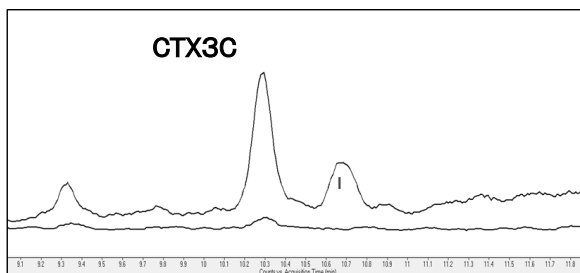
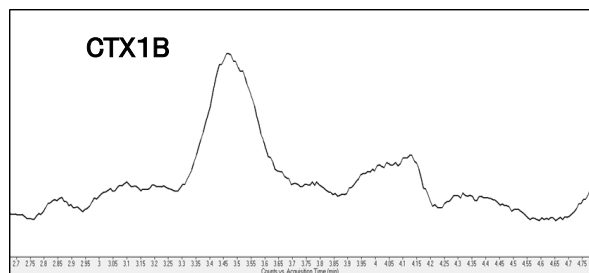


図3. 標準液（上）および標準添加試料（下）のクロマトグラム

ま と め

今回、CTX 類 2 種を対象とした分析法を検討した結果、夾雑成分の影響なく分析できる可能性を見出せた。今後、分析法の迅速性および回収率の向上、検討食品の追加、他のシガトキシン類の追加を検討していきたい。

参 考 文 献

- 1) 與儀健太郎, 他: 奄美大島・加計呂麻島におけるシガテラ原因魚の毒素性解析, 食衛誌, 54, 385-391, 2013