

親水性相互作用クロマトグラフィーを用いた LC/MS/MS によるテトロドトキシンの分析

赤木浩一・畑野和広

福岡市保健環境研究所保健科学部門

Analysis of Tetrodotoxin by LC/MS/MS using Hydrophilic Interaction Chromatography

Kouichi AKAKI and Kazuhiro HATANO

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

要約

フグ組織およびヒト血清・尿中のテトロドトキシン (TTX) を親水性相互作用クロマトグラフィーを用いて LC/MS/MS により定量・定性する迅速分析法を開発した。試料を 2% 酢酸で抽出し、フグ組織については水で希釈し、ヒト血清および尿については両性イオン基を結合したポリマー基材の親水性相互作用クロマトグラフィーカートリッジを用いて精製した。LC には同様に親水性相互作用クロマトグラフィーカラムを用いて移動相に 0.1% ギ酸・アセトニトリルによりグラジエント分析した。検出限界は、フグ組織では 10ng/g、ヒト血清および尿では 0.1ng/mL であった。添加回収試験の平均回収率はフグ (筋肉・肝臓・皮) で 85 ~ 105%、ヒト血清・尿で 70 ~ 85% と良好な結果が得られた。いずれもきょう雑ピークはほとんど見られなかった。

Key Words : テトロドトキシン tetrodotoxin, フグ puffer-fish, 血清 serum, 尿 urine, 親水性相互作用クロマトグラフィー hydrophilic interaction chromatography 高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 LC/MS/MS

はじめに

テトロドトキシン (TTX) は、マフグ科魚類や巻貝ボウシュウボラなどに含まれる強力な神経毒である。熱・光・酸に安定で通常の調理法では分解されず、自然毒による食中毒の代表的な原因物質となっている。

TTX の分析法には、公定法¹⁾のマウスを用いた生物学的試験法があるが、死亡の判定に伴う分析精度の問題やマウスの管理が煩雑で緊急時には対応しにくいなどの問題がある。理化学的試験法としては、蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ²⁾やガスクロマトグラフ/質量分析計^{3), 4)}を用いる方法が報告されているが、強アルカリによる分解やトリメチルシリル誘導体化が必要で操作性に劣っている。

著者らは近年普及している LC/MS/MS を用いたテトロドトキシン (TTX) の分析法を検討し報告した^{5), 6)}。この方法は、公定法のマウスを用いた生物学的試験法と比べ、感度や緊急時の対応の面で有効であった。しかし、LC の移動相に有機ハロゲン化合物のイオンペア試薬を使用することから、環境汚染物質を使用する点、LC の十分な洗浄が必要な点などの問題があった。

そこで、LC カラムに両性イオン基を結合したポリマー基材の親水性相互作用クロマトグラフィーカラム (HILIC カラム) を用い、環境と機器にやさしく操作性も良い分析法を目指して、フグおよびヒト血清・尿中の TTX を LC/MS/MS により分析する方法を検討した。

実験方法

1. 試料

ヒガンフグ（筋肉・肝臓・皮）、ヒト尿および血清。

2. 試薬等

標準品：TTX は、和光純薬工業(株)製を使用した。

標準原液：標準品 1mg を水で溶解し 10mL とした。

標準溶液：標準原液を適宜 0.1%酢酸で希釈して使用した。ただし、添加回収試験は水で希釈して使用した。

C18 ミニカートリッジ：Varian 社製 C18-HF 1g をあらかじめメタノール、水各 10mL でコンディショニングして使用した。

HILIC カートリッジ：SeQuant 社製 ZIC-HILIC SPE 1g をあらかじめ水 5mL、アセトニトリル 10mL、80%メタノール 10mL でコンディショニングして使用した。

その他の試薬：すべて特級品あるいは HPLC 用を使用した。

3. 装置

高速液体クロマトグラフ：Agilent 社製 Agilent 1100 シリーズを使用した。

質量分析装置 (MS/MS)：Applied Biosystems 社製 API4000 を使用した。

4. 測定条件

LC/MS/MS の測定条件は表 1 に示した。

表 1 テトロドトキシンの LC/MS/MS 測定条件

Column	SeQuantZIC-pHILIC 50mm×2mm i.d.				
Column temp.	40				
Mobile phase	Solvent A:0.1%formic acid Solvent B:acetonitrile				
Gradient profile	Time(min)	0	5	15	20
	B(%)	70	70	0	0
Post time	20min				
Injection volume	20μL				
Ionization	ESI(+)				
Ionspray voltage	5.5 kV				
Turbo gas temp.	750				
Dwell time	150ms				
Declustering potential(DP)	80V				
Collision energy (CE)	51eV				
Precursor ion	m/z 320				
Product ion	m/z 162				

5. 試料溶液の調製

ヒガンフグ（筋肉・肝臓・皮）は、既報⁶⁾により次のとおり抽出した。磨砕試料 5g を 200mL ナシ型フラスコに採り、2%酢酸 100mL を加えて、沸騰水浴中で 10 分間加温し、脱脂綿でろ過した。残さを 2%酢酸で反復洗浄し、ろ過溶液と洗浄溶液を合わせて 250mL に定容した。この抽出溶液 1mL を水で 20mL とした後、0.2μm フィルターでろ過し、試験溶液とした。なお、皮や肝臓試料で TTX 濃度が高いものについては、さらに 0.1%酢酸で適宜希釈した。

ヒト血清・尿は、試料 1mL に 2%酢酸を加え 10mL とした。これを C18 ミニカートリッジに負荷し通過した初流 4mL を廃棄し次の 6mL を採取した。うち 1mL にメタノール 20mL を加え HILIC カートリッジに負荷した。80%メタノール、水各 20mL で洗浄し 2%酢酸 5mL で溶出した。70℃で減圧濃縮し、窒素を吹き付け乾固した後、0.1%酢酸 1mL に溶解し、0.2μm フィルターでろ過し、試験溶液とした。

結果および考察

1. 前処理のカートリッジの検討

ヒトの尿・血清中には塩類が含まれており 100 倍未満の希釈率ではイオン化阻害やピーク形状の悪化が見られた。既報⁶⁾のメタクリレート-スチレンジビニルベンゼンカートリッジによる精製方法はカートリッジのリザーバー内で pH 調製を行うもので熟練を要し回収率が 60% 程度になることがあった。

そこで、親水性相互作用クロマトグラフィーを用いる方法を検討した。一般に親水性相互作用クロマトグラフィー用ミニカートリッジ（HILIC カートリッジ）はアセトニトリルやメタノールなどの溶媒で保持させ水で溶出させるものである。今回検討した TTX は水にもアセトニトリルなどの溶媒にも溶解しないため、HILIC カートリッジに保持させた後に水で洗浄することにした。しかし、塩が共存するヒトの尿・血清の場合は水洗浄で溶出しやすくなることから抽出液にメタノールを加え HILIC カートリッジに負荷することにした。80%メタノールで洗浄してから水洗浄をすることにより脱塩処理ができ、2%酢酸により容易に溶出することができた。

また、ヒト尿・血清の場合 HILIC カートリッジのみの精製ではカートリッジや LC カラムが詰まりやすい傾向にあったため、C18 カートリッジによる精製を追加することにした。

2. LC/MS/MS条件の検討

既報⁶⁾では LC/MS/MS で一般的に使用されている C18 カラムを使うためにイオンペア剤を用いた。LC/MS 用のイオンペア剤は有機ハロゲン化合物を用いておりそのものが環境汚染の分析対象となることや分析系に吸着しバックグラウンドの原因となるなど他の分析に支障を与えることが考えられた。

そのため、移動相を LC/MS で一般に使われるものにし、LC カラムも精製ミニカートリッジと同様の親水クロマトグラフィーを検討した。TTX は移動相としてアセトニトリル、メタノール、水を用いたどの場合でも HILIC カラムに強く保持され、LC/MS の移動相によく使用される 0.1%ギ酸により溶出したことから 0.1%ギ酸 - アセトニトリルによるグラジエント条件を検討した。TTX はアセトニトリル 70%以上で保持が強く溶出されず 30%以下で保持が無くなり溶出された。

TTX 標準溶液の場合は保持時間が 5 分以下でも良好なピーク形状であったが、HILIC カートリッジ処理したヒト尿に TTX を添加した場合はイオン化阻害を受けた。

そこで、HILIC カラムに TTX を保持させたまま、イオン化阻害と分離するようにアセトニトリル 70%で 5 分間保持させてからグラジエントした。なお、不要なきょう雑物を MS へ導入させないように試料注入後 10 分間はバルブ切り替えにより MS へ導入しないようにした。

MS/MS 条件は既報⁶⁾のとおり行った。

3. 検量線

検量線は 0.01 ~ 10ng/mL の範囲で $r=0.999$ であった。

4. 検出限界と添加回収

検出限界は、フグ組織で 10ng/g (約 0.05MU/g)、ヒト血清・尿で 0.1ng/mL であった。添加回収試験の平均回収率はフグ (筋肉・肝臓・皮) で 85 ~ 105%、ヒト血清・尿で 70 ~ 85%と良好な結果が得られた。図に TTX のクロマトグラムを示した。いずれもきょう雑ピークはほとんど見られなかった。

以上のことから本法は、イオンペア試薬を使用せず、前処理が簡便であり、また、定性も確実であることからフグ中毒事例において TTX を分析するための手法として有用であると考ええる。

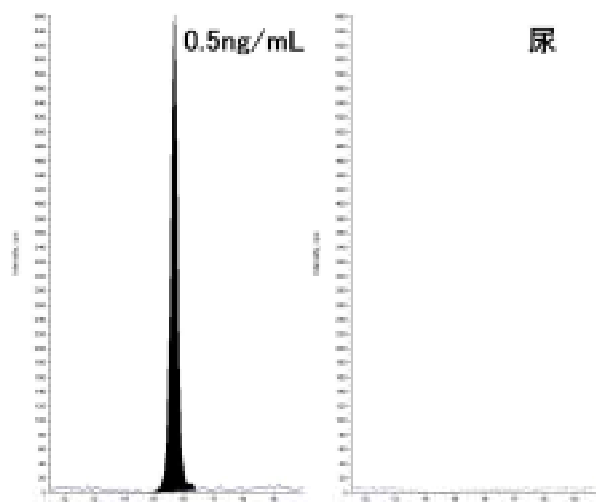


図 TTX のクロマトグラム

文献

- 1) 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.661-666.
- 2) Fuchi, Y., Morisaki, S., Nagata, T., Shimazaki, K., Noguchi, T., Ohtomo, N., Hashimoto, K., Determination of tetrodotoxin in puffer fish and shellfish by high performance liquid chromatography. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), 29, 306-312 (1988).
- 3) Kurono, S., Hattori, H., Yamada, T., Seno, H., Sensitive analysis of tetrodotoxin in human plasma by solid-phase extraction and gas chromatography /mass spectrometry. Anal. Lett., 34, 2, 439-2, 446 (2001).
- 4) Moriya, F., Miyaishi, S., Yamamoto, Y., Ishizu, H., The use of mass fragmentography for the detection of tetrodotoxin in human body fluids. Jpn. J. Legal Med., 46, 117-120(1992).
- 5) 赤木浩一: LC/MS/MS によるテトロドキシンの分析, 日本食品衛生学会第 88 回学術講演会講演要旨集, 93, 2004
- 6) Akaki, K., Hatano, K., Determination of Tetrodotoxin in Puffer-fish Tissues, and in Serum and Urine of Infocated Humans by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), 47, 46-50 (2006).