

作成日：2020年 3月 24日

更新日：2022年 7月 11日

麻痺性貝毒とテトロドトキシン測定のための超高速液体クロマトグラフィー質量分析法（UHPLC/MS/MS） マニュアル version 1.0.1

国立研究開発法人 水産研究・教育機構 水産技術研究所
水産物応用開発部 安全管理グループ
渡邊龍一

このマニュアルは（国）水産研究・教育機構中央水産研究所が参画した国際室間妥当性試験で配布されたプロトコル: Determination of paralytic shellfish poisoning toxins and tetrodotoxin by UHPLC-HILIC-MS/MS Guidance Protocol v8- Sep 2018 (written by Dr. Andrew Turner, Mike Boundy, Dr. Tim Harwood) を元に、許可を得て作成したものである。

目次

はじめに	4
1. 性能規格	6
1.1.方法の原理	6
1.2.対象とする生物種.....	6
1.3.必要とする試料量.....	6
1.4.検量線	6
2. 必要な備品	8
3. 試薬	9
3.1.主な試薬.....	9
3.2.UHPLC 移動相および洗浄溶液.....	10
3.3.試料調製用試薬類.....	12
3.4.一次標準の例.....	14
3.5.混合ストック標準溶液.....	15
3.6.混合ストック標準溶液の麻痺性貝毒の最終濃度（例）	15
3.7.ワーキング標準溶液の調製（例）	16
4. 分析手順	18
4.1.二枚貝からの毒の抽出.....	18
4.2.グラファイトカーボン SPE クリーンアップ	19
4.3.装置条件.....	19
4.4.UHPLC メソッド.....	20
4.5.MS/MS メソッド.....	23
4.6.サンプルリスト推奨手順	24
4.7.試料中の麻痺性貝毒の計算.....	25
4.8.毒力計算に用いる毒性等価係数（TEF）	25
5. クオリティーコントロール	26

5.1.クロマトグラフィー適合性.....	26
5.2.検量線と検出感度.....	26
5.3.麻痺性貝毒の正しい同定	27
6. トラブルシューティング	28
附則	29
装置および分析条件	29
クロマトグラム	30
謝辞	37

はじめに

麻痺性貝毒はある種の植物プランクトンによって生産される神経毒の一種である。多数成分で構成されるが、二枚貝等に取り込まれると代謝などによりさらに複雑な毒組成を示す。個々の毒の強さに強弱はあるものの毒力には相加性が認められる。そのため二枚貝に含まれる毒力を求める場合には手段によらず、総毒力として検出する必要がある。この点は、オカダ酸とディノフィシストキシン-1, -2 を含めてオカダ酸等量として求める下痢性貝毒の機器分析法と同じである。

1950年代に制定された、AOAC法となっているマウス毒性試験(MBA)は二枚貝ホモジネートの酸抽出液をマウスの腹腔内に投与して、致死時間から毒力を量る方法である。我が国でも種と性別を固定することで、サキシトキシンを使ってマウスを標準化することなく測定できるように配慮されており、公定法として採用されている。そのため、アメリカのFDAから供給されるサキシトキシン二塩酸塩を使ってマウスを標準化した際に用いられている国際単位：サキシトキシン二塩酸塩相当量($\mu\text{g STX}\cdot 2\text{HCl equivalent/kg}$)ではなく、我が国独自の単位であるマウスユニット(MU/g)が用いられている。この場合、1 MUは約 $0.2 \mu\text{g STX}\cdot 2\text{HCl equivalent}$ なので、国内の規制値：4 MU/gはCODEX基準値の $800 \mu\text{g STX}\cdot 2\text{HCl equivalent/kg}$ に相当する。この動物試験法が貝毒の監視体制に導入される一方で、当初は貝毒の動態を化学的に調べる目的で開発された機器分析法であったが、次第に貝毒監視体制への導入も目的として、MBAと同様の迅速性と簡易性を両立させた、麻痺性貝毒を化学的に検出できる手法へと改良されていった。

1990年代に開発された、麻痺性貝毒のプレカラムHPLC法およびポストカラムHPLC法が代表例である。毒を酸化剤と反応させて生じた蛍光物質に検出する方法で、カラムで分離する前に反応させるプレカラム法と、カラムで分離後に反応させるポストカラム法の大きく分けて二法がある。両者ともに一長一短があり、プレカラム法は迅速で装置構成が単純である一方、複数回分析する必要があり、成分によっては濃度計算が複雑となる欠点がある。ポストカラム法は、イオン対分離によって全ての毒を分離することが可能であるため、ピーク同定が容易である一方、複雑な装置構成と全成分を調べるためには3通りの分析条件で分析する必要があることが欠点である。プレカラム法については2019年1月からEUにおける公式な参照分析法(official reference method)として採用されており、ポストカラム法の導入時期は不明だが、アメリカやカナダでの導入実績がある。下痢性貝毒は脂溶性が高く、逆相分配系カラムに十分保持されるが、麻痺性貝毒は水溶性が高く先述のカラムでは全く保持されない。そこで、ポストカラム法では、移動相にイオン対試薬を添加し、電荷を有する麻痺性貝毒とイオン対を形成させ、電氣的に中性となった麻痺性貝毒イオン対を逆相分配カラムに保持させ分離した後、蛍光検出する特徴を有している。

2000年代頃になると、液体クロマトグラフおよび質量分析装置の高性能化や、親水性の高い麻痺性貝毒を、イオン対試薬を用いることなく、保持することのできる親水性相互作用

用を有する分析カラムが開発されたこともあり、単純な前処理と迅速性を兼ね備えた麻痺性貝毒の一斉分析法が開発されるに至った。イオン対試薬を用いないため質量分析装置のイオン源を汚染しないほか、1 検体 15 分以内での迅速分析が可能となった。近年、ヨーロッパを中心に二枚貝にテトロドトキシンが微量ながら検出される事例が相次いで報告されている。2017 年には欧州食品安全機関 (EFSA) がテトロドトキシンのリスク管理に関する報告書をまとめ、二枚貝の監視にテトロドトキシンも含めるよう勧告した。また、日本においても東日本で養殖されているホタテガイからテトロドトキシンを検出したとの報告がある。テトロドトキシンは麻痺性貝毒の作用機序と同じため、相加性を示す。本試験法は麻痺性貝毒のみならず、テトロドトキシンも同時に検出することが可能であり、こうした事例にも対応できる要素を有している。本法は単一試験室における妥当性確認試験が実施され、さらに最近、複数試験室における妥当性確認試験が実施された。本マニュアルはこの妥当性確認試験で用いられたプロトコルを基に作成した。

なお、日本では、2015 年 3 月に農林水産省消費・安全局による「二枚貝等の貝毒のリスク管理に関するガイドライン」が制定され、貝毒のリスク管理にスクリーニング法とともに、MBA と同等性以上の性能基準を満たす機器分析法を導入することが認められた。

本マニュアルは国際室間妥当性試験で配布されたプロトコルに基づき作成されたものであるが、そのもととなる研究成果は以下の論文により報告されている。これらの論文を原著論文として引用の際に参考にされたい。

Ultrahigh-Performance Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry Method for the Determination of Paralytic Shellfish Toxins and Tetrodotoxin in Mussels, Oysters, Clams, Cockles, and Scallops: Collaborative Study.

Turner A.D., Dhanji-Rapkova M., Fong S.Y.T., Hungerford J., McNabb P.S., Boundy M.J., Harwood D.T. *J. AOAC Int.* (2019) doi: 10.5740/jaoacint.19-0240

Single-Laboratory Validation of a Multitoxin Ultra-Performance LC-Hydrophilic Interaction LC-MS/MS Method for Quantitation of Paralytic Shellfish Toxins in Bivalve Shellfish.

Turner A.D., McNabb P.S., Harwood D.T., Selwood A.I., Boundy M.J. *J. AOAC Int.* (2015) 98(3):609-621. doi: 10.5740/jaoacint.14-275

Development of a sensitive and selective liquid chromatography-mass spectrometry method for high throughput analysis of paralytic shellfish toxins using graphitised carbon solid phase extraction.

Boundy M.J., Selwood A.I., Harwood D.T., McNabb P.S., Turner A.D. *J. Chromatogr. A.* (2015) 1387:1-12. doi: 10.1016/j.chroma.2015.01.086.

1. 性能規格

1.1 方法の原理

二枚貝ホモジネート 5 g から、5 mL の 1 % 酢酸溶液により毒を抽出する。抽出液は上清を移し替えることができるように十分遠心分離し、1 mL をポリプロピレンチューブに移す。抽出液 1 mL に 5 µL の LC-MS 添加用アンモニア水を加え、良く攪拌する。次に、その抽出液をグラファイトカーボン固相抽出カートリッジに通してクリーンアップし、アセトニトリルで希釈する。その希釈液を UHPLC-MS/MS にて分析する。

測定対象物質

1) 麻痺性貝毒：サキシトキシン二塩酸塩相当量として生物活性情報（比毒性あるいは毒性等価係数）が報告されたもの。

N-sulfocarbamoyl gonyautoxin-2 (C1), N-sulfocarbamoyl gonyautoxin-3 (C2), N-sulfocarbamoyl gonyautoxin-1 (C3), N-sulfocarbamoyl gonyautoxin-4 (C4), decarbamoyl gonyautoxin-1 (dcGTX1), decarbamoyl gonyautoxin-2 (dcGTX2), decarbamoyl gonyautoxin-3 (dcGTX3), decarbamoyl gonyautoxin-4 (dcGTX4), gonyautoxin-1 (GTX1), gonyautoxin-2 (GTX2), gonyautoxin-3 (GTX3), gonyautoxin-4 (GTX4), gonyautoxin-5 (GTX5), gonyautoxin-6 (GTX6), decarbamoyloxy-saxitoxin (doSTX), decarbamoyl-saxitoxin (dcSTX), decarbamoyl-neosaxitoxin (dcNEO), neosaxitoxin (NEO), saxitoxin (STX)

2) テトロドトキシン

Tetrodotoxin (TTX)

1.2 対象とする生物種

生鮮二枚貝類

*ホヤとカニ類、二枚貝加工食品等については別途、妥当性確認を実施すること。

1.3 必要とする試料量

5.00 g

1.4 検量線

麻痺性貝毒の定量に際し、ワーキング標準溶液は最低 5 点とるようにすべきである。標準溶液はブランクの二枚貝マトリクスを用いて調製する。どうしても二枚貝マトリクスが入手できない場合は、後述する標準希釈液を用いて希釈する。

Figure 1 主要な麻痺性貝毒（左）とテトロドトキシン（右）の化学構造

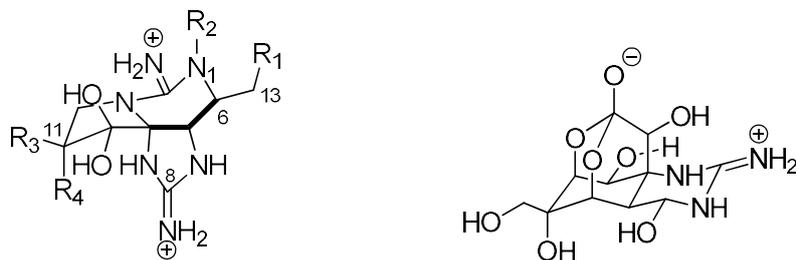


Table 1 麻痺性貝毒の主要な類縁体

Toxins	Abbrev.	R1	R2	R3 (β)	R4 (α)
Saxitoxin	STX	OCONH ₂	H	H	H
neosaxitoxin	NEO	OCONH ₂	OH	H	H
Gonyautoxin 1	GTX 1	OCONH ₂	OH	H	OSO ₃ ⁻
Gonyautoxin 2	GTX 2	OCONH ₂	H	H	OSO ₃ ⁻
Gonyautoxin 3	GTX 3	OCONH ₂	H	OSO ₃ ⁻	H
Gonyautoxin 4	GTX 4	OCONH ₂	OH	OSO ₃ ⁻	H
Gonyautoxin 5	GTX 5	OCONHSO ₃ ⁻	H	H	H
Gonyautoxin 6	GTX 6	OCONHSO ₃ ⁻	OH	H	H
decarbamoyle neosaxitoxin	dcNEO	OH	OH	H	H
decarbamoyle saxitoxin	dcSTX	OH	H	H	H
decarbamoyle gonyautoxin 1	dcGTX 1	OH	OH	H	OSO ₃ ⁻
decarbamoyle gonyautoxin 2	dcGTX 2	OH	H	H	OSO ₃ ⁻
decarbamoyle gonyautoxin 3	dcGTX 3	OH	H	OSO ₃ ⁻	H
decarbamoyle gonyautoxin 4	dcGTX 4	OH	OH	OSO ₃ ⁻	H
C 1	C1	OCONHSO ₃ ⁻	H	H	OSO ₃ ⁻
C 2	C2	OCONHSO ₃ ⁻	H	OSO ₃ ⁻	H
C 3	C3	OCONHSO ₃ ⁻	OH	H	OSO ₃ ⁻
C 4	C4	OCONHSO ₃ ⁻	OH	OSO ₃ ⁻	H
decarbamoyle saxitoxin	doSTX	H	H	H	H

2 必要な備品

- 2.1 超高速液体クロマトグラフー質量分析計 (Ultra-high performance liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (UHPLC-MS/MS))
* 飛行時間質量分析計やキングドントラップ質量分析計については妥当性確認が実施されていないので用いる際には妥当性確認を実施すること。
- 2.2 ウォーターバス (沸騰水浴できるものなど)
- 2.3 遠心分離器 (>10000×g で作動可能なもの)
- 2.4 (オプション) マイクロ遠心機
- 2.5 ボルテックスミキサー
- 2.6 (必要に応じて) バキュームマニホールド
- 2.7 ピペットマン
- 2.8 Duran ボトル
- 2.9 50 mL ポリプロピレン製遠沈管
- 2.10 15 mL ポリプロピレン製遠沈管
- 2.11 4 mL ポリプロピレン製バイアル
- 2.12 1.5 mL ポリプロピレン製チューブ
- 2.13 ポリプロピレン製 700 μ L オートサンプラーバイアル (Phenomenex あるいは同等品)
- 2.14 pH メーター
- 2.15 UHPLC HILIC-Amide カラム (e.g. Waters, Acquity UPLC BEH Glycan 1.7 μ m, 2.1 \times 150 mm, 130 \AA あるいは、Acquity UPLC BEH Amide 1.7 μ m, 2.1 \times 150 mm, 130 \AA あるいは、同等の分離を示すカラム)
- 2.16 UHPLC ガードカートリッジ (e.g. Waters Acquity UPLC BEH Amide VanGuard Pre-column, 130 \AA , 1.7 μ m, 2.1 mm \times 5 mm, 3/pk (P/N 186004799) あるいは同等品) あるいはプレカラムフィルター
- 2.17 グラファイトカーボン SPE カートリッジ (e.g. supelclean ENVI-carb 250mg/3ml あるいは同等の脱塩・クリーンアップができるもの)
- 2.18 組成標準物質 (毒を含まないもの)
例) NRCCanada, CRM-Zero-Mus (Mussel tissue [*Mytilus edulis*] matrix for negative control) 8g

3 試薬

3.1 主な試薬

3.1.1 アセトニトリル (MeCN), LC-MS 用

保管：室温

3.1.2 メタノール (MeOH), LC-MS 用

保管：室温

3.1.3 蒸留水, LC-MS 用

保管：室温

期限：24 時間以内（自家調製の場合）

3.1.4 ギ酸 (FA) 98 % -100 %, LC-MS

保管：室温

3.1.5 氷酢酸 (AcOH)

保管：室温

3.1.6 アンモニア水 (LC-MS additive, 25 % as NH₃)

保管：4 °C

28 % アンモニア水等も販売されているが、アンモニアの濃度によって麻痺性貝毒の溶出・保持に影響を与えることがある。従って、25 % を購入すること。

3.2 UHPLC 移動相および洗浄溶液：良好な分離を得るために、正確な移動相の調製が重要である。調製とピペッティング作業に注意する。

3.2.1 移動相 A1:

蒸留水 (3.1.3) 500 mL + ギ酸 (3.1.4) 75 μ L + アンモニア水 (3.1.6) 300 μ L
ビーカーに蒸留水を入れ、攪拌子で良く攪拌させながら、そこにギ酸とアンモニア水をそれぞれ添加し、しばらく (3 分) 攪拌する。pH は 9.0~9.4 になる。

保管：室温

使用期限：24 時間

3.2.2 移動相 B1:

アセトニトリル (3.1.1) 700 mL + 蒸留水 (3.1.3) 300 mL + ギ酸 (3.1.4) 100 μ L

移動相調製時、アセトニトリルと蒸留水は別々に量りとり、混合する。その後ギ酸を添加し、良く攪拌する。

保管：室温

使用期限；3 か月

3.2.3 移動相 A2: (For shutdown)

蒸留水 (3.1.3) 200 mL + ギ酸 (3.1.4) 1 mL

よく混合する。

保管：室温

使用期限：1 週間

3.2.4 移動相 B2: (For shutdown)

メタノール (3.1.2)

保管：室温

使用期限：3 か月

3.2.5 パージおよびシール洗浄溶液 (Acquity UPLC SM-FTN および BSM モジュール用)

アセトニトリル (3.1.1) 100 mL + 蒸留水 (3.1.3) 900 mL

よく混合する

保管：室温

使用期限：3 か月

3.2.6 ニードル洗浄液 (Acquity UPLC SM-FTN モジュール用)

アセトニトリル (3.1.1) 700 mL + 蒸留水 (3.1.3) 300 mL

よく混合する

保管：室温

使用期限：3 か月

上記移動相などは、Waters 製装置に対して設定されたものである。他社質量分析装置等を使用する際は同等の試薬を調製し、キャリーオーバーを最小にし、ニードルとポンプシールをクリーンな状態にしておく必要がある。

3.3 試料調製用試薬類

3.3.1 抽出溶媒, 1% 酢酸溶液

蒸留水 (3.1.3) 1,000 mL + 氷酢酸 (3.1.5) 10 mL

よく混合する。

保管：冷蔵 (4°C)

使用期限：1 か月

3.3.2 抽出モディファイアー

アンモニア水 (3.1.6)

保管：冷蔵 (4°C)

使用期限：1 週間

3.3.3 1% 酢酸含有 20% アセトニトリル

アセトニトリル (3.1.1) 200 mL + 蒸留水 (3.1.3) 800 mL + 氷酢酸 (3.1.5) 10 mL

よく混合する。

保管：室温

使用期限：3 か月

3.3.4 0.025% アンモニア水

蒸留水 (3.1.3) 500 mL + アンモニア水 (3.1.6) 500 μ L

よく混合する。

保管：室温

使用期限：1 週間

3.3.5 蒸留水

保管：室温

使用期限：24 時間 (自家調製の場合)

3.3.6 試料希釈溶媒

アセトニトリル

保管：室温

使用期限：1 か月

3.3.7 標準液希釈溶媒* (二枚貝マトリクスが入手できない場合)

0.25% 酢酸含有 80% アセトニトリル

アセトニトリル (3.1.1) 80 mL + 蒸留水 (3.1.3) 20 mL + 氷酢酸 (3.1.5) 250
μL

保管：室温

使用期限：3 か月

*これを用いて標準液を調製した場合、マトリクスを用いて調製した標準液
とで検量線の傾きが異なるので、定量計算する際には注意(補正)すること。
また、マトリクス検量線の調製法については後述する。

参考文献; Turner et al., *J. AOAC int.* (2015) 98 p609

3.3.8 メタノール

保管：室温

使用期限：3 か月

3.4 一次標準の例

装置校正や検量線を作成するために必要であるが、生産海域によっては検出されない成分もあるため、すべて揃える必要はない。

Table 2 現在入手できる一次標準のリスト

Toxins	Supplier	Code	Original Conc (μmol/L)
STX di-HCl	NRCC	NRC CRM-STX	STX: 66.3
	CIFGA	CRM-00-STX	STX: 55.1
NEO	NRCC	NRC CRM-NEO	NEO: 65.6
	CIFGA	CRM-00-NEO	NEO: 52.7
GTX1, 4	NRCC	NRC CRM-GTX1, 4	GTX1: 60.4, GTX4: 19.7
	CIFGA	CRM-00-GTX1&4	GTX1: 66.4, GTX4: 17.7
GTX2, 3	NRCC	NRC CRM-GTX2, 3	GTX2: 114.2, GTX3: 43.4
	CIFGA	CRM-00-GTX2&3	GTX2: 56.3, GTX3: 20.6
GTX5	NRCC	NRC CRM-GTX5	GTX5: 65.0
GTX6	NRCC	NRC CRM-GTX6	GTX6: 12.5
	CIFGA	CRM-00-GTX6	GTX6: 25.3
dcSTX	NRCC	NRC CRM-dcSTX	dcSTX: 65.0
	CIFGA	CRM-00-dcSTX	dcSTX: 59.1
dcGTX2, 3	NRCC	NRC CRM-dcGTX2, 3	dcGTX2: 116.4, dcGTX3: 26.1
	CIFGA	CRM-00-dcGTX2&3	dcGTX2: 99.5, dcGTX3: 22.7
C1, 2	NRCC	NRC CRM-C1,2	C1: 113.4, C2: 33.9
	CIFGA	CRM-00-C1&2	C1: 84.4, C2: 24.2
dcNEO	NRCC	NRC CRM-dcNEO	dcNEO: 29.4
	CIFGA	CRM-00-dcNEO	dcNEO: 26.2
dcGTX1,4	CNC	RM-dcGTX1,4	
C3, 4	CNC	RM-C3,4	
doSTX	CNC	RM-doSTX	
TTX	NRCC	CRM-TTX	TTX: 21.1
	CIFGA	CRM-03-TTXs	TTX: 81.2

NRCC: National Research Council Canada; CIFGA: Laboratorio CIFGA S.A.; CNC: Cawthron Natural Compounds; CRM: Certified Reference Material; RM: Reference Material: 一次標準の濃度はロットによって異なるので実際調製する際には濃度を確認すること。CNC 製品は 2020 年 3 月現在、入手できる状況ではない。STX

およびそれを含む製品は「化学兵器の禁止及び特定物質の規制等に関する法律（平成7年4月5日法律第65号）」の規定により、特定物質の使用許可を経済産業大臣より受ける必要がある。

3.5 混合ストック標準溶液

標準品の混合ストック溶液は CRM として入手できるもの、あるいは正確に濃度決定された毒の純品を使って調製する。Boundy et al. *J. Chromatogr. A* 1387 (2015) p1-12 の supplementary data に調製法が記載されているので参考にされたい。

3.6 混合ストック標準溶液の麻痺性貝毒の最終濃度（例）

PST analogue	濃度 (μmol/L)
C1	9.16
C2	2.75
C3	10.90
C4	4.59
dcGTX2	8.07
dcGTX3	2.39
dcGTX1	8.03
dcGTX4	2.89
GTX2	8.21
GTX3	3.48
GTX1	4.58
GTX4	1.44
GTX5	4.68
GTX6	1.00
doSTX	0.43
dcSTX	5.34
dcNEO	2.43
STX	5.35
NEO	5.21
TTX	5.84

ここに示した各毒の濃度は一例である。この辺りを目安に調製すれば、ワーキング標準溶液を適切な濃度範囲で調製できる。

保管：冷蔵（4℃）

使用期限：12 か月

3.7 ワーキング標準溶液の調製（例）

検量線用標準液は次のように混合ストック標準溶液と二枚貝マトリクスを混合させて調製する。

		混合ストック溶液	容量 (μL)	Matrix Modifier (μL) [#]
1/20 dilution	Level 7	混合ストック	20	380
1/50 dilution	Level 6	混合ストック	10	490
1/100 dilution	Level 5	混合ストック	5	495
1/200 dilution	Level 4	1/50	100	300
1/500 dilution	Level 3	1/50	50	450
1/1000 dilution	Level 2	1/200	100	400
1/2000 dilution	Level 1	1/200	50	450

#: 使用する無毒抽出液（毒を含まない）は、ワーキング溶液の調製（Section 4.1, 4.2）に先立ち、抽出作業、SPE クリーンアップ作業、アセトニトリルによる希釈作業をしたものを用いる。これが使用できない場合は、標準液希釈溶媒（3.3.7）を用いる。

毒を含まないムラサキイガイの組成標準物質は National Research Council Canada あるいは、日本では関東化学株式会社（カタログ番号：49915-23）から入手できる。製品は次のとおりである。

CRM-Zero-Mus (Mussel tissue [*Mytilus edulis*] matrix for negative control) 8g

検量線は、少なくとも5点を用いる。（高性能機種（装置感度の高いもの）は Level 1 - Level 6 を使い、中程度の機種では、Level 2 - Level 7 を使用することを勧める。）検量線の直線範囲内に収まった定量結果のみを使用する。

ワーキング標準溶液はアセトニトリルの含量が高いため、溶媒蒸発には注意すること。

二次標準（ワーキング標準溶液）

保管：冷蔵（4℃）、オートサンプラーバイアル

使用期限：1週間

ワーキング標準溶液の濃度（例, nmol/L）

	C1	C2	C3	C4	dcGTX2	dcGTX3	dcGTX1	dcGTX4	GTX2	GTX3
L7 (1/20)	458	137.6	545.2	229.6	403.6	119.4	401.4	144.4	410.4	174
L6 (1/50)	183.2	55.0	218.1	91.8	161.4	47.8	160.6	57.8	164.2	69.6
L5 (1/100)	91.6	27.5	109	45.9	80.7	23.9	80.3	28.9	82.1	34.8
L4 (1/200)	45.8	13.8	54.5	22.96	40.4	11.9	40.1	14.4	41.0	17.4
L3 (1/500)	18.3	5.50	21.8	9.18	16.1	4.78	16.1	5.78	16.4	6.96
L2 (1/1000)	9.16	2.75	10.9	4.59	8.08	2.39	8.03	2.89	8.21	3.48
L1 (1/2000)	4.58	1.38	5.45	2.30	4.04	1.19	4.01	1.44	4.10	1.74

	GTX1	GTX4	GTX5	GTX6	doSTX	dcSTX	dcNEO	STX	NEO	TTX
L7 (1/20)	228.8	72	234	50	21.68	267.2	121.6	267.6	260.4	292
L6 (1/50)	91.5	28.8	93.6	20	8.67	106.9	48.6	107	104.2	116.8
L5 (1/100)	45.8	14.4	46.8	10	4.34	53.4	24.3	53.5	52.1	58.4
L4 (1/200)	22.9	7.2	23.4	5	2.17	26.7	12.2	26.8	26.0	29.2
L3 (1/500)	9.15	2.88	9.36	2	0.87	10.7	4.86	10.7	10.4	11.68
L2 (1/1000)	4.58	1.44	4.68	1	0.43	5.34	2.43	5.35	5.21	5.84
L1 (1/2000)	2.29	0.72	2.34	0.5	0.22	2.67	1.22	2.68	2.60	2.92

低感度装置*（SCIEX QTRAP4500）を用いた場合でも、多くの毒は Primary SRM transition にて L1 まで検出できる。ただし、NEO と GTX4、dcGTX3、doSTX、dcNEO などは L 2-3 の検出感度であった。

国際室間妥当性確認試験で用いられた分析装置（2019年3月現在）：

高感度機種：Agilent 6495 and 6940, Waters TQ-XS and TQ-S, SCIEX 6500(+)

中感度機種：Waters TQ and TQ-S Micro, SCIEX 5500, Thermo Vantage

低感度機種：Agilent 6460, SCIEX 4500

*ここでの機種感度は、麻痺性貝毒の検出感度を基準にした場合のものであり、一般的な性能基準ではない。

4 分析手順

汚染防止のため、必ず、洗浄済みの備品を使用すること

4.1 二枚貝から毒の抽出

4.1.1 50 mL ポリプロピレン製遠沈管に二枚貝ホモジネート 5.00 g を量りとる。

4.1.2 1% 酢酸溶液 5.00 mL を加え、ボルテックスミキサーで 90 秒間混合する。
キャップはしっかりと閉めること。

4.1.3 ポリプロピレン製遠沈管内の溶液面がウォーターバスの水面よりも下になるようにして、ウォーターバス（沸騰水浴）に 5 分間静置する。一度に多くのポリプロピレン製遠沈管を置くと、温度が低下するので、注意すること。

4.1.4 ウォーターバスから取り出し、氷冷あるいは流水にて 5 分間冷却する。

4.1.5 ボルテックスミキサーで 90 秒間攪拌する。

4.1.6 沈殿物ができるまで静置する、または、 $\geq 4000 \times g$, 10 min の条件で遠心分離する。

4.1.7 注意：一回抽出にとどめ、容量調整は行わないこと。

4.1.8 ポリプロピレン製チューブに上清 1 mL を移す。

4.1.9 5 μ L のアンモニア水 (3.1.6) を加え、すぐに攪拌する。

4.1.10 追加作業：懸濁物が生じた場合には、 $\geq 10000 \times g$, 1 min にて遠心分離する。
(試料によっては省くことが可能である)

4.1.11 グラファイトカーボン SPE カートリッジでのクリーンアップに用いる試料とする。

4.2 グラファイトカーボン SPE クリーンアップ

- 4.2.1 ENVI-Carb 250 mg/3 mL カートリッジを 1 % 酢酸含有 20 % アセトニトリル 3 mL、次に 0.025 % アンモニア水 3 mL の順でコンディショニングする。流速の目安は 6 mL/min 程度である。どちらもトップフリットまで溶出させ、溶出液は捨てる。
- 4.2.2 平衡化したカートリッジに、試料 (4.1.11) 400 μ L を負荷する。トップフリットまで溶出させ、溶出液は捨てる。流速の目安は 3 mL/min である。
- 4.2.3 蒸留水 700 μ L でカートリッジを洗浄し、溶出液は捨てる。このとき、最後にエアージェットする (加圧してカートリッジ内の溶媒を出し切る)。流速の目安は 3 mL/min である。
- 4.2.4 カートリッジから 1 % 酢酸含有 20 % アセトニトリル 2 mL で溶出し、きれいなポリプロピレン製バイアル (e.g. 4 mL 容量) に採る。最後はエアージェットする。流速の目安は 3 mL/min である。溶出液をボルテックスミキサーでよく混合し、均質にする。
- 4.2.5 ポリプロピレン製 700 μ L オートサンプラーバイアルに溶出液 100 μ L とアセトニトリル 300 μ L を加えて混合し、4 倍希釈する。溶出液 (4.2.4) は冷蔵条件下で、28 日間安定である。

4.3 装置条件

Parameters	Description/composition
Column	Amide HILIC 1.7 μ m 2.1 mm \times 150 mm
Solvent line A1	Water with 0.015 % FA + 0.015 % NH ₃ (3.2.1)
Solvent line B1	70 % MeCN + 0.01 % FA (3.2.2)
Solvent line A2	Water with 0.5% FA (3.2.3)
Solvent line B2	MeOH (3.2.4)
Solvent line Seal wash	10 % MeCN (3.2.5)
Solvent line purge	10 % MeCN (3.2.5)
Solvent line needle wash	70 % MeCN (3.2.6)
Injection	2 μ L
Runtime	11 min
Column temperature	60 $^{\circ}$ C
Autosampler temperature	4 $^{\circ}$ C

この例は、Waters Acquity system のものである。他社装置を使用する場合は、適宜それぞれの装置に応じて最適化して使用すること。カラムは、同等の分離を示すものであれば別のものも使用できる。

4.4 UHPLC メソッド

- ・この方法は HILIC を使用するので、カラムを手順通りに処理することが必要不可欠である。
- ・バッチの始めと終わりに関しては、Strat-up (4.4.2) と Shutdown method (4.4.4) をそれぞれ行う。
- ・カラムを初めて使用する場合、しばらく使用しなかったとき、予期しない保持時間にピークが見られた時などは、最初に Column conditioning method で送液する。
- ・特別な仕様でない限り、追加的な Pre-run time および Post-run time は用いない。
- ・以下のすべてのメソッドで、すべてのステップでグラジエントカーブは linear とする。

4.4.1 Column conditioning

新しいカラムは麻痺性貝毒を適切に保持するため、事前にコンディショニングが必要となる。この操作は、通常分析と同じ溶媒を使用する。Waters BEH Amide および Glycan カラムに関しては、最初にカラムを 60 倍量以上の移動相 A1 で洗浄する必要がある。BEH 基材の性質のため、膨潤が起きると、高含水条件で圧力が上昇する。そのため、溶媒粘性を最小とするためにカラムを 60~80 °C に加温することを推奨する。ポンプの耐圧性能に問題がなければ、室温で移動相を送液し、圧力の上昇に応じて昇温することにより、カラムの劣化を軽減することができる。流速は、カラムとシステム圧を超えないように低流速 (0.2~0.4 mL/min) とする。そのほかのカラムを使用するときは、再現性の高い分離となるように適切にカラムをコンディショニングする。

Column conditioning method (Column at 60°C)

Time (min)	Flow rate (ml/min)	%A1	%B1
Initial	0.100	100.0	0.0
1.50	0.200	100.0	0.0
3.00	0.300	100.0	0.0
4.00	0.350	100.0	0.0
30.00	0.350	100.0	0.0

4.4.2 UPLC Start-up method (17.5 min run time)

Time (min)	Flow rate (ml/min)	%A1	%B1
Initial	0.300	50.0	50.0
4.00	0.300	50.0	50.0
6.00	0.500	50.0	50.0
15.00	0.500	50.0	50.0
16.00	0.500	2.0	98.0
17.00	0.400	2.0	98.0
17.50	0.400	2.0	98.0

4.4.3 UPLC method

Time (min)	Flow rate (ml/min)	%A1	%B1
Initial	0.400	2.0	98.0
5.00	0.400	2.0	98.0
7.50	0.400	50.0	50.0
9.00	0.500	50.0	50.0
9.50	0.500	2.0	98.0
10.00	0.800	2.0	98.0
10.60	0.800	2.0	98.0
10.61	0.400	2.0	98.0
11.00	0.400	2.0	98.0

毒成分が遅く溶出してくる場合、グラジエントと初期条件を最適化できる。このとき、98% B1 を 95-97% B1 に下げるか、98% B1 の 5.00 を 4.00 に短くすることにより調整可能である。

4.4.4 UPLC shutdown method

Time (min)	Flow rate (ml/min)	%A2	%B2
Initial	0.300	100.0	0.0
4.00	0.300	100.0	0.0
8.00	0.300	0.0	100.0
9.00	0.300	0.0	100.0
11.00	0.600	0.0	100.0
15.00	0.600	0.0	100.0

4.5 MS/MS メソッド

MS/MS メソッドを次に示す Selected Reaction Monitoring (SRM) transition を用いてセットアップする。正イオンモードは、STX, NEO, dcSTX, dcNEO, doSTX, TTX に対して適用する。負イオンモードは、GTX1, GTX2, dcGTX2, dcGTX1, C1 の α エピマーに対して適用する。それ以外の類縁体は、正・負イオンモードを混合して使用する。推奨する定量 SRM transition は次の表における太字で示したものである。ギ酸ナトリウムのクラスターは負イオンモードで検出できる。最初に溶出する C 群と分離して検出される塩のピークは分離の良い指標となる。

Analogue	ESI (+) Transition	ESI (-) Transition
STX	<i>m/z</i> 300.1>204.1 , 138.0	
NEO	<i>m/z</i> 316.1>126.1 , 220.1	
dcSTX	<i>m/z</i> 257.1>126.1 , 222.0	
dcNEO	<i>m/z</i> 273.1>126.1 , 225.1	
doSTX	<i>m/z</i> 241.1>60.0 , 206.1	
TTX	<i>m/z</i> 320.1>302.1 , 162.1	
GTX2		<i>m/z</i> 394.1>351.1 , 333.1
GTX3	<i>m/z</i> 396.1>298.1	<i>m/z</i> 394.1>333.1
GTX1		<i>m/z</i> 410.1>367.1 , 349.1
GTX4	<i>m/z</i> 412.1>314.1	<i>m/z</i> 410.1>367.1
GTX5	<i>m/z</i> 380.1>300.1	<i>m/z</i> 378.1>122
GTX6	<i>m/z</i> 396.1>316.1	<i>m/z</i> 394.1>122
dcGTX2		<i>m/z</i> 351.1>164.0 , 333.1
dcGTX3	<i>m/z</i> 353.1>255.1	<i>m/z</i> 351.1>333.1
dcGTX1		<i>m/z</i> 367.1>274.1 , 349.1
dcGTX4	<i>m/z</i> 369.1>271.1	<i>m/z</i> 367.1>349.1
C1		<i>m/z</i> 474.1>122.0 , 351.1
C2	<i>m/z</i> 396.1>298.1	<i>m/z</i> 474.1>122.0
C3	<i>m/z</i> 412.1>332.1	<i>m/z</i> 490.1>410.1
C4	<i>m/z</i> 412.1>314.1	<i>m/z</i> 490.1>392.1
Sodium		<i>m/z</i> 452.7>113.0, 588.6>316.8

GTX1 と GTX4 は同じ SRM transition を定量用としている。GTX3 については、正イオンモードの方が感度が高いが、データの再現性の点で負イオンモードの方が良いため、そちらを定量用としている。Waters 製 Xevo TQ-S および Agilent 製 6495 MS/MS については、最適な MS/MS パラメーター情報があるので水産技術研究所

まで問い合わせさせていただきたい。

4.6 サンプルリスト 推奨手順

推奨サンプルリストは以下のカラムに適用する。

- ・新しいカラム
- ・しばらく使用していなかったカラム
- ・予期しない/問題のあるクロマトグラムが得られたカラム

Injection	No. Injection	LC Method	MS method	Reason
Blank (80% MeCN)	1	Column conditioning	Divert to waste	Column conditioning
Blank	1	Shut-down LC method	Divert to waste	Column flush
Blank	1	Start-up LC method	Divert to waste	カラムの調整
Blank	2	UPLC LC method	SRM	カラムの平衡化
QC mix	2	UPLC LC method	SRM	保持時間の確認
QC mix	1 or more	UPLC LC method	SRM	ピーク溶出の確認
Calibration STD L1 to L6	1 each	UPLC LC method	SRM	Initial calibration
Samples	1 each	UPLC LC method	SRM	Quantitation
Calibration STD L1 to L6	1 each	UPLC LC method	SRM	Final calibration
Blank	1	Shut-down LC method	Divert to waste	Column flush

平衡化されたカラムを使用する場合の推奨サンプルリスト

Injection	No. Injection	LC Method	MS method	Reason
Blank (80% MeCN)	1	Start-up LC method	Divert to waste	Column conditioning
Blank	2	UPLC LC method	SRM	カラムの平衡化
QC mix	2	UPLC LC method	SRM	保持時間の確認
QC mix	1 or more	UPLC LC method	SRM	ピーク溶出の確認
Calibration STD L1 to L6	1 each	UPLC LC method	SRM	Initial calibration
Samples	1 each	UPLC LC method	SRM	Quantitation
Calibration STD L1 to L6	1 each	UPLC LC method	SRM	Final calibration
Blank	1	Shut-down LC method	Divert to waste	Column flush

4.7 試料中の麻痺性貝毒の計算

濃度計算は次の式に従って行う。

$$Conc_{\mu g \text{ STX-2HCl eq/kg}} = \frac{Conc_{nM} \times M_{STX} \times DF \times RRF \times TEF}{1000}$$

なお、マトリクスを用いた希釈標準品を用いた場合は次の式で計算する。

$$Conc_{\mu g \text{ STX-2HCl eq/kg}} = \frac{Conc_{nM} \times M_{STX} \times 40 \times TEF}{1000}$$

ここで、

Conc_{nM}: サンプル抽出液の測定濃度 (nM)

Conc_{μg STX-2HCl eq/kg}: サンプルホモジネート中の STX 当量

M_{STX}: サキシトキシン二塩酸塩の分子量 (372.2)

DF: サンプルホモジネートの希釈率 (プロトコール通り行えば 40 倍希釈になる)

TEF: 毒性等価係数 (4.8 参照)

RRF: 相対応答感度 (別の標準物質を用いた場合)

Ref; Turner et al., *J. AOAC int.* (2015) 98 p609

4.8 毒力計算に用いる毒性等価係数 (TEF)

EFSA ガイダンスに基づいて、TEF は次の数値を用いる。

Analyte	TEF	Analyte	TEF
C1	0.01	GTX1	1
C2	0.1	GTX4	0.7
C3	0.02	GTX5	0.1
C4	0.1	GTX6	0.1
dcGTX2	0.2	doSTX	0.05
dcGTX3	0.4	dcSTX	1.0
dcGTX1	0.5	dcNEO	0.4
dcGTX4	0.5	STX	1
GTX2	0.4	NEO	1
GTX3	0.6	(TTX)	(1)

TTX の TEF については、Finch et al., *Toxins* (2018) 10, p423 を参照した。

5 クオリティーコントロール

5.1 クロマトグラフィー適合性

この方法で麻痺性貝毒と TTX を精確に定量するためには、HILIC クロマトグラフィーが効率よく動作する必要がある。チェックポイントを以下に示す。

- 代表的なクロマトグラムを附則に示す。
- エピマー同士（例：C1 と C2, GTX1 と GTX4 など）は完全分離しなくてはならない。
- MS でのデータ取得ウィンドウを分けて使用する場合（時間を区切ってデータ取得する場合）、C 群、GTX 群、カルバメイト群（STX 群）のように 3 群に分けて行う。ただし、アジレントの装置を使用する場合はこの限りではない。
- すべての毒のピーク形状が正規分布をとる。テーリングやブロードニング、フロンティング、ピーク割れは移動相やカラム、インジェクタ等の装置に問題があるので改善が必要である。
- In-source fragmentation が起きる場合、dcGTX2,3 は GTX2,3 とベースライン分離しなくてはならない。
- C4 と GTX2, GTX4 と GTX5, GTX6 と doSTX は、理想的にはベースライン分離するのが望ましい。
- C 群はギ酸ナトリウムのクラスターと分離させる必要がある。重なっている場合、C 群がイオン化抑制を受けている可能性が高い。
- 問題ないと判断され、MS ソフトウェアが許可した場合、データ取得ウィンドウがデータ取得を補うためにオーバーラップすることがある。保持時間がドリフトして、ピークを見失わないように注意する必要がある。
- 保持時間のドリフトが分析中に生じる場合がある。特に、異なるマトリクスを分析している場合に顕著である。これは大きな問題ではない。許容できるドリフトは 5% である。

5.2 検量線と検出感度

- 検量線は、調製した標準品の濃度範囲において直線である必要がある。最小許容決定係数 (R^2) は 0.98 である。
- 使用する装置に従って、適切な濃度の標準品を分析すべきである。高性能モデルでは、1/50-1/2000 希釈液であり、低から中程度の性能モデルでは、1/20-1/1000 希釈液を推奨する。
- 装置の感度は、定量用と定性用 SRM transition の両方で、低濃度の標準品が検出できるようにする必要がある。十分に検討した SRM 条件であるため、この条件で検出できない場合には、検出限界が高くなる可能性

が高い。

- 新しいカラムや新たにカラムを洗浄した状態で使用をする場合には、検量線のドリフトが観測されることがある。装置感度が低下した場合はメンテナンスかクリーニングが必要である。著しいドリフトが起きた場合は、バッチを繰り返すことで症状が改善することがある。

5.3 麻痺性貝毒の正しい同定

- 各分析種のピークを正しく選択するためには注意が必要である。附則に分析例として代表的なクロマトグラムを添付したので参考にしてほしい。
- 次の条件を満たすように注意すること。
 - ① エピマー：C1&C2, GTX1>X4 などのようなエピマー同士で shared SRM transition を用いた場合、 α -エピマーは常に最初に溶出してくる。
 - ② In-source fragmentation 効果が GTX の SRM transition で観測されるので、次の成分同士の分離には注意が必要である。
 1. GTX2 と dcGTX2 (GTX2 が dcGTX2 SRM で検出されることがある)
 2. GTX1 と dcGTX1 (GTX1 が dcGTX1 SRM で検出されることがある)
 3. GTX3 と dcGTX3 (GTX3 が dcGTX3 SRM で検出されることがある)
 4. GTX4 と dcGTX4 (GTX4 が dcGTX4 SRM で検出されることがある)
 - ③ NEO と M2 (二枚貝代謝毒としてイガイ類から検出されることがある) : NEO は二つのピークのうち、最初に溶出してくるものである。NEO が検出されないとき、M2 を誤って NEO として計算しないように注意が必要である。その場合は、定性用 SRM を活用すべきである。
 - ④ GTX6: 定量用 SRM で 3 つのピークが検出されることがあり、その場合最初のピークである。正しい保持時間を選択する必要がある。(定性用 SRM が確認に役立つ)
 - ⑤ dcNEO: 11-OH dcSTX が shared SRM transition (273-126) で dcNEO の後に溶出してくることが観察される。

6 トラブルシューティング

- 6.1 次の症状が見られた場合は Shutdown method/Start-up method を行い、カラムを一度洗浄・平衡化させる。
- 全体的にピークが遅く溶出する。
 - ピークがあまりにも早く溶出する。
 - ピーク形状が正規分布ではない。
 - STX 群がブロードなピーク形状を与える。
- 6.2 カラム圧が高くなって、装置が停止した場合は、ガードカラムあるいはプレフィルターを交換する。
- 6.3 圧力が変動する場合は、ラインのどこかでリークしている可能性がある。ラインを確かめ、必要であれば、カラムを再接続する。
- 6.4 検量線の直線性の問題：正しく標準溶液が調製されているか再確認する。必要であれば再度調製しなおす。
- 6.5 カルバメイト毒の感度低下：標準溶液あるいは試料中に高濃度の塩の存在が考えられる。
- SPE で調製したマトリクスが MeCN で希釈されているか確認する。
 - ギ酸ナトリウムの SRM ピーク強度を確認する。
 - 再度、SPE を行う。
- 6.6 C 毒の応答がドリフトする：ギ酸ナトリウムの溶出時間を確認する。イオン化抑制等を受けている可能性がある。

附則 分析条件の一例とその時の代表的なクロマトグラム

装置条件は次のとおりである。

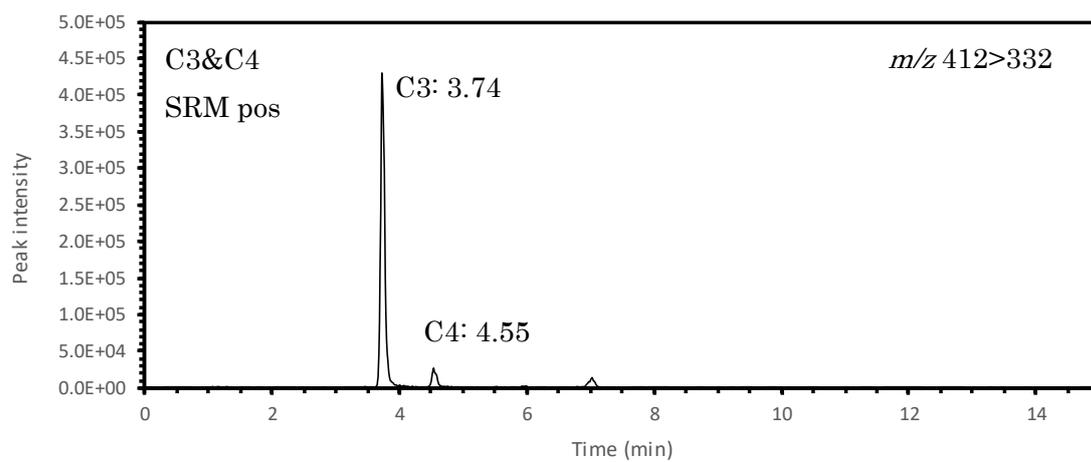
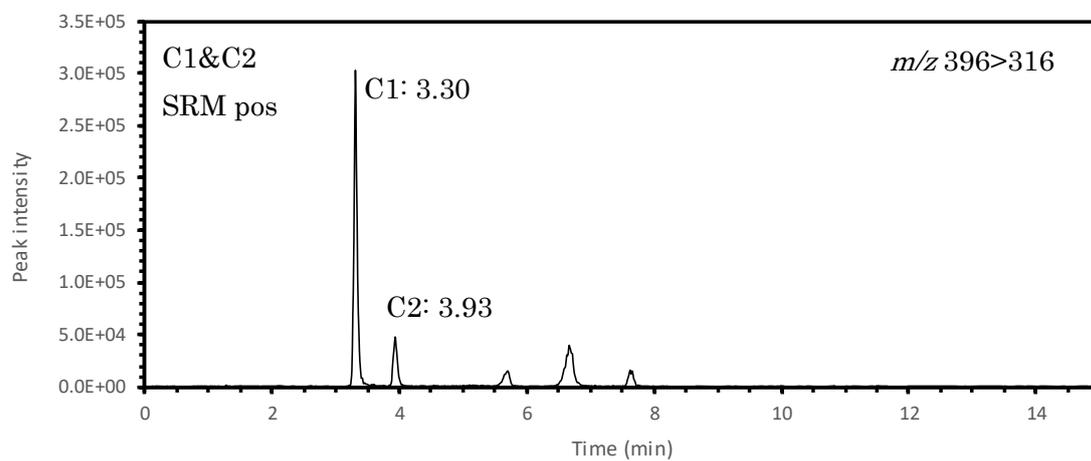
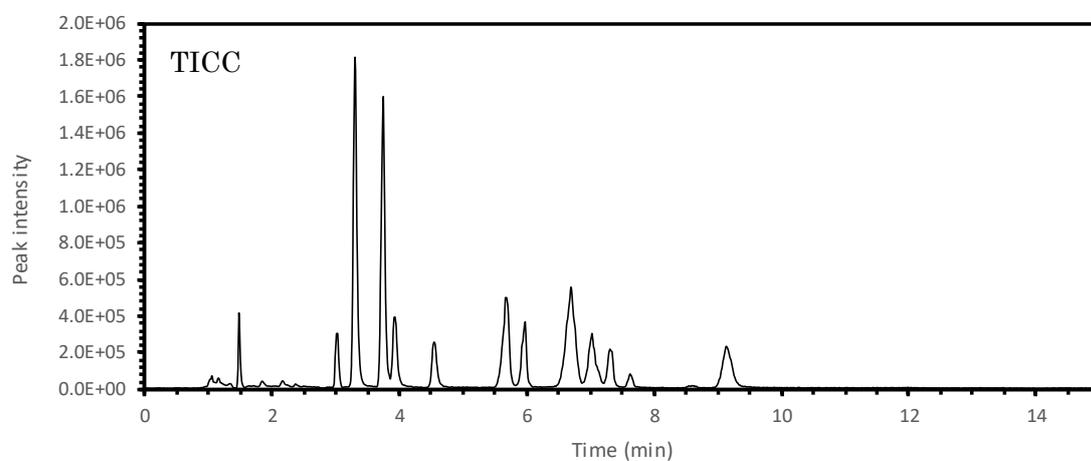
Parameters	Description/composition
Instrument (LC)	Shimadzu NexeraXR (620 bar)
Instrument (MS)	SCIEX QTRAP4500
Column	Amide HILIC 1.7 μ m 2.1 \times 150 mm
Solvent line A1	Water with 0.015 % FA + 0.015 % NH ₃ (3.2.1)
Solvent line B1	70 % MeCN + 0.01 % FA (3.2.2)
Solvent line A2	Water with 0.5% FA (3.2.3)
Solvent line B2	MeOH (3.2.4)
Solvent line needle wash	70 % MeCN (3.2.6)
Injection	4 μ L
Runtime	15 min
Column temperature	80 $^{\circ}$ C
Autosampler temperature	4 $^{\circ}$ C

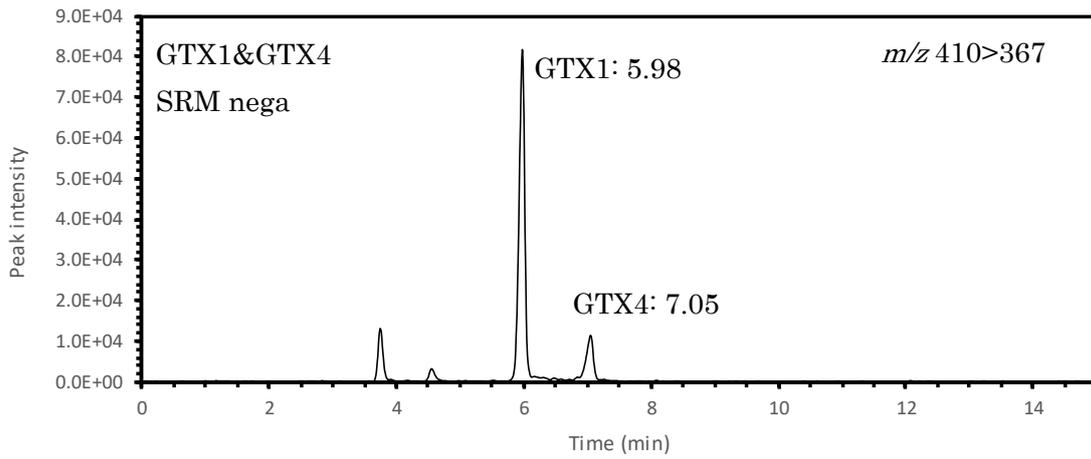
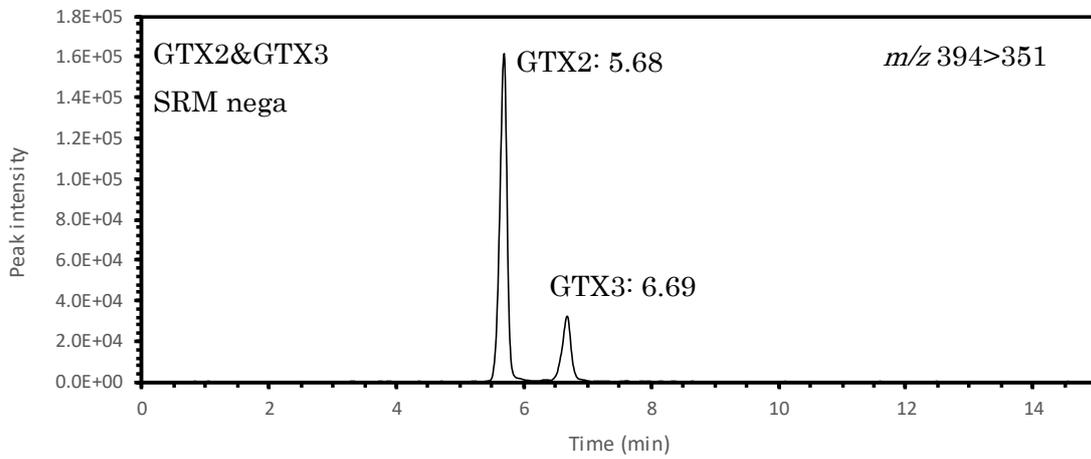
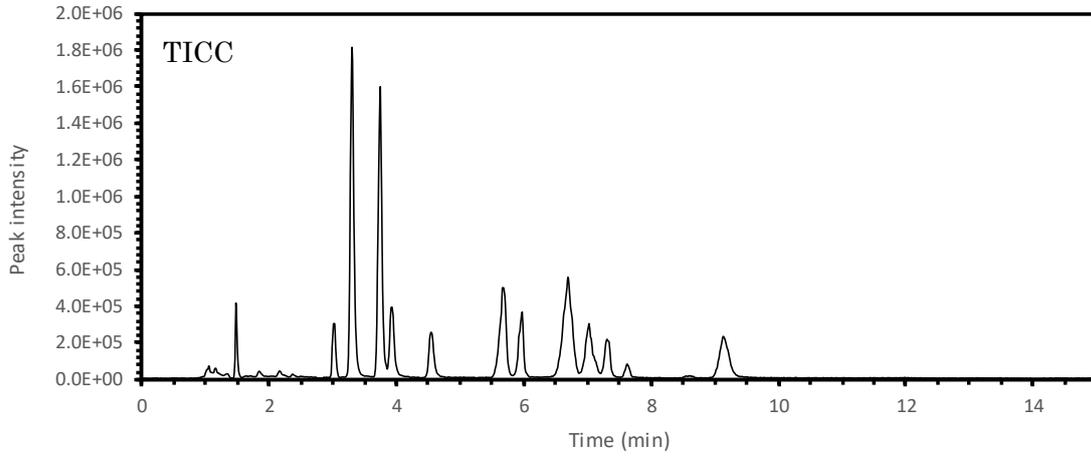
送液プログラムは次のとおりである。液体クロマトグラフの上限耐圧の関係上、流速を 0.4 mL/min に統一し、分析時間を 15 分に延長した。

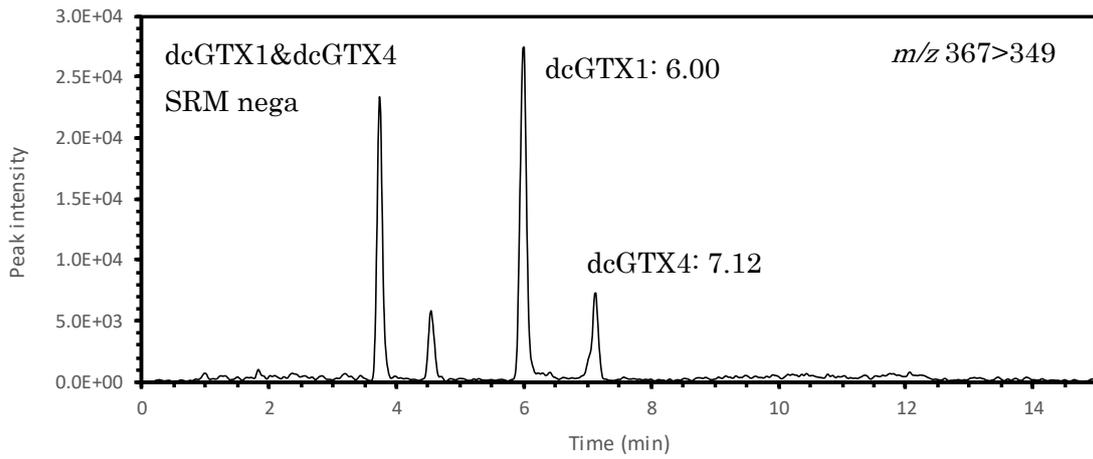
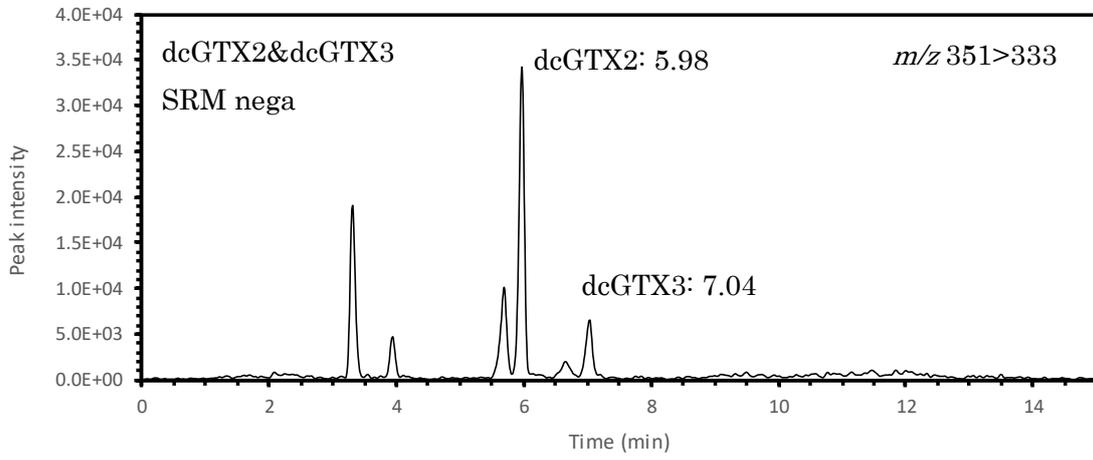
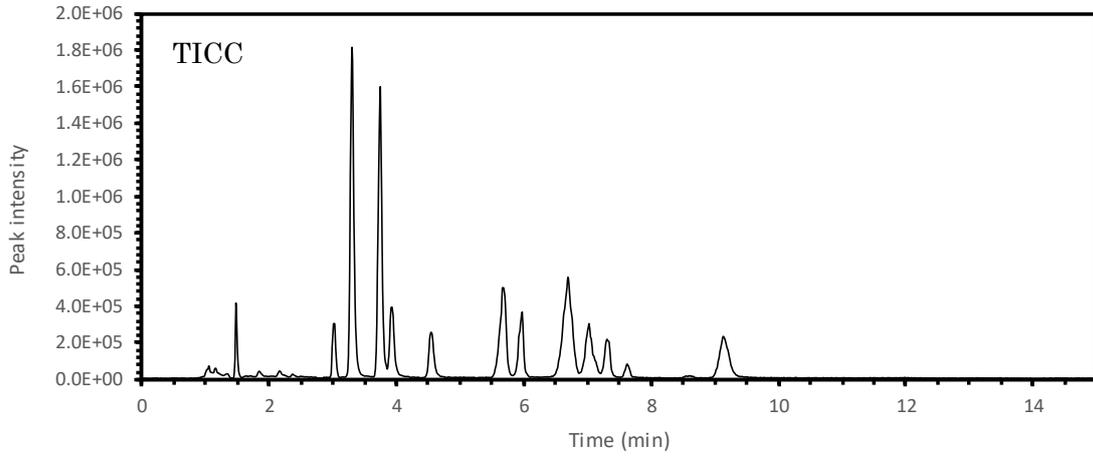
Time (min)	Flow rate (ml/min)	%A1	%B1
Initial	0.400	2.0	98.0
5.00	0.400	2.0	98.0
7.50	0.400	50.0	50.0
10.50	0.400	50.0	50.0
11.00	0.400	2.0	98.0
15.01	0.400	2.0	98.0

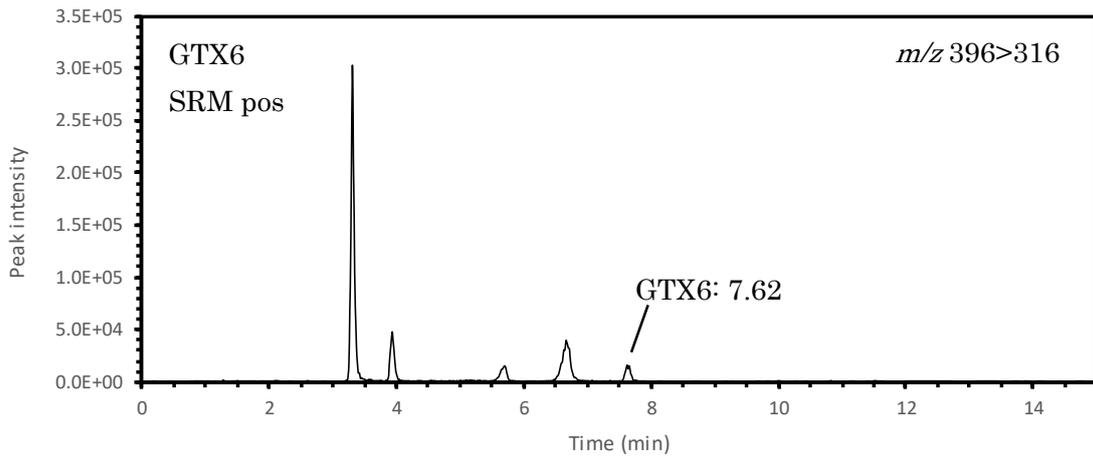
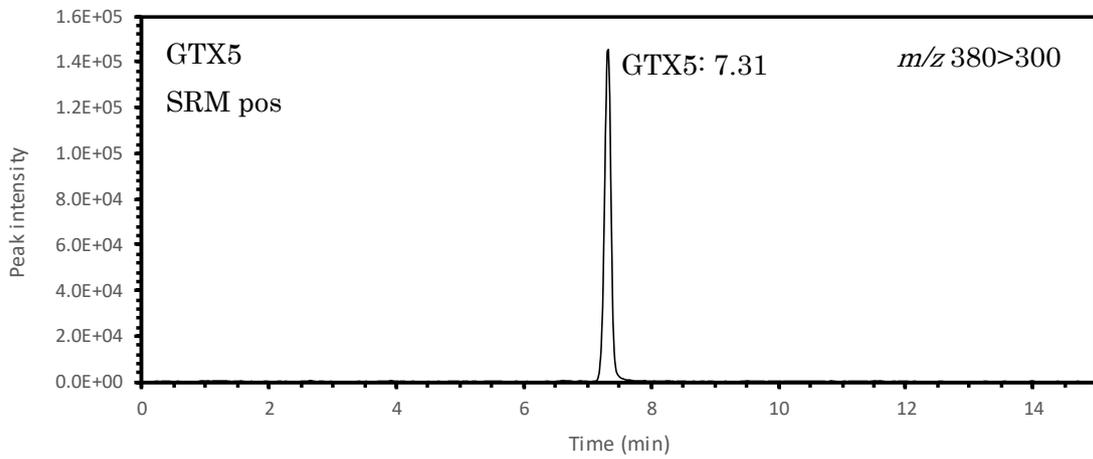
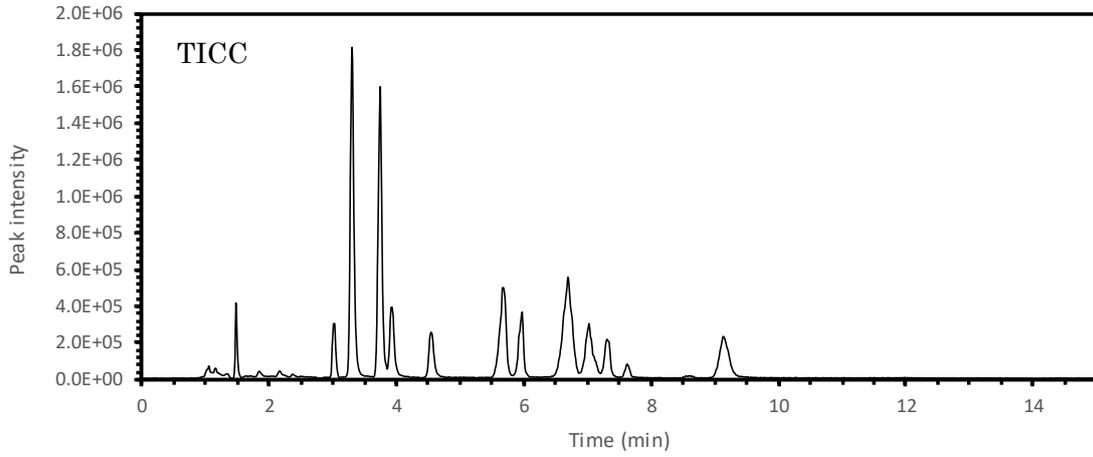
送液プログラムを変更しているため、全体的に溶出が遅くなっているが、分離の傾向は変わらない。各毒の溶出及び分離を参考にしてほしい。なお、以下の抽出イオンクロマトグラムは必ずしも定量用の SRM transition ではないことに注意する。

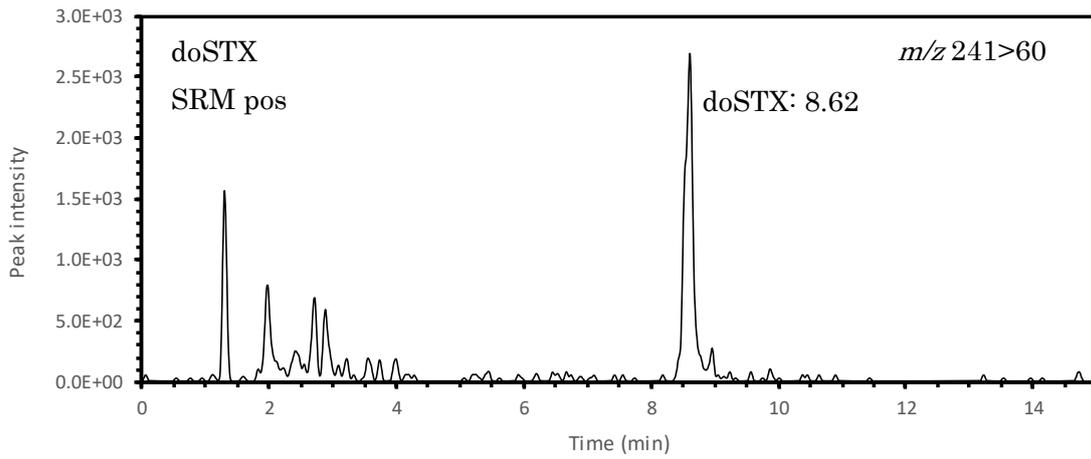
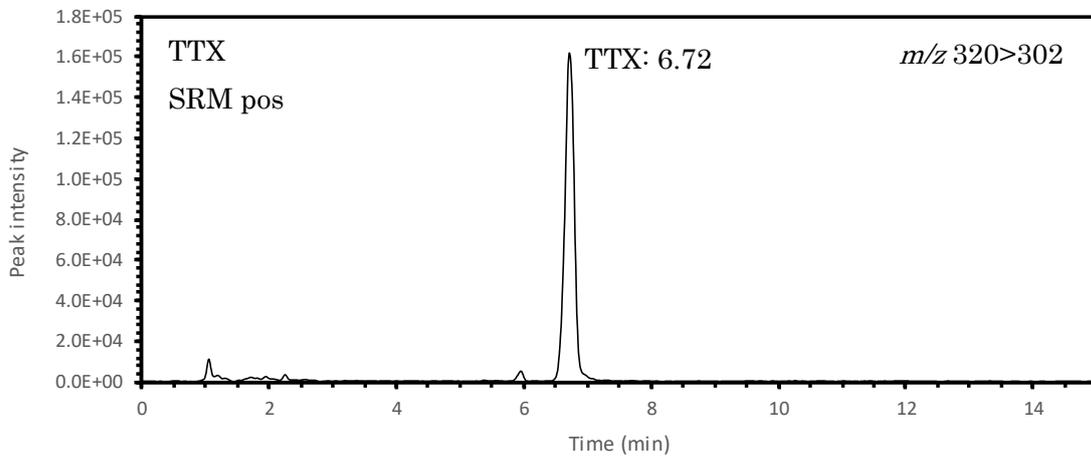
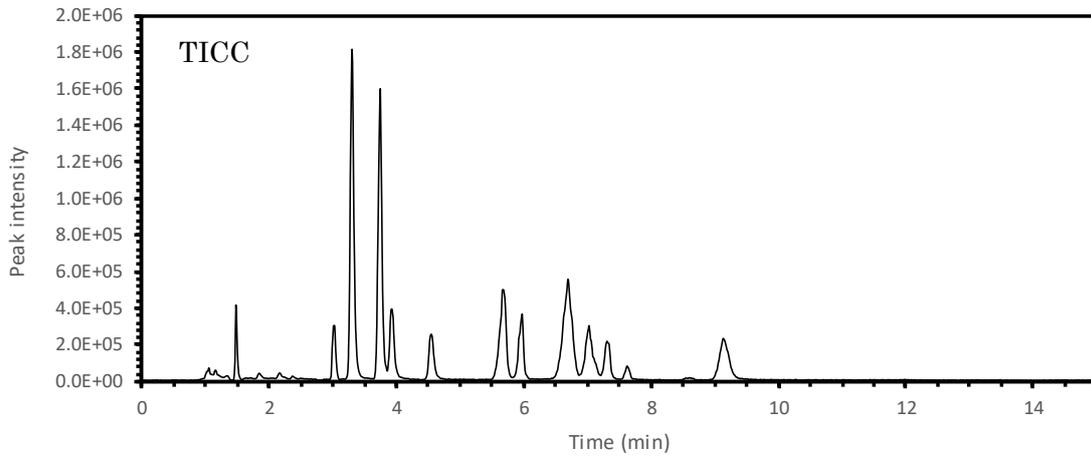
20190517 PST Lv6 sample 16

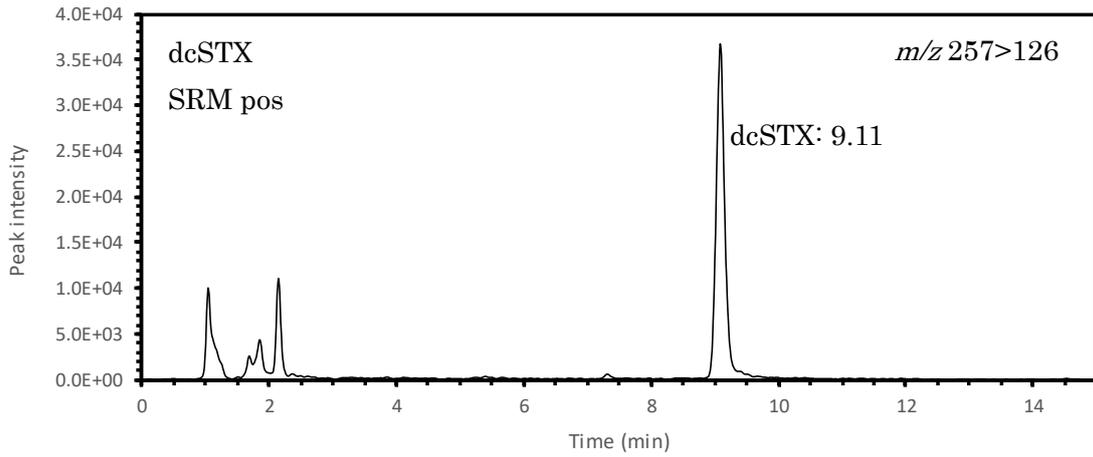
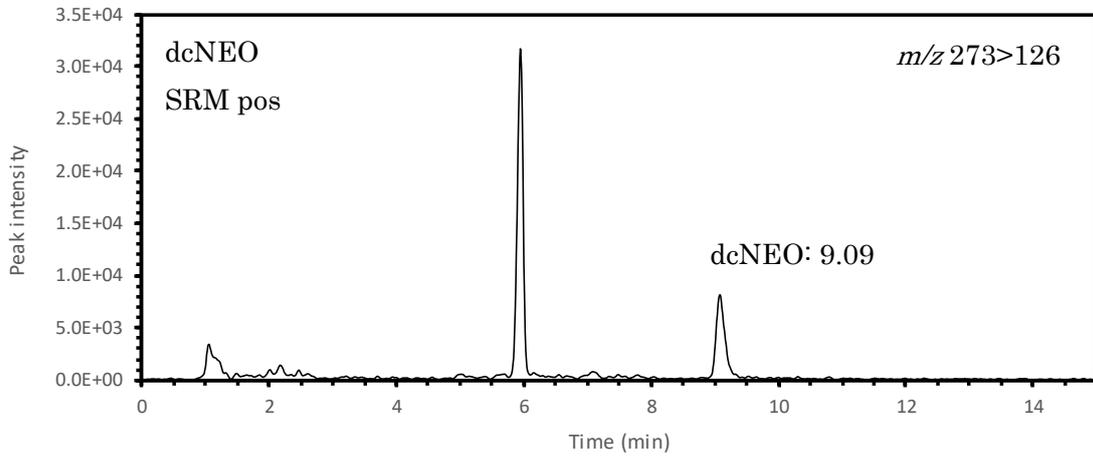
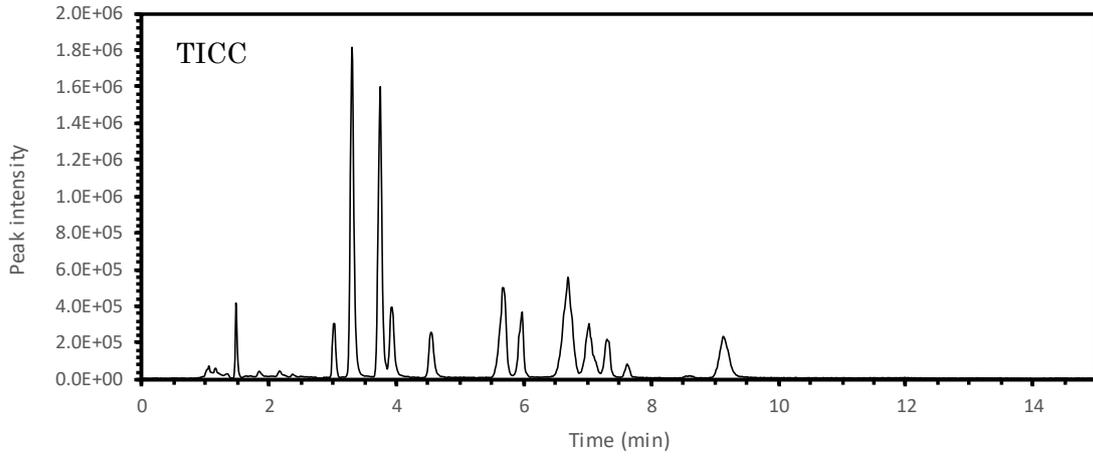


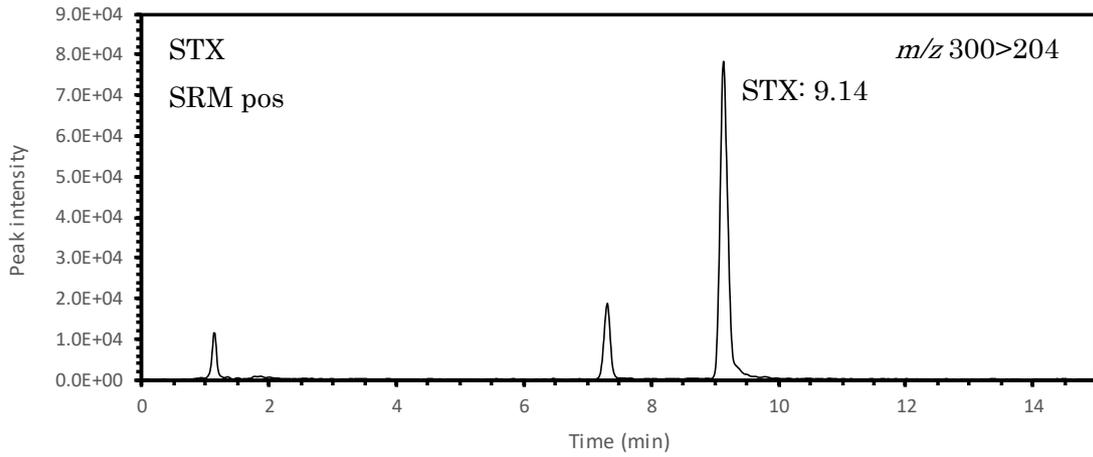
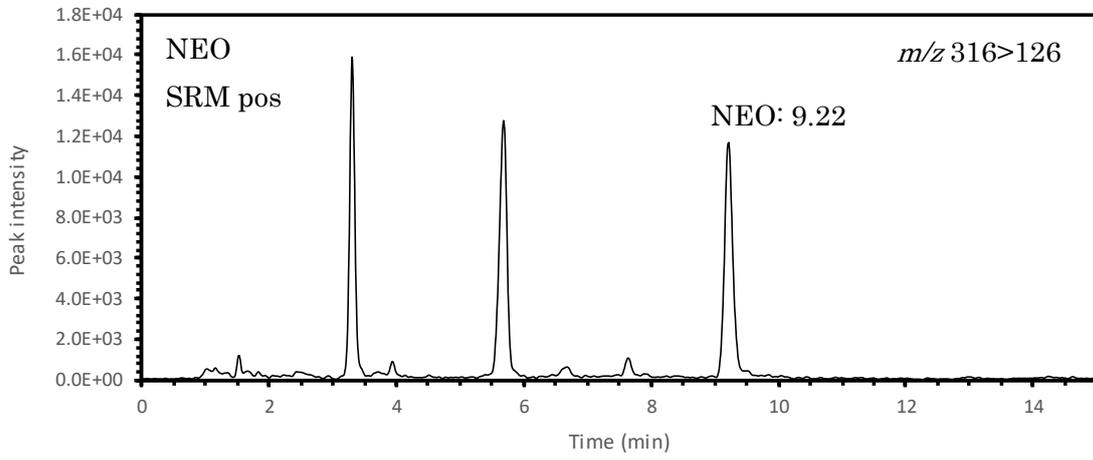
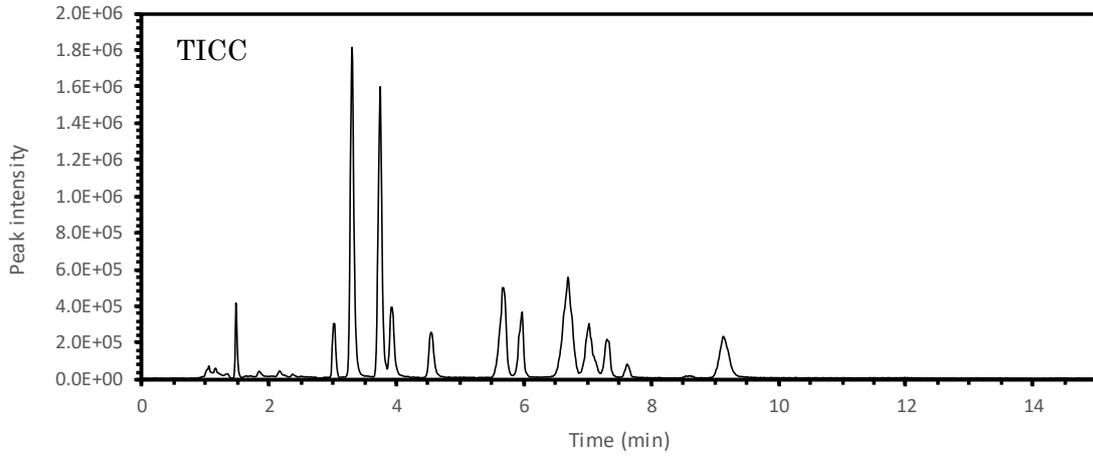












本マニュアルの作成は、農林水産省「安全な農林水産物安定供給のためのレギュラトリーサイエンス研究委託事業（2902）」の支援を受けて実施されました。また、本マニュアル作成にあたり、本委託事業の外部アドバイザーを務められた大島泰克 東北大学名誉教授および日本食品検査 橋田規 氏から貴重なご意見を賜りました。ここに謝意を示します。