

LC/MS/MSによる尿中のテトロドトキシンの分析

秦野真澄 難波江芳子 友岡美智代 東 忠英
岡 裕三 小笠原光憲 大瀬戸光明 井上博雄

Determination of Tetrodotoxin in Urine by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry

Masumi SHINNO, Yoshiko NABAE, Michiyo TOMOOKA, Tadahide HIGASHI
Yuuzou OKA, Mitsunori OGASAWARA, Mitsuki OSETO, Hiroo INOUYE

An analytical method using liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) was developed for the determination of tetrodotoxin (TTX) in human urine. The mass spectral acquisition was performed in the positive mode by applying multiple reaction monitoring (MRM). In LC separation, TTX was able to retain without the aid of an ion pair reagent by using Atlantis™ HILIC Silica column. The calibration curve of TTX was linear within the range 0.5-100ng/mL, and the detection limit was 10ng/mL in human urine. The recoveries of TTX in human urine were 89-103% and coefficient of variation was 6.0%. TTX levels were 24ng/mL and 78ng/mL in patients' urine poisoned by ingestion of puffer fish.

Keywords : Tetrodotoxin, Urine, LC/MS/MS

はじめに

テトロドトキシ (TTX : 構造式及び分子量は図1のとおり) は、神経細胞や筋細胞に存在しているナトリウムチャンネルを抑制することで、神経や筋肉を麻痺させる強力な自然毒であり、フグなど多くの生物が保有している。

フグを原因食品とする食中毒事件は、件数は少ないものの死亡率が高く、愛媛県では平成8年から平成17年までの10年間で、9件 (患者12名、うち死者2名) 発生している。

TTXの分析法は、公定法¹⁾としてマウス毒性試験法があるが、マウスの個体差やTTXのみの毒性を試験していないことから検査精度上に問題がある。また、マウスの入手及び管理等複雑な問題があり、迅速な検査の実施には困難な面がある。このため、直接TTXを分析する方法として、高速液体クロマトグラフ(HPLC)²⁻⁴⁾、ガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)²⁾、高速液体クロマトグラフ/質量分析計(LC/MS)^{4,5)}、高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計(LC/MS/MS)^{4,6)}を使用した機器分析法が報告されている。しかし、これまでに主に報告されている高速液体クロマト

グラフを使用する分析法においては、分離カラムにODSカラムを使用しており、TTXの保持にイオンペア試薬の使用が不可欠である。一方、フグ中毒事例において、患者尿からのTTX検出例が報告されている^{2,3,6)}。フグ中毒事例においては、原因食品の入手が困難な場合もあることから、患者尿は検査試料として極めて有用であると考えられる。

今回、TTXがイオン性物質であることに着目し、親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)カラムを使用し、高感度かつ選択性の高いLC/MS/MSを用いて尿中のTTXの迅速分析法を検討した。また、県内で発生したフグ中毒事例において同法による分析を実施したので併せて報告する。

材料と方法

1 試料

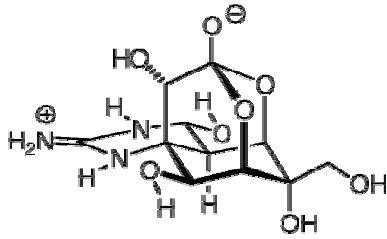
健康者の尿及びフグ中毒患者の尿を使用した。

2 試薬等

TTX標準品は和光純薬工業株式会社製生化学用を使用した。

標準原液は標準品1mgを精製水に溶解し20mLとした。

標準溶液は適宜80%アセトニトリル水溶液で、尿に添加するための標準溶液は適宜精製水で希釈して使用し



分子量 319.3

図1 TTXの構造式及び分子量

表1 測定条件

カラム : Atlantis™ HILIC Silica (Waters社) (2.1mm i.d. × 150mm, 5 μm)
ガードカラム : Atlantis™ HILIC Silica (Waters社) (2.1mm i.d. × 10mm, 5 μm)
移動相 : A ; 0.1%ギ酸, B ; アセトニトリル
グラジエント条件 : B ; 0-0.01min 95-40% 0.01-6min 40%
カラム温度 : 40°C
流速 : 0.2 mL/min
注入量 : 5 μL
イオン化モード : ESI positive
測定モード : MRM
キャピラリー電圧 : 0.5kV
コーン電圧 : 42V
プレカーサーイオン : m/z 320
コリジョンエネルギー電圧 : 38 (24) V
プロダクトイオン : m/z 162 (302)
() は定性用イオン
イオン源温度 : 120°C
デゾルベーション温度 : 350°C
デゾルベーションガス流量 : 600L/hr
コーンガス流量 : 50L/hr

た。

その他の試薬は、和光純薬工業株式会社製高速液体クロマトグラフ用あるいは試薬特級を使用した。

ODSカートリッジは、Waters社製 Sep-Pak Vac 6cc (500mg) C18カートリッジをあらかじめメタノール5mL及び精製水10mLでコンディショニングして使用した。

グラファイトカーボンカートリッジは、GL Sciences社製グラファイトカーボンパウダー1gをVarian社製 BOND ELUT RESERVOIR (6mL) に充填し、あらかじめ精製水10mLでコンディショニングして使用した。

3 装置

高速液体クロマトグラフはAlliance 2695 (Waters社) を、質量分析計はMicromass Quattro micro API (Waters社) を用いた。

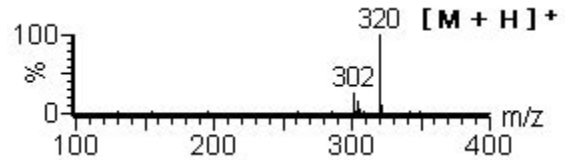


図2 TTXのプレカーサーイオンのマスペクトル

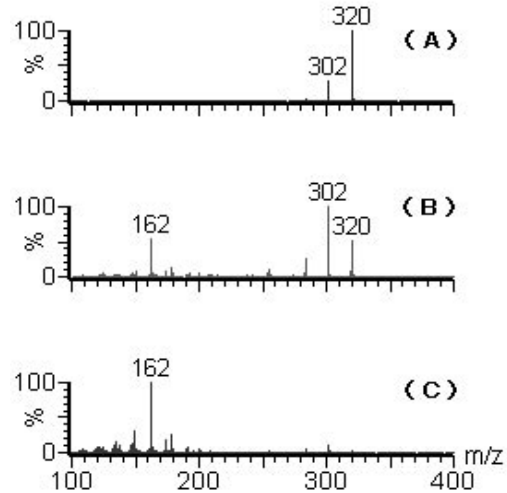


図3 TTXのプロダクトイオンのマスペクトル (A)CE20V (B)CE30V (C)CE40V

4 測定条件

測定条件を表1に示した。

5 試験溶液の調製

尿からのTTXの抽出は、公定法¹⁾の注解に記載の塩蔵品や乾製品の抽出方法を参考にして行った。

試料0.5mLを、ODSカートリッジの下にグラファイトカーボンカートリッジを直列に接続した2連カートリッジに負荷した後、精製水30mLで洗浄した。グラファイトカーボンカートリッジに吸着している成分を20%エタノール含有1%酢酸水溶液20mLで溶出させた後、減圧乾固し、残留物を80%アセトニトリル水溶液で10mLに定容し、0.45 μmメンブランフィルターでろ過したものをLC/MS/MS測定用試験溶液とした。

結果及び考察

1 LC/MS/MS測定条件の検討

1) MS/MS条件の検討

TTXはイオン性物質であるため、報告⁴⁻⁶⁾でも採用されているとおり、インターフェイスはエレクトロスプレーイオン化 (ESI) を選択した。

TTXのプレカーサーイオンのマスペクトルを図2に示した。プレカーサーイオンは、ポジティブモードでプロトンが付加したm/z320の強度が高く、コーン電圧

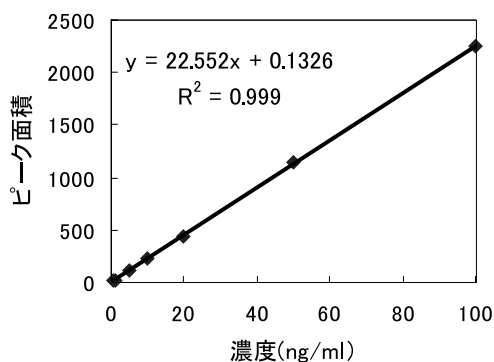


図4 TTXの検量線

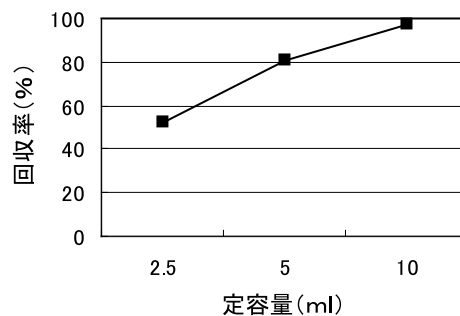


図6 定容量と回収率の関係

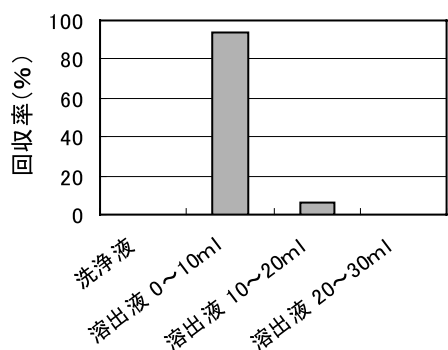


図5 溶出量と回収率の関係

は42Vで最大の強度が得られた。

コリジョンエネルギー電圧 (CE) が20, 30, 40Vの時に測定したプロダクトイオンのマススペクトルを図3に示した。CE20Vの時はm/z302, CE30Vの時はm/z302及び m/z162, CE40Vの時はm/z162が特徴的に生成された。CEを20Vから40Vの間で変化させて最適条件を検討したところ、CE24Vでm/z302の強度が最も高かったが、次に高いCE38Vでのm/z162の方が、プレカーサーイオンの脱水イオンであるm/z302と比較してベースラインが安定し、選択性も高いことから、m/z162を定量用イオンとし、m/z302を定性用イオンとした。

キャピラリー電圧は、0.5kVから3.5kVの間で変化させて最適条件を検討したところ、0.5kVで最大の強度が得られた。

2) LC条件の検討

TTXは一般に汎用されているODSカラムでは保持されにくいいため、イオンペア試薬を移動相に添加する必要がある³⁻⁶⁾。しかしイオンペア試薬を使用すると、装置の洗浄が不十分な場合、流路系に吸着してバックグラウンドに影響を及ぼし、分析感度低下の原因となる可能性がある。そこで、高極性化合物の保持に有効なHILICカラムを用いたところ、イオンペア試薬を使用することなく、良好なピーク形状と保持を得ることが

表2 TTXの添加回収試験結果

カートリッジ	回収率 (%)	変動係数 (%)
グラファイトカーボン	55~87	18
ODS+グラファイトカーボン	89~103	6

(最終濃度 10ng/mL) (n=6)

できた。

移動相として、有機溶媒はアセトニトリル、メタノール、揮発性の酸及び塩類はギ酸、酢酸、ギ酸アンモニウム、酢酸アンモニウムが一般によく使用されている。そこで、これらを使った移動相で検討した結果、アセトニトリル、ギ酸で良好なピーク強度及びピーク形状を得ることができた。

3) 検量線

TTXの検量線を図4に示した。検量線は、0.5~100ng/mLの範囲で相関係数は0.999以上であり、良好な直線性を示した。TTX標準溶液の検出限界は、0.5ng/mL (S/N=3)であった。

2 精製方法の検討

公定法¹⁾では活性炭カラム (10×150mm) が使用されているが、溶出に時間を要することから、グラファイトカーボンを充填したミニカートリッジを作成し検討を行った。このカートリッジにTTX100ng/mLを1mL負荷し、洗浄液及び溶出液中のTTX濃度を測定し、カラムからの溶出条件を検討した。溶出量と回収率の関係を図5に示した。その結果、洗浄液中にはTTXの溶出は認められず、溶出液10mLで90%以上、溶出液20mLではほぼ100%の回収率が得られた。

次に、健常者の尿を用いて前処理の検討を行った。グラファイトカーボンカートリッジのみではTTXの安定した回収結果を得ることができなかった。そこで、TTXはODSカートリッジに水溶液で保持されない性質があることから⁵⁾、前処理にODSカートリッジとグラファ

表3 フグ食中毒事例におけるTTX分析結果

発生年月日	尿採取時間	結果 (ng/mL)	回収率 (%)
H18. 1. 31	発症16時間後	78	93
	発症19時間後	24	—

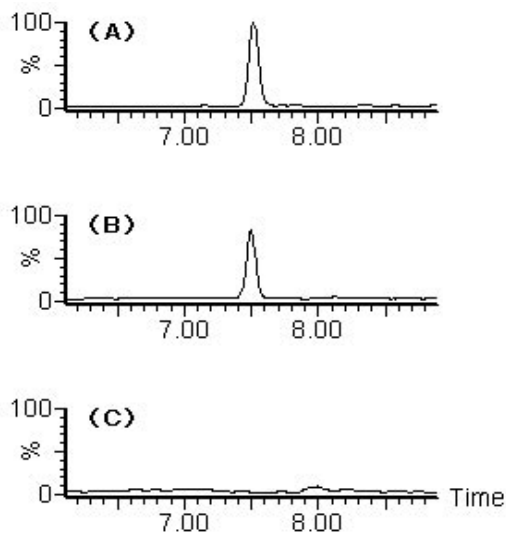


図7 MRMクロマトグラム(m/z320→162)

- (A) TTX 標準溶液5ng/mL
- (B) フグ中毒患者の尿(発症16時間後)
- (C) 健常者の尿

イトカーボンカートリッジを併用したところ、安定した回収を得ることができた。これは、ODSカートリッジのマトリックス除去効果により、グラファイトカーボンカートリッジへのTTX吸着効率が高まったためと考えられる。

LC/MS及びLC/MS/MS分析を行う場合、試料由来のマトリックス成分によりイオン化が抑制されたり促進されたりして検出感度が変化することが知られているが、試料液を希釈することによってこの影響を回避する手法も報告されている⁵⁾。そこで、試料を精製した後の残留物に標準溶液を添加し、全量を2.5, 5, 10mLに定容し、イオン化阻害の回収率に与える影響を測定した結果を図6に示した。マトリックスの影響による回収率の低下を避けるには少なくとも10mLに定容する必要があった。試料を10mLに定容した時の尿中のTTXの検出限界は10ng/mLであった。

3 添加回収試験

本法の実試料への適用を検討するため、健常者の尿を用いてTTXの添加回収試験を行った結果を表2に示した。前処理にODSカートリッジとグラファイトカーボンカートリッジを併用した本法では、回収率89~103%

変動係数6.0% (n=6) で、良好な結果を得ることができた。

4 フグ食中毒事例の概要及び分析結果

平成18年1月31日、コモンフグの肝臓を原因食品とする食中毒が発生した。患者は50代の男性1名で、唇、手足指先のしびれを訴えて入院したが、その後回復し2月2日に退院した。

TTXの分析結果を表3に示した。発症16時間後の尿では78ng/mL、発症19時間後の尿では24ng/mLであった。また、発症16時間後の尿を用いて添加回収試験を行ったところ、TTXの回収率は93%であった。

図7に標準溶液、フグ中毒患者の尿及び健常者の尿のMRMクロマトグラムを示した。妨害となるようなピークは見られなかった。

まとめ

LC/MS/MSにより尿中のTTXの分析を行った結果、次のことが明らかとなった。

- 1 LCにHILICカラムを用いることにより、イオンペア試薬を使用することなく、良好なピーク形状と保持を得ることができた。
- 2 検量線は、0.5~100ng/mLの範囲で相関係数は0.999以上であり、良好な直線性を示した。
- 3 前処理にODSカートリッジとグラファイトカーボンカートリッジを併用することによって、TTXを安定して回収することができた。また、マトリックスの影響を避けるには定容量を10mLにする必要があった。試料を10mLに定容した時の尿中のTTXの検出限界は10ng/mLであった。
- 4 健常者の尿にTTXを添加して行った添加回収試験では、回収率89~103%、変動係数6.0% (n=6) で、良好な結果を得ることができた。
- 5 フグ食中毒事例においてTTXの分析を行った結果、発症16時間後の尿では78ng/mL、発症19時間後の尿では24ng/mLであった。発症16時間後の尿を用いて添加回収試験を行ったところ、TTXの回収率は93%であった。

文 献

- 1) 厚生労働省：食品衛生検査指針 理化学編2005, 661-666, 社団法人日本食品衛生協会 (2005)
- 2) 石村勝之ほか：広島市衛研年報, 15, 87-89 (1996)
- 3) 高田久美代ほか：広島県保健環境センター研究報告 9, 27-30 (2001)
- 4) Yuki Shoji et al: Anal.Biochem., 290, 10-17 (2001)
- 5) 堀江正一ほか：食衛誌, 43, 234-238 (2002)
- 6) 赤木浩一ほか：食衛誌, 47, 46-50 (2006)