

フグに含まれるテトロドトキシンの LC/TOF-MS による分析

吉岡 直樹^{1*} 松岡 智郁¹ 秋山 由美¹ 三橋 隆夫¹
押部 智宏² 近平 雅嗣²

Determination of Tetrodotoxin in Puffer Fish by Liquid Chromatography / Time-of-Flight Mass Spectrometry (LC/TOF-MS)

Naoki YOSHIOKA^{1*}, Tomofumi MATSUOKA¹, Yumi AKIYAMA¹, Takao MITSUHASHI¹,
Tomohiro OSHIBE², and Masatsugu CHIKAHIRA²

¹Life Science Division and ²Infectious Disease Research Division, Public Health Science Research Center, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Consumer Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan

A rapid screening method utilizing liquid chromatography / time-of-flight mass spectrometry (LC/TOF-MS) was developed for the determination of tetrodotoxin (TTX).

The sample was extracted with 0.1% acetic acid and passed through a solid phase extraction (SPE) column. The eluate was diluted with 0.1% acetic acid - acetonitrile (1:1). 1 μ L of the solution was injected into LC/MS system. The chromatographic separation was performed on a hydrophilic interaction chromatography (HILIC) column with a mobile phase of acetonitrile - 16 mM ammonium formate (pH 5.5).

This method has been applied to a food poisoning case occurred in Hyogo prefecture in 2008. There was a good correlation between results from LC/TOF-MS and mouse bioassay (MBA). This method is suitable for rapid screening of TTX.

I はじめに

フグ摂取によるテトロドトキシシン (TTX) 中毒は、年々減少傾向にあるものの、全国では年間約 20~40 件発生しており、動物性自然毒による中毒件数の半分以上を占めている¹⁾。兵庫県内においても、ほぼ毎年のようにフグ中毒が発生しており、平成 20 年には 3 件の事例が報告されている。

現在、TTX の分析法は、公定法としてマウス毒性試験

法²⁾が採用されているが、マウスの入手等に時間を要するために、理化学分析として、ポストカラム蛍光HPLC³⁾、イオンペア試薬を用いたLC/MS/MS⁴⁾、およびODSカラムを用いたLC/TOF-MS⁵⁾による分析法などが報告されている。

近年、高極性化合物に対して保持の強いHILIC (親水性相互作用クロマトグラフィー)カラムが開発されたが、今回は、このカラムを用いたLC/TOF-MSによるTTX分析法を検討した。

また、2008年12月に県内で発生したフグ中毒事例において、患者胃内容物中のTTXを、開発した分析法を用いて測定し、マウス毒性試験の結果と比較したので併せて報告する。

¹健康科学部 ²感染症部

*別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町 2-1-29
兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学研究センター
健康科学部 吉岡 直樹

II 材料と方法

1. 試料

2008年4月に明石市で採取されたコモンフグ雌雄各1尾(皮・筋肉・精巢・肝臓・卵巣)を用いた。なお、添加回収試験に用いたシロサバフグは神戸市内の小売店で購入した。

2. 試薬および試液

TTX 標準品は和光純薬工業(株)製生化学用を用いた。酢酸、ギ酸アンモニウムは試薬特級を用い、アセトニトリルは高速液体クロマトグラフ用を用いた。固相抽出カラムは Waters 製 Oasis HLB (30 mg, 1 mL) を使用した。

3. 装置および測定条件

装置: Agilent 1200 Series LC, 6210 TOF-MSD

カラム: TSK gel Amide-80 (2.0 mm×250 mm, 5 μm)

移動相: 16 mM ギ酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.5) - アセトニトリル (2:3)

流量: 0.2 mL/min, カラム温度: 40°C

注入量: 1 μL

イオン化法およびキャピラリー電圧: ESI (Positive, 4000V)

ネブライザ圧力: 50 psi, 乾燥ガス: 10L/min (350°C)

フラグメンター電圧: 200 V

スキャン範囲: m/z 50-950

リファレンスマス: 121.0509 および 922.0098

4. 試験溶液の調製

4.1 フグ組織

フグ組織からの TTX 抽出は、公定法²⁾に準じた。皮についてはハサミで細切り、他の部位はホモジナイザーで均一化した。筋肉は 10 g, その他の部位は 5 g を共栓試験管に入れ、0.1% 酢酸 25mL を加えて沸騰水浴中で 10 分間加熱抽出した。これを遠心分離した後、上清をろ紙でろ過した。さらに残渣を約 25mL の 0.1% 酢酸で洗浄し、ろ液と洗液を併せた後、0.1% 酢酸を加えて 50mL に定容した。この液の約 2mL を取り、Oasis HLB ミニカラムを通過させた。最初の 1mL を捨て、後の流出液を 0.1% 酢酸/アセトニトリル (1:1) で適度に希釈し、LC/TOF-MS により分析した。

4.2 胃内容物

胃内容物 1 g に 0.1% 酢酸 10 mL を加えて、ホモジナイザーで抽出した。抽出液の約 2mL を分取し、Oasis HLB ミニカラムを通過させた。最初の 1mL を捨て、後の流出液を 0.1% 酢酸/アセトニトリル (1:1) で適度に

希釈し、LC/TOF-MS により分析した。

III 結果および考察

1. 分析条件の検討

TTX (構造式: Fig.1) はイオン性化合物で極性が高く、逆相の ODS カラム等ではイオンペア試薬を用いないと保持されにくい。このため本法では、高極性化合物の分析に適した HILIC カラムを使用した。移動相は、Nakagawa らの条件⁹⁾を参考に、16mM ギ酸アンモニウム (pH 5.5) - アセトニトリル (2:3) を使用した。この結果、TTX は約 13.5 分の保持時間にピークが見られ、形状も良好であった。

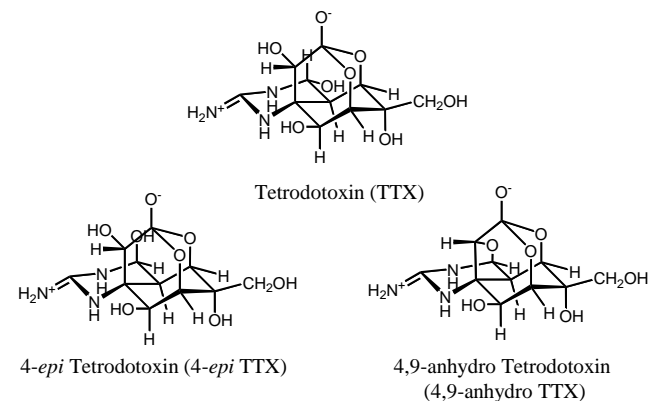


Fig.1 Chemical structures of Tetrodotoxin (TTX) and related compounds.

LC/TOF-MS のフラグメンター電圧は、TTX のプロトン付加分子 $[M+H]^+$ (m/z 320.1088) が観測されやすい 200 V に設定した。また、ネブライザ圧力、乾燥ガス、キャピラリー電圧等のパラメータを検討した結果、II 方法に記載した条件が最適であった。Fig.2 に TTX 標準 0.1μg/mL 溶液のマススペクトルと抽出イオンクロマトグラム (m/z 320.1088±0.005) を示した。

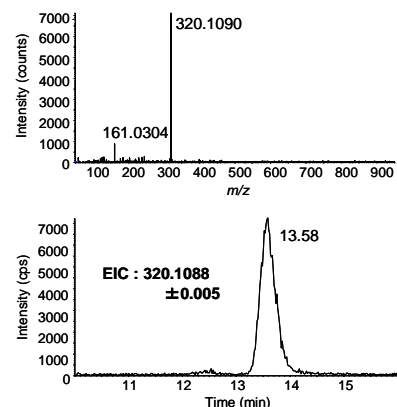


Fig.2 Mass spectrum and extracted ion chromatogram of TTX standard (0.1μg/mL) by LC/TOF-MS.

また、この条件では観測されなかった TTX の脱水イオン $[M-H_2O+H]^+$ (m/z 302.0983) は、フラグメンター電圧を 300V 以上にすると顕著に認められた。

2. 精製方法の検討

LC/MS におけるイオン化阻害物質の除去のために、ミニカラム精製を検討した。TTX は 0.1%酢酸溶液では Oasis HLB には保持されず全量が通過した。そこで、抽出液中の低～中極性妨害成分の除去を目的として、0.1%酢酸抽出液を Oasis HLB ミニカラムに通過させた。この結果、LC/TOF-MS 分析において夾雑物による TTX のイオン化阻害は見られなかった。

3. 添加回収試験

TTX を含有していないシロサバフグの筋肉に TTX を 0.1 μ g/g 相当添加し、回収試験を行った結果、回収率は 72.5 \pm 2.3% ($n=3$) であった。本法による検出限界 ($S/N=3$) および定量限界 ($S/N=10$) は、フグ筋肉においてそれぞれ 0.02 μ g/g, 0.05 μ g/g であった。

また、TTX 標準溶液の検量線は、1 μ L 注入において、0.002 μ g/mL～2 μ g/mL の範囲で直線性が認められた ($r^2=0.999$)。

4. フグ組織別の TTX 濃度

本法を用いて、コモンフグ各部位について TTX 分析を行った。Table 1 に定量結果を示し、Fig.3 に卵巣抽出液のクロマトグラムを示した。

Table 1 Results of LC/TOF-MS analysis of TTX in puffer fish (*Takifugu poecilonotus*)

Sample	LC/TOF-MS	
	TTX (μ g/g)	Toxicity (MU/g)*
Skin	5.6	25.4
Muscle	0.14	0.65
Testis	1.9	8.7
Liver	2.0	8.9
Ovary	43.8	199.1

* 1 MU = 0.22 μ g of TTX

各組織の TTX 濃度が異なるため、定量には、筋肉、精巢、肝臓では Oasis HLB 通過溶液を 5 倍に希釈したものを用い、皮、卵巣はそれぞれ 10 倍、20 倍に希釈したものを用いた。また毒力 (MU, 1MU は体重 20g のマウスを 30 分で死亡させる毒量) への換算 η は 1MU=0.22 μ g/g を使用した。

コモンフグは、北海道以南の日本各地の沿岸に生息し⁸⁾、皮・精巢は有毒であり、筋肉は一般に可食部位 (三陸沿岸産は除く) とされている⁹⁾。今回の試料からは、

すべての部位において TTX が検出され、筋肉からも無毒レベルであるが、0.14 μ g/g 検出された。また卵巣が最も濃度が高く 43.8 μ g/g であった。

また、筋肉以外の組織からは、TTX の異性体である 4-*epi* TTX および 4,9-anhydro TTX (Fig.1) と推定されるピークも観測された。4-*epi* TTX, 4,9-anhydro TTX の各標準品は市販されていないため、精密質量および保持指標を文献値¹⁰⁾と比較したところ、一致した。

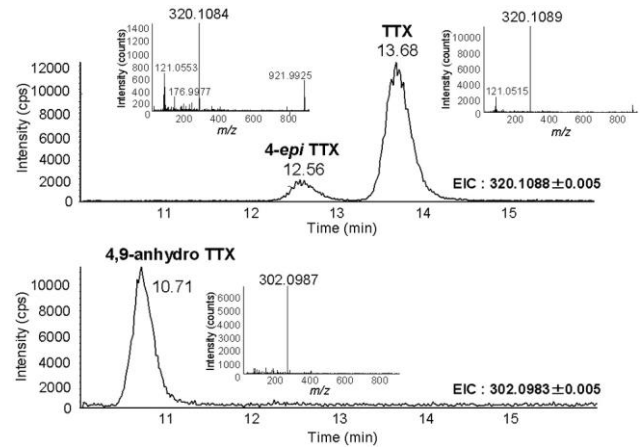


Fig.3 Extracted ion chromatograms and mass spectra of ovary extract by LC/TOF-MS.

5. マウス毒性試験との比較

各組織の分析で、TTX が高濃度で検出された皮および卵巣サンプルについて、公定法であるマウス毒性試験を行った。その結果、LC/TOF-MS 分析から得た毒力換算値とマウス毒性試験の値は、ほぼ一致していた (Table 2)。

Table 2 Comparison of toxicity by mouse bioassay and LC/TOF-MS analysis

Sample	Toxicity (MU/g)	
	Mouse Bioassay	LC/TOF-MS
Skin	22.5	25.4
Ovary	251.4	199.1

6. フグ中毒事例の適用

2008 年に県内で発生したフグ中毒事例において、患者胃内容物中の TTX の定量に本法を適用した。

その定量結果は、胃内容物あたり 2.1 μ g/g (9.6 MU/g) であり、併行して行ったマウス毒性試験の結果 (11.1 MU/g) と近似した値が得られた。

IV 結 論

LC/TOF-MSによるフグ毒 TTX の分析法を検討した。高極性化合物に対して保持の強い HILIC カラムを用いることにより、ODS カラム使用時に必要なイオンペア試薬等を用いることなく TTX が分析可能であった。

フグ組織およびフグ中毒患者の胃内容物の TTX 分析に、本法を適用した結果、公定法であるマウス毒性試験法と近似した値が得られ、分析法の信頼性が確認できた。

本法は、抽出した溶液をミニカラムに通過させ、LC/TOF-MS で分析する簡便な方法であるため、抽出および分析の所要時間も約 2 時間程度であった。また、マウス等の実験動物が不要であることから、食中毒発生のような緊急時に、フグ組織や胃内容物などをスクリーニングする迅速分析法として有効である。

文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課：平成 20 年食中毒発生状況. 食品衛生研究, **59**, 74-160 (2009)
- 2) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針 理化学編, p.661-666, 日本食品衛生協会, 東京 (2005)
- 3) 瀧 祐一, 森崎澄江, 長田 忠, 嶋崎晃次, 野口玉雄, 大友信也, 橋本周久：高速液体クロマトグラフィーによる魚貝類中のテトロドトキシンの定量. 食衛誌, **29**, 06-312 (1988)
- 4) 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. 食衛誌, **47**, 46-50 (2006)
- 5) 中山秀幸ら：第 42 回全国衛生化学技術協議会年会講演集, p.136-137 (2005), 東京
- 6) Nakagawa, T., Jang, J, Yotsu-Yamashita, M. : Hydrophilic interaction liquid chromatography - electrospray ionization mass spectrometry of tetrodotoxin and its analogs. Anal. Biochem., **352**, 142-144 (2006)
- 7) 日本薬学会編：衛生試験法・注解 2005, p.278-285, 金原出版, 東京 (2005)
- 8) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課：日本近海産フグ類の鑑別と毒性, p.10, 中央法規出版, 東京 (1984)
- 9) 厚生省環境衛生局長通知：フグの衛生確保について, 1983 年 12 月 2 日, 環乳第 59 号