

## 機器分析法による下痢性貝毒の試験法の検討(第2報)

佐々木 珠生 小中 ゆかり 福田 裕

### はじめに

麻痺性貝毒及び下痢性貝毒を含む貝類の取扱いについては、「麻痺性貝毒等により毒化した貝類の取扱いについて」(昭和55年7月1日付け環乳第29号)に基づき取り扱ってきたが、平成27年3月に厚生労働省より発出された通知<sup>1)</sup>(以下「通知」という。)により、下痢性貝毒を含む貝類の取扱いについては、国際的に機器分析法の導入が進められている現状に鑑み、機器分析法が導入されることとなった。オカダ酸(以下「OA」という。)、ジノフィストキシン-1(以下「DTX1」という。)及びジノフィストキシン-2並びにそれらのエステル化合物を分析対象化合物とし、毒性等価係数を用いてOA当量に換算したものの総和を下痢性貝毒の規制値0.16mg OA当量/kgと定められた。また、その試験法は性能評価基準を満たす方法とされ、性能評価基準、妥当性確認の方法及び分析操作例(以下「操作例」という。)が通知<sup>2)</sup>された。

当所では、広島県貝毒対策実施要領に基づくモニタリングとしての貝毒検査を実施しており、下痢性貝毒については、年1回、カキ、アサリ及びムラサキイガイを対象にマウス試験法により実施している。通知を受け、早急に機器分析法へ移行するため、昨年度は、LC-MS/MSを用いた試験法を検討し、カキについて妥当性評価を行った。性能評価基準を満たし、カキについては適用可能となったことを既報<sup>3)</sup>により報告した。今回、アサリ及びムラサキイガイについて試験法を検討し、併せて妥当性評価を行ったので、その結果について報告する。

### 方 法

#### 1 試料

アサリ、ムラサキイガイ

#### 2 試薬

標準品：OA及びDTX1は国立研究開発法人水産総合研究センターからの供与品を用いた。

標準原液：各標準品をメタノールに溶解して1µg/mLとした。

混合標準液：各標準原液を混合し、メタノールで希釈して50ng/mLとした。

固相抽出カラム：Waters社製 Oasis PRiME HLB(200mg)を用いた。コンディショニング操作はなし。

その他の試薬は既報<sup>3)</sup>のとおり。

#### 3 装置

既報<sup>3)</sup>のとおり。

#### 4 機器条件

既報<sup>3)</sup>のとおり。

#### 5 試験溶液の調製

試料2gを採取し、操作例に従い、抽出、加水分解及びヘキサンによる脱脂を行った。脱脂後のメタノール層に水2.5mLを加えて攪拌し、全量をPRiME HLB ミニカラムに負荷した。ミニカラムを5%メタノール5mLで洗浄した後、アセトニトリル・メタノール混液(9:1)5mLで溶出させ、溶出液を40℃以下で濃縮乾固し、メタノールで2mLに溶解した。メタノールで5倍希釈し、試験溶液とした。

#### 6 検量線の作成

既報<sup>3)</sup>のとおり。

#### 7 妥当性評価

試料の90%メタノール抽出液2mLに、試料中濃度として0.05mg/kgとなるように混合標準液を添加し、30分静置後、加水分解処理以降の操作を行った。1日2併行、5日間の枝分かれ実験を実施した。

### 結 果 と 考 察

#### 1 分析法の検討

既報<sup>3)</sup>に準じて分析操作したところ、回収率が120%を超過した。精製に用いるミニカラムについては、ホタテガイにおいてPRiME HLB ミニカラムで良好な結果が得られたことが報告されている<sup>4)</sup>。そこで、アサリ及びムラサキイガイについてODSミニカラムの代わりにPRiME HLB ミニカラムを用いる方法を検討したところ、良好な結果が得られた(表1)。アサリ、ムラサキイガイについては、PRiME HLB ミニカラムを用いて精製を行うこととした。

また、既報<sup>3)</sup>において、カキの試験溶液をメタノールで希釈することにより、マトリックスの影響が抑えられることを確認した。そこで、アサリ、

表 1 添加回収試験結果 (n=2)

		回収率 (%)	
		C18	PRiME HLB
アサリ	OA	115.0	107.3
	DTX1	126.0	106.2
ムラサキイガイ	OA	110.8	101.9
	DTX1	111.0	90.1

ムラサキイガイについても、希釈によるマトリックスの影響の低減について検証した(図)。希釈によりマトリックスの影響が低減されていることが確認されたことから、定量下限値を考慮し、アサリ、ムラサキイガイについても、5倍希釈したものを最終試験溶液とすることとした。

2 検量線

0.2~10 μg/L の範囲において、検量線の直線性 (r=0.999 以上)を確認した。

3 妥当性評価

(1) 選択性

ブランク試料を本法に従って試験し、定量を妨害するピークの有無を確認したところ、妨害ピークは見られなかった。

(2) 真度及び精度

真度(回収率)、併行精度及び室内精度について評価した。真度、併行精度及び室内精度は全て、目標値を満足していた。その結果を表2に示した。

(3) 定量限界

また通知に示されている定量限界 0.01mg/kg となるようブランク試料の試験溶液に標準液を添加し、ピークが S/N 比 ≥ 10 であることを確認した。

(4) 評価結果

全ての項目で性能評価基準を満足し、アサリ及びムラサキイガイについて適用可能となった。

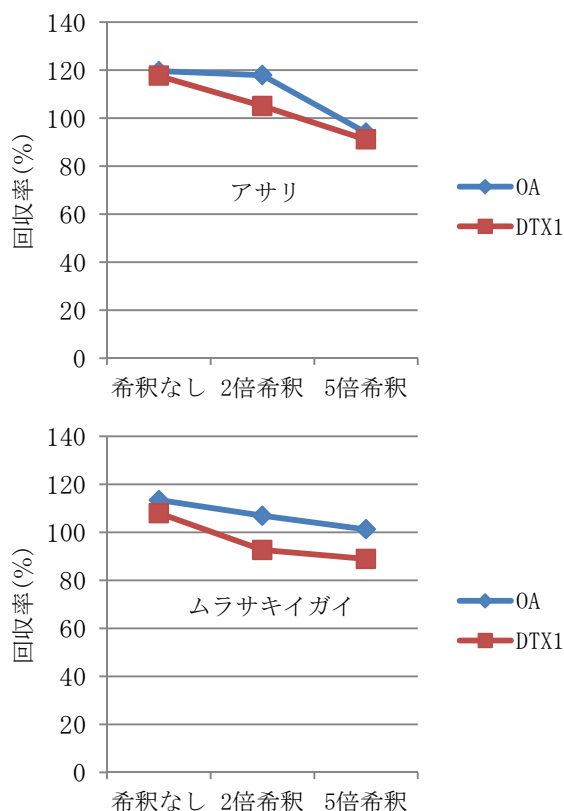


図 希釈によるマトリックス効果の低減 (n=2)

文 献

- 1) 厚生労働省通知, 食安発 0306 第 1 号, 平成 27 年 3 月 6 日
- 2) 厚生労働省通知, 食安基発 0306 第 3 号, 食安監発 0306 第 1 号, 平成 27 年 3 月 6 日
- 3) 村上紀子 他: 機器分析法による下痢性貝毒の試験法の検討, 広島市衛生研究所年報, 35, 45~47(2016)
- 4) 小池敬信 他: LC/MS/MS による下痢性貝毒分析の検討, 新潟市衛生環境研究所年報, 40, 30~32(2016)

表 2 真度(回収率)及び精度の結果

	OA			DTX1		
	真度(回収率) (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度(回収率) (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
目標値	70~120	15 ≥	20 ≥	70~120	15 ≥	20 ≥
アサリ	107.4	4.6	8.2	97.3	7.3	7.7
ムラサキイガイ	105.8	6.9	6.9	91.8	3.1	4.8