

資料

## 下痢性貝毒分析法の妥当性評価について

中島 安基江, 井原 紗弥香, 平本 春絵, 新井 清

### Validation on Determination for Diarrhetic Shellfish Poison

AKIE NAKASHIMA, SAYAKA IHARA, HARUE HIRAMOTO, and KIYOSHI ARAI

(Received October 1, 2015)

下痢性貝毒分析法について、下痢性貝毒化合物のオカダ酸群のうち、オカダ酸、ジノフィシストキシン1について、食用二枚貝（カキ、アサリ及びイガイ）を試料として、妥当性評価を行った。全ての項目及び試料について、真度及び精度パラメータの目標値等に適合していることを確認した。

キーワード：下痢性貝毒, オカダ酸 (OA), ジノフィシストキシン1 (DTX1), 妥当性評価, LC-MS/MS

#### 緒 言

わが国では昭和55年7月に下痢性貝毒の規制値が設定され [1]、公定法であるマウス試験法 [2] により食用の二枚貝の検査が実施されてきた。広島県においても、現在、カキ、アサリ及びイガイについて、マウス試験法により下痢性貝毒の検査を実施している。

しかしながら、下痢性貝毒を含む貝類については、国際的に機器分析法の導入が進められていることなどから、平成27年3月に厚生労働省から発出された通知 [3] [4] により機器分析法が導入されることとなり、OA群 (OA, DTX1及びジノフィシストキシン2 (DTX2)) に対して0.16 mgOA 当量/kgの規制値が定められた。

こうした状況のもと、本県においても、機器分析による下痢性貝毒の検査体制を整備することが急務である。

そこで、今回、当施設における下痢性貝毒分析法の妥当性を評価した結果について報告する。

#### 材料と方法

##### 1 試料

カキ、アサリ及びイガイは市内流通品を市場で購入して用いた。カキ及びイガイについては中腸腺を取り出し、これを試料とした。アサリはむき身を試料とした。

##### 2 試薬及び器具

抽出溶媒及び固相抽出にメタノール（残留農薬分析用）、n-ヘキサン（残留農薬分析用）、LC移動相にアセ

トニトリル（HPLC用）、蒸留水（HPLC用）はシグマ・アルドリッチ（株）製を用いた。ギ酸（LC-MS用）及びギ酸アンモニウム（特級）は和光純薬工業（株）製、水酸化ナトリウム（特級）及び塩酸（精密分析用）はナカライ社製を用いた。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（200 mg）はWaters社製、前処理フィルター（0.45  $\mu$ m）はMillex-LH13（Merck社製）を用いた。

##### 3 標準品

下痢性貝毒標準品OA及びDTX1は、農林水産省消費・安全局平成24年度海洋生物毒安全対策事業における独立行政法人水産総合研究センターからの配布品を用いた。

これらの標準品をメタノールに溶解し標準原液を調製した。

さらにこれらの標準原液をメタノールで適宜希釈して混合標準溶液とした。

##### 4 装置

高速液体クロマトグラフはAgilent社製HP-1100シリーズを使用した。質量分析装置はABSciex社製API-3000を使用した。

##### 5 LC-MS/MS測定条件

測定条件は、表1のとおり。また、化合物ごとのプリカーサーイオン (Q1)、プロダクトイオン (Q3)、MRMモードにおけるDP (Declustering Potential)、CE (Colligion Energy)、CXP (Collision Cell Exit Potential) 及び保持時間 (RT: Retention Time) は表2に示した。

表1 LC-MS/MSの測定条件

カラム	Waters社製 XBridge C18 (粒子系2.5 μm, 2.1 mm × 50 mm)
流速	0.2 mL/min
注入量	5 μL
カラム温度	40℃
移動相	A: 水 (2 mM ギ酸アンモニウム及び50 mM ギ酸含有) B: 95% アセトニトリル (2 mM ギ酸アンモニウム及び50 mM ギ酸含有)
グラジエント条件	B: 40% (0-2.5分) → 100% (7.5-12.5分) → 40% (12.6-18分)
イオン化法	エレクトロスプレーイオン化 (ESI), ネガティブ (-)
イオンスプレー電圧	-4.5kV
イオンソース温度	550℃
測定モード	MRM (Multiple Reaction Monitoring)

表2 MS/MSのパラメータ及び保持時間

化合物名	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	FP (V)	CE (V)	CXP (V)	RT (min)
OA	803.6	254.9	46	350	58	1	7.76
		113.2	46	350	82	5	
DTX1	817.6	254.9	61	310	58	13	8.89
		113.1	61	310	86	5	

## 6 試験溶液の調製

通知 [4] 「オカダ酸群分析操作例」(以下, 通知法) に従い実施した。

なお, 操作フローを図1に示した。

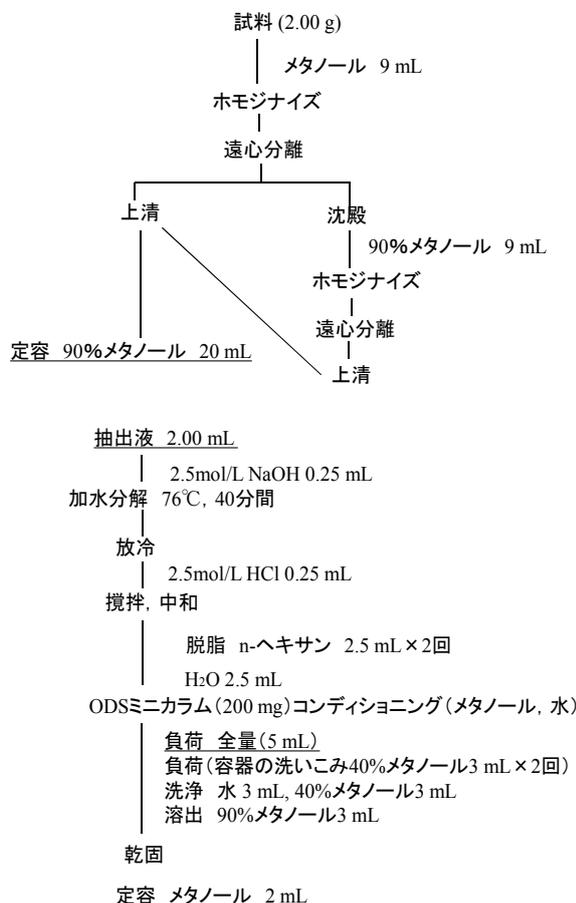


図1 オカダ酸群分析フロー

## 7 検量線の作成

混合標準液をメタノールで希釈し, 0.75~10 ng/mLの検量線用標準溶液を調製した。それぞれLC-MS/MSに注入し, ピーク面積法で検量線を作成した。

## 8 妥当性評価のための実験計画

通知法「妥当性確認の方法」に従い実施した。

ブランク試料2.0 gに対し, 混合標準溶液1.0 mg/Lを0.1 mL添加(試料中換算0.05 mg/kg)した。分析者1名が2併行5日間実施する計画とした。

通知 [4] 及び「食品中の有害物質等に関する分析法の妥当性確認ガイドライン」[5] に準じ, 妥当性確認のパラメータは, 選択性, 真度, 精度及び定量限界とした。真度, 併行精度及び室内精度の目標値 [4] を表3に示した。

表3 真度, 併行精度及び室内精度の目標値<sup>4)</sup>

評価対象	試行回数*	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
OA	5	70 ~ 120	15 ≥	20 ≥
DTX1	5	70 ~ 120	15 ≥	20 ≥
DTX2	5	70 ~ 120	15 ≥	20 ≥

\*自由度4以上とする。

## 結果及び考察

### 1 選択性

カキ, アサリ及びイガイのブランク試料を分析法に従って分析し, それぞれの試料において, 妨害ピークの面積が, 試料中各オカダ酸群濃度0.01 mg/kg に相当するピークの面積と比較し1/10未満であることを確認した。

## 2 真度及び精度

### (1) 真度 (回収率)

真度は、OAについて、カキ、アサリ及びイガイでそれぞれ98.3、104.8及び98.9%、DTX1について、カキ、アサリ及びイガイでそれぞれ93.8、89.6及び91.5%で、すべての化合物及び試料で表3に示したガイドラインの目標値である70~120%を満たした(表4)。

### (2) 精度

それぞれの試料における、対象化合物の併行精度及び室内精度は表計算ソフトにより、一元配置分散分析による解析を行い算出した。表4にその結果を示した。すべての項目において、表3に示したガイドラインの目標値を満たした。

以上の結果から、カキ、アサリ及びイガイのOA及びDTX1の分析についてはLC-MS/MSに適用可能と考えられた。

表4 妥当性評価結果

試料	OA			DTX1		
	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
カキ	98.3	2.9	2.9	93.8	5.3	5.3
アサリ	104.8	7.0	7.0	89.6	6.0	6.1
イガイ	98.9	4.1	13.0	91.5	7.2	7.2

### 3 定量限界

真度及び精度の目標値を満足した添加試料において、0.01 µg/gの濃度で添加した化合物のピークは全てS/N比≥10を満たした。

## ま と め

通知法に基づき、OA及びDTX1について、LC-MS/MSによる妥当性評価試験を実施したところ、OA及びDTX1ともに、すべての試料でガイドラインの目標値を満たした。

なお、DTX2については、今回、標準品の入手ができなかったことから、標準品を入手次第、妥当性評価を実施する予定である。

今後、下痢性貝毒検査において、マウス試験法から、機器分析法への移行に向け、当センターの検査体制を確立していく予定である。

## 文 献

- [1] 厚生省環境衛生局乳肉衛生課長通知. 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
- [2] 厚生省環境衛生局乳肉衛生課長通知. 下痢性貝毒の検査について, 昭和56年5月19日付け環乳第37号
- [3] 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知. 麻痺性貝毒等により毒化した貝類の取扱いについて, 平成27年3月6日付け食安発0306第1号
- [4] 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長, 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知. 下痢性貝毒(オカダ酸群)の検査について, 平成27年3月6日付け食安基発0306第3号, 食安監発0306第1号
- [5] 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知. 食品中の有害物質等に関する分析法の妥当性確認ガイドラインについて, 平成26年12月22日付け食安発1222第7号