

[資 料]

記憶喪失性貝毒ドウモイ酸分析法の マガキ及びムラサキイガイにおける妥当性評価

吉岡 直樹* 藤田 裕代

Validation Study of Analytical Method for Determination of Domoic Acid in Oyster and Mussel Samples

Naoki YOSHIOKA* and Yasuyo FUJITA

*Health Science Research Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health Science,
1819-14 Kanno, Kanno-cho, Kakogawa 675-0003, Japan*

Domoic acid is one of the causative agents of amnesic shellfish poisoning (ASP). Cases of food poisoning by cultured mussels have been reported overseas, and the maximum level by the Codex Alimentarius Commission is set at 20 mg/kg. In this study, a rapid analytical method for domoic acid in oyster and mussels was investigated and validation studies were carried out. The trueness of the method ranged from 82.2 to 103.8%, and laboratory reproducibility (RSD) were within 5.4%. These parameters met the criteria in the Codex Alimentarius.

I はじめに

ドウモイ酸は記憶喪失性貝毒を引き起こす中毒原因物質の一つである。海外では養殖ムラサキイガイによる食中毒事例が報告されており、国際食品規格であるCODEXでは20 mg/kgを基準値として設定している¹⁾。

日本ではドウモイ酸を原因とした食中毒の報告例はないが、市販のムラサキイガイからの微量検出例²⁾やドウモイ酸を産生する珪藻もわずかに確認されている³⁾。また農林水産省のリスクプロファイルシート⁴⁾によると、国内で採取した二枚貝（ホタテガイ、ムラサキイガイ、アサリ、カキ等）1096 検体についてドウモイ酸を分析した結果（2008-2010年）、95%の検体が定量下限値（0.012 mg/kg）未満の濃度で、最大でもCODEX基準値の1/25程度であった。

今回マガキ及びムラサキイガイ中のドウモイ酸の迅速分析法を検討し、妥当性評価を実施した。また県内で入手したマガキ及びムラサキイガイを分析した結果についても報告する。

II 材料と方法

1. 試料

兵庫県内の小売店で購入したムラサキイガイ（国内産及び輸入品）、県内で採取したマガキ及びムラサキイガイを用いた。

2. 試薬、試液及び器具

2.1 標準品及び標準原液

ドウモイ酸標準溶液（96.6 µg/mL）はNational Research Council Canada製を用いた。これを10%アセトニトリルで希釈して1 µg/mL標準原液とした。ドウモイ酸の構造式をFig.1に示す。

兵庫県立健康科学研究所 健康科学部

* 〒675-0003 兵庫県加古川市神野町神野 1819-14

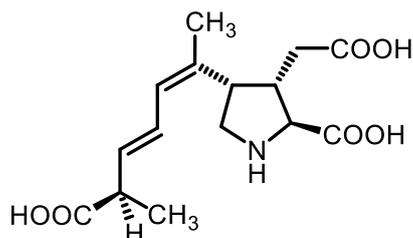


Fig.1 Chemical structure of domoic acid

2.2 その他の試薬等

メタノール及びアセトニトリルは関東化学製LC/MS用を用い、ギ酸は富士フィルム和光純薬製LC/MS用を用いた。固相抽出ミニカラムはメルク製Supelclean ENVI-Carb (250 mg, 3 mL) を用いた。

3. 装置

ブレンダーはWaring製7012S, ホモジナイザーはIKA製ULTRA-TURRAX T25を使用し、遠心機は日立工機製CT15REを使用した。

LC-MS/MSはAB SCIEX製ExionLC及びQTRAP 4500を使用した。

4. 測定条件

LC-MS/MSの測定条件をTable 1に示した。

5. 試験溶液の調製

試験溶液の調製はOchiらの方法²⁾を参考とし、以下の方法で調製した。

ブレンダーを用いて均質化した試料4 gを50 mL遠沈管に入れ、50%メタノール10 mLを加えて、1分間ホモジナイズした。50%メタノール5 mLでホモジナイザーの刃を洗い、この洗液と抽出液とを併せて20 mLに定容した後、遠心分離(1600×g, 10分間)した。50%メタノール3 mLでコンディショニングした固相抽出カラム(Supelclean ENVI-Carb)に、遠心分離した上清0.5 mLを負荷し、水2.5 mLで洗浄後、0.1%ギ酸25%アセトニトリル 3 mLで溶出し、同溶液で5 mLに定容した。この溶液をLC-MS/MSで分析した。

6. 検量線

標準原液を10%アセトニトリルで希釈して検量線用溶液(0.0005 µg/mL~1 µg/mL)を調製した。

7. 妥当性評価

妥当性評価ガイドライン³⁾に従い、ドウモイ酸の定量限界未滿を確認したマガキ及びムラサキイガイのブランク試料に0.05 mg/kg及び1 mg/kg相当のドウモイ酸を添加し、分析者1名、2併行、5日間の添加回収試験を行った。その結果から真度、併行精度及び室内精度を求めた。選択性及び定量限界については、ブランク試験溶液及び0.05 mg/kg相当を添加した試験溶液のクロマトグラムを比較し、評価した。

Table 1 LC-MS/MS operating conditions

LC parameters	Column	Waters XBridge BEH C18 (100 mm×2.1 mm, 3.5 µm)
	Mobile phase	A: 0.1% formic acid, B: acetonitrile
	Gradient elution	A:B = 88:12 (0 min) → 88:12 (5 min) → 50:50 (10 min) → 88:12 (10.01 min)
	Flow rate	0.2 mL/min
	Column temperature	40°C
	Injection volume	2 µL
	MS parameters	Ionization mode
Curtain Gas		40 psi
Collision Gas		6 psi
IonSpray Voltage		5500 V
TurboIonSpray teperature		650°C
Ion Source Gas 1		70 psi
Ion Source Gas 2		80 psi
Ionization parameters of analyte		
Quantifier		Q1: 312.0, Q3: 266.0 (DP: 41 V, CE: 21 V, CXP: 10 V)
Qualifier		Q1: 312.0, Q3: 248.0 (DP: 41 V, CE: 23 V, CXP: 18 V)

Ⅲ 結果及び考察

1. 試験溶液の調製

試験溶液の調製はOchiらの方法から、抽出工程を50%メタノールを加えてのホモジナイズ(1回)に変更し、最終溶液の液量は定容器具の関係で5 mLとした。

2. 妥当性評価

2.1 検量線

検量線は0.0005 µg/mL~1 µg/mLの範囲で良好な直線性 ($R^2 \geq 0.999$) が得られた。

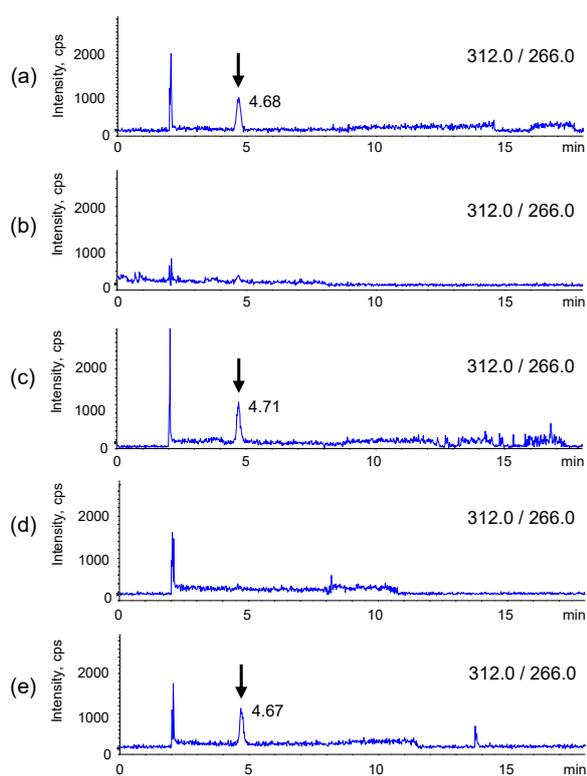


Fig.2 LC-MS/MS chromatograms obtained from 0.001 µg/mL standard solution (a), blank oyster sample (b), oyster sample fortified at 0.05 mg/kg (c), blank mussel sample (d) and mussel sample fortified at 0.05 mg/kg (e).

2.2 選択性

マガキ及びムラサキガイのブランク試料を本分析法に従って分析し、定量を妨害するピークが存在しないことを確認した。

2.3 定量限界

定量限界はマガキ及びムラサキガイにおいて、ブランク試料に0.05 mg/kg相当のドウモイ酸を添加した試料中のピークが $S/N \geq 10$ を満たしていたため、0.05 mg/kgを定量限界とした。代表的なクロマトグラムをFig.2に示した。

2.4 真度及び精度

マガキ及びムラサキガイにおける真度、併行精度及び室内精度の結果をTable 2に示した。真度は82.2~103.8%であり併行精度とともにCODEXの性能規準⁶⁾の目標値(真度 80~110%, 併行精度 $\leq 20\%$)を満たした。

3. 実態調査

兵庫県内の小売店で購入したムラサキガイ(国内産2検体及び輸入品3検体)、県内で採取したマガキ6検体及びムラサキガイ1検体について実態調査を行った。その結果、合計12検体中ムラサキガイ1検体(輸入品、ボイル)からCODEX基準値(20 mg/kg)を大幅に下回る0.64 mg/kgのドウモイ酸を検出したが、他の試料については定量限界未満であった。

Ⅳ 結論

記憶喪失性貝毒であるドウモイ酸について、マガキ及びムラサキガイを用いて妥当性評価を実施した結果、CODEXが定める性能規準を満たしていた。また県内で購入又は採取した試料について分析した結果、CODEX基準値を超えるドウモイ酸は検出されなかった。

Table 2 Validation results of domoic acid in oyster and mussel

Parameter	Oyster		Mussel	
	Fortification level		Fortification level	
	0.05 mg/kg	1 mg/kg	0.05 mg/kg	1 mg/kg
Trueness (%)	103.8	90.2	95.5	82.2
RSDr ^a (%)	4.2	3.4	3.3	3.1
RSDwr ^b (%)	3.3	5.4	5.4	5.2

^aRSD of repeatability

^bRSD of within-laboratory reproducibility

謝 辞

試料採取に協力いただきました兵庫県立農林水産技術総合センター 水産技術センター 宮原一隆主席研究員兼課長に深謝致します。

文 献

- 1) 食品衛生検査指針委員会：食品衛生検査指針 理化学編 2015, p.820-827, 公益社団法人日本食品衛生協会, 東京 (2015)
- 2) Ochi, N., Suzuki, T. : Determination of lipophilic marine biotoxins (azaspiracids, brevetoxins, and okadaic acid group) and domoic acid in mussels by solid-phase extraction and reversed-phase liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Chrom. A*, **1720**, 464795 (2024)
- 3) Kotaki, Y., Koike, K., Sato, S., Ogata, T., Fukuyo, Y., Kodama, M. : Confirmation of domoic acid production of *Pseudo-nitzschia multiseries* isolated from Ofunato Bay, Japan. *Toxicon*, **37**, 677-682 (1999)
- 4) 食品安全に関するリスクプロファイルシート：ドゥモイ酸〔農林水産省〕
https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/priority/attach/pdf/hazard_chem2-1.pdf
- 5) 厚生労働省医薬局食品安全部長通知：食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について。平成 22 年 12 月 24 日, 食安発第 1224 第 1 号 (2010)
- 6) WHO/FAO : STANDARD FOR LIVE AND RAW BIVALVE MOLLUSCS CODEX STAN 292-2008

(令和 7 年 3 月 31 日受理)