

産卵期ホタテガイ試料中のドウモイ酸定量法

The Method of Determination for Domoic Acid in Scallop Samples during the Spawning Season

橋本 諭 細川 葵 上野 健一

Satoshi HASHIMOTO, Aoi HOSOKAWA and Ken-ichi UENO

Key words : domoic acid (ドウモイ酸) ; scallop (ホタテガイ) ; spawning season (産卵期) ; HPLC/UV
(紫外吸光検出高速液体クロマトグラフィー)

緒 言

ドウモイ酸（以降 DA、図 1）は海洋珪藻類が生産する神経毒である。海外では DA を蓄積した食用二枚貝を原因とする食中毒¹⁾が発生しており、重症の場合には記憶喪失、けいれん、昏睡などの症状がみられ、死亡者も出ている。日本では DA を原因とする食中毒の報告はなく、DA の規制値は設定されていないが、輸出向けホタテガイの検査において DA の測定が行われている。当所ではその測定を、ヨーロッパ連合の標準分析法²⁾である紫外吸光検出高速液体クロマトグラフィーに、Hatfield らの強陰イオン交換固相による精製法³⁾を組み合わせた試験法で行っており、ほとんどのホタテガイ試料において測定が可能である。しかし、生殖巣、特に卵巣が肥大している産卵期のホタテガイを試料とする場合、添加回収率が 70% を下回る事例が発生する。この現象は同じ試験法を採用している青森県でも

確認され、試料の加熱処理による回収率向上を報告⁴⁾している。しかし、当所でホタテガイ卵巣ホモジネート試料に対し加熱処理を行ったところ、十分な回収率が得られなかった。このことから、卵巣重量割合が大きい試料の場合、加熱処理だけでは対応できない事例が発生する可能性が考えられた。そこで、加熱処理以外の手法を検討し、アセトニトリルによる試料洗浄を導入した新たな分析法を開発したので報告する。併せて精製カラムの変更についても検討したので報告する。

方 法

1. 試料

麻痺性貝毒検査の終了した産卵期ホタテガイ試料（ホモジネート）のうちの一つを使用した。解凍、凍結の繰り返しによる試料変性を避けるため、試料は試験一回分ずつポリプロピレン製遠沈管に秤量し、-70℃で冷凍保管した。なお、冷凍中の試料変性が疑われる⁴⁾ことから、実験には凍結後 3 ヶ月以内の試料を用いた。

2. 試薬及び標準液

アンモニア水 (NH₃ 28%)、ぎ酸 (HCOOH 88%)、試料洗浄に使用したアセトニトリルは富士フイルム和光純薬 (株) 製特級を、メタノール、高速液体クロマトグラフィーで使用したアセトニトリル、トリフルオロ酢酸は富士フイルム和光純薬 (株) 製 HPLC 測定用を用いた。ドウモイ酸は Sigma-Aldrich 社製を用いた。水は純水製造装置 Millipore 社製 Simplicity UV で精製した脱イオン水を用いた。C18 固相 (オクタデシルシリル化シリカゲル) 抽出カラムは Waters 社製 Sep-Pak C18 Plus Short Cartridge (充填量 360 mg、ホールドアップボリューム 0.7 mL) を用いた。メンブランフィルターは東洋濾紙 (株) 製 ADVANTEC DISMIC-28 HP (親水性 PTFE、孔径 0.45 μm) を用いた。

ドウモイ酸標準原液は次のとおり調製した。内容量表示 5 mg のドウモイ酸試薬バイアル瓶にアセトニトリル-水

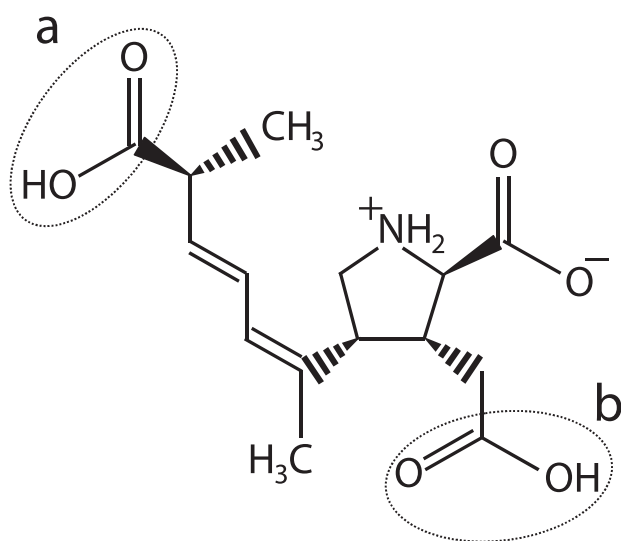


図 1 ドウモイ酸

表1 高速液体クロマトグラフィー条件

カラム	Waters 社製 XBridge BEH C18 Column、4.6×150 mm、粒子径 5 μ m
流速	0.7 mL/min
カラム恒温槽温度	40℃
注入量	25 μ L
測定波長	242 nm
溶出液	A：0.1% ^{*1} トリフルオロ酢酸水溶液 B：0.1% ^{*1} トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液
溶出条件	低圧グラジエント B10% 条件でアイソクラティック溶出
測定時間	23.5 分 ^{*2}

^{*1} %は体積分率を表す

^{*2} DA の保持時間は約 14.5 分

(1：9) 混液を直接入れ、内容物を溶解させた後に溶液の全量及びバイアル内洗浄液を 25 mL 容メスフラスコに移し、アセトニトリル-水 (1：9) 混液で定容した。正確な秤取量は開封時の風袋込み重量と洗浄乾燥後の風袋重量の差から求めた。当該品の純度規格は $\geq 90\%$ (HPLC) であったが、定量時の過小評価を避けるため、純度 100% として DA 濃度を算出した。標準原液の濃度は 200 μ g/mL 強となった。

3. 装置

紫外可視吸光検出器付き高速液体クロマトグラフは(株)日立製作所製 L 7000 シリーズを用いた。遠心機は(株)日立製作所製 CF 16 RX II (ローター回転半径 16 cm) を用いた。超音波洗浄装置は超音波工業(株)製 USC-400 Z 38 S-24 (出力 500 W、周波数 38 kHz) を用いた。

4. 測定条件

高速液体クロマトグラフィーによる DA の測定条件を表 1 に示した。

5. 試験液の調製

1) 洗浄及び抽出方法

試験液の調製法を図 2 に示した。試料 5.0 g にアセトニトリル 20 mL を加え、2 分間手振りで振とうした後、遠心加速度 100–180 $\times g$ で 2 分間遠心し、上清を廃棄した。沈殿物にアセトニトリル 20 mL を加えて分散させ、先と同様に振とうした後、1,600 $\times g$ で 5 分間遠心し、上清を廃棄した。沈殿物に水-メタノール (1：1) 混液 20.0 mL を加え、2 分間振とうした後、5 分間超音波処理をした。3,600 $\times g$ で 10 分間遠心し、上清を抽出液とした。なお、試料体積は 5 mL とみなし、抽出液総量を 25 mL とした。

2) 精製方法

「5. 試験液の調製、1) 洗浄及び抽出方法」で得た抽出液 2.0 mL を分取し、150 mmol/L アンモニア水 500 μ L を加えた。C18 固相抽出カラムをメタノール 5 mL、水 5 mL で順次コンディショニングし、カラム内部に残る水を軽く排出した後、直ちに全量を注入した。初流 0.8 mL を廃棄し、以降を溶出液として回収した。溶出液 1.0 mL を分取し、150 mmol/L ぎ酸 1.0 mL を加え、pH 調整を行った後、メンブランフィルターでろ過し、試験液とした。

6. 洗浄効果確認実験

試料 5.0 g に DA 100 μ g を添加し、室温暗所に 30 分間静置した後、「5. 試験液の調製、1) 洗浄及び抽出方法」に従い試料を洗浄し、DA を抽出した。抽出液の一部を 15,000 rpm (計算値 21,640 $\times g$) で遠心し、メンブランフィルターでろ過した。ろ過液 1.0 mL を分取し、アセトニトリル-水 (1：9) 混液 1.0 mL、150 mmol/L ぎ酸 500 μ L を加えて試験液とした。試験液中の DA の量を高速液体クロマトグラフィーにより測定し、添加量に対する割合 (添加回収率) を計算した。一方、試料洗浄を行わずに抽出して調製した試験液を対照区とした。併行数は各区 5 点とした。

7. 妥当性評価方法

ホタテガイ試料における妥当性評価を「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⁹⁾」に準じて実施した。DA は国内基準値が設定されていないため、添加量は CODEX の DA 基準値 20 μ g/g⁶⁾ 相当量とし、真度は 5 点併行、1 日で行った添加回収試験の結果より、併行精度・室内精度は試験者 1 名、2 点併行/日、5 日間行った添加回収試験の結果より評価した。添加回収試験は次のとおりに行った。試料 5.0 g に DA 100 μ g を添加し、室温暗所に 30 分間静置した後、「5. 試験液の調製」に従い試験液を調製した。試験液中の DA の量を高速液体クロマトグラフィーにより測定し、添加回収率を計算した。

8. 検量線

DA 4、6、8、10、12 μ g に相当する標準原液を 5 mL 容メスフラスコにとり、150 mmol/L ぎ酸 500 μ L を加え、アセトニトリル-水 (1：9) 混液で定容して検量線用標準液を調製した。

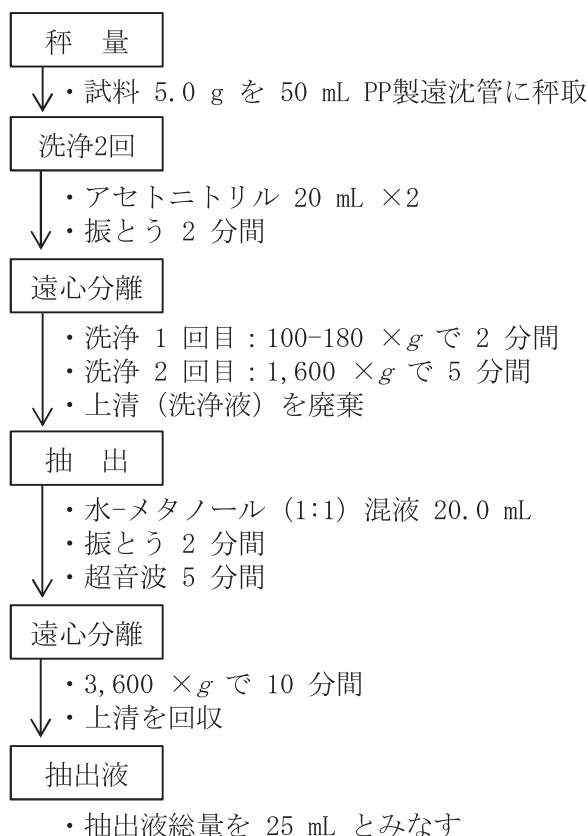
結果及び考察

1. 分析法の検討

1) 試料洗浄

DA の添加回収率が産卵期に低下したことから、ホタテガイの成熟した生殖巣には DA の抽出を阻害する物質が多く含まれると考えられた。DA は非プロトン性極性溶媒アセトニトリルへの溶解度が低い⁷⁾ことから、アセトニトリルを用いた試料洗浄により、DA 以外の極性物質を除去す

1) 洗浄及び抽出方法



2) 精製方法

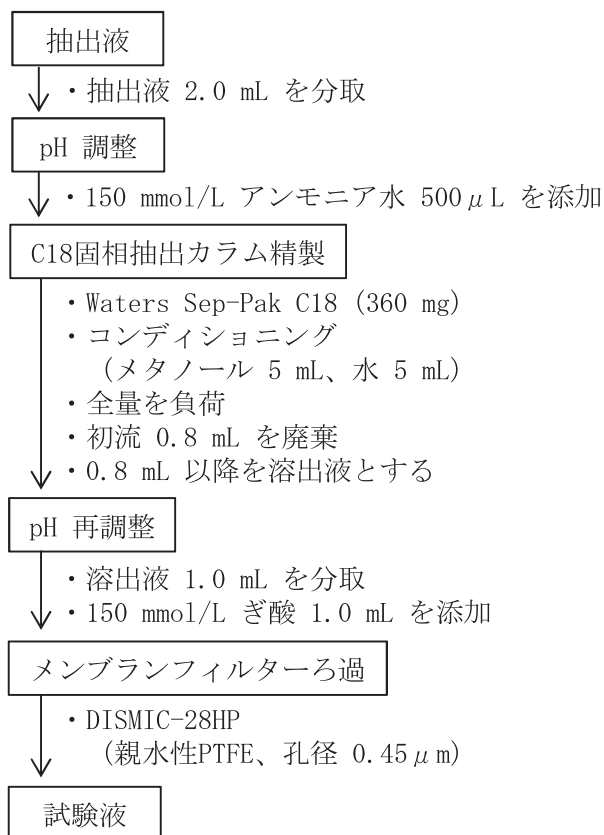


図2 試験液調製方法（新分析法）

ることを試みた。試料洗浄効果の確認のため、洗浄の有無による抽出工程の添加回収率の差を比較した。実験の結果、試料洗浄を行った場合の回収率は $97.8 \pm 5.4\%$ (Mean $\pm$ 2SD、 $n=5$)、対照区の回収率は $77.0 \pm 5.8\%$ (Mean $\pm$ 2SD、 $n=5$) であった。有意水準を両側 5% に設定した t 検定により両者は有意差あり ($t(8)=11.78$ 、 $p<0.001$) と判定され、洗浄による回収率の向上が確認された。

2) 精製方法

従来行っていた強陰イオン交換固相による保持型精製法は、精製度が高いが、DA の損失が発生する。DA はカルボキシ基を有する 2 つの側鎖を持った水溶性の高いアミノ酸であるが、酸性の液性下あるいは高いイオン強度下、水和にかかわる 2 つのカルボキシ基（図 1 の a、b）のプロトン解離が抑えられると、構造上、親水性が低下することが予測された。そのため、イオン交換固相からの溶出時に、DA と固相疎水性部位との間に新たな相互作用が生じている可能性があった。固相への吸着が少ない C18 固相を用いた通過型の精製法⁸⁾も報告されているが、水溶性成分や極性が高い成分の除去はできない。しかし、アセトニトリル洗浄によりそれらをあらかじめ除去できれば、C18 固相でも十分精製ができると考え、C18 固相抽出カラムによる精製を検討した。精製は通過法で行ったが、抽出液の液性が酸性の場合、DA の一部が C18 固相に保持された。そこで、カラム負荷前に抽出液の液性を弱アルカリ性に調整した。しかし、試験液の液性を弱アルカリ性とした場合、高速液体クロマトグラフィーによる測定時に DA のピークがブロードとなり、かつショルダーが生じたことから、測定前に液性を弱酸性に調整した。ホタテガイ試料を用いて精製効果を確認したところ、DA 保持時間に妨害ピークは出現しなかった。また、測定間隔を延長させる原因となる保持時間の遅いブロードなピークも出現しなかった。ホタテガイ試料の場合、アセトニトリル洗浄と組み合わせることで、C18 固相でも精製が可能であった。

2. 妥当性評価

真度試験の結果は回収率 $91.4 \pm 8.1\%$ (Mean $\pm$ 2SD、 $n=5$) であり、ガイドラインの目標値 70-120% を満たしていた。また、精度試験の結果は併行精度 1.8%、室内精度 3.6% であり、ガイドラインの目標値、併行精度 10% 未満、室内精度 15% 未満を満たしていた。これらの結果より、新分析法のホタテガイ試料における性能は妥当であると評価された。今後、由来の異なる複数のホタテガイ試料を用いた標準添加回収試験により、実現性の検証を行う。また、他の食用二枚貝における妥当性評価も実施する予定である。

文 献

- 1) Perl TM, Bedard L, Kosatsky T, Hockin JC, Todd ECD, Remis RS: An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid. *N. Engl. J. Med.*, 322(25), 1775-1780 (1990)
- 2) EU Reference Laboratory for Marine Biotoxins: EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of domoic acid in shellfish and finfish by RP-HPLC using UV detection, 1-12 (2008), https://www.aesan.gob.es/CRLMB/docs/docs/procedimientos/EU-Harmonised-SOP-ASP-HPLC-UV_Version1.pdf (確認：2021年5月28日)
- 3) Hatfield CL, Wekell JC, Gauglitz Jr EJ, Bamett HJ: Salt clean-up procedure for the determination of domoic acid by HPLC. *Nat. toxins*, 2(4), 206-211 (1994)
- 4) 山本明美, 中谷 実, 古川章子: ホタテ貝のドウモイ酸添加回収率における性差. 青森県環境保健センター研究報告, 18, 13-17 (2007)
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知食安発 1224 第 1 号「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
- 6) CODEX ALIMENTARIUS: Standard for Live and Raw Bivalve Molluscs CXS 292-2008, 1-9 (2008), http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252FCodex%252FStandards%252FCXS%2B292-2008%252FCXS_292_e_2015.pdf (確認：2021年5月28日)
- 7) Falk M, Seto PF, Walter JA: Solubility of domoic acid in water and in non-aqueous solvents. *Can. J. Chem.*, 69, 1740-1744 (1991)
- 8) Quilliam MA, Sim PG, McCulloch AW, McInnes AG: High-performance liquid chromatography of domoic acid, a marine neurotoxin, with application to shellfish and plankton. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 36, 139-154 (1989)