

## 精度管理用具毒検査試料中の遊離脂肪酸の測定

(財) 食品薬品安全センター・○川崎勝、大島赴夫、(社) 日本食品衛生協会・

松木容彦、(独) 水産総合研究センター・鈴木敏之、

国立医薬品食品衛生研究所・山本茂貴、伊藤嘉典、町井研士

### A. 研究目的

下痢性貝毒検査におけるマウスアッセイのための外部精度管理用リファレンスマテリアルを安定して供給する上での問題点として、陰性サンプルを冷凍保存しても遊離脂肪酸の増加により往々マウスが死亡(偽陽性化)し、精度管理用サンプルとして不適切になる事が知られている。安定した外部精度管理調査用試料を調製するために、遊離脂肪酸の簡便な微量分析法を確立することとした。

### B. 遊離脂肪酸測定

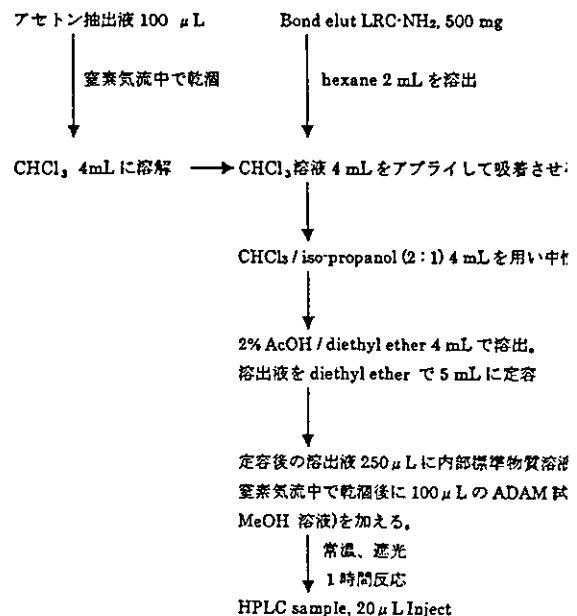
標準品は myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0), oleic acid (C18:1), linoleic acid (C18:2), arachidic acid (C20:0), palmitoleic acid (C18:4), cis 5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoic acid (EPA) (C20:5), Cis 4, 7, 10, 13, 16, 19- eicosapentaenoic acid sodium salt, arachidonic acid (C20:4), cis 4, 7, 10, 13, 16, 19- docosahexaenoic acid (C22:6) を測定対象にした。測定は鈴木ら<sup>2,3)</sup>による方法を一部改変して行った (scheme 1)。主な変更点は以下の通りである。測定に用いる溶液量を 100  $\mu$ L にスケールダウンし、マウスアッセイに用いるアセトン抽出液の一部をアッセイに支障を来さないよう少量分取して試料とした。Hexane-MeOH による液-液分配をより操作の簡便な Bond elut NH<sub>2</sub> による遊離脂肪酸分離法を用いた。その結果、液-液分配と減圧濃縮操作のない、簡便な精製法となった。遊離脂肪酸の検出には微量で感度良くさらに誘導体化に特別な装置や技術を要しない 9-anthryl diazomethane (ADAM 試薬) による蛍光誘導体化を採用して HPLC による蛍光検出による測定を行った。ADAM 試薬は条件により反応中間体を検出する可能性もあったの

で、内部標準物質 (IS) は、貝試料由来のピと重ならない保持時間を持つ decanoic acid (C10:0) が最適と考え使用したところ良好結果が得られた。

添加回収実験は各脂肪酸 8  $\mu$ g をアセトン液 50  $\mu$ L に加えて回収率を求めた。その結果 85 %~112 % の良好な回収率が得られた。より、貝毒検査用のアセトン抽出液の微量簡便な遊離脂肪酸測定法が確立された。目法を用いた貝試料中の遊離脂肪酸含量の基的データを収集して、精度管理用試料作製立てると共に、遊離脂肪酸の増加が貝毒の発現にどのように寄与するかについて検討である。

### C. 文献

- 1) AOAC official methods of analysis (2000) Natural toxins chapter 49,
- 2) Suzuki, T. et al. Lipids, Vol. 31 6 (1996), p641-645
- 3) Suzuki, T. Journal of Chromatogr A, 677 (1994) 301-306



Scheme 1 固相抽出法を用いたアセトン抽出液からの遊離脂肪酸