

## 記憶喪失性貝毒ドウモイ酸の超高速液体クロマトグラフィーによる測定について

花石竜治 山本明美 中谷 実 佐藤裕久

記憶喪失性貝毒のドウモイ酸について、超高速液体クロマトグラフィー (UPLC) 法の分析条件を検討した。UPLC 法では、従来の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法よりも、ドウモイ酸 (DA) とエピドウモイ酸 (epiDA) の分離度が若干劣っていた。UPLC クロマトグラム解析をした結果、UPLC 条件では DA ピークのテーリングが認められた。最後に、ホタテガイ試料への添加回収試験結果について、HPLC 法と UPLC 法 (使用カラム 3 種) とで有意差の検定を行ったところ、方法の違いによる結果の有意差はないという結論を得た。

Key words : amnesic shellfish poison, domoic acid, HPLC, UPLC

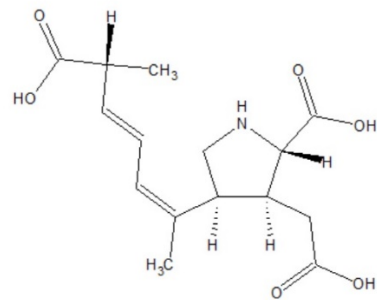
### 1. 緒言

二枚貝のうち、ホタテガイは、青森県陸奥湾の養殖漁業において重要な位置を占めている。

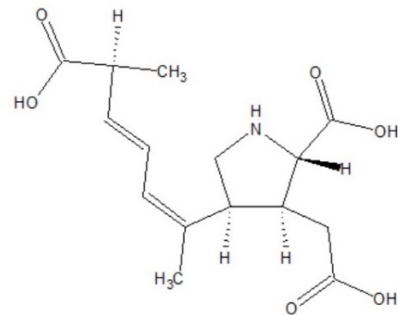
ドウモイ酸 (DA) とその異性体であるエピドウモイ酸 (epiDA) を主体とした記憶喪失性貝毒は、特に欧米で重要視されている二枚貝の貝毒である。青森県では EU にホタテガイを輸出するため、生産海域モニタリング検査を実施しており、当該検査についても ISO/IEC17025 試験所認定を取得して実施しているところである。

二枚貝の貝毒には、脂溶性貝毒、麻痺性貝毒、記憶喪失性貝毒などが含まれる。これらのうち、記憶喪失性貝毒は、陸奥湾産ホタテガイでは、これまで検出されたことはない。しかし近年、アメリカ合衆国西海岸では、毒化した貝の食餌により、アシカが中毒を起こすという問題が発生しており、記憶喪失性貝毒の本体である DA が、アシカの脳の海馬の機能を冒しているという最新の研究結果が公表された<sup>1)</sup>。図 1 に DA と epiDA の分子構造式を示した。

当所では、本分析は、Hatfield 法<sup>2)</sup>を原法として、242 nm の光吸収による高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法で実施してきた。近年、超高速液体クロマトグラフ (UPLC) 導入に伴い、分析時間を短縮するため、モニタリングの際に UPLC を使用するための検討を行ったので報告する。



(a) DA



(b) epiDA

図 1 DA 及び epiDA の分子構造式

### 2. 装置及び試薬

#### 2.1 装置

HPLC 装置は、島津製作所社製 LC-VP を用い、カラムとして、資生堂製 CAPCELL PAK C18 UG120 ( $\phi 4.6 \times 250$  mm) 粒径  $5 \mu\text{m}$  に、加えてガードカラムとして同社製 CAPCELL C18 UG120 ( $\phi 4.0 \times 10$  mm) を用いた。

UPLC 装置は Waters 社製 ACQUITY UPLC H-Class を用い、カラムとして、同社製 ACQUITY UPLC BEH C18 1.7  $\mu\text{m}$  ( $\phi$ 2.1 $\times$ 50 mm および 100 mm) (以下、BEH カラム 50 mm、100 mm と称する。) 及び同社製 ACQUITY UPLC CSH C18 1.7  $\mu\text{m}$  ( $\phi$ 2.1 $\times$ 100 mm) (以下、CSH カラムと称する。) を用いた。

## 2.2 試薬及び試料

DA の検量線用の標準物質は、市販のカナダ NRC CRM-DA-g 溶液 (DA+epiDA として 103.3  $\pm$  2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を 10% アセトニトリルで適宜希釈して使用した。

DA 分析の陽性コントロールの認証標準物質としては、カナダ NRC CRM-ASP-Mus-d を用いた。

添加回収試験に用いる DA の標準溶液は、Sigma 社 Domoic acid で 1 バイアル全量を 10% アセトニトリルで溶解し、定容したものを使用し、分析時に定量した。

DA の抽出精製操作等に用いたメタノール及びアセトニトリルは HPLC 用、塩化ナトリウムは試薬特級で、HPLC 及び UPLC の移動相調製に使用したギ酸は LC/MS 用、トリフルオロ酢酸、ギ酸アンモニウム、アンモニア水は試薬特級、炭酸水素アンモニウムは試薬一級であり、いずれも和光純薬工業社製であった。

添加回収試験の検体は陸奥湾産ホタテガイの剥き身のホールボディを粗く粉砕したものをを用いた。

## 3. 方法

### 3.1 LC 分析用検液調製

方法は、山本らの既報<sup>3)</sup>に掲載されているので、ここでは概要のみ記す。

フードプロセッサーで粗く粉砕したホールボディの貝試料に、50%メタノールを加えてホモジナイズし、遠心分離して、上清を孔径 0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターでろ過し、コンディショニングしておいた SAX ミニカラム (Agilent 社製 Bond Elut LRC-SAX 500mg) に負荷し、0.1 mol/L NaCl (10% アセトニトリル溶液) で不純物を溶脱させ、1 mol/L NaCl (10% アセトニトリル溶液) により目的成分を溶離させて調製した。

HPLC 及び UPLC 測定により得られたクロマトグラムを評価すべく、上記により調製した Mus-d 抽出溶液を測定に供した。

添加回収試験は、2015 年度 (1 月~3 月) の青森県陸奥湾産ホタテガイ検体 (検体番号 278-13~278-33-1) に、DA の標準溶液を添加し、以後、無添加の試料と同様に、抽出、精製の操作を行って検液

を得て、機器分析に供した。

### 3.2 HPLC 分析条件

#### (1) HPLC における移動相

HPLC においては、0.1 v/v% のトリフルオロ酢酸を含んだ 10% アセトニトリルを用いた。勾配法は用いず、単一条件 (isocratic) の移動相を用いた。

#### (2) HPLC 条件

表 1 に HPLC 条件のうち主要なものを列記した。

表 1 HPLC 条件

流速	1 mL/min
カラム温度	40 $^{\circ}\text{C}$
検出法	吸光光度法
検出波長	242 nm
移動相	Isocratic
分析時間	20 min
試料注入量	20 $\mu\text{L}$

### 3.3 UPLC

#### (1) カラムの選択

UPLC においては、カラムとして、EU の SOP<sup>4)</sup> に記載がある BEH カラム 50 mm を第一選択としたが、かつて UPLC 条件を isocratic 条件で検討した際に、CSH カラムが比較的、分離能が良好であったので、今回はそれも加えて検討した。

また UPLC 装置製作会社から UPLC 分析条件が公表されており、それも加えて検討した。この方法では 100 mm の BEH カラム使用であった。

#### (2) UPLC における移動相および分析条件

UPLC においては、移動相に勾配法を適用した。BEH カラム 50 mm では、EU の SOP<sup>4)</sup> 記載の条件を適用し、CSH カラムでは、その条件を適宜改変して適用した。表 2 に移動相勾配の条件を記した。A 液が 30 mM ギ酸水溶液、B 液が 30 mM とするのギ酸を含んだ 95% アセトニトリルであった。

また BEH カラム 100 mm を用いたときの勾配法の条件を表 2(c) に示した。ここで、A 液は 50 mM のギ酸を含んだ 2 mM ギ酸アンモニウム水溶液であり、B 液は アセトニトリル : 水 : 500 mM 炭酸水素アンモニウム : 25% アンモニア水 = 450 : 30.5 : 2 : 17.5 であった。

表 2 UPLC 条件一覧

(a) BEH カラム 50 mm 使用時

移動相勾配条件

時刻(min)	流速(mL/min)	A%	B%	勾配
init	0.4	95	5	6
0.30	0.4	95	5	6
2.50	0.4	60	40	6
2.51	0.4	95	5	6
3.00	0.4	95	5	-

UPLC 条件

流速	0.4 mL/min
カラム温度	35 °C
検出法	吸光光度法
検出波長	242 nm
移動相	Gradient
分析時間	4 min
試料注入量	5 µL

(b) CSH カラム使用時

移動相勾配条件

時刻(min)	流速(mL/min)	A%	B%	勾配
init	0.4	95	5	6
0.30	0.4	95	5	6
3.50	0.4	60	40	6
3.51	0.4	95	5	6
4.00	0.4	95	5	-

UPLC 条件

流速	0.4 mL/min
カラム温度	35 °C
検出法	吸光光度法
検出波長	242 nm
移動相	Gradient
分析時間	7 min
試料注入量	5 µL

(c) BEH カラム 100 mm 使用時

移動相勾配条件

時刻	流速(mL/min)	A%	B%	勾配
init	0.6	95	5	6
1.00	0.6	90	10	6
1.50	0.6	87	13	6
1.51	0.6	95	5	-

UPLC 条件

流速	0.6 mL/min
カラム温度	30 °C
検出法	吸光光度法
検出波長	242 nm
移動相	Gradient
分析時間	4 min
試料注入量	5 µL

## 4. 結果

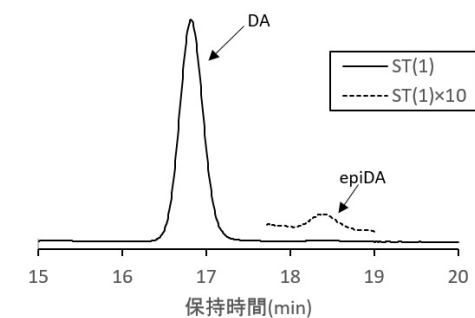
### 4.1 HPLC クロマトグラム

図 2(a) に、DA の標準溶液 ST(1) について、HPLC で得られたクロマトグラムの DA のピーク近傍を示す。また図 2(b) に、Mus-d の抽出液についてのクロマトグラムを示す。

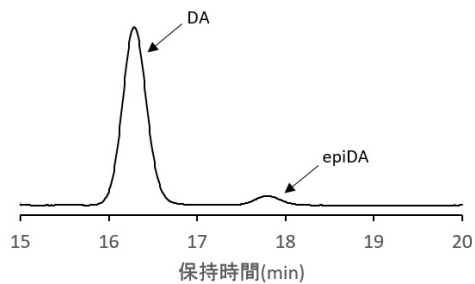
HPLC で、DA と epiDA のピークは完全に分離していた。

### 4.2 UPLC クロマトグラム

図 3、図 4 および図 5 に、それぞれ BEH カラム 50 mm、CSH カラム、BEH カラム 100 mm を用いた条件での標準溶液 (a) 及び Mus-d 抽出溶液 (b) のクロマトグラムを示す。

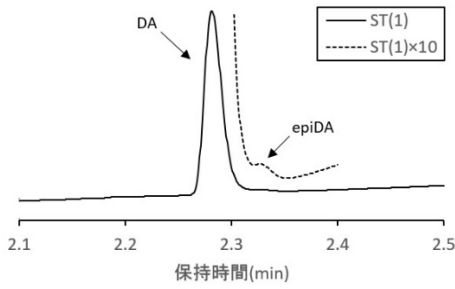


(a) 標準溶液

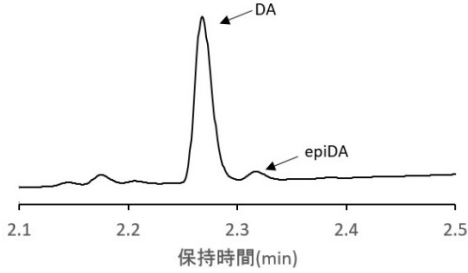


(b) Mus-d 抽出溶液 (5 倍希釈)

図 2 HPLC における DA のピーク形状

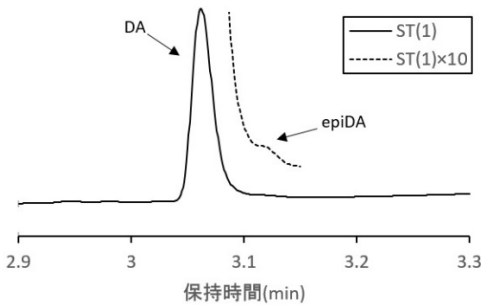


(a) 標準溶液

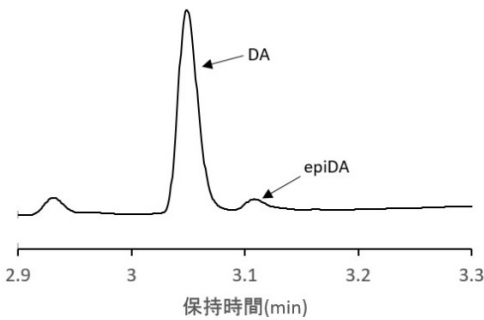


(b) Mus-d 抽出溶液 (5 倍希釈)

図 3 UPLC (BEH カラム 50 mm 使用時) における DA のピーク形状

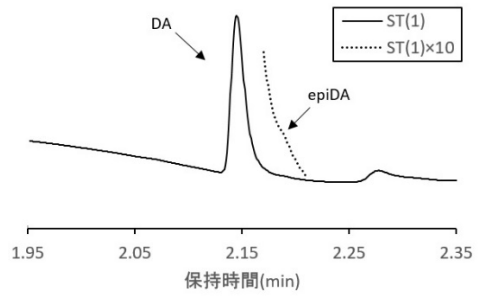


(a) 標準溶液

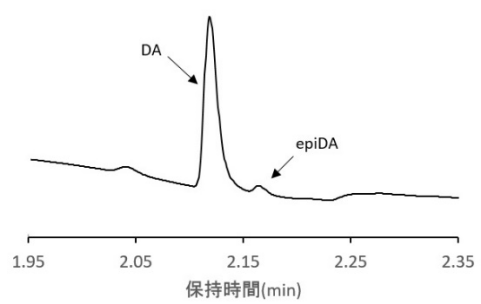


(b) Mus-d 抽出溶液 (5 倍希釈)

図 4 UPLC (CSH カラム使用時) における DA のピーク形状



(a) 標準溶液



(b) Mus-d 抽出溶液 (5 倍希釈)

図 5 UPLC (BEH カラム 100 mm 使用時) における DA のピーク形状

## 5. 考察

### 5.1 HPLC クロマトグラム解析による理論段数、分離度およびシンメトリー係数の算出

理論段数<sup>5), 6)</sup>  $N$ とは、クロマトグラフィーにおいて、カラム等分離部の性能を示す指標である。

$$N = \left( \frac{t_R}{\sigma_t} \right)^2$$

ここで、 $t_R$  はピークの保持時間、 $\sigma_t$  は、ピークの半値全幅  $W_h$  と次なる関係がある。

$$W_h = 2.355\sigma_t$$

また、分離度<sup>5), 6)</sup>  $R_S$  は、二つのピークの保持時間差  $\Delta t$  と、二つのピークの半値全幅  $W_1$ 、 $W_2$  と次なる関係がある。

$$R_S = \frac{1.18\Delta t}{W_1 + W_2}$$

さらに、シンメトリー係数<sup>6)</sup>  $S$  とは、ピーク高さの  $1/20$  の高さにおけるピーク幅を  $W_{0.05h}$ 、 $W_{0.05h}$  のピーク幅をピーク頂点から横軸へ下ろした垂線で 2

分したピーク立上りの距離を  $f$  とすると

$$S = \frac{W_{0.05h}}{2f}$$

と定義され、 $S > 1$  であればテーリング、 $S = 1$  であれば左右対称なガウス分布ピークである。

上記により、HPLC および UPLC の 3 条件における理論段数と分離度、シンメトリー係数をクロマトグラムから求め、次の表 3 を得る。

表 3 HPLC 測定における理論段数と分離度

(a) HPLC						
	$t_R$ (min)	$W_h$ (min)	$\sigma_t$ (min)	理論段数 $N$	分離度 $R_s$	シンメトリー係数 $S$
DA	16.29	0.305	0.1295	15800	2.82	1.08
epiDA	17.79	0.322	0.1366	17000		1.21
(b) UPLC BEHカラム 50 mm						
	$t_R$ (min)	$W_h$ (min)	$\sigma_t$ (min)	理論段数 $N$	分離度 $R_s$	シンメトリー係数 $S$
DA	2.27	0.017	0.0071	103000	1.79	1.38
epiDA	2.32	0.016	0.0067	118000		—
(c) UPLC CSHカラム						
	$t_R$ (min)	$W_h$ (min)	$\sigma_t$ (min)	理論段数 $N$	分離度 $R_s$	シンメトリー係数 $S$
DA	3.05	0.020	0.0085	129000	2.42	1.31
epiDA	3.12	0.015	0.0064	240000		—
(d) UPLC BEHカラム 100 mm						
	$t_R$ (min)	$W_h$ (min)	$\sigma_t$ (min)	理論段数 $N$	分離度 $R_s$	シンメトリー係数 $S$
DA	2.12	0.013	0.0057	140000	2.17	1.67
epiDA	2.17	0.013	0.0053	167000		—

結果の項で示したクロマトグラムから分かるように、HPLC では、標準溶液を使用した場合でも、DA と epiDA はほぼ完全に分離していた。

表 3 により、UPLC では、HPLC に比べて 10 倍程度の理論段数であったが、DA と epiDA の分離度は HPLC のほうがよく、特に EU の方法である、カラム BEH 使用では、分離度が劣っていた。

また、BEH カラム 100 mm では、シンメトリー係数が高く、ピークのテーリングが著しいことが分かる。

## 5.2 ホタテガイ試料への標準品添加の測定値についての UPLC 結果の HPLC 結果との比較

これら 2 系統の測定値の比較を行うことは、実際の検体で、2 手法による結果に有意差があるかないかの議論につながる。

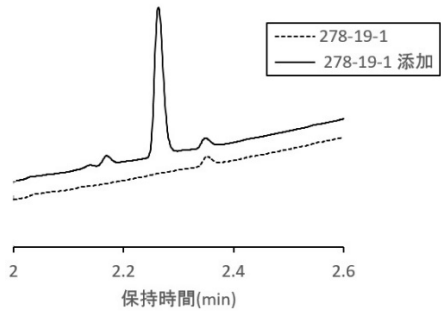
方法としては、 $x$  に一つの方法の回収率を取り、 $y$  にもう一つの方法の回収率を取って、回帰直線  $y = ax + b$  を計算し、その傾き  $a$  が 1、切片  $b$  が 0 と有意に異なるかを検定するものである<sup>7)</sup>。すなわち、最小二乗法による回帰計算により得られた回帰直線の傾き、切片の 95% 信頼区間を求め、この間に 1, 0 がそれぞれ入るかどうかを検討する。

表 4 に、検討した測定結果の組み合わせと検定の結果を示した。検討した全ての組み合わせにおいて、傾き  $a$  の 95% 信頼区間内に傾き 1 が、切片  $b$  の 95% 信頼区間内に切片 0 が入り、全ての手法の組み合わせの間で有意差がないことが判明した。

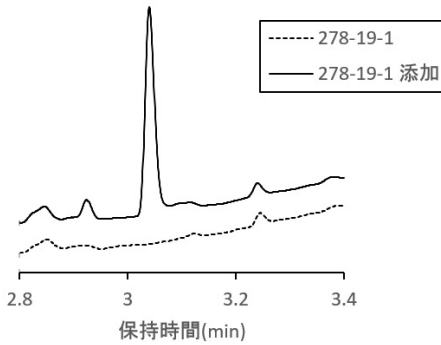
## 5.3 UPLC 法での使用カラムの選択

表 4(b), (d) および (f) により、CSH カラムは UPLC 測定において、有意差はないが高めの分析値

を与えることが分かった。この原因を精査すべく、クロマトグラムのうち、特に目立って回収率の高かった 278-19-1 への添加と、278-33-1 への添加の 2 例について、BEH カラム、CSH カラムを使用した場合のクロマトグラムをそれぞれ図 6、図 7 に示す。

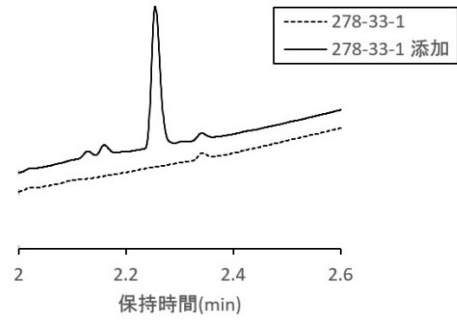


(a) BEH カラム使用時

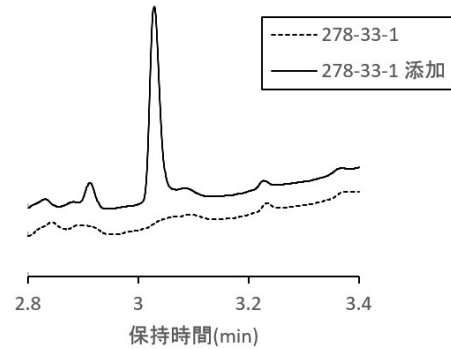


(b) CSH カラム使用時

図 6 検体 278-19-1 への添加の 2 例



(a) BEH カラム使用時



(b) CSH カラム使用時

図 7 検体 278-33-1 への添加の 2 例

図 6 及び 7 から、CSH カラムを使用した場合、DA 等のピーク近傍が、標準品を添加していないときも、乱れたクロマトグラムになっていることが分かる。BEH カラムではそのような現象はなく、原因は不明である。少なくとも汚染が原因ではないことは、連続自動分析における無添加と添加の間に挟んだ空試験のクロマトグラムにそのようなピークがないことから分かる。

5.2 の項で述べたように、BEH と CSH のカラムでは、後者が比較的分離能に優れており、その使用が望ましい側面もあるが、実際の検体分析への応用の見地からは、弱点を有するとも考えられる。

なお、EU の SOP<sup>4)</sup> では、BEH カラム 50 mm を使用する条件が記述されており、BEH カラムの使用で問題ないと考えられた。また、分離度が多少劣っても、文献<sup>8)</sup> に述べられているように、DA と epiDA は 242 nm においてモル吸光係数が同一であることから、ピークを合算し、DA+epiDA の面積値として処理した方がむしろ簡潔であるとの指摘もある。



表 4 測定結果の組み合わせと検定の結果 (上段は回収率%、下段は解析結果を示す。)

(a) HPLC vs. UPLC BEH 50 mm			(d) UPLC BEH 50 mm vs. UPLC CSH		
項目名称	HPLC	UPLC BEH 50	項目名称	UPLC BEH 50	UPLC CSH
Add to 278-13	86.5	89.3	Add to 278-13	89.3	89.8
Add to 278-19-1	86.7	88.7	Add to 278-19-1	88.7	96.5
Add to 278-21-1	75.3	77.5	Add to 278-21-1	77.5	81.8
Add to 278-27-1	74.2	78.8	Add to 278-27-1	78.8	81.8
Add to 278-33-1	77.4	78.6	Add to 278-33-1	78.6	101.4
	<i>b</i>	<i>a</i>		<i>b</i>	<i>a</i>
係数	7.55	0.94	係数	51.71	0.47
標準誤差	9.43	0.12	標準誤差	67.39	0.81
下限 95%	-22.45	0.56	下限 95%	-162.75	-2.12
上限 95%	37.56	1.31	上限 95%	266.16	3.06

(b) HPLC vs. UPLC CSH			(e) UPLC BEH 50 mm vs. UPLC BEH 100 mm		
項目名称	HPLC	UPLC CSH	項目名称	UPLC BEH 50 mm	UPLC BEH 100 mm
Add to 278-13	86.5	89.8	Add to 278-13	89.3	97.4
Add to 278-19-1	86.7	96.5	Add to 278-19-1	88.7	96.6
Add to 278-21-1	75.3	81.8	Add to 278-21-1	77.5	85.5
Add to 278-27-1	74.2	81.8	Add to 278-27-1	78.8	85.0
Add to 278-33-1	77.4	101.4	Add to 278-33-1	78.6	87.1
	<i>b</i>	<i>a</i>		<i>b</i>	<i>a</i>
係数	37.67	0.66	係数	5.06	1.03
標準誤差	58.58	0.73	標準誤差	7.07	0.09
下限 95%	-148.76	-1.67	下限 95%	-17.43	0.76
上限 95%	224.10	2.98	上限 95%	27.54	1.30

(c) HPLC vs. UPLC BEH 100 mm			(f) UPLC CSH vs. UPLC BEH 100 mm		
項目名称	HPLC	UPLC BEH 100 mm	項目名称	UPLC CSH	UPLC BEH 100 mm
Add to 278-13	86.5	97.4	Add to 278-13	89.8	97.4
Add to 278-19-1	86.7	96.6	Add to 278-19-1	96.5	96.6
Add to 278-21-1	75.3	85.5	Add to 278-21-1	81.8	85.5
Add to 278-27-1	74.2	85.0	Add to 278-27-1	81.8	85.0
Add to 278-33-1	77.4	87.1	Add to 278-33-1	101.4	87.1
	<i>b</i>	<i>a</i>		<i>b</i>	<i>a</i>
係数	10.55	1.00	係数	65.16	0.28
標準誤差	4.08	0.05	標準誤差	33.69	0.37
下限 95%	-2.43	0.83	下限 95%	-42.06	-0.91
上限 95%	23.53	1.16	上限 95%	172.38	1.46

## 6. 結語

記憶喪失性貝毒のドウモイ酸の分析法について、UPLC 法の分析条件を検討した。その結果、

- (1) UPLC 法では、従来の HPLC 法よりも、DA と epiDA の分離度が若干劣っていた。
- (2) UPLC クロマトグラム解析により、UPLC 条件では DA ピークが非対称で、シンメトリー係数が 1 を超え、テーリングが認められた。
- (3) ホタテガイ試料への添加回収試験結果について、HPLC 法と UPLC 法 (使用カラム 3 種) とで有意差の検定を行ったところ、有意差はないという結論を得た。よって、UPLC 法は従来法の代替手法として利用可能と考えられた。

- (4) ホタテガイ試料への添加回収試験における UPLC 法の CSH カラム使用時に、BEH カラム使用時よりもやや高い回収率を与えることがあった。そのときのクロマトグラムを検証したところ、無添加の検液でもクロマトグラムが乱れる現象が認められた。この原因は不明である。
- (5) UPLC 法において CSH カラムを使用する分離度は BEH カラム使用時より若干高くなるが、上述の (3) 及び (4) から、検体分析では BEH カラムを用いるべきと結論された。

以上が、ドウモイ酸の UPLC 測定の検討で得られた結論である。

文 献

- 1) Cook, P. F. et al.: Algal toxin impairs sea lion memory and hippocampal connectivity, with implications for strandings. *Science online*, 14, Dec, 2015.
- 2) Hatfield, C. L. et al.: Salt clean-up procedure for the determination of domoic acid by HPLC. *Natural Toxins*, **2**, 206-211 (1994).
- 3) 山本明美他: ホタテ貝のドゥ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).
- 4) European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins: Standard Operating Procedure for determination of domoic acid (ASP toxins) in molluscs by UPLC-MS, ver 1. Feb 2010.
- 5) 松下至: 液体クロマトグラフィーを使いこなす—その基礎と計算力. 技報堂出版, 東京 (2013).
- 6) 日本工業標準調査会審議: 日本工業規格 高速液体クロマトグラフィー通則 JIS K0124. 日本規格協会, 東京 (2011).
- 7) 宗森信訳, Miller, J. C. et al.: データのとり方とまとめ方—分析化学のための統計学. 共立出版, 東京 (1991).
- 8) European Union 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, ver 1. Jun 2008.

## Measurements of domoic acids as amnesic shellfish poisons by means of ultra-high performance liquid chromatography

Ryuji Hanaishi, Akemi Yamamoto, Minoru Nakaya, Hirohisa Sato

Analysis conditions of an ultra-high performance liquid chromatography, UPLC, for amnesic shellfish poisons, domoic acids, were examined. Resolutions on UPLC between domoic acid (DA) and epi-domoic acid (epiDA) were somewhat inferior to those obtained by HPLC. Analyses of UPLC chromatograms showed tailing of DA peaks. Finally, we made significant difference tests for the results of recovery rates in spiked scallop samples, between HPLC method and UPLC method with 3 types of columns, and concluded that there were no significant differences between these methods.

Key words: amnesic shellfish poison, domoic acid, HPLC, UPLC