

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：

コアシェルカラムの使用による分離の達成

花石竜治 柴田めぐみ 中谷 実 山本明美 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 (UPLC) 法の分析条件を検討し、分析化学的に良好な条件を得た。"coreshell" カラムを採用し、単一組成移動相によって、ドウモイ酸 (DA) とエピドウモイ酸 (epiDA) の分離が、従来法の HPLC を超えた高い分離度で達成された。また、LC-MS/MS 法で、UPLC クロマトグラム上のピークの帰属ができた。さらにこの UPLC 条件で、DA と epiDA の検量線の傾きに有意差がないことを示した。また UPLC 法での試料における定量下限は、当所の目標定量下限内であった。結論として、"coreshell" カラムを装着した UPLC の使用は、従来法の HPLC 法の代替法として十分耐えうる性能を持つという結論に達した。

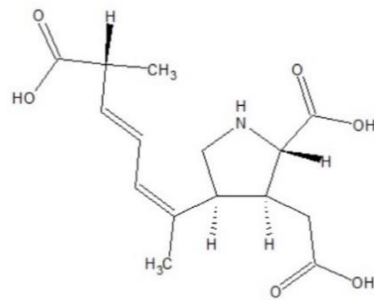
Key words: Amnesic shellfish poison, Domoic acid, HPLC, UPLC

1. 緒言

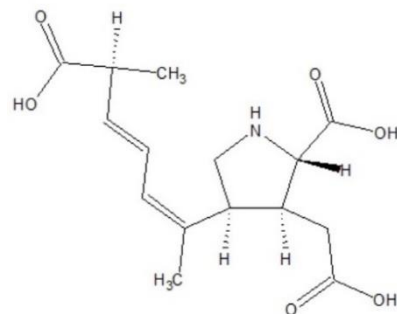
青森県における食品衛生試験部門での、ホタテガイ貝毒試験の重要性については、前報¹⁾に記したとおりであり、当所では、ドウモイ酸 (DA) とその異性体であるエピドウモイ酸 (epiDA) (分子構造は図 1 参照) に係る記憶喪失性貝毒検査についても ISO/IEC17025 試験所認定を取得して実施している。

当所では本分析は、Hatfield 法²⁾を原法として、242 nm の光吸収検出による高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法で実施してきた。

また、2013 年度に当所に導入された超高速液体クロマトグラフ (UPLC) を使用することにより、分析時間の短縮を図り、HPLC 法の代替法となりうる分析条件について、2014 年度から検討を行った³⁾。本報告では、その後、優れた分離度や理論段数等が得られた分析条件を報告し、さらに、その条件による記憶喪失性貝毒の HPLC 法の代替分析法としての分析精度等を検討したので報告する。



(a) DA



(b) epiDA

図 1 DA および epiDA の分子構造式

2. 方法

2.1 装置

HPLC 装置は、島津製作所 LC-20 を用い、カラムとして、資生堂 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 CAPCELL C18 UG120 (4.0×10 mm) を用いた。

UPLC 装置は Waters 社 ACQUITY UPLC H-Class を用い、カラムとして、“coreshell” カラムの一種である、同社 CORTECS UPLC C18 $1.7 \mu\text{m}$ ($\phi 2.1 \times 100$ mm) を用いた。なお、クロマトグラムの表示には、スムージングを使用していないが、ピーク面積値計算では、7 点の平均法によるスムージングを使用した。

LC-MS/MS 装置は Waters 社 ACQUITY UPLC I-Class/ Xevo TQ-S micro を用い、カラムは上述の UPLC 装置に装着したのと同じ、“coreshell” カラムを使用した。数値処理にあたっては、7 点の平均法によるスムージングを使用した。ピーク検出には ApexTrack 法ではなく、従来法を用いた。なお、DA を LC-MS/MS で分析する方法は既報があり⁴⁾、MS 条件の設定などの測定の参考にした。

2.2 試薬および材料

検量線用の標準物質は、市販のカナダ NRC 社の認証標準物質 CRM-DA-g 溶液 (DA+epiDA として $103.3 \pm 2.5 \mu\text{g/mL}$) を 10% アセトニトリルで適宜希釈して使用した。HPLC および UV 検出の UPLC 法では、最大 $1.2394 \mu\text{g/mL}$ (DA+epiDA として) の標準液を用い、LC-MS/MS 法では、最大 $0.6197 \mu\text{g/mL}$ (DA+epiDA として) の濃度の標準液を使用した。

その他の試薬については、既報¹⁾ のとおりであるので、記述を省略する。

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。

2.3 陽性コントロールの測定溶液調製方法

ホタテガイのホールボディの前処理方法は、山本らの既報³⁾ に掲載されているので、ここでは認証標準物質の扱いのみ記す。

認証標準物質 CRM-ASP-Mus-d (DA+epiDA として $49 \pm 3 \mu\text{g/g}$) の全量をスパーテルと 50% メタノールを用いて遠沈管に移し、50% メタノールを加えてホモジナイズした。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た。これを、メタノール、水、50% メタノールの順でコンディショニングしておいた SAX ミニカラム (Agilent 社 Bond Elut LRC-SAX 500 mg) 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。検液は検量線範囲内に収まるよう、1 mol/L NaCl (10% アセトニトリル溶液) により 5 倍に希釈して測定溶液とした。

移動相は、A: アセトニトリル、B: 0.1v/v% ギ酸を含む水とし、A:B=1:9 として、勾配をかけずに単一組成とした。表 2 に条件を示した。

2.4 測定条件

(1) HPLC

既報¹⁾ のとおりとした。

(2) UPLC (UV 検出)

移動相に単一条件 (isocratic) を適用し、0.1 v/v% のギ酸を含んだ 10% アセトニトリルを用いた。表 1 に条件を示した。

表 1 UPLC 条件

流速	0.4 mL/min
カラム温度	30 °C
検出法	UV-Vis 吸光度法
検出波長	242 nm
移動相	Isocratic
分析時間	3.5 min
試料注入量	1 μL

(3) LC-MS/MS

移動相は、A: アセトニトリル、B: 0.1v/v% ギ酸を含む水とし、A:B=1:9 として、勾配をかけずに単一組成とした。表 2 に条件を示した。

表 2 LC-MS/MS 条件

(a) LC および MS 条件

流速	0.4 mL/min
カラム温度	30 °C
移動相	Isocratic
分析時間	5 min
試料注入量	5 μL
イオンモード	ES+
キャピラリー電圧	0.53 kV
エクストラクタ電圧	0 V
イオン源温度	148 °C
解離温度	498 °C

(b) MS/MS 条件

検出モード MRM	312 > 266 (定量用)	312 > 248 (確認用)	312 > 193 (確認用)
コーン電圧	26 V	26 V	26 V
衝突エネルギー	16 V	18 V	16 V

2.5 HPLC 法と UPLC 法の比較方法

最大濃度の標準液および Mus-d 抽出液 (5 倍希釈) のクロマトグラムから、クロマトグラフィーにおける理論段数、DA および epiDA の分離度、シンメト

リー係数を比較した。

また、標準液の繰り返し測定により標準偏差等を求め、その結果から試料における検出下限および定量下限を算出した。

最後に、認証標準物質の Mus-d 抽出液を HPLC 法および UPLC 法で測定して得た濃度を比較し、認証値の範囲内に入るかを検討した。

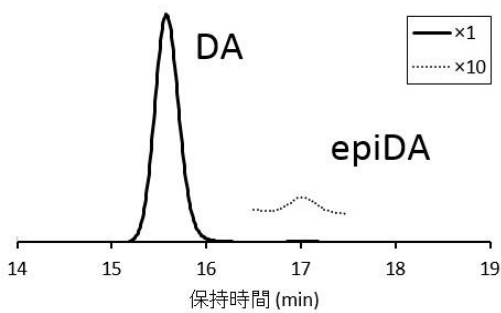
3. 結果

3.1 HPLC クロマトグラム

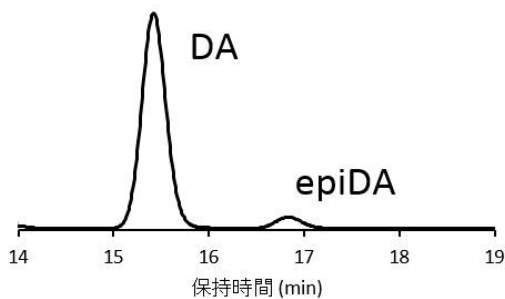
図 2(a) に標準溶液、(b) に Mus-d 抽出溶液のクロマトグラムを示す。DA と epiDA のピークは完全に分離していた。

3.2 UPLC クロマトグラム

図 3(a) に標準溶液、(b) に Mus-d 抽出溶液のクロマトグラムを示す。UPLC でも、DA と epiDA のピークは完全に分離していた。

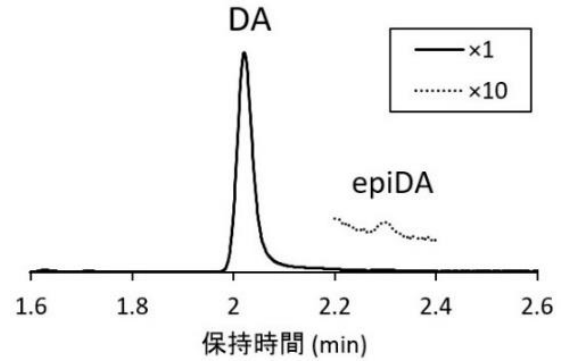


(a) 標準溶液

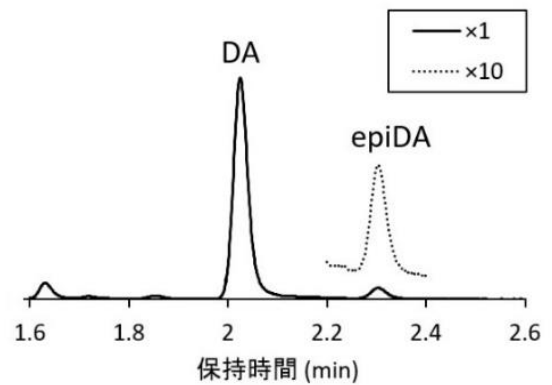


(b) Mus-d 抽出溶液 (5倍希釈)

図 2 HPLC クロマトグラム



(a) 標準溶液



(b) Mus-d 抽出溶液 (5倍希釈)

図 3 UPLC クロマトグラム

3.3 LC-MS/MS クロマトグラム

図 4 に DA 標準液 $0.6197 \mu\text{g/mL}$ (DA+epiDA として) の LC-MS/MS クロマトグラムのうち、MRM: $m/z = 312 > 266$ のものを示した。

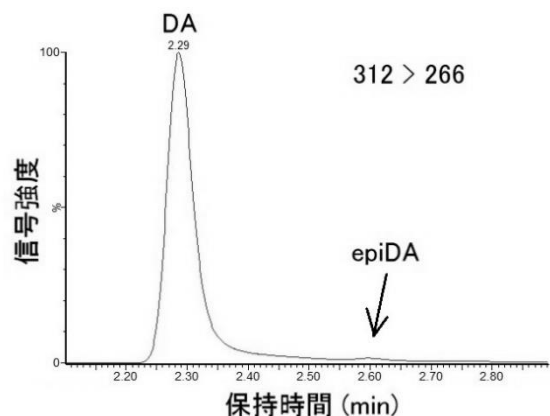


図 4 LC-MS/MS クロマトグラム

3.4 UPLC 法による繰り返し測定結果

4段階の濃度に設定した標準液を10回ずつ繰り返し測定し、原点通過の検量線データを得た結果を表 3 に示した。

表3 標準液の繰り返し測定による検量線用データの統計量（応答の平均および標準偏差の単位は（ $\mu\text{V}\cdot\text{秒}$ ））

(a) DA				
濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.0492	0.2458	0.6144	1.2288
応答の平均	518	2650	6683	14070
標準偏差	25.7	40.8	160.2	157.7
変動係数%	4.95	1.54	2.40	1.12
(b) epiDA				
濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.0004	0.0021	0.0053	0.0106
応答の平均	—	33	49	165
標準偏差	—	6.0	16.5	36.6
変動係数%	—	18.45	33.28	22.13
(c) DA+epiDA				
濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.0496	0.2479	0.6197	1.2394
応答の平均	518	2660	6727	14235
標準偏差	25.7	48.9	177.6	177.1
変動係数%	4.95	1.84	2.64	1.24

4. 考察

4.1 UPLC 条件での DA および epiDA のピーク帰属

UV 検出法では、単一波長の吸光度を測定するので、化学種の同定に不確定な因子が加わる。

本研究で DA 認証標準物質として用いた CRM-ASP-Mus-d に添付されている分析認証の資料に LC-MS 条件での DA と epiDA のピーク帰属が報告されている⁹⁾。この条件は、 $m/z=312 > 266$ のタンデム MS 条件であり、本報告の 3.3 に示した MRM 条件と同一である。

DA と epiDA は、エナンチオマーの関係ではなく、エピマーの関係にあることから、必ずしもイオン開裂のパターン・強度が完全に同一とは判断できなかったが、この文献⁹⁾と図4のクロマトグラムによって、DA ピークの後に溶出してくる物質を epiDA と断定した。

LC-MS/MS と UV 検出の UPLC とでは、移動相がほぼ同じ組成であり、またカラムも同一であることから、図3に示したクロマトグラムの DA の後のピークを epiDA と帰属した。

4.2 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

これらのパラメータについての定義等は前報¹⁾に記している。

今回は、Visual Basic で、クロマトグラムのデジタルデータから、これらの理論段数、分離度及びシンメトリー係数などを算出するプログラムを作成し、実際の評価に使用した。

表4に Mus-d 抽出液のクロマトグラム（図2(b) および図3(b)）を用いて、今回の UPLC 条件での理論

段数等を HPLC と比較した結果を示す。

表4 HPLC および UPLC における理論段数と分離度、シンメトリー係数

(a) HPLC			
	理論段数 N	分離度 R_s	シンメトリー係数 S
DA	15300	2.65	1.06
epiDA	15400		1.00
(b) UPLC			
	理論段数 N	分離度 R_s	シンメトリー係数 S
DA	22700	4.87	1.21
epiDA	22900		1.15

表4に示したように、UPLC 法では、HPLC 法より高い理論段数および高い分離度が算出された。ただし、シンメトリー係数は、HPLC においてほぼ1に近かったが、UPLC ではやや1から乖離した結果となった。このことは、UPLC で若干のテーリングが生じていることを示した。

4.3 UPLC 法における DA および epiDA の検量線の傾きの違いについて

UV 検出法の UPLC 法では、検出波長の 242 nm で、DA と epiDA とでモル吸光係数が同一であることから、検量線の傾きはこれらで同一と考えられた。このことを UPLC 法の検量線用データから検証した。

有意差検定は、表3(a)および(b)のデータを用い、原点通過の回帰直線の傾きについて分散分析を行い、等分散か不等分散かを判断し、それによって評価式を使い分け、t 検定⁹⁾を行う方針とした。危険率として5%を仮定した。

結果の概略を示す。DA と epiDA とでは、回帰直線の傾きを持つ誤差の分散に有意差があり、よって不等分散の t 検定を行うこととなった。等価自由度を 3.0098 と算出し、これと表5の標準誤差とから、t 検定の結果、二者の検量線の傾きに有意差はないと結論した。

表5 DA と epiDA の検量線の傾きの有意差検定に関する統計量（決定係数以外の量の単位は（ $\mu\text{V}\cdot\text{秒}$ ）/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$ ）

	傾き a	標準誤差	下限95%	上限95%	決定係数 R^2
DA	11478	81	11219	11737	0.9998
epiDA	14437	1744	6933	21941	0.9716

以上の結果は、これまでに示した、UPLC の高い分離能により、DA と epiDA とが分離定量されたことに起因すると判断した。

これらのピークの分離が不十分な場合には、装置の解析ソフトで、ピーク面積の取り方などを指定する必要がある。

さらにこれら二成分の分離は、注入する溶液に塩化ナトリウムが存在するかどうか（当所で採用している Hatfield 法で、塩化ナトリウムを使用）にも影響される（図 3(a) と (b) の、DA ピークのテーリングの程度が異なることに表れている。）。よって、塩化ナトリウムを含まない標準液と、それを含む検体の抽出液とで、統一的な解析条件設定をする必要が生じることになる。

今回の UPLC 条件では、DA と epiDA のピークが分離したので、上記の事態を回避することができた。

4.4 UPLC 法における検出下限および定量下限

表 3 に示した検量線作成標準溶液の最低濃度の DA ピーク高さとはベースラインでのノイズ（スムージングをしない条件）の信号対雑音比 s/n を求めると $s/n = 33 \sim 63$ で、平均で 48 ($n=10$) であった。

また、表 3(c) の DA+epiDA の検量線データから、その傾きを求めると $a = 11339 (\mu\text{V} \cdot \text{秒})/(\mu\text{g/mL})$ であった。これから標準偏差を σ とすれば、検出下限 3σ は標準液濃度にして $0.0068 \mu\text{g/mL}$ であり、当所の検体前処理法の標準作業手順書 (SOP) 記載の条件では、ホタテガイ検体中濃度 $0.085 \mu\text{g/g}$ に相当した。また定量下限 10σ は、 $0.023 \mu\text{g/mL}$ であり、 $0.28 \mu\text{g/g}$ に相当した。

当所の SOP 記載の HPLC を用いる従来法では、検体中濃度として、定量下限を $1 \mu\text{g/g}$ に規定⁷⁾している。今回検討した UPLC 法は、この目標定量下限を満足していたと判断した。

4.5 認証標準物質中の DA+epiDA の濃度の検証

認証標準物質である CRM-ASP-Mus-d の濃度が、従来法の HPLC 法と、UPLC 法とで同一になるか検証した。表 6 に Mus-d からの抽出による DA+epiDA の濃度の測定結果を示す。

表 6 Mus-d 検体の HPLC と UPLC 結果の比較

	(DA+epiDA 単位 $\mu\text{g/g}$)	
	HPLC	UPLC
検体1	47.4	46.9
検体2	49.1	47.7

表 6 に示したように、従来法の HPLC 法と今回、取り上げた UPLC 法とで、認証濃度範囲内 (49 ± 3) $\mu\text{g/g}$ の結果が得られた。よって、両者の方法は、ほぼ同一の結果を与えるものと判断した。

5. 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) “coreshell”カラムと単一相の移動相を用いた UPLC 法では、従来の HPLC 法よりも、DA と epiDA の分離度が優れており、これらはクロマトグラム上で完全に分離した。
- (2) UPLC 法では、検量線の傾きが、DA と epiDA とで有意差のない結果を与えた。これはピーク分離が完全になされた結果と推定された。また、このことは、貝毒濃度の計算に用いる DA+epiDA としてのピーク面積計算等を容易にするものとなった。
- (3) UPLC 法での DA 分析の精度を求めたところ、目標定量下限を満たす結果が得られた。
- (4) 最後に、認証標準物質を用いて、HPLC 法と UPLC 法との測定結果が、値付けの範囲内に入ることを確認した。これにより、両者のドウモイ酸分析が、ほぼ同一の結果を与えるものと判断した。

UPLC の大きな長所の一つは、HPLC に比べて分析時間を数分の 1 に短縮できることである。本研究での分析法としての検討により、UPLC 法は、従来法の HPLC 法の代替法として十分耐えうる性能を持つという結論に達した。

文献

- 1) 花石竜治, 他: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.青森県環境保健センター年報,**27**,28-35,2016.
- 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.
- 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) Reeves, K.L. et al.: CRM-ASP-Mus-d, a mussel tissue reference material for domoic acid. *Biotoxin Metrology*

Technical Report ASP-Mus-d-201112, National Research Council Canada, Halifax, March 2012.

6) 藤森利美：分析技術者のための統計的方法 第2版. 丸善,東京,1995.

7) 山本明美,他:二枚貝中の記憶喪失性貝毒分析法の妥当性確認. 食品衛生学雑誌, **58**, 281-287,2017.

Analyses of the amnesic shellfish poison domoic acid using ultra-high performance liquid chromatography: successful separation using a core-shell column

Ryuji Hanaishi, Megumi Shibata, Minoru Nakaya, Akemi Yamamoto, Hirohisa Sato

We investigated the analysis conditions for domoic acid (DA), an amnesic shellfish poison, using ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) and found adequate conditions from the viewpoints of analytical chemistry. DA and epi-domoic acid (epiDA) were successfully separated at a higher resolution using a “core-shell” column with an isocratic mobile phase than using the conventional method, high-performance liquid chromatography (HPLC). Furthermore, peaks on the UPLC chromatogram were identified by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Under the UPLC conditions, the slope of calibration curves did not significantly differ between DA and epiDA. The quantification limit for UPLC was less than the expected lower limit of quantification in our laboratory. In conclusion, UPLC using a “core-shell” column turned out to provide satisfactory performance as an alternative to the conventional HPLC method.

Key words: Amnesic shellfish poison, Domoic acid, HPLC, UPLC