

作成日：2020年 3月 24日

更新日： 年 月 日

麻痺性貝毒のポストカラム蛍光誘導体 化 UHPLC 分析法 (UHPLC/OX/FL) マニュアル version 1

国立研究開発法人 水産研究・教育機構 中央水産研究所
水産物応用開発研究センター 衛生管理グループ
渡邊龍一

このマニュアルは貝毒分析研修会テキスト「麻痺性貝毒 HPLC 分析法」を参考に、UHPLC 用の変更点にポイントを絞って作成されたものである。基本的な原理などは当該テキストを参照してほしい。

目次

1	装置構成	3
2	移動相および反応液、中和液の調製	6
3	装置の運転	8
4	装置の最適化および装置の運転に関する諸注意	10
5	二枚貝の前処理操作	11

1 装置構成

装置の概略図を以下に示す。最近の装置は、メインポンプとオートサンプラー（試料注入部込み）、蛍光検出器、データ収集用パソコンがセットで販売されている場合が多い。ただし、本分析ではポストカラム反応系を用いるため、個々の装置を集めて組み立てることを前提にしている。

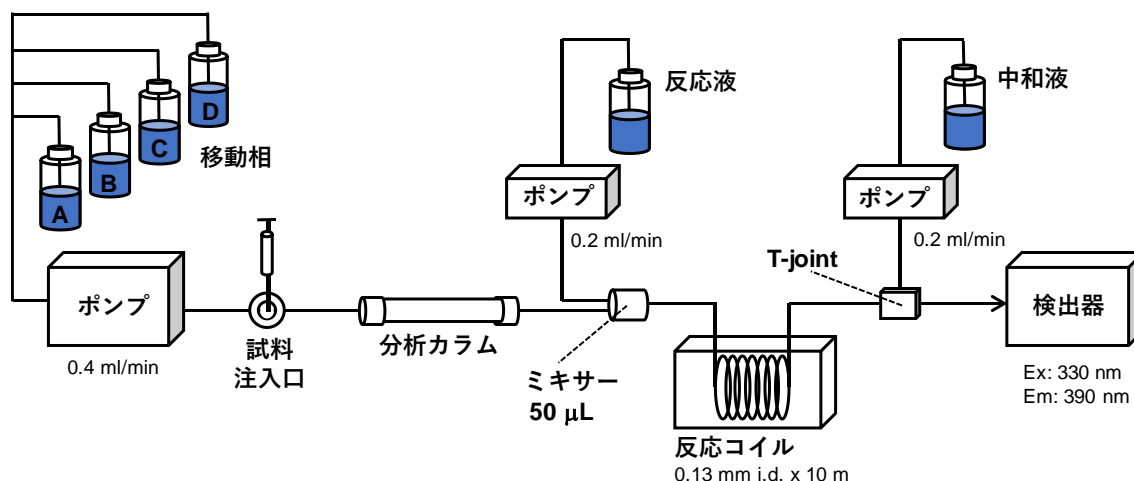


Fig. 1 麻痺性貝毒分析用装置の概略図

1.1 クロマトグラフィー用ポンプ

超高速液体クロマトグラフィー用ポンプ（低圧および高圧グラジエントどちらでもよい）で、耐圧性能が 100 MPa のものを用いる。耐圧性能が 9000 psi (620 bar, 62 MPa, 632 kgf/cm²) 以上であり、流速 0.4 mL/min にて安定した送液ができれば、メーカーおよび機種を問わない。9000 psi は分析カラム (2.1 mm i.d. × 100 mm, 1.8 µm) を用いて、流速 0.4 mL/min で送液した時の平均圧力であるので、用いるカラムによってはより高い耐圧性能を求められる場合やより低い耐圧性能でよい場合がある。反応コイルでの圧力が上昇することもあるため、余裕を持った耐圧性能のポンプを用いることが望ましい。

送液ラインは、2 液以上送液できるものが望ましい。麻痺性貝毒の分析では 3 群に分けて分析するため、すべてを自動化しようとした場合、4 液分の送液ラインがあると便利である。また、脱気装置を備えたものがよい。

1.2 インジェクター（オートサンプラー）

高速液体クロマトグラフィーと比較して、本分析ではより高感度になる。そのため、濃度が 1 $\mu\text{mol/L}$ 程度のものを用いた場合の妥当な注入量は 2-3 μL と思われる。少量注入での分析では、精度・正確さが高いものがよい。コンベンショナル HPLC では、5-10 μL の注入量で十分な再現性が得られる。

1.3 分析カラム

麻痺性貝毒分析に用いるコンベンショナル HPLC システム系では C8 を化学結合させた充填剤を詰めたカラムを用いるが、本 UHPLC システム系では C18 を化学結合させた充填剤を詰めたカラムを用いる。例外的に一部の C8 カラムでも良好な分離を示すものもある。さらに、充填剤はよくエンドキャップされたものを用いる。サイズは、内径 2.0~2.1 mm のセミマイクロカラムで、長さは 100 mm のものが望ましい。耐圧性能は用いるカラムの粒子径にもよるが、高圧に耐えられるものが良い。また、送液に用いるラインは、内径 0.13 mm の PEEK チューブとする。以下に示す製品は麻痺性貝毒成分の分離が良好であることを確認したものである (2018 年時点)。

- Acquity UPLC HSS C18 (Waters, 2.1 mm i.d. \times 100 mm, 1.8 μm)
- Unison UK-C18 UP (Imtakt, 2.1 mm i.d. \times 100 mm, 3.0 μm)
- Unison CD-C18 UP (Imtakt, 2.1 mm i.d. \times 100 mm, 3.0 μm)
- Zorbax Eclipse Plus C8 (Agilent, 2.1 mm i.d. \times 100 mm, 1.8 μm)
- Zorbax Eclipse Plus C18 (Agilent, 2.1 mm i.d. \times 100 mm, 1.8 μm)
- Develosil HSR AQ C18 (Nomura chemical, 2.0 mm i.d. \times 100 mm, 2.0 μm)

1.4 小容量ミキサー

超高速液体クロマトグラフィーでは流速が早くかつ内径の細かいラインを用いるため、T ジョイントでは移動相と反応液とが適切に混合されず、蛍光化反応が起きない。そこで、小容量ミキサー (50 μl) を用いる。このミキサーは反応槽の外に出して使用する。現在、本法で利用可能であることが確認されているミキサーは、以下の製品である。

- P/N 700002911 Waters, Acquity BSM 50 μL Zirconia Mixer, Standard

1.5 反応液 (Oxidizing reagent) ポンプ

脈流が小さく、0.2 mL/min で安定した送液ができるポンプが求められる。カラム以降に圧力はほとんどかからないため、市販されているシン

ダブルランジャーポンプでも差し支えない。ポンプヘッドは無機溶媒用（耐酸、耐塩基）であることが望ましい。

1.6 反応コイル

内径 0.13 mm、長さ 10 m の PEEK チューブを使用する。チューブの出口である、中和液との混合部が詰まりやすいので、圧力変動等には注意する。

1.7 恒温槽

設定温度（85 °C）に対し、 ± 1 °C 以内に保てるものがよい。エアオープンタイプの Waters Temperature Control Module II では性能が確認されている。ウォーターバスの場合は設定温度を 65 °C とし、必要に応じて温度を変える。

1.8 中和液 (Acidifier) ポンプ

反応液ポンプと同じでよい。小型のダブルランジャーポンプのポンプヘッドを分けて、反応液と中和液の両方に送液できるようにすれば省スペース化できる。また、反応槽から出てくるラインと中和液の送液ラインは T ジョイントでつなぐ。1.5 の反応液ポンプとも関連するが、SP-D-2502U（日本精密科学製）については性能を確認している。

1.9 検出器

一般に高速液体クロマトグラフィー対応用で市販されている蛍光検出器で十分である。

1.10 データ収集用パソコン

最近の液体クロマトグラフは PC により制御されるタイプのものが多い。分析メソッドを記憶させることができ、複数のメソッドをシークエンス内で走らせることができるものがよい。

1.11 配管

注入試料の拡散を防ぐため、用いる配管はすべて内径 0.13 mm の PEEK チューブがよい。

2 移動相および反応液、中和液の調製

麻痺性貝毒のポストカラム蛍光誘導体化 UHPLC 分析法 (Ultra-high performance liquid chromatography with post-column oxidation and fluorescent detection: UHPLC/OX/FL) は、HPLC を用いた分析法から負担なく移行できるように配慮している。そのため、基本的に移動相のストック溶液、ワーキング溶液の組成に大きな変更はない。HPLC 分析法と同じ移動相については、濃度のみ示す。

2.1 2液送液ラインの装置を用いた場合の移動相

C 群

2 mmol/L テトラブチルアンモニウムフォスフェイト+1 mmol/L
リン酸アンモニウム緩衝液 pH 6.3

GTX 群

2 mmol/L ヘプタンスルホン酸+10 mmol/L リン酸アンモニウム緩
衝液 pH 7.1

STX 群

2 mmol/L ヘプタンスルホン酸+30 mmol/L リン酸アンモニウム緩
衝液 pH 7.1+アセトニトリル 5%

アセトニトリル含量については検討していないので、毒の溶出時間
を確認しながら調整する必要がある。

送液ラインの一つをアセトニトリル専用にして、UHPLC 内で 2 液
を混合させる方法もある。

2.2 4液送液ラインの装置を用いた場合の移動相

C 群

2 mmol/L テトラブチルアンモニウムフォスフェイト+1 mmol/L
リン酸アンモニウム緩衝液 pH 6.3

GTX-STX 群

4 mmol/L ヘプタンスルホン酸+20 mmol/L リン酸アンモニウム緩
衝液 pH 7.1

蒸留水 400 mL に対し、100 mmol/L ヘプタンスルホン酸 20 mL と 500 mmol/L リン酸 20 mL を加え、よく攪拌する。希釈したアンモニア水を滴下し、pH を 7.1 に調製したあと、500 mL に定容する。

- 蒸留水
MilliQ 水 500 mL

- アセトニトリル
アセトニトリル HPLC 用 あるいは LC-MS 用 500 mL

- 送液ラインの配置 (一例)
4 液の送液ラインを仮に A、B、C、D とする。その場合、
 - A: GTX-STX 群移動相
 - B: 蒸留水
 - C: C 群移動相
 - D: アセトニトリルと配置する。そして、メソッドを組む際に、
 - GTX 群分析用として、A/B (50%/50%)
 - STX 群分析用として、A/D (93%/7%)
 - C 群分析用として、C (100%)
 - カラム洗浄用として、B/D (任意の比率)の混合比とする。

2.3 反応液および中和液の調製

- 反応液
7 mmol/L オルト過ヨウ素酸 + 50 mmol/L リン酸カリウム緩衝液
pH 9.0

- 中和液
0.5 mol/L 酢酸

3 装置の運転

3.1 起動操作

- 新しいカラムを使用する場合は、100 % アセトニトリルをカラムの 50 倍量送液する。次に、50 %、25 % と順次アセトニトリル濃度を下げて送液してから、移動相を送液する。
- 移動相を送液後数分したら、恒温槽の電源を入れ、反応液と中和液を 0.2 mL/min で送液する。注意:アセトニトリルを含んだ溶媒(25 %、50 %、100 %) の送液時に反応液を流すと塩が析出し、ラインが詰まることがある。
- 蛍光検出器の波長を励起波長 330 nm、蛍光波長 390 nm に設定し、電源を入れる。ランプが安定するまで待つ。
- ベースラインが安定したら、標準毒あるいは QC サンプルを注入し、各成分の分離と保持時間、ピーク高が安定したことを確認する。移動相を流し始めて 10-15 分程度で平衡に達する。
- カラム温度は室温もしくは最適化した温度で行う。

3.2 試料の分析

- 試料を 2-3 μL ずつ注入してクロマトグラムを得る。
- 分析時間は各成分とも 10 分あれば十分である。5-6 試料ごとに標準液を注入し、装置が安定していることを確認する。標準溶液が貴重なため、濃度計算は一点検量線で行い、濃度が一番近い標準毒のクロマトグラムを基準として、ピーク面積から試料濃度を求める。標準毒に余裕がある場合は 5 点程度の検量線を作成し、試料濃度を求める。

3.3 終了操作

- 蛍光検出器と恒温槽の電源を切る。
- 反応液のラインを蒸留水に置換し、10 分程度送液する。
- 移動相を蒸留水に切り替え、10 分程度送液したのち、50%アセトニトリルでカラムを 15 分間洗浄する。

標準のクロマトグラムを次ページに示す。これは 4 液送液ラインを使った条件で分析した結果である。

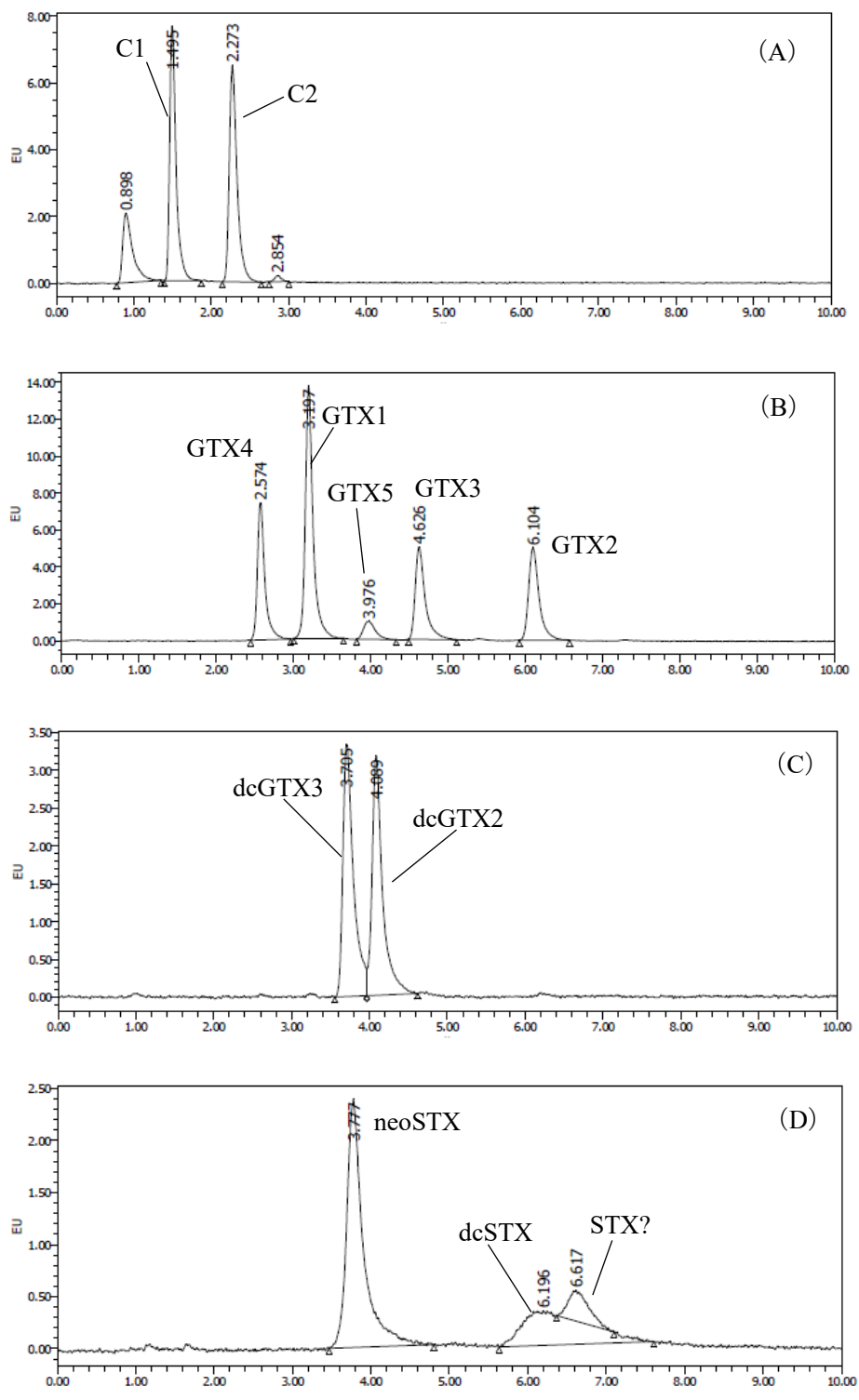


Fig. 2 各毒成分の代表的なクロマトグラム (HSS C18, Waters)
 (A) C群のクロマトグラム、(B) GTX1-5のクロマトグラム (C) dcGTX2/dcGTX3
 のクロマトグラム (D) STX群のクロマトグラム

4 装置の最適化および装置運転に関する諸注意

基本的には、HPLC と同様である。

4.1 装置の最適化

- GTX5 の感度が、HPLC と比較すると若干劣る傾向がある。条件を変えて検討してみたが、改善は見られなかった。
- dcSTX は4液送液ラインを用いた移動相条件ではブロードなピークとして検出される。様々なカラムを検討したがピーク形状が改善されることはなかった。
- GTX4 と GTX1 のピーク強度比が $1 : 2-1 : 3$ 程度、GTX3 と GTX2 についても同様に $1 : 1-1 : 2$ 程度になるように、酸化剤の量を調整する。GTX4 と GTX1 の強度比が上述した比から外れるような場合、反応液との混合あるいは、中和液との混合がうまく機能していない可能性がある。また、反応コイルが目詰まりを起こしている可能性もある。

4.2 装置運転に関する諸注意

- UHPLC を用いた分析法の特徴は省溶媒化できること以外にも、イオン対試薬を用いた移動相でのカラム平衡化が 10-15 分程度と HPLC と比べて短縮されることがあげられる。
- 移動相、反応液、中和液の使用期限は HPLC マニュアルを参照。
- カラムの寿命：経験上、カラムの寿命は HPLC で用いている C8 系カラムと比べると短い。ピーク形状 (GTX1/4 などの N1-OH 成分) と分離が低下した場合が交換の目安になる。
- カラムのメンテナンス：イソクラティック溶離ではカラムに試料マトリクスが蓄積していくので、ピーク形状、分離が低下した場合は有機溶媒にて十分洗浄する。また、プレカラムフィルターを用いている場合、交換や逆洗により性能が回復することもある。

- 圧力が変動する場合、主にカラム接合部からのリークが疑われる。
それ以外では、ミキサー接合部、T ジョイント部からのリークである。

5 二枚貝の前処理操作

二枚貝の前処理操作は2種類ある。目的に合わせて選択する。

5.1 逆相系固相抽出カートリッジカラムを用いる方法

HPLC法で報告されている Sep-Pak C18 plus 固相抽出カートリッジを用いる方法である。作業手順は貝毒分析研修会テキスト「麻痺性貝毒 HPLC 分析法」に従って行う。

5.2 グラファイトカーボンカートリッジを用いる方法

麻痺性貝毒の UHPLC/MS/MS 分析のために考案された方法である。二枚貝試料は逆相系固相抽出カラムを用いた時と比べると、5倍希釈される。そのため、場合によっては注入量を増やすことが有効である。この方法の利点は、UHPLC/MS/MS と同じ検液を使用できるので、相互確認が容易であることである。

具体的な手順は以下のとおりである。(詳細は、麻痺性貝毒とテトロドトキシン測定のための超高速液体クロマトグラフィー質量分析法 (UHPLC/MS/MS) 分析法マニュアルを参照のこと)

二枚貝からの毒の抽出手順はマウス毒性試験に準ずる。まず、二枚貝ホモジネート $5.0 \text{ g} \pm 0.1 \text{ g}$ を量りとり、そこに1% 酢酸溶液 5.0 mL を添加し良く攪拌する。5分間沸騰湯浴内で加熱抽出後、冷却し、遠心分離によって上清を得る。上清 1 mL に対し、5 μL の 25% アンモニア水を添加し良く攪拌して、前処理試料とする。

グラファイトカーボンカートリッジ (Supelclean ENVI-Carb 250 mg/3 mL, SUPELCO) を、1% 酢酸含有 20% アセトニトリル溶液 3 mL、次いで 0.025% アンモニア水 3 mL にて平衡化する。そこに、前処理試料 0.4 mL をトップフリットまで通液する。次に、蒸留水 0.7 mL でカラムを洗浄し、エアーパージする。最後に1% 酢酸含有 20% アセトニトリル溶液 2 mL にて溶出 (エアーパージまで行う) し、ポリプロピレンバイアルに回収する (ホモジネートから 10倍希釈されている)。カラムでの目詰まり等を防ぐため、回収した溶出液をシリンジフィルター (0.2 μm) にて処理してもよい。グラファイトカーボンカートリッジは再利用できない。UHPLC/MS/MS ではアセトニトリルを用いてさらに4倍希釈するが、UHPLC/OX/FL は塩等による検出阻害がみられないため、希釈せずに用いる。

本マニュアルは、農林水産省「安全な農林水産物安定供給のためのレギュラトリーサイエンス研究委託事業（2902）」の支援を受けて作成されました。また、本マニュアルの作成に当たり、外部アドバイザーを務められました大島泰克 東北大学名誉教授ならびに日本食品検査 橋田規 氏から貴重なご意見を賜りました。ここに謝意を示します。