[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

UPLC-MS/MSを用いた下痢性・脂溶性貝毒、アザスピロ酸群、ドウモイ酸の一斉分析

2012030001J

目的

下痢性・脂溶性貝毒及びドウモイ酸の高感度・高速一斉分析法の開発。

ウォーターズソリューション

ACQUITY UPLC I-Class

Xevo TQ MS

MassLynxソフトウェア

ACQUITY UPLC BEH カラム

キーワード

下痢性貝毒

脂溶性貝毒

ドウモイ酸

はじめに

貝毒は渦鞭毛藻により生産され、これらを捕食する二枚貝を毒化させます。貝毒の発生海域は拡大傾向にあり、近年、貝毒検査への需要は益々高まっています。貝が有毒かどうかの判断は国際的にも広く普及しているマウス毒性試験により行われており、国内公定法でも採用されています。しかし、マウス毒性試験では、毒成分組成が判定できず、CODEX等により定められた毒の個別検査ができません。さらに、検査に時間を要することも課題であり、国際的にはマウスを使用しない貝毒検査の導入が推進されています。

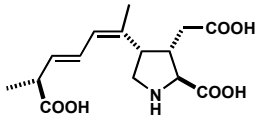
迅速に二枚貝の毒力を判定できる非動物検査法として、LC-MS/MSによる分析法があり、EUにおいてはLC/MS/MSを用いた脂溶性貝毒の分析法がSOP化され試験の導入が見込まれています。

簡便な前処理で広範囲の貝毒を迅速に分析することが必要とされるため、下痢性・脂溶性貝毒及びドウモイ酸を対象とし、ACQUITY UPLC I-ClassおよびXevo TQ MSタンデム四重極型質量分析計を用いて測定しました。

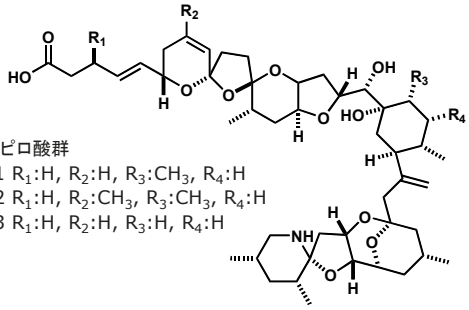
対象化合物

下痢性、脂溶性貝毒には主骨格に異なる官能基が置換した様々な化合物が存在します。DTX1の脂肪酸エステルであるDTX3は、酸性条件下ではC18やC8カラムより溶出が困難であるため、通常は加水分解後にDTX1として測定します。しかし、PTXやAZA群も分解されるため、これらの化合物群を測定するには加水分解処理をしたものとしないもの2種のサンプルを測定する必要があります。

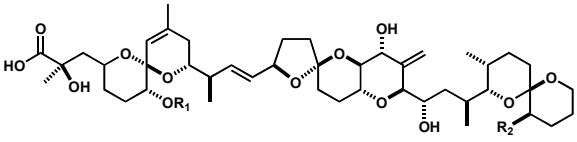
メタノール抽出後に加水分解せずにこれらの貝毒が分析可能な条件について検討しました。



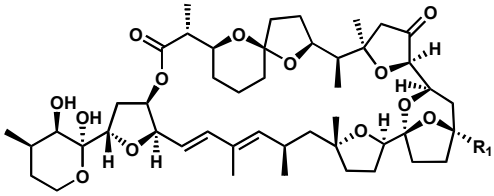
ドウモイ酸
(DA)



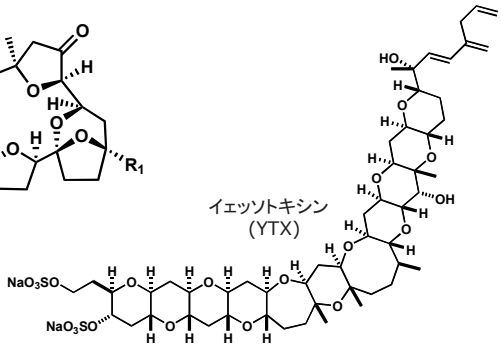
アザスピロ酸群
AZA1 R_1:H, R_2:H, R_3:CH_3, R_4:H
AZA2 R_1:H, R_2:CH_3, R_3:CH_3, R_4:H
AZA3 R_1:H, R_2:H, R_3:H, R_4:H



オカダ酸
OA R_1:H, R_2:H
ディノフィシストキシン群
DTX1 R_1:H, R_2:CH_3
DTX3 R_1:acyl, R_2:H or CH_3



ペクテノトキシン群
PTX1 R_1:CH_2OH
PTX2 R_1:CH_3
PTX6 R_1:COOH



イェッソトキシン
(YTX)

分析条件

UPLC 条件

LC システム: ACQUITY UPLC I-Class

カラム: ACQUITY BEH C18
1.7 µm, 2.1 x 100 mm
(P/N：186002352)

カラム温度: 30 ℃

移動相 A1: 50mM-ギ酸含有
2mM-ギ酸アンモニウム水溶液

移動相 A2: 水/500mM-NH4HCO3/
25%-アンモニア水
=490.5/2/7.5

移動相 B: アセトニトリル/水/
500mM-NH4HCO3/
25%-アンモニア水
=450/30.5/2/17.5

流速： 0.6 mL/min
注入量： 5 uL
グラジエント：
(Method 1)

時間(分)	A1%	B%	Curve
0.0	90	10	6
0.3	75	25	6
1.9	50	50	6
2.0	15	85	6
2.7	0	100	6
4.5	90	10	11

グラジエント：
(Method 2)

時間(分)	A2%	B%	Curve
0.0	90	10	6
0.3	75	25	6
0.5	75	25	6
1.9	50	50	6
2.1	25	75	6
2.5	0	100	6
4.7	90	10	11

分析時間： 7.0 min

MS 条件

MSシステム: Xevo TQ MS

イオン化モード: ESI positive, negative

キャピラリー電圧: 0.75 kV(positive)
1.5 kV(negative)

イオン源温度: 150℃

脱溶媒ガス: 1200 L/hr(650℃)

測定モード: MRM (2チャンネル/化合物)

分析条件

移動相は酸性および塩基性の移動相を使用しました。これらの移動相はEUの貝毒分析のSOPに記載されている移動相です。カラムはSOPに記載されている塩基性条件下でも高い耐久性を示すハイブリッドシリカゲルを充填したBEHカラムを使用します。

ドウモイ酸(DA)は高極性の酸性化合物であり、逆相カラムでは酸性条件下にて保持しますが、塩基性条件下では保持を示しません(Fig. 1)。一方、ジノフィシストキシン3(DTX3)は酸性条件下では逆相カラムに対する保持が強くカラムから溶出しませんが、塩基性下では溶出することができます(Fig. 2)。

全ての成分を溶出させるため、Method 1に示す酸性と塩基性の移動相によるグラジエント分析を検討した結果、全成分の溶出は可能となりますが、pH変化によりある種の成分では感度変動が見られるため、DAはMethod 1、DA以外はMethod 2で分析を行い、ポジティブおよびネガティブモードは同時取り込みで行いました。

Table 1 イオン化モード

化合物	Ion Mode
AZA1	ESI+
AZA2	ESI+
AZA3	ESI+
DA	ESI+
DTX1	ESI-
DTX3	ESI-
OA	ESI-
PTX1	ESI+
PTX2	ESI+
PTX6	ESI+
YTX	ESI-

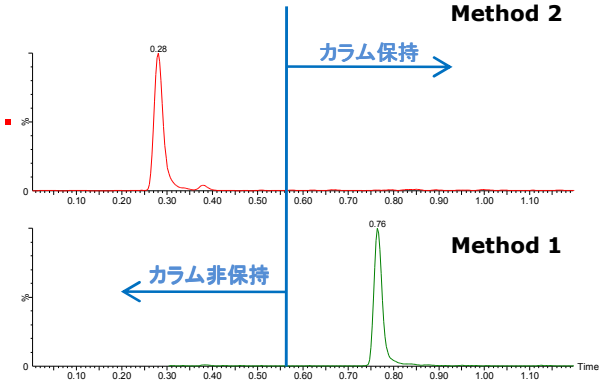


Fig. 1 酸性・塩基性条件下でのDAの保持

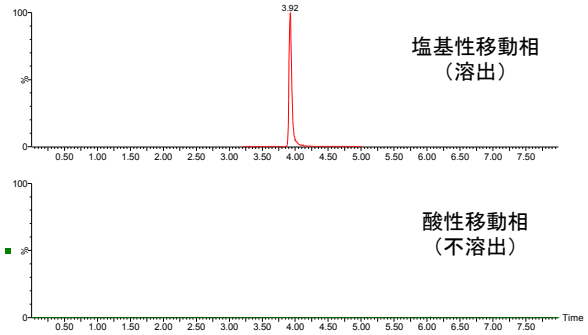


Fig. 2 酸性・塩基性条件下でのDTX3の保持

ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQ MSシステム

測定結果

Method 1においてもDAの溶出以降は残存する成分を溶出させるため、塩基性移動相にて洗浄を行います。貝毒11成分はMethod 1、2の分析条件にて良好な感度と分離を示し、Method 1、2ともに平衡化を含む分析時間が7分と高速分析が可能となります(Fig. 3)。

また、目標とされる基準値相当の濃度においても高感度検出が可能です(Fig. 3)。

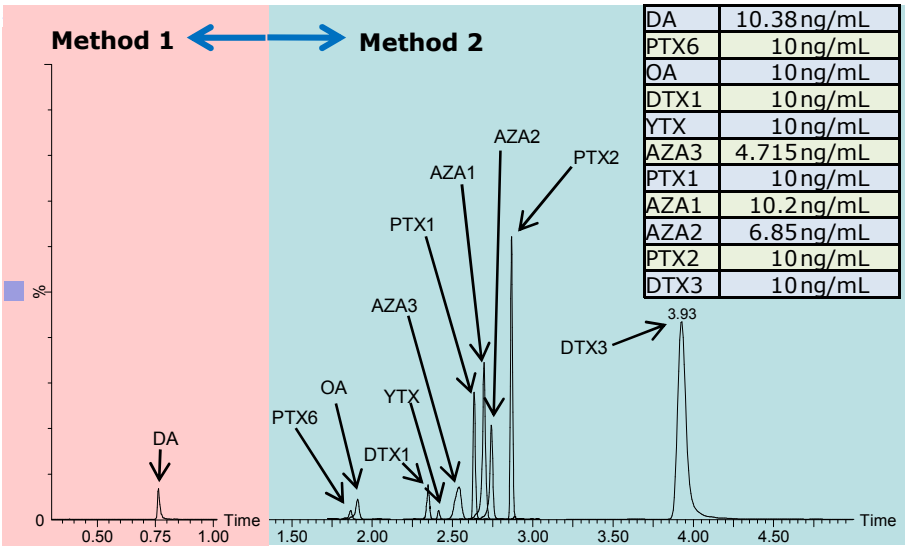


Fig. 3 貝毒11成分のMRMロマトグラム

検量線は目標とされる基準値以下の濃度範囲にて作成しました。いずれの化合物においてもR^2=0.99以上と良好な直線性を示します。また、酸性・塩基性移動相を用いたMethod 1、塩基性移動相を用いたMethod 2においても各成分は安定した保持を示し、保持時間、面積値ともに良好な再現性です(Table 2)。

Table 2 検量線、繰り返し再現性結果(検量線最大濃度)

Compound	検量線範囲(ppb)	R^2	%RSD	
			RT	Area
DA	0.2076-10.38	1.000	0.5	1.8
PTX6	0.5-10	0.997	0.3	8.8
OA	0.2-10	0.994	0.4	7.1
DTX1	0.5-10	0.988	0.2	4.3
YTX	0.5-10	0.992	0.2	5.2
AZA3	0.0943-4.715	0.996	0.2	2.8
PTX1	0.2-10	0.994	0.2	7.3
AZA1	0.204-10.2	0.995	0.2	2.9
AZA2	0.137-6.85	0.989	0.2	7.8
PTX2	0.2-10	0.999	0.0	3.7
DTX3	0.2-10	0.999	0.8	2.0

結論

DTX3を直接分析することができれば、サンプルの加水分解に係る時間や煩雑性を半減することができ、加水分解処理および未処理の2つのサンプルを調製せずに塩基性移動相を用いることによりDTX3を直接分析することが可能となります。

本法では、LC条件を2つ使用することで加水分解を行わないサンプルを用いて、DA、OA、PTX、YTX、AZA、DTXなどの広範囲な下痢性および脂溶性貝毒の高速・高感度分析が移動相の切り替えのみで可能となるため、出荷や輸入時期に合わせた適時の貝類毒性試験に有用です。

謝辞

実験に協力頂いた独立行政法人水産総合研究センター 鈴木敏之博士、渡邊龍一博士に感謝する。なお、この分析法は独立行政法人水産総合研究センターとの共著により、論文の投稿を準備しています。

Waters、ACQUITY UPLC および UPLC は Waters Corporation の登録商標です。
MassLynx、TargetLynx および The Science of What's PossibleはWaters Corporation の商標です。その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2012年3月 Produced in Japan. 20112030001J

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.co.jp
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第5小池ビル
TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 サムティ新大阪フロントビル 11F
TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡