ApplicationNOTE

Waters

ACQUITY UPLC™/Quattro Premier™ XEによる貝類中の脂溶性海洋生物毒の分析

Application Note No. 720001918J

概要

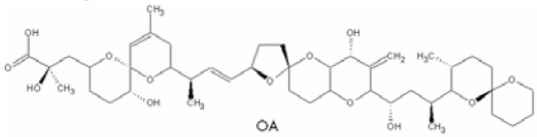
海洋生物毒には水溶性と脂溶性、毒性の違いなどによっていくつかの種類があります。これらの化合物は海水中のどこにでも存在する可能性があり、予測したり制御することはできません。これらの毒物を含む貝類を食した場合には、人間に対して様々な症状－下痢性・健応性・麻痺性中毒(DSP,ASP,PSP)－を引き起こします。

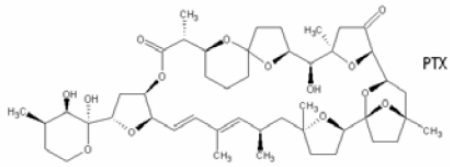
これらの被害を防ぐために、貝類に対して毒性化合物の有無を調べる試験が行われ、検出された場合には捕獲は中止されます。これまで定められた公式な分析手法はEUによるマウスを使ったバイオアッセイでしたが、定性的にも定量的にも十分なものではありませんでした。2005年にはEUから Food Quality and Safety Priority(FP6-2003-Food-2A)のもとに代わりとなる分析手法の調査が開始されました。これはイムノアッセイのような手法をモニターすること、LC/MSを用いた複数の毒物の分析手法を確立することがねらいです。規制対象化合物についてはEU Commission Decision 2002/225/EC(EU directive 91/942/EECに改定)で説明されています。

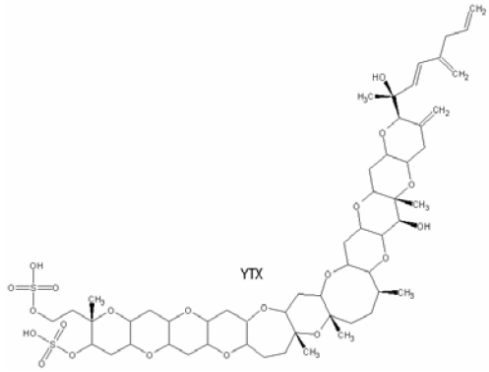
このアプリケーションノートでは、Waters ACQUITY UPLC™/Quattro Premier™ XEシステムを使用し、マトリックス効果が低く、選択的かつ迅速な分析手法を開発した結果について説明します。

Acquity™ Ultra Performance LC

化合物







分析条件

装置

ACQUITY UPLC™ システム
カラム：ACQUITY UPLC™ BEH C_{18}
2.1×100 mm , 1.7 μm
カラム温度：30℃
移動相：A) 2mM ギ酸アンモニウム＋50mMギ酸/水
B) 2mMギ酸アンモニウム＋50mMギ酸
/95%アセトニトリル5%水
グラジェント：30%B(0分)→90%B(3分)→30%B(4.6分)
サイクルタイム6.6分
流速 ：0.4 ml/min
注入量：10 μl

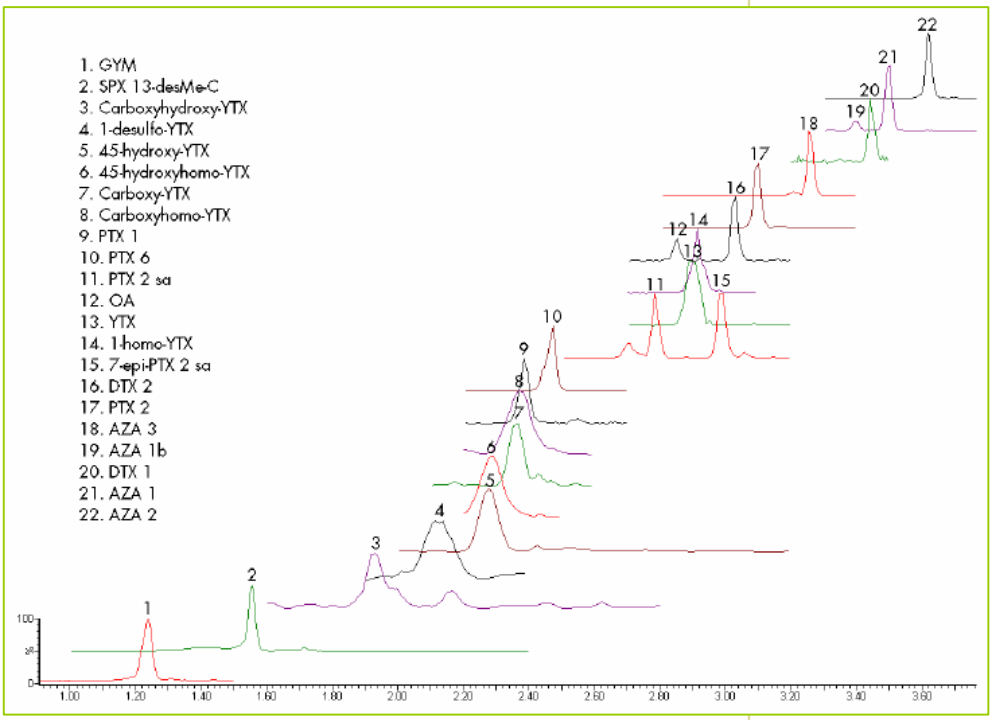
Quattro Premier™ XE タンデム四重極型質量分析計
イオン化 ：ESIポジティブ/ネガティブ
キャピラリ電圧：+/-2.5kV
脱溶媒ガス：850L/hr
脱溶媒温度：350℃
コーンガス：50L/hr
ソース温度：120℃
コリジョンガス：$4.5e^{-3}$mbar

ソフトウエア
MassLynx™4.1
TargetLynx™アプリケーションマネージャー

表1. 確認試験用の分析条件

Compound	MRM Transition	Mode	Cone Voltage/V	Collision Energy/eV
GYM	508.3 > 392.4	positive	50	35
	508.3 > 490.4			24
SPX-13-desMeC	692.5 > 164.2	positive	50	60
	692.5 > 444.4			55
Carboxyhydroxy-YTX	1189.5 > 1109.5	negative	45	40
YTX	1141.5 > 1061.5	negative	40	55
	1141.5 > 925			55
1-Desulfo-YTX	1061.5 > 981.5	negative	45	40
45-OH-YTX	1157.5 > 1077.5	negative	40	55
Carboxy-YTX	1173.5 > 1094.5	negative	40	55
Homo-YTX	1155.5 > 1075.5	negative	40	55
Carboxyhomo-YTX	1187.5 > 1107.5	negative	40	55
45-OH-homo-YTX	1171.5 > 1091.5	negative	40	55
OA & DTX2	803.5 > 255.2	negative	70	50
	803.5 > 113			65
DTX1	817.5 > 255.5	negative	70	65
	817.5 > 113			90
AZA1 & AZA1b	842.5 > 654.5	positive	50	55
	842.5 > 362			55
AZA2	856.5 > 672.5	positive	30	55
	856.5 > 654.5			45
AZA3	828.5 > 362	positive	50	55
	828.5 > 640.5			55
PTX2	876.5 > 823.5	positive	40	40
	876.5 > 212.5			50
PTX1	892.5 > 839.5	positive	40	25
PTX6	906.5 > 853.5	positive	40	25
PTX2sa & 7-epi-PTX2sa	894.5 > 805.2	positive	40	40

図1. 毒性化合物のMSクロマトグラム



サンプルの準備

試料2gを50mL容量の遠心分離管に入れ、6mLのメタノールを加えて抽出を行いました(各3本)。2500rpmで1分間ボルテックスミキサーにかけた後、6000rpmで15分間遠心分離しました。上澄み液を20mLのフラスコに移したあと沈殿物を再度同じプロセスでメタノール抽出しました。3回目の抽出ではさらに11000rpmで1分間遠心分離しました。すべての上澄み液をフラスコに移し、AZAとOAの標準原液を1mg/mLから30ng/mLの濃度範囲で添加しました。これらの溶液を20mLに調整し、0.2μmのフィルターでろ過して分析に用いました。

表1に22化合物の確認試験用のMS分析条件をまとめました。

図1には表1の条件による毒性化合物のMRMクロマトグラムを示します。分析時間4分以内にすべての成分が検出されています。毒性化合物の構造は多岐に渡るため同時溶出する成分もありますが、MRMモードの測定ではこれらを識別することが可能です。

図2. OAのMRMクロマトグラムと検量線 (TargetLynx™のウインドウ)

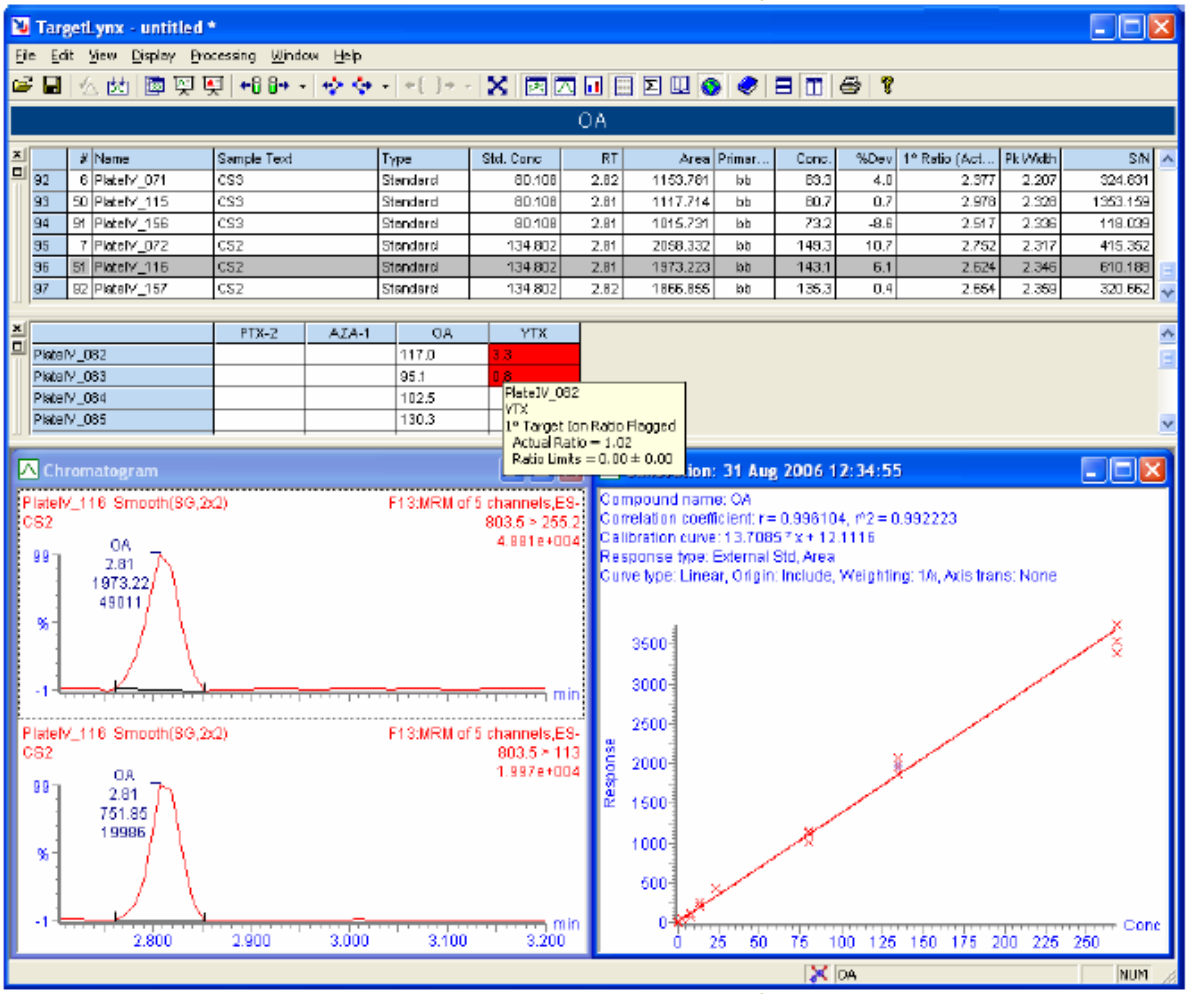


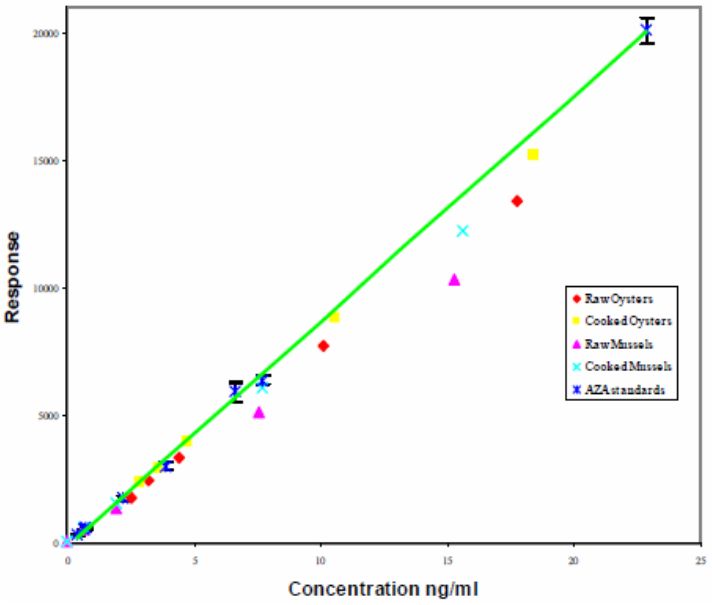
表2. TargetLynx™による定量結果

Compound	Correlation coefficient	LOD (pg/ml)	LOQ (ng/ml)	Range (ng/ml)
OA	0.997 ± 0.0012	483.1	1.61	1.5 -232
YTX	0.9969 ± 0.0009	336.3	1.12	2.8 - 56
AZA1	0.9996 ± 0.0004	32.8	0.11	0.4 - 77
PTX2	0.9993 ± 0.0007	47.7	0.16	0.5 - 96
GYM	0.9974 ± 0.0014	60	0.2	1.5 - 111
SPX 13-desMe-C	0.9966 ± 0.0037	22	0.07	1.0 - 80

図2にOAのMRMクロマトグラムと検量線を示します。この結果はMassLynx™のアプリケーションマネージャーであるTargetLynx™によって作成されました。特に注目したい化合物については、確認のために2つのMRMトランジションを設定することができます。その比率を標準化合物の比率と比較して、差が大きい場合には警告(図中の赤い部分)してその理由を表示させることができます。

表2はおよそ2000のサンプルを主な6化合物について分析した結果のまとめです。

図3. AZA1標準添加によるマトリックス効果



貝類からの抽出液のように複雑なマトリックスを含むサンプルでは、MS測定におけるイオン化の抑制あるいは増幅効果を検討する必要があります。図3はAZA1を様々な試料からの抽出溶液に添加して測定を行った結果です。カキと貝の生のものと調理したものからのサンプルのレスポンスと調整した試料濃度の相関を示しています。

図4. AZA1標準添加による収率とマトリクス量

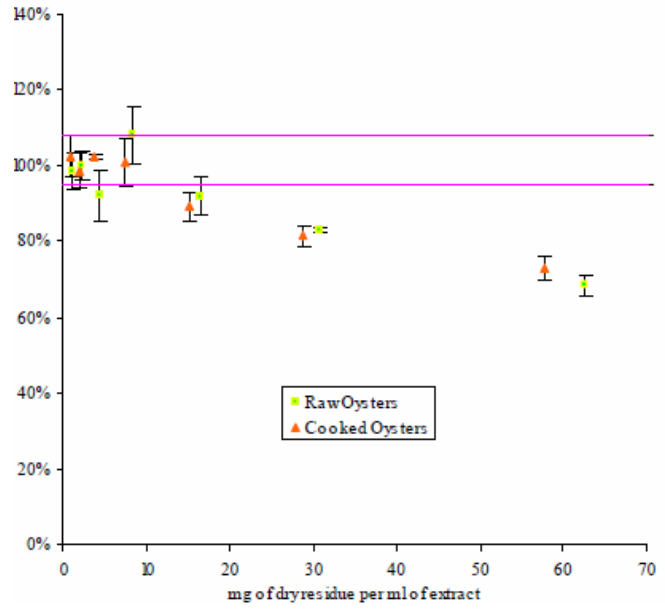


図4にはAZA1をカキ抽出液へ添加した場合の、マトリックス量との関係を示しています。マトリックス量が増えると、イオン化抑制効果が高くなることが推定されます。このことから、前処理によってMSに導入するマトリックス量を減らすことが、感度を向上させるために重要であると考えられます。

※測定試料について
OA,PTX2,YTX,GYM,SPX 13-desMe-C はNRCカナダより購入しました。AZA1はMarine Instituteによって天然の貝から摘出されたものをご提供いただきました。種々のYTX化合物はNSVS(オスロ)とCentro Ricerche Marine (イタリア) よりご提供いただきました。ホタテ貝からのPTX1と6抽出物は(財)日本食品分析センターの安元先生よりご提供いただきました。ご協力に感謝いたします。
なお、このアプリケーションに関する研究はWaters Corporation (マンチェスタ)とMarine InstituteのBiotoxins Chemistry によって行われたものです。

Waters

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 カトキチ新大阪ビル 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　静岡