

Bond Elut QuEChERS EMR Lipids を 用いた下痢性貝毒分析の前処理法



Agilent Technologies

要旨 > 下痢性貝毒の Bond Elut QuEChERS EMR Lipids を用いた迅速、簡便かつ信頼性の高い前処理法を開発しました。この前処理法によるマトリックス効果は-7~3%と顕著な感度低下は認められませんでした。また、下痢性貝毒の添加回収率はホタテガイで 87~101%、カキで 88~94%、アサリで 84~93%、再現性は n=5 での相対標準偏差が 3.7~7.2%と良好な結果でした。今回の前処理を使用することで Agilent 6495 Triple Quadrupole LC/MS を用いた検出限界は 0.1ng/g 以下でした。

Key Words: Bond Elut QuEChERS EMR Lipids、オカダ酸、ジノフィシトキシン-1、ジノフィシトキシン-2

1. はじめに

我が国ではホタテガイやムラサキガイなどで下痢性貝毒の発生が報告されており、麻痺性貝毒及び下痢性貝毒を含む貝類の取扱いについては、「麻痺性貝毒等により毒化した貝類の取扱いについて」(昭和 55 年 7 月 1 日環乳第 29 号)に基づき取り扱われていました。しかし、下痢性貝毒を含む貝類については国際的に機器分析法の導入が進められていることから、我が国においても機器分析法が導入されることとなり、平成 27 年 3 月 6 日に厚生労働省より「下痢性貝毒の検査について(平成 27 年 3 月 6 日食安基発 0306 第 3 号・食安監発 0306 第 1 号)」が出され、ヘキサノアセトニトリル分配及び C18 ミニカラムを用いた試料精製法が、ホタテガイにおいて妥当性が確認された試験方法として記載されています。ここでは、より簡便な精製法として長鎖アルキル基を特異的に吸着する吸着剤を用いた分散固相抽出法を用いた方法について紹介します。

2. 装置及び測定条件

分析条件は表 1 に示した通りです。装置は Agilent 6495 Triple Quadrupole LC/MS を使用しました。分析用カラムは逆相系の Agilent Technologies ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHT (50mm, 2.1mm, 1.8µm)、移動相はアセトニトリル及び 0.1% 酢酸+2.5mM 酢酸アンモニウム混合水溶液を使用しました。各下痢性貝毒の SRM 条件は表 2 に示した通りです。

表 1 下痢性貝毒類の LC-MSMS による分析条件

HPLC	: Agilent 1290 Infinity II LC System
Column	: ZORBAX Eclipse plus C18 (100mm, 2.1mm, 1.8µm)
Mobile phase	: A: 0.1% HCOOH+2.5mM HCOONH ₄ B: Acetonitrile 30%B---(10min)---100%B/2min
Column temp	: 40°C
Sample volume	: 5µl
Flow rate	: 0.2mL/min
MS	: Agilent 6495 triple quadrupole LC/MS system
Ionization	: Agilent Jet Stream(AJS)(Negative ion mode)
Drying gas	: 20 L/min at 200°C
Nebulizer gas	: 345kPa
Sheath gas	: 12L/min at 400°C
Fragmentor	: 380V
Vcap	: 4000V
Nozzle	: 2000V

表 2 下痢性貝毒類の SRM 条件

No	Mycotoxins	Precursor	Product		CE(eV)		TS
			定量イオン	確認イオン	定量イオン	確認イオン	
1	OA+DTX2	803.5	255	113	55	65	1
2	DTX1	807.5	255	113	55	65	2

試料前処理法は図 1 に示しましたが、抽出法は厚生省の試験法と同様で、加水分解-中和後の精製法に EMR Lipids を使用した分散固相抽出法を使用しました。

貝粉砕物(ペースト状)2g をメタノール(9mL)、90%メタノール(9mL)で2回抽出

抽出液を合わせて、メタノールで20mLに定容

抽出液を4mL取り、2.5mol/L NaOHを0.5mL添加

80°C/40分加熱により加水分解

放冷後、2.5mol/L HClを0.5mL添加、攪拌して中和

全量に純水(3mL)添加後、EMR Lipid分散 SPEキットに移しVortex(1分)

4000回転/5分遠心分離後、上清を0.2µmのフィルターでろ過

LC-MS分析(0.05g/mL)

図 1 下痢性貝毒分析用試料前処理法

3. 結果及び考察

今回使用した吸着剤である EMR Lipids は活性化に水分が必要なことから、試料精製法の検討として、EMR Lipids で分散固相抽出を行う際に添加する純水の量を 0、1 及び 3mL で検討を行いました。

3.1 EMR Lipids による脂質除去の比較

EMR Lipids は長鎖アルキル基を有する、脂質や脂肪酸の除去に有効であることから、抽出液中のこれら試料マトリックスの有無を比較しました。図 2 に表 1 条件で測定したホタテガイとカキでのトータルイオンクロマトグラム(TIC)を示しましたが、EMR Lipids による精製がない場合は脂質の加水分解物と考えられるピークが多く検出され、測定



Agilent Technologies

対象成分の保持時間と重なるピークも存在しました。しかし、EMR Lipids で精製することで、ほとんどピークは観察されませんでした。また、分析条件では溶出しにくい、脂質についても移動相に IPA を用いた分析条件による TIC を図3に示しました。このTICにおいても未処理では多くの脂質と考えられるピークが多く観察されましたが、EMR Lipids で精製することでほとんどピークが観察されませんでした。また、添加する純水量は 3mL が最も効果的に脂質除去が可能でした。

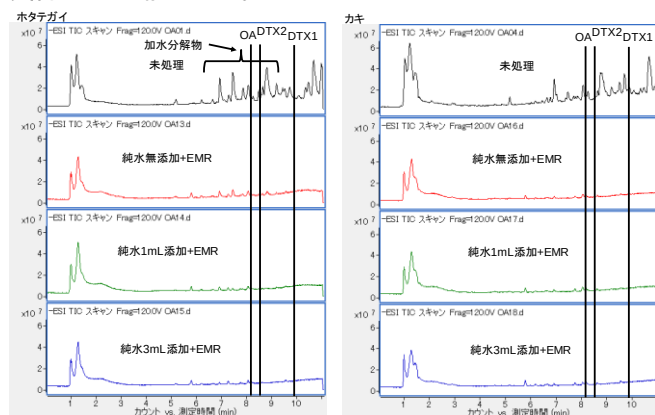


図2 表1条件での各試料抽出液のTIC

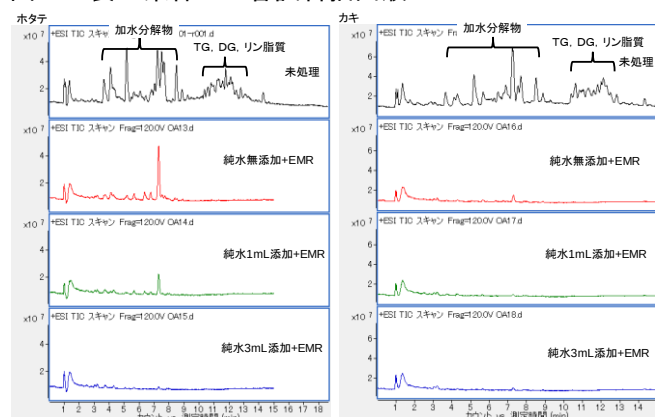


図3 IPA を使用した移動相条件による各試料抽出液のTIC

3.2 マトリックス効果及び添加回収率

試料精製法の違いによる各試料抽出液でのマトリックス効果及び添加回収率を表3に示しました。

表3 各試料でのマトリックス効果及び添加回収率

	マトリックス効果								
	ホタテガイ			牡蠣			アサリ		
	オカダ酸	DTX2	DTX1	オカダ酸	DTX2	DTX1	オカダ酸	DTX2	DTX1
1	82	94	83	94	82	84	82	79	81
2	83	92	93	91	88	91	85	93	94
3	93	95	97	92	93	92	92	95	93

標準溶液に対する相対強度,%

純水添加量 1: 0mL, 2: 1mL, 3: 3mL

	添加回収率								
	ホタテガイ			カキ			アサリ		
	オカダ酸	DTX2	DTX1	オカダ酸	DTX2	DTX1	オカダ酸	DTX2	DTX1
1	91	101	92	91	89	91	89	93	92
2	93	98	93	92	87	93	92	91	95
3	92	102	92	94	93	101	93	95	96

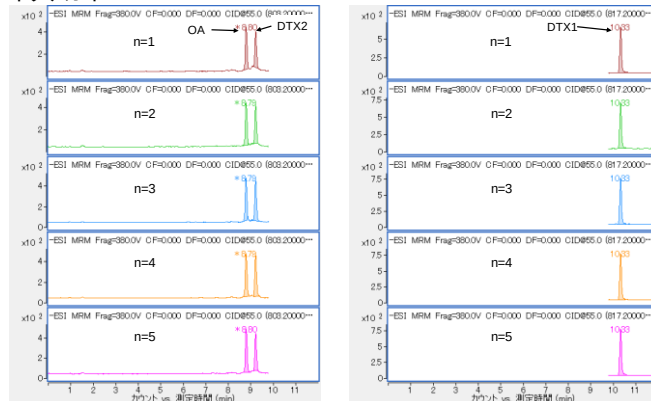
標準溶液添加試料抽出液に対する相対強度,%

純水添加量 1: 0mL, 2: 1mL, 3: 3mL

マトリックス効果は純水を 3mL 添加することで最少に抑えることが可能で、感度の低下は 10%以内でした。また、

添加回収率は添加する純水の量には関係なく 90%以上でした。図4は図1条件で処理した標準添加試料抽出液(濃度:2ng/g)のMRMクロマトグラムを示し、表4に添加回収率を示しましたが、全ての試料で添加回収率は 80%以上と良好な結果でした。

ホタテガイ



カキ

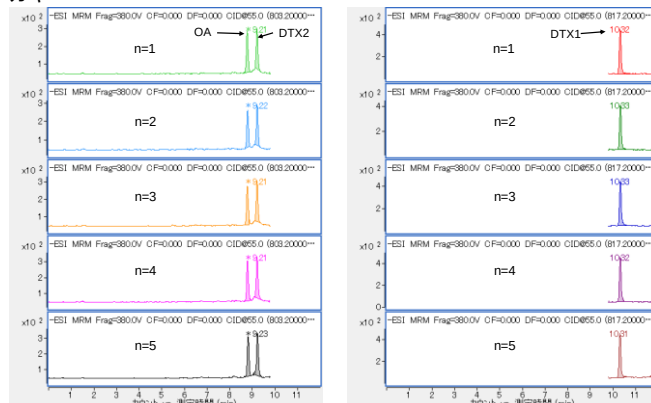


図4 各試料中下痢性貝毒のMRMクロマトグラム
濃度:2ng/g

表4 各試料中下痢性貝毒の添加回収率

下痢性貝毒	添加回収率								
	ホタテガイ			カキ			アサリ		
	2ng/g	10ng/g	50ng/g	2ng/g	10ng/g	50ng/g	2ng/g	10ng/g	50ng/g
オカダ酸	91(6.9)	88(7.9)	87(5.1)	93(6.2)	94(6.3)	91(4.6)	88(7.1)	84(5.6)	85(4.9)
DTX2	89(6.2)	92(4.5)	93(4.8)	91(7.1)	90(5.5)	88(4.3)	85(6.7)	88(4.9)	91(4.4)
DTX1	91(7.2)	93(6.1)	101(5.7)	88(5.3)	96(6.3)	92(5.1)	87(5.5)	93(6.0)	89(3.7)

() 相対標準偏差,% n=5

4.まとめ

今回、ホタテ、カキ及びアサリ中下痢性貝毒 (OA、DTX-2、DTX-1)の分析に新規吸着剤であるEMR Lipidsを使用した精製法を開発しました。この方法による各試料中添加回収率は 84~101%と良好な結果でした。また、再現性は n=5 で各下痢性貝毒の相対標準偏差は 3.7~7.2%でした。

【LC-MS-201607TK-001】

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更することがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

〒192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1

www.agilent.com/chem/jp



Agilent Technologies