

Agilent InfinityLab Poroshell120 の 親水性相互作用クロマトグラフィーに よるフグ毒テトロドトキシンの分析



要旨

Authors

澤田 有司

アジレント・テクノロジー
株式会社

フグ毒テトロドトキシン (Tetrodotoxin, TTX) は代表的な魚貝毒であり、国内では年間数十件のフグ毒中毒が発生しています。このため、TTX の定量的な検出は食品衛生上重要な課題の一つです。高極性化合物の TTX は一般的な ODS カラムの逆相分析では十分に保持されないため、より強い保持を示す親水性相互作用クロマトグラフィー (Hydrophilic Interaction Chromatography, HILIC) による分析が検討されています。このアプリケーションノートでは、TTX 分析を Agilent InfinityLab Poroshell120 の HILIC カラム 3 種 (HILIC、HILIC-OH5、HILIC-Z) で行いました。

Key words: フグ毒、テトロドトキシン、Poroshell120、HILIC、LC/MS、MRM

はじめに

親水性相互作用液体クロマトグラフィー（HILIC）は、標準的な LC システムと一般的な逆相溶媒を使用し、逆相 LC 分析で十分に保持できなかった高極性化合物に強い保持を示します。アジレントでは、高いカラム効率と低背圧を実現した表面多孔性カラム Agilent InfinityLab Poroshell120 の三種の HILIC カラムを提供しています。これらは、極性化合物に優れた保持を示す未修飾シリカ層の HILIC、フルクタン結合層により特徴的な選択性を示す HILIC-OH5、両性イオン型官能基固定相により高極性または荷電化合物に高い保持を示す HILIC-Z です。

このアプリケーションノートで分析方法を検討した TTX は構造が複雑な高極性の荷電化合物であり（図 1）、これらの HILIC カラムの選択性の違いによる分離の差を期待できます。また、TTX の実用的な試験法では高感度検出が求められます。TTX は顕著なUV吸収を示さないため、高感度検出には LC-MS/MS 分析が有効です。そこで、このアプリケーションノートでは、3種の HILIC カラムの分離とトリプル四重極質量分析装置を用いた TTX の LC-MS/MS 分析を検討しました。まず、三種の HILIC カラムを比較するために、イソクラテック条件、グラジエント条件で TTX の保持力の比較を行いました。次に、TTX に最も強い保持を示した HILIC-Z を用いた検量線作成を行いました。

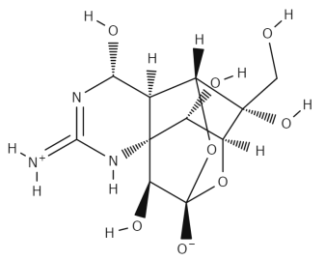


図 1. テトロドトキシンの構造

実験方法

試薬および調製

標準溶液は、1 mg の TTX を 0.1% 氷酢酸 10 mL で希釈した 100 ppm 溶液を原液としました。TTX の希釈系列サンプル（0.1–1000 ppb）は、LC 移動相 B で希釈しました。移動相の調製では、100 mM のギ酸アンモニウム溶液を水（移動相 A）、アセトニトリル（移動相 B）で 10 倍希釈し、ギ酸を加えました（HPLC 条件参照）。

実験器具と材料

- カラム入口：Agilent InfinityLab クイックコネク ト LC フィッティング(p/n 5067-5965)
- カラム出口：Agilent InfinityLab クイックターン LC フィッティング(p/n 5067-5966)
- スクリュースバイアル、2 mL、茶色、ラベル付 (p/n 5182-0716)
- Agilent 圧着スクリュージャップ、圧着、青、PTFE/赤シリコンセプトラム(p/n 5190-7024)
- Agilent バイアルインサート、250 µL、不活性ガラス、樹脂足付(p/n 5181-8872)

- Agilent InfinityLab 溶媒ボトル、茶色、1,000 mL (p/n 9301-6526)
- Agilent A-Line セーフティキャップ、GL45、3 ポート、1 ベントバルブ(p/n 5043-1219)

装置構成

- Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ G7120A
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンプラ G7167B
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット G7116B
- Agilent 6470 トリプル四重極 LC/MS

ソフトウェア

- Agilent MassHunter Workstation Software LC/MS Data Acquisition
- Agilent MassHunter Workstation Software Navigator
- Agilent MassHunter Workstation Software Quantitative Analysis
- Agilent MassHunter Workstation Software Optimizer Version

MRM条件の最適化

- MassHunter OptimizerによるFragmentor, Collision Energyの最適化は 10 ppmのTTX溶液を利用し、フローインジェクション(FIA)-MS/MS分析で行いました。

LC条件の最適化

- TTXの保持を3種のカラムで比較するために、イソクラテック条件（70、80、90%B）で比較しました。
- グラジエント条件は、イソクラテック分析でTTXの強い保持を示した90%BからTTXが溶出された70%Bで検討しました。

HPLC条件

パラメータ	設定値		
カラム	InfinityLab Poroshell HILIC 2.1 x 100 mm, 2.7 μm (p/n 695775-901)		
	InfinityLab Poroshell HILIC-OH5 2.1 x 100 mm, 2.7 μm (p/n 685775-601)		
	InfinityLab Poroshell HILIC-Z 2.1 x 100 mm, 2.7 μm (p/n 685775-924)		
移動相	溶媒・試薬	移動相A	移動相B
	水 (%)	100	10
	アセトニトリル (%)	0	90
	ギ酸アンモニウム (mM)	10	10
	ギ酸 (%)	0.1	0.1
流速	FIA: 0.2 mL/min、LC-MS/MS: 0.5 mL/min		
FIA	50%B		
イソクラテック	70、80、90%B		
グラジエント	時間 (分)	%B	
	0	90	
	1	90	
	2	70	
	6	70	
	7	90	
	14	90	
カラム温度	30°C		
注入量	2 μL		

MS条件

パラメータ	設定値
乾燥ガス	N ₂ , 300°C, 10 L/min
シースガス	N ₂ , 400°C, 12 L/min
極性	ポジティブ
イオンソース	AJS (Agilent Jet Stream, ESI)
キャピラリ電圧	3000 V
FIA-MS/MS	Fragmentor: 50–200V. Collision energy: 5–55 eV
MRM	MRM F ¹ CE ² Abundance (%) ³
	320.1 > 302 170 25 100
	320.1 > 162.1 170 45 47
	320.1 > 60.1 170 41 13
	320.1 > 178 170 45 11

¹F = Fragmentor voltage (V)

²CE = Collision energy (eV)

³Relative abundance of FIA-MS/MS analysis

結果と考察

MassHunterOptimizer による検出条件の最適化では、4種類の MRM 条件が決定できました (MS条件参照)。この MRM 条件で LC/MS 分析を行い、TTX の保持力を三種のカラムで比較しました。まず、イソクラティック条件 (%B: 70, 80, 90) で分析した結果、HILIC-Z、HILIC-OH5 の順に高い保持力を示しました (図2、図3)。一方、HILIC は、イソクラティック条件で大きな差がみられないことから、TTX の保持力は低いことがわかりました (図2、図3)。

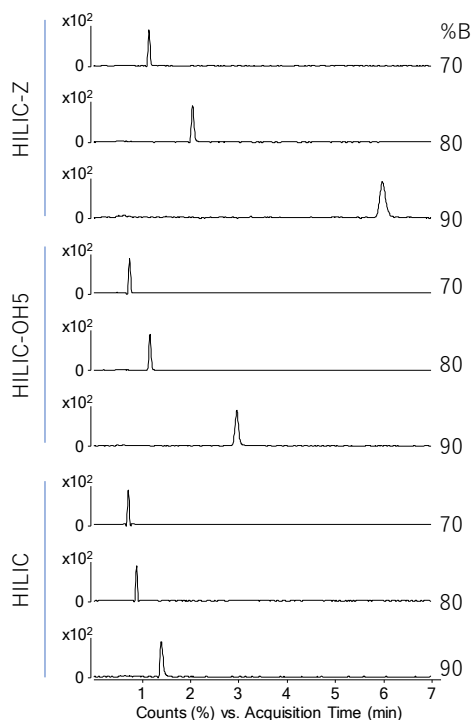


図2. イソクラティック分析による保持力の比較

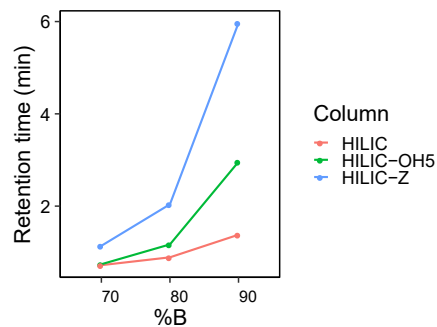


図3. HILIC カラム3種のイソクラティック条件の溶出時間の比較

グラジエント分析では、イソクラティック条件で検討した 90%B を初期条件として 70%B までの条件を検討しました。この結果、イソクラティック条件と同様に HILIC-Z が最も強い保持を示しました (図4)。

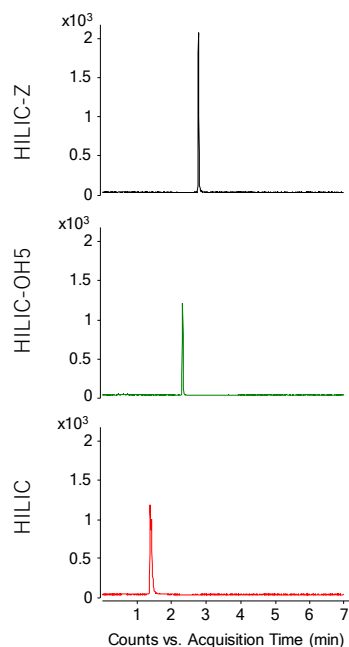


図4. グラジエント条件による保持力の比較

最後に、TTX に最も強い保持を示した HILIC-Z のグラジエント条件で検量線を作成しました (図5)。この結果、0.1–1000 ppb で良好な直線性を示しました ($R^2 = 0.99989$)。

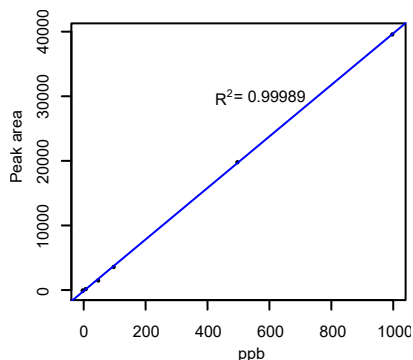


図5. HILIC-Z を利用した TTX 検出の検量線 (MRM 条件: 302.1 > 302, TTX 濃度: 0.1–1000 ppb)

まとめ

Agilent InfinityLab Poroshell120 HILIC カラム3種 (HILIC、HILIC-OH5、HILIC-Z) を用いた TTX 分析を検討しました。この結果、イソクラテック条件、グラジエント条件ともに、HILIC-Z が強い保持を示すことがわかりました。さらに、HILIC-Z のグラジエント条件で検量線を作成し、低濃度から高濃度まで良好な直線性を示すことがわかりました。HILIC-Zを用いた LC-MS/MS 分析は TTX の迅速な定量分析が可能であり、魚貝毒の実用的な分析法として食品衛生検査に利用されることが期待されます。

このアプリケーションノートでは、3種類のカラムを比較するために同一の条件で分析を行いました。HILIC-Z は高い pH と温度安定性 (pH 範囲 3-11、温度上限 80°C) を示すため、これらの条件を変更することで、さらに最適化することが可能です。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2020

Printed in Japan, September 24, 2020

LC-MS-202009SD-001