

Agilent 6410 によるテトロドトキシンの高感度分析



要旨> ふぐ毒であるテトロドトキシンの LC-MS/MS 法による高感度分析法を検討しました。その結果、イオン源に ESI 法、カラムにマルチモードカラムを使用することで TTX は良好なピーク形状が得られ、0.1ng/mL 以下の測定が可能でした。また、マウス血清抽出液中において血清成分由来の妨害ピークの影響なく微量 TTX を測定することが可能でした。

Key Words: テトロドトキシンの(TTX)、フグ毒、LC-MS/MS、MRM

1. はじめに

テトロドトキシンの(TTX)はふぐ毒として有名ですが、実際にはある種細菌が生産したものが餌であるか貝類を通して生物濃縮され体内に蓄積したと考えられており、アカハライモリやツムギハゼなどその他生物も TTX を持っています。しかしふぐは食用として流通していることから食品衛生上フグ毒としての TTX が最も重要です。TTX の構造は複雑で極性の高い水溶性化合物であり GC では測定が困難な化合物です。一方 LC 法を使用した場合逆相系カラムでは保持が非常に弱いことから TTX のイオン性を利用してイオン交換カラムが用いられます。また、検出に関しては UV 吸収を持たないことから質量分析 (MS) 法が有効であり、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法が多く使用されています。そこで今回、分配、吸着に加え陽イオン交換機能を有したマルチモードカラムを使用した LC-MS/MS によるテトロドトキシンの高感度分析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。カラムには TTX が塩基性であることから微量のスルホン酸基を導入したポリマー系マルチモードカラムを使用し、移動相には、アセトニトリル及び 10mM 酢酸アンモニウムを使用した 10%アセトニトリル及び 90%10mM 酢酸アンモニウムのアイソクラティックモードで測定しました。また MS 条件はイオン源に ESI を用いた正イオンモードで測定し、MRM トランジションは $m/z=320>302$ としました。

実試料にはマウス血液を遠心分離して得られた血清を処理した血清抽出液を使用しました。

表.1 LC-MS/MS による TTX の分析条件

LC	: 1200LC
Column	: Shodex RSpak NN-414(150mm,4.6mm)
Mobile phase	: A:10mMCH ₃ COONH ₄ , B: ACN 10%B
Column temp	: 40°C
Sample volume	: 10uL
Flow rate	: 0.3mL/min
MS	: Agilent 6410 triple quadrupole LC/MS
Ionization	: ESI (Positive)
MRM transition	: $m/z=320>302$
Drying gas	: 10L/min at 350C
Nebulizer gas	: 345kPa
Fragmentor	: 160V

3. 結果及び考察

図.1 にプロトン化分子をプリカーサーイオンに設定したプロダクトイオン scan モードによる MS/MS スペクトルを示しました。この MS/MS スペクトルから MRM トランジションには最も強度の強いプロダクトイオンである脱水イオン ($m/z=302, 248$) を使用しました。

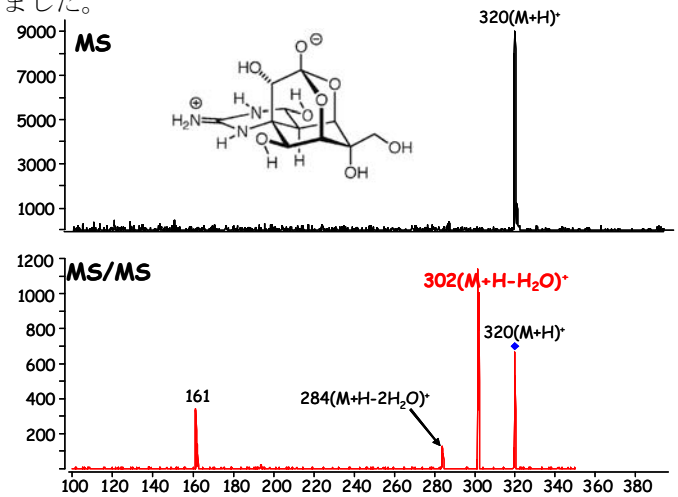


図.1 TTX のプロダクトイオンスキャンによる MS/MS スペクトル



Agilent Technologies

標準溶液での結果は TTX の MRM クロマトグラム及び検量線を図. 2, 3 に示しましたが、このクロマトグラムから 0.1ng/mL 以下での検出が可能です。また直線性に関して決定係数 (r^2) は 0.9998 と良好な結果でした。

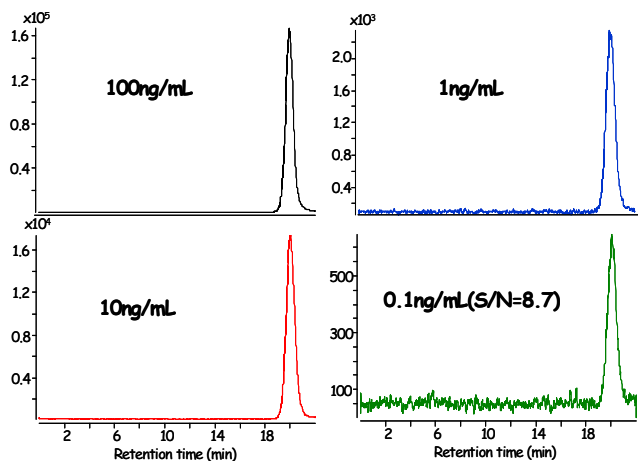


図. 2 TTX の MRM クロマトグラム

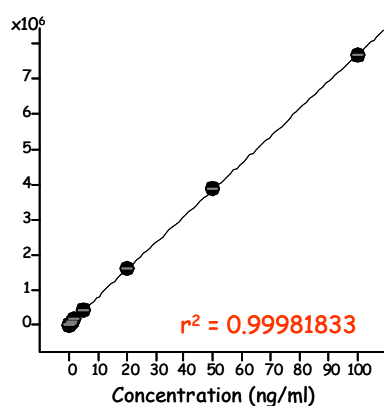


図. 3 TTX の検量線 (100~0.1ng/mL)

実試料に関しては、マウス血液から得られたコントロール血清及びコントロール血清の TTX を添加した MRM クロマトグラムを図. 4 に示しました。

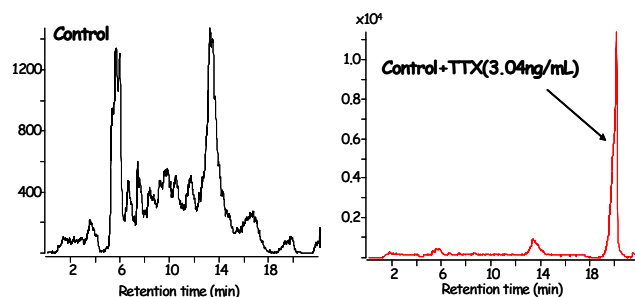


図. 4 マウス血清及び TTX 添加マウス血清の MRM クロマトグラム

この結果から、血清試料中サブ ng/mL の TTX の測定が可能であることがわかります。また、コントロール血清において血清成分由来のピークが検出されましたが、TTX の分析には影響はありませんでした。

4. まとめ

今回 LC-MS/MS を用いたマウス血清中 TTX の分析法の検討を行った結果、プリカーサーイオンにプロトン化分子、プロダクトイオンに脱水イオンとした MRM 法において 0.1ng/mL 以下で測定が可能でした。また、マウス血清抽出液中微量 TTX を検出することが可能でした。

【LCMS-200806TK-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