

Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS による 貝に含まれる脂溶性海産毒の 堅牢な高感度分析

アプリケーションノート

環境、食品安全性

著者

Oliver Keuth
Chemical and Veterinary Analytical
Institute Muensterland-Emscher-Lippe,
Muenster, Germany

Thomas Glauner
Agilent Technologies, Waldbronn,
Germany

概要

人体の健康に対する海産毒 (マリントキシン) の脅威が、世界各地で高まっています。海産毒は複数の属の微細な浮遊性藻類により、通常はきわめて低い濃度で生成されますが、二枚貝軟体動物中に蓄積し、中毒量に達することがあります。汚染された魚介を食べると、人間でも中毒を起し、場合によっては死に至ることもあります。動物および人体では、4 種類の貝毒症状が知られています (下痢性貝毒 (DSP)、麻痺性貝毒 (PSP)、神経性貝毒 (NSP)、記憶喪失性貝毒 (ASP))。

脂溶性海産毒に関する EU の公式標準参照メソッド (欧州委員会規則 EC No. 2074/2005) は、マウスバイオアッセイ (MBA) です。先ごろ、MBA について、欧州食品安全機関 (EFSA : European Food Safety Authority) は能力不足であるとの見解を発表しました (EFSA Journal, 2009, 1306, 1-1)。その理由として、現行の MBA 法は変動が大きく、検出能力が不十分で、特異性が制限されていることが挙げられています。こうしたことから、海産毒を検出下限 (LOD) で測定でき、MBA に代わる高性能な測定メソッドが求められています。

このアプリケーションノートでは、脂溶性海産毒を測定するための高感度 LC-MS/MS メソッドを紹介します。ここでは、オカダ酸 (OA)、ジノフィシトキシン (DTX)、およびアザスピロ酸 (AZA)、ペクテノトキシン (PTX)、イエソトキシン (YTX) といったポリエーテル系毒素などの海産毒を測定しました。リファレンス化合物が利用できる場合には、ドウモイ酸 (DA)、ギムノジミン (GYM)、スピロリド (SPX) などの他の脂溶性毒素にもこのメソッドを適用できることが、予備試験により示されています。



Agilent Technologies

はじめに

海産毒は、海洋浮遊性藻類が 2 次代謝物として生成する物質で、通常はきわめて低い濃度で生成されます。藻類の異常発生時には、特に二枚貝軟体動物中での蓄積により、毒素の濃度が中毒量に達することがあります。過去 20 年で、有害な藻類異常発生の件数や規模が増大し、海洋食物連鎖において発見された毒性化合物の数も増えていきます (Marine biotoxins. FAO Food and Nutrition Papers (80) 2004)。欧州食品安全機関 (EFSA) は、これまでよりも感度と信頼性の優れた脂溶性海産毒の測定メソッドを求めています。

課題

課題となっているのは、魚介類に含まれるオカダ酸 (OA)、ジノフィシトキシン (DTX)、およびアザスピロ酸 (AZA)、ペクテノトキシン (PTX)、イエソトキシン (YTX) といったポリエーテル系毒素などの脂溶性海産毒を測定できる堅牢な高感度メソッドを開発することです。ドウモイ酸 (DA)、ギムノジミン (GYM)、スピロリド (SPX) などの他の脂溶性毒素に応用できることも求められます。検出下限 (LOD) に関しては、最大残留基準値 (MRL) を下回る必要があります。MRL は EU の法律により、アザスピロ酸 (AZA)、オカダ酸 (OA) とジノフィシトキシン (DTX) およびペクテノトキシン (PTX) の合計、イエソトキシン (YTX) について規定されています。微量化合物の定量および確認は、マトリックスの存在により複雑化することがあります。多くの化合物

ではリファレンス物質が利用できないため、他の化合物のレスポンスをもとに複数の化合物を定量するツールが求められます。

統合型アプローチ

海産毒の分析に用いられる最先端のメソッドは、トリプル四重極質量分析 (LC-MS/MS) などの物理化学的テクニックをベースにしています。トリプル四重極質量分析では、マトリックス干渉を大幅に低減し、場合によっては排除することができます。マルチブルリアクションモニタリング (MRM) は、分析対象化合物の「プリカーサイオン」の衝突解離により生成された 2 次的な「プロダクトイオン」の検出をベースとする手法です。分析対象化合物のプリカーサイオン (SIM メカニズムにより MS1 で分離) の選択性は SIM と同じですが、その結果生じたプロダクトイオン (SIM メカニズムにより MS2 で分離) は、ターゲット化合物に固有のものである可能性が高いため、MRM の選択性が高くなります。固有のプロダクトイオン (選択性が高い) に、バックグラウンドノイズの除去を組み合わせれば、複雑なマトリックスでも一貫して低い検出下限が得られます。ここで紹介するメソッドは、貝サンプルに含まれる脂溶性海産毒をきわめて高い感度および特異性で分析できます。このメソッドでは、MRM モードの Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS システムを Agilent 1200 SL Rapid Resolution HPLC および Agilent MassHunter Workstation ソフトウェアと組み合わせて使用しました。ここで紹介

するサンプルクリーンアップ手順はきわめて簡単で、ルーチン分析への応用性が高くなっています。OA、DTX-1、加水分解後のエステルを含めた DTX-2、YTX、OH-YTX、PTX-1、PTX-2、AZA-1、AZA-2、AZA-3 の分析が可能です。一部の毒素については、市販の標準を利用できないため、他の化合物のキャリブレーションレスポンスを用いて定量する必要があります。

メソッドと手順

海産毒分析の最先端メソッドは、LC-MS/MS をベースにしています。サンプル前処理は簡単で、液液抽出およびその後のろ過により行われます。分離は HPLC がベースで、定量は LC-ESI-MS/MS (MRM - ポジティブおよびネガティブモード) により行われます。

分析手順

液液抽出、ろ過

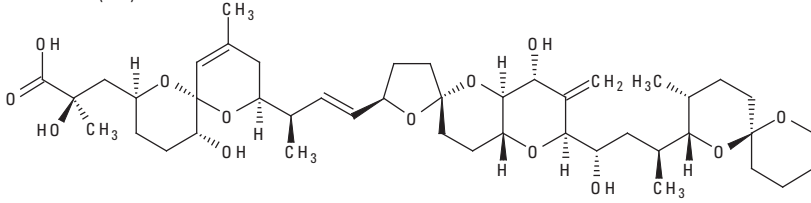
直線グラジエントによる HPLC 分析
LC-ESI-MS/MS (MRM) による検出

サンプル前処理手順

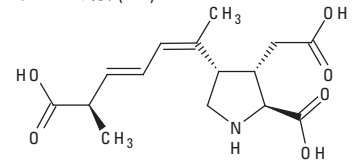
加熱してすりつぶした貝組織 2 g を計量します。メタノール (80 %) 9 mL を添加します。この抽出手順を 2 回行います。2 回分の抽出液をまとめ、計量フラスコに入れて 50 mL までメスアップします。適量をろ過して、残っている粒子をすべて除去し (フィルタ RC 0.45 μm)、このサンプル抽出液 10 μL を注入して LC-MS/MS 分析を行います。

成分の構造 (例)

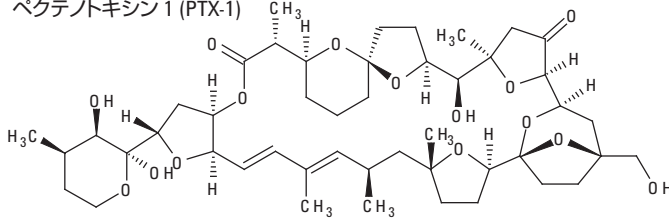
オカダ酸 (OA)



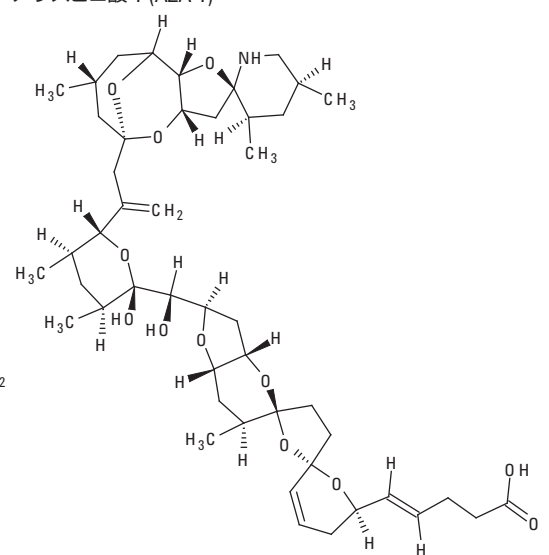
ドウモイ酸 (DA)



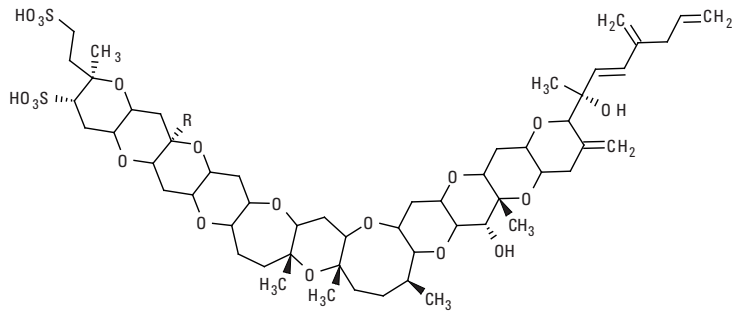
ペクテノキシン 1 (PTX-1)



アザスピロ酸 1 (AZA-1)



イエットキシン (YTX)



ジノフィシストキシン 1 (DTX-1)

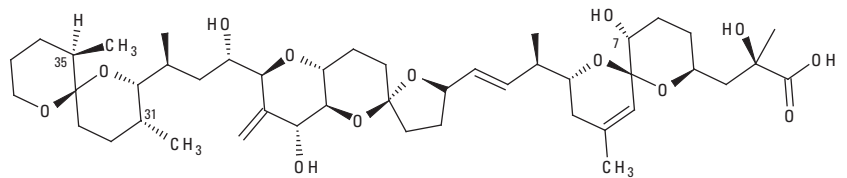


図 1
海産毒の化学構造例

LC-MS/MS メソッド

脂溶性海産毒の測定に要する総分析時間は、30 分未満です。OA、DTX-1、DTX-2、PTX-1、PTX-2、AZA-1、AZA-2、AZA-3 については、メソッドをポジティブモードで実行します。YTX は個別の分析条件で測定します。この分析には、異なるカラムおよび移動相が必要です。抽出液 (10 μ L) を直接 LC-MS/MS システムに注入します。LC メソッドでは、ポジティブモード測定には水 (A) および MeOH (B) 中

0.1 % ギ酸の混合溶媒を、ネガティブモード測定には水 (A) および MeOH (B) 中 2 mM 酢酸アンモニウムを、直線グラジエントの移動相として使用します。カラム (Phenomenex Luna 5 μ m C18(2) 100 \AA 150 x 2.0 mm [ポジティブモード]、ZORBAX Eclipse Plus C 8 4.6 x 75 mm 3.5 μ m [ネガティブモード]) を 30 $^{\circ}$ C に設定したカラムオープンに取り付け、流量を 0.2 mL/min とします。

グラジエント* 時間 [分]	溶媒比 B [%]
0	5
10	85
22	85
23	5
30	5

表 1
グラジエント設定

*ポジティブおよびネガティブモードに適用

サンプル前処理手順

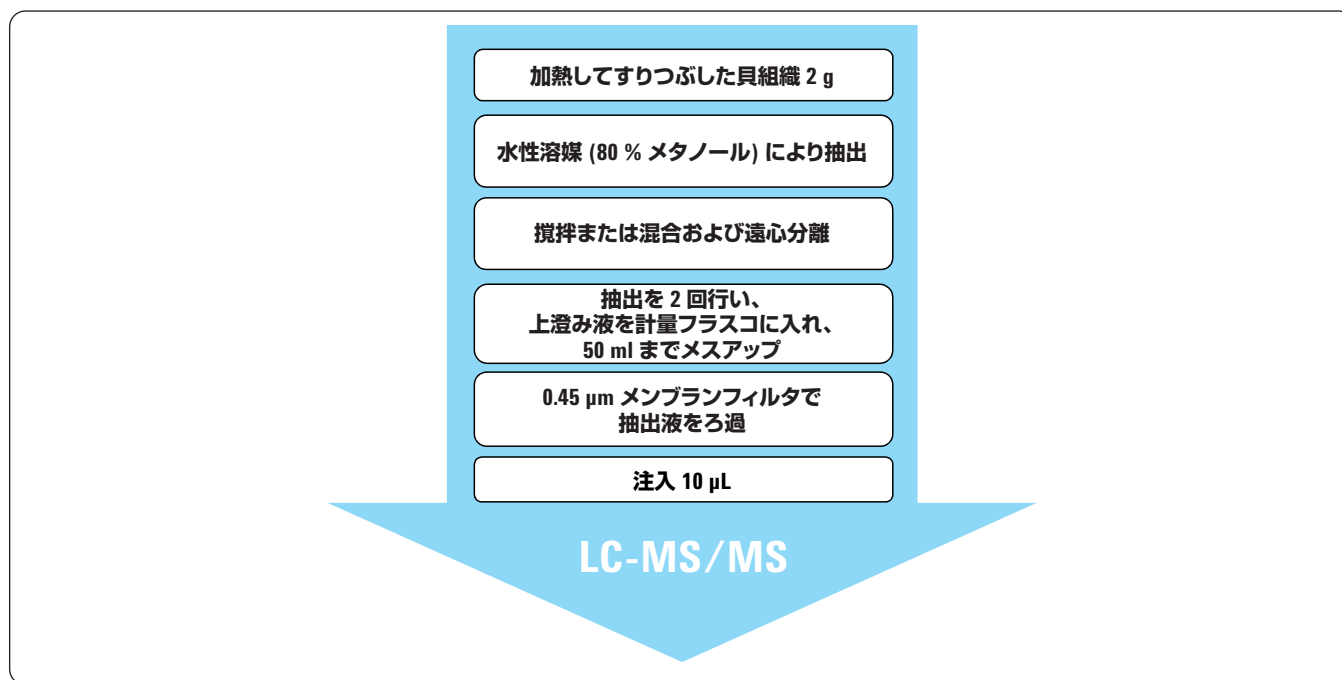


図 2

貝に含まれる海産毒測定のサンプル前処理手順

以下の資料に準拠しています。

McNabb, P., A.I.Selwood, and P.T.Holland, Multiresidue method for determination of algal toxins in shellfish. J AOAC Int, 2005.88: p. 761-772

Chapela, M.J., et al., Lipophilic toxins analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry and comparison with mouse bioassay in fresh, frozen, and processed molluscs. J Agric Food Chem, 2008.56(19): p. 8979-86.

Moutfort, D.O., T. Suzuki, and P. Trueman, Protein phosphatase inhibition assay adapted for determination of total DSP in contaminated mussels. Toxicon, 2001.39: p. 383-390

MS/MS 条件設定

Agilent 6460 QQQ ESI JetStream ソースパラメータ

ガス温度:	300 °C
ガス流量:	5 L/min
ネブライザ:	45 psi
シーガス温度:	250 °C
シーガス流量:	11 L/min
キャピラリ:	+ 3500 V - 3500 V
ノズル電圧:	+/- 500 V
デルタ EMV	400

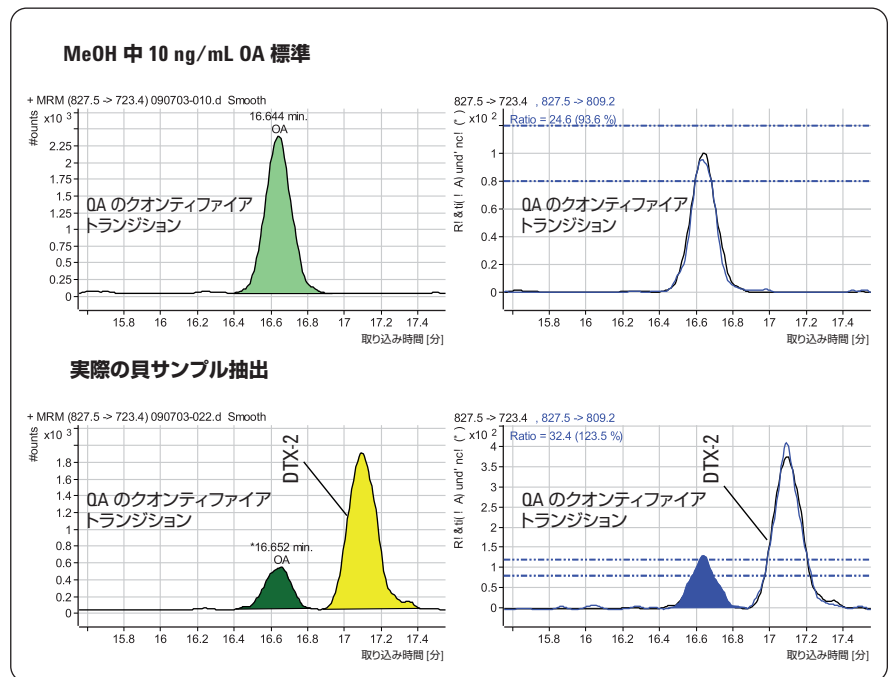


図 3
OA 標準および実際の貝サンプル、OA および DTX-2 を含む (図 4 に示すのと同じサンプル)
OA 23 µg/kg および DTX-2 130 µg/kg

成分	極性	プリカーサ イオン m/z	プロダクト イオン m/z	フラグメント [V]	CE [eV]	クオンティ ファイア
OA および DTX-2	pos	827.5	723.4	220	55	X
	pos	827.5	809.2	220	45	
DTX-1	pos	841.5	737.2	220	55	X
	pos	841.5	823.2	220	45	
PTX-1	pos	897.5	555.3	230	70	X
	pos	897.5	853.5	230	60	
PTX-2	pos	881.5	539.3	230	70	X
	pos	881.5	837.5	230	60	
PTX-2sa*	pos	899.5	855.5	230	60	X
	pos	899.5	557.3	230	70	
YTX	neg	1141.5	1061.3	135	35	X
	neg	1141.5	925.5	135	60	
Homo-YTX*	neg	1155.4	1075.5	135	35	X
OH-YTX	neg	1157.4	1077.5	135	35	X
OH-Homo-YTX*	neg	1171.4	1091.5	135	35	X
AZA-1	pos	842.5	824.5	200	40	X
	pos	842.5	806.5	200	55	
AZA-2	pos	856.5	838.5	200	40	X
	pos	856.5	820.5	200	55	
AZA-3	pos	828.5	810.5	200	40	X
	pos	828.5	792.5	200	55	

*文献の情報にもとづくトランジション

表 2
MRM トランジションおよび MS 設定

結果

このメソッドの有効性は、国際的なコラボ研究により確認されています。コラボ研究は、作業部会 §64 LFGB “Phycotoxins” で実施されました。この作業部会は、独連邦消費者保護・食品安全庁 (BVL: the federal Office of Consumer Protection and Food Safety) の主催によるものです。

化合物	LOD	LOQ
¹ OA	6 µg/kg	20 µg/kg
¹ DTX-1 & 2	6 µg/kg	20 µg/kg
² AZA-1 to 3	6 µg/kg	20 µg/kg
¹ PTX-1 & 2	6 µg/kg	20 µg/kg
³ YTX	10 µg/kg	35 µg/kg

- ¹ OA、DTX-1 & 2、PTX-1 & 2 の総計に関する生ムール貝中の MRL: OA 相当で 160 µg/kg
² 各種アザスピロ酸の総計に関する生ムール貝中の MRL: AZA-1 相当で 160 µg/kg
³ 各種イェソトキシンの総計に関する生ムール貝中の MRL: YTX 相当で 1000 µg/kg

表 3

加熱してすりつぶしたムール貝に含まれる脂溶性海産毒の分析メソッドの LOD と LOQ

再現性の標準偏差は、およそ 10~35 % の範囲内でした (マトリックス、濃度、成分によって異なる)。

抽出回収率は、75~102 % の範囲内でした (成分およびマトリックスによって異なる)。

利点

- Agilent 6460 トリプル四重極 LC-MS システムと Agilent 1200 SL Rapid Resolution HPLC による海産貝毒の高選択性および高感度測定
- シンプルでコスト効率の良いサンプル前処理と、ルーチン分析で高い信頼性が得られる簡単なワークフロー
- 最新の EFSA ガイドラインに準拠
- 他の脂溶性毒素を追加できる柔軟性

実際の貝サンプルのクロマトグラム

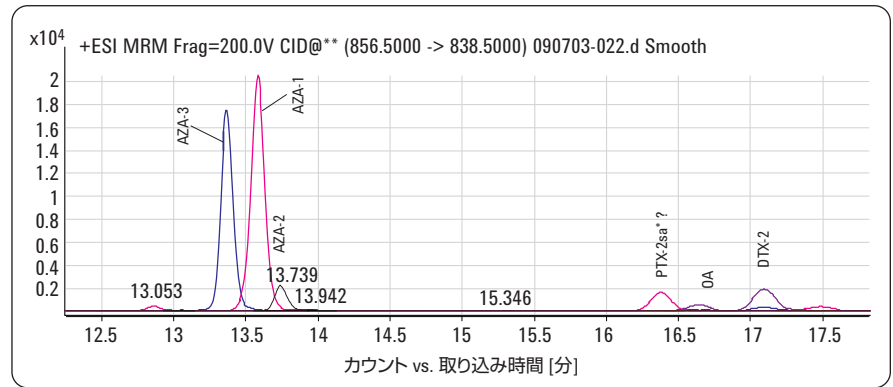


図 4

実試料ムール貝の抽出液

濃度: 96 µg/kg AZA-1、22 µg/kg AZA-2、50 µg/kg AZA-3、23 µg/kg OA、130 µg/kg DTX-2

*PTX-2sa については、文献に準拠したトランジションに暫定的に割り当て。PTX-2sa の標準は利用できません。

実際の貝サンプルのクロマトグラム

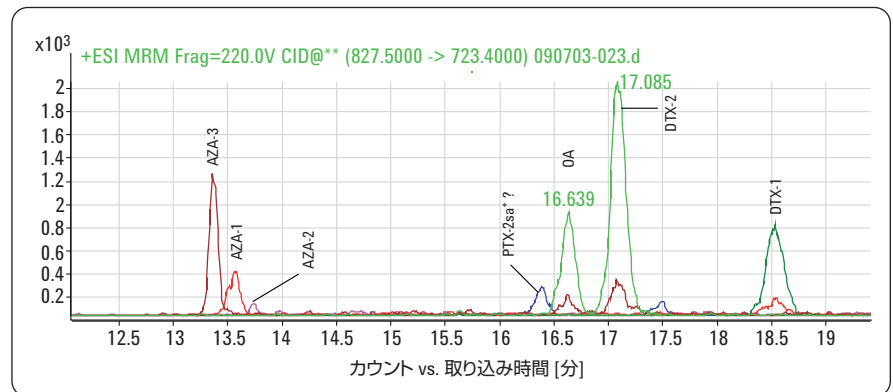


図 5

実試料ムール貝の抽出液、AZA-1~3 < LOQ 20 µg/kg

濃度: 37 µg/kg OA、120 µg/kg DTX-2、69 µg/kg DTX-1

*PTX-2sa については、文献に準拠したトランジションに暫定的に割り当て。PTX-2sa の標準は利用できません。

QC サンプルのクロマトグラム

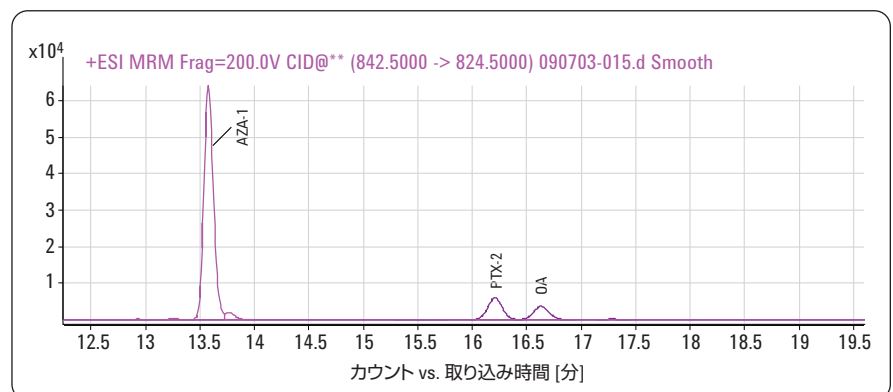


図 6

QC サンプル、AZA-1、PTX-2、OA 15 µg/kg をムール貝抽出液に添加

検量線 (マトリクスマッチ)

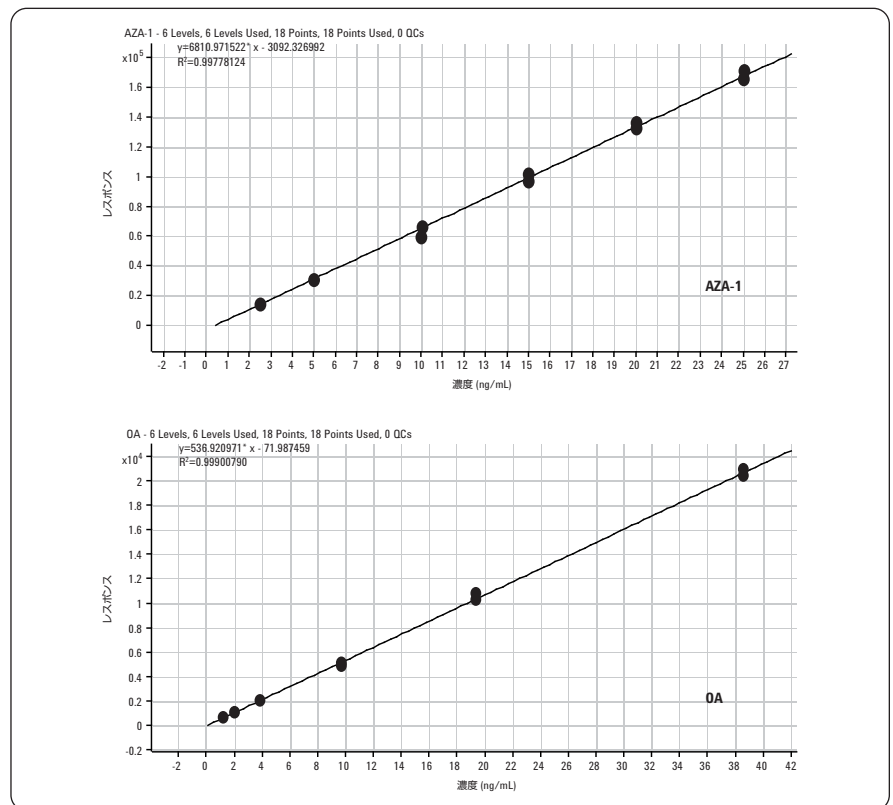


図 7
 ムール貝抽出液に添加した AZA-1 および OA の検量線、キャリブレーション範囲は
 AZA-1 2.5~25 ng/mL、OA 1.1~38 ng/mL

検量線 (メタノール中)

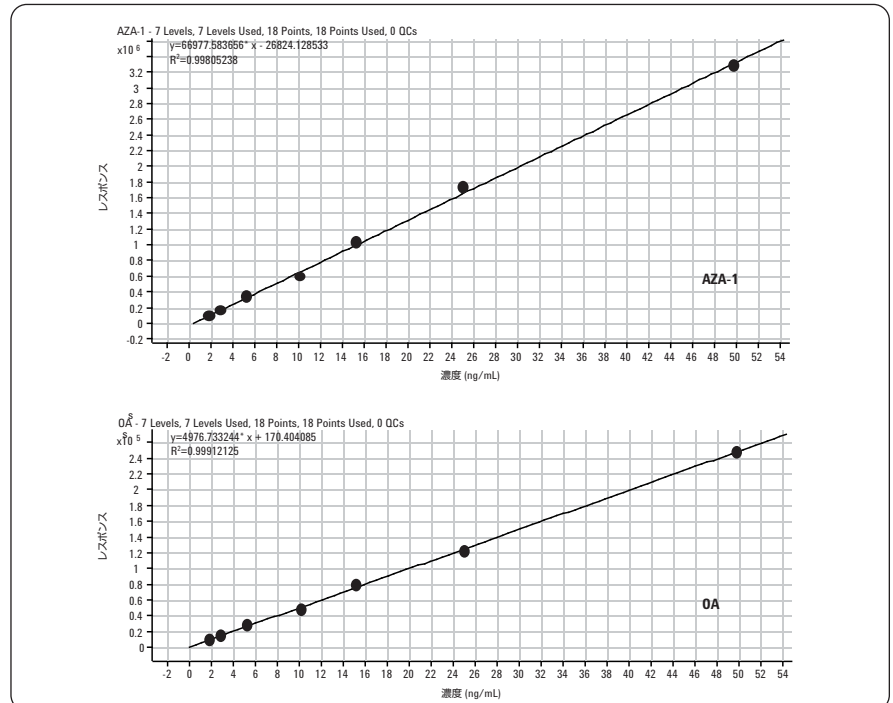


図 8
 MeOH 中 AZA-1 および OA の検量線、キャリブレーション範囲はいずれも 1.5~50 ng/mL

www.agilent.com/chem/jp

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2010
Published September 1, 2010
5990-6377JAJP

