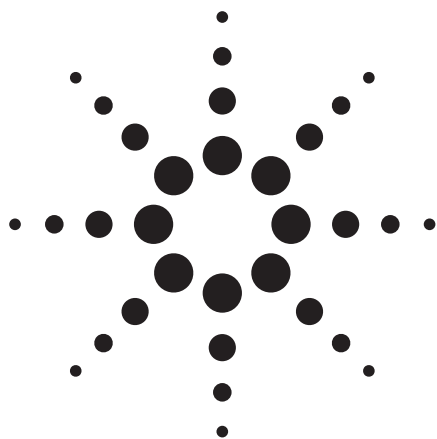




# 分析モードとセミ分取モードを備えた LC/MS システムによる DSP 毒素の同定と 単離

## アプリケーション

食品安全性

### 著者

Norbert Helle  
TeLA GmbH  
Bremerhaven, Germany

Sebastian Lippemeier  
BlueBioTech Microalgen Biotechnologie  
Ellerbek, Germany

Jürgen Wendt  
Agilent Technologies Sales and Support GmbH  
Waldbronn, Germany

### 要旨

このアプリケーションノートでは、DSP 毒素の同定と単離に使用する液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) 連結システムの機器構成と操作について説明します。分析モードでは、蛍光検出方式による LC と比べてオカダ酸 (OA) およびディノフィストキシン -1 (DTX-1) をより選択的に、感度よくモニターすることができます。サンプル調製の手間が減る一方、検出限界が 3 ~ 5 倍 (マトリックスによる) ほど低くなっています。セミ分取モードでは、質量をトリガにしたフラクションコレクタを使って渦鞭毛藻の粗抽出液から OA および DTX-1 を純度 98% 以上で単離することができます。このメソッドにより、DSP 毒素の参照標準物質が市販品として入手できるようになりました。

### はじめに

下痢性貝毒 (DSP) はホタテ貝、ムール貝、ハマグリ、カキといった二枚貝軟体動物を人が摂取した後に発生する胃腸管症候群です。症状としては、腹痛、嘔吐、吐き気、頭痛、下痢、悪寒、熱などがあります。DSP 毒素は、OA および

ディノフィストキシン (DTX) を含むオカダ酸 (OA) グループ、ペクテノトキシングループ (PTX)、およびイエツトキシングループ (YTX) の 3 つのグループに分類することができます。

OA グループの中で、DSP 大量発生の原因となる主な毒素は OA と DTX-1 です。この大量発生によって、多くの国で海洋性生物毒素のコントロールプログラムが策定されるようになりました。ドイツでは現在、ムール貝の DSP 毒素残留物は 2000 年 6 月 8 日の魚衛生令 (Fischhygiene-Verordnung) によって規制されています。この法令では、動物実験 (マウスバイオアッセイ) あるいは化学分析実験によって、貝を検査して毒素が存在するかどうか確認することが義務づけられています<sup>1, 2</sup>。蛍光検出による液体クロマトグラフィーは確立された分析法ですが、この分析をする場合そのままでは蛍光を発しない DSP 毒素を誘導体化して蛍光着色する必要があります。エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) を組み合わせた LC/MS を使用すれば、もっと簡単なサンプル調製でより高い感度、選択性を達成することができます。

DSP 毒素のモニターを行う分析メソッドにまつわる最大の問題点は、純度の高い標準物質が入手できるかどうかです。セミ分取モードでは、質量をトリガにしたフラクションコレクタを使って渦鞭毛藻の粗抽出液から DSP 毒素である OA および DTX-1 を単離することができます。このアプリケーションノートでは、分析およびセミ分取作業を行う LC/MS 連結システムの装置構成、設定、操作について説明します。



Agilent Technologies

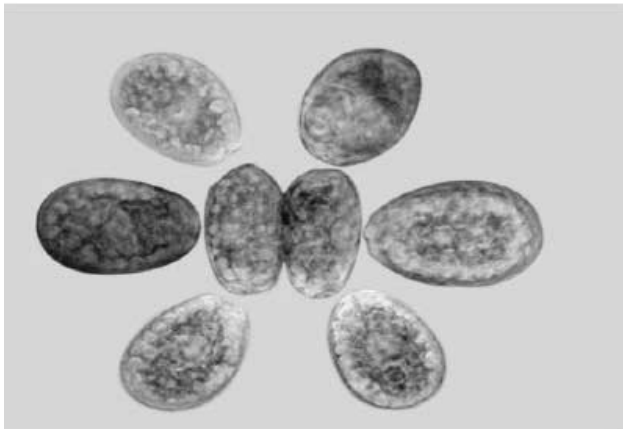


図 1. 顕微鏡で見た渦鞭毛藻

## 実験

この研究で分析した DSP 毒素は図 2 に示されています。分析は、分析モードとセミ分取モードの 2 つのモードで実行しました。

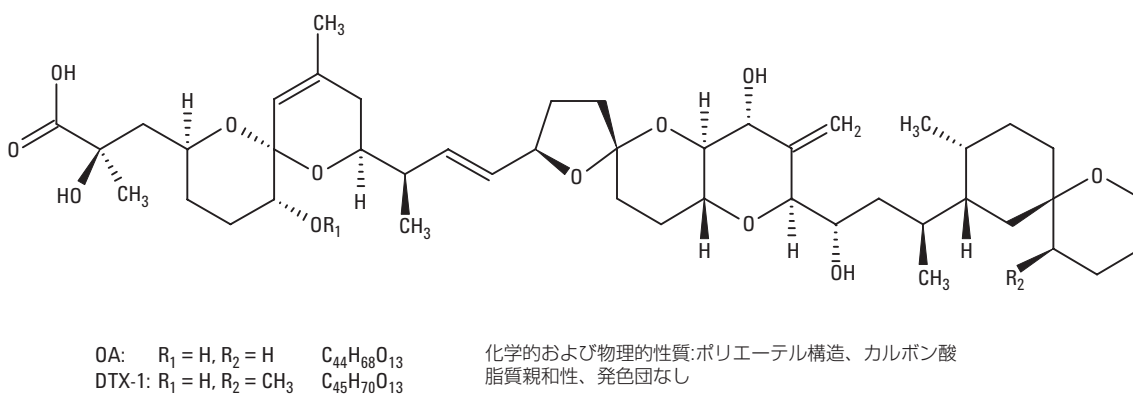


図 2. DSP 毒素

### LC/MS メソッドの詳細 – 分析

#### LC 条件

|         |                                            |
|---------|--------------------------------------------|
| 装置:     | Agilent 1100 HPLC (クォーターナリポンプ)             |
| カラム:    | 150 × 3.0 mm ZORBAX SB-C18, 5 μm           |
| 移動相:    | A 水 (0.1%のギ酸添加)<br>B メタノール                 |
| グラジエント: | 0 分で B 液20%<br>5 分で B 液20%<br>20 分で B 液80% |
| 停止時間:   | 28 分                                       |
| ポストタイム: | 4 分                                        |
| 流量:     | 0.6 mL/min                                 |
| 注入量:    | 10 μL                                      |

#### MS 条件

|             |                      |
|-------------|----------------------|
| 装置:         | Agilent LC/MSD       |
| ソース:        | 正負切り替え ESI           |
| 乾燥ガス流量:     | 12 L/min             |
| ネブライザ:      | 60 psig              |
| 乾燥ガス温度:     | 350 °C               |
| $V_{cap}$ : | 3000 V (正イオンおよび負イオン) |

## LC/MS メソッドの詳細 – セミ分取

### LC 条件

|              |                                                       |
|--------------|-------------------------------------------------------|
| 装置 1:        | Agilent 1100 HPLC (クォーターナリポンプ)                        |
| カラム:         | 50 × 9.4 mm ZORBAX SB-C18、5 μm                        |
| 移動相:         | A 水 (0.1%のギ酸添加)<br>B メタノール                            |
| グラジエント:      | 0 分で B 液20%<br>5 分で B 液20%<br>20 分で B 液80%            |
| 停止時間:        | 28 分                                                  |
| ポストタイム:      | 4 分                                                   |
| 流量:          | 7.0 mL/min                                            |
| 注入量:         | 100 μL (マルチ吸引モードで 250 μL)                             |
| 装置 2:        | Agilent 1100 HPLC (アイソクラティックポンプ)<br>メークアップフロー用        |
| 流量:          | 0.8 mL/min (50% H <sub>2</sub> O + 50% MeOH + 0.1%ギ酸) |
| アクティブスプリッター: | スプリット比 271 : 1                                        |

### MS 条件

|                    |                |
|--------------------|----------------|
| 装置:                | Agilent LC/MSD |
| イオン源:              | 負イオン ESI       |
| 乾燥ガスフロー:           | 12 L/min       |
| ネブライザ:             | 60 psig        |
| 乾燥ガス温度:            | 350 °C         |
| V <sub>cap</sub> : | 3000 V (プラス)   |

### MSD フラクションコレクタ設定

FC モード: メソッドターゲット質量を使用。アダクトイオン: (M-H)<sup>-</sup>

## 結果と考察

### 分析作業

LC/MS システム (図 3) の分析モードで、正負モード切り替え ESI を使って DSP 毒素をモニターしました。正イオンモードでは、負イオンモードの 4 倍の感度を示しました (図 4)。0A および DTX-1 のマススペクトルでは、プロトン化分子イオンではなくナトリウム化分子イオンが生成されていること、H<sub>2</sub>O を継続的に失うことによって形成された [M+H-nH<sub>2</sub>O] (n=1 ~ 4) というこれらの化合物に特徴的なフラグメントイオンの存在が示されています。負イオンモードでは [M-H]<sup>-</sup> イオンだけが検出されます。DSP 毒素のモニタリングにおいて、LC/MS は蛍光検出方式 (図 5) LC よりも選択性と感度で 3 ~ 5 倍上回ることがわかりました。

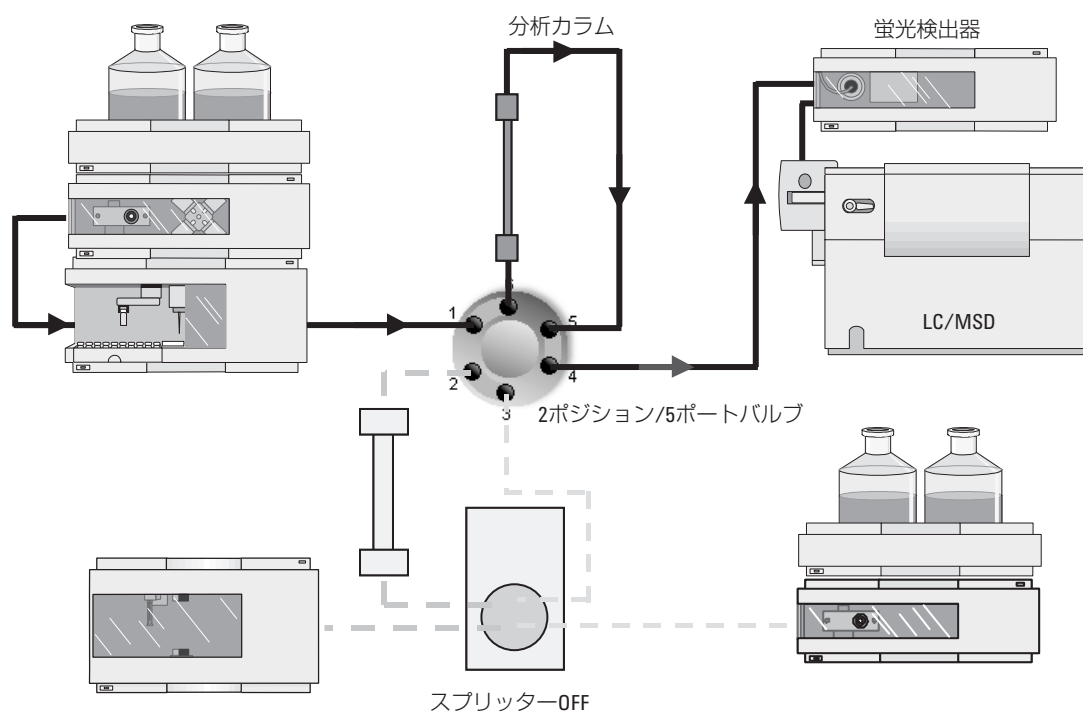


図 3. システム構成図(分析作業)

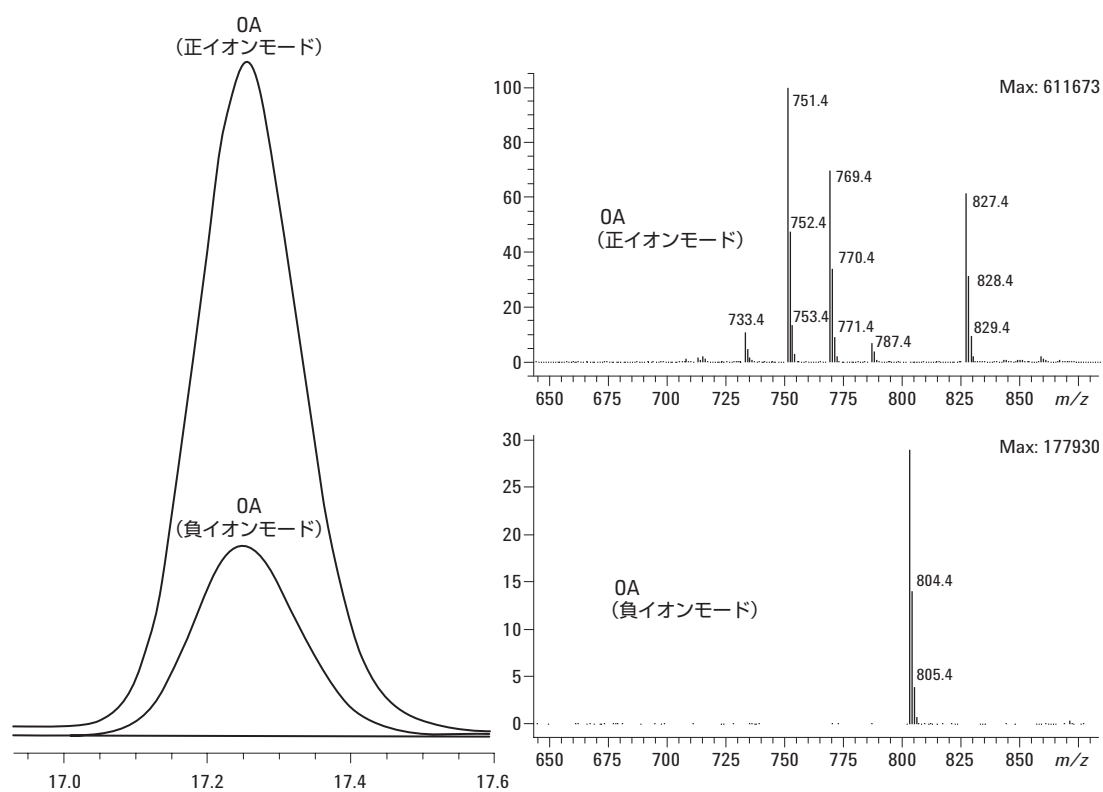


図 4. OA の LC/MS 分析

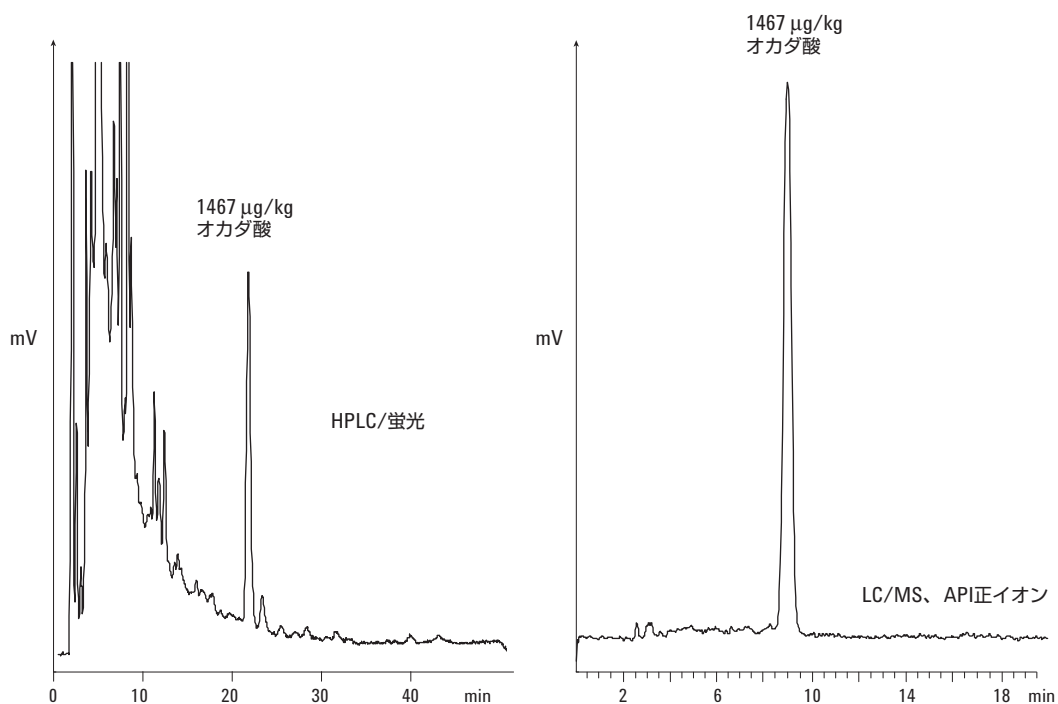


図 5. 貝の DSP 毒素の比較分析

### セミ分取作業

システムをセミ分取モードに切り替えることによって参照標準物質を得ることができました(図 6)。バルブは 2 の位置に切り替わります。

メインフローはセミ分取カラムに流れ、その後スプリッターを通してフラクションコレクタ(AS)に達します。メークアップフローはスプリッターを通り、そこでメインフローからいくつかの化合物を取り込んで質量選択性検出器(MSD)に達します。

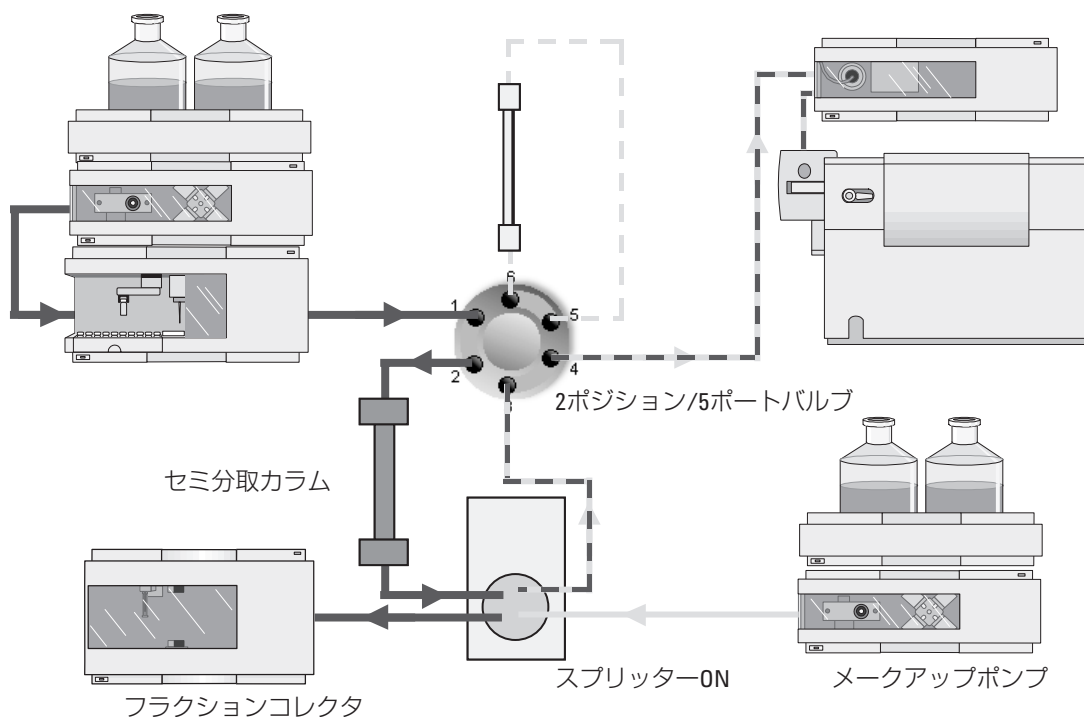


図 6. システム構成図 (セミ分取作業)

質量をトリガにしたフラクションコレクタ(図 7)を使って、渦鞭毛藻の粗抽出液から OA と DTX-1 のほかにマスペクトル上で類似の特徴を備えた新しい OA 毒素も単離することができました。渦鞭毛藻のメタノール抽出物を、質量をトリガにしてフラクション捕集することにより、OA、DTX-1、未知の毒素という 3 つのフラクションを得ることができました。MS<sup>n</sup> の実験から、未知の毒素の分子構造は OA および DTX-1 に非常に類似していることがわかります。

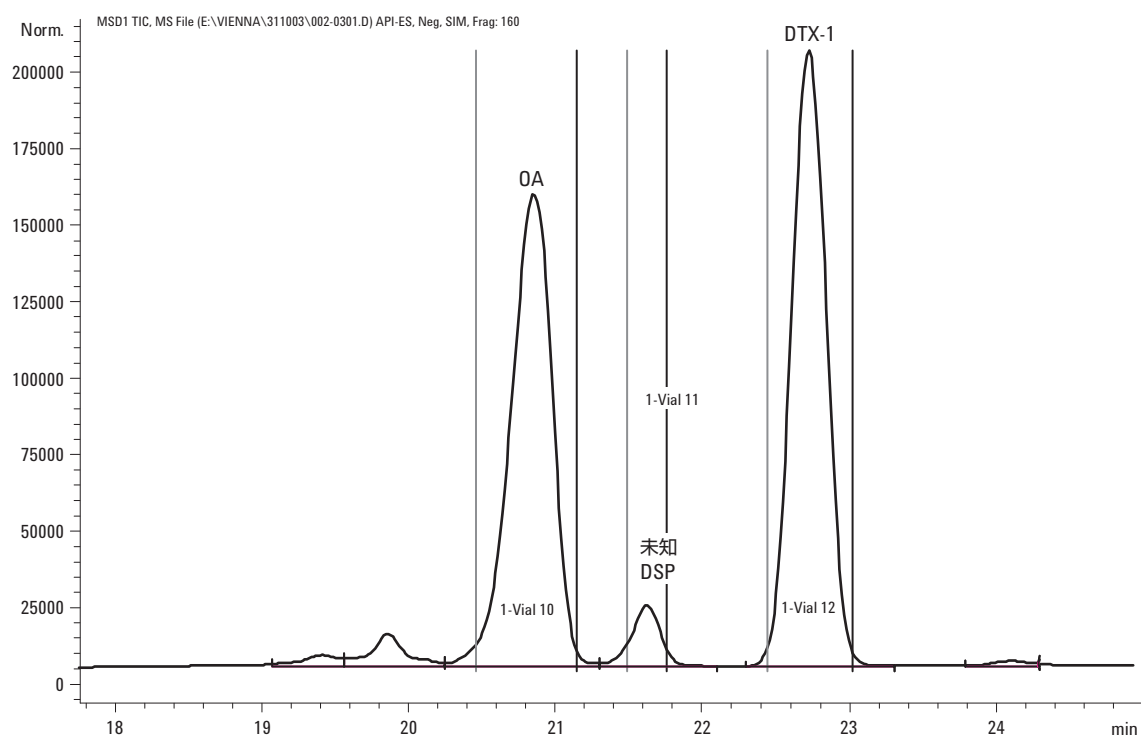


図 7. 質量をトリガにした DSP 毒素のフラクション捕集

濃度が低いため、目的化合物はプーリングと呼ばれるプロセスを使用して同じサンプルの複数の注入から収集する必要がありました(図 8)。捕集されたフラクションを再分析した結果、98 % 以上の純度が達成されました。頑健性の高いこのメソッドによって(図 9)、DSP 毒素の参照標準物質が市販品として販売されるようになりました。

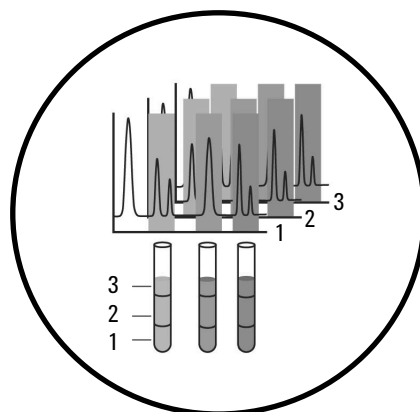
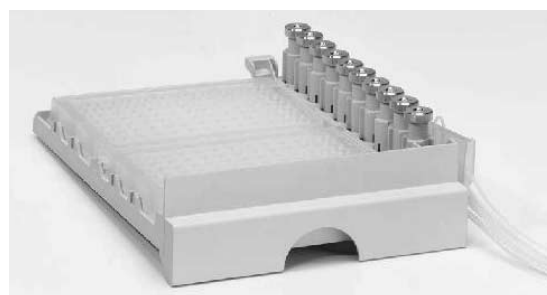
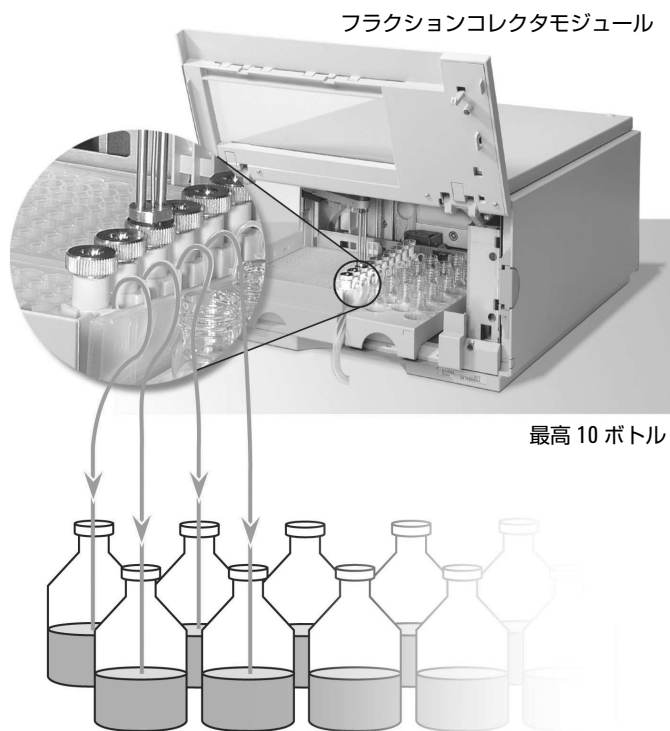


図 8. プーリング

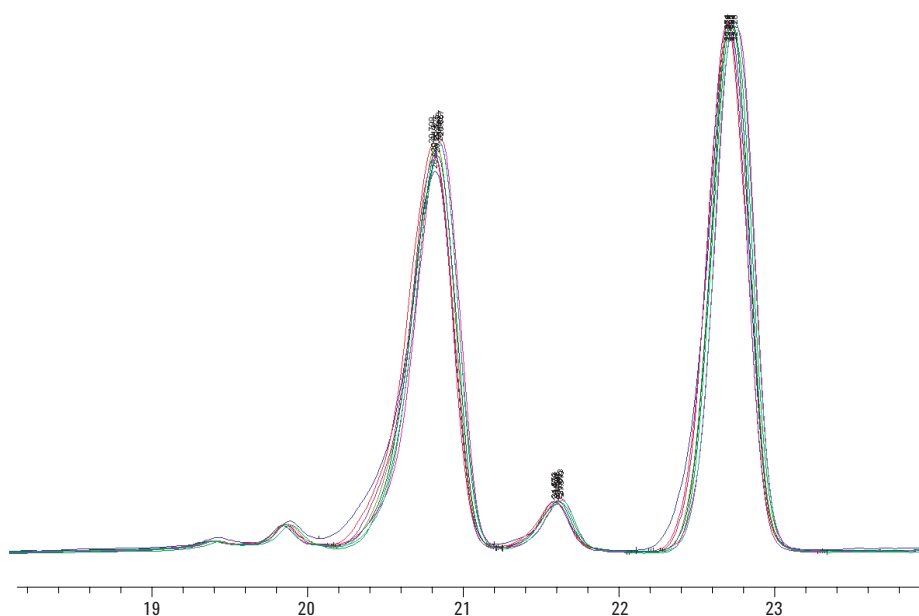


図 9. メソッドの頑健性 - 10 回の質量をトリガにしたフラクション捕集を重ね合わせた図

## 結論

このアプリケーションノートでは、DSP 毒素を同定、単離するための LC/MS 連結システムの機器構成と動作について説明しました。分析モードでは、蛍光検出方式による LC よりも OA と DTX-1 をより選択的に、より感度よくモニタリングすることができました。サンプル調製の手間が減る一方、検出限界を 3 ～ 5 倍 (マトリックスによる) 低くすることができました。セミ分取モードでは、質量をトリガにしたフラクションコレクタを使って渦鞭毛藻の粗抽出液から OA および DTX-1 を純度 98 % 以上で単離することができました。このメソッドによって、DSP 毒素の参照標準物質が市販されるようになりました。

## 参考文献

1. M.A. Quilliam, A. Gago-Martinez, and J.A. Rodriguez-Vasquez, "Improved method for preparation and use of 9-anthryldiazomethane for derivatization of hydroxycarboxylic acids - Application to diarrhetic shellfish poisoning toxins", (1988), Journal of Chromatography A, 807, 229–239.
2. A.G. Bauder; A.D. Cembella, V.M. Bricelj, and M.A. Quilliam, "Uptake and fate of diarrhetic shellfish poisoning from the dinoflagellate *Prorocentrum lima* in the bay scallop *Argopecten irradians*", (2001), Marine Ecol. Progr. Ser., 213, 39–52.

## さらに詳しくは...

本アプリケーションノートに関するご質問は、  
Juergen\_Wendt@Agilent.comまでご連絡ください。

お問い合わせは : 0120-477-111  
横河アナリティカルシステムズ株式会社  
〒192-0033 東京都八王子市高倉町 9-1

Agilent は、この文書に含まれる誤り、あるいは本資料の提供、履行、使用に関連して生じた付随的または間接的な損害について一切の責任を負いません。

本文書に記載の情報、説明、および仕様は、予告なく変更されることがあります。

© Agilent Technologies, Inc. 2004

Printed in the USA  
May 24, 2005  
5989-2912JAJP



Agilent Technologies