

Deteksjon og kvantifisering av lipofile
algetoksiner i skjell ved
LC-MS/LC-MSMS

**Trude Sophie Kristensen
Guldberg**

Cellebiologi for medisinsk/teknisk personell

Innlevert: desember 2013

Hovedveileder: Åse Krøkje, IBI

Medveileder: Berit H. Falch, Avdeling for klinisk farmakologi, St Olavs Hospital

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Institutt for biologi

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Avdeling for Klinisk Farmakologi ved St Olavs Hospital i Trondheim. Avhandlingen er del av et toårig mastergradstudium med studieretning Cellebiologi for medisinsk teknisk personell ved Institutt for Biologi, Fakultetet for Naturvitenskap og Teknologi ved Norges Teknisk Naturvitenskaplig Universitet (NTNU) i Trondheim.

I forbindelse med dette arbeidet har flere personer vært involvert, og jeg vil spesielt få takke min tidligere overordnede og første faglige veileder Kjell Aarstad som oppmuntret meg til å begynne på mastergradsstudiet. Samtidig ønsker jeg å rette en stor takk til min nåværende overordnede Berit Hasle Falch og avdelingssjef Trond Aamo som i stor grad har lagt til rette for at jeg har kunnet gjennomføre mastergraden. Jeg ønsker også å takke Berit for at hun stilte opp som faglig veileder for meg da Kjell bestemte seg for og tre inn i pensjonistenes rekker. Det var sporty gjort, og tusen takk for konstruktive tilbakemeldinger under skriveprosessen. Veileder ved NTNU har vært Åse Krøkje, som jeg ønsker å takke for positiv imøtekommelse og god støtte.

En stor takk rettes til teamet for analyse av algetoksiner på farmakologen; Anne-Lill Olsen, Tone Hatlen, Elin Nilssen, Siri Gotvassli og Beate Skomsvoll. Dere har hjulpet meg både ved å analysere utallige prøver samt deltatt i gjennomføringen av en del av forsøkene. Jeg vil også takke min gode venn og kollega som jeg deler kontor med; Wenche Rødseth Brede, for at du alltid stiller opp for meg og gjør ditt ytterste for å besvare mine spørsmål samt alle gode faglige diskusjoner. Til alle andre gode kolleger på farmakologen; takk for deres positivitet og for støttende ord underveis.

Til slutt en spesiell takk til min nærmeste familie; Chris og mine barn Magnus, Maja og Casper, for at dere har utvist stor tålmodighet og fleksibilitet for at jeg skulle kunne gjennomføre dette studiet. Jeg gleder meg til og endelig kunne svare "ja" på spørsmålet om jeg snart er ferdig med master'n!

Trondheim, 29.11.2013

Trude Sophie Kristensen Guldborg



Begrep og forkortelser

ADAM	9-antryldiazo-metane; derivatiseringsreagens
AKF	Avdeling for Klinisk Farmakologi, St Olavs Hospital
amu	Atomisk masse unit; $1/12$ av massen til et atom av ^{12}C
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APCI	Kjemisk ionisering ved atmosfærisk trykk
ASP	“Amnesic Shellfish Poisoning”; hukommelsestapgivende algetoksiner
Asymmetrifaktor	Parameter som beskriver hvor symmetrisk fasong en kromatografisk topp har i forhold til 1,0 (Gaussisk form)
Aza	Azaspiracid; lipofil algetoksingruppe
Blankprøve	Prøve som tidligere er testet negativ og ikke inneholder ønsket analytt
Bruksløsning	Fortynnet standardløsning som inneholder en eller flere analytter
CAV	Celle-akseleratorspenning i MSMS
CE	Kollisjonsenergi i MSMS
CRM	“Certified Reference Materials”; sertifisert referansemateriale
CRM DSP Mus-b	Sertifisert referansekontroll for DSP i blåskjell
DA	Domoinisyre, algetoksin som tilhører ASP-gruppen
Datterion	Se produksjon
DHO	Deoksykolsyre
dMRM	Dynamisk multipel reaksjon monitorering; monitorering av flere spesifikke analyttoverganger innenfor eget retensjonstidsvindu samtidig ved MSMS-analyser
DSP	“Diarrhetic Shellfish Poisoning”; diarègivende algetoksiner. Består av OA og DTX
DTX	Dinofysistoksin; lipofilt algetoksin, del av DSP-gruppen
Dveletid	“Dwell time”; tiden som trippelkvadrupol trenger for å analysere en enkel MRM-overgang. Parameter i LC-MS/LC-MSMS.
ESI	Elektrospray ionisering
ESTD	Kalibreringskuve konstruert på bakgrunn av analyttrespons mot kjent konsentrasjon i standardprøver
EURLMB	Europeisk referanselaboratorium for marine biotoksiner
EU-SOP	<i>EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of Lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MSMS</i>

eV	Elektronvolt; unit for kollisjonsenergi i MSMS
FIA	“Flow injection analysis”. Brukes ved metodeutvikling eller metodetilpasning for å optimalisere utvalgte instrumentparametere for ønsket analytt.
Forstøvergass	“Nebulizer”; gasslevering som reduserer LC-eluenten til en fin spray i ionekilden på MS-instrument
FWHM	“Full width at half maximum”; toppbredde ved halv høyde. Grunnlinjen dras under toppen, og det trekkes en horisontal linje ved toppens maksimum. Deretter trekkes en vertikal linje mellom grunnlinjen og topplinjen. Denne linjen deles i to ved å trekke en horisontal linje ved halv høyde.
GC	Gasskromatografi
Grunnlinje	Den delen av kromatogrammet som viser detektorresponsen når bare mobilfase eluerer ut av den analytiske kolonnen
GYM	Gymnodiminer; lipofilt algetoksin
HAB	“Harmful algal blooms”; forekomst av algeoppblomstring med giftige eller skadelige phytoplankton. Er ofte forbundet med ulike typer av skalldyrforgiftninger.
Hep-PBI	1-n-Heptyl-2-fenylbenzimidazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IonTrap	Ionefelle massespektrometer
IS	Internstandard
ISTD	Kalibreringskuve konstruert på bakgrunn av relativt forhold mellom analyttrespons og internstandardrespons mot kjent konsentrasjon i standardprøver
Kappegass	“Sheat gas”; gasslevering til ionekilden i MSMS som fokuserer forstøvergassen
KI	Konfidensintervall
Kvalifiseringsion	Molekylspesifikke ion som brukes som bekreftelse for riktig identitet på kvantifiseringsion
Kvantifiseringsion	Molekylspesifikke ion som vanligvis brukes til å kvantifisere analyttkonsentrasjonen
LC	Liquid Chromatography; væskkromatografi

LC-MS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry; væskekromatografi i kombinasjon med massespektrometri
LC-MSMS	Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry; væskekromatografi i kombinasjon med masseanalysator koblet i tandem
LLE	“Liquid-Liquid Extraction”; væske-væske ekstraksjon
log P	Fordelingskoeffisient, et mål på hvor godt et stoff fordeler seg mellom fett og vann som nøytralt molekyl
MBA	“Mouse BioAssay”; biologisk deteksjon av lipofile toksiner ved bruk av mus/rotter
ME	Matrikseffekt; en uønsket effekt som oppstår under analyse på grunn av sammensetning i prøvematerialet som analyseres
MF	Mobilfase i et kromatografisk system
MMS	Matriksmatchende standarder; standardrekke laget i samme matriks som prøvene som skal analyseres
MMS B	Standardrekke laget i blåskjell
MMS K	Standardrekke laget i kamskjell
Moderion	Se utgangsjon
MRM	Multipel reaksjon monitorering; måling av spesifikke analyttoverganger inndelt i tidssegment ved MSMS-analyser
ms	Millisekund
MS	Singelkvadrupol massespektrometer
MSMS	Trippelkvadrupol massespektrometer
MS “duty cycle”	Arbeidssyklusen for den del av ioner av en bestemt m/z produsert i ionekilden som blir effektivt analysert
MTL	Multitoksinløsning; bruksløsning som inneholder flere toksiner i kjent konsentrasjon
m/z	Molekylmasse/ladnings-forhold
Nullprøve	Prøve med ukjent konsentrasjon av ønsket analytt
OA	Okadasyre; lipofilt algetoksin, del av DSP-gruppen
PBI	Fenylbenzimidazol
Pent-PBI	1-n-Pentyl-2-fenylbenzimidazol
pK_a	Dissosiasjonskonstanten, et mål på styrken av en syre eller en base
Produksjon	Ion dannet som produkt fra en reaksjon som involverer et bestemt utgangsjon.

PSP	“Paralytic Shellfish Poisoning”; paralyserende algetoksiner
PTX	Pektenotoksin; lipofilt algetoksin
Q-TOF	MSMS koblet til TOF (time-of-flight)
Q-Trap	MSMS koblet til ionefelle (IonTrap)
Recovery	Gjenvinning/utbytte av en substans ved ekstraksjon eller analyse
Retensjonstid	Den tiden det tar for et stoff å vandre gjennom den analytiske kolonnen
RF	Radiofrekvent spenning i kvadrupolen
SIM	“Selected ion monitoring”; modus i LC-MS hvor det velges ut enkelte ioner som slipper gjennom massefilteret
SNR	“Signal-to-Noise Ratio”; signal-til-støy ratio; forholdet mellom signal og støy på grunnlinje i tilknytning til en kromatografisk topp
SPE	“Solid Phase Extraction”; fast-fase ekstraksjon
SPX	Spirolider; lipofilt algetoksin
SRM	“Selected-reaction monitoring”; deteksjon av produksjon i LC-MSMS. Ligner i prinsippet SIM på LC-MS, men er mer spesifikt da det kun er bestemte datterion av bestemte moderion som detekteres.
SSR	“Solvent-to-Sample Ratio”; forholdet mellom løsemiddel og prøvemateriale i en prøve før ekstraksjon
Stamløsning	Opprinnelig standardløsning/referanseløsning som inneholder en analytt
Syklustid	“Cycle time”; den tiden som kreves for å oppnå et massespekter eller annen massespektrometrisk datamengde i et MS-eksperiment
t_R	Retensjonstid
TOF	“Time-Of-Flight”; deteksjonsprinsipp hvor molekylers flygetid måles og relateres til eksakt masse
Toppbredde	Bredden av en kromatografisk topp som vanligvis måles ved grunnlinjen ved å trekke tangentene til avbøyningspunktene på begge sider av den Gaussiske kurven som representerer toppen.
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
Utgangsion	Ion som reagerer og danner bestemte produksjoner eller gjennomgår spesifisert nøytrale tap. Kalles også moderion. Reaksjonen kan være molekylær dissosiasjon for å danne produksjoner, eller kun omfatte en forandring i antall ladninger.
V	Volt (spenning)
YTX	Yessotoksin; lipofilt algetoksin

Sammendrag

Mikroskopiske plantealger kan danne marine algetoksiner i svært lave konsentrasjoner, og disse algetoksinene kan under gitte forhold akkumulere i skjell. I næringsmiddelsammenheng kan inntak av giftige skjell føre til alvorlige forgiftninger eller død.

Det finnes fire ulike grupper av marine algetoksiner: diarégivende, paralyserende, nevrotoksiske og det såkalte hukommelsestaptoksinet. De fettløselige algetoksinene – okadasyre, dinofystoksiner, azaspiracid toksiner, pektenotoksiner, yessotoksiner, spirolider og gymnodiminer – danner en gruppe komponenter som kalles lipofile algetoksiner. I henhold til regelverkskravet fra myndighetene for å sikre folkehelsen, skal forekomster og konsentrasjoner av lipofile algetoksiner i skjell overvåkes. Inntil nylig har biologisk testing i mus vært referansemetoden innen EU for påvisning av toksiske nivåer av lipofile algetoksiner i skjellmat. Dette er nå endret slik at det skal benyttes kjemiske analysemetoder hvor væskekromatografi kombineres med tandem-massespektrometri (LC-MSMS).

Målet med denne oppgaven var å gjøre en vurdering av LC-MSMS-metodene som er foreslått i *EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of Lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MSMS* (EU-SOP). To av metodene som beskrives i EU-SOP (sur og basisk metode) ble sammenlignet med pH-nøytral metode (LC-MS). Den sistnevnte er siden 2007 blitt benyttet rutinemessig ved Avdeling for Klinisk Farmakologi, St Olavs Hospital.

For de fleste toksinene var alle kvalitetskriterier ved de tre undersøkte elueringsbetingelsene i samsvar med hva EU-SOP anser som akseptabelt ved kvantitativ analyse. Det ble påvist forskjeller mellom metodene, både når det gjaldt kromatografisk toppfasong, linearitet og endringer i instrumentfølsomhet i løpet av analyseserien, så vel som signal-til-støy forhold. Kromatografiske betingelser hadde relativt stor effekt på følsomhet og matrikseffekt. pH-nøytral metode viste generelt minst matrikseffekt, selv om matriksstyrken var høyest i ekstraktene som ble analysert på LC-MS. Både sur og basisk metode krever tiltak for å håndtere matrikseffekt for de fleste toksinene og dermed redusere kvantifiseringsfeil.

Denne studien viste at matrikseffekt kan være artsavhengig, og at graden av matrikseffekt kan variere med årstid. Variasjon i matrikspåvirkning innen kamskjell relatert til de undersøkte årstidene, var større enn variasjonen innen blåskjell. Resultatene tyder på at valg av kamskjell som blankmateriale for standardkurve bør følge inneværende sesong. Det ble utført

sammenligning av toksinkonsentrasjon i naturlig kontaminerte skjell ved standardaddisjon og kvantifisering ved bruk av matriksmatchende standardkurve. Resultatene viste at matriksmatchende standarder i stor grad eliminerte matrikseffekten. I tillegg antydte resultatene at toksinestimering i blåskjell og kamskjell kan gjøres ved å bruke samme kalibreringsmatriks, selv om egen matriks som kalibreringsmatriks ga noe bedre resultater for nøyaktighet og presisjon. Undersøkelse i forbindelse med innføring av potensielle internstandarder viste utfordringer i forhold til å finne egnede forbindelser som er i stand til å kompensere for responsvariasjon og matrikseffekt ved analyse av lipofile algetoksiner. Lovende resultater ble indikert for enkelte toksiner, men ytterligere undersøkelser er nødvendig for å kunne konkludere.

Alle tre metodene er egnet for bestemmelse av marine algetoksiner. Imidlertid må matrikseffekt vurderes nøye og tas i betraktning før kvantifisering av toksininnhold. Total analysetid ble betydelig redusert ved bruk av LC-MSMS-metodene. Muligheten ved bruk av dynamisk MRM som sørger for rask polaritetsbytte, fjerner kravet til full grunnlinjeseparasjon i tillegg til å gi høy sensitivitet ved analyse av komplekse prøver som inneholder mange analytter i lav konsentrasjon i ulike matrikser. Likevel må enkelte kompromisser ofte gjøres i analytiske metoder som inkluderer mange forbindelser, og valget av en rutinemetode for toksinovervåking bør gjøres med vekt på forventet toksinprofil i skjellene.

Abstract

Marine biotoxins are formed by microscopic plankton algae of several genera and typically at very low concentrations. They can accumulate in bivalve molluscs and potentially reach toxic doses. The consumption of contaminated shellfish can lead to human poisoning or even death.

There are four different types of shellfish poisoning; Diarrhetic, paralytic, neurotoxic and amnesic shellfish poisoning. The lipid-soluble biotoxins – okadaic acid, dinophysistoxins, azaspiracids, pectenotoxins, yessotoxins, spirolides and gymnodimine – form a class of compounds known as lipophilic toxins. To ensure consumer protection, monitoring of lipophilic toxins in shellfish is a regulatory requirement. Until recently, the EU reference method for the detection of lipophilic toxins was a qualitative mouse bioassay. Under current EU regulations the mouse bioassay has been replaced with chemical analysis methods by the use of liquid chromatography coupled with tandem-mass spectrometry (LC-MSMS).

The aim of this study was to make an assessment of the LC-MSMS methods as stated in *EU Harmonised Standard Operating Procedure for Determination of Lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MSMS* (EU-SOP). Two of the gradient methods (acidic and alkaline chromatographic conditions) were compared with the pH-neutral method (LC-MS), formerly used as the chemical method at Department of Clinical Pharmacology, St Olavs Hospital.

All quality control criteria for the results were in accordance with the EU-SOP for acceptance for quantitative analysis of most toxins at all elution conditions. However, differences were detected between the methods in terms of chromatographic peak shapes, linearity and changes in instrument sensitivity during the analytical series as well as signal-to-noise ratios.

Chromatographic conditions had a relatively strong effect in relation to sensitivity and matrix effect. pH-neutral method proved generally least pronounced matrix effect even though the matrix strength was higher in the crude extracts analyzed by LC-MS. Both acidic and alkaline methods require actions to address the matrix effect associated with quantification errors for most toxins.

This study showed that matrix effects may be species-dependent, and the degree of effect may vary with season. The matrix effects in scallops were more prone to seasonal variations, suggesting that the choice of blank material should follow the current season. Experiments performed on naturally contaminated shellfish samples by comparison of standard addition test results and toxin concentrations quantified by using matrix matching standards, showed

that this strategy largely eliminated the matrix effect. The results also suggests that the estimation of toxin levels in mussels and scallops by using the same calibration matrix is achievable, even though a calibration curve based on its own matrix gave better results for accuracy and precision for most compounds. Moreover, studies in relation to introduction of potential internal standards illustrated the challenge finding suitable compounds which are able to compensate for response variations and matrix effects. Promising results were obtained for some toxins, but further investigation is necessary to conclude.

The methods are suitable for quantification of marine biotoxins. However, the matrix effects must be assessed and taken into account before quantification. Total runtime was significantly reduced in the LC-MSMS applications. The ability to benefit dynamic MRM which enables fast polarity switching, eliminates the need for complete baseline separation in addition to provide high sensitivity in analysis of complex samples containing many different analytes in low concentration in different matrices. Nevertheless, compromises must usually be entered into analytical methods which include numerous analytes. In addition, the choice of a routine monitoring method should be made with emphasis on the toxin profile expected in the shellfish samples.

Figurer og tabeller

Figurer

1.1	Molekylstrukturer for fem toksingrupper innenfor lipofile algetoksiner.....	4
1.2	Molekylet DTX-1- på uladet og ladet form.....	9
1.3	Skisse over standard elektropray ionekilde og JetStream ionekilde.....	10
1.4	Skisse over kvadrupolen i massespektrometer.....	12
1.5	Prinsipp for trippelkvadrupol masseanalysator.....	13
1.6	Sammenligning av MRM og dMRM.....	14
1.7	Illustrasjon over mulig årsak for ionesuppresjon i elektropray-ionisering.....	18
1.8	Molekylstruktur for fosfatidylcholin og lysosofosfatidylcholin og eksempel på monitorering av m/z 184 > 184 ved analyse på LC-MSMS.....	20
1.9	Molekylstruktur for pent-PBI, hep-PBI og DHO.....	24
3.1	Flytskjema for ekstraksjon av lipofile toksiner fra skjellmat.....	31
3.2	Kromatogram og elueringsrekkefølge i pH-nøytral metode.....	33
3.3	Kromatogram og elueringsrekkefølge i sur metode på LC-MSMS.....	35
3.4	Kromatogram og elueringsrekkefølge i basisk metode på LC-MSMS.....	36
3.5	Kromatogram og elueringsrekkefølge for internstandarder i pH-nøytral metode.....	37
3.6	Kromatogram og elueringsrekkefølge for internstandarder i basisk metode.....	38
4.1	Signal-til-støy ratio ved laveste standard for pH-nøytral, sur og basisk metode.....	48
4.2	Sammenligning av arealrespons for lipofile algetoksiner analysert ved metoder på LC-MSMS med referansem metode på LC-MS ved lineær regresjon.....	51
4.3	A: Sammenligning av høyderespons for YTX for LC-MSMS-metoder med referansem metode (LC-MS) B: Sammenligning av høyderespons for Aza-3 basert på LC-MSMS hvor sur metode er satt til referansem metode.....	52
4.4	Standardiserte residualer for arealbasert respons for OA, DTX-1, Aza-1 og PTX-2 plottet mot tid (min) for injeksjonstidspunkt.....	53
4.5	Standardiserte residualer for arealbasert respons for Aza-2, Aza-3, SPX-1 og GYM plottet mot tid (min) for injeksjonstidspunkt.....	54
4.6	Responsdrift for YTX og Aza-1 korrelert med forskjell mellom injeksjonstidspunkt.....	58
4.7	Responsdrift for YTX og SPX-1 korrelert med asymmetrifaktor.....	58
4.8	Responsdrift for DTX-1, YTX og SPX-1 korrelert med toppbredde.....	58
4.9	Responsdrift for OA og YTX korrelert med FWHM.....	59

4.10	Matrikseffekt i blåskjell og kamskjell ved pH 3, pH 6,8 og pH 11 framstilt som beregnet ME-verdi.....	62
4.11	Matrikseffekt ved pH 3 illustrert ved forholdet mellom standardkurver laget i metanol og matriksmatchende standarder (MMS) av blåskjell og kamskjell.....	63
4.12	Matrikseffekt ved pH 6,8 illustrert ved forholdet mellom standardkurver laget i metanol og matriksmatchende standarder (MMS) av blåskjell og kamskjell.....	63
4.13	Matrikseffekt ved pH 11 illustrert ved forholdet mellom standardkurver laget i metanol og matriksmatchende standarder (MMS) av blåskjell og kamskjell.....	64
4.14	Framstilling av gjenfinning av 25 ng/ml tilsatt negative blåskjell- og kamskjellprøver høstet i tidsperioden januar/februar og juli/august i 2010 - 2012.....	68
4.15	Box-and-Whisker plott av konsentrasjon (log) kvantifisert direkte fra metanolkurve i pH-nøytral metode.....	70
4.16	Sammenligning av nøyaktighet for målt verdi i skjellprøver kvantifisert ved bruk av metanolkurve, MMS blåskjell og MMS kamskjell.....	72
4.17	Sammenligning av OA-konsentrasjon fra standardaddisjon fra pH-nøytral metode med direktekvantifisering ved MMS blåskjell i sur og basisk metode.....	78
4.18	Sammenligning av DTX-1-konsentrasjon fra standardaddisjon fra pH-nøytral metode med direktekvantifisering ved MMS blåskjell i sur og basisk metode.....	78
4.19	Sammenligning av YTX-konsentrasjon fra standardaddisjon fra pH-nøytral metode med direktekvantifisering ved MMS blåskjell i sur og basisk metode.....	78
4.20	Sammenligning av Aza-1-konsentrasjon fra standardaddisjon fra pH-nøytral metode med direktekvantifisering ved MMS blåskjell i sur og basisk metode.....	79
4.21	Sammenligning av Aza-2-konsentrasjon fra standardaddisjon fra pH-nøytral metode med direktekvantifisering ved MMS blåskjell i sur og basisk metode.....	79
4.22	Sammenligning av Aza-3-konsentrasjon fra standardaddisjon fra pH-nøytral metode med direktekvantifisering ved MMS blåskjell i sur og basisk metode.....	79
4.23	Sammenligning av innen-serie stigningstallvariasjon for Aza-1 i seks kalibreringskurver konstruert uten IS og med to ulike IS.....	87
4.24	Samvariasjon av analyttrespons i skjellmatriks for A) OA og DHO, og for B) DTX-1 og DHO.....	91
4.25	Samvariasjon av analyttrespons i skjellmatriks for A) Aza1 og Pent-PBI, og for B) PTX-2 og Pent-PBI.....	91

Tabeller

1.1	Regulatoriske grenseverdier for konsentrasjon av lipofile algetoksiner i skjellmat	6
1.2	Kjemiske data for lipofile algetoksiner.....	7
1.3	Oversikt over lipofile algetoksiners funksjonelle grupper og ladning ved ulike pH.....	9
1.4	Kjemiske data for internstandarder som ble testet i metodene.....	24
3.1	Referansemateriale (CRM) benyttet for analyse av lipofile algetoksiner.....	26
3.2	Oversikt over internstandarder ved analyse av algetoksiner.....	27
3.3	Oversikt over kjemikalier benyttet i studiet.....	27
3.4	Tillaging av bruksløsning til metoder på LC-MS.....	28
3.5	Tillaging av multitoksin standardløsning (MTL) til metoder på LC-MSMS.....	28
3.6	Fortynning av bruksløsning og MTL til konsentrasjonsnivå for standardkurver for metodesammenligning utført i metanol.....	28
3.7	Fortynning av bruksløsning og MTL til konsentrasjonsnivå for matriksmatchende standarder benyttet ved undersøkelser vedrørende matrikseffekt i skjell.....	29
3.8	MS-parametre for pH-nøytral metode på LC-MS.....	33
3.9	MRM-overganger og MSMS-parametere for sur metode på LC-MSMS.....	35
3.10	MRM-overganger og MSMS-parametere for basisk metode på LC-MSMS.....	36
3.11	MS-parametre for internstandarder i pH-nøytral metode på LC-MS.....	37
3.12	MRM-overganger og MSMS-parametere for internstandarder i basisk metode på LC-MSMS.....	37
4.1	Metodesammenligning av pH-nøytral metode (LC-MS) og sur og basisk metode (LC-MSMS) for OA, DTX-1, YTX, Aza-1 og PTX-2.....	43
4.2	Metodesammenligning av sur og basisk metode (LC-MSMS) for Aza-2, Aza-3, SPX-1 og GYM.....	45
4.3	Responsforskjeller for OA, DTX-1, YTX, Aza-1 og PTX-2 i metanol, analysert ved pH-nøytral (LC-MS), sur og basisk metode (LC-MSMS).....	50
4.4	Responsforskjeller for Aza-2, Aza-3, SPX-1 og GYM i metanol, analysert ved sur og basisk metode (LC-MSMS).....	50
4.5	Høydebasert respons – resultater for YTX i metanol ved pH-nøytral (LC-MS), sur og basisk metode (LC-MSMS), samt for Aza-3 i metanol analysert ved sur og basisk metode (LC-MSMS).....	52
4.6	Oversikt over responsdrift basert på areal.....	56
4.7	Relativ sensitivitet ved ulike kromatografiske betingelser.....	61

4.8	Kvantifiseringsgrense (LOQ) for blåskjell- og kamskjellprøver for hver matriks ved ulike kromatografiske forhold.....	65
4.9	Gjenfinning av tilsatt kjent toksinkonsentrasjon i analyserte negative skjellprøver fra 2010 til 2012 sortert på art og sesong.....	67
4.10	Toksininnhold i naturlig kontaminerte prøver fra 2009 til 2012 kvantifisert direkte fra metanolkurve samt matrikskorrigert ved tre forskjellige beregningsmodeller.....	69
4.11	Fordeling av antall berørte prøver (%) uavhengig av type toksin.....	70
4.12	Relativ sensitivitet mellom kamskjell og blåskjell basert på ratio mellom stigningstall....	73
4.13	Nøyaktighet og presisjon for blåskjell tilsatt lav konsentrasjon og til regulatoriske grenseverdi analysert ved ulike kromatografiske betingelser	74
4.14	Nøyaktighet og presisjon for kamskjell tilsatt lav konsentrasjon og til regulatoriske grenseverdi analysert ved ulike kromatografiske betingelser	75
4.15	Sammendrag av resultater fra kalkulerte konsentrasjoner ved standardaddisjon analysert ved pH-nøytral metode og konsentrasjoner direkte avlest mot MMS blåskjell for naturlig kontaminerte blåskjell og kamskjell.....	80
4.16	Sammenligning av stigningstall for kalibreringskurver i metanol konstruert med og uten IS.....	86
4.17	Samvariasjon i arealintensitet for tiltenkt IS og tilhørende toksin tilsatt ulike skjelltyper.....	90
4.18	Sammenligning av konsentrasjon og nøyaktighet av lipofile algetoksiner kvantifisert på tre måter (matrikskorrigert ved standardaddisjon, ESTD og ISTD).....	93
4.19	Analytisk presisjon ved kvantifisering uten (ESTD) og med IS (ISTD).....	94

Innholdsfortegnelse

FORORD	i
BEGREP OG FORKORTELSER	iii
SAMMENDRAG	vii
FIGURER OG TABELLER	xi
1. INNLEDNING	1
1.1 Introduksjon.....	1
1.2 Generell oversikt over marine algetoksiner.....	3
1.2.1 Klassifisering og virkningsmekanismer	3
1.2.2 Kjemiske egenskaper.....	6
1.2.3 Kromatografiske vurderinger	8
1.3 Prinsipp for massespektrometri	9
1.3.1 Ioniseringsprosessen.....	10
1.3.2 Molekylfragmentering.....	11
1.3.3 Massefiltrering i MS og MSMS	12
1.3.4 Metodeoptimalisering på LC-MS og LC-MSMS.....	13
1.3.5 MRM og dMRM	14
1.4 Programvare.....	16
1.4.1 ChemStation	16
1.4.2 MassHunter	16
1.5 Matrikseffekt	16
1.5.1 Undersøkelse av matrikseffekt	18
1.5.1.1 Post-kolonne infusjon	18
1.5.1.2 Post-ekstraksjon standardaddisjon.....	19
1.5.1.3 Sammenligning av stigningstall.....	19
1.5.1.4 Monitorering av fosfolipider ved bruk av LC-MSMS.....	20
1.5.2 Håndtering av matrikseffekt ved analyse av lipofile algetoksiner	21
1.5.2.1 Standardaddisjon til prøver med ukjent konsentrasjon.....	21
1.5.2.2 Vurderinger ved bruk av matriksmatchende standarder.....	23
1.6 Internstandard	23
2. PROBLEMSTILLING	25

3. MATERIALER OG METODER	26
3.1 Materialer, reagenser og utstyr	26
3.1.1 Kjemikalier og standarder	26
3.1.2 Tillaging av standardløsninger	27
3.1.3 Analytiske kolonner	29
3.2 Metoder.....	30
3.2.1 Ekstraksjon og hydrolyse	30
3.2.1.1 Ekstraksjon av toksiner fra skjellmat.....	30
3.2.1.2 Alkalisk hydrolyse	31
3.2.2 pH-nøytral metode på LC-MS.....	32
3.2.3 Sur og basisk metode på LC-MSMS.....	33
3.2.4 Analytiske parametere for utvalgte internstandarder	37
3.2.5 Kvantitativ analyse av lipofile algetoksiner	38
3.2.6 Kvalitetskrav for kromatografiske vurderinger.....	39
3.3 Statistiske metoder og standardisering av data.....	40
4. RESULTATER	42
4.1 Sammenligning av LC-MS og LC-MSMS – pH-nøytral, sur og basisk metode.....	42
4.1.1 Kromatografiske sammenligninger	45
4.1.1.1 Retensjonstid	45
4.1.1.2 Toppsymmetri.....	46
4.1.1.3 "Full-width-at-half-maximum" (FWHM) og toppbredde.....	47
4.1.1.4 Signal-til-støy ratio (SNR).....	47
4.1.1.5 Kvantifiseringsgrense (LOQ) og nøyaktighet	48
4.1.1.6 Linearitet.....	49
4.1.2 Sensitivitet og responsforskjeller	49
4.1.3 Responsdrift	52
4.2 Matrikseffekt	60
4.2.1 Matrikseffekt i pH-nøytral, sur og basisk metode.....	60
4.2.2 Matriksforskjeller i ulike arter ved to årstider.....	65
4.2.3 Standardaddisjon til positive prøver.....	68
4.2.4 Matriksmatchende standarder (MMS)	71
4.2.5 Standardaddisjon eller kvantifisering mot matriksmatchende standarder?.....	76
4.3 Innføring av internstandard	83
4.3.1 Prosjektbeskrivelse <i>Designer Internal Standards</i> for legemidler	83
4.3.2 Introduksjon og bakgrunn for IS-prosjektet vedrørende algetoksiner	83
4.3.3 Metoder benyttet ved innføring av IS til analyse av algetoksiner.....	84

4.3.4	Resultater og diskusjon for innføring av IS til metodene.....	85
4.3.4.1	Utvelgelse av potensielle IS-kandidater basert på retensjonstid	85
4.3.4.2	IS som modifikator for analytisk responsdrift	85
4.3.4.3	Samsvar i matrikspåvirkning av IS og toksiner i ulike arter	87
4.3.4.4	Kompensering av matrikseffekt ved bruk av IS	92
4.3.4.5	Sammenligning av presisjon med og uten IS	93
4.3.5	Foreløpig konklusjon vedrørende IS	94
5.	DISKUSJON	95
5.1	Sammenligning av LC-MS og LC-MSMS – pH-nøytral, sur og basisk metode.....	95
5.1.1	Kromatografiske sammenligninger	95
5.1.2	Sensitivitet og responsforskjeller	99
5.1.3	Responsdrift	100
5.2	Matrikseffekt	105
5.2.1	Matrikseffekt i pH-nøytral, sur og basisk metode.....	105
5.2.2	Matriksforskjeller i ulike arter ved to årstider.....	107
5.2.3	Standardaddisjon til positive prøver.....	109
5.2.4	Matriksmatchende standarder	111
5.2.5	Standardaddisjon eller kvantifisering ved matriksmatchende standarder?	113
6.	KONKLUSJON	115
6.1	Valg av optimal analysemetode.....	115
6.2	Hvordan best mulig å håndtere matrikseffekt.....	116
7.	REFERANSER	119
	VEDLEGG A	123
	VEDLEGG B	127
	VEDLEGG C	131
	VEDLEGG D	132
	VEDLEGG E.....	136
	VEDLEGG F.....	137
	VEDLEGG G	138

VEDLEGG H	146
VEDLEGG I.....	149

1. Innledning

1.1 Introduksjon

Sikkerheten ved å bruke skjellmat som føde til mennesker kan svekkes ved kontaminasjon av marine biotoksiner i skjellene. Planteplankton er en naturlig næringskilde for skjell, og flere typer marine fytoplankton kan produsere toksiner som akkumuleres i skjellenes vev og organer. Inntak av forgiftede skjell kan føre til alvorlige lidelser i mennesker. Algetoksiner produseres av naturlig forekommende mikroalger som *Alexandrium tamarense*, *Dinophysis* spp, *Protoceratium* spp og *Azadinium spinosum* [1]. Under visse miljømessige forhold kan algepopulasjoner øke kraftig slik at det oppstår en skadelig algeoppblomstring (harmful algal blooms, HAB). Under forekomster av HAB utgjør marine algetoksiner en signifikant risiko for mattrygghet ved at toksinene akkumuleres i skjellene. I tillegg til å være en bekymring for offentlig helsemyndigheter, er det også en stor utfordring for skjellindustrien verden over siden stenging av uttakssteder på grunn av toksiner i skjell gir store konsekvenser for økonomien i oppdrettsnæringen.

Adekvat kontroll av toksininnhold i skjell er viktig for å sikre både folkehelsen og oppdrettsnæringen. Overvåking av de mest fremtredende lipofile marine biotoksiner kreves innen EU i henhold til Commission Regulation (EU) No 15/2011 [2]. Grenser for maksimal tillatt konsentrasjon for menneskeføde er satt i Regulation (EC) No 853/2004 [3]. De fleste land har innført styringssystemer og regelverk for maksimalt akseptable nivåer av enkelte toksiner for å redusere risiko for konsumenter av sjømat. Nasjonale overvåkningsprogram bruker ofte en kombinasjon av analyse av toksiner i skjellmat fra skjellprøver samt identifikasjon og telling av hasardiøse algearter i vannprøver og håvtrekk.

Biologisk metode (MBA), hvor mus benyttes, har siden 1980-tallet vært den offisielle metoden for testing av lipofile algetoksiner i skjell [4]. I tillegg til det etiske hensynet, har MBA dårlig presisjon samt lav sensitivitet og selektivitet slik at enkelte toksingrupper ikke detekteres ved de gjeldende regulatoriske grensene [5]. I de senere årene er det derfor nedlagt mye arbeid verden over for å utvikle og validere kjemiske, instrumentelle metoder som kan erstatte testing på mus. Biologisk testing ble fjernet som referansem metode i Norge i juli 2011 [6] etter at EU i januar samme år vedtok å erstatte MBA med analytiske metoder basert på væskechromatografi med tandem massespektrometri (LC-MSMS) [2]. I den anledning har Europeisk referanselaboratorium for marine biotoksiner (EURLMB) lansert *EU-Harmonised Standard Operating Procedure for Determination of Lipophilic Marine Biotoxins in Molluscs*

by LC-MSMS (version 4, July 2011) (EU-SOP) [7] som er en detaljert protokoll for kjemisk analyse av lipofile algetoksiner. I Norge har man brukt kjemisk metode parallelt med biologisk metode i mange år, og ved Avdeling for klinisk farmakologi (AKF), St Olavs Hospital, har det blitt benyttet metodikk på LC-MS ved pH-nøytrale kromatografiske elueringsbetingelser siden 2007. I denne oppgaven sammenlignes pH-nøytral metode på LC-MS med EU referansemetoden på LC-MSMS. Prosedyren EU-SOP er åpen for valg når det gjelder kromatografiske betingelser, samt hvilken analytisk kolonne som kan benyttes. Samtidig foreslås en ekstraksjonsprosedyre med et alkalisk hydrolysetrinn samt en liste over mulige MSMS-overganger. Analyse ved lav pH, som benyttes av EURLMB pr i dag, ble først foreslått av Quilliam et al i 2001 [8] og deretter videreutviklet av McNabb et al i 2005 [9]. Den basiske metoden ble publisert første gang i 2009 som et alternativ til sur metode av Gerssen et al [10]. Begge metodene er aksepterte i henhold til EU.

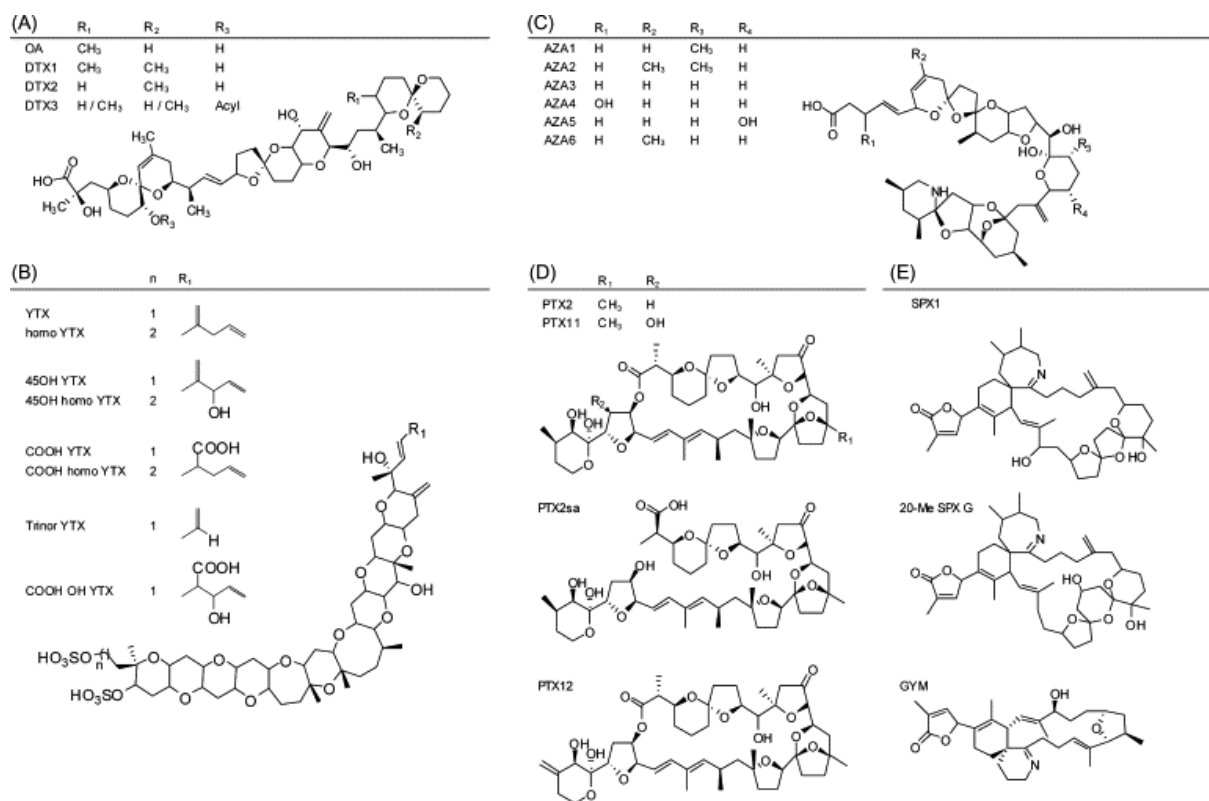
Med tanke på at EU-SOP ikke legger spesifikke føringer for valg av kromatografiske betingelser, samtidig som den gir begrenset med retningslinjer for både metodenes ytelse og håndtering av matrikseffekt, kan det være utfordrende å vurdere hvilken som er den mest egnede metoden til rutineformål. For å kunne velge den mest optimale analytiske metoden for rutineanalyse av algetoksiner ved AKF, ble sur og basisk metode med to ulike kolonner evaluert. I henhold til EU-SOP skal et hvert laboratorium kjenne til matrikseffekten på sine analyseinstrument for å kunne avgjøre hvorvidt matrikskorrigering er nødvendig. I den anledning ble matrikseffekten studert og sammenlignet mellom metodene. I tillegg ble det prøvd ut ulike tilnæringsmodeller for håndtering av matrikseffekt ved å innføre internstandard, standardaddisjon samt matriksmatchende kalibratorer i metodene. Målet med denne oppgaven var å kunne bidra til et analytisk begrunnet valg av metodebetingelser før implementering av analysen ved AKF.

1.2 Generell oversikt over marine algetoksiner

1.2.1 Klassifisering og virkningsmekanismer

Akkumulering av marine algetoksiner i skalldyr oppstår fra tid til annen, og forgiftning i menneske baseres på akutt eller kortvarig eksponering. Toksinene forekommer hovedsakelig i skjell hvor de høyeste konsentrasjonene som regel finnes i blåskjell [11]. Sporadiske kontroller er tidligere utført på kråkeboller og snegler som så langt har vist seg toksinfrie. Norge hadde i 2002 en hendelse med høye toksinkonsentrasjoner i taskekrabber, som mest sannsynlig hadde spist blåskjell inneholdende diarègivende algetoksiner. Humantoksiske problemer ble rapportert i etterkant av inntak av krabbe i denne perioden. Det er ikke påvist at lipofile algetoksiner akkumuleres i fisk. De ulike toksinene oppstår til ulike årstider, og toksinkonsentrasjonen samt toksintypeforekomst varierer blant annet både med geografisk uttakssted, og fra år til år.

Over 200 lipofile algetoksiner har inntil nå blitt beskrevet i litteraturen [12]. Av disse er 13 toksiner nedfelt i EU's regelverk for rutineovervåking. Toksinene kan klassifiseres etter symptomene de gir etter inntak og etter vannløselige egenskaper. De fleste intoksikasjoner i Europa er forårsaket av inntak av skjellmat kontaminert med diarègivende algetoksiner (DSP). Diarètoksiner er ikke livstruende, men kan gi så stort ubehag at det er viktig å kontrollere nivåene. Samtidig er det helt avgjørende for skjellnæringen at kontrollen er så god at skjell som omsettes ikke fører til forgiftninger. Toksingroupen DSP består av okadasyre (OA) med de tilhørende derivatene dinofysistoksin-1 (DTX-1), dinofysistoksin-2 (DTX-2) og dinofysistoksin-3 (DTX-3). Sistnevnte er biotransformerte acetylerede fettsyrestere av OA, DTX-1 og DTX-2 (figur 1.1A) [13]. På grunn av sine lipofile egenskaper, er DSP-toksinene klassifisert i gruppen lipofile algetoksiner. Disse biotoksinene produseres av dinoflagellater som *Dinophysis acuta*, *Dinophysis acuminata*, *Azadinum spinosum* og *Protoceratium reticulatum*. Betegnelsen lipofile algetoksiner inkluderer i tillegg til DSP, fire ulike kjemiske grupper; yessotoksiner (YTX) (figur 1.1B), azaspiracider (AZA) (figur 1.1C), pektenotoksiner (PTX) (figur 1.1D) og spiroimin toksiner (figur 1.1E).



Figur 1.1 Molekylstrukturer for fem toksingrupper innenfor lipofile algetoksiner; **A)** okadasyre og dinofysistoksiner **B)** yessotoksiner **C)** azaspiracider **D)** pektenotoksiner **E)** spiroiminer

Toksisk effekt av DSP i mennesker skyldes at toksinene binder til og dermed inhiberer enzymaktiviteten til serin/treonin proteinfosfatase type 1 og 2A (PP1 og PP2A) i epitelceller i tarm. Serin/treonin-fosfataser har bred spesifisitet og katalyserer hydrolytisk defosforylering av proteiner i flere intracellulære signalveier, og DSP er dermed svært celletoksisk. Økt fosforylering av regulatorproteiner for natriumsekresjon som skyldes DSP-forgiftning, antas å føre til økt utslipp av natrium over cellemembranene og økt paracellulær permeabilitet av tarmepitel. Det er denne forandringen i tarmcellenes fysiologi som kan bidra til diarè. I tillegg antas DSP-gruppen å være en potent kreft-promoter [14]. Toksinene DTX-1 og OA er de mest giftige forbindelsene, mens DTX-2 har ca 50 % lavere toksisitet. Ved beregning av OA-ekvivalenter pr kg skjellmat benyttes derfor en toksisitetsfaktor på 0,6 for DTX-2 [15]. Acyl-estere av både OA, DTX-1 og DTX-2 utgjør DTX-3, og er en samlebetegnelse for disse toksinene. En fettsyrekjede av varierende lengde og metningsgrad kobles på modermolekylet i posisjon R₃ (figur 1.1A) ved esterbindinger. Fettsyrekjeden kan variere fra 4 til 22 karbonatomer [16]. Omdannelse til DTX-3 skjer via en enzymatisk reaksjon, og er trolig en del av den generelle fettsyresyntesen i skjellet. Toksinestere er ikke toksiske i seg selv, men kan hydrolyseres tilbake til modermolekylet OA, DTX-1 eller DTX-2 etter inntak på grunn av

lav pH i magen. Det er derfor viktig også å utføre analyse på total mengde DSP, og ikke bare på de frie modermolekylene. Toksinene i DSP-gruppen har sin hovedforekomst om høsten, og kan finnes i skjellene til langt utover vinteren [11].

Mer enn 90 ulike YTX-analoger er identifisert, og YTX og homoYTX med metabolittene 45-OH-YTX og 45-OH-homoYTX [17] er mest interessante i forhold til mulig humane forgiftninger. Molekylene i toksingruppen YTX inneholder sulfatgrupper som gjør at de absorberes i svært liten grad fra tarm, og er derved lite giftig ved oralt inntak. Toksikologisk mekanisme er lite kjent, og inntil nå er ingen human intoksikasjon rapportert. Samtlige av disse vektet med toksisitetsfaktor 1,0 med unntak av 45-OH-homoYTX som har 50 % lavere toksisitet og dermed toksisitetsfaktor 0,5. Det er størst forekomst av YTX i skjellene om våren og sommeren.

Til nå er det identifisert 24 ulike AZA hvor azaspiracid-1 (Aza-1), - 2 (Aza-2) og -3 (Aza-3) er de mest dominante [18]. Metyl-homologen Aza-2 produseres direkte fra Aza-1 i kildeorganismen. Analogene Aza-3 er et produkt av metabolismen av Aza-1 i skjellet. Forgiftningsmekanisme for AZA er ikke helt forstått, men selv om hovedsymptomet er diarè er de ikke proteinfosfatasehemmere slik som DSP-gruppen. Toksinet Aza-1 er hyppigst forekommende, og toksinkonsentrasjonen beregnes i Aza- ekvivalenter per kg skjellmat hvor toksisitetsfaktor for Aza-2 og Aza-3 er henholdsvis 1,8 og 1,4 [19]. Ingen forgiftningstilfeller av Aza-gruppen er så langt rapportert i Norge, og høyeste konsentrasjon i skjellene oppstår som regel om høsten [11].

Hittil er 15 ulike PTX identifisert. Toksinene i PTX-gruppen har ulik toksikologisk effekt som kan relateres til deres molekylstruktur. Toksinmolekyler med åpen syklisk struktur, såkalte seco-syrer, klassifiseres som ikke-giftig. I alger finnes hovedsakelig PTX-2, og etter inntak av alger i skalldyr kan PTX-2 metaboliseres til andre PTX-derivater. Inntil nå er ingen humane forgiftninger rapportert, og nivået av PTX-toksiner er stort sett lavt i norske skjell. Toksinet gir svak diarèeffekt ved at det bindes til komponenter i cytoskjelettet i cellene slik at membranpermeabiliteten i cellene endres.

Sykliske iminer som spirolider (SPX) og gymnodiminer (GYM) produseres av henholdsvis *Alexandrium ostenfeldii* og *Karenia selliforme*. Det er identifisert 10-15 ulike SPX i alger og skjell, og den viktigste av disse er 13-desmetyl spirolid C (SPX-1). Virkningsmekanismen *in vivo* er ikke klarlagt, men intraperitoneal injeksjon av kontaminert skjellekstrakt i mus har forårsaket umiddelbar død. Toksinet SPX-1 er derfor klassifisert som "fast acting" [20].

Tilfeller av human intoksikasjon er så langt ikke kjent. Sykliske iminer er foreløpig ikke aktuelle i norske farvann [11].

Overvåkningsprogram og regelverk er etablert av EU for 13 toksiner i fire av de lipofile toksingruppene, med unntak av spiroimin toksingruppen hvor verken gymnodimin (GYM) eller spiroalider (SPX) er regulert [3]. Tabell 1.1 oppgir maksimalt tillatte konsentrasjoner av lipofile toksiner i skjellmat dersom skjellene skal omsettes kommersielt som human føde. Mattilsynet i Norge forholder seg til de samme grensene ved kostholdsråd.

Tabell 1.1 Regulatoriske grenseverdier for konsentrasjon av lipofile algetoksiner i skjellmat [3]

Toksin	Administrativ grenseverdi ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
DSP-gruppen	160 OA-ekvivalenter
YTX-gruppen	1000 YTX-ekvivalenter
PTX-gruppen	160 OA-ekvivalenter
Aza-gruppen	160 Aza-ekvivalenter

I tillegg til de lipofile toksingruppene innbefatter marine algetoksiner en rekke andre grupper. De øvrige som er mest aktuelle i næringsammenheng, er de paralyserende toksinene (PSP) og det såkalte hukommelsestaptoksinet (ASP). Disse gruppene er også regulert, og skal inkluderes i analyser for mattrygghet før kommersiell omsetning av skjellmat [3]. Flere enn 20 ulike PSP er pr i dag kjent. Disse er klassifisert i grupper basert på ulike kjemiske substitusjoner i R_4 -posisjon som karbamat, dekarbamoyl og sulfokarbamoyl hvor karbamatene er de mest toksiske. PSP-toksinene er vannløselige. Ved forgiftning undertrykkes musklernes aksjonspotensial slik at lammelser av ulik alvorlighetsgrad og varighet kan inntreffe. I Norge produseres PSP stort sett av algefamilien *Alexandrium*. Nevrotoksinet domoinsyre (DA) dominerer i ASP-gruppen, og er en aminosyre. Toksiske konsentrasjoner påvises stort sett i kamskjell. Flere algearter produserer DA, blant annet kiselalger og *Pseudonitzschia spp* som finnes i betydelige mengder i våre kystfarvann. Toksingruppene PSP og ASP vil ikke bli undersøkt i denne oppgaven.

1.2.2 Kjemiske egenskaper

Dissosiasjonskonstanten (pK_a) er et mål på styrken av en syre eller en base. Ved kjennskap til pK_a -verdien er det mulig å anslå ladningen på et molekyl ved enhver pH. Når pK_a for et stoff er lik pH i en løsning er halvparten av molekylene på ladet form, mens den andre halvparten er uladet. De fleste molekylene i en gitt løsning forekommer som deprotonerte ved 2 pH-enheter over sin pK_a -verdi; $pK_a + 2$, og som protonerte ved 2 pH-enheter under; $pK_a - 2$.

Fordelingskoeffisienten $\log P$ er et mål på hvor godt et stoff fordeler seg mellom fett og vann som nøytralt molekyl, og den er et mål på lipofilisitet. Beregning av $\log P$ kan gjøres ved hjelp av distribusjonskoeffisienten ($\log D$) etter ligning $\log D = \log P + pK_a - pH$. I praksis vil $\log P$ variere i henhold til under hvilke forhold målingene foretas og etter valg av løsemiddel.

Både pK_a og $\log P$ er nyttige parametre for å forstå hvordan et molekyl oppfører seg under gitte betingelser. Ulike ioniserte former av et molekyl har ulike fysiske, kjemiske og biologiske egenskaper, og det kan være nyttig å kunne forutsi hvilke ioniske former av molekylet som er tilstede ved kjemisk analyse. Det finnes lite data tilgjengelig for pK_a og $\log P$ for algetoksiner i litteraturen. Forsøk på estimering av pK_a og $\log P$ for enkelte toksiner ved bruk av kromatografi og LC-MS, har blitt utført av E. Fux ved Marine Institute, Dublin, [16] (se tabell 1.2).

Tabell 1.2 indikerer at DSP-toksinene er mer sur enn Aza-gruppen. Som forventet ble det funnet lik pK_a -verdi mellom analogene i de ulike toksingruppene. De analytiske resultatene for $\log P$ er forbundet med stor usikkerhet da disse var systematisk høyere enn forventet teoretisk verdi. Toksinenes lipofilisitet relativt til hverandre skal i følge Fux likevel reflektere virkeligheten [16]. Data for Aza-3, SPX-1 og GYM er ikke funnet i litteraturen.

Tabell 1.2 Kjemiske data for lipofile algetoksiner

Toksin	Molekylformel	Molekylvekt (g/mol)	pK_a^*	$\log P^*$
OA	$C_{44}H_{68}O_{13}$	804,1	$4,9 \pm 0,5$	$5,1 \pm 0,7$
DTX-1	$C_{45}H_{70}O_{13}$	819,0	$4,9 \pm 0,5$	$6,9 \pm 1,4$
DTX-2	$C_{44}H_{68}O_{13}$	804,1	$4,9 \pm 0,5$	$5,6 \pm 0,8$
Aza-1	$C_{47}H_{71}NO_{12}$	842,1	$5,8 \pm 0,2$	$7,5 \pm 1,0$
Aza-2	$C_{48}H_{73}NO_{12}$	856,1	$5,8 \pm 0,2$	$8,2 \pm 1,3$
Aza-3	$C_{46}H_{69}NO_{12}$	828,0	-	-
PTX-2	$C_{47}H_{70}NO_{14}$	859,1	-	$6,5 \pm 2,4$
YTX	$C_{55}H_{80}O_{21}S_2$	1141,3	$6,9 \pm 0,5$	-
SPX-1	$C_{42}H_{61}NO_7$	691,5	-	-
GYM	$C_{32}H_{45}NO_4$	507,3	-	-

*Eksperimentelle resultater (\pm standardavvik) [16]

Toksinene i DSP-gruppen har en funksjonell gruppe; karboksylgruppen. Molekylene er polyeter karboksylsyrer, og de er strukturelt veldig like. Toksinet DTX-2 er isomere av OA, mens DTX-1 er et metylderivat av OA.

Molekylstrukturen for YTX består av et stigelignende polyeterskjelett hvor to sidekjeder inneholder sulfat, og molekylet er en sterk syre. På grunn av de sure sulfatgruppene er YTX antatt å være mer hydrofilt enn de øvrige toksinene, og det forventes at molekylet har to verdier for pK_a . Første pK_a -verdi var ikke målbar i Fux's kromatografisk system, og er antagelig lav på grunn av svovelsyren som er en sterk syre. Den andre pK_a -verdien ble målt til ca 6,9, men er forbundet med usikkerhet på grunn av få målinger. Verdien var høyere enn forventet, men det kan muligens skyldes interaksjon mellom de to sulfatgruppene og ustabilitet i et hydrogenatom slik at dette vandrer fra en sulfatgruppe og over til den andre.

Toksinene i PTX-gruppen består av en makrosyklisk struktur med stor lakton-ring, og de er såkalte polyeter makrolider. Ved lagring ødelegges PTX-2 i sterke syrer, men er stabil i pH-område 4,5 til 9,1. Det nøytrale molekylet PTX-2 er uten sterke baser eller sure funksjonelle grupper, og pK_a var ikke målbart [16].

Gruppen for Aza skiller seg ut fra de øvrige nitrogenholdig polyeter-toksinene ved å ha et unikt spiroring-kompleks, et syklisk amin og en karboksylgruppe. Det er to ioniserbare grupper på molekylene Aza-1 og Aza-2; karboksylsyre og sykliske amin, og to pK_a -verdier kan forventes. Kun en pK_a -verdi ble fastsatt eksperimentelt til ca $5,8 \pm 0,2$, mens den andre ble beregnet teoretisk til 9,2. I tillegg til å være en amfotær forbindelse, er Aza-molekylet også et zwitterion.

1.2.3 Kromatografiske vurderinger

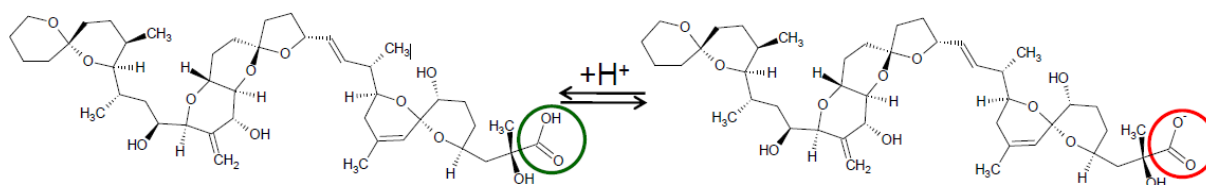
Når mange toksiner med ulike kjemiske egenskaper skal analyseres samtidig i en metode, stilles det store krav til instrumentering og metodikk. De lipofile algetoksinene inneholder ulike funksjonelle grupper som kan protoneres eller deprotoneres avhengig av pH i mobilfasen (MF), se tabell 1.3 og eksempel for DTX-1 vist i figur 1.2. Elueringsrekkefølgen vil avhenge av ladningen som toksinene har under de ulike pH-betingelsene. Generelt sett vil ioniserte forbindelser eluere tidligere i et kromatografisk system enn nøytrale komponenter. Bufferens pH-verdi bør være minst to pH-enheter over eller under analyttens pK_a -verdi for at de fleste molekylene enten er ioniserte eller nøytrale. Ioniseringen styres ved å ha kontroll på pH i mobilfasen, slik at ionebytting unngås. Ionebytteeffekt gir dårlige kromatografiske topper, og skyldes ofte matriksavsetning på overflaten av kolonnematerialet.

Ved ammoniakkholdige mobilfaser vil OA, DTX og PTX danne NH_4^+ -addukt ved positiv ionisering. Vann i buffere er ofte kontaminert av Na^+ . Bruk av Na^+ -addukt, herunder også $PTX-2-Na^+$, som utgangspunkt for MS-deteksjon anbefales ikke. Kontaminasjon fra mobilfasen

kan gi dårligere reproduserbarhet [21]. Ved lav pH kan sulfatgruppene på YTX medføre interaksjoner med silanolgrupper på kolonnematerialet. Dette kan trolig skape kromatografiske utfordringer, mens ved høy pH får YTX to negativt ladede grupper [10, 21].

Tabell 1.3 Oversikt over lipofile algetoksiners funksjonelle grupper og ladning ved ulike pH [10]

Toksin	Funksjonell gruppe	pH 3	pH 11
DSP	-COOH	Nøytral	Negativ
YTX	-OSO ₃ H (x 2)	Negativ	Negativ
Aza	-COOH og -NH	Positiv	Negativ
PTX	Ingen	Nøytral	Nøytral
GYM/SPX	>C=NH (imin)	Positiv	Nøytral



Figur 1.2 Eksempel på et algetoksinmolekyl i uladet og ladet (negativt) tilstand, vist i ved deprotonering av DTX-1 i basiske omgivelser [22].

1.3 Prinsipp for massespektrometri

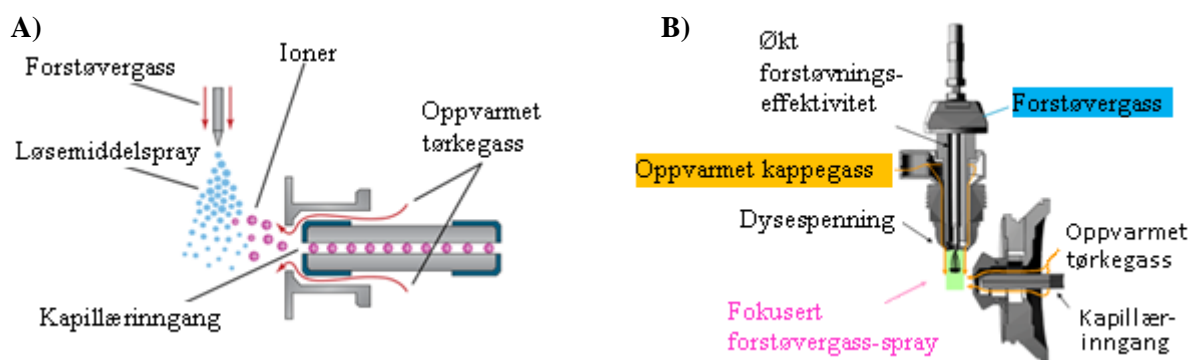
Massespektrometri (MS) er en analytisk teknikk som måler masse-til-ladning ratio (m/z) på ladede partikler. Molekylene separeres ofte ved hjelp av kromatografi før de introduseres til ionekilden. Det analytiske prinsippet i alle massespektrometriske teknikker innbefatter tre trinn: ionisering av et analytisk molekyl, separasjon i et elektromagnetisk felt og deteksjon i en ionedetektor. Et massespektrometer består av to nøkkelkomponenter hvor ionekilden lager ioner og masseanalysatoren sorterer ionene. En stor fordel ved å bruke MS er muligheten til å koble ulike masseanalytatorer i tandem, for eksempel MSMS og MS/time of flight (TOF). Dette gjør at det oppnås mer strukturinformasjon samt sikrere identifikasjon av ønsket analytt, mindre bakgrunnsstøy og bedre sensitivitet og selektivitet. Ved MSMS tilføres ytterligere to trinn til de grunnleggende prinsippene; etter ioniseringen isoleres bestemte masser i første masseanalysator, etterfulgt av en reaksjon som danner spesifikke fragmenter av disse massene. Deretter utføres en ny spesifikk masseanalyse før deteksjon (se figur 1.5).

De vanligste kromatografiske separasjonsteknikker innbefatter gaskromatografi (GC) og væskkromatografi (LC), som i kombinasjon med massespektrometri omtales som GC-MS og LC-MS. I LC-MS-metodikk er mobilfasen (MF) som oftest en blanding av vann og organiske

løsemidler, og komponentene i en prøve separeres i en analytisk kolonne basert på ulike adsorpsjon til kolonnematerialet.

1.3.1 Ioniseringsprosessen

Etter separasjon fordampes prøven i ionekilden slik at molekylene går over til gassfasen for så å bli ionisert. Ioniseringsteknikk for små molekyler kan deles inn i elektropray ionisasjon (ESI) og atmosfærisk trykk kjemisk ionisering (APCI). Teknikken ESI er en såkalt ”myk” ionisering som benyttes for middels polare til polare substanser, mens APCI er en kraftigere ionisering. Væsken som inneholder ønsket analytt(er), LC-eluenten, sprayeres som en fin aerosol inn i et ionekammer med et sterk elektrostatisk felt og oppvarmet tørkegass (figur 1.3). På grunn av det elektriske feltet dissosierer analyttmolekylene i løsemiddeldråpene, og ioner dannes. Tørkegassen krymper dråpene samtidig som overflatespenning øker slik at ionene overføres til gassfasen. Ionene trekkes mot og gjennom kapillæret, og videre inn i masseanalysatoren. Store molekyler kan ofte få flere enn en ladning.



Figur 1.3 A) Skisse over standard elektropray ionekilde (Agilent) hvor en gass-spray langs innføringsnålen i ionekammeret skal sikre fullstendig vaporisering av løsemiddeldråper [23]. Elektrisk ladning over inngangen til kapillæret i tillegg til oppvarmet tørkegass trekker ionene videre inn i masseanalysatoren. B) Skisse over Agilent JetStream ionekilde hvor oppvarmet kappegass fokuserer forstøvergass-spray slik at spredningen på sprayen blir mindre. Samtidig kan dysespenningen som sitter ved utgangen av nåla optimaliseres for å få maksimal følsomhet. Denne spenningen kan bidra med å tilføre ladning til analytten [24].

Instrumentene LC-MS og LC-MSMS som ble benyttet i dette studiet var utstyrt med litt ulike ionekilder, henholdsvis standard ESI og JetStream ESI (figur 1.3A og B). Prinsippet for ionisering er det samme, men det er flere innstillingsmuligheter i JetStream ESI. Ved JetStream er det mulig å tilføre dysespenning over ESI-nålen i ionekammeret. Dette gir maksimal ionisering i tillegg til at forstøvergass-sprayen fokuseres til en skarpere stråle enn ved standard ESI. Standard ESI har ikke dysespenning, og det er kun spenningen på kapillæret (CAP voltage) som kan justeres.

Ioniseringsteknikkene ESI og APCI kan brukes i både positiv og negativ modus hvor det dannes ioner ved å legge til eller ved å fjerne et proton som betegnes henholdsvis $[M + H]^+$ og $[M - H]^-$. I positiv modus kan andre kationer som er tilstede i systemet også brukes til ionedannelse, for eksempel natrium-addukt $[M + Na]^+$ eller ammoniakk-addukt $[M + NH_4]^+$. Negativ modus kan brukes for sure analytter som syrer, hydroksylgrupper, fosfater og sulfater, mens positiv ofte benyttes for basiske analytter som aminer, amider og lignende.

Kromatografisk separasjon kan være problematisk, spesielt med tanke på at algetoksinene som ioniseres i ulik modus ofte koeluerer eller har dårlig separasjon. Ved å bruke et massespekter som har rask polaritetsskifte unngås bruk av to metoder og dermed to injeksjoner, med det til følge at analys tiden blir kortere.

1.3.2 Molekylfragmentering

Fragmentering av molekyler skjer ved omdannelse av ionenes bevegelsesenergi til indre energi. Tilført energi i form av varme og/eller spenning samt energi som blir til overs etter ionisering, bryter karakteristiske bindinger innenfor molekylet slik at det dannes spesifikke fragmenter. Dette gjør at molekylets identitet blir sikrere ved at flere ioner fra samme molekyl kan detekteres. Ionene akselereres over et spenningsfall gjennom massespektrometeret som gir en bevegelsesenergi som hovedsakelig lagres i ionenes bindinger som vibrasjonsenergi.

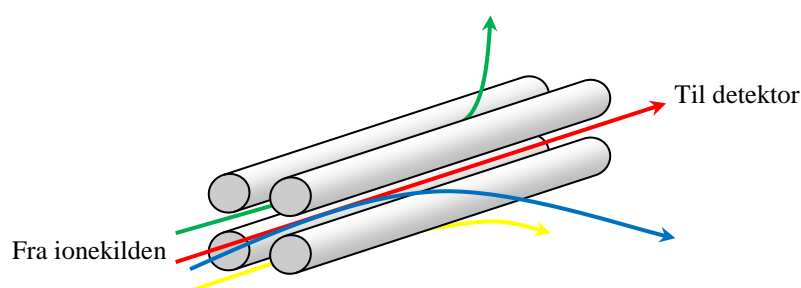
I singelkvadrupol massespektrometere (MS) kan man i varierende grad indusere fragmentering ved å endre på den elektriske spenningsforskjellen mellom kapillæret og skimmer slik at ionene akselereres mot detektoren litt for fort slik at de kolliderer med luftmolekyler. På denne måten vil en økning i spenningen overføre energi til å bryte bindinger i ionet slik at produksjon kan produseres. Fragmentering utført på denne måten kan gi dårligere ioneoverføring, lavere sensitivitet og tap av signal for utgangsignet, samtidig som utvelgelsen av dette ionet ikke er spesifikk. Dette betyr i praksis at det kommer betydelig mer støy på grunnlinjen i forhold til trippelkvadrupol massespektrometer, også omtalt som "ekte" MS. Ved bruk av singelkvadrupol MS-metodikk kan det i tillegg være vanskelig å avgjøre hvilket utgangsign som ga opphavet til hvilket produksjon.

I et trippelkvadrupol massespekter (MSMS) fragmenteres spesifikt valgte moderion. Moderionene selekteres i 1. masseanalysator (Q1), og fragmenteringen foregår i kollisjonscellen ved kontrollerte kollisjoner med nøytrale gassmolekyler. Kollisjonene overfører energi mellom de partiklene som støter sammen, og denne energien kan brukes til å fragmentere ionene slik at det dannes spesifikke datterion; produksjon. Fragmenteringen

avhenger av mengden energi som lagres, og av ionets størrelse. Jo mer energi, jo flere bindinger brytes. Store ioner kan være vanskeligere å fragmentere enn små.

1.3.3 Massefiltrering i MS og MSMS

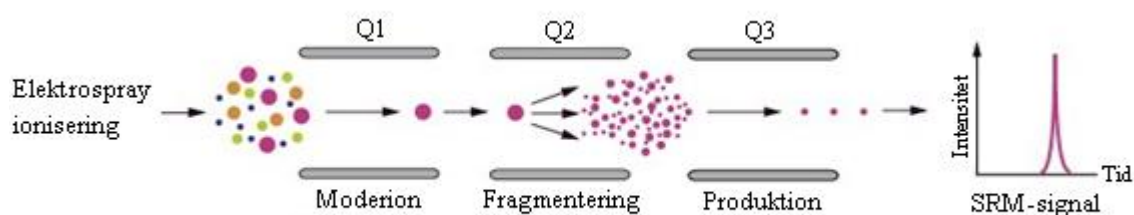
Kvadrupolen i masseanalysatoren sorterer ionene som er dannet i ionekilden basert på molekylets masse-ladning ratio, m/z . Kvadrupolen består av fire parallelle sirkulære staver arrangert i et kvadrat, hvor hvert motsatt stavpar er elektrisk sammenkoblet, og en radiofrekvens (RF) spenning settes på mellom parene. På denne måten oppstår et variabelt oscillerende elektrisk felt hvor m/z -ratio for det ion som passerer gjennom kvadrupolen ved en gitt tid, er proporsjonal med amplituden av RF [24], se figur 1.4. Ioner med for høy eller for lav m/z vil ikke komme i resonans med den pålagte RF-spenningen og filtreres bort før de når detektoren.



Figur 1.4 Forenklet skisse over kvadrupol i massespektrometer (egen figur etter [24]). Kun ioner med spesifikk m/z – rød pil – vil slippe igjennom kvadrupolen. Andre ioner – gul, blå og grønn pil – vil gå til grunne før de når detektoren.

I LC-MS er det en kvadrupol. Denne kan innstilles i to ulike modus; skanning og SIM (“selected ion monitoring”). Ved skanning analyseres et større m/z -område, mens i SIM velges det ut enkelte m/z som slipper igjennom massefilteret. I kvantifiseringsammenheng benyttes oftest SIM som er mer sensitiv. Skanning gir informasjon om flere ioner og brukes i kvalitativ analyse av analytter som ikke er kjent på forhånd.

I LC-MSMS er det to kvadrupoler i tillegg til en kollisjonscelle, hvor kollisjonscellen er plassert mellom de to kvadrupolene. Analyttsensitiviteten er ofte 20 - 100 ganger bedre ved LC-MSMS enn ved LC-MS, og er samtidig mer masse-spesifikk. Ionfiltrering utføres to ganger (figur 1.5) ved LC-MSMS, og detektoren registrerer et bestemt produktion (datterion) fra et bestemt moderion (“selected-reaction monitoring”, SRM).



Figur 1.5 Prinsipp for trippelkvadrupol masseanalysator. De utvalgte ionene i første kvadrupol (Q1) tillates å bli sendt videre til kollisjonscellen (Q2) hvor de blir bombardert med gassatomer som gir spesifikke fragmenteringsmønstre for hvert molekyl. Produksjoner av interesse velges ut i andre kvadrupol (Q3), og sendes derved til detektoren. Alle uønskede ioner og fragmenter filtreres ut [25].

1.3.4 Metodeoptimalisering på LC-MS og LC-MSMS

Instrumenter som ble benyttet i denne studien var fra Agilent Technologies; 1100-serie LC/MSD med elektrospray (ESI) ionekilde, og HPLC 1200-serie 6460 Triple Quad LC/MS med JetStream ESI ionekilde.

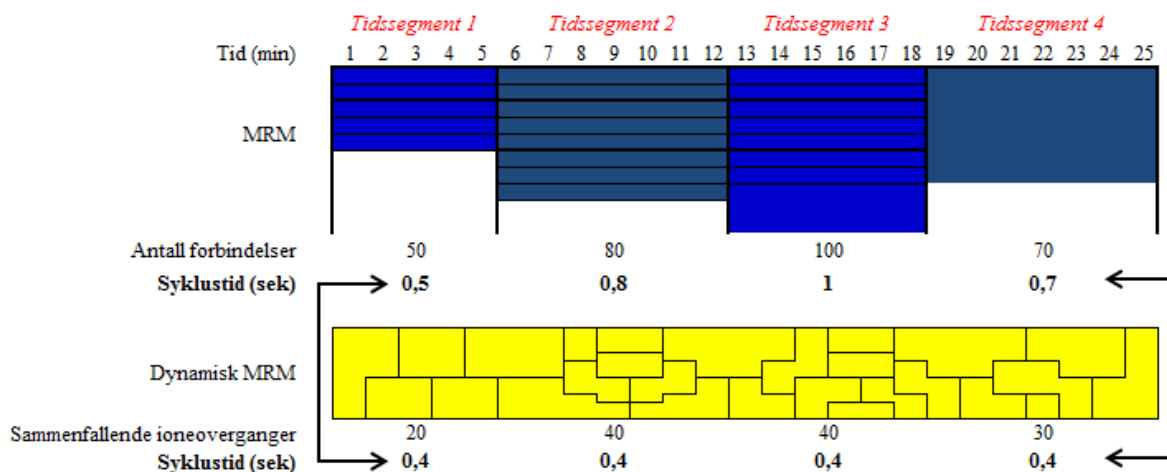
Optimalisering av metoder eksperimentelt under metodeutvikling eller metodetilpasning utføres vanligvis ved “flow injection analysis” (FIA) både på LC-MS og LC-MSMS. Ved hjelp av en T-kobling og en ekstern pumpe injiseres en jevn strøm av ren analytt samtidig som mobilfase (MF) pumpes gjennom LC-systemet. Ved FIA på LC-MS bør kapillærspenning optimaliseres for å fastsette den ideelle spenningen for fragmentering av utgangssonet. I tillegg er det mulig å justere forsterking av signal (“gain”) dersom analyttresponen ikke skulle være tilfredsstillende. Ionekildeparametre som temperatur og hastighet på gasser følger anbefalte områder avhengig av MF-hastighet. Disse parametrene trenger ikke optimaliseres da de ikke påvirker følsomheten i særlig stor grad.

Optimalisering av MSMS-metodene utføres for parametre som fragmenteringsspenning, kollisjonsspenning og resolusjon. Optimalisering av fragmentorspenning gjøres for å finne den mest gunstige innstillingen for overføring av flest mulige moderioner til kvadrupolene. Ved å optimalisere kollisjonsenergi bestemmes de mest lovende datterionene for kvantifisering og kvalifisering. Ofte velges det produktionet med kraftigst signal som kvantifiseringsion. Samtidig optimaliseres tiden som brukes på moderionet (dveletid). Vanligvis ligger denne tiden mellom 100 - 500 ms. Dysespenningen kan være viktig å optimalisere ved bruk av JetStream ESI for å få maksimal følsomhet. Denne spenningen sitter ved utgangen av nålen i ionekilden og den kan bidra med å tilføre ladning til molekylene. I tillegg kan optimalisering av temperaturen for kappegassen gi ytterligere økning i analyttrespon. Kappegassens funksjon er å kollimere forstøvergass-sprøyen slik at denne sprøyen samles. Dette fører til skarpere stråle av forstøvergassen (figur 1.3B).

Resolusjonsparameteren fungerer som en pupill som bestemmer hvilke ioner som skal slippes videre innover i instrumentet. I MSMS-metodene optimaliseres resolusjon for hvert enkelt toksin mellom innstillingene “unit”, “wide” og “widest”. “Unit” vil gi best selektivitet med et massevindu på 0,7 amu for ønsket masse. For analytter med lav respons kan “wide” eller “widest” benyttes. Ved “wide” (1,2 amu) eller “widest” (2,5 amu) slippes også isotopene gjennom kvadrupolen noe som kan være hensiktsmessig før fragmentering. Samtidig kan støy på grunnlinjen øke slik at signal-til-støy ratio (SNR) reduseres.

1.3.5 MRM og dMRM

Multipel reaksjon monitoring (MRM) baseres på måling av dannelse av flere produksjoner. Bruk av MRM er vanlig ved kvantitative analyser av kjente analytter når det benyttes trippelkvadrupol MS. Disse metodene utvikles med tidssegmenter slik at hvert kvantifiseringsion har minst ett, men helst to, kvalifiseringsion. Metoden deles inn i en serie av tidssegment med predefinerte sett av MRM-overganger som måles innenfor hvert segment. I tillegg kan optimale betingelser for ioneovergangene som resolusjonen i kvadrupolene og kollisjonsspenningen legges inn for de individuelle analyttene innenfor hvert tidssegment. Figur 1.6 viser et eksempel på en MRM-metode med fire tidssegmenter hvor ett sett av MRM-overganger analyseres i segment 1, ett annet sett i segment 2, og så videre.



Figur 1.6 Sammenligning av MRM og dMRM [21]. MRM-metoder deles inn i tidssegmenter med et predefinert sett av MRM-overganger. dMRM deles inn i individuelle analyttsegmenter basert på retensjonstidsvindu for hver analytt. Dette resulterer i kortere syklustid og lengre dveletid per analytt, noe som gir økt sensitivitet og bedre presisjon.

Fordelen med å benytte en slik metode sammenlignet med en singelkvadrupol MS-metode, er at i stedet for å utføre MRM-skanning for alle analyttene i metoden gjennom hele analyssetiden, analyseres kun overgangene for de analyttene som eluerer innenfor et gitt tidssegment. Dette resulterer i færre MRM-overganger i løpet av hver MS-skanning, og det

kan dermed brukes lengre tid på hver overgang. I tillegg blir den totale syklustiden for hver MRM-skanning kortere slik at det samles inn flere datapunkt for hver topp. Dette vil gi økt sensitivitet i metoden.

Begrensninger ved å benytte tidssegment oppstår når antall analytter i metoden øker, som igjen medfører at mange MRM-overganger måles samtidig innenfor samme segment. Da må enten dweetiden for disse overgangene reduseres, eller syklustiden for hver MS-skanning økes. Redusert dweetid kan introdusere fenomenet “cross-talk”, det vil si utilstrekkelig tømning av kollisjonscellen mellom individuelle MRM-analyser slik at noen produksjon fra tidligere MRM kan detekteres i den pågående MRM. Dersom innstilling for dweetid beholdes mens total MS-syklustid økes, kan dette medføre at for få datapunkt registreres over den kromatografiske toppen under eluering. Begge disse faktorene kan dermed føre til redusert kvalitet på MS-data, og upresis analyttkvantifisering.

Ved å introdusere muligheten til å bruke dynamisk MRM (dMRM) modus omgås denne utfordringen ved analyse av komplekse prøver som inneholder mange ulike analytter i lave konsentrasjoner i ulike matriser. Ioneoverganger og retensjonstidsvindu for hver analytt bygges dynamisk opp gjennom en analysering, basert på retensjonstiden for hver individuell analytt (figur 1.6). På denne måten vil en analytt kun monitoreres når den forventes å eluere, og analytten inkluderes ikke i MS-arbeidssyklusen ved andre tidspunkt. Antall individuelle MRM-overganger i hver MS-skanning reduseres, og det kan tillates mye raskere syklustid. Dette oppnås fordi dMRM gir generelt færre samtidig pågående ioneoverganger per unit tid sammenlignet med tradisjonell MRM hvor det deles inn i tidssegment. Dweetiden for individuelle ioneovergang blir lengre enn ved bruk av MRM, og ved kortere MS-skanning syklustid oppnås flere “scan” per sekund. Ved å sette syklustiden til en konstant verdi, for eksempel 400 ms som figur 1.6 viser, justeres individuell dweetid for å holde en konstant datainnsamlingshastighet over alle toppene. Dette kan gjøres selv om antallet ioneoverganger som monitoreres endres dynamisk, og vil variere fra syklus til syklus avhengig av elueringstid og antall analytter. På denne måten sikres et statistisk adekvat antall datapunkter over hver analytisk topp tilpasset toppbredden, noe som gir god toppsymmetri i tillegg til analytisk nøyaktighet og presisjon.

I tillegg til de optimale betingelsene for karakteristiske ioneoverganger som resolusjon og kollisjonsspenning, kan ioniseringsmodus legges inn for de individuelle analyttene slik at ioniseringspolaritet hurtig skiftes innenfor samme analysering. Bruk av dMRM fjerner også

kravet om å opprettholde grunnlinjeseparasjon, og koeluerende topper er ikke et problem så fremt de individuelle ioneovergangene er unike.

1.4 Programvare

1.4.1 ChemStation

Programvaren ChemStation (versjon Rev.B.01.01) var installert på LC-MS-instrumentene. ChemStation var tidligere standard software programpakke for de fleste av Agilent sine instrumenter. ChemStation består av to moduler; *Online* og *Offline*. *Online* er koblet direkte til LC-MS for instrumentkontroll. *Offline* er ikke direkte koblet til instrumentets hardware, men er designet for å analysere data. ChemStation er strukturert rundt et antall multifunksjonelle minneregistre som kan inneholde analytiske data og informasjon både i to- og tredimensjonal form, for eksempel tid og intensitet. Programvaren inneholder kommandoer og funksjoner for å konstruere, utvide og trekke ut informasjon uten å endre primære data [23].

1.4.2 MassHunter

Nyere modeller av Agilent-instrumenter som LC-MSMS er utstyrt med MassHunter. Agilent MassHunter er en programvare som tilbyr instrumentkontroll, datainnsamling, kvalitativ og kvantitativ dataanalyse samt rapportering. Kvantitativ analyse muliggjør rask datagjennomgang ved hjelp av funksjoner som “compounds-at-a-glance¹”, dynamisk koblede resultater og kurvetilpasningsassistanse. Den inneholder automatisert kvalitetskontroll og flagging av avvik samt parameterfrie integratorer med innebygget validering av kromatografiske topper, blant annet for toppsymmetri, toppbredde og signal-til-støy ratio. Dette gjør at resultatbehandlingen går raskere og er forbundet med høyere konfidens [23]. Instrumentet som ble benyttet i denne oppgaven hadde installert versjon B.04.01 av MassHunter.

1.5 Matrikseffekt

Det er velkjent at fenomenet matrikseffekt i LC-MS- og LC-MSMS-analyser kan føre til over- eller underestimering av analyttkonsentrasjonen. Et hvert laboratorium bør evaluere matrikseffekt på sine metoder, og eventuelt gjøre nødvendige tiltak for å redusere dette. Med tanke på at prøvematerialet for analyse av algetoksiner består av en kompleks matriks som stort sett kun fortynnes før injisering på instrumentet (se kapittel 3), er det viktig å kartlegge

¹Kan for eksempel gi en rask oversikt over en analytt i alle prøver samtidig

eventuell matrikseffekt. Skjell er biologiske organismer som påvirkes av ytre forhold som miljøfaktorer, næringstilgang, temperaturer og havstrømmer der de vokser. De har ingen mulighet til å flytte på seg dersom omgivelsene ikke lenger er optimale. Derfor vil skjellmatinnhold og sammensetning variere, både innen og mellom arter [26].

Før implementering av analytiske metoder for deteksjon og kvantifisering av lipofile algetoksiner, bør følgende spørsmål derfor være vurdert:

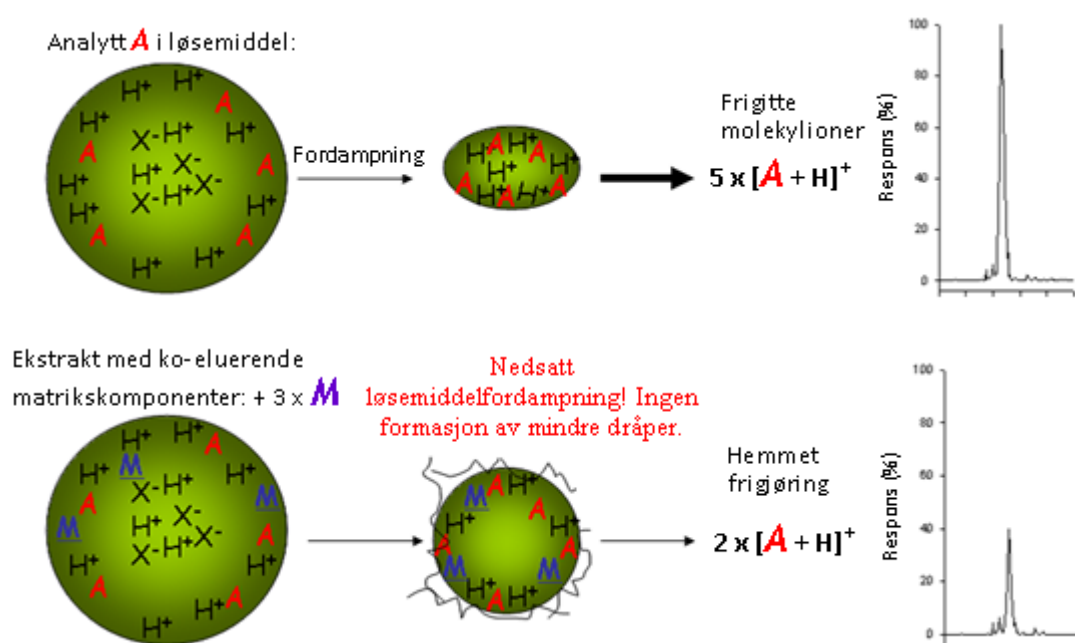
1. Påvirkes matrikseffekt av kromatografiske betingelser?
2. Er matrikseffekt arts- og/eller sesongavhengig?
3. Hvordan skal dette håndteres ved kvantifisering?

Matrikseffekt (ME) innen analytisk kjemi er en uønsket effekt som oppstår under analyse på grunn av sammensetning i prøvematerialet, og som påvirker resultatet i en eller annen grad. Ved LC-MS-analyser kan ME deles inn i to typer; svekking eller forsterkning av analyttens signal, også kalt henholdsvis ionesuppresjon og ioneforsterkning. Dette vil videre kunne påvirke metodens presisjon og nøyaktighet. I tillegg kan ME gi økende grunnlinje, drift i retensjonstid og haledannelse på kromatografiske topper. Den eksakte mekanismen hvordan ME oppstår er ikke fullstendig forstått [27]. Det antas at koeluerende matrikskomponenter kan påvirke signalintensiteten ved å konkurrere med ønsket analytt om de tilgjengelige primærionene i ionekilden for ladning- og ioneoverføringsreaksjoner. Dette kan medføre ionesuppresjon. Reaksjonshastighet og reaksjonseffektivitet avhenger av molekylene som er i ionekilden ved en gitt tid og deres ioniseringsenergi og proton/elektronaffinitet (figur 1.7). Mulige årsaker for ioneforsterkning er lite beskrevet i litteraturen, men Matuszewski et al [27] foreslår at signaløkning kan oppstå dersom standardprøvene inneholder et stort antall analytter, og prøvene som analyseres bare inneholder en analytt.

En av hovedårsakene til ionesuppresjon og matrikseffekt ved bruk av ESI skyldes trolig endogene lipider. Fosfo- og lysofosolipider finnes i høye konsentrasjoner i biologiske matrikser, og selv om disse ikke koeluerer med ønsket analytt kan de påvirke metodens ytelse og robusthet. Ikke-flyktige komponenter som lipider, kan endre overflatespenningen og kokepunkt på dråpeformasjon i ionekilden (se figur 1.7). Dette vil videre føre til at mye av analytten forblir i væskefasen, og mindre blir overført til gassfasen for så å gå videre inn i massespektrometret. I tillegg kan ionesuppresjon oppstå ved at lipidene endrer pH i mobilfasen ved konkurranse om bufferionene mellom frie fettsyrerester og analyttene i ekstraktet. I metoder med høyt eller økende innhold av organiske løsemidler i MF og bruk av

C₁₈-kolonne for kromatografisk separasjon, vil ionesuppresjon forårsaket av fosfatidylcholin, lipider og andre hydrofobe forbindelser oppstå ved henholdsvis 70 - 90 % og > 90 % organisk MF-innhold [28]. Lipider og hydrofobe komponenter kan bli holdt tilbake på den analytiske kolonnen slik at matrikseffekt bygges opp over tid. I tillegg vil ionekilden kontamineres.

Proteiner, peptider, salter og pigmenter i ekstraktet kan også gi uønskede effekter under analyse. Salter og polare forbindelser eluerer gjerne i dødvolumet til kolonnen ved < 20 % organisk MF [28], og kan forårsake ionesuppresjon tidlig i kromatogrammet. Proteiner og peptider eluerer senere, typisk ved 40 – 70 % av organisk MF. Dette kan gi ionesuppresjon, og over tid vil effekten vises ved kolonnetilsmussing og ionekildekontaminasjon [28].



Figur 1.7 Illustrasjon som viser hvordan ionesuppresjon kan oppstå i ESI. Ekstrakter som inneholder ko-eluerende matrikskomponenter kan hindre eller forsinke dannelse av dråper i ionekilden slik at mengden av analyttioner som trekkes inn i massespektrometeret blir mindre, og detektert signal blir svekket [29].

1.5.1 Undersøkelse av matrikseffekt

I tillegg til at matrikseffekt kan evalueres ved sammenligning av analyseresultater i ulike matriks, finnes det flere tilnæringsmodeller for å studere påvirkningsgraden av matriks i LC-MS-metoder.

1.5.1.1 Post-kolonne infusjon

Matrikseffektprofil for hver enkelt matriks og analytt kan undersøkes ved post-kolonne infusjon. Ved hjelp av en T-kobling satt på systemet etter den analytiske kolonnen føres analytten inn ved hjelp av en infusjonspumpe samtidig som blankmatriks injiseres via

autosamplere i HPLC. Resultatet gjør det mulig å estimere matrikseffekten i løpet av en kromatografisk analyse. Forstyrrelser i analyttens grunnlinje visualiseres ved et brått fall eller ved topper i kromatogrammet. Dette vil indikere om matrikskomponenter i prøvematerialet eluerer nær retensjonstiden til ønsket analytt. Samtidig kan områder i kromatogrammet uten matrikspåvirkning identifiseres. Post-kolonnie infusjon er en forholdsvis tidskrevende fremgangsmåte for å undersøke matrikspåvirkning i metoder som inneholder mange analytter, og det kreves større mengder referansemateriale. Da referansematerialene for lipofile algetoksiner er forholdsvis kostbare, ble ikke post-kolonnie infusjon utført i denne studien.

1.5.1.2 Post-ekstraksjon standardaddisjon

Ved post-ekstraksjon addisjon tilsettes en kjent mengde analytt til matrikseksakt. Dette kan utføres på to måter. Den første metoden er også kjent som standardaddisjon ved at ulike analyttkonsentrasjoner tilsettes eksakt med en gitt matriksstyrke. Dette gir muligheten til å vurdere linearitet ved denne eksaktfortynningen. En annen variant er å tilsette samme konsentrasjon av analytt til ekstrakter med varierende matriksstyrke, slik at betydningen av matrikseffekt kan forutsies. I denne studien ble standardaddisjon utført ved tilsetting av en fast analyttkonsentrasjon for undersøkelser vedrørende håndtering av matrikseffekt, se kapittel 1.5.2.

1.5.1.3 Sammenligning av stigningstall

Fordelen med standardaddisjon til blankeksakt med ulike analyttkonsentrasjoner, matriksmatchende standarder (MMS), er at metoden gir stor statistisk styrke da matrikseffekt blir kalkulert fra replikate injeksjoner for flere konsentrasjonsnivå. Stigningstall for standardkurver med fem til sju punkter i blankeksakt og i metanol beregnes ved lineær regresjon. Grad av observert matrikseffekt blir ekvivalent til stigningstallforholdet for eksaktkurven og metanolkurven [16]. Følgende formel benyttes:

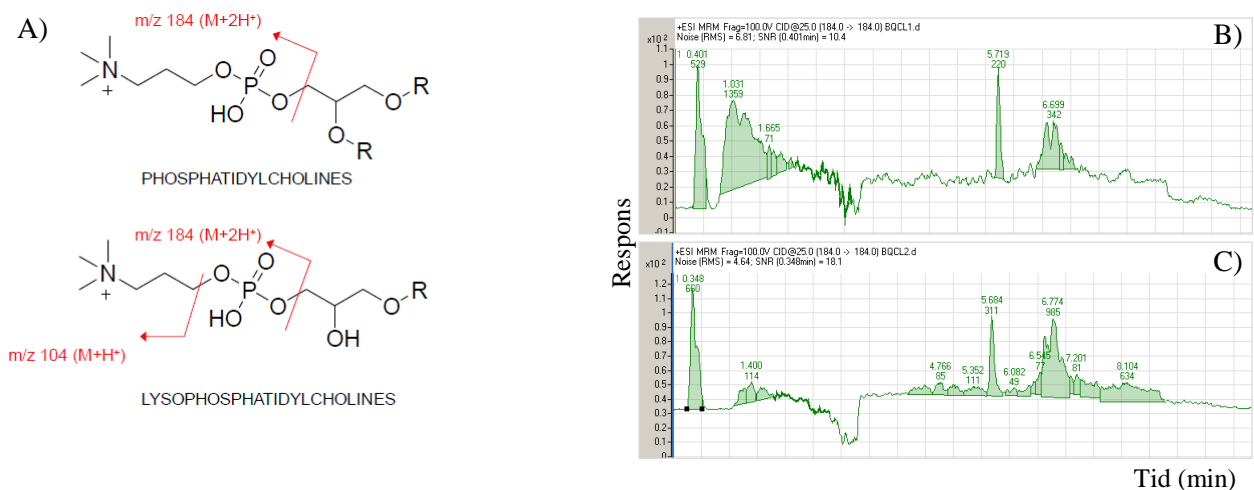
$$ME = \frac{\text{Stigningstall i matriks}}{\text{Stigningstall i metanol}} \quad \text{Formel 1}$$

hvor $ME = 1$ tilsier ingen matrikseffekt, $ME > 1$ antyder signalforsterkning, og $ME < 1$ antyder signalsuppresjon. Grenser for ME -verdier som definerer matrikseffekter er ikke funnet i litteraturen for algetoksiner.

1.5.1.4 Monitorering av fosfolipider ved bruk av LC-MSMS

For monitorering av fosfolipider kan m/z -overgangen $184 > 184$ legges inn i metoden. Denne massen representerer den ioniske gruppen som er felles for alle typer fosfolipider (figur 1.8A) [28]. Dette vil gi et mål på den totale mengden av fosfolipider og lysofosfolipider i en prøve, og gjør det mulig å følge en eventuell sammenheng mellom lipidene og uønskede observasjoner. Forsøket bør utføres på ny kolonne for å få representative resultater.

Det ble undersøkt for mulig metodepåvirkning av fosfolipider i blåskjellmatriks i forkant av denne oppgaven. Det ble funnet ubetydelig bidrag på analyttresponsen ved sammenligning av ny og gammel analytisk kolonne ($> \pm 3\%$). Se eksempel i figur 1.8B) og C) hvor blåskjell er injisert på henholdsvis ny og gammel C_{18} -kolonne på LC-MSMS.



Figur 1.8 A) Molekylærstruktur for fosfatidylcholin og lysofosfatidylcholin som viser den ioniske gruppen som er felles for alle fosfolipider med $m/z\ 184$ [28]. **B)** Kromatogram fra basisk metode som viser ioneovergangen $m/z\ 184 > 184$ i blåskjell på ny C_{18} -kolonne. **C)** Tilsvarende injeksjon som i B) men på gammel C_{18} -kolonne.

I litteraturen er det beskrevet en del angående lipofile algetoksiner og matrikseffekt.

Eksempelvis har Fux [16] i sin studie utført en omfattende undersøkelse vedrørende grad av matrikseffekt for OA, Aza-1 og PTX-2 i blåskjell og østers. Han benyttet både C_8 - og C_{18} -kolonne samt elueringsbetingelser ved $pH \sim 3$ og $pH\ 6,8$, analysert på HPLC og UPLC – begge med MSMS, i tillegg til Q-TOF (MSMS koblet til TOF). Hans endelige konklusjon er at matrikseffekt er høyst variabel, og avhenger av analytt, stasjonærfase i den analytiske kolonnen, type MS-instrument, skjelltype og matriksstyrke i ekstraktet. Tilsvarende konklusjon ble også gitt av Kilcoyne [26] som i tillegg undersøkte matrikseffekt ved basiske betingelser.

1.5.2 Håndtering av matrikseffekt ved analyse av lipofile algetoksiner

Ulike tilnæringsmåter for å minimalisere, eliminere eller korrigere for matrikseffekt i LC-MS-analyser på generelt grunnlag er bredt omtalt i litteraturen. Dette kan blant annet inkludere prøvebehandling før analyse, som ekstraktfiltrering, ekstraktfortynning, protein presipitering, fast-fase ekstraksjon (SPE) eller væske-væske ekstraksjon (LLE). Videre kan bruk av matriksmatchende standarder, standardaddisjon, innføring av internstandard (IS) eller endringer i kromatografiske separasjonsbetingelser for eksempel pH i mobilfasen, elueringsgradient og/eller type kolonnemateriale, påvirke grad av matrikspåvirkning. En forbedret prøveopparbeidelse og endret MF-gradient vil medføre økt analysetid. Bruk av IS og standardaddisjon vil gi økte kostnader til referanseløsninger. Instrumentelle innstillinger for reduksjon av matrikspåvirkning kan gjøres ved sende de første minuttene etter injeksjon til avfallsbeholderen framfor inn i masseanalysatoren, og/eller tilbakespyling av kolonnen etter at de ønskede analyttene har eluert ut.

Gerssen et al [30] konkluderer i sitt studie av matrikseffekt at ved bruk av SPE med polymer sorbent samt basisk kromatografisk metode (pH ~ 11), ble ME redusert til mindre enn 15 % for noen av toksiner. These et al [31] har utført et lignende studie hvor det ble benyttet elueringsbetingelser ved pH 7,9. De viser til at SPE og LLE kan bidra til å øke sensitiviteten på grunn av oppkonsentrering, mens effektiviteten for håndtering av ME ikke var like tydelig.

Ekstraktfortynning kan være effektivt for eliminering av ME, men dette krever svært sensitive analyseinstrument [16]. For fjerning av interferenter ved filtrering av skjellekstrakt, bør type filter velges med omhu. Bruk av feil filtertype kan holde tilbake toksinene, med tap av analyttmengde i ekstraktet til følge [32].

1.5.2.1 Standardaddisjon til prøver med ukjent konsentrasjon

Ved standardaddisjon vil tilsatt kjent konsentrasjon av analytten fungere tilnærmet som en internstandard. Bruk av standardaddisjon til prøver med ukjent toksinkonsentrasjon krever minimum to injeksjoner pr prøve; nullprøve og prøve tilsatt kjent analyttkonsentrasjon. Tilsatt konsentrasjon bør ideelt sett være dobbel så høy som naturlig kontaminert toksininnhold [33]. I tillegg vil korrekt volum i alle analytiske ledd være helt avgjørende for resultatet.

Analyttkonsentrasjon i nærheten av den regulatoriske grensen er det mest kritiske området. Noe større unøyaktighet i prøvesvar ved lavere og høyere konsentrasjoner kan tolereres.

Ved analyse av rutineprøver ved AKF tilsettes det 25 ng/ml til alle prøver, noe som tilsvarer regulatorisk grense (160 µg/kg) for DSP, Aza-gruppen og PTX-2 [3]. Matriksstyrken i de

undersøkte prøvene er 0,2 g/ml (se kapittel 3), og tre ulike beregningsmodeller for matrikskorrigering av prøvesvar sammenlignes:

Metode 1) Beregninger for standardaddisjon etter formel fra Ito et al [34]:

$$C_x = \frac{C_{ADD} \times y_x}{(y_S - y_x)} \quad \text{Formel 2}$$

der C_x = ukjent konsentrasjon av toksin i prøven (ng/ml), C_{ADD} = konsentrasjon av tilsatt mengde toksin (ng/ml), y_x = signal av toksinet i nullprøven, og y_S = signal av toksinet i tilsatt prøve.

Metode 2) Beregninger for matrikskorreksjonsfaktor etter metode fra These et al [31]:

Metoden setter tilsatt kjent mengde lik 100 %, og det benyttes kvantifiserte konsentrasjoner etter følgende formel:

$$ME \% = \frac{100 \%}{C_{ADD} \text{ (ng/ml)}} \times (C_S - C_x)$$

$$MKF = 100 \% - ME (\%) \quad \text{Formel 3}$$

$$C_x^M = C_x + (C_x \times MKF)$$

hvor ME (%) er matrikseffekt i prosent, C_S og C_x er henholdsvis avlest konsentrasjon i tilsatt prøve og i nullprøve (ng/ml), MKF er matrikskorreksjonsfaktor og C_x^M er matrikskorrigert konsentrasjon (ng/ml) i den ukjente prøven.

Metode 3) Beregninger for standardaddisjon etter metode fra Zellmer [35]:

Metoden bygger på tillaging av standardkurve for hver enkelt prøve av sin egen matriks, hvor det tilsettes analyttkonsentrasjon i økende konsentrasjon til flere paralleller. Etter analyse plottes respons (ordinat) og kjent konsentrasjon (abscisse) i et xy-diagram. Nullprøven, $x = 0$, (hvor det ikke er tilsatt analytt) danner skjæringspunktet på y-aksen. Den lineære kurven mellom punktene ekstrapoleres bakover til den krysser x-aksen. Matrikskorrigert konsentrasjon kan enten leses direkte av fra plottet hvor den lineære kurven for prøven krysser x-aksen (absoluttverdi), eller beregnes ut i fra regresjonslikningen for kurven ($y = ax + b$) etter følgende formel:

$$C_x = \frac{-\left(\frac{-b}{a}\right) \times V_T}{V_x} \quad \text{Formel 4}$$

hvor C_x er konsentrasjon i ukjent prøve (ng/ml), V_T er totalvolum av standardtilsatt prøve (ul), og V_x er uttaksvolum av nullprøven (ul). b tilsvare skjæringspunktet for kurven, mens a representerer stigningstallet. Metoden tar høyde for fortykning av prøven.

1.5.2.2 Vurderinger ved bruk av matriksmatchende standarder

Matriksmatchende standarder (MMS) innebærer tillaging av kalibratorer i eksakt samme matriks som prøvene som skal kvantifiseres. Denne tilnæringsmåten for kvantifisering er i utgangspunktet adekvat, såfremt ikke antall ulike skjellarter er mange. Kilcoyne [26] påpeker i sin studie at skjellekstrakter innenfor samme art som stammer fra ulike uttakssteder og/eller som er høstet på ulike årstider, ikke nødvendigvis vil være identiske. Dette er på grunn av at miljøfaktorer og næringstilgang trolig vil kunne påvirke sammensetningen av skjellvevet (for eksempel fettinnholdet). I denne oppgaven undersøkes muligheten for å benytte en type MMS (blåskjell) for kvantifisering av andre typer skjell (kamskjell). Studiet er utført på ekstrakter med matriksstyrke 0,1 g/ml (se kapittel 3).

1.6 Internstandard

Bruk av internstandard (IS) kan være en god tilnærming for å sikre tilfredsstillende resultater for nøyaktighet og presisjon i metoder på LC-MS. Lik mengde IS med kjent konsentrasjon tilsettes alle prøver og standarder. Basert på ratio mellom analyttsignal og IS-signal som en funksjon av analyttkonsentrasjonen i standardene (ISTD), plottes kalibreringskurve. En optimal IS bør ha tilnærmet like kjemiske og fysiske egenskaper som analytten for å kunne kompensere for eventuelle uventede effekter under ekstraksjon og analyse. Samtidig kreves det at den ikke interfererer med analytten(e) som skal analyseres, samt at den ikke må være tilstede i prøven fra før. Ideelt sett ønskes isotopmerket IS. For lipofile biotoksiner er ikke deutererte IS kommersielt tilgjengelige, ei heller andre egnede IS finnes på markedet. Andre mulige IS kan være homologer til ønsket analytt med tilnærmet lik retensjonstid (t_R) og dermed trolig tilsvarende matrikspåvirkning.

Potensielle IS som ble prøvd ut i denne oppgaven ble hentet fra en IS-matrise fra et tidligere samarbeidsprosjekt mellom AKF og Chiron AS (Trondheim). Valg av IS-kandidater for lipofile algetoksiner ble foretatt på grunnlag av funksjonalitets- og polaritetslikheter med analyttene i pH-nøytral metode. Syntetiserte IS ble designet fra skjelettstrukturen for fenylobenzimidazol (PBI) ved substitusjonsreaksjoner av ulike funksjonelle grupper (utført av Chiron AS). Benzimidazol er en heterosyklisk aromatisk forbindelse som består av en fusjon av benzen og imidazol. Fenylingen, som er hydrofobisk, sitter bundet i 2'-posisjon. For å variere de kjemiske og fysiske egenskapene, ble det satt på alkylgrupper av ulik lengde i 1'-posisjon (metyl, etyl, propyl, butyl, pentyl, heksyl, heptyl, oktyl, dodekyl). Ulike andre funksjonelle grupper som amin, hydroksyl, karboksyl og halogen, ble bundet til fenylingen

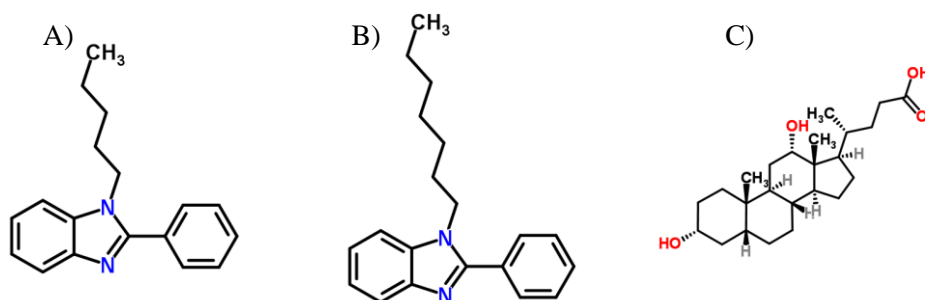
[36]. På bakgrunn av god kromatografi og ionisering samt retensjonstid ble to av disse, 1-pentyl-2-fenylbenzimidazol (Pent-PBI) og 1-heptyl-2-fenylbenzimidazol (Hep-PBI) valgt ut som kandidater for metoden med positiv ionisering (tabell 1.4, figur 1.9A og B).

Deoksykolsyre (DHO) er et metabolsk biprodukt av tarmbakterier, og den er en sekundær gallesyre. Forbindelsen er et polysyklisk steroid og har vært brukt innenfor flere felt i human medisin, blant annet i immunologi ved inflammasjons- og kreftbehandling samt i vaksiner. Egnetheten til DHO som mulig IS ble undersøkt i metode med negativ ionisering (tabell 1.4 og figur 1.9C).

Siste del av denne oppgaven tar for seg utprøving av de ulike IS. Kapittel 4.3 oppsummerer resultatene for dette studiet som i utgangspunktet ble utført på LC-MS for pH-nøytral metode. Utprøvingen ble utført i 2010/2011 før LC-MSMS-metodene var tatt i bruk. Av den grunn ble kun noe testing utført med basisk metode, mens ingen av IS ble prøvd i sur metode.

Tabell 1.4 Kjemiske data for internstandarder som ble testet i metodene for analyse av lipofile algetoksiner [36]

Analytt	Molekylformel	Molekylvekt (g/mol)	pK _a	LogP
1-n-pentyl-2-fenylbenzimidazol	C ₁₈ H ₂₀ N ₂	264,4	5,8	4,6
1-n-heptyl-2-fenylbenzimidazol	C ₂₀ H ₂₄ N ₂	292,4	5,8	5,7
Deoksykolsyre	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	392,6	6,6	4,8



Figur 1.9 Molekylstruktur [36] for A) 1-pentyl-2-fenylbenzimidazol (pent-PBI) B) 1-heptyl-2-fenylbenzimidazol (hep-PBI). C) Deoksykolsyre (DHO)

2. Problemstilling

Den offisielle standard referansemetoden i EU (Commission Regulation EC No 2074/2005) [4] for overvåking av lipofile biotoksiner i skjellmat, har inntil nylig vært biologisk testing ved bruk av mus (MBA). Utover at det er etisk betenkelig å bruke dyreforsøk til kontrollformål, har resultater fra MBA vist dårlig reproducerbarhet, selektivitet og sensitivitet [5]. I den anledning har Commission Regulation (EU) No 15/2011 [2] anmodet om at den offisielle referansemetoden innen EU endres til kjemisk analytisk testing. Væskekromatografi koblet til massespektrometri (LC-MS) har nå blitt en akseptert metodikk innenfor EU for påvisning og kvantifisering av lipofile algetoksiner i skjellmat. Europeisk referanselaboratorium for marine biotoksiner (EURLMB) har utarbeidet en prosedyre for bestemmelse av lipofile marine biotoksiner i skjellmat ved LC-MS/MS (EU-SOP) [7]. I denne prosedyren skisseres mulige kromatografiske betingelser, men det er opp til hvert enkelt laboratorium å velge hvilket system som passer best for seg og sitt bruksområde. Et av fokusene ved denne oppgaven var å sammenligne to av de beskrevne kromatografiske metodene; sur metode ved ca pH 3, og basisk metode ved ca pH 11. I tillegg er disse metodene sammenlignet med den akkrediterte metoden (pH-nøytral metode på LC-MS) som benyttes ved Avdeling for klinisk farmakologi, St Olavs Hospital.

Analyse ved bruk av LC-MS/MS kan påvirkes av matrikseffekt (ME). Matrikspåvirkning må av den grunn vurderes og evalueres ved optimalisering og validering av metodene. Analyse av skalldyr er en utfordrende oppgave forårsaket av kompleksiteten av skjellmatriksen, og antall ulike skjellarter som skal testes i forbindelse med kvantifisering av toksinninnhold. Det er derfor avgjørende at årsak og omfang av ME er best mulig forstått for å kunne sette inn korrigerende tiltak i analysemetoden. I denne oppgaven ble det prøvd ut ulike tilnæringsmodeller for å håndtere ME, som standardaddisjon, matriksmatchende kalibratører samt innføring av internstandard. Samtidig ble påvirkningsgrad av ME for de ulike toksinene ved de tre nevnte kromatografiske forhold kartlagt og sammenlignet. Variasjon av matrikseffekt innen og mellom ulike arter, samt sesongvariasjoner ble også studert.

Formålet med oppgaven er å kunne bidra til valg av den mest optimale metoden for rutineanalyser av algetoksiner, samtidig som den belyser betydning av god kjennskap til prøvematriks som skal analyseres, og hvordan en eventuell matrikseffekt skal håndteres.

3. Materialer og metoder

3.1 Materialer, reagenser og utstyr

3.1.1 Kjemikalier og standarder

Tabell 3.1, 3.2 og 3.3 nedenfor oppsummerer referansemateriale og kjemikalier som ble benyttet. Alle kjemikaliene ble kjøpt av VWR International, Norge (produsent Merck for løsemidlene; produsent Prolab for fast stoff). Deionisering og rensing av H₂O ble utført ved Milli-Q® vannrensesystem levert av MilliPORE.

Alle referansestoffene ble bestilt og produsert ved *National Research Council, Institute for Marine Biosciences* (NRC-CNRC), Halifax, Canada, med unntak av DTX-1 som er produsert av Wako Chemicals, Osaka, Japan. DTX-1 er et ikke-sertifisert materiale, mens de øvrige stamløsningene leveres med sertifisert konsentrasjon. Alle referansestoffene leveres løst i egnet løsemiddel, med unntak av DTX-1 som ble levert som ”neat²”.

Forbindelsene som ble benyttet til forsøk vedrørende innføring av internstandard til de analytiske metodene, var en del av et større forskningsprosjekt igangsatt av AKF og Chiron AS. Totalt ble 15 analoger av fenylobenzimidazol (PBI) testet i metodene hvor to av disse ble valgt ut for grundigere undersøkelser. Deoxycholsyre (DHO) ble også testet ut etter forslag fra Chiron AS som leverte stoffet.

Tabell 3.1 Referansemateriale (CRM³) benyttet for analyse av lipofile algetoksiner

Analytt	CAS-nr	Lot-nr
Okadasyre (CRM-OA-c)	78111-17-8	20070328
Azaspiracid-1 (CRM-AZA1)	214899-21-5	20060719
Azaspiracid-2 (CRM-AZA2)	265996-92-7	20081211
Azaspiracid-3 (CRM-AZA3)	265996-93-8	20081210
Pektenotoksin-2 (CRM-PTX2)	97564-91-5	20021127
Gymnodimin (CRM-GYM)	173792-58-0	20021220
13-Desmetyl spiroolid C (CRM-SPX1)	334974-07-1	20020807
Yessotoksin (CRM-YTX)	112514-54-2	20060308
Dinofysistoksin-1*	81720-10-7	WKM7094
DSP Mus-b (CRM DSP Mus-b)	-	200304

*Ikke sertifisert

²ikke fortynnet eller blandet med andre stoffer

³CRM: Sertifisert referansemateriale

Tabell 3.2 Oversikt over internstandarder som ble testet i metodene for analyse av lipofile algetoksiner

Analytt	CAS nr	Produktnr	Lot nr	Renhet (%)
1-n-Pentyl-2-fenylbenzimidazol	305347-17-5	8761.18	-	99,5
1-n-Heptyl-2-fenylbenzimidazol	305347-16-4	8763.20	-	98,5
Deoksyholsyre	83-44-3	9817.2-5G	11 108	95,0

Tabell 3.3 Oversikt over kjemikalier benyttet i studiet

Produkt	Molekylformel	CAS-nr	Art. nr	Kvalitet
Acetonitril	CH ₃ CN	75-05-8	1.00029	Hypergrad HPLC
Metanol	CH ₃ OH	67-56-1	1.06035	HPLC-grad
Ammoniakk	NH ₃	7664-41-7	1.05423	≥ 25 %
Saltsyre	HCl	7647-01-0	1.00317	37 %
Natriumhydroksid	NaOH	1310-73-2	28244.295	≥ 99 %
Maursyre	CH ₂ O ₂	64-18-6	1.00264	98 – 100 %
Ammoniumformat	NH ₄ HCO ₂	540-69-2	156264	≥ 99 %
Ammoniumacetat	C ₂ H ₃ O ₂ NH ₄	631-61-8	21200.297	≥ 99 %

3.1.2 Tillaging av standardløsninger

Beregning av uttaksvolum av referanseløsningene ble foretatt ved forfynningsformel:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \quad \text{Formel 5}$$

hvor C_1 og C_2 er konsentrasjonen av analytten henholdsvis før og etter forfynning, og V_1 og V_2 tilsvarende volum før og etter forfynning. Antall mol av den løste analytten før forfynning er lik antall mol av den løste analytten etter forfynning. Uttaksvolumet fra referanseløsningen, V_1 , blir dermed som følger:

$$V_1 = \frac{C_2}{C_1} \times V_2 \quad \text{Formel 6}$$

Bruksløsning bestående av Aza-1 og PTX-2 forfynnet i metanol ble laget for standarder (std) til metoden med positiv ionisering (ESI⁺), mens bruksløsning for metoden med negativ ionisering (ESI⁻) inneholdt OA og DTX-1 i metanol (tabell 3.4). På grunn av lavere konsentrasjon av YTX stamløsning, lavere toksisitet og høyere konsentrasjonsnivå i standardkurven, ble YTX tilsatt direkte fra stamløsningen til standarder i negativ metode. Standardrekker som ble benyttet i metodene på LC-MSMS ble laget fra multitoksin standardløsning (MTL), og denne inneholdt alle toksinene med metanol som løsningsmiddel, se tabell 3.5.

Bruksløsningene og MTL ble deretter fortynnet i metanol til sju ulike konsentrasjonsnivå (tabell 3.6) for metodesammenligning, se kapittel 4.1. For undersøkelser med hensyn på matrikseffekt ble toksinfrie (blank-) blåskjellekstrakt og kamskjellekstrakt tilsatt mengde toksiner til konsentrasjonsnivå foreslått i EU-SOP [7] (tabell 3.7). Disse kalibreringsrekkene ble benyttet som matriksmatchende standardrekker (MMS) med matriksstyrke 0,2 g/ml for analyser på LC-MS og 0,1 g/ml for LC-MSMS (se kapittel 3.2.1.1). Internstandardene ble løst i 100 % metanol til konsentrasjon lik 1 mg/ml som videre ble fortynnet til egnet konsentrasjon i henhold til analyttenes respons i metodene.

Tabell 3.4 Tillaging av bruksløsning til metoder på LC-MS

Analytt	Sertifisert kons. (µg/ml)	Uttak fra stamløsning (µl)	Totalt volum (µl)	Sluttkons. (ng/ml)
Aza-1	1,24 ± 0,07	282,3	700	500
PTX-2	8,6 ± 0,3	40,7		
OA	14,3 ± 1,5	21,0	600	500
DTX-1	10,0	30,0		

Tabell 3.5 Tillaging av multitoksin standardløsning (MTL) til metoder på LC-MSMS

Analytt	Sertifisert kons. (µg/ml)	Uttak fra stamløsning (µl)	Totalt volum (µl)	Sluttkons. (ng/ml)
SPX-1	7,0 ± 0,4	22,9	800	200
GYM	5,0 ± 0,2	32,0		
Aza-1	1,24 ± 0,07	129,0		
Aza-2	1,28 ± 0,05	125,0		
Aza-3	1,04 ± 0,04	153,8		
OA	14,3 ± 1,5	11,2		
PTX-2	8,6 ± 0,3	18,6		
DTX-1	10,0*	16,0		
YTX	5,5 ± 0,3	72,7		

* benevning i mg

Tabell 3.6 Fortynning av bruksløsning og MTL til konsentrasjonsnivå for standardkurver for metodesammenligning utført i metanol (kapittel 4.1)

Std	DSP*, PTX2, AZAs, GYM og SPX-1 kons. (ng/ml)	YTX kons. (ng/ml)
1	2	7,5
2	5	15
3	10	25
4	25	50
5	50	75
6	75	100
7	100	250

*DSP: OA og DTX-1

Tabell 3.7 Fortynning av bruksløsning og MTL til konsentrasjonsnivå for MMS benyttet ved undersøkelser vedrørende matrikseffekt i blåskjell og kamskjell (kapittel 4.2)

Std	DSP*, PTX2, AZAs, GYM og SPX-1 kons. (ng/ml)	YTX kons. (ng/ml)
1	3	7,5
2	6	15
3	10	25
4	20	50
5	30	75
6	40	100

*DSP: OA og DTX-1

3.1.3 Analytiske kolonner

Retensjon ved bruk av omvendt-fase HPLC-kolonner påvirkes av molekylstørrelse, lipofile egenskaper og polare eller ioniserbare grupper på molekylet som kan vekselvirke med stasjonærfasen i kolonnen. I tillegg kan pH i mobilfasen påvirke grad av interaksjon mellom analytt og kolonnemateriale. Ioniserte stoffer vil nesten utelukkende finnes i mobilfasen ved bruk av C₈/C₁₈-kolonner. Ioniserbare forbindelser som syrer og baser, kan signifikant endre retensjon og selektivitet ved endringer av mobilfasens pH. Ikke-ioniserte analytter har større retensjon, som for eksempel syrer ved lav pH, og baser ved høy pH. Vanligvis har C₈-kolonner som ble benyttet i sur metode, mindre retensjon for moderat polare til non-polare forbindelser enn C₁₈-kolonner. C₁₈-kolonne ble benyttet i pH-nøytral og alkalisk metode. Matriksinterferenter har også mindre retensjon på C₈-kolonner enn på C₁₈ [37]. Dette er på grunn av at C₈ er mer polar enn C₁₈.

Zorbax Eclipse XDB (Agilent), som ble brukt i både sur og pH-nøytral metode, er en kolonne med bundet fase og med dobbel ende-tildekking med pH-område 2 - 9. Ved ende-tildekking blokkeres overflaten av silika-bærematerialet i kolonnen ved binding av for eksempel trimetylklorasilan. Dermed får analytten i mobilfasestrømmen mindre tilgang til polare silanoler i stasjonærfasen. Dette skal forhindre oppløsning av silika ved middels og høy pH, og dette vil redusere haledannelse på den kromatografiske toppen.

I alkalisk metode ble det benyttet kolonnen XBridge C₁₈ (Waters) som inneholder en kryssbundet type av silika og er stabil over ett bredt pH-område; pH 2 – 12. Etylenbroer knytter tilstøtende silanoler sammen for å øke partikkelstyrken i bærematerialet. I tillegg begrenses antall frie silanolseter og dermed reduseres ugunstige effekter med injisert prøve, som for eksempel brede kromatografiske topper og haledannelse.

3.2 Metoder

Alle analyser ble utført på instrumenter fra Agilent Technologies. To LC-MS-instrument ble benyttet hvorav begge MS-systemene var fra 1100-series LC/MSD utstyrt med elektrospy (ESI) ionekilde. Metodene på LC-MSMS ble analysert på 6460 Triple Quad LC/MS med JetStream ESI ionekilde og HPLC 1200-serie. Begge systemene hadde termostatregulert kjøling på autosamplere satt til + 4 °C.

Samtlige skjell ble levert ferdig ekstrahert av Trondheim Kommune Analysesenter (TKA). Ekstrakter analysert på LC-MS ble opparbeidet til skjellmat:ekstraksjonsvolum ratio 1:5 (v/v). Ekstrakter til analyse på LC-MSMS hadde tilsvarende ratio 1:10 (v/v). Dette utgjør matriksstyrke i ekstraktene på henholdsvis 0,2 g/ml og 0,1 g/ml. Oppdragsgiver for rutineanalyse av skjell ønsker rapportering av positive prøver over 20 µg/kg (YTX: 100 µg/kg). Prøver med toksinkonsentrasjoner under rapporteringsgrensen anses som negative. Prøver som inneholder toksinnivåer over rapporteringsgrensen, men under regulatorisk grenseverdi [3] kan høstes for kommersiell omsetning. Uttakssteder stenges dersom toksinkonsentrasjonen overstiger regulatorisk grenseverdi.

3.2.1 Ekstraksjon og hydrolyse

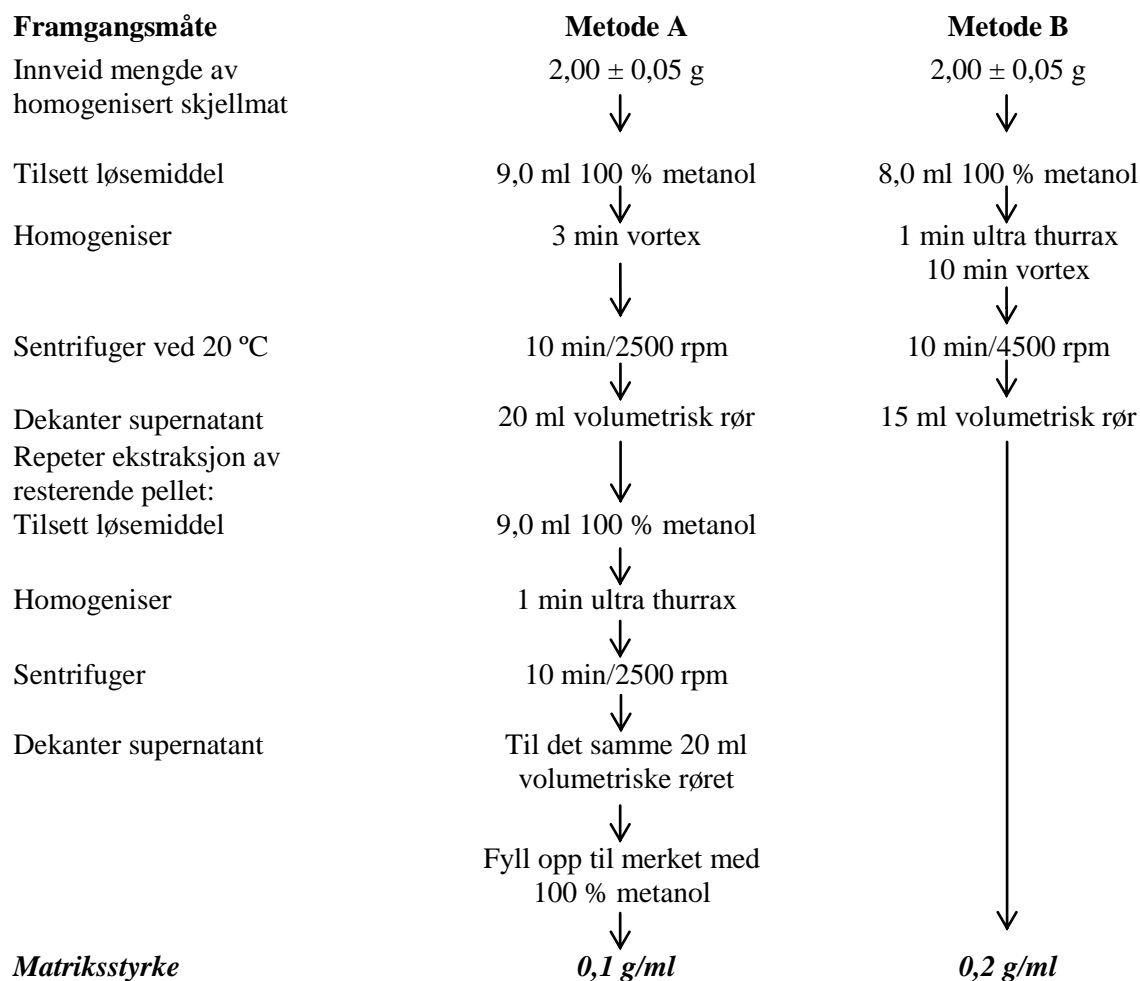
Naturlig kontaminerte skjellprøver som ble benyttet i denne oppgaven var de samme som rutinemessig ble analysert for toksiner i løpet av perioden. I et tidsrom ble det ekstrahert parallelt; det vil si at hver prøve ble delt i to fraksjoner hvorav den ene ble opparbeidet etter metode A (EU-SOP) [7] og den andre etter metode B (rutinemetode) [38] (figur 3.1).

3.2.1.1 Ekstraksjon av toksiner fra skjellmat

Ekstraksjon gjøres fra rå skjell som renses og vaskes utenpå med rent vann før de knekkes. Skjellmaten skylles i sil under rennende springvann for å fjerne saltvann. En representativ prøve, > 100 g skjellmat, veies og homogeniseres. Videre prøvepreparering som beskrives i EU-SOP [7] (metode A) skiller seg noe fra metoden som rutinemessig brukes ved TKA [38] (metode B).

Ved dobbeltekstraksjon, som utføres i metode A, skal ekstraktet volumjusteres. Målet med å utføre en dobbeltekstraksjon er å trekke ut alle toksinmolekylene fra homogenatet, og ekstraktet må derfor fortynnes til en gitt mengde. Enkeltekstraksjon i metode B derimot, er en homogenatfraksjon og kan betraktes som et "sub sample". Det forventes ikke 100 % ekstraksjon da det alltid vil være rester av toksiner igjen i pelleten [21]. Siden vekten av

skjellmaten regnes som lik antall ml i løsningen, vil toksiner som ikke ekstraheres til løsningen bli værende i pelleten som beregnes med i totalvekten av ekstraktet. Ekstraktet skal derfor ikke volumjusteres da det vil føre til ukontrollert fortynning av toksinkonsentrasjonen. I teorien skal ekstrakter fra metode A inneholde en større mengde analytt samtidig som mulige interferenter fra matriks er fortynnet med dobbel mengde løsemiddel. Ulempen er at metoden gir flere volumetriske feilkilder og er mer arbeidskrevende. Alle ferdige ekstrakter skal filtreres før injeksjon på instrumentet (Spin-X[®] 0,22 µm nylon).



Figur 3.1 Flytskjema for ekstraksjon av lipofile toksiner fra skjellmat som gir to ulike skjellmat:ekstraksjonsvolum ratio, og dermed ulik matriksstyrke i ekstraktet.

3.2.1.2 Alkalisk hydrolyse

Biotransformerte acetylerede fettsyreestere av OA, DTX-1 og DTX-2 med felles betegnelse DTX-3, forekommer i skjellene med ulik lengde og metningsgrad. I løpet av fordøyelsen i menneske kan DTX-3 hydrolyseres tilbake til det opprinnelige toksinet. Av den grunn skal en alikvot av ekstraktet hydrolyseres før analyse. Acyl-esterbindingene brytes ved alkalisk hydrolyse, og molekylene gjenoppstår som sine respektive modermolekyl; OA, DTX-1 eller

DTX-2. Etter analyse av både hydrolysert og ikke-hydrolysert ekstrakt kan analysesvarene sammenlignes. Forskjellen mellom toksinnholdet før og etter hydrolysen vil da utgjøre

DTX-3. Ved rutineanalyser er det imidlertid μg total-OA-ekvivalenter pr kg skjellmat som utgis som prøvesvar (se formel 8, kapittel 3.2.5). Dette beregnes ved å summere prøvesvarene for hydrolysert OA, DTX-1 og DTX-2 som gir total-DSP, etter å ha faktorisert med toksisitetsfaktor 0,6 for DTX-2 [15].

Hydrolyse av esterbindinger skjer ved tilsats av 2,5 M NaOH. Prøven settes i varmebad ved 76 °C, og hydrolyseaksjonen stoppes ved å tilsette 2,5 M HCl. Det hydrolyserte ekstraktet filtreres før injeksjon på instrumentet.

3.2.2 pH-nøytral metode på LC-MS

To metoder ble benyttet på LC-MS hvorav den ene analyserte i negativ ioniseringsmodus (ESI) og den andre i positiv (ESI⁺) (tabell 3.8). Metodene har tilnærmet like instrumentelle innstillinger, og de ble modifiserte etter metoden beskrevet av Stobo et al [38].

Kromatografisk separasjon ble utført ved å bruke Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (4,6 x 50 mm, 1,8 μm).

Mobilfaser (MF) benyttet i negativ metode besto av 50 mM ammoniumacetat (pH 6,8) i 100 % H₂O (MF B₁) og 100 % metanol (MF A₁). En lineær gradientøkning av MF A₁ fra 30 % til 90 % i løpet av 2,0 min, med påfølgende 3,0 min hold, ble brukt til eluering. MF-forholdet ble deretter satt tilbake til utgangspunktet, og 2,0 min ble lagt til for likevektinnstilling av systemet. Under analyse i positiv ioniseringsmodus besto eluentene av MF A₁ og MF B₁ som ovenfor, i tillegg til MF C₁; 25 mM maursyre i 100 % H₂O. Elueringen startet med isokratiske betingelser i 2,5 min (12,5 % MF B₁ og MF C₁). Deretter innførtes en lineær gradientøkning av MF A₁ fra 75 % til 85 % over 3,5 min. Denne holdes i 2,0 min, før 2,0 min ekvibrering med utgangsforholdet mellom MF var tillatt før neste injeksjon.

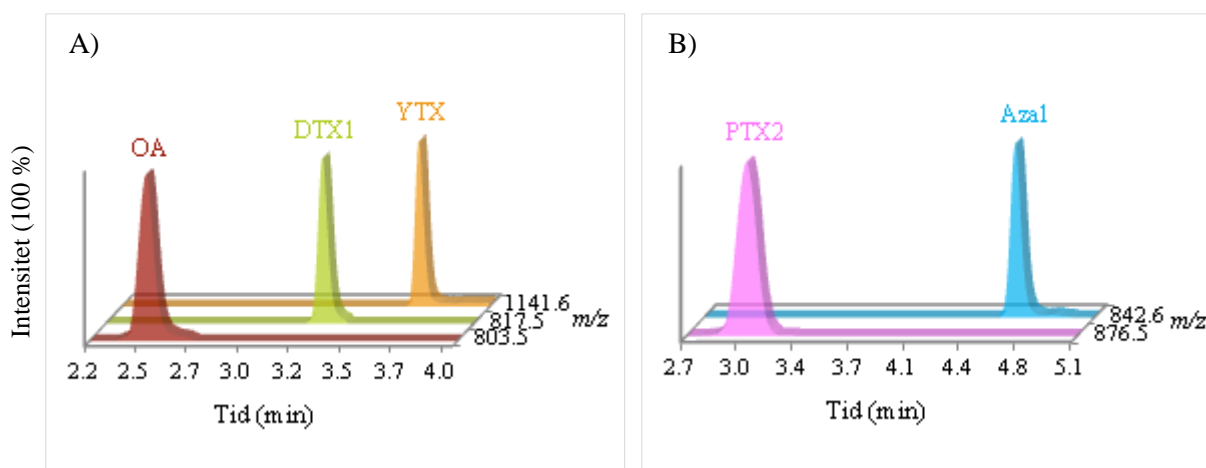
Hastighet for mobilfasene var henholdsvis 0,7 ml/min (ESI) og 1,0 ml/min (ESI⁺).

Injeksjonsvolum og kolonnetemperatur i negativ metode var henholdsvis 5,0 μl og 50 °C, mens det i positiv metode var 10,0 μl og 30 °C. Gasstemperaturen i ionekilden var 350 °C, gasshastigheten for tørkegassen var 10,0 l/min, mens forstøvergassens trykk var satt til 45 psi. Spenningen over kapillæringangen var 5500 V (negativ) og 6000 V (positiv). Total analysetid pr prøve var 7 min for ESI og 10 min for ESI⁺.

LC-MS-metodene inneholder til sammen fem toksiner (tabell 3.8 og figur 3.2), og disse to metodene har vært benyttet som rutinemetoder ved AKF siden 2008. Toksinene i ESI fragmenterer dårlig slik at ingen ytterligere fragment har høy nok respons til bruk som kvalifiseringsion. Den positive metoden inneholder i tillegg m/z for Aza-analogene Aza-2 og Aza-3 som passive analytter. I rutinedrift vurderes ikke Aza-2 og -3, og de ble ikke evaluert i pH-nøytral metode i denne studien. Analyse av prøver på LC-MS krever to separate injeksjoner.

Tabell 3.8 MS-parametere for pH-nøytral metode på LC-MS

Analytt	m/z		Fragmentor (V)	ESI
	Kvantifiseringsion	Kvalifiseringsion		
OA	803,5	-	290	Negativ
DTX-1	817,5	-	330	Negativ
YTX	1141,6	-	225	Negativ
Aza-1	842,5	825,4	220 / 400	Positiv
PTX-2	876,5	841,4	220 / 340	Positiv



Figur 3.2 Kromatogram og eleringsrekkefølge i pH-nøytral metode for A) OA, DTX-1 og YTX (ESI⁻) B) PTX-2 og Aza-1 (ESI⁺)

3.2.3 Sur og basisk metode på LC-MSMS

To alternative metoder for trippelkvadrupol er sammenlignet med LC-MS-metodene. Begge er anbefalt av Europeisk referanselaboratorium for marine biotoksiner (EURLMB), og de er godkjent i EU. EURLMB har utarbeidet *EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of Lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MSMS* (EU-SOP)[7]. EU-SOP foreslår tre eleringsgrader og kromatografiske betingelser. Hvert enkelt laboratorium står fritt til å velge metode, så fremt metoden tilfredsstillers krav satt i EU-SOP. I denne metodesammenligningsstudien ble sur (pH ~ 3) [39] og basisk (pH ~ 11) [10]

betingelse for kromatografisk separasjon valgt. Metodene inneholder totalt 14 toksiner, hvorav ni av disse ble vurdert i denne oppgaven (tabell 3.9 og 3.10, samt figur 3.3 og 3.4). Referansemateriale for DTX-2, YTX- og PTX-analogene var ikke tilgjengelig på analysetidspunktet, og de ble dermed ikke inkludert i undersøkelsene. Metodeparametrene fragmentor, kollisjonsenergi og masseoppløsning for hvert enkelt toksin ble optimalisert eksperimentelt ved direkteinjeksjon av enkeltstoffer ved hjelp av “flow injection analysis” (FIA). Det ble benyttet dynamisk MRM (dMRM) med hurtig polaritetsskifte som skanningstype i begge metodene, slik at både negativ og positiv ionisering kunne utføres i samme injeksjon.

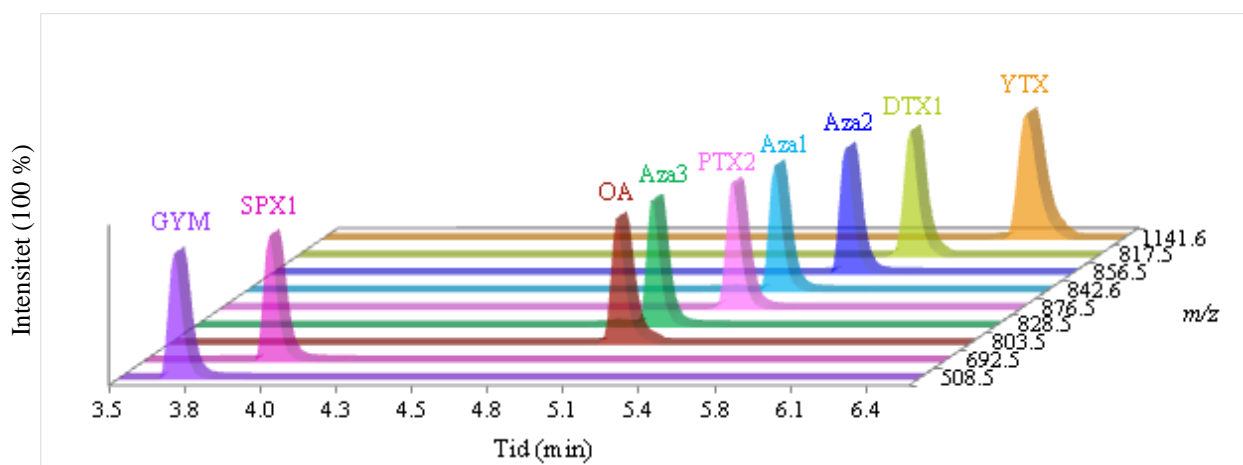
I sur metode ble kolonnen Zorbax Eclipse XDB-C₈ (50 x 3,0 mm, 1,8 µm) benyttet ved 40 °C. MF B₂ besto av 2,0 mM ammonium format og 50 mM maursyre i H₂O (pH ~ 3). MF A₂ var organisk fase hvor samme buffere ble tilsatt 95 % acetonitril (ACN), og MF-hastigheten var 0,4 ml/min. Det ble brukt en lineær gradient fra 12 % til 90 % MF A₂ i løpet av 1,0 til 8,0 min. Dette forholdet ble holdt i ytterligere 2,5 min før likevektsinnstilling av LC-systemet i 2,0 min. Ioniseringsparameterne gasstemperatur, gasshastighet og forstøvergassstrykk ble satt til henholdsvis 200 °C, 7 ml/min og 30 psi. Kappegass-temperatur og -hastighet var henholdsvis 400 °C og 11 ml/min. Kapillærspenningen var 4500 V (positiv) og 4000 V (negativ). Total analysetid pr prøve var 12,5 min. For toksin- og ioneovergangspesifikke innstillinger i MSMS for sur metode, masseoppløsning (MS res), fragmentorpenning (Frag), kollisjonsenergi (CE) og celle akseleratorspenning (CAV), se tabell 3.8. Eksempel på kromatogram er vist i figur 3.3.

Kromatografisk separasjon i basisk metode ble utført ved XBridge C₁₈, 50x2,1 mm, 2,5 µm. MF B₃ besto av 6,7 mM ammoniakk i H₂O (pH ~ 11), og MF A₃ var laget av samme mengde buffer løst i 90 % ACN. Metoden inneholdt en lineær gradient fra 1,0 min med startforhold 90/10 mellom mobilfase B₃ og A₃, til 8,0 min (sluttforhold 10/90). Etter 10,5 min ble MF tilbakestillt til utgangsførholdet. Det ble benyttet 2,0 min til likevektinnstilling av LC-systemet før neste injeksjon. Mobilfasehastighet var satt til 0,4 ml/min. Injeksjonsvolumet var 10 µl, og kolonnetemperaturen var 40 °C. Gasstemperatur og gasshastighet var på henholdsvis 300 °C og 10 ml/min. Forstøvergassstrykket var innstilt til 45 psi. Innstillinger for kappegassen var henholdsvis 350 °C og 11 ml/min. Positiv og negativ kapillærspenning var henholdsvis 5000 V og 4000 V. Total analysetid pr prøve var 12,5 min. Tabell 3.10 viser MSMS-parametrene i metoden. Figur 3.4 viser et eksempel på kromatogram fra basisk metode.

Tabell 3.9 MRM-overganger og MSMS-parametere for sur metode på LC-MSMS

Analytt	Moderion (<i>m/z</i>)	Datterion (<i>m/z</i>)	MS res	Frag (V)	CE (eV)	CAV (V)	ESI
SPX-1	692,5	444,3	Unit	225	40	3	Positiv
		164,1	Unit				
GYM	508,5	490,5	Unit	250	24	3	Positiv
		392,3	Unit				
Aza-1	842,6	824,6	Unit	220	29	4	Positiv
		672,4	Wide				
Aza-2	856,5	838,5	Unit	220	53	4	Positiv
		672,4	Wide				
Aza-3	828,5	810,5	Unit	220	29	4	Positiv
		658,4	Unit				
OA	803,5	255,2	Wide	295	54	3	Negativ
		113,1	Wide				
PTX-2	876,5	823,3	Wide	200	24	3	Positiv
		213,1	Unit				
DTX-1	817,5	255,2	Wide	295	54	3	Negativ
		113,1	Wide				
YTX	1141,6	1061,6	Wide	240	37	3	Negativ
		855,5	Wide				
DTX-2*	803,5	255,2	Wide	295	54	3	Negativ
		113,1	Wide				
PTX-1*	892,5	821,5	Wide	200	24	3	Positiv
		213,2	Unit				
45-OH-YTX*	1157,6	1077,6	Wide	240	37	3	Negativ
		871,5	Unit				
HomoYTX*	1155,6	1075,6	Wide	240	37	3	Negativ
		869,5	Wide				
45-OH-HomoYTX*	1171,6	1091,6	Wide	240	37	3	Negativ
		869,5	Wide				

*Analyttene er ikke vurderte i denne oppgaven på grunn av manglende referanseløsninger på analysetidspunktet

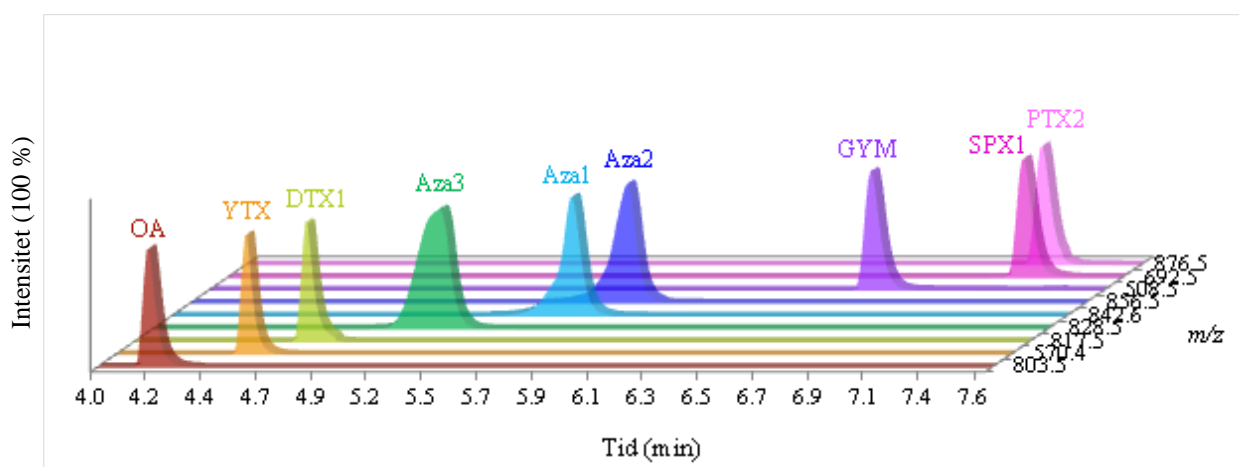


Figur 3.3 Kromatogram og elueringsrekkefølge i sur metode på LC-MSMS; GYM, SPX-1, OA, Aza-3, PTX-2, Aza-1, Aza-2, DTX-1 og YTX med dMRM og hurtig polaritetsskifte (ESI/ESI⁺).

Tabell 3.10 MRM-overganger og MSMS-parametere for basisk metode på LC-MSMS

Analytt	Moderion (<i>m/z</i>)	Datterion (<i>m/z</i>)	MS res	Frag (V)	CE (eV)	CAV (V)	ESI
SPX-1	692,5	444,3	Unit	150	40	7	Positiv
		164,1	Unit		50		
GYM	508,5	490,5	Unit	150	25	7	Positiv
		392,3	Unit		45		
Aza-1	842,6	824,6	Unit	200	32	7	Positiv
		806,5	Unit		40		
Aza-2	856,5	838,5	Unit	200	40	7	Positiv
		820,5	Unit		55		
Aza-3	828,5	810,5	Unit	200	40	7	Positiv
		792,5	Unit		55		
OA	803,5	255,2	Wide	300	45	3	Negativ
		113,1	Wide		50		
PTX-2	876,5	823,5	Wide	230	60	7	Positiv
		213,1	Wide		72		
DTX-1	817,5	255,2	Wide	300	45	3	Negativ
		113,1	Wide		50		
YTX	570,4	501,8	Wide	206	16	7	Negativ
		467,2	Wide		28		
DTX-2*	803,5	255,2	Wide	300	45	3	Negativ
		113,1	Wide		50		
PTX-1*	892,5	839,5	Wide	230	60	7	Positiv
		213,2	Wide		72		
45-OH-YTX*	578,4	467,4	Wide	206	16	7	Negativ
		396,4	Wide		28		
HomoYTX*	577,4	474,4	Wide	206	16	7	Negativ
		403,4	Wide		28		
45-OH-HomoYTX*	585,4	474,4	Wide	206	16	7	Negativ
		403,4	Wide		28		

*Analyttene er ikke vurdert i denne oppgaven på grunn av manglende referanseløsninger på analysetidspunktet



Figur 3.4 Kromatogram og elueringsrekkefølge i basisk metode på LC-MSMS; OA, YTX, DTX-1, Aza-3, Aza-1, Aza-2, GYM, SPX-1 og PTX-2 med dMRM og hurtig polaritetsskifte (ESI/ESI⁺).

3.2.4 Analytiske parametere for utvalgte internstandarder

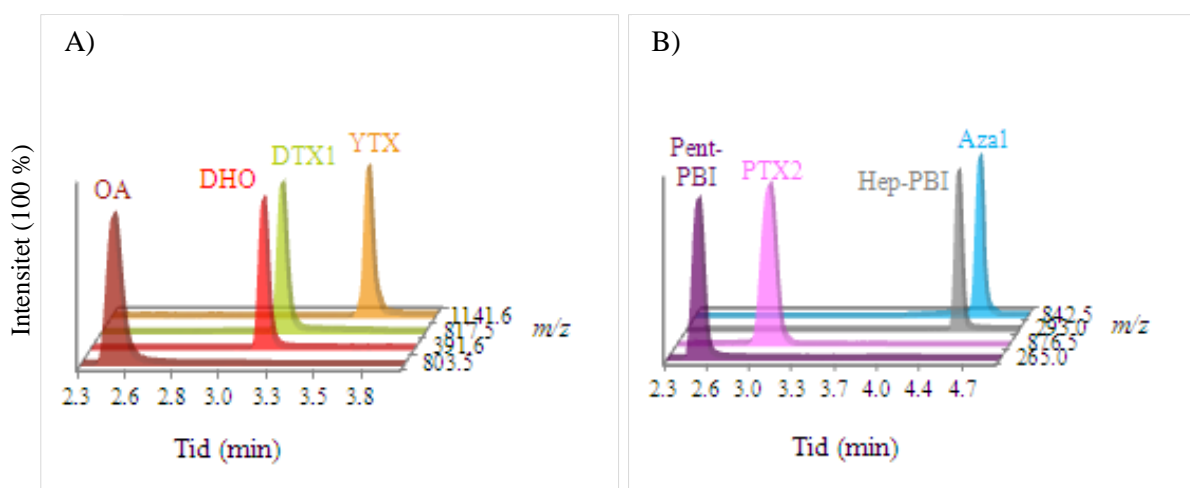
De tre valgte IS for videre utprøving i pH-nøytral og basisk metode ble optimalisert på instrumentene og lagt inn i de eksisterende metodene (tabell 3.11 og 3.12). Det ble ikke funnet egnet kvalifiseringsion for DHO ved negativ ionisering. Eksempel på kromatogram fra alle metodene hvor potensielle IS er inkludert, se figur 3.5 og 3.6.

Tabell 3.11 MS-parametere for internstandarder i pH-nøytral metode på LC-MS

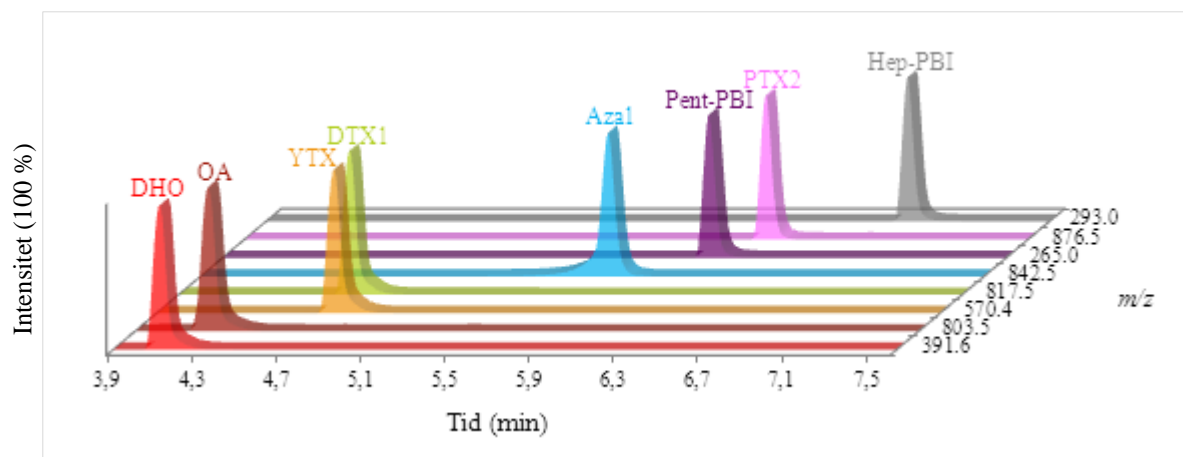
Analytt	<i>m/z</i>		Fragmentor (V)	ESI
	Kvantifiseringsion	Kvalifiseringsion		
Pent-PBI	265	195	75 / 275	Positiv
Hep-PBI	293	195	150 / 275	Positiv
DHO	391	-	200	Negativ

Tabell 3.12 MRM-overganger og MSMS-parametere for internstandarder i basisk metode på LC-MSMS

Analytt	Moderion (<i>m/z</i>)	Datterion (<i>m/z</i>)	MS res	Frag (V)	CE (eV)	CAV (V)	ESI
Pent-PBI	265,0	195,0	Unit	152	24	7	Positiv
		65,0	Wide				
Hep-PBI	293,0	195,0	Unit	152	24	7	Positiv
		65,0	Wide				
DHO	391,6	345,2	Unit	200	32	7	Negativ
		343,3	Wide				



Figur 3.5 Kromatogram og elueringsrekkefølge for internstandarder i pH-nøytrale metoder. **A)** DHO lagt til i metode med negativ ionisering. **B)** Pent-PBI og Hep-PBI lagt til i metode med positiv ionisering.



Figur 3.6 Kromatogram og elueringsrekkefølge for internstandarder i basisk metode analysert på LC-MSMS.

3.2.5 Kvantitativ analyse av lipofile algetoksiner

Kvantifisering av toksinkonsentrasjon i de tre kromatografiske metodene som er sammenlignet i denne studien, ble utført ved ekstern standard metode (ESTD). Det vil si at metodene ikke inneholdt internstandard, og kvantifisering ble utført ved å sammenligne respons i prøven direkte med respons fra analyser av standardløsninger med kjent konsentrasjon. Det ble konstruert kalibreringskurver for sammenheng mellom respons (y_x) og konsentrasjon (C_x), og prøvens analyttkonsentrasjon ble avlest ved hjelp av denne. Bruk av ekstern standard metode forutsetter at man har stabile og reproduerbare injeksjonsvolum i instrumentet. Stoffmengden (Q_x) som registreres i detektoren blir dermed proporsjonal med injeksjonsvolum (V_i) og analyttkonsentrasjon (C_x) etter formel:

$$Q_x \propto V_i \times C_x \quad \text{Formel 7}$$

Fra kalibreringskurven kalkuleres konsentrasjonen for de individuelle toksinene i hver prøve etter ligning [7]:

$$C_x (\mu\text{g}/\text{kg}) = \frac{y_x - b}{a} \times \frac{V_F (\text{ml})}{V_H (\text{ml})} \times V_T (\text{ml}) \times D \quad \text{Formel 8}$$

hvor y_x = areal eller høyde av den kromatografiske toppen, b = skjæringspunktet for kalibreringskurven, a = stigningstallet for kalibreringskurven, V_T = totalvolum av råekstraktet (20 og 10 ml for henholdsvis ekstraksjonsmetode A og B), V_H = volum brukt for hydrolyse, V_F = sluttvolum av ekstraktet etter hydrolyse, W = vekten av innveid prøvemengde (2 g), og D = fortynningsfaktor (dersom ekstraktet ble fortynnet).

I kapittel 4.3 som tar for seg utprøving av IS, ble toksinkonsentrasjoner kvantifisert fra ESTD sammenlignet med kvantifiserte verdier fra standardkurver konstruert på bakgrunn av responsforhold (ratio) mellom analytt og IS (ISTD).

3.2.6 Kvalitetskrav for kromatografiske vurderinger

Alle kromatografiske vurderinger ble foretatt i henhold til kvalitetskrav fra EU-SOP [7]. Ved evaluering av kvantifiseringsgrensen (LOQ) skal signal-til-støy ratio (SNR) være ≥ 10 for fragment med høyest intensitet. Anbefalt LOQ (ikke et krav) er 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for DSP- og Aza-gruppen, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for PTX-2 og 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for YTX. Retensjonstidstabilitet skal være $> 3\%$. Standardkurvenes korrelasjonskoeffisient skal være $\geq 0,98$ for å sikre god nok linearitet. Maksimalt tillatte stigningstallvariasjon mellom to sett kalibreringskurver i samme analytiske sekvens, er $\pm 25\%$. Det fastsettes ingen spesifikke krav til nøyaktighet og presisjon i EU-SOP, ei heller hvordan en eventuell matrikseffekt (utover DSP i blåskjell) skal håndteres. Publisert litteratur for de ulike metodene for lipofile algetoksiner, henviser til ulike aksepterte grenser for godkjenning av nøyaktighet og presisjon [10, 16, 26, 31, 38, 39, 40]. I denne oppgaven ble det valgt å følge *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation* [41] som er i tråd med publikasjoner fra både Gerssen [10], Fux [16] og Kilcoyne [26], i tillegg til at denne blir benyttet ved AKF for validering av legemiddel- og rusmiddelanalyser.

Anbefalte verdier for asymmetrifaktoren er mellom 0,7 og 1,4 [42]. Hvis toppen er symmetrisk, oppnås verdien 1,0. Hvis asymmetrifaktoren er mindre enn 0,7, kalles fenomenet for “fronting”, og dette kan skyldes en overbelastning av kolonnen på grunn av for stor prøvemengde. Når verdien av asymmetrifaktoren blir større enn 1,4 kalles fenomenet haledannelse, også kalt “tailing”. Asymmetrifaktor over 2,0 er ikke akseptabelt [43]. Verdier som er større enn 2,0 kan føre til feil integrering som resulterer i ukorrekt kvantifisering.

Resultatene for metodesammenligning gjort i denne studien er også vurdert mot resultater fra lignende studier. Gerssen et al [10] har sammenlignet sur (kolonne: BDS Hypersil C₈) og alkalisk (kolonne: XBridge C₁₈) metode analysert med bruk av MRM på Micromass Quattro tandem-MS (Waters). Fux [16] har benyttet sur metode hvor det ble benyttet UPLC-MSMS (Waters) og BEH C₁₈-kolonne (Waters). Villar-Gonzales [39] omtaler validering av sur metode analysert på Q-Trap LC-MSMS (AB Sciex) utstyrt med atmosfærisk trykkionisering (API) montert til ESI ionekilde. Stobo et al [38] har vurdert pH-nøytral metode og publiserer resultater ved bruk av C₈-kolonne og Agilent LC-system koblet til MS fra Applied Biosystems. Ito et al [34] beskriver matrikseffekt i kamskjell ved bruk av pH-nøytral metode

(Inertsil ODS-2 kolonne, LC-MS-system fra Hitachi). Både Gerssen et al [30] og Kilcoyne et al [26] har evaluert matrikseffekt i sur og basisk metode på LC-MSMS hvor de benytter omtrent de samme kromatografiske betingelsene. These et al [31] har undersøkt matrikseffekt og opprensning ved bruk av fast-fase ekstraksjon (elueringsbetingelser ved pH 7,9, Gemini NX C₁₈ kolonne og Agilent 1200-serie koblet til Q-Trap system fra Applied Biosystems).

3.3 Statistiske metoder og standardisering av data

Statistiske kalkuleringer ble foretatt ved å bruke MedCalc 12.0.0 i tillegg til analyseverktøyet *Dataanalyse* i Excel 2010. F-test, t-test, ANOVA (one-way), Kruskal-Wallis t-test og Spearman rank korrelasjon ble brukt som signifikanstester og sammenligning av metoder samt matrikseffekt. Statistisk analyse ble utført ved 95 % konfidensnivå ($\alpha = 0,05$) for alle eksperimenter med unntak av Spearman hvor det ble brukt 90 % konfidensnivå ($\alpha = 0,1$) For sammenligning av responsforskjeller mellom metodene, ble det benyttet regresjonsanalyse.

Sammenhengen mellom injisert mengde stoff og signal som registreres i detektoren, danner grunnlaget for kvantitativ analyse i kromatografiske metoder. Responsen måles på bakgrunn av kromatografisk toppareal eller topphøyde som injisert stoffmengde genererer. Topparealet og/eller topphøyden er proporsjonalt med mengde stoff av analytten som har nådd detektoren. Ved normalisering av rådata bestemmes responsfaktorer (D_{RF}) for prøvekomponentene i det aktuelle mengde-/konsentrasjonsområdet etter formelen:

$$D_{RF} = \frac{y_x}{Q_x} \quad \text{Formel 9}$$

hvor y_x er signalet (areal eller høyde) for analytt x, og Q_x er mengde av analytt x som har nådd detektoren. Kromatografiske rådata ble korrigert før metodesammenligning av sensitivitet. Dette ble gjort for å eliminere forskjeller som skyldes ulikt injeksjonsvolum i metodene. Normaliseringsmetoden forutsetter at alle komponenter i prøven gir et signal ($D_{RF} \neq 0$), og at de er tilgjengelige som referansestoff til bruk i kalibreringen [44].

Den enkleste formen for normalisering ble benyttet ved sammenligning av stigningstall for kalibreringskurver med og uten internstandard (IS). Normalisering i denne studien ble gjort ved å justere stigningstallene fra de ulike kurvene til en teoretisk felles skala for å komme fram til verdier sett i forhold til samme størrelsesvariabel (her: stigningstall basert på ratio mellom analyttrespons og IS-respons). De reskalerte, eller normaliserte, stigningstallene tillater også sammenligning av tilsvarende reskalerte stigningstall fra ulike datasett slik at

effekten av visse påvirkninger, som for eksempel dag-til-dag responsvariasjon i instrumentet, elimineres.

Residualer (ϵ) ble beregnet ved å ta differansen mellom observert verdi og forventet middelvei for dataene. Enheten for residualene er den samme som for dataene i utvalget. Ved sammenligning av residualer fra flere modeller kan det være vanskelig å avgjøre hva som er et stort residual eller et lite, samtidig som hvert residual har ulik varians. Standardiserte residualer (ϵ) tillater sammenligning av residualene på en "standard"-skala, og disse beregnes ved å dividere residualen (ϵ) med respektive estimerte standardavvik. Standardisering er en fremgangsmåte for å transformere data, slik at $\epsilon \sim N(0, 1)$. Dette innebærer at de standardiserte residualene vil ha middelvei null og standardavvik en. Standardiserte residualer ble benyttet for sammenligning av responsdrift i metodene. Dersom fordelingen av residualene er tilnærmet normal, vil 95 % av de standardiserte residualene falle mellom -2 og $+2$. Enkeltverdier som er uventet store relativt til $N(0, 1)$, det vil si $\epsilon > 3$, kan være en potensiell avviker [45].

4. Resultater

4.1 Sammenligning av LC-MS og LC-MSMS – pH-nøytral, sur og basisk metode

To nye metoder på LC-MSMS, en sur og en basisk, ble utviklet for å øke analytisk effekt, og for å gi bedre analytisk ytelse. I denne delen av oppgaven vil kvaliteten til disse to metodene sammenlignes med dagens standardmetoder ved AKF på LC-MS hvor pH-nøytrale betingelser benyttes. Metodesammenligningene inkluderer analytisk ytelse ved metodeparametere som følsomhet, linearitet, responsdrift, kvantifiseringsgrense (LOQ), retensjonstid og kromatografiske parametere som symmetri, signal-til-støy ratio (SNR) og toppbredde ved halv høyde (FWHM) samt toppbredde ved grunnlinjen. Sammenligningene og alle beregningene i dette kapittelet ble gjort for referansemateriale fortynnet i metanol og analysert i fem ulike analytiske serier. I hvert oppsett ble standardene analysert i duplikat. For sammenligning av responsdrift innen en serie ble y -residualene plottet mot tid (minutter) for å avdekke eventuell tidsavhengig effekt. Dette ble utført for alle oppsett i alle metodene. Responsdrift i prosent for de enkelte analyseseriene i hver metode ble undersøkt for sammenheng mellom FWHM, toppbredde og symmetrifaktor. Disse kromatografiske parametrene kan endres over tid på grunn av slitasje og ulik kvalitet i kolonnematerialet. Forskjeller i sensitivitet ble vurdert ved å beregne sensitivitetsratio med utgangspunkt i stigningstall fra rutinemetodene på LC-MS. Gjennomsnittlig nøyaktighet i standardløsningene ble beregnet ut i fra analysert verdi versus teoretisk verdi. Metodenes LOQ for hvert toksin ble satt lik 10 x standardavvik for laveste standard (std 1). Resultatene er oppsummert i tabell 4.1 og 4.2.

Statistiske sammenligninger av responsforskjeller ble foretatt ved regresjonsanalyse og Kruskal-Wallis test. Responsdrift relatert til tid og kromatografiske forskjeller ble undersøkt ved Spearman rank korrelasjon hvor tabellverdi for p ble benyttet ved tilfeller hvor $n < 11$. Statistisk signifikante forskjeller i responsdrift, nøyaktighet og kromatografiske parametere ble testet ved bruk av ANOVA one-way eller t-test med ulik varians, begge med 95 % konfidensnivå.

Tabell 4.1 Metodesammenligning av pH-nøytral metode LC-MS og sur og basisk metode LC-MSMS for OA, DTX-1 og YTX, negativ ionisering (tabellen fortsetter på neste side)

Metode	OA			DTX-1			YTX		
	Nøytral	Sur	Basisk	Nøytral	Sur	Basisk	Nøytral	Sur	Basisk
Antall oppsett	5	5	5	5	5	5	5	5	3
Antall prøver	70	70	70	70	70	70	70	70	42
Respons (areal, median)	2,2e ⁵	3,5e ⁴	1,2e ⁶	2,3e ⁵	3,2e ⁴	2,2e ⁵	5,3e ⁴	1,4e ⁵	4,4e ⁴
Stigningstall (areal)	1,4e ⁴	1762	5,6e ⁴	1,5e ⁴	1478	1,1e ⁴	1801	3517	1974
Skjæringspunkt (areal)	4246	-419	-2,0e ⁴	4818	127	-2840	-2008	-3397	-5533
Korrelasjonskoeffisient r (areal)	0,999	1,000	1,000	0,998	1,000	1,000	0,997	1,000	0,999
Responsratio LC-MSMS/LC-MS (areal)	-	0,1	4,0	-	0,1	0,7	-	2,0	1,1
Responsdrift (% , areal, median)	2,1	5,7	-5,0	3,2	-2,8	-3,8	-6,0	-6,1	-3,2
Respons (høyde, median)	4,0e ⁴	8724	3,1e ⁵	6,3e ⁴	6396	5,6e ⁴	1,9e ⁴	1,4e ⁴	1,1e ⁴
Stigningstall (høyde)	2454	439	1,5e ⁴	4151	357	2747	618	351	498
Skjæringspunkt (høyde)	329	-167	-1911	2003	-80	-392	-770	3122	-1992
Korrelasjonskoeffisient r (høyde)	0,997	1,000	1,000	0,998	0,999	1,000	0,997	0,981	0,999
Responsratio LC-MSMS/LC-MS (høyde)	-	0,2	6,0	-	0,1	0,7	-	0,6	0,8
Responsdrift (% , median, høyde)	-1,2	9,7	-2,6	-8,4	-2,3	-1,0	10,2	-15,0	-3,3
Retensjonstid (min)	2,46	5,13	4,18	3,26	5,82	4,74	3,65	6,04	4,68
Retensjonstidstabilitet, CV (%)	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,3	0,1	0,9	0,6
LOQ (ng/ml)	2,1	1,3	0,9	1,4	1,5	1,2	10,4	9,7	5,9
SNR (snitt ved laveste std, n = 10)	17	27	7656	23	22	764	7	219	573
FWHM (min)	0,086	0,063	0,054	0,054	0,064	0,058	0,044	0,175	0,059
Toppbredde ved grunnlinje (min)	0,35	0,29	0,30	0,25	0,30	0,30	0,18	0,64	0,31
Asymmetrifaktor	0,9	1,7	1,5	0,8	1,6	1,8	0,8	2,7	1,6
Nøyaktighet (%)	100	100	99	101	98	98	98	99	100

Tabell 4.1 fortsettelse: Metodesammenligning av pH-nøytral metode LC-MS og sur og basisk metode LC-MSMS for Aza-1 og PTX-2, positiv ionisering

Metode	AZA-1			PTX-2		
	Nøytral	Sur	Basisk	Nøytral	Sur	Basisk
Antall oppsett	5	5	5	5	5	5
Antall prøver	70	70	70	70	70	70
Respons (areal, median)	4,3e ⁵	5,2e ⁶	8,5e ⁶	2,1e ⁵	5,8e ⁵	7,8e ⁴
Stigningstall (areal)	2,0e ⁴	2,2e ⁵	4,0e ⁵	9461	3,2e ⁴	7211
Skjæringspunkt (areal)	2,3e ⁴	2,5e ⁴	2,6e ⁴	9064	1,5e ⁴	-1,7e ⁴
Korrelasjonskoeffisient r (areal)	0,995	1,000	0,999	0,999	1,000	0,999
Responsratio LC-MSMS/LC-MS (areal)	-	11,1	20,0	-	3,3	0,8
Responsdrift (% , areal, median)	0,6	2,3	-4,1	1,7	3,8	-0,9
Respons (høyde, median)	7,4e ⁴	1,3e ⁶	1,9e ⁶	2,4e ⁴	1,4e ⁵	1,9e ⁴
Stigningstall (høyde)	2779	6,6e ⁴	7,9e ⁴	1071	7679	1640
Skjæringspunkt (høyde)	3856	-1,5e ⁵	6,9e ⁴	1277	-3076	-3449
Korrelasjonskoeffisient r (høyde)	0,998	0,991	0,998	0,999	0,999	0,999
Responsratio LC-MSMS/LC-MS (høyde)	-	23,8	28,3	-	7,2	1,5
Responsdrift (% , median, høyde)	1,9	2,9	-0,9	1,5	2,7	-5,7
Retensjonstid (min)	5,05	5,73	5,90	3,05	5,42	6,55
Retensjonstidstabilitet, CV (%)	0,5	0,2	0,4	0,4	0,2	0,1
LOQ (ng/ml)	1,6	2,5	1,0	1,9	1,6	1,2
SNR (snitt ved laveste std, n = 10)	32	487	1612	30	464	572
FWHM (min)	0,115	0,063	0,069	0,132	0,068	0,061
Toppbredde ved grunnlinje (min)	0,44	0,35	0,37	0,47	0,38	0,32
Asymmetrifaktor	0,8	1,6	1,4	1,0	1,6	2,0
Nøyaktighet (%)	102	99	100	103	101	101

Tabell 4.2 Metodesammenligning av sur og basisk metode (LC-MSMS) for Aza-2, Aza-3, SPX-1 og GYM, positiv ionisering

Metode	AZA-2		AZA-3		SPX-1		GYM	
	Sur	Basisk	Sur	Basisk	Sur	Basisk	Sur	Basisk
Antall oppsett	5	5	5	5	5	5	4	5
Antall prøver	70	70	70	70	70	70	56	70
Respons (areal, median)	8,0e ⁵	3,1e ⁶	3,0e ⁶	5,5e ⁶	9,8e ⁵	6,6e ⁶	1,4e ⁶	1,9e ⁷
Stigningstall (areal)	3,5e ⁴	2,4e ⁵	1,6e ⁵	2,4e ⁵	4,4e ⁴	2,6e ⁵	6,2e ⁴	5,8e ⁵
Skjæringspunkt (areal)	2,1e ⁴	-2,6e ⁵	1,3e ⁵	-2,3e ⁵	1,9e ⁴	1,9e ⁵	3,4e ⁴	2,5e ⁶
Korrelasjonskoeffisient r (areal)	1,000	1,000	0,998	1,000	1,000	0,998	1,000	0,987
Responsratio sur/basisk (areal)	-	6,7	-	1,5	-	5,9	-	9,4
Responsdrift (% , areal, median)	4,1	-0,7	-2,5	-3,4	-1,0	-2,2	0,6	-1,4
Respons (høyde, median)	2,0e ⁵	7,0e ⁵	7,7e ⁵	4,0e ⁵	1,6e ⁵	1,7e ⁶	4,3e ⁵	4,9e ⁶
Stigningstall (høyde)	7790	4,9e ⁴	3,3e ⁴	1,7e ⁴	8818	6,6e ⁴	1,8e ⁴	1,2e ⁵
Skjæringspunkt (høyde)	7345	-4,4e ⁴	5,3e ⁴	-1,8e ⁴	5749	7,6e ⁴	1,5e ⁴	8,6e ⁵
Korrelasjonskoeffisient r (høyde)	0,999	1,000	0,994	0,999	1,000	0,997	1,000	0,970
Responsratio sur/basisk (høyde)	-	6,3	-	0,5	-	7,5	-	7,0
Responsdrift (% , median, høyde)	2,1	0,4	-1,8	-4,8	0,6	-1,2	1,0	0,3
Retensjonstid (min)	5,91	6,06	5,42	5,36	3,84	6,52	3,63	6,01
Retensjonstidstabilitet, CV (%)	0,2	0,4	0,2	0,4	0,3	0,1	0,1	0,1
LOQ (ng/ml)	0,9	1,3	2,3	1,8	1,0	1,0	1,3	1,1
SNR (snitt ved laveste std, n = 10)	476	2892	803	2104	5713	8530	4260	1,3e ⁴
FWHM (min)	0,063	0,068	0,062	0,224	0,090	0,058	0,052	0,063
Toppbredde ved grunnlinje (min)	0,36	0,35	0,35	0,86	0,42	0,30	0,29	0,32
Asymmetrifaktor	1,6	1,3	1,6	0,7	1,8	1,9	1,8	1,8
Nøyaktighet (%)	100	100	100	100	101	99	101	99

4.1.1 Kromatografiske sammenligninger

4.1.1.1 Retensjonstid

Det var forventet at retensjonstid (t_R) og elueringsrekkefølge av toksinene ble endret under ulike kromatografiske betingelser. I tillegg til at det ble brukt ulike kolonner i metodene som sammenlignes, hadde også mobilfasene ulik pH. Dette påvirket analyttens retensjon og ladningstilstand (se tabell 1.3). Ved lav pH som ble benyttet i den sure metoden var DSP uten ladning, mens Aza-gruppen og GYM og SPX-1 var protonert. Ved analyser under basiske betingelser var DSP og Aza-gruppen negativt ladet, mens GYM og SPX-1 var uladet. Det forventes at YTX var negativt ladet både ved høy og lav pH, samtidig som PTX-2 holdes uladet uansett pH i mobilfasen da denne analytten ikke har noen funksjonell gruppe.

Resultater for t_R og t_R -stabilitet (CV %) er vist i tabell 4.1 og 4.2, samt i figur 3.2 – 3.4.

Analytter som ble undersøkt under alle de tre ulike kromatografiske betingelsene, eluerte alle først i pH-nøytral metode grunnet høyere mobilfasehastighet. Det ble observert mindre retensjon under basiske forhold enn ved lav pH for DSP-gruppen og YTX. I motsetning til toksinene analysert i negativ modus, eluerte Aza-1 og PTX-2 raskere ut ved lav pH enn ved høy pH. Toksinene som kun ble analysert i sur og basisk metode, Aza-2, Aza-3, SPX-1 og GYM, ga førstnevnte metode vesentlig mindre retensjon. Alle toksinene viste svært god retensjonstidstabilitet ved alle de tre undersøkte kromatografiske forholdene ($CV < 1,0 \%$).

Elueringsrekkefølgen varierte mellom toksingruppene ved ulike forhold. I DSP-gruppen hadde OA alltid mindre retensjon enn DTX-1. I Aza-gruppen eluerte Aza-3 først, fulgt av Aza-1 og Aza-2. Det uladede molekylet PTX-2 derimot, eluerte tidlig i pH-nøytral metode, midt i ved sure betingelser, og helt sist i basisk metode. I forhold til øvrige toksiner i sur metode eluerte YTX sent, mens retensjon i basisk metode var relativt rask. Antallet negative ladninger på YTX-molekylet påvirkes av pH siden analytten har to ioniserbare sulfatgrupper. Ved ionisering under sure og pH-nøytrale forhold fikk YTX enkeltladning ($[M - H]^-$) slik at molekylet forble forholdsvis stort (m/z 1141,6). Under alkaliske forhold derimot, fikk YTX hovedsakelig dobbeltladning ($[M - 2H]^{2-}$), og m/z ble dermed lik 570,4. Det ble forventet lik elueringsrekkefølge for Aza-analogene i henholdsvis sur og basisk metode. Molekylene har molekylære strukturelle likheter med to ioniserbare grupper; syklisk imin og karboksylsyre. I sur metode protoneres aminogruppen, og i alkalisk metode deprotoneres karboksylsyren. Det metabolske produktet Aza-3 eluerte først i begge metodene. Metabolitten var det minste molekylet og samtidig det mest hydrofile (har ingen ekstra metylgruppe) i Aza-gruppen som ble vurdert i denne oppgaven. Det ble ikke funnet statistisk forskjell i t_R mellom sur og basisk metode.

4.1.1.2 Toppsymmetri

Asymmetrifaktor ble beregnet i programvaren til instrumentet. Verdier mellom 0,7 og 1,4 [42] anses som akseptabelt, mens verdien ikke bør overstige 2,0 [43]. Resultatene fra pH-nøytral metode var gode med verdier i området 0,8 – 1,0 for samtlige toksiner. Det var minst variasjon i symmetri mellom oppsettene i pH-nøytral metode, hvor OA viste den største variasjonen i toppsymmetri med 11,8 %.

I både sur og basisk metode hadde de fleste toksinene symmetriverdier som indikerte haledannelse med asymmetrifaktor $> 1,4$. Unntakene var Aza-1, Aza-2 og Aza-3 i basisk metode med faktorverdier innenfor anbefalte grenser. Gjennomsnittlig asymmetrifaktor for

YTX i sur metode var 2,7 med CV lik 16,6 %. Statistisk analyse viste at symmetrifaktor for SPX-1 og GYM ikke var signifikant forskjellige i sur og basisk metode ($p > 0,05$). Toksinene PTX-2 og DTX-1 hadde signifikant bedre symmetri i sur metode, mens OA, YTX, Aza-1, Aza-2 og Aza-3 hadde signifikant bedre verdi i basisk metode ($p < 0,05$).

4.1.1.3 "Full-width-at-half-maximum" (FWHM) og toppbredde

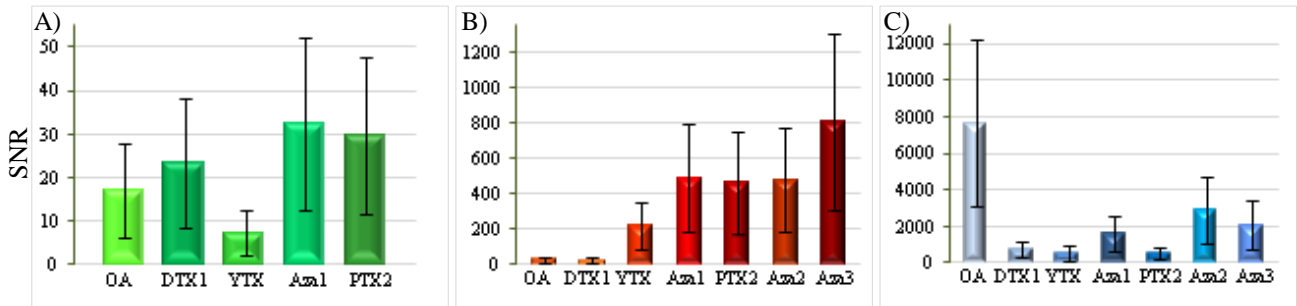
Verdier for FWHM og toppbredde ble beregnet i instrumentenes programvare. FWHM viste signifikante forskjeller for alle analytter i alle tre metodene. De smaleste toppene ble vist for DTX-1 og YTX ved analyse i pH-nøytral metode. De minste FWHM-verdiene for Aza-1, Aza-2, Aza-3 og GYM ble funnet ved sure betingelser, mens basisk metode ga de smaleste toppene for OA, PTX-2 og SPX-1. Størst variasjon i FWHM ved sammenligning av de ulike metodene ble vist for YTX; 0,044 min i pH-nøytral metode og 0,175 min i sur metode. Analytten Aza-3 i basisk metode hadde de bredeste toppene (0,224 min) av alle analyttene. De fleste andre toksiner hadde verdier under 0,1 min i alle metoder med unntak av Aza-1 og PTX-2 i pH-nøytral metode og YTX i sur metode.

Tilsvarende funn som for FWHM ble gjort for toppbredden målt ved grunnlinjen. De signifikant smaleste toppene for DTX-1 og YTX ble vist i pH-nøytral metode. Det samme gjaldt for PTX-2 og SPX-1 som viste lavest verdier under basiske forhold, og Aza-3 under sure forhold. Toppbredde for OA, Aza-1, Aza-2 og GYM viste ingen signifikant forskjell mellom sur og basisk metode. Som ved undersøkelse av FWHM viste også bredde ved grunnlinjen den største variasjonen for YTX. Bredden ble målt til 0,18 min i pH-nøytral metode mot 0,64 min i sur. De bredeste toppene også i denne undersøkelsen ble vist for Aza-3 i basisk metode (0,86 min), tilsvarende resultat som fra sammenligning av FWHM.

4.1.1.4 Signal-til-støy ratio (SNR)

I sur og basisk metode på LC-MSMS var grunnlinjen tilnærmet uten støy for de fleste analyttene, og ved høye analyttkonsentrasjoner returnerte instrumentprogrammet verdi for signal-til-støy ratio (SNR) som "uendelig" for enkelte av toksinene. Disse dataene ble utelatt fra sammenligningen. Basisk metode ga den høyeste gjennomsnittsratio mellom signal og støy for alle stoffer. SNR var signifikant høyere for alle analytter sammenlignet med de to andre metodene med unntak av GYM og Aza-2 ($p > 0,05$) hvor verdier fra sur og basisk metode var like gode. Det ble ikke påvist forskjell med hensyn på SNR mellom sur og pH-nøytral metode for OA, DTX-1 og Aza-1.

Verdier for SNR ble vurdert ved laveste standard (2 paralleller analysert i 5 oppsett, $n = 10$). Resultatene er vist i tabell 4.1 og tabell 4.2. Resultater for SPX-1 og GYM ble utelatt i figur 4.1 på grunn av svært høye verdier. Variasjon i SNR ved laveste standard var forholdsvis stor for alle toksiner i alle metoder. Minst variasjon av alle hadde PTX-2, beregnet til 33 % i pH-nøytral metode. Største variasjon ble funnet for OA; CV = 196 % i basisk metode, hvor målte SNR lå i området fra 176 til 52145 (ikke vist i tabell) med gjennomsnittsverdi på 7656.



Figur 4.1 Signal-til-støy ratio ved laveste standard. Gjennomsnittsverdier med 95 % konfidensintervall (KI) ($n=10$) for **A)** pH-nøytral metode på LC-MS **B)** Sur metode på LC-MSMS **C)** Basisk metode på LC-MSMS. Resultater for GYM og SPX-1 (begge metoder på LC-MSMS) er utelatt på grunn av svært høye verdier.

Ingen av SNR-verdiene ved laveste standard i basisk metode var under nedre grense for utgivelse av kvantitative svar ($SNR \geq 10$). Den laveste enkeltverdien som ble beregnet i basisk metode var for YTX i en parallell med $SNR = 25$. Fire enkeltmålinger av OA i sur metode hadde $SNR < 10$, mens de øvrige toksinene hadde $SNR > 10$ for alle paralleller. For YTX i pH-nøytral metode var beregnet gjennomsnittsverdi for $SNR = 7,0$ hvor åtte av ti målinger var under grense for SNR. I samme metode ble det observert $SNR < 10$ for DTX-1 og OA i henholdsvis tre og seks enkeltprøver av totalt ti. Analyse av PTX-1 og Aza-1 under pH-nøytrale betingelser hadde $SNR > 10$ for alle paralleller ved laveste standard.

4.1.1.5 Kvantifiseringsgrense (LOQ) og nøyaktighet

Teoretisk LOQ ble beregnet ved $10 \times$ standardavvik for laveste standard. Beregnet LOQ var lavere enn laveste standard (tabell 3.5) for samtlige analytter (tabell 4.1 og 4.2) i alle metoder med unntak av YTX ved sure og pH-nøytrale betingelser. For YTX, hvor laveste standard var 7,5 ng/ml, ble LOQ beregnet til 9,7 ng/ml og 10,4 ng/ml i henholdsvis sur og pH-nøytral metode. Basisk metode sammenlignet med sur og pH-nøytral metode ga også lavest LOQ for OA, DTX-1, Aza-1, PTX-2, Aza-3 og GYM. Sur metode ga lavest LOQ for Aza-2, mens LOQ for SPX-1 ble beregnet til lik verdi i begge metodene på LC-MSMS.

Data for gjennomsnittlig nøyaktighet viste ingen statistiske signifikante forskjeller mellom metodene ($p > 0,05$) for noen av toksinene. Alle beregninger for nøyaktighet ble beregnet til

verdier mellom 98 % (YTX i pH-nøytral metode) og 103 % (PTX-2 i pH-nøytral metode). Ved å undersøke gjennomsnittlig ratio i resultatene for nøyaktighet ble det ikke detektert systematiske feil mellom metodene. Det bemerkes for øvrig at ratio for nøyaktighet mellom basisk og sur metode for GYM ble beregnet til 0,94 (ikke vist), indikerte en ikke-signifikant svak negativ bias ($p > 0,05$). Dette tydet på at basisk metode ga noe lavere nøyaktighet enn sur metode ved analyse av GYM.

4.1.1.6 Linearitet

Beregnet korrelasjonskoeffisient for alle oppsett i metanol viste at det var en lineær sammenheng mellom forventet konsentrasjon og respons. De aller fleste toksinene i alle tre metodene hadde korrelasjonsfaktor $r > 0,995$ for arealbasert respons) og $r > 0,991$ for høydebasert respons. Unntak ble observert for GYM i basisk metode med $r = 0,987$ (areal) og $r = 0,970$ (høyde) samt YTX (høyde) i sur metode ($r = 0,981$). Responsen for analytten GYM i basisk metode var svært høy, noe som trolig ga ionemetning i ionekilden. Ionemetning gir kvadratiske kurver med negativ krumning. Det ble også observert at GYM i tre av fem basiske oppsett ikke tilfredstilte krav om linearitet med $r < 0,98$ både for areal og høyde, når høyeste standard ble inkludert i standardkurven. Krav til linearitet ble innfridd dersom høyeste standardnivå fjernes.

4.1.2 Sensitivitet og responsforskjeller

Metodene på LC-MSMS ble sammenlignet ved bruk av lineær regresjon mot pH-nøytrale metoder på LC-MS som referansem metode ($y = x$). Analyser av 7-punkts kalibreringskurver med nivå 2,0 til 100 ng/ml (unntak YTX; 7,5 til 250 ng/ml) i metanol ble undersøkt. Standardene ble analysert i duplikat i fem ulike oppsett og tre ulike metoder, hvor responsen ble normalisert ved beregning av responsfaktor i henhold til ulikt injeksjonsvolum i metodene (se kapittel 3.2.4). Hensikten var å finne ut om det var forskjell i sensitivitet, og hvorvidt eventuell forskjell var signifikant.

Tabell 4.3 viser oversikt over regresjonsligning for respons i pH-nøytral metode (y -verdier) og respons fra henholdsvis sur og basisk metode (x -verdier) samt korrelasjonskoeffisienten (r) mellom datasettene. Forskjeller i respons mellom sur/pH-nøytral og basisk/pH-nøytral ble statistisk vurdert ved Kruskal-Wallis test. I tillegg ble ratio for stigningstall med tilhørende CV beregnet mellom metodene (tabell 4.3). For toksiner som ikke var analysert i rutinemetoden på LC-MS ble basisk og sur metode vurdert mot hverandre etter tilsvarende modell (tabell 4.4). Sensitivitet og responsforskjeller er illustrert i figur 4.2.

Forskjeller i arealbasert respons for metanolstandardene ble påvist for alle undersøkte toksiner. Basisk metode viste signifikant høyere intensitet og sensitivitet for OA, Aza-1, Aza-2, Aza-3, SPX-1 og GYM. Positiv bias ble identifisert for OA og Aza-1 i basisk mot pH-nøytral metode, hvor ratio ble beregnet til henholdsvis 4 og 20. Dette tilsa at responsen var fire ganger høyere for OA under basiske forhold (stigningstall 0,25) enn ved pH-nøytrale betingelser, mens den var 20 ganger høyere for Aza-1 (stigningstall 0,05). Lignende resultater ble funnet for Aza-2 (6,7x), Aza-3 (1,5x), SPX-1 (5,9x) og GYM (9,4x) ved sammenligning av basisk metode mot sur. Signalintensiteten for YTX og PTX-2 var signifikant høyest i sur metode, hvor forskjellen ble beregnet til å være henholdsvis dobbelt (YTX) og mer enn tre ganger så høy (PTX-2) i forhold til analyse under pH-nøytrale betingelser.

Analyse av DTX-1 ved pH-nøytrale forhold ga 10x bedre sensitivitet enn ved lav pH. Nøytral metode viste samtidig noe høyere respons enn basisk, men observert forskjell var ikke statistisk signifikant ($p = 0,7$). Responsforskjellen mellom sur og basisk var derimot signifikant ($p < 0,05$), og hvor basisk metode ga 7,5x høyere signal enn sur.

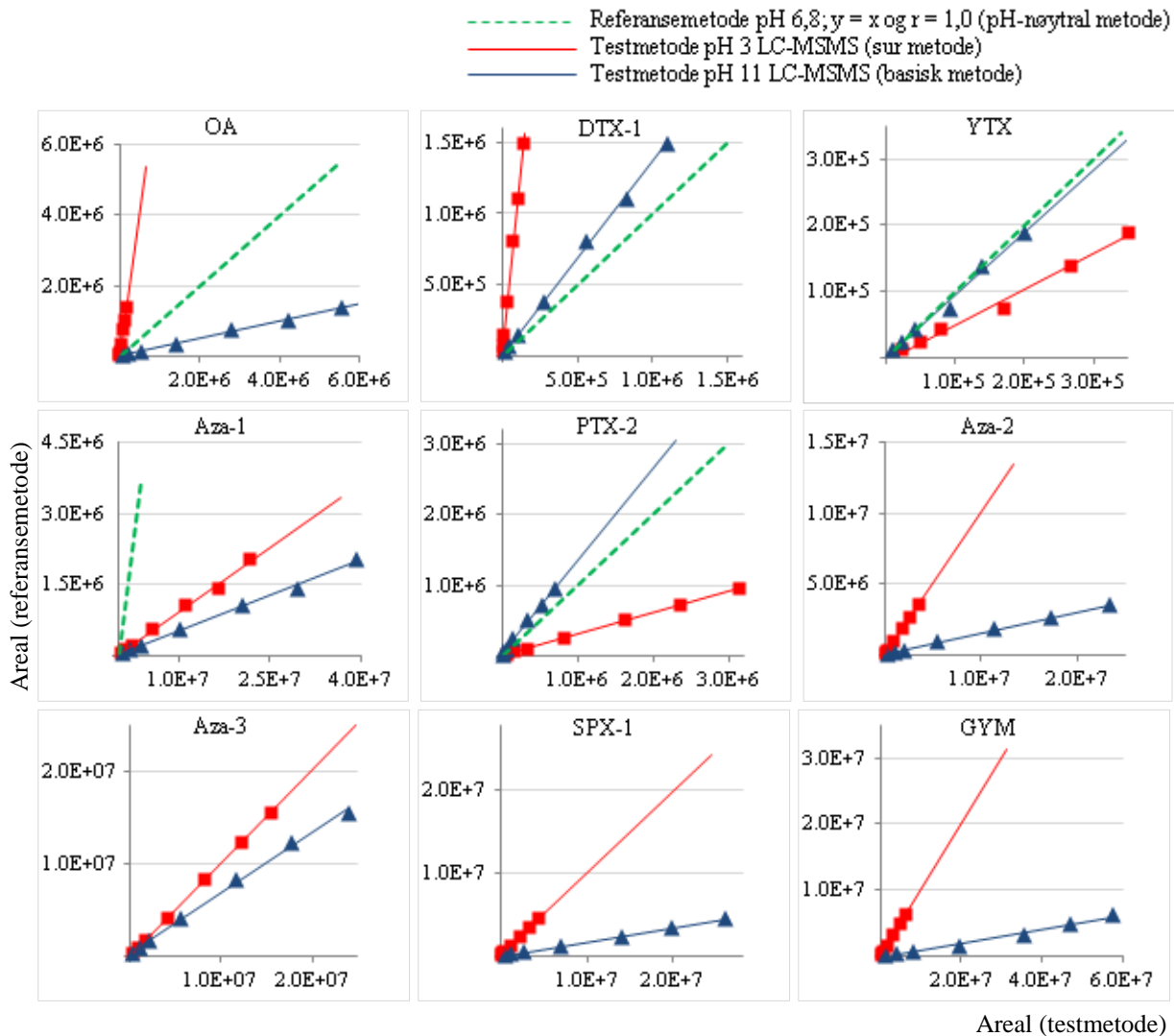
Tabell 4.3 Responsforskjeller for OA, DTX-1, YTX, Aza-1 og PTX-2 i metanol, analysert ved pH-nøytral (LC-MS), sur og basisk metode (LC-MSMS) (arealbasert respons)

Toksin	Metode	<i>n</i>	Regresjonsligning	Korrelasjonskoeffisient (r)	p-verdi	Ratio LC-MSMS/LC-MS	CV (ratio, %)
OA	Sur	70	$y = 7,9x + 7595$	0,999	< 0,05	0,1	8,9
	Basisk	70	$y = 0,25x + 9190$	0,999	< 0,05	4,0	8,5
DTX-1	Sur	70	$y = 10x + 4154$	0,996	< 0,05	0,1	17,9
	Basisk	70	$y = 1,4x + 8593$	0,998	0,7	0,7	6,7
YTX	Sur	70	$y = 0,51x - 287$	0,998	< 0,05	2,0	9,5
	Basisk	42*	$y = 0,91x + 3045$	0,998	0,6	1,1	14,3
Aza-1	Sur	70	$y = 0,090x + 20871$	0,994	< 0,05	11,1	8,4
	Basisk	70	$y = 0,050x + 20946$	0,997	< 0,05	20,0	11,0
PTX-2	Sur	70	$y = 0,30x + 4576$	1,000	< 0,05	3,3	7,0
	Basisk	70	$y = 1,3x + 31864$	0,996	< 0,05	0,8	23,2

*Utført på kun tre analyseserier på grunn av manglende referansemateriale på analysetidspunktet

Tabell 4.4 Responsforskjeller for Aza-2, Aza-3, SPX-1 og GYM i metanol, analysert ved sur og basisk metode (LC-MSMS) (arealbasert respons)

Toksin	<i>n</i>	Regresjonsligning	Korrelasjonskoeffisient (r)	p-verdi	Ratio basisk/sur	CV (ratio, %)
Aza-2	70	$y = 0,15x + 59251$	0,999	< 0,05	6,7	9,2
Aza-3	70	$y = 0,65x + 279357$	0,997	< 0,05	1,5	8,7
SPX-1	70	$y = 0,17x - 11527$	0,999	< 0,05	5,9	4,4
GYM	70	$y = 0,11x - 206852$	0,990	< 0,05	9,4	10,2



Figur 4.2 Sammenligning av arealrespons for lipofile biotoksiner analysert ved to metoder på LC-MSMS med referansemetode på LC-MS ved lineær regresjon hvor $y = x$ og $r^2 = 1,0$. Sammenligning gjort for Aza-2, Aza-3, SPX-1 og GYM baseres på LC-MSMS hvor sur metode (rød graf) ble satt til referansemetode ($x = y$). Hvert punkt på kurvene representerer gjennomsnittsrespons beregnet fra 10 paralleller (6 paralleller for YTX, basisk).

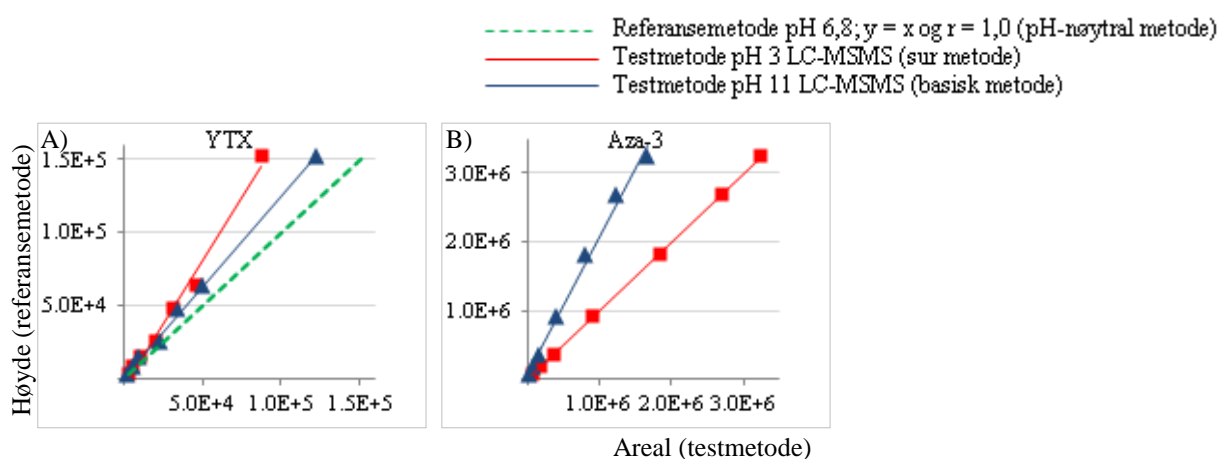
Signalintensiteten for YTX, som ble funnet til å være signifikant høyest i sur metode, må imidlertid relateres til observasjonene gjort vedrørende toppbredde i avsnitt 4.1.1.3 og tabell 4.1. Der ble det påvist signifikant bredere YTX- topper analysert ved lav pH. Ved å gjøre tilsvarende statistiske beregninger basert på toppenes høyde (se tabell 4.5) ble ingen signifikante forskjeller i respons detektert for YTX mellom alle metodene ($p = 0,3$). Både sur og basisk metode viste negativ bias i forhold til nøytral for høydebasert respons (figur 4.3A), og begge de kalkulererte ratioer var $< 1,0$.

Tilsvarende resultater ble observert for Aza-3 som for YTX. Det ble tidligere vist signifikant forskjell i toppbredde ved grunnlinje og FWHM mellom sur og basisk metode (tabell 4.2 og kapittel 4.1.1.3), og detektert responsforskjell kan mest sannsynlig relateres til dette.

Undersøkelser gjort for høydebasert respons for Aza-3 (tabell 4.5 og figur 4.3B) viste motsatte resultater hvor kalkulert responsforskjell var 0,5 ($p < 0,05$). Dette tilsier at sur metode gir dobbelt så høy respons som basisk. Høydebasert respons for øvrige toksiner viste lignende resultater som for arealrespons (se tabell 4.1 og 4.2).

Tabell 4.5 Høydebasert respons – oppsummering av resultater for LC-MS (nøytral metode) og LC-MSMS (sur og basisk metode) ved analyse av YTX i metanol, samt for resultater fra sur og basisk metode for LC-MSMS-analyser av Aza-3 i metanol

Toksin	Metode	<i>n</i>	Regresjonsligning	Korrelasjonskoeffisient (<i>r</i>)	<i>p</i> -verdi	Ratio basisk/sur	CV (ratio, %)
YTX	Sur	70	$y = 1,7x - 5479$	0,986	0,2	0,6	10,9
	Basisk	42	$y = 1,2x + 1711$	0,997	0,1	0,8	12,0
Aza-3		70	$y = 2,0x + 91032$	0,991	$< 0,05$	0,5	10,1

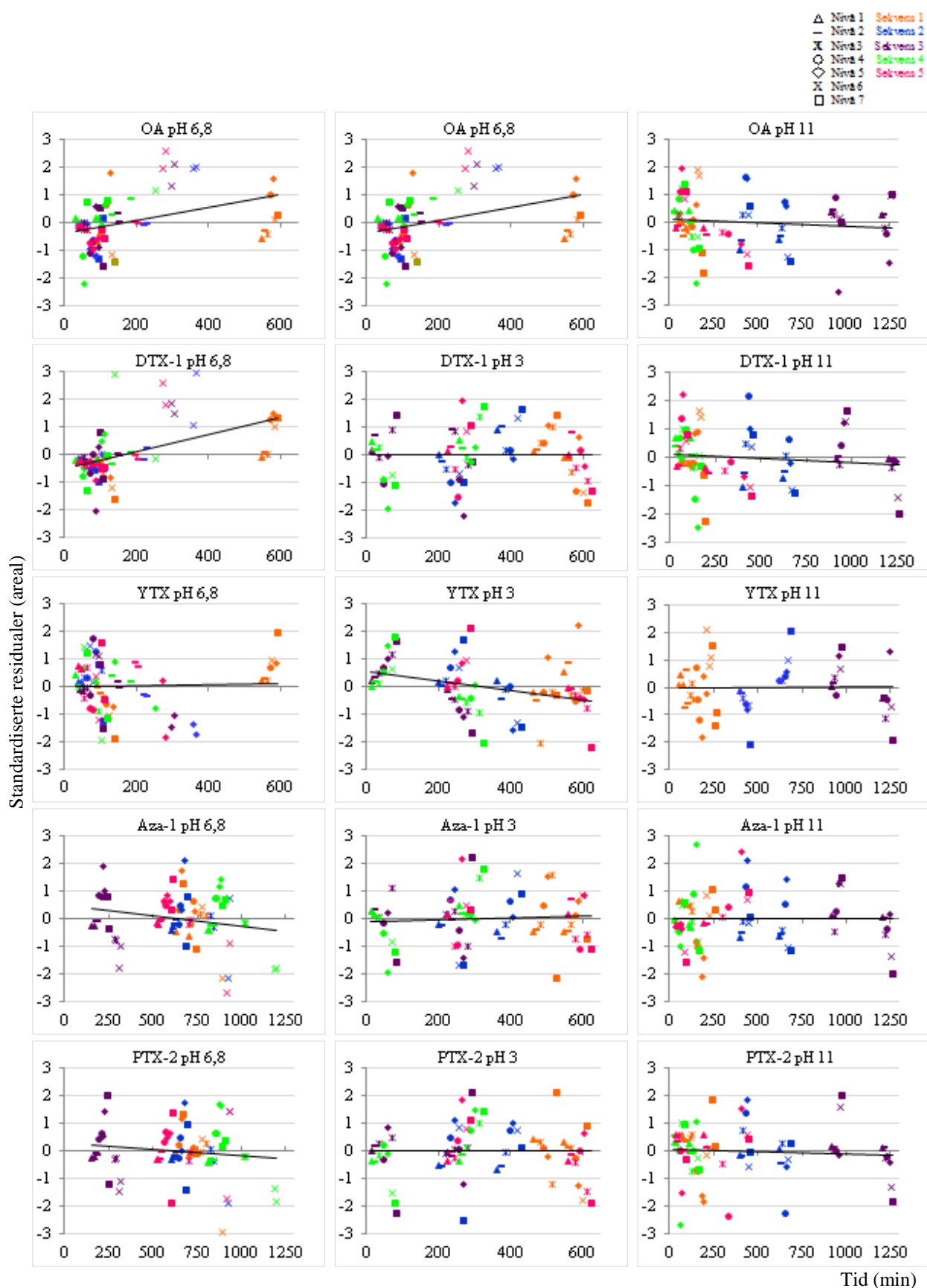


Figur 4.3 A) Sammenligning av høyderespons for YTX for to LC-MSMS-metoder med referansemetode (LC-MS), lineær regresjon hvor $y = x$ og $r^2 = 1,0$. **B)** Sammenligning av høyderespons for Aza-3 basert på LC-MSMS hvor sur metode ble satt til referansemetode ($x=y$).

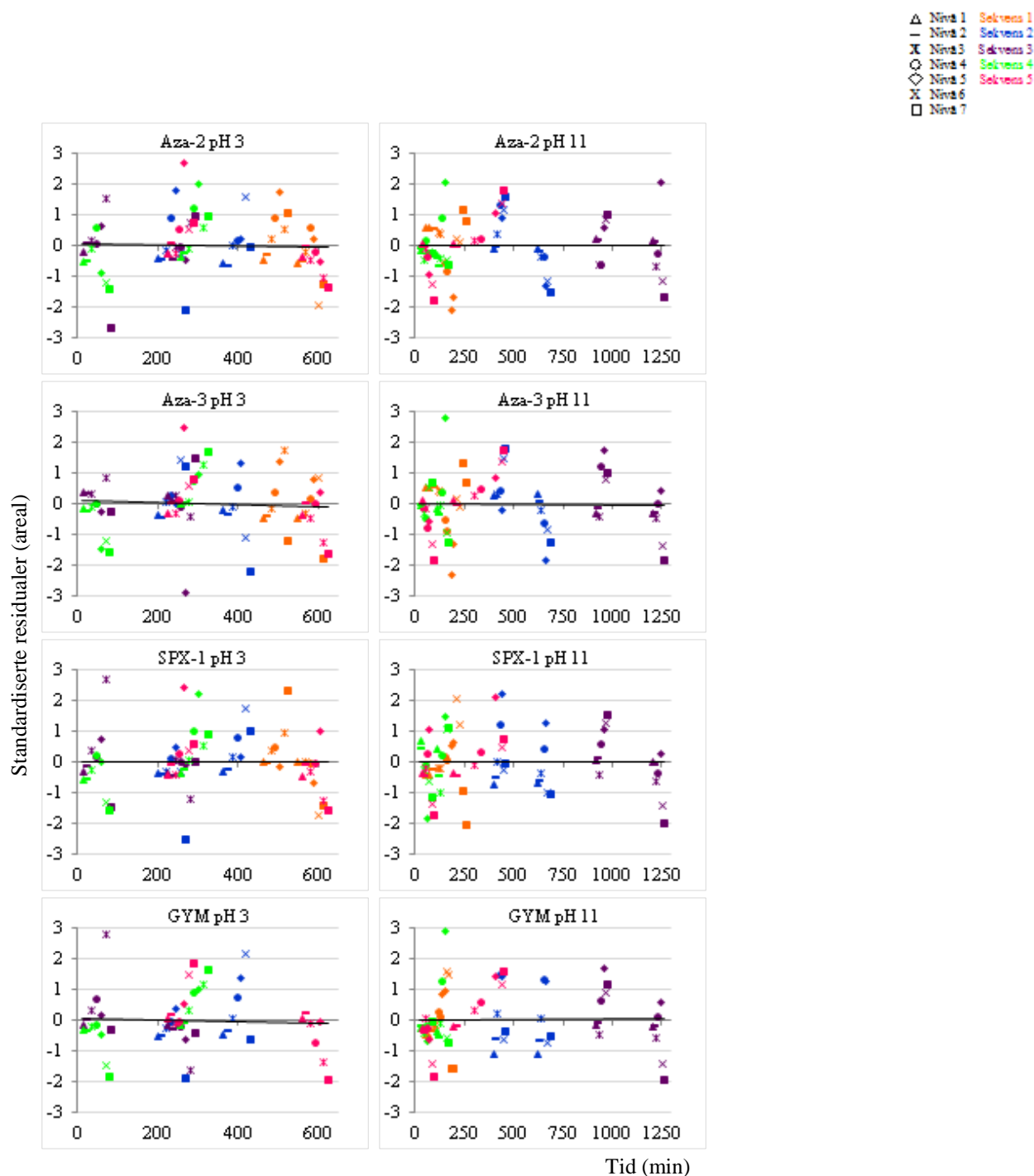
4.1.3 Responsdrift

Responsdrift, kalkulert prosentdifferanse i stigningstall mellom 1. og 2. kalibreringskurve innenfor samme sekvens i løpet av en analyseserie, er et velkjent fenomen ved bruk av LC-MS og LC-MSMS. Denne effekten kan være utfordrende å håndtere i metoder uten egnet internstandard. For kartlegging og sammenligning av hvordan driften generelt sett artet seg i de undersøkte metodene, ble det beregnet standardiserte residualer (ϵ) (se kapittel 3.4) for sju duplikate konsentrasjonsnivå (2,0 – 100 ng/ml, YTX; 7,5 – 250 ng/ml) i fem ulike oppsett med ulik total analysetid⁴. Residualene ble plottet mot tilhørende tidspunkt for hver injeksjon for å undersøke om den observerte responsdriften var tidsavhengig, se figur 4.4 og 4.5.

⁴Kun i tre oppsett for YTX i basisk metode på grunn av mangel på referanseløsning på analysetidspunktet ($n = 42$)



Figur 4.4 Standardiserte residualer for arealbasert respons for OA, DTX-1, YTX, Aza-1 og PTX-2 plottet mot tid (min) for injeksjonstidspunkt i analyseserien. Sju konsentrasjonsnivå fra 2,0 til 100 ng/ml (7,5 til 250 ng/ml for YTX) analysert i duplikat i fem ulike sekvenser, $n = 70$ pr analytt.



Figur 4.5 Standardiserte residualer for arealbaset respons for Aza-2, Aza-3, SPX-1 og GYM plottet mot tid (min) for injeksjonstidspunkt i analyseserien. Sju konsentrasjonsnivå fra 2,0 til 100 ng/ml analysert i duplikat i fem ulike sekvenser, $n = 70$ pr analytt.

Residualplottene ble tolket med henblikk på hvordan residualfordelingen var i forhold til injeksjonstidspunktet, og om det kunne observeres en trend i responsdriften. Samtidig ble det undersøkt om residualene innen metode var tilnærmet normalfordelte, og om enkeltmålinger kunne mistenkes som potensielle avvikere. Undersøkt tidsintervall for responsdrift var for ESI og ESI⁺ i nøytral metode, henholdsvis 30 - 600 min, og 150 - 1200 min. Tidsintervall for sur metode var 10 - 600 min, og for basisk metode fra 20 - 1300 min.

Figur 4.4 og 4.5 viser at spredningen av residualene for de fleste analytter i alle metodene stort sett fordelte seg jevnt rundt standardavvik lik null. Trendlinjene i diagrammene for DSP (OA og DTX-1) i pH-nøytral metode indikerte tidsavhengig økning i analyttrespons ved injeksjonstidspunkt i analyseserien > 150 min. For Aza-1 og PTX-2 analysert ved pH-nøytrale betingelser antydes negativ responsdrift ved lange analyseserier. Med unntak av YTX (pH 3) syntes driften å være liten for alle analyttene i metodene på LC-MSMS. Plottene viste at de standardiserte residualene for de fleste analytter og metoder var tilnærmet normalfordelte med > 95 % av punktene innenfor ± 2 standardavvik. De fleste analyttplottene innenfor alle de kromatografiske metodene viste enkelte punkter mellom 2 og 3 standardavvik. Ingen av enkeltmålingene kunne mistenkes som avvikere ($\epsilon < 3$) [45], selv om spredningen av residualene innenfor enkelte analytiske sekvenser virket stor.

Hensikten med å undersøke den generelle responsdriften var å evaluere om denne var redusert i metodene på LC-MSMS sammenlignet med LC-MS-metodene (innen-serie (%), vist i tabell 4.6), og om en eventuelt observert reduksjon var signifikant. Det ble også vurdert om responsdriften kunne relateres til tiden mellom injeksjon av kalibreringsstandardene, og/eller kromatografi i form av verdier for toppsymmetri, toppbredde og FWHM. Forskjell i tid (min) innen serie, ble beregnet ved å ta tidspunkt for siste injeksjon i standardkurve nr. 2 minus tidspunkt for første injeksjon i standardkurve nr. 1. Gjennomsnittsverdier for asymmetrifaktor, FWHM og toppbredde ble beregnet ut i fra alle konsentrasjonsnivåer i begge kalibreringskurver ($n = 14$ i hver serie). Fullstendig oversikt over resultatene for alle toksinene i forbindelse med undersøkelse av mulige analytiske årsaker til responsdrift, vises i vedlegg A (tabell) og B (figurer). Signifikante, eller mulige funn med tanke på responsdrift for enkelte toksiner, er kommentert i dette avsnittet.

Tabell 4.6 viser at responsdriften (%) i metodene på LC-MSMS var den samme eller større for alle analyttene ved sammenligning med metodene på LC-MS. Analyse av OA ved pH-nøytrale betingelser viste signifikant mindre responsdrift enn metodene på LC-MSMS. Ytterligere undersøkelser viste at det også var signifikant forskjell i responsdrift for OA mellom sur og basisk metode ($p < 0,05$). Basisk metode hadde mindre drift og mindre variasjon i driften enn sur. Resultatene for OA i tabell 4.6 indikerer at det mest sannsynlig forekommer positiv drift med økende respons i løpet av en analyseserie hvor pH-nøytral og sur metode benyttes. I basisk metode kan driften forventes å være negativ på grunn av synkende respons.

Signifikant forskjell i responsdrift mellom metodene ble detektert for DTX-1 hvor resultatene viste at det var minst variasjon i stigningstall mellom standardkurvene i sur metode.

Forskjellen ble derimot ikke funnet til å være signifikant ved sammenligning av kun pH-nøytral og sur metode ($p = 0,21$), ei heller mellom kun sur og basisk metode ($p = 0,28$).

Det vil si at detektert statistisk forskjell i responsdrift kan tilskrives mellom pH-nøytral og basisk metode.

Tabell 4.6 Oversikt over responsdrift basert på areal, $n = 2$ kalibreringskurver i hver sekvens

Toksin	Metode	Responsdrift (%)							p-verdi
		Sekvens 1	Sekvens 2	Sekvens 3	Sekvens 4	Sekvens 5	Snitt	Median	
OA	Nøytral	2,1	0,3	5,9	4,0	-0,3	2,4	2,1	< 0,05
	Sur	0,7	16,1	14,5	5,7	1,7	7,8	5,7	
	Basisk	-1,2	-6,7	2,8	-5,0	-6,4	-3,3	-5,0	
DTX-1	Nøytral	3,2	3,4	1,9	3,4	1,7	2,7	3,2	< 0,05
	Sur	-2,8	4,6	-7,6	4,8	-2,8	-0,8	-2,8	
	Basisk	-2,2	-4,2	-8,0	-2,2	-3,9	-4,1	-3,9	
YTX	Nøytral	27,7	-5,9	-6,5	-6,2	-6,0	0,6	-6,0	0,3
	Sur	-1,0	-3,3	-10,3	-6,1	-12,7	-6,7	-6,1	
	Basisk	-5,7	27,0	-2,8	-3,6*	-	3,7	-3,2	
Aza-1	Nøytral	-1,5	4,1	-1,5	0,6	6,7	1,7	0,6	0,2
	Sur	1,6	3,2	7,2	2,3	-0,6	2,7	2,3	
	Basisk	-1,7	-4,6	-4,1	-5,7	10,8	-1,0	-4,1	
PTX-2	Nøytral	1,7	6,5	-3,5	-0,1	9,4	2,8	1,7	0,3
	Sur	-1,9	3,8	10,2	15,3	-3,5	4,8	3,8	
	Basisk	-3,0	0,7	-8,2	-1,0	6,7	-0,9	-1,0	
Aza-2	Sur	-3,1	4,1	9,2	4,4	-3,3	2,3	4,1	0,6
	Basisk	-0,7	-5,5	-6,2	0,6	25,5	2,7	-0,7	
Aza-3	Sur	-2,5	-4,9	1,4	6,8	-3,0	-0,4	-2,5	0,7
	Basisk	-1,1	-5,5	-3,4	-5,6	12,6	-0,6	-3,4	
SPX-1	Sur	-6,6	7,2	-1,0	6,3	-2,6	0,6	-1,0	0,9
	Basisk	-2,2	-4,2	-3,6	4,4	10,3	0,9	-2,2	
GYM	Sur	-	4,1	-3,2	7,9	-2,9	1,5	0,6	0,9
	Basisk	0,0	-1,6	-4,3	-1,4	14,4	1,4	-1,4	

*Verdi fra 3. kalibreringskurve mot 1. kalibreringskurve i sekvens 1

Beregnet responsdrift for YTX viste at denne analytten hadde den største variasjonen av alle undersøkte toksiner. For arealbasert YTX- intensitet ble det ikke påvist forskjell mellom metodene. Spredningen for stigningstallvariasjon innen de enkelte metodene var ikke signifikant forskjellig fra spredningen mellom metodene. Alle tre metodene viste relativ stor

variasjon i responsdrift for YTX, også for beregninger gjort for signalthøyden (ikke vist). Statistisk analyse utført på høydebasert respons av YTX viste for øvrig signifikant forskjell i responsdrift ($p < 0,05$), hvor det ble indikert minst intensitetsvariasjon innen en analytisk serie ved bruk av basisk metode (se tabell 4.1).

Responsdrift for YTX og Aza-1 i henholdsvis sur og pH-nøytral metode kan relateres til analysetid ($0,05 > p > 0,025$) (figur 4.6 og vedlegg A). Resultatene for YTX viste en større negativ drift når tiden mellom injeksjon av 1. og 2. kurve økte. Dette vil eksempelvis medføre at prøver som injiseres sent i en analytisk serie og som leses av mot kalibreringskurve injisert tidlig, blir estimert til for lave verdier. For Aza-1 derimot, økte responsen som funksjon av total analysetid.

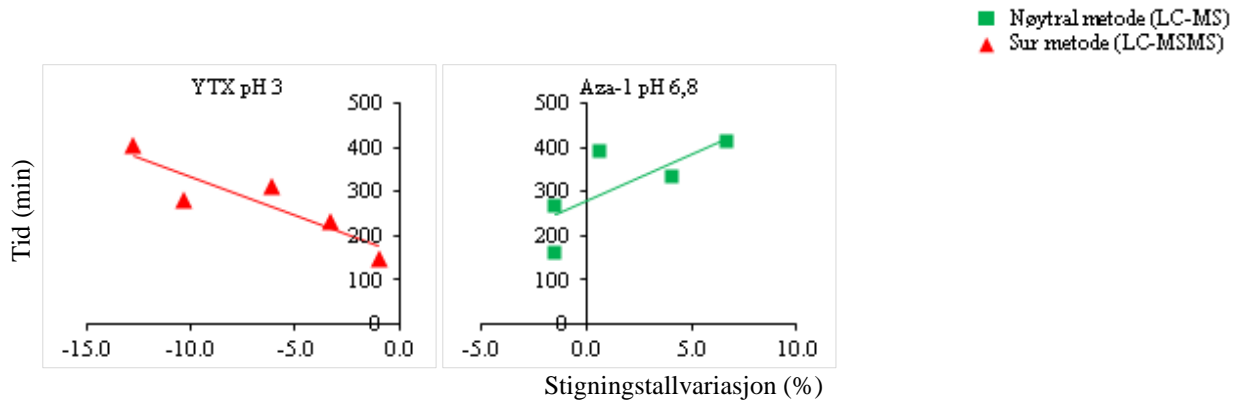
For YTX og SPX-1 ble det funnet signifikant sammenheng mellom asymmetriske topper og responsdrift (figur 4.7 og vedlegg A). Ved sure analysebetingelser ga økende asymmetrifaktor for YTX mindre negativ responsdrift. Asymmetrifaktor for YTX i sur metode var høy ($> 1,8$), og toppene var brede og utflytende. Responsdrift for SPX-1 analysert ved høy pH ble påvirket av toppfasong og signalintensiteten økte med økende asymmetrifaktor.

Når det gjelder toppbredde ved grunnlinjen, ble det funnet sammenheng med responsdrift for DTX-1 og YTX analysert ved lav pH samt for SPX-1 ved høy pH (figur 4.8 og vedlegg A). Smalere DTX-1- og YTX-topper i en analytisk serie så ut til å gi negativ drift som følge av signalfall i løpet av analysetiden. Statistisk analyse av data for SPX-1 i basisk metode viste sammenheng mellom toppbredde og responsdrift ($p < 0,1$, $\rho = 0,8$), mens korrelasjonskurvens stigningstall ikke var signifikant forskjellig fra null ($\alpha = 0,025$, 95 % KI: - 0,0033 til 0,0084). Det vil si at toppbreddevariasjonen for SPX-1 var for liten til å kunne relateres til retning av responsdrift.

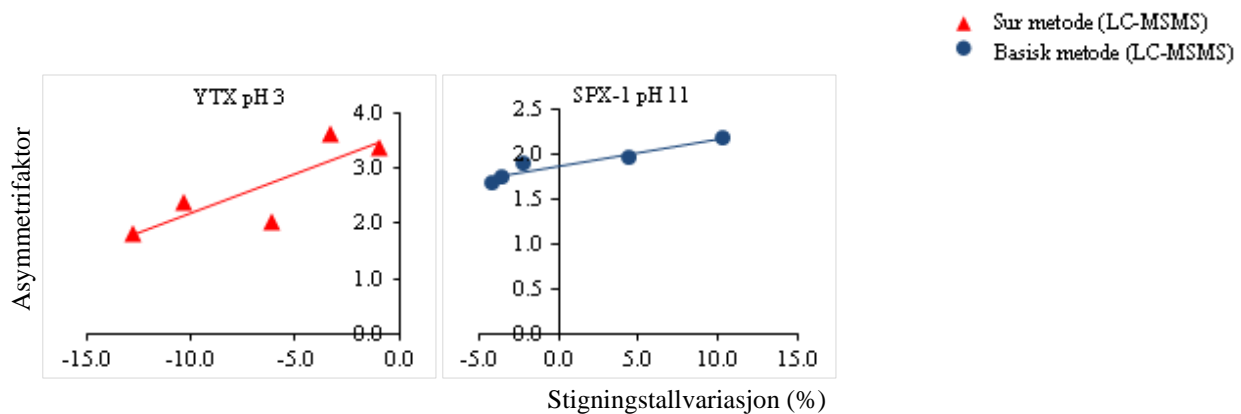
Resultater fra korrelasjonsundersøkelser mellom responsdrift og FWHM (figur 4.9) viste sammenheng både for OA (pH-nøytral og basisk metode) og for YTX (sur og basisk metode). Det ble antydnet at responsdriften innen en analyseserie økte i positiv retning med økende FWHM på OA-topperne. I pH-nøytral metode medførte dette at responsdriften for OA ble mer positiv, mens den i basisk metode ble mindre negativ. Korrelasjonsplott for YTX analysert ved sur og basisk pH, viste begge at bredere topper gir signifikant mindre responsdrift.

Andre interessante ikke-signifikante observasjoner ble funnet for Aza-analogene. Analyse av Aza-1 ved pH-nøytrale forhold viste størst responsdrift (6,7 %) i sekvens 5. Dette oppsettet

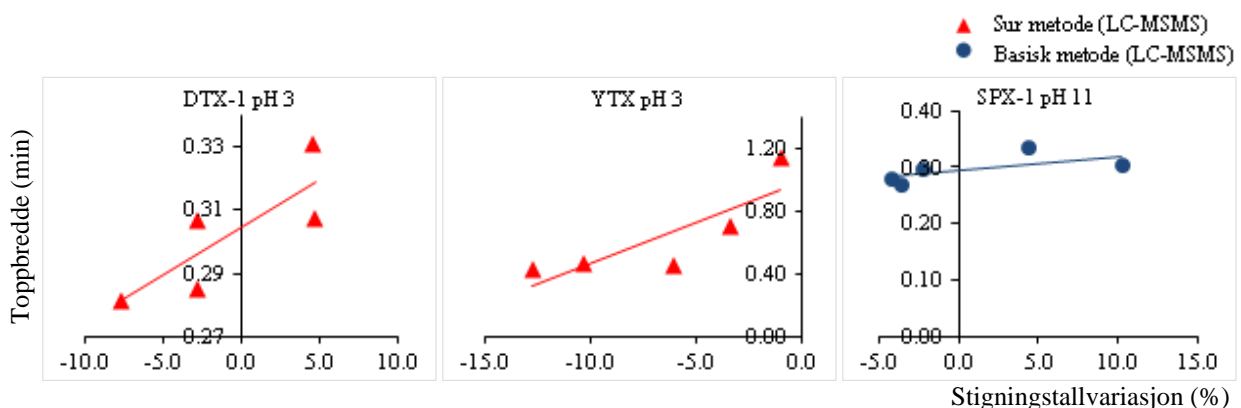
hadde de bredeste kromatografiske toppene, både toppbredde ved grunnlinje og FWHM (vedlegg B, figur B-4). For Aza-2 og Aza-3 analysert ved pH 11 ble størst responsdrift observert i sekvens 5. Denne sekvensen hadde størst tidsspenn i injeksjonstidspunkt mellom kurvene, målt til 400 min (vedlegg B, figur B-6 og B-7).



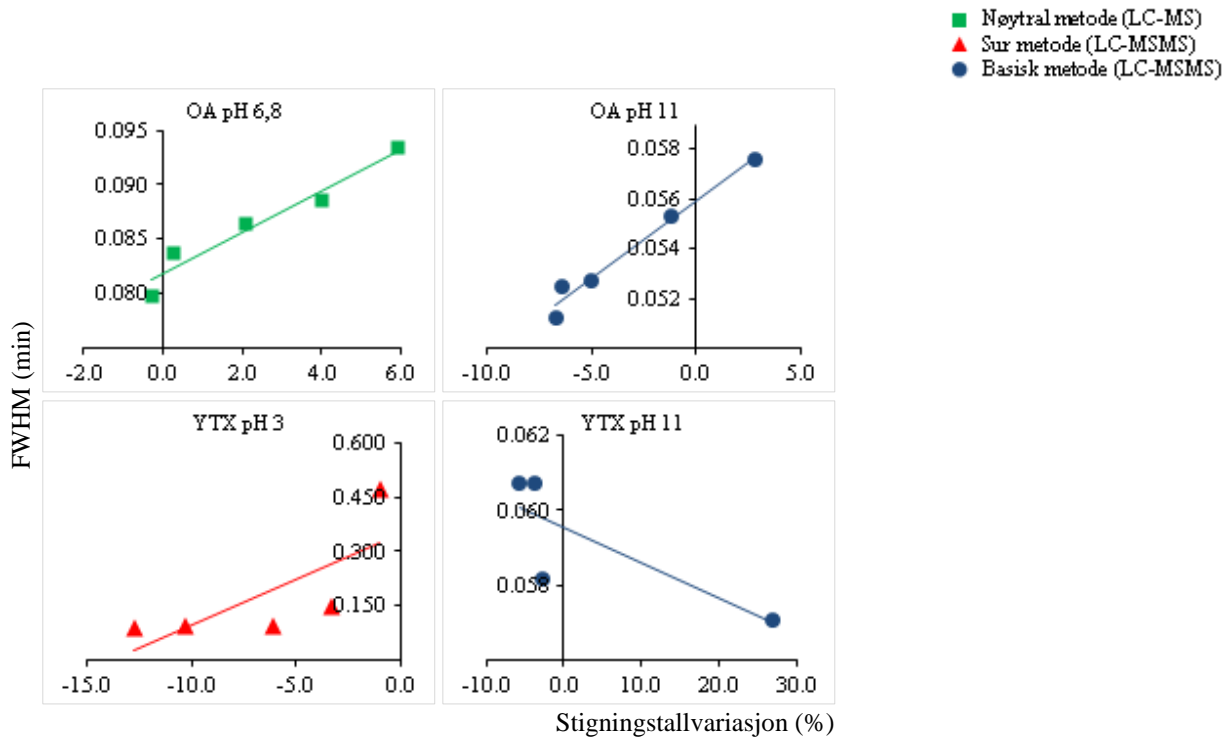
Figur 4.6 Responsdrift i fem analytiske oppsett for YTX og Aza-1 som viser korrelasjon med tidsforskjell (min) mellom injeksjonstidspunkt for to kalibreringskurver ($n = 14$) innenfor hver sekvens.



Figur 4.7 Responsdrift i fem analytiske sekvenser for YTX og SPX-1 som viser korrelasjon med gjennomsnittlig asymmetrifaktor for kromatografisk topper i to kalibreringskurver ($n = 14$) innenfor hver sekvens.



Figur 4.8 Responsdrift i fem analytiske sekvenser for DTX-1, YTX og SPX-1 som viser korrelasjon med gjennomsnittlig toppbredde for kromatografisk topper i to kalibreringskurver ($n = 14$) innenfor hver sekvens.



Figur 4.9 Responsdrift for OA og YTX i henholdsvis fem og tre analytiske oppsett, som viser korrelasjon med gjennomsnittlig FWHM for kromatografisk topper i to kalibreringskurver ($n = 14$) innenfor hver sekvens⁵.

⁵Tre kalibreringskurver i oppsett nr. 1 for YTX

4.2 Matrikseffekt

4.2.1 Matrikseffekt i pH-nøytral, sur og basisk metode

Det ble undersøkt om matrikseffekt (ME) i blåskjell og kamskjell påvirkes av kromatografiske forhold. Det ble laget kalibreringskurver med seks konsentrasjonsnivå (se tabell 3.6) i toksinfrie blåskjell- og kamskjellekstrakt samt i metanol. Metanolkurvene ble brukt som sensitivitetsreferanse. Skjellekstraktene hadde matriksstyrke lik 0,2 g/ml for analyse ved LC-MS, og 0,1 g/ml ved LC-MSMS. Alle standardprøvene ble analysert ved sure (pH 3, buffer: ammoniumformat og maursyre, $n = 4$), pH-nøytrale (pH 6,8, buffer: ammonium acetat, $n = 4$) og basiske (pH 11, buffer: ammoniakk, $n = 6$) betingelser, hvor n er antall analytiske oppsett. Kalibreringskurvene ble konstruert ved snittrespons pr konsentrasjonsnivå (figur 4.11 til 4.13).

Gjennomsnittsverdier for ME, uttrykt som relativ sensitivitet mellom stigningstallene fra kalibreringskurvene i skjellekstrakt mot stigningstallene fra metanolkurver, presenteres i tabell 4.7 og figur 4.10. Dersom beregnet ratio er lik 1,0, antas det at analytten i matriks har samme respons som når den er løst i metanol. Matriks vil da ikke ha påvirkning på analyttens sensitiviteten i metoden. Hvis beregnet ratio er mindre enn 1,0 kan det tyde på signalsuppresjon på grunn av matriks, og tilsvarende dersom ratio er større enn 1,0 kan det tyde på signalforsterkning. Begge tilfeller kan være forårsaket av ukjente komponenter i matriks.

Resultatene viste at grad av ME var avhengig av de kromatografiske betingelsene, men at toksinene ble påvirket forskjellig. Toksinene i Aza-gruppen, SPX-1 og GYM ble i mindre grad utsatt for signalinhiberende komponenter i matriks, både i blåskjell- og kamskjellekstrakt, under alle undersøkte elueringsforhold. For Aza-gruppen var ionesuppresjon ($ME < 1$) mest uttalt i blåskjell analysert ved pH 3. En relativ høy grad av signalforsterkning for begge arter ble påvist for DSP-gruppen i sur metode, mens det ble observert signalundertrykkelse ved alkaliske betingelser ($p < 0,05$ for begge arter ved begge betingelser). For de andre toksinene i sur og i pH-nøytral metode ble det ikke påvist signifikante forskjeller mellom signalstyrken i de undersøkte artene i forhold til analyttresponsen i metanol ($p > 0,05$). Det ble heller ikke funnet holdepunkt for forskjellig matrikspåvirkning mellom ekstrakter med ulik matriksstyrke ($p > 0,05$).

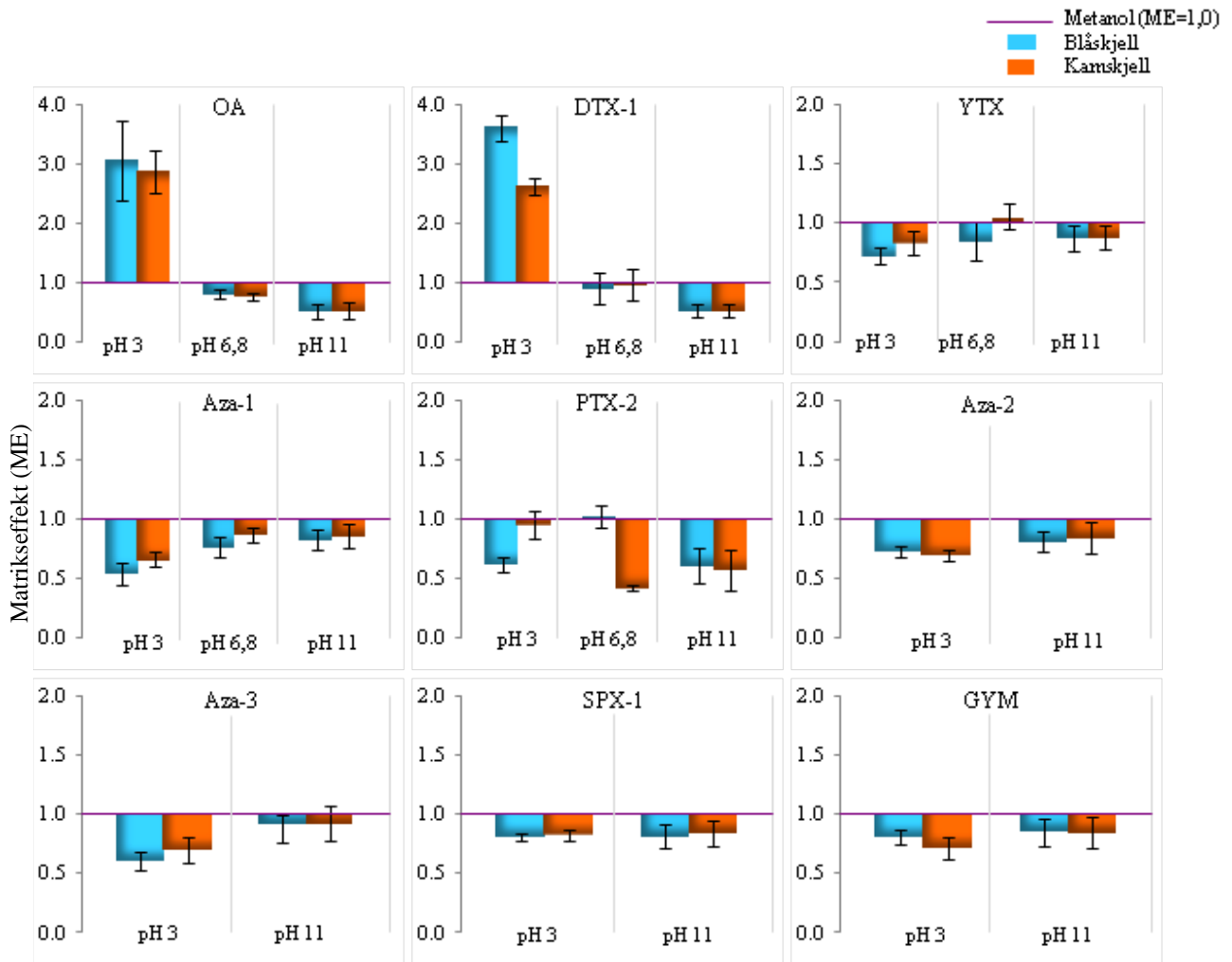
For to analytter ble det observert forskjellig effekt av matriksen for de to skjelltypene analysert ved samme betingelser. Ved analyse av PTX-2 i blåskjell indikerte resultatene fra pH-nøytral metode ingen matrikspåvirkning, samtidig som det ble observert signifikant ionesuppresjon i kamskjell ($p < 0,05$). Analyse av PTX-2 ved pH 3 viste motsatt resultat; undertrykkelse av signal i blåskjell, mens ingen matrikspåvirkning ble observert i kamskjell ($p = 0,1$). I pH-nøytral metode

antydtes signalet for YTX i blåskjell å bli undertrykket, mens responsen i kamskjell viste en mindre grad av forsterkning ($p = 0,1$). Ingen signifikante forskjeller i ME mellom blåskjell og kamskjell for de øvrige toksinene ble observert ($p > 0,05$).

Tabell 4.7 Relativ sensitivitet (matrikseffekt, ME) ved ulike kromatografiske betingelser med p-verdier (95 % konfidensnivå) for forskjell i respons mellom matrikser; blåskjell/metanol (B/M), kamskjell/metanol (K/M) og kamskjell/blåskjell (K/B)

Toksin	Matriks	pH 3 ($n = 4$)			pH 6,8 ($n = 4$)			pH 11 ($n = 6$)					
		ME-verdi	p-verdi			ME-verdi	p-verdi			ME-verdi	p-verdi		
			B/M	K/M	K/B		B/M	K/M	K/B		B/M	K/M	K/B
OA	Metanol*	2255				$1,3e^4$				$6,0e^4$			
	Blåskjell	3,1	<0,05			0,8	0,8			0,5	<0,05		
	Kamskjell	2,9		<0,05	0,8	0,8		0,8	0,9	0,5		<0,05	1,0
DTX-1	Metanol*	1001				$1,0e^4$				8076			
	Blåskjell	3,6	<0,05			0,9	1,0			0,5	<0,05		
	Kamskjell	2,6		<0,05	0,5	1,0		0,9	0,9	0,5		<0,05	0,6
YTX	Metanol*	2126				347				4061			
	Blåskjell	0,7	0,6			0,8	0,3			0,9	0,4		
	Kamskjell	0,8		0,4	0,9	1,1		0,2	0,1	0,9		0,4	0,8
Aza-1	Metanol*	$7,5e^4$				5607				$2,4e^5$			
	Blåskjell	0,5	<0,05			0,8	0,4			0,8	0,2		
	Kamskjell	0,7		0,2	0,1	0,9		0,4	0,8	0,9		0,2	1,0
PTX-2	Metanol*	$2,4e^4$				1907				7028			
	Blåskjell	0,6	0,1			1,0	0,8			0,6	<0,05		
	Kamskjell	1,0		0,9	0,1	0,4		<0,05	<0,05	0,6		<0,05	0,7
Aza-2	Metanol*	$1,2e^4$				-				$1,8e^5$			
	Blåskjell	0,7	0,2			-	-			0,8	0,2		
	Kamskjell	0,7		0,3	0,5	-		-	-	0,8		0,2	0,8
Aza-3	Metanol*	$3,5e^4$				-				$1,3e^5$			
	Blåskjell	0,6	0,2			-	-			0,9	0,5		
	Kamskjell	0,7		0,8	0,2	-		-	-	0,9		0,2	0,4
SPX-1	Metanol*	$2,5e^4$				-				$1,5e^5$			
	Blåskjell	0,8	0,4			-	-			0,8	0,5		
	Kamskjell	0,8		0,3	0,2	-		-	-	0,8		0,2	0,6
GYM	Metanol*	$2,2e^4$				-				$3,7e^5$			
	Blåskjell	0,8	0,6			-	-			0,9	0,1		
	Kamskjell	0,7		0,1	0,3	-		-	-	0,8		0,2	0,7

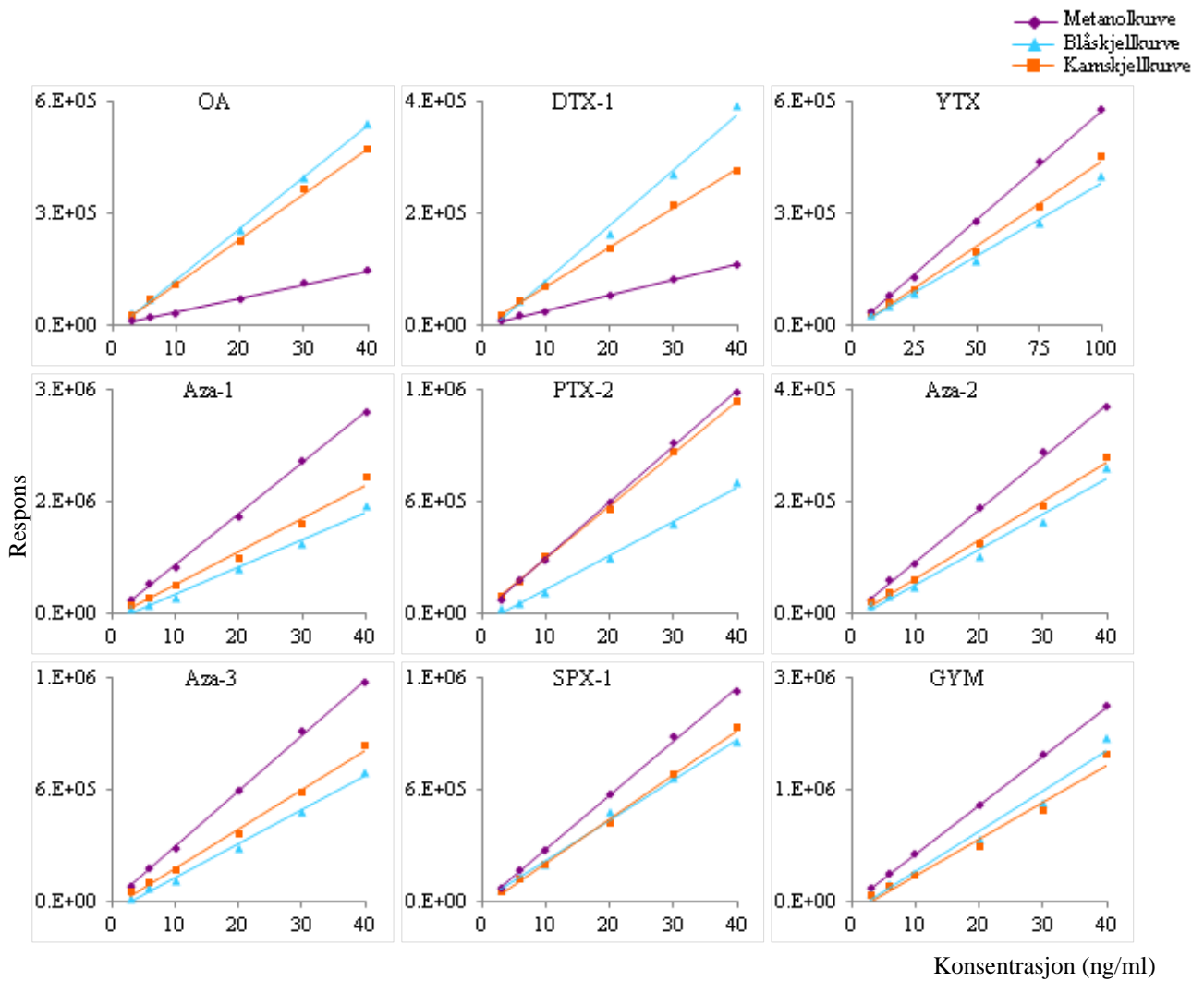
*Stigningstall for kalibreringskurve laget i 100 % metanol



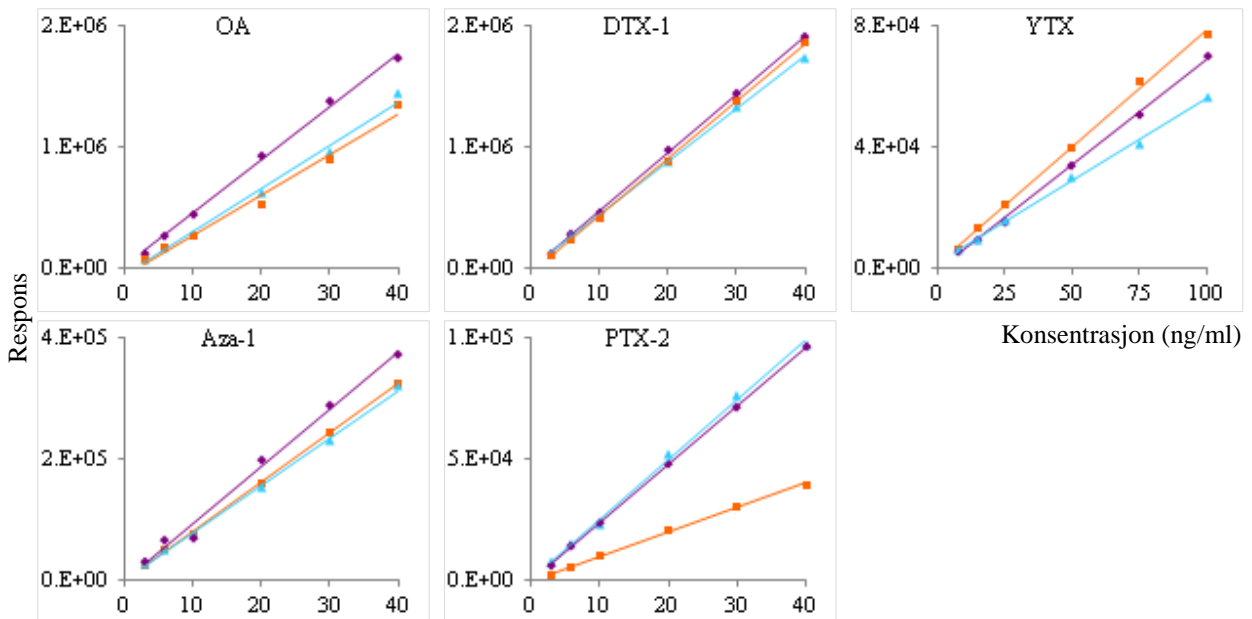
Figur 4.10 Matrikseffekt i blåskjell og kamskjell ved pH 3, pH 6,8 og pH 11 framstilt som beregnet ME-verdi med tilhørende konfidensintervall (95 %). Responratio i metanol ble satt til ME = 1,0 (ingen matrikspåvirkning). Aza-2, Aza-3, SPX-1 og GYM ble kun undersøkt ved sure og basiske forhold.

Standardkurvene indikerte at ME kan være artsavhengig for enkelte toksiner analysert ved sur (figur 4.11) og nøytral pH (figur 4.12) på tross av at ikke det ble påvist statistisk signifikant forskjell i alle tilfeller (tabell 4.7). Trolig vil ulik sensitivitet mellom arter for PTX-2 og Aza-1 (pH 3) samt for YTX (pH 6,8), føre til ukorrekt kvantifisering mot annen MMS enn standardkurve basert på egen art (for alle nevnte tilfeller; $p > 0,05$). Forskjell i matrikspåvirkning mellom blåskjell og kamskjell ble kun statistisk bekreftet for PTX-2 analysert under pH-nøytrale forhold.

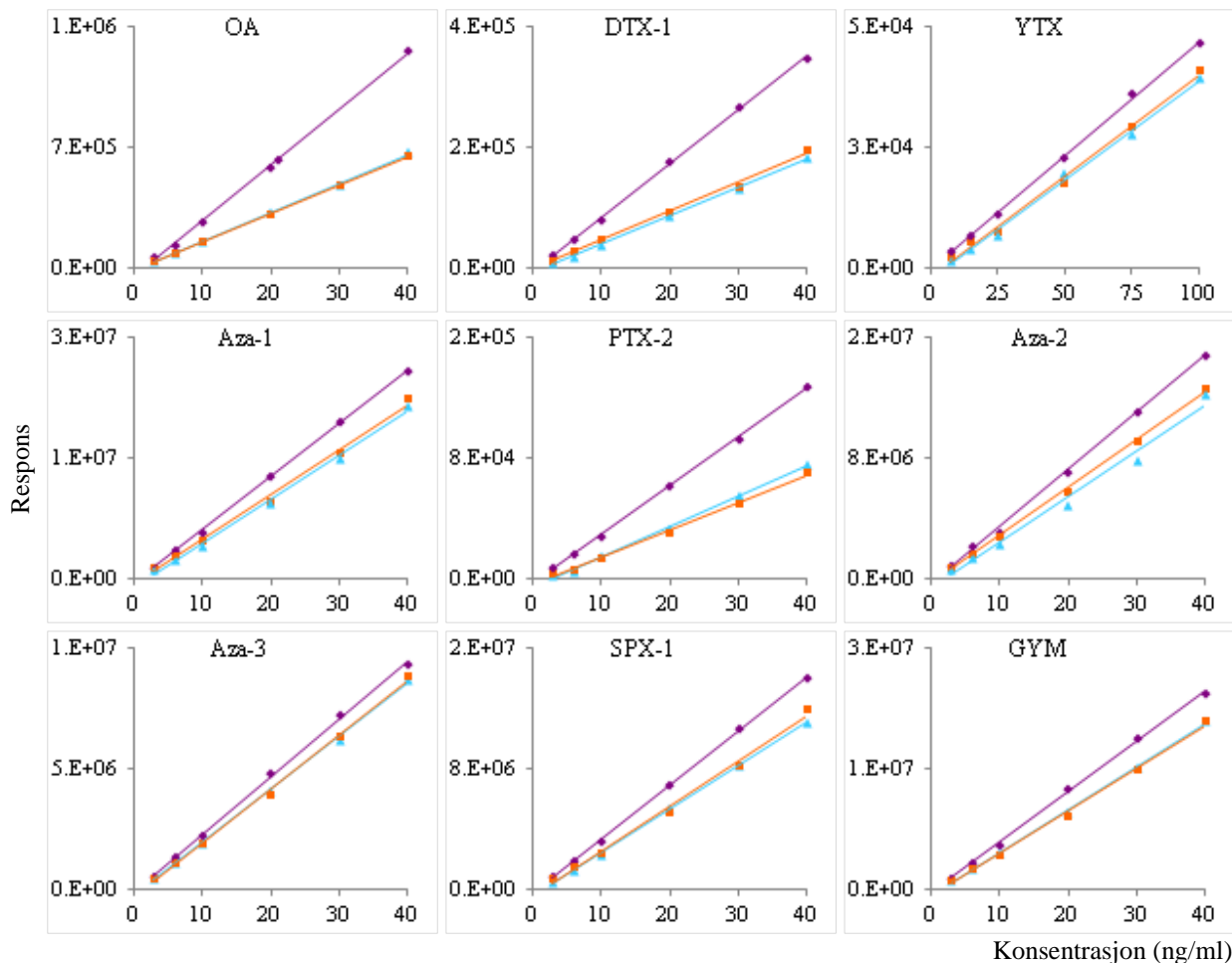
I basisk metode medførte matrikseffekt en viss grad av ionesuppresjon for alle toksiner (figur 4.13). I følge tabell 4.7 varierte grad av signalreduksjon i basisk metode fra halvering av responsen, som for OA og DTX-1, til nærmere ingen matrikspåvirkning, som vist for YTX og Aza-3. Bestemmelse av toksininnhold i blåskjell og kamskjell ved bruk av kalibreringskurve laget i 100 % metanol og analysert under basiske betingelser, vil gi signifikant falske for lave konsentrasjoner for OA, DTX-1 og PTX-2 ($p < 0,05$ for alle tre toksiner).



Figur 4.11 Matrikseffekt ved pH 3 (matriksstyrke 0,1) vist ved forholdet mellom standardkurver laget i metanol og matriksmatchende standarder (MMS) av blåskjell og kamskjell. Kalibreringskurvene ble konstruert på bakgrunn av gjennomsnittlig respons av standarder i fire oppsett ($n = 4$).



Figur 4.12 Matrikseffekt ved pH 6,8 (matriksstyrke 0,2) vist ved forholdet mellom standardkurver laget i metanol og matriksmatchende standarder (MMS) av blåskjell og kamskjell. Kalibreringskurvene ble konstruert på bakgrunn av gjennomsnittlig respons av standarder i fire oppsett ($n = 4$).



Figur 4.13 Matrikseffekt ved pH 11 (matriksstyrke 0,1) vist ved forholdet mellom standardkurver laget i metanol og matriksmatchende standarder (MMS) av blåskjell og kamskjell. Kalibreringskurvene ble konstruert på bakgrunn av gjennomsnittlig respons av standarder i seks oppsett ($n = 6$).

Med tanke på at sensitiviteten ble funnet å være avhengig av både elueringsystem og matriks, ble nedre grense for kvantifisering (LOQ) evaluert for hver variabel, se tabell 4.8. Teoretisk LOQ ble beregnet som $10 \times$ standardavvik ved laveste standard. Prøvene ble analysert i triplikat ved bruk av de tre metodene og kvantifisert mot kalibreringskurve i metanol. I tillegg ble CV (%) og nøyaktighet (%) i forhold til teoretisk verdi beregnet (tabell 4.13 og 4.14).

Resultatene i tabell 4.8 viste lavere eller tilsvarende LOQ i skjellmatriks som i metanolstandarder (tabell 4.1 og 4.2) for samtlige toksiner i begge skjelltyper under basiske forhold. I pH-nøytral metode (matriksstyrke 0,2 g/ml) ble LOQ for DTX-1 (blåskjell), Aza-1 (kamskjell) og PTX-2 i begge skjellarter funnet til å være noe høyere enn i metanol. Det samme var tilfelle for Aza-2 og SPX-1 tilsatt til blåskjell og analysert under sure forhold (matriksstyrke 0,1 g/ml).

I følge tabell 4.8 viste analyse av skjellekstrakt under alkaliske forhold generelt lavere LOQ for begge arter, men disse forskjellene ble ikke funnet til å være signifikante ($p > 0,05$). Det ble heller ikke funnet signifikant forskjell for beregnet LOQ mellom de to artene. Resultatene antydte at

forskjeller i LOQ mellom de undersøkte artene delvis ble påvirket av analytiske forhold. Analytter tilsatt til kamskjell hadde de laveste verdiene ved pH 3 for fem av ni toksiner, mens blåskjellprøvene viste lavere LOQ for sju av ni toksiner ved pH 11.

Tabell 4.8 Kvantifiseringsgrense (LOQ) ($\mu\text{g}/\text{kg}$) for blåskjell- og kamskjellprøver for hver matriks ved ulike kromatografiske forhold

Toksin	Matriks	pH 3 (n = 3)	pH 6,8 (n = 3)	pH 11 (n = 3)
OA	Blåskjell	12,4	5,6	5,6
	Kamskjell	14,1	8,4	3,9
DTX-1	Blåskjell	13,8	13,2	7,5
	Kamskjell	17,4	5,8	5,9
YTX	Blåskjell	24,7	32,7	16,8
	Kamskjell	21,5	33,3	31,3
Aza-1	Blåskjell	5,1	7,2	5,7
	Kamskjell	10,0	10,1	11,5
PTX-2	Blåskjell	12,1	23,2	8,2
	Kamskjell	15,5	13,5	10,0
Aza-2	Blåskjell	11,6	-	6,8
	Kamskjell	6,5	-	8,7
Aza-3	Blåskjell	16,7	-	12,4
	Kamskjell	8,9	-	12,5
SPX-1	Blåskjell	16,7	-	8,2
	Kamskjell	10,0	-	4,9
GYM	Blåskjell	5,8	-	3,7
	Kamskjell	4,0	-	11,7

4.2.2 Matriksforskjeller i ulike arter ved to årstider

Undersøkelser vedrørende sesong- og/eller artsavhengig ME ble utført ved innsamling av data fra rutineprøver analysert under pH-nøytrale betingelser. Ved AKF tilsettes rutinemessig en alikvot av alle prøver 25 ng/ml multitoksinløsning (MTL) som inneholder OA, DTX-1, YTX, Aza-1 og PTX-2. Sesong- og artsvariasjon i form av gjenfinning av tilsatt mengde toksin, ble studert i negative skjellprøver tilsatt MTL. Undersøkt tidsrom for analyser utført i 2010, 2011 og 2012, ble begrenset til uke 1 - 8 for vinterhalvåret og ukene 27 - 35 i sommerhalvåret. Utvalget ble gjort for å inkludere næringstilgang og -innhold knyttet til sesongvariasjon. Metodeparametrene på LC-MS har vært uendret i hele det undersøkte tidsintervallet. Beregninger som er gjort for DSP ble utført med hydrolyserte ekstrakter, det vil si total OA og total DTX-1.

Resultatene i tabell 4.9 viser hvor mye gjenfunnet konsentrasjon av tilsatt kjent toksinmengde varierte og om denne variasjonen var sesongavhengig. Videre ble forskjell i gjenfinningsprosent

mellom artene vurdert, og om en eventuell forskjell mellom arter var konstant gjennom året eller om den var sesongrelatert. Sammenligning av gjennomsnittlig gjenfinningsprosent med tilhørende 95 % konfidensintervall (KI) illustreres i figur 4.14. Resultatene ble sortert på art og årstid. For fullstendig oversikt, se vedlegg C.

Statistisk signifikant forskjell for gjenfinning av tilsatt MLT i blåskjell og kamskjell ble detektert for samtlige toksiner når datautvalget inkluderte begge årstidene. Tilsvarende ble signifikant forskjell påvist innen art i kamskjell for OA, YTX og PTX-2, noe som indikerte høyere gjenfinning av disse toksinene i sommerskjellene. Gjenfinning av Aza-1 i kamskjell ble ikke bevist forskjellig mellom vinter- og sommerukene, mens for DTX-1 var gjenfinningsprosenten signifikant lavere i sommermånedene. Forskjellen mellom minimum og maksimum gjenfinningsprosent for de enkelte analyttene varierte fra 31 - 94 % innenfor samme art og samme årstid.

Vurdering av dataene sortert på sesong viste ingen statistiske forskjeller mellom arter når det gjelder OA og DTX-1. Gjenfinning av YTX i blåskjell og kamskjell antydes forskjellig om sommeren, mens kvantifisert mengde av Aza-1 og PTX-2 mellom artene er statistisk forskjellig både sommer og vinter ($p < 0,05$). I praksis anses ikke ± 6 % gjennomsnittlig avvik (som for YTX og Aza-1) mellom årstidene som vesentlig, tatt i betraktning at variasjonen innen de ulike gruppene var forholdsvis stor.

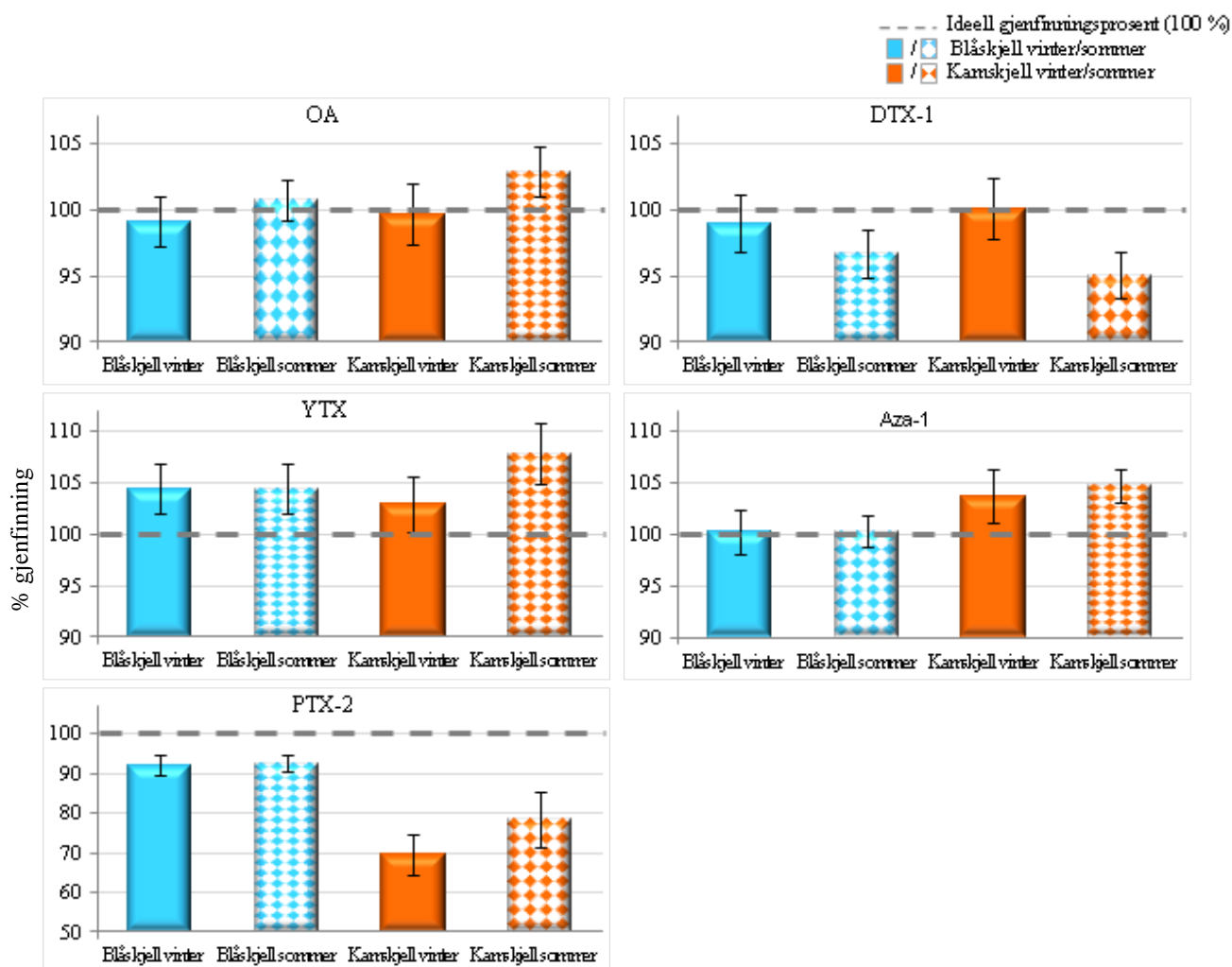
Størst gjennomsnittlig gjenfinningsverdi over tre år ble gjort i kamskjell for OA, YTX og Aza-1 høstet i sommerhalvåret. Gjennomsnittlig gjenfinningsprosent for PTX-2 i kamskjell var relativt lav i begge årstider, og spredning av målt konsentrasjon var høy. Beregnet CV for vinter- og sommermånedene var henholdsvis 28 % og 35 %. Ved nærmere studier av fordeling av gjenfinningsprosent av PTX-2 i kamskjell sortert på år, økte denne betydelig mellom vinter og sommer 2011 (se vedlegg C). Det ble i løpet denne perioden innført vasketrinn i den analytiske sekvensen på LC-MS, bestående av injeksjon av metanol og ACN etter hver kamskjellprøve.

Grafisk framstilling av resultatene med tilhørende 95 % KI for gjenfunnet konsentrasjon, illustrert i figur 4.14, viste at KI for flere av toksinene ikke inkluderte 100 % gjenfinningsprosent. Det største konfidensintervallet ble beregnet for PTX-2 i kamskjell ($\pm 6,9$ %, sommer), og denne analytten hadde i tillegg lavest gjenfinningsprosent uavhengig av sesong.

Tabell 4.9 Gjenfinning av tilsatt kjent toksinkonsentrasjon i analyserte negative skjellprøver (B = blåskjell, K = kamskjell) fra 2010 til 2012 sortert på art og sesong. Prøvene er kvantifisert mot kalibreringskurver i metanol.

Toksin	Art	Sesong	n	Snitt (%)	CV (%)	Min (%)	Max (%)	95 % KI	p-verdi			
									Innen art, begge årstider	Begge arter, begge årstider	Begge arter; vinter	Begge arter; sommer
OA	B	Vinter	57	99	7,3	85	116	97 til 101	0,2	<0,05	0,7	0,2
		Sommer	99	101	7,7	74	119	99 til 102				
	K	Vinter	53	100	8,5	82	121	97 til 102	<0,05			
		Sommer	63	103	7,3	89	131	101 til 105				
DTX-1	B	Vinter	52	99	7,8	84	115	97 til 101	0,1			
		Sommer	92	97	8,9	73	116	95 til 99		<0,05	0,5	0,2
	K	Vinter	57	100	8,6	79	116	98 til 102	<0,05			
		Sommer	65	95	7,7	77	119	93 til 97				
YTX	B	Vinter	55	105	8,8	81	124	102 til 107	0,2			
		Sommer	87	102	10,0	81	129	100 til 104		<0,05	0,4	<0,05
	K	Vinter	56	103	9,6	83	126	100 til 106	<0,05			
		Sommer	59	108	10,6	89	138	105 til 111				
Aza-1	B	Vinter	65	100	8,8	82	122	98 til 103	1,0			
		Sommer	115	100	7,8	82	122	99 til 102		<0,05	<0,05	<0,05
	K	Vinter	54	104	9,2	86	126	101 til 106	0,5*			
		Sommer	65	105	6,2	91	121	103 til 106				
PTX-2	B	Vinter	65	92	11,1	52	109	90 til 95	0,8			
		Sommer	112	93	13,0	67	137	90 til 95		<0,05	<0,05	<0,05
	K	Vinter	59	70	27,8	38	101	65 til 75	<0,05*			
		Sommer	64	79	35,4	34	128	72 til 85				

*F-test (p-verdi < 0,05). Statistisk analyse utført ved Mann-Whitney U-test.



Figur 4.14 Framstilling av gjennomsnittlig gjenfinning med tilhørende 95 % KI av 25 ng/ml MTL tilsatt negative blåskjell- og kamskjellprøver høstet i tidsperioden januar/februar og juli/august i 2010 - 2012. Antall prøver for hver søyle (n) er oppgitt i tabell 4.9.

4.2.3 Standardaddisjon til positive prøver

Det er publisert ulike matematiske beregningsmodeller ved bruk av standardaddisjon for korrigerende av ME i kvantifiseringssammenheng for lipofile biotoksiner [31, 34, 35]. Modellene tar utgangspunkt i kvantifisering med kalibreringskurve laget i metanol, og at tilsatt kjent konsentrasjon av ønskede toksiner skal kompensere for eventuell ME. I den sammenheng ble det gjort vurderinger om de tre ulike beregningsmåtene ga samme resultat, om toksinkonsentrasjonen ble signifikant endret etter ME-korrigerende, og om denne endringen ville hatt konsekvens for dyrker i henhold til rapporteringsgrense (20 µg/kg; YTX: 100 µg/kg) og høsteløyve (se tabell 1.1). Ligninger som ble benyttet for metode 1, metode 2 og metode 3 forklares i kapittel 1.5.2.1.

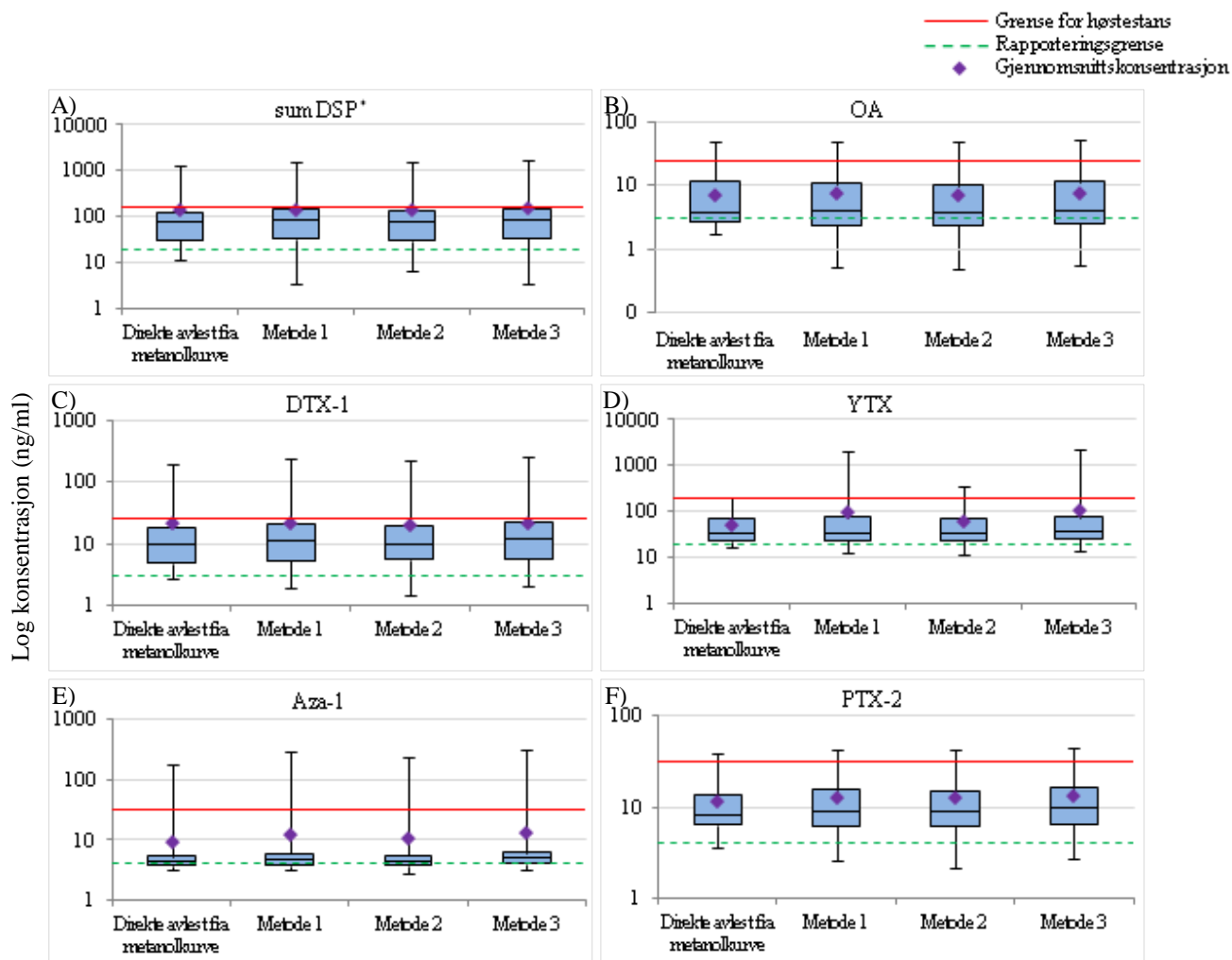
Det ble benyttet data for naturlig kontaminerte prøver som inneholdt OA, DTX-1, YTX, Aza-1 og PTX-2 over LOQ (se tabell 4.8). I tillegg ble sum total DSP vurdert. Alle prøvene ble analysert under pH-nøytrale forhold med bruk av LC-MS i rutinedriften ved AKF, i perioden 2009 til 2012.

Tabell 4.10 Toksininnhold i naturlig kontaminerte prøver fra 2009 til 2012 kvantifisert direkte fra metanolkurve samt ME-korrigert ved tre forskjellige beregningsmodeller. Endring for antall prøver og antall prøver med nedjustert eller oppjustert konsentrasjon ble talt opp i henhold til konsentrasjonsendring ved rapporteringsgrense og grense for høstestans [3].

Toksin	n	Vurderingsparameter	Ukorrigert resultat	ME-korrigert resultat		
				Metode 1	Metode 2	Metode 3
DSP	149	Konsentrasjon, snitt (µg/kg)	144	145	137	153
		Antall positive prøver	103	99	96	99
		Antall høstestans	31	37	36	39
		Endring antall prøver (%)		10,7	12,8	10,1
		Nedjustert antall prøver (%)		3,4	5,4	2,0
		Oppjustert antall prøver (%)		7,4	7,4	8,1
		p-verdi			0,8	
OA	97	Konsentrasjon, snitt (ng/ml)	7,2	7,4	7,1	7,8
		Antall positive prøver	58	57	53	59
		Antall høstestans	3	5	4	5
		Endring antall prøver (%)		13,4	13,4	13,4
		Nedjustert antall prøver (%)		5,2	8,2	4,1
		Oppjustert antall prøver (%)		8,2	5,2	9,3
		p-verdi			0,9	
DTX-1	127	Konsentrasjon, snitt (ng/ml)	21,1	21,2	19,8	22,3
		Antall positive prøver	93	90	94	89
		Antall høstestans	25	28	23	30
		Endring antall prøver (%)		11,8	7,1	9,4
		Nedjustert antall prøver (%)		4,7	4,7	2,4
		Oppjustert antall prøver (%)		7,1	2,4	7,1
		p-verdi			0,6	
YTX	90	Konsentrasjon, snitt (ng/ml)	51,7	98,8	62,1	104,0
		Antall positive prøver	76	74	76	75
		Antall høstestans	1	10	6	10
		Endring antall prøver (%)		20,0	17,8	18,9
		Nedjustert antall prøver (%)		1,1	3,3	0,0
		Oppjustert antall prøver (%)		18,9	14,4	18,9
		p-verdi			0,5	
Aza-1	61	Konsentrasjon, snitt (ng/ml)	9,4	12,2	11,0	12,8
		Antall positive prøver	40	37	36	43
		Antall høstestans	2	3	3	3
		Endring antall prøver (%)		21,3	21,3	27,9
		Nedjustert antall prøver (%)		11,5	11,5	9,8
		Oppjustert antall prøver (%)		9,8	9,8	18,0
		p-verdi			0,6	
PTX-2	10	Konsentrasjon, snitt (ng/ml)	11,8	12,7	12,7	13,4
		Antall positive prøver	7	8	8	8
		Antall høstestans	1	1	1	1
		Endring antall prøver (%)		10,0	10,0	10,0
		Nedjustert antall prøver (%)		0,0	0,0	0,0
		Oppjustert antall prøver (%)		10,0	10,0	10,0
		p-verdi			1,0	

Tabell 4.11 Fordeling av antall prøver (%) som ble endret uavhengig av type toksin. Oversikt over hvor stor andel av det totale prøveantallet hvor matrikskorrigering vil medføre konsekvensendring i forhold til konsentrasjonsgrenser for rapporteringsgrense og høstestans.

	Rapporteringsgrense			Høstegrense		
	Metode 1	Metode 2	Metode 3	Metode 1	Metode 2	Metode 3
Antall nedjusterte prøver (%)	14,6	18,2	10,5	1,3	2,0	1,3
Antall oppjusterte prøver (%)	29,1	29,1	37,3	17,0	12,6	17,7



*Konsentrasjon for sum DSP: $\mu\text{g}/\text{kg}$

Figur 4.15 Box-and-Whisker plott av konsentrasjon (log) kvantifisert direkte fra metanolkurve i pH-nøytral metode. Verdiene i metode 1, 2 og 3 er ME-korrigert konsentrasjon ved bruk av standardaddisjon hvor kalkuleringsene ble utført ved tre ulike matematiske modeller. Antall prøver for hvert toksin er oppgitt i tabell 4.10.

Opptelling av antall positive prøver (n) samt antall prøvesvar som ble endret i henhold til toksinkonsentrasjon ved rapporteringsgrensen og regulatorisk grense (tabell 4.10), viste at det ikke ble funnet signifikant forskjell i beregnet konsentrasjon for noen av de undersøkte toksinene. Det ble heller ikke funnet statistisk holdepunkt for å si at de tre matrikskorrigeringsmodellene ga konsekvensendring for ulikt antall berørte prøver ($p > 0,05$). Det ble likevel observert at ulike matrikseffekt i enkeltp prøver kan påvirke prøvesvaret som legges til grunn for utstedelse av

høsteløyve for kommersiell omsetning av skjell. Tabell 4.11 viste at de matrikskorrigerte toksinkonsentrasjonene beregnet ved alle metodene i større grad ble høyere enn lavere sammenlignet med de ukorrigerte prøvesvarene. Reduksjon av toksininnhold ved bruk av matrikskorrigering var oftere observert i lavt konsentrasjonsområde enn ved grense for høstestans. Resultatene indikerte også at matrikskorrigerte prøvesvar ville ha ført til flere stengte lokasjoner enn dersom metanolkvantifiserte ukorrigerte konsentrasjoner legges til grunn, uten at det ble statistisk bekreftet ($p = 0,7$).

Resultater for metode 1 og 3 i tabell 4.10 viste høyere gjennomsnittskonsentrasjon av YTX enn ved bruk av metode 2 samt metanolkvantifisert verdier. Matrikskorrigert konsentrasjon i metode 1 og 3 lå langt over interkvartil range, vist i figur 4.15D. Samtidig strakk øvre kvartil seg vesentlig høyere for disse to modellene. For YTX ble det funnet signifikant forskjell i spredningen for metanolkvantifiserte og matrikskorrigerte resultater mellom alle metoder ($p < 0,05$). Dette gjenspeiles i svært høy variasjonskoeffisient innbyrdes for noen av prøveparene, som ble beregnet til å være opp til 90 % CV for et enkelttilfelle (ikke vist). Det ble også observert forskjell i spredning for matrikskorrigerte verdier sammenlignet med ukorrigerte resultater for Aza-1 ($p < 0,05$). Det var en større spredning i de matrikskorrigerte konsentrasjonene (figur 4.15E). Datautvalget for Aza-1 var noe skjevt, da 87 % av prøvene inneholdt konsentrasjoner < 10 ng/ml.

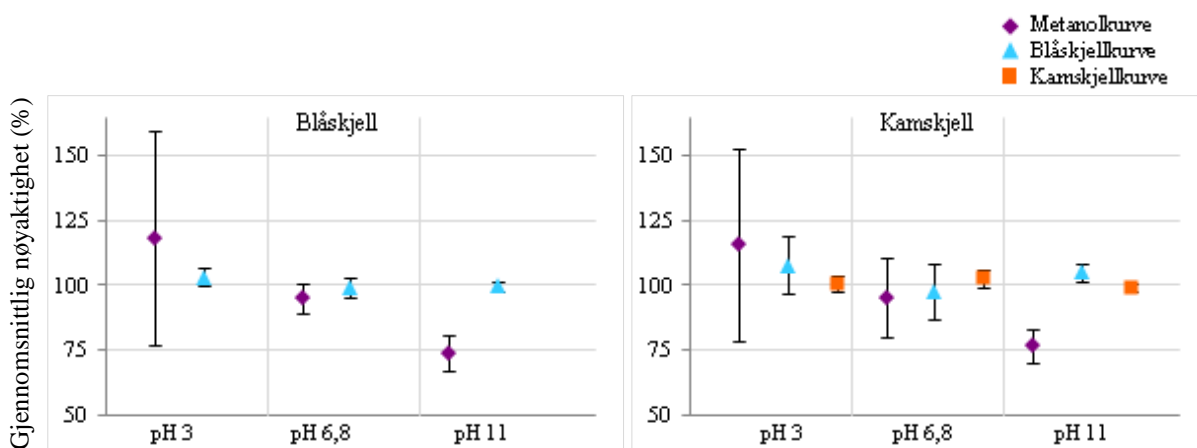
4.2.4 Matriksmatchende standarder (MMS)

Ved å benytte kalibreringskurver preparert i skjellekstrakt ble det undersøkt om korrigering av matrikseffekt kan utføres ved avlesning. Kvantifisering av toksinkonsentrasjon tilsatt blankprøver av blåskjell og kamskjell ble utført mot tre ulike matrikskurver. Det ble undersøkt om nøyaktighet (%) og presisjon (CV %) ble endret ved bruk av matriksmatchede standarder (MMS) i forhold til metanolbasert kurve. Det ble også undersøkt om det var likeverdig å benytte blåskjellkurve til kvantifisering av kamskjellprøver. Ved rutineanalyse mottas hovedsakelig blåskjell, og bruk av standardkurver fra kun en matrikstypen vil kunne redusere total analysetid betraktelig. Det ble av den grunn valgt å kvantifisere blåskjellprøvene mot standardkurver i metanol og blåskjell, mens kamskjellprøvene ble konsentrasjonsbestemt mot alle tre matrikskurvene.

Forventet sensitivitetsratio mellom skjelltypene i tabell 4.12 ble kalkulert fra data i tabell 4.7, hvor beregnet verdi = 1,0 indikerer ingen matriksforskjell mellom artene. Det betyr at kvantifisering i en type matriks, blåskjell eller kamskjell, skal være uavhengig av om det benyttes standardkurve i egen skjellmatriks. Ekstrakter fra negative skjell av begge arter ble tilsatt toksin i lavt nivå (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, YTX: 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$) samt til regulatorisk nivå for humant konsum (160 $\mu\text{g}/\text{kg}$, YTX: 1000

$\mu\text{g}/\text{kg}^6$) [3]. Antall prøver (n) varierer mellom metoder og matriks på grunn av ulikt analysetidspunkt. MMS ble laget av blankmateriale representativt for den årstiden analysene ble gjort, og analysene ble utført over minimum to dager. Tabellene 4.13 for blåskjell og 4.14 for kamskjell viser nøyaktighet som prosent gjenfinning av tilsatt kjent konsentrasjon, og presisjon (CV %) ved to ulike konsentrasjonsnivå. Grafisk framstilling for sammenligning av nøyaktighet for toksinene individuelt er vist i vedlegg D. Oversikt over optimalt valg av kurvematriks for enkelttoksiner basert på disse resultatene er vist i vedlegg E.

Sammenligning av gjennomsnittlig nøyaktighet av kvantifiserte verdier fra de ulike kurvematrikser ble gjort mot teoretisk verdi (figur 4.16). Dataene ble sortert på metode og skjellart, men uavhengig av toksintype og konsentrasjonsnivå. Total sett ble nøyaktighet og presisjon i begge arter signifikant bedre ved bruk av MMS laget av blåskjell (MMS B) i basisk metode ($p < 0,05$ for begge arter), mens i sur metode ble kun nøyaktighet bedret. Det ble ikke funnet statistisk holdepunkt for forbedring for noen av skjelltypene i pH-nøytral metode, verken med tanke på nøyaktighet eller presisjon. For kamskjellprøver ble nøyaktighet og presisjon kun signifikant bedre i basisk metode dersom MMS laget av kamskjell (MMS K) ble benyttet for kvantifisering framfor bruk av MMS B. Det ble for øvrig observert forholdsvis store konfidensintervall (KI) for kamskjell både ved pH 6,8 og pH 3, og for blåskjell analysert ved pH 3 (se figur 4.16). Dette skyldtes for høye kvantifiserte analyttkonsentrasjoner for DSP (pH 3, både for blåskjell og kamskjell), og stor konsentrasjonsvariasjon av PTX-2 i kamskjell (pH 6,8).



Figur 4.16 Sammenligning av gjennomsnittlig nøyaktighet for målt verdi i skjellprøver tilsatt kjent mengde toksin kvantifisert ved bruk av henholdsvis metanolkurve, MMS B og MMS K. Gjennomsnitt og 95 % KI ble beregnet uavhengig av toksintype og analyttkonsentrasjon for hver kromatografiske metode. Antall (n) for hver metode, matriks og konsentrasjonsnivå er oppgitt i tabell 4.13 og 4.14.

⁶SPX-1 og GYM er ikke regulert, men ble også undersøkt ved 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$ som de øvrige toksinene

Tabell 4.12 Relativ sensitivitet mellom kamskjell og blåskjell basert på ratio mellom stigningstall fra kalibreringskurver ved ulike kromatografiske betingelser

Toksin	pH 3 (n = 4)	pH 6,8 (n = 4)	pH 11 (n = 6)
OA	0,9	0,9	1,0
DTX-1	0,7	1,1	1,0
YTX	1,2	1,2	1,0
Aza-1	1,2	1,1	1,0
PTX-2	1,5	0,4	0,9
Aza-2	1,0	-	1,0
Aza-3	1,2	-	1,0
SPX-1	1,0	-	1,0
GYM	0,9	-	1,0

Resultatene i tabell 4.13 viste at samtlige toksinkonsentrasjoner målt i blåskjellprøvene under alle analytiske forhold var innenfor $\pm 15\%$ ved kvantifisering mot MMS B. Analyttkonsentrasjoner kvantifisert mot metanolkurve i pH-nøytral metode viste tilsvarende resultater. Bruk av metanolkurve for kvantifisering i blåskjell analysert ved sure og basiske elueringsforhold ga varierende verdier for nøyaktighet avhengig av type toksin. Beregnet presisjon for alle analyttene i blåskjell var 20 % eller bedre i de fleste tilfellene. Kun DSP-toksiner analysert på LC-MSMS og kvantifisert mot metanolkurve ga presisjon $> 20\%$.

Resultatene for toksinbestemmelse i kamskjell (tabell 4.14) viste at beregnet nøyaktighet ved kvantifisering mot MMS K lå mellom 85 – 115 %. Bruk av MMS B for kvantifisering av analytter i kamskjell viste stort sett noe høyere verdier med unntak av for PTX-2. Avhengig av type toksin, ble nøyaktighet funnet til å være både høyere og lavere ved bruk av metanolkurve. Beregnet presisjon for toksinene i kamskjell var tilsvarende god som for blåskjell.

Statistisk vurdering av nøyaktighet for toksinindividuelle resultater i de to artene mellom metanolkurve og MMS, ble gjort uten å ta hensyn til analyttkonsentrasjon. Resultatene i tabell 4.13 og 4.14 samt figurer i vedlegg D, indikerte at MMS bør benyttes framfor metanolkurve ved kvantifisering av de fleste toksiner i uavhengig av metode. For PTX-2 (kamskjell) og SPX-1 (blåskjell) i sur metode samt for DSP-toksinene (begge arter) og for blåskjellkonsentrasjon av YTX og PTX-2 analysert ved pH-nøytrale betingelser, ble ikke nøyaktigheten signifikant bedre ved bruk av MMS ($p > 0,05$ for alle tilfeller). Bruk av MMS K framfor MMS B for kvantifisering av toksinnhold i kamskjell viste statistisk signifikant bedre nøyaktighet for Aza-1 og PTX-2 analysert i metode ved pH 3. Tilsvarende resultater ble funnet for PTX-2 i pH-nøytral metode samt for Aza-1, Aza-2, GYM og DTX-1 ved alkaliske forhold. Øvrige analytter i kamskjell viste like god nøyaktighet når det ble benyttet MMS B for toksinkvantifisering (alle $p > 0,05$).

Tabell 4.13 Nøyaktighet (%) og presisjon (CV %) for blåskjell tilsatt lav konsentrasjon (30 µg/kg; for YTX 75 µg/kg) samt til regulatorisk grenseverdi (160 µg/kg; for YTX 1000 µg/kg) og analysert ved ulike kromatografiske betingelser. Prøvene ble avlest ved bruk av kalibreringskurve i metanol og i MMS B (blåskjellekstrakt).

Toksin (%)		pH 3			pH 6,8			pH 11		
		n	Metanol	MMS B	n	Metanol	MMS B	n	Metanol	MMS B
OA	Lav kons.	3	282	106	3	110	105	6	63	101
	CV		1,5	10,6		5,1	4,2		27,0	2,7
	Reg. grense	7	226	99	15	102	103	16	54	99
	CV		25,2	10,3		5,5	6,0		25,9	7,1
DTX-1	Lav kons.	3	254	111	3	99	103	6	61	105
	CV		1,8	3,2		13,4	8,9		24,2	1,9
	Reg. grense	7	299	98	15	94	100	16	51	100
	CV		15,9	8,5		12,6	7,9		17,2	11,5
YTX	Lav kons.	3	88	95	3	91	98	6	91	101
	CV		3,7	11,7		9,6	5,3		7,8	2,4
	Reg. grense	7	71	98	15	102	101	16	93	101
	CV		11,0	4,7		10,9	8,8		11,4	6,7
Aza-1	Lav kons.	3	67	111	3	86	105	6	78	101
	CV		2,5	15,0		5,5	4,2		2,0	3,5
	Reg. grense	7	68	97	15	88	95	16	83	99
	CV		4,6	5,3		9,0	7,3		12,0	2,8
PTX-2	Lav kons.	3	89	105	3	95	99	6	60	93
	CV		4,5	5,9		16,3	13,4		13,0	5,3
	Reg. grense	7	88	106	15	85	87	16	57	91
	CV		19,8	12,9		10,6	9,5		13,0	5,9
Aza-2	Lav kons.	3	69	117	-	-	-	6	77	97
	CV		5,6	12,0		-	-		2,2	3,4
	Reg. grense	7	79	99	-	-	-	16	80	97
	CV		7,6	7,2		-	-		12,7	5,6
Aza-3	Lav kons.	3	54	104	-	-	-	6	84	108
	CV		10,3	7,1		-	-		4,0	8,8
	Reg. grense	7	56	107	-	-	-	16	90	99
	CV		13,3	13,7		-	-		10,6	5,4
SPX-1	Lav kons.	3	85	105	-	-	-	6	78	102
	CV		6,5	5,4		-	-		7,1	5,7
	Reg. grense	7	95	91	-	-	-	16	86	95
	CV		16,0	9,8		-	-		9,8	4,3
GYM	Lav kons.	3	72	115	-	-	-	6	68	105
	CV		2,7	9,2		-	-		11,3	5,0
	Reg. grense	7	89	94	-	-	-	16	74	101
	CV		18,8	5,8		-	-		16,1	5,3

Tabell 4.14 Nøyaktighet (%) og presisjon (CV %) for kamskjell tilsatt lav konsentrasjon (30 µg/kg; for YTX 75 µg/kg) samt til regulatorisk grenseverdi (160 µg/kg, for YTX 1000 µg/kg) og analysert ved ulike kromatografiske betingelser. Prøvene ble avlest ved bruk av kalibreringskurve i metanol og i MMS (B = blåskjellekstrakt og K = kamskjellekstrakt).

Toksin (%)	n	pH 3			pH 6,8			pH 11					
		Metanol	MMS B	MMS K	Metanol	MMS B	MMS K	Metanol	MMS B	MMS K			
OA	Lav kons.	3	244	101	97	4	109	106	110	6	66	101	103
	CV		1,9	8,5	6,7	4	7,7	15,1	6,3	6	22,5	2,9	1,7
	Reg. grense	4	277	92	99	4	106	110	106	16	55	102	97
	CV		31,8	16,8	11,8	4	8,5	4,1	7,4	16	23,8	6,9	2,6
DTX-1	Lav kons.	3	241	94	89	4	106	104	108	6	58	114	103
	CV		2,4	16,2	2,8	4	5,4	8,5	9,0	6	19,8	8,0	1,2
	Reg. grense	4	234	90	99	4	100	101	105	16	55	106	98
	CV		15,8	10,4	8,5	4	3,7	5,0	2,7	16	12,5	7,8	3,1
YTX	Lav kons.	3	90	102	99	4	124	108	103	6	94	105	99
	CV		3,2	1,5	3,1	4	7,2	10,0	5,5	6	7,4	5,4	4,4
	Reg. grense	4	72	111	103	4	114	101	101	16	90	99	97
	CV		10,3	6,8	4,0	4	2,9	2,5	3,7	16	5,7	8,7	2,7
Aza-1	Lav kons.	3	69	122	112	4	88	110	102	6	84	100	98
	CV		4,9	8,9	6,8	4	7,7	9,2	5,8	6	4,2	7,7	8,1
	Reg. grense	4	58	112	95	4	89	97	101	16	88	105	98
	CV		1,5	5,6	3,4	4	7,6	11,1	4,1	16	10,0	4,5	2,7
PTX-2	Lav kons.	3	101	168	101	4	56	68	100	6	67	108	104
	CV		5,1	0,9	6,4	4	16,1	13,6	13,2	6	17,4	10,1	4,7
	Reg. grense	4	100	143	98	4	66	74	93	16	64	100	97
	CV		15,4	16,7	3,8	4	14,8	6,7	8,0	16	16,9	8,5	4,5
Aza-2	Lav kons.	3	83	100	109	-	-	-	-	6	80	107	99
	CV		2,6	7,3	7,7	-	-	-	-	6	2,5	4,1	5,0
	Reg. grense	4	76	95	97	-	-	-	-	16	87	106	97
	CV		4,8	6,2	3,2	-	-	-	-	16	12,1	6,5	4,6
Aza-3	Lav kons.	3	70	133	103	-	-	-	-	6	82	122	101
	CV		4,2	13,4	15,0	-	-	-	-	6	3,9	5,0	5,1
	Reg. grense	4	61	102	96	-	-	-	-	16	89	98	97
	CV		4,1	11,7	1,9	-	-	-	-	16	9,4	5,3	4,4
SPX-1	Lav kons.	3	83	81	102	-	-	-	-	6	79	94	95
	CV		4,0	5,3	14,8	-	-	-	-	6	5,6	1,9	8,9
	Reg. grense	4	83	95	98	-	-	-	-	16	90	99	98
	CV		2,4	4,7	2,2	-	-	-	-	16	10,7	4,3	4,8
GYM	Lav kons.	3	66	118	114	-	-	-	-	6	72	115	100
	CV		2,0	1,7	7,0	-	-	-	-	6	8,2	12,9	6,3
	Reg. grense	4	77	85	96	-	-	-	-	16	80	110	104
	CV		6,3	5,8	3,2	-	-	-	-	16	16,4	5,3	12,1

4.2.5 Standardaddisjon eller kvantifisering mot matriksmatchende standarder?

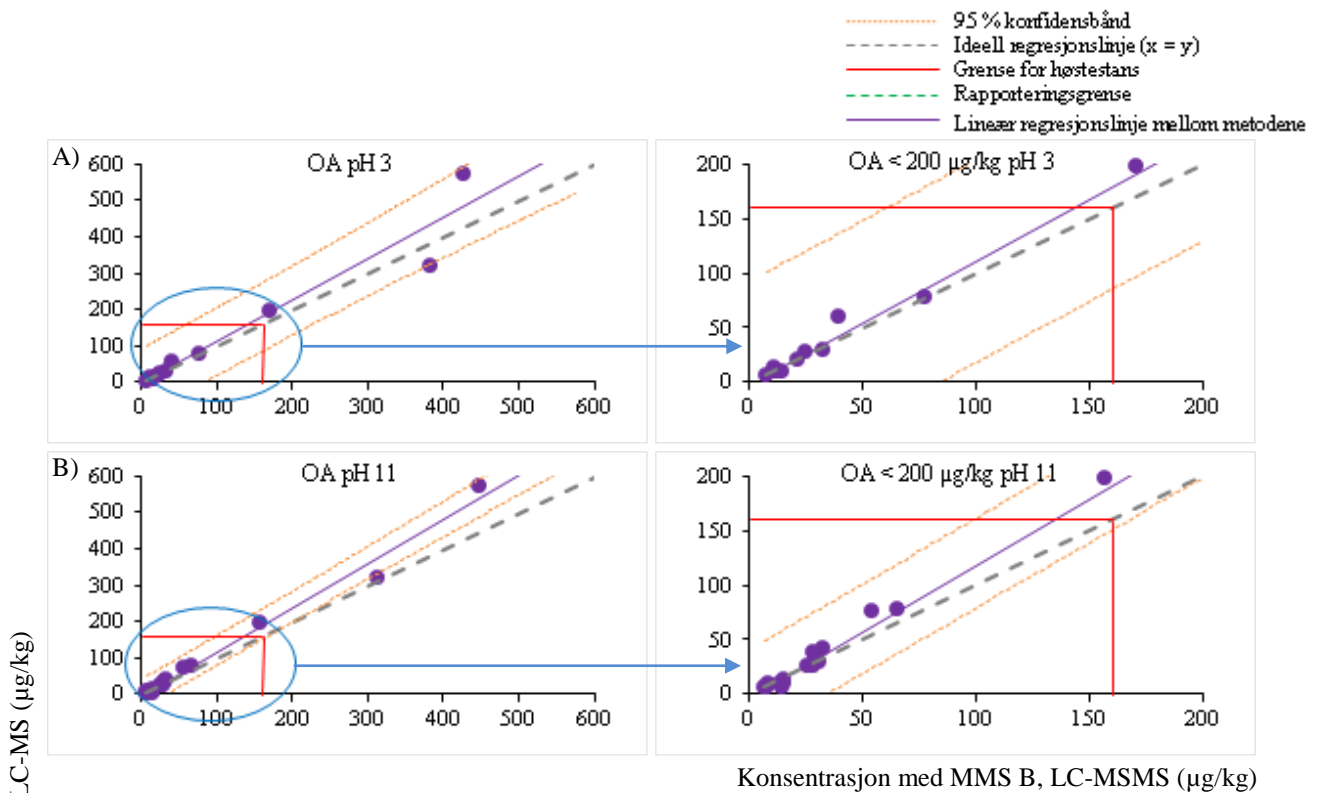
Da bruk av standardaddisjon kan være både tidkrevende og fordyrende for toksinkvantifisering i reelle prøver, ble det undersøkt om denne prosedyren kan erstattes av matriksmatchende standarder på basis av blåskjell (MMS B). På bakgrunn av resultatene fra analysene som ble gjort med skjellekstrakt tilsatt kjent toksinkonsentrasjon i kapittel 4.2.4, gjordes en antakelse om at benyttelse av MMS B i metodene på LC-MSMS også ville korrigere for en eventuell ME direkte ved kvantifisering av kontaminert toksinkonsentrasjon i begge skjellarter. Toksinkonsentrasjon i et tilfeldig utvalg av naturlig kontaminerte prøver med matriksstyrke 0,2 g/ml, ble kalkulert ved standardaddisjon (beregningsmodell 1) av 25 ng/ml multitoksinløsning. Prøvene ble analysert med pH-nøytral metode (LC-MS). De samme prøvene, men med matriksstyrke 0,1 g/ml, ble så analysert på LC-MSMS med sur og basisk metode, og kvantifisert ved å benytte MMS B. Konsentrasjonene ble deretter sammenlignet. Resultatene for OA, DTX-1, YTX og Aza-gruppen oppsummeres i tabell 4.15 og illustreres i figurene 4.17 – 4.22. Figurene viser lineær regresjon mellom prøvesvarene, og deres forhold til likeverdig konsentrasjonsmåling hvor $x = y$. Konfidensbåndene representerer 95 % konfidens for forventet gjennomsnitt til hver x -verdi. Ingen av prøvene i analyseperioden var kontaminert med PTX-2, SPX-1 og GYM. På grunn av få antall positive kamskjell ($n = 2$) i analyseperioden ble det ikke tatt hensyn til art ved sammenligningen. Øvrige positive prøver var blåskjell. Flesteparten av skjellene var sanket om høsten/vinteren.

Gjennomsnittsratio for konsentrasjon mellom prøvesvarene for OA og YTX (tabell 4.15) var $< 1,0$ for både sur og basisk metode, noe som indikerte en liten negativ bias i MMS B-kvantifiserte prøvesvar. Tre prøver som inneholdt OA ble beregnet til konsentrasjoner over regulatorisk grenseverdi ved bruk av standardaddisjon, mens bare to av disse ble avlest til konsentrasjon over den regulatoriske grensen ved bruk av MMS B i basisk metode. Den tredje prøven lå imidlertid rett under grensen for høststans; 156 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (høstestans ved 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$) når den ble kvantifisert ved bruk av MMS B. Gjennomsnittskonsentrasjonen for YTX var lav i forhold til rapporteringsgrensen (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$), og ingen prøver ble funnet å inneholde YTX i nærheten av regulatorisk grenseverdi (1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Resultatene for YTX (figur 4.19) avdekket relativt brede konfidensbånd for forventet gjennomsnittskonsentrasjon i tillegg til forholdsvis lav korrelasjonskoeffisient for begge metoder ($r < 0,85$). Antall prøver over rapporteringsgrensen for OA og YTX ble funnet til å være det samme uansett kvantifiseringsmodell.

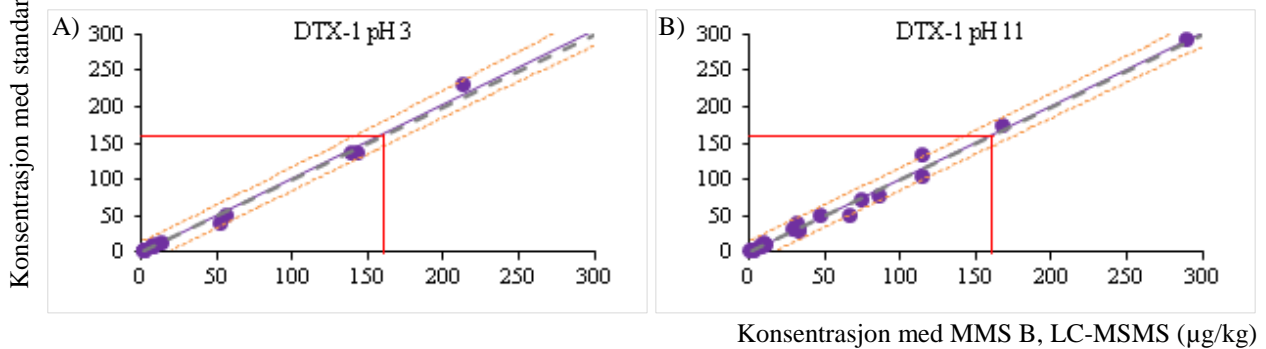
Resultatene for DTX-1 og Aza-1 (figur 4.18 og 4.20) illustrerte ingen klar retningsbestemt bias ved sammenligning av toksinkonsentrasjoner (tabell 4.15; konsentrasjonsratio = 1,0). Det ble vist

svært godt samsvar mellom resultatene med $r > 0,99$ og smale KI, både for DTX-1 analysert med begge metoder og for Aza-1 i basisk metode. Figur 4.20A for sur og pH-nøytral metode, viser et bredt konfidensbånd for forventet gjennomsnittskonsentrasjon av Aza-1 ved MMS B og standardaddisjon ($n = 6$). Tre av prøvene for Aza-1 var av kamskjell, hvor en av disse ble avlest til vesentlig høyere verdi ved bruk av MMS B i forhold til konsentrasjonen beregnet ved standardaddisjon. Sammenligningen av Aza-1 analysert i sur mot pH-nøytral metode ble trolig påvirket av et lite prøveantall og en mulig "outlier". I basisk metode ble seks prøver beregnet til Aza-1-konsentrasjon under rapporteringsgrensen ved bruk av standardaddisjon, mot fem ved MMS B kvantifisering. Prøven som avvek ved MMS B ble imidlertid avlest til konsentrasjon rett over rapporteringsgrensen.

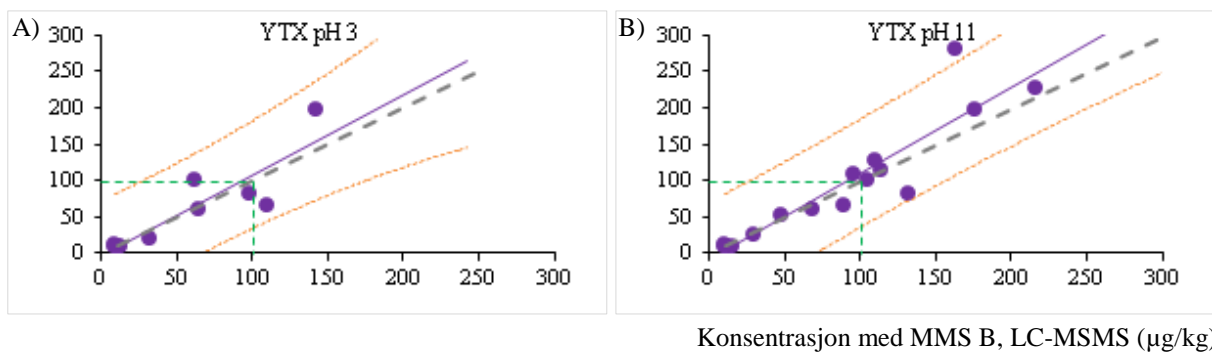
Sammenligning av prøvesvar for Aza-2 og Aza-3 i figur 4.21 og 4.22 bygde på et noe spinkelt grunnlag; $n = 6$ for begge metoder. Forholdsvis stor høy konsentrasjonsratio ($> 1,2$) ble antydning for begge Aza-analogene, i tillegg til romslige konfidensbånd og KI for stigningstall i begge metoder. Beregnet CV mellom prøveparallelene (tabell 4.15) var også relativ stor; $> 22\%$. Akseptabel korrelasjon mellom prøvesettene ble observert, med $r > 0,89$. En prøve ble kvantifisert til verdi over regulatorisk grenseverdi for Aza-2 med MMS B i basisk metode ($211 \mu\text{g}/\text{kg}$). Denne prøven ble funnet til å være under grensen når den ble beregnet med standardaddisjon fra LC-MS ($122 \mu\text{g}/\text{kg}$). Samme prøve ble kvantifisert til $154 \mu\text{g}/\text{kg}$ ved bruk av MMS B i sur metode. Antallet prøver over gitte grenser for det øvrige datautvalget var lik mellom begge kvantifiseringsmodeller og de tre undersøkte kromatografiske metodene.



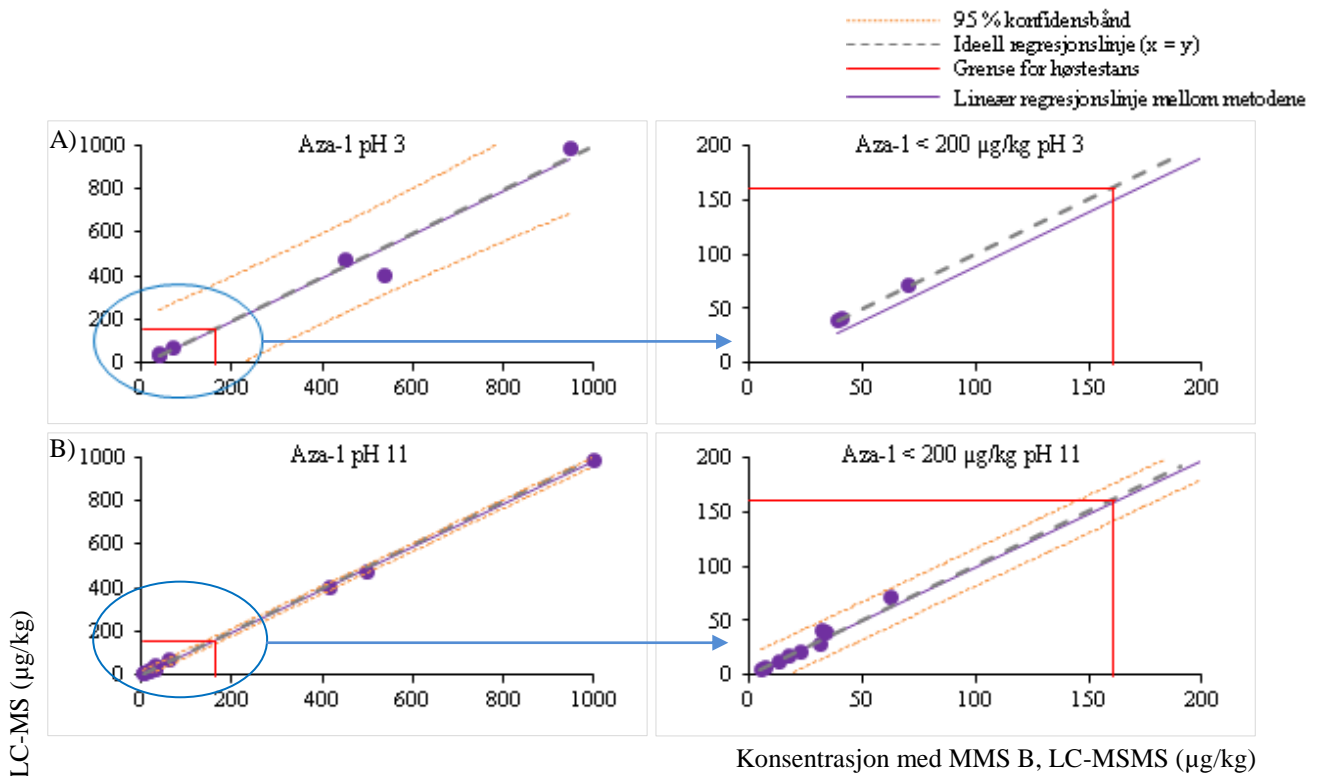
Figur 4.17 Sammenligning av OA ($\mu\text{g/kg}$) kvantifisert ved standardaddisjon (metode 1) fra pH-nøytral metode på LC-MS med konsentrasjon bestemt direkte ved MMS B analysert på LC-MSMS ved **A)** sur metode, og **B)** basisk metode. Diagrammene til høyre er uttrekk for konsentrasjoner $< 200 \mu\text{g/kg}$.



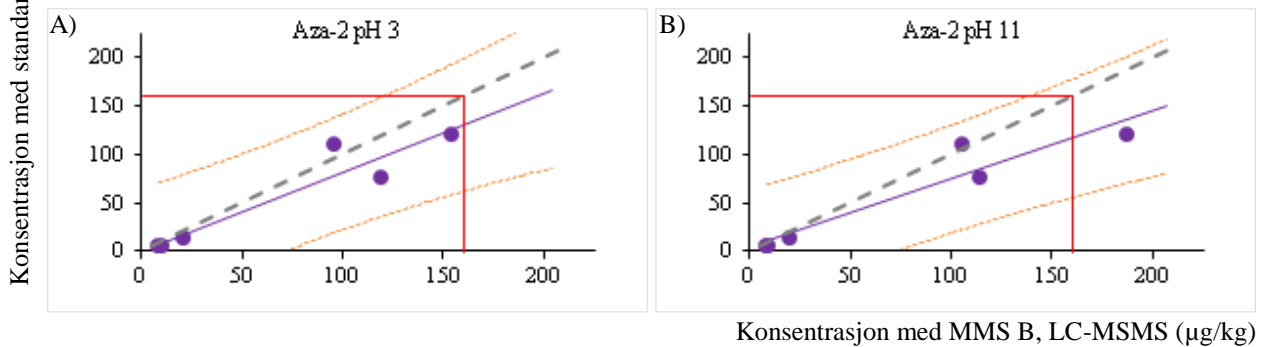
Figur 4.18 Sammenligning av DTX-1 ($\mu\text{g/kg}$) kvantifisert ved standardaddisjon (metode 1) fra pH-nøytral metode på LC-MS med konsentrasjon bestemt direkte ved MMS B analysert på LC-MSMS ved **A)** sur metode, og **B)** basisk metode.



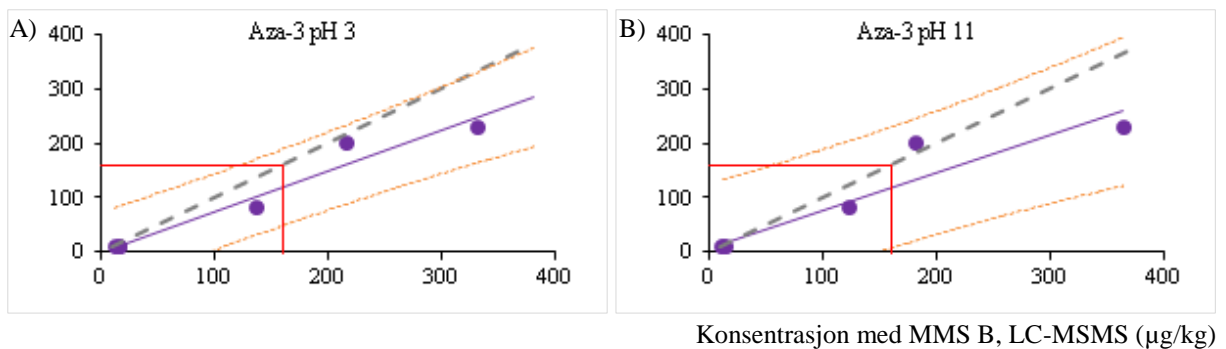
Figur 4.19 Sammenligning av YTX ($\mu\text{g/kg}$) kvantifisert ved standardaddisjon (metode 1) fra pH-nøytral metode på LC-MS med konsentrasjon bestemt direkte ved MMS B analysert på LC-MSMS ved **A)** sur metode, og **B)** basisk metode.



Figur 4.20 Sammenligning av Aza-1 ($\mu\text{g/kg}$) kvantifisert ved standardaddisjon (metode 1) fra pH-nøytral metode på LC-MS med konsentrasjon bestemt direkte ved MMS B analysert på LC-MSMS ved **A)** sur metode, og **B)** basisk metode. Diagrammene til høyre er uttrekk for konsentrasjoner $< 200 \mu\text{g/kg}$.



Figur 4.21 Sammenligning av Aza-2 ($\mu\text{g/kg}$) kvantifisert ved standardaddisjon (metode 1) fra pH-nøytral metode på LC-MS med konsentrasjon bestemt direkte ved MMS B analysert på LC-MSMS ved **A)** sur metode, og **B)** basisk metode.



Figur 4.22 Sammenligning av Aza-3 ($\mu\text{g/kg}$) kvantifisert ved standardaddisjon (metode 1) fra pH-nøytral metode på LC-MS med konsentrasjon bestemt direkte ved MMS B analysert på LC-MSMS ved **A)** sur metode, og **B)** basisk metode.

Tabell 4.15 Sammendrag av resultater fra kalkulerte konsentrasjoner ved standardaddisjon (metode 1) analysert ved pH-nøytral metode på LC-MS (i kursiv) og konsentrasjoner direkte avlest mot MMS B analysert på LC-MSMS med sur og basisk metode for naturlig kontaminerte blåskjell og kamskjell

Toksin		pH 3		pH 11	
OA	Antall prøver (n)	14		21	
	Snitt konsentrasjon ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	98	89	73	63
	Ratio LC-MSMS/LC-MS (CV %)	0,9 (10 %)		0,9 (14 %)	
	Korrelasjonskoeffisient (r)	0,94		0,99	
	Lineær regresjonsligning	$y = 1,13x - 1,82$		$y = 1,22x - 0,34$	
	95 % KI for stigningstall	0,95 til 1,31		1,15 til 1,28	
	Prøver < 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$	8 (57 %)	8 (57 %)	14 (67 %)	14 (67 %)
	Prøver > 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$	3 (21 %)	3 (21 %)	3 (14 %)	2 (10 %)
DTX-1	Antall prøver (n)	13		21	
	Snitt konsentrasjon ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	50	50	55	54
	Ratio LC-MSMS/LC-MS (CV %)	1,0 (11 %)		1,0 (11 %)	
	Korrelasjonskoeffisient (r)	0,99		0,99	
	Lineær regresjonsligning	$y = 1,03x - 1,87$		$y = 1,01x + 0,12$	
	95 % KI for stigningstall	0,96 til 1,09		0,96 til 1,06	
	Prøver < 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$	8 (62 %)	8 (62 %)	10 (48 %)	10 (48 %)
	Prøver > 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$	1 (8 %)	1 (8 %)	2 (10 %)	2 (10 %)
YTX	Antall prøver (n)	10		16	
	Snitt konsentrasjon ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	58	55	94	87
	Ratio LC-MSMS/LC-MS (CV %)	0,9 (19 %)		0,9 (12 %)	
	Korrelasjonskoeffisient (r)	0,79		0,85	
	Lineær regresjonsligning	$y = 1,11x - 2,83$		$y = 1,18x - 8,51$	
	95 % KI for stigningstall	0,64 til 1,57		0,89 til 1,47	
	Prøver < 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	8 (80 %)	8 (80 %)	9 (56 %)	9 (56 %)
	Prøver > 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Aza-1	Antall prøver (n)	6		12	
	Snitt konsentrasjon ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	336	348	176	179
	Ratio LC-MSMS/LC-MS (CV %)	1,0 (6 %)		1,0 (7 %)	
	Korrelasjonskoeffisient (r)	0,97		1,00	
	Lineær regresjonsligning	$y = 0,99x - 11,5$		$y = 0,98x + 1,06$	
	95 % KI for stigningstall	0,77 til 1,23		0,96 til 0,99	
	Prøver < 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0 (0 %)	0 (0 %)	6 (50 %)	5 (42 %)
	Prøver > 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$	3 (50 %)	3 (50 %)	3 (25 %)	3 (25 %)
Aza-2	Antall prøver (n)	6		6	
	Snitt konsentrasjon ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	56	68	56	74
	Ratio LC-MSMS/LC-MS (CV %)	1,2 (24 %)		1,3 (24 %)	
	Korrelasjonskoeffisient (r)	0,90		0,91	
	Lineær regresjonsligning	$y = 0,81x + 1,00$		$y = 0,70x + 4,00$	
	95 % KI for stigningstall	0,42 til 1,19		0,39 til 1,01	
	Prøver < 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$	3 (50 %)	3 (50 %)	3 (50 %)	3 (50 %)
	Prøver > 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (17 %)
Aza-3	Antall prøver (n)	6		6	
	Snitt konsentrasjon ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	90	122	90	118
	Ratio LC-MSMS/LC-MS (CV %)	1,4 (26 %)		1,3 (22 %)	
	Korrelasjonskoeffisient (r)	0,96		0,89	
	Lineær regresjonsligning	$y = 0,75x - 0,60$		$y = 0,68x + 9,53$	
	95 % KI for stigningstall	0,53 til 0,96		0,36 til 1,01	
	Prøver < 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$	3 (50 %)	3 (50 %)	3 (50 %)	3 (50 %)
	Prøver > 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$	2 (33 %)	2 (33 %)	2 (33 %)	2 (33 %)

4.3 Innføring av internstandard

Denne delen av oppgaven er en oppsummering av forsøk på å innføre internstandard (IS) til metodene for algetoksiner. Forsøkene ble utført høsten 2010 og vinteren 2011. Målet for eksperimentet var å kunne finne en eller flere egnede IS som kunne kompensere for eventuell ulik gjenvinning av toksin under ekstraksjon samt responsdrift og matrikseffekt i analysen, i tillegg til andre hendelser i analyseforløpet. Under uttesting av ulike IS hadde metodene på LC-MSMS så vidt kommet i gang, og derfor ble denne metodikken lite inkludert i studiet. Analyttene ble lagt inn i basisk metode mot slutten av prosjektet, men det ble ikke utført videre testing på LC-MSMS etter at studiet ble avsluttet i mai 2011.

Forsøket ble presentert ved en poster (vedlegg F) på the 8th International Conference for Molluscan Shellfish Safety på Prince Edward Island, Canada, i juni 2011, og publisert i etterkant av dette [46]. Innholdet i dette kapittelet er i store trekk et resymé av denne artikkelen (vedlegg G).

4.3.1 Prosjektbeskrivelse *Designer Internal Standards* for legemidler

I 2006 fikk AKF og Chiron AS (Trondheim) støtte fra Norsk Forskningsråd for å utvikle og teste mulige kjemiske forbindelser som kunne egne seg som multifunksjonelle IS som erstatning for deutererte IS for legemiddelanalyse på LC-MS. Deutererte IS er ofte svært kostbare i tillegg til at de ikke alltid er kommersielt tilgjengelige. Hovedmålet med prosjektet var å framskaffe et begrenset antall syntetiske IS til bruk ved analyse av de fleste legemidler i biologisk materiale med serum som primær prøvematriks. Mange av forbindelsene ble laget med utgangspunkt i et felles molekylskelett hvor det ble heftet på forskjellige funksjonelle grupper for å oppnå ulike kjemiske og fysiske egenskaper. Molekylene ble designet og syntetisert etter en matrisemodell (4 x 4 eller 5 x 5) hvor stoffenes polaritet ble systematisk variert i x-retningen og funksjonaliteten i y-retningen. Denne matrisen skulle brukes ved valg av egnede IS i analysemetoder, sett i forhold til den ønskede analyttens kjemiske og fysiske egenskaper.

4.3.2 Introduksjon og bakgrunn for IS-prosjektet vedrørende algetoksiner

Rutinemetodene for analyse av lipofile algetoksiner på LC-MS var utsatt for både responsdrift og matrikseffekt. Det var derfor ønskelig å utrede muligheten for at innføring av IS til metodene kunne kompensere for ukontrollerbare og uforutsette analytiske hendelser. Mangel på kommersielt tilgjengelige deutererte IS for toksinene samt lite publikasjoner vedrørende

temaet, gjorde det interessant å prøve ut IS fra det omtalte prosjektet i kapittel 4.3.1. Potensialet ved å bruke IS syntetisert ved substitusjon av ulike grupper på fenylbenzimidazol (PBI) samt deoksykolsyre (DHO) ble dermed utredet for å forbedre LC-MS-metodenes, både ved positiv og negativ ionisering, ytelse for analyse av lipofile algetoksiner. Totalt ble 15 analoger av PBI med ulike kjemiske og fysiske egenskaper forsøkt optimalisert og fragmentert i metodene. På bakgrunn av kromatografi, respons og retensjonstid ble to av disse, 1-pentyl-2-fenyl-benzimidazol (Pent-PBI) og 1-heptyl-2-fenyl-benzimidazol (Hep-PBI) valgt ut for metoden med positiv ionisering. Forbindelsene ga god kromatografi, god respons og retensjonstiden var i nærheten av de to analyttene (PTX-2 og Aza-1) i metoden.

Ingen av de testede PBIs ga tilfredsstillende resultater under optimalisering i negativ ioniseringsmodus. Velkjente IS som ofte benyttes i metoder for analyse av legemidler; Brallobarbitol, Flurazepam og Griseofulvin, ble også forsøkt i mangel av andre alternative forbindelser som ioniseres negativt. Brallobarbitol eluerte for tidlig (0,9 min), mens Griseofulvin hadde dårlig kromatografiske topper. Flurazepam viste bedre resultater både for retensjonstid (t_R) (2,4 min) og kromatografi. Flurazepam ble ikke undersøkt videre på grunn av indikasjon på at Deoksykolsyre (DHO) var en potensielt mer egnet kandidat for metoden. I et tidligere prosjekt utført av Chiron AS i 1990, ble DHO innført som en forbedring ved HPLC-analyse med ADAM-derivatisering av OA og DTX-1 [47]. Forbindelsen DHO har sammenlignbare kjemiske og fysiske egenskaper som DSP. Så vidt det vites, har ikke DHO vært forsøkt ved metodikk på LC-MS eller LC-MSMS som mulig IS for analyse av lipofile algetoksiner. Det ble i tillegg forsøkt å hydrogenere DTX-1 (utført av Chiron AS) som mulig IS for ESI. De første injeksjonene av hydrogenert DTX-1 virket lovende med tanke på kromatografi og t_R . På grunn av holdbarhetsproblematikk med hydrogenert DTX-1, ble det ikke satt inn ytterligere ressurser for å gå videre med denne analytten. For fullstendig oversikt over resultatene fra optimalisering i metodene på LC-MS, se vedlegg H.

De tre utvalgte IS-analyttene DHO, Pent-PBI og Hep-PBI ble i løpet av undersøkelsen også optimalisert for analyse ved basisk metode på LC-MSMS. Resultatene ble vurdert uten å ta spesielt hensyn til ulik instrumentering og kromatografiske metoder.

4.3.3 Metoder benyttet ved innføring av IS til analyse av algetoksiner

Referansematerialer, kjemikalier samt analytiske metoder var som beskrevet i kapittel 3. Det ble konstruert to sett kalibreringskurver. Den ene var basert på analyttrespons og teoretisk konsentrasjon (ESTD) og den andre på responsratio mellom analytt og internstandard (ISTD).

Studiet ble utført ved å bruke naturlig toksinkontaminerte blåskjell og kamskjell. Det ble utført parallell opparbeidelse av skjellene hvor en parallell ble ekstrahert med metanol tilsatt IS og den andre kun med metanol. Det ble benyttet ekstraksjonsmetode B med matriksstyrke 0,2 g/ml for begge paralleller (se kapittel 3.2.1.1). Standardaddisjon ble utført ved å tilsette en kjent mengde av multitoksinløsning (MTL) til råekstraktene. Kvantifiserte konsentrasjoner ved bruk av ISTD- og ESTD-standardkurver, ble sammenlignet med matrikskorrigerte verdier beregnet ved metode 1 [34], omtalt i kapittel 1.5.2.1.

Monitorering av forskjeller i responsdrift med og uten IS ble utført ved injeksjon av standardprøver fortynnet i metanol til minst fem konsentrasjonsnivå. Standardene ble injisert tidlig, midt i og til slutt i lengre analytiske sekvenser. Analyttrespons, responsratioer og kalibreringskurvenes stigningstall ble normalisert til sammenlignbare nivåer før statistisk analyse. Analytisk presisjon uttrykt som CV (%), ble beregnet basert på en sertifisert kontrollprøve (CRM DSP Mus-b) samt i naturlig kontaminerte skjellprøver.

4.3.4 Resultater og diskusjon for innføring av IS til metodene

4.3.4.1 Utvelgelse av potensielle IS-kandidater basert på retensjonstid

Forbindelser av PBI som inneholdt korte alifatiske kjeder eluerte for tidlig ved både ESI⁺ og ESI⁻. Enkelte PBI-analoger ioniserte ikke i negativ modus.

På tross av noe kjemiske ulikhet med de lipofile toksinene, ble Hep-PBI og Pent-PBI valgt ut for videre utprøving som potensielle IS for Aza-1 og PTX-2 i positiv ioniseringsmodus. Ved analyse i pH-nøytral metode koeluerte Hep-PBI med Aza-1. Den svakt mer polare forbindelsen Pent-PBI, eluerte mellom PTX-2 og Aza-1 (se figur 3.5B). På grunnlag av dette ble det antatt at Hep-PBI ville være en velegnet IS for Aza-1. I basisk metode endret t_R seg slik at Hep-PBI eluerte til sist (figur 3.6).

Retensjonstid (t_R) for DHO var nær t_R for DTX-1 i pH-nøytral metode, noe som indikerte at DHO kunne være en egnet IS for DTX-1. I mangel på andre alternativer for IS i ESI⁻modus ble DHO også testet for egnethet for OA og YTX. I basisk metode var t_R for DHO nærmere OA enn DTX-1.

4.3.4.2 IS som modifikator for analytisk responsdrift

For vurdering om bruk av IS kunne kompensere for analytisk responsdrift og dermed benyttes som responsdriftmodifikator, ble undersøkt ved at standarder ble tilsatt IS. Deretter ble standardene analysert to til tre ganger innenfor hver analytisk serie. To sett kalibreringskurver

ble konstruert for hver injeksjon av kalibratorene; ett sett ved å benytte analyttrespons (ESTD) og ett sett hvor responsratio mellom analytt og IS ble brukt (ISTD). Stigningstall for kalibreringskurvene i de ulike seriene ble bestemt og sammenlignet. Dersom IS skal kunne kompensere for responsdrift innenfor en analytisk sekvens, bør IS-responsen endres med samme størrelse, i samme retning og til samme tid som analyttens respons (se tabell 4.17).

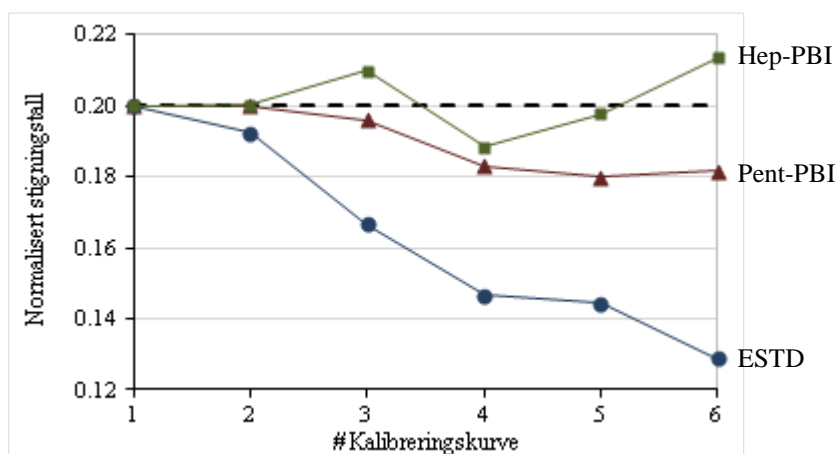
Tabell 4.16 viser gjennomsnittlig stigningstallvariasjon (%) som skyldtes responsdrift i det analytiske systemet innenfor en analyseserie. Det ble observert økende responsdrift ved lengre serier, både ved bruk av ESTD- og ISTD-kalibratorene. I de fleste tilfellene viste ISTD-kurvene et smalere konfidensintervall (95 %) for stigningstallsvariasjon, noe som kunne tyde på at IS delvis kompenserte for responsdrift. Samtidig viste de IS-korrigerede standardkurvene noe mindre stigningstallvariasjon for alle toksiner med unntak av YTX. For øvrig ble mindre responsdrift ved bruk av IS kun bekreftet statistisk for Aza-1 i forbindelse med Hep-PBI ($p = 0,005$).

Tabell 4.16 Sammenligning av stigningstallsvariasjon for kalibreringskurver laget i metanol konstruert uten (ESTD) og med IS (ISTD). (n = totalt antall kalibreringskurver fordelt på fire og fem analytiske sekvenser)

Toksin	IS	n	Snitt stigningstallvariasjon (%)				p-verdi
			ESTD	95 % KI	ISTD	95 % KI	
OA	DHO	20	4,2	- 1,2 til 9,7	1,7	- 1,3 til 4,7	0,4
DTX-1	DHO	20	4,0	- 3,0 til 11,0	2,4	- 3,5 til 8,3	0,7
YTX	DHO	20	- 2,3	- 8,2 til 3,7	- 3,8	- 8,9 til 1,4	0,6
Aza-1	Pent-PBI	13	- 6,4	- 9,8 til - 3,0	- 2,7	- 5,6 til 0,2	0,1
	Hep-PBI				1,8	- 1,6 til 5,2	0,005
PTX-2	Pent-PBI	13	- 4,5	- 13,9 til 5,0	- 1,0	- 9,2 til 7,1	0,6
	Hep-PBI				3,6	- 6,1 til 13,2	0,3

For å illustrere grad av responsdrift i løpet av en lang analytisk serie, viser figur 4.23 variasjonen i stigningstall for seks kalibreringskurver for Aza-1 analysert innenfor samme sekvens. Det var totalt 145 injeksjoner i serien, og den inneholdt i tillegg til standardprøver både prøver og kontroller. Figuren viser hvordan IS jevnet ut responsvariasjonen i standardprøvene. Alle stigningstall ble normalisert til sammenlignbare verdier basert på stigningstallet som ble beregnet for den første kalibreringskurven konstruert med Pent-PBI som IS; $a = 0,2$, vist som stiplet linje i figur 4.23. Trendlinjen for stigningstallene som ble beregnet for kalibreringskurver konstruert kun på bakgrunn av analyttintensitet (ESTD) viste negativ retning, og avvek mer fra standardisert stigningstall enn stigningstallene fra ISTD-kurvene.

Stigningstallvariasjonen ved bruk av Hep-PBI som IS for Aza-1, viste at disse ISTD-korrigererte standardkurvene varierte både litt over og litt under den normaliserte standardverdien for stigningstall. Dette indikerte at Hep-PBI ble tilnærmet likt berørt av ytre påvirkninger som analytten. Av den grunn vil trolig Hep-PBI kompensere for den negative trenden med synkende stigningstall som igjen vil føre til overestimering av toksinkonsentrasjonen.



Figur 4.23 Sammenligning av stigningstall for Aza-1 i seks kalibreringskurver analysert i samme analytiske serie med totalt 145 injeksjoner. Stigningstallene er beregnet fra standardkurver basert på analyttrespons (ESTD) og ved bruk responsratio for to ulike IS (ISTD), Hep-PBI og Pent-PBI. Stiplet linje viser normalisert verdi for stigningstall.

4.3.4.3 Samsvar i matrikspåvirkning av IS og toksiner i ulike arter

Responsvariasjon for toksiner og IS ble testet i tidligere verifisert negative skjellektrakt som ble tilsatt kjent mengde CRM (125 µg/kg). Hensikten var å undersøke om arealintensiteten for analyttene og deres tiltenkte IS varierte likt, både innen og mellom art, ved tilsetning til ulike skjellmatrikser. For undersøkelse av Aza-1 og PTX-2 ble det benyttet totalt 98 råekstrakt som fordelte seg på artene blåskjell (46 stk), kamskjell (37 stk) og hjerteskjell (15 stk). Alle prøvene ble analysert med pH-nøytral metode i løpet av henholdsvis fire, to og tre dager. Responssamsvar for tilsatt DSP og YTX i 39 blåskjell og 37 kamskjell, ble først undersøkt ved alkaliske forhold på LC-MSMS og deretter under pH-nøytrale betingelser på LC-MS. Kromatografiske toppareal i påfølgende analytiske serier ble standardisert i forhold til den første prøven injisert i den første sekvensen for å eliminere dag-til-dag variasjon som skyldes instrumentelle årsaker. Dataanalyse ble foretatt ved bruk av Spearman rank korrelasjon (tabell 4.17), og presentasjon av data framstilles her noe annerledes enn i vedlegg F og G. Tilsatt mengde av IS var henholdsvis 10 µg/ml DHO i metode med negativ ionisering, og 1 µg/ml Pent-PBI og Hep-PBI til positiv ioniseringsmetode.

Resultatene tilsa at observert variasjon i analyttrespons delvis var betinget av art, trolig på grunn av ulikheter i matrikssammensetning. For undersøkelser av DHO som mulig IS i ESI, ble det indikert samsvar i responsdrift mellom OA og DHO ($p < 0,10$). Dette resultatet var uavhengig av ulike kromatografiske elueringsmetoder, analyseinstrument og art, vist ved svart stiplede linje i figur 4.24A. Ved inndeling etter art ble det antydnet at det kun var sammenheng mellom responsdrift for DHO og OA i kamskjell, og ikke i blåskjell ($p = 0,37$) (figur 4.24A; OA i blåskjell og kamskjell, uavhengig av metode). Dersom resultatene sorteres med hensyn på analytisk metode og uavhengig av art, ble det ikke funnet signifikant forskjell mellom responsdrift for IS og OA samt IS og DTX-1 ($p < 0,10$). Korrelasjonskoeffisientene var for øvrig relativt lave; r mellom 0,259 og 0,589.

Ved inndeling etter art ble det observert forskjellig resultat vedrørende responsammenheng for DSP i begge de analytiske metodene. Dette indikerte ulik grad av matrikspåvirkning i skjelltypene analysert ved ulike metodebetingelser. Analyttresponsen for både OA og DTX-1 viste seg å gå i motsatt retning sammenlignet med DHO i kamskjell. Det vil si at når intensiteten for DHO økte, sank responsen for DSP-toksinene. Eksempel er vist for DTX-1 i kamskjell i figur 4.24B. Tilsvarende resultat ble ikke funnet i blåskjell. Dette skyldes trolig ulik matrikspåvirkning, og DHO var derfor ikke egnet som IS for kvantifisering av DSP i kamskjell.

Resultatene for YTX viste ingen klar sammenheng for tilnærmet lik matrikspåvirkning som DHO (tabell 4.17). Samvariasjon for de to stoffene ble antydnet ved samlet vurdering av art og metode ($p < 0,10$), men resultatene var ikke konsekvente når variablene ble vurdert hver for seg. Toksinet YTX oppførte seg analytisk annerledes enn DHO uavhengig av både type skjell, kromatografisk metode og instrumentering. Retningen på responsvariasjonen for YTX i forhold til DHO virket nærmest tilfeldig. Det ble like gjerne observert responsdrift i lik retning som i motsatt retning innenfor samme kategori (art og metode).

For analyse av Aza-1 med positiv ionisering i pH-nøytral metode, ble det funnet sammenheng i responsvariasjon ved bruk av Hep-PBI som IS når alle arter ble vurdert under ett ($p < 0,1$) (tabell 4.17). Det ble funnet artsindividuelle forskjeller, der Aza-1 i kamskjell viste god korrelasjon med begge de vurderte IS ($r > 0,76$). Resultatene for Aza-1 i blåskjell og hjerteskjell ikke var like tilfredsstillende. Responsendringene varierte i takt for Pent-PBI og Aza-1 i blåskjell, men ble funnet til å drifte i hver sin retning (figur 4.25A). Variasjon i intensitet mellom Hep-PBI og Aza-1 i blåskjell viste tilnærmet ingen sammenheng, med

korrelasjon $r = 0,008$ ($p = 0,96$). Av den grunn virket derfor heller ikke Hep-PBI særlig egnet som IS ved analyse av Aza-1 i blåskjell. Responsendring på grunn av matrikspåvirkning var tilnærmet identisk for begge IS, noe som var forventet med tanke på at forbindelsene er kjemisk relatert til hverandre.

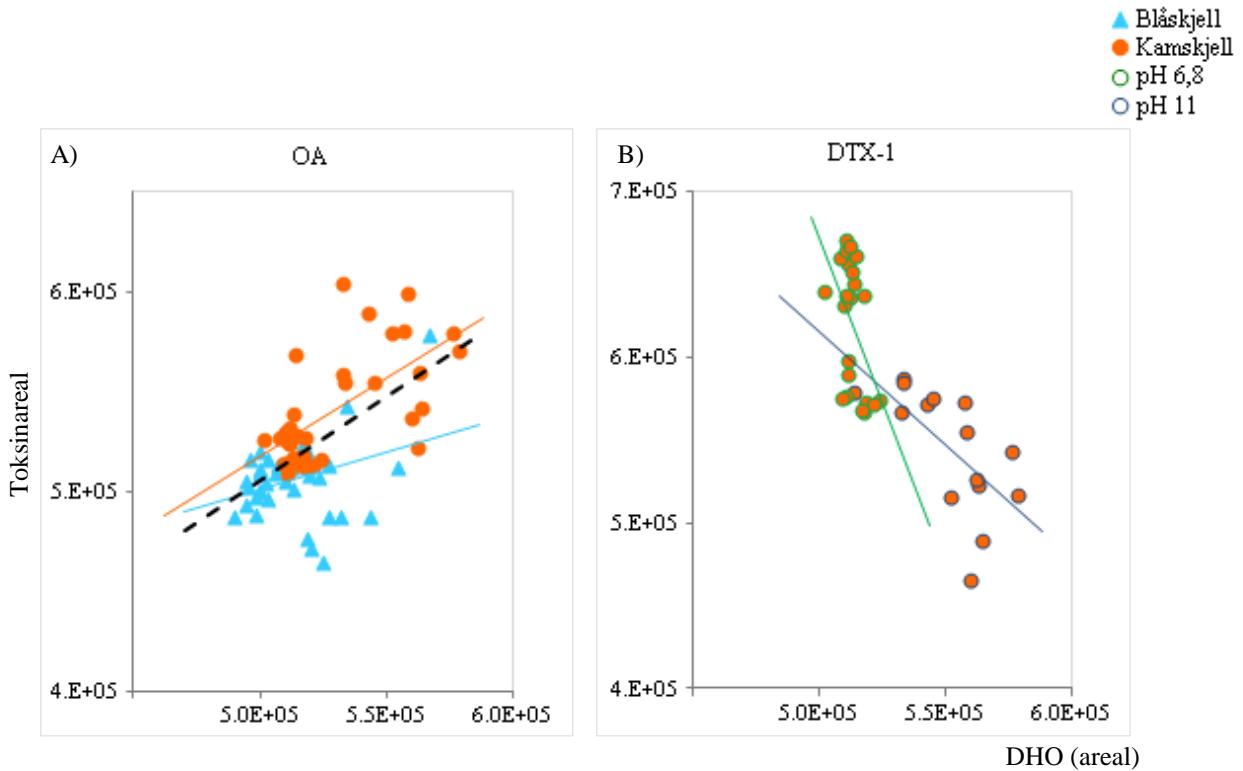
Detektert intensitet av tilsatt PTX-2 i kamskjellprøver avvok signifikant fra både blåskjell og hjerteskjell, noe som antydte ionesuppresjon i kamskjellprøvene. Dette fenomenet er beskrevet både tidligere i denne oppgaven, og av andre [34]. I den forbindelse var resultatet for samsvar i responsvariasjon for PTX-2 med begge PBI-forbindelsene interessant.

Resultatene indikerte sammenheng mellom intensitetsendringer i både blåskjell og kamskjell, og at endringen forekom i samme retning i løpet av analysen. Det vil si at PBI og PTX-2 ble påvirket tilnærmet likt av matrikseffekt under analysen. Analyttresponsen av PTX-2 i kamskjell var lav i forhold til IS-responsen (ca 1:4), men viste likevel god korrelasjon med svingningene i detektorsignalene. Eksempel er vist for PTX-2 og Pent-PBI i figur 4.25B.

I forbindelse med injeksjoner av kamskjell ble det observert at analyttresponsen for PTX-2 i den påfølgende prøve eller standard ble undertrykt. Det betyr trolig at kamskjellmatriks blir hengende igjen i det analytiske systemet slik at ionesuppresjon oppstår ved ionisering av PTX-2 i neste injeksjon, uavhengig av prøvematriks, i den etterfølgende prøven. Det ble foreslått at injeksjon av organiske løsemidler som metanol og ACN, bør gjøres i etterkant av hver analyse av kamskjell. Denne prosedyren ble innført i rutinemetoden ved AKF som følge av denne observasjonen.

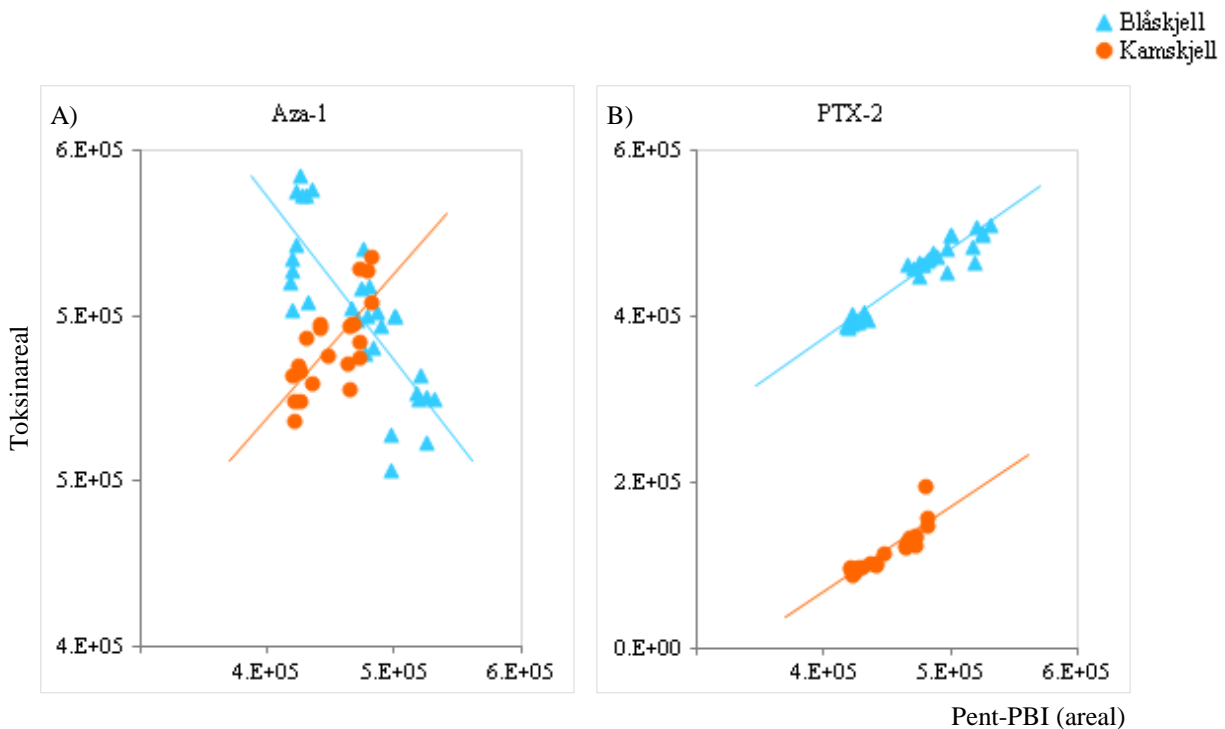
Tabell 4.17 Samvariasjon i arealintensitet for tiltenkt IS og tilhørende toksin tilsatt ulike skjellmatriser

Toksin	IS	Art	Metode	<i>n</i>	Spearman's rho	p-verdi		
OA	DHO	Begge arter	Begge metoder	76	0,486	< 0,10		
			pH 6,8	44	0,259	< 0,10		
			pH 11	32	0,589	< 0,10		
		Blåskjell	Begge metoder	39	0,147	0,37		
			pH 6,8	22	0,532	< 0,10		
			pH 11	17	0,056	0,83		
		Kamskjell	Begge metoder	37	0,545	< 0,10		
			pH 6,8	22	- 0,278	0,21		
			pH 11	15	- 0,207	0,46		
		DTX-1	DHO	Begge arter	Begge metoder	76	0,020	0,87
					pH 6,8	44	0,333	< 0,10
					pH 11	32	0,385	< 0,10
Blåskjell	Begge metoder			39	0,262	0,11		
	pH 6,8			22	0,755	< 0,10		
	pH 11			17	0,355	0,16		
Kamskjell	Begge metoder			37	- 0,794	< 0,10		
	pH 6,8			22	- 0,433	< 0,10		
	pH 11			15	- 0,729	< 0,10		
YTX	DHO			Begge arter	Begge metoder	76	0,383	< 0,10
					pH 6,8	44	- 0,197	0,20
					pH 11	32	0,490	< 0,10
		Blåskjell	Begge metoder	39	- 0,127	0,44		
			pH 6,8	22	- 0,584	< 0,10		
			pH 11	17	0,061	0,82		
		Kamskjell	Begge metoder	37	0,720	< 0,10		
			pH 6,8	22	0,320	0,15		
			pH 11	15	- 0,246	0,38		
		Aza-1	Pent-PBI	Begge arter	53	- 0,303	< 0,10	
				Blåskjell	pH 6,8	31	- 0,810	< 0,10
				Kamskjell	22	0,768	< 0,10	
Hep-PBI	Alle arter		98	0,310	< 0,10			
	Blåskjell		46	0,008	0,96			
	Kamskjell		pH 6,8	37	0,760	< 0,10		
PTX-2	Pent-PBI	Hjerteskjell	15	0,258	0,35			
		Begge arter	53	0,702	< 0,10			
		Blåskjell	pH 6,8	31	0,939	< 0,10		
	Hep-PBI	Kamskjell	22	0,950	< 0,10			
		Alle arter	98	0,351	< 0,10			
		Blåskjell	46	0,338	< 0,10			
Hjerteskjell	Kamskjell	pH 6,8	37	0,733	< 0,10			
	Hjerteskjell	15	- 0,083	0,77				



Figur 4.24 A) Sammenheng i variasjon for analyttrespons av OA og DHO uavhengig av art og kromatografisk metode vises med svart stiplet linje ($n = 76$, $r = 0,486$). Sammenheng innen art og uavhengig av metode indikeres med trendlinje i turkis (blåskjell) og oransje (kamskjell).

B) Sammenheng i variasjon for analyttrespons av DTX-1 og DHO i kamskjell analysert ved pH 6,8 ($n = 22$) og pH 11 ($n = 15$).



Figur 4.25 A) Sammenheng i variasjon for analyttrespons av Aza-1 og Pent-PBI i kamskjell ($n = 22$) og blåskjell ($n = 31$) i pH-nøytral metode **B)** Sammenheng i variasjon for analyttrespons av PTX-2 og Pent-PBI i kamskjell ($n = 22$) og blåskjell ($n = 31$) i pH-nøytral metode

4.3.4.4 Kompensering av matrikseffekt ved bruk av IS

Toksinkonsentrasjonene ble beregnet på tre måter for å undersøke hvorvidt IS kunne kompensere for ME ved kvantifisering av toksinkonsentrasjon. Antall naturlig kontaminerte prøver var begrenset i undersøkelsesperioden senhøst/vinter. Av den grunn ble ME studert i kun 18 ulike prøver, fordelt på 14 blåskjell og fire kamskjell. Alle prøvene hadde relativt lavt toksininnhold. I tillegg til å konstruere kalibreringskurver med IS (ISTD) og uten IS (ESTD) for estimering av toksinkonsentrasjon, ble standardaddisjon utført for å korrigere for individuell ME. Resultatene ble sammenlignet, og nøyaktighet i forhold til ME-korrigerede verdier ble beregnet (se tabell 4.18).

Estimerte konsentrasjon av OA var i området 5,3 - 31,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($n = 9$), og beregnet nøyaktighet for ISTD-bestemte verdier i forhold til ME-korrigerede resultater var 97 % (KI: 96 til 99 %). Antallet positive prøver var for få til å trekke en endelig konklusjon, men resultatene indikerte at DHO kan egne seg som IS for OA-kvantifisering. Statistisk analyse (paret t-test) viste for øvrig signifikant forskjell ($p < 0,05$) mellom prøvesvarene. Denne ulikheten ville ikke hatt betydning for de analyserte prøvene i henhold til stengning av oppdrettsanlegg, da alle OA-konsentrasjonene var langt under regulatorisk grense for høsting av skjell [3].

Innhold av Aza-1 i de undersøkte prøvene varierte fra 6,4 til 37,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($n = 3$), som også var langt under grensen for høstestans [3]. Nøyaktighet av konsentrasjonsestimering ved bruk av Hep-PBI som IS var gjennomsnittlig 114 % (KI: 110 – 119 %) mot ME-korrigerede verdier. Resultatene virket lovende med tanke på benyttelse av Hep-PBI som IS for kvantifisering av Aza-1 når det gjaldt individuell ME. Kvantifisering ved bruk av Pent-PBI ga verdier tilnærmet lik ESTD-resultatene. Datautvalget for Aza-1 i naturlig kontaminerte prøver var for lite til å kunne behandles statistisk, og flere positive prøver bør analyseres før en endelig konklusjon kan trekkes.

Bruk av DHO som IS for konsentrasjonsbestemmelse av DTX-1 og YTX i skjellprøvene virket mindre lovende. Resultatene for DTX-1 ($n = 11$) viste ikke statistisk forskjell mellom ESTD- og ISTD-kvantifiserte verdier ($p > 0,05$), mens resultatene beregnet ved standardaddisjon var vesentlig høyere. Dette indikerte at toksinkonsentrasjonen ble underestimert ved bruk av både ESTD og ISTD. Konsentrasjonsområdet for de positive prøvene var fra 9,9 til 225 $\mu\text{g}/\text{kg}$, hvorav en prøve inneholdt DTX-1 over regulativ grenseverdi [3]. Uttaksstedet hadde blitt stengt uavhengig av hvilken kvantifiseringsmodell

som hadde blitt benyttet. Forslaget om å benytte DHO som IS for DTX-1 ut i fra tilnærmet like retensjonstider var ikke nok. Flere positive prøver for DTX-1 bør analyseres for å kunne konkludere endelig.

Resultatene for YTX ble trolig noe påvirket av at konsentrasjonene var lave, både i forhold til metodens LOQ og regulatorisk grenseverdi [3]. Kvantifisert toksininnhold i prøvene var signifikant høyere ved bruk av ISTD, og beregnet nøyaktighet i forhold til ME-korrigerede verdier var 135 % (KI: 123 til 148 %).

Det ble detektert PTX-2 i bare fire prøver (to av hver art). Toksinkonsentrasjonen i begge arter ble betydelig overestimert i prøveparallellene tilsatt IS med mer enn 40 % økning i forhold til ME-korrigerede prøvesvar (ikke vist). Konsentrasjonsnivået i de positive prøvene var i området fra 8,9 til 155,7 µg/kg. Disse resultatene som baseres på et svært lite antall prøver, indikerte at IS verken kunne kompensere for ionsuppresjon av PTX-2 i kamskjell, eller benyttes ved konsentrasjonsestimering av PTX-2 i blåskjell. Dette gjaldt både Hep-PBI og Pent-PBI.

Tabell 4.18 Gjennomsnittlig konsentrasjon av algetoksiner (µg/kg) kvantifisert på tre måter; matrikskorrigert ved standardaddisjon, ESTD og ISTD, samt nøyaktighet (%) mot matrikskorrigert (ME-korr) resultater

Toksin	IS	n	Snitt konsentrasjon (µg/kg)			Nøyaktighet (%)	
			ME-korr.	ESTD	ISTD	ESTD	ISTD
OA	DHO	9	15,5	13,1	15,0	86	97
DTX-1	DHO	11	52,7	39,9	42,4	74	80
YTX	DHO	12	29,9	33,3	40,0	113	135
Aza-1	Pent-PBI	3	18,9	21,6	23,7	131	134
	Hep-PBI				21,3		114

4.3.4.5 Sammenligning av presisjon med og uten IS

Reproduserbarhet ble undersøkt med og uten bruk av IS. Det ble benyttet naturlig kontaminerte skjellprøver samt en sertifisert referansekontroll som inneholdt OA og DTX-1 (CRM DSP Mus-b). Prøvene ble analysert i løpet av tre dager hvor det ble foretatt flere injeksjoner hver av dagene. Analytisk presisjon uttrykt som CV (%) ble beregnet for ISTD-kvantifiserte og ESTD-kvantifiserte resultater (tabell 4.19).

Resultatene for reproduserbarhet var akseptable for alle toksinene ved bruk av begge typer kvantifiseringsteknikk, og det ble ikke funnet signifikant forskjell i presisjon for noen av analyttene.

Tabell 4.19 Analytisk presisjon for analyse av algetoksiner kvantifisert uten (ESTD) og med IS (ISTD)

Toksin	IS	n	Antall replikate injeksjoner	CV (%)		p-verdi
				ESTD	ISTD	
OA	DHO	10	89	2,7	3,5	0,9
DTX-1	DHO	12	117	3,1	3,9	1,0
YTX	DHO	6	46	8,8	8,8	0,9
Aza-1	Pent-PBI	1	10	2,3	2,5	0,7
	Hep-PBI	10	52	2,7	4,8	0,3
PTX-2	Pent-PBI	4	40	8,5	9,2	0,9
	Hep-PBI				10,0	0,9

4.3.5 Foreløpig konklusjon vedrørende IS

Dette studiet illustrerer kompleksiteten ved etablering av passende IS for kromatografisk og massespektrometrisk analyse av lipofile algetoksiner. Implementering av IS kan gi vesentlig forbedring av en analytisk metode. Med tanke på utfordringene knyttet til ulike matrikspåvirkninger ved analyse av algetoksiner i skjell, hadde egnede IS vært et nyttig analytisk verktøy i kvantifiseringssammenheng.

Konklusjoner ut i fra resultatene i denne undersøkelsen blir noe begrenset på grunn av lite datamateriale. Studiet må sees på som et utgangspunkt for forbedring av massespektrometrisk analysemetode som deteksjon- og kvantifiseringsmetodikk av marine biotoksiner.

Beregninger gjort med bruk av IS i dette studiet virket lovende for OA og Aza-1. DHO viste seg å være en bedre egnet IS for OA enn for DTX-1, selv om DTX-1 eluerte nærmere i tid til DHO enn OA. Begge de to PBI-forbindelsene viste positive resultater som IS for Aza-1, mens resultatene for PTX-2 ga ingen klare svar.

Forbedringer med tanke på responsdrift og matrikseffekt for DTX-1 og YTX ble ikke vist. Molekylstruktur og de kjemiske egenskapene for mange av algetoksinene er forholdsvis ulike, og det gjør det utfordrende å finne en egnet IS som passer til alle analyttene i metodene. I tillegg vil de ulike matrikssammensetningene i prøvematerialet gjøre det ekstra krevende.

Ytterligere studier er nødvendig før endelig konklusjon kan trekkes.

5. Diskusjon

5.1 Sammenligning av LC-MS og LC-MSMS – pH-nøytral, sur og basisk metode

5.1.1 Kromatografiske sammenligninger

5.1.1.1 Retensjonstid

Resultatene for retensjonstid i pH-nøytral metode, der alle undersøkte toksiner viste minst retensjon, er ikke direkte sammenlignbare med retensjonstiden funnet i sur og basisk metode. Nøytral metode analyseres med mobilfasehastighet på henholdsvis 1,0 ml/min (ESI⁺) og 0,7 ml/min (ESI⁻), mens hastigheten i metodene på LC-MSMS er 0,4 ml/min. Ved sammenligning av retensjon mellom metodene, vurderes derfor kun elueringsrekkefølgen av toksinene.

Som forventet har DSP-gruppen minst retensjon ved høy pH, der karboksylgruppen deprotoneres og molekylet blir negativt ladet. I sur metode er DSP-analyttene uladet, og retensjonstiden øker. Elueringsrekkefølgen innad i DSP-gruppen er konstant, hvor OA alltid eluerer før DTX-1 da OA har lavere molekylvekt enn DTX-1.

For YTX, som har to pK_a-verdier hvorav den ene er ukjent, og den andre er ca 6,9 som er en usikker verdi (se kapittel 1.2.2), og for PTX-2, hvor pK_a-verdi er ukjent, forventes det at t_R for disse analyttene er tilnærmet upåvirket av endringer i mobilfasens pH [10, 21]. Retensjon for YTX ved analyse under basiske forhold er lavere enn i øvrige metoder på grunn av lavere m/z siden analytten får dobbeltladning. Molekylet PTX-2, som er uladet under alle forhold, har forskjellig retensjon under sure og alkaliske betingelser; t_R på henholdsvis 5,4 og 6,6 min. Årsaken til dette kan forklares med at ulikt kolonnemateriale benyttes i de to metodene. Kolonner med C₈-materiale som brukes i sur metode, har mindre retensjon for moderat polare til non-polare forbindelser sammenlignet med C₁₈-kolonnen i basisk metode. Log P for PTX-2 er i følge tabell 1.2, funnet til å være 6,5 ± 2,4.

Som nevnt i kapittel 3.2 ligger m/z for Aza-2 og Aza-3 som passive analytter i pH-nøytral metode på LC-MS, og analyse av Aza-analogene ved disse betingelsene ble ikke vurdert i denne oppgaven. Retensjonstidene i pH-nøytral metode for henholdsvis Aza-3 og Aza-2 er likevel funnet til å være ca. 4,2 min og ca. 5,3 min (ikke vist). Analyttene i Aza-gruppen har lik elueringsrekkefølge i de tre metodene som er undersøkt.

I basisk metode er GYM og SPX-1 uladet, og t_R på henholdsvis 6,0 og 6,5 min er betydelig lenger enn ved lav pH der molekylene er protonerte, hvor de måles til 3,6 og 3,8 min.

Elueringsrekkefølgen av disse to toksinene kan forklares ut fra molekylvekt, der SPX-1 er et vesentlig større molekyl enn GYM. Samtidig observeres det at SPX-1 praktisk talt koeluerer med PTX-2 i basisk metode. Ved bruk av dMRM som deteksjonsmetodikk er koeluering uproblematisk siden de individuelle ioneovergangene er unike for hvert av toksinene.

Stabil t_R er en viktig parameter for metodene på LC-MSMS. Drift i analyttenes retensjonstid kan føre til eluering utenfor de fastsatte retensjonstidsvinduerne og dermed tap av signal. Stabiliteten i t_R er god for alle toksiner analysert ved de ulike kromatografiske forholdene ($CV < 1,0 \%$), og er godt innenfor kravet ($< 3 \%$) fastsatt i EU-SOP [7].

5.1.1.2 Toppsymmetri

Under ideelle forhold bør kromatografiske topper ha Gauss-form med perfekt symmetri. I praksis har ofte de kromatografiske toppene en mindre eller større grad av fronting eller haledannelse [43]. Resultatene indikerer ulik grad av "tailing" for de fleste toksinene i både sur og basisk metode, mens de kromatografiske toppene analysert ved nøytral pH er tilnærmet symmetriske. Teoretisk sett kan haledannelse skyldes flere årsaker. Det kan ha oppstått et dødvolum i det kromatografiske systemet, slik at prøvens komponenter fortynnes med mobilfasen og dermed blir til et bredere bånd. I følge Gerssen [10], som har gjort en lignende studie for sur og basisk metode, kan pH-endring i mobilfasen også ha en effekt på toppfasongen fordi endring i ladningstilstanden til analytten vil kunne påvirke interaksjonen med stasjonærfasen i kolonnen. Samtidig kan dårlig regulert pH i mobilfasen også kunne bidra til asymmetriske topper. Fux [16] påviste i sin studie pH-økning i løpet av mobilfasegradient med ACN dersom bufferløsningen består av konjugerte buffere som eksempelvis ammonium format og maursyre. Tilsvarende buffer ble benyttet i sur metode i denne oppgaven. Fux har ikke gjort lignende forsøk for ammonium og ACN som ble brukt i alkalisk metode. Målinger gjort i eget studie vedrørende basisk mobilfase A₃ (pH ~ 11) viste en pH-reduksjon med inntil 0,8 pH-enheter over en ukes oppbevaring. Dette skyldtes trolig fordampning av NH₃, og av den grunn ble mobilfasen laget ny for hvert analytisk oppsett.

Asymmetrifaktor for YTX i sur metode overstiger øvre maksimumtillatte grense stipulert til 2,0 i *Agilent LC-handbook* [43]. Visuell bedømming av kromatogram for YTX viste at den kromatografiske toppen var hakket og smurt utover et bredt tidsintervall. Dette kan tyde på at det har oppstått sekundære interaksjoner som ionebytte-interaksjoner, på grunn av protonering

av silanolgrupper i stasjonærfasen ved lav pH [10, 21]. Sulfatgruppene på YTX-molekylet kan dermed ha vekselvirket med silanolgruppene på kolonnematerialet, og på den måten redusert den kromatografiske kvaliteten.

5.1.1.3 FWHM og toppbredde

Toppbredde ved halv topphøyde (FWHM) viser tilfredsstillende resultater for de fleste analyttene i alle tre metoder. Unntakene er YTX i sur metode og Aza-3 i alkalisk metode som strekkes over et bredt tidsintervall, henholdsvis 0,175 og 0,224 min. Disse verdiene for YTX bekrefter utfordringene knyttet til analyse av denne analytten under sure forhold. De kromatografiske parameterne (gjelder også toppsymmetri) for YTX blir vesentlig forbedret ved økt pH. Dette var også tilfelle for Gerssen's studie [10]. Det er funnet signifikant bredere kromatografiske topper for Aza-3 i basisk metode, både FWHM og toppbredde, enn ved lav pH. I følge Gerssen er nettoeffekt av pH-endringer for Aza-gruppen uklar, ettersom disse analyttene forblir på ionisert form ved både høy og lav pH. Han mener at dette kan tyde på at molekylene ikke er i fullstendig deprotonert tilstand ved pH 11, og at det dermed gis rom for sekundære interaksjoner med stasjonærfasen. Oversikten i tabell 1.2 viser at Aza-1 og Aza-2 har pK_a -verdi lik ca 5,8. Det ble ikke funnet pK_a -verdi for Aza-3 i litteraturen. Fux [16] gjorde en antakelse i sin studie om at toksiner innenfor samme toksingruppe har tilnærmet like pK_a -verdier. Dersom dette kan vektlegges, er trolig pK_a -verdien for Aza-3 i nærheten av 5,8. Molekylet forventes dermed å være deprotonert ved basiske betingelser. Teorien beskrevet ovenfor kan antakelig også forklare hvorfor Aza-1 viser de bredeste toppene analysert under pH-nøytrale betingelser.

Det observeres i tillegg at FWHM og toppbredden for OA og PTX-2 i pH-nøytral metode er vesentlig bredere enn i metoder på LC-MSMS. Både OA og PTX-2 eluerer først i sine respektive metoder, ESI og ESI⁺, på LC-MS. Toppbredde og FWHM for øvrige analytter i disse metodene er ikke tilsvarende brede. Brede kromatografiske topper for tidlig eluerende analytter kan i teorien skyldes problem i forbindelse med væskebanen i LC-systemet, muligens på grunn av ikke-optimal indre diameter på tubings eller ved bruk av feil koblingsskruer [48, 49].

Å måle bredden på de kromatografiske toppene ved grunnlinjen kan være utfordrende siden toppen ofte begynner og ender relativt gradvis. Derfor er FWHM en bedre parameter for å beskrive metodenes oppløsning.

5.1.1.4 Signal-til-støy ratio (SNR)

Basisk metode gir høyere verdier for signal-til-støy ratio enn de øvrige undersøkte metodene, spesielt for toksinene i ESI-modus. Alle toksiner analysert under alkaliske forhold på LC-MSMS tilfredsstiller krav om $SNR \geq 10$ ved konsentrasjon lik laveste standard [7]. Krav til SNR for analyse med sur metode innfris for alle toksiner, med unntak av OA hvor fire av ti paralleller faller under grensen. Ved analyse på LC-MS oppfylles $SNR \geq 10$ kun for Aza-1 og PTX-2 i alle vurderte oppsett. Toksiner analysert i negativ modus innfris i mindre grad kravet om $SNR \geq 10$; spesielt YTX, hvor beregnet gjennomsnitt av $SNR = 7,0$, og kun to av ti paralleller har $SNR > 10$.

I følge Blay et al [40] som har studert massenøyaktighet av marine biotoksiner ved LC-MS, kan lavere oppløsning i kvadrupolen på MS-instrumentet føre til at metodene er mer utsatt for interferens fra ioner med lignende masser i komplekse prøver. Samtidig ble det påpekt at det var større sannsynlighet for feil ved deteksjon av nøyaktig m/z for negative ioner, trolig fordi ioneoptikken er typisk optimalisert for positive ioner. Dette på grunn av at det er mest vanlig å analysere ved positiv ionisering. Slik interferens kan ha bidratt til dårligere SNR for DSP og YTX ved pH-nøytral metode.

Høyere verdier for SNR i metodene på LC-MSMS skyldes sannsynligvis også at instrumentet er mer sensitivt og selektivt enn LC-MS. Fragmentering utføres på to ulike måter ved bruk av LC-MS og LC-MSMS. Utvelgelse av utgangsign i kvadrupolen på LC-MS kan være mindre spesifikk samt gi dårligere ioneoverføring. Dette kan blant annet medføre lavere signal og betydelig mer støy på grunnlinjen i forhold til LC-MSMS. Ionefiltrering utføres to ganger ved LC-MSMS-metodikk, noe som gjør instrumentet mer spesifikk (se figur 1.3).

5.1.1.5 Kvantifiseringsgrense og nøyaktighet

Det oppnås lavere teoretiske kvantifiseringsgrenser for alle analyttene ved bruk av metoder på LC-MSMS sammenlignet med LC-MS-metodene. Disse LOQ-verdiene ble ikke bekreftet analytisk ved å analysere blankprøver tilsatt CRM lik teoretisk LOQ med tanke på SNR-krav for kvantifisering ($SNR \geq 10$) [7]. Største endring observeres for YTX hvor LOQ reduseres med 50 % i basisk metode i forhold til pH-nøytral. Dette resultatet kan trolig forklares ut fra et høyere injeksjonsvolum i basisk metode hvor det ble injisert 10 μl , mot 5 μl i pH-nøytral metode. Grensen for YTX-kvantifisering ved sure forhold endres i mindre grad sammenlignet med pH-nøytral metode. Årsaken til dette kan forklares fra signifikant bredere og asymmetriske topper for YTX i sur metode. Forskjeller i toksinenes beregnede LOQ mellom

metodene har ingen analytisk relevans for rutineanalyse, da LOQ for alle analyttene er langt under dagens regulatorisk grense (1,0 mg/kg for YTX og 160 µg/kg for de resterende).

Gjennomsnittlig nøyaktighet for metodene er ikke signifikant forskjellig for noen av de undersøkte toksinene. Det påvises ikke at en av metodene sannsynlig er mindre utsatt for feil, og alle metodene gir resultater nær teoretisk verdi. Det observeres en mindre, ikke-signifikant negativ bias i nøyaktighet mellom basisk og sur metode for GYM. Dette kan forklares ut fra svært høy respons for denne analytten i basisk metode med mulig ionemetning i ionekilden, noe som gir avvikende resultat for de to høyeste konsentrasjonsnivåene. Så langt er ikke GYM påvist i norske farvann, og analytten er heller ikke regulert i EU.

5.1.1.6 Linearitet

Kalibreringskurven demonstrerer forholdet mellom respons og konsentrasjon. Dette forholdet skal ideelt sett være lineært, $y = ax + b$, hvor y tilsvarer instrumentets respons, x er konsentrasjonen, a representerer stigningstallet til linjen og b er skjæringspunktet med y -aksen. Korrelasjonskoeffisienten r beskriver styrken av sammenhengen mellom de to variablene x og y .

Korrelasjon ved bruk av lineær standardkurve i metanol viser akseptabelt resultat for samtlige toksiner med unntak av GYM analysert under basiske betingelser. I tre av fem analytiske oppsett er ikke kravet til korrelasjonsfaktor i henhold til EU-SOP [7] innfridd ($r < 0,98$). Årsaken kan sannsynligvis forklares ut i fra ionemetning i ionekilden. Bruk av kvadratiske kurver gir bedre korrelasjon da kun en sekvens faller utenfor kravet. Det bør eventuelt vurderes om høyeste standard kan utelates fra standardkurven, noe som gir $r > 0,98$ for alle standardkurvene for GYM. Tilsvarende funn ble ikke rapportert i Gerssen's studie [10].

5.1.2 Sensitivitet og responsforskjeller

En større verdi for standardkurvenes stigningstall tilsier en mer sensitiv metode. Analysene i denne oppgaven viser at sensitiviteten for de lipofile biotoksinene er påvirket av kromatografiske forhold.

Økning i sensitivitet ved å benytte LC-MSMS framfor LC-MS, varierte fra toksin til toksin. Størst økning observeres for Aza-1 som får 20 ganger bedre følsomhet under alkaliske forhold, og 11 ganger bedre ved sure betingelser. Resultatene for DTX-1 viser det motsatte; følsomheten synker med 10 og 1,4 ganger, hvor sistnevnte ikke signifikant nedgang i forhold til nøytral metode på LC-MS, ved henholdsvis lav og høy pH. Signifikant nedgang i

sensitivitet er også påvist for OA ved lav pH, og PTX-2 ved høy pH, i forhold til metodene på LC-MS.

I følge tabell 1.2 er pK_a -verdien for Aza-1 funnet å være ca $5,8 \pm 2,0$. Mest sannsynlig har Aza-1 to pK_a -verdier, hvor den andre kun beregnet teoretisk til 9,2. Analytten kan opptre både som syre og base. Som nevnt under kapittel 5.1.1.3 forblir Aza-gruppen på ionisert form både ved høy og lav pH, og at nettoeffekten av pH-endringer er uklar. Ved analyse med pH-nøytral metode vil trolig Aza-molekylene være delvis ladet og delvis uladet. Mobilfasenes pH i metodene som benyttes ved LC-MSMS-analyser, er noe lengre unna pK_a -verdien(e). Dermed er Aza-1 enten i positiv (lav pH) eller negativ (høy pH) ladet form. Flere molekyler ioniseres før fragmentering i massespektrometeret, og responsen øker.

Med tanke på at toksinene i DSP-gruppen har nesten lik molekylstruktur, hvor DTX-1 har metylgruppe i R_2 -posisjon og OA har hydrogen (se figur 1.1A), og lik pK_a -verdi (ca $4,9 \pm 0,5$), er det uventet at DTX-1 har så mye lavere respons enn OA i basisk metode.

Responratio mellom OA og DTX-1 er ca 1,0 i både pH-nøytral og sur metode. DSP er på uladet form i begge disse metodene. Ratio er 5,0 i basisk metode hvor DSP er negativt ladet. Produksjonene er de samme for både OA og DTX-1 (m/z 255,2 og 113,1), og innstillinger i MSMS er lik for begge toksinene. DTX-1 (4,74 min) eluerte litt senere enn OA (4,18 min). Metoden har en lineær gradient, men forskjellen i relativ bufferkonsentrasjon er neglisjerbar; henholdsvis 43 % buffer ved 4,74 min, og 50 % ved 4,18 min. Referansematerialet benyttet for DTX-1 er det eneste i denne studien som ikke er sertifisert. Årsaken til at DTX-1 ioniserer og/eller fragmenterer dårligere ved høy pH, er ukjent. Lignende resultat er ikke funnet i litteraturen.

Høy pH gir bedre sensitivitet for OA, Aza-1, Aza-2, Aza-3 (kun for arealbasert respons), SPX-1 og GYM, mens nøytral pH viser best følsomhet for DTX-1. Lav pH gir best verdier for YTX (kun for areal) og PTX-2. Signifikant kromatografisk påvirkning på toppfasong for YTX og Aza-3 bidrar til at sensitivitetsverdien basert på arealrespons, ikke stemmer overens med sensitivitet basert på høyde, i henholdsvis sur og basisk metode.

5.1.3 Responsdrift

Metoder uten egnet internstandard som blant annet korrigerer for ulike instrumentelle variabler i løpet av en lengere analysesekvens, er mer sårbare for responsdrift. Responsdrift kan forekomme både i positiv og negativ retning. Responsdrift kan være utfordrende å håndtere i rutinesammenheng da dette kan kreve injeksjon av standarder flere ganger i løpet

av en sekvens. Kvantifisering ved bruk av standardkurve basert på gjennomsnittlig respons kan gi ikke-korrekte konsentrasjoner på grunn av for stor variasjon i toppareal/høyde i løpet av analyseserien. Bruk av såkalte "bracketing"-kurver⁷ vil mest sannsynlig gi uakseptabel korrelasjonskoeffisient ($r < 0,98$). En bedre løsning kan være å konstruere flere standardkurver innenfor samme analytiske serie og lese prøvene mot den kurven som er injisert nærmest i tid.

Resultatene for responsdrift, i form av residualer (figur 4.4 og 4.5), viser at retningen på driften ikke nødvendigvis er lik for hver enkeltanalytt. Dette gjelder både for sammenligning av alle analytter innen samme kromatografiske forhold, og for sammenligning av alle tre metodene for hver enkeltanalytt. Responsdriften for DSP og YTX i pH-nøytral metode på LC-MS er ikke-lineær, og det er tidsintervall i diagrammene som bare har enten positive eller negative residualer (mellom ca 200 og 400 min). Dette indikerer at injeksjoner innenfor et visst tidsvindu mest sannsynlig vil få for høyt (OA og DTX-1) eller for lavt (YTX) signal. Disse resultatene stemmer overens med observasjoner gjort i rutinedriften ved AKF. Injeksjon av konsentrasjon 75 ng/ml (nivå 6, YTX: nivå 5) viser ofte respons som avviker i forhold til forventet respons. Dette nivået analyseres som kontrollprøve i rutinen, og den injiseres oftest til slutt i den analytiske sekvensen. Tilsvarende resultater for Aza-1 og PTX-2 er observert. Avsetning av ulike skjellmatriks på kolonnen fra prøvene kan være en av årsakene til dette.

Det er ikke funnet statistisk holdepunkt for mindre spredning av residualene for enkeltmålinger i metodene på LC-MSMS ($p > 0,05$). Responsdrift innen serie er ikke påvist til å bli signifikant bedre ved sammenligning av LC-MS og LC-MSMS for verken OA, YTX, Aza-1 og PTX-2. Minst variasjon i signalintensitet mellom oppsettene er vist for DTX-1 under sure betingelser. Minst innen-serie drift (%) for OA er funnet i pH-nøytral metode, og videre gir analyse i basisk metode mindre drift enn i sur metode for denne analytten. For de øvrige toksiner er det ikke påvist signifikant forskjell mellom metodene.

Tre enkeltresultater for stigningstallvariasjon er utenfor EU-SOP [7] krav ($< \pm 25\%$). Dette gjelder YTX, både med pH-nøytrale og basiske betingelser, og Aza-2 med basiske. Verdiene er beregnet fra sekvenser med størst tidsforskjell for injeksjon av standardkurvene; henholdsvis 500 min for YTX i pH-nøytral metode, og 400 min for Aza-2 i basisk metode. Det samme er ikke tilfelle for YTX under basiske forhold, der både lengre og kortere serier

⁷Standardkurve som konstrueres ved å trekke en linje mellom parallelle injeksjoner av hvert standardnivå injisert på ulike tidspunkt i en sekvens. Prøver analysert i tidspunktet mellom kurve 1 og kurve 2 leses av mot denne.

gir med mindre absoluttvariasjon. Øvrige resultater for stigningstallvariasjon er innenfor kriteriumet satt i EU-SOP.

Hvor stor konsentrasjonsendring stigningstallvariasjonen gir, avhenger også av verdien for skjæringspunktet for kalibreringskurven (*b*). Isolert sett vil $\pm 25\%$ forskjell i stigningstall (*a*) for to standardkurver gi prøvesvar som varierer med $\pm 20\%$. Verdien av *b* samt fortegnet til denne verdien, vil ha større innvirkning på lave konsentrasjoner enn høye siden bidraget er konstant. Skjæringspunktverdien har dermed mindre betydning for konsentrasjoner ved regulatorisk grenseverdi, da responsbidraget eller fratrukket fra konstanten, blir liten i forhold til analyttens respons (*y*).

Responsdrift kan relateres til tid og kromatografisk påvirkning for enkelte analytter innenfor samtlige metoder. Signifikant sammenheng mellom responsdrift og tid mellom injeksjon av 1. og 2. kalibreringskurve er påvist for toksinene YTX og Aza-1 i henholdsvis sur og pH-nøytral metode. Responsvariasjoner som kan knyttes til den kromatografiske kolonnen er funnet for YTX (pH 3; asymmetri, toppbredde/FWHM og pH 11; FWHM), SPX-1 (pH 11; asymmetri, toppbredde), DTX-1 (pH 3; toppbredde), og OA (pH 6,8 og pH 11; FWHM). Lignende studier eller resultater for sammenligninger for responsdrift for algetoksiner er ikke funnet i litteraturen.

Undersøkelsene bekrefter analytiske utfordringer knyttet til analyser YTX ved lav pH. Som tidligere påpekt er YTX-toppene brede og utflytende ved lav pH, noe som kan bidra til utfordringer når det gjelder integrering og reproduserbarhet. Tolkning av grafene for sur metode i vedlegg B (figur B-3, røde markører) antyder at YTX analysert på en ny kolonne som gir smale og symmetriske topper, også gir mest negativ drift. Etter hvert som kolonnen blir brukt øker toppbredden og toppen blir mindre symmetrisk samtidig som responsdriften blir mindre. Det er verdt å merke seg at stigningstallvariasjonen for YTX innen serie i sur metode ikke overstiger EU-kriteriet, som for øvrig brytes i en av fem analytiske sekvenser i både pH-nøytral og basisk metode.

Det kan være flere måter å redusere responsdrift i analyser på LC-MS/LC-MSMS [50]. Ved bruk av gradientmetoder er det viktig at systemet er i ”steady-state”-modus. Dette vises for øvrig som oftest først ved reduksjon av retensjonstid innen en analytisk serie. For analytter som har lav retensjon må den kromatografiske fronten (dødvolumet) unngås. Dette kan for eksempel gjøres ved å senke hastigheten til mobilfasen eller temperaturen i kolonneovnen. Dersom analyttene eluerer for nær dødvolumet øker risiko for interferens med ikke-retarderte

komponenter som kan konkurrere om reaksjonseffektiviteten til MS-detektoren ved å interferere med ioniseringen. I den grad det er mulig å sikre stabile ioniseringsforhold i ionekilden, slik som temperatur, spenning og gasshastighet, vil dette også bidra til mer stabil respons over tid. Likeledes er likevektinnstilling i MS-systemet viktig da noen massespektrometere fra ulike produsenter trenger mer tid for innstilling av kollisjonsgass. Ionekildene i enkelte instrumenter er utformet slik at majoriteten av ikke-ioniserbare komponenter hindres fra å komme inn ionekammeret.

Mest sannsynlig skyldes økende respons over tid matrikseffekt [21, 37]. Prøver fra biologiske matriser er ikke rene når de injiseres i massespektrometeret, og disse kan kontaminere både kolonnen og massespektrometeret. Resultatene i denne studien viser at eventuell akkumulering og kontaminering av matrisinterferenter på den analytiske kolonnen og i massespektrometeret påvirker analyttene ulikt. Dette kan trolig også knyttes til kromatografiske betingelser da det ble oppdaget flest signifikante sammenhenger for responsdrift i sur metode på LC-MSMS. Ved analyse av veldig korte analytiske serier, færre enn 40 injeksjoner, eller ved serier som bare inneholder metanolløsninger, er ikke responsdrift framtreddende [32, 49]. Dersom total analysetid øker kan matris som er akkumulert på kolonnematerialet gradvis lekke ut og interferere. Dette kan medføre at kalibreringskurven som er injisert mot slutten av serien enten får signalforsterkning eller signalsuppresjon. Uansett effekt vil de to kalibreringskurvene avvike så mye fra hverandre at korrekt kvantifisering blir vanskelig. Det er flere løsninger på dette problemet; alltid å analysere korte analytiske serier for å opprettholde samme respons gjennom hele sekvensen. Alternativt kan prøvene renses bedre før injeksjon, fortrinnsvis ved fast-fase ekstraksjon (SPE). Det beste alternativet vil være å innføre en deuterert internstandard som er i stand til å kompensere for matrikseffekt. Instrumentelle løsninger kan være å skylle kolonnen med en trinnvis gradient av den organiske mobilfasen etter hver injeksjon, eller å sende det første minuttet av hver injeksjon til avfallsbeholderen. Dersom prøvene er oppkonsentrert kan det brukes ESI med splitt-injeksjon. Ved splitt-injeksjon føres bare en liten fraksjon av prøven til deteksjon, mens resten ledes til avfallsbeholderen. Før første injeksjon av prøve kan det eventuelt også injiseres et antall blankprøver for å stabilisere systemet.

I analysemetodene som vurderes i denne studien er ingen av analyttene i konflikt med ikke-retarderte komponenter som eventuelt eluerer i dødvolumet. Retensjonstidene til de analyttene som eluerer først har god margin til den kromatografiske fronten. Resultatene for retensjonstidstabilitet tyder på at gradienten i metodene var stabil. For å minimalisere

matriksakkumulering i massespektrometeret ble det første minuttet i hver injeksjon ledet til avfallsbeholderen. I tillegg ble det alltid injisert et visst antall matriks blankprøver før injeksjon av 1. kalibreringskurve. De reelle forholdene i ionekilden og i massespektrometeret kan følges i plott pr tid på instrumentet. Enkelte løsningsforslag skissert ovenfor er ikke compatible med rutinedrift i storskala. Total analysetid bestemmes av antall prøver som rekvireres. Prøvesvarene skal leveres innen en gitt tidsfrist. Av den grunn vil kolonneskylling etter hver injeksjon bli vanskelig å håndtere i rutinedrift, da total analysetid pr prøve blir lang. Rensing av prøveekstraktene ved SPE og injisering med splitt-funksjon er prøvd ut med vekslende resultater av andre [26, 30, 31]. Deutererte internstandarder for lipofile algetoksiner er ikke kommersielt tilgjengelig.

Responsdriften kan følges ved å spre kontroller gjennom den analytiske serien, og kontrollene kan brukes til å dele sekvensen mellom de to, eventuelt tre, standardkurvene. Utvidet vedlikehold av ionekilden og massespektrometeret kan bidra til å opprettholde stabil respons over tid. Kolonnekontaminasjon kan monitoreres over tid ved å følge med på toppsymmetri og toppbredde/FWHM for så å relatere dette til observert signalvariasjon innen sekvens. Dette kan brukes til å sette opp retningslinjer for kolonnebytte og/eller MS-vedlikehold basert på trender relatert til responsdrift. Kontrollplott av kalibreringskurvenes stigningstall kan brukes for å overvåke instrumentets sensitivitet, og det kan etableres nedre grenser for godkjenning av analysen [32].

5.2 Matrikseffekt

5.2.1 Matrikseffekt i pH-nøytral, sur og basisk metode

Matrikseffekt er funnet til å være påvirket av kromatografiske forhold. Resultatene bekreftes fra lignende studier beskrevet i litteraturen. Studier av ME er blitt utført for flere ulike arter på forskjellige MS-instrumenter med varierende kromatografiske metoder. Fux [16] som har sammenlignet flere metoder på ulike instrumenter og kolonner, viste OA og PTX-2 alltid ioneforsterkning, mens signalet for Aza-1 ble svekket. Kilcoyne et al [26] har utført et omfattende studie for OA og Aza-1 ved bruk av flere typer MS-instrument, mobilfaser og matriks-korrigeringssteknikker. De konkluderte med at ME var avhengig av både art og kromatografiske forhold. Gerssen et al [30] rapporterer om ulik grad av ME uavhengig av art ved bruk av sur og basisk metode. Ito et al [34] har studerte ME ved pH-nøytrale betingelser i kamskjell hvor DSP og YTX ble utsatt for ionesuppresjon. Villar-Gonzalez et al [39] som har publisert et valideringsstudie ved bruk av sur metode og MSMS koblet til Q-Trap, bemerker lite vedrørende matrikspåvirkning for de undersøkte toksinene.

Analyse ved lav pH gir ionesuppresjon for samtlige toksiner, med unntak av OA og DTX-1 hvor signalet blir forsterket. Disse resultatene stemmer stort sett overens med resultatene publisert av Fux [16], Kilcoyne [26] og Gerssen [30]. Fux [16] og Gerssen [30] rapporterer i tillegg om ioneforsterkning for PTX-2. Dette er ikke observert i denne oppgaven. pH-nøytral metode viser generelt sett mindre ME selv om store forskjeller i signalintensitet mellom blåskjell og kamskjell er observert for PTX-2. Tilsvarende funn gjøres for YTX der toksinresponsen undertrykkes i blåskjell, og svakt forsterkes i kamskjell. Signalsvekkelse av signalet for DSP i kamskjell er ikke så entydig i denne oppgaven som Ito [34] beskriver i sin studie. Observert artsuavhengig ionesuppresjon for samtlige toksiner ved bruk av basiske betingelser er i samsvar med resultatene til Gerssen et al [30].

Ulik stasjonærfase i kolonnematerialet kan også ha medvirket til ME-forskjeller mellom metodene. Kolonnematerialet kan ha ulik retensjonskapasitet for forstyrrende lipofile forbindelser som slippes gradvis i løpet av en analytisk sekvens. Forandring av elueringsbetingelsene i de kromatografiske metodene kan også ha påvirket elueringsrekkefølgen av interferenter slik at matrikseffekten endres.

Det er ikke funnet statistisk forskjell i grad av matrikspåvirkning mellom skjellekstrakter av ulik styrke; 0,1 g/ml og 0,2 g/ml for henholdsvis LC-MSMS- og LC-MS-metoder. Disse resultatene tyder på at forholdet mellom antall gram skjellmat som veies inn før

prøveopparbeidelse og volum av løsemiddel som brukes ved ekstraksjon, trolig har mindre å si for matrikseffekten. Ekstrakter fortynnet til 0,2 g/ml er i så måte tilstrekkelig for å holde ioniseringssuppresjon/-forsterkning på et akseptabelt nivå.

Statistiske beregninger (tabell 4.7) viser at metanolbaserte standardkverer kan benyttes for enkelte av toksinene innenfor alle metodene. I pH-nøytral metode viser resultatene at alle de fem undersøkte toksiner uavhengig av art, med unntak for PTX-2 i kamskjell, kan kvantifiseres mot metanolkurve. Toksinene OA og DTX-1 bør kvantifiseres mot skjellbasert standardkurve (MMS) i både sur og basisk metode, mens for YTX, Aza-2, Aza-3, SPX-1 og GYM kan metanolkurve benyttes. Sistnevnte gjelder begge arter. For PTX-2 og Aza-1 avhenger optimalt valg av kurvematriks trolig både av art og kromatografiske betingelser. Det er kun funnet statistisk holdepunkt for at det må benyttes standardkurve i egen skjellmatriks for PTX-2 i kamskjell med pH-nøytral metode, for de vurderte kromatografiske betingelser (alle andre toksiner; $p > 0,05$). Ut i fra disse resultatene skal blåskjellkurve kunne benyttes ved kvantifisering av de fleste toksiner i kamskjellprøver, og vice versa.

Selv om det ikke i alle tilfeller er funnet statistisk signifikante forskjeller for sensitivitet mellom artene, indikerer grafene i figur 4.11 (sur metode) og 4.12 (pH-nøytral metode) at kurvene vil gi analytisk ulike prøvesvar. Mest sannsynlig vil observert forskjell for PTX-2 i sur metode føre til underestimering av konsentrasjonen dersom det brukes annen kurvematriks enn egen matriks ved kvantifisering av PTX-2 i blåskjell, og motsatt; overestimering av PTX-2 i kamskjell ved bruk av blåskjellkurve. Tilsvarende resultat er funnet for Aza-1 i metode ved pH 3 og for YTX i pH-nøytral metode. Statistisk analyse gir ingen signifikant forskjell mellom blåskjell- og kamskjellkurve (begge toksiner; $p = 0,1$), men også i disse tilfellene vil trolig bruk av blåskjellkurve ved kvantifisering av kamskjell gi overestimert toksinkonsentrasjon.

Beregnet LOQ i de ulike matrikser i følge tabell 4.8 er akseptable i henhold til spesifikasjon gitt i EU-SOP [7] hvor anbefalt kvantifiseringsgrense for DSP- og Aza-gruppen er satt til 40 µg/kg, og for PTX-gruppen til 50 µg/kg. Anbefalt grense for YTX er 60 µg/kg. Beregnet LOQ er lavere enn rapporteringsgrenser for positive prøvesvar som benyttes for rutineprøver pr i dag for alle toksiner i samtlige metoder; 20 µg/kg, YTX: 100 µg/kg. Indikasjon på at kromatografiske forhold i metodene påvirker forskjellen i beregnet LOQ mellom artene, kan for enkelte toksiner trolig relateres til responsforskjeller. Selv om ikke intensiteten er statistisk

signifikant forskjellig i alle tilfeller, gir lavere respons ved analyse av laveste standard oftere høyere standardavvik. Beregnet LOQ fastsettes ved 10 x standardavvik.

5.2.2 Matriksforskjeller i ulike arter ved to årstider

Kartlegging av biologisk variasjon mellom og innen art knyttet til årstid, er relevant med tanke på at det eventuelt skal benyttes toksinfrie ekstrakter til MMS. I rutinesammenheng er det en fordel å lage store kvanta av hvert standardnivå som deretter fordeles og fryses ned. På denne måten spares både dyre referanseløsninger og arbeidstid. Sesongvariasjoner i matriks sammensetning kan imidlertid tilføre en feilkilde ved toksinkvantifisering [26, 32]. Dersom matriksen inneholder ulike mengde interferenter, vil ioniseringen av toksinene kunne bli påvirket ulikt i standarder og prøver. I følge Kilcoyne [26] er mulig at variasjonen i ioneforsterkning eller ionesuppressjon som observeres mellom de ulike artene, også kan oppstå mellom ulike prøver av samme art tatt ut ved ulike tidspunkt og ulike steder. I nevnte studie ble det vurdert forskjeller i matrikseffekt ved sur og basisk metode. Matriksvariasjon innen art ble studert i tre ulike kamskjell av Ito [34] ved bruk av pH-nøytral metode for toksinene OA, DTX-1 og YTX. Han påviste ionesuppressjon i sitt kromatografiske system, men at grad av nedsatt ionisering mellom de ulike skjellene varierte med 19 – 42 % for DSP. Samtidig hevdes det i samme studie at graden av signalnedtrykking var konstant og uavhengig av analyttkonsentrasjonen i ekstraktet. Evaluering av sesongvariasjon innen og mellom arter i analyse ved pH-nøytral metode er ikke funnet i litteraturen.

Kinetikken til lipofile algetoksiner er lite kjent [51], men det antas i enkelte studier at miljøfaktorer som kan relateres til årstid, som temperatur, salinitet og forekomst av alger, påvirker hastigheten for avgiftning [52]. Andre studier stiller spørsmål ved dette, og hevder at muligens utskillelsen av toksinene går av seg selv – uten påvirkning fra verken ytre miljøfaktorer eller indre fysiologiske forhold, og at veksthastigheten av bløtvevet er det eneste som påvirker detoksifisering [53]. En forutsetning for skjellens vekst er tilgang på naturlig føde. Spiseadferd endres ikke ved lave fødekonsentrasjoner. Både kamskjell og blåskjell fortsetter å spise med høy hastighet, og tilegner seg vekst [54]. Det er ikke funnet noe litteratur på om næringsinnholdet vil endres i magrere tider. Næringsinnholdet og fettsyresammensetningen i kamskjell kontra blåskjell er noe ulikt [55]. Blåskjell har mer fett (1,4 g/100 g) enn kamskjell (1,1 g/100 g). Blåskjell har også mer flerumettede fettsyrer enn kamskjell, i tillegg til enumettede fettsyrer, som ikke finnes i kamskjell. Gytetid for artene er ulik; kamskjell gyter i sommerhalvåret, mens blåskjell gyter mellom april og juni når det er litt kaldere i sjøen.

I denne oppgaven er det ønsket om det er mulig å bruke samme blankmatriks for kalibreringskurvene året rundt, eller om valg av blankmatriks bør gjøres blant skjell høstet innenfor samme sesong. Det er påvist signifikant forskjell i gjenfinningsprosent av tilsatt mengde toksiner ved vurdering av begge arter med hensyn på årstid (tabell 4.9). Statistikken tilsier at bruk av den samme, og en felles matriks for artene hele året igjennom, ikke er å anbefale. Bruk av samme blåskjell som basis for MMS for blåskjellprøver som skal analyseres på vinter og sommer, er funnet til å være greit. Valg av kamskjellmatriks til MMS bør statistisk sett følge årstid. Samtidig kan forskjellen i gjennomsnittlig gjenfinning mellom vinter og sommer i praksis vurderes som mindre betydningsfull da variasjonen innen art og årstid er beregnet til å være relativ stor.

Det ble funnet signifikant høyere gjenfinningsprosent i kamskjell i sommerskjellene, med unntak for DTX-1 som er lavere. Dette kan indikere at matriks sammensetningen ikke er lik året rundt. Kamskjellene som ble undersøkt i denne studien var høstet under gyting. Da har skjellene mindre matinnhold [56], og trolig også mindre matrikseffekt ved kjemisk analyse. Om dette også kan være grunnen til at tilsvarende forskjell i gjenfinningsprosent ikke ble påvist i blåskjell som gyter på våren, ble ikke videre undersøkt. Mindre variasjoner i gjenfinningsprosent kan i tillegg være forårsaket av ulik slitasje og alder på den analytiske kolonnen. Det er benyttet flere ulike lotnummer på kolonnen i tidsrommet for undersøkelsen.

Metodeparametrene i de analytiske metodene og leverandør av referansematerial har vært uendret i analyseperioden. Det er derfor sannsynlig at økt gjenfinningsprosent for PTX-2 i kamskjell fra og med sommeren 2011, kan skyldes at det i løpet av den samme våren ble innført vasketrinn etter kamskjellprøver i den analytiske sekvensen på LC-MS. Injeksjon av metanol og ACN ble tatt i bruk etter gjentagende problemer i rutineanalysen ved AKF, hvor det ble detektert lavere analyttsignal i standardprøver injisert etter kamskjell. Samme observasjon ble gjort i forbindelse med forsøk på å innføre IS til metoden (se kapittel 4.3.4.4). Det kan tyde på at enten sent eluerende matrikskomponenter, eller interferenter som blir holdt tilbake over tid i ionekilden, trolig har forårsaket ionesuppresjon. Tilsvarende økning er ikke observert for Aza-1 som er den andre analytten i ESI⁺-metoden. En mulig forklaring på dette kan være at Aza-1 i kamskjell ikke er like mye påvirket av matriks som PTX-2. Det er funnet forholdsvis store forskjeller på minimum og maksimum gjenfinningsprosent for flere av analyttene. Dette ble også tidligere vist i kamskjell av Ito et al [34]. Med unntak av PTX-2 er CV (%) beregnet til akseptabel verdi (< 13 %). Valg av blankmateriale for å lage MMS bør av denne grunn vurderes på forhånd.

5.2.3 Standardaddisjon til positive prøver

Standardaddisjon, som et alternativ for korrigering av matrikseffekt ved kvantifisering av algetoksiner, er vurdert ved å undersøke hvor mye toksinkonsentrasjonene endres ved bruk av tre ulike kalkuleringsmodeller. De mest interessante konsentrasjonsnivåene i den forbindelse, er ved rapporteringsgrensen for positive prøver (20 µg/kg, YTX: 100 µg/kg) samt ved grense for høstestans (160 µg/kg, YTX: 1000 µg/kg) [3]. Det er også foretatt konsekvensvurdering av eventuell prøvesvarendring. Endringer i toksinkonsentrasjon ved rapporteringsgrensen har liten betydning for skjelloppdretter og medfører heller ikke humantoksiske problemer.

Toksininnhold som ved matrikskorrigering forandres fra under til over regulatorisk grense fører til stenging av oppdrettsanlegg, eller mulig forgiftning ved inntak av kontaminerte skjell. Høsteforbud av skjell i norske farvann på grunn av lipofile algetoksiner skjer som regel på grunn høyere konsentrasjoner av DSP og/eller YTX. Høye forekomster av Aza-1 og PTX-2 er mer uvanlig. Det påvises sjelden PTX-2 i skjell langs norskekysten, noe som medførte et vesentlig mindre sammenligningsgrunnlag for denne analytten i dette studiet. I løpet av fire år er PTX-2 kun detektert i ti av totalt 1152 prøver.

I undersøkelsesperioden ville endringene i toksininnhold på grunn av matrikskorrigering hatt betydning for relativt få dyrkere. De fleste matrikskorrigerte resultater er noe ujevnt spredt over konsentrasjons-måleområde, hvor majoriteten av prøvene ligger langt under grensen for høstestans. Med tanke på funnene i tabell 4.7 vedrørende ME ved pH-nøytrale betingelser hvor de viktigste toksinene, med unntak av YTX i kamskjell, er utsatt for ionsuppresjon, er det forventet at flest prøver blir oppjustert i forhold til metanolkvantifiserte verdier. Dette stemmer godt overens med resultatene vist i tabell 4.11.

Ved prøvesvar hvor konsentrasjonen endres fra negativ til positiv prøve, medfører dette ingen konsekvens for dyrker. Verdier mellom rapporteringsgrense og høstestans er mest interessant i forhold til monitorering; hvorvidt toksisiteten er økende eller avtagende over tid, noe som igjen forutsetter at det tas ut prøver med kort tids mellomrom fra samme lokasjon. Regelverk fra Mattilsynet vedrørende kommersiell høsting og omsetning av levende skjell [6] krever uttak og testing av to prøver med minimum 48 timers mellomrom. Begge prøvene skal ha toksininnhold under grenseverdiene før utstedelse av høstesertifikat. Videre heter det at når høsting pågår skal toksinkonsentrasjonen i skjellene undersøkes ukentlig gjennom hele høsteperioden.

De tre beregningsmodellene gir ikke alltid samsvar for alle enkeltresultat selv om det totalt sett ikke er funnet statistisk forskjell mellom dem. Ved å legge resultater fra metode 1 og 3 til grunn, antydes flere stengte uttakssteder enn ved de to øvrige modellene. Det er ikke funnet statistisk holdepunkt for dette. Stor variasjon mellom avlest verdi og matrikskorrigerte konsentrasjoner for enkeltprøver er observert for flere analytter. Tilfeller der kalkuleringer i metode 3 gir uventet høye konsentrasjon i forhold til direkteavlest og metode 2, kan trolig forklares ut i fra at beregningsformelen bygger på lineær regresjon mellom respons og konsentrasjon. I denne studien er det brukt 2-punktskurve som er ekstrapolert mellom nullprøven og prøven med tilsatt toksin. Konsentrasjonen i nullprøven er satt til $x = 0$. Dersom det ikke er lineær sammenheng mellom respons og toksininnhold i prøven, vil ikke den korrigerte konsentrasjon bli riktig. Bruk av tre eller fire punkter i kurven vil mest sannsynlig gi mer nøyaktige prøvesvar. Det er heller ikke undersøkt eller tatt høyde for effekt av instrumentell usikkerhet [35]. Metode 1 bygger på et lignende prinsipp hvor formelen baseres på analyttresponsen i prøvene. Denne metoden blir brukt i rutineanalyse ved AKF. Erfaring gjort i den sammenhengen, tilsier at dersom responsen i nullprøven og den standardtilsatte prøven ligger for langt unna eller for nær hverandre, blir ikke kalkulert verdi riktig. Det kan tyde på at matriks trolig forårsaker et ikke-lineært forhold mellom respons og konsentrasjon. I metode 2 benyttes avlest konsentrasjon, både for nullprøven og den standardtilsatte prøveparallellen, i formelen for matrikskorrigering. Dette stiller krav til at kalibreringskurven på injeksjonstidspunktet av prøvene gjenspeiler eventuell responsdrift som kan ha oppstått i metoden under den analytiske sekvensen. Monitorering av responsdrift kan følges ved å spre kvalitetskontroller av skjellmatriks utover i analyseoppsettet.

Ideelt sett bør standardkonsentrasjonen som tilsettes prøvene være omtrent det dobbelt av toksinnivåene i skjellene, hevder Quilliam [33]. For å oppnå mer nøyaktige prøvesvar i rutinesammenheng er denne tilnærmingen ikke gjennomførbar. Dette vil innebære at alle prøvene først må analyseres og kvantifiseres i eget oppsett, for så å tilsettes dobbel mengde toksininnhold før ny analysering. Sannsynligvis kan noe av den store variasjonen mellom parallellene av metanolkvantifisert og matrikskorrigerte prøvesvar for YTX i enkelte prøver forklares ut i fra høy konsentrasjon ($> 100 \mu\text{g}/\text{kg}$). Tilsetting av $25 \text{ ng}/\text{ml}$ analytt vil i denne sammenhengen trolig ikke være nok for å få et pålitelig beregningsgrunnlag.

5.2.4 Matriksmatchende standarder

Antakelser gjort på grunnlag av resultatene fra studiet vedrørende ME i pH-nøytral, sur og basisk metode (avsnitt 5.2.1) er videre undersøkt ved analyse av skjellekstrakter tilsatt lav og høy toksinkonsentrasjon. Kvantifisering ved bruk av matriksbasert kalibreringskurve viser at nøyaktigheten blir vesentlig bedre for alle toksiner ved bruk av MMS sammenlignet med kvantifisering mot metanolkurve i metodene på LC-MSMS. Dette resultatet samsvarer med funn i kapittel 4.2.1 hvor ME er observert til å være større i sur og basisk metode enn ved pH-nøytral metode. Beregnet nøyaktighet for DSP analysert på LC-MSMS og kvantifisert med metanolbasert kalibreringskurve lå i området 234 – 299 % (pH 3) og 51 – 66 % (pH 11). Dette viser at ME har en større innvirkning på OA og DTX-1, uavhengig av skjelltype. Resultatene for PTX-2 viser at ME påvirkes både av kromatografiske forhold og matriks. Ved bruk av MMS er nøyaktigheten for både OA, DTX-1 og PTX-2 vesentlig bedre hvor alle resultatene da ligger innenfor 85 – 114 %. Lignende undersøkelser for sammenligning av nøyaktighet mellom ulike kurvematriks er ikke funnet i litteraturen.

Det er statistisk forventet utifra resultatene i kapittel 4.2.1 at bruk av metanolkurve i pH-nøytral metode for toksinkvantifisering i begge arter skal gi like gode resultater for nøyaktighet som bruk av MMS, unntatt for PTX-2 i kamskjell. Dette innfris for de fleste toksiner i både kamskjell og blåskjell, med unntak av Aza-1 (begge arter) og YTX i kamskjell. Resultatene for Aza-1 indikerer underestimert i begge skjelltyper (85 – 89 %) ved metanolkvantifisering, mens YTX i kamskjell er overestimert (> 114 %). Antakelse for YTX diskutert i kapittel 5.2.1, hvor det påpekes forholdsvis ulike stigningstall for kalibreringskurvene i de to undersøkte matriksene, bekreftes av MMS-resultatene.

Antakelsen om tilsvarende nøyaktighet for YTX, Aza-2, Aza-3, SPX-1 og GYM uansett kalibreringsmatriks i sur og alkalisk metode, er ikke innfridd. Samtlige av disse analyttene i begge arter er underestimert i større eller mindre grad ved bruk av metanolkurve, med unntak av SPX-1 i blåskjell ved pH 3. Observert ionsuppresjon er derimot eliminert ved kvantifisering mot standardkurve laget av skjellmatriks.

Beregnet sensitivitetsratio mellom kamskjell og blåskjell analysert ved pH 11, er i tabell 4.12 beregnet til å være tilnærmet 1,0, som antyder ingen matriksforskjell, for alle analyttene. I kamskjell er Aza-1, Aza-2, GYM og DTX-1 likevel kvantifisert til litt høyere konsentrasjoner ved bruk av MMS B, og viser statistisk signifikant bedre nøyaktighet med MMS K. Selv om analytisk forskjell virker marginal kan denne feilkilden bidra til konsekvensendring for

høstetillatelse ved at kamskjellprøver avleses til for høy verdi med MMS B som følge av ulik matrikspåvirkning i ioniseringsprosessen. Observert bedring i nøyaktighet for Aza-1 og PTX-2 analysert ved sure betingelser er forventet med tanke på kalkulert sensitivitetsratio mellom artene, henholdsvis 1,2 og 1,5. Det samme er tilfelle for PTX-2 ved pH 6,8 (ratio 0,4). For øvrig påvises det ikke signifikant forbedring for YTX i pH-nøytral metode, der beregnet ratio er 1,2 (tabell 4.12). Nøyaktighet fra begge kalibreringsmatriks viser godt resultat for YTX. Forholdstallet mellom kamskjell- og blåskjellmatriks syntes noe høyt med tanke på at konsentrasjonsforskjellen for YTX ikke er funnet signifikant forskjellig ved bruk av MMS K kontra MMS B. Trolig har sesongvariasjonen i kamskjellmatriks (diskutert i 5.2.2) gitt grunnlag for beregning av høy ratio mellom artene. Tre av fire standardkurver i kamskjell ble laget av skjell høstet på sommeren, hvor gjenfinningsprosenten av tilsatt analytt tidligere ble vist til å være signifikant høyere enn i vinterskjellene.

Når det gjelder valg av skjellbasert blankmatriks for laging av kalibreringskurver til bruk i rutineanalyse, bør det gjøres en avveining for hva som er gjennomførbart. Det bør gjøres en vurdering av hva som vil gi mest mulig riktige konsentrasjoner for flest mulig analytter i de aktuelle prøvetypene som skal analyseres. Samtidig bør valget baseres på toksinprofil i det geografiske området prøvene er tatt ut fra. Toksiner som mest sannsynlig forekommer i farvannet og som kan oppstå i risikohøye konsentrasjoner, bør vektlegges. I norske farvann finnes primært lipofile algetoksiner fra DSP- og Aza-gruppen samt YTX. Spirolider og PTX-2 påvises mer sjeldent i norske skjell [11].

Alle enkelttoksinene viser best resultat for nøyaktighet under samtlige kromatografiske forhold når de kvantifiseres mot standardkurve laget i samme matriks som prøven. Bruk av metanolkurve for kvantifisering i metodene på LC-MSMS gir ikke tilfredsstillende resultater i skjellprøvene som ble tilsatt toksiner. Kvantifisering ved å benytte MMS B for toksiner i kamskjell er funnet til å gi like gode resultater for alle analyttene i sur metode, med unntak av Aza-1 og PTX-2. Det samme var tilfelle i basisk metode, da med unntak av Aza-1, Aza-2, GYM og DTX-1. Ut i fra disse resultatene må det trolig inngås kompromiss på bekostning av enkelttoksiner for å imøtekomme ønske om å kunne benytte en type kalibreringsmatriks til rutinebruk.

Resultatene fra vurdering av basisk metode ble for øvrig også presentert ved poster i anledning NML kongress i Trondheim i juni 2013 (vedlegg I).

5.2.5 Standardaddisjon eller kvantifisering ved matriksmatchende standarder?

Undersøkelser gjort i naturlig toksinkontaminerte skjell basert på resultatene funnet tidligere i kapittel 4.2 vedrørende matrikseffekt, viser at konsentrasjon av OA og YTX er lavere ved bruk av MMS B sammenlignet med standardaddisjon. Ingen forskjell i prøvekonsentrasjon av DTX-1 og Aza-1 er observert, mens Aza-2 og Aza-3 kvantifiseres til høyere verdier med MMS B. For Aza-analogene bygger disse resultatene på få observasjoner. Kun tre kamskjell er inkludert i studiet på grunn av lite positive prøver i analyseperioden.

En faktor som potensielt kan ha påvirket korrelasjonen mellom prøvesvarene fra metodene, er mengde toksiner ekstrahert med to ulike ekstraksjonsmetoder (se kapittel 3.2.1.1). I følge McNabb [21] vil man aldri oppnå 100 % ekstraksjon ved enkeltekstraksjon, mens det ved dobbeltekstraksjon forventes at alle toksinene ekstraheres fra homogenatet. Det er kun Aza-2 og Aza-3 som er funnet til høyere konsentrasjoner i dobbeltekstrahert prøvemateriale. Dette resultatet kan trolig heller forklares ut fra måleusikkerhet knyttet til Aza-derivatene i pH-nøytral metode. Rutinemessig analyseres ikke disse to analyttene i denne metoden, og den er dermed heller ikke optimalisert med tanke på deres masse/ladningsforhold. I denne oppgaven er det ikke utført gjenvinningsforsøk med tanke på hvor mye som som gjenfinnes ved henholdsvis enkelt- og dobbelekstraksjon analysert ved like betingelser.

De fleste analyttene som er detektert i kontaminerte skjellprøver kvantifiseres til likeverdige konsentrasjoner uansett kalibreringsmatriks (MMS B eller MMS K) i begge analytiske metoder på LC-MSMS. I kapittel 4.2.1 er det antydnet, men ikke statistisk bevist, at Aza-1 analysert ved sure betingelser og bruk av MMS B ved kvantifisering av kamskjell, trolig vil gi overestimert toksinkonsentrasjon. Resultatene for Aza-1 analysert i metode ved pH 3 viser et forholdsvis bredt konfidensbånd basert på forventet gjennomsnitt til hver x -verdi. Trolig er konsentrasjonen av Aza-1 i en kamskjellprøve betydelig overestimert ved bruk av MMS B. Dette bidrar i stor grad til det brede konfidensintervallet. Ved å benytte MMS K under kvantifisering av denne prøven, blir CV for prøveparallellens ME-korrigert og MMS-kvantifisert verdi redusert fra 20 % når det ble benyttet MMS B, til 2 % ved bruk av MMS K.

En mulig årsak til dårligere korrelasjon mellom datasettene for YTX kan relateres til resultatene for undersøkelsene gjort for standardaddisjon til positive prøver (4.2.2). Forholdsvis stor forskjell (> 80 %) er observert mellom direkte avleste verdier for

metanolkurve og ME-kalkulerte konsentrasjoner i pH-nøytral metode for to av prøvene som begge var blåskjell. Dersom matriks har påvirket forholdet mellom respons og toksinkonsentrasjon i disse tilfellene, kan de ME-korrigerede resultatene blitt beregnet for høyt, slik som diskutert i kapittel 5.2.2. Punktene som ligger under regresjonslinjen i diagrammene for YTX (også disse begge blåskjell) er avlest og ME-korrigert til lave verdier i forhold til MMS B.

6. Konklusjon

6.1 Valg av optimal analysemetode

Metodenes ytelse ble vurdert med tanke på at metodene skal benyttes som multitoksinmetode. Det vil si at valg av den mest optimale metoden gjøres ut i fra en totalvurdering av hvor flest toksiner gir best resultat. I denne studien ble tre ulike kromatografiske metoder sammenlignet når det gjaldt funksjonalitet, kvalitetskrav og kvantifiseringsstrategier ved ulike eksperimentelle betingelser; ekstraksjonsprosedyre, kromatografisk kolonne og massespektrometer instrumentering.

Kvalitetsparametere fastsatt i EU-SOP [7]; sensitivitet, kalibreringskurvens korrelasjonskoeffisient, responsdrift samt retensjonstidsdrift, ble undersøkt. De fleste toksinene oppfylte kravene uavhengig av elueringsbetingelser. Det ble observert økt sensitivitet for flere av toksinene ved analyse under basiske elueringsbetingelser. Størst økning viste toksinet Aza-1 med 20 ganger høyere signalstyrke i forhold til pH-nøytral metode. Analyse ved lav pH ga det høyeste signalet for YTX basert på toppareal, men dette skyldes dårlig kromatografi med signifikante forskjeller i toppbredde og toppsymmetri. Den kromatografiske toppfasongen for YTX ble vesentlig bedre ved analyse under pH-nøytrale og basiske forhold. Kromatografien for Aza-3 derimot, ble negativt påvirket av den basiske gradienten i forhold til sur metode.

Responsdrift i form av stigningstallvariasjon for duplikat injeksjon av standardkurver, ble påvist i større eller mindre grad for alle analytter under alle analysebetingelser. Det ble ikke funnet signifikant bedring for responsdrift i metodene på LC-MSMS sammenlignet med LC-MS, med unntak av DTX-1 analysert med sur metode. Responsdriften for OA var minst uttalt ved analyse på LC-MS ved vurdering av OA og de tre ulike analysemetodene.

Sammenheng mellom responsdrift og total analysetid samt kromatografiske parametere som asymmetri, FWHM og toppbredde, ble for alle toksiner observert i størst grad for YTX analysert med sur metode. Samtlige kalibreringskurver viste akseptabel korrelasjon ($r > 0,98$), med unntak av GYM analysert under basiske forhold. Dette skyldtes at detektorsignalet for høye GYM-konsentrasjoner trolig gikk i metning, da kurvene krummet i tre av fem tilfeller. Krav til mindre enn 25 % stigningstallvariasjon ble ikke innfridd i tre tilfeller; YTX i pH-nøytral og basisk metode, og Aza-2 i basisk metode. Resultater for stigningstallvariasjon for de øvrige analyttene var innenfor kriterium satt i EU-SOP [7].

Krav til signal-til-støy ratio (10:1) ved laveste standard ble innfridd for alle toksiner analysert i basisk metode, mens analyttene i negativ ioniseringsmodus, både sur og pH-nøytral metode, ikke alltid innfridde dette. Variasjon i retensjonstid var < 1 %. Basiske elueringsbetingelser reduserte kvantifiseringsgrensen for YTX med 50 %, trolig delvis på grunn av god kolonnekapasitet slik at injeksjonsvolumet kunne dobles.

Muligheten til å analysere med dMRM med rask polaritetsskifte som metodikk for ioneskanning er en av fordelene med å benytte LC-MSMS. Total analysetid ble vesentlig redusert sammenlignet med på LC-MS der det kreves to separate metoder for å få detektert alle de påkrevde toksinene. Kompromiss må som oftest inngås i metoder som inneholder mange analytter, og de valg som tas bør gjøres på grunnlag av toksinprofilen i skjell tatt ut i norske farvann. Den basiske prosedyren har nylig blitt validert ved AKF, mens pH-nøytral metode ble validert og akkreditert i 2007 i henhold til ISO/IEC 17025.

6.2 Hvordan best mulig å håndtere matrikseffekt

En av de største utfordringene ved analyse av komplekse prøvematerialer, er effekten av matriks. EU-SOP [7] fastsetter retningslinjer for implementering av LC-MSMS metodikk, men den er ikke tydelig med tanke på mulige matrikseffekter eller strategier for håndtering av dette. I denne oppgaven har både ioneundertrykkelse og ioneforsterkning blitt observert for flere av analyttene i både blåskjell og kamskjell ved alle de tre undersøkte elueringsforholdene.

Følgende spørsmål ble stilt vedrørende matrikseffekt i denne oppgaven:

1. Påvirkes matrikseffekt av kromatografiske betingelser?
2. Er matrikseffekt arts- og/eller sesongavhengig?
3. Hvordan skal dette håndteres ved kvantifisering?

Kromatografiske forhold har en forholdsvis sterk effekt både på metodenes sensitivitet og matrikseffekt. Dette er også påpekt av både Fux [16], Kilcoyne [26] og Gerssen [10]. Denne undersøkelsen viste at analyse med elueringsbetingelser ved pH 6,8 og kolonne Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ generelt sett ga minst matrikseffekt selv om matriksstyrken var høyere i ekstraktene som ble analysert på LC-MS. Både sur og basisk metode på LC-MSMS krever tiltak for å håndtere matrikseffekt i forbindelse med kvantifisering av de fleste toksinene. Vesentlig ioniseringsforsterkning ble observert for OA og DTX-1 ved analyse under sure betingelser, mens signalsuppresjon var dominerende i basisk metode.

Dette studiet viste at matrikseffekt også kan være artsavhengig, og at graden av effekt kan variere med årstid. Ulik matrikspåvirkning ble vist for PTX-2 i blåskjell og kamskjell, både i metode med pH 3 og pH 6,8. Resultatene for sesongvariasjon av matrikseffekt innen art foretatt for vinter og sommer, indikerte at påvirkningsgraden for de undersøkte toksinene i blåskjell var stabil. Det betyr at høstetidspunkt for blåskjell som skal brukes som blankmateriale for matriksmatchende kalibreringskurve, spiller mindre rolle. Matrikseffekten i kamskjell varierte mer i forhold til uttakstidspunkt. Dersom det skal benyttes kamskjell som basis for matriksmatchende standarder, bør valg av blankmateriale følge inneværende sesong.

Ulike tilnærminger for håndtering av matrikseffekt ved kvantifisering av lipofile algetoksiner ble forsøkt. Post-ekstraksjon standardaddisjon hvor matrikskorrigering av prøvesvar ble beregnet ved tre ulike matematiske modeller, viste ingen signifikant forskjell mellom de kalkulerte resultatene. Konsekvensendringer i forhold til regulatorisk maksimal grenseverdi som følge av matrikskorrigerte toksinverdier ble funnet for mindre enn 20 % av prøvene i løpet av 4 år. Det ble funnet vesentlig flere endringer for prøver som inneholdt lave toksinkonsentrasjoner. Nær 50 % av prøvene ble justert til enten over eller under rapporteringsgrensen for positive prøvesvar, hvor de fleste av prøvene ble korrigert til høyere konsentrasjon. Dette tyder på at matrikskorrigering har større innvirkning på prøver med lavt naturlig kontaminert toksininnhold.

Bruk av matriksmatchende framfor metanolfortynnede standarder forbedret metodenes nøyaktighet og presisjon for alle toksinene i begge de undersøkte skjelltyper. Det ble samtidig vist at bruk av metanolbasert kalibreringskurve i pH-nøytral metode ga akseptable verdier for nøyaktighet og presisjon for de fleste analyttene. Nøyaktighet av kvantifiserte toksiner i kamskjell var tilfredsstillende ved bruk av standardkurve preparert i blåskjellekstrakt, selv om kurve basert på egen matriks ga bedre resultater for de fleste forbindelsene. Innføring av en type kalibreringsmatriks til rutinebruk for ulike arter, vil trolig medføre noe redusert kvalitet for enkelte toksiner. Betydningen av det bør konsekvensvurderes ut i fra forventet toksinprofil i prøvene.

Forsøk med naturlig kontaminerte prøver for sammenligning av standardtilsatte prøvesvar mot toksinkonsentrasjoner kvantifisert ved bruk av matriksmatchende standarder, viste at denne strategien i stor grad eliminerte matrikseffekt. Dette betyr at estimering av toksininnhold i blåskjell og kamskjell ved å bruke samme kalibreringsmatriks er mulig, men på grunn av begrenset tilgang på positive kamskjell i undersøkelsesperioden bør flere

prøvesvar sammenlignes før endelig konklusjon kan trekkes. Varierende matrikssammensetning i prøvene som mottas til analyse kan gjøre det vanskelig å opprettholde matriksmatchende standarder tilpasset en hver variabel i rutinesammenheng.

Ved analyse av andre typer analytter i andre biologiske matrikser er ^{13}C -merkede eller deutererte internstandarder, og/eller matriksmatchende standarder ofte brukt for å motvirke matrikseffekter. Tilsvarende internstandarder for algetoksiner ikke er tilgjengelige, og utprøvinger vist i dette studiet illustrerer utfordringen knyttet til å finne egnede internstandarder som kan benyttes for flere analytter i samme metode. Lovende resultater ble funnet for OA og Aza-1, men videre undersøkelser er nødvendig for å kunne konkludere.

Denne studien viser at forskjellige instrumenter, kromatografiske forhold og ekstraksjonsprosedyrer kan gi ulike analyseresultater for lipofile algetoksiner på grunn av matrikseffekter. Matrikseffekter bør derfor undersøkes grundig før en metode tas i bruk i, spesielt dersom et nytt toksin skal inkluderes i metoden eller ved analyse av en ny matriks. Det er viktig å ha mest mulig kunnskap om de ulike matriksene og innføre prosedyrer som minimaliserer og/eller korrigerer for effektene. På bakgrunn av dette kan denne sammenlignende studien tjene som utgangspunkt ved valg av den mest egnede metoden for deteksjon og kvantifisering av lipofile toksiner i sjømat ved LC-MS/LC-MSMS.

7. Referanser

1. Moestrup, Ø., Akselman, R., Cronberg, G., Elbraechter, M., Fraga, S., Halim et al, (Eds) (2009 onwards). IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae. Tilgjengelig fra: <http://www.marinespecies.org/HAB>
2. Regulation (EC) no 15/2011 of 10 January 2011, Official J. Eur. Union L 6/3. Tilgjengelig fra: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:006:0003:0006:EN:PDF>
3. Regulation (EC) no 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004. Official Journal of the European Communities, L 139, 55-255. Tilgjengelig fra: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0055:0205:EN:PDF>
4. Commission Regulation (EC) No 2074/2005 of 5 December 2005 L 338/27. Tilgjengelig fra: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0027:0059:EN:PDF>
5. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Marine Biotoxins in Shellfish – summary on regulated marine biotoxins. The EFSA Journal, 2009, 1306, 1-23. Tilgjengelig fra: <http://www.efsa.europa.eu/de/scdocs/doc/1306.pdf>
6. <http://www.mattilsynet.no/>
7. *EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of Lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS/MS, version 4*. Tilgjengelig fra: http://www.aesan.msps.es/en/CRLMB/web/procedimientos_crlmb/crlmb_standard_operating_procedures.shtml
8. Quilliam, M.A., Hess, P., Dell'Aversano, C., i *Mycotoxins and Phycotoxins in perspective at the turn of the Century*, deKoe, W.J, Sampson, R.A., van Egmond, H.P, Gilbert, J., Sabino, M.M (Eds), Nederland, 2001, 383-387. Fra Proceedings of the Xth International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Sao Paulo, Brasil, 22-25 mai, 2000
9. McNabb, P., Selwood, A.I., Holland, P.T., *Multiresidue Method for Determination of Algal Toxins in Shellfish: Single-Laboratory Validation and Interlaboratory Study*, J AOAC Int, 2005 May-June, 88 (3), 761-772. Tilgjengelig fra: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16001850>
10. Gerssen, A., Mulder, P.P.J., McElhinney, M.A., de Boer, J. *Liquid chromatography tandem mass spectrometric method for the detection of marine lipophilic toxins under alkaline conditions*. J Chromatography A 2009 Febr 27, 1216 (9):1421-1430. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.12.099
11. Alexander, J., Frøyland, L., Hemre, G.I., Jacobsen, B.K., Lund, E., Meltzer H.M et al, *Et helhetssyn på fisk og annen sjømat i norsk kosthold*, Vitenskapskomiteen for mattrygghet, 2006. Tilgjengelig fra: <http://www.vkm.no/dav/a2805d6a8c.pdf>
12. Gerssen, A., Mulder, P.P.J., deBoer, J., *Screening of lipophilic marine toxins in shellfish and algae: Development of a library using liquid chromatography coupled to orbitrap mass spectrometry*, Analytica Chimica Acta, 2011 Jan 31, 685 (2), 176-185. DOI: 10.1016/j.aca.2010.11.036
13. <http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0021967309000119-gr1.gif>
14. <http://www.veths.no/no/Tjenester/Laboratorietjenester/Algegifter/Marine-algetoksiner-og-helse/>

15. Aune, T., Larsen, S., Aasen, J.A.B., Rehnmann, M., Satake, M., Hess, P., *Relative toxicity of dinophysistoxin-2 (DTX-2) compared with okadaic acid, based on acute intraperitoneal toxicity in mice*, Toxicon, 2007 January, 49 (1), 1-7. Tilgjengelig fra: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010106002947>
16. Fux, E. *Development and evaluation of passive sampling and LC-MS based techniques for the detection and monitoring of lipophilic marine toxins in mesocosm and field studies*, PhD thesis, Dublin institute of technology, 2008. Tilgjengelig fra: <http://arrow.dit.ie/sciendoc/54/>
17. Miles, C.O., Samdal, I.A., Aasen, J.A.B., Jensen, D.J., Quilliam, M A., Petersen, D. et al, *Evidence for numerous analogs of yessotoxin in Protoceratium reticulatum*. Harmful Algae, 2005, 4: 1075-1091. Tilgjengelig fra: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568988305000442>
18. Rehnmann, N., Hess, P., Quilliam, M.A., *Discovery of new analogs of the marine biotoxin azaspiracid in blue mussels (Mytilus edulis) by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry*, Rapid Commun Mass Spectrom, 2008; 22(4): 549-58. DOI: 10.1002/rcm.2285
19. Alexander, J., Benford, D., Cockburn, A., Cradevi, J.P., Dogliotti, E., Domenico, et al, *Marine biotoxins in shellfish – azaspiracid group*, The EFSA Journal 2008, 723, 1-52. DOI: 10.2903/j.efsa.2008.723
20. Munday, R., Quilliam, M.A., LeBlanc, P., Lewis, N., Gallant, P., Sperker, S.A. et al, *Investigation into the toxicology of spirolides, a group of marine Phycotoxins*, Toxin (Basel) 2012 January, 4 (1), 1-14. DOI: 10.3390/toxins4010001
21. Quilliam, M.A, Gago-Martinez, A, Glauner, T., McNabb, P, fra *Training Course on Laboratory Techniques for the Determination of Lipophilic Toxins by LC-MSMS*, April 2011, arrangert av EURLMB/Universitet i Vigo, Spania
22. Zweigenbaum, J., Glauner, T., Royce, S., Ben-Gigirey, B., Brana-Magdalena, A., Leao Martins, J.M., Gago-Martinez, A., *Inter-laboratory Validation of a Fast and Sensitive UHPLC-MSMS Method with Fast Polarity Swicthing for the Analysis of Lipophilic Shellfish Toxins*, poster fra Agilent Technologies samt privat diskusjon med T. Glauner, April 2011. Tilgjengelig fra: http://www.chem.agilent.com/Library/slidepresentation/Public/FPRW2012_Shellfish_Toxins_JZ.pdf
23. <http://www.home.agilent.com/agilent/home.jsp?cc=NO&lc=eng>
24. Negru, J., fra Trippel Quadropole (QQQ) Teori, eget kursmaterieell fra Agilent Technologies, april 2008
25. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1367593109001367> Lisensnr. for reprint og oversettelse: 3258291261466
26. Kilcoyne, J., Fux, E., *Strategies for the elimination of matrix effects in the LC-MSMS analysis of the lipophilic toxins okadaic acid and azaspiracid-1 in molluscan shellfish*, J Chromatography A, 2010 Nov 5, 1217 (45), 7123-7130. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.09.020
27. Matuszewski, B.K., Constanzer, M.L., Chavez-Eng, C.M., *Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MSMS*, Anal. Chem., 2003, 75 (13), 3019-3030. DOI: 10.1021/ac020361s
28. Boguszewski, P., *Analyzing a complex biological sample with the simplest workflow*, seminar i regi av Matriks AS/Agilent Technologies, 2012, Trondheim, Norge
29. McCarron, P., Emteborg, H., Giddings, S., Nulty, C., Rundberget, T., Loader, J.I et al, *A Certified Reference Material (CRM) for the Analysis of Multiple Groups of Shellfish Toxins*, foredrag på 7th International Conference for Molluscan Shellfish Safety, 2009, Nantes, Frankrike

30. Gerssen, A., McElhinney, M.A., Mulder, P.P.J., Bire, R., Hess, P., deBoer, J., *Solid phase extraction for removal of matrix effects in lipophilic marine toxin analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, Anal Bioanal Chem, 2009 Jun, 394 (4), 1213-1226. DOI: 10.1007/s00216-009-2790-0
31. These, A., Scholz, J., Preiss-Weigert, A., *Sensitive method for the determination of lipophilic marine biotoxins in extracts of mussels and processed shellfish by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry based on enrichment by solid-phase extraction*, J Chromatography A, 2009 May 22, 1216 (21), 4529-4538. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.03.062
32. Gerssen, A., Quilliam, M.A, deBoer, J., Kilcoyne, J., Ben-Gigirey, B fra *Quasimeme Biotoxin Workshop*, arrangert av The Marine Institute, Dublin Institute of Technology, og Quasimeme, Mars 2012, Galway, Irland
33. Quilliam, M.A., National Research Council, Institute for Marine Biosciences, NRC-CNRC, Halifax, Canada, privat diskusjon, April 2011, Vigo, Spania
34. Ito, S., Tsukada, K., *Matrix effect and correction by standard addition in quantitative liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins*, J Chromatography A, 2002 Jan 11, 943 (1), 39-46. DOI: 10.1016/s0021-9673(01)
35. <http://zimmer.csufresno.edu/~davidz/Chem106/StdAddn/StdAddn.html>
36. <http://www.chemspider.com/>
37. Gago-Martinez, A., Glauner, T. fra *Seminar LC-MSMS Determination of Lipophilic Marine Biotoxins in seafood*, mai 2011, Agilent Technologies, Waldbronn, Tyskland
38. Stobo, L.A., Lacaze, J-P.C L., Scott, A.C., Gallacher, S., Smith, E.A., Quilliam, M.A. *Liquid Chromatography with Mass Spectrometry – Detection of Lipophilic Shellfish Toxins* (2005), J AOAC Int, 2005 Sept-Oct, 88 (5), 1371-1382. Tilgjengelig fra: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16385985>
39. Villar-Gonzales, A., Rodriguez-Velasco, M.L., Gago, A., *Determination of Lipophilic Toxins by LC-MSMS: Single-Laboratory Validation*, J AOAC Int., 2011 May-June, 94 (3), 909-922. Tilgjengelig fra: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21797020>
40. Blay, P., Hui, J.P.M., Chang, J., Melanson, J.E., *Screening for multiple classes of marine biotoxins by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry*, Anal Bioanal Chem, 2011 Apr, 400 (2), 577-585. DOI: 10.1007/s00216-011-4772-2
41. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, May 2001. Tilgjengelig fra: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>
42. HPLC metodeutvikling og optimering, Industriens uddannelser, november 2006, Danmark. Tilgjengelig fra: <http://materialeplatform.emu.dk/materialer/bogkort/337863>
43. The LC Handbook, Guide to LC Columns and Method Development, Agilent Technologies, 2011, USA
44. Greibrokk, T., Lundanes, E., Rasmussen, K.E., *Kromatografi*, Oslo, Norge, Universitetsforlaget, 2005, ISBN 82-13-02356-0 (KJ2053 NTNU, forelesninger og notater)
45. <http://sites.stat.psu.edu/~jls/stat511/lectures/lec20.pdf>
46. Guldberg, T.S., Hatlen, T., Aarstad, K., kapittel 16: *Searching for Internal Standard for Chemical Routine Analysis of Lipophilic Shellfish Toxins* i Gilbert Sauvè (ed) *Molluscan Shellfish Safety*, SpringerLink, 2014, ISBN 978-94-007-6588-0, DOI: 10.1007/978-94-007-6588-7_16. Tilgjengelig fra: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-6588-7_16

47. Fiksdahl, A., *Kjemisk analyse av DSP toxiner i skjell*, Oppsummeringsrapport til Chiron AS etter prosjekt ”Toxinanalyse og kvalitetskontroll av skjellprodukter” mellom Chiron AS, Oceanor og Sintef, 1990
48. Vallat, A, Troubleshooting guide - HPLC, 2007. Tilgjengelig fra:
<http://www.pbf.unizg.hr/hr/content/download/19116/76175/version/1/file/TroubleshootingGuide-HPLC.pdf>
49. Korte, E., *Sample Clean-Up in Residue Analysis*, seminar i regi av Matriks AS/ Agilent Technologies, 2010, Trondheim, Norge
50. <http://www.pharmpk.com/PK05/PK2005289.html>
51. Aune, T., Yndestad, M., kapittel 5: *Diarrhetic shellfish poisoning* i Falconer, I.R. (ed) *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*, London, UK, Academic Press, 1993, 87-104.
52. Christophersen, G., *Algetoksiner i blåskjell*, SMR-rapport 17/94, Senter for miljø- og ressursstudier, Universitetet i Bergen, 1994, ISSN 083-7132. Tilgjengelig fra:
<http://www.fou.uib.no/fd/1997/f/418001/kap04.htm>
53. Dunkier, A., Bergslien, M., kapittel 6.1.3: *Avgiftning av skjell* i Kyst og Havbruk 2005, Havforskningsinstituttet. Tilgjengelig fra:
http://www.imr.no/filarkiv/2006/03/6.1.3_Avgiftning_av_skjell.pdf/nb-no
54. Strohmeier, T., *Feeding behaviour and bioenergetic balance of the great scallop (Pecten maximus) and the blue mussel (Mytilus edulis) in a low seston environment and relevance to suspended shellfish aquaculture*, PhD, Universitetet i Bergen, 2009. Tilgjengelig fra:
https://bora.uib.no/bitstream/handle/1956/3713/Dr.thesis_Tore%20Strohmeier.pdf?sequence=1
55. <http://www.nifes.no/sjomatdata/>
56. <http://www.matportalen.no/verktoy/blaskjellvarsel/>

VEDLEGG A

Tabell A Fullstendig oversikt over resultater vedrørende undersøkt sammenheng mellom responsdrift (%) og injeksjonstidspunkt (Δ tid) samt asymmetrifaktor, toppbredde (min) og FWHM (min).

Statistisk databehandling ble utført ved Spearman rank korrelasjon (ρ) med $\alpha = 0,1$. Metode er indikert N = pH-nøytral, S = sur og B = basisk. Antall analytiske sekvenser er nummerert fortløpende fra 1 til 5. Signifikante funn er markert i *kursiv*. Tabellen fortsetter på neste side.

Toksin	Metode/ Sekvens	Drift (%)	Δ tid (min)	ρ	p-verdi	Sym- metri	ρ	p-verdi	Bredde (min)	ρ	p-verdi	FWHM (min)	ρ	p-verdi
OA	N-1	2,1	502			0,7			0,49			0,086		
	N-2	0,3	329			0,9			0,30			0,084		
	N-3	5,9	268	-0,1	>0,1	0,9	0,2	>0,1	0,34	0,7	>0,1	0,093	1,0	<0,01
	N-4	4,0	221			0,9			0,34			0,089		
	N-5	-0,3	243			0,8			0,29			0,080		
	S-1	0,7	150			1,5			0,35			0,082		
	S-2	16,1	235			1,9			0,30			0,062		
	S-3	14,5	282	0,0	>0,1	1,6	0,6	>0,1	0,24	-0,4	>0,1	0,053	-0,4	>0,1
	S-4	5,7	313			1,6			0,29			0,060		
	S-5	1,7	404			1,9			0,29			0,061		
	B-1	-1,2	139			0,9			0,32			0,055		
	B-2	-6,7	287			1,6			0,29			0,051		
	B-3	2,8	351	-0,2	>0,1	1,8	0,0	>0,1	0,33	0,7	>0,1	0,058	1,0	<0,01
	B-4	-5,0	150			1,7			0,28			0,053		
	B-5	-6,4	416			1,9			0,28			0,053		
DIX-1	N-1	3,2	502			0,8			0,30			0,053		
	N-2	3,3	329			0,8			0,25			0,056		
	N-3	1,9	268	-0,1	>0,1	0,8	-0,7	>0,1	0,24	0,7	>0,1	0,054	-0,3	>0,1
	N-4	3,4	221			0,8			0,26			0,053		
	N-5	1,7	243			0,8			0,20			0,053		
	S-1	-2,8	150			1,6			0,31			0,079		
	S-2	4,6	235			1,7			0,33			0,065		
	S-3	-7,6	282	0,3	>0,1	1,5	0,5	>0,1	0,28	0,8	<0,1	0,056	0,1	>0,1
	S-4	4,8	313			1,6			0,31			0,060		
	S-5	-2,8	404			1,5			0,29			0,062		
	B-1	-2,2	139			1,6			0,30			0,059		
	B-2	-4,2	287			1,8			0,31			0,056		
	B-3	-8,0	351	-0,7	>0,1	1,8	-0,1	>0,1	0,26	0,3	>0,1	0,057	0,5	>0,1
	B-4	-2,2	150			1,9			0,31			0,056		
	B-5	-3,8	416			2,0			0,32			0,057		

Tabell A fortsettelse

Toksin	Metode/ Sekvens	Drift (%)	Δ tid (min)	ρ	p-verdi	Sym- metri	ρ	p-verdi	Bredde (min)	ρ	p-verdi	FWHM (min)	ρ	p-verdi
YTX	N-1	27,7	502			0,8			0,17			0,044		
	N-2	-5,9	329			0,8			0,22			0,046		
	N-3	-6,5	268	0,7	>0,1	0,8	-0,6	>0,1	0,17	0,6	>0,1	0,045	0,1	>0,1
	N-4	-6,2	221			0,9			0,17			0,044		
	N-5	-6,0	243			0,9			0,18			0,042		
	S-1	-1,0	150			3,4			1,14			0,472		
	S-2	-3,3	235			3,6			0,70			0,146		
	S-3	-10,3	282	-0,9	<0,05	2,4	0,8	<0,1	0,47	0,9	<0,05	0,095	0,9	<0,05
	S-4	-6,1	313			2,0			0,46			0,093		
	S-5	-12,7	404			1,8			0,44			0,087		
	B-1	-5,7	204			1,4			0,32			0,061		
	B-2	27,0	287			1,6			0,30			0,057		
	B-3	-2,8	351	0,8	>0,1	1,8	0,7	>0,1	0,30	-0,7	>0,1	0,058	-0,9	<0,1
	B-4	-3,6	214			1,4			0,32			0,061		
	B-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aza-1	N-1	-1,5	266			0,9			0,34			0,070		
	N-2	4,1	336			0,8			0,36			0,085		
	N-3	-1,5	164	0,9	<0,05	0,7	-0,3	>0,1	0,42	0,3	>0,1	0,116	0,4	>0,1
	N-4	0,6	392			0,9			0,29			0,070		
	N-5	6,7	414			0,7			0,78			0,231		
	S-1	1,6	150			1,5			0,39			0,074		
	S-2	3,2	235			1,6			0,36			0,065		
	S-3	7,2	282	-0,3	>0,1	1,5	-0,3	>0,1	0,32	-0,3	>0,1	0,056	-0,5	>0,1
	S-4	2,3	313			1,5			0,34			0,059		
	S-5	-0,6	404			1,6			0,33			0,059		
	B-1	-1,7	204			0,7			0,46			0,077		
	B-2	-4,6	287			1,3			0,35			0,064		
	B-3	-4,1	351	0,7	>0,1	1,5	0,1	>0,1	0,21	-0,2	>0,1	0,066	-0,3	>0,1
	B-4	-5,7	150			1,8			0,39			0,067		
	B-5	10,8	416			2,1			0,34			0,063		
PTX-2	N-1	1,7	266			1,0			0,44			0,129		
	N-2	6,5	336			0,9			0,46			0,124		
	N-3	-3,5	164	0,7	>0,1	0,9	-0,2	>0,1	0,47	0,4	>0,1	0,124	0,3	>0,1
	N-4	-0,1	392			1,1			0,44			0,136		
	N-5	9,4	414			1,0			0,54			0,148		

Tabell A fortsettelse

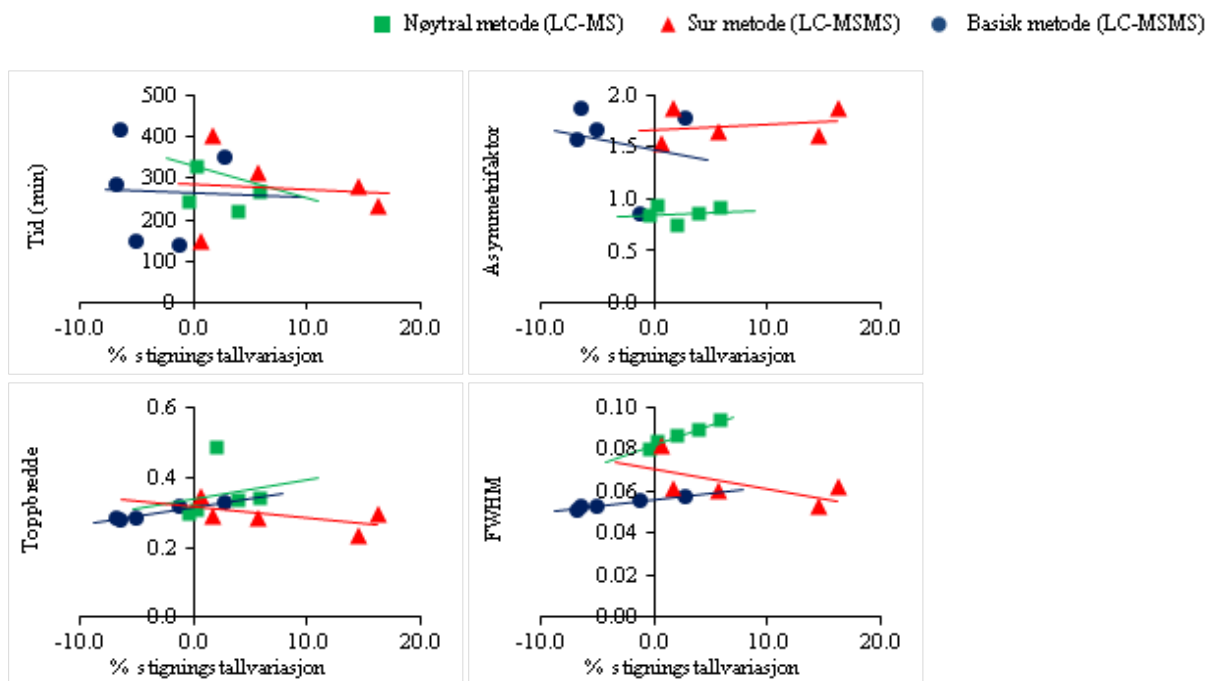
Toksin	Metode/ Sekvens	Drift (%)	Δ tid (min)	ρ	p-verdi	Sym- metri	ρ	p-verdi	Bredde (min)	ρ	p-verdi	FWHM (min)	ρ	p-verdi
PTX-2	S-1	-1,9	150			1,9			0,44			0,085		
	S-2	3,8	235			1,7			0,39			0,069		
	S-3	10,2	282	0,0	>0,1	1,5	-0,2	>0,1	0,33	-0,6	>0,1	0,060	-0,6	>0,1
	S-4	15,3	313			1,5			0,35			0,063		
	S-5	-3,5	404			1,5			0,36			0,064		
	B-1	-3,0	204			1,9			0,31			0,060		
	B-2	0,7	287			1,8			0,30			0,058		
	B-3	-8,2	351	0,3	>0,1	2,0	0,3	>0,1	0,30	0,2	>0,1	0,058	0,2	>0,1
	B-4	-0,9	150			2,1			0,36			0,070		
	B-5	6,7	416			2,2			0,34			0,061		
Aza-2	S-1	-3,1	150			1,6			0,40			0,073		
	S-2	4,1	235			1,7			0,36			0,065		
	S-3	9,2	282	-0,1	>0,1	1,6	-0,3	>0,1	0,33	-0,4	>0,1	0,056	-0,7	>0,1
	S-4	4,4	313			1,5			0,34			0,060		
	S-5	-3,3	404			1,6			0,34			0,061		
	B-1	-0,7	204			0,7			0,43			0,073		
	B-2	-5,5	287			1,4			0,33			0,063		
	B-3	-6,2	351	0,0	>0,1	1,4	0,7	>0,1	0,17	0,6	>0,1	0,067	0,1	>0,1
	B-4	0,6	150			1,7			0,40			0,071		
	B-5	25,2	416			1,8			0,35			0,064		
Aza-3	S-1	-2,5	150			1,5			0,40			0,074		
	S-2	-4,9	235			1,7			0,36			0,064		
	S-3	1,4	282	0,2	>0,1	1,7	-0,2	>0,1	0,32	-0,6	>0,1	0,055	-0,6	>0,1
	S-4	6,8	313			1,6			0,34			0,059		
	S-5	-3,0	404			1,5			0,35			0,060		
	B-1	-1,1	204			0,8			0,79			0,169		
	B-2	-5,5	287			0,7			0,93			0,253		
	B-3	-3,4	351	0,7	>0,1	-	-0,3	>0,1	0,56	-0,3	>0,1	0,219	0,0	>0,1
	B-4	-5,6	150			0,7			1,12			0,256		
	B-5	12,6	416			0,7			0,98			0,263		
SPX-1	S-1	-6,6	150			2,1			0,91			0,233		
	S-2	7,2	235			2,1			0,35			0,061		
	S-3	-1,0	282	0,1	>0,1	1,7	0,1	>0,1	0,27	-0,3	>0,1	0,047	-0,3	>0,1
	S-4	6,3	313			1,6			0,28			0,050		
	S-5	-2,6	404			1,7			0,28			0,051		

Tabell A fortsettelse

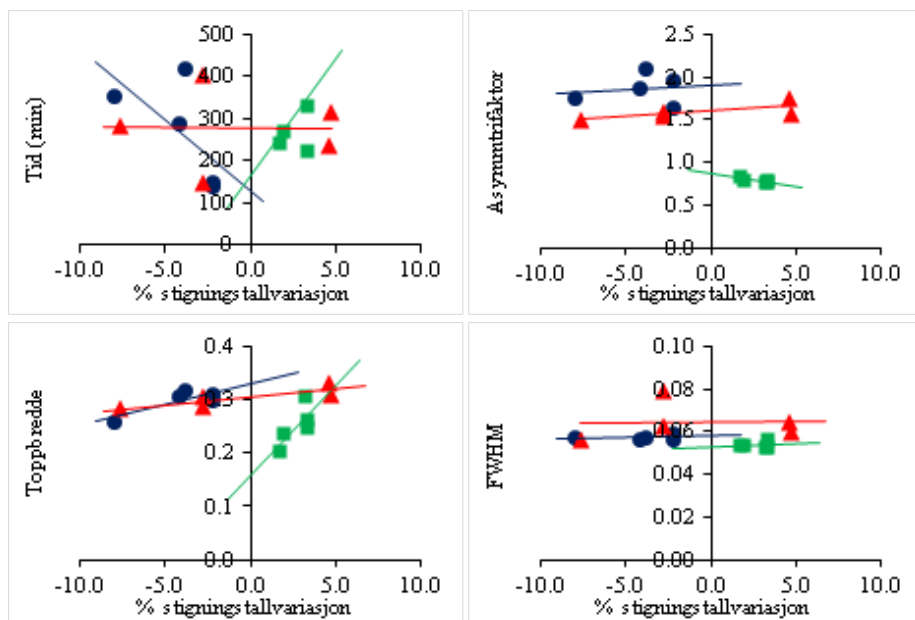
Toksin	Metode/ Sekvens	Drift (%)	Δ tid (min)	ρ	p-verdi	Sym- metri	ρ	p-verdi	Bredde (min)	ρ	p-verdi	FWHM (min)	ρ	p-verdi
SPX-1	B-1	-2,2	204			1,9			0,30			0,057		
	B-2	-4,2	287			1,7			0,28			0,054		
	B-3	-3,6	351	0,1	>0,1	1,7	1,0	<0,01	0,27	0,8	<0,1	0,055	0,2	>0,1
	B-4	4,4	150			2,0			0,34			0,065		
	B-5	10,3	416			2,2			0,30			0,057		
GYM	S-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S-2	4,1	235			2,2			0,35			0,062		
	S-3	-3,2	282			1,6			0,27			0,047		
	S-4	7,9	313	0,0	>0,1	1,6	-0,2	>0,1	0,27	0,4	>0,1	0,049	0,4	>0,1
	S-5	-2,9	404			1,7			0,28			0,050		
	B-1	0,0	204			1,9			0,33			0,061		
	B-2	-1,6	287			1,6			0,32			0,061		
	B-3	-4,3	351	0,0	>0,1	1,7	0,6	>0,1	0,30	0,6	>0,1	0,062	0,5	>0,1
	B-4	-1,4	150			1,9			0,36			0,065		
	B-5	14,4	416			1,9			0,32			0,066		

VEDLEGG B

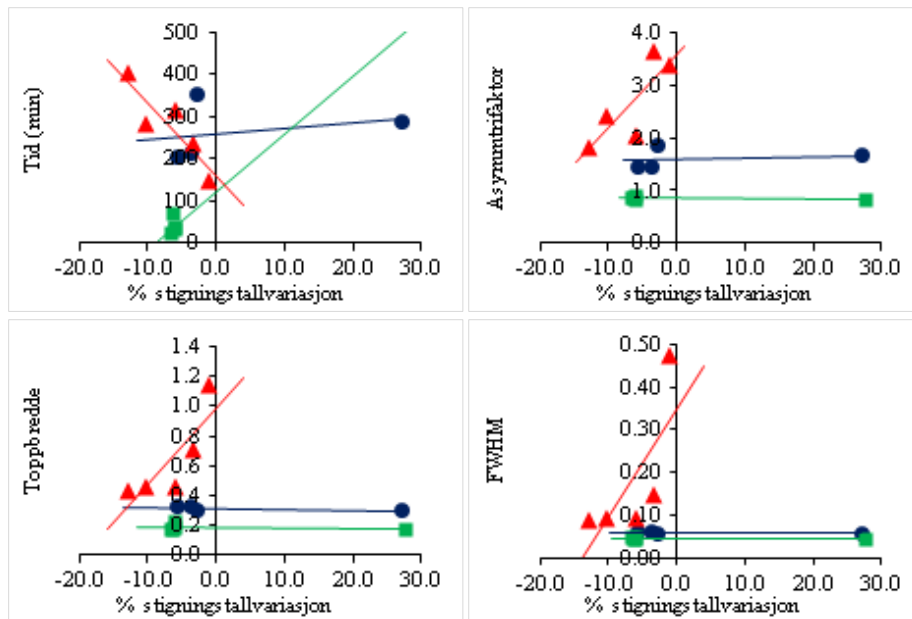
Figur B Spearman rank korrelasjonsplott vedrørende stigningstallsvariasjon (%) relatert til tid, asymmetrifaktor, toppbredde og FWHM for duplikat injeksjon av standarder i fem analytiske oppsett pr metode. Figuren fortsetter på neste side.



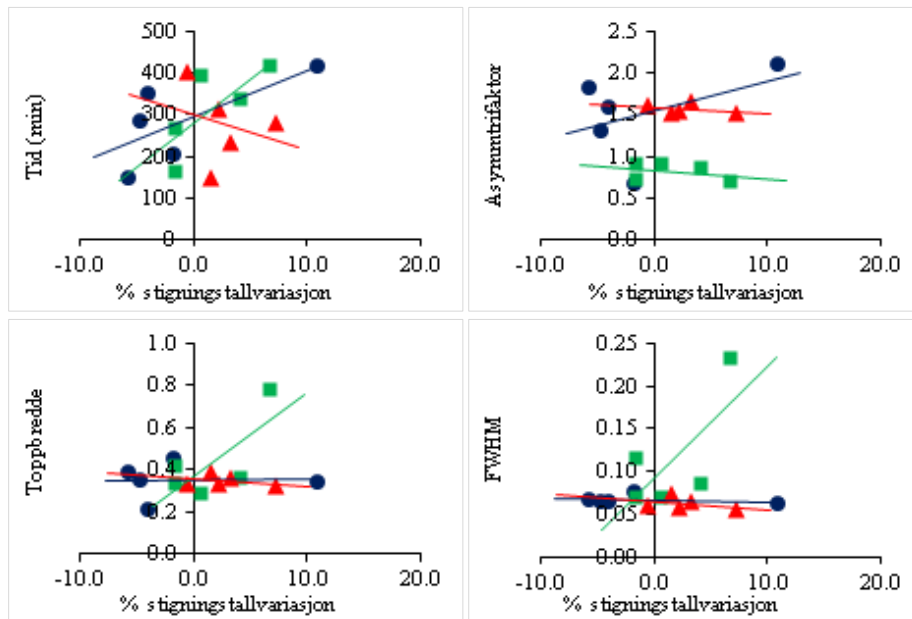
Figur B-1 Resultater for OA



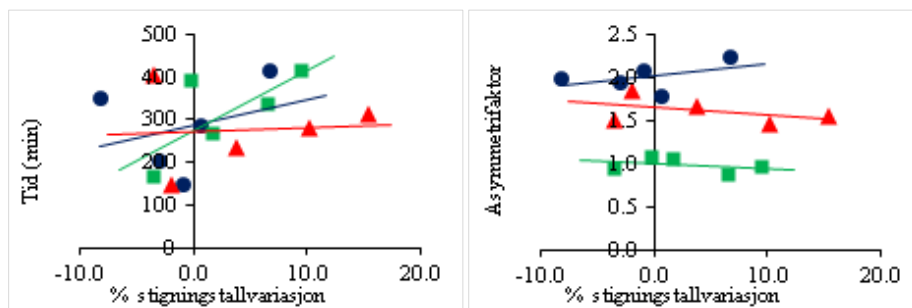
Figur B-2 Resultater for DTX-1



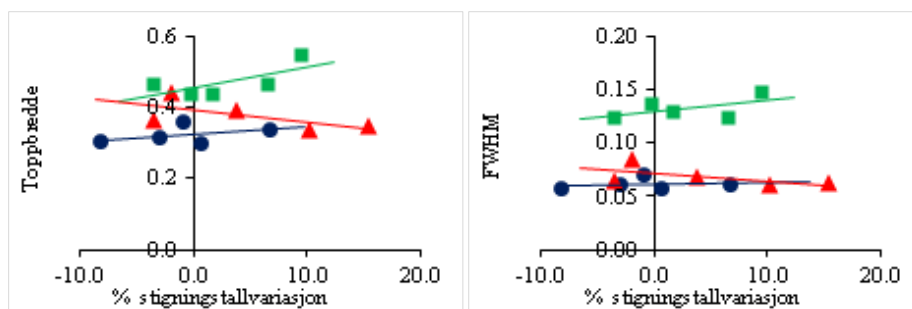
Figur B-3 Resultater for YTX



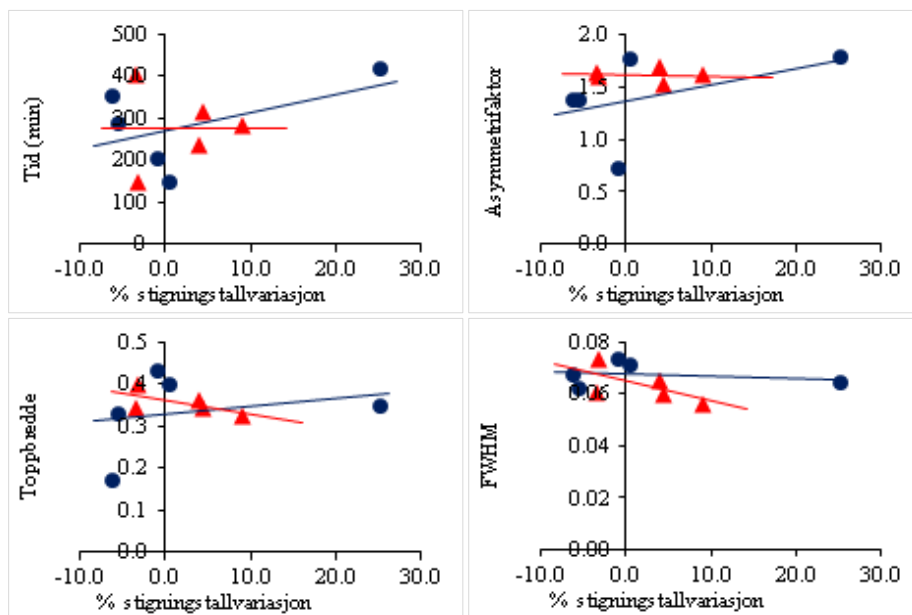
Figur B-4 Resultater for Aza-1



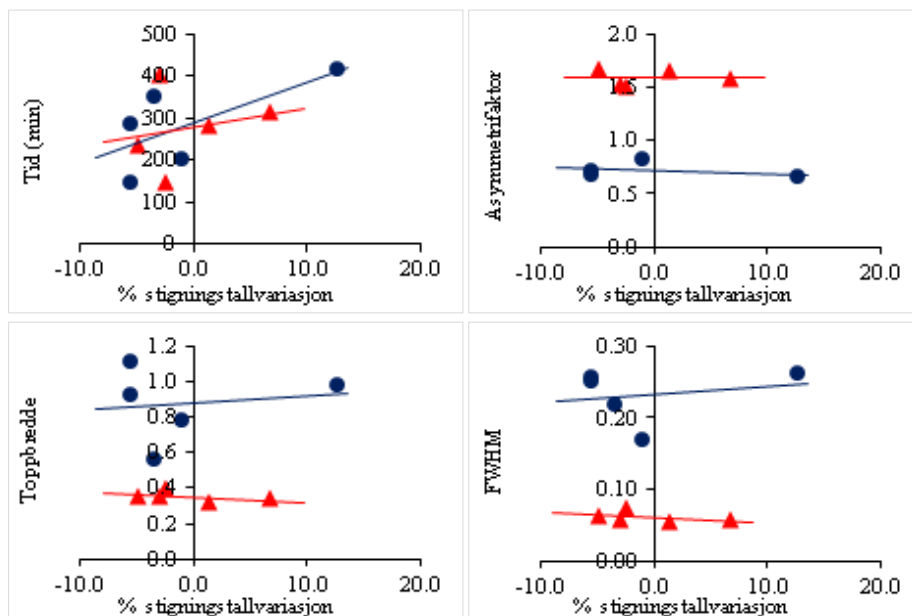
Figur B-5 Resultater for PTX-2 (figuren fortsetter på neste side)



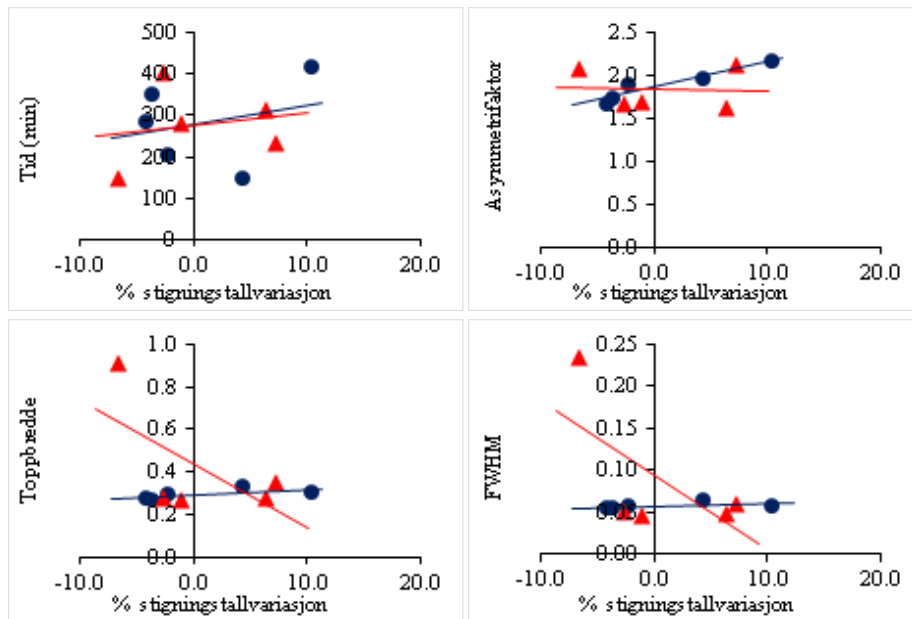
Figur B-5 fortsettelse: Resultater for PTX-2



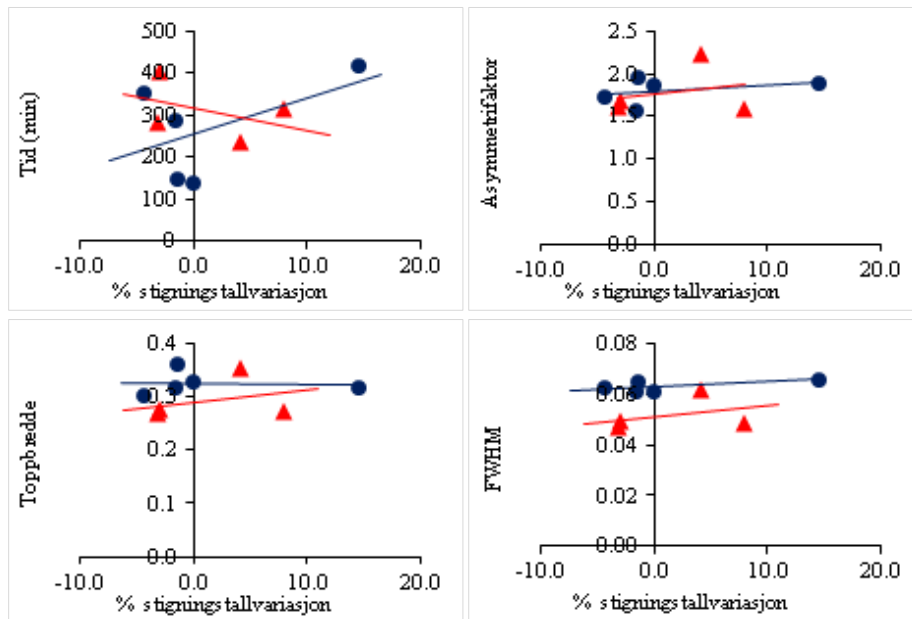
Figur B-6 Resultater for Aza-2



Figur B-7 Resultater for Aza-3



Figur B-8 Resultater for SPX-1



Figur B-9 Resultater for GYM

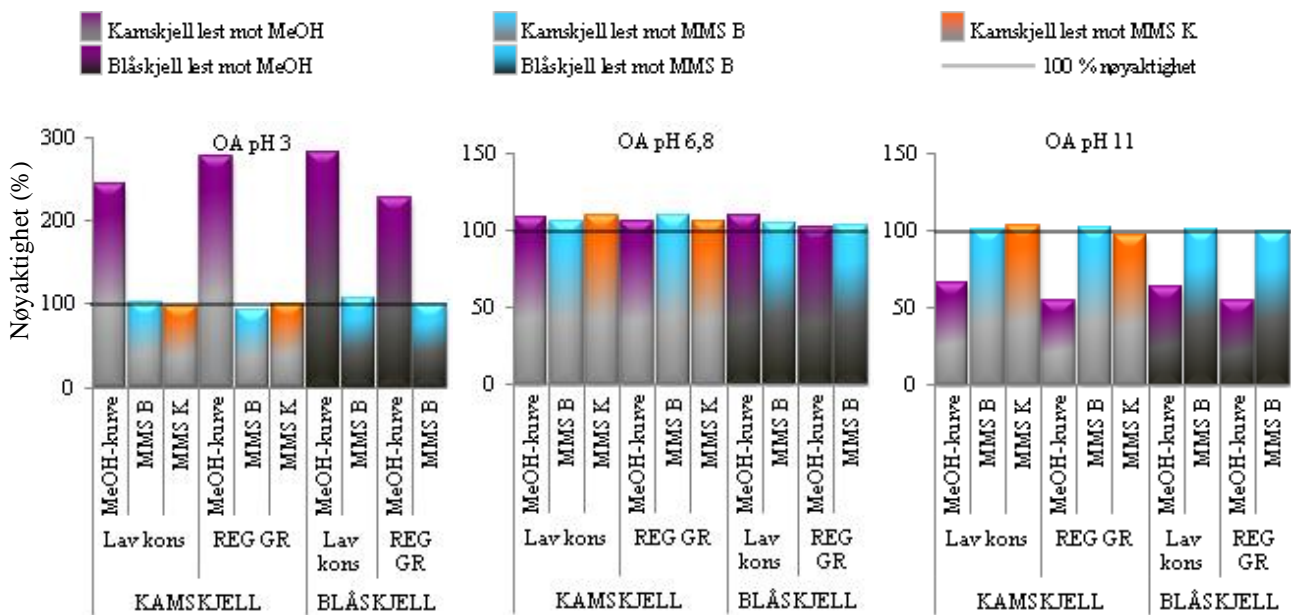
VEDLEGG C

Tabell C Oversikt over sesong- og artsvariasjon sortert på år i form av gjenfinning av mengde toksin i standardtilsatte negative skjellprøver

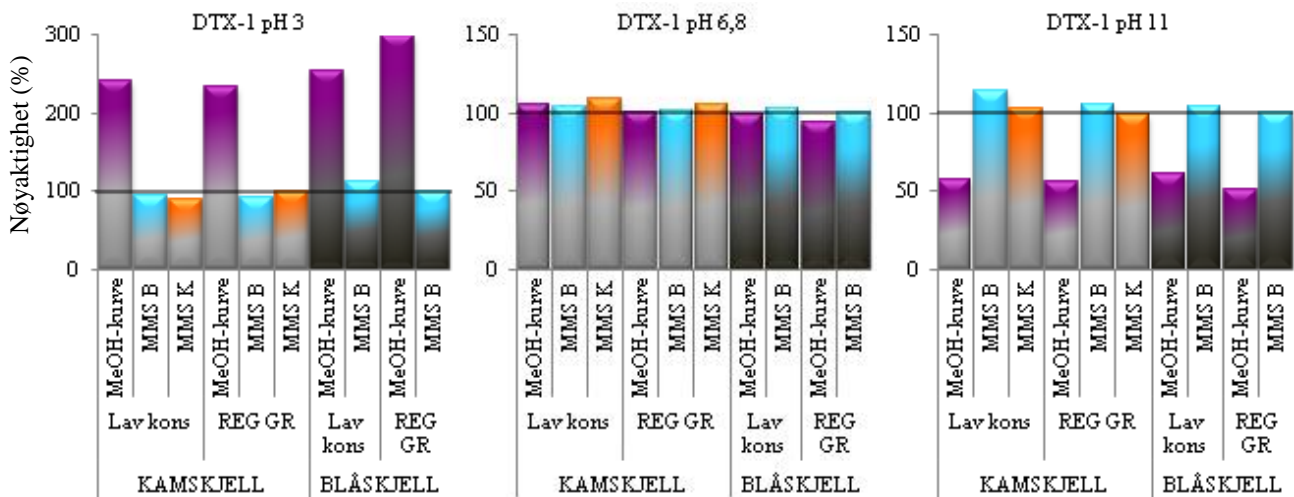
Toksin	Art	Sesong	<i>n</i>			Gjennomsnitt % gjenfinning			CV (%)		
			2010	2011	2012	2010	2011	2012	2010	2011	2012
OA	Blåskjell	Vinter	14	17	26	102	98	99	9,5	6,9	5,8
		Sommer	37	23	39	98	100	104	9,4	7,6	4,3
	Kamskjell	Vinter	9	21	23	103	96	101	9,0	9,6	6,6
		Sommer	22	20	21	103	103	103	9,4	6,9	5,4
DTX-1	Blåskjell	Vinter	14	17	21	101	99	95	7,8	7,6	8,2
		Sommer	36	18	38	95	99	98	11,1	7,2	7,1
	Kamskjell	Vinter	13	21	23	100	99	101	6,9	10,1	8,4
		Sommer	23	21	21	93	96	96	10,3	6,3	5,3
YTX	Blåskjell	Vinter	12	18	25	98	108	106	8,6	10,0	6,0
		Sommer	23	23	38	106	101	101	12,1	9,5	8,5
	Kamskjell	Vinter	13	21	22	98	104	105	9,4	10,4	8,1
		Sommer	21	19	19	114	108	100	10,6	8,3	8,1
Aza-1	Blåskjell	Vinter	21	18	26	100	103	98	6,9	10,8	8,3
		Sommer	42	25	48	97	103	102	7,7	10,0	5,2
	Kamskjell	Vinter	11	20	23	100	108	102	7,9	8,2	9,8
		Sommer	23	21	21	104	107	103	5,0	7,2	5,7
PTX-2	Blåskjell	Vinter	21	18	26	91	95	91	14,4	11,7	6,6
		Sommer	42	25	45	88	109	88	8,9	11,6	6,6
	Kamskjell	Vinter	15	21	23	55	57	91	19,6	20,2	7,1
		Sommer	42	20	21	45	107	89	19,0	9,4	7,7

VEDLEGG D

Figur D Vurdering av metodenes ytelse når det gjelder nøyaktighet for toksinene individuelt. Figuren viser nøyaktighet for to konsentrasjonsområder tilsatt til kamskjell og blåskjell analysert ved tre (to for Aza-2, Aza-3, SPX-1 og GYM) ulike analysebetingelser når kvantifisert ved bruk av ulike matriks kalibreringskurver. Lav konsentrasjon tilsvarer 30 µg/kg (YTX: 75 µg/kg), mens konsentrasjon ved regulatorisk grenseverdi⁸ (REG GR) er 160 µg/kg (YTX: 1 mg/kg). For antall prøver (n), se tabell 4.13 og 4.14.

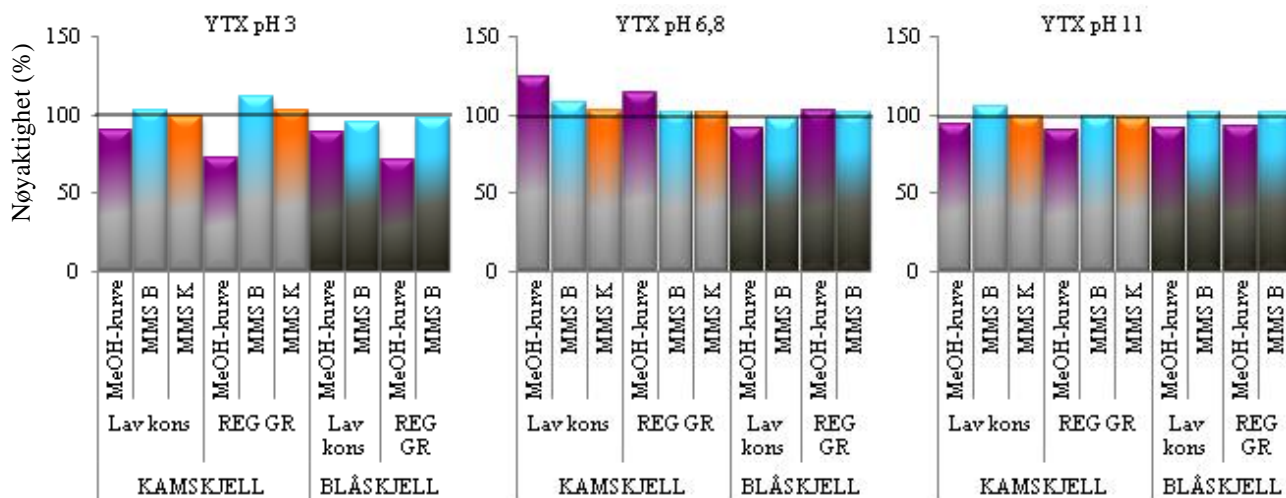


Figur D-1 Sammenligning av nøyaktighet ved to konsentrasjonsnivå i skjell tilsatt OA kvantifisert ved bruk av metanolkurver og MMS av henholdsvis blåskjell (MMS B) og kamskjell (MMS K)

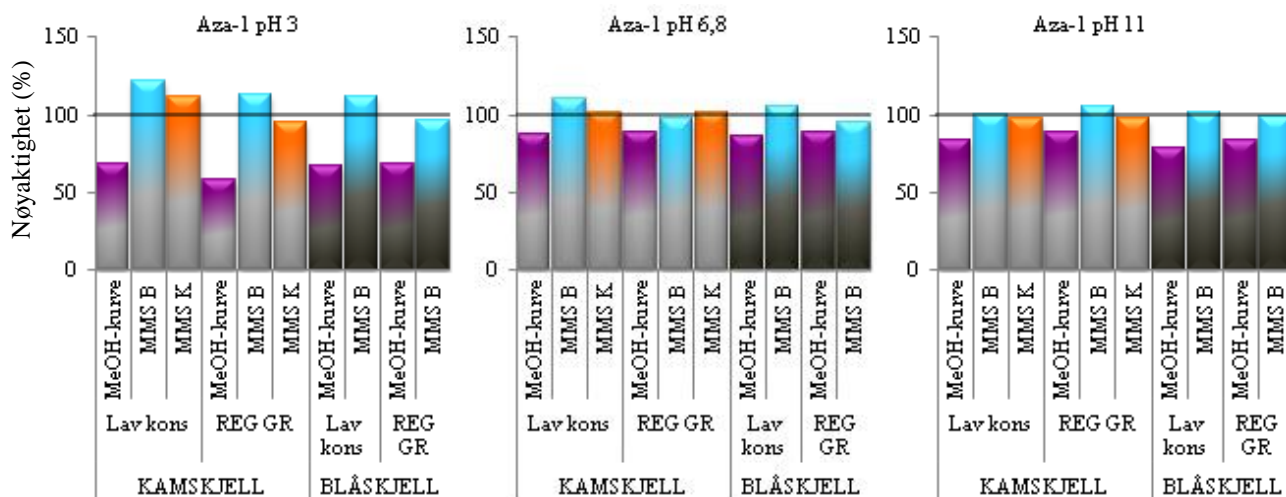


Figur D-2 Sammenligning av nøyaktighet ved to konsentrasjonsnivå i skjell tilsatt DTX-1 kvantifisert ved bruk av metanolkurver og MMS av henholdsvis blåskjell (MMS B) og kamskjell (MMS K)

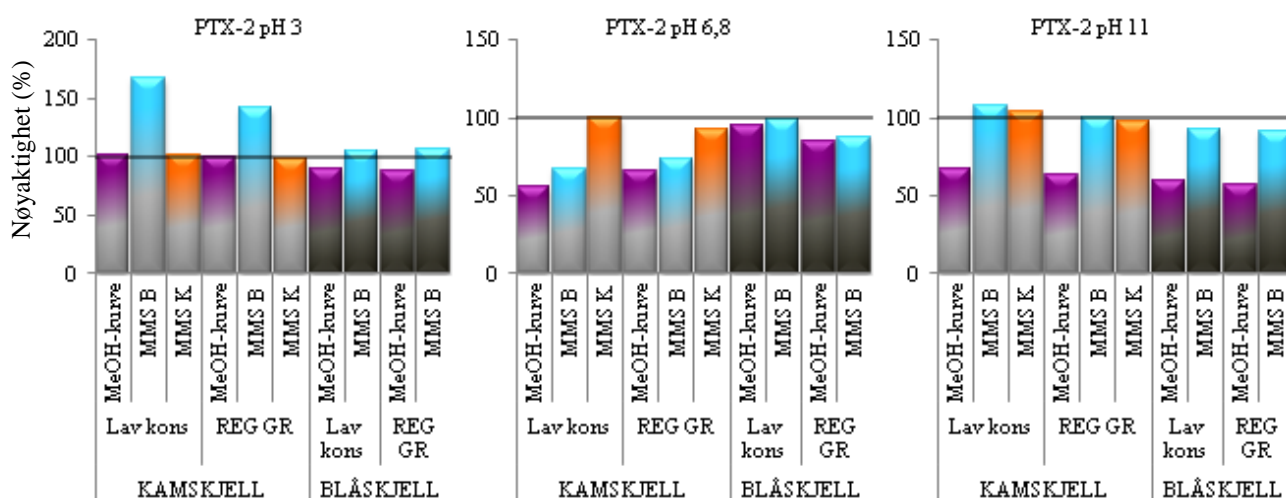
⁸SPX-1 og GYM er ikke regulert, men ble også undersøkt ved 160 µg/kg som de øvrige toksinene



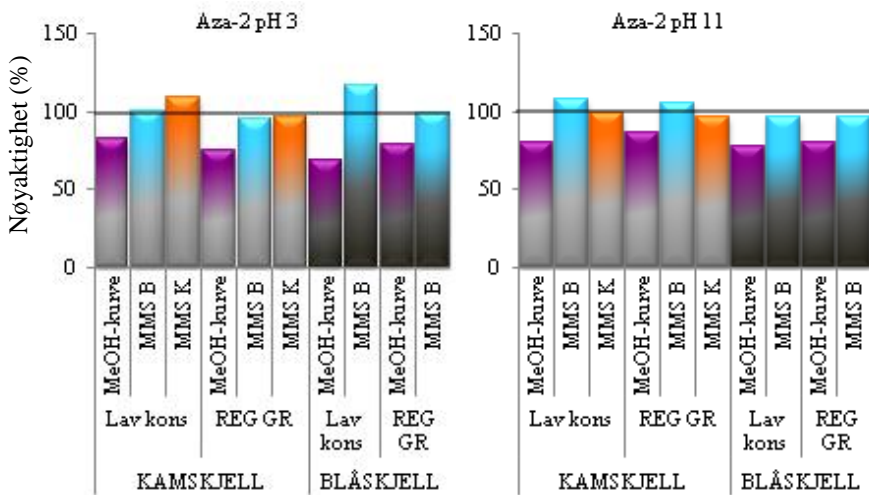
Figur D-3 Sammenligning av nøyaktighet ved to konsentrasjonsnivå i skjell tilsatt YTX kvantifisert ved bruk av metanolkurver og MMS av henholdsvis blåskjell (MMS B) og kamskjell (MMS K)



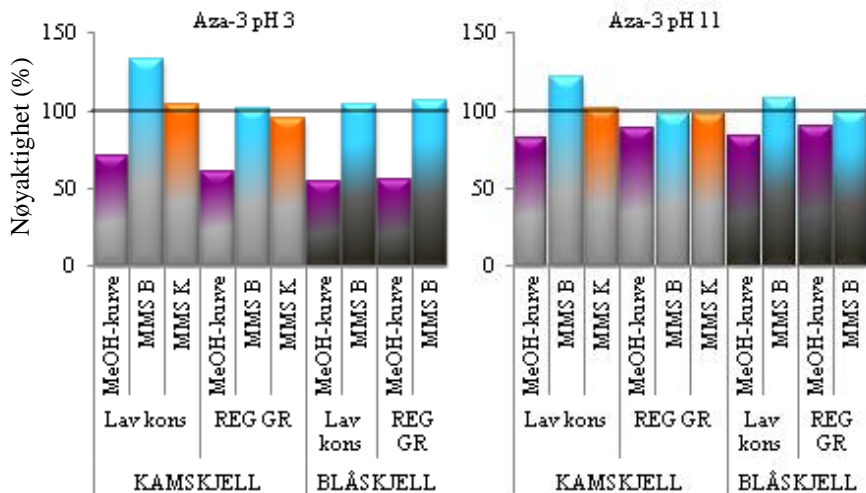
Figur D-4 Sammenligning av nøyaktighet ved to konsentrasjonsnivå i skjell tilsatt Aza-1 kvantifisert ved bruk av metanolkurver og MMS av henholdsvis blåskjell (MMS B) og kamskjell (MMS K)



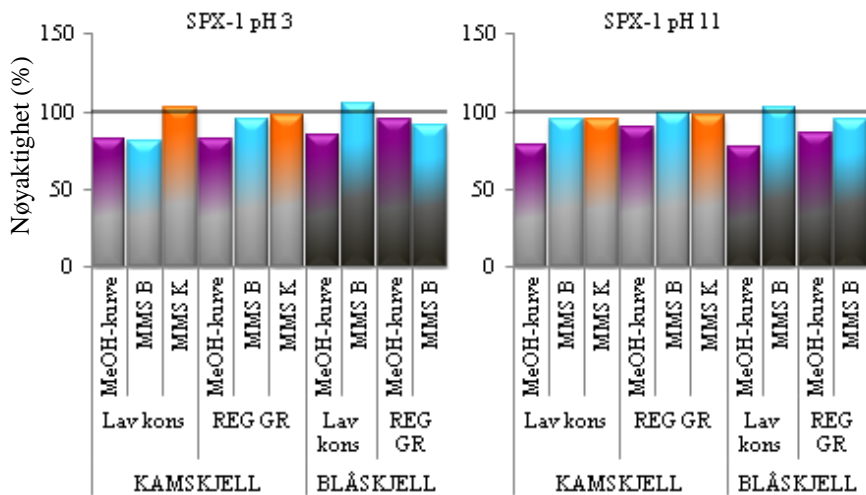
Figur D-5 Sammenligning av nøyaktighet ved to konsentrasjonsnivå i skjell tilsatt PTX-2 kvantifisert ved bruk av metanolkurver og MMS av henholdsvis blåskjell (MMS B) og kamskjell (MMS K)



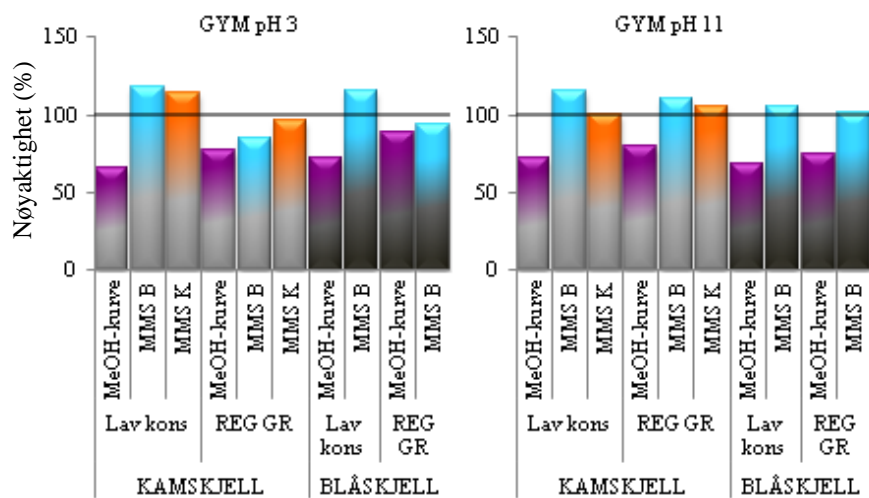
Figur D-6 Sammenligning av nøyaktighet ved to konsentrasjonsnivå i skjell tilsatt Aza-2 kvantifisert ved bruk av metanolkurver og MMS av henholdsvis blåskjell (MMS B) og kamskjell (MMS K)



Figur D-7 Sammenligning av nøyaktighet ved to konsentrasjonsnivå i skjell tilsatt Aza-3 kvantifisert ved bruk av metanolkurver og MMS av henholdsvis blåskjell (MMS B) og kamskjell (MMS K)



Figur D-8 Sammenligning av nøyaktighet ved to konsentrasjonsnivå i skjell tilsatt SPX-1 kvantifisert ved bruk av metanolkurver og MMS av henholdsvis blåskjell (MMS B) og kamskjell (MMS K)



Figur D-9 Sammenligning av nøyaktighet ved to konsentrasjonsnivå i skjell tilsatt GYM kvantifisert ved bruk av metanolkurver og MMS av henholdsvis blåskjell (MMS B) og kamskjell (MMS K)

VEDLEGG E

Tabell E Oversikt over optimal kurvematriks for kvantifisering av algetoksiner i to ulike arter basert på nøyaktighet mot teoretisk verdi tilsatt til skjellprøver

Toksin	pH 3					pH 6,8					pH 11				
	Blåskjell		Kamskjell			Blåskjell		Kamskjell			Blåskjell		Kamskjell		
	MeOH	MMS B	MeOH	MMS B	MMS K	MeOH	MMS B	MeOH	MMS B	MMS K	MeOH	MMS B	MeOH	MMS B	MMS K
OA															
DTX-1															
YTX															
Aza-1															
PTX-2															
Aza-2															
Aza-3															
SPX-1															
GYM															

VEDLEGG F



Searching for internal standards for chemical routine analysis of lipophilic shellfish toxins

Trude Guldberg, Tone Hatlen and Kjell Aarstad
 Department of Clinical Pharmacology, St. Olavs University Hospital, N-7006 Trondheim, Norway
 E-mail: trude.guldberg@stolav.no

Introduction

The lack of internal standards (IS) in LCMS determination of marine biotoxins in molluscan shellfish makes the analysis vulnerable to analytical and instrumental variations. Correct quantification is dependant on accurate volumes during extraction and response stability during instrumental analysis.

An IS requires non-interference with the masses specified for the desired toxins, both in positive and negative ionization mode. Ideally, the IS should be stable isotope labeled, but that is not available for most toxins. Non-labeled IS are often homologs which elute close to the analyte thus appearing in the same vicinity with respect to any matrix effect.

The aim of this work is to increase the methods' performance by introducing IS, which can be used to compensate for response drift, matrix effects and unpredictable events during the extraction and analytical process.

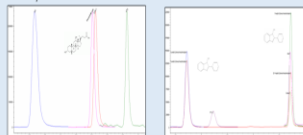
Methods

We have mainly examined synthesized IS where phenyl/benzimidazole (PBI) underwent substitution reactions with different functional groups. A total of 15 substances were tested in both negative and positive ionization mode. PBIs containing polar groups eluted too early in both modes, or did not ionize in negative mode at all. Therefore, in the negative mode, the polycyclic steroid deoxycholic acid (DHO), which has comparable chemical and physical properties as the toxins in the DSP group, was examined. For positive mode two of the less polar PBIs were further tested in the method.

The analytes established as candidates for optimal function, are listed in table 1.

Table 1: Analytical properties internal standards

Analyte	PBI	Prod
	Zon	Zon
	(m/z)	(m/z)
Deoxycholic acid (DHO)	Negative	392.0
2-pentyl-2-phenylbenzimidazole (Pent-PBI)	Positive	355.2
4-ethyl-2-phenylbenzimidazole (Hep-PBI)	Positive	303.0



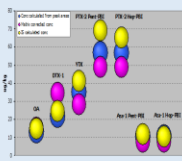
To monitor response drift with or without IS during analysis, calibration curves with at least five concentration levels were analyzed intermittently during analytical sequences. CRM calibration standards were fortified in methanol. Calibration curve slopes, peak areas and IS-ratios were normalized, tested for significance and confidence intervals were determined.

The impact of introducing IS for reduced matrix effects were examined in naturally contaminated blue mussel samples. IS was added to the crude shellfish materials before extraction, and this was followed by standard addition of multi-toxin solution to the methanol extracts. The IS-quantified concentrations were compared with matrix corrected concentrations. Analytical precision, expressed as % RSD for method precision, was calculated based on CRM-DSP Mus-b and additionally unknown samples.

The methods used for analysis were AOAC LC-MS method 88.5 2005 (modified), with column Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6x50mm, 1.8 µm), Agilent MS-1956B and EU-harmonised-SOP-LIPO-LCMSMS basic conditions (pH 11.0) with column X-Bridge C18 (50x2.1mm, 2.5 µm), Agilent MSMS-6460 (1200-series). All results are evaluated without distinction on instruments.

Results

Matrix effects



The figure shows how the concentrations for each toxin calculated in three different ways, corresponds. If optimal correlation, the circles should overlap each other.

OA (n=9), and Aza-1 (n=4) related to IS Hep-PBI, shows overlap of yellow circles which represent IS-calculated concentrations, with both pink circles (matrix corrected) and blue circles (peak area). No significant differences in toxin amount calculated in the different ways have been found.

Calculations of DTX-1 (n=13) show good correlation based on peak area and IS-ratio, while YTX (n=13) and PTX-2 (n=4) show significant higher concentrations using IS-ratios compared with matrix corrected.

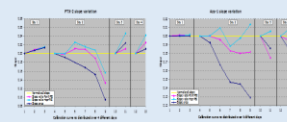
Conclusions

- The present study illustrates the complexity of establishing appropriate internal standards for chromatographic determination of lipophilic shellfish toxins.
- For OA and Aza-1 calculations with IS are promising.
- DHO is more appropriate IS for OA than for DTX-1 though DTX-1 elutes closer to DHO than OA.

Response drift

Table 2: Comparison of calibration curve slopes

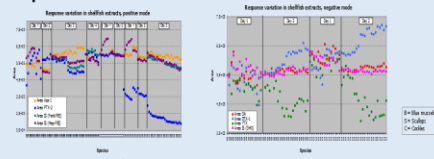
Toxin	IS	Calibration	Area	Ratio	95% CI of difference	P-value
OA	DHO	20	0.217	0.215	-0.002 to 0.007	0.389
DTX-1	DHO	20	0.217	0.215	-0.002 to 0.013	0.547
YTX	DHO	21	0.020	0.020	-0.002 to 0.001	0.276
PTX-2	Hep-PBI	13	0.388	0.330	-0.051 to 0.035	0.280
Aza-1	Hep-PBI	13	0.388	0.330	-0.052 to 0.044	0.075
Aza-1	Hep-PBI	13	0.381	0.330	-0.050 to 0.038	0.121
Aza-1	Hep-PBI	13	0.381	0.330	0.008 to 0.037	0.010



The figures show how the calibration curve slopes vary during an analytical sequence. For most toxins slopes based on IS ratio will partly level out variations, but not consistently. Day 3 in negative mode are calibration curves from LCMSMS. The response drift increases with the length of the sequence, both for areas and ratios.

According to Table 2 Aza-1 is the only toxin showing significantly less response drift by using IS ratio calculated from Hep-PBI, versus peak area.

Response variation



The figures show the variation of the peak areas of IS and each toxin standard added of 125 µg/kg to different species of shellfish extracts. For negative mode ionization DHO follows the response of OA (p=0.6), while peak areas for DTX-1 and YTX are drifting in opposite directions (p<0.05).

The plot for positive mode ionization shows no significant differences in peak area variation between Hep-PBI and Aza-1 (p=0.14). These results are independent of the shellfish species.

The results for PTX-2 show no correlation with Pent-PBI or Hep-PBI (p<0.05). However, by excluding data from scallops, PTX-2 peak area variation show no significant differences from Pent-PBI (p=0.3). Areas for PTX-2 in scallops differ from both, which indicates substantial ion suppression for that toxin.

Precision

Table 3: Comparison of precision of naturally contaminated samples from blue mussels

Toxin	IS	Sample size	No. of replicate	% RSD	Conc range
			(n=replicates)	Ratio	(µg/kg)
OA	DHO	10	89	2.7	3.5
DTX-1	DHO	12	127	3.1	3.9
YTX	DHO	6	46	8.8	8.8
PTX-2	Hep-PBI	4	40	8.5	8.2
PTX-2	Hep-PBI	4	40	10.0	10
Aza-1	Hep-PBI	10	39	2.7	2.5
Aza-1	Hep-PBI	10	52	4.8	19

*For negative mode analyzed over 3 different days, for positive mode over 2 different days

Table 3 shows analytical precision expressed as % RSD compared with and without IS in naturally contaminated samples.

Calculations based on peak areas seem to give slightly better precision than using IS-ratios.

VEDLEGG G

Molluscan Shellfish Safety; Chapter 16 **Searching for Internal Standard for Chemical Routine Analysis of Lipophilic Shellfish Toxins**

Trude S. Guldberg, T. Hatlen, and K. Aarstad

Introduction

Analytical methods based on liquid chromatography (LC) coupled to mass spectrometry (MS) have been used for several years to detect and quantify lipophilic marine biotoxins in crude methanol shellfish extracts. Identification and quantification in routine analysis relies on retention time and peak area response compared to certified standards. The analytical applications can be challenging as marine toxins are complex analytes which are present in complex biological matrices. Response drift and matrix effects (ion suppression or ion enhancement) in LC-MS analysis can lead to an over or underestimation of the toxin concentration.

Various approaches can be used to overcome these potential errors, including internal standards, standard addition, or by various clean-up techniques for removal of interfering matrix components. To our knowledge, no internal standards are available yet. Due to cost and limited availability of certified standards, the standard addition approach is generally not feasible in routine analysis. Clean-up applications by using solid phase extraction are rather time consuming and not necessarily successful with regards to eliminating matrix effects (Gerssen et al. 2009b; These et al. 2009). The lack of internal standards in LC-MS determinations makes the analysis vulnerable to analytical and instrumental variations. Correct quantification is dependent on accurate volumes during extraction and response stability during instrumental analysis.

An adequate internal standard requires non-interference with the masses specified for the toxin of interest and should be able to mimic the behavior of a particular analyte by being as similar as possible; ideally isotope labeled. Non-labeled internal standards are often homologs which elute close to the analyte thus appearing in the same vicinity with respect to any matrix effect.

T.S. Guldberg (✉) • T. Hatlen • K. Aarstad
Department of Clinical Pharmacology, St. Olav's University Hospital, Trondheim, Norway
e-mail: trude.guldberg@stolav.no; tone.hatlen@stolav.no; kjell.aarstad@live.no

G. Sauvè (ed.), *Molluscan Shellfish Safety*, DOI 10.1007/978-94-007-6588-7 16,
© Springer ScienceCBusiness Media Dordrecht 2014

Purpose

The aim of this study was to improve the performance of LC-MS methods for lipophilic marine biotoxins by introducing internal standards as an analytical tool, which might compensate for response drift, matrix effects and unpredictable events during the analytical process.

Methods

Synthesized internal standards were designed from the skeletal structure of phenylbenzimidazole (PBI) by substitution reactions of different functional groups. Fifteen substances were tested in methods with negative and positive ionization mode. Two of the PBIs were further examined in the positive method; 1-pentyl-2-phenylbenzimidazole (Pent-PBI) and 1-heptyl-2-phenyl-benzimidazole (Hep-PBI). The monitored mass transitions were (precursor > fragment): Pent-PBI m/z 265.2 > 195.1 and Hep-PBI m/z 293.2 > 195.1.

In addition the polycyclic steroid deoxycholic acid (DHO) was tested for suitability in the method using negative ionization mode. DHO has comparable chemical and physical properties with the toxins in the diarrhetic shellfish toxins (DSP) group, and the monitored transition was m/z 391.1 > 345.2.

The impact of introducing an internal standard for reduced matrix effects was examined in naturally contaminated mussels (*Mytilus edulis*) and scallops (*Pectinidae*). Parallel extractions were carried out in which one group was extracted with methanol containing internal standard while the other was extracted using a published procedure (Stobo et al. 2005). Standard addition was performed by adding a known amount of multi-toxin solution into crude extracts. The quantified concentrations were compared with matrix corrected values.

To monitor response drift with or without internal standard during analysis, calibration curves with at least five concentration levels were analyzed intermittently during analytical sequences. CRM⁹ calibration standards were fortified in methanol. Calibration curve slopes, peak areas and response ratios were normalized to comparable levels, tested for significance and confidence intervals (CI) were determined. Analytical method precision, expressed as % RSD, was calculated based on CRM DSP Mus-b (certified control sample) and naturally contaminated shellfish samples.

Chromatography was performed with two different systems; neutral and alkaline conditions. The methods used for analysis on single quadrupole MS was AOAC LC-MS method 88.5 2005 (modified) (Stobo et al. 2005), with a Zorbax Eclipse XDB-C₁₈, 4.6x50 mm, 1.8 µm column (Agilent), equipped with an in-line 0.2 µm filter (Agilent). For negative ionization mode mobile phase A was 100 % methanol while mobile phase B was 100 % aqueous containing 50 mM ammonium acetate. A gradient from 30 to 90 % A was run over 2 min, and then held for 3 min. At 5 min the composition was reset to the initial conditions and 2 min equilibration time was allowed. The flow rate was set at 0.7 ml min⁻¹ and 5 µl of each sample was injected onto the column at 50 °C.

For analysis in positive ionization mode, mobile phase A was 100 % methanol. Mobile phase B and C were 100 % aqueous, with 50 mM ammonium acetate and 25 mM formic acid, respectively. Starting with isocratic conditions of 12.5 % of eluent B and C for 2.5 min, a linear gradient from 75 to 85 % A was run over 3.5 min. At 6 min the composition was reset to the initial conditions and 2 min equilibration time was allowed. The flow rate was set at 1.0 ml min⁻¹ and 10 µl of each sample was injected into the column at 30 °C. The autosampler maintained 4 °C, and the detector (Agilent MS 1956B) was equipped with an electrospray source (ESI).

⁹Certified Reference Materials, NRC-CNRC. Exceptions: DTX-1 from Wako, Japan.

For triple quadrupole analysis, alkaline conditions described in EU harmonized SOP LIPO LC-MS/MS (EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of Lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS/MS & version 4. Retrieved July 2011; Gerssen et al. 2009a) were analysed with X-Bridge C₁₈, 2.1x50 mm, 2.5 µm column (Waters), carried out on an Agilent MSMS 6460 (1200-series), electro spray ionization combined with positive and negative ionization modes. The mobile phases consisted of H₂O containing 0.05 % ammonia (pH 11) in channel A, and 95 % acetonitrile containing 0.05 % ammonia in channel B. Analysis were performed by running a linear gradient elution, starting from 10 to 90 % B from 1 to 6.7 min, followed by a 1.3 min hold at 90 % B, a 10 % A, decreasing to 10 % B over 2 min, and holding for 3 min until the next injection. The flow rate was 0.7 ml min⁻¹, and the injection volume was 10 µl at a column temperature of 40 °C. All results are, as far as possible, evaluated without distinction on instruments or methods.

Results and Discussion

Retention Times

PBI containing short aliphatic chains eluted too early in both ionization modes, or did not ionize in negative mode at all. Two of the PBI's; Hep-PBI and Pent-PBI, were tested further in the positive method, even though they differ chemically from the lipophilic toxins. Hep-PBI coeluted with azaspirazid-1 (Aza-1) while Pent-PBI, which is slightly more polar than Hep-PBI, eluted between pectenotoxin-2 (PTX-2) and Aza-1. Because of this, it is reasonable to assume that Hep-PBI will be appropriate as internal standard for Aza-1. The retention time of DHO was close to dinophysistoxin-1 (DTX-1), which may indicate DHO as a suitable internal standard for DTX-1.

Matrix Effects

The toxin concentrations were calculated in three ways to assess whether the use of internal standard compensate for the matrix effects (Table 16.1). Due to seasonal variations, naturally contaminated shellfish were in limited supply, and the survey was carried out on only 18 different samples; 14 mussels and 4 scallops, generally with low toxin amount. Samples with okadaic acid (OA) ($n = 9$), DTX-1 ($n = 11$), yessotoxin (YTX) ($n = 12$) and Aza-1 ($n = 3$) were extracted with a solvent-to-sample ratio (SSR) of five (Stobo et al. 2005).

Traditionally, toxin concentrations are measured from external calibration curves which are based on peak responses (ESTD). The calibration curves which are based on internal standards (ISTD) were generated from the ratio of peak responses between the toxin and the internal standard. Standard addition was performed in order to correct for individual matrix effects. As the standard addition method is the most widely accepted way to compensate for matrix effects, both the ISTD and ESTD concentrations were compared with those generated using standard addition. All concentration ranges stated in the results are matrix-corrected values determined by use of the formula suggested by Ito et al. (Ito and Tsukada 2001):

$$C_{ME-corr} = \frac{C_{theoretical} \times C_{unknown}}{(C_{std\ add} - C_{unknown})} \quad (16.1)$$

The concentration range of OA was from 5.3 to 31.3 µg kg⁻¹, and recovery for ISTD results was 97.4 % (95 % CI: 95.6–99.2 %), Table 16.1. All nine samples were mussels. It appears that using the DHO internal standard instead of standard addition can be helpful for quantification of OA, but the sample size is too low to draw any final conclusions. Statistical differences ($p < 0.05$) in toxin amount were detected by the use of paired t-test. However, the dissimilarity had no significance with regard to harvesting shutdown as all results were below the EU regulatory limit (160 µg kg⁻¹) (Regulation (EC) No 853/2004).

The toxin amount of Aza-1 ranged from 6.4 to 37.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, which was far below the EU regulatory levels (160 $\mu\text{g kg}^{-1}$) (Regulation (EC) No 853/2004). The recovery result of 114 % (95 % CI: 110–119 %) was promising when using a larger number of samples are required before drawing a final conclusion. The sample size for Aza-1 results was too small to be handled statistically.

Discrepancies were observed between matrix-corrected and ISTD concentrations in relation to DTX-1 and YTX using DHO. ESTD results of DTX-1 were in agreement with the values from ISTD, in which no statistical significance was detected (paired t-test, $p < 0.05$). However, both ISTD and ESTD results had relative low recovery comparing to standard addition values, which indicated an underestimation of the toxin amount. The concentration range of DTX-1 was 9.9–225 $\mu\text{g kg}^{-1}$, and test samples in question were mussels only. One sample contained DTX-1 above the regulatory limit (160 $\mu\text{g kg}^{-1}$) (Regulation (EC) No 853/2004), and recovery relative to matrix-corrected result for ESTD and ISTD were acceptable; 82 and 87.4 %, respectively. The final toxin amount would cause harvesting shutdown no matter how the data was quantified. The idea of using DHO as an internal standard for DTX-1 because of the close retention time, is most likely not feasible, although a larger number of samples are required in order to draw a definitive conclusion.

Measurements of YTX ($n = 12$) ranged from 17.3 to 46.4 $\mu\text{g kg}^{-1}$, were low compared to the method limit of quantitation (LOQ) and EU regulatory limits (Regulation (EC) No 853/2004). Average recovery of ISTD was 135.4 % (95 % CI: 123–148 %). Quantified toxin amount of YTX were significantly higher when using internal standard than compared to standard addition, even though more samples are needed to draw a final conclusion. Unfortunately, no samples containing higher levels of YTX were available due to the seasonality of the sampling period.

In relation to PTX-2 ($n = 4$), two of four samples were scallops which clearly suffered from major matrix effect of more than 40 % enhancement by using both PBIs. The concentration range was wide, and extended from 8.9 to 155.7 $\mu\text{g kg}^{-1}$. For this reason, no comparisons based on the data were made. A high level of PTX-2 was measured in one of the samples (mussel), showing ESTD and matrix-corrected results of 147.4 and 155.7 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. ISTD values were measured to $< 200 \mu\text{g kg}^{-1}$. Calculations done by the use of internal standard did not seem to compensate for matrix effects affecting PTX-2, YTX or DTX-1, though more samples need to be analyzed.

Table 16.1 Average concentrations of DSP toxins ($\mu\text{g/kg}$) measured in three ways (matrix corrected, ESTD and ISTD) and relative recovery (%) to matrix-corrected results

Toxin	Internal standard	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	n	Mean conc. ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			Recovery (%)	
				Matrix corr.	ESTD	ISTD	ESTD	ISTD
OA	DHO	5.0	9	15.5	13.1	15.0	85.7	97.4
DTX-1	DHO	5.0	11	52.7	39.9	42.4	74.2	79.5
YTX	DHO	66.0	12	29.9	33.3	40.0	112.5	135.4
Aza-1	Pent-PBI	4.4	3	18.9	21.6	23.7	131.1	134.2
	Hep-PBI					21.3		114.5

Response Drift

Response drift during analytical sequences were monitored by analyzing calibration standards in the beginning, midway and the end of each analytical sequence. Each calibration curve consisted of five levels of CRMs fortified in methanol. The concentration levels of OA and DTX-1 ranged from 2 to 250 ng ml^{-1} , YTX; 10–500 ng ml^{-1} , and Aza-1 and PTX-2; 2–100 ng ml^{-1} .

Two sets of calibration curves were constructed each day; one set using the toxin peak areas (ESTD), and one set by the response ratios (ISTD). Four to five analytical sequences were analyzed on subsequent days, and the determined calibration curve slopes were compared. When using internal

standard to compensate for response drift, one would expect less slope variation if the internal standard drift is in the same direction at the same time as the toxin.

Table 16.2 Comparison of normalized calibration slopes of methanol standard curves

Toxin	Internal standard	No. of calibration curves	Mean slope variance (%)				P-value
			Area	95 % CI	Ratio	95 % CI	
OA	DHO	20	4.2	-1.2 to 9.7	1.7	-1.3 to 8.3	0.442
DTX-1	DHO	20	4.0	-3.0 to 11.0	2.4	-3.5 to 8.3	0.725
YTX	DHO	20	-2.3	-8.2 to 3.7	-3.8	-8.9 to 1.4	0.628
PTX-2	Pent-PBI	13	-4.5	-13.9 to 5.0	-1.0	-9.2 to 7.1	0.596
	Hep-PBI	13			3.6	-6.1 to 13.2	
Aza-1	Pent-PBI	13	-6.4	-9.8 to -3.0	-2.7	-5.6 to 0.2	0.128
	Hep-PBI	13			1.8	-1.6 to 5.2	

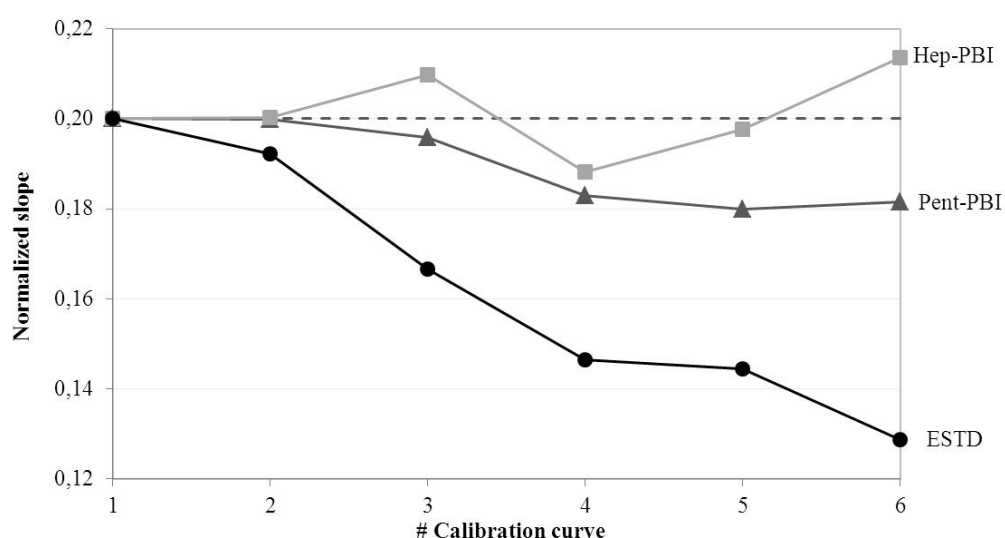


Fig. 16.1 Comparison of calibration slopes for Aza-1 in one analytical sequence, 145 injections

The average slope variances (Table 16.2) show the daily variation of the calibration curve slopes due to response drift in the system. The response drift increased with the length of the analytical sequence, both with respect to areas and ratios. Most calibration slopes based on ISTD partly smoothed out variations, shown by a tighter confidence interval. The ISTD calibration curves showed a slight improvement in the slope variations for all toxins except for YTX. Aza-1 was the only analyte with significantly less response drift using the ratio calculated from Hep-PBI versus peak area ($p = 0.005$), Table 16.2.

To illustrate response drift during a long analytical sequence, Fig. 16.1 shows the differences in slope values obtained for Aza-1 and how the internal standards level out the variations in the abundance. Six standard curves were generated from six different calibration series spread out in one analytical sequence containing samples and controls, with a total number of 145 injections. All slopes were normalized to the slope obtained from the first calibration curve ($a = 0.20$). The normalized slope is shown in Fig. 16.1 as a dashed line.

The slopes of ESTD point toward a negative trend and deviate more from the normalized slope than the ISTD slopes. The slope variation using Hep-PBI differs in both positive and negative directions indicating that the internal standard response was not affected to the same extent as the toxin. Hence, Hep-PBI compensated for the negative trend of a decreasing slope which leads to overestimating of toxin concentrations.

Response Variation

The response stability for the analytes and internal standards during analytical sequences were tested in previously negative shellfish spiked with CRM ($125 \mu\text{g kg}^{-1}$). For Aza-1 and PTX-2 a total of 98 crude shellfish extracts were studied, of which 46 were mussels, 37 scallops and 15 cockles (*Cerastoderma edule*), analyzed by the neutral method (Stobo et al. 2005) over 4, 2 and 3 days, respectively. OA, DTX-1 and YTX were studied in 39 mussels and 37 scallops, analyzed over 2 days, respectively. The alkaline method (EU-Harmonised Standard Operating Procedure) was used during the first day of analysis whilst the neutral method (Stobo et al. 2005) was used during the second day. The determined peak areas were normalized to the first sample in each sequence before the comparison of day-to-day variations of response drift.

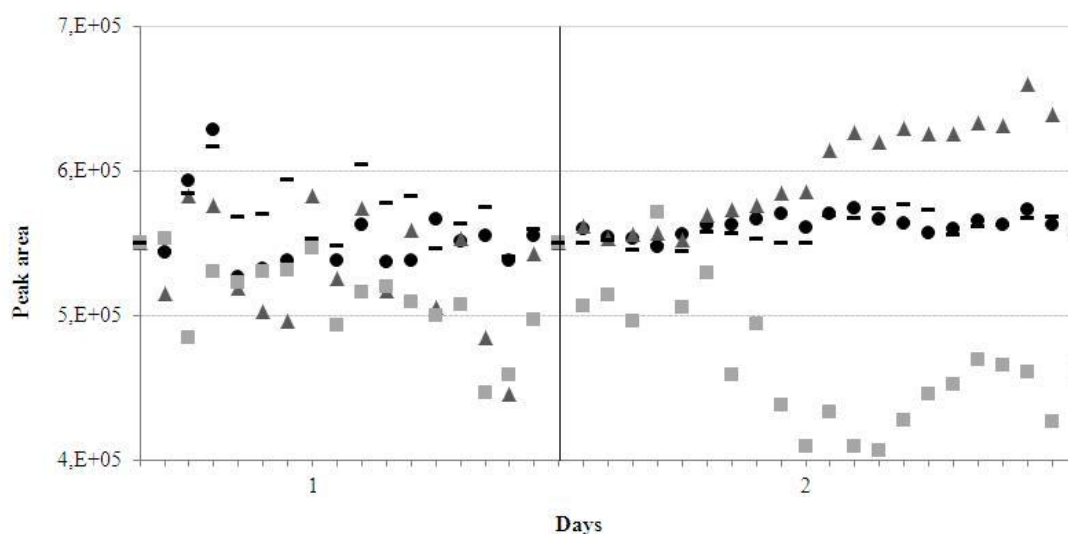


Fig. 16.2 Peak areas for OA (black circles), DTX-1 (grey triangles), YTX (light grey squares) and DHO (black lines) in mussels, analyzed during 2 days ($n = 39$)

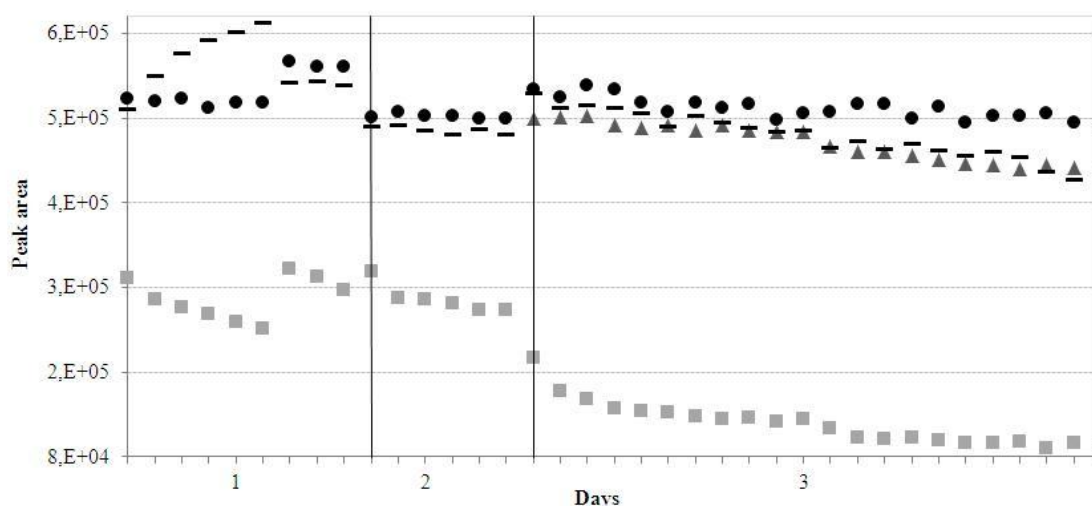


Fig. 16.3 Peak areas for Aza-1 (black circles), Pent-PBI (grey triangles), PTX-2 (light grey squares) and Hep-PBI (black lines) in scallops, analyzed during 3 days ($n = 37$).

The results suggest that response variation depends on the species because their matrix behaves differently. For the negative ionization mode, DHO followed the response of OA ($p > 0.05$), and were not affected by different methods, instruments or species. Peak areas for DTX-1 and YTX

drifted in opposite directions ($p < 0.05$) when considering the results without taking into account the different species (not shown). If the results were split by species the response variations of DTX-1 in mussels (Fig. 16.2) did not statistically differ from DHO. However, as seen in Fig. 16.2, there were lower DTX-1 values on day one than day two due to the difference in methodology and instrumentation, suggesting that a conclusion cannot be drawn based on this study. YTX behaved differently from DHO regardless of species, methodology and instrumentation.

The results for positive mode ionization demonstrated no statistical significance in the response variation between Hep-PBI and Aza-1 considering all three species together ($p = 0.14$) (not shown), or individually (example: scallops ($p > 0.05$), Fig. 16.3). In fact, using Pent-PBI for Aza-1 quantification seems promising in mussels (not shown) since their peak areas showed a linear relationship ($p = 0.4$). Pent-PBI was included at a later stage in the study, and that explains why no data is shown in Fig. 16.3 for the first and second day.

The results for PTX-2 showed no correlation with Pent-PBI or Hep-PBI ($p < 0.05$) either when considering all species together or individually. However, by excluding data from scallops, PTX-2 peak area variation showed no significant differences from Pent-PBI ($p = 0.3$). Peak area response for PTX-2 in scallops differed from both mussels and cockles, which indicates substantial ion suppression, also shown by Ito and Tsukada (2001). The pronounced matrix effect observed for PTX-2 in scallops is illustrated in Fig. 16.3. None of the internal standard in this study was able to compensate for the ion suppression.

An additional observation was made by subsequent injections after samples of scallop which were influenced by matrix deposition in the analytical system. The observed contamination means that the PTX-2 signal in the next sample or standard was affected by ion suppression from the previous scallop extract. This suggests that injections of organic solvent should be done after analysis of scallop extracts.

Precision

To demonstrate and compare the reproducibility of the two methods, naturally contaminated samples and CRM DSP Mus-b were analyzed. The samples were run over three different days with multiple injections in each sequence. Table 16.3 shows analytical precision expressed as % RSD compared with (ISTD) and without internal standard (ESTD).

Calculation of analytical precision was slightly better using peak areas compared to internal standards. The precision results for most toxins were satisfactory.

Precision for YTX was acceptable for both calculation models bearing in mind the low toxin concentration due to the EU regulatory limit for intoxication in humans (Regulation (EC) No 853/2004). The limited number of samples containing PTX-2 reflected the relatively high % RSD as the measured toxin amount was close to the LOQ ($12 \mu\text{g kg}^{-1}$) in three out of four samples.

Table 16.3 Analytical precision by quantifying toxin concentrations by ISTD or ESTD with and without the use of internal standards

Toxin	Internal standard	Sample size	No. of replicate injections	% RSD	
				ESTD	ISTD
OA	DHO	10	89	2.7	3.5
DTX-1	DHO	12	117	3.1	3.9
YTX	DHO	6	46	8.8	8.8
PTX-2	Pent-PBI	4	40	8.5	9.2
	Hep-PBI				10.0
Aza-1	Pent-PBI	1	10	2.3	2.5
	Hep-PBI	10	52	2.7	4.8

Conclusions

This preliminary study illustrates the complexity of establishing appropriate internal standards for chromatographic and mass spectrometric determination of lipophilic shellfish toxins. Implementation of an internal standard can be a powerful analytical approach to improve the performance, as the analytical methods for marine toxins were clearly compromised by matrix effects.

The conclusions one can draw from the study are somewhat limited owing to the fact that the data set is small. However, the study undoubtedly represents a starting point to improve the performance of MS detection as a valuable tool for identification and quantification of marine biotoxins.

Calculations with the internal standards examined in this study are promising for OA and Aza-1. DHO seems to be more suitable as an internal standard for OA than for DTX-1, although DTX-1 elutes closer to DHO than OA. The internal standard candidates examined in this initial work did not show improvements related to response drift or matrix effects for DTX-1, PTX-2 or YTX.

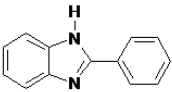
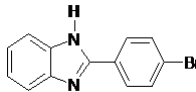
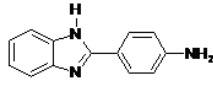
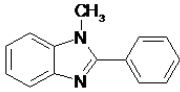
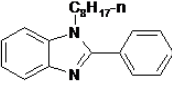
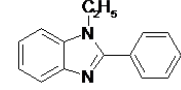
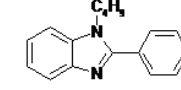
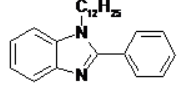
The molecular structure and the chemical properties of YTX differ from the other marine toxins, and thus make it more challenging to find one suitable internal standard that matches all analytes in the methods. Further studies are required before any definite conclusions can be drawn.

References

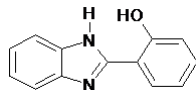
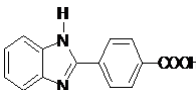
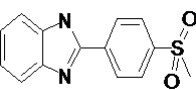
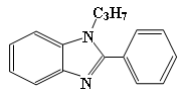
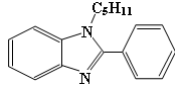
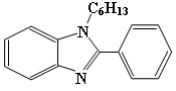
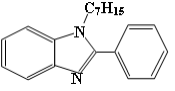
- EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of Lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS/MS, version 4. Retrieved July 2011, from http://www.aesan.msps.es/en/CRLMB/web/procedimientos_crlmb/crlmb_standard_operating_procedures.shtml
- Gerssen A, Mulder PPJ, McElhinney MA, de Boer J (2009a) Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of marine lipophilic toxins under alkaline conditions. *J Chromatogr A* 1216:1421–1430
- Gerssen A, McElhinney MA, Mulder PPJ, Bire R, Hess P, de Boer J (2009b) Solid phase extraction for removal of matrix effects in lipophilic marine toxin analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 394:1213–1226
- Ito S, Tsukada K (2001) Matrix effect and correction by standard addition in quantitative liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins. *J Chromatogr A* 943:39–46
- Regulation (EC) No 853/2004. Official Journal European Parliament and of the Council of 29 April 2004, p 99. Retrieved February 2011, from http://www.aesan.msps.es/en/CRLMB/web/legislacion_comunitaria/legislacion.shtml
- Stobo LA, Lacaze JPCL, Scott AC, Gallacher S, Smith EA, Quilliam MA (2005) Liquid chromatography with mass spectrometry – detection of lipophilic shellfish toxins. *J AOAC Int* 88:1371–1382
- These A, Scholz J, Preiss-Weigert A (2009) Sensitive method for the determination of lipophilic marine biotoxins in extracts of mussels and processed shellfish by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry based on enrichment by solid-phase extraction. *J Chromatogr A* 1216:4529–4538

VEDLEGG H

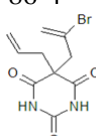
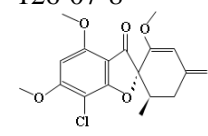
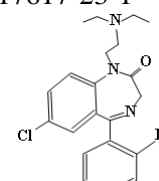
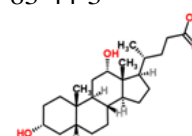
Tabell I Oversikt over alle internstandarder som ble testet ut i pH-nøytral metode (tabellen fortsetter på neste side). I tabellen angis kvantifiseringsion og kvalifiseringsion som henholdsvis *kvant. ion* og *kval. ion*, mens fragmentorspenning (V) er forkortet til *frag.*

IS (nummer)		#1	#2	#3	#4
	Kjemisk navn	2-Fenyl-Benzimidazol	2-(4-Bromofenyl)-Benzimidazol	2-(4-Aminofenyl)-Benzimidazol	1-Metyl-2-Fenyl-Benzimidazol
	CAS-nr.	716-79-0	2622-74-4	2963-77-1	2622-63-1
	Struktur				
	MW	194	272	209	208
	pK _a	5,15	5,14	5,30	5,03
	LogP	3,23	4,06	2,42	4,02
	Konsentrasjon	10 µg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml
ESI ⁺	Kvant. ion (frag. (V))	195 (150)	273 (175)	210 (175)	209 (175)
	Kval. ion (frag. (V))	92 (250)	-	92 (275)	195 (300)
	t _R (min)	0,8	1,0	0,9	0,9
	Kommentar	Usymmetriske topper. Eluerer for tidlig.	Usymmetrisk topp.	Fin kromatografi. Eluerer for tidlig.	Fine topper. Lav respons. Eluerer for tidlig.
ESI	Kvant. ion (frag. (V))	Ikke utført	Ikke utført	208 (-)	207 (-)
	Kval. ion (frag. (V))	Ikke utført	Ikke utført	-	-
	t _R (min)	Ikke utført	Ikke utført	Ikke lagt inn i metoden	Ikke lagt inn i metoden
	Kommentar	Ikke utført	Ikke utført	Fragmenterer ikke i ESI	Fragmenterer ikke i ESI
IS (nummer)		#7	#8	#11	#12
	Kjemisk navn	1-n-Oktyl-2-Fenyl-Benzimidazol	1-Etyl-2-Fenyl-Benzimidazol	1-Butyl-2-Fenyl-Benzimidazol	1-Dodekyl-2-Fenyl-Benzimidazol
	CAS-nr.	305347-15-3	6528-75-2	24107-62-8	615280-16-5
	Struktur				
	MW	306	222	250	362
	pK _a	5,00	5,00	5,00	5,00
	LogP	6,93	4,35	5,26	8,6
	Konsentrasjon	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml og 10 µg/ml
ESI ⁺	Kvant. ion (frag. (V))	307 (150)	223 (125)	251 (125)	263 (250)
	Kval. ion (frag. (V))	195 (300)	195 (275)	195 (275)	-
	t _R (min)	5,4	1,1	1,9	6,9
	Kommentar	Begge topper veldig fine. Kan prøves videre.	Begge topper veldig fine.	Begge topper veldig fine.	Grei topp, litt bred

Tabell I fortsettelse

ESI	Kvant. ion (frag. (V))	305 (150)	221 (-)	249 (150)	361 (175)
	Kval. ion (frag. (V))	255 (125)	-	-	255 (125)
	t _R (min)	Ikke lagt inn i metoden	Ikke lagt inn i metoden	Ikke lagt inn i metoden	5,0
	Kommentar	Kvant. ion er fraværende. Dårlig kromatografi.	Fragmenterer ikke i ESI	Dårlig resultat	Kvant. ion er fraværende. Grei topp for Q-ion, men lav respons.
IS (nummer)		#18	#20	#22	#30
	Kjemisk navn	2-(2-Hydroksyfenyl)-1H-Benzimidazol	2-(4-Karboksyfenyl)-1H-Benzimidazol	2-(4-[Metylsulfonyl]fenyl)-1H-Benzimidazol	1-Propyl-2-Fenyl-Benzimidazol
	CAS-nr.	2963-66-8	66631-29-6	143426-39-5	314769-68-1
	Struktur				
	MW	210	238	272	236
	pK _a	4,87	5,21	5,05	5,00
	LogP	2,84	2,78	1,93	4,39
	Konsentrasjon	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml
ESI ⁺	Kvant. ion (frag. (V))	211 (100)	239 (200)	273 (175)	237 (125)
	Kval. ion (frag. (V))	118 (100)	-	194 (275)	195 (250)
	t _R (min)	0,5	0,6	0,7	1,4
	Kommentar	Fine topper, Kval. ion ser best ut og har høyest respons	Lav respons, men fin kromatografi	Begge topper veldig fine	Begge topper veldig fine
ESI	Kvant. ion (frag. (V))	209 (175)	237 (125)	271 (125)	235 (-)
	Kval. ion (frag. (V))	181 (275)	193 (275)	224 (250)	-
	t _R (min)	2,1	0,7	1,0	Ikke lagt inn i metoden
	Kommentar	Usymmetriske topper	Fin kromatografi i std (MeOH), men ikke i skjellmatriks. Eluerer for tidlig	Fine topper i både std (MeOH) og i skjellmatriks. Eluerer litt tidlig.	Fragmenterer ikke i ESI
IS (nummer)		#31	#32	#33	
	Kjemisk navn	1-Pentyl-2-Fenyl-Benzimidazol	1-Heksyl-2-Fenyl-Benzimidazol	1-Heptyl-2-Fenyl-Benzimidazol	
	CAS-nr.	305347-17-5	476298-71-2	305347-16-4	
	Struktur				
	MW	264	278	292	
	pK _a	5,8	5,0	5,7	
	LogP	4,6	6,5	5,7	
	Konsentrasjon	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	

Tabell I fortsettelse

ESI ⁺	Kvant. ion (frag. (V)) Kval. ion (frag. (V)) t _R (min) Kommentar	265 (75) 195 (275) 2,7 Fine topper, t _R kan passe til PTX-2 i pH- nøytral metode	279 (150) 195 (275) 3,9 Bra kromatografi, litt bred topp.	293 (150) 195 (275) 4,6 Bra kromatografi, t _R kan passe til Aza-1 i pH- nøytral metode	
ESI	Kvant. ion (frag. (V)) Kval. ion (frag. (V)) t _R (min) Kommentar	263 (-) - Ikke lagt inn i metoden Fragmenterer ikke i ESI	277 (-) - Ikke lagt inn i metoden Fragmenterer ikke i ESI	291 (-) - Ikke lagt inn i metoden Fragmenterer ikke i ESI	
IS (navn)		Brallobarbital	Griseofulvin	Flurazepam	Deoksykhol- syre
Kjemisk navn		5-(Allyl-5-bromoallyl) Barbitursyre	(2S,5'R)-7-kloro-3',4,6-trimetoksy-5'-metylspro[1-benzofuran-2,4'-sykloheks-2-ene]-1',3-dione	7-kloro-1-[2-(dietylamino)etyl]-5-(2-fluorofenyl)-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-one	(3α,5β,12α,20R)-3,12-dihydrokholan-24-oiksyre
CAS-nr.		561-86-4	126-07-8	17617-23-1	83-44-3
Struktur					
MW		287	353	388	393
pK _a		7,7	-4,3/17,7	1,9/8,2	6,6
LogP		2,0	3,5	4,0	4,8
Konsentrasjon		1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml
ESI ⁺	Kvant. ion (frag. (V)) Kval. ion (frag. (V)) t _R (min) Kommentar	Ikke utført Ikke utført Ikke utført Ikke utført	Ikke utført Ikke utført Ikke utført Ikke utført	Ikke utført Ikke utført Ikke utført Ikke utført	Ikke utført Ikke utført Ikke utført Ikke utført
ESI	Kvant. ion (frag. (V)) Kval. ion (frag. (V)) t _R (min) Kommentar	286 (100) 255 (150) 0,9 Fin topp, men eluerer for tidlig	352 (100) 283 (175) 3,6 Ikke bra kromatografi	386 (100) 265 (125) 2,4 Begge topper er fine. Kan prøves ut videre.	391 (200) - 3,1 Ikke funnet kval. ion. Fin kromatografi med passende t _R .

VEDLEGG I

Detection and quantification of lipophilic marine biotoxins in shellfish extracts by using LC-MSMS

Trude Guldberg and Anne-Lill Olsen

Department of Clinical Pharmacology, St. Olavs University Hospital, N-7006 Trondheim, Norway

E-mail: trude.guldberg@stolav.no

Introduction

Marine biotoxins produced by plankton algae can accumulate in bivalve molluscs and potentially reach toxic levels. To prevent human poisoning or death, monitoring toxins in shellfish is a regulatory requirement^{1,2}. The lipid-soluble biotoxins; okadaic acid (OA), dinophysistoxins (DTXs), azaspiracids (AZAs), pectenotoxins (PTXs), yessotoxins (YTXs), spirolides (SPXs) and gymnodimine (GYM), form a class of compounds known as lipophilic toxins (LSP). An in-house validation was conducted to characterize the performance of the extraction and analytical procedures given by the European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins.

Methods

A double extraction with 100 % methanol was performed on 2.0 g homogenised shellfish tissue. The final solvent-to-sample ratio (SSR) was 10:1. The samples were analyzed in duplicate, where one of the parallels was the crude extract, and the other was hydrolyzed by alkaline conditions to determine the total content of OA and DTXs.

An alkaline method was adopted and modified following EU-Harmonised Standard Operating Procedure (EU-SOP) for determination of Lipophilic marine biotoxins in molluscs by Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry (LC-MSMS), see table 1, table 2 and figure 1.

Table 1: LC settings for the analysis of lipophilic marine biotoxins under alkaline conditions

Instrument	Agilent Technologies 1200 Series 6460 Triple Quad LC/MS	Time (min)	A (%)	B (%)
LC Column	XBridge [®] C18 2.5 µm 2.1x50 mm	0.00	90	10
Flow (ml/min)	0.5	1.00	90	10
Injection (µl)	10.0	7.30	10	90
Column Temp (°C)	40.0	8.00	10	90
Mobile phase A	0.05 v/v % ammonia in H ₂ O	8.01	90	10
Mobile phase B	0.05 v/v % ammonia in 90 % in ACN	10.0	90	10

Table 2: MRM fragmentation parameters for all ion transitions obtained and used in our laboratory (qualifier ions in brackets)

Toxin	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	Fragmentor (V)	Collision energy (eV)	ES [†]	Polarity
OA	883.5	255.2 (113.1)	300	45 (50)	—	—
DTX-2	883.5	255.2 (113.1)	300	45 (50)	—	—
YTX	570.4 [‡]	447.2 (201.0)	200	28 (16)	—	—
DTX-1	817.5	255.2 (113.1)	300	45 (50)	—	—
Aza-3	826.5	810.5 (792.5)	200	40 (55)	+	+
Aza-1	842.6	824.5 (806.5)	240	32 (40)	+	+
Aza-2	856.5	838.5 (820.5)	200	40 (55)	+	+
GYM	508.5	490.5 (392.3)	150	25 (45)	+	+
SPX-1	692.5	164.1 (444.3)	150	50 (40)	+	+
PTX-2	876.5	823.5 (213.1)	150	30 (30)	+	+

[†]Resist as [M+H]⁺ under alkaline conditions

The use of dynamic MRM (dMRM), which enables fast polarity switching, reduces LC separation time significantly compared to other analytical methods for biotoxins. This is achieved by eliminating the need for division into time segments due to different ionization modes.

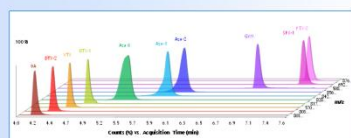


Figure 1: Reversed phase LC-MSMS chromatogram of ten lipophilic toxin standards spiked into mussel extracts acquired with dMRM, allowing fast polarity switching between positive (GYM, SPX-1, PTX-2, AZA-1, -2, -3) and negative (YTX, OA, DTX-1, -2) scans. Peak heights have been normalized for each chromatogram.

Results and discussion

Linearity of detection was explored using MeOH- and shellfish matrix-based (mussel and scallop) solutions (SSR 10:1) spiked with NRC CRM³ to a concentration range from 30 to 400 µg/kg for all toxins, except for YTX (75 to 2500 µg/kg). Triplicate LC injections were performed for seven levels, and calibration curves for all toxins showed correlation coefficients (r²) of >0.985.

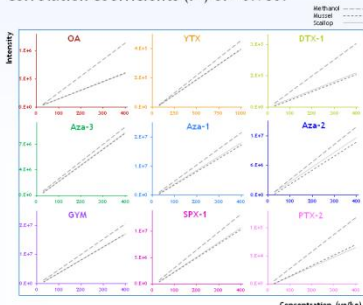


Figure 2: Matrix effect under pH 11. Calibration curves in shellfish extracts shows signal suppression for all toxins

Matrix effect (ME), ie the difference in sensitivity caused by the matrix, was determined by the equation:

$$ME = \frac{\text{Slope}_{\text{matrix}}}{\text{Slope}_{\text{MeOH}}}$$

ME = 1 → No matrix effect
ME > 1 → Signal enhancement
ME < 1 → Signal suppression

The slope of each calibration curve is based on three levels in each matrix, and were analyzed over six days.

Table 3: Calculated ME-values in mussel and scallop (n=6)

	OA	YTX	DTX-1	Aza-3	Aza-1	Aza-2	GYM	SPX-1	PTX-2
MeOH [†]	60264	4061	8076	132464	238430	184049	368540	147243	7028
Mussel	0.51	0.88	0.53	0.92	0.83	0.81	0.85	0.80	0.62
Scallop	0.54	0.87	0.54	0.93	0.85	0.85	0.85	0.83	0.57

[†]Slope for calibration curve in 100 % methanol

As figure 2 and table 3 demonstrates, the matrix interferences are a major challenge. Significant differences in sensitivity between methanolic and shellfishbased calibration curve slopes were found for OA, DTX-1 and PTX-2 (ANOVA, p<0.05). For that reason, the ME-value between scallop and mussel were assessed, see figure 3.

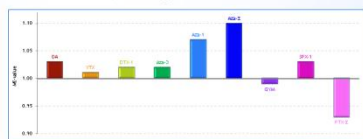


Figure 3: ME-values for scallop plotted versus mussel show more similar matrix effect than by calculations from MeOH

The results indicate that accurate quantification of lipophilic biotoxins cannot be achieved by using methanolic calibration curves. To avoid underestimation of the toxin concentration, matrix-matched standard (MMS) curves must be applied.

Limits of quantification (LOQ) was evaluated using triplicate LC injections of three different blank samples of each species, spiked with NRC CRM³ at theoretical LOQ levels for each toxin. The samples were quantified by MMS curves prepared in mussel extracts (table 4). Precision and accuracy at LOQ-levels were determined (table 5).

All signal-to-noise values of product ion with lowest intensity are ≥ 20.

Table 4: Experienced LOQ (µg/kg) in mussel and scallop determined by MMS curves in mussel extract (n=9)

	OA	YTX	DTX-1	Aza-3	Aza-1	Aza-2	GYM	SPX-1	PTX-2
Mussel	11.5	128.0	23.2	12.0	15.2	10.9	36.2	34.6	53.2
Scallop	10.8	133.0	21.7	11.5	19.0	13.1	37.0	35.2	57.0

Table 5: Accuracy (%) and repeatability (RSD %) for experienced LOQ (n=9)

	OA	YTX	DTX-1	Aza-3	Aza-1	Aza-2	GYM	SPX-1	PTX-2
Mussel	Accuracy 110	93	100	98	104	92	102	97	104
	Precision 7.7	6.5	7.8	6.1	7.6	7.5	4.0	5.5	7.8
Scallop	Accuracy 109	97	94	94	130*	111	104	99	108
	Precision 4.2	8.2	4.1	4.5	9.8	8.7	4.8	4.8	3.4

*Somewhat elevated accuracy due to endogenous concentrations of Aza-1 in the blank samples

Precision and accuracy at the EU permitted levels (PLs) for human consumption¹ were determined in the spiked blank shellfish matrix. The samples were analyzed over the course of three days with a total of eleven replicates (table 6).

PLs for the sums of OA+DTXs, AZAs and PTXs are 160 µg/kg, while for YTX it is 1000 µg/kg.

Table 6: Accuracy (%) and reproducibility (RSD %) for EU PLs (n=11)

	OA	YTX	DTX-1	Aza-3	Aza-1	Aza-2	GYM	SPX-1	PTX-2
Mussel	Accuracy 98	105	104	100	101	100	99	95	91
	Precision 1.1	2.8	2.0	1.1	0.9	1.3	2.8	1.6	3.6
Scallop	Accuracy 104	100	112	100	108	110	109	100	105
	Precision 0.7	1.6	1.9	1.3	0.7	0.9	1.8	3.0	3.7

[†]SPX-1 and GYM are not yet under EU legislation. Level used = 160 µg/kg.

Conclusions

The method has been validated for the analysis of nine lipophilic marine biotoxins, including parameters such as linearity, matrix effects, limits of quantification, precision and accuracy.

Matrix effects in terms of ion suppression was observed for all toxins. The use of matrix-matched standards fully corrected for signal suppression for both species, and the choice of mussel as matrix for MMS was based on current sample distribution of species. By using MMS in mussel, all quality requirements set by the EU-SOP and the criteria in our accredited laboratory were fulfilled.

The method is suitable for determination of marine biotoxins; however matrix effects must be assessed and taken into account before quantification.

The LC-MSMS method with alkaline conditions will become the accepted methodology by the autumn of 2013.

References

- [1] Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004. Official Journal of the European Communities, L19, 26-29.
- [2] Commission Regulation (EU) No 18/2011 of 10 January 2011. Official Journal of the European Union, L4, 3-9.
- [3] National Research Council Certified Reference Material, Canada



NML Congress 2013, Trondheim, Norway