

Ultivo トリプル四重極 LC/MS を用いた 穀類中トリコテセン系カビ毒及びゼアラレノンの分析



Authors

滝埜 昌彦

澤田 浩和

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

本アプリケーションノートでは、試料精製に Captiva EMR-Lipid, Bond Elut Mycotoxin Jr を使用し、測定に Ultivo トリプル四重極 LC/MS を用いたハトムギ加工品中トリコテセン系カビ毒及びゼアラレノンの一斉分析法を紹介します。

ハトムギ子実の熱水抽出エキ스는ヨクイニンと呼ばれ漢方薬として利用され抗腫瘍、抗肥満、抗糖尿など様々な機能を持つことが報告されています。また近年ではハトムギ茶や穀実(子実、外殻、薄皮、渋皮)の熱水抽出エキスなども注目され、抗腫瘍作用、抗炎症作用や美白効果なども報告されています。一方、ハトムギはトリコテセン系カビ毒が多く検出されると報告されています。そこで今回、市販されているハトムギ加工品中トリコテセン系カビ毒及びゼアラレノンの一斉分析法の検討を行いました。

Key words: トリコテセン系カビ毒, ゼアラレノン, Ultivo, ハトムギ加工品

分析条件

システム

1260 Infinity II Prime pump (G7104C)
1260 Infinity II Vial Sampler (G7129C)
Ultivo Triple Quadrupole LC/MS (G6465AA)
MassHunter Data Acquisition C.01.00

LC-MS条件

今回の分析はエレクトロスプレーイオン化法を用いたトリプル四重極LC/MS法を使用しました。条件は表1及び2に示した通りです。

表 1. 分析条件

LC	Agilent 1260 Infinity II Prime LC System
移動相	A:5 mM 酢酸アンモニウム B:メタノール
カラム	ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD(1.8 μm, 2.1 mm×100 mm) (P/N:959758-902)
流速	0.2 mL/min
カラム温度	40 °C
注入量	50 μL
試料溶媒	5 %メタノール/95 %5 mM酢酸アンモニウム
グラジエント	右図
分析時間	34 分
MS	Ultivo Triple Quadrupole LC/MS System
イオン源	Agilent Jet Stream(AJS)
測定モード	Dynamic MRM (dMRM)
乾燥ガス	350 °C 10L/min
シースガス	400 °C 12 L/min
ネブライザ圧	50 psi
キャピラリ電圧	4000 V
ノズル電圧	0 V

表2. 各化合物のMRM条件

No	マイコトキシン	プリカーサー	プロダクト		コリジョンエネルギー		極性
			定量	確認	定量	確認	
1	ニバレノール(NIV)	371	281	59	0	10	負
2	デオキシニバレノール(DON)	297	175	249	15	5	正
3	フザレンX(FUX)	355	175	137	35	15	正
4	ネオソラニオール(NEO)	400	215	185	15	25	正
5	15-アセチルDON(15-AcDON)	339	231	43	10	40	正
6	3-アセチルDON(3-AcDON)	339	137	261	10	10	正
7	ジアセトキシシルベノール(DAS)	384	307	199	5	15	正
8	HT-2トキシシン(HT-2)	442	263	215	5	5	正
9	T-2トキシシン(T-2)	484	305	215	5	15	正
10	ゼアラレノン(ZEN)	317	131	273	25	15	負

試料

カビ毒混合標準液は各カビ毒メタノール溶液(1000 ppm)を混合した後、希釈液として5 %メタノール/95 %5mM酢酸アンモニウム溶液を用いて各濃度に調製しました。ハトムギ加工品(表3)は5 gを秤量し、50 mLの80 %アセトニトリル水溶液で日本精機製作所製エースホモジナイザーAM3により5分間抽出しました。粗抽出液はAgilent Technologies製 Captiva EMR-Lipid (3 mL/300 mg, P/N:5190-1003)及びBond Elut Mycotoxin Jr(500 mg, P/N:12165001B)を連結したミニカラムを用いて図1の通り精製を行い、分析試料としました。

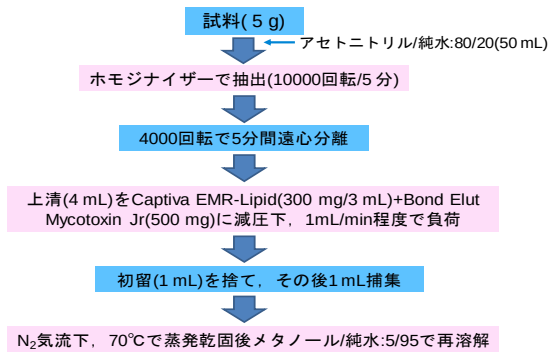


図 1. 試料精製法

表3. ハトムギ加工品

	種類	原産	性状	
A	ハトムギ酵素処理エキス	国産	固体	粉末
B	ハトムギ酵素処理エキス	国産	固体	錠剤
C	ハトムギエキス	国産	液体	カプセル
D	ハトムギエキス	タイ産	液体	カプセル
E	発芽ハトムギ酵素処理エキス	不明	固体	粉末
F	ハトムギエキス	タイ産	固体	粉末
G	ハトムギ酵素処理エキス	国産	液体	パウチ

結果

標準液

確立した分析法の感度、直線性及び再現性を確認しました。図2に1 ppb標準液のMRMクロマトグラム、表4にPeak to PeakのS/N, 決定係数及び相対標準偏差を示しました。

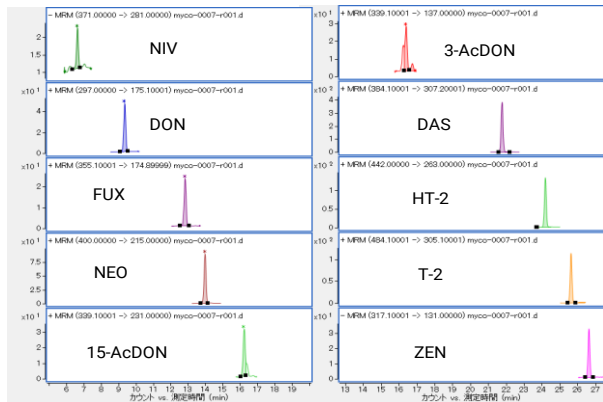


図2. 各カビ毒標準液のMRMクロマトグラム(1 ppb)

表4. 各カビ毒の感度、直線性及び再現性

No	マイコトキシン	S/N	検出限界	決定係数	再現性(n=5)
		0.1 ppb	S/N=3ppb	0.1 ~ 50 ppb	1ppb
1	ニバレノール(NIV)	18*	0.167	0.9984	9.76
2	デオキシニバレノール(DON)	95	0.003	0.9994	1.69
3	フザレンX(FUX)	18	0.017	0.9997	2.69
4	ネオソラニオール(NEO)	88	0.003	0.9998	1.34
5	15-アセチルDON(15-AcDON)	13	0.023	0.9992	3.94
6	3-アセチルDON(3-AcDON)	16	0.019	0.9996	1.94
7	ジアセトキシシルベノール(DAS)	323	0.001	0.9994	1.07
8	HT-2トキシシン(HT-2)	93	0.003	0.9990	3.04
9	T-2トキシシン(T-2)	170	0.002	0.9991	5.84
10	ゼアラレノン(ZEN)	71	0.004	0.9997	3.21

*: 10ppb

結果は検出限界(S/N=3)が0.001~0.167 ppb, 0.1~50 ppbの範囲で各カビ毒の決定係数が0.998以上と良好でした。また、1 ppbによる再現性が相対標準偏差で1.34~9.76 %と良好な結果でした。

ミニカラムによる回収率

今回、試料精製にCaptiva EMR-Lipid(脂質除去)とBond Elut Mycotoxin Jr(極性化合物除去)を使用しました。これらミニカラムによる各カビ毒の溶出プロファイルは図3に示しましたが、80 %アセトニトリル溶液を用いる事で初留(1 mL)は高極性化合物の回収率が低かったものの、1 mL以降は回収率は良好でした。従って捕集は初留(1 mL)を捨てた後、1 mL捕集しました。

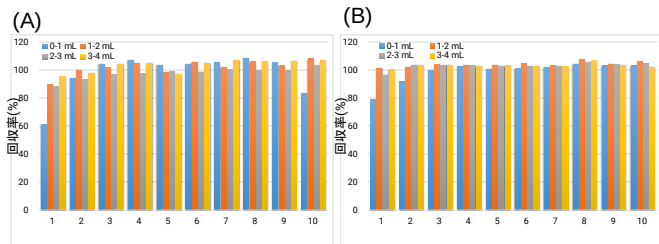


図3. 各カビ毒の溶出プロファイル
(A): Captiva EMR-Lipid (B): Bond Elut Mycotoxin Jr

マトリックス除去及びイオン化阻害

ハトムギ加工品抽出液の精製効果を確認するため試料Aの粗抽出液及び各画分のScanモードによるトータルイオンクロマトグラムを図4に示しました。

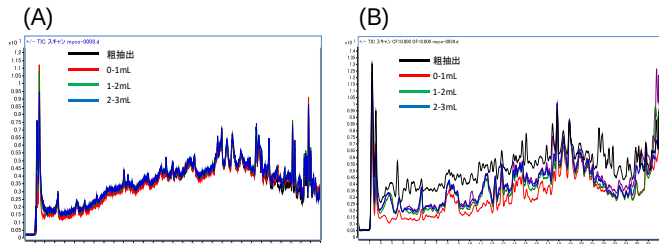


図4. 試料Aの粗抽出液及び各画分のTIC
(A): Captiva EMR-Lipid (B): Bond Elut Mycotoxin Jr

結果、Captiva EMR-Lipid(A)はクロマトグラムの有意差はありませんでした。一方、Bond Elut Mycotoxin Jr(B)は粗抽出液と比較して各画分でマトリックスが顕著に低下していました。前者は脂質除去が目的のミニカラムである為、カビ毒の分析に対して脂質の影響が顕著でなかったと考えられます。

そこで、Bond Elut Mycotoxin Jrで処理した画分のイオン化阻害を確認するために各画分にカビ毒標準液を添加し測定した際の標準液との相対強度を図5に示しました。

結果、粗抽出液と比較してデオキシニバレノール及びアセチルデオキシニバレノールのイオン化阻害が顕著に改善しました。1-2mL画分の各カビ毒の標準液との相対強度は約80%以上でした。

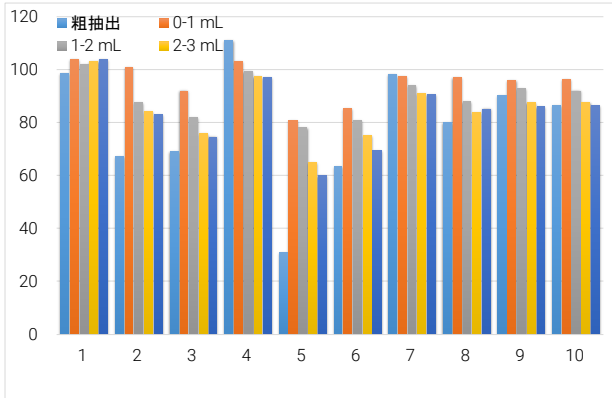


図5. 各カビ毒のイオン化阻害(濃度:100 ppb)

一方、Captiva EMR-Lipidによる処理は各カビ毒のイオン化阻害の低減には効果ありませんでしたが、脂質類(ジグリセライド、トリグリセライド)は90%以上除去が可能でした。従って、今回の様に溶出の早いカビ毒のピーク形状を改善させるため精製液を蒸発乾固後、5%メタノール/95%純水で再溶解した場合、再溶解液の白濁化を抑えることができ脂溶性の高いカビ毒の回収率は低下しませんでした。

以上の結果、両ミニカラムが必要な事から直接連結が可能なBond Elut Mycotoxin JrをCaptiva EMR-Lipidに直接連結し図1に示した処理を行いました。各試料中の回収率は表5に示しましたが回収率、再現性共に良好でした。

表5. 試料中各カビ毒の添加回収率

No	マイコトキシン	A	B	C	D	E	F	G
1	ニバレノール(NIV)	98(6.5)	97(7.8)	97(6.4)	93(4.5)	92(3.9)	94(5.9)	98(6.2)
2	デオキシニバレノール(DON)	101(4.2)	103(6.1)	95(6.9)	93(8.1)	104(5.1)	101(3.7)	93(4.8)
3	フザレンオン(FUX)	93(5.5)	91(4.7)	93(7.1)	98(3.7)	93(6.7)	90(7.1)	95(4.9)
4	ネオソラニオール(NEO)	89(5.1)	97(6.4)	95(8.1)	91(3.8)	89(4.7)	93(5.5)	97(4.8)
5	15-アセチルDON(15-AcDON)	74(5.1)	84(7.4)	81(6.1)	79(6.1)	77(5.7)	84(6.7)	76(7.1)
6	3-アセチルDON(15-AcDON)	81(6.1)	77(3.9)	76(3.7)	84(7.4)	83(5.7)	79(4.9)	84(6.4)
7	ジアセチルシシルペノール(DAS)	95(6.1)	93(7.4)	89(6.4)	95(6.7)	91(4.8)	96(3.7)	94(6.7)
8	HT-2トキシシン(HT-2)	101(8.4)	103(7.1)	92(6.7)	99(6.3)	95(7.8)	93(4.9)	95(5.9)
9	T-2トキシシン(T-2)	94(4.9)	88(6.7)	93(4.8)	102(7.1)	94(6.8)	87(5.3)	104(6.7)
10	ゼアラレノン(ZEN)	102(6.8)	104(5.8)	97(6.7)	103(4.9)	107(7.3)	102(5.9)	104(6.2)

添加濃度:100 ppb (n=3,相対標準偏差)

ハトムギ加工品

ハトムギ加工品(A)のMRMクロマトグラムは図6、各試料中のカビ毒の定量値は表6に示しました。全試料共にニバレノールが高い値を示し、試料Dは全てのカビ毒で高値を示しました。

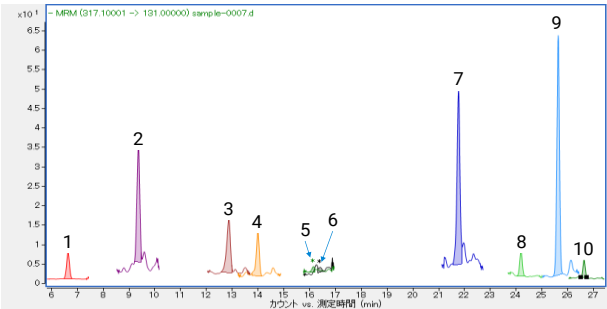


図6. ハトムギ加工品(A)のMRMクロマトグラム

表 6. ハトムギ加工品中各カビ毒の定量値

No	マイコトキシン	A	B	C	D	E	F	G
1	ニバレノール(NIV)	56.5	59.3	21.6	97.4	4.9	27.8	25.9
2	デオキシニバレノール(DON)	3.3	7.7	1.8	32.0	15.7	3.6	4.0
3	フザレノンX(FUX)	6.3	8.0	2.7	40.6	17.1	6.4	1.6
4	ネオソラニオール(NEO)	0.2	1.1	1.7	1.8	0.9	3.0	0.1
5	15-アセチルDON(15-AcDON)	ND	0.5	1.5	2.9	0.8	2.6	0.5
6	3-アセチルDON(15-AcDON)	ND	ND	1.8	2.0	3.1	2.9	ND
7	ジアセトキシシシルベノール(DAS)	0.2	1.1	4.3	1.5	0.4	6.5	0.2
8	HT-2トキシン(HT-2)	ND	ND	ND	0.5	0.7	0.1	ND
9	T-2トキシン(T-2)	4.3	5.0	3.0	9.7	7.7	6.1	2.0
10	ゼアラレノン(ZEN)	1.5	1.3	21.6	5.8	1.8	45.3	1.4

濃度単位:ppb

まとめ

Captiva EMR-Lipid(A)とBond Elut Mycotoxin Jr(B)を連結したミニカラムによる試料精製とUltivoトリプル四重極LC/MSを用いることで、ハトムギ加工品中トリコテセン系カビ毒とゼアラレノンの一斉分析が可能となりました。また、今回確立した分析法で市販のハトムギ加工品を測定したところ、穀類に暫定基準値(1.1ppm)が設定されているデオキシニバレノールも暫定基準値以下でした。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

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

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2019

LC-MS-201906TK-001