

蜂蜜中の米シロップの特別なマーカー (SMR) の検出と評価

Agilent 1260 Infinity II LC システムおよび
Ultivo トリプル四重極 LC/MS



著者

Saikat Bhattacharya,
Vikrant Goel, Saikat Banerjee,
and Nitin Vig
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、Agilent 1260 Infinity II LC システムを Agilent Ultivo トリプル四重極 LC/MS (LC/TQ) と組み合わせることにより、蜂蜜サンプル中に含まれる低ナノグラム量の 2-AFGP を分析できることを実証します。このメソッドは、コンパクトな形状ながらも、比類ない分析結果が得られる Ultivo LC/TQ で開発しました。このメソッドは、食品産業における蜂蜜の製造、加工、および商用試験時のルーチン分析のほか、学術的研究目的にも最適です。シンプルな液液抽出法 (LLE) ベースのサンプル前処理を用いて、マトリックス中の定量下限 (LOQ) の 0.005 mg/kg の 2-AFGP を適切に定量できます。

はじめに

蜂蜜はミツバチが採集して貯蔵する香りがよく栄養価の高い食品であり、抗酸化性、抗菌性、抗炎症性の特性を持つため、広く消費されています。ただし、比較的高価で生産が限定されており組成も複雑であることから、偽和物混入に対して脆弱であり、結果として消費者やメーカーに悪影響を与えてしまいます。最も一般的な蜂蜜への偽和物混入は、純粋蜂蜜への米シロップの添加など、シュガーシロップの添加によるものです。さらに、収量と利益率を増大させるためにミツバチにシュガーシロップを与えると、間接的に蜂蜜に偽和物が混入してしまいます。



図 1. 蜂蜜

AFGP (2-アセチルフラン-3-グルコピラノシド) は米シロップの特別なマーカーであり、SMRとも呼ばれています。このマーカーは他のシュガーマーカーと同様に、安定炭素同位体比、パルスドアンペロメトリ検出、LC-IRMS (液体クロマトグラフィー /同位体比質量分析)、赤外線分光分析 (IR)、TLC、GC/MS、およびNMR を使用して検出できます。ただし、このような従来のメソッドは時間と労力がかかるか、または場合によっては矛盾する結果や偽陽性が生じてしまいます。

トリプル四重極 LC/MS システムは、蜂蜜中の汚染物質および混和物の明確な確認に関して、米国、EU、FSSAI、およびその他の国のガイドラインに準拠した標準分析法です。Ultivo LC/TQ は、このアプリケーションで使用されているトリプル四重極 LC/MS システムの画期的技術であり、得られる感度は食品規制機関が規定する安全限界を上回っています。

実験条件

今回の実験では、アセトニトリル (Honeywell、LC/MS 34967)、メタノール (Honeywell、LC/MS 34966)、純水 (Millipore)、ギ酸 (Honeywell、LC/MS 56302)、2-アセチルフラン-3-グルコピラノシド (TRC Canada、p/n G596874)、および Agilent 0.2 μm PVDF シリンジフィルタ (p/n 5191-5924) を使用しました。原液はメタノールで前処理し、2-AFGP の作業希釈液は純水で前処理しました。

抽出

サンプル前処理では 1g の蜂蜜を使用しました。ステップは、希釈液として純水を使用する希釈、遠心分離、ろ過後の上澄みの LC/MS への注入でした (最小限のコストの抽出を実現するため)。詳細なプロトコルを図 2 に示しています。

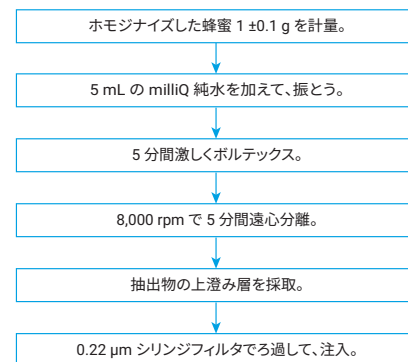


図 2. LLE ベースのサンプル前処理

装置構成

今回の実験で使用した機器は、Agilent 1260 Infinity II クォータナリポンプ (G7104C)、Agilent 1260 Infinity II バイアルサンプラ (G7129C)、Agilent 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116A)、Ultivo LC/TQ と AJS イオン源 (G6465B) でした。LC および MS のパラメータを表 1 と表 2 に示します。

表 1. HPLC グラジエントメソッド

| パラメータ | 設定値 |
|-----------|---|
| カラム | Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 150 mm、4 μm |
| 移動相 | 水 (0.1 % FA) : アセトニトリル (0.1 % FA)、500 $\mu\text{L}/\text{min}$ |
| 注入量 | 2 μL |
| カラム温度 | 40 °C |
| グラジエント | 時間 (分) 水 (0.1 % FA) アセトニトリル (0.1 % FA) |
| | 0.0 98 2 |
| | 5.0 98 2 |
| | 8.0 90 10 |
| | 10.0 5 95 |
| | 12.0 5 95 |
| 12.1 98 2 | |

表 2. Ultivo LC/TQ の条件

| パラメータ | 設定値 | |
|----------|-------------------|--------|
| イオン化モード | AJS (+ve) | |
| ネブライザガス | 50 psi | |
| 乾燥ガス | 300 °C で 10 L/min | |
| シースガス | 300 °C で 11 L/min | |
| キャピラリー電圧 | 4,000 V | |
| ノズル電圧 | 1,500 V | |
| フラグメンタ電圧 | 80 V | |
| ドウェルタイム | 100 ms | |
| 分解能 | Unit/Unit | |
| 分析対象物 | MRM トランジション | CE (V) |
| 2-AFGP | 311.1/185 | 9 |
| 2-AFGP | 311.1/148.9 | 13 |

結果と考察

SMR は、ブランク抽出の蜂蜜と比較した 0.05 mg/kg (50 ppb) レベルでのプレスパイク SMR の MRM で見られるように簡単に検出される成分です (図 3)。Ultivo LC/TQ を使用したメソッドの LOQ は、インドの食品安全性ガイドライン (FSSAI) に従った目的の最低濃度の検出量として、1 mg/kg に対して 0.005 mg/kg と特徴づけられました。さらに、図 4 に示すとおり、蜂蜜にさまざまな濃度の SMR を注入した場合に再現可能な溶出プロファイルが得られました。

キャリブレーション、RSD、回収率

定量イオンとして 148.9 および定性イオンとして 185.0 を使用して濃度範囲 0.005 ~ 0.25 mg/kg において、蜂蜜中の事前抽出 SMR の検量線の直線性をプロットしました。堅牢性を評価するために、低および高それぞれの QC レベルで 6 回の繰り返し分析を実施しました。図 5 に示すように、両方の QC レベルでの RSD (%CV) は < 10 % で、回収率は 70 ~ 120 % の範囲内でした。SANTE2019 の規制内容に従って、定量イオン、定性イオン、イオン比を含むキャリブレーションテーブルのスクリーンショットを図 6 に示します。

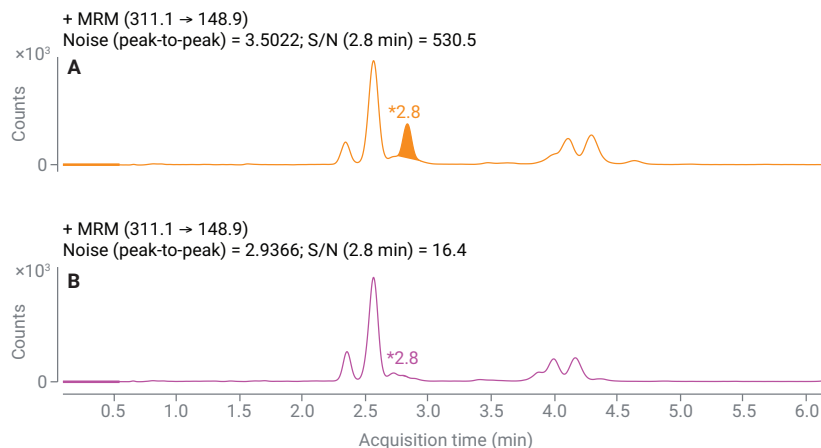


図 3. Agilent Ultivo LC/TQ での SMR レスポンス (ブランクと 0.05 mg/kg の比較)

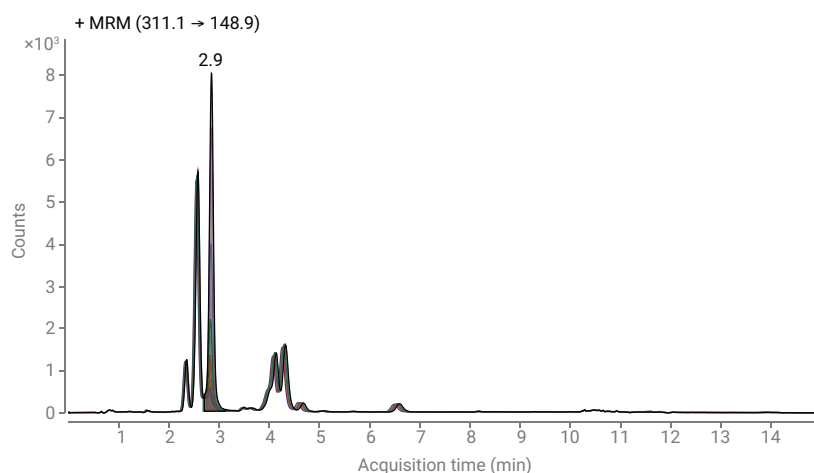


図 4. 2.9 分でのさまざまな濃度の SMR の重ね表示

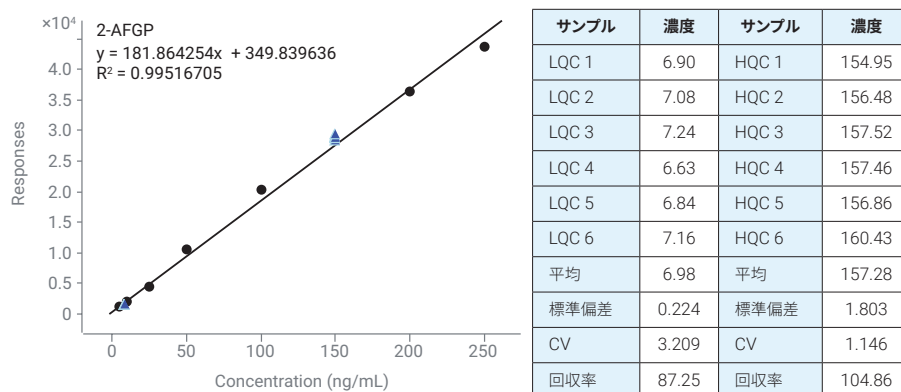


図 5. 5 ~ 250 ppb の直線性プロット ($R^2 = 0.9952$) および QC レベルでの回収率計算値

さまざまな蜂蜜サンプル中の SMR の定量

このメソッドではさまざまな蜂蜜サンプルを用いました。開発した手法に従って、すべてのサンプルを抽出して分析しました。最初のサンプルを純水中で 5 回希釈し、希釈係数を 5 とし得られた値を報告しました。合計 10 種類のサンプルの中で、3 種類に SMR が含まれていることがわかりました。陽性のサンプルのうち 2 種類にはキャリブレーション範囲より高い SMR が検出されましたが、残りのサンプルでは SMR が存在しないか、またはキャリブレーション範囲より低い値でした。10 種類のサンプルすべての定量データを図 6 に示します。図 7 に、ブランクの蜂蜜、SMR スパイクした蜂蜜、SMR が陰性のサンプル、および SMR が陽性のサンプルの定性および定量イオン MRM クロマトグラムプロファイルを示します。

| Sample | | | | 2-AFGP... | | 2-AFGP Results | | | | Qualifier... | |
|--------------------|-------------|-------|----------------------|------------|------|----------------|-------------------------------------|-------------|----------|--------------|-------------------------------------|
| Data File | Type | Level | Acq. Date-Time | Exp. Conc. | RT | Resp. | MI | Calc. Conc. | Accuracy | Ratio | MI |
| MATRIX_BLANK_3.d | MatrixBlank | | 5/17/2021 6:10 PM | | 2.85 | 77.0 | <input checked="" type="checkbox"/> | 0.00 | | 238.0 | <input checked="" type="checkbox"/> |
| MATRIX_5PPB.d | Cal | 1 | 5/17/2021 6:26 PM | 5 | 2.81 | 1205.0 | <input type="checkbox"/> | 4.70 | 94.0 | 58.6 | <input type="checkbox"/> |
| MATRIX_10PPB.d | Cal | 2 | 5/17/2021 6:42 PM | 10 | 2.82 | 2102.0 | <input type="checkbox"/> | 9.63 | 96.3 | 89.0 | <input type="checkbox"/> |
| MATRIX_25PPB.d | Cal | 3 | 5/17/2021 6:57 PM | 25 | 2.82 | 4570.0 | <input type="checkbox"/> | 23.21 | 92.8 | 77.8 | <input type="checkbox"/> |
| MATRIX_50PPB.d | Cal | 4 | 5/17/2021 7:13 PM | 50 | 2.83 | 10595.0 | <input type="checkbox"/> | 56.33 | 112.7 | 73.6 | <input type="checkbox"/> |
| MATRIX_100PPB.d | Cal | 5 | 5/17/2021 7:29 PM | 100 | 2.84 | 20323.0 | <input type="checkbox"/> | 109.82 | 109.8 | 68.4 | <input type="checkbox"/> |
| MATRIX_200PPB.d | Cal | 6 | 5/17/2021 7:44 PM | 200 | 2.85 | 36321.0 | <input type="checkbox"/> | 197.79 | 98.9 | 66.7 | <input type="checkbox"/> |
| MATRIX_250PPB.d | Cal | 7 | 5/17/2021 8:00 PM | 250 | 2.85 | 43726.0 | <input type="checkbox"/> | 238.51 | 95.4 | 66.4 | <input type="checkbox"/> |
| LQC_1.d | QC | 8 | 5/17/2021 8:16 PM | 8 | 2.86 | 1604.0 | <input type="checkbox"/> | 6.90 | 86.2 | 106.7 | <input type="checkbox"/> |
| LQC_2.d | QC | 8 | 5/17/2021 8:31 PM | 8 | 2.86 | 1637.0 | <input type="checkbox"/> | 7.08 | 88.5 | 104.3 | <input type="checkbox"/> |
| LQC_3.d | QC | 8 | 5/17/2021 8:47 PM | 8 | 2.86 | 1667.0 | <input type="checkbox"/> | 7.24 | 90.5 | 96.8 | <input type="checkbox"/> |
| LQC_4.d | QC | 8 | 5/17/2021 9:03 PM | 8 | 2.87 | 1556.0 | <input type="checkbox"/> | 6.63 | 82.9 | 105.7 | <input type="checkbox"/> |
| LQC_5.d | QC | 8 | 5/17/2021 9:18 PM | 8 | 2.87 | 1599.0 | <input type="checkbox"/> | 6.87 | 85.9 | 102.2 | <input type="checkbox"/> |
| LQC_6.d | QC | 8 | 5/17/2021 9:34 PM | 8 | 2.87 | 1652.0 | <input type="checkbox"/> | 7.16 | 89.5 | 98.5 | <input type="checkbox"/> |
| HQC_1.d | QC | 9 | 5/17/2021 9:50 PM | 150 | 2.87 | 28529.0 | <input type="checkbox"/> | 154.95 | 103.3 | 67.8 | <input type="checkbox"/> |
| HQC_2.d | QC | 9 | 5/17/2021 10:05 P... | 150 | 2.88 | 28808.0 | <input type="checkbox"/> | 156.48 | 104.3 | 67.4 | <input type="checkbox"/> |
| HQC_3.d | QC | 9 | 5/17/2021 10:21 P... | 150 | 2.87 | 28998.0 | <input type="checkbox"/> | 157.52 | 105.0 | 68.2 | <input type="checkbox"/> |
| HQC_4.d | QC | 9 | 5/17/2021 10:37 P... | 150 | 2.88 | 28986.0 | <input type="checkbox"/> | 157.46 | 105.0 | 67.8 | <input type="checkbox"/> |
| HQC_5.d | QC | 9 | 5/17/2021 10:52 P... | 150 | 2.87 | 28877.0 | <input type="checkbox"/> | 156.86 | 104.6 | 67.7 | <input type="checkbox"/> |
| HQC_6.d | QC | 9 | 5/17/2021 11:08 P... | 150 | 2.88 | 29527.0 | <input type="checkbox"/> | 160.43 | 107.0 | 67.3 | <input type="checkbox"/> |
| ▶ MATRIX_BLANK_4.d | MatrixBlank | | 5/17/2021 11:24 P... | | 2.77 | 355.0 | <input type="checkbox"/> | 0.03 | | 90.1 | <input type="checkbox"/> |
| Sample_V_13.d | Sample | | 5/17/2021 11:40 P... | | 2.78 | 746.0 | <input type="checkbox"/> | 2.18 | | 84.2 | <input type="checkbox"/> |
| Sample_V_14.d | Sample | | 5/17/2021 11:55 P... | | 2.77 | 616.0 | <input type="checkbox"/> | 1.46 | | 95.1 | <input type="checkbox"/> |
| Sample_V_15.d | Sample | | 5/18/2021 12:11 A... | | 2.77 | 429.0 | <input type="checkbox"/> | 0.44 | | 89.5 | <input type="checkbox"/> |
| Sample_V_16.d | Sample | | 5/18/2021 12:27 A... | | 2.78 | 481.0 | <input type="checkbox"/> | 0.72 | | 80.0 | <input type="checkbox"/> |
| Sample_V_245.d | Sample | | 5/18/2021 12:42 A... | | 2.77 | 152.0 | <input type="checkbox"/> | 0.00 | | 119.7 | <input type="checkbox"/> |
| Sample_K_231.d | Sample | | 5/18/2021 12:58 A... | | 2.76 | 202.0 | <input type="checkbox"/> | 0.00 | | 55.9 | <input type="checkbox"/> |
| Sample_K_198.d | Sample | | 5/18/2021 1:14 AM | | 2.86 | 79206.0 | <input type="checkbox"/> | 433.60 | | 62.2 | <input type="checkbox"/> |
| Sample_J_215.d | Sample | | 5/18/2021 1:29 AM | | 2.86 | 13160.0 | <input type="checkbox"/> | 70.44 | | 68.3 | <input type="checkbox"/> |
| Sample_J_221.d | Sample | | 5/18/2021 1:45 AM | | 2.87 | 49042.0 | <input type="checkbox"/> | 267.74 | | 63.7 | <input type="checkbox"/> |
| Sample_N_5390.d | Sample | | 5/18/2021 2:01 AM | | 2.76 | 228.0 | <input type="checkbox"/> | 0.00 | | 81.6 | <input type="checkbox"/> |
| MATRIX_BLANK_5.d | Sample | | 5/18/2021 2:16 AM | | 2.78 | 335.0 | <input type="checkbox"/> | 0.00 | | 91.9 | <input type="checkbox"/> |

図 6. 5 ~ 250 ppb (0.005 ~ 0.25 mg/kg) の蜂蜜中の SMR のキャリブレーションテーブル

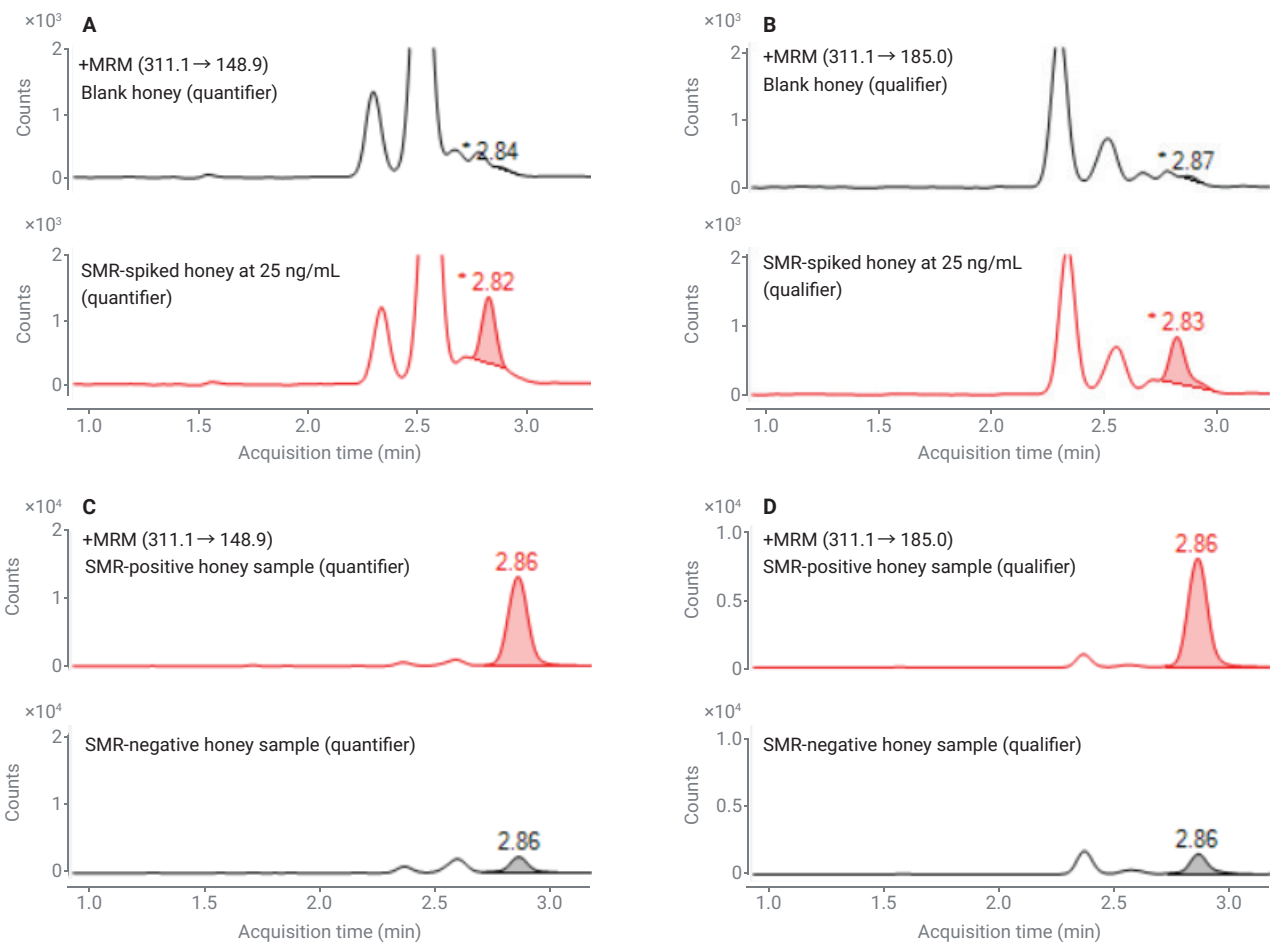


図 7. (A) ブランクマトリックス中の SMR と 25 ng/mL での蜂蜜中の SMR の比較における MRM 定量イオンプロファイル。(B) ブランクマトリックス中の SMR と 25 ng/mL での蜂蜜中の SMR の比較における MRM 定性イオンプロファイル。(C) 蜂蜜中の SMR の MRM 定量イオン、陽性サンプルと陰性サンプルの MRM 定量イオンプロファイルの比較。(D) 蜂蜜中の SMR の MRM 定性イオン、陽性サンプルと陰性サンプルの MRM 定量イオンプロファイルの比較。

結論

厳格なバリデーションアプローチを使用することにより、このアプリケーションノートで説明したメソッドの LOQ は、蜂蜜中の SMR に対して FSSAI 規格の 200 分の 1 になっています。2 つの QC レベルの 6 回の繰り返し分析では、%CV 値は 5 % より小さく、QC レベルでの % 回収率は 70 ~ 120 % の範囲内です。つまり、Ultivo LC/TQ システムを 1260 Infinity II と組み合わせて使用することにより、EU 規格に従って実際の蜂蜜サンプル中の SMR を適切に分析できます。サンプル前処理メソッドでは、簡単かつ高速でコスト効率の高いステップを使用した、希釈-注入の LLE ベースのプロトコルを規定しています。

参考文献

1. Bing, D. et al. Rapid Screening of Multiclass Syrup Adulterants in Honey by Ultrahigh-performance Liquid Chromatography/Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2015**, 63, 6614–6623. DOI: [10.1021/acs.jafc.5b01410](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01410).
2. SeKW, Wahab R. A., Syed Yaacob S. N., Ghoshal S. K. Detection Techniques for Adulterants in Honey: Challenges and Recent Trends. *Journal of Food Composition and Analysis* **2019**, 80, 16–32. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.04.001>
3. Food Safety and Standards Authority of India File no. 11023/53/2018-QA. Method of detection of 2-Acetylfuran-3-Glucopyranoside (2-AFGP)/3-O- α -D-Glucosyl Isomaltol, the Specific Marker for Rice Syrup (SMR) by LC-MS/MS.
4. SANTE/12682/2019; EURL | Residues of Pesticides | Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed (eurl-pesticides.eu)

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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。

DE44419.4764583333

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2021

Printed in Japan, October 1, 2021

5994-4155JAJP