

異なるサンプル前処理手法を用いた 小麦中トリコテセンおよび ゼアラレノンの LC/MS/MS 分析

アプリケーションノート

食品試験・農業

著者

Nick Byrd、Danielle Sweeney
Campden BRI
Gloucestershire
UK

Thomas Glauner
Agilent Technologies, Inc.,
Waldbronn
Germany

概要

LC/MS/MS 分析のサンプル前処理に QuEChERS (キャッチャーズ) と Agilent Bond Elut Mycotoxin SPE を使えば、トリコテセンとゼアラレノンの検出において、優れた分析結果が得られます。吸着剤キャパシティの大きい Bond Elut Mycotoxin SPE カートリッジでは、クリーンな抽出が実現し、LOD と LOQ が若干ながら向上します。一方、QuEChERS メソッドでは、サンプル前処理に必要な所要時間が大幅に短縮され、溶媒や吸着剤の消費量も大幅に減少します。どちらのサンプル前処理アプローチでも、すべてのマイコトキシンで優れた直線性が得られました ($R^2 \geq 0.995$)。添加小麦サンプル (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $n = 9$) での回収率は 72~105% ($\text{CV} \geq 11\%$) で、マイコトキシンのサンプル精製手法として広く認識されている、免疫アフィニティ法に匹敵しました。この例では、2つのサンプル前処理手順を使用しました。この手順を Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS の優れた性能と組み合わせれば、規制管理要件に応じた感度を満たすデータを生成しながら、分析コストを削減することが可能です。



Agilent Technologies

はじめに

マイコトキシンは、複数種の菌が産生する毒性のある二次代謝産物です。なかでも重要な菌は、温暖な地域に生育する小麦、トウモロコシ、大麦、オートムギなどの穀類において特に蔓延するフサリウム属種です。菌に感染すると、多くの場合は穀物の収穫量が減りますが、感染する菌種によっては、トリコテセンと呼ばれる類のマイコトキシンが形成されることがあります。現在、150種類以上のトリコテセンが確認されています。もっとも広く見られるトリコテセンはデオキシニバレノールですが、ニバレノール、フサレノン X、ネオソラニオール、3- および 15-アセチルデオキシニバレノール、ジアセトキシシルペノール (DAS)、T-2 トキシン、HT-2 トキシンなどの他のトリコテセンも存在することが、複数の調査により明らかになっています。これらの物質はタイプ A および B トリコテセンに属し、同じ基本化学構造を共有しています。ゼアラレノンはトリコテセンではありませんが、トリコテセンと同じく多くのフサリウム属種により形成される物質です。

トリコテセンを摂取すると、動物や人体の健康に悪影響が出るおそれがあります。トリコテセンは、食物の拒絶、皮膚炎、嘔吐、下痢といった中毒症状の原因となることがあります。また、タンパク質や DNA の合成を阻害する可能性もあり、免疫抑制活性も備えています。EU 委員会規則 No 1881/2006 では、穀類を用いた幅広い未加工食品および加工食品に含まれるデオキシニバレノールについて、最大許容限度が規定されています。加工食品の限度は、未加工食品よりも低く設定されています。これらの限度に対するコンプライアンスは、残留化学物質分析により確認されます。電子捕捉検出または質量分析検出を用いたガスクロマトグラフィーは、サンプル抽出物の誘導体化後のタイプ A および B トリコテセンの検出および定量に広く導入されています。最近では、LC/MS/MS により、タイプ A および B トリコテセンとゼアラレノンを同時に測定するメソッドが開発されています。

このアプリケーションノートでは、小麦中の 9 種類のトリコテセンおよびゼアラレノンの LC/MS/MS 検出において、2 つのサンプル前処理手順の性能を比較しました。

手法と結果

サンプル前処理手順として、QuEChERS 抽出および分散 SPE (d-SPE)、または Bond Elut Mycotoxin SPE カートリッジによるアセトニトリル/水抽出を使用しました (表 1)。

表 1. トリコテセンおよびゼアラレノンの分析における QuEChERS メソッドおよび Bond Elut Mycotoxin SPE メソッドのサンプル前処理手順

QuEChERS	Bond Elut Mycotoxin SPE メソッド
粉碎サンプル 5 g	粉碎サンプル 25 g
1. MeOH:ACN (85:15) 10 mL	1. H ₂ O:ACN (20:80) 100 mL
2. MgSO ₄ 4 g + NaCl 1 g	2. 1 時間振とう
3. 振とうおよび遠心分離	
2-mL を採取	8-mL を採取
1. MgSO ₄ 300 mg + PSA 100 mg	1. Bond Elut Mycotoxin
2. ボルテックスおよび 0.02- μ m メンブレンでろ過	2. 蒸発および H ₂ O:ACN (80:20) 1 mL に再溶解
3. 蒸発および H ₂ O:ACN (80:20) 1 mL に再溶解	3. 0.02- μ m メンブレンでろ過

QuEChERS メソッド

粉碎サンプルを含む各試験管にメタノール/ACN 溶媒を加え、ボルテックスしました。その後、MgSO₄ 4 g と NaCl 1 g を含む Agilent Bond Elut バッファなし抽出バケット (p/n 5982-5550) を加えました。試験管をよく振とうし、遠心分離しました。

上澄みの適量を、重量 1:3 の PSA/MgSO₄ が入った試験管に移しました。

2-mL のアリコートを用いる場合は、MgSO₄ 300 mg と PSA 100 mg を計量し、2-mL ブランク試験管を手動で前処理しました。その後のルーチン分析では、MgSO₄ 150 mg と PSA 50 mg を含む Bond Elut d-SPE チューブ (p/n 5982-5022) を使用できるようにするために、アリコートを 1 mL に減らしました。

Bond Elut Mycotoxin SPE メソッド

2 つ目のサンプル前処理メソッドでは、Bond Elut Mycotoxin SPE カートリッジ、500 mg、3 mL (p/n 12102167) を使用しました。抽出サンプルの適量に SPE カートリッジを適用しました。溶離液を採取し、蒸発させました。この SPE メソッドは非保持 SPE (スカベンジャー) メカニズムで、ESI-MS/MS 検出に干渉する可能性のあるマトリックス成分をサンプルから除去できます。

条件

HPLC 条件

カラム	Agilent ZORBAX Rapid Resolution HT Eclipse Plus C18、 2.1 x 100 mm、1.8 µm (p/n 959764-902)
機器	Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS、 Agilent 1290 Infinity LC システム
流速	0.25 mL/min
カラム温度	30 °C
注入量	10 µL
移動相	A: 水 + 0.2 % 酢酸、5 mM 酢酸アンモニウム B: メタノール + 0.2 % 酢酸、5 mM 酢酸アンモニウム

MS/MS 条件

表 2 に Agilent Jetstream パラメータを、表 3 に MS 条件を示しています。MRM 遷移と条件の最適化には、MassHunter Optimizer ソフトウェアを使用しました。Agilent Jet Stream パラメータは、分析に用いた移動相条件と流速をもとに最適化しました。

表 2. Agilent Jet Stream パラメータ

ESI および Agilent Jet Stream パラメータ、pos/neg 高速極性切り替え

乾燥ガス温度	200 °C
乾燥ガス流速	8 L/min
ネブライザ圧力	45 psi
シースガス温度	400 °C
シースガス流速	12 L/min
キャピラリ電圧	± 3,000 V
ノズル電圧	± 500 V
デルタ EMV	500 V
分解能	ユニット、ユニット

表 3. トリコテセンおよびゼアラレノン分析の MS 条件

マイコトキシ	フレカーサイオン	プロダクトイオン	フラグメンター	衝突エネルギー	極性
15-アセチル-デオキシニバレノール	356	321	95	5	ポジティブ
15-アセチル-デオキシニバレノール	356	137	95	8	ポジティブ
15-アセチル-デオキシニバレノール	339	137	105	12	ポジティブ
3-アセチル-デオキシニバレノール	397	337	95	4	ネガティブ
3-アセチル-デオキシニバレノール	397	59	95	20	ネガティブ
ジアセトキシシルベノール (DAS)	384	307	105	4	ポジティブ
ジアセトキシシルベノール (DAS)	384	247	105	6	ポジティブ
デオキシニバレノール (DON)	355	265	95	4	ネガティブ
デオキシニバレノール (DON)	355	59	95	20	ネガティブ
フサレノン X	413	263	95	8	ネガティブ
フサレノン X	413	59	95	28	ネガティブ
HT-2 トキシ	442	263	105	4	ポジティブ
HT-2 トキシ	442	215	105	4	ポジティブ
ネオソラニオール	400	215	95	16	ポジティブ
ネオソラニオール	400	185	95	16	ポジティブ
ニバレノール	371	311	108	4	ネガティブ
ニバレノール	371	281	108	8	ネガティブ
ニバレノール	371	59	108	24	ネガティブ
T-2 トキシ	484	215	120	16	ポジティブ
T-2 トキシ	484	185	120	14	ポジティブ
ゼアラレノン	317	175	190	16	ネガティブ
ゼアラレノン	317	131	190	24	ネガティブ
ゼアラレノン	319	275	185	16	ネガティブ
ゼアラレノン	319	205	185	16	ネガティブ

このメソッドでは、高速スイッチングを用いて、最高の感度が得られるイオン化モードで各マイコトキシンを測定しました。タイムセグメンテーションを用いる、または用いないスタティック MRM か、ダイナミック MRM を使用すれば、それが可能になります。リテンションタイム幅が 1 分、サイクルタイムが 500 ms のダイナミック MRM を用いる場合、並列 MRM の最大

数は 12 で、最小ドウェルタイムは 31.5 ms、最大ドウェルタイムは 246.5 ms になります。500 ms というサイクルタイムにより、クロマトグラフィーピークで少なくとも 20 データポイント以上を採取でき、正確な定量が可能になります。小麦マトリックスに添加した 50 ppb のマイコトキシンのクロマトグラムを図 1 に示しています。

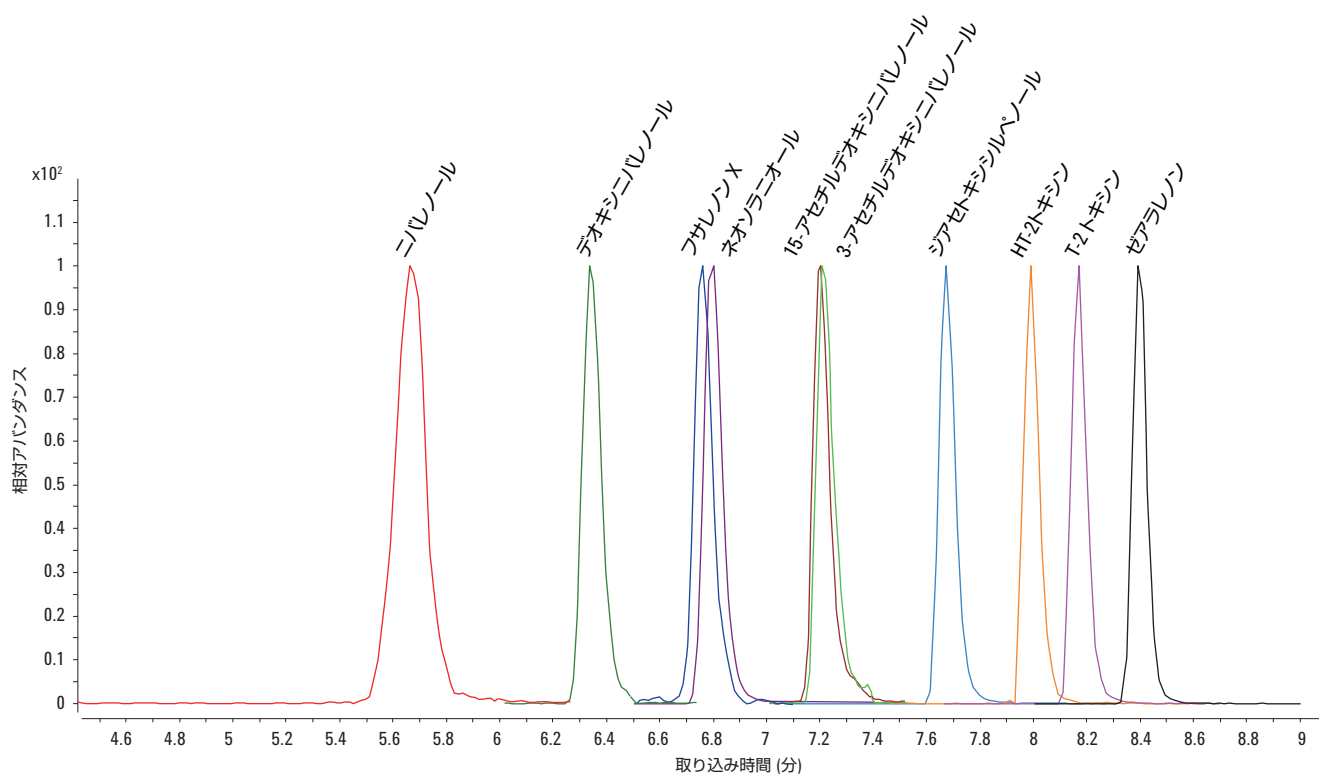


図 1. 50 ppb 小麦マトリックス標準: 1 次遷移の標準化クロマトグラム。このメソッドの場合、15-アセチルデオキシニバレノールと 3-アセチルデオキシニバレノールの異性体については、異なる質量分析極性での測定により識別されるため、クロマトグラフィーでの分離は必要ない点に注意してください

図 2 に、マトリックス適合キャリブレーション標準で得られた 3 種類のマイコトキシンの検量線と、対応するクロマトグラムを示しています。

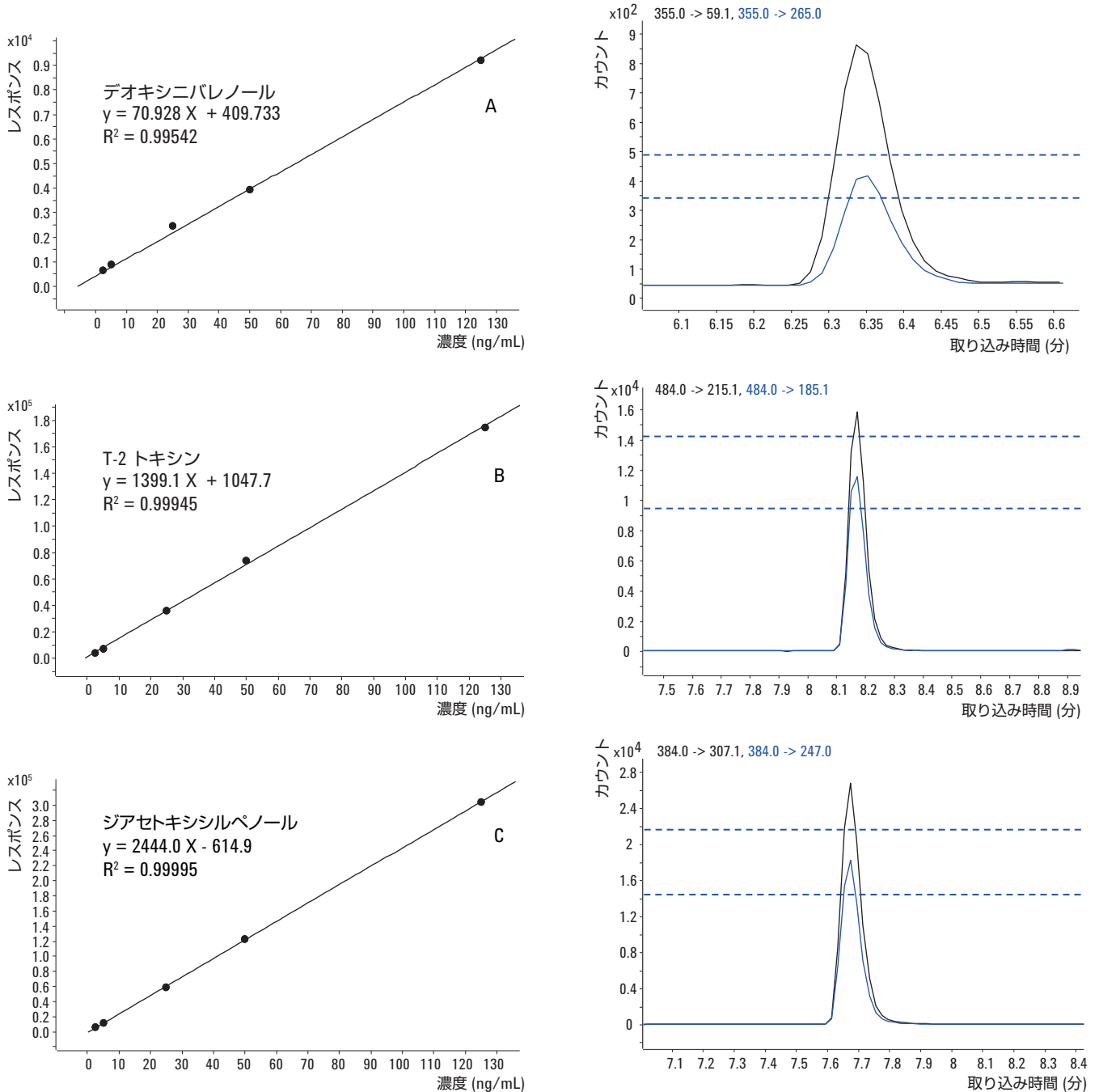


図 2. 検量線 (A) デオキシニバレノール、(B) T-2 トキシン、(C) ジアセトキシシルペノールと対応する各クロマトグラム

すべてのマイコトキシンについて優れた直線性が得られ ($R^2 \geq 0.995$)、添加小麦サンプル (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $n = 9$) の回収率は、すべての化合物およびいずれのサンプル前処理メソッドについても、72~105 % ($CV \leq 11$ %) の範囲内でした (表 4)。

分析対象物の感度は、いずれのサンプル前処理手法でも良好でしたが、吸着剤キャパシティの大きい Bond Elut Mycotoxin SPE

カートリッジによる精製では、よりクリーンな抽出物が得られ、LOD ($S/N > 3$) と LOQ ($S/N > 10$) がわずかに向上しました。すべてのマイコトキシンの最終抽出物における LOQ は、QuEChERS で 0.003 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ジアセトキシシルペノール) から 1.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ニバレノール) の範囲内、BE Mycotoxin SPE メソッドで 0.002 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ジアセトキシシルペノール) から 0.66 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (15-アセチルデオキシニバレノール) の範囲内でした (表 5)。

表 4. 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($n=9$) で小麦サンプルに添加した化合物における QuEChERS とカートリッジ SPE の回収率データの比較

化合物	リテンションタイム (分)	QuEChERS 回収率 (%)	QuEChERS RSD (%)	Bond Elut Mycotoxin SPE 回収率 (%)	Bond Elut Mycotoxin SPE RSD (%)
ニバレノール	5.6	73	7	93	11
デオキシニバレノール	6.4	85	8	84	11
フサレノン X	6.8	81	9	89	9
ネオソラニオール	6.8	94	9	77	9
15-アセチル デオキシニバレノール	7.2	88	9	72	10
3-アセチル デオキシニバレノール	7.2	100	9	92	11
ジアセトキシシルペノール	7.7	105	2	104	3
HT-2	8.0	83	8	99	4
T-2 トキシン	8.2	83	8	100	4
ゼアラレノン	8.4	87	8	79	9

表 5. 小麦サンプルにおけるトリコテセンおよびゼアラレノンの検出下限と定量下限

化合物	QuEChERS LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	QuEChERS LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Bond Elut Mycotoxin SPE LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Bond Elut Mycotoxin SPE LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
ニバレノール	0.31	1.04	0.07	0.24
デオキシニバレノール	0.04	0.12	0.04	0.12
フサレノン X	0.09	0.3	0.08	0.26
ネオソラニオール	0.13	0.4	0.03	0.1
15-アセチル デオキシニバレノール	0.2	0.66	0.2	0.66
3-アセチル デオキシニバレノール	0.1	0.34	0.1	0.33
ジアセトキシシルペノール	0.001	0.003	0.0006	0.002
HT-2	0.05	0.17	0.03	0.1
T-2 トキシン	0.01	0.04	0.006	0.02
ゼアラレノン	0.02	0.06	0.02	0.06

LOD = 検出下限 ($S/N > 3$)、LOQ = 定量下限 ($S/N > 10$)

結論

小麦サンプルに 9 種類のトリコテセンおよびゼアラレノン
50 µg/kg で添加しました。マトリックス適合標準に照らして定
量することで、サンプル抽出物のイオン抑制を制御しました。
QuEChERS と Bond Elut Mycotoxin SPE のいずれについても、優
れた感度が得られました。吸着剤キャパシティの大きい Bond
Elut mycotoxin SPE メソッドでは、よりクリーンな抽出物が得ら
れ、LOD と LOQ がわずかに向上しました。この 2 つのサンプル
前処理手法の回収率は、72~105 % でした。

一方、QuEChERS メソッドにも利点があります。前処理時間が大
幅に短縮できるため、サンプルスループットが大きく向上しま
す。また、使用する溶媒と吸着剤が大幅に少なくなるため、分析
コストの大幅な削減が可能です。

参考文献

1. F Berthiller, R. Schuhmacher, G. Buttinger, and R. Krska (2005)
Simultaneous determination of type A and B trichothecenes
along with zearalenone by high performance liquid
chromatography–tandem mass spectrometry. *Mycotoxin Res.*,
21(4): 237-240.
2. I. Sospedra, J. Blesa, J.M. Soriano, and J. Manes, (2010) Use
of the modified quick easy cheap effective rugged and safe
sample preparation approach for the simultaneous analysis of
type A- and B-trichothecenes in wheat flour. *J. Chrom. A*, 1217:
1437-1440.

詳細情報

本書には典型的なデータを記載しています。アジレント製品と
サービスの詳細については、アジレントのウェブサイト
www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

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。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc., 2012

Printed in Japan

February 2, 2012

5990-9107JAJP



Agilent Technologies