

UHPLC/MS/MS による アーモンド、ヘーゼルナッツ、 ピーナッツ、ピスタチオに含まれる マイコトキシンなど 191 種類の菌代 謝物のスクリーニングと定量

アプリケーションノート

著者

Elisabeth Varga、Franz Berthiller、
Rudolf Krska、Rainer Schuhmacher、
Michael Sulyok
Christian Doppler Laboratory for
Mycotoxin Metabolism and Center for
Analytical Chemistry, Department for
Agrobiotechnology (IFA-Tulln),
University of Natural Resources and
Life Sciences,
Vienna, Austria (BOKU)

Thomas Glauner
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany

概要

このアプリケーションノートでは、カビ毒であるマイコトキシンなど 191 種類の菌代謝物の測定、並びにアーモンド、ヘーゼルナッツ、ピーナッツ、およびピスタチオに使用されるマルチターゲットメソッドの開発とバリデーションについて説明します。このメソッドは、欧州連合で規制されているすべてのマイコトキシンの他、食品によく見られる多数のマイコトキシンにも対応します。このメソッドでは、まず、酸性のアセトニトリル/水混合液を使って単純な抽出を行い、続けてその抽出物を希釈してから、UHPLC/MS/MS で測定します。キャリブレーションはすべての化合物に対し、溶媒標準を使用しました。

さらに、このアプリケーションノートでは、4 種類のテストマトリックスで 65 種類の最重要マイコトキシンに対するバリデーションの一部を示します。このメソッドはピーナッツに含まれるエニアチン B3 を 0.04 µg/kg まで検知するなど優れた高感度と、大半の成分で標準偏差が 10 % 以下という優良な再現性を示しました。マトリックス成分の組み合わせの約 60 % で、70~120 % の添加回収率が得られました。回収率の低いケースでは、抽出回収率が低い (例: フモニシンなどの抽出) か、または初期のいくつかの溶出成分でマトリックス効果による感度低下が観察されました。数例でマトリックス効果による感度上昇が見られ、回収率の上昇につながりました。

このメソッドを、自然に汚染された殻果類のサンプルの分析に応用することにより、全部で 40 種類の菌代謝物を同定できました。興味深いことに、最も高い頻度で検出された毒は現在欧州連合で規制されている化合物ではなく、ボーベリシン、エニアチン B、およびマクロスポリンでした。最も汚染のひどかったヘーゼルナッツのサンプルには 26 種類の毒が含まれていました。すべての結果の詳細は Varga らの報告に記載されています [1]。



Agilent Technologies

はじめに

マイコトキシンは菌の二次代謝物で、ヒトや動物に急性または慢性の中毒作用をもたらします。耕作時や貯蔵中に菌のコロニー形成が発生すると、マイコトキシンは、穀物類、殻果類、果実、香辛料、コーヒーなどさまざまな飼料や食品に見られるようになります [2]。マイコトキシンはさまざまな化学物質群に属し、まったく異なる物理的性質を示します。これまでに同定された数百種類のマイコトキシンのうち、約 12 種類が健康上大きなリスクがあるとみなされ、食品および飼料において規制されています。欧州委員会規則 (EC) 1881/2006 およびその修正条項は、食品におけるアフラトキシン、デオキシニパレノール、フモニシン、オクラトキシン A、パツリン、およびゼアラレノンの最大基準値を定めています [3]。さらに、委員会の勧告 2013/165/EU には指標値が示されていますが、これを超えた場合、T-2 および HT-2 トキシンの存在につながる要因に対して調査を実行する必要があります [4]。このような化合物は、(例えば、国の食品安全機関による) 日常的監視プログラムの対象となっており、さまざまな食料品でのこれらマイコトキシン類の発生に関するデータが調査されています。シングルターゲットメソッドは、同時に発生するマイコトキシンを同時定量するための液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) をベースとするマルチターゲットメソッドに置き換えられています。この分析法の発展には、最新のトリプル四重極機器の性能向上、および Agilent Dynamic MRM 機能などのソフトウェアツールの進歩が寄与しており、これにより、分析者は多数のターゲット化合物を分析する高速メソッドをより簡単に開発および発展させることができます。

マルチターゲットメソッドには、さまざまな食品に由来する異なる物理的性質を持つ成分の効率的な抽出と、自然発生的な毒素濃度が大きな差を有するという 2 つの課題があります。マルチターゲットメソッドの大部分は、未処理の穀物類に含まれるマイコトキシンのスクリーニング用に開発されています [5]。殻果類など、その他のマトリックスにおけるマイコトキシン汚染に関する包括的な情報は不足しています [1]。

殻果類とは、硬い殻と種子から成る乾燥した果実です。植物学的には、真の殻果類とは非裂開性の種子を持つものを言います。食品的には、殻果類という用語の使い方はそれほど厳密ではなく、植物学的には核果であるアーモンドや、実際はマメ科の植物であるピーナッツも含まれています。このアプリケーションノートで調査する 4 種類のマトリックスすべて (アーモンド、ヘーゼルナッツ、ピーナッツ、およびピスタチオ) を殻果類と呼びます。田畑にある農産物はほとんどの場合、フザリウム属、アルテルナリア属、およびクラドスポリウム属の菌に感染するのに対し、貯蔵中においては、アスペルギルス属、ペニシリウム属、およびトリコデルマ属の菌の多くが腐敗が原因です [6]。現在、ほとんどのデータが殻果類でのア

フラトキシンおよびオクラトキシン A の発生に関するものです。そのほかのマイコトキシンによる汚染に関する情報は非常に限られています。

このアプリケーションノートでは、殻果類に含まれるマイコトキシンなど 191 種類の菌代謝物の定量に使用されるマルチターゲット UHPLC/MS/MS メソッドを説明します。このメソッドでは、酸性のアセトニトリル/水混合液を使って抽出を 1 回行い、その後、測定のためにこの未処理の抽出物を希釈します。メソッドパラメータは、アーモンド、ヘーゼルナッツ、ピーナッツ、およびピスタチオに含まれる 65 種類の最も重要な汚染物質についての具体例です。オーストリアおよびトルコ市場から入手したさまざまな殻果類に対してこのメソッドを適用しました。Varga らの報告 [1] は、本メソッドとそれにより得られた結果を詳しく説明しています。

実験手法

試薬、リファレンス化合物、および殻果類サンプル

すべての試薬と溶媒には、HPLC または LC/MS グレードのものを使用しました。アセトニトリル、メタノール、酢酸は VWR International (オーストリア、ウィーン) で、酢酸アンモニウムは Sigma-Aldrich (オーストリア、ウィーン) で購入したものです。超純水の製造には MilliQ Plus システム (フランス、モルスアイム) を使用しました。マイコトキシンの分析用標準は、Alexis Austria (オーストリア、ウィーン)、Alfarma (チェコ共和国、プラハ)、Axxora Europe (スイス、ローザンヌ)、Bioaustralis (ドイツ、Tebu-Bio が配布)、Iris Biotech GmbH (ドイツ、マルクトレドヴィッツ)、LGC Promochem GmbH (ドイツ、ヴェーゼン)、Romer Labs (オーストリア、ツルン)、Sigma-Aldrich から購入したもので、または世界中の研究グループから分離菌として提供されたものです。

標準原液は、リファレンス化合物の物理的性質に応じ、この化合物をアセトニトリル、メタノール、水、または混合溶媒で溶かして調製しました。個々の標準液を混ぜ合わせて、最高 13 種類のターゲット化合物を含む中間希釈液を作成しました。使用直前、中間希釈液を混ぜ合わせて多成分作業用溶液を調製し、キャリブレーション、および殻果類のブランクマトリックスのスパイキングに使用しました。標準原液および中間希釈液は使用直前まで -20°C で保管されていました。キャリブレーションサンプルは、作業用溶液をアセトニトリル/水/酢酸 (20:79:1, v/v/v) の混合液で段階的に希釈して作成しました。

殻果類サンプルは、オーストリアとトルコのさまざまな地域にあるさまざまな店から購入しました。すべてのサンプルは使用直前まで -20°C で保管されていました。サンプルの皮むきとすりつぶしには電動ミキサーを使用しました。サンプルのうち 5.00 g (± 0.01

g) を 50 mL のポリプロピレン製試験管に入れ、抽出溶媒 (アセトニトリル/水/酢酸、79/20/1、v/v/v) 20 mL を追加しました。これらのサンプルをロータリーシェーカーに入れ、室温で 90 分間、200 rpm で抽出処理しました。固形残渣の沈澱後、未処理の抽出物 500 μ L を同量の希釈溶媒 (アセトニトリル/水/酢酸、20/79/1、v/v/v) で希釈します。その結果、8 倍希釈液を得られます。

分析の対象となった 4 種類の殻果類ごとにブランクサンプルを 1 つ選び、完全に均一化しました。抽出前、各サンプルの 3 つの部分が多成分作業用溶液を使ったある濃度レベルでスパイクしていました。溶媒の蒸発後、スパイクを示したサンプルとブランクサンプルの両方を前述の方法で抽出しました。ブランクサンプルの未処理の抽出物は、さまざまな濃度の多成分作業用溶液でスパイクを示しました。抽出前および後でスパイクしたサンプルの添加回収率を比較検討して、エレクトロスプレーイオン化および抽出回収率におけるマトリックス効果を評価しました。

装置

分離は Agilent 1290 Infinity を使用して行いました。UHPLC システムの構成は以下のとおりです。

- Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity 高性能オートサンプラ (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity カラムコンパートメント (G1316C)

UHPLC システムを、Agilent Jet Stream エレクトロスプレーイオンソースを搭載した Agilent 6460A トリプル四重極質量分析装置に連結します。データの取得と分析には、Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェア B.06.00 を使用しました。

メソッド

表 1 に 1290 Infinity UHPLC の条件、表 2 に 6460 トリプル四重極パラメータの概要をまとめます。イオンの極性、プリカーサイオン、およびプロダクトイオンの識別、およびフラグメント電圧およびコリジョンエネルギーの最適化は、標準リファレンス溶液をフローインジェクションし、MassHunter 最適化ソフトウェアを使って行いました。ほとんどの成分について、2 種類のトランジションが見られましたが、これは委員会の決定 2002/657/EC で指定された識別条件に準拠して行いました [7]。分析は、ダイナミックマルチブルリアクションモニタリング (DMRM) で、ポジティブモードおよびネガティブモードを個別に実行して測定しました。トランジションおよび条件すべての一覧、およびすべての成分のリテンションタイムについては、[1] を参照してください。

表 1. Agilent 1290 UHPLC パラメータ

UHPLC カラム	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 2.1 x 150 mm、1.8 μ m (p/n 959759-902)、25 °C	
移動相	A:メタノール/水/酢酸 (10/89/1、v/v/v) の酢酸アンモニウムを 5 mM B:メタノール/水/酢酸 (97/2/1、v/v/v) の酢酸アンモニウムを 5 mM	
グラジエントプログラム	時間 (分)	% B
	0	0
	2	0
	5	50
	14	100
	18.5	100
	18.6	0
ストップタイム	21 分	
流量	0.25 mL/分	
注入量	5 μ L	
ニードル洗浄	アセトニトリル/水 (50/50、v/v) で 5 秒間	

表 2. Agilent 6460 トリプル四重極パラメータ

イオン化モード	ポジティブまたはネガティブ ESI、Agilent Jet Stream を使用
スキャンタイプ	ダイナミック MRM
ガス温度	200 °C
ガス流速	8 L/min
ネブライザ圧	40 psi
シースガス温度	350 °C
シースガス流速	11 L/min
キャピラリー電圧	3,500 V
ノズル電圧	500 V (正); 0 V (負)
サイクル時間	750 ms
MRM 総数	304 (正); 70 (負)
同時 MRM の最大数	36 (正); 8 (負)
最小デュエルタイム	17.3 ms (正); 90.2 (負)
最大デュエルタイム	371.5 ms (正); 750 (負)
分解能	ユニット

データの解析には、MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェアを使用しました。キャリブレーションは、純粋な標準溶液と 1/x で重みづけされた線形検量線を使って行いました。定量限界 (LOQ) は、各マトリックスの希釈係数と回収率を考慮し、存在量の少ないクオリファイアトランジションについては、信号対ノイズ (S/N) 比 10 以上 (ピーク間、信号の高さに基づく) に基づいて計算しました。実サンプルでは、マイコトキシンの濃度が指定された LOQ を上回り、リテンションタイムが想定されるリテンションタイムの $\pm 2.5\%$ の範囲内で、クオリファイア率が委員会の決定 2002/657/EC [7] で指定された目標範囲内に収まっている場合にマイコトキシンが明瞭に識別されたと報告しました。

結果と考察

UHPLC/MS/MS メソッドの開発

マイコトキシンおよび菌代謝物のスクリーニングと定量に使用した新しいマルチターゲット UHPLC/MS/MS メソッドの開発には、6460 トリプル四重極質量分析装置に連結した 1290 Infinity UHPLC システムを使用しました。成分数の多さ、および簡便な溶媒抽出に起因するマトリックス負荷が想定されたため、カラムの長さ 150 mm、分析時間を 21 分に設定しました。分析開始時、グラジエントに急勾配を持たせ、後半で安定させることにより、成分をよりよく分離できました。図 1 は、ヘーゼルナッツのサンプルで中程度 (成分に応じて 0.04 ~250 µg/kg) のスパイクを示したターゲット化合物すべてを、ポジティブ (A) またはネガティブ (B) モードで取得して表したクロマトグラムです。

アフラトキシン M₂ とアフラトキシン G₂、サイトカラシン C と D、エニアチン B2 と K1、フモニシン B₃ とフモニシン B₂ は異性体で MRM トランジションの一部を共有しているので、これらを分離することは重要です。このような化合物については、ベースライン分離はできませんでしたが、3 アセチルデオキシニバレノールと 15 アセチルデオキシニバレノールをクロマトグラフィーに基づいて分離することはできませんでした。一般的にピークの形状は非常に良好で、平均ピーク幅は 0.11 分間 (半値全幅) でした。指定されたクロマトグラフィー条件でピーク幅 0.3 分間を超えた化合物はシクロスポリン A、C、D や HC トキシンなどごく少数の化合物だけでした。このような化合物や、溶出異性体に近い化合物については、ダイナミック MRM の取り込み時間を 1 分間、延長しました。

各成分は、信号の存在量が最も多くなり、S/N 比が最高となる極性で検出されました。ポジティブモードでは、プロトン化された一価イオン種がプリカーサとして最もよく使われます。一部のマイコトキシンはナトリウム付加物を簡単に形成しますが、これにより衝突による解離で弱いフラグメンテーションが見られることがよくあるため、移動相に酢酸アンモニウムを追加して、アンモニウム付加物

の形成を促進し、安定させました。2、3 の化合物については、プロトン化された二価イオン種やインソースフラグメントをプリカーサとして使用しました。これらのイオンの大部分はエレクトロスプレーイオン化により形成されるからです。ネガティブモードでの主なプリカーサイオンは脱プロトン化されたイオン種です。また、化合物全体の約 20 % については、プリカーサイオンとしてアセテート付加体を選択すると、信号がより強くなります。

化合物 1 つにつき 2 種類の質量トランジションを選択したところ、MassHunter データ解析ソフトウェアは自動的に、存在量が多いトランジションをクオンティファイア、もう片方のトランジションをクオリファイアに選択しました。存在量が少ないトランジションの S/N 比が極めて大きい場合は、このトランジションをクオンティファイアとして選択しました。クオリファイアとクオンティファイアの割合はピーク面積に基づいて計算しました。また、このイオン比率には、委員会の決定 2002/657/EC [7] に規定された制限値に従って、自動的に判定フラグを立てました。

メソッド性能の分析

欧州連合の食品および飼料に関する早期警告システム (RASFF) では、マイコトキシンが穀果類の作物に対する苦情の主な原因であり、アフラトキシンとオクラトキシン A 以外のマイコトキシンの発生については、入手できるデータが非常に限られているため、このメソッドが開発、検証されました。メソッド性能パラメータを得るために、抽出前にアーモンド、ヘーゼルナッツ、ピスタチオ、およびピーナッツのブランクサンプルをスパイクさせました。抽出後には、ブランクサンプルの未処理の抽出物をスパイクさせてマトリックス効果を評価しました。抽出ステップの回収率を計算するために、これら 2 種類のサンプルセットを比較しました。65 種類の重要な測定対象化合物の性能パラメータ (規制されたマイコトキシン、自然に汚染された穀果類に含まれるマイコトキシン、その他の食品にしばしば見られるマイコトキシン) およびすべてのテスト済みマトリックスについては、[1] で詳しく説明されています。

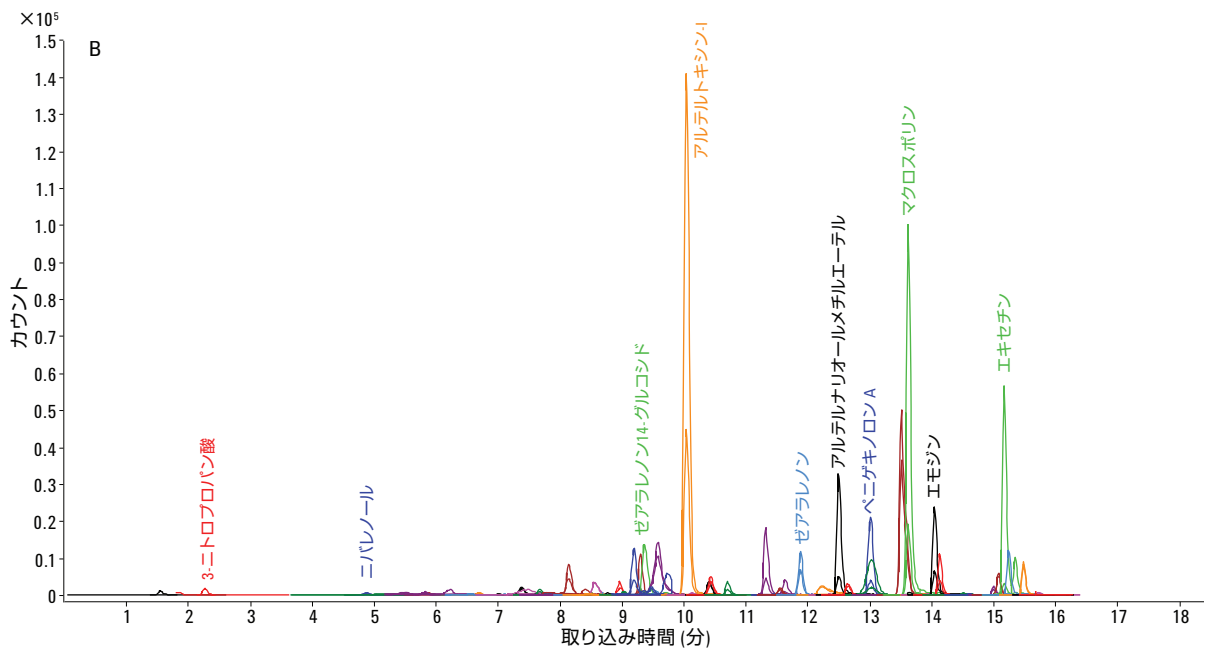
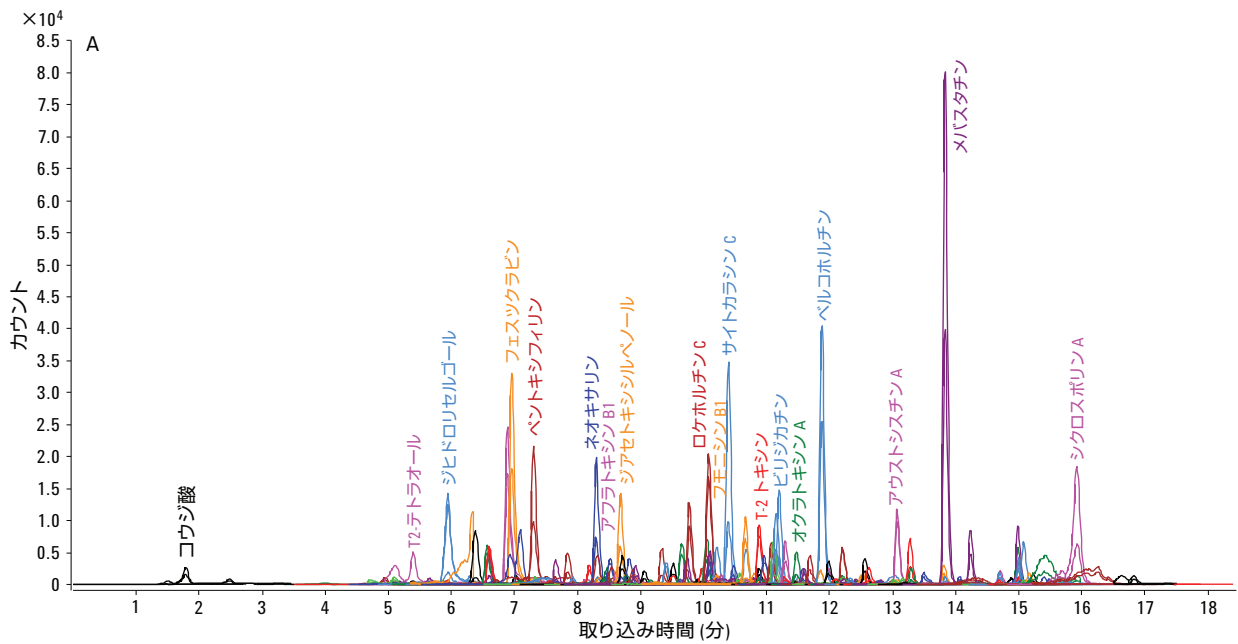


図1. ヘーゼルナッツのブランクサンプルにスパイクしたターゲットであるマイコトキシンおよび菌代謝物すべてのクロマトグラムをポジティブ (A) およびネガティブ (B) モードで測定したものを示す。読みやすくするために、一部のピークにのみラベルを付けてあります。

図2に、ポジティブモードで取得されたアフラトキシン B₁ (A)、ボーベリシン (B)、およびミコフェノール酸 (C) の検量線を示します。また、アルテルナリオール (D)、エモジン (E)、ゼアラレノン (F) はネガティブイオン化で取得されたものです。

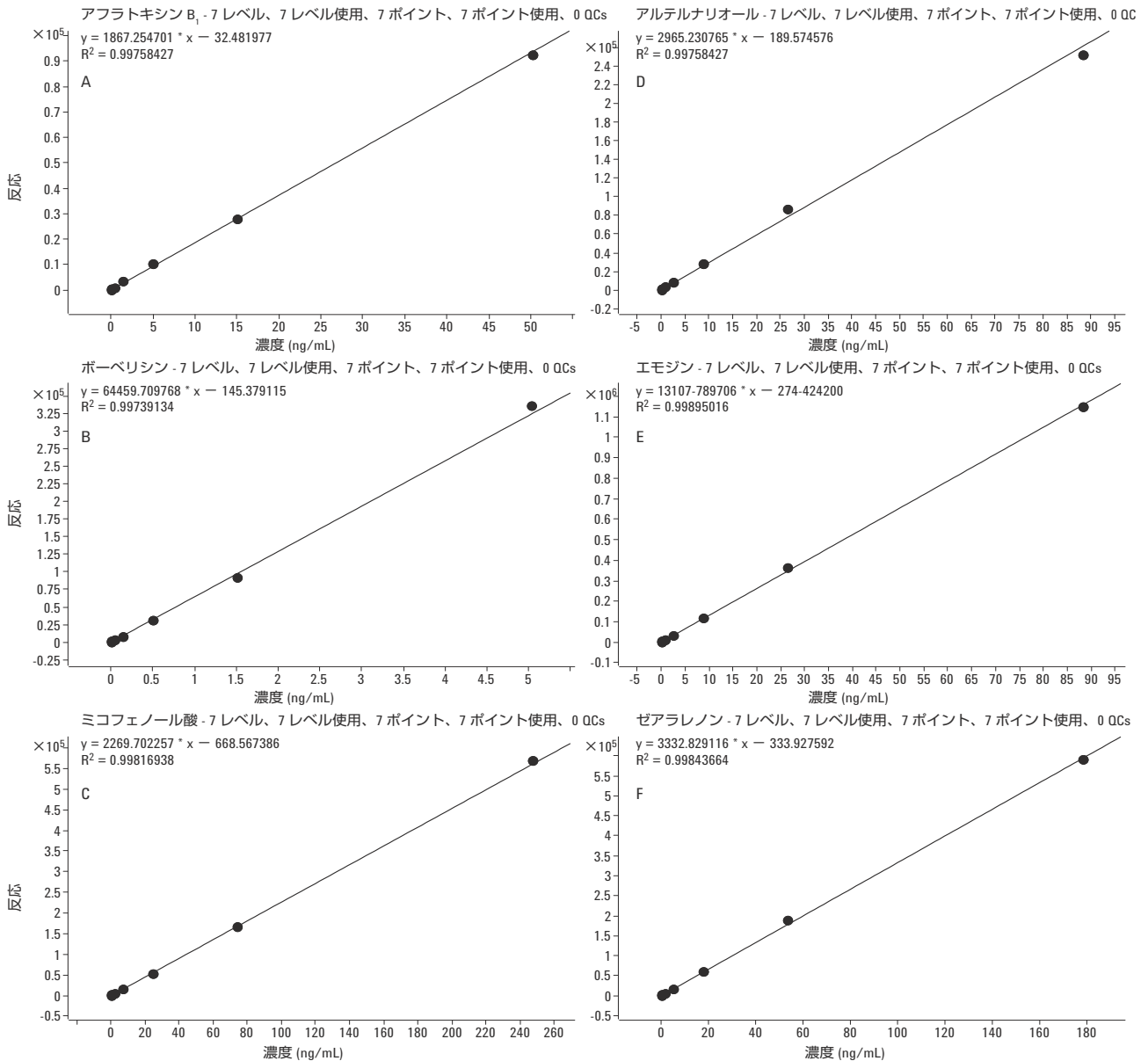


図2. アフラトキシン B₁ (A)、ボーベリシン (B)、およびミコフェノール酸 (C) の検量線 (ポジティブモード)、およびアルテルナリオール (D)、エモジン (E)、ゼアラレノン (F) の検量線 (ネガティブモード)。

測定対象となるマイコトキシンはすべてで検量線は少なくとも1000倍を超える範囲においても直線になります。定量限界 (LOQ) は化合物によって異なり、その範囲は1 kgあたり1 µg未滿から数百 µgまでになります。この値は、サンプル前処理中の8倍希釈物にすでに含まれています。この希釈物のため、またLOQがクオリファイアトランジションの存在量の少ないS/N比に基づいて計算されているため、アフラトキシンのLOQは、委員会規則2006/1881/EC [3]で設定された最大レベルよりも多少高くなりました。対照的に、ゼアラレノンとT-2トキシンについては、公開されているその他のマルチターゲットメソッドと比べ、低いLOQが観察されました。ターゲット成分すべてについて、メソッドパラメータが最適化されたため、ソースパラメータをさらに調整することで、特定の化合物に対する感度を高めることができます。感度を上げるためのその他の手段には、[8]に説明されているようなサンプルのクリーンアップ (これが191種類の成分すべてに等しく効果があるとは限りません) や改良戦略、Agilent 6490 トリプル四重極MS [9]などの感度の高い検出器の使用があります。

回収率の計算には、抽出前にスパイクした殻果類サンプルについて得られた結果を使用しました。図3は、4種類のマトリックスにあるバリデーショ済み化合物すべての回収率をまとめたヒストグラムです。

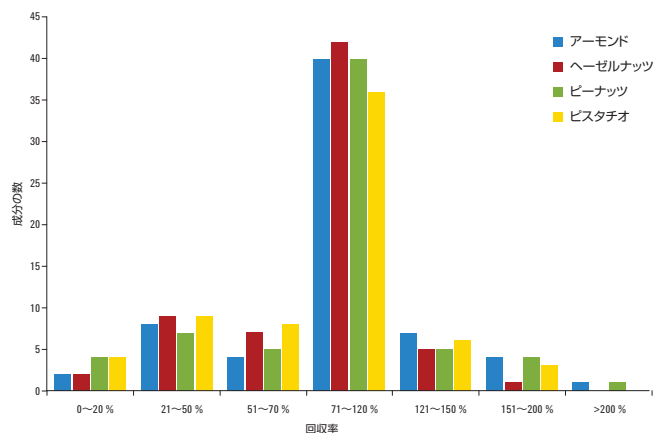


図3. 4種類のマトリックスにあるバリデーショ済み化合物65種すべての回収率をまとめたヒストグラム。

バリデーショ済み成分の約60%において、回収率の範囲は70~120%です。回収率で観察された大きな偏差の原因はマトリックス効果、または不十分な抽出でした。化学的に多様な膨大な数の成分をカバーするマルチターゲットメソッドでは、抽出溶媒とクロマトグラフィーによる分離の両方で妥協が必要だったため、この結果は想定されていました。4種類の各マトリックスについて、回収率は非常によく似ていて、再現性も高く、ほとんどすべての成分で標準偏差は10%を下回っていました。

抽出回収率を算出するために、抽出の前と後でスパイクしたサンプルを比較しました。一般に、化合物の半分については、使用した抽出手順の結果、抽出回収率は50%以上になりました。フモニシンでは、低い抽出回収率が認められました。

抽出後にスパイクしたサンプルについては、純粋な標準溶液と比較しマトリックス効果による感度低下と感度上昇を計算しました。成分の57%では、信号抑制または強調による信号の減少または増大は20%未滿でした。3-ニトロプロパン酸、コウジ酸、デオキシニバレノールなどの初期の溶出化合物における感度低下は著しいものでした。対照的に大きな感度上昇を見せた化合物もいくつかありました。最大値はフィシオン (最高295%) とエキセチン (最高285%) で観察されました。安定同位体希釈またはマトリックスマッチングキャリブレーションは、マトリックスによる感度低下や感度上昇を補正するための有効な方法であることが示されました [9]。ターゲット化合物については、このようなアプローチが効果的であることがあります。ただし、このメソッドの主な利点は、191種類の化合物の簡単かつ迅速なスクリーニングです。

自然に汚染された殻果類サンプルでのマイコトキシンのスクリーニング

50以上の殻果類サンプルでのマイコトキシンのスクリーニングにこのメソッドを適用しました。図4は、自然に汚染されたヘーゼルナッツサンプルで検出されたマイコトキシンのクロマトグラムです。このようなマイコトキシンには、ヘーゼルナッツでは初めて発見されたアフラトキシン、アルテルナリア属マイコトキシン、ミコフェノール酸、T-2トキシンが含まれています。

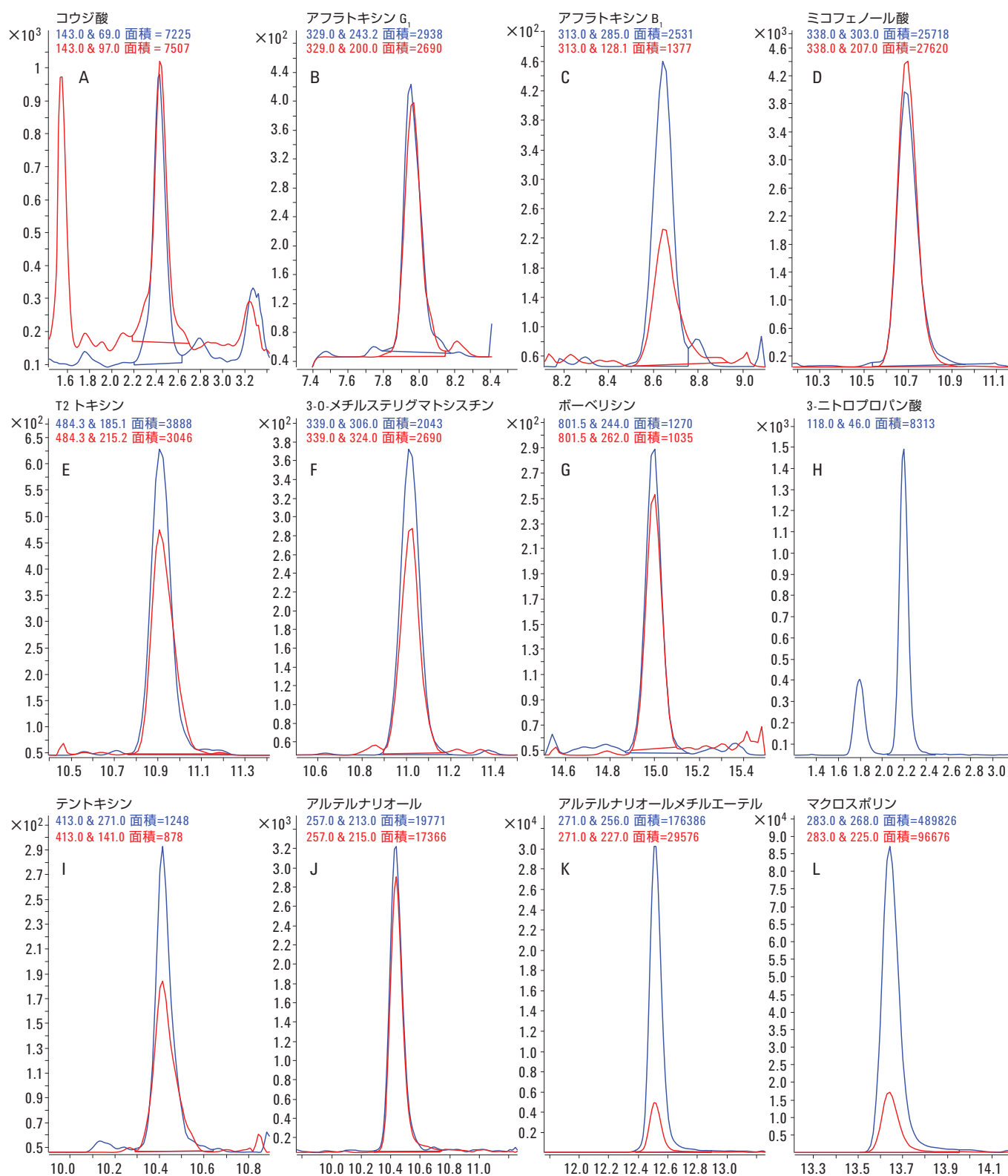


図4.自然に汚染されたヘーゼルナッツサンプルで検出されたマイコトキシンのクロマトグラム(A) コウジ酸 (1,300 µg/kg)、(B) アフラトキシン G₁ (22 µg/kg)、(C) アフラトキシン B₁ (15 µg/kg)、(D) ミコフェノール酸 (570 µg/kg)、(E) T-2 トキシン (41 µg/kg)、(F) 3-O-メチルステリグマトシスチン (3.9 µg/kg)、(G) ボーベリシン (1.3 µg/kg)、(H) 3-ニトロプロパン酸 (850 µg/kg)、(I) テントキシン (2.6 µg/kg)、(J) アルテルナリオール (49 µg/kg)、(K) アルテルナリオールメチルエーテル (79 µg/kg)、および(L) マクロスポリン (340 µg/kg)。

すべての種類の殻果類に 40 種類以上のマイコトキシンが検出されました。汚染物質の大半は、ヘーゼルナッツサンプル (36) で検出され、以下、ピーナッツ (30)、アーモンド (13)、ピスタチオ (5) と続きました。これは他の食品と比べ、ヘーゼルナッツは分析されたサンプルの数が多かったためである可能性があります。しかし、あるヘーゼルナッツサンプルは 1 つで 26 種類のマイコトキシンに汚染されていました。また、それとは別に、8 つのヘーゼルナッツサンプルで 20 種類以上のマイコトキシンが検出されました。ピーナッツ、アーモンド、およびピスタチオでは、サンプル 1 つあたり、順に 17 種類、13 種類、5 種類のマイコトキシンが検出されました。最も多く発見されたのがボーベリシンで 42 件検出されました。これにエニアチン B (33)、マクロスポリン (30)、3-ニトロプロパン酸 (29) と続きます。さらに、数種類のアルテルナリア属マイコトキシンと 27 サンプルにアルテルナリオールメチルエーテルが発見されました。このほか、アルテルナリオール (24)、テントキシン (22)、テヌアゾン酸 (21) も検出されています。

ヘーゼルナッツおよびピーナッツのサンプルで同定されたマイコトキシンには、欧州連合で最大レベルが設定されているアフラトキシンも含まれていました。8 件のヘーゼルナッツサンプルと 8 件のピーナッツサンプルで測定されたアフラトキシン B₁ 濃度は、法で定められたヘーゼルナッツに対する上限 5 µg/kg、ピーナッツの上限 2 µg/kg を上回り、最大濃度は 15 µg/kg でした。さらに、最も毒性の強いアフラトキシン B₁ プリカーサであるステリグマトシスチンが、分析されたヘーゼルナッツサンプル 22 件のうち 21 件で発見され、最大濃度は 5.5 µg/kg でした。T-2 および HT-2 トキシンが初めて 15 件のヘーゼルナッツサンプルで同定され、平均濃度は HT-2 トキシンが 39 µg/kg、T-2 トキシンが 32 µg/kg でした。

一部のヘーゼルナッツサンプルはアルテルナリア属マイコトキシン汚染がひどく、アルテルナリオールの濃度は最大 650 µg/kg、アルテルナリオールメチルエーテルの濃度は最大 220 µg/kg でした。ヘーゼルナッツサンプルで最も量の多かったマイコトキシンは 3-ニトロプロパン酸で、ヘーゼルナッツサンプルすべてで検出され、最高濃度は 980 µg/kg でした。2 番目に多かったのは 17 件のサンプルで検出されたエニアチン B で最高濃度は 540 µg/kg でした。最高濃度を示したのは強力な免疫抑制化合物の一種であるミコフェノール酸で、サンプルの 1 つで 6,100 µg/kg の濃度が検出されました。また、マクロスポリンも検出されましたが、最大濃度は 2,200 µg/kg でした。

ピーナッツサンプルすべてで、ボーベリシンが検出され、濃度は最大 12 µg/kg でした。また、ピーナッツはコウジ酸 40,000 µg/kg という単一サンプルでの最大汚染も記録しました。アーモンドサンプルでは、アルテルナリア属マイコトキシンとエニアチンが見つかりました。最大の汚染が観察されたのは、シクロピアゾン酸

(最大濃度 130 µg/kg) とセカロン酸 D (51 µg/kg) でした。

ピスタチオで検出できた成分は 5 つだけで、LL0Q を超えるマクロスポリンで汚染されていたサンプルは 1 件だけでした。

結論

欧州で規制されているすべてのマイコトキシンを含む 191 種類のマイコトキシンやその他の菌代謝物の測定に使用される UHPLC/MS/MS ベースのマルチターゲットメソッドが開発されました。これは Agilent 1290 Infinity LC System のディレイボリュームの低さと、UHPLC 分離で高い背圧を巧みに扱い、マトリックス成分の分離におけるクロマトグラフの分解能を向上させる能力をフルに活用しています。このメソッドでは、簡単かつ高速でコストをかけずに溶媒抽出を行い、その後、希釈された未処理の抽出物を UHPLC/MS/MS システムに注入します。このメソッドは、Agilent 6460 トリプル四重極 MS の感度と堅牢性、および Agilent Jet Stream イオンソースの性能を活用しています。個々の化合物のデュエルタイムを最大化するためにダイナミック MRM 取り込みを使用しました。数々のターゲット化合物全体に合わせたソースパラメータが最適化されました。

このメソッドは、アーモンド、ヘーゼルナッツ、ピーナッツ、およびピスタチオで規制され、最も頻繁にみられるマイコトキシンすべてについてバリデーションされています。したがって、これら 65 種類の化合物についての定量が可能です。その他の成分についても、このメソッドを使って、半定量的な情報を提供できます。このメソッドは、殻果類についてバリデーションされたものですが、その他、一部の食品や飼料マトリックスに含まれるマイコトキシンのスクリーニングにも使用できます。ここで説明したメソッドを単一成分または成分グループの検出メソッドとして使用し、さまざまな食品でマイコトキシンの発生に関する知見を収集することができます。

このメソッドを 53 種類の殻果類サンプルに適用したところ、40 種類のマイコトキシンおよび菌代謝物が検出されました。殻果類について、現在、欧州連合で規制されている唯一のマイコトキシンであるアフラトキシンに加え、殻果類に関係する汚染物質である他の毒素も見られました。サンプル全体の 50 % 以上に、ボーベリシン、エニアチン B、マクロスポリン、3-ニトロプロパン酸、エモジン、アルテルナリオールメチルエーテルが見られ、一部は非常に高い濃度を示しました。ヘーゼルナッツでは、HT-2 と T-2 トキシンが初めて確認されました。検出されたマイコトキシンの多くはまだ毒性学的に完全な評価を受けておらず、添加物や同時発生する毒素の相乗効果に関する詳細な知見もありません。

参考文献

1. E. Varga, et al. "Development and validation of a (semi-)quantitative UHPLC-MS/MS method for the determination of 191 mycotoxins and other fungal metabolites in almonds, hazelnuts, peanuts and pistachios" *Anal. Bioanal. Chem.* **405**:5087-5104, 2013.
2. P. Zöllner, B. Mayer-Helm "Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry" *J. Chromatogr. A* **1136**:123-169, 2006.
3. Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (including amendments as of 13 November 2012).
4. Commission Recommendation No. 2013/165/EU of 27 March 2013 on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products.
5. M. Sulyok, R. Krska, R. Schuhmacher "Application of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method in multimycotoxin determination in raw cereals and evaluation of matrix effects" *Food Addit. Contam.* **24**:1184-1195, 2007.
6. J. C. Frisvad, B. Andersen, R. A. Samson "Association of moulds to foods" In: J. Dijksterhuis, R. A. Samson (eds), "Food mycology: a multifaceted approach to fungi and food" *CRC*, Boca Raton, 2007.
7. Commission Decision (EC) No. 657/2002 of 14 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (including amendments as of 31 December 2012).
8. Y. Chen, J. Cappozzo, P. J. W. Stone "Sensitive Femtogram Determination of Aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in Food Matrices using Triple Quadrupole LC/MS" *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5990-6894EN, **2011**.
9. E. Varga, et al. "Validation of a Stable Isotope Dilution Assay for the Accurate Quantitation of Mycotoxins in Maize Using UHPLC/MS/MS" *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-2808EN, **2013**.

詳細情報

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。

本資料に記載の情報、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. 2014

Published in Japan, August 8, 2014

5991-4991JAJP



Agilent Technologies