

Q-TOF LC/MS と 精密質量ライブラリによる 食品中のマイコトキシンの スクリーニングと検証

アプリケーションノート

食品と農業

概要

このアプリケーションノートは、マイコトキシンおよび関連代謝物の精密質量ライブラリの 作成およびこのライブラリを使用した食品中のマイコトキシンのスクリーニングのアプリ ケーションについて説明します。Agilent 1290 Infinity LC と Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS を組み合 わせ、デュアルスプレー Agilent Jet Stream テクノロジーを用いて、ポジティブおよびネガティ ブエレクトロスプレーモードで分析しました。片方または両方のイオン化モードですべての 関連するイオン種について多数のマイコトキシンおよび関連代謝物の精密質量スペクトルを 取り込みました。

3つの異なるマトリックスが抽出され44の指標化合物を添加しました。ターゲット MS/MS と All Ions MS/MS データ取り込みを使用してサンプルを分析しました。この分析により両方の取 り込みモードの価値を実証します。また、効率的なデータ解析ワークフローとマイコトキシ ンと関連代謝物のパーソナル化合物データベースおよびライブラリ (PCDL) との組み合わせに より、複雑なマトリックス中のマイコトキシンのスクリーニングや検証を実現できることを 実証します。



Elisabeth Varga, Franz Berthiller, Rudolf Krska, 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 (BOKU), Vienna, Austria

Emma Rennie Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, CA, USA

Thomas Glauner Agilent Technologies GmbH, Waldbronn, Germany



はじめに

マイコトキシンは穀物類、殻果類、果実、香辛料、ワイン、コー ヒーなどのさまざまな食品および飼料製品で発生する菌類の毒性二 次代謝物です[1]。マイコトキシンにより、肝毒性、突然変異誘発 性、発がん性、エストロゲン様、免疫抑制性の作用が人や動物内で 発生します。数百種類のマイコトキシンおよび二次菌代謝物は大き く異なる物理化学的性質を持つさまざまな化学物質群に属していま す。現在、ほんの十数種類の化合物が主な健康上のリスクだと考え られ、この結果、食品や飼料で規制されています。EU では欧州委員 会規制 (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、デオキシニバレノール、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 [2]。さ らに、T-2 および HT-2 トキシンについても指標値が委員会の勧告 2013/165/EU に示されています [3]。

特に未処理の穀物以外の食品マトリックスでは、規制された化合物 以外のマイコトキシンの発生に関する包括的なデータは限られてい ます [4]。これは、近年、単一のマイコトキシンのメソッドを LC/MS ベースのマルチターゲットメソッドに置き換えることが多くなって きていることが理由の 1 つです [4、5]。異なる商品に対するメソッ ドのハーモナイゼーション、思いもよらないマトリックス内のマイ コトキシンの同定、アスペルギルス属、ペニシリウム属、フザリウ ム属、アルテルナリア属の種からの新種のマイコトキシンについて の知見の増加は、この傾向の理由の一部に過ぎません。これらの進 展は、ここ数年での最新 LC/MS 機器の性能の向上と生産性を向上さ せるソフトウェアツールの開発によって支えられています。最新の 高分離能精密質量 LC/0-TOF 機器ではほぼ無制限の数の汚染物質を分 析することができます [6]。また、過去に遡ってのデータ解析も可能 で測定時には考えられていなかった汚染物質を見つけることができ ます [7]。

ほとんどのマルチターゲットメソッドは汚染物質のスクリーニング のために開発されましたが、規制されたマイコトキシンの定量的情 報を取り込むこともできます。課題は、たくさんの食品に由来する 非常にさまざまな物理化学的特性と天然起源の毒素濃度が大きく異 なる分析対象物質の効率的な抽出です。

このアプリケーションノートでは、精密質量 LC/MS/MS データベース およびライブラリの作成と使用について説明します。ライブラリに は 300 種類を超える LC/MS で検査が可能なマイコトキシンおよび菌 代謝物またはバクテリア代謝物が含まれ、食品サンプル中のこれら の化合物をスクリーニングして同定できます。サンプル前処理メ ソッドでは、酸性のアセトニトリル/水混合液を使って1回抽出しま す。2つの異なるスクリーニング方法を用います。1つ目の従来手法 では、Q-TOF LC/MS システムを最初に TOF モードで使用しデータベー ス検索を実行します。推測される候補リストについて、デュアル ループインジェクション機能とターゲット MS/MS メソッドを使用 し、得られたスペクトルを MS/MS ライブラリと比較します。2 つ目 の手法では、Q-TOF を All lons MS/MS モードでの2種類のコリジョンエ ネルギーで使用します。All Ions 技術により、取り込みメソッドおよ び MS/MS スペクトルライブラリを用いたマイコトキシンの検証を容 易にセットアップできます。このメソッドはプリカーサおよびプロ ダクトイオンのクロマトグラフィーの共溶出を生成します。とうも ろこし、ヘーゼルナッツ、ワインにおける 44 種類の代表的な指標化 合物についてのメソッド性能パラメータを提示します。

実験方法

試薬および標準溶液

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、ギ酸は VWR International (ウィーン、オーストリア) から購入しました。ギ酸アンモニウム溶 液 (p/n G1946-85021) はアジレント製です。超純水の生成には Purelab Ultra システム (ELGA LabWater、ツェレ、ドイツ)を使用しました。菌代 謝物およびバクテリア代謝物の分析標準は、Enzo Life Sciences (ラウゼ ン、スイス)、Bioviotica Naturstoffe GmbH (ドランスフェルト、ドイツ)、 Bioaustralis (販売は Tebu-Bio、ドイツ)、Iris Biotech GmbH (マルクトレド ヴィッツ、ドイツ)、Romer Labs (トゥルン、オーストリア)、Sigma-Aldrich Corp. (ウィーン、オーストリア) から購入しました。他の標準 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性質に応じ、アセトニトリル、 メタノール、水またはこれらの混合溶媒で溶かして調製しました。 標準溶液は個別に、キャリブレーションおよびブランクサンプルの 添加に使用された多成分作業用溶液に混ぜ合わせました。標準原液 と多成分作業用溶液は、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:ギ酸 (20:79:1、v/v/v) の混合液で希釈して調製しました。抽出溶液 は同一成分でした。

サンプル前処理

添加実験用のブランクのとうもろこしおよびヘーゼルナッツサンプ ルは購入したもので、LC/MS/MS メソッドを用いていずれかの分析対 象化合物が存在しないことを確認しました。サンプルのすりつぶし とホモジナイズには電動ミキサーを使用しました。サンプルのうち 5g(±0.01g)を50mLポリプロピレン製試験管に入れ、抽出溶媒20mL を追加しました。サンプルは室温で90分間、ロータリシェーカーで 抽出しました。固形残渣の沈澱後、一定量の抽出液をHPLCバイアル に移しました。未処理の抽出物に3つの異なる濃度の多成分作業用 溶液を添加しました。

LC/MS/MS 分析

分離には次の機器で構成される Agilent 1290 Infinity UHPLC を使用しました。

- ・ 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、デュアルスプレー Agilent Jet Stream エレクトロスプ レーイオンソースを搭載した Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS に連結し ます。リファレンス質量イオンの送液には、流速 1.0 µL/min の Agilent Infinity 1260 アイソクラティックポンプ (G1310B) と 100:1 フロースプ リッタ (G1607-60000) を使用しました。リファレンススプレイヤーへ の最終的な流量は 10 µL/min でした。Q-TOF LC/MS 機器は Agilent MassHunter データ取り込みソフトウェア (rev. B.05.01) と組み合わせ、2 種類の異なるメソッドでポジティブおよびネガティブイオン化の2 GHz 拡張ダイナミックレンジモードで使用しました。ターゲット MS/MS の取り込みでは、3 スキャン/秒のデータレートを MS および MS/MS モードで使用しました。All Ions MS/MS の取り込みでは 3 ス キャン/秒を2つの異なるコリジョンエネルギーで使用しました。2 つのコリジョンエネルギーを使用した結果、プリカーサイオンを含 む低エネルギーチャネルおよびプリカーサイオンとプロダクトイオ ンを含む2つの高エネルギーチャネルのスペクトルが互いに得られ ました。

分析条件

クロマトグラフィー条件

カラム:	Agilent Poroshell 120 EC-C18、 2.1 × 100 mm、 2.7 μm (p/n 695775-902)					
移動相:	A) 5 mM NH ₄ ギ酸塩 + 0.1 % ギ酸 B) 5 mM NH ₄ ギ酸塩 + 0.1 % ギ酸を含むメタノール					
グラジエント:	時間 (分) % B 0.0 10 0.5 10 10.0 98 15.0 98 15.1 10 17.0 10					
ストップタイム:	17.0 min					
温度:	30 °C					
流量:	0.40 mL/min					
注入量:	2 µL					
デュアル AJS 条件						
ガス温度:	130 °C					
ガス流量:	16 L/min					
ネブライザ:	30 psig					
シースガス温度:	300 °C					
シースガス流量:	11 L/min					
キャピラリ電圧:	+ve 4,000 V、 -ve 4,000 V					
ノズル電圧:	+ve 500 V、 -ve 500 V					
リファレンス質量補正:	+ve 121.05087 および 922.00980、-ve 112.98559 および 966.00073					
All-lons MS/MS						
質量範囲:	40~1,300 amu					
スキャン速度:	3スペクトル/秒					
コリジョンエネルギー:	0 V、 10 V、 40 V					
ターゲット MS/MS						
MS 質量範囲:	80~1,300 amu					
MS/MS 質量範囲:	40~1,300 amu					
スキャン速度:	MS および MS/MS の場合は 3 スペクトル/秒					
コリジョンエネルギー:	20 V					
ターゲット質量:	45 (ポジティブおよびネガティブ)、デルタ RT 0.5 ゲ					

データは MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェア B.07.00 を用いて評価しました。化合物を Find by Formula データマイニングアルゴリズムで検出した場合は、5 ppm 未満の質量誤差および十分なスコア (同位体アバンダンスおよび同位体間隔を含む)でマイコトキシンの同定が報告されました。システム間の変動性を原因とするリテンションタイムシフトを補正するために±1分のリテンションタイム枠がピーク検出用に指定されました。

マイコトキシンと関連代謝物の PCDL の作成

精密質量スペクトルは、コリジョンエネルギーを10、20、40 eVとし ターゲット MS/MS モードでフロー注入によってまたは単一成分溶液 の短いカラムを通して取り込みました。[M+H]⁺、[M-H]^{-、} [M+NH₄]^{+、} [M+HCOO]⁻ を含むすべての関連化合物種はターゲット質量として使 用されました。プリカーサイオンの安定により高いコリジョンエネ ルギーを必要とした場合、2 回目の実行で追加のスペクトルを取り 込みました。ポジティブとネガティブの両方のイオン化モードで、 300 種類以上のマイコトキシンおよびその他の菌またはバクテリア 代謝物について有意義な MS/MS スペクトルを取り込みました。いく つかの化合物では、両方のイオン化モードで1つ以上のプリカーサ イオン種について MS/MS ライブラリスペクトルを採取しました。固 形標準や標準原液は10回以上収集しました。ほとんどの化合物は異 なるサプライヤから購入し、そのほかのものは IFA-Tulh、BOKU と関 係のないところのものか他の研究グループから提供されたもので す。質量割り当てエラーを回避するために、取り込んだスペクトル のフラグメント質量を理論上のフラグメント式と比較し、理論上質 量を補正しました。すべての MS/MS スペクトルでスペクトルノイズ が排除されました。ベースピークの最小スレッシュホールドを適用 して、すべてのフラグメントイオンのイオン統計が正しくなるよう に修正しました。この補正したスペクトルをマイコトキシンおよび 関連代謝物の Agilent パーソナル化合物データベースライブラリ (p/n G5883CA) に算入し、食品サンプル中のマイコトキシンのスクリーニ ングおよび検証に使用しました。44 種類の指標化合物については、 適切な UHPLC メソッドを用いて包括的なマイコトキシン標準を分析 し、リテンションタイム情報をライブラリに加えました。

図1はMassHunter PCDL Manager ソフトウェアのスクリーンキャプチャーを10 eVのコリジョンエネルギーで得られたT-2トキシンの[M+NH₄]⁺種の精密質量スペクトルとともに示しています。

Dark Londs	And America	100.00		Same Press		Brand Stores	And American Control of Control o
outre and and	core services	10.50			-		E Description
	and and	(Section 2017)		-			ACT NOT
Potamona Bara	1 25 2 34	Here was		2			a 10* MARCHINE
dealos 20 PLoos Bilde	NUMBER NOT	Dest.		•			2 to. 21, 1000 102
and and							2 C
deressor 0.1 est							P.
							B1-
the local division of the Lines.							16-
		12000	-			1.4.4	
Consuled Same	to aprevent	T ISSNE IN	CAPI	the second second	Ar sugars	Taka wa	14
2.11 844		- al. 114		Preder		1.04	
21 Fallear	14	45.24	M	20 Feather	LOI	3.04	25 second reading the second secon
2 Paller	144.4	195.65	14 j	10 Tealler		0.0	100 BHO
8:04/3.	100.00			241100	æ.,	10.0	
211/144	14.40	20.24	-	20 Panaur	na	m	ويستجدد المرابلة الأرابلة المستحدي
-5111 Jack	11.40	45.54	11	C Parally	P.0	334	N N N N 20 21 M 23 40
							1
1	Hele Seers To	A. 10	10				
Second free -	Hele Search Ta Saide	Alter Alto Mari	in) Area	Sev 11.14		io centero	A K har Jania
Samura Rem Salaratin	inde Saart fa wede otweer	Heri Mari 252.0005	Area FT	Salar III) e Jiji	r u ant ais	to createra Los militari	R, N. Hear Service Net + at Albehanaus freed Homas Production (2
convoltime - adore tarretan	Contraction Contraction Contraction Contraction	Hen Hen XXXXXXX HELCOM	4 mm	Salar III In IN IV	r o ant dis inc an	ю снедал са тран хон дикло	R. N. Peer Service Net + 2020 bit was free from which you are going to be Devin John Andread Balance To Conceptor 1
convoit filme - adoren Ur/Citan U/Citan	under Sammer für Sammer Sammer Sammer Sammer Sammer	Han XXX.vvet House House No. 1464	Ann Pi Pi IU	Salar III ba Pi IV	r U ant dia ing dia jan	to creater Line tripon Sector (an enter Line to (creater	A Schem Servin Nel + stähdnisse frei Hunschlehrun, o Dans John Aufschlehrungen (* 2 19. et Schl. Obergeneter Service, 44, 5
Sensor Clime - Tacket III Tacket III Tacket Tacket Tacket Tacket	Contraction Contract	Han Man Maranet Maranet Maranet Maranet	4 m F F	544 0.14 P P U U	r C ant dis are are are are are	ю снедни са ттон 524 дитела 430 2.286 430 2.286	K. N. Franc. Service Mathematical Services Constraints Services Constraints Services Constraints Services Constraints Services Constraints Services Constraints Constrain
Verson of Reference - Tables Hereins Tables - Tables - Tables - Tables - Tables -	onde Saaren fe onde OUWRER SANKER SANKER SANKER SankERYS	Han Societa Maria Societa Morita Societa Societa Societa Societa		54v (1.)+ P P U U U	r 0 ant 244 240 240 240 240	Ko Creedaw Log Inten Logi (Mr.K.No Holo (Creed Holo (Creed Holo (Creed Holo (Creed)	Ry No. Neuro Secular Heini + antichologica final - languarita di numeri di a Secular di antichologica di anticologica di anticologica Secular di anticologica di anticologica di anticologica Secular di anticologica di anticologica di anticologica Secular di anticologica di anticologica di anticologica Secularizzatione di anticologica di anti
Samuel Reg - Salaria 11/ Chan 11/ Seno 11/Sen Vanitera Tani Rastanti Tani Rastanti	Several Second S	Hen Douver Hen Douver Heurour Polision Heurour Douver Heurour Douver			r C ant sta ing an an Sub Sub Lan	KO CHEMAN CHE TITON CHE (MARINE MARINE ZIZZIZAN MARINE ZIZZIZAN MARINE ZIZZIZAN MARINE ZIZZIZAN MARINE ZIZZIZAN	R. N. Peer Service Helm - California State Homosoft Annual C Dennis Antoning and Homosoft Annual C (K. K. S. H. C. Sprawnen State - 44, 5 (K. K. S. H. C. Sprawnen State - 44, 5 (K. K. S. H. C. Sprawnen State - 44, 5 (K. K. S. H. S. H. Sprawnen State - 44, 5 (K. K. S. H. Sprawnen State - 44, 5 Dennis Homosoft Base - 144, 5 Helm - 144, 5
Convol film	Serve Second To Serve S 20/1985 - 20/1985 - 20/1985 - 20/1985 - 20/1985 - 20/1985 - 20/1985 - 20/1985 -	Hen Douver Hen Douver Henzour Douver Henzour Douver Henzour Henzour Henzour Henzour Henzour		544 11 He 25 17 17 17 17 17 17 17 17 17 17 17 17 17	r C ant stat and stat and ant ant ant ant ant ant ant ant ant ant	No Creation L-d 17004 N204 2444,00 A002 2250,00	R. N. Franc. Service Market and Service Zeneral control and an Annual Control and Zeneral control and Control and Zeneral control a
Convertiller - Interie Uniferen Uniferen Uniferen Terrentaul Europhiaul Kolleren Mederen	Control Control Control Control Control Contro	Print 405 Here 300 works Hereau Print 404 Hereau Berlands Hereau Hereau Hereau			 Control (1998) Control (1998)<td>0 Creden Co Millor Scart (Arriso Millor (2014) Millor Carlor (2014) Carlor Carl</td><td>R. N. Hear Sector Hait + attAbulances front - foreignet Sector Sect</td>	0 Creden Co Millor Scart (Arriso Millor (2014) Millor Carlor (2014) Carlor Carl	R. N. Hear Sector Hait + attAbulances front - foreignet Sector Sect
Connord Term - Inform - To Techon - Ulterns - Tolens	Control Contro	Han Storwell Hear Storwell Hear Perfect Hear Storwell Hear Hear Hear Hear Hear Hear Hear Hear			6 U anti sist ing dat anti anti anti anti anti anti anti an	N Creden Col Inter Scart (Jan No 1995) 22858 1995) 22858 1995) 22858 1995) 22858 1995) 22858 1995) 22858 1995) 22858	K. N. Franc. Service Mole + GARdenices-Franker House-Franker House-Franker House-Franker Service Descent Analysis (1999) - 110 - 110 - 110 (Carlow House
Convert Rem - adol in Tar / Calan U/ Perso 17 Der Tarbin Tarbin Tarbin Tarbin Tarbin K. / Microlen Network Network Network Network Network	Control Control Control Contro Control Control Control	Hen Hen DELANK HELELAN HELELAN HELELAN HELELAN HELELAN HELELAN HELELAN HELELAN HELELAN			6 U anti she ing dan anti anti anti anti anti anti anti an	Condexy Condexy Condexy Condexy Condex Co	R. N. Hear Service Market Statement of Constant of Consta
Consol films - Table 1 Table	Control Sector 1 Tel Sector 2014/05 Control Co	6 m 400 Max 20 week 60			2 U anii 2 ia 200 200 200 200 200 200 200 200 200 20	C Cardon Col 1100 Col 1100 Col 2005 Col 2005 Col 2005 Col 100 Col 100	R. N. Franc. Section Hail + architectures front - from control results Descent Data Architectures front - descent - des
Convertière - Solares - United - United - United - United - Solares -	Control Control To Sector Control Con	Mar. 2022 Mar. 2022/046 49:2222/04 99:1462 49:			2 0 201 212 202 200 200 200 200 200 200 200 200 20	C C eden C 1 110H Col 110H Col 2214 22	R. Yu Hum Sector Data Collection from Facilitation Collection C Data Collection Collection Collection C Collection Collection Collection C C Description Collection Collection C C Description Collection Collection C C Description Collection Collection Collection C C Description Collection Collection Collection Collection C C Description Collection Collection Collection Collection C C Description Collection Collection Collection Collection C C Description Collection Collection Collection Collection Collection Collection C

図 1. マイコトキシンおよび関連代謝物の PCDL と 10 eV のコリジョンエネルギー での T-2 トキシンの [M+NH₄]⁺ 種の 精密質量スペクトルを示す Agilent MassHunter PCDL Manager ソフトウェア。

結果と考察

スクリーニングと検証を同時実行する All Ions MS/MS 取り込み

とうもろこしとヘーゼルナッツの抽出物および赤ワインのサンプル には、マイコトキシンおよび菌代謝物のグループに由来する 44 種類 の指標化合物を添加しました。すべての規制化合物、一部の極性お よび非極性の分析対象物、うまくイオン化されない化合物を選択し ました。All Ions MS/MS ワークフローで低エネルギーチャネルでのフ ラグメンテーションを含まない精密質量データを収集しました。同 時に、プリカーサを選択せずに 2 種類の異なるコリジョンエネル ギーで化合物を断片化しました。精密質量フラグメントデータを2 つの高エネルギーチャネルで記録しました。Find by Formula アルゴリ ズムを使用してデータを解析するときに、マイコトキシンおよび関 連代謝物の PCDL からのプリカーサ情報を用いて、化合物クロマトグ ラムをすべての特定のイオン種について抽出しました。推定上の同 定では、PCDL に保存されたスペクトルを使用し、存在量が最も多い フラグメントの指定されたクロマトグラム数を自動的に高エネル ギーチャネルから抽出します。例えば、図2Aは、マイコトキシンお よび関連代謝物の PCDL のアスペルギリミドの精密質量ライブラリス ペクトラムを示し、図 2Bの添加したとうもろこしサンプルのクリー



図 2. コリジョンエネルギーが 40 eV でのアスペルギリミドの 精密質量ライブラリスペクトル (A) と添加したとうもうろこし サンプルから取り込まれた高エネルギースペクトル (クリーンな スペクトル) (B) との比較。ライブラリスペクトル内の赤色の三角形 は All Ions MS/MS 評価用に自動的に選択たイオンを示しています。

ンな高エネルギースペクトルと比較しています。赤色の三角形は評価用ライブラリスペクトルから自動的に選択されたフラグメントイオンを示しています。ライブラリスペクトルは 40 eV のコリジョンエネルギーを元にしたものですが、クリーンな高エネルギースペクトルは 10 と 40 eV の両方の高エネルギーチャネルからの情報が組み合わされています。

プリカーサイオンとフラグメントイオンの両方のクロマトグラムを 重ねて表示し共溶出スコアの計算値によって、菌代謝物アスペルギ リミドの同定を確認しました。共溶出スコアは、アバンダンス、 ピーク形状 (対称性)、ピークの幅、リテンションタイムなどの要素 から構成されます。スコアをプロットして共溶出プロットでの検査 が可能になりました。図 3A はプリカーサクロマトグラムと高エネル ギーチャネルでのフラグメントクロマトグラムを重ねて表示してい ます。図 3B の共溶出プロットによって明らかなように、自動的に抽 出されたフラグメントから 6 つのフラグメントクロマトグラムがプ リカーサイオンの共溶出を示しました。図 3C は、化合物の表で詳細 な同定結果を示しています。



図 3. 添加したとうもろこしサンプル中のアスペルギリミドのプリカー サイオントレースとフラグメントイオントレースの重ね表示 (A)、 共溶出プロット (B)、共溶出スコアを含む化合物同定結果 (C)。

表1はとうもろこし抽出物に 30 ng/mL で添加した 44 種類のマイコト キシンと菌代謝物のすべてのリストです。化合物をポジティブまた はネガティブイオン化で測定し、各分析対象物の主な種を示しま す。いくつかの化合物は両方の極性で検出され、適格性が評価され ました。より高感度なイオン化モードでの結果を示しています。こ の濃度では、ほとんどの化合物を Find by Formula アルゴリズムを用い て自動検索しました。理論上質量と測定した質量を比較した場合の 質量誤差はおおむね 1 ppm 未満でした。質量誤差が 2~5 ppm の化合 物は 11 種類のみでした。このため、リテンションタイム、質量精 度、同位体アバンダンス、同位体間隔を含むターゲットスコアは一 般的に 90 (100 点満点中) 以上でした。ほとんどの化合物をポジティ ブまたはネガティブイオンモードで 1 つ以上の追加のフラグメント イオンを用いて検証しました。最小共溶出スコアの 80 (100 点満点 中) は化合物検証用の基準として指定されています。

ターゲット MS/MS 取り込みによる食品中の マイコトキシンのスクリーニングと検証

また、同一のクロマトグラフィーメソッドを用いてターゲット MS/MS 取り込みで同一サンプルを分析しました。マイコトキシンと 関連代謝物の PCDL を Find by Formula データマイニングアルゴリズムと 組み合わせて化合物を確認しました。予想されるイオン種のクロマ トグラム、MS および MS/MS スペクトルが同定された化合物につい て自動的に抽出されました。精密モノアイソトピック質量、同位体 比、同位体間隔、リテンションタイムの一致度をもとに、結果にス コアがつけられました。 図 4 はとうもろこし抽出物に添加した T-2 トキシンの化合物クロマ トグラムとピークスペクトルを示しています。T-2 トキシンの主なイ オン種は [M+NH₄]⁺ イオンと [M+Na]⁺ イオンでした。これらのイオン 種の測定された m/z 信号 (青) は予想される同位体比 (赤いボックス) と良好に一致しました。ソフトウェアによって全部で 10 種類のイオ ンが T-2 トキシンの [M+H]⁺、[M+NH₄]⁺、[M+Na]⁺ の種およびそれらの 同位体信号に割り当てられました。良好な質量精度および同位体パ ターンマッチングが 98.5 (100 点満点中) という良好なターゲットスコ アに反映されました。他の化合物のターゲットスコア (記載はあり ません) は All Ions MS/MS ワークフローの表 1 の値に相当します。

赤のひし形は MS/MS スペクトルがその m/z で取り込まれたことを示しています。分析対象ピーク範囲について MS/MS スペクトルを自動的に抽出し、PDCL に含まれるライブラリスペクトルと照らし合わせました。



図 4. とうもろこしサンプルに 30 ng/mL で添加した T-2 トキシンに ついて Find by Formula アルゴリズムによって得られた化合物の クロマトグラム (A) とピークスペクトル (B)。

表 1. ポジティブまたはネガティブな All Ions MS/MS 取り込みで測定した、	とうもろこし抽出物に 30 ng/mL で添加した 44 種類	の
マイコトキシンおよび菌代謝物の分析。		

	リテンション	/				ターゲット	共溶出
化合物	タイム (分)	分子式	イオン種	質量	質量誤差 (ppm)	スコア	スコア
15-モノアセトキシスシルペノール	5.61	C ₁₇ H ₂₄ O ₆	$[M+NH_4]^+$	324.1573	-2.52	96.8	96.3
16-ケトアスペルギルイミド	5.85	$C_{20}H_{27}N_{3}O_{4}$	[M+H] ⁺	373.2002	-1.61	94.9	94.9
3-アセチルデオキシニバレノール	4.88	$C_{17}H_{22}O_7$	[M+HC00] ⁻	338.1366	-2.73	98.0	
アフラトキシン B ₁	6.36	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	[M+H] ⁺	312.0634	-0.59	98.2	90.2
アフラトキシン B ₂	6.12	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	[M+H] ⁺	314.0790	0.86	98.5	96.9
アフラトキシン G ₁	5.83	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	[M+H] ⁺	328.0583	-0.65	99.6	97.0
アフラトキシン G₂	5.56	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	[M+H] ⁺	330.0740	1.06	98.3	96.5
アフラトキシン M ₁	5.62	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	[M+H] ⁺	328.0583	-0.14	97.7	95.3
アグロクラビン	4.77	C ₁₆ H ₁₈ N ₂	[M+H] ⁺	238.1470	-0.41	99.2	96.5
アルテルナリオール	7.48	C ₁₄ H ₁₀ O ₅	[M-H]	258.0528	0.27	97.5	96.6
アルテルナリオールメチルエーテル	8.72	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	[M-H]	272.0685	0.10	98.6	97.0
アスペルギリミド	4.48	C ₂₀ H ₂₉ N ₃ O ₃	[M+H] ⁺	359.2209	-0.57	99.1	97.2
ボーベリシン	10.09	C ₄₅ H ₅₇ N ₃ O ₉	$[M+NH_4]^+$	783.4095	0.24	99.2	95.5
ブレビアナミドF	4.99	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₂	[M+H] ⁺	283.1321	-0.63	96.8	98.7
クルブラリン	7.10	C ₁₆ H ₂₀ O ₅	[M+H]+	292.1311	-0.86	99.1	97.8
シクロピアゾン酸	8.86	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	336.1474	-3.01	97.3	96.7
シクロスポリン A	10.45	C ₆₂ H ₁₁₁ N ₁₁ O ₁₂	[M+HC00] ⁻	1201.8414	-4.30	85.5	96.4
ジアセトキシシルペノール	6.34	C ₁₉ H ₂₆ O ₇	[M+NH ₄] ⁺	366.1679	-1.48	96.9	92.3
デオキシニバレノール	2.99	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	[M+Na] ⁺	296.1260	-1.80	97.6	
エモジン	7.39	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M-H]	270.0528	-2.46	91.1	
エニアチン B	9.90	C ₃₃ H ₅₇ N ₃ O ₉	[M+NH ₄] ⁺	639.4095	-2.96	95.2	92.5
エルゴシン	6.29	C ₃₀ H ₃₇ N ₅ O ₅	[M+H] ⁺	547.2795	-3.30	94.2	82.2
エルゴシニン	6.19	C ₃₀ H ₃₇ N ₅ O ₅	[M+H] ⁺	547.2795	-1.18	95.9	93.5
エルゴタミニン/エルゴタミン	6.46	C ₃₃ H ₃₅ N ₅ O ₅	[M+H] ⁺	581.2638	-1.29	97.5	86.3
フモニシン B ₁	7.78	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅	[M+H] ⁺	721.3885	-3.12	87.2	
フモニシン B_2	8.69	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	[M+H] ⁺	705.3936	-2.42	97.3	96.6
フサレノン-X	3.91	C ₁₇ H ₂₂ O ₈	[M+Na] ⁺	354.1315	-4.80	89.0	
HT-2 トキシン	7.30	C ₂₂ H ₃₂ O ₈	$[M+NH_4]^+$	424.2097	-2.05	97.8	97.8
マクロスポリン	9.36	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M-H]	284.0685	0.33	97.6	96.6
モニリホルミン	0.72	C ₄ H ₂ O ₃	[M-H]	98.0004	-3.01	91.2	
ミコフェノール酸	7.75	C ₁₇ H ₂₀ O ₆	[M+H] ⁺	320.1260	-0.09	97.7	97.3
ニバレノール	2.15	C ₁₅ H ₂₀ O ₇	[M+HC00]-	312.1209	-3.22	87.4	
オクラトキシンA	8.38	C ₂₀ H ₁₈ CINO ₆	[M+H] ⁺	403.0823	-1.81	91.7	97.7
パラヘルクアミドA	6.26	C ₂₈ H ₃₅ N ₃ O ₅	[M+H] ⁺	493.2577	-0.85	96.7	96.8
パツリン	2.38	C ₇ H ₆ O ₄	[M-H]	154.0266	-1.07	99.7	92.0
ロケホルチン C	7.35	$C_{22}H_{23}N_5O_2$	[M+H] ⁺	389.1852	-0.36	98.9	97.3
スキリン	10.23	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₀	[M-H]	538.0900	-1.19	98.0	99.1
スタキボトリラクタム	9.22	C ₂₃ H ₃₁ NO ₄	[M+H] ⁺	385.2253	-1.10	99.5	97.0
スロクリン	6.21	C ₁₇ H ₁₆ O ₇	[M-H]	332.0896	-0.71	98.1	97.8
T-2 トキシン	7.83	C ₂₄ H ₃₄ O ₉	$[M+NH_4]^+$	466.2203	-0.18	97.4	97.7
テヌアゾン酸	6.19	C ₁₀ H ₁₅ NO ₃	[M+H] ⁺	197.1052	0.96	99.1	
テルフェニリン	6.75	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	[M+H] ⁺	338.1154	-1.79	98.3	95.4
ビリジカチン	7.97	C ₁₅ H ₁₁ NO ₂	[M+H] ⁺	237.0790	1.26	99.0	96.2
ゼアラレノン	8.36	C ₁₈ H ₂₂ O ₅	[M-H]	318.1467	0.10	99.3	96.0

図5では、30 ng/mL (一番上のパネル)の濃度で添加したとうもろこし 抽出物中のT-2トキシンをPCDLのライブラリスペクトル (一番下のパ ネル)と比較して示しています。中央のパネルは異なるスペクトル を反射鏡表示したものです。T-2トキシンのライブラリスペクトルに あるすべての主要フラグメントイオンが、20 eV のコリジョンエネル ギーのリファレンススペクトルと同様の比率で、狭い質量抽出枠内 の測定スペクトルにおいても検出されました。精密質量ライブラリ のリバースサーチにより、100 点中 95.9 というスコアが得られ、サ ンプル中の T-2 トキシンの存在が確認されました。詳細な化合物の 同定結果は図6の化合物の表に示されています。すべての化合物に ついてそれぞれ MS/MS スコアは示していませんが、60以上で検証さ れています (図7を参照)。

2種類のワークフローの比較

マイコトキシンおよび菌代謝物の精密質量スクリーニングを MS/MS ライブラリ検索による同定済み汚染物質の検証または All Ions MS/MS 取り込みと組み合わせて、添加した食品抽出物に適用しました。図 7 は30 ng/mL での 3 つの異なるマトリックスについて両方の取り込み モードの比較を示したものです。一般的に赤ワインは強い抑制効果 を示して他のマトリックスよりも低い検出率および検証率を示しま した。単一のコリジョンエネルギーでのターゲット MS/MS 取り込み とライブラリ照合の組み合わせは、フラグメント共溶出による All Ions MS/MS 取り込みでの検証率と同様の結果を示しました。特に、 プリカーサアイソレーションを使用すると、より影響を及ぼすマト リックスである低質量汚染物質の場合でも、All Ions MS/MS 取り込みは 非常に高速でエルゴシンとエルゴシニンなどの近接して溶出する異 性体を区別することができます。



図 5. とうもろこし抽出物に添加された T-2 トキシンで測定した スペクトルと Agilent マイコトキシンおよび関連代謝物の PCDL の リファレンススペクトルとの比較。

1	1 30		10.45	11.12	County		Mars was inc	elle vie beite e	ot va Gent	Do ya Res Gary	TV.	Sectors die	a illa via theat d	Nava Mida chi ya 38
100	3	13-73 Sec.	Test H.	12-19-20-0	074	1006 19420 MT	1001300	NELDER	40	H.C.	7.827	NE 13	1012228	011
100	. Tribana	T+ runsis T	· June Tree to	TT Pas	True la	All same T.F. M.	Info and TA	A	4 0.0 mT+	HJ. TA Viewa	in Section	LOT A BAR	NAME OF COMPANY	The Trible of The Hand
1.18	1.64	51 Y 34 54	Vic[4	ata	42.1901	1.54	294	4.71.354	0. 1.90	7.64 1142441	CI	14.6	114, 54.8-3	Call Content
	T THE	4-10-10	a lon barrow	art. hout	na last	Common States	an Assess of the Stat	and have		Geri	1.0	Variation of		
	.22	274.76	1 0	1914	176	824	11.7	R.M. Sena	card function	ins from March 1	Avalant.	04467+		
			Contraction of the last				- BAR SHOW				-	Second Second		
2.1	in the second	and the second second	1122	C. Andrew	0.042	44.0	and the s	1. Mar 11 1		of the second second	14			
52	and the second		145.75 47.07			1.7				0.5	10.1			
	1.000	made The	A Law The Lot	104 7-1		multiple Terri	Martin Press	an Lines 7 + Per	- Apr 1 1 4	weight of the Autor Tra				
	1000	414-5411		- 23	140.5	1000								
	11.20	10,0511		9.1	00001	1667.3			144					
	10.0		11		101			54						
	1.0.0	10.000			1.0									
	- Waser				199.4		*							
τ.	Sector, Se A	the loganet and	PON R Month	(*)0048	800C#,50	WHERE \$ 5, 20	A De l' Mile I	Y* how pears?	 consigno sh 	ALC: A STREET IN STR	DOX 5			
G.,	Marete		1825 04	R.I.;		812		M.1		05	46.0			
	- mit - 24+	- 140 Th.	11am 31 (11)	infat Trees	100 T 0	myst Data (T+)	Augusta We Au	ab. Litter T- tok	- Am I T + I	task barb. Date Tre				
	4,5,25,1	4(3,4/2)		100	1005.1	CHORE	1.0	1.61	1.01	· 6.4				
	142	107.56	1%	21	1001	1082	114	31	14	517				
					1.000	100.0		1/20						
	742.	-443/043	4.75		447.141									

図 6. とうもろこしサンプルに添加された T-2 トキシンについての化合物の同定の結果、 質量精度および MS スペクトルからの同位体情報、MS/MS スペクトルの比較を含む。

3	ターゲット MS /I	MS		All lons MS/MS			
赤ワイン	とうもろこし	ヘーゼルナッツ	化合物名	赤ワイン	とうもろこし ヘーゼルナッツ		
			15-モノアセトキシスシルペノール				
			16-ケトアスペルギルイミド				
			3-アセチルデオキシニバレノール				
			アフラトキシン B ₁				
			アフラトキシン B ₂				
			アフラトキシン G ₁				
			アフラトキシン G_2				
			アフラトキシン M ₁				
			アグロクラビン				
			アルテルナリオール				
			アルテルナリオールメチルエーテル				
			アスペルギリミド				
			ボーベリシン				
			ブレビアナミドF				
			クルブラリン				
			シクロピアゾン酸				
			シクロスポリン A				
			ジアセトキシシルペノール				
			デオキシニバレノール				
			エモジン				
			エニアチン B				
			エルゴシン				
			エルゴシニン				
			エルゴタミニン/エルゴタミン				
			フモニシン B ₁				
			フモニシン B ₂				
			フサレノン-X				
			HT-2 トキシン				
			マクロスポリン				
			モニリホルミン				
			ミコフェノール酸				
			ニバレノール				
			オクラトキシン A				
			パラヘルクアミド A				
			パツリン				
			ロケホルチン C				
			スキリン				
			スタキボトリラクタム				
			スロクリン				
			T-2 トキシン				
			テヌアゾン酸				
			テルフェニリン				
			ビリジカチン				
			ゼアラレノン				
FE	BF で検出され、	ライブラリ照合	EBE 不按山子	わた未給証の	化合物		
ま 検	たはフラグメン 証された化合物	ノトの共溶出によ 物					
				1 いみリッフルこ1じ	口 19J		

図 7. ターゲット MS/MS 取り込みとライブラリ検索または All Ions MS/MS 取り込みによる 3 種類のマトリックスでの 30 ng/mL のマイコトキシン および菌代謝物のスクリーニングおよび検証の結果。緑: 自動検出された化合物で存在を MS/MS ライブラリ照合またはフラグメント共溶出に よって検証、黄: 自動検出されたが検証可能な MS/MS スペクトルの取り込み適さなかった化合物。

実際のサンプルの分析

添加したマトリックスだけでなく、汚染されたヘーゼルナッツサン プルをメソッドに従って抽出し、All Ions MS/MS をポジティブおよび ネガティブモードで使用して 0-TOF LC/MS システムに注入しました。 キャリブレーションサンプルの All Ions MS/MS 評価からのプリカーサ およびフラグメント情報を MassHunter 定量分析にエクスポートして 定量データ処理メソッドの迅速な作成を実現しました。データ処理 の後、化合物一覧表示モジュールでサンプルに化合物別で結果を表 示しました。図 8 はヘーゼルナッツサンプル中で汚染物質として見 つかった 6 種類の菌代謝物のクロマトグラムを示しています。アル テルナリオール、アルテルナリオールメチルエーテル、ゼアラレノ ン、マクロスポリンはネガティブモードで分析されました。ブレビ アナミド F とミコフェノール酸はポジティブモードで分析されまし た。すべての化合物について、プリカーサ m/z および少なくとも 1 つのフラグメントイオンの質量誤差が化合物の同定に必要な 5 ppm 未満でした。

結論

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/Q-TOF/MS システム に注入します。Agilent 1290 Infinity LC のディレイボリュームの低さと UHPLC 分離での高い背圧の処理能力を利用してクロマトグラフィー 分離能を向上できます。このメソッドは、Agilent 6550 iFunnel Q-TOF の 感度、および Agilent Jet Stream イオンソースの汎用性の高いイオン化 性能を活用しています。

マイコトキシンおよび関連代謝物の精密質量 PCDL を作成し、食品サ ンプル中のマイコトキシンのスクリーニングと検証に適用しまし た。44 種類の菌代謝物を含む食品サンプルを分析することによって ターゲット MS/MS および All Ions MS/MS 取り込みを評価しました。両 方の取り込みモードは Agilent MassHunter ソフトウェアおよびユニーク な組み込み同定基準を用いてサンプル中のマイコトキシンの存在を 効果的に検証しました。ターゲット MS/MS の情報は低分子量の化合 物の分析をより信頼性が高いものにし、All Ions MS/MS データは初期 の測定中の分析範囲に含まれない化合物を検出、解析することがで きます。効率的にデータを確認するために、定量分析ソフトウェア を使用しました。このソフトウェアにより、精密質量、クオリファ イア率、ライブラリマッチスコア、リテンションタイム一致などの 品質基準を含め、クオンティファイアイオンおよびクオリファイア イオンを視覚化できます。

この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、さまざまな食料品での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。



(A) ブレビアナミド F (LLOQ 未満)、 (B) アルテルナリオール (310 μg/kg)、 (C) ミコフェノール酸 (6,100 μg/kg)、 (D) ゼアラレノン (21 μg/kg)、 (E) アルテルナリオールメチルエーテル (220 μg/kg)、 (F) マクロスポリン (520 μg/kg)。

参考文献

- Zöllner, P.; Mayer-Helm, B. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography–atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. J. Chromatogr. A. 2006, 1136, 123-169.
- Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (including amendments as of 01 September 2014).
- 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.
- Varga, E.; Berthiller, F.; Krska, R.; Schuhmacher, R.; Sulyok, M.; Glauner, T. 「UHPLC/MS/MS によるナッツ類に含まれるマイコ 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」 Application Note, Agilent Technologies, Inc., Publication number 5991-4991JAJP, 2014.
- Varga, E.; Mayer, K.; Sulyok, M.; Schuhmacher, R.; Krska, R.; Berthiller, F. Validation of a Stable Isotope Dilution Assay for the Accurate Quantitation of Mycotoxins in Maize Using UHPLC/MS/MS; Application Note, Agilent Technologies, Inc., Publication number 5991-2808EN, **2013**.

- Kempe, G.; Spitzbarth, F.; Glauner, T. 「果実および野菜中農薬の 精密質量スクリーニングと定量のための精密質量 LC/MS/MS ライブラリの開発と応用」 Application Note, Agilent Technologies, Inc., Publication number 5991-2227JAJP, 2013.
- Wüst, B.; Glauner, T.; Madden, S.; Taylor, L.; Payne, T. Rapid Pesticide Screening and Identification Using the High Resolution All Ions MS/MS Technique; Application Note, Agilent Technologies, Inc., Publication number 5991-2295EN, 2013.
- Chen, Y.; Cappozzo, J.; Stone, P. J. W. Sensitive Femtogram Determination of Aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in Food Matrices using Triple Quadrupole LC/MS; Application Note, Agilent Technologies, Inc., Publication number 5990-6894EN, 2011.

詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの 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.aglient.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. 2015 Printed in Japan April 9, 2015 5991-5667JAJP

