

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

著者

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

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。



Agilent Technologies

はじめに

マイコトキシンは穀物類、穀果類、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/Q-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細菌代謝物が含まれ、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、デュアルルーブ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 Ions 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。菌代謝物および細菌代謝物の分析標準は、Enzo Life Sciences (ラウゼン、スイス)、Biovitica 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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 5 g (± 0.01 g) を 50 mL ポリプロピレン製試験管に入れ、抽出溶媒 20 mL 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 に接続します。リファレンス質量イオンの送液には、流速 1.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ 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 $\mu\text{L}/\text{min}$ 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ン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ン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、 $2.7 \mu\text{m}$ (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-Ions 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 分

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undance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。

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ン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ン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、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ン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ン

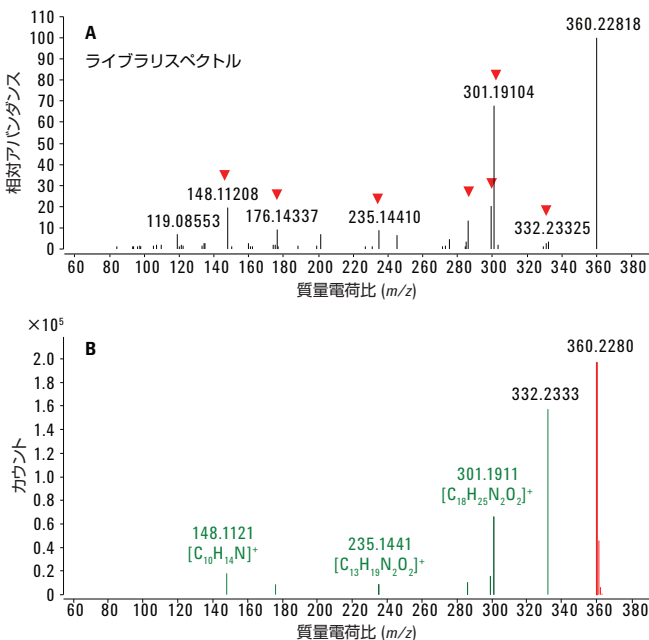


図 2. コリジョンエネルギーが 40 eV でのアスペルギリミドの精密質量ライブラリスペクトル (A) と添加したとうもろこしサンプルから取り込まれた高エネルギーチャンネル (クリーンなスペクトル) (B) との比較。ライブラリスペクトル内の赤色の三角形は All Ions MS/MS 評価用に自動的に選択したイオンを示しています。

な高エネルギーチャンネ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チャンネルは 10 と 40 eV の両方の高エネルギーチャン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undance、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ン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。

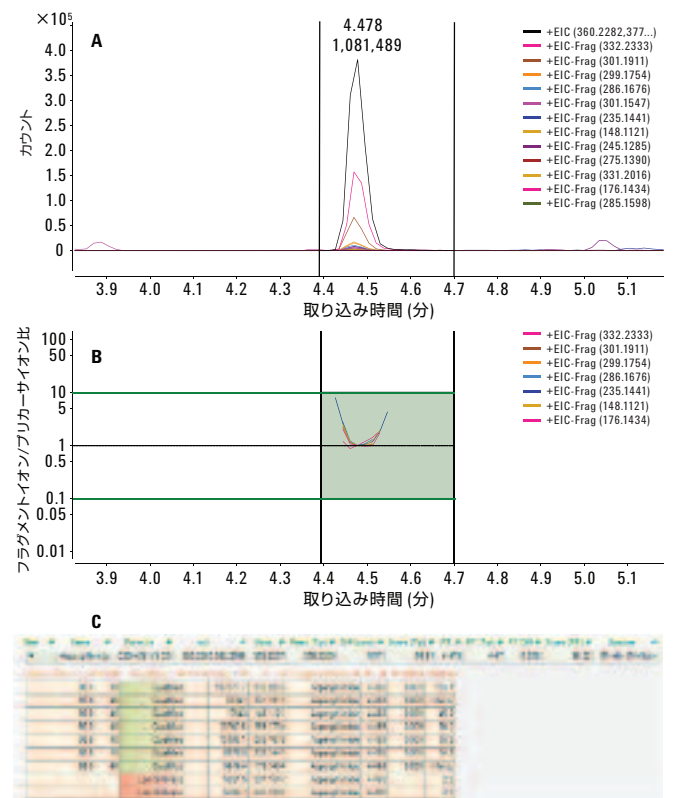


図 3. 添加したとうもろこしサンプル中のアスペルギリミドのプリカーサイオンとフラグメントイオントレースの重ね表示 (A)、共溶出プロット (B)、共溶出スコアを含む化合物同定結果 (C)。

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undance、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 $[M+NH_4]^+$ 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 $[M+H]^+$ 、 $[M+NH_4]^+$ 、 $[M+Na]^+$ 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。

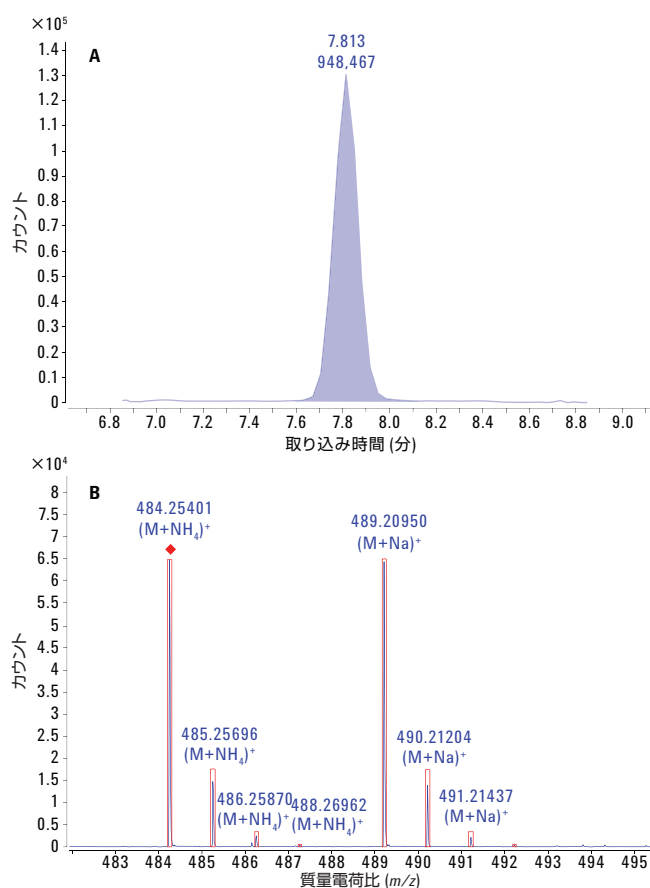


図 4. とうもろこしサンプルに 30 ng/mL で添加した T-2 トキシンの Find by Formula アルゴリズムによって得られた化合物のクロマトグラム (A) とピークスペクトル (B)。

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。

化合物	リテンション タイム (分)	分子式	イオン種	質量	質量誤差 (ppm)	ターゲット スコア	共溶出 スコア
15-モノアセトキシシルベノール	5.61	C ₁₇ H ₂₄ O ₆	[M+NH ₄] ⁺	324.1573	-2.52	96.8	96.3
16-ケトアスペルギリミド	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+HCOO] ⁻	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 G ₂	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 ₄₆ 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
シクロピアソン酸	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+HCOO] ⁻	1201.8414	-4.30	85.5	96.4
ジアセトキシシルベノール	6.34	C ₁₈ 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+HCOO] ⁻	312.1209	-3.22	87.4	
オクラトキシン A	8.38	C ₂₀ H ₁₈ ClNO 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 ₅ O 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毒素をPCDLのライブラリスpek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spekトルを反射鏡表示したものです。T-2毒素のライブラリスpek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spekトルと同様の比率で、狭い質量抽出枠内の測定spek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毒素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、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、プリカーサイソレーションを使用すると、より影響を及ぼすマトリクスである低質量汚染物質の場合でも、All Ions MS/MSフラグメンテーションよりも同定が向上しました。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。

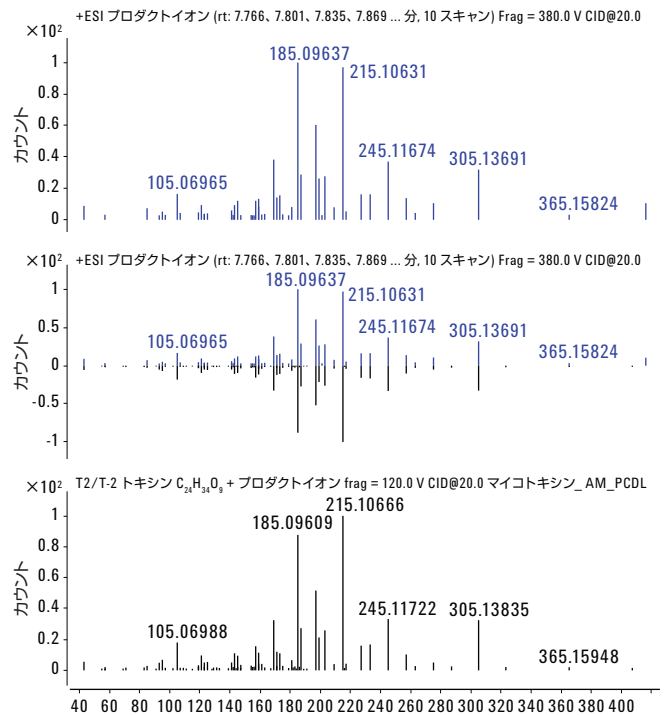


図5. とうもろこし抽出物に添加されたT-2毒素で測定したspekトルとAgilentマイコトキシンおよび関連代謝物のPCDLのリファレンスspekトルとの比較。

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

ターゲット MS/MS				All Ions 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-モノアセトキシシルベノール			
			16-ケトアスベルギリミド			
			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			
			アスベルギリミド			
			ボーベリシン			
			プレビアナミド F			
			クルブラリン			
			シクロピアゾン酸			
			シクロスボリン A			
			ジアセトキシシルベノール			
			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			
			マクロスボリン			
			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			
			バラヘルクアミド 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			

FBF で検出され、ライブラリ照合
 またはフラグメントの共溶出によって
 検証された化合物

FBF で検出された未検証の化合物

FBF で検出されなかった化合物

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 Q-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。プレビアナミド 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。

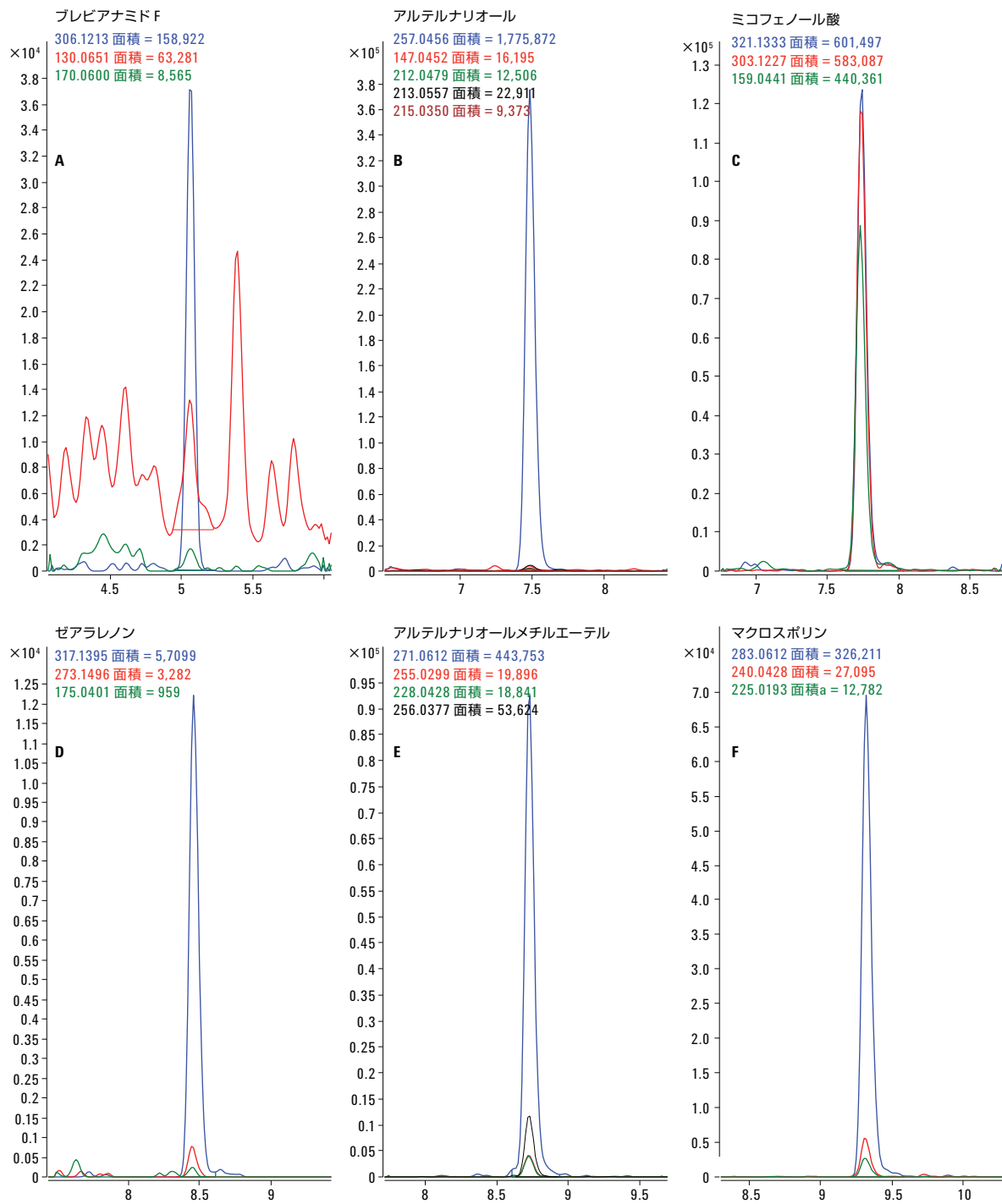


図 8. 自然汚染されたヘーゼルナッツサンプルで検出されたマイコトキシンのサンプルクロマトグラム。

(A) プレビアナミド F (LL0Q 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

1. 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.
2. 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).
3. 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.
4. 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**.
5. 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**.
6. 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**.
7. 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**.
8. 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.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. 2015

Printed in Japan

April 9, 2015

5991-5667JAJP



Agilent Technologies