

Captiva EMR-Lipid クリーンアップおよび LC/MS/MS を用いた乳児用調合乳中の マイコトキシンの分析

著者

Derick Lucas
Agilent Technologies, Inc.

概要

一部の国では、食品中のマイコトキシンの量が規制されています。しかし、タンパク質や脂質が含まれている食品もあり、含有物の複雑性のため、このマトリックス内の微量のマイコトキシンの正確な定量が困難な場合があります。このアプリケーションノートでは、QuEChERS (Quick (高速)、Easy (簡単)、Cheap (低価格)、Effective (効果的)、Rugged (高い耐久性)、Safe (安全)) ワークフローと、Agilent Captiva EMR-Lipid カートリッジによるクリーンアップを用いた固体および液体の乳児用調合乳中の 13 種類のマイコトキシンの分析について説明します。Captiva EMR-Lipid 充填剤の優れた選択性により、すべてのマイコトキシンにおいて高い回収率 (70.4 ~ 106.8 %) と精度 (<18 %) を得ることができました。このシンプルで堅牢な手法は、最小限の機器と専門知識のみを必要とするため、食品分析ラボで容易に実施できます。

はじめに

マイコトキシンは、穀物、トウモロコシやナッツなどの作物でカビ類の二次代謝物として生成されます。牛が汚染された飼料を摂取すると、マイコトキシンやその代謝物が牛の乳汁中に排出される可能性があります¹。アフラトキシン M1は、牛乳で最も一般的に検出されるマイコトキシンであり、米国および欧州を含む多くの国でモニタリングおよび規制の対象になっています^{2,3}。牛乳中についてアフラトキシン M1 以外のマイコトキシンの規制はありませんが、フモニシンやオクラトキシンなどの他のマイコトキシンのモニタリングにも関心が高まっています。

特に乳児用調合乳中の規制値は非常に低いため、低濃度での分析対象物のシグナルを改善するには、サンプル前処理でマトリックス干渉を除去する必要があります。免疫測定法や LC/MS メソッドを、イムノアフィニティ、固相抽出 (SPE)、または安定同位体希釈⁴ などのサンプル前処理法と組み合わせて、マイコトキシンの分析に使用することができます。しかし、脂質が多く複雑なサンプルは、タンパク質や脂質などのマトリックス成分が高濃度で含まれるため、特に問題となる場合があります。イムノアフィニティカートリッジは高価で、多くの場合、分析対象物やサンプルに特有のものです。他のクリーンアップ製品では、ターゲット化合物に対する選択性がなく脂質を除去する効果もないため、再現性の低下、マトリックス効果の発生、機器への蓄積の原因となります。

脂質除去製品である Agilent Captiva EMR-Lipid は、サイズ排除と疎水性相互作用を組み合わせることにより、ターゲット化合物の回収率を落とさずに脂質炭化水素鎖を選択的に保持できます。3 mL および 6 mL の Captiva EMR-Lipid チューブを使用すると、複数の種類の多成分残留分析においてパススルークリーンアップが容易になり、脂質の多いサンプル抽出物から脂質が選択的に除去されます。QuEChERS 抽出により、液体および粉末の乳児用調合乳から 13 種類のマイコトキシンを抽出します。QuEChERS はさまざまなクラスの分析対象物に関して抽出効率が高いことで定評がありますが、同時に大量のマトリックスを抽出してしまうこともあります。Captiva EMR-Lipid カートリッジを使用することで脂質除去率が高くなり、ターゲットのマイコトキシンを正確に定量できます。乳児用調合乳に関するメソッドのバリデーションは、アフラトキシン (AF-B1、B2、G1、G2、M1)、オクラトキシン (OTA、OTB)、フモニシン (FB1、FB2、FB3)、ゼアラレノン (ZON)、ミコフェノール酸 (MPA)、およびステリグマトシステン (STC) を用いて 3 段階のスパイク濃度レベルで実施しました。今回のメソッドでは、この複雑で脂質の多いマトリックス内の微量濃度のマイコトキシンに対して、優れた回収率、精度、および感度が達成されました。

実験方法

サンプル前処理

- Captiva EMR-Lipid 3 mL チューブ (部品番号 5190-1003)
- Captiva EMR-Lipid 6 mL チューブ (部品番号 5190-1004)
- QuEChERS オリジナル法 (部品番号 5982-5555)
- VacElut SPS24 真空マニホールド (部品番号 12234022)

LC の構成とパラメータ

構成	
Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)	
Agilent 1290 Infinity II マルチサンブラ (G7167B)	
Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)	
分析カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、 2.1 × 100 mm、2.7 μm、LC カラム (部品番号 695775-902) Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、 2.1 × 5 mm、2.7 μm、ガードカラム (部品番号 821725-911)
カラム温度	40 °C
注入量	5 μL
移動相 A	5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 + 0.1 % 酢酸
移動相 B	1:1 アセトニトリル (ACN):メタノール + 0.1 % 酢酸
流量	0.5 mL/min
グラジエント	5 %B から開始 1 分間保持 4 分で 50 %B から 60 %B まで上昇 7 分で 98 %B まで 1 分間保持
ポストタイム	2 分間
ニードル洗浄	1:1:1 H ₂ O:ACN:イソプロパノール (10 秒間)
バイアル	2 mL バイアル (部品番号 5190-4044) PTFE キャップ (部品番号 5182-0725) インサート (部品番号 5183-2086)

MS/MS の構成

構成	
Agilent 6490 トリプル四重極 LC/MS (Agilent Jet Stream 搭載)	
MS/MS モード	ダイナミック MRM
イオンモード	ポジティブ/ネガティブ
ドライガス温度	250 °C
ドライガス流量	8 L/min
ネブライザ圧力	40 psi
ソースガス温度	350 °C
ソースガス流量	11 L/min
キャピラリー電圧	5,000 V
EMV	500 V(+) 0 V(-)
ノズル電圧	1,500 V(+) 0 V(-)

MS/MS パラメータ

化合物	プリカーサイオン	定量イオン (CE)	定性イオン (CE)	フラグメント (V)	リテンション タイム (分)
アフラトキシン M1	329.1	313.0 (24)	115.1 (88)	135	1.842
アフラトキシン G2	331.1	313.0 (24)	115.1 (88)	165	1.916
アフラトキシン G1	329.1	243.2 (24)	200.0 (44)	175	2.018
アフラトキシン B2	315.1	287.0 (28)	259.0 (32)	175	2.104
アフラトキシン B1	313.1	285.2 (24)	128.1 (84)	170	2.223
フモニシン B1	722.4	352.3 (36)	334.4 (44)	200	2.810
オクラトキシン B	370.0	205.0 (16)	120.1 (96)	120	3.200
ミコフェノール酸	321.1	302.9 (4)	206.9 (20)	90	3.235
フモニシン B3	706.4	336.3 (36)	318.5 (40)	200	3.676
ゼアラレノン	317.1	175 (24)	131 (28)	175	4.217
フモニシン B2	706.4	336.3 (36)	318.5 (40)	200	4.398
オクラトキシン A	404.1	239.0 (24)	120.1 (96)	120	4.398
ステリグマトシスチン	325.0	310.0 (24)	281 (40)	150	4.525

表 1. サンプル QC 濃度

分析対象物	LQ (ng/g)	MQ (ng/g)	HQ (ng/g)
アフラトキシン B1 (AF-B1)	2	10	20
アフラトキシン B2 (AF-B2)	2	10	20
アフラトキシン G1 (AF-G1)	2	10	20
アフラトキシン G2 (AF-G2)	2	10	20
アフラトキシン M1 (AF-M1)	1	5	10
フモニシン B1 (FB1)	10	50	100
フモニシン B2 (FB2)	10	50	100
フモニシン B3 (FB3)	10	50	100
ミコフェノール酸 (MPA)	2	10	20
オクラトキシン A (OTA)	2	10	20
オクラトキシン B (OTB)	1	5	10
ステリグマトシスチン (STC)	2	10	20
ゼアラレノン (ZON)	2	10	20

材料および試薬

定量とマトリックス除去の検討には、地域の食料品店で購入した食品サンプルを用いました。標準と内部標準はプレミックス溶液として、Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) または Romer Labs (ゲッツァースドルフ、オーストリア) から購入しました。LC 溶媒は Honeywell (マスキーゴン、ミシガン州、米国) から購入しました。

メソッドバリデーション

乳児用調合乳中のマイコトキシンのバリデーションは、2 つのダブルブランク、2 つのブランク、6 つのキャリブレータ、および 3 つの QC レベルから構成されるバッチで実施しました。QC は表 1 に示すように 6 回 (n = 6) の繰り返し分析でプレスパイクし、2 セットの検量線用サンプルの間で注入しました。検量線は次の 6 つのレベルにより作成しました。

- 0.25、1、5、10、20、40 ng/mL (AF-B1、AF-B2、AF-G1、AF-G2、MPA、OTA、STC、ZON)
- 0.125、0.5、2.5、5、10、20 ng/mL (AF-M1、OTB)
- 1.25、5、25、50、100、200 ng/mL (FB1、FB2、FB3)

同位体標識された内部標準 ¹³C₁₇-AF-B1 は 5 ng/mL でスパイクしました。

サンプル前処理の手順

粉末の乳児用調合乳 (5 g) は、キャリブレータと QC を適切なレベルでプレスパイクし、抽出前に 1 時間以上完全に浸潤させました。次に、サンプルに 10 mL の水を加え、浸潤させました。液体の乳児用調合乳は、10 g を抽出に使用し、キャリブレータと QC を適切なレベルでプレスパイクしました。水はさらに追加する必要はありませんでした。粉末と液体の乳児用調合乳はいずれも、2 % 酢酸を含む 10 mL のアセトニトリルおよび QuEChERS オリジナル法キット (4 g MgSO₄、1.5 g NaCl) を加え、ジェノグラインダーで 10 分間縦方向に振とうして抽出しました。続いて 5,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。上部アセトニトリル層 (8 mL) を新しい 15 mL チューブに移して 2 mL の水 (容量で 20 % の水) で希釈し、ボルテックスしました。この抽出物 (2.5 mL) を 3 mL Captiva EMR-Lipid チューブにロードし、自然落下で流しました。抽出物が Captiva EMR-Lipid チューブを通して完全に溶出したら (約 10 分間)、1 ~ 10 inHg の圧力勾配で吸引してチューブ内の液をドレインしました。プレスパイクサンプルは、溶出液 0.500 mL をオートサンブラチューブに移して、0.1 % 酢酸を含む 5 mM 酢酸アンモニウムを 0.300 mL 加えました。マトリックスマッチキャリブラントは、ブランク溶出液 0.500 mL をオートサンブラチューブに移して、0.1 % 酢酸を含む 5 mM 酢酸アンモニウム 0.270 mL と適切な標準液 0.030 mL を用いて前処理しました。

結果と考察

直線性

データは Agilent MassHunter 定量ソフトウェアで処理しました。13 種類のマイコトキシンに対して、直線回帰と $1/x^2$ 重み付けを適合させた場合の検量線 R^2 値は 0.992 ~ 0.998 でした。すべてのキャリブレーションの真度が、予想された値の $\pm 10\%$ 以内に収まっていました。

真度と精度の結果

表 2 に示したように、優れた結果が得られました。すべての QC の回収率は 70 ~ 120 % であり、すべてのレベルにおいて $\%RSD < 20$ でした (大部分は $\%RSD < 10$)。アセトニトリルによる抽出効率が低かったため、この検討ではフモニシンのみマイコトキシンの中で分析困難でした。最適化によって明らかになったことは、2 % ギ酸を加えることにより、他の種類に悪影響を与えずに分析対象物の溶解度が大幅に増大したということです。

EMR-Lipid のメカニズム

EMR-Lipid の選択性は、サイズ排除と疎水性相互作用を組み合わせたメカニズムに起因するものです。脂質は直線的で枝分かれのない炭化水素鎖を備えていますが、これは EMR-Lipid 充填剤に入り込むのに十分小さいものです。脂質は充填剤の内部に入り込むと、疎水性相互作用により所定の位置に取り込まれます。大部分の分析対象物には直線的で枝分かれのない炭化水素鎖は含まれておらず充填剤には入り込まないため、分析時には溶液中に残されたままになります。炭化水素鎖が短くなると (< 6 炭素) EMR-Lipid によってそれほど強く結合されず、鎖が長い脂質と同じくらいの効率では除去されません。EMR-Lipid 独自のメカニズムは、マトリックス干渉を受けやすい複数の種類の多成分残留分析に最適です。

表 2. 乳児用調合乳中の 13 種類のマイコトキシンの回収率と精度の結果 (n = 6)

分析対象物	乳児用調合乳 (液体)					
	LQ		MQ		HQ	
	% 回収率	% RSD	% 回収率	% RSD	% 回収率	% RSD
アフラトキシン M1	92.6	5.5	96.1	3.7	94.5	3.8
アフラトキシン G2	82.6	2.6	91.4	5.5	87.5	5.1
アフラトキシン G1	86.9	2.4	97.7	3.2	93.7	3.4
アフラトキシン B2	86.9	2.6	97.5	2.7	91.1	4.2
アフラトキシン B1	88.3	1.8	99.6	4.3	92.0	3.2
フモニシン B1	80.6	2.1	89.2	3.7	82.5	2.0
オクラトキシン B	89.2	6.7	96.8	2.7	93.2	3.1
ミコフェノール酸	83.0	2.7	92.1	4.6	93.3	3.7
フモニシン B3	87.0	4.4	88.1	5.8	90.1	4.6
ゼアラレノン	91.0	2.2	92.5	7.2	88.2	3.4
フモニシン B2	82.2	5.3	88.5	4.9	88.0	5.0
オクラトキシン A	84.4	2.3	92.8	5.7	90.5	2.0
ステリグマトシステン	85.8	1.9	88.2	7.0	91.4	3.6

分析対象物	乳児用調合乳 (粉末)					
	LQ		MQ		HQ	
	% 回収率	% RSD	% 回収率	% RSD	% 回収率	% RSD
アフラトキシン M1	97.5	5.1	96.9	4.9	100.4	4.6
アフラトキシン G2	100.6	5.5	98.4	1.5	101.9	3.7
アフラトキシン G1	101.5	1.4	98.2	3.3	101.7	5.1
アフラトキシン B2	101.0	3.4	99.3	3.5	102.1	4.2
アフラトキシン B1	99.7	3.6	97.5	3.6	100.5	4.7
フモニシン B1	85.1	11.8	85.7	11.1	92.9	12.0
オクラトキシン B	102.5	6.5	98.4	2.8	106.8	4.6
ミコフェノール酸	106.2	6.3	98.8	1.4	101.8	4.6
フモニシン B3	76.0	12.8	94.2	17.2	96.8	5.1
ゼアラレノン	99.9	5.6	100.6	2.4	103.2	4.0
フモニシン B2	70.4	13.7	73.2	7.6	72.4	10.4
オクラトキシン A	98.1	5.9	97.1	4.3	102.3	3.7
ステリグマトシステン	87.5	4.7	87.3	2.7	93.1	3.3

他社製品との比較 — 回収率と精度

Captiva EMR-Lipid (6 mL カートリッジ) と市販の他社製パススルークリーンアップ製品 (他社製品 A、6 mL、500 mg) について、回収率と精度を評価しました。この評価では、回収率と精度に影響を及ぼす抽出を避けるため、乳児用調合乳抽出物を直接スパイクしました。結果を表 3 に示します。Captiva EMR-Lipid は高い回収率を示しており、特にゼアラレノン、オクラトキシン A、およびステリグマトシスチンに対して顕著に表れています。Captiva EMR-Lipid 独自の充填剤により、脂質を選択的に除去できます。一方、他社製品では、特に疎水性が高い分析対象物の場合、望まない対象物の吸着が生じることがあります。

GC/MS によるマトリックス除去のモニタリング

バリデーションは LC/MS により実施していますが、クリーンアップしたサンプルを GC/MS フルスキャンで比較することにより、マトリックスと脂質の除去に関する貴重な情報が得られます。図 1 に、Captiva EMR-Lipid によるクリーンアップ前後における、乳児用調合乳の GC/MS フルスキャンクロマトグラムを示します。黒のトレースは、クリーンアップを実施していないサンプルのクロマトグラムで、他のマトリックス共溶出物と同様に脂質も現れています。Captiva EMR-Lipid クリーンアップ後の乳児用調合乳 (紫) は 90 % のマトリックス除去を示しています。値は式 1 により計算しました。溶出時間が遅いマトリックスは完全に除去されており、溶出時間が早いマトリックスも大幅に減少しましたが、完全には除去されませんでした。

表 3. Captiva EMR-Lipid と他社製品 A のパススルークリーンアップの回収率と精度の比較 (乳児用調合乳、5 ng/mL、n = 4)

分析対象物	Captiva EMR-Lipid		他社製品 A	
	回収率 (%)	% RSD	回収率 (%)	% RSD
アフラトキシン M1	96.1	3.6	93.5	4.4
アフラトキシン G2	100.9	0.5	89.5	4.4
アフラトキシン G1	102.4	1.6	86.1	4.8
アフラトキシン B2	100.8	3.2	84.2	4.7
アフラトキシン B1	98.4	4.0	85.3	5.5
フモニシン B1	96.6	3.4	77.3	3.8
オクラトキシン B	104.9	6.4	76.7	7.5
ミコフェノール酸	90.8	7.2	79.3	7.0
フモニシン B3	103.1	11.6	76.8	11.5
ゼアラレノン	96.1	3.1	46.7	7.5
フモニシン B2	85.0	6.9	85.1	9.6
オクラトキシン A	95.1	10.9	66.4	11.7
ステリグマトシスチン	99.6	4.1	50.1	10.3

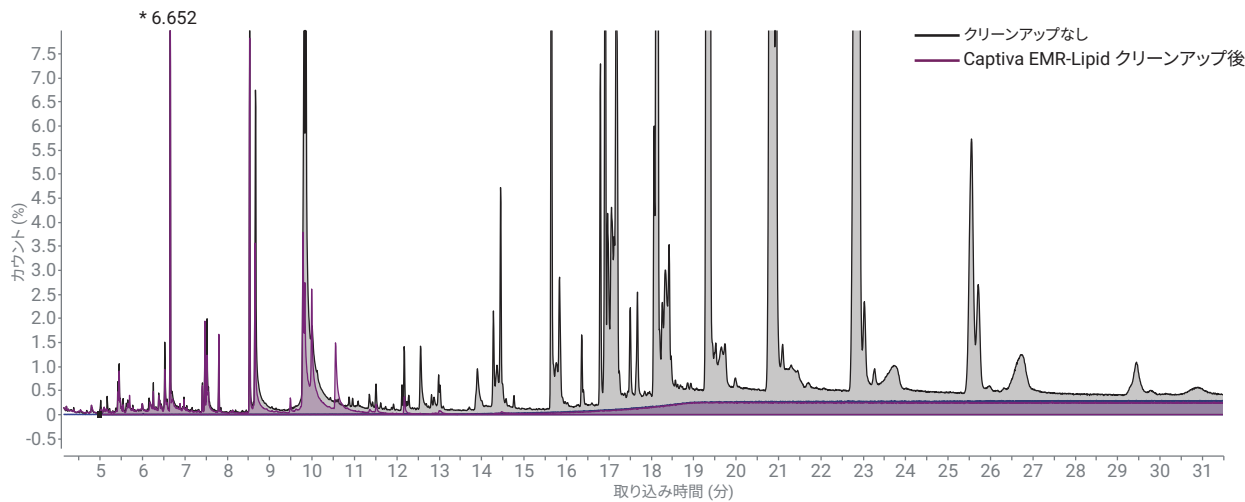


図 1. クリーンアップ前と Captiva EMR-Lipid クリーンアップ後の乳児用調合乳サンプルの GC/MS フルスキャンクロマトグラム比較によるマトリックス除去の評価

% マトリックス除去 =
$$\frac{(\text{ピーク面積}_{\text{ブランク, クリーンアップなし}} - \text{ピーク面積}_{\text{ブランク, Captiva クリーンアップ}})}{(\text{ピーク面積}_{\text{ブランク, クリーンアップなし}} - \text{ピーク面積}_{\text{試薬ブランク}})} \times 100$$

式 1. クロマトグラムの総ピーク面積を用いた % マトリックス除去の計算式

結論

本アプリケーションノートでは、複数の種類のマイコトキシンの分析に関して、Captiva EMR-Lipid で簡単に効果的なクリーンアップができることが示されました。乳児用調合乳のバリデーションでは、優れた回収率 (70.4 ~ 106.8 %)、精度 (< 18 %)、感度 (1.0 ng/g まで検出可能) を達成しました。GC/MS フルスキャンにより、効率的なクリーンアップが実施されていることが実証されました。Captiva EMR-Lipid を使用した場合のマイコトキシンの回収率は、市販の他社製クリーンアップ製品を使用した場合よりも大幅に高いことがわかります。脂質のマトリックス除去および分析対象物の回収率は幅広いアプリケーションにおいて高い値を示しており、今回の実験結果の範囲を上回っている場合もあります^{5,6}。Captiva EMR-Lipid は、複数の種類の多成分残留分析で選択的な脂質クリーンアップが実施可能な新世代の製品であり、サンプル前処理を容易にすると同時にメソッドの性能向上を目指しているラボにとって最適です。

参考文献

1. Jard, G.; *et al.* Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Addit. Contam. Part Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* **2011**, *11*, 1590-1609.
2. Guidance for Industry: Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed. <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ChemicalContaminantsMetalsNaturalToxinsPesticides/ucm077969.htm#afla> (accessed August 27, **2018**).
3. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:02006R1881-20140701> (accessed August 27, **2018**).
4. Zhang, Z.; *et al.* Determining Mycotoxins in Baby Foods and Animal Feeds Using Stable Isotope Dilution and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 8935-8943.
5. Zhao, L.; Lucas, D. Multiclass Multiresidue Veterinary Drug Analysis in Beef Using Agilent Captiva EMR-Lipid Cartridge Cleanup and LC/MS/MS, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-8598EN.
6. Lucas, D.; Zhao, L. Multiclass Mycotoxin Analysis in Cheese Using Agilent Captiva EMR-Lipid Cleanup and LC/MS/MS, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-8694EN.

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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2018

Printed in Japan, October 19, 2018

5994-0365JAJP