

Captiva EMR-Lipid クリーンアップおよび LC/MS/MS を用いたピーナッツバター中の 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。ピーナッツバターの場合、ピーナッツの栽培や保存中にマイコトキンによる汚染が生じることがあります。しかし、ピーナッツバターはタンパク質や脂質が多く含まれているため、このマトリックス内の低レベルのマイコトキシンの正確な定量が非常に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ピーナッツバター中の 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ンにおいて高い回収率 (78.7 ~ 119.1 %) と精度 (<17 %) 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。ピーナッツバター の汚染は、収穫前や保存中にマイコトキシンに汚染されたピーナツから生じます¹。食品中のマイコトキシンは、米国および欧州を含む多くの国で規制対象になっています^{2,3}。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、マイコトキシンの検出と測定に使用します。しかし、ピーナッツバターのような脂質が多く複雑なサンプルは、ターゲット化合物の濃度が相対的に低く、分析に干渉する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、特に脂質などのマトリックス共溶出物を効果的かつ選択的に除去することは困難であり、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。Captiva EMR-Lipid 3 mL および 6 mL カートリッジを使用すると、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、ピーナッツバターから 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。ピーナッツバター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、この高脂質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、および感度が得られました。

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)
- 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 ギ酸アンモニウム水溶液 + 0.1 % ギ酸
移動相 B	1:1 アセトニトリル:メタノール + 0.1 % ギ酸
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
ニードル洗浄	1:1:1 H ₂ O:アセトニトリル: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

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

ピーナッツバター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 つのキャリブレーション、および 3 つの QC レベルから構成されるパ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に注入しました。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 $^{13}\text{C}_{17}$ -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

キャリブレーションと QC を適切なレベルでプレスパイクし、抽出前にピーナッツバターマトリックス (5 g) 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。サンプルに 2 % ギ酸を含む 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 MgSO_4 、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

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

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 % ギ酸を含む 5 mM ギ酸アンモニウムを 0.300 mL 加えました。マトリックスマッチキャリブレーションは、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 % ギ酸を含む 5 mM ギ酸アンモニウム 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 0.993 ~ 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、この研究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 % 酢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。

表 2. ピーナッツバター中の 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	ピーナッツバター					
	LQ		MQ		HQ	
	% 回収率	% RSD	% 回収率	% RSD	% 回収率	% RSD
アフラトキシン M1	100.9	6.4	93.5	5.4	95.6	6.3
アフラトキシン G2	103.4	9.4	101.3	6.3	101.0	6.5
アフラトキシン G1	103.7	5.4	99.7	6.0	103.0	5.6
アフラトキシン B2	105.7	3.1	97.0	4.4	99.2	4.9
アフラトキシン B1	99.5	7.6	95.2	3.1	98.6	4.0
フモニシン B1	119.1	12.3	108.6	4.9	114.1	10.1
オクラトキシン B	109.8	6.0	102.1	4.9	102.2	5.0
ミコフェノール酸	113.8	7.5	100.0	4.4	101.3	4.3
フモニシン B3	94.4	16.2	102.1	11.7	113.6	9.1
ゼアラレノン	103.0	8.3	101.2	3.0	97.2	6.8
フモニシン B2	78.7	10.2	90.1	8.7	92.7	9.5
オクラトキシン A	103.3	5.9	98.2	5.4	100.2	4.8
ステリグマトシステン	90.3	5.7	84.6	3.9	87.3	4.1

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。

GC/MS によるマトリックス除去のモニタリング

ピーナッツバターはタンパク質とさまざまな脂質クラスを含んでいます。タンパク質は、アセトニトリルベースの QuEChERS 抽出時に効率的に除去されます。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、ピーナッツバターの 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ピーナッツバター (緑) は 60.4 % 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。

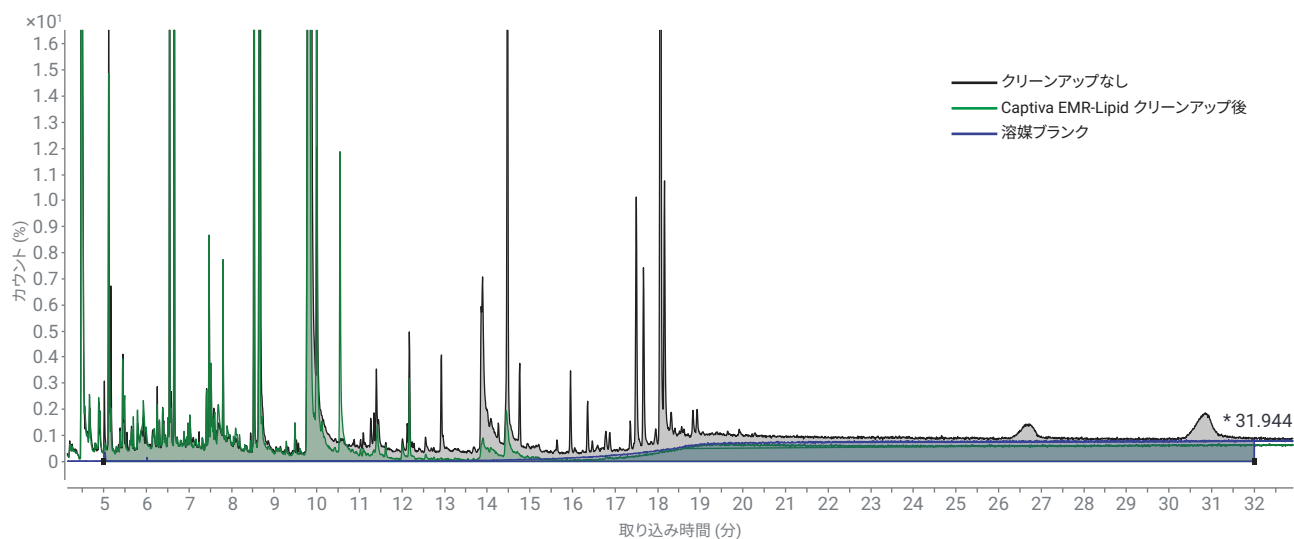


図 1. クリーンアップ前と Captiva EMR-Lipid クリーンアップ後のピーナッツバターサンプルの GC/MS フルスキャンクロマトグラム比較によるマトリックス除去の評価

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

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。ピーナッツバターのバリデーションでは、優れた回収率 (78.7 ~ 119.1 %)、精度 (< 17 %)、および感度 (1 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。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. Offiah, N.; Adesiyun, A. Occurrence of Aflatoxins in Peanuts, Milk, and Animal Feed in Trinidad. *J. Food. Prot.* **2007**, *70*(3), 771-775.
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, K.; *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
5994-0366JAJP