

Application News

No. C165

LC/MS

かび毒規制 18 成分の LC/MS/MS による一斉分析 (2)

フザリウム属のいくつかの種が産生する、かび毒（マイコトキシン）は構造的に多様な二次代謝物群であり、さまざまな食品や飼料を汚染し、結果的に人間や動物の健康に影響をおよぼすと報告されています。EU では、人間や動物の健康に対する問題を最小化するために、食品や飼料におけるマイコトキシン類の最大許容値を設定しています。毒性学的に最も重要なフザリウム属が産生するマイコトキシンとして、デオキシニバレノール（DON）、T-2 毒（T-2）を含むトリコセン類、ゼアラレノン（ZON）あるいはフモニシン B1（FB1）などが挙げられます。

本アプリケーションでは、食の安全上問題となる主要な 18 種類のマイコトキシンを対象とした LC/MS/MS による一斉分析法を、ご紹介します。

開発したメソッドにより、12.5 分のサイクルタイムで、アフラトキシン類（B1、B2、G1、G2）、フモニシン類（B1、B2、B3）、オクラトキシン A（OTA）およびトリコセン類（3-アセチルデオキシニバレノール（3-AcDON）、15-アセチルデオキシニバレノール（15-AcDON）、デオキシニバレノール（DON）、ジアセトキシスシルペノール（DAS）、フザレノン-X（FUS-X）、HT-2、ネオソラニノール（NEO）、ニバレノール（NIV）、T-2、ゼアラレノン（ZON））の分析を可能としました。定量限界は、EC/1886/2006 に規定されている最大値以下もしくは同等を達成しました。

試料と分析条件

測定試料は、イギリスの受託分析会社である Concept Life Sciences 社より、同社が開発した抽出プロトコルに基づき処理、提供されました。

測定機器は、UHPLC Nexera X2 とトリプル四重極型質量分析計 LCMS-8060 を用いました。3 種類の位置異性体ペア（3-AcDON/15-AcDON、FB2/FB3 および FA2/FA3）を分離するために、ペンタフルオロフェニル（PFP）結合型カラムを用い、C18 カラムと比較しました。

信号強度を向上させるために、移動相として酢酸アンモニウム、フッ化アンモニウム、ギ酸アンモニウムおよび酢酸溶液を検討しました。検討の結果として、フッ化アンモニウム水溶液と、酢酸をフッ化アンモニウムメタノール溶液に添加した溶液を移動相として採用しました。この移動相条件は、今回検討したすべてのかび毒のポジティブモードのイオンについて、信号強度の大幅な向上が確認されました。定量結果は、抽出処理段階でかび毒の ^{13}C 内部標準品を添加して、算出しました。測定に使用したすべての溶媒は、LCMS グレード（Sigma-Aldrich 製）を用いました。

D. Baker^{*1}, C. Titman^{*1}, N. Loftus^{*1}, J. Horner^{*2}

^{*1}: Shimadzu, Manchester, UK

^{*2}: Concept Life Sciences, Cambridge, UK

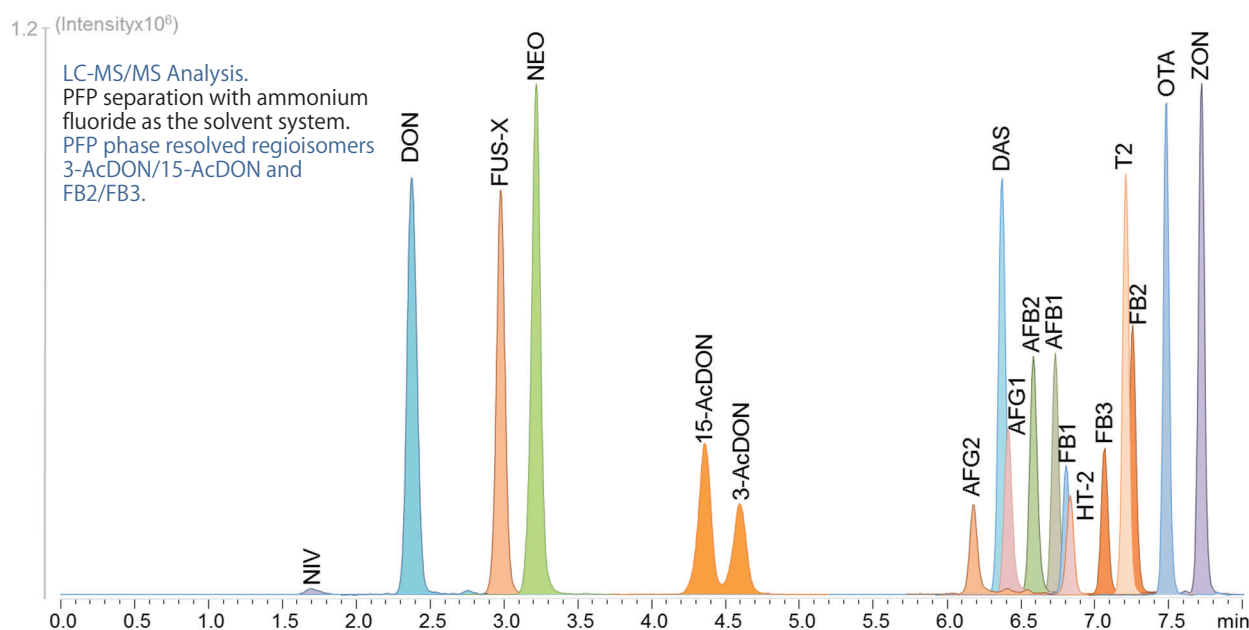


図 1 かび毒 18 成分の MRM クロマトグラム (Mastro PFP カラム)

AFB1 (aflatoxin B1; 1 $\mu\text{g/kg}$; rescaled x3), AFB2 (aflatoxin B2; 1 $\mu\text{g/kg}$; rescaled x3), AFG1 (aflatoxin G1; 1 $\mu\text{g/kg}$; rescaled x3), AFG2 (aflatoxin G2; 1 $\mu\text{g/kg}$; rescaled x3), OTA (ochratoxin A; 4 $\mu\text{g/kg}$; rescaled x2), FB1 (fumonisins B1; 100 $\mu\text{g/kg}$; rescaled x2), FB2 (fumonisins B2; 100 $\mu\text{g/kg}$; rescaled x2), FB3 (fumonisins B3; 100 $\mu\text{g/kg}$; rescaled x2), 15-AcDON (15-acetyldeoxynivalenol; 100 $\mu\text{g/kg}$), 3-AcDON (3-acetyldeoxynivalenol; 100 $\mu\text{g/kg}$), DON (deoxynivalenol; 100 $\mu\text{g/kg}$), DAS (diastereoisomer of deoxynivalenol; 100 $\mu\text{g/kg}$), FUS-X (fusarenon-X; 100 $\mu\text{g/kg}$), HT-2 (100 $\mu\text{g/kg}$), T-2 (100 $\mu\text{g/kg}$; rescaled x0.3), NEO (neosolaniol; 100 $\mu\text{g/kg}$; rescaled x0.3), NIV (nivalenol; 100 $\mu\text{g/kg}$), ZON (zearalenone; 100 $\mu\text{g/kg}$)

■イオン信号強度へのフッ化アンモニウム
の影響

一般的に、フッ化アンモニウムは気化状態で高い塩基性を示し、ネガティブモードのイオン化において低分子化合物の感度向上に効果的であることが知られています。

しかし、今回、かび毒分析に用いられる一般的な移動相条件と比較検討した結果、フッ化アンモニウムを移動相に添加することにより、ポジティブモードにおいてもイオンの信号強度を向上させることが明らかとなりました。

図2に、移動相にフッ化アンモニウムを添加し、イオンの信号強度が向上した例を示します。3種のクロマトグラムの縦軸は同じ信号強度で正規化しました。フッ化アンモニウム添加移動相は他の条件と比較して、ポジティブモードにおける各カビ毒のイオン信号強度が大きく向上しています(図2a)。

表1 分析条件	
UHPLC	Nexera X2 LC system
Analytical column	Mastro PFP (100 mmL×2.1 mm I.D., 3 μm)
Column temperature	40 °C
Flow rate	0.4 mL/min
Solvent A	0.15 mmol/L ammonium fluoride aqueous solution
Solvent B	0.15 mmol/L ammonium fluoride methanol solution with 2 % acetic acid
Binary Gradient	B conc. 15 % (0 min) - 25 % (1 min) - 40 % (2 min) - 41 % (4.5 min) - 100 % (7.5 - 10 min) - 15 % (10.1 min) - Stop (12.5 min)
Mass spectrometer	Shimadzu LCMS-8060
Pause time/Dwell time	1 msec/10-40 msec
Polarity switching time	Pos/neg switching time set to 5 msec
Source temperatures	300 °C; 400 °C; 250 °C
(interface; heat block; DL)	
Gas flows	3 L/min; 10 L/min; 10 L/min
(nebulising; heating; drying)	

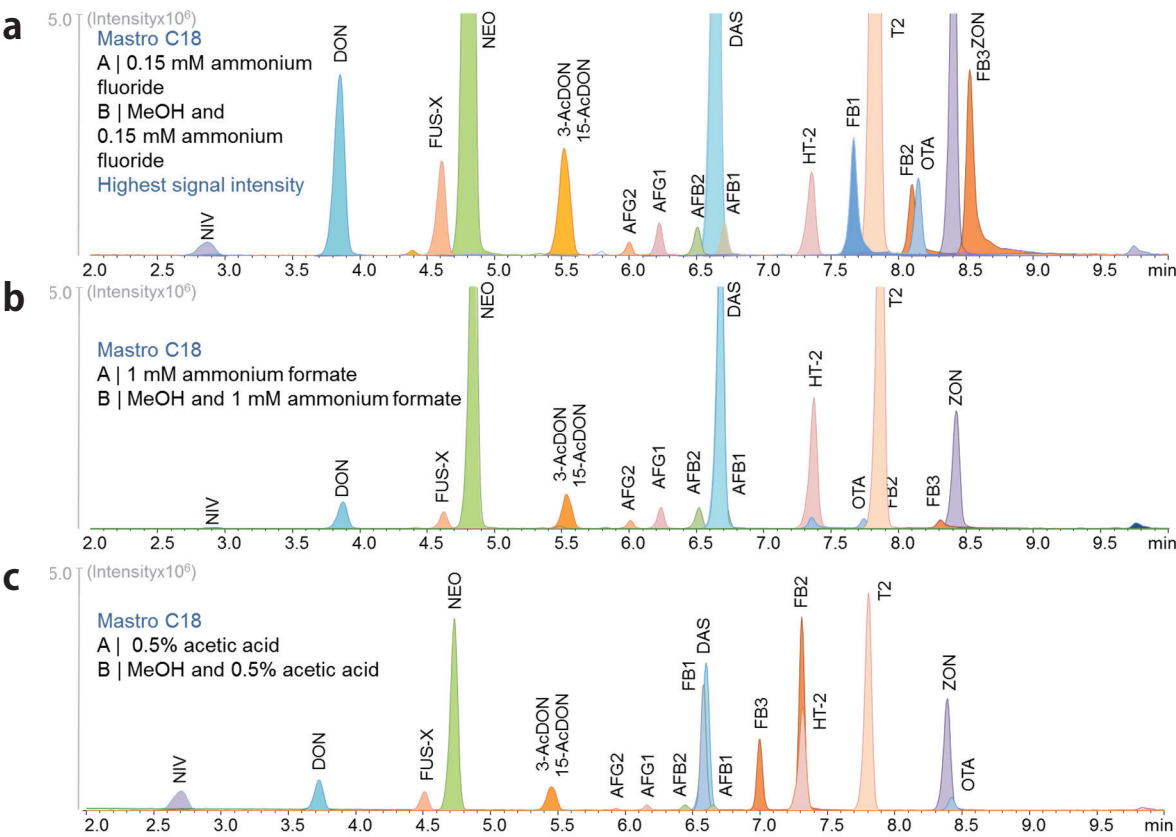


図2 移動相条件の異なるかび毒 18 成分のMRM クロマトグラム比較 (Mastro C18 カラム)
a：移動相 A 0.15 mM フッ化アンモニウム水溶液、移動相 B 0.15 mM フッ化アンモニウム添加メタノール溶液
b：移動相 A 1 mM ギ酸アンモニウム水溶液、移動相 B 1 mM ギ酸アンモニウム添加メタノール溶液
c：移動相 A 0.5 %酢酸水溶液、移動相 B 0.5 %酢酸添加メタノール溶液

図3にフッ化アンモニウム移動相を使用したかび毒18成分のPFPカラムとC18カラムのクロマトグラム比較を示します。PFPカラムは、C18カラムでは分離が困難な3-アセチルデオキシニパレノールと15-アセチルデオキシニパレノールのベースライン分離をほぼ可能にしました。

一方、C18カラムは、3-AcDONのネガティブイオン検出が良好で、使用されています。

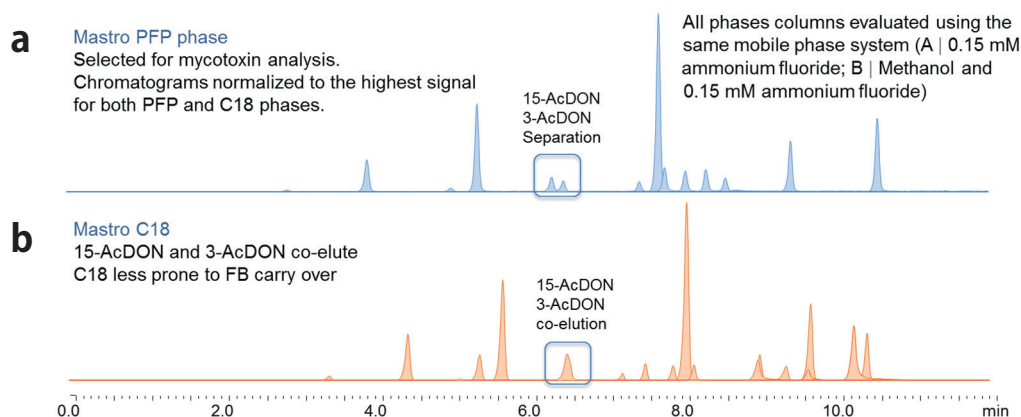


図3 カラムの異なるかび毒18成分のMRMクロマトグラム比較
移動相 A 0.15 mM フッ化アンモニウム水溶液、移動相 B 0.15 mM フッ化アンモニウム添加メタノール溶液共通
a : Mastro PFP カラム、b : Mastro C18 カラム

■ 実試料マトリックスの測定

3-AcDON/15-AcDON と FB2/FB3 (位置異性体) 分離評価のため、以下の PFP カラムを評価しました (Mastro PFP、Kinetix PFP、Discovery HS F5 PFP および ACE PFP)。C18 カラムと比較して、上記いずれの PFP カラムも位置異性体の分離をベースライン分離に近い状態で実現できました。しかし、FB のキャリーオーバーを抑制するには、移動相の若干の変

更が必要でした。移動相 B への、2%酢酸の添加が FB のキャリーオーバー抑制に有効でした。

図4に、かび毒標準試料溶液、ミックススパイス抽出液と胡椒抽出液のクロマトグラムを示します。各抽出液を繰り返し注入 (n=12) した結果、カビ毒 (AFB1、B2、G1、G2、OTA) のそれぞれの面積値%RSD は、10%以下となりました。

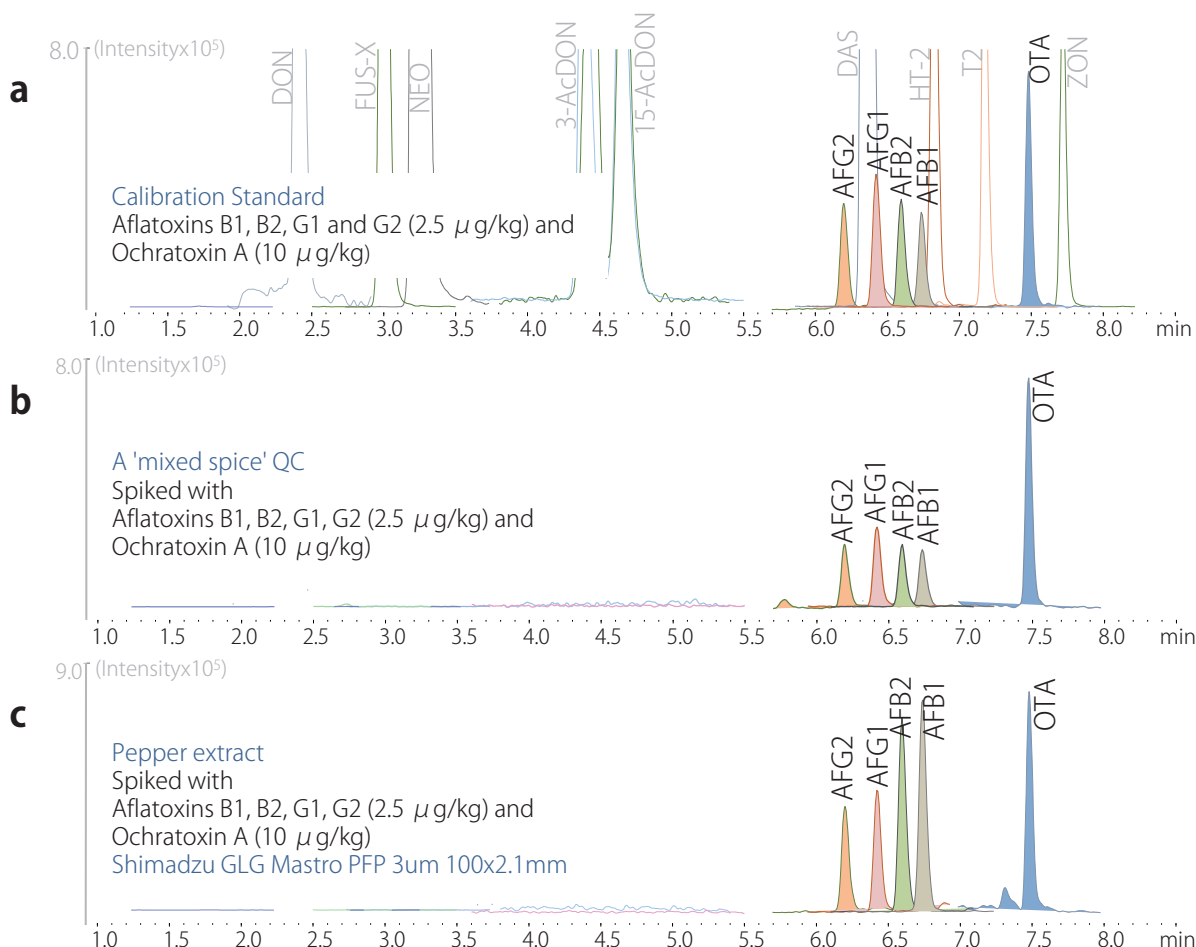


図4 かび毒標準試料とミックススパイス、胡椒抽出液のクロマトグラム
アフラトキシンB1、B2、G1、G2 (2.5 µg/kg) とオクラトキシンA (10 µg/kg) を添加
a : かび毒標準試料溶液、b : ミックススパイス抽出液、c : 胡椒抽出液

表 2 カビ毒の MRM トランジション

Compound name	Parent ion	RT (mins)	MRM 1	MRM 2	Internal Standard	Calibration range ($\mu\text{g/kg}$)	R ²
Aflatoxin B1	[M+H] ⁺	6.773	313 > 241	313 > 285	¹³ C Aflatoxin B1	0.1 - 10	0.9988
Aflatoxin B2	[M+H] ⁺	6.621	315 > 259	315 > 287	¹³ C Aflatoxin B2	0.1 - 10	0.9995
Aflatoxin G1	[M+H] ⁺	6.453	329 > 243	329 > 200	¹³ C Aflatoxin G1	0.1 - 10	0.9998
Aflatoxin G2	[M+H] ⁺	6.219	331 > 245	331 > 285	¹³ C Aflatoxin G2	0.1 - 10	0.9965
Ochratoxin A	[M+H] ⁺	7.509	404 > 239	404 > 221	¹³ C Ochratoxin A	0.4 - 40	0.9969
Fumonisin B1	[M+H] ⁺	6.811	722 > 352	722 > 334	¹³ C Aflatoxin B2	10 - 1000	0.9937
Fumonisin B2	[M+H] ⁺	7.26	706 > 318	706 > 354	¹³ C Aflatoxin B2	10 - 1000	0.9998
Fumonisin B3	[M+H] ⁺	7.073	706 > 318	706 > 354	¹³ C Aflatoxin B2	10 - 1000	0.9991
Deoxynivalenol	[M+H] ⁺	2.372	297 > 279	297 > 249	¹³ C Deoxynivalenol	10 - 1000	0.9992
Diacetoxyscirpenol	[M+NH ₄] ⁺	6.349	384 > 229	384 > 307	¹³ C T-2 Toxin	10 - 1000	0.9994
T-2	[M+NH ₄] ⁺	7.206	484 > 185	484 > 215	¹³ C T-2 Toxin	10 - 1000	0.9989
HT-2	[M+Na] ⁺	6.822	447 > 345	447 > 285	¹³ C T-2 Toxin	10 - 1000	1.0000
Nivalenol	[M+CH ₃ COO]	1.684	371 > 281	371 > 311	¹³ C HT-2	10 - 1000	0.9991
Neosolaniol	[M+NH ₄] ⁺	3.227	400 > 215	400 > 305	¹³ C Deoxynivalenol	10 - 1000	0.9995
Fusarenon X	[M+H] ⁺	2.986	355 > 247	355 > 277	¹³ C Deoxynivalenol	10 - 1000	0.9987
Zearalenone	[M-H] ⁻	7.711	317 > 175	317 > 131	¹³ C T2 Toxin	10 - 1000	0.9985
15-Acetyldeoxynivalenol	[M+H] ⁺	4.406	339 > 261	339 > 297	¹³ C Deoxynivalenol	10 - 1000	1.0000
3-Acetyldeoxynivalenol	[M+H] ⁺	4.618	339 > 261	339 > 297	¹³ C Deoxynivalenol	10 - 1000	0.9986
¹³ C HT-2	[M+NH ₄] ⁺	6.844	464 > 278				
¹³ C T-2	[M+NH ₄] ⁺	7.228	508 > 322				
¹³ C Aflatoxin B1	[M+H] ⁺	6.754	330 > 301				
¹³ C Aflatoxin B2	[M+H] ⁺	6.614	332 > 303				
¹³ C Aflatoxin G1	[M+H] ⁺	6.435	346 > 212				
¹³ C Aflatoxin G2	[M+H] ⁺	6.219	348 > 259				
¹³ C Ochratoxin A	[M+H] ⁺	7.516	424 > 250				

■ まとめ

フッ化アンモニウムの使用は、カビ毒のポジティブモード検出におけるイオンの信号強度向上にも有効でした。

移動相 B に 2 % 酢酸を添加することで、フモニシン類のキャリアオーバーを抑制できました。

PFP 固定相カラムを使用することにより、カビ毒の位置異性体の分離が可能となりました。

今回開発したメソッドにより、かび毒の高感度分析が、PFP および C18 カラムで可能になりました。両カラムともに、12.5 分のサイクルタイムを達成しました。