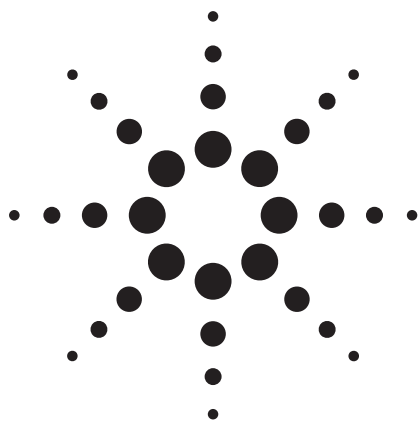




LC/TOF-MS による

菌抽出物の二次代謝物に関する迅速分析 - 菌特性解析の新たな方法

アプリケーション

食品

著者

Hamide Z. Şenyuva
Ankara Test and Analysis Laboratory
Scientific and Technological Research Council of Turkey
Ankara 06330
Turkey

John Gilbert
Central Science Laboratory
Sand Hutton
York YO41 1LZ
UK

要約

LC/TOF-MS を用いて菌の二次代謝物の新しい研究方法を開発しました。培養した菌を溶媒抽出し、LC/TOF-MS で直接分析しました。465 の二次代謝物をデータベース検索することで、マイコトキシンとその他の対象化合物を容易に同定することが可能です。20 種類のマイコトキシン標準試料を用いて培地にスパイクし、溶媒抽出物中のこれらの毒素を同定することでメソッドをバリデーションしました。その結果、7 つの異なる菌を用いて、3 つの異なる培地で 7 ～ 14 日間培養後、予想された代謝物を容易に同定できました。

緒言

食品の安全性の観点から、農産物から単離されたカビ(菌)は、食品中のマイコトキシン汚染の発生源となる可

能性があるため、その特徴を解析する必要があります。菌特性解析は、菌をさまざまな培地で培養し、その後、態学的挙動や増殖挙動の特性により分類するという古典的な手法に基づいて行われてきました。しかし、この方法は時間がかかり、主観的で、研究者の技能や経験に依存する面があります。さらに、上記の菌分類は、以前観察された特定菌種の二次代謝物に基づいているため、二次代謝物の実際のプロファイルに関する事例証拠しか提供しません。この分類方法では、同じ種の菌であっても毒素産生と毒素非産生の両方の可能性があるため、明確な結果が得られないことがあります。つまり、容易にマイコトキシンを産生する菌もあれば、これと同じ種にもかかわらず、毒素産生の遺伝的能力がなく、この点を除けばマイコトキシンを産生する菌とまったく区別できない菌もあります。そのため、菌種の分類だけではマイコトキシン産生を的確に捉えることはできません。

過去においては、マイコトキシンの存在に関する菌培地の直接分析には、どの毒素と考えるべきかについて必然的な仮定とともに必要な関連「対象」分析がありました。一方、LC/TOF-MS は、毒素産生に関して菌の挙動を研究するための新しい可能性を提供します。非常に異なる極性を持つ毒素を培地から効率的に抽出でき、TOF-MS の特異性により、さらなるサンプルクリーンアップは必要ないということが示されました。さらに、LC 分析で検出される成分の分子イオンの精密質量測定を行うことが可能なため、対象の菌分類研究は必要なく、また、関連二次代謝物の正確な質量のデータベースを検索することで、これらを同定することが可能です。



Agilent Technologies

このアプリケーションノートでは、培養菌からの二次代謝物の抽出のための適切な条件と、それに続く分析のための LC/TOF-MS 条件を説明します。培地にアフラトキシン、オクラトキシン A、トリコテセン、ゼラレノン、フモニシンなどをスパイクしました。スパイクしたものを分析し、465 の二次代謝物のデータベース検索により、培地中の低濃度での同定と良好な回収率を証明し、メソッドがバリデーションされました。メソッドは、菌株保存機関から入手した 1 種類のペニシリウム種と 6 種類のアスペルギルス種に適用され、その二次代謝物を予想毒素プロファイルと比較しました。

実験

Agilent 1200 シリーズ HPLC と Agilent 6210 TOF-MS を用いて、すべての分析作業を行いました。マイコトキシンおよびその他の菌代謝物の分離は、逆相 C18 カラム (ZORBAX Eclipse XDB 100 x 2.1 mm, 1.8 µm) を搭載した HPLC システム (デガッサ、冷却機能付きオートサンプラ、バイナリポンプ、DAD システムから構成) を用いて行われました。TOF-MS はデュアルネブライザエレクトロスプレーイオン源を搭載し、リファレンスマス化合物を連続導入することが可能です。機器は、9,429 トランシェント/スキャンで 1 サイクル/秒のスキャン速度で、すべてのサンプルに対して、 m/z 100 ~ 1,000 でスキャンされました。この質量範囲により、 m/z 121.0508 と 922.0097 のイオンを生成する 2 つのリファレンスマス化合物を含めることが可能になりました。注入したサンプル量は 5 µL でした。

HPLC 分析には、0.3 mL/min の流量で、アセトニトリルおよび 2 mM 酢酸アンモニウムの 1% ギ酸水溶液の移動相を使用しました。グラジエント溶出は 15% アセトニトリルで開始し、20 分で 100% アセトニトリルに到達しました。カラムは、5 分間 100% アセトニトリルで洗浄し、クロマトグラフ分析の間の 5 分間で平衡化しました。4 nm の分解能で、200 ~ 700 nm を 0.4 秒ごとにスキャンするダイオードアレイ検出を用いて、UV スペクトルが得られました。最適な TOF-MS 条件は表 1 に記載されています。記録されたデータは、精密質量アプリケーションを搭載した Analyst-QS ソフトウェアで解析しました。465 種類のマイコトキシンとその他の

表 1. ESI+ イオンモードの LC/MS-TOF 操作条件

パラメータ	
キャピラリー電圧	3,000 V
ネブライザ圧力	40 psig
乾燥ガス	10 mL/min
ガス温度	300 °C
フラグメンター電圧	150 V
スキマー電圧	60 V
OCT* RF	250 V
OCT* DC	37.5 V
質量範囲 (m/z)	100 ~ 1,000
リファレンス質量	121.050873; 922.009798

* オクタポール

菌代謝物のデータベースは、情報源 [1,2] から Excel で作成され、アジレントのソフトウェアで操作できました。

菌抽出

A. paraciticus (NRRL 2999) の特徴解析された分離株は USDA 菌株保存機関から入手し、*A. flavus* (200198)、*A. ochraceus* (200700)、*A. oryzae* (200828)、*A. niger* (200807)、*A. fumigatus* (200418)、*P. citrinum* (501862) の分離株は TÜBITAK Mamara 研究センター菌株保存機関から入手しました。菌はシャーレー内の麦芽抽出物寒天 (MEA)、ポテトデキストロース寒天 (PDA)、イースト抽出物サッカロース寒天 (YES) に接種されました。25 °C で 7 ~ 14 日間、菌を成長させた後、菌コロニーの典型的な高い成長が観察されました。穿孔器を使用して直径 6 mm の栓を縦に切断して、下にある培地と一緒に菌糸体のサンプルを採取しました。栓は 5 mL の使い捨てスクリュキャップボトルに移しました。抽出条件は以前発表されたメソッド [3,4] を変更しました。栓の 1 つは 2 mL の酢酸エチル 1% ギ酸溶液で、その後 2 mL のイソプロパノールで 2 回抽出しました。2 つ目の栓は 2 mL の酢酸エチル 1% ギ酸溶液で、その後 2 mL アセトニトリルで、続いて 1 分のボルテックスと合計 30 分の超音波を掛けて、2 回抽出しました。抽出物はろ過され、窒素気流下で徐々に蒸発させました。両方の場合で残留物は 1 mL のメタノールに溶解し、10 分間超音波を掛け、HPLC 分析前に 0.2 µL の使い捨てフィルタでろ過しました。

結果および考察

LC/TOF-MS 条件の最適化

最高感度を実現するために、キャピラリー電圧、ネブライザ圧力、乾燥ガス、ガス温度、スキマー電圧などの重要な機器パラメータはオートチューンで最初に最適化しました。しかし、構造情報を最大限に提供するために、フラグメンター電圧を最適化する必要がありました。その他の条件を変更せずに、55 ~ 250 V の範囲でフラグメンター電圧を変えることで、最適化を行いました。最小の解裂を示すフラグメンター電圧は 150 V と分かりました。

手順全体のバリデーションを行うために、20 種類の市販標準試料 (アフラトキシン B₁、B₂、G₁、G₂; アフラトキシン M₁; オクラトキシン A; ゼラレノン; 4-デオキシニバレノール; 3-アセチルデオキシニバレノール; 15-アセチルデオキシニバレノール; ジアセトキシシシルフェノール; フサレノン X; ネオソラニオール; フモニシン B₁、B₂、B₃; ニバレノール; HT-2 トキシン; T2 トキシン; コジック酸) および内部標準 (ベンゾフェノン) を混合しました。いずれの場合にも、ポジティブエレクトロスプレーを用いて、プロトン化された分子イオンの精密質量、リテンションタイム、UV スペクトルが得られました。

菌代謝物の精密質量データベースの構築

465 種類のマイコトキシンや菌代謝物のそれぞれの正確な質量データを含む Excel スプレッドシートが、これらの実験式と一緒に構築されました [1,2]。化合物の理論的モノアイソトピックの正確な質量は、Excel スプレッドシートを用いてそれらの分子式に基づき計算され (「Formula DB Generator」と呼ばれ、Agilent TOF とともに提供される)、Agilent TOF 自動データ解析ソフトウェアで使用するために、csv (カンマ区切り) 形式で記録されました。サンプル分析の完了時に、csv ファイルは LC/TOF-MS 機器で自動的に検索され、データベースで発見された化合物に関するレポートが作成されます。データ解析エディタを用いて、データ解析メソッドの作成が行われます。エディタにより、付加物の選択 (ポジティブイオン H⁺、NH₄⁺、Na⁺ など)、やニュートラルロス、他、質量精度、リテンションタイム許容誤差、レポートオプション、その他の検索および検出基準なども、自動的に検索することが可能になります。リテンションタイムは必要ありませんが、既知の場合には、同定の信頼性が高まります。

リテンションタイムを測定するために、20 種類のマイコトキシン標準試料の標準混合物でスパイクされた各種培

地を使用します。リテンションタイムの再現性を規定するために、標準試料を 10 回注入しました。同定に使用された基準は、M+1 イオンの精密質量が 5% の質量許容誤差に適合し、リテンションタイムは ± 0.2 分で一致し (標準試料が入手可能な場合)、1,000 カウントの化合物リミット値と呼ばれる最小ピーク高さカウント (あるいは、最高 10:1 の S/N 比または相対量の 0.06%)、存在する場合は予想付加化合物およびニュートラル解裂ロスとの優れた一致 (± 5 ppm で) などです。

スパイクおよび分析によるメソッドバリデーション

培地に 25 ~ 100 μ g でスパイクし、上で説明したように分析した場合、上記検出基準に基づき、全 20 種類の標準試料が正しく同定されました。

特徴解析された菌からの代謝物産生を測定するためのメソッドの利用

スパイクした培地での基礎研究は、実際に特徴解析されている菌の代謝物測定にこのメソッドが適用されました。1 つのペニシリン種および 6 つのアスペルギルス種は、3 つの異なる培地で培養されました。上記のシンプルな溶媒抽出を用い、抽出物を LC/TOF-MS で直接分析しました。図 1 には約 20 の成分検出を示す *A. flavus* 抽出物の全イオンクロマトグラムを示します。データベース検索で 8.9 分に溶出しているピークは、 m/z 313.0712 の精密質量を持つことが分かりました。M+H⁺ イオンに基づき、これは、アフラトキシン B₁ に対するデータベース精密質量と比較して、0.2 ppm の質量一致でアフラトキシン B₁ に一致しました。

ソフトウェアは、実際のピークではなく、実際のイオンを「分子構造」でグループ化するすべてのイオンを抽出する分子構造 (MFE) アルゴリズムを使用します。相互および付加化合物、二量体、三量体などとの関連性により、その分子構造の特徴を解析することが可能で、これらの同位体 (+1、+2 などとして表される) は差し引かれます。アフラトキシン B₁ と同定された 8.9 分のリテンションタイムのピークに対する、これらの分子構造および精密質量測定は、表 2 に要約されています。分子構造を選択することで、ソフトウェアは可能性のある実験式を計算し、提案した化学式に対する「適合」に関して同位体の採点をすることになります。これも表 2 に示されています。スコア 100 の式がアフラトキシン B₁ の化学式です。その結果、この化学式を NIST、ChemIndex、Medline を用いた Web 接続検索に自動的に翻訳することが可能です。NIST での検索結果により、図 2 にアフラトキシン B₁ の化学式および構造を示しました。

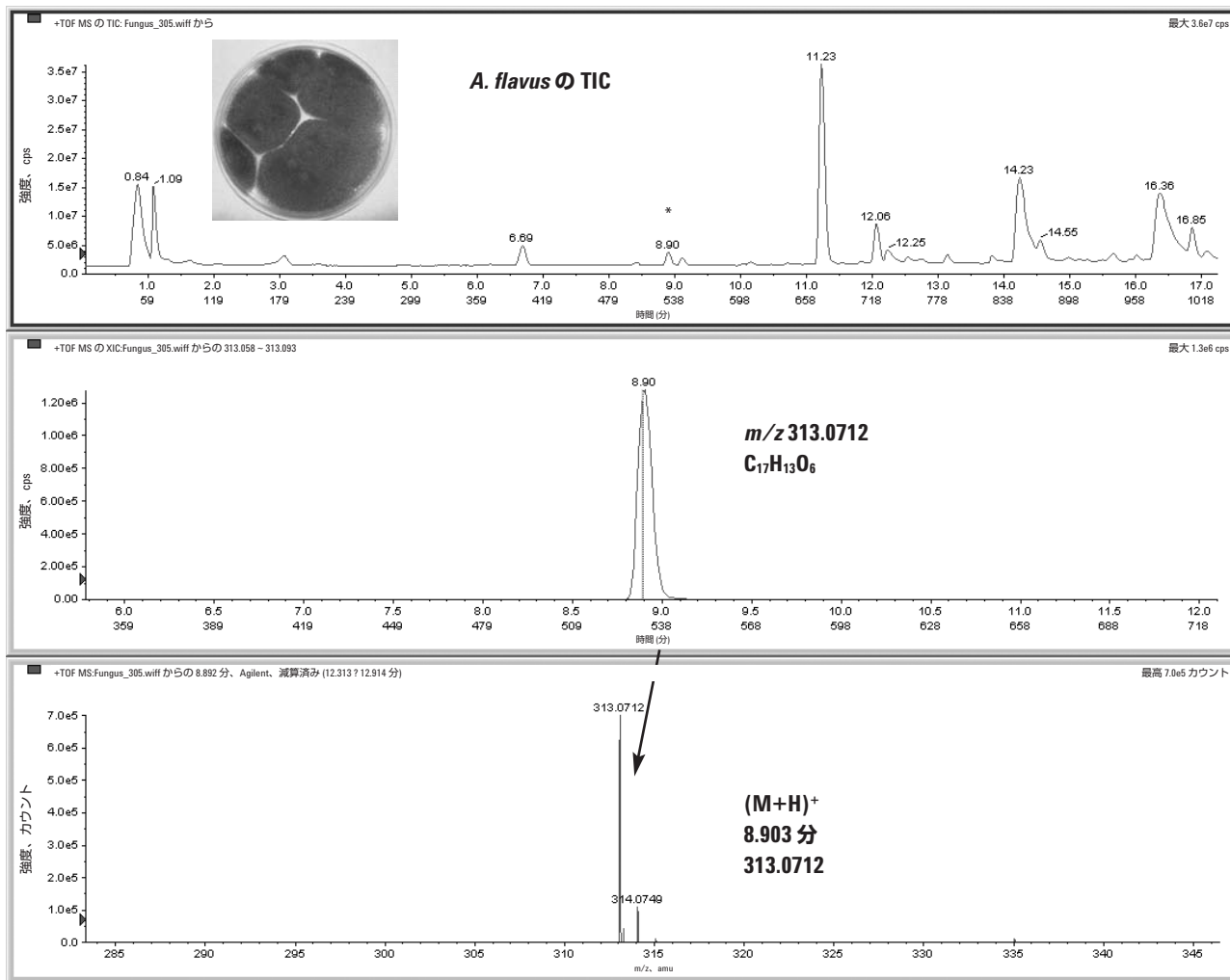


図 1. LC/TOF-MS による *A. flavus* からの抽出物。

(a) アフラトキシン B₁ に一致する * 印のピークを持つ総イオンクロマトグラム (TIC)

(b) アフラトキシン B₁ に対する m/z 313.058 ~ 313.093 の抽出イオンクロマトグラム

(c) アフラトキシン B₁ の M+1 イオンに対して誤差 0.2 ppm の精密質量を示すフルスキャンスペクトル

表 2. ピークリテンションタイム 8.90 分、 m/z 313.0706 での ESI+ LC/MS-TOF で見られる典型的なクラスタ

MFE

Feature #27 (RT = 8.903)

種	RT	m/z	質量	アバundance	幅
M	8.903		312.0633	5541933	0.088
M+H	8.903	313.0706	312.0633	4035186	0.09
M+H+1	8.903	314.0744		622147	0.088
M+H+2	8.902	315.0766		74349	0.09
M+H+3	8.906	316.0795		7943	0.085
M+Na	8.904	335.0529	312.0637	86580	0.094
M+Na+1	8.904	336.0563		15898	0.097
M+Na+2	8.916	337.0593		1848	0.091
2M+H	8.906	625.1357	312.0642	741	0.049
2M+Na	8.902	647.1164	312.0636	226965	0.061
2M+Na+1	8.902	648.1202		65639	0.063
2M+Na+2	8.900	649.1228		14941	0.065
2M+Na+3	8.899	650.1256		2677	0.058
2M+Na+4	8.897	651.1290		257	0.048

MFE

組成式	dm(Da)	dm(ppm)	dm(ppm)	DBE	スコア
C ₁₇ H ₁₂ O ₆	0.0001	0.2	0.2	12	100
C ₁₈ H ₈ N ₄ O ₂	0.0014	4.5	4.5	17	77
C ₁₄ H ₄ N ₁₀	-0.0013	-4.2	4.2	18	68
C ₉ H ₁₆ N ₂ O ₈ S	-0.0006	-1.9	1.9	3	58
C ₁₃ H ₈ N ₆ O ₄	-0.0026	-8.4	8.4	13	55

NIST

National Institute of Standards and Technology

Standard Reference
Data Program

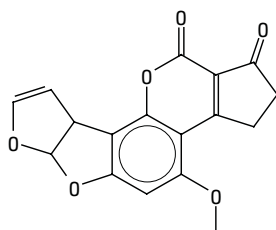
Data
Gateway

Online
Databasis

Chemistry
WebBook

Aflatoxin B₁

- **Formula:** C₁₇H₁₂O₆
- **Molecular weight:** 312.27
- **IUPAC International Chemical Identifier:**
 - o InChI=1/C17H12O6/c1-20-10-6-11-14(8-4-5-21-17(8)22-11)15-13(10)7-2-3-9(18)12(7)16(19)23-15/h4-6,8,17H,2-3H2,1H3
- **CAS Registry Number:** 1162-65-8



- **Chemical structure:**

図 2. NIST を用いた実験式についてのデータベース検索結果 (Medline および ChemIndex の結果は同じでしたが、ここでは示していません)。分子量は「平均分子量」で、モノアイソトピック質量ではないことがあるため、このデータベースで分子量を検索しないように注意してください。

A. flavus からの二次代謝物としてのアフラトキシン B₁ の同定に加え、この菌はアフラトキシン B₂、アフラトキシン B₃、アフラトキシン G₁ を産生することも分かりました。表 3 には、5 ppm の許容誤差を持つデータベース検索からのスクリーニング結果を、既知化合物と一致する一部のその他のピークの精密質量とともに示します。良く一致するコジック酸およびメトキシステリグマトシスチンは、両方とも *A. flavus* から検出されると予想される菌代謝物です。代謝物として知られていない桂皮酸にも一致することが分かりました。

菌株保存機関から入手し、3 つの異なる培地で成長させた合計 7 つの異なる菌の予備研究にこの新しい方法を適用した場合、表 4 の結果が得られました。ほとんどの場合、予想した代謝物が検出され、このメソッドの信頼性の高さが示されました。表 4 より、以前の研究から存在すると予想されたマイコトキシンが検出されず、予想されていない代謝物が検出されていることがわかりました。これは、誤同定、または新発見の可能性があります。このメソッドの優れた能力が明らかになりましたが、より詳細な研究でこれらの結果をフォローアップする必要があります。

表 3. *A. flavus* 抽出物 自動マイコトキシンデータベース検索の結果 (抽出化合物リストは 5 ppm の誤差内でリテンションタイムの昇順で保存されます。内部標準としてベンゾフェノンを使用しました。)

Mass Value = 142.03					
化学式	化合物	質量	誤差 (mDa)	* 誤差 (ppm)	リテンションタイム誤差
C ₆ H ₆ O ₄	コジック酸	142.03	-0.10	-0.7	-
Mass Value = 148.05					
化学式	化合物	質量	誤差 (mDa)	誤差 (ppm)	リテンションタイム誤差
C ₉ H ₈ O ₂	桂皮酸	148.05	-0.08	-0.5	-
Mass Value = 328.06					
化学式	化合物	質量	誤差 (mDa)	誤差 (ppm)	リテンションタイム誤差
C ₁₇ H ₁₂ O ₇	アフラトキシン G ₁	328.06	1.01	1.4	-0.05
Mass Value = 354.07					
化学式	化合物	質量	誤差 (mDa)	* 誤差 (ppm)	リテンションタイム誤差
C ₁₉ H ₁₄ O ₇	5-メトキシステリグマトシスチン	354.07	0.99	2.8	-
Mass Value = 312.06					
化学式	化合物	質量	誤差 (mDa)	* 誤差 (ppm)	リテンションタイム誤差
C ₁₇ H ₁₂ O ₆	アフラトキシン B ₁	312.06	-0.05	-0.2	-0.11
Mass Value = 312.06					
化学式	化合物	質量	誤差 (mDa)	* 誤差 (ppm)	リテンションタイム誤差
C ₁₇ H ₁₄ O ₆	アフラトキシン B ₂	314.08	0.06	0.2	0.06
Mass Value = 338.08					
化学式	化合物	質量	誤差 (mDa)	* 誤差 (ppm)	リテンションタイム誤差
C ₁₉ H ₁₄ O ₆	メトキシステリグマトシスチン	338.08	-0.16	-0.5	-
Mass Value = 182.07					
化学式	化合物	質量	誤差 (mDa)	* 誤差 (ppm)	リテンションタイム誤差
C ₁₃ H ₁₀ O	ベンゾフェノン	182.07	0.73	4.0	-0.15

表 4. 菌株保存機関からの MEA、YES、PDA 培地で成長された菌の検出および予想代謝物の比較

代謝物	菌						
	<i>P. citrinum</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. paraciticus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>A. ochraseus</i>
AFB1		* √	* √				
AFB2		* √	* √				
AFB3		* √	*				
AFG1		* √	* √				
AFG2		*	* √				
KA	* √	* √	* √		*	*	
MST		* √	√				
5-MST		√					√
OTA				* √			*
RO-A					√		
FU-B					* √		
MA				* √			
AA		*					√
Nig				* √			
Ter							√
Cit	*						

√ - LC/TOF-MS で検出された代謝物; * - 存在すると予想された代謝物

略語:

AFB1	アフラトキシン B ₁ など	FU-B	Fumigaclavine B
KA	コジック酸	MA	マルフォルミン (ペプチド)
MST	メトキシステリグマトシスチン	AA	アスペルギリン酸
5-MST	5-メトキシステリグマトシスチン	Nig	Nigrigillin
OTA	オクラトキシン A	Ter	テレイン
RO-A	Roquefortine A	Cit	シトリニン
	(isofumigaclavine A)		

将来展望

データベース検索と組み合わせた精密質量 LC/TOF-MS は、ターゲット分析で使える多用途の同定技術です。菌代謝物の分野で、専用メソッドが使用できない種々の代謝物に関して、菌をスクリーニングする潜在能力が証明されました。代謝物産生および食品の安全にとって重要である、マイコトキシンに関する農産物の迅速なスクリーニングに基づく菌分類の新たな可能性がこの方法により示されました。未知の代謝物が検出された場合、LC/TOF-MS で得られる情報に加え、構造解析のためには複合型 Quadrupole Time-of-Flight LC/MS システム (LC/QTOF-MS) を用いた研究が必要になります。

結論

さまざまな培養条件で菌により産生された二次代謝物のプロファイルを測定するために、LC/TOF-MS を用いたシンプルで迅速なメソッドを開発しました。この方法は、代表的な代謝物を個体培養にスパイクすることでバリデーションが行われ、代謝物データベースに対して精密質量を検索することで、良好な回収率と同定を証明しました。菌株保存機関からの特徴解析されたさまざまな菌に対する分析結果から、予測した毒素を容易に検出できることが分かりました。

参考文献

1. R. J. Cole and R. H. Cox. (1981) Handbook of Toxic Fungal Metabolites, Academic Press Inc. (New York).
2. J. C. Frisvad and U. Thrane (1987) "Standardized High-Performance Liquid Chromatography of 182 Mycotoxins and Other Fungal Metabolites Based on Alkylphenone Retention Indices and UV-VIS Spectra (diode array detection)," *Journal of Chromatography A*, 404:195–214.
3. J. Smedsgaard (1997) "Micro-Scale Extraction Procedure for Standardized Screening of Fungal Metabolite Production in Cultures," *Journal of Chromatography A*, 760: 264–270.
4. J. Stroka, M. Petz, U. Joerissen, and E. Anklam, (1999) "Investigation of Various Extractants for the Analysis of Aflatoxin B₁ in Different Food and Feed Matrices," *Food Additives & Contaminants*, 16: 331–338.

詳細情報

アジレント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。

アジレントは、本資料に誤りが発見された場合、また、本資料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。また、本資料掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。

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。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本資料を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

© Agilent Technologies, Inc. 2007

Printed in Japan
June 12, 2007
5989-6820JAJP



Agilent Technologies