



Q-TOF LC/MS 및 Accurate Mass 라이브러리를 이용한 식품 중의 Mycotoxin 스크리닝 및 검증

응용 자료

식품 및 농업

저자

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

개요

이 응용 자료는 Mycotoxin 및 관련 대사체의 accurate mass 라이브러리 생성과 식품 중의 Mycotoxin 스크리닝 응용에 대해 설명합니다. Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS와 Agilent 1290 Infinity LC를 결합하였으며 이중 스프레이 Agilent Jet Stream Technology를 사용하여 양이온 및 음이온 전자분무로 작동했습니다. Accurate mass 스펙트럼은 한 개 또는 두 개의 이온화 모드에서 그리고 관련된 모든 이온 종에 대해 Mycotoxin 및 관련 대사체의 대량 수집을 위해 제공 받았습니다.

3개의 다른 매트릭스를 44개의 지표 화합물을 사용하여 추출하고 주입하였습니다. 시료는 표적 MS/MS 및 All Ions MS/MS 수집을 사용하여 분석하였습니다. 이 작업은 복잡한 혼합물 중의 Mycotoxin 스크리닝 및 검증을 위해 두 수집 모드와 효율적인 데이터 분석 워크플로와 Mycotoxin 및 관련 대사체 PCDL (Personal Compound Database and Library)과 결합하여 분석하는 것이 매우 중요하다는 것을 보여줍니다.



Agilent Technologies

소개

Mycotoxin은 곡류, 견과류, 과일, 향신료, 와인 및 커피를 포함하여 다양한 식품 및 사료 제품에서 발생할 수 있는 균류의 독성 2차 대사체입니다[1]. 이들은 사람이나 동물에게서 간독성, 돌연변이, 발암성, 발정 또는 면역 억제 효과를 유발할 수 있습니다. 수백 개의 Mycotoxin 및 2차 균류 대사체는 매우 다른 물리화학적 특성을 가진 다양한 화학적 분류에 속합니다. 현재는 약 12개의 화합물만 주요 건강 위험 요인으로 간주하며, 식품과 사료에서 규제되고 있습니다. 유럽연합 위원회 규정(EC) 1881/2006 및 그 수정안에 식품 중 aflatoxins, deoxynivalenol, fumonisins, ochratoxin A, patulin 및 zearalenone의 최대 농도 수준이 명시되어 있습니다[2]. 또한, 유럽연합 위원회 규정(EC) 2013/165/Eu에 T-2 및 HT-2 독성의 지표 수준이 명시되어 있습니다[3].

규제된 화합물과 달리 Mycotoxin 발생에 대한 포괄적인 데이터는 특히 원료 곡물이 아닌 식품 매트릭스에 제한됩니다[4]. 이것은 최근 몇 년 동안 단일 mycotoxin 분석법에서 LC/MS-기반 다표적 분석법으로 점점 대체되고 있는 하나의 이유입니다[4,5]. 다양한 상품에 대한 분석법의 조화, 가능성 없는 매트릭스에서 Mycotoxin의 식별, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* 또는 *Alternaria* 중에서 Mycotoxin이 발생한다는 사실을 잘 알게 된 것은 이런 추세에 몇 가지 이유에 불과합니다. 이런 발전은 지난 몇 년 동안 최신 LC/MS 기기의 성능 향상과 생산성을 증대시키는 소프트웨어 도구의 개발로 인해 가능했습니다. 최신의 고분해능, accurate-mass LC/Q-TOF 기기는 사실상 무제한의 많은 오염물질을 분석할 수 있습니다[6]. 또한 이 기기는 소급적 데이터 분석을 통해 측정 시 고려하지 않았던 오염물질을 발견할 수 있습니다[7].

대부분의 다표적 분석법은 오염물질 스크리닝을 위해 개발되었기 때문에 이 분석법을 통해 규제된 Mycotoxin에 대한 정량적 정보를 수집할 수 있습니다. 문제는 많은 식품과 크게 다른 물리화학적 특성을 가지며 자연 발생적인 독성 농도의 큰 차이를 가진 분석물질을 효율적으로 추출하는 것입니다.

이 응용 자료에서는 accurate mass LC/MS/MS 데이터베이스 및 라이브러리의 생성과 사용에 대해 설명합니다. 라이브러리는 식품 시료에서 이러한 화합물을 스크리닝하고 식별하기 위해 300개 이상의 LC/MS 검출 가능한 Mycotoxin 및 균류 또는 박테리아 대사체의 스펙트럼을 포함합니다. 시료 전처리 분석법은 산성화된 acetonitrile-물 혼합물을 사용한 단일 추출로 구성됩니다. 두 개의 다른 스크리닝 전략을 사용합니다. 기존의 방법에서는, Q-TOF LC/MS 시스템을 TOF 모드에서 우선 작동한 다음 데이터베이스 검색을 수행합니다. 2차 주입에서는 의심 성분 목록의 표적 MS/MS 분석법을 사용하고, 그로부터 얻은 스펙트럼을 MS/MS 라이브러리와 비교했습니다. 두 번째 방법에서, Q-TOF는 두 개의 충돌 에너지를 사용하는 All Ions MS/MS 모드에서 작동합니다. All Ions 기법의 특징은 MS/MS 스펙트럼 라이브러리를 사용하여 Mycotoxin의 수집 방법과 검증을 쉽게 설정할 수 있다는 것입니다. 이 방법은 전구 이온 및 생성 이온의 크로마토그래피 동시용리를 유발합니다. 옥수수, 헤이즐넛 및 와인 중 44 개의 대표적인 지표 화합물에 대한 분석법 파라미터를 제시합니다.

실험

시약 및 표준물질

모든 시약과 용매는 HPLC 또는 LC/MS 등급을 사용하였습니다. Acetonitrile, methanol 및 formic acid는 VWR International (Vienna, Austria)에서 구매하였습니다. Ammonium formate 용액(p/n G1946-85021)은 애질런트 제품을 사용하였습니다. 초순수는 Purelab Ultra 시스템(ELGA LabWater, Celie, Germany)을 이용하여 제조하였습니다. 균류 및 박테리아 대사체 분석 표준물질은 Enzo Life Sciences(Lausen, Switzerland), Biovotica Naturstoffe GmbH(Dransfeld, Germany), Bioaustralis (Tebu-Bio 유통, Germany), Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Germany), Romer Labs(Tulln, Austria) 또는 Sigma-Aldrich Corp.(Vienna, Austria)에서 구매하였습니다. 기타 표준물질은 전세계 연구 그룹에서 개별 제공받았습니다.

표준 원액은 물질의 물리화학적 특성에 따라 acetonitrile, methanol, 물 또는 이들의 혼합물에 기준 화합물을 용해하여 준비했습니다. 개별 표준용액은 검량 및 바탕 시료 주입용 다중 분석물질 표준용액으로 준비하였습니다. 표준원액과 다중 분석물질 표준 용액은 사용 시까지 -20°C에 보관했습니다. 검량 시료는 acetonitrile:물:formic acid (79:20.9:0.1, v:v:v) 비율의 표준 용액을 희석하여 준비했습니다. 추출 용액은 조성이 동일했습니다.

시료 전처리

주입 실험을 위한 옥수수 및 헤이즐넛 바탕 시료는 구매 후 LC/MS/MS 분석법을 이용하여 관심 대상 화합물의 불검출을 확인하였습니다. 시료는 전기 분쇄기로 갈아 균질화하였습니다. 시료의 5g(± 0.01 g) 분량을 50mL polypropylene 튜브에 담아 무게를 측정하고, 20mL 추출 용액을 첨가하였습니다. 시료는 실온에서 90분 간 회전식 진탕기를 사용하여 추출했습니다. 고체 잔여물을 침전 시킨 후, 추출물 분액을 HPLC 바이알로 옮겼습니다. 추출 원액에 세 가지 다른 농도 수준의 다중 분석물질 표준 용액을 첨가하였습니다.

LC/MS/MS 분석

분리 과정은 다음 구성으로 이루어진 Agilent 1290 Infinity UHPLC를 이용하여 수행하였습니다.

- Agilent 1290 Infinity Binary 펌프(G4220A)
- Agilent 1290 Infinity High Performance 자동 시료 주입기(G4226A)
- Agilent 1290 Infinity 향온 컬럼 장치(G1316C)

UHPLC 시스템은 이중-스프레이 Agilent Jet Stream 전자분무 이온화원을 장착한 Agilent 6550 iFunnel Quadrupole Time-of-Flight LC/MS와 연결하여 사용하였습니다. 기준 질량 이온은 1.0mL/분에서 작동하는 Agilent 1260 Infinity Isocratic 펌프(G1310B)와 1:100 유속 분배기(p/n G1607-60000)를 사용하여 전달하였습니다. 기준 분무기의 최종 유속은 10 μ L/분이었습니다. Q-TOF LC/MS 기기는 두 가지의 다른 분석법인 양이온 또는 음이온의 2GHz 확장 측정 범위 모드로 Agilent MassHunter Data Acquisition Software(rev. B.05.01)를 사용하여 작동하였습니다. 표적 MS/MS 수집 시, MS 및 MS/MS 모드에서 세 가지 스캔/초의 데이터 속도를 사용하였습니다. All Ions MS/MS 수집 시에는 두 개의 개별 충돌 에너지와 함께 세 가지 스캔/초를 사용하였습니다. 두 개의 충돌 에너지를 사용하면 전구 이온을 포함한 낮은 에너지 채널과 전구 이온 및 생성 이온을 포함한 두 개의 높은 에너지 채널을 가진 교차 스펙트럼이 나타납니다.

크로마토그래피 조건

크로마토그래피 조건

컬럼:	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 \times 100mm, 2.7 μ m(p/n 695775-902)	
이동상:	A) 5mM NH ₄ formate + 0.1% formic acid B) 5mM NH ₄ formate + 0.1% formic acid in methanol	
그라디언트:	시간(분)	% B
	0.0	10
	0.5	10
	10.0	98
	15.0	98
	15.1	10
	17.0	10
정지 시간:	17.0분	
온도:	30°C	
유속:	0.40mL/분	
주입량:	2 μ L	

이중 AJS 조건

가스 온도:	130°C
가스 유량:	16L/분
Nebulizer:	30psig
Sheath 가스 온도:	300°C
Sheath 가스 유량:	11L/분
캐필러리 전압:	+ve 4,000V; -ve 4,000V
노즐 전압:	+ve 500V; -ve 500V
기준 질량 보정:	+ve 121.05087 및 922.00980; -ve 112.98559 및 966.00073

All-Ions MS/MS

질량 범위:	40~1,300amu
스캔 속도:	3spectra/초
충돌 에너지:	0 - 10 - 40V

표적 MS/MS

MS 질량 범위:	80~1,300amu
MS/MS 질량 범위:	40~1,300amu
스캔 속도:	MS 및 MS/MS에 대해 3 spectra/초
충돌 에너지:	20V
표적 질량:	45(양이온 및 음이온), Delta RT 0.5분

데이터는 MassHunter Qualitative Analysis Software (B.07.00)를 이용해 평가하였습니다. Mycotoxin의 확실한 식별은 5ppm 미만의 질량 오류와 충분한 점수(동위원소 존재비와 동위원소 간격 포함)를 가진 Find by Formula 데이터 마이닝 알고리즘으로 화합물이 검출된 경우에 보고되었습니다. ± 1 분의 머무름 시간 범위는 시스템 간 변동성으로 인해 머무름 시간 이동을 보상하기 위해 피크 검출에 대해 지정되었습니다.

Mycotoxin 및 관련 대사체 PCDL의 생성

Accute mass스펙트럼은 흐름 주입 또는 10, 20 및 40eV의 충돌 에너지를 사용하여 표적 MS/MS의 단일 분석물질 용액의 짧은 컬럼을 통해 수집했습니다. $[M+H]^+$, $[M-H]^-$, $[M+NH_4]^+$ 및 $[M+HCOO]^-$ 를 포함하는 모든 관련 화합물 종은 표적 질량으로 사용했습니다. 전구 이온 안정성이 더 높은 충돌 에너지를 요구할 경우, 추가 스펙트럼을 두 번째 실험에서 수집했습니다. 양이온 모드 또는 음이온 모드에서, 300개 이상의 Mycotoxin 및 기타 균류 또는 박테리아 대사체에 대한 유의미한 MS/MS 스펙트럼을 입수했습니다. 여러 화합물의 경우, MS/MS 라이브러리 스펙트럼은 두 가지 이온 모드에서, 한 개 이상의 전구 이온 종에 대해 수집했습니다. 고체 표준물질 또는 원액은 10번 이상 수집했습니다. 대부분의 화합물은 다양한 공급업체에서 구매하였으며, 기타 화합물은 IFA-Tullin이나 BOKU에서 개별 구입했거나 기타 연구 그룹에서 제공받았습니다. 질량 오차를 없애기 위해, 수집한 스펙트럼의 조각 질량을 이론상의 조각 분자식과 비교하여 이론상의 질량으로 보정하였습니다.

모든 MS/MS 스펙트럼은 스펙트럼 노이즈에 대해 큐레이션을 하였습니다. 모든 조각 이온에 대해 양호한 이온 통계를 보장하기 위해 최소 기본 피크 임계값을 적용하였습니다. 보정된 스펙트럼은 식품 시료에서 Mycotoxin의 스크리닝 및 검증에 사용하는 Mycotoxin 및 관련 대사체(p/n G5883CA)용 Agilent PCDL에 포함하였습니다. 44개 지표 화합물의 경우, 주어진 UHPLC 분석법을 사용하여 포괄적인 mycotoxin 표준물질을 분석하여 머무름 시간 정보를 라이브러리에 추가하였습니다.

그림 1은 10eV의 충돌 에너지를 사용하여 수집한 T-2 독성의 $[M+NH_4]^+$ 종의 accurate mass 스펙트럼과 함께 MassHunter PCDL Manager Software의 스크린샷을 보여줍니다.

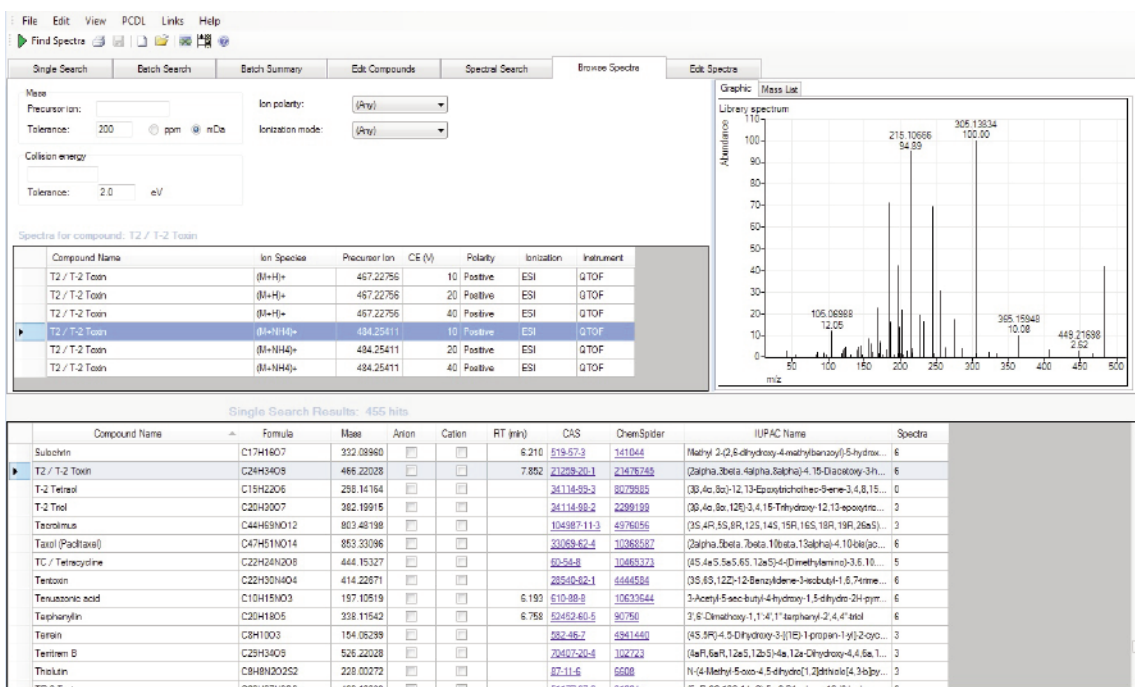


그림 1. Mycotoxin 및 관련 대사체 PCDL과 10eV의 충돌 에너지에서 $[M+NH_4]^+$ T-2 독성 종에 대한 accurate mass 스펙트럼을 보여주는 Agilent MassHunter PCDL Manager 소프트웨어

결과 및 토의

동시 스크리닝 및 검증을 위한 All Ions MS/MS 수집

옥수수 및 헤이즐넛 추출물과 레드 와인 시료에 Mycotoxin 및 균류 대사체 그룹에서 얻은 44개의 지표 화합물을 첨가하였습니다. 모든 규제 화합물, 일부 극성 및 비극성 분석물질, 약한 이온화 화합물을 선택하였습니다. All Ions MS/MS 워크플로에서, accurate mass 데이터는 낮은 에너지 채널에서 조각화 없이 수집하였습니다. 동시에, 화합물들은 전구물질 선택 없이 두 개의 다른 충돌 에너지를 사용하여 조각화하였습니다. Accurate mass 조각 데이터는 두 개의 높은 에너지 채널에 저장되었습니다. Find by Formula 알고리즘을 사용하여 데이터를 분석할 때, 전구물질 정보는 Mycotoxin 및 관련 대사체 PCDL에서 파생되며, 화합물 크로마토그램은 모든 지정된 이온 중에 대해 추출됩니다. 추정 식별의 경우, PCDL에 저장한 스펙트럼을 사용하며, 가장 많은 조각 수가 지정된 경우 높은-에너지 채널에서 크로마토그램이 자동으로 추출됩니다. 예를 들어, 그림 2A는 첨가 옥수수 시료(그림 2B)에서 얻은 선명하고 높은에너지 스펙트럼과 비교하여 Mycotoxin 및 관련

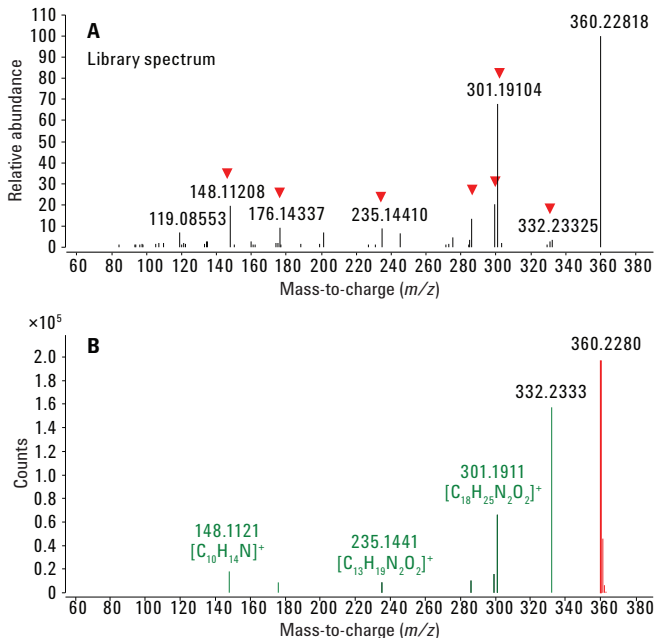


그림 2. 첨가된 옥수수 시료(선명한 스펙트럼)에서 수집한 높은에너지 스펙트럼(B)과 비교한 40eV의 충돌 에너지(A)에서 aspergillimide의 accurate mass 라이브러리 스펙트럼. 라이브러리 스펙트럼의 빨간색 삼각형은 All Ions MS/MS 평가를 위해 자동으로 선택한 이온을 나타냄

대사체 PCDL에서 얻은 aspergillimide의 accurate mass 라이브러리 스펙트럼을 보여줍니다. 빨간색 삼각형은 평가를 위해 라이브러리 스펙트럼에서 자동으로 선택한 조각 이온을 나타냅니다. 라이브러리 스펙트럼이 40eV의 충돌 에너지에 기초한 반면, 선명하고 높은 에너지 스펙트럼은 10 및 40eV를 사용하여 수집한 두 개의 높은-에너지 채널에서 얻은 정보를 결합합니다.

두 개의 전구 및 조각 이온에 대한 크로마토그램과 동시용리 점수 계산을 오버레이하여 균류 대사체 aspergillimide의 식별을 확인하였습니다. 동시용리 점수는 존재비, 피크 모양(대칭), 피크 폭 및 머무름 시간과 같은 요인들을 설명합니다. 이 점수는 동시용리 플롯에 검사용으로 표시하고 사용할 수 있습니다. 그림 3A는 높은 에너지 채널에서 얻은 조각 이온 크로마토그램과 전구 이온크로마토그램의 오버레이를 보여줍니다. 자동 추출된 조각 중에서, 6개의 조각 크로마토그램은 그림 3B의 동시용리 플롯에 나타난 것처럼 전구 이온을 가진 동시용리를 보여주었습니다. 그림 3C는 화합물 표에 상세한 식별 결과를 보여줍니다.

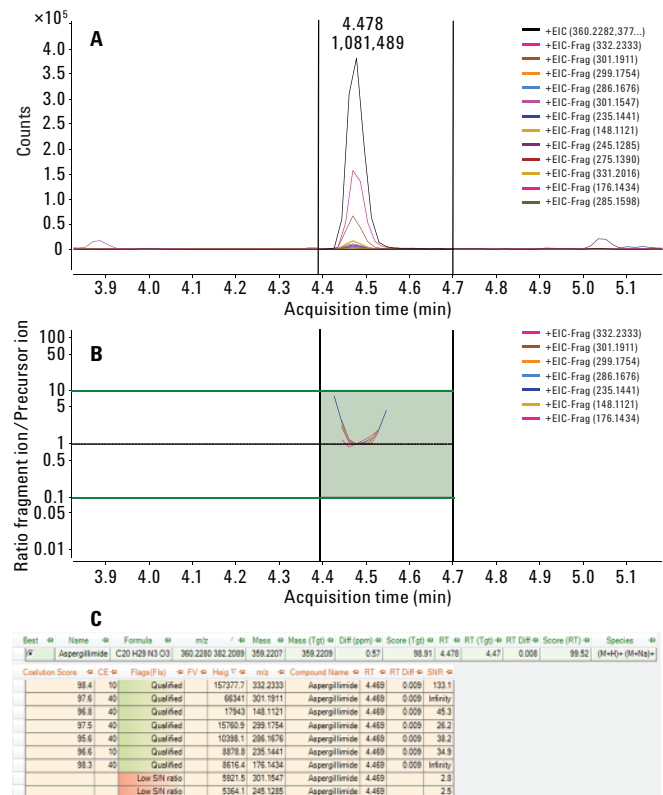


그림 3. 첨가된 옥수수 시료(A), 동시용리 플롯(B) 및 동시용리 점수 포함 화합물 식별 결과(C)에서 aspergillimide에 대한 전구 및 조각 이온 추적 오버레이

표 1은 30ng/mL의 옥수수 추출물에 첨가한 44개의 Mycotoxin 및 군류 대사체 목록을 나타냅니다. 화합물은 양이온 또는 음이온 모드를 사용하여 측정했으며, 각 분석물 질에 대해 우세한 종을 제공했습니다. 여러 화합물이 검출되었고, 두 극성 모두 적합했습니다. 이 경우, 더 민감한 이온 모드의 결과를 보여줍니다. 이 농도에서, 대부분의 화합물은 Find by Formula 알고리즘을 사용하여 자동으로 검색하여 찾았습니다. 이론상 질량과 비교하여 측정된 질량의 질량 편차는 일반적으로 1ppm 미만이었습니다. 단 11 개의 화합물에서 2~5ppm의 질량 편차가 관찰되었습니다. 따라서, 머무름 시간, 질량 정확도, 동위원소 존재비 및 동위원소 간격을 포함하는 표적 점수는 일반적으로 90점(100점 만점)이 넘었습니다. 대부분의 화합물은 양이온 모드나 음이온 모드에서 최소 한 개 이상의 추가 조각 이온을 사용하여 검증하였습니다. 80점(100점 만점)의 최소 동시용리 점수를 화합물 검증 기준으로 지정하였습니다.

표적 MS/MS 수집에 의한 식품 중 Mycotoxin의 스크리닝 및 검증

또한 동일한 크로마토그래프 분석법을 사용하였지만 표적 MS/MS 수집과 함께 동일한 시료를 분석하였습니다. Mycotoxin 및 관련 대사체 PCDL은 화합물을 찾기 위해 Find by Formula 데이터 마이닝 알고리즘과 함께 사용하였습니다. 예상한 이온 종, MS 및 MS/MS 스펙트럼의 크로마토그램이 식별된 화합물에 대해 자동으로 추출되었습니다. 결과는 accurate 단일 동위원소 질량, 동위원소 비율, 동위원소 간격 및 머무름 시간의 일치에 기초하여 점수가 계산되었습니다.

그림 4는 화합물 크로마토그램과 옥수수 추출물에 첨가한 T-2 독성의 피크 스펙트럼을 보여줍니다. T-2 독성에 우세한 이온 종은 $[M+NH_4]^+$ 및 $[M+Na]^+$ 이온이었습니다. 이 종(파란색)에 대해 측정된 m/z 시그널은 예상한 동위원소 비율(빨간색 상자)과 일치했습니다. 전체적으로, 소프트웨어는 동위원소 시그널을 포함하여 $[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$ 및 $[M+Na]^+$ T-2 독성 종에 10개의 이온을 할당했습니다. 양호한 질량 정확도와 동위원소 패턴 매칭은 98.5점(100점 만점)이라는 양호한 표적 점수에 반영되었습니다. 다른 화합물(보이지 않음)의 표적 점수를 All Ions MS/MS 워크플로에 대해 표 1에 제시된 값과 비교하였습니다.

빨간색 다이아몬드 표시는 MS/MS 스펙트럼을 해당 m/z 에 대해 수집했음을 나타냅니다. MS/MS 스펙트럼은 피크 범위에서 자동으로 추출되어 PCDL에 포함된 라이브러리 스펙트럼과 매칭하였습니다.

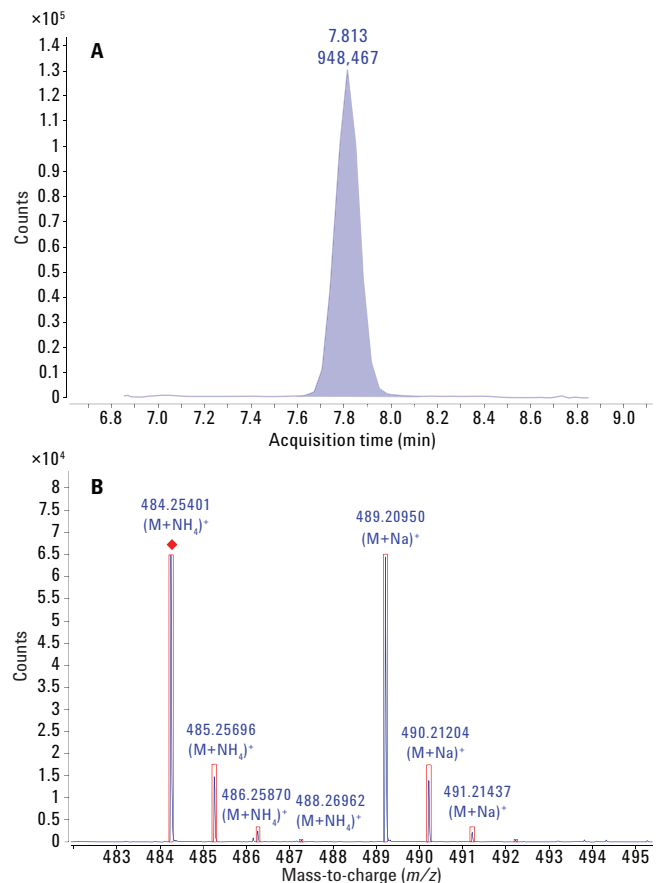


그림 4. 30ng/mL의 옥수수 시료에 첨가한 T-2 독성의 Find by Formula 알고리즘으로 얻은 화합물 크로마토그램(A)과 피크 스펙트럼(B)

표 1. 30ng/mL의 옥수수 추출물에 첨가하고, 양이온 또는 음이온 All Ions MS/MS 수집으로 측정한 44개 Mycotoxin 및 균류 대사체의 분석

화합물	머무름 시간 (분)	화합식	이온 종	질량	질량 편차 (ppm)	표적 점수	동시용리 점수
15-Monoacetoxyscirpenol	5.61	C ₁₇ H ₂₄ O ₆	[M+NH ₄] ⁺	324.1573	-2.52	96.8	96.3
16-Keto-Aspergillimide	5.85	C ₂₀ H ₂₇ N ₃ O ₄	[M+H] ⁺	373.2002	-1.61	94.9	94.9
3-Acetyldeoxynivalenol	4.88	C ₁₇ H ₂₂ O ₇	[M+HCOO] ⁻	338.1366	-2.73	98.0	
Aflatoxin B ₁	6.36	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	[M+H] ⁺	312.0634	-0.59	98.2	90.2
Aflatoxin B ₂	6.12	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	[M+H] ⁺	314.0790	0.86	98.5	96.9
Aflatoxin G ₁	5.83	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	[M+H] ⁺	328.0583	-0.65	99.6	97.0
Aflatoxin G ₂	5.56	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	[M+H] ⁺	330.0740	1.06	98.3	96.5
Aflatoxin M ₁	5.62	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	[M+H] ⁺	328.0583	-0.14	97.7	95.3
Agroclavine	4.77	C ₁₆ H ₁₈ N ₂	[M+H] ⁺	238.1470	-0.41	99.2	96.5
Alternariol	7.48	C ₁₄ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	258.0528	0.27	97.5	96.6
Alternariolmethylether	8.72	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	272.0685	0.10	98.6	97.0
Aspergillimide	4.48	C ₂₀ H ₂₉ N ₃ O ₃	[M+H] ⁺	359.2209	-0.57	99.1	97.2
Beauvericin	10.09	C ₄₅ H ₅₇ N ₃ O ₉	[M+NH ₄] ⁺	783.4095	0.24	99.2	95.5
Brevianamid F	4.99	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₂	[M+H] ⁺	283.1321	-0.63	96.8	98.7
Curvularin	7.10	C ₁₆ H ₂₀ O ₅	[M+H] ⁺	292.1311	-0.86	99.1	97.8
Cyclopiazonic acid	8.86	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	336.1474	-3.01	97.3	96.7
Cyclosporin A	10.45	C ₆₂ H ₁₁₁ N ₁₁ O ₁₂	[M+HCOO] ⁻	1201.8414	-4.30	85.5	96.4
Diacetoxyscirpenol	6.34	C ₁₉ H ₂₆ O ₇	[M+NH ₄] ⁺	366.1679	-1.48	96.9	92.3
Deoxynivalenol	2.99	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	[M+Na] ⁺	296.1260	-1.80	97.6	
Emodin	7.39	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	270.0528	-2.46	91.1	
Enniatin B	9.90	C ₃₃ H ₅₇ N ₃ O ₉	[M+NH ₄] ⁺	639.4095	-2.96	95.2	92.5
Ergosine	6.29	C ₃₀ H ₃₇ N ₅ O ₅	[M+H] ⁺	547.2795	-3.30	94.2	82.2
Ergosinine	6.19	C ₃₀ H ₃₇ N ₅ O ₅	[M+H] ⁺	547.2795	-1.18	95.9	93.5
Ergotamine/ergotamine	6.46	C ₃₃ H ₃₅ N ₅ O ₅	[M+H] ⁺	581.2638	-1.29	97.5	86.3
Fumonisin B ₁	7.78	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅	[M+H] ⁺	721.3885	-3.12	87.2	
Fumonisin B ₂	8.69	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	[M+H] ⁺	705.3936	-2.42	97.3	96.6
Fusarenon-X	3.91	C ₁₇ H ₂₂ O ₈	[M+Na] ⁺	354.1315	-4.80	89.0	
HT-2 toxin	7.30	C ₂₂ H ₃₂ O ₈	[M+NH ₄] ⁺	424.2097	-2.05	97.8	97.8
Macrosporin	9.36	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	284.0685	0.33	97.6	96.6
Moniliformin	0.72	C ₄ H ₂ O ₃	[M-H] ⁻	98.0004	-3.01	91.2	
Mycophenolic acid	7.75	C ₁₇ H ₂₀ O ₆	[M+H] ⁺	320.1260	-0.09	97.7	97.3
Nivalenol	2.15	C ₁₅ H ₂₀ O ₇	[M+HCOO] ⁻	312.1209	-3.22	87.4	
Ochratoxin A	8.38	C ₂₀ H ₁₈ ClNO ₆	[M+H] ⁺	403.0823	-1.81	91.7	97.7
Paraherquamide A	6.26	C ₂₈ H ₃₅ N ₃ O ₅	[M+H] ⁺	493.2577	-0.85	96.7	96.8
Patulin	2.38	C ₇ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	154.0266	-1.07	99.7	92.0
Roquefortine C	7.35	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₂	[M+H] ⁺	389.1852	-0.36	98.9	97.3
Skyrin	10.23	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₀	[M-H] ⁻	538.0900	-1.19	98.0	99.1
Stachybotrylactam	9.22	C ₂₃ H ₃₁ NO ₄	[M+H] ⁺	385.2253	-1.10	99.5	97.0
Sulochrin	6.21	C ₁₇ H ₁₆ O ₇	[M-H] ⁻	332.0896	-0.71	98.1	97.8
T-2 toxin	7.83	C ₂₄ H ₃₄ O ₉	[M+NH ₄] ⁺	466.2203	-0.18	97.4	97.7
Tenuazonic acid	6.19	C ₁₀ H ₁₅ NO ₃	[M+H] ⁺	197.1052	0.96	99.1	
Terphenyllin	6.75	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	[M+H] ⁺	338.1154	-1.79	98.3	95.4
Viridicatin	7.97	C ₁₅ H ₁₁ NO ₂	[M+H] ⁺	237.0790	1.26	99.0	96.2
Zearalenone	8.36	C ₁₈ H ₂₂ O ₅	[M-H] ⁻	318.1467	0.10	99.3	96.0

그림 5는 PCDL(하단 패널)에서 얻은 라이브러리 스펙트럼과 비교하여 30ng/mL(상단 패널)를 첨가한 옥수수 추출물에서 수집한 T-2 독성에 대한 MS/MS 스펙트럼을 보여줍니다. 중간 패널은 차이 스펙트럼을 그대로 보여줍니다. T-2 독성 라이브러리 스펙트럼의 모든 주요 조각 이온들은 총돌 에너지가 20eV인 경우 좁은 질량 추출 범위 내에서 측정된 스펙트럼에서, 기준 스펙트럼과 비슷한 비율로 발견되었습니다. 따라서, accurate mass 라이브러리에 대한 역검색은 100점 중 91.7점을 받았고, 시료에 T-2 독성이 있음을 확인했습니다. 상세한 화합물 식별 결과는 그림 6의 화합물 표에 나타나 있습니다. 모든 개별 화합물의 MS/MS 점수가 나와 있지 않지만, 검증을 통과하려면 60점이 넘어야 합니다 (그림 7 참조).

두 워크플로의 비교

MS/MS 라이브러리 검색 또는 All Ions MS/MS 수집에 의해 식별된 오염물질의 검증과 Mycotoxin 및 균류 대사체에 대한 accurate mass 스크리닝을 결합하여 첨가된 식품 추출물에 적용하였습니다. 그림 7은 세 개의 다른 30ng/mL 매트릭스에 대한 두 개의 수집 모드를 비교한 것입니다. 일반적으로, 레드 와인은 강력한 억제 효과를 보였고, 다른 매트릭스에 비해 검출 및 검증 속도가 낮았습니다. 라이브러리 매칭과 결합하여 단일 총돌 에너지를 사용한 표적 MS/MS 수집은 조각 동시용리를 사용한 All Ions MS/MS 수집과 비슷한 검증 비율을 보였습니다. 특히, 전구물질을 분리함으로써 더 무거운 매트릭스 중의 All Ions MS/MS 조각화와 비교하여 낮은 질량 오염물질을 더 잘 식별할 수 있었습니다. 반대로, All Ions MS/MS 수집이 매우 빨라졌고, ergosine 및 ergosinine과 같이 거의 동시에 용리되는 이성질체를 구분할 수 있었습니다.

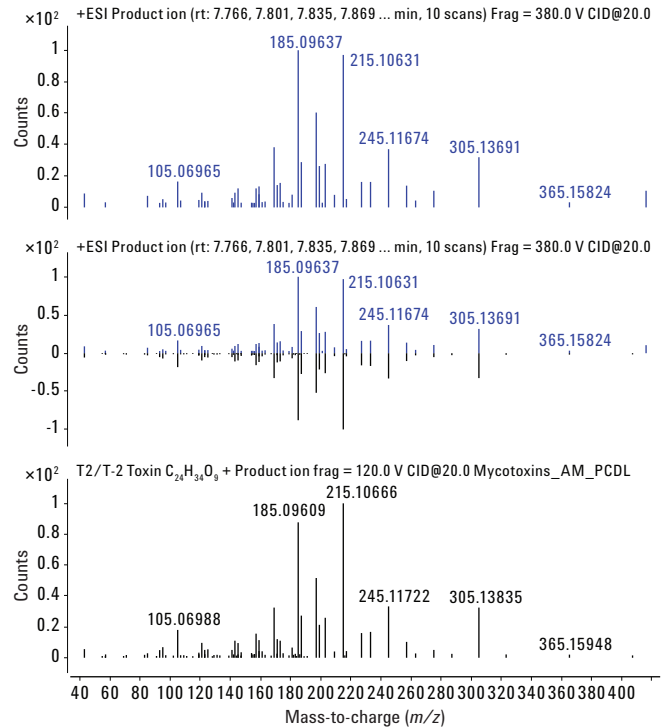


그림 5. 첨가한 옥수수 추출물에서 측정된 T-2 독성 스펙트럼과 Agilent Mycotoxin 및 관련 대사체 PCDL의 기준 스펙트럼 비교

Compound List														
Cpd	Name	Label	Formula	m/z	Mass	Mass (Tgt)	Diff (Tgt, ppm)	Score (Tgt)	Flags (Tgt)	RT	Score (DB)	Mass (DB)	Mass (MPG)	Diff (Tgt, mDa)
26	T2/T-2 Toxin	Cpd 36: T2/T-2 Toxin	C24H34O9	484.26401	466.22008	466.22028	-0.41	99.42		7.847	99.42	466.22028		-0.19
Best	Name	Formula	Score	Mass	Mass (Tgt)	Diff (Tgt, ppm)	Diff (Tgt, mDa)	RT (Tgt)	RT (DB)	RT (Tgt)	Score (Tgt)	Score (DB)	Species	Library
1	T2/T-2	C24H34O9	99.42	466.220	466.22028	0.41	0.41	0.19	7.847	7.852	-0.006	99.42	91.74	(M+H)+ (M, 467.22, C:MassH)
CE	Name	Formula	Score	Mass	Mass (Tgt)	Diff (Tgt, ppm)	Diff (Tgt, mDa)	RT (Tgt)	RT (DB)	RT (Tgt)	Score (Tgt)	Score (DB)	Species	Library
20	T2/T-2 Toxin		79	484.26411	484.26411	0.00	0.00	90.07	91.74	91.74	90.07	91.74	Forensic and Toxicology drug: Fungal Metabolite: Mycotoxin...	(M+NH4)+
Species	Ion Formula	m/z	Abund	Score (MPG)	Score (MS)	Score (MS/MS)	Score (mass)	Score (iso. abund)	Score (iso. spacing)					
(M+H)+		467.22	254.9		44.4		93.24	0	0					
(M+NH4)+		484.26	64826.9		97.76		99.92	93.18	99.15					
m/z	m/z (Calc)	Diff (ppm)	Diff (mDa)	Height	Height (Calc)	Height %	Height % (Calc)	Height Sum %	Height Sum % (Calc)					
484.26	484.26411	0.2	0.1	64826.9	62470.2	100	100	77.8	75					
486.26	486.26744	0.99	0.5	15502.3	16931.3	23.9	27.1	18.6	20.3					
488.26	488.26984	2.54	1.2	2515.5	3361.7	3.9	5.4	3	4					
487.26	487.26267	0.6	0.3	418.1	486.7	0.6	0.8	0.6	0.6					
486.26	486.26507	-3.31	-4.5	58.3	61.2	0.1	0.1	0.1	0.1					
Species	Ion Formula	m/z	Abund	Score (MPG)	Score (MS)	Score (MS/MS)	Score (mass)	Score (iso. abund)	Score (iso. spacing)					
(M+H)+		489.20	65006.4		94.2		99.85	92.34	97.16					
m/z	m/z (Calc)	Diff (ppm)	Diff (mDa)	Height	Height (Calc)	Height %	Height % (Calc)	Height Sum %	Height Sum % (Calc)					
489.20	489.20095	0.01	0	65006.4	61436.9	100	100	79.7	76.3					
490.21	490.21291	1.78	0.9	13890.4	16390.2	21.4	26.7	17	20.1					
491.21	491.21542	2.16	1.1	2219.8	3238.4	3.4	6.3	2.7	4					
492.21	492.21809	1.53	0.8	430.5	475.2	0.7	0.8	0.5	0.6					

그림 6. MS 스펙트럼의 질량 정확도와 동위원소 정보 및 MS/MS 스펙트럼 비교를 포함하여 첨가된 옥수수 시료에서 T-2 독성 화합물 식별 결과

표적 MS/MS			화합물명	All Ions MS/MS		
레드 와인	옥수수	헤이즐넛		레드 와인	옥수수	헤이즐넛
			15-Monoacetoxyscirpenol			
			16-Keto-Aspergillimide			
			3-Acetyldeoxynivalenol			
			Aflatoxin B1			
			Aflatoxin B2			
			Aflatoxin G1			
			Aflatoxin G2			
			Aflatoxin M1			
			Agroclavine			
			Alternariol			
			Alternariolmethylether			
			Aspergillimide			
			Beauvericin			
			Brevianamid F			
			Curvularin			
			Cyclopiazonic acid			
			Cyclosporin A			
			Diacetoxyscirpenol			
			Deoxynivalenol			
			Emodin			
			Enniatin B			
			Ergosine			
			Ergosinine			
			Ergotaminine/Ergotamine			
			Fumonisin B1			
			Fumonisin B2			
			Fusarenon-X			
			HT-2 toxin			
			Macrosporin			
			Moniliformin			
			Mycophenolic acid			
			Nivalenol			
			Ochratoxin A			
			Paraherquamide A			
			Patulin			
			Roquefortine C			
			Skyrin			
			Stachybotrylactam			
			Sulochrin			
			T-2 toxin			
			Tenuazonic acid			
			Terphenyllin			
			Viridicatin			
			Zearalenone			

FBF로 발견하여 라이브러리 매칭 또는 조각의 동시용리로 검증된 화합물
 FBF로 발견했지만 검증되지 않은 화합물
 FBF로 발견되지 않은 화합물

그림 7. 표적 MS/MS 수집과 라이브러리 검색 또는 All Ions MS/MS 수집을 사용하여 세 개의 다른 30ng/mL 매트릭스에서 실행한 Mycotoxin 및 균류 대사체의 스크리닝 및 검증 결과. 녹색: MS/MS 라이브러리 매칭 또는 조각 동시용리에 의해 자동으로 발견되고 존재가 검증된 화합물. 노란색: 자동으로 발견되지만 MS/MS 스펙트럼 수집으로 검증되지 않은 화합물

실제 시료의 분석

첨가된 매트릭스 외에, 오염된 헤이즐넛 시료를 분석법에 따라 추출하여 양이온 및 음이온 모드에서 All Ions MS/MS를 사용하여 Q-TOF LC/MS 시스템에 주입하였습니다. 검량 시료의 All Ions MS/MS 평가에서 얻은 전구물질 및 조각 정보를 정량적 데이터 처리 방법의 빠른 생성을 위해 MassHunter Quantitative Analysis로 내보냈습니다. 데이터 처리 후에 Compounds-at-a Glance 모듈에서 시료와 화합물로 결과를 확인했습니다. 그림 8은 헤이즐넛 시료에서 오염물로 검색된 6개 군류 대사체의 크로마토그램을 보여줍니다. Alternariol, alternariolmethylether, zearalenone 및 macrosporin은 음이온 모드에서 분석하였습니다. Brevianamid F와 mycophenolic acid는 양이온 모드에서 분석하였습니다. 모든 화합물의 경우, 전구 이온 m/z 와 최소 한 개 조각 이온의 질량 편차는 화합물의 식별에 필요한 5ppm 미만이었습니다.

결론

여기에 제시된 분석법은 빠르고 쉽고 저렴한 용액 추출과 UHPLC/Q-TOF/MS 시스템으로 희석된 원추출물의 후속 주입으로 구성됩니다. 이 분석법은 Agilent 1290 Infinity LC의 낮은 지연량과 크로마토그래프 분리능을 증가시키기 위해 UHPLC 분리에서 높은 역압을 제어하는 능력을 최대한 이용합니다. 이 분석법은 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF의 감도와 Agilent Jet Stream 이온화원의 범용 이온화 능력을 이용합니다.

Mycotoxin 및 관련 대사체에 대한 accurate mass PCDL은 식품 시료 내 Mycotoxin의 스크리닝 및 검증을 위해 생성하고 적용하였습니다. 표적 MS/MS 및 All Ions MS/MS 수집은 44개의 군류 대사체를 포함하는 식품 시료를 분석하여 평가하였습니다. 두 가지 수집 모드는 Agilent MassHunter Software와 특별히 내장된 식별 기준을 사용하여 시료 중 Mycotoxin의 존재를 효과적으로 검증했습니다. 표적 MS/MS 정보는 저분자량 화합물에 대해 더 많은 신뢰성을 제공하지만, All Ions MS/MS 데이터는 초기 측정 시 분석 범위에 없었던 화합물에 대해서 나중에 정보를 다시 얻을 수 있습니다. 효율적인 데이터 검토를 위해 정량 분석 소프트웨어를 사용하였습니다. 이를 통해 질량 정확도, 정성용 이온 비율, 라이브러리 매치 점수 및 머무름 시간 매칭과 같은 품질 기준을 포함하여 정량용 및 정성용 이온을 나타낼 수 있습니다.

이 분석법은 다양한 식품에서 Mycotoxin이 발생하는 사실을 잘 알게 해주는, 단일 분석물질이나 분석물질 군 검출 방법에 적절한 보완 수단입니다.

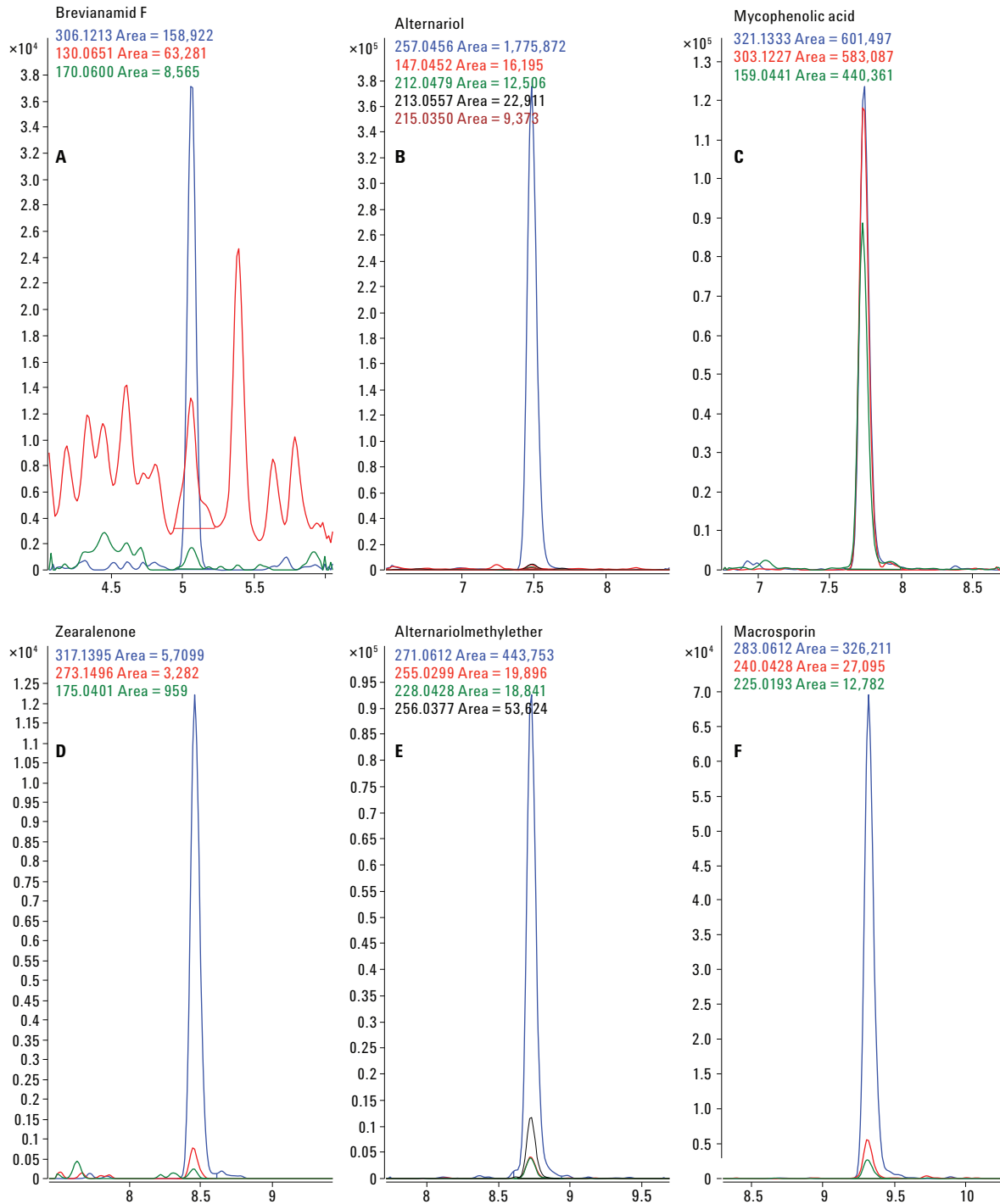


그림 8. 자연적으로 오염된 헤이즐넛 시료에서 검출된 Mycotoxin의 크로마토그램 (A) brevianamid F(<LLOQ), (B) alternariol(310 μ g/kg), (C) mycophenolic acid(6,100 μ g/kg), (D) zearalenone(21 μ g/kg), (E) alternariolmethylether(220 μ g/kg), (F) macrosporin(520 μ g/kg)

참고문헌

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. Screening and Quantitation of 191 Mycotoxins and Other Fungal Metabolites in Almonds, Hazelnuts, Peanuts, and Pistachios Using UHPLC/MS/MS; Application Note, Agilent Technologies, Inc., Publication number 5991-4991EN, **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. Development and Application of an Exact Mass LC/MS/MS Library for the Accurate Mass Screening and Quantitation of Pesticides in Fruits and Vegetables; Application Note, Agilent Technologies, Inc., Publication number 5991-2227EN, **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**.

자세한 정보

이러한 데이터는 일반적인 결과를 나타냅니다. 애질런트 제품에 대한 더 자세한 정보를 알아보시려면 www.agilent.com/chem을 방문하십시오.

www.agilent.com/chem

애질런트는 이 문서에 포함된 오류나 이 문서의 제공, 이행 또는 사용과 관련하여 발생한 부수적인 또는 결과적인 손해에 대해 책임을 지지 않습니다.

이 발행물의 정보, 설명 및 사양은 사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2015
한국에서 인쇄
2015년 3월 31일
5991-5667KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr



Agilent Technologies