



# 高速データ取り込みと高精度定量分析によるスパイス中のマイコトキシン、 違法添加物 (着色料)、農薬の同時測定

## アプリケーションノート

食品分析

### 著者

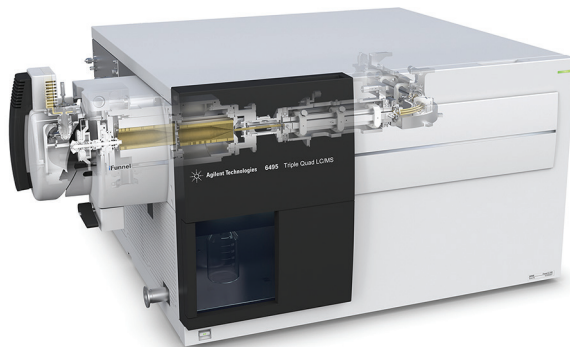
Mark Sartain, Thomas Glauner, Behrooz Zekavat,  
and Anabel Fandino Agilent Technologies, Inc.  
Santa Clara, CA, USA

### 概要

スパイスは古代より食品に香りや色を付けるために使用されています。しかし、欧州諸国ではさまざまな汚染物質の観点からスパイスの安全性について警告されてきました。このために、単一の多成分残留物メソッドによる、農薬、マイコトキシン、着色料の同時スクリーニングおよび定量の必要性が高まりました。主な課題は、複雑なマトリックス、多数の分析対象物、化合物クラスの多様性、分析でカバーしなければならない濃度範囲、が挙げられます。

このアプリケーションノートでは、微量濃度の分析対象物の拡張スイートに対して正確な定量を実現するためにダイナミック MRM および高速極性切り替えで動作するイオンファネルトリプル四重極質量分析システムを評価しています。さらに、MRM 間デレイタイムを最適化し、0.5 ms という短いドウェルタイムで高品質データを得るために改変したソフトウェアとファームウェアを評価しています。

Agilent 6495B トリプル四重極 LC/MS が実現した優れた感度により、高倍率で希釈した農薬、マイコトキシン、着色料の高精度で正確な定量が可能となり、マトリックス効果を低減しメソッドの堅牢性を向上できます。



**Agilent Technologies**

## 実験方法

### 試料調製

粉黒コショウおよびパプリカは地元の食品店で購入し、Agilent BondElut QuEChERS キット (p/n 5982-6650) を用い、EN 15662 QuEChERS プロトコルに従って抽出しました。抽出物を Agilent QuEChERS dSPE EMR Lipid キット (p/n 5982-1010) でさらに洗浄した後、脱水ステップ (p/n 5982-0102) を実行しました。最終抽出物に 2 ppb (10 µg/kg) でアジレントの農業総合混合液 (p/n 5190-0551)、マイコトキシン、着色料標準 (Sigma) をスパイクしました。スパイクした抽出物はアセトニトリルを用いて、1:5、1:10、1:20、1:50、1:100 に希釈しました。

### メソッド設計

Agilent MassHunter Optimizer ソフトウェアを使用し 5 種類のマイコトキシンと 9 種類の着色料に合わせて MRM トランジションを最適化しました。1 つの化合物あたり少なくとも 2 つの MRM トランジションとこれに相当する MS 条件をアジレントの農業トリガー MRM (tMRM) LC/MS アプリケーションキットから得ました。ダイナミック MRM (dMRM) または tMRM でポジティブおよびネガティブエレクトロスプレーイオン化を 1 回の分析で実行しました。機器の設定条件の表に、主な UHPLC および dMRM MS パラメータを示します。

## 結果と考察

### 最適化された MRM 間ディレイタイムの評価

MRM メソッドは、53 種類の農業を表す 100 トランジションをターゲットとして開発され、MRM 間ディレイタイムを最適化するために変更されたソフトウェアとファームウェアを評価することができます。図 1 は 4 つの異なるドウェルタイムでの 2 種類の農業の MRM クロマトグラムの重ね表示です。イオンシグナルを短いドウェルタイムで維持するために、適切な MRM 間ディレイタイムの使用が重要であることがわかります。

## 機器条件

Agilent 1290 Infinity II UHPLC システム	
カラム	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18、2.1 × 150 mm、1.8 µm (p/n 959759-902)
カラム温度	40 °C
注入量	2 µL
移動相	A) 5 mM ギ酸アンモニウム + 0.1 % ギ酸 B) 5 mM ギ酸アンモニウム + 0.1 % ギ酸を含むメタノール
流量	0.4 mL/min
グラジエント	0.5 分間 95 % A を保持、3.5 分で 40 % B に 17 分で 98 % B に、3 分間保持、 0.1 分で 5 % B まで下げて 0.9 分間保持、ストップタイム 21.00 分 ポストタイム 2 分
Agilent 6495B トリプル四重極質量分析システム	
イオン源	Agilent Jet Stream ESI
極性	ポジティブとネガティブの切り替え
ガス温度	120 °C
乾燥ガス (窒素)	17 L/min
ネブライザガス (窒素)	30 psi
シースガス (窒素)	300 °C
シースガス流量	12 L/min
キャピラリー電圧	3,500/-3,500 V
ノズル電圧	300/-500 V
iFunnel 高/低圧 RF	150/60 V
スキャンタイプ	ダイナミック MRM (dMRM)
Q1/Q2 分離能	ユニット (0.7 amu)
デルタ EMV	200 V
セル加速電圧	3 ~ 7 V
MRM の総数	542 (ポジティブ: 530、ネガティブ: 12)

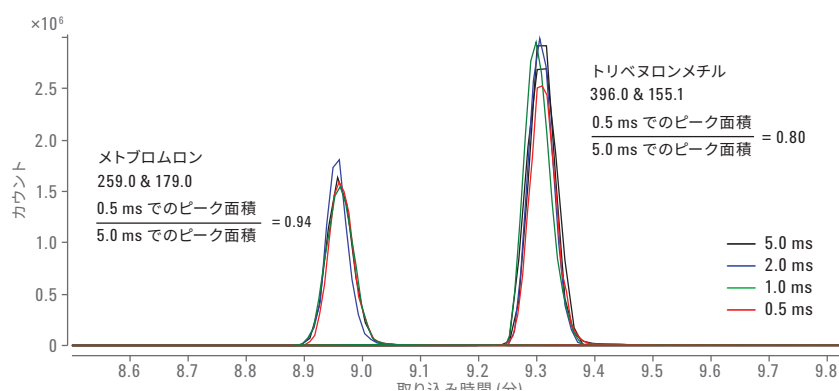


図 1. 最適化された MRM 間ディレイタイムを使用しデュエルタイム 5.0、2.0、1.0、0.5 ms でのメトプロロンとトリベヌロンメチル (100 ppb) の MRM クロマトグラムの重ね表示。

## メソッド開発と性能

最初に、対象となるマイコトキシンおよび着色料化合物に最適化された新しいトランジションを用いて MRM メソッドを開発しました。次に、新しい化合物のトランジションと観察された RT データを使用して 250 以上の農薬をターゲットとする dMRM メソッドを更新しました。

UHPLC と最適化された 6495B トリプル四重極質量分析システムとを組み合わせることにより、大半の分析対象物についてそれぞれの許容最大残留レベル (MRL) の 10 % に相当する定量下限 (LLOQ) で定量することができました。2 ppt の低い LLOQ から 100 ppb の定量上限 (ULOQ) までの範囲の 13 種類の標準濃度で測定精度と真度を評価し、各レベルでの 5 回の繰り返し注入から計算しました。優れた分析精度 (LLOQ で RSD % < 20 %、他のレベルでは < 15 %) と平均真度 (LLOQ で 80 ~ 125 %、他のレベルでは 85 ~ 115 %) を得ることができました。検量線の相関係数 ( $R^2$ ) は 0.99 以上でした。

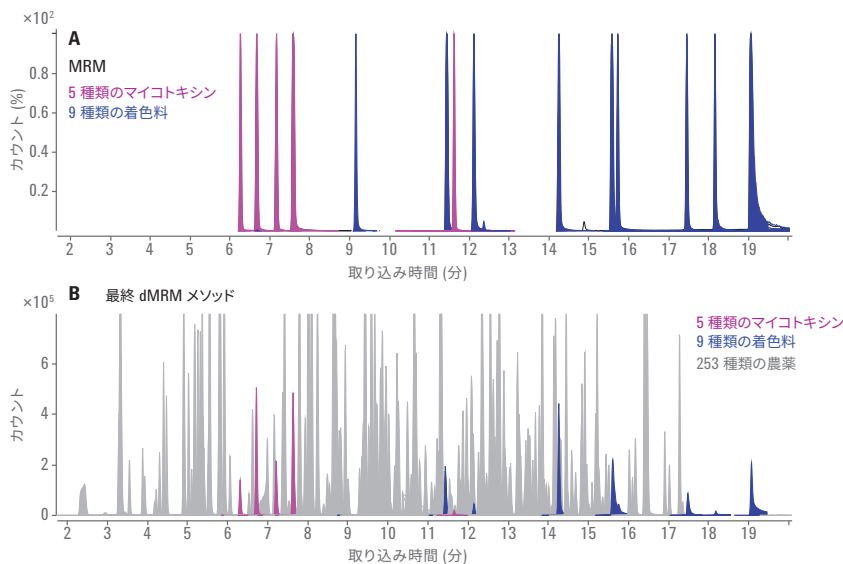
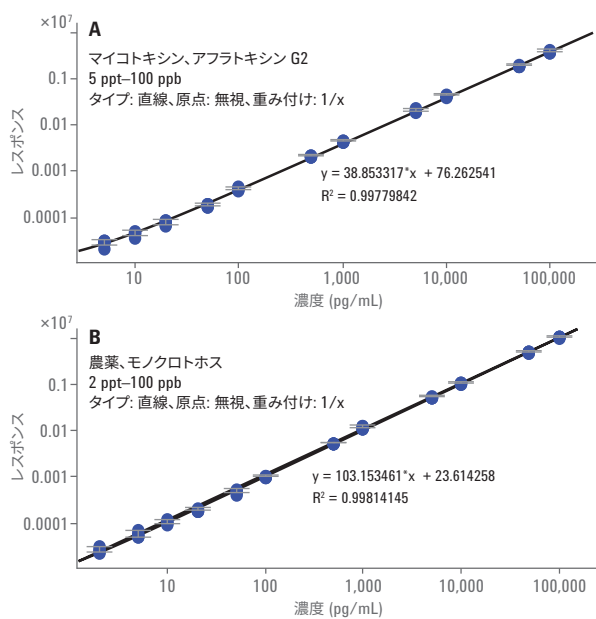


図 2. マイコトキシンと着色料の MRM クロマトグラムの重ね表示 (A)。全部で 267 種類の化合物をターゲットとする最終 dMRM メソッドによる標準の 10 ppb 混合物からの MRM クロマトグラムの重ね表示 (B)。



マイコトキシン	LLOQ (ppt)	IDL (ppt)
アフラトキシン B1	10	3.7
アフラトキシン B2	20	2.2
アフラトキシン G1	5	2.3
アフラトキシン G2	5	2.6
オクラトキシン A	500	274.5

着色料	LLOQ (ppt)	IDL (ppt)
ジメチルイエロー	50	7.9
オレンジ II	1,000	733.5
ローダミン B	500	294.1
スタン I	50	24.0
スタン II	50	8.8
スタン III	500	158.8
スタンオレンジ G	500	190.5
スタンレッド 7B	50	11.6
スタンレッド G	100	24.1

図 3. 最終 dMRM メソッドにより達成したダイナミックレンジと直線性の例。表は、マイコトキシンと着色料の定量下限 (LLOQ) と機器検出下限 (IDL) を示しています。

## 抽出物の希釈によってマトリックス効果を最小化

マトリックス効果を最小にするために複雑なサンプル抽出物を希釈できることでさらに正確な定量を可能にし、同時に LC/MS システムの汚染も低減し、これにより堅牢性を向上させることができます。表 1 は、希釈効果を示しています。サンプルを希釈するにつれて黒コショウ中の化合物の分析対象物の回収率が向上しています。

スパイスはその複雑な性質のためにイオン抑制効果が大きくなるため、分析が極めて困難な食品マトリックスです。着色料の化合物の損失が観察されるために従来の分散 SPE クリーンアップを活用して干渉マトリックス化合物を除去することができず、マトリックス効果がさらに強まります。この結果、抽出物の希釈が抑制の低減に極めて重要でした。図 4 より、スパイスの種類によって必要な希釈の程度がかなり変化することが分かります。

黒コショウは分析した中で最も困難なスパイスマトリックスでした。図 5 より、化合物の > 90 % について許容可能な回収率を達成するには抽出物を 1:100 にアセトニトリルで希釈することが必要であることが分かります。6495B LC/MS システムの感度によって適切な希釈レベル (1:100) の黒コショウを分析でき、20 % 未満の面積 RSD で大半の化合物を検出する機能を維持することができました。

表 1. 溶剤キャリブレーションを基に異なる希釈比について計算した選択済みの化合物の回収率。緑色にハイライトされたセルは SANCO/12571/2013 の要件を満たしています。

分析対象物	希釈なし	1:5 で希釈	1:10 で希釈	1:20 で希釈	1:50 で希釈	1:100 で希釈
アセタミプリド	47.1 ± 3.7	88.5 ± 2.3	94.6 ± 3	99.2 ± 6.8	104.5 ± 6.4	116.7 ± 5.9
アフラトキシン B1	31.1 ± 0.9	80 ± 1.3	90 ± 3.8	92.1 ± 7.7	110.2 ± 8.8	112 ± 3.4
プロブフェジン	4.1 ± 0.3	16.6 ± 1.1	32.1 ± 1.2	47.3 ± 5.8	84.6 ± 9	109.8 ± 9.9
クロラントラニプロール	8.2 ± 0.7	31.1 ± 1.1	50.9 ± 5.2	65.5 ± 10.9	94.2 ± 10.2	101.9 ± 20.4
レナシル	16.9 ± 1.8	57.7 ± 5.9	75.7 ± 5.4	82.4 ± 3.6	97.5 ± 9.2	106.9 ± 11.5
メソミル	24.9 ± 1.9	51.3 ± 3.5	65.3 ± 6.5	77.1 ± 7.5	107.3 ± 10.7	113.3 ± 14.6
プロフェノホス	2.6 ± 0.3	12.5 ± 0.6	20.4 ± 2.1	34.2 ± 1.7	59 ± 8.3	88.5 ± 15.5
プロバモカルブ	105.9 ± 8	102.4 ± 3.4	101 ± 3	100.2 ± 2.8	114.5 ± 3.4	111.5 ± 6.8
プロキナジド	11.4 ± 0.6	42.8 ± 0.9	57.9 ± 1	68.3 ± 3.9	96 ± 11.6	111.3 ± 6.8
スタンレッド 7B	19.8 ± 2.5	57.4 ± 4.2	61 ± 6.9	70.5 ± 2.4	84 ± 5	81.5 ± 7.2

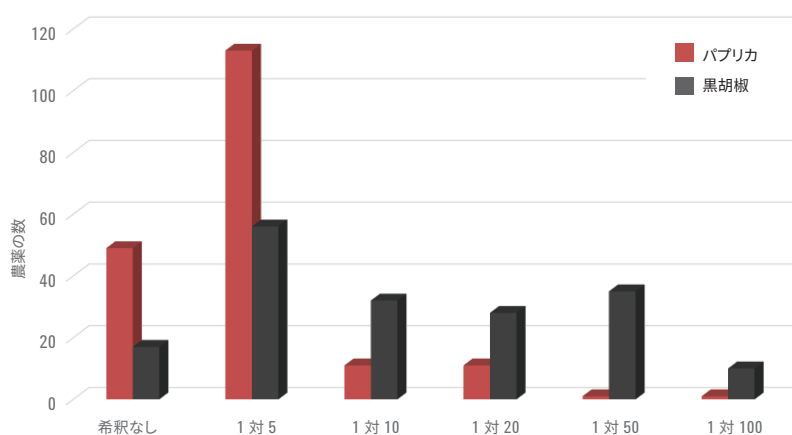


図 4. 194 種類の化合物について許容可能な回収率 (70 ~ 120 %) の数をパプリカと黒コショウの抽出物の希釈率別に比較しました。

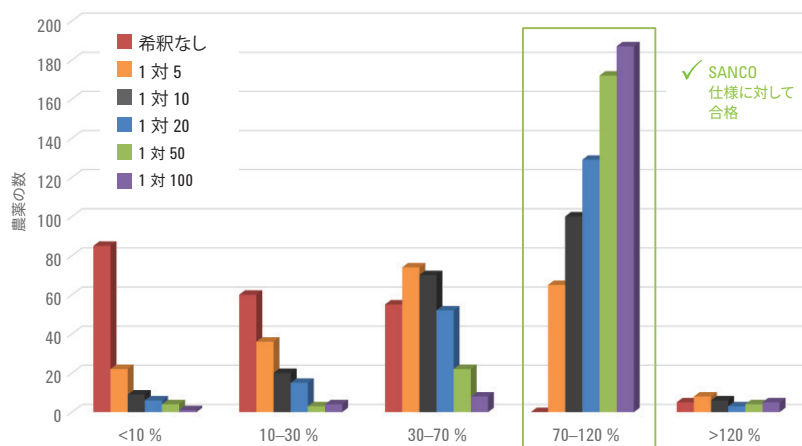


図 5. 黒コショウに 2 ppb (10 µg/kg) でスパイクしアセトニトリルで希釈した農薬、マイコトキシン、着色料の回収率のヒストグラム。205 種類の化合物が強いイオン抑制を示し、希釈後に回収率の大幅な向上を観察できました。

## トリガー MRM (tMRM) による確認

dMRM メソッドによるマトリックス効果の評価時に、パプリカ blanks 抽出物 (標準のスパイクなし) に存在している 20 種類以上の農薬およびマイコトキシンを見つけました。このコントロールサンプル中のこれらの化合物をさらに確認するために、単一の 1 次トランジションの存在をベースとした最大 6 トランジションを収集する tMRM メソッドを適用しました。す

べての化合物のスペクトルを純粋な標準から作成されたスペクトルライブラリと比較しました。定量にも同じデータを使用しました。図 6 に示す例では、1:20 に希釈されたパプリカ抽出物中のオクラトキシン A と アフラトキシン B1 は 28 µg/kg および 8.1 µg/kg と計算されました。

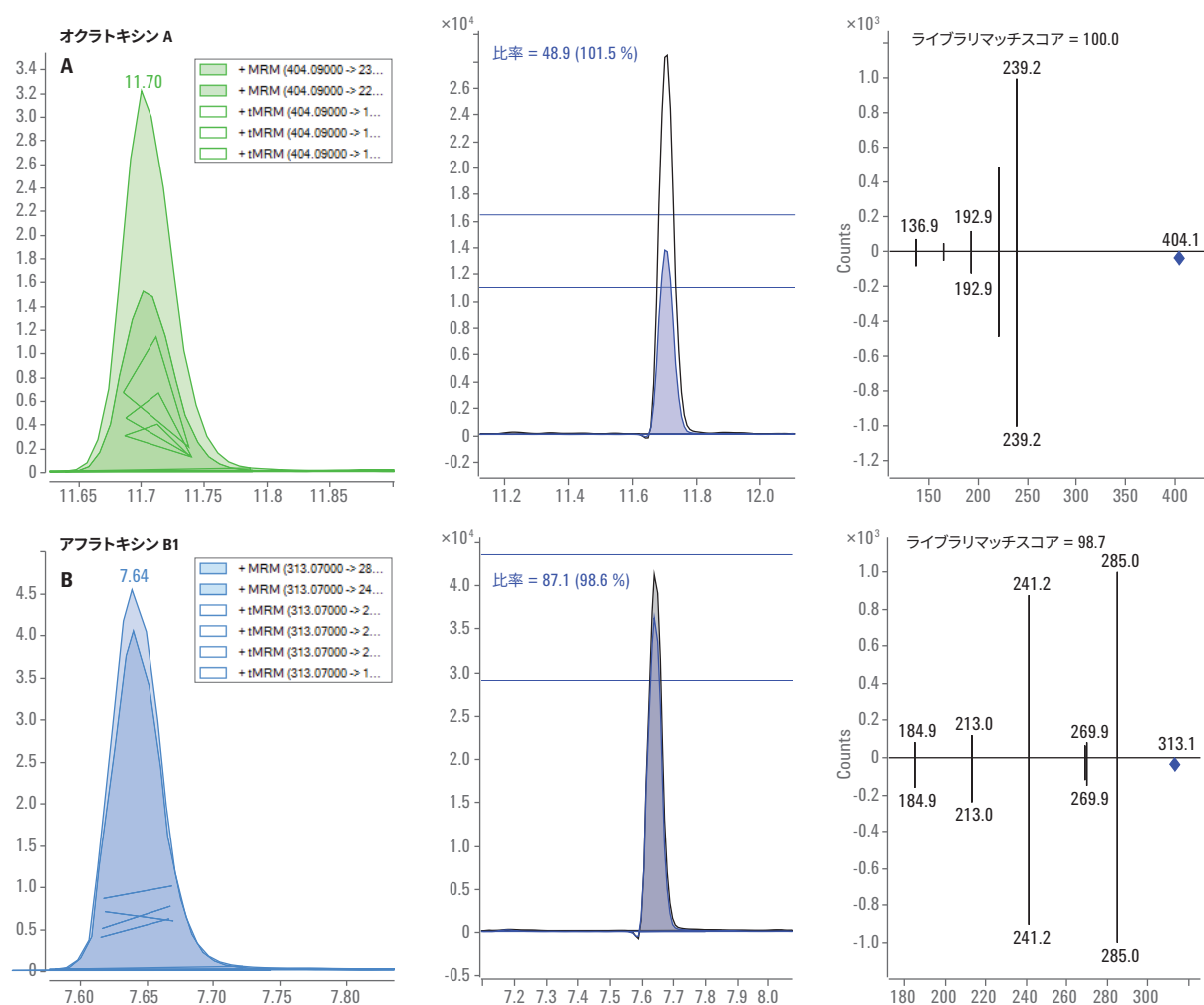


図 6. パプリカ抽出物中のオクラトキシン A (A) とアフラトキシン B1 (B) のトリガー MRM のデータ。化合物クロマトグラム、クオリファイアの詳細、リファレンスライブラリ照合 (左から右へ) を表示。

## 結論

- 最適化された MRM 間デレイタイムにより、0.5 ms の短い MRM ドウエルタイムを使用して分析対象物のシグナルロスを最小に抑えることができました。
- 260 種類以上の化合物を測定するためにマイコトキシンと着色料の化合物を UHPLC/MS/MS 農業メソッドに統合しました。
- Agilent 6495B LC/MS システムを用いて達成した感度の向上により、きわめて高い倍率で希釈したスパイス抽出物の高精度で正確な定量が可能になり、マトリックス効果の低減を実現し、メソッドの堅牢性が向上しました。
- スパイス中のマイコトキシン化合物の確認のために tMRM で収集した値を示しました。

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタマコンタクトセンタ

**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. 2016

Printed in Japan, December 15, 2016

5991-7300JAJP



**Agilent Technologies**