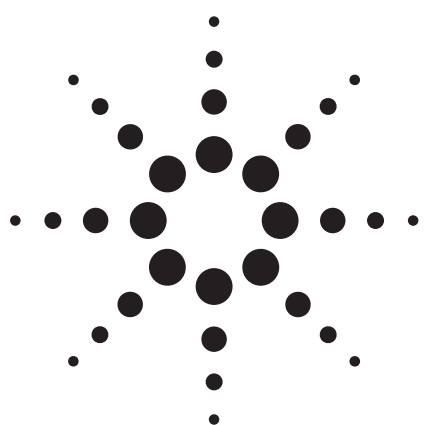


LC/MS/MSによる 食品中のアフラトキシンの測定



アプリケーション

食品安全性

著者

Masahiko Takino
Agilent Technologies
9-1 Takakura-Cho
Hachioji-Shi, Tokyo
Japan

Toshitsugu Tanaka
Kobe Institute of Health
Department of Food Chemistry
4-6 Minatojima-nakamachi
Chuo-ku, Kobe
Japan

要旨

穀物中のアフラトキシンG1、G2、B1、およびB2残留物測定のための、Agilent G6410AA LC/MSトリプル四重極質量分析計を用いた、高感度で選択的な分析法を開発しました。この方法では、簡単なサンプル調整とLC/MS/MSを使用します。穀物類に含まれる全アフラトキシンの検出下限は1ng/mL未満でした。

はじめに

アフラトキシンはカビ類の二次代謝産物の一種です。マイコトキシンであるアフラトキシンは、主にアスペルギルスフラバスおよびアスペルギルスパラジチカスにより産生される極めて毒性の高い代謝生成物であり、暴露されたヒトや家畜に対する発ガン性があります。疫学的データに基づき、世界保健機構と米国内環境保護庁は、ヒトの肝細胞にガンを引き起こす物質としてアフラトキシンを分類しています。以上のことから、アフラトキシン暴露に起因するヒトの疾病を防ぎ、世界的に食の安全を確保するには、アフラトキシンを正確に測定する必要があります。食品中アフラトキシンの分析は、薄層クロマトグラフィ

(TLC)やプレカラム誘導体化法あるいはポストカラム誘導体化法と蛍光検出 (FLD) を組み合わせた液体クロマトグラフィ (LC) を使用します。LC-FLDは、選択性と感度が高いことからよく使用される方法です。さらに、LCに質量分析法 (MS) を組み合わせた方法が開発され、食品中の残留物分析に用いられています。MSの高い選択性と感度をLCの分解能と組み合わせることで、従来であれば検出限界値以下であった微量レベルでも、広範囲の化合物の定性および定量分析を行うことが可能になりました。また、質量分析手法を用いたアフラトキシン分析に関する論文がいくつか発表されています[2-4]。

実験

試料調整

分析対象のサンプル (小麦、トウモロコシ) は地元の市場で購入したもので、アフラトキシンを含みません。アフラトキシンの抽出と洗浄の手順は、Tanaka [5]らによる方法に準じて行いました。

その手順を簡単に説明します。20gのサンプルを細かく砕き、200mLの三角フラスコに入れ、トウモロコシと小麦は40mLのアセトニトリル水溶液 (9:1, v/v) を添加し、30分間攪拌しました。その後、混合液を1,650回転で5分間遠心分離し、上澄み液は、ガラス製マイクロファイバーのGF/Bグレードのフィルタ (Whatman International Ltd, メードストーン、英国) でろ過しました。次にクリーンアップのため、5mLのろ過液をMultiSep228のカートリッジカラムに毎分1mLの流速で負荷し、最初の溶出液2mLを採取しました。さらに、40°Cで、溶出液を窒素気流下で乾固させ、残渣を10mMの酢酸アンモニウムを含む1mLのメタノール溶液 (4:6 v/v) で溶解し試料溶液としました。



Agilent Technologies

標準試薬の調製

アフラトキシンG₂ (AFG₂)、アフラトキシンG₁ (AFG₁)、アフラトキシンB₂ (AFB₂)、およびアフラトキシンB₁ (AFB₁)の各標準試薬は、1mg/mLのアセトニトリルで溶解後、使用まで4°Cの冷暗所で保管しました。LC/MS分析用標準試薬の調製にあたっては、各アフラトキシン保存溶液を一定量ビペットで採取し、バイアルに移した後、移動相で順次希釈しました。各アフラトキシンの最終濃度は1ng/mLとしました。

試薬

標準試薬AFG₂、AFG₁、AFB₂、およびAFB₁はシグマアルドリッチジャパン（東京、日本）から入手しました。これら試薬の純度は99%以上です。酢酸アンモニウム、トルエン、HPLCグレード、アセトニトリル、およびHPLCグレードのメタノールは和光純薬（大阪、日本）から入手しました。水はMilli-Qシステム（ミリポア、東京、日本）を用いてラボで精製しました。MultiSep228のカートリッジカラムは、昭和電工（神奈川、日本）から購入しました。

LC/MSシステム

本実験では、Agilent 1200シリーズのバキュームデガッサ、バイナリポンプ、ウェルプレートオートサンブラ、カラム恒温槽、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) ソース付きのAgilent G6410トリプル四重極質量分析計で構成されたLC/MS/MSシステムを使用しました。今回の目的は、食品中のアフラトキシン類測定のための高速、高感度分析法の開発です。クロマトグラフィの分離およびMS感度のために、さまざまな溶媒およびカラムを最適化しました。その結果、水、メタノール、および酢酸アンモニウムと、粒子径1.8 μmのC18カラムを組み合わせた、単純な溶媒システムが、もっとも分析に適していることが分かりました。

LC条件

装置: Agilent 1200 HPLC
カラム: ZORBAX Extend C18、100mm×2.1mm、1.8 μm (部品番号728700-902)
カラム温度: 40°C
移動相: A = 10mMの酢酸アンモニウム(水中)
B = メタノール 40% A/60% B
流量: 0.2mL/min
注入量: 5 μL

MS条件

装置: Agilent 6410 LC /MSトリプル四重極
ソース: ESI (正イオンモード)
乾燥ガス流量: 10L/min
ネブライザガス圧: 50psig
乾燥ガス温度: 350°C
V_{cap}: 4000V
スキャン範囲: m/z 100~550
フラグメンター電圧: 100V
MRMイオン: 表1参照
コリジョンエネルギー: 表1参照

LC/MS/MSメソッド

定量分析は、MRMモードで実行しました。MRMのパラメータは表1に示しています。

表1. 各アフラトキシンに関するMRM遷移のデータ取り込みパラメータ

番号	マイコトキシン	保持時間(分)	分子量	プリカーサイオン(m/z)	プロダクトイオン(m/z)	コリジョンエネルギー(V)
1	アフラトキシンG ₂	5.21	330	331	245	30
2	アフラトキシンG ₁	6.61	328	329	243	30
3	アフラトキシンB ₂	8.44	314	315	259	30
4	アフラトキシンB ₁	10.89	312	313	241	30

結果および考察

MRM遷移の最適化

各アフラトキシンに対するMRM条件の最適化には、まずシングルMSフルスキャンモードおよびプロダクトイオンスキャンモードを使用しました。フルスキャンモードおよびプロダクトイオンスキャンモードでの上記標準試薬の質量スペクトルを表1と表2に示します。フルスキャンモードでの各アフラトキシンの質量スペクトルでは、プロトン化分子 $[M+H]^+$ がベースピークイオンとして観察されました。MRMモードのプリカーサイオンとして、これらのイオンを選択しました。

また、最適なコリジョンエネルギーは化合物によって異なります。このパラメータは、エネルギーを5Vから40Vまで5Vずつ変化させることで決定しました。図2に示したように、各アフラトキシンのプロダクトイオンの強度は30V付近で最大値を示しています。最大強度を示したプロダクトイオンはそれぞれ、 m/z 245 (AFG_2)、243 (AFG_1)、259 (AFB_2)、および241 (AFB_1) です。これらの結果に基づき、最適なコリジョンエネルギーは30Vに設定しました。

表1には、各アフラトキシンに関するMRM条件を記載しています。

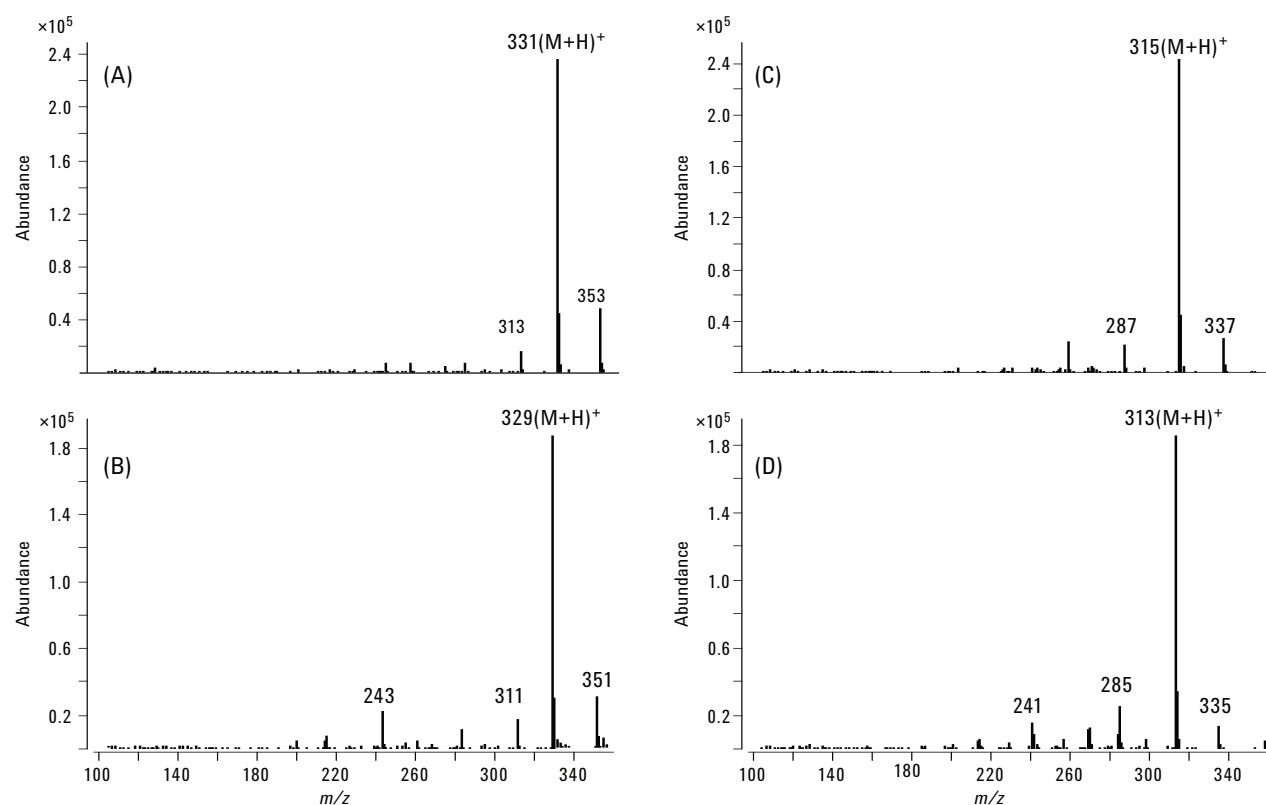


図1. シングルMSフルスキャンモードの1 $\mu g/mL$ での4つのアフラトキシン標準のマススペクトル
(A):アフラトキシン G_2 、(B):アフラトキシン G_1 、(C):アフラトキシン B_2 、および (D):アフラトキシン B_1

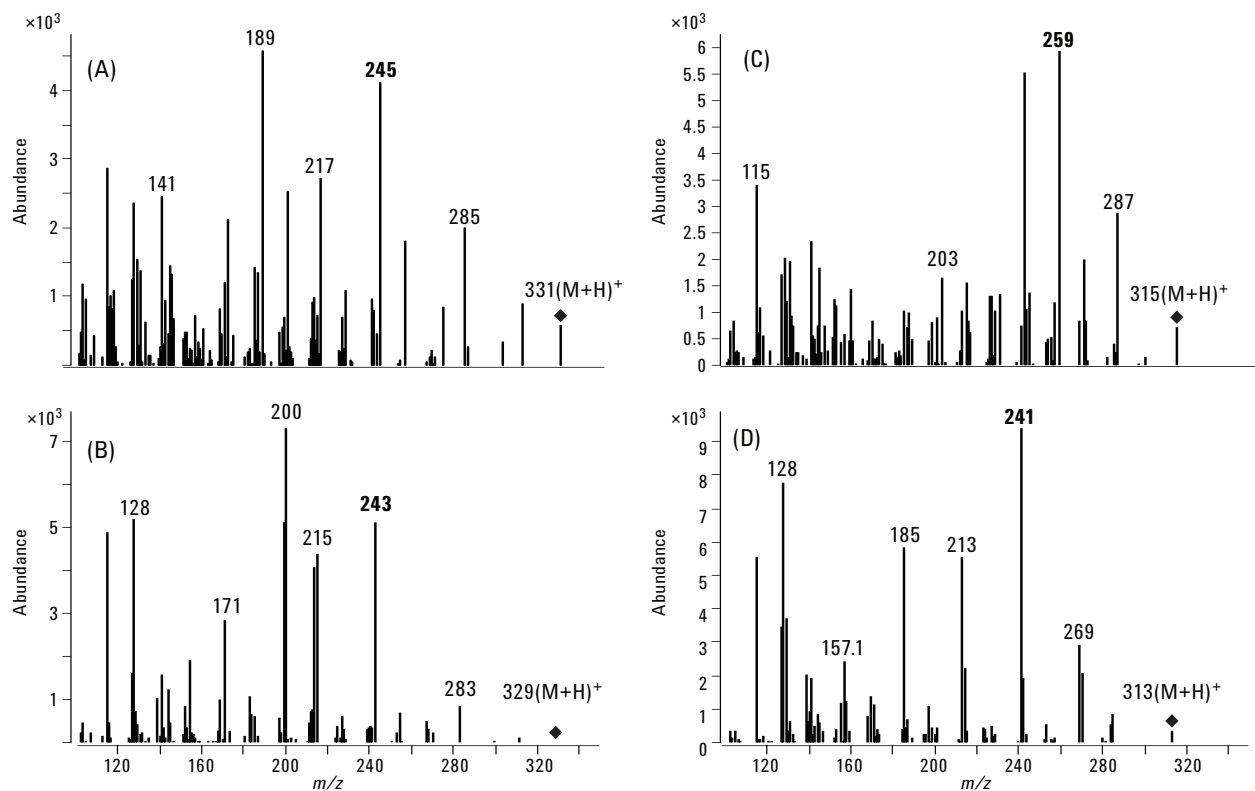


図2. 生成物イオンキャンモードの1 µg/mLでの4つのアフラトキシン標準のマススペクトル。
(A):アフラトキシンG₂、(B):アフラトキシンG₁、(C):アフラトキシンB₂、および (D):アフラトキシンB₁

0.1ng/mLでの各アフラトキシンのMRMクロマトグラムは図3に示しました。これらは、すべてのアフラトキシンに関して良好なS/N比を示しました。各アフラトキシンの検出限界(LOD)は、このMRMクロマトグラムでS/N比3を基に計算し、表2に示しました。直線性を評価するため、0.1ng/mL～100ng/mLの範囲のさまざまな濃度のアフラトキシンの標準液を分析しました。図4と表2に示したように、すべてのアフラトキシンで決定係数(r^2)が0.999を超える良好な直線性が得られました。

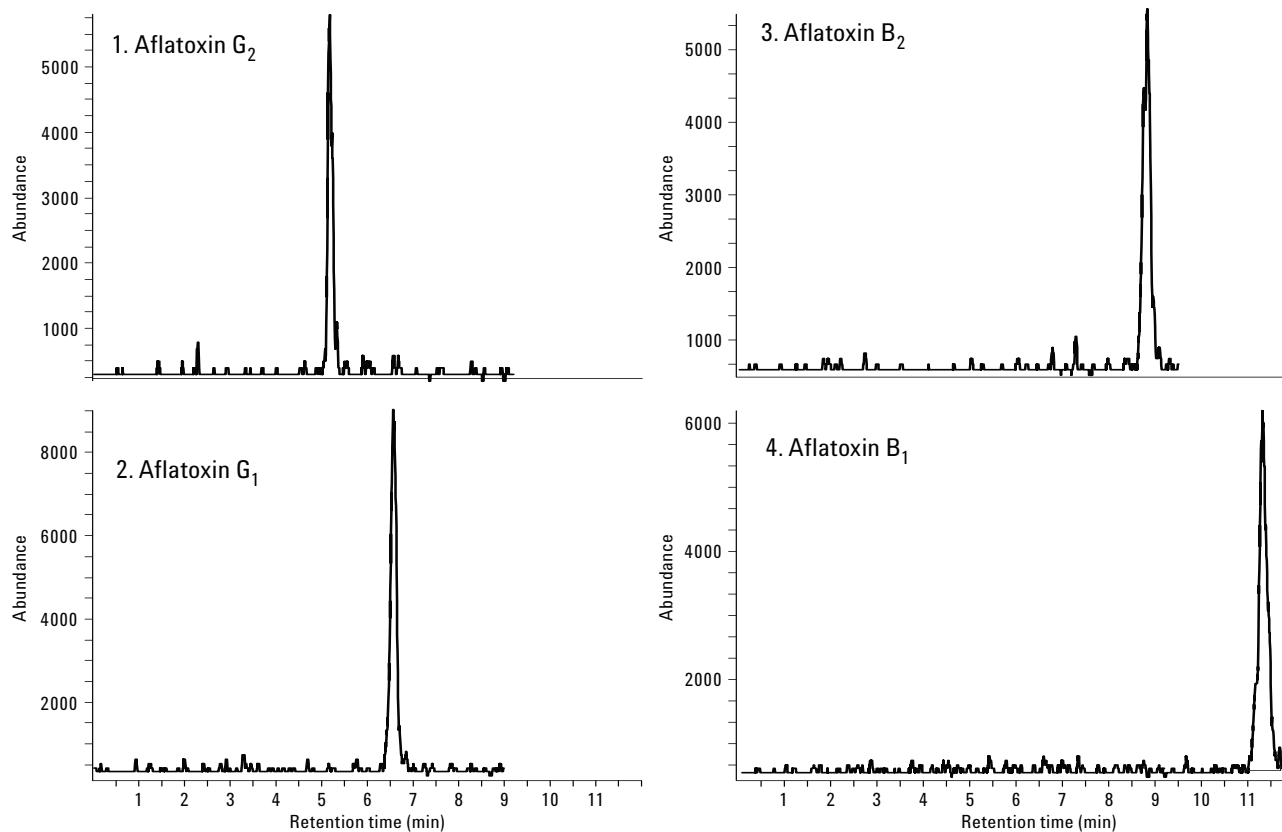


図3. 0.1 ng/mLの標準溶液を添加した小麦抽出物の4つのアフラトキシンのMRMクロマトグラム

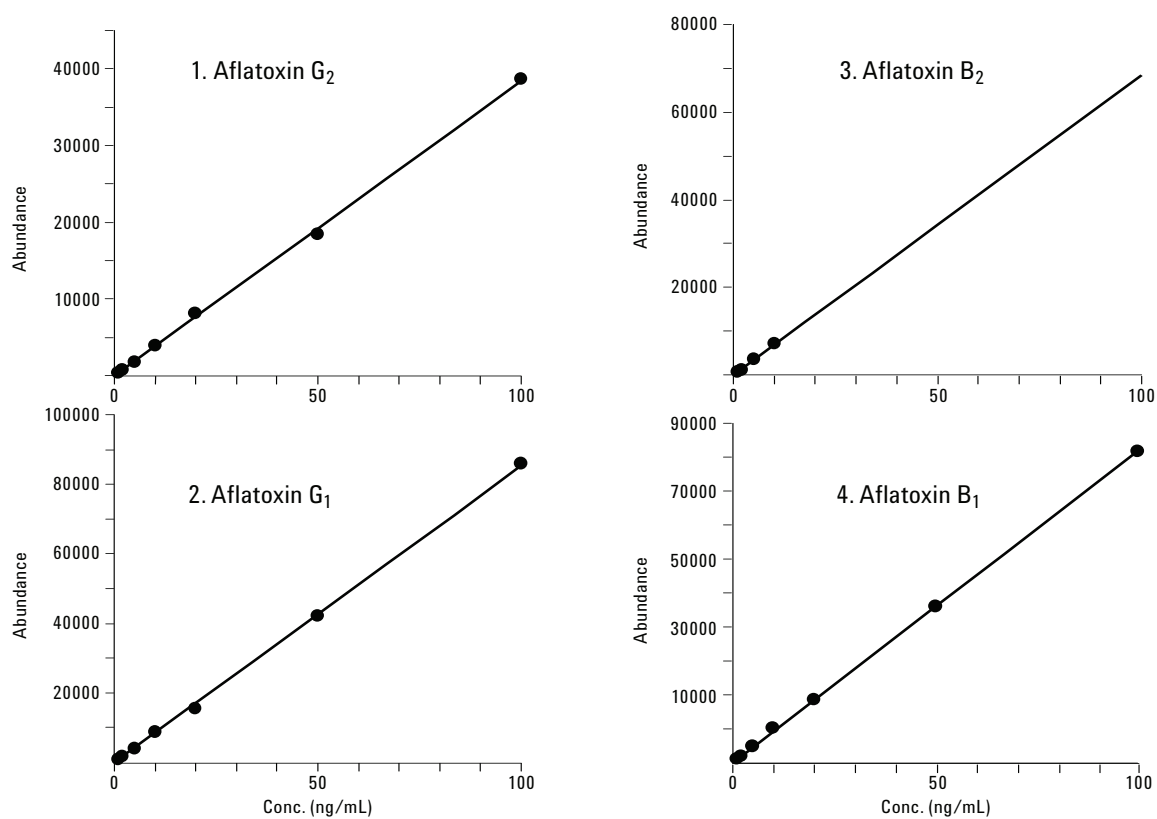


図4. 0.1ng/mL～100ng/mLの範囲の4つのアフラトキシンの検量線。

表2. 4つのアフラトキシンの直線性およびLOD

番号	マイコトキシン	r^2	LOD (ng/mL)
1	アフラトキシンG ₂	0.9999	0.025
2	アフラトキシンG ₁	0.9992	0.020
3	アフラトキシンB ₂	0.9999	0.025
4	アフラトキシンB ₁	0.9993	0.020

0.2ng/mLのアフラトキシン標準混合溶液を添加した小麦およびトウモロコシ抽出液を用い、この分析法のマトリックス効果を検証しました。小麦およびトウモロコシ抽出物の代表的なMRMクロマトグラムを、図5と図6にそれぞれ示しています。アフラトキシン標準液と比較した場合、いずれの食品でも試料マトリックス由来ピークは観察されませんでした。これらの結果から、MRMモードの選択性が非常に高いことが分かります。

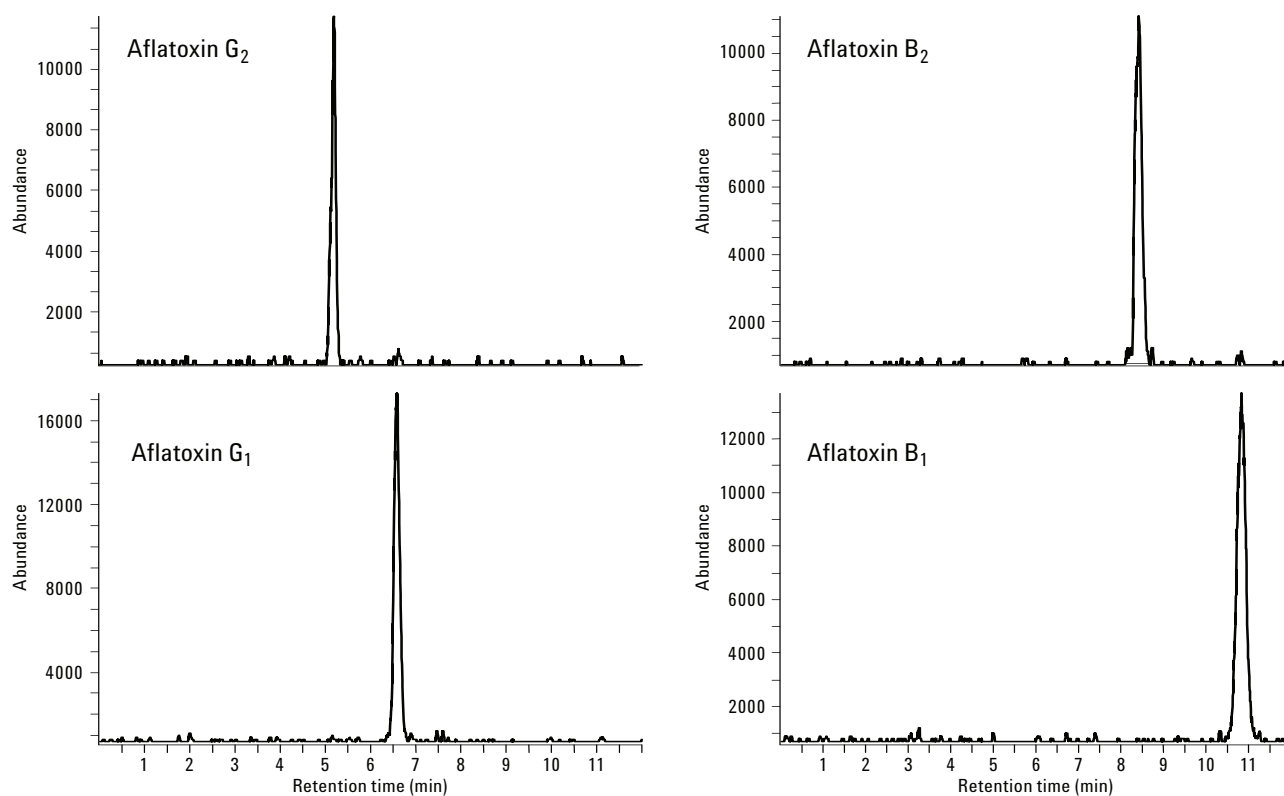


図5. 0.2ng/mLで添加された小麦の抽出物の4つのアフラトキシンのMRM。

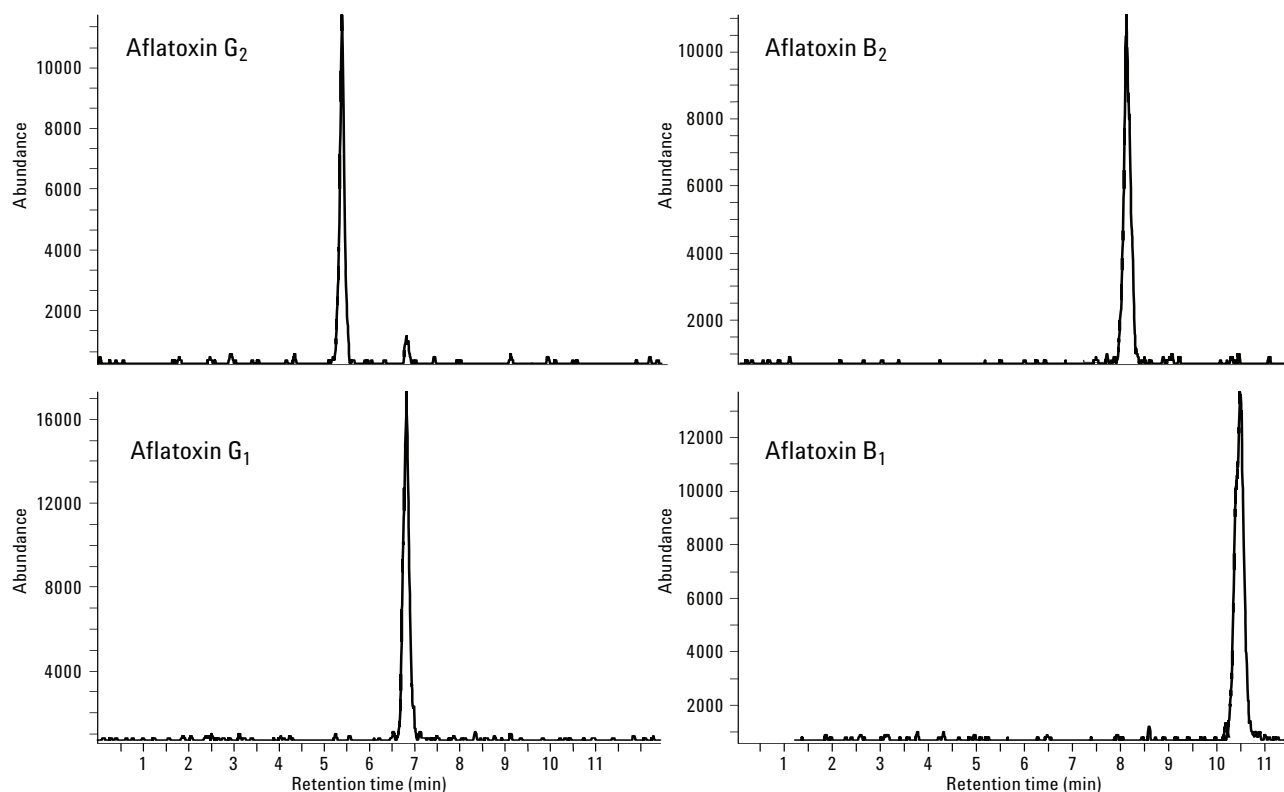


図6. 0.2ng/mLで添加されたトウモロコシの抽出物の4つのアフラトキシンのMRM。

さらに、試料マトリックスによる各アフラトキシンのピーク強度の変化について、アフラトキシスタンダード溶液のピーク強度と比較することで検証しました。表3に示した結果の通り、各農薬の標準溶液に対する相対強度は88～96%でした。この結果は顕著なイオン抑制などのマトリックス効果は認められなかったことを示しており、マトリックス検量線ではない、標準検量線による外部標準法が可能です。

表3. サンプル内の各アフラトキシンの相対強度抽出物

番号	マイコトキシン	相対強度 (%)	
		小麦	トウモロコシ
1	アフラトキシニンG ₂	88	91
2	アフラトキシニンG ₁	92	94
3	アフラトキシニンB ₂	93	96
4	アフラトキシニンB ₁	97	95

結論

ここで紹介したLC/MS/MSを用いたアフラトキシニン類一斉分析法は、感度および選択性が高く、小麦およびトウモロコシ抽出物から4種のアフラトキシンを測定することが可能でした。さらにこの分析法では、対象とした全食品試料でイオン抑制が起きなかったという利点もあります。

以上により、この分析法を用いると、試料ごとに調製が必要なマトリックス検量線が不要になり、分析法がより簡便となりました。

参考文献

1. K. K. Sinha and D. Bhatnagar, 1998, "Mycotoxins in Agriculture and Food Safety," 1998 (New York: Marcel Dekker)
2. W. J. Hurst, R. A. Martin, and C. H. Vestal, 1991, "The Use of HPLC/Thermospray MS for the Confirmation of Aflatoxins in Peanuts," J. Liq. Chromatogr., 14, 2541-2540.
3. A. Cappiello, G. Famigliani, and B. Tirillini, 1995, "Determination of Aflatoxins in Peanut Meal by LC/MS with a Particle Beam Interface," Chromatographia, 40, 411-416.
4. M. Vahl and K. Jorgensen, 1998, "Determination of Aflatoxins in Food Using LC/MS/MS," Z Lebensm Unters Forsch A., 206, 243-245.
5. T. Tanaka, A. Yoneda, Y. Sugiura, S. Inoue, M. Takino, A. Tanaka, A. Shinoda, H. Suzuki, H. Akiyama, and M. Toyoda, 2002, "An Application of Liquid Chromatography and Mass Spectrometry for Determination of Aflatoxins," Mycotoxins, 52, 107-113.

詳細情報

当社の製品およびサービスの詳細情報については、
当社のホームページ、www.agilent.com/chem/jp を
ご覧ください。

アジレントは、本文書に含まれている誤植、あるいは本品の設置、性能、
または使用に関する偶発的ないし間接的な損害に関して責任を負いません。

本書に記載されている情報、説明、および仕様は予告なく変更されることが
あります。

© Agilent Technologies, Inc. 2008

Printed in Japan
January 4, 2008
5989-7615JAJP



Agilent Technologies