

マルチマイコトキシン分析法のための ACQUITY™ Premier UPLC のメリット

Nicola Dreolin, Stuart Adams, Simon Hird, Peter Hancock, Timothy Jenkins

Waters Corporation

要約

マルチマイコトキシン分析法では通常、さまざまな化合物に対する不均等なレスポンス、LC システムにおけるキャリーオーバー、マトリックス効果などの課題が生じます。これらの要因はバリデーション実験に影響を及ぼし、分析法の性能に大きな影響を与える可能性があります。これらの課題に対処するため、ウォータースは MaxPeak™ High Performance Surfaces (HPS) テクノロジーを採用した ACQUITY Premier システムおよび分析カラムを開発しました。本研究では、これまでに開発したマルチマイコトキシン LC-MS/MS 分析法の新しい ACQUITY Premier システムへの移管に成功し、従来の UPLC と比較してフモニシンのキャリーオーバーが約 80% 低減することが確認できました。さらに、直線性、精度、ピーク形状、保持時間の安定性の点で非常に良好な分析法の性能が達成できました。

アプリケーションのメリット

- ACQUITY Premier システムとカラムにより、従来の UHPLC システムと比較して、フモニシンのキャリーオーバーが効果的に低減
- ACQUITY Premier システムでは、移動相または洗浄溶液に対する金属キレート剤の添加が不要
- 洗浄のサイクル数を減らすことができるため、ACQUITY Premier システムでの分析スループットが向上
- 非常に良好な直線性、精度、ピーク形状、保持時間の再現性が得られ、SANTE/12089/2016 性能ガイドラインに適合

はじめに

ウォーターズでは以前、「直接希釈注入」サンプル前処理手順に基づいた規制対象のマイコトキシン向けの UPLC-MS/MS 分析法を開発しており、その後、より多くの天然毒素を測定できるように分析法を拡張しました^{1,2}。マルチマイコトキシン分析法には通常、以下のような課題があります。毒素化合物の化学的多様性により、一部のクラスの化合物において、LC システムでの不均等なレスポンスファクターおよびキャリアオーバーという問題が生じます。また、さまざまな食品・飼料製品の複雑さにより、重大なマトリックス効果がしばしば生じます。これらの課題は、バリデーション実験に影響を及ぼし、分析法の性能に大きな影響を与える可能性があります。

効果的なクリーンアップステップをサンプル前処理プロトコルに取り入れることで、UPLC-MS/MS システムに導入される望ましくない共抽出物の量を減らすことができ、マトリックス効果の影響を軽減して、分析法の頑健性を高めることができます³。また、Xevo™ TQ-Absolute 質量分析計などの高感度タンデム四重極 MS を使用することで、マトリックス効果を軽減することができ、高いサンプル希釈係数（最大 100 倍）を適用することができます。

最新の LC モジュールを使用する場合、少量のサンプルまたは分析種が流路のどこかにトラップされることがよくあり、連続したクロマトグラムで予期しないピークや余分なピーク（ゴーストピーク）が生じることがあります。これは一般に「キャリアオーバー」と呼ばれ、液体クロマトグラフィーで最も腹立たしい問題の 1 つであり、高濃度スタンダード/サンプルの注入後のブランク注入における面積比で 3 ～ 20% もの値に達することがあります。ウォーターズの別の研究では、フモニシン B₂ (FB₂) のキャリアオーバーを検討し、これをケーススタディとして、異なるインジェクターシステムおよび構成を使用した後に流路に残る分析種の量を最小限に抑えるためのさまざまな戦略を比較しました⁴。FB₂ および類似の化合物の化学特性により、再現性が悪く、偽陽性の結果が生じる可能性があります。このような理由から、キャリアオーバーを許容レベルまで減らすことが重要です。キャリアオーバーを削減するためには通常、移動相またはサンプル希釈液にエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) やクエン酸などのキレート剤を添加します。ただし、キレート剤はイオン化抑制を引き起こす可能性があり、LC システムから除去するのが困難になる場合があります。

これらの課題に対処するため、ウォーターズは MaxPeak HPS テクノロジーを採用した ACQUITY Premier システムおよび分析カラムを開発しました⁵。HPS は、エンチレン架橋型シリキサン基を含む高度に架橋された層で構成され、流路内の金属表面との望ましくない相互作用を軽減する非常に効果的なバリアになります。

本研究では、これまでに開発したマルチトキシン分析法を新しい ACQUITY Premier UPLC システムに移管し、金属キレートによりステンレス表面に部分的に吸着することが知られているマイコトキシンのキャリアオーバーが MaxPeak HPS テクノロジーによって低減できるかどうかを評価しました。システムの感度、保持時間の再現性、ピーク形状、および全体的な分析法の性能も SANTE ガイドラインに従って評価しました⁶。

実験方法

サンプルおよびスタンダードの調製

小麦、オート麦、全粒粉のサンプルを、以前の研究に基づいた手順に従って抽出しました^{1,2}。簡単に説明すると、均質化したサンプル 5.0 g を 50 mL のプラスチック遠心チューブに入れ、20 mL の 79: 20: 1 MeCN: H₂O: 酢酸 (v/v/v) で 10 分間抽出しました。5,000 g 超で 6 分間遠心分離した後、上清の一部を直径 13 mm、孔径 1.2 µm のグラスファイバーシリンジフィルターでろ過し、水で 1: 5 に希釈して (100 µL の抽出物を 400 µL の H₂O と混合) 直接 LC バイアルに入れて、全体としての希釈係数が 20 倍になるようにしました。LC-MS/MS 分析を行う前に、¹³C 標識内部標準を含む 10 µL の内部標準混合物を各バイアルに添加しました。

ストック混合液の連続希釈により、ターゲット分析種を含む溶媒の検量線を調製しました。この時、溶媒の組成は H₂O: MeCN 95: 5 (v/v) に保ちました。500 µL の各キャリブレーションスタンダードに 10 µL の内部標準を加えました。

液体クロマトグラフィーの条件

クロマトグラフィーシステム:	標準の ACQUITY UPLC I-Class PLUS および ACQUITY Premier UPLC (バイナリーソルベントマネージャー搭載)
オートサンプラーおよびインジェクター:	ニードルサイズ 15 µL のフロースルーニードルインジェクター (FTN)、および注入バルブのポート 6 と APH の間に取り付けた 50 µL の HSP 延長ループ (製品番号: 700012825)。
カラム:	標準システム: ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ 1.7 µm (製品番号: 186002352) Premier システム: ACQUITY Premier BEH C ₁₈ 1.7 µm (製品番号: 186009453)
移動相:	水系: 1 mM 酢酸アンモニウム水溶液 + 0.3% 酢酸 + 0.1% ギ酸 (v/v) 有機: メタノール + 0.3% 酢酸 + 0.1% ギ酸 (v/v)
ニードル洗浄溶媒:	水: メタノール: アセトニトリル: イソプロパノール: アセトン

	20: 20: 20: 20: 20 + 0.1% ギ酸 (体積比)
シール洗浄溶媒:	水: メタノール 80: 20 (v/v)
カラム温度:	40 °C
サンプル温度:	15 °C
注入量:	5 µL
流速:	0.40 mL/分



図 1. この研究で使用した構成（左から右へ：ACQUITY Premier、ACQUITY I-Class Plus、Xevo TQ-S micro）

時間 (分)	% 有機	% 水系	曲線
0.0	5	95	–
0.7	5	95	6
6.5	50	50	6
9.5	100	0	6
12.5	100	0	6
12.6	5	95	6
14.0	5	95	6

表 1. UPLC グラジエント

質量分析条件

質量分析システム:	Xevo TQ-S micro
イオン化モード:	ESI+/- (極性切り替え)
取り込みモード:	マルチブルリアクションモニタリング (MRM)
キャピラリー電圧:	+0.75/-0.3 kV
コーンガス流量:	50 L/時間
脱溶媒温度:	600 °C
脱溶媒ガス流量:	1,100 L/時間

イオン源温度:	150 °C
分離:	MS1 ユニット、MS2 ユニット
データの取り込みと解析:	定量のための waters_connect™ (v. 1.1)

注: 最適化した MRM トランジション、コーン電圧、コリジョンエネルギーの包括的なリストは、以前の研究で報告されています⁷。

結果および考察

キャリアオーバーの低減

田村らは、フモニシン中の解離したカルボキシル基がサンプル流路で金属とキレートを形成し、後続の注入で分析種のキャリアオーバーが起こることを実験的に確認しています⁸。

この2つのシステムにおいてマイコトキシンのキャリアオーバーを評価する実験を行いました。この実験では、溶媒ブランク3回、上位レベルのキャリブラント1回、溶媒ブランク6回のシーケンスで複数回取り込みを行い、キャリアオーバーを面積割合 (CO [A%]) およびシグナル対ノイズ比 (S/N r/r) で計算しています⁴。

図2に、異なる日に2回繰り返し行った実験の結果を報告します。この図では、キャリアオーバーが LLOQ を超える値に達しているブランク注入は赤色で示され、キャリアオーバーの値が LLOQ の 65% 以内の場合は黄色、値が LLOQ を下回る（すなわち許容可能と見なされる）場合は緑色でそれぞれ示されています。標準の ACQUITY I-Class および他のベンダーの UHPLC では、高濃度のスタンダードや重度に汚染されたサンプル（この場合 2,000 µg/kg FB₂）を注入した後、FB₂ のレベルを定量下限 (LLOQ = 15 µg/kg) 未満にするのに、通常 2～3 回のブランク注入が必要になります。一方、ACQUITY Premier システムでは、1 回目の後続のブランクでの FB₂ のレスポンスは LLOQ と同等あるいは LLOQ を下回っており、2 回目のブランクでは FB₂ のレベルは定量不能なレベルでした。この結果、同じシーケンス内での洗浄サイクルの回数や時間を減らすことができ、ACQUITY Premier での分析スループットが向上します。さらに、実験を繰り返した結果、非常に類似した値が得られ、結果のさらなる信頼性が得られました。

実験 #1

標準 ACQUITY I-Class						ACQUITY Premier				
注入	ピーク面積	S/N	CO (A%)	CO (μg/kg)	S/N r/r	ピーク面積	S/N	CO (A%)	CO (μg/kg)	S/N r/r
標準	1505389	1022.0				2736304	1616.1			
ブランク #1	49351	45.9	3.3	66	4.5	19341	9.2	0.7	14	0.6
ブランク #2	19455	12.5	1.3	26	1.2	3860	ND	0.1	3	NA
ブランク #3	9958	19.1	0.7	13	1.9	ND	ND	0.0	0	NA
ブランク #4	5702	6.5	0.4	8	0.6	ND	ND	0.0	0	NA
ブランク #5	ND	ND	0.0	0	NA	ND	ND	0.0	0	NA
ブランク #6	ND	ND	0.0	0	NA	ND	ND	0.0	0	NA

実験 #2

標準 ACQUITY I-Class						ACQUITY Premier				
注入	ピーク面積	S/N	CO (A%)	CO (μg/kg)	S/N r/r	ピーク面積	S/N	CO (A%)	CO (μg/kg)	S/N r/r
標準	1516581	634.8				2500681	1004.7			
ブランク #1	52020	37.7	3.4	69	5.9	12589	5.2	0.5	10	0.5
ブランク #2	24558	18.7	1.6	32	3.0	5739	5.3	0.2	5	0.5
ブランク #3	12741	12.2	0.8	17	1.9	3919	5.8	0.2	3	0.6
ブランク #4	8021	6.7	0.5	11	1.0	3149	ND	0.1	3	NA
ブランク #5	6894	13.1	0.5	9	2.1	2956	ND	0.1	2	NA
ブランク #6	7111	13.4	0.5	9	2.1	ND	ND	0.0	0	NA

図 2. 標準の ACQUITY I-Class システムと ACQUITY Premier システムで実行した 2 つの実験での FB_2 のキャリアオーバー値。S/N = シグナル対ノイズ比、CO (A%) = 面積比として表したキャリアオーバー、CO (μg/g) = FB_2 の ppb として表したキャリアオーバー、S/N r/r = シグナル対ノイズ比/比、ND = 未検出、NA = 該当なし。カラーコード：赤色 = キャリーオーバー値 > LLOQ、黄色 = キャリーオーバー値が LLOQ の 65% 以内、緑色 = キャリーオーバー値 < LLOQ。

図 3 に、ACQUITY Premier システムでの上位レベルのスタンダードと後続の溶媒ブランク注入の FB_2 トレースおよびピーク面積の比較を示します。

フモニシン B_1 (FB_1) について、標準的な ACQUITY I-Class システムでは、キャリアオーバー値は 30、14、8 μg/kg と同等であり、2,000 μg/kg のスタンダードの注入後は後続のブランクで検出不能でした。ACQUITY Premier システムでは、1 回目のブランクですでにキャリアオーバーレベルが LLOQ 未満であり、2 回目のブランク注入では検出可能なピークはありませんでした。

これらの結果から、ACQUITY Premier システムでは、金属表面への分析種の吸着を顕著に低減する効率的なバリアとして作用する HPS テクノロジーにより、マイコトキシンのキャリアオーバーが大幅に低減するため、使用が有益であることが明らかになりました。

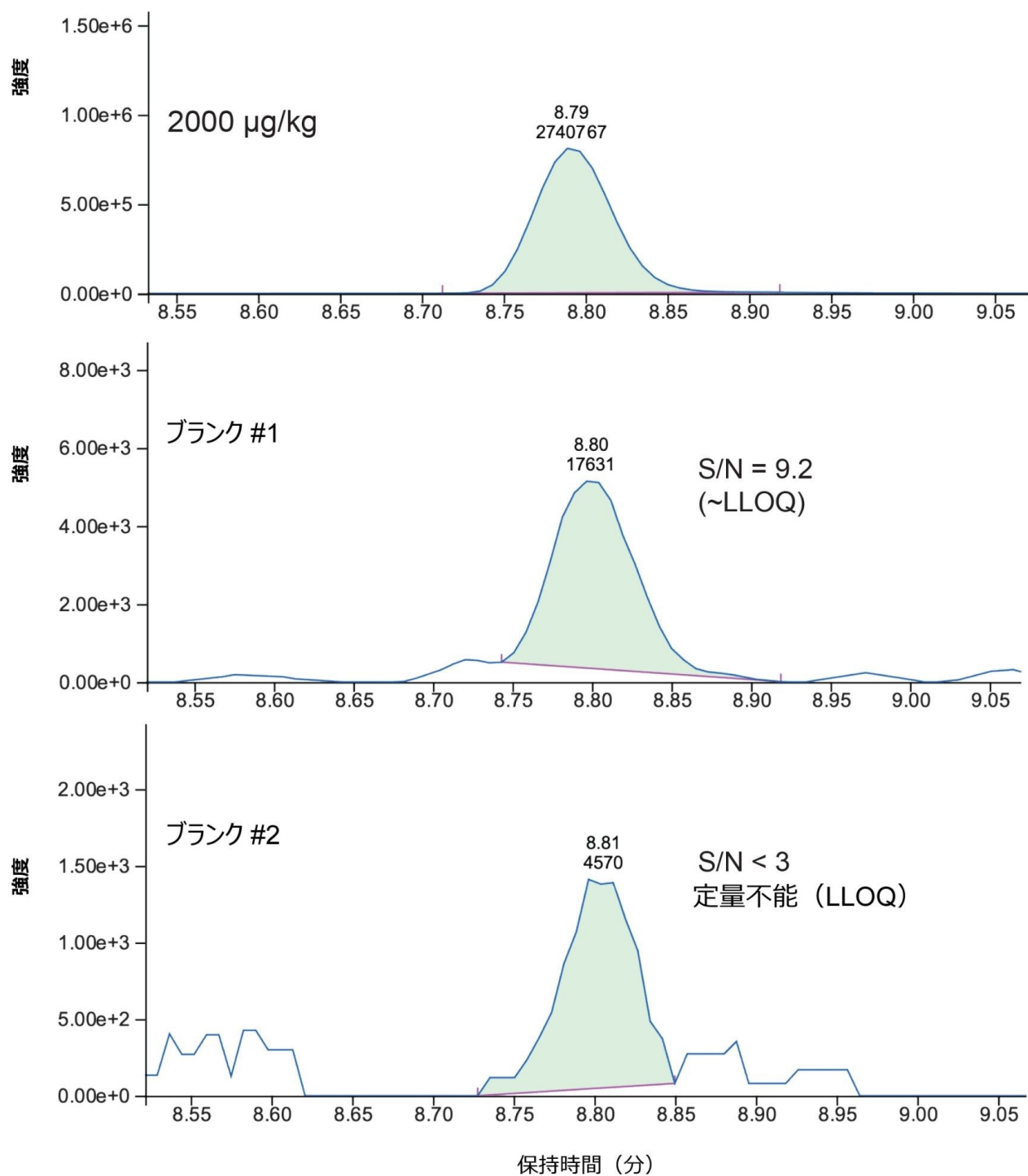


図 3. ACQUITY Premier システムでの、高レベルスタンダード（上）、1 回目の後続のブランク注入（中央）、および

2 回目の後続のブランク注入（下）におけるフモニシン B_2 のピーク面積とシグナル対ノイズ比（S/N）

全体的な性能比較

ルーチン食品・飼料検査ラボでの通常のシーケンスが再現されるように分析のシーケンスを設定することにより、マイコトキシンが含まれる穀物サンプルと既知濃度の 12 種類の規制対象マイコトキシンをスパイクしたサンプルを、両方の構成を使用して分析しました（図 4）。精度、感度、直線性、ピーク形状などの全般的な分析法の性能を 2 つのシステムで評価しました。

2x 溶媒ブランク
1 つ目のブラケット検量線（8 点）
4x 溶媒ブランク
3x 小麦粉サンプル
3x 小麦粉サンプルに 12 種のマイコトキシンをスパイク
3x 溶媒ブランク
3x オート麦サンプル
3x オート麦サンプルに 12 種のマイコトキシンをスパイク
3x 溶媒ブランク
3x 全粒粉サンプル
3x 全粒粉サンプルに 12 種のマイコトキシンをスパイク
3x 溶媒ブランク
2 つ目のブラケット検量線（8 点）
4x 溶媒ブランク
[...]

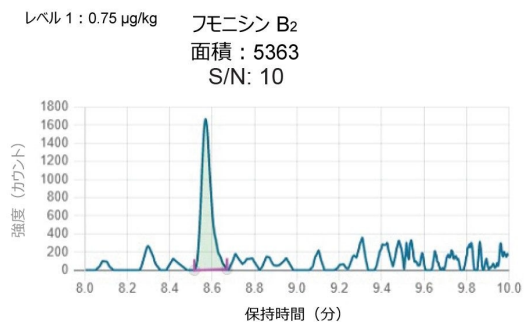
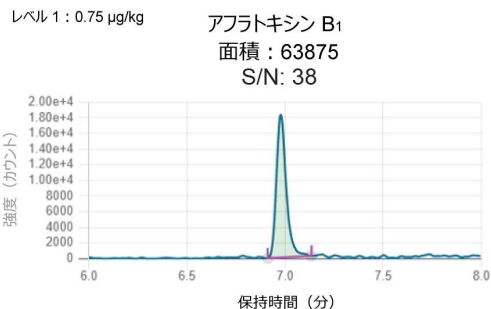
図 4. 分析シーケンスの繰り返しユニット

いずれのシステムでも、すべてのマイコトキシンに対して非常に良好な直線性が示され、決定係数（ R^2 ）> 0.99、残差は ±20% 以内でした。定量下限（LLOQ）は同等でしたが、ACQUITY Premier では一部の化合物についてわずかに高いピーク面積と S/N 比が認められました。表 2 に、LLOQ と分析法の直線性の範囲を報告しています。図 5 には、代表的な 2 種類のマイコトキシンの LLOQ レベルでのピークレスポンスと S/N 比の比較を示します。

分析種	LLOQ (µg/kg)	直線性範囲 (µg/kg)
アフラトキシン B ₁	0.75	0.75～100
アフラトキシン B ₂	0.75	0.75～100
アフラトキシン G ₁	0.75	0.75～100
アフラトキシン G ₂	0.75	0.75～100
デオキシコバレノール	18	18～2400
ゼアラレノン	15	15～2000
オクラトキシン A	1	1～400
HT-2 トキシン	9	9～1200
T-2 トキシン	9	9～1200
フモニシン B ₁	15	15～2000
フモニシン B ₂	15	15～2000
コバレノール	360	360～40000

表 2. 12 種類の規制対象マイコトキシンの定量下限
(LLOQ) および直線性の範囲

標準 ACQUITY I-Class



ACQUITY Premier

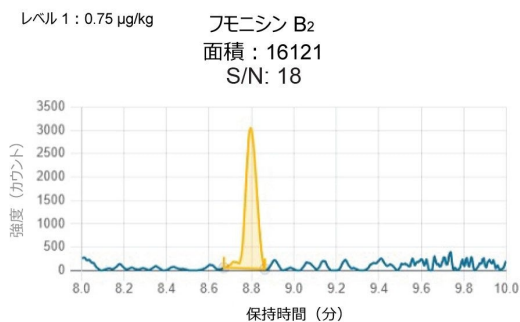
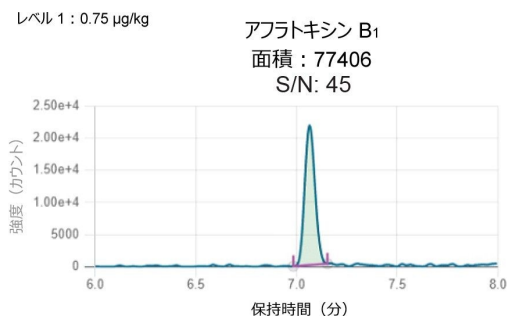


図 5. ACQUITY I-Class (左) と ACQUITY Premier (右) でのアフラトキシン B₁ (0.75 µg/kg) とフモニシン B₂ (15 µg/kg) のピークレスポンスおよびシグナル対ノイズ比。手動で変更した波形解析の結果は、黄色のトレースで示されています。

マイコトキシンが含まれるサンプルとスパイクサンプルの 3 回繰り返しにわたって計算した再現性試験の条件下での相対標準偏差 (RSD%) は、両方のシステムにおいて、すべての分析種について 10% 未満でした。すべての分析種について、同じシーケンス内で保持時間の偏差が 0.006 分未満と、非常に良好な保持時間の再現性が得られました。さらに、2 つのシステム間で同等のピーク形状が得られました。一例として、図 6 に、15 の穀物サンプル中の FB₂ のクロマトグラフィーのトレースを報告しています。いずれのシステムでもテーリングのないガウスピークが得られたことが注目されます。

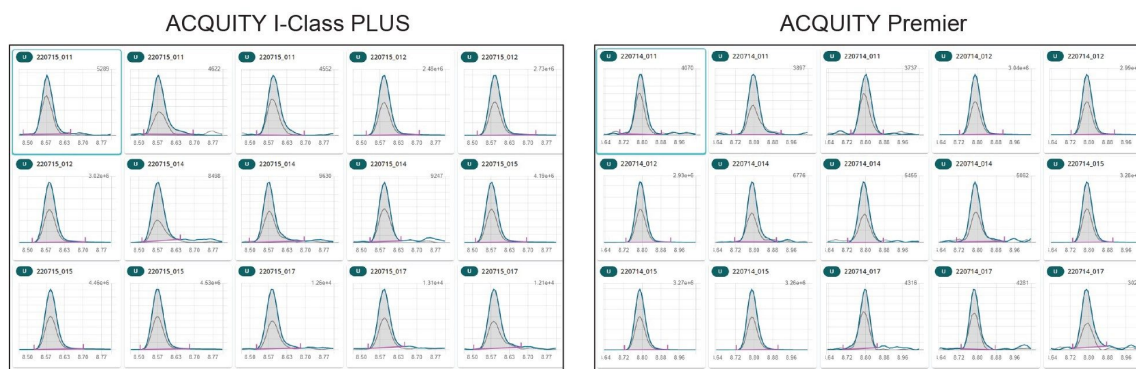


図 6. 2 種類のシステム構成を使用した、穀物サンプル中のフモニシン B_2 のクロマトグラフィー分析

結論

内部標準化されたキャリブレーションを備えた、以前に開発されたマルチマイコトキシン分析法を、LC 条件の変更を最小限に抑えて、新しい ACQUITY Premier システムに移管することに成功しました。異なるバッチの複数の繰り返しを含む食品サンプルの通常のルーチン分析を実行した場合、同等の分析法の性能が得られました。SANTE ガイドラインで定義されているように、すべての分析種について、非常に良好な直線性、精度、ピーク形状、保持時間の再現性が認められました。

ACQUITY Premier システムの主なメリットは HPS テクノロジーにあり、フモニシンのキャリーオーバーを約 80% 低減できました。これにより、移動相およびニードル洗浄溶液中の金属キレート剤を除くことができ、同じシーケンス内で必要な洗浄サイクルが減るため、分析スループットも向上しました。

参考文献

1. Dreolin N. and Stead S. LC-MS/MS Method Development and Validation for the Quantitative Determination of Regulated Mycotoxins in Cereal Grain Flours Using Simplified Sample Preparation Conditions on Xevo TQ-XS. Waters Application Note, 2019, [720006685](#).
2. Dreolin N.; Foddy H.; Hird S.; Hancock P. and Jenkins T. Development of a Multi-Toxin UPLC-MS/MS Method

- for 50 Mycotoxins and Tropane Alkaloids in Cereal Commodities. Waters Application Note, 2021, [720007476](#).
3. Dreolin N.; Foddy H.; Hird H.; Hancock P. and Jenkins T. Improve the robustness of an LC-MS/MS method for the determination of multiple mycotoxins in a range of food matrices. Waters White Paper, 2022, [720007521EN](#). <<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135092963&lcid=135092962>>
4. Dreolin N. Carryover in UPLC methods: the case-study of fumonisins B₂. Waters White Paper, 2020, [720006826en](#). <<https://www.waters.com/waters/library.htm?&lid=135077606>>
5. Walter T. H.; Trudeau M.; Simeone J.; Rainville P.; Patel A. V.; Lauber M. A.; Kellet J.; DeLano J.; Brennan K.; Boissel K.; Birdsall R. and Berthelette K. Low adsorption UPLC system and columns based on MaxPeak High performance Surfaces: the ACQUITY Premier solution. Waters White Paper, 2021, [720007128en](#) <<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135079876&lcid=135079875>> .
6. SANTE/12089/2016. Guidance document on identification of mycotoxins in food and feed. Implemented by 01/01/2017.
7. Dreolin N.; Stead S.; Hird S.; Jenkins T. Determination of Regulated and Emerging Mycotoxins in Cereals, Nuts, Figs, and Animal Feeds Using Pass-Through SPE and UPLC-MS/MS. Waters Application Note, 2021, [720007377](#).
8. Tamura, M.; Matsumoto, K.; Watanabe, J.; Iida, J.; Nagatomi, Y.; Mochizuki, N. Minimization of carryover for high-throughput liquid chromatography with tandem mass spectrometry analysis of 14 mycotoxins in corn grits. Journal of Separation Science. (2014). DOI: 10.1002/jssc.201400099.

ソリューション提供製品

ACQUITY Premier システム <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

ACQUITY UPLC I-Class PLUS システム <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-S micro タンデム四重極質量分析計 <<https://www.waters.com/134798856>>

定量のための waters_connect </nextgen/jp/ja/products/informatics-and-software/waters_connect-for-quantitation.html>

720007773JA、2022 年 10 月

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシー](#) [商標](#) [サイトマップ](#) [キャリア](#) [クッキー](#) [クッキー環境設定](#)