

LC-MS/MSによるフザリウムトキシンの一斉分析法

木村 圭介^a, 飯田 憲司^a, 松島 ゆき子^a, 松野 郁子^a, 大石 充男^a,
田端 節子^a

高速液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析装置 (LC-MS/MS) を用いた, 10種のフザリウムトキシン (デオキシニバレノール, ニバレノール, ネオソラニオール, ジアセトキシシルペノール, 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, HT-2トキシン, T-2トキシン, フザレノン-X, ゼアラレノン) の一斉分析法を開発した. 試料にアセトニトリル-水混液を加え振とうしフザリウムトキシンを抽出した後, 多機能カラムで精製しLC-MS/MSで分析を行った. 前処理条件, LC条件及びMS条件の最適条件を確立した後, 開発した分析法の妥当性評価試験を行った. その結果, 本法によるフザリウムトキシン10種の定量下限値は0.02 ppmであり, 回収率76.6~116.8%, 併行精度1.9~14.3%及び室内精度2.5~20.5%であり, いずれも良好な結果が得られた.

キーワード: フザリウムトキシン, カビ毒, 高速液体クロマトグラフィー, 高速液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析装置, 超高速液体クロマトグラフィー, 多機能カラム, 同時分析, 小麦粉, コーンフラワー

はじめに

カビ毒はカビが産生する二次代謝産物の中で, ヒトまたは家畜などに対して急性もしくは慢性の生理的あるいは病理的障害を与える有害物質であり, 300種類以上のカビ毒が報告されている. 特に, アフラトキシン類のように発ガン性を有する物もあり, 食品衛生上重要な自然毒の一種である. すべてのカビがカビ毒を産生するわけではなく, 温度や環境などの特定の条件が整ったときのみカビ毒を産生する. これらカビ毒のほとんどは熱に強く, 環境の変化や加熱などによりカビが死滅した後も食品中に残存する場合が多く, 一度生成されたカビ毒は除去することは困難である.

カビ毒を産生するカビのうち, 世界中の土壤中に常在している *Fusarium* 属菌は, 小麦やトウモロコシなどの作物の栽培期に合わせて植物組織内に侵入し増殖し, そのまま貯蔵変敗まで関与する植物病原菌と言われており, 特に小麦の赤カビ病菌として知られている¹⁾. この *Fusarium* 属のカビは, 低温でもカビ毒 (フザリウムトキシン) を産生することができる. フザリウムトキシンには, 構造にトリコテセン骨格を有するトリコテセン系カビ毒やゼアラレノンなどがある. トリコテセン系カビ毒はその構造によりA~Dの4タイプに分けられるが, 人や家畜の中毒に対し重要なのはタイプAとタイプBと言われている. タイプAは中極性溶媒に可溶なものでHT-2トキシン (以下HT-2と略す), T-2トキシン (以下T-2と略す), ネオソラニオール (以下NEOと略す) 及びジアセトキシシルペノール (以下DASと略す) などがある. タイプBは極性溶媒に可溶なもので, デオキシニバレノール (以下DONと略す), ニバレノール (以下NIVと略す), 3-アセチルデオキシニバレノール (以下3-AcDONと略す), 15-アセチルデオキシニバ

レノール (以下15-AcDONと略す) 及びフザレノン-X (以下Fus-Xと略す) が知られている²⁾ (Fig. 1). トリコテセン系カビ毒の毒性は主に消化器系障害および免疫機能抑制であり, 一般に急性毒性はかなり強いが, 発ガン性は認められていない. 急性毒性としては, 種々の動物に対して吐き気や嘔吐, 下痢などの消化器系症状や造血機能障害などがある.

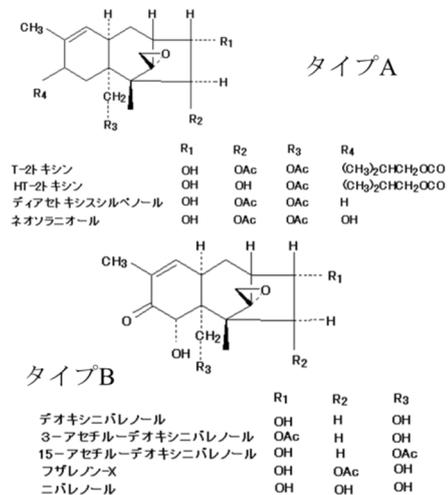


Fig. 1 トリコテセン系カビ毒の構造式

一方, ゼアラレノン (以下ZEAと略す) は, *F. graminearum* など主に穀類を侵す数種のカビによって産生されるトリコテセン骨格を持たないカビ毒である

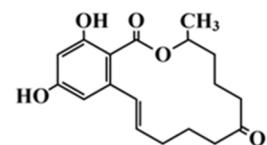


Fig. 2 ゼアラレノンの構造式

^a 東京都健康安全研究センター食品化学部食品成分研究科

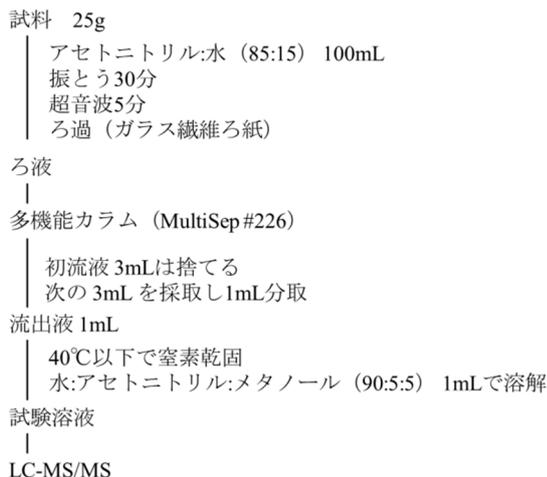


Fig. 3 前処理法のスキーム

(Fig. 2). 生体への影響としては、内分泌かく乱物質（環境ホルモン）の一つであり強いエストロゲン活性を有し、ブタの外陰部肥大などの家畜に対する女性ホルモン作用が特徴である。

このようなフザリウムトキシンのうち、我が国で規制値が設けられているのは、原麦に対するDONの暫定的な基準値として1.1 ppmが設定されているのみで、より毒性の強いT-2やHT-2については規制値がない。しかし、*Fusarium*属のカビは低温でもカビ毒産生が可能のため、日本国内でも汚染がみられる。そのため、急性毒性の強いトリコテセン系カビ毒による有害事象が起こった際には原因物質の特定が迅速に出来る一斉分析法の必要性は高いと言える。そこで、前述のトリコテセン系カビ毒9種類にZEAを加えた計10種のフザリウムトキシンを対象として、多機能カラムによる試料の前処理法、MS条件及びLC条件の最適化による一斉分析法の検討を行い、開発した一斉分析法の妥当性を評価した。さらに、作成した分析条件を超高速液体クロマトグラフィー（UHPLC）に適應して、高圧・高流速での分析を行い、分析時間の短縮についても検討した。

実験方法

1. 試料

妥当性評価を含む試験法の検討には東京都内で購入した小麦粉及びコーンフラワーを用いた。なお、対象とした10種類のカビ毒が含まれてないことをあらかじめ確認してから使用した。

2. 試薬

DON, NIV, T-2, HT-2, ZEA, 3-AcDON及び15-AcDONの標準品はSIGMA社製を、NEO, Fus-Xの標準品にはBiopure社製を、DASの標準品は和光純薬社製を用いた。メタノール、アセトニトリルは和光純薬工業社製HPLC用を、ギ酸は和光純薬工業社製LC-MS用を用いた。その他の試薬は特級を用いた。

3. 器具及び装置

試料の抽出操作に用いるろ紙にはWhatman社製ガラス繊維ろ紙GF/Fを用いた。カビ毒の精製には、Romar社製多機能カラム、MultiSep#226AfalaZon+（以下#226と略す）及び、MultiSep#227Trich+（以下#227と略す）を用いた。

HPLCには島津製作所製LC-20シリーズを、トリプル四重極型タンデム質量分析計にはサーモフィッシャーサイエントフィック社製のTSQ Vantageを用いた。中毒発生時の迅速分析にはAcquity UPLC H-CLASS及びTQ-Detector（いずれもWaters社製）分析用カラムにはCAPCELL CORE ADME（2.1 mm i.d.×150 mm, 粒子径2.7 μm）（資生堂製）を用いた。

検討により最適化したLC-MS/MS条件をTable 1に、各カビ毒のMRM条件及びプロダクトイオンスキャン条件をTable 2に示した。

Table 1 LC条件及びMS条件

| LC条件 | MS条件 |
|---|--------------------------------|
| カラム：CAPCELL CORE ADME (2.1 mm i.d.×150 mm 粒子径2.7 μm) | 測定モード：MRM Product ion scan |
| 流速：0.2 mL/min. カラム温度：40 °C | スプレー電圧：3000 V |
| 移動相：A液（水-アセトニトリル 90:10） B液0.5 %ギ酸含有メタノール | Vaporizer温度：400 °C |
| グラジェント条件 0 min(0 % B液)→7 min(0 % B液)→30 min(85 % B液)→ 40 min(85 % B液) | シースガス圧：30 arb Auxガス圧：25 arb |
| 試料注入量：2 μL. 測定時間：40分 | キャピラリー温度：300 °C イオン化法：ESI |

Table 2 各カビ毒のMRM及びプロダクトイオンスキャン条件

| カビ毒 | 分子量 | 測定モード | プリカーサーイオン (m/z) | プロダクトイオン(m/z) | | プロダクトイオン スキャン範囲(CE) |
|----------|--------|----------|--------------------|---------------|-----------------|------------------------|
| | | | | 定量用イオン(CE) | 確認用イオン(CE) | |
| NIV | 312.12 | Negative | 311 | 281(13) | 175(25) | 50-320(25) |
| DON | 296.32 | Negative | 295 | 265(15) | 247(14) | 50-300(25) |
| Fusa-X | 354.13 | Positive | 355 | 175(24) | 91(48)/137(23) | 50-380(25) |
| NEO | 382.16 | Positive | 405 | 345(19) | 135(22) | 50-410(19) |
| 15-AcDON | 338.36 | Positive | 339 | 261(9) | 222(15) | 50-340(15) |
| 3-AcDON | 338.36 | Positive | 339 | 231(12) | 279(13)/203(16) | 50-340(15) |
| DAS | 366.16 | Positive | 389 | 329(19) | 247(19) | 50-400(25) |
| HT-2 | 424.49 | Positive | 447 | 345(15) | 285(19) | 50-450(30) |
| T-2 | 466.53 | Positive | 489 | 387(20) | 245(23) | 50-490(20) |
| ZEA | 318.37 | Positive | 319 | 187(22) | 185(29) | 50-320(20) |

4. 試料の前処理

粉碎した試料25 gにアセトニトリル-水 (85 : 15) 混液 100 mLを加え, 30分間振とうした. 次に, 5 分間超音波をかけたものをガラス繊維ろ紙でろ過し, 得られたろ液を試料抽出液とした. 試料抽出液を多機能カラムに負荷し, 初流液3 mLは捨て, 次の流出液3 mLを分取した. この流出液3 mLから1 mLを別の試験管にとり, アルミブロックヒーターを用い, 40°C以下で加温しながら窒素ガスを吹きつけ乾固させた後, 水-アセトニトリル-メタノール (90 : 5 : 5) 混液1 mLを加え溶解したものを試験溶液とした. Fig. 3に前処理法のスキームを示した.

5. 妥当性評価試験

作成した試験法に対して, 厚生労働省が定めた「総アフラトキシンの試験法」⁵⁾ 及び, 「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」⁶⁾ を参考に妥当性評価試験を行った. 試料にはあらかじめ対象となるカビ毒が含まれていないことを確認した小麦粉及びコーンフラワーを用い, 添加濃度は2濃度 (0.25 ppm及び1.0 ppm) とし各2試行, 5日間で行った. 評価の目標値は回収率70 ~110%, 併行精度20%以下, 室内精度30%以下とした.

結果及び考察

1. MS条件の検討

一斉分析には高い感度と選択性と高い汎用性を併せ持ち, 近年食品分析の分野で急速に普及してきた高速液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析装置 (以下LC-MS/MSと略す) を用いた^{2) 3)}. 検討の第1段階として, 各フザリウム

トキシシンの1 ppm標準溶液をフローインジェクション法により質量分析計に導入しESI法によりイオン化を行い, それぞれポジティブモードおよびネガティブモードで検討を行った. その結果, DON及びNIVはESIネガティブモードでのイオン化の方が感度よく, プリカーサーイオンとして脱プロトン体が検出された. その他のカビ毒ではESIポジティブモードでのイオン化の方が感度よく, ZEA, 3-AcDON, 15-AcDON, Fus-Xはプロトン付加体, DAS, NEO, HT-2, T-2はナトリウム付加体のプリカーサーイオンが検出された. 次に, これらのプリカーサーイオンをもとにイオン化部や四重極のコリジョンエネルギー等の最適化を行い, プロダクトイオンの選択を行った. なお, プロダクトイオンは定量用と確認用の2種類を選んだ. また, 各カビ毒の確認試験として, プリカーサーイオンをコリジョンセルで分解して得られたプロダクトイオンをすべて測定する, プロダクトイオンスキャンを併用することにした. 今回対象とした10種類のカビ毒のうち,

2. LCの移動相の検討

今回分析対象としたトリコテセン系カビ毒は, 中極性溶媒に可溶性タイプAと極性溶媒に可溶性タイプBであるため, 本法ではこれらのカビ毒を一斉に分析出来るよう, グラジェント分析で行うこととしてカラムと移動相の検討を行った. カラムは一般的なODS系のカラムでは, DONやNIVといった極性化合物の保持が若干弱いこと, 構造異性体である3-AcDONと15-AcDONの分離が難しい⁷⁾. 特に3-AcDONと15-AcDONは位置異性体の関係にあり, 構造的な違いはほとんどなく, プリカーサーイオンも同じである.

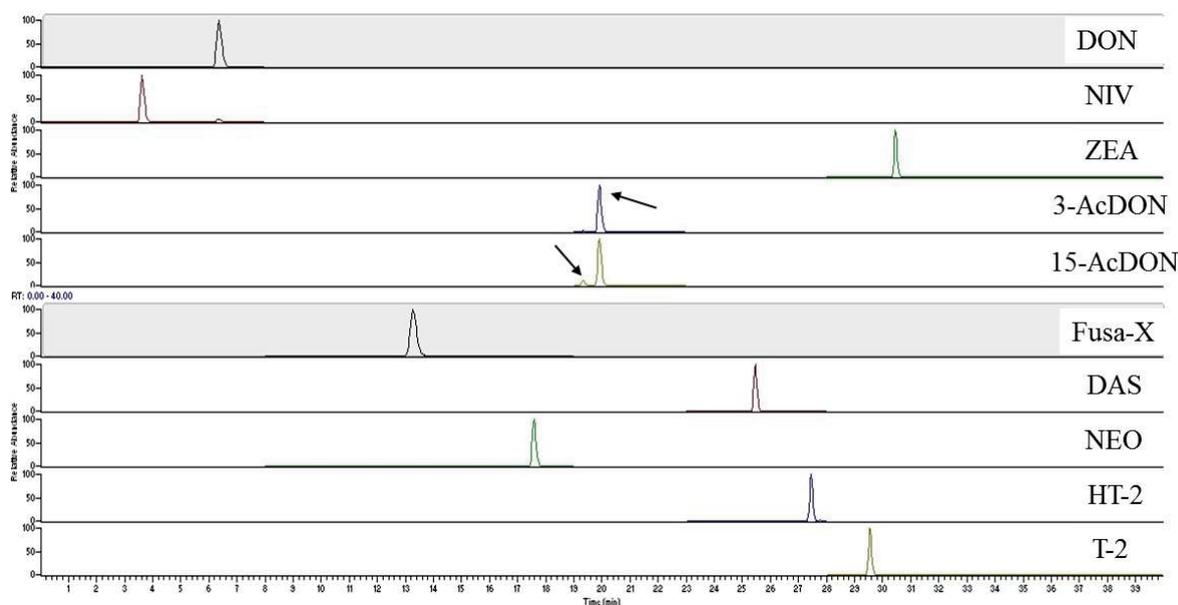


Fig. 4 混合標準溶液 (1 ppm) のMRMクロマトグラム

カラム: CAPCELL CORE ADME (2.1 mm i.d. × 150 mm 粒子径2.7 μm), カラム温度: 40°C
 移動相: A液 (水-アセトニトリル 90:10), B液 (0.5 %ギ酸含有メタノール)
 グラジェント条件: 0 min (0 % B液) → 7 min (0 % B液) → 30 min (85 % B液) → 40 min (85 % B液)
 流速: 0.2 mL/min, 試料注入量: 2 μL
 MS条件はTable 1を, MRM条件はTable 2を参照

そのため、この両者を分けるためにはLCでの分離が必要不可欠であることから、移動相やカラムによる分離ができるよう条件検討を行った。その結果、官能基に水系溶媒でも極性化合物の保持に優れたアダマンチル基を結合させた資生堂製のCAPCELL CORE ADME (2.1 mm i.d.×150 mm, 粒子径2.7 μm) を用いて検討を行うこととした。アダマンチル基は10個の炭素がダイヤモンド様の構造をしたかご形の疎水性官能基であるが、高い表面極性を有することからODSカラムに比べて極性化合物の保持が大きくなり、高極性化合物から疎水性化合物まで良好な分離ができるものである。また、移動相には水、ギ酸、メタノール及びアセトニトリルをそれぞれ組み合わせることで検討を行った。その結果、0.5%ギ酸及び0.5%ギ酸含有メタノールを組み合わせる場合、3-AcDONと15-AcDONの分離は良好であったが、NIVのピークが検出されなかった。また、0.5%ギ酸含有メタノール-アセトニトリル (1:1) 混液を用いた場合にはNIVのピークも検出され、その形状も良好であったが、3-AcDONと15-AcDONの分離が不十分であった。水溶性が高く保持時間の短いDONとNIVはネガティブモードでの測定であり、ギ酸を添加した移動相では溶媒中の水素イオンの影響を受けピークが検出されにくくなることから、分析開始直後の移動相には酸を加えない水のみとし、有機系溶媒にアセトニトリルのみを用いることでピーク形状及び感度共に良好な結果が得られた。また、中極性化合物であるタイプAの溶出のためグラジエント分析を行ったが、アセトニトリルを用いたグラジエント条件では3-AcDONと15-AcDONの分離が不十分であり、メタノールを用いた場合にはこの両者が完全に分離できることがわかった。これらの結果から、移動相にはA液に水-アセトニトリル

(90:10)、B液に0.5%ギ酸含有メタノールを用いたグラジエント分析条件を作成した。この条件で10種類の混合標準溶液を分析した時のマスクロマトグラムをFig. 4に示した。しかし、詳細な検討の結果、15-AcDONの標準溶液のクロマトグラムには3-AcDONと同じ溶出時間のピークが見られ、15-AcDONの標準品に3-AcDONが含まれている可能性が示唆された (Fig. 5)。したがって、定量値が不正確となる恐れがあったので3-AcDONと15-AcDONの2種類

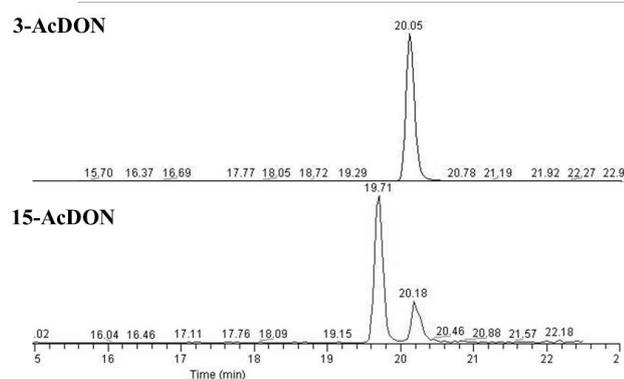


Fig. 5 3-AcDON標準溶液及び15-AcDON標準溶液のMRMクロマトグラム

を定量及び妥当性評価の対象から除外する事とした。3-AcDON及び15-AcDONについては標準品を入手し、再度妥当性評価をする予定である。

3. 前処理カラムの検討

トリコテセン系カビ毒の前処理には、アセトニトリル-水 (85:15) 混液を用いて抽出した後、多機能カラムによる精製法が用いられている⁸⁾。この多機能カラムは逆相樹脂や陰イオン交換樹脂及び陽イオン交換樹脂の混合物が封入されたもので、一般的な固相抽出カラムとは異なり、コンディショニングを行うことなく試料抽出液を通液させるだけで精製できるため、簡便性に優れている。そこで、本法でも試料からの抽出溶媒にはアセトニトリル-水 (85:15) 混液を用い、前処理にはMultiSep #226 (アフマトキシン・ゼアラレノン用) 及び#227 (トリコテセン系用) の多機能カラムを用いて検討を行った。#226及び#227の多機能カラムに2.4 ppmとなるようにカビ毒標準溶液を添加した小麦粉の試料抽出液を負荷し流出液を分析した。その結果、#226では10種類すべてのピークが検出されていたのに対し、#227ではZEA以外の9種類しか検出されなかった。これは#227に含まれる活性炭にZEAが吸着したためだと考えられた。したがって、試料の前処理に用いる多機能カラムには#226を用いることとした。

4. MultiSep #226の最適画分の検討

次に、MultiSep#226に測定対象物質を負荷した場合、どの画分で溶出されてくるのか確認を行った。前述のカラムの検討と同様に、2.4 ppmとなるようにカビ毒標準溶液を添加した試料抽出液を#226に負荷した後、流出液を各3 mLずつ15 mLまで採取しLC-MS/MS分析してピーク面積値

Table 3 絶対検量線での定量結果 (ppm)

| カビ毒 | 添加濃度 (ppm) | 定量値 (小麦粉) | 定量値 (コーンフラワー) |
|----------|------------|-----------|---------------|
| NIV | 0.2 | 0.215 | 0.192 |
| | 1 | 1.002 | 1.001 |
| DON | 0.2 | 0.175 | 0.216 |
| | 1 | 0.942 | 0.94 |
| Fusa-X | 0.2 | 0.219 | 0.218 |
| | 1 | 1.048 | 1.057 |
| NEO | 0.2 | 0.273 | 0.271 |
| | 1 | 1.261 | 1.236 |
| 3-AcDON | 0.2 | 0.23 | 0.233 |
| | 1 | 1.125 | 1.087 |
| 15-AcDON | 0.2 | 0.216 | 0.243 |
| | 1 | 1.232 | 1.207 |
| DAS | 0.2 | 0.215 | 0.195 |
| | 1 | 1.084 | 1.064 |
| HT-2 | 0.2 | 0.204 | 0.213 |
| | 1 | 1.025 | 1.033 |
| T-2 | 0.2 | 0.233 | 0.235 |
| | 1 | 1.11 | 1.094 |
| ZEA | 0.2 | 0.168 | 0.198 |
| | 1 | 0.849 | 0.917 |

を比較した。その結果、第一流出液ではNIVとZEAの回収率がほかのカビ毒に比べて若干悪いことが分かった。したがって、第一流出液3 mLを捨て、次の第二流出液を3 mL採取し、そのうちの1 mLを分取して試験溶液の調製に用いることとした。なお、抽出に用いているアセトニトリル-水 (85 : 15) 混液のままLCに注入した場合、DONやNIVはカラムでの保持が悪くなることから、一度溶媒を乾固した後、水-アセトニトリル-メタノール (90 : 5 : 5) 混液1 mLで溶解し試験溶液とした。

5. 検量線の検討

LC-MS/MS法では夾雑物の影響により測定対象物質のイオン化の阻害や促進により、定量値の信頼性が揺らぐことがある。そのため、検量線にはLC分析で一般的に用いられている絶対検量線のほかに、マトリックス検量線や標準添加法、サロゲートを内部標準物質として用いる方法などがある。しかし、試料ごとにマトリックスは異なるため、マトリックス検量線法や標準添加法では食品ごとに検量線を作成しないとしない等、非常に煩雑である。一方、サロゲートを用いる内部標準法では回収率の補正もできるため方法としては優れているが、すべてのカビ毒に対してサロゲートがあるわけではなく、また、非常に高価であるため、費用対効果を考えた場合には採用が難しい。そこで、今回は用いた質量分析計の検出感度が高いことを利用して、試験溶液を希釈することでマトリックスの濃度も相対的に低下させることでイオン抑制効果を受けにくくさせて、絶対検量線法で定量することとし、その確認を行った。前述の方法により試料の前処理を行った後、カビ毒の標準溶液を0.2 ppm及び1.0 ppmとなるように添加した試験溶液をLC-MS/MSで分析を行った。その結果、定量値はNEOやT-2などで一部高い値を示したが、概ね添加濃度の84%~120%の範囲であったことから、絶対検量線での定量で問題ないと思われた (Table 3)。また、0.05 ppmから2.0 ppmの各カビ毒標準溶液を分析し検量線を作成したところ、その相関係数は0.990から0.999となり良好な直線性が得られた。この時、0.05 ppmの標準溶液のPeak to Peak法による各カビ毒のピークのS/Nは20以上であったことから、抽出時の希釈を換算して、本法による定量下限値は試料中濃度で

0.02 ppmとした。

6. 妥当性評価試験の結果

今回検討した分析法の妥当性について評価を行った。その結果、試料に小麦粉を用いて1.0 ppm添加した場合のZEAの回収率のみ116.8%ととなり、目標値 (70 ~ 110%) を逸脱したが、それ以外のものでは回収率 76.6~103.6%, 併行精度1.9~14.3%及び室内精度2.5~20.5%と良好な結果が得られた。よって、本法は十分使用に耐えられるものであることが分かった。

7. 迅速分析法への応用

前述のように、トリコテセン系カビ毒には下痢や嘔吐などの消化器症状を主とする急性毒性がある。消化器症状を主訴とする健康危害事故発生時に、原因物質として中毒量のトリコテセン系カビ毒が混入しているかを迅速に判別できるように、質量分析計の感度は劣るが超高速液体クロマトグラフ (UHPLC) を用い、分析条件について検討を行った。

UHPLCにはAcquity UPLC H-Classを、タンデム型質量分析計にはTQ-Detector (いずれもWaters社製) を、カラムにはCAPCELL CORE ADME (2.1 mm i.d.×150 mm, 粒子径2.7 µm、資生堂製) を用いた。LC-MS/MS測定条件はTable 4及びTable 5に、一斉分析の結果をFig. 6に示した。各カビ毒のピーク形状、3-AcDONと15-AcDONの分離ともに良好であり、DONの暫定的な基準値である1.1 ppmを十分測定可能であった。1回の分析時間もHPLCでは約60分を要していたが、UHPLCによる分析では約20分に短縮することができ、健康危害事故発生時など迅速な対応が求められる場合でも良好な分析が可能であった。

Table 4 迅速分析時のLC条件及びMS条件

| LC条件 | MS条件 |
|---|-------------------------|
| カラム : CAPCELL CORE ADME (2.1 mm i.d.×150 mm 粒子径2.7 µm) | 測定モード : MRM |
| 流速 : 0.4 mL/min, カラム温度 : 40 °C | キャピラリー電圧 : 3000 V |
| 移動相 : A液 水-アセトニトリル (90:10) B液 0.5 % 脂肪酸含有メタノール | Source温度 : 150 °C |
| グラジェント条件 0 min(0 % B液)→2.5 min(0 % B液)→10 min(85 % B液)→ 15 min(85 % B液) | 脱溶媒温度 : 400 °C |
| 試料注入量 : 5 µL, 測定時間 : 40 分 | 脱溶媒ガス流量 : 800 L/hr |
| | コーンガス流量 : 50 L/hr |
| | コリジョンガス流量 : 0.20 mL/min |
| | イオン化法 : ESI |

Table 5 迅速分析時のMRM条件

| カビ毒 | 分子量 | 測定モード | プリカーサーイオン (<i>m/z</i>) | Cone電圧 (V) | プロダクトイオン(<i>m/z</i>) | |
|----------|--------|----------|-----------------------------|------------|------------------------|-----------------|
| | | | | | 定量用イオン(CE) | 確認用イオン(CE) |
| NIV | 312.12 | Negative | 311 | 20 | 281(13) | 175(25) |
| DON | 296.32 | Negative | 295 | 20 | 265(15) | 247(14) |
| Fusa-X | 354.13 | Positive | 355 | 25 | 175(24) | 91(48)/137(23) |
| NEO | 382.16 | Positive | 405 | 20 | 345(19) | 135(25) |
| 15-AcDON | 338.36 | Positive | 339 | 25 | 261(9) | 222(15) |
| 3-AcDON | 338.36 | Positive | 339 | 25 | 231(12) | 279(13)/203(16) |
| DAS | 366.16 | Positive | 389 | 25 | 329(19) | 247(19) |
| HT-2 | 424.49 | Positive | 447 | 25 | 345(15) | 285(19) |
| T-2 | 466.53 | Positive | 489 | 25 | 387(20) | 245(23) |
| ZEA | 318.37 | Positive | 319 | 40 | 187(22) | 185(29) |

8. まとめ

LC-MS/MSを用いた10種類のフザリウムトキシシン一斉分析法の開発を目的として、MS条件、LC条件及び前処理方法の検討を行った。

その結果、試料の前処理には多機能カラムであるMultiSep#226を用い、カラムには資生堂製 CAPCELL CORE ADME (2.1 mm i.d.×150 mm 粒子径2.7 μ m)を用い、移動相のA液に水-アセトニトリル (90:10)、B液に0.5%ギ酸含有メタノールを用いたグラジエント分析を行うこと、DON及びNIVはESIネガティブモードで、ZEA、3-AcDON、15-AcDON、Fus-X、DAS、NEO、HT-2及びT-2はESIポジティブモードでのMRM測定及びプロダクトイオンスキャン測定することにより、位置異性体である3-AcDONと15-AcDONを含む10種類のフザリウムトキシシンの高感度かつ精度よく分析することが可能であった。

また、作成した試験法について、妥当性評価試験を行ったところ、ZEAの小麦粉1 ppm添加の回収率が目標値を逸脱したが、それ以外に関しては小麦粉、コーンフラワーのいずれを用いた場合でも回収率、併行精度及び室内精度はすべて目標値内となり、良好な結果が得られた。

さらに、UHPLCを用いた迅速分析についても検討を行ったところ、HPLCでは約60分を要した分析時間を約20分に短縮することができた。

以上の結果から、今回作成したLC-MS/MSによるフザリウムトキシシン一斉分析法は、市販の小麦粉やトウモロコシ中の10種類のフザリウムトキシシンの分析に有用であると考える。

文 献

- 1) 齊藤初雄：微生物遺伝資源利用マニュアル (25) Fusarium toxins, MAFF Microorganism Genetic Resources Manual No.25 (2009)
- 2) 田端節子：Analytical Methods for Mycotoxins, 食衛誌 Vol.53, No.3 (2012)
- 3) 望月直樹：Analysis of Mycotoxins by LC-MS/MS, CHROMATOGRAPHY, Vol.33 No.3 (2012)
- 4) 望月直樹：Problems on LC-MS/MS Analysis to Ensure Food Safety, YAKUGAKU ZASSHI 131 (7) (2011)
- 5) 総アフラトキシシンの試験法について http://www.maff.go.jp/j/seisan/boeki/beibaku_anzen/kabikabidokukensa_surveillance/pdf/110816-3af.pdf (2014年8月28日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 6) 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン http://kouseikyoku.mhlw.go.jp/kyushu/gyomu/bu_ka/shokuhin/documents/shokuan_no1115003.pdf (2014年8月28日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 7) 田村昌義：ペンタフルオロフェニルカラムを用いたトリコセシン系カビ毒のLC-MS/MS高感度一斉分析法, 食衛誌, Vol.55, No.1 (2014)
- 8) デオキシニバレノールの試験法について, 食安発第0717001号, 平成15年7月17日

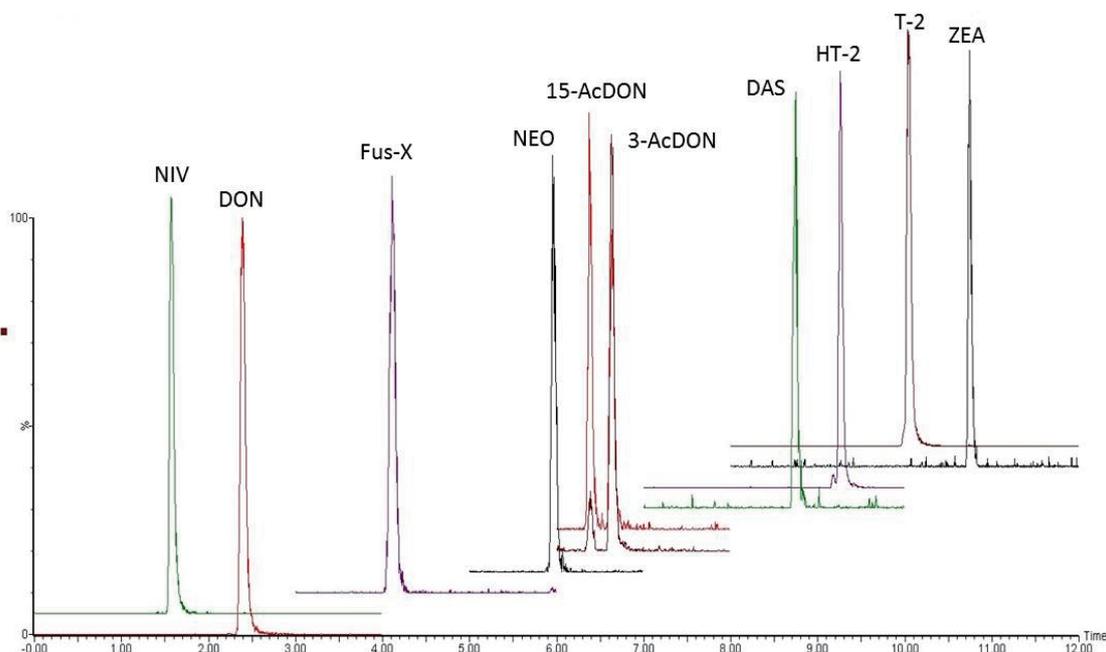


Fig. 6 UHPLCによる一斉分析のMRMクロマトグラム (2 ppm)

カラム: CAPCELL CORE ADME (2.1 mm i.d.×150 mm 粒子径2.7 μ m), カラム温度: 40 $^{\circ}$ C
 移動相: A液 (水-アセトニトリル 90:10), B液 (0.5%ギ酸含有メタノール)
 グラジエント条件: 0 min (0% B液) → 2.5 min (0% B液) → 10 min (85% B液) → 15 min (85% B液)
 流速: 0.4 mL/min, 試料注入量: 5 μ L
 MS条件はTable 4を, MRM条件はTable 5を参照

Simultaneous Determination of Fusarium Toxins by LC-MS/MS

Keisuke KIMURA^a, Kenji IIDA^a, Yukiko MATSUSHIMA^a, Ikuko MATSUNO^a, Mitsuo OISHI^a,
and Setsuko TABATA^a

A method was developed for the simultaneous analysis of 10 fusarium toxins (deoxynivalenol, nivalenol, neosolaniol, diacetoxyscirpenol, 3-acetyldeoxynivalenol, 15-acetyldeoxynivalenol, HT-2 toxin, T-2 toxin, fusarenon-X, and zealarenon). Fusarium toxins in samples were extracted with water-acetonitrile-methanol (90:5:5) and purified using a multi-functional column. The obtained sample solutions were quantified by liquid chromatography-mass spectroscopy (LC-MS/MS) with the ADME column and a mobile phase containing methanol. The quantification limit was 0.02 ppm. Method validation using wheat flour and corn flour samples demonstrated good recovery rates of 76.6 - 116.8% , repeatability of 1.9 - 14.3%, and reproducibility of 2.5 - 20.5%.

Keywords: fusarium toxin, mycotoxin, HPLC, LC-MS/MS, UHPLC, multi-functional column, simultaneous determination, wheat flour, corn flour

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan