

短報

高速液体クロマトグラフィー/
タンデム質量分析法を用いた穀類中の
カビ毒，デオキシニバレノールの分析

甲斐茂美, 赤星 猛, 藤巻照久

Analysis of deoxynivalenol in grain
using liquid chromatography / tandem
mass spectrometry

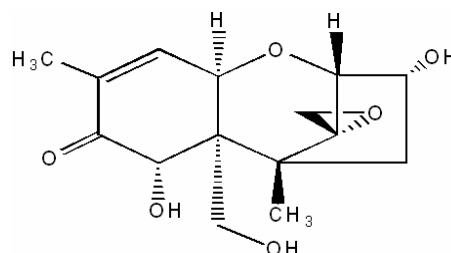
Shigemi KAI, Takeshi AKABOSHI
and Teruhisa FUJIMAKI

はじめに

デオキシニバレノール(DON)は、一般に赤カビとよばれるフザリウム(*Fusarium*)属の真菌により産生されるトリコテセン系カビ毒の一種である(図1)。DONは植物病原性を有するフザリウム属菌が、小麦、大麦、トウモロコシ等の主要穀類に圃場で感染し産生されることから、食品汚染の原因となっている。トリコテセン系カビ毒の毒性は、タンパク合成阻害、核酸合成阻害、免疫毒性等があり、急性毒性としては、嘔吐、下痢などの消化管障害を呈する¹⁻³⁾。フザリウム属の真菌は我が国の土壤にも生息しており、日本の気象条件でもトリコテセン系カビ毒の生産が可能で、国産農産物への汚染が問題となっている^{3,4)}。食品中のDONの規制は、欧米諸国を中心に300~2000 μg/kgに設定されている⁴⁾。我が国では平成14年に小麦中のDONに対し1.1ppmの暫定基準値が設定された。DONの試験法は、定性及び定量試験として紫外分光光度型検出器付高速液体クロマトグラフィー(UV-HPLC)法が、確認試験として液体クロマトグラフィー/質量分析法(LC-MS)またはガスクロマトグラフィー/質量分析法(GC-MS)が厚生労働省通知に示されている⁵⁾。しかし、DONのUV-HPLCでの測定波長220nmは、多くの有機化合物が吸収を持つため選択性が低く夾雑物質の影響を受けるので、定量性に問題がある。またGC-MS法ではDONを誘導体化する必要がある。抽出操作が煩雑である。LC-MS法について、Agilent社製LC/MSD1100シリーズSLで検討したところ、イオンソースをAPCIとしネガティブモードで、移動相に酢酸アンモニウムを加え

測定するとき、DONの酢酸付加イオンである[M+CH₃COO]⁻のm/z355を定量イオンとし測定することが可能であった。しかし、食品によってはDONの測定イオンと同様のm/zを有する夾雑物質により測定が妨害される恐れがあった。また、APCIの測定では、移動相にアセトニトリルを用いると、コロナニードルの先端が炭化しやすくなり、感度低下を起こす要因となるので、移動相の有機溶媒の選択に制限が生じた。

一方、近年普及してきた高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析装置(LC-MSMS)の活用は、食品由来の夾雑成分中から多数の目的物質を精度よく検出するために、DONの分析において非常に有効であると思われる。著者らは、従来からイオントラップ機能を有するLC-MSMSが、プロダクトイオンスキャン(EPI)やマルチプルリアクションモニタリング(MRM)等の機能により、高感度測定と構造解析能を合わせ持ち、高い選択性を有することに着目し、検査の確認に活用してきた⁶⁾。そこで、今回DONの分析法としてイオントラップLC-MSMSによる確認法及び定量法を確立し、日常検査への適用について検討したので報告する。



C₁₅H₂₀O₆ : M.W.296.32

図1 デオキシニバレノールの構造式

実験方法

1. 試料及び試薬

試料は神奈川県内で販売されていた小麦(玄麦)を分析対象とし、粉碎混合したものを用いた。

デオキシニバレノール標準品は和光純薬工業(株)製を用いた。標準品10mgを精秤し、アセトニトリルに溶解して100 μg/mlとしたものを標準原液とした。標準原液をメタノール-水(10:90)で段階的に希釈し各濃度の標準溶液とした。多機能ミニカラムはRomer Labs社製 MultiSep # 227を用いた。ガラス繊維ろ紙はWhatman社製GF/Bを用いた。アセトニトリル、メタノールは和光純薬工業(株)製残留農薬分析用及びLC-MS用を用い、他は特級を用いた。

2. 装置及び分析条件

LC-MSMSはApplied Biosystems社製Qtrap™ LC-MSMSを用い、イオン源はESIを使用した。イオン化

モードはネガティブ、イオンスプレー電圧 -4.2kV、イオン源温度480℃、ネブライザーガス圧は70psiで測定した。MRMモードではプレカーサイオンは m/z 295、プロダクトイオンは定量イオン m/z 265(コリジョンエネルギー(CE) -12V) 参照イオン m/z 138(CE -28V)で測定した。分析カラムは東ソー社製 TSK-Gel 100-V(2.1mmid.×150mm, 3 μ m)を用い、カラム温度40℃、移動相はアセトニトリル-2mM酢酸アンモニウムを用い、0-20min ; (5:95)から(50:50)までの直線グラジェント、流速0.2ml /minで送液し、注入量5 μ lで分析した。

3. 試験溶液の調製

試験溶液の調製法は通知法⁵⁾に準じて行った。粉碎均一化された試料の25.0gを三角フラスコに量り採り、アセトニトリル-水(85:15)100mlを正確に加えて振とう機を用いて30分間激しく振とうした後、ガラス繊維ろ紙を用いて吸引ろ過した。多機能ミニカラムに抽出液10mlを注入し、毎分1ml以下の流速で流出させた。初流通過液約3mlを捨て、DONが流出する分画の約5mlを採取した。この流出液の4.0mlをナス型フラスコに正確に採り、45℃以下で溶媒を除去した。残留物にメタノール-水(10:90)1.0mlを加えて溶かした後、13000rpmで5分間遠心分離し、上澄液を試験溶液とした。

結果と考察

1. LC-MSMS測定条件について

1)EPI分析条件

分析の選択性を高めるために、構造情報の得られる、イオントラップLC-MSMS特有の機能のEPIモードの測定条件について検討した。DONはイオン源をESIとし、ネガティブモードでイオン化が可能であった。DON標準溶液について、 $[M-H]^-$ のプレカーサイオンと、それぞれ複数のプロダクトイオンが測定できる条件を求めた。CE=-10Vのときは $[M-CH_2O]^-$ の m/z 265のフラグメントイオンが大きく現れ、CE=-30Vのときは代わって m/z 138のフラグメントイオンが大きく現れた。 $[M-H]^-$ と他のフ

ラグメントイオンが共に検出されるCE=-25Vを最適条件とした(図2)とき、EPIによる分析では0.25ngまでの範囲で同様のスペクトルが得られた。これらのスペクトルは化合物の構造情報を反映しており、定性分析の指標として有効であると考えられた。

2)MRM分析条件

EPIモードよりさらに高感度な測定による定量、確認のためMRMモードによる分析条件について検討した。イオン源をESI、ネガティブモードでイオンソースの最適化を行い、 $[M-H]^-$ である m/z 295をプレカーサイオンとし、 $[M-H]^-$ から派生するプロダクトイオンのうち、最も感度が強く得られた m/z 265を定量イオン、次に感度が強く得られた m/z 138を参照イオンとした。DONのモニターイオンによるクロマトグラムを図3に示した。定量イオンで検量線を作成したところ、0.025~2.5ngの範囲で良好な直線性を示し、検量線の相関係数(r)は0.9999であった(図4)。また0.025, 0.05, 0.5, 1.25, 2.5ng

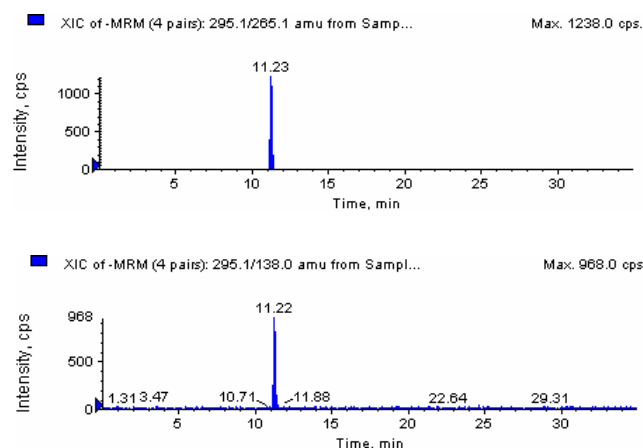


図3 LC-MSMS (MRM) によるDONのクロマトグラム(0.1ppm)

上段： m/z 295→265 (定量イオン)
下段： m/z 295→138 (確認イオン)

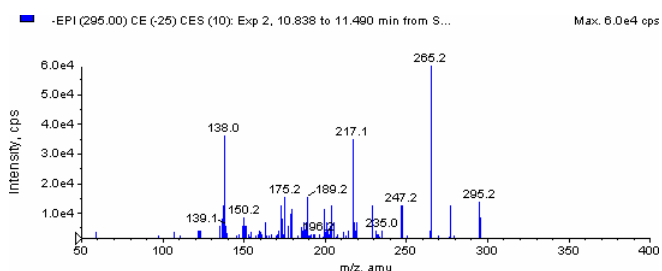


図2 LC-MSMS (EPI) によるDONのスペクトル

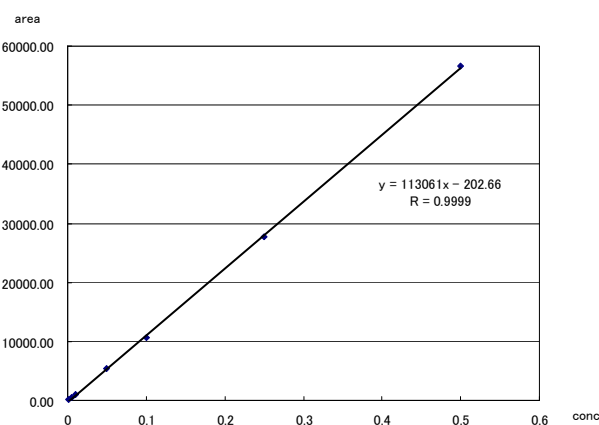


図4 LC-MSMS (MRM) によるDONの検量線

の各注入量における測定を5回行いピーク面積の変動係数を求めたところ、各注入量における変動係数は10%以内であり満足できる分析精度が得られた。検量線の最小濃度付近の標準溶液を5回測定して得られた標準偏差の10倍から算出した定量限界は $0.01 \mu\text{g/g}$ であり、HPLC法で示された定量限界値の $0.1 \mu\text{g/g}$ ⁷⁾を十分満たすものであった。標準偏差の3倍から算出した検出限界は $0.005 \mu\text{g/g}$ であった。

LC-MSMSのMRM分析で物質を同定する方法について、EUのガイドライン⁸⁾では「定量イオンに対する参照イオンの強度比が一定範囲にあることで物質を同定する」としている。そこで注入量の違いが、強度比に及ぼす影響について調べた。DON標準溶液の0.025, 0.05, 0.5, 1.25, 2.5ngの各注入量における定量イオンに対する参照イオンの強度比(R/T)を求めたところ、R/Tの平均値は 0.70 ± 0.07 であった。EUのガイドラインに従うと、R/Tが0.5より大きいときの変動の許容範囲は $\pm 20\%$ となっており、これを今回の検討で得られたDONのR/Tに当てはめると、R/Tの許容範囲は0.56~0.84となった。R/Tの実測値は0.025~2.5ngの範囲で0.68~0.76であり、これはEUのガイドラインで示している許容範囲を十分に満足する値であった。

このことから、定量イオンに対する参照イオンの強度比は、目的物質の注入量に影響されず、強度比が一定の範囲内にあることが明らかになり、MRM測定における物質の同定の指標となることが確認された。

3) 添加回収試験及び残留実態調査

通知法では検査に用いる試料量を50.0gとしているが、市販の食材の一包装量が少量である時を考慮し、試料量を1/2の25.0gとし、抽出溶媒等も1/2に変更することとした。本法を用いて、小麦にDONを $0.1 \mu\text{g/g}$ 及び $0.5 \mu\text{g/g}$ 添加して回収試験(n=5)を行った。 $0.1 \mu\text{g/g}$ 添加のときの回収率は $95.7 \pm 4.6\%$ 、相対標準偏差は4.8%、 $0.5 \mu\text{g/g}$ 添加のときの回収率は $100.1 \pm 3.3\%$ 、相対標準偏差は3.3%と良好であった。

また、本法を用いて平成17~18年度に神奈川県内に流通する小麦(玄麦)6検体についてDONの残留実態調査を実施したところ、いずれも不検出であった。

まとめ

フザリウム(*Fusarium*)属の真菌により産生されるトリコテセン系カビ毒のDONについて、LC-MSMSによる定量・確認法を確立し、日常検査への適用を検討した。LC-MSMSによる測定では、誘導体化等の複雑な前処理を行うことなく、簡便な抽出法で得られたサンプルでの測定が可能であった。また、イオントラップLC-MSMSのEPIやMRMによる分析は、より高感度であり構造情報も得ることができるため、分析精度を飛躍的に向上させることができることが明らかになった。DONの類縁体であるニバレノールなど、我が国ではまだ規制値が定められていないが、食品汚染が懸念されるカビ毒が多数知られている。今後はこのようなカビ毒に対しても、LC-MSMS等を用いた分析法を導入し、市販食品のモニタリング調査を進めていきたいと考える。

(平成19年7月20日受理)

文 献

- 1) 田端節子：食品分析インフォメーションVol.11, 食品衛生研究, **55**, 41-47(2005)
- 2) 田中敏嗣, 芳澤宅實：カビ毒による中毒例と研究のあゆみ, FFIジャーナル, **211**, 997-1003 (2006)
- 3) 小西良子：カビ毒の毒性と作用機序および最近の知見, FFIジャーナル, **211**, 1004-1009 (2006)
- 4) 吉澤宅實：食品のカビ毒汚染, その規制とリスク評価の現状, FFIジャーナル, **211**, 1018-1026 (2006)
- 5) 厚生労働省医薬局食品局食品安全部長通知, : 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)
- 6) 甲斐茂美, 赤星猛, 岸美智子：高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法を用いた食品中のアフラトキシン類の分析, 神奈川県衛生研究所研究報告, **35**, 13-17(2005)
- 7) 厚生労働省監修, 食品衛生検査指針 理化学編 2005, 585-590, (社)日本食品衛生協会, 東京 (2005)
- 8) European Parliament Decision 2002/657/EC, Official Journal of European Communities L221, 8(2002)