

フザリウムトキシン一斉分析法の検討（第2報）

酒井康行・小西伊久江

Study of Simultaneous Analysis Method for Fusarium Toxin (2nd Report)

Yasuyuki SAKAI, Ikue KONISHI

1. はじめに

フザリウムトキシンは、フザリウム属のかびが産生するかび毒の総称である。ヒトや動物が摂取すると、下痢、嘔吐等の消化器症状や免疫抑制等を起こすことが知られている^{1,2)}。汚染食品は小麦、大麦、トウモロコシ等の穀類に多く、わが国では地理的要因から比較的高濃度の汚染が報告されている^{3,4)}。

そこで、本県では県内産穀類を対象とした汚染実態調査を実施することとし、その前段としてLC-MS/MSを用いたフザリウムトキシン一斉分析法の検討を開始した。昨年は、LC-MS/MSの測定条件（分析カラム、移動相、イオン化条件、MRM トランジション等）について最適化した後、機器定量限界および検量線の範囲・直線性について評価した⁵⁾。今回は、LC-MS/MSで測定する検液を得るための前処理法（試料の抽出、精製等）について検討を行ったので、その結果を報告する。

2. 実験方法

2. 1 対象化合物

デオキシニバレノール、ニバレノール、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、フザレノン-X、HT-2 トキシン、T-2 トキシン、ジアセトキシシルペノール、ゼアラレノン（以下、それぞれ「DON」、「NIV」、「3-AcDON」、「15-AcDON」、「FUX」、「HT-2」、「T-2」、「DAS」および「ZEN」という。）

2. 2 試薬等

かび毒標準品：富士フィルム和光純薬社製またはMerck社製の標準物質を使用した。

かび毒混合標準液：各かび毒標準物質を1.0mgずつ量り取り、アセトニトリルで正確に10mLとして100ppm単体標準液を調製した。次に、この単体標準液を1mLずつ正確に量り取り、アセトニトリルで正確に10mLとして10ppm混合標準液を調製した。

内部標準品：ベルカロール、ゼアララノン（以下、それぞれ「VEL」、「ZAN」という。）は富士フィルム和光純薬社製の内部標準物質を使用した。¹³C-デオキシニバレノール（以下、「¹³C-DON」という。）はBiopure社製の25ppmアセトニトリル標準液を使用した。

内部混合標準液：各内部標準物質を5.0mgずつ量り取り、アセトニトリルで正確に50mLとして、100ppm単体内部標準液を調製した。次に、この単体内部標準液25μLおよび25ppm¹³C-DON標準液100μLを量り取り、アセトニトリルで250μLとして、10ppm混合内部標準液を調製した。

使用溶媒等：アセトニトリル、メタノール、超純水および酢酸アンモニウムは、富士フィルム和光純薬社製の液体クロマトグラフ用またはLC/MS用を使用した。

2. 3 機材等

多機能カラム：Romer社製のMultiSep226、MultiSep227、Mycospin400、GLサイエンス社製のInertSep VRA-1、InertSep VRA-3、昭和電工社製のAutoprep MF-T1500、Merck社製のSupelTox AflaZea、SupelTox Tricho、Agilent社製のBondElut Mycotoxinを用いた。

追加精製カラム：GLサイエンス社製のInertSep PLR、Agilent社製のCaptiva EMR-Lipid、Merck社製のZ-Sepを用いた。

2. 4 装置および測定条件

装置：液体クロマトグラフ質量分析計 Prominence 20A/3200Q TRAP（島津製作所/Sciex）、カラム：CAPCELL CORE ADME 粒子径2.7μm、2.1mm i.d.×150mm（資生堂）、移動相：A液5mM酢酸アンモニウム水溶液、B液5mM酢酸アンモニウム含有メタノール、グラジエント条件：B液10%(0min)→90%(15min)→90%(20min)、流速：0.2mL/min、カラム温度：40℃、注入量：5μL、MRM条件：表1のとおり。

上記条件で、検量線用標準液および検液をLC-MS/MSに注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積から絶対検量線法または内部標準法により定量した。内部標準物質は、検液中濃度で100ng/mLとなるよう添加した。

表1 各化合物のMRM トランジション

イオン化	ESI Positive (+)				
化合物名	3-AcDON	15-AcNIV	FUX	HT-2	T-2
定量イオン	339>231	356>321	372>355	442>263	484>305
確認イオン	339>203	356>137	372>247	442>215	484>185

イオン化	ESI Negative (-)			
化合物名	DON	NIV	VEL	¹³ C-DON
定量イオン	371>281	355>295	325>59	370>310
確認イオン	371>311	355>265	なし	370>279

イオン化	ESI Positive (+)			
化合物名	DAS	VEL	ZEN	ZAN
定量イオン	384>307	284>267	319>187	321>303
確認イオン	384>229	284>249	319>283	321>189

3. 結果および考察

3. 1 試験法の試行

かび毒分析の前処理法には、イムノアフィニティーカラムを利用する方法と多機能カラムを利用する方法の2種類が多く報告されている^{6,7,8)}。前者は目的成分をカラムに保持させ、夾雑物を洗い流してから目的成分を溶出させる保持型またはキャッチ&リリース型と呼ばれるカラムで、保持機構として抗原抗体反応を利用している。精製効果が高い反面、多成分分析には向いておらず、費用も高いのが特徴である。一方、後者は目的成分を保持させず、夾雑物のみ保持させる通過型またはパススルー型と呼ばれるカ

ラムで、逆相、順相、イオン交換樹脂等による複合的な保持機構により夾雑物を保持する。精製効果は比較的低いが、多成分分析が可能であり、費用も抑えることができるため、多機能カラムを選択した。

先行研究を参考にして、大麦試料における添加回収試験を実施した(図1)⁹⁾。試料には、はったい粉(麦焦がし)、大麦うどん、麦茶を用いた。検量線用標準液は、かび毒混合標準液をアセトニトリルで希釈した溶媒標準液と、各ブランク試料を図1に従って処理した検液に標準液を添加した、いわゆるマトリックス標準液を用い、絶対検量線法により定量した。



図1 検討した前処理法

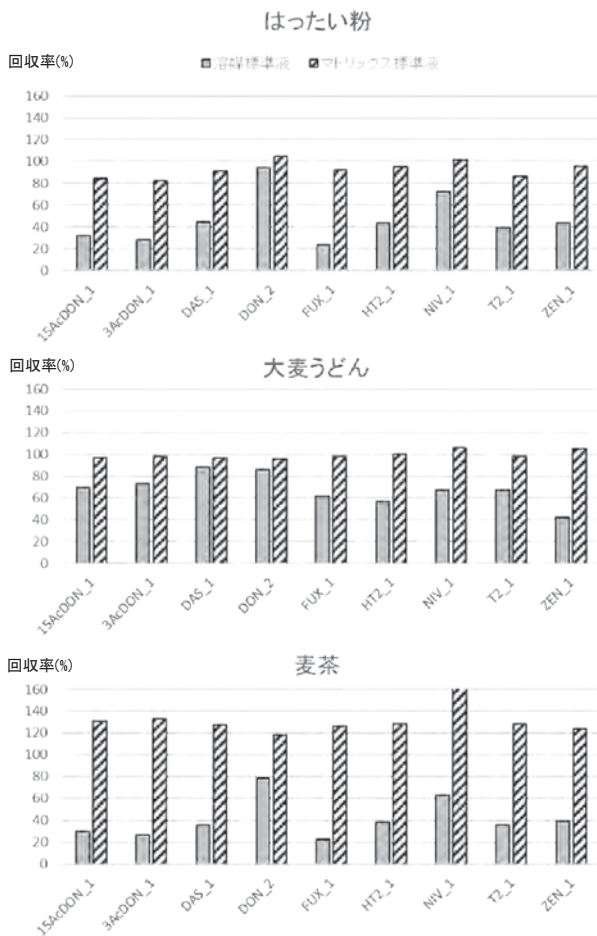


図2 大麦試料における添加回収試験

結果を図2に示す。溶媒標準液による定量結果では、添加した試料によって回収率は大きく異なり、大麦うどんでは40~90%であったのに対し、はったい粉や麦茶では20%~90%と不良であった。一方、マトリックス標準液による定量結果では、いずれの試料においても回収率は80%~130%程度となり、一部の化合物を除いて良好な結果が得られた。

今後、予定している汚染実態調査では幅広い試料を対象に調査する予定である。そのためには、マトリックス標準液による定量は大変手間であり、また、ブランク試料の入手にも困難を要することから、溶媒標準液での定量を目指して、マトリックス効果対策について検討した。

3.2 マトリックス効果の対策

マトリックス効果とは、マトリックスの影響により感度の減少または増加が起こる現象を指し、一義的な対策として検液の希釈またはマトリックスの除去が有効とされている。

3.2.1 検液の希釈

図1に従って処理した麦茶検液を10%アセトニトリルで段階的に希釈した後、かび毒混合標準液を添加したマトリックス標準液と、同濃度の溶媒標準液のカウント数を比較することによって希釈の効果を確認した。

結果は、図3のとおり。Negativeモードで測定するDONおよびNIVは希釈倍率に因らず、マトリックス標準液と溶媒標準液のカウント数が同程度となった。一方、Positiveモードで測定する化合物については、マトリックス標準液のカウント数は溶媒標準液に比べて低かったが、希釈倍率が高くなるほど溶媒標準液のカウント数に近づき、最終的に100倍希釈で同等となることがわかった。

以上のことから、マトリックス効果による干渉はPositiveモードでのみ起こり、今回のケースでは100倍程度希釈することによって低減化できることがわかった。ただし、前回の検討によって機器定量限界(IQL)はDON、NIV、3-AcDON、15-AcDON、FUX、ZENが10ng/mL、HT2、T2、DASが1ng/mLであることがわかっているため、検液の希釈を採用した場合、方法定量限界(MQL)はIQLの100倍程度となり、実際の穀類等における汚染濃度レベルに比べて相当高くなることから、採用できないことが明らかとなった。

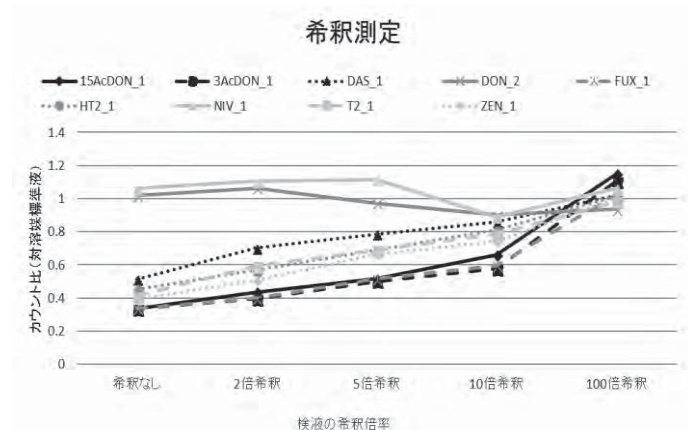


図3 検液の希釈

3. 2. 2 マトリックスの除去

使用する多機能カラムの選定を行うため、図 1 の MultiSep 226 を表 2 のカラムに代えて、はったい粉における添加回収試験を実施した。なお、スピン型カラムである MycoSpin400 については、抽出液 1mL をカラムに負荷した後、遠心分離 (10,000rpm、1min) してから、上清 0.4mL を分取した。濃縮乾固後、10%アセトニトリル 0.1mL で溶解したものをフィルターろ過し、検液とした。

表 2 検討に使用した多機能カラム

メーカー	名称	逆相	イオン	活性炭	順相
GL サイエンス	InertSep VRA-1	○	○		
	InertSep VRA-3	○	○		
Romer	MultiSep226	○	○		○
	MultiSep227		○	○	○
	MycoSpin400	?	?	?	?
昭和電工	Autoprep MF-T1500		○	○	○
Merck	SupelTox AflaZea	?	?	?	?
	SupelTox Tricho	?	?	?	?
Agilent	BondElut Mycotoxin				○

結果は、図 4 のとおり。MultiSep 226 に比べて、MultiSep 227、Autoprep MF-T1500、SupelTox AflaZea の回収率は ZEN を除いて全体的に良くなった。しかし、ZEN は固相に含まれる活性炭に吸着したと見られ、全く回収できなかった。その他のカラムについては、MultiSep 226 と同等またはそれ以下の結果となったことから、引き続き、MultiSep 226 を用いることにした。

次に、MultiSep 226 と組み合わせて使用する精製カラムの検討を行った。先の結果から、逆相系を強化することにより回収率が向上すると考え、脂質除去カラムについて検討した (表 3)。MultiSep 226 で処理した後、さらに精製カラムに負荷し、流出液を分取して以後同様に操作した。

表 3 検討に使用した追加精製カラム

メーカー	名称	材質	原理
GL サイエンス	InertSep PLR	二酸化チタン	リン酸基-二酸化チタンの吸着
Agilent	EMR	ジイソシアネートポリオール共重合体	サイズ除去、疎水相互作用
Merck	Z-Sep	シリカゲル修飾ジルコニア	ルイス酸塩基相互作用

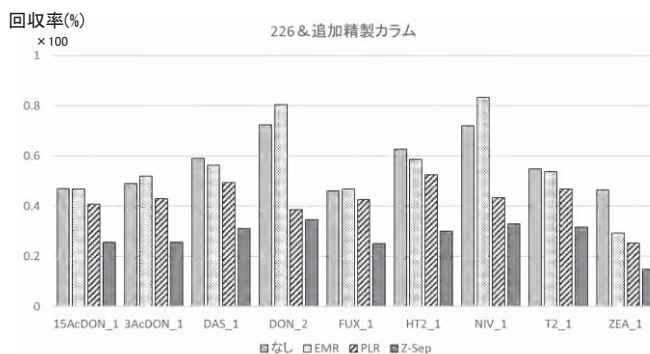


図 5 追加精製カラムの選定

結果を図 5 に示す。追加精製しない場合に比べて、同等またはそれ以下の結果となり、精製カラムの有効性は確認できなかった。ただし、その後の検討により、EMR については、負荷した検液中アセトニトリル濃度 (85%) が適当ではなく、50%~75%程度とした場合には、いずれの対象化合物も吸着することなく脂質、色素等を除去できることがわかったため、今後さらに検討したいと考えている。

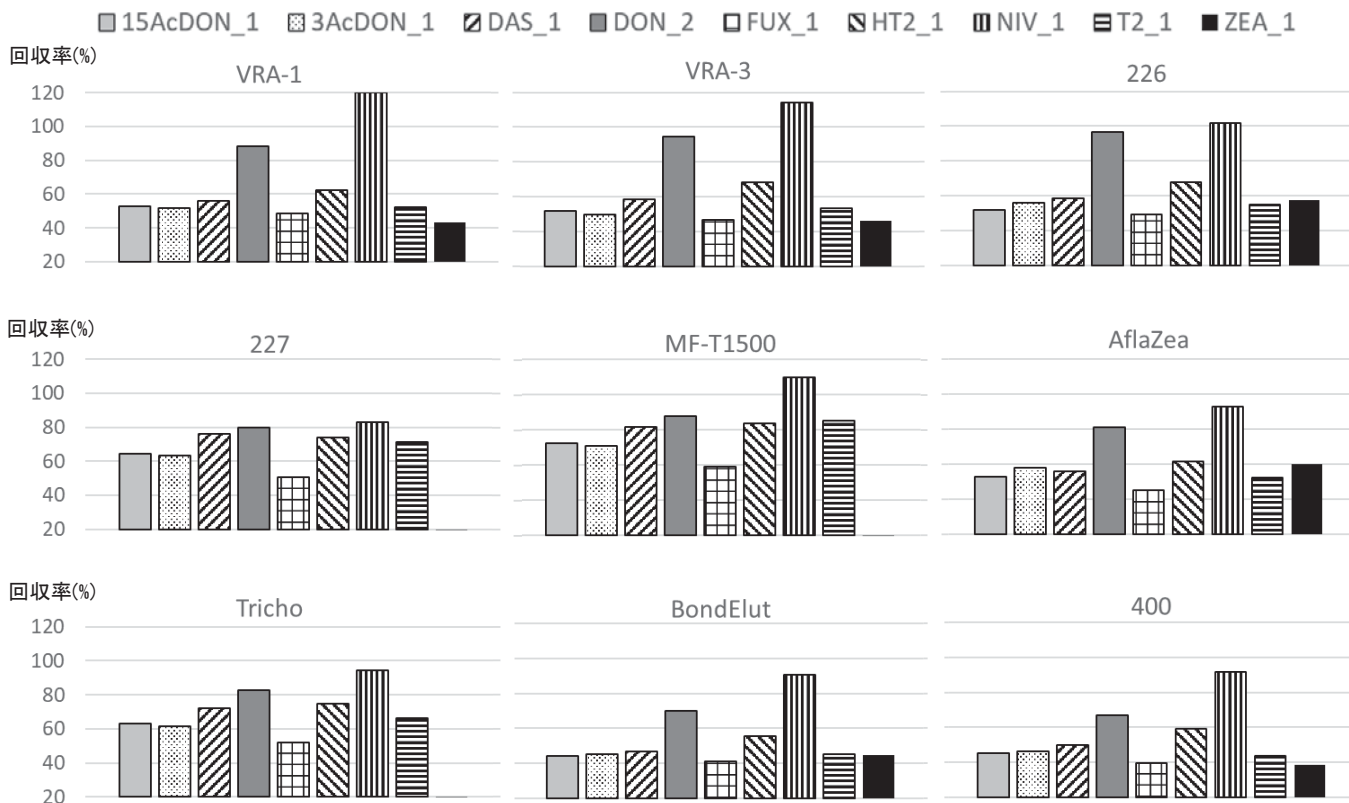


図 4 多機能カラムの選定

3.3 マトリックス効果の補正

検液の希釈およびマトリックスの除去では良い結果が得られなかったため、次にマトリックス効果を補正する方法について検討した。

補正には、一般的に(1)内部標準法による定量、(2)標準添加法による定量、(3)マトリックス検量線を用いた定量が用いられる。標準添加法やマトリックス検量線による定量は、検量線用標準液と検液のマトリックスをマッチングさせる必要があり、すなわち検液ごとに検量線用標準液を作成しなければならず、先述したように大変に手間である。

そこで、内部標準法での定量を試みた。内部標準法では、対象化合物と性状が類似した内部標準物質を選択することが重要であるため、標準液および検液中における各化合物のレスポンス変化を確認し、内部標準物質の割り当てについて検討した(図6)。

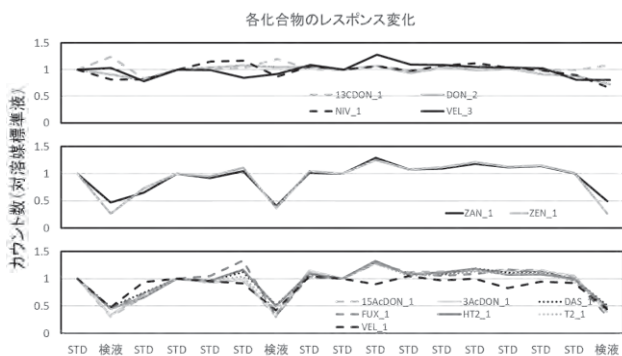


図6 内部標準物質の割り当て

Negativeモードでは、内部標準物質として¹³C-DONとNIVを検討し、いずれも対象化合物と同様の挙動を示したことから、内部標準物質として適当であると判断した。ただし、DONの安定性同位体である¹³C-DONは非常に高価であるため、価格面を考慮してVELを選択した。Positiveモードでは、内部標準物質としてZENにはZANを、トリコテセン系にはVELを検討した。Negativeモードとは異なり、標準液と検液中での明らかなレスポンス変化が確認できたが、いずれも対象化合物と同様の挙動を示したことから、内部標準物質として適当と判断した。

次に、選択した内部標準物質を用いた内部標準法と従来の溶媒標準液による絶対検量線法での定量結果を比較するため、はったい粉における添加回収試験(n=3)を実施した(図7)。絶対検量線法では回収率が30~110%であったのに対し、内部標準法では70~120%と大幅に改善した。個別では、Negativeモードで測定するDON、NIVの回収率にはほぼ差はなかったが、Positiveモードで測定する化合物には大幅な改善効果があった。この結果は、3.2.1の内容と一致した。

以上のことから、Negativeモードでは溶媒標準液による絶対検量線法により定量を行い、PositiveモードではVELまたはZENを内部標準物質に用いた内部標準法により定量を行うことで、マトリックス効果による影響を比較的受けずに、定量できる可能性が確認できた。今後は、添加回収試験を繰り返して行い、定量の精確性が確認できた場合には、汚染実態調査を開始する予定である。

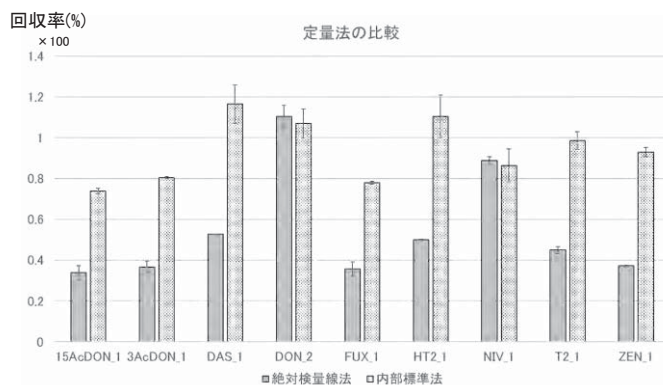


図7 絶対検量線法と内部標準法

4. まとめ

大麦試料を用いた添加回収試験では、マトリックス効果により回収率が低減する化合物があった。対策として、検液の希釈、マトリックスの除去について検討したが、有効な改善策とはならなかった。そこで、内部標準法による補正を検討した結果、VELおよびZANが内部標準物質として適当であり、絶対検量線法と内部標準法で実試料における添加回収試験の結果を比較したところ、Negativeモードで測定するDON、NIVはほぼ同等であったが、Positiveモードで測定する化合物には大幅な改善効果があった。

今後は、Negativeモードは絶対検量線法で、PositiveモードはVELおよびZANを内部標準物質とする内部標準法を用いて、添加回収試験を繰り返して行い、定量の精確性を確認した上で、県内産穀類における汚染実態調査を開始する予定である。

参考文献

- 1) 小西良子 他：食品衛生検査指針理化学編 2015 第6章 5.マイコトキシン,562-647,公益社団法人日本食品衛生協会,東京(2015)
- 2) 永山敏廣 他：衛生試験法・注解 2015 2.2 天然有毒物質試験法,287-305,金原出版株式会社,東京(2015)
- 3) 芳澤宅實：厚生労働科学研究費補助金厚生労働特別研究事業 平成13年度研究報告書(主任研究者 熊谷進)「食品中のかび毒のリスクアセスメントに関する研究」,98-113(2001)
- 4) 熊谷進：厚生労働科学研究費補助金厚生労働特別研究事業 平成14年度研究報告書(主任研究者 熊谷進)「小麦等のデオキシニバレノールに係る規格基準設定のための緊急調査研究」,6-9(2002)
- 5) 酒井康行 他：福井県衛生環境研究センター年報,15,72-77(2016)
- 6) 青山幸二 他：食品衛生学雑誌,53(3),152-156(2012)
- 7) Yoshinari et al. : Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62(5),1174-1180(2014)
- 8) 平成20年4月1日付け19消安第14729号農林水産省消費・安全局長通知「飼料分析基準の制定について」(平成28年12月22日一部改正)
- 9) 平成14年5月21日付け食発第0521001号 厚生労働省医薬局食品保健部長通知「小麦のデオキシニバレノールに係る暫定的な基準値の設定について」(平成15年7月17日一部改正)