

マイコトキシン一斉分析法の検討

野田拓史・田中宏和

Study of Simultaneous Analysis Method for Mycotoxin

Takumi NODA, Hirokazu TANAKA

1. はじめに

マイコトキシンとは、かびの産生する二次代謝産物のうち、ヒトや動物に健康被害を引き起こす化合物の総称である。その中でも食品汚染の事例が多く報告され、食品衛生上重要なマイコトキシンとして、*Aspergillus* 属の産生するアフラトキシン、オクラトキシン、ステリグマトシスチン、*Fusarium* 属が産生するトリコテセン系マイコトキシン（デオキシニバレノール、ニバレノール、T-2 トキシン、HT-2 トキシン等）およびその他のフザリウムトキシン（フモニシン、ゼアラレノン）、*Penicillium* 属が産生するシトリニン、パツリンなどがある^{1,2)}。湿潤かつ温暖なわが国の気候は、かびの生育に適した環境であり、気象条件や生産、貯蔵時の管理や取扱いなどによっては、農産物に健康影響への悪影響が無視できない汚染がおこる可能性がある。マイコトキシンによる健康被害の発生を未然に防止するためには、汚染実態を把握し、その汚染の程度に応じて、生産段階や貯蔵段階において必要かつ適切な対策をとることが不可欠である。そのため、農林水産省により麦類や米の生産や貯蔵段階での対策をまとめた指針やガイドラインが作成されている³⁾。

コシヒカリ発祥の地である本県では、コシヒカリを超える米として「いちほまれ」が開発され、一般財団法人日本穀物検定協会の令和4年産米の食味ランキングで特A評価を獲得している。このように本県では上質な米の開発や生産が盛んに行われているところだが、農林水産省の示す適切な生産・管理を怠った場合、マイコトキシンによる米の汚染が懸念されるところである。

そこで、県内産の米を対象として汚染実態調査を実施することとし、今回は、LC-MS/MSを用いた14種のマイコトキシン一斉分析法の検討を行った。検討内容は、MS条件（イオン化、MRM トランジション）およびHPLC条件（分析カラム、移動相等）であり、各項目について最適化した後、定量限界および検量線の範囲・直線性について評価したので、その結果を報告する。

2. 実験方法

2.1 測定対象

過去の報告等^{4,5)}から米を汚染するとされる14種のマイコトキシンを下記のとおり選定した。

アフラトキシン B1、アフラトキシン B2、アフラトキシン G1、アフラトキシン G2、オクラトキシン A、オクラトキシン B、ステリグマトシスチン、シトリニン、デオキシニバレノール、ニバレノール、T-2 トキシン、HT-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「AFB1」、「AFB2」、「AFG1」、「AFG2」、「OTA」、「OTB」、「STC」、「CIT」、「DON」、「NIV」、「T-2」、「HT-2」、「DAS」および「ZEN」という。）

2.2 試薬等

2.2.1 標準品および使用溶媒等

標準品：富士フィルム和光純薬社製または関東化学社製の標準品を使用した。

混合標準溶液：各標準品をアセトニトリルで $1 \mu\text{g/mL}$ となるように混合希釈し調製した。

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。

2.2.2 評価用標準溶液の調製

混合標準溶液（各 $1 \mu\text{g/mL}$ ）を 5mM 酢酸アンモニウム水溶液： 5mM 酢酸アンモニウム含有メタノール（9:1）混液中で希釈し調製した。

2.2.3 検量線用標準溶液の調製

混合標準溶液（各 $1 \mu\text{g/mL}$ ）を 5mM 酢酸アンモニウム水溶液： 5mM 酢酸アンモニウム含有メタノール（9:1）混液中で希釈し、各 0.5 、 1 、 2 、 5 、 10ng/mL の検量線用標準溶液を調製した。

2.3 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：TSKgel ODS 100V 粒子径 $5 \mu\text{m}$ 、 $2.0\text{mm i.d.} \times 150\text{mm}$ （東ソー）、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) \rightarrow 90% (10min) \rightarrow 90% (15min)、流速： 0.2mL/min 、カラム温度： 40°C 、注入量： $10 \mu\text{L}$ 、MRM条件：表1のとおり。

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	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	OTB
定量イオン	313>285	315>287	329>243	331>313	370>205
確認イオン	313>241	315>259	329>200	331>115	370>103

イオン化	ESI Positive (+)				
化合物名	HT-2	T-2	DAS	ZEN	STC
定量イオン	442>263	484>305	385>308	319>283	325>281
確認イオン	442>215	484>185	385>230	319>187	325>310

イオン化	ESI Negative (-)			
化合物名	CIT	DON	NIV	OTA
定量イオン	249>205	295>265	371>281	402>358
確認イオン	249>175	355>265	311>281	402>167

3. 結果および考察

3.1 MS条件の検討

測定は選択的にイオンをモニタリングするMRMモードで行った。評価用標準溶液をインフュージョン法でMS

部へ直接導入し、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI 法) のポジティブとネガティブの両モードでスキャン測定することにより、プリカーサーイオンを選定した。次に、解析ソフト (Analyst) の最適化ツールを用いてプロダクトイオンおよび MS パラメータ (コリジョンエネルギーおよび電圧等) の最適化を行い、MS 条件を決定した。

3. 2 HPLC 条件の検討

当センターでは過去にフザリウムトキシシン一斉分析法の検討を行っており⁶⁾、その際に得られた知見をもとに HPLC 条件の検討を行った。

分析カラムについて、既報では ODS カラムを使用したところ、位置異性体である 3-アセチルデオキシニバレノールと 15-アセチルデオキシニバレノールを分離することができなかったことから、これらを分離可能な ADME カラムを採用していたが、今回の測定対象にはそのような位置異性体は含まれていないため ODS カラムを使用することとした。

移動相に用いる有機溶媒について、既報ではメタノールからアセトニトリルに変更したところ、感度が最大で 1/10 程度まで減少していたため、メタノールを使用することとした。

移動相の pH について、既報の検討で pH が低下するにつれて、ポジティブモードで測定する化合物の感度は上昇し、逆に、ネガティブモードで測定する化合物の感度は減少することが分かっている。今回の測定対象の中では、ネガティブモードで測定する DON および NIV の感度が最も低かったため、pH 調整は行わないこととし、添加する酢酸アンモニウムの濃度は 5mM とした。

グラジエント条件について、メタノール濃度を初期濃度 10% から 10 分かけて 90% まで上昇させ 5 分間 90% を維持する条件にしたところ、すべての化合物を良好に測定することができた (図 1)。また、AFB1 と AFB2 および AFG1 と AFG2 はそれぞれ違いが二重結合の有無のみであり質量数の差は僅かであるが、本条件で測定した際の保持時間はそれぞれ AFB1 が 10.9 分、AFB2 が 10.7 分、AFG1 が 10.3 分、AFG2 が 10.0 分であり、HPLC によりこれらの化合物を良好に分離することができた。

3. 3 定量限界および検量線の範囲・直線性

最適化した条件を用いて 0.5ng/mL の混合標準溶液を測定したところ、すべての化合物のピークが $S/N \geq 10$ であったため、定量限界を 0.5ng/mL とした。

次に、0.5-10ng/mL の範囲で混合標準溶液を測定し検量線を作成した。その結果、すべての化合物で相関係数 0.999 以上の検量線となり、この範囲で良好に定量できることを確認した。

4. まとめ

LC-MS/MS を用いたマイコトキシシン一斉分析法の検討を行った。既報を参考に最適化した条件によりすべての対象化合物を良好に分離・測定することができた。

確立した分析法の性能評価を行った。定量限界は 0.5ng/mL であり、0.5-10ng/mL の範囲で定量可能であった。

今後は、前処理法の検討を行い、試験法の妥当性を確認した上で、県内産の米等の汚染実態調査を実施する予定である。

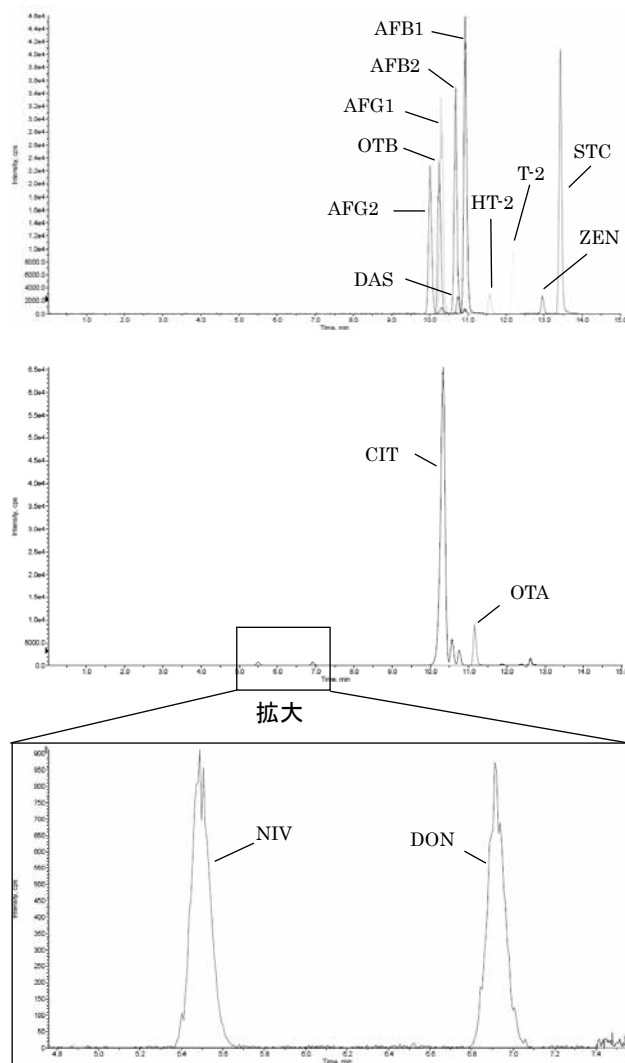


図 1 各化合物のクロマトグラム
(上段 ESI(+)) 下段 ESI(-))

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 2020 2.2 天然有毒物質試験法, 304-324, 金原出版株式会社, 東京(2020)
- 3) 農林水産省：食品のかび毒に関する情報 http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/priority/kabidoku/index.html
- 4) 田形卓巳 他：コメを汚染する黄変米毒産生菌株の効率的な検出を目指して, 麻布大学雑誌, **28**, 85(2017)
- 5) 一戸正勝：米に着生するカビ, *Mycotoxins*, **40**, 11-14(1994)
- 6) 酒井康行 他：フザリウムトキシシン一斉分析法の検討, 福井県衛生環境研究センター年報, **15**, 72-77(2016)