

【R4-6調査研究】 中間報告

福井県産の米におけるマイコトキシン 一斉分析法の確立および汚染実態調査

福井県衛生環境研究センター 保健衛生部

○野田拓史

現状

- ・穀類を中心に様々な食品がマイコキシンにより汚染されている
- ・現在AF、DON、パツリンについて基準値が設けられている
→規制対象が拡大する可能性がある
- ・以前の研究で大麦加工品から微量のマイコキシンが検出された

課題

- ・県内産の米について、汚染実態が明らかにされていない
- ・当センターでは検査体制が整備されていない

研究内容

1 試験法の検討

前処理法: 抽出法(アセトニトリルと水の比率)
精製法(固相抽出カラム(多機能、イムノアフィニティー))
測定法: 測定条件(分析カラム、移動相、MS条件)

2 試験法の評価

— 添加回収試験を繰り返しおこない、真度・精度等を確認

3 実態調査

— 県内産の米等の分析を行い汚染実態を調査

目標

- ・県内産の米の汚染実態の解明
- ・食品の安心安全の確保とブランド力向上
- ・検査体制の整備、分析技術の習得

測定対象

マイコトキシン	産生するかび	概要
アフラトキシン類 (AFB1、AFB2、AFG1、AFG2)	アスペルギルス属	非常に強い発がん性を持つ。食品衛生法によりすべての食品に対して0.01ppmの基準がある。過去に国産米から検出されたことがある。
オクラトキシンA (OTA) オクラトキシンB (OTB)	アスペルギルス属 ペニシリウム属	黄変米事件の原因と推定されている。国産米からOTA産生菌が検出された報告がある。EUでは米に0.005ppmの基準が設けられている。
ステリグマトシスチン (STC)	アスペルギルス属	過去に長期間保存された国産米から検出されたことがある。
シトリニン	ペニシリウム属	黄変米事件の原因と推定されている。
トリコテセン類 (DON、NIV、T-2、HT-2、DAS)	フザリウム属	小麦のDONに1.1ppmの基準がある。イネから検出された報告がある。
ゼアラレノン (ZEN)	フザリウム属	トリコテセン類と同時に検出されることが多い。

測定法の検討

	通知法	通知法	検査指針	検査指針	検査指針	以前の研究
項目	AFB1,AFB2, AFG1,AFG2	DON	OTA	DON,NIV	T-2,HT-2,ZEN	DON,NIV, 3-AcDON, 15-AcDON,FUX, HT-2,T-2,DAS,ZEN
前処理法	試料量	50g	50g	25g	25g	25g
	抽出溶媒	AcCN/水 (90:10)200mL	AcCN/水 (17:3)200mL	AcCN/水 (84:16)100mL	AcCN/水 (85:15) 100mL	AcCN/水 (85:15)100mL
	精製	多機能	多機能	多機能	多機能	多機能
	試験液	AcCN/水 (10:90)1mL	AcCN/水/ MeOH (1:18:1)0.5mL	AcCN/水/酢酸 (30:70:1)1mL	10mM酢酸 アンモニウム/ MeOH(9:1)1mL	10mM酢酸アンモニウ ム/MeOH (9:1)0.5mL
測定法	測定機器	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
	カラム	ODS	ODS	ODS	ODS	ADME
	A液	10mM 酢酸アンモニウム	2mM 酢酸アンモニウム	0.1%ギ酸	10mM 酢酸アンモニウム	10mM 酢酸アンモニウム
	B液	MeOH	MeOH or AcCN	AcCN	AcCN	MeOH
	移動相 (B液)	40%(アイソク ラティック)	5%(0min)→ 90%(8min)→ 90%(10min)	50%(0min)→ 50%(2min)→ 90%(10min)→ 90%(12min)	5%(0min)→ 90%(10min)	10%(0min)→ 100%(30min)

測定条件

- 装置: Prominence 20A/3200Q TRAP (島津/Sciex)
- カラム: TSKgel ODS 100V (東ソー) 粒子径5 μ m、2.0mm i.d. \times 150mm
- 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: 0.2 mL/min
- カラム温度: 40 $^{\circ}$ C
- 注入量: 10 μ L
- MRM条件: 下表のとおり

ESI(-)	トリニン	DON	NIV	OTA
定量イオン (m/z)	249 > 205	295 > 265	371 > 281	402 > 358
確認イオン (m/z)	249 > 175	355 > 265	311 > 281	402 > 167

ESI(+)	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	OTB	HT-2	T-2	DAS	ZEN	STC
定量イオン (m/z)	313 > 285	315 > 287	329 > 243	331 > 313	370 > 205	442 > 263	484 > 305	385 > 308	319 > 283	325 > 281
確認イオン (m/z)	313 > 241	315 > 259	329 > 200	331 > 115	370 > 103	442 > 215	484 > 185	385 > 230	319 > 187	325 > 310

クロマトグラム(10ppb)

AFG2(10.0min)

OTB(10.2min)

AFG1(10.3min)

AFB2(10.7min)

DAS(10.8min)

AFB1(10.9min)

HT-2(11.6min)

T-2(12.2min)

ZEN(13.0min)

STC(13.4min)

NIV(5.5min)

DON(6.9min)

シトリニン(10.3min)

OTA(11.2min)

※括弧内は保持時間

装置定量下限値および検量線の範囲・直線性の確認

- 0.5ppbの標準溶液を測定し、そのピークS/N比がすべて10以上であったため装置定量下限値を0.5ppbとした
- 0.5-10ppbの範囲で検量線を作成し、すべて相関係数が0.999以上、真度が80-120%であり、この範囲で良好に分析可能であることを確認した

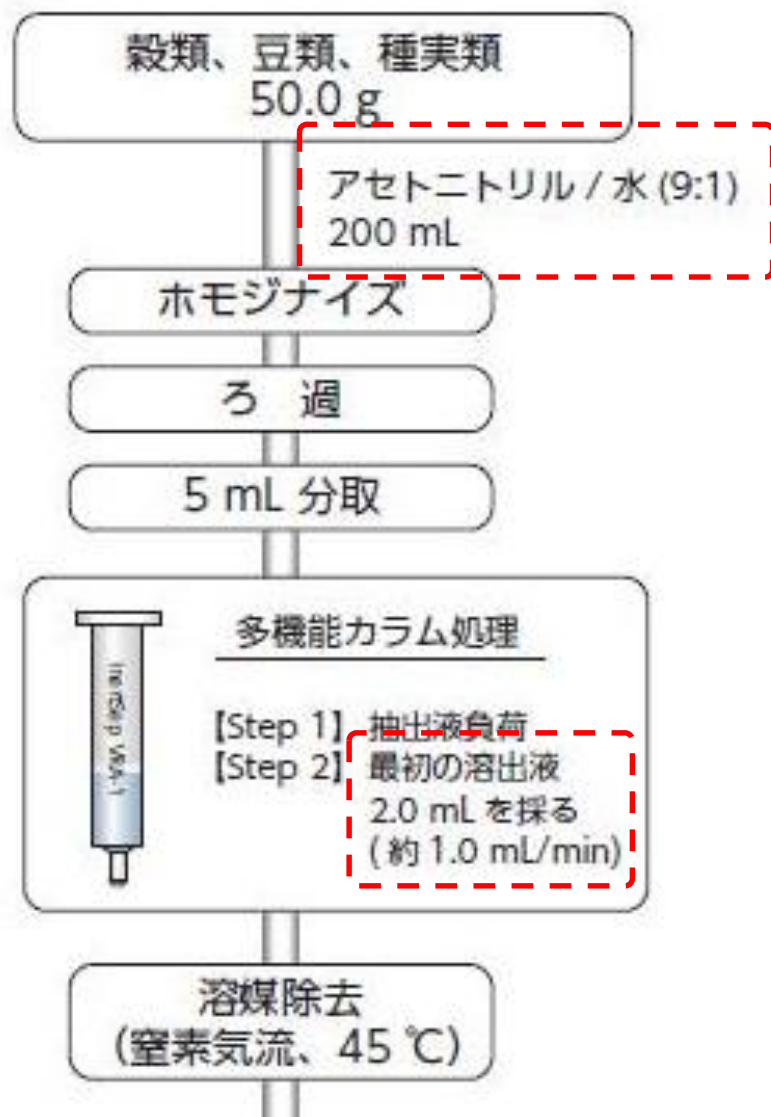
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	OTA	OTB	STC
0.5ppbのS/N比	167	701	831	878	91.2	613	276
相関係数	0.9999	1.0000	0.9999	0.9999	1.0000	0.9999	0.9999
真度	97-103%	95-103%	96-106%	85-109%	100%	96-105%	91-113%

	シトリン	DON	NIV	T-2	HT-2	DAS	ZEN
0.5ppbのS/N比	468	15.6	34.3	642	165	65.9	10.5
相関係数	1.0000	1.0000	0.9995	0.9998	0.9999	0.9996	0.9994
真度	99-101%	98-105%	82-112%	80-115%	82-111%	90-117%	88-112%

前処理法の検討

		通知法	通知法	検査指針	検査指針	検査指針	以前の研究
項目		AFB1,AFB2, AFG1,AFG2	DON	OTA	DON,NIV	T-2,HT-2,ZEN	DON,NIV, 3-AcDON, 15-AcDON,FUX, HT-2,T-2,DAS,ZEN
前 処 理 法	試料量	50g	50g	25g	25g	25g	25g
	抽出溶媒	AcCN/水 (90:10)200mL	AcCN/水 (17:3)200mL	AcCN/水 (84:16)100mL	AcCN/水 (85:15) 100mL	AcCN/水 (85:15)100mL	AcCN/水 (85:15)100mL
	精製	多機能	多機能	多機能	多機能	多機能	多機能
	試験液	AcCN/水 (10:90)1mL	AcCN/水/ MeOH (1:18:1)0.5mL	AcCN/水/酢酸 (30:70:1)1mL	10mM酢酸 アンモニウム/ MeOH(9:1)1mL	10mM酢酸アンモニウ ム/MeOH (9:1)0.5mL	AcCN/水 (10:90)0.25mL
測 定 法	測定機器	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
	カラム	ODS	ODS	ODS	ODS	ODS	ADME
	A液	10mM 酢酸アンモニウム	2mM 酢酸アンモニウム	0.1%ギ酸	10mM 酢酸アンモニウム	10mM 酢酸アンモニウム	10mM 酢酸アンモニウム
	B液	MeOH	MeOH or AcCN	AcCN	AcCN	MeOH	MeOH
	移動相 (B液)	40%(アイソク ラティック)	5%(0min)→ 90%(8min)→ 90%(10min)	50%(0min)→ 50%(2min)→ 90%(10min)→ 90%(12min)	5%(0min)→ 90%(10min)	10%(0min)→ 100%(30min)	10%(0min)→ 90%(10min)→ 90%(15min)

多機能カラムの検討①



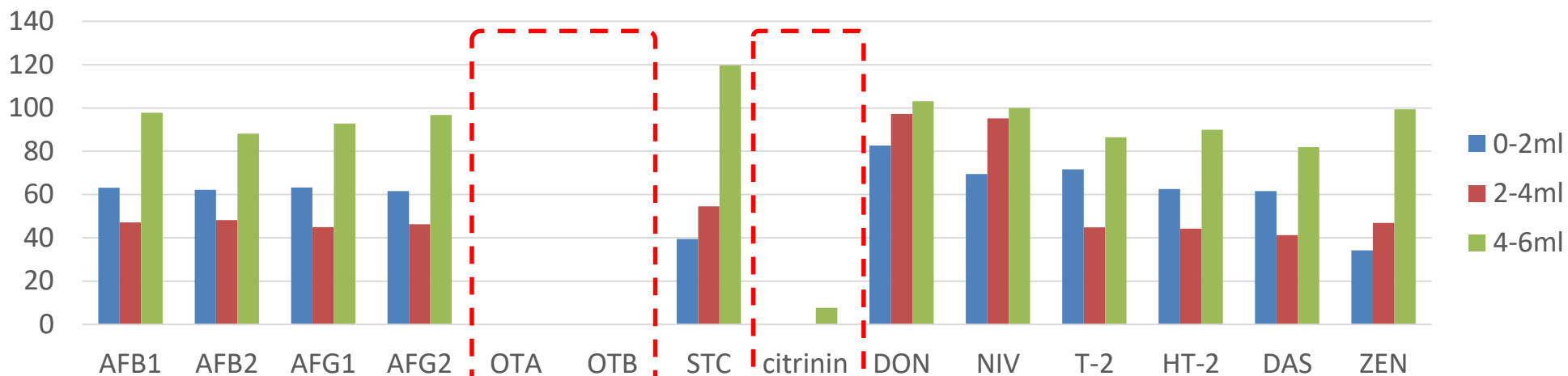
- ・VRA-3 (ジーエルサイエンス)
- ・MF-A 1000 (レゾナック)

90%アセトニトリルで調製した標準液をカラムに負荷し、通過液を2mLごと分取

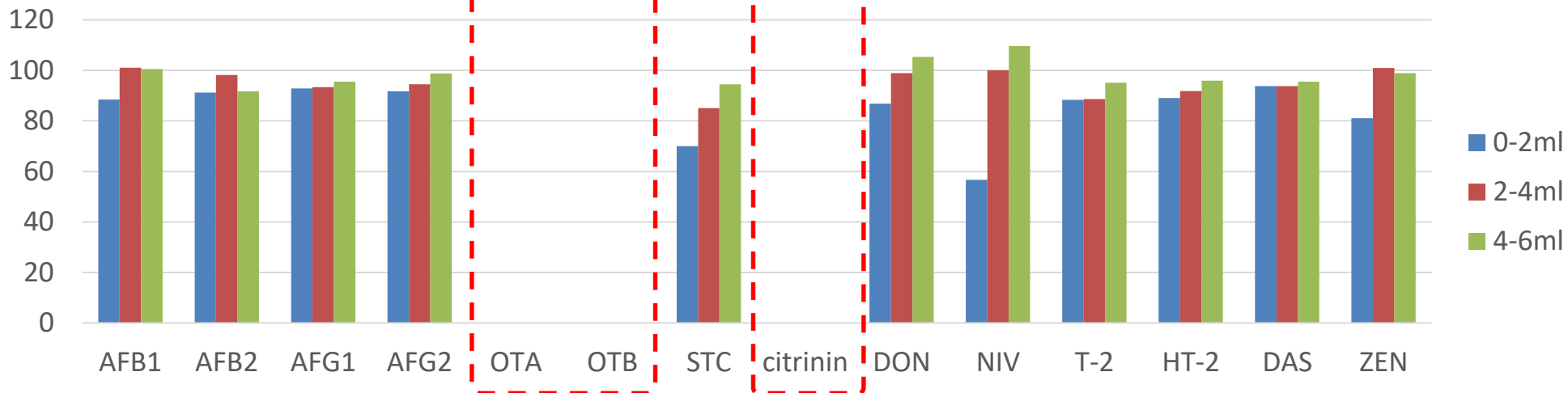
各通過液と標準液を測定し、ピーク面積の比により回収率を算出

多機能カラムの検討①

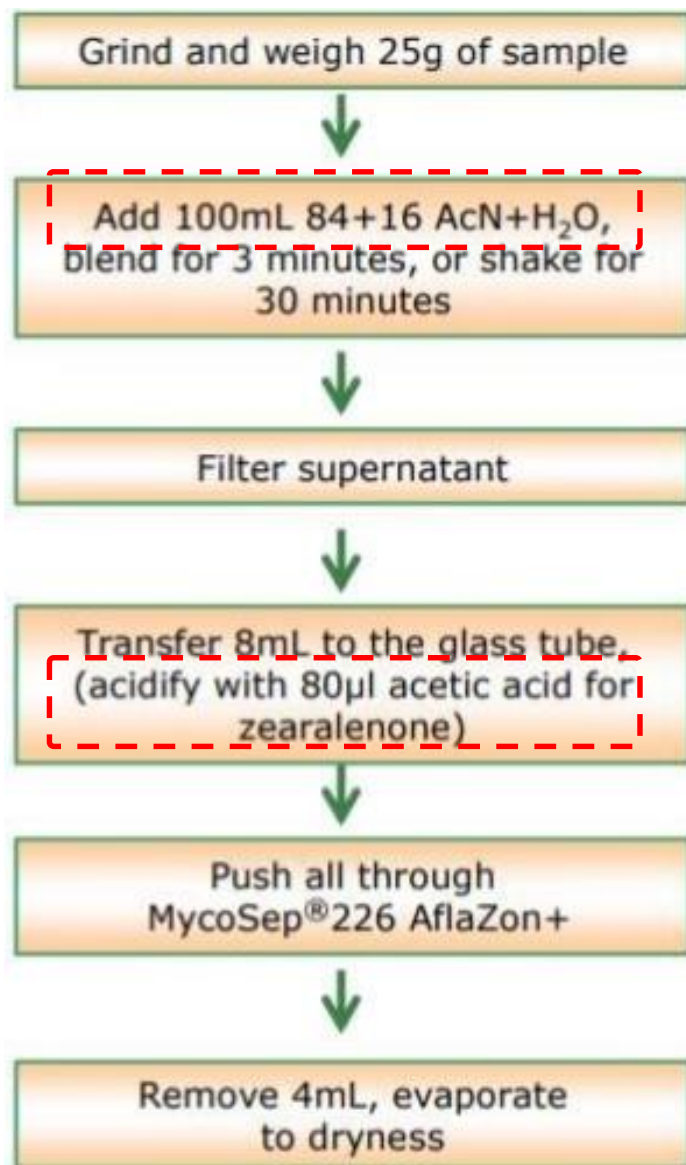
回収率



回収率



多機能カラムの検討②

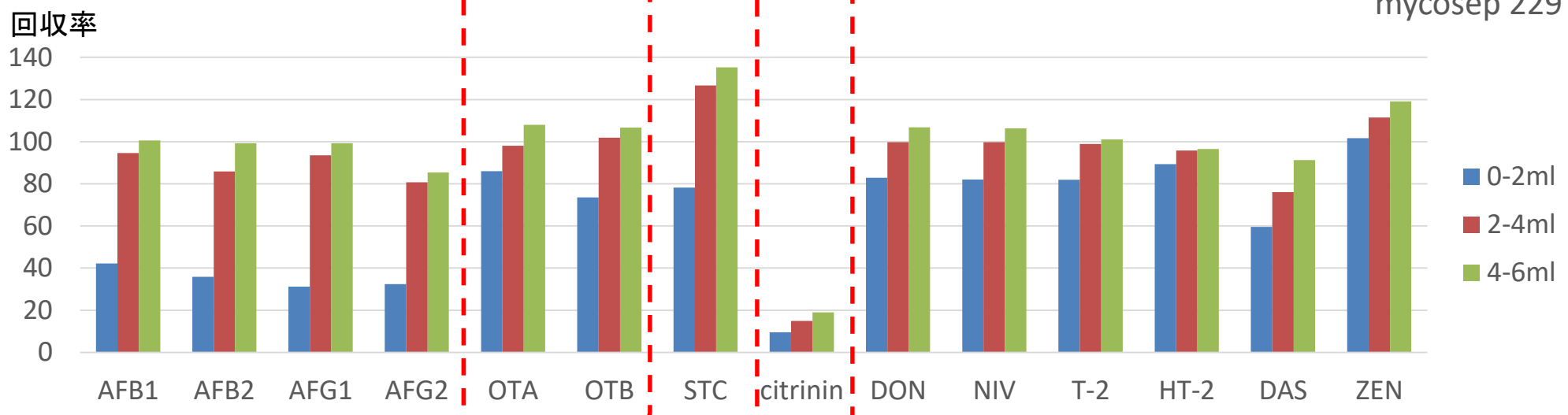
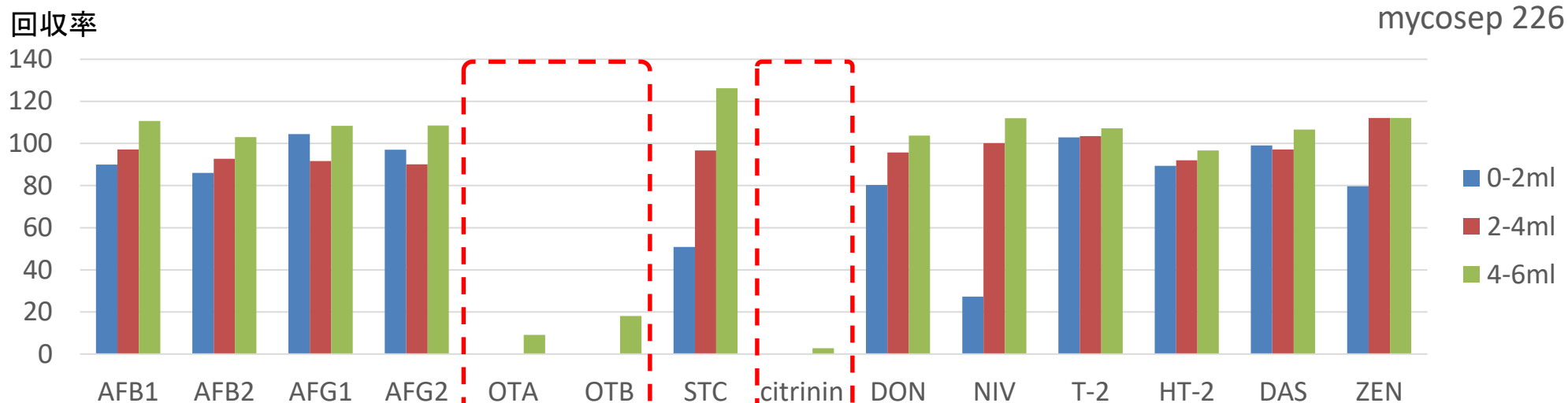


- mycosep 226 (Romer Labs)
- mycosep 229 (Romer Labs)

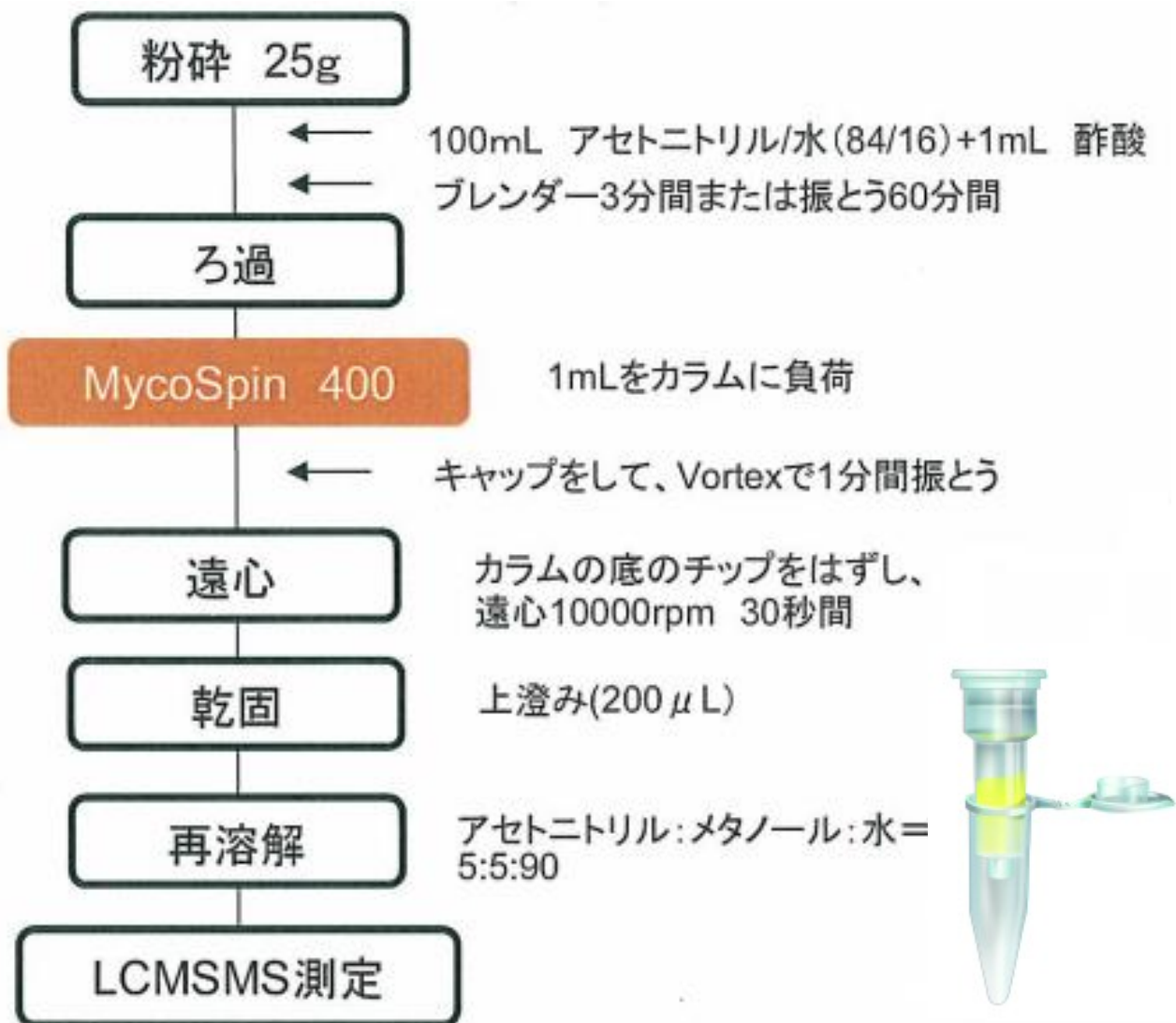
1%酢酸含有84%アセトニトリルで調製した標準液をカラムに負荷し、通過液を2mLごと分取

各通過液と標準液を測定し、ピーク面積の比により回収率を算出

多機能カラムの検討②



多機能カラムの検討③

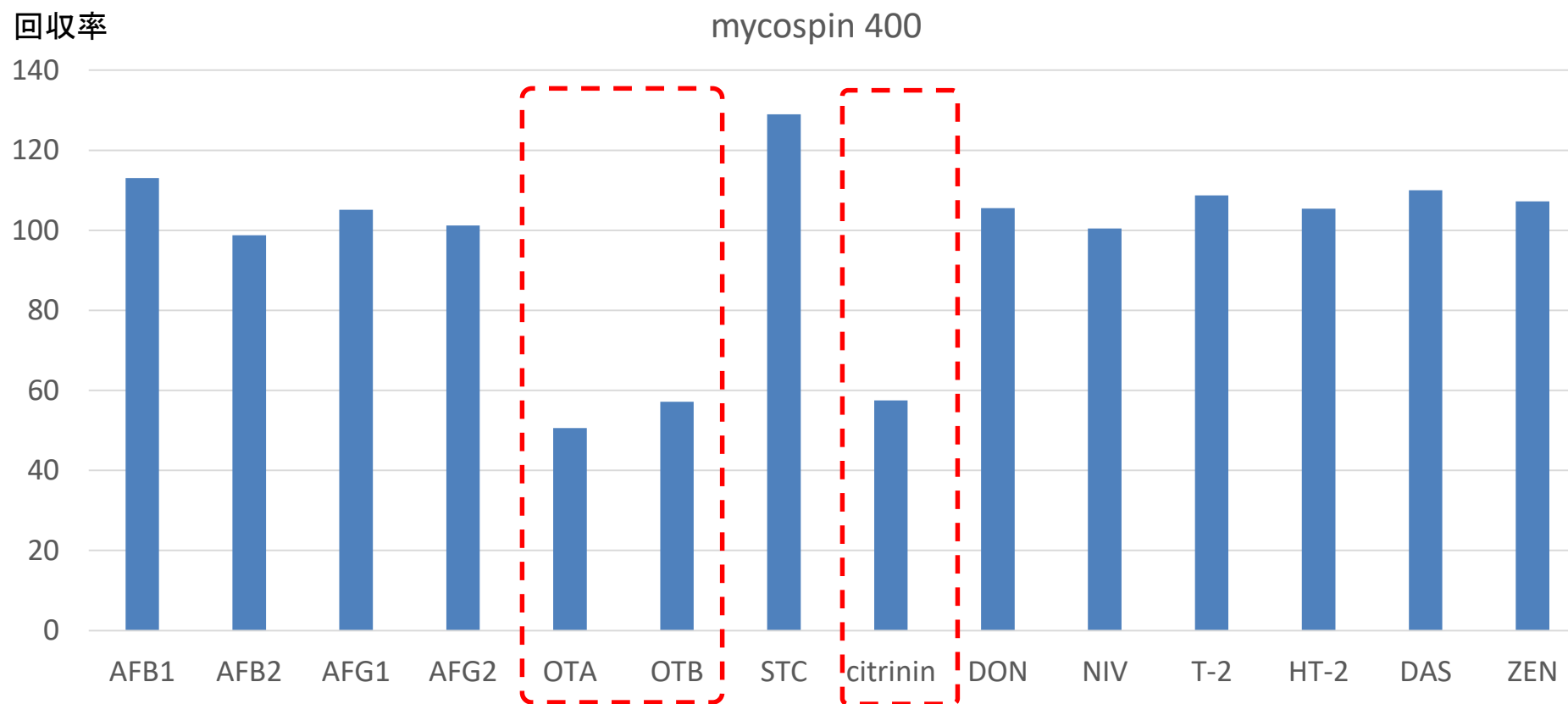


▪ mycospin 400 (Romer Labs)

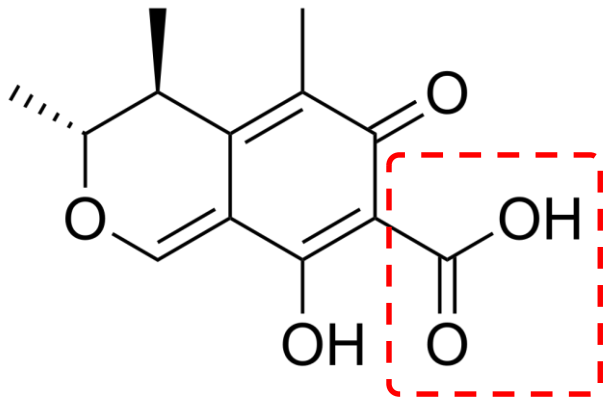
1%酢酸含有84%アセトニトリルで調製した標準液をカラムに負荷

通過液と標準液を測定し、ピーク面積の比により回収率を算出

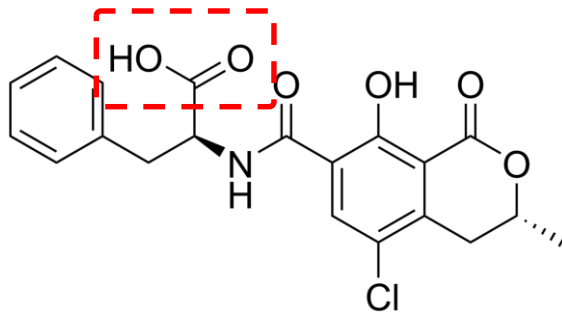
多機能カラムの検討③



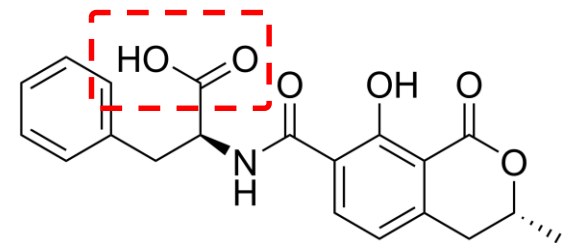
回収率の低かった3種のマイコトキシン



シトリニン



OTA



OTB

共通点

・イソクマリン骨格を持つ

・カルボキシル基を持つ

⇒イオン交換樹脂に吸着している可能性がある

⇒通過液のpHを調整することで溶出させることが可能かもしれない

まとめ

- 14種のマイコキシン一斉測定法を確立した。
- 移動相に酢酸アンモニウム水溶液/メタノール、分析カラムにODSを用いたグラジエント分析により良好に測定できた。
- 0.5-10ppbの範囲で良好な検量線を作成することができた。
- 多機能カラムを用いた精製において、OTA、OTBおよびシトリニンを溶出させるために溶媒条件等をさらに検討する必要がある。