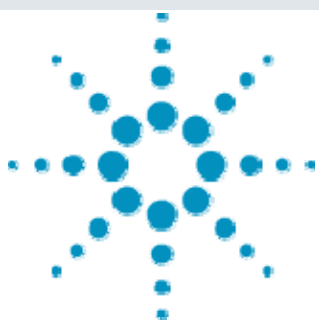




Agilent 6410 による 13 種カビ毒の一斉分析法



要旨> トリコテセン系カビ毒(TCs)であるニバレノール(NIV)、デオキシニバレノール(DON)、フザレノン-X(FUS-X)、3-アセチル-DON(3-ADON)、15-アセチル-DON(15-ADON)、ジアセトキシシシルペノール(DAS)、HT-2 トキシシン(HT-2)、T-2 トキシシン(T-2)およびアフラトキシン類(AFG1, AFG2, AFB1, AFB2)、ゼアラレノン(ZEN)の LC-MS/MS 法による高感度分析法を検討しました。その結果、イオン源に APCI 法、カラムに微小粒子径カラムを使用することで 13 種カビ毒の良好な分離が得られ、1ng/g 以下の測定が可能でした。また、小麦、トウモロコシ中で妨害ピークは検出されず、顕著なイオン化抑制もなく良好な結果が得られました。

Key Words: カビ毒、トリコテセン類、アフラトキシン類、LC-MS/MS、APCI

1. はじめに

カビ毒は様々な種類の真菌が産生する二次代謝産物であり、多くの化合物が発見されています。特に発ガン性の危険性があるアフラトキシン類や小麦など穀類に繁殖する赤カビ(*Fusarium* 属)が産生するトリコテセン系カビ毒、ゼアラレノンなどが良く知られており、食品衛生上重要な自然毒の一種です。一般的にこれらカビ毒の分析法は HPLC や LC/MS を用いた特定のカビ毒の個別分析です。しかし近年、複数のかび繁殖によるカビ毒の複合汚染が懸念されています。そこで、高分離、高速分析が可能な微小粒子径カラム及び高感度、高選択的検出が可能な三連四重極型質量分析計による MRM 法を用いた 13 種カビ毒の一斉分析法について紹介します。

2. 装置及び測定条件

分析条件は表. 1 に示した通りですが、移動相にはメタノール及び 10mM 酢酸アンモニウムを用い分離の最適化を行いました。MS 条件はイオン源に APCI を用いた正イオンモードで測定しました。また、MRM 条件は表. 2 に示した通りです。試料には小麦及びトウモロコシを用い、アセトニトリル抽出及び Romer Lab 製 MultiSep#226 による精製を行いました。

3. 結果および考察

各カビ毒は Q3 スキャンモードで得られたベースピークイオンをプリカーサーイオンとしたプロダクトイオンスキャンモードにより MRM 条件を最適化しました。特に 3, 15-アセチル-DON は異性体であり注意が必要でしたが、図. 1 の通りプリカーサーイオンを変えることで、選択的な MRM 条件を設定することが可能でした。

表. 1 13 種カビ毒の LC-MS/MS 条件

HPLC	: Agilent 1200
Column	: ZORBAX Extend C18 (100, 2.1mm, 1.8um)
Mobile phase	: A: MeOH 10mM HCOONH ₄ 10%A---(30min)---100%A
Column temp	: 40°C
Sample volume	: 20 µL
Flow rate	: 0.2 mL/min
MS	: Agilent 6410 Triple Quadrupole LC/MS
Ionization	: APCI (positive)
Mass range	: m/z 100-500
Drying gas	: 7 L/min at 350°C
Nebulizer gas	: 345kPa
Vaporizer temp	: 350°C
Fragmentor	: 100V
Vcap	: 4000V

表. 2 各カビ毒の MRM 条件

No	Mycotoxins	Precursor	Product	CE(V)
1	NIV	312	(M+NH ₄ -H ₂ O) ⁺	175
2	DON	297	(M+H) ⁺	249
3	FUS-X	355	(M+H) ⁺	247
4	15-ADON	356	(M+NH ₄) ⁺	137
5	3-ADON	339	(M+H) ⁺	231
6	AFG2	331	(M+H) ⁺	245
7	AFG1	329	(M+H) ⁺	243
8	AFB2	315	(M+H) ⁺	259
9	AFB1	313	(M+H) ⁺	241
10	DAS	384	(M+NH ₄) ⁺	307
11	HT-2	442	(M+NH ₄) ⁺	215
12	T-2	484	(M+NH ₄) ⁺	305
13	ZEN	319	(M+H) ⁺	187

CE: Collision voltage

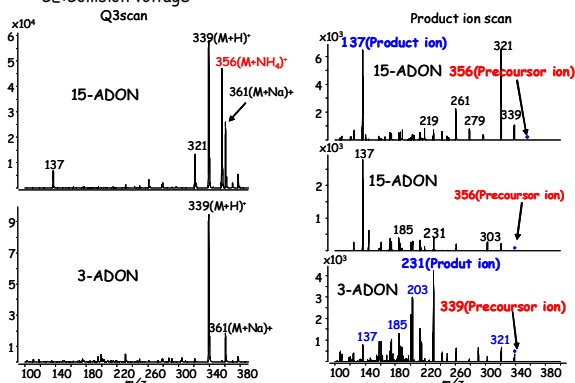


図. 1 アセチル-DON の MS 及び MS/MS スペクトル



Agilent Technologies

図.2にはMRMモードでの積算MRMクロマトグラムを示しました。その結果、異性体である3,15-アセチル-DONの完全分離は不可能でしたが、ピーク頂点の分離は可能でした。

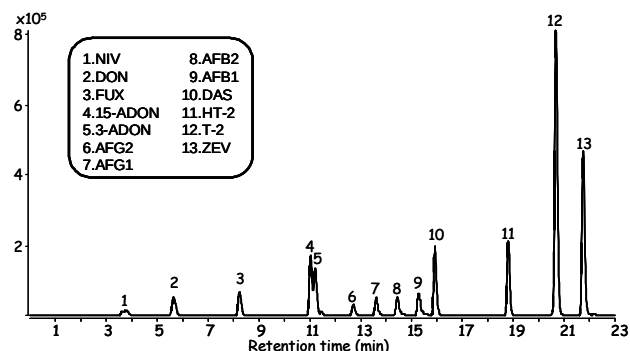


図.2 13種カビ毒の積算MRMクロマトグラム

カビ毒標準液を添加した小麦およびトウモロコシ(添加量 TCs, ZEN:10ng/g, AFs:1ng/g)中での結果は図.3に各カビ毒のMRMクロマトグラムを示しました。その結果、トウモロコシではクロマトグラム上に試料由来のピークは全く観察されず、小麦においてはT-2のMRMクロマトグラム中に試料由来のピークが観察されましたがT-2のピークと分離は可能で測定には影響ありませんでした。

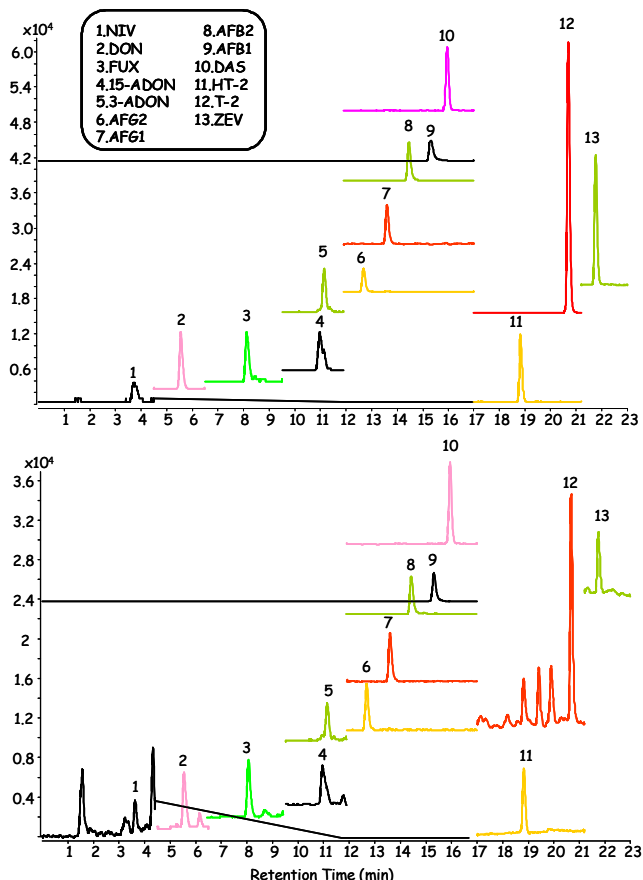


図.3 トウモロコシ(上段)、小麦(下段)中各カビ毒のMRMクロマトグラム

小麦、トウモロコシ中での各カビ毒の試料マトリックスによるイオン化抑制は表.3に示しました。イオン源にAPCIを用いることで標準液に対する相対強度が89%以上であり、試料マトリックス由来の顕著なイオン化抑制は観察されませんでした。

また、試料中での各カビ毒の直線性及びS/N=3を検出限界とした結果は表.4に示しましたが、決定係数で全て0.999以上、検出限界は1ng/g以下でした。

表.3 各カビ毒のイオン化抑制

Mycotoxins	Matrix effect	
	Wheat	Corn
NIV	92	93
DON	89	98
3-ADON	91	92
15-ADON	93	97
FUX	102	103
AFG2	101	113
AFG1	95	98
AFB2	91	96
AFB1	103	92
DAS	106	99
HT-2	93	102
T-2	93	107
ZEN	91	96

*STDに対する相対強度

表.4 各カビ毒の直線性及び検出限界

Mycotoxins	Linearity(r^2)	LOD(ng/g)		
		STD	Wheat	Corn
NIV	0.9999	1.00	0.30	0.30
DON	0.9998	1.00	0.20	0.10
FUS-X	0.9998	0.10	1.00	0.10
3-ADON	0.9998	0.30	0.10	0.08
15-ADON	0.9997	0.10	0.10	0.10
AFG2	0.9999	0.03	0.03	0.03
AFG1	0.9995	0.03	0.03	0.03
AFB2	0.9999	0.05	0.02	0.02
AFB1	0.9995	0.03	0.03	0.03
DAS	0.9996	0.10	0.05	0.03
HT-2	1.0000	0.20	0.05	0.02
T-2	0.9994	0.20	0.02	0.02
ZON	0.9998	0.30	0.20	0.20

4. まとめ

今回、LC-MS/MSを用いた13種カビ毒の一斉分析法を紹介しましたが、イオン源にAPCI、カラムに微小粒子径カラムの使用及びMRM法を用いることで小麦、トウモロコシ中1ng/g以下の高感度分析が可能であり、また実試料中においても妨害成分の影響なく測定が可能でした。

【LCMS-200807TK-002】

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更することがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

〒192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1

www.agilent.com/chem/jp



Agilent Technologies