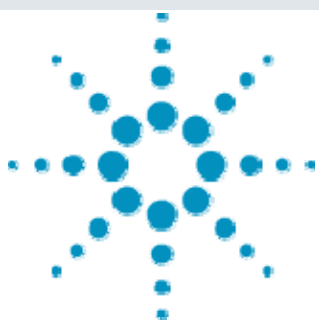




イムノアフィニティーカラムを用いた Agilent 6410 による トリコテセン系カビ毒 及び ゼアラレノンの一斉分析法



＜要旨＞ トリコテセン系カビ毒(TCs)である、デオキシニバレノール(DON)、HT-2 トキシシン(HT-2)、T-2 トキシシン(T-2)およびゼアラレノン(ZEN)の一斉分析にマルチイムノアフィニティーカラム(IAC)を用いた LC-MS/MS 法による高感度分析法を検討しました。その結果、イオン化に ESI 法を使用してもイオン化阻害なく高感度に測定することが可能でした。従って煩雑なマトリックス検量線を使用することなく小麦、ビスケット中これらカビ毒の一斉分析が可能でした。

Key Words: イムノアフィニティーカラム、カビ毒、トリコテセン類、ゼアラレノン、LC-MS/MS、ESI

1. はじめに

麦などの穀類に繁殖する *Fusarium* 属のかびはトリコテセン系カビ毒及びゼアラレノンを代表とする多くのカビ毒を産生することから食品衛生上重要なカビです。特にデオキシニバレノール(DON)、ニバレノール(NIV)、ゼアラレノン(ZEN)は日本、欧米の多くの国で麦を汚染していることから大きな問題となっています。さらに T-2 トキシシン(T-2)は毒性が DON, NIV と比較して 5~10 倍程度高いことから重要なカビ毒です。一般にこれらカビ毒の一斉分析法は多機能カラムを使用した前処理後、LC/MS や LC-MS/MS 法が使用されています。しかし、ZEN を含めたトリコテセン系カビ毒の一斉分析では効果的なクリーンアップが困難であることから最も汎用的なイオン化法である ESI 法を用いた場合、イオン化阻害が生じることから煩雑なマトリックス検量線による測定が必要です。一方、イムノアフィニティーカラム(IAC)は対象化合物の抗体を使用することから精製能力が非常に高く、近年使用頻度が増えています。そこで DON, HT-2, T-2 及び ZEN の精製が可能であるマルチ IAC を用いた LC-MS/MS による一斉分析法について紹介致します。

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、移動相にはアセトニトリル及び 10mM 酢酸アンモニウムを用いた分離の最適化を行いました。MS 条件はイオン化に ESI 法を用いた正イオンモードで測定しました。また、MRM 条件も表.1 に示した通りです。マルチ IAC は R-Biopharm 社製 DTZ Multi Myco IACs を使用しました。

試料には小麦及び市販のビスケットを用いましたが、抽出溶媒には 75%メタノール水溶液を使用し 30 分間振とう抽出しました。抽出液は遠沈後、上澄液

を小麦のみガラス繊維でろ過しました。この抽出液の一部(10mL)をリン酸緩衝液(PBS)で 5 倍希釈し、予め PBS でコンディショニングした IAC に 5mL 負荷しました。IAC は純水(10mL)で洗浄後、メタノール(2mL)で 2, 3 回バックフラッシュすることで目的カビ毒を溶出しました。溶出液は窒素気流下(60℃)で蒸発乾固後、初期移動相 0.5mL で再溶解しました。

表.1 4 種カビ毒の LC-MS/MS 条件

HPLC	: Agilent 1200
Column	: ZORBAX Extend C18 (100,mm,2.1mm,1.8um)
Mobile phase	: A:10mM CH ₃ COONH ₄ , B:ACN 10%B----(20min)---70%B
Column temp	: 40℃
Flow rate	: 0.2 mL/min
MS	: Agilent 6410B Triple Quadrupole LC/MS
Ionization	: ESI (positive)
Drying gas	: 10 L/min at 350℃
Nebulizer gas	: 345kPa
Fragmentor	: 100V

No	Mycotoxins	Precursor	Product 1	Product 2	CE1	CE2	R.time
1	DON	297	249	203	10	10	3.37
2	HT-2	442	263	215	9	9	10.12
3	T-2	484	305	215	10	20	12.25
4	ZEN	319	187	283	10	20	12.91

CE: Collision energy

3. 結果および考察

今回の 4 種カビ毒の測定では IAC を使用したことから従来使用されている多機能カラムと比較して精製能力が高く試料マトリックスの影響が少ないと考えられます。そこで IAC で処理した小麦、ビスケット抽出液に 10ppb 相当のカビ毒標準液を添加して測定を行い、標準溶液と比較しました。結果は図.1 に積算 MRM クロマトグラムを示しましたが、全てのカビ毒でマトリックスによるイオン化阻害や妨害ピークは観察されませんでした。従って IAC を用いることで煩雑なマトリックス検量線を使用することなく小麦、ビスケット中でのこれらカビ毒の定量が可能



Agilent Technologies

でした。

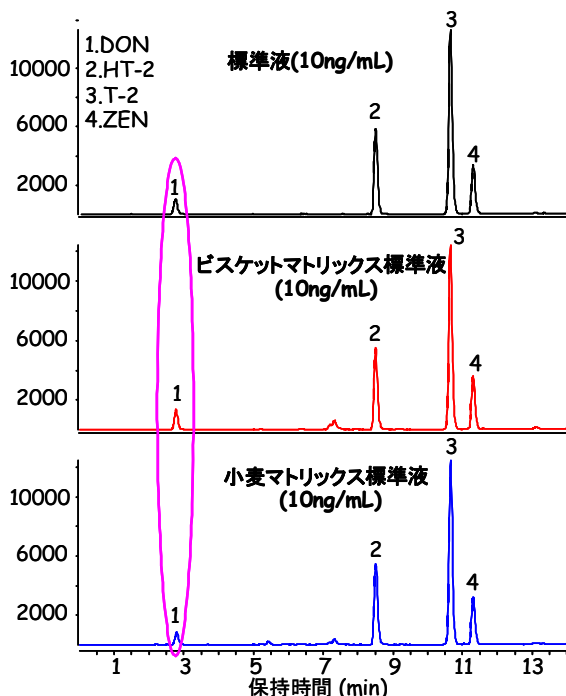


図. 1 標準液及びマトリックス標準液の積算 MRM クロマトグラム (10ng/mL)

各カビ毒の小麦及びビスケット中での MRM クロマトグラムは図. 2 に示しましたが、標準液でのクロマトグラムと全く変わらず各カビ毒共に 1ng/g レベル以下での測定が可能でした。

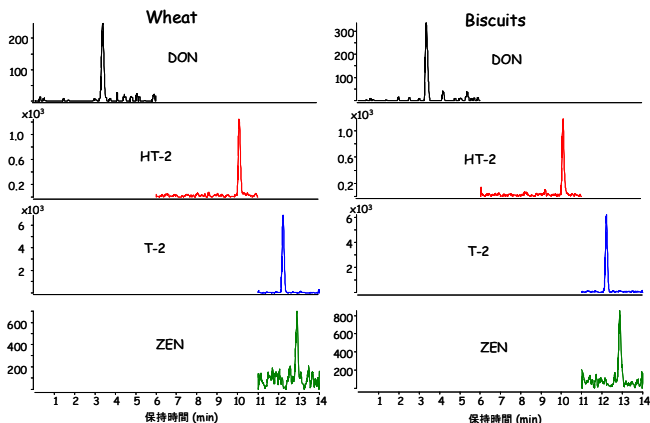


図. 2 小麦、ビスケット中各カビ毒の MRM クロマトグラム

今回使用した IAC での回収率及び S/N=3 を検出限界とした結果は表. 3 に示しましたが、10ng/g 添加量での回収率は小麦で 82.3~107.7%、ビスケットで 82.4~109.3%と良好でした。また n=3 での再現性は 3.2~6.1%でした。各農薬の検出限界は全カビ毒で 0.2ng/g 以下であり、IAC を用いた LC-MS/MS により 1ng/g 以下での測定が可能でした。

表. 2 各カビ毒の回収率及び検出限界

かび毒	回収率(%) ¹		S/N比 (10 ng/g)		検出限界 ²	
	小麦	ビスケット	小麦	ビスケット	小麦	ビスケット
DON	82.3(5.4)	82.4(5.8)	234	240	0.13	0.13
HT-2	93.2(3.2)	89.6(4.7)	375	176	0.08	0.17
T-2	103.4(5.1)	93.2(6.1)	1100	750	0.03	0.04
ZEN	107.7(4.8)	109.3(5.7)	127	90	0.24	0.33

¹: 相対標準偏差 (n=3) ²: S/N=3 を検出限界と定義

実試料での確認のため、今回確立した分析法で汚染小麦の測定を行いました。結果は図. 3 に示しました通りで試料 A では DON 及び ZEN が検出され、試料 B では全てのカビ毒が検出されました。また、検出されたカビ毒の濃度は 4~2300ng/g でした。

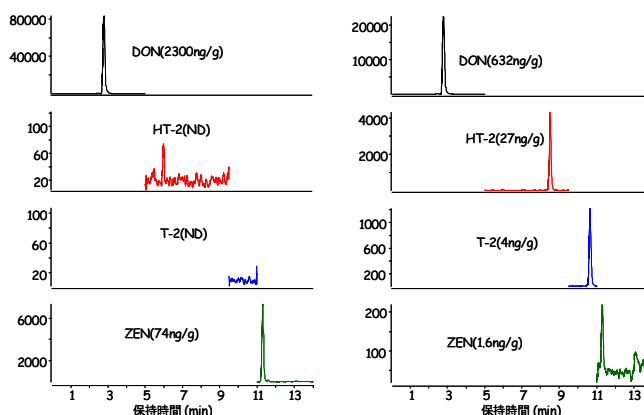


図. 3 汚染小麦中各カビ毒の MRM クロマトグラム

4. まとめ

今回、マルチ IAC を用いた LC-MS/MS による 3 種トリコセセン系カビ毒及びゼアラレノンの一斉分析法について紹介しましたが、試料精製に IAC を使用することでイオン源に ESI を用いてもマトリックスによるイオン化阻害も観察されず良好な結果が得られました。小麦、ビスケット中での検出限界は 0.03~0.33ng/g と 1ng/g 以下の高感度分析が可能でした。

【LCMS-200810TK-001】

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