

Application News

No. C138

LC/MS
Liquid Chromatography Mass Spectrometry

かび毒 規制 18 成分の LC/MS/MS による一斉分析

Multi-Residue Analysis of 18 Regulated Mycotoxins by LC/MS/MS

かび毒（マイコトキシン）は、その毒性により、食品や飼料における重要な汚染物の一つです¹⁾。マイコトキシンは、それら化学構造から、広い物理化学的性質を持った低分子物質の一群として扱われます²⁾。マイコトキシンは、一般的に農産物に寄生、付着する菌類により産生されますが、目視では見つけることができません³⁾。多くは、小麦、大麦、エン麦、ライ麦、とうもろこし、米、豆などの穀類および、牛乳において汚染が問題となっています⁴⁾。

食品中における、かび毒はその強い毒性のため、日本、欧米、中国を含めた世界各地で規制対象となっています⁵⁾。特に EU では、規制値やサンプリング方法、分析方法などが、EU 規制 (EC 1886/2006 (修正版: EC 1126/2007), EC 401/2006) により定められています。

複雑なマトリックスからなる食品や飼料中の、低濃度対象成分を検出する必要が有るため、かび毒の分析には、LC/MS/MS が最も広く用いられる分析手法となっています。マイコトキシンの、広い物理的または化学的性質から、これまで幾つかの対象成分のグループに対して、個別の LC/MS/MS が用いられていました。

■ 分析条件

Experimental

抽出前処理は、英国 Scientific Analysis Laboratories にて、検証済みの抽出手順により行いました。分析は、Nexera UHPLC, LCMS-8060 液体クロマトグラフ質量分析計にて行い、分析条件は Table 1 に示しています。検量線は、¹³C ラベル化内部標準物質を用いて、内部標準法により作成しました。MRM 条件は、対象成分および、内部標準物質を合わせて、Table 2 に示しました。移動相溶媒、その他主要な試薬類は、LC/MS 用の試薬を用いて分析を行いました。

本アプリケーションニュースでは、単独の LC/MS/MS による分析手法を、食の安全という観点で規制される 18 成分に適用した事例を紹介します。

検討により得られた検出下限は、EU 規制として EC/1886/2006 により示された許容値が、それ以下であることが確認されました。

本法の対象成分は、アフラトキシン (B1, B2, G1, G2)、フモニシン (B1, B2, B3)、オクラトキシン A (OTA)、およびトリコセテン類 (3-アセチルデオキシニパレノール (3AcDON), 15-アセチルデオキシニパレノール (15AcDON), デオキシニパレノール (DON), ジアセトキシスシルペノール (DAS), フザレノン-X (FUS X), HT-2, ネオソラニノール (NEO), ニパレノール (NIV), T2, ゼアラレノン (ZON)) の 18 成分であり、これらの分析に要する時間は約 12.5 分間となりました。

D. Baker¹ C. Titman¹ J. Horner² N. Loftus¹:

¹ Shimadzu UK ² Scientific Analysis Laboratories

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

UHPLC	: Nexera LC System
Mobile Phase	: A; Water with additives B; Methanol with additives
Column	: Reversed phase column (100 mm L. x 2.1 mm I.D.)
Column Temperature	: 40 °C
Flow Rate	: 0.4 mL/minute
Gradient	: B. Conc 15 % (0 min) → 25 % (1 min) → 40 % (2 min) → 41 % (4.5 min) → 100 % (7.5 - 10.0 min) → 15 % (10.10 min) → Stop (12.5 min)
LC-MS/MS	: LCMS-8060
Dwell Time	: 10 to 40 msec.
Pause Time	: 1 msec.
Ionisation Mode	: ESI +/-
Polarity Switching	: 5 msec.

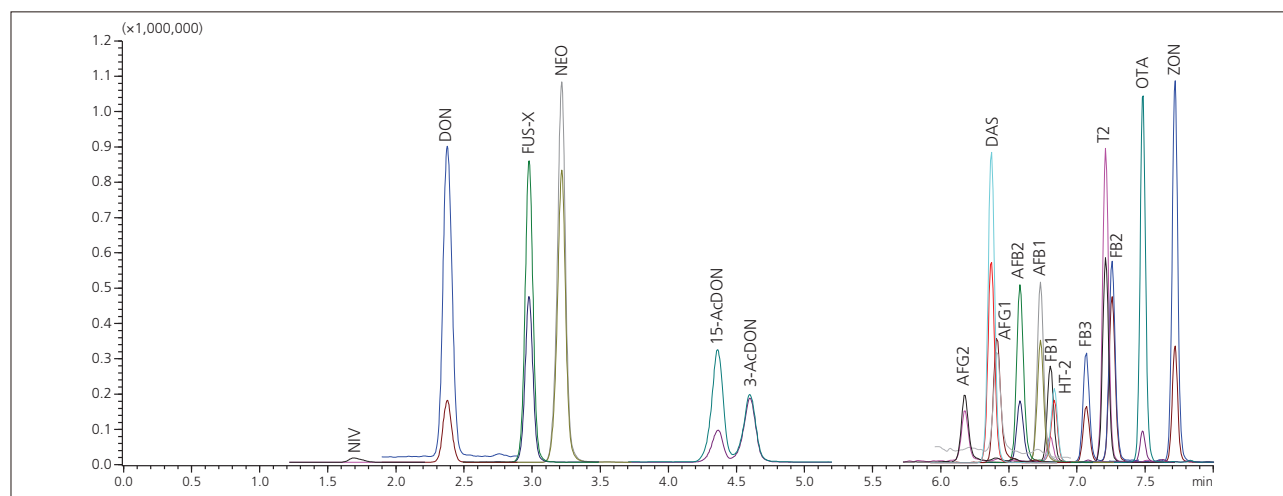


Fig. 1 かび毒 18 成分の MRM クロマトグラム
MRM Chromatograms of 18 Mycotoxins

AFB1 (aflatoxin B1; 1 µg/kg), AFB2 (aflatoxin B2; 1 µg/kg), AFG1 (aflatoxin G1; 1 µg/kg), AFG2 (aflatoxin G2; 1 µg/kg), OTA (ochratoxin A; 4 µg/kg), FB1 (fumonisin B1; 100 µg/kg), FB2 (fumonisin B2; 100 µg/kg), FB3 (fumonisin B3; 100 µg/kg), 15-AcDON (15-acetyldeoxynivalenol; 100 µg/kg), 3-AcDON (3-acetyldeoxynivalenol; 100 µg/kg), DON (deoxynivalenol; 100 µg/kg), DAS (diacetoxyscripanol; 100 µg/kg), FUS-X (fusarenon-X; 100 µg/kg), HT-2 (100 µg/kg), T-2 (100 µg/kg), NEO (neosolaninol; 100 µg/kg), NIV (nivalenol; 100 µg/kg), ZON (zearalenone; 100 µg/kg).

各成分につき、2 種類のトランジションによる MRM クロマトグラムを重ねて表示しています。一部の成分 (NEO (x0.3), T2 (x0.3), AF (x3), FB (x2)) は、表示スケールを補正しています。

For clarity only 2 MRM transitions are displayed per compound and the following MRM chromatograms were changed; NEO (x0.3), T2 (x0.3), AF (x3), FB (x2)

Table 2 MRM 条件および各成分の検量線寄与率一覧
All MRM's Measured in the Mycotoxin Method and Corresponding Calibration Range and R² Result

Compound name	Parent ion	Ret. Time (mins)	MRM 1	MRM 2	MRM 3	ISTD	Calibration range µg/kg	R ²
1 Aflatoxin B1	[M+H] ⁺	6.773	313 > 241	313 > 285	313 > 269	¹³ C Aflatoxin B1	0.1 - 10	0.9988
2 Aflatoxin B2	[M+H] ⁺	6.621	315 > 259	315 > 287	315 > 243	¹³ C Aflatoxin B2	0.1 - 10	0.9995
3 Aflatoxin G1	[M+H] ⁺	6.453	329 > 243	329 > 200		¹³ C Aflatoxin G1	0.1 - 10	0.9998
4 Aflatoxin G2	[M+H] ⁺	6.219	331 > 245	331 > 285		¹³ C Aflatoxin G2	0.1 - 10	0.9965
5 Ochratoxin A	[M+H] ⁺	7.509	404 > 239	404 > 221	404 > 358	¹³ C Ochratoxin A	0.4 - 40	0.9969
6 Fumonisin B1	[M+H] ⁺	6.811	722 > 352	722 > 334	722 > 704	¹³ C Aflatoxin B2	10 - 1000	0.9937
7 Fumonisin B2	[M+H] ⁺	7.260	706 > 318	706 > 354	706 > 688	¹³ C Aflatoxin B2	10 - 1000	0.9998
8 Fumonisin B3	[M+H] ⁺	7.073	706 > 318	706 > 354	706 > 688	¹³ C Aflatoxin B2	10 - 1000	0.9991
9 Deoxynivalenol	[M+H] ⁺	2.372	297 > 279	297 > 249		¹³ C Deoxynivalenol	10 - 1000	0.9992
10 Diacetoxyscirpenol	[M+NH ₄] ⁺	6.349	384 > 229	384 > 307	384 > 247	¹³ C T2 Toxin	10 - 1000	0.9994
11 T2	[M+NH ₄] ⁺	7.206	484 > 185	484 > 215	484 > 245	¹³ C T2 Toxin	10 - 1000	0.9989
12 HT-2	[M+Na] ⁺	6.822	447 > 345	447 > 285		¹³ C T2 Toxin	10 - 1000	1.0000
13 Nivalenol	[M-CH ₃ COO] ⁻	1.684	371 > 281	371 > 311		¹³ C HT-2	10 - 1000	0.9991
14 Neosolaniol	[M+NH ₄] ⁺	3.227	400 > 215	400 > 305	400 > 185	¹³ C Deoxynivalenol	10 - 1000	0.9995
15 Fusarenon X	[M+H] ⁺	2.986	355 > 247	355 > 277		¹³ C Deoxynivalenol	10 - 1000	0.9987
16 Zearalenone	[M-H] ⁻	7.711	317 > 175	317 > 131	317 > 273	¹³ C T2 Toxin	10 - 1000	0.9985
17 15-Acetyldeoxynivalenol	[M+H] ⁺	4.406	339 > 261	339 > 297		¹³ C Deoxynivalenol	10 - 1000	1.0000
18 3-Acetyldeoxynivalenol	[M+H] ⁺	4.618	339 > 261	339 > 297		¹³ C Deoxynivalenol	10 - 1000	0.9986
19 ¹³ C HT-2	[M+NH ₄] ⁺	6.844	464 > 278					
20 ¹³ C T2	[M+NH ₄] ⁺	7.228	508 > 322					
21 ¹³ C Aflatoxin B1	[M+H] ⁺	6.754	330 > 301					
22 ¹³ C Aflatoxin B2	[M+H] ⁺	6.614	332 > 303					
23 ¹³ C Aflatoxin G1	[M+H] ⁺	6.435	346 > 212					
24 ¹³ C Aflatoxin G2	[M+H] ⁺	6.219	348 > 259					
25 ¹³ C Ochratoxin A	[M+H] ⁺	7.516	424 > 250					

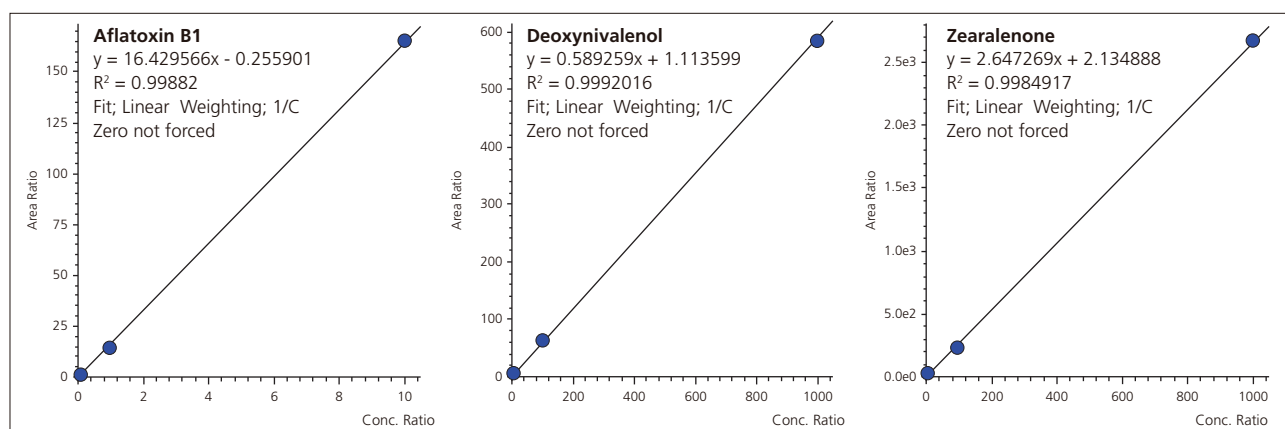


Fig. 2 主要化合物の検量線 - 検量線範囲: aflatoxin (0.1 - 10 µg/kg), deoxynivalenol (10 - 1000 µg/kg), zearalenone (10 - 1000 µg/kg) - Calibration Curves for Selected Compounds.
Calibration Curves for aflatoxin (0.1 - 10 µg/kg), deoxynivalenol (10 - 1000 µg/kg), and zearalenone (10 - 1000 µg/kg).

■まとめ

Conclusions

12.5 分間の分析サイクルで、かび毒 18 成分の一斉分析を行いました。EU における規制値を十分に満たす範囲 (0.1 - 10 µg/kg) で、寄与率 R² 0.998 以上の良好な検量線直線性を確認しました。15- アセチルデオキシニバレノールと、3-アセチルデオキシニバレノールの分離も含めて、対象成分の良好な分離を確認しました。

■参考文献

References

- 1) A. Rahmani, S. Jinap, and F. Soleimany. 2009. Qualitative and Quantitative Analysis of Mycotoxins. Comprehensive reviews in food science and food safety. 8: 202-251.
- 2) M. E. Zain. 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. Journal of Saudi Chemical Society. 15(2): 129-144.
- 3) M. Sameni, A. Dübecke and J. F. Weber. 2014. Simultaneous Multi-Residue Determination of Mycotoxins in Foods Using LC-MS/MS. Journal of Environmental & Analytical Toxicology. 5 (2): 1000259
- 4) J. W. Bennett and M. Klich. 2003. Mycotoxins. Clinical Microbiology Reviews. 16 (3): 497-516
- 5) Mycotoxins regulations for Food.
http://www.mycotoxins.info/myco_info/consum_regu.html
(2016 年 9 月)

株式会社 島津製作所

分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2016年10月

島津コールセンター ☎ 0120-131691
(075)813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制Webの閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。