

5 とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル中のアフラトキシン、ステリグマトシスチン及びゼアラレノンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法の検討

渡辺 ちとせ^{*1}, 林 菜月^{*2,3}

Study of Determination Method of Aflatoxin, Sterigmatocystin and Zearalenone in Corn Dried Distillers Grains with Solubles by LC-MS/MS

WATANABE Chitose^{*1} and HAYASHI Natsuki^{*2,3}

(^{*1} Sendai Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC) (Now National Livestock Breeding Center),

^{*2} Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC,

^{*3} Institute of Food Research, National Agriculture and Food Research Organization)

We have studied a quantitative determination method of the concentration of aflatoxin (AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂), sterigmatocystin (STC), and zearalenone (ZEN) in brans and food processing by-products, and oil seed meal using a liquid-chromatograph electrospray-ionization tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

AFs, STC and ZEN were extracted with acetonitrile-water (21:4), and the extracted solution was centrifuged. The supernatant (10 mL) was transferred to another centrifuge tube, added with magnesium sulfate and sodium chloride, and shaken. Organic layer was purified with two types of columns (Captiva EMR-Lipid, Agilent Technologies, Inc.; CA, US and MultiSep #226 AflaZon+, Romer Labs Division Holding GmbH; Getzersdorf, Austria), and injected into LC-MS/MS to determine the concentration of AFs, STC and ZEN. LC separation was then carried out on an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 1.8 μm, Agilent Technologies Inc.) with a gradient of 0.5 mmol/L ammonium acetate-0.1 % formic acid aqueous solution and 0.5 mmol/L ammonium acetate-0.1 % formic acid methanol solution as a mobile phase. In the MS/MS analysis, the positive mode electrospray ionization (ESI+) was used for AFs and STC, while the negative mode electrospray ionization (ESI-) was used for ZEN.

Corn dried distillers grains with solubles was used as an analytical sample to confirm the concentration of each mycotoxin in the effluent fraction from MultiSep 226 AflaZon+. As a result, good recoveries were obtained with 0-0.5 mL for AFs, and with 0.5 mL or more for STC and ZEN, whereas ionization suppression due to matrix effect was observed for AFG₁. The necessity to reduce the matrix effect was thus suggested.

Key words: aflatoxin; sterigmatocystin; zearalenone; liquid-chromatograph tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); brans and food processing by-product; oil seed meal; corn dried distillers grains with solubles

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター, 現 独立行政法人家畜改良センター

^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

^{*3} 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品研究部門

キーワード：アフラトキシン；ステリグマトシスチン；ゼアラレノン；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；そうこう類；植物性油かす類；とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル

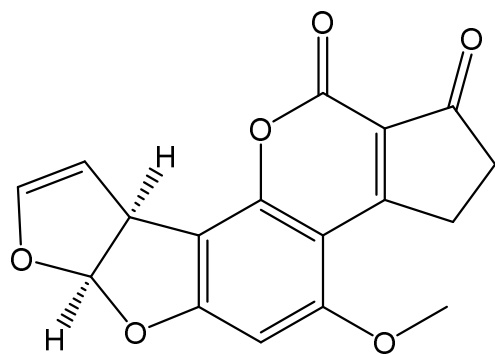
1 緒 言

現在，独立行政法人農林水産消費安全技術センターでは，かび毒のうちアフラトキシン，ステリグマトシスチン及びゼアラレノンの分析は，飼料分析基準¹⁾第5章第3節1の「かび毒の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による一斉分析法」（以下「かび毒一斉法」という．）を中心に実施している．しかし，そうこう類及び植物性油かす類の中にはかび毒一斉法において，飼料分析基準別表3「試験法の妥当性確認法ガイドライン」による真度等の目標値を満たさないものがあることから²⁾，他の分析法により分析を実施している，もしくは分析を実施していない成分がある．そうこう類及び植物性油かす類のかび毒の基準値は設定されていないものの，アフラトキシン及びゼアラレノンは配合飼料等で基準値³⁾が設定されており，ステリグマトシスチンは農林水産省の「サーベイランス・モニタリング中期計画」で調査対象として取り上げられている．従って，そうこう類及び植物性油かす類中のアフラトキシン，ステリグマトシスチン及びゼアラレノンについて，効率的な分析の実施及び分析を実施していない成分への対応のため，新規分析法を確立する必要がある．

そうこう類及び植物性油かす類中のかび毒分析が困難である要因は，それぞれの特異なマトリックスに由来する測定妨害であると考えられる．この問題を解決する方法として，同位体標識された内標準物質を用いる方法があり，飼料中のかび毒分析法にも応用されているが⁴⁾，かび毒一斉法において各分析対象の内標準物質を用いると分析コストの増加に加え，市販されている内標準物質が限定されていることから実用性にも欠ける．また，標準液の溶媒に試料マトリックスを用いるマトリックスマッチング法⁵⁾があるが，そうこう類及び植物性油かす類はかび毒汚染のないブランク試料の入手が困難である．

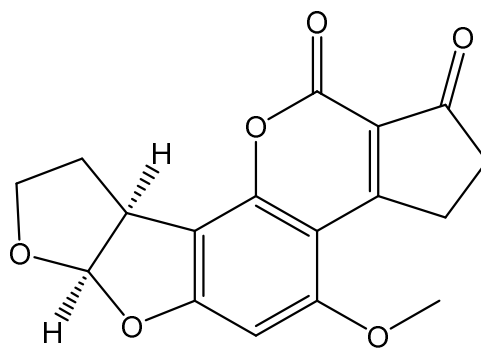
近年，迅速かつ簡便にマトリックスを分離する方法として急速に普及している QuEChERS 法⁶⁾は，かび毒分析にも適用されており，固相抽出法を取り入れた方法も報告されている⁷⁾．そこで，そうこう類及び植物性油かす類中のアフラトキシン，ステリグマトシスチン及びゼアラレノンについて，QuEChERS 法による粗精製後に固相抽出により精製し，液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（以下「LC-MS/MS」という．）により定量する方法を検討したので報告する．なお，検討にはマトリックスが複雑であると考えられるとうもろこしジスチラーズグレインソリュブル（以下「DDGS」という．）を用いた．

参考にあフラトキシン，ステリグマトシスチン及びゼアラレノンの構造式等を Fig. 1 に示した．

Aflatoxin B₁

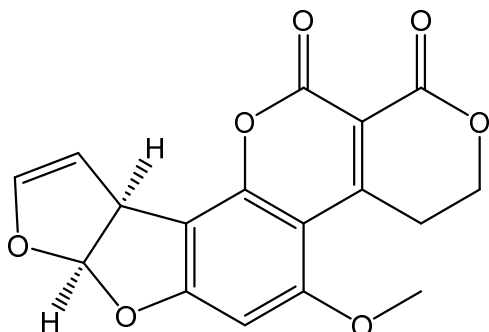
(6*aR*,9*aS*)-2,3,6*a*,9*a*-Tetrahydro-4-methoxycyclopenta[*c*]furo[3',2':4,5]furo[2,3-*h*][1]benzopyran-1,11-dione

C₁₇H₁₂O₆ MW: 312.06 CAS No.: 1162-65-8

Aflatoxin B₂

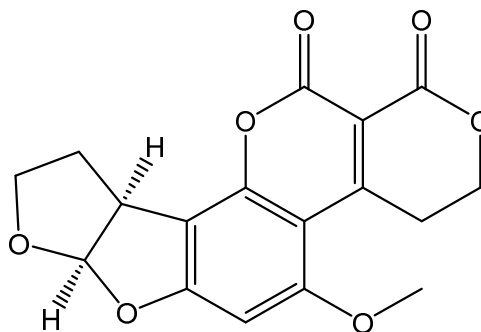
(6*aR*,9*aS*)-2,3,6*a*,8,9,9*a*-hexahydro-4-methoxy-cyclopenta[*c*]furo[3',2':4,5]furo[2,3-*h*][1]benzopyran-1,11-dione

C₁₇H₁₄O₆ MW: 314.08 CAS No.: 7220-81-7

Aflatoxin G₁

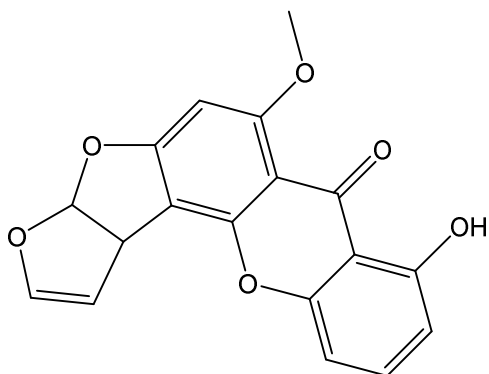
(7*aR*,10*aS*)-3,4,7*a*,10*a*-tetrahydro-5-Methoxy-1*H*, 12*H*-furo[3',2':4,5]furo[2,3-*h*]pyrano[3,4-*c*][1]benzopyran-1,12-dione

C₁₇H₁₂O₇ MW: 328.06 CAS No.: 1165-39-5

Aflatoxin G₂

(7*aR*,10*aS*)-3,4,7*a*,9,10,10*a*-hexahydro-5-Methoxy-1*H*,12*H*-furo[3',2':4,5]furo[2,3-*h*]pyrano[3,4-*c*][1]benzopyran-1,12-dione

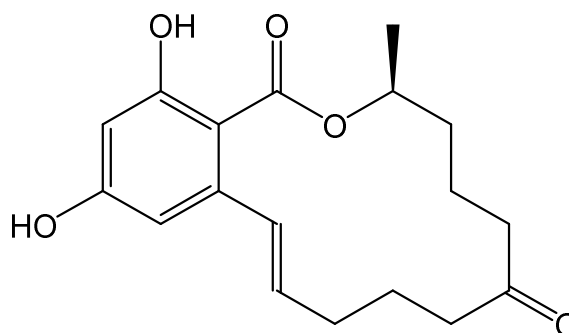
C₁₇H₁₄O₇ MW: 330.07 CAS No.: 7241-98-7



Sterigmatocystin

(3*aR*-*cis*)3*a*,12*c*-dihydro-8-hydroxy-6-methoxy-7*H*-furo[3',2':4,5]furo[2,3-*c*]xanthen-7-one

C₁₈H₁₂O₆ MW: 324.28 CAS No.: 10048-13-2



Zearalenone

(4*S*,12*E*)-15,17-dihydroxy-4-methyl-3-oxabicyclo[12.4.0]octadeca-12,15,17,19-tetraene-2,8-dione

C₁₈H₂₂O₅ MW: 318.36 CAS No.: 17924-92-4

Fig. 1 Chemical structures of aflatoxins, sterigmatocystin and zearalenone

2 実験方法

2.1 試料

DDGS を目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎し、分析用試料とした。

2.2 試薬

- 1) 塩化ナトリウムは試薬特級を用いた。アセトニトリルは LC/MS 用（関東化学製又は富士フィルム和光純薬製）を用いた。ギ酸、酢酸及びメタノールは LC/MS 用（富士フィルム和光純薬製）を用いた。硫酸マグネシウムは鹿特級（関東化学製）を用いた。1 mol/L 酢酸アンモニウムは高速液体クロマトグラフィー用（関東化学製）を用いた。水は Milli-Q Advantage（Merck Millipore 製）により精製した超純水（JIS K0211 の 5218 に定義された超純水）を用いた。
- 2) アフラトキシン標準原液
市販のアフラトキシン（B₁, B₂, G₁, G₂）混合標準液（各アフラトキシン 25 µg/mL, 富士フィルム和光純薬製）をアフラトキシン標準原液とした。
- 3) ステリグマトシスチン標準原液
ステリグマトシスチン標準品（富士フィルム和光純薬製, 純度 98.7 %）2.5 mg を量って 10 mL の全量フラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、更に標線までアセトニトリルを加えてステリグマトシスチン標準原液を調製した（この液 1 mL は、ステリグマトシスチンとして 250 µg を含有）。
- 4) ゼアラレノン標準原液
ゼアラレノン標準品（富士フィルム和光純薬製, 純度 99.7 %）10 mg を量って 50 mL の全量フラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、更に標線までアセトニトリルを加えてゼアラレノン標準原液を調製した（この液 1 mL は、ゼアラレノンとして 200 µg を含有）。
- 5) かび毒混合標準液
各かび毒標準原液の一部を混合し、アセトニトリルで正確に希釈しかび毒混合標準原液を調製した。
使用に際して、かび毒混合標準原液の一部を、アセトニトリル-水-酢酸（20.5+78.5+1）で正確に希釈し、Table 1 に示す濃度範囲の検量線作成用かび毒混合標準液を調製した。

Table 1 Concentration of mycotoxin mixed standard solution

Mycotoxin	Concentration of standard solution (ng/mL)										
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11
Aflatoxin B ₁	0.25	0.5	1	2	3	4	5	10	15	20	25
Aflatoxin B ₂	0.25	0.5	1	2	3	4	5	10	15	20	25
Aflatoxin G ₁	0.25	0.5	1	2	3	4	5	10	15	20	25
Aflatoxin G ₂	0.25	0.5	1	2	3	4	5	10	15	20	25
Sterigmatocystin	0.5	1	2	4	6	8	10	20	30	40	50
Zearalenone	2	4	8	16	24	32	40	80	120	160	200

6) 添加用かび毒混合標準液

各かび毒標準原液をアセトニトリルで正確に希釈し、1 mL あたりアフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ として 6.25 ng, ステリグマトシスチンとして 12.5 ng 及びゼアラレノンとして 50 ng

を含む添加用かび毒混合標準液（以下「添加用混合標準液①」という．），1 mL あたりアフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ として各 2.5 µg, ステリグマトシスチンとして 5 µg 及びゼアラレノンとして 20 µg を含む添加用かび毒混合標準液（以下「添加用混合標準液②」という．）を調製した．また，添加用混合標準液②をアセトニトリルで正確に 10 倍希釈し，添加用混合標準液③を調製した．

2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：ZM 200 Retsch 製（1 mm スクリーン，使用時回転数 14000 rpm）
- 2) 振り混ぜ機：レシプロシェーカーSR-2W タイテック製（使用時振動数 300 rpm）
- 3) 定容用チューブ：Digi TUBEs 15 mL ポリプロピレン SCP Science 製
- 4) 脂質吸着機能付きポリマーカラム（以下，「脂質除去用カラム」という．）：Captiva EMR-Lipid（充てん剤量 600 mg）Agilent Technologies 製
- 5) 多機能カラム：MultiSep 226 AflaZon+ Romer Labs 製
- 6) メンブランフィルター：DISMIC-13HP（孔径 0.45 µm, 直径 13 mm, 親水性 PTFE）東洋濾紙製
- 7) LC-MS/MS：
LC-MS/MS 1：
LC 部：Nexera X2 島津製作所製
MS 部：LCMS-8040 島津製作所製
LC-MS/MS 2：
LC 部：Nexera X2 島津製作所製
MS 部：QTrap 4500 AB Sciex 製

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 25 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ，アセトニトリル-水（21+4）100 mL を加え，60 分間振り混ぜて抽出した．抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ，1700×g で 5 分間遠心分離した．

2) 塩析

上澄み液 10 mL を 15 mL プラスチック遠沈管に正確に入れ，塩化ナトリウム 0.25 g 及び無水硫酸マグネシウム 1 g を加え，直ちに手で振り混ぜた後，ボルテックスミキサーで 1 分間かき混ぜた．1700×g で 5 分間遠心分離し，上澄み液全量を定容用チューブに入れ，酢酸 100 µL を加えた後水で 10 mL に定容し，カラム処理 I に供する試料溶液とした．

3) カラム処理 I

脂質除去用カラムの下に 10 mL のガラス試験管を置き，試料溶液を脂質除去用カラムに入れ，全量流出させ，カラム処理 II に供する試料溶液とした．

4) カラム処理 II

多機能カラムにストップコックを連結し，その下に 10 mL のガラス試験管を置き，多機能カラムに試料溶液を入れてコックを開け，流出液を試験管にとった．流出液の一部を水で正確に希釈し，メンブランフィルターでろ過し，LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした．

5) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各検量線作成用かび毒混合標準液各 5 µL を LC-MS/MS に注入し, 選択反応検出 (以下「SRM」という.) クロマトグラムを得た. 各装置の測定条件を Table 2 及び 3 に示した.

Table 2-1 Operation conditions of LC-MS/MS 1

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d. × 150mm, 1.8 µm), GL Sciences
Mobile phase	0.5 mmol/L ammonium acetate 0.1 % formic acid aqueous solution - 0.5 mmol/L ammonium acetate 0.1 % formic acid methanol solution (4:1) → 8 min → (1:4) 9 min → (0:10) (hold for 5 min) → (4:1) (hold for 5 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Detector	Quadrupole mass spectrometer
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Nebulizer gas	N ₂ (3 L/min)
Drying gas	N ₂ (15 L/min)
Interface temperature	350 °C
Heat block temperature	400 °C
Desolvation line temperature	250 °C
Collision gas	Ar (230 kPa)

Table 2-2 MS/MS parameters of LC-MS/MS 1

Target	Mode	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion		Collision energy (eV)
			Quantifier (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)	
Aflatoxin B ₁	+	313	241	-	41
			-	285	24
Aflatoxin B ₂	+	315	287	-	28
			-	259	31
Aflatoxin G ₁	+	329	243	-	29
			-	200	42
Aflatoxin G ₂	+	331	245	-	31
			-	313	25
Sterigmatocystin	+	325	281	-	39
			-	310	26
Zearalenone	-	317	175	-	25
			-	131	31

Table 3-1 Operation conditions of LC-MS/MS 2

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d. × 150mm, 1.8 μm), GL Sciences
Mobile phase	0.5 mmol/L ammonium acetate 0.1 % formic acid aqueous solution - 0.5 mmol/L ammonium acetate 0.1 % formic acid methanol solution (4:1) → 8 min → (1:4) 9 min → (0:10) (hold for 5 min) → (4:1) (hold for 5 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Detector	Quadrupole mass spectrometer
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Ion source temperature	600 °C
Curtain gas	N ₂ (40 psi)
Cone gas	Air (80 psi)
Turbo gas	Air (80 psi)
Collision gas	N ₂ (8)
Capillary voltage	4500 V

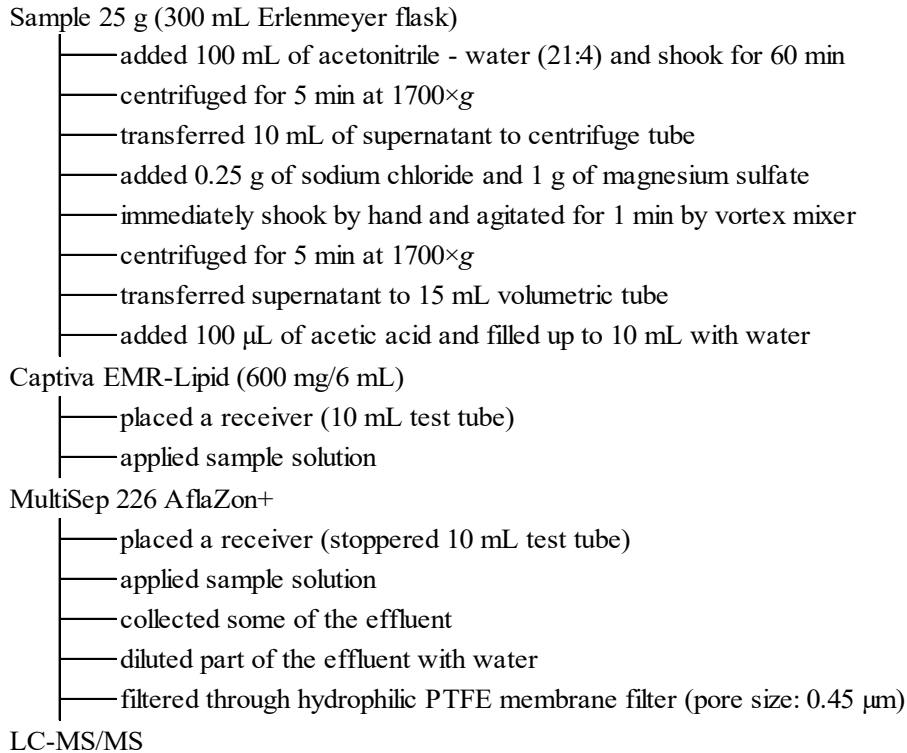
Table 3-2 MS/MS parameters of LC-MS/MS 2

Target	Mode	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion		Collision energy (eV)
			Quantifier (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)	
Aflatoxin B ₁	+	313	241	-	49
			-	285	31
Aflatoxin B ₂	+	315	287	-	35
			-	259	39
Aflatoxin G ₁	+	329	243	-	35
			-	200	51
Aflatoxin G ₂	+	331	189	-	53
			-	313	33
Sterigmatocystin	+	325	310	-	33
			-	281	47
Zearalenone	-	317	175	-	32
			-	131	38

6) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中の各かび毒量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for aflatoxins, sterigmatocystin and zearalenone in corn distillers dried grains with solubles (DDGS)

2.5 脂質除去用カラムからの流出画分の確認

- 1) 添加用混合標準液①を脂質除去用カラムに入れ、流出液を 2 mL ごとに分取した。分取した流出液のうち 200 µL をそれぞれ正確にとり、これらに水 600 µL を正確に加え、メンブランフィルターでろ過し、LC-MS/MS 2 に供する試料溶液とした。得られた試料溶液を 2.4 の 5)及び 6)に従い定量し、回収率を求めた。
- 2) DDGS を 2.4 の 1)に従って抽出、遠心分離し、上澄み液 10 mL を 15 mL プラスチック遠沈管に正確に分取し、添加用混合標準液②25 µL (各アフラトキシンとして 0.025 mg/kg 相当量、ステリグマトシスチンとして 0.05 mg/kg 相当量及びゼアラレノンとして 0.2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中にアフラトキシン B₁、B₂、G₁及び G₂として各 1.56 ng/mL、ステリグマトシスチンとして 3.13 ng/mL、ゼアラレノンとして 12.5 ng/mL 相当量)) を添加した (以下「添加試料溶液」という。)。これとは別に、上澄み液 10 mL を 15 mL プラスチック遠沈管に正確に分取した (以下「無添加試料溶液」という。)。添加試料溶液及び無添加試料溶液について、2.4 の 2)及び 3)に従い操作し、カラム処理 I における流出液を 2 mL ごとに分取した。分取した添加試料溶液の流出液 200 µL をそれぞれ正確にとり、これらに水 600 µL を正確に加え、メンブランフィルターでろ過し、添加回収率を求めるための試料溶液とした。また、分取した無添加試料溶液の流出液 195 µL をそれぞれ正確にとり、添加用混合標準液③5 µL (最終試料溶液中の各かび毒濃度は同上) を添加した後、水 600 µL を正確に加え、メンブランフィルターでろ過し、マトリックス効果を求めるための試料溶液とした。得られた試料溶液を 2.4 の 5)及び 6)に従い LC-MS/MS 2 を用いて定量し、回収率を求めた。

2.6 多機能カラムからの流出画分の確認

DDGS を 2.4 の 1) に従って抽出，遠心分離し，上澄み液 10 mL を 15 mL プラスチック遠沈管に正確に分取し，2.5 の 2) と同様に添加試料溶液及び無添加試料溶液を調製した．添加試料溶液及び無添加試料溶液について，2.4 の 2) から 4) に従い操作し，カラム処理 II における流出液を 0.5 mL ごとに分取した．分取した添加試料溶液の流出液 300 μ L をそれぞれ正確にとり，水 900 μ L を正確に加え，メンブランフィルターでろ過し，添加回収率を求めるための試料溶液とした．また，無添加試料溶液の流出液 195 μ L をそれぞれ正確にとり，添加用かび毒混合標準液③ 5 μ L（最終試料溶液中の各かび毒濃度は同上）を添加した後，水 600 μ L を正確に加え，メンブランフィルターでろ過し，マトリックス効果を求めるための試料溶液とした．得られた試料溶液を 2.4 の 5) 及び 6) に従い LC-MS/MS 2 を用いて定量し，回収率を求めた．

3 結果及び考察

3.1 検量線

2.2 の 5) により調製した各かび毒混合標準液各 5 μ L を LC-MS/MS 2 に注入し，得られた SRM クロマトグラムからピーク面積及び高さを用いて検量線を作成した．

得られた検量線の一例は Fig. 2 のとおりであり，アフラトキシン B₁，B₂，G₁ 及び G₂ はそれぞれ 0.25~25 ng/mL（注入量として 0.00125~0.125 ng 相当量）の範囲で，ステリグマトシスチンは 0.5~50 ng/mL（同 0.0025~0.25 ng 相当量）の範囲で，ゼアラレノン は 2~200 ng/mL（同 0.01~1 ng 相当量）の範囲で直線性を示した．

なお，当該検量線の濃度範囲は，アフラトキシン B₁，B₂，G₁ 及び G₂ をそれぞれ 0.004~0.4 mg/kg，ステリグマトシスチンを 0.008~0.8 mg/kg，ゼアラレノンを 0.032~3.2 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の各かび毒濃度範囲に相当する．

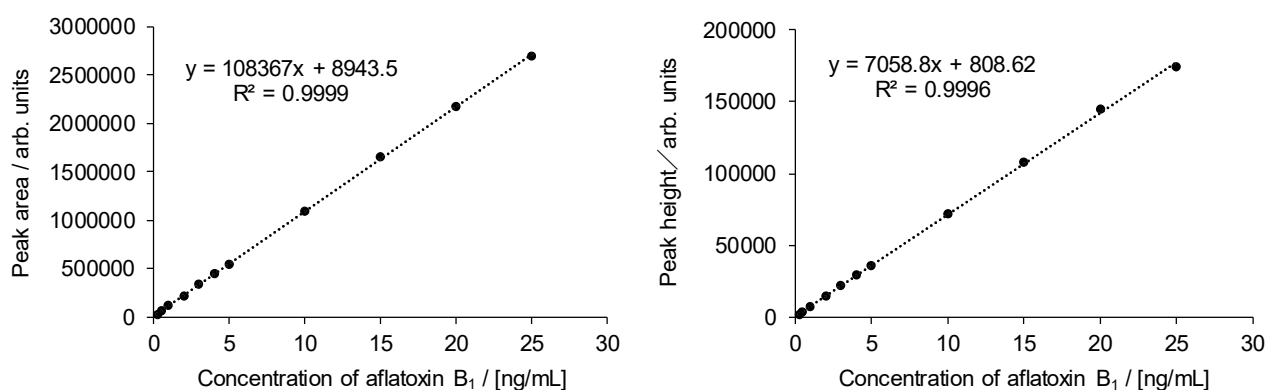


Fig. 2-1 Calibration curves of aflatoxin B₁ by peak area (left) and peak height (right)

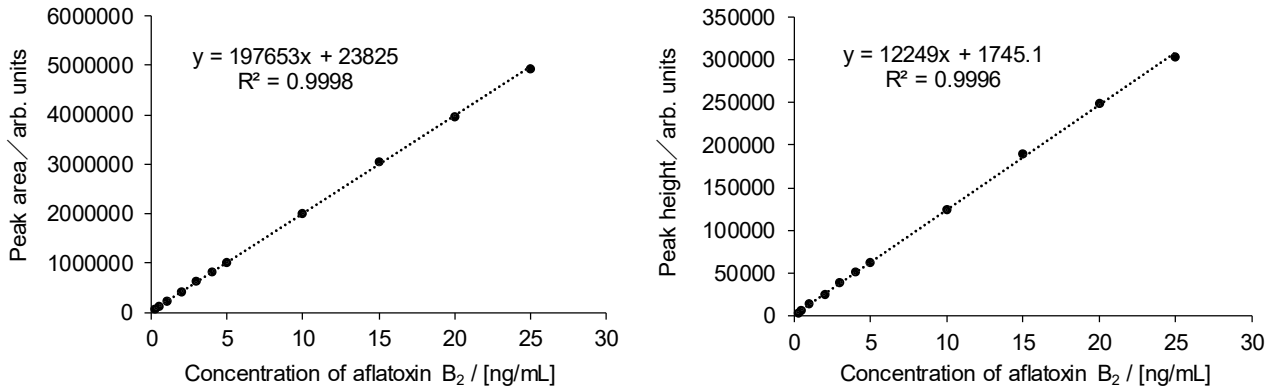


Fig. 2-2 Calibration curves of aflatoxin B₂ by peak area (left) and peak height (right)

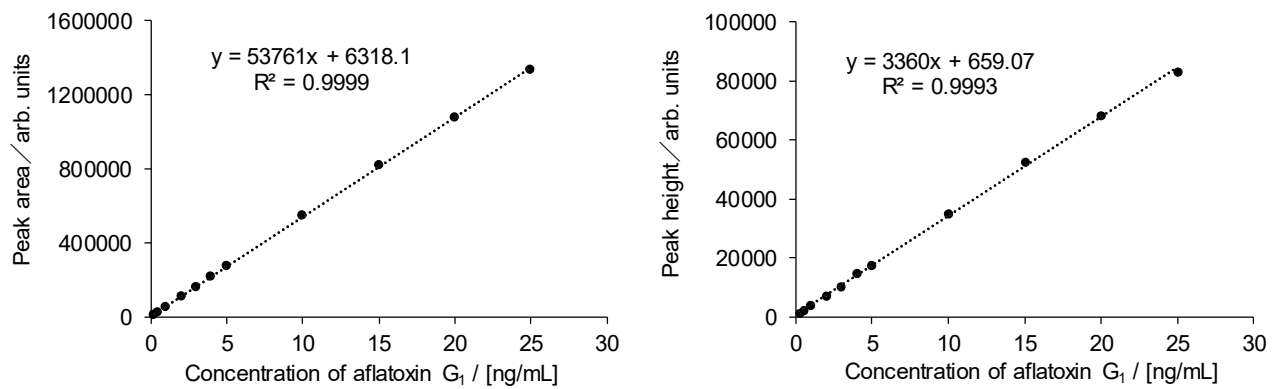


Fig. 2-3 Calibration curves of aflatoxin G₁ by peak area (left) and peak height (right)

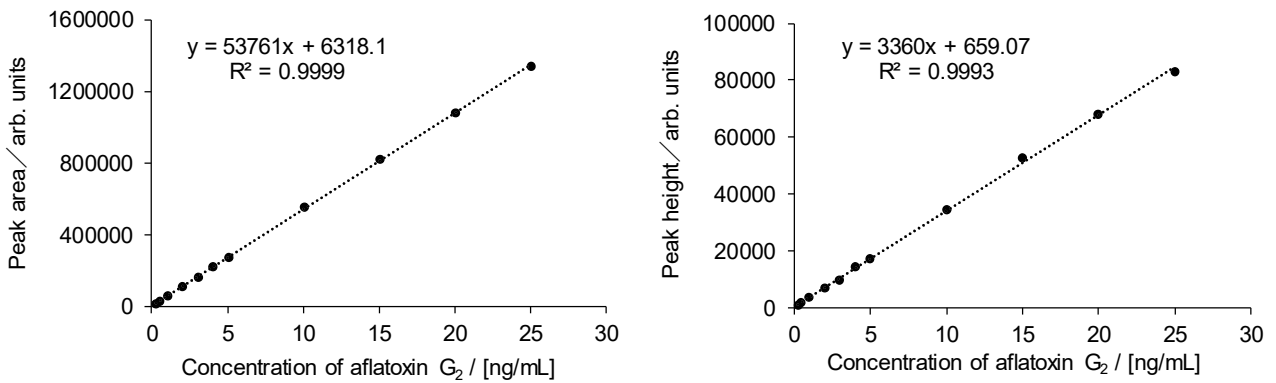


Fig. 2-4 Calibration curves of aflatoxin G₂ by peak area (left) and peak height (right)

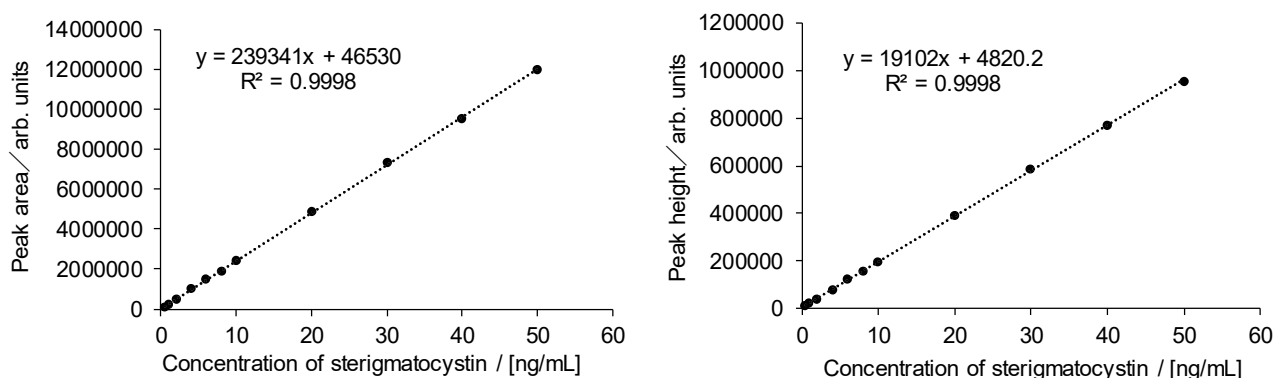


Fig. 2-5 Calibration curves of sterigmatocystin by peak area (left) and peak height (right)

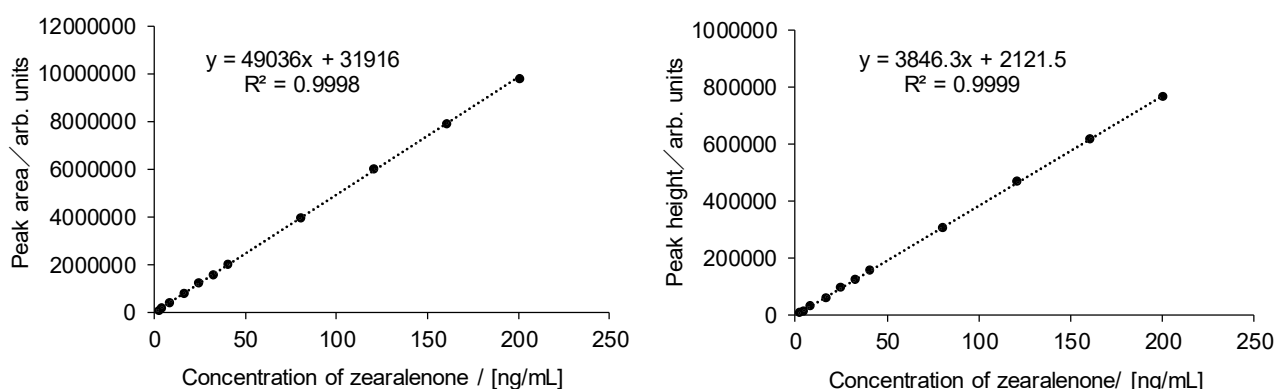


Fig. 2-6 Calibration curves of zearalenone by peak area (left) and peak height (right)

3.2 脂質除去用カラムからの流出画分の確認

2.5 の 1)により脂質除去用カラムからの流出画分を確認した。その結果は Table 4 のとおり、各かび毒の混合標準液を脂質除去用カラムに入れ、流出させた場合、各かび毒は 91.5%以上流出した。また、マトリックスの有無が各かび毒の流出に及ぼす影響を確認するため、2.5 の 2)により流出画分を確認した。なお、脂質除去用カラムのみでは精製が不十分であると考えられたため、同時にマトリックス効果を求めるための試料溶液を測定し、得られた流出画分の各かび毒の回収率をこれで除すことでマトリックス効果を補正した。その結果は Table 5 のとおり、各かび毒の流出液の回収率は 80.5%以上であり、マトリックスを含む場合、脂質除去カラムからの各かび毒の回収率が低下する傾向が見られた。

Table 4 Elution pattern of aflatoxins, sterigmatocystin and zearalenone from Captiva EMR-Lipid (standard solution)

Fraction (mL)	Mycotoxins					
	Aflatoxin B ₁	Aflatoxin B ₂	Aflatoxin G ₁	Aflatoxin G ₂	Sterigmatocystin	Zearalenone
0-2	95.1	97.9	97.3	103	95.4	99.1
2-4	97.3	95.9	97.9	102	97.7	97.7
4-6	91.5	100	99.8	99.4	96.2	97.0
6-8	94.4	100	97.4	101	95.8	98.1
8-10	94.8	99.5	98.7	105	99.1	98.8

$n = 1$

Table 5 Elution pattern of aflatoxins, sterigmatocystin and zearalenone from Captiva EMR-Lipid (matrix spike)

	Fraction (mL)	Mycotoxins					
		Aflatoxin B ₁	Aflatoxin B ₂	Aflatoxin G ₁	Aflatoxin G ₂	Sterigmatocystin	Zearalenone
Matrix effect ^{a)} (%)	0-2	73.5	59.8	71.0	88.3	98.6	88.2
	2-4	69.6	55.8	79.6	91.1	89.3	84.6
	4-6	72.6	58.3	77.2	91.8	87.8	83.4
	6-8	67.5	57.0	77.2	87.6	87.0	85.8
	8-10	71.2	56.3	78.5	88.2	85.9	85.0
Recovery (%)	0-2	59.7	50.7	69.9	77.9	79.4	77.3
	2-4	62.2	51.8	66.3	77.4	75.0	73.0
	4-6	59.9	49.0	64.0	78.7	72.4	71.7
	6-8	57.1	48.4	64.8	74.8	72.9	71.5
	8-10	58.0	48.9	64.2	80.6	72.2	74.8
Corrected recovery ^{b)} (%)	0-2	81.2	84.7	98.5	88.3	80.5	87.7
	2-4	89.4	92.8	83.3	85.0	83.9	86.2
	4-6	82.5	84.1	83.0	85.7	82.4	85.9
	6-8	84.6	85.0	83.9	85.3	83.8	83.3
	8-10	81.4	86.8	81.8	91.4	84.0	88.0

$n = 1$

a) Ratio of peak area of mycotoxins in the presence of matrix to that in the absence of matrix

b) $100 \times \text{recovery} / \text{matrix effect}$

3.3 多機能カラムからの流出画分の確認

2.6により多機能カラムからの流出画分の確認を実施した。その結果はTable 6のとおり、各アフラトキシンは0~0.5 mLの画分で91.4%以上、ステリグマトシスチン及びゼアラレノンは0.5 mL以降の範囲で86.1%以上の流出を認めた。

また、アフラトキシン B₁, B₂及びG₂は0~0.5 mLの範囲でマトリックス効果が80.6%以上だったが、アフラトキシン G₁はすべての流出画分で80%を下回り、マトリックス効果を低減するための検討が必要と示唆された。なお、ステリグマトシスチン及びゼアラレノンは、試料マトリックスの影響をほぼ受けずに測定が可能であった。

Table 6 Elution pattern of aflatoxins, sterigmatocystin and zearalenone from MultiSep 226 AflaZon+

Fraction (mL)	Mycotoxins						
	Aflatoxin B ₁	Aflatoxin B ₂	Aflatoxin G ₁	Aflatoxin G ₂	Sterigmatocystin	Zearalenone	
0-0.5	83.2	86.8	79.4	80.6	97.5	94.1	
0.5-1	69.8	59.8	68.5	85.6	98.6	91.6	
1-1.5	54.7	41.3	55.4	67.1	80.5	73.1	
1.5-2	67.4	53.0	66.9	88.0	100	95.0	
Matrix effect ^{a)} (%)	2-2.5	66.2	52.5	66.8	83.8	103	94.2
	2.5-3	66.2	53.8	65.7	87.0	101	94.4
	3-3.5	65.0	55.9	66.7	82.4	103	99.7
	3.5-4	57.2	52.2	62.1	79.2	103	94.8
	4-4.5	57.7	52.4	63.6	75.9	101	99.2
	4.5-5	55.8	50.9	60.3	73.3	99.2	95.9
	0-0.5	93.1	94.2	91.4	94.4	67.0	49.4
0.5-1	67.8	55.0	60.9	80.6	86.1	98.7	
1-1.5	62.3	47.9	58.0	77.6	91.6	100	
1.5-2	58.3	49.5	60.7	77.7	94.6	96.3	
Recovery (%)	2-2.5	57.7	49.9	60.2	78.2	92.9	93.3
	2.5-3	57.7	48.7	60.4	77.4	94.5	91.0
	3-3.5	56.0	50.3	58.7	76.1	93.3	91.2
	3.5-4	50.7	45.6	55.4	70.5	92.5	92.3
	4-4.5	50.0	43.1	51.4	65.9	88.3	91.6
	4.5-5	48.7	44.0	50.9	61.2	88.0	91.1

$n = 1$

a) Ratio of peak area of mycotoxins in the presence of matrix to that in the absence of matrix

3.4 妨害物質の検討

DDGS 1 検体を用い、本法により調製した試料溶液を LC-MS/MS 1 に注入し、得られた SRM クロマトグラムを確認したところ、アフラトキシン B₂, G₁, G₂ 及びステリグマトシスチンについては定量を妨げるピークは認められなかったが、アフラトキシン B₁ 及びゼアラレノンについては、試料において標準液と同じ保持時間にピークが認められた。これらのピークについて、定量イオンと確認イオンの比を確認したところ、標準液と同等であったことから、アフラトキシン B₁ 及びゼアラレノンであると判断した。

なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

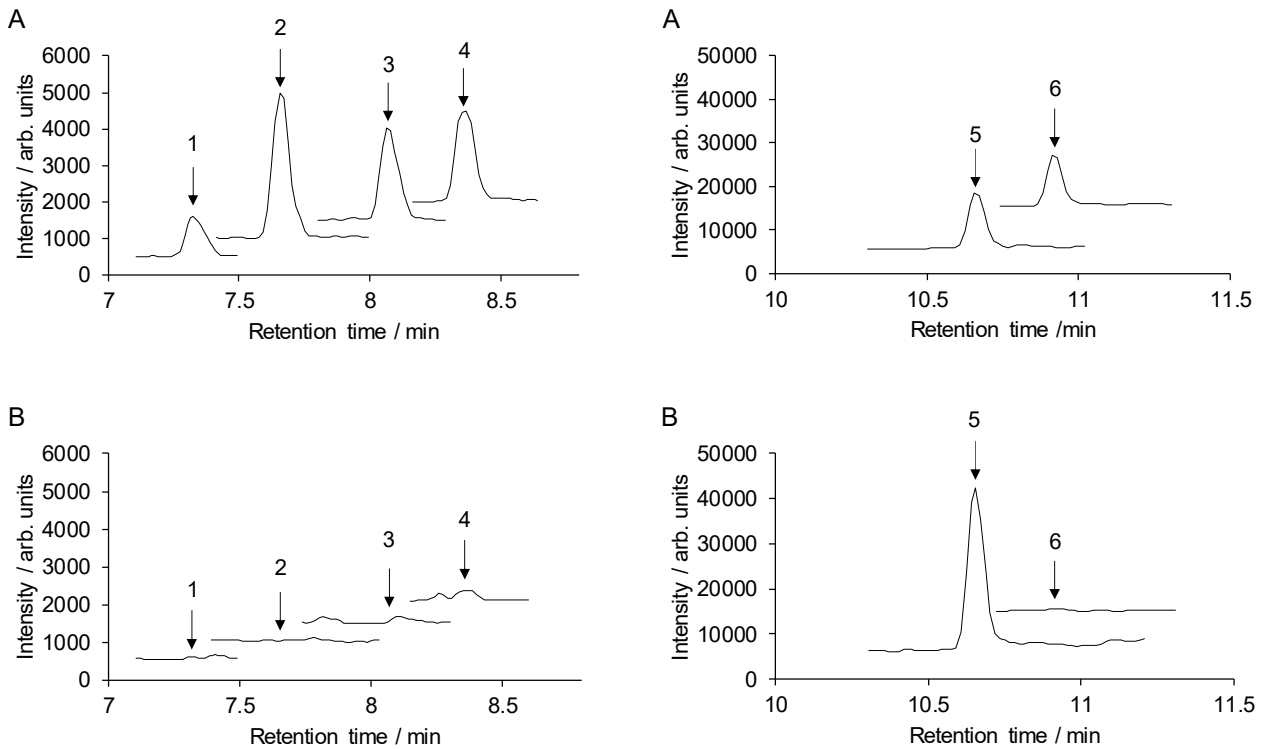


Fig. 3 Typical selected reaction monitoring chromatograms of aflatoxins, sterigmatocystin and zearalenone in standard and blank sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 3 and 4. Arrows indicate the retention times of 1: aflatoxin G₂, 2: aflatoxin G₁, 3: aflatoxin B₂, 4: aflatoxin B₁, 5: zearalenone and 6: sterigmatocystin. The baselines were shifted for display.)

A: Standard solution (aflatoxins: 0.25 ng/mL each, sterigmatocystin: 0.5 ng/mL, zearalenone: 2.0 ng/mL),

B: Sample solution of DDGS

4 まとめ

DDGS 中のアフラトキシン、ステリグマトシスチン及びゼアラレノンについて、QuEChERS 法による粗精製後に固相抽出により精製し、LC-MS/MS により定量する方法を検討したところ、以下の結果が得られた。

- 1) 検量線について、アフラトキシン (B₁, B₂, G₁ 及び G₂) は各 0.25~25 ng/mL (注入量として 0.00125~0.125 ng 相当量) , ステリグマトシスチンは 0.5~50 ng/mL (同 0.0025~0.25 ng 相当量) , ゼアラレノンは 2~200 ng/mL (同 0.01~1 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。なお、当該検量線の濃度範囲は、アフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ を各 0.004~0.4 mg/kg, ステリグマトシスチンを 0.008~0.8 mg/kg, ゼアラレノンを 0.032~3.2 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の濃度範囲に相当する。
- 2) 脂質除去用カラムからの流出画分の確認をした結果、マトリックスを含む場合、脂質除去カラムからの各かび毒の回収率は低下する傾向が見られた。

- 3) 多機能カラムの流出画分を確認した結果、アフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ の回収率は 0~0.5mL の画分で、ステリグマトシスチン及びゼアラレノン は 0.5 mL 以降の画分で十分に流出した。
- 4) DDGS のマトリックス効果を確認した結果、アフラトキシン G₁ は多機能カラムの全ての流出画分においてマトリックスによる影響が認められ、マトリックス効果を低減するための検討が必要と示唆された。
- 5) DDGS について、本法に従って得られたクロマトグラムには各かび毒の定量を妨げるピークは認められなかった。

謝 辞

本研究に協力していただいた国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品研究部門及び基盤技術研究本部高度分析研究センターにおける関係者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 2) 鈴木 知華，名塚 英一，加藤 耕一，青山 幸二：かび毒の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による一斉分析法の植物性油かす類に対する妥当性確認，飼料研究報告，41，118-121 (2016).
- 3) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 4) Jackson LC, Kudupoje MB, Yiannikouris A: Simultaneous multiple mycotoxin quantification in feed samples using three isotopically labeled internal standards applied for isotopic dilution and data normalization through ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 26, 2697–2713 (2012).
- 5) Dzuman Z, Zachariasovan M, Lacina O, Veprikova Z, Slavikova P, Hajslova J: A rugged high-throughput analytical approach for the determination and quantification of multiple mycotoxins in complex feed matrices, *Talanta*, 121, 263-272 (2014).
- 6) Anastassiades M, Lehotay S J: Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce, *J. AOAC Int.*, 86 (2), 412-431 (2003).
- 7) 田村 昌義，中川 博之，宇山 敦生，望月 直樹：ペンタフルオロフェニルカラムを用いたトリコテセン系カビ毒の LC-MS/MS 高感度一斉分析法，食品衛生学雑誌，55 (1)，19-24 (2014).