



Agilent 6410 によるフモニシン類の 高感度一斉分析



要旨 > *F. verticillioides* (*F. moniliforme*) および *F. proliferatum* が産生するかび毒の一種であるフモニシン B1、フモニシン B2 及びフモニシン B3 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 ESI 法、移動相にぎ酸を使用することで全フモニシン類の分離が可能で、1ng/g 以下の測定が可能でした。また、配合飼料中においても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: フモニシン B1,B2,B3(FB1,FB2,FB3)、かび毒、LC-MS/MS、MRM

1. はじめに

フモニシンは *F. verticillioides* (*F. moniliforme*) および *F. proliferatum* が産生するかび毒であり穀類、特にトウモロコシを汚染します。従って家畜飼料のフモニシン汚染例は多く、ウマの白質脳症の原因物質と発見されたかび毒です。毒性はほとんどの家畜に対して肝機能障害、心機能障害、さらには発ガン性も疑われています。国内では飼料に対して基準値が設定されていますが、食品に対する基準値はありません。しかし基準値が設定されている国も多く、今後注意が必要なかび毒です。

従来使用されている蛍光検出器を用いた HPLC 法は選択性の高い高感度分析法ですが、違反例が出た場合の確認法としては不十分です。そこで三連四重極型質量分析計である Agilent 6410 LC-MS を用いた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、移動相にはアセトニトリル及び 0.1%ぎ酸を用い、グラジエント溶出で分離の最適化を行いました。MS 条件はイオン源に ESI を用いた正イオンモードで測定しました。試料には配合飼料を用いましたが、前処理は飼料分析基準に準じて行いました。

3. 結果および考察

図.1 に各フモニシンの Q3 の Scan による質量スペクトル及び Q3 の Scan でベースピークとして観察されたプロトン化分子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による MS/MS スペクトルを示しました。その結果、コンリジョンエネルギーを 35V に設定することで多くのプロダクトイオンが観察され、フモニシン B1 は m/z=352、フモニシン B2, B3 は b/z=336 をプロダクトイオンに設定しました。

表.1 フモニシン類の LC-MS/MS による分析条件

| | |
|------------------|--|
| LC | : 1200LC |
| Column | : ZORBAX Extend C18(100mm,2.1mm,1.8 μm) |
| Mobile phase | : A: 0.1%HCOOH, B: ACN 20%B--(20min)--100%B |
| Column temp | : 40°C |
| Sample volume | : 5μL |
| Flow rate | : 0.2mL/min |
| MS | : Agilent 6410 LC-MS |
| Ionization | : ESI(Positive) |
| Collision energy | : 40V |
| Scan range | : m/z 100-800 |
| Drying gas | : 10L/min at 350C |
| Nebulizer gas | : 345kPa |
| Fragmentor | : 100V |

| No | Name | Precursor ion | Product ion | Collision energy |
|----|--------------|---------------|-------------|------------------|
| 1 | Fumonisin B1 | 722.5 | 352 | 35 |
| 2 | Fumonisin B3 | 706.5 | 336 | 35 |
| 3 | Fumonisin B2 | 706.5 | 336 | 35 |

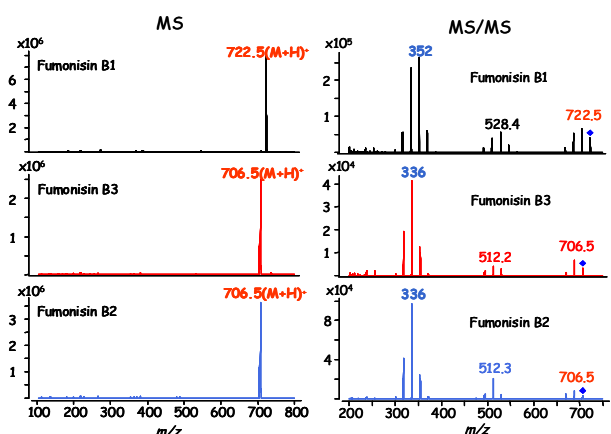


図.1 フモニシン類の質量スペクトル

標準溶液での結果は各フモニシンの MRM クロマトグラム及び検量線は図.2, 3 に示しましたが、このクロマトグラムから 1ng/mL 以下での検出が可能です。また直線性についても r² は 0.998 以上で良好な結果でした。



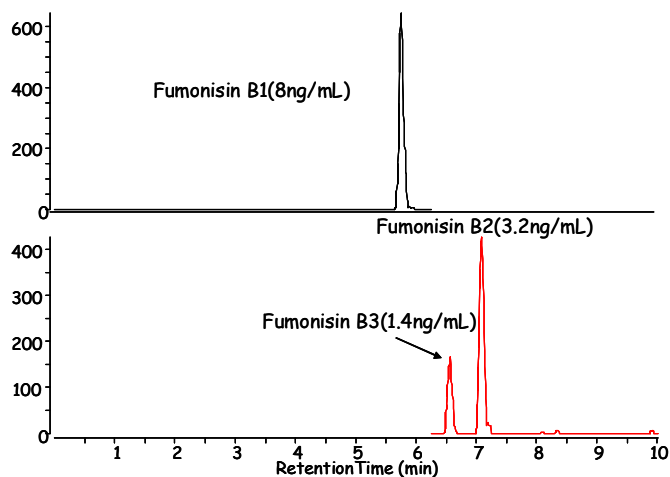


図.2 各フモニシン標準液のMRM クロマトグラム

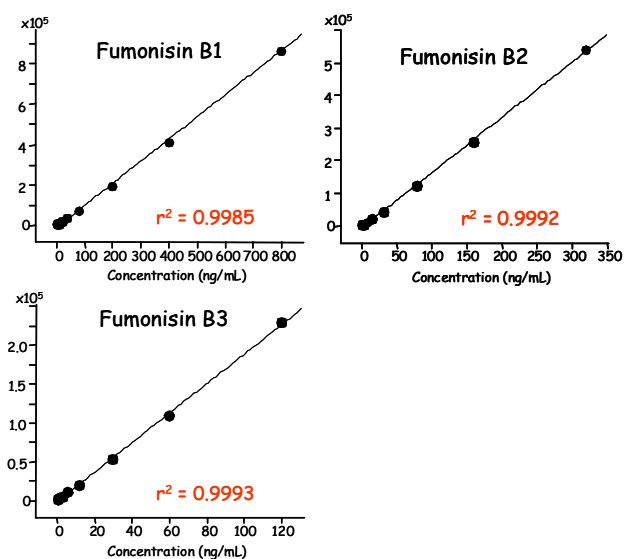


図.3 各フモニシンの検量線

実試料に関しては配合飼料を飼料分析基準に準じて前処理を行った抽出液を測定しフモニシン類の有無を確認しました。その結果、今回測定した配合飼料中フモニシン類は検出されませんでした。そこで、この抽出液に飼料濃度として 40, 6, 16ng/g となる様に標準液を添加し測定を行いました。結果のMRM クロマトグラムは図.4 に示しましたが、同一試料を n=5 で測定した結果です。このクロマトグラム中配合飼料由来のピークは全く観察されず、MRM 法の高い選択性が実証できました。また各フモニシンの定量結果は表.2 に示しましたが、各フモニシンに定量値は平均で 42, 6.1, 15.6ng/g と添加量に対して 105, 102 及び 97% と良好な結果でした。従って顕著なマトリックス効果も観察されず、標準溶液での検量線による定量が可能であることが確認できました。また再現性に関しては相対標準偏差で 2.4, 7.5 及び 6, 2% と全て 10% 以下でした。

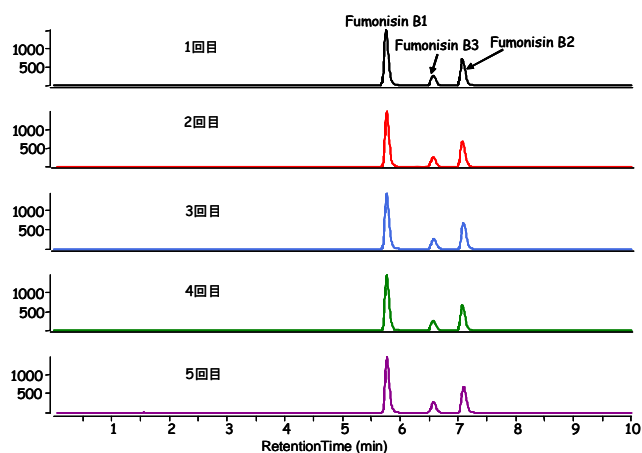


図.4 配合飼料抽出液中各フモニシンの繰り返し再現性の積算 MRM クロマトグラム (n=5)

表.2 配合飼料中フモニシン類の定量結果 (ng/g)

| | フモニシンB1 | フモニシンB3 | フモニシンB2 |
|--------|---------|---------|---------|
| 1回目 | 42.3 | 5.9 | 15.2 |
| 2回目 | 41.2 | 6.3 | 17.1 |
| 3回目 | 40.5 | 5.4 | 16.3 |
| 4回目 | 42.8 | 6.2 | 15.2 |
| 5回目 | 43.2 | 6.8 | 14.3 |
| 平均 | 42.0 | 6.1 | 15.6 |
| 標準偏差 | 1.006 | 0.462 | 0.974 |
| 相対標準偏差 | 2.40 | 7.55 | 6.24 |

4. まとめ

今回、LC-MS/MS を用いたフザリウム属マイコトキシンであるフモニシン B1, B2 及び B3 の一斉分析法を紹介しましたが、MRM 法を使用することで 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あり MRM 法の高い選択性が実証できました。

【LCMS-200804TK-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