

Agilent 6410 によるアフラトキシンの一斉分析法



＜要旨＞米、もち米中アフラトキシシン G2、アフラトキシシン G1、アフラトキシシン B2 及びアフラトキシシン B1 の一斉分析に多機能カラム及び LC-MS/MS 法を用いた高感度分析法を検討しました。その結果、イオン化に ESI 法を使用することで全アフラトキシシン類で 0.1ng/mL での測定が可能でした。また米及びもち米において多機能カラムを使用することで試料マトリックスによる妨害ピークの影響や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米、もち米中アフラトキシシン類の一斉分析が可能でした。

Key Words: 事故米、アフラトキシシン類、カビ毒、米、もち米、LC-MS/MS、ESI

1. はじめに

最近、問題となっている事故米は農薬であるメタミドホス、アセタミプリドだけでなく発がん性を有するアフラトキシシン B1 にも汚染された米です。このアフラトキシシン B1 は *Aspergillus flavus* や *A. parasiticus* などの真菌が産生するカビ毒の一種でアフラトキシシン B1 以外にアフラトキシシン G2、アフラトキシシン G1 及びアフラトキシシン B2 が良く知られています。わが国では輸入されるピーナッツ、ピスタチオなどのナッツ類やナツメグやコショウなどの香辛料からしばしば検出され、アフラトキシシン B1 に対して HPLC-蛍光検出器 (LC-FLD) を用いた試験法が指定され 10ng/g を基準に測定されています。この方法ではアフラトキシシン B1 は直接蛍光検出器で測定できないため、TFA で誘導体化が必要です。今回は米及びもち米中 4 種アフラトキシシン類の分析に LC-MS/MS を使用した高感度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 に示した通りですが、プリカーサーイオンには全てプロトン化分子 (M+H)⁺ を選択しました。

試料には米及びもち米を用いましたが、試料前処理は厚生労働省の通知試験法に準じて図. 1 に示した通り実施し、精製カラムには多機能カラムとして昭和電工製 Autoprep MF-A 1000 を使用しました。この前処理で最終抽出液中試料量は 0.5g/mL です。

表. 1 アフラトキシシン類の LC-MS/MS 条件

LC	: 1200LC			
Column	: ZORBAX Extend C18(100mm, 2.1mm, 1.8 μm)			
Mobile phase	: A: MeOH, B: 10mM CH ₃ COONH ₄ , 35%B			
Column temp	: 40°C			
Sample volume	: 5μL			
Flow rate	: 0.2mL/min			
MS	: Agilent 6410 Triple quadrupole LC/MS			
Ionization	: ESI (Positive)			
Collision energy	: 40V			
Scan range	: m/z 100-500			
Drying gas	: 10L/min at 350°C			
Nebulizer gas	: 345kPa			
Fragmentor	: 100V			

No	Mycotoxins	Precursor	Product	CE(V)	R.time
1	AFG2	331	245	30	3.61
2	AFG1	329	243	25	4.07
3	AFB2	315	259	30	4.79
4	AFB1	313	241	40	5.55

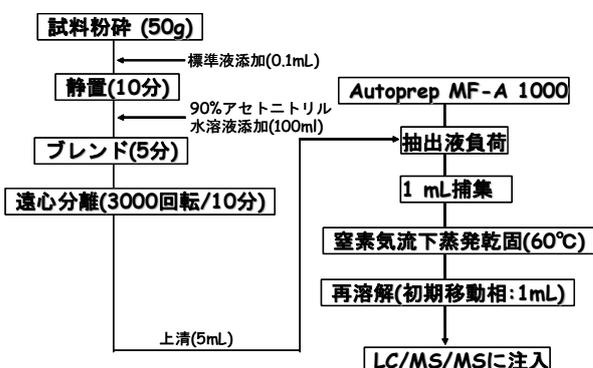


図. 1 試料前処理条件

3. 結果および考察

対象とした 4 種のアフラトキシシン類の標準液での MRM クロマトグラムは図. 2 に示しました。今回の測定では各アフラトキシシンを直接 LC-MS/MS で測定し



たことから溶出順は誘導体化-LC-FLD 法と異なりアフラトキシン G2、G1、B2 及び B1 となります。検出感度は 0.1ng/mL で S/N>10 で測定可能でした。直線性に関しては図.3 に各アフラトキシンの検量線を示しましたが、100-0.1ng/mL の範囲で決定係数 (r^2) は全て 0.999 以上でした。

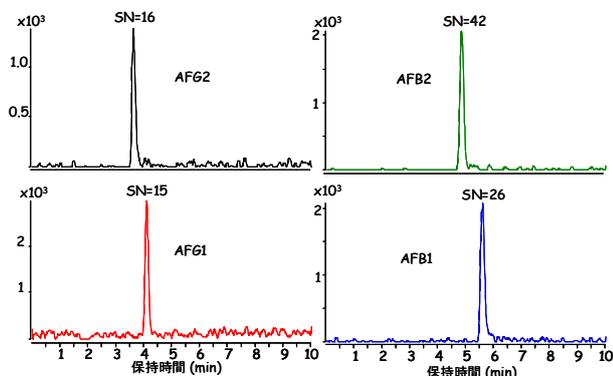


図.2 アフラトキシン標準液のMRMクロマトグラム
濃度:0.1ng/mL

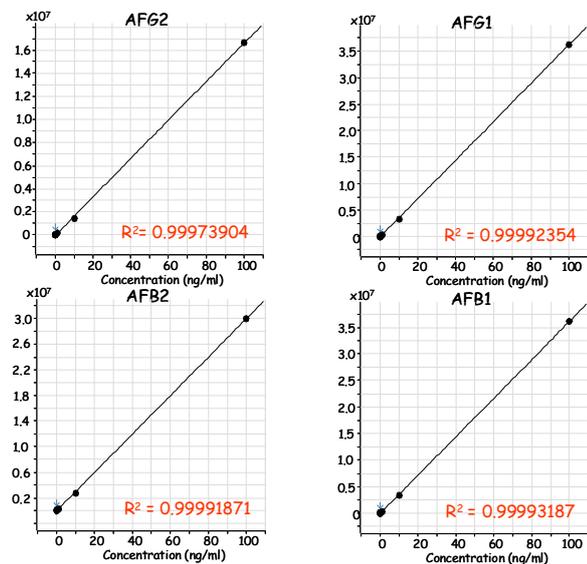


図.3 各アフラトキシンの検量線

米及びもち米中アフラトキシン類の測定例として 0.25g/mL 相当のアフラトキシン類を添加した米及びもち米を図.1 に示した方法で処理した試料の結果を図.4 に示しました。この結果から米、もち米共に試料マトリックス由来のピークは全く観察されませんでした。さらに、各アフラトキシンの図.3 に示した標準液での検量線による回収率は表.2 に示しましたが全て 88~108%と良好な結果でした。この結果から試料マトリックスによるイオン化阻害もなかったと考えられます。

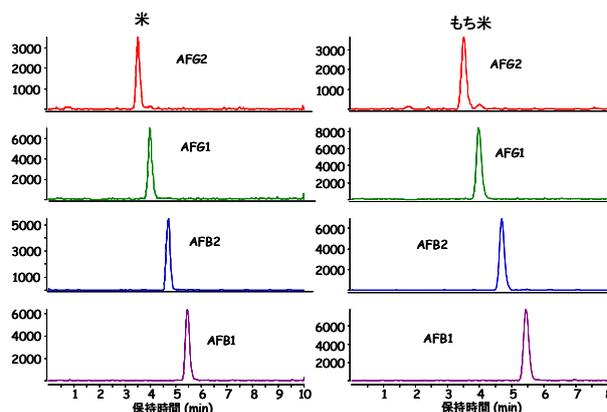


図.4 米、もち米中各アフラトキシンのMRMクロマトグラム(濃度:0.25ng/g)

表.2 米、もち米中各アフラトキシンの定量値及び回収率

試料	アフラトキシンG2		アフラトキシンG1		アフラトキシンB2		アフラトキシンB1	
	定量結果	回収率	定量結果	回収率	定量結果	回収率	定量結果	回収率
0.25ng/mL添加米	0.23	92	0.26	104	0.23	92	0.24	96
0.25ng/mL添加もち米	0.24	96	0.23	92	0.22	88	0.27	108

4. まとめ

今回、米及びもち米中4種アフラトキシン類の分析に多機能カラムを使用した通知試験法及びLC-MS/MS法を使用することで0.1ng/g以下の測定が可能でした。また、イオン源にESIを使用しましたが米、もち米中で試料マトリックスによるイオン化阻害は認められませんでした。従ってマトリックス検量線を使用せずに定量が可能でした。

【LCMS-200810TK-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