

パススルー SPE および UPLC-MS/MS を用いたシリアル、ナッツ、イチジク、および動物飼料中の規制対象および新規マイコトキシンの測定

Nicola Dreolin, Sara Stead, Simon Hird, Timothy Jenkins

Waters Corporation

要約

マイコトキシンは、収穫前および収穫後の汚染メカニズムを介してさまざまな食品中に自然に生成される可能性があり、世界中で規制されています。ここでは、シリアルベースの製品、ピーナッツ、木の実、乾燥イチジクおよび動物用飼料の LC-MS/MS 分析の前に、迅速かつ簡単なパススルー SPE クリーンアップを使用した 31 種の規制対象および新規マイコトキシンのマルチトキシン分析法について説明します。

この分析法は、回収率を最大化し、より使いやすいように開発されました。分析法の性能は、スパイク添加したサンプルを使用してバリデーションし、適宜標準物質を使用して検証しています。

この分析法は、真度および再現性の点で非常に良好な性能を実現し、分析法の LOQ は、アフラトキシンについて 0.25 µg/kg、オクラトキシン A について 1.0 µg/kg と低い値を示しています。

Oasis PRiME HLB SPE クリーンアップは、シンプルで迅速なパススループロトコルを含み、SPE のコンディショニング、平衡化、および洗浄のステップが不要になるため、特に有用です。回収率はすべての分析種について優れており（60～108% の範囲）、クリーンアッププロトコルの適用範囲が広いことを証明しています。これにより、必要に応じて分析法をより広範囲の化合物に拡張できるため、この点は重要になります。

アプリケーションのメリット

- 複雑で多様なマトリックスに用いることができる単一のマルチマイコトキシン分析法
- パススルー SPE クリーンアップによる主要な共抽出物の除去

- 試験したすべてのマイコトキシンについて規制要件を満たす優れた分析法性能
- より多くの分析種とさまざまな食品・飼料マトリックスに分析法をスケールアップできる可能性あり

はじめに

マイコトキシンは、ヒトや動物に有毒な真菌由来の二次代謝産物であり、多種多様な食品・飼料に含まれている可能性があります。最も一般的なマイコトキシンは、毒性、出現率、消費データ、並びに経済的・政治的な考慮事項を検討して徹底したリスク評価を行った後、世界の多くの国で規制対象とされています。規制には通常、さまざまな食品・飼料における指定値（最大許容レベルまたはガイダンス値のいずれか）が含まれています。マイコトキシンに適用される規制レベルおよび標準は、世界の地域ごとに異なります¹。マイコトキシンは毒性が強いため、食品中のマイコトキシンの最大許容レベルは非常に低い値となります。さらに、法規制の枠組みが年々変更されることが予想されており、最大レベルが更新されるとともに、デオキシニバレノールの修飾型、エンニアチン類、アルテルナリア毒素類など、より多くの新規マイコトキシンが今後の法規制に含められると予想されます。

この研究では、3種類の食品（シリアル、ナッツ、イチジク）および動物用飼料中の31種の規制対象および新規マイコトキシンの、シンプルで迅速なサンプル前処理プロトコルおよびLC-MS/MS分析法の性能について説明します。Oasis PRiME HLBはパススルー固相抽出（SPE）カートリッジで、主要な干渉物の除去に適用され、分析法の頑健性が向上しています²。親水性-親油性バランスコポリマー（HLB）は、溶媒和、平衡化、またはコンディショニングのステップを必要としないため、時間と溶媒にかかる費用を節約できます。

実験方法

サンプルの説明および前処理

小麦粉、ピーナッツ、イチジク、動物用飼料（ペット用飼料の混合物）は最寄りの市場で購入しました。各食料品約200gを粉碎し、分析ミル（IKA）を用いて均質化してから抽出しました。トウモロコシ粉、ヘーゼルナッツ（水/ナッツスラリー）、乾燥イチジク（水/フルーツスラリー）、動物用飼料（牛）などの標準品は、Fera Science Ltd（FAPAS）から購入しました。

サンプル抽出およびクリーンアップ

サンプル前処理プロトコルはすべてのマトリックスに対して一貫しており、図1に示されています。

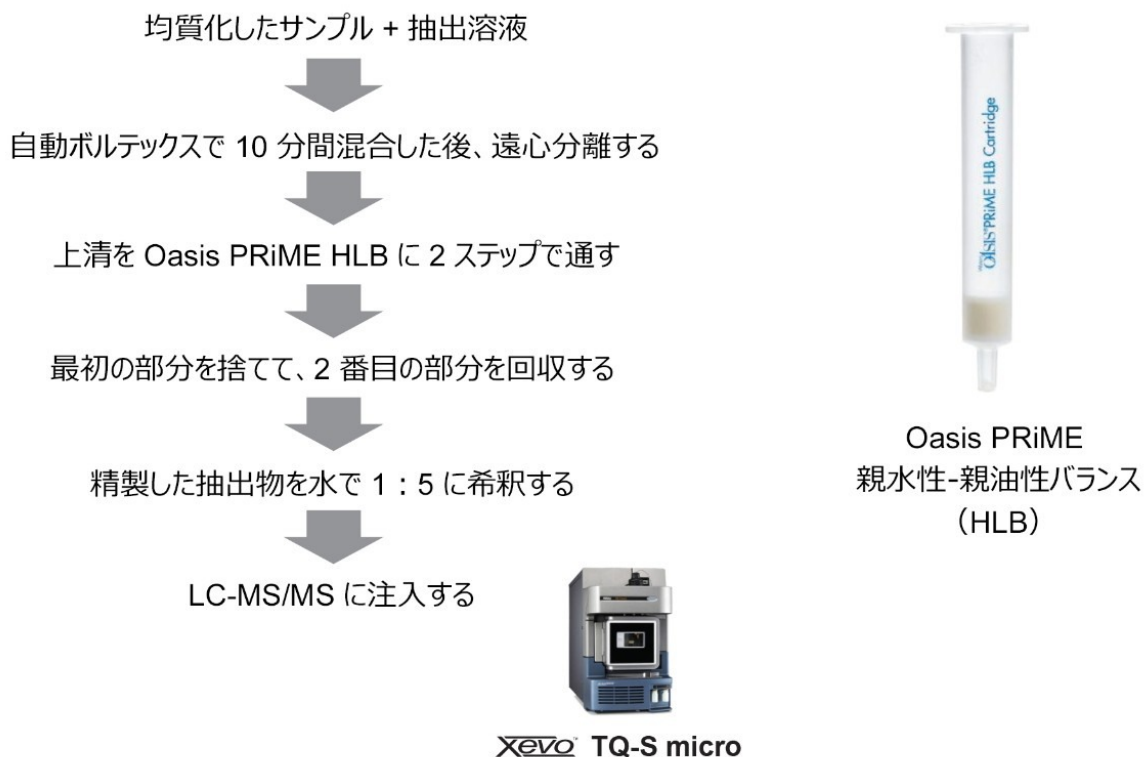


図 1. サンプル前処理プロトコルのスキーム

均質化した代表的なサンプルの一部 (5 g) を 50 mL のプラスチック遠心分離チューブに入れました。サンプルを、0.5% 酢酸と 0.2% ギ酸 (v/v) を含む 20 mL の 80: 20 MeCN: H₂O で抽出し、10 分間ボルテックス混合しました。 > 5000 g で遠心分離した後、上清 0.4 mL を Oasis PRiME HLB カートリッジ (3 cc、150 mg、製品番号 [186008717 < https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/sample-preparation--filtration/186008717-oasis-prime-hlb-3-cc-vac-cartridge-150-mg-sorbent-per-cartridge-.html >](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/sample-preparation--filtration/186008717-oasis-prime-hlb-3-cc-vac-cartridge-150-mg-sorbent-per-cartridge-.html)) にロードし、カートリッジベッドを乾燥させて (カートリッジに 3 mL の空気を送り込んで) 廃棄しました。上清 1.2 mL をロードし、回収しました。次に、精製した抽出物を、LC-MS/MS 分析用の LC バイアルに直接入れて水で 1: 5 に希釈し (200 μ L の精製抽出物を 800 μ L の H₂O と混合)、全体の希釈係数が 20 になるようにしました。希釈後、抽出物を内径 13 mm の 1.2 μ m ガラス繊維シリンジフィルターでろ過しました。マトリックスマッチ標準を定量に使用しました。

LC-MS/MS 条件

クロマトグラフィーシステム:

ACQUITY UPLC I-Class PLUS システム

オートサンプラーおよびインジェクター:

ニードルサイズ 15 μ L のフロースルーニードルインジェクター (FTN)、および注入バルブのポート 4 と APH の間に取り付けた 50 μ L の延長ループ (製品番

号: 430002012)

カラム:	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ (2.1 × 100 mm、粒子径 1.7 μm、ポアサイズ 130 Å、製品番号 186002352)
水系移動相:	1 mM 酢酸アンモニウム水溶液 + 0.5% 酢酸 + 0.1% ギ酸 (v/v)
有機移動相:	メタノール + 0.5% 酢酸 + 0.1% ギ酸
ニードル洗浄溶媒:	水: メタノール: アセトニトリル: イソプロパノール : アセトン 20: 20: 20: 20: 20 + 1% ギ酸 (体積比)
シール洗浄溶媒:	水: アセトニトリル 80: 20 (v/v)
カラム温度:	40 °C
サンプル温度:	15 °C
注入量:	8 μL
流速:	0.40 mL/分

時間 (分)	% 有機	% 水系	曲線
0	5	95	-
0.7	5	95	6
6.5	50	50	6
9.5	100	0	6
12.5	100	0	6
12.6	5	95	6
14	5	95	6

表 1. UPLC グラジエント

質量分析システム:	Xevo TQ-S micro
イオン化モード:	ESI+/- (極性切り替え)
取り込みモード:	マルチプルリアクションモニタリング (MRM)
キャピラリー電圧:	+0.75/-0.3 kV
コーンガス流量:	50 L/時間
脱溶媒温度:	600 °C
脱溶媒ガス流量:	1100 L/時間
イオン源温度:	150 °C
分解能:	MS1 ユニット、MS2 ユニット
ソフトウェア:	MassLynx v4.2 (データ解析にTargetLynx XS を使用)

分析種	RT 幅* (分)	付加イオン	プリカーサー m/z	プロダクト m/z	コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
AFB ₁	7.05~7.30	[M+H] ⁺	313.0	285.0	30	20
				241.0		37
AFB ₂	6.73~7.01	[M+H] ⁺	315.1	287.0	30	25
				259.0		28
AFG ₁	6.43~6.70	[M+H] ⁺	329.1	243.0	25	24
				311.0		20
AFG ₂	6.09~6.33	[M+H] ⁺	331.1	313.2	25	25
				245.1		30
FB ₁	8.07~8.55	[M+H] ⁺	722.3	334.3	30	40
				352.3		35
FB ₂	8.55~9.06	[M+H] ⁺	706.4	336.4	30	36
				318.4		37
FB ₃	8.35~8.70	[M+H] ⁺	706.4	336.4	10	40
				94.8		60
OTA	8.80~9.08	[M+H] ⁺	404.1	239.0	20	25
				221.0		36
ZEA	8.79~9.00	[M+H] ⁺	319.2	185.1	20	25
				187.1		19
DON	3.33~3.59	[M+H] ⁺	297.1	249.1	15	10
				231.1		10
DON-3-Glu	3.45~3.81	[M-Glu+H] ⁺	297.2	249.1	20	12
				231.1		12
NIV	2.00~3.25	[M+CH ₃ COO] ⁻	371.1	281.0	10	10
				311.0		10
HT-2	8.17~8.42	[M+NH ₄] ⁺	442.3	263.1	20	10
				215.1		10
T-2	8.55~8.76	[M+NH ₄] ⁺	484.2	305.1	20	15
				215.1		22
3-Ac-DON	5.40~5.85	[M+H] ⁺	339.2	136.8	10	13
				321.0		12
15-Ac-DON	5.40~5.85	[M+H] ⁺	339.2	212.8	10	18
				231.1		8
DAS	7.25~7.59	[M+NH ₄] ⁺	384.2	307.2	7	10
				247.0		13
NEO	4.75~5.00	[M+NH ₄] ⁺	400.2	305.1	10	12
				184.9		20
FUS-X	4.35~4.62	[M+H] ⁺	355.2	247.0	10	15
				229.0		17
デヒボキシ-DON	4.43~4.67	[M+H] ⁺	281.0	108.5	10	16
				232.9		10
シトリニン	7.95~8.47	[M+H] ⁺	251.0	233.0	16	17
				205.0		25
ステリガマトンスチン	8.89~9.22	[M+H] ⁺	325.0	310.0	10	25
				281.0		37
ビューベリシン	9.75~10.00	[M+H] ⁺	784.5	244.1	80	27
				262.2		25
エンニアチン A	9.92~10.12	[M+NH ₄] ⁺	699.5	210.0	10	32
				100.0		70
エンニアチン B	9.66~9.90	[M+NH ₄] ⁺	657.5	196.0	50	30
				214.0		30
エンニアチン A ₁	9.84~10.07	[M+NH ₄] ⁺	685.5	210.0	10	35
				228.0		35
エンニアチン B ₁	9.77~10.00	[M+NH ₄] ⁺	671.5	196.0	10	37
				210.0		35
AOH-Me-エーテル	8.97~9.25	[M-H] ⁻	271.0	256.0	20	22
				228.0		30
テントキシシ	8.23~8.55	[M+H] ⁺	415.3	57.5	10	30
				312.1		20
テヌアソソ酸	7.15~7.65	[M+H] ⁺	198.0	124.7	10	15
				152.8		15
アルテヌエン	6.96~7.25	[M+H] ⁺	293.0	257.0	10	13
				275		11

(* 保持時間 (RT) は、変動する場合があります。試験注入を行って各 MRM チャンネルの取り込み時間を修正し、オーバーラップを最小限に抑えます。これにより、自動デュエルタイムが長くなります (ピーク幅 = 6 秒、ピークあたりのポイント数 = 15)。
デュエルタイム = 自動。
スパン = 0 Da (すべてのファンクションに対して)。

表 2. 最適化した MRM ト

ランジション

分析法のバリデーション

分析法の真度 (回収率を使用) と再現性のバリデーションを行うため、小麦粉、ピーナッツ、イチジク、および動物用飼料サンプルに、3 濃度レベルの 31 種のマイコトキシンの混合物を 3 回繰り返し追加しました (濃度は表 4、5、6、7

パススルー SPE および UPLC-MS/MS を用いたシリアル、ナッツ、イチジク、および動物飼料中の規制対象および新規
マイコトキシンの測定

に示しています)。次に、前のセクションで説明したように、ブランク試料およびスパイクしたサンプルを抽出して、分析しました。Eurachem ガイドライン³によると、この分析法の性能は、一部の FAPAS 標準物質（トウモロコシ粉、ヘーゼルナッツ、干しいちじく、動物用飼料）を 6 回繰り返し分析することによっても検証されています。

結果および考察

クロマトグラフィー

クロマトグラフィー性能は、SANTE/12089/2016 のガイドラインと一致していました⁴。最初に溶出する化合物（ニバレノール）は、保持時間 2.38 分を示し、その結果、カラムのボイドボリューム (V_d) (V_d 約 0.55 分) に対応する保持時間より 2 倍長くなりました。31 種のマイコトキシンを添加した小麦抽出物の代表的なクロマトグラムを図 2 に示します。サンプル抽出物中の分析種の保持時間は、SANTE ガイドラインに従って、許容誤差 ± 0.05 分で同じシーケンスで測定したキャリブレーション標準の平均の保持時間に対応していました。RT の再現性は、各シーケンス内で ± 0.03 分を超えていません。

化合物のクリティカルペアは次のとおりです。

- デオキシニバレノール (DON) およびデオキシニバレノール-3-グルコシド (DON-3-Glu) : DON-3-Glu がイオン源でグリコシル基を失うため、これらの化合物は同じ MRM トランジションを有し、 $[\text{DON}+\text{H}]^+$ としてモニタリングされます。この分析法により、これらの化合物のベースライン分離が達成されました。
- 3-アセチル-デオキシニバレノール (3-Ac-DON) および 15-アセチル-デオキシニバレノール (15-Ac-DON) : これらの異性体は通常、逆相 LC 次元で部分的に共溶出するため、3-Ac-DON および 15-Ac-DON の合計として通常モニタリングおよび定量されます。これらの化合物は、ACQUITY UPLC HSS T3 カラム (2.1 × 150 mm、1.8 μm 、製品番号 [186003540 <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186003540-acquity-uplc-hss-t3-column-100a-18--m-21-mm-x-150-mm-1-pk.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186003540-acquity-uplc-hss-t3-column-100a-18--m-21-mm-x-150-mm-1-pk.html)) を使用して、または ACQUITY UPLC HSS PFP カラム (2.1 × 100 mm、1.8 μm 、製品番号 [186005967 <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186005967-acquity-uplc-hss-pfp-fluoro-phenyl-column-100a-18--m-21-mm-x-100.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186005967-acquity-uplc-hss-pfp-fluoro-phenyl-column-100a-18--m-21-mm-x-100.html)) を使用して分離することができます。アセチル-DON 異性体の分離の詳細については、ウォーターズにお問い合わせください。

溶出順：

1. NIV
2. DON
3. DON-3-Glu
4. FUS-X
5. テトラヒドロキシ-DON
6. NEO
7. Ac-DON
8. AFG2
9. AFG1
10. AFB2
11. アルテヌイン
12. AFB1
13. テヌアゾン酸
14. DAS
15. AOH
16. シトリニン
17. HT-2
18. FB1
19. デントキシン
20. FB3
21. T-2
22. FB2
23. ZEA
24. OTA
25. ステリグマトシステン
26. AOH-Me-エーテル
27. ENNB
28. BEA
29. ENNB1
30. ENNA1
31. ENN A

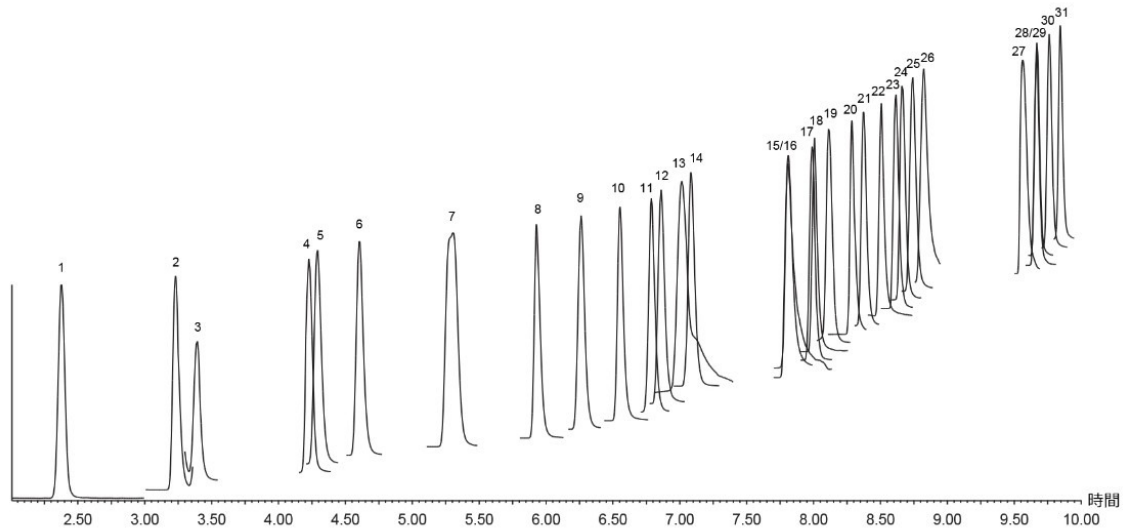


図 2. 試験したマイコトキシンの溶出順序と代表的なクロマトグラム（小麦抽出物のマトリックス添加標準品）

直線性、同定および定量限界

分析法の直線性が、試験した濃度範囲にわたって確認されました。検量線の決定係数 (R^2) は > 0.9900 で、残差は $\pm 20\%$ 未満でした。試験したすべてのサンプルのイオン比は、同じシーケンスのキャリブレーション標準で計算された平均イオン比に対して $\pm 30\%$ 以内でした。表 3 に、溶媒標準品 (LOQ レベルでシグナル対ノイズ比 ≥ 10) で計算した装置の定量限界 (i-LOQ) を示します。表 4、5、6、7 に、分析法の LOQ (m-LOQ)³ および小麦粉、ピーナッツ、イチジク、動物用飼料のそれぞれの直線性範囲を示します。この分析法の直線性の範囲により、試験した食品の通常の規制レベルでのマイコトキシンの測定が可能になりました。

分析種	i-LOQ (ng/mL)	イオン比	保持時間 (分)
AFB ₁	0.006	0.930	6.86
AFB ₂	0.006	0.900	6.55
AFG ₁	0.006	0.660	6.26
AFG ₂	0.006	0.780	5.93
FB ₁	0.25	0.905	8.01
FB ₂	0.4	0.520	8.51
FB ₃	0.4	0.700	8.28
OTA	0.025	0.380	8.66
ZEA	0.2	1.200	8.62
DON	0.15	0.383	3.22
DON-3-Glu	0.3	0.480	3.39
NIV	8.4	1.278	2.38
HT-2	0.25*	0.850	7.99
T-2	0.075	0.700	8.38
3-Ac-DON	0.15	1.020	5.34
15-Ac-DON	0.15	0.730	5.27
DAS	0.15	0.615	7.08
NEO	0.15	0.900	4.60
FUS-X	0.15	0.890	4.21
デエポキシ-DON	0.3	0.665	4.28
シトリニン	0.3	0.075	7.82
ステリグマトシスチン	0.04	0.890	8.74
ビューベリシン	0.07	0.610	9.67
エンニアチン A	0.075	0.082	9.85
エンニアチン B	0.075	0.575	9.56
エンニアチン A ₁	0.075	0.465	9.76
エンニアチン B ₁	0.075	0.720	9.67
AOH-Me-エーテル	0.15	0.192	8.82
テントキシシ	0.15	0.270	8.12
テヌアゾン酸	0.9	0.552	7.02
アルテヌイン	0.15	0.362	6.79

表 3. Xevo TQ-S micro での装置

定量限界 (i-LOQ)、イオン比、および保持時間

真度と再現性

試験した全食品において、回収率は 60% ~ 108%、再現性条件下での相対標準偏差 (%RSD_r) は 11% 未満で、規制要件の推奨値⁵に準拠しています (表 4、5、6、7 を参照)。平均回収率も図 3、4、5、6 に示しています。

パススルー SPE および UPLC-MS/MS を用いたシリアル、ナッツ、イチジク、および動物飼料中の規制対象および新規マイコトキシンの測定

分析種	m-LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	分析法の 直線性範囲 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加レベル #1		添加レベル #2		添加レベル #3	
			添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回収率 % ($\pm\text{RSD}_r$ %)	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回収率 % ($\pm\text{RSD}_r$ %)	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回収率 % ($\pm\text{RSD}_r$ %)
AFB ₁	0.25	0.25~100	0.5	96 (± 4)	1.5	103 (± 2)	10	102 (± 1)
AFB ₂	0.25	0.25~100	0.5	108 (± 4)	1.5	104 (± 2)	10	103 (± 2)
AFG ₁	0.25	0.25~100	0.5	103 (± 2)	1.5	104 (± 0.4)	10	102 (± 1)
AFG ₂	0.25	0.25~100	0.5	98 (± 6)	1.5	102 (± 3)	10	99 (± 5)
FB ₁	10	10~1000	10	102 (± 5)	30	95 (± 4)	200	98 (± 3)
FB ₂	10	10~1000	10	102 (± 5)	30	99 (± 4)	200	97 (± 4)
FB ₃	10	10~1000	10	104 (± 7)	30	99 (± 1)	200	100 (± 2)
OTA	1	1~400	2	98 (± 2)	6	99 (± 2)	40	100 (± 2)
ZEA	10	10~6000	30	76 (± 5)	90	88 (± 3)	600	91 (± 3)
DON	6	6~2400	12	95 (± 3)	36	101 (± 1)	240	100 (± 2)
DON-3-Glu	10	10~2400	12	86 (± 2)	36	109 (± 6)	240	105 (± 4)
NIV	200	200~40000	200	95 (± 10)	600	99 (± 2)	4000	98 (± 3)
HT-2	5	5~1200	6	100 (± 6)	18	105 (± 3)	120	102 (± 5)
T-2	3	3~1200	6	102 (± 2)	18	106 (± 4)	120	104 (± 2)
3-Ac-DON	6	6~2400	12	98 (± 2)	36	100 (± 4)	240	98 (± 3)
15-Ac-DON	6	6~2400	12	97 (± 3)	36	98 (± 3)	240	99 (± 2)
DAS	6	6~2400	12	97 (± 1)	36	106 (± 3)	240	102 (± 3)
NEO	6	6~2400	12	98 (± 1)	36	101 (± 4)	240	103 (± 3)
FUS-X	6	6~2400	12	101 (± 6)	36	104 (± 3)	240	105 (± 5)
デエポキシ-DON	6	6~1200	12	97 (± 2)	36	104 (± 2)	240	103 (± 3)
シトリニン	6	6~2400	12	81 (± 1)	36	81 (± 1)	240	85 (± 2)
ステリグマトシスチン	2	2~1200	6	84 (± 4)	18	89 (± 2)	120	87 (± 5)
ビューベリシン	2	2~2400	12	86 (± 7)	36	94 (± 3)	240	95 (± 5)
エンニアチン A	3	3~1200	12	98 (± 2)	36	101 (± 2)	240	100 (± 3)
エンニアチン B	3	3~1200	12	108 (± 2)	36	103 (± 2)	240	102 (± 1)
エンニアチン A ₁	3	3~1200	12	102 (± 2)	36	104 (± 2)	240	103 (± 2)
エンニアチン B ₁	3	3~1200	12	99 (± 4)	36	98 (± 4)	240	99 (± 2)
AOH-Me-エーテル	6	6~2400	12	64 (± 5)	36	65 (± 3)	240	60 (± 2)
テントキシシ	3	3~2400	12	96 (± 5)	36	103 (± 1)	240	102 (± 1)
テヌアゾン酸	15	15~5000	12	97 (± 8)	36	104 (± 7)	240	102 (± 5)
アルテヌエン	6	6~2400	12	102 (± 7)	36	99 (± 3)	240	98 (± 5)

表 5. 3つの添加レベルで試験したピーナッツ中のマイコトキシンの分析法における LOQ (m-LOQ)、分析法の直線性の範囲、および回収率±パーセント相対標準偏差 (%RSD_r, n = 3)

分析種	m-LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	分析法の 直線性範囲 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加レベル #1		添加レベル #2		添加レベル #3	
			添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回収率 % ($\pm\text{RSD}_r$ %)	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回収率 % ($\pm\text{RSD}_r$ %)	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回収率 % ($\pm\text{RSD}_r$ %)
AFB ₁	0.4	0.4~100	0.5	92 (± 6)	1.5	101 (± 4)	10	101 (± 4)
AFB ₂	0.25	0.25~100	0.5	99 (± 7)	1.5	99 (± 5)	10	99 (± 4)
AFG ₁	0.25	0.25~100	0.5	95 (± 3)	1.5	101 (± 10)	10	106 (± 1)
AFG ₂	0.25	0.25~100	0.5	93 (± 5)	1.5	100 (± 7)	10	101 (± 5)
FB ₁	10	10~1000	10	90 (± 16)	30	89 (± 5)	200	100 (± 4)
FB ₂	10	10~1000	10	104 (± 4)	30	96 (± 5)	200	101 (± 3)
FB ₃	10	10~1000	10	108 (± 7)	30	104 (± 4)	200	103 (± 2)
OTA	1	1~400	2	91 (± 3)	6	99 (± 2)	40	95 (± 2)
ZEA	10	10~6000	30	90 (± 6)	90	94 (± 7)	600	98 (± 3)
DON	6	6~2400	12	97 (± 5)	36	99 (± 3)	240	103 (± 1)
DON-3-Glu	30	30~1200	12	89 (± 7)	36	102 (± 4)	240	86 (± 3)
NIV	200	200~40000	200	89 (± 8)	600	106 (± 4)	4000	93 (± 1)
HT-2	5	5~1200	6	99 (± 4)	18	99 (± 7)	120	99 (± 2)
T-2	3	3~1200	6	100 (± 2)	18	101 (± 2)	120	103 (± 4)
3-Ac-DON	6	6~2400	12	105 (± 3)	36	98 (± 7)	240	102 (± 3)
15-Ac-DON	6	6~2400	12	102 (± 3)	36	96 (± 6)	240	101 (± 4)
DAS	6	6~2400	12	100 (± 5)	36	105 (± 3)	240	102 (± 3)
NEO	6	6~2400	12	98 (± 8)	36	95 (± 3)	240	103 (± 4)
FUS-X	6	6~2400	12	91 (± 7)	36	97 (± 1)	240	97 (± 5)
デオキシ-DON	6	6~1200	12	95 (± 4)	36	95 (± 3)	240	99 (± 2)
シトリニン	6	6~2400	12	81 (± 1)	36	94 (± 0.1)	240	100 (± 1)
ステリグマトシスチン	2	2~1200	6	102 (± 2)	18	100 (± 1)	120	103 (± 3)
ビューベリシン	2	2~2400	12	70 (± 4)	36	109 (± 3)	240	79 (± 13)
エンニアチン A	3	3~1200	12	96 (± 4)	36	99 (± 3)	240	93 (± 7)
エンニアチン B	3	3~1200	12	81 (± 5)	36	106 (± 2)	240	106 (± 3)
エンニアチン A ₁	3	3~1200	12	96 (± 8)	36	100 (± 5)	240	100 (± 4)
エンニアチン B ₁	3	3~1200	12	96 (± 6)	36	102 (± 2)	240	102 (± 6)
AOH-Me-エーテル	6	6~2400	30	64 (± 8)	90	66 (± 4)	600	65 (± 3)
テントキシシン	3	3~2400	12	93 (± 3)	36	97 (± 6)	240	101 (± 4)
テヌアゾン酸	15	15~5000	12	92 (± 6)	36	73 (± 2)	240	73 (± 2)
アルテヌエン	6	6~2400	12	104 (± 1)	36	96 (± 5)	240	95 (± 4)

表 6. 3つの添加レベルで試験したイチジク中のマイコトキシンの分析法における LOQ (m-LOQ)、分析法の直線性の範囲、および回収率 \pm パーセント相対標準偏差 (%RSD_r, n = 3)

分析種	m-LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	分析法の 直線性範囲 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加レベル #1		添加レベル #2		添加レベル #3	
			添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回収率 % ($\pm\text{RSD}\%$)	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回収率 % ($\pm\text{RSD}\%$)	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回収率 % ($\pm\text{RSD}\%$)
AFB ₁	0.5	0.5~100	0.5	101 (± 7)	1.5	97 (± 10)	10	96 (± 2)
AFB ₂	0.5	0.5~100	0.5	98 (± 9)	1.5	104 (± 5)	10	100 (± 5)
AFG ₁	0.5	0.5~100	0.5	99 (± 4)	1.5	101 (± 1)	10	97 (± 3)
AFG ₂	0.5	0.5~100	0.5	97 (± 1)	1.5	99 (± 1)	10	99 (± 2)
FB ₁	10	10~1000	10	97 (± 6)	30	75 (± 2)	200	100 (± 2)
FB ₂	10	10~1000	10	93 (± 2)	30	90 (± 2)	200	97 (± 1)
FB ₃	10	10~1000	10	86 (± 3)	30	87 (± 3)	200	99 (± 3)
OTA	3	3~400	3	95 (± 4)	6	98 (± 3)	40	97 (± 4)
ZEA	10	10~6000	30	94 (± 7)	90	99 (± 7)	600	84 (± 1)
DON	6	6~2400	12	100 (± 9)	36	99 (± 4)	240	95 (± 3)
DON-3-Glu	10	10~2400	12	82 (± 11)	36	93 (± 8)	240	97 (± 10)
NIV	200	200~40000	200	70 (± 7)	600	75 (± 9)	4000	85 (± 10)
HT-2	5	5~1200	6	92 (± 10)	18	98 (± 0.3)	120	99 (± 2)
T-2	3	3~1200	6	94 (± 4)	18	101 (± 2)	120	93 (± 1)
3-Ac-DON	6	6~2400	12	95 (± 10)	36	99 (± 2)	240	99 (± 3)
15-Ac-DON	6	6~2400	12	94 (± 8)	36	98 (± 1)	240	100 (± 5)
DAS	6	6~2400	12	97 (± 6)	36	99 (± 3)	240	101 (± 5)
NEO	6	6~2400	12	94 (± 2)	36	100 (± 1)	240	102 (± 1)
FUS-X	6	6~2400	12	98 (± 3)	36	100 (± 1)	240	98 (± 1)
デオキシ-DON	6	6~1200	12	91 (± 7)	36	99 (± 0.3)	240	94 (± 1)
シトリニン	6	6~2400	12	82 (± 1)	36	73 (± 1)	240	70 (± 1)
ステリグマトシスチン	2	2~1200	6	95 (± 3)	18	91 (± 2)	120	89 (± 2)
ビューベリシン	2	2~2400	12	79 (± 8)	36	88 (± 5)	240	82 (± 6)
エンニアチン A	3	3~1200	12	94 (± 4)	36	99 (± 3)	240	93 (± 7)
エンニアチン B	3	3~1200	12	89 (± 1)	36	107 (± 5)	240	108 (± 4)
エンニアチン A ₁	3	3~1200	12	97 (± 7)	36	99 (± 3)	240	101 (± 4)
エンニアチン B ₁	3	3~1200	12	95 (± 5)	36	101 (± 3)	240	103 (± 5)
AOH-Me-エーテル	10	10~3000	30	60 (± 7)	90	63 (± 0.1)	600	61 (± 4)
テントキシシン	3	3~2400	12	98 (± 8)	36	101 (± 2)	240	96 (± 6)
テヌアゾン酸	30	30~5000	12	102 (± 2)	36	98 (± 5)	240	101 (± 3)
アルテヌエン	6	6~2400	12	101 (± 2)	36	102 (± 0.4)	240	102 (± 1)

表 7. 3つの添加レベルで試験した動物用飼料中のマイコトキシンの分析法における LOQ (m-LOQ)、分析法の直線性の範囲、および回収率 \pm パーセント相対標準偏差 (%RSD_r, n = 3)

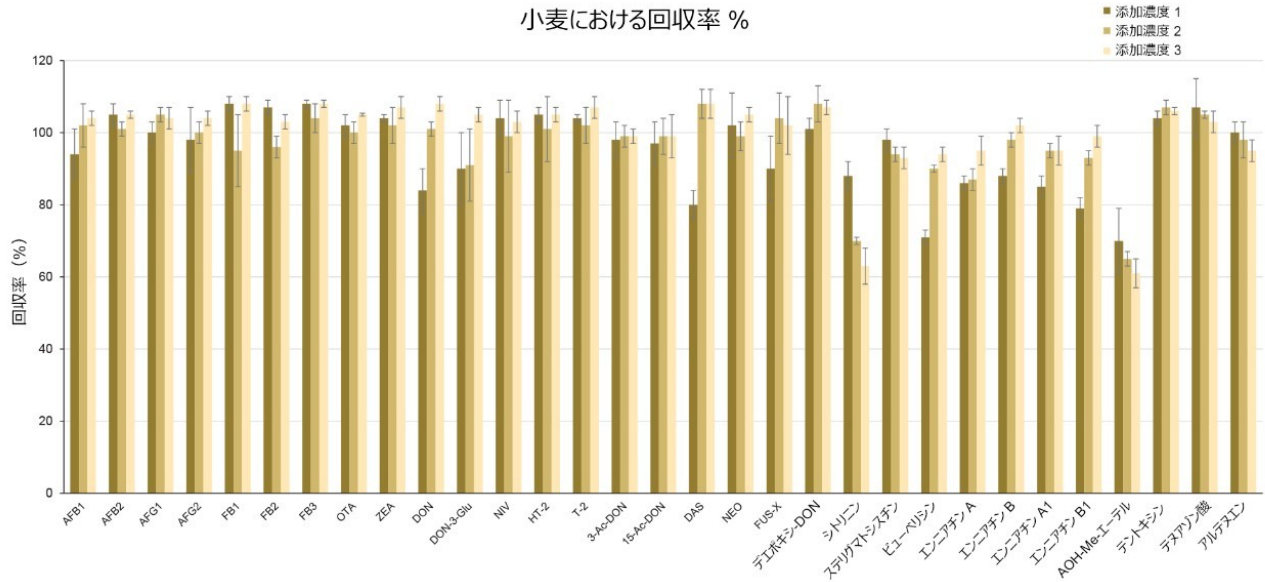


図 3. 3つの添加レベルで試験した小麦粉中のマイコトキシンの平均回収率を示す棒グラフ。エラーバーはパーセント相対標準偏差 (%RSD_r, n = 3) を示しています。

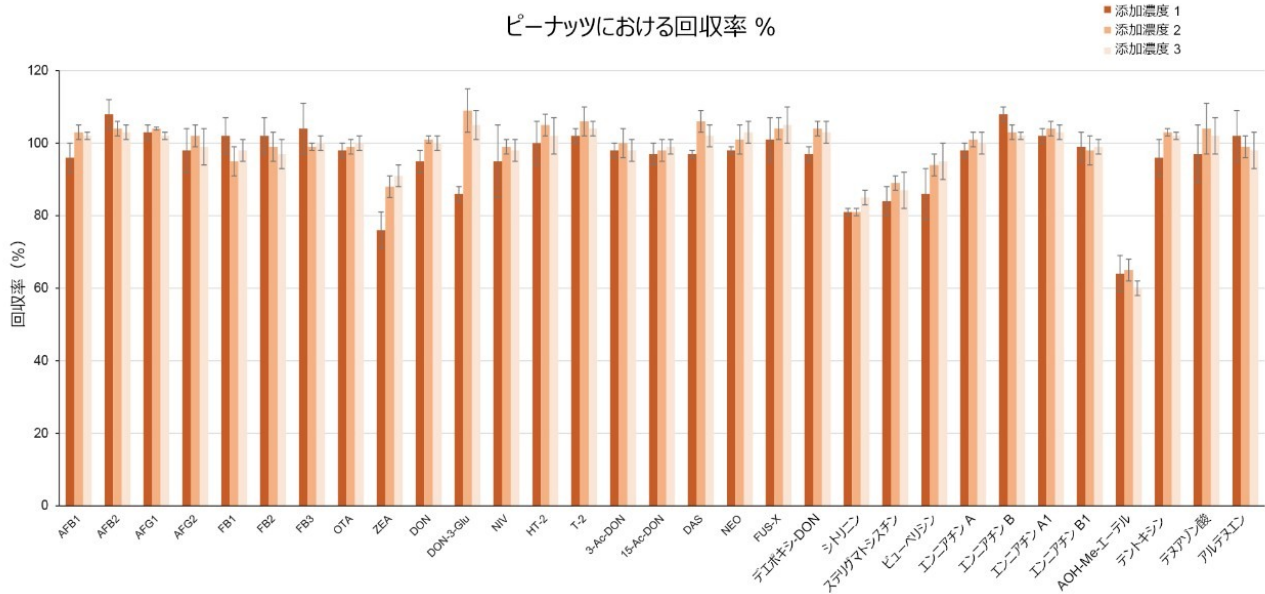


図 4. 3つの添加レベルで試験したピーナッツ中のマイコトキシンの平均回収率を示す棒グラフ。エラーバーはパーセント相対標準偏差 (%RSD_r, n = 3) を示しています。

イチジクにおける回収率 %

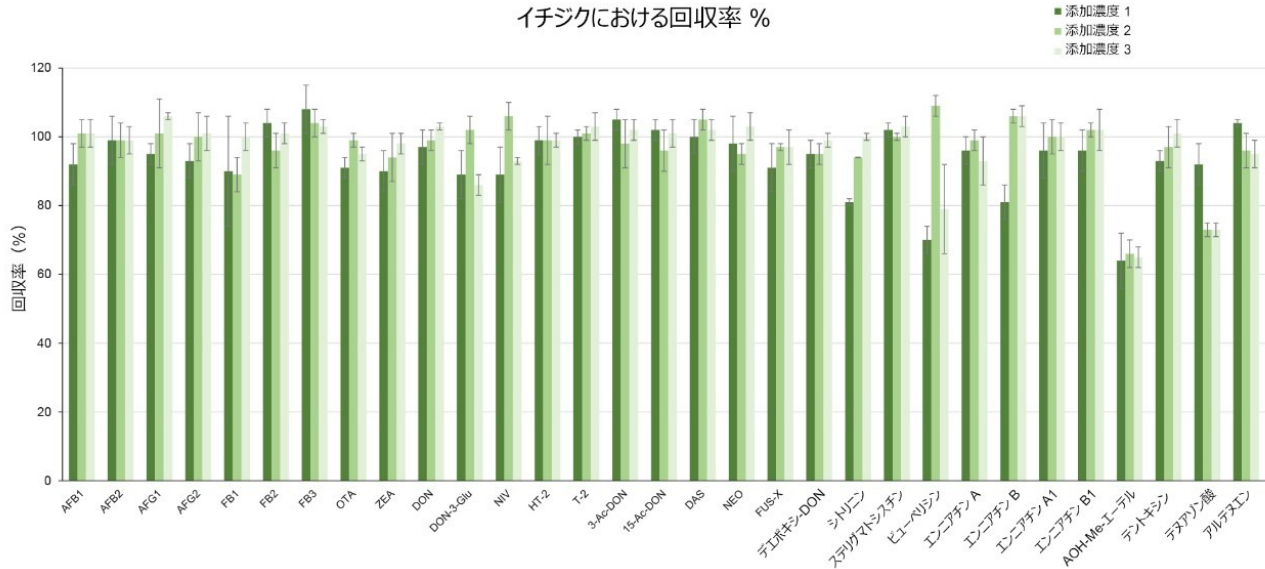


図 5.3 つの添加レベルで試験したイチジク中のマイコトキシンの平均回収率 (Rec%) を示す棒グラフ。エラーバーはパーセント相対標準偏差 (%RSD_r, n = 3) を示しています。

真度と再現性はいずれも、独立の標準物質を使用して評価しました。トウモロコシ粉、ヘーゼルナッツ/水スラリー、乾燥イチジク/水スラリー、および動物用飼料の標準物質の計算濃度値は $\pm 2|z|$ -スコアの間十分に収まっています。真度は 71 ~ 99% の範囲で、再現性 (%RSD_r, n = 6) は 0.5 ~ 7% の範囲でした (表 8、9、10、11 を参照)。

分析種	平均 ± 標準偏差 (µg/kg)	RSD _r %	Xa (µg/kg)	Xa ± 2 z (µg/kg)	真度 (%)
AFB ₁	1.51 ± 0.06	4	1.88	1.05~2.70	80
OTA	1.97 ± 0.11	6	1.99	1.11~2.86	99
DON	181 ± 1.4	1	231	139~323	78
ZEA	30.8 ± 3.4	11	26.7	14.9~38.4	85
FB ₁	575 ± 2.7	0.5	526	341~711	91
FB ₂	151 ± 8.5	6	125	70~180	79
T-2	26.4 ± 0.3	1	22.2	12.4~31.9	81
HT-2	27.0 ± 2.0	7	22.9	12.8~33.0	82

表 8. FAPAS トウモロコシ標準物質 T04366QC の計算濃度の平均 ± 標準偏差およびパーセント相対標準偏差 (%RSD_r, n = 6)。Xa = 割り当て値。割り当て値からの計算濃度の真度 (%)。

分析種	平均 ± 標準偏差 (µg/kg)	RSD _r %	Xa (µg/kg)	Xa ± 2 z (µg/kg)	真度 (%)
AFB ₁	3.31 ± 0.21	6	4.50	2.52~6.49	74
AFB ₂	1.88 ± 0.11	6	2.27	1.27~3.26	83
AFG ₁	1.39 ± 0.02	1	1.96	1.10~2.83	71
AFG ₂	0.78 ± 0.02	3	1.09	0.61~1.57	72
OTA	6.77 ± 0.28	4	7.96	4.46~11.47	85

表 9. FAPAS ヘーゼルナッツ標準物質 T04390QC (水/ナッツスラリー) の計算濃度の平均±標準偏差およびパーセント相対標準偏差 (%RSD_r, n = 6) 。 Xa = 割り当て値。割り当て値からの計算濃度の真度 (%) 。

分析種	平均 ± 標準偏差 (µg/kg)	RSD _r %	Xa (µg/kg)	Xa ± 2 z (µg/kg)	真度 (%)
AFB ₁	2.26 ± 0.07	3	3.01	1.68~4.33	75
AFB ₂	1.57 ± 0.05	3	1.76	0.98~2.53	89
AFG ₁	2.11 ± 0.07	3	2.8	1.57~4.03	75
AFG ₂	1.0 ± 0.02	2	1.04	0.58~1.50	95
OTA	5.17 ± 0.16	3	6.36	3.56~9.16	81

表 10. FAPAS 乾燥イチジク標準物質 T04343QC (水/フルーツスラリー) の計算濃度の平均±標準偏差およびパーセント相対標準偏差 (%RSD_r, n = 6) 。 Xa = 割り当て値。割り当て値からの計算濃度の真度 (%) 。

分析種	平均 ± 標準偏差 (µg/kg)	RSD _r %	Xa (µg/kg)	Xa ± 2 z (µg/kg)	真度 (%)
AFB ₁	15.7 ± 0.4	2	14.6	8.2~21.1	92
ZEA	936 ± 39	4	906	612~1200	97
DON	2762 ± 62	2	2702	1958~3447	98

表 11. FAPAS 動物用飼料標準物質 T04375QC の計算濃度の平均±標準偏差およびパーセント相対標準偏差 (%RSD_r, n = 6) 。 Xa = 割り当て値。割り当て値からの計算濃度の真度 (%) 。

結論

アフラトキシン類、オクラトキシン A、フモニシン類、ゼアラレノン、A 型および B 型トリコテセン類、エンニアチン類、ビューベリシン、ステリグマトシスチン、シトリニン、アルテルナリア毒素など 11 種類の規制対象マイコトキシンと 20 種類の新規マイコトキシンのためのマルチマイコトキシン分析法の開発とバリデーションに成功しました。この分析法の性能は、欧州規則 No 401/2006 および SANTE ガイドラインで設定された基準を満たしています。シンプルで迅速なパススルー SPE クリーンアップを取り入れて、主要な干渉物を効果的に除去できるため、分析法の頑健性が向上します。

この分析法は優れた真度と再現性を示しており、このことは、既知の濃度のマイコトキシンを含む独立した標準物質を使用して検証されました。この分析法は、シリアルを代表する小麦とトウモロコシおよび高デンプン含量の乾燥食品、

グラウンドナッツ・木の実を代表するピーナッツとヘーゼルナッツおよび高脂質含有食品、フルーツや高極性食品を代表するイチジク、動物用飼料など、幅広い食品に適用できます。

最後に、Oasis PRiME HLB クリーンアップが非常に幅広い適用性と汎用性を有するため、この分析法の分析範囲は将来的に拡張される可能性があります。

参考文献

1. Agriopoulou S., Stamatelopoulou E., Varzakas T. (2020).Advances in Occurrence, Importance, and Mycotoxin Control Strategies: Prevention and Detoxification in Foods.Foods 9(2):137.
<https://doi.org/10.3390/foods9020137> <<https://doi.org/10.3390/foods9020137>>.
2. Oasis Cartridges and 96-Well Plates – Care and use Manual.Waters Corp. (p/n: [715001391](https://www.waters.com/waters/support.htm?lid=134847668&lcid=134847667&type=USRM) <<https://www.waters.com/waters/support.htm?lid=134847668&lcid=134847667&type=USRM>>).
3. Magnusson B. and Örnemark U. (eds.)Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed.2014).ISBN 978-91-87461-59-0.
4. SANTE/12089/2016.Guidance Document on Identification of Mycotoxins in Food and Feed.Implemented by 01/01/2017.
5. Commission Regulation No 401/2006 of 23 February 2006 Laying Down the Methods of Sampling and Analysis for the Official Control of the Levels of Mycotoxins in Foodstuffs.

略語リスト

AFB₁ = アフラトキシン B₁

AFB₂ = アフラトキシン B₂

AFG₁ = アフラトキシン G₁

AFG₂ = アフラトキシン G₂

FB₁ = フモニシン B₁

FB₂ = フモニシン B₂

FB₃ = フモニシン B₃

OTA = オクラトキシン A

ZEA = ゼアラレノン

DON = デオキシニバレノール

DON-3-Glu = デオキシニバレノール-3-グルコシド

NIV = ニバレノール

HT-2 = HT-2 トキシン

T-2 = T-2 トキシン

3-Ac-DON = 3-アセチル-デオキシニバレノール

15-Ac-DON = 15-アセチル-デオキシニバレノール

DAS = ジアセトキシシルペノール

NEO = ネオソラニオール

デエポオキシ-DON = デエポオキシ-デオキシニバレノール

FUS-X = フザレノン X

AOH-Me-Ether = アルテルナリオール-メチルエーテル

ソリューション提供製品

- [ACQUITY UPLC I-Class PLUS システム <https://www.waters.com/134613317>](https://www.waters.com/134613317)
- [Xevo TQ-S micro タンデム四重極型質量分析計 <https://www.waters.com/134798856>](https://www.waters.com/134798856)
- [MassLynx MS ソフトウェア <https://www.waters.com/513662>](https://www.waters.com/513662)
- [TargetLynx <https://www.waters.com/513791>](https://www.waters.com/513791)

720007377JA、2021 年 9 月



© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.