

小麦及び大麦中のデオキシニバレノール-3-グルコシドを含めたフザリウム毒素一斉分析法の妥当性評価



川西美穂、木谷裕亮、末永和也、篠田隆祥
(独) 農林水産消費安全技術センター



はじめに

小麦及び大麦中のデオキシニバレノール(DON)、ニバレノール(NIV)、T-2トキシン(T-2)、HT-2トキシン(HT-2)、ゼアラレノン(ZEN)については、中川らによる室間共同試験で妥当性が確認されたLC-MS/MSによるかび毒の一斉分析法が報告されている。^{*1}

このかび毒一斉分析法を用いて、3-アセチル-デオキシニバレノール(3-Ac-DON)、15-アセチル-デオキシニバレノール(15-Ac-DON)、4-アセチル-ニバレノール(4-Ac-NIV)、デオキシニバレノール-3-グルコシド(D3G)、及びジアセトキシスシルベノール(DAS)の妥当性確認を実施し、DON、NIV、T-2、HT-2、ZENと合わせて10種類のかび毒について、小麦及び大麦を試験対象品目として一斉分析できることを確認した。(本法でISO/IEC17025試験所認定取得: 日本適合性認定協会 RTL03860)

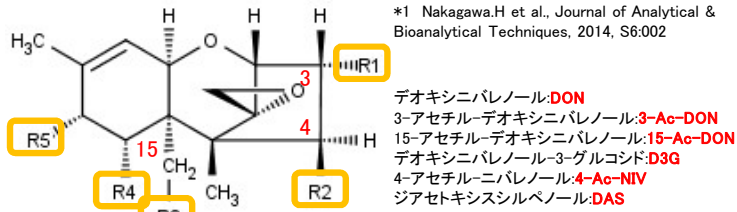


Fig.1 トリコテセンかび毒の構造式

Table.1 トリコテセンかび毒の構造式

	R1	R2	R3	R4	R5
DON	OH	H	OH	OH	=O
3-Ac-DON	OAc	H	OH	OH	=O
15-Ac-DON	OH	H	OAc	OH	=O
D3G	O-Glu	H	OH	OH	=O
4-Ac-NIV	OH	OAc	OH	OH	=O
DAS	OH	OAc	OAc	H	H

評価結果

選択性、検量線の直線性、検出限界、定量下限、真度および精度、HorRat(r)の各性能パラメータをProcedural Manual(Codex Alimentarius Commission)等の基準にしたがって評価した。

1. 選択性の確認

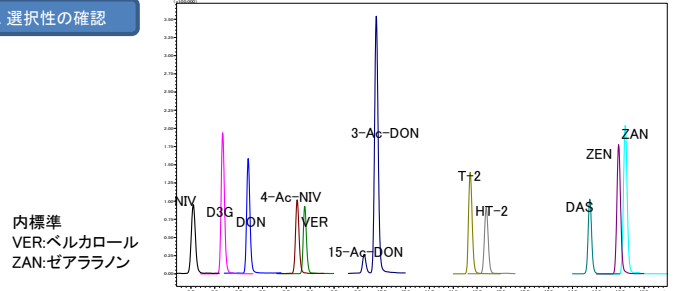


Fig.3 各分析種のクロマトグラム

2. 検量線の直線性

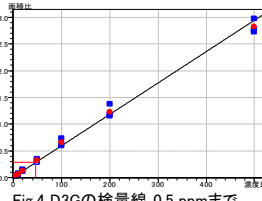


Fig.4 D3Gの検量線 0.5 ppmまで

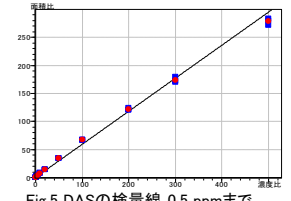


Fig.5 DASの検量線 0.5 ppmまで

Table.2 各分析種の相関係数

	3-Ac-DON	15-Ac-DON	D3G	4-Ac-NIV	DAS
相関係数r	0.995	0.998	0.998	0.999	0.997

3. その他のパラメーター

Table.3 小麦における各種パラメーター(低濃度は定量下限付近、高濃度はその10倍程度)

小麦	3-Ac-DON	15-Ac-DON	D3G	4-Ac-NIV	DAS	
検出限界(mg/kg)	0.003	0.003	0.003	0.003	0.002	
定量下限(mg/kg)	0.010	0.010	0.010	0.010	0.004	
真度(%)	低濃度	107.7	98.4	80.4	86.9	95.1
	高濃度	100.6	90.6	88.5	90.8	97.2
室内精度 RSDi(%)	低濃度	5.0	15.7	9.6	15.4	15.0
	高濃度	10.1	6.7	11.4	11.1	10.9
併行精度 RSDr(%)	低濃度	4.5	9.4	8.0	15.4	12.5
	高濃度	10.1	6.7	9.5	3.9	10.9
HorRat(r)*	低濃度	0.2	0.7	0.4	0.7	0.7
	高濃度	0.5	0.3	0.5	0.5	0.5

*HorRat(r)はRSDi(%)より算出

Table.4 大麦における各種パラメーター(低濃度は定量下限付近、高濃度はその10倍程度)

大麦	3-Ac-DON	15-Ac-DON	D3G	4-Ac-NIV	DAS	
検出限界(mg/kg)	0.003	0.003	0.003	0.003	0.002	
定量下限(mg/kg)	0.010	0.010	0.010	0.010	0.004	
真度(%)	低濃度	88.7	95.6	99.7	87.5	89.6
	高濃度	90.2	102.5	104.6	87.0	99.8
室内精度 RSDi(%)	低濃度	14.3	9.9	9.0	15.3	13.0
	高濃度	7.3	10.0	9.1	8.3	6.6
併行精度 RSDr(%)	低濃度	8.6	9.9	5.4	15.3	10.5
	高濃度	7.3	10.0	9.1	7.3	6.6
HorRat(r)*	低濃度	0.7	0.5	0.4	0.7	0.6
	高濃度	0.3	0.5	0.4	0.4	0.3

*HorRat(r)はRSDi(%)より算出

分析法の概要

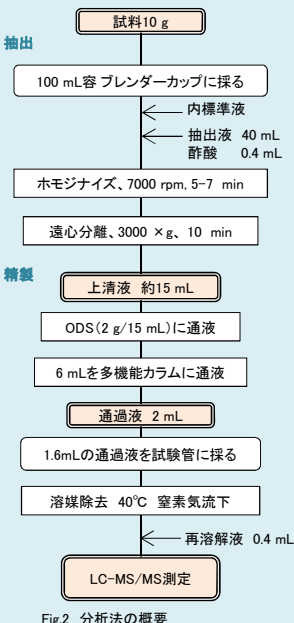


Fig.2 分析法の概要

試料から毒素等をアセトニトリル:水混合溶媒で抽出しオクタデシル化シリカゲル系固相抽出カラム及びかび毒精製用多機能ミニカラムにて精製した後、含アセトニトリル酢酸酸性水溶液に溶媒置換。試料溶液はLC-MS/MSにより測定し、内標準法で定量

LC-MS/MS測定条件

カラム: ODS 内径3mm 長さ250mm
粒子径5µm

カラム温度: 40°C

移動相A: 0.5 mM酢酸アンモニウム+0.1%酢酸

移動相B: アセトニトリル+0.1%酢酸

流速: 0.3 mL/min

注入量: 10 µL

グラジエント条件

time(min)	A (%)	B (%)
0	90	10
1	90	10
15	10	90
18	10	90
19	90	10
23	90	10

イオン化法: エレクトロスプレー(ESI)法
(positiveまたはnegative)

まとめ

3-Ac-DON、15-Ac-DON、4-Ac-NIV、D3G及びDASのすべての分析種において、選択性、検量線の直線性、真度、精度、HorRat(r)は許容範囲内であり、妥当性が確認された。中川らによる室間共同試験で妥当性が確認されたLC-MS/MSによるかび毒の一斉分析法のDON、NIV、T-2、HT-2、ZENと同時に分析が可能になった。この10分析種のLC-MS/MSによるかび毒の一斉分析法で、ISO/IEC17025試験所認定を2016年12月に取得。妥当な分析データを提供できる体制を確立できた。