

# Development of Simultaneous Determination Methods for Mycotoxins in Foods by LC-MS/MS and LC-Orbitrap MS

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/45296">http://hdl.handle.net/2297/45296</a>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



氏名	田村 昌義
学位の種類	博士 (創薬科学)
学位記番号	医薬保博甲第43号
学位授与の日付	平成28年3月22日
学位授与の要件	課程博士 (学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	Development of Simultaneous Determination Methods for Mycotoxins in Foods by LC-MS/MS and LC-Orbitrap MS (LC-MS/MS 及び LC-Orbitrap MS を用いた食品中カビ毒の一斉分析法の開発)
論文審査委員	主査 早川 和一 副査 小谷 明 副査 鳥羽 陽 副査 佐々木 陽平 副査 鈴木 信雄

# 学位論文要旨

## Abstract

Mycotoxins, which are one of the risk factors for food safety, exist widely and contaminate various foods. Multiple mycotoxins will need to be managed simultaneously, hereafter. Therefore, the aim of the thesis is to develop rapid and high quantitative methods for simultaneous determination of mycotoxins using LC-MS/MS and LC-Orbitrap MS, with the overall goal of suggesting them as an official method. There are some specific problems associated with mass spectrometry; the influence of matrix, carryover, and impossibility of discriminating between compounds having the same formula such as isomers. Therefore, appropriate preparation and LC conditions were examined for the determination of multiple mycotoxins having different properties. The rapid and simple preparations for beer, wine, corn, wheat, and barley samples were developed with suitable for individual foods by using QuEChERS methodology and solid phase extraction. Additionally, the reduction of carryover and the complete separation of target mycotoxins including isomers were achieved by optimized LC conditions. The analyses of commercially available beer, wine, corn, wheat, and barley using these methods revealed that *Fusarium* toxins were detected frequently and were found to contaminate food widely. The simultaneous determination methods for mycotoxins would contribute to reducing the risks associated with food contamination and it can help spread the importance of simultaneous determination using mass spectrometry as well as pave the way for its adoption as a new official method.

## 背景及び目的

カビ毒とは、カビが産生する二次代謝産物のうち、ヒトや動物に有害な物質の総称であり、農産物やその加工品を汚染する。主なカビ毒には、アフラトキシン類 (AFB1、AFB2、AFG1、AFG2)、オクラトキシン A (OTA)、パツリン (PAT)、トリコテセン類 (ニバレノール : NIV、デオキシニバレノール : DON、HT-2 トキシン : HT-2、T-2 トキシン : T-2 など)、フモニシン B 類 (FB1、FB2、FB3)、ゼアラレノン (ZEN) などが挙げられ、それぞれ発がん性、肝・腎障害、消化管内出血、免疫機能障害、エストロゲン様作用などの毒性を有する。熱安定性が高く、加熱では分解しないため、加工食品への残留リスクが高い。ヒトや動物の健康被害を低減するため、基準値の設定などが国際的に取り組まれており、日本においてもアフラトキシン類、PAT、DON に対して基準値が設定されている。そのため、正確な分析法を用いた厳密なリスク管理が求められる。しかし、現在の公的分析法はカビ毒グループごとに異なる手法を用いた個別分析法であり、一斉分析法は取り入れられていない。そのため、個別分析法を用いて複数カビ毒を管理するには作業が煩雑であり大変な時間を要する。

最近では高感度、高選択性、誘導体化が不要な LC-MS/MS が普及し、物性の異なる複数のカビ毒に対しても迅速な一斉分析が可能である。LC-MS/MS は、2 段階のマスフィルターにより選別するため、測定対象物質を選択的に検出できる。また、2005 年から市販された LC-Orbitrap MS は、小数点以下 4 桁までの精密質量が測定できる高分解能型質量分析装置である。精密質量を指標にした既知物質の選択的検出と、精密質量に基づく未知物質の組成式推定を可能とした優れた特徴を有する。

一方、質量分析装置を用いた測定には装置特有の注意すべき問題点が存在する。その一つは夾雑成分の影響である。夾雑成分の存在により目的成分のイオン化効率の変化やピーク形状・ピーク強度の悪化を

招くほか、装置を汚染し分析精度を低下させる。従って、質量分析装置を用いて測定を行うためには、前処理における夾雑成分の除去が大変重要となる。食品には多くの夾雑成分が複雑に存在し、これは食品ごとに異なることから、夾雑成分を可能な限り除去しかつ物性の異なるカビ毒を一度に回収できる簡便かつ適切な前処理法をそれぞれの食品に対して開発することが必要である。

他の問題点としてキャリーオーバーが挙げられる。この現象は、LC 装置内に残存した対象成分が次の分析で検出してしまう現象であり、定量精度や定量値に大きな影響を与える。低感度装置では問題視されなかったが、高感度な質量分析装置の利用によりたびたび問題となっている。そのため、キャリーオーバーの原因を究明しその抑制を行うことは、高精度な分析法を構築する上で大変重要である。さらに、質量分析装置は異なる組成式を持つ物質の判別が可能である一方、異性体など同じ組成式を持つ類似物質の判別が困難である。そのため、それぞれを正確に定量するためには LC による分離が不可欠である。

従って、食品試料ごとに適切な前処理法の開発と LC 条件の最適化を行い、装置の問題点を解決することで、質量分析装置の性能を十分に活用し迅速で高精度なカビ毒一斉分析法の構築が可能となる。

そこで本博士論文では、公定法では取り入れられていない質量分析装置を用いた一斉分析法を新しい公定法として提言すべく、LC-MS/MS 及び LC-Orbitrap MS を用いた迅速・高精度なカビ毒一斉分析法の開発を目的とし、物性の異なる複数のカビ毒を対象に食品ごとに適した簡便な前処理法の検討、及び LC 条件の最適化やキャリーオーバーの低減の検討を行ったので報告する。

## 1. LC-MS/MS を用いたビール及びワイン中の主要カビ毒一斉分析法の開発

対象カビ毒には、国際的に注目されている AFB1、AFB2、AFG1、AFG2、AFM1、OTA、PAT、NIV、DON、HT-2、T-2、FB1、FB2、FB3、ZEN (Figure 1) を選択し、LC-MS/MS を用いた一斉分析法を検討した。カビ毒標準物質を用いて LC 条件を検討した結果、FB1、FB2、FB3 の顕著なキャリーオーバーを確認した。そのため、これらのキャリーオーバーが発生しないグラジエント条件を検討し、LC 条件を 2 つに分けることで FB1、FB2、FB3 のキャリーオーバーを回避したカビ毒一斉分析を可能とした (Figure 2)。

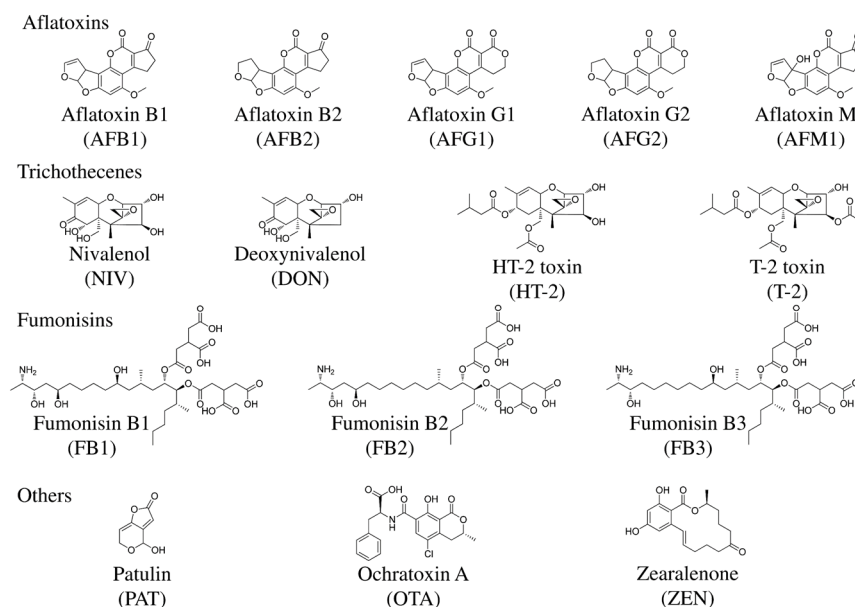
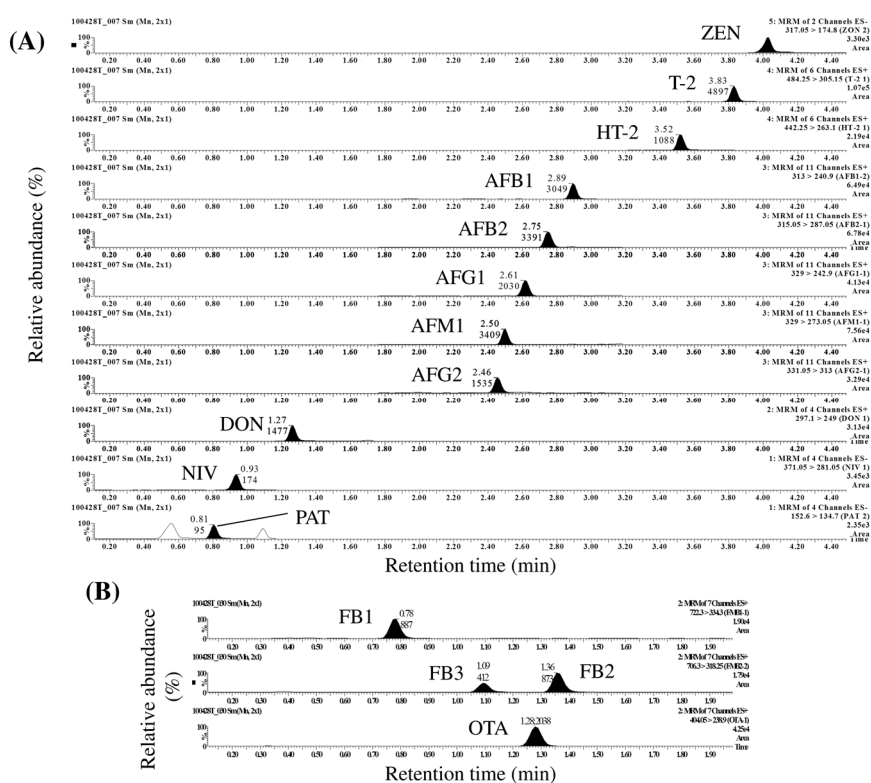


Figure 1 Chemical structures of the mycotoxins under study.



**Figure 2** Chromatograms of mycotoxins under study. (A) Chromatograms of 11 mycotoxins except FB1, FB2, FB3, and OTA; (B) chromatograms of FB1, FB2, FB3, and OTA.

ビールの前処理には、残留農薬分析用に開発された迅速前処理法である QuEChERS 法の適用を試みた。QuEChERS 法とは、塩析によるアセトニトリル層への抽出工程及び C18 や弱陰イオン交換 (PSA)、グラファイトカーボンブラック (GCB) などの固相単体による脂質や色素成分除去の精製工程を経る簡便な前処理法である。検討の結果、C18 では対象カビ毒を回収できたが、PSA や GCB では一部のカビ毒が回収困難であった。これは、イオン性相互作用や  $\pi$ - $\pi$  相互作用によるものと推察する。そこで、QuEChERS キットによる抽出 (以下、QuEChERS 抽出) と C18 固相抽出カートリッジによる精製とすることで、ビールの色素成分除去と対象カビ毒の良好な回収率を得ることができた。

ワインには、アントシアニンなどの色素成分や有機酸などの高極性成分が豊富に含まれている。ビールの前処理法ではこれらの夾雑成分を十分に除去できなかった。そのためワインの前処理には、色素成分除去のため順相・逆相・イオン交換などが混合された多機能カートリッジによる精製と、高極性成分除去のためポリマー系固相抽出カートリッジである OasisHLB による抽出・精製を組み合わせることで、良好な分析精度が得られた。

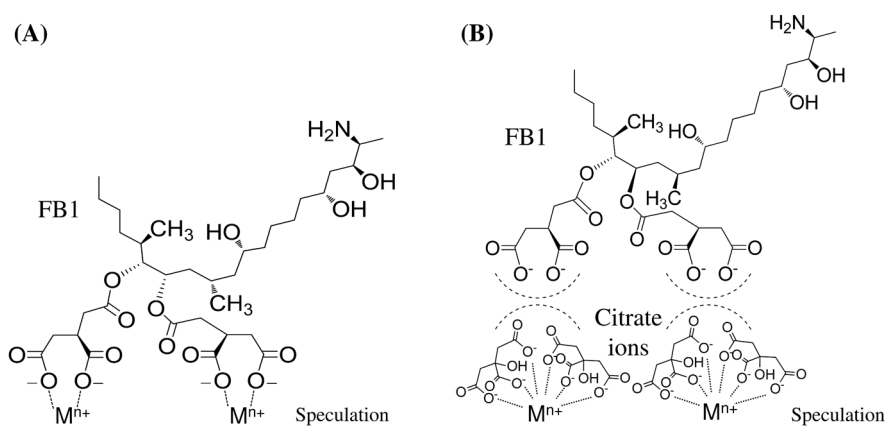
本分析法を用いて市販のビール、ワインを測定した結果、極微量の NIV、DON、FB1、FB2、FB3、OTA を検出したが、ヒトへの健康リスクは低い。本分析法により複数カビ毒の共汚染を確認した。

## 2. キャリーオーバーを低減したコーン中の主要カビ毒一斉分析法の開発

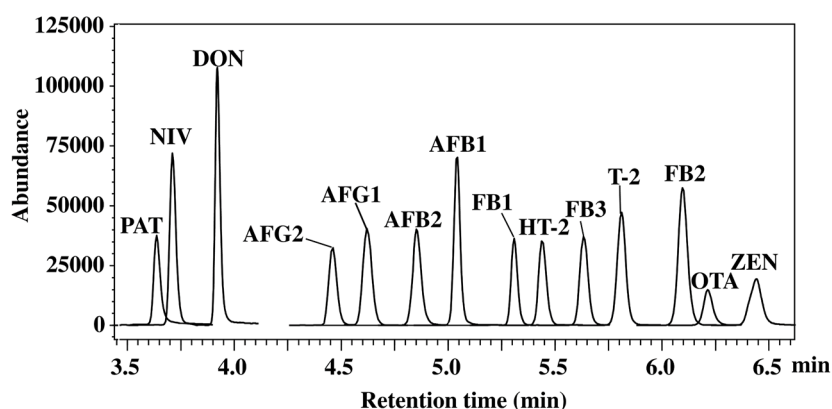
フモニシン B 類のキャリーオーバーの原因究明と低減策を検討し、1 回で測定可能なカビ毒一斉分析

法の開発を行った。測定対象にはフモニシン B 類の汚染リスクの高いコーンを選択し、高濃度測定においてもキャリーオーバーの無い一斉分析法の検討を行った。

LC 装置内におけるキャリーオーバーの原因は、フモニシン B 類が流路中の微量金属とキレーションにより吸着することで発生するものと推察した (Figure 3-(A))。その原因箇所は、LC インジェクションニードル及び分析カラムが想定され、一般的にそれらの材質はステンレス (SUS) である。SUS 及びその材料である鉄、ニッケルの金属粉末を用いて、FB1 との吸着の有無を検証した結果、溶液中の FB1 はこれらの金属と吸着することを確認した。次に、フモニシン B 類はクエン酸イオンとの競合的キレーション (Figure 3-(B)) 及び低極性溶媒への溶解により金属から遊離するものと考え、洗浄溶媒を検討した結果、クエン酸三ナトリウム水溶液及び 1%ギ酸水溶液/メタノール/アセトニトリル/イソプロパノール (1:1:1:1) で洗浄できることを確認した。LC インジェクションニードルの洗浄工程にこれらの溶媒を用い、さらに内部が樹脂で処理され SUS の活性を抑制した分析カラム (MastroC18) を用いた結果、FB1、FB2、FB3 のキャリーオーバーが大幅に低減され、全ての主要カビ毒を 1 回で測定可能な一斉分析法の開発に成功した (Figure 4)。



**Figure 3** Possible coordination. (A) Interaction with metal ions with FB1; (B) interaction between metal ions and citrate ions.



**Figure 4** A chromatogram of the 14 mycotoxins for a Mastro C18.

コーンは脂質及び色素成分を多く含むことから、前処理は脱脂のための QuEChERS 抽出と色素成分除去のための多機能カートリッジ精製とした。本分析法により広い濃度範囲においてもキャリーオーバ

一の無い良好な分析精度を得た。本分析法を用いて市販コーンを分析した結果、トリコテセン類 (NIV、DON、HT-2、T-2)、フモニシン B 類 (FB1、FB2、FB3)、ZEN が検出された。特に DON、FB1、FB2、FB3、ZEN の検出濃度及び頻度が高い傾向が見られた。これらのカビ毒は、フザリウム菌が産生するフザリウムカビ毒と呼ばれ、コーンを共汚染していることを確認した。

### 3. LC-Orbitrap MSによるカビ毒汚染コーン中のフモニシン類縁体の検出及び分析法開発

コーンから高濃度・高頻度で検出したフモニシン B 類には、いくつかの類縁体が知られ同様の毒性が報告されている。しかし、これらの類縁体を食品から検出し定量した報告はない。そこで、精密質量測定が可能で物質推定に有用な LC-Orbitrap MS を用いて、コーン中のフモニシン類縁体の検出と定量を試みた。

LC-Orbitrap MS を用いた精密質量測定の結果、カビ毒汚染コーンからフモニシン B 類の *N*-アセチル体であるフモニシン A 類と推定される 3 物質を検出した。そこで、フモニシン B 類標準物質のアセチル化によりフモニシン A 類を合成し (Figure 5)、検出された 3 物質の保持時間及びプロダクトイオンスペクトルを比較した結果、それぞれ FA1、FA2、FA3 であると同定した。

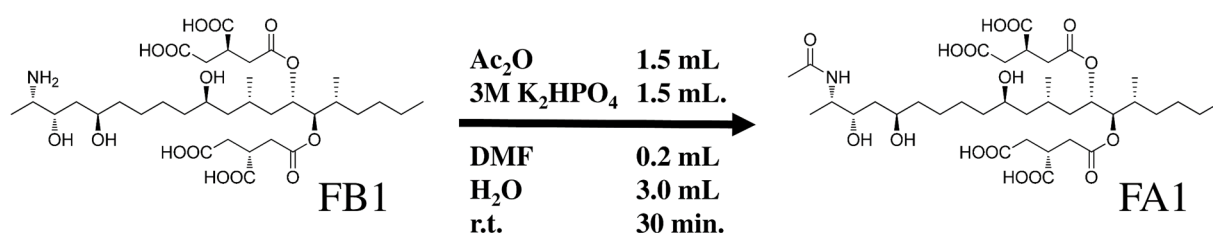
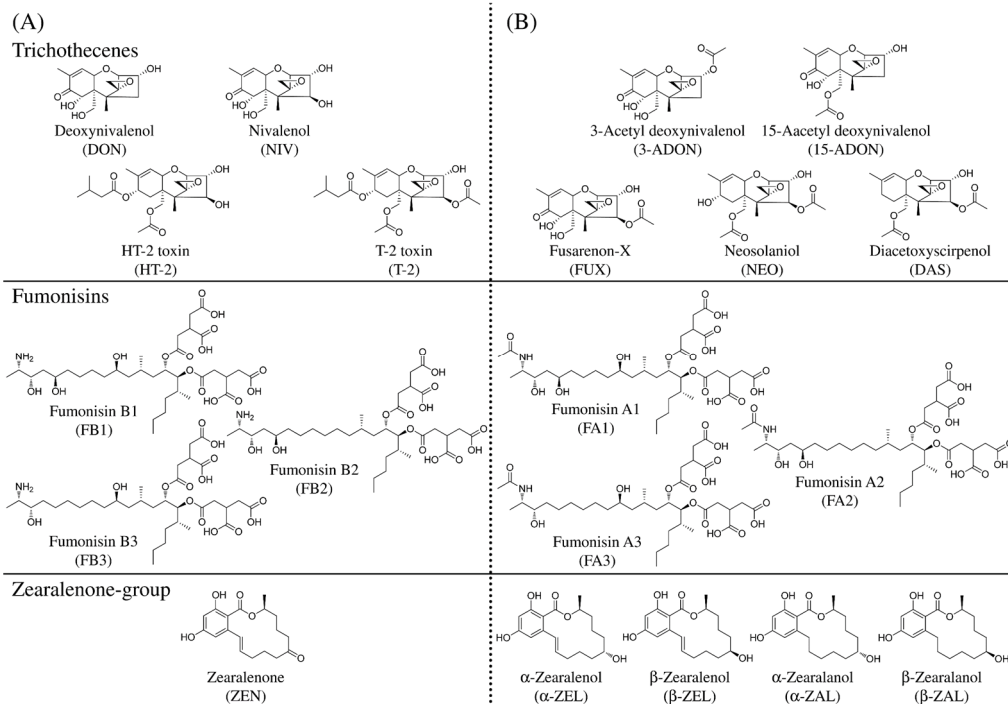


Figure 5 Synthesis of FA1 from FB1.

コーンを対象に、フモニシン類 6 種 (FA1、FA2、FA3 及び FB1、FB2、FB3) の一斉分析法を検討した。前処理は上述の QuEChERS 抽出と多機能カートリッジ精製とし、良好な分析精度を得た。2 章において、FB1、FB2、FB3 が高濃度検出したコーン試料を測定した結果、全ての試料から FA1、FA2、FA3 が検出され、フモニシン B 類とフモニシン A 類に共汚染されていることを確認した。この分析結果は、コーン試料からフモニシン A 類を初めて同定・定量した結果である。

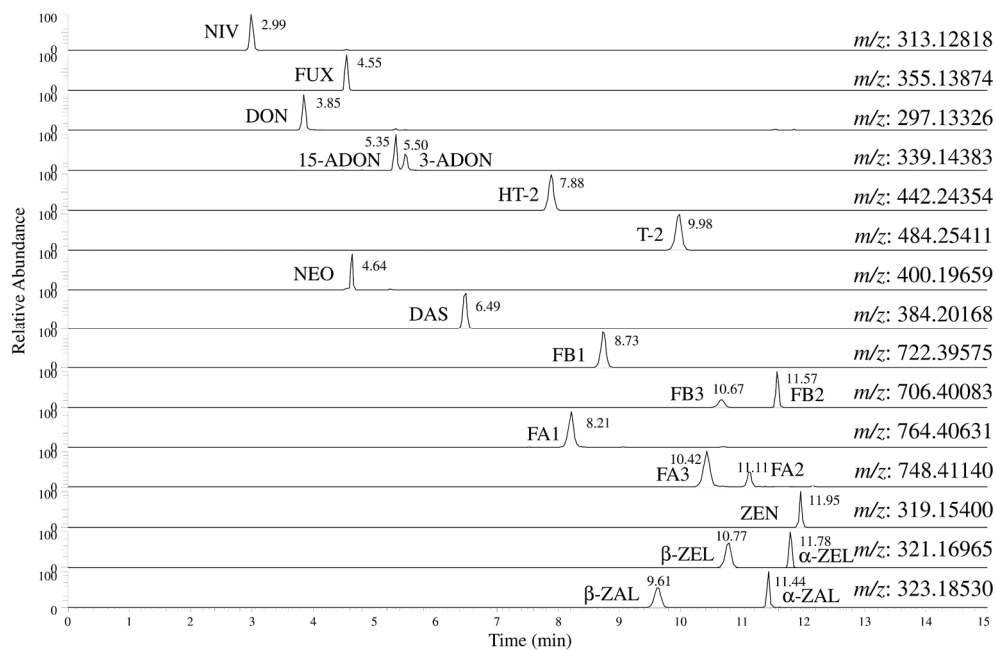
### 4. LC-Orbitrap MS を用いた穀類中のフザリウムカビ毒一斉分析法の開発

2 章においてコーンから検出されたフザリウムカビ毒には、化学構造が近く、毒性が同等またはそれ以上の類縁体が知られている。DON の類縁体である 3-ADON と 15-ADON は、生体内にて DON に変換し毒性を示す。また、ZEN の還元代謝物である  $\alpha$ -ZEL、 $\beta$ -ZEL、 $\alpha$ -ZAL、 $\beta$ -ZAL は ZEN と同様にエストロゲン活性を示し、ZEN よりも活性が高いものがある。加えて、これらは同じ組成式を持ち、質量分析装置での判別が困難な異性体である。従って、これらの類縁体を精度よく定量するためには、LC による分離が不可欠である。そこで、主要なフザリウムカビ毒とその類縁体を対象に、異性体 (FB2/FB3、3-ADON /15-ADON、FA2/FA3、 $\alpha$ -ZEL/ $\beta$ -ZEL、 $\alpha$ -ZAL/ $\beta$ -ZAL) の LC 分離条件を検討し、LC-Orbitrap MS を用いたフザリウムカビ毒 (Figure 6) の一斉分析法の開発を行った。



**Figure 6** Structures of *Fusarium* toxins. (A) Key *Fusarium* toxins and (B) derivatives of the key *Fusarium* toxins.

ODS カラム (MastroC18) では位置異性体である 3-ADON と 15-ADON の分離は不可能であった。そこで、異性体の分離に有効なペンタフルオロフェニル (PFP) カラム (MastroPFP) を用いることとした。3-ADON 及び 15-ADON 中のそれぞれの水酸基の位置関係により PFP 基との相互作用が異なり、3-ADON と 15-ADON は分離するものと考えた。標準物質を用いて確認した結果、3-ADON と 15-ADON を含めた 20 種フザリウムカビ毒の完全分離を達成した (Figure 7)。



**Figure 7** Chromatograms of the 20 *Fusarium* toxins for the Mastro PFP.



試料の前処理は QuEChERS 抽出と多機能カートリッジ精製とし、コーン、小麦、大麦に対して良好な分析精度が得られた。市販のコーン、小麦、大麦を測定した結果、コーン試料からは、トリコテセン類、フモニシン類、ZEN が高濃度、高頻度で検出され、特にフモニシン B 類は高濃度であった。小麦、大麦試料からはトリコテセン類、特に DON が高頻度で検出された。一方、ZEN の類縁体である  $\alpha$ -ZEL、 $\beta$ -ZEL、 $\alpha$ -ZAL、 $\beta$ -ZAL は全ての試料において不検出であった。

## 結論

一斉分析に適した質量分析装置を用いた新しい公定法の第一歩とすべく、物性の異なる複数のカビ毒を対象に、適切な LC 条件の検討及び食品試料ごとに適した前処理法の検討を行い、LC-MS/MS 及び LC-Orbitrap MS を用いた迅速・高精度なカビ毒一斉分析法を開発した。これらの分析法を用いて市販のビール・ワイン・コーン・小麦・大麦を測定した結果、フザリウムカビ毒の検出頻度が高く、広く食品を汚染していることが示唆された。

1. LC-MS/MS を用いて国際的に注目されている主要カビ毒の一斉分析法を開発した。フモニシン B 類の顕著なキャリアオーバーを確認し、LC 条件を 2 つに分けキャリアオーバーを回避した。ビール及びワインに適した簡便な前処理法を開発し、極微量のカビ毒を検出した。
2. LC-MS/MS を用いて、キャリアオーバーを大幅に低減し 1 回で測定可能な主要カビ毒一斉分析法を開発した。フモニシン B 類のキャリアオーバーは金属との吸着が原因であり、溶媒による洗浄工程及び金属活性の低い分析カラムを用いることでキャリアオーバーの大幅な低減を可能とした。コーン試料に適した簡便な前処理法を開発し、主要なフザリウムカビ毒の共汚染を確認した。
3. LC-Orbitrap MS を用いて、コーン試料からフモニシン B 類の類縁体であるフモニシン A 類を検出し、フモニシン類 6 種の一斉分析法を開発した。測定したコーン試料は、フモニシン B 類だけでなく、フモニシン A 類にも汚染されていることを確認した。
4. LC-Orbitrap MS を用いたフザリウムカビ毒の一斉分析法を開発した。ペンタフルオロフェニルカラムを用いて、異性体を含むフザリウムカビ毒の完全分離を達成した。簡便な前処理法を用いてコーン・小麦・大麦を測定した結果、フザリウムカビ毒の検出頻度や検出濃度は高く、また一部の試料からその類縁体の検出を確認した。

開発したカビ毒一斉分析法を用いることで、日本における将来的なカビ毒の規制強化に対応できると共に厳密な管理が可能である。本研究成果は、食の安全に対するリスクの低減と新しい公定法として質量分析装置を用いた一斉分析法の構築に貢献できると考える。

参考論文)

1. Tamura, M.; Matsumoto, K.; Watanabe, J.; Iida, J.; Nagatomi, Y.; Mochizuki, N. Minimization of carryover for high-throughput liquid chromatography with tandem mass spectrometry analysis of 14 mycotoxins in corn grits. *J. Sep. Sci.* **2014**, *37*(13), 1552–1560.
2. Tamura, M.; Mochizuki, N.; Nagatomi, Y.; Toriba, A.; Hayakawa, K. Characterization of fumonisin A-series by high-resolution liquid chromatography-orbitrap mass spectrometry. *Toxins* **2014**, *6*(8), 2580-2593.
3. Tamura, M.; Mochizuki, N.; Nagatomi, Y.; Harayama, K.; Toriba, A.; Hayakawa, K. Identification and quantification of fumonisin A1, A2, and A3 in corn by high-resolution liquid chromatography-orbitrap mass spectrometry. *Toxins* **2015**, *7*(2), 582-592.
4. Tamura, M.; Mochizuki, N.; Nagatomi, Y.; Harayama, K.; Toriba, A.; Hayakawa, K. A method for simultaneous determination of 20 *Fusarium* toxins in cereals by high-resolution liquid chromatography-orbitrap mass spectrometry with a pentafluorophenyl column. *Toxins* **2015**, *7*(5), 1664-1682.

副論文)

1. Tamura, M.; Uyama, A.; Mochizuki, N. Development of a multi-mycotoxin analysis in beer-based drinks by a modified QuEChERS method and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Anal. Sci.* **2011**, *27*(6), 629-635.
2. Tamura, M.; Takahashi, A.; Uyama, A.; Mochizuki, N. A method for multiple mycotoxin analysis in wines by solid phase extraction and multifunctional cartridge purification, and ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Toxins* **2012**, *4*(6), 476-486.

# 審査結果の要旨

## [審査経過]

審査方針に従い基礎学力の確認，研究概要の説明と諮問を行った。次いで2月9日に口頭発表（最終試験）を行い，終了後の最終審査委員会で次のように判定した。

## [審査結果]

本研究は農産物や加工品を汚染することで注目されるカビ毒を対象に，以下の迅速・高精度な一斉分析法を開発して成果を得た。1) LC-MS/MS でフモニシン B 類のキャリアオーバーを回避した 15 種カビ毒の一斉分析法を開発した。簡便前処理法を開発してビール及びワインに適用し，極微量の検出に成功した。2) LC-MS/MS でキャリアオーバーを引き起こす金属の妨害が無い分析カラムを用いて 15 種カビ毒の一斉分析法を開発した。簡便な前処理法で，コーンから主要なフザリウムカビ毒の共汚染を確認することに成功した。3) LC-Orbitrap MS でフモニシン B 類と類縁体の同時検出を可能とし，フモニシン類 6 種の一斉分析法を開発した。さらにコーンからフモニシン A 類と B 類の同時分析に成功した。4) LC-Orbitrap MS にペンタフルオロフェニル分析カラムを組み合わせて，異性体を含むフザリウムカビ毒 20 種の完全分離分析法を確立した。本法は，簡便な前処理でコーン・小麦・大麦からフザリウムカビ毒やその類縁体を高性能に検出できる方法であることがわかった。以上の成果より，審査委員会は博士（創薬科学）に値すると判定した。