

目的

トリコテセン系カビ毒は、フザリウム属に分類されるカビが産生する二次代謝産物であり、穀物などの農作物を汚染することが知られている。分析にはHPLCやLC-MS/MSが一般に用いられるが、試料中の夾雑物が測定を妨げるため、前処理として精製用固相カラムが広く使用されている。精製用に用いられている充填剤として、逆相やイオン交換相が一般的である一方で、グラファイトカーボン（GC）は色素除去に優れた特性を持つことが知られている。本研究では、既存多機能カラムにカーボン系充填剤を組み合わせた試作カラムを用い、複数のカビ毒がどのような精製挙動を示すのかを比較し、前処理設計に資する基礎的知見を得ることを目的とした。

多機能カラムによる前処理

測定対象成分として、A型トリコテセン（T-2, HT-2, DAS）、B型トリコテセン（DON, NIV, Fus-X, 3-Ac-DON）、およびゼアラレノン（ZEA）を選定した。精製用固相抽出カラムとして、アフラトキシン用のInertSep VRA-1をベースにグラファイトカーボン（GC）を混合した改良型カラムを作製した。本検討において、使用する精製用多機能カラムは下記の6種とした。

- ① Inert Sep VRA-3
- ② VRA改1.6 g
- ③ VRA改1.6 g + GC50 mg
- ④ VRA改1.6 g + GC100 mg
- ⑤ VRA改1.6 g + GC200 mg
- ⑥ 他社カラムA

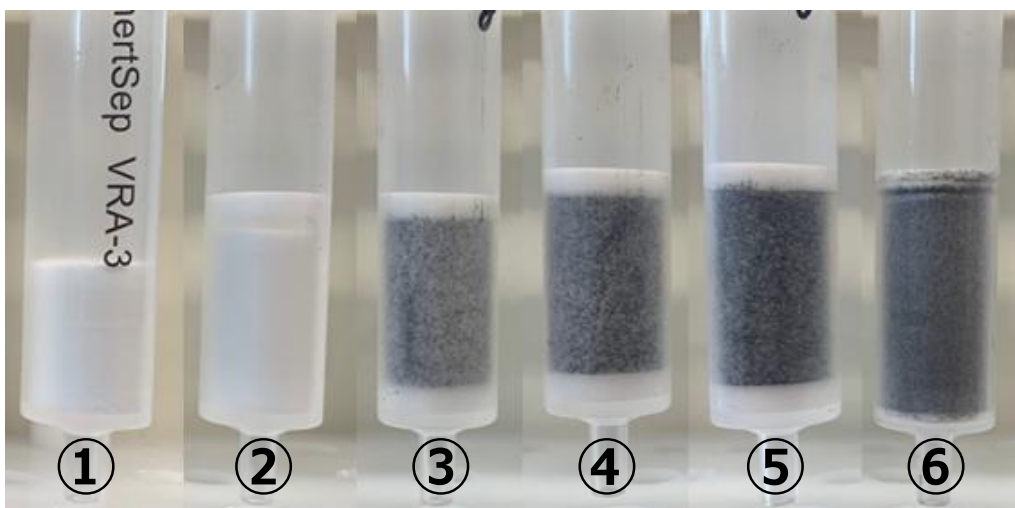


Fig1：精製用多機能カラム

Fig.2の前処理フローの手順に従って、多機能カラムの精製効果、溶出フラクションの確認、および回収試験を実施した。

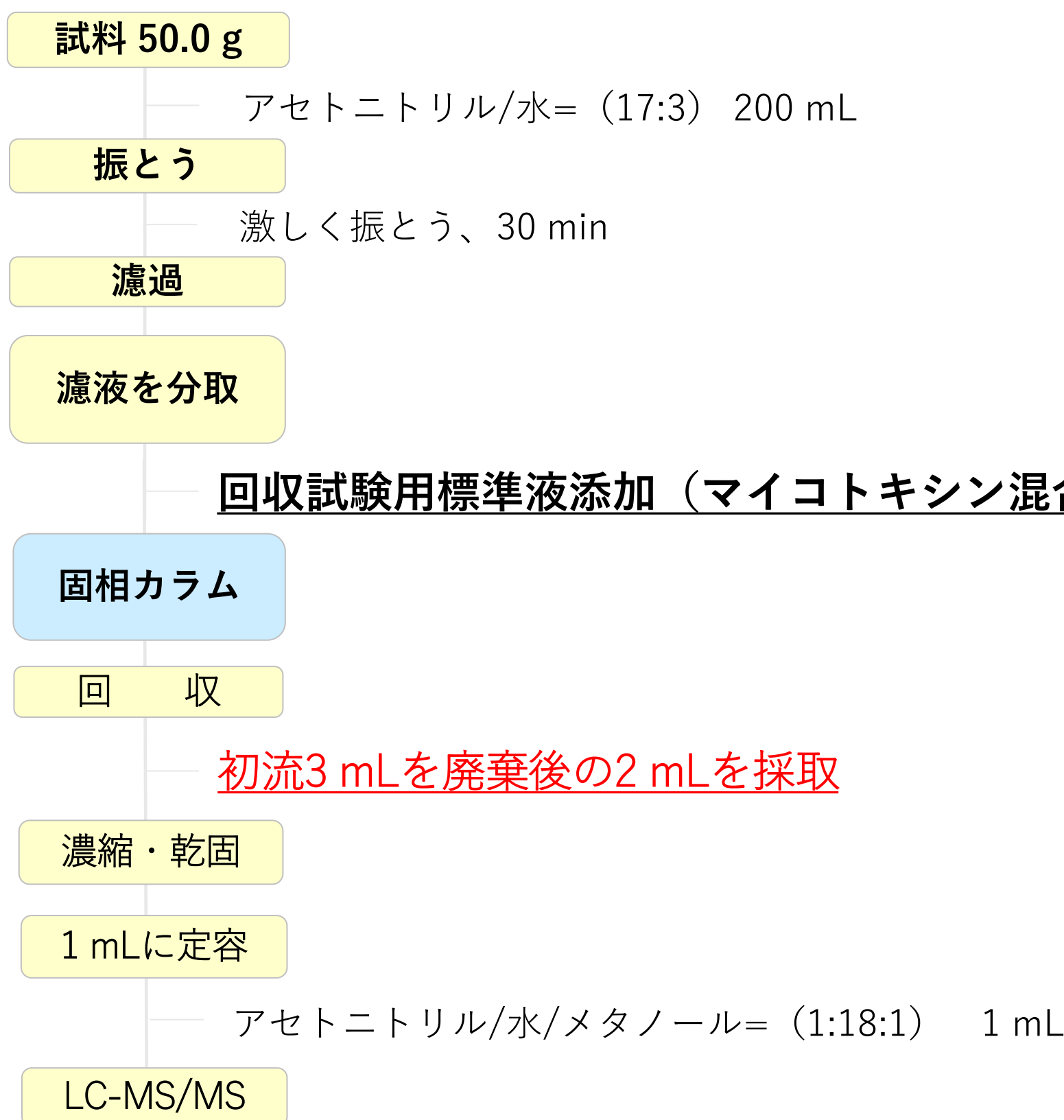


Fig.2：前処理フロー

測定対象農薬・分析条件

【対象農薬】
対象成分は、マイコトキシン混合液4（関東化学社製）の8成分とした。

Table1：LC-MS/MS分析条件

System	LC：Exion LC（サイエックス社製） MS：Triple Quad 4500（サイエックス社製）					
Column	InertSustain Swift C18 1.9 μm, 100 × 2.1 mm I.D. （ジーエルサイエンス社製）					
Eluent	A) 10 mmol/L CH ₃ COONH ₄ in H ₂ O B) CH ₃ OH					
	A/B = 90/10 – 15 min – 10/90 (3 min hold) – 18.1 min – 90/10 (4 min hold), V/V					
Flow Rate	0.2 mL/min					
Injection Vol.	5 μL					
Col. Temp.	40°C					
Detection	MS/MS (ESI, Positive, Negative, MRM)					
	Positive					
	CUR	CAD	IS	TEM	GS1	GS2
	30	6	4500	400	60	40
	Negative					
	CUR	CAD	IS	TEM	GS1	GS2
	30	6	-4000	400	60	40

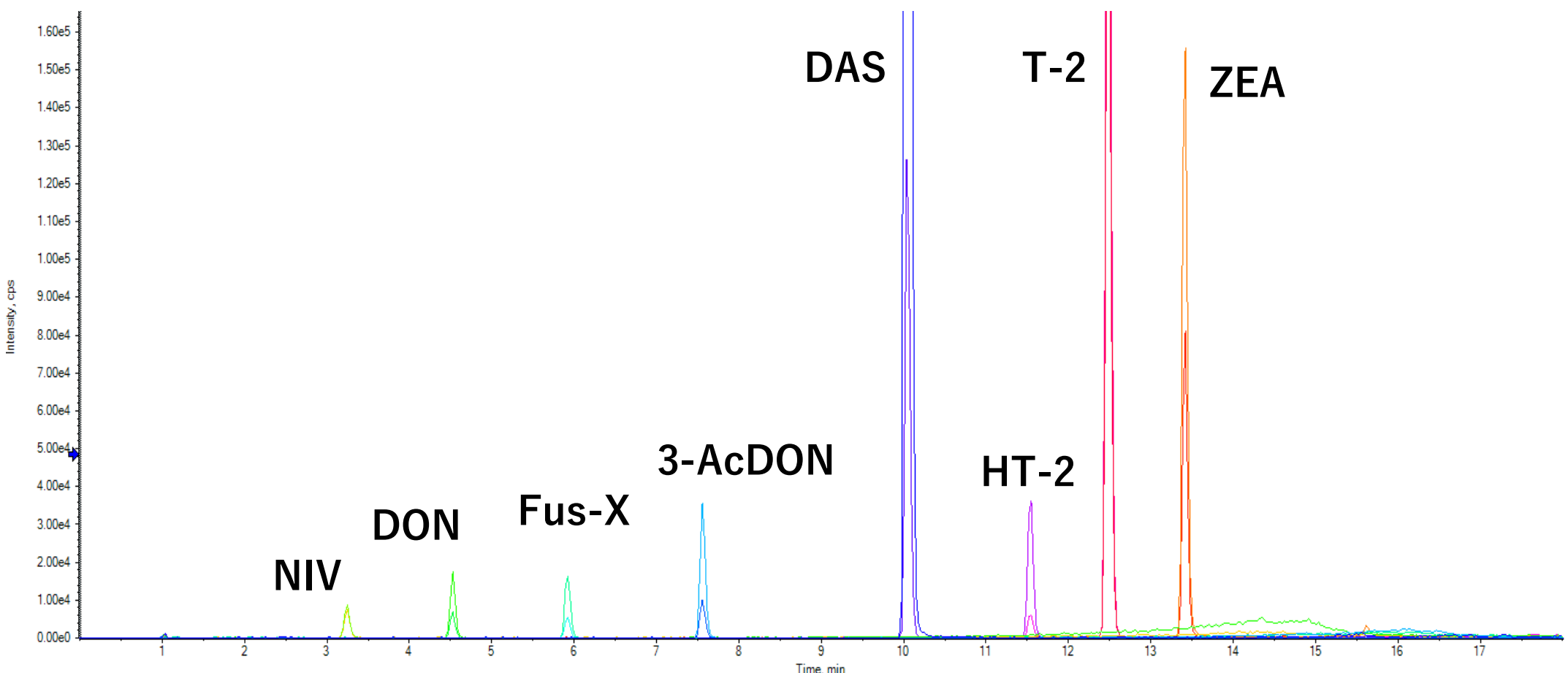


Fig.3：混合標準液のクロマトグラム（20 ng/mL）

結果

（検討1：各種多機能カラムの精製効果、DONの溶出画分に関する検討）

各種多機能カラムの精製効果、フラクションパターンを比較することを目的とした。試料はひよこ豆を用いて、固相カラムの溶出液を5分画採取し、HPLC-UVを用いて220 nmで分析した。精製効果について、改良型のカラムはいずれも精製効果が高い傾向にあった。また、グラファイトカーボン（GC）を含有する多機能カラムで処理した試料液に着色は見られなかった。画分1,2（0~4 mL）に関して、グラファイトカーボン（GC）の充填量による精製効果に違いは認められなかった（Fig.4）。一方で画分3（4~6 mL）については、精製効果に違いが見られ、GCを200 mg混合したカラムが最も精製効果が高かった（Fig.5）。DONの溶出画分について、画分2（2~4 mL）以降で100 %の回収率が得られた（Table2）。これらの結果を踏まえて、以降の検討では、⑤ VRA改1.6 g + GC200 mg（InertSep VRA-TRI）を用いることとした。

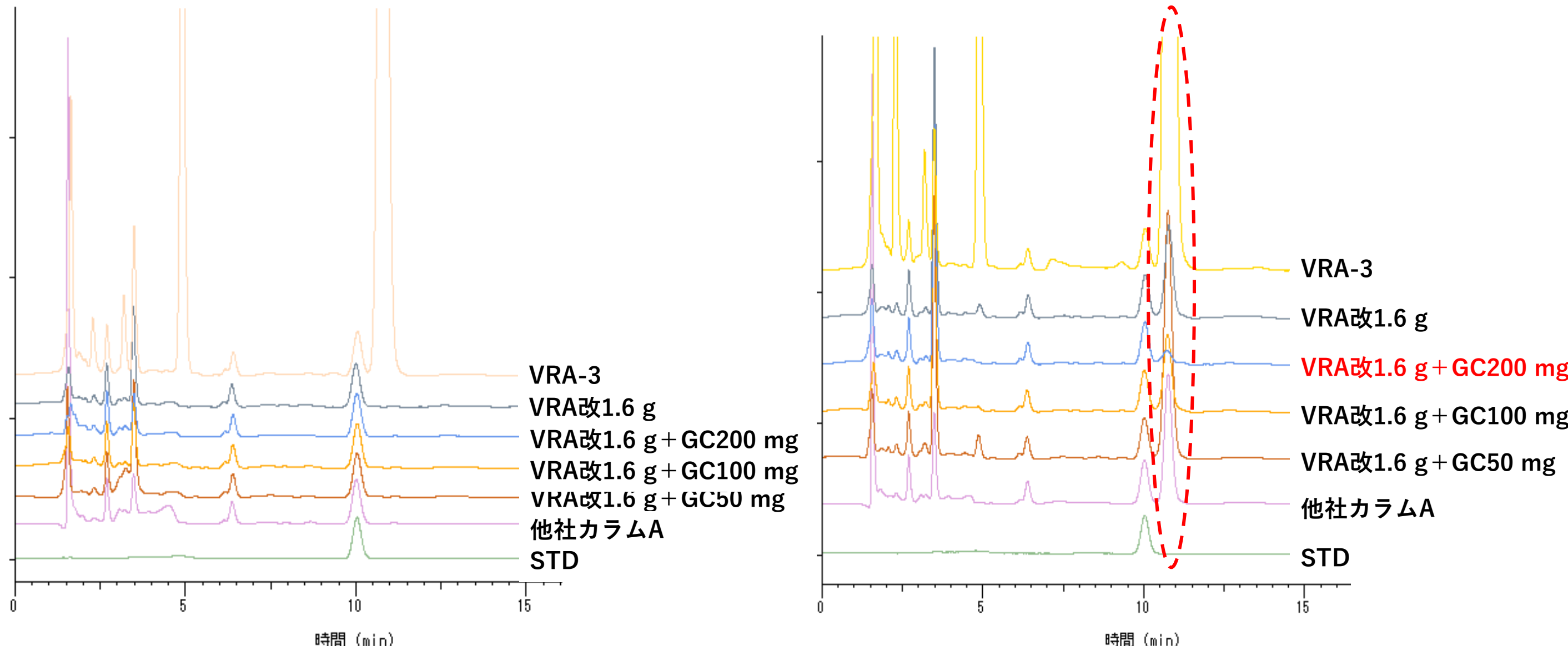


Fig.4：画分2の各クロマトグラム

Fig.5：画分3の各クロマトグラム

Table2：各種多機能カラムの各画分におけるDONの回収率（%）

	画分 1 (0~2 mL)	画分 2 (2~4 mL)	画分 3 (4~6 mL)	画分 4 (6~8 mL)	画分 5 (8~10 mL)
Inert Sep VRA-3	100.0	105.6	104.8	106.3	99.3
VRA改1.6 g	91.0	101.6	108.9	112.4	104.7
VRA改1.6 g + GC200 mg	83.4	105.4	108.5	113.2	107.6
VRA改1.6 g + GC100 mg	86.5	105.1	106.4	108.0	106.7
VRA改1.6 g + GC50 mg	88.7	105.6	109.3	110.9	108.5
他社カラムA	70.2	105.6	111.7	110.3	108.3

（検討2：⑤VRA改1.6 g + GC200 mg（InertSep VRA-TRI）の溶出画分に関する検討）

⑤VRA改1.6 g + GC200 mgを用いて、カビ毒8成分の溶出画分を確認した。固相カラムの溶出液を5分画採取して、LC-MS/MSで分析を行った。ZEAについては全ての画分で溶出が見られなかった。画分1（0~2 mL）では複数成分の回収率が低く、溶出しきれていなかった。画分2以降は良好な回収率が得られていたが、T-2は若干遅れて溶出してくる傾向にあった。以上の結果、および試験法¹⁾や文献事例²⁾を鑑みて、初流3mLを廃棄後の2 mLを採取する前処理フローとして、回収試験を行った。

Table3：⑤VRA改1.6 g + GC200 mgの各画分におけるカビ毒8成分の回収率（%）

	画分 1 (0~2 mL)	画分 2 (2~4 mL)	画分 3 (4~6 mL)	画分 4 (6~8 mL)	画分 5 (8~10 mL)
DAS	72.3	94.5	102.9	104.9	101.6
HT-2	73.4	97.2	94.2	115.0	102.5
T-2	57.2	87.8	95.5	101.0	100.2
ZEA	1.1	0.8	1.1	0.8	1.1
NIV	63.9	105.4	130.7	118.8	118.4
DON	99.9	104.5	102.9	105.5	100.6
Fus-X	107.2	106.6	112.7	109.5	107.4
3-AcDON	106.9	111.1	112.8	115.8	107.1

（検討3：実サンプルを用いた抽出液スパイクによる回収試験）

検討2の結果を踏まえて、抽出液スパイクによる回収試験を行った。試料には玄小麦、ひよこ豆、とうもろこしフレークを用いて、Fig.2の前処理フローに沿って行った。抽出液中のカビ毒成分は各10 ng/ mLとした。結果、ZEAを除く全ての成分で、良好な回収率、再現性が得られた。

Table4：抽出液スパイクによるカビ毒8成分の回収率（%）

	玄小麦		ひよこ豆		とうもろこしフレーク	
	Ave.	C.V.	Ave.	C.V.	Ave.	C.V.
DAS	96.9	5.7	99.4	1.6	92.9	0.8
HT-2	92.4	4.0	85.7	3.2	87.9	1.3
T-2	92.4	2.8	93.6	1.1	91.8	0.6
ZEA	2.8	49.2	1.2	32.2	0.6	9.0
NIV	108.7	1.4	100.2	7.6	93.4	6.5
DON	92.4	4.7	99.9	3.4	115.0	10.3
Fus-X	111.3	1.2	97.4	2.9	105.6	1.5
3-AcDON	101.1	5.1	103.3	3.3	104.4	5.3

まとめ

多機能カラムにグラファイトカーボンを含有させることで高い精製効果が得られた。⑤VRA改1.6 g + GC200 mg（InertSep VRA-TRI）を用いて、カビ毒8成分の溶出挙動を確認したところ、ZEAを除き、画分2以降で高い回収率が得られた。また、実サンプルを用いた抽出液スパイクによる回収試験を行ったところ、回収率、再現性共に良好な結果が得られ、本カラムがトリコテセン系カビ毒に対して有効な精製用カラムであることが示唆された。

参考文献

- 1) 厚生労働省, “小麦中のデオキシニバレノール試験法”
- 2) 佐野ら, “水産飼料中のトリコテセン系カビ毒一斉分析法の開発”, 日本水産学会誌 (2021)