

アセチルデオキシニバレノール異性体のクロマトグラフィー分離におけるカラム選択



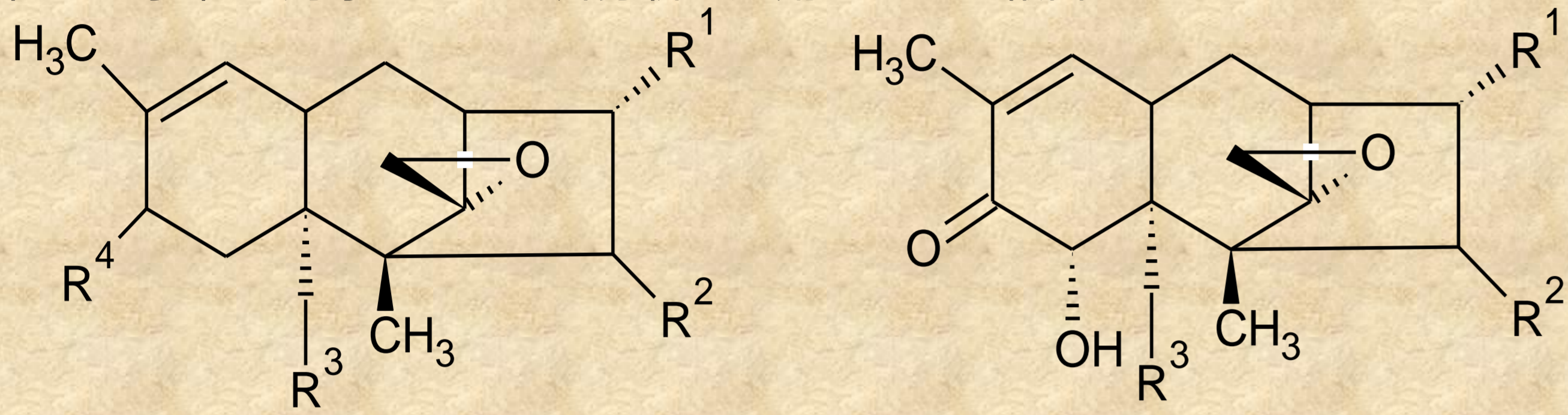
○佐野勇気¹、高橋洋武¹、橘田規¹、佐藤信彦¹、照井善光¹、望月直樹²
¹(一財)日本食品検査、²横浜薬科大学

一般財団法人 日本食品検査

【目的】

Fusarium 属菌が産生するトリコテセン系カビ毒は、麦、トウモロコシ等の穀類を汚染することで知られている。これらの類縁体は幅広い物性を有することから、一斉分析にはLC-MSが有効である。MSは高い選択性を有するが、夾雑物とのクロマトグラフィー分離は重要であり、特に異性体が存在する場合には完全分離が求められる。トリコテセン系カビ毒の一種であるアセチルデオキシニバレノール (AcDON) には、3-AcDONおよび15-AcDONの異性体があり、MSのトランジションが一致することから、クロマトグラフィー分離が必須となる。

この2つの分析種は、PFPカラムで高い分離度が得られるが、耐久性や安定性の面ではC18カラムより劣る。一方、C18カラムを用いて完全分離させることも可能であるが、測定に長時間を要するという問題点がある。今回、AcDON異性体の分離に最適な分析法を検討し、ニバレノール (NIV)、デオキシニバレノール (DON)、フザレノンX (FX)、ネオソラニオール (NEO)、ジアセトキシシロペノール (DAS)、HT-2トキシン (HT2)、T-2トキシン (T2) を含むトリコテセン系カビ毒9種を対象とした一斉分析に適用したので報告する。



化合物名	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
NEO	OH	OAc	OAc	OH
DAS	OH	OAc	OAc	H
HT2	OH	OH	OAc	(CH ₃) ₂ CH CH ₂ OCO
T2	OH	OAc	OAc	(CH ₃) ₂ CH CH ₂ OCO

化合物名	R ₁	R ₂	R ₃
NIV	OH	OH	OH
DON	OH	H	OH
FX	OH	OAc	OH
3-AcDON	OAc	H	OH
15-AcDON	OH	H	OAc

【方法】

種々の条件を検討し、3-AcDONおよび15-AcDONの分離を可能とする測定条件を設定した。さらに、本条件をトリコテセン系カビ毒9種を対象とした一斉分析に展開し、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」に従い、分析法の妥当性評価を実施した。前処理には下記条件を設定し、試料は小麦を用い、添加濃度は10 ng/g相当、1人が1日2回、5日間分析する枝分かれ実験計画を実施した。なお、標準品は関東化学製のマイコトキシン混合液4(A,B-Trichothecenes, ZON)、15-アセチルデオキシニバレノール標準品、ネオソラニオール標準品を使用した。検量線の範囲は1, 2.5, 5, 7.5, 10 ng/mLで分析した。

LC条件

- 装置：UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific)
- カラム：Raptor C18 (RESTEK)
- カラム温度：40 °C
- 流速：0.4 mL/min
- 移動相
- A液：0.1 vol% 酢酸
- B液：2 mmol/L 酢酸アンモニウム・MeOH溶液

時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)
0.0	98	2
0.5	98	2
7.0	60	40
10.0	2	98
11.0	2	98
11.01	98	2

MS条件

- 装置：Q Exactive Focus (Thermo Fisher Scientific)
- イオン化法：ESI
- 測定モード：Full MS (pos)
- 分解能：35,000 (@m/z 200)
- 化合物情報

化合物名	分子式	イオン種	精密質量
NIV	C ₁₅ H ₂₀ O ₇	[M+H] ⁺	313.128
DON	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	[M+H] ⁺	297.133
FX	C ₁₇ H ₂₂ O ₈	[M+H] ⁺	355.139
NEO	C ₁₉ H ₂₆ O ₈	[M+NH ₄] ⁺	400.197
3-AcDON	C ₁₇ H ₂₂ O ₇	[M+H] ⁺	339.144
15-AcDON	C ₁₇ H ₂₂ O ₇	[M+H] ⁺	339.144
DAS	C ₁₉ H ₂₆ O ₇	[M+NH ₄] ⁺	384.202
HT2	C ₂₂ H ₃₂ O ₈	[M+NH ₄] ⁺	442.244
T2	C ₂₄ H ₃₄ O ₉	[M+NH ₄] ⁺	484.254

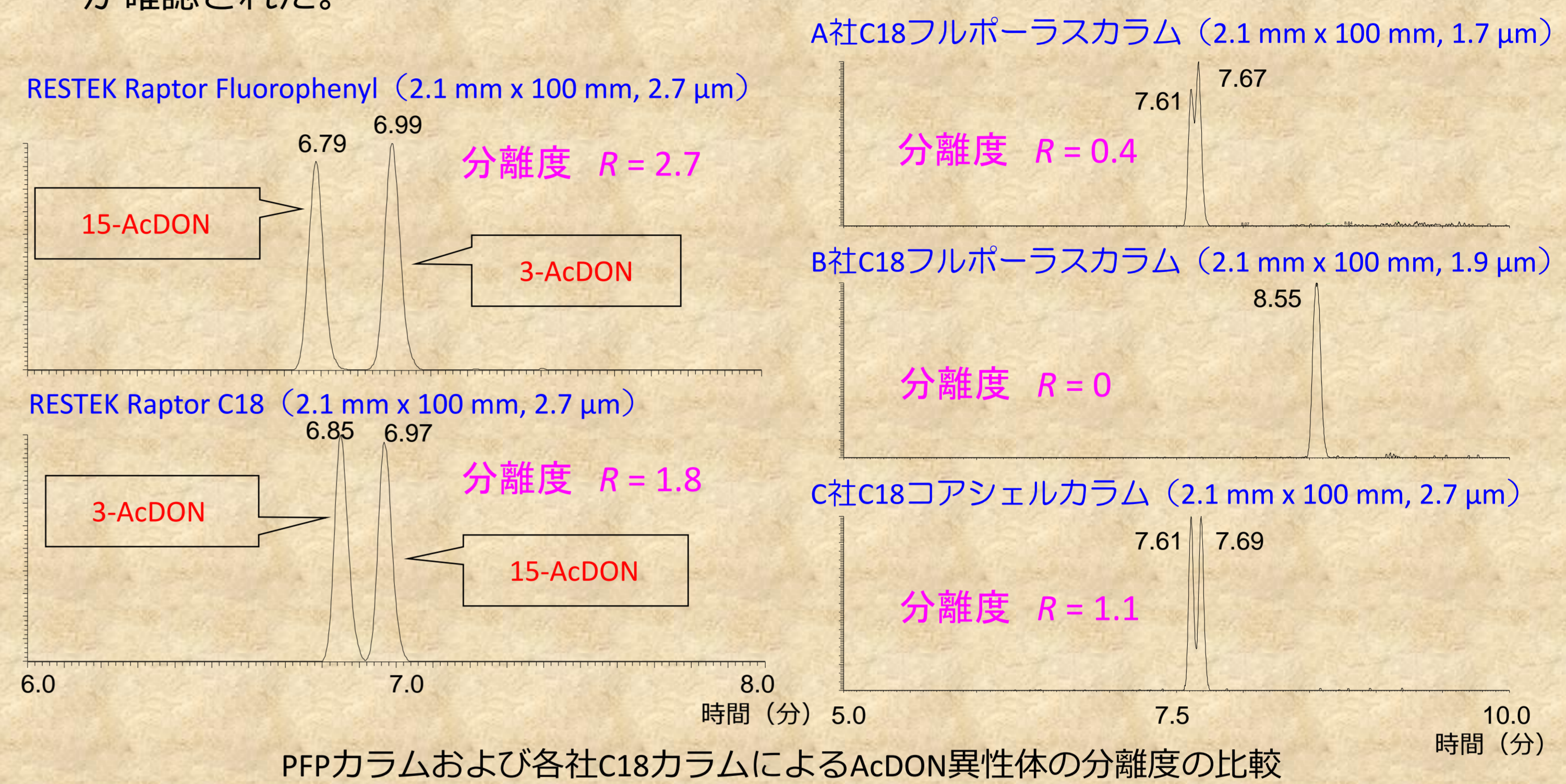
前処理条件

- 抽出 試料 25.0 gにACNおよび水 (21 : 4) 混液 100 mL加えて60分間振とう
- 精製 InertSep™ C18 (500 mg) (GL Science) / ISOLUTE® AL-N (500 mg) (Biotage) コンディショニング ACNおよび水 (9 : 1) 混液 5 mL
- 負荷 抽出液2 mL+ACN1.2 mL
- 溶出 ACNおよび水 (9 : 1) 混液 5 mL
- 濃縮乾固 (エバポレーター、40 °C以下、窒素気流)
- 定容 ACN : MeOH : 水 (1 : 1 : 18) 混液 1 mL
- 測定 LC-MS/MS

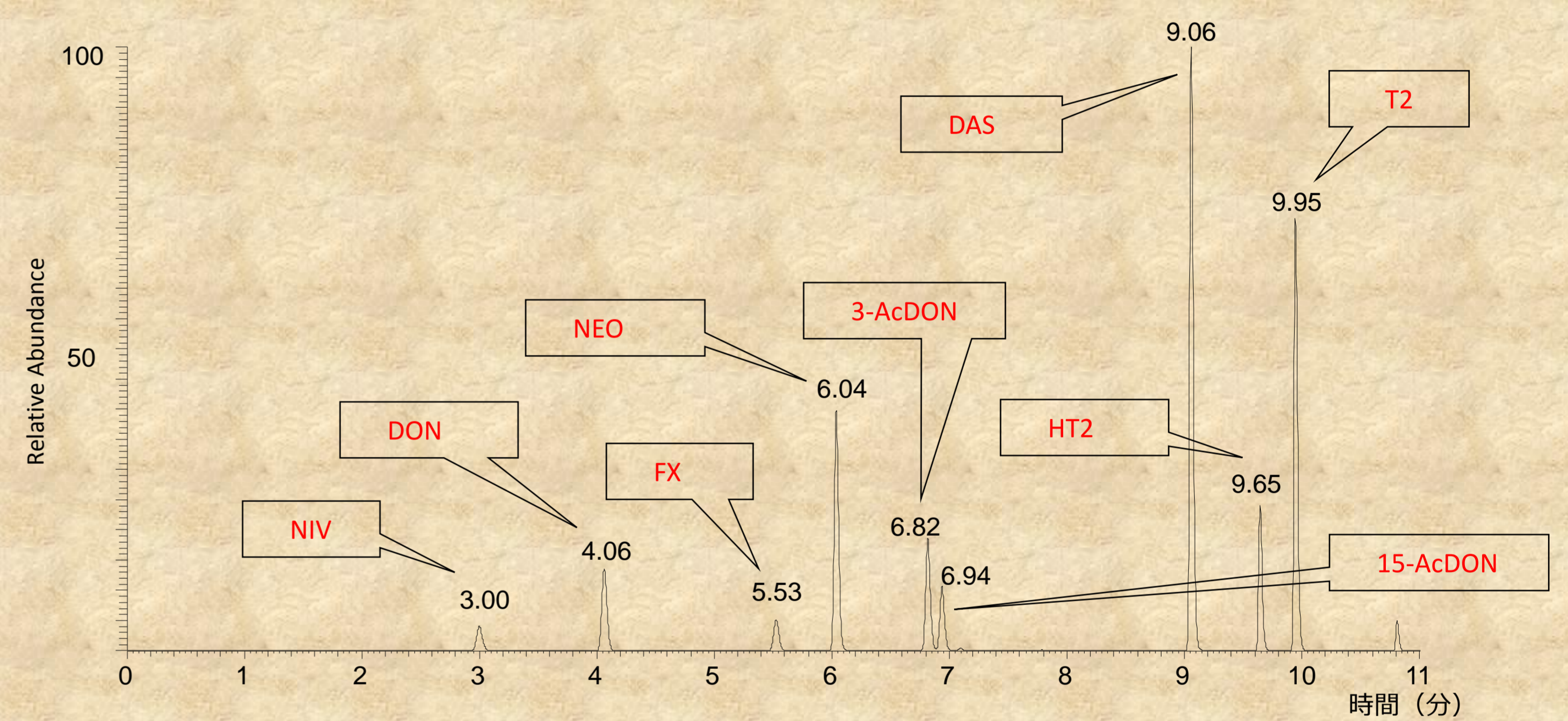
※抽出方法は「飼料分析基準 第五章 かび毒 第三節 多成分分析法」に準拠した。

【結果および考察】

PFPカラムおよびC18カラムではAcDON異性体の溶出順が異なった。これは、PFPカラムでは水酸基とフッ素の水素結合が大きく働き、一方C18カラムでは疎水性相互作用がわずかなLogPowの違いを捕え、両分析種の保持に影響したものと考えられる。C18カラムの分離度は0~1.8と製品ごとに様々で、PFPカラムには劣るものの、Raptor C18 (RESTEK)は唯一完全分離(R>1.5)を達成した。また、優れた分離に加え、高い耐久性と安定性を有する本カラムを用いて、トリコテセン系カビ毒9種を対象とした迅速一斉分析条件を確立した。本条件で実試料を用いた妥当性評価を実施したところ、全分析種で真度70%~120%、併行精度<25%、室内精度<30%、検量線の決定係数r²>0.995を満たす良好な結果が得られ、分析法の妥当性が確認された。

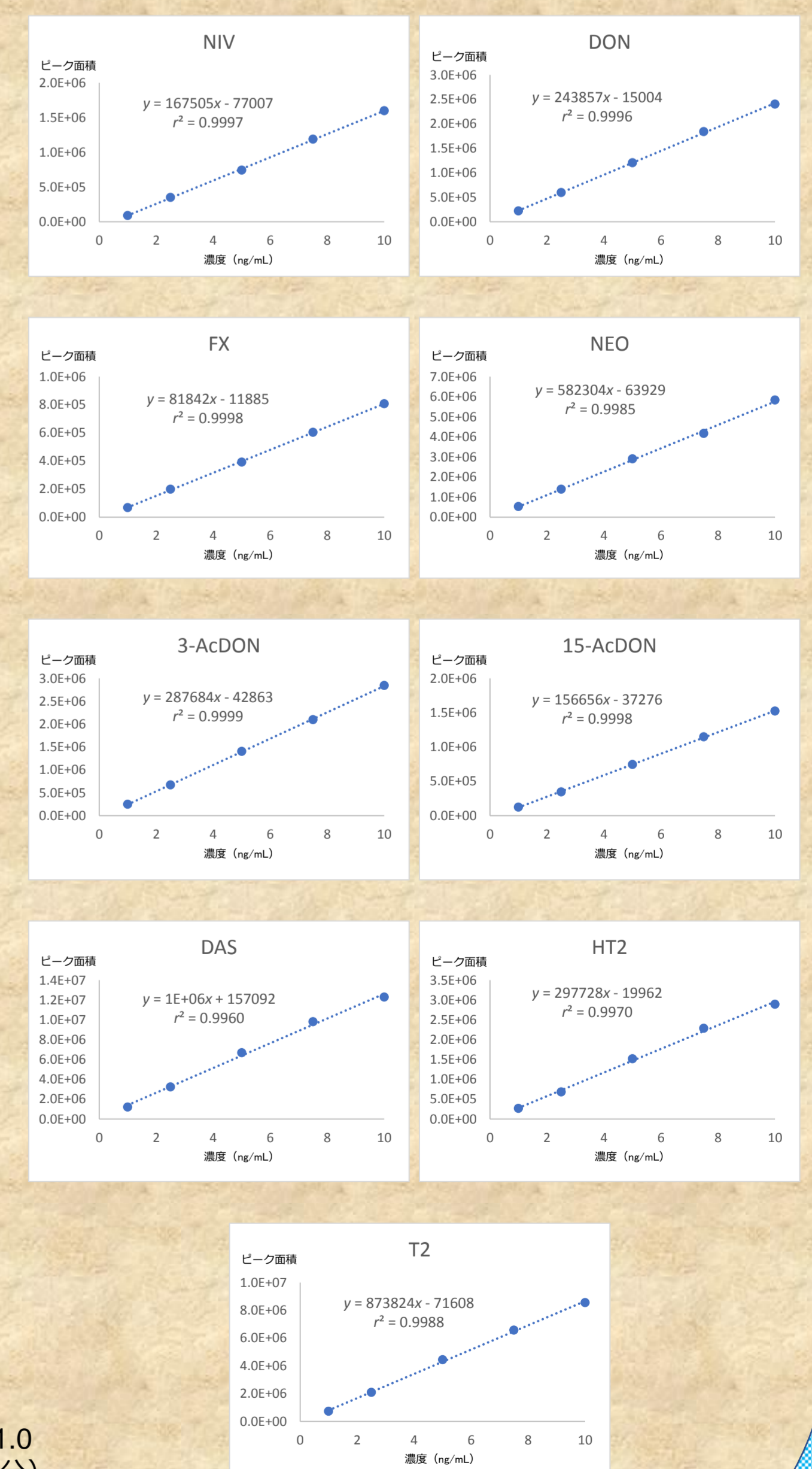


PFPカラムおよび各社C18カラムによるAcDON異性体の分離度の比較



妥当性評価結果

化合物名	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	LOQ (ng/mL)	LOD (ng/mL)
NIV	82.1	2.5	3.6	0.5	0.25
DON	91.6	5.0	8.1	0.5	0.25
FX	87.5	3.6	11.2	0.5	0.25
NEO	96.7	2.2	5.4	0.1	0.05
3-AcDON	99.3	2.3	5.0	0.1	0.05
DAS	96.3	3.0	3.3	0.05	0.025
HT2	88.0	5.6	7.0	0.25	0.1
T2	88.7	9.1	9.1	0.25	0.05



【まとめ】

PFPカラムおよびC18カラムでは保持機構が異なることからAcDON異性体の溶出順が入れ替わることが分かった。全体的にC18カラムはPFPカラムに比べ分離では劣るものの、Raptor C18では優れた分離が得られた。本カラムを用いてトリコテセン系カビ毒9種を対象とした一斉分析法の妥当性評価を実施したところ、良好な結果が得られた。今後は分析種の拡張を目指す。

参考文献 1) CHROMATOGRAPHY, 33, p.167 (2012). 2) 飼料分析基準(平成20年4月1日・19消安第14729号 農林水産省消費・安全局長通知).