水産飼料中のカビ毒一斉分析

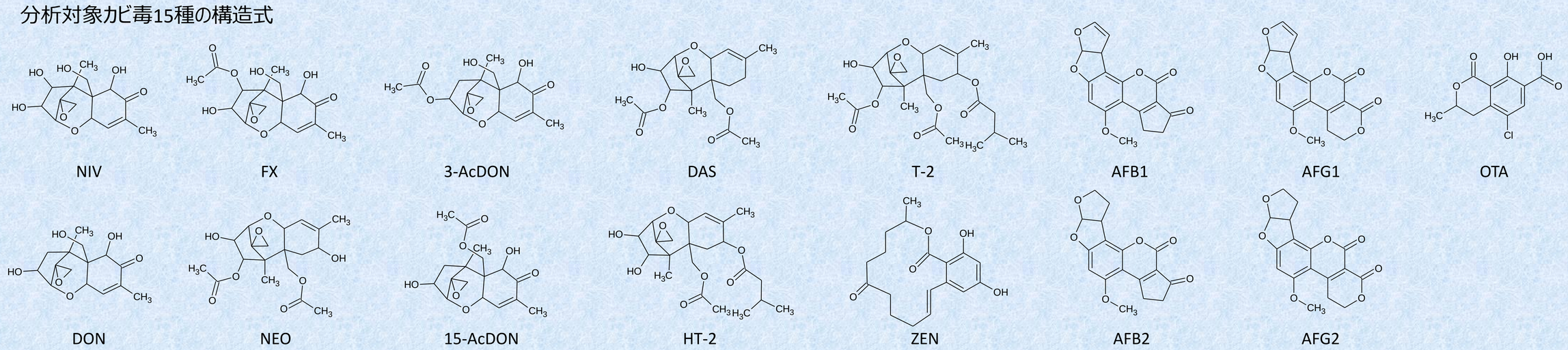
○佐野勇気[1]，高橋洋武[1]，橘田規[1]，佐藤信彦[1]，照井善光[1]，望月直樹[2]
[1]（一財）日本食品検査，[2]横浜薬科大学

一般財団法人
日本食品検査

【背景・目的】

養殖に使われる水産飼料は，その原料や保管状態によってはカビ毒に汚染される可能性がある。魚粉を配合したドライペレット系飼料には小麦粉が多く使用されており，また一方で穀物は多種類のカビ毒によって汚染されることが報告されている。特に，高温多湿の環境下で飼料が保管されると毒素産生カビの増殖が促されるため大きな被害が予想される。これまでに我々はトリコテセン系カビ毒であるNivalenol (NIV), Deoxynivalenol (DON), Fusarenon-X (FX), Neosolaniol (NEO), 3-Acethyldeoxynivalenol (3-AcDON), 15-Acethyldeoxynivalenol (15-AcDON), Diacetoxyscirpenol (DAS), HT-2 toxin (HT-2), T-2 toxin (T-2)の一斉分析法を検討してきた。本検討により，互いに構造異性体でありクロマトグラフィー分離が求められるAcDON異性体を，安定性および耐久性の高いC18カラムで完全分離する迅速条件の開発に成功し，様々な試料マトリックスの分析が可能となった。今回，Aflatoxin B1 (AFB1)，Aflatoxin B2 (AFB2)，Aflatoxin G1 (AFG1)，Aflatoxin G2 (AFG2) , Zearalenone (ZEN), Ochratoxin A (OTA)を加えたカビ毒15種に対象分析種を拡張した。本分析法の妥当性を評価し，これを用いて国内で流通している水産飼料の分析を行ったので報告する。

分析対象カビ毒15種の構造式



【方法】

各種の検討により測定条件および前処理条件を下記のとおり設定し，CODEX Procedural Manualに示された分析法の妥当性評価ガイドライン[1)]に従い，本分析法の妥当性評価を実施した。また，小麦粉の配合率の異なる3種のドライペレット，すなわち，小麦の配合率0 %のもの（以下「Sample 1」という。），小麦の配合率14 %のもの（以下「Sample 2」という。），小麦の配合率29 %（以下「Sample 3」という。）を対象試料とし分析を行った。

HPLC conditions

- LC : UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific)
- Column : Raptor C18 2.1 mm×100 mm, 2.7 µm (RESTEK)
- Column temperature : 40 °C
- Flow rate : 0.4mL/min
- Mobile phase
  - A : 0.1 vol% Acetic acid
  - B : 0.1 vol% Acetic acid MeOH containing 2 mmol/L ammonium acetate

Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
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 conditions

- MS : Q Exactive Focus (Thermo Fisher Scientific)
- Ionization : ESI (+)
- Mesurement mode : Full MS
- Resolution : 35,000（@*m/z* 200）

Compound Name	Formula	Adduct ion	Exact Mass
NIV	$C_{15}H_{20}O_7$	$[M+H]^+$	313.128
DON	$C_{15}H_{20}O_6$	$[M+H]^+$	297.133
FX	$C_{17}H_{22}O_8$	$[M+NH_4]^+$	372.165
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
HT-2	$C_{22}H_{32}O_8$	$[M+NH_4]^+$	442.244
T-2	$C_{24}H_{34}O_9$	$[M+NH_4]^+$	484.254
ZEN	$C_{18}H_{22}O_5$	$[M+H]^+$	319.154
AFB1	$C_{17}H_{12}O_6$	$[M+H]^+$	313.071
AFB2	$C_{17}H_{14}O_6$	$[M+H]^+$	315.086
AFG1	$C_{17}H_{12}O_7$	$[M+H]^+$	329.066
AFG2	$C_{17}H_{14}O_7$	$[M+H]^+$	331.081
OTA	$C_{20}H_{18}ClNO_6$	$[M+H]^+$	404.090

Pretreatment

< Extraction >※
- Sample 25.0 g
- Add ACN : Water (21:4) 100 mL
- Shaking (60 min)

↓

< Purification >
- Captiva EMR-Lipids (300 mg) (Agilent technologies) / ISOLUTE® Multimode (500 mg) (Biotage)
- Conditioning ACN 5 mL
- Load : Extract 0.8 mL
- Elute : ACN 5 mL
- Concentration
- Fill-up : ACN:MeOH:Water (1:1:18) 1 mL

↓

< Measurement >
- LC-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

【結果・考察】

15種のカビ毒の一斉分析から得られたクロマトグラム，各検量線，妥当性評価結果および水産飼料分析結果を下記に示した。真度，精度，検量線の直線性，選択性，感度など，全てのクライテリアを満たし，本分析法の妥当性が確認された。また，水産飼料の分析では検体2および検体3からそれぞれ0.03 ppm以上のDONが検出された。DONは多くの穀物から検出されることが知られており，今回の分析においても小麦の配合された検体のみから検出されたことから，飼料の加工に使用される小麦がDONに汚染されていたことが示唆された。ただし我が国における小麦中のDONの暫定基準は1.1 ppmであり，今回分析した試料はただちに健康危害を及ぼすレベルではなかった。

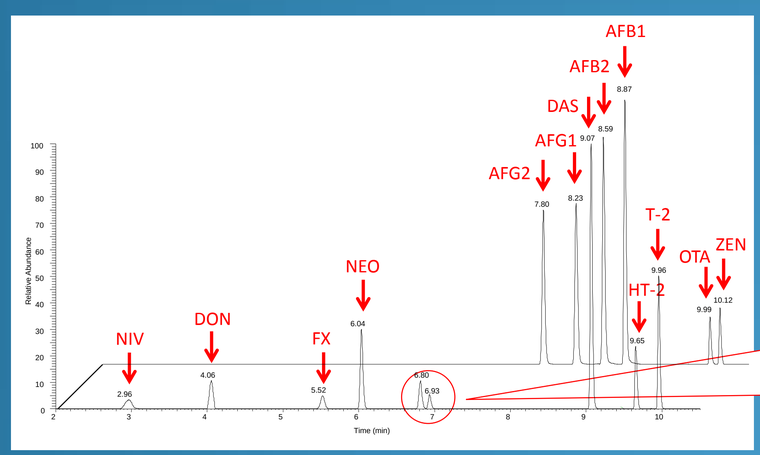


Fig.1 : EIC of 15 species of Mycotoxin

※AcDON異性体の分離にはPFPカラムが有利だが，水産飼料のような試料を分析すると，安定性および耐久性が悪く再現性の良いデータが得られない。C18カラムによる完全分離を達成したことにより本分析が可能になった。

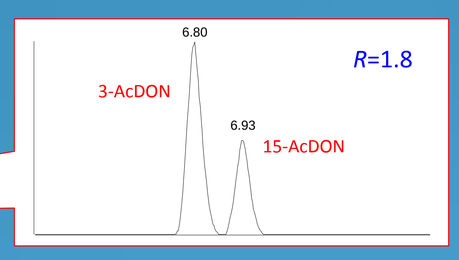


Fig.2 : EIC of 3-AcDON and 15-AcDON

Table 1 : Result of validation

Compound Name	Acccuracy (%)	Repeat-ability (%)	Reprodu-cibility (%)	LOQ (ng/mL)	LOD (ng/mL)
NIV	76.2	9.2	9.2	0.5	0.25
DON	88.8	6.5	8.8	0.5	0.25
FX	92.9	3.4	10.9	0.5	0.25
NEO	108.2	2.2	5.4	0.1	0.05
3-AcDON	106.9	2.5	4.9	0.1	0.05
15-AcDON	91.2	2.8	5.3	0.25	0.1
DAS	103.9	3.0	3.6	0.05	0.025
HT-2	112.2	6.1	7.8	0.25	0.1
T-2	111.5	8.2	10.5	0.25	0.05
ZEN	68.5	11.5	11.5	0.1	0.05
AFB1	83.6	5.6	7.7	0.05	0.025
AFB2	87.28	8.2	10.1	0.05	0.025
AFG1	82.28	4.5	6.6	0.05	0.025
AFG2	105.6	3.9	5.5	0.05	0.025
OTA	72.9	6.6	9.2	0.25	0.1

Table 2: Result of Sample analysis

Compound Name	Sample 1 (ppm)	Sample 2 (ppm)	Sample 3 (ppm)
NIV	N.D.	N.D.	N.D.
DON	N.D.	0.045	0.034
FX	N.D.	N.D.	N.D.
NEO	N.D.	N.D.	N.D.
3-AcDON	N.D.	N.D.	N.D.
15-AcDON	N.D.	N.D.	N.D.
DAS	N.D.	N.D.	N.D.
HT-2	N.D.	N.D.	N.D.
T-2	N.D.	N.D.	N.D.
ZEN	N.D.	N.D.	N.D.
AFB1	N.D.	N.D.	N.D.
AFB2	N.D.	N.D.	N.D.
AFG1	N.D.	N.D.	N.D.
AFG2	N.D.	N.D.	N.D.
OTA	N.D.	N.D.	N.D.

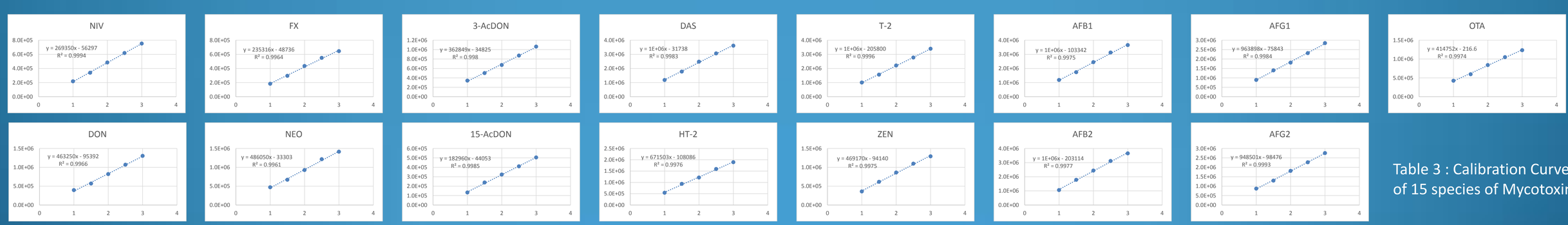


Table 3 : Calibration Curves of 15 species of Mycotoxin

【まとめ】

C18カラムを用いた15種のカビ毒の迅速一斉分析条件を開発した。本分析条件の妥当性評価をし，水産飼料の分析を実施したところ，小麦を配合した試料から0.03 ppm以上のDeoxynivalenolが検出された。わが国の小麦の暫定基準1.1 ppmに鑑みて直ちに健康危害を及ぼすレベルではないものの汚染の実態が示された。

謝辞 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提供頂いた関東化学株式会社にこの場を借りて御礼申し上げる。

参考文献 1) PROCEDURAL MANUAL Twenty-fifth edition, CODEX. 2) *CHROMATOGRAPHY*, **33**, p.167 (2012). 3) 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).