

Review

LC-MS/MS を用いたマイコトキシン分析

望月直樹

Analysis of Mycotoxins by LC-MS/MS

Naoki Mochizuki

*Research Laboratories for Food Safety Chemistry, Asahi Group Holdings, LTD**1-1-21 Midori, Moriya-Shi, Ibaraki 302-0106***Abstract**

Responding to increasing consumer demands for food safety, food and brewing makers have to present possible risks of contaminating their products, based on analytical data. There are various substances that can threaten the food safety, such as pesticides, mycotoxins, and veterinary medicines. LC-MS/MS analysis is a prevailing technique for the detection of these substances in food. Mycotoxins are especially frequent contaminants of agricultural products, and brewers are concerned that they can give serious damages to their products. In this study, a multi-residue method for the analysis of fourteen mycotoxins without any carry-over was developed. Using this method, the fates of mycotoxins in the courses of beer were investigated. The ground malt was artificially contaminated with the fourteen mycotoxins and was brewed on a laboratory scale. The samples taken at certain key stages in the brewing processes were analyzed by LC-MS/MS. Through the processes, many of the mycotoxins showed a reduction in concentration, and some of these resolved during the fermentation. This result suggests that the risks of contaminating beer with mycotoxins were reduced remarkably after the brewing.

Keywords: food safety, LC-MS/MS, mycotoxins, fates in the brewing

1. 緒言

近年の「食の安全」に対する消費者意識の高まりを受け、分析値に基づいた科学的なリスク管理の重要性が増している。しかし、食品におけるリスク成分は多種多様である上、多くの食品構成成分が分析を妨害するため、食品中の微量リスク成分を正確に分析するのは困難を極める。液体クロマトグラフトリプル四重極型質量分析計 (LC-MS/MS) は、高い感度と選択性を併せ持つため、近年食品分析の分野で急速に普及してきた分析装置である。一方、カビが産生する自然毒であるマイコトキシン (カビ毒: mycotoxin) は、国内外で規制が強化されつつある食品リスク物質であり、様々な分析法が開発されてきた。今回我々は、LC-MS/MS を用いたマ

イコトキシンの一斉分析法を確立し、その分析法を利用して酒類製造工程におけるマイコトキシンの挙動を明らかにしたので報告する。

2. マイコトキシンとその分析法

マイコトキシン (カビ毒: mycotoxin) は、カビが産生する二次代謝産物の中で、ヒトや動物に健康被害を及ぼす化合物である。主要なマイコトキシンとして、アフラトキシン類、オクラトキシン類、トリコテセン系マイコトキシン、フモニシン類、ゼアラレノンおよびパツリン等が挙げられる (Figure 1)。これらのマイコトキシンは難揮発性化合物が多く、HPLC-UV、HPLC-FL、GC、GC-MS で分析する方法

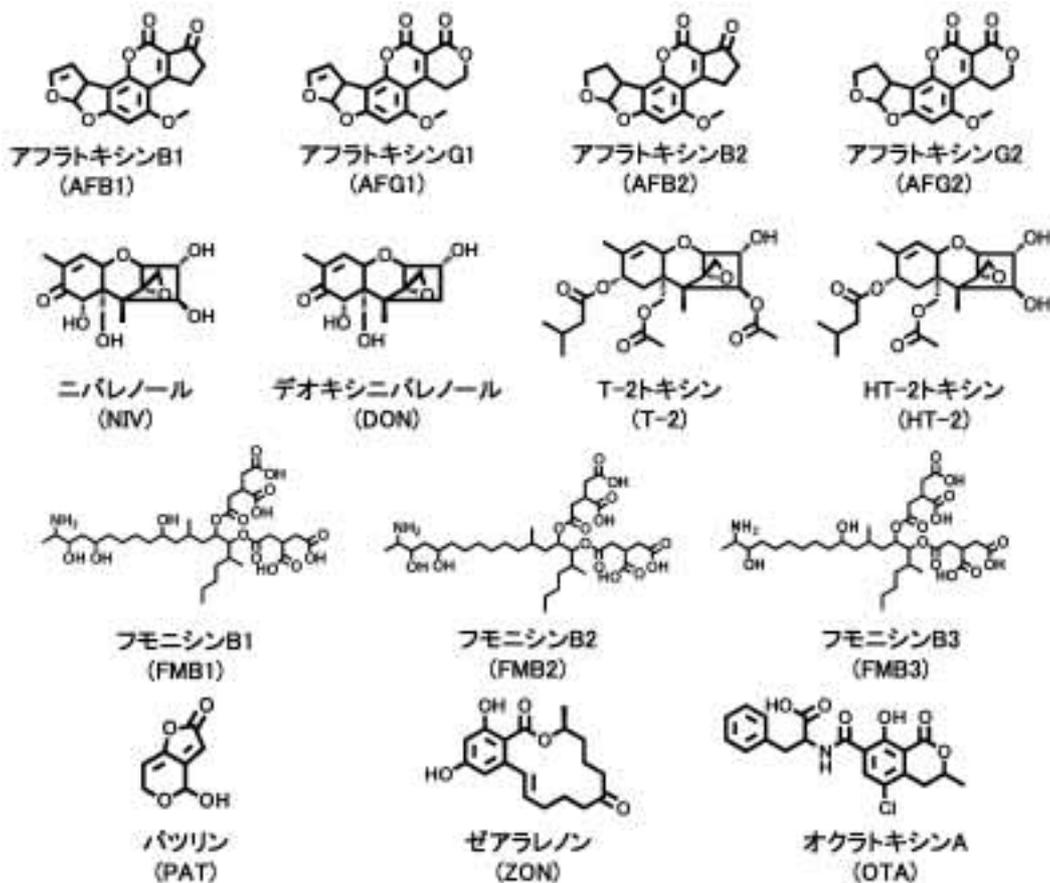


Figure 1. Structures of fourteen target mycotoxins.

が用いられてきたが、選択性および感度の低さ、誘導体化による前処理の煩雑さ等が問題となっており、選択性と感度に優れたLC-MS/MSによる分析が有効である[1,2]。

マイコトキシンは、強い毒性を有することからppbオーダーの高感度分析が求められており、このような低濃度域で精度良く分析するためには、分析を妨害する夾雑成分、すなわちマトリックスの影響を極力減らす必要がある。それには、適切なサンプル前処理によるマトリックスの除去とHPLCにおけるマイコトキシンとマトリックスの十分な分離が重要になる。

マイコトキシン分析におけるサンプル前処理には、固相カラムによる精製が広く用いられており、逆相カラム、イオン交換カラム、多機能カラム、抗体カラムといった様々な前処理用固相カラムが利用されている[3,4]。

逆相カラムやイオン交換カラムは、固相担体にマイコトキシンを保持させ、洗浄によりマトリックスを除去した後、溶出させることにより精製する。また、PVPP（ポリビニルポリピロリドン）樹脂を用いた逆相系樹脂カラムは、幅広い化合物に適度な保持能を有するため、多成分の一斉前処理に適している。

多機能カラムは、マトリックスを固相担体に保持させつつマイコトキシンを通過させることにより精製する。効率的に

マトリックスのみを保持するために順相、逆相、イオン交換用の担体、および活性炭が目的に応じて混合されている。各マイコトキシン分析用に設計された多機能カラムが市販されており、広く用いられている。

抗体カラム（イムノアフィニティーカラム）は、目的とする測定物質に特異的な抗体を固相担体に結合させたもので、目的物質以外の成分はこのカラムに保持されない。精製手順としては、試料を抗体カラムに負荷した後、水溶液でマトリックスを洗い流し、最後にメタノール等の有機溶媒で抗体を変性させることにより、目的物質をカラムから溶出させる。様々なマイコトキシンに対応した抗体カラムが市販されており、選択性が非常に高いことから、マトリックスを多く含んだサンプルの精製に用いられている。

次に、主要なマイコトキシンについて説明する。

アフラトキシン（AF）は、*Aspergillus* 属から産生され、ナッツ、穀類、香辛料から検出される。肝毒性が強く、特にAFB1は自然界で最も強い発ガン物質である。ビスフラン環とクマリン骨格にシクロペンタノンが結合したAFB1およびB2、6員環ラクトンが結合したAFG1およびG2の4つが代表的なアフラトキシン類である。分析法としては、多機能カラムや抗体カラムを用いて精製した後、AFB1とAFG1のフラン環を強酸で水酸化して蛍光誘導体とした後、

HPLC-FLで分析する。最近では、誘導体化せずにLC-MS/MSを用いて分析する方法も使われている[5]。

オクラトキシンA (OTA) は、*Aspergillus* 属、*Penicillium* 属の菌から産生され、イソクマリン骨格にフェニルアラニンが結合した構造を有する化合物で、穀類、ブドウ、コーヒー豆から検出される。血中半減期が長く、腎毒性が強い。分析法は、選択性の高い抗体カラムが前処理に用いられ、OTAが蛍光を発することからHPLC-FLが使われているが、LC-MS/MS法も報告されている[6-8]。

トリコテセン系マイコトキシンは、*Fusarium* 属の菌が産生し、麦、トウモロコシをはじめとする穀類を汚染する主要なマイコトキシンである。トリコテセン骨格と呼ばれるエポキシ環を含む4員環骨格を有するセスキテルペン化合物で、代表的なトリコテセン系マイコトキシンとして、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) が挙げられる。DONとNIVは構造中に水酸基を多く有する為、比較的水溶性が高い。分析法は、GC-MS法やHPLC-UV法が用いられてきたが、感度および選択性が劣ることから、LC-MS/MSを用いた分析法が開発されている[9-11]。

フモニシン (FM) は、*Fusarium* 属の菌が産生し、世界中のトウモロコシを汚染している。食道がんの原因物質として疑われている。長い炭化水素鎖にアミノ基を有する分子量700を超える化合物で、脂溶性が比較的高い。水酸基の位置と数の異なるFMB1、B2、B3が代表的なフモニシン類として知られている。分析法としては、構造中にカルボン酸を多く有するため、陰イオン交換基を有する固相カラムがフモニシンの前処理に有効である。アミノ基を蛍光試薬で化学修飾した後、HPLC-FLで分析する方法や、誘導体化をせずにLC-MS/MSで分析する方法がある[11,12]。

ゼアラレノン (ZON) は、大環状ラクトン化合物で、女性ホルモン様作用を示し、内分泌攪乱物質の一つである。トリコテセン系マイコトキシンと同様の*Fusarium* 属の菌によって生成されるが、トリコテセン骨格を有さないで区別される。分析法は、ZONが蛍光性を有することからHPLC-FLで分析されてきた。代謝物である α 、 β -ゼアラレノールと、 α 、 β -ゼアララノールを含めたLC-MS/MSによる一斉分析法もある[13,14]。

パツリン (PAT) は *Penicillium* 属の菌によって産生され、リンゴやリンゴジュース等の加工品を汚染する。不飽和ラクトン化合物で、ヘミアセタール環を有し、水溶性が高い。分析法として、HPLC-UV法が用いられている。またPVPPを用いた固相カラムで前処理をした後、LC-MS/MSを用いて分析する方法も知られている[15,16]。

このように、従来マイコトキシンの分析には、HPLC-UVやHPLC-FLで分析する方法が用いられてきたが、選択性および感度の低さ、誘導体化による前処理の煩雑さといった問題点をかかえており、これらを解決するために、選択性と感

度に優れたLC-MS/MSによる分析が注目を集めている。

3. トリコテセン系マイコトキシンの一斉分析

トリコテセン系マイコトキシンの分析法は、最近では誘導体化が不要なLC-MS/MSによる分析が主流となりつつある。我々の研究所においても、7種 (DON、NIV、T-2、HT-2、DAS、NEO、FX) のトリコテセン系マイコトキシンの一斉分析法を開発してきた[11]。しかし近年、7種以外にアセチルデオキシニバレノール (AcDON) の毒性も注目されるようになり、3-AcDONと15-AcDONも含めた9種類のトリコテセン系マイコトキシンの一斉分析法が必要となった (Figure 2)。3-AcDON及び15-AcDONは組成式が同じで極性もほぼ等しいためC18タイプの分析カラムでは分離することが難しい。また、MS/MSにおける m/z も、開裂パターンがほぼ一致するため、異なるプレカーサーイオンとプロダクトイオンを選択しづらく、MS/MSによる選択的な分析が困難である。

そこでC18カラムに代わり、ペンタフルオロフェニル (PFP) 基を持つカラムの使用を検討した。PFPカラムは、PFP基のフッ素原子と分析対象成分との間で複雑な相互作用を示し、特に構造異性体に対して良好な分離を示すことが知られている。今回PFPカラムを用い、移動相条件を最適化した結果、3-AcDONと15-AcDONの分離に成功した。これは、PFP基のフッ素とAcDONの水酸基との相互作用により、保持時間に差ができたものと考えられる (Figure 3)。更に、コアシェル (表面多孔性) 型カラムの使用により、分析の更なる高速化も試みた。コアシェル型充填剤は、無孔性の核を中心に持ち、その表面を官能基が結合した多孔性の層で覆っているため、全多孔性型カラムに比べてカラム内拡散が抑制され、ピーク形状が改善される。また、粒子径を大きくしても分離能が確保出来るため、システム圧が減少し、流速を上げることが可能となる。コアシェルカラム (Kinetex PFP, 150×2.1 mm, 2.6 μ m) を用いることで、3-AcDONと15-AcDONを良好に分離し、1分析サイクル7分という非常に迅速なトリコテセン系マイコトキシン9種の一斉分析を可能とした (Figure 4) (Table 1-3) [17]。

4. 主要マイコトキシン14種の一斉分析法

穀物 (とうもろこし、小麦、大麦、米など) は、マイコトキシンによる汚染が多く報告されている。穀物は酒類の主原料でもあるため、我々酒類メーカーはマイコトキシンによる汚染リスクを厳重に管理する必要がある。これまでにも、様々なマイコトキシン分析法が開発されてきたが、サンプル前処理法や機器測定条件がマイコトキシン毎に異なるため、複数のマイコトキシンを分析するには膨大な時間を要した。そのため、効率的かつ厳重な品質管理を実現するためには、LC-MS/MSを用いたマイコトキシンの迅速一斉分析法の開発が不可欠である。

我々は多様なシステム洗浄が可能な HPLC と高感度な MS /MS を用いることにより、主要マイコトキシン14種の高精度かつ高感度な迅速一斉分析法を確立することに成功した。対象としたマイコトキシンの構造式は Figure 1 に示したとおり

である。

ビール系飲料を対象としたサンプル前処理には、PVPP とジビニルベンゼン共重合体を固相担体とする逆相系樹脂カラム (Oasis HLB) を用いた。Oasis HLB は、Figure 5 に示した

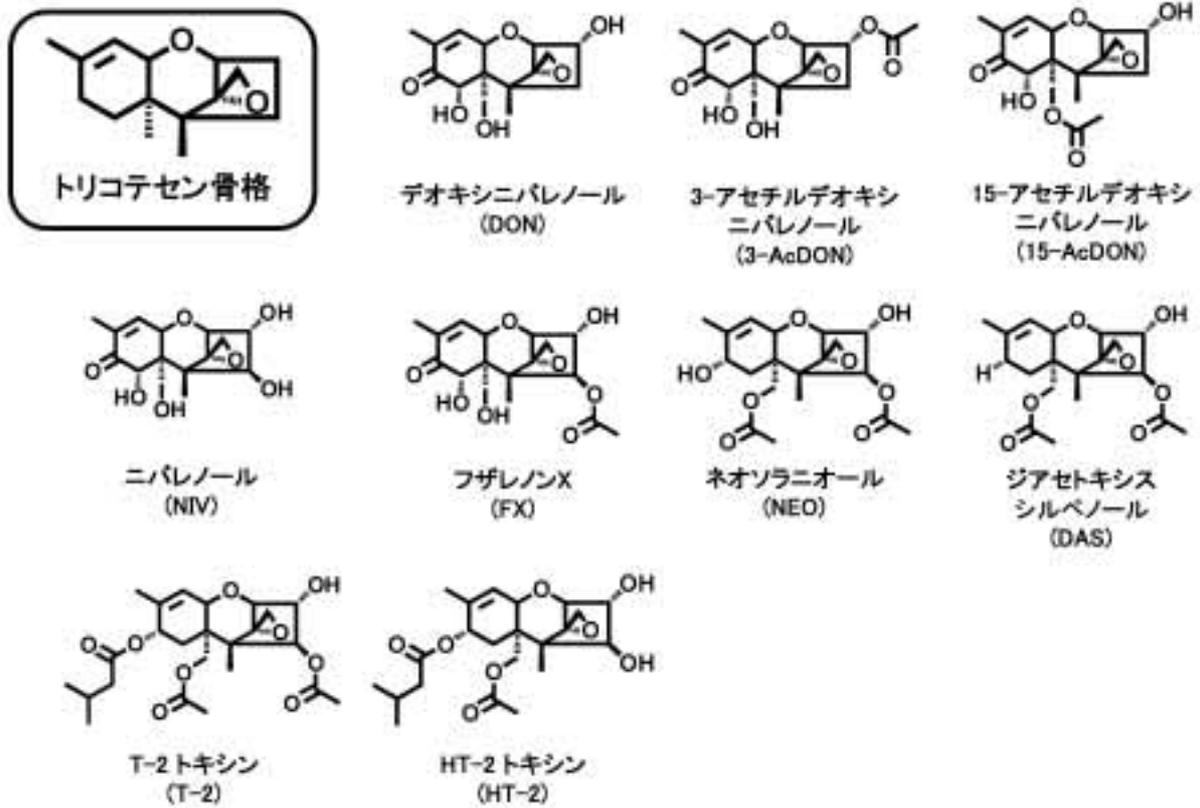


Figure 2. Structures of nine trichothecenes.

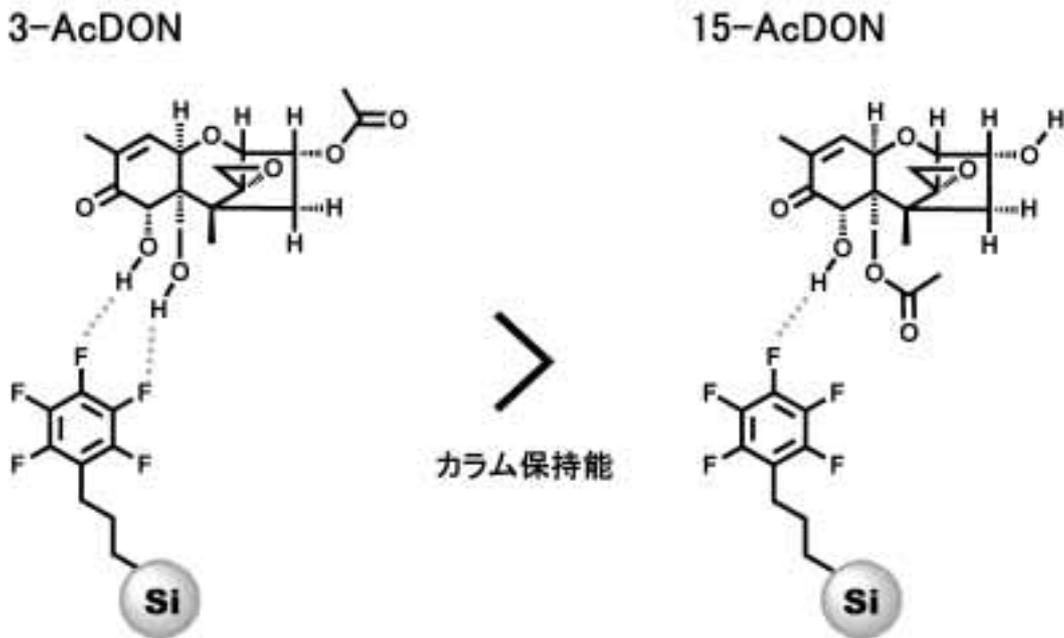


Figure 3. Image of interactions between the PFP column and AcDONs.

ように様々なマイコトキシンを保持することが出来、これによって14種のマイコトキシンを一度に精製することが可能となった。固形サンプルからの抽出には、残留農薬分析の簡易前処理法として注目されている QuEChERS 法の抽出法を利用した。

QuEChERS 法とは、2003年に残留農薬分析用に開発され

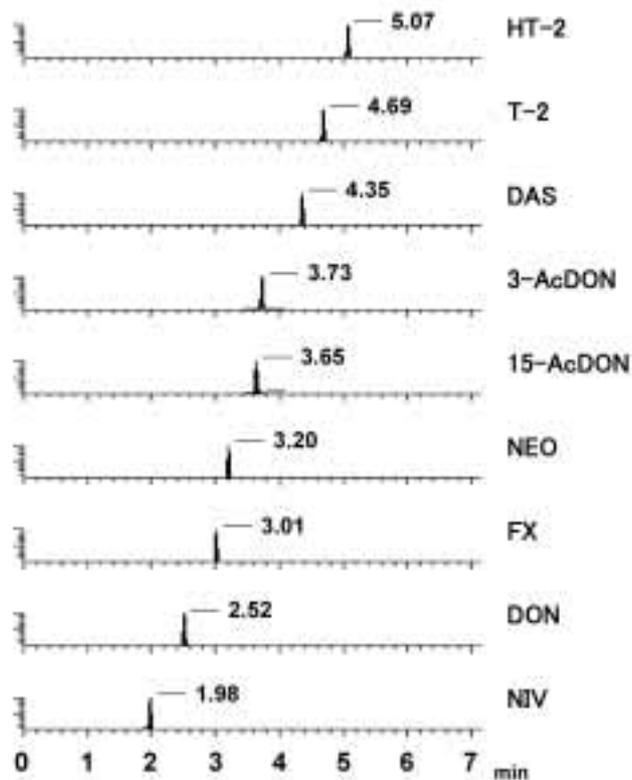


Figure 4. LC-MS/MS chromatograms of nine trichothecenes.

た迅速サンプル前処理法であり、QuEChERSとは「迅速 (Quick)、簡単 (Easy)、安価 (Cheap)、効率的 (Effective)、堅牢 (Rugged)、安全 (Safe)」の略である。この方法は、一段階目でアセトニトリル抽出+塩析+脱水を行い、二段階目で固相担体を抽出液に直接混ぜてマトリックスを除去するという非常に簡便な前処理法で、多検体を短時間で処理することが可能である。幅広い農薬に適応出来るため、残留農薬一斉分析の有用な前処理法として注目されており、数多くの論文が報告されている。また、各メーカーから、抽出用および精製の試薬キットが市販されており、今回のマイコトキシン分析には抽出用の市販キットを利用した[18,19]。

LC-MS/MSには、Nexera LCMS-8040 (Shimadzu) を用いた。分析カラムには金属フリーなC18カラム (Mastro C18、100×2.0 mm、3 μm) を使用し、移動相の流速は0.4 mL/min に設定した。イオン化条件としては、ESIの正イオン化モードと負イオン化モードをマイコトキシン毎に切り替えることによって高感度な一斉分析を可能とした。移動相に関しては、酢酸アンモニウムだけを使用する中性条件下で、フモニン類のピークに強いテーリングが見られたが、フモニン溶出時の移動相のpHを低くすることで、テーリングを抑制することができた。一方、感度の点からは、パツリンやデオキシニバレノールは移動相が中性の方が適していた。また、HT-2トキシシンとT-2トキシシンはアンモニア付加体イオンを検出イオンにしているため、移動相中のアンモニウム塩濃度が感度に影響を与えることが明らかとなった。それらを考慮し、移動相Aに酢酸アンモニウム、移動相Bに酢酸を加え、グラジエントプログラムで酢酸アンモニウム濃度とpHを調節することによって、マイコトキシン14種を1分析サイクル11分で一斉分析することに成功した (Figure 6) (Table 4 - 6)。

Table 1. UHPLC-MS/MS conditions for the determination of 9 trichothecenes.

| Testing condition | Specification |
|-------------------------|---|
| UHPLC | Acquity UPLC™ system (Waters) |
| Column | Kinetex PFP (2.6 μm, 2.1 × 150 mm: phenomenex) |
| Column temperature | 40°C |
| Flow rate | 0.4 mL/min |
| Mobile phase | Solvent A: 10 mM ammonium acetate aqueous solution Solvent B: Methanol |
| Gradient profile | 5% B (0 min) → 90%B (5-5.5 min) → 5%B (5.51-7.0 min) |
| Injection volume | 5 μL |
| MS/MS | Quattro Premier™ XE (Waters) |
| Ion source | Electrospray-ionization (ESI) |
| Capillary voltage | Positive mode: 3.0 kV Negative mode: 2.8 kV |
| Ion source temperature | 120°C |
| Desolvation temperature | 450°C |
| Cone gas flow | 50 L/h (nitrogen) |
| Desolvation gas flow | 800 L/h (nitrogen) |
| Collision gas flow | 0.3 mL/min (argon) |

Table 2. MS/MS conditions for selected parameters.

| Trichothecene | Polarity | Cone voltage (V) | Precursor ion (m/z) | Quantification ion | | Identification ion | |
|--|----------|------------------|---------------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|
| | | | | Collision energy (eV) | Product ion (m/z) | Collision energy (eV) | Product ion (m/z) |
| NIV | ESI- | 23 | 371 | 15 | 281 | 10 | 311 |
| DON | ESI+ | 28 | 297 | 10 | 249 | 13 | 231 |
| FX | ESI+ | 20 | 355 | 20 | 175 | 10 | 247 |
| NEO | ESI+ | 20 | 400 | 13 | 305 | 13 | 245 |
| 15-AcDON | ESI+ | 15 | 356 | 18 | 137 | 13 | 321 |
| 3-AcDON | ESI+ | 25 | 339 | 13 | 231 | 13 | 291 |
| DAS | ESI+ | 23 | 384 | 13 | 305 | 15 | 247 |
| HT-2 | ESI+ | 15 | 442 | 13 | 263 | 15 | 215 |
| T-2 | ESI+ | 20 | 484 | 23 | 185 | 25 | 305 |
| I.S. | | | | | | | |
| ¹³ C ₁₅ -NIV | ESI- | 23 | 386 | 15 | 295 | 10 | 326 |
| ¹³ C ₁₅ -DON | ESI+ | 28 | 312 | 13 | 263 | 13 | 245 |
| VEL | ESI+ | 13 | 284 | 5 | 267 | 7 | 249 |
| ¹³ C ₁₇ -3-AcDON | ESI+ | 15 | 373 | 8 | 356 | 17 | 245 |
| ¹³ C ₂₂ -HT-2 | ESI+ | 20 | 464 | 15 | 278 | 13 | 229 |
| ¹³ C ₂₄ -T-2 | ESI+ | 23 | 508 | 15 | 322 | 25 | 198 |

Table 3. Performance of the method used for determining trichothecene content in a corn product.

| Trichothecene | I.S. | Linearity (<i>r</i>) ¹⁾ | Repeatability (%) ²⁾ | Accuracy (%) ²⁾ | Retention time (min) |
|---------------|--|--------------------------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------|
| NIV | ¹³ C ₁₅ -NIV | >0.999 | 7.4 | 92 | 1.98 |
| DON | ¹³ C ₁₅ -DON | 0.996 | 2.6 | 91 | 2.50 |
| FX | VEL | 0.996 | 9.2 | 104 | 3.00 |
| NEO | ¹³ C ₁₇ -3-AcDON | 0.998 | 1.3 | 106 | 3.18 |
| 15-AcDON | ¹³ C ₁₇ -3-AcDON | 0.997 | 2.3 | 106 | 3.65 |
| 3-AcDON | ¹³ C ₁₇ -3-AcDON | 0.994 | 3.5 | 93 | 3.73 |
| DAS | ¹³ C ₂₂ -HT-2 | 0.994 | 7.3 | 80 | 4.34 |
| HT-2 | ¹³ C ₂₂ -HT-2 | 0.993 | 4.8 | 96 | 4.69 |
| T-2 | ¹³ C ₂₄ -T-2 | 0.994 | 3.5 | 91 | 5.08 |

1) The coefficient of linearity was determined at the level of 5, 10, 20, 50, 100, 200, and 500 µg/kg.

2) The accuracy and repeatability (%RSD) experiments involved 5 replicate measurements, which were carried out on the same day using corn-product samples spiked with trichothecenes at the level of 50 µg/kg.

LC-MS/MSによる高感度分析では、HPLC-UV分析など感度の低い分析では気付かなかった分析成分の吸着と、それに起因するキャリアオーバーが見出されることがある。吸着はバイアル、オートサンプラー、サンプルループ、カラム結合部などで多く見られ、成分が吸着した場合、その後の分析でキャリアオーバーが生じる可能性が高い。吸着の予防法としては、不活性化処理されたバイアルを使用すること、分析成分の極性に合わせた移動相を選択すること、注入部の最適な洗浄条件を選択すること、などが挙げられる。そして、これら対策を講じた後、キャリアオーバーがないことを確認し、分析に取り掛かることが重要である。LC-MS/MSでマイコトキシンの一斉分析を行う際には、特にフモニシン類

(FMB1、B2、B3)のキャリアオーバーが発生するので注意が必要である。その原因として、フモニシン類と金属とのキレーション形成による吸着が考えられるため (Figure 7)、我々は金属フリーな分析カラムの使用と、オートサンプラーの洗浄方法の最適化によりこの問題を解決した。今回使用した Mastro C18カラムはフリット部分に樹脂が用いられ、金属カラム管の内面が樹脂コーティングされているため、化合物が吸着し難い。また、オートサンプラーの洗浄液に、イソプロパノールとメタノールとアセトニトリルとギ酸水溶液の混合液と、キレーション能のあるクエン酸ナトリウム水溶液を用いることで、フモニシン類のシステムへの吸着を抑制できた。これによって、フモニシン類のキャリアオー

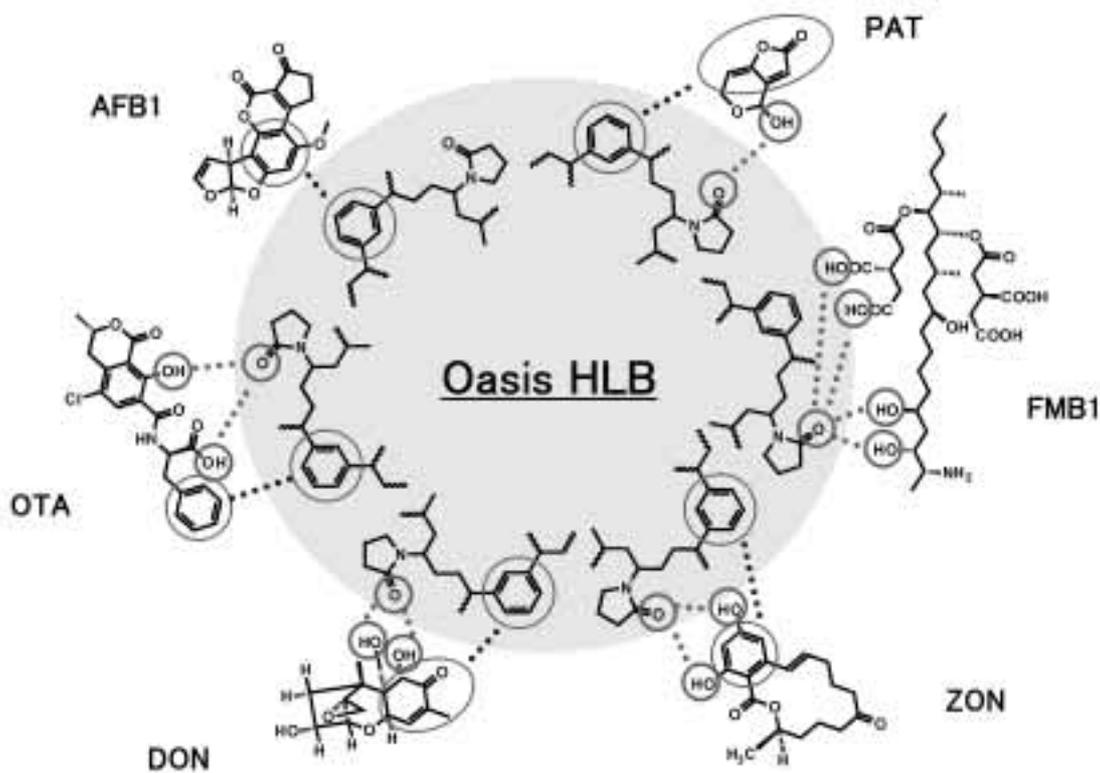


Figure 5. Image of interactions between the solid phase column (Oasis HLB) and mycotoxins.

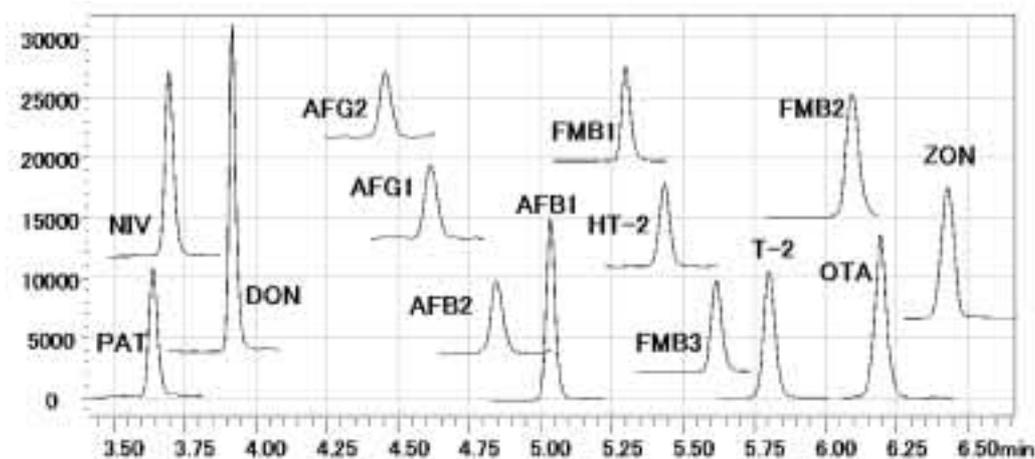


Figure 6. LC-MS/MS chromatograms of fourteen target mycotoxins.

バーを回避し、マイコトキシン14種の高精度かつ高感度なLC-MS/MS 一斉分析が実現した[20,21]。

5. 酒類製造工程におけるマイコトキシンの挙動

先述したLC-MS/MSによるマイコトキシンの一斉分析法を利用して、酒類製造工程におけるマイコトキシンの挙動を追跡した。

5-1. 焼酎の蒸留工程における挙動

無汚染の麦焼酎モロミにマイコトキシン14種を人為的に添

加し、得られた汚染モロミを用いて蒸留実験を行った。実際に麦焼酎の製造に用いられる、水蒸気による常圧蒸留と減圧状態で蒸留する減圧蒸留の2種類の蒸留法を実験室スケールで再現し (Figure 8)、添加したマイコトキシンが蒸留液に移行するかをLC-MS/MSを用いて分析した。結果、焼酎の蒸留工程において、いずれのマイコトキシンも蒸留液への移行は認められなかった[22,23]。

5-2. ビールとワインの醸造工程における挙動

ビール原料である麦芽およびワイン原料である葡萄果汁

Table 4. UHPLC–MS/MS conditions for the determination of 14 mycotoxins.

| Testing condition | Specification |
|----------------------|---|
| Column | Mastro C18 (3 μ m, 2.0 \times 100 mm) |
| Column temperature | 40°C |
| Flow rate | 0.4 mL/min |
| Mobile phase | Solvent A: 10 mM ammonium acetate in water Solvent B: 2% acetic acid in methanol |
| Gradient profile | 2%B (0–2.0 min) \rightarrow 55%B (3.0–4.0 min) \rightarrow 70%B (4.1 min) \rightarrow 80%B (7.0 min) \rightarrow 95%B (7.01–8.0 min) \rightarrow 2%B (8.01–11.0 min) |
| Injection volume | 5 μ L |
| Needle rinse solvent | R0: 10 mM ammonium acetate in water R1: 10 mM sodium citrate in water R2 and R3: 1% formic acid in water/methanol/acetonitrile/iso–propanol (1/1/1/1) |
| Needle rinse profile | Inner: R1 \rightarrow R0 \rightarrow R2 \rightarrow R0 Outer: R3 \rightarrow R0 |

Table 5. SRM transitions of 14 mycotoxins.

| Mycotoxin | Polarity | SRM transition | Precursor ion |
|-----------|----------|----------------|--|
| PAT | Negative | 153.1 > 109.2 | [M – H] [–] |
| NIV | Negative | 371.1 > 281.3 | [M + CH ₃ COO] [–] |
| DON | Negative | 355.1 > 295.2 | [M + CH ₃ COO] [–] |
| AFG1 | Positive | 329.1 > 243.1 | [M + H] ⁺ |
| AFG2 | Positive | 331.0 > 245.0 | [M + H] ⁺ |
| AFB1 | Positive | 313.0 > 241.1 | [M + H] ⁺ |
| AFB2 | Positive | 315.0 > 259.0 | [M + H] ⁺ |
| HT–2 | Positive | 442.0 > 263.1 | [M + NH ₄] ⁺ |
| T–2 | Positive | 484.0 > 305.0 | [M + NH ₄] ⁺ |
| OTA | Positive | 404.1 > 238.9 | [M + H] ⁺ |
| ZON | Negative | 317.1 > 273.0 | [M – H] [–] |
| FMB1 | Positive | 722.5 > 334.3 | [M + H] ⁺ |
| FMB2 | Positive | 706.5 > 336.3 | [M + H] ⁺ |
| FMB3 | Positive | 706.5 > 336.3 | [M + H] ⁺ |

に、マイコトキシン14種を人工的に添加し、それらを用いて実験室スケールで醸造実験を行った (Figure 9)。醸造工程の各段階でサンプリングを行い、各々のサンプルに適した固相抽出法で前処理を実施し、得られた分析試料を LC–MS/MS で一斉分析することにより、マイコトキシンの挙動を追跡した。

ビール醸造工程においては、発酵前の仕込み段階で、マイコトキシンの残存量が大きく低下し、続く発酵工程を経て、半数のマイコトキシン (7種) の残存率が20%以下に低下した (Figure 10)。一方で、NIV等のトリコテセン系マイコトキシンは、比較的、減少し難い成分であった。減少したマイコトキシンの多くがビール粕へ吸着し、ろ過と共に系外へ除去された。さらに、発酵工程においてゼアラレノン (ZON) が毒性の低い β -ゼアラレノール (β -ZOL) へ変換されることを見出した (Figure 11) [24,25]。

ワイン醸造工程においては、発酵中に4種のマイコトキシン (AFB1、AFG1、ZON、PAT) が50%以下に減少した (Figure 12)。また、一部マイコトキシンは澱に吸着して減少し、さらにAFB1、PAT、ZONが発酵工程中に分解することを明らかにし、パツリン (PAT) はアスクラジオールへ変換されることを見出した (Figure11)[26]。

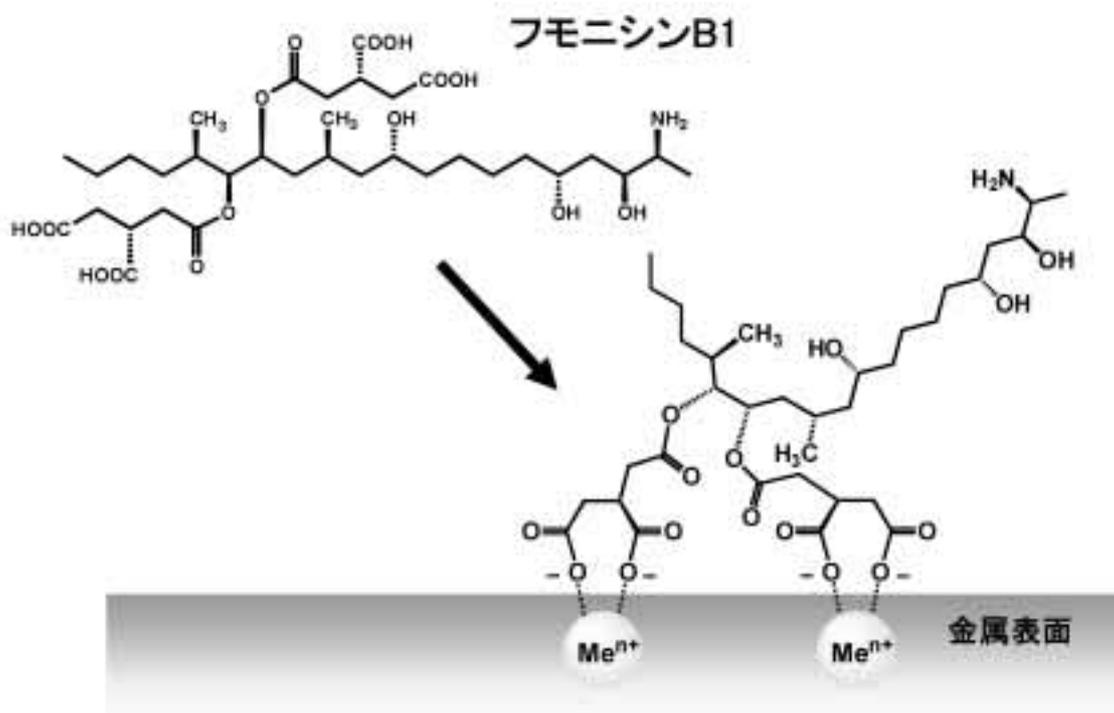
本研究結果より、酒類製造工程を経ることで、製品へのマイコトキシン汚染リスクは著しく低下することが明らかとなった。得られた各種マイコトキシンの挙動データは、酒類メーカーにおけるリスク管理上、重要な知見である。

Table 6. Performance of the method used for determining 14 mycotoxins content in beer.

| Mycotoxin | Repeatability ¹⁾ (%RSD) | Recovery ¹⁾ (%) | Linearity ²⁾ (<i>r</i>) | Spiked levels [μg/L] |
|-----------|---------------------------------------|-------------------------------|---|-------------------------|
| PAT | 5.2 | 107.4 | 0.9994 | 5, 10, 20, 50, 100, 200 |
| NIV | 11.5 | 75.6 | 0.9928 | 5, 10, 20, 50, 100, 200 |
| DON | 3.4 | 108.3 | 0.9997 | 2, 5, 10, 20, 50, 100 |
| AFB1 | 12.2 | 85.9 | 0.9995 | 0.4, 0.8, 2, 4, 8, 20 |
| AFB2 | 4.9 | 89.1 | 0.9998 | 0.4, 0.8, 2, 4, 8, 20 |
| AFG1 | 1.0 | 88.9 | 0.9999 | 0.4, 0.8, 2, 4, 8, 20 |
| AFG2 | 6.2 | 83.0 | 0.9998 | 0.4, 0.8, 2, 4, 8, 20 |
| HT-2 | 5.7 | 103.2 | 0.9999 | 2, 5, 10, 20, 50, 100 |
| T-2 | 3.5 | 111.9 | >0.9999 | 2, 5, 10, 20, 50, 100 |
| OTA | 4.7 | 99.5 | >0.9999 | 2, 5, 10, 20, 50, 100 |
| ZON | 5.1 | 93.8 | 0.9999 | 2, 5, 10, 20, 50, 100 |
| FMB1 | 2.8 | 113.5 | 0.9991 | 5, 10, 20, 50, 100, 200 |
| FMB2 | 11.2 | 102.3 | 0.9992 | 5, 10, 20, 50, 100, 200 |
| FMB3 | 9.4 | 94.0 | 0.9995 | 5, 10, 20, 50, 100, 200 |

1) The repeatability (%RSD) and recovery experiments involved 5 replicate measurements, which were carried out on the same day using beer samples spiked with each mycotoxin at the following levels: 50 μg/L for PAT, NIV, DON, and ZON; 2 μg/L for AFB1, B2, G1, and G2; 10 μg/L for HT-2, T-2, and OTA; 20 μg/L for FMB1, B2, and B3.

2) Coefficient of linearity was determined using beer samples spiked with each mycotoxin at the levels of described in the column of “Spiked levels”.

**Figure 7.** Image of chelation formed between fumonisin B1 and the metal.

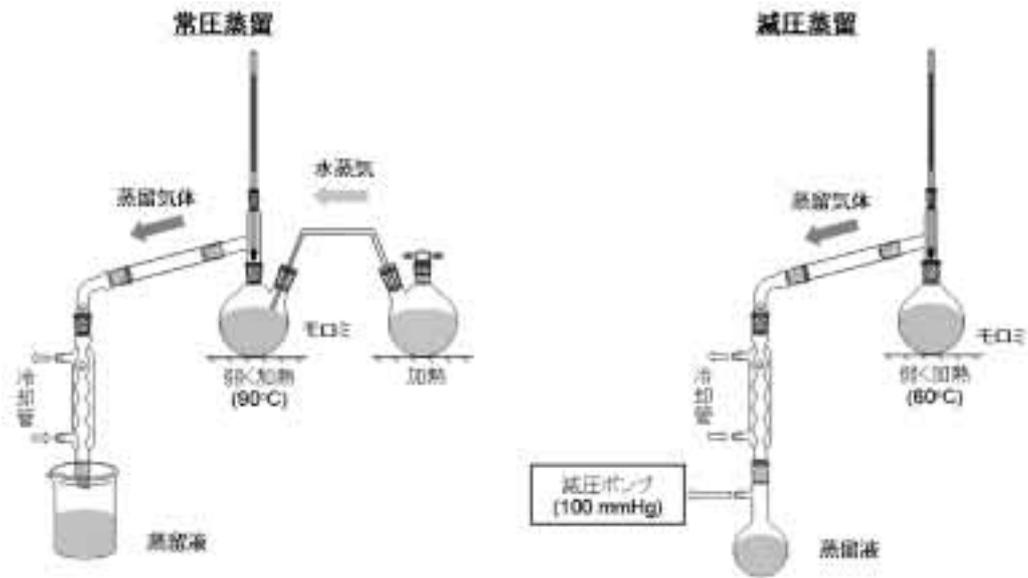


Figure 8. Laboratory display of distillation for making "barley shochu".

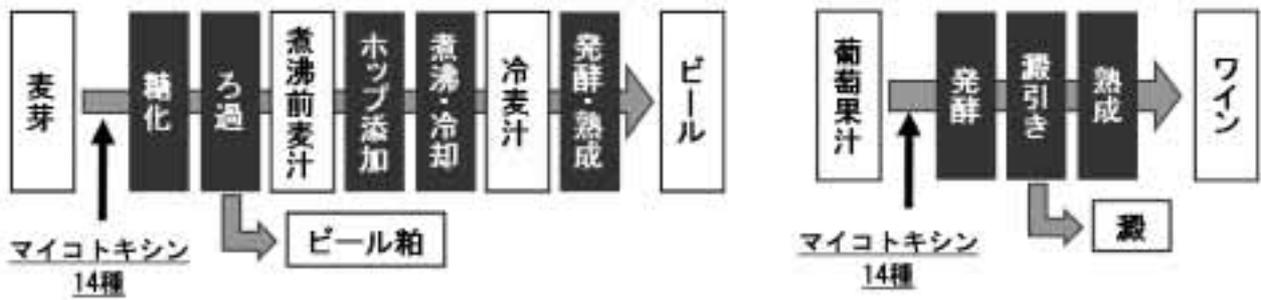


Figure 9. Brief descriptions of the beer and wine production processes.

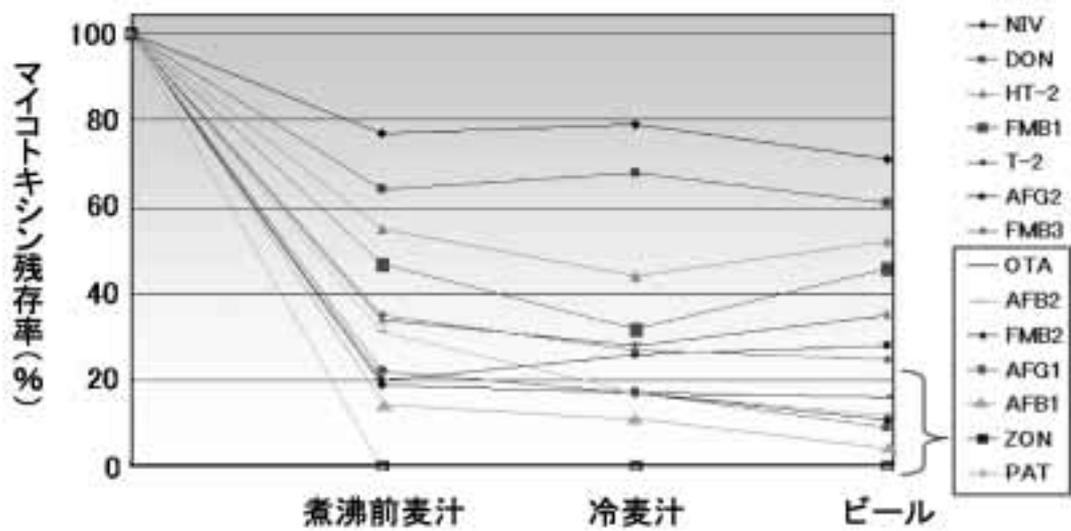


Figure 10. Fates of mycotoxins in wort and beer during the beer brewing.

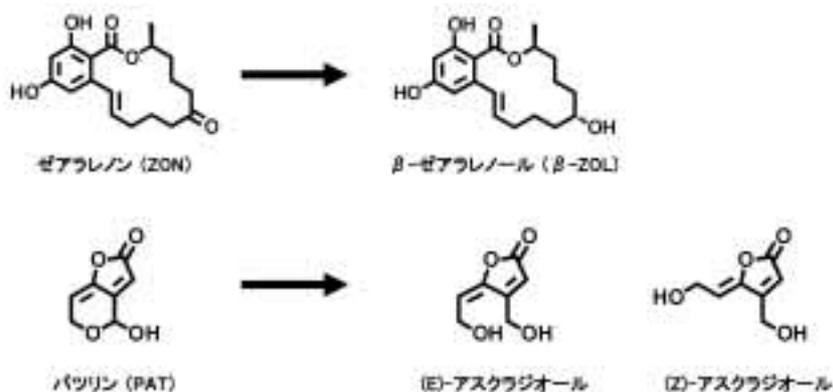


Figure 11. Metabolization of patulin and zearalenone in the fermentation process.

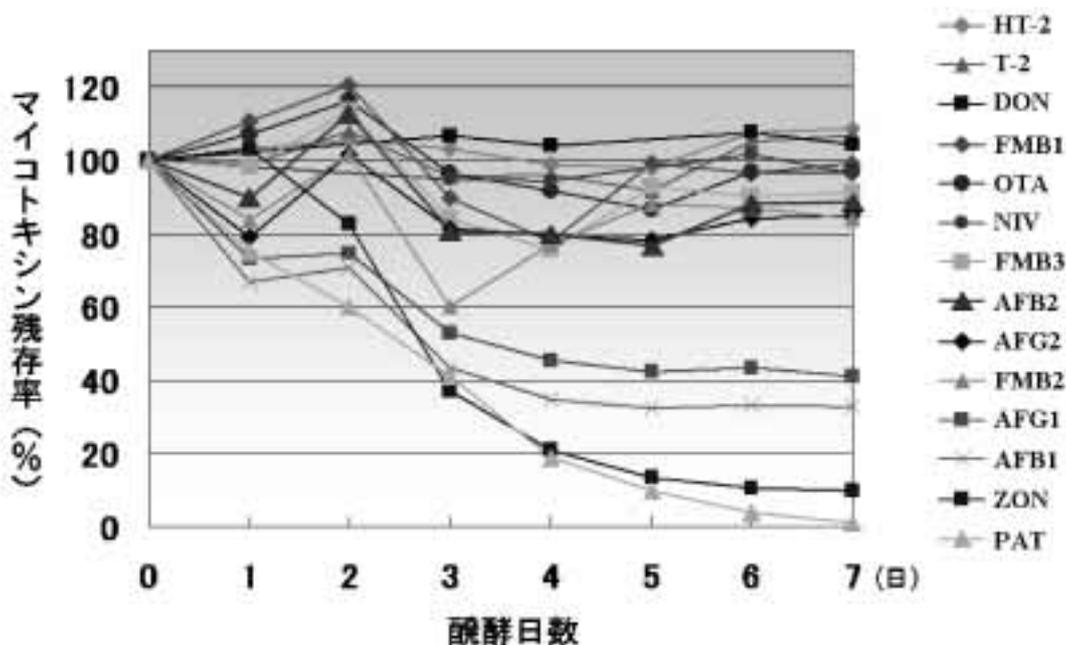


Figure 12. Fates of mycotoxins per day during the wine fermentation.

6. まとめ

LC-MS/MS を用いた迅速なマイコトキシン一斉分析法を開発し、その分析法を利用して酒類醸造工程におけるマイコトキシンの挙動を明らかにした。

トリコテセン系マイコトキシンの分析法を検討し、コアシェルタイプの PFP カラムを用いることによって、3-Ac-DON と 15-Ac-DON を含めたトリコテセン系マイコトキシン 9 種をわずか 7 分で分析することに成功した。また、システム洗浄の最適化、および金属フリーな分析カラムの使用により、フモニン類のキャリーオーバーを克服し、マイコトキシン 14 種を 1 分析サイクル 11 分で高感度分析することに成功した。酒類の製造工程を実験室スケールで再現し、マイコトキシンの挙動を追跡した結果、多くのマイコトキシンが酒類製造工程中に減少することを明らかにした。また、一部マイコトキシンが特定の分解物になることを見出した。

酒類メーカーにとって、マイコトキシンは農薬と並ぶ重要なリスク因子である。開発した分析法、および挙動研究で得られた知見を利用して、一層厳重なリスク管理を実現していきたい。

文献

[1] Trucksess, M. W. *J. AOAC Int.* **2011**; Chapter 49.
 [2] 田端節子 *食品衛生学雑誌* **2012**, 53, 129-138.
 [3] 望月直樹; 須賀啓子 *化学と生物* **2010**, 48, 201-209.
 [4] 望月直樹 *薬学雑誌* **2011**, 131, 1019-1025.
 [5] Walkington, A. E.; Wilson, D. J. *AOAC Int.* **2006**, 89, 678-692.
 [6] Omote, M.; Kitagawa, Y.; Mochizuki, N. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **2008**, 66, 59-62.
 [7] Noba, S.; Omote, M.; Kitagawa, Y.; Mochizuki, N. *J. Food*

- Prot.* **2008**, *71*, 1038–1042.
- [8] Noba, S.; Uyama, A.; Mochizuki, N. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 6036–6040.
- [9] 須賀啓子；望月直樹；山下 博 *食品衛生学雑誌* **2004**, *45*, 255–258.
- [10] Suga, K.; Mochizuki, N.; Harayama, K.; Yamashita, H. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **2005**, *63*, 1–4.
- [11] 須賀啓子；田村昌義；北川 泰；望月直樹 *日本食品化学学会誌* **2007**, *14*, 93–98.
- [12] 須賀啓子；望月直樹；原山耕一；山下 博 *食品衛生学雑誌* **2004**, *45*, 307–311.
- [13] Mizutani, K.; Kitagawa, Y.; Mochizuki, N. *Mycotoxin* **2007**, *57*, 202–206.
- [14] Mizutani, K.; Nagatomi, Y.; Mochizuki, N. *Toxins* **2011**, *3*, 134–141.
- [15] Ito, R.; Yamazaki, H.; Inoue, K.; Yoshimura, Y.; Kawaguchi, M.; Nakazawa H. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *25*, 7464–7468.
- [16] Mochizuki, N.; Hoshino, H.; Suga, K.; Konishi, Y. *J. Food Prot.* **2009**, *72*, 805–809.
- [17] Tamura, M.; Hiroyuki, N.; Uyama, A.; Mochizuki, N. “in preparation.”
- [18] Tamura, M.; Uyama, A.; Mochizuki, N. *Anal. Sci.* **2011**, *27*, 629–635.
- [19] Tamura, M.; Takahashi, A.; Uyama, A.; Mochizuki, N. *Toxins* **2012**, *4*, 476–486.
- [20] 田村昌義；松本恵子；渡邊 淳；飯田順子；永富康司；望月直樹 *島津評論* **2012**, *69*, 159–163.
- [21] Tamura, M.; Matsumoto, K.; Watanabe, J.; Iida, J.; Nagatomi, Y.; Mochizuki, N. “in preparation”
- [22] Nagatomi, Y.; Inoue, T.; Uyama, A.; Mochizuki, N. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2012**, *76*, 202–204.
- [23] Inoue, T.; Nagatomi, Y.; Kinami, T.; Uyama, A.; Mochizuki, N. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2010**, *74*, 2518–2522.
- [24] Inoue, T.; Nagatomi, Y.; Suga, K.; Uyama, A.; Mochizuki, N. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 3857–3868.
- [25] Nagatomi, Y.; Inoue, T.; Uyama, A.; Mochizuki, N. *Toxins* **2011**, *3*, 134–141.
- [26] Inoue, T.; Nagatomi, Y.; Uyama, A.; Mochizuki, N. “in preparation”.