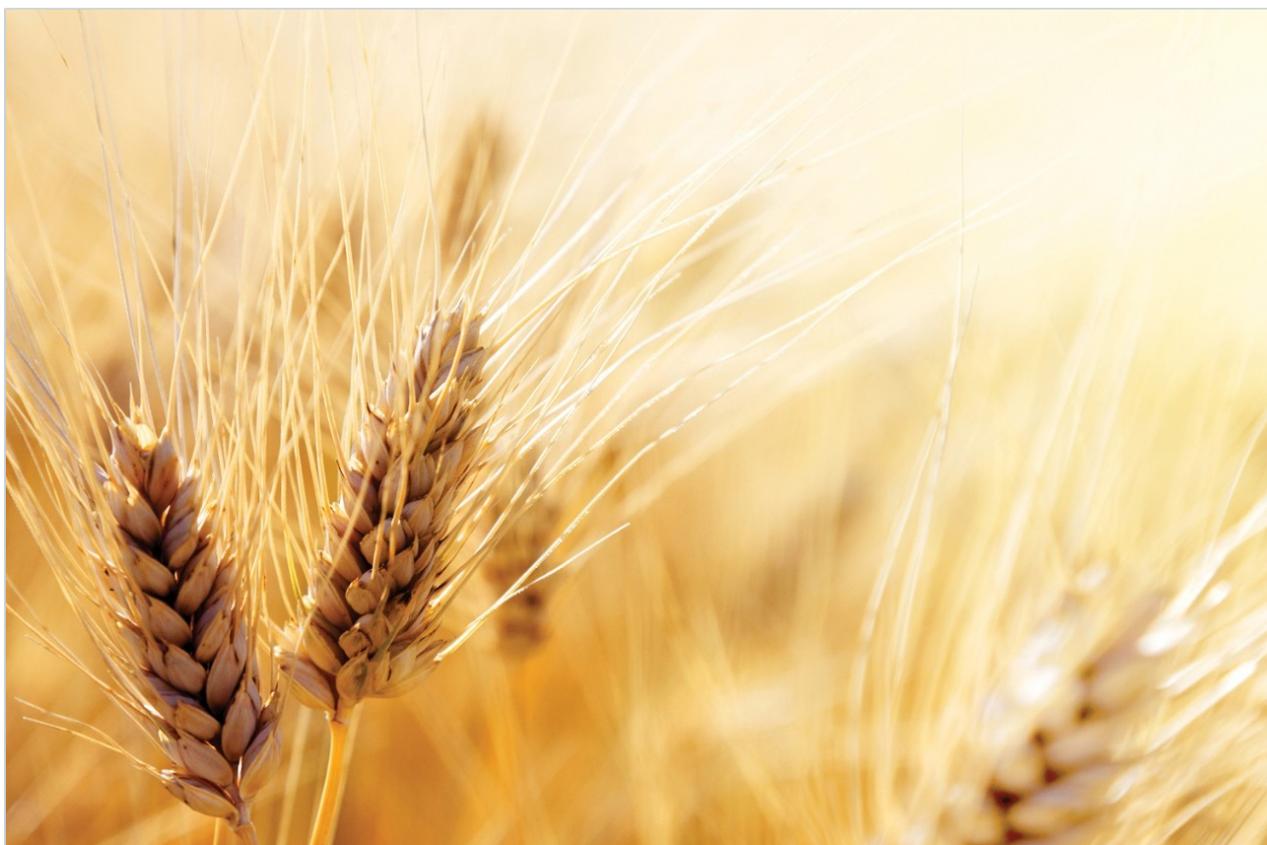


## 複数のラボ間での試験による穀類中の規制対象マイコトキシンの簡易な LC-MS/MS 分析法の性能評価

---

Nicola Dreolin, Janitha De-Alwis, Dimple D. Shah, Joanne Williams, Sarah Dowd, Nicole Baumgarten, Stuart Adams, Simon Hird

Waters Corporation



本書はアプリケーションブリーフであり、詳細な実験方法のセクションは含まれていません。

---

## 要約

ウォーターズでは以前、EUで規制対象になっている様々な穀類中の12種のマイコトキシンについて、クリーンアップなしの単純な汎用抽出法の後でLC-MS/MSに基づいて測定を行う分析法の開発、および単一のラボでのバリデーションについて報告しました。このアプリケーションブリーフでは、複数のラボ間での試験で分析法の性能を評価した結果を示します。2つの穀類FAPAS QC試料を、ヨーロッパと米国の4つのラボに送りました。各試料は、4つのラボで3回繰り返し分析されました。すべてのラボで、2つのFAPAS QC試料中の8種のマイコトキシンの測定について、正確度と精度が優れていることが実証されました。報告された濃度は、FAPASによる割り当て値と一致していました。真度は85～113%の範囲内、室内併行精度は3.0～13%、室間再現精度は3.1～23%でした。これらの結果は、欧州委員会が定めた性能基準を満たしており、この分析法が、公的検査や食品事業者による自主検査のいずれにおいても、穀類内のマイコトキシンのモニタリングに適していることを実証しています。

## アプリケーションのメリット

- 抽出から測定までカバーする分析法を簡単に導入
- 離れた場所にある複数のラボで同等の分析法性能を発揮

---

## はじめに

マイコトキシンは糸状菌の二次代謝物であり、製造、加工、輸送、保管など多くの汚染経路を介して、食品および農産物に混入する可能性があります。マイコトキシンは、ヒトおよび動物の健康に重大な悪影響を及ぼし、企業収益の大きな損失やブランド力・評判の低下の原因になる可能性があります。最も一般的なマイコトキシンは、毒性、出現率、消費データ、並びに経済的・政治的な考慮事項を検討して徹底したリスク評価を行った後、世界の多くの国で規制対象とされています。例えば、欧州委員会規制番号1881/2006では、様々な食材中のアフラトキシンB1、B2、G1、G2、フモニシンB1、B2、デオキシニバレノール、ゼアラレノン、およびオクラトキシンAの最大限度値が設定され、およびT-2およびHT-2トキシンに対して指標となる基準値が設定されています<sup>1,2</sup>。

このような規制に準拠していることを確認するには、分析試験が必要です。1つの分析法で複数のマイコトキシンを測定するには、様々な種類のマイコトキシンを確実に回収するために、汎用的な抽出条件が必要になります。以前、LC-MS/MSの感度と選択性の関係から、通常はクリーンアップなしの抽出物の単なる希釈が優先されることが多いことを説明しました<sup>3</sup>。ここでは、複数のラボ間での試験の結果を報告して、分析法の性能を更に評価します。

---

## 結果および考察

4つのラボ（オーストリアに1ヶ所、英国に1ヶ所、米国に2ヶ所）に以下のものを提供しました。

- ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>、1.7 μm、2.1 × 100 mm（製品番号：186002352 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186002352-acquity-uplc-beh-c18-column-130a-17--m-21-mm-x-100-mm-1-pk.html>>）
- 対象のマイコトキシン、使用する分析法の詳細、分析のシーケンスなどを含む分析のプロトコル（720006685EN <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/lc-ms-ms-method-development-and-validation-for-the-quantitative-determination-of-regulated-mycotoxins-in-cereal-grain-flours-using-simplified-sample-preparation-conditions-on-xevo-tq-xs.html>>）
- FAPAS QC 試料： T04366QC（トウモロコシ粉）および T04359QC（トウモロコシ粉）
- 溶液として事前調製したキャリブレーション標準試料
- 内部標準として使用するための <sup>13</sup>C 標識アナログの原液

4つのラボは、提供された分析法を使用して、このアプリケーションの12種のマイコトキシンについて、2つのFAPAS QC 試料を3回繰り返し抽出して分析するよう指示されました<sup>3</sup>。キャリブレーション標準試料は、発送前にWilmslow（英国のラボ）にて溶媒中に調製しました。FAPAS QC 試料中のマイコトキシンの濃度は、内部標準化したブラケット検量線を使用して決定しました。各ラボでは、Xevo TQ-XS タンデム四重極型質量分析計と組み合わせたACQUITY UPLC システムを使用しました。

各ラボでは、対象の各化合物のピーク形状と保持時間がレファレンスラボで得られたピーク形状と保持時間とほぼ同じになるように、公表済みの分析法に基づいてクロマトグラフィー分析法を適切に導入しました。最も早く溶出するピークであるニバレノールの保持時間は、カラムのボイドボリュームに対応する保持時間の2倍を超えていました<sup>4</sup>。図1に、FAPAS QC 試料の1つで検出された分析種の代表的なクロマトグラムとレスポンスを示します。

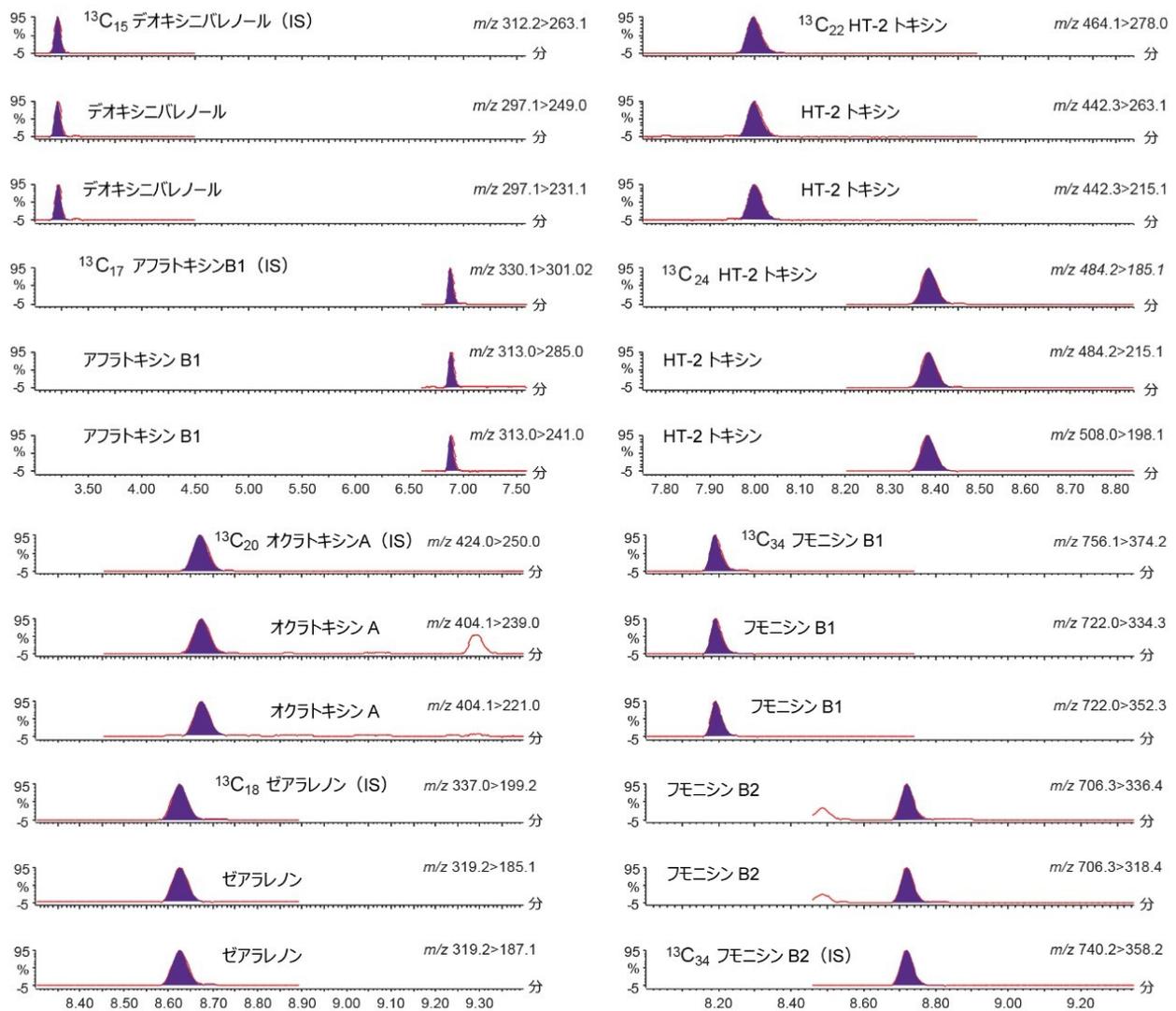
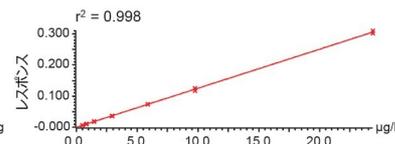
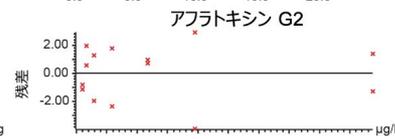
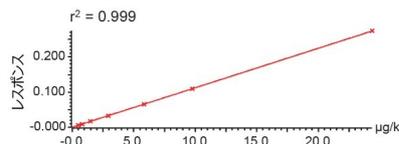
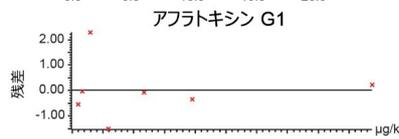
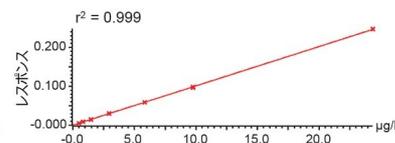
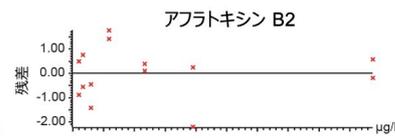
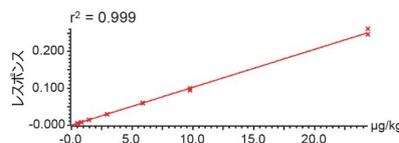
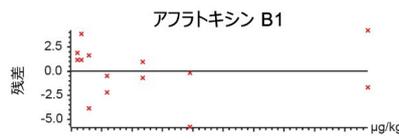
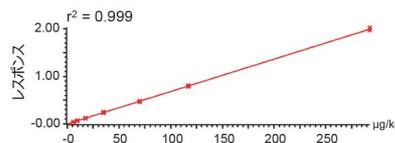
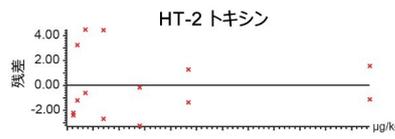
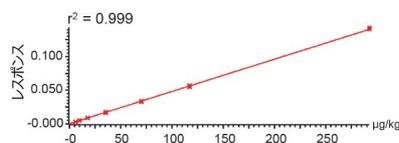
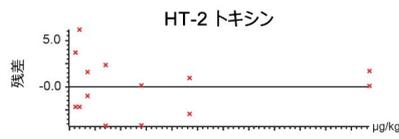
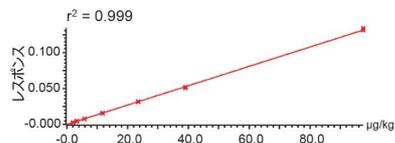
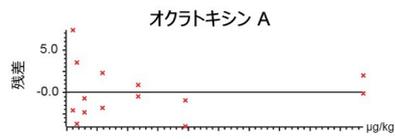
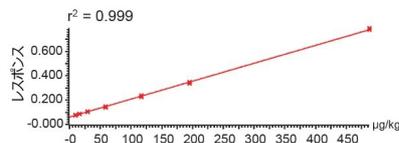
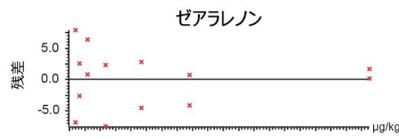


図 1. T04366QC の分析で検出された 8 種のマイコトキシンすべてと、標識内部標準を示す代表的なクロマトグラム（濃度については表 2 を参照）

1 つを除くすべての検量線グラフにおいて、決定係数が 0.95 を超え、残差が 20% 未満であることが示されています。あるラボでは、アフラトキシン G2 によるバックグラウンド汚染の問題が発生しましたが、この化合物はいずれの標準品にも存在しませんでした。T04366QC 中のフモニシン B1、T04395QC 中のデオキシニバレノールという 2 つのケースにおいて、抽出物を 10 倍希釈し、分析種のレスポンスがキャリブレーション範囲内に収まるようにしました。これにより得られた値は、希釈していない抽出物から得られた値と一致していました（データは表示していません）。図 2 に、この分析法でカバーされる 12 種の規制対象マイコトキシンすべての代表的な検量線グラフを示します。



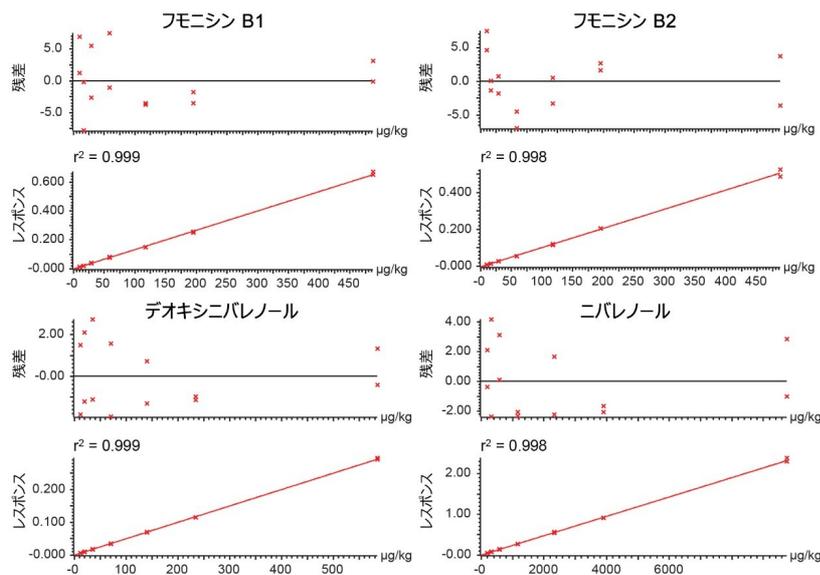


図 2. 12 種の規制対象マイコトキシンの代表的な検量線グラフ（内部標準化済み）

2 種の FAPAS QC 試料の分析の結果から、ラボの性能が良好であることが分かりました。測定濃度と割り当て値はほぼ一致しており、T04366QC のフモニシン B2 の 1 セットの測定値を除いて、すべての測定値は  $z \leq 2$  で、FAPAS が提供している許容範囲内です。測定濃度を割り当て値と比較して算出された真度の値は 85 ~ 113% でした。室内併行精度 ( $RSD_r$ ) は 3.0 ~ 13% で、室間再現精度 ( $RSD_{RL}$ ) は 3.1 ~ 23% でした。これらの化合物の中で、フモニシンの分析が最も困難であることが分かりましたが、すべての結果において欧州委員会が定めた分析法の性能基準が満たされていました<sup>5</sup>。この分析法でカバーされているその他のマイコトキシンについて、偽陽性の報告はありませんでした。ラボ間試験の結果のまとめを表 1 および表 2 に記載しています。

T04395QC	アフラトキシン B1	オクラトキシン A	HT-2 トキシン	T-2 トキシン	ゼアレノン	デオキシニバレノール	フモニシン B1	フモニシン B2
内部標準	U-[ <sup>13</sup> C <sub>17</sub> ]-AFB1	U-[ <sup>13</sup> C <sub>20</sub> ]-OTA	U-[ <sup>13</sup> C <sub>22</sub> ]-HT-2	U-[ <sup>13</sup> C <sub>24</sub> ]-T-2	U-[ <sup>13</sup> C <sub>18</sub> ]-ZEA	U-[ <sup>13</sup> C <sub>15</sub> ]-DON	U-[ <sup>13</sup> C <sub>34</sub> ]-FB1	U-[ <sup>13</sup> C <sub>34</sub> ]-FB2
割り当てられた値 (μg/kg)	9.22	2.69	215	209	95.8	948	287	273
測定値の平均値 (μg/kg)	9.08	2.38	199	186	94.4	878	246	309
[z] ≤ 2の範囲 (μg/kg)	5.26~13.3	1.51~3.87	128~302	125~294	53.7~138	643~1254	176~397	167~370
測定値の範囲 (μg/kg)	8.28~10.5	2.19~2.60	185~229	163~231	86.5~97.7	813~1004	222~284	276~356
真度 (%)	98.5	88.6	92.5	88.8	98.5	92.6	85.8	113
ラ室内併行精度 (%RSD <sub>r</sub> )	7.39	4.03	4.88	6.36	3.14	4.22	6.04	3.22
ラボ間再現性 (%RSD <sub>RL</sub> )	7.83	4.51	6.35	10.6	3.12	7.27	20.9	16.9

表 1. 4 つの参加ラボによる FAPAS QC 試料 T04395QC の分析結果

T04366QC	アフラトキシン B1	オクラトキシン A	HT-2 トキシン	T-2 トキシン	ゼアラレノン	デオキシコパレノール	フモニシン B1	フモニシン B2
内部標準	U-[ <sup>13</sup> C <sub>17</sub> ]-AFB1	U-[ <sup>13</sup> C <sub>20</sub> ]-OTA	U-[ <sup>13</sup> C <sub>22</sub> ]-HT-2	U-[ <sup>13</sup> C <sub>24</sub> ]-T-2	U-[ <sup>13</sup> C <sub>18</sub> ]-ZEA	U-[ <sup>13</sup> C <sub>15</sub> ]-DON	U-[ <sup>13</sup> C <sub>34</sub> ]-FB1	U-[ <sup>13</sup> C <sub>34</sub> ]-FB2
割り当てられた値 (µg/kg)	1.88	1.99	22.9	22.2	26.7	231	526	125
測定値の平均値 (µg/kg)	1.74	1.74	20.1	19.6	25.8	208	446	127
[z] ≤ 2の範囲 (µg/kg)	1.05~2.70	1.11~2.86	12.8~33.0	12.4~31.9	14.9~38.4	139~323	341~711	70~172
測定値の範囲 (µg/kg)	1.58~1.89	1.45~1.93	17.5~24.2	17.0~23.1	22.2~28.8	183~246	391~510	108~175
真度 (%)	92.4	87.5	87.7	88.4	96.6	90.2	84.7	102
室内併行精度 (%RSDr)	2.99	3.51	7.78	5.02	4.68	6.88	7.99	12.7
ラボ間再現性 (%RSD <sub>RL</sub> )	6.44	11.3	9.49	10.1	6.99	10.2	22.9	13.1

表 2. 4 つの参加ラボによる FAPAC QC 試料 T04366QC の分析結果

いずれの場合も、FAPAS QC 試料で検出されたマイコトキシンの相対保持時間とイオン比は、キャリブレーション標準試料の分析で得られた所定の判定基準内の値と一致していました<sup>4</sup>。<sup>13</sup>C 同位体標識アナログを内部標準として使用して得られた分析種の保持時間は、± 0.05 分の許容範囲内で対応する標識内部標準品の保持時間と一致していました。

## 結論

この分析法の性能を、複数のラボ間での試験により調査しました。各ラボでは、公開されたアプリケーションノートに概説されている 12 種の規制対象マイコトキシンを測定するための分析法が適切に導入されました。すべてのラボで、2 つの FAPAS QC 試料中の 8 種のマイコトキシンの測定について、正確度と精度が優れていることが実証されました。これらの結果は、欧州委員会が定めた性能基準を満たしており、この分析法が、公的検査や食品事業者による自主検査のいずれにおいても、穀類内のマイコトキシンのモニタリングに適していることを実証しています。

科学者は各自のラボの分析法を検証し、その性能が目的に適合しており、また関連の分析コントロール保証システムのニーズを満たしていることを証明しなければなりません。

## 参考文献

1. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs. Off. J. Eur. Union 2006, L364, 5–23.

2. Commission Recommendation of 27 March 2013 on the Presence of T-2 and HT-2 Toxin in Cereals and Cereal Products (2013/165/EU).Off.J. Eur.Union 2013, L91, 12–15.
3. Dreolin N, Stead S (2019).LC-MS/MS Method Development and Validation for the Quantitative Determination of Regulated Mycotoxins in Cereal Grain Flours Using Simplified Sample Preparation Conditions on Xevo TQ-XS.Waters Application Note [720006685EN <https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/lc-ms-ms-method-development-and-validation-for-the-quantitative-determination-of-regulated-mycotoxins-in-cereal-grain-flours-using-simplified-sample-preparation-conditions-on-xevo-tq-xs.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/lc-ms-ms-method-development-and-validation-for-the-quantitative-determination-of-regulated-mycotoxins-in-cereal-grain-flours-using-simplified-sample-preparation-conditions-on-xevo-tq-xs.html) .
4. Document No.SANTE/12089/2016.Guidance Document on Identification of Mycotoxins in Food and Feed.
5. 401/2006 as Regards Methods of Sampling of Large Lots, Spice and Food Supplements, Performance Criteria for T-2, HT-2 Toxin and Citrinin and Screening Methods of Analysis, Off.Union 2014 L147, 29–43.

## 謝辞

サンプル分析を実施するにあたり、以下のウォーターズ施設のスタッフからのサポートに感謝致します：アメリカのアプリケーションラボ、オーストリアのアプリケーションラボ、サイエンティフィックオペレーションアプリケーションラボ（英国）、およびサイエンティフィックオペレーションアプリケーションラボ（米国）。

---

## ソリューション提供製品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS システム <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-XS タンデム四重極型質量分析計 <<https://www.waters.com/134889751>>

MassLynx MS ソフトウェア <<https://www.waters.com/513662>>

720007165JA、2021 年 2 月