

長野県産小麦中のデオキシニバレノール及びニバレノールの分析

小山和志¹・上沼由佳¹・宮川あし子^{1,2}・土屋としみ^{1,2}

令和3年7月「食品添加物等の規格基準」(昭和34年厚生省告示第370号)が改正され、小麦(玄麦)はデオキシニバレノール(DON)を「1.0mg/kgを超えて含有してはならない」旨の成分規格が設けられた。これに対応するため、令和3年9月に通知された試験法に従いLC-MS/MS法によるDONの分析法を検討した。また、DONと共に検出されることもあるが当所での分析実績がなく、耐容一日摂取量(TDI)がDONよりも低値のニバレノール(NIV)との同時分析法も合わせて検討した。

多機能カラム精製におけるDON及びNIVの流出画分の確認、移動相(グラジエント)条件の検討等により得られた分析法を用いて5併行で実施した添加回収試験の結果は、DON 99%(CV1.7%)、NIV 88%(CV0.8%)、定量下限値は各々0.1mg/kgであり、分析を妨害するピークもなく良好であった。そこで長野県産小麦12検体を分析したところ、DON濃度はND~0.36mg/kgで基準を超過したものはなく、NIVは全て定量下限値未満であった。

キーワード: 赤かび病, 小麦, デオキシニバレノール(DON), ニバレノール(NIV), LC-MS/MS法

1 はじめに

DON及びNIVは赤かび病に感染した小麦等の穀類から検出されることのあるトリコセシン系かび毒である。*Fusarium*属菌が産生に関わっているがその菌種によりDON又はNIVのみを産生するもの、両方を産生するものがある^{1), 2)}。それぞれの濃度についてDON>NIV, DON≒NIV等地域ごとに特色がみられ、北海道ではDON>NIVの傾向が見られる^{2)~5)}。昭和初期~中期頃には北海道等で赤かび汚染の小麦等が原因とされ、嘔吐、下痢等を主症状とした食中毒も発生している^{6)~8)}。また、近年はこれらの汚染低減のため、栽培品種の選定等様々な対策が講じられている^{2), 9), 10)}。

DONについては、平成13年に国内で実施された実態調査で国産小麦の一部が最大2.2mg/kgと比較的高濃度に汚染されていることが判明したため¹¹⁾、平成14年5月に暫定基準1.1mg/kgが設定された¹²⁾。これを受け当県では平成14年度から県内産小麦の分析を開始した。平成14年7月に通知されたHPLC-UV法で定量、GC-MS法で定性(確認)を行い¹³⁾、令和3年度までの20年間で延237検体の分析を実施した。結果は20検体から検出、濃度はND~0.38mg/kgであり暫定基準を超過したものはなかった。

その後の食品安全委員会における食品健康影響評価¹⁾、国内に流通する食品中の汚染実態及び国民の食品摂取量等を踏まえ¹⁴⁾令和3年7月、1.0mg/kgの成分規格(基準値)が設定された^{15)~17)}。その際に用いられたTDIは1μg/kg/体重/日であった^{1), 14)}。同年9月に通知された試験法(通知法)^{18), 19)}では、定量はHPLC-UV法、確認はLC-MS(/MS)法で行い、また、LC-MS(/MS)法により定量及び確認を一度に行うこともできるとされた。通知法には妥当性評価の方法や真度、精度等の評価基準も示された。当所では平成14年度からHPLC-UV法でDONの分析を行っていること、また、LC-MS/MSの使用状況から、令和3年7月の改正では定量をHPLC-UV法、確認をLC-MS/MS法とした。HPLC-UV法による定量法にあっては別途妥当性評価を実施した²⁰⁾。

NIVのTDIは0.4μg/kg/体重/日であり^{1), 14)}DONより毒性は強いと考えられるが基準値の設定は行われていない。また、当所での分析実績はない。

これらのことから、LC-MS/MS法による確認試験法作成に係る検討は、単なる確認だけでなくHPLC-UV法によるDONの定量結果を補完できること、NIVも同時に分析できることを目的に実施した。さらに、検討した分析法で令和3年及び令和4年産の長野県産小麦12検体を分析した。

1 長野県環境保全研究所 食品・生活衛生部 〒380-0944 長野市安茂里米村1978

2 現:退職

分析法の検討並びに長野県産小麦中の DON 濃度、NIV 濃度及びこれらについて若干の知見が得られたので併せて報告する。

2 分析方法

2.1 検体

令和 3 年及び令和 4 年に県内で栽培された小麦（玄麦）を検体とした。内訳は各 6 検体で合計 12 検体を用いた。

2.2 試薬及び標準品

2.2.1 試薬

アセトニトリル：LC/MS 用（関東化学）、残留農薬試験用（関東化学）

蒸留水：LC/MS 用（関東化学）

メタノール：残留農薬試験用（関東化学）

酢酸アンモニウム：特級（関東化学）

多機能カラム：MultiSep 227 Trich+（Romer Labs）

シリンジフィルター：DISMIC-13HP（ADVANTEC）

2.2.2 標準品（標準原液）

DON：100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アセトニトリル溶液；マイコトキシン試験用（富士フィルム和光純薬）、カビ毒分析用（関東化学）

NIV：100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アセトニトリル溶液；カビ毒分析用（関東化学）

2.3 試料溶液の調製

検体をミキサーで粉碎後、1000 μm の標準網ふるいを通過させた。それをよく混合してポリエチレン製袋に入れ、脱気後に冷凍保存したものを試料とした。その試料から図 1 に示したフローにより分析用の試料溶液を調製し、LC-MS/MS 法で分析を行った。

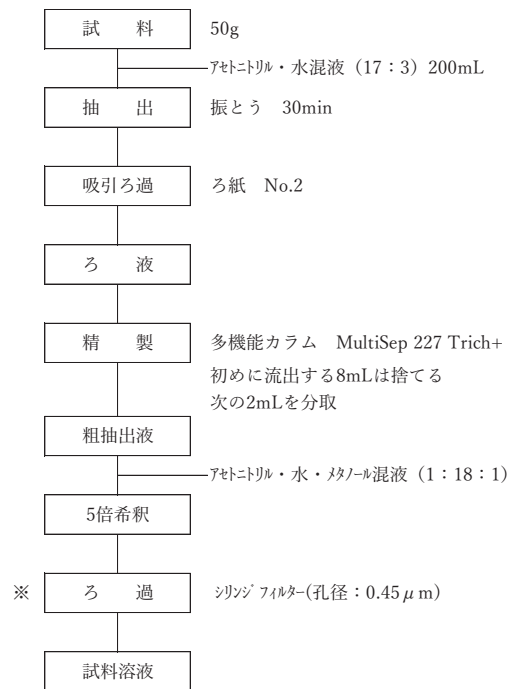
2.4 分析装置及び操作条件

2.4.1 分析装置

LC-MS/MS

LC 部：Nexera XR（島津製作所）

MS/MS 部：LCMS-8050（島津製作所）



注）※：必要に応じて実施

図 1 試料溶液調製フロー

2.4.2 操作条件等

LC 部

カラム：Inertsil ODS-SP (2.1mm I.D. × 150mm L, 3 μm)、(ジーエルサイエンス)

カラム温度：40°C

移動相：A 液 2mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及び B 液アセトニトリル (95:5) を 5 分間維持し、(10:90) までの濃度勾配を 10 分間で行い、その後 (0:100) で 5 分間保持した。

流量：0.2mL/min

注入量：2 μL

MS/MS 部

イオン化モード：ESI (-)

ネブライザーガス流量：2.5 L/min

ドライイングガス流量：10 L/min

ヒーティングガス流量：10 L/min

ヒートブロック温度：400°C

DL 温度：200°C

インターフェース温度：300°C

CID ガス：アルゴン、270kPa

SRM 条件：表 1 に示した。

表1 DON・NIVのSRM条件

		保持時間 (min)	Q1 (<i>m/z</i>)	Q2 (<i>m/z</i>)	CE (V)
DON	定量用	10.0	355	295	11
	確認用 1			265	17
	確認用 2			59	22
NIV	定量用	6.8	371	281	17
	確認用 1			311	11
	確認用 2			59	41

2.5 検量線の作成

DON及びNIVの標準原液をアセトニトリル・水・メタノール混液(1:18:1)(希釈液)で希釈し、1~1000ng/mLの混合標準溶液列を調製した。その溶液列をLC-MS/MSに注入し、ピーク面積から絶対検量線を作成した。

2.6 定量下限値等

DON

定量下限値；0.1mg/kg

検出下限値；0.05 mg/kg

NIV

定量下限値；0.1mg/kg

検出下限値；0.05 mg/kg

3 結果及び考察

3.1 分析方法

3.1.1 試料溶液調製の検討

試料からの抽出は通知法に基づき試料50gに抽出液としてアセトニトリル・水混液(17:3)(抽出液)200mLを加え、30分の振とう後吸引ろ過した。ろ液を多機能カラム MultiSep 227 Trich+に負荷し自然落下により毎分1mL程度で通過させ、初めの8mLは捨て次の2mLを分取し粗抽出液とした。その液を希釈液で5倍に希釈し、必要に応じてシリンジフィルターでろ過して分析用の試料溶液とした。

多機能カラムによる精製ではDON及びNIVの流出画分を確認するため、各標準原液を抽出液で希釈した標準溶液及び小麦マトリックスを含むマトリックス添加標準溶液を多機能カラムに負荷した。流出液を1mLずつ分取しその分析により流出画分を確認した。その結果を図2に示した。DONでは3mL、NIVでは7mLまではそれぞれの濃度に変動があっ

た。そこで両者がそれぞれ一定濃度になる8mLを捨てた次の2mLを分取することにした。

移動相(グラジエント初期)と粗抽出液の極性乖離によるNIVピークの形状悪化を解消するため、粗抽出液の希釈を実施した。希釈は段階的に行いピーク形状の改善と目標とする基準値の1/10以下の定量下限値を得ることの両者を勘案して5倍希釈とした。希釈時に白濁する試料があり、その場合はシリンジフィルターでのろ過が必要となった。

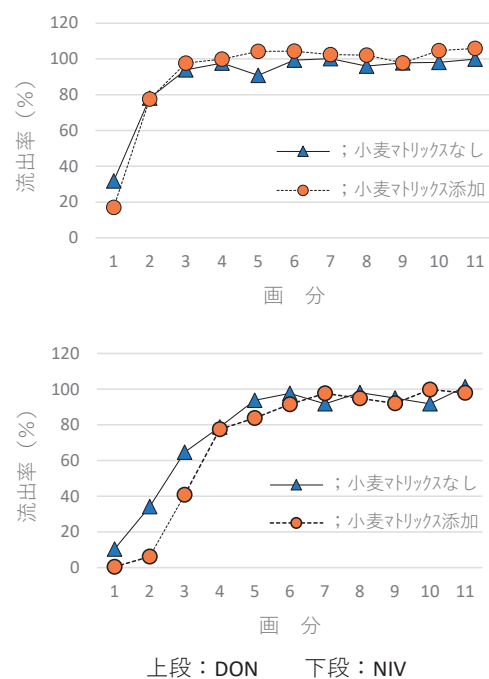


図2 多機能カラムからの流出状況

3.1.2 分析装置及び操作条件の検討

LC-MS/MS操作条件は、DONのみを分析対象項目とした通知法の操作条件を基本にしながらNIVも対象に加えるため、分析カラムの選定とグラジエント条件及びSRM条件等の検討を行った。

分析カラムは通知法で示されたODS系カラムのうち、当所で汎用しているジーエルサイエンス製のInertsil ODS-SP, Inertsil ODS-3, InertSustain C18の3種類、いずれも内径2.1mm、長さ150mm、粒子径3 μ mで検討した。ピーク形状、保持時間、カラム圧を総合的に勘案して、Inertsil ODS-SPを用いることにした。

移動相はA液2mmol/L酢酸アンモニウムとB液アセトニトリルのグラジエント溶離でNIVを保持させるため、通知法よりもグラジエント勾配をゆる

やかにした。その結果、NIV の保持時間は 4.5min から 6.8min, DON は 5.1min から 10.0min で十分な保持が得られた。なお、通知法では B 液はアセトニトリ又はメタノールとしているがよりシャープなピーク形状が得られるアセトニトリを用いた。

SRM 条件の検討では DON 又は NIV 500ng/mL 標準溶液を LC-MS/MS に導入してパラメータの最適化により、Q1 プリカーサーイオン、Q2 プロダクトイオン等を決定した(表 1)。通知法では DON の Q1 を「M-H」⁻である m/z 295 としているがより高感度で選択性に優れた「M+CH₃COO」⁻の m/z 355 とした。NIV については「M-H」⁻である m/z 311 がほとんど生成せず、「M+CH₃COO」⁻の m/z 371 とした。また、各トランジションに係る LC-MS/MS からの指示値(ピーク面積)等を考慮して定量用、確認用のイオンを決定した。

LC-MS/MS 法による分析ではマトリックス効果としてイオン化抑制・促進が知られているため²¹⁾、試料溶液に DON 及び NIV を添加してその影響を確認した。結果は DON, NIV それぞれ目標に対して 102%, 99%でありマトリックスの影響はほとんど受けていないと考えられた。

3.1.3 検量線

DON 及び NIV 濃度として 1~1000ng/mL の標準溶液列を LC-MS/MS に注入し、ピーク面積から絶対検量線を作成した。検量線は図 3 に示したようにそれぞれ当該濃度範囲で $R^2 > 0.999$ の良好な直線性が確認できた。

なお、装置コンディション等により、直線性の得られた濃度範囲がわずかに変動することがあった。

3.1.4 添加回収試験

ブランク試料 50g に基準濃度に相当する 50 μ g の DON 及び 50 μ g の NIV を添加し、5 併行で添加回収試験を実施した。その結果は DON で平均回収率 99%(CV1.7%), NIV で平均回収 88%(CV0.8%)であり共に良好であった。

3.1.5 妥当性評価

DON については、HPLC-UV 法による定量に係る妥当性評価試験²⁰⁾で得た試料溶液を用いて本分析法の妥当性評価を実施した。結果は真度 94%, 併行精度 1.4%, 室間精度 4.4%であり、それぞれの目標値である 80~110%, 10%未満, 15%未満を満たした。

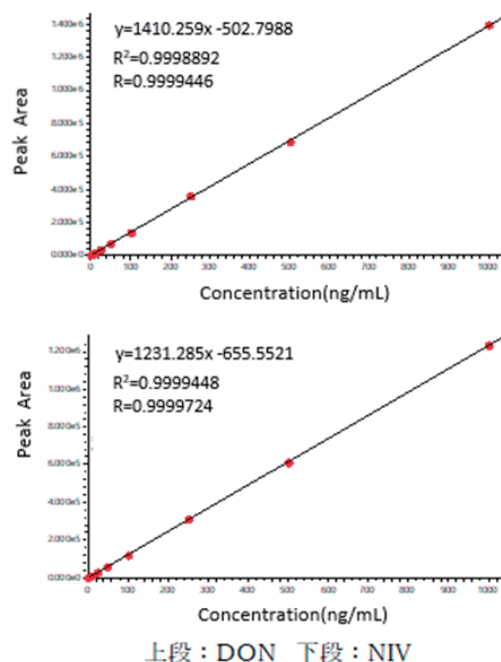


図 3 DON 及び NIV の検量線

このことから本法は DON の定量に十分使用できると考えられた。

3.1.6 定量・検出下限値

DON 及び NIV 濃度 50ng/mL の標準溶液を 5 回分析し、対応する試料濃度を求めた。その濃度の標準偏差の 10 倍 (10 σ) を定量下限値, 3 倍 (3 σ) 検出下限値とした。結果を表 2 に示した。DON については、目標とした定量下限値の 1/10 相当の 0.1mg/kg, 検出下限値の 1/20 相当の 0.05mg/kg を十分に達成していた。NIV についてもほぼ同様な値であり、その TDI から考えると十分な感度が確認できた。

表 2 算出された定量・検出下限値

	定量下限	検出下限	基準値
DON	0.043	0.013	1.0
NIV	0.046	0.014	—

3. 2 分析結果

検討した分析条件で DON 及び NIV を分析した結果を表 3 に示した。

3.2.1 DON

DONは12検体中の8検体から検出された。その濃度範囲は0.12~0.36mg/kgであり、基準値を超えるものはなかった。代表的なLC-MS/MS (SRM) クロマトグラムを図4に示した。

3.2.2 NIV

NIVについては、12検体中の1検体から検出さ

表3 長野県産小麦(玄麦)の分析結果

No.	検体	DON	NIV	(mg/kg) 参考 DON※1
1	R3_1	0.18	ND	0.17
2	R3_2	ND	ND	ND
3	R3_3	0.36	ND	0.38
4	R3_4	ND	ND	ND
5	R3_5	ND	ND	ND
6	R3_6	0.24	Tr※2	0.27
7	R4_1	0.20	ND	—
8	R4_2	0.13	ND	—
9	R4_3	0.32	ND	—
10	R4_4	0.12	ND	—
11	R4_5	ND	ND	—
12	R4_6	0.25	ND	—

注) ※1) : HPLC-UV法による分析値
 ※2) : 検出下限値 ≦ 分析値 < 定量下限値

れた。濃度は検出下限値を超えているが定量下限値を超えないトレース (Tr) であった。また、NIVが検出された検体からはDONが検出された。

3.2.3 DON 濃度と NIV 濃度の関係

DON濃度とNIV濃度の関係には地域差があるといわれている。長野県的小麦はDONが検出されてもNIVがほとんど検出されないか、検出されても極めて低濃度であることから北海道等の傾向に類似していた。

4 まとめ

令和3年7月小麦中のDONに係る基準値が設定され、主に定量はHPLC-UV法、確認はLC-MS/MS法を中心とした試験法が通知された。当所では平成14年に設けられた暫定的基準に対応するためHPLC-UV法で定量を行ってきたことなどから、定量を従来どおりHPLC-UV法、確認をLC-MS/MS法とした。この確認試験法作成に係る検討では、単なる確認だけではなく定量結果を補完できること、DONと共に検出されることもあるが当所での分析実績がなく、TDIがDONよりも低値のNIVが同時に分析できることも目的にした。

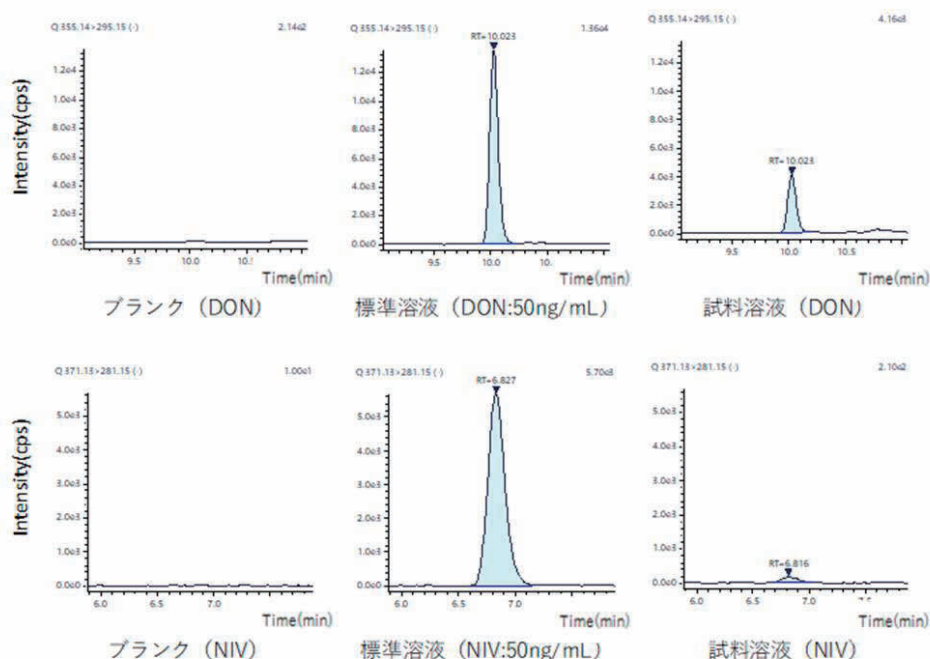


図4 LC-MS/MS (SRM) クロマトグラム

これらの分析法の検討及び長野県産小麦の分析を
ととして次の知見が得られた。

- (1) 検量線は DON 又は NIV 濃度で 1~1000ng/mL
の間で直線性が確認できた。それぞれ定量下限値
は 0.01mg/kg であり、DON については基準値の
1/10 に相当した。
 - (2) 添加回収試験の結果は、DON で平均回収率
99%(CV1.7%), NIV で平均回収 88%(CV0.8%)
と共に良好であった。また、マトリックスの影響
もほとんど受けず、DON 及び NIV を含まないブ
ランク試料には試験を妨害するピークはなかった。
 - (3) DON について実施した妥当性評価試験の結果
は、真度、併行精度及び室間精度がそれぞれの目
標値を満たしたことから、本法は DON の定量に
も使用できると考えられた。
 - (4) 令和 3 年及び 4 年に長野県で生産された小麦
(玄麦) 12 検体を分析した。DON は 12 検体中
の 8 検体から検出され、その濃度範囲は 0.12~
0.36mg/kg であり、基準値を超えるものはなかつ
た。また、NIV は 1 検体から検出され、濃度は Tr
であった。
 - (5) DON が検出された検体からは NIV が検出され
ることがあったが、NIV のみが検出された検体は
なかった。
 - (6) DON 濃度と NIV 濃度の関係には地域差がある
といわれ、長野県産小麦の場合は、DON が検出
されても NIV がほとんど検出されないか、検出さ
れても極めて低濃度であることから北海道等の傾
向に類似していた。
 - (7) 検体数が少ないため、分析の継続は必要である
と思われるが、NIV について健康への影響はほと
んどないものと考えられた。
 - (8) HPLC-UV 法による分析結果及びこの度の分析
結果から、長野県産小麦のかび毒汚染低減のため
の対策が適切に行われていると考えられた。
- 3) 農林水産省消費・安全局、国産麦類中のかび
毒(フザリウム毒素)の実態調査結果、平成
29 年 6 月。
 - 4) Takumi YOSHIKAWA, Yin-Zhe JIN (1998),
Trichothecene occurrence in Japanese wheat
and barley-its characteristics, *Mycotoxins*, 47:
15-18.
 - 5) 芳澤宅實, 日本におけるデオキシニバレノール,
ニバレノールの汚染実態:
[https://www.fsc.go.jp/koukan/risk-
tokyo201205/risk-tokyo201205_siryou3.pdf](https://www.fsc.go.jp/koukan/risk-tokyo201205/risk-tokyo201205_siryou3.pdf)
(令和 4 年 12 月確認)。
 - 6) 中村豊ら(1952) 赤かび病被害小麦の食中毒に
関する研究, 北海道立衛生研究所報, 2: 35-45
 - 7) 一戸正勝(2003) 異常気象下における麦類赤カ
ビ病とフザリウム毒素類, *Mycotoxins*, 53(1):
5-10.
 - 8) 芳澤宅實(2003) トリコテセン系マイコトキシ
ンによるヒトの中毒事例, *Mycotoxins*, 53(2):
113-118.
 - 9) 農林水産省消費・安全局 生産局, 麦類のデオ
キシニバレノール・ニバレノール汚染低減の
ための指針, 平成 20 年 12 月
 - 10) 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研
究機構, 麦類のかび毒汚染低減のための生産工
程管理マニュアル改訂版, 平成 28 年 3 月
 - 11) 厚生労働省ホームページ, 食品中のかび毒の
リスクアセスメントに関する調査研究, 平成
13 (2001) 年度厚生科学研究: [https://mhlw-
grants.niph.go.jp/project/5095](https://mhlw-grants.niph.go.jp/project/5095) (令和 4 年 12
月確認)。
 - 12) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知(平成 14
年 5 月 21 日付け食安発第 0521001 号)「小
麦のデオキシニバレノールに係る暫定的な基
準値の設定について」。
 - 13) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知(平
成 15 年 7 月 17 日付け食発第 0717001 号)「デ
オキシニバレノールの試験法について」。
 - 14) 瀬浪孟明(2022) 小麦中のデオキシニバレノール
に係る成分規格の設定について, 食品衛生研
究, Vol.72, No.3: 13-18
 - 15) 昭和 34 年 12 月 28 日付け厚生労働省告示第
370 号
 - 16) 令和 3 年厚生労働省告示第 294 号(令和 3 年

文 献

- 1) 食品安全委員会, かび毒評価書デオキシニバレノ
ール及びニバレノール(第 2 版), 2019 年 2 月。
- 2) 農林水産省消費・安全局, 指針活用のための技
術情報, 平成 20 年 12 月(平成 28 年 6 月一部
改定)。

- 7月30日付け)「食品, 添加物等の規格基準の一部を改正する件」.
- 17) 厚生労働省大臣官房生活衛生・食品安全審議官通知(令和3年7月30日付け生食発0730第7号)「食品, 添加物等の規格基準の一部を改正する件(小麦中のデオキシニバレノールに係る基準値の設定)」.
- 18) 大臣官房生活衛生・食品安全審議官通知(令和3年9月30日付け生食発0930第1号)「小麦中のデオキシニバレノール試験法について」.
- 19) 厚生労働省医薬・生活衛生局食品基準審査課(令和3年9月30日付け事務連絡)「小麦中のデオキシニバレノール試験法について」.
- 20) 上沼由佳ら(2023)玄麦中のデオキシニバレノールの妥当性評価, 長野県環境保全研究所研究報告第19号:93-96.
- 21) 望月直樹(2011)食品の安全におけるLC-MS/MS分析の問題点, The Pharmaceutical Society of Japan, 131(7):1019-1025.

Analysis of deoxynivalenol and nivalenol in wheat cultivated in Nagano Prefecture

Kazushi KOYAMA¹, Yuka UENUMA¹, Ashiko MIYAGAWA^{1,2}
and Toshimi TSUCHIYA^{1,2}

1 Food and Pharmaceutical Sciences Division, Nagano Environmental Conservation Research Institute, 1978 Komemura, Amori, Nagano 380-0944, Japan

2 Present address: Retirement