

技術レポート

6 とうもろこしサイレージ中のかび毒の定量法に関する検討 ～アフラトキシン B₁, ゼアラレノン及びデオキシニバレノール～

伊藤 千晶*, 佐藤 憲大*

Study of Determination Method of Mycotoxins in Corn Silage ~ Aflatoxin B₁, Zearalenone and Deoxynivalenol ~

Chiaki ITO* and Norihiro SATO*

(* Fertilizer and Feed Inspection Department, Food and Agricultural Materials Inspection Center)

The applicability of analytical methods of aflatoxin B₁ (AFB₁), deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEN) listed in Analytical Standards of Feeds to corn silage was investigated.

Tested methods for AFB₁ were simultaneous determination methods using a liquid chromatograph (LC) and using a LC equipped with a photochemical reactor. For DON and ZEN, a simultaneous determination method using liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS) was tested.

Corn silage samples were air-dried and ground. In the simultaneous determination method of DON and ZEN, there were some cases where the specified amount of extraction solvent was insufficient for corn silage.

The spike test results suggested that both determination methods of AFB₁ may be applicable to corn silage, and that the simultaneous determination method for DON and ZEN needs some improvements with respect to the preparation of sample solution and the selectivity of DON.

Key words: Aflatoxin B₁ (AFB₁); deoxynivalenol (DON); zearalenone (ZEN); liquid chromatograph (LC); photochemical reactor; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); corn silage

キーワード：アフラトキシン B₁；デオキシニバレノール；ゼアラレノン；液体クロマトグラフ；フォトケミカルリアクター；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；とうもろこしサイレージ

1 緒 言

飼料自給率の向上は、食料自給率向上の重要な施策として位置付けられ、とうもろこしサイレージを含む粗飼料の増産が積極的に行われている。その一方で、とうもろこしサイレージからデオキシニバレノール（以下「DON」という。）、ゼアラレノン（以下「ZEN」という。）等のかび毒が検出されており¹⁾、農林水産省が委託事業として平成 24 年度から汚染実態調査を実施している。飼料分析基準²⁾に記載されたこれらのかび毒の分析法は、とうもろこしサイレージへの適否が明らかではないことから、上記の汚染実態調査では、事業者が独自に開発した分析法が用いられている。

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

しかし、飼料の有害物質の指導基準及び管理基準³⁾には、DON及びZENの管理基準が規定されており、牛用飼料も対象になることから、将来的に国産粗飼料について基準への適否の判定のための分析法を定めておく必要があると考えられる。そこで、飼料分析基準収載法のとうもろこしサイレージへの適用の可否について検討した。合わせて、飼料の有害物質の指導基準及び管理基準が定められているアフラトキシンB₁（以下「AFB₁」という。）についても、同様に検討を行った。

とうもろこしサイレージに適用されている方法として、平成27年度の汚染実態調査で用いられた定量法⁴⁾（以下「実態調査法」という。）を参考に、以下の飼料分析基準収載法について検討を行った。AFB₁については、実態調査法がフォトケミカルリアクターを接続した高速液体クロマトグラフ（以下「LC」という。）を用いた方法であったため、トリフルオロ酢酸を用いて誘導体化を行う飼料分析基準第5章第3節2アフラトキシンの液体クロマトグラフによる同時分析法（以下「TFA法」という。）及びフォトケミカルリアクターを用いる飼料分析基準第5章第3節3アフラトキシンの液体クロマトグラフ-フォトケミカルリアクターによる同時分析法（以下「PR法」という。）の適用を検討した。また、DON及びZENの定量法については、実態調査法が液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（以下「LC-MS/MS」という。）による分析法であったため、DON及びZENを含む一斉分析法である飼料分析基準第5章第3節1かび毒の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による一斉分析法（以下「一斉法」という。）の適用を検討した。

2 実験方法

2.1 試料

検討には6種類のとうもろこしサイレージを用いた。試料の調製方法は、飼料分析基準の規定に従い、試料200g以上の必要量をとってその重さを量り、60℃で6~25時間乾燥後、更に室内で静置して風乾し、再び重さを量った後、1mmのスクリーンを装着した粉砕器で粉砕した。

2.2 試薬

1) アセトニトリル及びメタノールは、LCで測定する分析法にはLC用、LC-MS/MSで測定する分析法には液体クロマトグラフ質量分析計用を用いた。トリフルオロ酢酸はReagent Plus（純度99%，Sigma Aldrich製）を用いた。酢酸アンモニウムは高速液体クロマトグラフ用（1mol/L水溶液，関東化学製）を用いた。水はMilli-Q Integral 5（Millipore製）により精製した超純水（JIS K0211の5218に定義された超純水）を用いた。

2) AFB₁標準液

市販のアフラトキシン（B₁，B₂，G₁，G₂）混合標準液（各成分25µg/mL，アセトニトリル溶液，Sigma-Aldrich製）をAFB₁標準原液とした。AFB₁標準原液1mLを試験管に正確に取り、アセトニトリル1.5mLを正確に加えて混合し、1mL中にAFB₁として10µgを含有するAFB₁標準液を調製した。

i TFA法

AFB₁標準液（10µg/mL）250µLを10mLの全量フラスコに入れ、更に標線までアセトニトリルを加えて1mL中にAFB₁として250ngを含有する標準液を調製した。

使用に際して、この液4，10，20及び40µLを、飼料分析基準第5章第3節2アフラトキシンの液体クロマトグラフによる同時分析法に従い、それぞれトリフルオロ酢酸により誘導体化を行い、1mL中にAFB₁として1，2.5，5.0及び10.0ng相当量を含有する各AFB₁誘導体

標準液を調製した。

ii PR 法

AFB₁ 標準液 (10 µg/mL) 1 mL を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ, 更に標線までアセトニトリル-水 (9+1) を加えて 1 mL 中に AFB₁ として 100 ng を含有する標準液を調製した。

使用に際して, この液の一定量をアセトニトリル-水 (9+1) で正確に希釈し, 1 mL 中に AFB₁ として 2.5, 5, 10 及び 20 ng を含有する各 AFB₁ 標準液を調製した。

3) DON 標準原液

DON 標準品 (純度 99.4 %, Biopure 製) 2 mg を正確に量って 10 mL の全量フラスコに入れ, アセトニトリルを加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えて DON 標準原液を調製した (この液 1 mL は, DON として 200 µg を含有する.) .

4) ZEN 標準液

ZEN 標準品 (純度 99.7 %, Sigma-Aldrich 製) 2 mg を正確に量って 10 mL の全量フラスコに入れ, アセトニトリルを加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えて 1 mL 中に ZEN として 200 µg を含有する標準原液を調製した. この液 1 mL を 10 mL の全量フラスコに正確に入れ, 更に標線までアセトニトリルを加えて ZEN 標準液を調製した (この液 1 mL は, ZEN として 20 µg を含有する.) .

5) DON 及び ZEN 混合標準液

DON 標準原液 5 mL 及び ZEN 標準液 1 mL を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ, 水 16 mL を加えて混合し, 更に標線までアセトニトリルを加えて DON 及び ZEN 混合標準原液を調製した (この液 1 mL は, DON として 10 µg 及び ZEN として 0.2 µg を含有する.) .

使用に際して, DON 及び ZEN 混合標準原液の一定量をアセトニトリル-水 (21+4) で正確に希釈し, 1 mL 中に DON として 50, 100, 200, 500 及び 1000 ng, ZEN として 1, 2, 4, 10 及び 20 ng をそれぞれ含有する DON 及び ZEN 混合標準液を調製した. 更に各 DON 及び ZEN 混合標準液の一定量をそれぞれ同容量の酢酸 (1+100) で希釈して, 各検量線作成用 DON 及び ZEN 混合標準液を調製した。

2.3 装置及び器具

検討に用いた装置及び器具を Table 1 に示した。

Table 1 Instruments and equipments

Mycotoxins	Methods	Instruments and equipments
	TFA method ^{a)}	1) Grinder: ZM 200, Retsch (1 mm screen, rotational speed: 14000 rpm) 2) Shaker: Strong shaker SR-2DW (shake speed: 300 rpm), TAITEC 3) Multifunctional column: MycoSep 226 AflaZon+, Romer Labs 4) LC: LC system: Prominence, Shimadzu Fluorescence detector: RF-20AX, Shimadzu
Aflatoxin B ₁ (AFB ₁)	PR method ^{b)}	1) Grinder: ZM 200, Retsch (1 mm screen, rotational speed: 14000 rpm) 2) Shaker: Strong shaker SR-2DW (shake speed: 300 rpm), TAITEC 3) Multifunctional column: MycoSep 226 AflaZon+, Romer Labs 4) LC: LC system: prominence, Shimadzu Photochemical reaction system: Photochemical reactor (PHRED), AURA Industries Fluorescence detector: RF-20AX, Shimadzu
Deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEN)	Simultaneous method ^{c)}	1) Grinder: ZM 200, Retsch (1 mm screen, rotational speed: 14000 rpm) 2) Shaker: Strong shaker SR-2DW (shake speed: 300 rpm), TAITEC 3) Multifunctional column: MultiSep 226 AflaZon+, Romer Labs 4) LC-MS/MS: LC system: Nexera X2, Shimadzu MS/MS detector: LCMS-8040, Shimadzu

a) Simultaneous analysis of aflatoxins by liquid chromatography (listed in Analytical Standards of Feeds, 5.3.2)

b) Simultaneous analysis of aflatoxins by liquid chromatograph-photochemical reactor (listed in Analytical Standards of Feeds, 5.3.3)

c) Simultaneous analysis of mycotoxins by liquid chromatograph / tandem mass spectrometer (listed in Analytical Standards of Feeds, 5.3.1)

2.4 定量方法

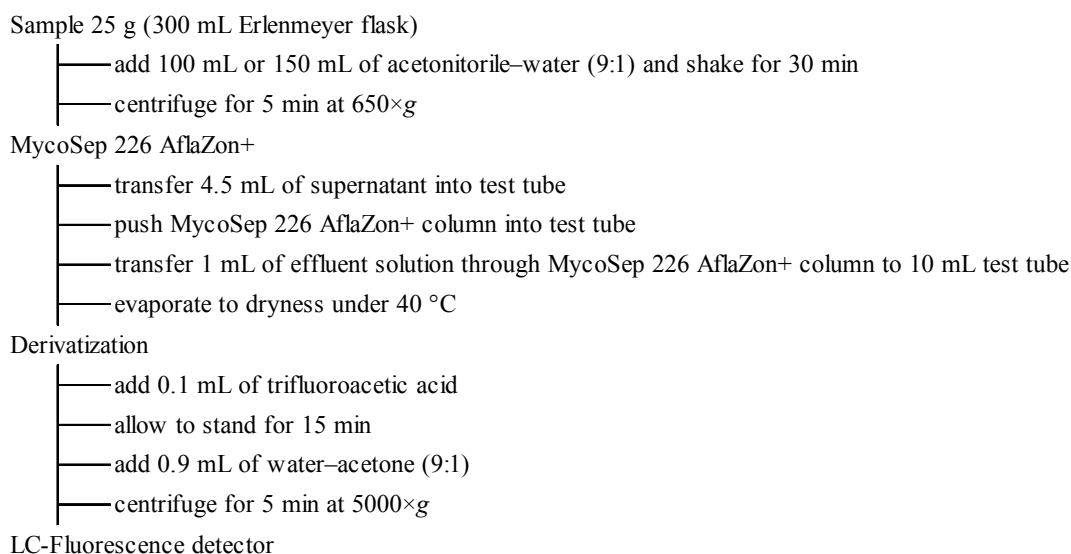
定量方法は、飼料分析基準に従い 1)~3)のとおり行った。なお、定量操作は遮光した状態で行った。

1) AFB₁ (TFA 法)

定量は TFA 法により行った。なお、分析試料の採取量は 25.0 g とし、分析試料が抽出溶媒を吸収して振り混ぜることができない場合は、溶媒の量を 100 mL から 150 mL に変更した。LC の測定条件を Table 2 に、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

Table 2 Operating conditions of LC for analyzing AFB₁ by TFA method

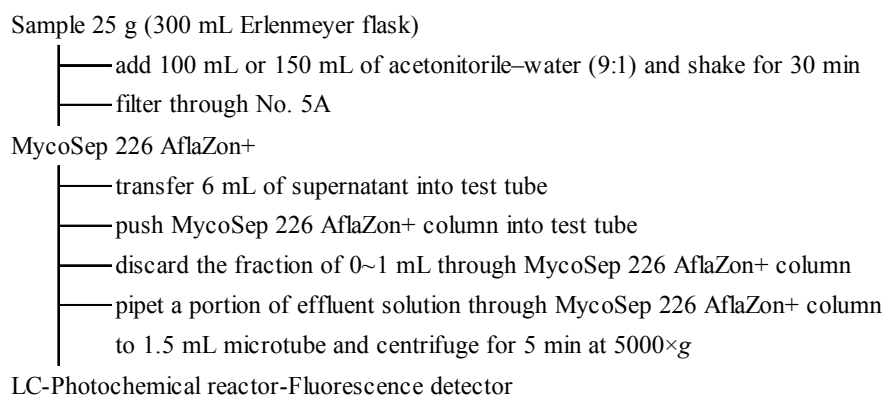
Column	Mightysil RP-18 GP (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm), Kanto Chemical
Guard column	Mightysil RP-18 GP (4.6 mm i.d. × 5 mm, 5 μm), Kanto Chemical
Mobile phase	Water-methanol (3:2)
Flow rate	0.8 mL/min
Column temperature	40 °C
Detector	Fluorescence detector (Ex: 365 nm, Em: 450 nm)

Scheme 1 Analytical procedure for AFB₁ in corn silage (TFA method)2) AFB₁ (PR 法)

定量は PR 法により行った。なお、分析試料の採取量は 25.0 g とし、分析試料が抽出溶媒を吸収して振り混ぜることができない場合は、溶媒の量を 100 mL から 150 mL に変更した。LC の測定条件を Table 3 に、定量法の概要を Scheme 2 示した。

Table 3 Operating conditions of LC for analyzing AFB₁ by PR method

Column	Mightysil RP-18 GP (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm), Kanto Chemical
Guard column	Mightysil RP-18 GP (4.6 mm i.d. × 5 mm, 5 μm), Kanto Chemical
Mobile phase	Water–methanol (3:2)
Flow rate	0.7 mL/min
Column temperature	35 °C
Photochemical reaction system	Low-pressure mercury lamp (15 W) (245 nm) wrapped with knitted reactor coil (0.25 mm i.d. × 10 m)
Detector	Fluorescence detector (Ex: 365 nm, Em: 450 nm)

Scheme 2 Analytical procedure for AFB₁ in corn silage (PR method)

3) DON 及び ZEN (一斉法)

定量は一斉法により行った。ただし、一斉法では、試料 50 g にアセトニトリル-水 (21+4) 100 mL を加えたとき、分析試料が抽出溶媒を吸収して振り混ぜられない場合には、溶媒の量を 150 mL とすることとなっているが、とうもろこしサイレージでは 150 mL でも振り混ぜられない場合があったことから、抽出溶媒量等を以下のように変更した。

試料採取量を 25 g, 抽出溶媒量を 100 mL に変更し、それでも振り混ぜられなかった場合は、必要に応じて抽出溶媒量を最大 150 mL まで増やした。

また、最終試料溶液濃度が検量線の範囲を超える場合は、カラム処理後の試料溶液をアセトニトリル-水 (21+4) で正確に希釈した。この溶液 1 mL を試験管に正確に入れ、酢酸 (1+100) 1 mL を正確に加え、以降、一斉法の規定のとおり、この液の一定量を遠心分離し、上澄み液を LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

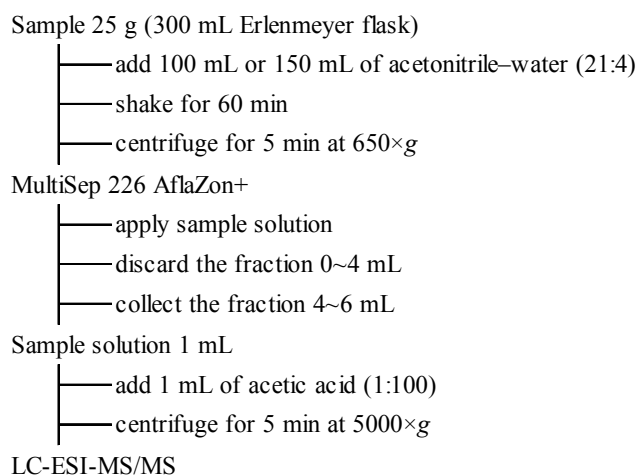
なお、LC-MS/MS の測定条件を Table 4 及び 5 に、定量法の概要を Scheme 3 に示した。

Table 4 Operating conditions of LC-MS/MS for analyzing DON and ZEN

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 μm), Agilent Technologies
Guard column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 mm i.d. × 12.5 mm, 5 μm), Agilent Technologies
Mobile phase	10 mmol/L ammonium acetate-acetonitrile (9:1) (hold for 1 min) → 19 min → (8:2) (hold for 15 min) → (10:0) (hold for 5 min) → (9:1) (hold for 5 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Negative
Interface temperature	350 °C
Heat block temperature	500 °C
Desolvation gas	N ₂ (3 L/min)
Drying gas	N ₂ (15 L/min)
Collision gas	Ar (230 kPa)

Table 5 MS/MS parameters for analyzing DON and ZEN

Target	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion		Collision energy (eV)
		Quantifier (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)	
DON	355	295	-	10
		-	59	25
ZEN	317	131	-	31
		-	175	25



Scheme 3 Analytical procedure for DON and ZEN in corn silage (Simultaneous method)

3 結果及び考察

3.1 試料調製

実態調査法では、分析用試料の調製方法が飼料分析基準に規定された方法と異なり、試料を風乾せず、水分を60%以上含んだ原物のまま2 mm スクリーンで粗粉碎する方法であった。とうもろこしサイレージには子実部分や茎部分が混在しており、粉碎粒度が粗く、かつ、供試量が少ない原物中の分析では、分析値のばらつきが大きくなること、分析用試料中の水分が抽出液量や組成を変化させること等が懸念されたことから、飼料分析基準への収載を念頭においた分析法の検討については、飼料分析基準に規定された方法で調製した分析用試料を用いることとし、検討する分析法も飼料分析基準収載法により行うこととした。

3.2 抽出溶媒量

一斉法において、抽出工程で試料による抽出溶媒の吸収が著しく、試料採取量25 g に対し225 mL の抽出溶媒を必要とする試料があり、試料採取量や抽出溶媒量について改良の必要性が示唆された。なお、当該試料は入手した量が少なかったため、3.3 以降の検討には用いなかった。

3.3 妨害物質の検討

1) AFB₁

3種類のとうもろこしサイレージを用い、TFA法及びPR法により得られたクロマトグラムを確認した。その結果、いずれにおいてもAFB₁の定量を妨害するピークは検出されなかった。

本検討により得られたクロマトグラムの一例をFig. 1に示した。

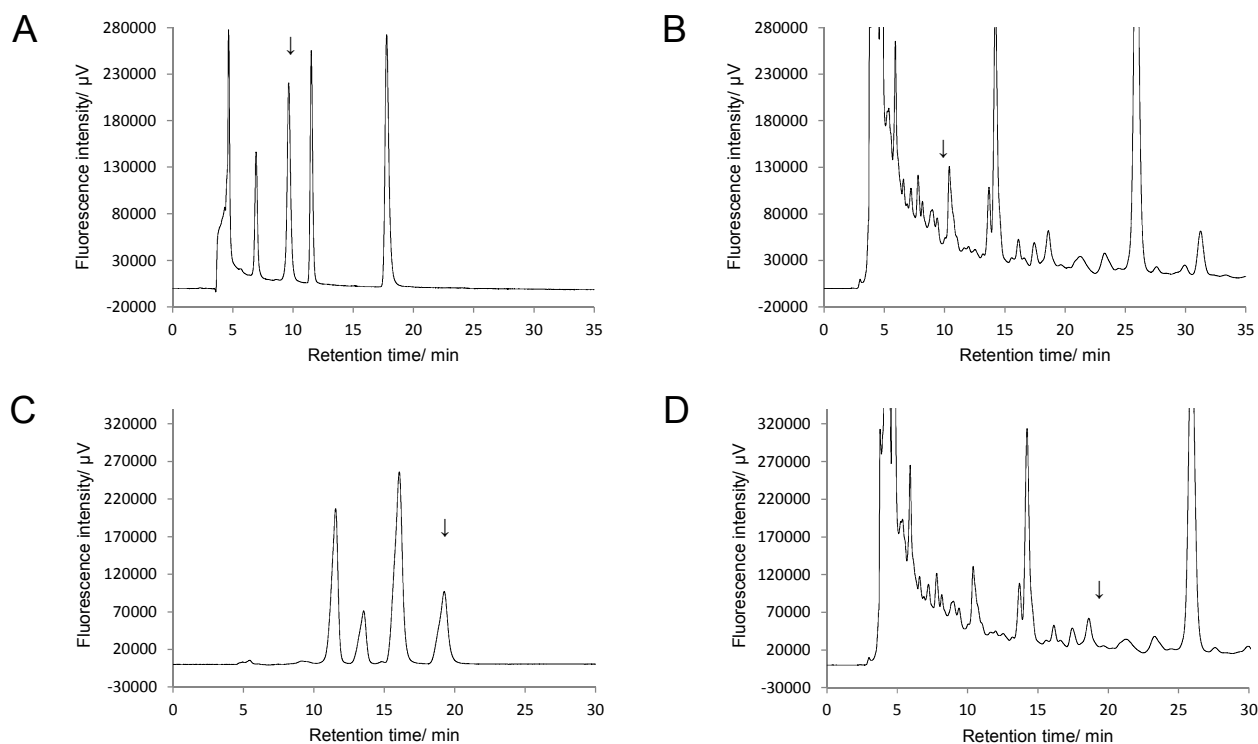


Fig. 1 Chromatograms of standard solutions and sample solutions of corn silage (blank) (LC conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the retention time of AFB₁ derivative.)

A: TFA method; Standard solution (1 ng/mL: 20 pg as AFB₁)

B: TFA method; Corn silage (blank)

C: PR method; Standard solution (1 ng/mL: 20 pg as AFB₁)

D: PR method; Corn silage (blank)

2) DON

4種類のとうもろこしサイレージを用い、一斉法により得られた選択反応検出（以下「SRM」という。）クロマトグラムを確認した。その結果、全ての試料においてDONと同じ保持時間にピークが認められ、確認イオンのピークも認められたことからDONのピークと考えられたが、定量イオンのピークと直前の妨害ピークが重なり、定量値への影響はDONとして最大0.4 mg/kg程度であった。このことから、一斉法をとうもろこしサイレージに適用しようとする場合には、精製の追加、液体クロマトグラフ条件の変更等分析法の改良が必要と考えられた。本検討により得られたSRMクロマトグラムの一例をFig. 2に示した。

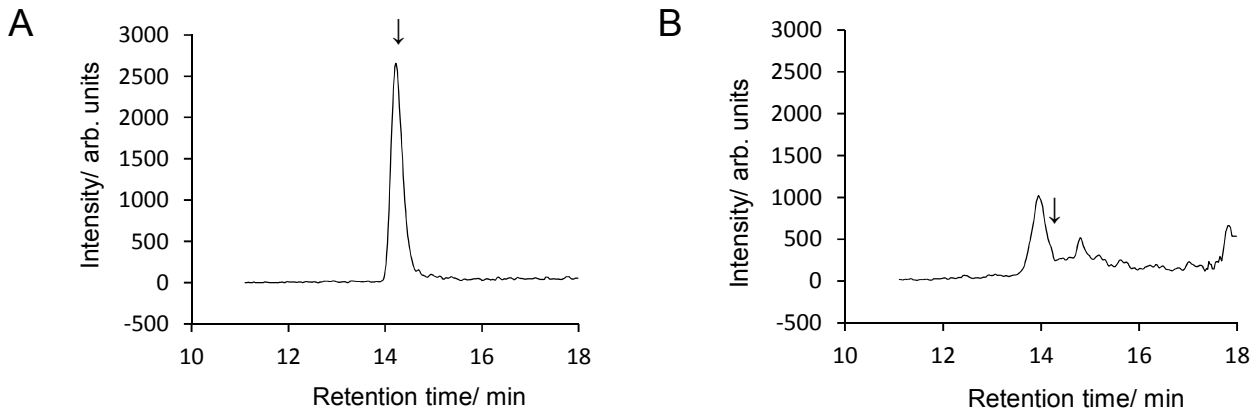


Fig. 2 SRM chromatograms of standard solution and sample solution of corn silage (naturally contaminated)

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 4 and 5. Arrows indicate the retention time of DON.)

A: Standard solution (25 ng/mL: 250 pg as DON)

B: Corn silage (naturally contaminated)

3) ZEN

4種類のとうもろこしサイレージを用い、一斉法により得られたSRMクロマトグラムを確認した結果、定量を妨げる妨害ピークは認められなかった。

なお、全ての試料でZENと同じ保持時間にピークが認められた。これらのピークについて、定量イオンと確認イオンの比を確認したところ、標準液と同等であったことから、ZENであると判断した。

本検討により得られたSRMクロマトグラムの一例をFig. 3に示した。

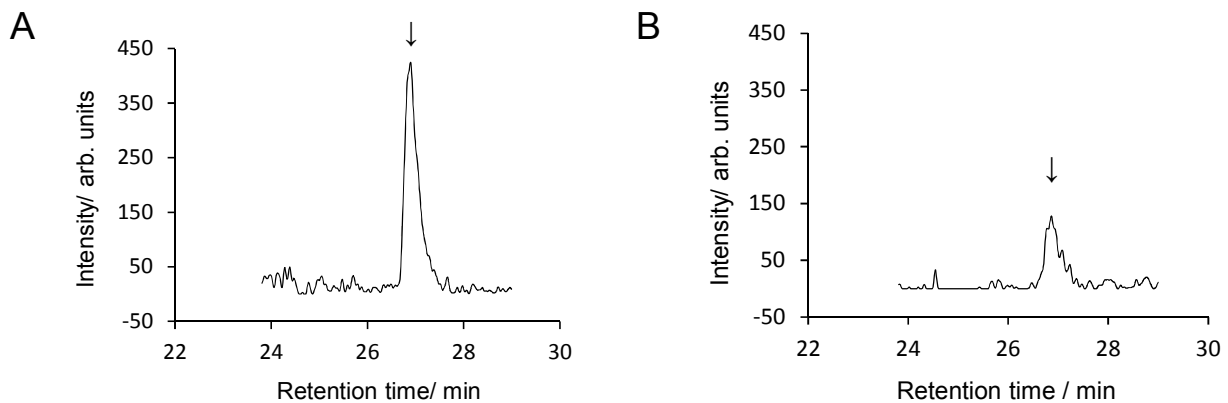


Fig. 3 SRM chromatograms of standard solution and sample solution of corn silage (naturally contaminated)

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 4 and 5. Arrows indicate the retention time of ZEN.)

A: Standard solution (0.5 ng/mL: 5 pg as ZEN)

B: Corn silage (naturally contaminated)

3.4 添加回収試験

1) AFB₁

2.2 の 2) で調製した, 1 mL 中に AFB₁ として 10 µg を含有する標準液をアセトニトリルで正確に希釈し, 添加に用いた.

3 種類のとうもろこしサイレージを用い, TFA 法及び PR 法ともに, 原物換算して AFB₁ として 0.01 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 5 ng/mL (抽出溶媒量 100 mL の場合) または 3.3 ng/mL (抽出溶媒量 150 mL の場合)) をそれぞれ添加後よく混合し, 一夜静置した後に, 各方法に従って試験を実施し, 平均回収率及び繰返し精度を求めた.

なお, 添加は風乾物試料に対して AFB₁ として 0.02 mg/kg 相当量になるよう行い, 原物中濃度への換算は, 原物中及び風乾物中の水分含有量を 60 % 及び 10 % と想定して, 原物 (水分含有量 60 %) 中濃度 = 風乾物 (水分含有量 10 %) 中濃度 / 2.25 の式により行った.

その結果は Table 6 のとおり, TFA 法については平均回収率 81.3~90.4 %, その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 4.0 % 以下, PR 法については平均回収率 72.2~89.7 %, RSD_r 8.4 % 以下の成績が得られ, 飼料分析基準の妥当性確認法ガイドライン²⁾ (以下「妥当性確認法ガイドライン」という.) に定められた真度及び併行精度の目標値を満たした. TFA 法及び PR 法は, とうもろこしサイレージへの適用可能であることが示唆された.

なお, 得られたクロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した.

Table 6 Recoveries for AFB₁

Sample No.	Spiked level (mg/kg original matter) ^{a)}	Methods			
		TFA method		PR method	
		Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)	Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)
1	0.01	90.4	2.9	84.2	3.3
2	0.01	83.9	4.0	89.7	8.4
3	0.01	81.3	1.4	72.2	3.8

a) AFB₁ was spiked to air-dried corn silage samples one night prior to extraction. The spiked level was 0.02 mg/kg air-dry matter. The level of AFB₁ in original matter was calculated with following equation on the assumption that the moisture content of corn silage samples was 60 % for original matter and 10 % for air-dry matter.

$$\begin{aligned} & \text{The level of AFB}_1 \text{ in original matter (moisture 60 \%)} \\ & = \text{the level of AFB}_1 \text{ in air-dry matter (moisture 10 \%)} / 2.25 \end{aligned}$$

b) Mean ($n = 3$)

c) Relative standard deviation of repeatability

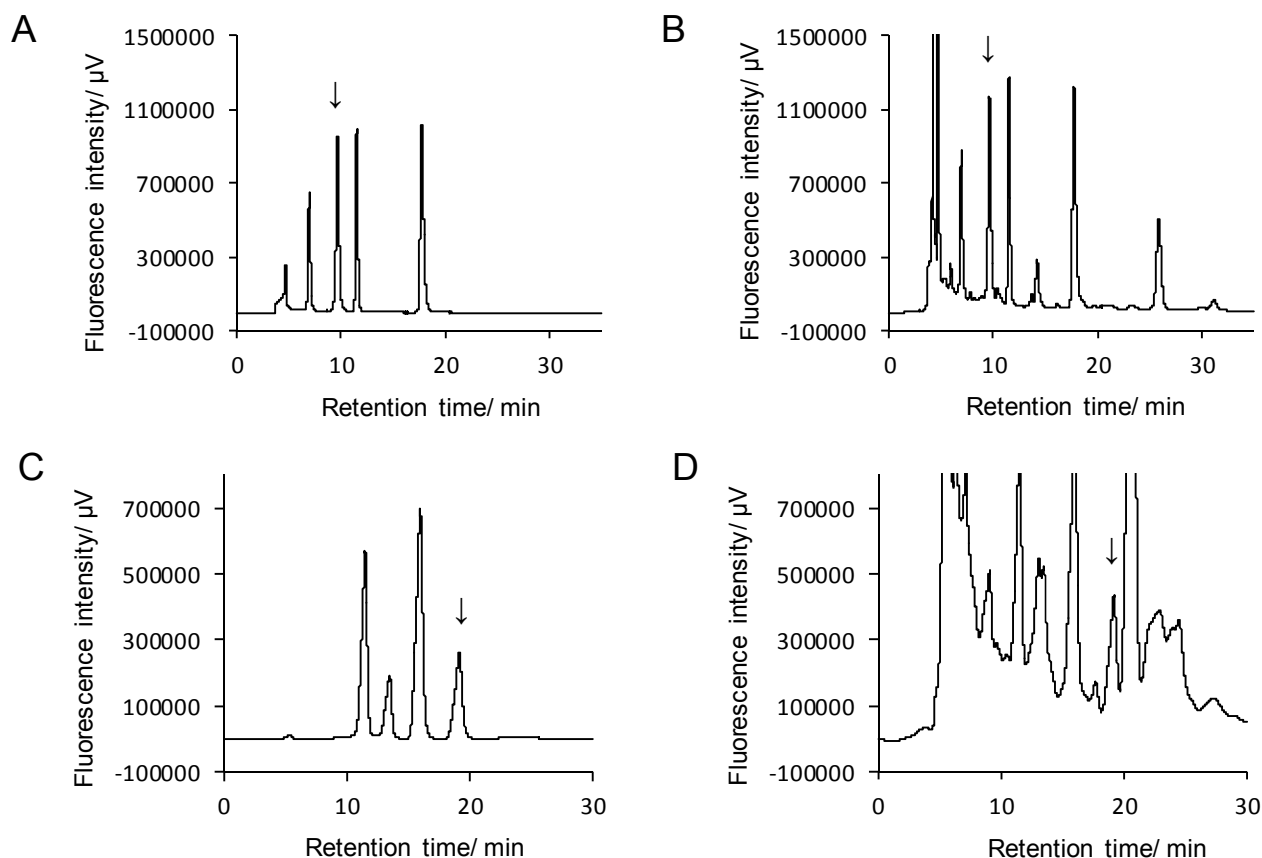


Fig. 4 Chromatograms of AFB₁ derivative

(LC conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the peaks of AFB₁ derivative.)

A: TFA method; Standard solution (2.5 ng/mL: 50 pg as AFB₁)

B: TFA method; Sample solution of corn silage spiked at 0.01 mg/kg original matter of AFB₁
(3.3 ng/mL: 67 pg as AFB₁)

C: PR method; Standard solution (2.5 ng/mL: 50 pg as AFB₁)

D: PR method; Sample solution of corn silage spiked at 0.01 mg/kg original matter of AFB₁
(3.3 ng/mL: 67 pg as AFB₁)

2) DON 及び ZEN

DON については 2.2 の 3) で調製した DON 標準原液を、ZEN については 2.2 の 4) で調製した標準原液を、それぞれアセトニトリルで正確に希釈し、添加に用いた。

なお、DON については 3.3 の 2) のとおり妨害ピークが認められたため参考値とし、妨害ピークの面積を DON 量に換算した値を差し引くことにより回収率を算出した。

4 種類のとうもろこしサイレージを用い、DON 及び ZEN として、原物換算して 1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各成分 250 ng/mL（抽出溶媒量 100 mL の場合）又は 167 ng/mL（抽出溶媒量 150 mL の場合））をそれぞれ添加後よく混合し、一夜静置した後、試験を実施し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

なお、添加は風乾物試料に対して DON 及び ZEN として 2 mg/kg 相当量になるよう行い、原物中濃度への換算は、1) と同様に行った。

その結果は Table 7 のとおり DON については平均回収率 80.7~90.6 %，RSD_r 2.8 % 以下，

ZEN については平均回収率 116~123 %, RSD_r 2.7 %以下の成績となり, ZEN については妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たしていた. DON については妨害ピークが認められたため参考値であるが, 回収率及び RSD_r については, 妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たしていた.

なお, 得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 5 に示した.

Table 7 Recoveries for DON and ZEN

Sample No.	Spiked level (mg/kg original matter) ^{a)}	Mycotoxins			
		DON		ZEN	
		Recovery ^{b)} (%)	RSD_r ^{c)} (%)	Recovery ^{b)} (%)	RSD_r ^{c)} (%)
1	1	87.1	1.3	123	2.7
2	1	80.7	2.5	116	0.5
4	1	81.8	2.4	119	0.3
5	1	90.6	2.8	119	2.5

a) DON and ZEN were spiked to air-dried corn silage samples one night prior to extraction.

The spiked level was 2 mg/kg air-dry matter. The levels of DON and ZEN in original matter were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of corn silage samples was 60 % for original matter and 10 % for air-dry matter.

The levels of mycotoxins in original matter (moisture 60 %)

= the levels of mycotoxins in air-dry matter (moisture 10 %) / 2.25

b) Mean ($n = 3$)

c) Relative standard deviation of repeatability

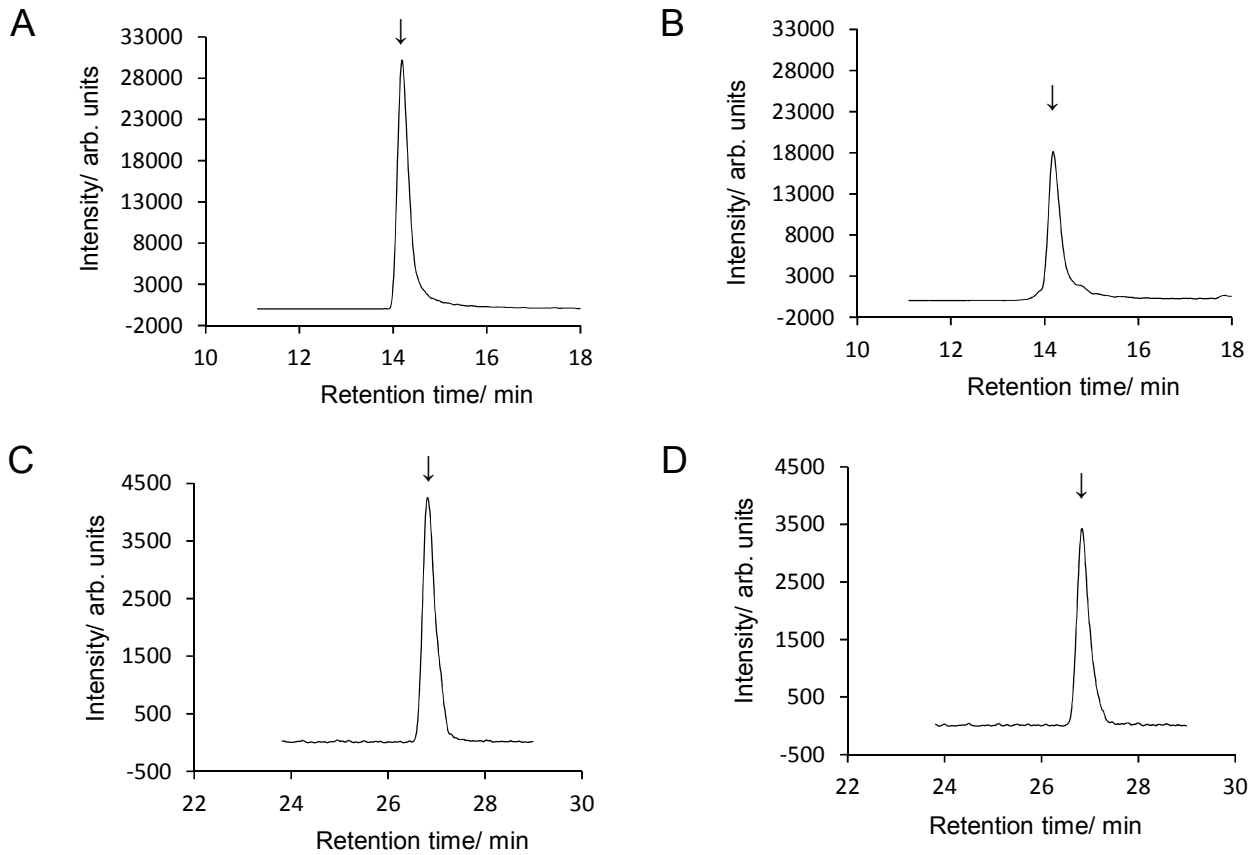


Fig. 5 SRM chromatograms of DON and ZEN

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 4 and 5. Arrows indicate the peaks of DON (A and B) and ZEN (C and D).)

A: Standard solution of DON (250 ng/mL: 2.5 ng as DON)

B: Sample solution of corn silage spiked at 1 mg/kg original matter of DON (167 ng/mL: 1.67 ng as DON)

C: Standard solution (5 ng/mL: 0.05 ng as ZEN)

D: Sample solution of corn silage spiked at 1 mg/kg original matter of ZEN (3.3 ng/mL: 0.033 ng as ZEN)

4 まとめ

とうもろこしサイレージ中に含有される AFB₁, DON 及び ZEN について, 飼料分析基準に従って試験を行ったところ, 以下の結果が得られた.

- 1) 飼料分析基準への収載を念頭においた分析法の検討については, 飼料分析基準に規定された方法で調製した分析用試料を用いることとした.
- 2) DON 及び ZEN について, 飼料分析基準をとうもろこしサイレージに適用しようとする場合には, 試料採取量や抽出溶媒量について改良の必要性が示唆された.

- 3) AFB₁ について、いずれの分析方法において得られたクロマトグラムについても、定量を妨げるピークは認められなかった。DON については、全ての試料において得られた SRM クロマトグラムに DON の定量を妨害するピークが認められたため、とうもろこしサイレージに適用しようとする場合は、選択性についての分析法の改良が必要であった。ZEN については、得られた SRM クロマトグラムには、定量を妨げるピークは認められなかった。
- 4) 風乾したとうもろこしサイレージに AFB₁ として 0.02 mg/kg 相当量を添加し、TFA 法及び PR 法に従って、添加回収試験を 3 点併行で実施し、回収率及び繰返し精度を求めた結果、いずれの方法も妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たした。また、同様に DON 及び ZEN として 2 mg/kg 相当量を添加し、一斉法に従って添加回収試験を 3 点併行で実施し、回収率及び繰返し精度を求めた結果、いずれの成分も妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たした。

文 献

- 1) 平岡 久明：飼料中のマイコトキシン汚染状況，臨床獣医，25 (6), 10-17 (2007).
- 2) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 3) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 4) 一般財団法人日本食品分析センター：平成 27 年度生産資材安全確保対策事業「国産飼料中のかび毒含有実態調査委託事業」報告書，平成 28 年 3 月 (2016).