

4 とうもろこしサイレージ中のデオキシニバレノール及びゼアラレノンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法の開発

大島 慎司*, 田端 麻里*, 青山 幸二*

Development of Determination Method of Deoxynivalenol and Zearalenone in Corn Silage by LC-MS/MS

Shinji OSHIMA*, Mari TABATA* and Koji AOYAMA*

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

We have developed a quantitative determination method of the concentration of deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEN) in corn silage using a liquid chromatograph-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometer (LC-APCI-MS/MS).

DON and ZEN were extracted with acetonitrile-water (21:4), and the extracted solution was centrifuged. The supernatant (1 mL) was then diluted with acetonitrile-water (21:4) to a volume of 20 mL. The diluted solution was purified with a SPE column (InertSep VRA-3, GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan), and the purified solution was used for LC-MS/MS determination of ZEN. As for DON, the purified solution was further purified with graphite carbon to obtain a sample solution of DON. Sample solutions thus obtained from each process of DON and ZEN were respectively injected into a LC-MS/MS to determine the concentration of DON and ZEN. LC separation was then carried out on an ODS column (InertSustain C18, 3.0 mm i.d. × 50 mm, 2 μm, GL Sciences Inc.) with a gradient of 2 mmol/L ammonium acetate solution and 2 mmol/L ammonium acetate methanol solution for DON, and 2 mmol/L ammonium acetate solution and acetonitrile for ZEN as a mobile phase respectively. In the MS/MS analysis, the negative mode atmospheric pressure chemical ionization (APCI-) was used.

Recovery tests were conducted on corn silages. Corn silage was added with 0.2 and 4 mg/kg of DON, and 0.02 and 1 mg/kg of ZEN respectively. The resulting mean recoveries ranged from 89.3 % to 116 %, and the repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was less than 8.7 % for DON, while the mean recoveries ranged from 101 % to 112 %, and RSD_r was less than 12 % for ZEN.

Key words: deoxynivalenol; zearalenone; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); atmospheric pressure chemical ionization (APCI); corn silage

キーワード：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タンデム型質量分析計；大気圧化学イオン化法；とうもろこしサイレージ

1 緒 言

飼料自給率の向上は、食糧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国産粗飼料の増産対策が積極的に行われている。その一方で、国産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事業を実施している。飼料分析基準²⁾に記載されている DON 及び ZEN を含むかび毒一斉分析法はとうも

* 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

ろこしサイレージへの適用が困難であることが確認されており³⁾, 上記の汚染実態調査事業では, 事業者が独自に開発した分析法が用いられている.

飼料の有害物質の指導基準及び管理基準⁴⁾において, DON については反すう動物 (ほ乳期のものを除く.) に給与される飼料中で 4 mg/kg 並びに家畜 (反すう動物 (ほ乳期のものを除く.) を除く.) 及び家きんに給与される飼料中で 1 mg/kg, ZEN については家畜及び家きんに給与される飼料中で 1 mg/kg の管理基準値が設定されており, 将来的に国産粗飼料が管理基準値を遵守していることを確認する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, 汚染実態調査事業において, 平成29年度に一般財団法人日本食品検査が用いた分析法⁵⁾ (以下「JFIC 法」という.) 及び平成30年度に一般社団法人日本海事検定協会が用いた分析法⁶⁾ (以下「NKKK 法」という.) を基に, とうもろこしサイレージ中の DON 及び ZEN の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.) による定量法の飼料分析基準への適用の可否を検討したので, その概要を報告する.

参考に DON 及び ZEN の構造式等を Fig. 1 に示した.

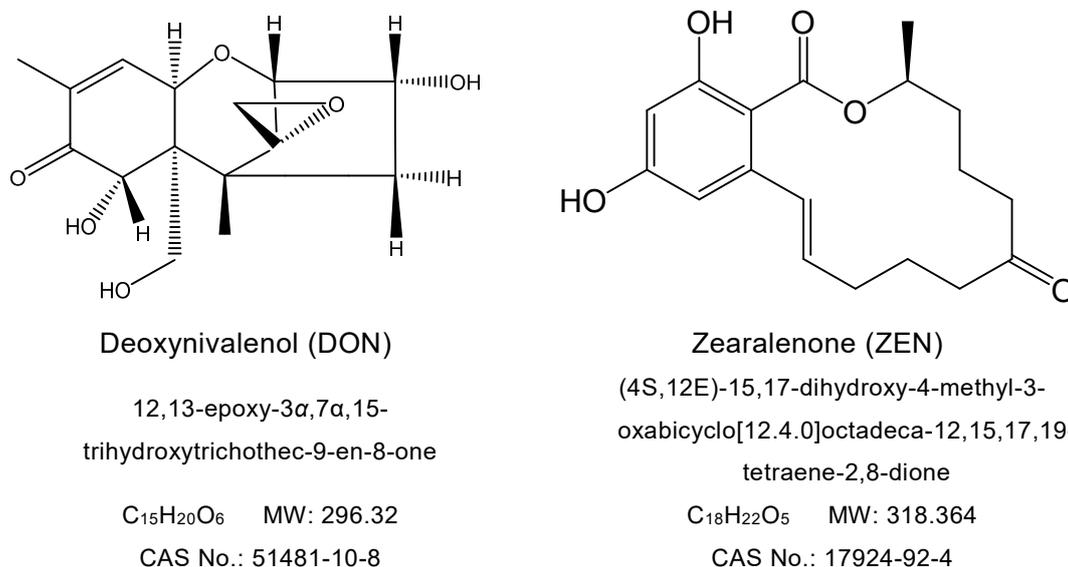


Fig. 1 Chemical structures of DON and ZEN

2 実験方法

2.1 試料

とうもろこしサイレージは 60 °C で 18~24 時間乾燥後, 更に室内に静置して風乾した後, 目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎した.

2.2 試薬

1) 酢酸アンモニウムは試薬特級, アセトニトリル及びメタノールは LC-MS 用 (富士フィルム和光純薬製), グラファイトカーボン は Supelclean ENVI-Carb SPE Bulk Packing (Sigma-Aldrich 製), 1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液は高速液体クロマトグラフ用 (富士フィルム和光純薬製) を用いた. 水は Milli-Q Integral 5 (Merck 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) DON 標準液

DON 標準品（富士フィルム和光純薬製，純度 100.0 %）2 mg を正確に量って 20 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 0.1 mg を含有する．）．

使用に際して，DON 標準原液 1 mL を 50 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（21+4）を加えて，1 mL 中に DON として 2 µg を含有する標準液を調製した．この標準液の一定量を，水-メタノール-アセトニトリル（18+1+1）で正確に希釈し，1 mL 中に DON としてそれぞれ 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60, 80 及び 100 ng を含有する各標準液を調製した．

3) ZEN 標準液

ZEN 標準品（富士フィルム和光純薬製，純度 100.0 %）2 mg を正確に量って 20 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 ZEN 標準原液を調製した（この液 1 mL は，ZEN として 0.1 mg を含有する．）．

使用に際して，ZEN 標準原液 1 mL を 50 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（21+4）を加えて，1 mL 中に ZEN として 2 µg を含有する標準液を調製した．この標準液の一定量を，アセトニトリル-水（21+4）で正確に希釈し，1 mL 中に ZEN としてそれぞれ 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40 及び 50 ng を含有する各標準液を調製した．

2.3 装置及び器具

- 1) 粉砕機：ZM 200 Retsch 製（1 mm スクリーン，使用時回転数 14000 rpm）
- 2) 振とう機：ストロングシェイカーSR-2DW タイテック製（使用時振とう数 300 rpm）
- 3) 多機能カラム：InertSep VRA-3（リザーバー容量 6 mL）ジーエルサイエンス製
- 4) メンブランフィルター：13HP020AN（孔径 0.20 µm，直径 13 mm，ポリテトラフルオロエチレン） 東洋濾紙製
- 5) LC-MS/MS：
LC 部：Nexera X2 島津製作所製
MS 部：LCMS-8040 島津製作所製

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 25.0 g を量って 500 mL の共栓三角フラスコに入れ，アセトニトリル-水（21+4）250 mL を加え，60 分間振り混ぜて抽出した．抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ，1600×g で 5 分間遠心分離し，上澄み液 1 mL を 20 mL の全量フラスコに正確に入れた．全量フラスコの標線までアセトニトリル-水（21+4）を加え，カラム処理に供する試料溶液とした．

2) カラム処理

試料溶液を多機能カラムに入れ，初めの流出液 1 mL を捨てた．10 mL の試験管をカラムの下に置き，その後の流出液 1 mL を受け，LC-MS/MS による ZEN の測定に供する試料溶液とした．更に，別の 10 mL の試験管をカラムの下に置き，その後の流出液 3 mL を受け，精製に供する試料溶液とした．

3) 精製

試料溶液をあらかじめグラファイトカーボン 200 mg を入れた 15 mL の遠心チューブに入れ、1 分間振り混ぜた。1600×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液 2 mL を 10 mL の試験管に正確に入れ、窒素ガスを送って乾固した。水-メタノール-アセトニトリル (18+1+1) 0.5 mL を正確に加えて残留物を溶かし、メンブランフィルターでろ過し、LC-MS/MS による DON の測定に供する試料溶液とした。

4) LC-MS/MS による測定

試料溶液、各 DON 標準液及び各 ZEN 標準液 5 µL を LC-MS/MS に注入し、選択反応検出 (以下「SRM」という。) クロマトグラムを得た。測定条件を Table 1 及び 2 に示した。液体クロマトグラフ部において、DON 及び ZEN の溶離液の条件を変え、Table 1 のとおりそれぞれ溶離液 1 及び 2 の条件で測定した。

Table 1 Operation conditions of LC-MS/MS

Column	InertSustain C18 (3.0 mm i.d. × 50 mm, 2 µm), GL Sciences
Mobile phase 1 (DON)	2 mmol/L ammonium acetate-2 mmol/L ammonium acetate methanol solution (19:1) (hold for 1 min) → 9 min → (1:19) (hold for 5.5 min) → 0.1 min → (19:1) (hold for 4.4 min)
Mobile phase 2 (ZEN)	2 mmol/L ammonium acetate-acetonitrile (7:3) (hold for 1 min) → 4 min → (1:19) (hold for 7 min) → 0.1 min → (7:3) (hold for 4.9 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Atmospheric pressure chemical ionization (APCI)
Mode	Negative
Nebulizer gas	Air (4 L/min)
Drying gas	N ₂ (5 L/min)
Interface temperature	350 °C
Heat block temperature	200 °C
Desolvation line temperature	250 °C
Collision gas	Ar (230 kPa)

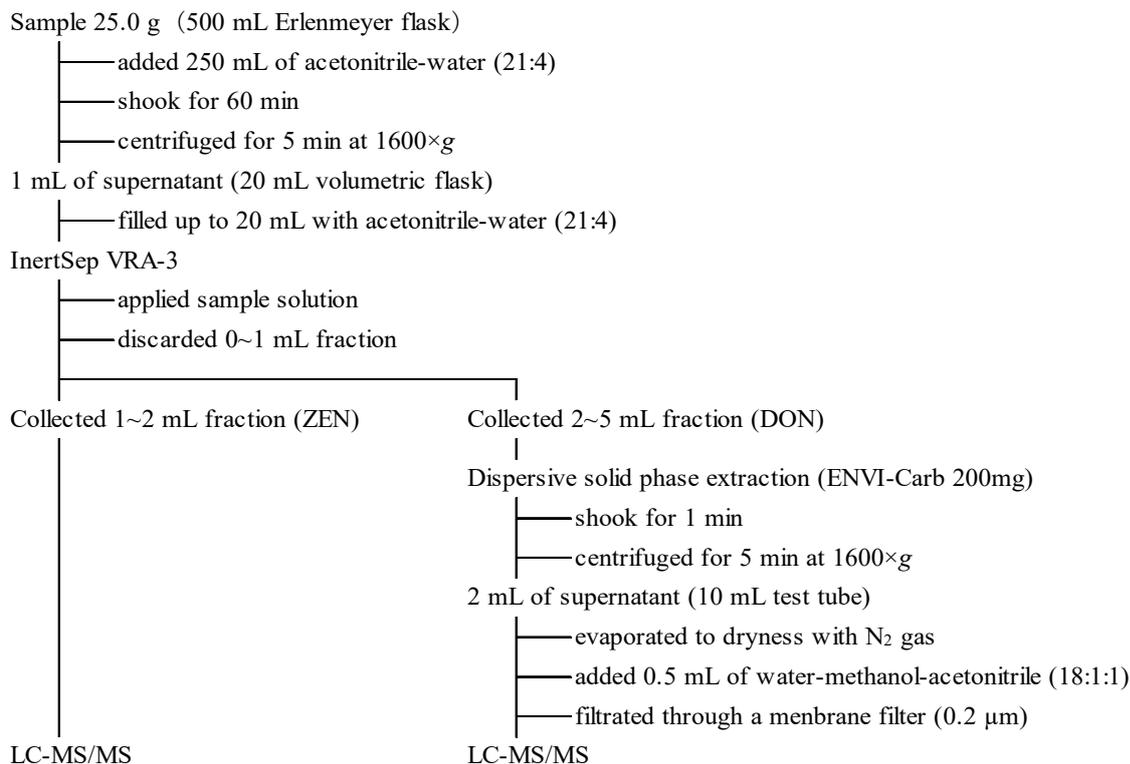
Table 2 MS/MS parameters

Target	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion		Collision energy (eV)
		Quantifier (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)	
DON	295	265	-	10
	355	-	265	13
ZEN	317	131	-	30
		-	175	22

5) 計算

得られた SRM クロマトグラムからピーク面積及び高さを求めて検量線を作成し、試料中の DON 量及び ZEN 量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for DON and ZEN in corn silage

2.5 多機能カラムからの流出画分の確認方法

1) ZEN の多機能カラムからの流出画分の確認方法

とうもろこしサイレージ 12.5 g をアセトニトリル-水 (21+4) 125 mL で抽出し、遠心分離した上澄み液 2.5 mL を 10 mL の全量フラスコに正確に入れ、これに ZEN として 1 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 50 ng/mL 相当量) を添加した後、全量フラスコの標線までアセトニトリル-水 (21+4) を加え、カラム処理に供する試料溶液を調製した。試料溶液を多機能カラムに入れ、0~1 mL, 1~2 mL, 2~3 mL, 3~4 mL の流出画分を採取し、LC-MS/MS による測定に供した。

2) ZEN の多機能カラムからの流出画分における希釈効果の確認方法

とうもろこしサイレージを用いて 2.5 の 1)と同様に抽出、遠心分離した上澄み液 1 mL を 10 mL 及び 20 mL の全量フラスコにそれぞれ正確に入れ、これらに ZEN としてそれぞれ 1 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 20 ng/mL 及び 10 ng/mL 相当量) を添加した後、全量フラスコの標線までアセトニトリル-水 (21+4) を加え、カラム処理に供する試料溶液を調製した。以降の操作は 2.5 の 1)と同様に行った。

2.6 添加回収試験

DON は、DON 標準品 (富士フィルム和光純薬製、純度 100.0 %) 9 mg を正確に量って 20 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 添加用標準液を調製した (この液 1 mL は、DON として 0.45 mg を含有する。)。同標準液をアセトニトリルで正確に希釈し添加した。

ZEN は、2.2 の 2) の ZEN 標準原液をアセトニトリルで正確に希釈し添加した。

とうもろこしサイレージについて、DON として、原物換算して 0.2 及び 4 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 8 及び 180 ng/mL）、ZEN として、原物換算して 0.02 及び 1 mg/kg 相当量（同 0.2 及び 10 ng/mL）になるようにそれぞれ添加後よく混合し、一夜静置した後に 2.4 に従って定量し、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 として 0.4 及び 9 mg/kg 相当量、ZEN として 0.04 及び 2 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。

3 結果及び考察

3.1 試料の調製方法

JFIC 法及び NKKK 法における試料の調製方法は、飼料分析基準に規定された方法と異なり、試料を風乾せずに原物のまま 2 mm スクリーンで粗粉碎する方法である。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、供試する乾物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が懸念されたことから、飼料分析基準に規定された試料の調製方法を用いることとした。

3.2 抽出溶媒量の検討

とうもろこしサイレージの風乾物 25.0 g に、JFIC 法及び NKKK 法と同様にアセトニトリル-水 (21+4) 100 mL を加えたところ、抽出溶媒を吸収して振り混ぜられない試料があった。最大で 225 mL の抽出溶媒を必要とする試料があったことから、余裕を持たせて抽出溶媒量を 250 mL とした。

なお、検討に用いることのできる分析試料が十分量確保できなかったことから、3.3 以降の検討は試料採取量及び抽出溶媒量を半量にして実施した。

3.3 LC-MS/MS 測定条件の検討

とうもろこしサイレージ 12.5 g をアセトニトリル-水 (21+4) 125 mL で抽出し、以降 JFIC 法に従って調製した試料溶液を、NKKK 法の条件に従って LC-MS/MS で測定し、得られた SRM クロマトグラムを確認した。その結果、DON において定量を妨げるピークが認められたことから、LC-MS/MS の測定条件の変更を検討した。

DON の定量イオン及び確認イオンをそれぞれ m/z : 295 > 265 及び m/z : 355 > 265 に変更して測定した結果、定量を妨げるピークは認められなかったことから、当該測定条件を用いることとした。

3.4 検量線

2.2 の 2) 及び 3) により調製した DON 及び ZEN 標準液各 5 μ L を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムからピーク面積及び高さを用いて検量線を作成した。

得られた検量線の一例は Fig. 2-1 及び 2-2 のとおりであり、DON は 4~100 ng/mL（注入量として 0.02~0.5 ng 相当量）、ZEN は 0.1~50 ng/mL（同 0.0005~0.25 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線の濃度範囲は、DON を 0.2~5 mg/kg 及び ZEN を 0.02~10 mg/kg 含有する分析

用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の各かび毒濃度範囲に相当する。

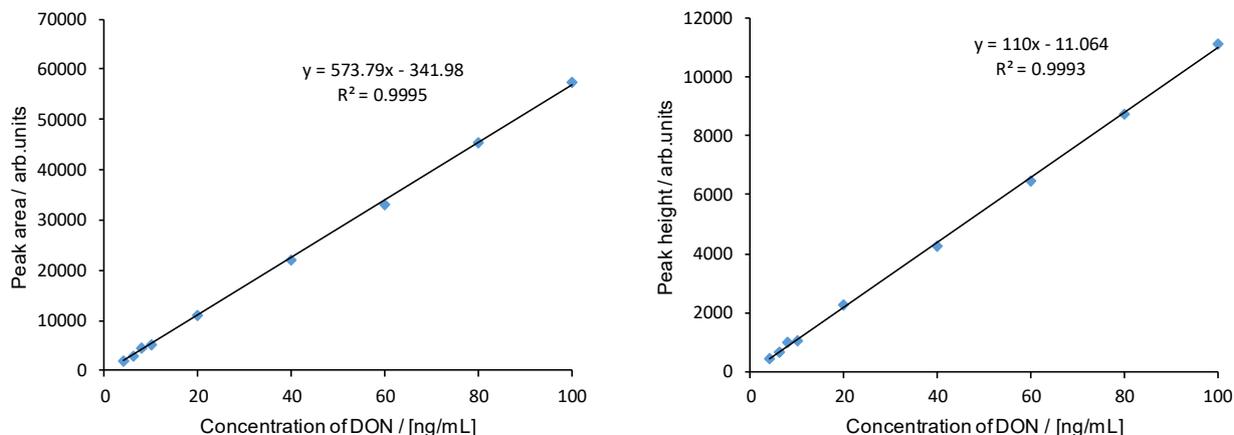


Fig. 2-1 Calibration curves of DON by peak area (left) and peak height (right)

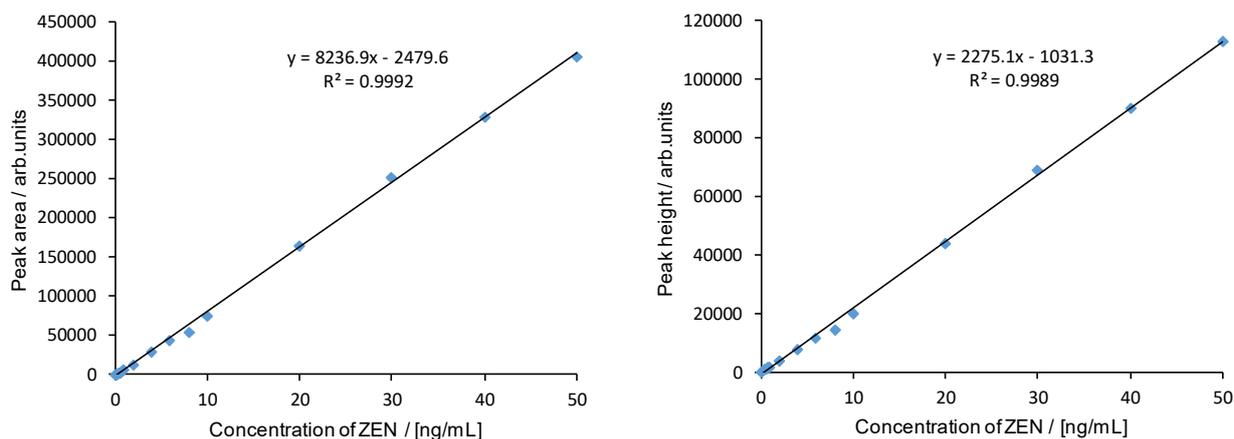


Fig. 2-2 Calibration curves of ZEN by peak area (left) and peak height (right)

3.5 多機能カラムからの流出画分の確認

1) ZEN の多機能カラムからの流出画分の確認

2.5 の 1)により ZEN の多機能カラムからの流出画分を確認した。その結果は Table 3 のとおり、0~1 mL の画分で 54.6 %、1 mL 以上の画分ではそれぞれ 143 %以上の流出であった。

Table 3 Outflow pattern of ZEN from InertSep VRA-3

Mycotoxin	Dilution ratio	Concentration (ng/mL)	(%) ^{a)}			
			0~1 mL	1~2 mL	2~3 mL	3~4 mL
ZEN	4	50	54.6	143	147	150

n = 1

a) Quantitated concentration in sample solution after column treatment / Concentration in sample solution before column treatment × 100

2) ZEN の多機能カラムからの流出画分における希釈効果の確認

1)における結果の原因は、夾雑成分による影響であると推定し、夾雑成分の低減を期待して、2.5 の 2)によりカラム処理に供する試料溶液の希釈倍率について検討を行った。その結果は Table 4 のとおり、0~1 mL の画分では、10 倍希釈及び 20 倍希釈でそれぞれ 51.3 及び 46.9 % であり、低い値のままであった。1 mL 以上の画分では希釈により 100 % に近づく傾向が認められ、10 倍希釈と比較して 20 倍希釈の方が良好な結果となった。このことから、抽出液を 20 倍希釈した液をカラム処理に供する試料溶液に用いることとした。

Mycotoxin	Dilution ratio	Concentration (ng/mL)	Concentration (%) ^{a)}			
			0~1 mL	1~2 mL	2~3 mL	3~4 mL
ZEN	10	20	51.3	121	117	106
	20	10	46.9	113	114	113

$n = 1$

a) Quantitated concentration in sample solution after column treatment / Concentration in sample solution before column treatment $\times 100$

3) DON の多機能カラムからの流出画分の確認

とうもろこしサイレージ 12.5 g を本法 2.4 の 1)により調製したカラム処理に供する試料溶液に DON として 4 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 80 ng/mL 相当量）を添加し、多機能カラムからの流出画分を確認した。流出画分は、操作性を考慮し 2 mL ずつの採取とし、0~6 mL 及び 1~7 mL の範囲で確認した。その結果は Table 5 のとおり、JFIC 法で採取している流出液 2~4 mL 及び 3~5 mL の画分で 106 % の流出を認めた。

Mycotoxin	Dilution ratio	Concentration (ng/mL)	Concentration (%) ^{a)}			Concentration (%) ^{a)}		
			0~2 mL	2~4 mL	4~6 mL	1~3 mL	3~5 mL	5~7 mL
DON	20	80	97.2	106	99.1	93.0	106	102

$n = 1$

a) Quantitated concentration in sample solution after column treatment / Concentration in sample solution before column treatment $\times 100$

1)~3)の結果から、多機能カラムからの流出画分については、初めの 1 mL を捨て、1~2 mL の画分を ZEN を測定するための LC-MS/MS に供する試料溶液とし、2~5 mL の画分を JFIC 法と同様に DON を測定するための精製に供する試料溶液とした。

3.6 妨害物質の検討

とうもろこしサイレージ 4 検体を用い、本法により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムを確認した結果、定量を妨げるピークは認められなかった。なお、DON は一部の試料、ZEN は全ての試料でそれぞれ DON 及び 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、DON 及び 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。

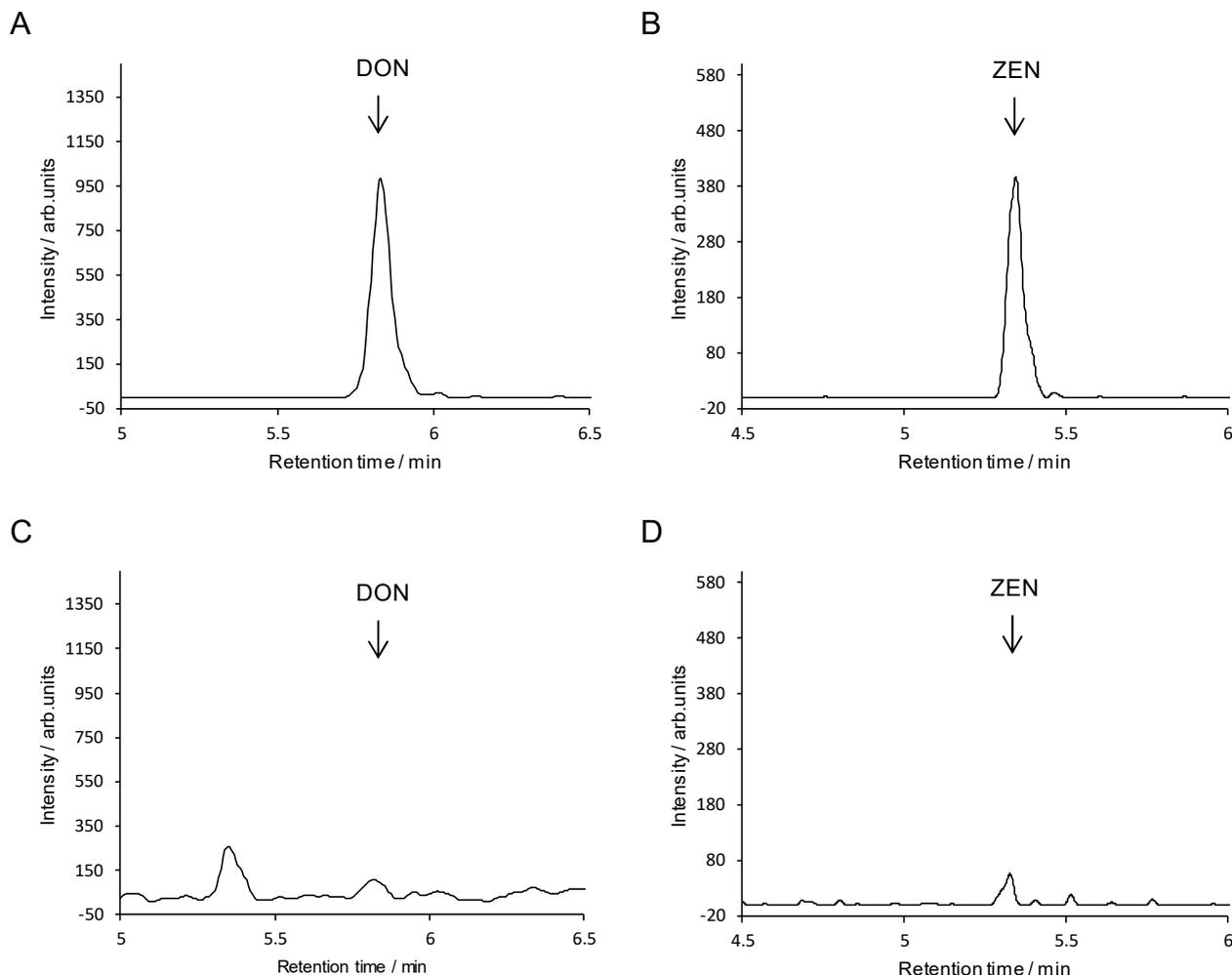


Fig. 3 Typical Selected Reaction Monitoring (SRM) chromatograms of DON and ZEN in standard and blank sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrows indicate the retention times of mycotoxin.)

A: Standard solution (8 ng/mL as DON)

B: Standard solution (0.2 ng/mL as ZEN)

C: Sample solution of DON from corn silage (blank)

D: Sample solution of ZEN from corn silage (blank)

3.7 マトリックス効果の確認

2.4の1)~3)により調製したとうもろこしサイレージのブランク試料溶液にDONとして4 mg/kg相当量(最終試料溶液中で80 ng/mL相当量)を添加したマトリックス標準液, 2.4の1)~2)により調製したとうもろこしサイレージのブランク試料溶液にZENとして2 mg/kg相当量(同10 ng/mL相当量)を添加したマトリックス標準液について, 2.2の2)及び3)に従って調製した同濃度の各かび毒標準液に対するピーク面積比を確認したところ, Table 6のとおりであり, 各かび毒は試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。

Table 6 Matrix effect study

Mycotoxins	Concentration of mycotoxins		Matrix effect ^{b)} (%)	
	in matrix standard solution (ng/mL)	in sample ^{a)} (mg/kg air-dry matter)	Corn silage 1	Corn silage 2
DON	80	4	102	108
ZEN	10	2	103	105

$n = 1$

a) Converted from the concentration in matrix standard solution

b) Ratio of peak area of mycotoxins in the presence of matrix to that in the absence of matrix

3.8 添加回収試験

2.6 により添加回収試験を実施した。その結果は Table 7 のとおり、DON については平均回収率 89.3~116 %，その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 8.7 %以下，ZEN については平均回収率 101~112 %，RSD_r は 12 %以下の成績が得られ，飼料分析基準別表 3 の試験法の妥当性確認法ガイドライン（以下「妥当性確認法ガイドライン」という。）に定められた 1) 及び 2) の真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果であった。

1) 真度：70 %以上 120 %以下

2) 併行精度：22 %以下（添加濃度 0.02 mg/kg），20 %以下（同 0.2 mg/kg），16 %以下（同 1 mg/kg），13 %以下（同 4 mg/kg）

なお，得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

Table 7 Recoveries for DON and ZEN

Mycotoxin	Spiked level (mg/kg as fed basis) ^{a)}	Com silage 1		Com silage 2		Com silage 3		Com silage 4	
		Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)	Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)	Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)	Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)
DON	4	89.3	5.9	89.4	8.7	—	—	—	—
	0.2	—	—	—	—	114	7.9	116	6.0

Mycotoxin	Spiked level (mg/kg as fed basis) ^{a)}	Com silage 1		Com silage 2		Com silage 3		Com silage 5	
		Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)	Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)	Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)	Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)
ZEN	1	101	4.0	106	4.2	—	—	—	—
	0.02	—	—	—	—	110	8.7	112	12

—: Not tested

a) The mycotoxins were spiked to air-dried corn silage samples one night prior to extraction. The spiked levels were 0.4 and 9 mg/kg as air-dry basis for DON, and 0.04 and 2 mg/kg as air-dry basis for ZEN respectively. The levels of mycotoxins as fed basis were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of corn silage samples was 60 % as fed basis and 10 % as air-dry basis.

The levels of mycotoxins as fed basis (moisture 60 %)

= the levels of mycotoxins as air-dry basis (moisture 10 %) / 2.25

b) Mean ($n = 5$)

c) Relative standard deviation of repeatability

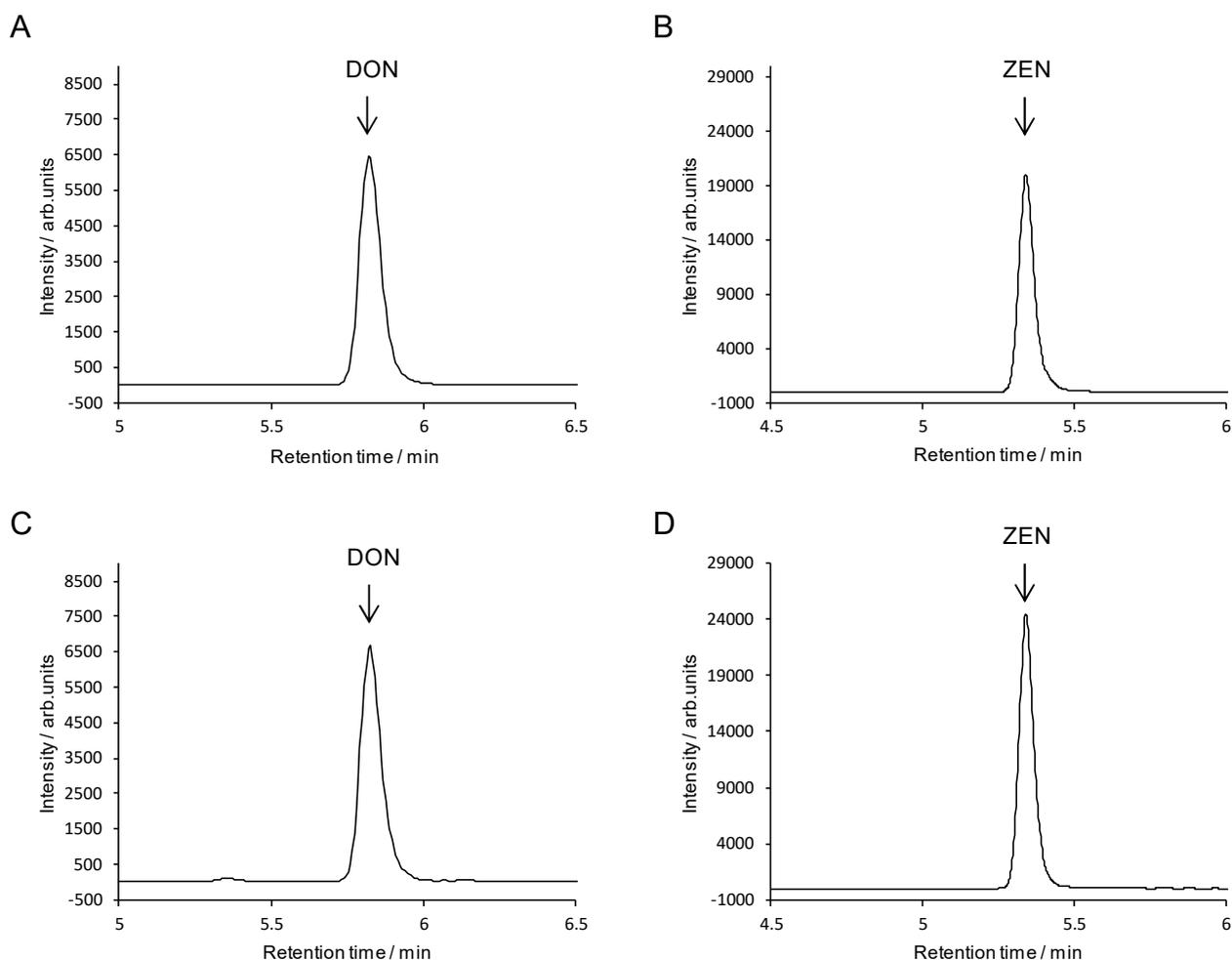


Fig. 4 Typical SRM chromatograms of DON and ZEN in standard and spiked sample solutions (LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrows indicate the peaks of mycotoxin.)

A: Standard solution (60 ng/mL of DON (0.3 ng as injection amount))

B: Standard solution (10 ng/mL of ZEN (0.05 ng as injection amount))

C: Sample solution of corn silage (spiked at 1.3 mg/kg original matter of DON (0.3 ng as injection amount))

D: Sample solution of corn silage (spiked at 1 mg/kg original matter of ZEN (0.05 ng as injection amount))

3.9 定量下限及び検出下限の検討

検量線が直線性を示した範囲, DON においては 4~100 ng/mL の下端付近となる濃度 (とうもろこしサイレージ風乾物中で 0.4 mg/kg 相当量 (最終試料液中濃度 8 ng/mL 相当量)), ZEN においては 0.1~50 ng/mL の下端付近となる濃度 (とうもろこしサイレージ風乾物中で 0.04 mg/kg 相当量 (最終試料液中濃度 0.2 ng/mL 相当量)) の添加回収試験の結果, 得られたピークの SN 比が 10 以上であったため, DON 及び ZEN の定量下限の濃度はとうもろこしサイレージの風乾物中でそれぞれ 0.4 及び 0.04 mg/kg とした. この濃度は, DON 及び ZEN のとうもろこしサイレージ中の管理基準値 (DON については最も低い値) の風乾物中換算値 (2 mg/kg) に対してそれぞれ 1/5 及び 1/50 であり, 妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値 (1/5 以下) を満たして

いた。

本法の検出下限を確認するため、添加回収試験により得られたピークの SN 比が 3 となる濃度を求めた。その結果、検出下限は風乾物中で DON 0.1 mg/kg , ZEN 0.01 mg/kg であり、同様に妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値 (1/10 以下) を満たしていた。

なお、Table 7 に示したとおり、当該定量下限濃度における添加回収試験結果は良好であった。

4 まとめ

とうもろこしサイレージ中の DON 及び ZEN について、JFIC 法及び NKKK 法を基に、LC-MS/MS を用いた定量法の飼料分析基準への適用の可否について検討したところ、抽出溶媒量、カラム処理に供する試料溶液の希釈倍率及び多機能カラム処理における採取する流出画分を変更することで、以下の結果が得られた。

1) 検量線は、DON は 4~100 ng/mL (注入量として 0.02~0.5 ng 相当量) , ZEN は 0.1~50 ng/mL (注入量として 0.0005~0.25 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線の濃度範囲は、ZEN を 0.02~10 mg/kg 及び DON を 0.2~5 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の各かび毒濃度範囲に相当する。

2) 本検討で用いたとうもろこしサイレージについて、本法に従って得られた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。

3) 本法に従い得られた試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果、DON 及び ZEN は試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。

4) とうもろこしサイレージに、DON として原物換算して 0.2 及び 4 mg/kg 相当量、ZEN として原物換算して 0.02 及び 1 mg/kg 相当量を添加し、本法に従って 5 点併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ、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す良好な結果が得られた。

5) 本法の DON の定量下限は風乾物中で 0.4 mg/kg, 検出下限は 0.1 mg/kg, ZEN の定量下限は風乾物中で 0.04 mg/kg, 検出下限は 0.01 mg/kg であった。設定した定量下限及び検出下限は、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値を満たしていた。

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) 伊藤 千晶，佐藤 憲大：とうもろこしサイレージ中のかび毒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～，飼料研究報告，42，87-100 (2017)。
- 4) 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)。
- 5) 一般財団法人日本食品検査：平成 29 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）報告書，平成 30 年 1 月 (2018)。
- 6) 一般社団法人日本海事検定協会：平成 30 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）成果報告書，平成 31 年 1 月 (2019)。