

5 愛玩動物用飼料中のデオキシニバレノール、ニバレノール、HT-2 トキシン及び T-2 トキシンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法の開発

立石 洋暢*, 加藤 耕一*, 桑原 正良*

Development of Simultaneous Determination Method of Deoxynivalenol, Nivalenol, HT-2 Toxin and T-2 Toxin in Pet Food by LC-MS/MS

Hironobu TATEISHI*, Koichi KATO* and Masayoshi KUWABARA*

(* Kobe Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center)

We have developed a simultaneous quantitative determination method of the concentration of deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV), HT-2 toxin (HT-2) and T-2 toxin (T-2) in pet food using a liquid chromatograph- electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS).

DON, NIV, HT-2 and T-2 were extracted with water-containing acetonitrile. The extracted solution was purified with a multifunctional column (MultiSep 227 Trich+, Romer Labs.; Getzersdorf, Lower Austria, Austria), and injected into a LC-MS/MS to determine the concentration of each mycotoxin. LC separation was then carried out on ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 3.0 mm i.d. × 150 mm, 5 µm, Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA) with a gradient of 10 mmol/L ammonium acetate solution and acetonitrile as a mobile phase. In the MS/MS analysis, the negative mode electrospray ionization (ESI-) for DON and NIV, and the positive mode electrospray ionization (ESI+) for HT-2 and T-2 were used respectively.

Recovery tests were conducted on dry food for cats, semi dry food for dogs, formed jerky for dogs, dried jerky for dogs (soft and hard), confectionery (biscuit for dogs), milk powder for cats and wet food for dogs. DON was intentionally added at the levels of 0.1 and 1 mg/kg for the pet foods except wet food, and 0.02 and 0.1 mg/kg for wet food respectively. NIV was intentionally added at the levels of 0.1 and 0.5 mg/kg for the pet foods except wet food and milk powder, 0.5 and 1.0 mg/kg for milk powder, and 0.02 and 0.05 mg/kg for wet food respectively. The resulting mean recoveries ranged from 80.2 % to 108 % for DON, and 85.5 % to 102 % for NIV respectively. The repeatability in the form of the relative standard deviations (RSD_r) was less than 15 % for DON, and less than 17 % for NIV.

Note that HT-2 and T-2 were excluded from the analysis because of their tendency of excessive recovery.

Key words: mycotoxin; deoxynivalenol; nivalenol; HT-2 toxin; T-2 toxin; liquid chromatograph-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); pet food

キーワード：かび毒；デオキシニバレノール；ニバレノール；HT-2 トキシン；T-2 トキシン；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；愛玩動物用飼料

1 緒 言

トリコテセン系かび毒は、化学構造の違いによりタイプ A から D に分類され、ニバレノール (以

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

下「NIV」という.)は8位の炭素にカルボニル基を有するタイプ B に属する。NIV はデオキシニバレノール (以下「DON」という.)の類縁化合物であり、共にフザリウム属のかびにより産生され、穀類 (特に小麦、大麦及びとうもろこし) を汚染することが知られている¹⁾。

国内では、NIV については食品、飼料ともに基準値はなく、同タイプに属する DON については食品用小麦で $1.1 \mu\text{g/g}$ ²⁾、家畜及び家きんに給与される飼料で 1 mg/kg (反すう動物 (ほ乳期のものを除く.)に給与される飼料は 4 mg/kg (配合飼料は 3 mg/kg)³⁾の基準値が設定されているほか、愛玩動物用飼料では犬用で $2 \mu\text{g/g}$ 、猫用で $1 \mu\text{g/g}$ の基準値⁴⁾が定められている。

愛玩動物用飼料中の DON の分析法としては、愛玩動物用飼料等の検査法⁵⁾において液体クロマトグラフ質量分析計を用いた単成分分析法が記載されており、定量限界 (下限) はウェット製品以外の試料で 0.1 mg/kg であり、ウェット製品 (原物) では 0.02 mg/kg である。

平成30年度に、筆者らは一般財団法人日本食品分析センターが開発した分析法⁶⁾ (以下「JFRL法」という.)を基に、DON, NIV, HT-2トキシン (以下「HT-2」という.)及び T-2トキシン (以下「T-2」という.)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.)による同時定量法の検討を行った (以下「前報」という.)⁷⁾。その結果、ウェット製品については愛玩動物用飼料等の検査法第11章試験法の妥当性確認法 (以下「試験法の妥当性確認法」という.)の目標値を満たす良好な結果が得られたが、ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー (ハードタイプ及びソフトタイプ) 並びに菓子類では NIV の回収率が低く、また、粉ミルクでは NIV が過回収の傾向にあり、更なる検討が必要であった。

そこで今回、前報の抽出条件を改良し、回収率の改善を図ったのでその概要を報告する。参考に、各分析対象物の構造式等を Fig. 1 に示した。

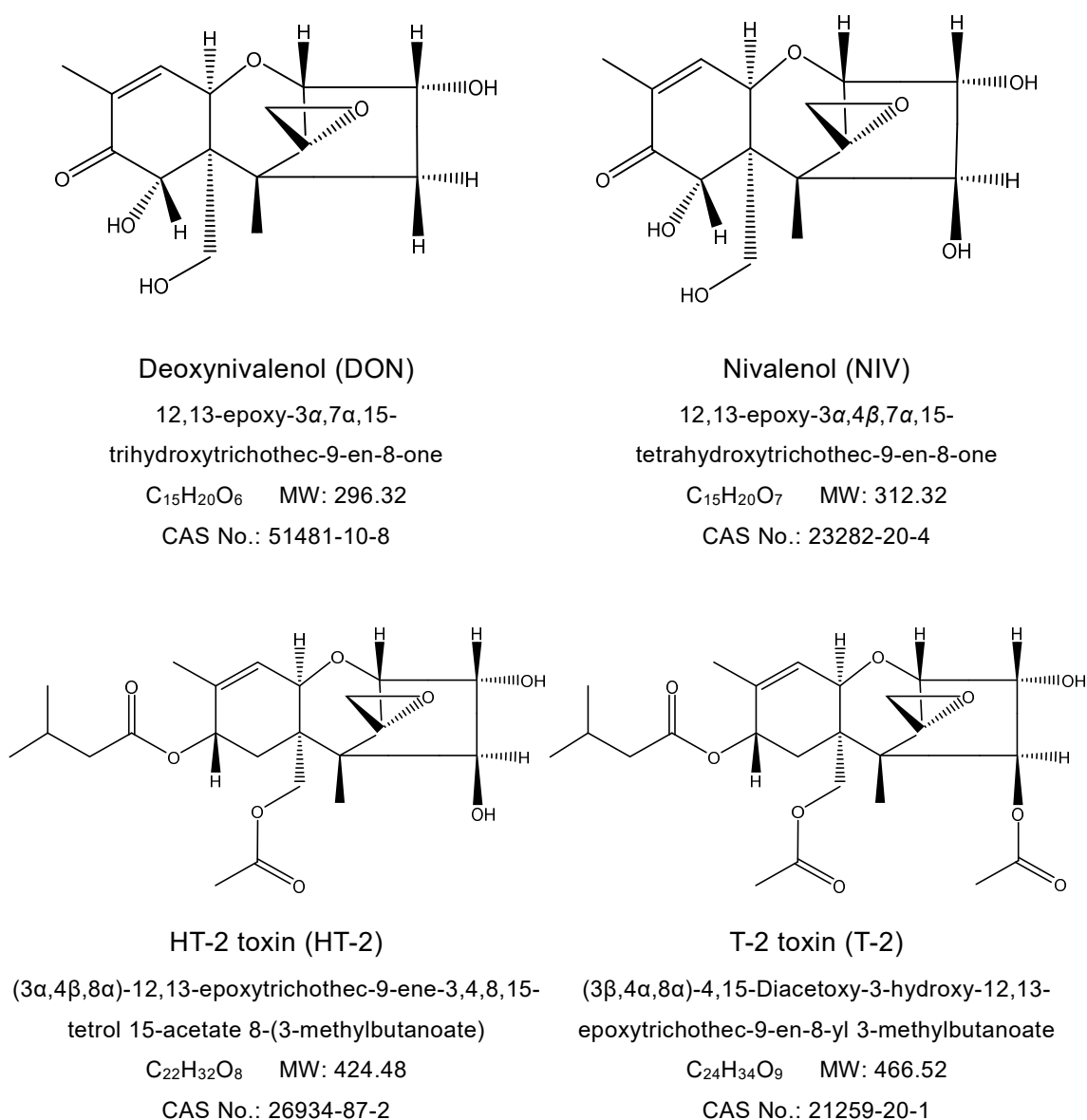


Fig. 1 Chemical structures of DON, NIV, HT-2 and T-2

2 実験方法

2.1 試料

愛玩動物用飼料のうちドライ製品（猫用），セミドライ製品（犬用），成型ジャーキー（犬用），素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ（犬用）及びソフトタイプ（犬用））並びに菓子類（犬用ビスケット）は目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕し，混合して用いた．なお，そのままでは粉砕が困難なジャーキー類は，はさみ等を用いて細断したのち粉砕した．ウェット製品（犬用）はフードプロセッサで破砕し，混合して用いた．粒度が 1 mm 以下であった粉ミルクはそのまま用いた．

検討に用いた試料の種類及びその原材料名を Table 1 に示した．原材料名は検討に用いた各試料に表記されていた名称に準拠した．

Table 1 Ingredients list of pet foods used in this study

Pet food types	Ingredients
Dry food for cats	Chicken raw meat, dried chicken, coarsely ground rice, pea protein, brown rice, chicken oil, alfalfa meal, potato protein, beet pulp, linseed, protein hydrolysate, oats fiber, soybean oil, yucca extract, vitamins (V. A, V. B ₁ , V. B ₂ , V. B ₆ , V. B ₁₂ , V. C, V. D ₃ , V. E, choline, niacin, pantothenic acid, biotin, folic acid), minerals (K, Cl, Se, Na, Mn, I, Zn, Fe, Cu), amino acids (taurine, methionine), antioxidant (mix tocopherol, rosemary extract), green tea extract, spearmint extract
Semi dry food for dogs	Meat (chicken, etc.), sugars, beans, starches, grains, fishery products, oils and fats, vegetables (carrot, pumpkin, spinach, etc.), dietary fiber, minerals (P, Ca, Cl, Na, Mg, Zn, Fe, Cu, Mn, I), thickening stabilizer (glycerin, casein sodium), quality improving agent (propylene glycol), preservative (sorbic acid potassium), pH regulator, vitamins (choline, V. C, V. A, V. E, nicotinic acid, pantothenic acid, V. B ₁₂ , V. B ₆ , V. B ₁ , V. B ₂ , folic acid, V. D), food color (titanium dioxide, yellow 5, red 106, blue 1, yellow 4, red 102), color former (sodium nitrite)
Wet food for dogs	Chicken white meat, vegetables (potato, carrot, green peas), sugar, chicken liver, chicken wings, soybean oil, oligosaccharide, salt, refined fish oil containing DHA and EPA, chondroitin protein complex, glucosamine hydrochloride, plant lactic acid bacterium K71, thickening stabilizer, minerals, taurine, vitamins
Formed jerky for dogs	Beef tongue skin, chicken, wheat starch, soy flour, modified sugar, dietary fiber, salt, sorbitol, propylene glycol, polyphosphoric acid Na, food color (red 102, yellow 5, red 106, yellow 1)
Dried jerky for dogs (hard type)	Deer meat
Dried jerky for dogs (soft type)	Chicken (white meat), glycerin (humectant), propylene glycol (quality maintenance agent), antioxidant (nitrite Na)
Confectionery (biscuit) for dogs	Wheat flour, glucose, shortening, cornstarch, sweet potato, oligosaccharide, yeast
Milk powder for cats	Milk (powdered skim milk, casein), oils and fats (plant oil, animal fats, γ -linolenic acid), soy protein, egg yolk powder, oligosaccharide, L-carnitine, minerals (Ca, P, K, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, I, Co), emulsifier, flavor, vitamins (V. A, V. B ₁ , V. B ₂ , V. B ₆ , V. B ₁₂ , V. D, V. E, V. K, nicotinic acid, pantothenic acid, folic acid, choline), taurine

2.2 試薬

- 1) アセトニトリル (LC-MS/MS 測定時の溶離液のみ LC-MS 用 (富士フイルム和光純薬製)) 及びメタノールは残留農薬・PCB 試験用を用いた。酢酸アンモニウムは高速液体クロマトグラフ用 (1 mol/L 溶液, 富士フイルム和光純薬製) を用いた。水は LC-MS 用の超純水 (富士フイルム和光純薬製) を用いた。
- 2) 各かび毒標準品
DON, NIV, HT-2 及び T-2 の標準品は全て Trilogy Analytical Laboratory 製、純度 98.0 % のものを用いた。

3) 各かび毒標準原液

2.2 の 2) に示した市販の各かび毒ドライアップ製品に、指定された量のアセトニトリルを加えて溶かし、各標準原液を調製した（これらの各標準原液 1 mL は、各かび毒として 0.1 mg を含有する。）。

4) かび毒混合標準液

各標準原液の一定量を混合し、アセトニトリルで正確に希釈し、1 mL 中に各かび毒として 10 µg を含有する混合標準原液を調製した。

使用に際して、混合標準原液の一定量を水-メタノール-アセトニトリル (18+1+1) で正確に希釈し、1 mL 中に各かび毒として 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 400, 600, 800 及び 1000 ng を含有する混合標準液を調製した。

2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：ZM 200 Retsch 製（目開き 1 mm スクリーン、使用時回転数 14000 rpm）
- 2) フードプロセッサ：MK-K80 パナソニック製
- 3) 振とう機：理研式シェーカー MW-DRV 宮本理研工業製（使用時振とう数 300 rpm）
- 4) 定温乾燥機：FC-410 アドバンテック製
- 5) 多機能カラム：MultiSep 227 Trich+カートリッジ Romer Labs 製
- 6) メンブランフィルター：

DISMIC-13HP（孔径 0.2 µm, 直径 13 mm） 東洋濾紙製

Ekicrodisc 13CR（孔径 0.2 µm, 直径 13 mm） PALL 製

7) LC-MS/MS

LC 部：ACQUITY UPLC System Waters 製

MS 部：ACQUITY TQ Detector Waters 製

2.4 定量方法

1) 抽出

i ウェット製品

分析試料 25.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水 (21+4) 70 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出した後、10 分間静置した。抽出液を 100 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1600×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を 200 mL の全量フラスコに入れた。共栓遠心沈殿管をアセトニトリル-水 (21+4) 70 mL で洗浄し、洗液を順次先の共栓三角フラスコに移し、同様に 30 分間振り混ぜて抽出した。内容物を先の共栓遠心沈殿管に入れ、1600×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を先の全量フラスコに加え、更に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。

ii ウェット製品以外

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) 200 mL を加え、密栓して 60 °C で 60 分間静置後、室温で 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、1000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を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 3 mL を捨て、その後の流出液 3 mL（ウェット

製品では 5 mL) を 10 mL の試験管に受けた. この液の 2 mL (ウェット製品では 4 mL) を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ, 50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後, 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) 1 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を用いてろ過し, LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした.

なお, 粉ミルクについては, LC-MS/MS による測定に供する試料溶液の一定量を水-メタノール-アセトニトリル (18+1+1) で正確に 5 倍希釈し, 別途, NIV 測定用の試料溶液とした.

3) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各かび毒混合標準液各 10 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 2 及び 3 に示した.

Table 2 Operation conditions of LC-MS/MS

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm i.d. × 150 mm, 5 µm), Agilent Technologies
Mobile phase	10 mmol/L ammonium acetate-acetonitrile (19:1) (hold for 1 min) → 14 min → (1:19) (hold for 10 min) → 1 min → (19:1) (hold for 9 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Source temperature	120 °C
Desolvation gas	N ₂ (800 L/h, 400 °C)
Capillary voltage	Positive mode: 3.5 kV, Negative mode: 1.5 kV
Cone gas	N ₂ (50 L/h)
Collision gas	Ar (0.25 mL/min)

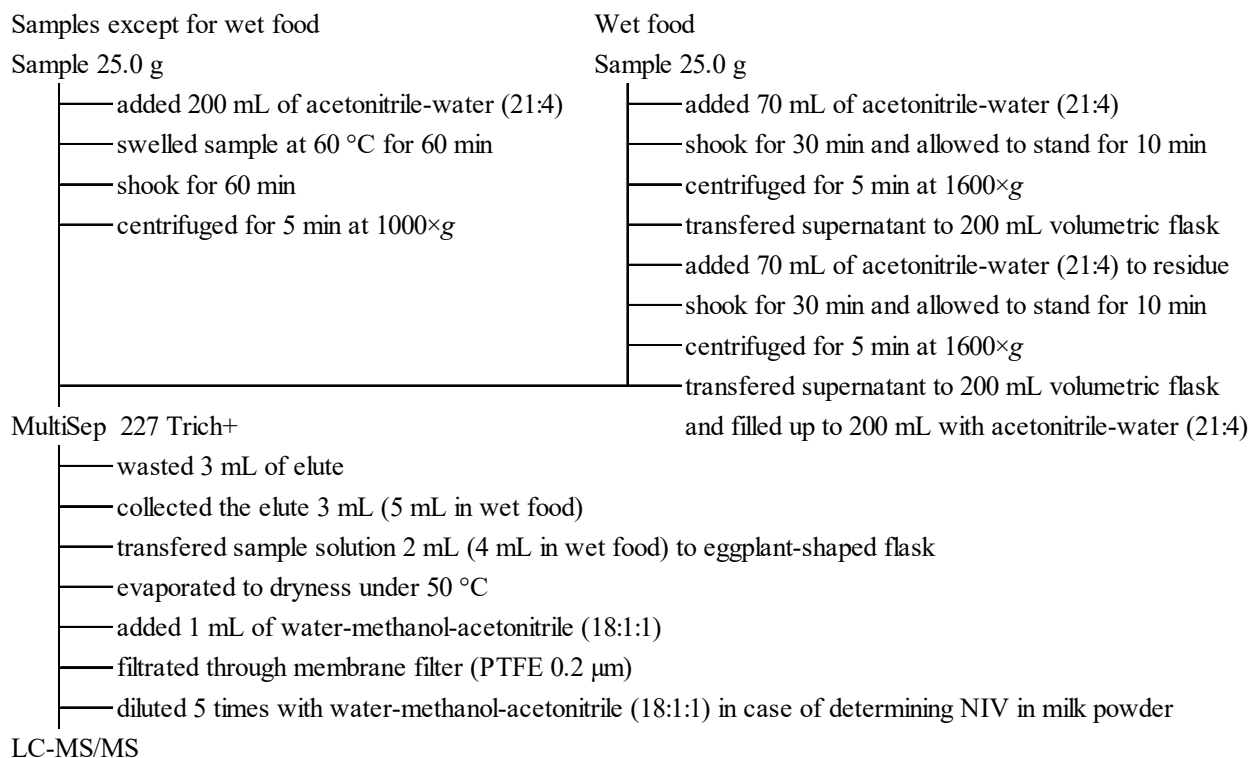
Table 3 MS/MS parameters

Target	Mode	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
			Quantifier (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)		
DON	-	355	265	-	10	10
			-	295	10	10
NIV	-	371	281	-	10	15
			-	311	10	10
HT-2	+	442	215	-	20	20
			-	263	20	15
T-2	+	484	185	-	34	22
			-	305	20	15

4) 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, NIV, HT-2 及び T-2 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, NIV, HT-2 and T-2 in pet foods

2.5 メンブランフィルターの検討方法

水-メタノール-アセトニトリル (18+1+1) で調製した 25 ng/mL のかび毒混合標準液を用い、東洋濾紙製及び PALL 製のメンブランフィルター (材質: PTFE) に通してろ過した標準液とろ過しない標準液を LC-MS/MS により測定し、得られた各かび毒のピーク面積を比較した。

2.6 ウェット製品以外を対象とした JFRL 法の抽出条件の改良で用いた定量法

素材乾燥ジャーキーハードタイプに各かび毒として 0.1 mg/kg 相当量を添加した分析試料について、以下の 1)~3) に基づき各 3 点併行で操作し、各々の回収率を比較した。

- 1) 分析試料 25.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水 (21+4) 100 mL を加え、密栓して 60 °C で 60 分間静置後、室温で 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、1000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液の一定量をアセトニトリル-水 (21+4) で正確に 2 倍希釈し、カラム処理に供する試料溶液とした。以降は 2.4 の 2), 3) 及び 4) に従い定量した。
- 2) 1) の操作のうち、共栓三角フラスコを 200 mL から 300 mL に変更し、同様の操作を行った。
- 3) 2.4 の 1) ii, 2), 3) 及び 4) に従い定量した。

2.7 粉ミルク試料溶液の希釈倍率の検討

2.4 の 1) 及び 2) により調製した粉ミルクのブランク試料溶液に、NIV として 0.5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 125 ng/mL 相当量) を添加したマトリックス標準液及びこのマトリックス標準液を水-メタノール-アセトニトリル (18+1+1) で正確に 5 倍及び 10 倍希釈した試料溶液を調製し、2.2 の 4) に従って調製した同濃度の NIV 標準液に対するピーク面積比を確認した。

2.8 添加回収試験

2.2 の 3) の DON 標準原液及び NIV 標準原液をアセトニトリルで正確に希釈し添加に用いた。

DONとして、ウェット製品以外の試料に0.1及び1 mg/kg相当量（最終試料溶液中で25及び250 ng/mL）、ウェット製品（原物）に0.02及び0.1 mg/kg相当量（同10及び50 ng/mL）、NIVとして、粉ミルク及びウェット製品以外の試料に0.1及び0.5 mg/kg相当量（同25及び125 ng/mL）、粉ミルクに0.5及び1 mg/kg相当量（同25及び50 ng/mL）、ウェット製品（原物）に0.02及び0.05 mg/kg相当量（同10及び25 ng/mL）になるようにそれぞれ添加後よく混合し、ウェット製品以外については一夜静置、ウェット製品については30分間ほど静置した後に、本法に従って添加回収試験を実施し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

3 結果及び考察

3.1 検量線

2.2の4)により調製した各混合標準液10 µL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。

DON及びNIVは2~1000 ng/mL（注入量として0.02~10 ng相当量）、HT-2及びT-2は0.5~1000 ng/mL（注入量として0.005~10 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、ウェット製品以外ではDON及びNIVを0.008~4 mg/kg、HT-2及びT-2を0.002~4 mg/kg含有する分析用試料、ウェット製品ではDON及びNIVを0.004~2 mg/kg、HT-2及びT-2を0.001~2 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。

3.2 メンブランフィルターの検討

前報において、最終試料溶液は5000×gで5分間遠心分離後の上澄み液としていたが、この最終試料溶液をLC-MS/MSに注入したところ、カラムの詰まりがみられた。そこで、最終試料溶液中の不溶成分の除去操作について、遠心分離からメンブランフィルターに変更し、2.5に従い各かび毒の吸着の有無を確認した。その結果はTable 4のとおり、各メンブランフィルターのピーク面積比は、東洋濾紙製は97.0~101%、PALL製は94.8~103%であり、メンブランフィルターへの吸着による影響は問題ないものであった。

Table 4 Adsorption of each mycotoxin by membrane filter

	DON		NIV		HT-2		T-2	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
Toyo Roshi Kaisha, Ltd	101	1.5	97.0	7.3	100	4.3	99.8	4.9
PALL Corporation	98.4	8.3	103	9.4	96.8	6.6	94.8	2.1

a) Mean ($n = 3$)

Ratio of peak area of mycotoxin after filtration to that before filtration

b) Relative standard deviation of repeatability

3.3 抽出条件の検討

前報において、ウェット製品以外のNIVの回収率が試験法の妥当性確認法の目標値を下回る結果となった原因は、試料量に対する溶媒量や容器容量が適当ではなく、振り混ぜが不十分なことによる抽出効率の低下に問題があると考えられた。このため、2.6に従い、抽出操作時の溶媒量及び容器容量を変えて、各条件における抽出効率を比較した。

その結果は Table 5 のとおり、NIV の回収率は抽出溶媒量 200 mL 及び容器容量 500 mL の抽出条件において 90.5 % となり、前報と比較して良好な結果であった。また、DON の回収率についても、102 % と良好な結果が得られた。一方、T-2 は各抽出方法において過回収となり、また、HT-2 においても過回収の傾向であった。

これらの結果から、ウェット製品以外の抽出条件は抽出溶媒量 200 mL 及び容器容量 500 mL に変更し、分析対象から HT-2 及び T-2 を除外して、以降の検討を行うこととした。

Table 5 Recoveries for mycotoxins in dried jerky for dogs (hard type) under various extraction conditions

Name	Spiked level (mg/kg)	Extractant volume (mL)	Flask volume (mL)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
DON	0.1	100	200	78.6	7.4
			300	81.3	8.5
		200	500	102	4.0
NIV	0.1	100	200	68.7	3.8
			300	71.8	6.7
		200	500	90.5	4.0
HT-2	0.1	100	200	114	2.6
			300	108	2.8
		200	500	109	3.4
T-2	0.1	100	200	138	6.1
			300	129	4.5
		200	500	127	3.8

In dark cell, mean recovery is less than 80 % or more than 110 %

a) Mean ($n = 3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.4 粉ミルク試料溶液の希釈倍率の検討

前報において、粉ミルクのマトリックス効果試験では NIV について過回収の傾向が見られた。今回、抽出条件を変更したことから、NIV に対する粉ミルク試料溶液中の夾雑成分に由来するイオン化促進の影響を 2.7 に従い確認した。

その結果は Table 6 のとおり、試料溶液を希釈しなかった場合では過回収の傾向が見られたが、希釈することにより、マトリックスの影響が低減された。

以上の結果から、粉ミルクの NIV の定量においては、カラム処理後の試料溶液を 5 倍希釈して LC-MS/MS に供することとした。

Table 6 Effect of matrix effect on NIV detection in milk powder for cats

Dilution rate (-fold)	NIV concentration		Matrix effect ^{b)} (%)
	in matrix standard solution	in sample ^{a)}	
	(ng/mL)	(mg/kg)	
no	125	0.5	136
5	25	0.5	112
10	12.5	0.5	98.1

$n = 3$

a) Converted from the concentration in matrix standard solution

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

3.5 多機能カラムからの流出画分の確認

ドライ製品（猫用）25.0 g を 2.4 の 1) ii) により調製したカラム処理に供する試料溶液に、DON 及び NIV として各 1 mg/kg 相当量を添加（最終試料溶液中で 250 ng/mL 相当量）し、多機能カラムからの流出画分を確認した。その結果は Table 7 のとおりであり、DON 及び NIV は流出液 3 mL 以上の画分では 88.7% 以上の流出を認めた。このため、JFRL 法と同様にウェット製品以外については初めの流出液 3 mL を捨て、その後の 3~6 mL の画分から 2 mL を採取することとした。なお、ウェット製品については前報で確認済みのため検討は省略した。

Table 7 Elution patterns of DON and NIV from MultiSep 227 Trich+

Types	Target	(%) ^{a)}						
		0~1 mL	1~2 mL	2~3 mL	3~4 mL	4~5 mL	5~6 mL	6~7 mL
Dry food for cats	DON	35.7	84.6	110	90.5	91.5	93.9	95.2
	NIV	0.1	23.5	61.0	88.7	98.7	101	109

$n = 1$

a) Concentration of the target component in efflux after the column processing / that in the sample solution before the column processing $\times 100$

3.6 妨害物質の検討

ウェット製品以外の 7 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ところ、いずれの試料においても DON 及び NIV の選択性を妨げるピークは認められなかった。ウェット製品については前報で確認済みのため検討は省略した。

なお、得られた SRM クロマトグラムを Fig. 2 に示した。

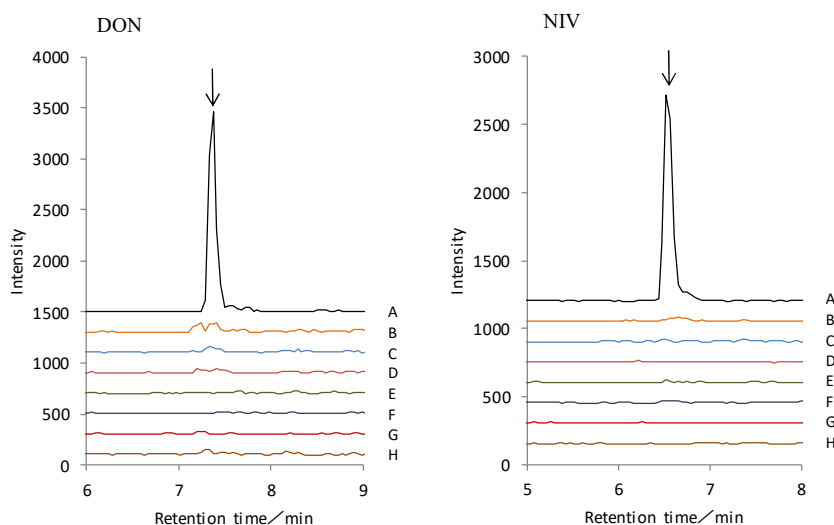


Fig. 2 Typical Selected Reaction Monitoring (SRM) chromatograms of DON and NIV in standard and blank sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the retention time of mycotoxins. The baselines were shifted for display.)

A: Standard solution (25 ng/mL each as DON and NIV)

B~H: Blank sample solution (B: dry food for cats, C: semi dry food for dogs, D: formed jerky for dogs, E: dried jerky for dogs (hard), F: dried jerky for dogs (soft), G: biscuit for dogs, H: milk powder for cats)

3.7 マトリックス効果の確認

2.4 の 1) ii, 2)及び 3)により調製したウェット製品以外の愛玩動物用飼料のブランク試料溶液に DON として 1.0 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 250 ng/mL 相当量), NIV として 0.5 mg/kg 相当量 (同 125 ng/mL 相当量) をそれぞれ添加した. 粉ミルクの NIV については, 上記添加溶液を水-メタノール-アセトニトリル (18+1+1) で 5 倍希釈して最終試料溶液中で 25 ng/mL 相当量とした各マトリックス標準液を作成し, 2.2 の 4)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 8 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 8 Matrix effect study

Types	Concentration				Matrix effect ^{b)}	
	in matrix standard		in sample ^{a)}		(%)	
	(ng/mL)		(mg/kg)		DON	NIV
	DON	NIV	DON	NIV		
Dry food for cats	250	125	1.0	0.5	102	100
Semi dry food for dogs	250	125	1.0	0.5	89.8	97.2
Formed jerky for dogs	250	125	1.0	0.5	95.1	101
Dried jerky for dogs (hard)	250	125	1.0	0.5	89.3	94.9
Dried jerky for dogs (soft)	250	125	1.0	0.5	94.5	89.1
Biscuit for dogs	250	125	1.0	0.5	94.6	97.7
Milk powder for cats	250	25	1.0	0.5	99.6	112

$n = 3$

a) Converted from the concentration in matrix standard solution

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

3.8 添加回収試験

2.8 により添加回収試験を実施した。その結果は Table 9 のとおり、DON の平均回収率は 80.2~108 %，その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 15 %以下，NIV の平均回収率は 85.5~102 %， RSD_r は 17 %以下の成績が得られたことから，試験法の妥当性確認法に定められた真度及び併行精度の目標値（真度：80~110 %（添加濃度が 1, 0.5 及び 0.1 mg/kg の場合），60~115 %（添加濃度が 0.02 及び 0.05 mg/kg の場合），精度：16 %以下（添加濃度が 1 mg/kg の場合），22 %以下（添加濃度が 0.5, 0.1, 0.05 及び 0.02 mg/kg の場合））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. 3 に示した。

Table 9 Recoveries for DON and NIV

Mycotoxins	Spiked level (mg/kg)	Dry food for cats		Semi dry food for dogs		Wet food for dogs		Formed jerky for dogs	
		Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
DON	0.02	—	—	—	—	89.8	14	—	—
	0.1	106	6.2	106	4.2	101	1.5	108	5.0
	1.0	89.2	2.2	100	15	—	—	80.2	8.7
NIV	0.02	—	—	—	—	85.5	11	—	—
	0.05	—	—	—	—	87.9	5.3	—	—
	0.1	97.1	11	102	3.0	—	—	92.7	1.1
	0.5	90.7	3.7	89.1	17	—	—	94.9	13

Mycotoxins	Spiked level (mg/kg)	Dried jerky for dogs (hard)		Dried jerky for dogs (soft)		Biscuit for dogs		Milk powder for cats	
		Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
DON	0.1	83.7	4.7	82.1	2.2	88.4	5.5	104	3.4
	1.0	100	1.9	98.0	1.2	102	0.4	89.3	2.8
NIV	0.1	90.9	11	91.9	3.2	85.9	14	—	—
	0.5	99.4	1.6	92.3	2.7	95.8	2.3	88.6	9.1
	1.0	—	—	—	—	—	—	89.9	2.6

— : Not tested

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

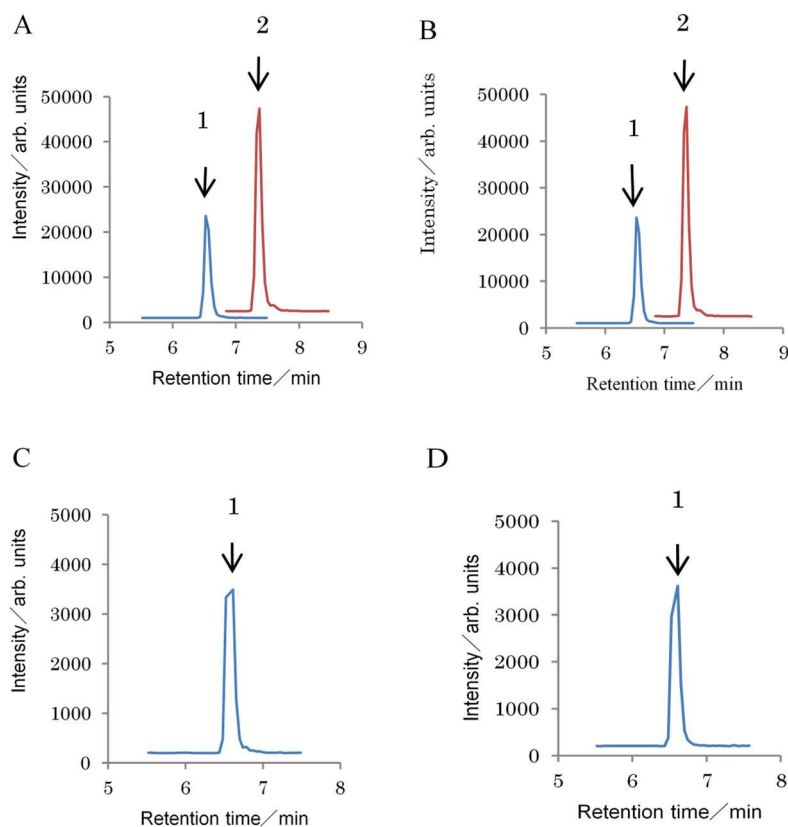


Fig. 3 Typical SRM chromatograms of DON and NIV in standard and spiked sample solutions (LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the retention time of 1: NIV, 2: DON. The baselines were shifted for display.)

A: Standard solution (The concentration is 250 ng/mL of DON (2.5 ng as injection amount) and 125 ng/mL of NIV (1.25 ng as injection amount).)

B: Dry food for cats (spiked at 1.0 mg/kg of DON (2.5 ng as injection amount) and 0.5 mg/kg of NIV (1.25 ng as injection amount))

C: Standard solution (The concentration is 25 ng/mL of NIV (0.25 ng as injection amount).)

D: Milk powder for cats (spiked at 0.5 mg/kg of NIV (0.25 ng as injection amount))

3.9 定量限界（下限）及び検出限界の検討

DON及びNIVの検量線が直線性を示した範囲、各2~1000 ng/mLの下端付近となる濃度（DONにおいてはウェット製品以外で0.1 mg/kg相当量（最終試料溶液中で25 ng/mL相当量）、ウェット製品（原物）で0.02 mg/kg相当量（同10 ng/mL相当量）、NIVにおいては粉ミルク及びウェット製品以外で0.1 mg/kg相当量（最終試料液中濃度25 ng/mL相当量）、粉ミルクで0.5 mg/kg相当量（同25 ng/mL相当量）及びウェット製品（原物）で0.02 mg/kg相当量（同10 ng/mL相当量））の添加回収試験の結果、得られた分析値の標準偏差の10倍となる濃度を求めた。

その結果、DONの定量限界（下限）濃度はウェット製品以外で0.1 mg/kg及びウェット製品（原物）で0.02 mg/kgとした。これらの濃度は愛玩動物用飼料中の基準値の最も低い値（猫用：1 µg/g）に対して1/10（ウェット製品以外）及び1/5（ウェット製品）であり、試験法の妥当性確認法に定められた目標値（基準値の1/5以下（ウェット製品以外）、基準値の1/2以下（ウェッ

ト製品（水分含有量 10 %に換算したものに対して））を満たしていた。また、NIV の定量限界（下限）濃度は粉ミルク及びウェット製品以外で 0.1 mg/kg, 粉ミルクで 0.5 mg/kg 及びウェット製品（原物）で 0.02 mg/kg とした。

本法の検出下限を確認するため、上記添加回収試験により得られた分析値の標準偏差に Student の t -値を乗じた値の 2 倍を求めた。その結果、DON の検出限界濃度はウェット製品以外で 0.03 mg/kg, ウェット製品（原物）で 0.01 mg/kg とした。これらの濃度は愛玩動物用飼料中の基準値の最も低い値（猫用：1 μ g/g）に対して 1/33（ウェット製品以外）及び 1/11（ウェット製品）であり、試験法の妥当性確認法に定められた目標値（基準値の 1/10 以下（ウェット製品以外）、基準値の 1/3 以下（ウェット製品（水分含有量 10 %に換算したものに対して）））を満たしていた。NIV の検出限界濃度は粉ミルク及びウェット製品以外で 0.05 mg/kg, 粉ミルクで 0.2 mg/kg, ウェット製品（原物）で 0.008mg/kg であった。

なお、Table 9 に示したとおり、当該定量限界（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

愛玩動物用飼料中のトリコテセン系かび毒の DON, NIV, HT-2 及び T-2 について、前報を基に LC-MS/MS を用いた同時定量法の愛玩動物用飼料等の検査法への適用の可否について検討したところ、分析対象のかび毒を 4 種類から 2 種（DON 及び NIV）に変更、抽出溶媒量及び抽出容器容量の変更、粉ミルク中の NIV のマトリックスによる影響を低減するため最終試料溶液を 5 倍希釈することで、以下の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

- 1) ドライ製品、セミドライ製品、成型ジャーキー、素材乾燥ジャーキー（ハードタイプ及びソフトタイプ）、菓子類並びに粉ミルクについて、本法に従って得られた SRM クロマトグラムには、選択性を妨げるピークは認められなかった。
- 2) 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 NIV 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。
- 3) DON としてウェット製品以外の試料に 0.1 及び 1 mg/kg 相当量、ウェット製品（原物）に 0.02 及び 0.1 mg/kg 相当量、NIV として粉ミルク及びウェット製品以外の試料に 0.1 及び 0.5 mg/kg 相当量、粉ミルクに 0.5 及び 1.0 mg/kg 相当量、ウェット製品（原物）に 0.02 及び 0.05 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、試験法の妥当性確認法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。
- 4) 本法の DON の定量限界（下限）濃度はウェット製品以外で 0.1 mg/kg, ウェット製品（原物）で 0.02 mg/kg, 検出限界濃度はウェット製品以外で 0.03 mg/kg, ウェット製品（原物）で 0.01 mg/kg, NIV の定量限界（下限）濃度は粉ミルク及びウェット製品以外で 0.1 mg/kg, 粉ミルクで 0.5 mg/kg 及びウェット製品（原物）で 0.02 mg/kg, 検出限界濃度は粉ミルク及びウェット製品以外で 0.05 mg/kg, 粉ミルクで 0.2 mg/kg, ウェット製品（原物）で 0.008 mg/kg であった。

設定した DON の定量限界（下限）及び検出限界は、試験法の妥当性確認法に定められた目標値を満たしていた。

文 献

- 1) 宇田川 俊一, 田端 節子, 中里 光男: 食品安全性セミナー5 マイコトキシン, 中央法規出版, 130-131 (2002) (ISBN 978-4-8058-2125-1).
- 2) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知: 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, 平成 14 年 5 月 21 日食発第 0521001 号 (2002).
- 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) 農林水産省令・環境省令: 愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令, 平成 21 年 4 月 28 日, 農林水産省令・環境省令第 1 号 (2009).
- 5) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター理事長通知: 「愛玩動物用飼料等の検査法」の制定について, 平成 21 年 9 月 1 日, 21 消技第 1764 号 (2009).
- 6) 一般財団法人日本食品分析センター: 平成 29 年度愛玩動物用飼料の分析法検討等委託事業報告書, 平成 30 年 3 月, (2018).
- 7) 立石 洋暢, 加藤 耕一, 桑原 正良: 愛玩動物用飼料中のデオキシニバレノール, ニバレノール, HT-2 トキシン及び T-2 トキシンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法の開発, 飼料研究報告, 44, 75-94 (2019).