

3 飼料中の HT-2 トキシンの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法

石橋 隆幸*, 吉村 正寿*, 牧野 大作*

Determination of HT-2 toxin in Feed by LC-MS

Takayuki ISHIBASHI*, Masatoshi YOSHIMURA* and Daisaku MAKINO*

(* Food and Agricultural Materials Inspection Center (I.A.A.), Kobe Regional Center Osaka Office)

An analytical method for determination of HT-2 toxin in feed by liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS) was developed.

HT-2 toxin was extracted with acetonitrile-water (21+4). The extract was purified with a MultiSep 227 Trich+ and analyzed by LC-MS. The LC separation was carried out on an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 3.0 mm i.d.×250 mm, 5 μm) using gradient with 10 mmol/L ammonium acetate-methanol as a mobile phase. The determination was performed in a selected ion monitoring (SIM) mode using $[M+CH_3COO]^-$ ion at m/z 483.

The mean recoveries of HT-2 toxin from 2 kinds of grain and 2 kinds of formula feed spiked at 15, 20 and 200 μg/kg ranged from 98.0 to 113.3%, and the relative standard deviations (RSD) were within 8.7%.

A collaborative study was conducted with formula feed and barley spiked with HT-2 toxin at 200 μg/kg in 7 laboratories. The mean recovery of HT-2 toxin in formula feed was 106%, and the repeatability and reproducibility as the relative standard deviation (RSD_r and RSD_R) were 2.9% and 8.5% respectively, as for barley these were 104%, 2.6% and 9.6% respectively.

Key words: かび毒 mycotoxin ; HT-2 トキシシン HT-2 toxin ; 飼料 feed ; 液体クロマトグラフ質量分析計 liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS) ; 大気圧光イオン化法 atmospheric pressure photo ionization (APPI) ; 大気圧化学イオン化法 atmospheric pressure chemical ionization (APCI) ; 共同試験 collaborative study

1 緒 言

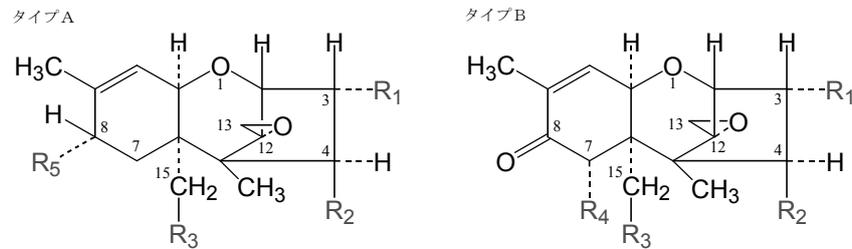
HT-2 トキシシンは *F. acuminatum* 等から産生されるトリコテセン系マイコトキシシン (かび毒) で、その構造から T-2 トキシシンと同じタイプ A に属す (Fig.1 参照) . HT-2 トキシシンを含めトリコテセン系マイコトキシシンは、嘔吐作用、タンパク合成阻害作用等を有しており、デオキシニバレノール (DON) , ニバレノール (NIV) , T-2 トキシシン, HT-2 トキシシン, ジアセトキシシルペノール等の汚染報告が多い^{1)~3)}.

現在、HT-2 トキシシンについてはカナダで規制値が設定されており、その値は飼料中で 100 μg/kg である⁴⁾. また、2001 年に開催された FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会 (JECFA) の第 56 回特別部会において検討されたマイコトキシシンのリスク評価にて、T-2 トキシシンと HT-2 トキシシンの含量で 60 ng/kg 体重/日が暫定 1 日耐容摂取量として設定された⁵⁾.

* 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大阪事務所

飼料分析基準⁶⁾には、T-2 トキシンの定量法として液体クロマトグラフ質量分析法⁷⁾及びガスクロマトグラフ法⁸⁾が記載されているが、HT-2 トキシンの定量法は記載されておらず、これらを踏まえ飼料中の HT-2 トキシンの定量法を確立することが急務となった。

そこで筆者らは、T-2 トキシンの液体クロマトグラフ質量分析法⁷⁾を基に、多機能カラムを用いた液体クロマトグラフ質量分析計による定量法を検討したところ、良好な成績が得られたので報告する。



		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Molecular formula	MW	CAS
Type A	T-2 toxin	OH	OAc	OAc	---	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂	C ₂₄ H ₃₄ O ₉	466.5	21259-20-1
	HT-2 toxin	OH	OH	OAc	---	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂	C ₂₂ H ₃₂ O ₈	424.5	26934-87-2
Type B	Deoxynivalenol (DON)	OH	H	OH	OH	---	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	296.3	51481-10-8
	3-Acetyldeoxynivalenol	OAc	H	OH	OH	---	C ₁₇ H ₂₂ O ₇	338.4	50722-38-8
	15-Acetyldeoxynivalenol	OH	H	OAc	OH	---	C ₁₇ H ₂₂ O ₇	338.4	88337-96-6
	Nivalenol (NIV)	OH	OH	OH	OH	---	C ₁₅ H ₂₀ O ₇	312.3	23282-20-4
	Fusarenone-X	OH	OAc	OH	OH	---	C ₁₇ H ₂₂ O ₈	354.4	23255-69-8

Fig. 1 Structure of HT-2 toxin and other trichothecenes

2 実験方法

2.1 試料

市販の配合飼料及び飼料原料をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉砕し、供試試料とした。

なお、検討に用いた配合飼料の一例を Table 1 に示した。

Table 1 Example of component of formula feed

Kind of formula feed	Classification of ingredient	Ratio (%)	Ingredient
Formula feed for layer	Grains	59	Corn
	Oil meals	25	Soybean meal, Rapeseed meal, Corn gluten meal
	Animal by-products	1	Fish meal
	Brans	1	Rice bran
	Others	14	Calcium carbonate, Calcium phosphate, Paprika extract, Feed additives
Formula feed for beef cattle	Grains	63	Corn, Milo, Barley
	Brans	18	Wheat bran, Rice bran, Corn gluten feed
	Oil meals	10	Soybean meal
	Others	9	Alfalfa, Molasses, Calcium carbonate, Salt, Feed additives

2.2 試 薬

1) HT-2 トキシシン標準液

HT-2 トキシシン標準品 (Sigma Chemical 製) 1 mg を正確に量って 5 mL の褐色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た (この液 1 mL は、HT-2 トキシシンとして 0.2 mg を含有する)。更にこの液の一定量をアセトニトリルで正確に希釈し、1 mL 中に 25 µg を含有する HT-2 トキシシン標準原液を調製した。なお、標準原液は冷凍庫 (-20°C) で保存した。

使用に際して、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) で正確に希釈して、1 mL 中に HT-2 トキシシンとして 0.001, 0.0025, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 及び 1 µg を含有する各 HT-2 トキシシン標準液を調製した。

2) メタノール、アセトニトリル及び蒸留水は液体クロマトグラフ用試薬を用いた。その他、特記している以外の試薬は試薬特級を用いた。

2.3 装置及び器具

- 1) 液体クロマトグラフ：Agilent 製 Agilent 1100 Series 及び島津製作所製 Prominence
- 2) 質量分析計：Agilent 製 Agilent 1100 Series MSD SL 及び島津製作所製 LCMS-2010EV
- 3) 振とう機：タイテック製 レシプロシェーカーSR-2 及び
宮本理研工業製 理研式小型シェーカーMW-DR 型
- 4) 遠心分離器：久保田商事製 5200 及び KS-3000P
- 5) 高速遠心分離器：久保田商事製 KM-15200 及び日立製作所製 SCT15B
- 6) 遠心エバポレーター：東京理化学製 CVE-3100 型
- 7) ロータリーエバポレーター：東京理化機械製 N-1N 型
- 8) 多機能カラム：Romer Labs 製 MultiSep 227 Trich+

2.4 定量方法

1) 抽 出

分析試料 25 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、60 分間振り混ぜて抽出した。抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ、1,000×g (2,000 rpm) 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 を捨てた。10 mL の試験管をカラムの下に置き、その後の流出液の 3 mL を受けた。流出液 2 mL を正確に 50 mL のなす型フラスコに入れ、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、この液の一部をプラスチック製遠心沈殿管 (容量 1.5 mL) に入れ、5,000×g (10,000 rpm) で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフ質量分析計による測定に供する試料溶液とした。

3) 液体クロマトグラフ質量分析計による測定

試料溶液及び各 HT-2 トキシシン標準液 5 µL を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、SIM クロマトグラムを作成し、ピーク面積又は高さより試料中の HT-2 トキシシン量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に、液体クロマトグラフ (以下「LC」という。) 及び質量分析計 (以下「MS」という。) の測定条件を Table 2, 3 及び 4 に示した。

- Sample 25 g
- add 100 mL of acetonitrile-water (21:4)
 - shake for 60 min
 - centrifuge for 5 min at 1,000×g (2,000 rpm)
- Column (MultiSep 227 Trich+)
- apply supernatant
 - drain the fraction of 0~3 mL
 - collect the fraction of 3~6 mL
- Sample solution 2 mL
- evaporate to dryness
 - dissolve in 1 mL of water-methanol-acetonitrile (18:1:1)
 - centrifuge for 5min at 5,000×g (10,000 rpm)
- LC-MS

Scheme 1 Analytical procedure for HT-2 toxin in feed

Table 2 Operating conditions for LC

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm i.d.×250 mm, 5 μm)
Mobile phase	10 mmol/L Ammonium acetate-methanol (4:1)→15 min→methanol (5 min)
Flow rate	0.5 mL/min
Column temp.	40°C
Injection volume	5 μL

Table 3 Operating conditions for MS (Agilent, Agilent 1100 Series MSD SL)

Ionization	Atmospheric pressure photo ionization (APPI)
Mode	Negative
Fragmentor	100 V
Nebulizer	N ₂ (55 psi)
Drying gas	N ₂ (7.0 L/min, 350°C)
Vaporizer	300°C
V cap	1,500 V
Monitor ion	<i>m/z</i> 483

Table 4 Operating conditions for MS (Shimadzu, LC-MS2010EV)

Ionization	Atmospheric pressure chemical ionization (APCI)
Mode	Negative
Nebulizer gas	N ₂ (2.5 L/min)
Interface Temp.	400°C
Heat block temp.	200°C
CDL temp.	200°C
Monitor ion	<i>m/z</i> 483

3 結果及び考察

3.1 質量分析計条件の検討

飼料分析基準に記載されている T-2 トキシンの液体クロマトグラフ質量分析法⁷⁾のイオン化法は、測定条件例として大気圧光イオン化法 (APPI) 及び大気圧化学イオン化法 (APCI) が記載されている。

そこでイオン化法について、2 種類の液体クロマトグラフ質量分析計 (Agilent 製 1100 Series MSD SL 及び島津製作所製 LCMS-2010EV) にて検討を行った。

その結果、Agilent 製 1100 Series MSD SL においては ESI より APPI、島津製作所製 LCMS-2010EV においては ESI 及び APPI より APCI を用いた場合、他のイオン化法より高感度な測定を行うことができた。

このことから、使用する機種によって最も感度良く測定できるイオン化法を選択することとした。

また、HT-2 トキシンのマススペクトルは Fig. 2 のとおりであり、モニターイオンとして最も感度のよい m/z 483 (HT-2 トキシンの酢酸付加イオン $[M+CH_3COO]^-$) を用いることとした。

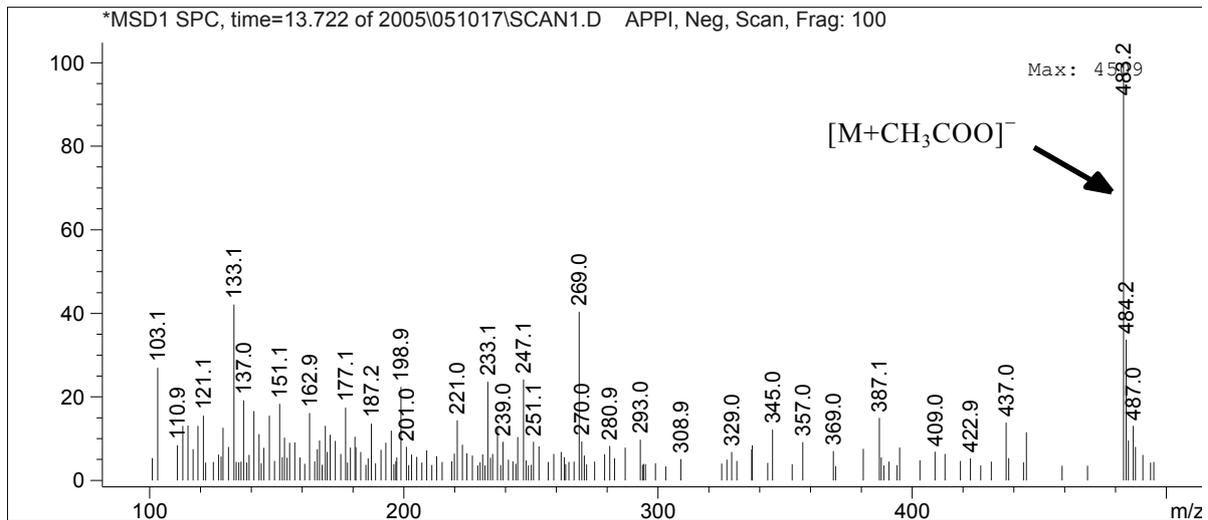


Fig.2 Mass spectrum of HT-2 toxin

3.2 検量線の作成

HT-2 トキシンとして 1 mL 中に 0.001~1 μg を含む 8 点の各標準液を調製し、各 5 μL を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、得られた SIM クロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成した。その結果、検量線は HT-2 トキシンとして 0.005~5 ng の範囲で直線性を示した。

3.3 多機能カラムの検討

筆者らは、T-2 トキシンの定量法⁷⁾において、多機能カラム (MultiSep 227 Trich+) による精製を行っており、HT-2 トキシンの定量法においてもこのカラムが適用可能か確認した。

HT-2 トキシンとして 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加した大麦の抽出液を多機能カラムに入れ、流出液を 1 mL 毎に分画し、各溶出画分についてそれぞれ本法に従って HT-2 トキシンの回収率を求めた。その結果、Table 5 のとおり、0~1 mL の画分では回収率が低く、1~10 mL の各画分では回

収率は 103~123%であり，かつ定量を妨害するピークは認められなかった．

このことから，本法では基とした定量法と同様に，初めの流出液 3 mL を捨て，その後の流出液 3~6 mL を採取することとした．

Table 5 Elution pattern of HT-2 toxin from MultiSep 227 Trich+

Fraction volume /mL	Barley ^{a)}
0~1	49 ^{b)}
1~2	108
2~3	115
3~4	104
4~5	115
5~6	117
6~7	123
7~8	116
8~9	105
9~10	103

a) Extract from barley spiked with HT-2 toxin at 100 µg/kg

b) Mean recovery ($n=2$)

3.4 妨害物質の検討

配合飼料（鶏用 1 点，牛用 3 点），とうもろこし，マイロ，大麦，ライ麦，玄米，精白米，米ぬか，ビールかす及びホミニーフードについて，本法に従って SIM クロマトグラムを作成し，HT-2 トキシンの定量を妨害するピークの有無を検討した．その結果，HT-2 トキシンの定量を妨害するピークは認められなかった．

なお，妨害物質の検討で得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した．

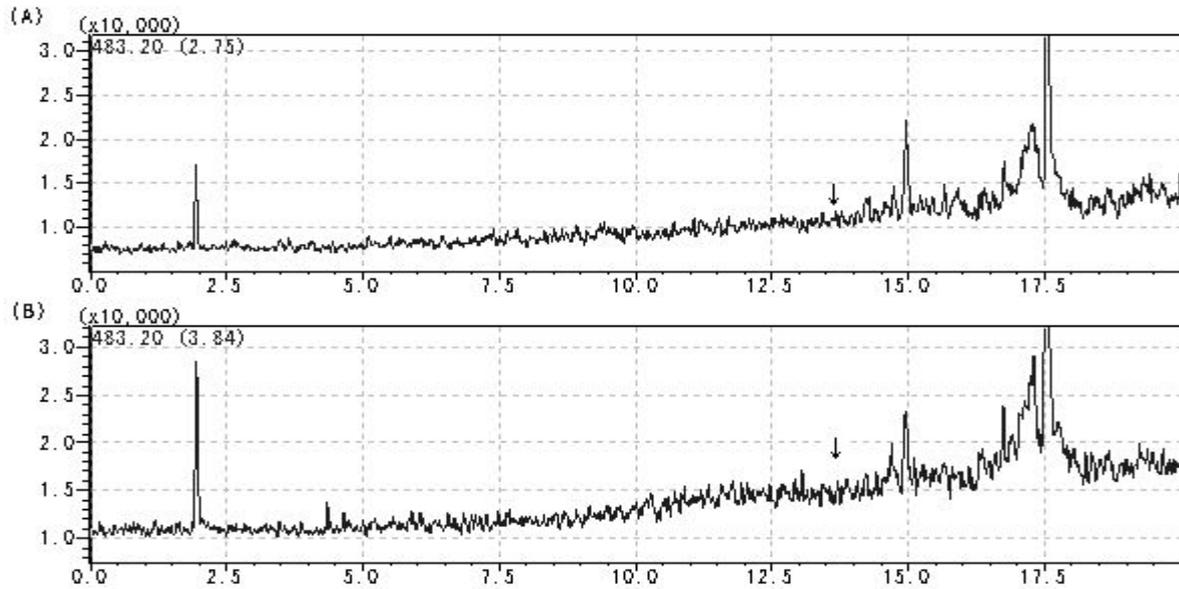


Fig. 3 LC-MS chromatograms of sample solutions

LC-MS conditions are shown in Table 2 and 4.

(A) Sample solution of formula feed for beef cattle (not spiked)

(B) Sample solution of barley (not spiked)

(Peak assignments: HT-2 toxin)

3.5 添加回収試験

本法による回収率及び繰返し精度を確認するために添加回収試験を実施した。

Table 1 の 2 種類の配合飼料，とうもろこし及び大麦に HT-2 トキシンとして 200，20 及び 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加した試料について，本法に従って 3 回分析を行い，その回収率及び繰返し精度を求めた。その結果，Table 6 のとおり，HT-2 トキシンの平均回収率は 98.0~113.3%，その繰返し精度は相対標準偏差（RSD）として 8.7%以下であった。

なお，添加回収試験で得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig.4 に示した。

Table 6 Recoveries of HT-2 toxin from 4 kinds of feed

Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					(%)
	Corn	Barley	Formula feed for layer	Formula feed for beef cattle	
200	101.2 ^{a)} (6.9) ^{b)}	100.6 (4.4)	107.4 (8.7)	103.2 (5.1)	
20	108.0 (2.0)	107.3 (7.3)	112.7 (4.7)	113.3 (8.6)	
15	110.7 (0.60)	107.1 (5.2)	98.0 (3.1)	106.9 (6.4)	

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation (RSD)

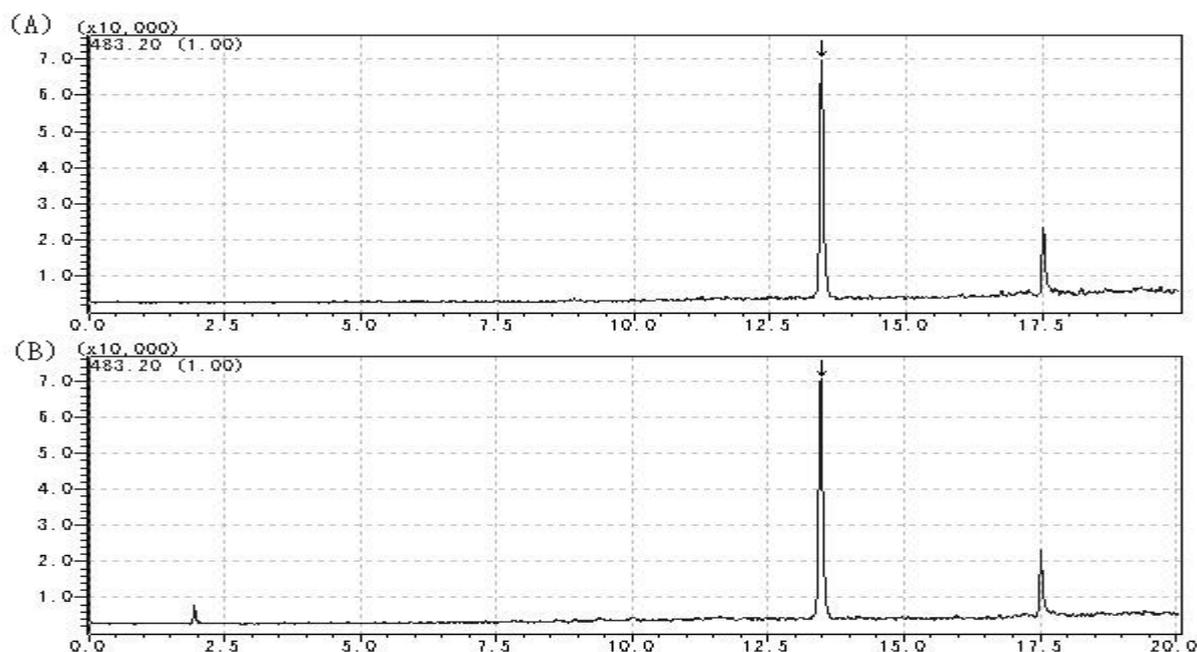


Fig. 4 LC-MS chromatograms of standard solution and sample solution

LC-MS conditions are shown in Table 2 and 4.

(A) Standard solution (The amount of HT-2 toxin is 0.5 ng.)

(B) Sample solution of formula feed for layer (spiked at 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

(Peak assignments: HT-2 toxin)

3.6 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、大麦に HT-2 トキシンとして 15 及び 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加した試料について 3 点併行分析を行い、得られたピークの SN 比を求めた。

その結果、得られたピークの SN 比が 10 となる濃度は 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、本法の定量下限は 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と考えられた。なお、その平均回収率は 107.1%，繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 5.2%であった。

また、検出下限は SN 比が 3 となる濃度から 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と見積もられた。

3.7 共同試験

本法の再現精度を調査するため、鶏用配合飼料及び大麦に HT-2 トキシンとして 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加した共通試料を用いて、株式会社島津製作所分析計測事業部応用技術部東京カスタマーサポートセンター、全国酪農業協同組合連合会分析センター、財団法人日本食品分析センター多摩研究所、財団法人マイコトキシン検査協会、独立行政法人肥飼料検査所（現（独）農林水産消費安全技術センター）本部、同大阪事務所（現 同神戸センター大阪事務所）及び仙台事務所（現 同仙台センター）（7 試験室）において本法に従って共同分析を実施した。

その結果、Table 7 のとおり、鶏用配合飼料の HT-2 トキシンの平均回収率は 106%，それらの繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD_f 及び RSD_R) として 2.9%及び 8.5%であり、HorRat は 0.42 であった。また、大麦においては、平均回収率は 104%，それらの繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD_f 及び RSD_R) として 2.6%及び 9.6%であり、HorRat は 0.47 であった。

なお、参考のため、各試験室で使用した LC-MS の機種等を Table 8 に示した。

Table 7 Quantitative value of HT-2 toxin in collaborative study

Laboratory number	Formula feed for layer ^{a)}		Barley ^{a)}	
				($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	215	223	220	214
2	211	205	198	201
3	224	241	226	241
4	220	229	207	195
5	211	211	206	207
6	175	181	171	173
7	215	215	223	220
Mean value ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	212		207	
Recovery (%)	106		104	
RSD _r ^{b)} (%)	2.9		2.6	
RSD _R ^{c)} (%)	8.5		9.6	
HorRat	0.42		0.47	

a) Spiked with HT-2 toxin at 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Relative standard deviation of reproducibility between different laboratories

Table 8 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	LC-MS Instrument	Ionization	Mobile phase	LC column (i.d.×length, particle size)
		Polarity Monitor ion (m/z)		
1	Waters micromass Quattro Micro	ESI	Acetonitrile	GL Sciences
		Negative 483.2	Methanol 10 mmol/L Ammonium acetate	Inertsil ODS-3 (2.1 mm×250 mm, 5 μm)
2	Waters micromass Quattro Micro	ESI	Methanol	GL Sciences
		Negative 483.3>58.7	10 mmol/L Ammonium acetate	Inertsil ODS-3 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
3	Agilent Technologies 1100 Series LC/MSD SL	APPI	Methanol	Shiseido
		Negative 483	10 mmol/L Ammonium acetate	Capcell Pak C18 AQ (3.0 mm×150 mm, 5 μm)
4	SHIMADZU LCMS-2010EV	APCI	Methanol	Agilent Technologies
		Negative 483.2	10 mmol/L Ammonium acetate	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm×250 mm, 5 μm)
5	Agilent Technologies 1100 Series LC/MSD SL	APPI	Methanol	Agilent Technologies
		Negative 483.2	10 mmol/L Ammonium acetate	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm×250 mm, 5 μm)
6	SHIMADZU LCMS-2010EV	APCI	Methanol	SHIMADZU
		Positive 442.2	10 mmol/L Ammonium acetate	Shim-pack VP-ODS (2.0 mm×150 mm, 5 μm)
7	Waters micromass Quattro Micro	ESI	Methanol	Agilent Technologies
		Negative 483.2	10 mmol/L Ammonium acetate	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×250 mm, 3.5 μm)

4 まとめ

飼料中の HT-2 トキシンの定量法として、アセトニトリル-水 (21+4) で抽出し、多機能カラムにより精製し、液体クロマトグラフ質量分析計を用いた定量法を検討したところ、次の結果を得た。

- 1) ODS カラム (ZORBAX Eclipse XDB-C18) を用いることにより、HT-2 トキシンを分離し、質量分析計 (モニターイオン m/z 483) で測定が可能であった。
- 2) ピーク面積又は高さを用いて検量線を作成したところ、HT-2 トキシンとして 0.005~5 ng の範囲で直線性を示した。
- 3) 抽出液の夾雑成分は、多機能カラム (MultiSep 227 Trich+) により除去できた。
- 4) 飼料原料及び配合飼料について、本法に従って SIM クロマトグラムを作成したところ、HT-2 トキシンの定量を妨害するピークは認められなかった。
- 5) 2 種類の飼料原料及び 2 種類の配合飼料に HT-2 トキシンとしてそれぞれ 200, 20 及び 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加し、本法に従って添加回収試験を実施した結果、その平均回収率は 98.0~113.3%、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 8.7%以下であった。
- 6) 本法による HT-2 トキシンの定量下限は試料中で 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、検出下限は 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と見積もられた。
- 7) 鶏用配合飼料及び大麦に HT-2 トキシンとして 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加した共通試料を用いて、7 試験室において本法に従って共同分析を実施した。

その結果、鶏用配合飼料の HT-2 トキシンの平均回収率は 106%、それらの繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD_r 及び RSD_R) として 2.9%及び 8.5%であり、HorRat は 0.42 であった。また、大麦においては、平均回収率は 104%、それらの繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD_r 及び RSD_R) として 2.6%及び 9.6%であり、HorRat は 0.47 であった。

謝 辞

共同試験に参加していただいた株式会社島津製作所、全国酪農業協同組合連合会、財団法人日本食品分析センター及び財団法人マイコトキシンの検査協会の試験室の各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) M. M. Mossoba, S. Adams, J. A. Roach, M. W. Trucksess: J. AOAC Int., 79, 1116 (1996).
- 2) C. C. Hsueh, Y. Liu, M. S. Freund : Analytical chemistry, 71, 4075 (1999).
- 3) H. M. Muller, J. Reimann, U. Schumacher, K. Schwadorf: Archive of animal nutrition, 54, 173 (2001).
- 4) FAO : FAO Food and Nutrition Paper 81, Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003, (2004), FAO, Rome, Italy
- 5) WHO : Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food (WHO Food Additives Series 47), Geneva (2001).
- 6) 農林水産省畜産局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 7 年 11 月 15 日，7 畜 B 第 1660 号 (1995).
- 7) 石橋隆幸，小野雄造：飼料研究報告，29，1 (2004).
- 8) 田中壽雄，石崎和宏：飼料研究報告，13，1 (1988).