

技術レポート

4 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 the 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 foods using a liquid chromatograph-tandem mass spectrometry (LC-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.

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), confectionary (biscuit for dogs), milk powder for cats and wet food for dogs. DON and NIV were intentionally added at the levels of 0.1 and 1 mg/kg for the pet foods except for wet food, 0.02 and 0.2 mg/kg for wet food respectively. HT-2 and T-2 were added at the levels of 0.04, 0.1 and 0.5mg/kg for the pet foods except for wet food, 0.01, 0.02 and 0.1 mg/kg for wet food respectively. The resulting mean recoveries ranged from 81.6 % to 106 % for DON, 64.9 % to 145 % for NIV, 96.0 % to 113 % for HT-2, and 87.7 % to 117 % for T-2 respectively. The repeatability in the form of the relative standard deviations (RSD_r) was less than 13 % for DON, less than 20 % for NIV, less than 9.3 % for HT-2, and less than 7.1 % for T-2.

.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

* 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

(以下「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, 麦類等の穀類を汚染することが知られている. これらかび毒の汚染低減対策については, 「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の策定・普及について」に基づき推進されているところである¹⁾. 食品安全委員会は 2010 年に, NIV 及び DON の食品健康影響評価を実施し, NIV 及び DON の耐容一日摂取量をそれぞれ 0.4 及び 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日と設定している²⁾.

一方, 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.) はタイプ A に分類されるトリコテセン系かび毒である. FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA) は 2016 年に, HT-2, T-2 及びジアセトキシスシルペノール (DAS) のグループ暫定最大耐容一日摂取量 (group PMTDI) を 60 ng/kg 体重/日 (0.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日) (HT-2, T-2 及び DAS の合計) と設定している³⁾.

国内では, 現在, NIV については食品、飼料ともに規制値はなく, DON については食品用小麦で 1.1 $\mu\text{g}/\text{g}$ ⁴⁾, 家畜等用飼料で 1 $\mu\text{g}/\text{g}$ (生後 3 か月以上の牛用にあつては 4 $\mu\text{g}/\text{g}$)⁵⁾の規制値が設定されているほか, 愛玩動物用飼料では犬用で 2 $\mu\text{g}/\text{g}$, 猫用で 1 $\mu\text{g}/\text{g}$ の規制値⁶⁾が定められている. また, HT-2 及び T-2 の規制値は設定されていない.

家畜等用飼料中のトリコテセン系かび毒の分析法は, 飼料分析基準⁷⁾に各種の方法が収載されている. 一方, 愛玩動物用飼料については, DON の分析法のみが愛玩動物用飼料等の検査法⁸⁾に収載されており, NIV, HT-2 及び T-2 の汚染実態を把握できない状況であることから分析法の確立が急務となっている.

今回, 一般財団法人日本食品分析センターが「平成 29 年度愛玩動物用飼料の分析法検討等委託事業」において開発した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.) を用いた愛玩動物用飼料中の DON 及び NIV の同時定量法⁹⁾ (以下「JFRL 法」という.) を基に, DON, NIV, HT-2 及び T-2 の同時定量法を検討し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.

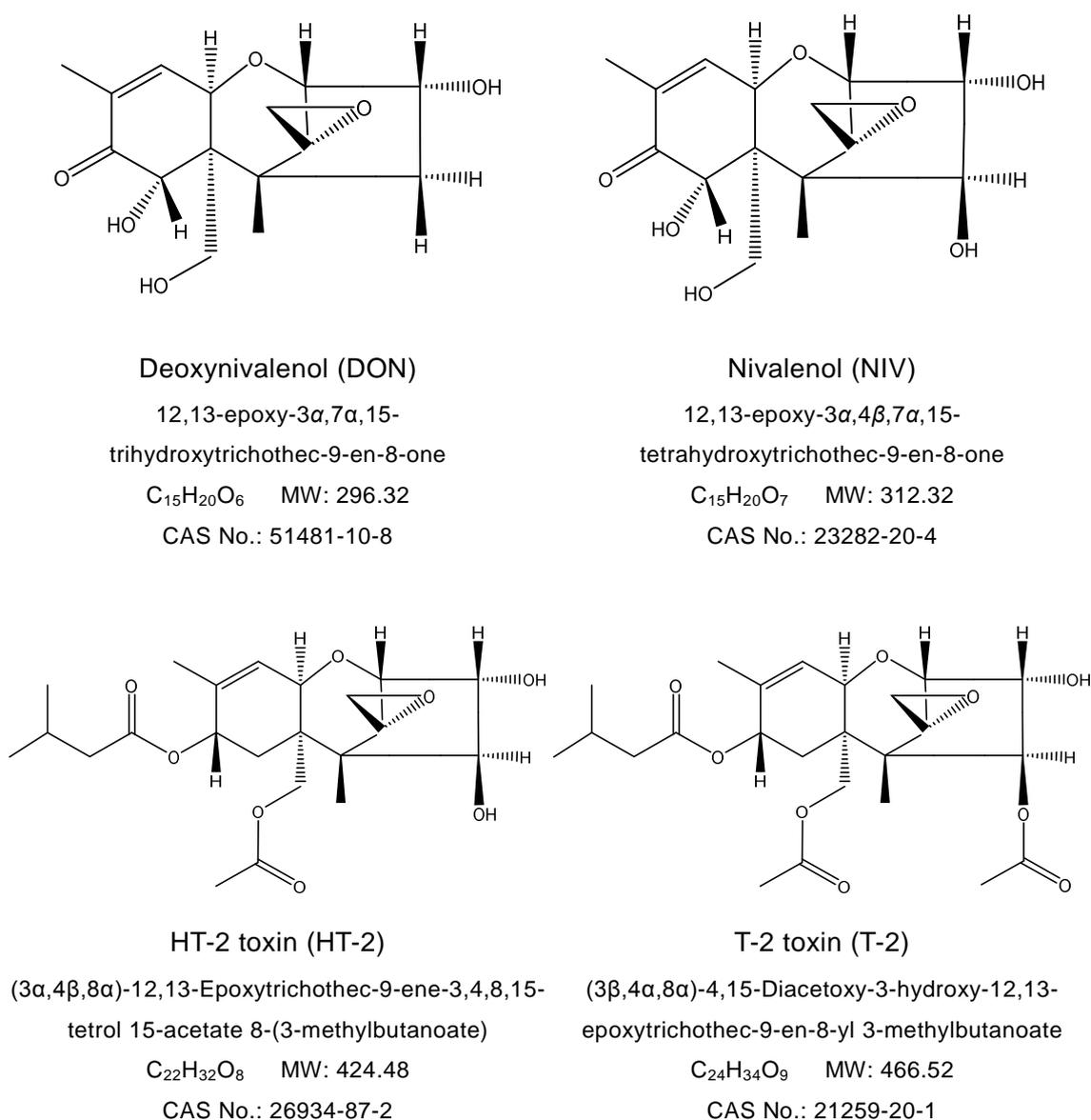


Fig. 1 Chemical structures of DON, NIV, HT-2 and T-2

2 実験方法

2.1 試料

愛玩動物用飼料（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）），菓子類（犬用ビスケット）及び粉ミルク（猫用））は目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕（粒度が 1 mm 以下であった粉ミルクを除く。）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，はさみ等を用いて裁断したのち粉砕した．愛玩動物用飼料（ウェット製品（犬用））はフードプロセッサー等で破砕し，混合して用いた．

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, I, Co), 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, potato, carrot, sugar, green peas, chicken, chicken liver, soybean oil, salt, oligosaccharide, chondroitin protein complex, glucosamine hydrochloride, lactic acid bacterium, thickening stabilizer, minerals, 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ィー用 (1 mol/L 溶液, 富士フイルム和光純薬製) を用いた。水は Milli-Q Element A10 (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) 各かび毒標準品
DON, NIV, HT-2 及び T-2 の標準品は Table 2 に示した供給業者, 純度のものを用いた。

Table 2 Mycotoxin standards used in this study

Name	Manufactures	Formula	MW	CAS No.	Purity (%)
DON	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	296.32	51481-10-8	98.0
NIV solution (100 µg/mL in acetonitrile)	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	C ₁₅ H ₂₀ O ₇	313.32	23282-20-4	*
HT-2	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	C ₂₂ H ₃₂ O ₈	412.53	26934-87-2	97.0
T-2	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	C ₂₄ H ₃₄ O ₉	466.52	21259-20-1	98.0

*: 100.2 µg/mL (certificate of analysis)

3) 各かび毒標準原液

NIV は Table 2 に示した市販の標準液を標準原液 (100.2 µg/mL) とした。DON, HT-2 及び T-2 は各標準品 5 mg を正確に量ってそれぞれ 25 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 0.2 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 25 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) 多機能カラム: MultiSep 227 Trich+カートリッジ Romer Labs 製
- 5) LC-MS/MS

LC-MS/MS 1

LC 部: ACQUITY UPLC System Waters 製

MS 部: ACQUITY TQ Detector Waters 製

LC-MS/MS 2

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

i ウェット製品以外

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、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、 $1000\times g$ 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。

ii 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、 $1600\times g$ 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、 $1600\times g$ 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。

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、 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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、この液をプラスチック製遠心沈殿管 (容量 1.5 mL) に入れ、 $5000\times g$ で 5 分間遠心分離し、上澄み液を LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

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 2.3 の 5) の LC-MS/MS 1 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 3-1 及び 3-2 に示した。

Table 3-1 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm i.d. \times 150 mm, 5 μm), Agilent Technologies
Mobile phase	10 mmol/L ammonium acetate-acetonitrile (19:1) (hold for 1 min) \rightarrow 15 min \rightarrow (1:19) (hold for 5 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	$40\text{ }^{\circ}\text{C}$
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Source temperature	$120\text{ }^{\circ}\text{C}$
Desolvation gas	N_2 (800 L/h, $400\text{ }^{\circ}\text{C}$)
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)

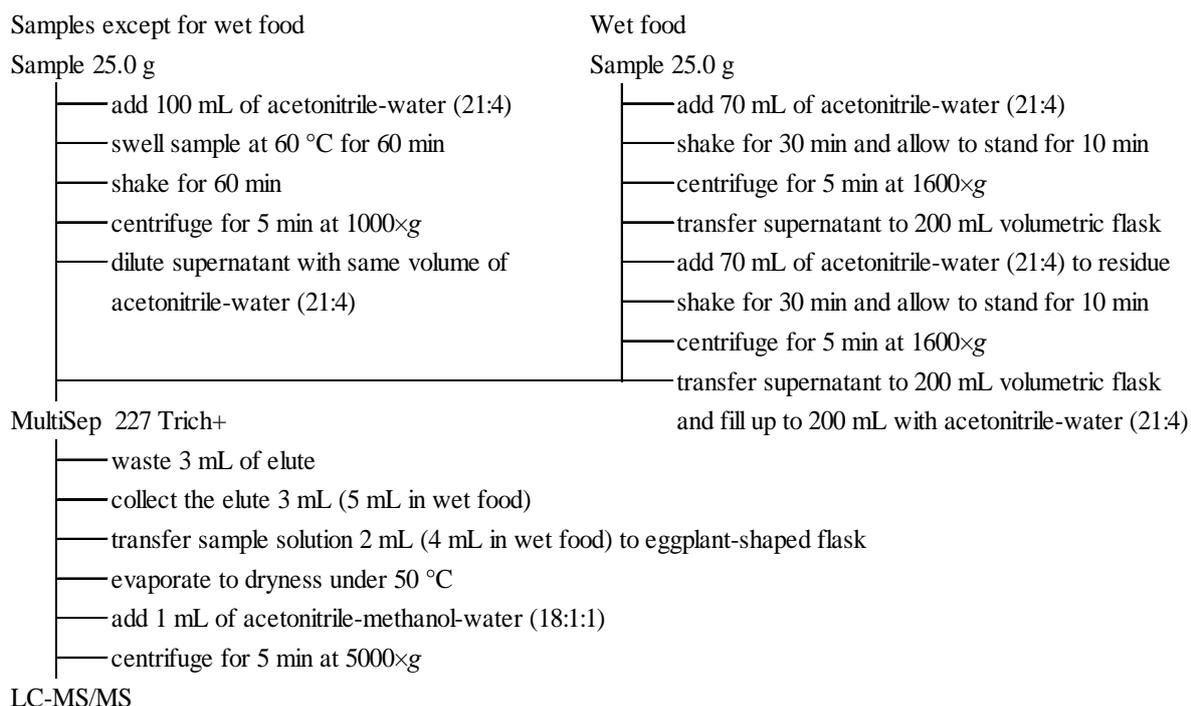
Table 3-2 MS/MS parameters

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	15
			-	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、分析法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for DON, NIV, HT-2 and T-2 in pet foods

2.5 LC-MS/MS 測定条件におけるイオン化法の検討

2.2 の 3) の NIV 標準原液をアセトニトリルで正確に希釈して調製した 250 ng/mL の標準液を、LC-MS/MS 1 を用いて 2.4 の 3) の測定条件の ESI 法及び大気圧化学イオン化 (APCI) 法で測定し、イオン化法の違いを検証した。また、参考として、同溶液を 2.3 の 5) の LC-MS/MS 2 を用いて APCI 法で測定し、LC-MS/MS 1 との機種間の相違を検証した。LC-MS/MS 1 及び LC-MS/MS 2 における APCI 法によるタンデム型質量分析計部の測定条件を Table 4-1 及び 4-2 並びに 5-1 及び

5-2 に示した.

Table 4-1 Operating conditions of LC-MS/MS 1

Ionization	Atmospheric pressure chemical ionization (APCI)
Source temperature	150 °C
Desolvation gas	N ₂ (900 L/h)
APCI probe temperature	450 °C
Cone gas	N ₂ (50 L/h)
Collision gas	Ar (0.25 mL/min)

Table 4-2 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>)		
NIV	-	371	281	-	25	22
			-	311	20	13

Table 5-1 Operating conditions of LC-MS/MS 2

Ionization	Atmospheric pressure chemical ionization (APCI)
Nebulizer gas	Air (4 L/min)
Drying gas	N ₂ (3 L/min)
Interface temperature	330 °C
Heat block temperature	150 °C
DL temperature	180 °C
Collision gas	Ar (230 kPa)

Table 5-2 MS/MS parameters

Target	Mode	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion		Collision energy (eV)
			Quantifier (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)	
NIV	-	371	281	-	14
			-	311	12

2.6 添加回収試験

2.2 の 4)に従って調製したかび毒混合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。ウェット製品以外の試料に DON 及び NIV として 0.1 及び 1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 25 及び 250 ng/mL），HT-2 及び T-2 として 0.04, 0.1 及び 0.5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10, 25 及び 125 ng/mL），ウェット製品に DON 及び NIV として 0.02 及び 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 及び 100 ng/mL），HT-2 及び T-2 として 0.01, 0.02 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5, 10 及び 50 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、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 LC-MS/MS におけるイオン化法の検討

2.5 に基づき、LC-MS/MS 1 による APCI 法と ESI 法の *SN* 比について比較検討をした。その結果、APCI 法では *SN* 比は 36 となり、ESI 法では *SN* 比は 366 となった。このことから、ESI 法は APCI 法より低濃度の測定が期待できること、また、ESI 法は APCI 法に比べより汎用的なイオン化法であることから、本検討においては ESI 法を採用することとした。参考までに、2.5 に基づき、LC-MS/MS 2 の APCI 法により測定を実施したところ、*SN* 比は 4831 となり機種間で差が認められた。

3.2 モニターイオンの設定

DON, NIV, HT-2 及び T-2 のマススペクトル例を Fig. 2 に、プロダクトイオンスペクトル例を Fig. 3 に示した。各かび毒のプリカーサーイオン及びプロダクトイオンからモニターイオンを Table 3-2 のとおり定めた。

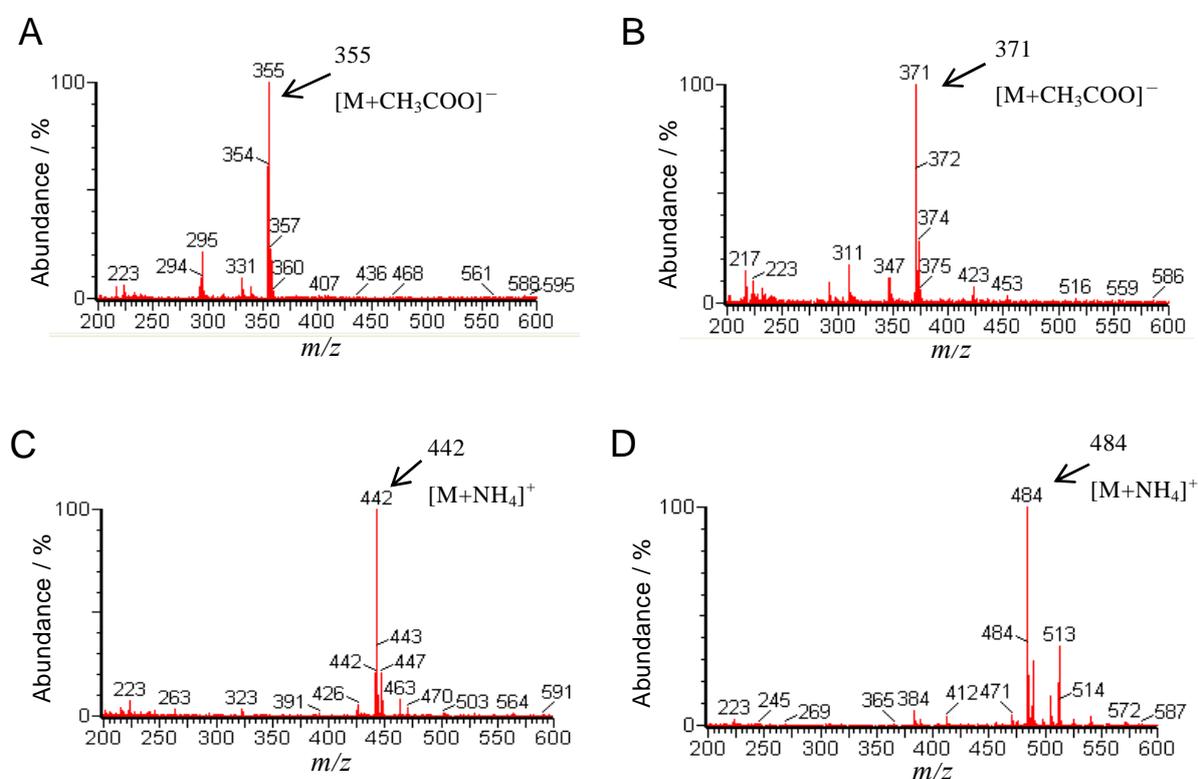


Fig. 2 Mass spectrum of DON, NIV, HT-2 and T-2

A: DON, B: NIV, C: HT-2, D: T-2

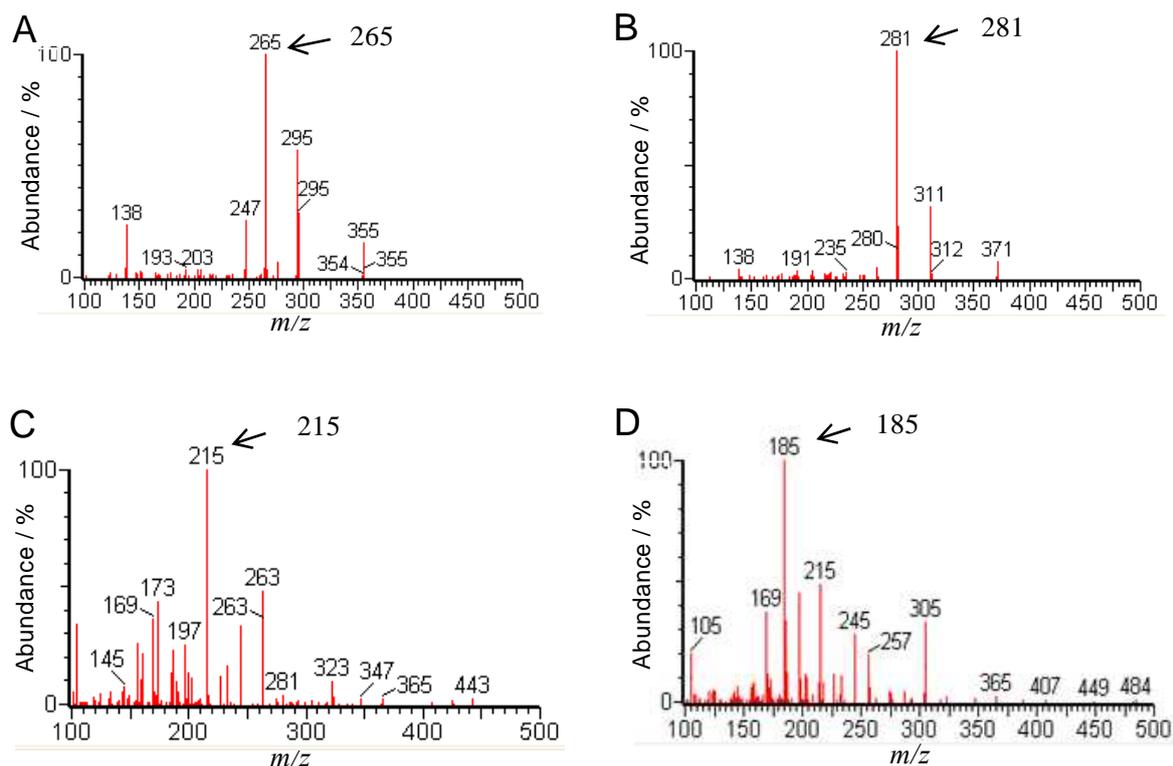


Fig. 3 Product ion spectrum of DON, NIV, HT-2 and T-2

- A: DON (precursor ion: m/z 355, collision energy: 15 eV)
 B: NIV (precursor ion: m/z 371, collision energy: 15 eV)
 C: HT-2 (precursor ion: m/z 442, collision energy: 20 eV)
 D: T-2 (precursor ion: m/z 484, collision energy: 22 eV)

3.3 検量線

2.2 の 4)により調製した各かび毒混合標準液の各 10 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. 4 のとおりであり、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。

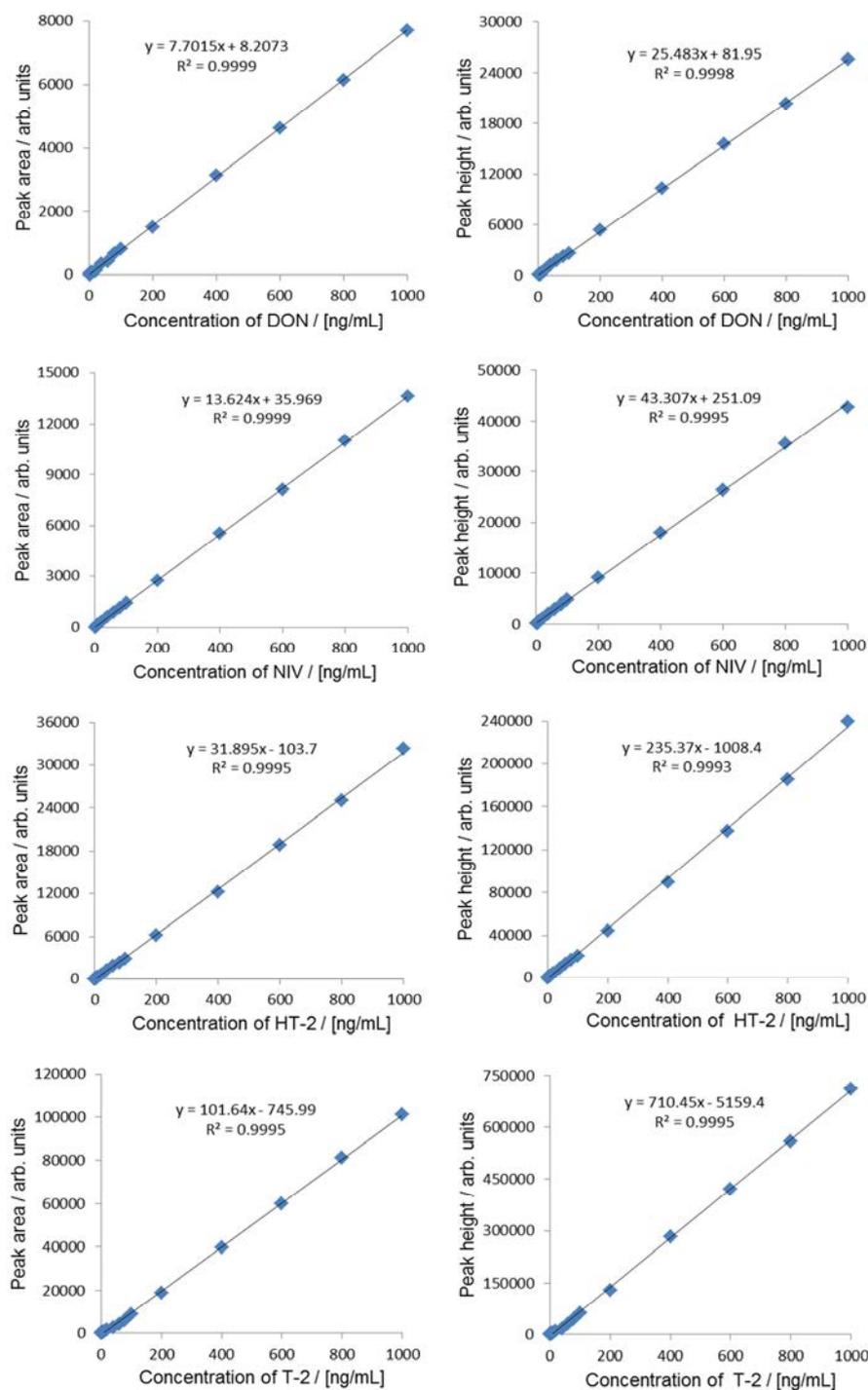


Fig. 4 Calibration curves of DON, NIV, HT-2 and T-2 by peak area (left) and peak height (right)

3.4 多機能カラムからの流出画分の確認

2.4 の 1)に従って調製したカラム処理に供するドライ製品（猫用）及びウェット製品（犬用）の試料溶液に DON, NIV, HT-2 及び T-2 として、それぞれ各 1 mg/kg 及び各 0.2 mg/kg 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。その結果は Table 6 のとおりであり、ドライ製品及びウェット製品とも 3 mL 以上の画分で良好な回収率であったため、JFRL 法のとおり、ドライ製品では 3~6 mL の画分から 2 mL を採取、ウェット製品では 3~8 mL の画分から 4 mL を

採取することとした。

Table 6 Outflow pattern of DON, NIV, HT-2 and T-2 from MultiSep 227 Trich+

Types	Target	Concentration (ng/mL)	Concentration (%) ^{a)}								
			0~1 mL	1~2 mL	2~3 mL	3~4 mL	4~5 mL	5~6 mL	6~7 mL	7~8 mL	8~9 mL
Dry food for cats	DON	125	37.1	89.9	100	104	98.4	95.6	103	105	97.9
	NIV	125	—	31.3	79.2	90.6	94.9	84.9	102	104	101
	HT-2	125	32.2	80.6	91.8	90.8	95.6	89.6	93.5	90.7	91.9
	T-2	125	43.9	74.2	84.4	86.8	88.1	86.2	91.2	90.3	90.7
Wet food for dogs	DON	25	52.2	66.5	71.3	98.4	84.1	92.0	85.9	88.3	84.9
	NIV	25	25.5	72.6	89.6	94.5	103	92.1	98.4	97.4	101
	HT-2	25	63.5	83.9	96.5	99.2	93.4	92.3	98.3	102	103
	T-2	25	54.6	82.6	91.2	95.6	98.4	98.2	95.0	96.6	99.8

$n = 1$

—: Not detected

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

3.5 妨害物質の検討

本法の選択性を確認するため、8種類の愛玩動物用飼料（ドライ製品（猫用）、セミドライ製品（犬用）、ウェット製品（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））、菓子類（犬用ビスケット）及び粉ミルク（猫用）各1検体）について、本法に従い分析したところ、定量を妨げるピークは認められなかった。

なお、得られたSRMクロマトグラムの一例をFig. 5-1及び5-2に示した。

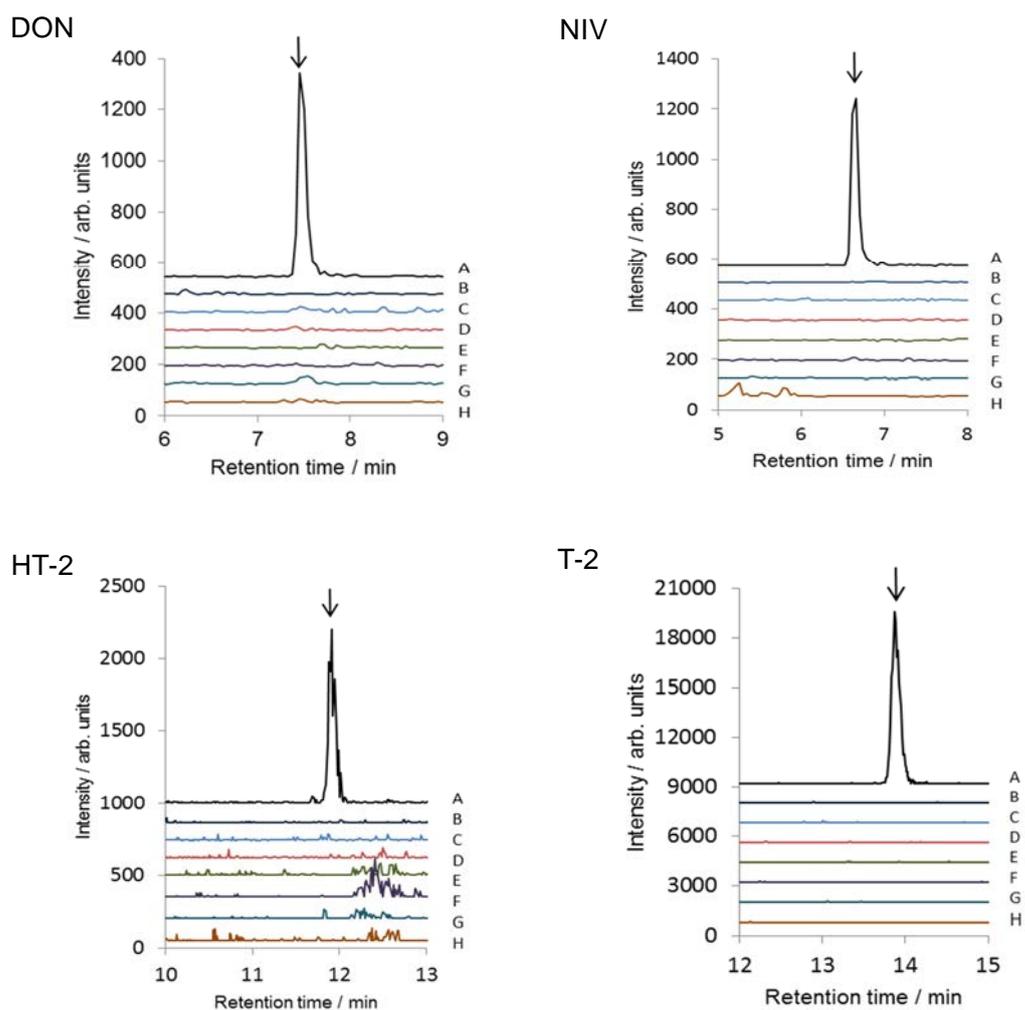


Fig. 5-1 SRM chromatograms of standard solution and blank sample solutions (without wet type pet food)

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 3-1 and 3-2. Arrows indicate the retention time of mycotoxins. The baselines were shifted for display.)

A: Standard solution (25 ng/mL each as DON and NIV, 10 ng/mL each as HT-2 and T-2)

B: Dry food for cats

C: Semi dry food for dogs

D: Formed jerky for dogs

E: Dried jerky for dogs (hard type)

F: Dried jerky for dogs (soft type)

G: Confectionery (biscuit) for dogs

H: Milk powder for cats

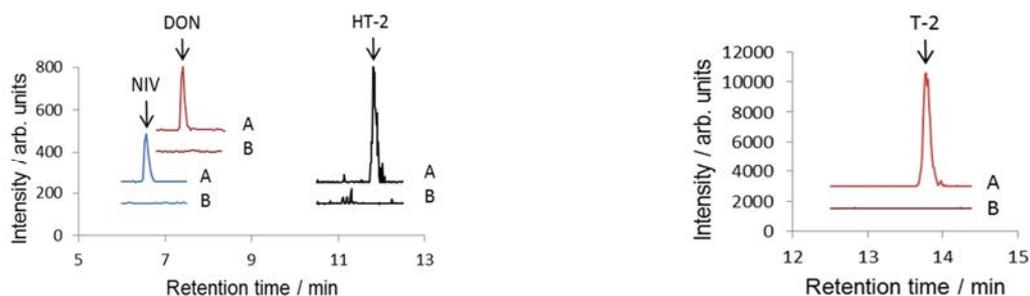


Fig. 5-2 SRM chromatograms of standard solution and blank sample solution (wet type pet food) (LC-MS/MS conditions are shown in Tables 3-1 and 3-2. Arrows indicate the retention time of mycotoxin. The baselines were shifted for display)

A: Standard solution (10 ng/mL each as DON and NIV, 5 ng/mL each as HT-2 and T-2)

B: Wet food for dogs

3.6 マトリックス効果の確認

2.4 の 1)から 2)により調製したウェット製品以外のブランク試料溶液に DON, NIV, HT-2 及び T-2 として各 0.1 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で各 25 ng/mL 相当量), ウェット製品のブランク試料溶液に DON, NIV, HT-2 及び T-2 として各 0.01 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で各 5 ng/mL 相当量) をそれぞれ添加した各マトリックス標準液について, 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. 結果は, Table 7 のとおり, 素材乾燥ジャーキーハードタイプ (犬用) に添加した DON, 粉ミルク (猫用) に添加した NIV 及びすべての種類に添加した T-2 は試料マトリックスによる影響があった.

試料マトリックスにより影響があった NIV 及び T-2 の粉ミルク (猫用) について, ブランク試料溶液の希釈操作によって改善が認められないかを検討したところ, T-2 では 5 倍希釈によって改善されたが, NIV では 10 倍希釈によっても改善されなかった.

Table 7 Matrix effect study

Types	Concentration		Matrix effect ^{b)}			
	in matrix standard solution (ng/mL)	in sample ^{a)} (mg/kg)	(%)			
			DON	NIV	HT-2	T-2
Dry food for cats	25	0.1	108	109	105	121
Semi dry food for dogs	25	0.1	99	94	106	116
Wet food for dogs	5	0.01	101	90	108	119
Formed jerky for dogs	25	0.1	106	93	107	119
Dried jerky for dogs (hard type)	25	0.1	112	103	105	125
Dried jerky for dogs (soft type)	25	0.1	107	102	104	121
Confectionery (biscuit) for dogs	25	0.1	110	88	108	117
Milk powder for cats	25	0.1	102	163	110	125
Milk powder for cats (5 times dilution) ^{c)}	25	0.1	96	135	97	82
Milk powder for cats (10 times dilution) ^{c)}	25	0.1	100	125	91	77

$n = 3$

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

c) Blank solution (milk powder) diluted by water-methanol-acetonitrile (18:1:1)

3.7 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 8 のとおり、DON の平均回収率は 81.6~106 %，その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 13 % 以下，NIV の平均回収率は 64.9~145 %， RSD_r として 20 % 以下，HT-2 の平均回収率は 96.0~113 %， RSD_r として 9.3 % 以下，T-2 の平均回収率は 87.7~117 %， RSD_r として 7.1 % 以下の成績が得られた。NIV はウェット製品（犬用）を除く 7 種類の愛玩動物用飼料において，低回収率又は過回収率となった。T-2 はドライ製品（猫用）及び素材乾燥ジャーキーハードタイプ（犬用）で過回収率となった。その他の試験区は愛玩動物用飼料等の検査法⁸⁾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。）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であった。NIV の低回収は多機能カラム及びマトリックス効果の検討で問題が無かったことから抽出方法の改良が必要であると考えられた。また，粉ミルク（猫用）の NIV の過回収は，マトリックス効果で検討した希釈操作においても改善が認められなかったことから，分析法の改良が必要であると考えられた。なお，得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig.6-1 及び 6-2 に示した。

Table 8 Recoveries for DON, NIV, HT-2 and T-2

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	—	—	—	—	99.2	7.8	—	—
	0.1	106	8.6	96.7	7.1	—	—	103	3.6
	0.2	—	—	—	—	98.4	3.2	—	—
	1	103	0.8	93.3	1.7	—	—	89.5	1.6
NIV	0.02	—	—	—	—	84.5	8.8	—	—
	0.1	80.2	5.2	69.8	13	—	—	71.8	12
	0.2	—	—	—	—	95.8	3.2	—	—
	1	79.4	7.3	76.8	1.8	—	—	70.3	2.5
HT-2	0.01	—	—	—	—	106	5.3	—	—
	0.02	—	—	—	—	96.0	4.2	—	—
	0.04	102	6.5	110	5.5	—	—	107	3.9
	0.1	105	3.7	104	4.0	99.7	1.7	106	5.2
	0.5	107	1.2	107	1.9	—	—	109	2.1
T-2	0.01	—	—	—	—	88.9	4.4	—	—
	0.02	—	—	—	—	93.4	2.5	—	—
	0.04	106	2.5	105	2.0	—	—	108	2.2
	0.1	114	3.8	104	4.0	89.6	1.4	108	6.4
	0.5	101	1.9	96.2	2.4	—	—	102	2.7

Mycotoxins	Spiked level (mg/kg)	Dried jerky for dogs (hard type)		Dried jerky for dogs (soft type)		Confectionery (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	90.5	13	81.6	11	99.0	13	103	9.5
	1	93.5	1.7	85.5	3.1	92.5	1.6	98.5	1.6
NIV	0.1	64.9	20	72.7	6.6	84.5	6.6	145	9.1
	1	73.7	1.3	73.1	1.0	72.0	2.7	108	2.5
HT-2	0.04	110	4.8	104	7.4	113	2.8	106	5.3
	0.1	109	2.8	103	3.6	108	5.1	108	9.3
	0.5	108	2.3	100	3.5	104	1.9	109	1.2
T-2	0.04	115	5.9	103	1.2	106	2.4	111	2.3
	0.1	117	2.1	108	3.3	105	2.8	110	1.6
	0.5	96.0	3.2	87.7	4.3	88.7	7.1	101	1.6

— : Not tested

In dark cell, mean recovery (spiked level: more than 0.1 mg/kg) is less than 80 % or more than 110 %.

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

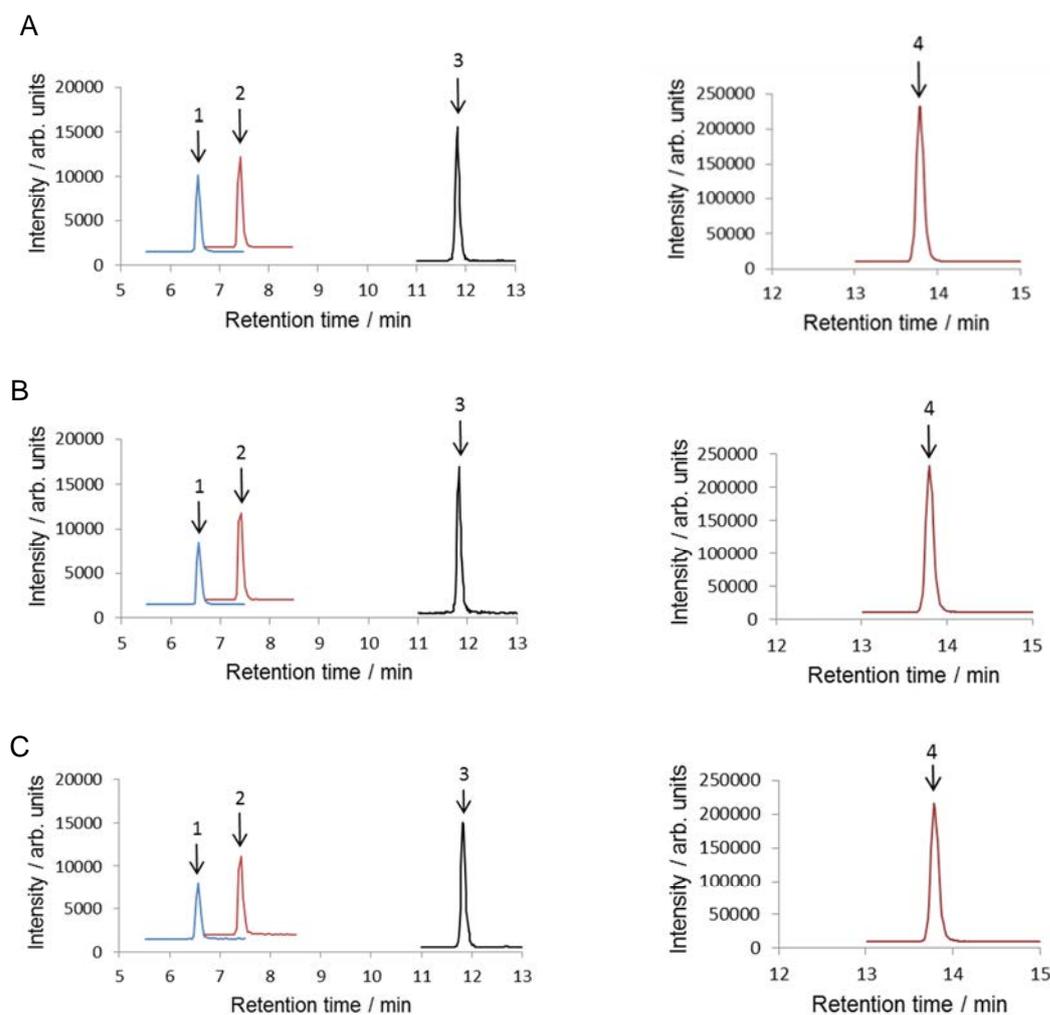


Fig. 6-1 SRM chromatograms of standard solution and spiked samples (dry food and semi-dry food)

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 3-1 and 3-2. Arrows indicate the retention time of 1: NIV, 2: DON, 3: HT-2 and 4: T-2. The baselines were shifted for display.)

A: Standard solution (The concentration is 250 ng/mL of DON and NIV each (2.5 ng as injection amount) and 125 ng/mL of HT-2 and T-2 each (1.25 ng as injection amount))

B: Dry food for cats (spiked at 1 mg/kg of DON and NIV each (2.5 ng as injection amount) and 0.5 mg/kg of HT-2 and T-2 each (1.25 ng as injection amount))

C: Semi-dry food for dogs (spiked at 1 mg/kg of DON and NIV each (2.5 ng as injection amount) and 0.5 mg/kg of HT-2 and T-2 each (1.25 ng as injection amount))

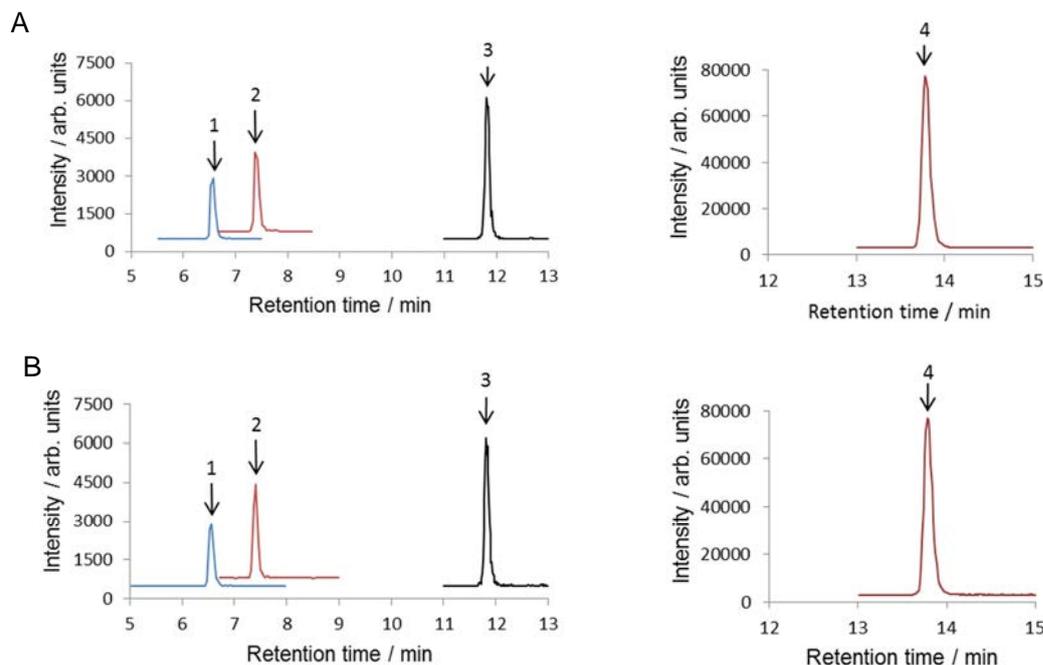


Fig. 6-2 SRM chromatograms of standard solution and spiked sample (wet food) (LC-MS/MS conditions are shown in Tables 3-1 and 3-2. Arrows indicate the retention time of 1: NIV, 2: DON, 3: HT-2 and 4: T-2. The baselines were shifted for display.)

- A: Standard solution (The concentration is 100 ng/mL of DON and NIV each (1.0 ng as injection amount) and 50 ng/mL of HT-2 and T-2 each (0.5 ng as injection amount))
 B: Wet food for dogs. (spiked at 0.2 mg/kg of DON and NIV each (1.0 ng as injection amount) and 0.1 mg/kg of HT-2 and T-2 each (0.5 ng as injection amount))

3.8 定量限界（下限）及び検出限界の検討

各かび毒の検量線が直線性を示した範囲，DON及びNIVにおいては2~1000 ng/mLの下端付近となる濃度（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），ウェット製品で0.02 mg/kg相当量（最終試料液中濃度10 ng/mL相当量）），HT-2及びT-2においては0.5~1000 ng/mLの下端付近となる濃度（ウェット製品以外で0.04 mg/kg相当量（最終試料液中濃度10 ng/mL相当量），ウェット製品で0.01 mg/kg相当量（最終試料液中濃度5 ng/mL相当量））の添加回収試験の結果から，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及びNIVの定量限界（下限）濃度はウェット製品以外で0.1 mg/kg，ウェット製品で0.02 mg/kg，HT-2及びT-2の定量限界（下限）濃度はウェット製品以外で0.04 mg/kg，ウェット製品で0.01 mg/kgであった。なお，Table 8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DON，HT-2及びT-2は8種類すべての愛玩動物用飼料，NIVはドライ製品，ビスケット及びウェット製品において良好であった。

検出限界は，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倍とした。その結果，DON及びNIVの検出限界濃度はウェット製品以外で0.06 mg/kg，ウェット製品で0.01 mg/kg，HT-2及びT-2はウェット製品以外で0.01 mg/kg，ウェット製品で0.002 mg/kg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 4 種類 (DON, NIV, HT-2 及び T-2) について、JFRL 法を基に LC-MS/MS を用いた同時定量法を検討し、以下の結果が得られた。

- 1) 検量線は、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) 今回用いた試料について、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) DON 及び NIV として 0.1 及び 1 mg/kg 相当量 (ウェット製品では 0.02 及び 0.2 mg/kg 相当量)、HT-2 及び T-2 として 0.04, 0.1 及び 0.5 mg/kg 相当量 (ウェット製品では 0.01, 0.02 及び 0.1 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、DON 及び HT-2 は 8 種類すべての愛玩動物用飼料、NIV はウェット製品、T-2 はドライ製品及び素材乾燥ジャーキーハードタイプを除く 6 種類の愛玩動物用飼料において、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) 本法による DON 及び NIV の定量限界 (下限) は 0.1 mg/kg (ウェット製品では 0.02 mg/kg)、検出限界は 0.06 mg/kg (ウェット製品では 0.01 mg/kg)、HT-2 及び T-2 の定量限界 (下限) は 0.04 mg/kg (ウェット製品では 0.01 mg/kg)、検出限界は 0.01 mg/kg (ウェット製品では 0.002 mg/kg) であった。
- 5) T-2 の過回収については、最終溶液の希釈が有効と考えられたが、NIV の過回収については、マトリックス効果で検討した希釈操作においても改善が認められなかったことから、分析法の改良が必要であると考えられた。また、NIV の低回収については、多機能カラム及びマトリックス効果の検討で問題が認められなかったことから、抽出方法の改良が必要であると考えられた。

文 献

- 1) 農林水産省消費・安全局長, 生産局長通知: 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の策定・普及について, 平成 20 年 12 月 17 日, 20 消安第 8915 号, 20 生産第 5731 号 (2008).
- 2) 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, 2010 年 11 月 (2010).
- 3) JECFA: Evaluation of certain contaminants in food, eighty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO technical report series 1002 (2017) (ISBN: 978-92-4-121002-7).
- 4) 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).
- 5) 農林水産省畜産局長通知: 飼料の有害物質の指導基準の制定について, 昭和 63 年 10 月 14 日, 63 畜 B 第 2050 号 (1988).

- 6) 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).
- 7) 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).
- 8) 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).
- 9) 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).