

技術レポート**5 愛がん動物用飼料（ウェット製品）中のデオキシニバレノールの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法の共同試験**吉村 哲史^{*}, 高橋 雄一^{*}, 山多 利秋^{*}

Collaborative Study of Determination of Deoxynivalenol in Wet Type Pet Foods by LC-MS

Satoshi YOSHIMURA^{*}, Yuuichi TAKAHASHI^{*} and Toshiaki YAMATA^{*}

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

1 緒 言

デオキシニバレノール（以下「DON」という）は、主に*Fusarium*属のかび（赤かび）が産生するトリコテセン系のかび毒である。主な産生菌の*F. graminearum*, *F. culmorum*は、麦類を中心とした赤かび病の原因となる植物病原菌で、広く穀類に被害を与える¹⁾。

トリコテセン系かび毒による人や家畜に対する中毒症状としては、食欲減退、おう吐、胃腸炎、下痢等の消化器系への症状や、免疫機能の抑制等が知られている¹⁾。また、犬及び猫を用いたDON汚染飼料の給与試験において、高濃度（6 mg/kg~）では摂餌量の減少及びおう吐が見られたとの報告もある²⁾。

我が国においてDONが愛がん動物に対して危害を及ぼし問題となった事例はないが、飼料用のとうもろこし、麦類などの穀類から高濃度のDONが検出されることがあり、穀類及びその副産物を原料とする愛がん動物用飼料にも混入するおそれがある。このため、農林水産省では、愛がん動物用飼料中のDONについて、汚染実態のデータを収集した上で基準値を設定する方向で検討する物質と位置付けている³⁾。また、環境省は、犬及び猫用の愛がん動物用飼料中のDONに関してそれぞれ2及び1 µg/gの上限値を設けることについて、パブリックコメント等の手続きを実施している。なお、海外では、EUにおいて5 mg/kg、米国において2 mg/kgという指針がある。

愛がん動物用飼料中のDONの分析法としては、財団法人日本食品分析センターが開発した方法⁴⁾（以下「分析センター法」という。）が報告されており、当該方法は飼料分析基準⁵⁾第5章第3節4の「トリコテセン系かび毒の液体クロマトグラフ質量分析計による同時分析法」を基に検討されたものである。

本法は対象試料の水分含有量に応じて前処理の方法が2法に分かれており、ウェット製品を対象とする分析法については、分析センター法が愛がん動物用飼料等の検査法への適用可能と考えられたことから、妥当性確認の補足として共同試験を実施したので、その結果について概要を報告する。

* 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

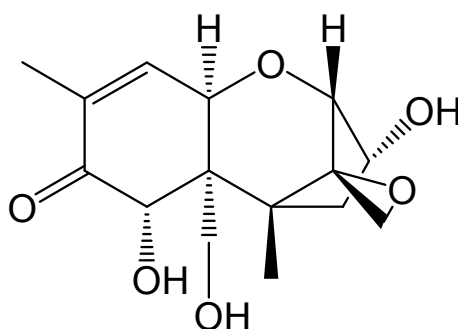
(3 α ,7 α)-3,7,15-trihydroxy-12,13-epoxytrichothec-9-en-8-oneC₁₅H₂₀O₆ MW: 296.3 CAS No.: 51481-10-8

Fig. 1 Chemical structure of deoxynivalenol

2 実験方法

2.1 分析試料

愛がん動物用飼料成犬用ウェット製品及び成猫用ウェット製品をフードプロセッサーで破碎して供試試料として用いた。

なお、それぞれに表示されていた原材料を Table 1 に示した。

Table 1 Ingredients list of wet type pet foods

Pet food types	Ingredients
Wet type for adult dogs	Meat (Chicken, Beef, Mutton), Vegetables (Potato, Carrot, Greenpiece), Wheat flour, Polysaccharide, Minerals (K, Cl, Na, Mg, Zn, Se, I), Sodium tripolyphosphate, Flavor, Coloring agents (Titanium dioxide, Ferric oxide), Vitamins (Choline Chloride, Pantothenic acid, Biotin, E, B ₁ , D ₃ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , Folic acid), Antioxidant(EDTA-Ca-Na), Sodium nitrite
Wet type for adult cats	Pork, Fish, Wheat, Animal Fat, Corn Starch, Corn, Cellulose, Chicken extracts, Yeast, Minerals, Vitamins, Amino acids (Taurine, Methionine), Coloring agent (Ferric oxide), Polysaccharide

2.2 試薬

1) デオキシニバレノール標準液

DON [C₁₅H₂₀O₆]（純度 100.0 %, 和光純薬工業製）10 mg を正確に量って 50 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、DON 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 DON として 25 μ g を含有する DON 標準原液を調製した。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、1 mL 中に DON として 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 及び 1 μ g を含有する各 DON 標準液を調製した。

2) アセトニトリル及びメタノールは液体クロマトグラフ用試薬を用いた。

2.3 器具

1) 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 25.0 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、1,600×g (3,000 rpm) 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。共栓遠心沈殿管中の残さをアセトニトリル-水 (21+4) 70 mL で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 (2 回目) した。

2 回目の抽出液を先の共栓遠心沈殿管に入れ、1,600×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た。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 5 mL を 10 mL の試験管に受けた。流出液 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、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 DON 標準液各 5 µL を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、選択イオン検出クロマトグラムを得た。測定条件を Table 2 に示した。

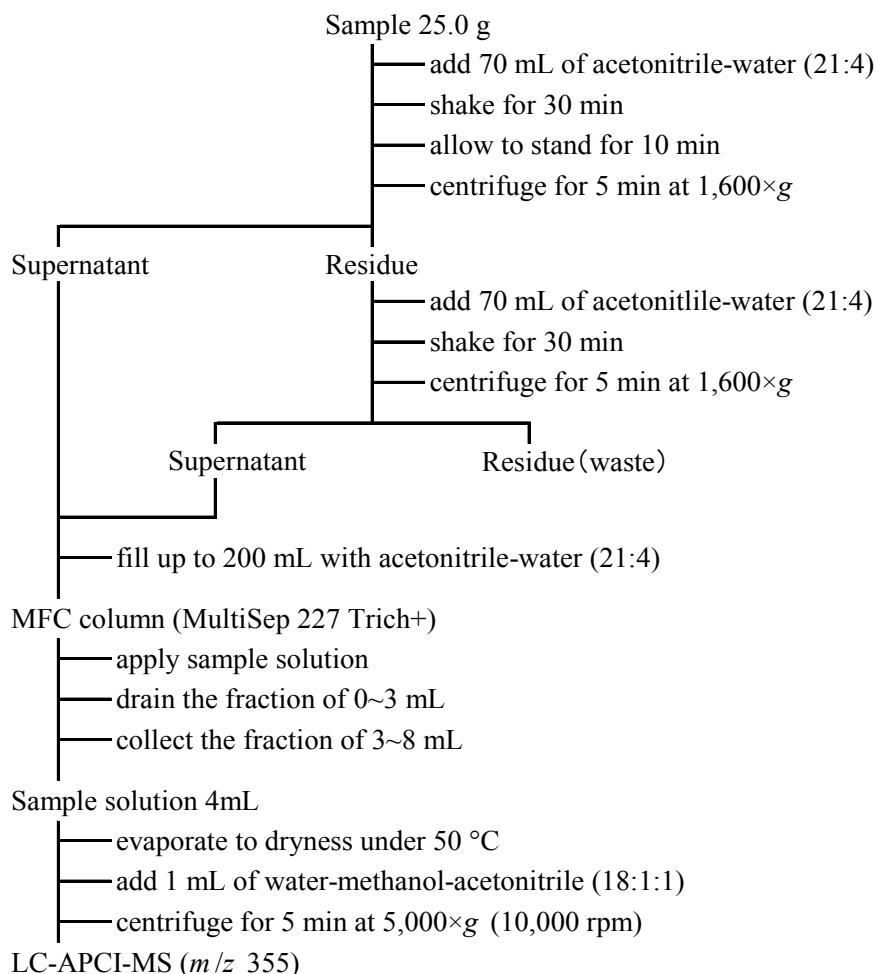
Table 2 Operating conditions of LC-MS for analysis of deoxynivalenol

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3 mm i.d.×250 mm, 5 µm)
Mobile phase	10 mmol/L Ammonium acetate solution - acetonitrile (19:1) (1 min) → 10 min → (1:1) → 4 min → (1:19) (15 min)
Flow rate	0.5 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Atmosphere pressure chemical ionization (APCI)
Mode	Negative
Nebulizer	N ₂ (2.5 mL/min)
Interface temperature	400 °C
Heat block temperature	200 °C
CDL temperature	250 °C
Monitor ion	<i>m/z</i> 355 (for quantitation), 295 (for confirmation)

4) 計算

得られた選択イオン検出クロマトグラムから DON のピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中の DON 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 deoxynivalenol in wet type pet foods

3 結果及び考察

3.1 共同試験

ペットフード中の DON の分析法の再現精度を確認するため、犬用ウェット製品（水分 87 %以下）に DON として 0.04 mg/kg 相当量を添加した試料及び猫用ウェット製品（水分 77 %以下）に DON として 0.4 mg/kg 相当量を添加した試料を用い、財団法人日本食品分析センター多摩研究所、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、同仙台センター、同名古屋センター、同神戸センター、同福岡センターの計 6 試験室で共同試験を実施した。

結果を Table 3 に示した。犬用ウェット製品では、平均回収率 105 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_I 及び RSD_R として 11 %及び 12 %であり、HorRat は 0.53 であった。一方、猫用ウェット製品は自然汚染されていたため、ブランク値を求めて補正を行った。その結果、平均回収率は 103 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_I 及び RSD_R として 2.5 %及び 12 %であり、HorRat は 0.69 であった。

なお、参考のため、各試験室で使用した液体クロマトグラフ質量分析計の機種等を Table 4 に示した。

Table 3 Collaborative study results of deoxynivalenol

Lab. No.	Wet type for dogs		Wet type for cats	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.0330	0.0394	0.535	0.519
2	0.0415	0.0410	0.417	0.404
3	0.0527	0.0402	0.423	0.425
4	0.0460	0.0443	0.400	0.418
5	0.0391	0.0451	0.360	0.384
6	0.0395	0.0406	0.410	0.417
Spiked level (mg/kg)	0.0400		0.400	
Blank value (mg/kg)	ND (<0.010)		0.013	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.0419		0.426	
Recovery ^{a)} (%)	105		103	
RSD _r ^{b)} (%)	11		2.5	
RSD _R ^{c)} (%)	12		12	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		18	
HorRat	0.53		0.69	

a) $n=12$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

d) Predicted relative standard deviations of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 4 Instruments used in the collaborative study

Lab.No.	LC-MS	LC column
		(i.d.×length, particle size)
1	Shimadzu LCMS-2010EV	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm × 250 mm, 5 μm)
2	Waters ACQUITY TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm × 250 mm, 5 μm)
3	Shimadzu LCMS-2010EV	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm × 250 mm, 5 μm)
4	Shimadzu LCMS-2010EV	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm × 250 mm, 5 μm)
5	Agilent Technologies 1100 Series	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm × 250 mm, 5 μm)
6	LC: Waters Alliance 2695 MS: Micromass Quattro micro API	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm × 250 mm, 5 μm)

4 まとめ

愛がん動物用飼料（ウェット製品）中の DON について、分析センター法の愛がん動物用飼料等の検査法への適用の可否を検討するため、妥当性確認の補足として共同試験を実施したところ、次の結果を得た。

- 1) 犬用ウェット製品に DON として 0.04 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて、6 試験室で共同試験を実施した。その結果、平均回収率 105 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 (RSD_r 及び RSD_R) として 11 % 及び 12 % であり、HorRat は 0.53 であった。
- 2) 猫用ウェット製品に DON として 0.4 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて、6 試験室で共同試験を実施した。その結果、平均回収率は 103 %、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_r 及び RSD_R として 2.5 % 及び 12 % であり、HorRat は 0.69 であった。

謝 辞

共同試験に参加いただいた財団法人日本食品分析センター多摩研究所の試験室の関係各位に感謝いたします。

文 献

- 1) 農林水産消費安全技術センター：<http://www.famic.go.jp/ffis/feed/info/profile/DON.pdf> (2011.5 現在)
- 2) D. M. Hughes, M. J. Gahl, C. H. Graham and S. L. Grieb: Overt signs of toxicity to dogs and cats of dietary deoxynivalenol, *J. Anim. Sci.*, **77**(3), 693-700 (1999).
- 3) 農業資材審議会飼料分科会及び同安全性部会並びに中央環境審議会動物愛護部会ペットフード小委員会合同会合（第3回）資料：愛がん動物用飼料の基準・規格 (2010).
- 4) 財団法人日本食品分析センター：平成 21 年度愛がん動物用飼料安全確保調査等委託事業 ペットフード中の有害物質の分析法の開発, 47 (2009).
- 5) 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).