

4 愛玩動物用飼料（ドライ製品及びセミドライ製品）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

上野山 智洋^{*1}, 田中 里美^{*1}, 山多 利秋^{*2}, 高橋 雄一^{*3}

Determination of Deoxynivalenol in Dry and Semi-dry Type Pet Foods by LC-MS

Tomohiro UENOYAMA^{*1}, Satomi TANAKA^{*1}, Toshiaki YAMATA^{*2} and Yuuichi TAKAHASHI^{*3}

(^{*1}Food and Agricultural Inspection Center, Kobe Regional Center

^{*2}Food and Agricultural Inspection Center, Kobe Regional Center
(Now Fertilizer and Feed Inspection Department)

^{*3}Food and Agricultural Inspection Center, Kobe Regional Center
(Now Nagoya Regional Center))

An analytical method was developed to determine deoxynivalenol levels in dry and semi-dry pet food using liquid chromatograph-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometer (LC-APCI-MS).

Deoxynivalenol was extracted from pet food with acetonitrile-water solution (21:4 v/v). Twenty five grams of pet food was added to 100 mL of acetonitrile-water (21:4 v/v) and heated at 60 °C for an hour before extraction. The extract was diluted to two-fold with acetonitrile-water (21:4 v/v). The diluted solution was purified with MultiSep 227 Trich+ multifunctional column (Romer Labs Inc.; Union, MO, U.S.) and desolvated. The residue was dissolved in water-methanol-acetonitrile (18:1:1 v/v/v) and analyzed by LC-APCI-MS.

Spike tests were conducted on four kinds of pet food. Adult dry dog food, adult dry cat food, all life stages dry cat food, and small breed adult semi-dry dog food spiked with 0.1 or 2.0 mg/kg, 0.1 or 1.0 mg/kg, 0.1 or 1.0 mg/kg, and 0.1 or 1.4 mg/kg of deoxynivalenol, respectively. The mean recoveries of deoxynivalenol ranged from 88.2 % to 108 % with relative standard deviations of repeatability of not more than 6.8 %.

A collaborative study was conducted in eight laboratories using four kinds of pet food. Adult dry dog food, adult dry cat food, all life stages dry cat food or adult semi-dry dog food was spiked with 2.0 mg/kg, 1.0 mg/kg, 0 mg/kg (without added deoxynivalenol) or 0.2 mg/kg of deoxynivalenol, respectively. The mean recoveries of deoxynivalenol were 97.3 %, and both repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviations (RSD_r and RSD_R) were 6.5 % for adult dry dog food. These values were 97.1 %, 5.7 % and 7.2 % for adult dry cat food and 97.6 %, 2.8 % and 6.3 % for small breed adult semi-dry dog food. For naturally contaminated all life stages dry cat food, the average quantitative value of deoxynivalenol was 0.225 mg/kg and RSD_r and RSD_R were 6.6 % and 9.4 % respectively.

This method was validated and established for use in the inspection of pet food for deoxynivalenol.

^{*1} 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

^{*2} 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, 現 肥飼料安全検査部

^{*3} 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, 現 名古屋センター

Key words: deoxynivalenol ; pet food ; liquid chromatograph mass spectrometer (LC-MS) ; atmospheric pressure chemical ionization (APCI) ; collaborative study

キーワード：デオキシニバレノール；愛玩動物用飼料；液体クロマトグラフ質量分析計；大気圧化学イオン化法；共同試験

1 緒 言

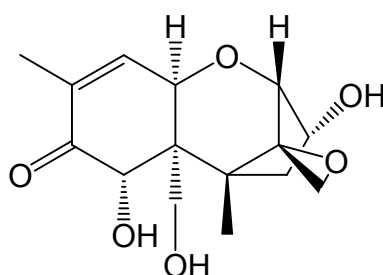
デオキシニバレノール（以下「DON」という．）は、主に*Fusarium*属の赤かびが産生するトリコテセン系のかび毒である．愛玩動物用飼料中のDONについては、平成23年9月1日付けで犬用2 $\mu\text{g/g}$ 及び猫用1 $\mu\text{g/g}$ 以下の基準値が定められた^{1), 2)}．

独立行政法人農林水産消費安全技術センター（以下「FAMIC」という．）が定める愛玩動物用飼料中のDONの定量法については、ウェット製品を対象とした方法³⁾のみが規定されている．この方法は、財団法人日本食品分析センターが開発した液体クロマトグラフ質量分析計（以下「LC-MS」という．）を用いた方法⁴⁾（以下「食品分析センター法」という．）について、FAMICが共同試験による妥当性確認を行った⁵⁾ものである．

ドライ製品及びセミドライ製品を対象とした方法についても、今回、食品分析センター法を基に検討を行った．食品分析センター法では多機能カラムで精製後、クロロホルムを用いたフロリジルカラムによる精製を行っていたが、本法では抽出液を希釈後、多機能カラムで精製することにより、クロロホルムを用いるフロリジルカラムによる精製の省略が可能であった．また、一部の試料で回収率及び繰返し精度の低下が認められたことから、抽出方法について改良を行った．

改良した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、添加回収試験等の妥当性確認を行ったので、その概要を報告する．

なお、DONの構造式をFig. 1に示した．



(3 α ,7 α)-3,7,15-trihydroxy-12,13-epoxytrichothec-9-en-8-one

$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_6$ MW: 296.3 CAS No.: 51481-10-8

Fig. 1 Chemical structure of deoxynivalenol (DON)

2 実験方法

2.1 試料

愛玩動物用飼料（ドライ製品及びセミドライ製品）を 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎したものを用いた。原材料の一例を Table 1 に示した。

Table 1 Examples of ingredients list of pet foods

Pet food types	Ingredients
Complete and balanced dry type for adult dogs	Grains (maize, rice, wheat flour, unpolished rice, etc.), meat (chicken, beef, etc.), plant protein, oils and fats (palm oil, soybean oil, sunflower oil, etc), alimentary fiber (beat pulp), dehydrated protein, soybean, xylose, vegetables (carrot, tomato), green tea extracts, powdered milk, vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , C, D ₃ , E, choline, niacin, pantothenic acid, folic acid), minerals (Zn, K, Ca, Cl, Se, Fe, Cu, Na, Mn, I, P), amino acids (glycine, methionine, cysteine), preservative (potassium sorbate), colorant (caramel), antioxidants (mixed tocopherol, rosemary extracts), pH adjuster
Complete and balanced dry type for adult cats	Wheat, poultry meal, cone gluten meal, beef fat, dehydrated protein, egg, fish meal, tuna meal, bonito meal, sardine meal, lamb meal, beef meat meal, potato, powdered milk, powdered cheeze, cereal bran, vegetable meal, minerals (Ca, K, Na, Cl, Fe, Cu, Mn, Zn, I, Se, Co), vitamins (A, D, E, K, B ₁ , B ₂ , pantothenic acid, niacine, B ₆ , folic acid, biotin, B ₁₂ , choline, C), amino acids (taurine, methionine), colorant (food red no.2, food yellow no.4), antioxidants (mixed tocopherol, rosemary extracts)
Complete and balanced dry type for cats in all growth stages	Grains (maize, cone gluten meal, wheat flour, bread crumbs), meat (poultry by-product meal, powdered beef, powdered pork), fishes (fish meal, dried bonito fish, bonito extracts, powdered small fish, powdered white bait), oils and fats (palm oil, chicken oil, beef oil, γ -linolenic acid), white meat chips, defatted soy bean, oligosaccharide, herbs (thyme, dill, fennel), vegetables (tomato, carrot, spinach), powdered cranberry, minerals (Ca, P, K, Cl, Cu, Zn, I), wall of yeast cells, pH adjuster, amino acids (taurine, triptophan, methionine), vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , E, K, nicotinic acid, pantothenic acid, folic acid, choline), colorant (annatto pigment food red no.102, food yellow no.5, food blue no.1, titanium dioxide), antioxidants (mixed tocopherol, rosemary extracts), glucosamine, chondroitin
Complete and balanced semi-dry type for adult small dogs	Meat (chicken, etc.), saccharides, beans, starch, grains, fish, oils and fats, powdered green tea, alimentary fiber (powdered cellulose), vitamins (A, D, E, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , C, nicotinic acid, pantothenic acid, folic acid, choline), minerals (calcium phosphate, calcium carbonate, sodium chloride, magnesium sulfate, ferric sulfate, zinc carbonate, copper sulfate, manganese carbonate, calcium iodate), emulsifier, thickening stabilizer (glycerin, casein sodium), quality improving agent (propylene glycol), preservative (potassium sorbate), pH adjuster, colorant (titanium dioxide, food red no.106, food yellow no.4, food yellow no.5, food blue no.1), colorant (sodium nitrite), antioxidants (sodium erythorbate, mixed tocopherol, rosemary extracts)

2.2 試薬

1) DON 標準液

デオキシニバレノール標準品（マイコトキシン試験用，和光純薬工業製，純度 100.0 %）2.5 mg を正確に量って 50 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 0.05 mg ($f = 1.00$) を含有する．）．

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 0.010, 0.025, 0.050, 0.075, 0.10, 0.25, 0.50, 0.75 及び 1.0 μg を含有する各 DON 標準液を調製した．

2) 水，メタノール及びアセトニトリルは液体クロマトグラフ用を用いた．

2.3 装置及び器具

1) 振とう機：宮本理研工業製 理研式シェーカー MW-DRV

2) 遠心分離器：久保田製作所製 テーブルトップ遠心機 4000

3) 多機能カラム：Romer Labs 製 MultiSep[®] 227 Trich+カートリッジ

4) ロータリーエバポレーター：BÜCHI Labortechnik 製 Rotavapor R-200（真空コントローラ V-800 付き）

5) 高速遠心分離機：日立工機製 HIMAC SCT15B

6) 液体クロマトグラフ質量分析計：

LC 部：島津製作所製 Prominence

MS 部：島津製作所製 LCMS-2010EV

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）100 mL を加え，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 の遠心沈殿管に入れ，1,000 \times g（2,300 rpm）で 5 分間遠心分離した．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．

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．その後の流出液 2 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 \times 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) LC-MS による測定

試料溶液及び各デオキシニバレノール標準液各 5 μL を LC-MS に注入し，Table 2 の測定条件に従って選択イオン検出クロマトグラムを得た．

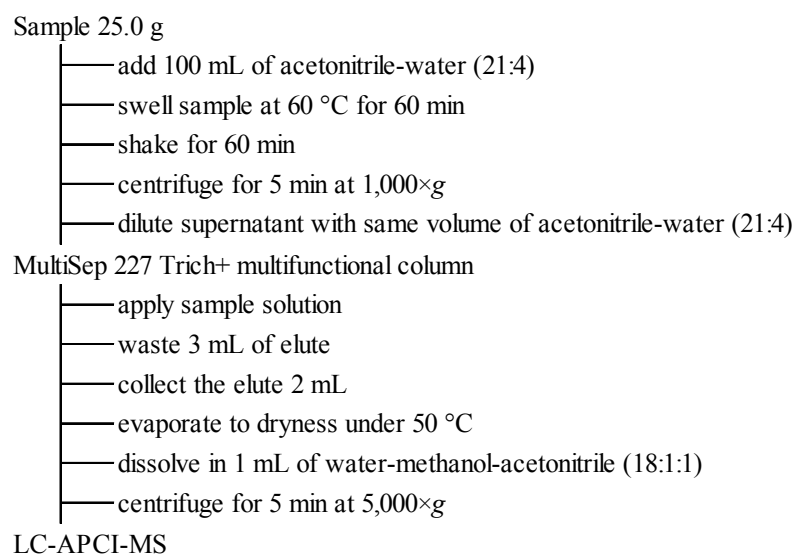
Table 2 Operating conditions of LC-MS for analyzing deoxynivalenol

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	Atmospheric pressure chemical ionization (APCI)
Mode	Negative
Nebulizer gas	N ₂ (2.5 L/min)
Interface temperature	400 °C
Heat block temperature	200 °C
CDL temperature	250 °C
Monitor ion	<i>m/z</i> 355

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 dry and semi-dry type pet foods

3 結果及び考察

3.1 LC-MS 測定条件の変更

食品分析センター法の液体クロマトグラフ条件では、10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-メタノール (4+1) からメタノールへのグラジエントとなっている。しかし、当試験室で使用した LC-MS 機器及び分析カラムでは、各種の愛玩動物用飼料の試料溶液を繰返し測定すると、信号強度が不安定になり、ピーク形状の変化、感度の低下等が見られることがあった。試料溶液に由来する夾雑成分がカラム及びイオン源に蓄積することが原因として考えられ、溶離液をメタノー

ルより若干溶出力が高いとされるアセトニトリルに変更することとした。なお、当 LC-MS の APCI (負イオンモード) では、溶離液に酸を用いることができないことから、これ以上の溶離液の変更等は検討しなかった。

3.2 検量線

2.2 の 1)により調製した 0.01~1 $\mu\text{g/mL}$ のデオキシニバレノール標準液各 5 μL を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、得られた選択イオン検出クロマトグラムからピーク面積を用いて検量線を作成した。その結果、検量線は Fig. 2 のとおり 0.01~1 $\mu\text{g/mL}$ (注入量として 0.05~5 ng) の範囲で直線性を示した。

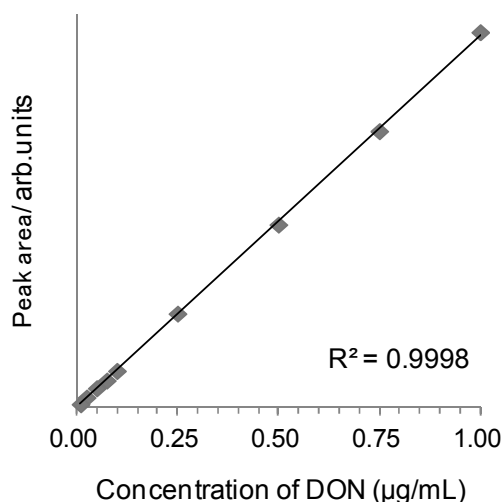


Fig. 2 Calibration curve of deoxynivalenol by peak area

3.3 ドライ及びセミドライ製品の精製操作の簡素化

食品分析センター法のドライ及びセミドライ製品の前処理においては、多機能カラムからの流出液の一定量をクロロホルム-メタノール (9+1) に転溶した後、合成ケイ酸マグネシウムミニカラム (Waters 製 Sep-Pak Plus Florisil) により更に精製を行うこととしている。分析法の愛玩動物用飼料等の検査法³⁾への適用を検討するに当たり、クロロホルムの使用は可能な限り差し控えるべきであることから、当該操作の代替を検討した。

食品分析センター法で合成ケイ酸マグネシウムミニカラムによる精製が追加された理由は、選択イオン検出クロマトグラム上に夾雑成分が現れ、定量に影響するため⁴⁾であったが、食品分析センター法の目標とする定量限界 0.02 mg/kg に対して、当該妨害ピークの影響は分析試料中濃度として 0.01 mg/kg 未満であり、すべての試料で現れるものではなかった。愛玩動物用飼料中の DON の基準値は、犬用 2 mg/kg 及び猫用 1 mg/kg 以下であることから^{1), 2)}、試料溶液を希釈して定量限界を引き上げても支障がないと考えられた。

そのため、多機能カラムによる精製効果の向上も目的として、当該カラム処理前に抽出液を希釈する操作を加え、食品分析センター法の合成ケイ酸マグネシウムミニカラムによる精製を省略する方法を検討した。

DON による汚染が認められた 4 種類の愛玩動物用飼料 (犬用ドライ製品 2 種類、猫用ドライ製品 1 種類及び犬用セミドライ製品 1 種類。ただし、猫用ドライ製品は低濃度であったため、

DONとして0.05 mg/kg相当量を添加したもの。）について、本法により抽出した後、(A) 原液のまま、(B) 原液を2倍希釈した後、それぞれ多機能カラムで精製し、以下本法に従って試料溶液を調製し、定量値を比較した。

その結果はTable 3のとおりであり、有意差は認められないが、(B)の方が若干高めに定量された。また、いずれの方法、試料においても、選択イオン検出クロマトグラム上で定量を妨害するピークは認められなかった。試料に由来する共存成分（マトリックス）が定量値に影響している可能性が考えられたが、(A)の最終試料溶液を希釈して測定しても定量値の増加は認められなかったことから、LC-MSにおけるイオン化抑制ではなく、多機能カラムにおける何らかの影響の懸念があった。

一方、比較的高濃度（0.5 mg/kg~）にDONによる汚染が認められた犬用ドライ製品及び猫用ドライ製品各1種類を用いて、試験的に抽出液を5倍希釈して同様に定量を行ったところ、2倍希釈の場合の定量値より低かった。このため、マトリックスを過剰に希釈すると、DONが多機能カラムに吸着される可能性が考えられた。

以上のことを勘案し、本法では、クロロホルムを必要とする合成ケイ酸マグネシウムミニカラムによる精製を省略し、また、回収率低下の防止及びLC-MSへの負荷を軽減する観点から、抽出液を2倍希釈した後、多機能カラムによる精製を行うこととした。

Table 3 Quantitative value relative with dilution of extract solutions

Sample solution	Undiluted solution	Diluted solution (two-fold) ^{b)}
Pet food types	Quantitative value (mg/kg) ^{a)}	Quantitative value (mg/kg) ^{a)}
Dry type pet food for dogs A	0.047	0.067
Dry type pet food for dogs B	1.23	1.31
Dry type pet food for cats	0.090	0.098
Semi-dry type pet food for dogs	0.067	0.072

a) $n=2$

b) Extract solutions were the same origin of the left column.

3.4 抽出前の加温の検討

検討に際して一部の猫用ドライ製品で、数ヶ月保存した後に回収率及び繰返し精度の低下が見られた。しかし、これらの試料を用いても、保存前は良好な結果が得られており、また、いずれの場合においても使用した標準液、多機能カラムには問題は認められなかった。

このため、数ヶ月保存した間に当該試料に何らかの変性が起こり、DONの抽出を妨げた可能性を疑い、振とう抽出の前に加温・膨潤操作を加えることを検討した。

DONによる汚染が認められた5種類の愛玩動物用飼料（犬用ドライ製品2種類、猫用ドライ製品2種類及び犬用セミドライ製品1種類）について、分析試料10gにアセトニトリル-水（21+4）100 mLを加えた後、直ちに振とう抽出（食品分析センター法）した場合と40、50、60又は70 °Cに設定した恒温機中で60分間静置した後、振とう抽出した場合との定量値を比較した（一部試料については40及び70 °Cを省略した。）。

その結果はFig. 3のとおりであり、犬用及び猫用のドライ製品で、振とう抽出の前に加温することにより高い定量値が得られる試料があった。また、温度による定量値の変化については、

50 °C 以上で一定であった。抽出溶媒であるアセトニトリルと水は、沸点 76.5 °C で水組成 16 % の共沸混合物となることから、安全のため抽出前の加温温度は 60 °C とした。

加温時間については、犬用ドライ製品及び猫用ドライ製品各 1 種類を用い、30 分と 60 分とを比較した予備試験 ($n = 3$) の結果、定量値に相違はなく、相対標準偏差は犬用ドライ製品で 30 分 : 9.8 %, 60 分 : 4.7 %, 猫用ドライ製品で 30 分 : 7.2 %, 60 分 : 5.5 % と 60 分加温した方が若干小さい傾向が認められたため、60 分とした。

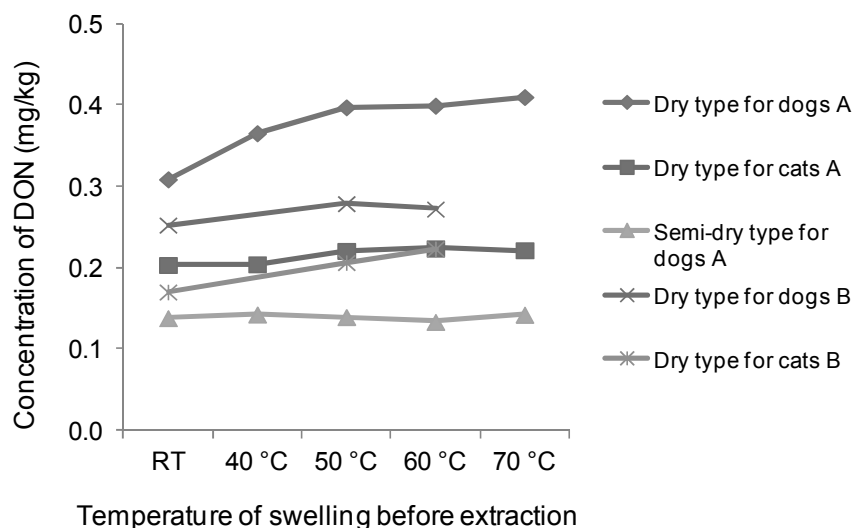


Fig. 3 Concentration of deoxynivalenol (DON) in pet foods derived by several temperatures of swelling before extraction

(40~70 °C: Samples were swelled at each temperature for 60 minutes before extraction; RT: DON was extracted without swelling of samples.)

3.5 妨害物質の検討

本法の選択性を確認するため、15 種類の愛玩動物用飼料（犬用ドライ製品 5 種類、猫用ドライ製品 5 種類及び犬用セミドライ製品 5 種類）について本法に従いクロマトを得た。

その結果、妨害ピークは認められなかった。

本検討で得られた選択イオン検出クロマトグラムの一例を Fig. 4 A) に示した。

なお、確認イオンとして m/z 295 (DON のプロトン脱離イオン) についても測定したが、当該イオンはピーク強度が定量イオン m/z 355 の 1/10 以下で、SN 比が低下するため、DON のピークが確認できるのは約 0.10 $\mu\text{g/mL}$ 以上、試料中濃度として 0.4 mg/kg 以上の場合であった。

3.6 添加回収試験

本法の真度及び併行精度を確認するため、犬用ドライ製品 1 種に DON として 0.10 及び 2.0 mg/kg 相当量、猫用ドライ製品 2 種に DON として 0.10 及び 1.0 mg/kg 相当量並びに犬用セミドライ製品 1 種（水分表示量 30 %）に DON として 0.10 及び 1.4 mg/kg 相当量を添加した試料を用い、本法に従って 5 点併行で分析を行った。なお、猫用ドライ製品については、DON を含有していたため、定量値から自然汚染値を差し引いて回収率を求めた。

その結果は Table 4 のとおりであり、いずれも真度及び精度の規準³⁾を満たしていた。

なお、各愛玩動物用飼料に DON として 0.10 mg/kg 相当量を添加した試料を用い、振とう抽出

前の加温をしない方法で、3点併行で分析を行った。その結果、回収率は成犬用ドライ製品で111%、成猫用ドライ製品で86.2%、全成長段階猫用ドライ製品で74.3%及び成犬期・維持期小型犬用セミドライ製品で86.2%であり、猫用ドライ製品で若干低下が見られた。

本検討で得られた選択イオン検出クロマトグラムの一例を Fig. 4 B)に示した。

Table 4 Recoveries of deoxynivalenol from four kinds of pet food

Spiked level of deoxynivalenol (mg/kg)	Pet food types							
	Dry type for dogs		Dry type for cats		Dry type for cats in all growth stages		Semi-dry type for small dogs	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a),c)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a),d)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
2.0	92.6	2.5	-	-	-	-	-	-
1.4	-	-	-	-	-	-	96.5	1.8
1.0	-	-	97.0	2.5	93.8	4.0	-	-
0.10	108	6.8	92.4	2.5	88.2	2.5	90.0	3.7

a) Mean ($n=5$)

b) Relative standard deviations of repeatability

c) Blank value (0.04 mg/kg) was subtracted in calculation of recovery.

d) Blank value (0.11 mg/kg) was subtracted in calculation of recovery.

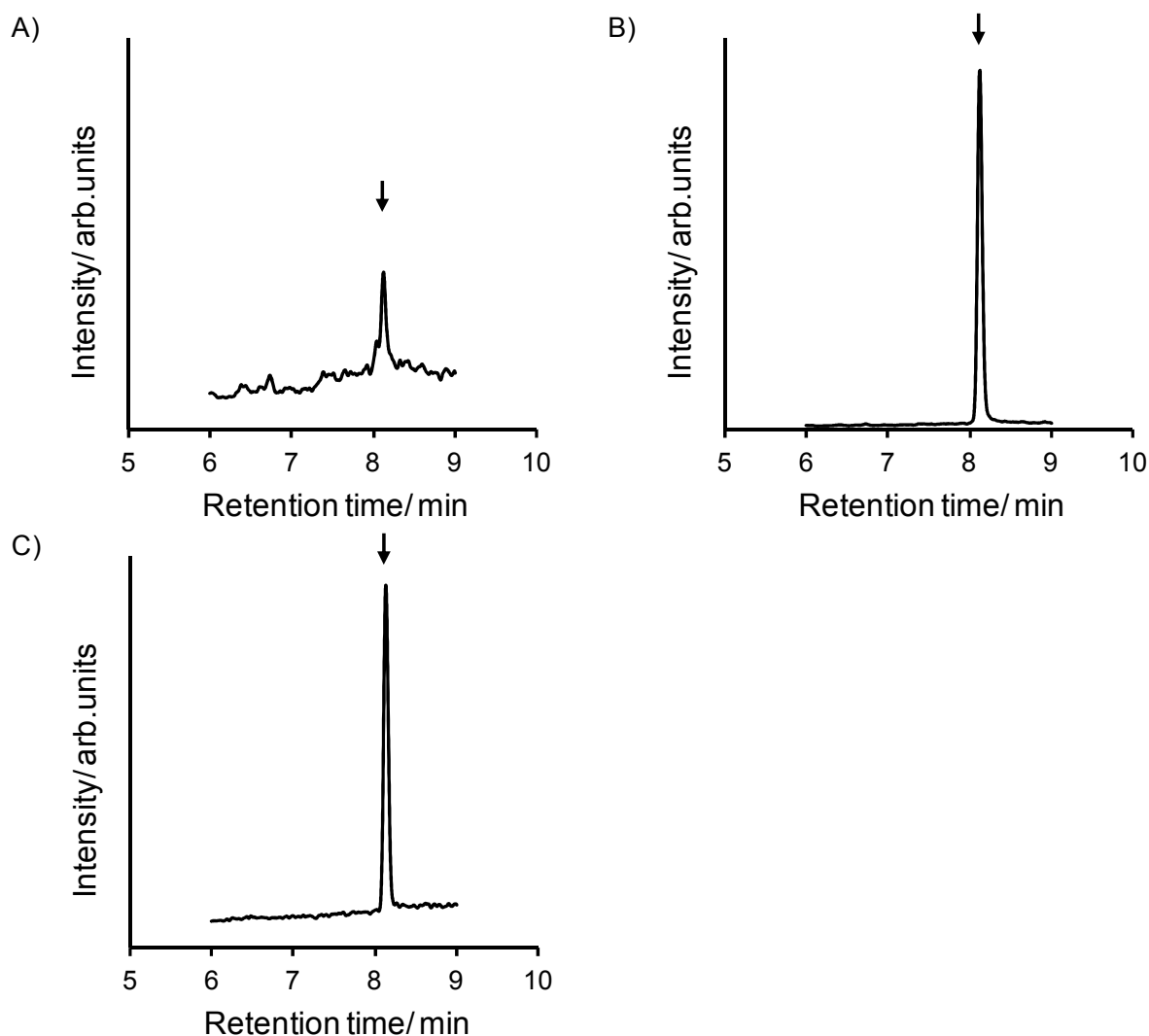


Fig. 4 SIM chromatograms of deoxynivalenol (DON) in selectivity and recovery tests

(Arrows indicate the peak or retention time of DON.)

Scale of Y-axis for B is ten times larger than A and C.)

- A) Blank sample of dry type pet food for cats
- B) Spiked dry type pet food for cats (Spiked level was 1 mg/kg for DON)
- C) Standard solution of DON (0.125 ng equivalent per milliliter)

3.7 定量限界（下限）及び検出限界

前項で実施した添加回収試験のうち、低濃度（0.1 mg/kg 相当量）における選択イオン検出クロマトグラムからピークの *SN* 比を確認した。

その結果、加温せずに抽出した場合に比べ、わずかにノイズが大きくなっていたが、いずれの試料においても *SN* 比 10 以上が確保され、添加回収試験の結果も良好であったことから、本法の定量限界は試料中 0.1 mg/kg とした。

本法の検出限界は、*SN* 比 3 を満たす濃度として、試料中 0.03 mg/kg とした。

3.8 共同試験

犬用ドライ製品（ブランク値 0.03 mg/kg）にデオキシニバレノール（DON）として 2 mg/kg 相当量（50 µg/mL 標準液 1 mL）を添加した試料、猫用ドライ製品 A（ブランク値 0.04 mg/kg）に

DON として 1 mg/kg 相当量 (25 µg/mL 標準液 1 mL) を添加した試料, 猫用ドライ製品 B の自然汚染試料及び犬用セミドライ製品 (ブランク値 0.03 mg/kg) に DON として 0.2 mg/kg 相当量 (5 µg/mL 標準液 1 mL) 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, 日本ハム株式会社中央研究所, 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, 同札幌センター, 同仙台センター, 同名古屋センター, 同福岡センター及び同神戸センター (計 8 試験室) において, 本法に従い共同試験を実施した。

各試験室から有効数字 3 けたで分析値を報告させ, IUPAC のプロトコール⁶⁾に従い, Cochran 検定並びに外れ値 1 個及び 2 個の Grubbs 検定を行った上, 統計処理を行った。なお, 各検定により棄却された試験室はなかった。

その結果は Table 5 のとおりであり, 犬用ドライ製品では平均回収率は 97.3 %, その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 6.5 % 及び 6.5 % であり, HorRat は 0.45 であった。猫用ドライ製品 A では, 平均回収率は 97.1 %, RSD_r 及び RSD_R は 5.7 % 及び 7.2 % であり, HorRat は 0.45 であった。猫用ドライ製品 B では, 平均定量値は 0.225 mg/kg, RSD_r 及び RSD_R は 6.6 % 及び 9.4 % であり, HorRat は 0.47 であった。犬用セミドライ製品では, 平均回収率は 97.6 %, RSD_r 及び RSD_R は 2.8 % 及び 6.3 % であり, HorRat は 0.31 であった。いずれも良好な室間再現精度が得られた。

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 6 に示した。

Table 5 Collaborative study results of deoxynivalenol

Lab. No.	Pet food types			
	Dry type for dogs		Dry type for cats A	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	2.05	2.03	1.16	1.07
2	1.81	2.03	1.00	0.984
3	2.10	1.81	0.984	0.891
4	1.90	2.00	1.05	0.955
5	1.93	1.99	0.984	1.03
6	2.07	1.74	1.01	0.858
7	1.99	2.11	1.06	1.07
8	2.03	2.02	1.05	1.02
Mean value ^{a)} (mg/kg)	1.98		1.01	
Spiked level (mg/kg)	2.00		1.00	
Blank (mg/kg)	0.03		0.04	
Recovery ^{b)} (%)	97.3		97.1	
RSD _r ^{c)} (%)	6.5		5.7	
RSD _R ^{d)} (%)	6.5		7.2	
PRSD _R ^{e)} (%)	14		16	
HorRat	0.45		0.45	

Lab. No.	Pet food types			
	Dry type for cats B		Semi-dry type for small dogs	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.232	0.239	0.247	0.240
2	0.220	0.188	0.208	0.200
3	0.214	0.249	0.234	0.233
4	0.236	0.238	0.210	0.227
5	0.212	0.209	0.212	0.219
6	0.194	0.215	0.242	0.230
7	0.213	0.224	0.214	0.219
8	0.243	0.269	0.235	0.233
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.225		0.225	
Spiked level (mg/kg)	---		0.20	
Blank (mg/kg)	---		0.03	
Recovery ^{b)} (%)	---		97.6	
RSD _r ^{c)} (%)	6.6		2.8	
RSD _R ^{d)} (%)	9.4		6.3	
PRSD _R ^{e)} (%)	20		20	
HorRat	0.47		0.31	

a) $n = 16$

b) Blank value was subtracted in calculation of recovery.

c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

e) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 6 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 Quatro Premier XE	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm × 250 mm, 5 μm)
3	LC: Waters 2695 Alliance MS: Micromass Quattro micro API	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm × 250 mm, 5 μm)
4	Waters ACQUITY TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm × 250 mm, 5 μm)
5	Shimadzu LCMS-2010EV	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm × 250 mm, 5 μm)
6	Shimadzu LCMS-2010EV	Chemicals Evaluation and Research Institute L-column2 ODS (3.0 mm × 250 mm, 5 μm)
7	Agilent Technologies 1100 Series G1956B	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm × 250 mm, 5 μm)
8	LC: Agilent Technologies 1100 Series MS: Applied Biosystems API2000	Tosoh ODS-120A (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)

4 まとめ

愛玩動物用飼料（ドライ製品及びセミドライ製品）中のデオキシニバレノールについて、LC-MSを用いた食品分析センター法の精製操作の一部を簡素化し、更に抽出前に加温操作を加えた方法を検討し、愛玩動物用飼料等の検査法への適用の可否について、妥当性の確認を行い、次の結果が得られたことから、適用が可能であると考えられた。

- 1) 振とう抽出前に 60 °C で 60 分加温・膨潤させることにより、犬用及び猫用のドライ製品でより高い定量値が得られる試料が認められた。
- 2) 検量線は、0.01~1 μg/mL（注入量として 0.05~5 ng）の範囲で直線性を示した。
- 3) 食品分析センター法においてクロロホルムを必要とする合成ケイ酸マグネシウムミニカラムによる精製操作を省略し、抽出液を 2 倍希釈後に多機能カラムによる精製を行い、更に抽出前に加温・膨潤操作を加えても、妨害ピークは現れず、選択性の規準を満たしていた。
- 4) 本法により添加回収試験を実施した結果、真度及び併行精度の規準を満たしていた。
- 5) 本法の定量下限は、試料中 0.1 mg/kg、検出限界は 0.03 mg/kg であった。
- 6) 本法により 4 種の試料を用いて 8 試験室で共同試験を実施した結果、室間再現精度の規準を満たしていた。

謝 辞

共同試験に参加していただいた財団法人日本食品分析センター多摩研究所及び日本ハム株式会社中央研究所における関係者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 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).
- 2) 農林水産省令・環境省令：愛がん動物用飼料の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令，平成 23 年 9 月 1 日，農林水産省令・環境省令第 3 号 (2011).
- 3) 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).
- 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，47-72 (2010).
- 5) 吉村 哲史，高橋 雄一，山多 利秋：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，飼料研究報告，36，114-119 (2011).
- 6) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, Pure & appl. Chem., 67 (2), 331-343 (1995).