

技術レポート

1 かび毒の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による一斉分析法の植物性油かす類に対する妥当性確認

鈴木 知華^{*1}, 名塚 英一^{*2}, 加藤 耕一^{*3}, 青山 幸二^{*1}

Method Validations of the Simultaneous Determination Method of Mycotoxins by LC-MS/MS for Oil Meals

Chika SUZUKI^{*1}, Eiichi NAZUKA^{*2}, Koichi KATO^{*3} and Koji AOYAMA^{*1}

(^{*1} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

^{*2} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sendai Regional Center

^{*3} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

(Now Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan))

1 緒 言

飼料分析基準¹⁾に既記載であるかび毒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。）による一斉分析法（以下「本法」という。）は、適用範囲を飼料としており、単体飼料から配合飼料まで飼料全般を対象にした定量法となっている。しかし、分析法開発時には、大豆油かす等の植物性油かす類に対する妥当性を確認していない²⁾。そこで、そうこう類及び植物性油かす類の中から米ぬか油かす、コーングルテンミール、大豆油かす及びなたね油かすを選択し、本法のこれらの試料に対する妥当性を確認した。なお、本法の測定対象物質 16 成分のうち、主要な 9 成分（Table 1）のかび毒について試験を行った。

2 実験方法

2.1 試 料

米ぬか油かす、コーングルテンミール、大豆油かす及びなたね油かすをそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉砕した。

2.2 試 薬

1) アセトニトリルは LC-MS 用を用いた。酢酸アンモニウム溶液は 1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 LC 用（和光純薬工業製）を用いた。水は超純水（JIS K 0211 に定める 5218 の超純水）を用いた。

2) かび毒混合標準液

ステリグマトシスチン、デオキシニバレノール及びニバレノールについては、和光純薬工業

^{*1} 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

^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター

^{*3} 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， 現 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課

製標準品を正確に量って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ものを標準原液とした。各標準原液の濃度を Table 1 に示す。アフラトキシン B₁、アフラトキシン B₂、アフラトキシン G₁ 及びアフラトキシン G₂ は市販の混合標準液（各アフラトキシン 25 µg/mL, 和光純薬工業製）、ゼアラレノン及び T-2 トキシンは市販の標準液（100 µg/mL, 和光純薬工業製）を標準原液とした。

かび毒標準原液の一定量を混合し、アセトニトリル-水（21+4）で正確に希釈し低濃度及び高濃度かび毒混合標準原液を調製した。

使用に際して、低濃度及び高濃度かび毒混合標準原液をアセトニトリル-水（21+4）で正確に希釈し、更に各希釈液の一定量を同容量の酢酸（1+100）で希釈して Table 1 に示す濃度範囲の各検量線作成用かび毒混合標準液を調製した。

Table 1 Standard solutions of mycotoxins

Mycotoxins	Concentration of stock solution (µg/mL)	Concentration of mixed stock solutions		Range of concentration of mixed standard solutions for calibration		
		Lower (ng/mL)	Higher (ng/mL)	Lowest (ng/mL)	~	Highest (ng/mL)
Aflatoxin B ₁	25	50	200	0.125	~	1.0
Aflatoxin B ₂	25	50	200	0.125	~	1.0
Aflatoxin G ₁	25	50	200	0.125	~	1.0
Aflatoxin G ₂	25	50	200	0.125	~	1.0
Sterigmatocystin	50	50	100	0.125	~	0.5
Zearalenone	100	50	2500	0.125	~	12.5
T-2 toxin	100	400	800	1.0	~	4.0
Deoxynivalenol	100	2000	10000	5.0	~	50
Nivalenol	100	3000	4500	7.5	~	22.5

2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：ZM-200 Retsch 製（1 mm スクリーン，回転数 14000 rpm）
- 2) 振とう機：レシプロシェーカーSR-2W（使用時回転数 300 rpm）
- 3) 多機能カラム：MultiSep 226 AflaZon+ Romer Labs 製
- 4) LC-MS/MS：

LC-MS/MS 1 LC 部：Nexera X2 島津製作所製

MS 部：LCMS-8040 島津製作所製

LC-MS/MS 2 LC 部：ACQUITY UPLC Waters 製

MS 部：ACQUITY Xevo TQD Waters 製

LC-MS/MS 3 LC 部：1200 Agilent Technologies 製

MS 部：6410 Triple Quad LC/MS Agilent Technologies 製

LC カラム：ZORBAX Eclipse XDB-C18 Agilent Technologies 製

なお，大豆油かす及びなたね油かすは LC-MS/MS 1，米ぬか油かすは，LC-MS/MS 2，コーングルテンミールは LC-MS/MS 3 で測定した。

2.4 定量方法

飼料分析基準第 5 章第 3 節 1 の方法によった。ただし、試料採取量は 25.0 g、抽出溶媒量は 50 mL とした。

3 結果及び考察

3.1 添加回収試験

米ぬか油かす、コーングルテンミール、大豆油かす及びなたね油かすに各かび毒を添加した試料を用い、3 点併行で定量し、回収率及び繰返し精度を求めた。なお、試料が不足するため採取量は 25.0 g とした。

その結果は Table 2 のとおり、米ぬか油かすについては、ステリグマトシスチン、T-2 トキシン、デオキシニバレノール及びニバレノールで低回収となった。コーングルテンミールについては、アフラトキシン B₁、ステリグマトシスチン、T-2 トキシン及びニバレノールで低回収となった。大豆油かすについては、ニバレノールで低回収となった。なたね油かすについては、T-2 トキシン以外の 8 成分で低回収又は過回収となった。なお、LC-MS/MS 測定時のモニターイオンは、本法に示す例によるプリカーサーイオン及びプロダクトイオンを用いたが、米ぬか油かすの試験においてデオキシニバレノールのモニターイオン (m/z : 355 > 295) 及びニバレノールのモニターイオン (m/z : 371 > 281) において定量を妨害するピーク及びベースラインの乱れが認められ、定量が困難であったため、デオキシニバレノールではモニターイオン (m/z : 295 > 265) を、ニバレノールではモニターイオン (m/z : 311 > 281) を用いても測定を行った。これらの結果から、本法をそうこう類及び植物性油かす類に適用する場合、真度、精度等を確認する必要があることが示唆された。

Table 2 Recoveries for mycotoxins

Mycotoxins	Spiked level (µg/kg)	Feed types							
		Soybean meal		Rapeseed meal		Defatted rice bran		Corn gluten meal	
		Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
Aflatoxin B ₁	1	102	3.4	48.0	13	73.5	8.2	41.4	4.0
	4	106	6.2	41.4	2.2	73.1	3.0	46.1	3.0
Aflatoxin B ₂	1	102	3.9	32.8	20	71.4	18	74.4	4.5
	4	108	5.8	28.8	16	74.7	14	72.7	1.5
Aflatoxin G ₁	1	96.4	4.0	41.8	4.6	75.7	3.2	81.4	9.0
	4	93.9	1.3	29.8	16	75.8	5.4	74.0	3.2
Aflatoxin G ₂	1	90.4	6.5	0	—	78.9	13	88.1	16
	4	86.5	3.0	0	—	90.0	7.0	78.6	3.8
Sterigmatocystin	1	109	7.5	72.8	10	49.8	3.0	60.3	3.3
	2	97.9	3.6	62.3	2.8	47.9	1.7	54.1	5.8
Zearalenone	1	— ^{c)}	— ^{c)}	171	3.9	73.4	14	— ^{c)}	— ^{c)}
	50	103	4.9	98.0	1.1	105	0.9	119	13
T-2 toxin	8	99.3	4.8	74.3	3.6	70.0	2.9	68.7	2.2
	16	107	0.6	76.4	5.6	61.2	3.9	70.2	0.1
Deoxynivalenol	40	109	0.7	49.8	23	— ^{f)}	69.6 ^{d)}	— ^{f)}	7.2 ^{d)}
	200	99.2	1.5	61.6	2.7	90.1	59.3 ^{d)}	3.2	3.2 ^{d)}
Nivalenol	60	55.7	13	17.0	173	63.3	44.7 ^{e)}	57	8.5 ^{e)}
	90	57.8	9.1	71.4	26	87.8	67.1 ^{e)}	20	6.9 ^{e)}

Colored cells stand for recoveries of less than 70 % or more than 120 %, and RSD_r of more than 20 %.

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

c) The test could not be conducted because of lack of uncontaminated samples.

d) The value of deoxynivalenol was determined by another monitor ion (m/z : 295 > 265).

e) The value of nivalenol was determined by another monitor ion (m/z : 311 > 281).

f) The determination could not be conducted because the baseline became unstable.

4 まとめ

植物性油かす類について、かび毒の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による一斉分析法の妥当性を確認した結果、試料及びかび毒の組み合わせによっては回収率の低下等が認められた。

文 献

- 1) 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 (2006).
- 2) 福中 理絵，平岡 久明：高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による飼料中の 11 種類のかび毒の一斉分析法，飼料研究報告，31，8-30 (2006).