

2 稲発酵粗飼料中のデオキシニバレノール及びゼアラレノンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法の開発

鈴木 知華*

Development of Determination Method of Deoxynivalenol and Zearalenone in Whole-Crop Rice Silage by LC-MS/MS

SUZUKI Chika*

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

This paper presents the results of a validation I have conducted for developing a quantitative determination method of the concentration of deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEN) in whole-crop rice silage (WCRS) using a liquid-chromatograph atmospheric-pressure-chemical-ionization tandem mass spectrometer (LC-APCI-MS/MS).

DON and ZEN were extracted with acetonitrile-water (21:4), and the extracted solution was centrifuged. The supernatant (1 mL) was then diluted with acetonitrile-water (21:4) to a volume of 20 mL. The diluted solution was purified with a SPE column (InertSep VRA-3, GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan), and the purified solution was used for LC-MS/MS determination of ZEN. As for DON, the purified solution was further purified with graphite carbon to obtain a sample solution. Sample solutions thus obtained from each process of DON and ZEN were respectively injected into a LC-MS/MS to determine the concentration of DON and ZEN. LC separation was then carried out on an ODS column (InertSustain C18, 3.0 mm i.d. × 50 mm, 2 μm, GL Sciences Inc.) with a gradient of 2 mmol/L ammonium acetate aqueous solution and 2 mmol/L ammonium acetate methanol solution for DON; and 2 mmol/L ammonium acetate aqueous solution and acetonitrile for ZEN as a mobile phase respectively. In the MS/MS analysis, the negative mode atmospheric pressure chemical ionization (APCI-) was used.

Recovery tests were conducted on WCRS. WCRS was added with 0.2 and 4 mg/kg of DON, and 0.04 and 1 mg/kg of ZEN respectively. The resulting mean recoveries ranged from 97.9 % to 107 %, and the repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was less than 3.9 % for DON, while the mean recoveries ranged from 100 % to 110 %, and RSD_r was less than 12 % for ZEN.

Key words: deoxynivalenol; zearalenone; liquid-chromatograph tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); atmospheric pressure chemical ionization (APCI); whole-crop rice silage

キーワード：デオキシニバレノール；ゼアラレノン；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；大気圧化学イオン化法；稲発酵粗飼料

1 緒 言

飼料自給率の向上は、食料自給率向上の重要な施策として位置付けられ、稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という。）を含む国産粗飼料の増産対策が積極的に行われている。その一方で、飼料作物サイレージからデオキシニバレノール（以下「DON」という。）、ゼアラレノン（以下「ZEN」という。）等のかび毒が検出されており¹⁾、農林水産省が委託事業として平成 24 年度から汚染実

* 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

態調査事業を実施している。飼料分析基準²⁾に記載されている DON 及び ZEN を含むかび毒一斉分析法はとうもろこしサイレージへの適用が困難であることが確認されており³⁾，上記の汚染実態調査事業では，事業者が独自に開発した分析法^{4)~8)}が用いられている。

飼料の有害物質の指導基準及び管理基準⁹⁾において，DON については反すう動物（ほ乳期のものを除く．）に給与される飼料中で 4 mg/kg 並びに家畜（反すう動物（ほ乳期のものを除く．）を除く．）及び家きんに給与される飼料中で 1 mg/kg，ZEN については家畜及び家きんに給与される飼料中で 1 mg/kg の管理基準値が設定されており，将来的に国産粗飼料が管理基準値を遵守していることを確認するための分析法を定めておく必要があると考えられる。

このため，令和元年度に大島らは，汚染実態調査事業において平成 29 年度に一般財団法人日本食品検査が用いた分析法¹⁰⁾及び平成 30 年度に一般社団法人日本海事検定協会が用いた分析法¹¹⁾を基に，とうもろこしサイレージ中の DON 及び ZEN の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法の飼料分析基準への記載の可否を検討した¹²⁾。この分析法について，適用範囲を WCRS に拡大するための検討を行ったので，その概要を報告する。

参考に DON 及び ZEN の構造式等を Fig. 1 に示した。

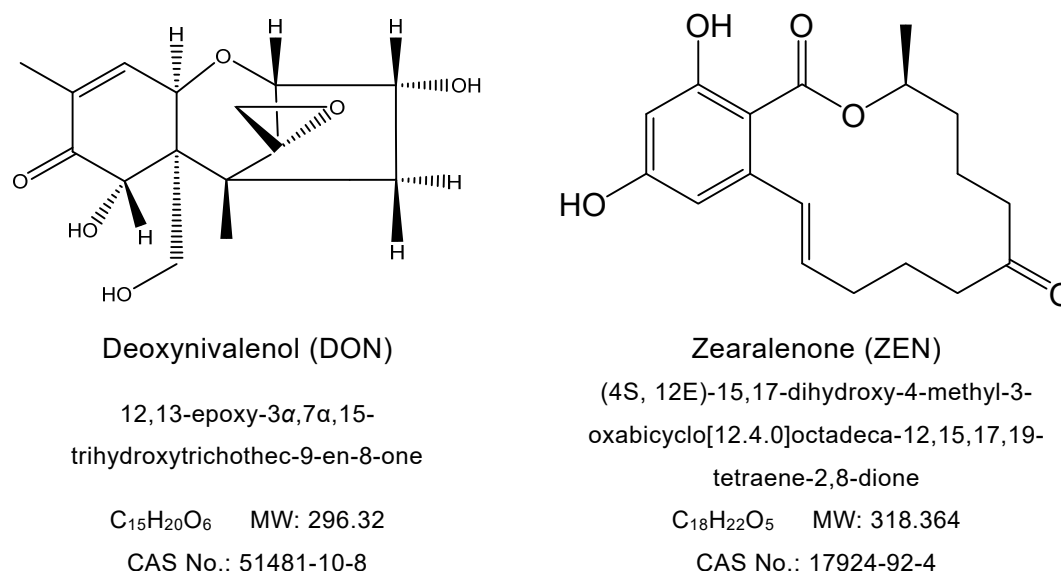


Fig. 1 Chemical structures of DON and ZEN

2 実験方法

2.1 試料

WCRS は，60 °C で 18~24 時間乾燥後，更に室内に静置して風乾した後，はさみを用いて細断したのち目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎し，分析用試料とした。

2.2 試薬

- 1) アセトニトリル及びメタノールは LC-MS 用（富士フイルム和光純薬製），グラファイトカーボン は Supelclean ENVI-Carb SPE Bulk Packing（Sigma-Aldrich 製），1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液は高速液体クロマトグラフ用（富士フイルム和光純薬製）を用いた。水は Milli-Q Advantage（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) DON 標準液

DON 標準品（富士フィルム和光純薬製，純度 100.0 %）2 mg を正確に量って 20 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 0.1 mg を含有）。

使用に際して，DON 標準原液 1 mL を 50 mL の全量フラスコに正確に入れ，更に標線までアセトニトリル-水（21+4）を加えて，1 mL 中に DON として 2 µg を含有する標準液を調製した。この標準液の一定量を，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 としてそれぞれ 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60, 80 及び 100 ng を含有する各標準液を調製した。

3) ZEN 標準液

ZEN 標準品（富士フィルム和光純薬製，純度 100.0 %）2 mg を正確に量って 20 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 ZEN 標準原液を調製した（この液 1 mL は，ZEN として 0.1 mg を含有）。

使用に際して，ZEN 標準原液 1 mL を 50 mL の全量フラスコに正確に入れ，更に標線までアセトニトリル-水（21+4）を加えて，1 mL 中に ZEN として 2 µg を含有する標準液を調製した。この標準液の一定量を，アセトニトリル-水（21+4）で正確に希釈し，1 mL 中に ZEN としてそれぞれ 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40 及び 50 ng を含有する各標準液を調製した。

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) 振とう機：ストロングシェイカーSR-2DW タイテック製（使用時振とう数 300 rpm）
- 3) 多機能カラム：InertSep VRA-3（リザーバー容量 6 mL）ジーエルサイエンス製
- 4) メンブランフィルター：13HP020AN（孔径 0.20 µm，直径 13 mm，ポリテトラフルオロエチレン）東洋濾紙製
- 5) LC-MS/MS：
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

分析試料 25.0 g を量って 500 mL の共栓三角フラスコに入れ，アセトニトリル-水（21+4）250 mL を加え，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，1600×g で 5 分間遠心分離し，上澄み液 1 mL を 20 mL の全量フラスコに正確に入れた。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 1 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 1 mL を受け，LC-MS/MS による ZEN の測定に供する試料溶液とした。更に，別の 10 mL の試験管をカラムの下に置き，その後の流出液 3 mL を受け，精製に供する試料溶液とした。

3) 精製

試料溶液をあらかじめグラファイトカーボン 200 mg を入れた 15 mL の遠心チューブに入れ、1 分間振り混ぜた。1600×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液 2 mL を 10 mL の試験管に正確に入れ、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) 0.5 mL を正確に加えて残留物を溶かし、メンブランフィルターでろ過し、LC-MS/MS による DON の測定に供する試料溶液とした。

4) LC-MS/MS による測定

試料溶液、各 DON 標準液及び各 ZEN 標準液 5 µL を LC-MS/MS 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 1 及び Table 2 に示した。液体クロマトグラフ部において、DON 及び ZEN の溶離液の条件を変え、Table 1 のとおりそれぞれ溶離液 1 及び 2 の条件で測定した。

Table 1 Operation conditions of LC-MS/MS

Column	InertSustain C18 (3.0 mm i.d. × 50 mm, 2 µm), GL Sciences
Mobile phase 1 (DON)	2 mmol/L ammonium acetate aqueous solution-2 mmol/L ammonium acetate methanol solution (19:1) (hold for 1 min) → 9 min → (1:19) (hold for 5.5 min) → 0.1 min → (19:1) (hold for 4.4 min)
Mobile phase 2 (ZEN)	2 mmol/L ammonium acetate aqueous solution-acetonitrile (7:3) (hold for 1 min) → 4 min → (1:19) (hold for 7 min) → 0.1 min → (7:3) (hold for 4.9 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Atmospheric pressure chemical ionization (APCI)
Mode	Negative
Nebulizer gas	Air (DON 2.5 L/min, ZEN 4 L/min)
Drying gas	N ₂ (DON 6 L/min, ZEN 5 L/min)
Interface temperature	DON 400 °C, ZEN 350 °C
Heat block temperature	200 °C
Desolvation line temperature	250 °C
Collision gas	Ar (230 kPa)

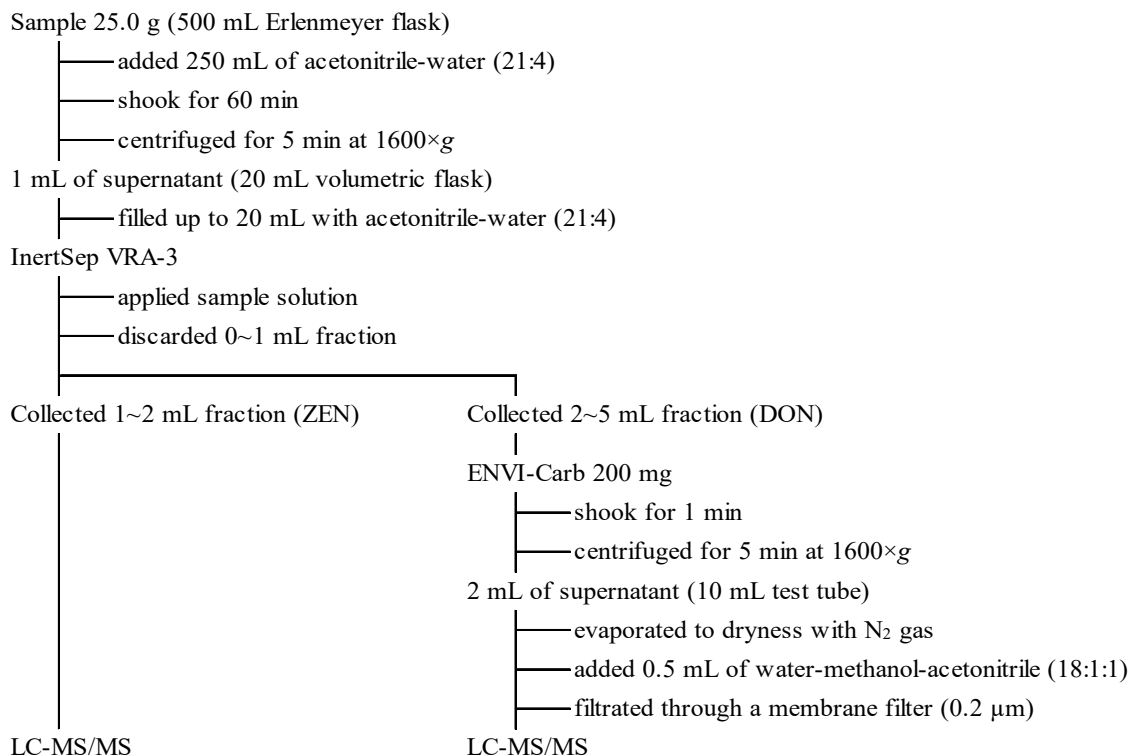
Table 2 MS/MS parameters

Target	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion		Collision energy (eV)
		Quantifier (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)	
DON	295	265	-	11
	355	-	265	15
ZEN	317	131	-	29
		-	175	23

5) 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 量及び ZEN 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 DON and ZEN in WCRS

2.5 添加回収試験

DON は、DON 標準品（富士フィルム和光純薬製、純度 100.0 %）9 mg を正確に量って 20 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 添加用標準液を調製した（この液 1 mL は、DON として 0.45 mg を含有）。同標準液をアセトニトリルで正確に希釈し添加した。

ZEN は、2.2 の 2) の ZEN 標準原液をアセトニトリルで正確に希釈し添加した。

WCRS について、DON として、原物換算して 0.2 及び 4 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 8 及び 180 ng/mL）、ZEN として、原物換算して 0.04 及び 1 mg/kg 相当量（同 0.4 及び 10 ng/mL）になるようにそれぞれ添加後よく混合し、一夜静置した後に 2.4 に従って定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

なお、添加は風乾物試料に対して DON として 0.4 及び 9 mg/kg 相当量、ZEN として 0.08 及び 2 mg/kg 相当量になるように行い、原物中濃度への換算は、原物中及び風乾物中の水分含有量を 60 % 及び 10 % と想定して、原物（水分含有量 60 %）中濃度 = 風乾物（水分含有量 10 %）中濃度 / 2.25 の式により行った。また DON として 9 mg/kg 相当量添加した場合、最終試料溶液中濃度が検量線の最高濃度（100 ng/mL）を超えるため、水-メタノール-アセトニトリル（18+1+1）で 3 倍希釈し測定した。

3 結果及び考察

3.1 妨害物質の検討

WCRS 2 検体を用い、本法により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムを確認した結果、定量を妨げるピークは認められなかった。

本検討により得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した。

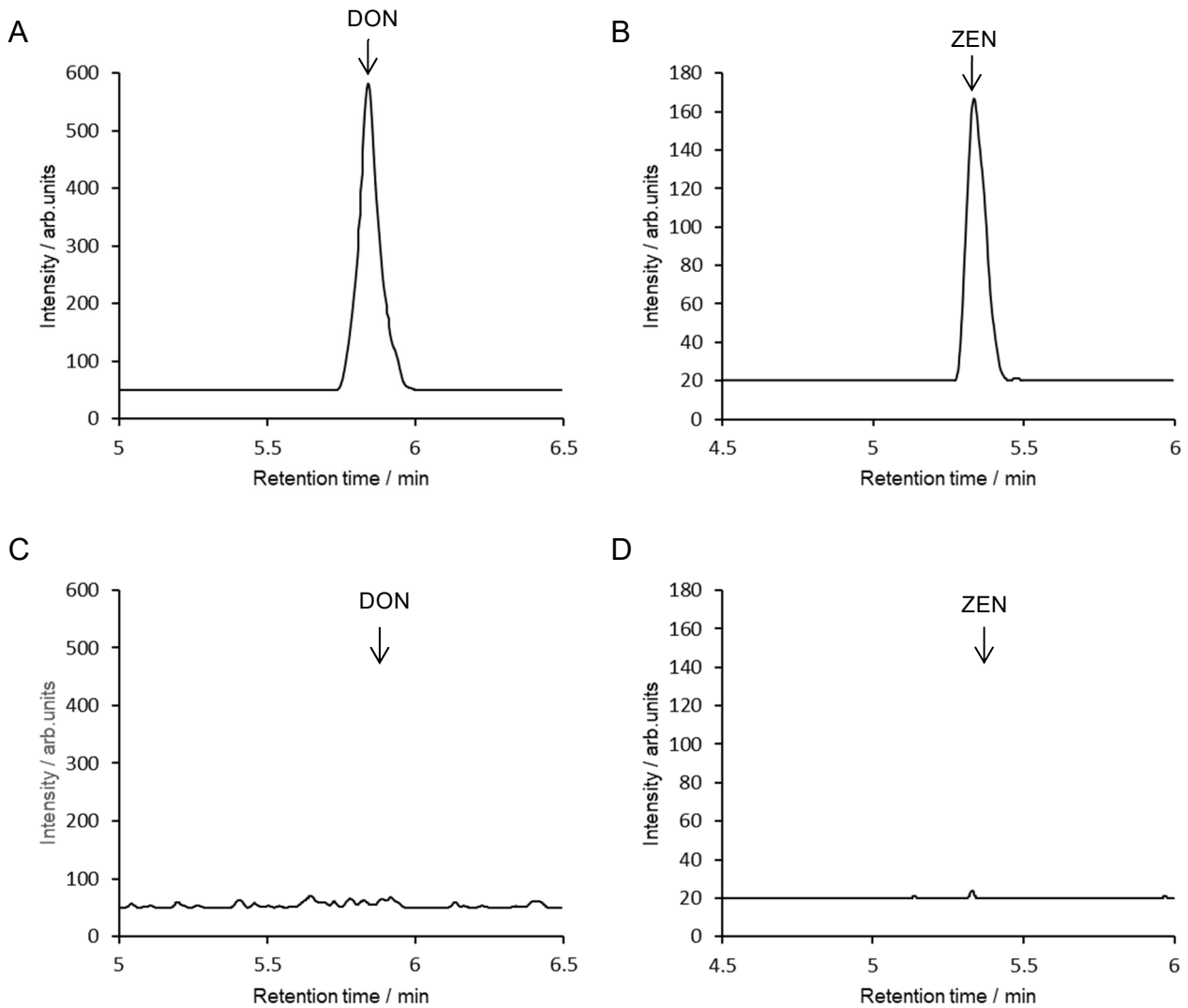


Fig. 2 Typical selected reaction monitoring (SRM) chromatograms of DON and ZEN in standard and blank sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrows indicate the retention times of mycotoxins.)

- A: Standard solution (8 ng/mL as DON)
- B: Standard solution (0.4 ng/mL as ZEN)
- C: Sample solution of DON from WCRS (blank)
- D: Sample solution of ZEN from WCRS (blank)

3.2 マトリックス効果の確認

2.4 の 1)~3)により調製した WCRS のブランク試料溶液に DON として 4 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 80 ng/mL 相当量）を添加したマトリックス標準液、2.4 の 1)~2)により調製した WCRS のブランク試料溶液に ZEN として 2 mg/kg 相当量（同 10 ng/mL 相当量）を添加したマトリックス標準液について、2.2 の 2)及び 3)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

積比を確認したところ、Table 2 のとおりであり、各かび毒は試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。

Table 2 Matrix effect study

Mycotoxins	Concentration of mycotoxins		Matrix effect ^{b)} (%)	
	in matrix standard solution (ng/mL)	in sample ^{a)} (mg/kg air-dry basis)	WCRS 1	WCRS 2
DON	80	4	102	97.1
ZEN	10	2	106	111

$n = 3$

a) Converted from the concentration in matrix standard solution

b) Ratio of peak area of pesticides in the presence of matrix to that in the absence of matrix

3.3 添加回収試験

2.5 により添加回収試験を実施した。その結果は Table 3 のとおり、DON については平均回収率 97.9~107 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 3.9 %以下、ZEN については平均回収率 100~110 %、 RSD_r はとして 12 %以下の成績が得られ、飼料分析基準別表 3 の試験法の妥当性確認法ガイドライン (以下「妥当性確認法ガイドライン」という。) に定められた真度及び併行精度の目標値 (真度 : 70 %以上 120 %以下、精度 : 0.04 mg/kg では 22 %以下、0.2 mg/kg では 20 %以下、1 mg/kg では 16 %以下、4 mg/kg では 13 %以下) を満たす良好な結果であった。

なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig.3 に示した。

Table 3 Recoveries for DON and ZEN

Mycotoxin	Spiked level (mg/kg as fed basis) ^{a)}	WCRS 1		WCRS 2	
		Recovery ^{b)} (%)	RSD_r ^{c)} (%)	Recovery ^{b)} (%)	RSD_r ^{c)} (%)
DON	0.2	105	3.9	107	1.8
	4	97.9	2.8	98.0	2.6
ZEN	0.04	100	12	107	9.9
	1	108	2.7	110	4.2

a) The mycotoxins were spiked to air-dried WCRS samples one night prior to extraction. The spiked levels were 0.4 and 9 mg/kg as air-dry basis for DON and 0.08 and 2 mg/kg as air-dry basis for ZEN respectively. The levels of mycotoxins as fed basis were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of WCRS samples was 60 % as fed basis and 10 % as air-dry basis.

The levels of mycotoxins as fed basis (moisture 60 %)

= the levels of mycotoxins as air-dry basis (moisture 10 %) / 2.25

b) Mean ($n = 5$)

c) Relative standard deviation of repeatability

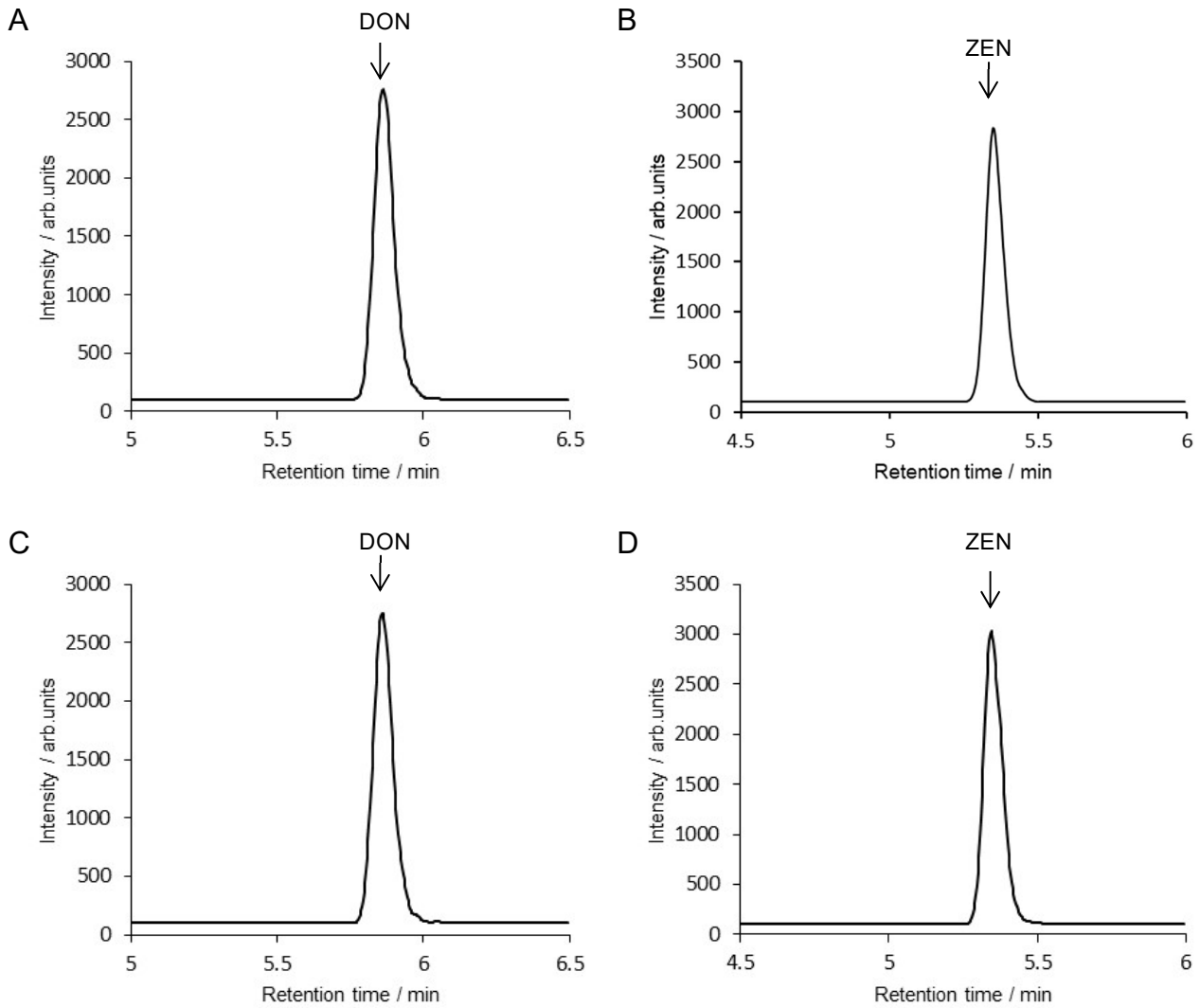


Fig. 3 Typical SRM chromatograms of DON and ZEN in standard and spiked sample solutions (LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrows indicate the peaks of mycotoxin.)

A: Standard solution (60 ng/mL of DON (0.3 ng as injection amount))

B: Standard solution (10 ng/mL of ZEN (0.05 ng as injection amount))

C: Sample solution of WCRS (spiked at 1.3 mg/kg as fed basis of DON (0.3 ng as injection amount))

D: Sample solution of WCRS (spiked at 1 mg/kg as fed basis of ZEN (0.05 ng as injection amount))

3.4 定量下限及び検出下限

検量線が直線性を示した範囲，DON においては 4~100 ng/mL の下端付近となる濃度（WCRS 風乾物中で 0.4 mg/kg 相当量（最終試料溶液中濃度 8 ng/mL 相当量），ZEN においては 0.1~50 ng/mL の下端付近となる濃度（WCRS 風乾物中で 0.08 mg/kg 相当量（最終試料液中濃度 0.4 ng/mL 相当量））の添加回収試験の結果は良好であり，得られたピークの SN 比が 10 以上であったため，DON 及び ZEN の定量下限の濃度は WCRS の風乾物中でそれぞれ 0.4 及び 0.08 mg/kg とした。この濃度は，DON 及び ZEN の WCRS 中の管理基準値（DON については最も低い値）の風乾物中換算値（2 mg/kg）に対してそれぞれ 1/5 及び 1/25 であり，妥当性確認法ガイドラインに

定められた目標値（基準値の 1/5 以下）を満たしていた。

本法の検出下限を確認するため、添加回収試験により得られたピークの SN 比が 3 となる濃度を求めた。その結果、検出下限は風乾物中で DON 0.1 mg/kg, ZEN 0.04 mg/kg であり、同様に妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値（基準値の 1/10 以下）を満たしていた。

4 まとめ

WCRS 中の DON 及び ZEN について、前報を基に、LC-MS/MS を用いた分析法の飼料分析基準への収載の可否について検討したところ、以下の結果が得られた。

- 1) 本検討で用いた WCRS 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。
- 2) 本法に従い得られた試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果、DON 及び ZEN は試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。
- 3) WCRS に、DON として原物換算して 0.2 及び 4 mg/kg 相当量、ZEN として原物換算して 0.04 及び 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、妥当性確認法ガイドライン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) 本法の DON の定量下限は風乾物中で 0.4 mg/kg, 検出下限は 0.1 mg/kg, ZEN の定量下限は風乾物中で 0.08 mg/kg, 検出下限は 0.04 mg/kg であった。設定した定量下限及び検出下限は、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値を満たしていた。

文 献

- 1) 平岡 久明：飼料中のマイコトキシン汚染状況，臨床獣医，25(6)，10-17 (2007)。
- 2) 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)。
- 3) 伊藤 千晶，佐藤 憲大：とうもろこしサイレーン中のかび毒定量法に関する検討～アフラトキシン B₁，ゼアラレノン及びデオキシニバレノール～，飼料研究報告，42，87-100 (2017)。
- 4) 財団法人日本食品分析センター：平成 24 年度飼料中の有害物質等の含有量実態調査事業（重金属，かび毒）報告書，平成 25 年 3 月 (2013)。
- 5) 一般財団法人日本食品分析センター：平成 25 年度飼料中の有害物質等の含有量実態調査事業（重金属，かび毒）報告書，平成 26 年 3 月 (2014)。
- 6) 一般財団法人日本食品分析センター：平成 26 年度飼料中のかび毒含有量実態調査事業実態調査報告書，平成 27 年 3 月 (2015)。
- 7) 一般財団法人日本食品分析センター：平成 27 年度生産資材安全確保対策事業「国産飼料中のかび毒含有実態調査委託事業」報告書，平成 28 年 3 月 (2016)。
- 8) 一般財団法人日本冷凍食品検査協会：平成 28 年度生産資材安全確保対策事業「国産飼料中のかび毒含有実態調査委託事業」報告書，平成 29 年 2 月 (2017)。
- 9) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988)。

- 10) 一般財団法人日本食品検査：平成 29 年度生産資材安全確保対策事業（国産飼料中のかび毒含有実態調査）報告書，平成 30 年 1 月 (2018).
- 11) 一般社団法人日本海事検定協会：平成 30 年度生産資材安全確保対策事業（国産飼料中のかび毒含有実態調査）成果報告書，平成 31 年 1 月 (2019).
- 12) 大島 慎司，田端 麻里，青山 幸二：どうもろこしサイレージ中のデオキシニバレノール及びゼアラレノンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法の開発，飼料研究報告，45, 39-50 (2020).