

4 そうこう類及び植物性油かす類中のアフラトキシン, ステリグマトシスチン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検討

山上 陽平^{*1}, 井上 直^{*2}, 齊木 雅一^{*2}, 中村 信仁^{*3}, 小塚 健志^{*1}, 青山 幸二^{*1}

Study of Determination Method of Aflatoxin, Sterigmatocystin and Zearalenone
in Brans and Food Processing By-products, and Oil Seed Meals for Feed by LC-MS/MS

YAMAGAMI Yohei^{*1}, INOUE Tadashi^{*2}, SAIKI Masakazu^{*2}, NAKAMURA Nobuhito^{*3},
KOZUKA Kenji^{*1} and AOYAMA Koji^{*1}

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

^{*2} Sapporo Regional Center, (FAMIC),

^{*3}Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC (Current affiliation: Agricultural Chemicals Inspection
Department, FAMIC))

A quantitative determination method using a liquid-chromatograph electrospray-ionization tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS) was studied to determine the concentrations of aflatoxins (AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂), sterigmatocystin (STC), and zearalenone (ZEN) in brans and food processing by-products, and oil seed meal.

An extraction solvent in the method, compiled in the Feed Analysis Standard of Japan, was modified to reduce matrix effects. The matrix effects tended to decrease as the proportion of water in the extraction solvent decreased. However, extraction efficiency of mycotoxins also decreased.

At the same time, matrix effects and recovery rates of each mycotoxin in the effluent fraction were also confirmed using a purification column (Captiva EMR Mycotoxins, Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA) and an LC column (Inertsil Ph, GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan), which are different from the method compiled in the Feed Analysis Standard of Japan. Among aflatoxins and ZEN, ion suppression of AFB₁, AFG₂ and ZEN was observed due to the sample matrix in some of the sample fractions, while AFB₁ and AFB₂ showed low recovery in some of the sample fractions. However, these matrix effects and recovery rates were within the acceptable range. On the other hand, ion enhancement of STC due to the sample matrix was observed in many of the samples. For future studies, the recovery rate of STC in each sample will be evaluated using a stable isotope-labeled STC.

Key words: aflatoxin; sterigmatocystin; zearalenone; liquid-chromatograph tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); brans and food processing byproduct; oil seed meal; corn dried distillers grains with solubles

キーワード：アフラトキシン；ステリグマトシスチン；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；エレクトロスプレーイオン化法；そうこう類；植物油かす類；とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル

^{*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札幌センター

^{*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 農薬検査部

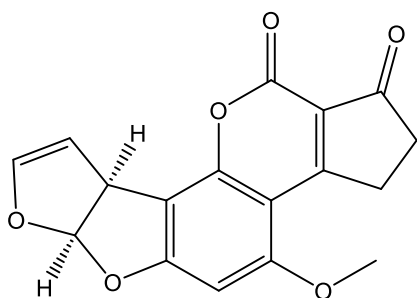
1 緒 言

現在，独立行政法人農林水産消費安全技術センターでは，かび毒のうちアフラトキシン，ステリグマトシスチン及びゼアラレノンの分析は，飼料分析基準¹⁾第5章第3節1の「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」（以下「かび毒一斉法」という．）を中心に実施している．しかし，そうこう類及び植物性油かす類の一部はかび毒一斉法において，飼料分析基準別紙2「試験法の妥当性確認ガイドライン」による真度等の目標値を満たさないものがあることから²⁾，他の分析法により分析を実施している，もしくは分析を実施していない成分がある．アフラトキシン及びゼアラレノンは配合飼料等で基準値³⁾が設定されており，ステリグマトシスチンは農林水産省の「サーベイランス・モニタリング中期計画」で調査対象として取り上げられている．従って，そうこう類及び植物性油かす類中のアフラトキシン，ステリグマトシスチン及びゼアラレノンについて，効率的な分析の実施及び分析を実施していない成分への対応のため，新規分析法を確立する必要がある．

令和4年度に渡辺ら⁴⁾は，とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル（以下「DDGS」という．）を対象として塩析を用いた新規分析法を検討した際に，アフラトキシン G₁ 等においてマトリックス効果が認められたため，マトリックス効果低減の検討を行ったが，改善には至らなかった．

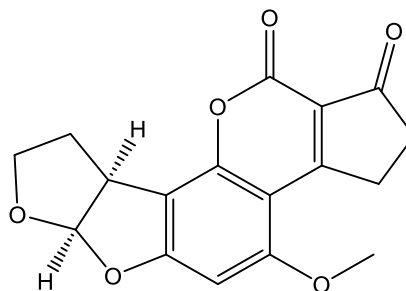
そこで，今回，そうこう類及び植物性油かす類中のアフラトキシン，ステリグマトシスチン及びゼアラレノンを液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（以下「LC-MS/MS」という．）により定量する方法について，抽出溶媒及び精製カラムを検討した結果を報告する．

参考にあフラトキシン，ステリグマトシスチン及びゼアラレノンの構造式等を Fig. 1 に示した．

Aflatoxin B₁

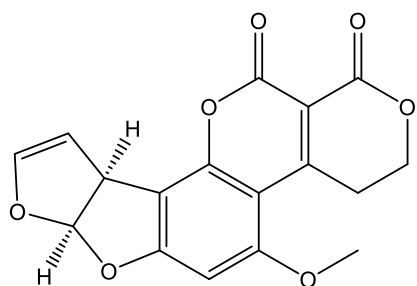
(6a*R*,9a*S*)-2,3,6a,9a-tetrahydro-4-methoxycyclopenta[*c*]furo[3',2':4,5]furo[2,3-*h*][1]benzopyran-1,11-dione

C₁₇H₁₂O₆ MW: 312.06 CAS No.: 1162-65-8

Aflatoxin B₂

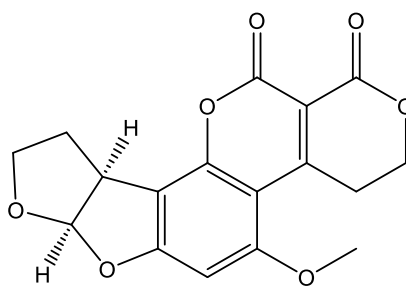
(6a*R*,9a*S*)-2,3,6a,8,9,9a-hexahydro-4-methoxy-cyclopenta[*c*]furo[3',2':4,5]furo[2,3-*h*][1]benzopyran-1,11-dione

C₁₇H₁₄O₆ MW: 314.08 CAS No.: 7220-81-7

Aflatoxin G₁

(7a*R*,10a*S*)-3,4,7a,10a-tetrahydro-5-methoxy-1*H*,12*H*-furo[3',2':4,5]furo[2,3-*h*]pyrano[3,4-*c*][1]benzopyran-1,12-dione

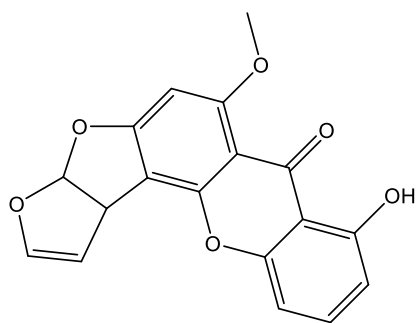
C₁₇H₁₂O₇ MW: 328.06 CAS No.: 1165-39-5

Aflatoxin G₂

(7a*R*,10a*S*)-3,4,7a,9,10,10a-hexahydro-5-methoxy-1*H*,12*H*-furo[3',2':4,5]furo[2,3-*h*]pyrano[3,4-*c*][1]benzopyran-1,12-dione

C₁₇H₁₄O₇ MW: 330.07 CAS No.: 7241-98-7

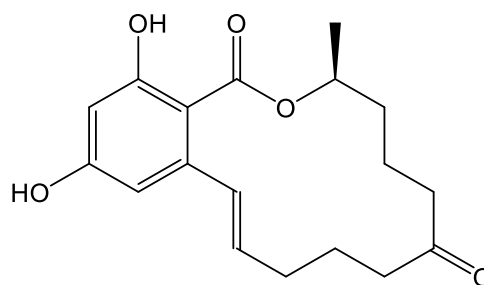
Sterigmatocystin



(3a*R*-*cis*)3a,12c-dihydro-8-hydroxy-6-methoxy-7*H*-furo[3',2':4,5]furo[2,3-*c*]xanthen-7-one

C₁₈H₁₂O₆ MW: 324.28 CAS No.: 10048-13-2

Zearalenone



(4*S*,12*E*)-15,17-dihydroxy-4-methyl-3-oxabicyclo[12.4.0]octadeca-12,15,17,19-tetraene-2,8-dione

C₁₈H₂₂O₅ MW: 318.36 CAS No.: 17924-92-4

Fig. 1 Chemical structures of aflatoxins, sterigmatocystin and zearalenone

2 実験方法

2.1 試料

米ぬか油かす，コーングルテンフィード，DDGS，ふすま，麦ぬか，コーングルテンミール，大豆油かす及びなたね油かすはそれぞれ目開き 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

2.2.1 2.4.1 及び 2.4.2 には以下の 1)~6)の試薬を用いた。

- 1) アセトニトリルは LC/MS 用（富士フイルム和光純薬製）を用いた。酢酸アンモニウムは HPLC 用 1 mol/L 水溶液（富士フイルム和光純薬製）を用いた。水は LC/MS 用（富士フイルム和光純薬製）を用いた。
- 2) アフラトキシン標準原液
市販のアフラトキシン（B₁，B₂，G₁，G₂）混合標準液（各アフラトキシン 25 µg/mL，富士フイルム和光純薬製）をアフラトキシン標準原液とした。
- 3) ステリグマトシスチン標準原液
ステリグマトシスチン標準品（富士フイルム和光純薬製，純度 98.2 %）5 mg を量って 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，更に標線までアセトニトリルを加えてステリグマトシスチン標準原液を調製した（この液 1 mL は，ステリグマトシスチンとして 0.25 mg を含有）。
- 4) ゼアラレノン標準原液
ゼアラレノン標準品（富士フイルム和光純薬製，純度 99.7 %）5 mg を量って 100 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，更に標線までアセトニトリルを加えてゼアラレノン標準原液を調製した（この液 1 mL は，ゼアラレノンとして 0.05 mg を含有）。
- 5) 添加用アフラトキシン標準液
アフラトキシン標準原液の一部を，アセトニトリルで正確に希釈し，保管用標準液を調製した。使用に際して，保管用標準液の一部をアセトニトリルで正確に希釈し，1 mL あたりアフラトキシン B₁，B₂，G₁ 及び G₂ としてそれぞれ 25 ng を含む添加用アフラトキシン標準液を調製した。
- 6) 検量線作成用ステリグマトシスチン及びゼアラレノン混合標準液
ステリグマトシスチン標準原液及びゼアラレノン標準原液の一部を混合し，アセトニトリルで正確に希釈し，検量線作成用ステリグマトシスチン及びゼアラレノン混合標準原液を調製した。
使用に際して，検量線作成用ステリグマトシスチン及びゼアラレノン混合標準原液の一部を，アセトニトリル-水（84+16）で正確に希釈し，1 mL 中にステリグマトシスチン及びゼアラレノンとしてそれぞれ 0.1，0.125，0.25，0.5，0.75，1，2，3 及び 4 ng を含有する検量線作成用ステリグマトシスチン及びゼアラレノン混合標準液を調製した。

2.2.2 2.4.3 には以下の 1)~6)の試薬を用いた。

- 1) アセトニトリル，ギ酸，酢酸及びメタノールは LC/MS 用（富士フイルム和光純薬製）を用いた。酢酸アンモニウムは遺伝子工学研究用 10 mol/L 水溶液（ニッポンジーン製）を用いた。水は Milli-Q IQ 7005（Merck Millipore 製）により精製した超純水（JIS K 0211 の 5218 に定義さ

れた超純水)を用いた。

2) アフラトキシシン標準原液

市販のアフラトキシシン (B₁, B₂, G₁, G₂) 混合標準液 (各アフラトキシシン 25 µg/mL, 富士フイルム和光純薬製) をアフラトキシシン標準原液とした。

3) ステリグマトシスチン標準原液

ステリグマトシスチン標準品 (富士フイルム和光純薬製, 純度 99.5 %) 5.0 mg を量って 10 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, 更に標線までアセトニトリルを加えてステリグマトシスチン標準原液を調製した (この液 1 mL は, ステリグマトシスチンとして 500 µg を含有)。

4) ゼアラレノン標準原液

ゼアラレノン標準品 (富士フイルム和光純薬製, 純度 99.7 %) 2.5 mg を量って 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, 更に標線までアセトニトリルを加えてゼアラレノン標準原液を調製した (この液 1 mL は, ゼアラレノンとして 50 µg を含有)。

5) 検量線作成用かび毒混合標準液

各かび毒標準原液の一部を混合し, アセトニトリルで正確に希釈し, 検量線作成用かび毒混合標準原液を調製した。

使用に際して, 検量線作成用かび毒混合標準原液の一部を, アセトニトリル-水-酢酸 (23+76+1) で正確に希釈し, 1 mL 中にアフラトキシシン B₁, B₂, G₁, G₂ 及びステリグマトシスチンとしてそれぞれ 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 及び 20 ng, ゼアラレノンとして 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30 及び 40 ng を含有する検量線作成用かび毒混合標準液を調製した。

6) 添加用かび毒混合標準液

各かび毒標準原液の一部を混合し, アセトニトリルで正確に希釈し, 添加用かび毒混合標準原液を調製した。

添加用かび毒混合標準原液の一部を, アセトニトリルで正確に希釈し, 1 mL 中にアフラトキシシン B₁, B₂, G₁, G₂ 及びステリグマトシスチンとしてそれぞれ 2000 ng 及びゼアラレノンとして 40000 ng を含む添加用混合標準液①, 並びに 1 mL 中にアフラトキシシン B₁, B₂, G₁, G₂ 及びステリグマトシスチンとしてそれぞれ 200 ng 及びゼアラレノンとして 4000 ng を含む添加用混合標準液②を調製した。

2.3 装置及び器具

1) 粉碎機 : ZM 200 Retsch 製 (1 mm スクリーン, 使用時回転数 14000 rpm)

2) 振り混ぜ機 : レシプロシェーカー SR-2W タイテック製 (使用時振動数 300 rpm)

3) 多機能カラム :

多機能カラム 1 (2.4.1 及び 2.4.2 に使用) : MultiSep 226 AflaZon+ Romer Labs 製

多機能カラム 2 (2.4.3 に使用) : Captiva EMR Mycotoxins (600 mg) Agilent Technologies 製

4) メンブランフィルター : DISMIC-13HP (孔径 0.45 µm, 直径 13 mm, 親水性 PTFE) 東洋濾紙製

5) LC-MS/MS :

LC-MS/MS 1 (2.4.1 及び 2.4.2 に使用)

LC 部 : Nexera X2 島津製作所製

MS 部 : LCMS-8050 島津製作所製

LC-MS/MS 2 (2.4.3 に使用)

LC 部 : Nexera X2 島津製作所製

MS 部 : QTrap 4500 AB Sciex 製

2.4 定量方法

2.4.1 抽出溶媒の変更によるマトリックス効果の確認

かび毒一斉法を用い，分析試料としてコーングルテンフィードの採取量は 25 g とし，抽出溶媒はアセトニトリル-水 (100+0, 84+16, 70+30 又は 60+40) 4 種類を検討した．各抽出溶媒によるコーングルテンフィードの抽出液を多機能カラム 1 に負荷し，流出液を 2 mL ずつ分取した．分取した流出液のうち 475 μ L をそれぞれ正確にとり，添加用アフラトキシン標準液 25 μ L を添加 (各アフラトキシンとして 0.001 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 1.25 ng/mL 相当量)) し，LC-MS/MS に供する試料溶液とした．同時に 2.2.1 の 6) に従って調製した試料マトリックスを含まない同濃度の液を調製し，LC-MS/MS に供する標準液とした．試料溶液及び標準液各 10 μ L を 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て，試料溶液及び標準液のピーク面積比を確認した．測定条件は Table 1 及び 2 のとおり．

Table 1 Operating conditions of LC-MS/MS 1

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 mm i.d. $\times$ 150 mm, 5 μ m), Agilent Technologies
Mobile phase	10 mmol/L ammonium acetate aqueous solution – acetonitrile (9:1) (hold for 1 min) $\rightarrow$ 19 min $\rightarrow$ (1:4) (hold for 15 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 $^{\circ}$ C
Detector	Quadrupole mass spectrometer
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Nebulizer gas	N ₂ (2.5 L/min)
Drying gas	N ₂ (5 L/min)
Interface temperature	300 $^{\circ}$ C
Heat block temperature	200 $^{\circ}$ C
Desolvation line temperature	200 $^{\circ}$ C
Collision gas	Ar (270 kPa)

Table 2 MS/MS parameters of LC-MS/MS 1

Target	Mode	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion		Collision energy (eV)
			Quantifier (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)	
Aflatoxin B ₁	+	313	241	-	39
			-	285	24
Aflatoxin B ₂	+	315	243	-	42
			-	259	27
Aflatoxin G ₁	+	329	214	-	38
			-	200	41
Aflatoxin G ₂	+	331	217	-	37
			-	245	31
Sterigmatocystin	+	325	281	-	37
			-	310	25
Zearalenone	-	317	175	-	23
			-	131	30

2.4.2 抽出溶媒の変更による抽出効率の確認

かび毒一斉法を用い、分析試料としてとうもろこし（自然汚染試料）の採取量は 25 g とし、抽出溶媒はアセトニトリル-水（100+0, 90+10 又は 84+16）3 種類を検討した。各抽出溶媒により得られた抽出液 2.5 mL に、それぞれアセトニトリル-水（59+16, 82+18 又は 84+16）7.5 mL を加え、多機能カラム 1 に負荷する液の抽出溶媒の組成がアセトニトリル-水（84+16）となるよう希釈した。以降はかび毒一斉法に従い、得られた試料溶液を LC-MS/MS による測定に供した。試料溶液並びに検量線作成用ステリグマトシスチン及びゼアラレノン混合標準液各 10 µL を LC-MS/MS 1 に注入し、SRM クロマトグラムを得た。測定条件は Table 1 及び 2 のとおり。

2.4.3 多機能カラム 2 を用いた場合の回収率の確認

分析試料 25 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水（84+16）100 mL（ふすま及び麦ぬかは 150 mL）を加え、60 分間振り混ぜて抽出した。抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ、1700×g で 5 分間遠心分離した。上澄み液 5 mL を 10 mL の全量フラスコに正確に入れ、添加用混合標準液①25 µL を添加した（ふすま及び麦ぬかは各アフラトキシシン及びステリグマトシスチンとして 0.06 mg/kg 相当量、ゼアラレノンとして 1.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中に各アフラトキシシン及びステリグマトシスチンとして 1.875 ng/mL 相当量、ゼアラレノンとして 37.5 ng/mL 相当量）、その他の試料は各アフラトキシシン及びステリグマトシスチンとして 0.04 mg/kg 相当量、ゼアラレノンとして 0.8 mg/kg 相当量（同各アフラトキシシン及びステリグマトシスチンとして 1.25 ng/mL 相当量、ゼアラレノンとして 25 ng/mL 相当量））後、アセトニトリルで 10 mL に定容した。試料溶液を多機能カラム 2 に入れ、流出液をガラス試験管に 2 mL ずつ分取した。流出液のうち 200 µL（ふすま及び麦ぬかは 300 µL）をそれぞれ正確にとり、これらに 1 %酢酸 600 µL（ふすま及び麦ぬかは 500 µL）を正確に加え、メンブランフィルターでろ過し、LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。標準液を添加しない試料についても同様に操作した。試料溶液及び各検量線作成用かび毒混合標準液各 5 µL を LC-MS/MS 2 に注入し、SRM クロマトグラムを得た。測定条件を Table 3 及び 4 に示した。

また，マトリックス効果確認のため，標準液を添加しない試料の各画分の流出液 195 μL （ふすま及び麦ぬかは 295 μL ）をそれぞれ正確にとり，添加用混合標準液②5 μL を添加した（各アフラトキシン及びステリグマトシスチンとして 0.04 mg/kg 相当量，ゼアラレノンとして 0.8 mg/kg 相当量（同各アフラトキシン及びステリグマトシスチンとして 1.25 ng/mL 相当量，ゼアラレノンとして 25 ng/mL 相当量））後，1 %酢酸 600 μL （ふすま及び麦ぬかは 500 μL ）を正確に加え，メンブランフィルターでろ過し，LC-MS/MS 2 による測定を行った。

Table 3 Operating conditions of LC-MS/MS 2

Column	Inertsil Ph (2.1 mm i.d. $\times$ 150 mm, 5 μm), GL Sciences
Mobile phase	0.5 mmol/L ammonium acetate 0.1 % (v/v) formic acid aqueous solution- 0.5 mmol/L ammonium acetate 0.1 % (v/v) formic acid methanol solution (4:1) $\rightarrow$ 14 min $\rightarrow$ (0:10) $\rightarrow$ (4:1) (hold for 5 min)
Flow rate	0.3 mL/min
Column temperature	40 $^{\circ}\text{C}$
Detector	Quadrupole mass spectrometer
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Ion source temperature	650 $^{\circ}\text{C}$
Curtain gas	N_2 (40 psi)
Nebulizer gas	Air (70 psi)
Turbo gas	Air (70 psi)
Collision gas	N_2 (8)
Capillary voltage	Positive: 5500 V, Negative: 4500 V

Table 4 MS/MS parameters of LC-MS/MS 2

Target	Mode	Precursor ion (m/z)	Product ion		Collision energy (eV)
			Quantifier (m/z)	Qualifier (m/z)	
Aflatoxin B ₁	+	313	241	-	47
			-	285	31
Aflatoxin B ₂	+	315	259	-	39
			-	287	33
Aflatoxin G ₁	+	329	311	-	29
			-	200	51
Aflatoxin G ₂	+	331	313	-	31
			-	245	39
Sterigmatocystin	+	325	310	-	33
			-	281	49
Zearalenone	-	317	175	-	30
			-	131	36

3 結果及び考察

3.1 抽出溶媒の変更によるマトリックス効果の確認

かび毒一斉法では抽出溶媒をアセトニトリル-水（84+16）としている．この抽出溶媒の組成

を変更することによりマトリックス効果の低減が可能であるか、各アフラトキシンを対象に 2.4.1 により確認した。その結果は Fig. 2 のとおりであり、抽出溶媒における水の割合が低くなるほど試料マトリックスの測定値への影響が低減される傾向にあった。また、アセトニトリル-水 (100+0) においては、いずれの画分においても試料マトリックスの測定値への顕著な影響は認められなかった。

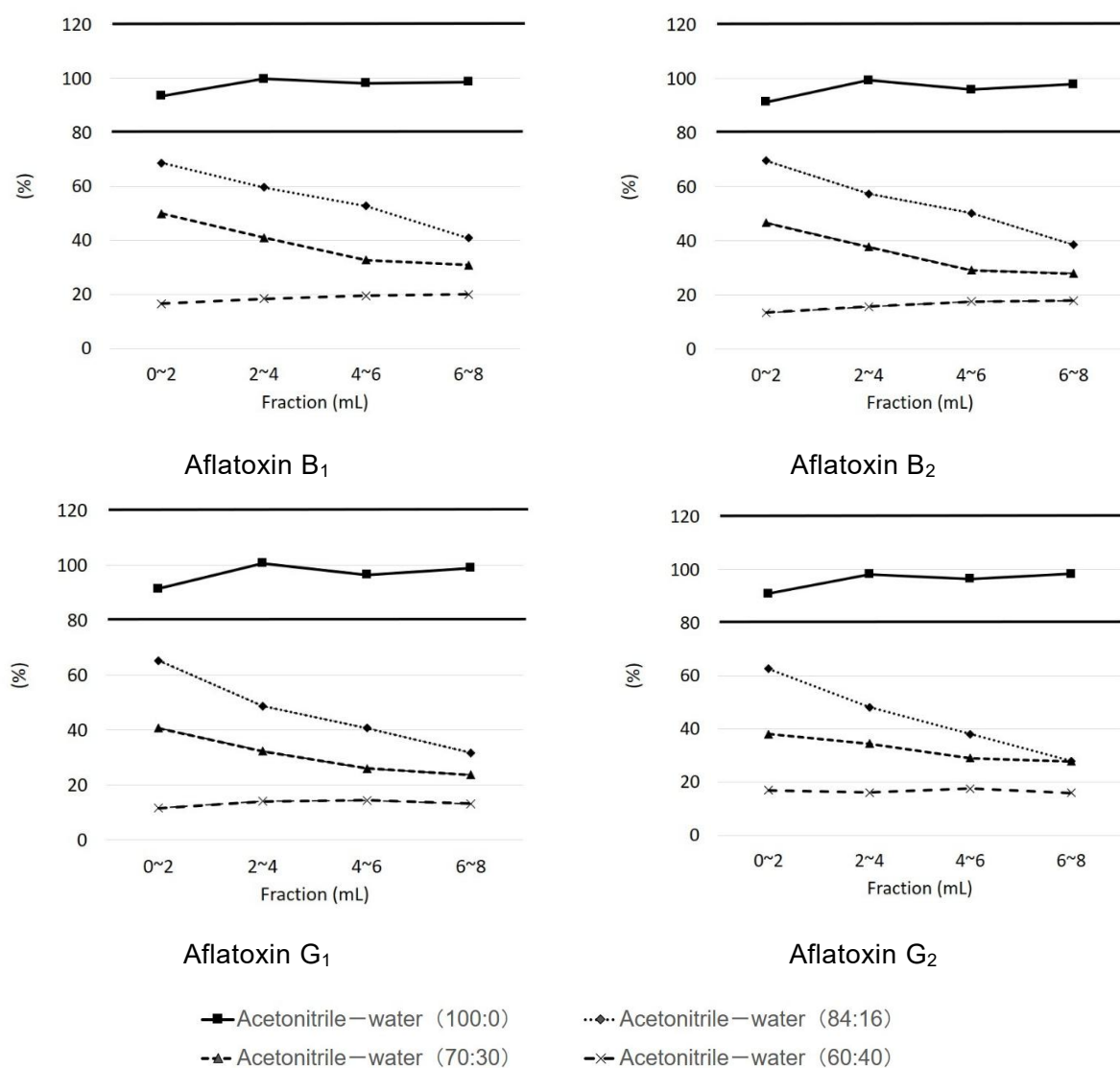


Fig. 2 Matrix effects (%) for different extraction solvent composition

$n = 1$

Ratio of peak area of aflatoxins in the presence of matrix to that in the absence of matrix.

The bold lines indicate the range in which quantification is possible without substantial matrix effects (80~120 %).

3.2 抽出溶媒の変更による抽出効率の確認

3.1 の結果を受け、かび毒一斉法の適用範囲であるとうもろこしの自然汚染試料を用いて、ステリグマトシスチン及びゼアラレノンを対象に 2.4.2 により抽出効率を確認した。その結果は Table 5 のとおりであり、かび毒一斉法の抽出溶媒であるアセトニトリル-水 (84+16) の抽出効率に対して、ステリグマトシスチン、ゼアラレノンともに、抽出溶媒における水の割合が低くなるほど抽出効率が減少した。そのため、抽出溶媒の組成は変更せず検討を進めることとした。

Table 5 Comparison of extraction recoveries using naturally contaminated corn samples

Mycotoxin	Extraction solvent composition	Concentration of mycotoxin (µg/kg)	Relative extraction recovery ^{a)} (%)
Sterigmatocystin	Acetonitrile-water (100:0)	0.74	45
	Acetonitrile-water (90:10)	1.25	76
	Acetonitrile-water (84:16)	1.64	100
Zearalenone	Acetonitrile-water (100:0)	11.8	31
	Acetonitrile-water (90:10)	18.7	49
	Acetonitrile-water (84:16)	38.4	100

$n = 3$

a) Relative extraction recovery (%) was calculated as: recovery with acetonitrile-water (100:0 or 90:10) / recovery with acetonitrile-water (84:16) $\times$ 100.

3.3 多機能カラム 2 を用いた場合の回収率の確認

多機能カラム 2 (Captiva EMR Mycotoxins) は、メーカーのアプリケーションノートにおいてとうもろこし子実及び大豆中のかび毒の分析において良好な結果が得られている。また、LC カラムの Inertsil Ph はシリカゲルにアルキルフェニル基を結合させたフェニルカラムの一種であり、アルキル鎖による疎水性相互作用及びフェニル基の π 電子相互作用が働く。アフラトキシン、ステリグマトシスチン及びゼアラレノンはいずれも芳香環を有することから、Inertsil Ph はかび毒一斉法で用いられている C18 カラムとは異なる挙動を示すことが期待された。そこで、2.4.3 により各試料溶液における Captiva EMR Mycotoxins からの流出画分を Inertsil Ph を用いて測定した。得られた結果のうち、代表的な結果である DDGS、ふすま及び麦ぬかのマトリックス効果及び回収率を Fig. 3 に示した。

マトリックス効果は、各アフラトキシン及びゼアラレノンでは、一部の試料の画分においてアフラトキシン B₁、G₂ 及びゼアラレノンが 80 %より低かったが、それ以外の画分は良好であり、全体的に全試料において試料マトリックスの測定値への顕著な影響は認められなかった。一方、ステリグマトシスチンでは、コーングルテンフィード及び DDGS は良好であったが、ふすま及

び麦ぬかは全画分において 120 %より高く、測定値への顕著な影響が認められた。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は、一部の画分において 120 %に近い又は 120 %より高く、測定値への影響が認められた。

回収率は、各アフラトキシン及びゼアラレノンでは、一部の試料の 0~2 mL 画分においてアフラトキシン B₁ 及び B₂ が 70 %より低かったが、それ以外の全試料の画分は良好であった。一方、ステリグマトシスチンでは、DDGS は良好であったが、ふすま及び麦ぬかは全画分において、米ぬか油かす、コーングルテンフィード、コーングルテンミール、大豆油かす及びなたね油かすは一部の画分において、70 %より低い (0~2 mL 画分のみ) 又は 120 %より高かった。

試料マトリックス由来の夾雑物の影響により、特にステリグマトシスチンにおいて顕著な影響を受けたことから、今後は、安定同位体標識ステリグマトシスチンを内標準として用いて検討を進める予定である。

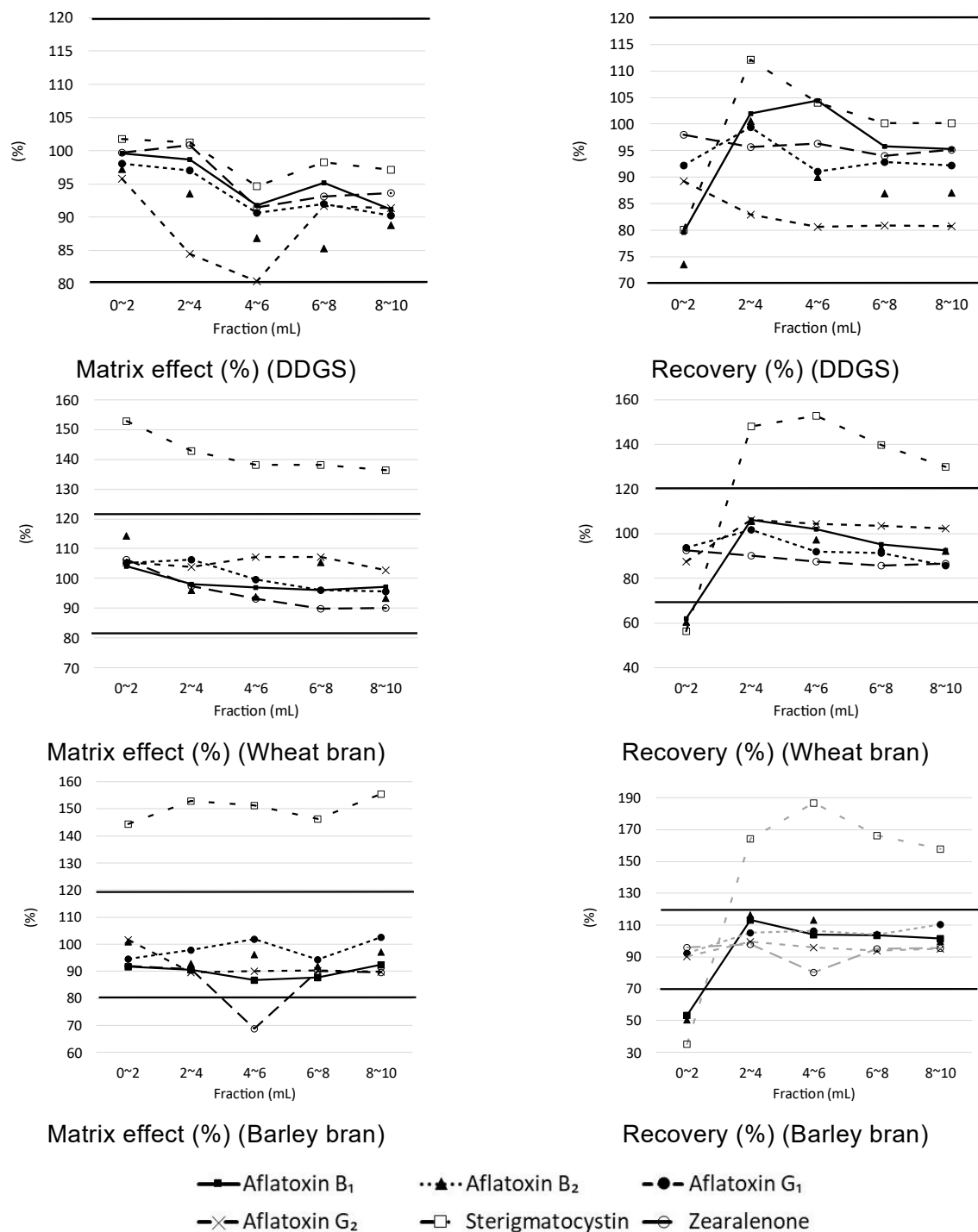


Fig. 3 Elution pattern of aflatoxins, sterigmatocystin and zearalenone using a multifunctional column and a phenyl column

$n = 1$

Ratio of peak area of mycotoxins in the presence of matrix to that in the absence of matrix.

The bold lines indicate the range in which quantification is possible without substantial matrix effects (80~120 %) for matrix effects, and the target trueness range (70~120 %) for recovery rates specified in the validation guideline for test methods in Appendix 2 of the Feed Analysis Standards of Japan.

4 まとめ

そうこう類及び植物性油かす類中のアフラトキシン，ステリグマトシスチン及びゼアラレノンについて，LC-MS/MSにより定量する方法を検討したところ，以下の結果が得られた．

- 1) かび毒一斉法を基に抽出溶媒の組成を変更したところ，抽出溶媒における水の割合が低くなるほど試料マトリックスの測定値への影響が低減される傾向にあったが，抽出効率は減少した．
- 2) かび毒一斉法とは異なる精製カラム（Captiva EMR Mycotoxins）及び LC カラム（Inertsil Ph）を用いて，流出画分における各かび毒のマトリックス効果及び回収率を確認したところ，アフラトキシン及びゼアラレノンは，一部の試料の画分においてアフラトキシン B₁，G₂ 及びゼアラレノンのマトリックス効果並びにアフラトキシン B₁ 及び B₂ の低回収が認められたものの，全体的に全試料において顕著なマトリックス効果は認められず，回収率も良好であった．一方，ステリグマトシスチンは，多くの試料において試料マトリックスによるイオン化促進が認められた．

今後，安定同位体標識ステリグマトシスチンを使用し，各試料におけるステリグマトシスチンの回収率を評価する予定である．

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，令和 5 年 12 月 1 日，5 消安第 4714 号 (2023)．
- 2) 鈴木 知華，名塚 英一，加藤 耕一，青山 幸二：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，飼料研究報告，41，118-121 (2016)．
- 3) 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)．
- 4) 渡辺 ちとせ，林 菜月：とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル中のアフラトキシン，ステリグマトシスチン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検討，飼料研究報告，48，50-64 (2023)．