

第5章 かび毒

第1節 かび毒各条

1 アフラトキシシン B₁

1.1 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

(適用範囲：飼料)

第3節1による。

1.2 アフラトキシシンの液体クロマトグラフによる同時分析法

(適用範囲：配合飼料及びとうもろこし)

第3節2による。

1.3 アフラトキシシンの液体クロマトグラフーフォトケミカルリアクターによる同時分析法

(適用範囲：大豆油かすを除く飼料)

第3節3による。

1.4 蛍光デンシトメーター法

(1) 落花生油かす

A 試薬の調製

- 1) アフラトキシシン混合標準液 アフラトキシシン B₁ [C₁₇H₁₂O₆]、アフラトキシシン B₂ [C₁₇H₁₄O₆]、アフラトキシシン G₁ [C₁₇H₁₂O₇] 及びアフラトキシシン G₂ [C₁₇H₁₄O₇] 各 5 mg を正確に量ってそれぞれ 250 mL の褐色全量フラスコに入れ、ベンゼン-アセトニトリル (49+1) を加えて溶かす。更に各全量フラスコの標線まで同溶媒を加えてアフラトキシシン B₁、B₂、G₁ 及び G₂ 標準原液を調製する (これらの液各 1 mL は、アフラトキシシン B₁、B₂、G₁ 及び G₂ として 20 µg をそれぞれ含有する。)

使用に際して、各標準原液の一定量を混合し、ベンゼン-アセトニトリル (49+1) で正確に希釈し、1 mL 中にアフラトキシシン B₁、B₂、G₁ 及び G₂ として各 0.2 µg を含有するアフラトキシシン混合標準液を調製する。

- 2) アフラトキシシン B₁ 標準液 使用に際して、アフラトキシシン B₁ 標準原液の一定量をベンゼン-アセトニトリル (49+1) で正確に希釈し、1 mL 中にアフラトキシシン B₁ として 0.2 µg を含有するアフラトキシシン B₁ 標準液を調製する。

B 定 量

抽出 分析試料 20.0 g を量って 500 mL の分液漏斗に入れ、水 10 mL を加えて潤した後、クロロホルム 100 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出する。抽出液をろ紙 (2 種) でろ過し、薄層クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

薄層クロマトグラフィー 薄層板^{注1}の一辺から 2 cm 離れた位置をベースラインとする。このベースライン上に試料溶液の一定量 (10~20 µL)、アフラトキシシン混合標準液 10 µL 及び検量線作成のためのアフラトキシシン B₁ 標準液 5~20

μL の間の数点を 1.5 cm 間隔にマイクロシリンジを用いてスポットする。薄層板を展開槽に入れ、展開液（クロロホルム－アセトン－ヘキサン（20+1+1））の上達線がベースラインから 10 cm 以上の高さになるまで不飽和で展開した後、薄層板をとり出して風乾する。

測定 分光蛍光デンストメーター（励起波長 365 nm、蛍光波長 430 nm）によりアフラトキシン B₁ 標準液の展開スポット及び試料溶液のアフラトキシン B₁ 展開スポットの蛍光強度を測定する。

計算 アフラトキシン B₁ 標準液の蛍光強度から検量線を作成し、試料中のアフラトキシン B₁ 量を算出する。

注 1 シリカゲル 70 プレート－ワコー（20×20 cm）（和光純薬工業製）又はこれと同等のもの

(2) 綿実油かす

A 試薬の調製

- 1) アフラトキシン混合標準液及びアフラトキシン B₁ 標準液 (1)の A による。
- 2) 抽出溶媒 アセトン－水－酢酸（425+75+4）
- 3) 酢酸鉛溶液 酢酸鉛（II）三水和物 200 g を適量の水に溶かし、酢酸 3 mL を加え、更に水を加えて 1 L とする。
- 4) シリカゲル カラムクロマトグラフ用シリカゲル（粒径 74~149 μm（200~100 メッシュ））^{注1}を 110 °C で 2 時間乾燥し、1 v/w%相当量の水を加えて混和し、一夜静置する。

B 定 量

抽出 分析試料 25.0 g を量って 500 mL の分液漏斗に入れ、抽出溶媒 250 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出し、ろ紙（2 種）でろ過する。

ろ液 125 mL を 500 mL のなす形フラスコに入れ、酢酸鉛溶液 20 mL 及び水 25 mL を加え、50 °C の水浴で約 125 mL まで減圧濃縮した後放冷する。濃縮液を水で 200 mL の共栓メスシリンダーに移し、水を加えて 200 mL とし、ろ紙（2 種）でろ過する。

ろ液 160 mL を 250 mL の分液漏斗に入れ、クロロホルム 50 mL を加えて振り混ぜた後静置する。クロロホルム層（下層）を三角フラスコに入れ、残留液にクロロホルム 50 mL を加え、同様に操作し、クロロホルム層を先の三角フラスコに合わせる。

クロロホルム層を適量の硫酸ナトリウム（無水）で脱水し、200 mL のなす形フラスコにろ紙（2 種）でろ過する。先の三角フラスコ及び硫酸ナトリウムを順次少量のクロロホルムで洗浄し、洗液を先のろ紙を通してろ液を合わせる。ろ液を 50 °C 以下の水浴で 1~2 mL まで減圧濃縮し、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 硫酸ナトリウム（無水）10 g、シリカゲル 15 g 及び硫酸ナトリウム（無水）10 g をそれぞれジエチルエーテル－ヘキサン（3+1）に懸濁させてカラム管（内径 20 mm）に順次流し込み、液面が充てん剤の上端から 3 mm

の高さに達するまで流出させてカラムを調製する。

試料溶液をカラムに入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコをクロロホルム 2 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液をカラムに加え、液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流出させる。更にジエチルエーテル-ヘキサン (3+1) 150 mL をカラムに加え、同様に流出させる。

500 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、クロロホルム-アセトン (4+1) 200 mL をカラムに加えてアフラトキシン B₁ を溶出させる。溶出液を 50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮し、更に窒素ガスを送って乾固する。一定量のベンゼン-アセトニトリル (49+1) を正確に加えて残留物を溶かし、薄層クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

薄層クロマトグラフィー (1)の B の薄層クロマトグラフィーの項による。

測定 (1)の B の測定の項による。

計算 (1)の B の計算の項による。

注 1 ワコーゲル C-200 (和光純薬工業製) 又はこれと同等のもの

(3) どうもろこし

A 試薬の調製

- 1) アフラトキシン混合標準液及びアフラトキシン B₁ 標準液 (1)の A による。
- 2) シリカゲル (2)の A の 4)による。

B 定 量

抽出 分析試料 50 g を量って 500 mL の分液漏斗に入れ、水 25 mL を加えて試料を潤した後、クロロホルム 250 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出する。

抽出液を三角フラスコに入れ、適量の硫酸ナトリウム (無水) で脱水し、ろ紙 (2 種) でろ過する。ろ液 50 mL を 200 mL のなす形フラスコに入れ、50 °C の水浴で 1~2 mL まで減圧濃縮し、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 硫酸ナトリウム (無水) 10 g、シリカゲル 15 g 及び硫酸ナトリウム (無水) 10 g をそれぞれクロロホルムに懸濁させてカラム管 (内径 20 mm) に順次流し込み、液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流出させてカラムを調製する。

試料溶液をカラムに入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコをクロロホルム 2 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液をカラムに加え、液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流出させる。更にヘキサン 150 mL 及びジエチルエーテル 150 mL を順次カラムに加え、同様に流出させる。

200 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、クロロホルム-メタノール (9+1) 150 mL をカラムに加えてアフラトキシン B₁ を溶出させ、溶出液を 50 °C の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮し、更に窒素ガスを送って乾固する。

一定量のベンゼン-アセトニトリル (49+1) を正確に加えて残留物を溶かし、薄層クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

薄層クロマトグラフィー (1)の B の薄層クロマトグラフィーの項による。

測定 (1)の B の測定の項による。

計算 (1)の B の計算の項による。

(4) 配合飼料

A 試薬の調製

- 1) アフラトキシン混合標準液及びアフラトキシン B₁ 標準液 (1)の A による。
- 2) 酢酸鉛溶液 (2)の A の 3)による。
- 3) シリカゲル (2)の A の 4)による。
- 4) 酸性アルミナ カラムクロマトグラフ用酸性アルミナ (粒径 63~200 μm (230~70 メッシュ)) ^{注1}

B 定 量

抽出 分析試料 50 g を量って 500 mL の分液漏斗に入れ、塩酸 (0.1 mol/L) 70 mL を加えて試料を潤した後、クロロホルム 250 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出する。

クロロホルム層 (下層) を三角フラスコに入れ、適量の硫酸ナトリウム (無水) で脱水し、ろ紙 (2 種) でろ過し、精製に供する試料溶液とする。

精製 試料溶液 100 mL を 500 mL のなす形フラスコに入れ、50 °C の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮する。アセトン 20 mL、水 60 mL 及び酢酸鉛溶液 20 mL を加えて残留物を溶かした後 5 分間静置し、この液をろ紙 (2 種) でろ過する。

ろ液 50 mL を 250 mL の分液漏斗に入れ、クロロホルム 50 mL を加えて振り混ぜた後静置する。クロロホルム層 (下層) を三角フラスコに入れ、残留液にクロロホルム 50 mL を加えて、同様に操作し、クロロホルム層を先の三角フラスコに合わせる。

クロロホルム層を適量の硫酸ナトリウム (無水) で脱水し、200 mL のなす形フラスコにろ紙 (2 種) でろ過する。先の三角フラスコ及び硫酸ナトリウムを順次少量のクロロホルムで洗浄し、洗液を同様にろ過してろ液を合わせる。ろ液を 50 °C の水浴で 1~2 mL まで減圧濃縮し、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 酸性アルミナ 5 g、シリカゲル 15 g 及び硫酸ナトリウム (無水) 10 g をそれぞれクロロホルムに懸濁させてカラム管 (内径 20 mm) に順次流し込み、液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流出させてカラムを調製する。

試料溶液をカラムに入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコをクロロホルム 2 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液をカラムに加え、液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流出させる。更にベンゼン-酢酸 (9+1) 100 mL 及びジエチルエーテル-ヘキサン (3+1) 150 mL を順次カラムに加え、同様に流出させる。

500 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、クロロホルム-アセトン

(3+1) 200 mL をカラムに加えてアフラトキシン B₁ を溶出させる。溶出液を 50 °C の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮し、更に窒素ガスを送って乾固した後、一定量のベンゼン-アセトニトリル (49+1) を正確に加えて残留物を溶かし、薄層クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

薄層クロマトグラフィー (1)の B の薄層クロマトグラフィーの項による。

測定 (1)の B の測定の項による。

計算 (1)の B の計算の項による。

注 1 Aluminiumoxid 90 aktiv Art. 1078 (Merck 製) 又はこれと同等のもの

2 アフラトキシン B₂

2.1 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
(適用範囲：飼料)
第 3 節 1 による。

2.2 アフラトキシンの液体クロマトグラフによる同時分析法
(適用範囲：配合飼料及びとうもろこし)
第 3 節 2 による。

2.3 アフラトキシンの液体クロマトグラフ-フォトケミカルリアクターによる同時分析法
(適用範囲：大豆油かすを除く飼料)
第 3 節 3 による。

3 アフラトキシン G₁

3.1 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
(適用範囲：飼料)
第 3 節 1 による。

3.2 アフラトキシンの液体クロマトグラフによる同時分析法
(適用範囲：配合飼料及びとうもろこし)
第 3 節 2 による。

3.3 アフラトキシンの液体クロマトグラフ-フォトケミカルリアクターによる同時分析法
(適用範囲：大豆油かすを除く飼料)
第 3 節 3 による。

4 アフラトキシン G₂

4.1 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
(適用範囲：飼料)

第3節1による。

4.2 アフラトキシンの液体クロマトグラフによる同時分析法

(適用範囲：配合飼料及びとうもろこし)

第3節2による。

4.3 アフラトキシンの液体クロマトグラフーフォトケミカルリアクターによる同時分析法

(適用範囲：大豆油かすを除く飼料)

第3節3による。

5 ステリグマトシスチン

5.1 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

(適用範囲：飼料)

第3節1による。

5.2 液体クロマトグラフ法

A 試薬の調製

ステリグマトシスチン標準液 ステリグマトシスチン〔C₁₈H₁₂O₆〕1 mgを正確に量って5 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てステリグマトシスチン標準原液を調製する（この液1 mLは、ステリグマトシスチンとして0.2 mgを含有する。）。

使用に際して、標準原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中にステリグマトシスチンとして0.05~1 µgを含有する数点のステリグマトシスチン標準液を調製する。

B 定 量

抽 出 分析試料25.0 gを量って200 mLの褐色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、30分間振り混ぜて抽出する。抽出液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ、1,000×gで5分間遠心分離し、上澄み液をミニカラムクロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

カラム処理 試料溶液9 mLを試験管に入れ、多機能カラム（アフラトキシン・ゼアラレノン前処理用）^{注1}をゆっくり押し込み、充てん剤を通過した初めの流出液4 mLを捨てる。

更に先のカラムを押し込み、2 mLを流出させる。流出液を均質化し、その一部をプラスチック製遠心沈殿管（容量1.5 mL）に入れ、5,000×gで5分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各ステリグマトシスチン標準液各20 µLを液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：紫外吸光光度検出器（測定波長：330 nm）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5 μm）^{注2}

溶離液：メタノール-水（13+7）

流速：1.0 mL/min

カラム槽温度：40 °C

計算 得られたクロマトグラムからピーク高さを求めて検量線を作成し、試料中のステリグマトシスチン量を算出する。

注 1 MycoSep 226 AflaZon+（Romer Labs 製）又はこれと同等のもの

2 Mightysil RP-18 GP（関東化学製）又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

| 試料の種類 | 添加濃度 (μg/kg) | 繰返し | 添加回収率 (%) | 繰返し精度 RSD (%以下) |
|--------|-----------------|-----|--------------|--------------------|
| 豚用配合飼料 | 200~1,000 | 3 | 98.0~100.0 | 3.3 |
| 牛用配合飼料 | 200~1,000 | 3 | 93.9~97.6 | 2.9 |
| とうもろこし | 200~1,000 | 3 | 82.7~94.9 | 4.0 |
| 小麦 | 200~1,000 | 3 | 96.9~97.2 | 1.8 |

・共同試験

| 試料の種類 | 試験室 数 | 添加濃度 (μg/kg) | 添加回収率 (%) | 室内繰返し精度 RSD _r (%) | 室間再現精度 RSD _R (%) | HorRat |
|--------|----------|-----------------|--------------|---------------------------------|--------------------------------|--------|
| 豚用配合飼料 | 7 | 1,000 | 99.7 | 3.3 | 4.2 | 0.26 |

・定量下限 試料中 100 μg/kg

6 ゼアラレノン

6.1 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

（適用範囲：飼料）

第3節1による。

6.2 ゼアラレノン及びデオキシニバレノールの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による系統的分析法

（適用範囲：稲発酵粗飼料、とうもろこしサイレージ）

第3節12による。

6.3 液体クロマトグラフ質量分析計による単成分分析法

（適用範囲：飼料）

A 試薬の調製

- 1) ゼアラレノン標準液 ゼアラレノン [C₁₈H₂₂O₅] 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てゼアラレノン標準原液を調製する（この液 1 mL はゼアラレノンとして 0.2 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量をアセトニトリル-水（1+1）で正確に希釈し、1 mL 中にゼアラレノンとして 5~1,000 ng を含有する数点のゼアラレノン標

準液を調製する。

- 2) 内標準液 ゼアララノン [C₁₈H₂₄O₅] 1 mg を正確に量って 20 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て内標準原液を調製する（この液 1 mL はゼアララノンとして 50 µg を含有する。）。

使用に際して、内標準原液の一定量をアセトニトリル-水（1+1）で正確に希釈し、1 mL 中にゼアララノンとして 5 µg を含有する内標準液を調製する。

B 定 量

抽出 分析試料 50 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（21+4）150 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出する。抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ、1,000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液をカラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 試料溶液を多機能カラム（ゼアラレノン前処理用）^{注1}に入れ、最初の流出液 4 mL を捨て、その後の流出液 3 mL を 10 mL の試験管に受ける。この液 2 mL を正確に 10 mL の試験管に入れ、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する。

アセトニトリル-水（1+1）1 mL 及び内標準液 20 µL を正確に加えて残留物を溶かす。この液をプラスチック製遠心沈殿管（容量 1.5 mL）に入れ、5,000×g 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する。

同時に、各ゼアラレノン標準液 1.0 mL に内標準液 20 µL を正確に加え、液体クロマトグラフ質量分析計による測定に供する標準液とする。

液体クロマトグラフ質量分析計による測定 試料溶液及び各標準液 10 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る。

測定条件 例

カラム : オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 3.0 mm、長さ 250 mm、粒径 5 µm）^{注2}

溶離液 : アセトニトリル-メタノール-10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液（4+7+9）

流速 : 0.5 mL/min

カラム槽温度 : 40 °C

検出器 : 四重極型質量分析計^{注3}

イオン化法 : 大気圧化学イオン化（APCI）法（負イオンモード）

ネブライザーガス : N₂（2.5 L/min）

乾燥ガス : N₂（6 L/min）

インターフェイス温度 : 300 °C

ヒートブロック温度 : 200 °C

C D L 温度 : 200 °C

モニターイオン : *m/z* 317（ゼアラレノン）、319（ゼアララノン）

計算 得られた選択イオン検出クロマトグラムからゼアラレノン及びゼアラ

ラノンのピーク高さを求めて内標準法により検量線を作成し、試料中のゼアラレノン量を算出する。

注 1 MultiSep 226 AflaZon+ (Romer Labs 製) 又はこれと同等のもの

2 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies 製) 又はこれと同等のもの

3 LCMS-2010EV (島津製作所製) による条件例

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

| 試料の種類 | 添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 繰返し | 添加回収率 (%) | 繰返し精度 RSD (%以下) |
|------------|-------------------------------------|-----|--------------|--------------------|
| 大麦 | 40~1,000 | 3 | 98.4~98.7 | 5.0 |
| 玄米 | 40~1,000 | 3 | 92.4~94.2 | 4.2 |
| ほ乳期子豚用配合飼料 | 40~1,000 | 3 | 106.6~114.5 | 5.7 |
| 肉用牛用配合飼料 | 40~1,000 | 3 | 101.7~106.4 | 8.7 |

・共同試験

| 試料の種類 | 試験室 数 | 添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 添加回収率 (%) (測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)) | 室内繰返し精度 RSD _r (%) | 室間再現精度 RSD _R (%) | HorRat |
|-------|----------|-------------------------------------|--|---------------------------------|--------------------------------|--------|
| 玄米 | 9 | 50 | 112.7 | 3.9 | 10.8 | 0.49 |
| 大麦 | 9 | 200 | 112.1 | 5.3 | 8.3 | 0.41 |
| 小麦 | 9 | 500 | 111.7 | 6.0 | 10.7 | 0.60 |
| 配合飼料 | 9 | 自然汚染 | (38.8) | 8.8 | 13.1 | 0.60 |
| マイロ | 9 | 自然汚染 | (334) | 12.0 | 14.3 | 0.76 |

・定量下限 試料中 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$

6.4 液体クロマトグラフ法

(1) 飼料

A 試薬の調製

ゼアラレノン標準液 ゼアラレノン [$\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_5$] 1 mg を正確に量って 5 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てゼアラレノン標準原液を調製する (この液 1 mL は、ゼアラレノンとして 0.2 mg を含有する。)

使用に際して、標準原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 中にゼアラレノンとして 0.05~1 μg を含有する数点のゼアラレノン標準液を調製する。

B 定 量

抽 出 5.2 の B の抽出の項による。

カラム処理 試料溶液 9 mL を試験管に入れ、多機能カラム (アフラトキシン・ゼアラレノン前処理用) ^{注 1} をゆっくり押し込み、充てん剤を通過した最初の流出液 2 mL を捨てる。

更に先のカラムを押し込み、2 mL を流出させる。流出液を均質化し、その一部をプラスチック製遠心沈殿管 (容量 1.5 mL) に入れ、5,000 $\times g$ で 5 分間遠

心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。
 液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各ゼアラレノン標準液各 20 µL を液体
 クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：蛍光検出器（励起波長：278 nm、蛍光波長：460 nm）
 カ ラ ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 4.6 mm、
 長さ 250 mm、粒径 5 µm）^{注2}又はこれと同等のもの
 溶 離 液：メタノール-水（13+7）
 流 速：1.0 mL/min
 カラム槽温度：40 °C

計 算 得られたクロマトグラムからピーク高さを求めて検量線を作成し、
 試料中のゼアラレノン量を算出する。

注 1 MycoSep 226 AflaZon+（Romer Labs 製）又はこれと同等のもの

2 Mightysil RP-18 GP（関東化学製）又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

- ・添加回収率及び繰返し精度

| 試料の種類 | 添加濃度 (µg/kg) | 繰返し | 添加回収率 (%) | 繰返し精度 RSD (%以下) |
|--------|-----------------|-----|--------------|--------------------|
| 豚用配合飼料 | 200~1,000 | 3 | 93.6~101.9 | 2.6 |
| 牛用配合飼料 | 200~1,000 | 3 | 101.4~109.9 | 1.7 |
| とうもろこし | 200~1,000 | 3 | 95.2~99.4 | 1.7 |
| 小麦 | 200~1,000 | 3 | 95.2~99.4 | 1.7 |

- ・共同試験

| 試料の種類 | 試験室 数 | 添加濃度 (µg/kg) | 添加回収率 (%) | 室内繰返し精度 RSD _r (%) | 室間再現精度 RSD _R (%) | HorRat |
|--------|----------|-----------------|--------------|---------------------------------|--------------------------------|--------|
| 豚用配合飼料 | 7 | 1,000 | 102.7 | 3.0 | 4.2 | 0.26 |

- ・定量下限 試料中 50 µg/kg

(2) 穀類

A 試薬の調製

ゼアラレノン標準液 ゼアラレノン [C₁₈H₂₂O₅] 10 mg を正確に量って 100 mL
 の褐色全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線まで同溶
 媒を加えてゼアラレノン標準原液を調製する（この液 1 mL はゼアラレノンと
 して 0.1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中に
 ゼアラレノンとして 0.5~5 µg を含有する数点のゼアラレノン標準液を調製す
 る。

B 定 量

抽 出 分析試料 50 g を量って 500 mL の分液漏斗に入れ、水 25 mL を加
 えて試料を潤した後、クロロホルム 250 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出す
 る。

抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離する。クロロホルム層（下層）を三角フラスコに入れ、適量の硫酸ナトリウム（無水）で脱水し、ろ紙（2 種）でろ過する。

ろ液 50 mL を 100 mL のなす形フラスコに入れ、45 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮し、更に窒素ガスを送って乾固する。トルエン 2 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 シリカゲルミニカラム（690 mg）をトルエン 10 mL で洗浄する。

試料溶液をミニカラムに入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコをトルエン 2 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液をミニカラムに加え、圧注^{注1}して流出させる。更にトルエン 10 mL をミニカラムに加え、圧注^{注1}して流出させる。

50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、クロロホルム 12 mL をミニカラムに加え、圧注^{注1}してゼアラレノン^{注2}を溶出させる。溶出液を 45 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮し、更に窒素ガスを送って乾固する。

メタノール 2 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（孔径 0.5 μm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各ゼアラレノン標準液各 20 μL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：蛍光検出器（励起波長：276 nm、蛍光波長：455 nm）

カ ラ ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 4.0 mm、長さ 250 mm、粒径 5 μm）^{注2}

溶 離 液：メタノール-水（7+3）

流 速：1.0 mL/min

計 算 得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のゼアラレノン量を算出する。

注 1 流速は 2 mL/min 程度とする。

2 Nucleosil 5C₁₈（Macherey-Nagel 製）又はこれと同等のもの

(3) 配合飼料

A 試薬の調製

- 1) ゼアラレノン標準液 (1)の A による。
- 2) クエン酸溶液 クエン酸一水和物 106 g を水に溶かして 1 L とする。

B 定 量

抽 出 分析試料 50 g を量って 500 mL の分液漏斗に入れ、塩酸（0.1 mol/L）25 mL 及びクロロホルム 250 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出する。抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離し、クロロホルム層（下層）を三角フラスコに入れる。クロロホルム層を適量の硫酸ナトリウム（無水）で脱水した後、分液ろ紙でろ過し、精製に供する試料溶液とする。

精 製 試料溶液 50 mL をあらかじめ水酸化ナトリウム溶液 (0.5 mol/L) 50 mL 及び塩化ナトリウム飽和溶液 10 mL を入れた 300 mL の分液漏斗に加え、1 分間激しく振り混ぜた後 30 分間以上静置し、クロロホルム層 (下層) を捨てる。クロロホルム 50 mL を分液漏斗に加え、同様に操作する。クエン酸溶液 50 mL 及びクロロホルム 50 mL を分液漏斗に加え、穏やかに振り混ぜた後静置し、クロロホルム層を 300 mL のなす形フラスコに分液ろ紙でろ過する。クロロホルム 50 mL を分液漏斗に加え、同様に 2 回操作する。ろ液を 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する。

メタノール 2 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 (孔径 0.5 µm 以下) でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各ゼアラレノン標準液各 20 µL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：蛍光検出器 (励起波長：276 nm、蛍光波長：455 nm)

カ ラ ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5 µm)^{注1}又はこれと同等のもの

溶 離 液：水-アセトニトリル-メタノール (10+8+5)

流 速：1.0 mL/min

計 算 得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のゼアラレノン量を算出する。

注 1 Nucleosil 5C₁₈ (Macherey-Nagel 製) 又はこれと同等のもの

7 HT-2 トキシン

7.1 トリコセセン系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

(適用範囲：飼料)

第 3 節 10 による。

7.2 液体クロマトグラフ質量分析計による単成分分析法

A 試薬の調製

HT-2 トキシン標準液 HT-2 トキシン [C₂₂H₃₂O₈] 1 mg を正確に量って 5 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る (この液 1 mL は、HT-2 トキシンとして 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 HT-2 トキシンとして 25 µg を含有する HT-2 トキシン標準原液を調製する。

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 HT-2 トキシンとして 0.005~1 µg を含有する数点の HT-2 トキシン標準液を調製する。

B 定 量

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 分間振り混ぜて抽出する^{注1}。抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ、1,000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液をカラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 試料溶液を多機能カラム (トリコテセン系かび毒前処理用)^{注2} に入れ、初めの流出液 3 mL を捨てる。10 mL の試験管をカラムの下に置き、その後の流出液 3 mL を受ける。流出液 2 mL を正確に 50 mL のなす形フラスコに入れ、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する。

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、この液の一部をプラスチック製遠心沈殿管 (容量 1.5 mL) に入れ、5,000×g 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する。

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 HT-2 トキシン標準液 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る。

測定条件 例

(液体クロマトグラフ部)

カラム : オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 3.0 mm、長さ 250 mm、粒径 5 µm)^{注3}

溶離液 : 10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-メタノール (4+1) →15 min→メタノール (5 min 保持)

流速 : 0.5 mL/min

カラム槽温度 : 40 °C

(質量分析部 例 1)

検出器 : 四重極型質量分析計^{注4}

イオン化法 : 大気圧光イオン化 (APPI) 法 (陰イオンモード)

フラグメンター電圧 : 100 V

ネブライザー圧力 : N₂ (380 kPa)

乾燥ガス : N₂ (7.0 L/min、350 °C)

ベーパーライザー温度 : 300 °C

キャピラリー電圧 : 1,500 V

モニターイオン : m/z 483

(質量分析部 例 2)

検出器 : 四重極型質量分析計^{注5}

イオン化法 : 大気圧化学イオン化 (APCI) 法 (陰イオンモード)

ネブライザーガス : N₂ (2.5 L/min)

インターフェイス温度 : 400 °C

ヒートブロック温度 : 200 °C

C D L 温 度 : 200 °C

モ ニ タ ー イ オ ン : m/z 483

計 算 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又は高さを求めて検量線を作成し、試料中の HT-2 トキシン量を算出する。

注 1 分析試料が抽出溶媒を吸収して振り混ぜる事ができない場合は、300 mL の共栓三角フラスコを用い、抽出溶媒の液量を 150 mL とする。

2 MultiSep 227 Trich+ (Romer Labs 製) 又はこれと同等のもの

3 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies 製、本測定条件による HT-2 トキシンの保持時間は約 13 分) 又はこれと同等のもの

4 Agilent 1100 Series MSD SL (Agilent Technologies 製) による条件例

5 LCMS-2010EV (島津製作所製) による条件例

(参考) 分析法バリデーション

・ 添加回収率及び繰返し精度

| 試料の種類 | 添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 繰返し | 添加回収率 (%) | 繰返し精度 RSD (%以下) |
|------------|-------------------------------------|-----|--------------|--------------------|
| とうもろこし | 15~200 | 3 | 101.2~110.7 | 6.9 |
| 大麦 | 15~200 | 3 | 100.6~107.3 | 7.3 |
| 成鶏飼育用配合飼料 | 15~200 | 3 | 98.0~112.7 | 8.7 |
| 肉用牛肥育用配合飼料 | 15~200 | 3 | 103.2~113.3 | 8.6 |

・ 共同試験

| 試料の種類 | 試験室 数 | 添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 添加回収率 (%) | 室内繰返し精度 | | HorRat |
|--------|----------|-------------------------------------|--------------|--------------------|--------------------|--------|
| | | | | RSD_r (%) | RSD_R (%) | |
| 鶏用配合飼料 | 7 | 200 | 106.2 | 2.9 | 8.5 | 0.42 |
| 大麦 | 7 | 200 | 103.6 | 2.6 | 9.6 | 0.47 |

・ 定量下限 試料中 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$

・ 検出下限 試料中 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$

8 T-2 トキシン

8.1 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

(適用範囲：飼料)

第 3 節 1 による。

8.2 トリコテセン系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

(適用範囲：飼料)

第 3 節 10 による。

8.3 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

(適用範囲：飼料)

第 3 節 4 による。

8.4 ガスクロマトグラフ法^{注1}

A 試薬の調製

- 1) T-2 トキシシン標準液 T-2 トキシシン [C₂₄H₃₄O₉] 10 mg を正確に量って 100 mL の褐色全量フラスコに入れ、クロロホルムを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えて T-2 トキシシン標準原液を調製する（この液 1 mL は、T-2 トキシシンとして 0.1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量をクロロホルムで正確に希釈し、1 mL 中に T-2 トキシシンとして 10 µg を含有する T-2 トキシシン標準液を調製する。

- 2) 内標準液 メトキシクロール 0.25 g を量って 250 mL の褐色全量フラスコに入れ、*n*-ペンタンを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えて内標準原液を調製する。

使用に際して、内標準原液の一定量を *n*-ペンタンで希釈し、1 mL 中にメトキシクロールとして 0.1 µg を含有する内標準液を調製する。

- 3) 洗浄溶液 水酸化カリウム 1.12 g 及び塩化カリウム 10 g を水に溶かして 1 L とする。
- 4) シリカゲル カラムクロマトグラフ用シリカゲル（粒径 74~149 µm（200~100 メッシュ））^{注2}を 120 °C で 2 時間乾燥する。
- 5) ケイソウ土 ケイソウ土^{注3}を温水及びメタノールで順次洗浄した後、風乾する。

B 定 量

抽 出 分析試料 10.0~50.0 g を量って 500 mL の分液漏斗に入れ、メタノール-水（1+1）250 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出し、ろ紙（2 種）でろ過する。

ろ液 60 mL を 500 mL のビーカーに入れ、硫酸アンモニウム溶液（30 w/v%）240 mL を加えてかき混ぜ、更にケイソウ土 25 g を加えてかき混ぜた後、ろ紙（2 種）でろ過し、精製に供する試料溶液とする。

精 製 試料溶液 200 mL を 300 mL の分液漏斗 A に入れ、クロロホルム 10 mL を加えて 1 分間激しく振り混ぜた後静置し、クロロホルム層（下層）をあらかじめ洗浄溶液 100 mL を入れた 300 mL の分液漏斗 B に入れる。クロロホルム 10 mL を分液漏斗 A に加えて同様に操作した後、クロロホルム層を分液漏斗 B に入れ、穏やかに振り混ぜた後静置する。クロロホルム層をあらかじめ硫酸ナトリウム（無水）25 g を入れた漏斗を通過させて脱水し、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 硫酸ナトリウム（無水）1 g、シリカゲル 2 g 及び硫酸ナトリウム（無水）1 g をそれぞれクロロホルムに懸濁させてカラム管（内径 10 mm）に順次流し込み、ジエチルエーテル 50 mL 及びクロロホルム 20 mL を順次加えてカラムを洗浄し、液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流出させてカラムを調製する。

試料溶液 5 mL を 50 mL のなす形フラスコに入れ、ヘキサン 20 mL を加え、混合した後、カラムに入れ、先のなす形フラスコを少量のヘキサンの 3 回洗浄し、洗液をカラムに加える。液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流

出させた後、ベンゼン 20 mL、ベンゼン-アセトン (19+1) 30 mL を順次カラムに加えて同様に流出させる。

50 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、ジエチルエーテル 30 mL をカラムに加えて T-2 トキシンを溶出させ、溶出液を 50 °C 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する。

ベンゼン 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、10 mL の褐色ねじ口試験管に入れ、誘導体化に供する試料溶液とする。

同時に、T-2 トキシン標準液 50~400 µL の間の数点をそれぞれ 10 mL の褐色ねじ口試験管に入れ、窒素ガスを送って乾固した後、ベンゼン 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、誘導体化に供する各標準液とする。

誘導体化 試料溶液に硫酸ナトリウム (無水) 1 g を加えて振り混ぜた後、*N*-ヘプタフルオロブチリルイミダゾール 100 µL を加える。試験管を密栓して 1 分間振り混ぜ、更に炭酸水素ナトリウム溶液 (5 w/v%) 2 mL を加え、再び密栓して 2 分間振り混ぜた後静置する。ベンゼン層 (上層) の一定量を正確にとり、内標準液で正確に 5 倍に希釈してガスクロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

同時に、各標準液について、試料溶液と同様に操作し、ガスクロマトグラフィーに供する各誘導体化 T-2 トキシン標準液とする。

ガスクロマトグラフィー 試料溶液及び各誘導体化 T-2 トキシン標準液各一定量をガスクロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器 : 電子捕獲検出器

カ ラ ム 用 管 : ガラス製 内径 3 mm、長さ 1.1 m

カラム充てん剤 : ポリジメチルシロキサン^{注4} (3%) /ガスクロマトグラフィー用ケイソウ土 (粒径 125~149 µm (120~100 メッシュ))

^{注5}

キャリアーガス : N₂ (30 mL/min)

カラム槽温度 : 220 °C

試料導入部温度 : 325 °C

検 出 器 温 度 : 325 °C

計 算 得られたクロマトグラムから誘導体化 T-2 トキシン及びメトキシクロールのピーク高さ又は面積を求めて内標準法により検量線を作成し、試料中の T-2 トキシン量を算出する。

注 1 溶媒は、残留農薬用試薬又はこれと同等のものを用いる。

2 ワコーゲル C-200 (和光純薬工業製) 又はこれと同等のもの

3 Hyflo Supercel (Celite Corporation 製) 又はこれと同等のもの

4 Silicone SE-30 (GE 東芝シリコーン製) 又はこれと同等のもの

5 Gaschrom Q (Applied Science Labs 製、信和化工販売) 又はこれと同等のもの

新たにカラムを調製した場合は、カラムをエージングした後、カラム槽温度を 150~180 °C とし、シラン化処理試薬 (Silyl-8 (Pierce Chemical 製) 又は

これと同等のもの) をカラムに 200 μL 注入し、1 時間反応させた後、カラムを検出器に接続し、ベースラインを安定させる。

2 回目以降の使用に当たっては、シラン化処理試薬を 100 μL 注入し、同様の操作を行う。

9 ネオソラニオール

9.1 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

(適用範囲：飼料)

第 3 節 1 による。

9.2 トリコテセン系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

(適用範囲：飼料)

第 3 節 10 による。

10 フザレノン-X

10.1 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

(適用範囲：飼料)

第 3 節 1 による。

10.2 トリコテセン系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

(適用範囲：飼料)

第 3 節 10 による。

10.3 トリコテセン系かび毒のガスクロマトグラフによる同時分析法

(適用範囲：飼料)

第 3 節 5 による。

11 3-アセチルデオキシニバレノール

11.1 トリコテセン系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

(適用範囲：飼料)

第 3 節 10 による。

11.2 トリコテセン系かび毒のガスクロマトグラフによる同時分析法

(適用範囲：飼料)

第 3 節 5 による。

12 15-アセチルデオキシニバレノール

12.1 トリコテセン系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

(適用範囲：飼料)

第3節10による。

12.2 トリコテセン系かび毒のガスクロマトグラフによる同時分析法

(適用範囲：飼料)

第3節5による。

13 デオキシニバレノール

13.1 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

(適用範囲：飼料)

第3節1による。

13.2 トリコテセン系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

(適用範囲：飼料)

第3節10による。

13.3 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

(適用範囲：飼料)

第3節4による。

13.4 トリコテセン系かび毒のガスクロマトグラフによる同時分析法

(適用範囲：飼料)

第3節5による。

13.5 デオキシニバレノール及びニバレノールの液体クロマトグラフによる同時分析法

(適用範囲：穀類及びその副産物)

第3節6による。

13.6 ゼアラレノン及びデオキシニバレノールの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による系統的分析法

(適用範囲：稲発酵粗飼料、とうもろこしサイレージ)

第3節12による。

14 ニバレノール

14.1 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

(適用範囲：飼料)

第3節1による。

14.2 トリコテセン系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

(適用範囲：飼料)

第3節10による。

14.3 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

(適用範囲：飼料)

第3節4による。

14.4 トリコテセン系かび毒のガスクロマトグラフによる同時分析法

(適用範囲：飼料)

第3節5による。

14.5 デオキシニバレノール及びニバレノールの液体クロマトグラフによる同時分析法

(適用範囲：大麦を除く穀類及びその副産物)

第3節6による。

15 フモニシン B₁

15.1 フモニシンの液体クロマトグラフ質量分析計による同時分析法

(適用範囲：飼料)

第3節7による。

15.2 フモニシン B₁及び B₂の液体クロマトグラフによる同時分析法

(適用範囲：配合飼料及びとうもろこし)

第3節8による。

16 フモニシン B₂

16.1 フモニシンの液体クロマトグラフ質量分析計による同時分析法

(適用範囲：飼料)

第3節7による。

16.2 フモニシン B₁及び B₂の液体クロマトグラフによる同時分析法

(適用範囲：配合飼料及びとうもろこし)

第3節8による。

17 フモニシン B₃

17.1 フモニシンの液体クロマトグラフ質量分析計による同時分析法

(適用範囲：飼料)

第3節7による。

18 オクラトキシン A

18.1 オクラトキシン A 及びシトリニンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法

(適用範囲：飼料)

第3節11による。

18.2 液体クロマトグラフ法 (その1)

(適用範囲：穀類)

A 試薬の調製

オクラトキシン A 標準液 オクラトキシン A [C₂₀H₁₈NO₆Cl] 5 mg を正確に量って 25 mL の褐色全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてオクラトキシン A 標準原液を調製する (この液 1 mL はオクラトキシン A として 0.2 mg を含有する。)

使用に際して、標準原液の一定量をアセトニトリル-水-酢酸 (300+700+1) で正確に希釈し、1 mL 中にオクラトキシン A として 0.5~20 ng を含有する数点のオクラトキシン A 標準液を調製する。

B 定 量

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-酢酸 (84+16+1) 100 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出する。抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ、1,000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液をカラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 試料溶液を多機能カラム (オクラトキシン前処理用)^{注1}に入れ、初めの流出液 1 mL を捨て、その後の流出液 3 mL を 10 mL の試験管に受ける。この液 2 mL を別の 10 mL の試験管に正確に入れ、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する。

アセトニトリル-水-酢酸 (300+700+1) 1 mL を正確に加えて残留物を溶かす。この液をプラスチック製遠心沈殿管 (容量 1.5 mL) に入れ、5,000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各標準液各 50 μL を液体クロマトグラフに注入しクロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：蛍光検出器 (励起波長：385 nm、蛍光波長：444 nm)
カ ラ ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5 μm)^{注2}

溶 離 液：アセトニトリル-水-酢酸 (500+500+1)

アルカリ化溶液^{注3}：水酸化ナトリウム溶液 (0.1 mol/L)

流 速：溶離液 1.0 mL/min、アルカリ化溶液 0.3 mL/min

カラム槽温度：40 °C

計算 得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のオクラトキシン A 量を算出する。

注 1 MultiSep 229 Ochra (Romer Labs 製) 又はこれと同等のもの

2 Inertsil ODS-2 (ジューエルサイエンス製) 又はこれと同等のもの

3 PEEK 製ミキシングティーなどを用いて、カラムから溶出した溶離液とアルカリ化溶液を混合した後、蛍光検出器に送る。

(参考) 分析法バリデーション

・ 添加回収率及び繰返し精度

| 試料の種類 | 添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 繰返し | 添加回収率 (%) | 繰返し精度 RSD (%以下) |
|--------|-------------------------------------|-----|--------------|--------------------|
| とうもろこし | 1~20 | 3 | 95.8~121.3 | 0.4 |
| 大麦 | 1~20 | 3 | 96.4~118.0 | 2.5 |
| ライ麦 | 1~20 | 3 | 95.9~106.2 | 1.6 |

・ 共同試験

| 試料の種類 | 試験室 数 | 添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 添加回収率 (%) (測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)) | 室内繰返し精度 RSD _r (%) | 室間再現精度 RSD _R (%) | HorRat |
|-------|----------|-------------------------------------|--|---------------------------------|--------------------------------|--------|
| 小麦粉 | 7 | 5 | 98.2 | 3.7 | 8.8 | 0.40 |
| 小麦 | 7 | 自然汚染 | (3.83) | 7.1 | 11.0 | 0.50 |

・ 定量下限 試料中 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$

18.3 液体クロマトグラフによるオクラトキシン A 及びシトリニンの同時分析法

(適用範囲：穀類及び配合飼料)

第 3 節 9 による。

18.4 液体クロマトグラフ法 (その 2)

(適用範囲：穀類及び配合飼料)

A 試薬の調製

オクラトキシン A 標準液 オクラトキシン A [$\text{C}_{20}\text{H}_{10}\text{ClNO}_6$] 5 mg を正確に量って 250 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てオクラトキシン A 標準原液を調製する (この液 1 mL は、オクラトキシン A として 20 μg を含有する。)

使用に際して、標準原液の一定量をアセトニトリル-希リン酸^{注 1} (11+9) で正確に希釈し、1 mL 中にオクラトキシン A として 0.01~0.05 μg を含有する数点のオクラトキシン A 標準液を調製する。

B 定 量

抽出 分析試料 50 g を量って 500 mL の分液漏斗に入れ、酢酸 (1+19) 25 mL を加えて試料を潤した後、クロロホルム 250 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出する。

抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ、1,500 \times g で 5 分間遠心分離する。クロロホル

ム層（下層）を三角フラスコに入れ、適量の硫酸ナトリウム（無水）で脱水し、ろ紙（2種）でろ過する。

ろ液 50 mL を 100 mL のなす形フラスコに入れ、40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮し、更に窒素ガスを送って乾固する。トルエン 2 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 シリカゲルミニカラム（690 mg）をトルエン 10 mL で洗浄する。

試料溶液をミニカラムに入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコをトルエン 2 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液をミニカラムに加え、圧注^{注2}して流出させる。更に、トルエン 10 mL 及びクロロホルム-メタノール（97+3）6 mL を順次ミニカラムに加え、圧注^{注2}して流出させる。

50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、トルエン-酢酸（9+1）10 mL をミニカラムに加え、圧注^{注2}してオクラトキシン A を溶出させる。溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮し、更に窒素ガスを送って乾固する。アセトニトリル-希リン酸^{注1}（11+9）2 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（孔径 0.5 μm 以下）でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各オクラトキシン A 標準液各 20 μL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：蛍光検出器（励起波長：337 nm、蛍光波長：467 nm）

カ ラ ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5 μm）^{注3}

溶 離 液：アセトニトリル-希リン酸^{注1}（11+9）

流 速：1.0 mL/min

計 算 得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のオクラトキシン A 量を算出する。

注 1 リン酸（1+1,000）

2 流速は 2~3 mL/min とする。

3 UNISIL PACK 5C₁₈（ジーエルサイエンス製）又はこれと同等のもの

19 シトリニン

19.1 オクラトキシン A 及びシトリニンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法

（適用範囲：飼料）

第 3 節 11 による。

19.2 オクラトキシン A 及びシトリニンの液体クロマトグラフによる同時分析法

（適用範囲：穀類）

第 3 節 9 による。

- 20 α -ゼアララノール
- 20.1 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
(適用範囲：飼料)
第3節1による。
- 21 β -ゼアララノール
- 21.1 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
(適用範囲：飼料)
第3節1による。
- 22 ゼアララノン
- 22.1 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
(適用範囲：飼料)
第3節1による。
- 23 α -ゼアラレノール
- 23.1 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
(適用範囲：飼料)
第3節1による。
- 24 β -ゼアラレノール
- 24.1 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
(適用範囲：飼料)
第3節1による。
- 25 ジアセトキシシルペノール
- 25.1 トリコテセン系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
(適用範囲：飼料)
第3節10による。
- 26 デオキシニバレノール-3-グルコシド
- 26.1 トリコテセン系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
(適用範囲：飼料)
第3節10による。

第2節 エンドファイト産生毒素各条

1 エルゴバリン^{注1,2}

1.1 液体クロマトグラフ法

(適用範囲：乾牧草)

A 試薬の調製

- 1) 希釈溶媒 L-アスコルビン酸 1 g をメタノールに溶かし、1 L とする。
- 2) エルゴバリン標準液 酒石酸エルゴバリン $[(C_{29}H_{35}N_5O_5)_2 \cdot C_4H_6O_6]$ ^{注3} 11.4 mg を量って 100 mL の褐色全量フラスコに入れ、希釈溶媒を加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてエルゴバリン標準原液を調製する（この液 1 mL はエルゴバリンとして 0.1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、1 mL 中にエルゴバリンとして 0.25~5 µg を含有する数点のエルゴバリン標準液を調製する。

- 3) エルゴタミン標準液 酒石酸エルゴタミン $[(C_{33}H_{35}N_5O_5)_2 \cdot C_4H_6O_6]$ 11.3 mg を量って 100 mL の褐色全量フラスコに入れ、希釈溶媒を加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてエルゴタミン標準原液を調製する（この液 1 mL はエルゴタミンとして 0.1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、1 mL 中にエルゴタミンとして 6 µg を含有するエルゴタミン標準液を調製する。

- 4) 混合標準液^{注1} 各エルゴバリン標準液各 1 mL をそれぞれ 50 mL の褐色全量フラスコに正確に入れ、更にエルゴタミン標準液 1 mL ずつをそれぞれ正確に加える。更に各全量フラスコの標線までメタノール-アンモニア水 (100+0.04) を加え、1 mL 中にエルゴバリンとして 5~100 ng 及びエルゴタミンとしてそれぞれ 120 ng を含有する各混合標準液を調製する（使用時に調製する。）。

B 定 量

抽 出 分析試料 5 g を正確に量って 200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、酢酸 (5+21) 100 mL を加え、ときどき数秒間振り混ぜながら 2 時間抽出^{注4}する。抽出液にエルゴタミン標準液 1 mL を正確に加えて振り混ぜた後、ろ紙 (5 種 A) でろ過し、ろ液をカラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (360 mg) をメタノール 1 mL 及び水 4 mL で順次洗浄する。

試料溶液 10 mL を正確にミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させ、更に酢酸 (5+21) 4 mL 及び水 4 mL をミニカラムに順次加えて同様に流出させる。

15 mL の褐色共栓試験管をミニカラムの下に置き、メタノール-アンモニア水 (100+0.04) 5 mL を加えてエルゴバリン、エルゴタミン、エルゴバリン及びエルゴタミニンを溶出させる。溶出液を均質化した後、メンブランフィルター (孔径 0.5 µm 以下) でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各混合標準液各 20 µL を液体クロマトグラフに注入しクロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：蛍光検出器（励起波長：315 nm、蛍光波長：415 nm）

カ ラ ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm）^{注5}

溶 離 液：水-メタノール-アセトニトリル-アンモニア水
（90+90+20+0.3）

流 量：1.0 mL/min

カラム槽温度：40 °C

計 算^{注6} 得られたクロマトグラムから、エルゴタミンとエルゴタミニンのピーク面積の和（以下「 S_T 」という。）に対するエルゴバリンとエルゴバリニンのピーク面積の和（以下「 S_V 」という。）の比（以下「 S_V/S_T 」という。）を求め、各混合標準液のエルゴバリンの濃度に対する S_V/S_T から検量線を作成し、試料中のエルゴバリン量を算出する。

注 1 エルゴバリン及び内標準のエルゴタミンは、定量操作中に一定の割合で、それぞれエルゴバリニン及びエルゴタミニンに異性化する。混合標準液についても、調製後には同様に異性化する。

2 定量操作は遮光した状態で行う。

3 Auburn University（Division of Medical Chemistry）製

4 1時間に3~4回、数秒間振り混ぜる。

5 充てん剤の細孔径が 12 nm のもの（CAPCELL PAK C₁₈ UG120（資生堂製）又はこれと同等のもの）を用いる。

6 未開封の酒石酸エルゴバリン標準品が入手できない場合は、下式により近似的に試料中のエルゴバリン量を算出することができる。

$$\text{分析試料中のエルゴバリン含有量 (}\mu\text{g/kg)} = 1,200 \times \frac{S_V}{S_T}$$

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

| 試料の種類 | 添加濃度 (μg/kg) | 繰返し | 添加回収率 (%) | 繰返し精度 RSD (%以下) |
|---------|-----------------|-----|--------------|--------------------|
| トールフェスク | 200~1,000 | 3 | 97.2~103.3 | 1.8 |
| ライグラス | 200~1,000 | 3 | 93.7~104.8 | 1.6 |

・共同試験

| 試料の種類 | 試験室 数 | 添加濃度 (μg/kg) | 添加回収率 (%) | 室内繰返し精度 RSD _r (%) | 室間再現精度 RSD _R (%) | HorRat |
|---------|----------|-----------------|--------------|---------------------------------|--------------------------------|--------|
| トールフェスク | 7 | 485 | 100.1 | 2.5 | 8.5 | 0.48 |

・定量下限 試料中 50 μg/kg

2 ロリトレム B^{注1}

2.1 液体クロマトグラフ法

（適用範囲：乾牧草）

A 試薬の調製

ロリトレム B 標準液 ロリトレム B [$C_{42}H_{55}NO_7$] ^{注2} 1.3 μg を正確に量り、ジクロロメタン-アセトニトリル (4+1) 1 mL を正確に加えて溶かし、1 mL 中にロリトレム B として 1.3 μg を含有するロリトレム B 標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液の一定量をジクロロメタン-アセトニトリル (4+1) で正確に希釈し、1 mL 中にロリトレム B として 2~100 ng を含有する数点のロリトレム B 標準液を調製する。

B 定 量

抽出 分析試料 5 g を正確に量って 200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、酢酸エチル-エタノール (2+1) 100 mL を加え、ときどき数秒間振り混ぜながら 2 時間抽出^{注3}した後、抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過^{注4}する。ろ液 5 mL を正確に 25 mL のなし形フラスコに入れ、40 °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する。

ヘキサン-酢酸エチル (9+1) 5 mL を正確に加えて残留物を溶かした後、メンブランフィルター (孔径 0.5 μm 以下) でろ過し、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 シリカゲルミニカラム (690 mg) をヘキサン-酢酸エチル (9+1) 2 mL で洗浄する。

試料溶液 2 mL を正確にミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させ、更にヘキサン-酢酸エチル (9+1) 5 mL を加えて同様に流出させる。

25 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、ヘキサン-酢酸エチル (7+3) 6 mL を加えてロリトレム B を溶出させる。溶出液を 40 °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する。

ジクロロメタン-アセトニトリル (4+1) 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各ロリトレム B 標準液各 20 μL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：蛍光検出器 (励起波長：268 nm、蛍光波長：440 nm)

カ ラ ム：シリカゲルカラム (内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5 μm) ^{注5}

溶 離 液：ジクロロメタン-アセトニトリル-水 (200+50+1)

流 速：0.5 mL/min

計 算 得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のロリトレム B 量を算出する。

注 1 定量操作は遮光した状態で行う。

2 New Zealand Pastoral Agriculture Research Institute 製 (和光純薬工業販売)

3 1 時間に 3~4 回、数秒間振り混ぜる。

4 必要に応じて、抽出液を 50 mL の褐色共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液をろ過する。

5 充てん剤の細孔径が 7 nm のもの (ZORBAX SIL (Agilent Technologies 製)
 又はこれと同等のもの) を用いる。

(参考) 分析法バリデーション

- ・ 添加回収率及び繰返し精度

| 試料の種類 | 添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 繰返し | 添加回収率 (%) | 繰返し精度 RSD (%以下) |
|-------|-------------------------------------|-----|--------------|--------------------|
| ライグラス | 102~1,825 | 3 | 94.6~110.9 | 11.9 |

- ・ 共同試験

| 試料の種類 | 試験室 数 | 添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 添加回収率 (%) | 室内繰返し精度 RSD _r (%) | 室間再現精度 RSD _R (%) | HorRat |
|-------|----------|-------------------------------------|--------------|---------------------------------|--------------------------------|--------|
| ライグラス | 6 | 255 | 99.0 | 2.8 | 7.5 | 0.38 |

- ・ 定量下限 試料中 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$