

第3節 多成分分析法

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

- (1) 分析対象化合物 アフラトキシン B₁、アフラトキシン B₂、アフラトキシン G₁、アフラトキシン G₂、ステリグマトシスチン、ゼアラレノン、T-2 トキシン、デオキシニバレノール、ニバレノール、ネオソラニオール、フザレノン-X、 α -ゼアララノール、 β -ゼアララノール、ゼアララノン、 α -ゼアラレノール及び β -ゼアラレノール (16 成分)
- (2) 適用範囲 飼料^{注1}
- (3) 分析法

A 試薬の調製

- 1) 各かび毒標準原液 アフラトキシン B₁ [C₁₇H₁₂O₆]、アフラトキシン B₂ [C₁₇H₁₄O₆]、アフラトキシン G₁ [C₁₇H₁₂O₇]、アフラトキシン G₂ [C₁₇H₁₄O₇]、ステリグマトシスチン [C₁₈H₁₂O₆] 及びゼアラレノン [C₁₈H₂₂O₅] 各 1 mg、 α -ゼアララノール [C₁₈H₂₆O₅]、 β -ゼアララノール [C₁₈H₂₆O₅]、ゼアララノン [C₁₈H₂₄O₅]、 α -ゼアラレノール [C₁₈H₂₄O₅]、 β -ゼアラレノール [C₁₈H₂₄O₅]、T-2 トキシン [C₂₄H₃₄O₉] 及びネオソラニオール [C₁₉H₂₆O₈] 各 5 mg 並びにデオキシニバレノール [C₁₅H₂₀O₆]、ニバレノール [C₁₅H₂₀O₇] 及びフザレノン-X [C₁₇H₂₂O₈] 各 10 mg を正確に量ってそれぞれ 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す。更に各全量フラスコの標線まで同溶媒を加えて各かび毒の標準原液を調製する (これらの液 1 mL は、アフラトキシン B₁、アフラトキシン B₂、アフラトキシン G₁、アフラトキシン G₂、ステリグマトシスチン及びゼアラレノンとして 20 μ g を、 α -ゼアララノール、 β -ゼアララノール、ゼアララノン、 α -ゼアラレノール、 β -ゼアラレノール、T-2 トキシン及びネオソラニオールとして 100 μ g を、デオキシニバレノール、ニバレノール及びフザレノン-X として 200 μ g をそれぞれ含有する。)
- 2) かび毒混合標準液 アフラトキシン B₁ 及びアフラトキシン B₂ 標準原液各 1 mL、ゼアラレノン標準原液 2 mL、アフラトキシン G₁ 及びアフラトキシン G₂ 標準原液各 3 mL、 α -ゼアララノール、 β -ゼアララノール、ゼアララノン、 α -ゼアラレノール及び β -ゼアラレノール標準原液各 4 mL、ステリグマトシスチン、デオキシニバレノール及びフザレノン-X 標準原液各 10 mL、T-2 トキシン及びネオソラニオール標準原液各 20 mL 並びにニバレノール標準原液 30 mL を 200 mL の褐色全量フラスコに入れ、水 32 mL を加えて混合し、更に標線までアセトニトリルを加えてかび毒混合標準原液を調製する (この液 1 mL は、アフラトキシン B₁ 及びアフラトキシン B₂ として 0.1 μ g、ゼアラレノンとして 0.2 μ g、アフラトキシン G₁ 及びアフラトキシン G₂ として 0.3 μ g、 α -ゼアララノール、 β -ゼアララノール、ゼアララノン、 α -ゼアラレノール及び β -ゼアラレノールとして 0.4 μ g、ステリグマトシスチンとして 1 μ g、デオキシニバレノール、フザレノン-X、T-2 トキシン及びネオソラニオールとして 10 μ g 並びにニバレノールとして 30 μ g を含有する。)

使用に際して、かび毒混合標準原液の一定量をアセトニトリル-水 (21+4)

で 10~200 倍の間の数段階に正確に希釈し、更に各希釈液の一定量をそれぞれ同容量の酢酸 (1+100) で希釈して各かび毒混合標準液を調製する。

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、60 分間振り混ぜて抽出する^{注2}。抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ、650×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 10 mL を多機能カラム (かび毒前処理用)^{注3} に入れ、初めの流出液 4 mL を捨てる。10 mL の褐色試験管をカラムの下に置き、その後の流出液 2 mL を受ける。流出液 1 mL を別の 10 mL の褐色試験管に正確に入れ、酢酸 (1+100) 1 mL を正確に加えて希釈する。この液の一定量をプラスチック製遠心沈殿管 (容量 1.5 mL) にとり、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タンデム型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タンデム型質量分析計による測定 試料溶液及び各混合標準液各 10 µL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、選択反応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 4.6 mm、長さ 150 mm、粒径 5 µm)^{注4}

溶 離 液 : 10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (9+1) (1 min 保持) → 19 min → 10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (1+4) (15 min 保持)

流 速 : 0.2 mL/min

カ ラ ム 槽 温 度 : 40 °C

(タンデム型質量分析計部^{注5})

イ オ ン 化 法 : エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法

イ オ ン 源 温 度 : 120 °C

デソルベーション温度 : 300 °C

キャピラリー電圧 : 正イオン 4.0 kV、負イオン 1.5 kV

コ ー ン 電 圧 : 下表のとおり

コリジョンエネルギー : 下表のとおり

モ ニ タ ー イ オ ン : 下表のとおり

表 各かび毒のモニターイオン条件

かび毒名	測定 モード	プリカーサー イオン (<i>m/z</i>)	プロダクト イオン (<i>m/z</i>)	コーン 電圧 (V)	コリジョン エネルギー (eV)
アフラトキシンB ₁	+	313	241	40	35
アフラトキシンB ₂	+	315	243	40	35
アフラトキシンG ₁	+	329	214	40	35
アフラトキシンG ₂	+	331	217	40	35
ステリグマトシスチン	+	325	281	40	35
T-2トキシシン	+	484	305	20	15
ネオソラニオール	+	400	305	15	15
ゼアラレノン	-	317	175	40	25
α-ゼアララノール	-	321	277	30	25
β-ゼアララノール	-	321	277	30	25
ゼアララノン	-	319	205	30	20
α-ゼアラレノール	-	319	160	30	30
β-ゼアラレノール	-	319	160	30	30
デオキシニバレノール	-	355	295	10	10
ニバレノール	-	371	281	10	15
フザレノン-X	-	353	263	25	15

計 算 得られた選択反応検出クロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中の各かび毒量を算出する。

注 1 そうこう類及び植物性油かす類の一部で真度、精度等の低下が見られる場合があるため、必要に応じて別表 3 に定めるところにより妥当性を確認すること。

2 分析試料が抽出溶媒を吸収して振り混ぜることができない場合は、抽出溶媒の液量を 150 mL とする。

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

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

5 Quattro micro API Mass Analyzer (Waters 製) による条件例

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率、繰返し精度、定量下限及び検出下限

1) α -ゼアララノール、 β -ゼアララノール、ゼアララノン、 α -ゼアラレノール及び β -ゼアラレノール

添加成分名	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_r (%)	定量下限 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	検出下限 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
α -ゼアララノール	とうもろこし	4	3	117	7.4	4	2	
		8	3	120	1.9			
		100	3	111	0.4			
	大豆油かす	8	3	117	3.3			
		100	3	113	0.3			
	鶏用配合飼料	8	3	109	7.8			
		100	3	104	0.4			
	豚用配合飼料	4	3	112	2.4			
		8	3	99.9	4.6			
		100	3	96.7	0.6			
	β -ゼアララノール	とうもろこし	4	3	110	3.3	4	2
			8	3	107	5.6		
100			3	106	1.9			
大豆油かす		8	3	108	9.6			
		100	3	115	3.1			
鶏用配合飼料		8	3	103	11			
		100	3	104	2.2			
豚用配合飼料		4	3	113	7.8			
		8	3	99.9	8.3			
		100	3	93.5	3.6			
ゼアララノン		とうもろこし	4	3	113	11	4	2
			8	3	119	11		
	100		3	110	2.1			
	大豆油かす	8	3	102	0.6			
		100	3	106	3.2			
	鶏用配合飼料	8	3	116	7.4			
		100	3	106	0.3			
	豚用配合飼料	4	3	106	19			
		8	3	99.6	9.1			
		100	3	108	1.0			
	α -ゼアラレノール	とうもろこし	8	3	119	0.4	8	3
			100	3	115	3.3		
大豆油かす		8	3	102	13			
		100	3	117	1.5			
鶏用配合飼料		8	3	111	5.9			
		100	3	109	1.5			
豚用配合飼料		8	3	97.9	14			
		100	3	102	3.5			
β -ゼアラレノール		とうもろこし	8	3	98.8	14	8	3
			100	3	106	3.1		
		大豆油かす	8	3	105	9.8		
			100	3	114	2.2		
	鶏用配合飼料	8	3	106	5.2			
		100	3	105	0.9			
	豚用配合飼料	8	3	102	13			
		100	3	91.3	1.6			

2) その他のかび毒

添加成分名	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)	定量下限 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	検出下限 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
アフラトキシン B_1	とうもろこし	1~4	3	98.6~106.0	6.2	1	0.3
	牛用配合飼料	1~4	3	96.2~99.5	7.8		
アフラトキシン B_2	とうもろこし	1~4	3	101.4~105.5	6.4	1	0.3
	牛用配合飼料	1~4	3	94.2~100.8	7.5		
アフラトキシン G_1	とうもろこし	3~12	3	98.7~103.0	4.9	1	0.3
	牛用配合飼料	3~12	3	93.4~100.4	7.3		
アフラトキシン G_2	とうもろこし	3~12	3	100.3~103.0	5.8	1	0.3
	牛用配合飼料	3~12	3	97.4~101.3	9.1		
ステリグマトシスチン	とうもろこし	10~40	3	97.5~109.3	15.1	1	0.3
	牛用配合飼料	10~40	3	99.6~101.4	6.2		
ゼアラレノン	とうもろこし	2~8	3	99.8~102.4	14.0	1	0.3
	牛用配合飼料	2~8	3	105.9~109.3	9.8		
T-2トキシン	とうもろこし	100~400	3	102.7~103.0	8.6	8	2
	牛用配合飼料	100~400	3	100.1~108.1	10.7		
デオキシニバレノール	とうもろこし	100~400	3	104.4~106.2	7.7	40	10
	牛用配合飼料	100~400	3	96.4~103.9	9.9		
ニバレノール	とうもろこし	300~1,200	3	99.6~106.6	11.3	60	20
	牛用配合飼料	300~1,200	3	91.8~101.8	12.5		
ネオソラニオール	とうもろこし	100~400	3	101.8~110.3	13.0	8	2
	牛用配合飼料	100~400	3	91.1~92.6	12.4		
フザレノン-X	とうもろこし	100~400	3	97.9~106.2	8.3	80	20
	牛用配合飼料	100~400	3	104.6~110.2	12.2		

・共同試験

1) α -ゼアララノール、 β -ゼアララノール、ゼアララノン、 α -ゼアラレノール及び β -ゼアラレノール

分析成分名	試料の種類	試験室 数	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度	
						RSD _R (%)	HorRat
α -ゼアララノール	とうもろこし	10	50	100	2.0	17	0.77
	鶏用配合飼料	10	15	93.5	1.1	16	0.73
β -ゼアララノール	とうもろこし	11	50	90.7	4.3	23	1.0
	鶏用配合飼料	10	15	88.6	3.2	18	0.81
ゼアララノン	とうもろこし	9	50	109	1.3	8.1	0.37
	鶏用配合飼料	11	15	111	2.8	11	0.49
α -ゼアラレノール	とうもろこし	11	50	95.7	4.2	18	0.80
	鶏用配合飼料	9	15	94.3	2.2	18	0.82
β -ゼアラレノール	とうもろこし	10	50	92.3	3.5	21	0.95
	鶏用配合飼料	11	15	93.1	7.2	25	1.1

2) その他のかび毒

分析成分名	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
アフラトキシン B_1	とうもろこし	6	4	97.1	6.0	23.2	1.05
	牛用配合飼料	6	4	89.7	12.3	36.3	1.65
アフラトキシン B_2	とうもろこし	6	4	100.0	7.9	26.2	1.19
	牛用配合飼料	5	4	99.1	3.5	35.2	1.60
アフラトキシン G_1	とうもろこし	6	12	86.3	6.3	41.4	1.88
	牛用配合飼料	5	12	82.0	5.1	47.1	2.14
アフラトキシン G_2	とうもろこし	6	12	93.8	5.7	28.5	1.30
	牛用配合飼料	6	12	85.3	17.1	37.1	1.69
ステリグマトシステン	とうもろこし	6	40	113.3	7.0	11.6	0.53
	牛用配合飼料	5	40	113.9	7.0	17.4	0.79
ゼアラレノン	とうもろこし	6	8+自然汚染	(16.2)	13.0	14.6	0.66
	牛用配合飼料	6	8+自然汚染	(27.9)	19.0	36.1	1.64
T-2トキシシ	とうもろこし	6	400	108.7	2.6	13.8	0.75
	牛用配合飼料	5	400	107.4	3.6	17.9	0.97
デオキシニバレノール	とうもろこし	6	400+自然汚染	(444.3)	4.5	5.6	0.31
	牛用配合飼料	5	400	112.8	5.2	17.6	0.96
ニバレノール	とうもろこし	5	1,200	86.7	9.9	14.9	0.96
	牛用配合飼料	6	1,200	61.7	27.6	23.9	1.54
ネオソラニオール	とうもろこし	5	400	109.6	1.4	13.1	0.71
	牛用配合飼料	6	400	83.3	17.9	30.0	1.63
フザレノン-X	とうもろこし	5	400	104.4	6.2	11.3	0.62
	牛用配合飼料	4	400	105.6	5.8	5.8	0.32

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

- (1) 分析対象化合物 アフラトキシン B_1 、 B_2 、 G_1 及び G_2 (4 成分)
- (2) 適用範囲 配合飼料、とうもろこし及びとうもろこしサイレージ
- (3) 分析法^{注1}

A 試薬の調製

- 1) アフラトキシン B_1 標準原液 アフラトキシン B_1 [$\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_6$] 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アフラトキシン B_1 標準原液を調製する (この液 1 mL は、アフラトキシン B_1 として 0.2 mg を含有する。)
- 2) アフラトキシン B_2 標準原液 アフラトキシン B_2 [$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$] 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アフラトキシン B_2 標準原液を調製する (この液 1 mL は、アフラトキシン B_2 として 0.2 mg を含有する。)
- 3) アフラトキシン G_1 標準原液 アフラトキシン G_1 [$\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_7$] 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アフラトキシン G_1 標準原液を調製する (この液 1 mL は、アフラトキシン G_1 として 0.2 mg を含有する。)
- 4) アフラトキシン G_2 標準原液 アフラトキシン G_2 [$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7$] 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アフラトキシン G₂ 標準原液を調製する（この液 1 mL は、アフラトキシン G₂ として 0.2 mg を含有する。）。

- 5) アフラトキシン混合標準原液 アフラトキシン B₁、B₂、G₁ 及び G₂ 各標準原液の一定量を混合し、アセトニトリルで正確に希釈し、1 mL 中にアフラトキシン B₁、B₂、G₁ 及び G₂ としてそれぞれ 0.5 µg ずつを含有するアフラトキシン混合標準原液を調製する。

使用に際して、アフラトキシン混合標準原液の一定量をアセトニトリルで正確に希釈し、1 mL 中にアフラトキシン B₁、B₂、G₁ 及び G₂ として 20 ng を含有するアフラトキシン混合標準液を調製する。

B 定 量

抽 出 分析試料 50 g^{注2}（とうもろこしサイレージは 25 g）を量って 300 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水（9+1）100 mL（とうもろこしサイレージは 150 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、650×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 4.5 mL を試験管に入れ、多機能カラム（アフラトキシン前処理用）^{注3} をゆっくり押し込み、充てん剤を通過した流出液を誘導体化反応に供する試料溶液とする。

誘導体化反応 試料溶液 1 mL を 50 mL のなす形フラスコ^{注4} に正確に入れ、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。残留物にトリフルオロ酢酸 0.1 mL を正確に加え、なす形フラスコを密栓した後 15 分間静置し、更に水-アセトン（9+1）0.9 mL を先のなす形フラスコに正確に加えて振り混ぜる。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。

同時にアフラトキシン混合標準原液 2~60 µL の間の数点及びアフラトキシン混合標準液 2.5~25 µL の間の数点をそれぞれ 50 mL のなす形フラスコ^{注4} に正確に入れ、トリフルオロ酢酸 0.1 mL を正確に加える。以下試料溶液と同様に操作し、1 mL 中にアフラトキシン B₁、B₂、G₁ 及び G₂ としてそれぞれ 0.05~30 ng 相当量を含有する各標準液を調製する。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各標準液各 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 365 nm、蛍光波長 450 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5}

溶 離 液：水-メタノール（3+2）

流 速：0.8 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、試料中のアフラトキシン B₁、B₂、G₁ 及び G₂ 量を算出する。

注 1 定量操作は遮光した状態で行う。

2 振り混ぜることが困難な試料については 25.0 g とする。

3 Myco Sep 226 AflaZon+ (Romer Labs 製) 又はこれと同等のもの

4 50 mL のなす形フラスコの代わりに、50 mL 容以下のスクリーキャップ付きバイアルや試験管に正確にとり、遠心エバポレーター等を用いて 40 °C 以下で濃縮及び窒素ガスを送って乾固させた後、誘導体化反応を行うことも可能

5 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

添加回収試験結果 (配合飼料及びとうもろこし)

添加成分名	試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返 し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%以下)
アフラトキシンB ₁	鶏用配合飼料	0.01~0.1	3	96.0~103.3	5.2
	牛用配合飼料	0.01~0.1	3	96.0~97.3	2.8
	とうもろこし	0.01~0.1	3	92.0~100.3	4.0
アフラトキシンB ₂	鶏用配合飼料	0.01~0.1	3	92.0~95.0	4.8
	牛用配合飼料	0.01~0.1	3	90.7~100.3	4.7
	とうもろこし	0.01~0.1	3	92.7~96.3	5.3
アフラトキシンG ₁	鶏用配合飼料	0.01~0.1	3	95.3~102.7	7.4
	牛用配合飼料	0.01~0.1	3	94.0~102.3	4.4
	とうもろこし	0.01~0.1	3	95.3~101.0	4.2
アフラトキシンG ₂	鶏用配合飼料	0.01~0.1	3	92.7~96.0	8.0
	牛用配合飼料	0.01~0.1	3	91.0~103.7	5.0
	とうもろこし	0.01~0.1	3	91.7~97.0	1.7

添加回収試験結果 (定量下限相当濃度、配合飼料及びとうもろこし)

添加成分名	試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返 し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
アフラトキシンB ₁	鶏用配合飼料	0.0005	5	91.8	4.5
	ほ乳期子牛育成用代用乳用配合飼料	0.0005	5	96.6	4.7
	とうもろこし	0.0005	5	94.2	2.7
アフラトキシンB ₂	鶏用配合飼料	0.0005	5	88.9	2.5
	ほ乳期子牛育成用代用乳用配合飼料	0.0005	5	90.2	2.5
	とうもろこし	0.0005	5	87.5	1.7
アフラトキシンG ₁	鶏用配合飼料	0.0005	5	94.9	3.7
	ほ乳期子牛育成用代用乳用配合飼料	0.0005	5	83.5	8.5
	とうもろこし	0.0005	5	91.9	1.6
アフラトキシンG ₂	鶏用配合飼料	0.0005	5	93.5	2.4
	ほ乳期子牛育成用代用乳用配合飼料	0.0005	5	89.9	5.3
	とうもろこし	0.0005	5	91.4	0.8

添加回収試験結果（とうもろこしサイレージ）

添加成分名	試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返 し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
アフラトキシンB ₁	とうもろこしサイレージ1	0.0013	5	116	2.1
		0.022	5	89.2	1.4
		0.044	5	92.7	1.7
	とうもろこしサイレージ2	0.0013	5	93.0	1.4
		0.011	5	92.5	1.6
	とうもろこしサイレージ3	0.0013	5	97.8	4.4
0.022		5	85.0	3.5	
アフラトキシンB ₂	とうもろこしサイレージ1	0.0013	5	104	2.1
		0.022	5	88.7	1.1
		0.044	5	89.7	1.6
	とうもろこしサイレージ2	0.0013	5	119	2.2
		0.011	5	89.9	1.5
	とうもろこしサイレージ3	0.0013	5	113	4.2
0.022		5	84.0	3.2	
アフラトキシンG ₁	とうもろこしサイレージ1	0.0013	5	103	3.3
		0.022	5	91.6	1.4
		0.044	5	95.3	2.2
	とうもろこしサイレージ2	0.0013	5	106	3.3
		0.011	5	96.1	2.3
	とうもろこしサイレージ3	0.001	5	96.0	3.3
0.022		5	88.1	3.1	
アフラトキシンG ₂	とうもろこしサイレージ1	0.00022	5	93.8	6.3
		0.022	5	91.7	0.8
		0.044	5	94.0	1.7
	とうもろこしサイレージ2	0.00022	5	94.8	10
		0.011	5	93.9	3.5
	とうもろこしサイレージ3	0.00022	5	82.6	2.6
0.022		5	87.5	2.6	

・共同試験

分析成分名	試料の種類	試験 室数	添加濃度 (mg/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
アフラトキシンB ₁	鶏用配合飼料	7	0.02	98.5	2.9	3.8	0.17
アフラトキシンB ₂	鶏用配合飼料	7	0.02	90.6	2.8	7.3	0.33
アフラトキシンG ₁	鶏用配合飼料	7	0.02	100.0	2.6	3.0	0.14
アフラトキシンG ₂	鶏用配合飼料	7	0.02	93.5	2.6	4.9	0.22

- ・定量下限 試料中（とうもろこしサイレージを除く。） 0.0005 mg/kg、
とうもろこしサイレージ（風乾物）中 アフラトキシン G₂ 0.0005 mg/kg その他の
のアフラトキシン 各 0.003 mg/kg
- ・検出下限 試料中（とうもろこしサイレージを除く。） 各 0.0001 mg/kg、
とうもろこしサイレージ（風乾物）中 アフラトキシン G₂ 0.0002 mg/kg その他の
のアフラトキシン 各 0.001 mg/kg

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

- (1) 分析対象化合物 アフラトキシン B₁、B₂、G₁ 及び G₂ (4 成分)
- (2) 適用範囲 大豆油かすを除く飼料
- (3) 分析法^{注1}

A 試薬の調製

- 1) アフラトキシン B₁ 標準原液 2 の(3)の A の 1)による。
- 2) アフラトキシン B₂ 標準原液 2 の(3)の A の 2)による。
- 3) アフラトキシン G₁ 標準原液 2 の(3)の A の 3)による。
- 4) アフラトキシン G₂ 標準原液 2 の(3)の A の 4)による。
- 5) 混合標準液 使用に際して、アフラトキシン B₁、B₂、G₁ 及び G₂ 各標準原液の一定量を混合し、アセトニトリル-水 (9+1) で正確に希釈し、1 mL 中にアフラトキシン B₁、B₂、G₁ 及び G₂ としてそれぞれ 2.5~20 ng を含有する数点の混合標準液を調製する。

B 定 量

抽 出 分析試料 50 g^{注2}を量って 300 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水 (9+1) 100 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出する。抽出液をろ紙 (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 試料溶液 6 mL を試験管に入れ、多機能カラム (アフラトキシン前処理用)^{注3}をゆっくり押し込み、充てん剤を通過した初めの流出液 1 mL を捨てる。更に先のカラムを同様に押し込んでアフラトキシン B₁、B₂、G₁ 及び G₂ を流出させる。流出液を均質化した後、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、6,000×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 365 nm、蛍光波長 450 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4}

溶 離 液：水-メタノール-アセトニトリル (11+8+1)

流 速：0.7 mL/min

カラム槽温度：35 °C

光化学反応システム^{注5, 6}：245 nm 低圧水銀灯 (15 W) 照射システムの反応コイル用ホルダーに反応コイル (内径 0.25 mm、長さ 10 m) を装着したもの

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、試料中のアフラトキシン B₁、B₂、G₁ 及び G₂ 量を算出する。

注 1 定量操作は遮光した状態で行う。

2 振り混ぜることが困難な試料については 25.0 g とする。

- 3 MycoSep 226 AflaZon+, MycoSep 228 AflaPat (Romer Labs 製) 又はこれらと同等のもの
- 4 Shodex C18M4E (昭和電工製) 又はこれと同等のもの
- 5 PHRED (AURA industries 製) 又はこれと同等のものを用い、カラムと検出器の間に接続する。
- 6 当システムによる紫外線照射を行わない場合、アフラトキシン B₁ 及び G₁ の蛍光誘導体化合物が生成されないため、アフラトキシン B₁ 及び G₁ のピークが消失する。これにより、検出ピークの同定を行うことができる。

(参考) 分析法バリデーション

・ 添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	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)
アフラトキシンB ₁	鶏用配合飼料	5~40	3	84.0~96.9	7.1
	牛用配合飼料	5~40	3	79.3~98.3	4.3
	とうもろこし	5~40	3	87.1~99.3	10.3
	大豆油かす	5~40	3	54.9~91.7	21.2
アフラトキシンB ₂	鶏用配合飼料	5~40	3	79.4~92.0	13.9
	牛用配合飼料	5~40	3	80.9~102.5	4.0
	とうもろこし	5~40	3	89.0~94.0	4.2
	大豆油かす	5~40	3	79.4~96.6	7.9
アフラトキシンG ₁	鶏用配合飼料	5~40	3	77.2~93.3	7.1
	牛用配合飼料	5~40	3	78.5~89.3	8.1
	とうもろこし	5~40	3	72.5~86.8	9.3
	大豆油かす	5~40	3	84.1~92.1	6.0
アフラトキシンG ₂	鶏用配合飼料	5~40	3	72.4~100.5	11.2
	牛用配合飼料	5~40	3	88.5~96.5	8.1
	とうもろこし	5~40	3	78.0~94.9	4.5
	大豆油かす	5~40	3	91.5~104.7	3.5

・ 共同試験

分析成分名	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
アフラトキシンB ₁	牛用配合飼料	7	5	110.8	3.2	11.6	0.53
	とうもろこし	7	自然汚染	(8.89)	6.7	17.3	0.79
アフラトキシンB ₂	牛用配合飼料	7	5	94.6	1.9	9.5	0.43
アフラトキシンG ₁	牛用配合飼料	7	5	108.0	2.8	15.9	0.72
アフラトキシンG ₂	牛用配合飼料	7	5	87.0	3.7	9.0	0.41

4 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

- (1) 分析対象化合物 T-2 トキシン、デオキシニバレノール及びニバレノール (3成分)
- (2) 適用範囲 飼料

(3) 分析法

A 試薬の調製

- 1) T-2 トキシシン標準原液 T-2 トキシシン [$C_{24}H_{34}O_9$] 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、T-2 トキシシンとして 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 25 μ g を含有する T-2 トキシシン標準原液を調製する。
- 2) デオキシニバレノール標準原液 デオキシニバレノール [$C_{15}H_{20}O_6$] 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、デオキシニバレノールとして 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 中にデオキシニバレノールとして 25 μ g を含有するデオキシニバレノール標準原液を調製する。
- 3) ニバレノール標準原液 ニバレノール [$C_{15}H_{20}O_7$] 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、ニバレノールとして 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 中にニバレノールとして 25 μ g を含有するニバレノール標準原液を調製する。
- 4) 混合標準液 使用に際して、T-2 トキシシン、デオキシニバレノール及びニバレノール各標準原液の一定量を混合し、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 T-2 トキシシン、デオキシニバレノール及びニバレノールとしてそれぞれ 0.01~1 μ g を含有する数点の混合標準液を調製する。

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 \times 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、その後の流出液 3 mL を 10 mL の試験管に受ける。流出液 2 mL を正確に 50 mL のなす形フラスコに入れ、50 $^{\circ}$ 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 試料溶液及び各標準液 5 μ L 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 μ m) ^{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分保持)

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4}

イ オ ン 化 法 : 大気圧光イオン化 (APPI) 法又は大気圧化学イオン化 (APCI) 法 (正イオンモード : T-2 トキシン、負イオンモード : デオキシニバレノール及びニバレノール)

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)

ペ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* 484 (T-2 トキシン) 、 355 (デオキシニバレノール) 、 371 (ニバレノール)

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を求めて検量線を作成し、試料中の T-2 トキシン量、デオキシニバレノール量及びニバレノール量を算出する。

注 1 分析試料が抽出溶媒を吸収して振り混ぜることができない場合は、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 Multi Sep 227 Trich+ (Romer Labs 製) 又はこれと同等のもの

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

4 Agilent 1100 MSD SL (Agilent Technologies 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

添加成分名	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)
デオキシニバレノール	鶏用配合飼料	100~1,000	3	104.3~111.0	4.2
	豚用配合飼料	100~1,000	3	115.2~115.9	5.1
	マイロ	100~1,000	3	100.8~108.4	7.7
	大麦	100~1,000	3	105.6~110.6	8.5
ニバレノール	鶏用配合飼料	100~1,000	3	84.9~87.4	9.0
	豚用配合飼料	100~1,000	3	86.5~90.6	7.6
	マイロ	100~1,000	3	83.7~92.5	3.8
	大麦	100~1,000	3	83.7~85.8	14.4
T-2トキシン	幼すう育成用配合飼料	10~1,000	3	96.3~119.7	10.5
	牛用配合飼料	10~1,000	3	104.9~108.7	3.3
	とうもろこし	10~1,000	3	90.0~107.3	14.7
	小麦	10~1,000	3	102.8~106.7	3.3

・共同試験

分析成分名	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 _T (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
デオキシニバ レノール	鶏用配合飼料	5	500	113.8	1.6	4.7	0.26
ニバレノール	鶏用配合飼料	5	自然汚染	(211)	5.1	19.1	0.94
T-2トキシン	ブロイラー肥育 後期用配合飼料	6	200	89.4	3.0	12.9	0.63

- ・定量下限 デオキシニバレノール及びニバレノール 試料中 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、T-2トキシン 試料中 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$

5 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^{注1}

- (1) 分析対象化合物 3-アセチルデオキシニバレノール、15-アセチルデオキシニバレノール、デオキシニバレノール、ニバレノール及びフザレノン-X (5成分)
- (2) 適用範囲 飼料
- (3) 分析法

A 試薬の調製

- 1) 3-アセチルデオキシニバレノール標準原液 3-アセチルデオキシニバレノール [$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_7$] 1 mg を 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 3-アセチルデオキシニバレノール標準原液を調製する (この液 1 mL は、3-アセチルデオキシニバレノールとして 0.2 mg を含有する。)
- 2) 15-アセチルデオキシニバレノール標準原液 15-アセチルデオキシニバレノール [$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_7$] 1 mg を 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 15-アセチルデオキシニバレノール標準原液を調製する (この液 1 mL は、15-アセチルデオキシニバレノールとして 0.2 mg を含有する。)
- 3) デオキシニバレノール標準原液 デオキシニバレノール [$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_6$] 1 mg を

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デオキシニバレノール標準原液調製する（この液 1 mL は、デオキシニバレノールとして 0.2 mg を含有する。）。

- 4) ニバレノール標準原液　ニバレノール [C₁₅H₂₀O₇] 1 mg を 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ニバレノール標準原液調製する（この液 1 mL は、ニバレノールとして 0.2 mg を含有する。）。
- 5) フザレノン-X 標準原液　フザレノン-X [C₁₇H₂₂O₈] 1 mg を 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、フザレノン-X として 0.2 mg を含有する。）。
- 6) 混合標準原液　3-アセチルデオキシニバレノール標準原液、15-アセチルデオキシニバレノール標準原液、デオキシニバレノール標準原液、ニバレノール標準原液及びフザレノン-X 標準原液の一定量を混合し、アセトニトリルで正確に希釈し、1 mL 中に各かび毒としてそれぞれ 10 µg を含有する混合標準原液を調製する。
- 7) 誘導体化試薬^{注1}　*N*-トリメチルシリルイミダゾール-*N,O*-ビス（トリメチルシリル）アセトアミド-トリメチルクロロシラン（3+3+2）（使用時に調製する。）

B 定 量

抽 出　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2}。抽出液を 10 mL の遠心沈殿管に入れ、650×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3} に入れ、初めの流出液 3 mL を捨てる。その後の流出液 3 mL から 2 mL を正確に 50 mL のなす形フラスコに入れ、誘導体化に供する試料溶液とする。

誘導体化　試料溶液を 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。残留物に誘導体化試薬 0.1 mL を加え、試料溶液の入っていたなす形フラスコを密栓して室温で 15 分間静置する。2,2,4-トリメチルペンタン 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、更に水 1 mL を加え、5 分間振り混ぜる。この液全量を 10 mL 以下の試験管に入れ、振り混ぜた後静置し、2,2,4-トリメチルペンタン層（上層）をガスクロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

標準原液の誘導体化　かび毒混合標準原液 1 mL を正確に 50 mL のなす形フラスコに入れ、窒素ガスを送って乾固する。残留物に誘導体化試薬 0.1 mL を加え、先のなす形フラスコを密栓して室温で 15 分間静置する。2,2,4-トリメチルペンタン^{注4} 5 mL を正確に加えて残留物を溶かし、更に水 1 mL を加え、5 分間振り混ぜる。この液全量を 10 mL 以下の試験管に入れ、振り混ぜた後静置する。2,2,4-トリメチルペンタン層（上層）を同溶媒で正確に希釈し、1 mL 中に各かび毒として 0.01~1 µg 相当量を含有する数点のガスクロマトグラフィーに供する標準液

を調製する。

ガスクロマトグラフィー 試料溶液及び各標準液各 1 μ L をガスクロマトグラフに注入し^{注5}、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：電子捕獲型検出器

カ ラ ム^{注6}：熔融石英製キャピラリーカラム（35 %ジフェニルー
65 %ジメチルポリシロキサンコーティング、内径 0.25
mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m）

キャリアーガス：He（1.5 mL/min）

メイクアップガス：N₂（40 mL/min）

試料導入法：スプリットレス（60 s）

試料導入部温度：250 °C

カラム槽温度：80 °C（1 分間保持）→昇温 20 °C/min→180 °C→昇温
5 °C/min→300 °C（10 分間保持）

検出器温度：300 °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、試料中の各かび毒量を算出する。

注 1 定量する各かび毒を十分誘導体化できる試薬を使用する。

2 そうこう類等ペースト状になりやすい試料の場合は、試料 25.0 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリルー水（21+4）150 mL を加え、60 分間振り混ぜて抽出する。

3 Autoprep MF-T 1500（昭和電工製）、MultiSep 227 Trich+（Romer Labs 製）又はこれらと同等のもの

4 残留農薬試験用試薬又はこれと同等のものを用いる。

5 試料導入部にはシラン処理済みのインサートを使用する。このインサートによる定量値への影響がないことを確認する。

6 夾雑成分のピークと十分分離できることを確認する。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	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)
デオキシニバレノール	鶏用配合飼料	100~1,000	3	90.8~99.4	10.6
	豚用配合飼料	100~1,000	3	93.2~96.8	11.4
	マイロ	100~1,000	3	94.2~99.6	2.2
	大麦	100~1,000	3	92.8~98.7	3.6
ニバレノール	鶏用配合飼料	100~1,000	3	95.3~105.2	4.0
	豚用配合飼料	100~1,000	3	93.5~99.7	8.1
	マイロ	100~1,000	3	96.1~96.3	0.7
	大麦	100~1,000	3	85.8~92.4	4.3
3-アセチルデオキシニバレノール	鶏用配合飼料	100~1,000	3	95.0~96.5	4.2
	豚用配合飼料	100~1,000	3	96.6~99.2	7.6
	マイロ	100~1,000	3	93.2~95.7	6.0
	大麦	100~1,000	3	92.3~99.1	3.2
15-アセチルデオキシニバレノール	鶏用配合飼料	100~1,000	3	98.6~103.7	6.7
	豚用配合飼料	100~1,000	3	97.9~98.3	6.2
	マイロ	100~1,000	3	92.8~94.7	3.6
	大麦	100~1,000	3	94.2~97.1	3.2
フザレノン-X	鶏用配合飼料	100~1,000	3	94.6~98.1	4.5
	豚用配合飼料	100~1,000	3	96.1~99.8	5.3
	マイロ	100~1,000	3	92.6~97.0	2.4
	大麦	100~1,000	3	91.4~101.0	2.5

・共同試験

分析成分名	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
デオキシニバレノール	マイロ	8	400	105.2	4.1	6.2	0.34
	豚用配合飼料	8	自然汚染	(503)	4.7	10.3	0.58
ニバレノール	マイロ	8	400	95.4	4.5	6.1	0.33
	豚用配合飼料	8	自然汚染	(56.7)	8.4	14.7	0.67
3-アセチルデオキシニバレノール	マイロ	8	400	107.3	5.9	6.6	0.36
15-アセチルデオキシニバレノール	マイロ	8	400	105.4	5.1	7.3	0.40
	豚用配合飼料		自然汚染	(89.3)	8.4	17.3	0.79
フザレノン-X	マイロ	8	400	106.1	5.4	6.1	0.33

・定量下限 各かび毒 試料中 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$

6 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

- (1) 分析対象化合物 デオキシニバレノール及びニバレノール (2成分)
- (2) 適用範囲 穀類 (ニバレノールにあっては大麦を除く。) 及びその副産物
- (3) 分析法

A 試薬の調製

混合標準液 デオキシニバレノール [$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_6$] 及びニバレノール [$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_7$]
各 1 mg を正確に量ってそれぞれ 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、更に各全量フラスコの標線まで同溶媒を加えてデオキシニ

バレノール標準原液及びニバレノール標準原液を調製する（これらの液各 1 mL は、デオキシニバレノール及びニバレノールとしてそれぞれ 0.2 mg を含有する。）。

使用に際して、デオキシニバレノール及びニバレノール各標準原液の一定量を混合し、アセトニトリルで正確に希釈し、1 mL 中にデオキシニバレノール及びニバレノールとしてそれぞれ 25 µg を含有する液を調製する。更にこの液の一定量を水-メタノール-アセトニトリル（18+1+1）で正確に希釈し、1 mL 中にデオキシニバレノール及びニバレノールとしてそれぞれ 0.2~2 µg ずつを含有する数点の混合標準液を調製する。

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、その後の流出液 3 mL を 10 mL の試験管に受ける。

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：紫外吸光光度検出器（測定波長：220 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：水-メタノール-アセトニトリル（18+1+1）

流 速：1 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、試料中のデオキシニバレノール量及びニバレノール量を算出する。

注 1 試料が抽出溶媒を吸収して振り混ぜができない場合は、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 Shodex シリカ C18M 4E（昭和電工製）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

添加成分名	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)
デオキシニバレノール	とうもろこし	200~1,000	3	99.7~101.9	11.2
	マイロ	200~1,000	3	96.1~96.1	3.8
	小麦	200~1,000	3	98.2~108.2	4.2
	大麦	200~1,000	3	97.7~97.9	11.0
ニバレノール	とうもろこし	200~1,000	3	88.9~98.3	4.0
	マイロ	200~1,000	3	78.2~93.4	2.1
	小麦	200~1,000	3	78.6~86.5	4.7
	大麦	200~1,000	3	78.2~92.3	3.2

・共同試験

分析成分名	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
デオキシニバレノール	とうもろこし	7	1,000	102.8	3.4	4.2	0.26
ニバレノール	とうもろこし	7	1,000	84.4	3.1	3.7	0.23

・定量下限 各かび毒 試料中 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$

7 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

- (1) 分析対象化合物 フモニシン B₁、B₂及び B₃ (3成分)
- (2) 適用範囲 飼料
- (3) 分析法

A 試薬の調製

フモニシン混合標準液 フモニシン B₁ [C₃₄H₅₉NO₁₅]、フモニシン B₂ [C₃₄H₅₉NO₁₄] 及びフモニシン B₃ [C₃₄H₅₉NO₁₄] 各 10 mg を正確に量ってそれぞれ 50 mL の全量フラスコに入れ、アセトニトリル-水 (1+1) を加えて溶かし、更に各全量フラスコの標線まで同溶媒を加えてフモニシン B₁、B₂ 及び B₃ 各標準原液を調製する (これらの液各 1 mL はフモニシン B₁、B₂ 及び B₃ としてそれぞれ 0.2 mg を含有する。)

使用に際して、フモニシン B₁、B₂ 及び B₃ 各標準原液の一定量を混合し、アセトニトリル-水 (1+1) で正確に希釈し、1 mL 中にフモニシン B₁、B₂ 及び B₃ としてそれぞれ 1~1,000 ng を含有する数点のフモニシン混合標準液を調製する。

B 定 量

抽出 分析試料 20.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、メタノール-水 (3+1) 100 mL を加え、15 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、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 トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) ^{注1} をメタノール 8 mL 及びメタノール-水 (3+1) 8 mL で順次洗浄する。

試料溶液 10 mL をミニカラムに正確に入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた後、メタノール-水 (3+1) 8 mL 及びメタノール 8 mL を順次カ

ートリッジに加え、同様に流出させる。

50 mL のなし形フラスコをミニカラムの下に置き、メタノール-酢酸 (99+1) 14 mL をミニカラムに加えてフモニシン B₁、B₂ 及び B₃ 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。アセトニトリル-水 (1+1) 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、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 試料溶液及び各混合標準液 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

カラム : オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 5 µm) ^{注2}

溶離液 : 0.1 %ギ酸溶液-アセトニトリル (3+1) →5 min→ (1+1) (3 分保持) →2 min→ (3+1)

流速 : 0.2 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 : エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法 (正イオンモード)

フラグメンター電圧 : 220 V

ネブライザー圧力 : N₂ (340 kPa)

乾燥ガス : N₂ (10 L/min、350 °C)

キャピラリー電圧 : 3,000 V

モニターイオン : *m/z* 722 (フモニシン B₁)、706 (フモニシン B₂ 及び B₃)

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高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のフモニシン B₁、B₂ 及び B₃ 量を算出する。

注 1 Bond Elut LRC SAX (Varian 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 Agilent 1100 MSD SL (Agilent Technologies 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

添加成分名	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)
フモニシンB ₁	成鶏飼育用配合飼料	300~3,000	3	72.9~102.9	5.2
	ほ乳期子牛育成用配合飼料	300~3,000	3	80.6~106.3	11.3
	とうもろこし	300~3,000	3	78.6~89.7	10.2
	大麦	300~3,000	3	70.5~74.4	2.3
フモニシンB ₂	成鶏飼育用配合飼料	150~1,500	3	70.6~92.8	3.0
	ほ乳期子牛育成用配合飼料	150~1,500	3	75.6~108.7	9.1
	とうもろこし	150~1,500	3	76.9~88.3	4.9
	大麦	150~1,500	3	64.9~71.1	9.1
フモニシンB ₃	成鶏飼育用配合飼料	60~600	3	70.0~90.7	5.3
	ほ乳期子牛育成用配合飼料	60~600	3	78.2~110.0	10.3
	とうもろこし	60~600	3	75.0~75.6	5.2
	大麦	60~600	3	70.1~72.1	3.7

・共同試験

分析成分名	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 _f (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
フモニシンB ₁	鶏用配合飼料	11	1,000	80.5	4.3	13.6	0.85
	鶏用配合飼料	11	自然汚染	(218)	9.9	19.2	0.95
フモニシンB ₂	鶏用配合飼料	11	400	72.0	6.2	10.0	0.54
	鶏用配合飼料	11	自然汚染	(59)	9.7	15.7	0.71
フモニシンB ₃	鶏用配合飼料	11	150	74.8	7.0	11.6	0.55
	鶏用配合飼料	11	自然汚染	(24)	11.3	19.4	0.88

・定量下限 各かび毒 試料中 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$

8 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

- (1) 分析対象化合物 フモニシン B₁ 及び B₂
- (2) 適用範囲 配合飼料及びとうもろこし
- (3) 分析法

A 試薬の調製

フモニシン混合標準液 フモニシン B₁ [C₃₄H₅₉NO₁₅] 及びフモニシン B₂ [C₃₄H₅₉NO₁₄] 各 10 mg を正確に量ってそれぞれ 20 mL の全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に各全量フラスコの標線まで同溶媒を加えてフモニシン B₁ 及び B₂ 各標準原液を調製する（これらの液各 1 mL は、フモニシン B₁ 及び B₂ としてそれぞれ 0.5 mg を含有する。）。

使用に際して、フモニシン B₁ 及び B₂ 各標準原液の一定量を混合し、メタノール-水 (3+1) で正確に希釈し、1 mL 中にフモニシン B₁ 及び B₂ としてそれぞれ 1~8 μg を含有する数点のフモニシン混合標準液を調製する。

B 定 量

抽 出 分析試料 20.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、メタノ

ールー水 (3+1) 100 mL を加え、15 分間振り混ぜて抽出する。抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過^{注1}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 トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg)^{注2}をメタノール 8 mL 及びメタノールー水 (3+1) 8 mL で順次洗浄する。

試料溶液 10 mL をミニカラムに正確に入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた後、メタノールー水 (3+1) 8 mL 及びメタノール 8 mL を順次カートリッジに加え、同様に流出させる。

50 mL のなし形フラスコをミニカラムの下に置き、メタノールー酢酸 (99+1) 14 mL をミニカラムに加えてフモニシン B₁ 及び B₂ 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。メタノールー水 (3+1) 1 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 試料溶液及び各フモニシン混合標準液各 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 340 nm、蛍光波長 450 nm)

カ ラ ム：分岐状ポリフルオロアルキルシリル化シリカゲルカラム (内径 4.6 mm、長さ 30 mm、粒径 5 µm)^{注3}

溶 離 液：メタノールー無水トリフルオロ酢酸溶液 (0.1 v/v%) (1+1)

反 応 液^{注4}：蛍光化試液 *o*-フタルアルデヒド 0.4 g 及び *N*-アセチル-L-システイン 0.5 g をメタノール 5 mL で溶かし、更にホウ酸緩衝液 (ホウ酸 24.7 g 及び水酸化ナトリウム 12.3 g を水に溶かして 1 L とし、水酸化ナトリウム溶液 (30 w/v%) で pH を 9.9~10.1 に調整したもの。) を加えて 500 mL とする。

流 速：溶離液 1.0 mL/min、反応液 0.5 mL/min

温 度：カラム槽 50 °C、反応槽 50 °C

計 算 得られたクロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中のフモニシン B₁ 及び B₂ 量を算出する。

注 1 必要に応じて、ろ液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液をカラム処理に供する試料溶液とする。

2 Bond Elut LRC SAX (Varian 製) 又はこれと同等のもの

3 Fluofix 120E (和光純薬工業製) 又はこれと同等のもの

4 反応コイル (内径 0.5 mm、長さ 2 m) 中で、反応液をカラムから溶出した溶離液に合わせて蛍光化した後、直ちに蛍光検出器に送る。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	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)
フモニシンB ₁	成鶏用配合飼料	500~2,000	3	86.7~93.0	3.7
	肉豚用配合飼料	500~2,000	3	90.3~97.3	3.9
	乳牛用配合飼料	500~2,000	3	88.3~95.7	4.2
	とうもろこし	1,000~4,000	3	94.7~99.3	9.0
フモニシンB ₂	成鶏用配合飼料	500~2,000	3	81.7~94.0	6.6
	肉豚用配合飼料	500~2,000	3	87.7~92.3	2.9
	乳牛用配合飼料	500~2,000	3	85.0~93.0	7.9
	とうもろこし	1,000~4,000	3	88.7~93.0	7.5

・共同試験

分析成分名	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 _F (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
フモニシンB ₁	中さう育成用配合飼料	6	1,000	85.0	4.8	2.7	0.17
フモニシンB ₂	中さう育成用配合飼料	6	1,000	83.0	3.6	6.6	0.41

9 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

- (1) 分析対象化合物 オクラトキシン A 及びシトリニン (2 成分)
- (2) 適用範囲 穀類及び配合飼料 (シトリニンにあっては配合飼料を除く。)
- (3) 分析法

A 試薬の調製

- 1) オクラトキシン A 標準液 オクラトキシン A [$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{NO}_6\text{Cl}$] 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。)。更にこの液の一定量をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にオクラトキシン A として 1 μg を含有するオクラトキシン A 標準原液を調製する。
- 2) シトリニン標準液 シトリニン [$\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_5$] 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る (この液 1 mL は、シトリニンとして 0.2 mg を含有する。)。更にこの液の一定量をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にシトリニンとして 1 μg を含有するシトリニン標準原液を調製する。
- 3) 混合標準液 使用に際して、オクラトキシン A 及びシトリニン各標準原液の一定量を混合し、アセトニトリル-水 (1+1) で正確に希釈し、1 mL 中にオクラトキシン A 及びシトリニンとしてそれぞれ 1~50 ng を含有する数点の混合標準液を調製する。

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-塩酸-水 (8+1+1) 100 mL を加えて潤した後 5 分間静置^{注1}し、更に 30 分間振り混ぜて抽出する。抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過し、ろ液 5 mL を 50

mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C 以下で 1 mL 以下まで減圧濃縮する。更に窒素ガスを軽く送ってアセトニトリルを除去し、精製に供する試料溶液とする。

精 製 塩化ナトリウム約 0.5 g を試料溶液に加え、更に酢酸エチル 10 mL を正確に加えてよく混合した後、10 mL の試験管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離する。酢酸エチル層（上層）5 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C 以下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）2 mL を正確に加えて残留物を溶かす。この液をあらかじめプラスチック製遠心沈殿管（容量 1.5 mL）を連結した限外ろ過膜（分画分子量 30,000）付きフィルターカップ^{注2}に入れ、5,000×g で 15 分間遠心ろ過し、ろ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 335 nm、蛍光波長 480 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-水-1 v/v%リン酸（230+230+1）

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 量及びシトリニン量を算出する。

注 1 発泡が収まるまで静置する。

2 Microcon YM-30（Millipore 製）又はこれと同等のものを用いる。

3 Inertsil ODS-2（ジーエルサイエンス製）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

添加成分名	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)
オクラトキシンA	成鶏飼育用配合飼料	10~100	3	96.3~97.1	12.6
	肉豚肥育用配合飼料	10~100	3	98.6~103.4	13.6
	とうもろこし	10~100	3	105.6~106.5	8.9
	大麦	10~100	3	98.2~103.8	10.2
シトリニン	成鶏飼育用配合飼料	100~400	3	85.0~86.2	3.0
	肉豚肥育用配合飼料	100~400	3	87.5~88.7	3.0
	とうもろこし	100~400	3	77.2~90.8	12.5
	大麦	100~400	3	83.0~84.0	7.4

・共同試験

分析成分名	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
オクラトキシンA	豚用配合飼料	11	20	100.4	3.3	7.9	0.36
	マイロ	11	自然汚染	(18.6)	20.6	23.5	1.07
シトリニン	豚用配合飼料	11	200	83.6	6.1	11.8	0.58

- ・定量下限 オクラトキシン A 試料中 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、シトリニン 試料中 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$

10 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

- (1) 分析対象化合物 HT-2 トキシン、T-2 トキシン、ジアセトキシシルペノール、ネオソラニオール、3-アセチルデオキシニバレノール、15-アセチルデオキシニバレノール、デオキシニバレノール、デオキシニバレノール-3-グルコシド、ニバレノール及びフザレノン-X (10 成分)
- (2) 適用範囲 飼料
- (3) 分析法

A 試薬の調製

- 1) トリコテセン系かび毒 (9 種) 混合標準原液 HT-2 トキシン [$\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_8$]、T-2 トキシン [$\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_9$]、ジアセトキシシルペノール [$\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_7$]、ネオソラニオール [$\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_8$]、3-アセチルデオキシニバレノール [$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_7$]、15-アセチルデオキシニバレノール [$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_7$]、デオキシニバレノール [$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_6$]、ニバレノール [$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_7$] 及びフザレノン-X [$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_8$] 各 0.2 mg を正確に量って混合し^{注1}、アセトニトリル 2 mL を正確に加えて溶かし、トリコテセン系かび毒混合標準原液を調製する (この液 1 mL は、各かび毒としてそれぞれ 0.1 mg を含有する。)
- 2) デオキシニバレノール-3-グルコシド標準原液 デオキシニバレノール-3-グルコシド標準液 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)^{注2} を標準原液とする。
- 3) かび毒混合標準液 各標準原液の一定量を混合し、アセトニトリルで正確に希釈し、1 mL 中にデオキシニバレノール-3-グルコシドとして 0.5 μg 、その他の各トリコテセン系かび毒としてそれぞれ 1 μg を含有するかび毒混合標準原液を調製する。

使用に際して、標準原液 400 μL を正確にとり、窒素ガスを送って乾固した後、アセトニトリル-水 (1+9) で正確に希釈し、1 mL 中にデオキシニバレノール-3-グルコシドとして 0.5~20 ng、その他の各トリコテセン系かび毒としてそれぞれ 1~40 ng を含有する数点のかび毒混合標準液を調製する。

B 定 量

抽出 分析試料 50 g を量って 500 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水 (17+3) 200 mL を加え、60 分間振り混ぜて抽出する。500 mL のビーカーをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過する。

ろ紙上の残さを同溶媒 200 mL で先の三角フラスコに移し、60 分間振り混ぜて抽出する。抽出液を先のろ紙で吸引ろ過し、先の三角フラスコ及び残さを順次同溶媒 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過する。ろ液を同溶媒 30 mL で 500 mL の褐色全量フラスコに移す。更に全量フラスコの標線まで同溶媒を加え、カラム処理 I に供する試料溶液とする。

カラム処理 I 試料溶液 8 mL を多機能カラム（かび毒分析用）^{注3}に入れ、初めの流出液 5 mL を捨てる。10 mL の褐色試験管をカラムの下に置き、その後の流出液 2 mL を受ける。流出液 1 mL を 10 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する。

アセトニトリル-水 (1+9) 1 mL を加えて残留物を溶かし^{注4}、カラム処理 II に供する試料溶液とする。

カラム処理 II ^{注5} 10 mL のなす形フラスコをジルコニア被覆シリカゲルミニカラム (30 mg) ^{注6}の下に置き、試料溶液をミニカラムに入れ、全量を流出させる。試料溶液の入っていたなす形フラスコをアセトニトリル 1 mL で洗い、洗液をミニカラムに加え同様に流出させる。流出液を 50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

アセトニトリル-水 (1+9) 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし^{注4}、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タンデム型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タンデム型質量分析計による測定 試料溶液及び各かび毒混合標準液各 5 µL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、選択反応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 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 3 µm) ^{注7}

溶 離 液 : 10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (19+1) (4 min 保持) → 16 min → (1+4) (8 min 保持)

流 速 : 0.2 mL/min

カ ラ ム 槽 温 度 : 40 °C

(タンデム型質量分析計部^{注8})

イ オ ン 化 法 : 大気圧化学イオン化 (APCI) 法

ネ ブ ラ イ ザ ー ガ ス : 空気 (4 L/min)

乾 燥 ガ ス : N₂ (5 L/min)

インターフェース温度 : 350 °C

ヒートブロック温度 : 200 °C

D L 温 度 : 250 °C

コ リ ジ ョ ン ガ ス : Ar (230 kPa)

コリジョンエネルギー：下表のとおり
 モニターイオン：下表のとおり
 表 各物質のモニターイオン条件

測定対象物質	測定モード	プリカーサーイオン (<i>m/z</i>)	プロダクトイオン		コリジョンエネルギー (eV)
			定量用 (<i>m/z</i>)	確認用 (<i>m/z</i>)	
HT-2トキシシ	-	483	59	-	21
	+	442	-	215	13
T-2トキシシ	+	484	-	263	15
			185	-	23
			-	305	16
ジアセトキシシルペ ノール	+	384	-	215	21
			307	-	12
ネオソラニオール	+	400	-	247	14
			305	-	14
			-	215	18
3-アセチルデオキシニバ レノール	-	397	-	185	22
			337	-	8
15-アセチルデオキシニバ レノール	-	397	-	307	13
			59	-	21
デオキシニバレノール	-	355	-	277	7
			265	-	13
デオキシニバレノール-3- グルコシド	-	517	-	295	10
			427	-	21
ニバレノール	-	371	-	457	14
			281	-	13
フザレノン-X	-	413	-	311	10
			263	-	16
			-	353	10

計 算 得られた選択反応検出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、試料中の各トリコテセン系かび毒量を算出する。

注 1 市販の混合標準品 (Trilogy 製 (アズマックス販売) 等) を用いてもよい。

2 和光純薬工業製又はこれと同等のもの

3 InertSep VRA-3 (ジーエルサイエンス製、リザーバー容量 6 mL) 又はこれと同等のもの

4 必要に応じて超音波処理し、十分に拡散させる。

5 流速は 1 滴/s 程度とする。必要に応じて吸引マニホールドを使用する。

6 HybridSPE-Phospholipid (Sigma-Aldrich 製、リザーバー容量 1 mL) 又はこれと同等のもの

7 Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス製、本測定条件による HT-2 トキシシ、T-2 トキシシ、ジアセトキシシルペノール、ネオソラニオール、3-アセチルデオキシニバレノール、15-アセチルデオキシニバレノール、デオキシニバレノール、デオキシニバレノール-3-グルコシド、ニバレノール及びフザレノン-X の保持時間はそれぞれ約 16.0 分、18.2 分、15.4 分、11.9 分、12.8 分、13.2 分、10.0 分、9.6 分、8.3 分及び 11.3 分) 又はこれと同等のもの

8 LCMS-8040（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

添加成分名	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_r (%)
HT-2トキシシン	とうもろこし	20	3	97.7	5.4
		200	3	101	2.0
	大豆油かす	20	3	108	1.3
		200	3	106	4.3
	なたね油かす	5	3	106	5.9
		10	3	98.1	4.4
		20	3	101	7.1
		200	3	108	1.8
	大麦	10	3	104	17
		20	3	75.4	13
		200	3	103	5.1
	ブロイラー肥育 前期用配合飼料	200	3	110	5.0
	ほ乳期子豚	20	3	91.6	9.9
	育成用配合飼料	200	3	101	2.1
肉用牛肥育用 配合飼料	20	3	89.3	10	
200	3	102	1.8		
T-2トキシシン	とうもろこし	20	3	96.8	9.5
		200	3	111	6.9
	大豆油かす	20	3	108	5.8
		200	3	109	12
	なたね油かす	10	3	95.2	8.9
		20	3	101	6.2
		200	3	111	4.8
	大麦	10	3	116	11
		20	3	101	3.7
		200	3	104	4.0
	ブロイラー肥育 前期用配合飼料	200	3	108	6.5
	ほ乳期子豚	20	3	101	11
	育成用配合飼料	200	3	105	5.6
	肉用牛肥育用	20	3	102	10
配合飼料	200	3	94.3	4.9	

・添加回収率及び繰返し精度〔続き〕

添加成分名	試料の種類	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し 繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 $\text{RSD}_r(\%)$	
ジアセトキシシ シルペノール	とうもろこし	20	3	90.9	3.0	
		200	3	88.9	7.0	
	大豆油かす	20	3	98.4	14	
		200	3	106	8.1	
	なたね油かす	5	3	107	5.8	
		10	3	108	9.1	
		20	3	113	4.5	
		200	3	112	16	
	大麦	10	3	98.2	9.3	
		20	3	99.2	6.3	
		200	3	109	3.0	
	ブロイラー肥育 前期用配合飼料	200	3	110	1.2	
	ほ乳期子豚	20	3	108	4.2	
	育成用配合飼料	200	3	103	4.5	
	肉用牛肥育用 配合飼料	20	3	104	9.7	
	200	3	116	2.0		
	ネオソラニ オール	とうもろこし	20	3	110	2.0
			200	3	101	4.2
大豆油かす		20	3	102	1.4	
		200	3	107	6.2	
なたね油かす		5	3	109	7.4	
		10	3	108	7.9	
		20	3	115	2.0	
		200	3	112	17	
大麦		10	3	90.1	12	
		20	3	110	4.3	
		200	3	107	3.7	
ブロイラー肥育 前期用配合飼料		200	3	114	2.6	
ほ乳期子豚		20	3	107	4.2	
育成用配合飼料		200	3	107	7.0	
肉用牛肥育用 配合飼料		20	3	94.4	5.0	
200		3	116	1.1		
3-アセチルデ オキシニバレ ノール		とうもろこし	20	3	104	3.9
			200	3	94.2	6.3
	大豆油かす	40	3	78.5	2.9	
		200	3	90.5	3.5	
	なたね油かす	20	3	96.8	15	
		200	3	108	4.1	
	大麦	40	3	95.8	7.2	
		200	3	103	4.7	
	ブロイラー肥育 前期用配合飼料	200	3	99.3	2.5	
	ほ乳期子豚	20	3	102	8.0	
	育成用配合飼料	200	3	101	2.2	
	肉用牛肥育用 配合飼料	200	3	101	2.5	

・添加回収率及び繰返し精度〔続き〕

添加成分名	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 $\text{RSD}_r(\%)$	
15-アセチルデオキシニバノール	とうもろこし	20	3	106	9.8	
		200	3	103	5.4	
	大豆油かす	40	3	102	3.6	
		200	3	112	1.7	
	なたね油かす	20	3	110	3.7	
		200	3	115	1.7	
	大麦	40	3	100	4.3	
		200	3	102	6.3	
	ブロイラー肥育前期用配合飼料	200	3	108	1.1	
	ほ乳期子豚	20	3	102	6.9	
	育成用配合飼料	200	3	96.6	5.0	
	肉用牛肥育用	20	3	92.9	10	
	配合飼料	200	3	119	3.5	
	デオキシニバノール	とうもろこし	200	3	90.3	7.7
200			3	99.0	6.0	
大豆油かす		20	3	93.8	6.2	
		200	3	93.8	6.2	
なたね油かす		10	3	91.0	8.3	
		20	3	110	5.9	
		200	3	104	3.5	
大麦		200	3	92.1	3.0	
ブロイラー肥育前期用配合飼料		1000	3	91.4	9.1	
ほ乳期子豚		20	3	94.4	9.4	
育成用配合飼料		1000	3	90.2	7.1	
肉用牛肥育用		4000	3	111	2.4	
デオキシニバノール-3-グルコシド		とうもろこし	20	3	86.0	16
			100	3	81.5	4.7
	大豆油かす	20	3	91.1	17	
		100	3	82.2	4.4	
	なたね油かす	5	3	90.2	8.9	
		10	3	90.7	13	
		20	3	71.4	6.4	
		100	3	70.6	7.0	
	大麦	10	3	83.4	9.6	
		20	3	119	5.3	
		100	3	88.4	5.7	
	ブロイラー肥育前期用配合飼料	100	3	97.8	3.8	
	ほ乳期子豚	20	3	95.8	3.1	
	育成用配合飼料	100	3	72.5	17	
肉用牛肥育用	20	3	104	15		
配合飼料	100	3	98.2	2.2		

・添加回収率及び繰返し精度〔続き〕

添加成分名	試料の種類	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し 繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 $\text{RSD}_r(\%)$	
ニバレノール	とうもろこし	200	3	108	1.9	
		大豆油かす	20	3	98.0	4.2
		200	3	97.2	4.3	
	なたね油かす	5	3	102	5.9	
		10	3	90.0	14	
		20	3	82.0	2.7	
		200	3	107	5.2	
	大麦	200	3	98.8	3.0	
	ブロイラー肥育 前期用配合飼料	200	3	95.5	1.6	
	ほ乳期子豚	20	3	74.6	3.2	
	育成用配合飼料	200	3	89.4	3.5	
	肉用牛肥育用 配合飼料	200	3	108	4.4	
フザレノン-X	とうもろこし	20	3	83.3	4.7	
		200	3	91.1	8.0	
		大豆油かす	20	3	90.8	17
	大豆油かす	200	3	97.2	9.4	
		なたね油かす	10	3	111	13
		20	3	86.1	15	
	なたね油かす	200	3	101	8.6	
		大麦	10	3	108	11
		20	3	89.0	1.5	
	200	3	107	3.2		
	ブロイラー肥育 前期用配合飼料	200	3	101	1.5	
	ほ乳期子豚	20	3	100	4.4	
	育成用配合飼料	200	3	104	8.6	
	肉用牛肥育用 配合飼料	20	3	84.1	5.0	
	200	3	118	1.5		

・共同試験

成分名	試料の種類	有効試 験室数	棄却試 験室数	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加回収率 (%)	繰返し精度 $\text{RSD}_r(\%)$	室間再現精度 $\text{RSD}_R(\%)$	HorRat
HT-2トキシシン	とうもろこし	8	0	200	103	8.3	8.3	0.41
	大豆油かす	8	0	100	104	9.8	9.8	0.45
	ほ乳期子豚育 成用配合飼料	8	0	100	104	8.5	8.5	0.39
T-2トキシシン	とうもろこし	8	0	200	102	7.5	7.5	0.37
	大豆油かす	8	0	100	100	7.1	7.1	0.32
	ほ乳期子豚育 成用配合飼料	8	0	100	105	5.2	9.2	0.42
ジアセトキシス シルベノール	とうもろこし	7	1	100	99.8	4.5	4.5	0.22
	大豆油かす	7	1	50	101	4.3	4.3	0.19
	ほ乳期子豚育 成用配合飼料	8	0	50	103	6.6	8.8	0.40

・共同試験〔続き〕

成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_t (%)	室間再現精度 RSD_R (%)	HorRat
ネオソラニオール	とうもろこし	8	0	200	107	8.6	8.6	0.43
	大豆油かす	8	0	100	109	3.1	4.9	0.22
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	8	0	100	106	6.8	6.8	0.31
3-アセチルデオキシニバレノール	とうもろこし	8	0	200	97.1	9.1	9.2	0.45
	大豆油かす	8	0	100	103	7.6	12	0.57
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	8	0	100	102	8.8	11	0.49
15-アセチルデオキシニバレノール	とうもろこし	8	0	200	115	7.8	12	0.58
	大豆油かす	8	0	100	116	9.0	14	0.65
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	8	0	100	109	4.3	8.1	0.37
デオキシニバレノール	とうもろこし	8	0	200 ブランク値21.2	97.2	5.2	8.5	0.42
	大豆油かす	8	0	100 ブランク値28.6	103	3.4	13	0.59
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	8	0	1000 ブランク値15.8	98.2	6.5	11	0.70
デオキシニバレノール-3-グルコシド	とうもろこし	8	0	200	96.7	3.5	15	0.68
	大豆油かす	8	0	100	78.2	6.4	13	0.59
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	8	0	100	84.3	4.6	22	1.0
ニバレノール	とうもろこし	8	0	200 ブランク値159	98.8	4.1	7.6	0.40
	大豆油かす	8	0	100	89.9	5.6	5.6	0.25
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	8	0	100	99.9	3.9	9.4	0.43
フザレノン-X	とうもろこし	8	0	200	101	8.8	8.8	0.43
	大豆油かす	8	0	100	93.8	8.5	10	0.48
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	8	0	100	105	5.1	14	0.62

- ・ 定量下限 3-アセチルデオキシニバレノール及び 15-アセチルデオキシニバレノール 試料中 各 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、T-2 トキシン、デオキシニバレノール及びフザレノン-X 試料中 各 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、その他のかび毒 試料中 各 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$
- ・ 検出下限 3-アセチルデオキシニバレノール及び 15-アセチルデオキシニバレノール 試料中 各 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、T-2 トキシン、デオキシニバレノール及びフザレノン-X 試料中 各 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、その他のかび毒 試料中 各 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$

11 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

- (1) 分析対象化合物 オクラトキシン A 及びシトリニン (2 成分)
- (2) 適用範囲 飼料
- (3) 分析法

A 試薬の調製

- 1) オクラトキシン A 標準原液 オクラトキシン A [$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{NO}_6\text{Cl}$] 5 mg を正確

に量って 50 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る（この液 1 mL は、オクラトキシシン A として 0.1 mg を含有する。）。

- 2) シトリニン標準原液 シトリニン [C₁₃H₁₄O₅] 5 mg を正確に量って 50 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る（この液 1 mL は、シトリニンとして 0.1 mg を含有する。）。
- 3) 混合標準液 オクラトキシシン A 標準原液及びシトリニン標準原液各 1 mL を 100 mL の全量フラスコに正確に入れて混合し、更に標線までアセトニトリルを加えて混合標準原液を調製する（この液 1 mL は、各成分としてそれぞれ 1 µg を含有する。）。

使用に際して、混合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 中にオクラトキシシン A として 0.1~80 ng 及びシトリニンとして 0.2~80 ng を含有する数点の混合標準液を調製する。

B 定 量

抽出 分析試料 25.0 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-塩酸-水 (8+1+1) 100 mL を加え、5 分間静置後、30 分間振り混ぜて抽出し、抽出液を 50 mL の共栓遠沈管に入れて 700×g で 5 分間遠心分離する。上澄み液 10 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C 以下の水浴で 1 mL 以下まで減圧濃縮し、窒素ガスを送ってアセトニトリルを除去し、液液分配に供する試料溶液とする。

液液分配 塩化ナトリウム約 0.5 g を試料溶液に加え、更に酢酸エチル 10 mL を正確に加えてよく混合した後、10 mL の試験管に入れ、1,000×g で 5 分間遠心分離する。酢酸エチル層（上層）4 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C 以下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。ギ酸-メタノール (1+49) 2 mL を加えて残留物を溶かし、水 3 mL を加えてカラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 弱塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム^{注1}をメタノール 5 mL 及び水 5 mL で順次洗浄する。試料溶液をミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。試料溶液の入っていたなす形フラスコをメタノール 5 mL で 2 回洗浄し、洗液を順次カラムに加え同様に流出させる。

50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、アンモニア水-メタノール (1+19) 10 mL をカラムに加え、オクラトキシシン A 及びシトリニンを溶出させる。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させる。アセトニトリル-水 (1+1) 5 mL を加えて残留物を溶かし、5,000×g で 5 分間遠心分離し、液体クロマトグラフタンデム型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タンデム型質量分析計による測定 試料溶液及び各混合標準液各 5 µL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、選択反応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 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 3 μm)^{注2}

溶離液 : 0.1 v/v%ギ酸溶液-0.1 v/v%ギ酸アセトニトリル溶液 (19+1) → 10 min → (1+9) (5 min 保持)

流速 : 0.2 mL/min

カラム槽温度 : 40 °C

(タンデム型質量分析計部^{注3})

イオン化法 : エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法 (正イオンモード)

イオン源温度 : 120 °C

デソルベーションガス : N₂ (800 L/h、500 °C)

キャピラリー電圧 : 3.5 kV

コーンガス : N₂ (50 L/h)

コーン電圧 : 下表のとおり

コリジョンガス : Ar (0.2 mL/min)

コリジョンエネルギー : 下表のとおり

モニターイオン : 下表のとおり

表 各物質のモニターイオン条件

測定対象物質	プリカーサー	プロダクトイオン		コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
	イオン (m/z)	定量用 (m/z)	確認用 (m/z)		
オクラトキシンA	404	239	—	25	25
		—	221		40
シトリニン	251	233	—	30	20
		—	205		30

計算 得られた選択反応検出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 量及びシトリニン量を算出する。

注 1 Oasis WAX (Waters 製、充てん剤量 500 mg、リザーバー容量 6 mL)

2 InertSustain C18 (ジールサイエンス製、本測定条件によるオクラトキシン A 及びシトリニンの保持時間はそれぞれ約 9.5 及び 8.9 分) 又はこれと同等のもの

3 ACQUITY TQD (Waters 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

添加成分名	試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _f (%)
オクラトキシンA	ほ乳期子豚育成用配合飼料	0.001	5	103	5.8
		0.1	5	105	2.0
	肉用牛肥育用配合飼料	0.001	5	102	11
		0.1	5	99.3	2.4
	大麦	0.001	5	91.2	6.6
		0.005	5	98.1	5.0
	小麦	0.001	5	98.1	5.6
		0.005	5	104	3.3
	ふすま 1	0.001	5	97.4	7.2
		0.01	5	99.7	3.0
	ふすま 2	0.1	5	109	3.3
		0.25	5	109	3.4
	ふすま 3	0.25	5	112	4.6
	ふすま 4	0.25	5	103	1.1
シトリニン	ほ乳期子豚育成用配合飼料	0.005	5	103	5.7
		0.5	5	100	4.1
	肉用牛肥育用配合飼料	0.005	5	104	11
		0.5	5	108	2.3
	大麦	0.005	5	99.8	6.6
		0.05	5	93.3	2.0
	小麦	0.005	5	103	5.3
		0.05	5	101	2.5
	ふすま 1	0.005	5	95.1	5.9
		0.05	5	95.9	5.0
	ふすま 2	0.1	5	84.4	4.9
		0.25	5	95.1	7.0
	ふすま 3	0.25	5	102	4.8
	ふすま 4	0.25	5	92.8	1.3

・共同試験

成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (mg/kg)	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _f (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
オクラトキシンA	ほ乳期子豚育成用配合飼料	18	0	0.1	117	4.1	12	0.56
	肉用牛肥育用配合飼料	18	0	0.2	123	2.1	13	0.62
	大麦	18	0	0.01	95.1	8.9	17	0.75
	小麦	18	0	0.005	63.9	8.6	29	1.3
	ふすま	18	0	0.05	108	3.3	17	0.77
シトリニン	ほ乳期子豚育成用配合飼料	17	1	0.1	118	8.4	17	0.76
	肉用牛肥育用配合飼料	18	0	0.25	104	5.1	19	0.97
	大麦	18	0	0.025	94.3	8.2	33	1.5
	小麦	18	0	0.005	107	4.6	21	0.97
	ふすま	15	3	0.05	102	4.7	12	0.53

・定量下限 オクラトキシン A 試料中 0.001 mg/kg、シトリニン 試料中 0.005 mg/kg

・検出下限 オクラトキシン A 試料中 0.0003 mg/kg、シトリニン 試料中 0.002 mg/kg

12 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

(1) 分析対象化合物 ゼアラレノン及びデオキシニバレノール (2成分)

- (2) 適用範囲 稲発酵粗飼料、とうもろこしサイレージ
(3) 分析法

A 試薬の調製

- 1) ゼアラレノン標準液 ゼアラレノン [C₁₈H₂₂O₅] 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 100 µg を含有する。）。

使用に際して、この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それぞれ 0.1~50 ng を含有する数点のゼアラレノン標準液を調製する。

- 2) デオキシニバレノール標準液 デオキシニバレノール [C₁₅H₂₀O₆] 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デオキシニバレノール標準原液を調製する（この液 1 mL は、デオキシニバレノールとして 100 µg を含有する。）。

使用に際して、デオキシニバレノール標準原液 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 中にデオキシニバレノールとして 2 µg を含有する標準液を調製する。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 中にデオキシニバレノールとしてそれぞれ 4~100 ng を含有する数点のデオキシニバレノール標準液を調製する。

B 定 量

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する。抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,600×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る。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する。

カラム処理 試料溶液を多機能カラム^{注1}に入れ、初めの流出液 1 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 1 mL を受け、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定（ゼアラレノン）に供する試料溶液とする。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する。

精 製 試料溶液をあらかじめグラファイトカーボン 200 mg^{注2}を入れた 15 mL の遠心チューブに入れ、1 分間振り混ぜる。1,600×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する。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（孔径 0.20 µm）でろ過し、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定（デオキシニバレノール）に供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定（ゼアラレノン） 試料溶液及び各ゼアラレノン標準液 5 µL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、選択反応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 50 mm、粒径 2 μm) ^{注3}

溶離液 : 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (7+3) (1 min 保持) → 4 min → (1+19) (7 min 保持) → 0.1 min → (7+3) (4.9 min 保持)

流速 : 0.2 mL/min

カラム槽温度 : 40 °C

(タンデム型質量分析計部^{注4})

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 : 空気 (4 L/min)

乾燥ガス : N₂ (5 L/min)

インターフェース温度 : 350 °C

ヒートブロック温度 : 200 °C

D L 温度 : 250 °C

コリジョンガス : Ar (230 kPa)

コリジョンエネルギー : 下表のとおり

モニターイオン : 下表のとおり

表 ゼアラレノンのモニターイオン条件

測定対象物質	プリカーサー	プロダクトイオン		コリジョン
	イオン (<i>m/z</i>)	定量用 (<i>m/z</i>)	確認用 (<i>m/z</i>)	エネルギー (eV)
ゼアラレノン	317	131	—	29
		—	175	23

液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定 (デオキシニバレノール)
試料溶液及び各デオキシニバレノール標準液 5 μL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、選択反応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 50 mm、粒径 2 μm) ^{注3}

溶離液 : 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-2 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール溶液 (19+1) (1 min 保持) → 9 min → (1+19) (5.5 min 保持) → 0.1 min → (19+1) (4.4 min 保持)

流速 : 0.2 mL/min

カラム槽温度 : 40 °C

(タンデム型質量分析計部^{注4})

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：空気 (2.5 L/min)

乾燥ガス：N₂ (6 L/min)

インターフェース温度：400 °C

ヒートブロック温度：200 °C

D L 温度：250 °C

コリジョンガス：Ar (230 kPa)

コリジョンエネルギー：下表のとおり

モニターイオン：下表のとおり

表 デオキシニバレノールのモニターイオン条件

測定対象物質	プリカーサー	プロダクトイオン		コリジョン エネルギー (eV)
	イオン (m/z)	定量用 (m/z)	確認用 (m/z)	
デオキシニバレノール	295	265	—	11
	355	—	265	15

計算 得られた選択反応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、試料中のゼアラレノン量及びデオキシニバレノール量を算出する。

注 1 InertSep VRA-3 (リザーバー容量 6 mL、ジーエルサイエンス製) 又はこれと同等のもの

2 Supelclean ENVI-Carb SPE Bulk Packing (Sigma-Aldrich 製) 又はこれと同等のもの

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

4 LCMS-8040 (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

(ゼアラレノン)

試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
稲発酵粗飼料1	0.04	5	100	12
	1	5	108	2.7
稲発酵粗飼料2	0.04	5	107	9.9
	1	5	110	4.2
とうもろこしサイレージ3	0.02	5	110	8.7
とうもろこしサイレージ5	0.02	5	112	12
とうもろこしサイレージ1	1	5	101	4.0
とうもろこしサイレージ2	1	5	106	4.2

(デオキシニバレノール)

試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
稲発酵粗飼料1	0.2	5	105	3.9
	4	5	97.9	2.8
稲発酵粗飼料2	0.2	5	107	1.8
	4	5	98.0	2.6
とうもろこしサイレージ3	0.2	5	114	7.9
とうもろこしサイレージ4	0.2	5	116	6.0
とうもろこしサイレージ1	4	5	89.3	5.9
とうもろこしサイレージ2	4	5	89.4	8.7

• 共同試験

(ゼアラレノン)

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (mg/kg)	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)	室内再現精度 RSD _R (%)	HorRat
とうもろこしサイレージ1	8	0	2.2	106	6.1	7.4	0.53
とうもろこしサイレージ2	8	0	1.1	105	5.0	5.0	0.32
とうもろこしサイレージ3	8	0	0.2	111	5.5	8.8	0.44
稲発酵粗飼料1	8	0	2.6	104	2.0	4.9	0.36
稲発酵粗飼料2	8	0	1.8	105	4.5	5.3	0.36
稲発酵粗飼料3	8	0	0.48	108	5.8	7.7	0.44

(デオキシニバレノール)

試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (mg/kg)	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)	室内再現精度 RSD _R (%)	HorRat
とうもろこしサイレージ1	8	0	14	99.8	5.8	8.7	0.81
とうもろこしサイレージ2	8	0	7.0	99.3	4.1	13	1.1
とうもろこしサイレージ3	8	0	1.2	107	6.7	19	1.2
稲発酵粗飼料1	8	0	10	97.9	8.3	13	1.1
稲発酵粗飼料2	8	0	2.2	102	7.0	9.5	0.67
稲発酵粗飼料3	8	0	0.8	104	4.4	13	0.80

- 定量下限 ゼアラレノン：稲発酵粗飼料（風乾物）中 0.08 mg/kg、とうもろこしサイレージ（風乾物）中 0.04 mg/kg、デオキシニバレノール：稲発酵粗飼料（風乾物）中 0.4 mg/kg、とうもろこしサイレージ（風乾物）中 0.4 mg/kg
- 検出下限 ゼアラレノン：稲発酵粗飼料（風乾物）中 0.04 mg/kg、とうもろこしサイレージ（風乾物）中 0.01 mg/kg、デオキシニバレノール：稲発酵粗飼料（風乾物）中 0.1 mg/kg、とうもろこしサイレージ（風乾物）中 0.1 mg/kg

第4節 標準品の標定法

本節は、かび毒標準液の濃度を標定する必要がある場合のその標定法を規定する。

1 かび毒標準液の吸光光度法^{注1}による標定法

- (1) 標定対象かび毒 アフラトキシン B₁ [C₁₇H₁₂O₆]、アフラトキシン B₂ [C₁₇H₁₄O₆]、アフラトキシン G₁ [C₁₇H₁₂O₇]、アフラトキシン G₂ [C₁₇H₁₄O₇]、ステリグマトシスチン [C₁₈H₁₂O₆]、ゼアラレノン [C₁₈H₂₂O₅] 及びオクラトキシン A [C₂₀H₁₈NO₆Cl]

(2) 標定法

A 試薬の調製

- 1) ニクロム酸カリウム標準液 ニクロム酸カリウム（標準試薬）（めのう乳ばちを用いて粉末とし、100~110℃で3~4時間乾燥したもの）0.08 g を正確に量って 1 L の全量フラスコに入れ、硫酸（1+2,000）を加えて溶かし、更に標線まで硫酸（1+2,000）を加えて標準液 I とする（この液の濃度（C_S (mmol/L)）は下

式により求める。) 。

$$C_s = \frac{W}{294.18}$$

W : ニクロム酸カリウム採取量 (mg)

標準液 I の一定量を硫酸 (1+2,000) で正確に 2 倍及び 4 倍に希釈して、それぞれ標準液 II 及び標準液 III とする。

- 2) かび毒標定用標準液 表 1 に示すかび毒の標準液調製用試薬 10 mg^{注2} を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ、各かび毒に対応する希釈溶媒を加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加える (この液 1 mL は、各かび毒として 0.2 mg を含有する。) 。この液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、各かび毒に対応する測定濃度のかび毒標定用標準液を調製する。

表 1 各かび毒の標準液調製用試薬、希釈溶媒及び測定濃度

カビ毒名	標準液調製用試薬	希釈溶媒	測定濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
アフラトキシンB ₁	アフラトキシンB ₁ [C ₁₇ H ₁₂ O ₆]	アセトニトリル	10
アフラトキシンB ₂	アフラトキシンB ₂ [C ₁₇ H ₁₄ O ₆]	アセトニトリル	10
アフラトキシンG ₁	アフラトキシンG ₁ [C ₁₇ H ₁₂ O ₇]	アセトニトリル	10
アフラトキシンG ₂	アフラトキシンG ₂ [C ₁₇ H ₁₄ O ₇]	アセトニトリル	10
ステリグマトシスチン	ステリグマトシスチン [C ₁₈ H ₁₂ O ₆]	ベンゼン	10
ゼアラレノン	ゼアラレノン [C ₁₈ H ₂₂ O ₅]	メタノール	10
オクラトキシンA	オクラトキシンA [C ₂₀ H ₁₈ NO ₆ Cl]	トルエン-酢酸 (99+1)	10

B 吸光光度計の校正

ニクロム酸カリウム標準液 I、II 及び III について、硫酸 (1+2,000) を対照液として波長 350 nm の吸光度を測定し、下式により吸光率 (E) を算出する。

$$E = \frac{A \times 1,000}{C_s}$$

A : 吸光度

C_s : 標準液の濃度 (mmol/L)

各標準液についてそれぞれ算出した吸光率の平均値を算出し、下式により補正係数 (CF) を算出する^{注3}。

$$CF = \frac{3,160}{E_A}$$

E_A : 吸光率の平均値

C 測定

かび毒標定用標準液について、各かび毒に対応する希釈溶媒を対照液として、表 2 に示す各かび毒に対応する測定波長近傍の吸収スペクトルを測定し、その極大波長の吸光度を測定する。

下式により、かび毒標定用標準液の濃度 (C ($\mu\text{g/mL}$)) を算出する。

$$C = \frac{A \times M \times CF \times 1,000}{\epsilon}$$

A : 吸光度

M : 各かび毒の分子量 (下表)

ϵ : 各かび毒のモル吸光係数 (下表)

表 2 各かび毒の標準液調製用試薬、希釈溶媒及び測定濃度

カビ毒名	分子量 (g/mol)	測定波長 (nm)	モル吸光係数 ϵ
アフラトキシンB ₁	312	350	20,700
アフラトキシンB ₂	314	350	22,500
アフラトキシンG ₁	328	350	17,600
アフラトキシンG ₂	330	350	18,900
ステリグマトシスチン	324	325	15,200
ゼアラレノン	318	314	6,000
オクラトキシンA	403	333	5,440

注 1 光路長 1 cm の石英セルを用いる。

2 標定しようとする標準液の溶媒が本法の希釈溶媒と異なる場合は、10 mg 相当量の当該標準液を正確にとり、溶媒を除去した後以降の操作を行う。

3 補正係数 (CF) が 0.95 未満又は 1.05 を超える場合は、機器及び手法を確認の上、再測定を行う。