

### 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 B<sub>1</sub>、アフラトキシン B<sub>2</sub>、アフラトキシン G<sub>1</sub>、アフラトキシン G<sub>2</sub>、ステリグマトシスチン、ゼアラレノン、T-2 トキシシ、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、 $\alpha$ -ゼアララノール、 $\beta$ -ゼアララノール、ゼアララノン、 $\alpha$ -ゼアラレノール及び  $\beta$ -ゼアラレノール (16 成分)
- (2) 適用範囲 飼料<sup>注1</sup>
- (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 B<sub>1</sub> [C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>]、アフラトキシン B<sub>2</sub> [C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>]、アフラトキシン G<sub>1</sub> [C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>]、アフラトキシン G<sub>2</sub> [C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>]、ステリグマトシスチン [C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>] 及びゼアラレノン [C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>5</sub>] 各 1 mg、 $\alpha$ -ゼアララノール [C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>O<sub>5</sub>]、 $\beta$ -ゼアララノール [C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>O<sub>5</sub>]、ゼアララノン [C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>O<sub>5</sub>]、 $\alpha$ -ゼアラレノール [C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>O<sub>5</sub>]、 $\beta$ -ゼアラレノール [C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>O<sub>5</sub>]、T-2 トキシシ [C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>O<sub>9</sub>] 及びネオソラニオール [C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>O<sub>8</sub>] 各 5 mg 並びにデオキシニバレノール [C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>]、ニバレノール [C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>7</sub>] 及びフザレノン-X [C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub>] 各 10 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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アセトニトリル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 B<sub>1</sub>、アフラトキシン B<sub>2</sub>、アフラトキシン G<sub>1</sub>、アフラトキシン G<sub>2</sub>、ステリグマトシスチン及びゼアラレノンとして 20  $\mu$ g を、 $\alpha$ -ゼアララノール、 $\beta$ -ゼアララノール、ゼアララノン、 $\alpha$ -ゼアラレノール、 $\beta$ -ゼアラレノール、T-2 トキシシ及びネオソラニオールとして 100  $\mu$ 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  $\mu$ 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 B<sub>1</sub> 及びアフラトキシン B<sub>2</sub> 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 G<sub>1</sub> 及びアフラトキシン G<sub>2</sub> 標準原液各 3 mL、 $\alpha$ -ゼアララノール、 $\beta$ -ゼアララノール、ゼアララノン、 $\alpha$ -ゼアラレノール及び  $\beta$ -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 トキシシ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 B<sub>1</sub> 及びアフラトキシン B<sub>2</sub> として 0.1  $\mu$ g、ゼアラレノンとして 0.2  $\mu$ g、アフラトキシン G<sub>1</sub> 及びアフラトキシン G<sub>2</sub> として 0.3  $\mu$ g、 $\alpha$ -ゼアララノール、 $\beta$ -ゼアララノール、ゼアララノン、 $\alpha$ -ゼアラレノール及び  $\beta$ -ゼアラレノールとして 0.4  $\mu$ g、ステリグマトシスチンとして 1  $\mu$ g、デオキシニバレノール、フザレノン-X、T-2 トキシシ及びネオソラニオールとして 10  $\mu$ g 並びにニバレノールとして 30  $\mu$ g を含有する。）。

使用に際して、かび毒混合標準原液の一部をアセトニトリル-水 (21+4) で 10~200 倍の間の数段階に正確に希釈し、更に各希釈液の一部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 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、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<sup>注2</sup>。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)<sup>注3</sup> 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。この液の一部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)<sup>注4</sup>

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<sup>注5</sup>)

検出器 : 四重極型質量分析計

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 : 150 °C

デソルベーションガス : N<sub>2</sub> (800 L/h、400 °C)

キャピラリー電圧 : 正イオン 4.0 kV、負イオン 1.5 kV

コーンガス : N<sub>2</sub> (10 L/h)

コーン電圧 : 下表のとおり

コリジョンガス : Ar (0.4 Pa)

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 各物質の測定条件

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		コーン 電圧 (V)	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> )		
アフラトキシンB <sub>1</sub>	+	313	241	—	58	38
			—	285	58	22
アフラトキシンB <sub>2</sub>	+	315	243	—	58	40
			—	259	58	32
アフラトキシンG <sub>1</sub>	+	329	214	—	52	35
			—	200	52	38
			—	243	52	28
アフラトキシンG <sub>2</sub>	+	331	217	—	48	35
			—	245	48	30
			—	257	48	30
ステリグマトシステン	+	325	281	—	50	34
			—	310	50	24
T-2トキシン	+	484	305	—	26	14
			—	185	26	22
ネオソラニオール	+	400	305	—	32	12
			—	185	32	20
$\alpha$ -ゼアララノール	—	321	277	—	56	24
			—	303	56	24
$\beta$ -ゼアララノール	—	321	277	—	56	24
			—	303	56	24
ゼアララノン	—	319	205	—	62	26
			—	275	62	24
$\alpha$ -ゼアラレノール	—	319	160	—	62	28
			—	275	62	24
$\beta$ -ゼアラレノール	—	319	160	—	62	28
			—	275	62	24
ゼアラレノン	—	317	175	—	52	24
			—	131	52	32
デオキシニバレノール	—	355	295	—	24	8
		295	—	265	26	8
ニバレノール	—	371	281	—	24	14
		311	—	281	28	10
フザレノン-X	—	413	353	—	22	10
		353	—	263	22	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、必要に応じて別紙2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（単一試験室による確認）

1)  $\alpha$ -ゼアララノール、 $\beta$ -ゼアララノール、ゼアララノン、 $\alpha$ -ゼアラレノール及び $\beta$ -ゼアラレノール

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 <sub>r</sub> (%)	定量下限 (mg/kg)	検出下限 (mg/kg)
$\alpha$ -ゼアララノール	鶏用配合飼料	0.008	3	109	7.8	0.004	0.002
		0.100	3	104	0.4		
		豚用配合飼料	0.004	3	112		
	とうもろこし	0.008	3	99.9	4.6		
			3	96.7	0.6		
			3	117	7.4		
		0.100	3	120	1.9		
			3	111	0.4		
			3	117	3.3		
	大豆油かす	0.008	3	117	3.3		
		0.100	3	113	0.3		
		0.100	3	113	0.3		
$\beta$ -ゼアララノール	鶏用配合飼料	0.008	3	103	11	0.004	0.002
		0.100	3	104	2.2		
		豚用配合飼料	0.004	3	113		
	とうもろこし	0.008	3	99.9	8.3		
			3	93.5	3.6		
			3	110	3.3		
		0.100	3	107	5.6		
			3	106	1.9		
			3	108	9.6		
	大豆油かす	0.008	3	108	9.6		
		0.100	3	115	3.1		
		0.100	3	115	3.1		
ゼアララノン	鶏用配合飼料	0.008	3	116	7.4	0.004	0.002
		0.100	3	106	0.3		
		豚用配合飼料	0.004	3	106		
	とうもろこし	0.008	3	99.6	9.1		
			3	108	1.0		
			3	113	11		
		0.100	3	119	11		
			3	110	2.1		
			3	110	2.1		
	大豆油かす	0.008	3	102	0.6		
		0.100	3	106	3.2		
		0.100	3	106	3.2		
$\alpha$ -ゼアラレノール	鶏用配合飼料	0.008	3	111	5.9	0.008	0.003
		0.100	3	109	1.5		
		豚用配合飼料	0.008	3	97.9		
	とうもろこし	0.100	3	102	3.5		
			3	119	0.4		
			3	115	3.3		
		0.008	3	102	13		
			3	117	1.5		
			3	117	1.5		
	大豆油かす	0.008	3	102	13		
		0.100	3	102	13		
		0.100	3	117	1.5		
$\beta$ -ゼアラレノール	鶏用配合飼料	0.008	3	106	5.2	0.008	0.003
		0.100	3	105	0.9		
		豚用配合飼料	0.008	3	102		
	とうもろこし	0.100	3	91.3	1.6		
			3	98.8	14		
			3	106	3.1		
		0.008	3	105	9.8		
			3	105	9.8		
			3	114	2.2		
	大豆油かす	0.008	3	105	9.8		
		0.100	3	114	2.2		
		0.100	3	114	2.2		

2) その他のかび毒

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 <sub>r</sub> (%)	定量下限 (mg/kg)	検出下限 (mg/kg)
アフラトキシンB <sub>1</sub>	牛用配合飼料	0.001	3	96.2	7.8	0.001	0.0003
		0.002	3	96.7	7.0		
		0.004	3	99.5	5.0		
	とうもろこし	0.001	3	102	6.2		
		0.002	3	106	3.2		
		0.004	3	98.6	3.0		
アフラトキシンB <sub>2</sub>	牛用配合飼料	0.001	3	94.2	6.8	0.001	0.0003
		0.002	3	96.9	7.5		
		0.004	3	101	3.9		
	とうもろこし	0.001	3	106	4.9		
		0.002	3	101	6.4		
		0.004	3	104	5.8		
アフラトキシンG <sub>1</sub>	牛用配合飼料	0.003	3	93.4	4.8	0.001	0.0003
		0.006	3	100	7.3		
		0.012	3	97.9	5.1		
	とうもろこし	0.003	3	98.7	4.9		
		0.006	3	103	3.5		
		0.012	3	101	3.5		
アフラトキシンG <sub>2</sub>	牛用配合飼料	0.003	3	97.4	9.1	0.001	0.0003
		0.006	3	100	7.3		
		0.012	3	101	3.6		
	とうもろこし	0.003	3	102	2.4		
		0.006	3	100	2.6		
		0.012	3	103	5.8		
ステリグマトシスチン	牛用配合飼料	0.01	3	101	6.2	0.001	0.0003
		0.02	3	99.6	4.9		
		0.04	3	101	5.5		
	とうもろこし	0.01	3	97.5	8.5		
		0.02	3	102	15		
		0.04	3	109	9.3		
ゼアラレノン	牛用配合飼料	0.002	3	106	9.8	0.001	0.0003
		0.004	3	107	8.8		
		0.008	3	109	4.7		
	とうもろこし	0.002	3	99.8	10		
		0.004	3	102	14		
		0.008	3	102	2.9		
T-2トキシシン	牛用配合飼料	0.1	3	108	11	0.008	0.002
		0.2	3	100	7.0		
		0.4	3	106	5.1		
	とうもろこし	0.1	3	103	7.1		
		0.2	3	103	8.6		
		0.4	3	103	5.3		
ネオソラニオール	牛用配合飼料	0.1	3	91.1	7.2	0.008	0.002
		0.2	3	92.6	12		
		0.4	3	91.4	12		
	とうもろこし	0.1	3	102	5.9		
		0.2	3	109	5.0		
		0.4	3	110	13		
デオキシニパレノール	牛用配合飼料	0.1	3	104	3.9	0.04	0.01
		0.2	3	96.4	9.9		
		0.4	3	99.8	5.7		
	とうもろこし	0.1	3	106	4.7		
		0.2	3	104	7.7		
		0.4	3	106	3.4		
ニパレノール	牛用配合飼料	0.3	3	92.0	11	0.06	0.02
		0.6	3	91.8	13		
		1.2	3	102	6.1		
	とうもろこし	0.3	3	107	5.5		
		0.6	3	99.6	11		
		1.2	3	103	7.0		
フザレノン-X	牛用配合飼料	0.1	3	107	6.5	0.08	0.02
		0.2	3	105	6.8		
		0.4	3	110	12		
	とうもろこし	0.1	3	102	8.3		
		0.2	3	97.9	4.1		
		0.4	3	106	6.2		

・共同試験

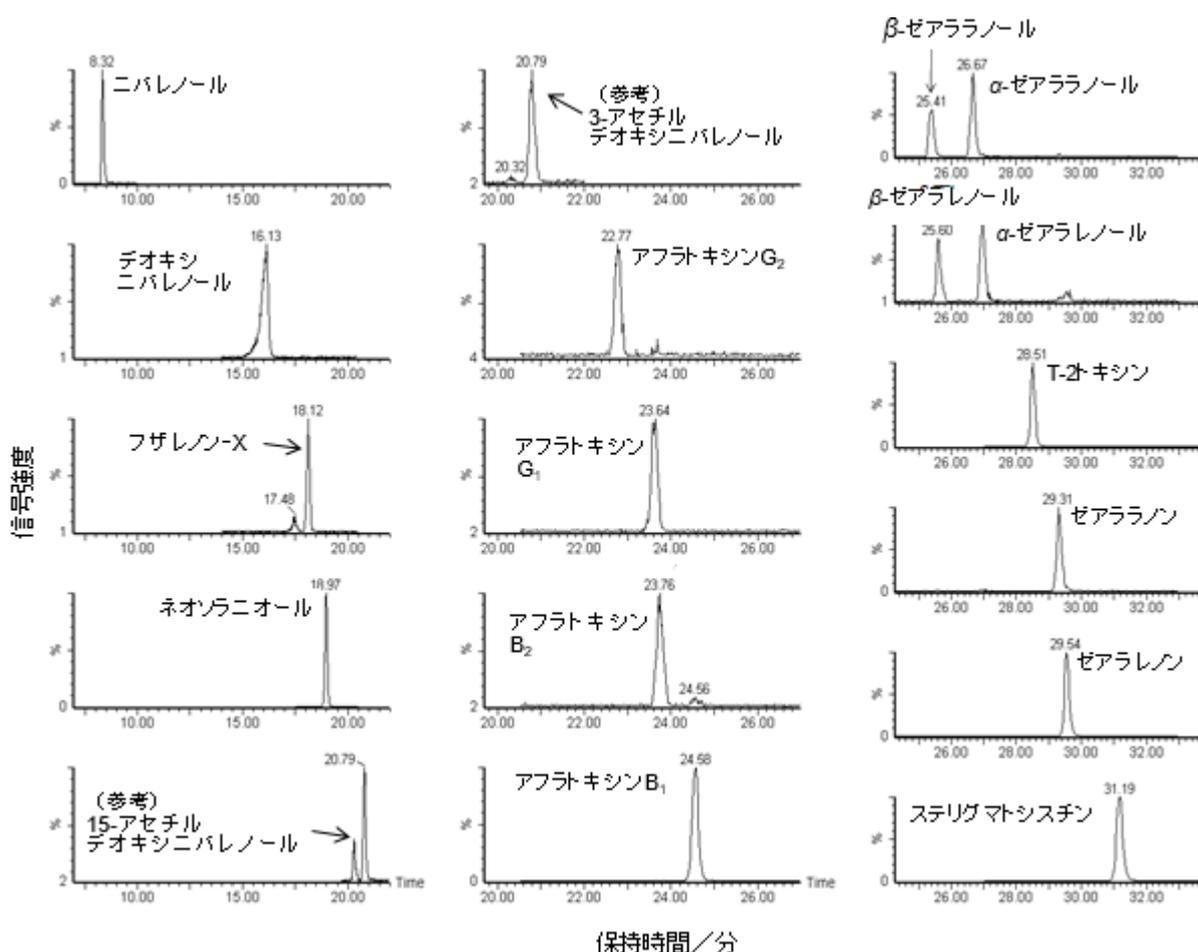
1)  $\alpha$ -ゼアララノール、 $\beta$ -ゼアララノール、ゼアララノン、 $\alpha$ -ゼアラレノール及び $\beta$ -ゼアラレノール

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 (%) (測定値 (mg/kg))	室内繰返し精度 RSD <sub>f</sub> (%)	室間再現精度 RSD <sub>R</sub> (%)	HorRat
$\alpha$ -ゼアララノール	鶏用配合飼料	10	1	0.015	93.5	1.1	16	0.73
	とうもろこし	10	1	0.05	100	2.0	17	0.77
$\beta$ -ゼアララノール	鶏用配合飼料	10	1	0.015	88.6	3.2	18	0.81
	とうもろこし	11	0	0.05	90.7	4.3	23	1.0
ゼアララノン	鶏用配合飼料	11	0	0.015	111	2.8	11	0.49
	とうもろこし	9	2	0.05	109	1.3	8.1	0.37
$\alpha$ -ゼアラレノール	鶏用配合飼料	9	2	0.015	94.3	2.2	18	0.82
	とうもろこし	11	0	0.05	95.7	4.2	18	0.80
$\beta$ -ゼアラレノール	鶏用配合飼料	11	0	0.015	93.1	7.2	25	1.1
	とうもろこし	10	1	0.05	92.3	3.5	21	0.95

2) その他のかび毒

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 (%) (測定値 (mg/kg))	室内繰返し精度 RSD <sub>f</sub> (%)	室間再現精度 RSD <sub>R</sub> (%)	HorRat
アフラトキシンB <sub>1</sub>	牛用配合飼料	6	0	0.004	89.7	12	36	1.7
	とうもろこし	6	0	0.004	97.1	6.0	23	1.1
アフラトキシンB <sub>2</sub>	牛用配合飼料	5	1	0.004	99.1	3.5	35	1.6
	とうもろこし	6	0	0.004	100	7.9	26	1.2
アフラトキシンG <sub>1</sub>	牛用配合飼料	5	1	0.012	82.0	5.1	47	2.1
	とうもろこし	6	0	0.012	86.3	6.3	41	1.9
アフラトキシンG <sub>2</sub>	牛用配合飼料	6	0	0.012	85.3	17	37	1.7
	とうもろこし	6	0	0.012	93.8	5.7	28	1.3
ステリグマトシステチン	牛用配合飼料	5	1	0.04	114	7.0	17	0.79
	とうもろこし	6	0	0.04	113	7.0	12	0.53
ゼアラレノン	牛用配合飼料	6	0	0.008+自然汚染	(0.0279)	19	36	1.6
	とうもろこし	6	0	0.008+自然汚染	(0.0162)	13	15	0.66
T-2トキシシン	牛用配合飼料	5	1	0.4	107	3.6	18	0.97
	とうもろこし	6	0	0.4	109	2.6	14	0.75
ネオソラニオール	牛用配合飼料	6	0	0.4	83.3	18	30	1.6
	とうもろこし	5	1	0.4	110	1.4	13	0.71
デオキシニバレノール	牛用配合飼料	6	0	0.4	110	5.2	18	0.96
	とうもろこし	6	0	0.4+自然汚染	(0.444)	4.5	5.6	0.31
ニバレノール	牛用配合飼料	6	0	1.2	61.7	28	28	1.7
	とうもろこし	5	1	1.2	83.6	9.9	15	0.96
フザレノン-X	牛用配合飼料	4	2	0.4	106	5.8	5.8	0.32
	とうもろこし	5	1	0.4	104	6.2	11	0.62

(参考) クロマトグラム例



### 標準液のクロマトグラム

(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、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として各 0.5 ng、アフラトキシン B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 及び G<sub>2</sub> 並びにステリグマトシスチンとして各 1 ng、ゼアラレノンとして 2.4 ng、T-2 トキシン及びネオソラニオールとして各 10 ng、デオキシニバレノール及びフザレノン-X として各 50 ng、ニバレノールとして 100 ng 注入)

## 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

- (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 [C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>8</sub>]、

T-2 トキシシン [C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>O<sub>9</sub>]、ジアセトキシシルペノール [C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>O<sub>7</sub>]、ネオソラニオール [C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>O<sub>8</sub>]、3-アセチルデオキシニバレノール [C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>O<sub>7</sub>]、15-アセチルデオキシニバレノール [C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>O<sub>7</sub>]、デオキシニバレノール [C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>]、ニバレノール [C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>7</sub>] 及びフザレノン-X [C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub>] 各 0.2 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、混合し<sup>注1</sup>、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 µg/mL) <sup>注2</sup> を標準原液とする。

3) かび毒混合標準液　各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、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 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、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。ろ紙上の残さをアセトニトリル-水 (17+3) 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アセトニトリル-水 (17+3) 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過する。ろ液をアセトニトリル-水 (17+3) 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アセトニトリル-水 (17+3) 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) <sup>注3</sup> 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<sup>注4</sup>、カラム処理 II に供する試料溶液とする。

カラム処理 II <sup>注5</sup>　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) <sup>注6</sup> 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<sup>注4</sup>、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  $\mu$ L 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  $\mu$ m) <sup>注7</sup>

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)  $\rightarrow$  16 min  $\rightarrow$  (1+4) (8 min 保持)

流速 : 0.2 mL/min

カラム槽温度 : 40  $^{\circ}$ C

(タンデム型質量分析計部<sup>注8</sup>)

検出器 : 四重極型質量分析計

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 : N<sub>2</sub> (5 L/min)

インターフェース温度 : 350  $^{\circ}$ C

ヒートブロック温度 : 200  $^{\circ}$ C

D L 温度 : 250  $^{\circ}$ 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 各物質の測定条件

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トキシン	-	483	59	-	21
	+	442	-	215	13
-			263	15	
T-2トキシン	+	484	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
3-アセチルデオキシニバレノール	-	397	-	215	18
			-	185	22
15-アセチルデオキシニバレノール	-	397	337	-	8
			-	307	13
デオキシニバレノール	-	355	59	-	21
			-	277	7
デオキシニバレノール-3-グルコシド	-	517	265	-	13
			-	295	10
ニバレノール	-	371	427	-	21
			-	457	14
フザレノン-X	-	413	281	-	13
			-	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 (アジマックス販売) 等) を用いてもよい。
- 2 富士フイルム和光純薬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) 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 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%)	
HT-2トキシシン	ブロイラー肥育前期用配合飼料	0.2	3	110	5.0	
		0.02	3	91.6	9.9	
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	0.2	3	101	2.1	
		0.02	3	89.3	10	
	肉用牛肥育用配合飼料	0.2	3	102	1.8	
		0.01	3	104	17	
	大麦	0.02	3	75.4	13	
		0.2	3	103	5.1	
		0.02	3	97.7	5.4	
	とうもろこし	0.2	3	101	2.0	
		0.02	3	108	1.3	
	大豆油かす	0.2	3	106	4.3	
		0.005	3	106	5.9	
	なたね油かす	0.01	3	98.1	4.4	
		0.02	3	101	7.1	
		0.2	3	108	1.8	
		0.2	3	108	1.8	
	T-2トキシシン	ブロイラー肥育前期用配合飼料	0.2	3	108	6.5
0.02			3	101	11	
ほ乳期子豚育成用配合飼料		0.2	3	105	5.6	
		0.02	3	102	10	
肉用牛肥育用配合飼料		0.2	3	94.3	4.9	
		0.01	3	116	11	
大麦		0.02	3	101	3.7	
		0.2	3	104	4.0	
		0.02	3	96.8	9.5	
とうもろこし		0.2	3	111	6.9	
		0.02	3	108	5.8	
大豆油かす		0.2	3	109	12	
		0.01	3	95.2	8.9	
なたね油かす		0.02	3	101	6.2	
		0.2	3	111	4.8	
		0.2	3	111	4.8	
ジアセトキシシスシル ペノール		ブロイラー肥育前期用配合飼料	0.2	3	110	1.2
			0.02	3	108	4.2
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	0.2	3	103	4.5	
		0.02	3	104	9.7	
	肉用牛肥育用配合飼料	0.2	3	116	2.0	
		0.01	3	98.2	9.3	
	大麦	0.02	3	99.2	6.3	
		0.2	3	109	3.0	
		0.02	3	90.9	3.0	
	とうもろこし	0.2	3	88.9	7.0	
		0.02	3	98.4	14	
	大豆油かす	0.2	3	106	8.1	
		0.005	3	107	5.8	
	なたね油かす	0.01	3	108	9.1	
		0.02	3	113	4.5	
		0.2	3	112	16	
		0.2	3	112	16	

・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 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%)	
ネオソラニオール	ブロイラー肥育前期用配合飼料	0.2	3	114	2.6	
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	0.02	3	107	4.2	
		0.2	3	107	7.0	
	肉用牛肥育用配合飼料	0.02	3	94.4	5.0	
		0.2	3	116	1.1	
	大麦	0.01	3	90.1	12	
		0.02	3	110	4.3	
		0.2	3	107	3.7	
	とうもろこし	0.02	3	110	2.0	
		0.2	3	101	4.2	
	大豆油かす	0.02	3	102	1.4	
		0.2	3	107	6.2	
	なたね油かす	0.005	3	109	7.4	
		0.01	3	108	7.9	
		0.02	3	115	2.0	
0.2		3	112	17		
3-アセチルデオキシ ニバレノール	ブロイラー肥育前期用配合飼料	0.2	3	99.3	2.5	
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	0.02	3	102	8.0	
		0.2	3	101	2.2	
	肉用牛肥育用配合飼料	0.2	3	101	2.5	
	大麦	0.04	3	95.8	7.2	
		0.2	3	103	4.7	
	とうもろこし	0.02	3	104	3.9	
		0.2	3	94.2	6.3	
	大豆油かす	0.04	3	78.5	2.9	
		0.2	3	90.5	3.5	
	なたね油かす	0.02	3	96.8	15	
		0.2	3	108	4.1	
	15-アセチルデオキシ ニバレノール	ブロイラー肥育前期用配合飼料	0.2	3	108	1.1
		ほ乳期子豚育成用配合飼料	0.02	3	102	6.9
			0.2	3	96.6	5.0
肉用牛肥育用配合飼料		0.02	3	92.9	10	
大麦		0.02	3	119	3.5	
		0.04	3	100	4.3	
とうもろこし		0.2	3	102	6.3	
		0.02	3	106	9.8	
大豆油かす		0.2	3	103	5.4	
		0.04	3	102	3.6	
なたね油かす		0.2	3	112	1.7	
		0.02	3	110	3.7	
		0.2	3	115	1.7	
デオキシニバレノール		ブロイラー肥育前期用配合飼料	1	3	91.4	9.1
		ほ乳期子豚育成用配合飼料	0.02	3	94.4	9.4
	1		3	90.2	7.1	
	肉用牛肥育用配合飼料	4	3	111	2.4	
	大麦	0.2	3	92.1	3.0	
		0.2	3	90.3	7.7	
	大豆油かす	0.02	3	99.0	6.0	
		0.2	3	93.8	6.2	
	なたね油かす	0.01	3	91.0	8.3	
		0.02	3	110	5.9	
	0.2	3	104	3.5		

・添加回収率及び繰返し精度〔続き〕

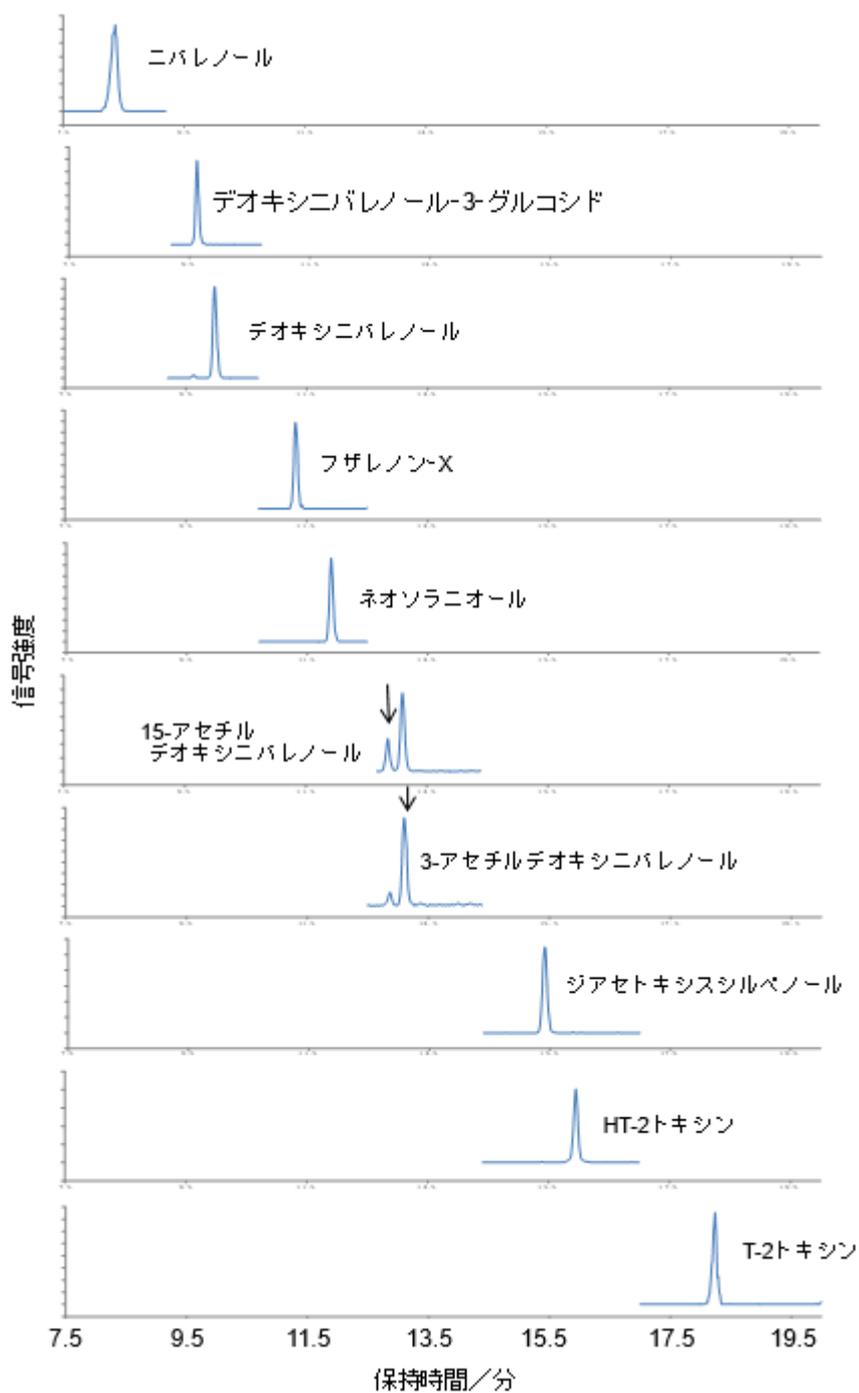
添加成分名	試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%)	
デオキシニバレノール-3-グルコシド	ブロイラー肥育前期用配合飼料	0.1	3	97.8	3.8	
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	0.02	3	95.8	3.1	
		0.1	3	72.5	17	
	肉用牛肥育用配合飼料	0.02	3	104	15	
		0.1	3	98.2	2.2	
	大麦	0.01	3	83.4	9.6	
		0.02	3	119	5.3	
		0.1	3	88.4	5.7	
	とうもろこし	0.02	3	86.0	16	
		0.1	3	81.5	4.7	
	大豆油かす	0.02	3	91.1	17	
		0.1	3	82.2	4.4	
	なたね油かす	0.005	3	90.2	8.9	
		0.01	3	90.7	13	
		0.02	3	71.4	6.4	
0.1		3	70.6	7.0		
ニバレノール	ブロイラー肥育前期用配合飼料	0.2	3	95.5	1.6	
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	0.02	3	74.6	3.2	
		0.2	3	89.4	3.5	
	肉用牛肥育用配合飼料	0.2	3	108	4.4	
	大麦	0.2	3	98.8	3.0	
	とうもろこし	0.2	3	108	1.9	
	大豆油かす	0.02	3	98.0	4.2	
		0.2	3	97.2	4.3	
	なたね油かす	0.005	3	102	5.9	
		0.01	3	90.0	14	
		0.02	3	82.0	2.7	
		0.2	3	107	5.2	
	フザレン-X	ブロイラー肥育前期用配合飼料	0.2	3	101	1.5
		ほ乳期子豚育成用配合飼料	0.02	3	100	4.4
0.2			3	104	8.6	
肉用牛肥育用配合飼料		0.02	3	84.1	5.0	
		0.2	3	118	1.5	
大麦		0.01	3	108	11	
		0.02	3	89.0	1.5	
		0.2	3	107	3.2	
とうもろこし		0.02	3	83.3	4.7	
		0.2	3	91.1	8.0	
大豆油かす		0.02	3	90.8	17	
		0.2	3	97.2	9.4	
なたね油かす		0.01	3	111	13	
		0.02	3	86.1	15	
		0.2	3	101	8.6	

・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 (%)	室内繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%)	室間再現精度 RSD <sub>R</sub> (%)	HorRat
HT-2トキシシン	ほ乳期子豚育成用配合飼料	8	0	0.1	104	8.5	8.5	0.39
	とうもろこし	8	0	0.2	103	8.3	8.3	0.41
	大豆油かす	8	0	0.1	104	9.8	9.8	0.45
T2-トキシシン	ほ乳期子豚育成用配合飼料	8	0	0.1	105	5.2	9.2	0.42
	とうもろこし	8	0	0.2	102	7.5	7.5	0.37
	大豆油かす	8	0	0.1	100	7.1	7.1	0.32
ジアセトキシスシルペノール	ほ乳期子豚育成用配合飼料	7	1	0.05	103	6.6	8.8	0.40
	とうもろこし	7	1	0.1	99.8	4.5	4.5	0.22
	大豆油かす	8	0	0.05	101	4.3	4.3	0.19
ネオソラニオール	ほ乳期子豚育成用配合飼料	8	0	0.1	106	6.8	6.8	0.31
	とうもろこし	8	0	0.2	107	8.6	8.6	0.43
	大豆油かす	8	0	0.1	109	3.1	4.9	0.22
3-アセチルデオキシニバレノール	ほ乳期子豚育成用配合飼料	8	0	0.1	102	8.8	11	0.49
	とうもろこし	8	0	0.2	97.1	9.1	9.2	0.45
	大豆油かす	8	0	0.1	103	7.6	12	0.57
15-アセチルデオキシニバレノール	ほ乳期子豚育成用配合飼料	8	0	0.1	109	4.3	8.1	0.37
	とうもろこし	8	0	0.2	115	7.8	12	0.58
	大豆油かす	8	0	0.1	116	9.0	14	0.65
デオキシニバレノール	ほ乳期子豚育成用配合飼料	8	0	1	98.2	6.5	11	0.70
				ブランク値0.0158				
	とうもろこし	8	0	0.2	97.2	5.2	8.5	0.42
				ブランク値0.021				
	大豆油かす	8	0	0.1	103	3.4	13	0.59
				ブランク値0.028				
デオキシニバレノール-3-グルコシド	ほ乳期子豚育成用配合飼料	8	0	0.1	84.3	4.6	22	1.0
	とうもろこし	8	0	0.2	96.7	3.5	15	0.68
	大豆油かす	8	0	0.1	78.2	6.4	13	0.59
ニバレノール	ほ乳期子豚育成用配合飼料	8	0	0.1	99.9	3.9	9.4	0.43
	とうもろこし	8	0	0.2	98.8	4.1	7.6	0.40
				ブランク値0.159				
	大豆油かす	8	0	0.1	89.9	5.6	5.6	0.25
フザレノン-X	ほ乳期子豚育成用配合飼料	8	0	0.1	105	5.1	14	0.62
	とうもろこし	8	0	0.2	101	8.8	8.8	0.43
	大豆油かす	8	0	0.1	93.8	8.5	10	0.48

- ・定量下限（単一試験室による確認） 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 0.02 mg/kg、T-2 トキシシン、デオキシニバレノール及びフザレノン-X：試料中 各 0.01 mg/kg、その他のかび毒：試料中 各 0.005 mg/kg
- ・検出下限（単一試験室による確認） 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 0.006 mg/kg、T-2 トキシシン、デオキシニバレノール及びフザレノン-X：試料中 各 0.003 mg/kg、その他のかび毒：試料中 各 0.002 mg/kg

(参考) クロマトグラム例



標準液（各かび毒として 10 ng/mL）のクロマトグラム

### 3 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<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 及び G<sub>2</sub> (4 成分)
- (2) 適用範囲 配合飼料、とうもろこし、イアコーンサイレージ、稲発酵粗飼料及びとうもろこしサイレージ
- (3) 分析法<sup>注1</sup>

#### A 試薬の調製

- 1) アフラトキシン B<sub>1</sub> 標準原液 アフラトキシン B<sub>1</sub> [C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>] 1 mg を 0.01 mg

の桁まで量り、その数値を記録し、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、更に標線までアセトニトリルを加えてアフラトキシン B<sub>1</sub> 標準原液を調製する（この液 1 mL は、アフラトキシン B<sub>1</sub> として 0.2 mg を含有する。）。

- 2) アフラトキシン B<sub>2</sub> 標準原液　アフラトキシン B<sub>2</sub> [C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>] 1 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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、更に標線までアセトニトリルを加えてアフラトキシン B<sub>2</sub> 標準原液を調製する（この液 1 mL は、アフラトキシン B<sub>2</sub> として 0.2 mg を含有する。）。
- 3) アフラトキシン G<sub>1</sub> 標準原液　アフラトキシン G<sub>1</sub> [C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>] 1 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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、更に標線までアセトニトリルを加えてアフラトキシン G<sub>1</sub> 標準原液を調製する（この液 1 mL は、アフラトキシン G<sub>1</sub> として 0.2 mg を含有する。）。
- 4) アフラトキシン G<sub>2</sub> 標準原液　アフラトキシン G<sub>2</sub> [C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>] 1 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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、更に標線までアセトニトリルを加えてアフラトキシン G<sub>2</sub> 標準原液を調製する（この液 1 mL は、アフラトキシン G<sub>2</sub> 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 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 及び G<sub>2</sub> 各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、1 mL 中にアフラトキシン B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 及び G<sub>2</sub> 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 中にアフラトキシン B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 及び G<sub>2</sub> 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<sup>註2</sup>（イアコーンサイレージ、稲発酵粗飼料及びとうもろこしサイレージは 25 g）を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、300 mL（イアコーンサイレージ及び稲発酵粗飼料は 500 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（イアコーンサイレージ及びとうもろこしサイレージは 150 mL、稲発酵粗飼料は 200 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）<sup>註3</sup> 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<sup>註4</sup> 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、この容器を密栓した

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<sup>注4</sup>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 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>及び G<sub>2</sub>としてそれぞれ 0.05~30 ng 相当量を含む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)<sup>注5</sup>  
分離液：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 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>及び G<sub>2</sub>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 g とする。

3 MycoSep 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 容以下のスクリュウ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

## 1) 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 <sub>r</sub> (%)
アフラトキシンB <sub>1</sub>	鶏用配合飼料	0.01	3	102	5.2
		0.02	3	103	3.0
		0.1	3	95.7	1.2
	牛用配合飼料	0.01	3	96.0	2.8
		0.02	3	96.3	2.2
		0.1	3	97.3	2.4
	とうもろこし	0.01	3	100	4.0
		0.02	3	95.0	0.0
		0.1	3	92.0	2.9
アフラトキシンB <sub>2</sub>	鶏用配合飼料	0.01	3	95.0	4.8
		0.02	3	93.7	2.7
		0.1	3	92.0	1.1
	牛用配合飼料	0.01	3	92.0	1.9
		0.02	3	90.7	1.3
		0.1	3	100	4.7
	とうもろこし	0.01	3	96.0	5.4
		0.02	3	92.3	0.6
		0.1	3	95.0	3.2
アフラトキシンG <sub>1</sub>	鶏用配合飼料	0.01	3	95	7.4
		0.02	3	103	2.2
		0.1	3	103	1.1
	牛用配合飼料	0.01	3	94.0	4.3
		0.02	3	96.3	2.6
		0.1	3	102	4.4
	とうもろこし	0.01	3	101	2.6
		0.02	3	95.3	4.2
		0.1	3	97.7	1.2
アフラトキシンG <sub>2</sub>	鶏用配合飼料	0.01	3	92.7	8.0
		0.02	3	94.7	2.2
		0.1	3	96.0	1.0
	牛用配合飼料	0.01	3	92.7	4.1
		0.02	3	91.0	1.1
		0.1	3	104	5.0
	とうもろこし	0.01	3	94.7	1.2
		0.02	3	91.7	1.7
		0.1	3	97.0	1.0

## 2) 配合飼料及びとうもろこし (定量下限相当濃度)

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 <sub>r</sub> (%)
アフラトキシンB <sub>1</sub>	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 <sub>2</sub>	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 <sub>1</sub>	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 <sub>2</sub>	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

### 3) 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 <sub>r</sub> (%)	
アフラトキシンB <sub>1</sub>	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	
		0.022	5	85.0	3.5	
	アフラトキシンB <sub>2</sub>	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	
		0.022	5	84.0	3.2	
アフラトキシンG <sub>1</sub>		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	
		0.010	5	96.0	3.3	
	アフラトキシンG <sub>2</sub>	とうもろこしサイレージ1	0.0002	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		0.0002	5	94.8	10	
		0.011	5	93.9	3.5	
		0.0002	5	82.6	2.6	
0.022		5	87.5	2.6		

### 4) イアコーンサイレージ及び稲発酵粗飼料

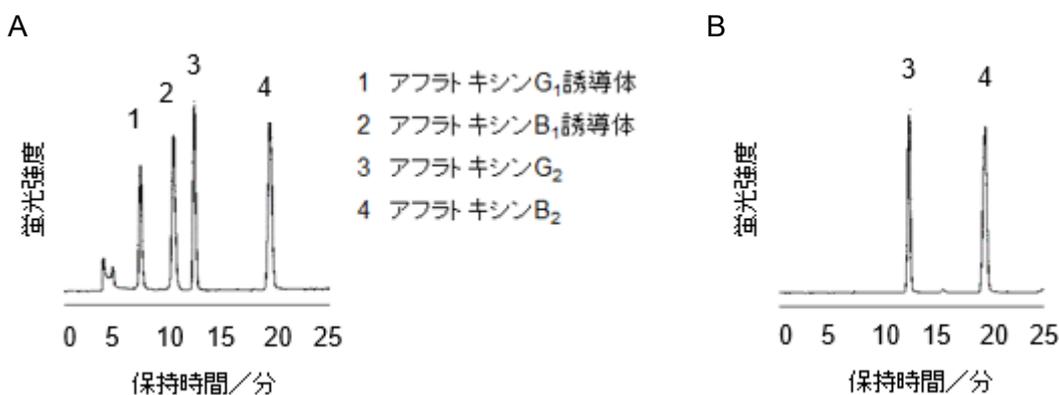
添加成分名	試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%)	
アフラトキシンB <sub>1</sub>	イアコーンサイレージ1	0.0026	5	91.6	1.6	
		0.022	5	78.6	1.7	
		0.044	5	81.7	1.0	
	イアコーンサイレージ2	0.0026	5	92.2	1.4	
		0.011	5	100	7.6	
		0.013	5	79.8	0.8	
	稲発酵粗飼料1	0.022	5	86.7	2.3	
		0.044	5	91.0	1.0	
		0.0013	5	84.8	2.5	
	稲発酵粗飼料2	0.011	5	85.0	2.8	
		0.00044	5	100	4.2	
		0.022	5	78.1	1.4	
アフラトキシンB <sub>2</sub>	イアコーンサイレージ1	0.0044	5	79.4	1.1	
		0.044	5	79.4	1.1	
		0.00044	5	86.4	2.2	
	イアコーンサイレージ2	0.011	5	93.0	3.7	
		0.00022	5	91.3	8.7	
		0.022	5	86.9	2.2	
	稲発酵粗飼料1	0.044	5	87.6	0.7	
		0.00022	5	98.2	7.4	
		0.011	5	86.9	1.3	
	アフラトキシンG <sub>1</sub>	イアコーンサイレージ1	0.0026	5	97.8	1.4
			0.022	5	76.3	1.8
			0.044	5	86.1	1.3
イアコーンサイレージ2		0.0026	5	101	0.5	
		0.011	5	108	6.5	
		0.0013	5	93.6	1.0	
稲発酵粗飼料1		0.022	5	87.2	3.5	
		0.044	5	99.7	1.9	
		0.0013	5	112	6.7	
稲発酵粗飼料2		0.011	5	88.1	3.6	
		0.0052	5	95.0	0.4	
		0.022	5	82.3	1.2	
アフラトキシンG <sub>2</sub>	イアコーンサイレージ1	0.044	5	86.3	1.4	
		0.0026	5	101	1.4	
		0.011	5	108	5.1	
	イアコーンサイレージ2	0.0026	5	101	1.4	
		0.011	5	108	5.1	
		0.0013	5	95.8	1.5	
	稲発酵粗飼料1	0.022	5	93.8	2.0	
		0.044	5	96.5	1.5	
		0.0013	5	107	2.5	
	稲発酵粗飼料2	0.011	5	94.9	2.3	

・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 (%)	室内繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%)	室間再現精度 RSD <sub>R</sub> (%)	HorRat
アフラトキシンB <sub>1</sub>	鶏用配合飼料	7	0	0.02	98.8	3.0	4.4	0.20
アフラトキシンB <sub>2</sub>	鶏用配合飼料	7	0	0.02	90.6	2.7	7.6	0.34
アフラトキシンG <sub>1</sub>	鶏用配合飼料	7	0	0.02	100	2.6	3.6	0.16
アフラトキシンG <sub>2</sub>	鶏用配合飼料	7	0	0.02	93.4	2.6	5.4	0.24

- ・定量下限（単一試験室による確認） 配合飼料及びとうもろこし 各 0.0005 mg/kg、稲発酵粗飼料及びイアコーンサイレージ（風乾物）中 アフラトキシン B<sub>2</sub> : 0.0005 mg/kg、その他のアフラトキシン : 0.003 mg/kg（イアコーンサイレージ中 アフラトキシン G<sub>2</sub> : 0.006 mg/kg）、とうもろこしサイレージ（風乾物）中 アフラトキシン G<sub>2</sub> 0.0005 mg/kg、その他のアフラトキシン 各 0.003 mg/kg
- ・検出下限（単一試験室による確認） 配合飼料及びとうもろこし 各 0.0001 mg/kg、稲発酵粗飼料及びイアコーンサイレージ（風乾物）中 アフラトキシン B<sub>2</sub> : 0.0002 mg/kg、その他のアフラトキシン : 0.001 mg/kg、とうもろこしサイレージ（風乾物）中 アフラトキシン G<sub>2</sub> 0.0002 mg/kg、その他のアフラトキシン 各 0.001 mg/kg

(参考) クロマトグラム例



標準液のクロマトグラム

A : アフラトキシン混合標準液（各 0.2 ng 注入、誘導体化処理あり）

B : アフラトキシン混合標準液（各 0.2 ng 注入、誘導体化処理なし）

4 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

- (1) 分析対象化合物 アフラトキシン B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 及び G<sub>2</sub>（4 成分）
- (2) 適用範囲 大豆油かすを除く飼料
- (3) 分析法<sup>注1</sup>

A 試薬の調製

- 1) アフラトキシン B<sub>1</sub> 標準原液 2 の(3)の A の 1)による。
- 2) アフラトキシン B<sub>2</sub> 標準原液 2 の(3)の A の 2)による。
- 3) アフラトキシン G<sub>1</sub> 標準原液 2 の(3)の A の 3)による。
- 4) アフラトキシン G<sub>2</sub> 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 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>及び G<sub>2</sub>各標準原液の一部を混合し、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 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>及び G<sub>2</sub>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<sup>注2</sup>を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、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)<sup>注3</sup>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 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>及び G<sub>2</sub>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)<sup>注4</sup>

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<sup>注5, 6</sup>：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 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>及び G<sub>2</sub>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 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 C18M 4E (レゾナック製) 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 B<sub>1</sub>及び G<sub>1</sub>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 B<sub>1</sub>及び G<sub>1</sub>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

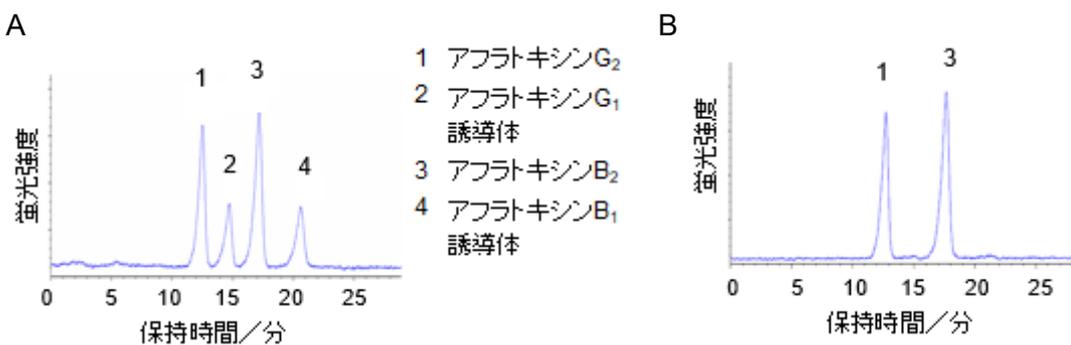
添加成分名	試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%以下)
アフラトキシンB <sub>1</sub>	鶏用配合飼料	0.005~0.04	3	84.0~96.9	7.1
	牛用配合飼料	0.005~0.04	3	79.3~98.3	4.3
	とうもろこし	0.005~0.04	3	87.1~99.3	10.3
	大豆油かす	0.005~0.04	3	54.9~91.7	21.2
アフラトキシンB <sub>2</sub>	鶏用配合飼料	0.005~0.04	3	79.4~92.0	13.9
	牛用配合飼料	0.005~0.04	3	80.9~102.5	4.0
	とうもろこし	0.005~0.04	3	89.0~94.0	4.2
	大豆油かす	0.005~0.04	3	79.4~96.6	7.9
アフラトキシンG <sub>1</sub>	鶏用配合飼料	0.005~0.04	3	77.2~93.3	7.1
	牛用配合飼料	0.005~0.04	3	78.5~89.3	8.1
	とうもろこし	0.005~0.04	3	72.5~86.8	9.3
	大豆油かす	0.005~0.04	3	84.1~92.1	6.0
アフラトキシンG <sub>2</sub>	鶏用配合飼料	0.005~0.04	3	72.4~100.5	11.2
	牛用配合飼料	0.005~0.04	3	88.5~96.5	8.1
	とうもろこし	0.005~0.04	3	78.0~94.9	4.5
	大豆油かす	0.005~0.04	3	91.5~104.7	3.5

・ 共同試験

成分名	試料の種類	試験室数	添加濃度 (mg/kg)	添加回収率 (%) (測定値 (mg/kg))	室内繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%)	室間再現精度 RSD <sub>R</sub> (%)	HorRat
アフラトキシンB <sub>1</sub>	牛用配合飼料	7	0.005	111	3.2	12	0.53
	とうもろこし	7	自然汚染	(0.00889)	6.7	17	0.79
アフラトキシンB <sub>2</sub>	牛用配合飼料	7	0.005	94.6	1.9	9.5	0.43
アフラトキシンG <sub>1</sub>	牛用配合飼料	7	0.005	108	2.8	16	0.72
アフラトキシンG <sub>2</sub>	牛用配合飼料	7	0.005	87.0	3.7	9.0	0.41

- ・ 定量下限 (単一試験室による確認) アフラトキシン B<sub>1</sub> 及び G<sub>1</sub> : 試料中 各 0.001 mg/kg、アフラトキシン B<sub>2</sub> 及び G<sub>2</sub> : 試料中 各 0.0005 mg/kg
- ・ 検出下限 (単一試験室による確認) アフラトキシン B<sub>1</sub> 及び G<sub>1</sub> : 試料中 各 0.0005 mg/kg、アフラトキシン B<sub>2</sub> 及び G<sub>2</sub> : 試料中 各 0.0002 mg/kg

(参考) クロマトグラム例



- A : アフラトキシン混合標準液 (各 0.2 ng 注入、フォトケミカルリアクター・オン)
- B : アフラトキシン混合標準液 (各 0.2 ng 注入、フォトケミカルリアクター・オフ)

5 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 [ $C_{18}H_{22}O_5$ ] 2 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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  $\mu$ g を含有する。)

使用に際して、この標準原液の一部を、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 [ $C_{15}H_{20}O_6$ ] 2 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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  $\mu$ g 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  $\mu$ g を含有する標準液を調製する。この標準液の一部を、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 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、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 $\times$ 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<sup>注1</sup>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 0.2 g (0.19~0.21 g)<sup>注2</sup>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 $\times$ 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  $\mu\text{m}$ ）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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{m}$ ）<sup>注3</sup>

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<sup>注4</sup>）

検出器：四重極型質量分析計

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：N<sub>2</sub>（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 ゼアラレノンの測定条件

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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{m}$ ）<sup>注3</sup>

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<sup>注4</sup>）

検 出 器：四重極型質量分析計

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：N<sub>2</sub>（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測定条件

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)
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 <sub>r</sub> (%)
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 <sub>r</sub> (%)
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 <sup>注</sup> (mg/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%)	室間再現精度 RSD <sub>R</sub> (%)	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 <sup>注</sup> (mg/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%)	室間再現精度 RSD <sub>R</sub> (%)	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

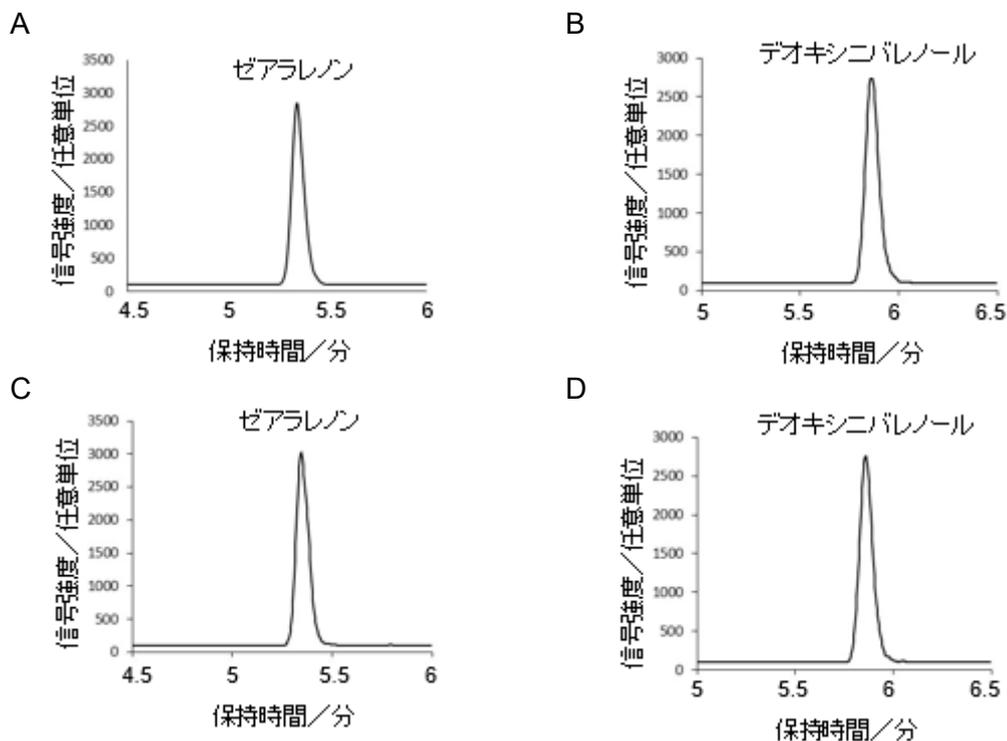
注 分析試料（風乾物）に対する添加濃度

- ・定量下限（単一試験室による確認） 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（単一試験室による確認） 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

（参考）クロマトグラム例



標準液及び添加試料のクロマトグラム

- A,B：標準液（ゼアラレノンとして 10 ng/mL、注入量として 0.05 ng 及びデオキシニバレノールとして 60 ng/mL、注入量として 0.3 ng）
- C：添加試料（とうもろこしサイレージにゼアラレノンとして 1 mg/kg 相当量（注入量として 0.05 ng 相当量）添加）
- D：添加試料（とうもろこしサイレージにデオキシニバレノールとして 1.3 mg/kg 相当量（注入量として 0.3 ng 相当量）添加）

## 6 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 トキシン標準原液 T-2 トキシン [C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>O<sub>9</sub>] 1 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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、更に標線までアセトニトリルを加える（この液 1 mL は、T-2 トキシンとして 0.2 mg を含有する。）。更にこの液の一部をアセトニトリルで正

確に希釈し、1 mL 中に 25 µg を含有する T-2 トキ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<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>] 1 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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、更に標線までアセトニトリルを加える（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。）。更にこの液の一部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 µg 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<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>7</sub>] 1 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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、更に標線までアセトニトリルを加える（この液 1 mL は、ニバレノールとして 0.2 mg を含有する。）。更にこの液の一部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 µg 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部を混合し、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 µg 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 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、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<sup>注1</sup>。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）<sup>注2</sup> 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 °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 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）<sup>注3</sup>

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

(タンデム型質量分析計部<sup>注4)</sup>)

検出器：四重極型質量分析計

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)

ネブライザーガス：N<sub>2</sub> (380 kPa)

乾燥ガス：N<sub>2</sub> (7.0 L/min、350 °C)

フラグメンター電圧：100 V

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： $m/z$  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 MultiSep 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

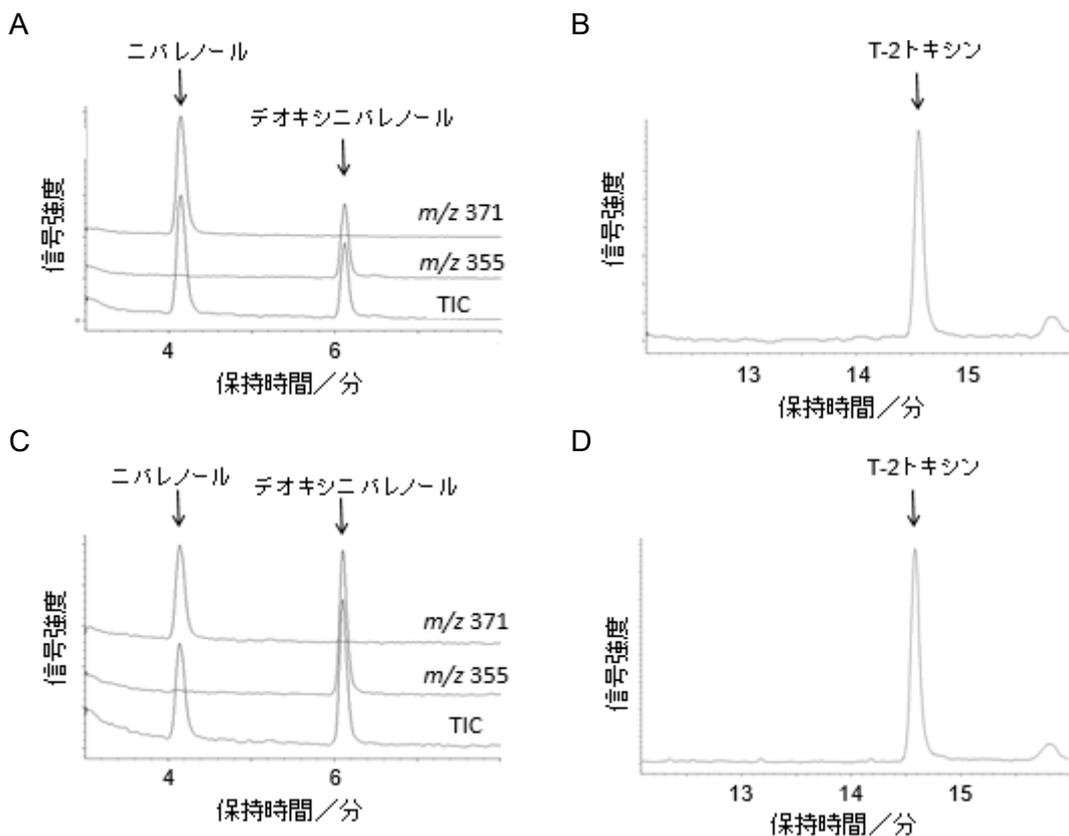
添加成分名	試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%)
T-2トキシシ	幼すう育成用配合飼料	0.01	3	119.7	6.5
		1	3	96.3	10.5
	牛用配合飼料	0.01	3	108.7	2.1
		1	3	104.9	3.3
	小麦	0.01	3	106.7	3.3
		1	3	102.8	3.0
とうもろこし	0.01	3	107.3	7.1	
	1	3	90.0	14.7	
デオキシニバレノール	鶏用配合飼料	0.1	3	104.3	4.2
		1	3	111.0	3.9
	豚用配合飼料	0.1	3	115.2	5.1
		1	3	115.9	3.9
	大麦	0.1	3	105.6	8.5
		1	3	110.6	4.8
マイロ	0.1	3	100.8	7.2	
	1	3	108.4	7.7	
ニバレノール	鶏用配合飼料	0.1	3	84.9	9.0
		1	3	87.4	7.2
	豚用配合飼料	0.1	3	90.6	7.6
		1	3	86.5	2.8
	大麦	0.1	3	83.7	14.4
		1	3	85.8	6.0
マイロ	0.1	3	83.7	3.8	
	1	3	92.5	0.5	

・ 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 (mg/kg)	添加回収率 (%) (測定値 (mg/kg))	室内繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%)	室間再現精度 RSD <sub>R</sub> (%)	HorRat
T-2トキシシ	ブロイラー肥育後期用配合飼料	6	0	0.2	89.4	3.0	13	0.63
デオキシニバ レノール	鶏用配合飼料 1	5	0	0.5	114	1.6	4.7	0.26
	鶏用配合飼料 2	5	0	自然汚染	(0.211)	5.1	19	0.94
ニバレノール	鶏用配合飼料	5	0	0.5	82.6	1.5	5.8	0.33

- ・ 定量下限 (単一試験室による確認)      デオキシニバレノール及びニバレノール: 試料中 各 0.01 mg/kg、T-2 トキシシ: 試料中 0.005 mg/kg

(参考) クロマトグラム例



#### 標準液及び添加試料のクロマトグラム

- A,B: 標準液 (デオキシニバレノール及びニバレノールとして各 0.25 ng、T-2 トキシシンとして 0.01 ng 注入)
- C: 添加試料 (豚用配合飼料にデオキシニバレノール及びニバレノールとして 0.1 mg/kg 相当量添加)
- D: 添加試料 (幼すう育成用配合飼料に T-2 トキシシンとして 0.01 mg/kg 相当量添加)

#### 7 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<sup>注1</sup>

- (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 [ $C_{17}H_{22}O_7$ ] 1 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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、更に標線までアセトニトリルを加えて 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 [ $C_{17}H_{22}O_7$ ] 1 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、5 mL の褐色

色全量フラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、更に標線までアセトニトリルを加えて 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 [C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>] 1 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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、更に標線までアセトニトリル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 [C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>7</sub>] 1 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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、更に標線までアセトニトリル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 [C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub>] 1 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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、更に標線までアセトニトリルを加える（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 標準原液の一部を混合し、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<sup>注1</sup>　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 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、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<sup>注2</sup>。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）<sup>注3</sup> 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<sup>注4</sup> 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 2,2,4-トリメチルペンタンで正確に希釈し、1 mL 中に各かび毒として 0.01~1 µg 相当量を含む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 µL をガスクロマトグラフに注入し<sup>注5</sup>、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<sup>注6</sup>：溶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 µm）<sup>注7</sup>

キャリアーガス：He（1.5 mL/min）

メイクアップガス：N<sub>2</sub>（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 min 保持）→昇温 20 °C/min→180 °C→昇温  
5 °C/min→300 °C（10 min 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 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（レゾナック製）、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。

7 DB-35（Agilent Technologies 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

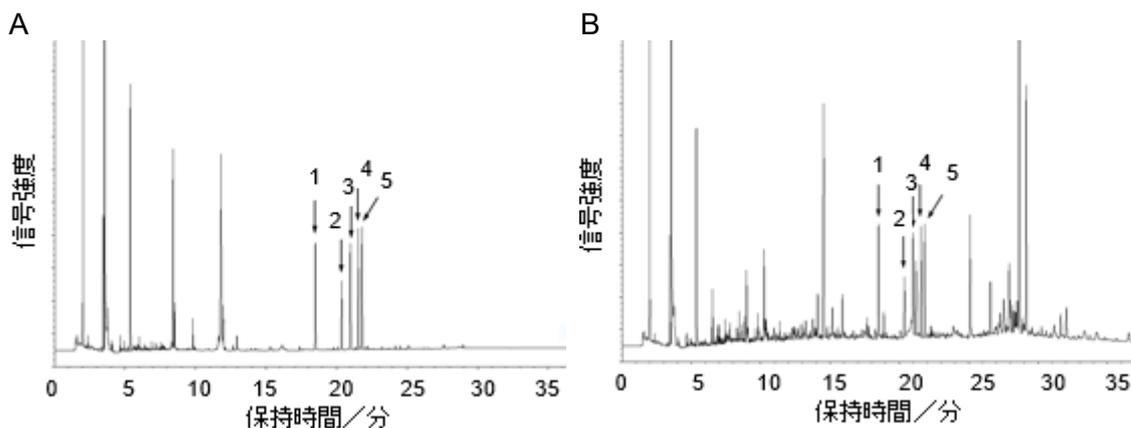
添加成分名	試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%)
3-アセチルデオキシ ニバレノール	鶏用配合飼料	0.1	3	95.0	4.2
		1	3	96.5	1.5
	豚用配合飼料	0.1	3	96.6	7.6
		1	3	99.2	7.3
	大麦	0.1	3	99.1	3.2
		1	3	92.3	0.1
	マイロ	0.1	3	93.2	6.0
		1	3	95.7	0.8
15-アセチルデオキシ ニバレノール	鶏用配合飼料	0.1	3	103.7	6.7
		1	3	98.6	1.5
	豚用配合飼料	0.1	3	97.9	6.2
		1	3	98.3	4.9
	大麦	0.1	3	97.1	1.2
		1	3	94.2	3.2
	マイロ	0.1	3	92.8	1.5
		1	3	94.7	3.6
デオキシニバレノール	鶏用配合飼料	0.1	3	90.8	10.6
		1	3	99.4	1.5
	豚用配合飼料	0.1	3	93.2	11.4
		1	3	96.8	4.7
	大麦	0.1	3	98.7	3.6
		1	3	92.8	2.9
	マイロ	0.1	3	99.6	1.8
		1	3	94.2	2.2
ニバレノール	鶏用配合飼料	0.1	3	105.2	4.0
		1	3	95.3	1.8
	豚用配合飼料	0.1	3	99.7	8.1
		1	3	93.5	6.0
	大麦	0.1	3	92.4	4.3
		1	3	85.8	1.0
	マイロ	0.1	3	96.3	0.7
		1	3	96.1	0.7
フザレン-X	鶏用配合飼料	0.1	3	98.1	4.5
		1	3	94.6	0.9
	豚用配合飼料	0.1	3	99.8	5.3
		1	3	96.1	4.0
	大麦	0.1	3	101.0	2.5
		1	3	91.4	1.5
	マイロ	0.1	3	97.0	2.4
		1	3	92.6	1.0

・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 (%) (測定値 (mg/kg))	室内繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%)	室間再現精度 RSD <sub>R</sub> (%)	HorRat
3-アセチルデオキシニ バレノール	マイロ	8	0	0.4	107	5.9	6.6	0.36
15-アセチルデオキシ ニバレノール	豚用配合飼料	8	0	自然汚染	(0.0893)	8.4	17	0.79
	マイロ	8	0	0.4	105	5.1	7.3	0.40
デオキシニバレノール	豚用配合飼料	8	0	自然汚染	(0.503)	4.7	10	0.58
	マイロ	8	0	0.4	105	4.1	6.2	0.34
ニバレノール	豚用配合飼料	8	0	自然汚染	(0.0567)	8.4	15	0.67
	マイロ	8	0	0.4	95.4	4.5	6.1	0.33
フザレン-X	マイロ	8	0	0.4	106	5.4	6.1	0.33

- ・定量下限 (単一試験室による確認) 試料中 各 0.010 mg/kg

(参考) クロマトグラム例



標準液及び添加試料のクロマトグラム

(矢印は 1 : デオキシニバレノール、2 : ニバレノール、3 : フザレノン-X、4 : 3-アセチルデオキシニバレノール、5 : 15-アセチルデオキシニバレノールを示す。)

A : 標準液 (各 0.25 ng 注入)

B : 添加試料 (豚用配合飼料に各かび毒として 0.1 mg/kg 相当量添加)

## 8 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 [ $C_{15}H_{20}O_6$ ] 及びニバレノール [ $C_{15}H_{20}O_7$ ] 各 1 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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アセトニトリル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部を混合し、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  $\mu$ g を含有する液を調製する。更にこの液の一部を水-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  $\mu$ 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 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、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<sup>注1</sup>。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)<sup>注2</sup> 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) <sup>注3</sup>

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 (レゾナック製) 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

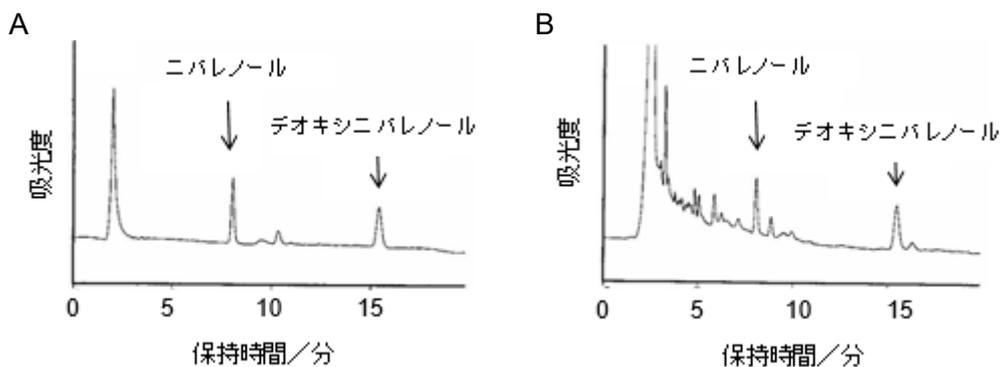
添加成分名	試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%)	
デオキシニバレノール	大麦	0.2	3	97.9	11.0	
		1	3	97.7	3.4	
	小麦	0.2	3	108.2	4.2	
		1	3	98.2	1.9	
	とうもろこし	0.2	3	99.7	11.2	
		1	3	101.9	4.0	
	マイロ	0.2	3	96.1	3.8	
		1	3	96.1	0.4	
	ニバレノール	大麦	0.2	3	92.3	3.2
			1	3	78.2	2.1
		小麦	0.2	3	86.5	4.7
			1	3	78.6	2.7
とうもろこし		0.2	3	98.3	3.2	
		1	3	88.9	4.0	
マイロ		0.2	3	93.4	1.1	
		1	3	78.2	2.1	

・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 (%)	室内繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%)	室間再現精度 RSD <sub>R</sub> (%)	HorRat
デオキシニバレノール	とうもろこし	7	0	1	103	3.4	5.0	0.32
ニバレノール	とうもろこし	7	0	1	84.4	3.1	4.5	0.27

・定量下限 (単一試験室による確認) 試料中 各 0.1 mg/kg

(参考) クロマトグラム例



標準液及び添加試料のクロマトグラム

A : 標準液 (各 10 ng 注入)

B : 添加試料 (とうもろこしに各かび毒として 1 mg/kg 相当量添加)

## 9 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 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>及び B<sub>3</sub> (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 B<sub>1</sub> [C<sub>34</sub>H<sub>59</sub>NO<sub>15</sub>]、フモニシン B<sub>2</sub> [C<sub>34</sub>H<sub>59</sub>NO<sub>14</sub>] 及びフモニシン B<sub>3</sub> [C<sub>34</sub>H<sub>59</sub>NO<sub>14</sub>] 各 10 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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アセトニトリル-水 (1+1) を加えてフモニシン B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub> 各標準原液を調製する (これらの液各 1 mL はフモニシン B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub> 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 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub> 各標準原液の一部を混合し、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 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub> 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 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、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) <sup>注1</sup> 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 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub> 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

(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 5 µm) <sup>注2</sup>

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

流速 : 0.2 mL/min

カラム槽温度 : 40 °C

(質量分析計部<sup>注3</sup>)

検出器 : 四重極型質量分析計

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

ネブライザーガス : N<sub>2</sub> (340 kPa)

乾燥ガス : N<sub>2</sub> (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 B<sub>1</sub>)、706 (フモニシン B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub>)

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 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub> 量を算出する。

注 1 Bond Elut LRC SAX (Agilent Technologies 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

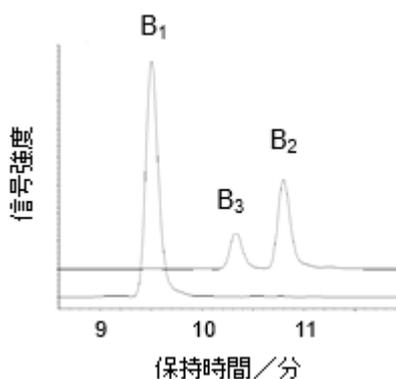
添加成分名	試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%)
フモニシンB <sub>1</sub>	成鶏飼育用配合飼料	0.3	3	102.9	5.2
		3	3	72.9	1.4
	ほ乳期子牛育成用配合飼料	0.3	3	106.3	11.3
		3	3	80.6	1.9
	大麦	0.3	3	74.4	2.3
		3	3	70.5	0.6
とうもろこし	0.3	3	89.7	10.2	
	3	3	78.6	0.3	
フモニシンB <sub>2</sub>	成鶏飼育用配合飼料	0.15	3	92.8	3.0
		1.5	3	70.6	1.8
	ほ乳期子牛育成用配合飼料	0.15	3	108.7	9.1
		1.5	3	75.6	0.6
	大麦	0.15	3	71.1	9.1
		1.5	3	64.9	1.9
とうもろこし	0.15	3	88.3	4.6	
	1.5	3	76.9	1.7	
フモニシンB <sub>3</sub>	成鶏飼育用配合飼料	0.06	3	90.7	5.3
		0.6	3	70.0	1.7
	ほ乳期子牛育成用配合飼料	0.06	3	110.0	10.3
		0.6	3	78.2	1.8
	大麦	0.06	3	70.1	3.7
		0.6	3	72.1	1.3
とうもろこし	0.06	3	75.0	5.2	
	0.6	3	75.6	1.8	

・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 (%) (測定値 (mg/kg))	室内繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%)	室間再現精度 RSD <sub>R</sub> (%)	HorRat
フモニシンB <sub>1</sub>	鶏用配合飼料	11	1	1	80.5	4.3	14	0.85
	鶏用配合飼料	11	1	自然汚染	(0.218)	9.9	19	0.95
フモニシンB <sub>2</sub>	鶏用配合飼料	11	1	0.4	72.0	6.2	10	0.54
	鶏用配合飼料	11	1	自然汚染	(0.059)	9.7	16	0.71
フモニシンB <sub>3</sub>	鶏用配合飼料	11	1	0.15	74.8	7.0	12	0.55
	鶏用配合飼料	11	1	自然汚染	(0.024)	11	19	0.88

- ・定量下限 (単一試験室による確認) 試料中 各 0.002 mg/kg
- ・検出下限 (単一試験室による確認) 試料中 各 0.0006 mg/kg

(参考) クロマトグラム例



自然汚染試料 (鶏用配合飼料) のクロマトグラム

## 10 フモニシン B<sub>1</sub> 及び B<sub>2</sub> 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 B<sub>1</sub> 及び B<sub>2</sub>
- (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 B<sub>1</sub> [C<sub>34</sub>H<sub>59</sub>NO<sub>15</sub>] 及びフモニシン B<sub>2</sub> [C<sub>34</sub>H<sub>59</sub>NO<sub>14</sub>] 各 10 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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メタノールを加えてフモニシン B<sub>1</sub> 及び B<sub>2</sub> 各標準原液を調製する（これらの液各 1 mL は、フモニシン B<sub>1</sub> 及び B<sub>2</sub> 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 B<sub>1</sub> 及び B<sub>2</sub> 各標準原液の一部を混合し、メタノール-水 (3+1) で正確に希釈し、1 mL 中にフモニシン B<sub>1</sub> 及び B<sub>2</sub> 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 g を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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。抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過<sup>注1</sup>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)<sup>注2</sup>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 B<sub>1</sub> 及び B<sub>2</sub> 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-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)<sup>注3</sup>

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

反応液<sup>注4</sup>：蛍光化試液 *o*-フタルアルデヒド 0.40 g (0.395~0.404 g) 及び *N*-アセチル-L-システイン 0.5 g (0.45~0.54 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 (24.65~24.74 g) 及び水酸化ナトリウム 12.3 g (12.25~12.34 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 B<sub>1</sub> 及び B<sub>2</sub> 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（Agilent Technologies 製）又はこれと同等のもの

3 Fluofix 120E（和光純薬工業製（販売終了））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

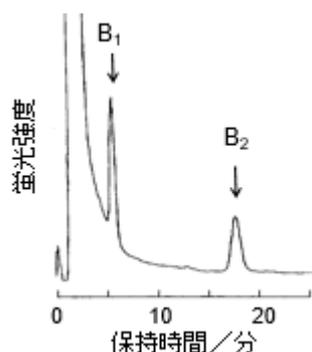
・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%)
フモニシンB <sub>1</sub>	成鶏用配合飼料	0.5	3	93.0	3.7
		1	3	88.3	1.7
		2	3	86.7	0.7
	肉豚用配合飼料	0.5	3	97.3	3.9
		1	3	93.0	0.0
		2	3	90.3	2.6
	乳牛用配合飼料	0.5	3	95.7	2.6
		1	3	88.3	2.4
		2	3	90.3	4.2
	とうもろこし	1	3	94.7	6.2
		2	3	96.0	7.9
		4	3	99.3	9.0
フモニシンB <sub>2</sub>	成鶏用配合飼料	0.5	3	94.0	6.6
		1	3	81.7	5.1
		2	3	82.7	2.8
	肉豚用配合飼料	0.5	3	92.0	2.9
		1	3	92.3	0.6
		2	3	87.7	1.3
	乳牛用配合飼料	0.5	3	89.0	7.9
		1	3	85.0	2.4
		2	3	93.0	3.9
	とうもろこし	1	3	88.7	5.1
		2	3	90.0	4.4
		4	3	93.0	7.5

・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 (mg/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%)	室内再現精度 RSD <sub>R</sub> (%)	HorRat
フモニシンB <sub>1</sub>	中ずう育成用配合飼料	6	0	1	84.9	4.8	4.8	0.29
フモニシンB <sub>2</sub>	中ずう育成用配合飼料	6	0	1	82.8	3.6	7.2	0.44

(参考) クロマトグラム例



添加試料（成鶏用配合飼料に各かび毒として 1 mg/kg 相当量添加）  
のクロマトグラム

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 [ $C_{20}H_{18}NO_6Cl$ ] 5 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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、更に標線までメタノールを加える（この液 1 mL は、オクラトキシン 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 [ $C_{13}H_{14}O_5$ ] 5 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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、更に標線までメタノールを加える（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  $\mu$ g を含有する。）。

使用に際して、混合標準原液の一部をアセトニトリル-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 g を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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 $\times$ 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  $^{\circ}$ 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<sup>注1</sup>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）<sup>注2</sup>

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<sup>注3</sup>）

検出器：四重極型質量分析計

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：N<sub>2</sub>（800 L/h、500 °C）

キャピラリー電圧：3.5 kV

コーンガス：N<sub>2</sub>（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 各物質測定条件

測定対象物質	プリカーサー	プロダクトイオン		コーン	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> )	電圧 (V)	エネルギー (eV)
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) 又はこれと同等のもの

2 InertSustain C18 (ジーエルサイエンス製) 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 <sub>r</sub> (%)
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
		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
		0.25	5	92.8	1.3

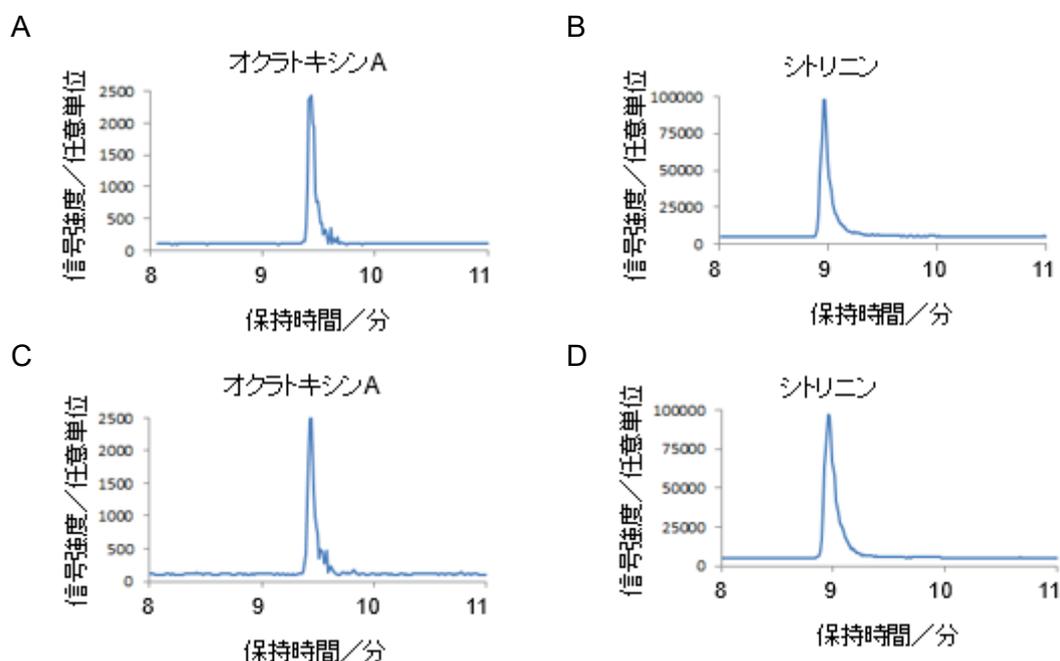
・共同試験

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 (%)	室内繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%)	室内再現精度 RSD <sub>R</sub> (%)	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 (単一試験室による確認) 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 (単一試験室による確認) 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

(参考) クロマトグラム例



標準液及び添加試料のクロマトグラム

A,B : 標準液 (オクラトキシン A として 1 ng/mL、シトリニンとして 10 ng/mL)

C : 添加試料 (小麦にオクラトキシン A として 0.005 mg/kg 相当量添加)

D : 添加試料 (小麦にシトリニンとして 0.05 mg/kg 相当量添加)

12 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 [C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>6</sub>Cl] 5 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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、更に標線までメタノールを加える（この液 1 mL は、オクラトキシシン A として 0.2 mg を含有する。）。更にこの液の一部をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にオクラトキシシン A として 1 µg を含有するオクラトキシシン A 標準原液を調製する。

- 2) シトリニン標準液 シトリニン [C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>] 5 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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、更に標線までメタノールを加える（この液 1 mL は、シトリニンとして 0.2 mg を含有する。）。更にこの液の一部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、オクラトキシシン A 及びシトリニン各標準原液の一部を混合し、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 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、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<sup>注1</sup>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<sup>注2</sup>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) <sup>注3</sup>

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 (販売終了)) 又はこれと同等のもの

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

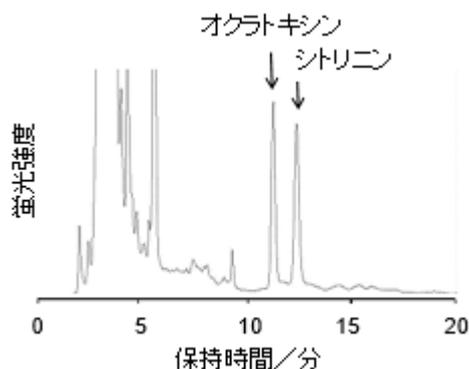
添加成分名	試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%)
オクラトキシンA	成鶏飼育用配合飼料	0.01	3	106.5	8.9
		0.1	3	105.6	7.6
	肉肥育用配合飼料	0.01	3	103.8	10.2
		0.1	3	98.2	7.4
	大麦	0.01	3	96.3	13.0
		0.1	3	97.1	7.1
	とうもろこし	0.01	3	103.4	13.6
		0.1	3	98.6	7.0
シトリニン	成鶏飼育用配合飼料	0.1	3	90.8	12.5
		0.4	3	77.2	5.5
	肉肥育用配合飼料	0.1	3	84.0	7.4
		0.4	3	83.0	3.6
	大麦	0.1	3	85.0	3.0
		0.4	3	86.2	0.5
	とうもろこし	0.1	3	87.5	2.7
		0.4	3	88.7	3.0

・ 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 (%) (測定値 (mg/kg))	室内繰返し精度 RSD <sub>r</sub> (%)	室間再現精度 RSD <sub>R</sub> (%)	HorRat
オクラトキシンA	豚用配合飼料	11	0	0.02	100	3.3	7.9	0.36
	マイロ	11	0	自然汚染	(0.0186)	21	24	1.1
シトリニン	豚用配合飼料	11	0	0.2	83.6	6.1	12	0.58

・ 定量下限 (単一試験室による確認)      オクラトキシン A : 試料中 0.005 mg/kg、シトリニン : 試料中 0.02 mg/kg

(参考) クロマトグラム例



添加試料 (大麦にオクラトキシン A として 0.1 mg/kg、シトリニンとして 0.4 mg/kg 相当量添加) のクロマトグラム

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度法<sup>注1</sup>による標定法

(1) 標定対象かび毒      アフラトキシン B<sub>1</sub> [C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>]、アフラトキシン B<sub>2</sub> [C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>]、アフラトキシン G<sub>1</sub> [C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>]、アフラトキシン G<sub>2</sub> [C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>]、ステリグマトシスチン [C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>]、ゼアラレノン [C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>5</sub>] 及びオクラトキシン

ン A [C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>6</sub>Cl]

(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 °C で3~4 時間乾燥したもの）80 mg を0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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<sub>S</sub> (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 の一部を硫酸（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<sup>注2</sup> を0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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、更に標線まで希釈溶媒を加える（この液 1 mL は、各かび毒として 0.2 mg を含有する。）。この液の一部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 (µg/mL)
アフラトキシンB <sub>1</sub>	アフラトキシンB <sub>1</sub> [C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> ]	アセトニトリル	10
アフラトキシンB <sub>2</sub>	アフラトキシンB <sub>2</sub> [C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> ]	アセトニトリル	10
アフラトキシンG <sub>1</sub>	アフラトキシンG <sub>1</sub> [C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub> ]	アセトニトリル	10
アフラトキシンG <sub>2</sub>	アフラトキシンG <sub>2</sub> [C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub> ]	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 <sub>18</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> ]	ベンゼン	10
ゼアラレノン	ゼアラレノン [C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub> ]	メタノール	10
オクラトキシンA	オクラトキシンA [C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>6</sub> Cl]	トルエン-酢酸 (99+1)	10

B 吸光度計の校正

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<sub>S</sub>：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<sup>注3</sup>。

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

E<sub>A</sub>：吸光率の平均値

## C 測 定

かび毒標準液について、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）

$\epsilon$  : 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 $\epsilon$
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。