

令和8年度輸入麦類中のカビ毒（T-2トキシン、HT-2トキシン及び ジアセトキシシルペノール）の濃度測定業務仕様書

1 業務の目的

本業務は、農林水産省農産局農産政策部貿易業務課（以下「貿易業務課」という。）が実施する、輸入食糧用麦類（小麦及び大麦（以下「玄麦」という。））に含まれるT-2トキシン（以下「T-2」という。）、HT-2トキシン（以下「HT-2」という。）及びジアセトキシシルペノール（以下「DAS」という。）の含有実態調査において、妥当性が確認された分析法を用い、試料採取者から送付された玄麦試料中の当該カビ毒3種の濃度を測定することを目的とするものである。

2 背景

T-2、HT-2及びDASは、いずれもフザリウム属のカビが産生する類似した分子構造を持つカビ毒であり、麦類やトウモロコシなどで産生され、健康被害（消化器官障害、免疫抑制）を引き起こすおそれがあるとされている。

FAO/WHO合同食品添加物専門家委員会（JECFA）は、令和4年にこれら3種のカビ毒についてリスクの再評価を行い、グループ耐容一日摂取量（TDI）として25 ng/kg体重、グループ急性参照用量（ARfD）として320 ng/kg体重を設定した。今後、コーデックス食品汚染物質部会（CCCF）において、食品中の基準値設定が検討される見込みである。

国内で消費される食糧用麦の大部分は、国家貿易による輸入麦であることから、国家貿易を所管する農林水産省において、国民に対して安全な穀類の供給を確保するため、輸入麦類中のT-2、HT-2及びDASの含有実態を調査する必要がある。

得られた濃度データは、全結果を集計・解析した上で、国内輸入麦関係者（輸入商社団体及び実需者団体等）に説明するとともに、必要に応じて関係機関、関係省庁、輸出国の麦産地、穀物輸出関係者等と共有し、今後のコーデックス基準値及び国内基準値の設定に反映させることを目指す。

3 業務の実施期間

契約の期間は、契約締結の日から令和9年3月19日（金）までとする。

4 業務内容

輸入麦類中のカビ毒（T-2、HT-2及びDAS）の濃度測定業務請負契約書（以下「契約書」という。）及び別添の「LC-MS/MSによるカビ毒の一斉分析標準作業書（小麦および大麦中のT-2、HT-2およびDAS）」（以下「SOP」という。）に基づき、以下のとおり業務内容を定める。

(1) 対象分析種

T-2（T-2トキシン）	CAS登録番号；21259-20-1
HT-2（HT-2トキシン）	CAS登録番号；26934-87-2
DAS（ジアセトキシシルペノール）	CAS登録番号；2270-40-8

(2) 玄麦試料

請負者は、貿易業務課が指定する者から順次送付される、約10 kgの玄麦試料を受領するものとする。当該玄麦試料は、試料送付書とともに段ボール箱に梱包され、常温の宅配便により送付される。受領した試料の情報（試料番号、試料名、試料重量及び受領日）を契約書の「分析試料整理簿」（様式2）に記入し、中間報告の際に合わせて貿易業務課へ報告すること。

請負者は、試料の引渡しを受けてから濃度測定を開始するまでの間、試料を冷凍（-20℃以下）で保管する。

(3) 試料の調製及び粉碎

請負者は、SOPに基づき速やかに、試料調製及び粉碎を実施するものとする。

請負者は、小麦においては本業務に使用する粉碎試料1 kgと粉碎済みの送付試料1 kg、大麦においては本業務に使用する粉碎試料1 kgを、冷凍（-20℃以下）で保存する。また、送付試料点数が20点前後となった時点で、段ボール箱に梱包し、契約書の「分析試料送付書」（様式4）を同梱した上で、貿易業務課から指定された試料送付先に宅配便（常温）を元払いで送付する。なお、25点を超過して保管する必要がある場合は、貿易業務課へ報告すること。また、最終発送日が令和9年2月末までとなるよう、発送状況を管理すること。

(4) 試料の濃度測定

請負者は、(1)に示した対象分析種ごとに、SOPの10に基づき、定量下限（LOQ）を2.0 µg/kg以下、検出下限（LOD）を1.0 µg/kg以下を目標に設定するものとする。請負者は、試料の濃度測定を開始する前に、小麦と大麦それぞれのLOQ及びLODの設定値について、あらかじめ貿易業務課へ報告し、了解を得るものとする。

請負者は、分析に用いた粉碎試料（約1 kg）の残余については、貿易業務課の指示があるまで、冷凍で保管する。なお、粉碎試料等2 kgを採取した後の残余試料（約8 kg）については、冷蔵（10℃以下）で保管する。廃棄する場合は、契約書の「廃棄計画書」（様式5）を貿易業務課に提出し、同課からの指示に従う。

(5) 内部精度管理

請負者は、「食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について」（平成9年4月1日付け衛食第117号厚生省生活衛生局食品保健課長通知）の別添「精度管理の一般ガイドライン」に従い、精度管理を行うこととする。また、5回繰り返しの添加回収試験（小麦及び大麦への10 µg/kgの添加試験）を、初回分析日の前及び本業務実施期間の中間の2回実施し、平均値及び標準偏差を求めるものとする。なお、ブランク試料は請負者が準備すること。

また、SOPの11に基づき、分析日ごとに添加回収試験及びブランク試験を実施するものとする。なお、回収率の許容範囲は60-115%とする。

5 予定試料数

小麦100点、大麦5点。

ただし、輸入本船の動向や寄港計画の直前変更等により、試料数が増減する場合がある。

6 結果報告

(1) 報告内容

請負者は、4の(3)の濃度分析の結果及び4の(4)の内部精度管理の結果を契約書の「令和8年度輸入麦類中のカビ毒(T-2、HT-2及びDAS)の濃度測定業務報告書」(様式3)に記録する。なお、請負者は、本請負業務の進行状況に係る報告を仕様書の定めにより行うほか、貿易業務課の求めに応じて1か月ごとに中間報告を行うこと。

(2) 報告期限及び報告先

請負者は、前項の内容を下記宛てに、令和9年3月19日(金)までに電子メールで報告する。

- ・住所：〒100-8950 東京都千代田区霞が関1-2-1
農林水産省農産局農産政策部貿易業務課米麦品質保証室
- ・電話：03-6744-1388
- ・報告先の電子メールアドレスについては、契約締結後に貿易業務課から請負者に対し通知する。
- ・契約書の様式3に係る電子媒体を、契約締結後に貿易業務課から請負者に対し送信するので、報告の際は当該電子媒体を使用する。

7 その他

(1) 本仕様書に記載のない事項及び疑義が生じた事項は、貿易業務課と請負者が協議の上、処理する。

また、請負者が行った測定(SOPの内容を含む。)及び測定結果について、明らかな欠陥があり再実行の必要が認められる場合は、貿易業務課と協議の上、再実行することとする。なお、当該再実行にかかる費用は請負者の負担とする。

(2) 請負者は試料を他の目的に使用しないこと。ただし、貿易業務課の指示により他の目的に供する場合はこの限りでない。また、残余試料は契約書の「廃棄計画書」(様式4)を令和9年3月19日(金)までに貿易業務課へ提出し、その了解を得た後に請負者の経費負担で適正かつ確実に廃棄する。

(3) 請負者は、分析法、測定結果及び分析に関する記録(精度管理、試料の受領、調製、保管、廃棄等に関するものを含む。)を契約終了後5年間保管する。また、本業務の請負により知り得た情報については、契約期間はもとより、契約終了後においても他に漏らしてはならない。

(4) 本請負業務により得られた結果は、全て貿易業務課に帰属する。

(5) 請負者は、本業務の遂行に当たり、廃棄物の処理及び清掃に関する法律(昭和45年法律第137号)、プラスチックに係る資源循環の促進等に関する法律(令和3年法律第60号)、水質汚濁防止法(昭和45年法律第138号)、労働安全衛生法(昭和47年法律第57号)及び地球温暖化対策の推進に関する法律(平成10年法律第117号)等の関連する環境関係法令を遵守するものとする。

(6) 請負者は、業務の遂行に当たり、新たな環境負荷を与えることにならないよう、6の報告時に別紙様式を用いて、以下の取組に努めたことを、環境負荷低減のクロスコンプライアンス実施状況報告書として提出すること。

なお、全ての事項について「実施した／努めた」又は「左記非該当」のどちらかにチェックを入れるとともに、ア～エの各項目について、一つ以上「実施した／努めた」にチェックを入れること。

ア 環境負荷低減に配慮したものを調達するよう努める。

イ エネルギーの削減の観点から、オフィスや車両・機械などの電気、燃料の使用状況の記録・保存や、不必要・非効率なエネルギー消費を行わない取組（照明、空調のこまめな管理や、ウォームビズ・クールビズの励行、燃費効率の良い機械の利用等）の実施に努める。

ウ 臭気や害虫の発生源となるものについて適正な管理や処分に努める。

エ 廃棄物の発生抑制、適正な循環的な利用及び適正な処分に努める。

様式

環境負荷低減のクロスコンプライアンス実施状況報告書

以下のア～ウの取組について、実施状況を報告します。

ア 環境負荷低減に配慮したものを調達するよう努める。

具体的な事項	実施した ／努めた	左記非 該当
対象となる物品の輸送に当たり、燃料消費を少なくするよう検討する（もしくはそのような工夫を行っている配送業者と連携する）。	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
事務用品を使用する場合には、詰め替えや再利用可能なものを調達することに努めている。	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
その他（ ）		

・上記で「実施した／努めた」に一つもチェックが入らず（全て「左記非該当」）、その他の取組も行っていない場合は、その理由
()

イ エネルギーの削減の観点から、オフィスや車両・機械などの電気、燃料の使用状況の記録・保存や、不必要・非効率なエネルギー消費を行わない取組（照明、空調のこまめな管理や、ウォームビズ・クールビズの励行、燃費効率の良い機械の利用等）の実施に努める。

具体的な事項	実施した ／努めた	左記非 該当
事業実施時に使用するオフィスや車両・機械等について、不要な照明の消灯やエンジン停止に努めている。	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
事業実施時に使用するオフィスや車両・機械等について、基準となる室温を決める、必要以上の冷暖房、保温を行わない等、適切な温度管理に努めている。	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
事業実施時に使用する車両・機械等が効果的に機能を発揮できるよう、定期的な点検や破損があった場合は補修等に努めている。	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
夏期のクールビズや冬期のウォームビズの実施に努めている。	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
その他（ ）		

・上記で「実施した／努めた」に一つもチェックが入らず（全て「左記非該当」）、その他の取組も行っていない場合は、その理由
()

LC-MS/MS によるかび毒の一斉分析標準作業書 (小麦および大麦中の T-2、HT-2 および DAS)

0 概要

本標準作業書（本 SOP）は、独立行政法人農林水産消費安全技術センター有害物質等分析調査統括チームが作成した『LC-MS/MS によるカビ毒の一斉分析標準作業書（麦類及びソバ中のフザリウム毒素）、第 14 版』（SOP 原本）を基に、農林水産省農産局農産政策部貿易業務課が、輸入玄麦（小麦、大麦）中の T-2、HT-2 及び DAS 濃度の 3 毒素を分析するために作成したものである。本 SOP は、SOP 原本と原理、試薬や手順など同一内容であるが、試料調製、定量下限・検出限界及び内部精度管理について加筆を行った。

1 適用

この試験法は、小麦、大麦の以下のフザリウム毒素の定量に適用する。

分析種	略称
T-2 toxin	(T-2)
HT-2 toxin	(HT-2)
diacetoxyscirpenol	(DAS)

2 原理

Harmonized Collaborative Validation of a Simultaneous and Multiple Determination Method for Nivalenol, Deoxynivalenol, T-2 Toxin, HT-2 Toxin, and Zearalenone in Wheat and Barley by Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) : J Anal Bioanal Tech 2014, S6:002 及び Single laboratory validation for a method of analysis for Fusarium toxins including deoxynivalenol-3-glucoside in wheat and barley. Mycotoxins 71: 59–62 で使用された試験法に基づく。

試料から毒素等をアセトニトリル-水混合溶液で抽出し、逆相固相抽出カラム（ODS）及びかび毒精製用多機能ミニカラムを用いて精製した後、含アセトニトリル酢酸酸性水溶液に再溶解したものを試料溶液とする。

一連の分析操作は常温の試験室で行うことができる。

HPLC は逆相カラムを用いて 2 液グラジェント分析を行う。分析種の検出は MS/MS の MRM (Multiple Reaction Monitoring) *モードで、定量は内標準法で検量線を作成し行う。

* : MRM : SRM (selected reaction monitoring) と同義

3 試薬

3.1 総論

注意事項：本試験法は、劇物、危険物を使用するため、試験操作に当たり試験者は必要な保護処置を行うこと。

試薬は特に指定しているもの以外は、精密分析に用いられる純度が保証されているグレードのものを使用する。

LC-MS/MS 移動相に用いる溶媒及び水については、適切なものを用いる。ガラス器具等は、精製水ですすいだ後、清浄な状態で管理されているものを使用する。

3.2 試薬

3.2.1 標準試薬（フザリウム毒素）

以下の市販標準溶液又は同等品で、濃度が認証され、不確かさが明示されているものを使用する。

- a) T-2 100 µg/mL アセトニトリル溶液：関東化学 49161-44
- b) HT-2 100 µg/mL アセトニトリル溶液：関東化学 49161-46
- c) DAS 100 µg/mL アセトニトリル溶液：関東化学 49150-16

3.2.2 内標準試薬

- a) Verrucarol (VER) 富士フイルム和光純薬 225-02231 又は同等品

3.2.3 その他の試薬

- a) 酢酸 JIS 特級以上 富士フイルム和光純薬 018-20061 又は同等品
- b) 1mol/L 酢酸アンモニウム溶液：HPLC 用 富士フイルム和光純薬 018-21041 又は同等品
- c) アセトニトリル LC/MS 用 富士フイルム和光純薬 018-19853 又は同等品
- d) 超純水 LC/MS 用 富士フイルム和光純薬 210-01303 又は同等品

3.2.4 HPLC 分離カラム

内径 3 mm、長さ 250 mm のステンレス管に、粒子径 5 µm のオクタデシルシリル化シリカゲル (ODS) を充てんしたもの。

(例) Eclipse XDB-C18 (3.0 × 250 mm) アジレント・テクノロジー社

注意事項：必要に応じてガードカラムを使用してもよい。

3.3 試液

3.3.1 抽出液

アセトニトリル(3.2.3 c))と超純水(3.2.3 d))を 80 : 20 (v/v)の割合で混合する。

3.3.2 再溶解液

アセトニトリル(3.2.3 c))、超純水(3.2.3 d))、酢酸(3.2.3 a))を 5 : 94 : 1(v/v/v)の割合で混合する。

3.3.3 HPLC 移動相

A : 超純水(3.2.3 d))に 0.5 mL の 1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液(3.2.3 b))及び 1 mL の酢酸(3.2.3 a))を加え、1000 mL とする。

B : アセトニトリル(3.2.3 c))に 1 mL の酢酸(3.2.3 a))を加え、1000 mL とする。

3.3.4 保存用標準溶液

それぞれの市販標準溶液をアセトニトリル(3.2.3 c))で希釈し、濃度が 20 mg/L である保存用標準溶液を調製し、冷凍保存する。また、保存用標準溶液は複数の分析種の混合標準として調製してもよい。

調製結果について、分析機関所定の様式に記録標準溶液の名称、名目濃度、実濃度、調整日、調

製者など必要事項を記録する。使用期限は調製後1年とする。1年を超えて使用する場合は安定性を確認して使用期限を延長することができる。

3.3.5 内標準液

a) VER 保存用溶液(10 mg/L)

Verrucarol (3.2.2 a)) をアセトニトリル(3.2.3 c))で溶解し、濃度が10 mg/Lである保存用溶液を調製し、冷蔵保存する。高濃度(例:100 mg/L)の保存用溶液を調製し、10 mg/Lに希釈してもよい。

b) 添加用内標準液 (VER 2 mg/L)

VER 保存用溶液(3.3.5 a)) 5 mL を 25 mL 全量フラスコに取り、アセトニトリル(3.2.3 c))で定容する。調製量を変える場合にはこの比率を厳守する。

c) 測定用標準液調製用内標準液 (VER 0.1 mg/L)

VER 保存用溶液(3.3.5 a)) 0.5 mL を 50 mL 全量フラスコに取り窒素乾固する。その後、再溶解液(3.3.2)で定容する。調製量を変える場合にはこの比率を厳守する。

d) 高濃度分析時添加用内標準液

Verrucarol (3.2.2 a)) をアセトニトリル(3.2.3 c))で溶解し、濃度が100 mg/Lである保存用溶液を調製し、冷蔵保存する。

これらの調製結果について、分析機関所定の様式に必要事項を記録する。使用期限は a)、d)は調製後3年間、b)、c)は調製後1週間とする。

3.3.6 検量線用の各検量点の標準液の調製

表1に従い各検量点用の標準液を調製する。表1に必要とする検量点とその調製例を示す。調製(最終)濃度、使用する溶液、採取量等の条件は変更してもよい。定容は測定用標準液調製用内標準液(3.3.5 c))で行う。調製結果について、分析機関所定の様式に必要事項を記録する。また使用する溶液、採取量等を変更する場合は分析機関所定の様式に変更事項を記載すること。調製した標準液は冷蔵保存し、使用期限は調製日を含め10日間とする。

表1. 検量線の検量点及び調製例 (単位に注意: µg/L)

T-2、HT-2 及び DAS		調製例		
溶液番号	最終濃度 (µg/L)	使用する溶液	採取量 (mL)	定容量 (mL)
①	500	保存用標準溶液 20 mg/L	0.25	10
②	50	溶液番号① 500 µg/L	0.5	5
③	20	溶液番号② 50 µg/L	2	5
④	10	溶液番号② 50 µg/L	1	5
⑤	5	溶液番号② 50 µg/L	0.5	5
⑥	2	溶液番号⑤ 5 µg/L	2	5
⑦	1	溶液番号⑤ 5 µg/L	1	5
⑧	0.5	溶液番号⑤ 5 µg/L	0.5	5

※保存用標準溶液を使用する際は、全量フラスコに採取後、窒素を吹きつけ、溶媒を除去してから定容する。

※T-2、HT-2 及び DAS の各検量点は溶液番号②～⑧の 7 濃度とする。

4 機器、器具

4.1 機器

- a) 超音波洗浄機： 卓上型のもの (例) SHARP UT-205S など
- b) 電子天秤： 最小表示が 0.01 g 以下で 1 kg 以上が測定できるもの
- c) 電子天秤： 最小表示が 0.1 mg 以下で 50 g 以上が測定できるもの
- d) カップブレンダー (カップ式ホモジナイザー)： 7000 rpm 以上での連続運転が可能で、50 mL 程度の量が均一に分散できるもの (例) AM-3 (日本精機製作所) など
- e) ブロックヒーター： 試験管を 40°C に保ち、窒素を吹き付けて溶媒を除去できるもの (例) DTU-1BN (タイテック社) など
- f) 遠心分離機： 遠心管(4.2 g))を用いて 2000×g 以上の遠心加速度で遠心分離できるもの (例) CAX-571 (トミー精工) など
- g) 試験管用ボルテックスミキサー： (例) VORTEX-GENIE 2 (エムエス機器) など
- h) LC-MS/MS システム： (例) LCMS-8050、LCMS-8045 (島津製作所) など

4.2 器具

ガラス製体積計及びピストン式ピペットはそれぞれ、妥当な管理手順により管理されているものを使用すること。

- a) ピストン式ピペット： 可変容量型、100 – 1000 μ L など
- b) メスシリンダー： ガラス製のもの
- c) 全量ピペット： ガラス製のもの
- d) 全量フラスコ： ガラス製のもの
- e) 葉さじ又はスパチュラ
- f) 抽出容器： 100 mL 容のカップブレンダー用カップ及びカッター
- g) 遠心管： 50 mL 容以上のガラス製、ポリプロピレン製又はアセトニトリルに耐性のある樹脂製のもの
- h) 遠心管： 15 mL 容のポリプロピレン又はアセトニトリルに耐性のある樹脂製で 1 mL 単位の目盛り付きのもの
- i) 試験管： 透明ガラス製で溶媒除去装置に設置できるもの
- j) シリンジ： メンブレンフィルター(4.2 k))及びかび毒精製用多機能ミニカラム(4.3 b))に接続可能であり、6 - 10 mL 容でポリプロピレン製又はアセトニトリルに耐性のある材質のもの
- k) メンブレンフィルター： 親水性 PTFE 製で孔径が 0.20 μ m のもの
- l) ガラス製インサート： 不活性処理済みでサンプルバイアルに挿入できるもの
- m) サンプルバイアル： LC-MS/MS のオートサンプラーで使用できるもの
- n) 標準液保存びん： 高気密状態で有機溶媒の保存ができるびん

4.3 固相抽出カラム

- a) ODS カラム：プレセップ® C18(ODS)-II (2g/15mL) (富士フイルム和光純薬)
- b) かび毒精製用多機能ミニカラム：Bond Elut Mycotoxin Jr. (Agilent 社)

5 試料調製

5.1 混合均一化

当該玄麦試料には異物や夾雑物が含まれている可能性があるため、試料調製に先立ち、目視または目開き 3～4 mm 程度の篩（ふるい）を用いて異物等を除去する。異物等除去後の玄麦穀粒の一次試料（10 kg）を、混合機で 5 分以上混合、又はポリエチレン製袋に密封し 15 分程度振り混ぜて均一化を行う。

5.2 粉碎

高速遠心粉碎機（例；Retsch ZM200 超遠心ミル（Verder Scientific 社））にて、玄麦穀粒 10 kg 全量を粒径 1.0 mm 以下に一次粉碎する。

小麦においては、粉碎した試料全体の 20 か所から無作為に 100 g ずつ採取して混合し 2 kg とする。その 2 kg 全量を粒径 0.5 mm 以下に二次粉碎し、粉碎試料（1 kg ずつ 2 分割して保管）とする。粉碎試料（1 kg ずつ 2 分割）は、未使用のポリエチレン製袋を二重にして密封包装（外装にラベル表示）し、ひとつを 6 項以降の分析に使用し、残りの一つは「送付試料」として、冷凍庫内（-20℃以下）で保存する。

大麦においては、粉碎した試料全体の 10 か所から無作為に 100 g ずつ採取して混合し 1 kg とする。その 1 kg 全量を粒径 0.5 mm 以下に二次粉碎し、粉碎試料とする。粉碎試料は、未使用のポリエチレン製袋を二重にして密封包装（外装にラベル表示）し、6 項以降の分析に使用し、冷凍庫内（-20℃以下）で保存する。

6 分析操作

試料に抽出液(3.3.1)を加えた場合は当日中に 6.3.1 の工程までの処理を実施する。6.3.1 の工程を終了した残留物を含む試験管は、遮光、密栓して冷凍庫内（-20℃以下）で、1 か月以内の保存ができる。

6.1 抽出

6.1.1 粉碎試料（1 kg）より分析試料 10.0 ± 0.2 g を抽出容器(4.2 f)に採取し、ピストン式ピペット(4.2 a)で添加用内標準液(3.3.5 b)0.5 mL を正確に加える。なお、高濃度汚染試料の再分析の際は、見込まれる濃度に応じて添加用内標準液(3.3.5 b)、又は高濃度分析時添加用内標準液(3.3.5 d)を希釈又はそのまま加える。試料を採取した抽出容器は冷凍庫内-20℃以下で、12 時間以上遮光保存する。保存期間が 2 週間を超えた場合は、分析の対象としない。

注意事項：抽出に使用しなかった残余の粉碎試料は、引き続き冷凍庫内（-20℃以下）で保存する。

再分析は試料中の各分析種の濃度が検量線の上限（50 µg/kg）を超える場合に実施する。

6.1.2 保存した抽出容器を室内に 30 分以上静置し、常温に戻す。

6.1.3 抽出容器にメスシリンダー(4.2 b)で抽出液(3.3.1) 40 mL 及びピストン式ピペット(4.2 a)で酢酸(3.2.3 a) 0.4 mL を加え、5 分間以上静置する。

6.1.4 カップブレンダー(4.1 d)で抽出容器の内容物をおおむね 7000 rpm で 5 分間以上破碎抽出

する。停止後内容物が器壁に付着して混合が不十分と判断した場合は、薬さじ(4.2 e))等で付着した試料をかき落とした後、抽出操作を2分程度追加する。

6.1.5 抽出容器の内容物を遠心管(4.2 g))に移し、2000×gの遠心加速度で10分間遠心分離する。

6.2 脱脂、精製

6.2.1 遠心分離で得られた上清液のおおむね15 mLをODSカラム(4.3 a))に通液し、自然滴下で溶出液の全量を遠心管(4.2 h))に採取する。

6.2.2 採取した溶出液の約6 mLをシリンジ(4.2 j))に採り、かび毒精製用多機能ミニカラム(4.3 b))に接続し、加圧しながら通液する。溶出液は、始めの3 mLを廃棄し、続く2 mLを遠心管(4.2 h))に採取する。

6.3 試料溶液の調製

6.3.1 採取した2 mLの溶出液のうち1.6 mL(高濃度分析時添加用内標準液(3.3.5 d))又は希釈したものを使用した場合は適宜変更する)をピストン式ピペット(4.2 a))で試験管(4.2 i))に移し、ブロックヒーター(4.1 e))に設置して、40°C以下で窒素を吹き付け、溶媒を完全に除去する。

6.3.2 試験管の残留物にピストン式ピペット(4.2 a))で再溶解液(3.3.2) 0.4 mLを加え、超音波洗浄機(4.1 a))、試験管用ボルテックスミキサー(4.1 g))を使用し、よく混合し再溶解する。高濃度汚染試料の再分析で高濃度分析時添加用内標準液(3.3.5 d))又は添加用内標準液(3.3.5 b))の添加量を変えた試料の分析の場合は、次式のとおり、再溶解液(3.3.2)を加え、よく混合し再溶解する。

再溶解液の量(mL)

$$= 6.3.1 \text{ の採取量 (mL)} \times \text{添加用内標準液 (VER) の濃度 } (\mu\text{g/mL}) \times \text{添加量(mL)} \times 0.25 \div 1 (\mu\text{g})$$

6.3.3 得られた溶液をシリンジ(4.2 j))に採取して、メンブレンフィルター(4.2 k))を通し、ろ液をサンプルバイアル(4.2 m))に挿入したガラス製インサート(4.2 l))に採り、LC-MS/MS測定用試料溶液とする。

7 LC-MS/MS 測定

7.1 HPLC 条件

a) 分離カラム： ZORBAX Eclipse XDB-C18 column, 3.0 × 250 mm, 5 μm (3.2.4)

b) 移動相 A： 0.5 mM 酢酸アンモニウム+0.1%の酢酸 (3.3.3 A)

c) 移動相 B： アセトニトリル+0.1%の酢酸 (3.3.3 B)

d) 流速： 0.3 mL/min.

e) カラム槽温度： 40°C

f) 注入量： 10 μL (測定対象成分のピーク強度が十分確保できる場合は、10 μL 以下でもよい。)

- g) グラジエント条件：表 2 のとおり（ただし、次の 2 点を満たすものであれば、その他の条件は変更してもよい。1. 移動相 A の組成比の 90 %から 10 %への減少時の組成変化速度を変更しない、2. 注入時の組成比で移動相を 4 分間以上通液した状態で次の測定を開始する。
- h) 連続分析時の試料注入順序等を定めた一覧表（バッチテーブル（島津社製の場合）など）をプリントアウトし、サンプルトレイ上のバイアルの順序と比較し間違いがないことを確認する。

表 2. グラジエント条件

測定時間 (分)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
0	90	10
1	90	10
15	10	90
18	10	90
19	90	10
23	90	10

注意事項：オートサンプラーを使用する場合、冷却機能付きで 5-10°C程度に設定することが望ましい。

7.2 MS/MS 条件

7.2.1 設定

イオン化； ESI ポジティブ、ネガティブ

DL 温度； 100°C

ヒートブロック温度； 200°C

インターフェイス温度； 200°C

ドライイングガス； 5 L/min

ネブライザーガス； 2.5 L/min

7.2.2 測定イオン

測定対象成分ごとに、表 3 の測定イオンの欄に掲げる m/z のプリカーサーイオン及びプロダクトイオンの組み合わせの中から、定量及び定性用のイオンをそれぞれ 1 種以上選択し測定する。

内標準物質は、定性用イオンを測定しなくてもよい。

表 3. 測定イオン一覧

測定対象成分	測定イオン (m/z)		
	イオン極性	プリカーサーイオン	プロダクトイオン
T-2	+	484	185
	+	484	215
	+	484	305

	+	442	105
HT-2	+	442	215
	+	442	263
	-	483	59
DAS	+	384	307
	+	384	247
VER	+	267	249
	+	284	249
	-	325	59

8 定性（判定）

試料溶液を測定した結果、それぞれの m/z の MRM で定量イオン及び定性イオンを検出し、それぞれのピークの頂点の保持時間が標準品と一致している場合に、当該分析種のピークであると判定する。

9 定量（測定値の決定）

定量は、ピーク面積比を用いた内標準法により行う。

ピーク面積比は、表 4 の内標準との面積比で求める。

表 4 分析種と対応する内標準

分析種	内標準
T-2	VER
HT-2	VER
DAS	VER

検量線は、定量しようとする範囲の両端を含む 4 点以上の校正点により作成する。濃度の逆数の重み付け検量線としてもよい。作成した検量線は、その相関係数 r が 0.995 以上の場合に採用し定量に用いる。

試料中の分析種の濃度は次式により算出する。なお、高濃度汚染試料の再分析時は、6.1.1 で添加した添加用内標準液の濃度及び量に応じて、次式に乗じる数を変更する。

$$\text{試料中濃度 (mg/kg)} = \text{試料溶液の測定値} (\mu\text{g/L}) \times \text{ファクター} \\ \times (10 \text{ (g) / 試料重量 (g)}) \times (1/1000) \times 1 \text{ (L/kg)}$$

※ 高濃度汚染試料の場合の計算式

$$\text{試料中濃度 (mg/kg)} = \text{試料溶液の測定値} (\mu\text{g/L}) \times \text{ファクター} \\ \times (\text{添加用内標準液 (VER) の濃度} (\mu\text{g/mL}) \times \text{量 (mL)} / 1 (\mu\text{g})) \\ \times (10 \text{ (g) / 試料重量 (g)}) \times (1/1000) \times 1 \text{ (L/kg)}$$

ここで、ファクターは測定用標準液の実濃度と名目濃度の比とする。

10 定量下限(LOQ)及び検出限界(LOD)

T-2、HT-2 及び DAS それぞれに、LOQ は 2.0 µg/kg 以下、LOD は 1.0 µg/kg 以下を目標に設定する。

各 LOQ と LOD は、標準溶液を添加したブランク試料（小麦、大麦）を用い、一連の分析操作を行って得た試料溶液について、21 回以上繰り返し測定し、その結果から算出される標準偏差に基づき設定する。

LOQ と LOD 設定用として、40 µg/L の混合標準溶液を調製する。分析操作 6.1.1 で採取したブランク試料に添加用内標準液(3.3.5 b))0.5 mL を添加するとともに、前述混合標準溶液を 0.5 mL（試料中濃度として 2.0 µg/kg 相当）添加する。分析操作 6.3.3 で作成した LC-MS/MS 測定用試料溶液の定量を 21 回繰り返し、T-2、HT-2 及び DAS それぞれの濃度の標準偏差を算出する。LOQ として 0.5 µg/kg、1.0 µg/kg、2.0 µg/kg の 3 濃度から、「標準偏差×10」以上の最小濃度を選択し設定する。また、LOQ の 1/2 を LOD として設定する。

注意事項：標準偏差に基づく LOQ と LOD の設定が困難な時は、0.5 µg/kg、1.0 µg/kg、2.0 µg/kg の 3 濃度から、クロマトグラムのベースラインのシグナルノイズ比 (S/N) が 10 以上となる最低濃度を LOQ として設定することも可能とする。この場合もブランク試料（小麦、大麦）を用いるが、6.1.1 で内標準液は添加せず、6.3.2 で再溶解液の代わりに検量線用の 0.5 µg/L、1 µg/L 及び 2 µg/L の標準液（内標準を含む）を加えて混合溶解する。それらの測定ピークより S/N を算出し、LOQ を設定する。LOQ の 1/2 を LOD として設定する。

11 内部精度管理

本分析を行う施設は、食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について（平成 9 年 4 月 1 日付け衛食第 117 号厚生省生活衛生局食品保健課長通知）の別添「精度管理の一般ガイドライン」に従って精度管理を行う。ただし、5 回以上の繰り返し試験による精度確認については、小麦と大麦のブランク試料に各分析種を 10 µg/kg の濃度で添加する回収試験を行い、平均値と標準偏差を求める。

分析日ごと（分析ランごと）の添加回収試験も小麦のブランク試料に各分析種を 10 µg/kg 添加して行うが、当日の分析試料に大麦が含まれている場合は、大麦の添加回収試験を行う。ブランク試験も同時に行う。

回収率の許容範囲は 60-115%とし、範囲外の場合は原因を調査して上で、再度当該試料分析と添加回収試験を行う。

12 記録

一連の分析の経過及び、結果その他必要な事項を、分析機関所定の様式に記録し、分析の終了後、速やかに監督者の確認を受ける。

13 記録の管理、保管

記録は分析機関所定の管理手順に従って管理、保管する。

14 使用した器具の処置

14.1 再使用する器具の洗浄

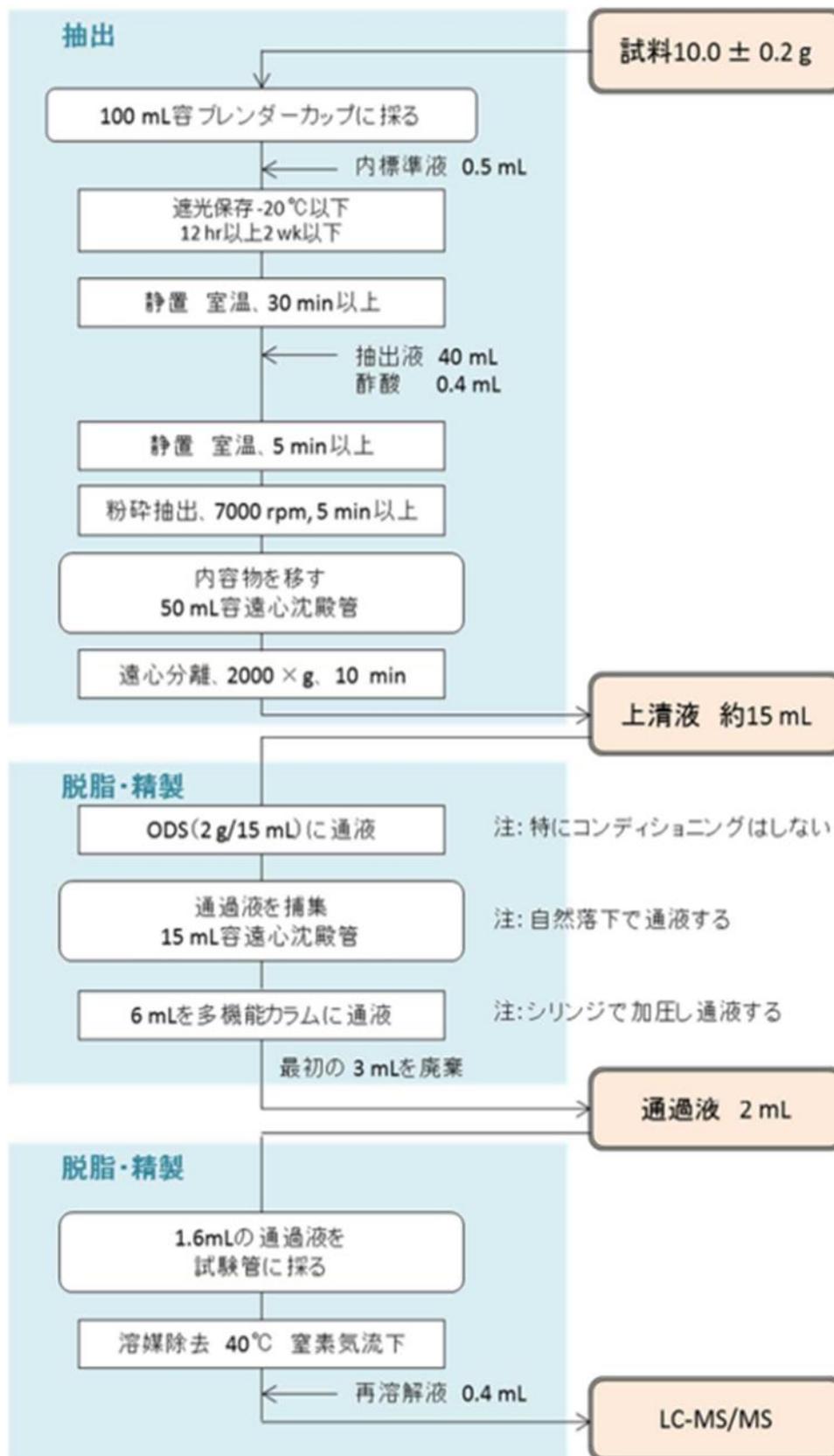
分析に再使用する器具の洗浄は、洗剤で清浄に洗浄した後、水道水ですすぎ、更に精製水ですいだ後、乾燥し清浄に保管する。必要に応じて 70%エタノール、エタノール等でさらにすすいだ後、乾燥し清浄に保管する。

14.2 ディスポ器具の廃棄

産業廃棄物として適切に処理すること。

15 廃液の処理

廃溶媒、廃酸、廃アルカリは分析機関の規定に基づき、適切に処理すること。



分析手順フローチャート