

平成 24 年～平成 27 年の国産麦類中のフザリウム毒素含有実態調査の方法

1. サンプルング

通常調査

平成 24 年～平成 27 年の概ね 6 月から 12 月までの間に、共同又は個人の乾燥調製施設、農業倉庫において、乾燥・調製¹された小麦、大麦の穀粒（いわゆる玄麦。）を採取した。ロットの大きさに応じた数の一次試料を採取²し、これを混合したもの約 1～2 kg を分析用試料とした。

小麦の調査計画点数は各年 120 点とし、国内生産量の最も多い北海道に 3 割を配分し、残りの 7 割を小麦の生産量に応じて各県に比例配分した。大麦の調査計画点数は各年 100 点とし、大麦生産量に応じて各道県に比例配分した。

追加調査

平成 26 年及び平成 27 年は、都道府県が公表している病害虫の発生状況等から、麦類赤かび病の発生が平年よりも多い等の情報が得られた地域において、赤かび病発生時のかび毒汚染実態を詳細に把握するため、通常調査の点数に追加して、通常調査と同様の方法で小麦又は大麦試料を採取した。

2. 分析対象のフザリウム毒素

以下のフザリウム毒素³を対象に、分析を行った。

- デオキシニバレノール（略称：DON）
- 3-アセチルデオキシニバレノール（略称：3-Ac-DON）
- 15-アセチルデオキシニバレノール（略称：15-Ac-DON）
- ニバレノール（略称：NIV）
- 4-アセチルニバレノール（略称：4-Ac-NIV、別称：フザレノン X）
- T-2 トキシン（略称：T2）
- HT-2 トキシン（略称：HT2）
- ゼアラレノン（略称：ZEN）

3. 試料点数

各調査年の品目別の試料点数（実績）を表 1 に示した。

¹ 品位が劣る穀粒、被害粒、異種穀粒、異物等を選別・除去済みのもの。

² General Standard for Contaminants and Toxins in Food and Feed (CODEX STAN 193-1995, p34-36) . Sampling Plans and Performance Criteria for Deoxynivalenol (DON) in Cereal-Based Foods for Infants and Young Children; in Flour, Meal, Semolina and Flakes Derived from Wheat, Maize or Barley; and in Cereal Grains (Wheat, Maize and Barley) Destined for Further Processing.の方法による。

³ 平成 27 年は、デオキシニバレノール-3-グルコシド及びジアセトキシシルペノールについても分析を行ったが、現時点では 1 年分のデータしか得られていないことから、今回の報告からは除外した。

表 1 各調査年の試料点数（実績）

調査年	試料点数			
	小麦		大麦	
	通常調査	追加調査	通常調査	追加調査
平成 24 年	120	-	100	-
平成 25 年	120	-	100	-
平成 26 年	120	7	99	-
平成 27 年	120	24	100	7

4. 分析方法の概要

(1) 分析用試料の調製

分析用試料の全量を、0.50 mm 径の梯（てい）型穴ふるいリングを装着したローターミルで粉碎し、よく混合した。

(2) 分析法の概要

かび毒の種類に応じて以下の 2 種類の分析法で定量した。それぞれの分析法の詳細は別紙に示した。

DON、NIV とそのアセチル体

粉碎した分析用試料 25 g を秤量し、アセトニトリル-水（84+16）混液で抽出し、多機能ミニカラムで精製した。*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）混液を用いてトリメチルシリル化した DON、3-Ac-DON、15-Ac-DON、NIV 及び 4-Ac-NIV を、ガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）で定量した。

その他のかび毒

粉碎した分析用試料 10 g を秤量し、アセトニトリル-水（80+20）混液で抽出し、オクタデシルシリル化ゲル系固相抽出カラム及び多機能ミニカラムで精製した。高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計（LC-MS/MS）で、T-2、HT-2 及び ZEN を定量した。

(3) 分析機関

適切な精度管理を実施し、信頼性の高い品質保証体制が整備されていることを確認した上で、独立行政法人農林水産消費安全技術センター（FAMIC）で分析を実施した。平成 24 年は 3 つの試験所（本報告では試験所 A、B、C とする。以下同じ。）で、平成 25 年～平成 27 年は 1 つの試験所（試験所 A）で実施した。

(4) 分析法の検出限界及び定量限界

各分析法について、低濃度の分析対象かび毒を含む試料を 21 回繰り返し測定して得られた測定値の標準偏差の 3.29 倍となる試料中のかび毒濃度を検出限界 (LOD) と、標準偏差の 10 倍となる試料中のかび毒濃度を定量限界 (LOQ) とした。各かび毒の検出限界、定量限界は表 3 に示した。

表 3 検出限界及び定量限界 (mg/kg)

かび毒	品目		平成 24 年	平成 25 年	平成 26 年	平成 27 年
DON	小麦	検出限界	0.0007-0.003	0.0007	0.001	0.001
		定量限界	0.0022-0.008	0.0021	0.003	0.003
	大麦	検出限界	0.0009-0.002	0.0008	0.001	0.001
		定量限界	0.0025-0.005	0.0022	0.003	0.003
3-Ac-DON	小麦	検出限界	0.002-0.003	0.001	0.002	0.002
		定量限界	0.005-0.006	0.003	0.005	0.005
	大麦	検出限界	0.002-0.003	0.0008	0.002	0.002
		定量限界	0.004-0.007	0.0024	0.005	0.005
15-Ac-DON	小麦	検出限界	0.0007-0.001	0.0007	0.001	0.001
		定量限界	0.0021-0.003	0.0020	0.003	0.003
	大麦	検出限界	0.0007-0.002	0.0009	0.001	0.001
		定量限界	0.0021-0.004	0.0025	0.003	0.003
NIV	小麦	検出限界	0.002-0.003	0.002	0.002	0.002
		定量限界	0.004-0.009	0.005	0.005	0.005
	大麦	検出限界	0.002	0.002	0.002	0.002
		定量限界	0.004-0.006	0.004	0.005	0.005
4-Ac-NIV	小麦	検出限界	0.0007-0.002	0.0008	0.001	0.001
		定量限界	0.0020-0.004	0.0024	0.003	0.003
	大麦	検出限界	0.0007-0.003	0.0008	0.001	0.001
		定量限界	0.0020-0.009	0.0023	0.003	0.003
ZEN	小麦	検出限界	0.0002	0.0003	0.0004	0.0004
		定量限界	0.0005-0.0006	0.0008	0.0010	0.0010
	大麦	検出限界	0.0002-0.0004	0.0003	0.0004	0.0004
		定量限界	0.0006-0.0009	0.0009	0.0010	0.0010
T2	小麦	検出限界	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003
		定量限界	0.0008	0.0009	0.0010	0.0010
	大麦	検出限界	0.0002-0.0003	0.0002	0.0003	0.0003
		定量限界	0.0006-0.0007	0.0005	0.0010	0.0010
HT2	小麦	検出限界	0.0003	0.0003	0.0004	0.0004
		定量限界	0.0007-0.0009	0.0009	0.0010	0.0010
	大麦	検出限界	0.0002-0.0004	0.0003	0.0004	0.0004
		定量限界	0.0006-0.0010	0.0008	0.0010	0.0010

(5) 添加回収率

異なる 2 種類 (LOQ 付近と検量線の間濃度付近等) の添加濃度となるように各調査対象かび毒の標準液を小麦、大麦にそれぞれ 3 回添加し、その平均添加回収率及び相対標準偏差 (RSD) を求めた。

各分析法による各かび毒の添加回収率は、10 µg/kg 以下では 60~120% の範囲、10~100 µg/kg では 72~115% の範囲、100~1000 µg/kg では 71~118% の範囲であった。100~1000 µg/kg において一部のかび毒の回収率がやや低かったが許容できる範囲と判断した。各かび毒の添加回収率は表 4 に示した。

なお、本報告の分析値は、回収率による調整を行っていない。

表 4 各かび毒の平均添加回収率

平成 24 年

かび毒	品目	試験所	添加濃度 (mg/kg)	試験回数	平均添加回収率 (%)	RSD (%)	
DON	小麦	試験所 A	0.01-0.02	3	76	3.8	
			0.2	3	73	2.8	
		試験所 C	0.01-0.02	3	77	5.8	
			0.2	3	76	2.8	
	大麦	試験所 A	0.01-0.02	3	81	5.0	
			0.2	3	71	1.6	
		試験所 B	0.01-0.02	3	103	5.3	
			0.2	3	86	7.7	
	試験所 C	0.01-0.02	3	76	4.8		
		0.2	3	73	3.2		
	3-Ac-DON	小麦	試験所 A	0.01-0.02	3	107	2.4
				0.2	3	81	1.4
試験所 C			0.01-0.02	3	85	5.3	
			0.2	3	79	1.9	
大麦		試験所 A	0.01-0.02	3	110	1.1	
			0.2	3	80	2.2	
		試験所 B	0.01-0.02	3	100	7.7	
			0.2	3	90	6.1	
試験所 C		0.01-0.02	3	91	6.5		
		0.2	3	77	1.8		
15-Ac-DON		小麦	試験所 A	0.01-0.02	3	94	3.8
				0.2	3	77	1.4
	試験所 C		0.01-0.02	3	91	1.4	
			0.2	3	80	2.3	
	大麦	試験所 A	0.01-0.02	3	103	2.2	
			0.2	3	76	3.8	
		試験所 B	0.01-0.02	3	74	3.3	
			0.2	3	80	2.5	
	試験所 C	0.01-0.02	3	88	2.0		
		0.2	3	75	3.3		

平成 24 年（続き）

かび毒	品目	試験所	添加濃度 (mg/kg)	試験 回数	平均添加 回収率(%)	RSD(%)
NIV	小麦	試験所 A	0.01-0.02	3	80	2.4
			0.2	3	72	0.9
		試験所 C	0.01-0.02	3	72	2.0
			0.2	3	76	1.7
	大麦	試験所 A	0.01-0.02	3	92	0.7
			0.2	3	74	3.0
		試験所 B	0.01-0.02	3	102	5.3
			0.2	3	76	1.0
		試験所 C	0.01-0.02	3	83	2.0
0.2	3	79	2.8			
4-Ac-NIV	小麦	試験所 A	0.01-0.02	3	87	4.4
			0.2	3	81	1.6
		試験所 C	0.01-0.02	3	92	2.3
			0.2	3	85	1.0
	大麦	試験所 A	0.01-0.02	3	100	1.7
			0.2	3	81	1.5
		試験所 B	0.01-0.02	3	104	4.8
			0.2	3	93	4.9
		試験所 C	0.01-0.02	3	101	2.4
0.2	3	84	1.5			
T2	小麦	試験所 A	0.001-0.002	3	94	3.9
			0.2	3	100	5.9
		試験所 C	0.001-0.002	3	99	14
			0.2	3	109	1.0
	大麦	試験所 A	0.001-0.002	3	86	3.1
			0.2	3	109	6.0
		試験所 B	0.001-0.002	3	79	7.5
			0.2	3	99	1.0
		試験所 C	0.001-0.002	3	83	7.6
0.2	3	98	10			
HT2	小麦	試験所 A	0.001-0.002	3	100	5.7
			0.2	3	102	1.3
		試験所 C	0.001-0.002	3	112	6.2
			0.2	3	112	2.3
	大麦	試験所 A	0.001-0.002	3	73	0.8
			0.2	3	91	1.9
		試験所 B	0.001-0.002	3	110	7.1
			0.2	3	118	1.1
		試験所 C	0.001-0.002	3	108	11
0.2	3	87	8.9			
ZEN	小麦	試験所 A	0.001-0.002	3	88	3.4
			0.2	3	97	0.9
		試験所 C	0.001-0.002	3	116	3.2
			0.2	3	108	3.9
	大麦	試験所 A	0.001-0.002	3	71	1.2
			0.2	3	96	0.9
		試験所 B	0.001-0.002	3	111	2.2
			0.2	3	107	4.9
		試験所 C	0.001-0.002	3	104	10
0.2	3	111	3.7			

平成 25 年

かび毒	品目	試験所	添加濃度 (mg/kg)	試験 回数	平均添加 回収率(%)	RSD(%)
DON	小麦	試験所 A	0.002	3	89	2.8
			1	3	95	9.4
	大麦	試験所 A	0.002	3	76	4.8
			1	3	90	5.3
3-Ac-DON	小麦	試験所 A	0.002	3	85	4.1
			1	3	80	2.9
	大麦	試験所 A	0.002	3	91	7.1
			1	3	87	2.9
15-Ac-DON	小麦	試験所 A	0.002	3	65	3.1
			1	3	74	3.1
	大麦	試験所 A	0.002	3	97	2.6
			1	3	77	1.5
NIV	小麦	試験所 A	0.004	3	107	5.6
			1	3	78	4.3
	大麦	試験所 A	0.004	3	74	5.1
			1	3	74	5.8
4-Ac-NIV	小麦	試験所 A	0.002	3	105	3.4
			0.5	3	77	1.7
	大麦	試験所 A	0.002	3	105	3.1
			0.5	3	87	4.4
T2	小麦	試験所 A	0.001	3	101	1.4
			0.02	3	109	3.0
	大麦	試験所 A	0.001	3	72	3.5
			0.02	3	82	3.4
HT2	小麦	試験所 A	0.001	3	112	5.2
			0.02	3	104	2.0
	大麦	試験所 A	0.001	3	89	5.2
			0.02	3	86	4.3
ZEN	小麦	試験所 A	0.001	3	78	8.0
			0.02	3	92	1.0
	大麦	試験所 A	0.001	3	79	6.5
			0.02	3	103	8.7

平成 26 年

かび毒	品目	試験所	添加濃度 (mg/kg)	試験 回数	平均添加 回収率(%)	RSD(%)
DON	小麦	試験所 A	0.005	3	84	3.9
			0.1	3	96	1.5
	大麦	試験所 A	0.005	3	75	16
			0.1	3	89	9.1
3-Ac-DON	小麦	試験所 A	0.005	3	106	4.9
			0.1	3	103	0.7
	大麦	試験所 A	0.005	3	101	1.9
			0.1	3	96	0.1
15-Ac-DON	小麦	試験所 A	0.005	3	60	0.2
			0.1	3	90	4.2
	大麦	試験所 A	0.005	3	60	0.9
			0.1	3	86	0.6
NIV	小麦	試験所 A	0.005	3	64	4.8
			0.1	3	76	2.5
	大麦	試験所 A	0.005	3	97	7.9
			0.1	3	80	2.7
4-Ac-NIV	小麦	試験所 A	0.005	3	95	1.7
			0.1	3	101	2.5
	大麦	試験所 A	0.005	3	102	4.7
			0.1	3	101	2.3
T2	小麦	試験所 A	0.001	3	76	8.0
			0.02	3	85	3.0
	大麦	試験所 A	0.001	3	61	4.9
			0.02	3	73	6.7
HT2	小麦	試験所 A	0.001	3	120	6.7
			0.02	3	115	3.3
	大麦	試験所 A	0.001	3	96	6.0
			0.02	3	109	0.8
ZEN	小麦	試験所 A	0.001	3	96	7.0
			0.02	3	94	1.3
	大麦	試験所 A	0.001	3	81	2.6
			0.02	3	75	4.3

平成 27 年

かび毒	品目	試験所	添加濃度 (mg/kg)	試験 回数	平均添加 回収率(%)	RSD(%)
DON	小麦	試験所 A	0.005	3	88	4.3
			0.1	3	80	0.1
	大麦	試験所 A	0.005	3	87	3.9
			0.1	3	79	2.3
3-Ac-DON	小麦	試験所 A	0.005	3	101	1.3
			0.1	3	91	1.0
	大麦	試験所 A	0.005	3	89	6.9
			0.1	3	91	3.8
15-Ac-DON	小麦	試験所 A	0.005	3	85	3.4
			0.1	3	79	1.1
	大麦	試験所 A	0.005	3	83	3.9
			0.1	3	79	1.8
NIV	小麦	試験所 A	0.005	3	82	5.3
			0.1	3	74	1.4
	大麦	試験所 A	0.005	3	85	2.1
			0.1	3	75	2.2
4-Ac-NIV	小麦	試験所 A	0.005	3	101	1.5
			0.1	3	94	0.5
	大麦	試験所 A	0.005	3	104	1.6
			0.1	3	96	2.8
T2	小麦	試験所 A	0.001	3	109	3.1
			0.02	3	107	2.4
	大麦	試験所 A	0.001	3	96	8.3
			0.02	3	75	3.1
HT2	小麦	試験所 A	0.001	3	109	3.8
			0.02	3	114	1.0
	大麦	試験所 A	0.001	3	99	2.8
			0.02	3	110	2.0
ZEN	小麦	試験所 A	0.001	3	110	2.0
			0.02	3	113	0.7
	大麦	試験所 A	0.001	3	103	2.8
			0.02	3	103	1.3

(6) 測定の“不確かさ”

各かび毒について、あらかじめ異なる2種類の濃度(LOQ付近と検量線の間濃度付近等)となる試料を調製し、その試料について異なる3日間にそれぞれ7点又は8点の併行試験を行い、その室内再現相対標準偏差(RSDi)を算出し、測定の不確かさを求めた。

各分析法による各かび毒のRSDiは21%以下であり、許容できる値であった。詳細は表5に示した。

表 5 各かび毒の測定の不確かさ

平成 25 年

かび毒	品目	試験所	試料濃度(mg/kg)	RSDi (%)
DON	小麦	試験所 A	0.002	9.8
			1	9.0
	大麦	試験所 A	0.002	7.9
			1	5.2
3-Ac-DON	小麦	試験所 A	0.002	9.8
			1	2.7
	大麦	試験所 A	0.002	11
			1	6.8
15-Ac-DON	小麦	試験所 A	0.002	5.3
			1	4.4
	大麦	試験所 A	0.002	20
			1	12
NIV	小麦	試験所 A	0.004	17
			1	5.5
	大麦	試験所 A	0.004	12
			1	6.7
4-Ac-NIV	小麦	試験所 A	0.002	5.4
			0.5	4.5
	大麦	試験所 A	0.002	8.6
			0.5	6.7
T2	小麦	試験所 A	0.001	14
			0.02	4.8
	大麦	試験所 A	0.001	13
			0.02	8.2
HT2	小麦	試験所 A	0.001	8.7
			0.02	6.7
	大麦	試験所 A	0.001	10
			0.02	7.2
ZEN	小麦	試験所 A	0.001	12
			0.02	8.5
	大麦	試験所 A	0.001	14
			0.02	8.1

平成 26 年

かび毒	品目	試験所	試料濃度 (mg/kg)	RSDi (%)
DON	小麦	試験所 A	0.003	11
			1	7.8
	大麦	試験所 A	0.003	6.7
			1	5.8
3-Ac-DON	小麦	試験所 A	0.005	4.7
			0.5	1.8
	大麦	試験所 A	0.005	17
			0.5	3.8
15-Ac-DON	小麦	試験所 A	0.003	14
			0.5	3.5
	大麦	試験所 A	0.003	19
			0.5	8.5
NIV	小麦	試験所 A	0.005	11
			1	5.3
	大麦	試験所 A	0.005	11
			1	11
4-Ac-NIV	小麦	試験所 A	0.003	6.4
			0.5	5.9
	大麦	試験所 A	0.003	8.1
			0.5	2.1
T2	小麦	試験所 A	0.002	20
			0.05	13
	大麦	試験所 A	0.002	21
			0.05	18
HT2	小麦	試験所 A	0.002	10
			0.05	16
	大麦	試験所 A	0.002	12
			0.05	20
ZEN	小麦	試験所 A	0.002	15
			0.05	9.2
	大麦	試験所 A	0.002	14
			0.05	5.8

平成 27 年

かび毒	品目	試験所	試料濃度 (mg/kg)	RSDi (%)
DON	小麦	試験所 A	0.005	15
			0.8	3.2
	大麦	試験所 A	0.005	9.7
			0.8	4.2
3-Ac-DON	小麦	試験所 A	0.005	5.1
			0.4	3.5
	大麦	試験所 A	0.005	8.0
			0.4	3.7
15-Ac-DON	小麦	試験所 A	0.005	4.0
			0.4	4.9
	大麦	試験所 A	0.005	4.9
			0.4	4.6
NIV	小麦	試験所 A	0.005	9.8
			0.8	4.7
	大麦	試験所 A	0.005	7.6
			0.8	5.3
4-Ac-NIV	小麦	試験所 A	0.005	4.5
			0.4	5.5
	大麦	試験所 A	0.005	4.2
			0.4	3.9
T2	小麦	試験所 A	0.002	9.0
			0.05	6.8
	大麦	試験所 A	0.002	17
			0.05	10
HT2	小麦	試験所 A	0.002	8.0
			0.05	2.7
	大麦	試験所 A	0.002	9.4
			0.05	4.5
ZEN	小麦	試験所 A	0.002	9.5
			0.05	2.8
	大麦	試験所 A	0.002	7.2
			0.05	13

かび毒の分析法

1. 分析用試料の調製

試験室試料 1 検体の全量を、0.50 mm 径の梯型穴ふるいリングを装着したローターミル (Variable Speed Rotor Mill PULVERISETTE 14 (Fritsch GmbH 製)) を用いて粉碎し、よく混合し分析用試料とした。

2. DON、3-Ac-DON、15-Ac-DON、NIV 及び 4-Ac-NIV の分析法

分析用試料から 25 g を 200 mL 容量の三角フラスコに秤量し、アセトニトリル-水 (84+16, v/v) 混液 100 mL、内標準物質 (3-アセチル-*d*₃-デオキシニバレノール, 2.5 mg/L) 0.5 mL を加え、60 分間振とう (250-300 回/分) 後、抽出液 20~30 mL を 50 mL 容量の遠沈管に移し、遠心分離 (1000 g, 5 分) した。

遠心分離後の上澄を、多機能ミニカラム (MycoSep #227 (Romer Labs 製)) に負荷し、最初の溶出液 3 mL を廃棄し、続く溶出液 4 mL を試験管に採取し、40 °C 以下で、窒素ガスを吹き付けて乾固した。

試験管内の残留物に、*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-*N*-トリメチルシリルイミダゾール (3+2+3) (SUPELCO Sigma-Aldrich 製) 0.1 mL を加え、70 °C で 30 分間静置し、誘導体化反応を行った。試験管を室温まで放冷し、2,2,4-トリメチルペンタン 0.5 mL、水 0.5 mL を加え 5 分間混和し、静置後の上層を試料溶液とした。試料溶液 2 μL を、GC-MS に供し、誘導体化した DON、3-Ac-DON、15-Ac-DON、NIV 及び 4-Ac-NIV を定量した。GC-MS の条件は、のとおり。

表 1 GC-MS の測定条件

機種	GCMS-QP2010 Ultra (島津製作所) 又は 5973 A/N MSD (Agilent Technology Inc.)
カラム	Rxi-35Sil MS (Restek) 又は J&W DB-35 (Agilent Technology Inc.) 0.25 mm i.d.×30 m, 膜厚 0.25 μm
注入方法	スプリットレス
温度	試料注入口 250 °C カラム 80 °C (1 min) →20 °C/min 昇温→180°C→5°C/min 昇温→300 °C (10min)
ガス流量	ヘリウム 1.0 mL/min
イオン化法	EI イオン源温度:230 °C イオン化電圧:70 eV
設定質量数 (m/z)	DON:422(定量イオン)、235(確認イオン) 3-Ac-DON:392(定量イオン)、467(確認イオン) 15-Ac-DON:392(定量イオン)、295(確認イオン) NIV:379(定量イオン)、289(確認イオン) 4-Ac-NIV:480(定量イオン)、251(確認イオン) 内部標準物質:3-Ac- <i>d</i> ₃ -DON: 395(定量イオン)

3. T-2、HT-2 及び ZEN の分析法⁴

分析用試料 10 g を 100 mL 容量の抽出用カップに秤量し、内標準液（ベルカロール 2 μg/mL 及びゼアララノン 1 μg/mL アセトニトリル溶液）0.5 mL を加え、冷凍庫（-20°C 以下）内で 12 時間以上静置した。

抽出用カップを室温に 30 分以上静置し、アセトニトリル-水（80+20, v/v）混液 40 mL、酢酸 0.4 mL を加えて 5 分間静置し、ホモジナイザーで攪拌（7000 rpm, 5 分）後に、抽出液を 50 mL 容量の遠沈管に移し、遠心分離（2000 g, 10 分）した。

遠心分離後の上澄 15 mL をオクタデシルシリル化ゲル系固相抽出カラム（Presep C18（2 g/15 mL）（和光純薬製））に負荷して得た溶出液の半量をシリンジで多機能ミニカラム（Bond Elut Mycotoxin Jr（Agilent 製））に加圧負荷し、最初の溶出液 3 mL を廃棄し、続く溶出液 2 mL を採取し、その 1.6 mL を新たな試験管に採り、40 °C 以下で、窒素ガスを吹き付けて乾固した。試験管内の残留物に、アセトニトリル-水-酢酸（5+94+1, v/v/v）混液 0.4 mL を加え、メンブレンフィルター（親水性 PTFE 製、孔径 0.20 μm）でろ過し、試料溶液とした。

試料溶液 20 μL を、LC-MS/MS に供し、T-2、HT-2 及び ZEN を定量した。LC-MS/MS の条件は、表 2 のとおり。

⁴ 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) (Nakagawa, et al. Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques, 2014, S6:002)

表 2 LC-MS/MS の測定条件

機種	LC: Alliance 2795 (Waters) MS/MS: Quattro Premier XE (Waters)
HPLC カラム	Zorbax Eclipse XDB-C18(Agilent Technology Inc.) 3.0 mm i.d.×250 mm, 粒径 5 μm
カラム温度	40 °C
移動相	Solvent A: 0.5 mM 酢酸アンモニウム水溶液(0.1 %酢酸含有) Solvent B: アセトニトリル(0.1 %酢酸含有) グラジエント条件 0 min A/B (90/10)→1 min A/B (90/10)→15 min A/B(10/90) →18 min A/B (10/90)→19 min A/B (90/10)→23 min A/B(90/10)
流量	0.3 mL/min
MS/MS	イオン化法: ESI(ポジティブ、ネガティブ) コーン電圧: 24 V(T-2 (ポジティブ)) 24 V(HT-2 (ネガティブ)) 54 V(ZEN (ネガティブ)) 10 V(内標準物質 ベルカロール(ポジティブ)) 18 V(内標準物質 ベルカロール(ネガティブ)) 58 V(内標準物質 ゼアララノン(ネガティブ)) コリジョンエネルギー: 16 eV(T-2 (ポジティブ)) 14 eV(HT-2 (ネガティブ)) 28 eV(ZEN (ネガティブ)) 6 eV(内標準物質 ベルカロール(ポジティブ)) 12e V(内標準物質 ベルカロール(ネガティブ)) 24 eV(内標準物質 ゼアララノン(ネガティブ)) イオン源温度: 120°C 脱溶媒ガス温度: 400°C 脱溶媒ガス流量: 850 L/h
設定質量数 (m/z)	T-2 (ポジティブ):484 > 305 (確認イオン) T-2 (ポジティブ):484 > 215 (定量イオン) HT-2 (ポジティブ) :442 > 263(確認イオン) HT-2 (ポジティブ) :483 > 59 (定量イオン) ZEN (ネガティブ) :317 > 175(確認イオン) ZEN (ネガティブ) :317 > 131(定量イオン) 内標準物質 ベルカロール(ポジティブ):284 > 249 (定量イオン) 内標準物質 ベルカロール(ネガティブ):325 > 59 (定量イオン) 内標準物質 ゼアララノン(ネガティブ):319 > 205 (定量イオン)