

「デオキシニバレノール、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の分析法」
コラボラティブスタディプロトコール

以下、デオキシニバレノールをDON、3-アセチルデオキシニバレノールを3ADON、15-デオキシニバレノールを15ADONと表記する。

[] 内数字は、実施要領参照

操作手順

1. 前処理

検体を天秤[5.1(1)]で25.0 gを正確に量りとり、300 ml容の共栓付き三角フラスコ[5.1(4)]に移す。添加用試料（試料番号1～8）の場合は、添加用DON、3ADON及び15ADONの3種混合溶液[4.2(2)]を250 μ l添加して暗所に1時間放置後に抽出溶媒を加える。自然汚染試料（試料番号9～12）及び試料番号13及び14については添加を行わない。

これに抽出溶媒 [4.1(3)] アセトニトリル：水（85：15）100 mlを加え、10分間室温で静置する。振とう機を用いて30分間激しく振り混ぜ、50 ml容プラスチック遠心チューブ[5.1(12)]に入れて3,000 gで5分間遠心分離[5.1(14)]し、上清を抽出溶液とする。

2. 多機能ミニカラムによる精製

- 1) 多機能ミニカラム[5.2(1)]をカラム架台[5.1(5)]にセットする。抽出溶液10 mlを入れ、最初の流出液3 mlは捨て、次いで流出する2.4 mlを共栓付き試験管[5.1(3)]に採り、溶出液とする。
- 2) 溶出液2.0 mlを共栓付き試験管[5.1(3)]に正確にとり、アルミブロックヒーター[5.1(6)]を40°C以下で使用し窒素気流[5.1(7)]を送るか、エバポレーター[5.1(8)]を用いて、試験管中の溶媒を除去する。

なお、試料番号13及び14については、以下の操作を行う。スタンダード1及び2については「3. 2) 検量線の作成」に従って調製する。

溶出液2.0 mlを共栓付き試験管[5.1(3)]にとり、試料番号13の溶出液にはスタンダード1（1 μ g/ml溶液）を75 μ l入れ、試料番号14の溶出液にはスタンダード2（100 ng/ml溶液）を50 μ l入れる。その後、溶媒の除去を行う。

- 3) 残留物にHPLC注入液 [4.1(4)]アセトニトリル：水（1：9）0.5 mlを加えたものを試験管ミキサー等[5.1(11)]で完全に溶解する。溶かした後、HPLC用バイアル[5.1(10)]に移す。試験溶液が濁っている場合は1.5 ml容マイクロチューブ[5.1(15)]等に移し、10,000 g 以上、5 分間遠心[5.1(16)]し、その上清をHPLC 用バイアル[5.1(10)]に移す。これをLC-MS/MS用試験溶液とする。なお、自然汚染試料においては、検量線から外れるものが多数存在する。そのため適宜試験溶液を希釈し、測定を行う。予備実験においては、原液とそれを10倍希釈した溶液を同時に測定し、検量線内に収まった値（両方とも収まった場合は原液の値）を用いた。

3. 高速液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC-MS/MS) による測定

LC-MS/MS[5.1(13)]を用いて試験溶液について測定を行う。

1) 測定条件 (例)

カラム (配布) [5.2(2)] : オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム温度 : 40 °C

移動相 : A溶媒 水[4.1(2)A]、B溶媒 アセトニトリル[4.1(1)]

0分 A 95% B 5%

7分 A 35% B 65%

流速 0.4 ml/分

注入量 10 µl

イオン化法 : ESI (－)

モニターイオン (m/z) :

	プリカーサー	プロダクト1	プロダクト2
DON	295	265	138
3ADON	337	307	173
15ADON	337	150	219

2) 検量線の作成

- ① DON、3ADON及び15ADONの三種混合標準液 (配布) [4.2(1)]を室温に戻した後、100 µlをピペッター[5.1(2)]でキャップ付きバイアル[5.1(9)]にとり、アセトニトリル[4.1(1)]900 µlを加え密栓後、試験管ミキサー等[5.1(11)]で完全に溶解する。(スタンダード1 : 1µg/ml溶液)
- ② ①で作製したスタンダード1 : 1 µg/ml溶液100 µl をキャップ付きバイアル[5.1(9)]にとり、アセトニトリル[4.1(1)]900 µlを加え密栓後、試験管ミキサー等[5.1(11)]で完全に溶解する。(スタンダード2 : 100 ng/ml溶液)
- ③ ②で作製したスタンダード2 : 100 ng/ml溶液100 µlをキャップ付きバイアル[5.1(9)]にとり、アセトニトリル[4.1(1)]900 µlを加え密栓後、試験管ミキサー等[5.1(11)]で完全に溶解する。(スタンダード3 : 10ng/ml溶液)
- ④ その後、以下の表に従い、スタンダード1、2、3 をHPLC 用バイアル[5.1(10)]にピペッター[5.1(2)]で分注し、窒素気流[5.1(7)]を送るかエバポレーター[5.1(8)]を用いて溶媒を除去する。
- ⑤ 除去した後、HPLC注入液[4.1(4)] アセトニトリル : 水 (1:9) 1.0 ml を加えて、よく混和したものをHPLC 用検量線用溶液とする。
- ⑥ 作製した8濃度の検量線用溶液10 µl (試験溶液の注入量に合わせる) をLC-MS/MSに注入し、ピークの面積で検量線を作成する。

DON類の濃度(ng/ml)	1	2	5	10	20	50	100	200
スタンダード1 (1 µg/ml)						50 µl	100 µl	200 µl
スタンダード2 (100 ng/ml)			50 µl	100 µl	200 µl			
スタンダード3 (10 ng/ml)	100 µl	200 µl						

3) 定量

試験溶液をLC-MS/MS[5.1(13)]に注入し、得られたクロマトグラムにおいてDON、3ADON及び15ADONのそれぞれの保持時間と一致するピークの面積と「2) 検量線の作成」で求めておいた検量線から試験溶液中の濃度を求める。試験溶液中の濃度と試料中の濃度の関係は以下である。

$$\text{試料中のDONの濃度 (ng/g)} = \text{試験溶液中のDONの濃度 (ng/ml)}$$

(注)

DON及びアセチル化DONを扱う際には手袋を装着し、実験台にはベンチコート等を使用し、汚染に気をつけること。また、使用した容器・器具は1%次亜塩素酸ナトリウム液に2時間以上浸漬した後、通常の洗浄を行うこと。

4. 分析法のフローチャート

	手順、条件	補足
抽出操作	検体25 gを秤量する	添加用試料(試料番号1~8)の場合は、 添加用溶液250 μ lを添加して暗所に1時間放置する
	抽出溶媒100 mlを加える	アセトニトリル:水(85:15)を用いる
	30分間振盪する	
	遠心分離し、上清を回収する	3000 gで5分間が望ましい
カラム操作	抽出溶液10 mlを入れる	
	最初に溶出する3 mlは捨て、 次いで溶出する2.4 mlを共栓付き試験管に回収する	
	溶出液2.0 mlを共栓付き試験管に正確にとる	試料番号13と14の場合は、この溶出液2.0 mlに スタンダード溶液を添加してから濃縮乾固を行う
サンプル調製	40°C以下、窒素気流で濃縮乾固	
	HPLC注入液アセトニトリル:水(1:9) 0.5 mlに溶解する	試験管ミキサーでよく攪拌する
	試験溶液が濁っている場合は遠心する	
LC-MS/MSの 測定条件例	LCカラム:Inertsil ODS-3 2.1 \times 150 mm, 3 μ m	
	カラム温度:40°C	
	注入量:10 μ l	
	流速:0.4 ml/min	
	移動相:A溶媒 水 B溶媒 アセトニトリル	
	0分 A 95% B 5% \rightarrow 7分 A 35% B 65%	
	イオン化:APCI negative	
モニターイオン DON 295>265, 138 3ADON 337>307, 173 15ADON 337>150, 219		

以上