

「食品中のフザリウムトキシン4種試験法」

操作手順

1. 抽出

- (1) 試料25 gを正確に抽出用容器に量り採る。
- (2) これに抽出溶媒メタノール：水（75：25）を100 mLを加え、30分間振とう抽出する。
- (3) 遠心分離（3000 rpm（1410 g）、10 分間）し、上清を抽出溶液とする。
- (4) 添加用試料の場合はそれぞれのカビ毒を添加して、暗所に1時間放置した後、抽出する。

2. イムノアフィニティーカラムカラムによる精製

イムノアフィニティーカラムの取り扱い上の注意：カラム内にはPBS が充填されていて、カラム上部には僅かに空気が入っている。そのため、横に倒すと空気がカラム（充填剤）に触れてしまい、その結果良好な回収率が得られなくなるため、保存時から分析終了時まで直立の状態を保っている必要がある。もし、ゲル上の白いフリット表面に気泡が溜まっていたら、タッピングして除去すること。

- ① イムノアフィニティーカラム（配付）は室温になるまで放置する。
- ② きり等でイムノアフィニティーカラムの上キャップに穴を開けてから上キャップをはずした後、下キャップをはずし、ストップコックを取り付け、カラム架台あるいはバキュームマニホールドにセットする。カラム内溶液を自然落下で排出後、あらたにPBSでカラム内を満たし、自然落下で排出させる。再度PBSでカラム内を満たし、PBS を半分程排出させた後、ストップコックを閉じる。
- ③ 「1.」の操作で得られた抽出溶液10.0 mLを正確にピペッターまたはホールピペットなどで50 mLのメスフラスコへとり、標線までPBS を加え良く混合し、試料溶液とする。
- ④ ③の溶液が混濁した場合は、ガラスロートにガラス繊維ろ紙をセットしろ過を行う。ろ液を三角フラスコにとり、試料溶液とする。
- ⑤ カラムにアダプターを取り付けたリザーバーを連結する。
- ⑥ ③又は④で得られた試料溶液5.0 mLをピペッター又はホールピペットで正確にとりイムノアフィニティーカラムに注入する。ストップコックを開き、1～2滴/秒の速さでろ液を排出させる（途中、排出速度が非常に遅くなった場合には、ゲル上の白いフリット表面に泡が付着していることがあるので、リザーバー及びカラムを手で保持し試料ろ液がこぼれないよう注意し、カラムを指等でタッピングし泡を取り除く）。全てのろ液を排出させたのち、リザーバーを取り除き、カラムを精製水で満たし、排出させる操作を5回繰り返すことにより洗浄を行う。カラム内の水分はアダプターを取り付けたシリンジ等で強く通気し十分に追い出す。その後共栓付き10 mL容試験管あるいはキャップ付

きバイアルにメタノール1 mLで溶出した後、アダプターを取り付けたシリンジ等で3回溶液を吸引及び通気を繰り返す。続いてメタノール1 mLで溶出を行った後、強く通気し、ゲル内のメタノールをすべて排出させる。

3. 試料溶液の調製

「2.」の⑥で得られたメタノール溶液を窒素気流を送るかエバポレーターを用いて溶媒を除去する。残さを5%メタノール水溶液0.5 mLで溶解する。孔径0.45 µmメンブランフィルター（フィルターを用いる場合は、吸着に注意してください）でろ過するか、あるいは10,000 rpm以上、5 分間遠心し、その上清をLC-MS/MS用試験溶液とする。

4. 高速液体クロマトグラフ-質量分析計（LC-MS/MS）による分析

LC-MS/MSを用いて試験溶液について測定を行う。

測定条件

HPLC

カラム：Inertsil ODS-4 3×50 mm, 2 µm

カラム温度：40°C

移動相：A溶媒 10 mM 酢酸アンモニウム

B溶媒 メタノール

分離条件：0分 A : B = 95 : 5

8分 A : B = 10 : 90 14分まで保持

流速：0.2 mL/分

注入量：10 µL

MS

イオン化：ESI

モニターイオン：各機関で以下の検出限界目標値を満たすイオンを選択する

検出限界目標値：

DON 5 ppb

T-2、HT-2、ZEN 1 ppb

以上