

3. 標準品

α -アマニチン *Amanita* sp.から抽出。90%以上

β -アマニチン *Amanita* sp.から抽出。90%以上

ファロイジン *Amanita* sp.から抽出。90%以上

4. 試験溶液の調整

a 抽出法

キノコ 2g を量り採り、これにメタノール 50ml を加え、5 分間ホモジナイズした後、ろ紙 (No.2) でろ過する。ろ液を 100ml のナス型フラスコに採り、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮する。残留物に 0.5%リン酸二水素ナトリウム 10ml を加え、溶解し抽出溶液とする。

b 精製法

Sep Pak C18 ミニカラムをあらかじめメタノール 10ml および 0.5%リン酸二水素ナトリウム 20ml で洗浄する。次いで a 抽出法で得られた抽出溶液をミニカラムに負荷し、流出液は捨てる。続いて 0.5%リン酸二水素ナトリウム 5ml でカラムを洗浄する。さらに、20%アセトニトリル 10ml をカラムに注入し、流出液を 50ml のメスフラスコに採り精製水で 50ml に定容し、これを試験溶液とする。

5. 操作法

a 定性試験

下記操作条件①あるいは②で、高速液体クロマトグラフィーを行い、試験溶液のクロマトグラムピークの検出時間と標準品のピークの検出時間を比較する。フォトダイオードアレイ検出器を用いた場合は、さらにピークのスペクトルを比較する。

操作条件① (グラジエント条件による分析)

カラム 内径 4.6mm、長さ 250mm のステンレス管に粒径 5 μ m のオクタデシルシリル化シリカゲルを充填したもの (TSKgel ODS-80TM (東ソー)と同等品)。

カラム温度 40℃

検出器 紫外吸光度計 (測定波長 295nm) あるいはフォトダイオードアレイ検出器 (測定波長 200-350nm)

移動相 A 液 アセトニトリル : 0.5%NaH₂PO₄ = 15 : 85

B 液 アセトニトリル : 0.5%NaH₂PO₄ = 30 : 70

グラジエント条件 0-6 分 (A 液 100%) → 6-15 分 (A 液 100%→40%) → 15-20 分 (A 液 40%)

移動相流量 1.0ml/分

操作条件② (イソクラティック条件による分析)

カラム、カラム温度および検出器は操作条件①と同じ

α -アマニチンおよび β -アマニチンの場合

移動相 アセトニトリル : 0.5%NaH₂PO₄ = 15 : 85

ファロイジンの場合

移動相 アセトニトリル : 0.5%NaH₂PO₄ = 22.5 : 77.5
移動相流量 1.0ml/分

b 定量試験

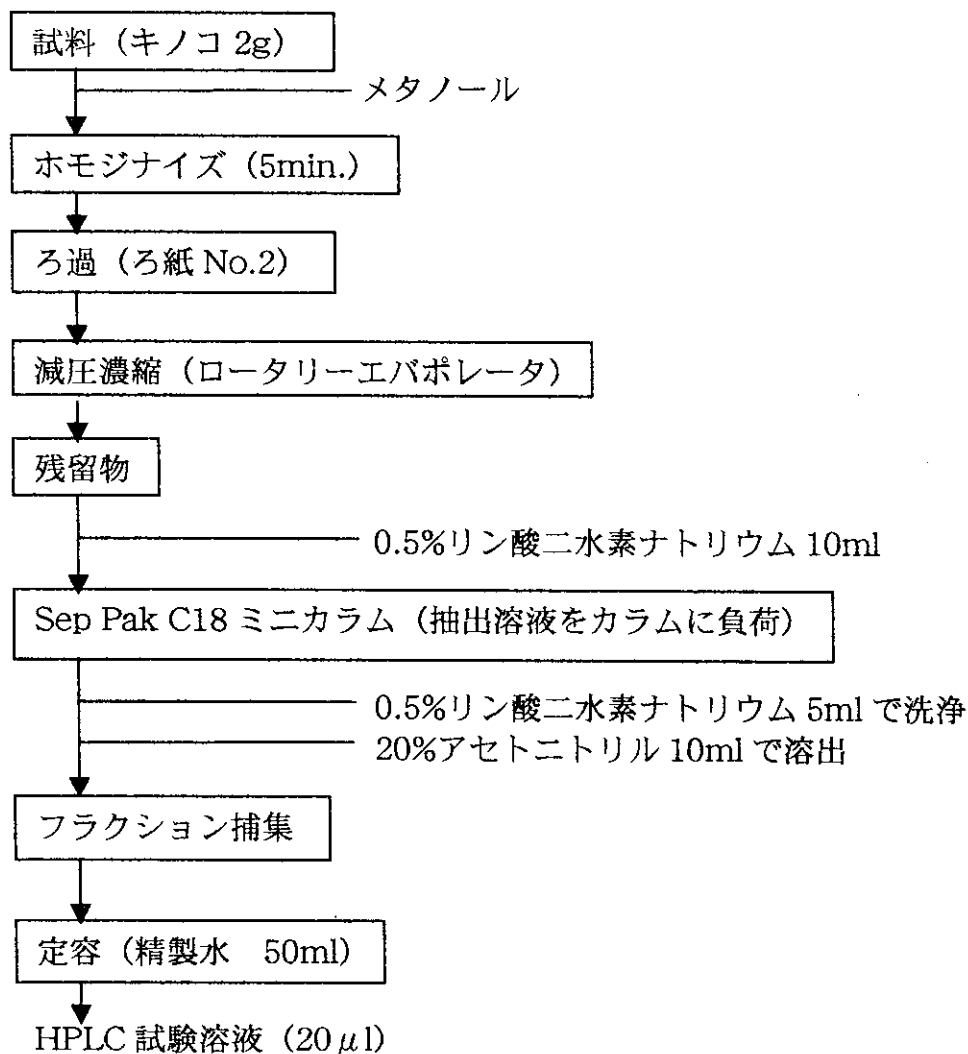
a 定性試験と同様の操作条件で得られた試験結果に基づき、ピーク高法またはピーク面積法により定量を行う。

定量下限は、0.2ppm である。

6. 出典

石原祐治・山浦由郎, 日本食品衛生学会第 63 回学術講演会要旨集, 42 (1992).

7. 操作のフローチャート



8. α -アマニチンおよびファロイジンの HPLC クロマトグラムおよびスペクトル

【操作条件】

カラム：L-column, 4.6mm×250mm, 5 μ m

カラム温度：40℃

移動相：A 液 アセトニトリル：0.5%NaH₂PO₄ = 15：85

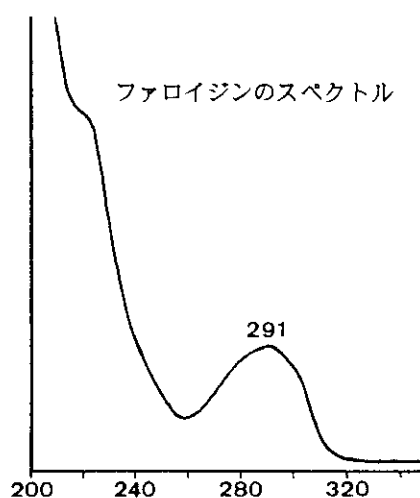
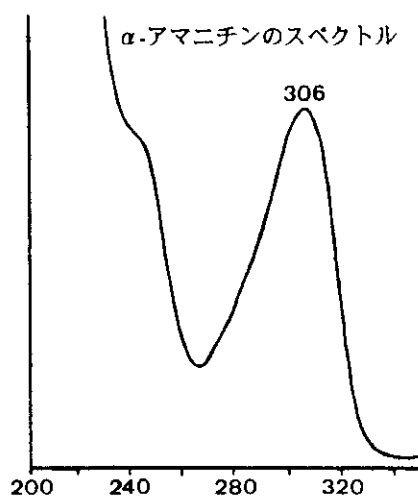
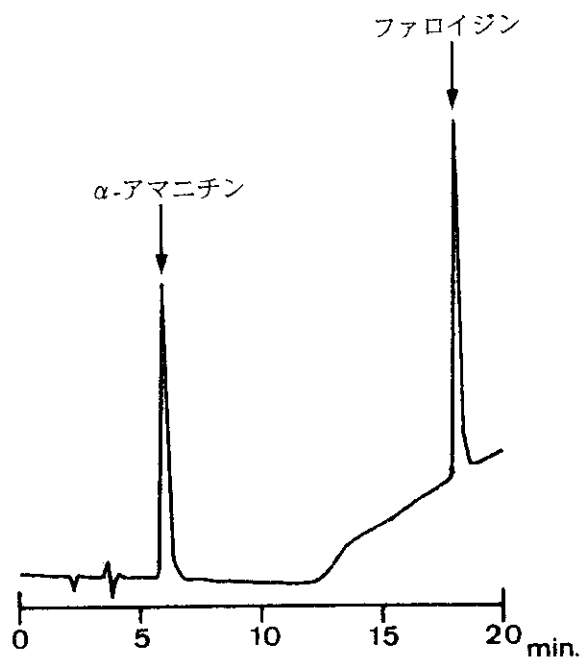
B 液 アセトニトリル：0.5%NaH₂PO₄ = 30：70

グラジエント条件：0-6分（A 液 100%）→6-15分（A 液 100%→40%）

流速：1.0ml/分

注入量：20 μ l

検出器：フォトダイオードアレイ検出器（200-350nm, モニター波長 295nm）



アマトキシシンおよびファロトキシシン試験法（その2）

1. 器具・装置

高速液体クロマトグラフィー（紫外吸光光度計）
上皿天秤：0.01 桁が表示できるもの
マグネティックスターラー
ロータリーエバポレーター
遠心分離器
振とう機

2. 試薬・試液

エタノール（試薬特級）
メタノール（高速液体クロマトグラフ用）
クロロホルム（試薬特級）
アセトニトリル（高速液体クロマトグラフ用）
酢酸アンモニウム（試薬特級）
酢酸（試薬特級）

3. 標準品

α -アマニチン *Amanita* sp.から抽出。90%以上
 β -アマニチン *Amanita* sp.から抽出。90%以上
ファロイジン *Amanita* sp.から抽出。90%以上

4. 試験溶液の調整

(1) キノコから調整

乾重量 2g のキノコを量り採り、これにエタノール-水（50 : 50 v/v）を 50ml 加え 15 分間マグネティックスターラーで攪拌する。静置後、上清を 300ml のナス型フラスコに移す。残留物に同様の操作をさらに二度繰り返す。全抽出液をロータリーエバポレーターで濃縮乾固させ、残留物にメタノール-水（50 : 50 v/v）5ml を加え溶解する。さらに水で 20ml に定容し、0.2 μ m のフィルターでろ過後これを試験溶液とする。

(2) 生体試料（血清および尿）

生体試料 1ml にメタノール-クロロホルム（50 : 50 v/v）を 2ml 加え 3 分間振とうし、3,000rpm、15 分間遠心分離する。遠心上清を 0.2 μ m のフィルターでろ過する。ろ液を 100 μ l まで減圧濃縮し、これを試験溶液とする。

5. 操作法

a 定性試験

下記操作条件で、高速液体クロマトグラフィーを行い、試験溶液のクロマトグラムのピーク検出時間と標準品のピークの検出時間を比較する。

操作条件

カラム 内径 4mm、長さ 125mm のステンレス管に粒径 5 μ m のオクタデシルシリル化シリカゲルを充填したもの (Lichrosorb RP-18 (Merck) と同等品)。

カラム温度 室温

検出器 紫外吸光光度計 (測定波長 302nm)

移動相 A 液 アセトニトリル

B 液 0.01M 酢酸-酢酸アンモニウム緩衝液 (pH5.0)

グラジエント条件 0-7分 (A 液 7%) \rightarrow 7-30分 (A 液 7% \rightarrow 25%)

移動相流量 1.0ml/分

b 定量試験

a 定性試験と同様の操作条件で得られた試験結果に基づき、ピーク高法またはピーク面積法により定量を行う。

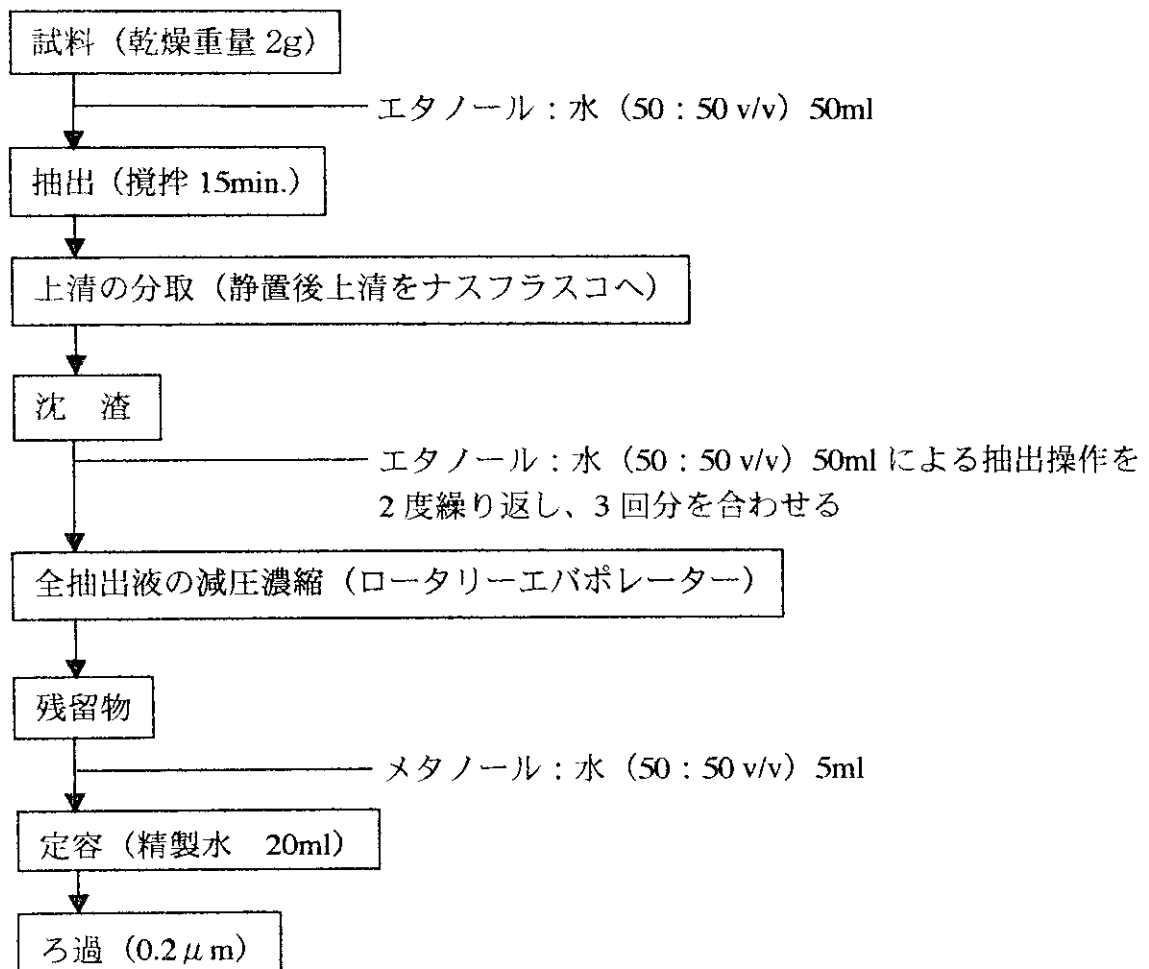
定量下限は、生体試料において α および β -アマニチンが 0.1ppm、ファロイジンが 0.05ppm である。

6. 出典

Caccialanza, G., Gandini, C. and Ponci, R., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 598, 179-185 (1992) .

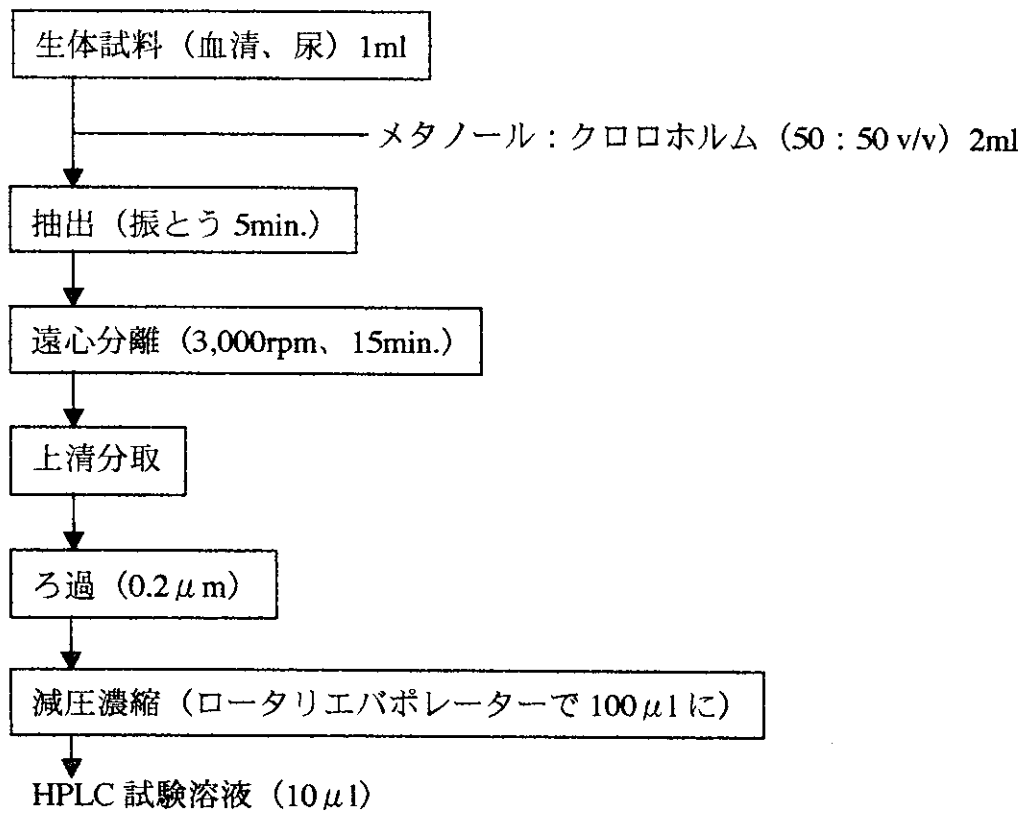
7. 操作法のフローチャート

(1) キノコからの試験溶液の調整



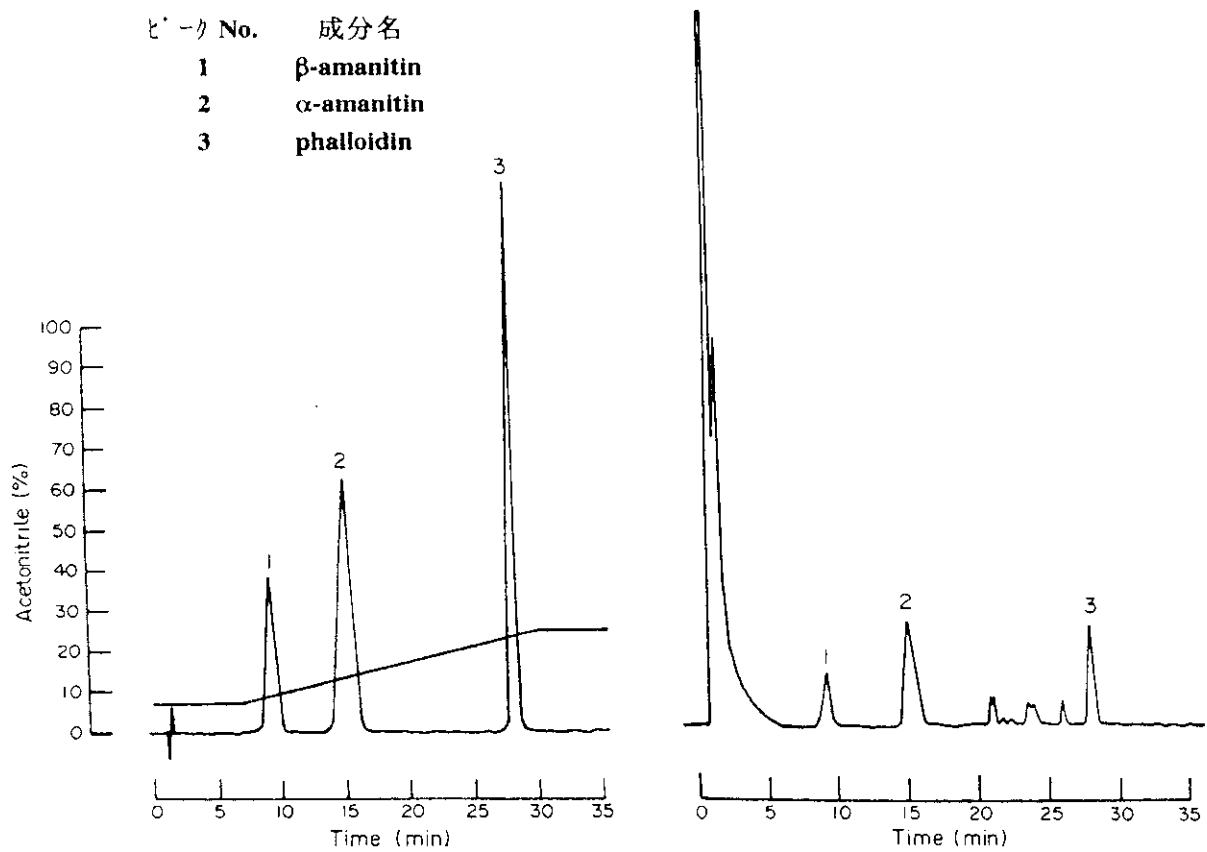
↓
HPLC 試験溶液 (10 μ l)

(2) 生体試料 (血清、尿) からの試験溶液の調整



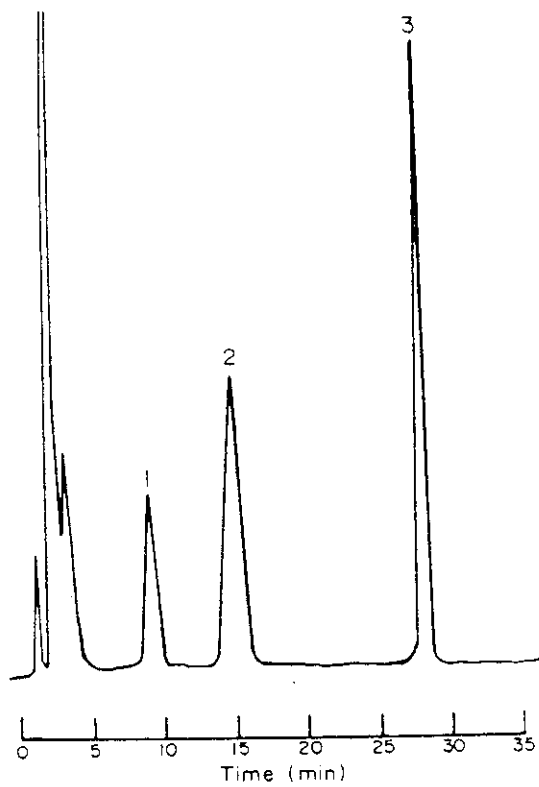
8. α -、 β -アマニチンおよびファロイジンの HPLC クロマトグラム (出典より引用)

ピーク No.	成分名
1	β -amanitin
2	α -amanitin
3	phalloidin

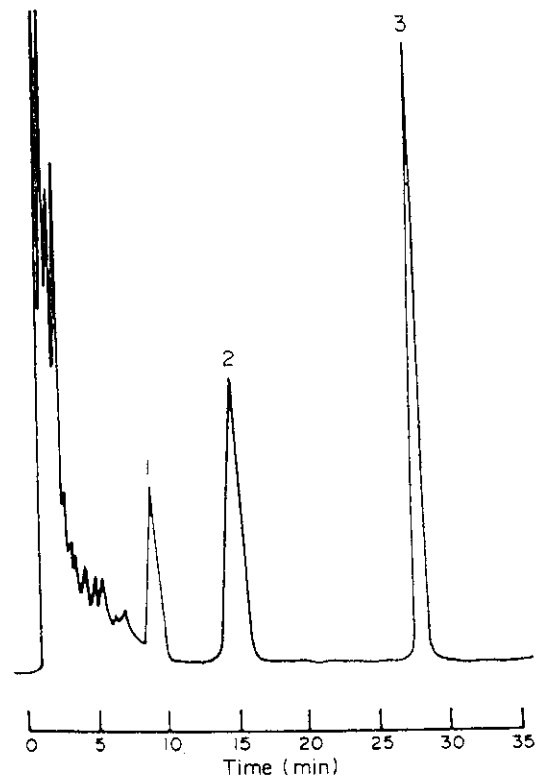


a) 標準溶液

b) キノコ抽出試験溶液

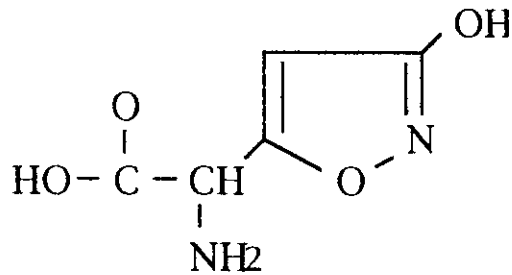


c) 血清添加回収試験溶液

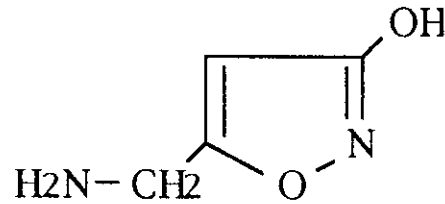


d) 尿添加回収試験溶液

イボテン酸およびムシモール試験法



ibotenic acid



muscimol

1. 装置

高速液体クロマトグラフ（紫外吸光光度計あるいはフォトダイオードアレイ検出器）
上皿天秤：0.01 桁が表示できるもの
ホモジナイザー

2. 試薬・試液

メタノール（高速液体クロマトグラフ用）
アセトニトリル（高速液体クロマトグラフ用）
ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）（試薬特級）
リン酸（試薬特級）

3. 標準品および標準原液

イボテン酸 *Amanita sp.*からの抽出品と合成品あり。95%以上
ムシモール

4. 試験溶液の調整

a 凍結乾燥キノコ

試料 2g を量り採り、これに 75%メタノール 70ml を加え、5 分間ホモジナイズした後、ろ紙でろ過する。ろ液を 75%メタノールで 100ml に定容し、0.45 μm のメンブランフィルターでろ過し、これを試験溶液とする。

b 新鮮キノコ

試料 25g を量り採り、これにメタノール 50ml を加え、5 分間ホモジナイズした後、ろ紙でろ過する。ろ液をメタノールで 100ml に定容し、0.45 μm のメンブランフィルターでろ過し、これを試験溶液とする。

5. 操作法

a 定性試験

下記操作条件で、高速液体クロマトグラフィーを行い、試験溶液のクロマトグラム
のピーク検出時間と標準品のピークの検出時間を比較する。フォトダイオードアレイ

検出器を用いた場合は、さらにピークのスペクトルを比較する。

操作条件

カラム 内径 4.0mm、長さ 250mm のステンレス管に粒径 5 μ m のオクタデシルシリル化シリカゲルを充填したもの。

カラム温度 45 $^{\circ}$ C

検出器 紫外吸光光度計（測定波長 210nm）あるいはフォトダイオードアレイ検出器（測定波長 195-350nm）

移動相 2.1mMSDS、4mM リン酸溶液（pH2.2）：アセトニトリル：メタノール
= 65 : 20 : 15

移動相流量 0.6ml/分

b 定量試験

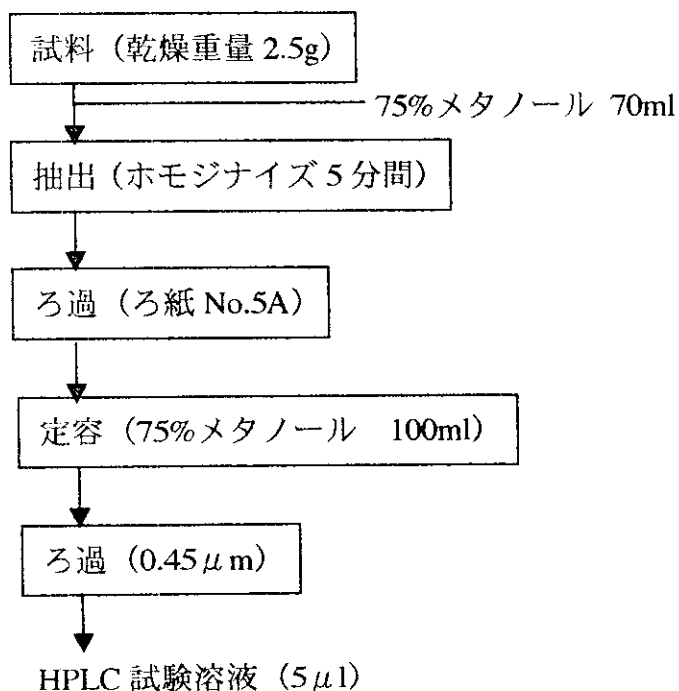
a 定性試験と同様の操作条件で得られた試験結果に基づき、ピーク高またはピーク面積法により定量を行う。

6. 出典

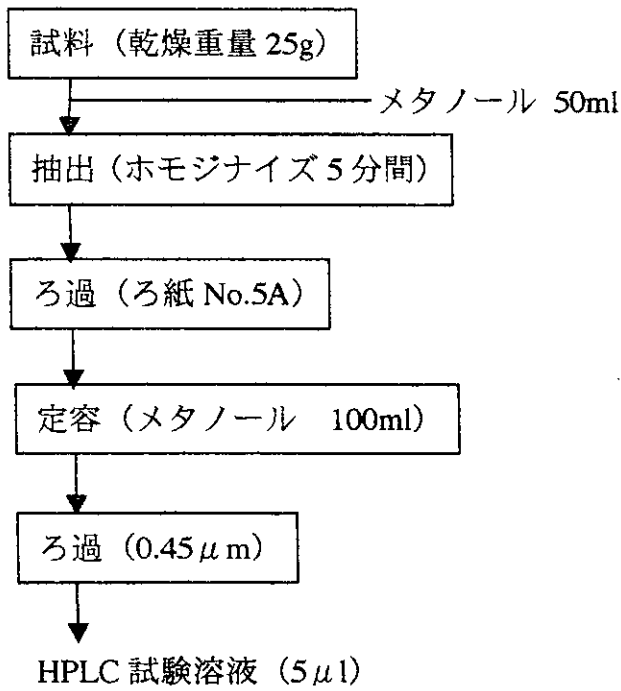
Tsunoda, K., Inoue, N., Aoyagi, Y. and Sugahara, T., 食衛誌. 34, 12-17 (1993).

7. 操作法のフローチャート

(1)乾燥キノコからの試験溶液の調整

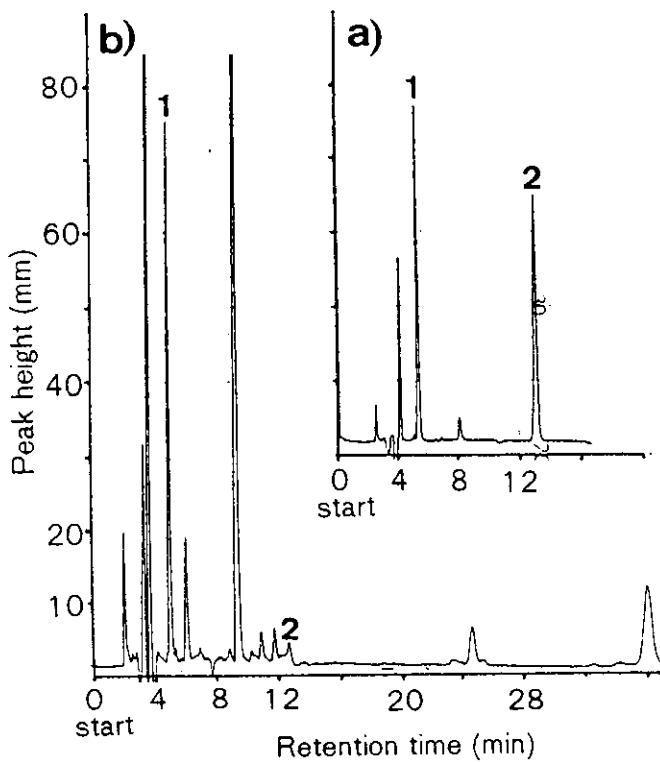


(2)新鮮キノコからの試験溶液の調整

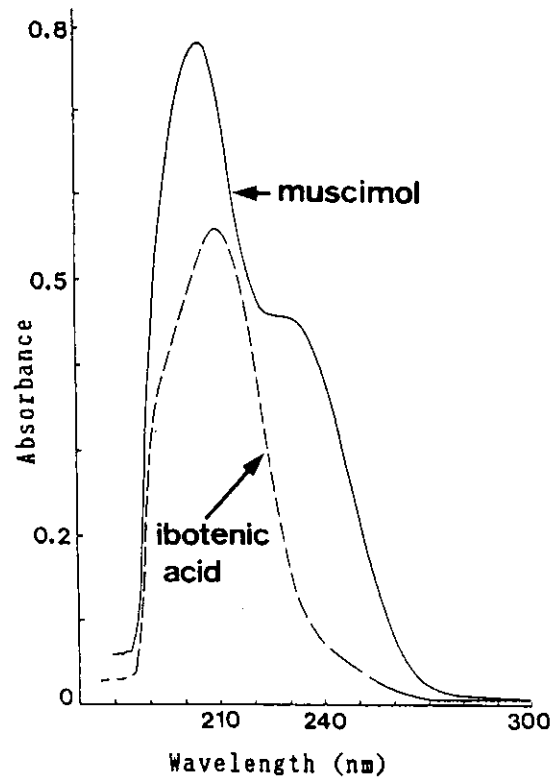


8. イボテン酸およびムシモールの HPLC クロマトグラムおよびスペクトル (出典から引用)

ピーク No.	成分名
1	ibotenic acid
2	muscimol

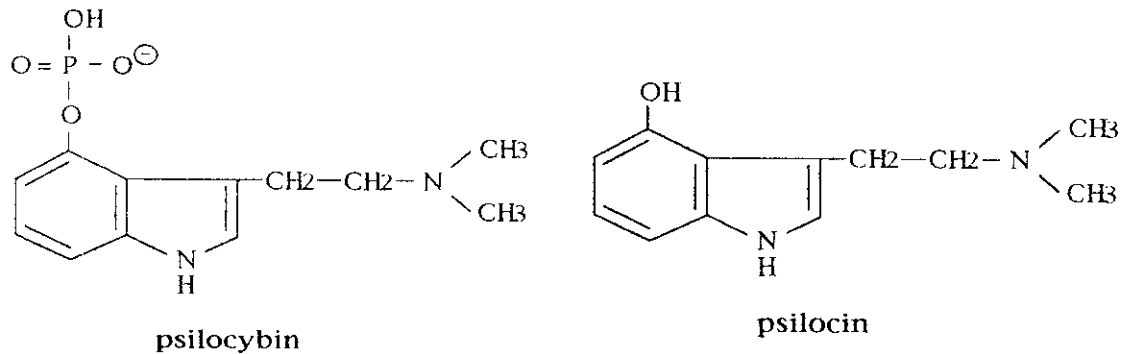


a)標準品および b)キノコ抽出試験溶液



イボテン酸およびムシモールのスペクトル

プシロシビンおよびプシロシン試験法



1. 器具・装置

高速液体クロマトグラフ（フォトダイオードアレイ検出器）
上皿天秤：0.01 桁が表示できるもの
超音波発生装置
ロータリーエバポレーター

2. 試薬・試液

メタノール（高速液体クロマトグラフ用）
酢酸アンモニウム（試薬特級）
アンモニア水（試薬特級）

3. 標準品

プシロシンのみ市販されているが、輸入規制対象品のため入手困難。ただし、プシロシンの標準溶液（100 μ g/ml）が入手可能（要輸出承認）。

4. 試験溶液の調整

凍結乾燥したキノコを乳鉢で粉砕し、250 μ m のふるいを通す。これを約 20mg 量り採り、2ml のメタノールを加え、超音波発生装置で 15 分間抽出する。抽出液をろ過（ろ紙 No.2）し、約 400 μ l にまで減圧濃縮する。必要であればこの濃縮液を 0.2 μ m のメンブランフィルターでろ過し、これを試験溶液とする。

5. 操作法

a 定性試験

下記操作条件で、高速液体クロマトグラフィーを行い、試験溶液のクロマトグラムのピーク検出時間と標準品（プシロシンのみ）のピーク検出時間を比較する。フォトダイオードアレイ検出器を用いた場合は、さらにピークのスペクトルを比較する。

操作条件

カラム 内径 4.6mm、長さ 250mm のステンレス管に粒径 5 μ m のオクタデシルシリル化シリカゲルを充填したもの（Spherisorb 5- μ m ODS-1（ウォーターズ））と同等

品)

カラム温度 室温

検出器 フォトダイオードアレイ検出器 (測定波長 230-350nm、モニター波長 269nm)

移動相 A液 0.3M 酢酸アンモニウム溶液 (アンモニア水で pH8 に調整)

B液 0.3M 酢酸アンモニウム添加メタノール

グラジエント条件 0-2分 (A液 100%) → 2-14分 (A液 100% → 5%)

移動相流量 2.0ml/分

b 定量試験 (プシロシンのみ)

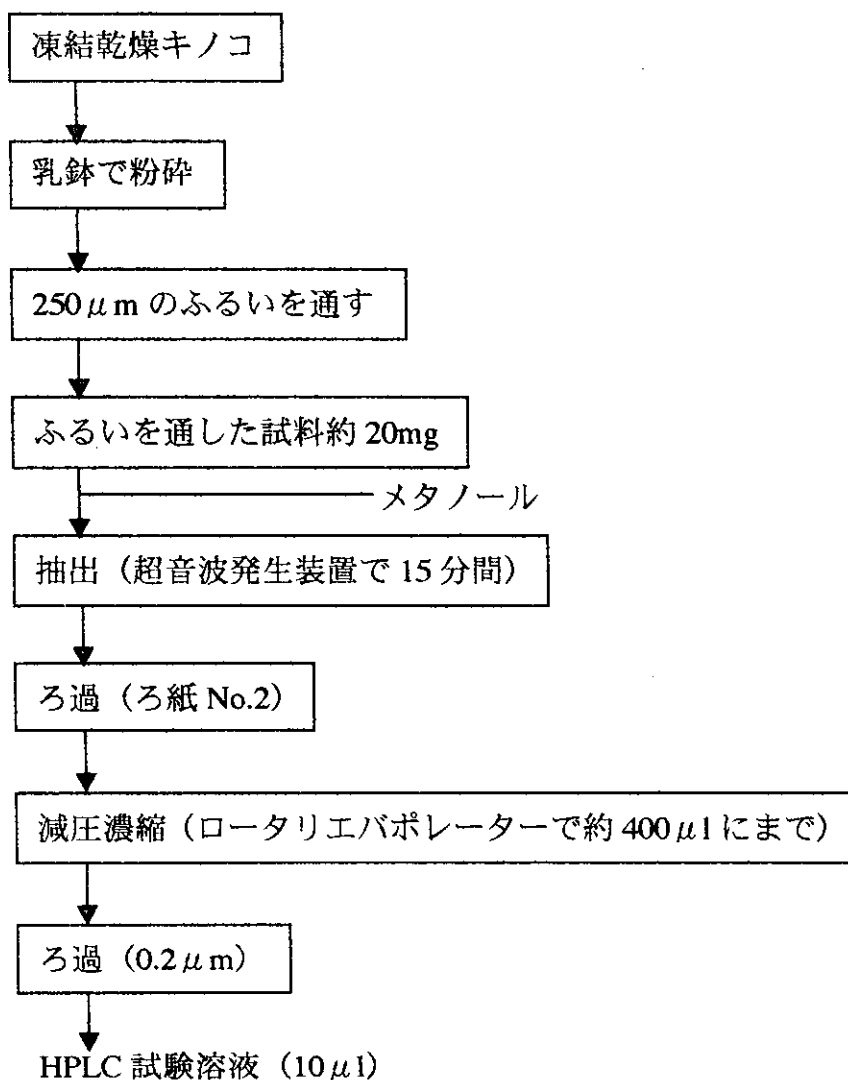
a 定性試験と同様の操作条件で得られた試験結果に基づき、ピーク高またはピーク面積法により定量を行う。

6. 出典

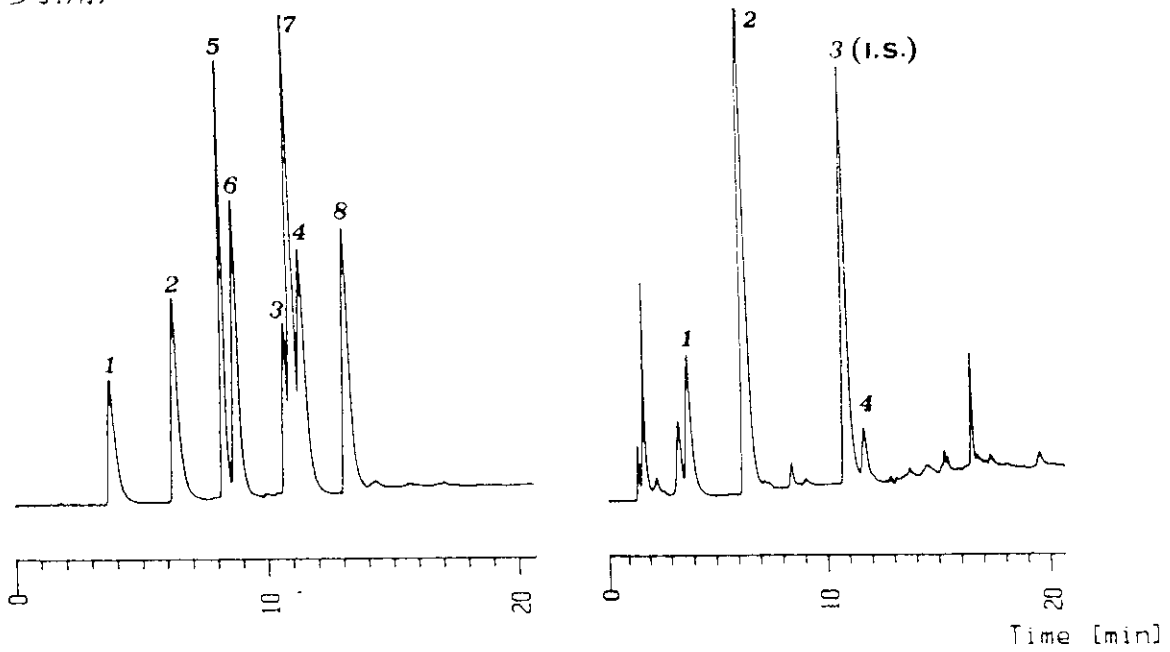
Borner, S. and Brenneisen, R., *J. Chromatogr.* 408, 402-408 (1987).

Wurst, M., Semerdzieva, M. and Vokoun, J., *J. Chromatogr.* 286, 229-235 (1984).

7. 操作のフローチャート



8. プシロシビンおよびプシロシンの HPLC クロマトグラムおよびスペクトル (出典から引用)

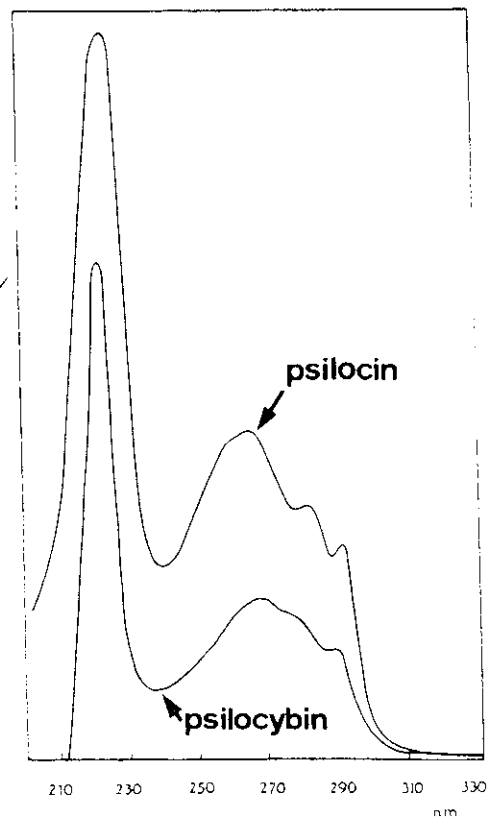


a) トリプタミン誘導体標準溶液

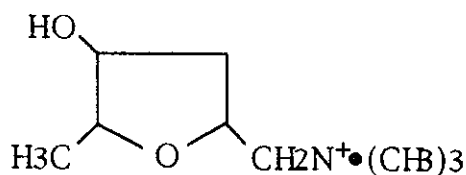
b) キノコ抽出試験溶液

ピーク No.	成分名
1	baeocystin
2	psilocybin
3	bufotenin (I.S.)
4	psilocin
5	serotonin
6	4-hydroxytryptamine
7	tryptamine
8	dimethyltryptamine

プシロシビンおよびプシロシンのスペクトル



ムスカリン試験法



muscarine

1. 器具・装置

ガスクロマトグラフ（窒素・リン検出器（NPD）、注入口に石英ウールを 20mm 詰めたガラスインサートを装着）

上皿天秤：0.01 桁が表示できるもの

ウォーターバス

ロータリーエバポレーター

2. 試薬・試液

メタノール（試薬特級）

エタノール（試薬特級）

無水硫酸ナトリウム（試薬特級）

3. 標準品

ムスカリンクロライド（試薬特級）

（標準溶液は、ムスカリンクロライド 1.00mg を正確にはかり、エタノール 10ml に溶解する。この溶液 1ml は、ムスカリン 0.0831mg を含有する。）

4. 試験溶液の調整

(1)キノコからの試験溶液の調整

a 抽出法

キノコ 10g を細切し、100ml の共栓付三角フラスコに採る。これに精製水 50ml を加え、簡易冷却管を付け 30 分間沸騰水浴上で加熱する。冷却後 No.2 のろ紙でろ過し、ろ液の pH が中性であることを確認し、抽出溶液とした。

b 精製法

Sep Pak C18 ミニカラムはあらかじめメタノール 10ml および精製水 20ml で洗浄する。次いで a 抽出法で得られた抽出溶液 5ml をミニカラムに負荷し、流出液は捨てる。続いて精製水 15ml で洗浄する。さらに、メタノール 5ml をカラムに注入し、溶出液を減圧乾固する。残渣をエタノール 1ml に溶解後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、これを試験溶液とする。

(2)生体試料（尿および血清）からの試験溶液の調整

a 尿

尿 10ml にエタノール 20ml を加え、80℃で減圧乾固し、残渣をエタノール 1ml に溶解する。この液を無水硫酸ナトリウムで脱水後、0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過し、これを試験溶液とする。

b 血清

血清 1ml にエタノール 20ml を加え混和後 10,000rpm で 10 分間遠心分離し、上清を 80℃で減圧乾固し、残渣をエタノール 1ml に溶解する。この液を無水硫酸ナトリウムで脱水後、0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過し、これを試験溶液とする。

5. 操作法

a 定性試験

下記操作条件で、ガスクロマトグラフィーを行い、試験溶液のクロマトグラムピーク検出時間と標準品のピーク検出時間を比較する。

操作条件

カラム 内径 0.25mm、長さ 15m のケイ酸ガラス製の細管に、(5%フェニル)-メチルポリシロキサンを 0.25 μ m の厚さでコーティングしたもの (DB-5 (ϕ 0.25mm \times 15m, 0.25 μ m, GL サイエンス) と同等品)。

注入口温度 320℃

オープン温度 80℃ (2分) - 5℃/分 - 150℃ - 30℃/分 - 260℃

検出器温度 280℃

カラム流量 He, 65 kPa

注入量 1 μ l (スプリットレス)

検出器 NPD

b 定量試験

a 定性試験と同様の操作条件で得られた試験結果に基づき、ピーク面積法により定量を行う。

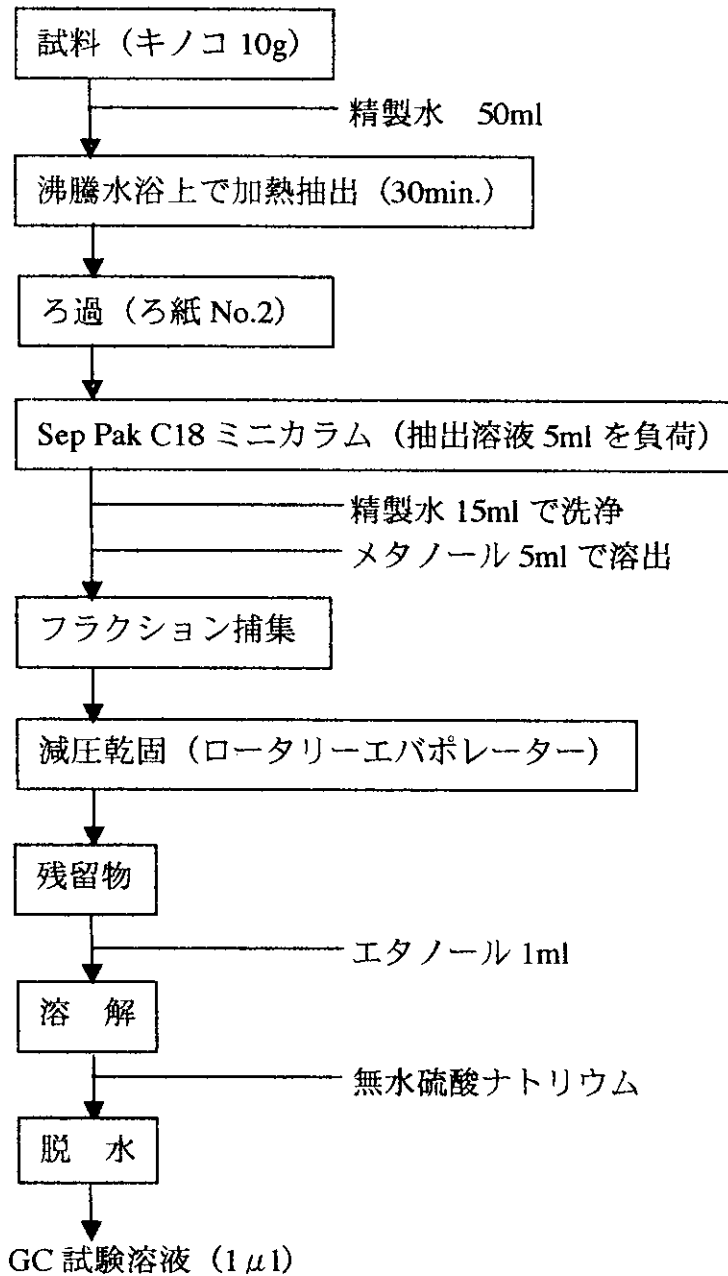
定量下限はムスカリン標準液として 1ppm である。

6. 出典

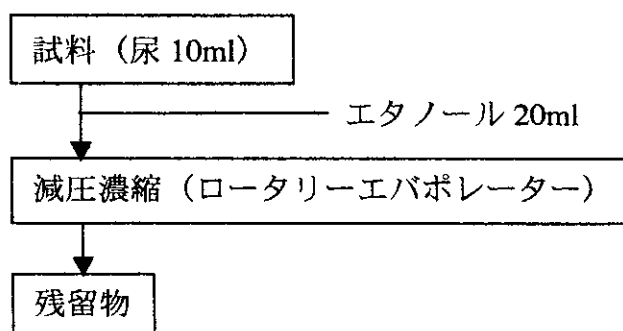
岡山明子・田原俊一郎・氏家英司・田中健・青木喜也・佐々木美智子, 奈良県衛生研究所年報, 30, 71-74 (1995).

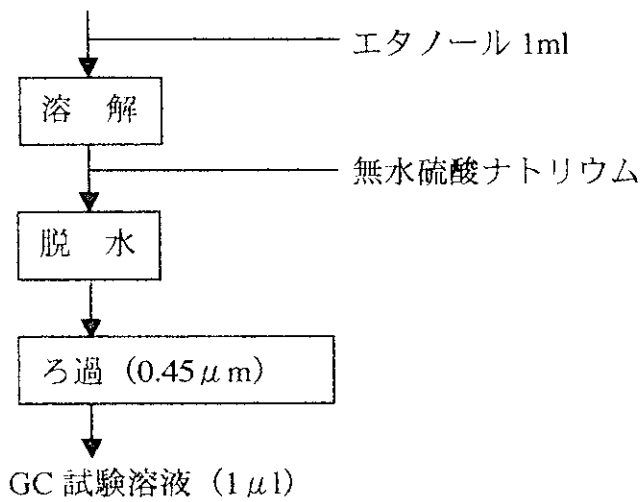
7. 操作法のフローチャート

(1)キノコからの試験溶液の調整

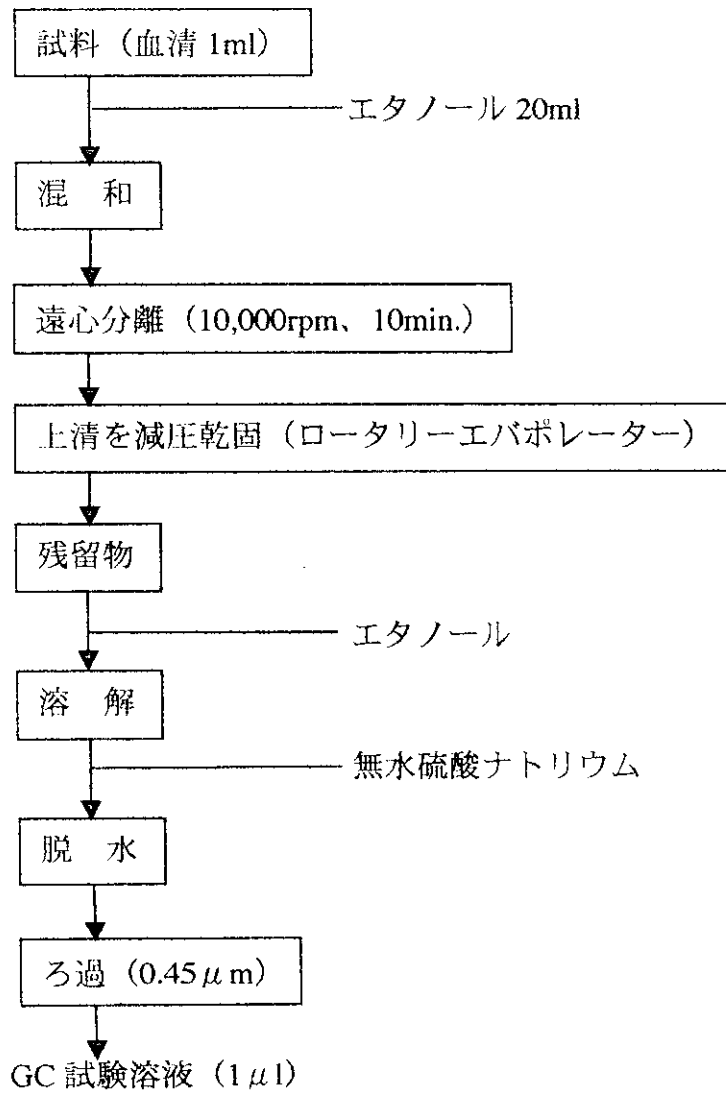


(2)-a 尿からの試験溶液の調整

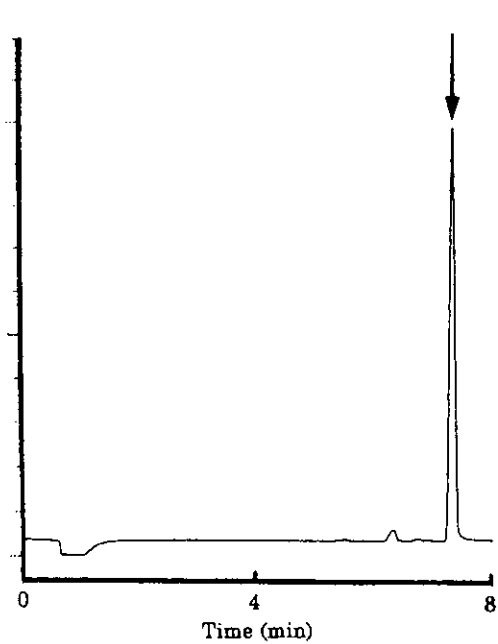




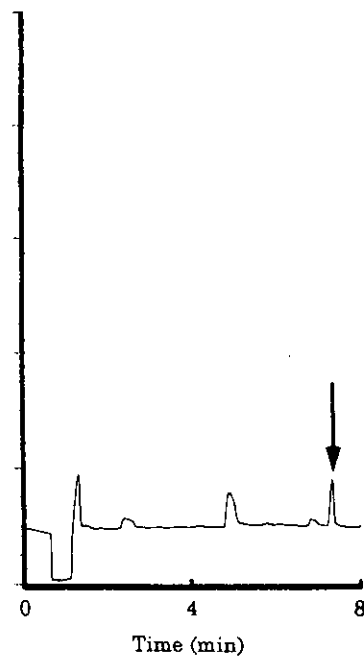
(2) -b 血清からの試験溶液の調整



8. ムスカリンの注入口熱分解 GC-NPD クロマトグラム (出典から引用)

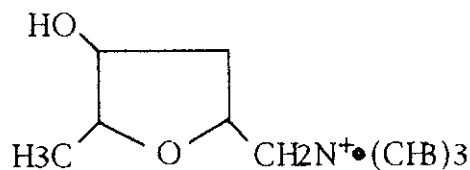


a) 標準溶液



b) キノコ抽出試験溶液

ムスカリン試験法



muscarine

1. 器具・装置

ガスクロマトグラフ（窒素・リン検出器（NPD）、注入口に石英ウールを 20mm 詰めたガラスインサートを装着）

上皿天秤：0.01 桁が表示できるもの

ウォーターバス

ロータリーエバポレーター

2. 試薬・試液

メタノール（試薬特級）

エタノール（試薬特級）

無水硫酸ナトリウム（試薬特級）

3. 標準品

ムスカリンクロライド（試薬特級）

（標準溶液は、ムスカリンクロライド 1.00mg を正確にはかり、エタノール 10ml に溶解する。この溶液 1ml は、ムスカリン 0.0831mg を含有する。）

4. 試験溶液の調整

(1)キノコからの試験溶液の調整

a 抽出法

キノコ 10g を細切し、100ml の共栓付三角フラスコに採る。これに精製水 50ml を加え、簡易冷却管を付け 30 分間沸騰水浴上で加熱する。冷却後 No.2 のろ紙でろ過し、ろ液の pH が中性であることを確認し、抽出溶液とした。

b 精製法

Sep Pak C18 ミニカラムはあらかじめメタノール 10ml および精製水 20ml で洗浄する。次いで a 抽出法で得られた抽出溶液 5ml をミニカラムに負荷し、流出液は捨てる。続いて精製水 15ml で洗浄する。さらに、メタノール 5ml をカラムに注入し、溶出液を減圧乾固する。残渣をエタノール 1ml に溶解後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、これを試験溶液とする。

(2)生体試料（尿および血清）からの試験溶液の調整

a 尿

尿 10ml にエタノール 20ml を加え、80℃で減圧乾固し、残渣をエタノール 1ml に溶解する。この液を無水硫酸ナトリウムで脱水後、0.45 μm のメンブランフィルターでろ過し、これを試験溶液とする。

b 血清

血清 1ml にエタノール 20ml を加え混和後 10,000rpm で 10 分間遠心分離し、上清を 80℃で減圧乾固し、残渣をエタノール 1ml に溶解する。この液を無水硫酸ナトリウムで脱水後、0.45 μm のメンブランフィルターでろ過し、これを試験溶液とする。

5. 操作法

a 定性試験

下記操作条件で、ガスクロマトグラフィーを行い、試験溶液のクロマトグラムのピーク検出時間と標準品のピーク検出時間を比較する。

操作条件

カラム 内径 0.25mm、長さ 15m のケイ酸ガラス製の細管に、(5%フェニル) -メチルポリシロキサンを 0.25 μm の厚さでコーティングしたもの (DB-5 (ϕ 0.25mm \times 15m, 0.25 μm , GLサイエンス) と同等品)。

注入口温度 320℃

オープン温度 80℃ (2分) - 5℃/分 - 150℃ - 30℃/分 - 260℃

検出器温度 280℃

カラム流量 He, 65 kPa

注入量 1 μl (スプリットレス)

検出器 NPD

b 定量試験

a 定性試験と同様の操作条件で得られた試験結果に基づき、ピーク面積法により定量を行う。

6. 出典

岡山明子・田原俊一郎・氏家英司・田中健・青木喜也・佐々木美智子, 奈良県衛生研究所年報, 30, 71-74 (1995).