

「穀類中のジアセトキシシルペノール試験法」
実態調査班用（平成28年9月改定）

操作手順

1. 抽出

- ① DASブランク小麦25gを正確に抽出用容器に量り採る。
- ② DAS01～06の添加溶液を200 μ Lとり、それぞれの番号に対応する試料に添加して、暗所に1時間放置する。
- ③ 抽出溶媒アセトニトリル：水（85：15）を100mL加え、30分間振とう抽出する。
- ④ 遠心分離（3000 g、10分間）し、上清を抽出溶液とする。

2. 多機能カラムによる精製

- ① 多機能ミニカラムをカラム架台にセットする。「1.」の操作で得られた抽出液約10mLを入れ、最初の流出液3mLは捨て、次いで流出する2.4mLを共栓付き試験管に採り、溶出液とする。
- ② 溶出液2.0mLを別の共栓付き試験管に正確にとり、窒素気流を用いて乾固する。残さにアセトニトリル：水（1：9）0.5mLを加え、試験管ミキサー等で完全に溶解する。孔径0.2 μ m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10,000rpm 以上で5 分間遠心し、その上清をLC-MS/MS用試験溶液とする。HPLC用のバイアルは、ポリプロピレン製のものを用いる。なお、サンプルNo. 3と4については、LC-MS/MS用試験溶液100 μ Lに10%アセトニトリル試験溶液900 μ Lを加えて良く混合した10倍希釈の溶液も調製し、同時に測定を行う。

3. 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：InertSustain C18 2.1 \times 150mm, 3 μ m（配布済み）

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：A溶媒 2mM 酢酸アンモニウム

B溶媒 メタノール

分離条件： 0分 A：B = 80：20

8分 A：B = 10：90 12分まで維持

流速：0.2mL/分

注入量：10 μ L

MS

イオン化：ESI

モニターイオン：各機関で以下の定量限界目標値を満たすイオンを選択する

定量限界目標値：1 μ g/L（標準溶液の濃度）

4. 検量線について

配布済みのジアセトキシシルペノール（DAS）標準液（10mg/L）100 μ Lを取り、アセトニトリル900 μ Lを加え、DAS標準液Ⅱ（1mg/L）を作成する。さらにDAS標準液Ⅱ100 μ Lを取り、アセトニトリル900 μ Lを加え、DAS標準液Ⅲ（100 μ g/L）を作成する。さらにDAS標準液Ⅲ100 μ Lを取り、アセトニトリル900 μ Lを加え、DAS標準液Ⅳ（10 μ g/L）を作成する。

No.	1	2	3	4	5	6	7
DAS終濃度(μ g/L)	1	2	5	10	20	50	100
標準液Ⅱ(μ L)						50	100
標準液Ⅲ(μ L)			50	100	200		
標準液Ⅳ(μ L)	100	200					

窒素気流で乾固した後、残さにアセトニトリル：水（1：9）1mL（試験溶液と量が異なるので気を付けてください）を加え、試験管ミキサー等で完全に溶解する。孔径0.2 μ m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、その上清を検量線用標準液とする。検量線の重みづけについては、相関係数が1に近づくよう各機関で調整する。

③定量限界値（LOD）と検出限界値（LOQ）の算出方法について

検量線用溶液を測定した場合のシグナル／ノイズ比（S/N）=3をLOD、S/N=10をLOQとして、結果報告用フォーマットに記載してください。

以上