

2) 検量線

各メーカーの標準品から調製した標準溶液 (0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10 ng/mL) を LC-MS/MS で測定し、得られたピーク面積で作成した検量線を図 2、3 に示す。

いずれの検量線も、 $r^2 \geq 0.9999$ と直線性は良好であった。

Compound name: 1170.4 > 1126
Correlation coefficient: $r = 0.999999$, $r^2 = 0.999999$
Calibration curve: $14319.7 * x + 5.40163$
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None

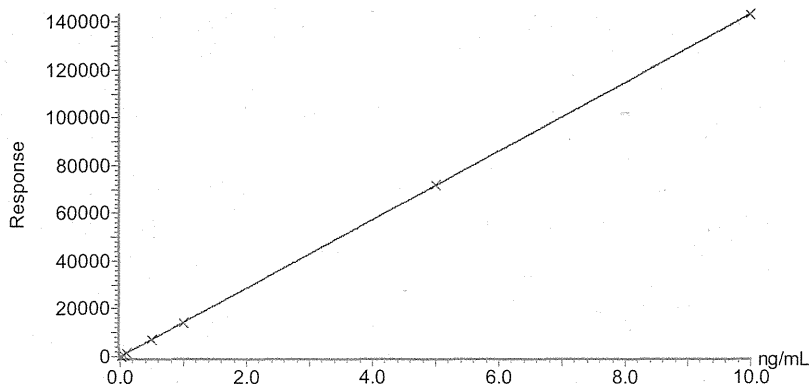


図 2 和光純薬工業社の標準品で調製した 0.01 ng/mL から 10 ng/mL の標準溶液を LC-MS/MS で測定し作成した検量線
 m/z 1170.4→1126.0

Compound name: 1170.4 > 1126
Correlation coefficient: $r = 0.999991$, $r^2 = 0.999981$
Calibration curve: $12178.2 * x + 102.231$
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None

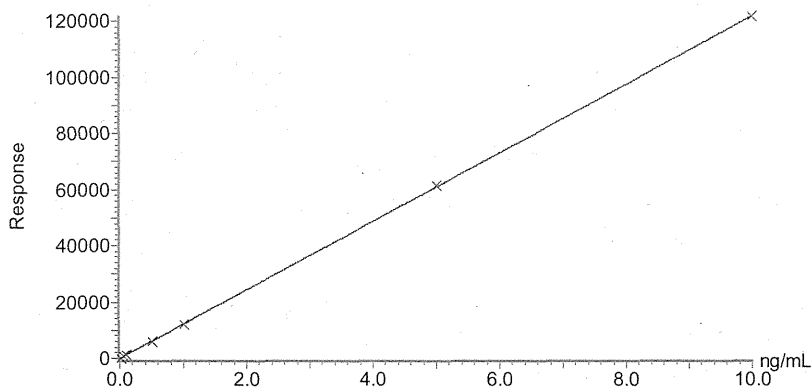


図 3 林純薬工業社の標準品で調製した 0.01 ng/mL から 10 ng/mL の標準溶液を LC-MS/MS で測定し作成した検量線
 m/z 1170.4→1126.0

3) ピーク面積

各メーカーの標準品から調製した標準溶液を測定して得られたピーク面積を表2に示す。
林純薬工業社の標準品から得たピーク面積と比較して、和光純薬工業社の標準品から得たピーク面積の方がおおむね15%程度大きかった。

表2 各メーカーの標準品から調製した標準溶液を測定して得られたピーク面積値とその比

標準溶液濃度 (ng/mL)	m/z 1170.4→1126.0 のピーク面積		m/z 1170.4→1126.0 のピーク面積比
	和光純薬工業	林純薬工業	和光純薬工業/林純薬工業
10	143232.484	123730.75	1.16
1	14379.866	12512.37	1.15
0.1	1434.721	1269.771	1.13
0.01	145.066	126.496	1.15

3. セレウス菌嘔吐毒素 (セレウリド) の試験法 [ステージ2] (案) の添加回収試験

セレウス菌嘔吐毒素 (セレウリド) の試験法 [ステージ2] (案) の試験法に則り、添加回収試験を実施した。

1) 材料、試薬、機器

- ・セレウリド標準品：和光純薬工業社 50 µg/mL メタノール溶液 500 µL
- ・パックライス：佐藤食品工業社 サトウのごはん
- ・メタノール：和光純薬工業社 特級
関東化学社 LC/MS 用
- ・ホモジナイザー：日本精機製作所 biomixer BM-2
- ・ガラス繊維ろ紙：ADVANTEC 社 GA-200 70 mm
- ・ロータリーエバポレーター：東京理化器械社 NVC-2200
- ・濃縮装置：Caliper Life Sciences 社 Turbo Vap LV
- ・遠心分離機：コクサン社 H-36
- ・吸引マニホールド：ウォーターズ社
- ・ポリマー系カートリッジカラム：ウォーターズ社 OASIS HLB VAC RC 60 mg
- ・メンブレンフィルター：Merck Millipore 社 MILLEX LG 0.20 µm
- ・LC-MS/MS：ウォーターズ社 ACQUITY UPLC、Quattro Premier XE

2) 試験溶液作成方法

① 試料をよく攪拌した。

② 試料 25 g をポリ遠沈管に秤量した。

※ 添加回収試験の場合

メタノールに溶解したセレウリド標準溶液 (125 ng/mL) 1 mL を試料中の複数箇所、ドロップした (5 ng/g 相当)。60 分間暗所室温にて静置した。

③ 試料 25 g に蒸留水 25 mL を加え、ホモジナイザーを用いて 1 分間均質化した。

④ 均質化した試料にメタノール 100 mL を加え、ホモジナイザーで 1 分間攪拌した。攪拌後、遠心分離機を用いて、3,000 rpm で 5 分間遠心分離した。

⑤ 上清を 250 ml メスフラスコにガラス繊維濾紙を用いてろ過して回収し、残留物にメタノールを 50 mL 加え、薬匙にて攪拌した。攪拌後、遠心分離機を用いて、3,000 rpm で 5 分間遠心分離した。

⑥ 上清を、ガラス繊維濾紙を用いてろ過した。ろ液は上記メスフラスコに回収した。残留物にメタノールを 50 mL 加え、薬匙にて攪拌した。攪拌後、遠心分離機を用いて、3,000 rpm で 5 分間遠心分離した。

⑦ 上清を、ガラス繊維濾紙を用いてろ過した。ろ液は上記メスフラスコに回収後、メタノールで 250 mL に定容した。

⑧ ホールピペットを用いて抽出液の 25 mL (ライス実量 2.5 g) を 100 mL ナスフラスコにとり、ロータリーエバポレーターを用いて 40 °C 以下で 1 mL 程度になるまで減圧濃縮した。

⑨ 残留物にメタノール 1 mL を加え溶解液とした。

⑩ メタノール 3 mL、その後 50 %メタノール溶液 3 mL をポリマー系カートリッジカラムに負荷し、カラムを平衡化した。

⑪ ⑨の溶解液をカラムに負荷し、流出液を捨てた。

⑫ 50 %メタノール溶液 3 mL でナス型フラスコ内壁を洗い、カラムに負荷し、流出液を捨てた。

⑬ 70 %メタノール溶液 3 mL でカラムを洗浄し、流出液を捨てた。

⑭ 95 %メタノール溶液 3 mL で溶出させ、溶出液をとった。

⑮ 水浴温度を 50°C に設定した Turbo Vap LV を用いて、溶出液を窒素気流により濃縮凝固した。

⑯ 残留物をメタノール 2 mL に溶解し、メンブランフィルターでろ過し、試験溶液とした。

3) マトリックス添加標準溶液

ブランク試料を用いて 3. 2) ①~⑮まで操作して得られた残留物にセレウリド標準溶液 (6 ng/mL、メタノール溶液) 2 mL を加えて溶解し、メンブランフィルターでろ過した試験溶液をマトリックス添加標準溶液とした。

4) 測定、定量

測定条件は1. 2) の条件を使用した。検量線は0.01、2、4、6、8、10 ng/mLのセレウリド標準溶液を測定して得られたピーク面積から、最小二乗法を用いて作成した。この検量線を用いて、絶対検量線法で定量を行った。検量線例を図4に示す。

Compound name: 1170.4 > 1126
 Correlation coefficient: $r = 0.999927$, $r^2 = 0.999854$
 Calibration curve: $2263.55 * x + 131.169$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None

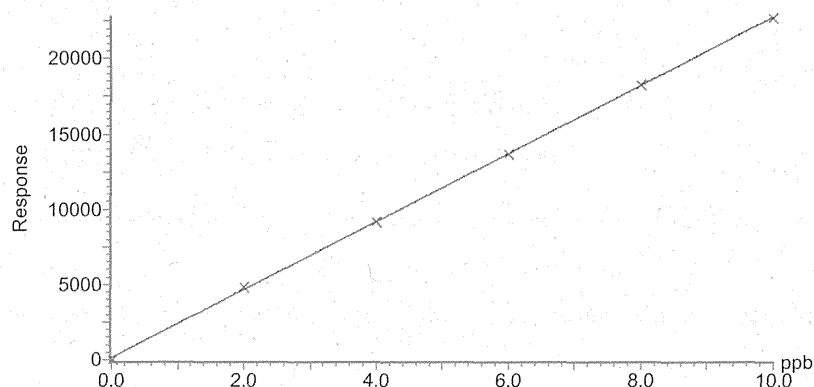


図4 添加回収試験の定量に用いた検量線
 標準溶液濃度：0.01、2、4、6、8、10 ng/mL
 m/z 1170.4→1126.0

5) 添加回収試験結果、試料マトリックスの測定への影響

添加回収試験を分析者1名、n=2で5日間実施した。その結果を表3に示す。また、代表的なクロマトグラムを図5に示す。空白試料のクロマトグラムに定量を妨害するピークは見られなかった。回収率は38.7%～87.1%であり、真度は67.8%であった。一元配置の分散分析による解析を行った結果、併行精度4.0% (RSD)、室内精度27.7% (RSD)であった。マトリックス添加標準溶液のピーク面積を溶媒標準溶液のピーク面積で除した値は0.99であり、顕著なマトリックス効果は確認されなかった。

表3 添加回収試験結果 (添加量 5 ng/g 相当)

	1日目		2日目		3日目		4日目		5日目	
	①	②	①	②	①	②	①	②	①	②
定量値 (ng/g)	4.0851	4.3417	4.2972	4.3560	2.9823	2.8705	3.3398	3.4817	2.2201	1.9329
回収率 (%)	81.7	86.8	85.9	87.1	59.6	57.4	66.8	69.6	44.4	38.7

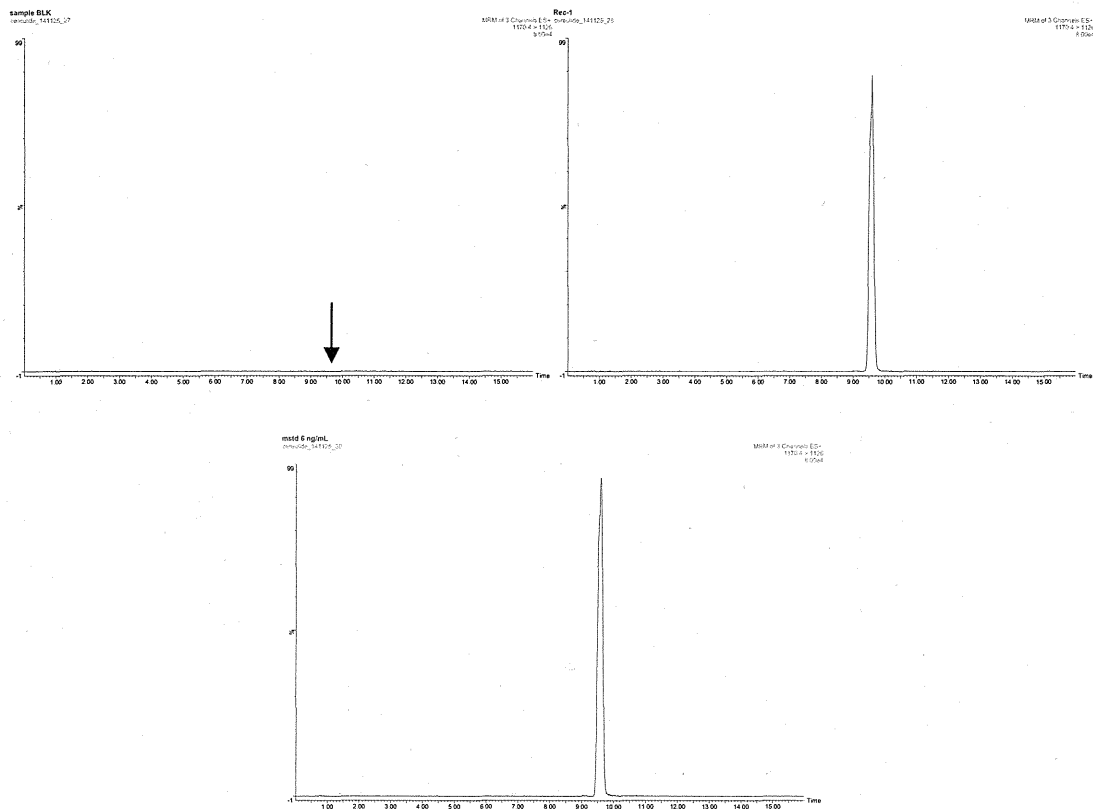


図5 代表的な SRM クロマトグラム
 左上：blank 試料、右上：添加回収試験
 下：マトリックス添加標準溶液 (6 ng/mL)
 m/z 1170.4→1126.0

6) 考察

①LC-MS/MS の測定においては、ピーク形状が若干悪かった。これは内径 2.1 mm のカラムに対して注入量が 10 μL と多いことが一因であると考えられる。注入量を減らす、あるいは注入する試験溶液のメタノール含量を下げるのが対策として考えられた。

②セレウス菌嘔吐毒素 (セレウリド) の試験法 [ステージ 2] (案) の試験法に則り、添加回収試験を実施した結果、室内精度が悪く、回収率は 40 % を下回る結果もあった。不良の原因について、固相抽出の部分に問題があるのではないかと考え、以下に考察した。

濃縮前のメタノール抽出液中には、ろ過で除ききれない微粒子が確認でき、この抽出液を濃縮すると白濁する。白濁した抽出液をミニカラムに負荷するため、カラムのフィルターが目詰まりし、吸引マニホールドを使用してもカラムの通液速度を一定に保つことが難しかった。通液速度が回収率のバラツキの一因ではないかと考えた。

また、エバポレーターで抽出液を 1 mL 程度まで濃縮することとなっているが、実施日ごとに圧力値や濃縮時間が異なることが原因で、毎回同じ液量まで濃縮することが困難であった。試験法では、濃縮した抽出液にメタノール 1 mL 加えてカラムに負荷することになっている。抽出液を濃縮しすぎた場合、メタノールを加えた際に抽出液中のメタノール割合が高くなってしまい、ミニカラムの保持

が弱くなると考えられる。併行精度は比較的良好で、室内精度の RSD が大きいことから、圧力値や濃縮時間の日間差が影響したのではないかと考えた。日間で濃縮条件を同じにすることが困難であることを加味すると、対策としてメタノールを加えてカラムに負荷するのではなく、水を加えてカラムに負荷する方法が有効ではないかと考えた。

以上

セレウリド試験法の検討 報告書

日本食品分析センター

1. 試験方法

「セレウス菌嘔吐毒素(セレウリド)の試験法[ステージ2](案)」に準拠して実施した。

1.1 検体

サトウのごはん 小盛り 150 g

- ・無添加試料：NC(Negative Control)
- ・添加回収(添加濃度 5 ng/g)：N=3(試行回数 3 回)
- ・計 4 検体を試験。

1.2 試薬・器材等

標準品：和光純薬工業製 セレウリド標準溶液(50 μ g/mL、500 μ L アンプル)

メタノール：試薬特級及び LC/MS 用[和光純薬工業製]

ギ酸：LC/MS 用[和光純薬工業製]

ギ酸アンモニウム：試薬特級[和光純薬工業製]

固相カラム：OASIS HLB(充てん量 60mg) [Waters 製]

ガラス繊維ろ紙：GA-55(125 mm) [ADVANTEC 製]

フィルター：MILLEX LG(0.20 μ m) [Merck Millipore 製]

HPLC カラム：Mightysil RP-18 GP(内径 2.0 mm、長さ 50 mm、粒子径 3 μ m) [関東化学製]

1.3 装置

液体クロマトグラフ：Acquity UPLC[Waters 製]

質量分析装置：Xevo TQ[Waters 製]

1.4 検量線

セレウリド標準溶液(50 μ g/mL)を 400 μ L とり、メタノールで 20 mL に定容し 1 μ g/mL の標準原液を作製した。標準原液をメタノールで順次希釈し、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10 ng/mL の検量線作成用標準溶液を作製した。

1.5 測定条件

以下に示す条件にて測定を行った。

<液体クロマトグラフ-質量分析装置測定条件>

機 種 : LC 部 ; Acquity UPLC [Waters 製]

MS 部 ; Xevo TQ [Waters 製]

カ ラ ム : Mightysil RP-18 GP, ϕ 2.0 mm \times 50 mm, 3 μ m [関東化学製]

移 動 相 : A 液 ; 0.1 vol%ギ酸及び 10 mM ギ酸アンモニウム溶液

B 液 ; メタノール

グラジエント : A : B (20 : 80) 0 min

A : B (5 : 95) 2 min \rightarrow 10 min リニアグラジエント

A : B (80 : 20) 10.01 min

A : B (80 : 20) 10.01 min \rightarrow 13 min

A : B (20 : 80) 13.01 min

A : B (20 : 80) 13.01 min \rightarrow 16 min 平衡化

カラム温度 : 50 $^{\circ}$ C

流 量 : 0.2 mL/min

注 入 量 : 5 μ L

キャピラリー電圧 : ESI (+) ; +3000 V

イオン源温度 : 150 $^{\circ}$ C

脱溶媒ガス温度 : 600 $^{\circ}$ C

コーンガス流量 : 窒素 50 L/Hr

脱溶媒ガス流量 : 窒素 1200 L/Hr

コリジョンガス : アルゴン、0.15 mL/min

設定質量数等 : 表-1

表-1

プリカーサーイオン (m/z)	フラグメントイオン (m/z)	コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
1171	1126	50	40
1171	172	50	70
1171	357	50	70
1171	314	50	70

2. 結果及び考察

2.1 マススペクトル

本試験に用いた装置でのマススペクトルを図1~5に示す。

m/z 1171→1126 を定量イオン、 m/z 1171→172、 m/z 1171→357 及び m/z 1171→314 を確認イオンとした。

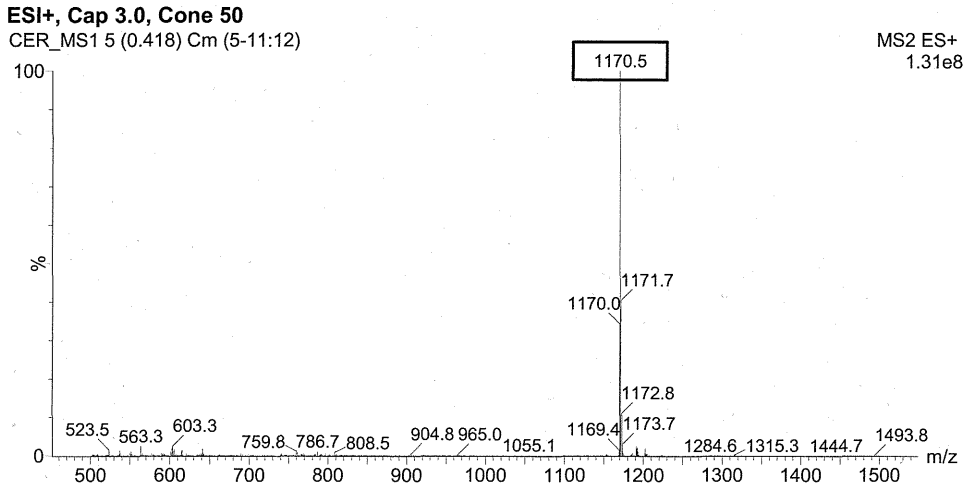


図-1 セレウリドのマススペクトル

(スキャン範囲 m/z 500~1500、コーン電圧 50 V)

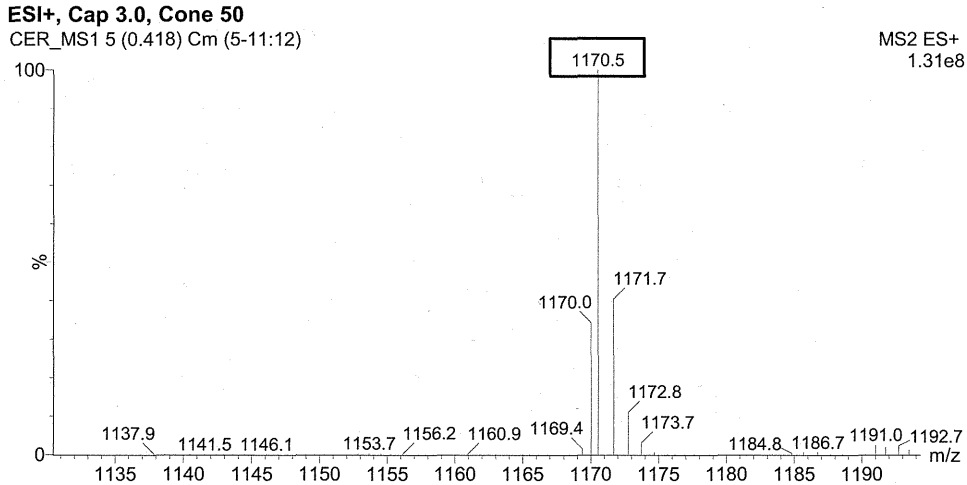


図-2 セレウリドのマススペクトル(拡大表示)

ESI+, Cap 3.0, Cone 50, Coll 40
 CER_MSMS2 4 (0.334) Cm (4:5)

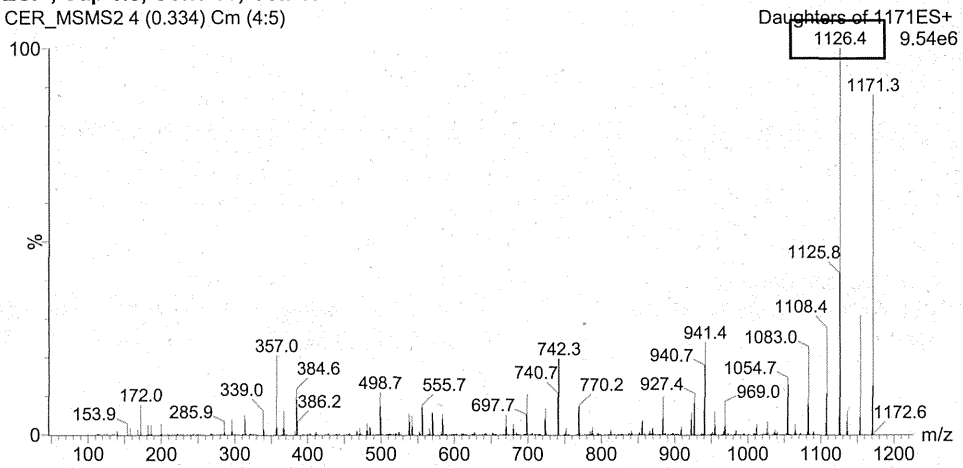


図-3 プリカーサーイオン m/z 1171 のプロダクトイオンスペクトル
 (スキャン範囲 m/z 100~1200、コリジョンエネルギー 40 eV)

ESI+, Cap 3.0, Cone 50, Coll 70
 CER_MSMS3 2 (0.167) Cm (2:3)

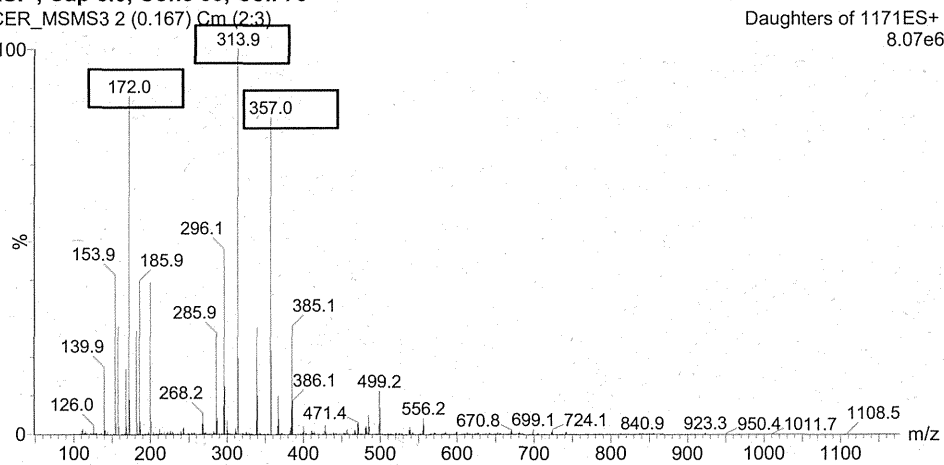


図-4 プリカーサーイオン m/z 1171 のプロダクトイオンスペクトル
 (スキャン範囲 m/z 100~1200、コリジョンエネルギー 70 eV)

ESI+, Cap 3.0, Cone 50, Coll 70
 CER_MSMS3 2 (0.167) Cm (2:3)

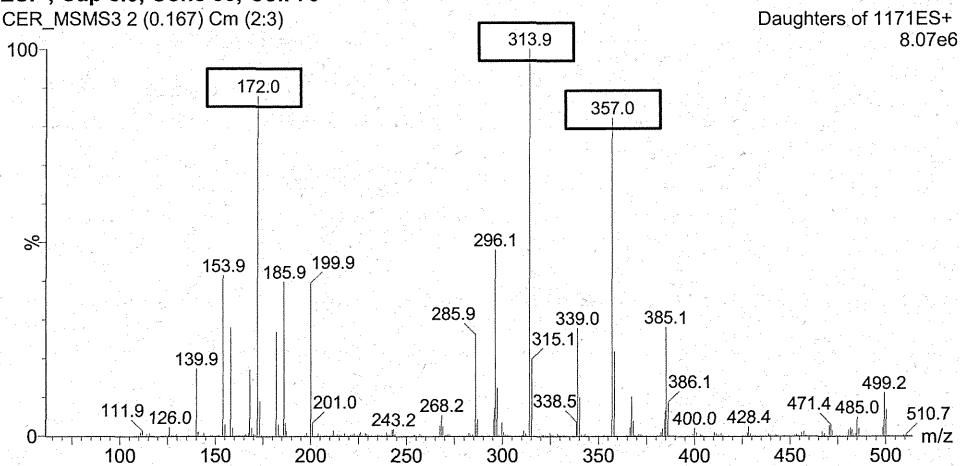


図-5 プリカーサーイオン m/z 1171 のプロダクトイオンスペクトル(拡大表示)

2.2 検量線

試験に用いた装置では、0.01 及び 0.02 ng/mL の標準溶液は感度不足によりピーク検出が困難であった。なお、注入量 10 μ L とした場合にピーク形状が崩れたため、注入量を 5 μ L とした。

10 μ L 注入時のクロマトグラム例を図-6 に、5 μ L 注入時のクロマトグラム例を図-7 に示した。

検量線は 0.05~10 ng/mL の濃度範囲で良好な直線性が得られた。設定質量数ごとの検量線を図-8~11 に示した。

本装置では、試験溶液の溶媒組成を移動相初期組成に合わせることで 10 μ L 注入時のピーク形状の崩れは改善すると予想された。

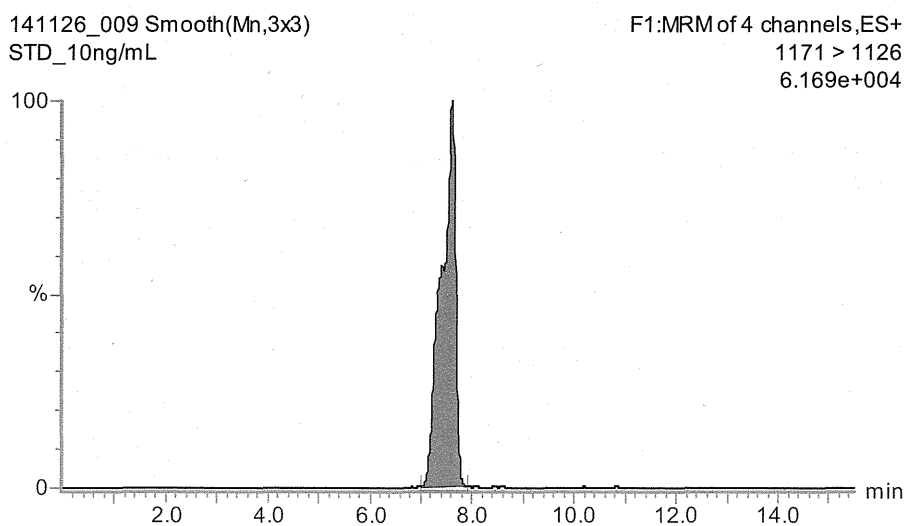


図-6 10 μ L 注入時のクロマトグラム例(標準溶液 10 ng/mL)

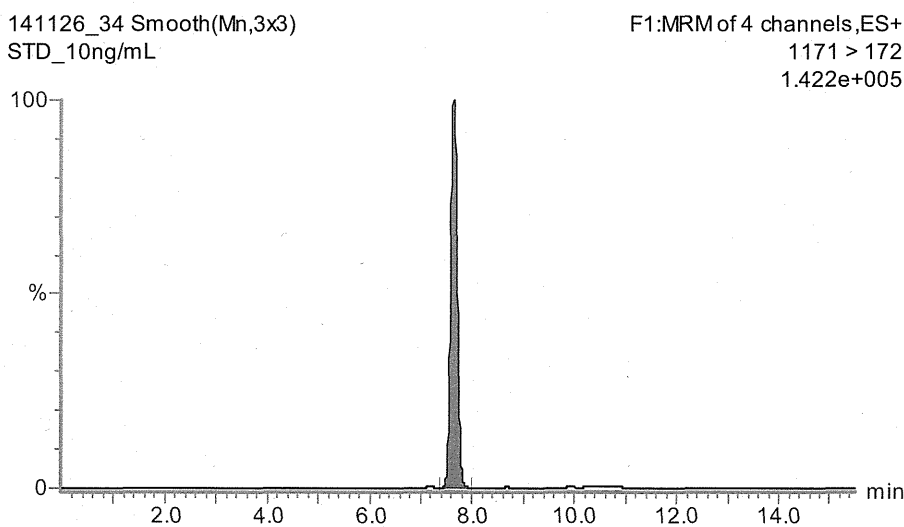


図-7 5 μ L 注入時のクロマトグラム例(標準溶液 10 ng/mL)

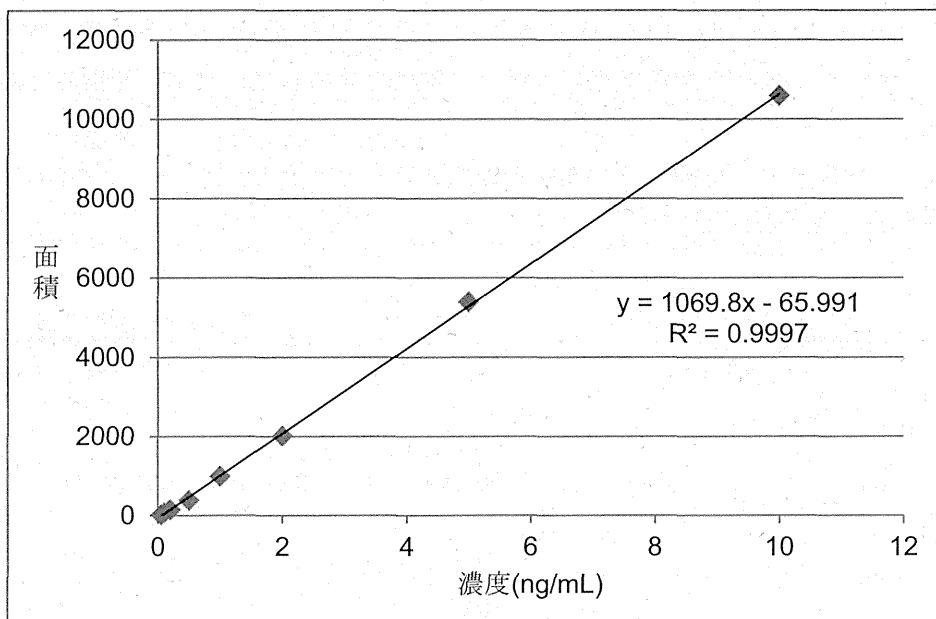


図-8 検量線 (m/z 1171→1126)

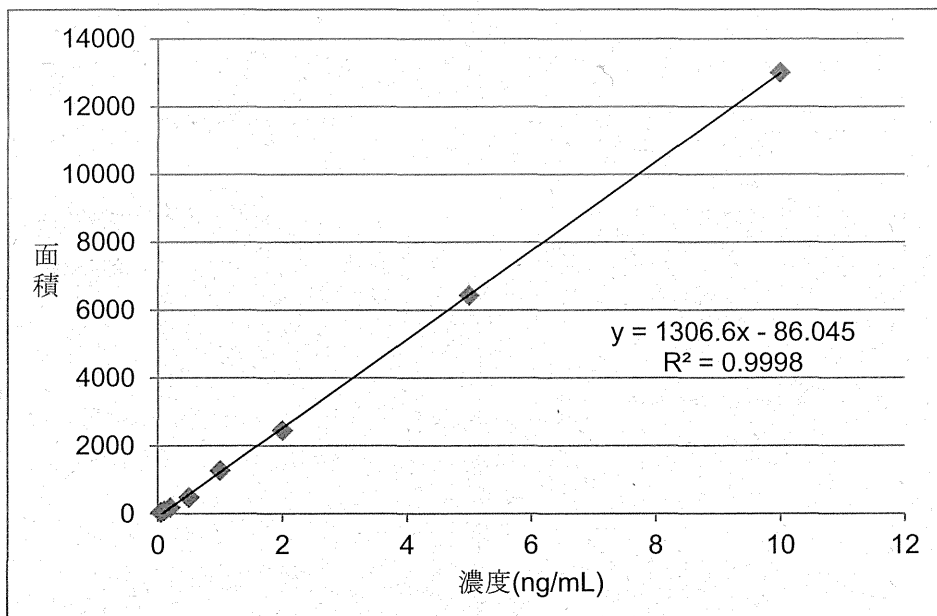


図-9 検量線 (m/z 1171→357)

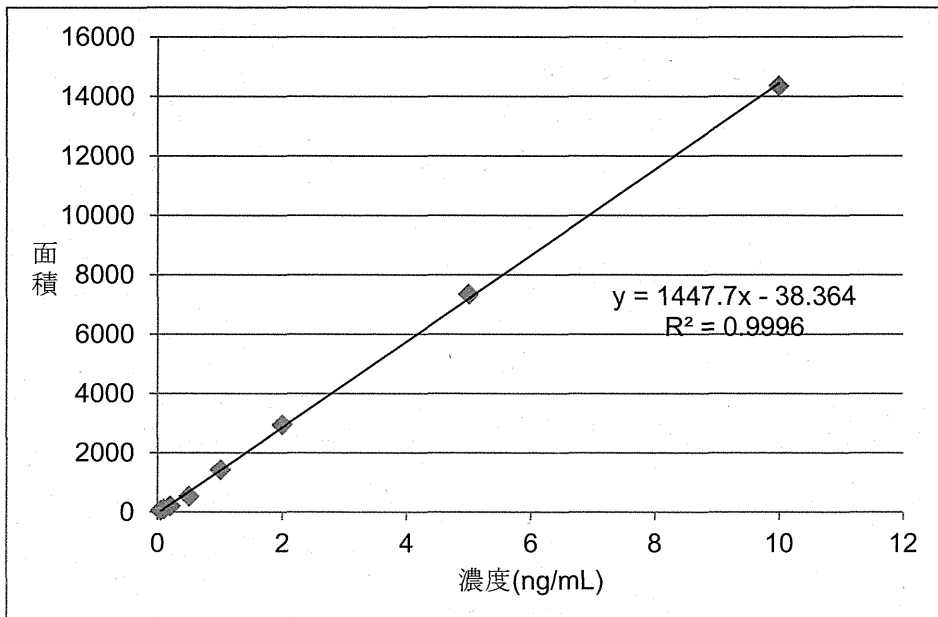


図-9 検量線 (m/z 1171→314)

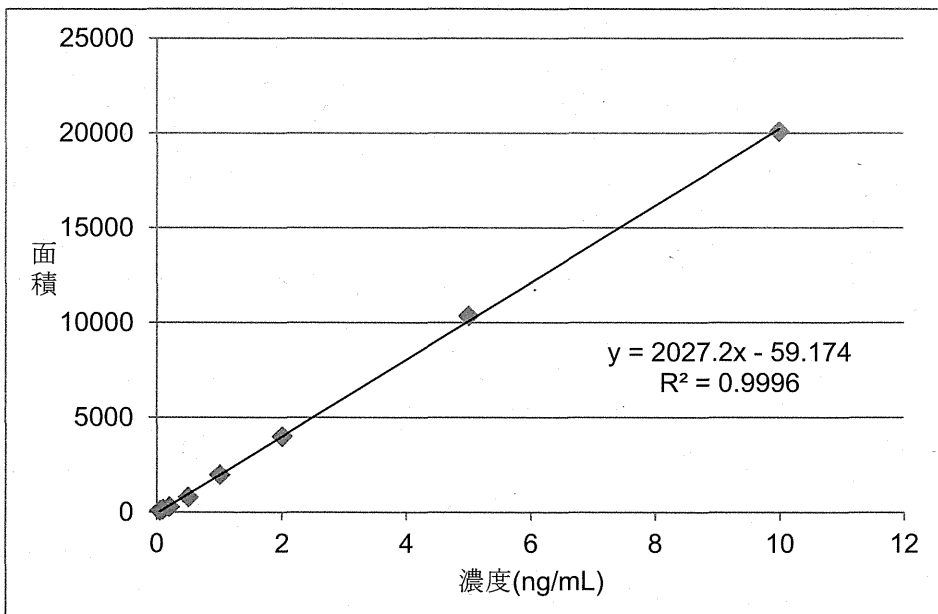


図-10 検量線 (m/z 1171→172)

2.3 選択性

セレウリド無添加試料でのクロマトグラムにおいて、定量を妨害するピークは検出されなかった。無添加試料のクロマトグラムを図-11~14に示した。

なお、定量イオンのクロマトグラムでは観察されなかったが、確認イオンのクロマトグラムにおいて、約8~11分の範囲でベースラインノイズの上昇が観察された。

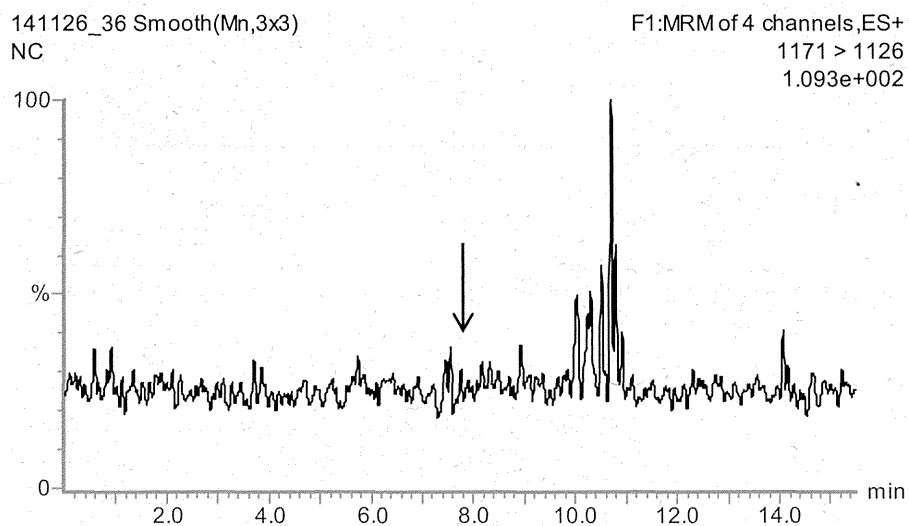


図-11 無添加試料のクロマトグラム (m/z 1171→1126)

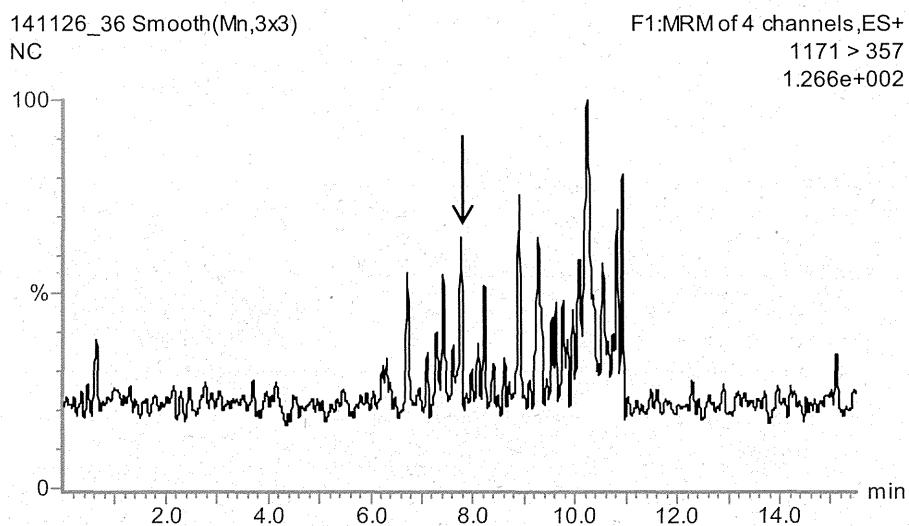


図-12 無添加試料のクロマトグラム (m/z 1171→357)

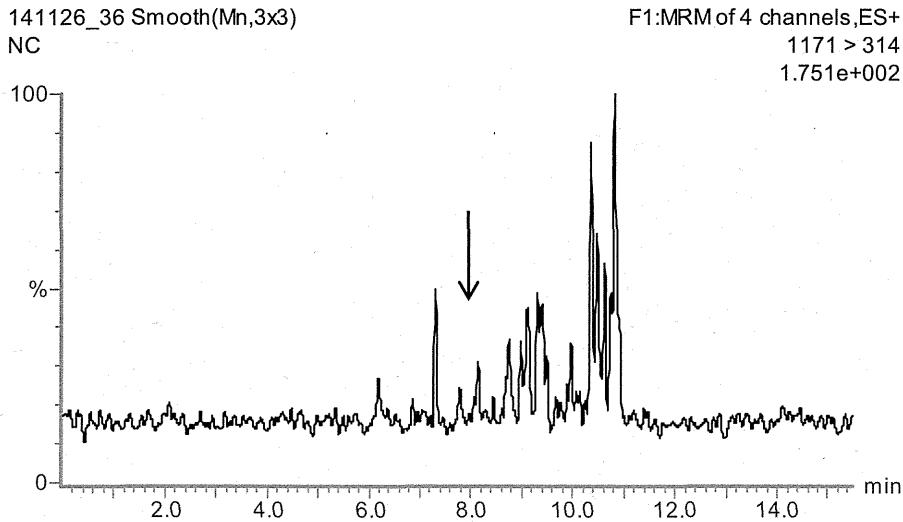


図-13 無添加試料のクロマトグラム (m/z 1171→314)

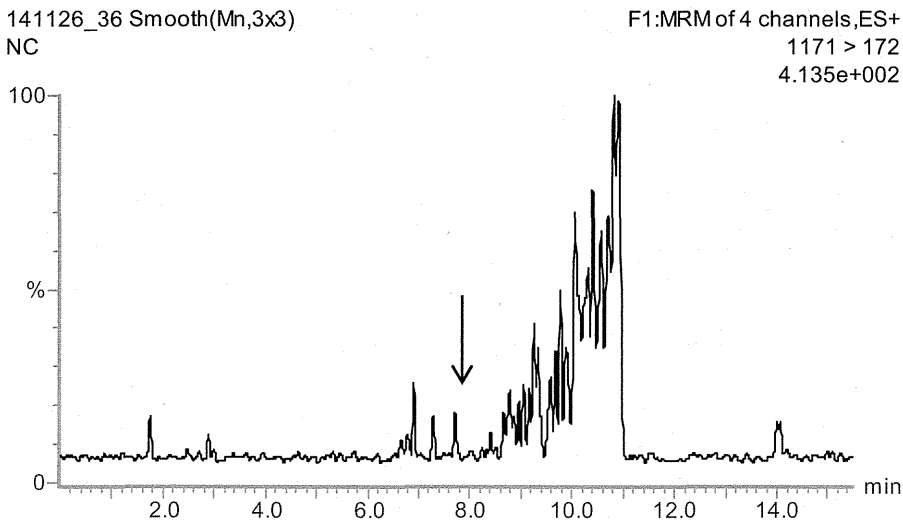


図-14 無添加試料のクロマトグラム (m/z 1171→172)

2.4 添加回収試験結果

設定質量数(m/z)ごとの分析結果を表-2に、回収率を表-3に示した。定量イオンにおける分析値は2.66~2.80 ng/g、回収率は53.1~55.9%であった。

表-2 設定質量数ごとの分析値(定量用は m/z 1171→1126、その他は確認用)

	1171→1126 (m/z)	1171→357 (m/z)	1171→314 (m/z)	1171→172 (m/z)
無添加 NC	ピーク検出せず	ピーク検出せず	ピーク検出せず	ピーク検出せず
添加回収 N=1	2.80	3.36	3.38	3.47
添加回収 N=2	2.66	2.99	2.96	3.03
添加回収 N=3	2.72	3.07	3.06	3.13

*単位：ng/g

定量法：絶対検量線法 検量線(0.2~10 ng/mLを使用)

表-3 設定質量数ごとの回収率(定量用は m/z 1171→1126、その他は確認用)

	1171→1126 (m/z)	1171→357 (m/z)	1171→314 (m/z)	1171→172 (m/z)
無添加 NC	—	—	—	—
添加回収 N=1	55.9	67.2	67.6	69.4
添加回収 N=2	53.1	59.8	59.2	60.6
添加回収 N=3	54.4	61.4	61.1	62.6

*単位(%)

3. その他

3.1 回収率

パッキライスをを用いた添加回収試験において、回収率が 70 %以下であった。低回収となった原因の特定が必要であるが、時間の制約もあり、今回は原因の特定には至っていない。なお、試験操作において固相カラムが目詰まりし、溶出までに時間を要した。

3.2 試験法の変更点等

試料採取容器はスクリュウキャップ付きポリ容器を用いた。

ガラス繊維ろ紙、Whatman 製 GF/F 直径 150 mmを所有していなかった為、ADVANTEC 製 GA-55 125mmを用いた。

ロータリーエバポレーターは水流式の装置を用いた。

メンブレンフィルターはMILLEX LG 0.20 μm : Merck Millipore 製を用いた。

試料採取容器は、ホモジナイザーカップを所有していなかった為、250 mL 容のポリ容器を用いた。

ホモジナイズ抽出後の静置の操作箇所は、静置ではなく遠心分離を行った。同様に、2 回目、3 回目の抽出後も遠心分離操作を行った。条件：遠心分離(20 $^{\circ}\text{C}$ 、3500 r/min、10 分間)

ろ過の受け器は 250 mL 容のメスフラスコを用いた。

最終試験溶液の作製(メタノールへの再溶解)の際、超音波処理を行った。

3.3 その他

和光純薬工業製セレウリド標準溶液は若干量が少なく 500 μL 採取出来なかったため、400 μL 採取とした。

以 上

