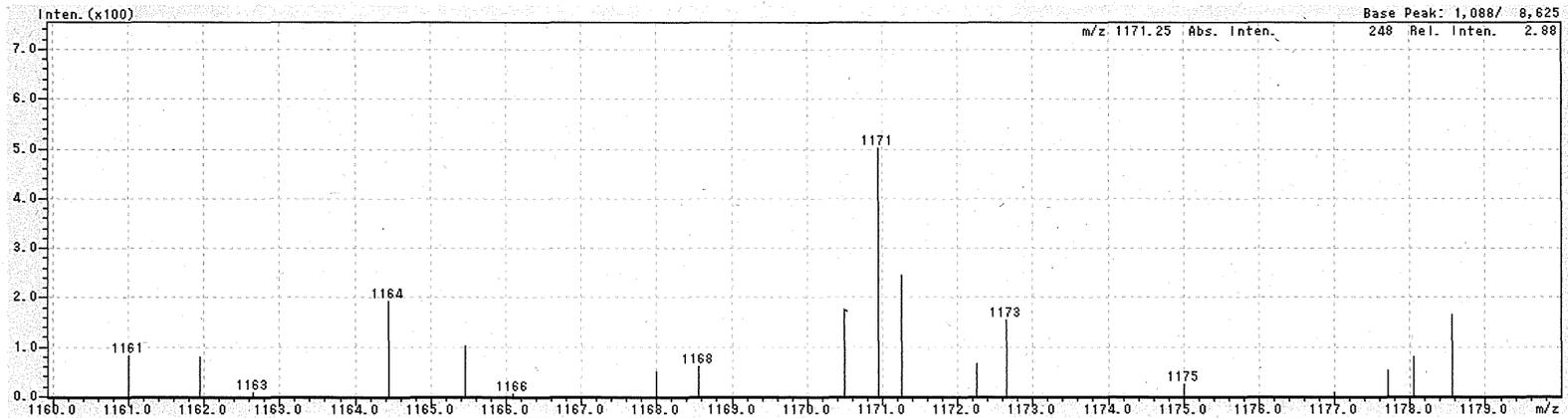
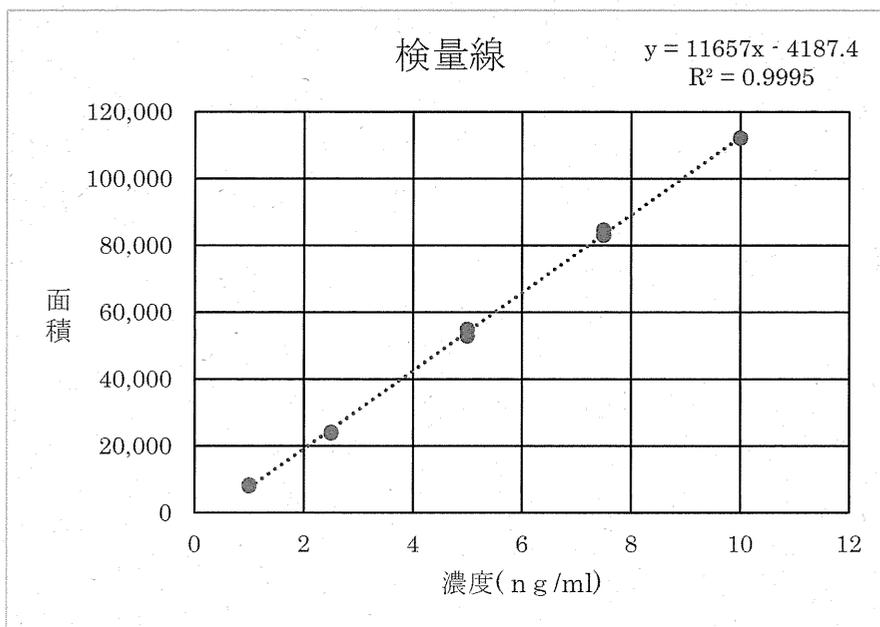


リテンションタイム 11 分におけるマススペクトル



リテンションタイム 11 分におけるマススペクトル (拡大)

図-5 LC/MS 測定時における標準セレウリドの絶対検量線 (1.0~10 ng/mL を使用)



定量用検量線	$y=11657x-4187.4$	$R^2=0.9995$
--------	-------------------	--------------

表 1 濃縮溶解法の検討

試行 1	水を秤量、メタノールを添加し 50%比とする	LC/MS	-
試行 2	乾固後、メタノールにて溶解、水を加えて 50%比とする	LC/MS	LC/MS/MS
試行 3	乾固後、50%メタノールにて溶解する	LC/MS	LC/MS/MS

表 2 LC/MS および LC/MS/MS を用いてのセレウリド添加回収試験 (%)  
(添加量 5 ng/g 相当)

LC/MS	1 日目		2 日目		3 日目		4 日目		5 日目	
	①	②	①	②	①	②	①	②	②	②
試行 1	81.2	81.5	86.6	85.6	89.6	90.8	90.8	86.0	83.7	86.8

LC/MS	1回目.		2回目	
	①	②	①	②
試行 2	86.6	100.2	80.7	97.8

LC/MS/MS	1回目.		2回目	
	①	②	②	②
試行 2	79.5	98.1	79.3	94.1

LC/MS	1回目.		2回目	
	①	②	①	②
試行 3	27.6	28.4	27.9	29.3

LC/MS/MS	1回目.		2回目	
	①	②	②	②
試行 3	26.3	28.4	24.0	24.8

表 3 妥当性評価 (パターン 1 の場合)

試料	真度 (%)	精度 (RSD%)	
	回収率	併行	室内
	86.3	2.2	4.2

目標値	70~120	<25	<30
-----	--------	-----	-----

## 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。

ただし、HLBカラム負荷前の処理を以下の2パターンにて行った。

パターン1：抽出液分取後、減圧濃縮により乾固、メタノール 1 mL を加え超音波処理により溶解後、水 1 mL を加えさらに超音波処理したものを予めコンディショニングした HLB カラムに負荷し、50 %メタノール 3 mL でナスフラスコ内壁を洗いカラム負荷、70 %メタノール 3 mL でカラム洗浄、95 %メタノール 3 mL にて溶出。

パターン2：抽出液分取後、減圧濃縮により乾固、50 %メタノール 2 mL を加え溶解したものを予めコンディショニングした HLB カラムに負荷し、50 %メタノール 3 mL でナスフラスコ内壁を洗いカラム負荷、70 %メタノール 3 mL でカラム洗浄、95 %メタノール 3 mL にて溶出。

### 1.1 検体

FamilyMart collection ごはん 180 g

- ・無添加試料：NC(Negative Control)
- ・添加回収(添加濃度 5 ng/g)：N=2(試行回数 2回)
- ・計 3 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  $\mu$ g/mL、500  $\mu$ L アンプル、Lot ECP4779)

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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ g/mL)を 400  $\mu$ L とり、メタノールで 20 mL に定容し 1  $\mu$ 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、0.5、1、2、5 及び 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 1~4 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 1 : 以下「測定条件 1」とする〉

機 種 : LC 部 ; Acquity UPLC [Waters 製]

MS 部 ; Xevo TQ [Waters 製]

カラム : Mightysil RP-18 GP,  $\phi$  2.0 mm  $\times$  50 mm, 3  $\mu$ 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 保持

カラム温度 : 50  $^{\circ}$ C

流 量 : 0.2 mL/min

注 入 量 : 5  $\mu$ 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

表 SRM 条件

プリカーサーイオン ( $m/z$ )	プロダクトイオン ( $m/z$ )	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

<液体クロマトグラフ-質量分析装置測定条件2: 以下「測定条件2」とする>

機 種: LC部; Acquity UPLC[Waters製]

MS部; Xevo TQ[Waters製]

カラム: Mightysil RP-18 GP,  $\phi$ 2.0 mm $\times$ 50 mm, 3  $\mu$ 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 (5:95) 10 min $\rightarrow$ 16 min 保持

A:B (20:80) 16.01 min

A:B (20:80) 16.01 $\rightarrow$ 20 min 保持

カラム温度: 50  $^{\circ}$ C

流 量: 0.2 mL/min

注 入 量: 5  $\mu$ 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

表 SRM条件

プリカーサーイオン ( $m/z$ )	プロダクトイオン ( $m/z$ )	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

〈液体クロマトグラフ-質量分析装置測定条件3：以下「測定条件3」とする〉

機 種：LC部；Acquity UPLC[Waters製]

MS部；Xevo TQ[Waters製]

カラム：Mightysil RP-18 GP,  $\phi$ 2.0 mm $\times$ 50 mm, 3  $\mu$ 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 保持

カラム温度：50  $^{\circ}$ C

流 量：0.2 mL/min

注 入 量：5  $\mu$ 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

表 SIM条件

設定質量数 ( $m/z$ )	コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
1170	50	4
1171	50	4
1172	50	4

〈液体クロマトグラフ-質量分析装置測定条件4：以下「測定条件4」とする〉

機 種：LC部；Acquity UPLC[Waters製]

MS部；Xevo TQ[Waters製]

カラム：Mightysil RP-18 GP,  $\phi$ 2.0 mm×50 mm, 3  $\mu$ 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→10 min リニアグラジエント

A：B (5:95) 10 min→16 min 保持

A：B (20：80) 16.01 min

A：B (20：80) 16.01→20 min 保持

カラム温度：50 °C

流 量：0.2 mL/min

注 入 量：5  $\mu$ L

キャピラリー電圧：ESI(+)；+3000 V

イオン源温度：150°C

脱溶媒ガス温度：600°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

表 SIM条件

設定質量数 ( $m/z$ )	コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
1170	50	4
1171	50	4
1172	50	4

## 2. 結果及び考察

### 2.1 添加回収率

パターン 1 及びパターン 2 の処理を行った試験溶液について、測定条件 1~4 にて測定した際の添加回収率を表-1 に示した。SRM 測定については  $m/z$  1171→1126 を、SIM 測定については  $m/z$  1171 での結果を示す。

表-1 測定条件ごとの回収率 (%)

		測定条件 1 ( $m/z$ 1171→1126)	測定条件 2 ( $m/z$ 1171→1126)	測定条件 3 ( $m/z$ 1171)	測定条件 4 ( $m/z$ 1171)
パターン 1	無添加 NC	—	—	—	—
	添加回収 N=1	79.5	79.3	86.6	80.7
	添加回収 N=2	98.1	94.1	100.2	97.8
パターン 2	無添加 NC	—	—	—	—
	添加回収 N=1	26.3	24.0	27.6	27.9
	添加回収 N=2	28.4	24.8	28.4	29.3

HLB 負荷前の抽出液濃縮乾固操作後の処理は、50 %メタノールへの溶解よりも、一旦メタノールに溶解させた後、水を加えることで回収率の改善が認められた。

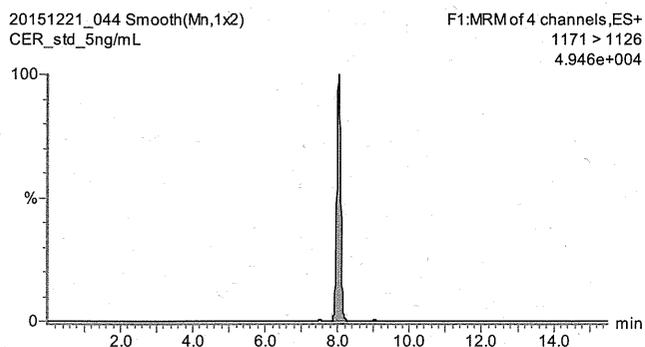
濃縮乾固をする場合は、メタノールに溶解させた後に加水する方法が有効と考えられる。

### 2.2 HPLC 条件

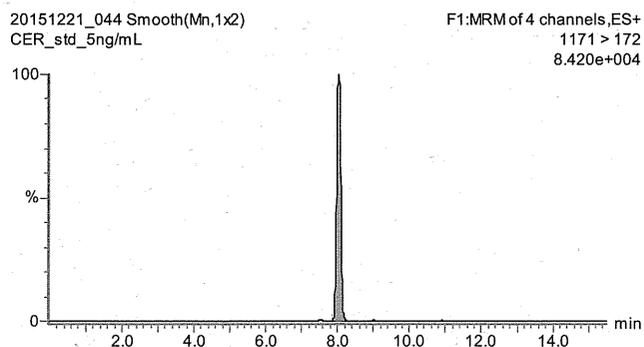
測定条件 1~4 における SRM 及び SIM のクロマトグラム例を図 1~4 に示す。

測定条件 1 及び 2 における SRM 測定のクロマトグラムではバックグラウンドの上昇は認められなかった。

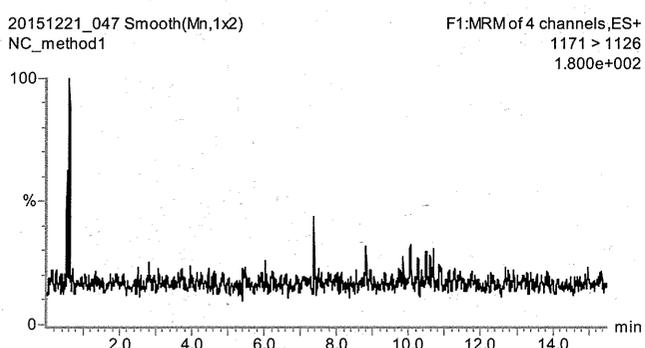
測定条件 3 及び 4 における SIM 測定においては、検討に用いた本装置のバックグラウンドが高く、グラジェントと共にベースラインの上昇が確認された。試料濃度 (5 ng/g) を確認することは可能であるが、バックグラウンドの低減策が必要であると考えられる。なお、ベースラインは注入ごとに減少傾向にあるため、HPLC 及び HPLC カラムの洗浄により低減と考えられる。



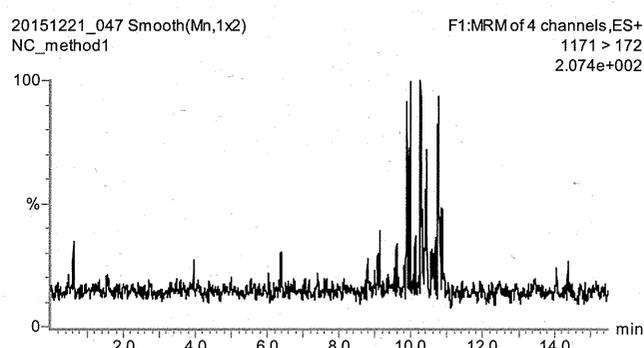
標準溶液 5 ng/mL  
( $m/z$  1171→1126)



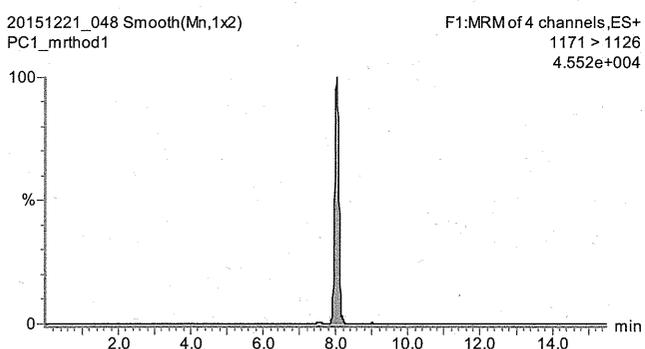
標準溶液 5 ng/mL  
( $m/z$  1172→172)



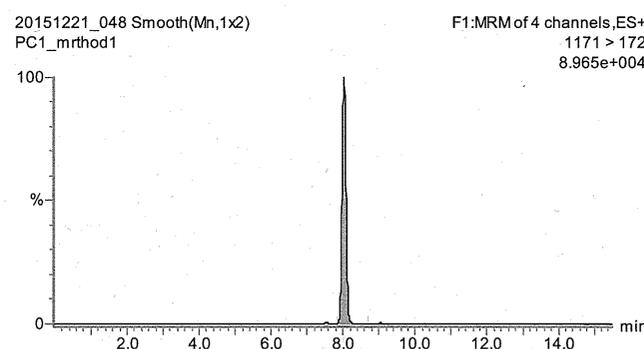
無添加試料(パターン1)  
( $m/z$  1171→1126)



無添加試料(パターン1)  
( $m/z$  1172→172)

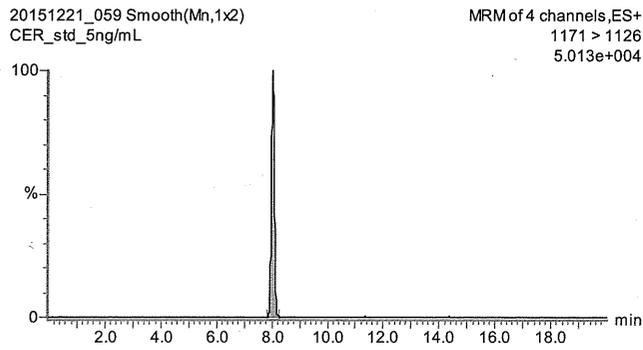


添加試料(パターン1)  
( $m/z$  1171→1126)

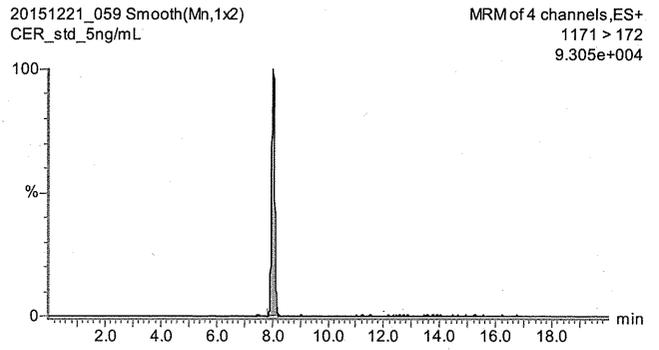


添加試料(パターン1)  
( $m/z$  1172→172)

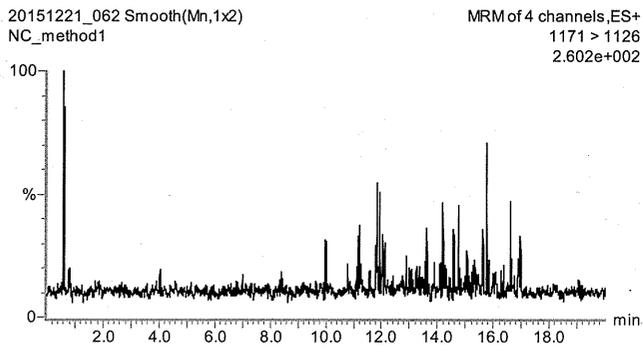
図1 測定条件1のクロマトグラム例



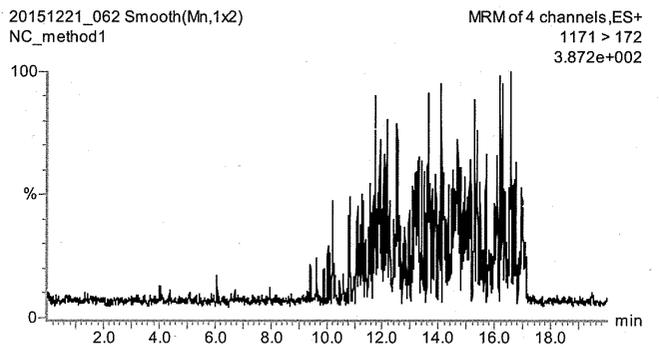
標準溶液 5 ng/mL  
( $m/z$  1171→1126)



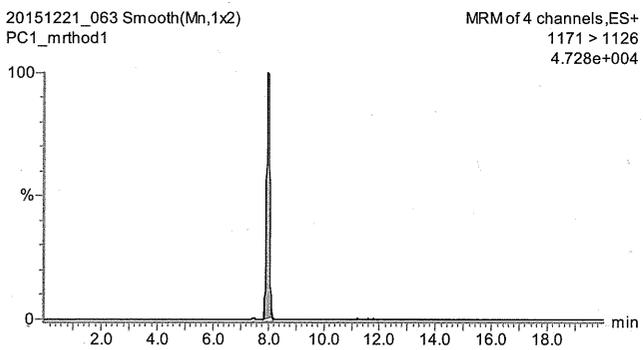
標準溶液 5 ng/mL  
( $m/z$  1172→172)



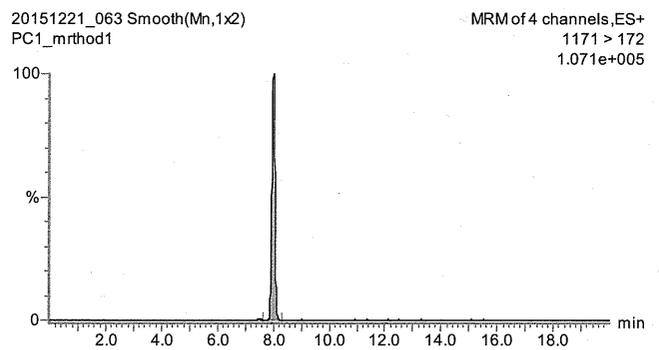
無添加試料(パターン1)  
( $m/z$  1171→1126)



無添加試料(パターン1)  
( $m/z$  1172→172)

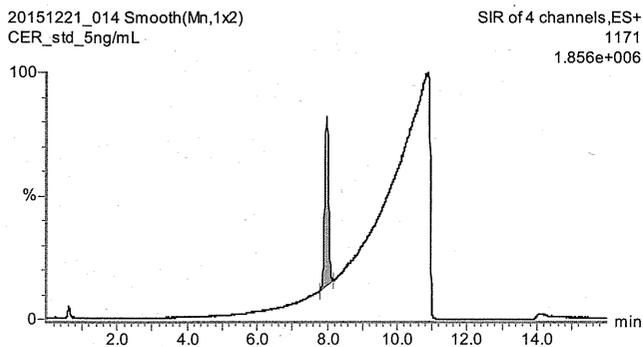


添加試料(パターン1)  
( $m/z$  1171→1126)

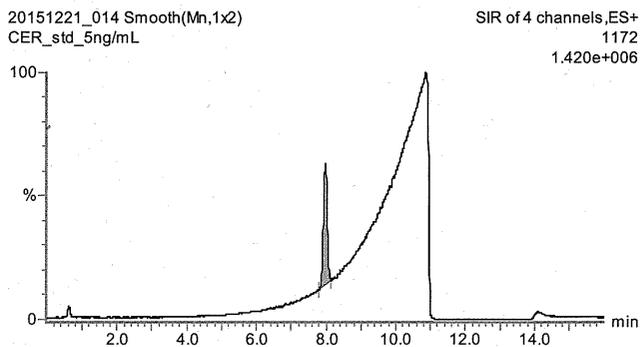


添加試料(パターン1)  
( $m/z$  1172→172)

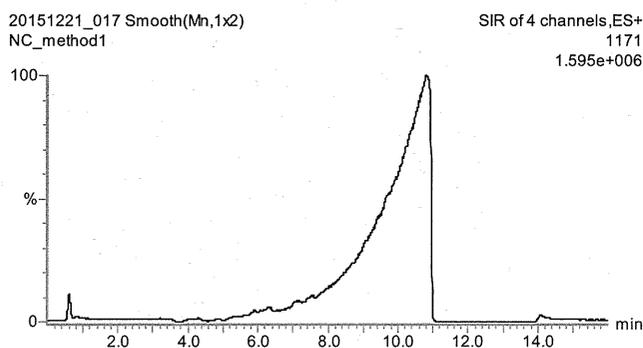
図2 測定条件2のクロマトグラム例



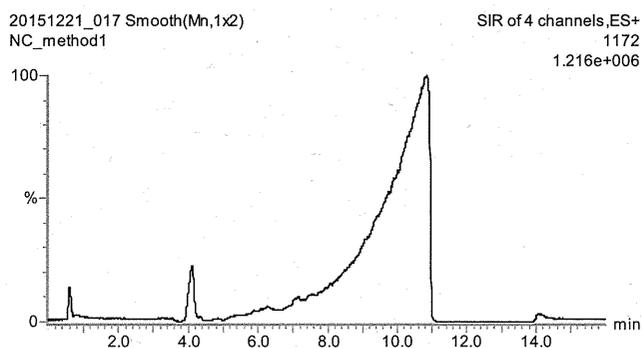
標準溶液 5 ng/mL  
( $m/z$  1171)



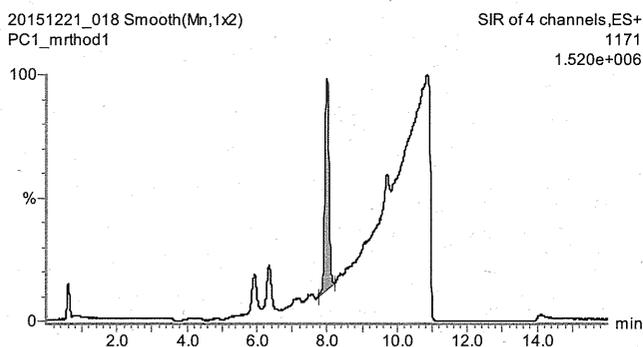
標準溶液 5 ng/mL  
( $m/z$  1172)



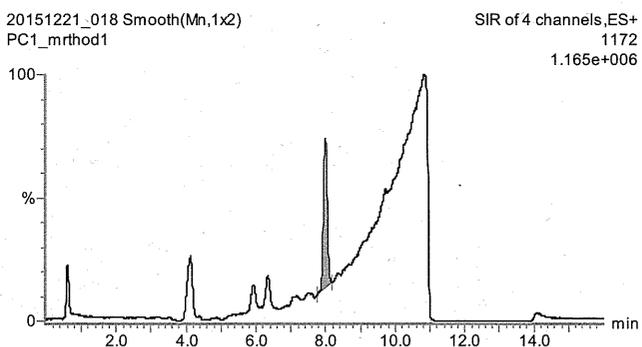
無添加試料 (パターン 1)  
( $m/z$  1171)



無添加試料 (パターン 1)  
( $m/z$  1172)

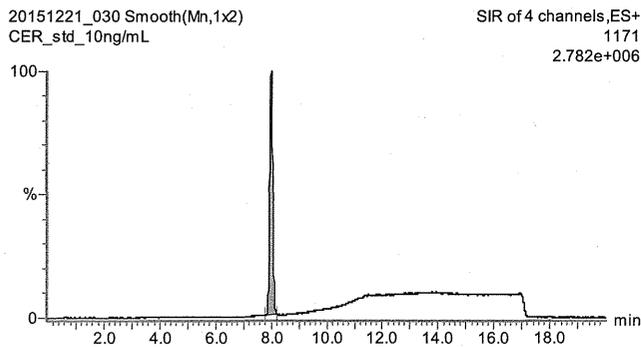


添加試料 (パターン 1)  
( $m/z$  1171)



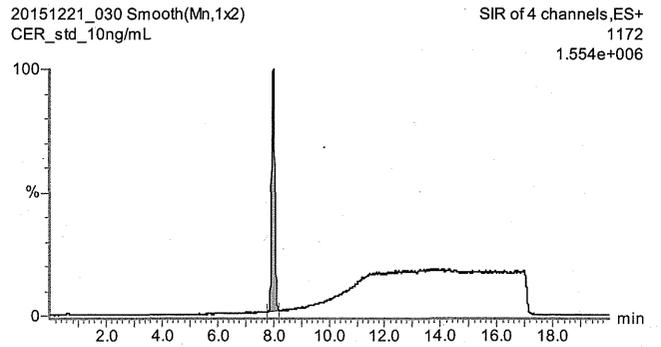
添加試料 (パターン 1)  
( $m/z$  1172)

図3 測定条件3のクロマトグラム例



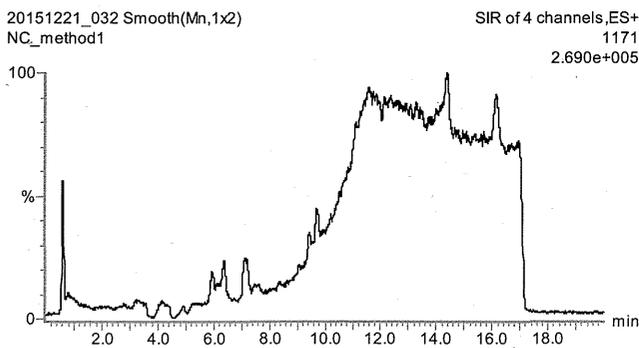
標準溶液 10 ng/mL

(*m/z* 1171)



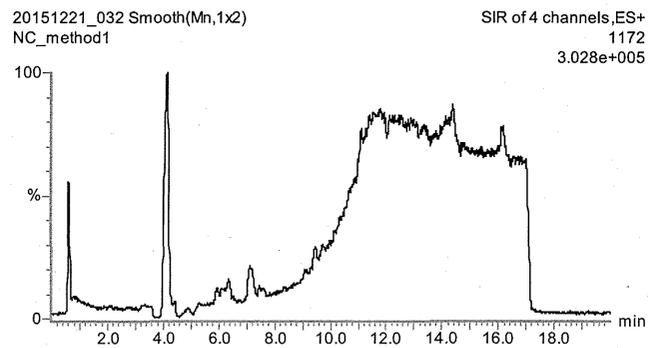
標準溶液 10 ng/mL

(*m/z* 1172)



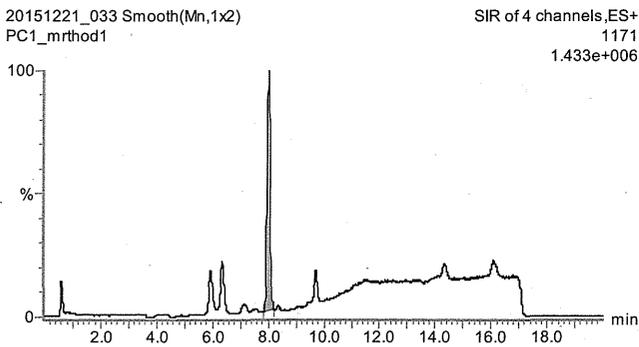
無添加試料 (ハ° ターン 1)

(*m/z* 1171)



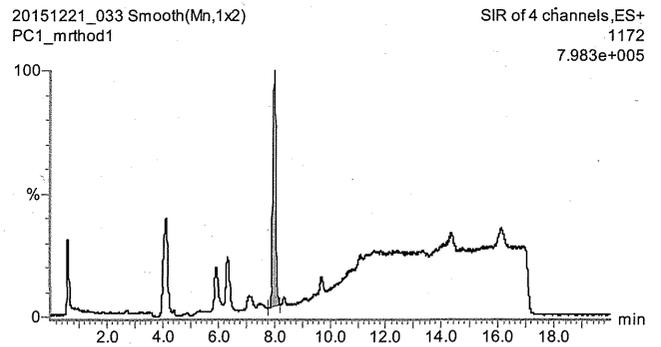
無添加試料 (ハ° ターン 1)

(*m/z* 1172)



添加試料 (ハ° ターン 1)

(*m/z* 1171)



添加試料 (ハ° ターン 1)

(*m/z* 1172)

図4 測定条件4のクロマトグラム例  
(標準溶液 5 ng/mL データ欠損のため 10 ng/mL を例示した)

### 2.3 マススペクトル

標準溶液 1000 ng/mL を注入し、 $m/z$  100~1300 の範囲でスキャン測定を行った。移動相条件は測定条件 1 を用いた。TIC クロマトグラムを図 5 に示す。

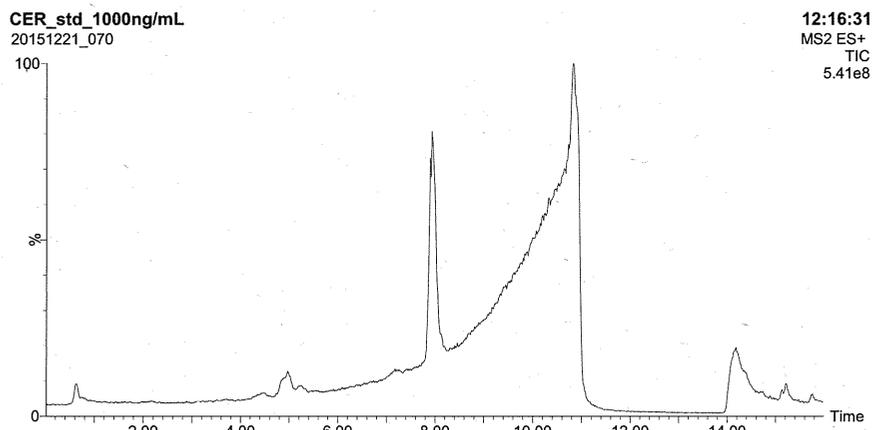


図 5 スキャン(範囲  $m/z$  100~1300)の TIC クロマトグラム

リテンションタイム 8 分におけるマススペクトルを図 6-1 に、部分拡大のマススペクトルを図 6-2 に示す。バックグラウンドを差し引いたマススペクトルを図 6-3 に、部分拡大のマススペクトルを図 6-4 に示す。

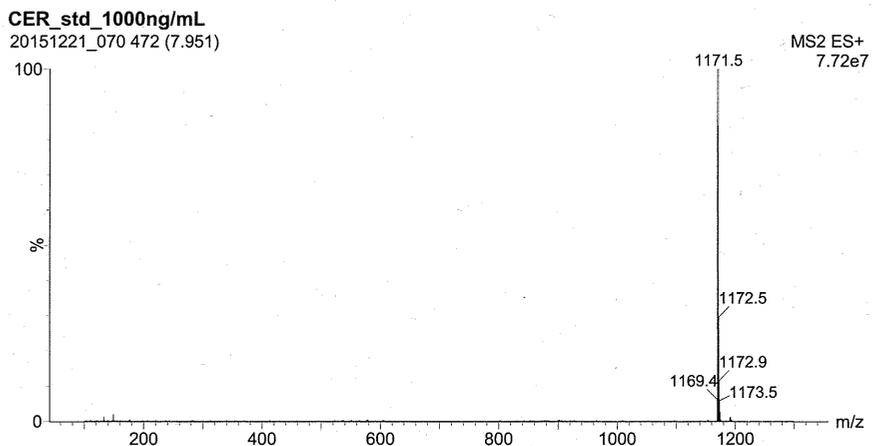


図 6-1 リテンションタイム 8 分におけるマススペクトル

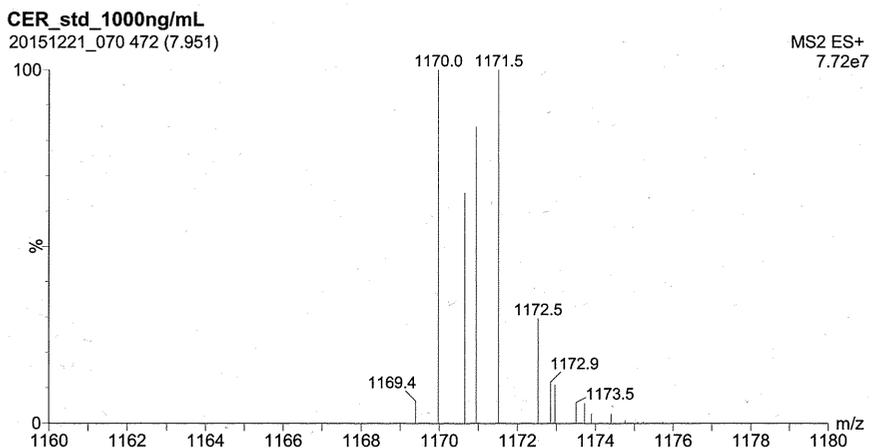


図 6-2 リテンションタイム 8 分におけるマススペクトル(拡大)

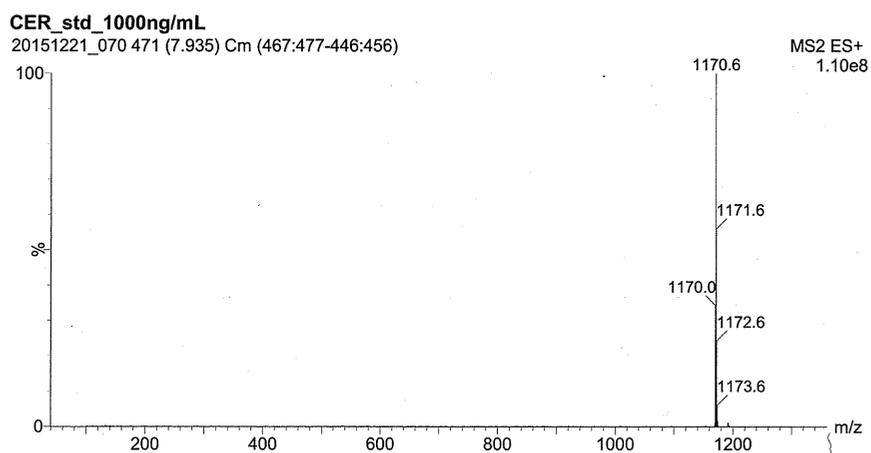


図 6-3 リテンションタイム 8 分におけるマススペクトル(バックグラウンド差引)

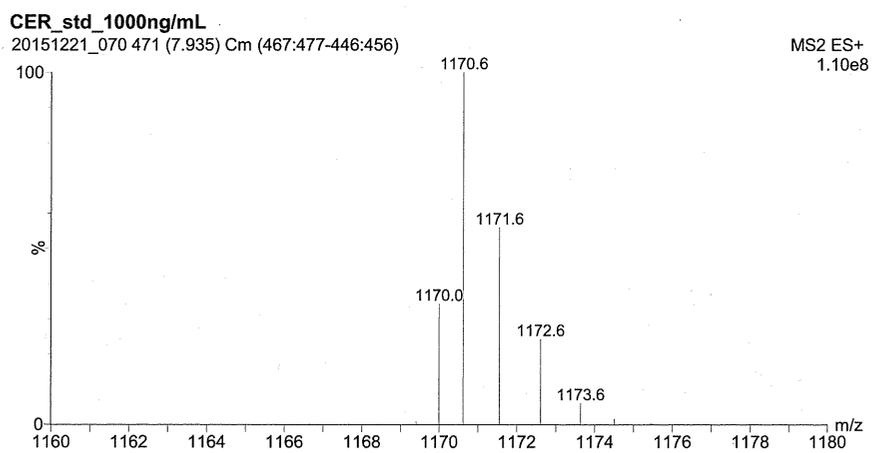


図 6-4 リテンションタイム 8 分におけるマススペクトル(バックグラウンド差引) (拡大)

図 6-1~6-4 より、バックグラウンドを差し引くことでセレウリドのマススペクトルを確認出来た。

以 上

