

「食品中のステリグマトシスチン試験法」

実態調査班用（平成28年9月改定）

操作手順

1. 抽出

- ① STEブランク小麦25gを正確に抽出用容器6つにそれぞれ量り採り、1～6まで番号を付ける。
- ② STE01～06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. イムノアフィニティーカラムによる精製

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5.0mLをピペッターなどで50mLのメスフラスコへとり、標線までPBS を加え良く混合する。
- ④ ガラスロートにガラス繊維ろ紙をセットし、③の希釈液をろ過する。ろ液を三角フラスコにとり、試料溶液とする。（~~試料換算~~ 0.5g）
- 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 ④で得られた試料溶液20.0mLをピペッターなどでリザーバーに注入する。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）。全ての試料溶液を排出させたのち、リザーバーを取り除き、カラ

ムをPBSで満たし、排出させる操作を3回、さらに蒸留水で同じ操作を3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10mL容試験管をカラムの下に置き、アセトニトリル1mLをカラムに注入し、自然落下で溶出させた後5分間放置する。さらにアセトニトリル1mLをカラムに注入し溶出する。この操作をもう一度繰り返した後、シリンジで空気を押し出すことによりカラム中ゲル内の溶媒をすべて溶出する。

4. 試料溶液の調製

「2.」の⑥で得られたアセトニトリル溶出液を窒素気流を用いて乾固する。残さをアセトニトリル0.5mLで溶解後、さらに蒸留水0.5mLを加えよく混合する。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、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、STE02とSTE05については、LC-MS/MS用試験溶液100 μ Lに50%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。

5. 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 = 60 : 40

13分 A : B = 10 : 90

（13分以内にSTEが溶出されない場合は、溶出されるまでこの比率を維持する。）

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：0.1 μ g/L（標準溶液の濃度）

6. 検量線について

配布済みのステリグマトシスチン (STE) 標準液 (10mg/L) 100 μ Lを取り、アセトニトリル900 μ Lを加え、STE標準液II (1mg/L) を作成する。さらにSTE標準液II 100 μ Lを取り、アセトニトリル900 μ Lを加え、STE標準液III (100 μ g/L) を作成する。さらにSTE標準液III 100 μ Lを取り、アセトニトリル900 μ Lを加え、STE標準液IV (10 μ g/L) を作成する。さらにSTE標準液IV 100 μ Lを取り、アセトニトリル900 μ Lを加え、STE標準液V (1 μ g/L) を作成する。

以下の表に従い、7種のバイアルにそれぞれの標準液を加える。

No.	1	2	3	4	5	6	7
STE終濃度(μ g/L)	0.1	0.2	0.5	1	2	5	10
標準液III(μ L)						50	100
標準液IV(μ L)			50	100	200		
標準液V(μ L)	100	200					

窒素気流で乾固した後、残さをアセトニトリル0.5mLで溶解後、さらに蒸留水0.5mLを加えよく混合する。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。場合によっては最高濃度の標準溶液 (No.7) をはずすことも可能。

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