

## 「フモニシン類の分析法」 コラボラティブスタディプロトコール

以下、フモニシンB1をFB1、フモニシンB2をFB2、フモニシンB3をFB3と表記する。

[ ] 内数字は、実施要領参照

### 操作手順

#### 1. 前処理

検体を天秤[5.1(1)]で20.0 gを正確に量りとり、300 ml容の共栓付き三角フラスコ[5.1(4)]に移す。添加用試料（試料番号1～8を付する）の場合は、添加用FB1、FB2及びFB3の3種混合溶液[4.2(3)]を200 µl添加して暗所に1時間放置後に抽出溶媒を加える。これに抽出溶媒 [4.1(6)] メタノール：水（3：1）100 mlを加える。振とう機を用いて15分間激しく振り混ぜ、50 ml容プラスチック遠心チューブ[5.1(11)]に入れて3,000 gで5分間遠心分離[5.1(13)]し、上清液を抽出溶液とする。

#### 2. カラム（強塩基性陰イオン交換体ミニカラム）による精製法

- 1) カラムの前処理：強塩基性陰イオン交換体ミニカラムa及びb[4.2(1)]をカラム架台[5.1(5)]にセットする（カラムaとbを用いた分析は同時に行う。）メタノール[4.1(2)] 8 mlを入れ、自然落下で排出させる<sup>注1</sup>。抽出溶媒[4.1(6)] メタノール：水（3：1）8 mlを入れ、自然落下で排出させる。
- 2) サンプルの負荷及び洗浄：抽出溶液 10 mlをピペッター等[5.1(2)]で正確にカラムに入れ、自然落下で排出させる。抽出溶媒[4.1(6)]メタノール：水（3：1）8 mlを入れ、自然落下で排出させる<sup>注1</sup>。メタノール[4.1(2)] 8 mlを入れ、自然落下で排出させる。
- 3) フモニシン類の溶出：溶出用溶液[4.1(7)] メタノール：酢酸（99：1）14 mlを入れ、流出液をキャップ付きバイアル[5.1(3)]に採る。
- 4) 試料のマトリックス効果を調べるため、以下の操作も行う。スタンダード1及びスタンダード2は「3. 2) 検量線の作成」に従って調製する。

添加用トウモロコシ試料（試料番号13及び14を付する）20 gに対し、上述の「1. 前処理」を行う。カラムa及びbを2本ずつ用意し、「2. 3）」の溶出まで行い、計4種の溶出液約14 mlをバイアル[5.1(3)]に得る。カラムaを用いて精製を行った溶出液の試料番号をそれぞれ13a及び14a、カラムbを用いて精製を行った溶出液の試料番号をそれぞれ13b及び14bとする。試料番号13a及び13bにスタンダード1（1 µg/ml溶液）を100 µl入れ、試料番号14a及び14bにスタンダード2（100 ng/ml溶液）を100 µl入れる。

試料番号	13a	13b	14a	14b
精製カラム	カラムa	カラムb	カラムa	カラムb
添加する標準液	スタンダード1 (1 µg/ml)		スタンダード2 (100 ng/ml)	
添加量	100 µl			

- 5) 3) 及び4) で得た溶出液について、アルミブロックヒーター[5.1(6)]を40°C以下で使用し窒素気流[5.1(7)]を送るか、エバポレーター[5.1(8)]を用いて、試験管中の溶媒を除去する。残留物にHPLC注入液 [4.1(8)]アセトニトリル：水 (50 : 50) 1.0 mlを加えたものを試験管ミキサー等[5.1(10)]で完全に溶解する。溶かした後、HPLC用バイアル[5.1(9)]に移す。試験溶液が濁っている場合は1.5 ml容マイクロチューブ[5.1(14)]等に移し、10,000 g 以上、5 分間遠心[5.1(15)]し、その上清をHPLC 用バイアル[5.1(9)]に移す。これをLC-MS/MS用試験溶液とする。
- なお、本スタディのサンプルにおいては、検量線から外れるものが多数存在する。そのため適宜試験溶液を希釈し、測定を行う。予備実験においては、原液とそれを20倍希釈した溶液を同時に測定し、検量線内に収まった値 (両方とも収まった場合は原液の値) を用いた。

注1) 前処理及び洗浄のステップにおいて、排出速度が極端に小さい場合は、圧力をかけることができる。ただし、1秒当たりの排出量は1~2滴を超えないこと。

### 3. 高速液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC-MS/MS) による測定

LC-MS/MS[5.1(12)]を用いて試験溶液について測定を行う。

#### 1) 測定条件 (例)

カラム (配布) [5.2(1)] : オクタデシルシリル化シリカゲル (Inertsil ODS-4 3×50 mm, 2 µm)

カラム温度 : 40 °C

移動相 : A溶媒[4.1(9)] 0.1% ギ酸水溶液、B溶媒 アセトニトリル[4.1(1)]

0分 A 75% B 25%

5分 A 50% B 50% →8分 A 50% B 50%

10分 A 75% B 25%

流速 0.2 ml/分

注入量 5 µl

イオン化法 : ESI (+)

モニターイオン (m/z) :

	プリカーサー	プロダクト1	プロダクト2
FB1	722	334	352
FB2	706	336	354
FB3	706	336	354

## 2) 検量線の作成

- ① FB1、FB2及びFB3の3種混合標準液（配付）[4.2(2)]を室温に戻した後、100 µlをピペッター[5.1(2)]でキャップ付きバイアル[5.1(3)]にとり、HPLC注入液 [4.1(8)]アセトニトリル：水（50：50）900 µlを加え密栓後、試験管ミキサー等[5.1(10)]で完全に溶解する。（スタンダード1：1 µg/ml溶液）
- ② ①で作製したスタンダード1：1 µg/ml溶液100 µl をキャップ付きバイアル[5.1(3)]にとり、HPLC注入液 [4.1(8)] アセトニトリル：水（50：50）900 µlを加え密栓後、試験管ミキサー等 [5.1(10)]で完全に溶解する。（スタンダード2：100 ng/ml溶液）
- ③ ②で作製したスタンダード2：100 ng/ml溶液100 µlをキャップ付きバイアル[5.1(3)]にとり、HPLC注入液 [4.1(8)] アセトニトリル：水（50：50）900 µlを加え密栓後、試験管ミキサー等 [5.1(10)]で完全に溶解する。（スタンダード3：10 ng/ml溶液）
- ④ その後、以下の表に従い、スタンダード1、2、3とHPLC注入液 [4.1(8)] アセトニトリル：水（50：50）をHPLC 用バイアル[5.1(9)]にピペッター[5.1(2)]で分注し、よく混和したものをHPLC 用検量線用溶液とする。
- ⑤ 作製した7濃度の検量線用溶液5 µl（試験溶液の注入量に合わせる）をHPLC に注入し、ピークの面積で検量線を作成する。

フモニシン類の濃度 (ng/ml)	2	5	10	20	50	100	200
スタンダード1 :1 µg/ml (µl)						100	200
スタンダード2 :100 ng/ml (µl)			100	200	500		
スタンダード3:10 ng/ml (µl)	200	500					
HPLC注入液 (µl)	800	500	900	800	500	900	800

## 3) 定量

試験溶液をLC-MS/MS[5.1(12)]に注入し、得られたクロマトグラムにおいてFB1、FB2及びFB3のそれぞれの保持時間と一致するピークの面積と「2) 検量線の作成」で求めておいた検量線から試験溶液中の濃度を求める。試験溶液中の濃度と試料中の濃度の関係は以下である。

試料中のFB1、FB2又はFB3の濃度 (ng/g)

$$= \text{試験溶液中のFB1、FB2又はFB3の濃度 (ng/ml)} \div 2$$

(注)

フモニシン類を扱う際には手袋を装着し、実験台にはベンチコート等を使用し、汚染に気をつけること。また、使用した容器・器具は1%次亜塩素酸ナトリウム液に2時間以上浸漬した後、通常の洗浄を行うこと。

#### 4. 分析法のフローチャート

	手順、条件	補足
抽出操作	検体20 gを秤量する	添加用試料の場合は、添加用溶液200 $\mu$ lを添加して暗所に1時間放置する
	抽出溶媒100 mlを加える	メタノール：水(3:1)を用いる
	15分間振盪する	
	遠心分離し、上清を回収する	3000 gで5分間が望ましい
カラムの準備	メタノール8 mlを入れ、自然落下で排出させる	毎秒1~2滴に調整、流速が極端に遅い場合には圧力をかける
	抽出溶媒8 mlを入れ、自然落下で排出させる	
カラム操作	抽出液10 mlを入れ、自然落下で排出させる	負荷
	抽出溶媒8 mlを入れ、自然落下で排出させる	洗浄
	メタノール8 mlを入れ、自然落下で排出させる	
	メタノール：酢酸(99:1) 14 mlを入れ、流出液をバイアルに回収する	溶出
サンプル調整	40°C以下、窒素気流で濃縮乾固	
	HPLC注入液アセトニトリル：水(50:50) 1.0 mlに溶解する	試験管ミキサーでよく攪拌する
	試験溶液が濁っている場合は遠心する	
LC-MS/MSの測定条件例	LCカラム：Inertsil ODS-4 3 $\times$ 50 mm, 2 $\mu$ m	
	カラム温度：40°C	
	注入量：5 $\mu$ l	
	流速：0.2 ml/min	
	移動相：A溶媒 0.1% ギ酸水溶液 B溶媒 アセトニトリル	
	0分 A 75% B 25% $\rightarrow$ 5分 A 50% B 50% $\rightarrow$ 8分 A 50% B 50% $\rightarrow$ 10分 A 75% B 25%	
	イオン化：ESI positive	
	モニターイオン FB1 722>334, 352 FB2 706>336, 354 FB3 706>336, 354	