

トリプル四重極質量分析計を用いた粉ミルク中のセレウリドの分析

○吉岡紗穂、前島希、朝野夏世、小林まなみ
株式会社島津製作所 分析計測事業部 Solutions COE

◆背景・目的

セレウス菌（*Bacillus cereus*）は、自然界に広く分布する芽胞形成性のグラム陽性桿菌であり、農産物をはじめとする多種多様な食品を汚染し、食中毒を引き起こす。セレウス菌による食中毒は、臨床症状から「下痢型」と「嘔吐型」に大別される。嘔吐型食中毒の主要原因として、セレウス菌が食品中で産生する耐熱性の毒素であるセレウリド（図1）が知られている。

セレウリドは極めて微量の摂取でも健康被害を及ぼす懸念があるため、食品中の厳格な管理が求められている。特に乳幼児は成人よりも感受性が高く、ごく少量の摂取で嘔吐や下痢を呈する恐れがある。このため、乳児用調製粉乳（粉ミルク）における安全性への要求は極めて高く、低濃度域においても確実な検出・定量が可能な分析法の確立が急務となっている。

欧州食品安全機関（EFSA）は、乳児における急性参照用量（ARfD）を0.014 µg/kg体重と提案しており¹⁾、調乳後の粉ミルク中のセレウリド濃度が0.054 µg/Lを超えた場合、安全基準を上回る可能性を指摘している。しかし、粉ミルクは脂質やタンパク質を豊富に含む複雑なマトリックス（夾雑成分）を有するため、高感度分析においては適切な試料前処理法の選択が重要な課題となる。

本発表では、トリプル四重極質量分析計LCMSTM-8060RXを用い、粉ミルク中のセレウリドを対象とした高感度かつ迅速な分析手法の確立を目的とした。前処理法として、国際規格であるISO 18465²⁾に基づく手法と、迅速・簡便な手法として知られるQuEChERS法を参考にした手法の2種類を比較検討した。添加回収試験を通じて、両手法の回収率および定量妥当性を評価し、粉ミルクの品質管理における最適な分析ワークフローを提示する。

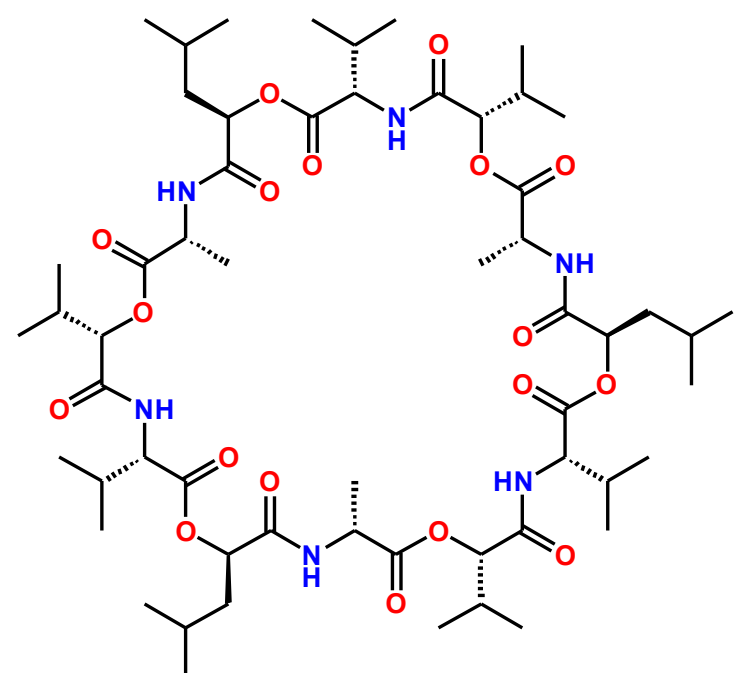


図1 セレウリドの構造

◆方法

試料調製および前処理：市販の粉ミルクを製品に記載のレシピに従って調乳し、これを分析サンプルとした。前処理法として、以下の2手法を比較検討した。ワークフローは図2に、分析条件は表1に示す。

(a) ISO 18465に基づく手法

- 試料2.5 mLを50 mL遠心チューブに分取し、アセトニトリル30 mLを添加。
- シェーカーにて1時間振とう後、遠心分離（3,000 rpm, 5 min）を実施。
- 回収した上清を親水性PTFEフィルター（TORAST Disc, 0.45 µm）にてろ過し、LC-MS/MS測定試料とした。

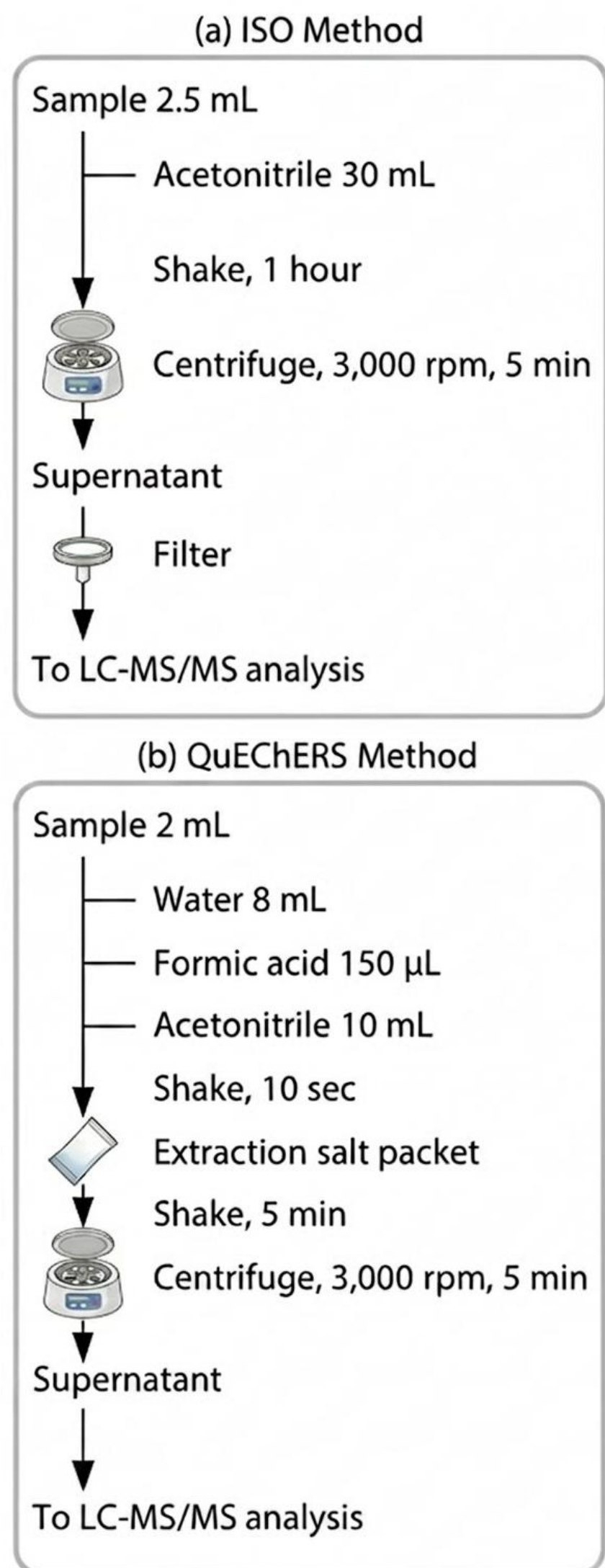


図2 前処理ワークフロー

表1 分析条件

[HPLC conditions] (Nexera™ X3)			
Column	Shim-pack Scepter™ C18-120 (50 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 μm)		
Mobile phase A	10 mM ammonium formate / 0.1% formic acid / water		
Mobile phase B	Acetonitrile		
Flow rate	0.4 mL/min		
Gradient program	B conc. 80-95% (0-6min) → 95% (6-10 min) → 80% (10.01-13 min)		
Column temp.	40 °C		
Injection volume	5 μL		
[MS conditions] (LCMS-8060RX)			
Ionization	ESI, Positive mode		
Mode	MRM		
Interface voltage	+1 kV	Focus voltage	+2 kV
Nebulizing gas flow	2.0 L/min	Interface temp.	300 °C
Drying gas flow	5.0 L/min	DL temp.	300 °C
Heating gas flow	15.0 L/min	Heat Block temp.	500 °C
Probe position	+1 mm		

流路切り替えバルブを用いて3–8 minのみをMSへ導入することで、夾雑成分によるイオン源の汚染を抑制した。

MRM条件を表2に示す。なお、定量用トランジションはISO 18465に準拠した。

表2 MRM条件

定量イオン	確認イオン
1170.70>314.15 (+)	1170.70>172.05 (+) , 1170.70>357.30 (+) , 1170.70>499.10 (+)

◆結果及び考察

外部標準法を用い、0.002～0.1 µg/Lの濃度範囲で検量線を作成した。検量線は図3に示す。

検量線は決定係数R²>0.999と良好な直線性を示し、各検量点の正確さ%は98.1～105.1%であった。

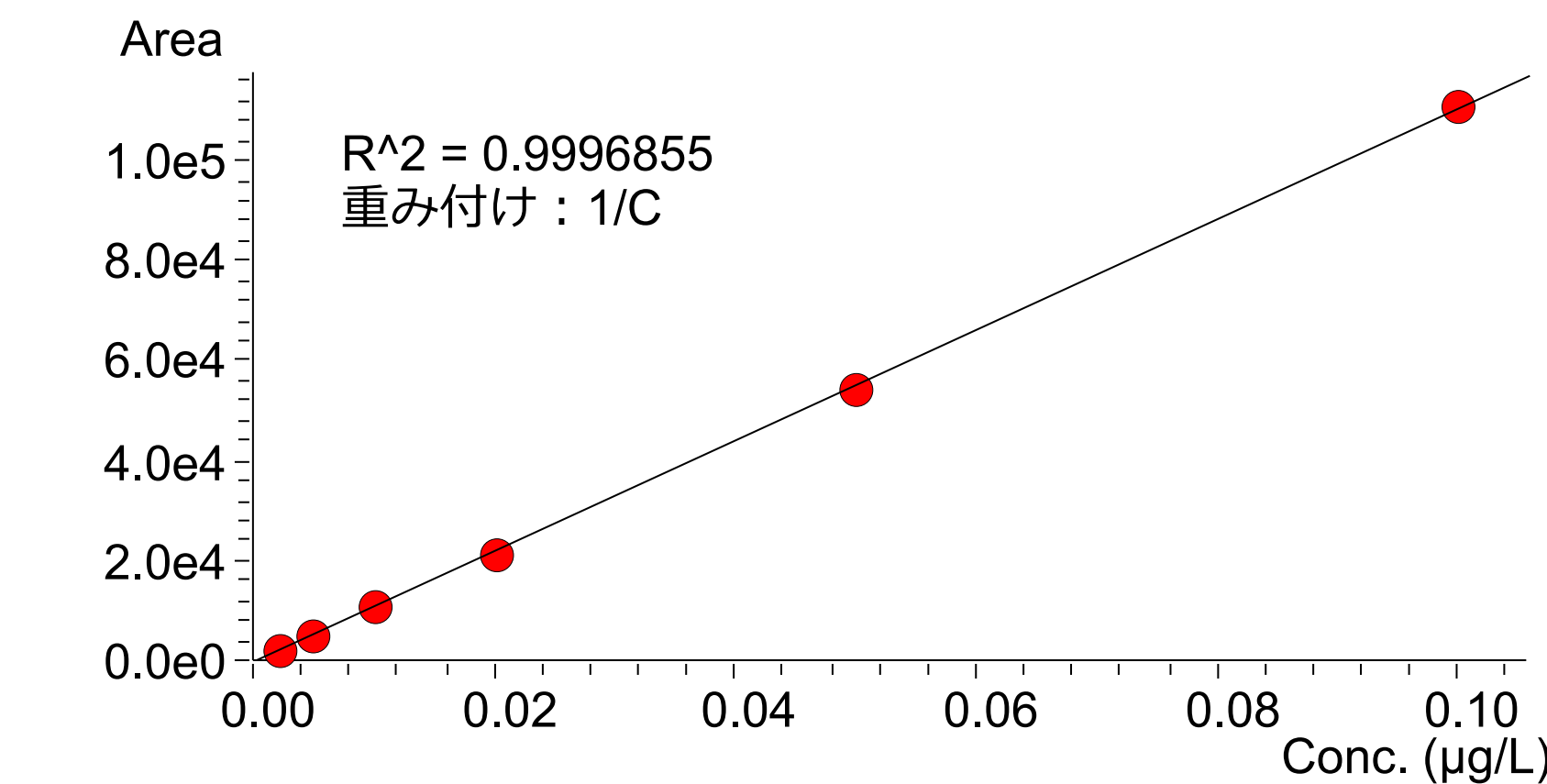


図3 セレウリド標準品を用いて作成した検量線

本研究では、確立した分析手法の妥当性を評価するため、EFSAのリスク評価基準（0.054 µg/L、調乳後の粉ミルク中の濃度）に基づき添加回収試験を実施した。前処理後の測定試料の終濃度（in vial）は、ISO 18465に基づく手法では0.0045 µg/L、QuEChERS法を参考にした手法では0.0108 µg/Lとなる。調乳後の粉ミルクにセレウリド標準品を添加し、ISO 18465に基づく手法と、QuEChERS法を参考にした手法の2種類の前処理法をそれぞれn=3で実施し、再現性確認も行った。

その結果、表3に示すとおり、いずれの手法においても良好な回収率と再現性が得られた。ISO 18465に基づく手法では回収率90.6%、再現性（濃度%RSD, n=3）は9.7%であった。QuEChERS法を参考にした手法では回収率100.1%、再現性（濃度%RSD, n=3）は2.3%であった。標準試料および添加回収試験におけるセレウリドのマスキロマトグラムを図4に示す。

表3 ISO法またはQuEChERS法による添加回収試験結果の比較			
前添加試料	回収率 (n=3)	ISO法	QuEChERS法
	濃度%RSD	9.7	2.3
後添加試料	回収率 (n=1)	109.3	108.7

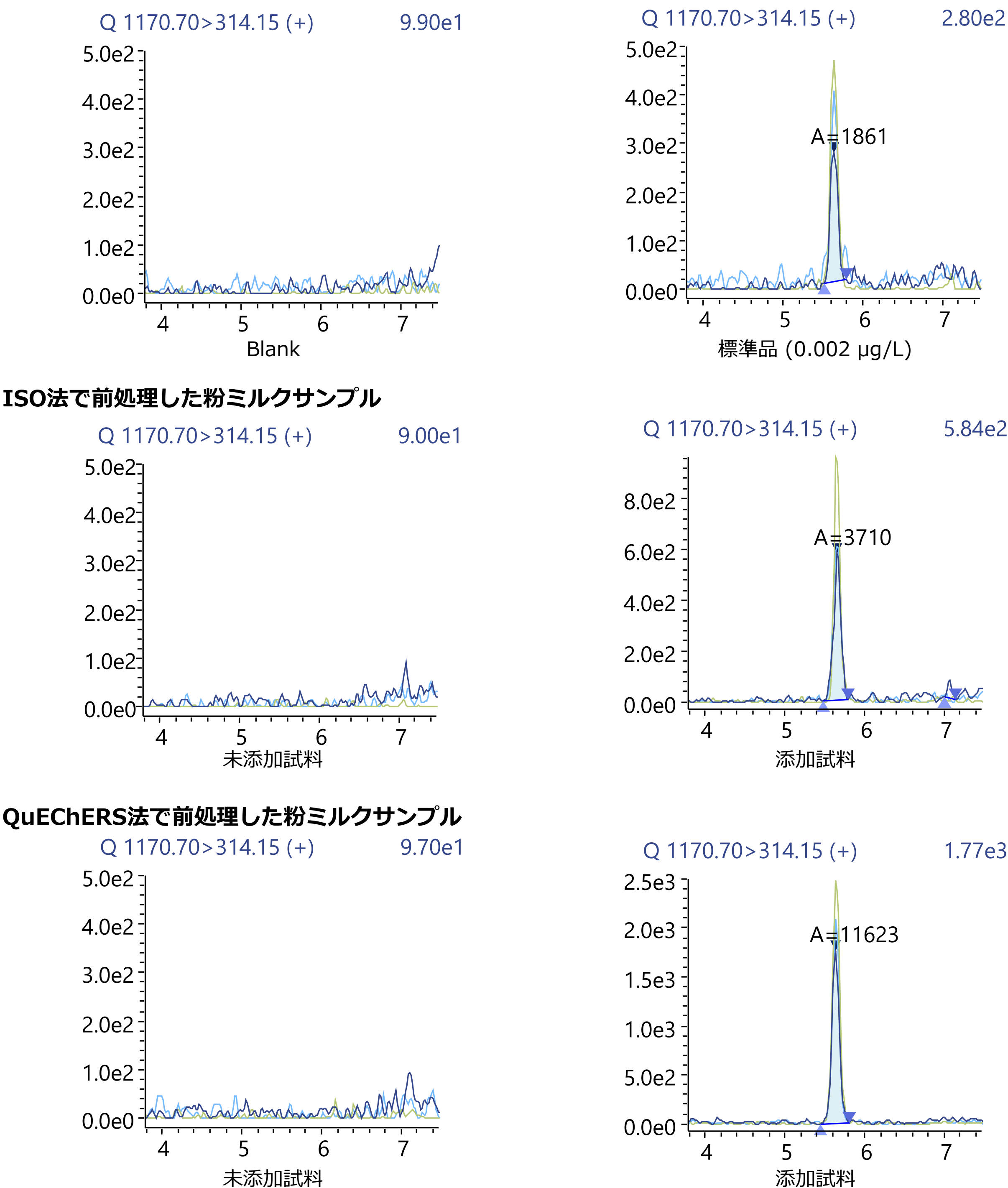


図4 セレウリドのマスキロマトグラム

また、イオン化時に夾雑物が与える影響（マトリックスエフェクト）も評価した。セレウリド標準品を添加せずに前処理を行ったサンプル（未添加試料）に対し、LC-MS/MS分析前にセレウリド標準品を添加して後添加試料を調製し、その回収率を確認した。その結果、いずれの前処理方法においても回収率は108.7%～109.3%以内であった。

◆結論

- トリプル四重極型LC-MS/MSを用いて、調乳後の粉ミルク中のセレウリドを高感度かつ高精度に定量できる手法を確立した。
- ISO 18465に準拠した手法、およびQuEChERS法を参考にした手法のいずれにおいても、内部標準不使用で高精度に再現性の良い定量が可能である。
- 本手法は、EFSAが提示する安全基準（0.054 µg/L）以下の低濃度域においても十分な定量精度を有しており、乳児用食品の品質管理・安全性評価に極めて有効といえる。

<参考文献>

- European Food Safety Authority (EFSA), Eskes C, et al. Rapid risk assessment on acute reference dose (ARfD) of cereulide in infants and information on acute consumption of infant formulae. EFSA Journal. 2026.
- ISO 18465. Microbiology of the food chain - Quantitative determination of emetic toxin (cereulide) using LC-MS/MS. 2017.

LCMS、NexeraおよびShim-pack Scepterは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。