

技術レポート**4 イムノアフィニティーカラムを用いた飼料中のゼアラレノン類の定量**

青山 幸二*, 渡部 千会*

1 緒 言

カビ毒の一つであるゼアラレノン (ZEN) は動物の体内で α -ゼアラレノール (α -ZEL), β -ゼアラレノール (β -ZEL), α -ゼアララノール (α -ZAL) 及び β -ゼアララノール (β -ZAL) に代謝されることが知られている。これらの代謝物はカビも産生するという報告^{1), 2)}もあり, 汚染濃度はわずかであるが自然汚染も報告されている³⁾⁻⁷⁾。

ゼアラレノン類はエストロゲン (女性ホルモン) 様作用を有するが, それらのマウスの細胞内エストロゲン受容体に対する親和力は, α -ZAL > α -ZEL > β -ZAL > ZEN > β -ZEL となる。つまり, ZEN によるリスクを考える際には, ZEN だけでなく, その代謝物についても分析を行う必要がある。

著者は以前, ZEN 代謝物も含めた ZEN 類の分析について, 多機能クリーンアップカラム (MultiSep 226 AflaZon+) で精製を行い, 液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) で定量する方法を検討した⁷⁾が, 一部の成分で定量を妨害するピークが確認され, 分析法を確立することができなかった。そこで, 今回は ZEN 類の分析に対して, 前報⁸⁾ (p.90) で示したイムノアフィニティーカラム (IAC) の適用を検討したので報告する。なお, ZEN の代謝物についても, 市販の ZEN 用 IAC で精製が可能であることが報告されている^{9), 10)}。

また, 以前の ZEN 類の分析法の検討⁷⁾では, LC-MS の測定で懸念されるイオン化抑制の影響を補正するため, 内標準物質としてゼアララノン (ZAN) を用いていた。しかしながら, ZAN がカビの分析より検出され得ること, IAC は精製能力が高く内標準を用いる必要性が低いこと等から, 今回の検討では ZAN は内標準ではなく, 分析対象成分に含めることとした。

2 実験方法**2.1 試 料**

市販の飼料原料をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎し, 供試試料とした。

2.2 試 薬**1) ゼアラレノン類標準液**

ZEN, ZAN, α -ZEL, β -ZEL, α -ZAL 及び β -ZAL 標準品 (いずれも Sigma 製) の一定量をアセトニトリルを用いて正確に希釈し, 各 ZEN 類標準原液を調製した (各 50 若しくは 100 μ g/mL)。各標準原液の一定量を混合し, アセトニトリルで正確に希釈して ZEN 類混合標準原液とした (各 2 μ g/mL)。なお, 標準原液及び混合標準原液は -20°C 以下で保存した。

使用に際して, ZEN 類混合標準原液の一定量をアセトニトリル-水 (1+1) で正確に希釈し, 1 mL 中に各 ZEN 類としてそれぞれ 5~1,000 ng を含有する各 ZEN 類標準液を調製した。

2) 溶媒はすべて液体クロマトグラフ用試薬を用いた。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) はタブレット (Sigma 製) を用いて調製した。その他の試薬は特級試薬を用いた。

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

2.3 装置及び器具

- 1) 液体クロマトグラフ：島津製作所製 Prominence
- 2) 質量分析計：島津製作所製 LCMS-2010 EV
- 3) 振とう器：タイテック製 RECIPRO SHAKER SR-2W
- 4) 遠心エバポレーター：東京理化学製 CVE-3100
- 5) 高速遠心分離器：久保田商事製 KM-15200
- 6) ろ紙：Advantec 製 5A
- 7) ガラス繊維ろ紙：Whatman 製 934-AH, GF/F 及び Advantec 製 GF-75
- 8) IAC：R-Biopharm Rhône 製 Easi-Extract Zearalenone

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 50.0 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、塩化ナトリウム 5 g 及びアセトニトリル-水 (9+1) 150 mL を加え、60 分間振り混ぜて抽出した。抽出液をろ紙でろ過し、ろ液 5 mL を 25 mL の全量フラスコに正確に入れ、標線まで PBS を加えて希釈した。希釈した溶液をガラス繊維ろ紙でろ過し、ろ液を IAC による精製に供する試料溶液とした。

2) IAC による精製

IAC 内の溶液を液面がカラム内ゲルの上面に達するまで 1 秒間に 1 滴程度の流速で流出後、カラム筒の上端まで PBS を加え、同様に流出させた。更に PBS を加え、液面がカラム筒の半分程度になるまで流出させた。IAC の上にリザーバーを連結し、試料溶液 7.5 mL を正確に加え、液面がカラム内ゲルの上面に達するまで流出させた。リザーバーを取り外し、カラム筒の上端まで水を加え、液面がカラム内ゲルの上面に達するまで流出させ、カラムを洗浄した。この操作を 2 回繰り返した後、カラム筒の上端まで水-メタノール (7+3) を加え、同様に洗浄した。この操作を 2 回繰り返した後、空気を通してカラム内ゲルに残った溶液を取り除いた。容器をカラムの下に置き、メタノール 1 mL を加えて ZEN 類を溶出させた。5 分程度放置後、メタノール 1 mL を加え、再び ZEN 類を溶出させた。空気を通してカラム内ゲルに残った溶液を溶出させ、すべての溶出液を 50°C 以下でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。アセトニトリル-水 (1+1) 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、プラスチック製遠心沈殿管に移した後、5,000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を LC-MS による測定に供する試料溶液とした。

3) LC-MS による測定

試料溶液及び各 ZEN 類標準液それぞれ 10 µL を LC-MS に注入し、選択イオン検出 (SIM) クロマトグラムを作成し、ピーク高さより試料中の各 ZEN 類量を算出した。

なお、LC-MS の測定条件を表 1 に示した。

表 1 LC-MS 測定条件

カラム	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (内径3.0 mm, 長さ250 mm, 粒径5 μ m)
カラム槽温度	40°C
溶離液	アセトニトリル-メタノール-10 mmol/L酢酸アンモニウム水溶液 (4+7+9)
流速	0.5 mL/min
イオン化法	大気圧化学イオン化法 (APCI)
モード	ネガティブ
ネブライザーガス	N ₂ (2.5 L/min)
乾燥ガス	N ₂ (6 L/min)
インターフェイス温度	300°C
ヒートブロック温度	200°C
CDL温度	200°C
モニターイオン	m/z 317 (ZEN) , 319 (ZAN, α -ZEL, β -ZEL) , 321 (α -ZAL, β -ZAL)

3 結果及び考察

3.1 分析法について

本法は、ISO に採用予定である、IAC を用いた飼料中の ZEN の定量法 (ISO/FDIS 17372) を参考に検討を行った。

また、前報にあるとおり、アフラトキシン分析法検討時に、IAC への負荷量を試料 1 g 相当量で行ったところ回収率が低いものが見受けられたため、本 ZEN 類の分析においても、念のため IAC への負荷量を試料 0.5 g 相当量とした。

3.2 添加回収試験

本法による回収率及び繰返し精度を確認するために添加回収試験を実施した。

とうもろこし及びマイロに各 ZEN 類として 80 μ g/kg 相当量を添加した試料について、本法に従って 3 回分析を行い、その回収率及び繰返し精度を求めた。その結果、表 2 のとおり、平均回収率は 88.5~109.8%、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 5.1%以下となり、良好な結果が得られた。

なお、添加回収試験で得られた SIM クロマトグラムの一例を図 1 に示した。

表 2 添加回収試験 (各 ZEN 類として 80 μ g/kg 相当量添加)

試料	ZEN		ZAN		α -ZEL		β -ZEL		α -ZAL		β -ZAL	
	回収率 ^{a)}	(RSD ^{b)})	回収率	(RSD)	回収率	(RSD)	回収率	(RSD)	回収率	(RSD)	回収率	(RSD)
とうもろこし	88.5	(1.4)	90.3	(0.7)	97.6	(2.1)	104.1	(3.4)	98.1	(2.4)	107.1	(3.5)
マイロ	103.1	(1.1)	102.2	(3.4)	107.2	(2.2)	108.0	(5.1)	102.0	(2.7)	109.8	(1.7)

a) 平均回収率, $n=3$

b) 相対標準偏差

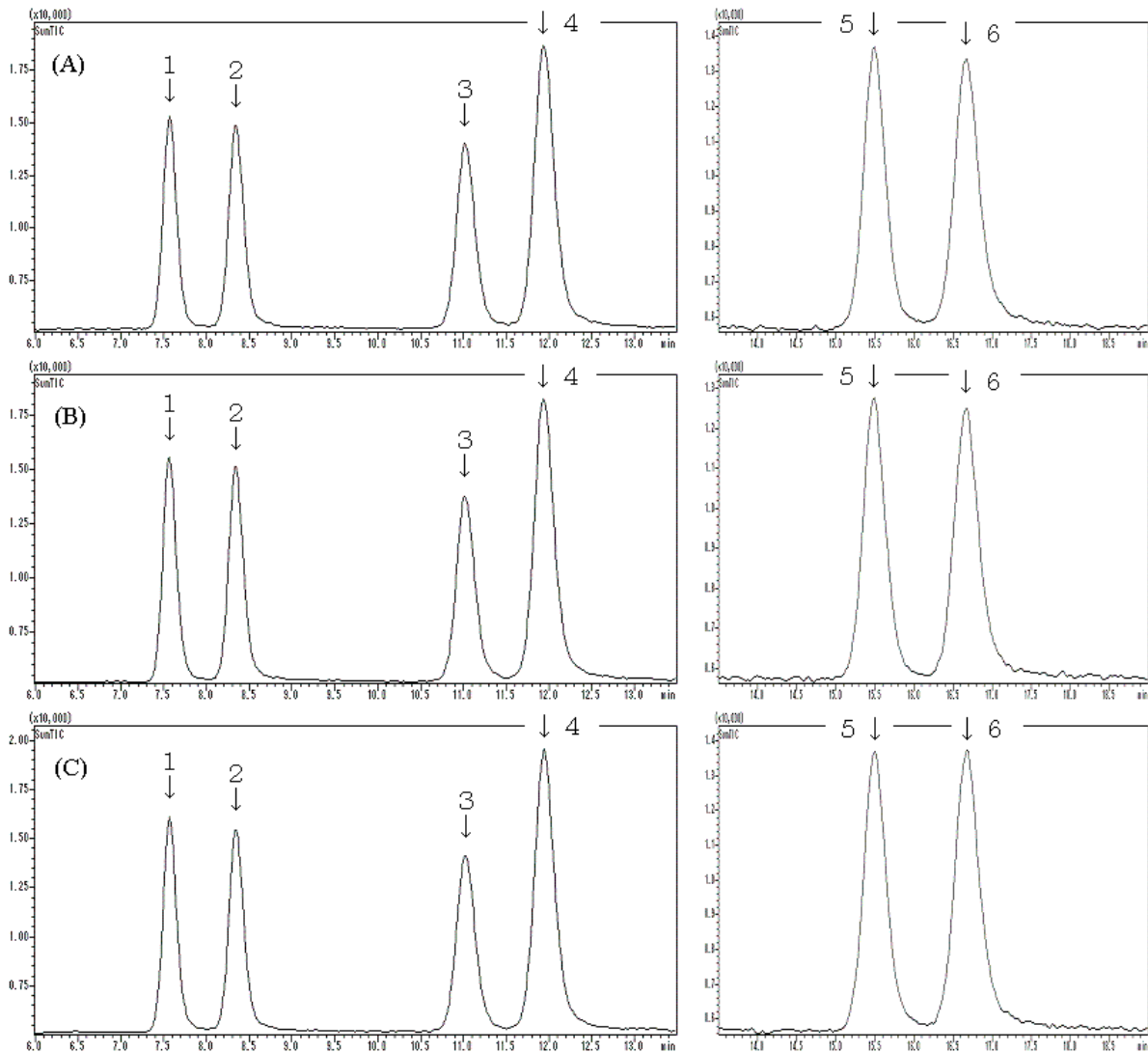


図1 添加回収試験で得られたSIMクロマトグラムの一例

測定条件は表2のとおり。

(A) 標準液 (各ZEN類 40 ng/mL)

(B) とうもろこし

(C) マイロ

矢印は 1 : β -ZAL, 2 : β -ZEL, 3 : α -ZAL, 4 : α -ZEL, 5 : ZAN, 6 : ZEN

文 献

- 1) Hagler, W.M., Mirocha, C.J., Pathre, S.V. and Behrens, J.C.: Appl. Environ. Microbiol., **37**, 849 (1979).
- 2) Richardson, K.E., Hagler, Jr. W.M., and Mirocha, C.J.: J. Agric. Food Chem., **33**, 862 (1985).
- 3) Chang, H.L. and DeVries, J.W.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., **67**, 741 (1984).
- 4) Bottalico, A., Visconti, A., Logrieco, A., Solfrizzo, M. and Mirocha, C.J.: Appl. Environ. Microbiol., **49**, 547 (1985).
- 5) Tanaka, T., Teshima, R., Ikebuchi, H., Sawada, J., Terao, T. and Ichinoe, M.: J. AOAC Int., **76**, 1006 (1993).
- 6) Bagnieris, R.W., Gaul, J.A. and Ware, G.M.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., **69**, 894 (1986).
- 7) 青山幸二: 飼料研究報告, **31**, 31 (2006).

- 8) 青山幸二, 渡部千会 : 飼料研究報告, **32**, 90 (2007).
- 9) Kruger, S.C., Kohn, B., Ramsey, C.S. and Prioli, R.: J. AOAC Int., **82**, 1364 (1999).
- 10) Terada, H.: Mycotoxins, **50**, 129 (2000).