

技術レポート**1 ライグラス中のロリトレム B の液体クロマトグラフによる定量法の改良**

細貝 明理*

Improved Determination Method of Lolitrem B in Ryegrass by LC

Ari HOSOKAI*

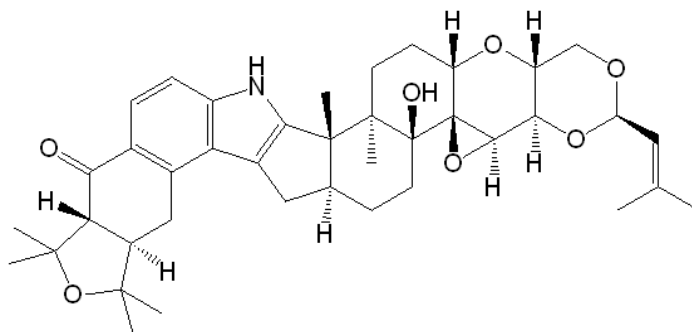
(*Food and Agricultural Materials Inspection Center,
Fertilizer and Feed Inspection Department)**1 緒 言**

ロリトレム B はイネ科植物内に共生する微生物である *Neotyphodium lolii* がライグラスわらに感染して産生する生理活性物質のひとつであり、ライグラススタグー等の家畜中毒を引き起す神経毒素として知られている。米国オレゴン州立大学の報告¹⁾によると、ロリトレム B の家畜に対する危険値は、1,800~2,000 ppb とされているが、国内で報告されるロリトレム B によると思われる中毒事例は 1,800 ppb 以下でも見受けられており、品種や年齢、性別など個体により感受性が異なると言われている²⁾。

現在、我が国におけるライグラスわら中のロリトレム B の定量法は、小野らが検討した LC 法³⁾が飼料分析基準⁴⁾に収載されている。しかし、米国の定量法が我が国の定量法と異なり、米国の定量法で得られたロリトレム B の定量値が日本での定量値よりも高くなる事例が見られたことから、抽出方法の改良を中心として日米共同で検討していくこととなった。

なお、ロリトレム B の構造式を Fig. 1 に示した。

* 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



Lolitreum B

 $C_{42}H_{55}NO_7$ MW: 685.89

CAS No.: 81771-19-9

Fig. 1 Chemical structure of Lolitreum B

2 実験方法

2.1 試料

ペレニアルライグラスわら及びイタリアンライグラスわらをそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉砕し、供試試料とした。

2.2 試薬等

1) ロリトレム B 標準液

ロリトレム B 標準品（和光純薬工業製，純度 98.0 %）1.3 μg を正確に量り，ジクロロメタン-アセトニトリル（4+1）1 mL を正確に加えて溶かし，ロリトレム B 標準原液を調製した（この液 1 mL はロリトレム B として 1,300 ng ($f=0.980$) を含有する．）。

使用に際して，標準原液の一定量をジクロロメタン-アセトニトリル（4+1）で正確に希釈し，1 mL 中にロリトレム B として 2.08, 5.2, 10.4, 52.0 及び 104.0 ng を含有する各ロリトレム B 標準液を調製した。

2) アセトニトリル，ジクロロメタン及び蒸留水は液体クロマトグラフ用試薬を用いた．その他，特記している以外の試薬については特級を用いた．

2.3 装置及び器具

1) 液体クロマトグラフ：Agilent Technologies 製 1100 Series

2) 振とう機：TAITEC 製 Water Bath Shaker XY-80

3) ロータリーエバポレーター：BÜCHI 製 R-200

4) シリカゲルミニカラム：Waters 製 Sep-Pak Plus Silica cartridge（充てん剤量 690 mg）にリザーバーを連結したもの

5) メンブランフィルター：関東化学製 HLC-DISK13 溶媒系（孔径 0.45 μm ，直径 13 mm，PTFE）

2.4 定量方法

定量操作は遮光した状態で行った。

1) 抽出

分析試料 1 g を正確に量って 50 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、酢酸エチル-メタノール-ヘキサン (4+3+2) 20 mL を加えた後、18 時間ゆるやかに横に振り混ぜて抽出した。

抽出液をろ紙 (5 種 A) でろ過し、ろ液 5 mL を正確に 50 mL のなす形フラスコに入れ、40 °C 以下の水浴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。

ヘキサン-酢酸エチル (9+1) 5 mL を正確に加えて残留物を溶かした後、メンブランフィルター (孔径 0.5 μm 以下) でろ過し、カラム処理に供する試料溶液とした。

2) カラム処理

シリカゲルミニカラムをヘキサン-酢酸エチル (9+1) 2 mL で洗浄した。

試料溶液 2 mL を正確にミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させ、更にヘキサン-酢酸エチル (9+1) 5 mL を加えて同様に流出させた。

50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、ヘキサン-酢酸エチル (7+3) 6 mL を加えてロリトレム B を溶出させた。溶出液を 40 °C 以下の水浴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。

ジクロロメタン-アセトニトリル (4+1) 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

3) 液体クロマトグラフィー

試料溶液及び各ロリトレム B 標準液各 20 μL を液体クロマトグラフに注入し、Table 1 の測定条件に従ってクロマトグラムを得た。

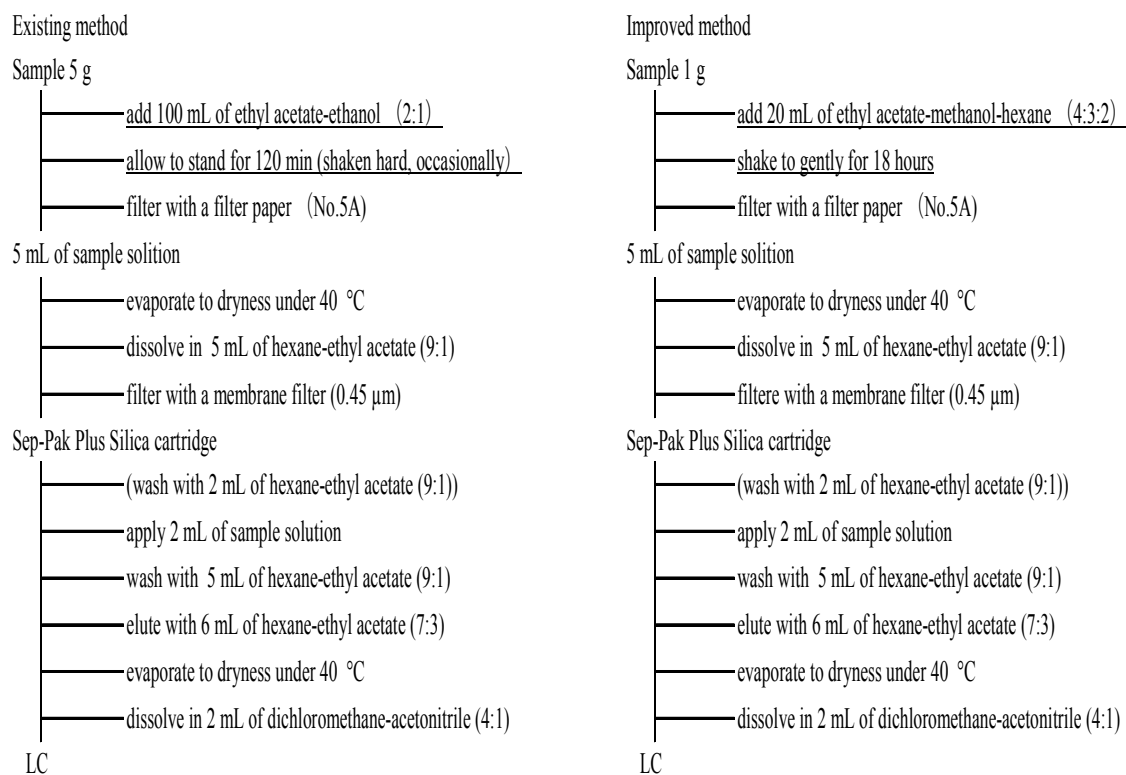
Table 1 Operating conditions of LC for analyzing Lolitrem B

Column	Agilent Technologies ZORBAX SIL (4.6 mm i.d.×250 mm, 5 μm)
Mobile phase	dichloromethane-acetonitril-water (200:50:1)
Flow rate	0.5 mL/min
Detector	Fluorescence detector (Ex:268 nm, Em:440 nm)
Column temperature	40 °C

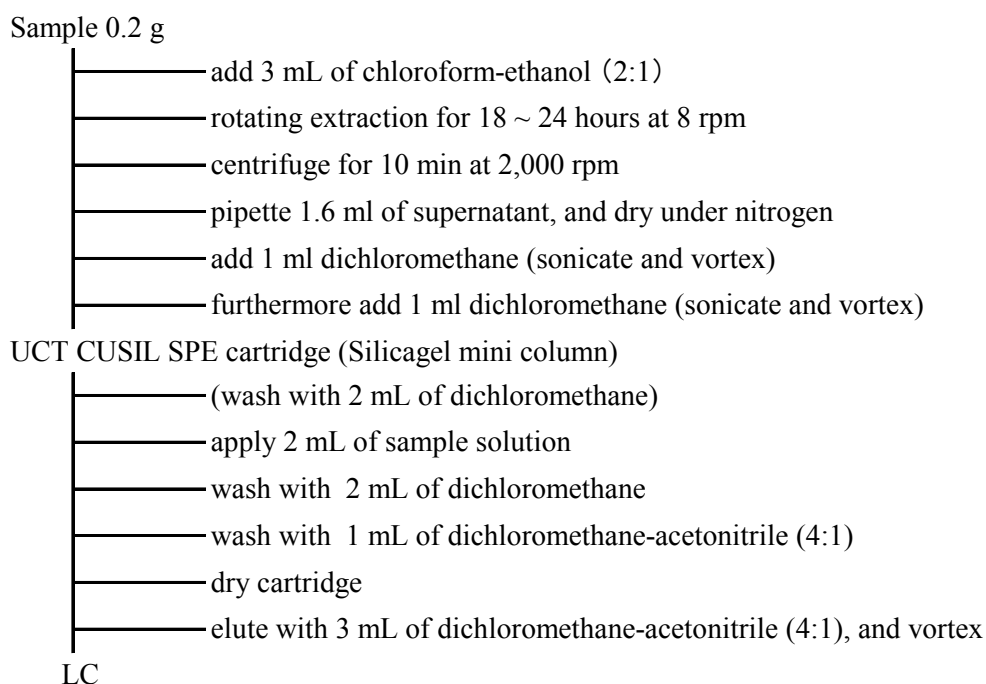
4) 計算

得られたクロマトグラムからピーク高さを求めて検量線を作成し、試料中のロリトレム B 量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。また、参考までに、米国の定量法の概要を Scheme 2 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure of existing and improved method of Lolitrem B in ryegrass in japan



Scheme 2 Analytical procedure of Lolitrem B in ryegrass in oregon

3 結果及び考察

3.1 検量線の作成

2.2 の 1)に従って調製した標準液各 20 μL を液体クロマトグラフに注入し、得られたクロマトグラムからピーク高さを求めて検量線を作成した。その結果、Fig. 2 のとおり、検量線は 2.08~104 ng/mL (注入量として 0.0416~2.08 ng) の範囲で直線性を示した。

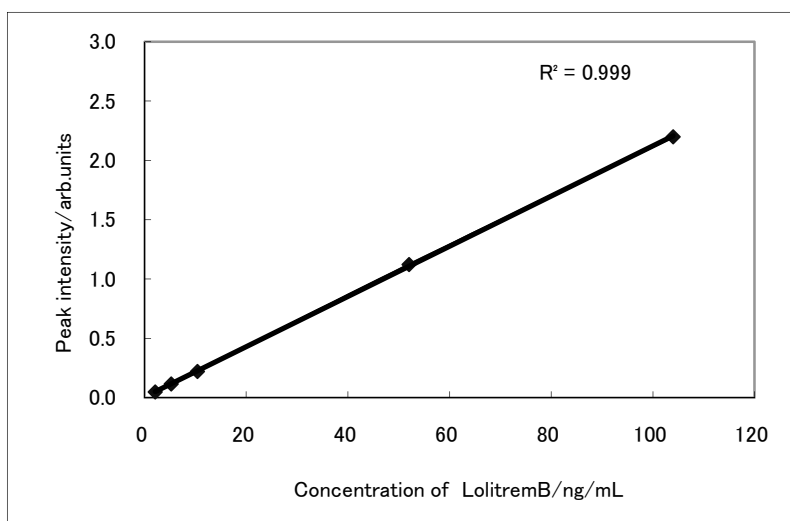


Fig. 2 Calibration curve of Lolitrem B

3.2 抽出液の検討

飼料分析基準収載法⁴⁾ (以下「現行法」という.) では、抽出液に酢酸エチル-エタノール (2+1) が採用されている。一方、オレゴン州立大学の方法 (以下「オレゴン大法」という.) を Scheme 2 に示した。オレゴン大法では、抽出液にクロロホルム-メタノール (2+1) を用いている。小野ら³⁾が現行法を検討した際には、分析者への健康影響を考慮しクロロホルムに代えて酢酸エチルを採用しているが、この抽出液ではロリトレム B が十分に抽出されず、そのことが両法間の定量値の差に影響しているものと考えられた。

そこで、オレゴン大法の抽出液であるクロロホルム-メタノール (2+1) を基にして、抽出液をオレゴン大の提案に準じて、クロロホルムの代わりにヘキサン-酢酸エチル (1+2) を用い、酢酸エチル-メタノール-ヘキサン (4+3+2) (以下「改良抽出液」という.) に変更して、以下現行法に従って定量を行い、現行法との定量値を比較した。

試料には、自然汚染されたライグラスわらを用いた。

その結果、Table 2 のとおり、イタリアン及びペレニアルライグラスわらのいずれの試料においても、改良抽出液では現行法の抽出液に対して 10~20 %の定量値の増加が見られた。このことから今後の検討では改良抽出液を使用することとした。

Table 2 Comparison of quantitative value of Lolitrem B by extraction solvents

kind of ryegrass	existing extraction solvent		new extraction solvent	
	Value ^{a)}	RSD ^{b)}	Value ^{a)}	RSD ^{b)}
	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	(%)	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	(%)
Italian	1344	3.3	1626	0.3
Perennial	2146	1.0	2455	1.1

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.3 抽出方法及び抽出時間の検討

次に、抽出時間及び抽出方法について検討を行った。

現行法では 1 時間に 3~4 回激しく振り混ぜながら 2 時間静置して抽出を行っている。これに対し、オレゴン大法では 18~24 時間のゆるやかな振とうにより抽出している。このことから、18 時間ゆるやかに振とうした抽出法と現行の抽出法を比較するため、それぞれの抽出法で抽出し、以降現行法に従って定量を行った。なお、18 時間ゆるやかに振とうするにあたり 100 rpm で振とうを行った。

その結果、Table 3 のとおり、ロリトレム B の回収率は 18 時間ゆるやかな振とう抽出を行った場合、現行法に対し 6 %の定量値の増加が得られた。このことから今後の検討では、18 時間ゆるやかに振とうした抽出方法で検討を行うこととした。

Table 3 Comparison of quantitative value of Lolitrem B by extraction methods and times

kind of ryegrass	existing extraction method (2hours)		new extraction method (18hours)	
	Value ^{a)}	RSD ^{b)}	Value ^{a)}	RSD ^{b)}
	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	(%)	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	(%)
Italian	1626	0.3	1737	0.4
Perennial	2455	1.1	2612	0.8

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.4 試料採取量の検討

試料の採取量については現行法では 5 g としている。しかし、平成 10 年度有害物質等残留防止緊急事業において財団法人日本食品分析センターが検討した分析法⁵⁾では 1 g、オレゴン大法では 0.2 g で分析を行っている。このことから、採取量の影響を調べるため、自然汚染された試料を用いて次の検討を行った。

自然汚染された試料 0.5 g に対して 10 mL, 1 g に対して 20 mL, 5 g に対して 100 mL の改良抽出液を用いて 18 時間ゆるやかに振とう抽出し、以下現行法に従って分析値を求めた。

その結果、Table 4 のとおり、平均定量値に特に差は認められなかった。相対標準偏差 (RSD) は試料採取量が多くなるにつれて小さくなる傾向はあるものの、いずれも問題があると認められる値ではなかった。これらのことから、分析操作の簡便性を考慮して 1 g を採用することにした。

Table 4 Comparison of quantitative value of Lolitrem B by sampling weights

sampling weight	0.5 g		1 g		5 g	
	Value ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD ^{b)} (%)	Value ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD ^{b)} (%)	Value ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD ^{b)} (%)
infected ryegrass						
high concentration	1981	3.7	1955	3.9	1987	0.5
low concentration	48	2.3	49	3.1	48	0.4

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.5 シリカゲルミニカラムの検討

ロリトレム B について、シリカゲルミニカラムからの溶出画分の検討を行った。

2.4 の 1)に従ってライグラスわらから抽出した抽出液 5 mL に対して、ロリトレム B として 520 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量添加し、2.4 の 2)に従ってカラム処理を行った。

ミニカラムからの各溶出画分をそれぞれ分取し、これらを減圧濃縮、乾固後、残留物をジクロロメタン-アセトニトリル (4+1) に溶かしたものを液体クロマトグラフによる測定に供試した。

Table 5 に示したように、ロリトレム B はヘキサン-酢酸エチル (7+3) 0~6 mL に溶出し、洗浄液には溶出されなかった。以上の結果から、本法では現行法³⁾と同様にヘキサン-酢酸エチル (7+3) 6 mL で溶出することとした。

Table 5 Elution pattern of Lolitrem B from silicagel mini column

	Hexane-ethylacetate (9+1)		Hexane-ethylacetate (7+3)					Total
	0~5 mL	0~1 mL	1~2 mL	2~3 mL	3~4 mL	4~5 mL	5~6 mL	
			0	0	37	49	13	
Recovery ^{a)} (%)	0	0	0	37	49	13	0	99

a) $n=1$

3.6 添加回収試験

2.1 で調製したライグラスわらにロリトレム B として 390, 260, 130 及び 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加した試料を用いて、本法により 3 点併行で定量し、回収率及び繰返し精度を検討した。添加回収試験については、ロリトレム B の汚染が認められないライグラスわらが入手できなかったことから、試料として汚染程度の低いライグラスわらを用い、回収率は定量値からブランク値を差し引いて求めた。

Table 6 に示したように、平均回収率 78.7~109 %, その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD) として 11 %以下の成績が得られた。

なお、クロマトグラムの一例を Fig.3 に示した。

Table 6 Recoveries of Lolitrem B from ryegrass

Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Ryegrass	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)
390	108	0.5
260	107	2.3
130	109	3.7
50	78.7	11

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

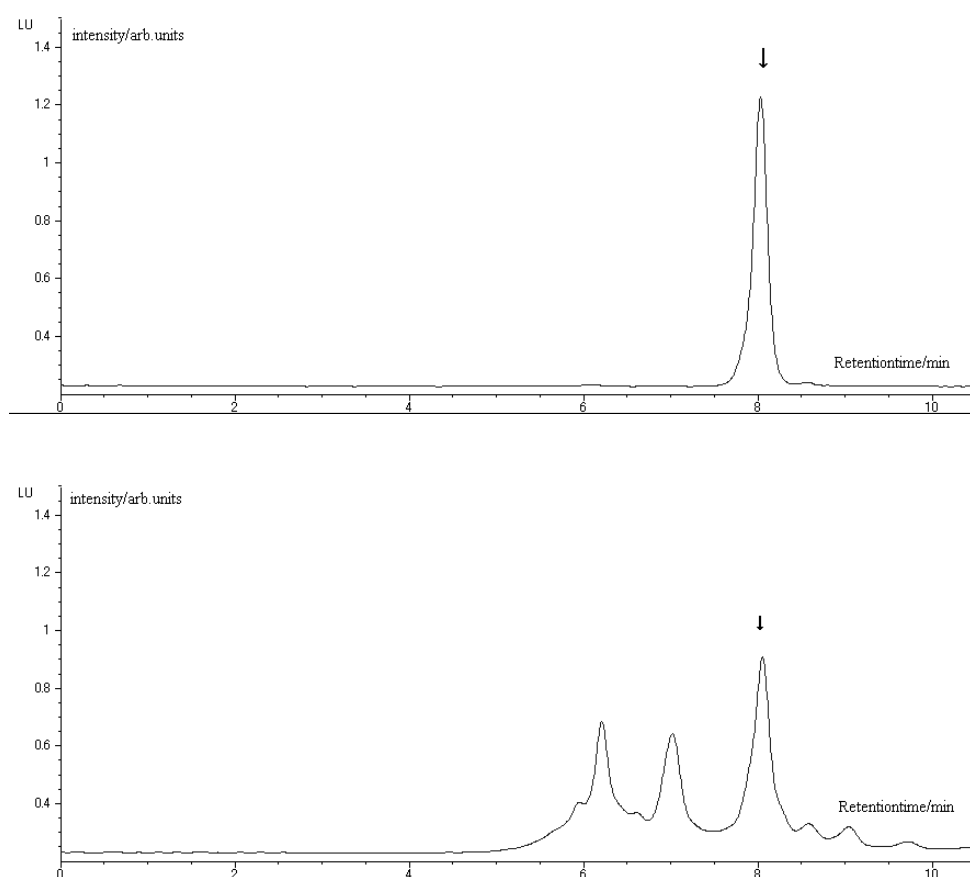


Fig.3 LC chromatograms of Lolitrem B

LC conditions are shown in Table 1.

a) Standard solution (The amount of lolitremB is 1.3 ng.)

b) Sample solution of ryegrass Spiked lolitremB at 770 $\mu\text{g}/\text{kg}$

(\downarrow : Arrows indicate the peak of lolitremB.)

4 まとめ

ライグラスわら中のロリトレム B について、液体クロマトグラフを用いた定量法の改良を検討したところ、次の結果を得た。

- 1) 検量線は、ロリトレム B について 0.04~2.04 ng の範囲で直線性を示した。
- 2) 抽出液に酢酸エチル-メタノール-ヘキサン (4+3+2) を採用したところ、良好な結果が得られた。
- 3) 18 時間ゆるやかに振り混ぜて抽出することで良好な結果が得られた。
- 4) 試料採取量について 5, 1 及び 0.5 g を比較した結果、1 g を採用することにした。
- 5) ミニカラムからの溶出画分の検討を行ったところ、現行法と同様に 6 mL で溶出することとした。
- 6) ライグラスわらに、ロリトレム B として 390, 260, 130 及び 50 µg/kg 相当量を添加した試料を用いて、添加回収試験を実施したところ、平均回収率 78.7~109 %, その繰り返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 11 %以下の成績が得られた。
- 7) 今後、本法での定量下限及び検出下限の検討等並びに共同試験を実施する予定である。

文 献

- 1) S.Aldrich-Markham, G.Pirelli, A.M.Craig: Oregon State University Extension Service EM8598-E · Revised (2007).
- 2) Shigeru Miyazaki, Megumi Fukumura, Miyako Yoshioka, Noriko Yamanaka: Detection of Endophyte Toxins in the Imported Perennial Ryegrass Straw, *J. Vet. Med. Sci.*, **63**(9), 1013-1015 (2001).
- 3) 小野雄三, 染谷潔, 古川明, 菅野清: 高速液体クロマトグラフィーによるライグラス中のロリトレム B の定量, *飼料研究報告*, **25**, 12-20 (2000).
- 4) 農林水産省消費・安全局長通知: 飼料分析基準の制定について, 平成 20 年 4 月 1 日, 19 消安第 14729 号 (2008).
- 5) 財団法人日本食品分析センター: 平成 10 年度有害物質等残留防止緊急対策事業 飼料中の抗菌性飼料添加物等の分析法の開発, (1999).