

**技術レポート****3 イムノアフィニティーカラムを用いた飼料中のオクラトキシン A の定量**

青山 幸二\*, 渡部 千会\*

**1 緒 言**

カビ毒であるオクラトキシン A (OTA) は肝臓及び腎臓に毒性を示し、発がん性も疑われている。OTA は比較的低温地域においても汚染が報告されており、特にヨーロッパでは関心が持たれている。OTA の規制値は、我が国では食品、飼料ともに未だ設定されていないが、ヨーロッパを中心とした国々ではすでに設定されており、その大半は 5 ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) という値を採用している<sup>1)</sup>。Codex においても現在、大麦等に規制値を設定するための作業が進められており、その値は 5 ppb もしくは 20 ppb で議論が進められている。

以上のように、OTA の規制値は他のカビ毒と比べると低い値であることから、分析法についても、より低レベルまで定量が可能な分析法が必要となる。そこで、前報<sup>2)</sup> (p.90) で示したイムノアフィニティーカラム (IAC) を OTA の分析にも適用するための検討を行ったので報告する。

**2 実験方法****2.1 試 料**

市販の飼料原料及び分析法検討用に作成された試験飼料をそれぞれ 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) OTA 標準液**

OTA 標準品 (Sigma 製) 5 mg を正確に量り、トルエン-酢酸 (99+1) を用いて 50 mL の褐色全量フラスコに移し、同溶媒を標線まで加えて標準原液を調製した (この液 1 mL は OTA として 0.1 mg を含有する。)。なお、標準原液は $-20^{\circ}\text{C}$  以下で保存した。

使用に際して、標準原液の一定量を取り、溶媒を除去した後、アセトニトリル-水-酢酸 (30+70+1) を正確に加えて残留物を溶かし、更に同溶媒で正確に希釈し、1 mL 中に OTA として 0.05~10 ng を含有する各 OTA 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。

**2.3 装置及び器具**

- 1) 液体クロマトグラフ : Agilent Technologies 製 1100 Series
- 2) 質量分析計 : Agilent Technologies 製 1100 Series LC/MSD SL
- 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

\* 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

- 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：Vicom 製 OchraTest

## 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、アセトニトリル-水 (3+2) 150 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出した。抽出液をろ紙でろ過し、ろ液 4 mL を 50 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 25 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。一旦リザーバーを取り外し、カラム筒の上端まで PBS を加え、半分程度流出させた後、再びリザーバーを取り付け、PBS 15 mL を加え、カラムを洗浄した。PBS 流出後リザーバーを取り外し、カラム筒の半分程度まで 10 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液を加え流出させた後、10 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液 15 mL で同様にカラムを洗浄した。リザーバーを取り外し、空気を通してカラム内ゲルに残った溶液を取り除いた後、容器をカラムの下に置き、メタノール-酢酸 (98+2) 1 mL を加えて OTA を溶出させた。5 分程度放置後、メタノール-酢酸 (98+2) 1 mL を 2 回加え、再び OTA 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-酢酸 (30+70+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、上澄み液を液体クロマトグラフィー (LC) あるいは液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) による測定に供する試料溶液とした。

### 3) LC による測定

試料溶液及び各 OTA 標準液それぞれ 100 µL を LC に注入し、クロマトグラムを作成し、ピーク高さより試料中の OTA 量を算出した。

なお、HPLC の測定条件を表 1 に示した。

表 1 LC 測定条件

検出器	蛍光検出器 (励起波長 333 nm, 蛍光波長 460 nm)
カラム	Inertsil ODS-3V (内径 4.6 mm, 長さ 250 mm, 粒径 5 µm)
カラム槽温度	45°C
溶離液	アセトニトリル-水-酢酸 (55+43+2)
流速	1.0 mL/min

### 4) LC-MS による測定

試料溶液及び各 OTA 標準液 50 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 OTA 量を算出した。

なお、LC-MS の測定条件を表 2 に示した。

表 2 LC-MS 測定条件

カラム	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (内径2.1 mm, 長さ150 mm, 粒径5 μm)
カラム槽温度	40°C
溶離液	10 mmol/L酢酸アンモニウム水溶液-アセトニトリル (7+3) →15分→ (1+19)
流速	0.2 mL/min
イオン化法	エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)
モード	ポジティブ
ネブライザーガス	N <sub>2</sub> (60 psi)
乾燥ガス	N <sub>2</sub> (10 L/min, 350°C)
キャピラリー電圧	4,000 V
フラグメンター電圧	120 V
モニターイオン	<i>m/z</i> 404

### 3 結果及び考察

#### 3.1 分析法の検討

本法を検討するにあたっては、OMA of AOACI<sup>3)</sup>に採用されている方法及び厚生労働省による食品中のカビ毒汚染実態調査に使用された方法<sup>4)~6)</sup>を参考に、飼料及び多種類の IAC に適用可能であると思われる方法を設定した。

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 OTA の分析においても、念のため IAC への負荷量を試料 0.67 g 相当量とした。

#### 3.2 妨害物質の検討

とうもろこし、マイロ、大麦、小麦、玄米、大豆油かす、ふすま及び試験飼料 8 種類について、本法の LC を用いる方法に従って定量を行った。その中で OTA と同じ位置にピークが確認された試料について、蛍光スペクトル及び LC-MS によりピークの確認を行ったところ、小麦及び多くの試験飼料については OTA の定量を妨害するピークが存在することが判明した。

そこで、LC の溶離液の極性を上げて OTA と夾雑ピークとの分離を試みた。その結果、ピークが分離する条件は得られたが、OTA の溶出時間が遅くなり、SN 比による定量下限が 2 μg/kg 以上となった。OTA の想定される基準値 5~20 μg/kg からすると、この定量下限は十分とは言えない。なお、極性を上げて得られた LC の定量値と LC-MS から得られた定量値はほぼ同じ値であったため、夾雑ピークは見られず、LC-MS 分析の際に懸念されるイオン抑制もないものと考えられた。

以上のことから、以下の検討には定量に LC-MS を用いることとした。

#### 3.3 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。

マイロ及び大麦に OTA として 0.5 μg/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、LC-MS によりその回収率及び繰返し精度を求めた。その結果、表 3 のとおり、マイロ及び大麦の平均回収率はそれぞれ 87.9%及び 114.3%、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) としてそれぞれ 3.8%及び 4.2%と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 3 添加回収試験 (OTA として 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量添加)  
(%)

マイロ	大麦
回収率 <sup>a)</sup> (RSD <sup>b)</sup> )	回収率 (RSD)
87.9 (3.8)	114.3 (4.2)

a) 平均回収率,  $n=3$

b) 相対標準偏差

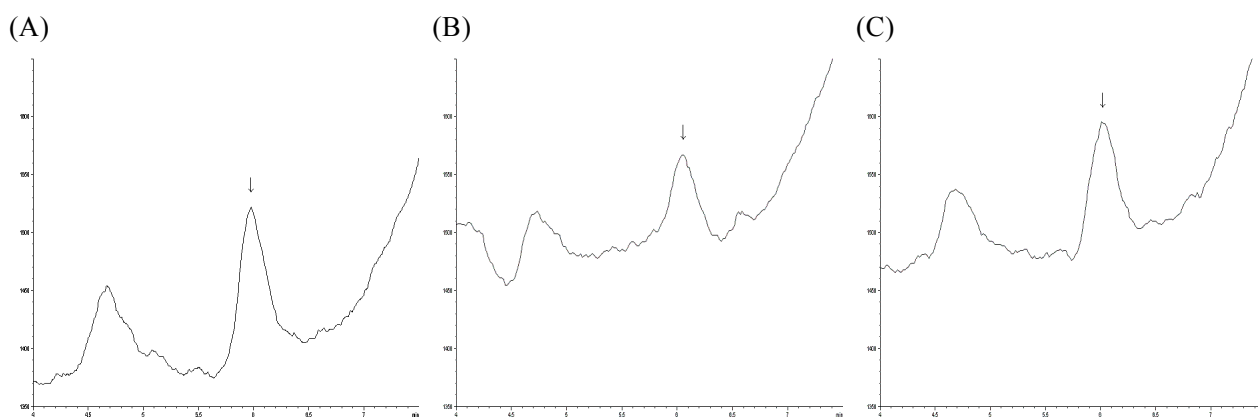


図 1 添加回収試験で得られた SIM クロマトグラムの一例

測定条件は表 2 のとおり。

(A) 標準液 (OTA 0.5 ng/mL)

(B) マイロ

(C) 大麦

矢印が OTA

## 文 献

- 1) FAO: FAO Food and Nutrition Paper 81, Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003, (2004), FAO, Rome, Italy
- 2) 青山幸二, 渡部千会: 飼料研究報告, 32, 90 (2007).
- 3) Horwitz, W. ed.: "Official Methods of Analysis of AOAC International", 18th Ed., Maryland, USA, AOAC International (2005).
- 4) Sugita-Konishi, Y., Nakajima, M., Tabata, S., Ishikuro, E., Tanaka, T., Norizuki, H., Itoh, Y., Aoyama, K., Fujita, K., Kai, S. and Kumagai, S.: J. Food Prot., 69, 1365 (2006).
- 5) 厚生労働科学研究費補助金, 食品の安全性高度化推進研究事業, 食品中のカビ毒の毒性および暴露評価に関する研究, 平成 16 年度総括・分担研究報告書 (主任研究者 小西良子) (2005).
- 6) 厚生労働科学研究費補助金, 食品の安心・安全確保推進研究事業, 食品中のカビ毒の毒性および暴露評価に関する研究, 平成 17 年度総括・分担研究報告書 (主任研究者 小西良子) (2006).