

「小麦におけるデオキシニバレノール、ニバレノール
及びそれらの配糖体の同時分析法」

操作手順

1. 抽出

- ① 試料25 gを正確に抽出用容器に量り採る。
- ② これに蒸留水を100 mLを加え、30分間振とう抽出する。
- ③ 遠心分離（1410 g、10分間）し、上清を抽出溶液とする。

2. イムノアフィニティーカラムカラムによる精製

イムノアフィニティーカラムの取り扱い上の注意：カラム内にはPBSが充填されていて、カラム上部には僅かに空気が入っている。そのため、横に倒すと空気がカラム（充填剤）に触れてしまい、その結果良好な回収率が得られなくなるため、保存時から分析終了時まで直立の状態を保っている必要がある。もし、ゲル上の白いフリット表面に気泡が溜まっていたら、タッピングして除去すること。

- ① イムノアフィニティーカラムDON-NIV WB（VICAM社製）は室温になるまで放置する。
- ② きり等でイムノアフィニティーカラムの上キャップに穴を開けてから上キャップをはずした後、下キャップをはずし、ストップコックを取り付け、カラム架台あるいはバキュームマニホールドにセットする。カラム内溶液を自然落下で排出後、あらたにPBSでカラム内を満たし、自然落下で排出させる。再度PBSでカラム内を満たし、PBSを半分程排出させた後、ストップコックを閉じる。
- ③ 「1.」の操作で得られた抽出溶液5.0 mLを正確にピペッターまたはホールピペットなどで三角フラスコへとり、PBS 25.0 mLを加え良く混合する。
- ④ ガラスロートにガラス繊維ろ紙をセットしろ過を行う。ろ液を三角フラスコにとり、試料溶液とする。
- ⑤ カラムにアダプターを取り付けたリザーバーを連結する。
- ⑥ ④で得られた試料溶液6.0 mLをピペッター又はホールピペットで正確にとりイムノアフィニティーカラムに注入する。ストップコックを開き、1～2滴/秒の速さでろ液を排出させる（途中、排出速度が非常に遅くなった場合には、ゲル上の白いフリット表面に泡が付着していることがあるので、リザーバー及びカラムを手で保持し試料ろ液がこぼれないよう注意し、カラムを指等でタッピングし泡を取り除く）。全てのろ液を排出させたのち、リザーバーを

取り除く。カラムをPBS（約3.3 mL）で満たし、排出させる操作を3回繰り返した後、蒸留水（約3.3 mL）で満たし、排出させる操作を3回繰り返すことにより洗浄を行う。その後、共栓付き10 mL容試験管あるいはキャップ付きバイアルにメタノール0.5 mLで溶出し、続いてアセトニトリル1.5 mLで溶出を行った後、強く通気し、ゲル内の溶媒をすべて排出させる。

3. 試料溶液の調製

「2.」の⑥で得られた溶液について窒素気流を用いて溶媒を除去する。残さを10%アセトニトリル水溶液0.25 mLで溶解する。遠心（12,000 g、5 分間）後、その上清をLC-MS/MS用試験溶液とする。

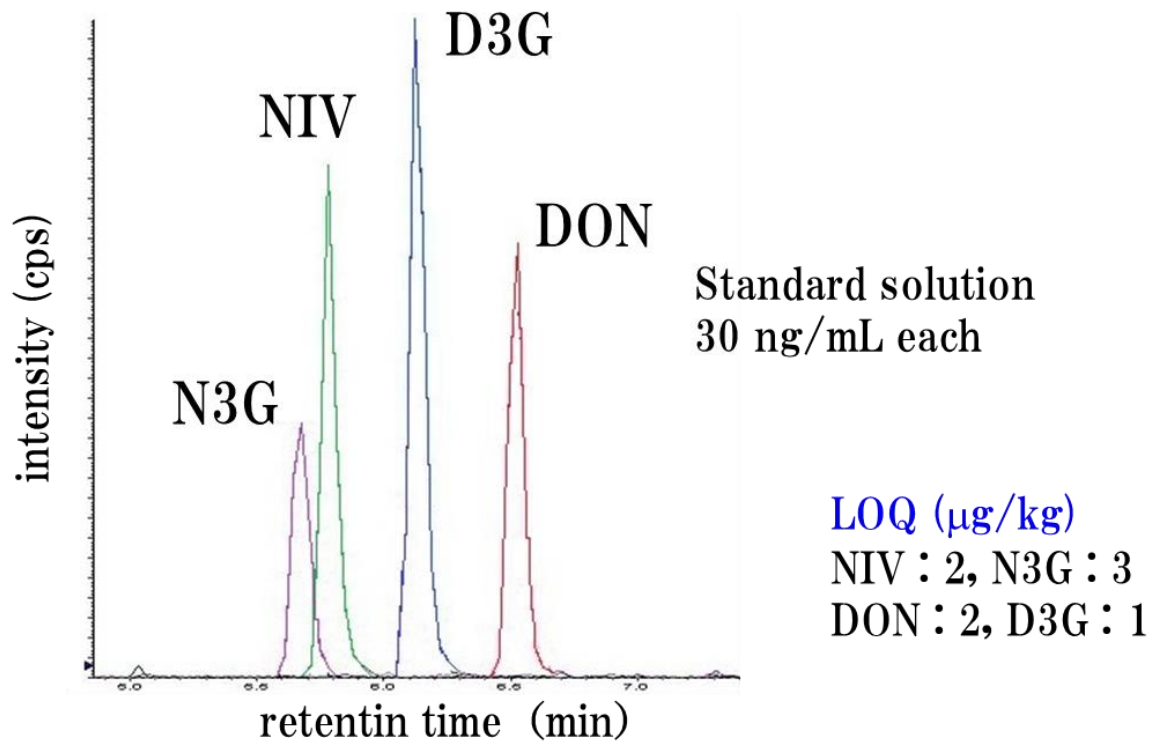
4. 高速液体クロマトグラフ-質量分析計（LC-MS/MS）による分析

① モニターイオン例

イオン化：ESI negative

- ニバレノール、 $371 [M + CH_3COO]^- > 281$
- ニバレノール-3-O- β -D-グルコピラノシド（N3G）、 $533 [M + CH_3COO]^- > 263$
- デオキシニバレノール、 $295 [M - H]^- > 265$
- デオキシニバレノール-3-O- β -D-グルコピラノシド（D3G）、 $517 [M + CH_3COO]^- > 427$

② クロマトグラム例と HPLC 測定条件（次ページ）



HPLC conditions

- column : Inertsil ODS-3 (2.1 × 150 mm, 3 μm)
- Mobile phase : A 10 mM ammonium acetate
B acetonitrile
- Gradient : B conc. 5% (0 min) – 83% (8 min)
- flow rate : 0.2 mL/min

③ 添加回収試験の結果などについては、Yoshinari et al. J Agric Food Chem. 2014; 62(5): 1174-80.に掲載しております。