

LC/MS/MS同時分析による穀類中のオクラトキシンおよびシトリニンの汚染調査

飯田 憲司, 田端 節子, 木村 圭介, 鈴木 仁, 井部 明広

Simultaneous Determination and Survey of Ochratoxin A, Ochratoxin B and Citrinin in Cereals by LC/MS/MS

Kenji IIDA, Setsuko TABATA, Keisuke KIMURA, Jin SUZUKI and Akihiro IBE

LC/MS/MS 同時分析による穀類中のオクラトキシンおよびシトリニンの汚染調査

飯田 憲司*, 田端 節子*, 木村 圭介*, 鈴木 仁**, 井部 明広*

Simultaneous Determination and Survey of Ochratoxin A, Ochratoxin B and Citrinin in Cereals by LC/MS/MS

Kenji IIDA*, Setsuko TABATA*, Keisuke KIMURA*, Jin SUZUKI** and Akihiro IBE*

Ochratoxin A (OTA), ochratoxin B (OTB) and citrinin (CIT) in cereals were determined simultaneously by liquid chromatography - electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC/MS/MS).

The quantification limits of OTA, OTB and CIT in the samples were 0.07, 0.03 and 0.07 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively.

In 33 samples examined, OTA was detected in 6 samples at levels of 0.2 - 1.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and CIT were detected in 2 samples at levels of 0.7 - 1.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$. One sample was co-contaminated with OTA and CIT. Contents of OTA detected in cereals were less than the regulation level of EU (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Keywords : オクラトキシン A ochratoxin A, オクラトキシン B ochratoxin B, シトリニン citrinin, マイコトキシン mycotoxin, 高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 LC/MS/MS, 穀類 cereals

緒言

オクラトキシン A (OTA) およびオクラトキシン B (OTB) は, *Aspergillus ochraceus* や *Penicillium verrucosum* 等のカビによって産生されるマイコトキシンである. 特に, OTA は腎毒性および発ガン性があることが知られている^{1, 2)}. 諸外国では OTA について穀類を中心に規制値が定められており³⁾, EU では原料穀類で 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 穀類およびその加工品で 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 干しぶどうで 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, その他焙煎コーヒーやワイン等に設定されている⁴⁾. また, Codex 委員会でも基準値の設定が検討されているが, 日本では規制値は設定されていない.

シトリニン (CIT) は *Penicillium citrinum* や *P.verrucosum* 等が産生するマイコトキシンで, OTA と同様に腎毒性があり, OTA の発ガン性を増強するといわれている^{5, 6)}. ヨーロッパでは *P.verrucosum* が原因と推測される OTA と CIT の複合汚染が報告されている^{7, 8)}. Fig. 1 にこれら 3 種のマイコトキシンの化学構造式を示した.

これらのマイコトキシンの分析には, 蛍光検出器を用いた HPLC 法が一般的に用いられている⁹⁻¹³⁾. しかし, OTA, OTB および CIT の同時分析の報告は少ない. また, 確認法としてメチル化後 HPLC で測定する方法¹³⁾があるが, 作業が煩雑で, 高濃度でないと十分に確認ができないという問題がある. 近年普及されつつある LC/MS/MS は特異性が高く, 低濃度まで分析が可能である. そこで, OTA, OTB および CIT の 3 種のマイコトキシンについて LC/MS/MS による同時分析を行い, 市販穀類中の OTA, OTB および CIT

の汚染調査を行ったので結果を報告する.

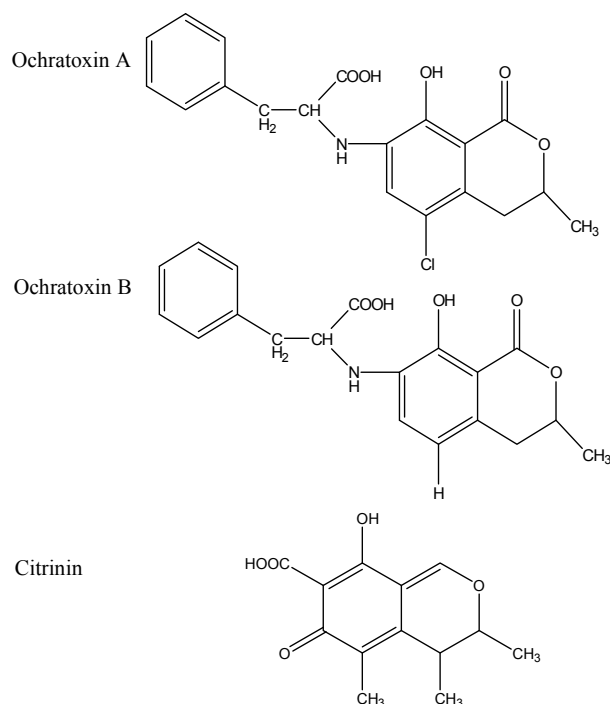


Fig.1. Structures of Ochratoxin A, Ochratoxin B and Citrinin

実験方法

1. 試料

平成 15 年 12 月から平成 16 年 11 月までに東京都内で

* 東京都健康安全研究センター食品化学部食品成分研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** 東京都健康安全研究センター医薬品部医薬品研究科

入手した小麦粉等の小麦製品 14, コーンミール等のトウモロコシ製品 10, ライ麦粉 7, そば粉 2 の計 33 試料を用いた。

2. 試薬

標準品: OTA, OTB および CIT は SIGMA 社製を用いた。
アセトニトリル: HPLC 用を用いた。
その他試薬: 特級品を用いた。

3. 装置

HPLC

高速液体クロマトグラフ: (株)島津製作所製 Class10A-VP シリーズを使用した。

蛍光検出器: (株)島津製作所製 RF-550 を使用した。

LC/MS/MS

高速液体クロマトグラフ: Waters 社製 alliance2695 シリーズを使用した。

質量分析装置: Micromass 社製 Quattro Ultima Pt を使用した。

4. 測定条件

HPLC 条件

中里らの方法^{1,2)}を用いた。ただし, カラムは COSMOSIL 5C18-AR (粒径 5 μm , 4.6 mm i.d. \times 250 mm) を用い, 注入量は 15 μL とした。

LC/MS/MS 条件

カラム: TSKgel ODS-80Ts (粒径 5 μm , 2.0 mm i.d. \times 150 mm), 移動相: アセトニトリル-1% ギ酸 (4:6) 混液, 流速: 0.2 mL/min, カラム温度: 40°C, 注入量: 5 μL , イオン化法: ESI(+), キャピラリー電圧: 4.0 kV, コーン電圧: 35 V, コリジョンエネルギー: 15 eV(OTA), 12 eV(OTB, CIT), ソース温度: 120°C, デソルベーション温度: 350°C, 選択イオン: m/z 404 \rightarrow 404, 358, 239 (OTA), m/z 370 \rightarrow 370, 324, 205 (OTB), m/z 251 \rightarrow 251, 233 (CIT)

5. 試験溶液の調製

中里らの方法^{1,2)}を一部改良して行った。すなわち, 試料 50 g をブレンダーカップに量りとり, 20%塩化ナトリウム溶液 20 mL, リン酸 1 mL および酢酸エチル 200 mL を加えて 5 分間, 10,000 rpm でホモジナイズした。得られた抽出液をろ紙でろ過し, そのうち 100 mL を分液ロートに分取した。20%塩化ナトリウム溶液 50 mL で洗浄した後, 2%炭酸水素ナトリウム 100 mL および 50 mL で 2 回抽出した。2%炭酸水素ナトリウム層を合わせ, 20%塩酸で pH を 2 以下にした後, 酢酸エチル 50 mL で 2 回抽出した。酢酸エチル層を合わせ, 無水硫酸ナトリウムで脱水した後, ろ紙でろ過し, 減圧濃縮乾固した。得られた残留物にアセトニトリル-水 (4:6) 混液 1 mL を加えて溶解し, 孔径 0.45 μm のマイクロフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

結果および考察

1. HPLC による測定

HPLC による添加回収試験は, 回収率は 70-107%, 相対標準偏差は 8.7%以下と, 良好な結果が得られた。なお, 定量限界 (S/N=10) は OTA, OTB および CIT すべて試料あたり 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。

2. LC/MS による測定の検討

従来は OTA が検出された試料の確認法^{1,3)}として, メチル化した後 HPLC で測定していたが, この方法では試料あたり 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の濃度がないと確認することが困難であった。そこで, 誘導体化などの前処理を必要としない LC/MS (SIR 法) で測定条件を検討した。

カラムは ODS 系カラム, 移動相はアセトニトリル-1% ギ酸混液とし, イオン化法にエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) および大気圧化学イオン化法 (APCI) を検討したところ, 3 物質とも ESI のポジティブモードが最も高感度であった。そこで, ESI のポジティブモードで測定することにした。キャピラリー電圧およびコーン電圧を調整して最適化し, キャピラリー電圧 4.0 kV, コーン電圧 35 V で $[\text{M}+\text{H}]^+$ が最も感度よく観察された。しかし, 実際に標準溶液を LC/MS で測定したところ, OTA の検出限界 (S/N=3) が試料あたり 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり, LC/MS では低濃度の測定を行うことは困難であった。

3. LC/MS/MS 条件の検討

LC/MS では十分な感度が得られなかったため, 特異性の高い LC/MS/MS (MRM 法) について条件を検討した。LC/MS と同様にイオン化法は ESI のポジティブモード, キャピラリー電圧 4.0 kV, コーン電圧 35 V の条件でコリジョンエネルギーを調整し, OTA および OTB ではフェニルアラニル基が外れたプロダクトイオンである m/z 404 \rightarrow 239 および m/z 370 \rightarrow 205 ($[\text{M}+\text{H}]^+ \rightarrow [\text{M}-\text{C}_9\text{H}_{10}\text{NO}_2]^+$), カルボニル基が外れたプロダクトイオンである m/z 404 \rightarrow 358 および m/z 370 \rightarrow 324 ($[\text{M}+\text{H}]^+ \rightarrow [\text{M}-\text{CHO}_2]^+$) をモニターした。CIT

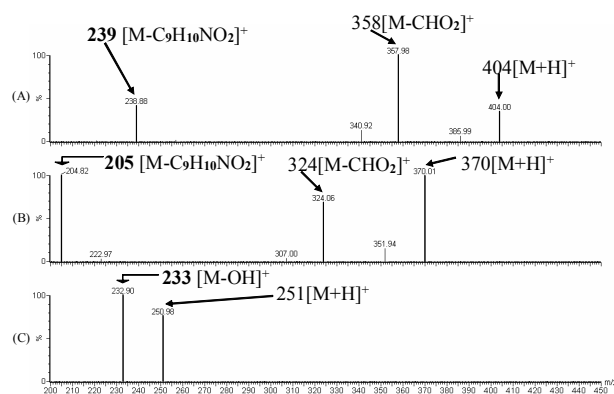


Fig.2. MS/MS spectra of OTA (A), OTB (B) and CIT(C)

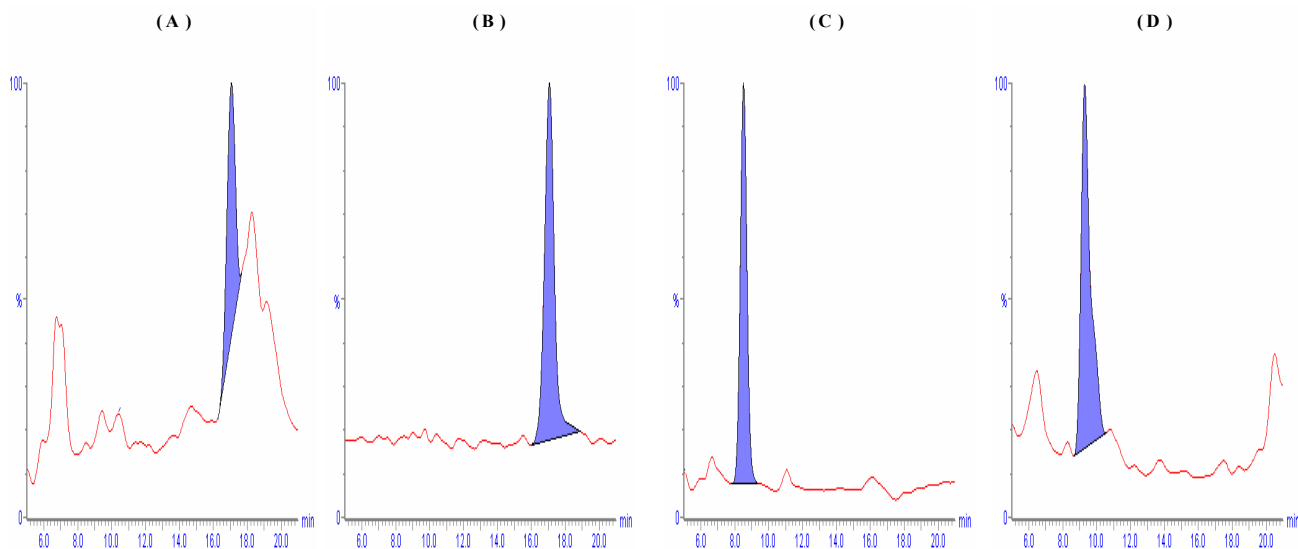


Fig.3. LC/MS/MS chromatograms of OTA, OTB and CIT added to wheat flour

(A):OTA, $m/z=404 \rightarrow 358$, (B):OTA, $m/z=404 \rightarrow 239$, (C):OTB, $m/z=370 \rightarrow 205$, (D):CIT, $m/z=251 \rightarrow 233$

では水酸基が外れたプロダクトイオンである m/z 251 \rightarrow 233 ($[M+H]^+ \rightarrow [M-OH]^+$) をモニターした。各化合物のフラグメントイオンを Fig. 2 に、クロマトグラムを Fig. 3 に示した。OTA では Fig. 2 に示したようにプロダクトイオン m/z 358 が最も強度が強いが、Fig. 3 に示したように試料由来の夾雑物の影響がみられた。そこで、定量には夾雑物等の影響が最も少ないプロダクトイオンである m/z 239 を選択した。OTB は最も感度の良い m/z 205 を選択した。CIT は特徴的なプロダクトイオンが m/z 233 のみであった。

3回の試行による添加回収試験の結果を Table 1 に示した。回収率は、OTA および OTB で 90%以上、CIT で 70%以上であり、相対標準偏差は 5.9%以下とすべて良好な結果が得られた。なお、定量限界 (S/N=10) は試料あたり OTA および CIT で 0.07 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、OTB で 0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、検出限界 (S/N=3) は OTA および CIT で 0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、OTB で 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。また、検量線は OTA および CIT で 1.75-1000 ng/mL 、OTB で 0.75-1000 ng/mL の範囲で直線性を示し、いずれのマイコトキシンも相関係数が 0.999 以上と良好であった。

4. 汚染調査結果

本法を用いて市販穀類の汚染実態調査を行った。その結

果を Table 2 に示した。小麦製品では、外皮を含む製品である全粒粉および小麦ふすまから検出され、14 試料中 2 試料から OTA が 0.3 および 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 検出された。両方ともアメリカ産およびカナダ産の混合製品であった。国産の小麦製品からは検出されなかった。トウモロコシ製品では 10 試料中 2 試料から OTA が 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、CIT が 0.7 および 1.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 検出された。このうちコーンミール 1 試料からは OTA と CIT の複合汚染が認められた。ライ麦粉からは OTA が 7 試料中 3 試料から 0.7-1.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 検出された。ライ麦粉は、井部らの報告⁹⁾では 78.9%、EU の報告²⁾では 53.2%と高い頻度で検出されており、ライ麦は OTA の汚染が多い食品として特に注意する必要があると思われる。なお、すべての試料で OTB は検出されなかった。今回の調査では、市販穀類から検出された OTA の量は EU の規制値である 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 未満であり、CIT の量も最大で 1.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と微量であった。

5. 定量値の比較

質量分析法では、夾雑物やマトリックス効果等の影響により、定量値が正確でないことがある。そこで、試料を LC/MS/MS と HPLC で測定し、その定量値を比較し、Table 3 に示した。1 試料を除き、両分析法の値はほぼ一致してい

Table 1. Recoveries of OTA, OTB and CIT Added to Wheat Flour and Corn Meal by LC/MS/MS

sample	added level	OTA		OTB		CIT	
		Recovery, % (n=3)	RSD, % (n=3)	Recovery, % (n=3)	RSD, % (n=3)	Recovery, % (n=3)	RSD, % (n=3)
wheat flour	A*	102	5.5	108	4.5	81.9	4.0
wheat flour	B**	98.8	5.1	104	5.9	73.2	2.6
corn meal	A*	96.0	1.6	109	2.2	70.0	1.0
corn meal	B**	90.8	5.5	94.7	2.7	72.0	4.5

*samples were spiked with 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of OTA, and 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of OTB and CIT.

**samples were spiked with 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of OTA, and 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of OTB and CIT.

Table 2. OTA, OTB and CIT Contamination in Cereals

Sample	No. of sample	No. of positive	Positive sample	OTA (µg/kg)	OTB (µg/kg)	CIT (µg/kg)	Country of origin
wheat products	14	2	whole wheat flour wheat bran	0.3 0.4	ND ND	ND ND	U.S.A. and Canada U.S.A. and Canada
corn products	10	2	corn meal	ND 0.2	ND ND	1.1 0.7	U.S.A. and Canada unknown
rye products	7	3	rye flour	1.8 0.7 0.7	ND ND ND	ND ND ND	U.S.A. Germany Germany
buckwheat	2	0	buckwheat flour				

ND: OTA, OTB and CIT < 0.1µg/kg

たことから、本法では LC/MS/MS で測定を実施しても、夾雑物やマトリックス効果等の影響をほとんど受けずに定量が可能であることが示唆された。

Table 3. Comparison of LC/MS/MS and HPLC for the Determination of OTA and CIT

sample	OTA (µg/kg)		CIT (µg/kg)	
	LC/MS/MS	HPLC	LC/MS/MS	HPLC
whole wheat flour	0.3	0.4	ND	ND
wheat bran	0.4	0.5	ND	ND
corn meal	ND	ND	1.1	0.4
rye flour	0.2	0.2	0.7	0.6
	1.8	1.6	ND	ND
	0.7	0.7	ND	ND
	0.7	0.7	ND	ND

まとめ

LC/MS/MS による穀類中の OTA, OTB および CIT の同時分析により、市販穀類の汚染調査を行った。LC/MS/MS 条件としてカラムに ODS 系カラム、移動相にアセトニトリル-1%ギ酸(4:6)混液、イオン化法に ESI のポジティブモードを用いたところ、OTA および CIT で 0.07 µg/kg, CIT で 0.03 µg/kg まで定量が可能であった。

本法を用い市販穀類 33 試料を調査したところ、OTA が 6 試料から 0.2-1.8 µg/kg, CIT が 2 試料から 0.7-1.1 µg/kg 検出された。そのうち 1 試料には OTA と CIT の複合汚染が認められた。なお、OTB は検出されなかった。市販穀類から検出された OTA の量は、EU の規制値である 5 µg/kg 未満であり、CIT も最大で 1.1 µg/kg と微量であった。

しかし、今回の汚染調査で OTA または CIT が検出された試料は全体で 21%、特にライ麦粉からは 42% と高率に検出されていること、平成 14 年にもライ麦粉から高濃度検出されていること¹⁴⁾、EU では穀類以外に規制対象食品がある⁴⁾ことから、穀類に加えレーズン等その他の食品も含め汚染調査を今後も継続していく必要があると考える。

文献

- 1) WHO Food Additives Series 47, Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food, WHO, p281-415, 2001.
- 2) Reports on tasks for scientific cooperation, Report of experts participating in Task 3.2.7, 2002.
- 3) FAO FOOD AND NUTRITION PAPER 81, Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003, FAO, 2004.
- 4) COMMISSION REGULATION(EC) No 123/2005, Official Journal of the European Union, L 25/3, 2005.
- 5) 蟹沢成好, マイコトキシン, 18, 15-20, 1983.
- 6) Mayura K., Parker R., Berndt W. W., et al: J. Toxicol. Environ. Health, 13, 553-561, 1984.
- 7) Terry Vrabcheva, Edward Usleber, Richard Dietrich, et al; J. Agric. Food Chem. , 48, 2438-2488, 2000.
- 8) A. Pfohl-Leskowicz, T. Petkova-Bocharova, I. N. Chernozemsky, et al: alkanendemic nephropathy and associated urinary tract tumours: Food Additives and contaminants, 19, 282-302, 2002.
- 9) 井部明広, 西島基弘, 安田和男, 他: 食品衛生学雑誌, 25, 334-341, 1983.
- 10) Akiyama H., Dayi CHEN, Miyahara M., et al.: J. Food Hyg. Soc. Japan, 38, 406-411, 1997.
- 11) Nakajima M., Studies on mycotoxin analysis using immunoaffinity column, Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol. 53, 43-52, 2003.
- 12) 中里光男, 斉藤和夫, 石川ふさ子, 他: 東京衛研年報, 47, 100-104, 1996.
- 13) Mark W. Trucksess (ed): Natural toxins, AOAC Official Method of Analysis, 18thEd., Chapter 49, p.56-57, 2005, .
- 14) 田端節子, 中里光男; マイコトキシン, 57(1), 37-46, 2007.