固相抽出を用いたベニコウジ色素中のシトリニンの分析

鈴木 公美，平田 恵子，荻本 真美，樺島 順一郎，植松 洋子，中里 光男

Clean-up Method for the Analysis of Citrinin in Monascus Color by Solid-phase Extraction

Kumi SUZUKI, Keiko HIRATA, Mami OGIMOTO, Junichiro KABASHIMA,
Yoko UEMATSU and Mitsuo NAKAZATO

東京都健康安全研究センター研究年報　第60号　別刷
2009

東京健安研セ年報　*Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. Pub. Health*, **60**, 119-123, 2009

固相抽出を用いたベニコウジ色素中のシトリニンの分析

鈴　木　公　美*，平　田　恵　子**，荻　本　真　美*，樺　島　順一郎*，
植　松　洋　子***，中　里　光　男*

イオン交換固相抽出カートリッジカラム（Bond Elut SAX 500 mg）を用いたベニコウジ色素中のシトリニンの分析法を検討し，簡易で精度の良い分析法を確立した．妨害成分を酢酸／メタノール（2：8）混液で溶出後，シトリニンを10%(v/v)トリフルオロ酢酸溶液／アセトニトリル（6：4）混液で溶出し，HPLCで測定した．添加回収試験を行ったところ回収率は84%以上，定量限界は0.04 μg/gであった．市販ベニコウジ色素を分析したところ，すべて公定書の規格値以下であった．

キーワード：ベニコウジ色素，モナスカス色素，シトリニン，固相抽出，食品添加物公定書，カビ毒，食品添加物，高速液体クロマトグラフ（HPLC）

緒　言

ベニコウジ色素は第7版食品添加物公定書（公定書）[1]から新規に収載された赤色色素である．公定書[1]では「本品は，ベニコウジカビの培養液から得られた，アンカフラビン類及びモナスコルブリン類を主成分とするものである．」と定義されている．ベニコウジ色素は子のう菌類ベニコウジカビ(*Monascus pilosus* K. Sato ex D. Hawksworth et Pitt, *Monascus purpureus* Went.)の菌体より，室温時～微温時含水エタノール又は含水プロピレングリコールで抽出して得られ，主な用途として，水産ねり製品，味付たこ，畜産加工品，たれ，水産加工品等に使用されている[2]．

この色素の産生菌であるベニコウジカビの一部にカビ毒であるシトリニン産生性[3,4]の可能性が指摘されたことから，安全性を確保するためベニコウジ色素中のシトリニンの限度値が，公定書[1]に収載された．規格値[1]は0.2 μg/g 以下（色価 50 に換算）である．

シトリニンは*Penicillium* 及び*Aspergillus* 属の数種の糸状菌によって産生されるカビ毒の一種で腎毒性を有することが知られている[4,5]．シトリニンの構造式を Fig. 1 に示した．

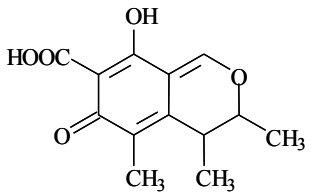

Fig. 1. Structure of Citrinin

公定書[1]記載のベニコウジ色素中のシトリニンの分析法（公定法）は，試料を吸着用樹脂を用いたオープンカラムで前処理後，HPLC で測定することとされているが，「検液のシトリニンのピークは，他のピークのテーリングの影響を受けるため，シトリニンの定量は，テーリング上のピークとしての面積処理を行った上で，検量線を用いて行う．」とされている．公定法に従って分析した液体クロマトグラムを Fig. 2 に示した．テーリング上のピークは定量性の点で好ましくないことから，イオン交換固相抽出カートリッジカラムを用いて前処理法を検討したところ，他成分のテーリングの影響を受けず，簡易で精度の良いベニコウジ色素中のシトリニンの分析方法を確立できたので報告する．

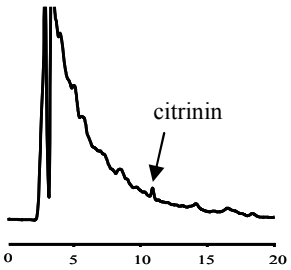

Fig. 2. HPLC Chromatogram of Citrinin in Test Solution of Monascus Color obtained by the method in the Japan's Specifications and Standards for Food Additives, 7th Edition

実 験 方 法

1. 試料

市販ベニコウジ色素（エタノール約50%含有の液状試料）：11試料．なお，検討に用いたベニコウジ色素は公定法であらかじめシトリニンを検出しないことを確認した試料を用いた．

2. 試薬

1) 標準溶液

シトリニン標準品10 mg （和光純薬工業（株）製）をメタノー

* 東京都健康安全研究センター食品化学部食品添加物研究科　169-0073　東京都新宿区百人町 3-24-1
** 東京都健康安全研究センター多摩支所食品衛生研究科　190-0023 東京都立川市柴崎町 3-16-25
*** 東京都健康安全研究センター食品化学部　169-0073　東京都新宿区百人町 3-24-1

ルに溶解し，100 mLとしたものを標準原液とした．本液 1 mLはシトリニン 100 μgを含有する．

2) HPLC用標準溶液

標準原液を10～200 ng/mLとなるようにメタノールで適宜希釈した．

3) 添加回収試験用標準溶液

標準原液1 mLをとり窒素で送風乾固した後，エタノールを用いて1～10 μg/mLとなるように適宜調製した．

4) 前処理用カートリッジカラム

Bond Elut SAX（充てん量500 mg，Varian社製），Bond Elut NH_2 (充てん量500 mg，Varian社製)を用いた．カートリッジカラムはあらかじめメタノール6 mL及び水6 mLで順次洗浄して用いた．

5) その他の試薬

メタノールは高速液体クロマトグラフィー用を，その他の試薬は市販特級品を用いた．

3. 装置

1) 分光光度計

（株）島津製作所製 UV-2200

2) 高速液体クロマトグラフ（HPLC）

（株）島津製作所製 LC-10 シリーズ：ポンプ；LC-10AT，デガッサー；DGU-12A，カラム恒温槽；CTO-10A，オートインジェクター；SIL-10AXL，蛍光検出器；RF-10AXL

4. 色価測定

公定書，色価測定法[6]に従った．

5. HPLC条件

佐藤[7]らの方法に準じた．分析カラム；TSKgel ODS-80Ts QA（4.6 mm i.d.×250 mm，東ソー（株）製），ガードカラム；TSK guardgel ODS-80Ts（3.2 mm i.d.×15 mm，東ソー（株）製），移動相；水／アセトニトリル／トリフルオロ酢酸（TFA）（450 : 550 : 0.5），流速；1.0 mL/min，注入量；10 μL，カラム温度；40℃，検出波長；励起波長　330 nm，蛍光波長　500 nm

6. 試験溶液の調製

試料約0.5 gを精密に量り水4 mLを加えて希釈したものを，あらかじめコンディショニングしたBond Elut SAXに負荷した．水5 mL，酢酸／メタノール（2 : 8）混液10 mL，水／アセトニトリル（6 : 4）混液10 mLで順次洗浄後，10 %(v/v) TFA溶液／アセトニトリル（6 : 4）混液で溶出した．この溶出液5 mLを捕集し，0.45 μmのメンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした．

7. シトリニンの測定

標準溶液および試験溶液の各10 μLをHPLCに注入し，あらかじめ作成した標準溶液の検量線から試験溶液中のシトリニン量を算出した．

結 果 及 び 考 察

1. 固相抽出カートリッジカラムの検討

シトリニンはFig. 1に示したようにカルボキシル基を持つ酸性物質であるため，イオン交換固相抽出カートリッジカラムのうち，陰イオン交換基を持つBond Elut SAX（SAX）及びBond Elut NH_2（NH_2）を用いて検討した．また，一般的に市販ベニコウジ色素はエタノール約50%含有の液状製品が多く，今回の検討はこれら液状製品を対象としたため，検討溶媒には50%エタノール溶液を用いた．50%エタノール溶液0.5 gに添加回収試験用標準溶液10 μg/mLを100 μL添加し，水4 mLを加えたものをそれぞれのカートリッジカラムに負荷し，水で洗い込みながら流出液計10 mLを分取した．その結果，シトリニンはNH_2ではほとんど保持されず流出液に約95%が溶出したのに対し，SAXからは溶出せず，100%保持されたことから以後の検討にはSAXを用いることとした．

2. SAXからのベニコウジ色素及びシトリニンの溶出挙動の検討

ベニコウジ色素0.5 g及び50%エタノール溶液0.5 gに添加回収試験用標準溶液10 μg/mLを100 μL添加し，水4 mLを加えたものをそれぞれSAXに負荷した．ベニコウジ色素及びシトリニンはSAXに水で負荷する段階でよく保持され，共に水では溶出されなかった．次に，水／有機溶媒混液および酸／有機溶媒混液を検討した．シトリニンが酸性物質であることから，酸で溶出することが考えられたので，水および酸の比率を低く，有機溶媒比率を高くした混液で検討することとし，水／有機溶媒（1 : 9）混液及び酸／有機溶媒（1 : 9）混液の各種混液で溶出し，溶出液10 mLを捕集しベニコウジ色素及びシトリニンの溶出挙動を検討した．結果をTable 1に示した．

Table 1. Elution of Citrinin and Monascus Color from Bond Elute SAX Cartrige in Eluents

Eluent, (1 : 9) mixture	Monascus color in the eluent	Citrinin(%)
Water / Methanol	Slight Eluted	–
Water / Acetonitrile	Slight Eluted	–
Acetic Acid / Methanol	Eluted	–
Acetic Acid / Acetonitrile	Eluted	78
Formic Acid / Methanol	Eluted	48
Formic Acid / Acetonitrile	Eluted	56
1% TFA / Methanol	Eluted	85
1% TFA / Acetonitrile	Eluted	35

1) 水／有機溶媒（1 : 9）混液による溶出挙動

水／メタノール（1 : 9），水／アセトニトリル（1 : 9）の各混液を検討したところ，両混液ともにベニコウジ色素はわずかに溶出したが，その大部分はSAXに保持されたままで溶出されなかった．また，シトリニンも溶出しなかった．

2) 酸／有機溶媒（1 : 9）混液による溶出挙動

有機溶媒比率を変えずに酸の違いによる，色素とシトリニンの溶出挙動を検討した．酸として酢酸，ギ酸，1%(v/v)TFA 溶液，

溶媒としてメタノール及びアセトニトリルを用いて計 6 種類の酸／有機溶媒（1：9）混液について検討した．その結果，6 種類全ての混液でベニコウジ色素が溶出されたのに対し，シトリニンは酢酸／メタノール（1：9）混液のみ溶出されなかった．また，シトリニンが溶出した 5 種の酸／有機溶媒（1：9）混液の中では 1%(v/v)TFA 溶液／アセトニトリル（1：9）混液が最も高い溶出率を示した．

これらの結果より，シトリニンが溶出されず妨害成分であるベニコウジ色素のみを溶出させる洗浄液には酢酸／メタノール混液を用いることとした．また，洗浄後にシトリニンを溶出させる溶出液には，TFA 溶液／アセトニトリル混液を用いることとし，さらに至適条件について検討した．

3. 酢酸／メタノール混液による洗浄液の検討

酢酸／メタノール混液の比率を（1：9），（2：8），（25：75），（3：7）とし洗浄液を検討した．

1) シトリニンの溶出挙動

50%エタノール溶液 0.5 g に添加回収試験用標準溶液 10 μg/mL を 100 μL 添加し，水 4 mL を加えたものを SAX に負荷し，各比率の酢酸／メタノール混液で溶出し，5 mL ずつ分取した．結果を Fig. 3 に示した．酢酸／メタノール混液（25：75），（3：7）では 20 mL 以前でシトリニンが溶出してしまうのに対し，（2：8）では 20 mL，（1：9）では 50 mL 流してもシトリニンは溶出しなかった．

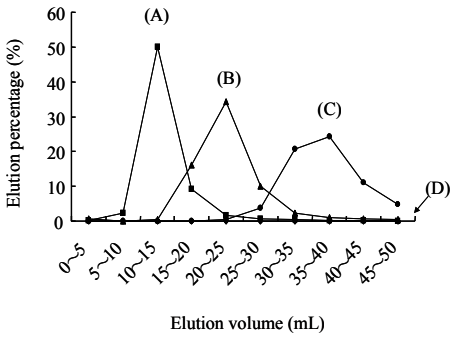

Fig. 3. Elution Profile of Citrinin from Bond Elute SAX Cartrige with Various Ratio of Acetic Acid and Methanol Mixture
(A) (3 : 7)　(B) (25 : 75)　(C) (2 : 8)　(D) (1 : 9)

2) ベニコウジ色素の溶出挙動

ベニコウジ色素 0.5 g に水 4 mL を加えたものを SAX に負荷し，各比率の酢酸／メタノール混液で溶出した．ベニコウジ色素は 0～5 mL で大部分が溶出され徐々に溶出液の色は薄くなった．ベニコウジ色素は酸の割合が高いほど溶出されやすく，少量の混液で良く溶出した．

これら各比率の酢酸／メタノール混液によるシトリニン及びベニコウジ色素の溶出結果から，シトリニンが溶出せず，妨害成分であるベニコウジ色素のみを溶出させることが可能な酢酸／メタノール混液の比率として，（1：9），（2：8）についてさらに比較検討した．

3)酢酸／メタノール混液の比率の検討

実際にシトリニンが検出されたベニコウジ色素を用いて，妨害成分であるベニコウジ色素のみを溶出させる洗浄液としての酢酸／メタノール混液の比率を（1：9）及び（2：8）として 10 mL 溶出した．以下，それぞれの SAX を水／アセトニトリル（6：4）混液 10 mL で洗浄後，10 %(v/v) TFA 溶液／アセトニトリル（6：4）混液で溶出し，この溶出液 5 mL を捕集し HPLC 用試験溶液を調製したときの HPLC クロマトグラムを Fig. 4 に示した．このクロマトグラムからも分かるように酢酸／メタノール（2：8）混液の方が妨害成分であるベニコウジ色素の影響をより良く除くことができ，大きな洗浄効果が得られた．

以上の結果より，洗浄液はシトリニンが溶出せず，妨害成分であるベニコウジ色素のみを溶出させることが可能であり，洗浄効果の高い酢酸／メタノール（2：8）混液とした．

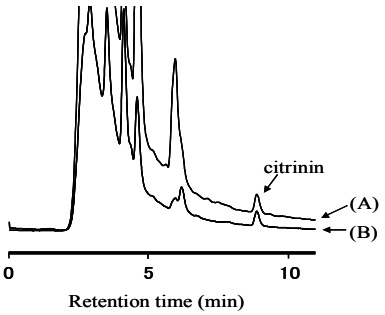

Fig. 4. HPLC Chromatograms of Citrinin in Monascus Color Eluted from Bond Elute SAX Cartrige After Washed with Acetic Acid / Methanol Mixture
(A) 1 : 9　(B) 2 : 8
(Elute Solution : 10 %(v/v) TFA / Acetonitrile)

4. 溶出液中のTFA溶液濃度の検討

溶出液として用いる TFA 溶液／アセトニトリル混液中の TFA 溶液濃度を検討した．SAX からのシトリニンの溶出率の最も良かった TFA 溶液／アセトニトリル混液は HPLC の移動相と同じ酸／有機溶媒混液であるため，溶出液の酸／有機溶媒比率を移動相に近づけた（6：4）に固定し TFA 溶液濃度を検討した．ベニコウジ色素 0.5 g に添加回収試験用標準溶液を 2 μg/g となるように添加したものを SAX に負荷し，溶出液として用いる TFA 溶液／アセトニトリル混液中の TFA 溶液濃度を 0.1～30%，溶出液量を 5 mL として，本法に従って分析した結果を Fig. 5 に示した．TFA 溶液濃度が 5%以上でほぼ一定の回収率を得たので溶出液は 10%(v/v)TFA 溶液／アセトニトリル（6：4）混液とした．

5. 添加回収試験

ベニコウジ色素 0.5 g に添加回収試験用標準溶液を 0.04～2 μg/g となるように添加し，本法に従い添加回収試験を行った結果を Table 2 に示した．すべての添加量で回収率 84%以上と良好な結果を得た．また，本法における定量限界は 0.04 μg/g であった．この値は公定書の規格値の 1/5 の値である．

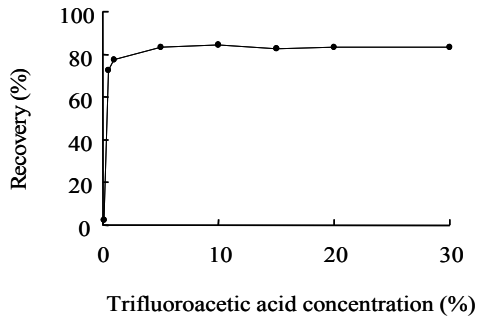

Fig. 5. Effect of Trifluoroacetic Acid Concentration on Recovery of Citrinin.

Table 2. Recoveries of Citrinin Added to Monascus Color

Added amount (μg/g)	Recovery (%)	CV(%)
2	84.0	0.1
0.2	85.9	5.2
0.04	84.4	2.1

n = 3

ベニコウジ色素0.5 gに規格限度値となるように，シトリニンを0.2 μg/g添加し，本法に従い前処理した試験溶液のHPLCクロマトグラムをFig. 6に示した．シトリニンのピークはベニコウジ色素の成分の影響を受けず，分離も良好なクロマトグラムを得た．

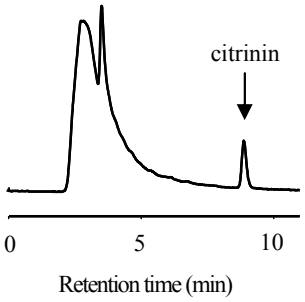

Fig. 6. HPLC Chromatogram Obtained from Monascus Color Spiked with Standard Citrinin
Spike Level : 0.2 μg/g

6. 市販ベニコウジ色素中のシトリニンの分析

市販ベニコウジ色素について本法に従ってシトリニンを測定した．シトリニン検出量（μg/g）は色価50に換算した値である．なお，今回用いたベニコウジ色素の色価は50～97であった．定量限界である0.04 μg/g未満の試料は8試料，0.04～規格値である0.2 μg/g以下検出された試料は3試料であった．また，規格値を超えた試料はなかった．

以上の結果より，本法はベニコウジ色素中のシトリニンの分析に適用できるものと考える．

ま と め

固相抽出を用いたベニコウジ色素中のシトリニンの分析方法を検討した．

イオン交換固相抽出カートリッジカラム（Bond Elut SAX 500 mg）を用いて前処理法を検討した．SAXからの妨害成分の溶出液（洗浄液）に酢酸／メタノール（2 : 8）混液を，シトリニンの溶出液に10%(v/v)TFA溶液／アセトニトリル（6 : 4）混液を用いることにより，簡易で精度の良い分析方法を確立した．

添加回収試験を行ったところ回収率84%以上と良好な結果を得た．

本法における定量限界は規格値の1/5である0.04 μg/gであった．

本法を用いて市販ベニコウジ色素を分析したところ，いずれも公定書の規格値以下であった．

文 献

1) 日本食品添加物協会編：第7版食品添加物公定書，429-430, 1999，日本食品添加物協会，東京．
2) 日本食品添加物協会技術委員会編：既存添加物名簿収載品目リスト注解書，479, 1999，日本食品添加物協会，東京．
3) Blanc, P. J., Laussac, J. P. and Le Bars, J., *et al*. : *Int. J. Food Microbiology*, **27**, 201-213, 1995.
4) 「*New Food Industry*」編集部 : *New Food Industry*, **41**(8), 10-12, 1999.
5) 中里光男，斉藤和夫，石川ふさ子，他 : 東京衛研年報，**47**, 100-104, 1996.
6) 日本食品添加物協会編：第7版食品添加物公定書，19-20, 1999，日本食品添加物協会，東京．
7) 佐藤恭子，坂元（佐々木）史歩，川崎洋子，他：日食化誌，**5**(1), 64-68, 1998.

Clean-up Method for the Analysis of Citrinin in Monascus Color by Solid-phase Extraction

Kumi SUZUKI[*], Keiko HIRATA[**], Mami OGIMOTO[*], Junichiro KABASHIMA[*],
Yoko UEMATSU[*] and Mitsuo NAKAZATO[*]

A clean-up method for the determination of citrinin in monascus color by solid-phase extraction was developed. A commercial monascus color was diluted with water. The diluted solution was cleaned up on a Bond Elut SAX cartridge column. The cartridge was washed first with water, followed by 10 mL of an acetic acid/methanol (2:8) mixture and 10 mL of a water/acetonitrile (6:4) mixture. Citrinin was eluted with 5 mL of a 10%(v/v) trifluoroacetic acid/acetonitrile (6:4) mixture. Citrinin was determined by HPLC. Recoveries of the citrinin added to monascus colors were greater than 84%. The limit of quantification of citrinin was 0.04 µg/g, which is one-fifth of the limit set by Japan's Specifications and Standards for Food Additives, 7th Edition. Levels of citrinin in 11 commercial monascus colors were less than the 0.04 µg/g limit.

Keywords: monascus color, citrinin, solid-phase extraction, Japan's Specifications and Standards for Food Additives, mycotoxin, food additive, HPLC

[*] Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan
[**] Tama Branch Institute, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-16-25, Shibasaki-cho, Tachikawa, Tokyo 190-0023 Japan