

【特集】

LC/MS/MS 同時分析による穀類中のオクラトキシン
及びシトリニンの汚染調査Simultaneous Determination and Survey of Ochratoxin A, Ochratoxin B and
Citrinin in Cereals by LC/MS/MS飯田憲司¹, 田端節子¹, 木村圭介¹, 鈴木仁², 井部明広³

東京都健康安全研究センター

1 食品化学部食品成分研究科、2 医薬品部医薬品研究科、3 精度管理室

Kenji IIDA¹, Setsuko TABATA¹, Keisuke KIMURA¹, Jin SUZUKI² and Akihiro IBE³

Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

1 Department of Food Safety, Division of Food Hygiene and Nutrition

2 Department of Pharmaceutical Sciences, Division of Drugs

3 Office of Quality Assurance

要旨 : LC/MS/MS を用いて、穀類中のオクラトキシン A (OTA)、オクラトキシン B (OTB) 及びシトリニン (CIT) の同時分析を行った。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(+)を用いたところ、定量限界は OTA 及び CIT で 0.07 μ g/kg、OTB で 0.03 μ g/kg 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 μ g/kg、CIT が 2 試料から 0.7 及び 1.1 μ g/kg 検出された。

キーワード : オクラトキシン A、オクラトキシン B、シトリニン、マイコトキシン、高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法、穀類

Abstract: 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 μ g/kg, respectively. In 33 samples examined, OTA was detected in 6 samples at levels of 0.2 - 1.8 μ g/kg, and CIT were detected in 2 samples at levels of 0.7 - 1.1 μ g/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 μ g/kg).

Keywords: ochratoxin A, ochratoxin B, citrinin, mycotoxin, LC/MS/MS, cereals

社会的意義: オクラトキシンA (OTA) およびオクラトキシンB (OTB) は *Aspergillus* 属及び *Penicillium* 属のカビから産生されるマイコトキシンである。特にOTAは腎毒性、発ガン性、催奇形成、生殖毒性、神経毒性、遺伝毒性などが報告されており、国際癌研究機構 (IARC) ではOTAをグループ2B (ヒトに対して発ガン危険性の可能性がある) に分類している。さらにバルカン諸国におけるヒトの腎炎 (バルカン腎炎) の原因物質である可能性も指摘されている。OTBも同様な毒性を持つが、毒性は弱いと言われている。OTAは世界中の広い範囲で汚染がみられ、ヨーロッパ諸国を中心に42カ国 (2003年時点) で規制値が設けられている。EUでは原料穀類で5 μ g/kg、穀類およびその加工品で3 μ g/kg、干しぶどうで10 μ g/kg、その他焙煎コーヒーやワイン等に規制値が設定されている。また、コーデックス委員会 (FAO/WHO合同食品規格委員会) でも規制値の設定が検討されている。2008年現在、日本ではOTAの規制値は設けられていない。しかし、平成18年に農林水産省が「農林水産省及び厚生労働省における食品の安全性に関するリスク管理の標準手順書」に基づいて作成された有害物質リストの中で、OTAは「優先的にリスク管理を行うべき有害化学物質」に分類されており、現在国内の汚染実態調査が進められている。

シトリニン (CIT) は *Penicillium* 属のカビから産生されるマイコトキシンで、オクラトキシンと同様に腎毒性が報告され、OTAの発ガン性を増強すると言われている。

これらのマイコトキシンの分析にはHPLC法が一般的に用いられているが、OTA、OTB及び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測定する方法があるが、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。近年普及してきた分析装置であるLC/MS/MSを用いることにより、これら3種のマイコトキシンを特異的且つ低濃度まで同時分析することが可能となった。

この分析法を用いて、東京都内で販売されている小麦粉、ライ麦粉等の穀類33試料について汚染調査を行った。その結果、OTAが6試料から0.2-1.8 μ g/kg、CITが2試料から0.7及び1.1 μ g/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。今回の調査で検出されたOTAの量は、EUの規制値である5 μ g/kg未満であり、CITも最大で1.1 μ g/kgと微量であった。FAO/WHO合同食品添加物専門家会議

(JECFA) によるとOTAの暫定最大耐用摂取量 (PMTWI) は1週間のうち体重1kgあたり0.1 μ g/kgであり、今回の汚染された試料を喫食しても健康上の問題は無いと考えられる。

しかし、調査した試料のうち21%からOTAまたはCITが検出されていること、国際的に規制値が定められていることから、今後も穀類に加えレーズン等その他の食品について汚染調査を継続する必要があると考えられる。本報は、日本で規制値を設定するときの一助になると思われる。

1. はじめに

オクラトキシン A (OTA) 及びオクラトキシン 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 は腎毒性及び発ガン性があることが知られている (WHO, 2001、 Directorate-General Health and Consumer Protection, 2002)。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 (FAO, 2004)、EU では原料穀類で 5µg/kg、穀類及びその加工品で 3µg/kg、干しぶどうで 10µg/kg、その他焙煎コーヒーやワイン等に設定されている (EC, 2005)。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 (蟹沢, 1983) (Mayura et al, 1984)。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 (Terry, 2000、 A. Pfohl-Leszkowice et al, 2002)。図 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 (井部他, 1983、 Akiyama et al, 1997、 Nakajima, 2003、 中里他, 1996、 Mark, 2005)。しかし、OTA、OTB 及び 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 (Mark, 2005) 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 及び 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 及び CIT の汚染調査を行ったので結果を報告する。

2. 実験方法

2-1. 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。

2-2. 試薬

標準品：OTA、OTB 及び 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。

2-3. 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。

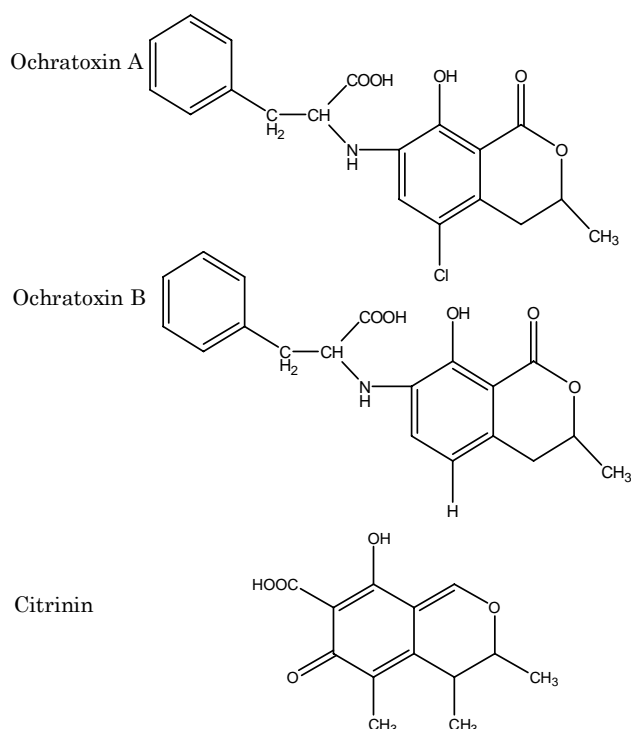


図 1 オクラトキシンA・オクラトキシンB・シトリニンの化学構造

2 - 4. 測定条件

1) HPLC 条件

中里らの方法(中里他, 1996)を用いた。ただし、カラムはCOSMOSIL 5C18-AR(粒径5 μ m、4.6 mm i.d.×250 mm)を用い、注入量は15 μ Lとした。

2) LC/MS/MS 条件

カラム: TSKgel ODS-80Ts(粒径5 μ m、2.0 mm i.d.×150 mm)、移動相: アセトニトリル-1%ギ酸(4:6)混液、流速:0.2mL/min、カラム温度:40°C、注入量:5 μ L、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:15eV(OTA)、12eV(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→404、358、239(OTA)、 m/z 370→370、324、205(OTB)、 m/z 251→251、233(CIT)

2 - 5. 試験溶液の調製

中里らの方法(中里他, 1996)を一部改良して行った。すなわち、試料50gをブレンダーカップに量りとり、20%塩化ナトリウム溶液20mL、リン酸1mL及び酢酸エチル200mL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100mLを分液ロートに分取した。20%塩化ナトリウム溶液50mLで洗浄した後、2%炭酸水素ナトリウム100mL及び50mL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50mL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1mLを加えて溶解し、孔径0.45 μ m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。

3. 結果及び考察

3 - 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及びCITすべて試料あたり0.1 μ g/kgであった。

3 - 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 μ g/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)及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。キャピラリー電圧及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[M+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 μ g/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 - 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及び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→239及び m/z 370→205([M+H]⁺→[M-C₉H₁₀NO₂]⁺)、カルボニル基が外れたプロダクトイオンである m/z 404→358及

び m/z 370→324 ($[M+H]^+ \rightarrow [M-CHO_2]^+$) をモニターした。CIT では水酸基が外れたプロダクトイオンである m/z 251→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図2に、クロマトグラムを図3に示した。

OTA では図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、図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表1に示した。回収率は、OTA及び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及び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及び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及びCITで $1.75\text{-}1000\text{ng}/\text{mL}$ 、OTBで $0.75\text{-}1000\text{ng}/\text{mL}$ 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。

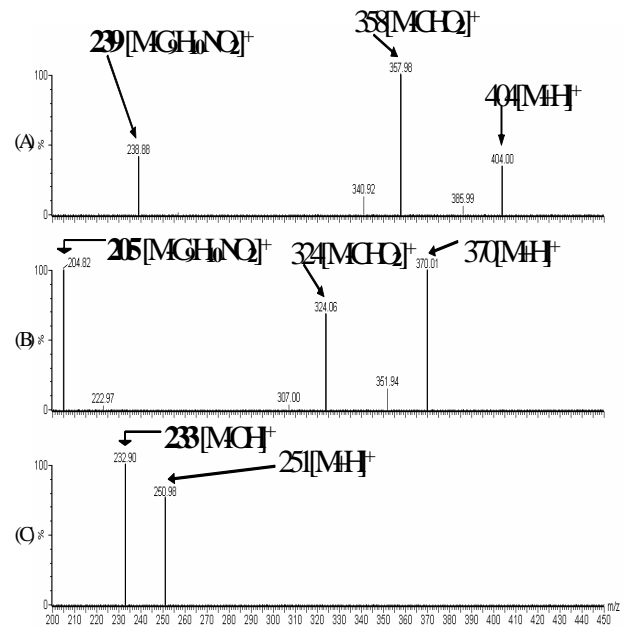


図2 オクラトキシンA(A)・オクラトキシンB(B)・シトリニン(C)のMS/MSスペクトル

3-4. 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。その結果を表2に示した。小麦製品では、外皮を含む製品である全粒粉及び小麦ふすまから検出され、14試料中2試料からOTAが

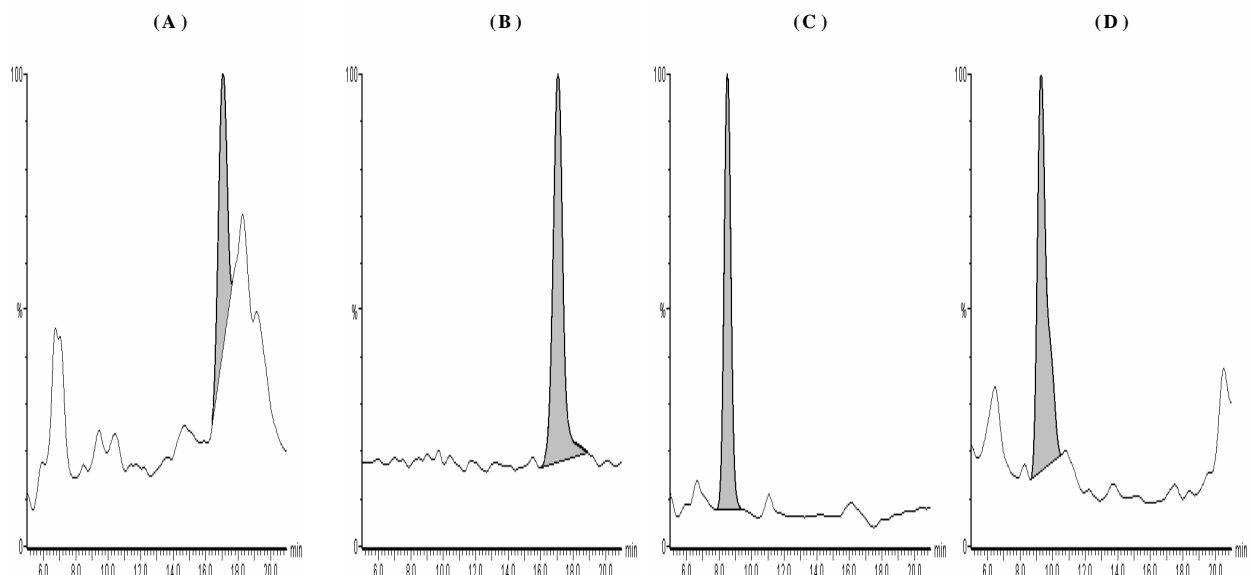


図3 小麦粉に添加したオクラトキシンA・オクラトキシンB・シトリニンのLC/MS/MSスペクトル

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

表1 小麦粉及びコーンミールに添加したオクラトキシンA・オクラトキシンB・シトリニンのLC/MS/MSによる回収率

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 5µg/kg of OTA, and 10µg/kg of OTB and CIT.

**samples were spiked with 0.5µg/kg of OTA, and 1.0µg/kg of OTB and CIT.

表2 市販穀類におけるオクラトキシンA・オクラトキシンB・シトリニン汚染実態

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	0.3	ND	ND	U.S.A. and Canada
			wheat bran	0.4	ND	ND	U.S.A. and Canada
corn products	10	2	corn meal	ND	ND	1.1	U.S.A. and Canada
				0.2	ND	0.7	unknown
rye products	7	3	rye flour	1.8	ND	ND	U.S.A.
				0.7	ND	ND	Germany
				0.7	ND	ND	Germany
buckwheat	2	0	buckwheat flour				

ND: OTA, OTB and CIT < 0.1µg/kg

0.3 及び 0.4µg/kg 検出された。両方ともアメリカ産及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 0.2µg/kg、CIT が 0.7 及び 1.1µg/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 0.7-1.8µg/kg 検出された。ライ麦粉は井部らの報告（井部他，1983）では 78.9%、EU の報告（Directorate-General Health and Consumer Protection, 2002）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 5µg/kg 未満であり、CIT の量も最大で 1.1µg/kg と微量であった。

3 - 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、表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

表3 オクラトキシンA・オクラトキシンB・シトリニン定量におけるLC/MS/MSとHPLCの比較

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
	0.2	0.2	0.7	0.6
rye flour	1.8	1.6	ND	ND
	0.7	0.7	ND	ND
	0.7	0.7	ND	ND

ことが示唆された。

4. まとめ

LC/MS/MSによる穀類中のOTA、OTB及び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及びCITで0.07µg/kg、CITで0.03µg/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0.2-1.8µg/kg、CITが2試料から0.7及び1.1µg/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5µg/kg未満であり、CITも最大で1.1µg/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(田端他, 2007)、EUでは穀類以外に規制対象食品がある(FAO, 2004)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。

本報文は、東京都健康安全研究センター研究年報第58号(2007)に掲載された論文の内容を基に、一部加筆・修正を加えたものである。

参考資料:

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

14. 中里光男, 斉藤和夫, 石川ふさ子, 他 : 東京衛研年報, 47, 100-104, 1996.