

る。溶出液を分液ロートに取り 1.5%炭酸ナトリウム溶液を 4ml 加え 2 分間振とうし水層を捨て、30g の硫酸ナトリウムにより脱水ろかをおこなう。PH4.0 の酢酸溶液で残留物を溶解し HPLC での分析に供する。

① 検体 10 ml を 50 ml の褐色遠心管にとり酢酸エチル 20ml をくわえ、10 分間振とうさせ、酢酸エチル層を分取する。これを 2 回くり返したのち減圧濃縮し、0.1% TFA 溶液 (10ml) で溶解する。調製ずみの Bond Elut C8 と GL-Pak PLS-2 を連続してつなぎ、溶解液をいれ、0.1% TFA 溶液 (10ml) で洗浄する。Bond Elut のみをはずし GL-Pak PLS-2 を 5%メタノール含有 0.1% TFA 溶液で洗浄後、50%メタノール含有 0.1% TFA 溶液で溶出させる。溶出液はエバポレーターで減圧濃縮後、0.1% TFA 溶液に溶解し HPLC での分析に供する。検体としてはクリアタイプと混濁タイプのリンゴジュースを用いた。添加回収実験は、検体を室温に戻した後、検体 1 ml に対して、パツリン標準液 (1 µg/ml) を 10-200 µl 添加しよく攪拌した後、抽出精製法で回収率を検討した。

## (2) 確認法の検討

確認実験は GC-MS および LC-MS で行った。

GC-MS に供した試料は次のように抽出、精製を行った。検体 50g に NaCl 10g を加え酢酸エチル 100ml で 2 回抽出し、酢酸エチル層を減圧濃縮後残渣を 2.5 ml の酢酸エチルに溶解したものを濃縮溶液とした。この溶液に Hexane 9ml をくわえ、Sep-Pack column で精製後減圧濃縮し、2.5% BSTFA 溶液 (ス

ベルコ社) を 0.5 ml 加え以下の条件にて GC-MS を行った。

### GC-MSの条件

装置 : QP-5000 (島津製作所)

カラム : PBX35(0.22mmx25m)

カラム温度: 80°C(2min)→150°C(10°C/min)

→230°C(5 °C/min,15min)

検出器 : EI-MS (230 °C , SIM,target ion: 226,183,170)

キャリアーガス : He (100kPa)

LC-MS に供した試料は、研究方法(B)②の方法で抽出、精製した。

### LC-MS の条件

装置 : Waters 2695 (HPLC), ZQ2000 (MS)

HPLC条件

移動相 : H<sub>2</sub>O, Acetonitrile, 10mM-NH<sub>4</sub>OAc (87:3:10)

カラム : Atlantis dC18 150 x 4.6 mm I. D. (3 µm)

流速 : 1.0 ml/min (全量をMSに導入)

カラム温度 : 40 °C

注入量 : 50 µL

分析時間 : 15 min

脱溶媒ガス温度 : 400 °C

脱溶媒ガス流量 : 900 L/Hr ( 15 L/min)

コーンガスMS条件

イオン化モード : ESIネガティブ

モニターイオン : SIR m/z = 153.0

コーン電圧 : 20 V

ソース温度 : 120°C

流量 : 50L /Hr ( 8 L/min)

Dwell : 2 sec

## 1) オクラトキシン

### (1) 試料

OTA 汚染が問題となる試料として、焙煎コーヒー豆、生コーヒー豆、コーン（今回はコーングリッツ）、玄小麦、玄大麦を用いた。コーングリッツ以外は 20 メッシュの篩いに通過するように破碎した。

### (2) 機器、器具

- a) ホモジナイザー
- b) 振とう器
- c) マイクロピペット-容量可変 200 $\mu$ l、1000 $\mu$ l 用
- d) マクロピペット-容量可変 10ml 用
- e) マイクロシリンジ-10 $\mu$ l、100 $\mu$ l 用
- f) 定性ろ紙-Whatman No.4
- g) ガラス繊維ろ紙-Whatman 934 AH, GF/B, GF/F glass fiber filter
- h) リザーバー-60ml Sep-Pak Reservoir (Waters)
- i) バキュームマニホールド
- j) バイアル-4ml シラーン処理褐色バイアル、テフロンライナー付きキャップ (Supelco)
- k) アルミブロックヒーター (タイテック)
- l) ホモジナイザー (500ml 容カップ、日本精機)
- m) 試験管攪拌器
- n) HPLC システム-ポンプ:Jasco 880 PU (日本分光)、カラム: Inertsil ODS-3, 5 $\mu$ m, 4.6 $\times$ 250mm (GL サイエンス)、カラムオープン (45 $^{\circ}$ C)、デガ

ッサー (Shodex)、検出器:RF10AXL 蛍光検出器 (励起波長 333nm、蛍光波長 460nm、島津)、データ処理装置:CR4A (島津)

### (3) 試薬

- a) アセトニトリル-HPLC grade
- b) メタノール-HPLC grade
- c) クロロホルム、リン酸、酢酸、硫酸、塩酸-特級
- d) 生理的リン酸緩衝液 (PBS) - Phosphate buffered saline tablet (Supelco)5 粒を 1L の精製水にて溶解 (pH7.4)
- e) PBS-0.01% Tween 20-PBS に 100 $\mu$ l の Tween 20 を加え溶解
- f) HPLC 移動相-アセトニトリル+水+酢酸 (55+43+2)
- g) HPLC 注入液-アセトニトリル+水+酢酸 (70+30+1)
- h) 抽出溶媒-①アセトニトリル+水 (6+4)、②メタノール+1% 炭酸水素ナトリウム水溶液 (7+3)、③メタノール+3% 炭酸水素ナトリウム水溶液 (1+1)、④メタノール-水 (8+2)
- i) IAC-OchraTest (VICAM), Ochraprep (R-BIOPHARM RHÔNE LTD), RIDA ochratoxin column (R-Biopharm AG), IMSORB-column ochratoxin (Romer Labs)
- j) OTA 標準液-1 $\mu$ g/ml (トルエン+酢酸=99+1)
- k) 検量線用 OTA 標準液-0.05, 0.1, 1.0, 5.0, 10.0, 50.0 100.0 ng/ml ; OTA 標準液 100 $\mu$ l

をバイアルにとり、窒素気流下で蒸発乾固し、1ml の HPLC 注入液にて溶解 (100ng/ml)、この溶液を用い規定の濃度の標準液を HPLC 注入液にて調製した。各濃度の標準液 100 $\mu$ l を HPLC に注入し、検量線を作成した。

#### (4) IAC の準備

IAC の上キャップにキリ等で穴を開け、上キャップを取り外した後、下キャップを外しストップコックを取り付けたバキュームマニホールドにセットした。IAC 内の溶液をすべて自然落下させた後、PBS 1ml で 2 回カラム内を洗浄した。カラム内の約半分ほど PBS で満たし、ストップコックを閉め、リザーバーを取り付けた (OchraPrep、IMSORB については専用のアダプターが必要)。

#### (5) IAC の性能評価

① OTA 標準液 5 $\mu$ l (5ng) を 10ml 共栓試験管にとり、窒素気流下で蒸発乾固後、1ml のメタノールで溶解し、10ml の PBS を加えよく攪拌した。この溶液を各 IAC に添加し、自然落下で溶液を溶出させ、水 3ml で洗浄後、3ml メタノール (1ml $\times$ 3 回) で OTA をバイアルに溶出した。溶出液をアルミブロックヒーター (45 $^{\circ}$ C) を用いて窒素気流下にて蒸発乾固後、1ml の HPLC 注入溶液を加え試験管攪拌器で 30 秒溶解した。この溶液 100 $\mu$ l を HPLC に注入した。

② 上記の方法の中で、洗浄に用いる水の代わりに PBS 3ml を用いた。

#### (6) 添加回収実験

試料 25.0g をホモジナイザーカップに採り、OTA 標準液 (1 $\mu$ g/ml) 125 $\mu$ l を試料に添加し、1 時間室温で放置した。これに抽出溶媒 (①

～④) それぞれ 100ml を加え (メタノール-水の場合は 5g の塩化ナトリウムを加えた)、10,000rpm、3 分間ホモジナイズした。定性ろ紙にてろ過後、ろ液 8ml を 100ml メスフラスコに移し PBS にて 100ml に希釈した。希釈液をガラス繊維ろ紙にてろ過し、そのろ液 50ml をバキュームマニホールドにセットした IAC のリザーバーに静かに移し、ストップコックを開け試料溶液を自然落下にて通過させた (約 1 滴/秒)。全ての試料溶液が通過した後、リザーバーを IAC から取り外し、IAC 内を PBS 10ml (1ml $\times$ 10) にて洗浄した。注射器等にて IAC に空気を通しゲル内の水分を取り除いた後、IAC をバイアル上に設置し、メタノール 1ml を IAC に添加し OTA を溶出させた。この操作をさらに 2 回繰り返した。

(メタノール全量 3ml)。バイアルを 45 $^{\circ}$ C に設定したアルミブロックヒーターに設置し、窒素気流下で溶媒を蒸発乾固した。バイアルに 1ml の HPLC 注入液を加え、キャップをしたのち試験管攪拌器で 30 秒間攪拌し試験溶液としその 100 $\mu$ l を HPLC に注入した。

天然汚染試料または、疑似天然汚染試料についてはクロロホルム抽出も行った。500ml の共栓つき三角フラスコに試料 20.0g を採り、これに 0.1M リン酸 10ml を加え潤した後、クロロホルム 100ml を加え 30 分間振とう抽出を行った。10g のセライトを乗せたガラス繊維ろ紙 (Whatman GF/B) にて吸引ろ過後、ろ液 30ml をエバポレーターで溶媒を留去した。窒素ガスで完全にクロロホルムを除いた後、3ml のメタノールで溶解しその 2.5ml を PBS-0.01% Tween で 50ml に希釈し、その 10ml

を IAC に添加した。続く行程は他の抽出溶媒と同様に行った。

抽出：試料 25.0g (50.0g) を 500ml 容ホモジナイザーカップに採り、これに 100ml (200ml) のメタノール-1%炭酸水素ナトリウム水溶液(7+3)を加え、約 10,000rpm で 3 分間ホモジナイズする。あるいは試料 25.0g (50.0g) を 500ml 容共栓三角フラスコに採り、これに 100ml (200ml) のメタノール-1%炭酸水素ナトリウム水溶液(7+3)を加え、30分間振とうする。抽出液を定性ろ紙(Whatman No. 4)にてろ過し、ろ液 8ml を 100ml メスフラスコ等に移し、PBS-0.01% Tween 20 溶液で 100ml に希釈する。この溶液をガラス繊維ろ紙(Whatman 934AH)にてろ過し試験溶液とする。

IAC によるクリーンアップおよび HPLC 用試験溶液の調製：IAC の上キャップにキリ等で穴を開け、上キャップおよび下キャップを取り除く。ストップコックを取り付けたバキュームマニホールドに IAC を取り付け、IAC の内液を自然落下させる。PBS 1ml を IAC に添加し洗浄する。さらに PBS 1ml を加え、PBS を半量ほど流出させた後、ストップコックを閉める。上キャップを利用しリザーバーと IAC のコネクターを作製し(IAC によっては固相抽出カートリッジ用のコネクターが必要)、リザーバーを IAC に取り付ける。試験溶液 50ml (試料 1g に相当) をリザーバーに移し、ストップコックを開け自然落下にて試験溶液を IAC に通過させる。試験溶液全量が通過した後、リザーバーを取り外し、PBS-0.01% Tween 20 溶液を IAC の上部まで充たし

自然落下させる。さらに PBS-0.01% Tween 20 溶液で洗浄(合計 5ml 程度)後、10mM 酢酸アンモニウム緩衝液 5ml で IAC を洗浄する。注射器あるいは吸引にて IAC のゲル内の水分を除いた後、IAC をバイアル上に置き、メタノール 1ml を IAC に添加する。注射器にて IAC 上部から少し圧をかけゲル内の気泡を取り除き、メタノールをバイアル内に自然落下させる。メタノール 1ml をさらに IAC に添加し、自然落下させる。この操作をもう一度繰り返し最後に注射器等で空気を IAC に通しゲル内のメタノールをバイアル内に溶出させる。バイアルを約 45℃に設定したアルミブロックヒーターに移し、窒素気流下にて蒸発乾固させる。これに 1ml の HPLC 注入液(アセトニトリル-水-酢酸=30+70+1)を加え、キャップで密栓し、試験管攪拌器等で 30 秒間良く混合し、その 100 $\mu$ l を HPLC に注入する。

上記の方法を用いて各種市販 IAC を用いて添加回収実験を行った。なお OTA 添加濃度は試料濃度として 5 $\mu$ g/kg とした。

## C. 研究結果・考察

### [パツリン]

#### (1) HPLC 定量法の検討

##### A) 分析条件の検討

HFM 5ppb およびパツリン 100ppb の標準品を用いた条件検討の結果を図 1 に示した。0.095% 過酸化水素水の条件では HMF のピークとパツリンのピークの分離があまりよくなかった。0.8% THF、5%アセトニトリルおよび4%アセトニトリルの条件で

は HMF のピークとパツリンのピークの分離は問題はなかったが、5%アセトニトリルの条件では時にパツリンのピークのあとに重なるようにピークが観察されることがあった。0.8% THF は良好な分離パターンが得られるが、取扱いが簡便で、ほぼ同様の分離パターンが得られる 4%アセトニトリルの条件で今後の検討を行うことにした。実際にリンゴジュースにパツリンを添加した試料でも、4%アセトニトリルの条件で HMF とパツリンの分離に問題がなく 0.8% THF 戸はほぼ同様な分離パターンが得られることが分かった (図 2)。

#### B)抽出、精製法の比較

A)で検討した分析条件で抽出、精製法の検討をおこなった。

①-③までの抽出、精製法をおこない、それぞれのクロマトグラムを図 2 に、回収率を表 2 に示した。①と②の方法は HMF とパツリンの分離が明確であったが、③の方法では HMF のピークが十分落ち切らないうちにパツリンが溶出する傾向があった。①の回収率は混濁タイプでもクリアタイプでも約 80%の回収率がえられた。②は①にくらべるとやや低い傾向にあった。③は混濁タイプのみを検討したが、高い濃度では良好な回収率が得られた。これらの結果から、パツリンの抽出、精製法としては簡便さやコスト面も考慮に入れると、①が優れていると考えられた。

#### (1) 確認法の検討

パツリンはすでに 50ppb の基準値が設定されていることから、50ppb 以上のパツリ

ンが HPLC 法で検出された場合はその定量と定性を確認するため確認法が必要である。パツリンの確認法は、GC-MS および LC-MS で検討を行った。GC-MS 法では試料のシリル化が必要であるが、リンゴジュース中のシリル化したパツリンは 226, 183, 170 m/z の 3 つの SIM によって同定を行うことができた (図 4)。なお、GC-MS 法でも良好な検量線が得られたことから、シリル化による操作の煩雑性はあるが、熟練すれば定量、定性に優れていることが明らかになった。LC-MS での定性は、試料をそのまま使用できる利点がある。標準品において検討した結果 MS SIR m/z=153 がターゲットイオンとして適当であると判断された。定量性についての検討は現在行っている (図 5)。

#### [オクラトキシン]

#### 1)市販 IAC の性能評価

AOACI の OMA に採用されている IAC 法には、使用する IAC について、以下の規定が定められている。すなわち、5~10ng の OTA を 5~10%濃度のメタノールを含む PBS を IAC に添加したときに 85%以上の回収率を得られる IAC を用いることとなっている。現在、世界で使用可能な市販の IAC は OchraTest、OchraPrep、RIDA ochratoxin column、IMSORB-column ochratoxin (仮名、現在デモ商品) の 4 種である。この 4 種の IAC について上記の性能を有しているかを試した (表 3)

OchraTest 以外の IAC は 5ng の OTA を含む

メタノール-PBS (1+10)を添加したときの回収率は極端に低かった。OchraTest についても、そのロットによっても回収率のバラツキがあり、また、OMA で定められている回収率が 85%以上であることの規定に達していないことが判明した。OchraTest に使用されている OTA に特異的なモノクローナル抗体は、他のマイコトキシンに対する抗体と比べ比較的弱いことが分かっており、添加溶媒の pH が 7~8 の範囲以外では OTA の回収率が減少することが報告されている。OchraTest のマニュアルおよび OMA に採用されている方法では、試料溶液添加後精製水で IAC を洗浄するよう指示されているが、他の IAC のマニュアルでは洗浄に PBS を用いるように指示されている。そこで、IAC の洗浄時に OTA が水によりカラムから溶出している可能性があるため、水洗浄を PBS 洗浄に変え性能評価を行った(表4)。

その結果、4種の IAC 全てにおいて 90%以上の回収率が得られた。しかし、PBS 洗浄の場合、最終試験溶液に PBS 由来の塩が混入し、HPLC における OTA の保持時間が標準液のそれに比べ 1分程早くなることが判明した。しかし、定量計算を行う上で、ピーク高を用いるのではなくピーク面積を用いれば定量値に影響を与えなかった。

なお、OchraTest において水洗浄による回収率の減少については、現在メーカーに問い合わせしており、日本への空輸時における温度管理等についても調査中である。

## 2. 各種抽出溶媒による回収率への影響

OTA 分析における試料からの抽出溶媒と

しては、リン酸酸性のクロロホルム、リン酸酸性アセトニトリル、メタノール水、アセトニトリル水、1~3%炭酸水素ナトリウム-メタノール、1%炭酸水素ナトリウム水溶液等が報告されている。

今回は、上記の抽出溶媒のうち、①アセトニトリル-水 (6+4)、②メタノール-1%炭酸水素ナトリウム水溶液 (7+3)、③メタノール-3%炭酸水素ナトリウム水溶液 (1+1)、④メタノール-水 (8+2)を用い、また試料としては焙煎コーヒー豆、生コーヒー豆、コーングリッツ、玄小麦、玄大麦を用いて添加回収実験を行った。なお、OTA は試料中濃度として 5 $\mu$ g/kg となるように添加し、IAC として OchraTest を使用した。また、PBS による希釈率は全て同様にし、試料 1g 相当を IAC に添加した。表 5 にその結果を示した。

アセトニトリル-水 (6+4) は OMA に採用されている大麦の分析に用いられる溶媒であるが、焙煎コーヒーを除き他の試料では 95%以上の回収率が得られた。メタノール-1%炭酸水素ナトリウム水溶液 (7+3) は Trucksess らが報告している溶媒で、小麦、大麦、コーヒー豆に適用している。PBS による希釈倍率は今回の方法の方が高いが、5種全ての試料において良い回収率が得られた。なお、焙煎コーヒーの回収率が生コーヒー豆より高かったが、OTA ピーク付近にも妨害ピークが現れており、これが回収率に影響を与えている可能性がある。メタノール-3%炭酸水素ナトリウム水溶液 (1+1) は、OMA に採用されている焙煎コーヒー分析に用いら

れる溶媒であるが、焙煎コーヒーの回収率が悪かった。また、メタノール-水は VICAM 社が推奨している穀類用の溶媒であるが、これもやはり焙煎コーヒー豆について低回収率であった。以上の結果から、メタノール-1%炭酸水素ナトリウム水溶液 (7 + 3) を抽出溶媒として用いることにした。

### 3. 天然汚染試料及び疑似天然汚染試料を用いた分析

生コーヒー豆については天然汚染試料を所持していたが、その他の試料については天然汚染試料が無かったため、擬似的に作製した。すなわち、適当量の OTA を溶解したアセトニトリル 300ml を試料 200g に混ぜ、室温で1時間放置後、エバポレーターを用いて溶媒をほとんど留去し、その後室温で一晩放置し完全にアセトニトリルをとばしたものを試料とし、これらを用いて抽出方法、すなわち、ホモジナイズ3分と振とう抽出 30 分の違いを検討した。また、クロロホルム抽出との比較も行った (表 6)。その結果、ホモジナイズおよび振とう抽出による OTA 濃度の大きな差は見られなかった。また、従来 OTA 分析に用いられてきたクロロホルム抽出との比較でも焙煎コーヒー豆、生コーヒー豆、玄大麦についてはその OTA 濃度に差はなく、メタノール-1%炭酸水素ナトリウム溶液の抽出は効果的であることが判明した。なお、クロロホルム抽出において、コーングリッツおよび玄小麦の OTA 濃度が低かったが、これはクロロホルム抽出において、試料由来の油分が多くメタノールに置き換える際に十分に抽出残留物が十分に可溶化できなかった

めと思われる。

天然汚染の生コーヒー豆と焙煎コーヒー豆については、クロマトグラム上の多数の妨害ピークが出現し、正確な定量が不可能 (図 6 a, b) であったため、さらに検討を加えた。その結果、IAC を PBS-0.01% Tween 20 で洗浄することにより妨害ピークを効果的に取り除くことが可能になった (図 6 c, d)。

### 4. IAC に試料溶液添加後の洗浄溶液の模索

1の項において、IAC の洗浄時に水を用いると4種の市販 IAC カラムからの OTA の回収率が極端に減少し、水の変わりに PBS で洗浄したときには高回収率が得られることを述べた。しかし、HPLC 分析時に OTA の保持時間が標準溶液のそれと比べ1分ほど早くなることと、将来的に LC/MS への以降を考慮した場合、試験溶液に塩が入ってくるのは望ましくない。また、3の項において、洗浄時に PBS-0.01% Tween 20 溶液を用いることにより、HPLC 分析時の妨害ピークを効果的に取り除けることも述べた。そこで、洗浄時の方法として、①PBS 洗浄後、1ml の精製水で洗浄することにより塩をできるだけ除く、②PBS-0.01% Tween 20 での希釈および洗浄を行う、③LC/MS 分析に使用される揮発性緩衝液酢酸アンモニウムでの洗浄等の効果を調べた。すなわち OTA の標準液 5 $\mu$ l を共栓試験管に採り、窒素ガスで溶媒を除いた後、1ml のメタノールで溶解し、①10ml の PBS を加え混合した溶液を IAC に添加後、5ml の PBS で洗浄した場合、②10ml の PBS を加え混合した溶液を IAC に添加後、4ml の PBS および 1ml の水で洗浄した場合、③10ml の PBS-

0.01% Tween 20 を加え混合した溶液を IAC に添加後、4ml の PBS-0.01% Tween 20 および 1ml の PBS で洗浄した場合、④10ml の PBS を加え混合した溶液を IAC に添加後、10mM 酢酸アンモニウム溶液 (pH6.6) 5ml で洗浄した場合における回収率を比較した。なお IAC として OchraTest を使用した。

表 7 に示したように、PBS 洗浄後わずか 1ml の水洗浄により回収率が減少したが、HPLC 分析時の OTA の保持時間は標準溶液のそれと一緒であった。HPLC 分析時の妨害ピークを効果的に取り除く PBS-0.01% Tween 20 溶液は回収率に影響を与えないことが判明した。また、LC/MS の移動相によく用いられる酢酸アンモニウム緩衝液を IAC の洗浄に用いた場合、PBS 洗浄と同等の高回収率が得られた。さらに、この緩衝液は OTA を IAC からメタノールで溶出後の蒸発乾固操作により揮発しているようであり、OTA の保持時間に影響を与えない事が判明した。

#### 5. OTA メチルエステルによる確認

OTA が試料から検出された場合の確認方法としては、エステル化による確認、LC/MS による確認が考えられるが、今回はエステル化による確認を用いた。エステル化には、BF<sub>3</sub>-メタノール法、硫酸-メタノール法、塩酸-メタノール法を用いる OTA メチルエステル化が報告されている。BF<sub>3</sub>-メタノール法については試薬の危険性、取り扱い等を考慮するとあまり一般的に使用できない。そこで今回は塩酸-メタノール法および硫酸-メタノール法について検討した。

##### ①塩酸-メタノール法：

OTA 標準液 10 $\mu$ l (10ng)をバイアルに採り、溶媒を窒素ガスで蒸発させた後、濃塩酸 100 $\mu$ l、HPLC 用メタノール 500 $\mu$ l を加え、キャップで密栓し試験管攪拌機でよく混合した。これを 100 $^{\circ}$ C、20 分間加温あるいは室温で一晩放置後、溶媒を 45 $^{\circ}$ C に設定したアルミブロックヒーター及び窒素ガスを用いて完全に蒸発乾固し、2ml の HPLC 注入溶液を加えよく溶解し、その 100 $\mu$ l を HPLC に注入した。

図 12 に示したように室温で一晩放置した場合は、OTA の 96%程がメチルエステル化したが、100 $^{\circ}$ C、20 分の処理では、OTA の 79%程度しかメチル化されなかった。

##### ②硫酸-メタノール法

OTA 標準液 5 $\mu$ l (5ng)あるいは試験溶液 500 $\mu$ l をバイアルに採り、溶媒を完全に蒸発させた後、濃硫酸 100 $\mu$ l および無水硫酸ナトリウムで一晩脱水させた HPLC 用メタノール 500 $\mu$ l を加え、キャップで密栓後よく攪拌し、100 $^{\circ}$ C の設定したアルミブロックヒーターにて 20 分間加熱した。冷後、1ml の水を加え 1ml のクロロホルムで 3 回抽出した。抽出液を合わせ 1ml の水で軽く洗浄後、蒸発乾固させた。OTA 標準については 1ml の HPLC 注入液で、試験溶液については 500 $\mu$ l の HPLC 注入液でよく溶解し、その 100 $\mu$ l を HPLC に注入した。

図 13 に示したように硫酸-メタノール法では、今回用いた条件では約 95%程度がメチル化された。塩酸法の場合は室温で一晩放置しなくてはメチル化は上手く行かないが、塩酸を窒素で除く事が可能なため便利である。硫酸法については短時間でメチル化を行えるが、硫酸を除くためにクロロホルムを使用しなく



てはならず、また少々手順が複雑になる。どちらの方法が良いかも含め、また、クロロホルム以外の溶媒でも可能であるか今後検討する必要がある。

#### D. 結論

パツリンの抽出、精製法としては回収率の高さ、簡便さ、コスト面、分析時間の短さから最近報告された AOAC 法が適当であると思われた。しかし、パツリン濃度が低い場合は大量のリンゴジュースを処理する必要性があるため、②法のようなケミエルトのような固相カラムを抽出に用いる方法も有用であると考えられる。また、高回収率を望む場合には手間はかかるがカラムを連結させる③の方法も有効である。これらのことから一つの方法に設定してしまうことなく、それぞれの需要に応じて抽出、精製法もバリエーションがあった方がよいと思われた。

パツリンの分析法としては GC-MS、HPLC、LC-MS 法とも定量性に優れていることが示されているが、GC-MS 法はシリル化が必要であるため、一般的な分析法として HPLC 法を検討した。その結果分析カラムとしては、オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 4.6 mm、長さ 250mm 5 $\mu$ m）を用い、移動相は 4%アセトニトリルを含む水溶液が適当であると考えられた。この条件では混濁タイプおよびクリアタイプのどちらでも分離は良好であった。検出限界は本研究で検討した方法では 10 ppb であったので、GC-MS 法や HPLC 法の方は検出感度が高いと言える。HPLC 法で検出感度を高くすることは今後の課題である。

確認法としては GC-MS と LC-MS を検討したが、GC-MS ではターゲットイオンは 170, 183, 226 m/z、LC-MS ではターゲットイオンは 153 m/z であった。

オクラトキシンの分析法としては、現在のところ免疫反応を利用した精製法（IAC 法）が最適であると考えられる。

表 8 に示したように Romer 社の IMSORB column ochratoxin は他社製品と比べ若干回収率が低かった。焙煎コーヒー豆については他の試料と比べ回収率が低いこれは恐らくカフェインの影響であると考えられる。今回抽出溶液中のカフェイン濃度は測定していないが、生コーヒー豆に比べ g 当たりのカフェイン量は焙煎コーヒー豆のほうが多いと考えられ、これが生コーヒー豆に比べ回収率が低い原因と考えられる。カフェインは図 7 に示されるように濃度依存的に OTA と抗体の結合を阻害しており、OMA で採用されている焙煎コーヒー豆用の OTA 分析法では IAC の前処理としてフェニルシラーンカラムを用いて溶液中のカフェインを除いている。しかしこの点については、抽出溶液の希釈倍率を上げることにより、回収率は増加すると考えられる。なお、コーングリッツにおいて希釈溶液を IAC に添加する場合、自然落下では IAC を通過しにくい場合がある。この場合、希釈後使用するガラス繊維ろ紙として Whatman GF/F を使用することにより、スムーズに試料溶液の添加が行えた。

これらの結果を踏まえて次年度は妥当性試験を行い、公定試験法としての妥当性を検討する。

F. 発表論文

1) T.Tanaka, A.Yoneda, Y.Sugiura, S.Inoue, M.Takino, A.Tanaka, A.Shinoda, H.Suzuki, H.Akiyama and M.Toyoda, An application of liquid chromatography and mass spectrometry for determination of aflatoxins. *Mycotoxins*, 52,107-113, 2002

2) 穂山 浩、田中 敏嗣、中島 正博、藤田 和弘、里山 俊哉、三浦嘉巳、米谷 民雄

厚生労働省通知アフラトキシン試験法の複数機関による評価研究、日本食品化学学会誌 9巻3号 p 120-124, 2002.

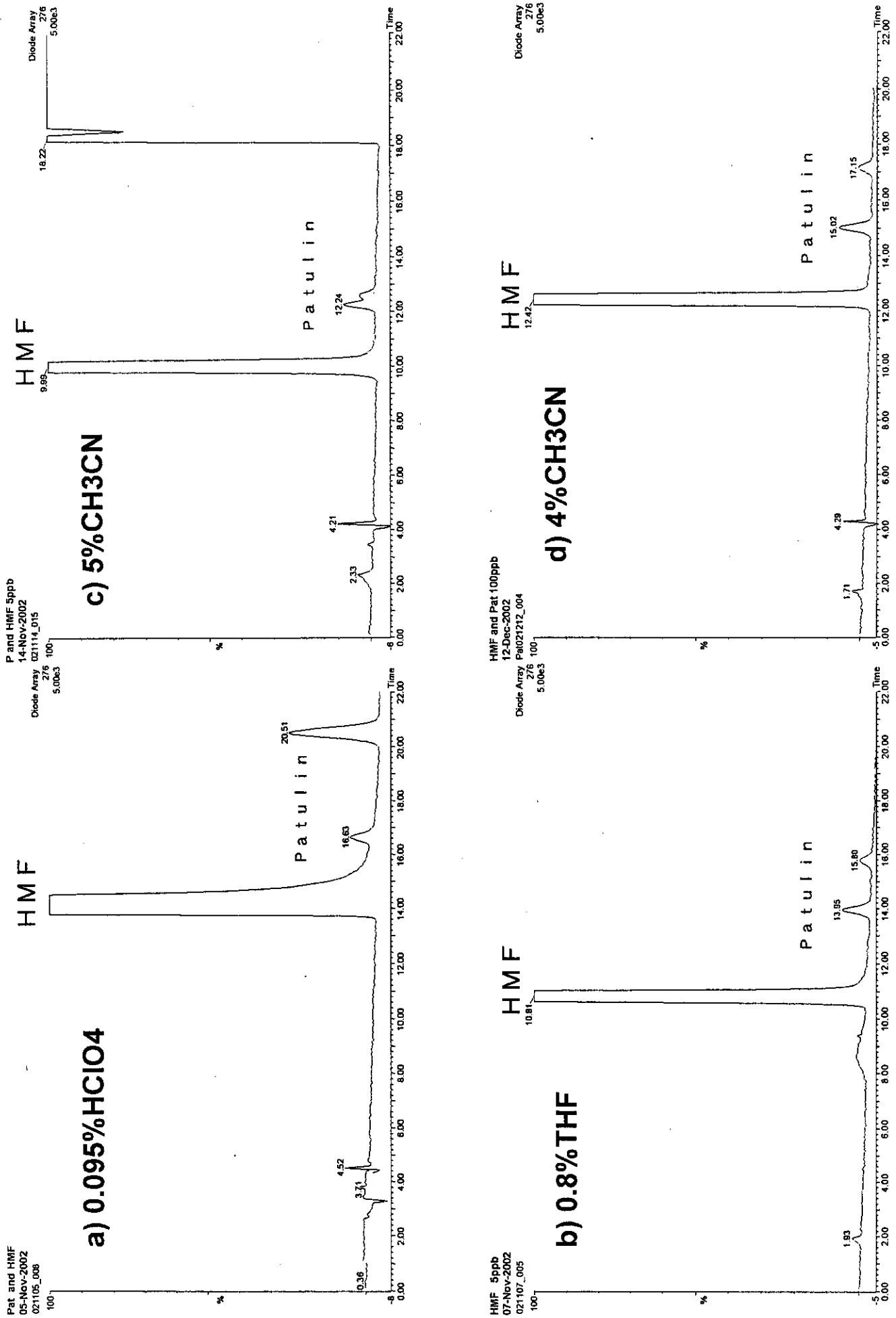


Fig.1 HPL patterns of Patulin on various conditions

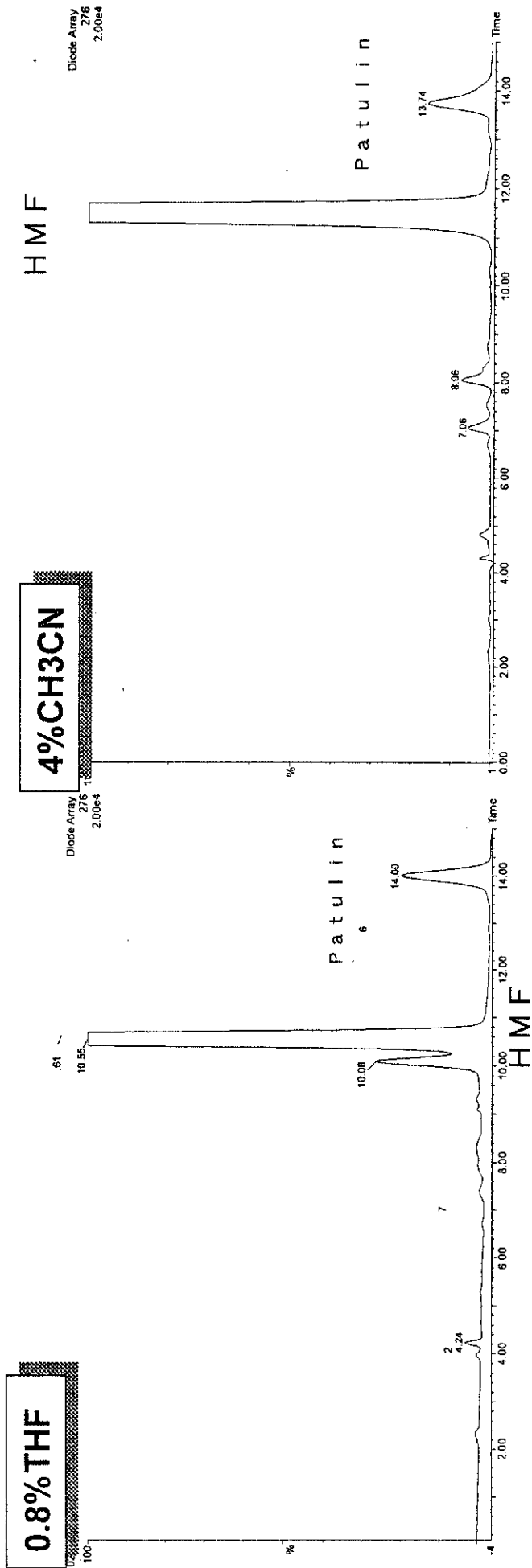


Fig.2 Apple juice and Patulin 1 ppm

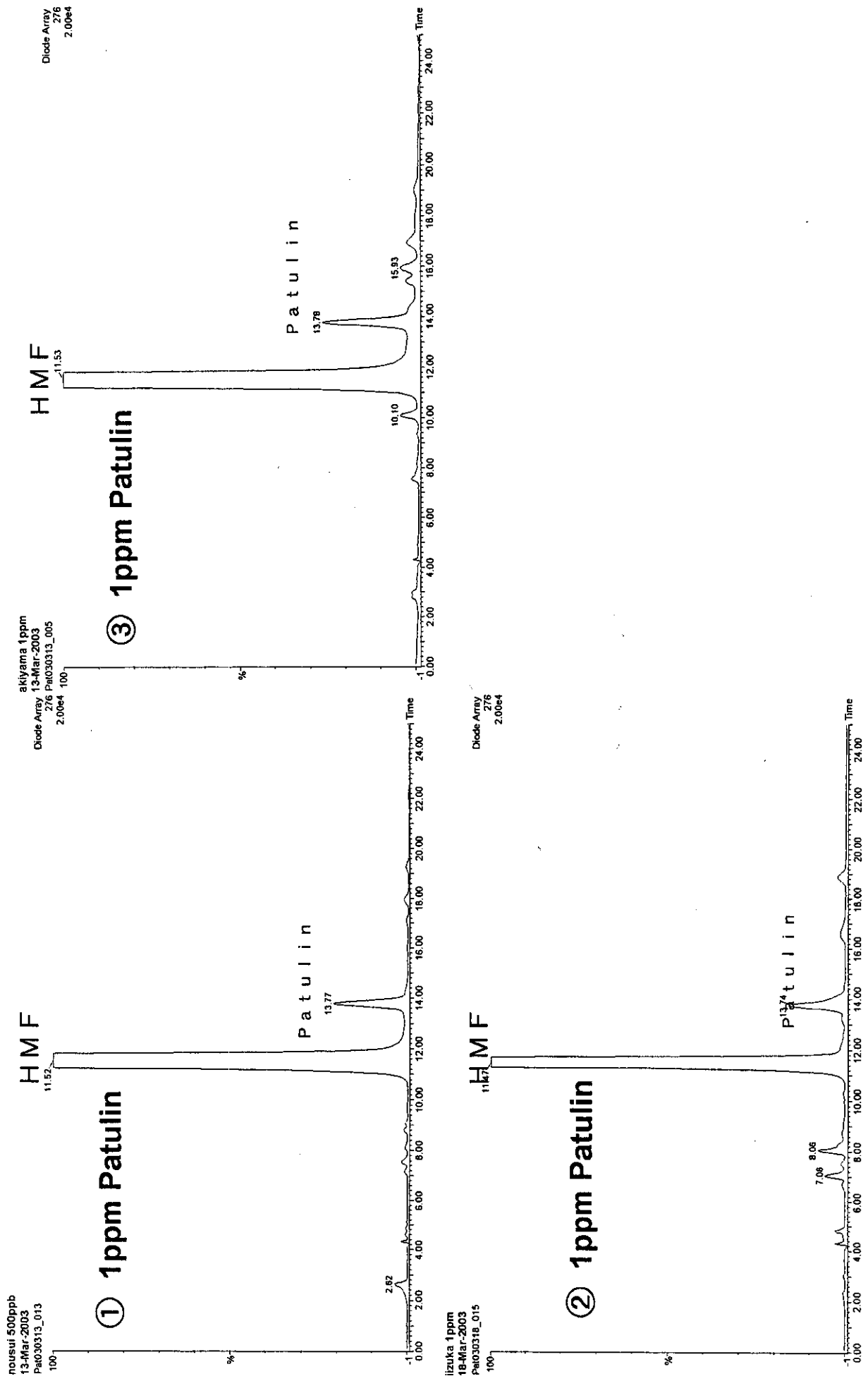
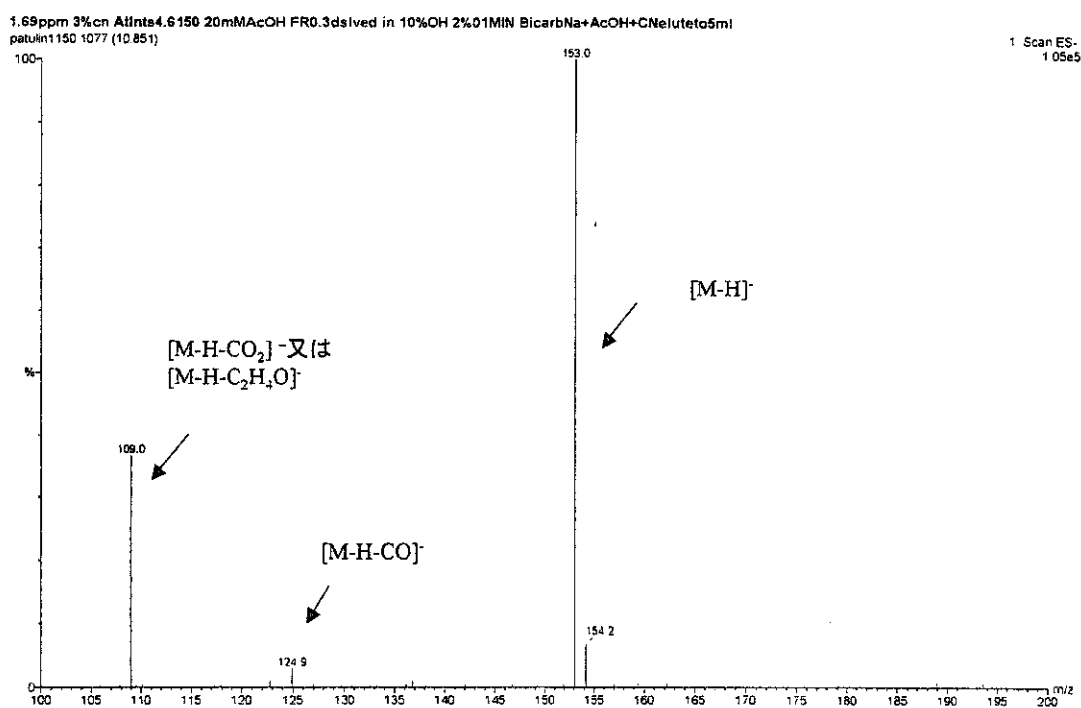
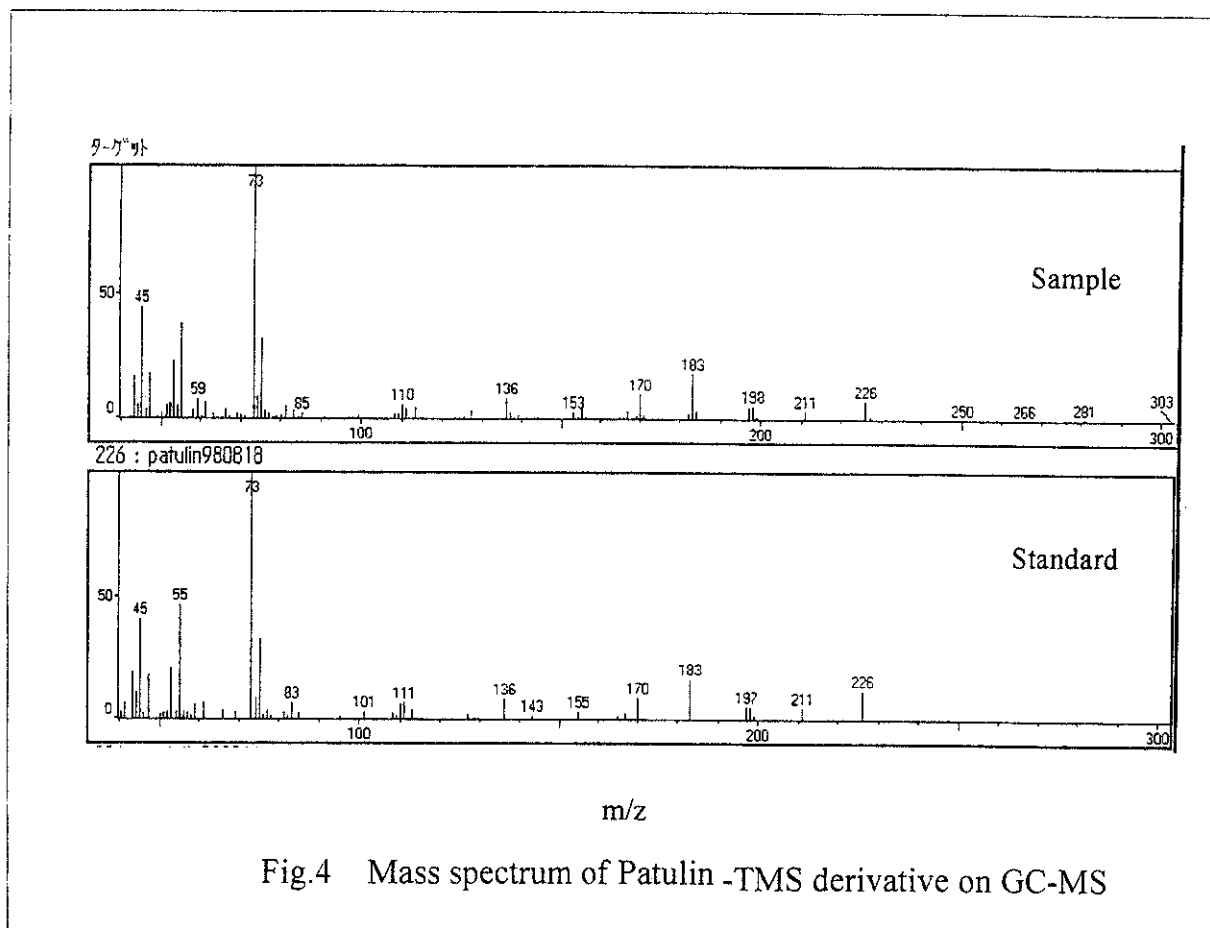


Fig.3 HPLC Patterns of Patulin with apple juice



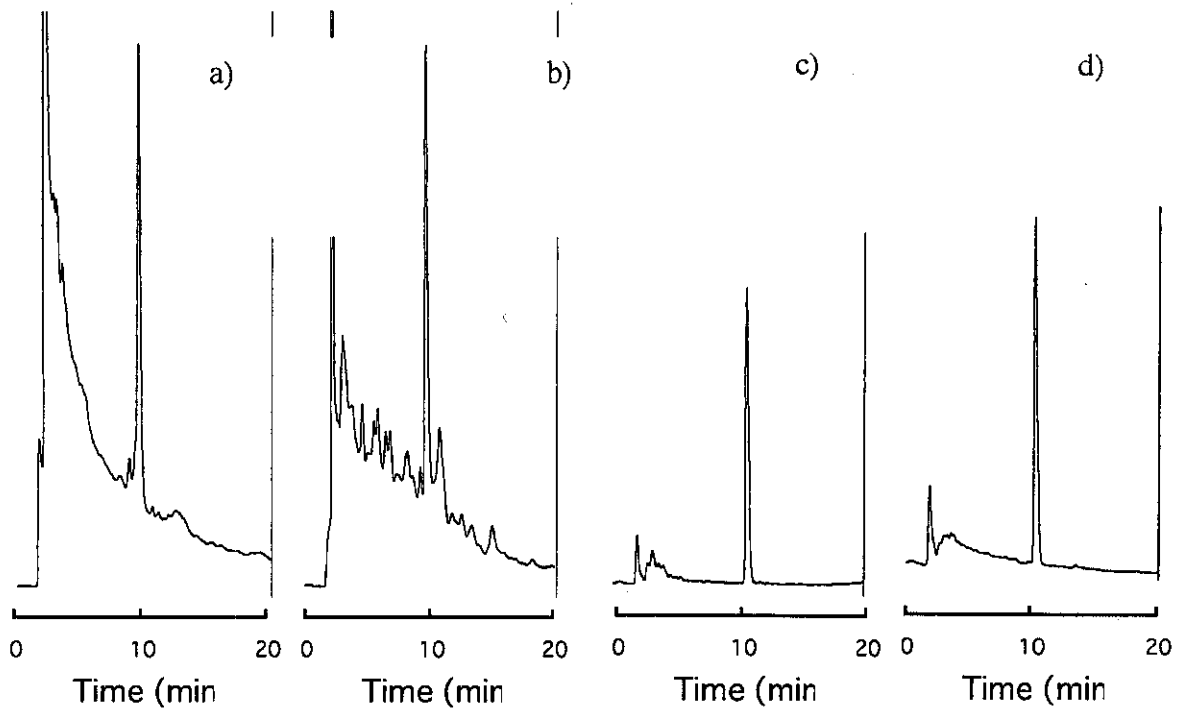


Fig.6 疑似天然汚染焙煎コーヒー豆及び天然汚染生コーヒー豆のクロマトグラム。a, b : PBS 洗浄、c, d : PBS-Tween 洗浄 a, c : 焙煎コーヒー豆、b, d : 生コーヒー豆

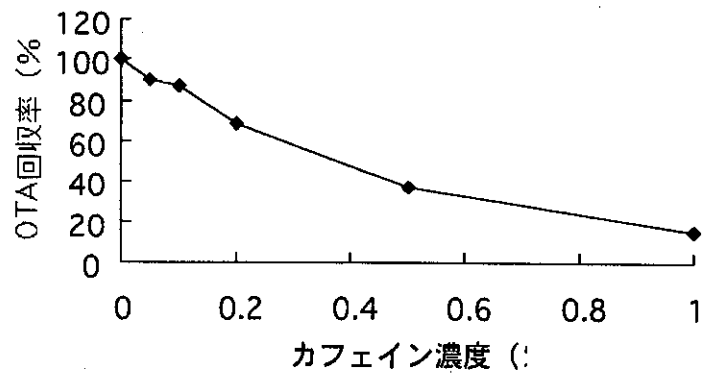


Fig.7 OchraTest でのカフェインの影響

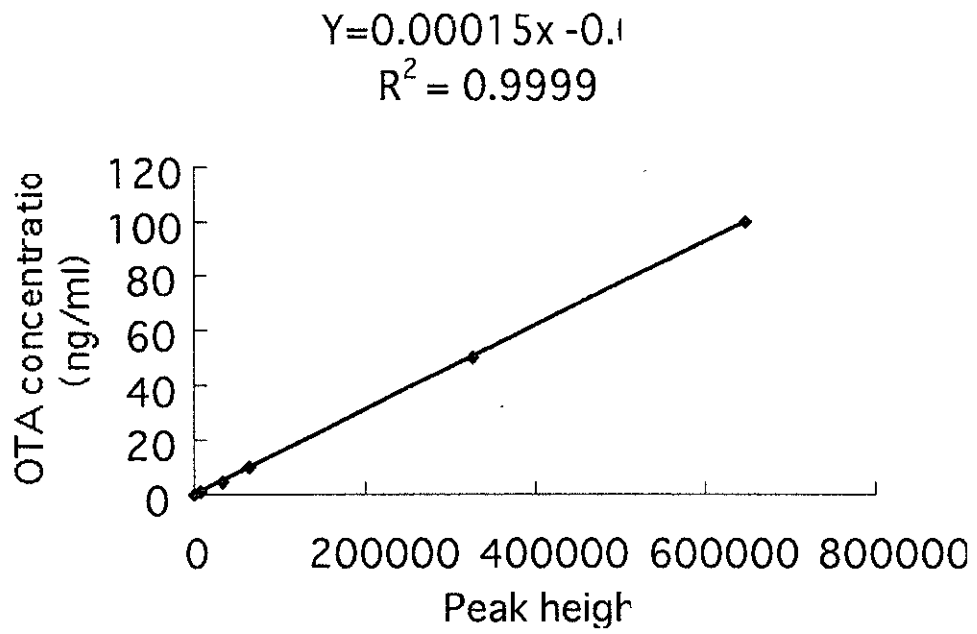


Fig.8 OTA 検量線

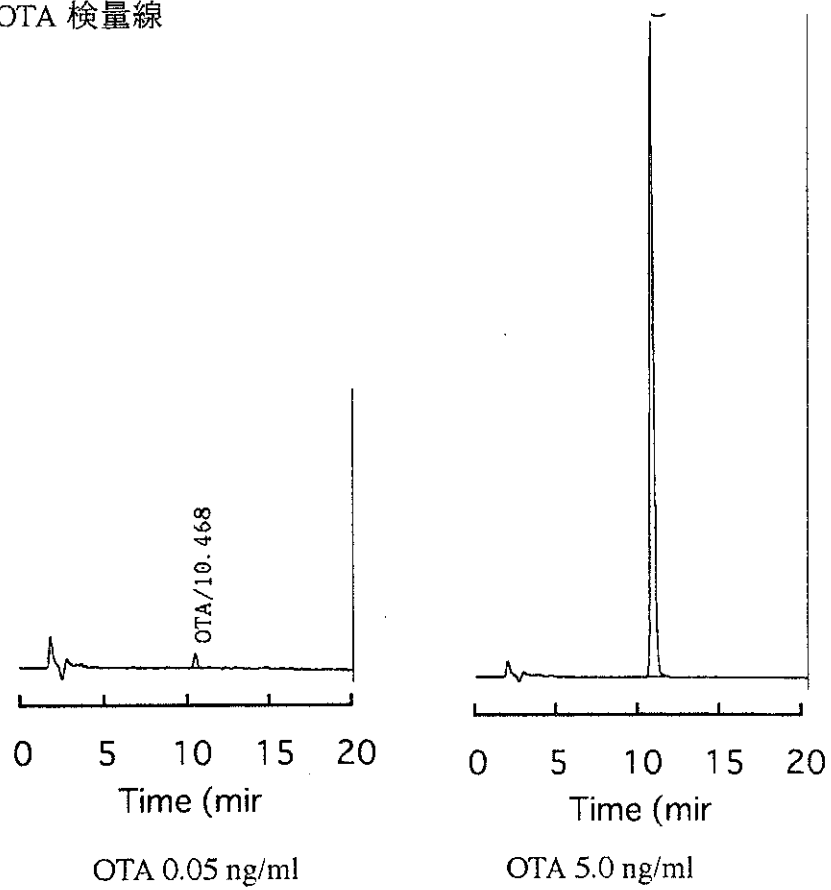
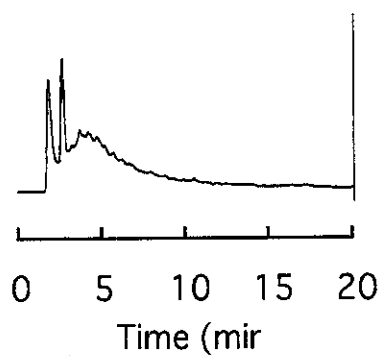
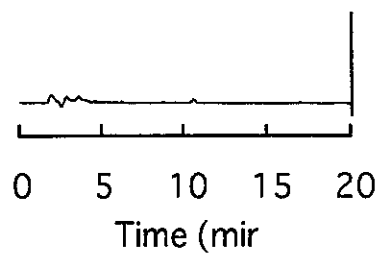


Fig.9 OTA 標準溶液のクロマトグラム

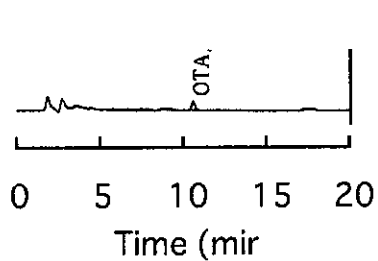




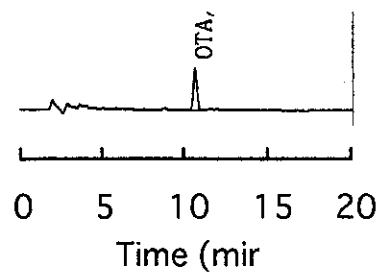
焙煎コーヒー豆



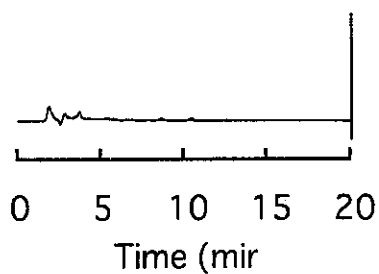
生コーヒー豆



コーングリッツ



玄小麦



玄大麦

Fig.10 OTA 無添加試料のクロマトグラム

コーングリッツ OTA 0.07 $\mu$ g/kg、玄小麦 OTA 0.34 $\mu$ g/kg 自然汚染

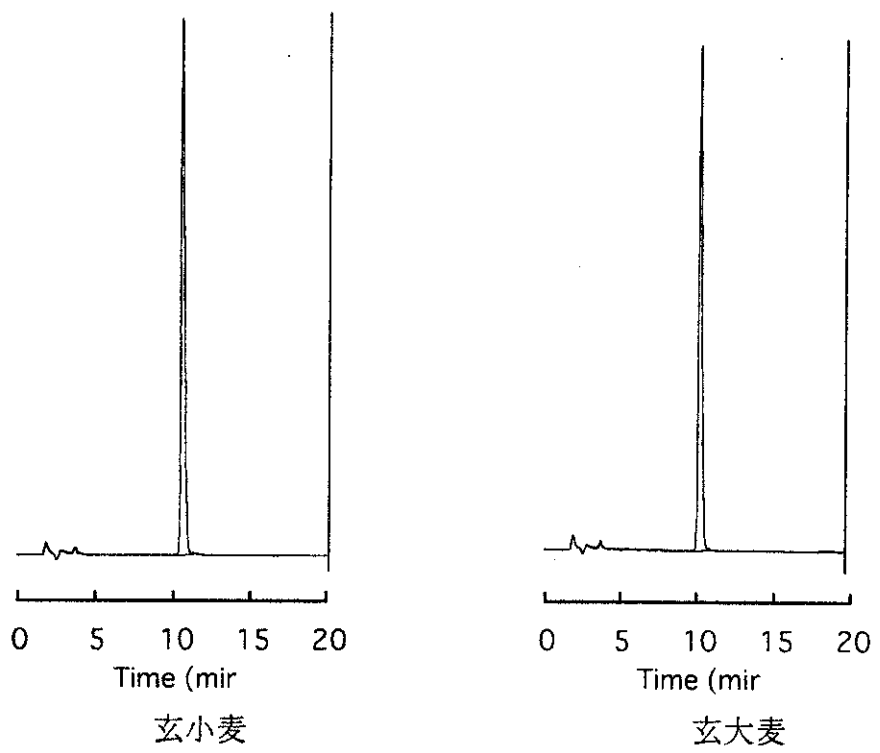
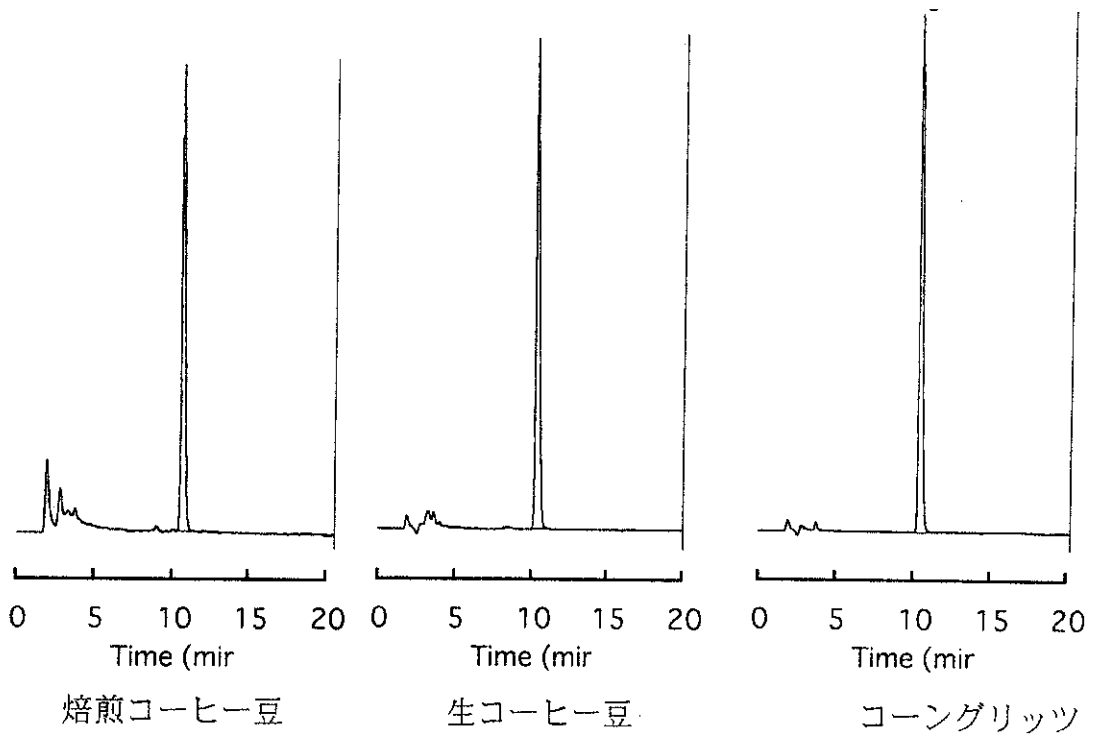


Fig 11 OTA 添加試料のクロマトグラム

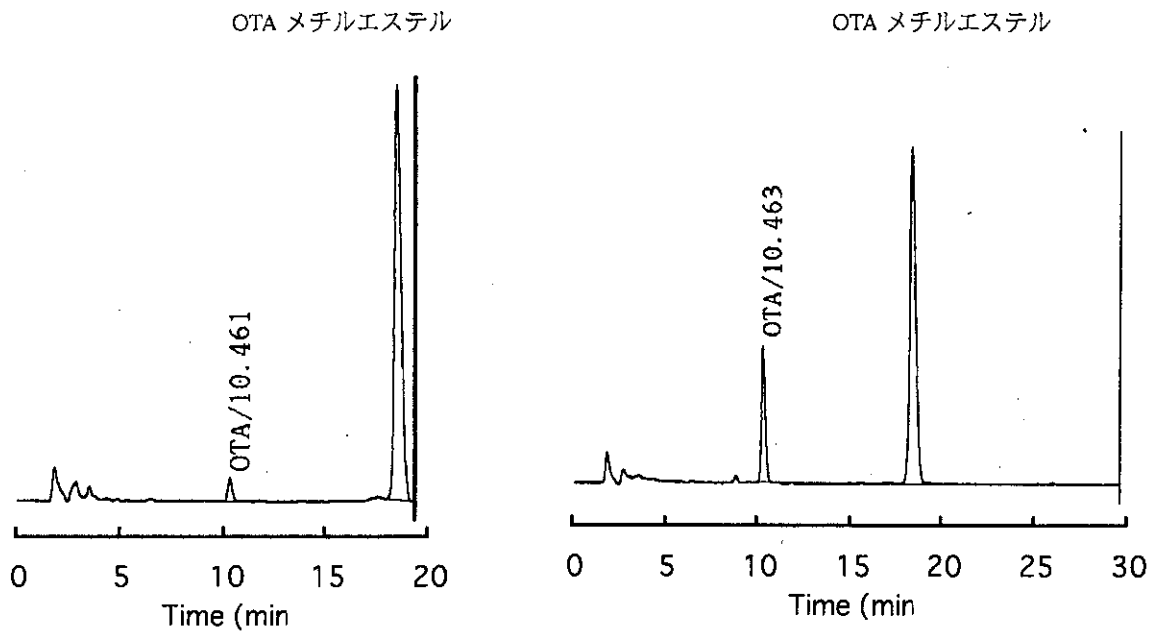


Fig.12 塩酸-メタノール法による OTA メチルエステルのクロマトグラム

a : 一晩放置、 b : 100℃、20 分、

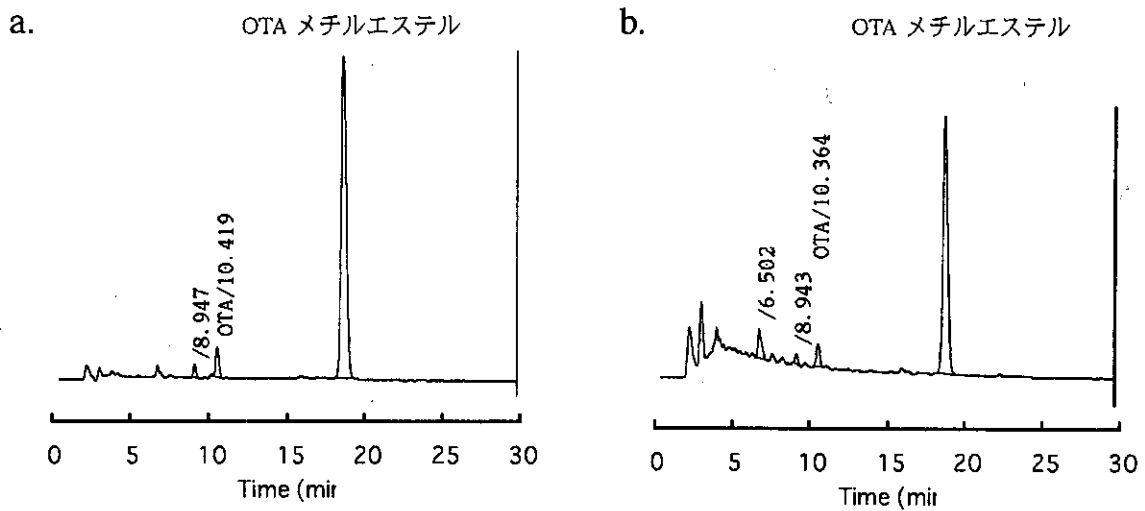


Fig.13 硫酸-メタノール法による OTA メチルエステルのクロマトグラム

a : OTA 標準溶液を用いたメチル化、 b : 焙煎コーヒー豆試料を用いたメチル化

表 1 パツリンの分析法（バリデーションされたもの）

出典方法	採取試料	抽出	精製	分析法	検出限界
Official French method NF V76-116 Nov.1985	リンゴジュース、 濃縮リンゴジュース、サイダー	エチルエーテル	シリカゲル（順相固相カラム）	HPLC UV 検出	20ng/g
AOAC Official method 974.18	リンゴジュース（透明）	エチルエーテル	シリカゲル（順相固相カラム）	TLC	20ng/g
AOAC Official method 995.10	リンゴジュース（透明）	エチルエーテル	炭酸ナトリウムで洗浄	HPLC UV 検出	10 ng/g
AOAC Official method 2000.02	リンゴジュース（混濁、 透明）、リンゴピューレ	エチルエーテル	炭酸ナトリウムで洗浄	HPLC UV 検出	20ng/g
ISO 8128-2:1993	リンゴジュース、 濃縮リンゴジュース、	エチルエーテル +クロロフォルム	シリカゲル（順相固相カラム）	TLC	25 ng/g
ISO 8128-1:1993	リンゴジュース、 濃縮リンゴジュース、	エチルエーテル	炭酸ナトリウムで洗浄	HPLC UV 検出	10 ng/g
Official Swiss Method Mitt. Gebiete Lebensm Hyg.75, 506 (1984)	リンゴジュース、 濃縮リンゴジュース、	エチルエーテル	炭酸ナトリウムで洗浄	HPLC UV 検出	5-10 ng/g
Official Swiss Method Mitt. Gebiete Lebensm Hyg.75, 506 (1984)	リンゴジュース、濃縮リンゴジュース、	硅藻土カラム	シリカゲル （順相固相カラム）	HPLC UV 検出	5-10 ng/g

表 2 パツリンの回収率 (%)

ジュースのタイプ	添加量	①	②	③
混濁タイプ	10 ppb	74.4	60.5	77.6
	40 ppb	88.0	-	-
	100 ppb	84.3	66.3	99.3
クリアータイプ	200 ppb	81.3	-	-
	40 ppb	87.0	-	-
	100 ppb	88.9	70.1	-
	200 ppb	79.0	-	-