

[Research Note]

LC/MS/MS による国産ワイン中のオクラトキシン A の分析

堀井幸江*・橋口知一・伊木由香理・須藤茂俊

(独) 酒類総合研究所 〒739-0046 東広島市鏡山 3-7-1

Investigation of Ochratoxin A in Japanese Wine by LC/MS/MS

Sachie HORII*, Tomokazu HASHIGUCHI, Yukari IGI, and Shigetoshi SUDOU

National Research Institute of Brewing, 3-7-1, Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-0046, Japan

Ochratoxin A in commercial domestic wine was determined by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). The method involves the use of disposable non-polar polymeric and aminopropyl solid-phase extraction cartridges to extract ochratoxin A from wine. The extracts were subsequently analyzed by LC/MS/MS. Mass spectral acquisition was performed in the positive ion mode by applying multiple reaction monitoring. The recoveries were 75.5% and 93.5% and the detection limits ($S/N \geq 3$) were 0.0058 $\mu\text{g/L}$ and 0.0045 $\mu\text{g/L}$ for red and white wines, respectively. These methods were found to be useful for the determination of low levels of ochratoxin A. In 59 wines examined, ochratoxin A was detected in 5 red wines and 5 white wines. The concentrations of ochratoxin A in the wines were much lower than the EU regulation level (2 $\mu\text{g/L}$).

Key words: domestic wine, LC/MS/MS, ochratoxin A

緒言

オクラトキシンは *Aspergillus ochraceus*、*Penicillium verrucosum* などにより産生されるカビ毒である。10 種類以上知られているオクラトキシンのうち食品汚染報告が最も多いのは、オクラトキシン A であり、次いでオクラトキシン B である (宇田川ら 2002)。オクラトキシン A は、イヌ、ブタに対して LD_{50} がそれぞれ 0.2 および 1.0 $\mu\text{g/kg} \cdot \text{body weight (bw)}$ と強い急性毒性を示し、発ガン性については WHO の国際がん研究機関 (IARC) においてグループ 2B (ヒトに発ガン性を示す可能性がある) に分類されている。オクラトキシン A の発ガン性は、Kanizawa and Suzuki (1978) によってマウスを用いた毒性試験ではじめて明らかにされた。またブルガリア、ルーマニア、クロアチア、セルビアなどのバルカン地方で、古くから腎症や尿路系臓器の腫瘍の患者が多発し、ヒト風土病と扱われてきたバル

カン腎炎との関連が指摘され、その地方の穀類やヒト血清中の調査が行われた。その結果オクラトキシン A がこの風土病の原因物質と推論されている (Pfohl-Leszkowicz et al. 2002、田中・芳澤 2006)。

オクラトキシン A 生産菌は熱帯地域から冷涼な地域まで広い範囲に分布するため、ライムギ、コムギなどのムギ類、穀類加工品、豆類、コーヒー豆、カカオ、ワイン、ブドウジュース、乾燥果実、ビール、香辛料など大変多くの食品が汚染されることが特徴である。汚染濃度と消費量から算出される各食品群のオクラトキシン A 暴露に対する寄与率は、EU において、穀類 50%、ワイン 13%、コーヒー 10%、香辛料 8%、その他 (主に果汁など) 6% であり、ビール、カカオ、乾燥果実、食肉加工品などは 5% 以下とされている (芳澤 2006)。

オクラトキシン A は、多くの国で規制が行われている。EU では、穀類およびその加工品で 3 $\mu\text{g/kg}$ 、干しぶどうで 10 $\mu\text{g/kg}$ 、ワインで 2 $\mu\text{g/kg}$ 、その他焙煎コーヒー等に規制値が設定されている。コーデックス委員

*Corresponding author (email: horii@nrib.go.jp)

2009 年 12 月 21 日受理

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。2009 年現在、日本ではオクラトキシン A 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「農林水産省およ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、オクラトキシン A 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組織的に進んでおり汚染実態が究明されつつある (小西 2005、2006a)。

その調査によると、日本でも様々な食品でオクラトキシン A による汚染が報告されている (飯田ら 2007、中島 2005、田端ら 2008a)。田端ら (2008b) によると、100 % 国産であると表示された小麦粉から 0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のオクラトキシン A が検出され、国内でもオクラトキシン A による汚染が起きていることが示唆されており、国産の農作物に対しても注意を払う必要があると述べられている。また、輸入ワイン (Scott 2008) だけでなく、国産ワインからも極低濃度であるがオクラトキシン A が検出された報告があった (野場ら 2007) ことから、本研究では、国産ワイン 59 点中のオクラトキシン A の含有実態について調査を行った。

材料と方法

標準溶液：オクラトキシン A は biopure 社製 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (アセトニトリル) を用いた。

溶媒：メタノールは LC/MS 用 (関東化学社製) を、その他の溶媒は残留農薬試験用 (300 倍濃縮) (関東化学社製) を用いた。

LC/MS/MS：HPLC は Waters ACQUITY UPLC[®] システム、MS は Quattro Premier[™] XE タンデム四重極型質量分析装置を用いた。

試料溶液の調整：サンプル 10 mL に塩酸を 3 滴加えて酸性化し、メタノール 5 mL を添加して希釈した。予めメタノール 5 mL および蒸留水 10 mL でコンディショニングした Oasis[™] HLB カートリッジ (200 mg, 6 mL; Waters, USA) に、酸性化したサンプルを 3~5 mL/min のスピードで通液した。蒸留水 5 mL でカートリッジを洗浄後、Sep-Pak[®] Light NH₂ カートリッジ (Waters, USA) を HLB カートリッジの下に連結した。メタノール 10 mL でオクラトキシン A を HLB カートリッジから Sep-Pak[®] Light NH₂ カートリッジに負荷し、

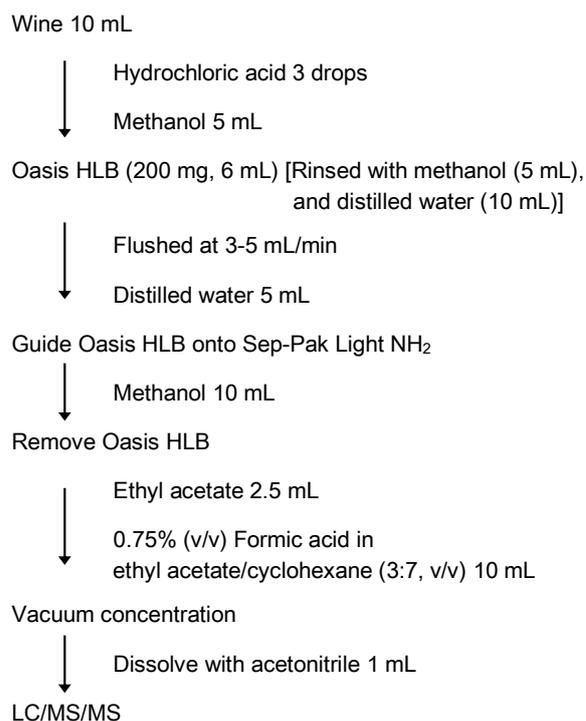


Fig. 1 Pretreatment procedure.

Table 1 LC/MS/MS conditions for ochratoxin A.

Parameters	Detail
LC/MS/MS	Waters ACQUITY UPLC [®] Quattro Premier [™] XE
Column	Waters ACQUITY UPLC [®] BEH C ₁₈ (2.1 x 100 mm, 1.7 μm)
Column temp.	30°C
Mobile phase	A = 0.1% formic acid/distilled water B = 0.1% formic acid/acetonitrile
Gradient conditions	from 0 min to 3 min, 10%B; at 10 min, 70%B; at 10.1 min 90%B; from 10.1 min to 12 min, 90%B; at 12.1 min, 10%B; from 12.1 min to 15min, 10%B
Flow rate	0.4 mL/min
Injection volume	5 μL
Ionization mode	ESI-positive
Capillary voltage	3.0 kV
Desolvation gas	800 L/hr
Corn gas	50 L/hr
Source temp.	120°C
Desolvation temp.	400°C
Multiple reaction monitoring (MRM) mode	<u>Ochratoxin A</u> Precursor ion: 404 m/z Product ion: 239 m/z Corn voltage: 35 V Collision energy: 25 V

HLB カートリッジを取り外した後に、酢酸エチル 2.5 mL で Sep-Pak[®] Light NH₂ カートリッジを洗浄した。0.75% (v/v) ギ酸含有酢酸エチル/シクロヘキサン (3:7, v/v) 10 mL でオクラトキシン A を Sep-Pak[®] Light NH₂ カートリッジから抽出した。40°C 下、窒素吹き付け装置 (TurboVap[®] LV ; Zymark) で溶媒を蒸発させアセトニトリル 1 mL で溶解し、測定サンプルとした (Varelis et al. 2006) (Fig. 1)。

LC/MS/MS 測定条件 : LC/MS/MS 測定条件は Table 1 に示した。LC/MS/MS のイオン化法は ESI のポジティブモード、キャピラリー電圧 3.0 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、オクラトキシン A 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 をモニターリングした。

結果と考察

3 回の試行による添加回収試験の結果、回収率は、赤ワインで 75.5%、白ワインで 93.5%であった。変動係数は、赤ワインで 10.2%、白ワインで 6.4%と良好な結果が得られた。なお、検出限界は、赤ワインで 0.0058 µg/L、白ワインで 0.0045 µg/L であった (Table 2)。赤

ワインで回収率が低く、検出限界が高い現象は、イムノアフィニティーカラムで試料溶液を調整した場合にも起こることが報告されている (Noba et al. 2008)。この原因は、果汁のみを発酵させる白ワインと比較して、赤ワインは含有成分が多く、その成分が夾雑物となり試料溶液の調整に影響するものと考えられる。

この条件下市販の国産ワイン 59 点 (赤ワイン 31 点、白ワイン 28 点) の分析を行った。赤ワインからは 5 点からオクラトキシン A が検出され、平均値は 0.027 µg/L であった。白ワインからは 5 点オクラトキシン A が検出され、平均値は 0.02 µg/L と、いずれも極低濃度であった (Table 2)。この濃度はヨーロッパでのワインの規制値である 2 µg/L と比較しても極低濃度で、人に対する健康被害はないものと考えられる。

オクラトキシンの代表的な生産菌はすでに述べたように *A. ochraceus* と *P. verrucosum* であるが、前者は温帯から熱帯地方において、後者は比較的涼しい地域から温暖な地域にかけてよく分離される (Marquardt・Frohlich 1992)。したがって、これらのカビはオクラトキシン産生に対しての最適な温度と水分活性などの条件は異なる (Northolt et al. 1979, Patterson・Damoglou

Table 2. Concentrations of ochratoxin A in wine.

Sample	Recovery (%)	Detection	Quantitation	Detected/Tested	Average (µg/L)	Max. (µg/L)
		limit (µg/L)	limit (µg/L)			
Red wine	75.5	0.0058	0.0193	5/31	0.027	0.030
White wine	93.4	0.0045	0.0150	5/28	0.020	0.022

1986, Sweeney・Dobson 1998)。 *A. ochraceus* の成長に必要な温度条件は 8~37°C、オクラトキシン産生に必要な温度は 12~37°C とされている。一方、 *P. verrucosum* においては成長に必要な温度条件は 0~31°C、また、オクラトキシンの産生では 4~31°C とかなり低温でもトキシンの生成が可能である。今回の調査では、ワインの生産地とオクラトキシン A の検出には相関が見られず、日本国内でも上述のオクラトキシン生産菌は生育可能であり、カビ毒汚染の危険性があることが示唆された。

近年、試料溶液の調整にイムノアフィニティーカラムが併用されるようになり (中島 2001, Noba et al. 2008, Omote et al. 2008)、サンプルをこの方法で処理

した後、HPLC で定量を行う方法が主流になりつつある。イムノアフィニティーカラムはカラムにカビ毒に特異的な抗体が固定された担体が充填されており、この抗体には目的のカビ毒のみしか保持されないため夾雑物の大半を除去することが可能である。これら免疫化学的な測定法は、目的とするカビ毒を選択的に分離・検出できる、操作が簡便で早い、有害な有機溶媒の使用量が極端に少ない等、従来の化学分析の欠点を補う特徴を有している (中島 2006)。この方法で夾雑物の除去を行えば、ワインでもより低濃度のカビ毒を分析することが可能となり、カビ毒が検出される点数が増えることも推察される。

オクラトキシンはシトリニン、デオキシニバレノール

ルおよびアフラトキシンとの複合汚染がかなりの頻度で起こっているといわれており(飯田ら 2007、田端ら 2008b)、2 種類以上のカビ毒による毒性面への影響を考慮する必要があると思われる。LC/MS/MS や LC/TOF-MS といった高分解能を利用した多成分一斉分析法が報告されており(Ofitserova et al. 2009、滝埜ら 2005、Tanaka et al. 2006)、今後、ワインについてもカビの複合汚染について調査する必要がある。

カビ毒による食品汚染の最も根本的な防衛策は、農作物にカビを着生させないことである。国際機関では、カビ毒汚染を最小限に防ぐための農業生産段階における行動規範を作成している。これには、例えば土壌、輪作方法、灌漑方法のチェックといった収穫前規範や、収穫時、貯蔵時における作物の水分含量をチェックすることおよび輸送時においてはカビの生育に適した水分含量にしないことといった収穫後規範がある。このような行動規範を参考に、カビ毒による汚染を防ぐ努力が必要である(小西 2006b)。また、ワインでは加工工程においても、さまざまな処理が施されるため、その工程に注意を払う事も重要である。

要 約

LC/MS/MS を用いて国産ワイン中のオクラトキシン A の分析を行った。サンプルは固相抽出法で前処理を行い分析した。LC/MS/MS では移動相は 0.1%ギ酸水および 0.1%ギ酸アセトニトリルを用いたグラジエント法を用い、ESI ポジティブイオンモードで測定した。添加回収試験の結果、回収率は赤ワインで 75.5%、白ワインで 93.5%であった。変動係数は、赤ワインで 10.2%、白ワインで 6.4%と良好であった。赤ワインで 0.0058 µg/L、白ワインで 0.0045 µg/L を検出限界とし国産ワイン 59 点(赤ワイン 31 点、白ワイン 28 点)の分析を行った所、赤ワイン 5 点、白ワイン 5 点からオクラトキシン A が検出された。しかし、その検出濃度は、最高値がそれぞれ、赤ワインで 0.03 µg/L、白ワインで 0.022 µg/L といずれも極低濃度であった。今回検出されたレベルは全て EU で設定されている規制値(2 µg/L)より低く、人に対する健康被害はないものと考えられる。

文 献

飯田憲司・田端節子・木村圭介・鈴木仁・井部明広.

2007. 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. 東京都健康安全研究センター研究年報. 58 : 153-156.

Kanizawa, M., and S. Suzuki. 1978. Induction of renal and hepatic tumors in mice by ochratoxin A, a mycotoxin. *Gann*. 69: 599-600.

小西良子. 2005. 食品中のカビ毒の毒性および暴露研究に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金「食品の安全性高度化推進研究事業」平成 16 年度総括・分担研究報告書. : 1-129.

小西良子. 2006a. 食品中のカビ毒の毒性および暴露研究に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金「食品の安全性高度化推進研究事業」平成 17 年度総括・分担研究報告書. : 2-90.

小西良子. 2006b. カビ毒の制御と今後の動向. *食品・食品添加物研究誌*. 211 : 1058-1062.

Marquardt, R.R., and A.A. Frohlich. 1992. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *J. Anim. Sci.* 70: 3968-3988.

中島正博. 2001. 食品分析におけるイムノアフィニティーカラムの応用. *食衛誌*. 42(1) : J1-J7.

中島正博. 2005. オクラトキシン A—その発癌性と汚染実態. *マイコトキシン*. 55 : 139-148.

中島正博. 2006. 免疫化学的手法によるカビ毒の分析法. *食品・食品添加物研究誌*. 211 : 1049-1057.

野場重都・表雅之・北川奏・望月直樹. 2007. LC/MS/MS を用いたワイン中のオクラトキシン A の分析. *J. ASEV Jpn.* 18: 162-163.

Noba, S., M. Omote, Y. Kitagawa, and N. Mochizuk. 2008. Determination of ochratoxin A in wine by immunoaffinity cleanup and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Food. Prot.* 71: 1038-1042.

Northolt, M.D., H.P. Van Egmond, and W.E. Paulsch. 1979. Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature. *J. Food. Prot.* 42: 485-490.

Ofitserova, M., S. Nerkar, M. Pickering, and L. Torma. 2009. Multiresidue mycotoxin analysis in corn grain by column high-performance liquid chromatography with postcolumn photochemical and chemical derivatization: single-laboratory validation. *J. AOAC Int.* 92: 15-25.

Omote, M., Y. Kitagawa, and N. Mochizuki. 2008.

- Determination of ochratoxin A in beer by immunoaffinity cleanup and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 66: 59-62.
- Patterson, M., and A.P. Damoglou. 1986. The effect of water activity and pH on the production of mycotoxins by fungi growing on a bread analogue. *Lett. Appl. Microbiol.* 3: 123-125.
- Pfohl-Leszkowicz, A., T. Petkova-Bocharova, I.N. Chernozemsky, and M. Castegnaro. 2002. Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. *Food. Addit. Contam.* 19: 282-302.
- Scott, P.M. 2008. Mycotoxins in alcoholic beverages and fruit juices: occurrence and analysis. *ACS symposium series.* 1001: 170-191.
- Sweeney, M.J., and A.D.W. Dobson. 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int. J. Food Mycobiol.* 43: 141-158.
- 田端節子・飯田憲司・木村圭介・岩崎由美子・中里光男・鎌田国広・広門雅子. 2008a. HPLC-FL および LC/MS/MS による食品中のオクラトキシン A, B およびシトリニンの同時分析法. *食衛誌.* 49:100-105.
- 田端節子・飯田憲司・木村圭介・岩崎由美子・中里光男・鎌田国広・広門雅子. 2008b. 各種市販食品中のオクラキシン A, B およびシトリニンの汚染実態調査. *食衛誌.* 49: 111-115.
- 滝埜昌彦・田中宏輝・小西良子・田中敏嗣. 2005. LC/TOF-MS を用いたかび毒の一斉分析法. *日本食品衛生学会第 89 回学術講演会講演要旨集.* 81: 29.
- Tanaka, H., M. Takino, Y. Sugita-Konishi, and T. Tanaka. 2006. Development of a liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometric method for the simultaneous determination of trichothecenes, zearalenone and aflatoxins in foodstuffs. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20: 1422-1428.
- 田中敏嗣・芳澤宅實. 2006. カビ毒による中毒事例と研究のあゆみ. *食品・食品添加物研究誌.* 211: 997-1003.
- 宇田川俊一・田端節子・中里光男. 2002. オクラトキシン A. p. 103-118. 細貝祐太郎・松本昌雄監修. *食品安全性セミナー5 マイコトキシン.* 中央法規出版(株). 東京.
- Varelis, P., S.L. Leong, A. Hocking, and G. Giannikopoulos. 2006. Quantitative analysis of ochratoxin A in wine and beer using solid phase extraction and high performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Food. Add. Contam.* 23: 1308-1315.
- 芳澤宅實. 2006. 食品のカビ毒汚染、その規制とリスク評価の現状. *食品・食品添加物研究誌.* 211: 1018-1026.