

LC/MS 及び HPLC による大麦中のオクラトキシン A の分析

Analysis of Ochratoxin A in barley by LC/MS and HPLC methods

オクラトキシン A は、*A.ochraceus* 等のカビにより産生されるカビ毒で、穀類やコーヒー、ビール等に含まれ、肝毒性及び腎毒性を有するとの報告があります。国内においては基準値が設定されていませんが、海外では、5 µg/kg (麦類、CODEX) 及び 2~10 µg/kg (麦類、EU) 等の基準値が設定されています。厚生労働省通知のオクラトキシン A の試験法では、イムノアフィニティーカラムを前処理カラムとして用いた LC/MS 法及び HPLC 法が採用されています。本報では、各検出法による大麦をモデル試料としたオクラトキシン A の測定例を紹介します。

大麦試料の前処理法を、図 2 に示します。アセトニトリル/水の混合溶媒を加え、ホモジナイズにより抽出しました。抽出液をろ過後、オクラトキシン特異抗体を結合させたイムノアフィニティーカラムを用いて精製した溶液を測定試料としました。

(1) LC/MS 法

分析条件を表 1 に示します。分析カラムには、TSKgel ODS-100V 5µm を使用し、酢酸アンモニウム水溶液/アセトニトリルのグラジエント溶離により分離しました。オクラトキシン A は、ESI のポジティブとネガティブの両方で検出可能ですが、今回は [M+H]⁺ 404 で検出しました。

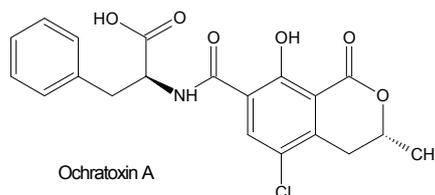


図 1 オクラトキシン A の構造式

試料	25 g
	+ アセトニトリル/水(6/4) 100 mL
ホモジナイズ	3 分間
ろ過(Whatman No.4)	
ろ液	4 mL分取
	+ リン酸緩衝生理食塩水 44 mL
イムノアフィニティーカラム精製(OchraTest WB, VICAM)	
	+ 負荷 (流速 5 mL/min以下)
	+ 洗浄;水 10 mL
	+ 溶出;引圧による水分除去後, メタノール 4 mL
溶出液	
減圧濃縮乾固	
	+ メタノール/水/酢酸(30/70/1) 1 mL
ろ過(メンブランフィルター 孔径 0.2 µm)	
↓	LC/MS, HPLC

図 2 大麦試料の前処理法

表 1 分析条件 (LC/MS 法)

Column	: TSKgel ODS-100V 5µm (2.0 mmI.D. × 150 mm, 5 µm)
Eluent	: A; 10 mmol/L CH ₃ COONH ₄ B; CH ₃ CN
Gradient	: B conc.(0 min) 20 % → (20-21 min) 50 % → (21.1-25 min) 95 %
Flow rate	: 0.2 mL/min
Column temp.	: 40 °C
Injection volume	: 50 µL
Instrument	: G1956B (Agilent)
Ionization	: ESI
Polarity	: Positive
Temperature	: 350 °C
m/z	: 404

大麦試料にオクラトキシン A を 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ になるように添加し、図 2 に示す前処理を行った後、LC/MS 法で測定したクロマトグラムを図 3 に示し

ます。オクラトキシン A は、15 分付近に溶出し、非添加の大麦抽出試料からは検出されませんでした。

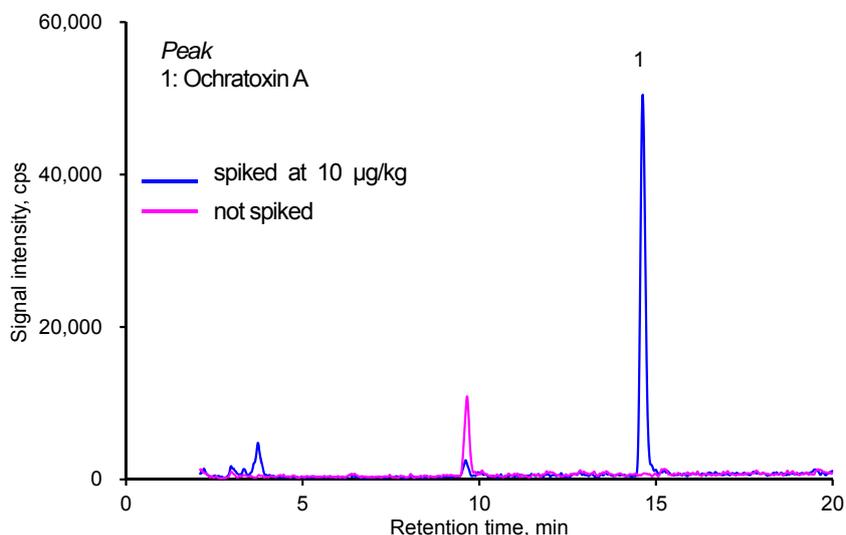


図 3 大麦抽出試料(添加及び非添加)のクロマトグラム(LC/MS 法)
添加濃度: 大麦中にオクラトキシン A として 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$

(2) HPLC 法

分析条件を表 2 に示します。分析カラムには、TSKgel ODS-100V 5 μm を使用し、アセトニトリル、水及び酢酸の混合溶媒を移動相としてイソクラティック溶離により分離しました。蛍光検出器

を使用し、オクラトキシン A のもつ自然蛍光を検出しました。図 3 の結果が得られた同じ各試料溶液を測定したクロマトグラムを図 4 に示します。

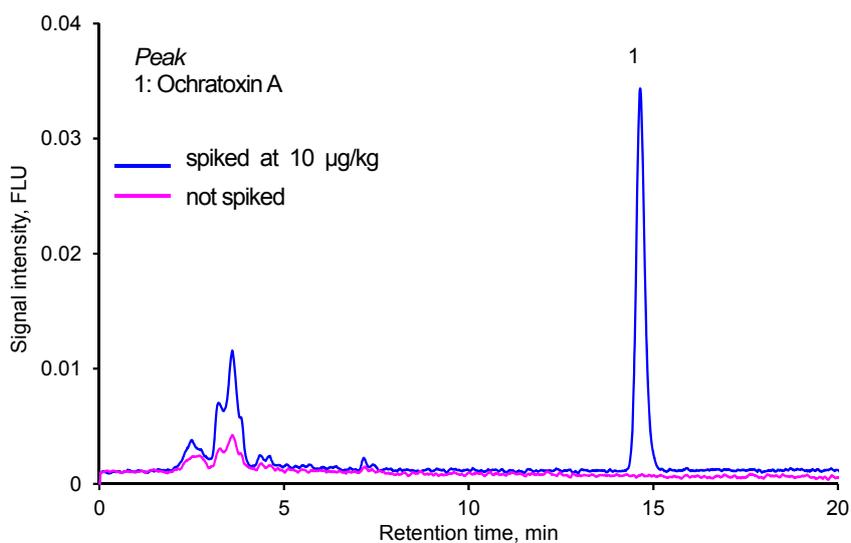


図 4 大麦抽出試料(添加及び非添加)のクロマトグラム(HPLC 法)
添加濃度: オクラトキシン A として 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$

表2 分析条件(HPLC法)

Column : TSKgel ODS-100V 5 μ m (4.6 mmI.D. \times 250 mm, 5 μ m)
Eluent : CH ₃ CN / H ₂ O / CH ₃ COOH = 480 / 510 / 10
Flow rate : 1.0 mL/min
Column temp. : 45 °C
Injection volume : 100 μ L
Detection : FLD (Ex; 333 nm, Em; 460 nm)

各検出法によるオクラトキシンAの定量範囲、再現性、定量限界及び回収率を表3に示します。標準試料を用いて検量線を作成した結果、いずれも0.5~10 μ g/Lの濃度範囲において、 $r^2 = 0.999$ の相関係数を有する直線性が得られました。定量下限値(LOQ)は、0.16及び0.29 μ g/Lとなり、試験法の前処理を行った場合、大麦中の含有濃度はそれぞれ0.16

μ g/kg及び0.29 μ g/kgに相当します。CODEXの定める基準値の1/10濃度が十分に測定可能であることを確認しました。また、オクラトキシンAの標準物質を各10 μ g/kgの濃度になるように添加した大麦を試料として測定を行った場合の回収率は、102.4%及び89.0%と良好な結果が得られました。

表3 各分析法による定量範囲、再現性、定量限界及び回収率

Methods	Calibration curve		RSD (% , n=6) (at 5 μ g/L)	LOQ		Recovery(%) (at 10 μ g/kg: barley)
	Range(μ g/L)	r^2		(μ g/L)	(μ g/kg: barley)	
LC/MS	0.5-10	0.999	1.57	0.16	0.16	102.4
HPLC	0.5-10	0.999	0.55	0.29	0.29	89.0