

Simultaneous detection of aflatoxins and benzo [a] pyrene by LC/MS/MS

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-12-20 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 中川, 博之, 亀山, 真由美, 佐合, 由紀, 箭田, 浩士, 久城, 真代, 長嶋, 等 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00002826

報 文

LC/MS/MS によるアフラトキシンとベンゾ [a] ピレンの同時分析

中川 博之[§], 亀山 眞由美, 佐合 由紀, 箭田 浩士, 久城 真代, 長嶋 等

食品総合研究所 305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12

Simultaneous detection of aflatoxins and benzo [a] pyrene by LC/MS/MS

Hiroyuki Nakagawa[§], Mayumi Ohnishi-Kameyama, Yuki Sago, Hiroshi Yada,
Masayo Kushiro, and Hitoshi Nagashima

National Food Research Institute, 2-1-12 Kannon-dai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

Abstract

Aflatoxins (AFs) are the most potent carcinogenic and toxic compounds among many kinds of substances in the nature, and benzo [a] pyrene (BaP) is known as a hardly degradable compound and also recognized as a carcinogen. Simultaneous detection of AFs (AFB₁, AFB₂, AFG₁, and AFG₂) and BaP was performed by liquid chromatography /tandem mass spectrometry (LC/MS /MS) equipped with an atmospheric pressure photo-ionization (APPI) probe. Mixtures of AFs and BaP were applied to multi-functional columns suggested for the purification on an official method for AFs determination, and both of them were well eluted through an Autoprep MF-A1000 column. In the aim of practical usage for food analysis, AFs and BaP were added to olive oil at the concentration of 4.0 μg/kg and 40 μg/kg, respectively, and analyzed with LC/MS/MS. When AFs and BaP were purified from olive oil with a solid phase extraction column Autoprep MF-A1000, the mean recovery of BaP was low (12.8 %) in contrast to that of AFs (102.1-125.3%). The cause of low recovery of BaP was its low extraction efficiency from olive oil with the solvent of acetonitrile-water (90: 10). If the purification process is improved to increase the extraction efficiency of BaP from olive oil, our method must be useful for the analysis of AFs and BaP contaminated in various foods.

緒 言

アフラトキシン (AF(s)) は *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus lutamarii* などの一部の糸状菌が産生するカビ毒 (マイコトキシン) である¹⁾. AFs は強力な毒性と発ガン性を有しているため, 穀物などの農作物における汚染は世界中で深刻な問題となっている²⁾³⁾. 糸状

菌が産生する AFs にはアフラトキシン B₁ (AFB₁), アフラトキシン B₂ (AFB₂), アフラトキシン G₁ (AFG₁), アフラトキシン G₂ (AFG₂) の4つの異性体が存在することが知られており (図1), 世界各国で基準値が定められており, その汚染が監視されている. 中でも AFB₁ は最も毒性が強く, また糸状菌が産生する量も特に多いことから, 特に厳しく規制されている. 日本では厚生労働省により AFB₁ について法的規制が行われており, 10ppb を超える AFB₁ が検出された食

2007年10月31日受付, 2007年12月18日受理

[§]Corresponding author, Hiroyuki Nakagawa

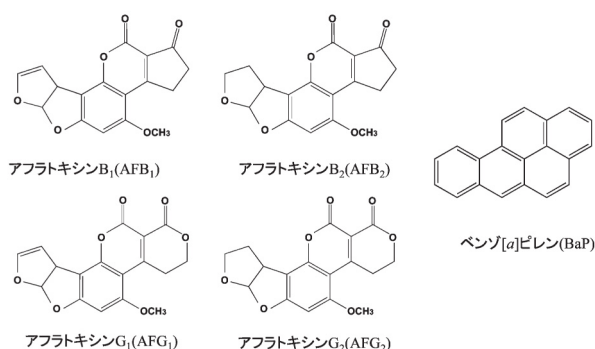


図1 アフラトキシンとベンゾ[a]ピレンの構造

品は食品衛生法違反品となる。

一方、多環式芳香族炭化水素 (polycyclic aromatic hydrocarbon(s), PAH(s)) は環境中から食品中にまで広く存在する化合物の総称である⁴⁾。言葉による定義の上ではナフタレンのような2つ以上の芳香環が縮合した構造をもつ化合物を「多環式炭化水素」というが、環の数が増加するにつれて水溶性が減少し、難分解性になる。発ガン性や変異原性などの有害物質としての性質が現れるのは芳香環を4つ以上持つ化合物(注:ピレンでは発ガン性はないといわれている)であるといわれている⁵⁾。PAHsは、これまでは自動車の排気ガスやタバコの煙、コールタール中に含まれる環境汚染物質として知られることが多かったが、近年になって、微量ではあるがベンゾ[a]ピレン(BaP)(図1)などのPAHsが薫製品やスモークチーズなどの食品中にも含まれることが報告され、食事を介して人体に取り込まれるリスクが懸念されるようになった^{6)~8)}。また、一部のPAHsは食品の加熱による調理過程で生じることも指摘されており、日常の食生活の中での摂取量が注目されるようになった^{9) 10)}。代表的なPAHであるBaPは国際ガン研究機関(IARC)により発ガン性物質(グループ1)に分類されている。米国や日本、コーデックス委員会(消費者の健康の保護、食品の公正な貿易の確保等を目的として、1962年にFAO及びWHOにより設置された国際的な政府間機関)などでは食品の管理基準はないが、EUは2.0ppb、中国は10ppb以下としている。韓国では2006年7月からオリーブ油にBaP勧奨基準2.0ppb以下を設定している。また、世界保健機関(WHO)による飲料水水質ガイドラインにおいては目標水質が0.7ppbと規定されている。BaPは食品中から最初に発ガン性物質として同定されたPAHであり¹¹⁾、動物実験でも最も強力な発ガン性物質の一つ

として報告されていることから¹²⁾、数あるPAHsの中でもその存在が広く知られており、詳細な研究が行われている。このため、BaPは環境や食品中に含まれる発ガン性PAHsのレベルを推定するマーカーとして利用されている^{9) 13)}。

そこで筆者らは、上記のように食品を汚染する代表的な発ガン性物質であるAFsとBaPを高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析装置(LC/MS/MS)を用いて同時に分析することを試みた。AFsはオリーブ油のような食用油における汚染例が報告されており¹⁴⁾、ピスタチオオイルでは毎年AFsによる食品衛生法違反事例が報告されている。BaPのようなPAHsは食用油を加熱処理した際にも生じる化合物であるといわれているが、AFsは熱にも安定であることから、AFsで汚染された油で食材を加熱調理した場合には両者による同時汚染が起こることは十分考えられる。カビ毒とPAHsは物性(極性)が大きく異なるため、これまで同時分析に関する報告例はなかったが、筆者らは大気圧光イオン化(atmospheric pressure photo-ionization, APPI)プローブを装着したLC/MS/MSを使用して同時分析を行ったので報告する。

実験方法

使用装置

1. 分析用試料の調製

AFの4種の誘導体はB₁、G₁はAcrosorganics製標品(アメリカ合衆国)、B₂、G₂は和光純薬標品を購入した。BaPはAccuStandard製標品(アメリカ合衆国)を購入した。これらの粉末標品は4℃(AFB₂、AFG₂は-20℃)にて保存し、30分以上放置して室温に戻してから使用した。各試薬標品を直示天秤LI-BRORLM-20(島津製作所)にてアルミボートを用いて約1mgを精確に量りとり、アセトニトリル(LC/MS分析用)を用いて溶解後、褐色ガラス製透明すりメスフラスコ(10mlおよび20ml, Arrow)に移し、正確に体積を調整してストック溶液を調製した。調製後はそれぞれの溶液を20ml容褐色ガラス製有機溶媒保存びん(アサヒテクノ硝子株式会社)に移し、AFsは-20℃、BaP溶液は4℃にて保存し、実験の際には30分以上放置して室温に戻してから使用した。検量線作成に用いた溶液は以下のように調

製した。ストック溶液から AFs 4 種と BaP を分取・混合し、アセトニトリルで希釈することにより、AFs と BaP を各 1 ppm ずつ含むアセトニトリル溶液を調製した。この溶液 1 ml, 500 μ l, 200 μ l, 100 μ l をそれぞれ 10 ml 容褐色透明擦りメスフラスコに精確に分取し、等量の蒸留水を添加した後、アセトニトリル-水混合液 (50 : 50) にて定容することにより、AFs と BaP を 100, 50, 20, 10 ppb ずつ含む標準溶液を調製した。このうち、50 ppb の溶液 1 ml, 400 μ l, 200 μ l, 100 μ l をそれぞれ 10 ml 容褐色透明擦りメスフラスコに精確に分取し、アセトニトリル-水混合液 (50 : 50) にて定容することにより、AFs と BaP を 5, 2, 1, 0.5 ppb ずつ含む標準溶液を調製した。さらに 2 ppb の溶液 1 ml および 500 μ l をそれぞれ 10 ml 容褐色透明擦りメスフラスコに精確に分取し、アセトニトリル-水混合液 (50 : 50) にて定容することにより、AFs と BaP を 0.2, 0.1 ppb ずつ含む標準溶液を調製した。

2. 分析方法

LC/MS/MS による分析は、分離部に Agilent 1100 シリーズ (Agilent Technologies, アメリカ合衆国)、イオン化部に大気圧光イオン化 (APPI) プローブをもつ三連四重極型質量分析装置 4000QTRAP LC/MS/MS システム (Applied Biosystems, アメリカ合衆国) で行った。LC の移動相は A 液 (0.1% 酢酸水溶液) と B 液 (0.1% 酢酸含有アセトニトリル) を下記のプログラムで混合し、分離には逆相カラム ZOR-BAX Eclipse Plus C18 (ϕ 2.1mm \times 150mm, 3.5- μ micron, ; Agilent Technologies, アメリカ合衆国) を用い、流速毎分 0.20 ml で溶出させた。グラジエントプログラムは、0 ~ 2 分 : 5% B, 2 ~ 17 分 : 5 \rightarrow 95% B, 17 ~ 22 分 : 95% B, 22 ~ 23 分 : 95 \rightarrow 5% B, 23 ~ 33 分 : 5% B とし、本条件下で AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ および BaP はそれぞれ 15.69, 15.21, 15.24, 14.73, および 24.31 に溶出された。カラムから溶出した試料を、APPI プローブでトルエン (HPLC 分析用) をドーパント溶媒として使用 (流速 0.02 ml/分) してイオン化した。各設定値は下記の通りである。イオン化電圧, 625 V ; イオン源温度, 500 $^{\circ}$ C ; カーテンガス流量, 10psi ; ネブライザーガス流量, 30 psi ; ランプガス流量, 10psi。各ガスは窒素ガスを用い、全て正イオン化モードで検出した。多成分反応モニタリング (MRM) に使用するプロダクトイオンは

AFs および BaP のそれぞれの [M+H]⁺ についてコリジョンエネルギーを変化させて MS/MS を行い、最も大きい強度で観測されたイオンを使用した。使用溶媒は全て HPLC 用を使用した。

3. 多機能固相抽出カラムを用いた同時精製法の検討

食品における AFs と BaP の同時汚染を調べる場合、各食品試料から AFs と BaP を抽出・精製する必要があることが予想される。基準値が設定されている AFs についてはさまざまなマトリックス (穀類, 豆類, 種実類, 香辛料など) について適用可能な多機能固相抽出カラムが市販されており、これらを用いた精製法が AF 測定通知法に記載されている。そこで、今回は AF 測定通知法で推奨されている 3 種類の多機能固相抽出カラムを用い、AFs 4 種と BaP を同時に精製可能か調べることにした。多機能固相抽出カラムとしては、AutoprepMF-A1000 (昭和電工株式会社), Multisep 226 AflaZon+ (RomerLabs, アメリカ合衆国) および Multisep 228 AflaPat (同) を使用した。1. で調製した AFs と BaP を各 1ppm ずつ含むアセトニトリル溶液 1ml を精確に 10ml 容褐色透明擦りメスフラスコに分取し、蒸留水 1ml を添加した後、アセトニトリルにて定容 (アセトニトリル終濃度 90%) したものを Autoprep MF-A1000 に負荷した。同様に、同溶液 2ml を精確に 20ml 容褐色ガラス製透明擦りメスフラスコに分取し、蒸留水 3.2ml を添加した後、アセトニトリルにて定容 (アセトニトリル終濃度 84% 溶液) したものを Multisep 226 AflaZon+ および Multisep 228 AflaPat に負荷した。いずれも各多機能固相抽出カラムについて製造社が推奨するアセトニトリルの最適濃度で、AFs および BaP を各 100ppb ずつ含むように調製した。いずれのカラムも平衡化は不要で、抽出液を直接負荷して自然落下で通液することができる。また、AFs は吸着されず、AFs 以外の夾雑成分が吸着されるように設計されているため、流出液中における AFs 濃度が負荷した溶液に含まれる AFs の濃度となる。各カラムにルアーストップコック (Varian, アメリカ合衆国) を装着し、流出液を 1.0ml ずつフラクションに分けて 7 本目まで回収した。すなわち、褐色ガラス濃縮管 (0.5ml/1.0ml メス / 7ml, GL サイエンス株式会社) に流出液を回収し、1.0ml の目盛りまで液面が達した時にコックを一時閉じ、溜まった流出液を褐色ガラス製バイアルび

表1 AFBs および BaP の LC/MS/MS における分析パラメーター

化合物	分子量	プリカーサーイオン m/z	プロダクトイオン m/z	DP	CE
AFB ₁	312	313	285	76	35
AFB ₂	314	315	287	131	39
AFG ₁	328	329	243	111	39
AFG ₂	330	331	313	101	39
BaP	252	253	248	96	105

DP:Declusteringpotential (V)

CE:Collisionenergy (V)

ん (Agilent Technologies, アメリカ合衆国) に移して LC/MS/MS による定量分析を行った。

4. オリーブ油への添加回収試験

AFs による汚染を受けた食用油の例としてはオリーブ油での汚染が Papachristou らにより報告されている¹⁴⁾。オリーブ油は BaP による汚染もしばしば報告されていることから、AFs と BaP の両者による同時汚染は十分に起こる可能性がある。そこで、市販のオリーブ油を購入し、AFs4 種および BaP を添加し、AFs 分析の通知法を参考にして多機能固相抽出カラムによる精製を行った。オリーブ油は試薬として販売されているものではなく、実際に日常生活で利用される食用オリーブ油を量販店で購入して使用した。50ml 容丸底褐色ガラス製透明擦り合わせ遠沈管 (φ35mm×110mm) にオリーブ油 2.5g を測り取り、AFs4 種各 0.1ppm と BaP 1 ppm を含むアセトニトリル溶液を 100μl 添加 (オリーブ油重量あたり AFs4 種各 4.0μg/kg, BaP 40μg/kg 添加) して、ボルテックス型ミキサーで混合した後 30 分間放置した。ここにアセトニトリル-水混合液 (90:10) 10ml を加え、KM ShakerV-DX (岩城産業) を用いて 300rpm にて 30 分間振とう抽出を行った。抽出液はパステールピペットを用いて 15ml 容丸底ガラス製ねじ口試験管 (φ16.5mm×125mm) に移し、遠心分離 (3000 g×10 分) を行った。抽出液は二層に分離するため、ルアーストップコック (Varian) を装着した多機能固相抽出カラムに上層 (下層はオリーブ油層) を負荷した。流出してくる溶液を 1.0 ml ずつ褐色ガラス濃縮管 (GLサイエンス) にフラクションに分けて回収し、各フラクションを窒素気流下で溶媒を除去した。残留物をアセトニトリル-水混合液 (50:50) 100μl に溶解し、ガラス製バイアルびん (Agilent) に移し

た後、LC/MS/MS による定量分析を 3. と同様に行った。その際、試料の量が少ないため、バイアルインサート (Agilent) を使用した。これら一連の操作を 3 回繰り返して行った。また、コントロール試験として、オリーブ油 2.5g に AFs および BaP を含まないアセトニトリルを 100μl 添加して、同様の操作を行った。コントロール試験は 2 回行った。

実験結果

1. LC/MS/MS による AFs および BaP の同時分析

AFs, BaP はともにポジティブモードで検出され、いずれもプリカーサーイオンとしては [M+H]⁺ が選択された。LC/MS/MS による AFs4 種および BaP の同時分析のために決定したイオン化パラメーターを表 1 に示す。AFs 4 種および BaP について 0.1 ~ 100 ppb の標準溶液を用いて検量線を作成したところ、AFB₁, AFG₁ は 0.5 ~ 100 ppb, AFB₂, AFG₂ は 1.0 ~ 100 ppb, BaP は 2.0 ~ 100 ppb の濃度範囲で直線性 (相関係数 0.990 以上) を示し、検出限界 (S/N 比 3 以上) と定量限界 (S/N 比 10 以上) はそれぞれ AFB₁ では 0.2ppb, 0.5ppb, AFB₂ では 0.5 ppb, 1.0 ppb, AFG₁ では 0.2 ppb, 0.5 ppb, AFG₂ では 0.5 ppb, 1.0 ppb, BaP では 1.0 ppb, 2.0 ppb であった。以上の結果から、AFs と BaP は本手法により同時定量分析が可能であることがわかった。

2. 多機能固相抽出カラムを用いた同時精製の検討

AFs および BaP を各 100ppb 含むアセトニトリル-水混合溶液を 3 種類の多機能カラム (AutoprepMF-A1000, Multisep 226 AflaZon+, Multisep 228

表2 多機能カラム Autoprep MF-A1000 における AFs と BaP の流出パターン^a

フラクション番号	濃度 (ppb)				
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	BaP
1	95.5	96.7	102	97.9	19.4
2	100	104	105	95.7	60.4
3	107	107	105	97.5	88.2
4	105	107	105	102	100
5	99.3	106	108	95.9	99.1
6	101	98.1	109	96.9	104
7	106	101	106	96.5	96.4

a) AFs と BaP を各 100ppb ずつ含む 90%アセトニトリルを負荷し、1 ml ずつ分取した。

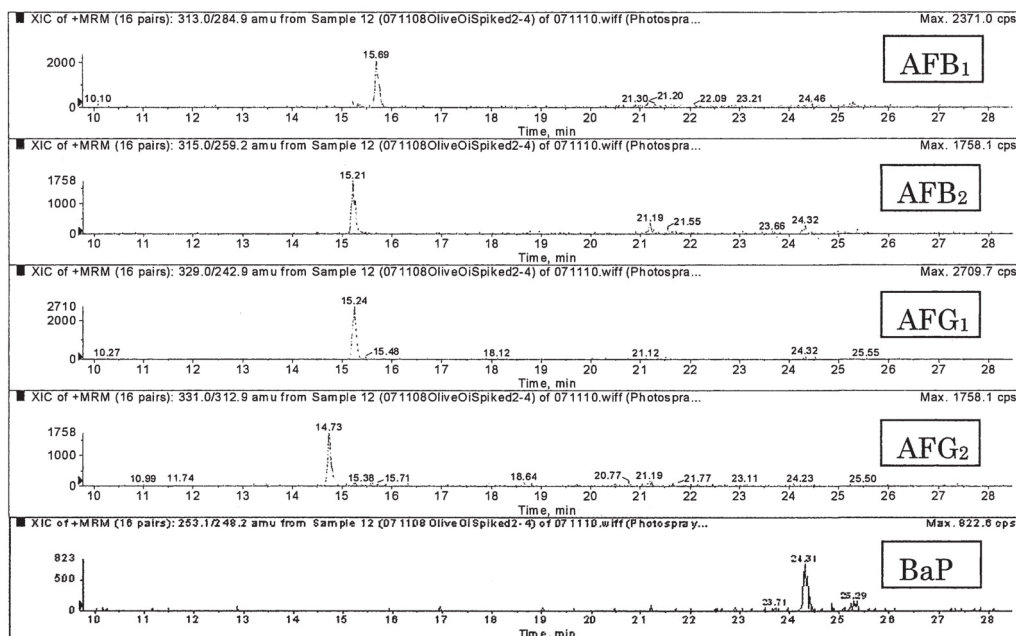


図2 LC/MS/MS による AFs と BaP の同時分析の MS/MS クロマトグラム

AflaPat) に負荷したところ、AFs はいずれのカラムにおいてもフラクション1本目から95.5~105 ppb (負荷濃度の95.5~105%相当) の流出が確認された。これに対して、BaP は AutoprepMF-A1000 ではフラクション3本目以降で88.2~104ppb (負荷濃度の88.2~104%相当)、Multisep226 ではフラクション6本目以降で105~145ppb (負荷濃度の105~145%相当) の流出が確認された。一方、Multisep228 ではフラクション7本目までBaPの溶出が確認されず、流出速度も遅かったため、AFs と BaP の同時精製には不相当であると判断した(データ省略)。以上より、各カ

ラムのベッドボリュームが異なるので、剤の材質だけに依存するとは限らないが、AFs と BaP の同時精製には Autoprep MF-A1000 を用いるのが適当であると判断した。表2に Autoprep MF-A1000 における AFs および BaP の流出パターンを示す。

3. オリーブ油への添加回収試験

オリーブ油への添加回収試験は最も良好な流出パターンを示した Autoprep MF-A1000 を用いて精製を行った。抽出はアセトニトリル-水混合液(90:10)を用いて行った。表2の結果より、BaP はフラクション4

表3 AFBs および BaP のオリーブ油への添加回収試験

	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	BaP
Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	4.0	4.0	4.0	4.0	40
Mean Recovery (%) (n=3)	110.9	113.7	102.1	125.3	12.8
Relative standard deviation (RSD)	10.9	13.2	15.3	10.6	2.1

本目以降に溶出が安定することから、AFs と BaP の同時分析には 4 本目のフラクションを用いた。4 本目のフラクションの典型的な MS/MS クロマトグラムを図 2 に、また 3 回の添加回収試験の結果を表 3 に示す。AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ の平均回収率はそれぞれ 110.9%、113.7%、102.1%、125.3% であり、繰り返し精度は相対標準偏差 (RSD) としてそれぞれ 10.9% 以下、13.2% 以下、15.3% 以下、10.6% 以下であった。一方、BaP の平均回収率は 12.8% であり、繰り返し精度は 2.1% 以下であった。コントロール実験として、オリーブ油 2.5g にアセトニトリルのみを 100 μl 添加して同様の操作を行ったが、AFs および BaP は検出されなかった。

考 察

食用油に含まれる AFs と BaP を LC/MS/MS による同時分析を行ったのは本研究が最初の例である。AFs の APPI プローブを用いた LC/MS による検出は Takino らによって報告されているが¹⁵⁾、マトリックスとしては穀類や香辛料を使用して添加回収実験を行っており、食用油を用いたデータは示されていない。一方、多環式芳香族炭化水素 (PAHs) の APPI プローブを用いた LC/MS/MS による検出は Moriwaki らが報告を行っているが¹⁶⁾、堆積物中の PAHs を分析対象としており、食品中の PAHs に関するデータは示されていない。従来、PAHs の分析に関してはガスクロマトグラフ質量分析法 (GC/MS 法、GC-MS/MS 法) が適用された例がほとんどであり、LC/MS/MS による分析例は皆無であった。APPI イオン化法はこれまで LC/MS/MS では検出することができなかった PAHs のような低極性化合物のイオン化が可能であることから、LC/MS/MS の分析装置としての利用範囲を拡大するイオンソースであるといえる。また、GC/MS (/MS) は高感度な分析装置であるが、水分を含む試料や熱に弱い化合物は分析することができない上に、-OH 基や-COOH 基を有する化

合物はメチル化やアセチル化などの誘導体化をしなければ検出不可能である。一方、LC/MS/MS は水溶性化合物や熱に不安定な化合物でも誘導体化せずに分析することが可能である。今回、筆者らは APPI プローブを用いた LC/MS/MS を使用して AFs 4 種と BaP の同時分析を行った。PAHs のような低極性化合物とカビ毒のような極性化合物の同時分析が可能であったことから、LC/MS/MS がより広い範囲の化合物の同時分析について適用可能であることが示された。

多環式芳香族炭化水素 (PAHs) の APPI プローブを用いた LC/MS/MS による検出において、Moriwaki らは BaP の検出限界を 1.0 ppb と報告しているが¹⁶⁾、今回筆者らも同等の値を得た。Moriwaki らの報告では BaP のプリカーサーイオンとしては $[\text{M}+\text{H}]^+$ は検出されず、ラジカルイオンである $[\text{M}]^+$ を使用していたが、本実験では AFs および BaP のいずれについてもプリカーサーイオンとして $[\text{M}+\text{H}]^+$ が選択された。BaP に関しては $[\text{M}]^+$ イオンも検出されたが、LC の移動相に 0.1% 酢酸を添加しているためか、 $[\text{M}+\text{H}]^+$ の方が強度が高かったためプリカーサーイオンとして使用した。

AFs、BaP の混合溶液を用いた実験では、両者とも Autoprep MF-A1000 カラムにおいて良好な流出パターンを示し、同時精製が可能であることが示唆された。また、市販のオリーブ油に AFs と BaP を添加して AFs 分析用の通知法に従った前処理を行ったところ、AF では Autoprep MF-A1000 を用いて 102.1 ~ 125.3% の平均回収率が得られた。一方、BaP については、平均回収率は 12.8% と低かったものの、AFs と一緒に精製可能であることが示された。AFs、BaP の混合溶液を用いた実験 (表 2) では BaP も良好な回収率が得られていたことから判断すると、オリーブ油への添加回収試験における BaP の回収率の低さは Autoprep MF-A1000 への吸着等によるものではなく、アセトニトリル-水混合液 (90:10) によるオリーブ油からの抽出効率の低さに起因するものであると思われる。従って、抽出効率を改善すれば Autoprep MF-A1000 は食用油

中に含まれる AFs と BaP の同時精製に有効であると思われる。日本における AFs の基準値は AFB₁ についてのみ定められており、「食品中に検出されてはならない」とされているが、食品衛生法第 6 条により暫定的な規制値が 10ppb と設定されている。一方、BaP については日本では食品の管理基準はないが、EU では 2.0ppb、韓国では勧奨基準 2.0ppb 以下を設定している。これらを規制レベルの目安とすると、LC/MS/MS は AFs、BaP いずれの化合物に対しても規制値レベル付近の濃度の定量分析が可能であるといえる。また、両化合物において 100ppb までは検量線が直線性を示したことから、AFs、BaP いずれかの濃度が極端に高い場合でも 100 ppb 程度までは同時分析が可能であると考えられる。しかし、オリーブ油からの抽出方法も含めた分析法として評価するためには、BaP に関しては定量限界の濃度（2.0ppb）での添加回収試験を行わなければならない。そのためには、抽出効率を大幅に改善する必要がある。

食用油のカビ毒による汚染は原料であるナッツ類やオリーブ等がカビ毒産生菌による加害を受けることが主な原因と思われる。Papachristou らによるとギリシャ産のオリーブでは AFs よりもオクラトキシン A (OTA) による汚染を受けた試料の方が多かったことが報告されている¹⁴⁾。筆者らは OTA と BaP の同時分析についても検討を行ったが、OTA、BaP の混合溶液を直接 LC/MS/MS で分析した際には、両者とも良好な感度で検出された。しかし、OTA 汚染試料の前処理にしばしば用いられる多機能カラム Multisep 229 Ochra (Romer Labs) に混合溶液を負荷したところ、BaP は同カラムに吸着されてほとんど流出されなかったため、その後の詳細な検討は行わなかった（データ未発表）。今回は適切な前処理方法を見つけることはできなかったが、APPI プローブを用いた LC/MS/MS では OTA も BaP と同時分析可能であることが確認された（データ未発表）ことから、汚染試料からの適切な抽出・精製方法を開発すれば OTA も AF や BaP と一緒に分析可能になると思われる。

近年、食品の安全性に関する国民の関心は高く、そのような世相を受けてアクリルアミド、トランス脂肪酸、フラン、ニトロソアミン、残留農薬、カビ毒など、食品中に含まれるさまざまな有害物質や残留物質を定量分析する手法が提案されている。その多くは一連の化合物を物性の似通ったグループ毎に分けて測定するものが多いように思われる。今回、AFs と BaP のよ

うな極性の異なる化合物の同時定量分析を一例として示したが、このような物性の異なる化合物の同時分析手法は、食品中に含まれるさまざまな物質（有害成分だけでなく機能性成分等も）を同時に測定し、網羅的に評価する手法を開発する上で役立つ技術であると思われる。

要 約

大気圧光イオン化 (APPI) プローブを装着した高速液体クロマトグラフトンデム型質量分析装置 (LC/MS/MS) を使用して、アフラトキシン (AFs) 4 種 (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) とベンゾ [a] ピレン (BaP) の同時定量分析を行った。AFs と BaP の混合溶液について AF 測定通知法で推奨されている 3 種類の多機能固相抽出カラムを用いて前処理を行ったところ、Autoprep MF-A1000 を用いた場合に両者を同時に精製することが可能であった。実際の食品中における AFs と BaP の複合汚染を想定して、オリーブ油重量当たり AFs と BaP をそれぞれ 4.0 μg/kg, 40 μg/kg の濃度で添加した試料の分析を行ったところ、Autoprep MF-A1000 を前処理に用いた場合、AFs の平均回収率は 102.1 ~ 125.3% であったが BaP の平均回収率は 12.8% であり、アセトニトリル-水混合液 (90:10) ではオリーブ油中の BaP は十分に抽出できていないことが示唆された。今回は AFs 測定通知法の前処理法を適用したが、両者を効率良く抽出することができれば、実サンプルでの同時分析は可能であるといえる。

謝 辞

本研究の一部は、農林水産省高度化事業研究「安全で信頼性、機能性が高い食品・農産物供給のための評価・管理技術の開発」の助成により行われたものである。

参考文献

- 1) Dvorackova, I. (1990) Aflatoxins and Human Health. CRC Press, Boca Raton, FL.
- 2) Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Brown, R. L., Cary, J. W., Yu, J., and Chang, P. K., Preharvest aflatoxin contamination: elimination through biotechnology. In: Dhaliwal GS, Arora R, Randh-

- awa NS, Dhawan AR (eds) Ecological agriculture and sustainable development, vol. 1. Indian Ecological Society. Ludhiana, India, pp 100-129 (1997).
- 3) Cleveland, T. E. and Bhatnagar, D., Molecular strategies for reducing aflatoxin levels in crops before preharvest. In: Bhatnagar D, Cleveland TE (eds) Molecular approaches to improving food quality and safety. Van Nostrand Reinhold, New York, pp 205-228 (1992).
 - 4) Guillen, M., D., Sopelana, P., Partearroyo, M. A., Food as a source of polycyclic aromatic carcinogens. *Rev. Environ. Health*, **12**, 133-146 (1997).
 - 5) 中川 博之, 仁田 貴子, 桐村 光太郎, 宇佐美 昭次, 芳香族化合物汚染環境のバイオレメディエーション, *水処理技術* **39**, 535-544 (1998).
 - 6) Ilidas, K., N., Zotos, A., Taylor, A., KD., and Petridis, D., Effect of pre-treatment and smoking process (cold and hot) on chemical, microbiological and sensory quality of mackerel (*Scomber scombrus*). *J. Sci. Food Agric.*, **84**, 1545-1552 (2004).
 - 7) Strelli, M., M., Stuffer, R., G., and Marcotrigiano, G., O., Polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, chlorinated pesticides (DDTs), hexacyclohexane, and hexachlorobenzene residues in smoked seafood. *J. Food Prot.*, **66**, 1095-1099 (2003).
 - 8) Anastasio, A., Mercogliano, R., Vollano, L., Pepe, T., and Cortesi, M. L., Levels of benzo [a] pyrene (BaP) in "Mozzarella di Bufala Campana" cheese smoked according to different procedures. *J. Agric. Food Prot.*, **52**, 4452-4455 (2004).
 - 9) Purcaro, G., Navas, J., A., Guardiola, F., Conte, L., S., and Moret, S., Polycyclic aromatic hydrocarbons in frying oils and snacks. *J. Food Prot.*, **69**, 199-204 (2006).
 - 10) Kazerouni, N., Sinha, R., Hsu, C-H., Greenberg, A., and Rothman, N., Analysis of 200 food items for benzo [a] pyrene and estimation of its intake an epidemiologic study. *Food and Chem., Toxicol.*, **39**, 423-436 (2001).
 - 11) Rhee, K. S. and Bratzler, L. J., Benzo [a] pyrene in smoked meat products. *J. Food Sci.*, **35**, 146-150 (1970).
 - 12) Howard, J. W. and Fazio, T., Review of polycyclic aromatic hydrocarbons in foods. Analytical methodology and reported findings of polycyclic aromatic hydrocarbons in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **63**, 1077-1104 (1980).
 - 13) Bjorseth, A., Handbook of polycyclic aromatic hydrocarbons. Marcel Dekker, New York (1983).
 - 14) Papachristou, A. and Markaki, P., Determination of ochratoxin A in virgin olive oils of Greek origin by immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *Food Addit. Contam.*, **21**, 85-92 (2004).
 - 15) Takino, M., Tanaka, T., Yamaguchi, K., and Nakahara, T., Atmospheric pressure photo-ionization liquid chromatography/mass spectrometric determination of aflatoxins in food. *Food Addit. Contam.*, **21**, 76-84 (2004).
 - 16) Moriwaki, H., Ishitake, M., Yoshikawa, S., Miyakoda, H., and Alary, J-F., Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment by liquid chromatography-atmosphere pressure photoionization-mass spectrometry. *Anal. Sci. Feb.*, **20**, 375-377 (2004).