

液体クロマトグラフィーによる食品中のかび毒及び糖類の分析法開発

2017年3月

埼玉大学大学院理工学研究科(博士後期課程)

理工学専攻(主指導教員 渋川 雅美)

和田 文晴

目次

概要

第一章 序論

1.1 研究の背景	1
1.2 食品等の分析法について	2
1.3 かび毒について	3
1.4 糖類について	4
1.5 研究の目的	5
1.6 本論文の構成	5

第二章 高速液体クロマトグラフィーを用いたペットフード中のオクラトキシン A の分析法開発

2.1 緒言	6
2.1.1 オクラトキシン A とは	6
2.1.2 オクラトキシン A の汚染事例	6
2.1.3 オクラトキシン A の毒性	7
2.1.4 オクラトキシン A の規制動向	8
2.1.5 オクラトキシン A の分析法の現状と問題点	8
2.1.6 イムノアフィニティーカラム(IAC)について	9
2.1.7 オクラトキシン A の分析法開発における戦略	11
2.2 実験	11
2.2.1 試薬及び試液	11
2.2.2 装置	12
2.2.3 試料の調達	12
2.2.4 試料への添加方法	12
2.2.5 抽出及び IAC による精製条件	15
2.2.6 HPLC 分析条件	15
2.2.7 検量線, 検出限界及び定量下限値	15
2.2.8 分析法の妥当性確認	16
2.3 結果と考察	17
2.3.1 OTA 検出条件の検討	17
2.3.2 抽出溶媒の最適化	18
2.3.3 HPLC における試料溶液注入量の検討	20
2.3.4 妨害物質の影響	21
2.3.5 検量線, 検出限界及び定量下限値	24

2.3.6 分析法の妥当性及び試験室間試験	27
2.4 結言	31
2.5 参考文献	31

第三章 塩素付加-液体クロマトグラフィー質量分析法を用いた食品中の糖類の一斉分析法 開発

3.1 緒言	35
3.1.1 糖類とは	35
3.1.2 糖類及び糖アルコールの生理活性及び健康影響	39
3.1.3 糖類の分析法の現状と問題点	40
3.1.4 糖類の分析法開発における戦略	44
3.1.5 分析対象物質	46
3.2 実験	48
3.2.1 試薬及び試料	48
3.2.2 装置	48
3.2.3 操作手順	49
3.3 結果と考察	51
3.3.1 マススペクトルの測定及びモニターイオンの選択	51
3.3.2 塩素供与物質の検討	54
3.3.3 液体クロマトグラフィーによる分離条件の検討	54
3.3.4 実試料への応用	64
3.3.5 LC-MS/MS への適用検討	67
3.4 結言	72
3.5 参考文献	72

第四章 結言

第五章 総括と展望

5.1 後記	79
5.2 付記	79
5.2.1 本研究に関する学会発表	79
5.2.2 本研究に関する論文発表	80
5.2.3 参考論文	80
5.3 謝辞	80

概要

我が国における食の安全に対する関心は高まる傾向にあり、今日、多くの残留農薬などについては既に確立された分析法により検査が行われている。しかし、有害性が確認されているにもかかわらず、依然として規制対象となっておらず、分析法が確立されていない化学物質も多い。本研究ではこのような観点から、食品等の安全性評価に係る2つの化合物あるいは化合物群について、高速液体クロマトグラフィーを用いた分析法を開発した。一つはかび毒の一種であるオクラトキシン A(OTA),もう一つは主に単糖及び二糖を対象とした糖類である。

穀類等に汚染が確認されているかび毒の一種である OTA は、我が国ではまだ食品及び家畜の飼料共に規制値は規定されておらず、公定的な分析法がない。また愛玩動物である犬は特に OTA 感受性が高いことが知られている一方、多くの愛玩動物用飼料(ペットフード)には OTA に汚染されやすいとうもろこし等の穀類が原料として用いられていることから、「愛玩動物用飼料の安全性の確保に関する法律」の観点からもペットフード中の OTA 濃度を把握するための分析法が求められている。そこで本研究では高速液体クロマトグラフ(HPLC)を用いたペットフード中の OTA の分析法を開発し、共通試料を複数の試験所で分析し、室間再現精度等を確認した。OTA はアセトニトリル及び水の混液を用いて試料から抽出し、イムノアフィニティーカラムを用いて抽出物を精製した後、蛍光検出器を備えた HPLC システムで分析した。本分析法における OTA の定量下限値はドライ及びセミドライタイプのペットフードに対して 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、ウェットタイプのペットフードに対して 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。検量線は 0.5 ~ 50 ng/mL (試料中濃度換算で 1~100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)の範囲で良好な直線性を示した。OTA に汚染されていないペットフード試料に 1~5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の濃度となるように OTA を添加して本分析法による回収試験を実施したところ、平均回収率は 83~106 %であり、併行精度(相対標準偏差)は 2.6~6.8%であった。試験所間の妥当性評価試験における平均回収率、併行精度、室間再現性(中間精度)及び Horwitz 比 (HorRat)は各々 75.6~83.1 %, 3.5~6.1 %, 5.0~15.0 % 及び 0.23~0.68 であった。

塩素付加-LC-MS/MS 法による食品中の糖質分析法を開発するため、単糖及び糖アルコールについて複数のコリジョンエネルギーでプロダクトイオンスキャン分析を行い、モニターイオンの選択を行って、塩素付加イオン化の最適化を行った。最適化のための塩素供与物質としてはジクロロメタンを用い、次に代替物質としてクロロアセトニトリルについて検討した。各分析対象物質について、塩素付加イオン($[\text{M}+\text{Cl}]^-$)をプリカーサーイオンとして、プロダクトイオンスキャン分析を行ったところ、概ね脱プロトン化イオン($[\text{M}-\text{H}]^-$)が検出されたが、一部の糖アルコールではいずれのコリジョンエネルギーでも塩化物イオン(Cl^-)以外のプロダクトイオンは検出されなかった。塩素供与物質としてジクロロメタンとクロロアセトニトリルを比較したところ、クロロアセトニトリルの方が高感度に糖類を

検出可能であることが確認された。

分離条件の検討においてはアミノプロピル基結合シリカゲルを充填剤とするアミノカラムではアノマー分離が生じることがなく、ケトース、二糖及び糖アルコールは良好な形状のピークが得られたが、アルドースのピーク形状はブロードで激しいテーリングが認められた。これはカラムのアミノ基とアルデヒド基がシッフ塩を形成するためであると考えられた。このため、アミド基を導入したエチレン架橋型ハイブリッド粒子を充填剤としたアミドカラムによる分離を検討した。この条件では五炭糖及び六炭糖のアルドースのピークが比較的良好的な形状で検出された。

第一章 序論

1.1 研究の背景

著者はこれまで化学物質のばく露によるヒト等の健康影響を評価するための分析法及び試験法に関する研究を行ってきた。化学物質のばく露は主に鼻腔や口腔といった呼吸器を経由する吸入ばく露、皮膚から吸収される経皮ばく露及び食物及び飲料に起因する経口ばく露が主な経路である。これらのばく露経路の中でも経口ばく露は頻度、ばく露量及び影響の程度の観点からも最も重要である。ヒトは生命活動を維持するために食品、飲料及び医薬品を能動的に摂取することが不可欠であるため、これらに含まれる化学物質の種類及びその含有量を把握することは、その安全性を評価する上での基本となる。食品中に含有することで問題となる化学物質は、食品添加物のように意図的に添加するもの、農薬のように生産の過程で使用したものが残留する可能性があるもの及びかび毒のように自然発生し、非意図的に汚染するものがある。食品添加物及び農薬はその使用量をコントロールすることで食品中の濃度を基準値未満に抑えることが可能であるが、かび毒による汚染を制御することは極めて困難である。

農林水産省の統計データによると、我が国における食料自給率は平成 20 年度においてカロリーベースで 41%であったが、徐々に減少して平成 27 年度には 39%となっており、輸入食品への依存度が高まる傾向が続いている。これは欧米型の食生活への変化が影響している。実際に主食である米の一人当たり 1 年間の消費量は平成 20 年度において 58.8 kg であったが、年々減少し、平成 26 年度は 56.9 kg となっているのに対し、畜産物の消費量は 131.2 kg から 136.5 kg へと上昇している。畜産物の自給率は、肉類が 55%、乳製品が 65%、鶏卵に至っては 95%という比較の高いレベルにあるが、飼料の自給率は 27 %であることから、実質的な自給率はより低いことは明らかである。飼料原料の 40%以上はとうもろこしであり、その主な原産国は米国、ブラジル及びアルゼンチンである（財務省の統計データ）。我が国における平成 20 年度から平成 26 年度のとうもろこしの輸入量は約 1500 万 t 程度であった。

このように、輸入に依存する我が国の食品の安全を確保するため、平成 15 年に改正された食品衛生法に基づき、平成 18 年 5 月に食品に残留する農薬・動物用医薬品等に関するいわゆるポジティブリスト制度が施行され、食品中の残留農薬等の規制が強化された。これは農薬、動物用医薬品及び飼料添加物について、一定量を超えて残留する食品の販売等を禁止する制度である。既に残留基準が定められている農薬については、基準内での残留を認め、それ以外の農薬については「人の健康を損なうおそれのない量」として暫定的な一律基準 (0.01 ppm) が適用されている。一律基準が適用された農薬等については、内閣府の食品安全委員会によるリスク評価結果等が整い次第、検討が行われた上で適切な基準値が設定され、厚生労働省から通知される。平成 28 年現在、この制度では約 800 種以上の物質が規制の対象となっており、検疫所及び登録検査機関によって輸入食品の残留農薬等の検査

が実施されている。

また、我が国では犬猫の飼育頭数がピークを迎えた平成 20 年に「愛玩動物用飼料の安全性の確保に関する法律（ペットフード安全法）」が制定され、愛玩動物（ペット）に対する健康被害を防止する観点から、愛玩動物用飼料（ペットフード）の製造・販売に係る基準・規格が、ペットフード安全法第 5 条に基づき「愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令」により設定された。これにより、当該基準・規格に合わないペットフードや有害な物質を含むペットフードの製造等が禁止されている。規制対象物質は添加物（酸化防止剤）、農薬、汚染物質及びその他であるが、食品と比較して対象物質数は少ない。したがって公的な分析法も食品と比較すると十分に整備されていないという現状がある。ペットフードの原料は基本的にヒト用の食品と共通するものの、穀物の場合は外皮、畜産物の場合は脂肪の多い部分、水産物の場合は血合いの部分等が利用されるため、食品以上の濃度で汚染物質が含まれている可能性がある。その上、犬及び猫のような愛玩動物は化学物質に対する感受性及び健康影響の程度が人と異なる。このため、より多くの化学物質について汚染実態の把握及びリスク評価を行う必要がある。しかしながら、そのために必要なペットフード中の化学物質分析法開発は食品と比較して極めて困難である。これは、食品の場合は未加工の農産物、畜産物及び水産物を対象として分析を行うことが一般的であるのに対して、ペットフードの場合は、ほとんどがこれらを原料として混合及び加工されたものであるためである。ペットフード中には動物性のタンパク及び脂質並びに植物性のタンパク、炭水化物及び脂質、更に様々な添加物及び無機成分が含まれ、極めて複雑な試料マトリックスを形成している。また、炭水化物に関しては α 化されたでん粉が用いられているため、水に対する親和性が高く、湿潤状態で高い粘性を示すという特徴がある。

1.2 食品等の分析法について

食品は多種多様であり、複雑な成分によって構成されるため、目的とする分析対象物質を抽出し、定量分析するためには高度な分析技術を要する。分析結果は食品の生産者、加工業者及び輸入業者にとっては経済的損害、消費者にとっては健康影響に直結するため、検査機関の責任は重大であり、検査法も確実性の高いものである必要がある。かくして、このような検査のために、十分な検証が行われた食品の試験法として厚生労働省により告示試験法及び通知試験法が整備されている。これらの方法は平成 22 年に厚生労働省から発信されたガイドライン「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について（食安発 1224 第 1 号）」に従って妥当性が確認されている。

家畜用の飼料中の有害物質等の分析法としては農林水産消費安全技術センターが制定した「飼料分析基準（平成 20 年 4 月 1 日付け 19 消安第 14729 号農林水産省消費・安全局長通知）」がある。また愛玩動物（犬及び猫）用の飼料（ペットフード）中の有害化学物質の分析法としては同センターから「愛玩動物用飼料等の検査法（平成 21 年 9 月 1 日付け 21 消技第 1764 号独立行政法人農林水産消費安全技術センター理事長通知）」が通知されている。

る。各々基準及び検査法には有害物質、農薬、かび毒、抗菌性物質等の分析法と、分析法の妥当性評価方法及び各分析法の妥当性確認結果が記載されている。

1.3 かび毒について

先述したとうもろこしなどの穀類、豆類及び種実類はかび毒に汚染されやすい。かび毒はマイコトキシンとも呼ばれている。マイコトキシン学会による定義では、糸状菌類、いわゆるかび類の二次代謝物で、ヒトあるいは家畜、魚類など高等動物に対して急性若しくは慢性の生理的あるいは病理的障害（機能的あるいは器質的障害）を与える物質群に与えられた総称とされている。

アフラトキシンは比較的温暖な地域で発生するコウジカビの一種 *Aspergillus flavus* 等が生産する毒素であり、厚生労働省が公表しているデータによると食品の種類としては、とうもろこし、落花生、ナッツ類及びドライフルーツにおいてアフラトキシンの汚染が多く発生している。中でもとうもろこしは輸入量も多く、その他のかび毒も同時に含むことがあるため監視対象としては特に重要である。特に米国産のとうもろこしはアフラトキシン類による汚染の蓋然性が高いことから、厚生労働省から検査命令が発せられ、輸入される全ロットについて検査が行われている。アフラトキシンは強い発がん性を有し、主に B1, B2, G1, G2 の 4 種類及び B1 及び B2 の代謝物である M1 及び M2 が知られている。B 群は青色（Blue）の蛍光を、G 群は緑色（Green）の蛍光をそれぞれ発することからこのように分類されている。これまで我が国では B1 のみが検査対象となっていたが、以前から欧米では総アフラトキシンとして B1, B2, G1 及び G2 が規制されていた。またコーデックス委員会*でもアーモンド等について総アフラトキシンの基準値が示されたこと、及び食品安全委員会におけるリスク評価の結果を受け、我が国も厚生労働省によって平成 23 年 3 月 31 日付け食安発 0331 第 5 号「アフラトキシンを含有する食品の取扱いについて」が通知され、総アフラトキシンについて検査が行われるようになった。

アフラトキシンは我が国においても食品中の残留基準値が設定され、以前から検査が行われているが、違反事例が後を絶たないという事実は、非意図的に発生するかび毒による食品の汚染をコントロールすることが、いかに困難であるかということを示している。また、多くのかび毒は加熱等の調理により除去することが困難であるため、ヒトへの健康影響のリスクが高いという問題がある。

かび毒による食品の汚染が社会問題となった事例としては、我が国において戦後の黄変米及び麦角の問題、近年ではアフラトキシンに汚染された事故米の不正転売事件などがある。これら以外にも様々な菌種によって複数のかび毒が産生され、複合的に汚染された食品及び飼料の摂取によるヒト及び家畜に対する様々な健康影響が問題となっている。オクラトキシン A は穀類、豆類等に付着するコウジカビの *Aspergillus ochraceus* 及び青カビの *Penicillium spp.* が生産する腎毒性を有する物質である。マウスを用いた動物実験では OTA による肝細胞がんの誘発が確認されており、国際がん研究機関（IARC : International

Agency for Research on Cancer) によってグループ 2B (ヒトに対する発がん性が疑われる) に分類されている。アフラトキシンが比較的温暖な地域の作物等から検出されるのに対して、OTA は地球上の広い範囲で汚染が確認されている。OTA は我が国ではまだ規制対象となっていないが、汚染される食品は穀類、ぶどう及びその製品、コーヒー豆、カカオ豆など多岐に渡っており、欧州では穀類及びぶどうの加工品などについて基準値が 2~10 µg/kg と設定されている。

ペットフード安全法では愛玩動物に対する健康被害を防止する観点から、ペットフードの基準・規格が設定されている。ペットフードにはかび毒の汚染源となる可能性が高い、とうもろこし、糠、ふすま、マイロなど、様々な穀類が原料として用いられている。今後、OTA については基準・規格が適正に設定されることが必須であり、これに伴って当該基準・規格の遵守状況を確認するための適切な分析法の開発が必要不可欠となっている。

1.4 糖類について

糖類はヒトや動物の生命維持のための重要な栄養素であるとともに、一部の希少糖は食品及び飲料水の食味や機能性といった付加価値のための調味料・添加物としても利用されている。その一方で、糖類は有害な一面も有する。我が国において糖尿病の患者数は増加傾向にあり、予防や治療の一環として糖質及び糖類の摂取を制限する人も増えている。高血糖値であることは視力障害、腎臓病、心筋梗塞、脳及び神経障害、組織の壊疽など、様々なリスクを伴う。このような背景から、糖質の含有量を低下させた「糖質オフ」、あるいは糖質を 0.5w/w%未満に低減させた「糖質ゼロ」を謳った健康志向の食品及び飲料の市場が拡大している。アルドースやケトースのような糖類のカルボニル基が還元されてヒドロキシ基となったソルビトールなどの糖アルコールはグルコースやスクロースなどの糖類と比較して低カロリーであるため、様々な特定保健用食品及び機能性表示食品などに甘味料として添加されているが、これらは消化管によって吸収されにくいいため、過剰に摂取すると下痢を引き起こす。他にも糖類の直接的な健康影響としては乳糖不耐症の人が乳製品に含まれるラクトース(乳糖)を摂取することによって消化不良及び下痢を引き起こすことが挙げられる。更に、ガラクトースなどの一部の糖は免疫に異常がある場合は、重大な健康影響を引き起こす可能性があるため摂取が制限される。また、一部の還元糖は加熱加工の過程でアスパラギンと反応し、発がん物質であるアクリルアミドを生成することが問題となっている。このように、今日我々が日常的に摂取する食品中には様々な糖類が使用されており、これらの種類及び濃度を把握すること、あるいは糖類が含まれていないことを確認することは健康維持のためにも重要である。このような背景から糖質の簡便かつ実用的な分析法の確立が求められている。しかしながら、糖類の分離分析は容易ではない。糖類には様々な種類があるが、これらの分子はいずれも基本的には炭素、水素及び酸素のみで構成されており、化学構造が類似しているため分離が困難である。また、紫外及び可視部に特徴的な吸収を持たず、エレクトロスプレーイオン化法及び大気圧化学イオン化法でイオン化しにくい

ため、一般に液体クロマトグラフィーと組み合わせて使用される紫外可視分光光度計及び質量分析計による検出が困難である。このため、誘導体化等の煩雑な前処理操作や、非特異的な検出器を用いた分析法に頼らざるを得ない状況である。

1.5 研究の目的

我が国における食の安全に対する関心は高まる傾向にあり、既に残留農薬などについては様々な確立された分析法により検査が行われているが、非意図的に発生あるいは混入する一部のかび毒などについては、我が国ではまだ行政によって規制されていないものも多く、分析法も十分に確立されていない。本研究ではその有害性から今後法律等によって規制されることが見込まれる化学物質である OTA 及び濃度の把握が必要となる化学物質として糖類を対象とし、主に液体クロマトグラフィーを応用し、加工食品をはじめとする複雑な試料マトリックスに適用可能で、選択的かつ高感度な試験法を開発することを目的とした。

1.6 本論文の構成

本論文の第二章では高速液体クロマトグラフィーを用いたペットフード中のオクラトキシン A の分析法開発について研究の背景、開発した分析法詳細及び妥当性の確認結果を述べる。第三章では塩素付加-液体クロマトグラフィー質量分析法を用いた糖類の一斉分析法開発について検出及び分離条件の検討結果を述べる。第四章ではこれらのまとめとして結言を、第五章では総括と展望を述べる。

第二章 高速液体クロマトグラフィーを用いたペットフード中のオクラトキシン A の分析法開発

2.1 緒言

2.1.1 オクラトキシン A とは

オクラトキシン A (OTA) は主に穀類, 豆類等に付着するコウジカビの *Aspergillus ochraceus* 及び青カビの *Penicilium spp.* が生産する二次代謝物で, ヒト及び動物に対する腎毒性を有するかび毒の一種である. OTA は塩素が結合したイソクマリン構造とフェニルアラニン構造がアミド結合を介して結合した化学構造を有する. 図 2.1 にオクラトキシンの化学構造式を, 表 2.1 に物性等を示す.

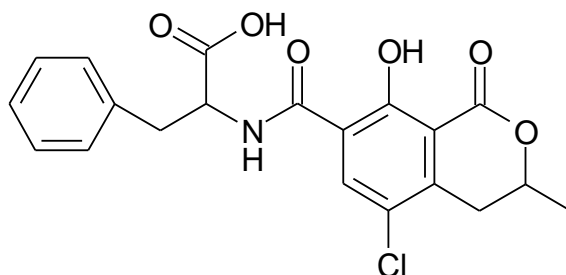


図 2.1 オクラトキシン A の化学構造式

表 2.1 オクラトキシン A の物性等^{1,2}

分子式	C ₂₀ H ₁₈ ClNO ₆
分子量	403.8
物質名 (IUPAC)	(2S)-2-[[[(3R)-5-クロロ-8-ヒドロキシ-3-メチル-1-オキソ-3,4-ジヒドロイソクロメン-7-カルボニル]アミノ]-3-フェニルプロパン酸
CAS No.	303-47-9
外観	昼白色の照明下では無色の結晶 紫外線を照射すると緑色又は青色の蛍光を示す
融点	169°C
溶解性	遊離状態ではクロロホルム, エタノール, メタノール及びキシレン等に溶解する.
1-オクタノール/水分配係数 (log K _{ow})	4.74

2.1.2 オクラトキシン A の汚染事例

多くの種類の穀類及びそれらを脱穀した後に生じる糠やふすま等の副産物は加工食品及び犬及び猫用のペットフードの原料として用いられている. 実際に世界各国で多くの種類の食品^{3,4}, 家畜用飼料及びペットフード製品⁵から OTA が検出されている. Li らは中国

において豚用の飼料及びとうもろこし及びふすまといった飼料原料を対象として調査したところ 64~100%において 5~48 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の濃度で OTA が検出されたと報告している⁶。英国で 1997 年に行われた調査では、市販されている 100 検体のペットフードのうち 10% が 1~7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の濃度で OTA に汚染されていた⁷。オーストリア及びポーランドで 2001 年に 10 検体のドッグフード及び 28 検体のキャットフードを対象として行われた調査では 47%の試料から OTA が検出され、その濃度範囲は 0.21~13.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であったと報告されている⁸。ポルトガルにおいて 2003 年に行われた調査では 60 検体のドライタイプのペットフードのうち 5 検体において OTA が 2.0~3.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の濃度範囲で検出された⁹。

2.1.3 オクラトキシン A の毒性

OTA の毒性影響は腎臓障害などの非発がん性に加えて発がん性があり、我が国の内閣府に設置された食品安全委員会は、これらの観点から OTA に関する過去の毒性試験等のデータを精査してリスク評価を行い、各々のヒトに対する毒性影響について耐容一日摂取量 (TDI) を算出した¹⁰。TDI は長期毒性試験等の無毒性量 (NOAEL: No Observed Adverse Effect Level) より決定される数値で、その化合物を一生涯に渡って仮に毎日摂取し続けたとしても、危害を及ぼさないと見なせる体重 1 kg 当たりの 1 日許容摂取量であり、次式で算出される。

$$\text{TDI} = \text{NOAEL} \div \text{不確実係数}$$

ここで NOAEL は毒性試験から求められた、動物が生涯毎日摂取しても動物の体に有害な作用を与えない量である。毒性試験によって、NOAEL が求められないときは、有害な影響が表れる最低の用量、最小毒性量 (LOAEL) を使用する。不確実係数は通常種差に対して 10、個体差 (個人差) に対して 10 などが用いられ、これらを乗じて算出される。食品安全委員会は OTA の非発がん毒性に関して、ブタの亜急性毒性試験における LOAEL が 8 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ であったことから、不確実係数 500 (種差 10×個体差 10×不可逆的な腎障害を指標とした LOAEL (=5)) を適用して、TDI を 16 ng/kg 体重/日と設定した。発がん毒性に関しては米国国家毒性プログラム (NTP) のラットの 2 年間発がん性試験において、NOAEL が 21 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重 (週 5 回投与、15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ に相当) であったことから、不確実係数 1000 (種差 10×個体差 10×発がん性 10) を適用して、TDI を 15 $\text{ng}/\text{kg}/\text{day}$ と設定している。

OTA が愛玩動物の健康に対して悪影響を及ぼした複数の事例が報告されている。OTA は愛玩動物に対して腎毒性を有する物質であり、特に犬は感受性が高い¹¹。幼若齢のオスの犬に対して体重 1kg 当り 0.2 mg の OTA を 2 週間反復投与した試験では、重篤な腎障害により死亡例が発生している¹²。ドイツでは 6.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 濃度の OTA に汚染された粉ミルクを給餌された仔犬 6 匹が死亡した事例もある⁵。ペットフードが OTA と別のかび毒である

シトリニンによって同時に汚染されることにより、複合的な健康影響が生じた事例も報告されている。韓国で3頭の犬に生じた致死的な腎障害はOTAとシトリニンに汚染されたペットフードが原因であると考えられている¹³。

2.1.4 オクラトキシン A の規制動向

OTAに汚染される食品は穀類、ぶどう及びその製品、コーヒー豆、カカオ豆など多岐に渡っており²、欧州連合(EU)は未加工の穀類に対しては5 µg/kg、穀類の加工品に対して3 µg/kg、干しぶどうに対しては10 µg/kg及び穀類を加工して製造された乳幼児用の食品に対しては0.5 µg/kgという基準値を設定して規制を実施している¹⁴。FAO(国際連合食糧農業機関)及びWHO(世界保健機関)が合同で設置した政府間組織であるコーデックス委員会はFAO/WHO合同食品添加物専門家会議(JECFA)のリスク評価を基に、小麦、大麦及びライ麦についてOTAの基準値を5 µg/kgと設定した¹⁵。これに加えてEUは養豚用の穀類及びその製品、栄養補助飼料及び総合栄養飼料についてOTAのガイダンスバリューを各々0.25 mg/kg、0.05 mg/kg及び0.1 mg/kgと設定して管理している¹⁶。これに対し我が国においては現在のところ食品中の基準値は設定されていないが、食品安全委員会のかび毒・自然毒等専門調査会の評価結果を受け、厚生労働省によって基準値の設定が検討されている。

我が国において平成20年に制定されたペットフード安全法は一部の毒性の高いかび毒に対しては基準値を設定している。この法律ではアフラトキシンB1のペットフードにおける基準値は0.02 mg/kgと設定され、デオキシニバレノールの基準値はドッグフード及びキャットフードに対して各々2 mg/kg及び1 mg/kgと設定されている。OTAに関して規制値は現在のところ設定されていないが、ペットフードの原料としてOTAの汚染源となる可能性が高いとうもろこしなどの穀類が多用されていること、実際に汚染が確認されていること及び特に犬がOTAの影響を受けやすいという事実を考慮すると、ペットフード中のOTAについても基準値等は設けられるべきである。また、ペットフード中のOTAについての基準値が遵守されていることを確認するための分析法が必要である。

2.1.5 オクラトキシン A の分析法の現状と問題点

公定的なOTAの分析法としては、農林水産消費安全技術センターが制定した「飼料分析基準(平成20年4月1日付け19消安第14729号農林水産省消費・安全局長通知)」¹⁷がある。しかしながら、この基準は穀物を主体とした植物由来の原料からなる牛などの家畜用の飼料を対象としたものであるため、抽出条件、抽出後の精製方法及び機器分析条件を畜水産物が主原料となるペットフードに適用することは困難である。食品試料中からOTAを抽出するためにはメタノール及びアセトニトリルといった極性有機溶媒と水又は緩衝溶液の混液が用いられる。抽出物には試料マトリックスが含まれるため、後の機器分析による定量分析に対する影響を防ぐ目的で通常は精製操作が行われる。食品及び飼料中

に含まれる OTA の分析法としては後述するイムノアフィニティーカラム (IAC) を用いたクリーンアップと蛍光検出を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が広く採用されている^{6, 18-25}.

IAC は OTA に特異的に結合する抗体がアガロース担体に結合されており、極めて高い精製能力を有する。しかしながら、穀物などの食品及び家畜用飼料と比較して、ペットフード中には動物性のタンパク及び脂質に加え、植物性のタンパク、炭水化物及び脂質、更に様々な添加物及び無機成分が含まれ、試料マトリックスが極めて複雑であるため、ペットフードからの粗抽出物には、同様に極めて複雑な試料マトリックスが含まれる。ペットフードには水分含量 10%程度の比較的乾燥したドライタイプ、水分を 25~35%含むセミドライタイプ及び 75%程度の水分を含むウェットタイプがあり、主な原料も様々である。また、通常ペットフードの製造においては加熱工程があるため、でん粉は α 化されており、抽出溶媒として水を用いると膨潤すると共に粘性を示すという特徴を有するため、前処理操作は食品及び飼料と比較して難易度が高い。これまでに食品及び飼料中の OTA を対象とした多くの汚染実態調査が行われているが、このように複雑かつ多様なタイプのペットフード中の OTA 分析に適用可能な HPLC による分析法として妥当性が確認されたものは報告されていなかった。

そこで本研究はタンパク及び脂質を多く含むペットフードに含まれる OTA の定量分析のため、高濃度の有機溶媒に耐性を有する IAC 及び HPLC-蛍光検出を用いる分析法を開発した。また、この分析法の妥当性を確認するため、犬用 3 タイプ、猫用 2 タイプの合計 10 種類のペットフードを用いて添加回収試験を実施した。

2.1.6 イムノアフィニティーカラム (IAC) について

IAC は目的とする化学物質と高い親和性を有する抗体をアガロースゲル担体に結合させたもので、アフラトキシンなどのかび毒を分析する際の試料マトリックスを除去するための前処理に用いられる。複数のメーカーから様々な化学物質に応じた IAC が開発され、市販されている。基質と抗体の結合は特異的かつ可逆的であるが、分子のどの部位を認識しているかは多くの場合において明らかにされていない。食品などの試料マトリックス中の分析対象物質を精製する場合は、概ね次のような操作が行われる。試料から適切な溶媒を用いて分析対象物質を抽出し、抽出液を IAC に負荷し、溶出液を除去する。この際に分析対象物質は IAC に特異的に保持され、その他の試料マトリックスは溶出される。IAC を緩衝液で洗浄した後、有機溶媒で分析対象物質を溶離させる。このように、分析対象物質はアセトニトリル及びメタールなどの有機溶媒によって IAC から溶離するため、試料を IAC に負荷する際の溶液中の有機溶媒の割合が高いと分析対象物質が十分に保持されない。しかしながら、OTA を脂質の多いペットフードから抽出する際は十分な抽出効率を得るために有機溶媒の割合を高くする必要がある。したがって試料負荷時における十分な有機溶媒耐性を有する IAC が必要となる。この問題を解決するため、Uchigashima らは高い

有機溶媒耐性を有する IAC を次に示す方法で開発した²⁶。通常抗体は抗原となる化学物質を実験動物に投与して作成するが、OTA のように分子量が小さく比較的構造が単純な化合物は、マウスの生体内で抗原として認識されにくい。このため、輸送タンパク質であるキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) と結合させ、OTA-KLH 結合体を作成し、7 週齢のメスの BALB/c マウスの腹腔内に OTA-KLH 結合体 (100 μ g/匹) を等量の抗原性補強剤と混合して乳化させて投与した。また、ブースターインジェクションとしてフロイント、インコンプリート及びアジュバントのエマルジョンを 2 週間間隔で 3 回投与した。最後の投与から 3 日後に抗体を産生する脾臓細胞 (B 細胞) を採取し、骨髄腫細胞 (ミエロマ細胞) を融合させてハイブリドーマを作成した。一つのハイブリドーマは 1 種類のモノクローナル抗体を産生し、かつ無限に増殖するが、この時点でハイブリドーマ自体は複数の種類が存在するポリクローナルな状態である。そこでハイブリドーマを 96 ウェルマイクロプレートに播種して培養し、10 日後にハイブリドーマのコロニーが形成されたウェルの培地を対象として 40% のメタノールが存在する状態で OTA と牛血清アルブミン (BSA) の結合体を用いた直接結合 ELISA 法によりスクリーニングを行った。これにより有機溶媒存在下で OTA に特異的な親和性を有するハイブリドーマを含むウェルを特定し、その細胞を限界希釈法によりモノクローン選別を行った。このようにして選抜した OTA に対する親和性が高い抗体はその構造において定常領域、可変領域及び抗原結合部位を有する (図 2.2)。そこで次にその定常領域と特異的に結合するプロテイン G を結合させたアガロースゲルに供して IAC を作成した (図 2.3)。

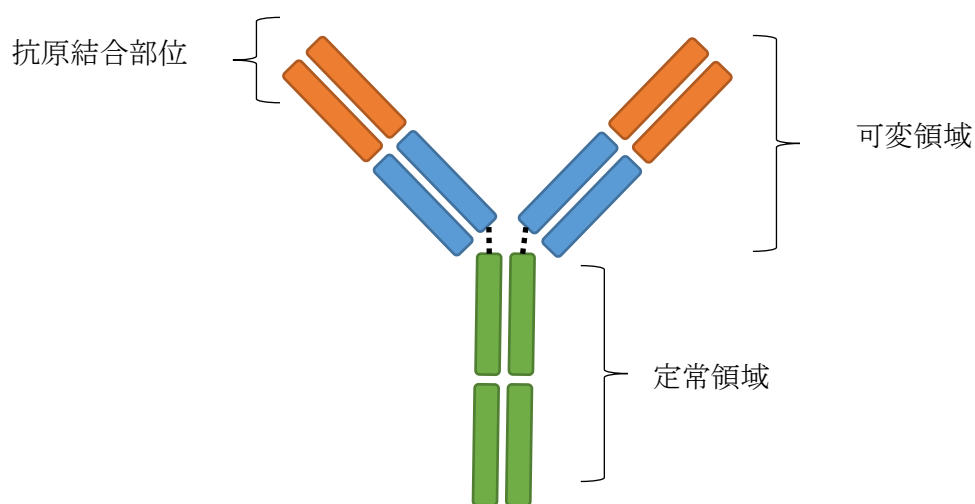


図 2.2 抗体の基本構造

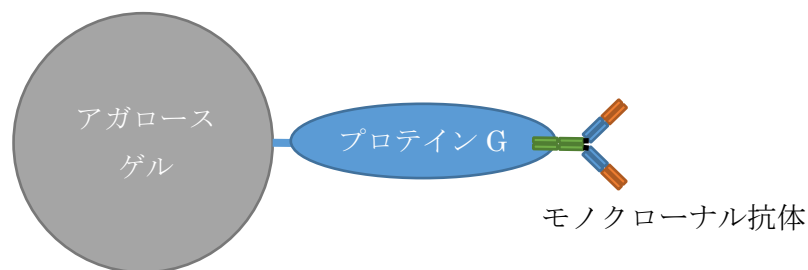


図 2.3 プロテイン G を介してアガロースゲルに固定されたモノクローナル抗体の模式図

2.1.7 オクラトキシン A の分析法開発における戦略

ペットフード中の OTA 分析法を開発するに当り、目標とする定量下限値及び検出下限値を設定する必要がある。定量下限値は基準値レベルの濃度を十分に精度よく分析できるよう設定されるべきであるが、先述したようにペットフード中の OTA については基準値が設定されていない。そこで、これまでの汚染実態調査の結果、TDI、他の食品における基準値等を勘案し、仮に基準値として $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ という値を設定した。この基準値案を基本とし、「愛玩動物用飼料等の検査法」²⁷ の試験法の妥当性確認法に従って定量下限値及び検出限界の目標値を次のように設定した。ドライ及びセミドライタイプのペットフードについては検出限界の目標値を基準値の $1/5$ 以下である $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、定量下限値の目標値を基準値案の $2/5$ 以下となる $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ とした。ウェットタイプのペットフードについては水分含有量が 80% であると仮定して水分含有量 10% 換算での定量下限値の目標値を基準値案と同等の $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、検出限界の目標値を基準値案の $1/2$ 以下となる $2.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ とした。

この目標を達成するために、次に示す方針で分析法を検討した。試料は脂質を多く含むため、抽出溶媒は OTA を十分に溶解することが可能な割合で有機溶媒を含むものとした。抽出溶媒中の有機溶媒の比率を高くした場合、OTA と同時に試料マトリックスを多量に抽出するため、精製効果が高い IAC を用いることとした。更にその IAC は有機溶媒耐性が高いものを採用することとした。分離用のカラムは OTA の $\log K_{ow}$ が 4.74 であることからオクタデシルシリル化シリカゲル (ODS) を充填剤とした逆相分配系のカラムを用いることが適切であると判断した。検出は OTA が蛍光を発することから、高感度かつ高選択的な蛍光検出器を用いることとした。

2.2 実験

2.2.1 試薬及び試液

OTA の標準品は Romer labs (Biopure ブランド Washington, USA) 製を購入した。アセトニトリル (Fluka 製 LC-MS 用) 及び生理的りん酸緩衝液 (PBS) 用タブレットはシグマアルドリッチ (St. Louis, USA) 製を購入した。酢酸 (特級), りん酸 (特級), メタノール (LC-MS 用) 及び超純水 (LC-MS 用) は和光純薬工業製 (Osaka, Japan) を購

入した。酢酸アンモニウム（HPLC 用）は関東化学製（Tokyo, Japan）を購入した。

試料から OTA を抽出するための抽出溶媒としてはアセトニトリル及び水の混液（3+2, v/v）を用いた。生理的りん酸緩衝液（PBS）はシグマアルドリッチ製のタブレット 5 個を超純水 1 L に溶解して作成した。HPLC の移動相としてはアセトニトリル、水及び 1% (v/v) りん酸溶液の混液（230:230:1, v/v/v）を用いた。酢酸アンモニウム溶液（10 mmol/L）は酢酸アンモニウム 0.385 g を 500 mL の超純水に溶解して調製した。メタノール及び酢酸混液（98:2, v/v）はメタノールと酢酸を容量比 98:2 で混合して調製した。最終的な試料溶液の溶媒として使用するアセトニトリル及び水の混液（1:1, v/v）はアセトニトリル及び水を容量比 1:1 で混合して調製した。

OTA の標準原液（200 µg/mL）は Romer labs 製（Biopure ブランド）の OTA（粉末）5 mg をメタノールに溶解し、25 mL 定容として調製した。添加用の標準溶液及び検量線用の標準液は標準原液をアセトニトリル及び超純水の混液（1+1, v/v）で希釈して調製した（0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10, 25 及び 50 ng/mL）。

2.2.2 装置

検出限界及び定量下限値の測定並びに分析法バリデーションに用いた HPLC システムは 2 台の LC-20AD 型ポンプ、200 µL のインジェクションループを装着した SIL-20AC 型オートインジェクター、CTO-20A 型カラムオーブン、RF-10AXL 蛍光検出器、DGU-20A3 型デガッサー、CBM-20A 型コミュニケーションモジュール及び LC-solution データシステム（いずれも島津製作所）により構成した。試験室間試験においては、1100 series（アジレント・テクノロジー）、2695 series（ウォータース）、L-2000（日立製作所）、Nanospace SI-2（資生堂）及び Prominence（島津製作所）といった様々な異なる HPLC を用いた。

2.2.3 試料の調達

本研究においては全てペットフード公正取引協議会の基準を満たした総合栄養食と表示されたものを添加回収試験等に使用した。ペットフードには畜水産物のみを原料とするものもあるが、総合栄養食には穀類などの植物由来の原料が含まれている。試料は全て東京都、埼玉県及び千葉県内の小売店において無作為に購入した。試料は犬用のドライ製品、セミドライ製品及びウェット製品及び猫用のドライ製品及びウェット製品各 2 製品の計 10 製品とした。猫用のセミドライ製品は流通量が極めて少なく、試料の選択が困難であることから対象から除外した。各製品の栄養成分表に表示された栄養成分を表 2.2 に示す。

2.2.4 試料への添加方法

分析法の妥当性を確認するためには、抽出効率の確認ができることから、自然に汚染された試料を用いることが望ましい。しかしながら、ペットフードは様々な原料によって構

成されているため、適度な既知の濃度で OTA に汚染された試料を調達することは困難である。更に、ペットフード中の OTA の安定性は確認されていない。したがって、本研究では試料に OTA を添加することとした。妥当性確認に添加試料を使用する場合、ペットフード試料には OTA が含まれていないか、含まれているとしても可能な限り低い濃度であることが望ましい。そこで、あらかじめ市販のペットフード試料を複数購入し、各試料における OTA の汚染レベルを IAC 及び HPLC を用いて分析し、適切なものを選定した。ドライタイプ、セミドライタイプ及びウェットタイプの試料は IMF-720G 型フードプロセッサ（岩谷産業）を用いて粉碎又はホモジナイズした。かびの発生を防ぐため、全ての試料は粉碎後から分析までの間 4℃で保管した。検出限界及び定量下限値の確認並びに分析法の妥当性確認のため、ドライタイプ及びセミドライタイプは 5 及び 2 µg/kg の 2 濃度、ウェットタイプは 1 µg/kg（水分 10%換算で 5 µg/kg）となるよう、試料 25 g に対して OTA のアセトニトリル溶液 1 mL を添加し、十分に混合した。添加後のドライ及びセミドライタイプの試料は 0~8℃で一晩放置して溶媒を揮発させた。ウェットタイプの試料は添加後 8℃で 30 min 静置した後、分析に供した。

表 2.2 本研究で用いたペットフード試料の栄養成分

Test sample	Nutrition (%)					Pet food materials
	Protein	Crude fat	Crude fiber	Crude ash	Moisture	
Dry dog food 1	≥21	≥9.5	≤3.0	≤9.0	≤10	Fish, Rice, Rice bran, Champignon, Minerals, Vitamins, Additives
Dry dog food 2	≥18	≥5.0	≤8.0	≤8.0	≤10	Potato, Salmon, Tomato, Beet pulp, Salt, Vegetal oil, Lecithin, Minerals, Vitamins, Additives
Semi-dry dog food 1	≥13	≥3.4	≤3.0	≤11	≤33	Chicken, Wheat, Sweet potato, Carrot, Squash, Spinach, Minerals, Vitamins, Additives
Semi-dry dog food 2	≥26	≥6.0	≤1.8	≤7.0	≤30	Chicken, Hen egg, Beef, Pork, Fish, Rice bran, Soybean, Soymeal, Wheat, Beet pulp, Minerals, Vitamins, Additives
Wet dog food 1	≥6.0	≥5.0	≤1.0	≤4.0	≤82	Chicken, Beef, Pork, Turkey, Carrot, Corn, Green pea, Tomato, Wheat, Potato, Beer yeast, Minerals, Vitamins, Additives
Wet dog food 2	≥9.0	≥7.0	≤1.5	≤3.1	≤76	Chicken, Brown rice, Hen egg, Flax seed, Herring, Minerals, Vitamins, Additives
Dry cat food 1	≥30	≥18	≤5.0	≤7.0	≤10	Chicken, Rice, Hen egg, Beet pulp, Salmon, Corn, Fish oil, Tomato, Flax seed, Yeast, Minerals, Vitamins, Additives
Dry cat food 2	≥30	≥12	≤8.0	≤9.0	≤10	Fish, Chicken, Hominy feed, Wheat, Beet pulp, Minerals, Vitamins, Additives
Wet cat food 1	≥12	≥1.5	≤0.5	≤3.0	≤84	Fish, Chicken, Vegetal oil, Egg albumen, Minerals, Vitamins, Additives
Wet cat food 2	≥9.0	≥1.5	≤1.0	≤3.5	≤85	Fish, Chicken, Vegetal oil, egg albumen, Minerals, Vitamins, Additives

2.2.5 抽出及び IAC による精製条件

各々の試料 25 g を容量 200 mL 三角フラスコに量り取り, 100 mL のアセトニトリル及び水の混液 (3:2, v/v) を加え 5 分間静置した後, 振とう器 (SRR-3, アズワン) を用いて 200 rpm で 30 分間振とうして OTA を抽出した. 試料は桐山ロート (桐山製作所) 及びガラス繊維ろ紙 (GFP, 95 mm, 桐山製作所) を用いてろ過した. 抽出液は PBS で希釈して 250 mL 定容とし, 析出した脂質等の不溶物をポリビニリデンフルオライド (PVDF) 製のメンブランフィルター (GD/X syringe filter, Whatman, 0.45 μ m, 25 mm) でろ過した. 3 mL の PBS を 2 回通液してコンディショニングした IAC (OCHRAKING, 堀場製作所) に容量 25 mL のリザーバー (ジューエルサイエンス) を装着し, ろ液 10 mL を負荷した. IAC に 3 mL の PBS を三回通液し, 次に 10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液を 3 回通液して洗浄した. IAC にメタノール及び酢酸 (98:2, v/v) 1 mL を 3 回通液して OTA を溶出させた. 溶出は常圧下で自然落下により行い, 溶出液をシラン処理した褐色バイアル (15 mm i.d. \times 45 mm, スペルコ) に捕集した. バイアルを 40°C に加熱した EB-303 型ドライブロックバス (アズワン) に入れ, 加温しながら緩やかな窒素気流により溶媒を除去した. 残渣にアセトニトリル及び水の混液 (1:1, v/v) を 2 mL 加えて溶解し, 試料溶液とした.

2.2.6 HPLC 分析条件

前項で抽出液を IAC で精製して得られた試料溶液 50 μ L を HPLC に注入した. 溶離液の流速は 1.0 mL/min, カラム恒温槽の温度は 40°C とし, ODS カラム (L-column2 ODS, 250 mm \times 4.6 mm i.d., particle size = 5 μ m, pore size = 12 nm, 化学物質評価研究機構) によって OTA を試料マトリックスと分離した. OTA は励起波長 335 nm, 蛍光波長 480 nm で蛍光検出器によって検出した. 試験室間試験において用いられた ODS カラムは, いずれも同じサイズではあるが, 製造会社及び銘柄は各試験所によって異なる. 用いたカラムを次に示す. Shodex C18M 4E (昭和電工), Inertsil ODS-2 and Inertsil ODS-3 (ジューエルサイエンス), Mightysil RP-18GP (関東化学) 及び L-column ODS (化学物質評価研究機構).

2.2.7 検量線, 検出限界及び定量下限値

OTA の検量線の直線性を確認するため, 一連の濃度で調製した OTA の標準溶液 (0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25 及び 50 ng/mL) 50 μ L を HPLC に注入して測定し, 各々の濃度に対して得られたピーク面積をプロットした. 検量線を定量下限値濃度を含めた 5 点以上で作成し, 相関係数は 0.99 以上を許容することとした.

試料中の OTA 濃度は絶対検量線法で次式により算出した。

$$C = \frac{A - b}{a}$$

ここで C : 試料中の OTA 濃度

A : 試料溶液における OTA のピーク面積値

a : 検量線の傾き

b : 検量線の切片

OTA の検出限界を評価するため、ドライ及びセミドライタイプのペットフードに対しては $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、ウェットタイプのペットフードには $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ となるように OTA を添加した。定量下限値 (LOQ) はコーデックス委員会のガイドライン“guidelines on analytical terminology” (CAC/GL 72-2009) (Codex Alimentarius Commission, 2009) ²⁸にしたがい、次の基準を満たすことを確認した。

- 定量下限値相当濃度を添加したブランク試料を繰り返し分析したときの分析値の標準偏差 (σ) の 10 倍であること。

$$\text{LOQ} = 10 \times \sigma$$

- クロマトグラフィーによる分析では、定量下限値濃度に対応する濃度から得られるピークが、 $S/N \geq 10$ であること。

また、同様に検出限界 (LOD) の目標値が以下の条件に該当することを確認した。

- 定量下限値濃度を添加したブランク試料を n 回分析したときの分析値の標準偏差 (σ) に Student の t 値 ($2t_{1-\alpha/2} = 2.015$:片側, 有意水準 0.05, 自由度 $n-1$) を乗じた値の 2 倍。

$$\text{LOD} = 2t_{1-\alpha/2} \sigma$$

- クロマトグラフィーによる分析では、得られるピークが、 $S/N \geq 3$ となる濃度。

2.2.8 分析法の妥当性確認

分析法の妥当性は犬用のドライ製品、セミドライ製品及びウェット製品及び猫用のドライ製品及びウェット製品各 2 製品の計 10 製品を用い「愛玩動物用飼料等の検査法 ²⁷」に準じて添加回収試験を行い確認した。

1) 真度及び精度

標準物質及び標準分析法がないため、添加試料 10 個を試験法に従って定量し、得られ

た定量値の平均値の添加濃度に対する比（回収率）を求めた。また、添加試料の分析を 5 回繰り返して、定量値の標準偏差及び相対標準偏差を求め、併行精度を評価した。回収率及び併行精度の目標値は各々 70～120%及び 22%とした。

2) 選択性

OTA を添加しない試料（ブランク試料）について操作を行い、定量を妨害するピークがないことを確認した。妨害ピークを認める場合は、そのピーク面積値が定量下限濃度の OTA ピークの 10%未満であった場合に許容することとした。

3) 試験室間試験

一般財団法人化学物質評価研究機構及び独立行政法人農林水産消費安全技術センターを含む 13 試験所を対象として実施した試験室間試験で得られた結果は IUPAC のプロトコール²⁹に従い、Cochran 及び Grubbs 検定（シングル）及び Grubbs 検定（ダブル）によるはずれ値のテストを行った。はずれ値を除外した後、併行相対標準偏差（RSD_r）及び室間再現相対標準偏差（RSD_R）を算出した。また、Horwitz 比（HorRat）は修正 Horwitz 式³⁰によって算出した。

2.3 結果と考察

2.3.1 OTA 検出条件の検討

OTA の検出条件を最適化するため、蛍光検出器を用いて OTA の励起波長スキャン測定及び蛍光波長スキャン測定を行った。濃度 0.1 µg/mL の OTA 溶液（溶媒組成は移動相と同じ）をマイクロシリンジを用いて検出器のフローセルに注入した。なお、励起波長スペクトルの測定では蛍光波長を 480 nm、蛍光波長スペクトルの測定では励起波長を 335 nm に設定した。

励起波長は 337 nm で極大を示し（図 2.4）、蛍光波長は 466 nm で極大を示した（図 2.5）。このため、励起波長は極大付近の波長である 335 nm を採用することとした。蛍光波長は、試料中にアフラトキシン及びフモニシンなど、450 nm 付近に吸収を有するその他のかび毒等の試料マトリックスが存在する可能性が高いことから、感度は犠牲となるが、バックグラウンドを低減するため、480 nm で測定することとした。

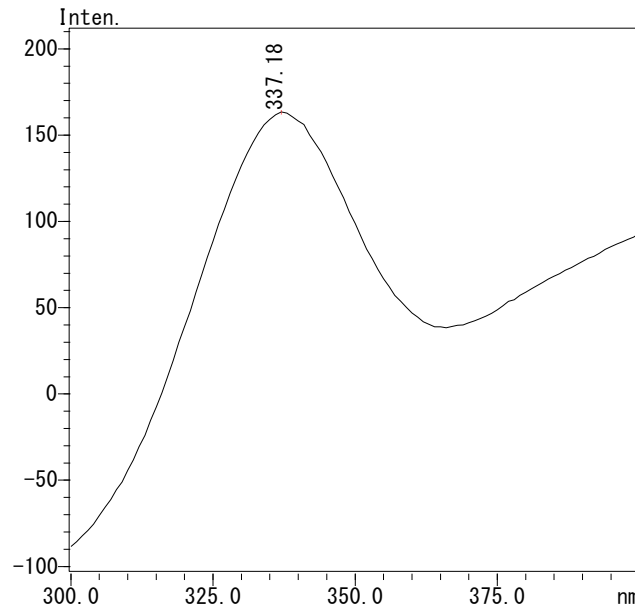


図2.4 OTAの励起波長スペクトル, 蛍光波長480 nm, OTA濃度: 0.1 $\mu\text{g/mL}$,
 溶媒組成: ACN+Water+1 v/v%リン酸混液 (230+230+1, v/v/v)

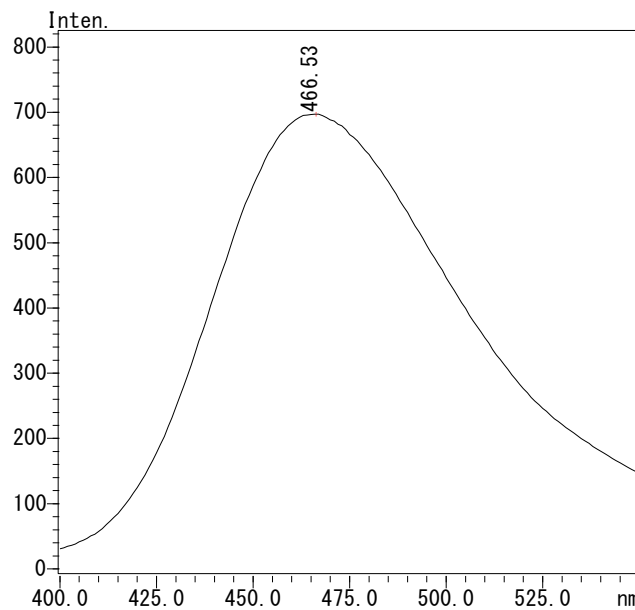


図2.5 OTAの蛍光波長スペクトル, 励起波長335 nm, OTA濃度:0.1 $\mu\text{g/mL}$,
 溶媒組成:ACN+Water+1 v/v%リン酸混液 (230+230+1, v/v/v)

2.3.2 抽出溶媒の最適化

分析法を開発するに当たり, 飼料分析基準に記載されている「オクラトキシン A 及びトリニンの液体クロマトグラフによる同時分析法」の適用性について検討を行った. この分析法は, 試料をアセトニトリル, 塩酸及び水の混液 (8:1:1, v/v/v) で抽出した後, 塩化ナ

トリウムを加えて液液分配により酢酸エチルに転溶し、更に溶媒をアセトニトリル及び水の混液 (1:1, v/v) に置き換え、限外ろ過して HPLC で分析する方法である。飼料分析基準の方法でドライタイプ及びウェットタイプのドッグフードを処理して得られた試料溶液のクロマトグラムを各々図 2.6 及び図 2.7 に示す。OTA ピーク位置付近に夾雑ピークあるいはベースラインの変動が認められることから、ペットフードのマトリックスを除去するには精製が不十分であると考えられた。これらのことから飼料分析基準の方法はペットフードに適用困難であるため改良を要すると判断した。

家畜用飼料中の OTA を抽出するための溶媒として、アセトニトリル及び水の混液 (6:4) 及びメタノール及び水の混液 (8:2) のような極性溶媒と水の組み合わせが一般的に用いられている^{19, 20, 23, 25}。しかしながら、ほとんどの IAC は有機溶媒に対する耐性が低い。このことから通常は IAC に負荷する前に抽出液を緩衝液で希釈する操作が必要となる。先述したように、この問題を解決するために Uchigashima²⁵ らが開発した有機溶媒耐性の高い IAC である OCHRAKING はメタノールであれば 60%、アセトニトリルであれば 48% の割合で存在していても OTA を保持することができる (Uchigashima *et al.*, 2012)。本研究では、異なる割合で混合したアセトニトリルと水の混液 (8:2, 7:3, 6:4, 5:5 及び 4:6) をドライタイプのドッグフード中 OTA を抽出する溶媒として比較検討した。アセトニトリルと水の割合が 5:5 及び 4:6 の場合は、試料の粘性が高い状態となり、後のろ過が困難となった。アセトニトリルと水の割合が 8:2 及び 7:3 の場合は、多くの脂溶性成分が抽出され、PBS で 2 倍希釈した際にこれらが析出するという現象が認められた。これらの析出物もまた、ろ過による除去が困難であった。アセトニトリル及び水の混液 (6:4, v/v) を用いた場合はろ過も容易であり、OTA を効率よく抽出可能であるため、本研究ではこの組成の混合溶媒を OTA の抽出溶媒として採用した。ただし、このままでは IAC に負荷できないため、PBS で 2.5 倍希釈して析出物をろ過することとした。また、希釈後のアセトニトリル濃度は 24% となり、IAC におけるアセトニトリルの許容濃度の 48% 以下であるため、OTA の保持に対する影響はないと考えられた。この結果、図 2.6 及び図 2.7 のクロマトグラムに認められた OTA ピーク付近の妨害ピークを低減することができた(2.3.4 項参照)。

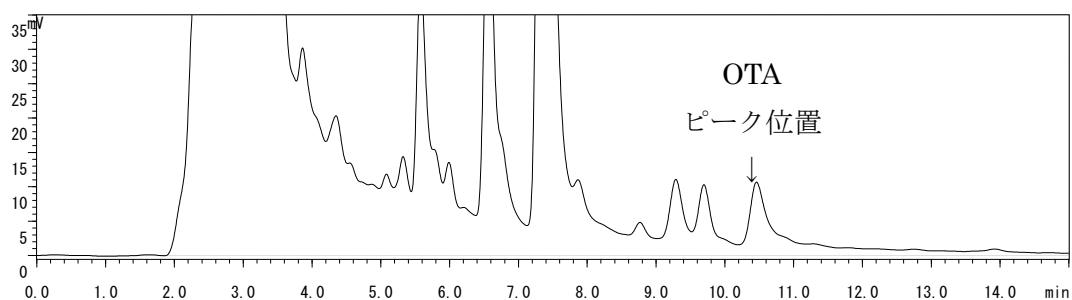


図 2.6 飼料分析基準の方法で得られたドライタイプのドッグフード試料溶液のクロマトグラム

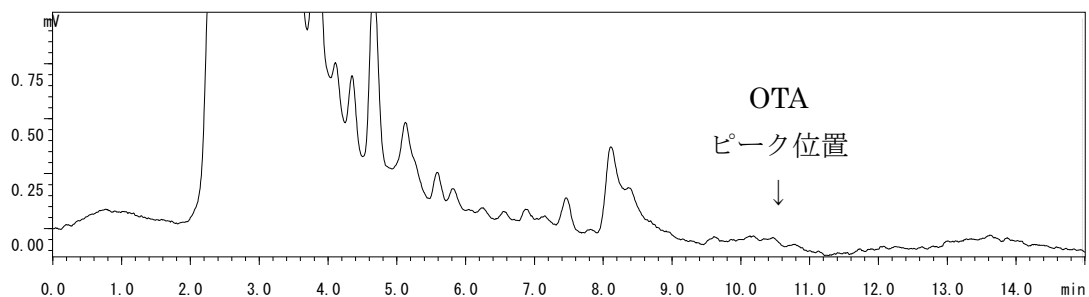


図 2.7 飼料分析基準の方法で得られたウェットタイプのドッグフード試料溶液のクロマトグラム

2.3.3 HPLC における試料溶液注入量の検討

ウェット製品の目標定量下限値（ $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ）相当濃度付近の濃度として $0.25 \text{ ng}/\text{mL}$ 及び $0.5 \text{ ng}/\text{mL}$ の標準溶液を測定した。これらのクロマトグラムを図 2.8 及び図 2.9 に示す。 $0.25 \text{ ng}/\text{mL}$ の OTA 標準溶液を $20 \mu\text{L}$ 注入した場合、S/N 比が 10 程度であり（図 2.8），ウェット製品の目標定量下限値を達成するためには感度が不十分であると考えられた。そのため、飼料分析基準の方法では注入量が $20 \mu\text{L}$ であるが、注入量を必要十分な感度が得られる $50 \mu\text{L}$ に増加させることを検討した。その結果ウェット製品の目標定量下限値（ $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ）相当濃度付近の濃度である $0.5 \text{ ng}/\text{mL}$ で十分な感度が得られることが確認された（図 2.10）。なお、注入量を変更するに当たり、HPLC 注入時の溶媒をメタノールからアセトニトリル及び水の混液（1:1, v/v）に変更した。

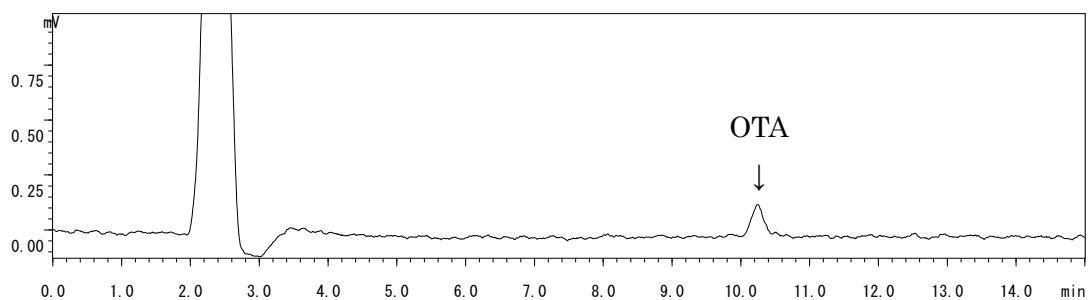


図2.8 OTA標準溶液0.25 ng/mLのクロマトグラム（溶媒:メタノール, 注入量: 20 μL ）

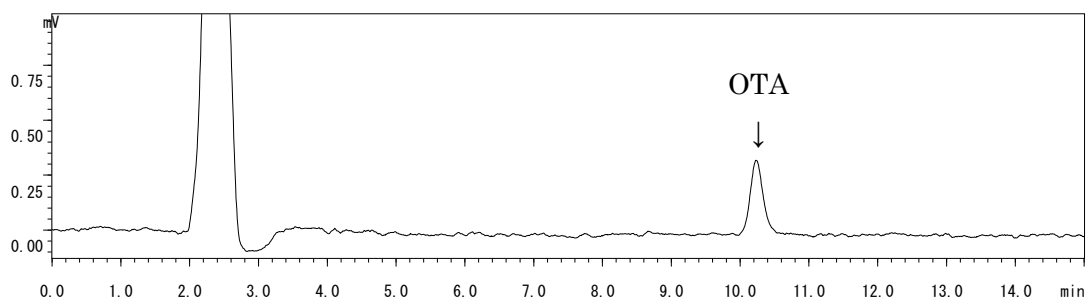


図2.9 OTA標準溶液0.5 ng/mLのクロマトグラム（溶媒:メタノール, 注入量: 20 μL ）

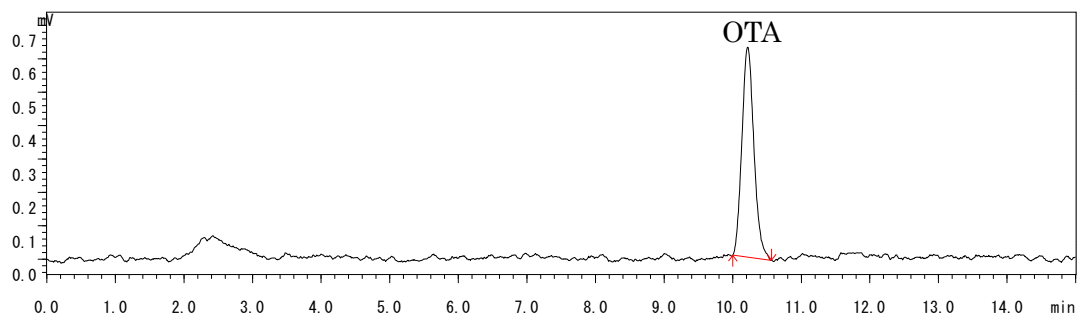


図2.10 OTA標準溶液0.5 ng/mLのクロマトグラム（溶媒:アセトニトリル及び水の混液（1:1, v/v）, 注入量:50 μ L）

2.3.4 妨害物質の影響

ドライタイプのドッグフード、セミドライタイプのドッグフード、ドライタイプのキャットフード、ウェットタイプのドッグフード及びウェットタイプのキャットフード各2検体の総合栄養食について分析し、クロマトグラム上のOTAピーク位置における妨害ピークの有無を確認した（図2.11～図2.20）。セミドライタイプのドッグフード等、一部のクロマトグラムにおいて、わずかではあるがOTAのピークが検出された。しかしながら、これらのピーク面積はLOQの5%未満であり、設定した基準（10%）よりも十分小さいため、その影響は無視できるレベルであると判断した。

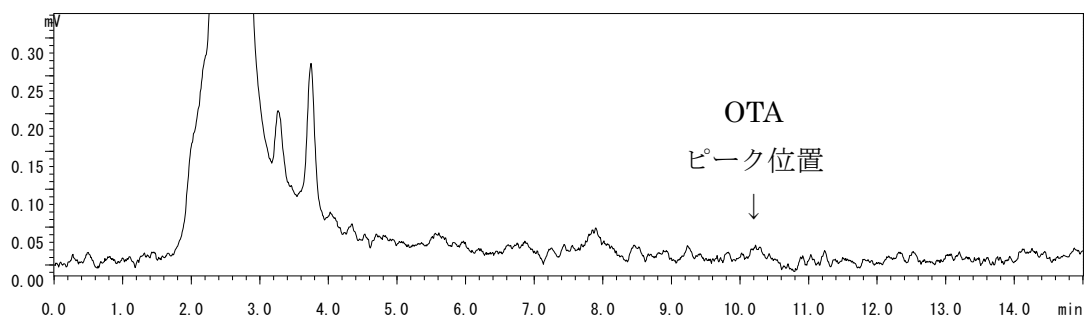


図 2.11 ドライタイプのドッグフード①のクロマトグラム（OTA 無添加）

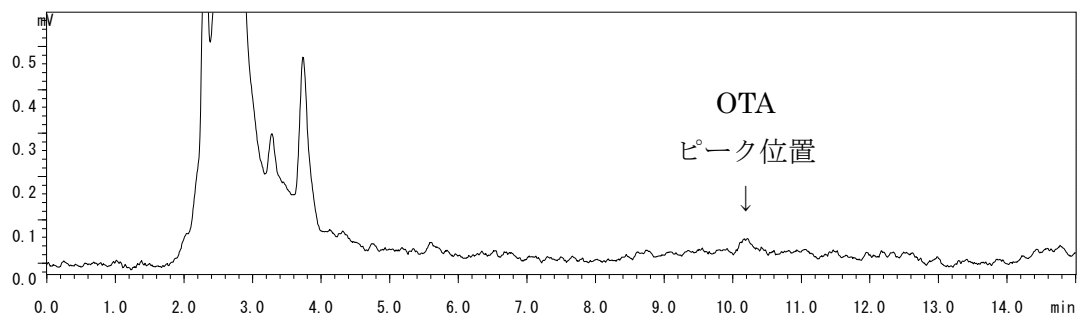


図 2.12 ドライタイプのドッグフード②のクロマトグラム (OTA 無添加)

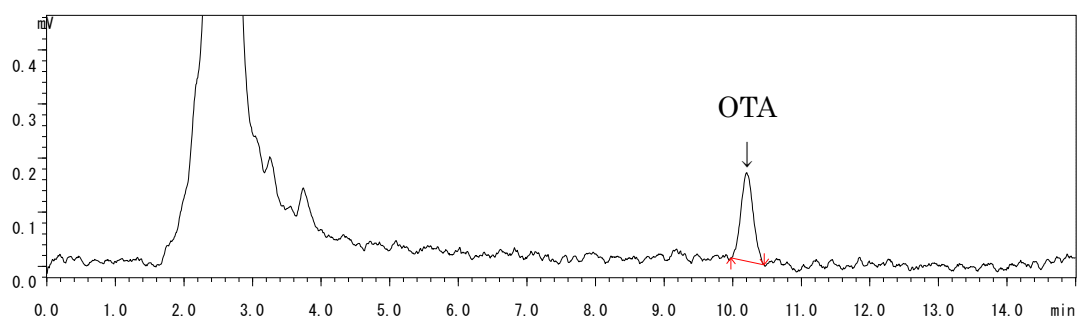


図 2.13 セミドライタイプのドッグフード①のクロマトグラム (OTA 無添加)

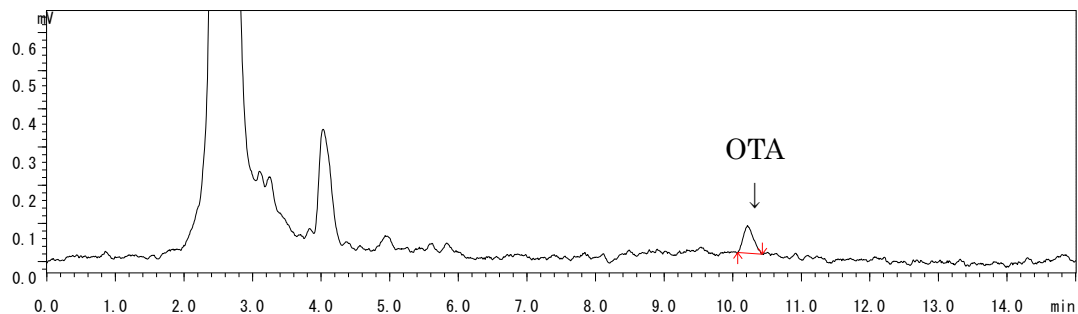


図 2.14 セミドライタイプのドッグフード②のクロマトグラム (OTA 無添加)

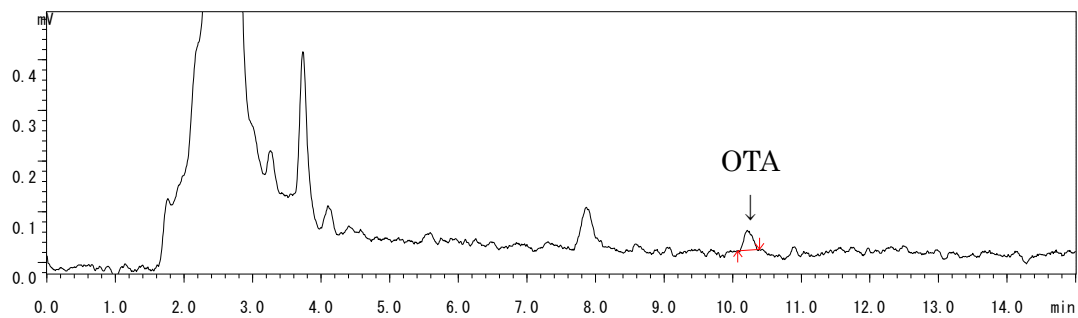


図 2.15 ウェットタイプのドッグフード①のクロマトグラム (OTA 無添加)

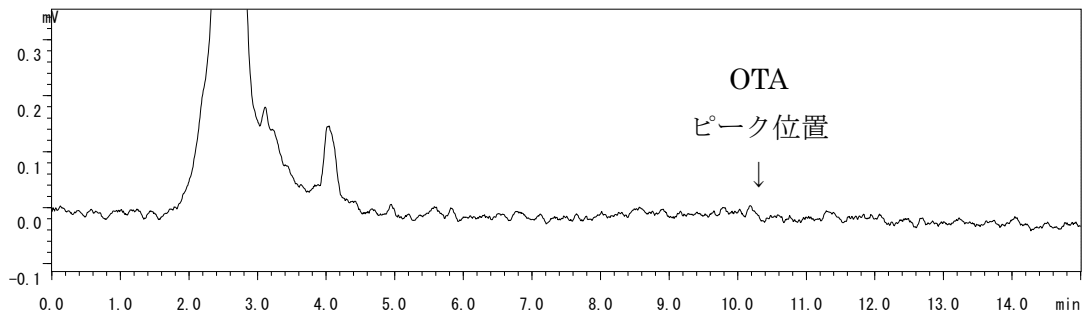


図 2.16 ウェットタイプのドッグフード②のクロマトグラム (OTA 無添加)

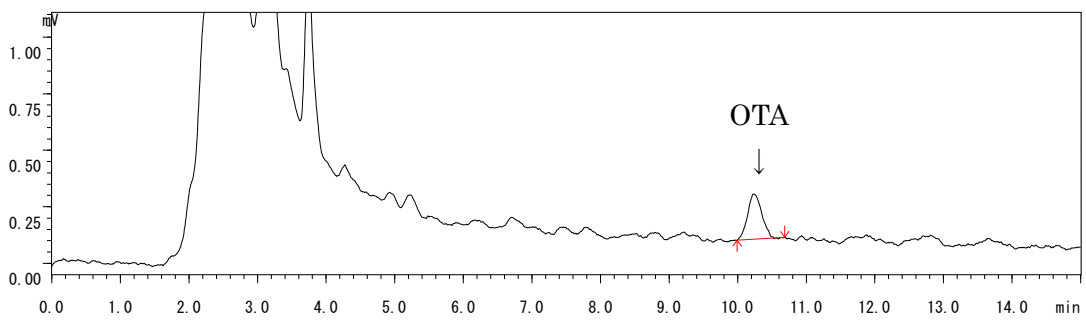


図 2.17 ドライタイプのキャットフード①のクロマトグラム (OTA 無添加)

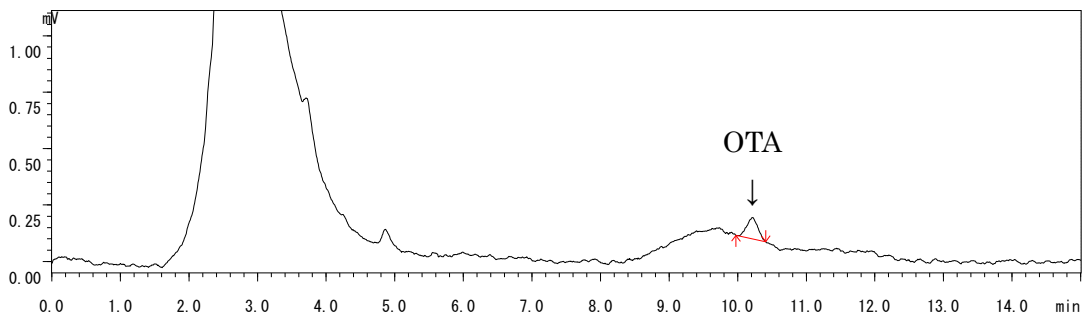


図 2.18 ドライタイプのキャットフード②のクロマトグラム (OTA 無添加)

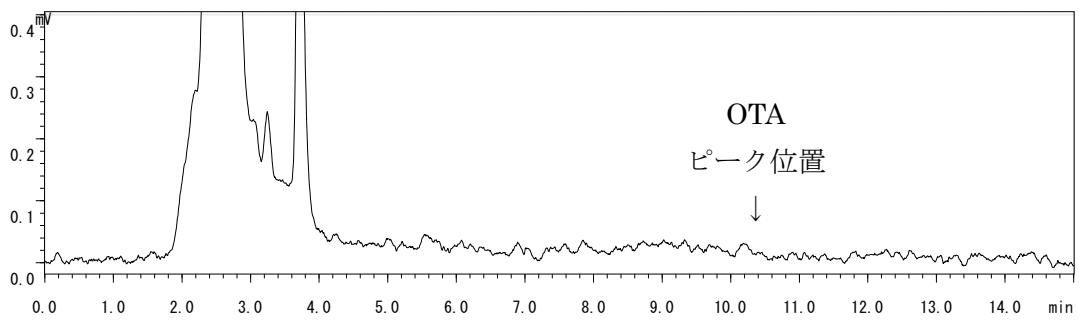


図 2.19 ウェットタイプのキャットフード①のクロマトグラム (OTA 無添加)

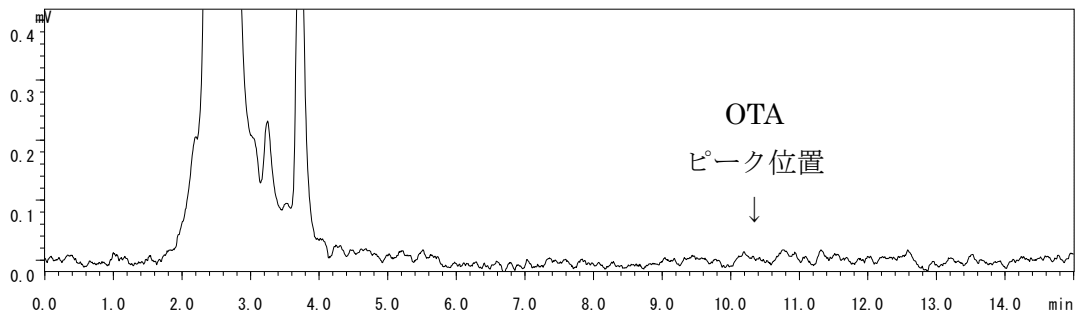


図 2.20 ウェットタイプのキャットフード②のクロマトグラム (OTA 無添加)

2.3.5 検量線, 検出限界及び定量下限値

検量線は決定係数 (R^2) が 0.9995 以上であり, 0.025 ng (0.5 ng/mL) ~2.5 ng (50 ng/mL) の範囲で良好な直線性を示した. 代表的な検量線を図 2.21 に示す.

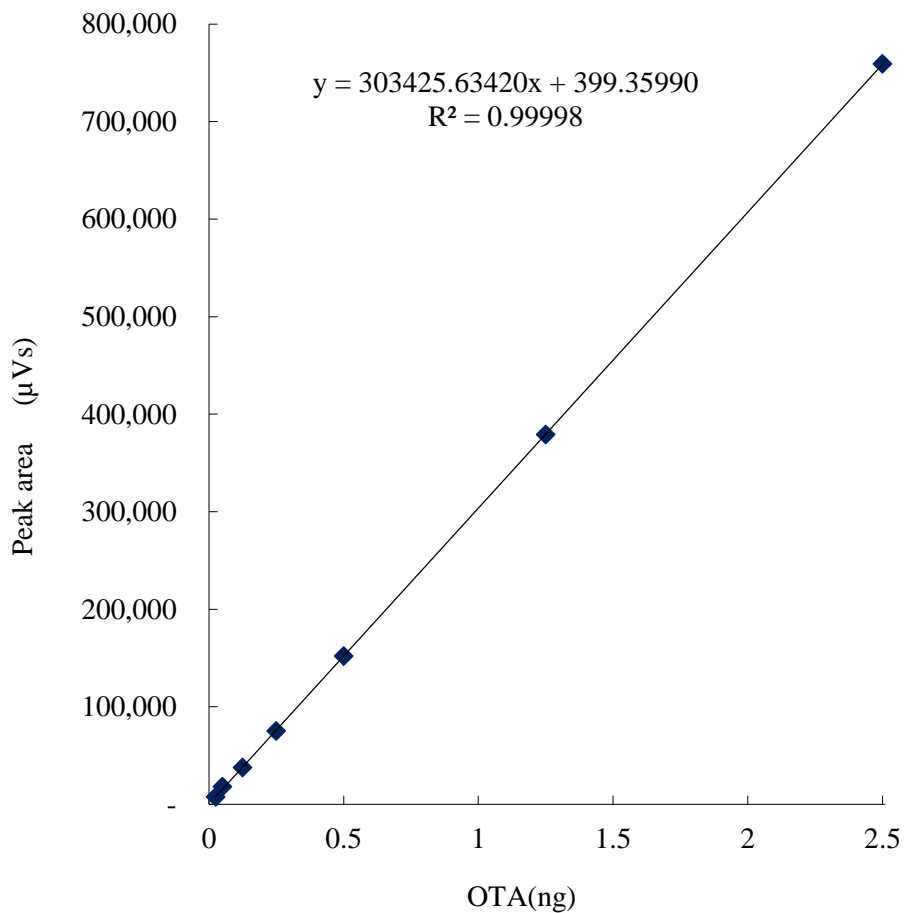


図 2.21 OTA の検量線

ペットフード試料における OTA の添加回収試験結果（定量下限値濃度）を表 2.3 に示す。定量下限値（LOQ）は、標準偏差（ σ ）の 10 倍に相当する濃度として算出し、ドライ及びセミドライタイプのペットフードについては $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以下、ウェットタイプのペットフードについては $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以下であることを確認した。検出限界（LOD）の評価は標準偏差（ σ ）の 2 倍にスチューデントの t 値（2.015, 片側, 有意水準 0.05, 自由度 $n-1$ ）を乗じた値として算出し、ドライ及びセミドライタイプのペットフードについては $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 及びウェットタイプのペットフードについては $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以下であることを確認した。これらの検出限界は Lattanzio³¹ らが既報にて示している液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC/MS/MS）による OTA の検出限界（ $0.3\sim 4.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ ）と遜色ないレベルである。

表 2.3 ペットフード試料における OTA の添加回収試験結果 (定量下限値濃度)

Sample	n	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	定量値 (平均) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Dog , Dry ①	5	2	1.69	0.388	0.963
Dog, Dry ②	5	2	1.88	0.194	0.481
Dog , Semi dry ①	5	2	1.63	0.091	0.225
Dog , Semi dry ②	5	2	1.77	0.377	0.934
Dog , Wet ①	5	1	0.951	0.140	0.348
Dog , Wet ②	5	1	1.03	0.219	0.544
Cat, Dry ①	5	2	1.86	0.394	0.978
Cat, Dry ②	5	2	1.76	0.257	0.638
Cat, Wet ①	5	1	0.992	0.175	0.433
Cat, Wet ②	5	1	0.941	0.098	0.242

表 2.4 ペットフード試料における OTA の添加回収試験結果 (基準値レベル)

Sample	n	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回収率 (平均) (%)	σ ^{a)}	RSDr ^{b)} (%)
Dog , Dry ①	5	5	92.3	4.7	5.0
Dog, Dry ②	5	5	91.3	4.0	4.3
Dog , Semi dry ①	5	5	106	3.0	2.8
Dog , Semi dry ②	5	5	92.6	6.3	6.8
Dog , Wet ①	5	1	95.1	3.5	3.7
Dog , Wet ②	5	1	103	5.4	5.3
Cat, Dry ①	5	5	83.0	1.7	2.0
Cat, Dry ②	5	5	85.2	3.4	4.0
Cat, Wet ①	5	1	99.2	4.3	4.4
Cat, Wet ②	5	1	94.1	2.4	2.6

a) 標準偏差, b) 併行相対標準偏差

2.3.6 分析法の妥当性及び試験室間試験

図 2.22～図 2.31 に添加回収試験における OTA のクロマトグラムを示す。表 2.4 に示すように、基準値レベルで OTA を添加した場合の平均回収率は 83.0～106% であり、5 回繰り返し測定 of 併行相対標準偏差は 7% 未満であった。ペットフード試料における OTA の試験室間試験結果（表 2.5）、OTA の回収率は 75.6～83.1% であり、RSD_r、RSD_R 及び HorRat は各々 3.5～6.1%、5.0～15.0% 及び 0.23～0.68 であった。HorRat の許容範囲は 0.5～2 であることから³⁰、本研究によって開発した分析法はペットフード中の OTA の分析法として適用可能であることが確認された。

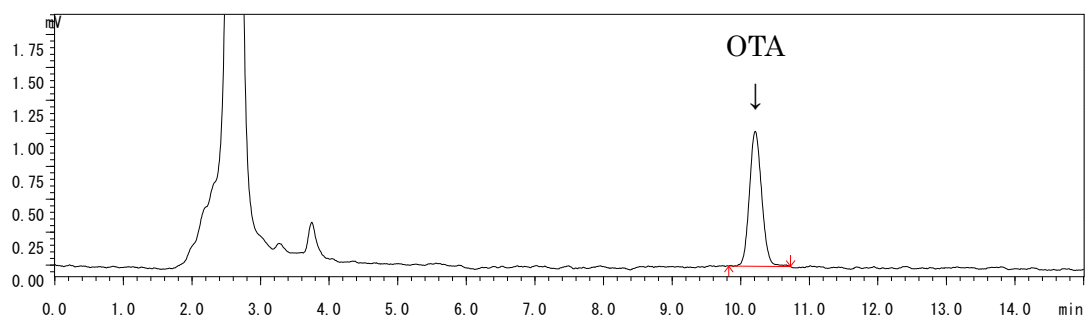


図 2.22 ドライタイプのドッグフード①のクロマトグラム (OTA 2 µg/kg 添加)

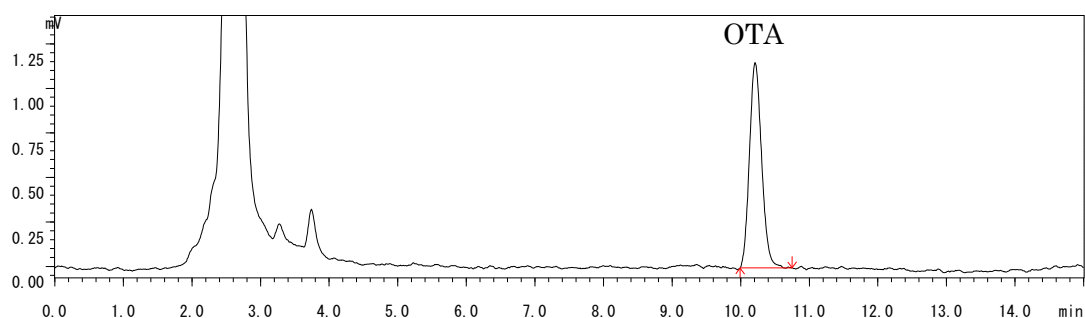


図 2.23 ドライタイプのドッグフード②のクロマトグラム (OTA 2 µg/kg 添加)

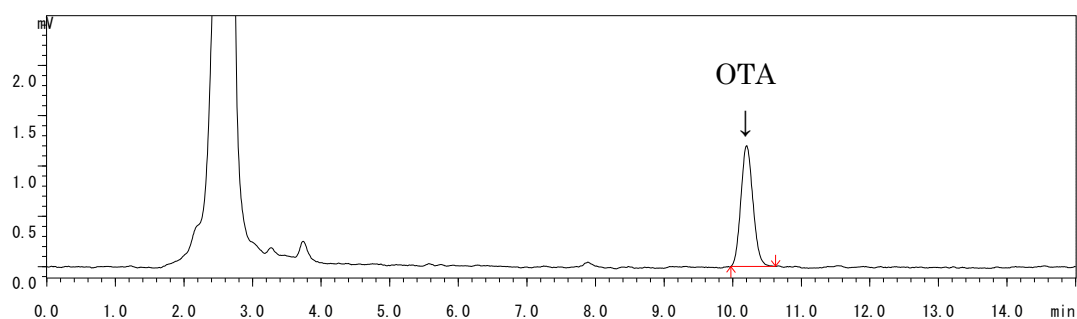


図 2.24 セミドライタイプのドッグフード①のクロマトグラム (OTA 2 µg/kg 添加)

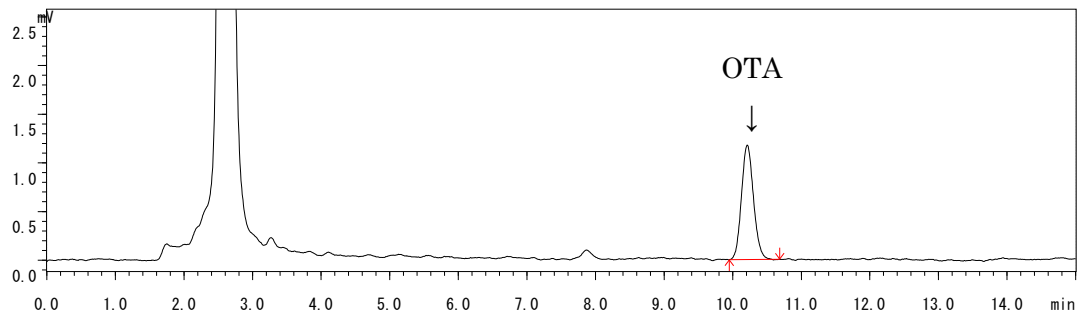


図 2.25 セミドライタイプのドッグフード②のクロマトグラム (OTA 2 µg/kg 添加)

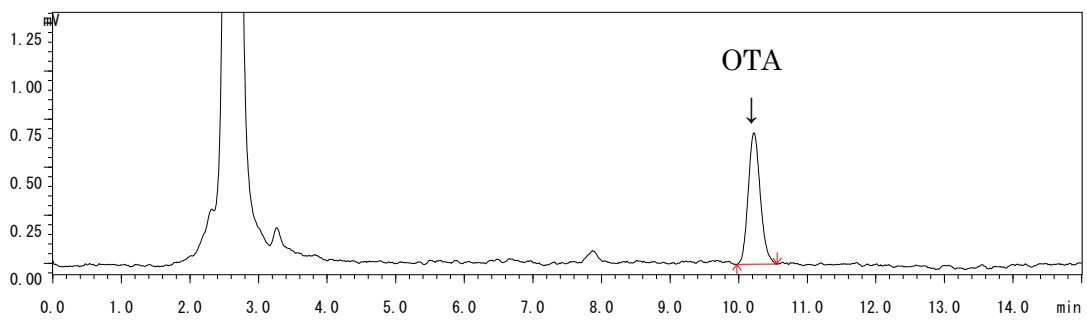


図 2.26 ウェットタイプのドッグフード①のクロマトグラム (OTA 1 µg/kg 添加)

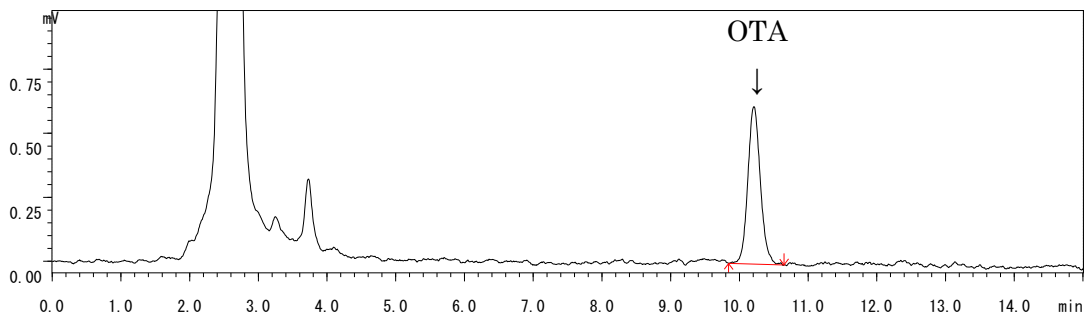


図 2.27 ウェットタイプのドッグフード②のクロマトグラム (OTA 1 µg/kg 添加)

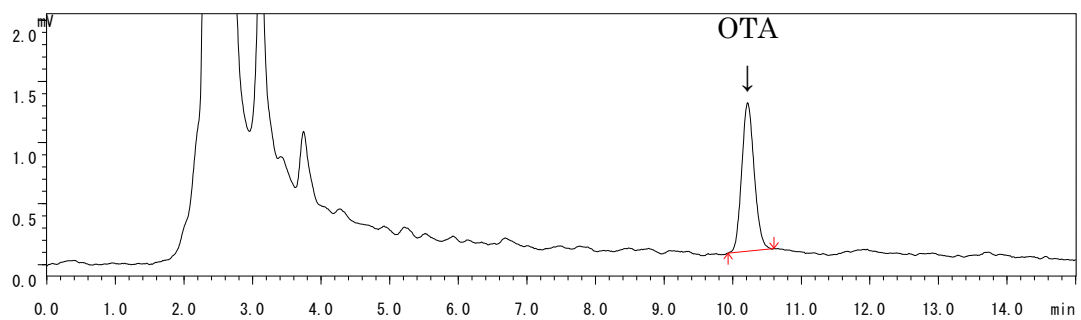


図 2.28 ドライタイプのキャットフード①のクロマトグラム (OTA 2 µg/kg 添加)

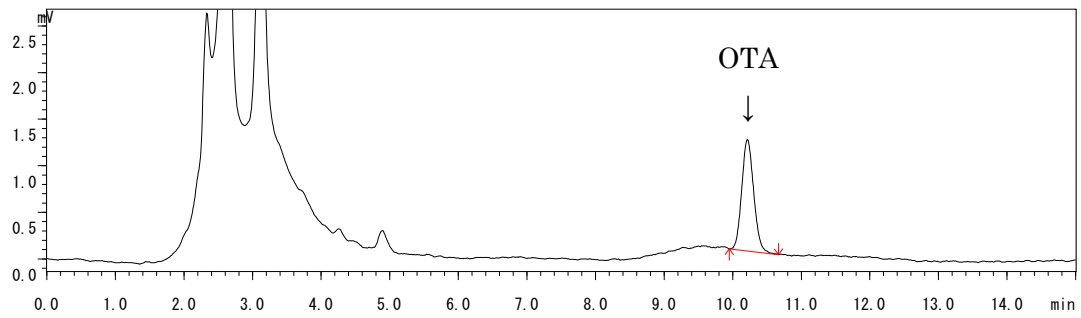


図 2.29 ドライタイプのキャットフード②のクロマトグラム (OTA 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加)

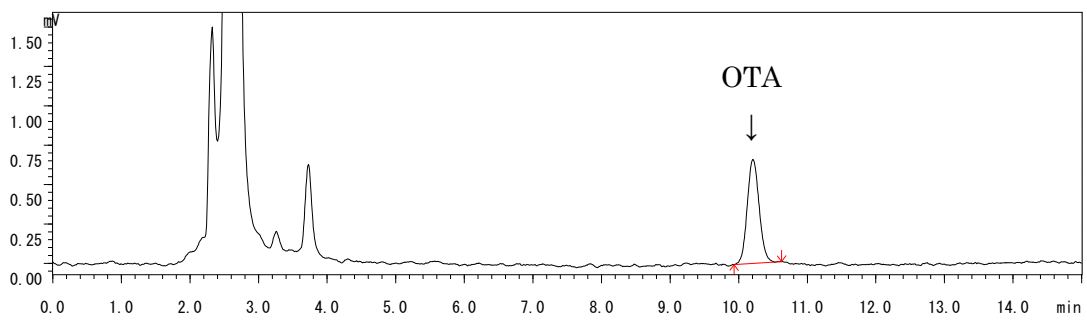


図 2.30 ウェットタイプのキャットフード①のクロマトグラム (OTA 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加)

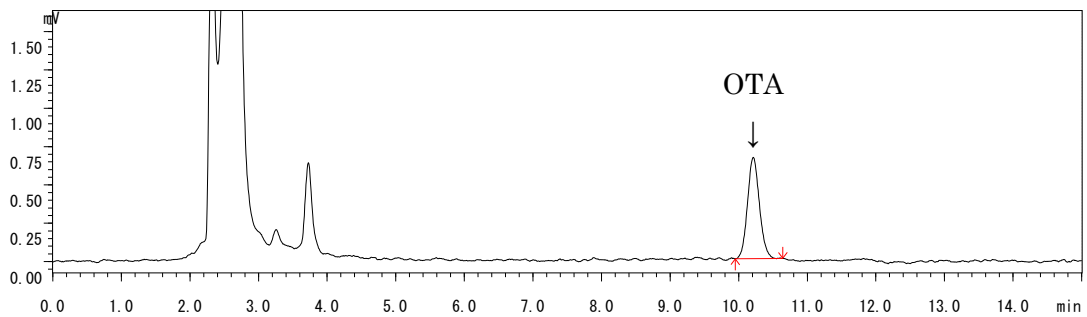


図 2.31 ウェットタイプのキャットフード②のクロマトグラム (OTA 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加)

表 2.5 ペットフード試料における OTA の試験室間試験結果

Laboratory	Pet food types					
	Dry type for dogs		Semi-dry type for dogs		Wet type for cats	
	(µg/kg)		(µg/kg)		(µg/kg)	
1	4.19	3.69	1.57	1.55	1.00 ^{e)}	1.00 ^{e)}
2	3.94	4.03	1.79	1.82	0.789	0.858
3	2.34 ^{a)}	2.42 ^{a)}	1.08	0.969	0.613 ^{e)}	0.557 ^{e)}
4	3.81	4.03	1.54	1.63	0.744	0.794
5	3.99	4.08	1.75	1.88	0.825	0.829
6	4.22	4.03	1.79	1.84	0.907	0.858
7	3.81	4.04	1.69	1.36	0.852	0.856
8	3.83	3.80	1.67	1.66	0.829	0.823
9	3.85	3.70	1.73	1.63	0.892	0.876
10	3.22	3.23	1.57	1.58	0.771	0.833
11	3.84	3.51	1.84	1.74	0.869	0.844
12	3.69	3.33	1.19	1.43	0.840	0.830
13	3.04	3.83	1.51	1.42	0.777	0.804
Spiked level (µg/kg)	5		2		1	
Mean value ^{a)} (µg/kg)	3.78		1.59		0.831	
Recovery ^{a)} (%)	75.6		79.5		83.1	
RSD _R ^{b)} (%)	6.1		5.8		3.5	
RSD _R ^{c)} (%)	8.4		15.0		5.0	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22		22	
HorRat	0.38		0.68		0.23	

a) Number of laboratories included in statistical analysis

Dry food for dogs: $n=24$, Semi-dry food for dogs: $n=26$, Wet food for cats: $n=22$

b) Relative standard deviation of reproducibility within laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

d) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

e) Data excluded by Grubbs test

2.4 結言

ペットフード中の OTA を精度よく定量するため、IAC (OCHRAKING) を用いて抽出物を精製する方法を開発した。10 種類のペットフード試料を用いて添加回収試験を実施したところ、全ての試料において OTA の回収率は 70%以上であった。OTA の LOQ 及び LOD は ドライ及びセミドライフードについて各々 2 µg/kg 及び 1 µg/kg, ウェットフードについて各々 1 µg/kg 及び 0.5 µg/kg であった。試験室間試験における OTA の平均回収率, 併行相対標準偏差 (RSD_r) 及び室間再現相対標準偏差 (RSD_R) 及び Horwitz 比 (HorRat) は各々 75.6~83.1%, 3.5~6.1%, 5.0~15.0% 及び 0.23~0.68 であった。これらの結果から、本分析法は様々なペットフード試料における OTA の分析法として適していることが確認された。

本研究は農林水産省の委託事業の一部として実施したものである。本研究の成果は、"Development and inter-laboratory study of a method for quantifying ochratoxin A in pet foods"と題して World Mycotoxin Journal に投稿した³²。また開発した分析法は「愛玩動物用飼料等の検査法²⁷」のオクラトキシン A 「液体クロマトグラフによる単成分分析法」として採用された。今後、ペットフード安全法に基づいて実施されるペットフードの検査に適用され、愛玩動物用飼料の安全確保に寄与するものと期待される。また、更にヒト用の加工食品へ応用することも可能であると考えられることから、OTA の汚染によるヒトへの健康を未然に防ぐための分析法として社会的な貢献が期待される。

2.5 参考文献

- 1) National Toxicology Program, Department of Health and Human Services, Ochratoxin A, Report on Carcinogens, Thirteenth Edition (2014)
<https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/content/profiles/ochratoxina.pdf#search='National+Toxicology+Program%2C+Department+of+Health+and+Human+Services%2C+Ochratoxin+A%2C+Report>
- 2) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, 1994. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins, 56.
- 3) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 2001. Safety evaluation of certain food additives and contaminants in food: ochratoxin A, In Proceedings of the 56th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. World Health Organization, Geneva. 281-415.
- 4) Aoyama, K., Nakajima, M., Tabata, S., Ishikuro, E., Tanaka, T., Norizuki, H., Itoh, Y., Fujita, K., Kai, S., Tsutsumi, T., Takahashi, M., Tanaka, H., Iizuka, S., Ogiso, M., Maeda, M., Yamaguchi, S., Sugiyama, K., Sugita-Konishi, Y., and Kumagai, S., 2010. Four-year Surveillance for Ochratoxin A and Fumonisin in Retail Foods

- in Japan. *Journal of Food Protection*, 73: 344-352.
- 5) Leung, M., D'az-Llano, G., and Smith, T., 2006, Mycotoxins in Pet Food: A Review on Worldwide Prevalence and Preventative Strategies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 9623–9635.
 - 6) Li, X., Zhao, L., Fan, Y., Jia, Y., Sun, L., Ma, S., Ji, C., Ma, Q. and Zhang, J., 2014. Occurrence of mycotoxins in feed ingredients and complete feeds obtained from the Beijing region of China. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 5: 37.
 - 7) Scudamore, A., Hetmanski, T., Nawaz, S., Naylor, J. and Rainbird, S., 1997. Determination of mycotoxins in pet foods sold for domestic pets and wild birds using linked-column immunoassay clean-up and HPLC. *Food Additives & Contaminants*. 14: 175-186.
 - 8) Pühringer, S., Razzazi, E., Kübber, A. and Iben, C., 2003. Occurrence of ochratoxin A in commercial cat food and feline kidneys. In *Proceedings to the 7th Conference of the European Society of Veterinary and Comparative Nutrition*; Druck, C., Ed. 37
 - 9) Martins, L., Martins, M., Bernardo, F., 2003. Fungal flora and mycotoxins detection in commercial pet food. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 98: 179-183.
 - 10) 食品安全委員会 かび毒評価書 オクラトキシン A 2014 年 1 月
 - 11) Boermans, H. and Leung, M., 2007. Mycotoxins and the pet food industry, Toxicological evidence and risk assessment. *International Journal of Microbiology* 119: 95-102.
 - 12) Szczech, G., Carlton, W. and Tuite, J., 1973. Ochratoxicosis in Beagle Dogs. 1. Clinical and Clinicopathological Features. *Veterinary Pathology* 10: 135-154.
 - 13) Jeong, W., Do, S., Jeong, D., Chung, J., Yang, H., Yuan, D., Hong, I., Park, J., Goo, M. and Jeong, K., 2006. Canine renal failure syndrome in three dogs. *J Vet Sci* 7: 299.
 - 14) Commission of the European Communities, 2006a. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union L364*: 5-24.
 - 15) Codex Alimentarius Commission. 2008. Report of the 2nd session of the Codex committee on contaminants in foods. *Alinorm 08/31/41*. Codex, Rome, Italy
 - 16) Commission of the European Communities, 2006b. Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2, and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. *Official Journal of the European Union L229*: 7-9.

- 17) 飼料分析基準（平成 20 年 4 月 1 日・19 消安第 14729 号 農林水産省消費・安全局長通知）
- 18) Nakajima, M., Tsubouchi, H., and Miyabe, M., 1999. A Survey of ochratoxin A and aflatoxins in domestic and imported beers in Japan by immunoaffinity and liquid chromatography. *Journal of AOAC International* 82: 897-902.
- 19) Visconti, A., Pascale, M. and Centonze, G., 1999. Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 864: 89-101.
- 20) Entwisle, A. C., Williams, A. C., Mann, P. J., Slack, P. T. and Gilbert, J., 2000. Liquid chromatographic method with immunoaffinity column cleanup for determination of ochratoxin A in barley: collaborative study. *Journal of AOAC International* 83: 1377-1383.
- 21) Entwisle, A. C., Williams, A. C., Mann, P. J., Russell, J. and Slack, P. T. 2001. Combined Phenyl Silane and Immunoaffinity Column Cleanup with Liquid Chromatography for Determination of Ochratoxin A in Roasted Coffee: Collaborative Study. *Journal of AOAC International* 84: 444-450.
- 22) Gilbert, J. and Anklam, E., 2002. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 21: 468-486.
- 23) Trucksess, M., Weaver, C., Oles, C., D'Ovidio, K. and Rader, J., 2006. Determination of aflatoxins and ochratoxin A in ginseng and other botanical roots by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of AOAC International* 89: 624-630.
- 24) Mngadi, T., Govinden, R. and Odhav, B., 2008. Co-occurring mycotoxins in animal feeds. *African Journal of Biotechnology* 7: 2239-2243.
- 25) Aoyama, K., Nakajima, M., Tabata, S., Ishikuro, E., Tanaka, T., Norizuki, H., Itoh, Y., Fujita, K., Kai, S., Tsutsumi, T., Takahashi, M., Tanaka, H., Iizuka, S., Ogiso, M., Maeda, M., Yamaguchi, S., Sugiyama, K., Sugita-Konishi, Y., and Kumagai, S., 2010. Four-year Surveillance for Ochratoxin A and Fumonisin in Retail Foods in Japan. *Journal of Food Protection*, 73: 344-352.
- 26) Uchigashima, M., Yamaguchi (Murakami), Y., Narita, H., Nakajima, M. and Miyake, S., 2012. Development of an immuno-affinity column for ochratoxin analysis using an organic solvent-tolerant monoclonal antibody. *Methods* 56: 180-185.
- 27) 愛玩動物用飼料等の検査法（平成 21 年 9 月 1 日付け 21 消技第 1764 号独立行政法人農林水産消費安全技術センター理事長通知）

- 28) Codex Alimentarius Commission, 2009. Guidelines on analytical terminology: 7 (CAC/GL 72-2009) . Codex, Rome, Italy
- 29) AOAC International, 2012. Official Methods of Analysis, interlaboratory collaborative study, Appendix D Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis: 5.2 Outliers, AOAC International, 19th Ed., AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
- 30) Thompson, M., 2000. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing, *Analyst* 125: 385-386.
- 31) Lattanzio, V., Solfrizzo, M., Powers, S. and Visconti, A., 2007. Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A and Fusarium toxins in maize by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after multitoxin immunoaffinity cleanup. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21: 3253-3261.
- 32) T. Wada, H. Saito, K. Aoyama, S. Saito, M. Shibukawa, Development and inter-laboratory study of a method for quantifying ochratoxin A in pet foods, *World Mycotoxin Journal*: 2016, 0(0) - Pages: 1 – 10,
DOI: <http://dx.doi.org/10.3920/WMJ2015.1953>, Published Online: June 13, 2016

第三章 塩素付加-液体クロマトグラフィー質量分析法を用いた食品中の糖類の一斉分析法 開発

3.1 緒言

3.1.1 糖類とは

単糖あるいは単糖の重合体は炭水化物に含まれ、組成式は $C_m (H_2O)_n$ で表される。炭水化物を化学的特徴である重合度によって分類すると、糖類（重合度が 1 又は 2）、少糖類（重合度 3~9）、多糖類（重合度 10 以上）に分類される^{1,2}。すなわち、糖類とは単糖及び二糖を指す。少糖類はマルトオリゴ糖（ α -グルカン）及びオリゴ糖に分類される。多糖類はでんぷんと非でんぷん性多糖類に分類され、前者にはアミロースやアミロペクチンが含まれ、後者にはセルロース、ヘミセルロース、ペクチン等が含まれる。食物繊維は、一般的には非でんぷん性多糖類に含まれる。また、多糖類は生理学的には、ヒトの消化酵素で消化可能な易消化性炭水化物及び消化不可能な難消化性炭水化物に分類される（図 3.1）。

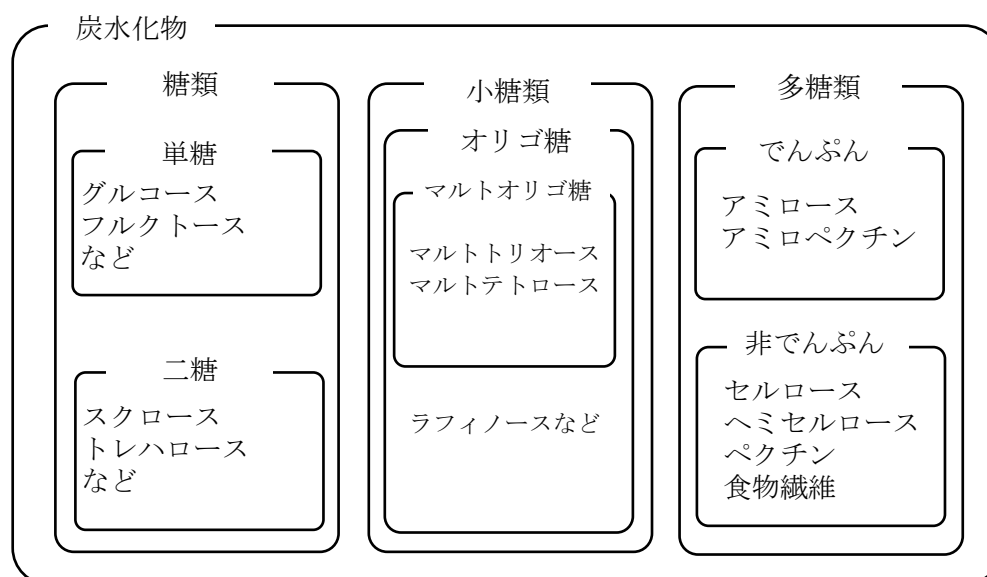


図 3.1 糖の分類

我が国の食品表示基準（内閣府令第 10 号）³においても、糖類とは「単糖類又は二糖類であって、糖アルコールでないものに限る」と定義されている。また、糖質は炭水化物のうち食物繊維を除くものと定義されている。したがって、「糖類ゼロ」と表示されていても甘味料として糖アルコールが含まれている場合があるが、「糖質ゼロ」と表示されていれば糖アルコールも含まれていないことになる。

単糖は炭化水素にカルボニル基及び複数の水酸基が結合した構造を有する。この条件を満たす最小単位は三炭糖（トリオース）のグリセルアルデヒド及びジヒドロキシアセトンであ

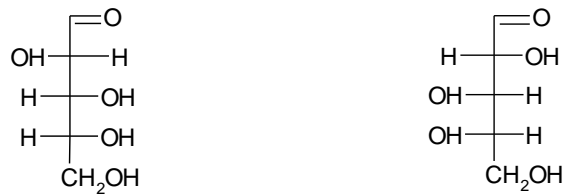
る。カルボニル基が末端（1位）の炭素にカルボニル基（アルデヒド基）が結合している場合はアルドース、2位の炭素にカルボニル基が結合している場合はケトースと呼ばれる。四炭糖（テトロース）のアルドースには2位の炭素に結合した水酸基の向きが異なるエリトロース及びトレオースの2種類が、ケトースはエリトルロースがある。1位の炭素から数えて最末端から1つ手前の不斉炭素に結合した水酸基の向きの違いによって、D体及びL体の光学異性体が生じる。L-アラビノース等の一部の例外を除き、生物によって生合成される糖はほとんどがD体である。炭素鎖が1つ増えるごとに水酸基の向きの組み合わせが異なる2種類の糖が派生する。したがって五炭糖（ペントース）では6種類、六単糖（ヘキソース）には12種類があり（図3.2）、各々にD体とL体が存在する（図3.3）。自然界に存在する主な糖はD-グルコース、D-リボース、D-マンノース、D-ガラクトース、D-フルクトース、D-キシロース及びL-アラビノースであり、これら以外は比較的存在量が少ない。D-プシコース、D-アロース及びD-タガトースなどは希少糖と呼ばれ、その生理活性及び合成方法について研究が進められている⁴。

五炭糖及び六炭糖は水中で環状構造を形成する（図3.4）。五員環及び六員環が存在し、平衡状態にあり、前者はフラノース、後者をピラノースという。直鎖構造の際に存在したカルボニル基は環状構造となった際に水酸基となるが、これをアノマー性水酸基といい、反応性が高いことから他の糖などとの結合に寄与する。アノマー性水酸基の向きによって α 体及び β 体（アノマー）が生じ、これらは平衡状態にある（図3.5）。また、この平衡は温度及びpHに依存することが知られている。

二糖は二つの単糖がグリコシド結合により結合したものである。主に結合に寄与するのは1位のアノマー性水酸基で、このアノマー性水酸基が α 体であるか β 体であるか、結合先が1位、2位、3位、4位又は6位のいずれであるかによって、糖の種類が異なる。代表的な二糖類を図3.6に示す。スクロース（ショ糖）はグルコース及びフルクトースが α -1,2-グリコシド結合した糖である。トレハロースは二つの α -グルコースが互いに1位の部分で結合した糖である。 α -グルコースが1位と4位の部分で結合した糖がマルトース（麦芽糖）である。 β -ガラクトースがグルコースの4位の部分と結合した糖がラクトースである。

糖のカルボニル基が水酸基に還元されたものが糖アルコールである。糖アルコールは両末端が同じであり、不斉炭素が少ないため、糖よりも異性体は少ない。シクロアルカンに水酸基が結合した *myo*-イノシトール等のシクリトール類も糖アルコールに含まれる（図3.7）。糖アルコールはある種の微生物によって産生されることが知られている⁵。糖アルコールの甘味の程度はショ糖よりも若干低いものが多いが、体内において消化吸収されにくいことから低カロリー甘味料として近年多用されている。

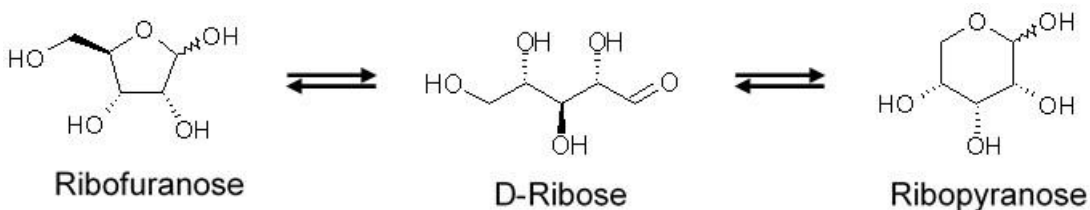
更に、糖の水酸基が一つ還元されたデオキシリボース、フコース及びラムノース等のデオキシ糖も天然に存在し、食品に含まれる可能性がある。このように、糖は炭素鎖と水酸基によって構成される単純な構造でありながら、多くの異性体が存在し、1つの糖であっても複数の形態があることが、検出及び分離の両面において分析を困難にしている。



D-Arabinose

L-Arabinose

図 3.3 D-アラビノース及び L-アラビノースの化学構造 (フィッシャー投影式)

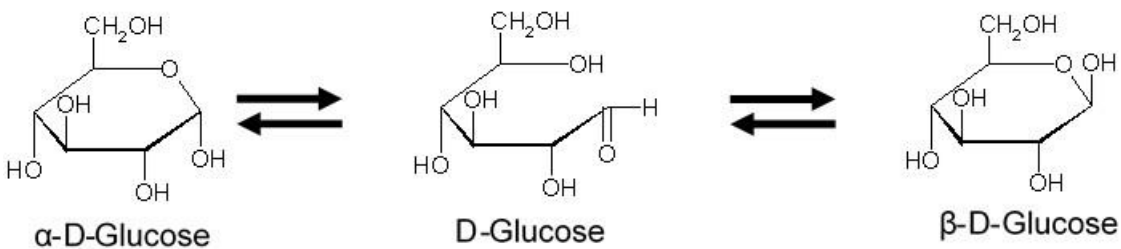


Ribofuranose

D-Ribose

Ribopyranose

図 3.4 D-リボースのフラノース構造及びピラノース構造

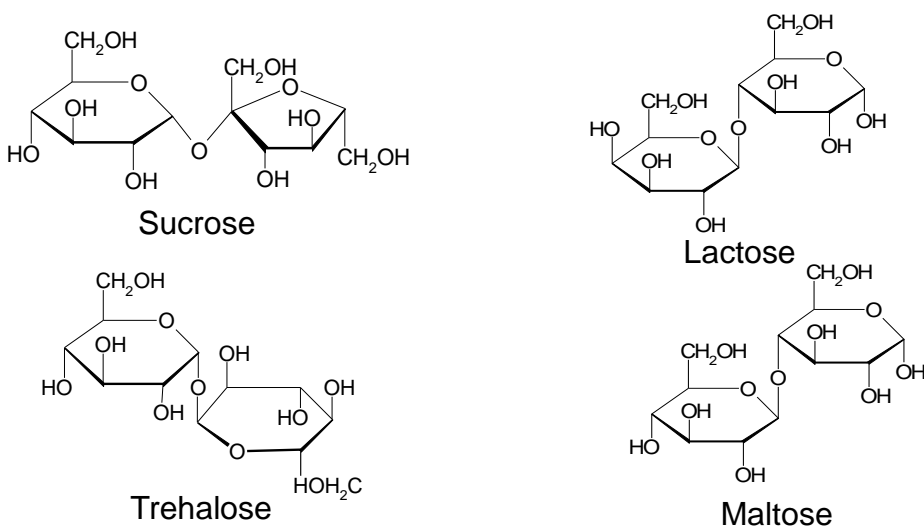


α -D-Glucose

D-Glucose

β -D-Glucose

図 3.5 D-グルコースのアノマー形成



Sucrose

Lactose

Trehalose

Maltose

図 3.6 代表的な二糖類

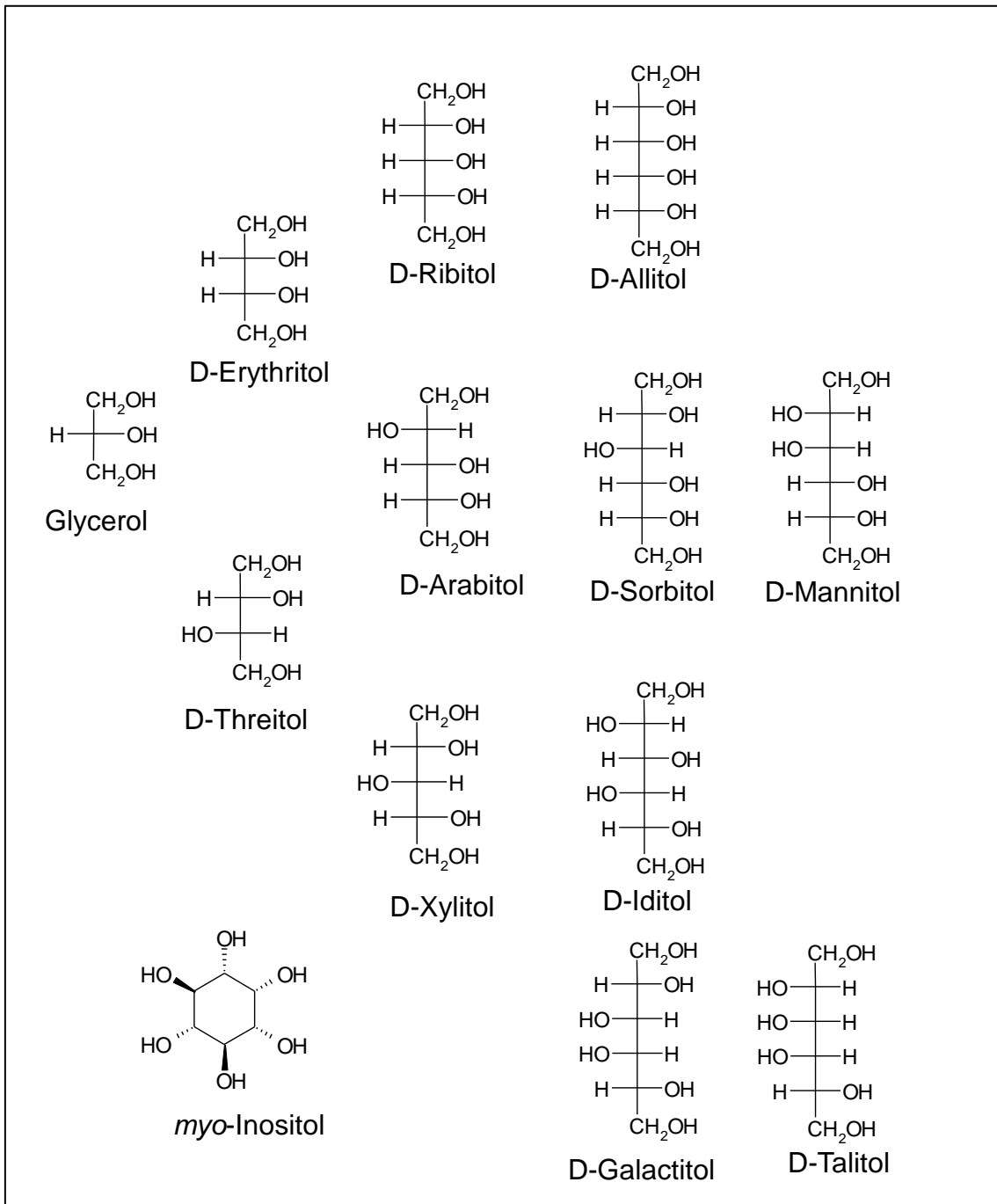


図 3.7 糖アルコールの化学構造式

3.1.2 糖類及び糖アルコールの生理活性及び健康影響

糖は動物にとって必要不可欠な栄養素である。先述した D-グルコース、D-リボース、D-マンノース、D-ガラクトース、D-フルクトース、D-キシロース及び L-アラビノースといった天然に一般的に存在する糖は摂取後代謝され、エネルギーとして利用される。二糖もまた、体内で加水分解されて単糖となり、エネルギー源となる。しかしながら、過剰摂取は

肥満の原因ともなるため、近年では低糖食が好まれる傾向がある。また、糖尿病患者においては血中の糖代謝が不十分となり、高血糖状態から様々な健康影響が生じるため、糖の摂取は細心の注意を払う必要がある。また、体質によって特定の糖が健康影響を引き起こすことがある。ガラクトースをグルコースに変換する酵素の遺伝性欠損症によって引き起こされるガラクトース血症は肝不全、腎不全、認知障害、白内障などを引き起こす⁶。

また、スクロースなどの糖は、口内の菌によって酸に代謝され、う歯の原因となると考えられている⁷。一方糖アルコールであるキシリトールは糖によるう歯のリスクを低減する効果があるとして、ガム等に添加されている。また、糖アルコールは消化及び吸収されにくいため、血糖値の上昇に寄与せず、ほとんどエネルギーとならないことから、低カロリーな代替甘味料として広く食品に用いられている。しかしながら、一定の量を超えて摂取した場合、糖アルコールは一過性ではあるが緩下性を示す⁸。希少糖も同様に代謝されにくく、低カロリーであるが、その他にも特徴的な生理活性を有することから近年注目されている。D-プシコースは α グルコシダーゼ活性阻害及びグルコキナーゼの活性化を促進し血糖上昇抑制効果を示す。また、肝臓における脂肪合成酵素の活性を阻害することで内臓脂肪の蓄積を抑制する。D-アロースは血圧上昇抑制及びがん細胞の増殖を抑制する効果が報告されている⁴。また、D-タガトースはHDLコレステロールの上昇を促進し、食後の血糖値上昇を抑制する効果がある⁴。このように糖アルコール及び希少糖は様々な効果が期待されていることから、今日これらが添加された食品が数多く上市されている。

このような背景から、食品中のD-グルコースなどの一般的な糖のみならず、多様な希少糖及び糖アルコールを同定し、定量する分析法が必要である。

3.1.3 糖類の分析法の現状と問題点

糖類及び糖アルコールの分析法としては、誘導体化処理した後にガスクロマトグラフ(GC)又はガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)で分析する方法、あるいは示差屈折率(RI)検出器、パルス式電気化学検出器(PAD)及び蒸発光散乱検出器(ELSD)といった非特異的な検出器を備えた高速液体クロマトグラフ(HPLC)を用いる方法が従来から用いられている。これらの分析法は前処理操作の利便性、選択性及び感度のいずれかにおいて難点があることから、食品中の糖の分析においては、しばしば複数の方法を併用する必要が生じる。

古典的な誘導体化-GC法としては、メチル誘導体化がある⁹。これは、メタノールを用いて糖の水酸基をメチルエステル化するものである。この方法の問題点は誘導体化反応に長時間を要すること及びしばしば α や β 体のピラノシドやフラノシド、カルボニル型の直鎖の誘導体が生成し、クロマトグラム上に複数のピークを与えることである。更に α 及び β 体のセプタノシドのピークも観察されることがある。また、メチル誘導体化が不十分な場合は、複数の水酸基のうち、部分的メチル化されたものが生じる可能性がある。

1つの糖から複数の誘導体が生じない方法としては、糖をホウ酸ナトリウムを用いて糖

アルコールに還元した後、アセチル化する方法がある^{10, 11, 12}。しかしながら、この方法では試料中に糖と糖アルコールが混在している場合は、これらを識別することができない。

糖をガスクロマトグラフィーで分析するための誘導体化として最も広く普及している方法はトリメチルシリル (TMS) 誘導体化である。Sweeley らはピリジン中で D-グルコースとヘキサメチルジシラザン (HMDS) 及びトリメチルクロロシラン (TMCS) を反応させ、速やかに TMS 誘導体化を行う方法を確立した¹³。先述したとおり、糖はフラノース及びピラノース並びに α 体及び β 体のアノマーといった複数の形態をとるため、単純に TMS 誘導体化した場合、複数のピークが生じて解析が困難である。そこで、あらかじめアミンを用いて糖のカルボニル基をオキシム化することで、単一の誘導体を得る方法が Sweeley らによって検討された¹³。この方法はその後 Mason らによって改良されたが、一部の糖は複数のピークとして検出されている¹⁴。オキシム化に用いるアミンとしては当初ヒドロキシルアミンが用いられていたが¹⁵、その後、メトキシアミンも用いられるようになった。また、誘導体化試薬は、より反応性に富む *N,O*-ビス (トリメチルシリル) アセトアミド (BSA) 及び *N,O*-ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセトアミド (BSTFA) を用いる方法が検討されている¹⁶。しかし、いずれの誘導体化試薬を用いた場合においても、TMS 誘導体化は反応の際に水分が悪影響を及ぼすため、脱水操作を長時間かけて行う必要がある。また、TMS 基はメチル基よりも嵩高いため、立体障害により特にヘキソースの場合、条件によって 3 位及び 4 位の水酸基が誘導体化されないことがある¹³。吉田らはメトキシアミンを用いて糖をオキシム化した後、*N*-メチル-*N'* (トリメチルシリル) トリフルオロアセトアミド (MSTFA) を用いて TMS 誘導体化し GC-MS で糖以外の血中代謝物と同時に測定する方法を報告している¹⁷。この方法はキャピラリーカラムを用いることで、より高い分離能が得られ、質量分析計により選択的に分析できるというメリットがあるが、試料中の水分を除去するために長時間の凍結乾燥と 2 段階の誘導体化を行うため、前処理操作が煩雑である。

ジメチルホルムアミド溶媒中で糖及び糖アルコールをトリフルオロ酢酸無水物と室温下において短時間で反応させ、トリフルオロ酢酸 (TFA) 誘導体とし、GC で分析する方法を報告している¹⁸。この方法は反応性が高く、TFA 誘導体とすることで電子捕獲型検出器 (ECD) で高感度に検出可能であるという利点を有するが、TFA 基が加水分解を受けやすいという難点がある。

煩雑な誘導体化操作を必要としない糖類の分析法として、種々の HPLC を用いる方法が検討されている。糖はその化学構造において二重結合等を有さず、200 nm 以上の領域で吸収を示さないことから、誘導体化されていない糖に対して HPLC の最も一般的な検出器である紫外可視分光光度計を検出器として用いることができない。安井らは、水で溶解または希釈した乳製品試料に 80% エタノールを加えて遠心分離し、その上清を試料液とするという単純な前処理法で、アミノ基結合シリカゲルカラム及び RI 検出器を用いた HPLC により、フラクトース、グルコース、スクロース及びラクトースを 10 分間以内で

分析している¹⁹。しかしながら、この方法はフルクトースとグルコースの分離が不十分である上、カラムの耐久性が低く、繰り返し測定によって分離が更に悪化する。今日においても RI 検出器は糖の検出に用いられる²⁰⁻²³。しかしながら、RI 検出器はベースラインの変動を伴うため、原理的にグラジエント溶離に対応できないという欠点がある。また、RI 検出器が非特異的で感度も低いことから、その他の微量な糖が含まれている場合には検出できないといった問題がある。

感度の面で RI よりも有利な検出器としては蒸発光散乱検出器 (ELSD) がある²⁴。ELSD は移動相を噴霧して溶媒を蒸発させ、微粒子化した不揮発性の分析対象物質に光を照射して散乱光の強度を測定する検出器で、糖の分析においても利用される²⁵⁻²⁷。

パルス式電気化学検出器 (PAD 又は ECD) は電極表面で生じる分析対象物質の酸化還元反応を利用して検出する装置で、一般的な分析においては UV 検出器よりも 10 倍から 100 倍程度高感度であるといわれている。また、分析対象物質に応じて電極を変更することで、ある程度の選択性を有する。PAD は移動相の制約が少なく、グラジエント溶離にも対応可能である。PAD を検出器として用いた方法では、いずれも高感度に糖を検出することが可能である²⁸⁻³²。

荷電化粒子検出器 (CAD: Charged Aerosol Detector) もまた糖の分析に適用可能な検出器である。CAD は移動相を噴霧した後溶媒を除去して不揮発性の分析対象物質を微粒子化する点においては ELSD に類似するが、CAD では高電圧の白金電極で荷電化した窒素分子を分析対象物質と衝突させることで電荷を移行させ、コレクターで電流量を測定するという点が異なる^{33,34}。微粒子の大きさは注入された不揮発性分析種の重量に比例するため、CAD では分析種の分子構造や物性に依存しない応答性が得られるという特徴がある。Yan らは CAD を用いた HPLC による植物由来のオリゴ糖及び多糖における中性単糖組成の分析法を開発した³⁵。この方法では pH10.8 に調整した 23 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及びアセトニトリルの混液 (12 : 88,v/v) を移動相とし、アミドカラムでグルコース、ガラクトース、アラビノース、ラムノース、マンノース、キシロース、フコース及びフルクトースの計 8 種類の単糖を分離している。しかしながら、CAD が非特異的検出器であるため、これら以外の五炭糖及び六炭糖及び妨害物質が試料溶液に含まれている場合には分離することが困難であり、多様な種類の試料に適用できない。

高感度かつ選択性の高い分析機器として、LC/MS はエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) と共に今日広く普及しており、糖の分析においてもその適用が試みられている。Hammad らは糖タンパクを酸で加水分解して得られた中性単糖を ESI を用いた液体クロマトグラフタンデム質量分析計 (LC-MS/MS) で分析し、組成解析を行っている³⁶。移動相に含まれる酢酸によって生じた酢酸付加イオン ($[M+CH_3COO]^-$) をプリカーサーイオンとし、衝突誘起解離 (CID) で得られた脱プロトン化分子 ($[M-H]^-$) をプロダクトイオンとして検出することで、高感度な分析を可能としている。しかしながら、キシロース、ガラクトース、マンノース及びグルコースはアノマー形成を防ぐ目的で、あらかじめホウ酸アンモニ

ウムによって糖アルコールに還元されているため、この方法を糖と糖アルコールが混在する試料の分析に適用することはできない。ESI で糖の脱プロトン化分子 ($[M-H]^-$) をプリカーサーイオンとして検出した例として Lowenthal の報告³⁷もあるが、比較的高性能な装置を用いている上、定性分析が目的のため検出可能な糖の濃度が明らかにされていない。進藤らは 1 mg/mL という高濃度でキシリトール、ソルビトール及びマンニトールを注入し ESI のポジティブモード及びネガティブモードでこれらのマススペクトルを得ている³⁸。ポジティブモードではいずれの糖アルコールについてもプロトン化分子 ($[M+H]^+$) は検出されず、ナトリウム付加イオン ($[M+Na]^+$) が検出されていることから、糖アルコールのプロトン親和性が極めて低いことが示されている。一方ネガティブモードでは脱プロトン化分子 ($[M-H]^-$) は検出されているものの、その感度は低く実用に耐えない。Matías らは ESI のポジティブモードでナトリウム付加イオン ($[M+Na]^+$) をモニターイオンとしてグルコース、フルクトース、スクロース及びケトースを検出しているが、移動相にナトリウムの供給源となる塩類は添加していない³⁹。ナトリウムは配位子交換カラムの対イオンから供給されていると考えられるが、揮発性の塩を形成するため、質量分析計への導入は好ましくない。Ghfara らはグルコース、スクロース、フルクトース、ケトース及びニストースをアセトニトリル及び 0.1%アンモニア溶液を移動相としてアミドカラムで分離し、これらの ESI ネガティブモードでイオン化して脱プロトン分子を検出するという分析法を果実中の糖類の分析に適用した⁴⁰。しかし、この方法は LC-MS/MS を用いながら、選択反応モニタリング (SRM) ではなく、選択イオンモニタリング (SIM) で検出しており、検量線の直線性が 1~50 $\mu\text{g/mL}$ であることから、イオン化効率が低いことが推察される。このように糖及び糖アルコールを直接 ESI でイオン化することは困難であるため、誘導体化して LC-MS で分析する方法も報告されている。Wu らは 1-フェニル-3-メチル-5-ピラロゾン (PMP) により糖類をプレカラム誘導体化し、ESI のネガティブモードで検出している⁴¹。この分析法は逆相分配モードの ODS カラムを使用できるという利点がある反面、誘導体化の操作が煩雑であり、LC-MS を用いるメリットがない。

大気圧化学イオン化法 (APCI) もまた LC/MS のイオン化法として普及しており、糖類への適用が試みられている。高井らは移動相にアセトニトリル及び水の混液 (60:40)、カラムに逆相用のものを用いてグルコース、フルクトース、ソルボース、ガラクトース及びラクトースを APCI のネガティブモードで測定し、マススペクトルを得ている⁴²。いずれの糖も脱プロトン化分子 ($[M-H]^-$) が検出されているが、測定時の濃度が不明であり、帰属が不明のノイズと思われるピークも多数検出されていることから、イオン化効率は低い状態であったと考えられる。これに対して Kato らはメタノール移動相中に 3~5%のクロロホルムを加え、APCI ネガティブモードでスクロースの塩素付加イオン ($[M+Cl]^-$) を検出している⁴³。Ricochon らも移動相に 1%のクロロホルムを添加し、APCI ネガティブモードで 10 種類の糖を分析している⁴⁴。

上記のように、HPLC で分析する場合は保持時間のみで分析対象物質を同定するが、検出器が非特異的であるため共雑物質の妨害が問題となり、感度の面でも実用的とは言えない。さらに、糖類分析用のカラムにはアミノプロピル基、2 級又は 3 級アルキルアミノ基、アミド基、トリアコンチル基 (C30) などを化学修飾した充填剤が用いられるが、いずれのカラムも単糖類と糖アルコールを十分に分離するに至っていない。このような状況から液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS) の適用が望まれるが、特に糖アルコールは一般的なイオン化法である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) ではイオン化効率が低いため、十分な感度が得られないという問題がある。

3.1.4 糖類の分析法開発における戦略

本研究は食品中の糖類及び糖アルコールを複雑な前処理を必要とせず、同時に分析する方法を確立することを目的とした。移動相に添加したクロロホルムを塩素供給源として糖が塩素付加体として APCI ネガティブモードでイオン化され、質量分析計で高感度に検出可能であることから、本研究ではこのイオン化法を糖アルコールに適用し、クロマトグラフィーによる分離が困難な糖及び糖アルコールを同時に分析することを試みた。既報では移動相にクロロホルムを添加しているが、本研究ではよりイオン化効率のよい塩素供与物質を検討することとした。また、クロロホルム等の有機塩素化合物は極性溶媒及び水への親和性が低いことから、ポストカラムで導入する方法を検討した。

更に、塩素付加イオン化法を液体クロマトグラフタンデム質量分析計 (LC-MS/MS) に適用するため、単糖及び糖アルコールについて複数のコリジョンエネルギーでプロダクトイオンスキャン分析を行い、モニターイオンの選択を行い、ポストカラム反応の最適化を行った。最適化のための塩素供与物質としてはジクロロメタンを用い、次に代替物質としてクロロアセトニトリルについて検討した。

1) マススペクトルの測定及びモニターイオンの選択

分析対象物質のモニターイオンを選定するため、代表的な糖及び糖アルコールとしてトレイトール、キシロース、ソルボース、キシリトール、マンニトール及びスクロースについて、LC-MS を用いて APCI ネガティブモードでスキャン分析を行い、マススペクトルを測定した。イオン化はジクロロメタンを塩素供与物質とした塩素付加イオン化法とした。

2) 分離条件の検討

本研究では異なる 2 種類のカラムを用いて糖類及び糖アルコールを分離した。一つはコンベンショナルな順相カラムであるアミノプロピル基結合シリカゲルを充填剤とするカラム(以下アミノカラムと略す)、もう一つは親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC: Hydrophilic Interaction Chromatography)モードのエチレン架橋型ハイブリッド(BEH)粒子⁴⁵にアミド基を化学修飾したカラム(以下アミドカラムと略す)である。アミノカラ

ムは糖の分析において古くから用いられてきた実績がある。塩基性の官能基を化学修飾しているため、糖のアノマー形成が起こらず、1 物質に対して比較的シャープな単一のピークが得られるという利点がある。しかしながらアミノ基はアルデヒド基と反応してシッフ塩を形成するため、繰り返し測定を行うとカラムが劣化する可能性がある。一方アミドカラムはシッフ塩を形成しないが、糖のアノマーが生じるため、ピークを 1 本にするためには移動相を塩基性とするか、カラム温度を高温にする必要がある。これらのカラムを用いて糖類及び糖アルコールを一斉分析するため、イソクラチック溶離及びグラジェント溶離条件を検討した。

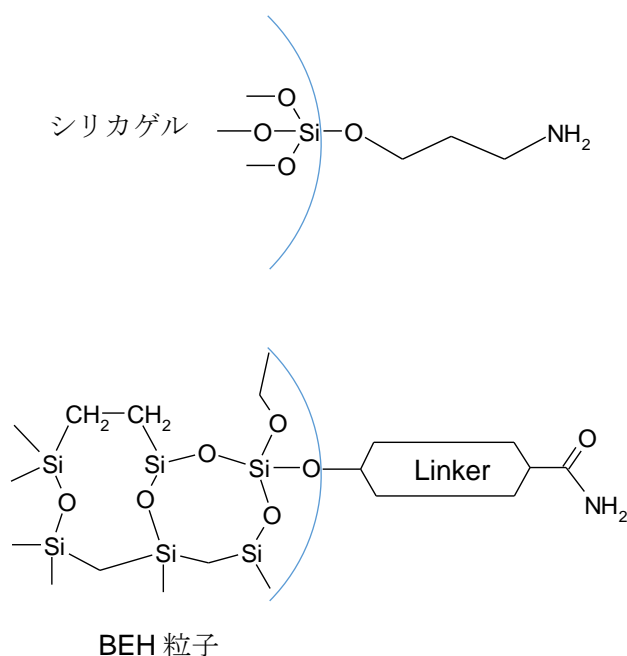


図 3.1 アミノカラム（上）及びアミドカラム（下）の固定相表面における化学修飾

3) LC-MS/MS への適用検討

塩素付加-APCI 法による糖の検出を更に選択的に行うため、LC-MS/MS 法への適用を試みた。糖類及び糖アルコールについて複数のコリジョンエネルギーでプロダクトイオンスキャン分析を行い、モニターイオンの選択を行った。

4) 塩素供与物質の検討

本研究において塩素供与物質として検討に用いたジクロロメタンは国際がん研究機関 (IARC: International Agency for Research on Cancer) によってグループ 2A 「Probably Carcinogenic (ヒトに対する発癌性がおそらくある)」に分類されている⁴⁶。また、クロロホルムは同機関によってグループ 2B (Possibly Carcinogenic, ヒトに対する発癌性が疑われる)に分類されている⁴⁷。これらの化学物質はわが国においては労働安全衛生法施行令及び特定化学物質障害予防規則によって、発がんのおそれがある有機溶剤に指定され、その使用が厳しく規制されている。このため、検査等の目的で分析する際にも、これらの有機塩素系溶媒の使用は最小限とすべきである。そこで本研究では IARC によってグループ 3 (Not Classifiable as to its Carcinogenic, ヒトに対する発癌性が分類できない)に含まれているクロロアセトニトリル (C_2H_2ClN , CAS No. 107-14-2)⁴⁸を塩素供与物質として適用することを検討した。

3.1.5 分析対象物質

本研究では 3.1.1 項に示した単糖、二糖及び糖アルコールのうち、試薬として入手可能な 29 物質を分析対象物質とした。なお、単糖はペントース及びヘキソースを、二糖は二つのヘキソースがグリコシド結合したもの、糖アルコールは炭素数が 4~6 までとした。表 3-1 に分析対象物質を示す。

表 3.1 分析対象物質とした単糖, 二糖及び糖アルコール

分析対象物質	分子式	分子量	CAS No.	分類
Erythritol	C ₄ H ₁₀ O ₄	122.12	149-32-6	糖アルコール
Threitol	C ₄ H ₁₀ O ₄	122.12	2418-52-2	糖アルコール
D-Ribulose	C ₅ H ₁₀ O ₅	150.13	488-84-6	ケトース
D-Xylulose	C ₅ H ₁₀ O ₅	150.13	551-84-8	ケトース
D-Ribose	C ₅ H ₁₀ O ₅	150.13	50-69-1	アルドース
D-Lyxsose	C ₅ H ₁₀ O ₅	150.13	1114-34-7	アルドース
D-Xylose	C ₅ H ₁₀ O ₅	150.13	58-86-6	アルドース
D-Arabinose	C ₅ H ₁₀ O ₅	150.13	10323-20-3	アルドース
Ribitol	C ₅ H ₁₂ O ₅	152.15	488-81-3	糖アルコール
Xylitol	C ₅ H ₁₂ O ₅	152.15	87-99-0	糖アルコール
Arabitol	C ₅ H ₁₂ O ₅	152.15	488-82-4	糖アルコール
D-Psicose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.16	551-68-8	ケトース
D-Talose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.16	2595-98-4	アルドース
D-Tagatose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.16	87-81-0	ケトース
D-Fructose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.16	200-333-3	ケトース
D-Allose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.16	2595-97-3	アルドース
D-Sorbose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.16	3615-56-3	ケトース
D-Mannose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.16	3458-28-4	アルドース
L-Gulose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.16	6027-89-0	アルドース
D-Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.16	50-99-7	アルドース
D-Galactose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.16	59-23-4	アルドース
<i>Myo</i> -Inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.16	87-89-8	シクリトール
Sorbitol	C ₆ H ₁₄ O ₆	182.17	6706-59-8	糖アルコール
Mannitol	C ₆ H ₁₄ O ₆	182.17	200-711-8	糖アルコール
Galactitol	C ₆ H ₁₄ O ₆	182.17	608-66-2	糖アルコール
Sucrose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.30	57-50-1	二糖
Lactose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.30	5989-81-1	二糖
Maltose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.30	6363-53-7	二糖
Trehalose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.30	99-20-7	二糖

3.2 実験

3.2.1 試薬 及び試料

キシリトール, D (+) -グルコース, ラクトース 一水和物, アンモニア水 (特級), メタノール及び超純水 (LC/MS 用) は和光純薬工業 (大阪) から購入した. D (-) -リボース, *meso*-エリスリトール, D (+) -キシロース, D (-) -アラビノース, L (-) -ソルボース, (+) -マンノース, D (+) -ガラクトース, *myo*-イノシトール, D (-) -マンニトール, ズルシット (ガラクトール), マルトース一水和物, クロロホルム (PCB, 残留農薬分析用), ジクロロメタン (LC/MS 用) 及びアセトニトリル (LC/MS 用) は関東化学 (東京) の試薬を購入した. D (-) -リキソース, リビトール, D (+) -アラビトール, D-プシコース, D (+) -タロース, D (-) -フルクトース, D (+) -アロース, L-グロース, D-ソルビトール, D (+) -トレハロース及びクロロアセトニトリルは東京化成工業 (東京) の試薬を購入した. D-トレイトール, D-リブロース, D-キシルロース 及び D-タガトースはシグマアルドリッチ (東京) の試薬を購入した. スクロースは昭和化学工業 (大阪) の試薬を購入した.

糖類及び糖アルコールの標準溶液は次の操作により調製した. 糖及び糖アルコールの試薬 10 mg を正確に量り取って各々 10 mL の全容フラスコに入れ, 水を加えて 10 分間超音波照射して溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えて定容とした (標準原液, 1000 µg/mL) . 検量線用及び検討用の標準溶液は標準原液を各々アセトニトリル及び水の混液 (95 : 5, v/v) で希釈して調製した. 各標準溶液は 5°C で保管し, 使用時は室温に戻し, 十分に攪拌してから用いた.

ジクロロメタン飽和水溶液は分液ロート中で超純水 500 mL にジクロロメタン 50 mL を加えて 30 分間激しく振とうし, 一晩静置した後, 分離したジクロロメタン層を廃棄して水相を用いた.

菌類を原料とした健康食品は埼玉県内の小売店で購入した. 冬虫夏草抽出物は岡山大学より提供を受けた.

3.2.2 装置

本研究で用いた LC-MS システムは, 3 台の LC-10ADvp 型ポンプ, SIL-HTA 型オートサンプラー, CTO-10Avp 型カラムオーブン, DGU-14AM 型デガッサー, LCMS-2010A 及び LCMS-solution データシステム (いずれも島津製作所) により構成した (図 3.1) . 塩素供与物質を含むポストカラム試薬は, カラムオーブンと質量分析計の間に T 型コネクタを用いて導入した. ネブライザーガス用の窒素発生装置は SLP-07 型 (システムインスツルメンツ製), システムの制御及びデータ処理用のソフトウェアは LCMS-Solution (島津製作所) を用いた.

また, 本研究で用いた LC-MS/MS システムは, G1379 型デガッサー, G1312 型バイナリーポンプ, G1313A 型オートサンプラー及び G1316 型カラムヒーターにより構成された 1100 シリーズ HPLC システム (アジレント・テクノロジー製) 及び TSQ Quantum

Discovery (サーモ フィッシャー サイエンティフィック製) を組み合わせて用いた。ネブライザーガス用の窒素発生装置は SLP-07 型 (システムインストルメンツ製) , システムの制御及びデータ処理用のソフトウェアは Xcalibur (サーモ フィッシャー サイエンティフィック製) を用いた。

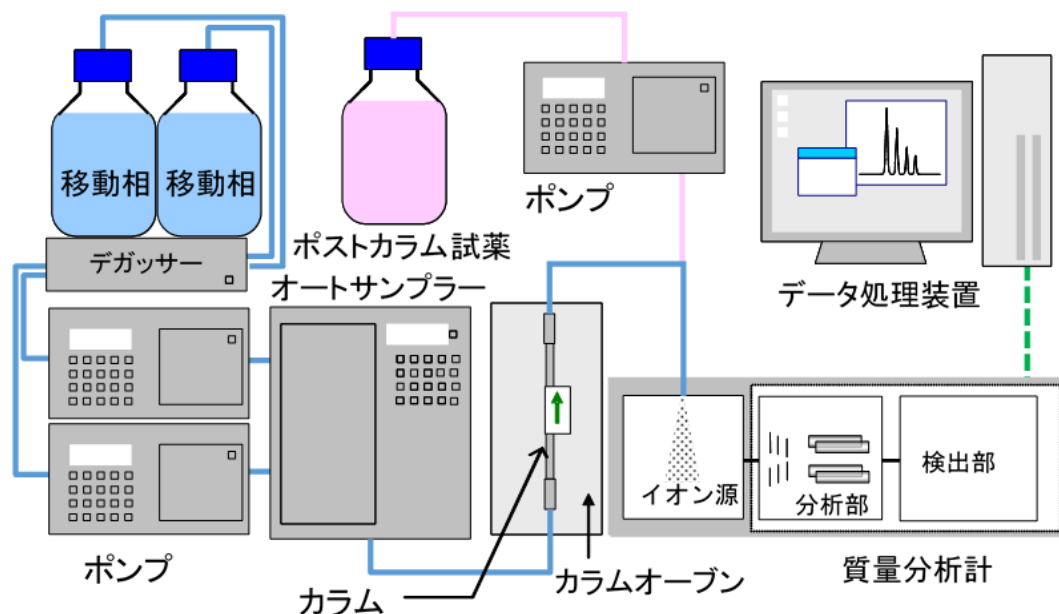


図 3.1 本研究で用いた LC-MS システムの概略図

3.2.3 操作手順

1) アミノカラムを用いた LC 分析条件

アミノカラムは TSKgel NH2-100 (粒径 3 μm , 内径 2.0 mm, 長さ 150 mm, 東ソー (東京)) を用いた。移動相は A 液を超純水, B 液をアセトニトリル及びジクロロメタンの混液 (95+5, v/v) とし, A:B (10:90, v/v) から 30 分間で A:B (50:50, v/v) に変化させるリニアグラジェント法を採用した。なお, 保持容量の大きいオリゴ糖の存在を想定し, A:B (50:50, v/v) の状態で 5 分間保持した。注入量は 10 μL , 流速は 0.3 mL/min, カラム温度は 40°C とした。

2) アミドカラムを用いた LC 分析条件

アミドカラムは XBridge BEH Amide (粒径 3.5 μm , 内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, ウォーターズ (米国)) を用いた。移動相は A 液を 0.1% アンモニア溶液, B 液を 0.1% アンモニアアセトニトリル溶液とし, A:B (5:95, v/v) から 30 分間で A:B (40:60, v/v) に変化させるリニアグラジェント法を採用した。注入量は 5 μL , 流速は 0.2 mL/min, カラ

ム温度は 40°Cとした。アセトニトリル及びジクロロメタンの混液 (90:10, v/v) をポストカラム試薬としてデッドボリュームの少ない T 型コネクタを用いて流速 0.1 mL/min で導入した。

3) 質量分析条件

質量分析の条件はアミノカラム及びアミドカラムで共通とした。APCI のネガティブモードで糖類及び糖アルコールの塩素付加イオン ($[M+Cl]^-$) をモニターイオンとして選択イオンモニタリング (SIM) で検出した。なお、糖アルコール及び二糖は脱プロトン化分子 ($[M-H]^-$) もモニターイオンとした。ネブライザーガスは窒素で流量を 2.5 mL/min に設定した。インターフェイス温度は 300°C, ヒートブロック及び CDL 温度は各々 200°C に設定した。各分析対象物質のモニターイオンを表 3.1 に示す。糖類及び糖アルコールの同定はアミノカラム及びアミドカラムで得られた保持時間及びモニターイオンの両方を用いた。

表 3.1 各分析対象物質のモニターイオン

分析対象物質	分子量	モニターイオン
Erythritol, Threitol	122.12	157, 159 ($[M+Cl]^-$), 121($[M-H]^-$)
D-Ribulose, D-Xylulose, D-Ribose D-Lyxsose, D-Xylose, D-Arabinose	150.13	185, 187 ($[M+Cl]^-$)
Ribitol, Xylitol, Arabitol	152.15	187, 189 ($[M+Cl]^-$), 151($[M-H]^-$)
D-Psicose, D-Talose, D-Tagatose D-Fructose, D-Allose, D-Sorbose D-Mannose, L-Gulose, D-Glucose D-Galactose, <i>myo</i> -Inositol	180.16	215, 217 ($[M+Cl]^-$)
Sorbitol, Mannitol, Galactitol	182.17	217, 219 ($[M+Cl]^-$), 181($[M-H]^-$)
Sucrose, Lactose, Maltose Trehalose	342.30	377, 379 ($[M+Cl]^-$), 341($[M-H]^-$)

4) 実試料の前処理法

冬虫夏草抽出物を試料とし、開発した糖及び糖アルコール分析法を適用した。試料 10 mL を 3,500 rpm で 10 分間遠心分離し、上澄み液をポリテトラフルオロエチレン (PTFE) 製のメンブランフィルター (0.45 μ m, 25 mm, ジーエルサイエンス) でろ過した。ろ液 5 mL をあらかじめメタノール 10 mL 及び超純水 10 mL でコンディショニングした C18 固相抽出カラム (Inertsep C18, 1g, 6cc, ジーエルサイエンス) に通し、流出液を回収した。固相抽出カラムを超純水 10 mL で洗浄し、流出液を回収して合わせ、ロータリーエバポレ

ータを用いて 45°Cで 5 mL まで減圧濃縮した。同様の操作を 3 回行い、10 mL 以上の試料溶液を得た。陰イオン交換固相抽出カラム Oasis WAX Plus Short (ウォーターズ) をメタノール及びギ酸の混液 (98:2, v/v) , メタノール及び超純水の順で各々 10 mL 通液してコンディショニングした。陽イオン交換固相抽出カラム Oasis WCX Plus Short (ウォーターズ) をメタノール及びアンモニア水の混液 (98:5, v/v) , メタノール及び超純水の順で各々 10 mL 通液してコンディショニングした。上段に陰イオン交換固相抽出カラム, 下段に陽イオン交換固相抽出カラムを連結し, C18 固相抽出カラムで処理した試料溶液を 1 セットにつき 10 mL 負荷し, 流出液を回収した。連結した固相抽出カラムを超純水 10 mL で洗浄し, 流出液を回収して合わせ, ロータリーエバポレータを用いて 45°Cで 10 mL まで減圧濃縮した。この液を LC-MS 分析に供した。

3.3 結果と考察

3.3.1 マススペクトルの測定及びモニターイオンの選択

分析対象物質のモニターイオンを選定するため, 代表的な糖及び糖アルコールとしてトレイトール, キシルロース, ソルボース, キシリトール, マンニトール及びスクロースについて, LC-MS を用いてスキャン分析を行い, マススペクトルを測定した。各々の分析対象物質の濃度は 20 µg/mL, 注入量は 10 µL とし, アミノカラムを装着した状態で移動相 (アセトニトリル及び水の混液 (50 : 50, v/v)) を 0.2 mL/min で送液し, ポストカラム試薬としてジクロロメタンの飽和水溶液を 0.2 mL/min で送液した。図 3.2~図 3.7 に各々のマススペクトルを示す。全ての分析対象物質について塩素付加イオン ($[M+Cl]^-$) の M+35 及び M+37 が検出された。これは, 原子量 35 及び 37 の塩素の同位体がほぼ 3 : 1 の割合で存在するためである。糖及び対応する糖アルコールの分子量の差は水素原子二つの 2 である。このため, キシルロースは分子量が 150 であるから m/z185 及び m/z187 のイオンが検出されるのに対して, 糖アルコールであるキシリトールは分子量が 152 であり, m/z187 及び m/z189 のイオンが検出される。したがって, この場合 m/z187 は各々に共通するイオンであるため, このイオンをモニターする限りにおいて, クロマトグラフィーによって分離されない場合は, キシルロースとキシリトールを識別することができない。しかしながら, m/z185 及び m/z189 をモニターした場合は, クロマトグラフィーによる分離が不十分であっても, 測定チャンネルが異なるため, 識別が可能となる。また, 糖アルコール及び二糖については低感度ではあるが, 脱プロトン化分子 ($[M-H]^-$) も検出された。これらの結果からジクロロメタンが塩素供与物質として有効であり, モニターイオンとしては $[M+Cl]^-$ 及び糖アルコール及び二糖については $[M-H]^-$ も利用可能であることが確認された。

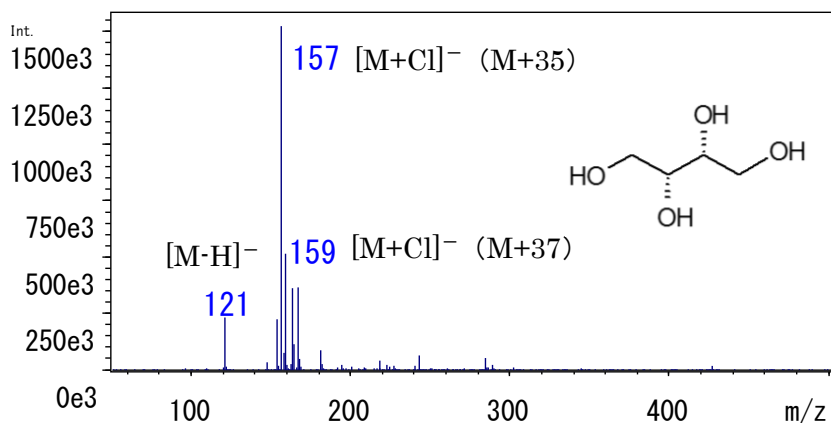


図 3.2 トレイトールのマススペクトル (APCI ネガティブモード)

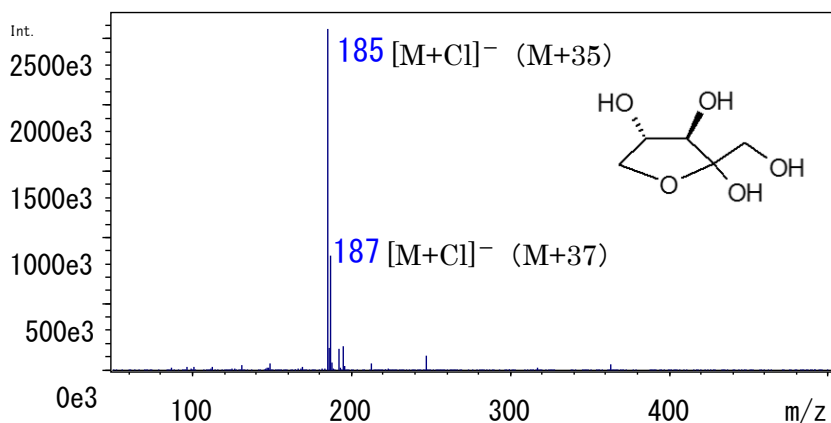


図 3.3 D-キシロロースのマススペクトル (APCI ネガティブモード)

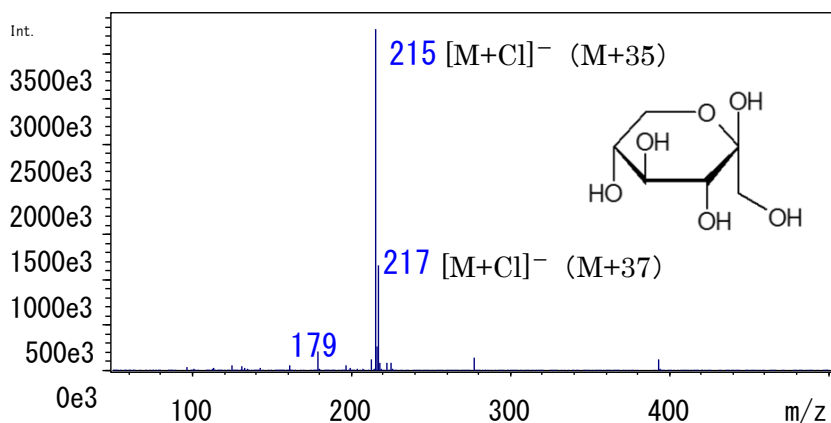


図 3.4 D-ソルボースのマススペクトル (APCI ネガティブモード)

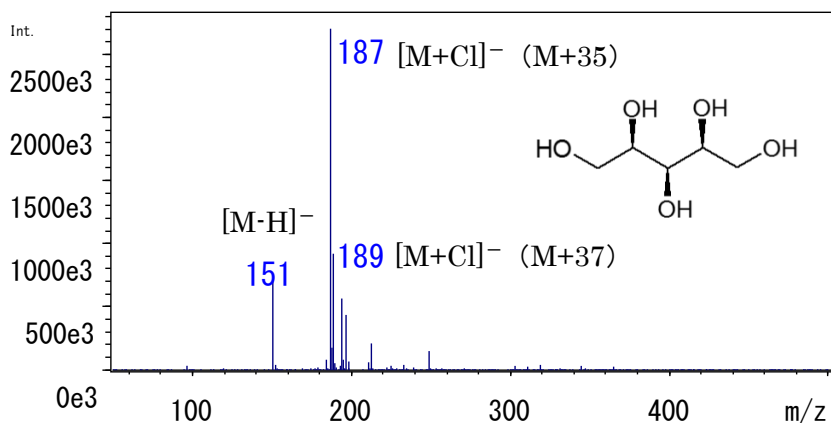


図 3.5 キシリトールのマススペクトル (APCI ネガティブモード)

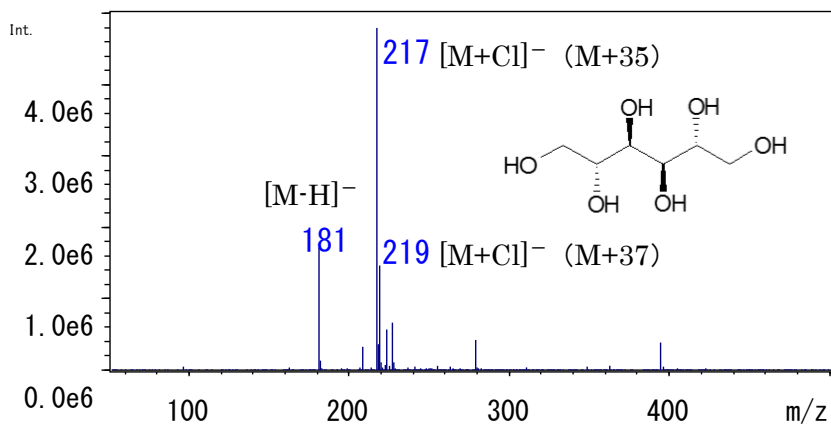


図 3.6 マンニトールのマススペクトル (APCI ネガティブモード)

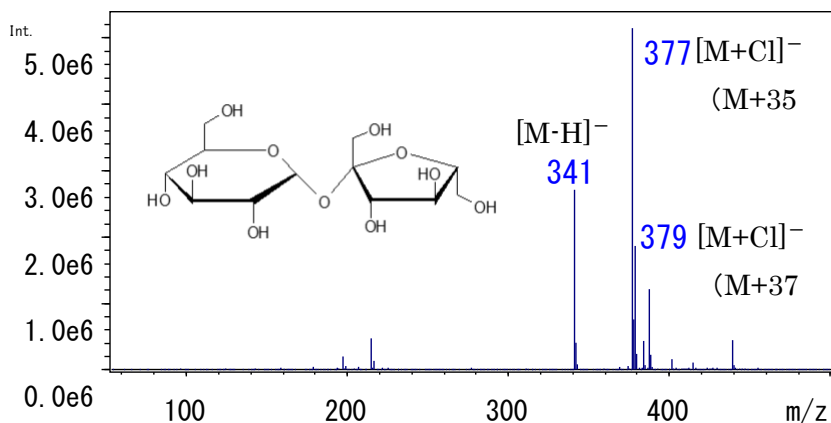


図 3.7 スクロースのマススペクトル (APCI ネガティブモード)

3.3.2 塩素供与物質の検討

前項の検討によってジクロロメタンが塩素付加イオン化における塩素供与物質として有効であることが確認された。一方、既報においては Kato ら及び Ricochon らはクロロホルムを塩素供与物質として用いている。そこで、ポストカラム試薬の種類及び濃度が感度に及ぼす影響について確認した。20 $\mu\text{g/mL}$ のマンニトール標準溶液をアミノカラムを装着した LC-MS に注入して SIM 測定を行い、クロマトグラムにおいて得られたピーク面積値を求めた。注入量は 2 μL とし、移動相はアセトニトリル及び水の混液 (75 : 25, v/v) のアイソクラチック (流速 0.2 mL/min), ポストカラム試薬はジクロロメタン又はクロロホルムの 1, 5, 10, 15 及び 20v/v% アセトニトリル溶液として 0.2 mL/min で送液した。図 3.8 に結果を示す。ジクロロメタン及びクロロホルムを比較したところ、いずれの濃度においてもピーク面積値が常に大きいことから、ジクロロメタンの方が糖を高感度に検出できることが確認された。ジクロロメタンを用いた場合、10 v/v% において極大を示すが、1~20 v/v% の範囲で感度に大きな影響はないため、有害性の観点から使用量を可能な限り少なくする必要があるのであるため、移動相との混合後の濃度としては 5 v/v% 程度が望ましいと考えられた。一方クロロホルムを用いた場合は、低濃度では測定値のばらつきが大きく、また、15 v/v% 以上では移動相と分離して測定が困難であった。これらの結果から塩素供与物質としてはジクロロメタンを用いることとした。

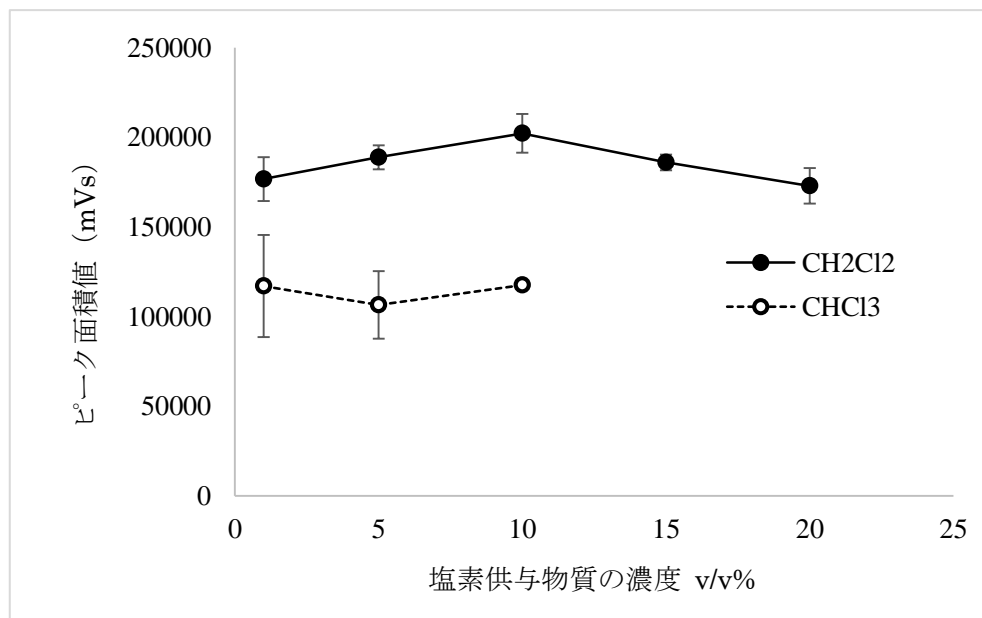


図 3.8 塩素供与物質濃度が感度に及ぼす影響 (マンニトール 20 $\mu\text{g/mL}$)

3.3.3 液体クロマトグラフィーによる分離条件の検討

1) アミノカラムを用いた糖類及び糖アルコールの分離

本研究では単糖、二糖及び糖アルコールを分析対象としているが、実際の食品にはオリ

ゴ糖のような様々な糖が含まれていることが想定される。オリゴ糖は多数の水酸基を有するため、順相系のカラムにおいては単糖よりも強く保持されると考えられる。そこで、菌類を原料とした市販の健康食品の粗抽出液をアミノカラムを用いた LC-MS で分析し、クロマトグラムの確認を行った。試料 0.5 g に 75%アセトニトリル 10 mL を加えて 20 分間超音波抽出し、得られた抽出液を 1500 rpm で 10 分間遠心分離して上澄み液を更にポリテトラフルオロエチレン (PTFE) 製のメンブランフィルター (0.45 μm , 25 mm, ジーエルサイエンス) でろ過した後、C18 固相抽出カラム (Inertsep C18, 1g, 6cc, ジーエルサイエンス) で精製し、得られた試料溶液 10 μL を LC-MS に注入した。移動相はアセトニトリル+水の混液 (75:25, v/v) でアイソクラチック、流速は 0.2 mL/min とした。ポストカラム試薬は飽和ジクロロメタン水溶液を 0.2 mL/min で送液した。なお、オリゴ糖(三糖)が含まれていることを想定し、 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ に相当する $m/z539$ 及び $m/z541$ もモニターイオンとした。得られたクロマトグラムを図 3.9 に示す。各糖に設定した複数のモニターイオンで同一の保持時間にピークが認められることから、この試料には糖アルコール (C5 及び C6)、ヘキソース、二糖類及びオリゴ糖 (三糖) が含まれていることが示唆された。この条件では三糖が含まれていても 30 分未済で溶離されるが、移動相中の水の割合が高いため、保持容量の小さい糖アルコール及びヘキソースは保持及び分離が不十分であった。また、二糖類はピーク形状がブロードであった。これはイソクラチック溶離であることに加え、ポストカラム試薬を移動相と合流させていることに起因するものと考えられた。これらの不具合を改善するため、グラジエント溶離及びジクロロメタンを移動相に添加することを検討した。

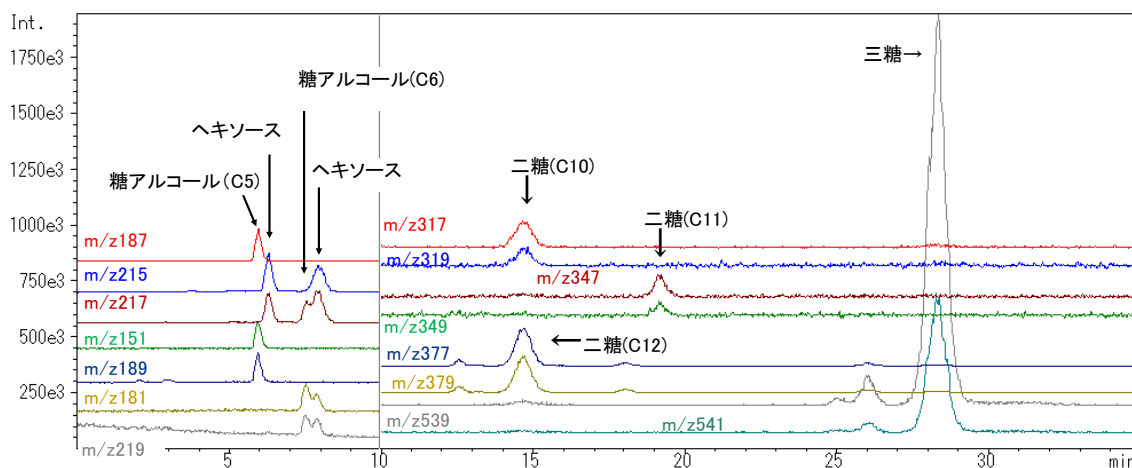


図 3.9 健康食品から抽出した糖類及び糖アルコールのクロマトグラム (SIM)

カラム: TSKgel NH2-100 (粒径 3 μm , 内径 2.0 mm, 長さ 150 mm, 東ソー), 移動相: アセトニトリル+水の混液 (75:25, v/v), イソクラチック, 流速: 0.2 mL/min, ポストカラム試薬: 飽和ジクロロメタン水溶液 (流速: 0.2 mL/min), APCI ネガティブモード

2) グラジェント溶離の検討

前項の検討結果から、アミノカラムを用いた条件でグラジェント溶離の適用を試みた。順相クロマトグラフィーにおけるグラジェント溶離では一般的に通常有機溶媒の割合が高い状態から、水の割合を直線的に増加させる。そこで、移動相 A を水、移動相 B をジクロロメタン及びアセトニトリル混液 (5:95, v/v) とし、複数のパターンでトレイトール、キシロース、ソルボース、キシリトール、マンニトール及びスクロースの混合標準溶液 (各 50 µg/mL) を分析し、溶離挙動を確認した。グラジェント条件 1 は B100%から 20 分間で B70%まで減少させ、10 分間その状態で送液するプログラムとした。この条件ではキシロース、トレイトール、キシリトール、ソルボース、マンニトール及びスクロースの順で溶離され、キシロースの保持時間は17.3分付近、トレイトールの保持時間は18.0分付近であった (図 3.10)。スクロースの保持時間は28.0分であり、検討した分析対象物質がほぼ 10 分の間に検出されていることから、グラジェント溶離は、ある程度水が存在する状態から開始し、濃度勾配を緩やかにする必要があると考えられた。このグラジェント溶離条件で、もう一つ着目すべき点は保持時間が遅い物質ほど感度が高くなる現象が認められたことである。

グラジェント溶離条件 2 では B95%から 30 分間で B50%まで減少させるプログラムとした。グラジェント条件 2 ではキシロースの保持時間が短くなり 13 分付近に検出された (図 3.11)。しかしながら、全体的に保持時間が短くなり、濃度勾配を緩やかにしてもキシロースからスクロースまでの保持時間の差はグラジェント溶離条件 1 と大きな差が認められなかった。

グラジェント溶離条件 3 ではグラジェント開始時の水の割合を更に増加し B90%とした。この条件ではキシロース及びトレイトールの保持時間が更に短くなったが、これらの分離は改善された (図 3.12)。

グラジェント溶離条件 4 ではグラジェント溶離条件 2 と同じプログラムで流速を 0.3 mL/min とした。この条件では各分析対象物質の保持時間は全体的に短くなったが、分離に関してはグラジェント溶離条件 2 と比較して、大きな悪化は認められなかったため (図 3.13)、この条件を採用することとした。

グラジェント溶離条件の違いにより、ピーク強度のパターンが異なる原因は、各分析対象物質がイオン化される際のジクロロメタン及び水の割合と関連性があると考えられた。つまり、ジクロロメタンを塩素の供給源として糖を塩素付加体とする際に水が関与していることが示唆された。このことから、ジクロロメタンから塩素が脱離する現象は水による加水分解であると推察される。グラジェント溶離条件 4 では溶質に対する溶媒の割合が増えているため、グラジェント溶離条件 3 よりも分析対象物質の感度差が少なくなったものと考えられる。

最終的に決定した溶離条件をその他の分析対象物質に適用した (図 3.14)。最も保持時間が短かったのは五炭糖のリブロースで、6 分付近に検出された。炭素数 4 の糖アルコー

ルであるエリスリトール及びトレイトールは五単糖よりも保持時間が長い、これらはほとんど同じ保持時間（約7分）で検出された。炭素数5の糖アルコールは9分から10分付近に検出された。キシリトール及びリビトールはほぼ同じ保持時間で、アラビトールが若干送れて溶離された。六炭糖は保持時間8分から14分の間に検出された。最も保持時間が短いものはプシコースであった。これに対し六炭糖と同じ分子量の *myo*-イノシトールは17分付近に検出された。炭素数6の糖アルコールは17分付近に検出され、マンニトール及びガラクトールは六単糖のスクロースとほぼ同じ保持時間で検出された。二糖類は保持時間17分から20分の間に検出されたが、マルトース及びラクトースはほぼ同じ保持時間であり、これらが混在している試料では識別は困難である。アミノカラムでは糖類よりも対応する糖アルコールの方が保持時間が長かった。また、同じモニターイオンの物質であって、保持時間もほとんど同じという物質が多数あるため、このカラム単独で糖の同定及び定量を行うことは困難であると考えられた。また、例外的にグルコースが検出されているが、それ以外のアルドースはブロードなテーリングを伴うピークとなり（図3.15）、再現性も乏しかった。ケトース、糖アルコール及び二糖については良好なピーク形状が得られていることから、ピークのテーリングはアルデヒド基とアミノ基のシッフ塩形成が関与しているものと考えられる。したがって、アミノカラムにおいてはグルコース以外のアルドースの分析には適用しないこととした。

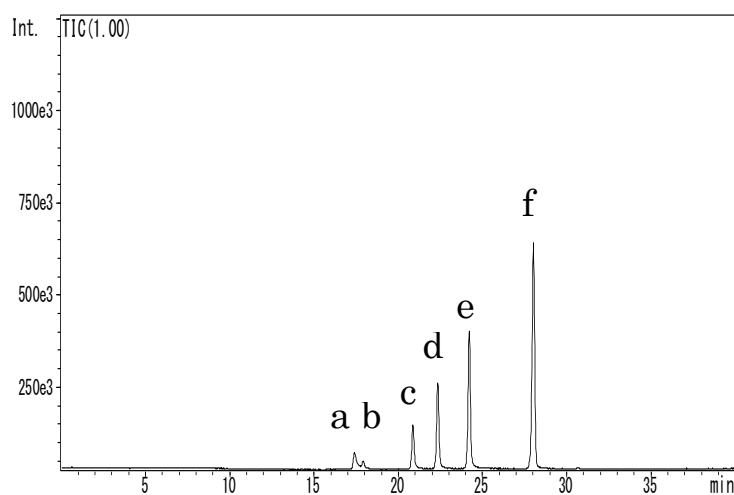


図 3.10 のグラジエント溶離条件 1 で得られた糖類及び糖アルコールのクロマトグラム (B100%-20 min-B70% (10 min) , 流速 : 0.2 mL/min, a: キシルロース, b: トレイトール, c:キシリトール, d:ソルボース, e:マンニトール及び f:スクロース)

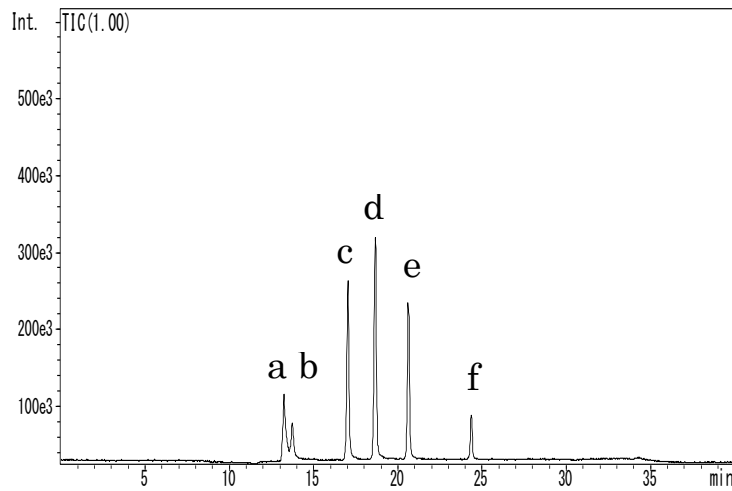


図 3.11 グラジエント溶離条件 2 で得られた糖類及び糖アルコールのクロマトグラム
 (B95%-30 min-B50% (0 min) , 流速 : 0.2 mL/min, a: キシルロース, b: トレ
 イトール, c:キシリトール, d:ソルボース, e:マンニトール及び f:スクロース)

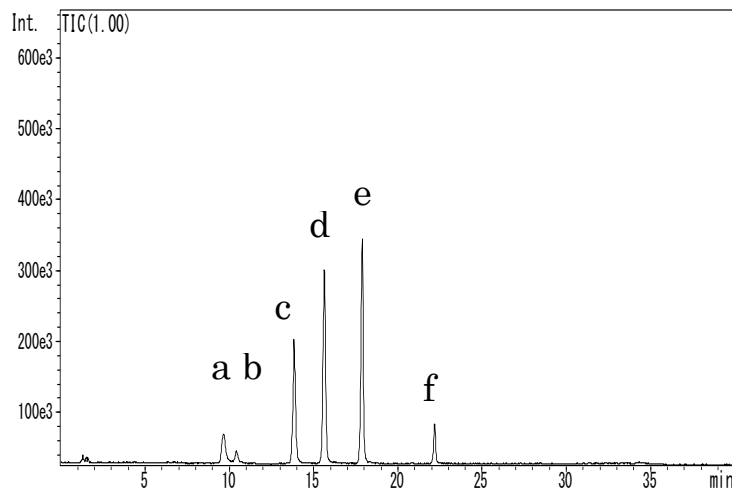


図 3.12 グラジエント溶離条件 3 で得られた糖類及び糖アルコールのクロマトグラム
 (B90%-30 min-B50% (0 min) , 流速 : 0.2 mL/min, a: キシルロース, b: トレ
 イトール, c:キシリトール, d:ソルボース, e:マンニトール及び f:スクロース)

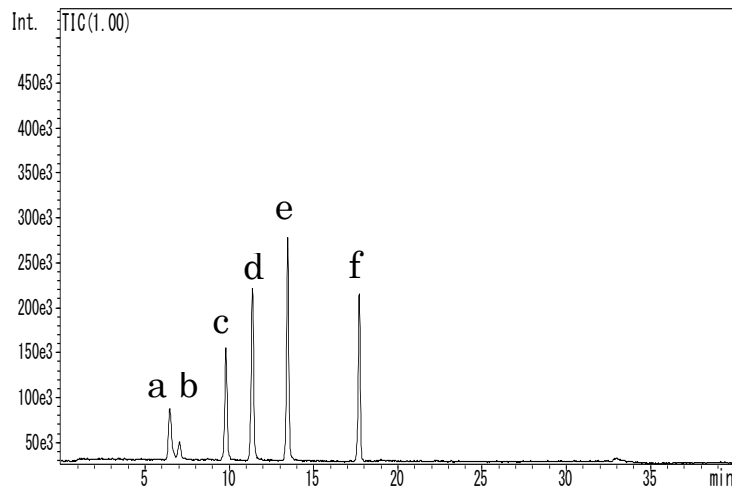


図 3.13 グラジエント溶離条件 4 で得られた糖類及び糖アルコールのクロマトグラム
 (B90%-30 min-B50% (0 min) , 流速 : 0.3 mL/min, a: キシルロース, b: トレ
 イトール, c: キシリトール, d: ソルボース, e: マンニトール及び f: スクロース)

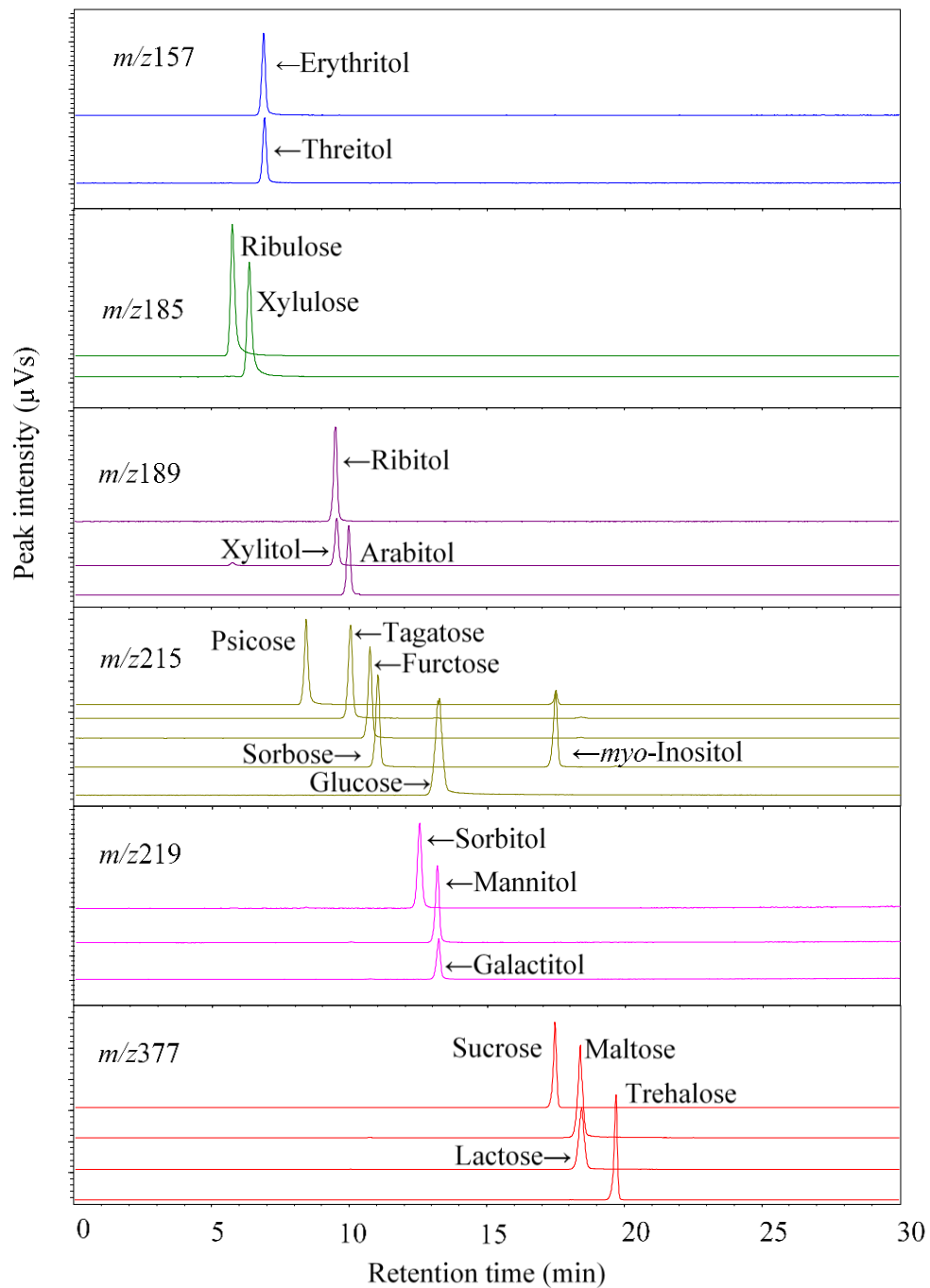


図 3.14 アミノカラムを用いて測定した分析対象物質のクロマトグラム
 カラム: TSKgel NH2-100 (粒径 $3\ \mu\text{m}$, 内径 $2.0\ \text{mm}$, 長さ $150\ \text{mm}$, 東ソー), 移動相 A:水, 移動相 B:ジクロロメタン及びアセトニトリルの混液 (5:95, v/v), リニアグラジエント溶離 (B90%-30 min-B50%), 流速: $0.3\ \text{mL/min}$, APCI ネガティブモード

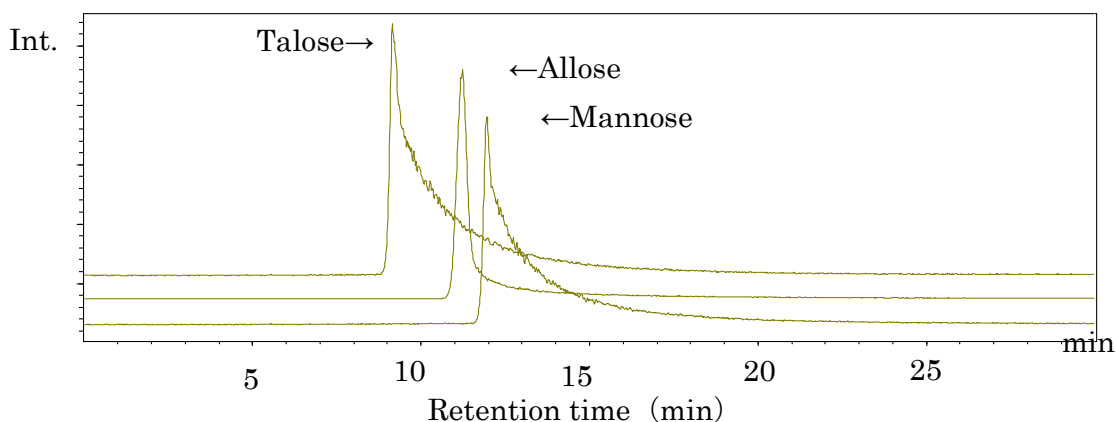


図 3.15 アミノカラムを用いて測定したアルドース（タロース、アロース及びマンノース）のクロマトグラム, カラム: TSKgel NH2-100 (粒径 3 μm , 内径 2.0 mm, 長さ 150 mm, 東ソー), 移動相 A:水, 移動相 B:ジクロロメタン及びアセトニトリルの混液 (5:95, v/v), リニアグラジエント溶離 (B90%-30 min-B50%), 流速: 0.3 mL/min), APCI ネガティブモード

3) アミドカラムを用いた糖類及び糖アルコールの分離

アミノカラムを用いた糖類及び糖アルコールの分析においては, 先述のとおりアルドースに適用できない, 一部分離が不十分であるといった問題があることから, アミドカラムの適用を検討した. アミドカラムは充填剤の基材におけるエチレン結合及びアミド基を結合させるために用いた Linker 部分のジクロロメタン耐性が不明であるため, ジクロロメタンは移動相に添加せず, ポストカラムで導入することとした. 溶離条件はグラジエント溶離を適用した. アミドカラムで測定した糖及び糖アルコールのクロマトグラムを図 3.16 示す. アミドカラムを用いた場合, 全体的にピークはブロードであるが, アルドースを含めて全ての分析対象物質のピークを検出することができた. アミノカラムと同様に炭素数 4 の糖アルコールであるエリスリトールとトレイトールは分離困難であった. また, ソルボース及びアロース並びにグルコース及びガラクトースは各々ほぼ同じ保持時間であるため, これらを同定することはできない. しかしながら, アミノカラムではアロースとガラクトースのピーク形状がソルボース及びグルコースと異なるため, これらを識別可能である. したがって, アミノカラム及びアミドカラムの両方で測定し, 各々の保持時間及びピーク形状から糖を同定することが可能である. アミノカラムとアミドカラムはいずれも同じ溶媒組成の試料溶液を注入することが可能であるため, 前処理操作を統一することができるという利点がある. 表 3.2 にアミノカラム及びアミドカラムを用いた分析で得られた分析対象物質の保持時間を示す.

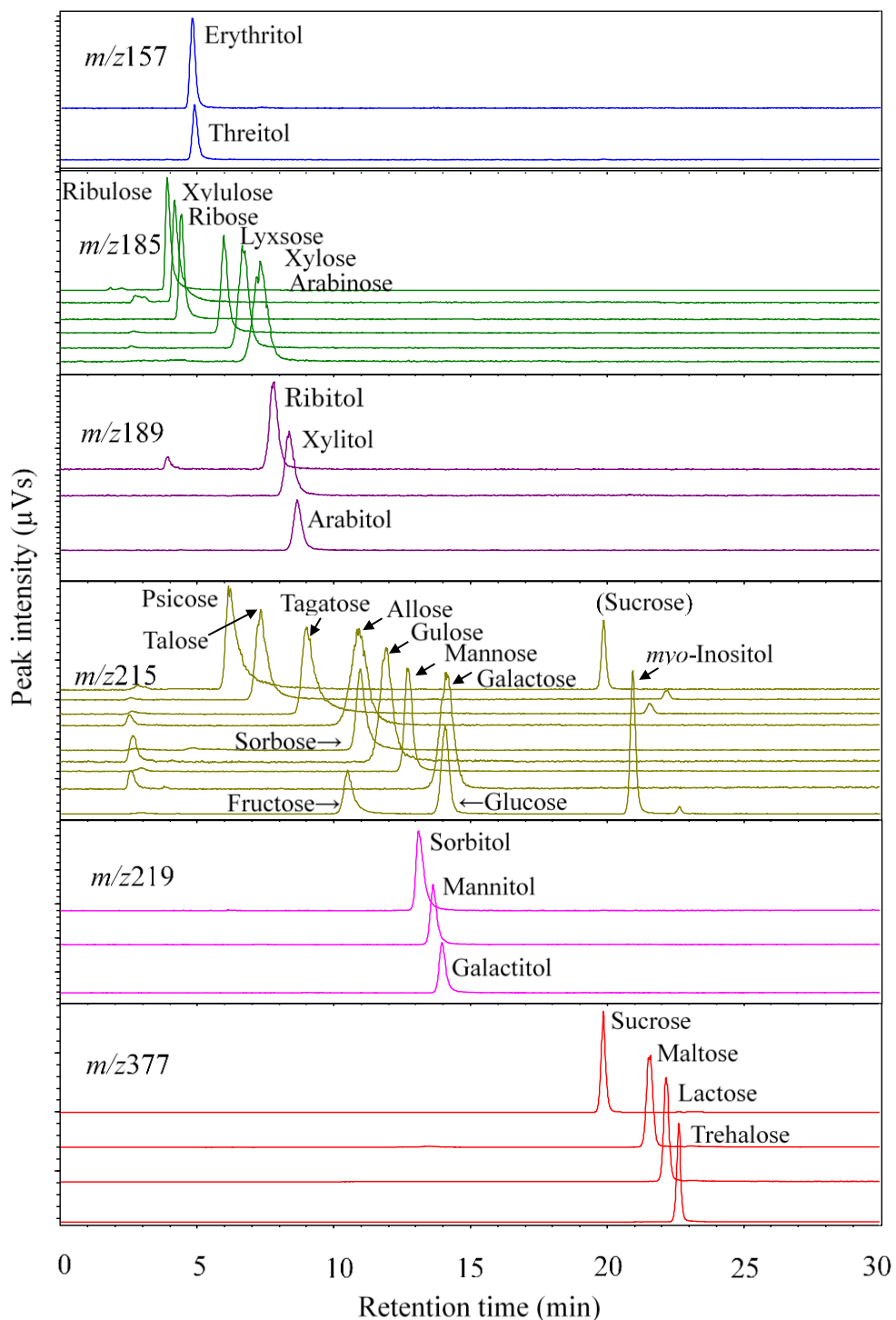


図 3.16 アミドカラムを用いて測定した分析対象物質のクロマトグラム, カラム:XBridge BEH Amide (粒径 3.5 μm , 内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, ウォーターズ), 移動相 A: 0.1% アンモニア溶液, B:0.1% アンモニアアセトニトリル溶液, グラジエント溶離:B 95%-30分-B:60%, 注入量:5 μL , 流速: 0.2 mL/min, カラム温度 40°C

表 3.2 アミノカラム及びアミドカラムで得られた分析対象物質の保持時間

分析対象物質	保持時間 (min)		分類
	アミノカラム	アミドカラム	
Erythritol	6.86	4.81	糖アルコール
Threitol	6.88	4.88	糖アルコール
D-Ribulose	5.73	3.94	ケトース
D-Xylulose	6.36	4.18	ケトース
D-Ribose	-	4.45	アルドース
D-Lyxose	-	5.99	アルドース
D-Xylose	-	6.70	アルドース
D-Arabinose	-	7.33	アルドース
Ribitol	9.50	7.80	糖アルコール
Xylitol	9.51	8.38	糖アルコール
Arabitol	9.96	8.64	糖アルコール
D-Psicose	8.39	6.19	ケトース
D-Talose	-	7.33	アルドース
D-Tagatose	10.03	8.98	ケトース
D-Fructose	10.73	10.49	ケトース
D-Allose	-	10.93	アルドース
D-Sorbose	11.04	10.96	ケトース
D-Mannose	-	12.71	アルドース
L-Gulose	-	11.94	アルドース
D-Glucose	13.19	14.05	アルドース
D-Galactose	-	14.15	アルドース
<i>Myo</i> -Inositol	17.51	20.94	シクリトール
Sorbitol	12.51	13.11	糖アルコール
Mannitol	13.15	13.65	糖アルコール
Galactitol	13.22	13.99	糖アルコール
Sucrose	17.46	19.90	二糖
Lactose	18.38	22.18	二糖
Maltose	18.44	21.58	二糖
Trehalose	19.70	22.65	二糖

3.3.4 実試料への応用

1) 糖の同定

開発した分析法を冬虫夏草抽出物試料に適用し、未知の糖類及び糖アルコールの同定を行った。図 3.17 にアミノカラムで分析した試料のクロマトグラムを、図 3.18 にアミドカラムで分析した試料のクロマトグラムを示す。いずれのカラムを用いた場合においても $m/z157$ 及び $m/z185$ のモニターイオンではピークは検出されなかったため、試料中に炭素数 4 の糖アルコール及びペントースは含まれていないものと考えられた。保持時間及びモニターイオンから $m/z189$ のピークはキシリトール、 $m/z215$ のピークはフルクトース及びグルコース、 $m/z219$ において検出されたピークはマンニトール及び $m/z377$ において検出されたピークはトレハロースであることが確認された。

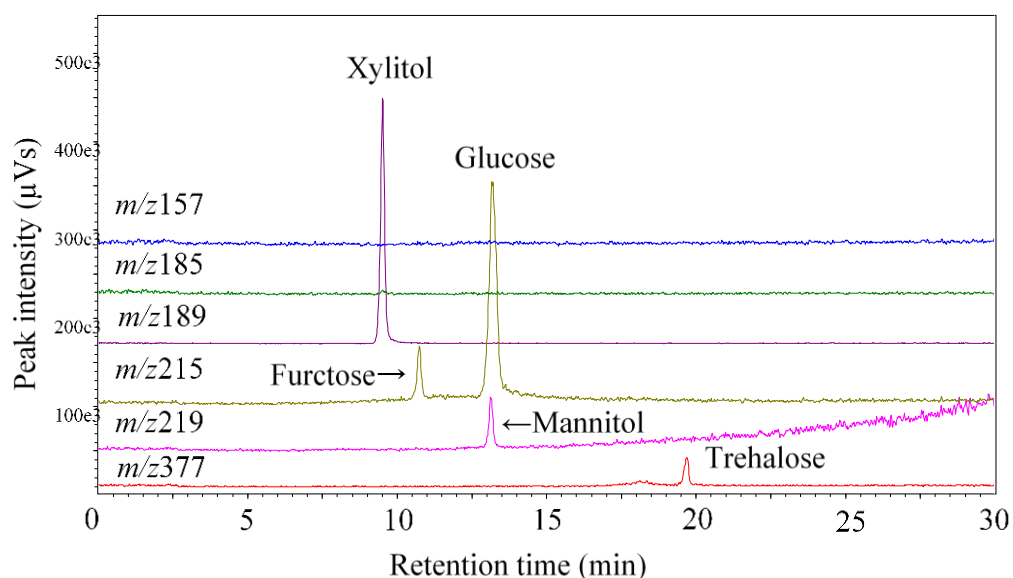


図 3.17 アミノカラムを用いて測定した冬虫夏草試料のクロマトグラム

カラム: TSKgel NH2-100 (粒径 3 μm , 内径 2.0 mm, 長さ 150 mm, 東ソー), 移動相 A:水, 移動相 B:ジクロロメタン及びアセトニトリルの混液 (5:95, v/v), リニアグラジエント溶離 (B90%-30 min-B50%), 流速: 0.3 mL/min), APCI ネガティブモード

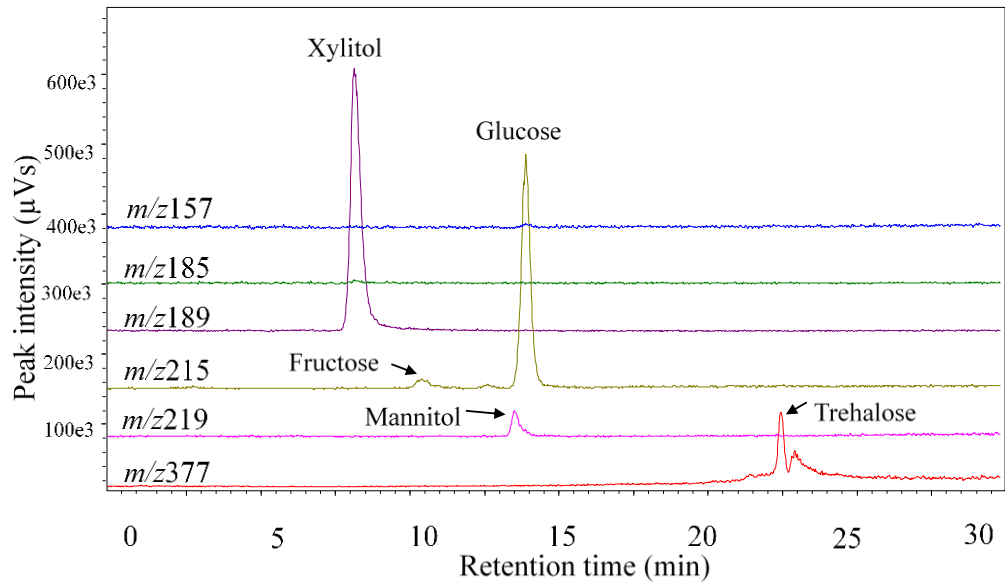


図 3.18 アミドカラムを用いて測定した冬虫夏草試料のクロマトグラム, カラム:XBridge BEH Amide (粒径 3.5 μm , 内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, ウォーターズ), 移動相 A: 0.1% アンモニア溶液, B:0.1% アンモニアアセトニトリル溶液, グラジエント溶離:B 95%-30分-B:60%, 注入量:5 μL , 流速: 0.2 mL/min, カラム温度 40 $^{\circ}\text{C}$

2) 糖の定量

次に, 検出された糖の濃度を求めるため, アミドカラムを用いる条件で定量分析を行った. 各糖の検量線は 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で良好な直線性を示した (表 3.3). 検量線の決定係数 (R^2) はいずれも 0.995 以上であった. 一例としてキシリトールの検量線を図 3.19 に示す. 試料中の糖類及び糖アルコール濃度は絶対検量線法で次式により算出した. 試料中の各糖及び糖アルコール濃度を表 3.4 に示す.

$$C = \frac{A - b}{a}$$

ここで C : 試料中の糖及び糖アルコール濃度

A : 試料溶液における糖及び糖アルコールのピーク面積値

a : 検量線の傾き

b : 検量線の切片

表 3.3 糖類及び糖アルコールの検量線

分析対象物質	検量線式	R ²
Xylitol	$y = 142,994.148x - 65,865.045$	0.998
Fructose	$y = 142,475.314x - 46,971.890$	0.999
Mannitol	$y = 225,396.994x - 56,611.468$	0.999
Glucose	$y = 86,034.322x - 55,959.035$	0.998
Trehalose	$y = 691,758.135x - 158,805.971$	0.999

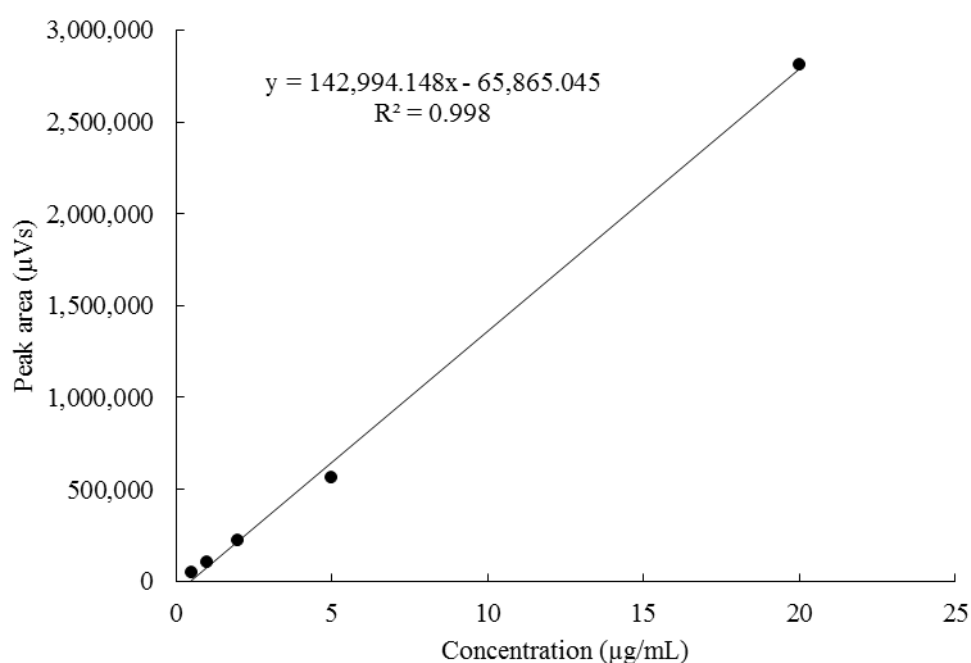


図 3.19 キシリトールの検量線

表 3.4 冬虫夏草抽出物から検出された糖の定量値

分析対象物質	定量値 (mg/mL)
Xylitol	23.0
Fructose	0.48
Mannitol	1.3
Glucose	4.5
Trehalose	0.33

3.3.5 LC-MS/MS への適用検討

塩素付加-APCI 法による糖の検出を更に選択的に行うため、LC-MS/MS 法への適用を試みた。糖類及び糖アルコールについて複数のコリジョンエネルギーでプロダクトイオンスキャン分析を行い、モニターイオンの選択を行った。条件検討のための塩素供与物質としてはジクロロメタンを用い、次に代替物質としてクロロアセトニトリルについて検討した。

1) プロダクトイオンスキャン分析

LC-MS/MS にアミノカラム(TSKgel NH2-100 3 μm , 内径 2.0 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3 μm , 東ソー)を接続し、カラム温度を 40°C に設定した。移動相は A 液を 0.5 mol/L ジクロロメタンアセトニトリル溶液及び水の混液(50:50, v/v), B 液をアセトニトリル及び水の混液(50:50, v/v)とし, A 液及び B 液を 50:50 (ジクロロメタン濃度として 0.125 mol/L) で混合し, 流量 0.2 mL/min でイソクラチックで送液した。各 20 $\mu\text{g/mL}$ のエリスリトール, キシルロース, キシリトール, フルクトース及びスクロースの標準溶液を 5 μL 注入し, 大気圧化学イオン化法ネガティブモード(APCI-)でプロダクトイオンスキャン測定を行った。エリスリトール, キシルロース, キシリトール, フルクトース, マンニトール及びスクロースのプリカーサーイオンは各々 $m/z157$, $m/z185$, $m/z187$, $m/z215$, $m/z217$ 及び $m/z377$ とした。マススペクトルを図 3.20~図 3.22 に示す。エリスリトールはコリジョンエネルギー5, 10, 15 及び 20 eV でスペクトル測定を行ったところ, プリカーサーイオン ($m/z157$, $[\text{M}+\text{Cl}]^-$)及び塩化物イオン ($m/z35$, Cl^-) 以外のフラグメントイオンはほとんど検出されなかった。キシルロースもコリジョンエネルギー10 eV ではプリカーサーイオンがベースピークとなっているが, 20 eV では塩化物イオンがベースピークとなった。また, わずかではあるが脱プロトン化分子も検出された。キシリトールはコリジョンエネルギー15 eV で脱プロトン化分子がわずかに検出されたが, 感度的に選択反応モニタリング (SRM) 用のトランジションには適さないと考えられた。フルクトース, マンニトール及びスクロースについては塩素付加イオンをプリカーサーイオンとした CID によって脱プロトン化分子が比較的検出されやすいことから, このトランジションを SRM に利用できると考えられた (図 3.22)。

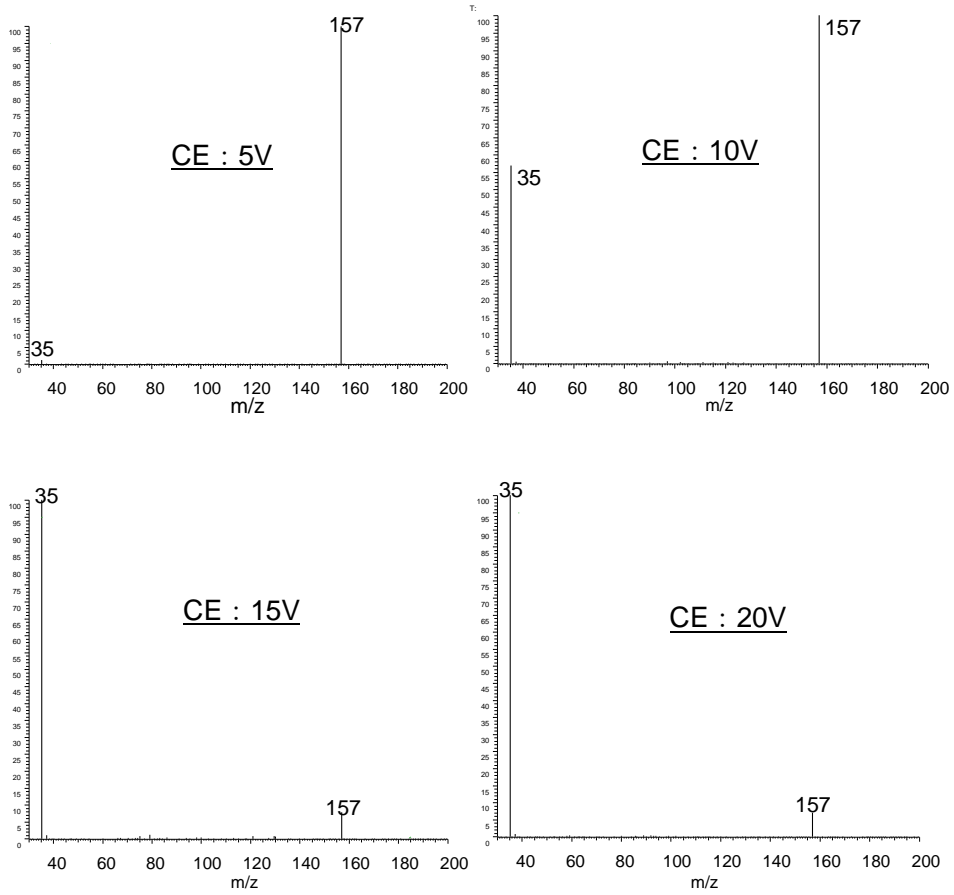


図 3.20 Erythritol のプロダクトイオンスペクトル
(APCI ネガティブモード, プリカーサーイオンは $([M+Cl]^-)$)

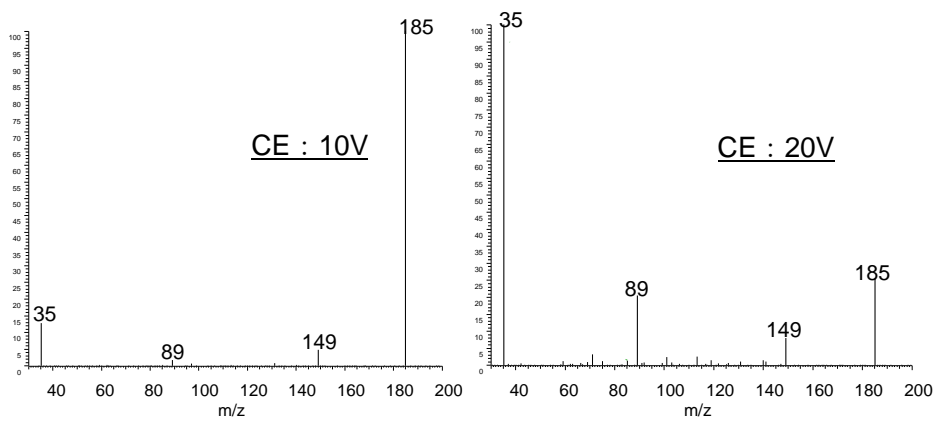


図 3.21 Xylulose のプロダクトイオンスペクトル
(APCI ネガティブモード, プリカーサーイオンは $([M+Cl]^-)$)

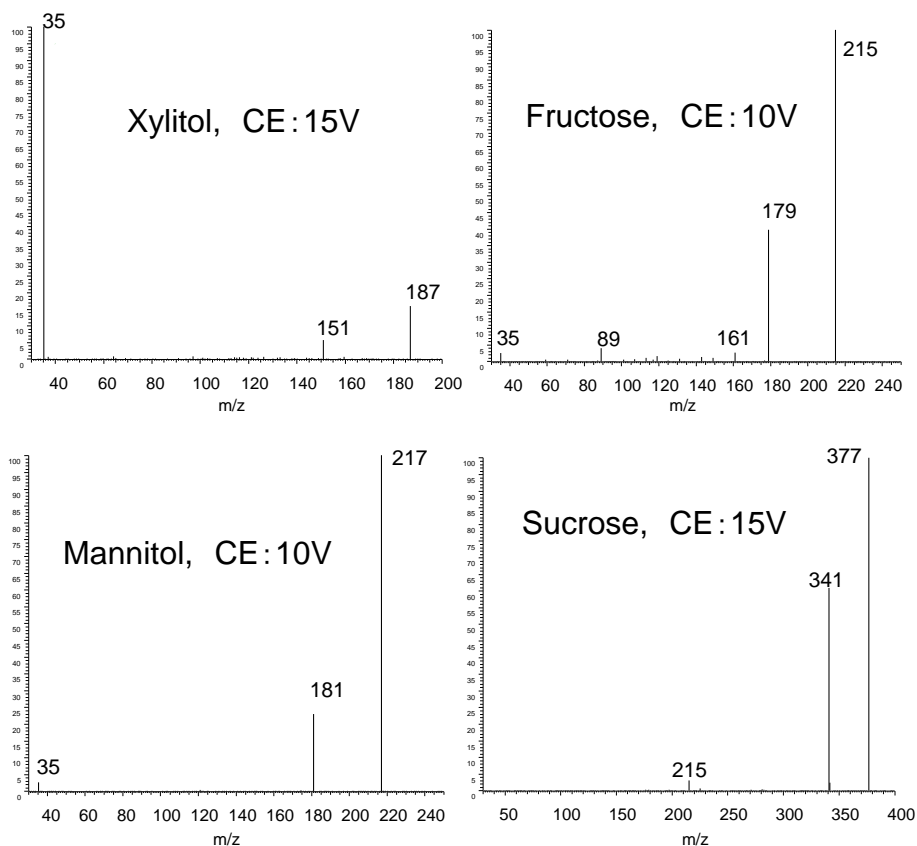


図 3.22 キシリトール、フルクトース、マンニトール及びスクロースのプロダクトイオンスペクトル (APCI ネガティブモード, 各々のプリカーサーイオンは $[M+Cl]^-$)

2) 塩素供与物質としてのクロロアセトニトリルの検討

LC-MS/MS にアミノカラム(TSKgel NH2-100 3 μm , 内径 2.0 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3 μm , 東ソー)を接続し, カラム温度を 40°C に設定した. 移動相は A 液を 0.5 mol/L クロロアセトニトリル (又はジクロロメタン) のアセトニトリル溶液及び水の混液(50:50, v/v), B 液をアセトニトリル及び水の混液(50:50, v/v)とし, A 液及び B 液を 5:95~60:40 (クロロアセトニトリル又はジクロロメタン濃度として 0.0125~0.150 mol/L) で混合し, 流量 0.2 mL/min でイソクラチックで送液した. 各 10 $\mu\text{g/mL}$ のエリスリトール及びキシロースの標準溶液を 5 μL 注入し, 大気圧化学イオン化法ネガティブモード(APCI-)で SRM 測定を行った. エリスリトール及びキシロースのプリカーサーイオンは各々 m/z 157 及び m/z 185, コリジョンエネルギーは各々 5 eV, プロダクトイオンは各々 m/z 35 及び m/z 149 とした. また, 同時に各々のプリカーサーイオンもモニターした. なお, この条件はクロロアセトニトリル濃度と分析対象物質の感度 (ピーク面積値) を比較することを目的としており, 分離については考慮していない.

クロロアセトニトリルを塩素供与物質として得られたエリスリトール及びキシロース

の SRM クロマトグラムを図 3.23 に示す。また、塩素供与物質濃度及びエリスリトールのピーク面積の関係を図 3.24、塩素供与物質濃度及びキシロースのピーク面積の関係を図 3.25 に示す。クロロアセトニトリルを用いた場合でも各々の分析対象物質のピークが検出された。また、同濃度で移動相に添加した場合において、いずれの分析対象物質に対してもクロロアセトニトリルはジクロロメタンよりもピーク面積値が大きいことから、クロロアセトニトリルはジクロロメタンよりも塩素供与物質として適しており、より低濃度で移動相に添加しても十分な感度が得られると考えられる。

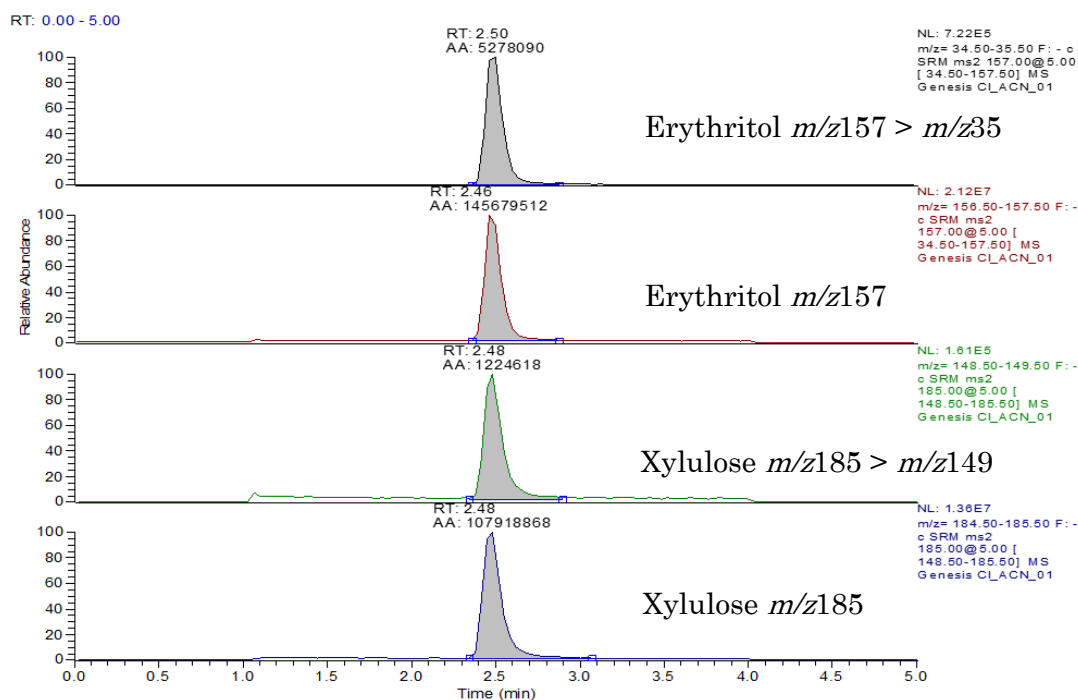


図 3.23 エリスリトール及びキシロースの SRM クロマトグラム (塩素供与物質:クロロアセトニトリル, APCI ネガティブモード, 各々のプリカーサーイオンは $([M+Cl]^-)$)

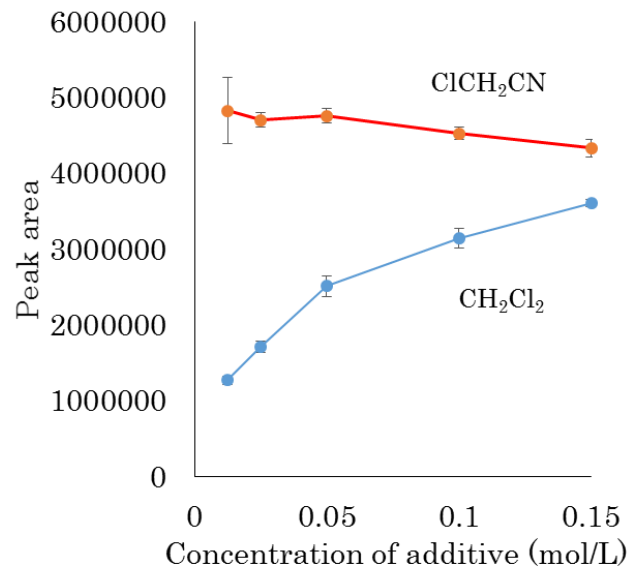


図 3.24 塩素供与物質濃度とエリスリトールのピーク面積の関係 (塩素供与物質:クロロアセトニトリル及びジクロロメタン, APCI ネガティブモード, 各々のプリカーサーイオンは ($[M+Cl]^-$))

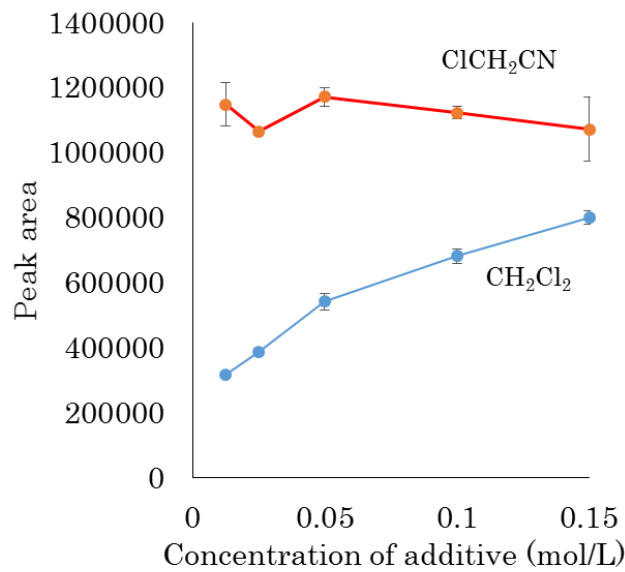


図 3.25 塩素供与物質濃度とキシロロースのピーク面積の関係 (塩素供与物質:クロロアセトニトリル及びジクロロメタン, APCI ネガティブモード, 各々のプリカーサーイオンは ($[M+Cl]^-$))

3.4 結言

本研究は食品中の糖類及び糖アルコールを複雑な前処理を必要とせず、同時に分析する方法を確立することを目的とした。移動相に添加した塩素供与物質により糖が塩素付加体として APCI ネガティブモードでイオン化され、質量分析計で高感度に検出可能であることから、本研究ではこのイオン化法を糖アルコールに適用し、クロマトグラフィーによる分離が困難な糖及び糖アルコールを同時に分析することを試みた。塩素供与物質としてはクロロホルムよりもジクロロメタンが適しているが、更にこれらの有機塩素系溶媒よりもクロロアセトニトリルはより効率よく糖及び糖アルコールをイオン化することを見出した。これにより、ESI 及び APCI を用いた一般的なイオン化法では困難であった糖のイオン化を効率的に行うことが可能となった。分離に関してはアミノカラムはケトース、二糖及び糖アルコールに対して良好なピーク形状を与えるものの、グルコース以外のアルドースはピークがテーリングしてブロードになる。この現象は単一のカラムで分析を行う上では重大な欠点となるが、他の方法分離が困難なアルドースとケトースを識別する上では重要な特性でもある。一方アミドカラムを用いた場合は全ての分析対象物質を検出することが可能であった。しかし、アミドカラムにおいても保持時間がほぼ同じ糖類があることから、アミノカラム及びアミドカラムを組み合わせることで、互いの欠点を補い、食品中の糖の化学種を同定することが可能である。また、本研究で確立した方法では検出に質量分析計を用いているため、従来の選択性の低い検出器では困難であった、クロマトグラフィーで分離できない化学種を識別することを可能とした。更に、塩素付加イオン化法を液体クロマトグラフタンデム質量分析計 (LC-MS/MS) に適用し、単糖及び糖アルコールについて選択反応モニタリングにより分析することが可能であることを確認した。

本研究の一部は”Identification of novel components leading to anti-tumor activity in the *Cordyceps militaris* extract”と題して論文を投稿する予定である。

3.5 参考文献

- 1) J Mann, JH Cummings, HN Englyst, T Key, S Liu, G Riccardi, C Summerbell, R Uauy, RM van Dam, B Venn, HH Vorster and M Wiseman, FAO/WHO Scientific Update on carbohydrates in human nutrition: conclusions, *European Journal of Clinical Nutrition* (2007) 61 (Suppl 1) , S132–S137; doi:10.1038/sj.ejcn.1602943
- 2) Cummings JH, Stephen AM. Carbohydrate terminology and classification. *Eur J Clin Nutr*, 2007 ; 61 (Suppl 1) , S5-18.
- 3) 食品表示基準 (平成 27 年 3 月 20 日 内閣府令第 10 号)
- 4) 飯田哲郎, 大隈一裕, 希少糖 (D-プシコース, D-アロース, D-タガトース) の特性とその利用, *オレオサイエンス* 第 13 巻第 9 号 (2013)

- 5) Takafumi KASUMI, Polyol Production as a Compatible Solute under Hyperosmotic Environmental Condition in Yeast, JOURNAL OF THE BREWING SOCIETY OF JAPAN, Vol. 105 (2010) No. 10 p. 618-627
- 6) Mark H. Beers 他著, 福島雅典 総監修, メルクマニュアル 第18版 日本語版, 日経BP社
- 7) Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases, WHO, 2003
- 8) 奥恒 行, 難消化吸収性糖質の消化・発酵・吸収ならびに許容量に関する研究, 日本栄養・食糧学会誌, Vol. 58 (2005) No. 6 P 337-342
- 9) Ernst Bayer, Rudi Widder, Gas Chromatographic Determination of the Carbonyl Forms of Sugars, Anal. Chem., 1964, 36 (8) , pp 1452-1455, DOI: 10.1021/ac60214a012
- 10) S. W. Gunner, J. K. N. Jones, M. B. Perry, The gas-liquid partition chromatography of carbohydrate derivatives: part I The separation of glycitol and glyucose acetates, Canadian Journal of Chemistry, 1961, 39 (10) : 1892-1899
- 11) J. S. Sawardeker, J. H. Sloneker, Allene. Jeanes, Quantitative Determination of Monosaccharides as Their Alditol Acetates by Gas Liquid Chromatography, Anal. Chem., 1965, 37 (12) , pp 1602-1604
- 12) D. T. Williaras, and J. K. N. Jones, The separation of aldopentose and aldohexose diethyl dithioacetal derivatives by gas-liquid partition chromatography, Canadian Journal of Chemistry, 44 (1966) 412-414
- 13) C. C. Sweeley, Ronald. Bentley, M. Makita, W. W. Wells, Gas-Liquid Chromatography of Trimethylsilyl Derivatives of Sugars and Related Substances, J. Am. Chem. Soc., 1963, 85 (16) , pp 2497-2507
- 14) Blanche S. Mason, Hal T. Slover, A gas chromatographic method for the determination of sugars in foods, J. Agr. Food Chem., 19, 551-554 (1971) .
- 15) 伊達ちぐさ, 田中平三, 吉川賢太郎, 植田豊, 馬場昭美, 林 正幸, 田中ゆかり, 島田豊治, 山本博司, 大和田国夫, 岡崎邦夫, 石井隆一郎, 庄司博延, ガスクロマトグラフィーによる食品中の糖類定量法 日衛誌 (Jpn. J. Hyg.) 第37巻 1982, 516-529
- 16) 上野民夫, 糖類のガスクロマトグラフィー, 化学と生物, Vol. 8, No. 2, 1970, 114-121
- 17) 吉田 優, 波多野 直哉, 篠原 正和, 西海 信, 入野 康弘, 東 健, 竹縄 忠臣, メタボロミクスの疾患診断への試み, 福岡医誌, 101 (11) , 2010, 231-237
- 18) Hiroshi Nakamura, Zenzo Tamura, Gas Chromatographic Analysis of Disaccharides. I. Analysis of Disaccharides as Trimethylsilyl and Trifluoroacethyl

- Derivatives of Corresponding Alditols, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* Vol. 18 (1970) No. 11 P 2314-2321
- 19) 安井 健, 古川 剛, 長谷 幸, 高速液体クロマトグラフィーによる乳製品中の糖類の定量法, *日本食品工業学会誌*, Vol. 27 (1980) No. 7 P 358-362, http://doi.org/10.3136/nskkk1962.27.7_358
 - 20) Annette Zeyner, Annett Gefrom, Dirk Hillegeist, Manfred Sommer, Jörg M. Greef, Contribution to the Method of Sugar Analysis in Legume Grains for Ensiling – A Pilot Study, *International Journal of Scientific Research in Science and Technology*, May-June 2015 [(1) 2: 74-80]
 - 21) Shruti Shukla and Myunghee Kim, Determination of amino acid and free sugar contents in Korean, *Pak. J. Pharm. Sci.*, Vol.29, No.3 (Suppl) , May 2016, pp.1101-1107
 - 22) 高野 香織, 岡本 健, 大嶽 秀之, 武藤 辰雄, HPLC 法による少糖類の一斉定量分析の検討について, *関税中央分析所報*, 第 54 号, 2014, 57-60
 - 23) Bin Lai, Manuel R. Plan, Mark P. Hodson and Jens O. Krömer, Simultaneous Determination of Sugars, Carboxylates, Alcohols and Aldehydes from Fermentations by High Performance Liquid Chromatography, *Fermentation* 2016, 2, 6; doi:10.3390/fermentation2010006
 - 24) Hidetoshi Terada, Yoshihiro Hayakawa and Hirohisa Mikami, How to Use Evaporative Light Scattering Detector Effectively, *CHROMATOGRAPHY*, Vol.32 No.3 (2011) 141-152
 - 25) 井上 嘉則, 上茶谷 若, 山本 敦, 両性イオンに基づく水和層を固定相とする保水性分離剤の開発, *分析化学*, Vol. 63 (2014) No. 2 p. 79-92
 - 26) Kamichatani W, Inoue Y, Yamamoto A. Separation properties of saccharides on a hydrophilic stationary phase having hydration layer formed zwitterionic copolymer. *Analytica Chimica Acta* 853 (2015) 602-607
 - 27) Shihao Sun, Hui Wang, Jianping Xie and Yue Su, Simultaneous determination of rhamnose, xylitol, arabitol, fructose, glucose, inositol, sucrose, maltose in jujube (*Zizyphus jujube* Mill.) extract: comparison of HPLC–ELSD, LC–ESI–MS/MS and GC–MS, *Chemistry Central Journal* (2016) 10:25, DOI 10.1186/s13065-016-0171-2
 - 28) Tomohisa Hayashi, Ikuo Sakurada, Kensuke Honda, Shigeyasu Motohashi, Kazuo Uchikura, Electrochemical Detection of Sugar-related Compounds Using Boron-doped Diamond Electrodes, *Analytical Sciences* 2012, Vol. 28, 127-133
 - 29) Chengzhu Ni, Binhe Zhu, Nani Wang, Muhua Wang, Suqing Chen, Jiajie Zhang, Yan Zhu, Simple column-switching ion chromatography method for determining

- eight monosaccharides and oligosaccharides in honeydew and nectar, *Food Chemistry* 194 (2016) 555–560
- 30) Xing Wang, Yong Xu, Li Fan, Qiang Yong, Shiyuan Yu, Simultaneous separation and quantitative determination of monosaccharides, uronic acids, and aldonic acids by high performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection in corn stover prehydrolysates, *BioResources*, Vol 7, No 4 (2012) 4614-4625
- 31) Jian-Hua Xie, Ming-Yue Shen, Shao-Ping Nie, Xin Liu, Hui Zhang, Ming-Yong Xie, Analysis of monosaccharide composition of *Cyclocarya paliurus* polysaccharide with anion exchange chromatography, *Carbohydrate Polymers* 98 (2013) 976–981
- 32) Shuji Hirayama, Michiko Yamaguchi, Yoshiya Izumi, Rapid HPLC Analysis of Monosaccharides in the Cellulose Decomposition Samples, *CHROMATOGRAPHY*, Vol.33 No.1 (2012) 35-39
- 33) Masaaki Senda, Kyouko Fukushima¹, Kusuo Hashiguchi¹, Tsutomu Matsumoto¹, P. H. Gamache, J. C. Waraska and D. Asa, A New Universal Detector, Corona Charged Aerosol Detection, *Chromatography*, Vol.27 No.3 (2006) 119-124
- 34) Kyoko Fukushima, Kusuo Hashiguchi, Takahiro Suzuki, Masamitsu Okawara and Yoko Sekiguchi, Recent Developments in Charged Aerosol Detection Technology and Applications, *Chromatography*, Vol.32 No.3 (2011) 161-170
- 35) Jun Yan, Songshan Shi, Hongwei Wang, Ruimin Liu, Ning Li, Yonglin Chen, Shunchun Wang, Neutral monosaccharide composition analysis of plant-derived oligo and polysaccharides by high performance liquid chromatography. *Carbohydrate Polymers* 136 (2016) 1273-1280
- 36) Loubna A. Hammad, Marwa M. Saleh, Milos V. Novotny, and Yehia Mechref, Multiple-Reaction Monitoring Liquid Chromatography Mass Spectrometry for Monosaccharide Compositional Analysis of Glycoproteins, *J Am Soc Mass Spectrom* 2009, 20, 1224–1234
- 37) Mark S. Lowenthal, Eric L. Kilpatrick, Karen W. Phinney, Separation of monosaccharides hydrolyzed from glycoproteins without the need for derivatization, *Anal Bioanal Chem* (2015) 407:5453–5462, DOI 10.1007/s00216-015-8717-z
- 38) 新藤 哲也, 貞升 友紀, 鈴木 敬子, 田中 康一, 外川 明子, 植松 洋子, 食品中糖アルコールの HPLC 定量法および LC-MS 確認法, *食衛誌* Vol. 54, No. 5, 358-363
- 39) Javier Matías, Jerónimo González, Luis Royano, Rafael A. Barrena, Analysis of

- sugars by liquid chromatography-mass spectrometry in Jerusalem artichoke tubers for bioethanol production optimization, *biomass and bioenergy* 35 (2011) 2006-2012
- 40) Ayman A. Ghfar, Saikh M. Wabaidur, A. Yacine Badjah Hadj Ahmed, Zeid A. Alothman, Mohammad R. Khan, Nora H. Al-Shaalan, Simultaneous determination of monosaccharides and oligosaccharides in dates using liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry, *Food Chemistry* Volume 176, 1 June 2015, Pages 487-492
 - 41) Xiaodan Wu, Wei Jiang, Jiajia Lu, Ying Yu, Bin Wu, Analysis of the monosaccharide composition of water-soluble polysaccharides from *Sargassum fusiforme* by high performance liquid chromatography/electrospray ionisation mass spectrometry, *Food Chemistry* 145 (2014) 976–983
 - 42) 高井信治, 玉井美紀, 金沢秀子, 内山秀文, HPLC/APCI-MS を用いた糖類の分析, *生産研究*, 43 (1991) 40-42
 - 43) Yoshiaki Kato, Yoko Numajiri, Chloride attachment negative-ion mass spectra of sugars by combined liquid chromatography and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *Journal of Chromatography*, 562 (1991) 81-97
 - 44) G. Ricochon, C. Paris, M. Girardin, L. Muniglia, Highly sensitive, quick and simple quantification method for mono and disaccharides in aqueous media using liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization–mass spectrometry (LC–APCI–MS) , *Journal of Chromatography B*, 879 (2011) 1529–1536
 - 45) Kevin D. Wyndham, John E. O'Gara, Thomas H. Walter, Kenneth H. Glose, Nicole L. Lawrence, Bonnie A. Alden, Gary S. Izzo, Christopher J. Hudalla, and Pamela C. Iraneta, Characterization and Evaluation of C18 HPLC Stationary Phases Based on Ethyl-Bridged Hybrid Organic/Inorganic Particles, *Anal. Chem.*, 2003, 75 (24) , pp 6781–6788
 - 46) Lamia Benbrahim-Tallaa, Béatrice Lauby-Secretan, Dana Loomis, Kathryn Z Guyton, Yann Grosse, Fatiha El Ghissassi, Véronique Bouvard, Neela Guha, Heidi Mattock, Kurt Straif, on behalf of the International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group, Carcinogenicity of perfluorooctanoic acid, tetrafluoroethylene, dichloromethane, 1,2-dichloropropane, and 1,3-propane sultone, *The Lancet Oncology*, Vol. 15, No. 9, p924–925, August 2014
 - 47) David M. DeMarini, Elsebeth Lynge, Chloroform, Citation for most recent IARC review, *IARC Monograph* 73, 1999
 - 48) IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Re-

evaluation of some organic, chemicals, hydrazine and, hydrogen peroxid, World Health Organization International Agency For Research on Cancer, 1999, vol. 71

第四章 結言

ヒト及び動物は生命活動を維持するために食品、飲料及び医薬品を能動的に摂取するため、これらに含まれる化学物質による経口ばく露は頻度、ばく露量及び影響の程度の観点からも重要である。特に食品に含まれる化学物質の種類及びその含有量を把握することは、その安全性や健康影響を評価する上で重要である。

かび毒のように非意図的に自然発生する毒素は、農薬のように使用量等の管理によってコントロールすることが難しく、汚染事例が後を絶たない。オクラトキシン A はその有害性と汚染範囲の広さから問題視されて久しいが、依然として我が国においては規制対象とはなっていない。我が国では犬猫の飼育頭数がピークを迎えた平成 20 年に「愛玩動物用飼料の安全性の確保に関する法律(ペットフード安全法)」が制定され、愛玩動物(ペット)に対する健康被害を防止する観点から、愛玩動物用飼料(ペットフード)の製造・販売に係る基準・規格は、ペットフード安全法第 5 条に基づき「愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令」により設定された。当該基準・規格に合わないペットフードや有害な物質を含むペットフードの製造等が禁止されている。本研究では高性能なイムノアフィニティーカラム及び高速液体クロマトグラフィーを用い、極めて複雑な試料マトリックスを含むペットフードに対応した OTA の分析法を開発し、その妥当性を確認した。ペットフードには穀類が原料として用いられることが多く、かび毒による汚染の可能性もあるため、本研究の成果が今後、ペットフード安全法に基づいて実施されるペットフードの検査に適用され、愛玩動物用飼料の安全確保に寄与することを期待する。

今日、糖類及び糖アルコールの様々な生理活性が着目され、多くの食品等に添加されていることから、これらの定性及び定量分析法が求められている。しかしながら、糖類には様々な種類があり、いずれも基本的には炭素、水素及び酸素のみで構成された類似する化学構造であるため、分離が困難である。本研究では移動相に添加した塩素供与物質により糖が塩素付加体として APCI ネガティブモードでイオン化され、質量分析計で高感度に検出可能であることから、本研究ではこのイオン化法を糖アルコールに適用し、クロマトグラフィーによる分離が困難な糖及び糖アルコールを同時に分析する方法を確立した。塩素付加イオン化法がこれまで普及しなかった理由の一つとしては塩素供与物質として利用されるクロロホルムやジクロロメタンの有害性がある。本研究ではより安全性の高いクロロアセトニトリルが塩素供与物質として利用可能であり、イオン化効率の面でクロロホルム及びジクロロメタンよりも適していることを見出した。この方法は従来イオン化が困難なために液体クロマトグラフィー質量分析への適用が困難であった化学物質の分析にも適用できる可能性がある。

第五章 総括と展望

OTA の分析では非常に複雑な試料マトリックスを含むペットフードに対応可能な分析法を確立し、添加試料を用いて妥当性を確認した。複数の試験機関を対象として実施した試験室間試験における OTA の平均回収率、併行相対標準偏差 (RSDr) 及び室間再現相対標準偏差 (RSDR) 及び Horwitz 比 (HorRat) は各々 75.6~83.1%, 3.5~6.1%, 5.0~15.0% 及び 0.23~0.68 であった。これらの結果から、本分析法は様々なペットフード試料における OTA の分析法として適していることが確認された。今後、ペットフード安全法に基づいて実施されるペットフードの検査に適用され、愛玩動物用飼料の安全確保に寄与するものと期待される。回収率に関しては基準を満たしているものの 90%を下回っているため、改善の余地がある。本研究で開発した方法では試料からの抽出を 1 回で行っているが、2 回抽出を行って抽出液を合わせ、同様の前処理操作を行うことで、回収率はより向上されると考えられる。

糖類の分析に関しては、異なる分子量の糖類及び糖アルコールについては質量分析計を用いることで識別を可能としているが、同じ分子量の糖に関してはクロマトグラフィーによる分離を必要とする。本研究ではアミノカラムとアミドカラムを組み合わせることで、糖及び糖アルコールの保持時間等の違いを利用して、食品中の糖の同定を可能としたが、炭素数 4 の糖アルコールや一部の六単糖についてはほとんど保持時間が同じものがある。また、保持時間が異なっても完全に分離ができていないものも複数あることから、クロマトグラフィーによる分離は今後の課題である。本研究では基本的に親水性相互作用を利用した分離を採用したが、更なる分離を追及するためには、異なる相互作用を利用する必要があると考えられる。筆者らはこの点において、今後様々な官能基を導入した固定相を合成し、糖の分離について検討する予定である。

5.1 後記

本研究は、著者が一般財団法人化学物質評価研究機構において研究開発業務の一部として行った内容について、2014 年 4 月から 2017 年 3 月までの 3 年間、埼玉大学大学院理工学研究科後期博士課程在学中に、同大学理工学部渋川雅美教授の指導のもと、更に深く掘り下げて研究を進めたものである。

5.2 付記

5.2.1 本研究に関する学会発表

- 1) 和田 丈晴, 齋藤 伸吾, 渋川 雅美, 「ポストカラム塩素付加-LC/MS 法による食品中の糖質の分析」, 日本分析化学会第 64 年会, 2015 年 9 月 11, 福岡
- 2) 和田 丈晴, 齋藤 伸吾, 渋川 雅美, 「液体クロマトグラフィー質量分析による糖質の一斉分析」, 日本分析化学会第 76 回分析化学討論会, 2016 年 5 月 29 日, 岐阜

5.2.2 本研究に関する論文発表

- 1) T. Wada, H. Saito, K. Aoyama, S. Saito, M. Shibukawa, “Development and inter-laboratory study of a method for quantifying ochratoxin A in pet foods”, *World Mycotoxin Journal*: 0 (0) - Pages: 1 - 10, DOI: <http://dx.doi.org/10.3920/WMJ2015.1953>, Published Online: June 13, 2016

5.2.3 参考論文

- 1) Takeharu Wada, I Wayan Sumardika, Shingo Saito, I Made Winarsa Ruma, Eisaku Kondo, Masami Shibukawa and Masakiyo Sakaguchi, Identification of novel components leading to anti-tumor activity besides the major ingredient Cordycepin in the *Cordyceps militaris* extract, *Journal of Chromatography B* (投稿予定)

5.3 謝辞

多くの方々の支えによって、今日まで研究を進めることができました。特に本論文を執筆するに当たり、微に入り細に入り、懇切丁寧にご指導並びにご鞭撻を賜りました埼玉大学大学院理工学研究科渋川雅美教授に心より感謝申し上げます。

研究の遂行に当たり、技術的、学術的観点のみならず、研究者としての在り方についてご指導を賜りました埼玉大学大学院理工学研究科齋藤伸吾准教授、半田友衣子助教及び加藤美佐技術職員には深く感謝いたしております。また、文献の調査、論文の作成、研究計画発表会、中間報告会及び雑誌会等でご支援いただきました大内和希様、中村圭介様、松本篤正様、石川順子様、宮内さおり様並びに渋川研究室の皆様にも深く感謝いたします。

本論文を作成するに当たりご指導いただきました埼玉大学大学院理工学研究科の松岡浩司教授、小林秀彦教授及び東京薬科大学薬学部医療薬物薬学科の柳田顕郎教授には深く感謝いたしております。カビ毒の分析法開発に関しましては、技術面でのご協力及び論文の執筆等でご支援を賜りました青山幸二様、野村昌代様を初めとする独立行政法人農林水産消費安全技術センターの皆様にご感謝申し上げます。糖の分析に関しましては試料及びアポトーシスに関するデータをご提供いただきました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科細胞生物学の阪口政清准教授に御礼申し上げます。

博士課程への進学及び研究テーマの選定等で多大なるご支援、ご指導を賜りました千葉大学名誉教授小熊幸一先生に深く感謝申し上げます。

社会人として博士課程へ進学するに当たり、ご理解をいただき、また在学中も大いなるご支援をいただきました一般財団法人化学物質評価研究機構の原孝晴様、久米猛元理事、四角目和宏理事、栗原勇副長を初めとする役職員の皆様にご心より御礼申し上げます。

最後に、社会人と学生の両立を生活面で支えてくれた妻と娘に深い感謝の意を表し、謝辞といたします。