

第 6 章

弱い力を主相互作用とする抽出分離剤の 実試料分析への適用性評価

*Application of the extraction/separation materials
having a weak force as the main interaction to
the actual sample analyses*

6.1 DBP 樹脂を用いる玄麦中クロピラリドの定量

6.1.1 緒言

第3章において開発した DBP 樹脂はハロゲン化芳香族化合物に対して高い親和性を示した。一方、非ハロゲン化芳香族化合物に対する親和性は非常に低く、ハロゲン基の有無により分離・分画が可能であるということが判明した。このことは、DBP 樹脂はハロゲン化芳香族化合物類の選択的固相抽出剤としての可能性を示している。そこで、実試料を用いて DBP 樹脂の有用性を検証した。

クロピラリド (Clopyralid : 3,6-dichloropyridine-2-carboxylic acid) は広葉雑草に対して植物ホルモン作用を有する除草剤の一種である。我が国での農薬登録はないが、海外では穀類、菜種、トウモロコシなどに使用されているため、我が国でも暫定基準値が設定されている。平成 20 年度の輸入米麦検査ではアメリカ、カナダ、オーストラリアの三カ国の輸入小麦検体のうち 17 % から 0.01~0.04 ppm のクロピラリドが検出されている [1]。クロピラリドは非常に安定な化合物であり哺乳類による代謝も受けにくく、また土壌などにも残留しやすいため、クロピラリドにより汚染された家畜粗飼料を摂取した牛などのふんから作られる堆肥からもクロピラリドが検出される。それを利用した国内農家のトマトや菊などが生育障害を受けた例が多数報告されている [2,3]。厚生労働省が定める農産物のクロピラリド試験法では、溶媒抽出の後、ケイソウ土や C18 シリカゲルなどを用いた多段階のカラム精製を経て液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS) により測定することが規定されている[4]。このような現行の残留農薬分析法は試料前処理工程が煩雑で、分析者にとって負担が大きいため、近年では QuEChERS 法と呼ばれる簡便な試料前処理手法と LC-MS/MS や GC-MS などの高選択的な分離・検出法とを組み合わせた分析手法が提案されている [5]。しかし、クロピラリドやピクロラム (Picloram : 4-amino-3,5,6-trichloropyridine-2-carboxylic acid) といったハロゲン化ピリジンカルボン酸系の薬剤について、QuEChERS 法による玄米試料の精製は回収率が低いといった問題が報告されている[6]。また、LC-MS/MS による農薬の一斉分析法でも、

クロピラリドの検量線の直線性 [7] や確認イオンの選定 [8] 等幾つかの問題点が指摘されている。質量分析計のような高選択的検出器を用いた分析手法であっても、従来の試料前処理方法では夾雑成分の除去が不十分な可能性があり、それ由来する妨害が分析値の信頼性・安定性を欠く要因となってしまうため、より高度な精製法の開発が必要となる。

そこで本節では第3章で試作したDBP樹脂を用い、簡便な固相抽出法による濃縮・精製を行うことで、クロピラリドを高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC-UV) 等汎用性の高い分析機器で定量可能とすることを目指した。

6.1.2 実験

6.1.2.1 試薬

クロピラリドは Fluka 製 (純度: 99.3%) を用いた。メタノールはメルク製 (HPLC 用) を用いた。これ以外の試薬は、和光純薬工業製の試薬特級または HPLC 用を用いた。クロピラリドの測定用原液は、クロピラリド 10 mg をエタノール (HPLC 用) 10 mL に溶解して調製し、測定溶液は原液を適宜希釈して使用した。純水は、東レ製超純水製造装置 LV408 で製造されたものを用いた。

6.1.2.2 2,4-ジブromフェノキシ基導入固相抽出剤 (DBP 樹脂) の調製

2,4-ジブromフェノキシ基導入固相抽出剤 (DBP 樹脂) の調製は、第3章 3.2.2 に示すとおりである。DBP 樹脂 100 mg を、VARIAN 製空カートリッジ (容量: 1 mL) に乾式充填した。作製した DBP 樹脂充填カートリッジは、使用前にメタノール 10 mL, 試料負荷に用いる溶媒 10 mL を順次通液してコンディショニングした。

6.1.2.3 HPLC 装置

HPLC 装置は、島津製作所製 LC-10AD (VP) ポンプ、同 DGU-10A 脱気装置、同 CTO-10A (VP) カラム恒温槽及び同 SPD-6 検出器で構成した。測定条件は以下の通り設定した。カラム: GL サイエンス製 InertSustain[®] C18 (250 mm×4.6 mm

i.d., 粒子径 5 μm), 移動相: 50 mMリン酸水溶液/メタノール (6/4 v/v), 流量: 1.0 mL min⁻¹, カラム温度: 50 °C, 検出波長: 280 nm, 注入量: 5 μL 。

6.1.2.4 DBP 樹脂におけるクロピラリドの吸脱着条件の検討

DBP 樹脂におけるクロピラリドの吸脱着条件を設定するため, クロピラリドの構造類似化合物を用いて DBP 吸着剤のハロゲン認識能を評価した。評価のための溶質には, 安息香酸, ピリジンカルボン酸等のクロピラリドと共通の官能基を有する 11 種の化合物を用いた。これらの溶質を各 10 ppm になるようにメタノール, エタノール, 2-プロパノール, アセトン及びアセトニトリルに溶解させ, その 10 mL を DBP 樹脂充填カートリッジに通液した。その後, メタノール/2%ジエチルアミン水溶液 (7/3 v/v) 10 mL で溶出させ, 溶出液中の各溶質濃度を HPLC-UV にて測定し, 回収率を算出した。

6.1.2.5 試験試料と調製

添加回収に適用した玄麦試料には岩手県産ゆきちから種 (小麦試料 A), 石川県産ナンブ種 (小麦試料 B), 石川県産シロガネ種 (小麦試料 C), および岩手県産ファイバースノウ種 (大麦試料 A) を用いた。これら玄麦試料の前処理操作のプロトコールを Fig. 2 に示す。ミルを用いて均一化した玄麦試料 50 g を正確に量り, そこに水 50 mL を加え 30 分間静置した後にアセトン 150 mL を加え, スパーテルで攪拌しながら 30 分間超音波を照射し抽出を行った。ビーカー内容物すべてをプラスチック製遠心沈殿管に移し, 4000 rpm で 10 分間遠心分離を行い, 上澄みを 200 mL のメスフラスコに移した。さらに, 沈殿物にアセトン適量を加え, 同様に攪拌下で超音波を照射し, 遠心分離により得た上澄みを先の上澄みと合わせた。得られた上澄みを, アセトンで 200 mL に定容したものを玄麦抽出液とした。玄麦抽出液 5 mL を DBP 吸着剤 200 mg 充填カートリッジに通過させた後, アセトン 5 mL とメタノール 10 mL を順次通液して DBP 吸着剤の洗浄を行った。DBP 樹脂に捕捉されたクロピラリドの溶出は, メタノール/2%ジエチルアミン水溶液 (7/3 v/v) 2 mL で行った。この溶出液中のクロピラリドを HPLC-UV を用いて定量した。

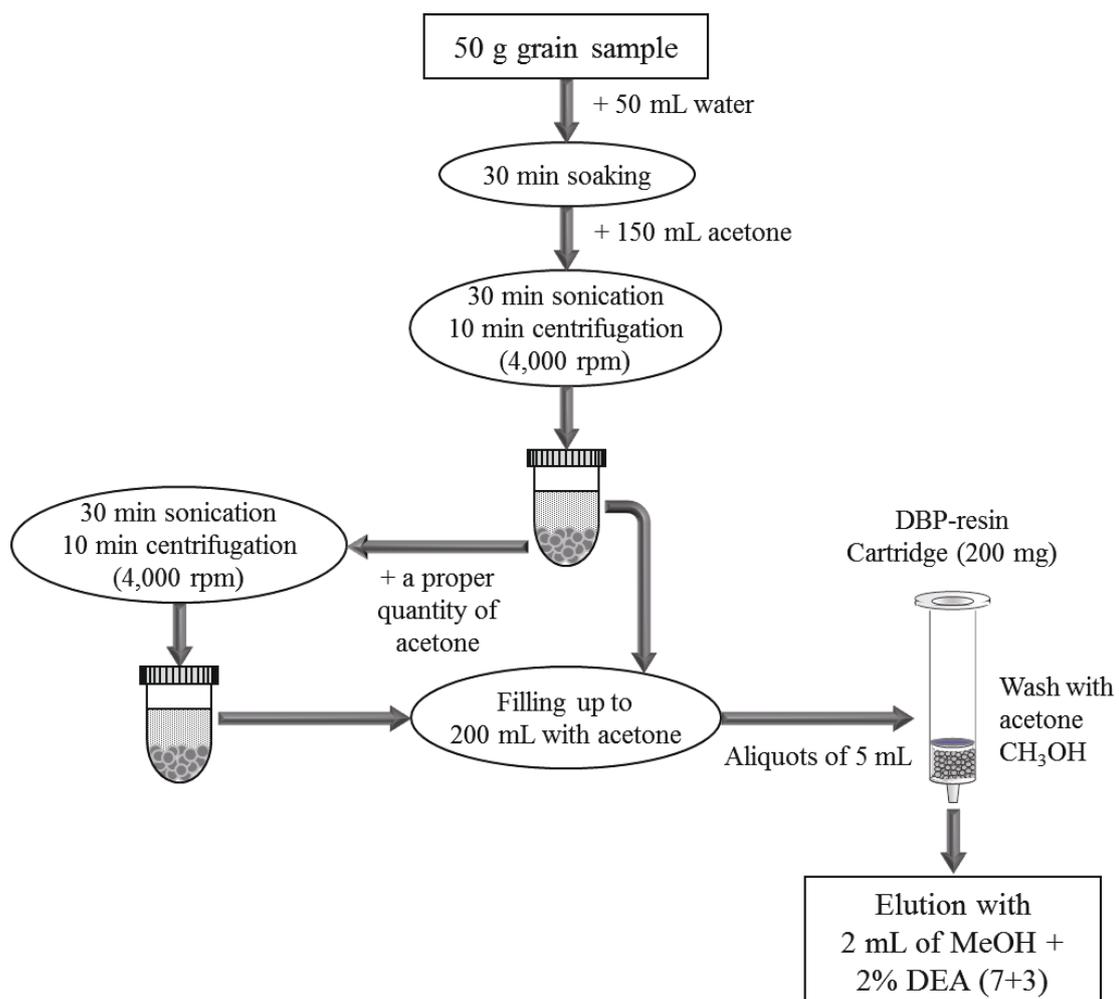


Fig. 6.1.1 Schematic diagram of the pretreatment procedure by the proposed method

6.1.3 結果と考察

6.1.3.1 DBP 樹脂におけるクロピラリドの吸脱特性

種々の有機溶媒に溶解させたクロピラリドを含む各種溶質の溶液を DBP カートリッジでの回収率を Table 6.1.1 に示す。

第 3 章及び第 5 章において、フェノキシ基導入樹脂とハロゲン化フェノール及びハロゲン化安息香酸類との間に選択的な親和力が働いていたが、クロピラリドの分子構造は樹脂との親和力の根源となる芳香環やハロゲン原子、カルボキシル基を有しているため、DBP に対し吸着選択性を発現した。第 3 章における各種樹脂の固相抽出実験に溶質として用いなかったピリジン類についても DBP に対する親和力を調査したが、Table 6.1.1 に示す安息香酸と 2-ピリジンカルボン酸の吸着挙動から、ベンゼン核よりもピリジン核に対する親和力が高いことが結果からわかった。また、Table 6.1.1 に示した δ_a 値はヒドロキシ基やカルボキシル基に対する親和力の指標であり、溶媒間で溶質に対する親和性の差異から、DBP-溶質間での水素結合性の相互作用が強いことが確認された。分かった。また、DBP 樹脂に吸着されたクロピラリドは、メタノール-水混合溶媒ではほとんど溶出されなかったが、酸やアミンなどを添加することにより溶出力が飛躍的に向上することが分かった。特にギ酸やトリフルオロ酢酸よりも、ジメチルアミンやジエチルアミンを添加した溶出液の方がより速やかにクロピラリドを溶出することが可能で、メタノール 2%ジエチルアミン水溶液 (7+3 容量) が最適な組成であった。これらの結果からも、クロピラリドのカルボキシル基と DBP 官能基近傍のヒドロキシ基間で生じる静電気が吸着に大きく寄与していると示唆され、酸はカルボキシル基と競合し、またアミンはヒドロキシ基と競合することによりクロピラリドの脱着効果を発揮したものと推定された。

DBP 樹脂に吸着されたクロピラリドは、メタノール-水混合溶媒ではほとんど溶出されなかった。そこで、ヒドロキシ基やカルボキシル基に対する親和力の切断を目的として、メタノール-水混合溶媒に酸あるいはアミンを添加して溶出性を調べた。その結果、ジエチルアミンを添加することにより速やかに溶出され、メタノール/2%ジエチルアミン水溶液 (7/3 v/v) が最適な組成であった。クロピラリドのカルボキシル

基と DBP 官能基根元のヒドロキシ基間とのクーロン力に対し、酸はカルボキシル基と競合し、またアミンはヒドロキシ基と競合するためにクロピラリドの脱着に効果を発揮したものと推定された。

6.1.3.2 DBP 樹脂の実試料への適用

玄米や玄麦等の穀物試料は、同量程度の水を加え 15 ~ 30 分間ほど浸漬させた後にアセトン等の溶解力の高い有機溶媒を加えて抽出することで、極性農薬に対し良好な回収率を得ることが可能である [12]。そこで、本研究でも、水 50 mL を加え 30 分間静置した後にアセトン 150 mL を加え、スパーテルで攪拌しながら 30 分間超音波を照射し抽出を行った。クロピラリド標準溶液、岩手県産大麦玄麦抽出液及びクロピラリド添加玄麦抽出液のクロマトグラムを Fig. 6.1.2 に示す。HPLC の移動相条件は移動相中のメタノール比率をクロピラリドが 7 ~ 8 分に検出されるようにした。標準溶液のクロマトグラム (Fig. 6.1.2A) から求めた検出限界は、絶対注入量で 0.5 ng (S/N = 3) であった。また、ピーク面積値を基に作成した検量線は、0.5 ~ 50 ng の範囲で良好な直線 ($r^2 = 1.000$) を与えた。

DBP 樹脂を利用し固相抽出を行った岩手産大麦玄麦試料のクロマトグラムを Fig. 6.1.2B に示す。本試料中からはクロピラリドは検出されなかったため、これを空試験試料とした添加回収実験を行った。この大麦玄麦抽出液に玄麦試料あたり 1 ppm に相当するクロピラリドを添加し、得られた最終溶液のクロマトグラムを Fig. 6.1.3C に示す。UV 検出器を用いる測定では、光吸収を有する夾雑成分による妨害を受けやすいため、高い定量性を確保するためには前処理における精製度の向上が必要となる。DBP 吸着剤を適用した本法ではその夾雑成分に由来するバックグラウンド及びピークは大幅に減少しており、クロピラリドのピークを十分に確認することが可能となった。さらに品種の異なる他の国産玄麦 3 種類についても同様の実験を 3 回繰り返し行った。結果を Table 6.1.2 に示す。それぞれの試料の平均値を算出したところ、88 ~ 95%と高い回収率が得られた。試料検体あたりのクロピラリドの検出限界は $0.16 \mu\text{g g}^{-1}$ であり、今回適用した玄麦試料に対して十分に対応可能であった。

Table 6.1.1 Recovery experiments for clopyralid and its analogue on a DBP-resin cartridge

analyte	solvents				
	methanol (7.5)	ethanol (5)	2-propanol (4)	acetonitrile (2.5)	acetone (2.5)
benzene	nr	nr	nr	nr	nr
chlorobenzene	nr	nr	nr	nr	nr
1,4-dichlorobenzene	nr	nr	nr	nr	nr
pentachlorobenzene	nr	nr	nr	nr	nr
benzoic acid	nr	51.0	85.1	98.0	85.9
2,5-dichlorobenzoic acid	49.6	98.7	98.5	99.4	> 100
pyridine	nr	nr	nr	nr	nr
2-chloropyridine	nr	nr	nr	nr	nr
2,5-dichloropyridine	nr	nr	nr	nr	nr
2-pyridinecarboxylic acid	24.4	63.1	97.6	99.1	49.7
clopyralid	98.9	99.8	93.0	> 100	99.3

* nr, not retained. number in the parenthesis corresponds to δ_a value

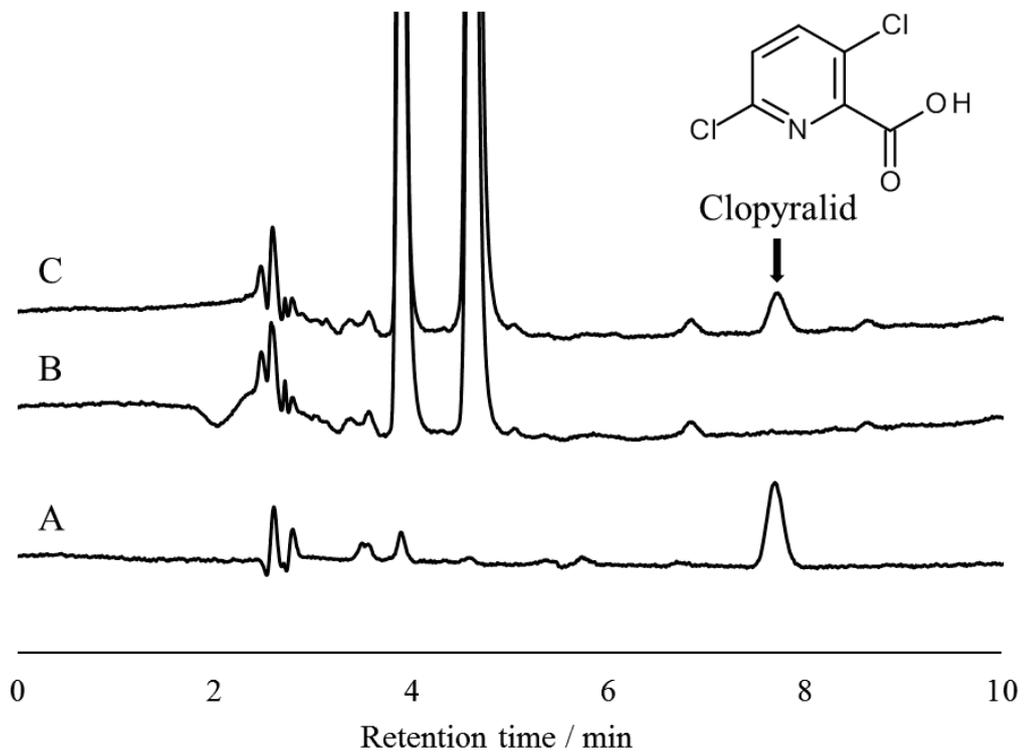


Fig. 6.1.2 Typical chromatograms of (A) clopyralid standard solution ($1 \mu\text{g g}^{-1}$), and wheat sample (B) without and (C) with clopyralid addition ($0.625 \mu\text{g g}^{-1}$)

Table 6.1.2 Recovery of chlopyralid from spiked wheat and barley samples

samples	prefecture of origin	recovery ^a %	RSD %
wheat A	Iwate	93.1	7.17
B	Ishikawa	90.6	6.62
C	Ishikawa	89.9	6.43
barley A	Iwate	88.5	0.92

*a: Mean of three determinations.

6.1.4 結 言

塩素やカルボン酸を有するピリジンの誘導体であるクロピラリドは DBP 樹脂に対し非常に強い親和力を発揮した。その結果、DBP 樹脂は、従来の逆相・順相といった保持機構とは異なる保持特性を示し、抽出や精製で用いられる汎用有機溶媒中に溶解したクロピラリドを強固に吸着することが可能であった。DBP 樹脂が発現するクロピラリドに対する吸着選択性を利用し、DBP 樹脂を玄麦中クロピラリド分析へ適用したところ、非常に簡便な前処理操作で夾雑成分を大幅に除去することが可能となり、HPLC-UV 法によるクロピラリドの高感度測定に成功した。これらの結果から、他の穀物や野菜、堆肥等のクロピラリド分析においても、分析に要する操作と時間を大幅に削減できる可能性が示唆された。さらに、LC-MS/MS 等を用いることで微量のクロピラリドに対してもバックグラウンドの低いクロマトグラム上で高感度・高選択的に検出を行うことも期待できる。有用な吸着剤であることが判明した。

引用文献

- [1] 農林水産省: 玄麦の残留農薬等の調査結果, 「20 年度に政府が買い付けた輸入米麦の残留農薬等の分析結果の取りまとめ」, (2008).
http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/kome/k_beibaku/pdf/h20_yunyu.pdf,
(accessed 2012-3-16).
- [2] 八木寿治, 関根優子, 白井裕治: 肥料研究報告, **3**, 51 (2010).
- [3] R. Uegaki, M. Ebato, M. Sutoh, Y. Cai: *Grassland Sci.*, **55**, 135 (2009).
- [4] 厚生労働省通知, 食安発第 1003001, 平成 18 年 10 月 3 日.
- [5] M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Stajnbaher, F. J. Schenck: *J. AOAC Int.*, **86**, 412 (2003).
- [6] U. Koesukwiwat, K. Sanguankaew, N. Leepipatpiboon: *Anal. Chim. Acta*, **626**, 10 (2008).
- [7] Y. Fillâtre, D. Rondeau, B. Bonnet, A. Daguin, A. Jadas-Hécart, P-Y. Communal: *Anal. Chem.*, **83**, 109 (2011).
- [8] A. Schaner, J. Konecny, L. Luckey, H. Hickers: *J. AOAC Int.*, **90**, 1402 (2007).

- [9] K. Kimata, T. Hirose, K. Moriuchi, K. Hosoya, T. Araki, N. Tanaka: *Anal. Chem.*, **67**, 2556 (1995).
- [10] M. Turowski, N. Yamakawa, J. Meller, K. Kimata, T. Ikegami, K. Hosoya, N. Tanaka, E. R. Thornton: *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 13836 (2003).
- [11] T. Tsukamoto, A. Yamamoto, W. Kamichatani, Y. Inoue: *Chromatographia*, **70**, 1525 (2009).
- [12] 坂真智子, 飯島和昭, 狛由紀子, 藤田真弘, 小田中芳次, 加藤保博: 日本農薬学会誌, **31**, 431 (2006).
- [13] 千原秀昭, 稲葉章訳: 「アトキンス物理化学要論」, 第3版, p. 335, 東京化学同人, 東京, 2003; P. W. Atkins: “*The Elements of Physical Chemistry Third Edition*”, Oxford University Press, London, 2001.
- [14] 中村洋監修: 「分析試料前処理ハンドブック」, p. 146, 丸善, 東京 2003.
- [15] 中村洋監修: 「高速液体クロマトグラフィーハンドブック」, p. 179, 丸善, 東京, 2000.

6.2 pNP 樹脂を用いるアルコール飲料中オクラトキシンの定量

6.2.1 緒言

第 5 章において、電子吸引性を示すシアノフェノキシ基、ニトロフェノキシ基を導入した固相抽出剤を開発した。これらの固相抽出剤は双極子を有する化合物に対して高い親和性を示すことが明らかとなった。そこで、これら電子吸引性を示す固相抽出剤の実試料分析への適用性を検証するため、これらの固相抽出剤を食品中危害因子であるオクラトキシ A (ochratoxin A : OTA) の前処理に応用した。

OTA は *Penicillium verrucosum* などにより二次代謝物として産生されるカビ毒の一種である [1]。OTA 産生菌は温暖地域から寒冷地域まで幅広く分布しているため、OTA による食品の汚染は深刻な国際問題となっている [2]。OTA は WHO の国際がん研究機関 (International Agency for Research on Cancer: IARC) によりグループ 2B (ヒトに発ガン性を示す可能性がある) に分類されている [3]。OTA の規制について、EU では食品中の最大残留基準値を Table 6.2.1 に示すとおりに設定している [4]。また、コーデックス委員会 (Codex alimentarius commission) は小麦、大麦、ライ麦の3種の穀類に対しそれぞれ $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ という基準値を設定している [5]。1998 年に発表されたコーデックス委員会による報告では、ヨーロッパにおけるヒト (体重 60 kg) の1日当たりの OTA 暴露量が最も多い食品は穀物の 1.9 ng kg^{-1} で、次いで赤ワイン (0.54 ng kg^{-1})、コーヒー (0.43 ng kg^{-1})、ビール (0.27 ng kg^{-1})、豚肉 (0.13 ng kg^{-1})、干しぶどう (0.11 ng kg^{-1})、香辛料 (0.09 ng kg^{-1})、家きん肉 (0.03 ng kg^{-1})、豆類 (0.02 ng kg^{-1}) という結果であった [6]。

Nakajima らは日本国内で流通するビールを対象とした OTA による汚染実態を調査し、分析を行った輸入品のうち 91.5% (96 検体中 86 検体, $1.2 \sim 66.2 \text{ pg mL}^{-1}$)、日本国内品で 95.5% (22 検体中 21 検体, $2.2 \sim 44.8 \text{ pg mL}^{-1}$) の検体から OTA が検出され、国内品のビール試料から検出される平均的な OTA 量は北アメリカやヨーロッパの試料の結果と類似していたと報告した [7]。

Table 6.2.1. Maximum levels for Ochratoxin A in foodstuffs

Foodstuff	Maximum levels ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Unprocessed cereals	5.0
All products derived from unprocessed cereals, including processed cereal products and cereals intended for direct human consumption with the exception of foodstuffs	3.0
Dried vine fruit (currants, raisins and sultanas)	10.0
Roasted coffee beans and ground roasted coffee, excluding soluble coffee	5.0
Soluble coffee (instant coffee)	10.0
Wine (including sparkling wine, excluding liqueur wine and wine with an alcoholic strength of not less than 15 % vol) and fruit wine	2.0
Aromatised wine, aromatised wine-based drinks and aromatized wine-product cocktails	2.0
Grape juice, concentrated grape juice as reconstituted, grape nectar, grape must and concentrated grape must as reconstituted, intended for direct human consumption	2.0
Processed cereal-based foods and baby foods for infants and young children	0.5
Dietary foods for special medical purposes bintended specifically for infants	0.5
Green coffee, dried fruit other than dried vine fruit, beer, cocoa and cocoa products, liqueur wines, meat products, spices and liquorice	-

この結果について Nakajima らは、日本がこれら地域で生産された麦芽を大量に輸入しビールの原料に用いていることが要因となる可能性を示唆した。さらに、2005～2006年にかけて行われた日本国内の小売店で販売されている食品を対象とした OTA 量の調査では、検出された試料の平均は小麦粉で $0.10 \sim 0.48 \mu\text{g kg}^{-1}$ (50 試料中 24 検体から検出)、ライ麦で $0.28 \sim 2.59 \mu\text{g kg}^{-1}$ (10 試料中 7 検体)、そば粉で $0.16 \sim 0.179 \mu\text{g kg}^{-1}$ (10 試料中 6 検体)、ワインで $0.07 \sim 0.72 \mu\text{g kg}^{-1}$ (10 試料中 6 検体)、ビールで $0.01 \sim 0.05 \mu\text{g kg}^{-1}$ (20 試料中 12 検体)との結果が報告された [8]。

OTA が食品の製造工程で完全に分解されずに残留し、さらに家畜粗飼料に由来する OTA が畜肉にも残留していることが多くの科学データにより報告されているものの、我が国には人の食用及び家畜用の飼料などに対する残留基準値は 2014 年現在では設定されていない [9]。家畜粗飼料の輸入量が多く、かつ食糧自給の低い我が国も OTA の暴露量は世界の先進国とほとんど変わらないと推察されるため、今後 OTA の基準値が EUなどを参考に設定される可能性が高い。

食品中の微量 OTA を正確に測定するには、試料前処理において高い精製効率が必要とされる。OTA を含む食品試料の前処理には主にイムノアフィニティーカラム (Immuno affinity column: IAC) [8, 10-17] の使用が主流である。しかしながら、生物学的な親和力に基づく分離場を利用する場合、OTA に対する分離選択性は非常に優れているものの、ランニングコストや使用期限、耐溶媒性などの問題が大きく、分析者にとっては負担が大きい。近年では分子鑄型ポリマー MIPs [18-21] を用いるという報告もあるが、MIPs では少量で非常に効果であるマイコトキシンをテンプレート分子に用いなくてはならないため、ルーティン分析用の試料前処理用吸着剤としては実用性に欠ける。この他、選択的な吸着性を有する合成核酸であるアプタマー [22-24] の分析分野への適用も報告されているが、前処理剤としての応用は始まったばかりである。また、OTA の検出システムは HPLC-FL [7, 8, 10-19, 21, 25-28] や HPLC-MS/MS [29-34] , ELISA [35-39] などが多用される。

オクラトキシン類の化学構造を Fig. 6.2.1 に示す。OTA は分子内に塩素原子とフェノール性水酸基、カルボキシル基のほかに、アミド基やフェニル基、イソクマリン骨格といった π 共役系も有しているため、第 5 章で試作した *p*-シアノフェノキシ基、*p*-

ニトロフェノキシ基を導入した樹脂が有する双極子モーメントに対し高い親和性を示すものと予想される。

そこで、第5章で調製した種々の樹脂を用いて OTA に対する吸着挙動を確認し、OTA の試料前処理への適用性を評価した。その結果、*p*-ニトロフェノキシ基型樹脂 (*p*NP 樹脂)が OTA に対し最も好適であったため、*p*NP 樹脂を用いてワインやビール等のアルコール飲料中の OTA の試料前処理に適用した。

6.2.2 実験

6.2.2.1 試薬

本検討には以下の試薬を用いた。アセトニトリル (Sigma-Aldrich 製, CHROMASOLV[®] gradient grade, for HPLC, $\geq 99.9\%$), メタノール (Merck 製, LiChrosolv[®] gradient grade for HPLC), アセトン (Sigma-Aldrich 製, Cgromadolv[®], for HPLC, $\geq 99.8\%$), 酢酸エチル (和光純薬製, 高速液体クロマトグラフ用), エタノール (和光純薬製, 高速液体クロマトグラフ用), 1-プロパノール (和光純薬製, 高速液体クロマトグラフ用), Supelco 製 Ochratoxin A (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in benzene : acetic acid (99:1), Lot:LB95283)。Supelco 製の OTA 溶液をアセトニトリルで 50 倍希釈し、それを固相抽出や添加回収実験などに使用した。純水は、東レ製超純水製造装置 LV408 で製造されたものを用いた。

6.2.2.2 高速液体クロマトグラフィー

HPLC システムには、GL サイエンス製の EZChrom Elite で制御された GL7400 シリーズを用いた (GL-7410 HPLC Pump, GL-7420 Auto Sampler, GL-7430 Column Oven, GL-7450 UV Detector, GL-7453A FL Detector, GL-7480 Solvent Reserver により構成)。測定条件は以下の通り設定した。カラム: GL サイエンス製 InertSustain[®] C18 (250 mm \times 4.6 mm i.d., 粒子径: 5 μm), 移動相: 4.4%酢酸/アセトニトリル (55/45 v/v), 流量: 0.3 mL min⁻¹, カラム温度: 50 $^{\circ}\text{C}$, 検出: 励起波長 333 nm, 蛍光波長 460 nm, 注入量: 5 μL 。

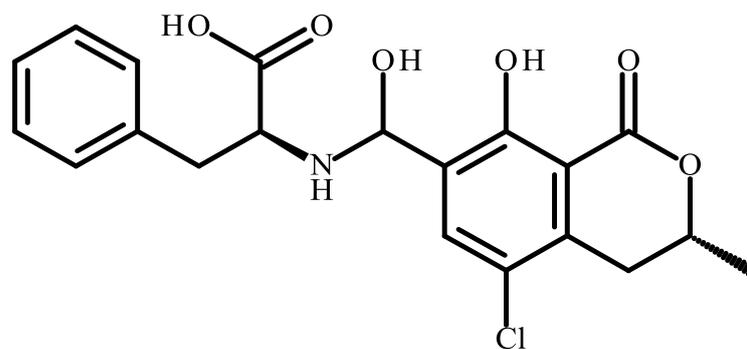


Fig. 6.2.1 Chemical structure of ochratoxin A

6.2.2.3 *p*-ニトロフェノキシ基導入固相抽出剤 (*p*NP 樹脂) の調製

*p*NP 樹脂をはじめとする *p*-置換フェノキシ基導入固相抽出剤の調製は、第 5 章に示した通りである。グリシジルメタクリレートとエチレンジメタクリレートとの共重合により合成した基材樹脂 (45 ~ 90 μm) に、*p*-ニトロフェノールを反応させた。反応後、硫酸酸性下で残存エポキシ基を開環させジオール基とした。同様の方法で *p*-シアノフェノール、*p*-フルオロフェノール、*p*-クロロフェノール、*p*-ブロモフェノール及びフェノールを導入した樹脂を調製した。それぞれ、*p*CP 樹脂、*p*FP 樹脂、*p*CIP 樹脂、*p*BrP 樹脂及び Phe 樹脂と表記する。得られたの官能基導入量及び導入した化合物の電子吸引性は Table 6.2.2 (Table 5.1 と同じ) に示した通りである。

6.2.2.4 各固相抽出剤における OTA の捕捉特性

得られた各 *p*-置換フェノキシ基導入固相抽出剤 100 mg を、VARIAN 製空カートリッジ (容量 1 mL) に乾式充填した。作製した *p*NP 樹脂充填カートリッジは、使用前にメタノール 10 mL、50 mM リン酸水溶液/アセトニトリル (4/6 v/v) 10 mL、純水 30 mL を順次通液してコンディショニングした。

各固相抽出剤における OTA の吸着特性は、各固相抽出剤を充填したカートリッジを用いて評価した。*p*NP 樹脂及び *p*-置換フェノキシ基導入固相抽出剤 100 mg を充填した固相抽出カートリッジにメタノール 10 mL、50 mM リン酸水溶液/アセトニトリル (4/6 v/v) 10 mL、純水 30 mL を順次通液してコンディショニングした。OTA 標準溶液 (1 ng mL^{-1}) 10 mL を、コンディショニング済のカートリッジに負荷させた。次いで、5 mM リン酸水溶液/アセトニトリル (5/5, v/v) 1 mL でカートリッジを洗浄して、捕捉された夾雑成分を洗い流した。その後、5 mM リン酸水溶液/アセトニトリル (4/6, v/v) を 1 mL ずつ 3 回通液して、それぞれの溶出液 (通過液) を採取した。溶出分画溶液中の OTA を HPLC-FL にて分離・定量した。

6.2.2.5 試験試料と調製

試験試料には、アルコール飲料としてワインとビールを選んだ。ワインには、チリ産及びフランス産の赤ワイン・白ワインをそれぞれ1種類、ビールは日本産を2種類とアメリカ産とオランダ産各1種類、さらにアイルランド産のダークビール1種類を用いた。

前処理操作のプロトコールを Fig. 6.2.2 に示す。*p*NP 樹脂及び *p*-置換フェノキシ基導入固相抽出剤 100 mg を充填した固相抽出カートリッジにメタノール 10 mL, 50 mM リン酸水溶液/アセトニトリル (4/6 v/v) 10 mL, 純水 30 mL を順次通液してコンディショニングした。各アルコール飲料 250 μ L を水/アセトニトリル (9/1, v/v) で 80 倍に希釈した試料溶液 20 mL を、コンディショニング済のカートリッジに負荷させた。次いで、5 mM リン酸水溶液/アセトニトリル (5/5, v/v) 1 mL でカートリッジを洗浄して、捕捉された夾雑成分を洗い流した。その後、50 mM リン酸水溶液/アセトニトリル (4/6, v/v) 1 mL で OTA を溶出させ、溶出液中の OTA を HPLC-FL にて分離・定量した。

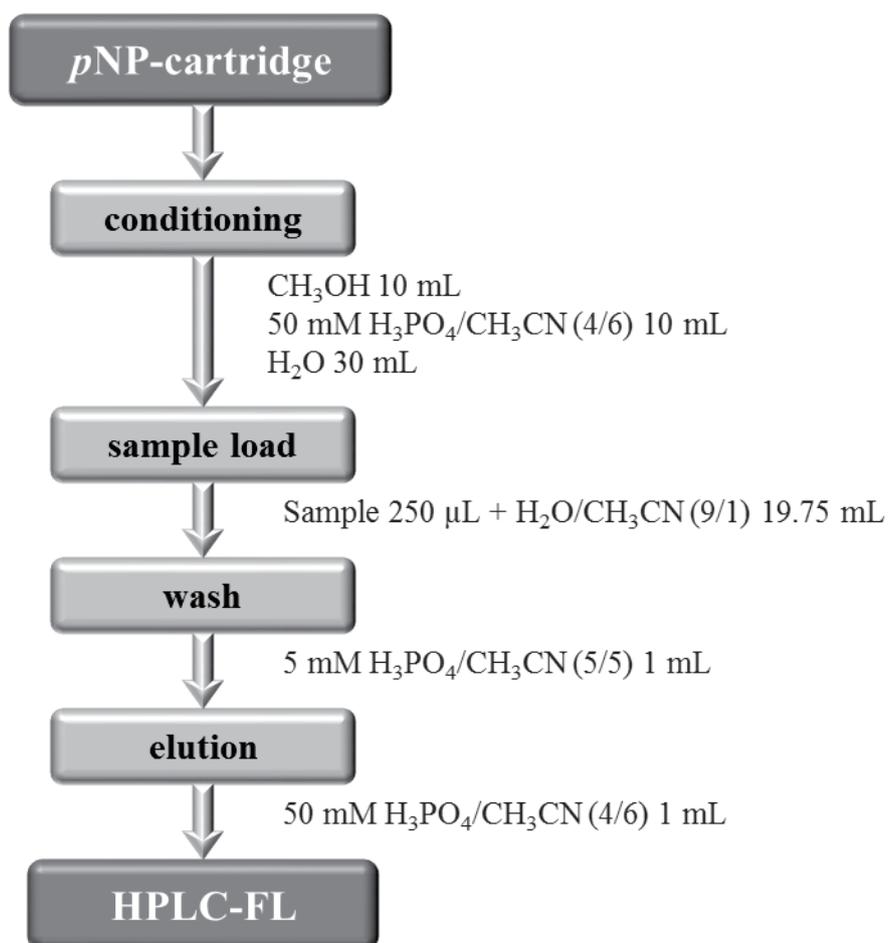


Fig. 6.2.2 Schematic diagram of the procedure for pretreatment of OTA

6.2.3 結果と考察

6.2.3.1 各固相抽出剤における OTA の捕捉特性

水/アセトニトリル (9/1, v/v) 調製した 1 ng mL^{-1} の OTA 溶液を 10 mL 負荷させ、その後、5 mM リン酸水溶液/アセトニトリル (4/6, v/v) を 1 mL ずつ 3 回通液した。カートリッジからの溶出液 (透過液) を順次捕集し、3 mL 目までの計 3 つの溶出分画液中の OTA 濃度を測定して回収率を求めた。結果を Fig. 6.2.3 に示す。

調製した各固相抽出剤における OTA の捕捉特性は、各固相抽出剤間で大きな差が観察された。置換基を持たない Phe 樹脂では第 1 溶出分画液中の OTA 量 (溶出した量) が最も高く、OTA との親和力がほとんどないものと推定した。ハロゲンで置換された官能基を有する固相抽出剤の場合には、ハロゲンの原子番号の大きい順に第 1 溶出分画液中の OTA 量が減少し、次いで *p*CIP 樹脂、*p*NP 樹脂の順に OTA の存在量は減った。一方、第 3 溶出分画液中の OTA 量が最も高かったのは *p*NP 樹脂であり、他の固相抽出剤では 10% 以下であった。*p*NP 樹脂を除く他の固相抽出剤では、3 回の通液で 90% 以上の OTA が溶出した。

これらの結果は、Hammett 則に基づく置換基の電子求引効果によって理解できる。Table 6.2.2 (Table 5.1 と同じ) に各種固相抽出剤に導入した化合物の電子求引性パラメータ δ_p 値を示す。フェノキシ基のエーテル酸素原子は電子供与性の官能基である。ベンゼンを介してパラ位にニトロ基のような電子求引性の官能基が置換されている場合、電荷の偏りによって生じる電気双極子モーメント μ は非常に大きくなる。これにより OTA との双極子間の相互作用が増大するため、*p*NP 樹脂が最も高い親和性を発現したものと考えられる。また、平面性の高い官能基を有する OTA に対し、*p*NP 樹脂が有するニトロ化芳香環は π - π 相互作用に OTA に対する親和性が増強された可能性も考えられる。なお、塩素と臭素が有する δ_p 値は同じにもかかわらず、OTA に対する吸着挙動に差が生じたのは、*p*BrP 樹脂が有する原子分極率に基づく分散相互作用が寄与しているためと推定される。

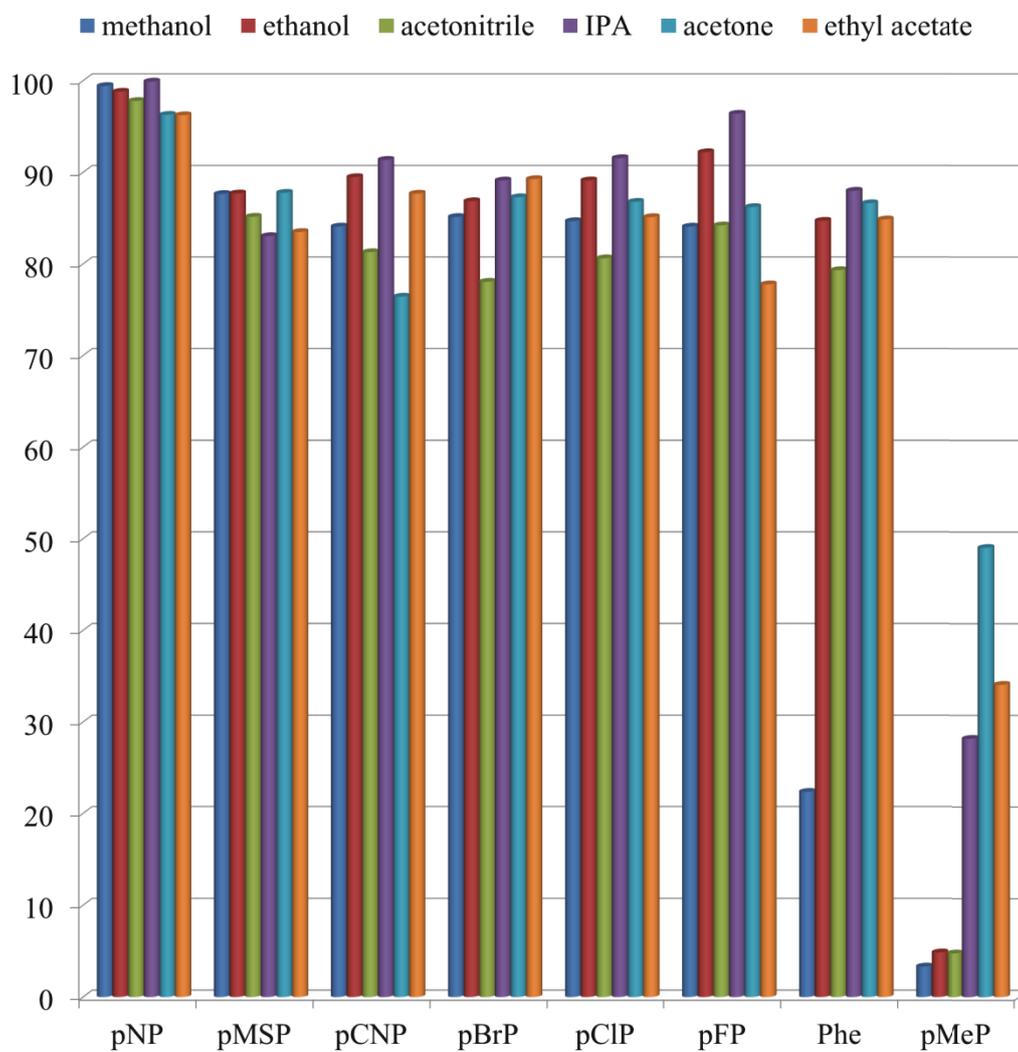


Fig. 6.2.3. Extraction efficiencies of OTA in organic solvents on various adsorbents.

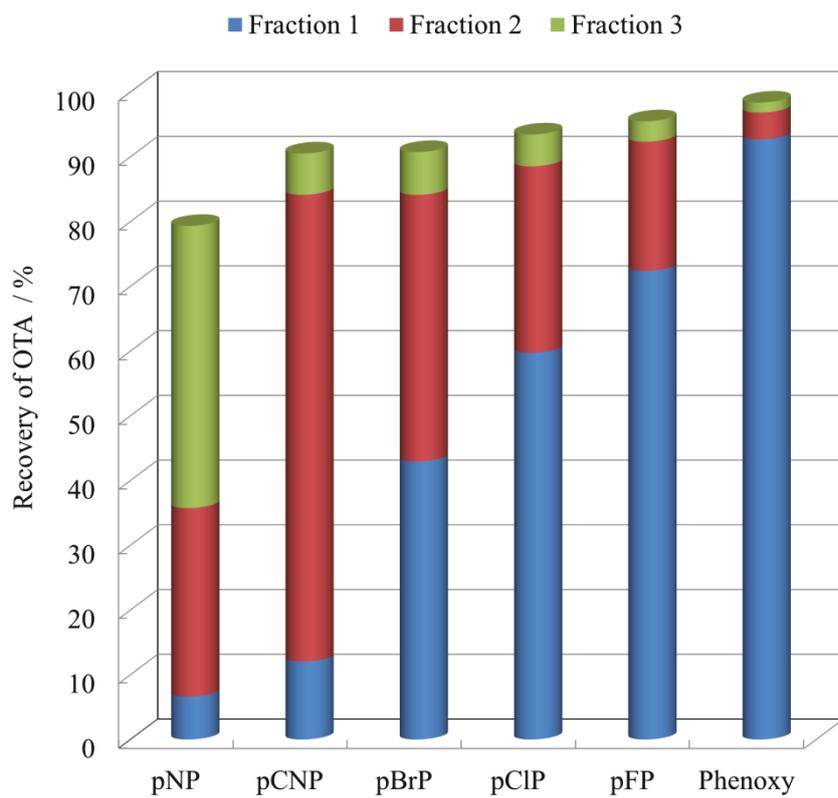


Fig. 6.2.4 Adsorption efficiencies of OTA on various phenoxy-resins

Fractions are eluted each 1 mL with 5 mM phosphoric acid / acetonitrile (4/6 v/v)

Table 6.2.2 Constants of electron withdrawing effect and contents of functional group in the prepared phenoxy-resins

phenoxy-resins	substituted groups	δ_p	contents of phenoxy group [mmol g ⁻¹]
Phe	H	0	1.22
<i>p</i> FP	F	0.06	—
<i>p</i> CIP	Cl	0.23	—
<i>p</i> BrP	Br	0.23	0.43
<i>p</i> CNP	CN	0.66	0.73
<i>p</i> NP	NO ₂	0.78	0.91

6.2.3.2 *p*NP 樹脂における OTA の脱着特性

前項の結果を受け、*p*NP 樹脂における OTA の脱着特性を調べた。*p*NP 樹脂を 1 mL シリンジ型カートリッジに 50 mg 充填したカートリッジを、前項と同様にコンディショニングし、 1 ng mL^{-1} の OTA 溶液を 10 mL を負荷させた。リン酸水溶液/アセトニトリル及びリン酸水溶液/メタノールを用い、リン酸濃度及び有機溶媒組成を変化させて OTA の溶出率を調べた。カートリッジからの溶出液を 1 mL ずつ順次捕集し、3 mL 目までの溶出分画液中の OTA の濃度を HPLC で定量し、定量値から求めた回収率を Fig. 6.2.5 に示す。

溶出液中のアセトニトリル組成が高いほど OTA の回収率は高く、またリン酸濃度が高いほど OTA の回収率は高くなった。50%アセトニトリルでは、リン酸濃度 25 mM 以上で定量的に溶出可能であった。溶離液中の有機溶媒をメタノールに変えて同様の検討を同様の実験を行ったが、本検討の範囲では OTA を効率良く溶出させることが困難であった。

この結果は、*p*NP 樹脂と OTA 間で作用する π - π 相互作用に基づくものと推定され、アセトニトリル分子内の π 電子により溶出力増強されたためと推定した。また、溶離液中のリン酸の代わりに酢酸を用いて同様の検討を行ったが、酢酸では OTA はほとんど溶出されなかった。これはリン酸と酢酸間のイオン強度に基づくものと考えられる。OTA 分子内には存在するフェノール性水酸基とカルボキシル基が存在しており、イオン強度が高い溶離液ほど OTA-*p*NP 樹脂間の極性相互作用を低減することができるためと考えられる。これらの結果から、溶離剤にはリン酸のほうが有効であると判断した。

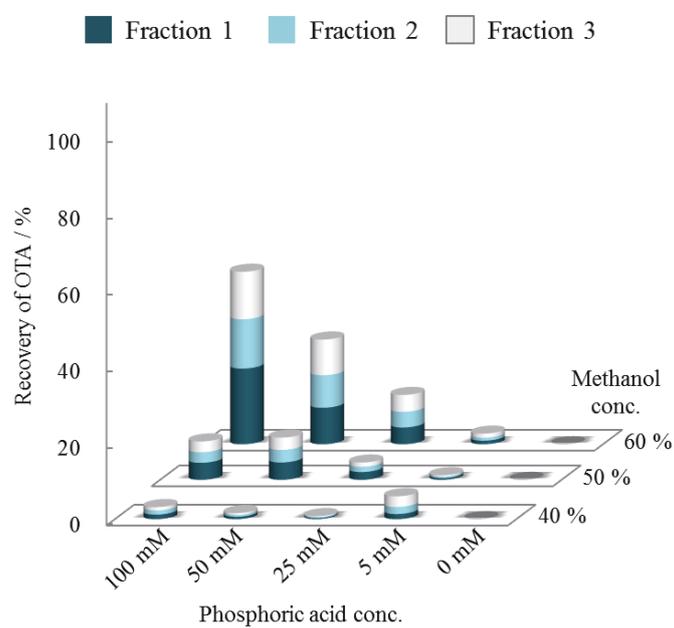
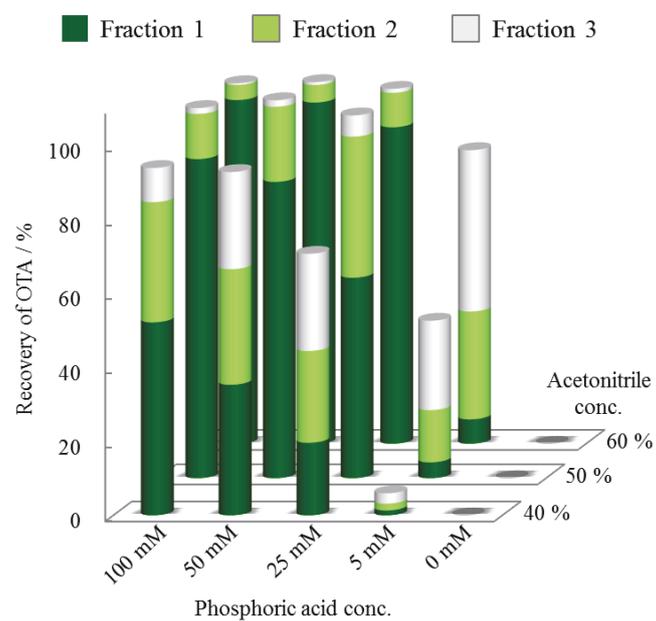


Fig. 6.2.5 Effect of acetonitrile and phosphoric acid content in eluent of OTA on the *p*NP-resin. Fractions are eluted each 1 mL with elution of each composition.

6.2.3.3 *p*NP 樹脂を前処理に用いたアルコール飲料中の OTA の測定

*p*NP 樹脂が有する OTA に対する親和性を利用した、ワイン及びビール中の OTA の固相抽出試験を行った。

ワイン及びビールは Fig. 6.2.3 に示した前処理プロトコールをに従い処理を行った。負荷後の洗浄液には 5 mM リン酸水溶液/アセトニトリル (5/5, v/v) 1 mL を、溶離液には 50 mM リン酸水溶液/アセトニトリル (4/6, v/v) 1 mL を用いた。溶出液を HPLC-FL を用いて OTA の分離・定量を行った。

OTA 標準溶液と、*p*NP 樹脂を用いて試料前処理を行ったワイン及びビールの抽出液とそれらに 0.5 ng L⁻¹ OTA を添加して前処理を行った時のクロマトグラムを Fig. 6.2.6 に示す。A は赤ワイン (Chile), B は白ワイン (Chile), C はビール (Japan) 及び E はダークビール (Republis of Ireland) のクロマトグラムである。また、B', C', D' 及び E' はそれぞれに 0.5 ng mL⁻¹ OTA を添加して前処理を行った溶液のクロマトグラムである。蛍光検出は発蛍光性溶質に対し高感度・高選択的な検出が可能であるが、ポリフェノール類等は OTA と同様に発蛍光性を有するためクロマトグラム上には夾雑成分由来の妨害ピークが検出されて定量性が低下する恐れがある。しかし、*p*NP 樹脂を試料前処理に適用した本法では夾雑成分に由来する妨害ピークは検出されず、OTA のピークを良好に分離検出することが可能であった。

今回用いたアルコール飲料からは OTA は検出されなかった。そこで、これらを空試験試料として添加回収実験を行った。各試料に 2 ng mL⁻¹ の OTA を添加して測定を行った。同一の実験を 3 回繰り返して調べた OTA の回収率と相対標準偏差 (RSD) を Table 6.2.3 に示す。各試料における回収率は、赤ワインで 82 ~ 83%, 白ワインで 86 ~ 88%, ビール試料で 87 ~ 93%, ダークビールで 93% であり、RSD も白ワイン 1 種を除き 5% 以下と良好な結果であった。

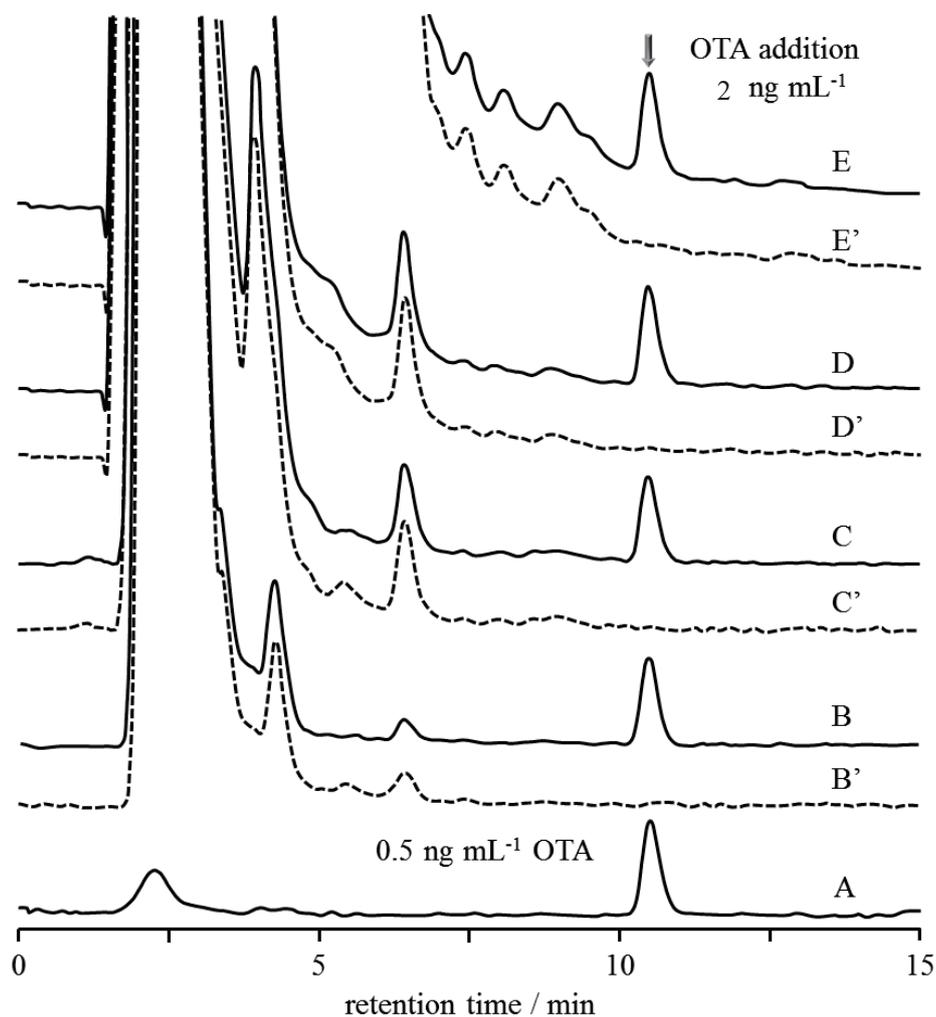


Fig. 6.2.6 Effect of *p*NP adsorbent treatment to the removal of matrix interferences in beer and wine samples

Typical chromatograms of (A) standard solution of 0.5 ng mL⁻¹ OTA, and red wine (B), white wine (C), beer (D), dark beer (E) without and (B'), (C'), (D'), (E') with OTA addition (2 ng mL⁻¹)

Chromatographic conditions: InertSustain[®] C18 (2.1 mm × 250 mm, 3 μm); mobile phase, 4.4% acetic acid/acetonitrile (55/45); flow rate, 0.3 mL min⁻¹; temperature, 50°C; injection volume, 5 μL; detector, FLD (em @333 nm, ex @460 nm)

Table 6.2.3 Recoveries of OTA added to wines and beers.

samples	country of origin	recovery [%] ^a	RSD [%]
red wine	Chile	81.6	4.33
	France	82.6	3.09
white wine	Chile	87.6	5.58
	France	85.5	3.76
beer	Japan	91.6	0.77
	Japan	93.3	3.35
	US	86.9	1.21
	Netherlands	91.0	0.60
dark beer	Republis of Ireland	92.6	1.96

a: mean of three determinations.

6.2.4 結 言

第 5 章において調整した電子求引性官能基をパラ位に有するフェノキシ基型吸着剤を用いたところ、OTA を高選択的かつ強固に吸着することが可能であった。特に、*p*-ニトロフェノキシ基を有する *p*NP 樹脂は、OTA に対し高い吸着選択性を発現した。*p*NP 樹脂を用いてポリフェノールを多く含むワイン及びビールの試料前処理に適用したところ、*p*NP 樹脂充填カートリッジのみで高度な精製が達成され、溶出液のクロマトグラム上には OTA の定量を妨害するピークは検出されなかった。これらのことから、本研究の双極子相互作用を活用した分子認識場は、OTA のように π 平面、さらに水酸基やカルボキシル基などの極性基を併せ持つ溶質に対し高い親和力を発現し、実試料への高い適用性も有していることが明らかとなった。

引用文献

- [1] A. E. Khoury, A. Atoui, *Toxins*, **2**, 461-493, (2010).
- [2] 宇田川俊一, 田端節子, 中里光男, “食品安全性セミナー5 マイコトキシン”, 中央法規出版, p. 103, (2002).
- [3] International agency for Research on Cancer,
“ Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–111”,
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>
- [4] “COMMISSION REGULATION (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs”, Official Journal of the European Union
- [5] CODEX STAN, “General standard for contaminants and toxins in food and feed”, 193, 29, (1995).
http://www.codexalimentarius.org/download/standards/17/CXS_193e.pdf
- [6] Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Codex Committee on Food Additives and Contaminants, Thirty-first Session: Position Paper on Ochratoxin A (CX/FAC 99/14), (1999).
- [7] M. Nakajima, H. Tsubouchi, M. Miyabe, *J. AOAC Int.*, **82**, 897-902, (1999).

- [8] Y. Sugita-Konishi, M. Nakajima, S. Tabata, E. Ishikuro, T. Tanaka, H. Norizuki, Y. Itoh, K. Aoyama, K. Fujita, S. Kai, S. Kumagai, *J. Food Prot.*, **69** (6), 1365-1370, (2006).
- [9] 厚生労働省, “食品中のオクラトキシンAの規格基準の設定について(案)”,
<http://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-11121000-Iyakushokuhinkyoku-Soumuka/0000062019.pdf>
- [10] A. Pena Æ F. Cerejo Æ C. Lino Æ I. Silveira, *Anal. Bioanal. Chem.*, **382**, 1288–1293, (2005).
- [11] A. Pittet, D. Tornare, A. Huggett, R. Viani, *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 3564-3569, (1996).
- [12] M. Nakajima, H. Tsubouchi, M. Miyabe, *J. AOAC. Int.*, **82** (4), 897-902, (1999)
- [13] S. Kumagai, M. Nakajima, S. Tabata, E. Ishikuro, T. Tanaka, H. Norizuki, Y. Itoh, K. Aoyama, K. Fujita, S. Kai, T. Sato, S. Saito, N. Yoshiike, Y. Sugita-Konishi, *Food Aditt. Contam.*, **25** (9), 1101-1106, (2008).
- [14] F. Longobardi, V. Iacovelli, L. Catucci, G. Panzarini, M. Pascale, A. Visconti, A. Agostiano, *J. Agric. Food Chem.*, **61** (8), 1604–1608, (2013).
- [15] M. Solfrizzo, G. Panzarini, A. Visconti, *J. Agric. Food Chem.*, **56** (23), 11081-11086, (2008).
- [16] M. Eskola, M. Kokkonen, A. Rizzo, *J. Agric. Food Chem.*, **50** (1), 41–47, (2002).
- [17] R. J. Garcia-Villanova, C. Cordon, A. M. G. Paramás, P. Aparicio, M. E. G. Rosales, *J. Agric. Food Chem.*, **52** (24), 7235–7239, (2004).
- [18] C. Baggiani, L. Anfossi, C. Giovannoli, *Anal. Chim. Acta*, **591**, 29-39, (2007).
- [19] C. Giovannoli, C. Passini, F. D. Nardo, L. Anfossi, C. Baggiani, *J. Agric. Food Chem.*, **62** (22), 5220–5225, (2014).
- [20] J. C. C. Yu, E. P. C. Lai, *Toxins*, **2** (6), 1536-1553, (2010).
- [21] J. C. C. Yu, S. Krushkova, E. P. C. Lai, E. Dabek-Zlotorzynska, *Anal. Bioanal. Chem.*, **382**, 1534-1540, (2005).
- [22] J. A. Cruz-Aguado and G. Penner, *J. Agric. Food Chem.*, **56** (22), 10456–10461, (2008).

- [23] F. Chapuis-Hugon, A. Boisbaudry, B. Madru, V. Pichon, *Anal. Bioanal. Chem.*, **400**, 1199-1207, (2011).
- [24] A. Rhouati, C. Yang, A. Hayat, J. Marty, *Toxins*, **5** (11), 1988-2008, (2013).
- [25] A. Pietri, S. Rastelli, T. Bertuzzi, *Toxins*, **2** (4), 758-770, (2010)
- [26] A. M. Chiodini, P. Scherpenisse, A. A. Bergwerff, *J. Agric. Food Chem.*, **54** (19), 7399–7404, (2006).
- [27] T. Goto, K. Otsuki, M. Umeda, S. Nakamura, S. Bandoh, *Mycotoxins*, **57** (2), 81-86, (2007).
- [28] A. Aresta, F. Palmisano, R. Vatinno, C. G. Zambonin, *J. Agric. Food Chem.*, **54** (5), 1594–1598, (2006).
- [29] K. Zhang, J. W. Wong, D. G. Hayward, M. Vaclavikova, C. Liao, M. W. Trucksess, *J. Agric. Food Chem.*, **61** (26), 6265–6273, (2013).
- [30] L. Vaclavik, M. Vaclavikova, T. H. Begley, A. J. Krynitsky, J. I. Rader, *J. Agric. Food Chem.*, **61** (20), 4822–4830, (2013).
- [31] F. Al-Taher, K. Banaszewski, L. Jackson, J. Zweigenbaum, D. Ryu, J. Cappozzo, *J. Agric. Food Chem.*, **61** (10), 2378–2384 (2013).
- [32] A. Bacaloni, C. Cavaliere, A. Faberi, E. Pastorini, R. Samperi, A. Laganà, *J. Agric. Food Chem.*, **53** (14), 5518–5525 (2005).
- [33] S. Noba, A. Uyama, N. Mochizuki, *J. Agric. Food Chem.*, **57** (14), 6036–6040 (2009).
- [34] R. Romero-González, J. L. M. Vidal, M. M. Aguilera-Luiz, A. G. Frenich, *J. Agric. Food Chem.*, **57** (20), 9385–9392, (2009).
- [35] I. Barna-Vetró, L. Solti, J. Téren, Á. Gyöngyösi, E. Szabó, A. Wölfling, *J. Agric. Food Chem.*, **44** (12), 4071–4074, (1996).
- [36] Y. Cho, D. Lee, D. Kim, W. Min, K. Bong, G. Lee, J. Seo, *J. Agric. Food Chem.*, **53** (22), 8447–8451, (2005).
- [37] F. Yu, T. Chi, B. Liu, C. Su, *J. Agric. Food Chem.*, **53** (17), 6947–6953 (2005).
- [38] A. H. Heussner, S. Ausländer, D. R. Dietrich, *Toxins*, **2** (6), 1582-1594, (2010).
- [39] F. Yu, M. M. Vdovenko, J. Wang, I. Yu. Sakharov, *J. Agric. Food Chem.*, **59** (3), 809–813, (2011).

