

## 18. ピロリジジンアルカロイド類の新規一斉分析法の開発と蜂蜜中における汚染実態解明

○ 仲谷 正 (大阪健康安全基盤研究所)

### 【研究目的】

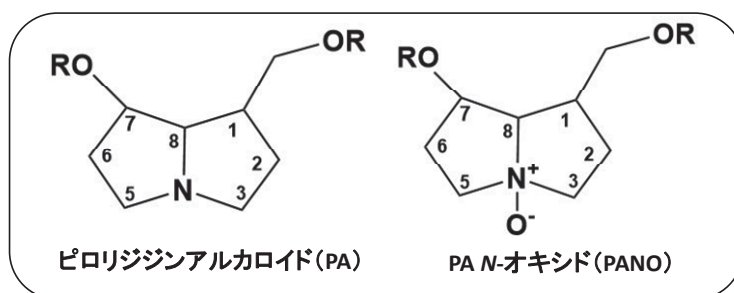
ヒトに対し肝毒性および発癌作用を示す植物産生のピロリジジンアルカロイドとそのオキシド体による蜂蜜汚染が世界的に問題視されている。しかしながら我が国においては蜂蜜中におけるこれら化合物の情報が極めて限定的である。本研究では蜂蜜中のピロリジジンアルカロイド類の新規一斉分析法を確立し、国内に流通する蜂蜜中のピロリジジンアルカロイド類の種類や濃度について明らかにする。

### 【研究の必要性】

ピロリジジンアルカロイド (PA) はキク科、マメ科およびムラサキ科等の植物が産生する自然毒の一つであり、ピロリジジン骨格を有する化合物の総称である(下図参照)。これまで複数の異なる PA およびその *N*-オキシド体 (PANO) の存在が知られており、中でも 1, 2 位に二重結合を有する PA および PANO ら (PAs) は肝ミクロソーム酸化酵素により活性化され、反応性が高いアルキル化剤となり、哺乳類に対する肝臓毒性を示す他、ヒトへの遺伝毒性発がん物質となる可能性が懸念されている。

最近の調査では人体に悪影響を及ぼす恐れのある複数種の PAs が、蜜源となる植物から蜂蜜中に混入することが報告されており、欧米諸国を中心に、蜂蜜および関連試料中の PAs 含有量について多くの調査が進められている<sup>1-4)</sup>。一方、日本においては、農林水産省より蜂蜜中の PAs 含有実態調査結果が、昨年公表されたが<sup>5)</sup>、調査対象となった PAs 種 (17 種) は限定的であり、また蜂蜜中に含有するそれらの種類や濃度についての情報は不明である。

蜂蜜中に含有する PAs の種類や濃度に関するデータの集積は、将来的に PAs のリスク管理を行う上での有意義な情報となる他、蜜源となる植物種の特定につながり、蜂蜜への PAs 混入の軽減に役立ち、最終的に国民の食の安全・安心に寄与できるものと考えられる。そのため、申請者は今回の研究を実施した。また蜂蜜中における PAs の分析法では、ドイツ連邦リスク評価研究所が公表した分析法 (BfR-PA-Honey-1.0/2013)<sup>6)</sup> が主に用いられているが、この手法はカラムによる精製過程で時間を要することや煩雑性を含むため、より簡便な PAs の分析法についても合わせて検討を行った。



## 【研究計画】

### 1. PAs の新規一斉分析法の検討

BfR-PA-Honey-1.0/2013 を基盤とした手法が、蜂蜜中における PAs の分析法として多く用いられている。この手法は蜂蜜中の PAs を 0.05 M 硫酸で抽出した後、強陽イオン交換樹脂カラム (SCX) に吸着させ、夾雑物を洗浄後、2.5%アンモニア含有メタノール溶液により SCX から PAs 再抽出する方法である。この方法は 0.05 M 硫酸抽出液を SCX に通液する際に時間を要すること、また夾雑物洗浄時の流速制御が煩雑な点等の問題点がある。今回検討を行った手法は、残留農薬の分析に用いられている QuEChERs 法を応用し、0.05 M 硫酸抽出液を QuEChERs 法によりアセトニトリルを用いて再抽出する簡便な分析法の開発を試みた。さらに本研究では、0.05 M 硫酸抽出時の酸性条件下で各種触媒を用い、PANO を PA に還元脱離させ、変換後の PA と元々存在している PA を合わせて LC-MS/MS で一斉定量する方法も合わせて検討した。この還元法を組み入れることによりクロマト上で解析するピーク数も半減し、より迅速な分析が期待できる。新規分析法の性能評価は、日間での添加回収試験 (n=2×5 日間) を 2 濃度 (0.25 および 5 ng/g) で行い、回収率、併行精度および室内精度を求めることにより実施した。分析機器には LC-MS/MS を用い、蜂蜜中に微量で存在することが予想される各種 PAs に対し高感度分析が期待できる scheduled MRM (sMRM) 法により測定を行い、マトリクス検量線により PAs の定量を行った。

なお今回検討対象とした PAs は、モノクロタリン (Mono) とその *N*-オキシド (MonoNox)、インターメディン (Inter) とその *N*-オキシド (InterNox)、リコプサミン (Lyco) とその *N*-オキシド (LycoNox)、ジャコビン (Jaco) とその *N*-オキシド (JacoNox)、ユーロピン (Euro) とその *N*-オキシド、レトロルシン (Ret) とその *N*-オキシド (RetNox)、セネシフィリンとその *N*-オキシド (EuroNox)、ヘリオトリン (Hel) とその *N*-オキシド (HelNox)、セネシベルニン (Seneciv) とその *N*-オキシド (SenecivNox)、セネシオニン (Senec) とその *N*-オキシド (SenecNox)、ペタシテニン (Pat)、エチミジン (Ech) とその *N*-オキシド (EchNox)、センキルキン (Senk)、ネオペタシテニン (Neo)、ラシオカルピン (Las) とその *N*-オキシド (LasNox) の 27 種であった。

### 2. 蜂蜜中における PAs 汚染実態調査

店頭購入した蜂蜜 49 試料 (国内産 19 試料、外国産 30 試料) および蜜蜂花粉 (外国産ビーポーレン) 2 試料を検討試料とし、上記の PAs27 種について測定を行った。

## 【実施内容・結果】

### 1. PAs の新規一斉分析法の検討結果

まず各種条件下で還元法を試みたところ、PANO の還元率は最大でも 50%であり、100%近くの還元率を満たす条件は定まらなかった。よって還元法を今回検討する分析法に組み込むことを断念し、0.05 M 硫酸抽出液を QuEChERs 法によりアセトニトリルを用いて再抽出する方法のみで分析法の確立を進めた。分析法を確立後、PAs 成分の含有が認められないブラ

ンク試料に PA 混合標準溶液を添加し、2 濃度 (0.25 ng/g と 5 ng/g) での添加回収試験を日間で行ったところ 0.25 ng/g での性能評価の結果、各成分の真度、併行精度および室内精度はそれぞれ 62~108%、2~10%および 4~12%の範囲にあり、真度 70%未満の PAs は 2 成分 (モノクロタリン 66%、ユーロピン 62%) であった。5 ng/g の場合、真度 74~123%、併行精度 4~11%および室内精度 7~15%の範囲であり、2 成分 (セネシオニン 123%、ラシオカルピン 121%) が真度 120%を超えた。

今回確立した分析法の性能評価の結果を、「食品中に残留する農薬等の試験法に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」記載の試験法の性能評価目標値 (添加濃度が 10 ng/g 以下の場合、真度 70~120%、併行精度 < 25%、室内精度 < 30%) と比較すると、一部の PAs の添加回収率が 70~120%の範囲外にあり、目標値を満たすことができなかったが全体的に十分許容できる範囲であった。

## 2. 蜂蜜中の PAs 含有量について

今回の検討した分析法の検出下限値 (LOD) はレトロルシンを除き 0.03 ng/g (レトロルシンは 0.08 ng/g)、定量下限値 (LOQ) はレトロルシンを除き 0.1 ng/g (レトロルシンは 0.3 ng/g) であった。これらの結果は、農林水産省で実施された蜂蜜中の PAs の含有実態調査で示されている分析法の感度とほぼ同等であった。

蜂蜜全試料中からいずれかの PAs が LOD 以上で検出された検出率は 63%であり、国内産および外国産試料からの検出も同率 (63%) であった。また LOQ 以上での PAs 検出率は、蜂蜜全試料に対し 37%、国内産および外国産試料に対してもそれぞれ 37%であった。一方、蜜蜂花粉 2 試料からも LOQ 以上の濃度レベルでいずれかの PAs が検出された。

図 1 は検討試料から LOD 以上の濃度レベルで検出された 18 種の PAs の検出率をそれぞれ示したものである。蜂蜜全試料に対し LOD および LOQ 以上の濃度レベルで共に検出率が高かった PAs は、インターメディン、リコプサミン、セネシフィリン、セネシベルニン、セネシオニンおよびエチミジンであった (図 1-a))。国産および外国産では検出率に若干の特色が見られた。国産ではエチミジンが検出されず、ペタシテニンおよびネオペタシテニンの検出率が外国産に比べ高かった (図 1-b))。一方、外国産ではセネシフィリン、セネシオニンおよびエチミジンの検出率が国産に比べ高いのに対し、インターメディンの検出率が低かった (図 1-c))。蜜蜂花粉からは蜂蜜試料から検出されなかったジャコビンも LOQ 以上で検出された (図 1-d))。

表 1 は LOQ 以上で検出された各種 PAs の濃度およびそれらの総量の平均値、中央値、最小および最大値を示したものである。LOQ 未満の各種 PAs の濃度は 0 として取り扱った。蜂蜜全試料における総 PAs 濃度の平均値は  $1.0 \pm 2.9$  ng/g、中央値は 0 ng/g、最小-最大値は 0-17.4 ng/g であった。中央値の値が示すように、また上記で述べた LOQ 以上の検出率が 37%であったことにより、多くの蜂蜜試料における PAs 濃度は LOQ 未満であった。一方、蜂蜜花粉中の総 PAs 濃度の最小値および最大値はそれぞれ 2.6 および 65.8 ng/g であり、蜂蜜花粉中の PAs 濃度は蜂蜜試料に比べ高い傾向にあった。

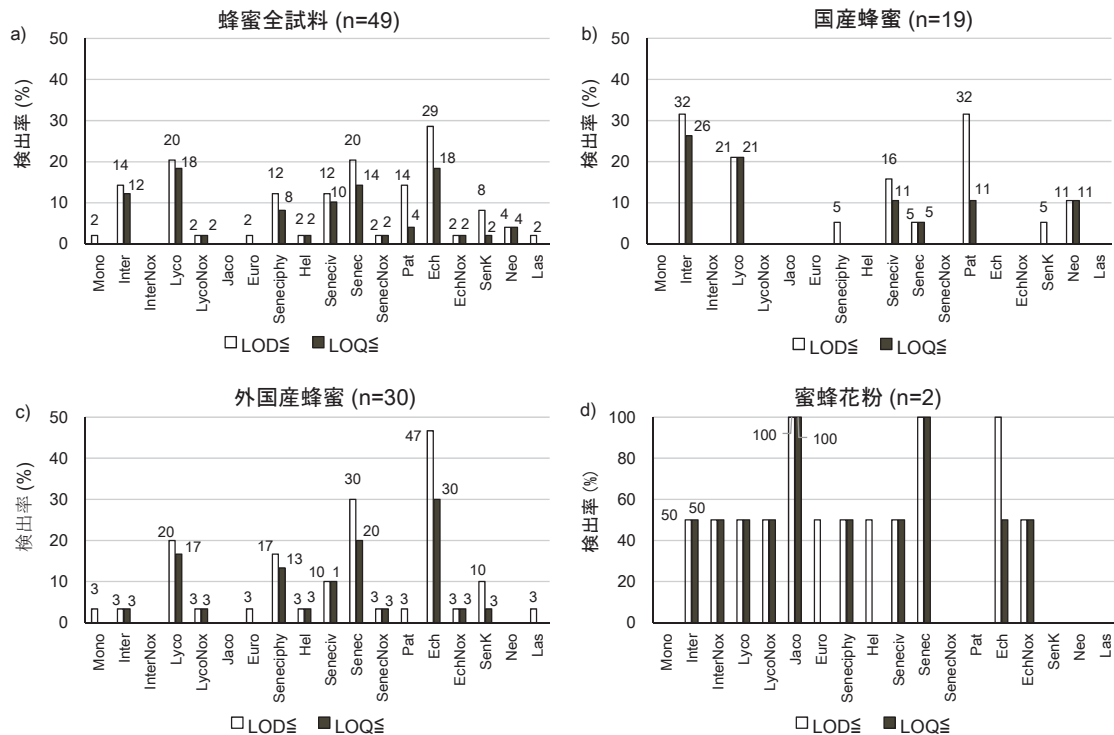


図1 蜂蜜および蜜蜂花粉より検出された各PAAs種 (LOD: 検出下限界, LOQ: 定量下限)

表1 蜂蜜および蜜蜂花粉中から定量下限 (LOQ) 以上で検出された各PAAsおよび総PAAsの濃度<sup>注)</sup>

PAAs	蜂蜜全試料 (n=49)						蜜蜂花粉 (n=2)	
	検出率 (%)	平均値 (ng/g)	標準偏差 (ng/g)	中央値 (ng/g)	最小値 (ng/g)	最大値 (ng/g)	試料1 (ng/g)	試料2 (ng/g)
インターメディン	12	0.3	1.6	0	0	10.6	0	2.3
インターメディン-N-オキシド	0	0	0	0	0	0	0	1.7
リコプサミン	18	0.2	0.7	0	0	4.6	0	2.1
リコプサミン-N-オキシド	2	0.003	0.02	0	0	0.2	0	3.0
ジャコピン	0	0	0	0	0	0	1.7	1.0
セネシフィリン	8	0.03	0.1	0	0	0.5	0.1	0
ヘリオトリン	2	0.003	0.02	0	0	0.2	0	0
セネシベルニン	10	0.1	0.4	0	0	2.0	0	0.3
セネシオニン	14	0.1	0.4	0	0	2.2	0.8	0.7
セネシオニン-N-オキシド	2	0.01	0.04	0	0	0.3	0	0
ペタシテニン	4	0.03	0.2	0	0	1.3	0	0
エチミジン	18	0.2	0.7	0	0	4.4	0	40.9
エチミジン-N-オキシド	2	0.01	0.06	0	0	0.4	0	14.0
センキルキン	2	0.002	0.01	0	0	0.1	0	0
ネオペタシテニン	4	0.01	0.1	0	0	0.5	0	0
総PAAs	37	1.0	2.9	0	0	17.4	2.6	65.8

注) LOQ未満の数値は0として計算した。

### 【考察と今後の課題】

今回の調査結果より日本に流通する蜂蜜中の各種 PAAs の組成が明らかとなった。蜂蜜試料に対し検出率が高かったインターメディン、リコプサミン、セネシフィリン、セネシベルニン、セネシオニンおよびエチミジンは海外の同様の調査<sup>1, 2)</sup>でも検出事例が多い PAAs であった。その他、比較的検出率が高かったペタシテニンおよびネオペタシテニンは過去

の調査では検出事例のない PA<sub>s</sub> 種であった。今後は蜂蜜中で検出された各種 PA<sub>s</sub> と蜜源となる植物中に存在 PA<sub>s</sub> の関連性について、文献調査や実際の調査を通じ明らかにしていきたい。人体に悪影響を及ぼす恐れのある PA<sub>s</sub> は数百種存在することが知られており、未知の PA<sub>s</sub> が蜂蜜中に含有することも否定できないため、より多くの PA<sub>s</sub> 種を対象とした詳細な調査がこれからも必要であると考えられる。

今回測定した蜂蜜試料中における PA<sub>s</sub> の多くは LOQ 未満の濃度レベル (<0.1 ng/g) であり、それを反映し総 PA<sub>s</sub> 濃度も未検出 (0 ng/g) となる試料が多数であった。測定対象試料数が異なることから単純な比較は難しいが、これらの結果は農林水産省の報告内容と同様の傾向を示した<sup>5)</sup>。一方、測定試料数はわずかであるが、今回の調査より蜜蜂花粉中の PA<sub>s</sub> 濃度は蜜蜂試料に比べ高い可能性があることが考えられる。海外の調査では蜜蜂花粉中には高濃度の PA<sub>s</sub> が含有することが報告されており、60 g の体重のヒトが 1 日あたり 5 g の蜜蜂花粉を摂取した場合、PA<sub>s</sub> を 84 ng/g 以上の濃度レベルで含有するものは推奨されていない<sup>3, 4)</sup>。蜜蜂花粉は健康食品として市場に流通しているが、蜜蜂花粉中の PA<sub>s</sub> に関するデータは今回の調査結果を除き日本国内ではほとんどないため、蜂蜜と共に蜜蜂花粉についてもさらなる調査が期待される。その際、今回確立した蜂蜜中の PA<sub>s</sub> 分析法の活用は迅速かつ簡便であり、精度良く測定できる方法として有効であると考えられる。

#### 【参考文献】

- 1) Martinallo et al. Food Control, **17**, 146–152 (2014).
- 2) Griffin et al. Food Additives and Contaminants Part A, **32**, 214–228 (2015).
- 3) Dübecke et al. Food Additives and Contaminants Part A, **28**, 348–358 (2011).
- 4) Kast et al. Food Additives and Contaminants Part A, **35**, 316–327 (2018).
- 5) 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課 はちみつのピロリジジナルカロイド類の含有実態調査結果 (平成 30 年 8 月 10 日) .
- 6) German Federal Institute for Risk Assessment (BfR). Determination of pyrrolizidine alkaloids (PA) in honey by SPE-LC-MS/MS Method Protocol (BfR-PA-Honey-1.0/2013).

#### 【経費使途明細】

使 途	金 額
はちみつ等試料購入	111, 439 円
HPLC 用カラム	69, 120 円
実験器具等消耗品	103, 948 円
実験データ保存用記憶媒体	15, 493 円
合 計	300, 000 円
大同生命厚生事業団助成金	300, 000 円