

食品中のアフラトキシン分析法の検討

A Study of Analysis of Aflatoxins in Foods

高橋 紀世子 赤間 仁 大江 浩

Kiseko TAKAHASHI, Hitoshi AKAMA, Hiroshi OOE

キーワード：アフラトキシン，高速液体クロマトグラフィー，ミニカラム，多機能カラム

Key Words: Aflatoxins, HPLC, Mini Column, Multifunction Column

公定法^{*}のクロロホルム抽出 フロリジルオープンカラム精製に代わる 種々の市販ミニカラムを用いた抽出を検討した。Bond Elut Jr SAXは廉価でナッツ類の回収率は良いが、カラム負荷で溶媒変換の必要があった。多機能カラム Isolute Mutimodelはナッツの種類と、アフラトキシンの一部で回収率が70%台に低下するものがあった。多機能カラム MycoSep及びMultiSepはナッツ類及び香辛料の分析において簡易で良い回収率が得られた。(*この試験法は平成14年3月26日付け食監発第0326001号で廃止となった。)

1 はじめに

アフラトキシン(以下AF)は真菌が産生するカビ毒で、微量で強い発ガン性物質であることから各国で食品に対して規制値(日本ではAF_{B₁}が10ppb以下)を設けており、特に近年の輸入食品の種類や量の増加によるAFの汚染が食品衛生上の問題となっている。

食品中のAFの分析法は昭和46年通知「環食第128号」^{*}で規定されているが、操作が煩雑で多くの操作時間を必要とし、抽出等にクロロホルム等の毒性の高い溶媒を多用し、シリカゲルTLCを行うこととされている。

一方、高速液体クロマトグラフィーを用いる測定法が上村等¹⁾、食品衛生検査指針²⁾及び衛生試験法注解³⁾に示されているが、抽出溶媒はクロロホルム、クリーンアップはフロリジルオープンカラムを使用する方法であり、回収率でも満足する方法とはいえない。

これらの問題に対処するために、人にも環境にもクリーンな市販ミニカラムを用いた方法について報告されるようになってきた⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾。そこで今回、これらの市販カラムでのナッツ類及び香辛料のAF分析の有用性を検討した結果について報告する。(*この試験法は平成14年3月26日付け食監発第0326001号で廃止となった。)

2 方 法

2.1 試 料

市販品のナッツ類(ピーナッツ、カシューナッツ、アーモンド、ピスタチオ、マカダミアナッツ)及び香辛料(白コショウ、黒コショウ、一味唐辛し、ナツメグ)

2.2 試薬及び器具

クロロホルム、アセトン、n-ヘキサン(残留農薬分析

用・和光純薬^(株)及び関東化学^(株))アセトニトリル、メタノール、液体クロマトグラフィー用及び残留農薬分析用・和光純薬^(株)及び関東化学^(株)、トリフルオロ酢酸(以下TFA東京化成^(株)、MERCK)、無水トリフルオロ酢酸(以下無水TFA東京化成^(株))、アフラトキシン標準試薬(B1、B2、G1、G2シグマ製)、Bond Elut Jr SAX 500mg (Varian製)、Isolute Multimode 500mg 3ml (International Solvent Technology製)、MultiSep #226、#228・MycoSep#228 (TM Labs. Inc. 製)

2.3 抽出及び精製方法

1) フロリジルオープンカラム 上村等¹⁾の方法に準じて実施。試料10gを水湿潤後クロロホルム50ml、10分振とう抽出、脱水後遠心分離し、残渣をクロロホルム25mlで10分振とう抽出後遠心分離する。クロロホルム層を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水する過、フロリジルカラム(無水硫酸ナトリウム5g、フロリジル0.7g、無水硫酸ナトリウム0.1g)精製、溶媒乾固後4ml定容とする。半量を溶媒除去後、TFA0.1mlを添加後密栓、攪拌し15分間冷暗所放置し、水/アセトン(9/1)の9mlを加え溶解する。

2) BOND ELUT Jr SAX (500mg) カラム 試料10gをアセトニトリル40mlで1分バイオトロン抽出、遠心分離後上清を分取し、溶媒除去(50%), 10%アセトン/ヘキサン10mlに(以下A/H)溶解、2mlをSAXカラムに負荷する。10% A/H10ml洗浄後、50% A/H10mlで溶出、溶媒除去する。以下1)と同様に処理する。

3) ISOLUTE MULTIMODEカラム 穂山等⁶⁾の方法に準じ、試料10gをアセトニトリル/水(9/1)40mlで1分間バイオトロン抽出後遠心分離。上清2mlを

MULTIMODEカラムに負荷し流出液を分取する。アセトニトリル/水(9/1) 1mlで溶出し、負荷流出液と溶出液を合わせ溶媒除去する。

以下1)と同様に処理する。

4) MycoSep#226, MultiSep#228カラム 穂山等⁸⁾の方法に準じ、試料10gを3)と同様に処理し、上清5mlをMycoSep#226カラムに負荷し最初に溶出する1mlを窒素パージ溶媒除去後TFA処理し、水/アセトニトリル(9/1)で1mlとする。

香辛料についてはMultiSep#228を用い、試料10gをアセトニトリル/水(9/1) 80mlで30分振とうし、以下同様に処理する。溶出液0.5mlを窒素パージ溶媒除去し、0.1mlTFAで処理、水/アセトニトリル(9/1) 0.4mlを加え溶解する。

2.4 HPLC測定条件

HPLC：島津LC10及びHP1100 カラム：東ソー(株)製 TSKgel ODS-80Ts及びGL社Inertsil ODS- II 移動相：20%アセトニトリル 流速：1 ml/ml 蛍光検出器：Ex365nm Em 450nm 注入量：10 µl

3 結果及び考察

1) フロリジルオープンカラム

この方法は、公定法に準じたクロロホルムを用いた抽出法で、平成10年度に作成した当部のSOPであるが、標準物質でのカラム精製以降からの回収率は(表1)、AF G1, B1, G2, B2 各々平均値(n=3)で52, 79, 57, 81%と、G1, G2の回収率が低く、またバラツキも大きかった。

表1 オープンフロリジルカラム回収率 (%)

	1	2	3	AV.	STD.	CV.%
G 1	61	43	53	52	8.8	16.9
B 1	88	66	82	79	11.4	14.5
G 2	69	46	58	57	11.7	20.3
B 2	93	69	83	81	12.3	15.1

標準添加濃度試料換算 10ppb

2) BOND ELUT Jr SAX (500mg) カラム

このカラムは陰イオン交換型カラムであるが、負荷及び溶出を順相カラム的な使用をすることで、ナッツ類での回収率は81~100%であり、1)の方法より簡便で優れていた(表2)。ピーナッツに標準添加した時のHPLCクロマトを図1に示した。HPLCでの分離カラムはTSKgel 80TsとInertsil ODS- 2の両方ともに良く分離できた。この方法では試料からの抽出溶媒であるアセトニトリルを、カラムに負荷する際にはアセトン/ヘキサンに変換する必要があるが、オープンカラム作成より簡便で、カラム1本の単価は廉価である。

3) ISOLUTE MULTIMODEカラム

逆相、イオン交換からなる多機能カラムである。抽出液をそのままカラムに負荷出来る利点があるが、ピー

表2 SAXカラム回収率 (%)

	peanut			cashew		
	AV.	STD.	CV.%	AV.	STD.	CV.%
G 1	82	6.05	7.8	81	3.23	4.0
B 1	91	1.59	1.8	92	0.61	0.7
G 2	86	4.02	4.7	93	2.69	2.9
B 2	100	1.42	1.4	98	2.09	2.1

標準添加濃度試料換算 5 ppb

n = 3

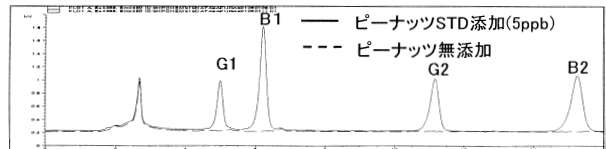


図1 BOND Elute Jr SAXカラムでの標準添加 (移動相：25%アセトニトリル)

ナッツのG1とカシューナッツのG1, B1で回収率が70%程度と低かった(表3)。また、HPLC測定において、移動相25%アセトニトリルではTSKgel ODS-80TsカラムではB1への妨害ピークが分離出来なかったがInertsil ODS- 2では分離可能であった(図2)。

表3 multimodeカラム回収率 (%)

	peanut			armond			cashew		
	AV.	STD.	CV.%	AV.	STD.	CV.%	AV.	STD.	CV.%
G 1	71	2.42	3.4	93	9.9	72	72	6.80	9.5
B 1	83	3.26	3.9	87	8.4	70	70	6.81	9.7
G 2	98	1.30	1.3	101	6.0	97	97	7.07	7.3
B 2	105	2.66	2.5	100	6.6	94	94	5.91	6.3

標準添加試料換算 5 ppb

n = 3

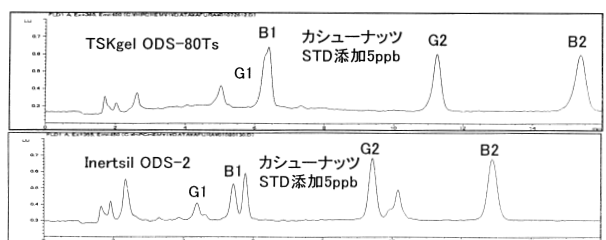


図2 ISOLUTE MULTIMODEカラムでの標準添加 (移動相：25%アセトニトリル)

4) MycoSep#226#228, MultiSep#228カラム

3)と同様に逆相、イオン交換からなる多機能カラムで、抽出液をそのまま負荷出来、簡便な方法である。

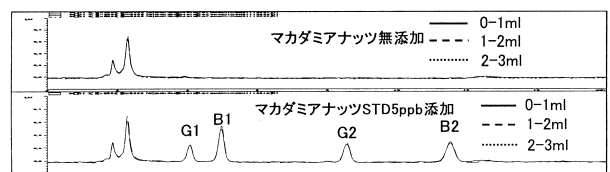


図3 MycoSep#226カラムでの標準添加 I (移動相：25%アセトニトリル)

図3にマカダミアナッツの無添加と標準添加し MycoSep#226カラム精製したクロマトを示した。最初の1mlと次の1mlを分取して測定したクロマトの重ね書きを示したが妨害ピークは出ていない。ナッツの種類によっては、カラムを通すことにより妨害物質も溶出してくるため、最初の1mlを分取することとした。

ピスタチオは移動相25%アセトニトリルではG1とRtが一致する妨害ピークがあり(図4), 移動相を初期5分間20%アセトニトリルとし, 16分で25%アセトニトリルとすることで妨害ピークと分離出来た。

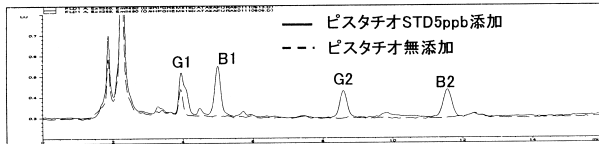


図4 MycoSep#226カラムでの標準添加Ⅱ (移動相: 25%アセトニトリル)

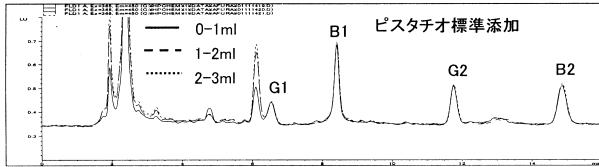


図5 MycoSep#226カラムでの標準添加Ⅲ (移動相: 20%アセトニトリル 5分 16分で25%アセトニトリル)

また,カラムを通すにつれてG1前の妨害ピークが増加した(図5)。ピーナッツ, カシューナッツ及びアーモンドでのMycoSep#226カラム精製での最初の1mlを分取したクロマトを図6に示した。また,表4に示したように, 暫定規制値のあるナッツ類での標準添加回収率は良好であった。

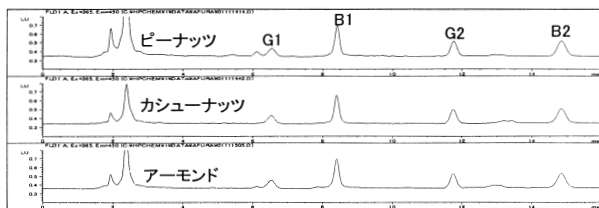


図6 MycoSep#226カラムでの標準添加Ⅳ 添加濃度 (5 ppb) (移動相: 20%アセトニトリル 5分 16分で25%アセトニトリル)

香辛料(一味唐辛子, ナツメグ, 白コショウ, 黒コショウ)ではMultiSep#228カラムを用い, ナッツ類と同じ操作法で処理すると, 一味唐辛子以外ではG2が妨害物質と重なるため, 20%アセトニトリルの一定濃度とすることで分離が可能となったが回収率が低く, 特にG2, B

表4 MycoSep#226カラム回収率 (%)

	peanut	macadamia	pistatio	cashew	armond
G1	98 ± 1.5	97 ± 2.8	98 ± 3.1	98 ± 1.8	98 ± 0.97
B1	97 ± 1.3	95 ± 2.2	102 ± 4.0	98 ± 4.9	98 ± 2.8
G2	98 ± 4.1	97 ± 2.3	97 ± 3.2	98 ± 1.5	97 ± 2.6
B2	97 ± 3.3	94 ± 2.6	99 ± 4.1	99 ± 4.1	96 ± 1.3

標準添加濃度試料換算 5 ppb

n = 3

2では約30%であった。

原因としてはTFA処理後に赤褐色で血餅状の沈殿が出来, 10%アセトンや10%アセトニトリルに完全に溶解しないためと考えられた。この不溶物は50%アセトニトリルでは溶解したが, AFの回収率は約80%程度であり, 全体のピークも妨害が大きかった。

そこで, 試料10gに対して抽出溶媒を倍量の80mlとすることで, TFA処理後の問題もなくなり, 満足する回収率が得られた(図7, 表5)。MycoSep型は手動による押し出しタイプであるため, 流速がコントロールし難いがMultiSep型はシリンジタイプのため流速コントロールが可能である。

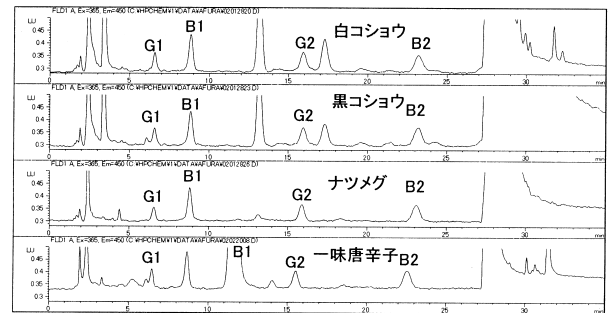


図7 MultiSep#228カラムでの標準添加Ⅴ 添加濃度 (10ppb) (移動相: 20%アセトニトリル 25分で90%アセトニトリル)

表5 MultiSep#228カラム回収率 (%)

	白コショウ	黒コショウ	ナツメグ	一味唐辛子
G1	87 ± 2.8	89 ± 2.3	86 ± 1.1	91 ± 3.9
B1	96 ± 5.5	97 ± 3.7	90 ± 4.1	96 ± 3.0
G2	95 ± 5.9	91 ± 4.2	94 ± 2.5	94 ± 5.7
B2	83 ± 1.6	91 ± 3.2	81 ± 0.6	85 ± 5.2

標準添加濃度試料換算 10ppb

n = 3

両方のタイプでの香辛料の回収率を検討したが回収率には差はなく, MultiSep型の方がややクロマトがきれいであった。

また, TFA処理に用いる試薬について文献によっては無水TFAとTFAの両方が記載されているが, 試料無添加の標準だけのピーク面積比を検討すると, 無水TFAでは, B1が76~83%, B2が56~63%と低く, 普通のTFA

を用いる方が感度は高いことがわかった(表6)。

表6 無水TFA/TFA (%)

STD濃度	5 ppb	10ppb	20ppb
G 1	99	97	97
B 1	76	83	81
G 2	99	97	97
B 2	56	59	63

n = 2

以上種々のカラムを検討したが、ナッツ類は多機能カラムMycoSep#226, 香辛料は多機能カラムMultiSep#228, MycoSep#228で回収率が良く, 簡便であると考えられた。

カラム1本当たりの単価は,SAXカラムやMultimodeカラムの4倍程度と高価であるが, カラム負荷の際の溶媒変換がなく, 操作が容易である。

なお, これら多機能カラムによるアフラトキシンの試験法が, 平成14年3月26日付け食監発第0326001号により, 採用された。

5) 検出下限及び定量下限

AF 0.25ppbでのHPLC再現性試験結果を表7に示した。標準での検出下限値を3 とすると0.05ppb, 定量下限値

表7 0.25ppbの再現性試験

	AV	std	3	10
G 1	0.264	0.011	0.03	0.11
B 1	0.263	0.011	0.03	0.11
G 2	0.286	0.015	0.05	0.15
B 2	0.250	0.014	0.04	0.14

10 μ l 注入

n = 5

を10 とすると0.15ppbとなる。多機能カラムMycoSep, MultiSepを用いた場合の試料換算(試料10G・注入量10 μ l)の定量下限値は, ナッツ類では0.6ppb, 香辛料は1.2ppbとなる。

4 ま と め

- 1) フロリジルオープンカラムでの回収率は, AFG1, B1, G2, B2で各々52, 79, 57, 81%でありG1, G2の回収率が低かった。
- 2) BOND ELUT Jr SAX (500mg)カラムはナッツ類での回収率は81~100%であり, カラムも廉価であるが, カラム負荷の際に抽出溶媒を変換する必要がある。
- 3) 多機能カラムISOLUTE MULTIMODEカラムはピーナッツのG1, カシューナッツのG1, B1の回収率で70%程度と低かった。
- 4) 多機能カラムMycoSep#226はナッツ類, MycoSep#228, MultiSep#228カラムは香辛料で良い回収率を示し, 操作も簡便である。

定量下限値はナッツ類で0.6ppb, 香辛料で1.2ppbである。

なお, これら多機能カラムによるアフラトキシンの試験法が, 平成14年3月26日付け食監発第0326001号により, 採用された。

文 献

- 1) Hisashi Kamiura et al.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68, 458 (1985)
- 2) 食品衛生検査指針
- 3) 衛生試験法注解1990版
- 4) 衛生試験法注解2000版
- 5) Trucksess et al.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 77, 1512 (1994)
- 6) Hiroshi Akiyama et al.: J. Food Hyg. Soc. Japan 37, 195 (1996)
- 7) 合田幸広等: 食衛誌 Vol. 42, No. 1, 56 (2001)
- 8) 穂山浩等: 日本食品衛生学会第81回学術講演会(平成13年5月)講演要旨集