Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

ACQUITY UPLC H-Classシステムを用いた トウモロコシ、穀類、アーモンド中のアフラトキシン類の迅速分析

利点

- 規制に対応する高感度分析
- アフラトキシン類の分離に効果的な3液混合送液が可能
- 非誘導体化分析
- 迅速分析によるスループットの向上

ウォーターズのソリューション

ACQUITY UPLC H-Class システム
ACQUITY UPLC 蛍光検出器

キーワード

アフラトキシン類、蛍光、
マイコトキシン、食の安全
VICAM® アフラテスト カラム

はじめに

食料品のマイコトキシン（カビ毒）による汚染は食の安全における大きな問題の一つです。マイコトキシンとは収穫前後の保存や輸送時、または加工工程において、ある一定の環境条件のもとでカビが二次代謝産物として生産する毒の総称です。アフラトキシンはその中でもアスペルギルス･フラスなどのカビにより生成される一般的に知られているカビ毒の一種です。アフラトキシン類は主に B1、B2、G1、G2が知られています。アフラトキシン M1と M2 はアフラトキシン B1、B2の代謝物であり、B1、B2に汚染された飼料を使用した家畜より検出されます。各アフラトキシンの構造式を図1に示しました。

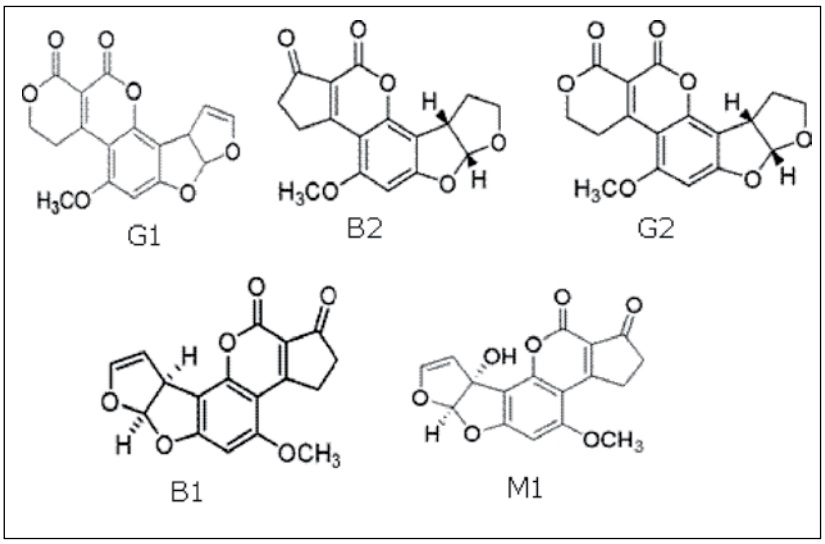

図1. アフラトキシン類の化学構造式

アフラトキシン類はカビ毒の中でも最も発がん性の高い物質です。この毒性により、食品中に含まれるアフラトキシンは政府により厳しく規制されています。[1, 2] また、アフラトキシンB1とG1はB2とG2に比べ検出される頻度が高いため、より厳しく規制されています。[3] 欧州連合 (EU) は最近アフラトキシン類の許容レベルとサンプル試験に関して規制の見直しを行いました。以前の規制はEU 規制1881/2006[1] に、追加の規制は165/2010[2]に記載されています。この規制は世界中でも最も厳しい規制となっています。

分析条件

LC条件

LCシステム: ACQUITY UPLC H-Class システム

分析時間: 4.0 分

カラム: ACQUITY BEH C_{18}、1.7 µm、2.1 x 100 mm (30 ℃)

移動相 A: 水

移動相 B: メタノール

移動相 C: アセトニトリル

流速: 0.4 mL/分

注入量: 20 µL
(オプションの 50 µLループ使用)

流速 (mL/分)	%A	%B	%C
0.4	64	18	18

(アイソクラティック)

蛍光検出器条件

励起波長: 365 nm

蛍光波長 429 nm (M1、B2、B1)

蛍光波長 456 nm (G2、G1)

ヨーロッパの規制では、穀類中のアフラトキシンB1 の最大残存許容量は2.0 µg/kg、B1、B2、G1、G2 を含むトータルアフラトキシンの最大残存許容量は4.0 µg/kgと規定されています。ナッツ中ではB1は2～12 µg/kg 、B1、B2、G1、G2のトータルアフラトキシンとして 4 ～15 µg/kg 、またアーモンドに関しては各アフラトキシンに対して8.0 µg/kg～10.0 µg/kgと特別に規定されています。生乳中においてはM1の最大残存許容量は 0.05 µg/kgに、特殊調製粉乳、フォローアップ粉乳に関しては0.025 µg/kgと規定されています。

アフラトキシン類の分析は、薄層クロマトグラフ(TLC)法、イムノアフィニティクロマトグラフ法、HPLC法、免疫学的測定 (ELISA) 法、LC/MS/MS法等、数多くの分析方法が報告されています。LC/MS/MS法は非常に高感度で選択性の高い分析手法ですが、 新たにLC/MS/MSシステムを導入する場合は、非常に大きな投資となります。 そこで、コスト面を考慮に入れた場合、LC/MS/MS分析に代わって、イムノアフィニティを用いた選択性の高い前処理と、蛍光検出器を用いた高感度検出を組み合わせた分析手法が、アフラトキシン類の分析において有効です。しかし、アフラトキシンB1とG1は逆相クロマトグラフィーで用いる移動相において蛍光が消失するため、従来は検出感度の向上を目的として誘導体化法が用いられてきました。[4,5]

本アプリケーションでは、ウォーターズの ACQUITY UPLC アフラトキシン分析キットとACQUITY UPLC H-Classシステムを用いて、アーモンド、トウモロコシ、粉ミルクが含まれた穀類中のアフラトキシンの分析をご紹介いたします。大容量フローセル搭載のACQUITY UPLC用蛍光検出器を使用した分析システムは、誘導体化を行わず、基準値レベルでのアフラトキシンの検出が可能です。従来の分析手法では感度向上を目的としたサンプルの誘導体化操作が必要であり、サンプル処理に時間がかかっていました。更に、ACQUITY UPLC H-Class システムは、溶媒の事前調製が不要な4液混合が可能であり、従来のHPLCのような操作性と、UPLC®の持つ超高分離と高いスループットを兼ね備えたシステムです。

標準試料溶液調製

アフラトキシンストックソリューション(メタノール溶液)：46319-U 、46304-U(スペルコ製)を用いて、濃度の異なる標準試料を6点準備しました。各濃度については表1を参照下さい。また標準試料の希釈には、1%の酢酸水を用いました。各標準試料について、注入量を20 µLとし、3回の繰り返し注入を行いました。

サンプル前処理

トウモロコシ(全粒)、殻付きアーモンド、幼児用ではない粉ミルクの含まれた穀類を 25 g ずつ各2種準備しました。一つはブランク試料としました。もう一つにはEUに規定されている濃度のアフラトキシン類標準品を添加しました。添加量は下記の「標準品添加試料調製」に示します。2種の試料は VICAMアフラテストサンプル前処理手順に従って処理を行いました。

標準品添加試料調製

各マトリックス中にトータルのアフラトキシン量として 4 µg/kg となるように標準品添加を行いました(B1は1.54 µg/kg 添加)。以下に示すサンプル前処理手順中のブレンダーでの攪拌時に0.26 mg/L の標準溶液を384 µL添加しました。粉ミルク含有の穀類には 0.05 µg/kg のM1を添加しました。(0.01mg/L の M1標準溶液を125.0 µL添加しました)。

アフラテストサンプル前処理手順[6]

- 25 g のサンプル、5 g の塩化ナトリウム、100 mLの 80:20メタノール: 水 (HPLCグレード) を加え1分間高速でブレンダーを用いて攪拌
- Whatman社製 ろ紙を用いてろ過 (ろ液1)
- ろ液1 10 mL に40 mL の水を加える
- ガラス繊維ろ紙を用いてろ過 (ろ液1)
- ろ液2 10 mL を VICAM アフラテストアフィニティカラムにロード
- 10 mLのHPLCグレードの水で2回洗浄
- 1 mL のHPLC グレードのメタノールで溶出
- 1% 酢酸水溶液で1:1 に希釈し供試料とする

100%の回収率と仮定した場合、各サンプルにはB、Gのトータルアフラトキシン量として 1000 ng/L、12.5 ng/Lのアフラトキシン M1が含まれています。 分析時の注入量は20 µLとしました。

結果および考察

今回のアフラトキシン類の分析では分析時間は4分以内でした。図2 に6点の濃度の異なる標準試料の重ね書きクロマトグラムを示します。

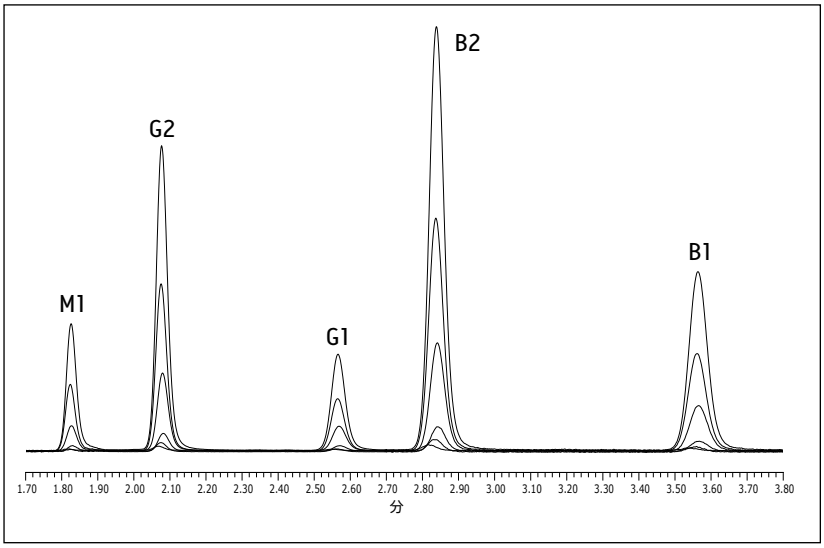

図 2. 標準試料6点の重ね書きクロマトグラム

B1とG1の強度はB2、G2と比べて移動相による蛍光の消光により低くなっています。しかし、大容量セル搭載ACQUITY UPLC用蛍光検出器ではB1、G1においても誘導体化を行わず目的の感度での検出が可能です。

各マトリックス標準品添加試料について、各アフラトキシンの定量を行いました。各アフラトキシンの検量線を図3 に示しました。全ての化合物において決定係数(R^2) が0.995以上と良好な結果が得られています。

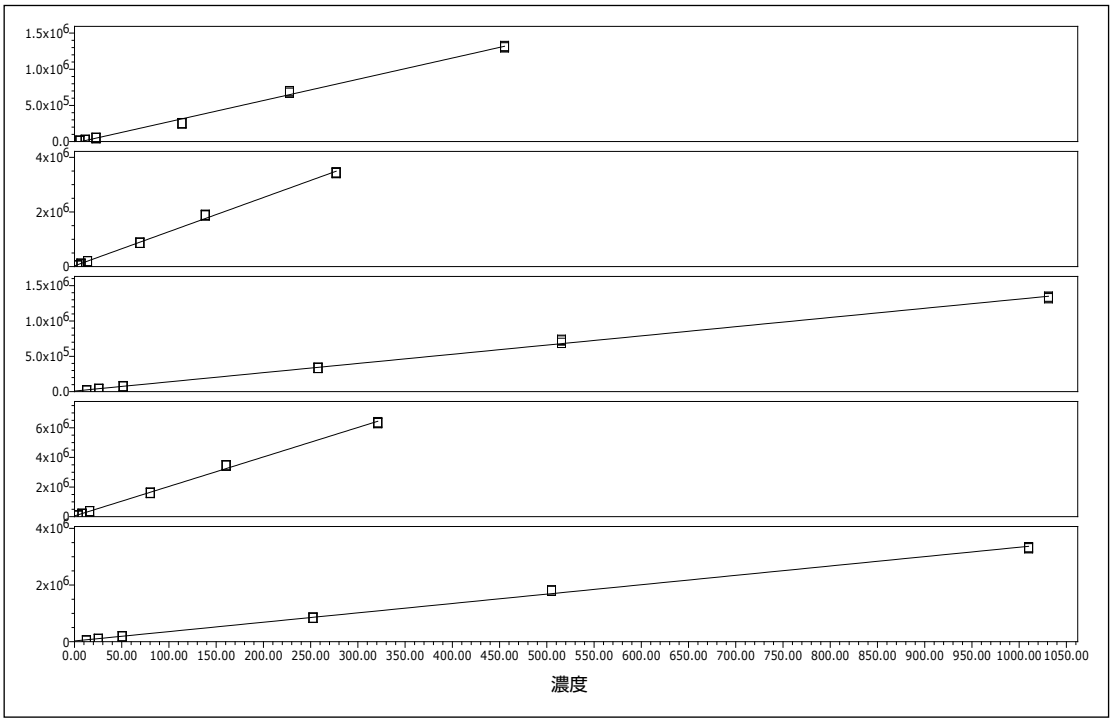

図 3. アフラトキシン類の検量線結果（濃度単位：ng/L）

表1に各標準試料の濃度を示します。各アフラトキシン類の濃度は、実際の規制レベルに基づいて設定しました。

表 1. 標準試料#1から#6の各アフラトキシン濃度（ ng/L）

#	M1	G2	G1	B2	B1
1	5.7	3.5	12.9	4.0	12.7
2	11.4	6.9	25.8	8.0	25.3
3	22.8	13.9	51.6	16.1	50.5
4	113.8	69.3	257.8	80.3	252.5
5	227.6	138.6	515.5	160.5	505.0
6	455.3	227.0	1031.0	321.0	1010.0

図4にトウモロコシ、アーモンド、穀類のブランク及び標準品添加試料のクロマトグラムを示しました。ブランクサンプル中にアフラトキシン B1及び B2が非常に低濃度ではありますが、検出されています。ブランクサンプル中で最も含まれていたトウモロコシのアフラトキシンB1の濃度は0.025 µg/kg でした。B1の規制濃度は2 µg/kgですので、検出された濃度は非常に低濃度であるといえます。ブランクサンプル中のアフラトキシン類のピークは拡大表示をしてあります。標準品添加試料中の各化合物の回収率は、それぞれのブランク中に検出されたアフラトキシンの濃度を考慮に入れて算出しました。回収率の結果を表2に示しました。全ての化合物において回収率は 84% から116%であり、良好な結果が得られました。図4に表示した、穀類の標準品添加試料中に検出されたアフラトキシンM1も拡大表示しています。

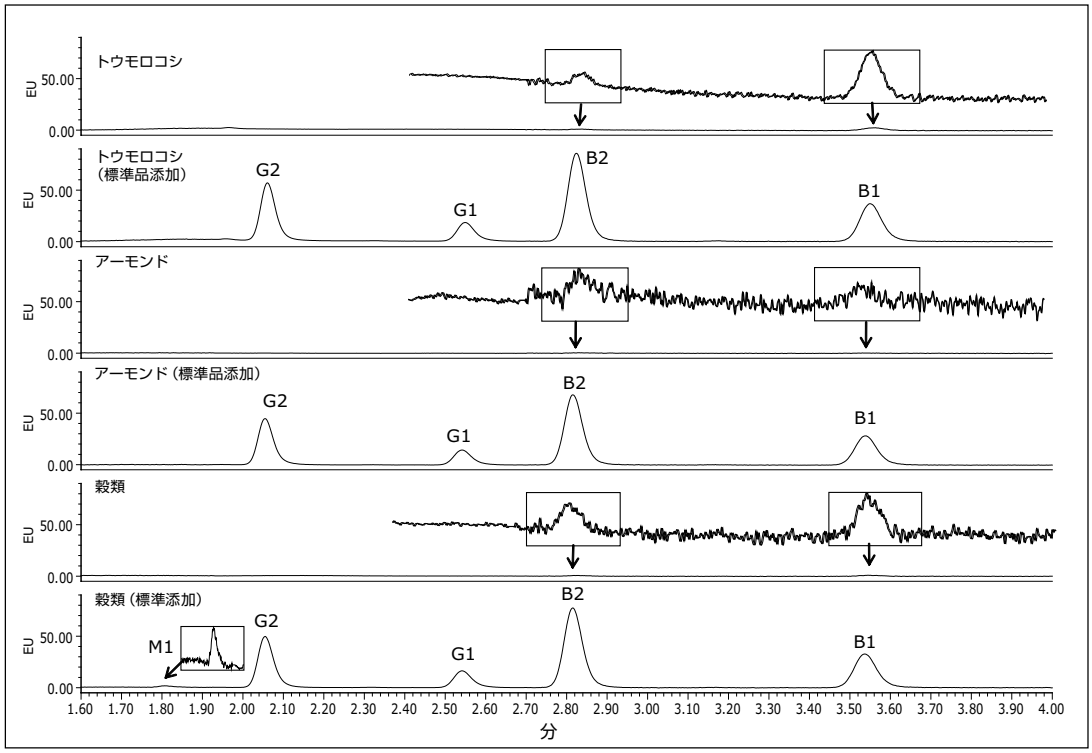

図 4.トウモロコシ、アーモンド、穀類マトリックスのクロマトグラム(ブランク及び標準品添加サンプル)

表 2. トウモロコシ、アーモンド、穀類マトリックスにおける各アフラトキシン類の回収率

化合物	% 回収率 トウモロコシ	% 回収率 アーモンド	% 回収率 穀類
M1	—	—	115.8
G2	109.8	91.3	102.2
G1	108.7	88.6	101.5
B2	110.6	89.4	102.9
B1	104.7	84.6	98.1

各マトリックスにおける、保持時間及び定量濃度の再現性(n=3)を表3に示しました。表4には、全分析(標準試料及び標準添加物サンプル) における保持時間の再現性の結果を示しました(全27回注入)。

表 3.各マトリックスにおけるアフラトキシン類の保持時間及び定量濃度再現性(n=3)結果 (% RSD)

化合物	トウモロコシ		アーモンド		穀類	
	保持時間	濃度	保持時間	濃度	保持時間	濃度
M1	—	—	—	—	0.39	6.04
G2	0.06	0.28	0.16	0.76	0.17	0.03
G1	0.04	1.34	0.16	0.98	0.16	0.62
B2	0.06	0.42	0.13	0.75	0.13	0.08
B1	0.03	0.21	0.08	8.16	0.10	0.65

表 4. 全サンプルにおけるアフラトキシン類の保持時間再現性結果 (% RSD) 合計注入回数27回

化合物	保持時間
M1	0.40
G2	0.47
G1	0.42
B2	0.36
B1	0.33

結論

本アプリケーションでは、ACQUITY UPLC H-Class 蛍光システムを用いた、サンプルの誘導体化を行わないアフラトキシン類の定量分析手法についてご紹介いたしました。誘導体化処理を行わない場合は、システムの容量を削減することができ、ピークの拡散を回避できます。その結果、高いシグナル・ノイズ比を維持することが可能です。更に、ポストカラムなど付属システムが不要となり、装置の操作トレーニングやメンテナンス等のコストも削減できます。

更に、アフラテストサンプル前処理手順を用いることにより、多岐にわたるマトリックスにおいて良好な回収率が得られました。実サンプルでの定量分析においても世界中で最も厳しいアフラトキシン類の基準に対応可能な分析法であることが実証されました。ACQUITY UPLC H-Classシステムとアフラトキシン分析キットを用いて簡便にアフラトキシン類の分析を行うことができました。4液混合システムは移動相の事前調製が不要であり、分析法開発においても操作性が向上します。更に分析時間が4分以内であり、従来のHPLC分析と比較し、サンプルのスループットとラボの生産性を同時に向上することが可能です。

参考文献

1. EU Commission Regulation 1881/2006.
2. EU Commission Regulation 165/2010.
3. Fungal Toxins Economic Health and Techno – Commercial Implications. Frost and Sullivan, p. 29, 2001.
4. Kok W.Th Derivatization Reactions for the Determination of Aflatoxins by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. J Chromatography B, 659: 127-137, 1994.
5. Joshua et al. The Simultaneous HPLC Determination of Six Aflatoxins, Zearalenone and Ochratoxin-A Using Gradient Elution. Post Column Photochemical Derivatization and Fluorescence Detection. Presented at the 110th AOAC International Meeting and Exposition, September 8-12, 1996, Orlando, FL.
6. VICAM Instruction Manual. 715001733 Rev A, 2007.

適用規格：JISQ9001:2008
登録番号：JMAQA-331 登録日：1999年05月31日
審査登録範囲：理科学機器（液体クロマトグラフ・質量分析装置・ データ管理システム等）の輸入・販売から保守業務までのトータルサポート及び保守プランの設計・開発

Waters、ACQUITY UPLC、ACQUITY および UPLC は Waters Corporationの登録商標です。The Science of What's Possible は Waters Corporationの商標です。その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

VICAM および AflaTest は VICAM Waters Businessの登録商標です。

このISO9001認証登録ロゴは、Waters Corporationのものです。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.co.jp
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第 5 小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 サムティ新大阪フロントビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 静岡

©2010 Waters Corporation. Produced in Japan.
2010年11月 720003644JA PDF