

自動前処理装置によるアフラトキシン (B1, B2, G1, G2) 分析法の開発

○小西賢治、島三記絵、佐々野僚一、斉藤勲
株式会社アイスティサイエンス

【目的】アフラトキシン(以下AF)とはアスペルギルス・フラバス (Aspergillus flavus : コウジカビの一種) などから生成されるカビ毒の総称であり、中でもAFB1は天然物で最も強力な発がん性物質として知られている。検査方法については、厚生労働省から『総アフラトキシン (AFB1, B2, G1, G2) の試験法¹⁾』が公開されているが、分析精度の安定・向上ならびに作業者のばく露防止を目的として固相抽出操作の自動化を検討した。

【方法】分析試料：アーモンド、標準品：アフラトキシン混合標準液 (B1, B2, G1, G2 各 25 μg/ml アセトニトリル溶液) (富士フィルム和光純薬)、自動前処理装置：ST-L400 (アイスティサイエンス)、測定装置：Nexera X2 及び LCMS-8045 (島津製作所)

抽出(溶媒抽出)操作：試料 50.0 g にアセトニトリル-水 (9/1) 200 mL を加えホモジナイズした後、上澄み 10 mL を遠心分離したものを抽出液とした。

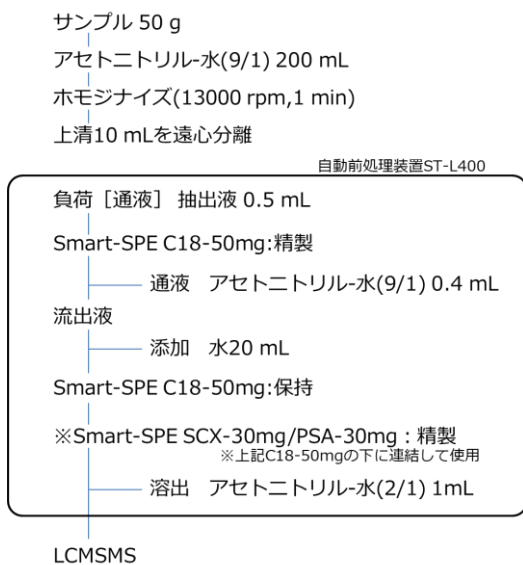


図1) 前処理フロー

精製(固相抽出)操作：抽出液 0.5 mL を取り C18 に通液した。流出液および洗浄液 (アセトニトリル-水 (9/1)) 0.4 mL に水 20 mL を混合し別の C18 に通液して AF を保持させた。C18 に SCX と PSA を連結し、アセトニトリル-水 (2/1) 1 mL で溶出・定容したものを試験液とした。

【結果と考察】固相 C18 への保持：アセトニトリル-水比率を変化させて C18 に通液した際に AF が保持される条件を検討した。アセトニトリル-水 (1/20) のとき、AF が十分保持された。

固相 C18 からの溶出：アセトニトリル-水 (2/1) を用いることで脂質などの無極性夾雑物 C18 に保持させたままから AF を溶出できた。また溶出の際に陰イオン交換相互作用を持つ PSA、陽イオン交換作用を持つ SCX を連結して追加精製を行った。

添加回収試験 (n=5) による試験法の評価：試料中濃度が各 2.5 μg/kg となるように AF を添加したアーモンドを分析用サンプルとして添加回収試験を行ったところ、下表1) のとおり良好な結果が得られ、夾雑成分による影響は見られなかった。

		※n=5	
	回収率(%)	RSD(%)	
AF B1	93	6.5	
AF B2	83	3.7	
AF G1	89	6.0	
AF G2	85	5.1	

表1) 添加回収試験結果

固相抽出操作を自動化することで、ばく露を防ぎながら安定した精度で分析できた。今後はスパイス等について検討したい。

1) 厚生労働省, 食安発0816第2号 平成23年8月16日

自動前処理装置によるアフラトキシン（B1,B2,G1,G2）分析法の開発

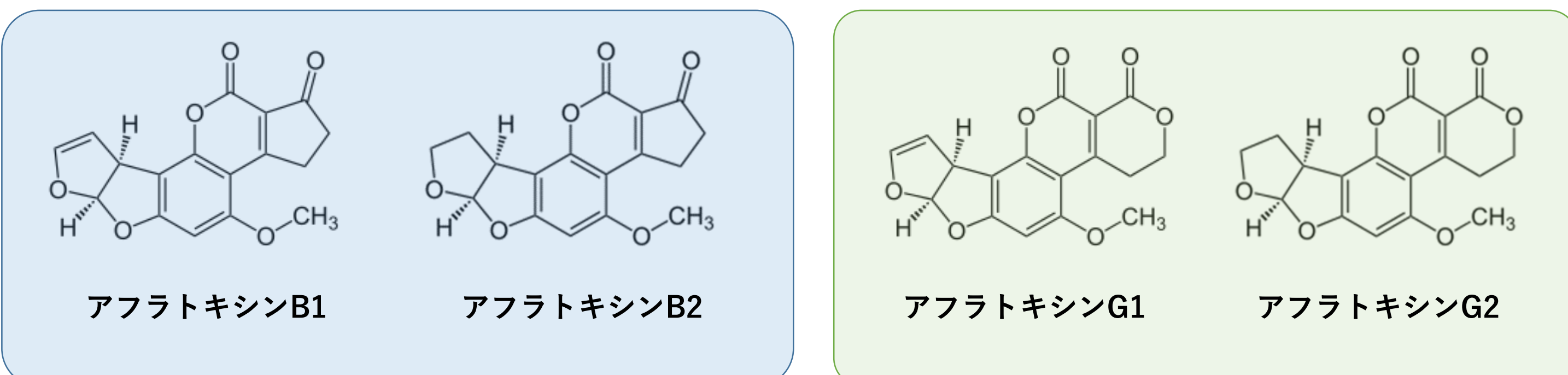
○小西賢治、島三記絵、佐々野僚一、斎藤勲

株式会社アイスティサイエンス

緒言

アフラトキシン(以下AFs)とはアスペルギルス・フラバス (*Aspergillus flavus*: コウジカビの一種)などから生成されるカビ毒の総称であり、中でもAFB1は天然物で最も強力な発がん性物質として知られている。検査方法については、厚生労働省から『総アフラトキシン(AFB1,B2,G1,G2)の試験法¹⁾』が公開されているが、分析精度の安定・向上ならびに作業者のばく露防止を目的として固相抽出操作の自動化を検討した。

目的化合物



実験方法

1.前処理フロー



2.測定条件

- 【測定装置】
UHPLC(Nexera X2)及びLCMS-8045 (島津製作所製)
- 【LC条件】
分析カラム: Shimpack FC-ODS (2 mmI.D. × 150 mmL, 3 μm)
移動相 A液: 10mM酢酸アンモニウム水
B液: メタノール
流速: 0.2 mL/min
グラジエント: B.Conc40%(0-2 min)→60%(10 min)→90%(12-14 min)→40%(14.1-15 min)
分析時間: 15分
注入量: 10 μL
カラム温度: 40 °C
- 【MS条件】
イオン化モード: ESI positive
ネブライザーガス流量: 2 L/min
ドラインガス流量: 10 L/min
ヒーティングガス流量: 10 L/min
インターフェース温度: 300 °C
DL温度: 250 °C
ヒートブロック温度: 400 °C
測定モード: MRM

まとめ

アフラトキシン分析の自動化を目的として分析法の検討を行った。アセトニトリル-水比率を調整してC18ミニカラムにより精製・保持を行い、C18からの溶出の際にイオン系夾雑物の除去を目的としてSCX/PSAを連結してアセトニトリルで溶出した。ピーク形状改善のため、溶出液に水を加えてアセトニトリル-水(1/1)となるよう調整した。アーモンド、とうもろこしを試料として添加回収試験を行ったところ、良好な回収率と再現性を得られた。

参考文献

- 1) 厚生労働省, 食安発0816第2号 平成23年8月16日
- 2) ”違反事例”. 厚生労働省. https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/yunyu_kanshi/ihan/index.html, (参照 2019-09-30)

結果

1. C18ミニカラムによる精製・保持

C18ミニカラムとアセトニトリル-水比率による精製・保持の最適条件を検討した。図1の結果より、抽出液に水を加えてアセトニトリル-水(1/1)としてC18に通液し、無極性夾雑物をC18に保持させAFsは流出させ、図2の結果より、AFsを含む流出液にさらに水を加えてアセトニトリル-水比率(1/20)とすることでAFsをC18に保持させることとした。

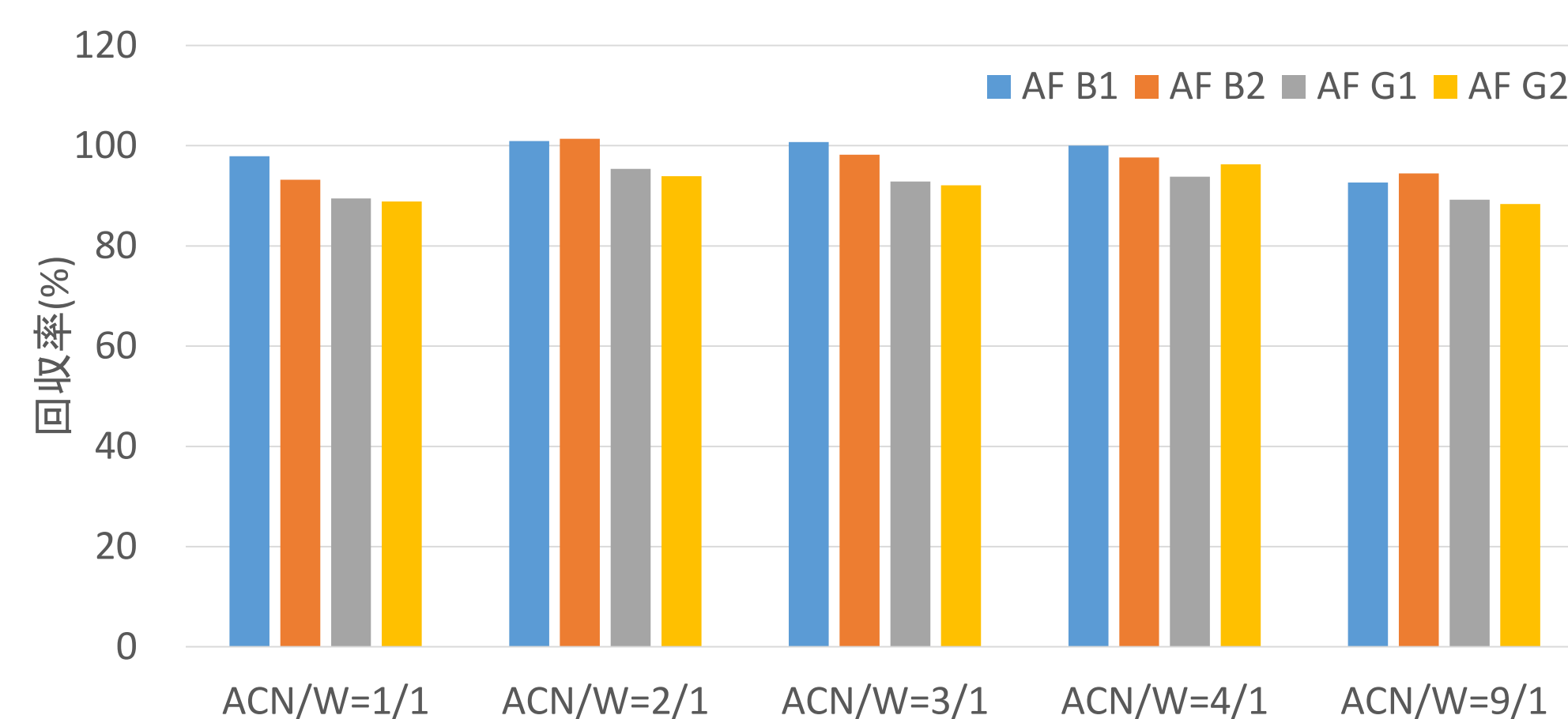


図1 C18ミニカラムにおけるアセトニトリル-水比率と回収率の関係

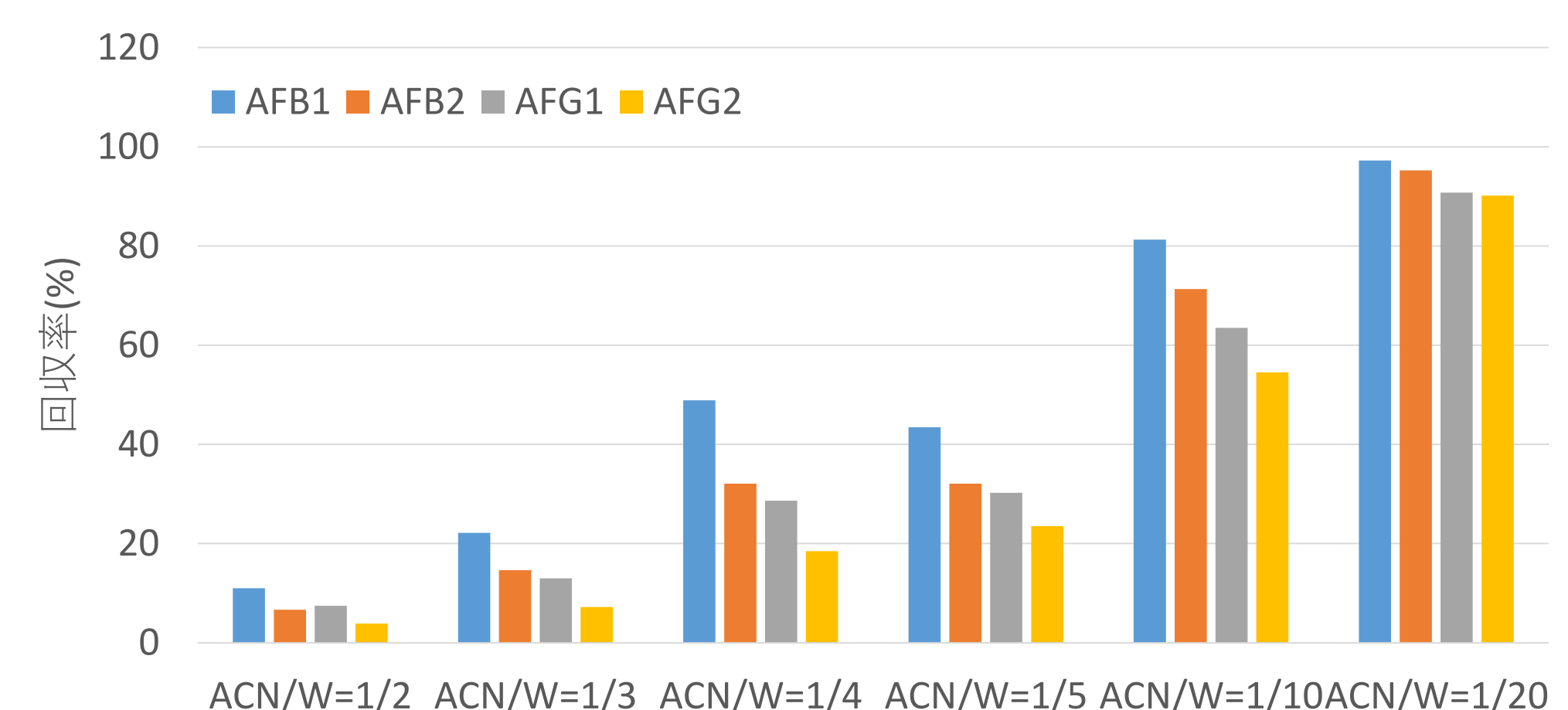


図2 C18ミニカラムにおけるアセトニトリル-水比率と保持の関係

2. イオン交換系ミニカラムによる精製

C18で保持したAFsを溶出する際に、イオン系夾雑物の除去を目的として追加精製を行うこととした。アーモンド抽出液に標準溶液を添加して回収率を評価したところ、SCX+PSAを用いることで良好な回収率が得られた。

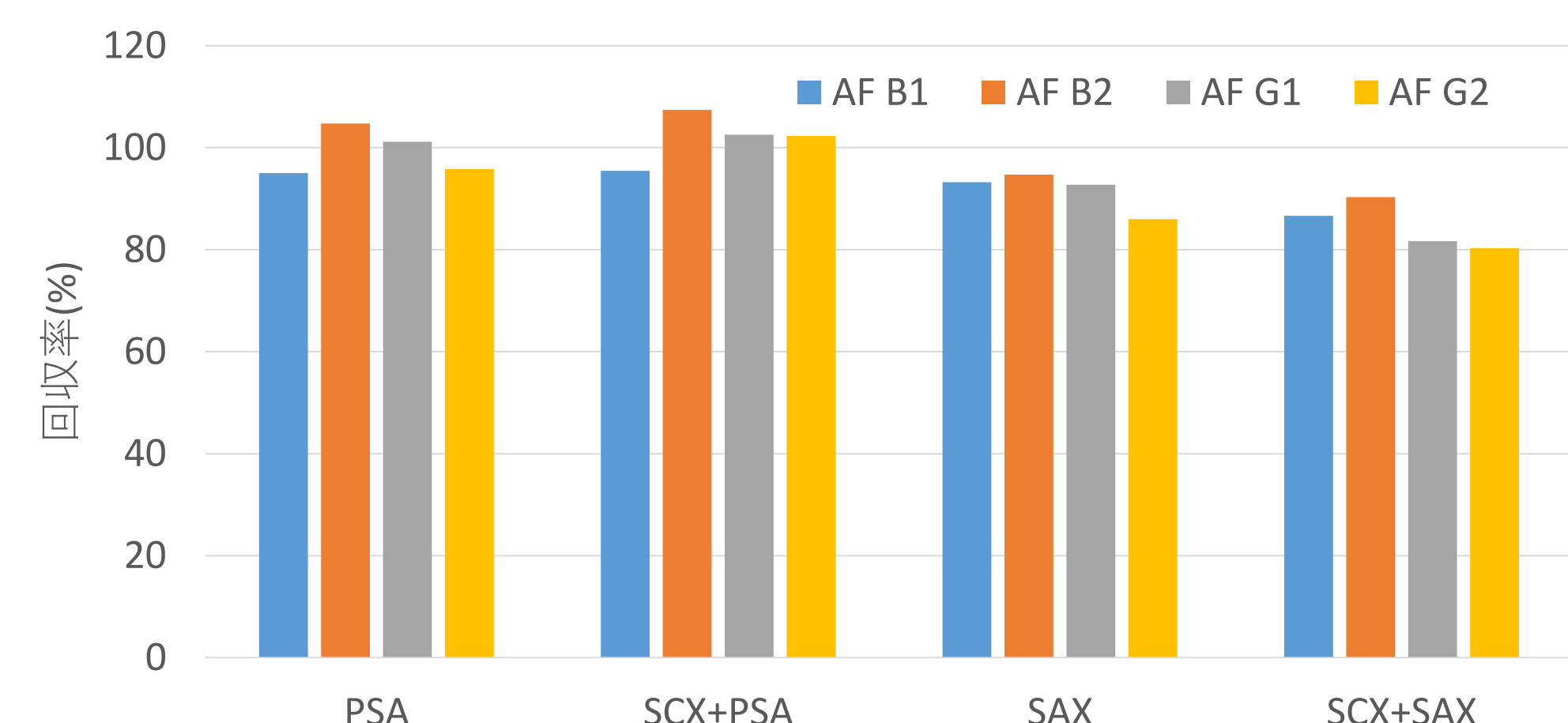


図3 陽イオン交換、陰イオン交換ミニカラムにおける精製

3. 添加回収試験

平成30年度に違反事例²⁾の多かったアーモンド、とうもろこしを分析用試料として試料中濃度が各2.5μg/kgとなるように標準溶液を添加して添加回収試験を実施した。とうもろこしにおける添加回収試験の際に抽出液(アセトニトリル-水(9/1))をそのままC18に負荷して分析を実施したところイオン化阻害を受けたため、精製効果向上のために抽出液に水を等量加えてC18に通液し、保持したC18からの溶出にアセトニトリルを用いてSCX/PSAで精製をしたところイオン化阻害の改善がみられた。アセトニトリルのみで溶出することでLCMSMS測定時にピーク形状が悪化した(図4)が、測定前に水で希釈することで改善がみられた。表1のとおり回収率、再現性ともに良好な結果が得られた。

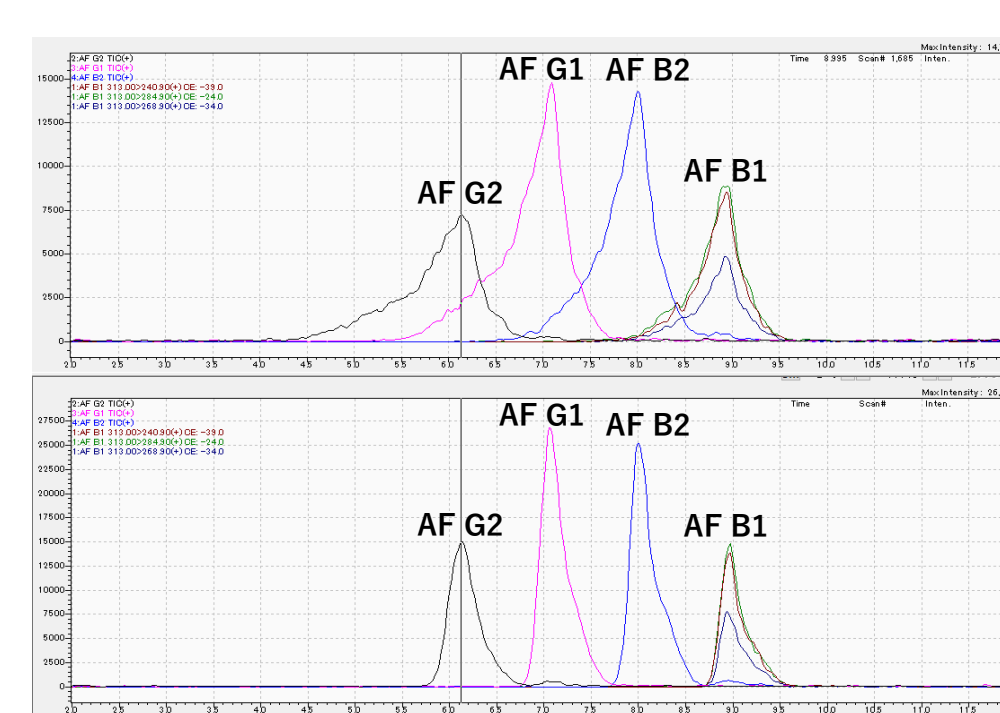


図4 アセトニトリル-水比率によるピーク形状
上) アセトニトリルのみ 下) アセトニトリル-水(1/1)

表1 添加回収試験結果

	RT(min)	アーモンド		とうもろこし	
		回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)
AF B1	8.947	93	6.5	94	7.0
AF B2	8.011	83	3.7	86	9.4
AF G1	7.075	89	6.0	107	6.9
AF G2	6.056	85	5.1	100	8.9