

LC/MS 及び HPLC による落花生中のアフラトキシンの分析

Analysis of Aflatoxins in peanut by LC/MS and HPLC methods

アフラトキシンは、*Aspergillus flavus* 等のカビにより産生されるカビ毒で、強い発がん性を有しています。現在、約 20 種が同定されていますが、代表的なものとしてアフラトキシン B1、B2、G1、G2 の 4 種(図 1)があります。食品衛生法では、従来、最も発がん性が高いとされるアフラトキシン B1 を検出することで規制されてきましたが、現在では、総アフラトキシン(B1、B2、G1、G2 の総和)として基準値(10 µg/kg)が設定されています。また、海外では、10 µg/kg(直接消費用ナッツ、CODEX)及び 15 µg/kg(加工用落花生、EU)等の基準値が設定されています。厚生労働省通知のアフラトキシンの試験法では、イムノアフィニティーカラムを前処理カラムとして用いた LC/MS 法及び蛍光誘導体化-HPLC 法が採用されています。

本報では、各分析法による落花生をモデル試料としたアフラトキシンの測定例を紹介します。

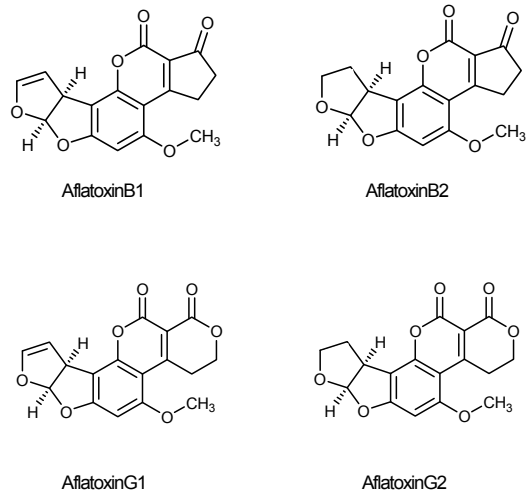


図 1 アフラトキシンの構造式

(1)LC/MS 法

落花生試料の前処理法を、図 2 に示します。ブレンダーによる粉碎、抽出、ろ過を行った後、アフラトキシン特異抗体を結合させたイムノアフィニティーカラムを用いて精製した溶液を、そのまま測定しました。

分離カラムには、TSKgel ODS-100V 5µm (2.0 mmI.D. x 100 mm, 5 µm) を使用し、酢酸アンモニウム水溶液、アセトニトリル、メタノールの混合溶媒を移動相として分離しました。試験法では、選択イオンモニタリング(SIM)及び選択反応モニタリング(SRM)の検出条件が例示されていますが、今回は SIM により検出を行いました。総アフラトキシン濃度が基準値の 2 倍である 20 µg/kg になるように添加した落花生を試料として、図 2 に示す前処理を行った後、LC/MS 法で測定したクロマトグラムを図 3 に示します。

試料	50 g
	+ アセトニトリル/水(9/1) 100 mL
	ブレンダーで攪拌 5 分間
	遠心分離(2500 r/min, 5分間)
抽出液	5 mL分取
	+ リン酸緩衝生理食塩水で定容 50 mL
	ろ過(ガラス繊維ろ紙)
ろ液	10 mL
	イムノアフィニティーカラム精製(AFLAKING, 堀場製作所)
	+ 洗浄;リン酸緩衝液 10mL
	+ 洗浄;水 10mL
	+ 溶出;加圧による水分除去後, アセトニトリル 3 mL
溶出液	アセトニトリル 5 mL 定容
試料溶液	1 mL
減圧濃縮乾固	
	+ 移動相 1 ml
↓	LC/MS

図 2 落花生試料の前処理法

表 1 分析条件

Column :	TSKgel ODS-100V 5 $\mu$ m (2.0 mmI.D. x 150 mm, 5 $\mu$ m)			
Eluent :	CH <sub>3</sub> OH/CH <sub>3</sub> CN/10 mmol/L CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> =60/20/150			
Flow rate :	0.2 mL/min			
Column temp. :	40 °C			
Injection volume :	10 $\mu$ L			
MS :	G1956B (Agilent Technologies)			
Ion source :	ESI(+)			
Mode :	SIM			
m/z :	AflatoxinB1	313	AflatoxinB2	315
	AflatoxinG1	329	AflatoxinG2	331

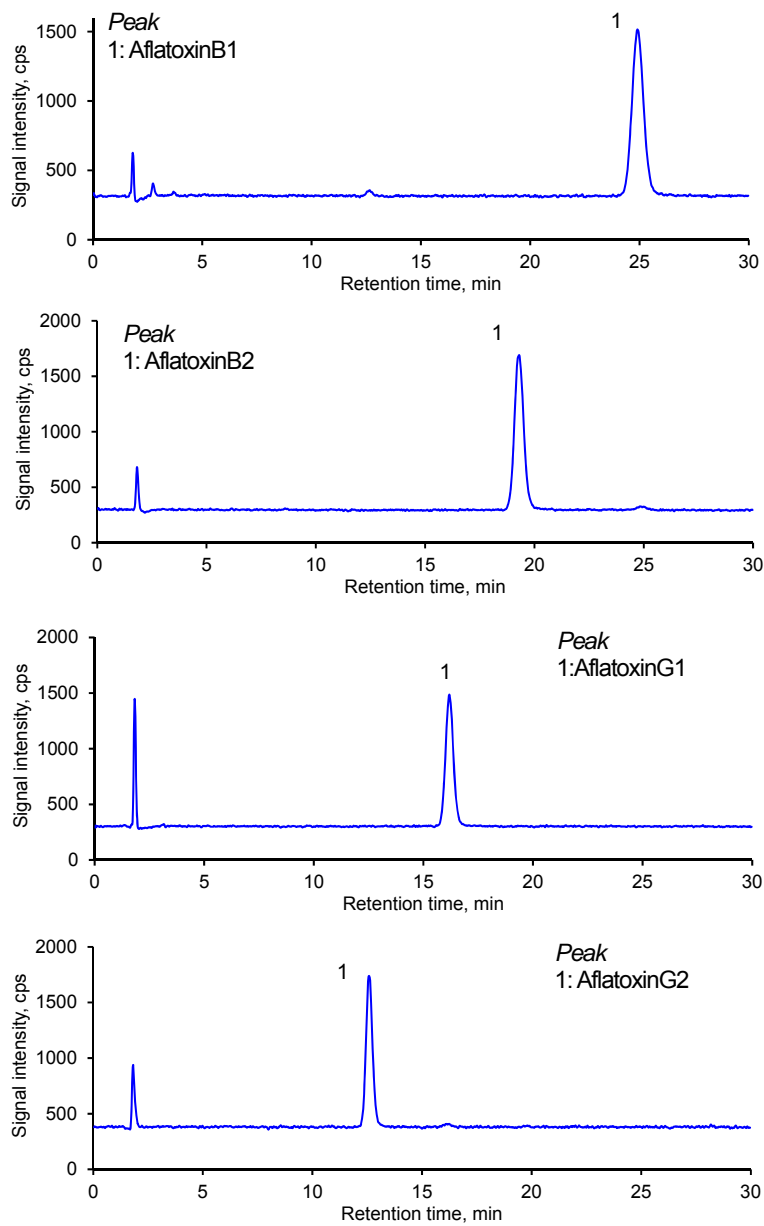


図3 落花生試料のクロマトグラム(LC/MS法)

添加濃度: 総アフラトキシン量として 20  $\mu$ g/kg(基準値の2倍)

## (2) 蛍光誘導体化-HPLC 法

落花生試料の前処理法を、図 4 に示します。試料の粉碎、抽出、ろ過処理及びイムノアフィニティーカラムを用いた精製までは、図 2 と同様の処理を行いました。アフラトキシンは、自然蛍光を有するため、誘導体化することなく蛍光検出が可能ですが、アフラトキシン B1 及び G1 の蛍光強度を増加する目的で、TFA を用いた水酸化体への誘導体化を行いました。なお、アフラトキシン B2 と G2 は、誘導体化されません。

分離カラムには、TSKgel ODS-100V 5 $\mu$ m (4.6 mmI.D. x 250 mm, 5  $\mu$ m) を使用し、水、アセトニトリル、メタノールの混合溶媒を移動相として分離しました。総アフラトキシン濃度が基準値の 2 倍である 20  $\mu$ g/kg になるように添加した落花生を試料として、図 4 に示す前処理を行った後、HPLC 法で測定したクロマトグラムを図 5 に示します。水酸化体にすることで、図 3 と比較して、アフラトキシン溶出順序が異なっています。

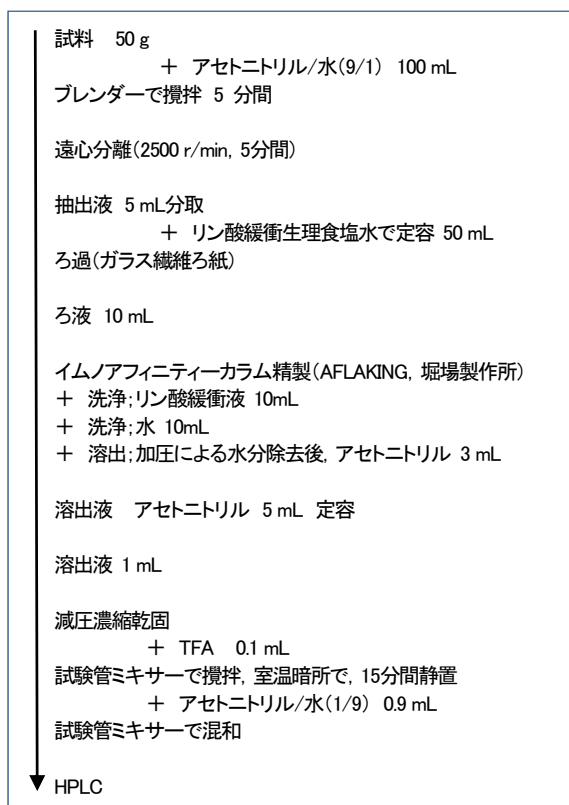


図 4 落花生試料の前処理法

表 2 分析条件

Column : TSKgel ODS-100V 5 $\mu$ m (4.6 mmI.D. x 250 mm, 5 $\mu$ m)
Eluent : CH <sub>3</sub> OH / CH <sub>3</sub> CN / H <sub>2</sub> O = 30/10/60
Flow rate : 1.0 mL/min
Column temp. : 40 °C
Injection volume : 20 $\mu$ L
Detection : FLD (Ex; 365 nm, Em; 450 nm)

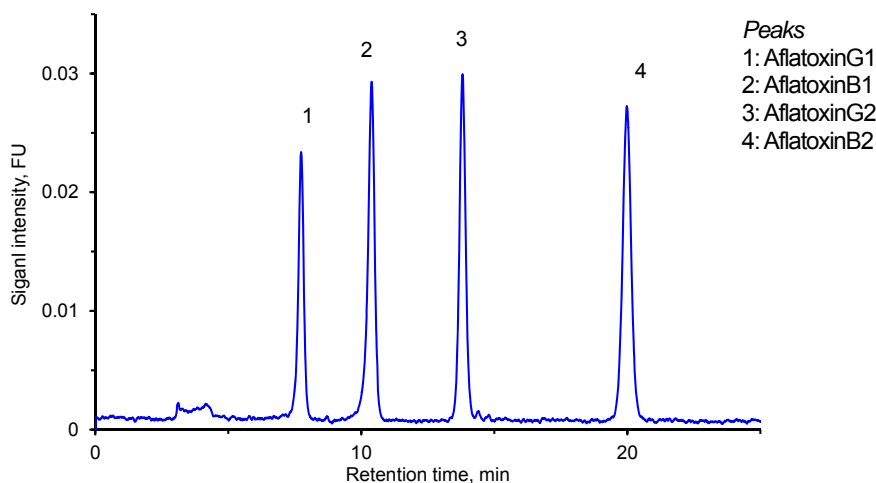


図 5 落花生試料のクロマトグラム(蛍光誘導体化-HPLC 法)

添加濃度: 総アフラトキシン量として 20  $\mu$ g/kg(基準値の 2 倍)

各分析法によるアフラトキシンの定量範囲、再現性、定量限界及び回収率を表3に示します。

標準試料を用いて検量線を作成した結果、LC/MS法で0.25~10 µg/L、蛍光誘導体化-HPLC法で1.0~4.0 µg/Lの濃度範囲において、 $r^2 = 0.999$ 以上の相関係数を有する直線性が得られました。定量下限値 (LOQ) は、

いずれの方法でも約0.1 µg/Lとなり、試験法の前処理を行った場合、1 µg/kg (基準値の1/10濃度)に相当します。各アフラトキシンの標準物質を各5 µg/kgの濃度になるように添加した落花生を試料として測定を行った場合の回収率は、98.7~110%と良好な結果が得られました。

表3 各分析法による定量範囲、再現性、定量限界及び回収率

LC/MS法

Analytes	Calibration curve		RSD (% , n=6) (at 5 µg/L)	LOQ		Recovery(%) (at 20µg/kg: peanut)
	Range(µg/L)	$r^2$		(µg/L)	(µg/kg : peanut)	
AflatoxinB1	0.25-10	0.999	0.76	0.072	0.72	101.7
AflatoxinB2	0.25-10	0.999	0.68	0.077	0.77	98.7
AflatoxinG1	0.25-10	0.999	0.37	0.093	0.93	109.2
AflatoxinG2	0.25-10	0.999	0.72	0.070	0.70	105.2

蛍光誘導体化-HPLC法

Analytes	Calibration curve		RSD (% , n=6) (at 2 µg/L)	LOQ		Recovery(%) (at 20µg/kg: peanut)
	Range(µg/L)	$r^2$		(µg/L)	(µg/kg : peanut)	
AflatoxinB1	1.0-4.0	0.999	1.0	0.068	0.68	104.6
AflatoxinB2	1.0-4.0	0.999	0.5	0.061	0.61	104.0
AflatoxinG1	1.0-4.0	0.999	2.0	0.069	0.69	108.3
AflatoxinG2	1.0-4.0	0.999	1.3	0.061	0.61	107.3