

コアシェル型カラムを用いた総アフラトキシン試験法の検討

中村和宏、中西希代子、橋本博之、原田利栄、林千恵子、本郷猛、池田恵

Validation of a HPLC method using core-shell column for the detection of total aflatoxins

Kazuhiro NAKAMURA, Kiyoko NAKANISHI, Hiroyuki HASHIMOTO, Rie HARADA,
Chieko HAYASHI, Takeshi HONGO and Megumi IKEDA

要旨

総アフラトキシンの通知試験法では高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法が採用されており、我々の施設では全多孔性型の HPLC カラムを用いて試験を実施していた。近年、汎用 HPLC でも超高速液体クロマトグラフに匹敵する性能を発揮することを可能としたコアシェル型カラムの有用性が報告されており、このカラムを全多孔性型カラムに代わる新たな HPLC カラムとして総アフラトキシン試験に適用できる可能性がある。このことからコアシェル型カラムを用いた総アフラトキシン測定条件の検討を行うとともに、生落花生およびカシューナッツを対象とした妥当性評価を実施した。この結果、既存の装置の設定を変更することなく、優れたピーク形状を得ることや分析時間の短縮化を図ることができ、妥当性評価の結果も良好であった。

キーワード：アフラトキシン、コアシェル型カラム、全多孔性型カラム、高速液体クロマトグラフ

Keywords : aflatoxin, core-shell column, fully porous column, high performance liquid chromatograph

はじめに

かび毒の一つであるアフラトキシンは、*Aspergillus flavus*、*A. parasiticus*、*A. nomius* などの *Aspergillus* 属により産生され、肝がん^{1) 2)}に関連することなどが報告されている。我が国では現在、総アフラトキシンについて規制値(アフラトキシン B₁、B₂、G₁ 及び G₂ の総和が 10 µg/kg を超えないこと)が設定されている³⁾。

アフラトキシン分析法には長らく薄層クロマトグラフ法が用いられていた⁴⁾。この分析法は抽出に毒性の高いクロロホルムを使用することなどが問題であった。平成 14 年より、この問題を解決した新たな試験法として高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法が導入され⁵⁾、平成 23 年にアフラトキシン B₁ のみの規制⁴⁾ から総アフラトキシンの規制³⁾ に変更されてからも試験法には引き続き HPLC 法が採用された。当所では全多孔性型の HPLC カラムを採用し、県産生落花生および輸入食品を対象として総アフラトキシンの試験を実施していた。

近年、汎用 HPLC でも超高速液体クロマトグラフに匹敵する分解能および感度を獲得でき、分析時間の短縮、有機溶媒使用量の削減を可能とするコアシェル型カラムが様々なメーカーにより開発されており、残留農薬やアミノ酸分析において有用性が報告されている^{7) 8)}。この HPLC カラムは全多孔性型カラムに代わる新たなカラムとして総アフラトキシン試験にも適用できる可能性がある。

そこで本研究ではコアシェル型カラムを用いた総

アフラトキシン試験法の検討を行うとともに、生落花生およびカシューナッツを対象として妥当性評価を実施したところ、良好な結果が得られたので報告する。

実験方法

1. 試料

千葉県産生落花生、輸入食品のカシューナッツ(あらかじめアフラトキシン B₁、B₂、G₁ および G₂ が不検出であることを確認したもの)を用いた。

2. 試薬および試液

標準液は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、和光純薬工業株式会社製)をアセトニトリルで任意の濃度に希釈したものを用いた。多機能カラムは Autoprep® MF-A 1000 (昭和電工株式会社製)、イムノアフィニティーカラムは AFLAKING (株式会社 堀場製作所製)を使用した。その他の試薬は HPLC 用または LC/MS 用を使用した。

3. 試料および標準液の調製

試料の調製は通知⁶⁾に準じて行った。均一化試料 50.0 g にアセトニトリル・水 (9:1) を 200 mL を加え 5 分間ホモジナイズし、抽出液を得た。抽出液中のアフラトキシンの精製には多機能カラムもしくはイムノアフィニティーカラムを用いた。カラム精製により得られた溶出液を窒素気流で乾固し、その残渣にトリフルオロ酢酸 0.1 mL およびアセトニトリル・水 (1:9) 0.9 mL を加えたものを HPLC 用試験溶

液とした。標準液は窒素気流で乾固し、試料と同様の処理を行った。

4. 装置および測定条件

HPLCはLC-10AT_{VP}シリーズ（デガッサー DGU-14A、低圧グラジエントユニット FCV-10AL_{VP}、ポンプ LC-10AT_{VP}、オートサンプラ SIL-10AD_{VP}、カラムオープン CTO-10A_{VP}、蛍光検出器 RF-10A_{XL}、システムコントローラー CBM-10A、株式会社島津製作所製）を使用した。分析カラムはコアシェル型カラム：Kinetex C18（250 mm×4.6 mm i.d.、5 μm、Phenomenex 社製）および全多孔性型カラム：Inertsil ODS-3（250 mm×4.6 mm i.d.、5 μm、ジーエルサイエンス株式会社製）を用いた。移動相はアセトニトリル、水及びメタノール（1：6：3）混液、カラム温度は40℃とした。蛍光検出は励起波長 365 nm、蛍光波長 450 nmで行った。コアシェル型カラムと全多孔性型カラムの比較検討は、注入量 20 μL、流速 1.0 mL/minで行った。流速条件の検討は、注入量 20 μL、流速 1.0、1.2、1.4 mL/minの3条件で行った。注入量と定量下限値の検討は、流速 1.0 mL/min、注入量 5、10、20 μLの3条件で行った。

5. 妥当性評価

生落花生およびカシューナッツを対象試料とした。添加回収試験用検体は、試料に各アフラトキシンが2.5 μg/kgとなるよう標準液を添加し、30分放置して作製した。生落花生は多機能カラム、カシューナッツはイムノアフィニティーカラムを用いて精製を行い、前述した方法によりHPLC用試験溶液を調製した。HPLCの設定条件は注入量 20 μL、流速 1.0 mL/minとした。妥当性評価の枝分かれ実験は、実施者1名が、同一の添加試料を1日2回、5日間分析で行った。

6. カラム性能評価と統計処理

性能評価の指標には面積高さ法により求めた理論段数を用い、標準液（各アフラトキシン濃度

2.5 ng/mL）を5回測定した平均値を比較した。定量下限値は標準液（各アフラトキシン濃度 0.25 ng/mL）を5回測定し、その測定値の標準偏差の10倍とした。2群間の差の検定はt検定、多重比較検定にはTukeyのHSD検定を用いた。p<0.05を統計学的に有意であるとした。

結果および考察

1. コアシェル型カラムを用いた総アフラトキシン試験法の条件検討

1) コアシェル型カラムと全多孔性型カラムの比較検討

はじめに2種類のHPLCカラム（コアシェル型カラムおよび全多孔性型カラム）を用いて標準液（各アフラトキシン濃度 2.5 ng/mL）を測定しカラムの性能を比較した。2種類のカラムともに、各アフラトキシンのピークの分離は良好であった。コアシェル型カラムで最も遅く溶出されるアフラトキシン B₂の溶出時間は10.5分、全多孔性型カラムでは20.3分であった（図-1）。コアシェル型カラムを用いると分析時間が全多孔性型カラムの半分の時間に短縮された。コアシェル型カラムは分析時間を短縮するだけでなく、各アフラトキシンピークの理論段数も全多孔性型カラムのそれと比較して4つすべてが有意に高かった（表-1）。

コアシェル型カラムの充填剤は、均一な多孔性膜が球形無孔性シリカの核を内包する構造を有している。このため、多孔性膜上のみで物質移動が起こり、分析対象物が全多孔性型カラムに比べてより速く充填剤を通過し拡散を抑制する⁹⁾。さらに、粒度分布も狭いため、カラム内拡散の影響が小さくなる⁹⁾。コアシェル型カラムはこれらの構造的な特徴により高い理論段数を得ることを可能としている。本検討に用いたコアシェル型カラムと全多孔性型カラムは同一サイズであるが、前者の方が優れた理論段数を

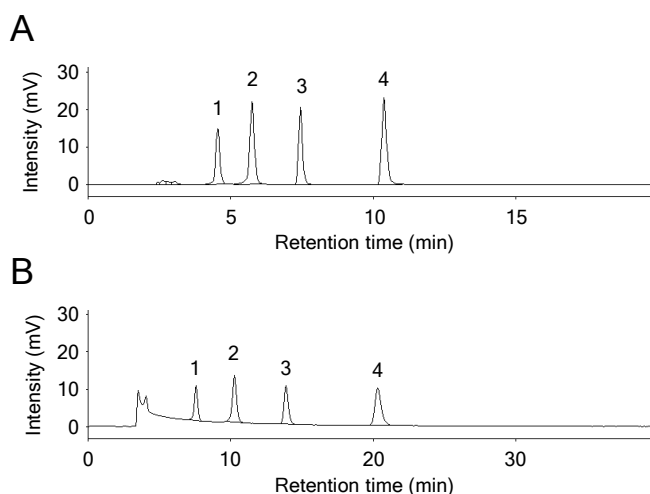


図-1 コアシェル型カラム（A）および全多孔性型カラム（B）を用いて分析したアフラトキシンのクロマトグラム

ピーク 1：アフラトキシン G₁、ピーク 2：アフラトキシン B₁、ピーク 3：アフラトキシン G₂、ピーク 4：アフラトキシン B₂

示した。また、コアシェル型カラムの導入により優れたピーク形状を得ることができるだけでなく、分析に要する時間が短くなることにより、溶媒消費量の削減によるコストダウン、廃液量の減少を図ることができた。

2) 流速条件の検討

次にさらなる高速分析が可能となるか検討するため流速条件を変えて標準液（各アフラトキシン濃度 2.5 ng/mL）を測定した。アフラトキシン B₂ の溶出時間は流速 1.0 mL/min のときに比べ、流速 1.4 mL/min では 2.5 分短縮された。流速を上げることによりアフラトキシンの溶出時間は短縮されたが、各ピークの理論段数が有意に低下する（表-2）とともに、装

置にかかる圧力が上昇した。このことからピーク形状および装置への負荷を考慮し、これ以降の分析には流速 1.0 mL/min を採用することにした。

3) 注入量と定量下限値の検討

HPLC への注入量を変え標準液（各アフラトキシン濃度 2.5 ng/mL）を測定したところ、注入量が少なくなるに従い理論段数が高くなる傾向が認められた（表-3）。一方、定量下限値は注入量 20 μ L のとき最も低くなった（表-4）。

注入量の減少に従い理論段数は上昇したが、測定値のバラツキが大きくなり定量下限値が高くなる傾向があった。このことから分析の精度を優先し、試料測定における注入量は 20 μ L とすることにした。

表-1 コアシェル型カラムと全多孔性型カラムを用いた測定における各アフラトキシンピークの理論段数

評価対象	理論段数			p
	コアシェル型カラム		全多孔性型カラム	
アフラトキシン B ₁	5679	± 92	5078 ± 37	< 0.001
アフラトキシン B ₂	16248	± 91	9343 ± 144	< 0.001
アフラトキシン G ₁	4767	± 34	4565 ± 29	< 0.001
アフラトキシン G ₂	13277	± 42	9138 ± 77	< 0.001
平均 ± SD (n = 5)				

表-2 コアシェル型カラムを用いた測定における流速別の各アフラトキシンピークの理論段数

評価対象	理論段数		
	1.0 mL/min	1.2 mL/min	1.4 mL/min
アフラトキシン B ₁	5679 ± 92 ^a	5440 ± 74 ^b	5119 ± 102 ^c
アフラトキシン B ₂	16248 ± 91 ^a	15332 ± 125 ^b	14138 ± 289 ^c
アフラトキシン G ₁	4767 ± 34 ^a	4514 ± 43 ^b	4125 ± 16 ^c
アフラトキシン G ₂	13277 ± 42 ^a	12312 ± 320 ^b	11499 ± 88 ^c
平均 ± SD (n = 5)			

数値横のアルファベットは、異なる文字間で多重比較検定において有意差があることを示す。

表-3 コアシェル型カラムを用いた測定における注入量別の各アフラトキシンピークの理論段数

評価対象	理論段数		
	5 μ L 注入	10 μ L 注入	20 μ L 注入
アフラトキシン B ₁	6465 ± 217 ^a	6148 ± 27 ^b	5679 ± 92 ^c
アフラトキシン B ₂	16647 ± 269 ^a	16297 ± 100 ^b	16248 ± 91 ^b
アフラトキシン G ₁	5335 ± 90 ^a	5125 ± 36 ^b	4767 ± 34 ^c
アフラトキシン G ₂	13211 ± 163 ^a	13191 ± 68 ^a	13277 ± 42 ^a
平均 ± SD (n = 5)			

数値横のアルファベットは、異なる文字間で多重比較検定において有意差があることを示す。

表-4 コアシェル型カラムを用いた測定における注入量別の定量下限値

評価対象	定量下限値 (μg/kg)		
	5 μL 注入	10 μL 注入	20 μL 注入
アフラトキシン B ₁	0.16	0.13	0.13
アフラトキシン B ₂	0.25	0.13	0.08
アフラトキシン G ₁	0.23	0.16	0.10
アフラトキシン G ₂	0.24	0.11	0.09

表-5 コアシェル型カラムを用いた試験法の妥当性評価結果
生落花生

評価対象	選択性	真度	併行精度	室内精度
アフラトキシン B ₁	○	95%	3.1%	3.7%
アフラトキシン B ₂	○	97%	2.8%	3.4%
アフラトキシン G ₁	○	100%	2.4%	3.7%
アフラトキシン G ₂	○	100%	2.7%	3.0%
目標値		70~110%	20%≧	30%≧

カシューナッツ

評価対象	選択性	真度	併行精度	室内精度
アフラトキシン B ₁	○	88%	2.4%	3.7%
アフラトキシン B ₂	○	91%	2.1%	3.8%
アフラトキシン G ₁	○	94%	1.6%	4.1%
アフラトキシン G ₂	○	96%	1.6%	3.2%
目標値		70~110%	20%≧	30%≧

2. コアシェル型カラムを用いた総アフラトキシン試験法の妥当性評価

本検討により測定条件を決定した試験法の妥当性を生落花生およびカシューナッツを対象として評価したところ、2種類の試料のすべてのアフラトキシンが妥当性評価の方法⁶⁾に示された選択性、真度、併行精度および室内精度の目標値を満たすことが確認された(表-5)。このことから、コアシェル型カラムを総アフラトキシン試験に適用可能であることが確認された。

本検討では生落花生およびカシューナッツを対象としてコアシェル型カラムを用いた試験法の妥当性を確認した。コアシェル型カラムは各アフラトキシンを良好に分離することができることから、固相カラムによる精製が十分に行われていれば生落花生およびカシューナッツ以外の食品にも本試験法を適用することが可能であると考えられる。

まとめ

コアシェル型カラムを用いた新たな総アフラトキシン試験法の確立を目的とし、当所で従来法として使用している全多孔性型カラムとの比較、測定条件

の検討、生落花生およびカシューナッツを対象とした試験法の妥当性評価を実施した。その結果、既存の装置にコアシェル型カラムを接続することで優れたピーク形状を得ることや分析時間を短縮することができ、妥当性評価の結果も良好となった。以上より、コアシェル型カラムを総アフラトキシン試験に適用可能であることが確認された。

引用文献

- 1) Ozturk M: p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure, Lancet, 338, 1356-1359 (1991)
- 2) Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M: Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa, Nature, 350, 429-431 (1991)
- 3) アフラトキシンを含有する食品の取扱いについて、食安発 0331 第 5 号, 平成 23 年 3 月 31 日
- 4) カビ毒(アフラトキシン)を含有する食品の取扱いについて、環食第 128 号, 昭和 46 年 3 月 16 日
- 5) カビ毒(アフラトキシン)を含有する食品の取扱いについて、食監発第 0326001 号, 平成 14 年 3 月 26 日

- 6) 総アフラトキシンの試験法について, 食安発
0816 第1号, 平成23年8月16日
- 7) Wang J, Chow W, Cheung W: Application of a tandem
mass spectrometer and core-shell particle column for
the determination of 151 pesticides in grains, Journal
of agricultural and food chemistry, 59, 8589-8608
(2011)
- 8) Song Y, Funatsu T, Tsunoda M: Amino acid analysis
using core-shell particle column, Journal of
chromatography, 927, 214-217 (2013)
- 9) Nishi H, Nagamatsu K: New trend in the LC
separation analysis of pharmaceuticals--high
performance separation by ultra high-performance
liquid chromatography (UHPLC) with core-shell
particle C18 columns, Anal Sci, 30, 205-211 (2014)