

種実類および乾燥果実類の総アフラトキシン試験法の検討

中西希代子・宮本文夫・橋本博之・眞壁祐樹・長谷川康行

Determination of Total Aflatoxins in Nuts and Seeds, and Dried Fruits

Kiyoko NAKANISHI, Fumio MIYAMOTO, Hiroyuki HASHIMOTO, Yuhki MAKABE,
and Yasuyuki HASEGAWA

要旨

落花生、木の実および乾燥果実類に含まれている総アフラトキシン(B₁,B₂,G₁,G₂)検査において、現在使用している多機能カラム(MFC)精製法はスクリーニング検査に有用であった。妨害および夾雑ピークが存在するアーモンド、乾燥ブルーベリーおよび乾燥イチジクについては、イムノアフィニティークラム(IAC)精製法の使用が妨害および夾雑ピークの除去に有効であることが分かり、MFC精製法で判定が困難な場合は、IAC精製法を実施することが望ましいと考えられた。また、添加回収率はいずれのカラム精製法も70~120%を満たし良好であった。

キーワード：アフラトキシン；種実類；多機能カラム；イムノアフィニティークラム；HPLC；蛍光検出器
Keywords : aflatoxin ; Nuts and Seeds ; multifunctional column ; immuno affinity column ; HPLC ; fluorescence detection

はじめに

アフラトキシンは *Aspergillus flavus*、*A. parasiticus*、*A. nomius* 等が産生するカビ毒である。*A. flavus* はアフラトキシン B₁ および B₂ を、*A. parasiticus*、*A. nomius* はアフラトキシン B₁、B₂、G₁ および G₂ を産生することが知られている^{1) 2)}。このうちアフラトキシン B₁ は、現存する天然物中で最も発がん性が高い化合物としても知られている³⁾。

昭和46年以来、我が国においてアフラトキシンは B₁ のみが規制されており⁴⁾、食品全般について不検出基準(10 ppb 未満)となっている。これに対して、CODEX 委員会や EU 等では、落花生および木の実等に対し、総アフラトキシンを指標とした規制を行っている。現在、我が国においても総アフラトキシンを指標とした規制に向けての整備が進められているところであり⁵⁾、今後4種のアフラトキシンの検査が必要となると考えられる。

我が国におけるアフラトキシン B₁ 分析法は、昭和46年3月に通知された試験法⁴⁾が廃止され、平成14年3月からクロロホルム等の有害試薬を使用しない現在の試験法⁶⁾が導入された。当研究所ではこの試験法のうち、石井ら⁷⁾の報告に基づき多機能カラム(MFC)精製法を使用している。また、MFC精製法を用いた前処理では適用が困難であった香辛料類等に対応するために、イムノアフィニティークラム(IAC)精製法が新たに通知された⁸⁾ことから精製カラムの選択肢もさらに広がっている。

今回、これからの総アフラトキシン検査の導入に対応するために、落花生、木の実および輸入乾燥果実類について MFC と IAC による精製法の比較検討を行ったので、それらの結果を報告する。

材料と方法

1. 試料

市販の県産落花生、輸入加工品のアーモンド、ピスタチオ、乾燥ブルーベリーおよび乾燥イチジク(予めアフラトキシン B₁、B₂、G₁ および G₂ 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

1) 標準溶液

和光純薬工業(株)製 Aflatoxins Mixture Solution 1 (B₁,G₁:各2 µg/mL, B₂,G₂:各0.5 µg/mL)をアセトニトリルで適宜希釈し、添加回収試験および検量線に用いた。

2) 生理的リン酸緩衝液(PBS):

塩化カリウム 0.20 g、リン酸二水素カリウム 0.20 g、無水リン酸水素二ナトリウム 1.16 g、塩化ナトリウム 8.00 g を 900 ml の水に溶解後、0.1 mol/L 塩酸で pH7.4 にあわせ、1L に定容した。

3) トリフルオロ酢酸:

和光純薬工業(株)製、HPLC 用

4) 多機能カラム(MFC):

昭和電工(株)製、Autoprep MF-A 1000

5) イムノアフィニティークラム(IAC):

堀場製作所製、AFLAKING

6) メンブランフィルター:

東洋濾紙(株)製 DISMIC-13HP (PTFE, 0.45 µm)

7) その他の試薬:

アセトニトリルおよびメタノールは和光純薬工業(株)製の特級および LC/MS 用を用い、水はミリポア社製 Milli-Q PLUS により精製して用いた。また、その他の試薬は和光純薬工業(株)製または関東化学(株)製の試薬特級品を用いた。

3. 装置

1) HPLC 装置：(株)島津製作所製

ポンプ：LC-10AT_{VP}；デガッサー：DGU-14A；システムコントローラー：CBM-10A；カラムオーブン：CTO-10A_{VP}；オートインジェクター：SIL-10AD_{VP}；蛍光検出器：RF-10A_{XL}

2) フードプロセッサー：(株)クイジナートサンエイ製 Cuisinart COMMERCIAL FP-75 PRO PREP

3) 遠心機：KUBOTA 5922

4) ホモジナイザー：(株)日本精機製作所製 エクセルオートホモジナイザー：ED-3

4. 測定条件

1) カラム：ジューエルサイエンス(株)製 Inertsil ODS-3 (4.6 mm i.d.×250 mm, 5 μ m)

2) 移動相：アセトニトリル・メタノール・水 (1:3:6)

3) 流速：1.0 mL/min

4) カラム温度：40 $^{\circ}$ C

5) 注入量：20 μ L

6) 蛍光検出波長：励起波長 (Ex.) 365 nm、蛍光波長 (Em.) 450 nm

5. 試料の調製

1) 粉碎均一化：フードプロセッサー処理し、目開き 2 mm のふるいを通したものを均一化試料とした。

2) 抽出：均一化試料 20.0 g にアセトニトリル・水 (9:1) を 40 mL を加え、5 分間ホモジナイズ抽出を行った。これを 3,000 rpm で 5 分間遠心分離し、得られた上澄液を抽出液とした。

3) カラムによる精製

(1) MFC 精製法：抽出液 5.0 mL を MFC に負荷し、溶出した液のうち、初流 1.0 mL を窒素気流にて溶媒除去し、乾固した。

(2) IAC 精製法：IAC は予め室温に戻して PBS 3 mL でコンディショニングを行った。抽出液 10.0 mL を精製水にて 50 mL に定容し、室温、10,000 \times g にて 10 分間高速遠心分離した。その 10.0 mL をコンディショニングした IAC に負荷し、これに精製水 3 mL を 2 回流して洗浄後、通気して水分を除去した。次に IAC にアセトニトリル 1 mL を注入し自然流下で溶出させた後、5 分間放置した。さらにアセトニトリル 1 mL で 2 回に分けて溶出したのち、通気によりカラム中に残存しているアセトニトリルを回収した。あわせた溶出液を窒素気流にて溶媒除去し、乾固した。

4) 誘導体化および HPLC 用試験溶液の調製：乾固後の残渣にトリフルオロ酢酸 0.1 mL を加え、密栓して激しく攪拌し、室温、暗所で 15 分間放置したのち、アセトニトリル・水 (1:9) 0.9 mL を加えた。この溶液を 0.45 μ m メンブランフィルターでろ過後、HPLC 用試験溶液とした。

結果および考察

1. HPLC 条件の検討

オクタデシルシリル化シリカゲルを充てん剤とした Inertsil ODS-2、Inertsil ODS-3 (いずれもジューエルサイエンス(株)製)、Wakosil-II 5C18 HG (和光純薬工業(株)製) および Mightysil RP-18 GP (関東化学(株)製) について検討した。このうち通知法に記載されている Inertsil ODS-3 の食品由来の妨害ピークとの分離が最も良好であったことから、Inertsil ODS-3 を使用した。

2. 精製法の検討

1) IAC 精製時の希釈液の検討

通知法に記載されているイムノアフィニティーカラム法では抽出液を PBS で希釈し、ガラス繊維ろ紙でろ過後、ろ液をイムノアフィニティーカラムに注入したのち、カラムを PBS および精製水で洗浄して水分を除去し、アセトニトリルで溶出させることとなっている。今回 PBS で希釈したところ、試料によっては沈殿が生じて濁りも強かったことから、香辛料類の精製法に用いられている 2% Tween20 含有 PBS で検体を希釈したが、回収率の低下がみられ、ばらつきも大きかった。そこで希釈は精製水で行い、カラムの洗浄も PBS は使用せず精製水で行ったところ、濁りはわずかに生じたのみであり、回収率、ばらつきともに良好な結果を示した。今回、2% Tween20 含有 PBS で検体を希釈した場合の回収率低下の原因については、今後の検討課題としたい。

2) 精製カラムの検討

従来法である MFC 精製法を用いて各試料を精製したところ、落花生の無添加試料のクロマトグラムにはピークはほとんど検出されず良好であった (Fig.1A)。アーモンド、ピスタチオでは妨害ピークは存在しなかったが、アーモンドの B₁ の直前に夾雑ピークがみられた。添加試料における B₁、B₂、G₁、G₂ の各クロマトグラムのピークとの分離は落花生 (Fig.1B)、アーモンド、ピスタチオのいずれも良好であった。乾燥ブルーベリーおよび乾燥イチジクについてはいずれも G₁ のピーク付近に妨害ピークが存在し、特に乾燥ブルーベリーは非常に近接した妨害ピークが存在したため G₁ の定量が困難であった (Fig.1C,D)。

また、IAC 精製法による精製を試みたところ、いずれの試料においても妨害および夾雑ピークは存在せず、添加試料での B₁、B₂、G₁、G₂ の各ピークとの分離も良好であった (Fig.2)。

添加回収試験の結果を Table 1 に示した。MFC 精製法はピスタチオでは 91.0~95.2% と低い傾向を示し、乾燥ブルーベリーは G₁ のみが 76.5% と低値を示したが、全体では 76.5~111.7% であり、概ね良好な回収率であった。

また、IAC 精製法は、MFC 精製法に比べてすべての試料で良好な回収率を示し、95.0~111.5% であった。

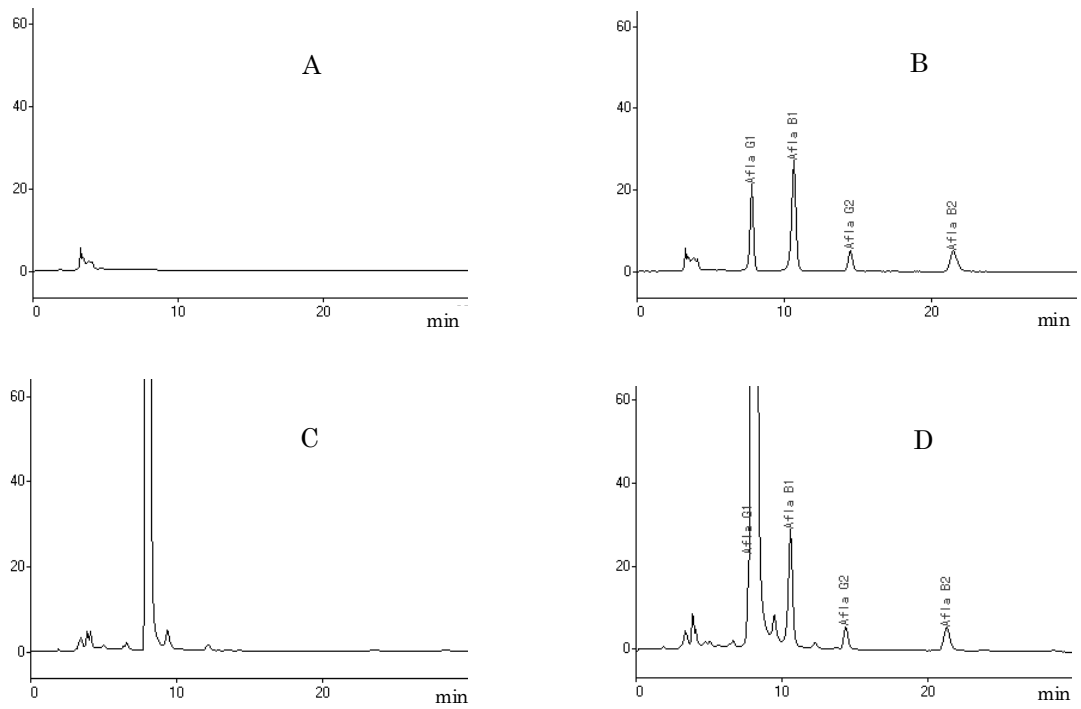


Fig.1. HPLC chromatograms of sample solution purified by MFC from peanut and dried prune unspiked peanut(A) and dried prune(C); spiked peanut(B) and dried prune(D) with aflatoxins B₁,G₁ at 10ng/g, and B₂,G₂ at 2.5ng/g

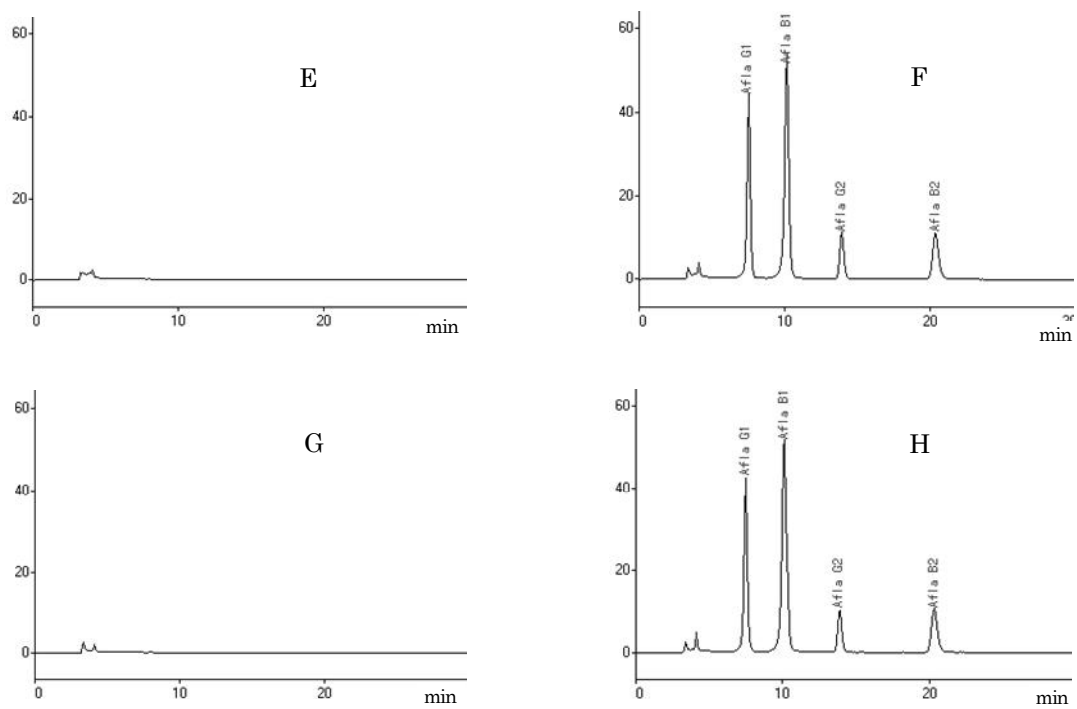


Fig.2. HPLC chromatograms of sample solution purified by IAC from peanut and dried prune unspiked peanut(E) and dried prune(G); spiked peanut(F) and dried prune(H) with aflatoxins B₁,G₁ at 10ng/g, and B₂,G₂ at 2.5 ng/g

Table 1. Recoveris of Aflatoxins from Peanuts, Nuts and Dried Fruits by MFC and IAC Method

| Sample | Cartridge column | Recovery (%) | | | |
|---------------|---------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | B ₁ | B ₂ | G ₁ | G ₂ |
| Peanut | MFC | 103.7 | 104.1 | 104.4 | 103.5 |
| | IAC | 101.8 | 108.4 | 108.1 | 110.8 |
| Almond | MFC | 105.5 | 107.5 | 111.7 | 109.2 |
| | IAC | 95.0 | 110.8 | 99.6 | 111.5 |
| Pistachio nut | MFC | 94.9 | 94.0 | 91.0 | 95.2 |
| | IAC | 103.6 | 109.1 | 106.9 | 110.4 |
| Dried Prune | MFC | 104.6 | 111.6 | 76.5 | 111.3 |
| | IAC | 102.2 | 105.2 | 107.5 | 105.7 |
| Dried Fig | MFC | 102.4 | 101.9 | 103.1 | 108.2 |
| | IAC | 104.3 | 107.7 | 108.9 | 108.0 |

Samples were spiked with aflatoxins B₁, G₁ at 10 ng/g, and B₂, G₂ at 2.5 ng/g.
Each value is the mean of two or three determinations.

3. 精製法の操作性および購入費用の比較

MFC精製法はカラムのコンディショニングの必要がなく、抽出液をカラムに注入したのち流出液を採取することから洗浄および溶出等も不要であり操作は簡便であった。これに対して、IAC精製法はカラムのコンディショニング、洗浄および溶出等が必要となるため精製時の操作が煩雑で検査に要する時間も長かった。また、IACゲル中の気泡の存在、IACへの抽出希釈液の負荷速度等がアフラトキシンの回収率に影響を与えることからカラムの取り扱いに際しては注意を要した。

精製カラムの購入費用については、MFCに比べてIACが高価であった。

まとめ

現在、我が国において検討されている総アフラトキシシン規制に向けて、従来アフラトキシシン B₁ 検査に使用している MFC 精製法と平成 20 年 7 月に新たに通知された IAC 精製法⁸⁾の比較検討を行なった。

MFC 精製法ではアーモンド、乾燥プルーン、乾燥イチジクは妨害および夾雑ピークが B₁ および G₁ のピーク付近に存在したが、IAC 精製法ではいずれの試料においても両ピークは存在せず、精製効果は高いと考えられた。また、添加回収率はいずれの精製法も 70~120%を満たし、良好であったが、操作性およびコスト面を考慮すると、スクリーニングとして MFC 精製法での測定を実施し、判定が困難な場合に精製効果の高い IAC 精製法での測定を実施することが望ましいと考えられる。

文献

- 1) Koji Yokoyama, Haruo Takahasi, Li Wang and Masakatsu Ichinoe : Characterization and typing of aflatoxin-producing fungi in sugarcane fields of the southernmost Japan by cytochrome *b* gene analysis New Horizon of Mycotoxicology for Assuring Food Safety(Proceedings of ISMYCO Kagawa ' 03),

123-131(2003)

- 2) 見城智子, 石手有佳, 青山幸二, 一戸正勝: 市販アーモンド粉末におけるカビ分布とアフラトキシシン汚染原因菌の解析,食品衛生学雑誌,48,90-96 (2007)
- 3) 食品安全の事典,東京,社団法人日本食品衛生学会, p 244-246. 2009, (ISBN978-4-254-43096-7)
- 4) 厚生省環境衛生局食品衛生課長通知“カビ毒(アフラトキシシン)を含有する食品の取り扱いについて”昭和 46 年 3 月 16 日,環食第 128 号 (1971)
- 5) 厚生労働省薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会“薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食品規格部会報告について”平成 22 年 6 月 1 日 (2010)
- 6) 厚生省生活衛生局食品保健課長通知“カビ毒(アフラトキシシン)を含有する食品の取り扱いについて”平成 14 年 3 月 26 日,食監発第 0326001 号 (2002)
- 7) 石井俊靖, 矢崎廣久: 新たな公定法であるアフラトキシシン B₁ 試験法の検討,千葉衛研報告,26,10-14 (2002)
- 8) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知“カビ毒(アフラトキシシン)を含有する食品の取り扱いについて”平成 20 年 7 月 28 日,食安監発第 0728003 号 (2008)