

HPLC-FLD検出を用いたイムノアフィニティ固相抽出による粉末ヘーゼルナッツ中の非誘導体化アフラトキシンB2、B1、G2、G1の測定

著者

Sylvia Grosse, Mauro De Pra,
Frank Steiner
Thermo Fisher Scientific,
Germering, Germany

キーワード

アフラトキシン、イムノアフィニティ固相抽出、FLD、Vanquish蛍光検出器F

目的

粉末ヘーゼルナッツ中の4種類のアフラトキシンをイムノアフィニティ固相抽出精製および蛍光検出によるHPLCで測定する

アプリケーションの利点

- 誘導体化を伴わない蛍光検出によりヘーゼルナッツ中の4種類のアフラトキシンを測定する迅速なクロマトグラフィー法
- イムノアフィニティ固相抽出カートリッジでアフラトキシンを選択的に精製・濃縮することによる検出限界および定量限界の向上

はじめに

マイコトキシンは、アスペルギルス・フラバス (*Aspergillus flavus*) で最初に発見された天然のカビ毒です。ほとんどは非常に安定で、加工や調理中に破壊されません。一般的な一群の総称がアフラトキシンで、そのうち天然に存在する20種類のものが知られています。アフラトキシンB1はヒトの健康に対してもっとも毒性が高いと考えられています。これに加えて、アフラトキシンB2、G2、G1、および乳由来の誘導体M1およびM2も非常に重要です。アフラトキシンBとGは、ナッツ類や穀類、スパイスなどのさまざまな食物で確認されますが、M誘導体は乳製品中で確認されます。本アプリケーションでは、粉末ヘーゼルナッツ中のアフラトキシンB2、B1、G2、G1の測定に重点を置きます。欧州委員会では、数種の食物についてその消費や使用を考慮して、それらに含まれるアフラトキシンの各種最高濃度を設定しています。¹

アフラトキシンB1の基準値 (EU) は、直接消費用または加工用で異なりますが、その範囲は2~12 µg/kgです。例外はベビーフード製品で、許容最高濃度は0.10 µg/kgです。4種類のアフラトキシン総量のEUは4~15 µg/kgの間で変動します。このため、各種食品中で低レベルであるかをモニターするため、高感度で正確な分析法が必要です。

確実な同定と定量のためには、蛍光検出 (FLD) を組み合わせた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) がもっとも一般的な手法の一つです。アフラトキシンB1とG1が発する蛍光の強度はG2およびB2より小さいため、微量の定量を行うには、誘導体化試薬または質量分析が必要な場合があります。

選択性、つまり定量限界 (LOQ) を向上させるもう一つの一般的なアプローチは、HPLC分析前にアフラトキシンを選択的に精製・濃縮するアフィニティ固相抽出 (SPE) ²を使用することです。このサンプル精製法では、非常に複雑で脂肪の多いマトリックス中でも低いLOQ値が得られます。

本アプリケーションノートでは、AflaCLEAN™ SelectイムノアフィニティSPEで精製後、HPLC-FLD分析を行って、粉末ヘーゼルナッツ中の4種類のアフラトキシンを測定・定量する方法をご紹介します。Thermo Scientific™ Vanquish™ Flex蛍光検出器 (FLD) を使用すると、粉末ヘーゼルナッツ中のアフラトキシンを、欧州委員会が規定する基準値をはるかに下回るレベルで検出できます。

実験

化学物質

- 超純水、比抵抗18.2 MΩ·cm以上
- Fisher Chemical™ Optima™ メタノール、LC/MSグレード (P/N 10767665)
- Fisher Chemical Optima アセトニトリル、LC/MSグレード (P/N 10001334)
- Fisher Scientific™ ヘキサン、HPLCグレード (P/N 10703611)
- Fisher Scientific PBS/バッファー (リン酸緩衝生理食塩水)、pH 7.2 (P/N 11530546)

- Fisher Scientific 酢酸、LC/MSグレード (P/N 10860701)
- Fisher Scientific 塩化ナトリウム、purris (p. a.) (P/N 15626770)
- アフラトキシン混合物 (信頼できる供給業者から購入)

器具

- マグネットスターラー
- ひだろ紙、グレード597½、Ø 185 mm、Fisher Scientific (P/N 10433141)
- シリンジフィルター、再生セルロース (RC)、Ø 15 mm、0.2 µm、Fisher Scientific (P/N 10712712)
- AflaCLEAN SelectイムノアフィニティSPEカラム、3 mL (信頼できる供給業者から購入)
- コニカルチューブ (15 mL)、Fisher Scientific (P/N 11307211)
- バイアル (褐色、2 mL)、Fisher Scientific (P/N 15508760)
- セプタム (シリコン/PTFE)、Fisher Scientific (P/N 11548180)

標準品の調製

標準添加法により定量を実施しました。校正用標準品調製のためのストック溶液は、メタノール中にG2とB2は857 µg/kg、G1とB1は2856 µg/kgを含んだものを (ストック溶液1)、1%酢酸溶液で100倍希釈しました (ストック溶液2)。ストック溶液2の添加溶液を作製し、アフィニティSPE後の精製済みサンプル抽出液に規定濃度で添加しました (次のセクションを参照)。表1に、校正レベルと対応する濃度の概要を示します。

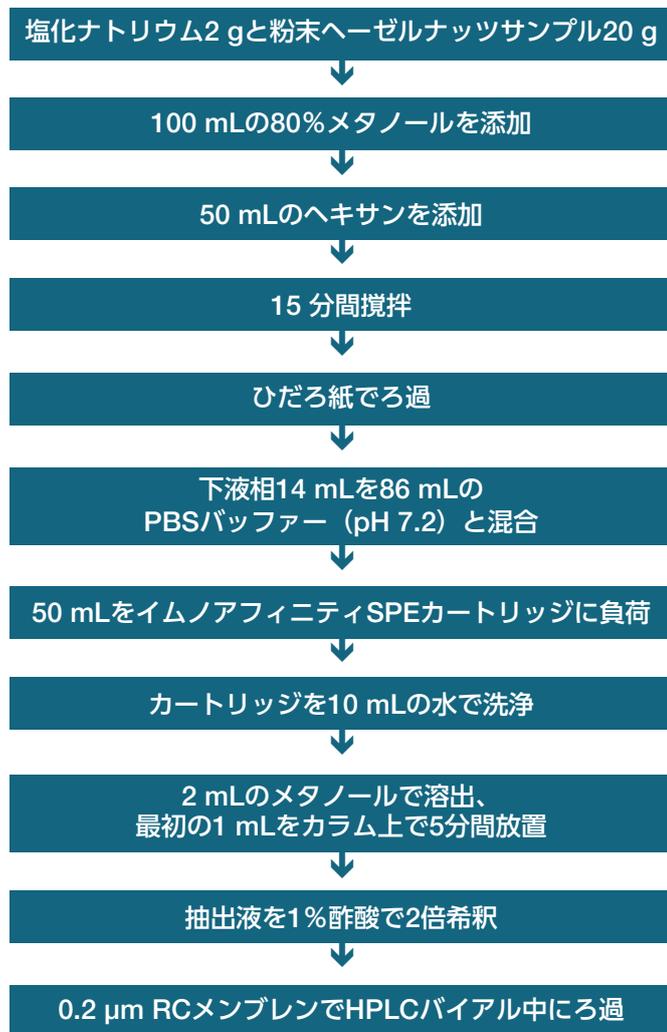
表1: 校正レベルと精製済みサンプル抽出液に添加した濃度 (µg/kg)

校正レベル	トキシシンG2、B2の濃度 (µg/kg)	トキシシンG1、B1の濃度 (µg/kg)
1	0.2	0.7
2	0.4	1.4
3	0.9	2.9
4	1.3	4.3
5	1.7	5.7
6	2.1	7.1

サンプル調製前の粉末ヘーゼルナッツサンプル20 gに113 µLのアフラトキシンストック溶液1を添加して、回収試験を実施しました。その結果、回収サンプルの濃度は、回収率100%と仮定して、G2とB2は1.7 µg/kg、G1とB1は5.65 µg/kgでした。

サンプル調製

添加サンプルと未添加サンプルを3検体ずつ調製しました。



装置

以下で構成されるThermo Scientific Vanquish Flex UHPLCシステムを使用しました。

- システムベースVanquish Flex (P/N VF-S01-A-01)
- フォータナリポンプF (P/N VF-P20-A-01)
- スプリットサンプラーFT (P/N VF-A10-A-01)
- カラムコンパートメント (P/N VH-C10-A-01)
- 蛍光検出器F (P/N VF-D51-A-01)
 - 標準Bio Flowセル、8 µL、20 bar (P/N 6079.4230)

LC条件

カラム:	Thermo Scientific Acclaim™ C18、 100 × 3 mm、3 µm (P/N 076186)
移動相:	A: 水 B: メタノール C: アセトニトリル
流量:	0.5 mL/min
イソクラティック 移動相条件:	50% A、30% B、20% C
イソクラティック 分析時間:	4 min
ミキサーボリューム:	350 + 50 µL
カラム温度:	30°C (強制空気循環モード、 ファンスピード5)
アクティブプレ ヒーター温度:	30°C
オートサンプラー 温度:	4°C
FLD励起波長:	365 nm
FLD蛍光波長:	450 nm
感度:	8
ランプモード:	HighPower
UVデータ サンプリングレート:	10 Hz
UVレスポンスタイム:	0.5秒
注入量:	20 µL
ニードル洗浄溶液:	メタノール/水 (90:10、v/v)

データ処理とソフトウェア

データ取得と解析は、Thermo Scientific Chromeleon™ 7.2.7クロマトグラフィードータシステム (CDS) ソフトウェアで実施しました。

結果と考察

図1に、励起波長365 nm、蛍光波長450 nmでのAcclaim 120 C18カラムによる標準アフラトキシン溶液のクロマトグラムを示します。ここでは、イムノアフィニティSPE精製は使用していません。この図からわかるとおり、最初のターゲットアフラトキシンG2の前にいくつかのピークが検出されています。これらの未知のピークは、ブランクでは認められない(データなし)ため、標準溶液中の不純物です。分析対象のすべてのアフラトキシンは4分以内にベースライン分離されています。

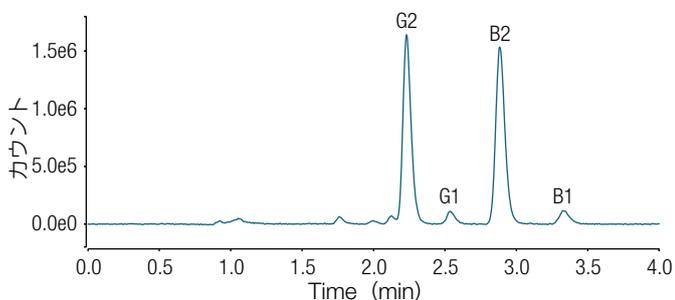


図1: 4種類のアフラトキシンG2、G1、B2、B1の標準溶液のFLDクロマトグラム。G2とB2の濃度は0.9 µg/kg、G1とB1は2.9 µg/kg

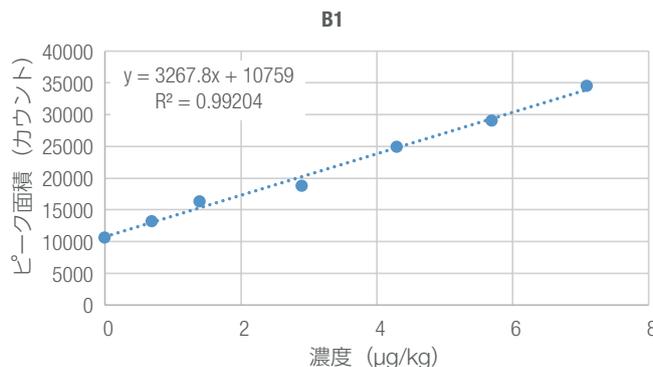
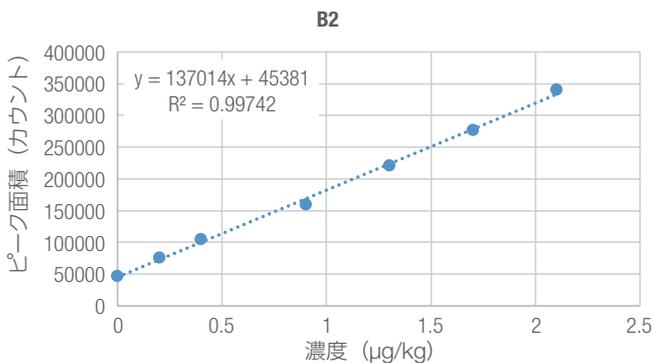
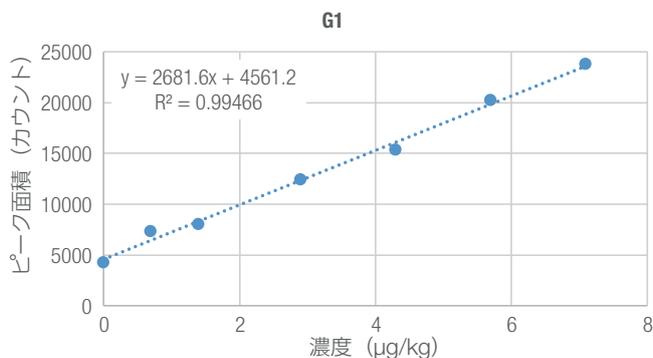
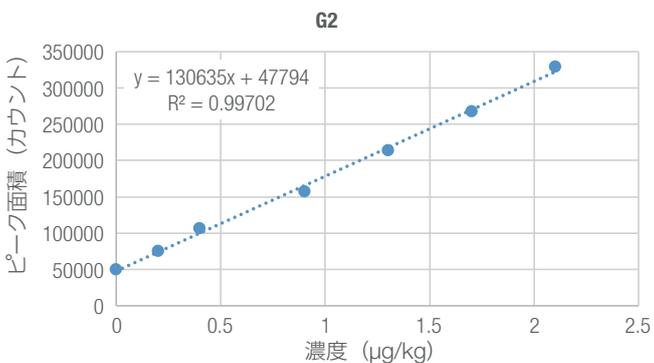


図2: 4種類の分析対象アフラトキシンの検量線

定量のため、粉末ヘーゼルナッツサンプルと回収サンプルを3検体ずつ調製しました。図2に、4種類のアフラトキシンの標準添加法による検量線を示します。全分析対象を含む元のサンプルを0に設定した結果、x軸切片が負となりました。このように、分析対象の定量値は、負のx切片の絶対量に対応します。

直線性 (R^2) は、4種類のアフラトキシンについて0.9920~0.9974であることがわかり、保持時間の相対標準偏差 (% RSD RT) はいずれも0.2%未満でした (表2)。

検出限界 (LOD) についてS/N比約3、定量限界 (LOQ) についてS/N比10に希釈したサンプル抽出液を3回注入して、各分析対象についてLODとLOQを計算しました。希釈サンプル抽出液中のアフラトキシンB2のLODとLOQを決定したクロマトグラムの一例を図3に示します。較正、直線性、LOD、LOQの結果をすべてまとめたものを表2に示します。

表2: % RSD RT (n=13)、検量線範囲、直線性、LOD、LOQのデータと標準偏差 (S.D.) (n=3)

化合物名	% RSD RT	検量線範囲 (µg/kg)	R ²	LOD (µg/kg) ± S.D.	LOQ (µg/kg) ± S.D.
G2	0.09	0.2~2.1	0.9970	0.075 ± 0.008	0.185 ± 0.017
G1	0.17	0.7~7.1	0.9947	0.931 ± 0.076	1.329 ± 0.066
B2	0.09	0.2~2.1	0.9974	0.104 ± 0.013	0.206 ± 0.017
B1	0.15	0.7~7.1	0.9920	1.056 ± 0.154	1.122 ± 0.061

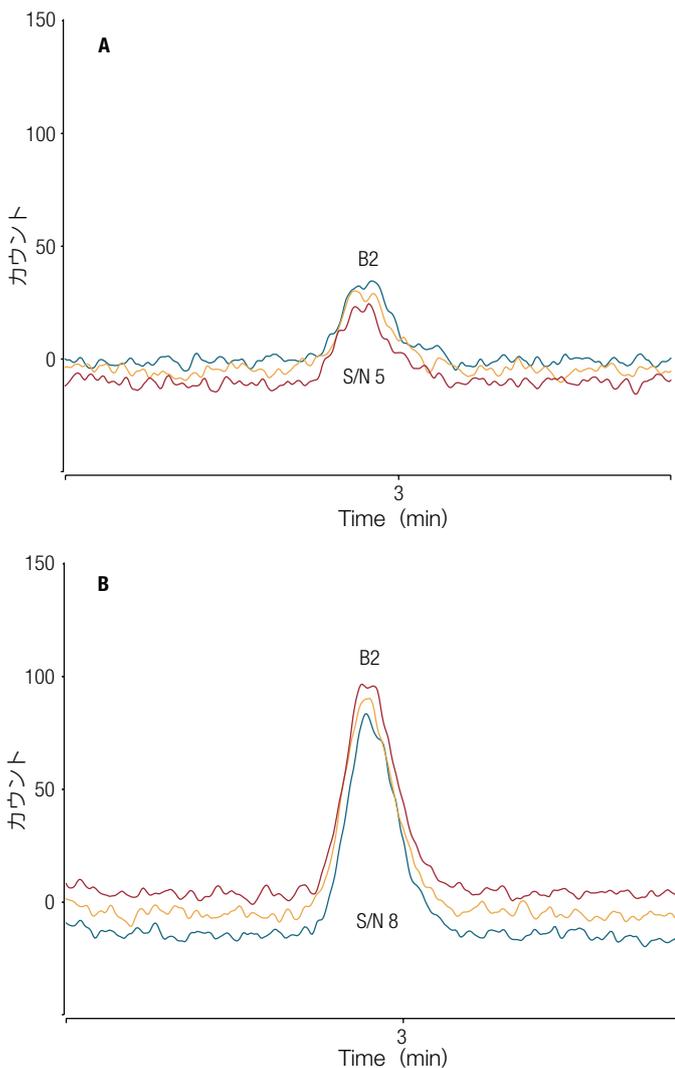


図3: A) アフラトキシンB2のLOD (S/N比約3) のクロマトグラム (3回注入)、B) アフラトキシンB2のLOQ (S/N比約10) のクロマトグラム (3回注入)

図4からわかるとおり、イムノアフィニティSPE精製の結果、純粋な抽出液が得られます。クロマトグラムの最初の2分間にいくつかのマトリックスピークが見られるものの、2~4分のターゲット分析対象領域に妨害はありません。無添加サンプル抽出液にも、サンプル調製前に標準溶液を添加した添加 (回収) 抽出液にも、図1の標準溶液で見られたようなトキシシンG2の前のピークはありません。ブランク注入および1個の検量点を示した図5では、精製手順後に抽出液に標準品を添加した際に不純物を検出できます。このことは、イムノアフィニティ精製により、標準溶液由来の不純物を排除できる可能性を示唆しています。

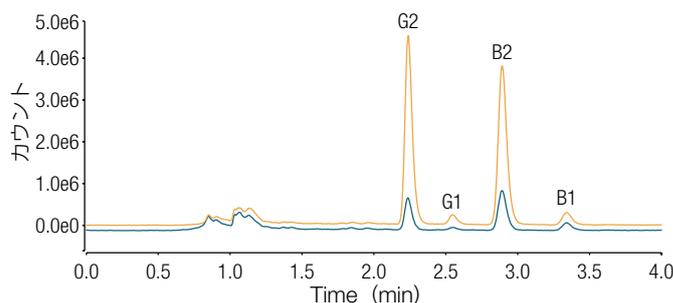


図4: 添加 (回収) サンプル (オレンジ) と未添加 (青) ヘーゼルナッツサンプルのクロマトグラムの重ね書き

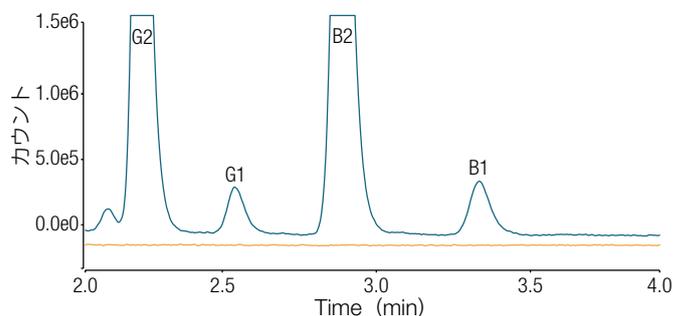


図5: 検量点の最高濃度を添加した処理済みサンプル (青) と直後のブランク注入 (オレンジ) のクロマトグラムの重ね書き (拡大)

また、G2とB2は2.1 µg/kg、G1とB1は7.1 µg/kgの検量点の最高濃度を添加した処理済みサンプルの注入後でも、ブランク注入時のキャリアオーバーは認められなかったことが、図5からわかります。

各化合物の回収率とサンプル量計算値（回収率で補正）を用いた定量結果を表3に示します。

表3：粉末ヘーゼルナッツの回収率およびサンプル量の計算結果（3検体の平均）

化合物名	回収率 (%)	サンプル量計算値 (µg/kg)
G2	100	0.4
G1	72	2.2
B2	100	0.3
B1	95	3.4

回収率は、G2、B2、B1では優れていますが、G1では低い結果となりました。イムノアフィニティSPEカートリッジの供給元は、G1について最低回収率を90%とデータシートで報告しています。しかし、カートリッジの安定性には限界があり、使用期限は適正な保管条件下でわずか数カ月と報告されています。本研究で用いたカートリッジは有効期限が近づいていたため、G1の回収率が低くなった可能性があります。

直接消費および食材としての使用もされる粉末ヘーゼルナッツ中のアフラトキシンの許容レベルは、欧州委員会規制により、B1は5 µg/kg、B1、B2、G1、G2の総量は10 µg/kgと規定されています。サンプル中に全4種類のアフラトキシンの検出されました。B1の測定量は、最大限界を下回る3.4 µg/kgでした。4種類の規定された総量に対し、定量値は6.3 µg/kgでした。

結論

- 誘導体化なしで、イムノアフィニティSPE精製による濃縮とFLD検出を組み合わせると、粉末ヘーゼルナッツ中のアフラトキシンのG2、G1、B2、B1を高感度に分析することができます。
- Vanquish蛍光検出器Fは、アフラトキシンのB1、G1では1 µg/mL、B2、G2では0.1 µg/mLまでの十分な微量レベルの検出性能を実現し、欧州委員会規定した許容レベルをはるかに下回る粉末ヘーゼルナッツ中のアフラトキシンの分析を可能にします。
- 今回使用した方法では、信頼性の高い定量結果を迅速に得るための良好な選択性、直線性、回収率が得られました。
- 分析時間が4分以内のため、大量のサンプルを処理することができます。

参考文献

- COMMISSION REGULATION (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006: setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, ANNEX section 2: mycotoxins (M5).
- Karsten, M.; Swart, R.; Mcleod, F.; Murphy, B.; Henderson, S.; Richter, B. Fast end Effective Determination of Aflatoxins in Grains for Food Using Accelerated Solvent Extraction followed by HPLC (HPLC 2008 presentation), Chromatography-Foods-Beverages-Contaminants-Applications-Notebook-71476, page 32–33.

© 2018 Thermo Fisher Scientific Inc. 無断複写・転写を禁じます。 HPLC098_A18060B
ここに記載されている会社名、製品名は各社の商標または登録商標です。
ここに記載されている内容は予告なく変更することがあります。
ここに記載されている製品は研究用機器であり、医療機器ではありません。

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

分析機器に関するお問い合わせはこちら

TEL: 0120-753-670 FAX: 0120-753-671
Analyze.jp@thermofisher.com

facebook.com/ThermoFisherJapan

@ThermoFisherJP

thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC