セップパックカートリッジによるアフラトキシン抽出液の クリーンアップについて

南澤 正敏・杉本 貞三・木野 信秋

M. MINAMISAWA, T. SUGIMOTO, N. KINO: The cleanup method of
aflatoxin extracts by using Sep-pac silica cartridge.

アフラトキシン (以下 Af) の分析操作は、供試料からの Af の抽出、抽出液のクリーンアップ、そして機器による計測の3つに大別される。クリーンアップにおいて通常行なわれる CB 法カラムクロマトグラフィーは、溶剤、吸着剤の使用量および手間数が多く、操作のため長時間拘束される。そこで我々は、省エネルギーの時勢下、これらの点に着目し簡便化を図る目的で検討を行なった。

実 験 方 法

1. 供試料の調整

供試料のうち穀類には、トウモロコシ、コウリヤン、大麦、小麦、落花生の5種を用い高速液体クロマトグラフィー (HPLC) における蛍光強度のバランスを考慮して、Af B₁ を 1.5 ppb となるように添加し、B₁ の濃度に対して B₂ と G₁ は 1/2、G₂ は 1/4 に調整し添加回収試料とした。一方牛乳には、Af B₁ および M₁ 量として 0.1, 0.2, 0.5 ppb の3段階に添加し、各 B₁, M₁ の濃度に対して B₂ と G₁ は 1/2、G₂ 1/4、M₂ は 2 倍に調整した。

2. Af の抽出およびクリーンアップ

穀類ならびに牛乳からの Af の抽出方法は AOAC 公定法^{1),2)} に準じたがそれぞれ部分的に操作を変更した個所があるので、それを Scheme 1,2 に示した。

3. カラムクロマトグラフィー

従来の CB 法カラムに代えて、ウォーターズ製、セップパックシリカカートリッジ (以下 SSC) を用いて各 Af 抽出液のクリーンアップを行なった。その操作を Scheme 3 に示した。

4. Af の計測

機器による計測は定量精度の良い HPLC を使用した。

HPLC の分析条件

装置：ウォーターズ 6000/U 蛍光検出器 (Ex 365 nm, Em 425 nm) 蛍光検出器のフローセルを Panalaks らの方法³⁾ に従い、シリカゲルパックドフローセルに改造した。

カラム：穀類の分析 4 mm×25 cm, Nucleosil 5-10

牛乳の分析 4 mm×25 cm×2, Nucleosil 5-10

(財) 日本穀物検定協会中央研究所 (〒272-01 千葉県市川市新井2-17-3)
Central Research Laboratory of Japan Grain Inspection Association (2-17-3; Arai, Ichikawa, Chiba 272-01)

Scheme 1. Extraction method of aflatoxins in grains

Scheme 2. Extraction method of aflatoxins in milk

Scheme 3. Sep-pac silica cartridge column chromatography

流速：穀類の分析 1.0 ml/min

水飽和クロロホルム-シクロヘキサン-アセトニトリル-エタノール (500 : 150 : 20 : 10)

牛乳の分析 1.5 ml/min

水飽和クロロホルム-シクロヘキサン-アセトニトリル-エタノール (500 : 150 : 20 : 13.5)

結果および考察

1. 添加回収率

穀類各調整試料の添加回収試験の結果を Table 1 に示した. なお, 1 例として Af B₁ 濃度 5 ppb に調整したトウモロコシについて分析を行なった際のクロマトグラムを Fig. 1 に示した. 牛乳各調

Table 1. Recovery of aflatoxins spiked into grain samples

Samples	Recovery (%)							
	B ₁		B ₂		G ₁		G ₂	
Milo	78	112	80	115	81	115	83	117
Wheat	84	96	90	96	102	96	96	96
Barley	78	93	73	92	96	98	84	93
Corn	93	97	96	98	80	98	72	100
Peanut	96	—	117	—	95	—	96	—
Amount of spiked aflatoxin (μ g/kg)	1.0	5.0	0.5	2.5	0.5	2.5	0.25	1.25

Fig. 1 Chromatogram of aflatoxins extracted from corn (aflatoxin B₁ 5 ppb)

Table 2. Recovery of aflatoxins in milk

Aflatoxins	B ₁			B ₂			G ₁		
Recovery (%)	105	105	105	84	82	73	100	101	97
Amount of spiked aflatoxin (μg/kg)	0.1	0.2	0.5	0.05	0.1	0.25	0.05	0.1	0.25

Aflatoxins	G ₂			M ₁			M ₂		
Recovery (%)	97	103	98	84	72	78	66	60	68
Amount of spiked aflatoxin (μg/kg)	0.025	0.05	0.125	0.1	0.2	0.5	0.2	0.4	1.0

Fig. 2 Chromatogram of aflatoxins extracted from milk (aflatoxin B₁ 0.5 ppb, M₁ 0.5 ppb)

整試料の添加回収試験の結果を Table 2 に示した。また Af B₁ と M₁ 濃度 0.5 ppb に調整した牛乳のクロマトグラムを Fig. 2 に示した。Af 以外のピークは M₂ 以降の大きな蛍光物質以外は認めず添加回収試験結果からも、FDA による牛乳中の M₁ 量のガイドラインである 0.5 ppb は本分析法

で充分可能であった。薄層クロマトグラフィー分析では Af M₂ は妨害蛍光と重なるが、本実験の HPLC による測定では充分な分離を示した。

2. CB 法カラムと SSC の比較

CB 法の場合はシリカゲルの活性化ならびに水分の調整が必要であるが、SSC はパックドカラムであるので直ちに使用可能であり製品ロット間の差も認めなかった。また CB 法カラムでは溶剤使用量 550 ml (クロロホルム 250 ml, n-ヘキサン 150 ml, エチルエーテル 150 ml) に対し、SSC では Scheme 1, 2, に示したとおり 55 ml であった。クロマトグラフィーに要する時間については CB 法約 120 分に対し SSC では 4 分であった。従って溶剂量は 1/10 で済み、クロマトグラフィーに要する時間は 1/30 に短縮された。

引用文献

- 1) Assoc. Offic. Agr. Chim.: "Official Methods of Analysis of the A.O.A.C." 12th Ed. 465 (1975).
- 2) Assoc. Offic. Agr. Chim.: "Official Methods of Analysis of the A.O.A.C." 12th Ed. 476 (1975).
- 3) Panalaks, T., Scott, P.M.: J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 60, 583 (1977).