マイコトキシンの化学分析に関する研究 (第7報)

高速液体クロマトグラフィーによるアフラトキシン類の分析

(昭和 51 年 6 月 8 日受理)

五十畑悦子* 武田由比子* 内山 充*

Studies on Chemical Analysis of Mycotoxin (VII)

Study on Determination of Aflatoxins by High Performance Liquid Chromatography

Etsuko ISOHATA, Yuiko TAKEDA and Mitsuru UCHIYAMA

(National Institute of Hygienic Sciences: Kamiyoga 1-chome, Setagaya-ku, Tokyo)

High-performance liquid chromatography of Aflatoxins was carried out by using two kinds of column packings.

Silicagel (Iatrobeads 6RS-8010) yielded satisfactory separation of Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂, by eluting with dichloromethane—chloroform—methanol (60:40:0.15) or chloroform—*iso*-octane—*iso*-propanol (75:25:0.5), whereas porous polymergel (Iatrobeads 6CP-2010) could be applied for the clear separation of B-group and G-group aflatoxins from patulin and penicillic acid.

The detection of aflatoxins was performed with UV-254 nm or UV-360 nm, while the latter is more recommendable to avoid the disturbance with coexisting materials.

(Received June 8, 1976)

アフラトキシンが数多くのマイコトキシンの中でも、急性および慢性毒性特に発がん性の点で、食品衛生上特別の注目を受けていることは周知の事実である。したがって食品中のアフラキシンの分析もかなりの緊急性と重要性を有している。これまで多くの食品についてアフラトキシンの化学分析が行われ、汚染の実態が明らかにされつつあるが、その際の試験法としては、我が国における厚生省からの通知¹⁾も、AOAC法²⁾も含水メタノール抽出後クリーンアップした後薄層クロマトグラフィーを行い、けい光スポットを検出する方法となっている。

著者らは前報までに諸種のマイコトキシンの化学的分析方法についての検討結果を報告してきたが^{3)~5)}、従来からマイコトキシンの分析に繁用され、現在でも改良が重ねられつつあるガスクロマトグラフィーや薄層クロマトグラフィーと並んで最近では高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を分析手段として検討しつつある。汚染菌種不明の試料について複数のマイコトキシンを抽出、分画、クリーンアップする方法の開発⁶⁾に引き続き、検出をより定量的にしかも速やかにするために検討した

HPLC は、ペニシリン酸、パツリン⁷⁾あるいはステリグマトシスチン⁸⁾に対して、かなり有効な分析手段となり得ることが明らかになった。

アフラトキシンの分析は食品衛生上の要求から高感度を必要とするので、上述のようにけい光デンストメトリーが用いられているが、これに HPLC を応用して、今後多数の未知検体の定量的分析処理に役立つ方法として、利用し得るかどうかを検討する目的で、今回は国産の2種類 (シリカゲル (正相) とポーラスポリマー (逆相)) の担体から最適の充てん剤を選定し、分析条件、溶離溶媒などを検討した。

実験方法

1. 装置

前報同様 HPLC の各パートを内径 0.25 mm のテフロンチューブで接続して manual に組み合わせた。検出には UV-254 nm と 360 nm を用いた。

検出器: Uvigraph LC-1 (UV-254 nm 固定)

" LC-3 (UV-360 nm 固定)

カラム管: 3 mmφ, 500 mm ガラス製

記録計: (株) 日立製作所製 QPD 54 型

* 国立衛生試験所: 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

2. カラムの調製

2.1 ポーラスポリマーゲル

あらかじめメタノール中で十分膨張させたイアトロビーズ・6CP-2010 をメタノール-水 (9:1) を用いて湿式法でガラス管に充てんする。

2.2 シリカゲル

イアトロビーズ・6RS-8010 を乾式充てん機でガラス管に充てんする。

3. 試薬

メタノール: 液体クロマトグラフィー用

和光純薬(株)製

他の試薬類は特級品, 溶媒類は蒸留したものを使用した。

標準溶液: 20 ml のメスフラスコ中に、パツリン標準品 0.5 mg, ペニシリン酸標準品 5 mg, アフラトキシン B₁, B₂, G₁, G₂ 標準品各 1 mg (以上すべて標準品は和光純薬(株)販売品) を秤取し, メタノールを加えて 20 ml とし 6 種のマイコトキシン混合標準溶液とする。

実験結果

1. ポーラスポリマーゲルによる分離および検出

6 種のマイコトキシン混合標準溶液 10 μ l を 2.1 より作製したカラムに注入し, 移動相-メタノール-水 (9:1), 圧力 15 kg/cm², 流量 1 ml/min の条件によって分離し, UV-254 nm で検出させたクロマトグラムを Fig. 1 に示す。アフラトキシン類は G₁ と G₂, B₁ と B₂ は分離せず G 群, B 群として溶出され, また既報のマイ

Fig. 1. Liquid chromatogram of aflatoxins together with patulin and penicillic acid

Sample: penicillic acid1
patulin2
aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂

Column: 3 mm ϕ $\times$ 500 mm
packing material: iatrobeads 6CP-2010
particle size: 10 μ
Detector: Iatron UVIGRAPH
method: 254 nm
range: $\times 0.08$ O.D
chart speed: 2.5 mm/min
Eluent: MeOH-H₂O (9:1)
flow rate: 1 ml/min
pressure: 15 kg/cm²
Temperature: R. T.

コトキシンの同時分析操作で同一のフラクションに分別される⁶⁾ ペニシリン酸, パツリンとは明らかに分離できる。また移動相をメタノール-水 (9.5:0.5), 圧力 9 kg/cm², 流量 1 ml/min の条件で分離させ, UV-360 nm で検出させると Fig. 2 に示すようにペニシリン酸,

Fig. 2. Liquid chromatogram of the same toxins as Fig. 1 but detected with UV 360 nm

Detector: Iatron UVIGRAPH
method: 360 nm
range: $\times 0.08$ O.D
chart speed: 2.5 mm/min
Eluent: MeOH-H₂O (9.5:0.5)
flow rate: 1 ml/min
pressure: 9 kg/cm²

Fig. 3. Liquid chromatogram of aflatoxins

Sample: aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂
injection volume: 20 μ l
concentration: 1 mg/20 ml
Column: 3 mm ϕ $\times$ 500 mm
packing material: Iatrobeads 6RS-8010
particle size: 10 μ
Detector: Iatron UVIGRAPH LC-3
method: 360 nm
range: $\times 0.16$ O.D
chart speed: 2.5 mm/min
Eluent: CH₂Cl₂-CHCl₃-MeOH
(60:40:0.15)
flow rate: 1.2 ml/min
pressure: 57 kg/cm²

Fig. 4. Liquid chromatogram of aflatoxins

Sample: aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂
 injection volume: 50 μ l
 Column: 3 mm ϕ $\times$ 500 mm
 packing material: Iatrobeads 6RS-8010
 particle size: 10 μ
 Detector: Iatron UVIGRAPH LC-3
 method: 360 nm
 range: $\times 0.16$ O.D
 chart speed: 2.5 mm/min
 Eluent: CHCl₃—*iso*-C₈H₁₈—*iso*-C₈H₇OH
 (75:25:0.5)
 flow rate: 1.0 ml/min
 pressure: 38 kg/cm²

Fig. 5. Calibration curve of aflatoxins

Sample: aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂
 solvent: CHCl₃
 Column: 3 mm ϕ $\times$ 500 mm
 packing material: 6RS-8010
 Detector: Iatron UVIGRAPH LC-3
 method: 360 nm
 range: $\times 0.16$ O.D
 chart speed: 2.5 mm/min
 Eluent: CHCl₃—CH₂Cl₂—MeOH (40:60:0.15)
 flow rate: 1.0 ml/min
 pressure: 40 kg/cm²
 Temperature: R.T.

Fig. 6. Liquid chromatogram of aflatoxins prepared from fungus*

* Strain is indicated in Table 1.

Table 1. Determination of Aflatoxins from Fungus

	Charged vol μl	μg/μl*			
		B ₁	G ₁	B ₂	G ₂
1. N.G-P-159a	3	0.070	0.413	0	0
2. NRRL-3145	3	0.021	0.467	0	0
3. 5-sp-13	5	0.114	0.480	0	0
4. ATCC-15517	5	0.076	0.143	0	0
5. 1157-a	10	0.076	0.001	0.008	0
6. 72-p-143	5	0.038	0.001	0	0
7. 72-p-144	5	0.041	0	0	0
8. 0-1	10	0.003	0.008	0	0
9. 1016a	5	0.050	0	0	0
10. NO-31a	10	0.005	0	0	0

* The concentration was expressed as the weight of each aflatoxin in μl of filtered culture medium of each fungus.

パツリンは検出されずにアフラトキシン類のみG群, B群として検出される。

2. シリカゲルによる分離と検出

6種のマイコトキシン混合標準溶液を2.2によって作製したカラムに注入し、移動相をジクロルメタン—クロロホルム—メタノール (60:40:0.15)、圧力 57 kg/cm²、流量 1.2 ml/min、選択波長 360 nm で分析すると Fig. 3のクロマトグラムを示し、アフラトキシン B₁, G₁, B₂, G₂の順に分離、検出する。また移動相をクロロホルム—イソオクタン—イソプロパノール (75:25:0.5) とし、選択波長 360 nm の条件では Fig. 4のクロマトグラムを示し、アフラトキシン類は B₁, B₂, G₁, G₂の順に分離検出した。

3. 検量線

シリカゲルによる分離検出の方法で求めた検量線を Fig. 5に示す。アフラトキシン B₁, B₂, G₁, G₂はそれぞれ 0.063 から 1 μg の間で直線性が得られる。

4. 応用

アフラトキシン産生菌株10種類を YES 培地で25° 1週間培養し、菌体部分をろ紙ですろ過した後、ろ液についてシリカゲルによる HPLC を行った。Fig. 5の検量線からアフラトキシン量を求め Table 1に示した。Fig. 6にこの試料の一部のクロマトグラムを示したが、いずれの試料も妨害ピークの影響はほとんどなく、アフラトキシン産生菌株のトキシン産生能を容易に知り得た。

考 察

アフラトキシン類の HPLC の報告はこれまで幾つか見られるが^{9)~14)}、例えば Williams⁹⁾ はシリカゲル Zorbax-sil を用いて、ジクロルメタン (50%水飽和)—クロロホルム (50%水飽和)—メタノール (60:40:0.1) で溶出しており、Kimieciak¹⁴⁾ はシリカゲル Corasil II でヘキサ—クロロホルム—エタノール (50:49:0.3) を用いている。検出は UV-254 nm で後者は 365 nm でも試みている。

本報では国産の充てん剤中適当なものを選定する目的とベニシリン酸、パツリンをも同時に溶出確認する方法への展開をも考慮し、シリカゲルの他にポラスポリマーゲルからも1種類を選んだ。検出は UV-360 nm と 254 nm 固定波長検出器によって行ったが UV-360 nmの方が試料中に共存する妨害物質の影響が少ない。

シリカゲルカラムによる HPLC に関して、アフラトキシンの相互分離に2種類の移動相を設定し得た。移動相の種類により4種のアフラトキシンの溶出順が異なり、定性的確認に利用し得る。またシリカゲルは文献にみられるような既成カラムを用いなくても、国産の充てん剤を用時充てんしたカラムで十分目的が達せられることが明らかとなった。最低検出量は B₁, B₂, G₁, G₂共に約 60 ng であるので試料 60 g より作った検液全量を用いれば 1 ppb の限度を出し得る。

本法をアフラトキシン産生菌株の産生能試験に応用したところ、簡単な前処理でトキシンの産生量を測定し得たことは、本法の今後の応用範囲の広いことを示してい

る。

アフラトキシン類は特異なけい光を示すのでけい光検出器を用いた方が感度は高くなるが4トキシンを同時分析するにはUV-検出器の方が適当と考えられる。

文 献

- 1) 厚生省: 食品衛生研究, **21**, 504 (1971).
- 2) Association of Official Analytical Chemists: "Official Methods of Analysis of A.O.A.C." 11th ed p. 426 (1970).
- 3), 4) 鈴木 隆, 武田明治, 田辺弘也: 食衛誌. **12**, 489, 495 (1971).
- 5) 武田由比子, 五十畑悦子, 天野立爾, 田辺弘也, 倉田 浩: 同上, **15**, 363 (1974).
- 6) 武田由比子, 五十畑悦子, 天野立爾, 内山 充, 直井家寿太, 中尾美津男: 同上, **17**, 193 (1976).
- 7) 五十畑悦子, 武田由比子, 内山 充: 同上, **17**, 308 (1976).
- 8) 五十畑悦子, 武田由比子, 内山 充: 同上, **17**, 392 (1976).
- 9) Williams, R. C.: Du Pont Liquid Chromatog. Methods Bull. May 30, 1973.
- 10) Rao, G.H.R., Anders, M.W.: J. Chromatog., **84**, 402 (1973).
- 11) Seitz, L. M.: *ibid.*, **104**, 81 (1975).
- 12) Pons, W. A., Jr.: J. Assoc. Offic. Anal. Chem., **59**, 101 (1976).
- 13) Hsieh, D. P. H., Fitzell, D. L., Miller, J. L., Seiber, J. N.: J. Chromatog., **117**, 474 (1976).
- 14) Kmiecik, S.: Z. Lebensm. Unters-Forsch., **160**, 321 (1976).