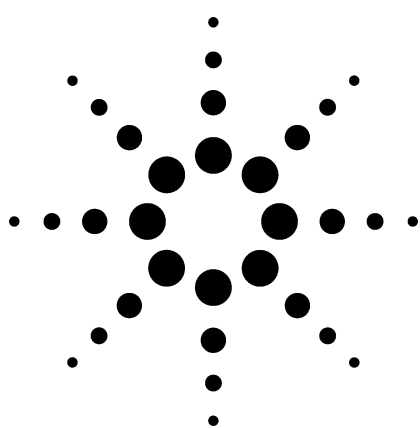


HPLC によるアフラトキシン類の分離 アプリケーション



環境、食品安全性

著者

Coral Barbas
Facultad de CC Experimentales y de la Salud
Universidad San Pablo-CEU
Urbanización Montepríncipe
Boadilla del Monte, 28668 Madrid
Spain

Andre Dams*
Agilent Technologies, Inc.
Amstelveen
The Netherlands

Ronald E. Majors
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

*Present address:
Andre Dams
Analytical Consultancy, Amstelveen
The Netherlands

要旨

4 種類のアフラトキシン (B₁、B₂、G₁、G₂) を、水、メタノール、アセトニトリルの 3 種類の混合溶媒によるアイソクラティック HPLC によって分離し、UV 365 nm で検出しました。5.5 分以内でベースライン上での分離が達成されました。

はじめに

アフラトキシン類は、さまざまな *Aspergillus flavus* (黄色アスペルギルス) 糸状菌によって生産されるマイコトキシンです。アフラトキシンは非常に高い毒性のみならず、変異原性、催奇性 (胎児異常を引き起こす)、および発癌性も有します。残念なことながら、*A. flavus* は熱帯地域および亜熱帯地域ではありふれた糸状菌であり、アフラトキシン汚染の原因であることが判明しています。ピーナッツ、穀物種子、ドライフルーツなど一部の農産物、ピスタチオ、ペカン、クルミ、アーモンドなどのさまざまなナッツ類、およびレッドペッパー、黒コショウ、ニンニク、シナモンなどのハーブ種の保存状態が不適切であることが、このアフラトキシン汚染の原因となっています。アフラトキシンはその毒性と発癌性により、食品のアフラトキシン汚染に関する定量下限 (MDQ) は極めて低い値が規定されています。

化学的性質

化学的性質

現在同定されているアフラトキシンは 18 種類ですが、その中でも図 1 に示す化学構造である B₁、B₂、G₁、および G₂ の 4 種類のアフラトキシンが代表的です。特にアフラトキシン B₁ は最も強力で多量に存在する環境変異原物質および発癌物質として知られている物質の 1 つです。アフラトキシンは多くの食品内で非常に安定的に存在し、容易に分解されることはありません。アフラトキシンは総じて、ジフランクマリン骨格を持つ誘導体です。純粋なアフラトキシン B₁ は、青白色～黄色、結晶状、無臭の固体です。アフラトキシンはクロロホルム、メタノール、ジメチルスルホキシドなどの中極性溶媒に溶けやすく、10～20 mg/L 程度までは水に溶けます。メタノール中では、265 nm および 360～362 nm において非常に高い吸光係数 (約 10,000) を持ちます。アフラトキシンは紫外線照射により蛍光を発し、HPLC での極微量分析には蛍光検出がしばしば用いられます。B₁ と B₂、G₁ と G₂ では蛍光収率が異なるため、紫外検出器と蛍光検出器をシリーズに接続して効果的に使用できます [1]。アフラトキシンには極性官能基はなく、その疎水性により分離が可能です。



Agilent Technologies

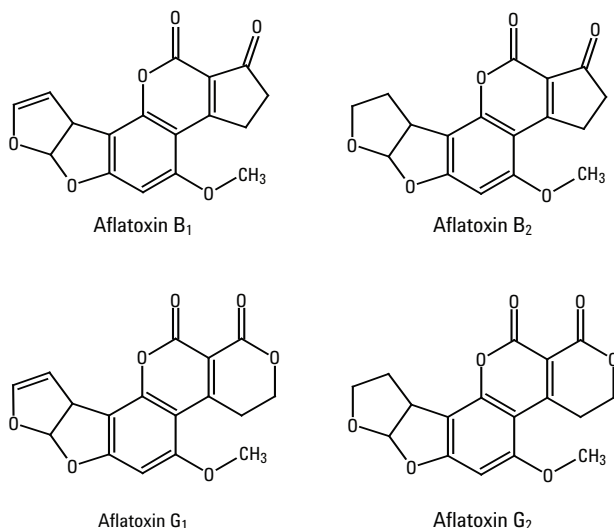


図1 今回分析したアフラトキシン類の化学構造

HPLC による分析

過去においては、白色の薄層クロマトグラフが多く用いられていましたが、近年では操作が容易で定量性の良い HPLC が用いられています。現在までに公開されているほとんどの HPLC メソッドでは、アフラトキシンの疎水性によりアフラトキシンを分離する C18 結合相での逆相 HPLC が使用されています [1-4]。報告されている分離方法は、そのほとんどが長さ 25 cm の 5 μ m カラムを使用しています。充填剤の粒子径を小さくした長さの短いカラムを使用して分離時間を短縮する方法が、現在の主流です。このような短いカラムは同じ分離能を持つ長いカラムに比べて、より短い時間で同等の分離を達成することができます。本報告では、こうした短いカラムを使用することにより従来のメソッドに比べてより優れた結果が得られることを紹介しました。図2をご覧ください。

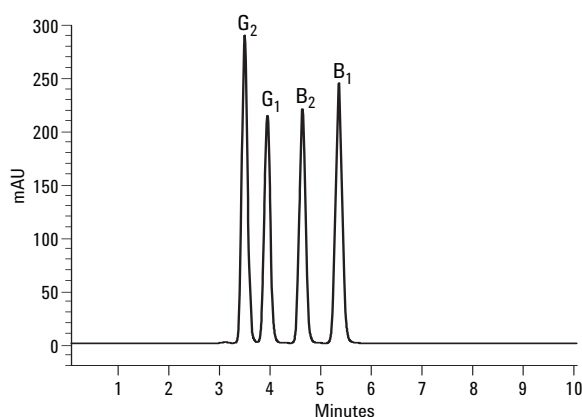


図2 ZORBAX XDB-C18 Rapid Resolution カラムを使用したアフラトキシン類の逆相分離

分析条件

標準品	アフラトキシン類はAldrich (Madrid, Spain) より購入
HPLC 条件	
カラム	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 mm×150 mm、3.5 μ m)
移動相	水/メタノール/アセトニトリル 50/40/10 (V/V/V)
流量	0.8 mL/min
温度	室温
検出器	紫外 365 nm
注入量	10 μ L (0.044 mg/mL)

結果と考察

4 種類のアフラトキシンはすべて、水、メタノール、アセトニトリルの 3 種混合溶媒によりアイソクラティック分離しました。5.5 分以内でベースライン上での分離が達成されました。本報は紫外検出によりましたが、蛍光検出 ($\lambda_{ex} = 365$ nm、 $\lambda_{em} = 455$ nm) を使用すると場合により B₂ と G₂ ではより低い検出レベルが可能になります。マススペクトル検出も使用できます [1]。

参考文献

1. R. Schuster, G. Marx, and M. Rothaupt, "Analysis of Mycotoxins by HPLC with Automated Spectroscopic Confirmation by Spectral Library", Agilent Technologies, publication 5091-8692E, www.agilent.com/chem
2. A. Gratzfeld-Heusgen, "HPLC Analysis of Aflatoxins in Pistachio Nuts", Agilent Technologies, publication 5966-0632E, www.agilent.com/chem
3. I. Ferreira, E. Mendes, and M. Oliveira, (2004) *J. Liquid Chromatog.*, **27** (2), 325–334.
4. E. Chiaavaro, C. Dall'Asta, G. Galaverna, A. Biancardi, and E. Gambarelli, (2001) *J. Chromatogr. A*, **937** (1–2), 31–40.

詳細情報

弊社製品とサービスについて更に詳しい情報をご希望のお客様は弊社 Web サイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

Agilent は、万一この資料に誤りが発見されたとしても、また、本資料の使用により付随的または間接的に損害が発生する事態が発生したとしても一切免責とさせていただきます。本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

© Agilent Technologies, Inc. 2005

Printed in Japan
August 16, 2005
5989-3634JAJP