

Application News

No. L500

高速液体クロマトグラフィー
High Performance Liquid Chromatography

“Nexera-i” と “RF-20Axs” を用いた葛根湯中 アフラトキシン B₁, B₂, G₁, G₂ の分析

Analysis of Aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂ in Kakkonto Using Nexera-i and RF-20Axs

カビ毒の1種であるアフラトキシンは、強い急性毒性や発がん性があり、天然の植物から生産される生薬や生薬を原料とする製剤において、アフラトキシンの試験検査を実施することが求められおり、第十七改正日本薬局方改正案として「生薬および生薬製剤のアフラトキシン試験法」がJPフォーラムに掲載されました（2015年7月現在）。本試験法案では、総アフラトキシン（アフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ の総和）として 10 µg/kg 以下を基準案としています。

本アプリケーションニュースでは、この第十七改正日本薬局方改正案を参考にして、複合生薬の一つである葛根湯を分析した例をご紹介します。第十七改正日本薬局方改正案には、アフラトキシンをトリフルオロ酢酸（TFA）で誘導体化処理した後、蛍光検出器を用いて分析する方法が記載されていますが、本アプリケーションニュースでは、この方法に加えて、誘導体化処理せずに直接蛍光検出した例をご紹介します。

尚、アフラトキシンに関しては食品において世界各国で規制対象となっており、日本でも既に規制⁽¹⁾ および通知試験⁽²⁾ が発行されています。この試験法による食品中のアフラトキシンの分析例は、既報のアプリケーションニュース L351, L422, L428, L430, L435 をご参照ください。

A. Nomura

■ TFA 誘導体化処理による分析

Analysis with Trifluoroacetic Acid Derivatization

極性溶媒中のアフラトキシン B₁ および G₁ は、アフラトキシン B₂ および G₂ と比べて蛍光強度が低いことが知られています。そのため、蛍光強度を増加させる方法としては、フォトケミカルリアクターによる誘導体化法、TFA による誘導体化法、電気化学的誘導体化法といったものがあります。本アプリケーションニュースでは、試験法案に記載されている TFA 誘導体化法を用いました。TFA 誘導体化反応は、一般的にプレカラム法と呼ばれるもので、分析用の試料を HPLC に供する前に誘導体化処理を行います。各アフラトキシンの構造式および TFA 誘導体化された後の構造式を Fig. 1 に示します。

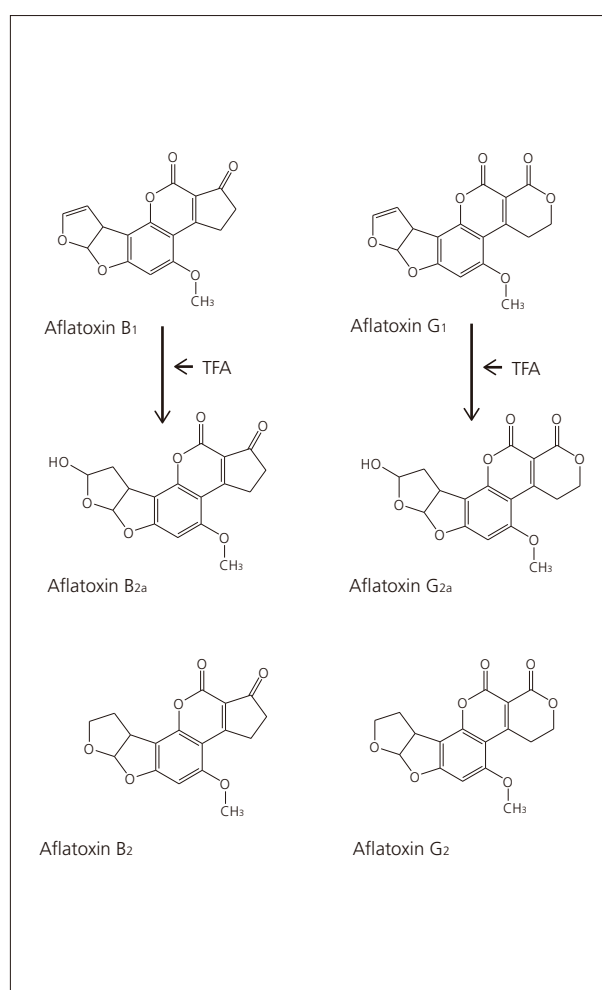


Fig. 1 アフラトキシン B₁, B₂, G₁, G₂ およびトリフルオロ酢酸による誘導体化 (B_{2a}, G_{2a}) の構造式
Structures of Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ and Derivatized Forms (B_{2a}, G_{2a}) with Trifluoroacetic Acid

複合生薬である葛根湯にアフラトキシン標準溶液を添加して分析を行いました。Fig. 2に前処理手順を示します。第十七改正日本薬局方改正案を参考にして行いました。夾雑成分の除去を行うためのカートリッジにはイムノアフィニティカラム“AFLAKING”（堀場製作所製）を用いました。アフラトキシン標準溶液は、生薬試料中に各アフラトキシンがそれぞれ0.25 µg/kg（総量1 µg/kg）となるように添加しました。これは第十七改正日本薬局方改正案で定められている基準値の1/10濃度に相当します。

葛根湯の分析例をFig. 3に、分析条件をTable 1に示します。参考のため、アフラトキシン標準溶液を添加していない試料の分析例も示します。なお、最後に溶出するアフラトキシンB₂の後も夾雑成分のピークが確認されたので、カラム洗浄工程を追加しています。標準溶液の分析例につきましては、既報のアプリケーションニュースL428をご参考ください。

Table 1 HPLC 分析条件
HPLC Analytical Conditions

System	: Nexera-i
Column	: Shim-pack FC-ODS (150 mm L × 4.6 mm I.D., 3 µm)
Mobile Phase	: A; Water/methanol/acetonitrile = 6/3/1 (v/v/v) : B; Acetonitrile
Time Program	: A Conc./B Conc. = 100/0 (0.00 - 15.00 min) → 10/90 (16.00 - 23.0 min) → 100/0 (24.00 - 34.00 min)
Flow Rate	: 0.80 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Injection Volume	: 20 µL
Detection	: RF-20Axs, Ex. at 365 nm, Em.at 450 nm
Cell Temp.	: 25 °C

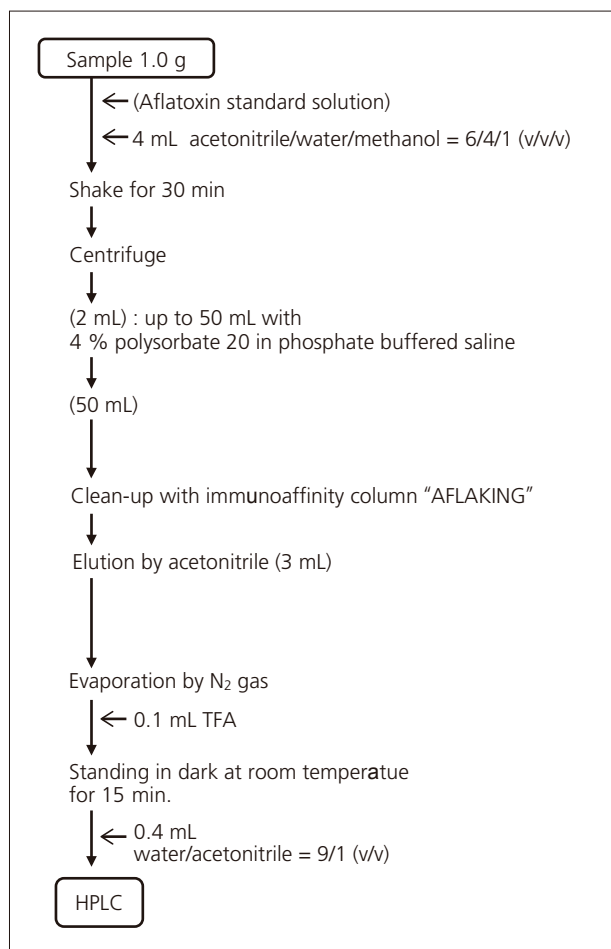


Fig. 2 前処理手順
Pretreatment Procedure

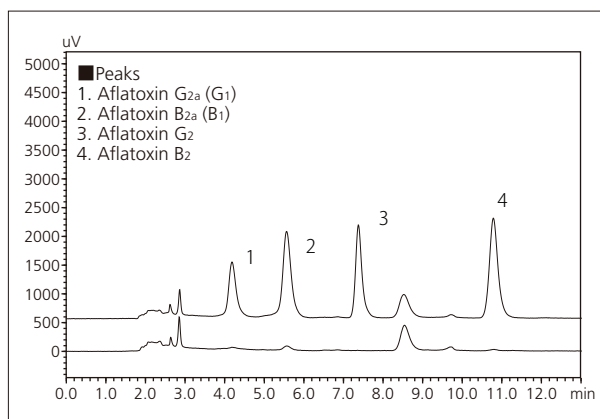


Fig. 3 葛根湯 TFA 誘導体化 HPLC 条件
(上段：標準溶液の添加あり，下段：添加なし)
Chromatogram of Kakkonto Extracts by TFA Derivatization
-HPLC Analysis
(Upper: Spiked Standard Sample, Lower: Unspiked)

■直接検出による分析

Analysis with Direct Detection

アフラトキシン B₁ および G₁ は、その蛍光強度は低いながらも、高感度蛍光検出器“RF-20Axs”を用いれば、誘導体化を行わなくても直接検出することが可能です。ここでは、“RF-20Axs”を用いて直接検出するとともに、高性能カラム“Shim-pack XR-ODS II”を利用して、分析時間の短縮も試みました。Fig. 4 に TFA 誘導体化処理を行わずにアフラトキシン標準溶液を分析した例（各アフラトキシン濃度:20 µg/L）、Fig. 5 に低濃度での分析例（各アフラトキシン濃度:0.1 µg/L）を示します。また分析条件を Table 2 に示します。0.1 µg/L のアフラトキシン B₁ を分析した際の面積の相対標準偏差（n = 6）は 2.6 % でした。この結果から、RF-20Axs を用いれば、TFA による誘導体化を行わなくても十分な感度が得られることがわかります。また、分析時間も TFA 誘導体化した場合と比較して、約 1/3 に短縮できています。Fig. 6 に各アフラトキシン濃度が 0.1 ~ 20 µg/L の範囲における検量線を示します。4 成分とも R² = 0.9999 以上の良好な直線性が得られました。

Table 2 UHPLC 分析条件
UHPLC Analytical Conditions

System	: Nexera-i
Column	: Shim-pack XR-ODS II (100 mm L. × 3.0 mm I.D., 2.2 µm)
Mobile Phase	: A; Water : B; Methanol : C; Acetonitrile
Time Program	: A Conc./B Conc./C Conc. = 65/30/5 (0.00 - 5.50 min) → 15/5/80 (5.51 - 7.0 min) → 20/80/0 (7.01 - 9.00 min) → 65/30/5 (9.01 - 12.00 min)
Flow Rate	: 1.00 mL/min
Column Temp.	: 50 °C
Injection Volume	: 10 µL
Detection	: RF-20Axs, Ex. at 365 nm, Em. at 450 nm
Cell Temp.	: 25 °C

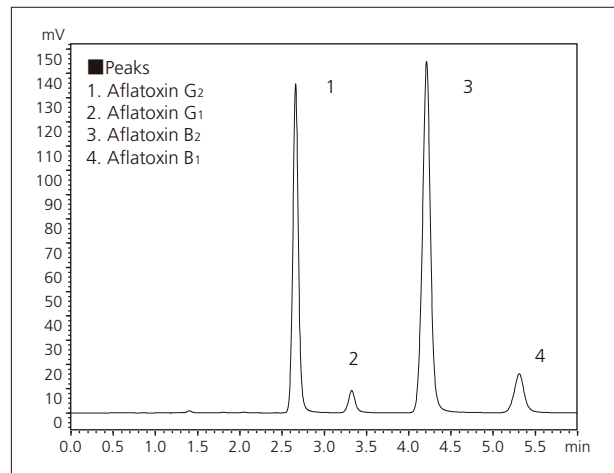


Fig. 4 アフラトキシン標準溶液のクロマトグラム - 直接検出 UHPLC 条件 (各 20 µg/L, 10 µL)
Chromatogram of Aflatoxin Standard Solution by Direct Detection - UHPLC Analysis (each 20 µg/L, 10 µL)

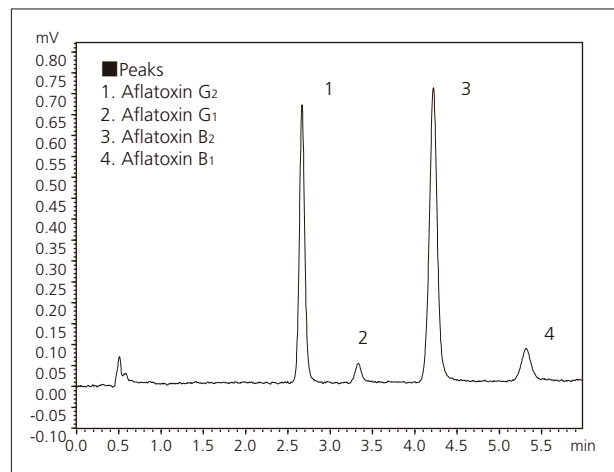


Fig. 5 アフラトキシン標準溶液のクロマトグラム - 直接検出 UHPLC 条件 (各 0.1 µg/L, 10 µL)
Chromatogram of Aflatoxin Standard Solution by Direct Detection - UHPLC Analysis (each 0.1 µg/L, 10 µL)

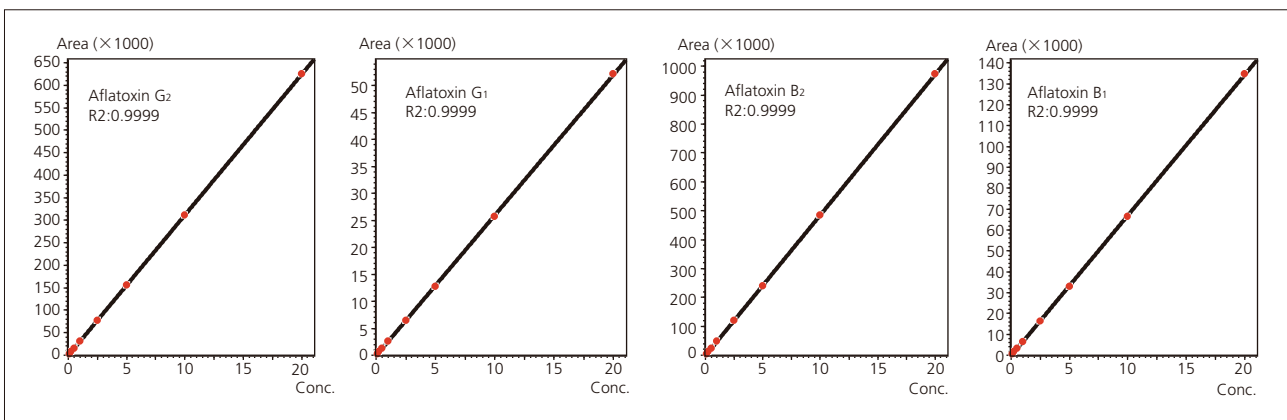


Fig. 6 アフラトキシン標準溶液の検量線 - 直接検出 (各 0.1 ~ 20 µg/L, 10 µL)
Calibration Curves of Aflatoxin Standard Solution-Direct Detection (each 0.1 ~ 20 µg/L, 10 µL)

TFA 誘導体化した場合と同様に複合生薬である葛根湯にアフラトキシン標準溶液を添加して分析を行いました。Fig. 7 に前処理手順を示します。ここでも夾雑成分の除去を行うためのカートリッジにはイムノアフィニティカラム“AFLAKING”（堀場製作所製）を用いました。この精製までの前処理手順は、Fig. 2 と同様です。アフラトキシン標準溶液は、生薬試料中に各アフラトキシンがそれぞれ 0.25 µg/kg（総量 1 µg/kg）となるように添加しました。これは第十七改正日本薬局方改正案における基準値の 1/10 濃度に相当します。

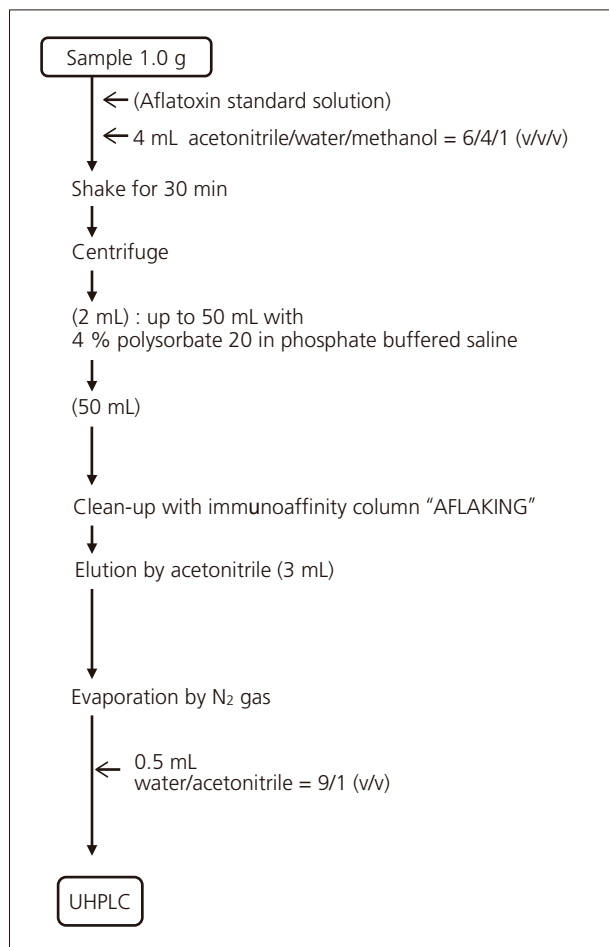


Fig. 7 前処理手順
Pretreatment Procedure

※アフラトキシンは紫外線で分解され、水溶液中ではガラス壁面に吸着するなどの性質があります。分析で使用したバイアルは、あらかじめ洗浄した低吸着性の褐色ガラスバイアルを用いました。

- (1) 「アフラトキシンを含有する食品の取り扱いについて」（平成 23 年 3 月 31 日，食安発 0331 第 5 号）
- (2) 「総アフラトキシンの試験法について」（平成 23 年 8 月 16 日，食安発 0816 第 2 号）

葛根湯の分析例を Fig. 8 に分析条件を Table 2 に示します。イムノアフィニティカラムを用いても夾雑物のピークがアフラトキシン G₁ と B₂ の間に溶出していますが，アフラトキシンとも十分に分離できており，洗浄工程を追加しても分析時間が 12 分で完了していることがわかります。

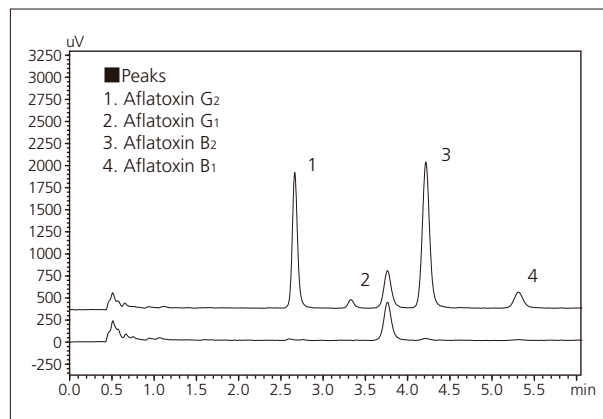


Fig. 8 葛根湯 直接検出 UHPLC 条件
(上段：標準溶液の添加あり，下段：添加なし)
Chromatogram of Kakkonto Extracts by Direct Detection
-UHPLC Analysis
(Upper: Spiked Standard Sample, Lower: Unspiked)