

# “Prominence RF-20Axs” 蛍光検出器の応用 (その 9) アフラトキシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> の高感度分析

Applications by the “Prominence RF-20Axs” Fluorescence Detector (Part 9)  
Analysis of Aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> at High Sensitivity

アフラトキシンは *Aspergillus* 属菌が産生するカビ毒で、その強い急性毒性と発ガン性から、食品において検出されはならないとされています<sup>1)</sup>。従来、国内のアフラトキシン規制はアフラトキシン B<sub>1</sub> に対して行われていましたが、2011年10月からは総アフラトキシン (アフラトキシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> の総和) を対象とすることになりました<sup>2)</sup>。

ここでは、高感度蛍光検出器 “Prominence RF-20Axs” を用いて、アフラトキシン 4 成分 (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) をトリフルオロ酢酸による誘導体化処理後検出した場合、および誘導体化処理なしに直接検出した場合の分析例をご紹介します。

K. Watanabe A. Nomura

## ■トリフルオロ酢酸によるアフラトキシンの誘導体化

Derivatization of Aflatoxins with Trifluoroacetic Acid

一般に、アフラトキシン B<sub>1</sub> および G<sub>1</sub> は、蛍光強度を増大させるために、トリフルオロ酢酸 (TFA) を用いて水酸化体であるアフラトキシン B<sub>2a</sub>, G<sub>2a</sub> に変換して HPLC 分析されます。Fig. 1 に、アフラトキシン 4 成分の構造式および TFA 処

理により生じる B<sub>2a</sub>, G<sub>2a</sub> の構造式を示します。

食品中のアフラトキシンを分析する際は、標準液および試料溶液の両方を TFA で誘導体化処理します。

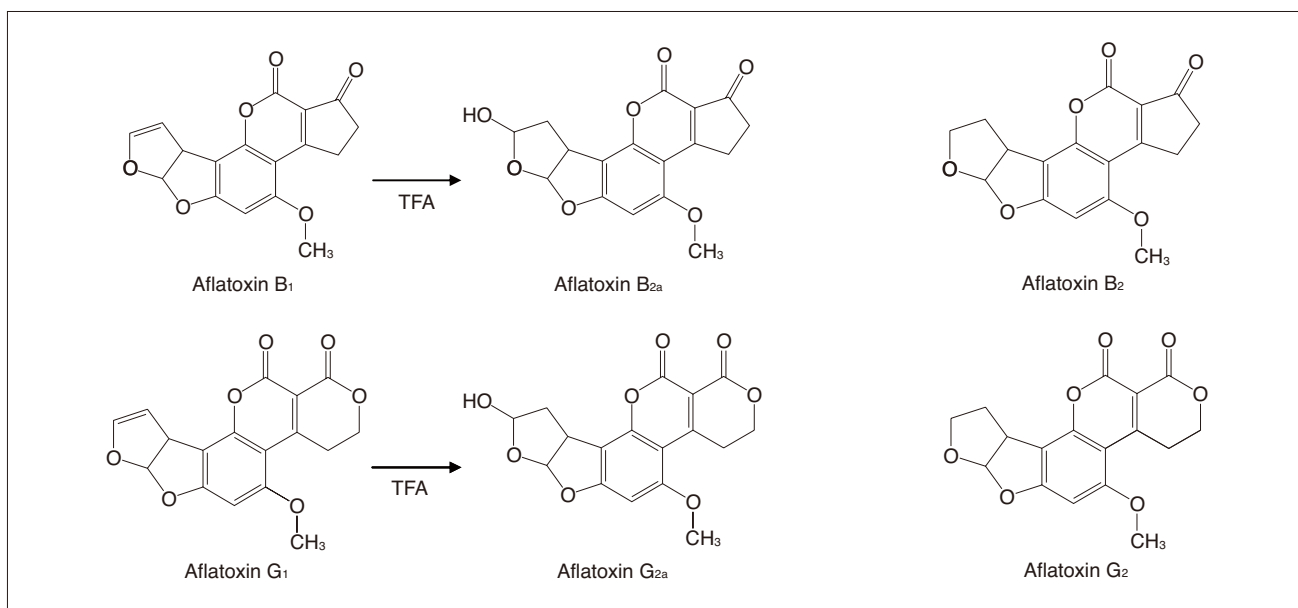


Fig. 1 アフラトキシン B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> およびトリフルオロ酢酸による誘導体 (B<sub>2a</sub>, G<sub>2a</sub>) の構造式  
Structures of Aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, and Derivatized Forms (B<sub>2a</sub>, G<sub>2a</sub>) with Trifluoroacetic Acid

## ■トリフルオロ酢酸による誘導体化標準液の分析

### Analysis of Standard Solution after Derivatization with Trifluoroacetic Acid

Fig. 2に、アフラトキシン4成分 (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) の標準液をTFAにて誘導体化処理後 (Fig. 4), 20  $\mu$ L注入したクロマトグラムを, Table 1にその分析条件を示します。Fig. 2 (右)の標準液におけるアフラトキシンB<sub>2a</sub>のピーク面積再現性 (n=6) は1.2 %RSDであり, 検出限界 (SN比=3.3, 20  $\mu$ L注入時) は0.4 ng/L (8 fg) と算出されました。

Fig. 3に, 検量線 (B<sub>1</sub>およびG<sub>1</sub>: 0.004~20  $\mu$ g/L, B<sub>2</sub>およびG<sub>2</sub>: 0.001~5  $\mu$ g/L) を示します。4成分共に, R<sup>2</sup>=0.9999以上の良好な直線性が得られました。

このように, RF-20Axsを用いることにより, 極微量のアフラトキシンを高感度に精度よく検出することができます。

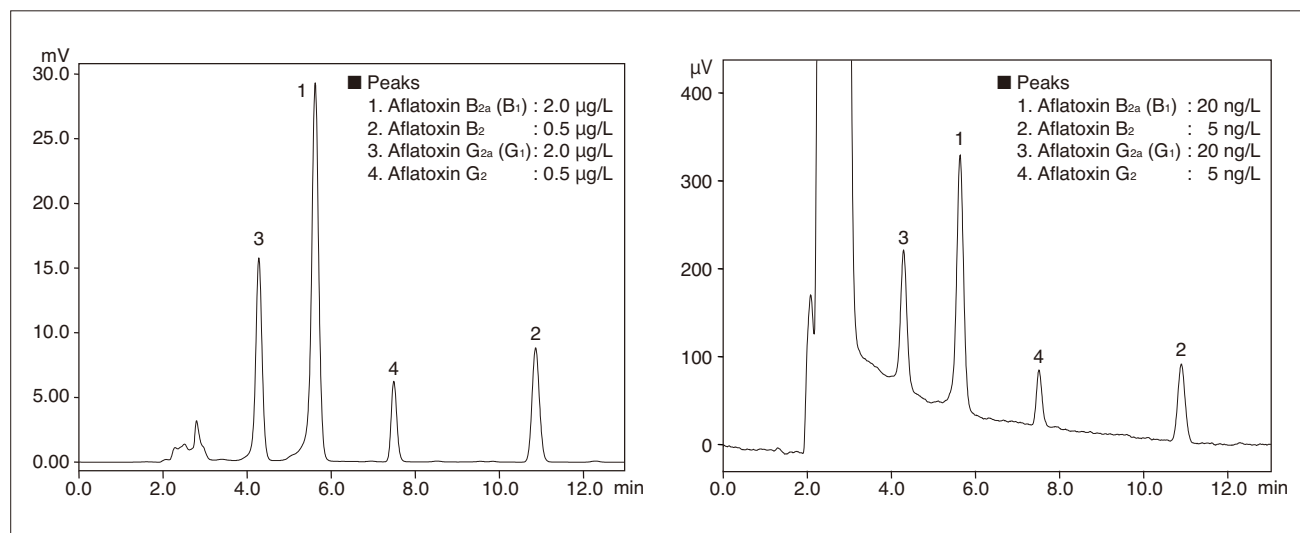


Fig. 2 トリフルオロ酢酸による誘導体化アフラトキシン標準液のクロマトグラム (20  $\mu$ L注入)  
(左) B<sub>1</sub>およびG<sub>1</sub>: 2.0  $\mu$ g/L, B<sub>2</sub>およびG<sub>2</sub>: 0.5  $\mu$ g/L, (右) B<sub>1</sub>およびG<sub>1</sub>: 20 ng/L, B<sub>2</sub>およびG<sub>2</sub>: 5 ng/L  
Chromatograms of Aflatoxin Standard Solutions after Derivatization with Trifluoroacetic Acid (20  $\mu$ L injected)  
(Left) B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub>: 2.0  $\mu$ g/L, B<sub>2</sub> and G<sub>2</sub>: 0.5  $\mu$ g/L, (Right) B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub>: 20 ng/L, B<sub>2</sub> and G<sub>2</sub>: 5 ng/L

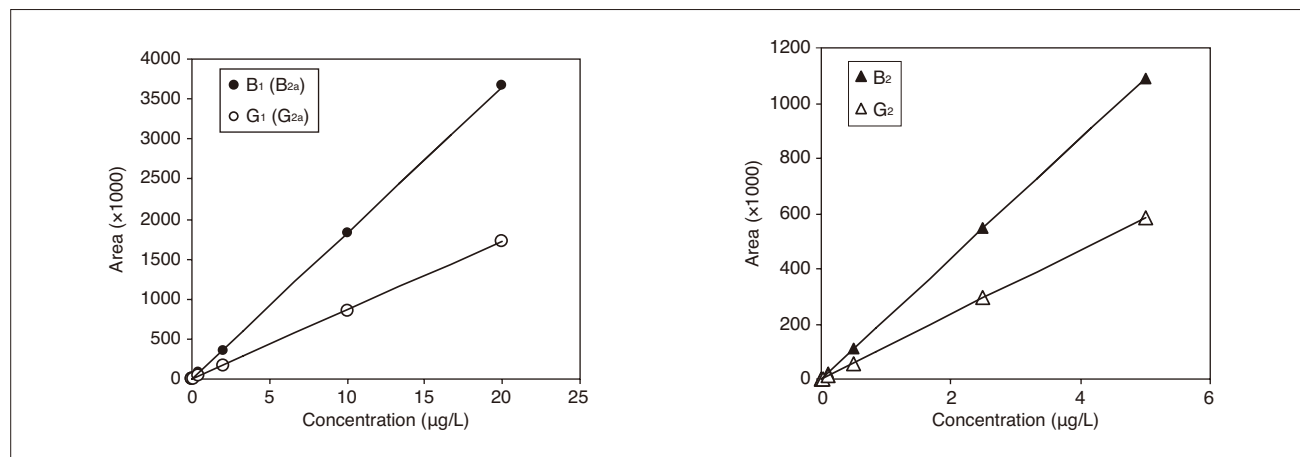


Fig. 3 トリフルオロ酢酸による誘導体化アフラトキシン標準液の検量線  
(B<sub>1</sub>およびG<sub>1</sub>: 0.004~20  $\mu$ g/L, B<sub>2</sub>およびG<sub>2</sub>: 0.001~5  $\mu$ g/L, 各20  $\mu$ L注入)  
Calibration Curves of Aflatoxin Standard Solutions after Derivatization with Trifluoroacetic Acid  
(B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub>: 0.004-20  $\mu$ g/L, B<sub>2</sub> and G<sub>2</sub>: 0.001-5  $\mu$ g/L, 20  $\mu$ L injected)

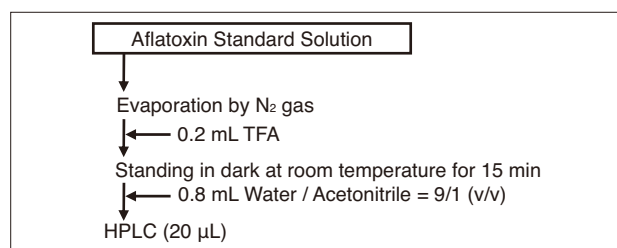


Fig. 4 TFAによる誘導体化  
Derivatization with TFA

Table 1 分析条件  
Analytical Conditions

Column	: Shim-pack FC-ODS (150 mm L.×4.6 mm I.D., 3 $\mu$ m)
Mobile Phase	: Water / Methanol / Acetonitrile = 6 / 3 / 1 (v/v/v)
Flow Rate	: 0.8 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Detection	: RF-20Axs, Ex at 365 nm, Em at 450 nm
RF Cell	: Conventional Cell
Cell Temperature	: 25 °C
Injection Volume	: 20 $\mu$ L

## ■直接検出による標準液の分析

### Analysis of Standard Solution by Direct Detection

Fig. 5に、TFA誘導体化処理を行わずにアフラトキシン4成分(B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>)の標準液を20 μL注入したクロマトグラムを示します。分析条件は、Table 1と同一です。Fig. 5(右)のクロマトグラムにおけるアフラトキシンB<sub>1</sub>のピーク面積再現性(n=6)は2.7 %RSDであり、検出限界(S/N比=3.3, 注入量20 μL)は3 ng/L (60 fg)と算出されました。このことから、RF-20AXsを用いれば、アフラトキシンB<sub>1</sub>

およびG<sub>1</sub>はTFAによる誘導体化処理を行わずとも、試験に必要な濃度を十分な感度で直接検出可能なことがわかります。

Fig. 6に、検量線(B<sub>1</sub>:0.004~20 μg/L, G<sub>1</sub>:0.02~20 μg/L, B<sub>2</sub>およびG<sub>2</sub>:0.001~5 μg/L)を示します。4成分共に、R<sup>2</sup>=0.9999以上の良好な直線性が得られました。

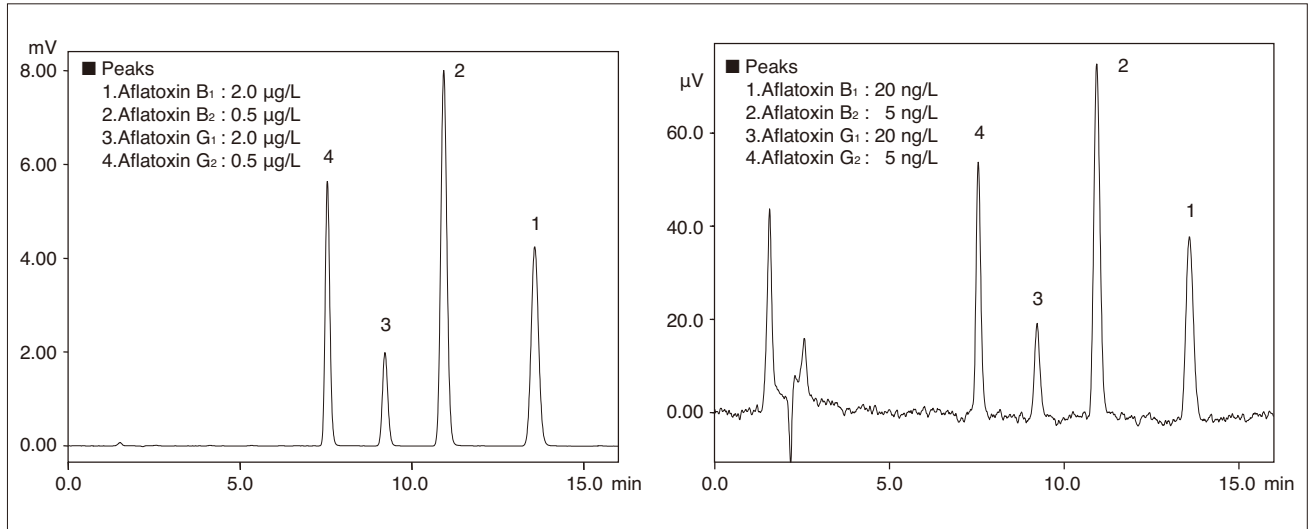


Fig. 5 直接検出によるアフラトキシン標準液のクロマトグラム (20 μL注入)  
(左) B<sub>1</sub>およびG<sub>1</sub>: 2.0 μg/L, B<sub>2</sub>およびG<sub>2</sub>: 0.5 μg/L, (右) B<sub>1</sub>およびG<sub>1</sub>: 20 ng/L, B<sub>2</sub>およびG<sub>2</sub>: 5 ng/L  
Chromatograms of Aflatoxin Standard Solutions by Direct Detection (20 μL injected)  
(Left) B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub>: 2.0 μg/L, B<sub>2</sub> and G<sub>2</sub>: 0.5 μg/L, (Right) B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub>: 20 ng/L, B<sub>2</sub> and G<sub>2</sub>: 5 ng/L

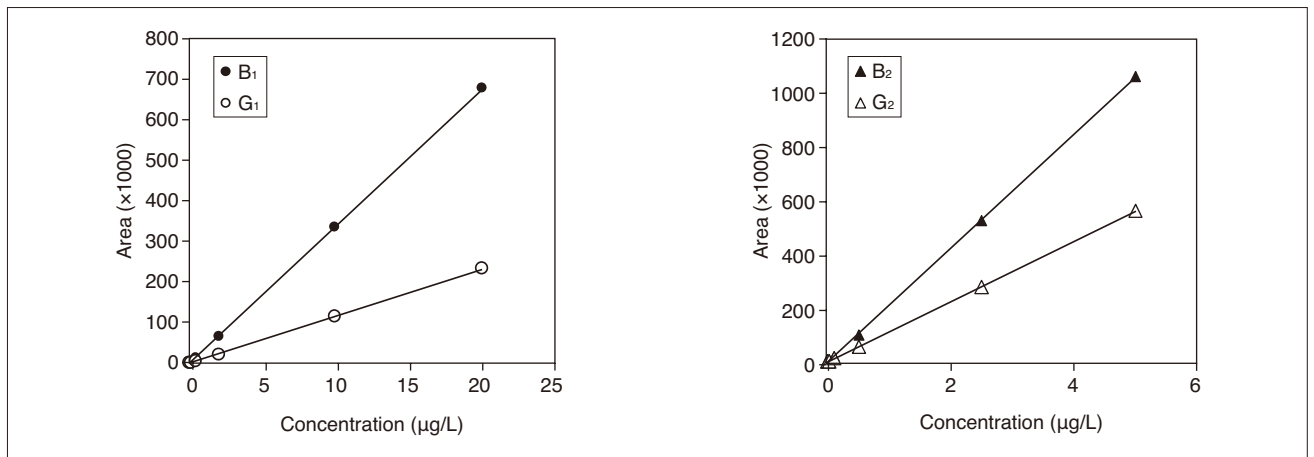


Fig. 6 直接検出によるアフラトキシン標準液の検量線  
(B<sub>1</sub>: 0.004~20 μg/L, G<sub>1</sub>: 0.02~20 μg/L, B<sub>2</sub>およびG<sub>2</sub>: 0.001~5 μg/L, 各20 μL注入)  
Calibration Curves of Aflatoxin Standard Solutions by Direct Detection  
(B<sub>1</sub>: 0.004-20 μg/L, G<sub>1</sub>: 0.02-20 μg/L, B<sub>2</sub> and G<sub>2</sub>: 0.001-5 μg/L, 20 μL injected)

## 食品試料の分析 Analysis of Food

食品試料への応用として、市販トウモロコシ粉にアフラトキシン標準液を添加して分析を行いました。Fig. 7に、試料の前処理手順を示します。夾雑成分の除去には、多機能カラムを用いました。アフラトキシン標準液は、試料中にB<sub>1</sub>およびG<sub>1</sub>は0.8 µg/kg、B<sub>2</sub>およびG<sub>2</sub>は0.2 µg/kgになるよう添加しました。分析は、TFAによる誘導体化処理をした場合と、誘導体化処理なしの直接検出の両方で行いました。

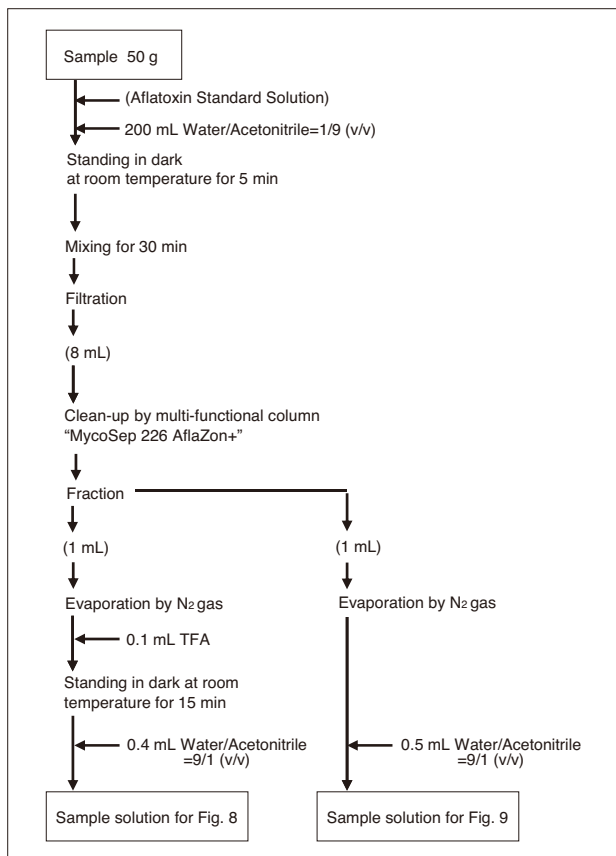


Fig. 7 前処理  
Sample Preparation

Table 2 分析条件  
Analytical Conditions

Mobile Phase	: A; Water / Methanol / Acetonitrile = 6 / 3 / 1 (v/v/v) B; Acetonitrile
Time Program	: B. Conc = 0 % (0.00-15.00 min) → 90 % (16.00-23.00 min) → 0 % (24.00-34.00 min)

\* 他の分析条件はTable 1と同一

### [参考文献]

- 1) 「カビ毒（アフラトキシン）を含有する食品の取扱いについて」(昭和46年3月16日厚生労働省環食第128号，改正平成14年3月26日食監発第0326001号)
- 2) 「アフラトキシンを含有する食品の取扱いについて」(平成23年3月31日厚生労働省食安発0331第5号)

アフラトキシン標準液添加/添加なし（ブランク）の市販トウモロコシ粉について、誘導体化処理し分析したクロマトグラムをFig. 8に、誘導体化処理をせず、直接検出により分析したクロマトグラムをFig. 9に示します。

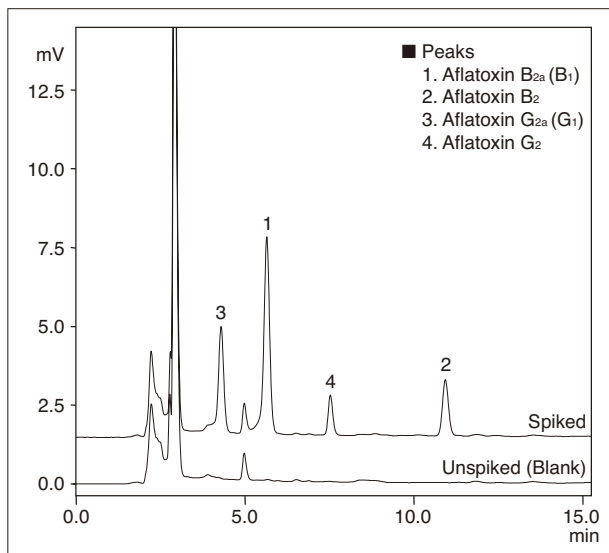


Fig. 8 トウモロコシ粉のクロマトグラム-TFAによる誘導体化処理 (20 µL注入)  
(上段) アフラトキシン標準添加, (下段) 添加なし  
Chromatograms of Corn Flour-After Derivatization with TFA (20 µL injected)  
(Upper) Aflatoxin Standard Spiked, (Lower) Unspiked

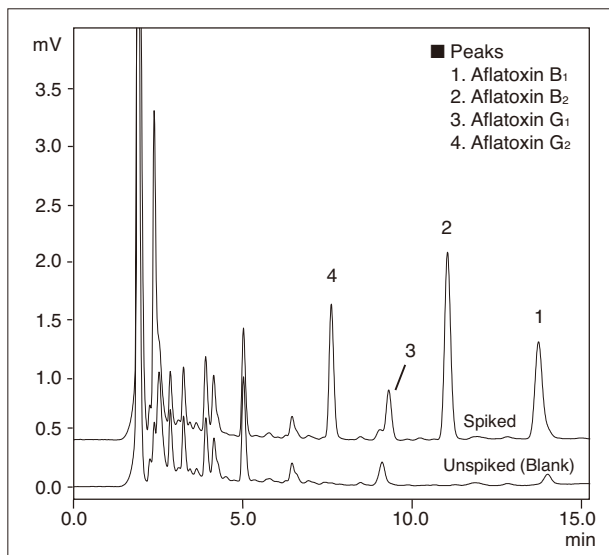


Fig. 9 トウモロコシ粉のクロマトグラム-直接検出 (20 µL注入)  
(上段) アフラトキシン標準添加, (下段) 添加なし  
Chromatograms of Corn Flour-Direct Detection (20 µL injected)  
(Upper) Aflatoxin Standard Spiked, (Lower) Unspiked

初版発行：2011年7月

**島津製作所** 分析計測事業部  
応用技術部

島津コールセンター

☎0120-131691  
TEL:075-813-1691

\* 本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。  
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。  
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>  
会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。