報 文

新規ミニカラム及び光誘導化 HPLC による生落花生、コーン、
そば粉及びとうがらし中のアフラトキシンの迅速分析

(平成 13 年 12 月 25 日受理)

田口修三^{*†} 吉田精作^{*} 田中之雄^{*} 堀伸二郎^{*}Rapid Analysis of Aflatoxins in Raw Peanuts, Corn, Buckwheat and
Red Pepper by a New Mini-column Cleanup and HPLC Using
Post-column Photochemical Derivatization SystemShuzo TAGUCHI[†], Seisaku YOSHIDA, Yukio TANAKA and Shinjiro HORI(Osaka Prefectural Institute of Public Health: 1-3-69, Nakamichi,
Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan; [†] Corresponding author)

A rapid and clean method for the analysis of aflatoxins (AFs) was developed by using a new column and post-column photochemical derivatization HPLC with fluorescence detection. The new cleanup column consisted of magnesia and basic alumina poured on the top of a commercial multi-functional mini-column. It was extremely effective for the cleanup of AFs from raw peanut, corn, buckwheat and red pepper. Fluorescent substances, which interfered with the analysis of AFs from corn, were completely absorbed at the top of the magnesia layer. Recoveries of AFs (B₁, B₂, G₁, G₂) added to raw peanuts, corn, buckwheat and red pepper were over 80% at two levels of fortification (higher level: 10, 3, 10, 3 ng/g, respectively, lower level: 1.0, 0.3, 1.0, 0.3 ng/g, respectively). Coefficients of variation were smaller than 12%, except the lower fortified level for red pepper. Limits of detection for AFs in raw peanuts, corn and buckwheat were 0.3 ng/g for B₁ and G₁, and 0.1 ng/g for B₂ and G₂. Those in red pepper were 0.5 ng/g for B₁, B₂, G₁ and G₂.

(Received December 25, 2001)

Key words: アフラトキシン aflatoxin; 高速液体クロマトグラフィー HPLC; 光誘導化 photochemical derivatization; ミニカラム mini-column; 酸化マグネシウム magnesia

緒 言

我が国におけるアフラトキシン分析法は、厚生省食品衛生課長通知で公定試験法が規定されている^{1), *1}。しかし、環境への影響や作業者の健康に配慮し、クロロホルムなどの有害な溶媒を使用しない分析法が望まれている。そのためイムノアフィニティークラム (immuno affinity column, IAC)^{2), 3)} の検討や、Mycosep^{4), 5)}、MultiSep⁶⁾ や Isolute Multimode^{7), 8)} などの多機能カラム (Multifunctional column, MFC) を用いてクロロホルムを使用しない精製方法の検討が広く行われている。

検出法としては TLC^{1), 9)} や順相 HPLC^{10), 11)} から逆相 HPLC^{2), 8), 12)~14)} に変遷してきているが、逆相 HPLC では B₁, G₁ の蛍光強度が弱く誘導化して検出する必要がある。

誘導化法としてはトリフルオロ酢酸 (TFA)^{6), 8), 13)} や無水トリフルオロ酢酸 (TFAA)^{5), 7), 14)} によるプレカラム誘導化法やヨウ素溶液などを用いたポストカラム誘導化法^{3), 12)} が用いられている。プレカラム誘導化法は操作が複雑であり、ポストカラム誘導化法では反応槽や送液ポンプが必要で試薬の調製も複雑である。またアフラトキシンの分析においては確認法が必要であり、TLC では二次展開の手法^{14), 15)} が用いられるが HPLC では簡便な確認方法がない。

著者ら¹⁶⁾ はポストカラム光誘導化法を用いてペニシリン系抗生物質の残留分析法を開発し、その有用性について報告したが、Joshua¹⁷⁾ はポストカラムで紫外線を照射しアフラトキシン B₁ を B_{2a} に、G₁ を G_{2a} に誘導化する方法と紫外線照射の有無による簡易な確認法を報告している。

今回、より簡易で健康や環境に配慮した試験法を開発する目的で新規ミニカラムの開発と、光誘導化法の適用について検討を行った。

[†] 連絡先^{*} 大阪府立公衆衛生研究所: 〒537-0025 大阪市東成区中道 1-3-69^{*1} 新試験法の通知 (厚生労働省医薬品食品保健部監視安全課長通知 “カビ毒 (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 14 年 3 月 26 日, 食監第 0326001 号 (2002)) により本試験法は 2002 年 3 月 31 日で廃止された。

実験方法

1. 試料

生落花生は渋皮を除去せずにフードミルで粉碎後、更にフードプロセッサーで粉碎混合したものを用いた。コーンやそば粉、とうがらしは粉末状に加工されたものをそのまま用いた。

2. 試薬

1) 標準溶液: 標準品は Sigma 社製混合アフラトキシンキット (1 バイアル中 B₁: 25 µg, B₂: 7.5 µg, G₁: 25 µg, G₂: 7.5 µg 含有する) を用い、これをアセトニトリルで全量 25 mL とし標準原液とした (B₁, G₁: 1.0 µg/mL, B₂, G₂: 0.3 µg/mL 溶液)。標準原液を水-アセトニトリル (9:1) で希釈し各濃度の標準溶液とした。

2) 市販ミニカラム: Isolute Multimode (以下 Multimode) 500 mg/3 mL は International Sorbent Technology (IST) 社製を用いた。

3) 自家製ミニカラム: 酸化マグネシウムは Merck 社製分析用試薬を用いた。MFC 固相 Multimode バルク充てん剤 (粒径: 40~70 µm, 細孔径: 6 nm), 塩基性酸化アルミニウム固相 Isolute AL-B バルク充てん剤 (粒径 40~70 µm, 細孔径: 6 nm), 3 mL 容量のポリエチレンリザーバー (内径 8.7 mm) 及び 20 µm ポリエチレンフリットは IST 社製を用いた。ミニカラム A はポリエチレンカラムに塩基性酸化アルミニウム 0.4 g, Multimode 0.5 g の順で積層した。ミニカラム B は酸化マグネシウム 0.1 g, 塩基性酸化アルミニウム 0.4 g, Multimode 0.5 g の順で積層した。ミニカラム C は Multimode 0.5 g, 酸化マグネシウム 0.2 g, 塩基性酸化アルミニウム 0.4 g の順で積層した。

4) その他の試薬: アセトニトリル, メタノールは関東化学(株)製液体クロマトグラフ用試薬を用い、*n*-ヘキサン (以下ヘキサン) は和光純薬工業(株)製残留農薬分析用試薬を用いた。水はミリポア社製 MILLI-Q SP.TOC. により精製して用いた。ろ紙はアドバンテック東洋(株)製 5A 定性用ろ紙 (12.5 cm) を用いた。

3. 装置

1) HPLC 装置: 送液ポンプ LC-10AD 型, カラムオーブン CTO-10ACvp 型, 蛍光検出器 RF550A 型は (株)島津製作所製を用いた。オートサンプラー AS8020 型は東ソー(株)製を用いた。光誘導化装置は松下電器産業(株)製 GL-10 型殺菌灯に Aura 社製, 内径 0.25 mm, 外径 1/16", 長さ 20 m のニット状テフロンコイル (以下 KOT) をアルミ箔で固定して用いた。データ処理装置は Waters 社製 Millennium 2010 Ver. 2.18 を用いた。

2) その他の装置: ミル MX-X60 型及びフードプロセッサー MK-K57 型は松下電器産業(株)製を用いた。遠心管用振とう機は宮本理研工業(株)製 MW-S 型, 試験管振とう機は IKA 社製 MS1 型を用いた。遠心分離機は久保田商事(株)製 KN-70 型及びトミー精工(株)製 HF120 型小型遠心分離機を用いた。

4. 試験溶液の調製

粉碎試料の 10 g をポリプロピレン製遠沈管に量り採り, 水-アセトニトリル (1:9) 20 mL を加えて振とう機を用いて 15 分間激しく振とうして抽出した。これを毎分 3,000 回転 (1,650 g) で 10 分間遠心分離した。上澄液を傾斜 (とうがらしの場合はろ過) して抽出液を得た。そのうちの 2 mL をあらかじめメタノール 5 mL, 水-アセトニトリル (1:9) 5 mL で洗浄したミニカラム C を通過させ溶出液を採り, 更に水-アセトニトリル (1:9) 1 mL で溶出しこれを合わせて減圧下濃縮乾固した。濃縮乾固物に水-アセトニトリル (1:9) 1 mL を加えて溶かし試験溶液とした。とうがらしの場合は濃縮乾固物に水-アセトニトリル (1:9) 2 mL 及びヘキサン 1 mL を加えて試験管振とう機で激しく振とうした。この一部を小型遠心管にとり毎分約 6,000 回転 (2,000 g) で 5 分間遠心分離して, ヘキサン層, 色素層, 水-アセトニトリル層に分離し, 最下層の水-アセトニトリル層を試験溶液とした。

5. HPLC 条件

カラムは Inertsil ODS3 (4.6 mm i.d.×250 mm) ジーエルサイエンス(株)製を用いて, カラム温度は 45°C とし, 移動相は水-メタノール-アセトニトリル (60:20:20) を用いて流速 1.0 mL/min で送液した。試験溶液 20 µL を注入し, 励起波長 365 nm, 蛍光波長 450 nm で測定した。

6. 検量線の作成

B₁, G₁: 0.5 ng/mL; B₂, G₂: 0.15 ng/mL; B₁, G₁: 1.0 ng/mL; B₂, G₂: 0.3 ng/mL; B₁, G₁: 2.5 ng/mL; B₂, G₂: 0.75 ng/mL; B₁, G₁: 5.0 ng/mL; B₂, G₂: 1.5 ng/mL; B₁, G₁: 10.0 ng/mL; B₂, G₂: 3.0 ng/mL 及び B₁, G₁: 12.5 ng/mL; B₂, G₂: 3.75 ng/mL の濃度の標準溶液 20 µL を HPLC 装置に注入し, ピーク面積法により求めた (相関係数 B₁ (B_{2a}): $r=0.9999$, B₂: $r=0.9999$, G₁ (G_{2a}): $r=1.0000$, G₂: $r=0.9994$)。

7. 定量

試験溶液 20 µL を HPLC 装置に注入し, 得られたピーク面積から検量線により試験溶液中濃度を算出し, 試料中の濃度を求めた。

結果及び考察

1. ポストカラム光誘導化

Joshua¹⁷⁾ は光誘導化のため最適暴露時間 (KOT を通過する時間) を 3.12 分としている。著者らは Joshua と異なる装置を用いたため最適暴露時間は 1 分間 (流速 1.0 mL/min で 20 m の KOT) であった。その条件で絶対注入量が B₁, G₁: 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5 ng; B₂, G₂: 0.0015, 0.003, 0.015, 0.03, 0.15, 0.3, 0.75 ng となるように標準溶液を注入したところ, ピーク面積と注入絶対量との相関は, B_{2a}, B₂, G_{2a}, G₂ いずれも $r=1.0000$ であった。また, 誘導化を受ける B₁, G₁ と受けない B₂, G₂ に対するピーク面積の相関はいずれも $r=1.0000$ であり光誘導化が定量的に進行していることを確認した。

今回の実験で得られた検量線の直線性の範囲は、 B_1 , G_1 で 0.005~2.5 ng, B_2 , G_2 で 0.0015~0.750 ng であり、これらを生落花生中に換算すると B_1 , G_1 で 0.25~125 ng/g, B_2 , G_2 で 0.075~37.5 ng/g となる。一方, Shirai ら⁵⁾ は TFAA 誘導化法により B_1 , B_2 , G_1 , G_2 で 0.004~1 ng の直線性範囲を得ている (飼料中換算で 0.4~100 ng/g)。Dorner ら¹²⁾ はヨウ素法により B_1 , G_1 で 0.025~1.25 ng, B_2 , G_2 で 0.0075~0.375 ng (生落花生中に換算すると B_1 , G_1 で 1~50 ng/g, B_2 , G_2 で 0.3~15 ng/g) と報告している。これらと比較しても光誘導化法の直線範囲は広く、汚染濃度が広範囲にわたるアフラトキシンの分析に対して有効な誘導化法であると考えられた。

2. ミニカラムの検討

生落花生及びコーン、そば粉の無添加試料と B_1 , G_1 : 1.0 ng/g, B_2 , G_2 : 0.3 ng/g 添加の試料を Akiyama らの方法⁷⁾ に従って水-アセトニトリル (1:9) で抽出し、その抽出液 2 mL を Multimode カラムに負荷して溶出液を得た。溶出液は、生落花生では紫色に、コーンでは蛍光を持つ黄色に、そば粉では褐色に着色していた。この溶出液を HPLC 装置に注入して光誘導化して測定したが、コーンのクロマトグラム (Fig. 1-1) では妨害ピークがすべてのピークに重なっていた。一方、落花生はクロマトグラム上の妨害はないが、そば粉はコーン同様に著しく妨害を受けた。

Shirai ら⁵⁾ は Multimode と Mycosep #226 の 2 種類の MFC の比較検討を行い、コーンや飼料の分析において Multimode では夾雑ピークが多くみられることを指摘している。Shirai ら⁵⁾ はプレカラム誘導化を用い、著者らはポストカラム光誘導化を用いたため、 B_{2a} , G_{2a} のピークだけではなく夾雑ピークの出現位置が異なることも考えられ直接的な比較はできないが、やはり Multimode カラムのみの精製では不十分であった。Goda ら⁸⁾ は Multimode カラムでの精製で妨害が除去できない試料については、更に IAC による精製を行っている。

Fig. 1. Chromatograms of corn samples purified by different clean-up columns

Corn samples fortified with B_1 , G_1 to 1.0 ng/g and B_2 , G_2 to 0.3 ng/g (upper), or unfortified (lower).

そこで、著者らは Multimode カラムに古典的なクロマトグラフィー用充てん剤を用いてクリーンアップカラム自体の改良を検討した。まず、塩基性酸化アルミニウム 0.4 g を積層したカラム (ミニカラム A) について検討した。生落花生の色素はアルミナ層に保持されクロマトグラムもアフラトキシン以外のピークが消失していた。コーンはアルミナ層に黄色の色素が一部吸着していたが抽出液は着色しており、またクロマトグラム上の妨害は完全には取り除けなかった (Fig. 1-2)。

次にミニカラム A に追加積層する固相を検討した。シリカゲルでは効果がなく、フロリジルでは色素を吸着するが活性が強くアフラトキシンも吸着した。一方、酸化マグネシウム 0.1 g を積層したカラム (ミニカラム B) ではコーンの溶出液は無色透明となりクロマトグラム上の妨害ピークも消失していた (Fig. 1-3)。使用後のカラムは酸化マグネシウム層の最上部に黄緑の色素が吸着していた。このカラムに紫外線ランプを照射したところ、酸化マグネシウム層が強い蛍光を発した。このことから酸化マグネシウムがコーン中の蛍光物質を極めて効果的に吸着除去していることが判明した。そば粉の場合も無色透明の溶出液が得られクロマトグラム上の妨害ピークが消失した。また標準品の水-アセトニトリル (1:9) 溶液をミニカラム B に負荷したとき溶出液の濃度変化はなく、夾雑物は吸着するがアフラトキシンは吸着しないことを確認した。

しかし、ミニカラム B を作製後数か月保管した場合、クロマトグラム上 B_{2a} のピーク以降に妨害ピークが生ずることが分かった。空試験でもこのピークが出現することから、実験室の雰囲気中の物質が保管中に吸着するものと考えられた。そこで、カラムを使用直前にメタノール 5 mL、水-アセトニトリル (1:9) 5 mL で洗浄したところ、 B_{2a} 以降の妨害ピークは消失した。

3. ミニカラム C の作製

ミニカラム B で妨害ピークは消失したが、コーン抽出液を負荷したところ酸化マグネシウム層の黄色のバンドが若干広がる傾向があった。そこで酸化マグネシウム量を 0.1 g から 0.2 g に変更して妨害物質の吸着除去を更に確実なものとした。

この場合、3 種類の充てん剤を混合してミニカラムを作製しても同じ結果が得られるが、それぞれの充てん剤は粒度分布が著しく異なるため個別に計量する必要があった。充てんしやすさを考慮し Multimode、酸化マグネシウム、塩基性酸化アルミニウムの順に積層してミニカラム C を作製した。以下の実験では、このミニカラム C を用いた。

4. 試験溶液の調製の検討

4.1 試料量

アフラトキシンは試料中でその汚染範囲が数千倍に及ぶことがあり、ロットを代表するサンプリング方法や分析に際しての試料の粉碎量が重要である¹⁸⁾。水-アセトニトリル (1:9) を抽出溶媒として用いる試験法^{4), 5), 7), 8)} では、試料はロットを代表する量を粉碎混合した後、そのうちの

20~50 g を採取するのが一般的である。このとき、試料 10 g 当たりの抽出溶媒量は 20 mL となる。著者らは、操作の簡便性と使用溶媒量の抑制の理由から試料量は 10 g、抽出溶媒量は 20 mL としたのでこの試料量の妥当性について、以下のような検証を行った。

フードミルを用いて粉碎した生落花生の自然汚染試料に 20 倍量の非汚染試料を加え、試料調製法の通知¹⁹⁾に準拠してフードプロセッサですりつぶして均一に混合した。これより 10 g ずつ 5 試料を採取し本法に従い試験したところ、B₁ の検出値 (1.9~2.1 ng/g) の変動係数は 4.1% と満足のできる結果であった。試料量の妥当性は粉碎後の試料の均一性と密接な関係にあり、適切な試料調製を行えば試料量 10 g の分析が実用に耐えるものと考えられた。

4.2 ミニカラム C からの溶出

抽出液 2 mL を前処理したミニカラム C に負荷し流出液を分取した後、水-アセトニトリル (1:9) 1 mL を流すことにより、カラムからアフラトキシン全量を溶出することができた。合わせた溶出液を濃縮乾固後、水-アセトニトリル (9:1) 1 mL に溶解して試験溶液としたとき、とうがらしを除き他の試料では回収率及び夾雑ピークの除去ともに良好な結果が得られた。

5. とうがらしからの試験溶液の調製の検討

試料に溶媒を加え振とう抽出し遠心分離したとき、とうがらしでは上澄液に浮遊物が認められたためろ過して抽出液を得た。また、とうがらしではミニカラム C からの溶出液を濃縮乾固すると赤色の油状色素が残存した。この油状色素は水-アセトニトリル (9:1) には溶けずに無色の試験溶液が得られた。しかし、回収率は B₁ で 27% であった。このことから、アフラトキシンは油状の色素から水-アセトニトリル (9:1) へ十分に移行しないと考えられた。そこで、濃縮乾固物を水-アセトニトリル (1:1) に溶解したところ、すべてが均質に溶解したが著しく着色しており HPLC 装置に注入することができなかったため、ヘキサソンの分配を検討した。水-アセトニトリル (9:1) の量を 2 mL としヘキサン 1 mL と分配した。上層のヘキサン層は黄色に着色し、赤色の油状色素は中間層として存在し、水-アセトニトリル (9:1) 層は無色であった。ヘキサンと

分配することによりアフラトキシンは赤色色素層から水-アセトニトリル (9:1) 層へ移行して回収率は改善された。

6. 添加回収実験

試料中の濃度が B₁, G₁: 10.0 ng/g; B₂, G₂: 3.0 ng/g 及び B₁, G₁: 1.0 ng/g; B₂, G₂: 0.3 ng/g となるように試料 10 g に混合標準液 (B₁, G₁: 200 ng/mL; B₂, G₂: 60 ng/mL) 0.5 mL 又は (B₁, G₁: 20 ng/mL; B₂, G₂: 6 ng/mL) 0.5 mL を添加した。

とうがらしの低いレベルでの添加で B₂, G₂ の変動係数が 20% 前後と大きい、そのほかでは 80% 以上の回収率と 12% 以下の変動係数が得られた (Table 1)。

また、Fig. 2 にクロマトグラムを示すが、生落花生、コーン、そば粉では妨害ピークは出現しなかった。S/N=3 を検出下限とすると、生落花生、コーン、そば粉の検出下限は B₁, G₁ で 0.3 ng/g, B₂, G₂ で 0.1 ng/g 以下であった。

とうがらしでは、B_{2a}, G_{2a} のピーク周辺には妨害は見みられないものの G₂ ピークの近傍に G₂ 換算で 0.16 ng/g に相当する妨害ピークがあり、また B₂ 周辺に微小な妨害ピークが出現することから、検出下限は B₁, B₂, G₁, G₂ でいずれも 0.5 ng/g となった。また、生落花生、コーン、

Fig. 2. Typical chromatograms of samples

Fortified samples B₁, B₂, G₁, G₂ (10, 3, 10, 3 ng/g) (upper), fortified samples B₁, B₂, G₁, G₂ (1.0, 0.3, 1.0, 0.3 ng/g) and native (lower). Final sample volumes are 1 mL, except red pepper (2 mL)

Table 1. Recoveries of Aflatoxins from Peanuts, Corn, Buckwheat and Red Pepper

Sample	Added (ng/g)	Recoveries (%) (CV (%) ^{a)} , n=5			
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
Peanuts	B ₁ , G ₁ : 1.0, B ₂ , G ₂ : 0.3	84.7 (7.5)	86.7 (6.3)	95.3 (4.9)	90.7 (5.0)
	B ₁ , G ₁ : 10.0, B ₂ , G ₂ : 3.0	89.6 (7.4)	98.1 (3.3)	90.5 (9.4)	96.3 (3.4)
Corn	B ₁ , G ₁ : 1.0, B ₂ , G ₂ : 0.3	93.8 (3.1)	90.8 (4.4)	95.5 (7.7)	97.9 (8.2)
	B ₁ , G ₁ : 10.0, B ₂ , G ₂ : 3.0	85.7 (11.9)	92.2 (5.2)	85.5 (11.0)	90.8 (4.2)
Buckwheat	B ₁ , G ₁ : 1.0, B ₂ , G ₂ : 0.3	81.4 (9.7)	82.8 (2.9)	91.0 (2.5)	84.0 (8.0)
	B ₁ , G ₁ : 10.0, B ₂ , G ₂ : 3.0	91.3 (7.9)	91.8 (7.7)	91.9 (7.8)	86.8 (6.9)
Red pepper	B ₁ , G ₁ : 1.0, B ₂ , G ₂ : 0.3	88.2 (9.9)	102.7 (17.2)	105.6 (10.6)	141.9 (22.7)
	B ₁ , G ₁ : 10.0, B ₂ , G ₂ : 3.0	83.7 (3.7)	101.7 (2.0)	93.5 (1.4)	104.7 (3.8)

^{a)} CV: Coefficient of variation

そば粉、とうがらしのいずれのクロマトグラムにも次試料の分析を妨害するような遅れて溶出するピークは出現しなかった。そのため、20 分間隔での注入が可能であった。

7. アフラトキシンの確認

従来 TLC を用いた検出法の確認試験法としては展開溶媒を変えた二次展開法¹⁴⁾、一次展開後に薄層板上で TFA 誘導化し二次展開する方法¹⁵⁾ 及び HPLC を併用し確認する方法²⁰⁾ がとられている。HPLC のみの分析での確認試験法としては、Goda ら⁸⁾ がピークの蛍光スペクトルによる確認試験法を報告している。しかし、蛍光スペクトルによる確認法は、10 ng/g 程度以上の濃度が必要である⁸⁾。一方 Shirai ら⁵⁾ はアフラトキシンのピークを認めた場合に、TFAA による誘導化を省略した試験溶液を調製し B₁, G₁ 由来のピークが消失することによる確認法を報告しているが、操作が繁雑である。

試薬混合型の一般的なポストカラム誘導化法では試薬の注入を直ちに中止することはできないが、光誘導化法では紫外線ランプの電源スイッチをオフにすることで誘導化を直ちに停止させることができる。すなわち紫外線ランプの電源をオフにしたとき B₁, G₁ 由来の B_{2a}, G_{2a} のピークは理論上消失する。Joshua¹⁷⁾ は B₁, B₂ による自然汚染のコーンについて実験を行っており、紫外線ランプの電源をオフにしたとき B_{2a} のピークが消失することを確認している。著者らは自然汚染により B₁, B₂, G₁ 及び G₂ を検出したピーナッツバターを用いて検討を行った。Fig. 3 に光誘導化の有無によるクロマトグラムを示すが、光誘導化を行わない場合には B₁, G₁ 由来の B_{2a}, G_{2a} のピークは消失したが B₂ 及び G₂ のピークには変化が認められなかった。Joshua¹⁷⁾ の実験では、ランプをオフにしたときに G₂ 近傍の夾雑ピークが増加しているが、著者らの実験では B₁, B₂, G₁ 及び G₂ のピーク周辺の変化も軽微であり、夾雑ピークの影響を受けることなく確認が可能であった。したがって、B_{2a}, G_{2a} のピークを認めた場合、照射装置の電源をオフにして試料を再注入し、これらのピークが消失するか否かによってアフラトキシンの確認が可能であると考えられる。

Fig. 3. Chromatograms from peanut butter naturally contaminated with aflatoxins
Lamp on, and lamp off detection in photochemical reactor

結 論

酸化マグネシウムを積層したミニカラムを作製し、コーンなどの試料中のアフラトキシンの分析に用いたところクリーンアップに極めて有効であり、MFC 法の精製効率を格段に上げることができた。酸化マグネシウムは古典的なクロマト充填剤であり特許製品に比べ安価であるため、TLC に必要とされるスケールアップに対しても有効であると考えられる。

また、光誘導化法は検出濃度範囲の広いアフラトキシンの分析に対して検量線は十分な直線性を有し、光源のオン・オフによる簡易な確認が可能であった。

本法は、生落花生、コーン、そば粉及びとうがらし中のアフラトキシンの確認法を含め十分実用性のあるものと考えられた。

文 献

- 1) 厚生省食品衛生課長通知“カビ毒（アフラトキシ）を含有する食品の取り扱いについて”昭和46年3月16日、環食第128号(1971).
- 2) Groopman, J. D., Donhue, K. F., Aflatoxin, a human carcinogen: determination in foods and biological samples by monoclonal antibody affinity chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**, 861-867 (1988).
- 3) Barmark, A. L., Larsson, K., Immunoaffinity column cleanup/liquid chromatographic determination of aflatoxins: an interlaboratory study. *J. AOAC Int.*, **77**, 46-53 (1994).
- 4) Wilson, T. J., Romer, T. R., Use of mycosep multifunctional cleanup column for liquid chromatographic determination of aflatoxin in agricultural products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **74**, 951-956 (1991).
- 5) Shirai, Y., Sekiguchi, Y., Shimomura, M., Hayakawa, T., High performance liquid chromatographic simultaneous determination of aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂ in feed after clean-up with multifunctional cleanup column. *Shiryou Kenkyu Hokoku (Bulletin of National Fertilizer and Feed Inspection Station)*, **24**, 10-26 (1999).
- 6) Akiyama, H., Goda, Y., Tanaka, T., Toyoda, M., Determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in spices using a multifunctional column clean-up. *J. Chromatogr. A*, **932**, 153-157 (2001).
- 7) Akiyama, H., Chen, D., Miyahara, M., Toyoda, M., Saito, Y., Simple HPLC determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in nuts and corn. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **37**, 195-201 (1996).
- 8) Goda, Y., Akiyama, H., Otsuki, T., Fujii, A., Toyoda, M., Application and improvement of aflatoxin analysis in food using a multifunctional column and HPLC. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **42**, 56-62 (2001).
- 9) Kamimura, H., Nishijima, M., Yasuda, K., Ushiyama, H., Tabata, S., Matsumoto, S., Nishima, T., Simple rapid cleanup method for analysis of aflatoxins and comparison with various methods. *J. Assoc. Off. Anal.*

- Chem., **68**, 458-461 (1985).
- 10) Panalaks, T., Scott, M., Sensitive silica gel-packed flow-cell for fluorometric detection of aflatoxins by high pressure liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **60**, 583-589 (1977).
 - 11) Manabe, M., Goto, T., Matsuura, S., High-performance liquid chromatography of aflatoxins with fluorescence detection. *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 2,003-2,007 (1978).
 - 12) Dorner, J. W., Cole, R. J., Rapid determination of aflatoxin in row peanuts by liquid chromatography with postcolumn iodination and modified minicolumn clean-up. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**, 43-47 (1988).
 - 13) Takahashi, D. M., Reversed-phase high-performance liquid chromatographic analytical system for aflatoxins in wines with fluorescence detection. *J. Chromatogr.*, **131**, 147-156 (1977).
 - 14) Pharmaceutical Society of Japan, ed., "Standard Method of Analysis for Hygienic Chemists (1990)", Tokyo, Kanahara Shuppan, 1990, p. 404-407. (ISBN4-307-47028-1)
 - 15) Stubblefield, R. D., Kwolek, W. F., Stoloff, L., Determination and thin layer chromatographic confirmation of identity of aflatoxin B₁ and M₁ in artificially contaminated beef livers: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **65**, 1,435-1,444 (1982).
 - 16) Taguchi, S., Yoshida, S., Tanaka, Y., Hori, S., Simple and rapid analysis of penicillins in milk by HPLC using multidimensional on-line clean-up and post-column photolysis with UV detection. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **40**, 375-381 (1999).
 - 17) Joshua, H., Determination of aflatoxins by reversed-phase high performance liquid chromatography with post-column in-line photochemical derivatization and fluorescence detection. *J. Chromatogr. A*, **654**, 247-254 (1993).
 - 18) Yamamoto, K., Statistical consideration of sampling plan for mycotoxin test of granular agricultural products. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **32**, 487-497(1991).
 - 19) 厚生労働省医薬局食品保健監視安全課長通知 "アフラトキシン検査におけるサンプリングについて" 平成 13 年 8 月 16 日, 食監発第 177 号 (2001).
 - 20) Taguchi, S., Fukushima, S., Sumimoto, T., Yoshida, S., Nishimune, T., Aflatoxin in foods collected in Osaka, Japan, from 1988 to 1992. *J. AOAC Int.*, **78**, 325-327 (1995).