

## 総アフラトキシン試験法の妥当性評価

小阪田正和\* 吉光真人\* 福井直樹\* 梶村計志\*

アフラトキシンの規制値は B1 のみが対象であったが、指標が総アフラトキシンに変更された。国は総アフラトキシン試験法を通知したが、当所においても通知試験法に準じる試験法を採用した。国の示す農薬等の試験法に関する妥当性評価ガイドラインに準じて、評価を行なったところ、ライスペーパー、ポップコーン、ピーナッツ、アーモンドについて、選択性、真度（回収率）、精度、定量限界ともにガイドラインの目標値を満たし、この試験法が総アフラトキシンの規制値の適合判定に使用できることがわかった。

キーワード：総アフラトキシン、イムノアフィニティーカラム、蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ、高速液体クロマトグラフータンデム型質量分析計、妥当性評価

Key words: Total Aflatoxins, Immunoaffinity Column, FL-HPLC, LC-MS/MS, Validation

アフラトキシンを含有する食品については、平成 23 年に指標がアフラトキシン B1 から総アフラトキシン（アフラトキシン B1、B2、G1 及び G2 の総和）に変更された<sup>1)</sup>。それに伴い、食品中の総アフラトキシンの定量について試験法が通知された<sup>2)</sup>。

当該試験法では、試験溶液の精製に多機能カラムまたはイムノアフィニティーカラムを用いる方法が示されている。多機能カラムは穀類および種実類に、イムノアフィニティーカラムは香辛料や加工食品、その他多機能カラムで精製が不十分な試料に適用される。当所では当該試験法に準ずる方法として、穀類および種実を対象にイムノアフィニティーカラムを用いて試験を行うこととした。

農薬等の試験法については、平成 22 年に改定された「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」において、独自の試験法に加え、通知試験法についても、ガイドラインに定められた妥当性の確認が必要になった<sup>3)</sup>（平成 25 年 12 月より施行）。

総アフラトキシン試験法の通知でも、ガイドライン

に準じた妥当性評価の方法が示されており、当所で実施する試験法について、評価を行うこととした。ライスペーパー、ポップコーン、ピーナッツ、アーモンドの 4 種類の穀類および種実を対象とし、蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフおよび 2 機種的高速液体クロマトグラフータンデム型質量分析計を用いた試験法について、妥当性評価を行なった結果を報告する。

### 方法

#### 1. 試料

大阪府内で販売されていた、ライスペーパー、ポップコーン、ピーナッツ、アーモンドを用いた。なお、対象のアフラトキシンが含まれていないことを事前に確認した試料を用いた。

#### 2. 試薬、器具

2-1. 標準品：市販の混合標準溶液（SUPELCO 社製、アフラトキシン B1、B2、G1 及び G2 各 25mg/L）を用いた。

2-2. 標準溶液：標準品をアセトニトリルで希釈し、添加用標準溶液（250ng/mL、アセトニトリル）、検量線用標準溶液（0.2, 0.5, 1, 2, 5ng/mL、10% アセトニトリル溶液）を調製した。MS/MS 測定条件の検討には添加用標準溶液を希釈したものを用

\*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 食品化学課

Validation Study on A Method for Analysis of Total Aflatoxins

by Masakazu OSAKADA, Masato YOSHIMITSU, Naoki FUKUI and Keiji KAJIMURA

いた。

2-3. その他の試薬、器具：アセトニトリル、塩化ナトリウムは和光純薬工業（株）製の残留農薬 PCB 試験用、メタノールは残留農薬 PCB 試験用または LC/MS 用、酢酸アンモニウムは試薬特級、Phosphate Buffer Saline は組織洗浄用を用いた。水は Merck Millipore 社製 Milli-Q 純水製造装置 (Elix Advantage, Milli-Q Advantage A10) で精製した水 (比抵抗値 18.2MΩ・cm) を用いた。ガラス繊維ろ紙は GE Healthcare Life Sciences 社製 934-AH を用いた。15mL ポリプロピレン製遠沈管は Corning Science 社製を用いた。イムノアフィニティーカラムは堀場製作所（株）製 Smart Column AFLAKING を用いた。

### 3. 装置

ホモジナイザー：KINEMATICA 社製 POLYTRON PT10-35GT、遠心機：日立工機（株）製 CR20GⅢ、05PR-22、遠心エバポレーター：東京理化学器械（株）製 CVE-3100、蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ：LC；Waters 社製 alliance e2695, 蛍光検出器；Waters 社製 2475, 分析カラム；関東化学（株）製 Mightysil RP-18 GP (5μm, 4.6×150mm)、高速液体クロマトグラフータンデム型質量分析計：LC；Shimadzu 社製 Prominence, MS/MS；ABSciex 社製 API3200QTRAP, 分析カラム；SUPELCO 社製 ASCENTIS C18 (3μm, 2.1×150mm)、高速液体クロマトグラフータンデム型質量分析計：LC；Shimadzu 社製 NEXERA, MS/MS；ABSciex 社製 API4000QTRAP, 分析カラム；Waters 社製 ACQUITY UPLC HSS T3 (1.8μm, 2.1×100mm)

#### 4. 蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ測定条件

4-1. 移動相：水-メタノール (3:2)、流速：0.7mL/min、カラム温度：40℃、注入量：20μL

4-2. 検出条件：励起波長 365nm、検出波長 450nm

#### 5. 高速液体クロマトグラフータンデム型質量分析計測定条件

5-1. 移動相：A 液：0.5mM 酢酸アンモニウム

表 1. MS/MS 測定条件

(API3200QTRAP)			
	Transition Declustering Colligion Potential		
	(m/z)	(V)	(V)
Afratoxin B1	313	61	—
	313→241	61	47
Afratoxin B2	315	71	—
	315→259	71	35
Afratoxin G1	329	61	—
	329→243	61	33
Afratoxin G2	331	66	—
	331→245	30	30
上段：定量用イオン (SIM)			
下段：定性用イオン (MRM)			
(API4000QTRAP)			
	Transition Declustering Colligion Potential		
	(m/z)	(V)	(V)
Afratoxin B1	313→241	96	53
	313→284	96	33
Afratoxin B2	315→287	91	37
	315→259	91	41
Afratoxin G1	329→243	86	39
	329→200	86	59
Afratoxin G2	331→245	91	43
	331→115	91	115
上段：定量用イオン (MRM)			
下段：定性用イオン (MRM)			

表 2. 真度および精度の目標値

添加濃度 (μg/kg)	回収率 (%)	精度 (RSD%)	
		併行精度	室内精度
2.5	70~110	20≧	30≧

水溶液、B 液：0.5mM 酢酸アンモニウムメタノール、グラジエント条件：(Shimadzu 社製 Prominence)；(%B) Initial (40) → 10min (95) → 15min (95)、流速：0.2mL/min、カラム温度：40℃、注入量：10μL、(Shimadzu 社製 NEXERA)；(%B) Initial (40) → 5min (95) → 9min (95)、流速：0.2mL/min、カラム温度：50℃、注入量：5μL

5-2-1. MS/MS 測定条件：API3200QTRAP について対象とした 4 種のアフラトキシンの定量用 SIM および確認用 MRM を測定するメソッドを作成した。測定条件は下記のように設定した。アフラトキシンごとのパラメーターは表 1 に示した。

Ion mode : positive、Ion spray voltage : 5500 V、Turbo heater : 450 °C、Ion source gas 1 : 70psi、Ion source gas 2 : 60psi

5-2-2. MS/MS 測定条件：API4000QTRAP について対象とした 4 種のアフラトキシンの定量用および確認用 MRM を測定するメソッドを作成した。測定条件は下記のように設定した。アフトキシンごとのパラメーターは表 1 に示した。

Ion mode : positive、Ion spray voltage : 5500 V、Turbo heater : 500 °C、Ion source gas 1 : 75psi、Ion source gas 2 : 65psi

## 6. 抽出、精製

試料は殻等の非可食部を除去し、粉砕した。試料 50.0g を 500mL ポリプロピレン製遠沈管に採取し、塩化ナトリウム 5g およびメタノール水 (4:1) 200mL を加えて、ホモジナイザーで 2 分間抽出した。5000rpm で 10 分間遠心分離し、上清をメスフラスコに 10mL 採取し、MilliQ 水を加えて 50mL とした後、ガラス繊維ろ紙を用いてろ過し抽出液とした。その後、抽出液 10mL をイムノアフィニティーカラムに注入した後、10mL の MilliQ 水で洗浄し、カラムを 800rpm で 30 秒間遠心して水を除去した。アセトニトリル 1 回あたり 1mL を注入する操作を 3 回繰り返して、溶出液を 15mL ポリプロピレン製遠沈管に採った。遠心エバポレーターを用いて溶出液を 45°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。残留物に 100μL アセトニトリルを加え、5 分間超音波処理を行った後、MilliQ 水 900μL を加えてよく混和して試験溶液とした。

## 7. 妥当性評価

試料中の濃度が 2.5μg/kg になるように標準溶液を添加し、30 分間放置後、抽出、精製し、分析を行った。実施者 2 名がそれぞれ 2 併行の添加回収試験を 3 日間行い、真度、併行精度および室内精度を求め目標値 (表 2) と比較した。

表 3. 妥当性評価結果 (蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ 真度、精度)

アフラトキシン	回収率 (%)	精度 (RSD%)	
		併行精度	室内精度
(ライスペーパー)			
Afratoxin B1	86.4	3.25	2.99
Afratoxin B2	90.6	3.31	3.71
Afratoxin G1	89.1	3.87	4.63
Afratoxin G2	94.0	3.38	4.50
(ポップコーン)			
Afratoxin B1	74.2	2.32	4.16
Afratoxin B2	80.5	1.59	3.24
Afratoxin G1	81.5	3.39	4.13
Afratoxin G2	87.1	1.96	3.40
(ピーナッツ)			
Afratoxin B1	80.0	2.42	5.49
Afratoxin B2	83.5	2.49	4.42
Afratoxin G1	83.1	4.64	6.24
Afratoxin G2	86.3	3.47	5.41
(アーモンド)			
Afratoxin B1	78.6	1.76	2.13
Afratoxin B2	82.3	1.61	2.89
Afratoxin G1	84.1	2.49	3.44
Afratoxin G2	86.5	1.81	3.07

## 結果および考察

### 1. 選択性

アフラトキシンの含有が認められない試料から調製したブランク試料と、標準溶液を添加した試料から調製した添加試料のクロマトグラフを比較したところ、定量を妨害する夾雑ピークは、ライスペーパー、ポップコーン、ピーナッツ、アーモンドいずれの試料においても確認されなかった。

### 2. 真度、精度

表 3 に示すように、蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフにおいて真度は 74.2~90.6%であった。併行精度は 1.59~4.64%、室内精度は 2.13~6.24%であった。表 4 に示すように、高速液体クロマトグラフータンデム型質量分析計 (API3200QTRAP) において真度は 73.3~88.7%で

表 4. 妥当性評価結果（高速液体クロマトグラフータンデム型質量分析計 [API3200QTRAP] 真度、精度）

アフラトキシン	回収率 (%)	精度 (RSD%)	
		併行精度	室内精度
(ライスペーパー)			
Afratoxin B1	84.6	2.21	3.49
Afratoxin B2	88.7	1.32	2.73
Afratoxin G1	81.4	5.19	7.96
Afratoxin G2	88.3	5.18	6.18
(ポップコーン)			
Afratoxin B1	73.3	3.62	3.57
Afratoxin B2	78.0	0.74	3.22
Afratoxin G1	79.6	10.3	10.0
Afratoxin G2	86.7	6.51	7.04
(ピーナッツ)			
Afratoxin B1	75.8	1.67	4.32
Afratoxin B2	77.7	1.51	5.49
Afratoxin G1	74.9	4.75	8.59
Afratoxin G2	78.3	3.54	6.88
(アーモンド)			
Afratoxin B1	80.4	2.58	4.22
Afratoxin B2	83.6	3.24	4.95
Afratoxin G1	82.3	3.91	5.93
Afratoxin G2	85.5	3.36	5.19

表 5. 妥当性評価結果（高速液体クロマトグラフータンデム型質量分析計 [API4000QTRAP] 真度、精度）

アフラトキシン	回収率 (%)	精度 (RSD%)	
		併行精度	室内精度
(ライスペーパー)			
Afratoxin B1	87.0	3.61	7.73
Afratoxin B2	90.2	2.17	7.10
Afratoxin G1	89.1	3.57	5.61
Afratoxin G2	93.0	2.39	5.58
(ポップコーン)			
Afratoxin B1	73.3	5.04	6.64
Afratoxin B2	79.3	5.57	7.04
Afratoxin G1	83.6	10.9	11.6
Afratoxin G2	89.3	8.09	9.74
(ピーナッツ)			
Afratoxin B1	74.3	6.91	9.93
Afratoxin B2	76.2	8.14	9.76
Afratoxin G1	74.6	8.96	10.7
Afratoxin G2	74.9	9.45	9.87
(アーモンド)			
Afratoxin B1	74.6	8.51	21.3
Afratoxin B2	77.2	8.12	21.0
Afratoxin G1	81.9	9.01	21.4
Afratoxin G2	83.6	9.34	20.5

あった。併行精度は 0.74~10.3%、室内精度は 2.73~10.0%であった。表 5 に示すように、高速液体クロマトグラフータンデム型質量分析計 (API4000QTRAP) において真度は 73.3~93.0%であった。併行精度は 2.17~10.9%、室内精度は 5.58~21.4%であった。真度および精度は、いずれの測定機器でもすべての項目において、ガイドラインの目標値を満たす結果が得られた。

### 3. 定量限界

2.5µg/kg 添加試料の S/N 比を算出した。蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフでは Waters 社の定量解析ソフトウェア Empower2 を用い、高速液体クロマトグラフータンデム型質量分析計では ABSciex 社の MS 用定量解析ソフトウェア Analyst を用いて、ピークの前または後、約 2 分間をノイ

ズ範囲の対象とし、ピークおよびノイズの振れ幅の最大値の比を算出した。2.5µg/kg 添加試料において、いずれのアフラトキシンも S/N 比は 10 以上であり、この濃度での定量性を確認した。

## 結論

総アフラトキシンの試験法の妥当性評価を行った。試料中の濃度が 2.5µg/kg になるよう標準溶液を添加し、選択性、真度、精度、定量限界を評価した。通知された試験法が示すガイドラインに準じた目標値を満たす結果が得られた。

## 文献

- 1) 「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 日付け食安発 0331  
第 5 号 (2011)

- 2) 「総アフラトキシシンの試験法について」平成  
23 年 8 月 16 日付け食安発 0816 第 2 号 (2011)
- 3) 「食品中に残留する農薬等に関する試験法の  
妥当性評価ガイドラインの一部改正について」  
平成 22 年 12 月 24 日付け食安発 1224 第 1 号  
(2010)