

### 1-1. カビ毒試験法評価委員会組織

① 委員長：

田中敏嗣（神戸市環境保健研究所）

② 実務委員：

石黒瑛一（(財)日本食品分析センター）

永山敏廣（東京都健康安全研究センター）

中島正博（名古屋市衛生研究所）

堀江正一（大妻女子大学）

③ 統計学的評価委員：

山本勝彦（名古屋学芸大学短期大学部）

内藤成弘（（独）農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所）

④ 事務局（作業部会）：

小西良子（国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部）

鎌田洋一（国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部）

大西貴弘（国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部）

各委員の任期は1年間で、評価対象のカビ毒によって臨時委員を設けることがある。

なお、事務局は作業部会も兼ねており、分析法のプロトコールの作成、コラボティブスタディに用いる試薬の調製、配布、データの収集などを行う。事務局は評価には関与しない。

### 1-2. 評価委員会による試験法の評価までの流れ

1) 委員会に属する作業部会委員がプロトコール(案)を作成し、委員会に提出する。

2) 委員会はプロトコールのプレビューし、必要な修正を申し出でる。

3) 作業部会は修正し国立医薬品食品衛生研究所のHPに掲載し、一般からのパブリックコメントを求める。

4) パブリックコメントを委員会が検討し、さらに必要であれば適切な修正を申し入れる。

5) これらの修正がなされたプロトコールを最終的なコラボティブスタディ用プロトコールとしてHPに掲載し、同時に一般からのコラボティブスタディ参加機関(11-12機関)を募る。

6) 作業部会が試料等を作成し、コラボティブスタディを実施する。

7) 結果を作業部会がまとめ、委員会に提出する。

8) 委員会は、その結果を基に分析法の妥当性の有無を評価する。

9) 妥当性があると評価された方法はHPに公開する。

### 2. ピーナッツ中の総アフラトキシン試験法の妥当性確認のためのコラボティブスタディ

2-1. 11の参加機関に以下に示す実施要領及びプロトコールを配布し、精製カラムとして多機能カラム及びイムノアフィニティークラムを用い、HPLC及びLC/MSで測定する試験法の妥当性を検討した。さらに、抽出溶剤として使用するアセトニトリルの供給が不安定であることから、代替え溶剤としてメタノールを用いて試験法の妥当性を検討した。

#### 2-1-1. トータルアフラトキシンの共同分析 コラボ実施要領

1. 目的:本共同分析の目的は、ピーナッツの総(トータル)アフラトキシンをイムノアフィニティークラムまたは多機能カラムによる精製後、蛍光検出器を接続した高速液体クロマトグラフ(以下HPLCと略す)ま

たは高速液体クロマトグラフ・質量分析計  
(以下 LC/MS と略す) で検出する分析法  
をバリデートすることである。

## 2. 試験実施期間

平成 21 年 3 月 25 日～平成 21 年 4 月 17 日

## 3. 配付物

(1) 室間共同試験の実施要領 (本紙) 6 枚

(2) 別紙-「ピーナッツ中のトータルアフラ  
トキシンの分析法」 7 枚

(3) プロトコール 1 枚および結果記入用紙 2  
枚: エクセルファイル (あらかじめ電子メ  
ールでも送付します。)

(4) 返信用封筒 1 枚

(5) 試験に用いる一部の試薬、器具等 (詳細  
については 4. 試薬及び 5. 器具等の項を参  
照)

- ・イムノアフィニティーカラム
- ・前処理用多機能カラム
- ・HPLC 用カラム
- ・アフラトキシシン標準液…B1, G1 1.0  
µg/mL、B2, G2 0.3 µg/mL (スペルコ製)
- ベンゼン:アセトニトリル=98:2 溶液 1 本、  
1 mL
- ・添加用アフラトキシシン溶液…各濃度 2 本  
4 種類 (試料番号) 計 8 本 1.0 mL (密閉遮  
光ビン)

(6) 測定試料

- ・イムノアフィニティーカラム用試料; ピ  
ーナッツ粉砕 440 g 入り 1 袋 (添加用)
- ・多機能カラム用試料; ピーナッツ粉砕 440  
g 入り 2 袋 (添加用)
- ・多機能カラム用自然汚染試料; ピーナツ  
粉砕 53 g 入り 4 袋 (アルミパック、3 桁  
試料番号)

## 4. 試薬

4-1. 御用意いただく試薬

(1) アセトニトリル: HPLC 用; 高速液体ク  
ロマトグラフ用

抽出、その他; 高速液体クロマトグラフ用  
(特級でも良い)

(2) メタノール: HPLC 用; 高速液体クロマ  
トグラフ用

抽出、その他; 高速液体クロマトグラフ用  
(特級でも良い)

(3) 水 (試験操作に使用): 精製水又は蒸留  
水

(4) 水 (クロマトグラフィーに使用): HPLC、  
LC/MS (または LC/MS/MS) の移動相とし  
て適したもの

(5) トリフルオロ酢酸 (以下 TFA と略す)  
(注: 無水物は使用不可)

(6) 抽出溶媒 (前処理用多機能カラム: メタ  
ノール抽出)

メタノール [4.1 (2)] 95 に対し水 [4.1 (3)] 5 の  
割合で混合する。

(7) 塩化ナトリウム: 特級

(8) 抽出溶媒 (イムノアフィニティーカラム  
用) メタノール [4.1 (2)] 80 に対し水 [4.1 (3)]  
20 の割合で混合する。

(9) イムノアフィニティーカラム用希釈  
液: PBS 錠 (配付) [4.2 (5)] 10 個を 1000 mL  
メスフラスコにとり、約 800 mL の精製水  
で溶解後、精製水にて 1000 mL に定容する。

(10) 注入溶媒 (TFA 反応液を希釈する溶媒)  
アセトニトリル [4.1 (1)] 1 に対し、水 [4.1 (4)]  
9 の割合で混合する。

(11) HPLC 移動相

アセトニトリル [4.1 (1)] 1 に対し、メタノー  
ル [4.1 (2)] 3、水 [4.1 (4)] 6 の割合で混合する。

(12) 10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液  
酢酸アンモニウム (特級) を秤量し、水に [4.1  
(3)] 溶かす。

(13) LC/MS 移動相

アセトニトリル [4.1 (1)] 2 に対し、メタノール [4.1 (2)] 6、10 mmol/L 酢酸アンモニウム [4.1 (12)] 15 の割合で混合する。

(14) LC/MS/MS 移動相 (LC/MS/MS を行う場合) メタノール [4.1 (2)] 62、10 mmol/L 酢酸アンモニウム [4.1 (12)] 38 の割合で混合する。

(15) 抽出溶媒(前処理用多機能カラム:アセトニトリル抽出)アセトニトリル [4.1 (1)] 90 に対し水 [4.1 (3)] 10 の割合で混合する。

4-2. 配布する試薬

(1) イムノアフィニティーカラム 10 本

(2) 前処理用多機能カラム 24 本

(3) アフラトキシン標準液…B1, G1 1.0 µg/mL、B2, G2 0.3 µg/mL (スペルコ製) ベンゼン:アセトニトリル=98:2 溶液 1 本、1 mL

(4) 添加用アフラトキシン溶液…各濃度 2 本 4 種類 (乱数番号、2 桁算用数字) 計 8 本 (密閉遮光ビン) 各 1.0 mL

(5) PBS 錠剤MP Biomedicals,LLC 製 1 袋

1. 器具等

1-1. 御用意いただく器具等

(1) ワーリングブレンダー又はポリトロン型ホモジナイザー (例: 日本精機社製ホモジナイザー)

(2) 抽出用容器

専用のブレンダーカップ 500 mL 用等 (ワーリングブレンダーを用いる場合)

三角フラスコ等 (ポリトロン型ホモジナイザーを用いる場合)

(3) 化学天秤; 0.1 g のレンジまで正確に量れるもの

(4) ピペッターまたはホールピペットなど

正確に量れるもの

(5) メスシリンダー (100 mL 容他)

(6) メスフラスコ (5 mL 容、20 mL 容、1 L 容他)

(7) 共栓付き三角フラスコ (200 mL 容が適当)

(8) ろ紙 (Whatman No.4、18 cm) か同等品

(9) ガラス繊維ろ紙 (Whatman 934AH、15 cm) か同等品

(10) ガラスロート (直径 9 cm および 7.5 cm)

(11) 三角フラスコまたはビーカー

(12) カラム架台 (カラムスタンド) またはバキュームマニホールド

(13) ストップコック: 固相抽出用 (必要であれば)

(14) リザーバー; リザーバー容量が 10 mL 以上のもの (例: 30 mL 容 (Waters 製)、注射筒でも可)

(15) アダプター; イムノアフィニティーカラムとリザーバー連結用 イムノアフィニティーカラムに合うもの

(16) キリ等; イムノアフィニティーカラムの上キャップに穴を開けるための先端の尖ったもの

(17) アルミブロックヒーター; 溶媒濃縮のために使用、窒素吹き付けが可能なもの。約 50 °C まで加温ができ、温度制御が可能なもの。

(18) エバポレーター (アルミブロックヒーターを使用する場合は不要) 溶媒濃縮のために使用 ウォーターバス (室温+5 °C ~ 80 °C 以上程度までの設定が可能なもの) 付き

(19) 共栓付き 10 mL 容目盛りつき試験管

(20) キャップ付きバイアル (褐色シラン処理、2 mL または 4 mL、例 SupeLco 製 SiLanized Amber Screw Top ViaL) か同等品

(21) HPLC、LC/MS 用バイアル (バイアル中での吸着、オートサンプラー測定での室温放置時間等による減衰なども事前に確認しておくこと。バイアルは褐色シラン処理したものが望ましい)

(22) 試験管ミキサー (Vortex 等)  
超音波照射装置 (Vortex で試験溶液が溶けたことが確認できれば不要)

(23) シリンジ (1 mL 容等: 試験溶液ろ過用、例硝子製ルアーコック先付き注射筒 東京ガラス器械、10 mL~20mL 容等: イムノアフィニティーカラムリザーバー用、例硝子製注射筒 東京ガラス器械、イムノアフィニティーカラム通気用、例テルモシリンジ)

(24) 0.45  $\mu\text{m}$  メンブランフィルター (試験溶液ろ過用、例ミリポア社製マイレクス LH13)

(25) 高速液体クロマトグラフ (HPLC)  
蛍光検出器; キセノンランプ、励起波長 365 nm および蛍光波長 450 nm が装置の設定範囲にあるもの  
送液ポンプ; 定流量送液が可能で少なくとも 0.1~3.0 mL の範囲での流量設定が可能なもの  
カラムオープン; 室温~60  $^{\circ}\text{C}$  程度まで 1  $^{\circ}\text{C}$  以下刻みで設定が可能なもの、仕様上の温度安定性が  $\pm 0.2$   $^{\circ}\text{C}$  未満のもの  
オートサンプラー (オートインジェクター); 1  $\mu\text{L}$  刻みで 1  $\mu\text{L}$ ~今回の測定における注入量までの設定が可能なもの  
データ処理装置; PC またはインテグレーター

一等

(26) 高速液体クロマトグラフー質量分析計 (LC/MS)

(LC/MS/MS を用いてもよい。)

質量分析計; ESI のイオンソースが付いているもの、質量範囲が  $m/z 50\sim 800$  程度まで設定可能なもの

送液ポンプ; できればグラジエント分析が可能なもの (例えばデュアルポンプ、溶媒混合ミキサーの付いているもの)、定流量送液が可能で少なくとも 0.1~3.0 mL の範囲での流量設定が可能なもの

カラムオープン; 室温~80  $^{\circ}\text{C}$  程度まで 1  $^{\circ}\text{C}$  以下刻みで設定が可能なもの、仕様上の温度安定性が  $\pm 0.2$   $^{\circ}\text{C}$  未満のもの

できればオートサンプラー (オートインジェクター); 1  $\mu\text{L}$  刻みで 1  $\mu\text{L}$ ~今回の測定における注入量までの設定が可能なもの  
データ処理装置; PC またはインテグレーター等

(27) HPLC 用カラム (例)

ステンレス管充てんカラム、充てん剤 ODS、内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 3~5  $\mu\text{m}$  Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス社製)、Shodex Silica C18M 4E (昭和電工社製) 及び Cadenza CD-C18 (インタクト社製)、Mightysil RP-18GP (関東化学社製) 等

(28) LC/MS (または LC/MS/MS) 用カラム (例)

セミマイクロ分析用ステンレス管充てんカラム、充てん剤 ODS、内径 1.5~2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 3~5  $\mu\text{m}$

5.2. 配付する器具等

(1) HPLC 用カラム 1 本

6. 分析について

(1) 多機能カラム用自然汚染試料 (4 袋) 及

び添加用アフラトキシン溶液 (8 本) [4.2 (4)] には試料番号としての算用数字が付してあります。添加用アフラトキシン溶液 [4.2 (4)] は量り採った多機能カラム用 (アセトニトリル抽出とメタノール抽出) 試料とアフィニティーカラム用試料に添加してください。分析は試料番号毎に行い、結果は試料番号毎に報告して下さい。したがって、合計 28 の試料について HPLC と LC/MS (または LC/MS/MS) での結果が出てきます。

(2) 冷蔵、冷凍保存しておいた試料、アフラトキシン標準液 [4.2 (3)]、添加用アフラトキシン溶液 [4.2 (4)] およびイムノアフィニティーカラム [4.2 (1)] は室温に戻してから、作業を開始してください。

#### (3) 検量線の作成方法

アフラトキシン標準液 (配付) [4.2 (3)] をもちいて別紙「ピーナッツ中のトータルアフラトキシンの分析法」を参考に作成してください。

#### (4) 分析用バイアルについて

望ましくはシラン処理褐色バイアル [5.1 (20)] を 20-30 %のアセトニトリル水で洗浄し、乾燥したものです。通常のガラスバイアルを使用する場合はアフラトキシンの吸着のないことをご確認ください。

#### (5) 多機能カラム用自然汚染試料の実施手順

① 算用数字を付した袋から試料 50.0 g を抽出用容器 [5.1 (2)] に量り採って下さい。アセトニトリル抽出には番号 101~122 をメタノール抽出には番号 123~144 を用いてください。

② 別紙「ピーナッツ中のトータルアフラトキシンの分析法」に従い、多機能カラムでの前処理を行い、分析を実施して下さい。

#### (6) 添加用試料の実施手順

① 440 g の試料が入ったバックから 50.0 g を抽出用容器 [5.1 (2)] に各々量り採って下さい。多機能カラム：アセトニトリル抽出用 n=8、多機能カラム：メタノール抽出用 n=8、イムノアフィニティーカラム用 n=8 です。

② 算用数字を付した添加用アフラトキシン溶液 (配付) [4.2 (4)] 200  $\mu$ L を正確に量り、①で採取した試料にそれぞれ添加して下さい。多機能カラム用 (アセトニトリル抽出とメタノール抽出) とイムノアフィニティーカラム用に各番号の溶液を合計 600  $\mu$ L 用います。

③ 添加した試料の入った容器に栓をしないで、暗所に 1 時間放置して下さい。

④ 別紙「ピーナッツ中のトータルアフラトキシンの分析法」に従い、分析を実施して下さい。

(7) LC/MS (または LC/MS/MS) 分析は、HPLC を実施した試料溶液について、同様の測定 (定量分析) をお願いします。

(8) HPLC および LC/MS (または LC/MS/MS) についてはアフラトキシン標準溶液を測定した場合の S/N=3 の検出限界 (LOD) と S/N=10 の定量限界 (LOQ) を結果に分析成績表に記載してください。

(9) 分析値は ng/g で示し、小数点第 2 位は切り捨て、小数点第 1 位まで求めて報告願います。なお、操作中の不具合等により測定できなかった場合は、結果欄に「-」を記載し、具体的にその理由を明記して下さい。

#### 7. 試料等の保存方法

アフラトキシン標準溶液、添加用アフラトキシン溶液、試料は -20  $^{\circ}$ C で保存してください。イムノアフィニティーカラムは使

用するまで冷蔵（約 5℃）で保管し、多機能カラム、PBS 錠剤は室温保存してください。

## 8. 結果の報告

### (1) 提出していただくもの

#### ① 結果記入用紙

・あらかじめ電子メールで送付した「分析成績表」に示した項目に記入の上、プリントアウトしたもの一部尚、「6. 分析」において、別紙「ピーナッツ中のトータルアフラトキシンの分析法」と異なる方法で定量した場合には、用いた方法の詳細について「分析成績表」の「変更点」、「測定条件・検出限界・定量限界」の欄に記入し報告してください。

#### ② クロマトグラム等

・クロマトグラム等：HPLC および LC/MS（または LC/MS/MS）について、アフラトキシンの検量線にもちいたクロマトグラム（6 濃度分全て）および全ての試料溶液のクロマトグラムのコピー

・検量線：HPLC および LC/MS の検量線のコピー

### (2) 提出先（お問合せ先）

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部  
部長 小西良子（または第 4 室室長 鎌田洋一）

住所 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

電話番号 03-3700-1141、FAX 番号 03-3700-9527

e-mail: ykonishi@nihs.go.jp（小西）、  
ykamata@nihs.go.jp（鎌田）

### (3) 提出期限

平成 21 年 4 月 17 日

### (4) 送付方法

結果記入用紙およびクロマトグラム等を、配付した返信用封筒に入れて郵送で送付願います。また、同時に「分析成績表」を添付ファイルとして電子メールで送信して下さい。クロマトグラムは電子媒体でお送り頂く必要はありません。

## 2-1-2. 「ピーナッツ中のトータルアフラトキシンの分析法」コラボラティブスタディプロトコール [ ] 内数字は、要項参照 操作手順

### 1. 抽出

多機能カラム用（アセトニトリル抽出）

(1) 多機能カラム用試料 50.0 g を抽出用容器 [5.1 (2)] に量り採る。

(2) 自然汚染試料の場合は、これに抽出溶媒 [4.1 (15)] アセトニトリル：水（90：10）200 mL を加え、5 分間程度静置した後、ブレンダー [5.1 (1)] で 5 分間（3000 rpm が適当）ブレンドする。

添加用試料の場合は、添加用アフラトキシンの溶液を 200 μL 添加して暗所に 1 時間放置後に抽出溶媒を加える。（要領参照）

(3) ガラスロート [5.1 (10)] にろ紙（Whatman No. 4 か同等品）[5.1 (8)] をセットし、ろ過するか、または遠心分離（3000 rpm, 5 分間）する。ろ液を共栓付き三角フラスコ [5.1 (7)] にとる。

多機能カラム用（メタノール抽出）

(1) 多機能カラム用試料 50.0 g を抽出用容器 [5.1 (2)] に量り採る。

(2) 自然汚染試料の場合は、これに抽出溶媒 [4.1 (6)] メタノール：水（95：5）200 mL を加え、5 分間程度静置した後、ブレンダー [5.1 (1)] で 5 分間（3000 rpm が適当）ブレンドする。

添加用試料の場合は、添加用アフラトキシ

ン溶液を200 μL添加して暗所に1時間放置後に抽出溶媒を加える。(要領参照)

(3) ガラスロート [5.1 (10)] にろ紙 (Whatman No. 4 か同等品) [5.1 (8)] をセットし、ろ過するか、または遠心分離 (3000 rpm, 5 分間) する。ろ液を共栓付き三角フラスコ [5.1 (7)] にとる。

イムノアフィニティーカラム用

(1) イムノアフィニティーカラム用試料 50.0 gを抽出用容器 [5.1 (2)] に量り採る。

(2) 添加用アフラトキシン溶液を200 μL 添加して、暗所に1時間放置する。(要領参照) これに塩化ナトリウム5.0g [4.1 (7)] および抽出溶媒 [4.1 (8)] メタノール：水 (8：2) を200 mLを加え、5分間程度静置した後、5分間 (3000 rpmが適当) ブレンドする。

(3) ガラスロート [5.1 (10)] にろ紙 (Whatman No. 4 か同等品) [5.1 (8)] をセットし、ろ過する。ろ過が困難な場合は遠心分離 (3000 rpm, 5 分間) する。ろ液を共栓付き三角フラスコ [5.1 (7)] にとる。

## 2. カラムによる精製

(1) 前処理用多機能カラム精製法

① 多機能カラム (配付) [4.2 (2)] をカラム架台 [5.1 (12)] にセットする。

(多機能カラムでフリットと充填剤の間に隙間がある場合は上から針で押して密着させる。)

② アセトニトリル抽出の場合：ろ液2.5-3 mL を多機能カラムにゆっくり注入し、1分間に1.0 mL以下の流速で流出する。最初に溶出される流出液1 mL (1~1.2 mL) を目盛り付き試験管 [5.1 (19)] に集める。(ろ

液が少なくなったために分画している途中に流速が落ちた場合はカラム上部にろ液を加える。) メタノール抽出の場合：ろ液2.5-3 mL を多機能カラムにゆっくり注入し、1分間に1.0 mL以下の流速で流出する。最初に溶出される流出液1 mL を目盛り付き試験管 [5.1 (19)] に集め捨て、次の流出液1 mL (1~1.2 mL) を目盛り付き試験管 [5.1 (19)] に集める。(ろ液が少なくなったために分画している途中に流速が落ちた場合はカラム上部にろ液を加える。)

③ HPLC分析の場合、その試料溶液の0.5mL をキャップ付きバイアルあるいは同等品 [5.1 (20)] に正確にとり、窒素気流 [5.1 (17)] を送るかエバポレーター [5.1 (18)] を用いて溶媒を除去し、乾固する。

④ 残さにトリフルオロ酢酸 (TFA) [4.1 (5)] 0.1 mL を加え、密栓して試験管ミキサー [5.1 (22)] 等で激しく攪拌する。室温、暗所で15分間放置したのち注入溶媒 [4.1 (10)] アセトニトリル：水 (1：9) 0.4 mL を加えて混和したものをHPLC用試験溶液とする。

⑤ LC/MS (またはLC/MS/MS) 分析の場合、②で得られた試験溶液の0.4 mL をキャップ付きバイアルあるいは同等品 [5.1 (20)] へ正確にとり、窒素気流 [5.1 (17)] を送るかエバポレーター [5.1 (18)] を用いて溶媒を除去する。残さをLC/MS移動相 [4.1 (13)] 0.4 mL で溶解後、高速液体クロマトグラフ-質量分析 (LC/MS) 用試験溶液とする。LC/MS/MSの場合は残さをLC/MS/MS移動相 [4.1 (13)] 0.4 mL で溶解後、LC/MS/MS用試験溶液とする。

(2) イムノアフィニティーカラム精製法  
＜イムノアフィニティーカラムの取り

扱い上の注意>

カラム内にはPBS が充填されていて、カラム上部には僅かに空気が入っている。そのため、横に倒すと空気がカラム (充填剤) に触れてしまい、その結果良好な回収率が得られなくなるため、保存時から分析終了時まで直立の状態を保っている必要がある。もし、ゲル上の白いフリット表面に気泡が溜まっていたら、タッピングして除去すること。

① イムノアフィニティーカラム (配付)

[4.2 (1)] は室温になるまで放置する。

② きり等 [5.1 (16)] でイムノアフィニティーカラムの上キャップに穴を開けてから上キャップをはずした後、下キャップをはずし、必要であれば開栓したストップコック [5.1 (13)] を取り付け、カラム架台あるいはバキュームマニホールド [5.1 (12)] にセットする。カラム内溶液を自然落下で排出後、あらたにPBS [4.1 (9)] でカラム内を満たし、自然落下で排出させる。再度PBS [4.1 (9)] でカラム内を満たし、PBS [4.1 (9)] を半分程排出させた後、ストップコック [5.1 (13)] を閉じるか下キャップを付ける。

③ 「1. 抽出」の操作で得られたろ液10.0 mLを正確にピペッターまたはホールピペットなどで [5.1 (4)] 50 mL のメスフラスコ [5.1 (6)] へとり、標線までPBS [4.1 (9)] を加え、良く混合する。

④ ガラスロート [5.1 (10)] にガラス繊維ろ紙 [5.1 (9)] をセットしろ過を行う。ろ液を三角フラスコ [5.1 (11)] にとる。

⑤ アダプター [5.1 (15)] でリザーバー [5.1 (14)] とカラムを連結する。

⑥ ④で得られた希釈したろ液10.0 mL をピペッターまたはホールピペットで [5.1

(4)] 正確にとりイムノアフィニティーカラムに注入する。ストップコックを開き、1~2滴/秒の速さでろ液を排出させる (途中、排出速度が非常に遅くなった場合には、ゲル上の白いフリット表面に泡が付着していることがあるので、リザーバーおよびカラムを手で保持し試料ろ液がこぼれないよう注意し、カラムを指等でタッピングし泡を取り除く)。全てのろ液を排出させたのち、リザーバー [5.1 (14)] を取り除き、カラムをPBS [4.1 (9)] 10 mL 以上および精製水 [4.1 (3)] 10 mL 以上で洗浄し、アダプターを取り付けたシリンジ [5.1

(24)] 等で強く通気しカラム内の水分を十分に追い出す。その後共栓付き10 mL容目盛りつき試験管 [5.1 (19)] あるいは5 mL容メスフラスコ [5.1 (6)] にアセトニトリル [4.1 (1)] 1 mL で溶出し5分間放置後、アセトニトリル [4.1 (1)] を1 mL ずつ2回、合計3 mL で溶出させ、さらにアダプターを取り付けたシリンジ [5.1 (24)] 等で強く通気し、ゲル内のアセトニトリルを排出させ、アセトニトリル [4.1 (1)] で5 mLに定容し良く混合する。

⑦ HPLC分析の場合、その試験溶液2.5 mL をキャップ付きバイアルあるいは同等品 [5.1 (20)] に量り採り、窒素気流 [5.1 (17)] を送るかエバポレーター [5.1 (18)] を用いて溶媒を除去する。

⑧ 残さにTFA [4.1 (5)] を0.1 mL 加え、密栓をして試験管ミキサー [5.1 (22)] 等で激しく攪拌する。室温、暗所で15分間放置したのち注入溶媒 [4.1 (10)] 0.4 mL を加えたものをHPLC 用試験溶液とする。



⑨ LC/MS (またはLC/MS/MS) 分析の場合、⑥で得られた試験溶液2.0 mLをキャップ付きバイアルあるいは同等品 [5.1 (20)] に量り採り、窒素気流 [5.1 (17)] を送るかエバポレーター [5.1 (18)] を用いて溶媒を除去する。LC/MS 移動相 [4.1 (13)] 0.4 mL で残さを溶解したものをLC/MS 用試験溶液とする。LC/MS/MSの場合は残さをLC/MS/MS移動相 [4.1 (13)] 0.4 mL で溶解後、LC/MS/MS用試験溶液とする。

### 3. 試料溶液の調製

「2. カラムによる精製」で作製した試験溶液はシリンジ [5.1 (24)] (1 mL容が適当) で吸い上げ、孔径0.45  $\mu\text{m}$  メンブランフィルター [5.1 (25)] を装着し、ろ過し、そのろ液をHPLCおよびLC/MS 用ガラスバイアル [5.1 (21)] にうつす。または、エッペンドルフ用チューブなどにうつし、10,000 rpm 以上、5 分間遠心し、その上清をHPLC およびLC/MS 用ガラスバイアル [5.1 (21)] にうつす。

### 4. 高速液体クロマトグラフ (HPLC) による測定

HPLC [5.1 (26)] を用いて試験溶液について測定を行う。

#### (1) 測定条件 (例)

カラム充てん剤 オクタデシルシリル化シリカゲル (粒径3~5  $\mu\text{m}$ ) を用いる。

カラム [5.1 (28)] 内径4.6 mm、長さ150 mm 又は250 mm

カラム温度 40  $^{\circ}\text{C}$

HPLC 移動相 [4.1 (11)] アセトニトリル・メタノール・水 (1:3:6) を用いる。

流速 0.6-1.0 mL/min

検出波長 励起波長365 nm、蛍光波長

450 nm で測定する。

注入量 20-100  $\mu\text{L}$  (50  $\mu\text{L}$  が適当)

#### (2) アフラトキシン検量線の作成

① アフラトキシン標準液 (配付) [4.2 (3)] を室温に戻した後、100  $\mu\text{L}$  をピペッター [5.1 (4)] でキャップ付きバイアル (褐色シラン処理) [5.1 (20)] にとり、アセトニトリル [4.1 (1)] 900  $\mu\text{L}$  を加え密栓後、試験管ミキサー等 [5.1 (22)] で完全に溶解する。(スタンダード1:100 ng/mL 溶液 (B1, G1 の濃度: 以下同様))。

② ①で作製したスタンダード1:

100ng/mL 標準溶液100  $\mu\text{L}$  をキャップ付きバイアル (褐色シラン処理) [5.1 (20)] にとり、アセトニトリル [4.1 (1)] 900  $\mu\text{L}$  を加え密栓後、良く攪拌する (スタンダード2:10ng/mL 溶液)。その後下表に従い、スタンダード1 と2 をHPLC 用バイアル [5.1 (21)] にピペッター [5.1 (4)] で分注し、窒素気流 [5.1 (17)] を送るかエバポレーター [5.1 (18)] を用いて溶媒を除去する。

③ 乾固した残さにTFA [4.1 (5)] 0.1 mL を加え、密栓をして激しく攪拌する。室温、暗所で15分間、放置したのち注入溶媒 [4.1 (10)] 0.4 mL を加えて混和したものをHPLC 用検量線溶液とする。

④ 作製した6 濃度の検量線用溶液50  $\mu\text{L}$  (試験溶液の注入量が50  $\mu\text{L}$  の場合、試験溶液の注入量に合わせる) をHPLC に注入し、ピークの高さまたはピークの面積で検量線を作成する。

#### (3) 定量

試験溶液をHPLC に注入し、得られたクロマトグラムにおいて各アフラトキシンの保持時間と一致するピークの高さまたはピー

クの面積と「(2)アフラトキシン検量線の作成」で求めておいた検量線から試験溶液中の濃度を求める。試験溶液中の濃度と試料中の濃度の関係は以下である。

①多機能カラムの場合

試料中の各アフラトキシンの濃度 (ng/g)  
= 試験溶液中の各アフラトキシンの濃度  
(ng/mL) × 4 × 50 ÷ W (試料量)

②アフィニティーカラムの場合

試料中の各アフラトキシンの濃度 (ng/g)  
= 試験溶液中の各アフラトキシンの濃度  
(ng/mL) × 2 × 50 ÷ W (試料量)

B1、B2、G1、G2 の合計でトータルアフラトキシンの濃度を求める。

5. 高速液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC/MS) による分析

LC/MS [5.1 (27)] (またはLC/MS/MS) を用いて試験溶液について測定を行う。

(1)測定条件

①LC/MSの測定例

カラム充てん剤 オクタデシルシリル化シリカゲル (粒径3~5 μm) を用いる。

カラム [5.1 (29)] 内径2.0 mm、長さ150 mm

カラム温度 40 °C

LC/MS 移動相 [4.1 (13)] アセトニトリル・メタノール・10 mmol/L 酢酸アンモニウム (2 : 6 : 15) を用いる。

流速 0.2 mL/min

注入量 5-20 μL

質量分析計条件(例)

イオン化モードESI-positive

モニターイオン (m/z) アフラトキシン

B1:313, B2:315, G1:329, G2:331

②LC/MS/MSの測定例

カラム充てん剤 オクタデシルシリル

化シリカゲル (粒径3~5 μm) を用いる。

カラム [5.1 (29)] 内径2.0 mm、長さ150 mm

カラム温度 40 °C

LC/MS/MS 移動相 [4.1 (14)] メタノール・10 mmol/L 酢酸アンモニウム (62 : 38) を用いる。

流速 0.2 mL/min

注入量 5 μL

質量分析計条件(例)

イオン化モード ESI-positive

ドライガス 10 L/min at 350 °C

ネプライザーガス 345 kPa

フラグメンター 100 V

モニターイオン (m/z)

(2)アフラトキシン検量線の作成 (例)

(LC/MS/MSの場合も同様)

①アフラトキシン標準液 (配付) [4.2 (3)]

を室温に戻した後、100 μLをピペッター [5.1 (4)] でキャップ付きバイアル (褐色シラン処理) [5.1 (20)] にとり、アセトニトリル [4.1 (1)] 900 μLを加え密栓後、試験管ミキサー等 [5.1 (22)] で完全に溶解する。(スタンダード1 : 100 ng/mL 溶液 (B1, G1 の濃度 : 以下同様))。

②①で作製したスタンダード1 : 100 ng/mL 標準溶液100 μLをキャップ付きバイアル (褐色シラン処理) [5.1 (20)] にとり、アセトニトリル [4.1 (1)] 900 μLを加え密栓後、良く攪拌する (スタンダード2 : 10 ng/mL 溶液)。その後下表に従い、スタンダード1 と2 をLC/MS 用バイアル [5.1 (21)] にピペッター [5.1 (4)] で分注し、窒素気流 [5.1 (17)] を送るかエバポレーター [5.1 (18)] を用いて溶媒を除去する。

③乾固した残さにLC/MS 移動相 [4.1 (13)] を0.4 mL 加えたものをLC/MS 用検量線溶液とする。

④作製した6 濃度の検量線用溶液5  $\mu$ L (試験溶液の注入量が5  $\mu$ Lの場合、試験溶液の注入量に合わせる) をLC/MS に注入し、ピークの高さまたはピークの面積で検量線を作成する。

### (3) 定量

試験溶液をLC/MS (またはLC/MS/MS) に注入し、得られたクロマトグラムにおいて各アフラトキシンの保持時間と一致するピークの高さまたはピーク的面積と「(2)アフラトキシンの検量線の作成」で求めておいた検量線から試験溶液中の濃度を求める。試験溶液中の濃度と試料中の濃度の関係は以下である。なお、機器の感度により希釈し測定した場合はその希釈率を乗ずる。

#### ①多機能カラムの場合

試料中の各アフラトキシンの濃度 (ng/g)  
= 試験溶液中の各アフラトキシンの濃度  
(ng/mL)  $\times 4 \times 50 \div W$  (試料量)

#### ②アフィニティーカラムの場合

試料中の各アフラトキシンの濃度 (ng/g)  
= 試験溶液中の各アフラトキシンの濃度  
(ng/mL)  $\times 2 \times 50 \div W$  (試料量)

B1、B2、G1、G2 の合計でトータルアフラトキシンの濃度を求める。

### 3. 乳中のアフラトキシシン M1 試験法の妥当性確認のためのコラプティブスタディ

3-1. コラボラティブスタディでは11の参加機関に以下に示す実施要領及びプロトコルを配布し、実施した。

3-1-1. アフラトキシシン M1 の共同分析コラボ実施要領

#### 1. 目的

本共同分析の目的は、乳中のアフラトキシシン M1 をイムノアフィニティーカラムによる精製後、蛍光検出器を接続した高速液体クロマトグラフ (以下 HPLC と略す) で検出する分析法をバリデートすることである。

#### 2. 試験実施期間

平成 21 年 12 月または平成 22 年 1 月 (予定)

#### 3. 配付物

(1) 室間共同試験の実施要領 (本紙) 5 枚  
(2) 別紙-「乳中のアフラトキシシン M1 の分析法」 4 枚

(3) プロトコル 1 枚および結果記入用紙 1 枚 : エクセルファイル (あらかじめ電子メールでも送付します。)

(4) 返信用封筒 1 枚

(5) 試験に用いる一部の試薬、器具等 (詳細については 4. 試薬及び 5. 器具等の項を参照)

・イムノアフィニティーカラム

・アフラトキシシン M1 標準液…アフラトキシシン M1 1.0  $\mu$ g/mL

・添加用アフラトキシシン M1 溶液…各濃度 2 本 4 種類 計 8 本 (試料番号、乱数) 各 0.5 mL (密閉遮光ビン)

・添加用 1 L 牛乳 1 瓶 プラスチック容器 (添加用)

・アフラトキシシン M1 汚染牛乳 2 瓶 (試料番号、乱数) 52-55 mL

・アフラトキシシン M1 汚染粉末乳 各機関 2 袋 (試料番号、乱数) 6 g/袋

#### 4. 試薬

4-1. 御用意いただく試薬

(1) アセトニトリル : HPLC 用 ; 高速液体ク

ロマトグラフ用

(2) 水 (クロマトグラフィーに使用) : HPLC の移動相として適したもの

水 (試験操作に使用) : 精製水又は蒸留水 (pH6.0-7.5 が望ましい)

(3) イムノアフィニティーカラム用洗浄用 : PBS 錠(配付) [4.2 (4)] 2 個を 200 mL メスフラスコにとり、約 150 mL の精製水で溶解後、精製水にて 200 mL に定容する。

(4) HPLC 移動相

アセトニトリル [4.1 (1)] 25 に対し、精製水 [4.1 (2)] を 75 の割合で混合する。

(5) HPLC 注入液

アセトニトリル [4.1 (1)] 2 に対し、精製水 [4.1 (2)] を 8 の割合で混合する。

4-2. 配布する試薬

(1) イムノアフィニティーカラム 14 本

(2) アフラトキシン M1 標準液…1.0 µg/mL

(3) 添加用アフラトキシン M1 溶液…各濃度 2 本 4 種類 (試料番号) 計 8 本 (密閉遮光ビン) 各 0.5 mL

(4) PBS 錠剤 MP Biomedicals, LLC 製 1 袋

5. 器具等

5-1. 御用意いただく器具等

(1) 化学天秤 (0.01 g のレンジまで正確に量れるもの)

(2) ピペッターまたはホールピペットなど正確に量れるもの

(3) メスシリンダー (50 mL、100 mL 容他)

(4) メスフラスコ (50 mL 容、200 mL 容、1L 容他)

(5) 共栓付き三角フラスコ (200 mL 容が適当)

(6) ガラス繊維ろ紙 (Whatman 934AH、15 cm) か同等品

(7) ガラスロート (直径 7.5 cm 他)

(8) 三角フラスコまたはビーカー

(9) カラム架台 (カラムスタンド) またはバキュームマニホールド

(10) ストップコック (必要であれば)

(11) リザーバー ; リザーバー容量が 20 mL 以上のもの (例 : 30 mL 容 (Waters 製)、注射筒でも可)

(12) アダプター ; イムノアフィニティーカラムとリザーバー連結用、イムノアフィニティーカラムに合うもの

(13) キリ等 ; イムノアフィニティーカラムの上キャップに穴を開けるための先端の尖ったもの

(14) アルミブロックヒーター ; 溶媒濃縮のために使用、窒素気流が可能なもの。約 50 °C まで加温ができ、温度制御が可能なもの。

(15) 窒素気流

(16) エバポレーター (アルミブロックヒーターを使用する場合は不要) ; 溶媒濃縮のために使用ウォーターバス (室温 +5 °C ~ 80 °C 以上程度までの設定が可能なもの) 付き

(17) キャップ付きバイアル (褐色シラン処理、2 mL または 4 mL、例 Supelco 製 Silanized Amber Screw Top Vial) か同等品

(18) HPLC 用バイアル (バイアル中での吸着、オートサンプラー測定での室温放置時間等による減衰なども事前に確認しておくこと。バイアルは褐色シラン処理したものが望ましい)

(19) 試験管ミキサー (Vortex 等)

(20) 超音波照射装置 (Vortex 等で試験溶液が溶けたことが確認できれば不要)

(21) シリンジ (試験溶液ろ過用: 1mL 容等、例硝子製ルアーコック先付き注射筒、東京ガラス器械、イムノアフィニティーカラムリザーバー用: 20 mL 容等、例硝子製注射筒 東京ガラス器械、イムノアフィニティーカラム通気用: 例 20 mL 容テルモシリンジ)

(22) 50 mL 容プラスチック遠心チューブ

(23) 高速液体クロマトグラフ (HPLC)

蛍光検出器; キセノンランプ、励起波長 365 nm および蛍光波長 435 nm が装置の設定範囲にあるもの

送液ポンプ; 定流量送液が可能で少なくとも 0.1~3.0 mL の範囲での流量設定が可能なもの

カラムオープン; 室温~60 °C 程度まで 1 °C 以下刻みで設定が可能なもの、仕様上の温度安定性が±0.2 °C 未満のもの

オートサンプラー (オートインジェクター) 必須ではない; 1 µL 刻みで 1 µL~今回の測定における注入量までの設定が可能なもの  
データ処理装置; PC またはインテグレーター等

(24) HPLC 用カラム (例)

ステンレス管充てんカラム、充てん剤 ODS、内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 3~5 µm Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス社製)、Shodex Silica C18M 4E (昭和電工社製)、Cadenza CD-C18 (インタクト社製) 及び Mightysil RP-18GP (関東化学社製) 等

(25) 遠心分離機

エッペンドルフ用チューブ (必要であれば)

6. 分析について

(1) 汚染牛乳試料 (2 瓶)、汚染粉末牛乳 (2 袋)、及び添加用アフラトキシン M1 溶液 (8 本) [4.2(3)] には試料番号が付してあります。

分析は試料番号毎に行い、結果は試料番号毎に報告して下さい。したがって、合計 14 の試料について HPLC での結果が出てきます。

(2) 冷凍保存しておいた試料は別紙「乳中のアフラトキシン M1 の分析法」の指示に従い、アフラトキシン M1 標準液 [4.2(2)]、添加用アフラトキシン M1 溶液 [4.2(3)] およびイムノアフィニティーカラム [4.2(1)] は室温に戻してから、作業を開始してください。

(3) 検量線の作成方法

アフラトキシン M1 標準液 (配付) [4.2(2)] をもちいて別紙「乳中のアフラトキシン M1 の分析法」を参考に作成してください。

(4) 分析用バイアルについて

望ましくはシラン処理褐色バイアル [5.1(17)] を 20-30 % のアセトニトリル水で洗浄し、乾燥したものです。通常のガラスバイアルを使用する場合はアフラトキシンの吸着のないことをご確認ください。

(5) 添加用試料の実施手順

① 1 L の添加用試料が入った瓶から 100.0 g を共栓付き三角フラスコに天秤 [5.1(1)] で正確に量り採り、試料番号を付した添加用アフラトキシン M1 溶液 (配付) [4.2(3)] 100 µL を正確にピペッター等 [5.1(2)] で加えて下さい。

② 別紙「乳中のアフラトキシン M1 の分析法」に従い、分析を実施して下さい。

(1) HPLC についてはアフラトキシン M1 標準溶液を測定した場合の S/N=3 の検出限界 (LOD) と S/N=10 の定量限界 (LOQ) を結果に分析成績表に記載してください。

(2) 分析値は ng/g で示し、小数点第 5 位は四捨五入、小数点第 4 位まで求めて報告願います。なお、操作中の不具合等により測

定できなかった場合は、結果欄に「-」を記載し、具体的にその理由を明記して下さい。定量限界以下で値を記す場合は数字の後ろに (Trace) と明記し、検出限界以下で値を記す場合はその数字の後ろに (N.D.) と明記してください。

#### 7. 試料等の保存方法

アフラトキシン M1 標準溶液、添加用アフラトキシン M1 溶液は冷凍保存してください。添加用牛乳、汚染牛乳、汚染粉末乳は冷凍保存してください。イムノアフィニティークラムは使用するまで冷蔵 (約 5 °C) で保管し、PBS 錠剤は室温保存してください。

#### 8. 結果の報告

##### (1) 提出していただくもの

###### ① 結果記入用紙

・あらかじめ電子メールで送付した「分析成績表」に示した項目に記入の上、プリントアウトしたもの一部

尚、「6. 分析について」において、別紙「乳中のアフラトキシン M1 の分析法」と異なる方法で定量した場合には、用いた方法の詳細について「分析成績表」の「変更点」、「測定条件・検出限界・定量限界」の欄に記入し報告してください。

###### ② クロマトグラム等

・クロマトグラム等：HPLC について、アフラトキシン検量線にもちいたクロマトグラム (8 濃度分全て) および全ての試料溶液のクロマトグラムのコピー

・検量線：HPLC の検量線のコピー

##### (2) 提出先 (お問合せ先)

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 部長 小西良子 (または第 4 室室長 鎌田洋一)

住所 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

電話番号 03-3700-1141、FAX 番号 03-3700-9527

e-mail: ykonishi@nihs.go.jp (小西)、  
ykamata@nihs.go.jp (鎌田)

##### (3) 提出期限

平成 21 年 12 月または平成 22 年 1 月 (予定)

##### (4) 送付方法

結果記入用紙およびクロマトグラム等を、配付した返信用封筒に入れて郵送で送付願います。また、同時に「分析成績表」を添付ファイルとして ykonishi@nihs.go.jp 宛に電子メールで送信して下さい。クロマトグラムは電子媒体でお送り頂く必要はありません。

3-1-2. 「乳中のアフラトキシン M1 の分析法」  
コラボラティブスタディプロトコール [ ]  
内数字は、要項参照

##### 操作手順

###### 1. 前処理

(1) 添加用牛乳の場合：37 °C に温めて穏やかに攪拌後、天秤 [5.1 (1)] で正確に 100.0g を共栓付き三角フラスコ [5.1 (5)] に量り取る。これに添加用アフラトキシン M1 溶液 100 μL をピペッター等 [5.1 (2)] で加え、攪拌し、10 分間超音波 [5.1 (20)] をかける。

約 45 mL を 50 mL 容プラスチック遠心チューブ [5.1 (22)] に移し、遠心分離 (3000 rpm、5 分間) [5.1 (22)] する。

汚染牛乳の場合：37 °C に温め、10 分間超音波 [5.1 (20)] をかける。メスシリンダー等 [5.1 (3)] で約 50 mL を量り、共栓付き三角フラスコ [5.1 (5)] に取る。約 45 mL

を50 mL容プラスチック遠心チューブ [5.1 (22)] に移し、遠心分離 (3000 rpm、5 分間) [5.1 (25)] する。

粉末乳の場合：室温に戻した後、天秤 [5.1 (1)] で正確に5.0 gをメスフラスコ [5.1 (4)] に量りとり、50 °Cの温水 [4.1 (2)] 30mL程度 に溶かし、37 °C程度に冷やした後、37 °Cの水で正確に50 mLにする。10分間超音波 [5.1 (20)] をかける。

(2) ガラスロート [5.1 (7)] にガラス繊維ろ紙 [5.1 (6)] をセットし、(1) をろ過する。粉末乳のろ過が困難な場合は遠心分離 (3000 rpm、5分間) [5.1 (25)] する。ろ液を共栓付き三角フラスコ [5.1 (5)] にとり、試料溶液とする。試料溶液は出来るだけ早くイムノアフィニティーカラムに注入する。(時間が経過するころ液がカラムに詰まる場合あり。)

## 2. カラム (イムノアフィニティーカラム) による精製法

<イムノアフィニティーカラムの取り扱い上の注意>

カラム内にはPBS が充填されていて、カラム上部には僅かに空気が入っている。そのため、横に倒すと空気がカラム (充填剤) に触れてしまい、その結果良好な回収率が得られなくなるため、保存時から分析終了時まで直立の状態を保っている必要がある。もし、ゲル上の白いフリット表面に気泡が溜まっていたら、タッピングして除去すること。

- ① イムノアフィニティーカラム (配付 [4.2 (1)]) は室温になるまで放置する。
- ② きり等 [5.1 (13)] でイムノアフィニティーカラムの上キャップに穴を開けてから上キャップをはずした後、下キャップを

はずし、必要であれば開栓したストップコック [5.1 (10)] を取り付け、カラム架台あるいはバキュームマニホールド [5.1 (9)] にセットする。カラム内溶液を自然落下で排出後、あらたにPBS [4.1 (3)] でカラム内を満たし、自然落下で排出させる。再度PBS [4.1 (3)] でカラム内を満たし、PBS [4.1 (3)] を半分程排出させた後、ストップコック [5.1 (10)] を閉じるか下キャップを付ける。

③ アダプター [5.1 (12)] でリザーバー [5.1 (11)] とカラムを連結する。

④ 前処理で得られた試料溶液を天秤 [5.1 (1)] で正確に20.0 g、ビーカー等 [5.1 (8)] に量りとり。ピペッター等 [5.1 (2)] でイムノアフィニティーカラムに全量注入する。ビーカー [5.1 (8)] を少量の精製水 [4.1 (2)] で洗い、それをアフィニティーカラムに注入する。粉末乳を処理した試料溶液については20.0mLををピペッター等 [5.1 (2)] で正確に注入する。ストップコック [5.1 (10)] を開き、1~2 滴/秒の速さでろ液を排出させる。途中、排出速度が非常に遅くなった場合には、ゲル上の白いフリット表面に泡が付着していることがあるので、リザーバー [5.1 (11)] およびカラムを手で保持し、試料ろ液がこぼれないよう注意し、カラムを指等でタッピングし泡を取り除く。全てのろ液を排出させたのち、リザーバー [5.1 (11)] を取り除く (ポリプロピレン等のプラスチック製リザーバーの場合、リザーバーの洗浄は必要無いが、ガラス製注射筒を用いた場合には、全ての試料溶液を排出させる前に少量の精製水で注射筒内を洗浄し、イムノアフィニティーカラムに注入する)。カラム

を50 mL容プラスチック遠心チューブ [5.1 (22)] に移し、遠心分離 (3000 rpm、5分間) [5.1 (25)] する。

粉末乳の場合：室温に戻した後、天秤 [5.1 (1)] で正確に5.0 gをメスフラスコ [5.1 (4)] に量りとり、50 °Cの温水 [4.1 (2)] 30mL程度 に溶かし、37 °C程度に冷やした後、37 °Cの水で正確に50 mLにする。10分間超音波 [5.1 (20)] をかける。

(2) ガラスロート [5.1 (7)] にガラス繊維ろ紙 [5.1 (6)] をセットし、(1) をろ過する。粉末乳のろ過が困難な場合は遠心分離 (3000 rpm、5分間) [5.1 (25)] する。ろ液を共栓付き三角フラスコ [5.1 (5)] にとり、試料溶液とする。試料溶液は出来るだけ早くイムノアフィニティーカラムに注入する。(時間が経過するとろ液がカラムに詰まる場合あり。)

## 2. カラム (イムノアフィニティーカラム) による精製法

<イムノアフィニティーカラムの取り扱い上の注意>

カラム内にはPBS が充填されていて、カラム上部には僅かに空気が入っている。そのため、横に倒すと空気がカラム (充填剤) に触れてしまい、その結果良好な回収率が得られなくなるため、保存時から分析終了時まで直立の状態を保っている必要がある。もし、ゲル上の白いフリッツ表面に気泡が溜まっていたら、タッピングして除去すること。

- ① イムノアフィニティーカラム (配付 [4.2 (1)]) は室温になるまで放置する。
- ② きり等 [5.1 (13)] でイムノアフィニティーカラムの上キャップに穴を開けてから上キャップをはずした後、下キャップを

はずし、必要であれば開栓したストップコック [5.1 (10)] を取り付け、カラム架台あるいはバキュームマニホールド [5.1 (9)] にセットする。カラム内溶液を自然落下で排出後、あらたにPBS [4.1 (3)] でカラム内を満たし、自然落下で排出させる。再度PBS [4.1 (3)] でカラム内を満たし、PBS [4.1 (3)] を半分程排出させた後、ストップコック [5.1 (10)] を閉じるか下キャップを付ける。

③ アダプター [5.1 (12)] でリザーバー [5.1 (11)] とカラムを連結する。

④ 前処理で得られた試料溶液を天秤 [5.1 (1)] で正確に20.0 g、ビーカー等 [5.1 (8)] に量り取る。ピペッター等 [5.1 (2)] でイムノアフィニティーカラムに全量注入する。ビーカー [5.1 (8)] を少量の精製水 [4.1 (2)] で洗い、それをアフィニティーカラムに注入する。粉末乳を処理した試料溶液については20.0mLををピペッター等 [5.1 (2)] で正確に注入する。ストップコック [5.1 (10)] を開き、1~2滴/秒の速さでろ液を排出させる。途中、排出速度が非常に遅くなった場合には、ゲル上の白いフリット表面に泡が付着していることがあるので、リザーバー [5.1 (11)] およびカラムを手で保持し、試料ろ液がこぼれないよう注意し、カラムを指等でタッピングし泡を取り除く。全てのろ液を排出させたのち、リザーバー [5.1 (11)] を取り除く (ポリプロピレン等のプラスチック製リザーバーの場合、リザーバーの洗浄は必要無いが、ガラス製注射筒を用いた場合には、全ての試料溶液を排出させる前に少量の精製水で注射筒内を洗浄し、イムノアフィニティーカラムに注入する)。カラム



を精製水 [4.1 (2)] 15 mL 以上で洗浄し (精製水でカラム内を満たし排出させる操作を5回繰り返す)、アダプターを取り付けたシリンジ [5.1 (21)] 等で強く通気しカラム内の水分を十分に追い出す。その後キャップ付きバイアルあるいは同等品 [5.1 (17)] にアセトニトリル [4.1 (1)] 1 mL で溶出し5分間放置後、アセトニトリル [4.1 (1)] を1 mL ずつ2回、合計3 mL で溶出させ、さらにアダプターを取り付けたシリンジ [5.1 (21)] 等で強く通気し、ゲル内のアセトニトリルを排出させる。

⑤ 窒素気流 [5.1 (15)] を送るかエバポレーター [5.1 (16)] を用いて溶媒を除去する。

⑥ HPLC注入液 [4.1 (5)] アセトニトリル：水 (2:8) 1.0 mL を加えたものを試験管ミキサー等 [5.1 (19)] で完全に溶解する。HPLC用ガラスバイアル [5.1 (18)] にうつす。試験溶液が濁っている場合はエッペンドルフ用チューブ [5.1 (26)] などにうつし、10,000 rpm 以上、5分間遠心 [5.1 (25)] し、その上清をHPLC用ガラスバイアル [5.1 (18)] にうつす。これをHPLC用試験溶液とする。

### 3. 高速液体クロマトグラフ (HPLC) による測定

HPLC [5.1 (23)] を用いて試験溶液について測定を行う。

#### (1) 測定条件 (例)

カラム充てん剤 オクタデシルシリル化シリカゲル (粒径3~5  $\mu\text{m}$ ) を用いる。

カラム [5.1 (24)] 内径4.6 mm、長さ150 mm又は250 mm

カラム温度 40  $^{\circ}\text{C}$

HPLC 移動相 [4.1 (11)] アセトニト

リル：水 (25 : 75) を用いる。

流速 0.6-1.0 mL/min

検出波長 励起波長365 nm、蛍光波長435 nmで測定する。

注入量 20-100  $\mu\text{L}$  (100  $\mu\text{L}$  を推奨)

#### (2) アフラトキシンM1検量線の作成

① アフラトキシンM1標準液 (配付) [4.2 (2)] を室温に戻した後、100  $\mu\text{L}$  をピペッター [5.1 (2)] でキャップ付きバイアル (褐色シラン処理) [5.1 (17)] にとり、アセトニトリル [4.1 (1)] 900  $\mu\text{L}$  を加え密栓後、試験管ミキサー等 [5.1 (19)] で完全に溶解する。(スタンダード1 : 100 ng/mL 溶液)

② ①で作製したスタンダード1 : 100 ng/mL 標準溶液100  $\mu\text{L}$  をキャップ付きバイアル (褐色シラン処理) [5.1 (17)] にとり、アセトニトリル [4.1 (1)] 900  $\mu\text{L}$  を加え密栓後、試験管ミキサー等 [5.1 (19)] で完全に溶解する。(スタンダード2 : 10 ng/mL 溶液)

③ ②で作製したスタンダード2 : 10 ng/mL 標準溶液100  $\mu\text{L}$  をキャップ付きバイアル (褐色シラン処理) [5.1 (17)] にとり、アセトニトリル [4.1 (1)] 900  $\mu\text{L}$  を加え密栓後、試験管ミキサー等 [5.1 (19)] で完全に溶解する。(スタンダード3 : 1 ng/mL 溶液)

④ その後下表に従い、スタンダード1、2、3 をHPLC用バイアル [5.1 (18)] にピペッター [5.1 (2)] で分注し、窒素気流 [5.1 (15)] を送るかエバポレーター [5.1 (16)] を用いて溶媒を除去する。

⑤ 除去したのち、HPLC注入液 [4.1 (5)] アセトニトリル：水 (2:8) 1.0 mL を加えて、よく混和したものをHPLC用検量線溶液と

する。

④ 作製した8濃度の検量線用溶液100  $\mu$  L (試験溶液の注入量に合わせる) をHPLC に注入し、ピークの高さまたはピークの面積で検量線を作成する。

### (3) 定量

試験溶液をHPLC に注入し、得られたクロマトグラムにおいてアフラトキシンM1の保持時間と一致するピークの高さまたはピーク的面積と「(2)アフラトキシンM1検量線の作成」で求めておいた検量線から試験溶液中の濃度を求める。試験溶液中の濃度と試料中の濃度の関係は以下である。

#### ①添加用牛乳、汚染牛乳の場合

試料中のアフラトキシンM1の濃度 (ng/g)  
= 試験溶液中のアフラトキシンM1の濃度  
(ng/mL)  $\div$  W

W = 牛乳量 (例 : 20.01 g)

#### ②粉末乳の場合

試料中のアフラトキシンM1の濃度 (ng/g)  
= 試験溶液中のアフラトキシンM1の濃度  
(ng/mL)  $\div$  W / 2.5

W = 粉末乳量 (例 : 5.00 g)

(注)

アフラトキシン M1 は発ガン性があるので、操作は手袋を装着し、実験台にはベンチコート等を使用し、汚染に気をつけること。また、乳を使用した容器・器具は1%次亜塩素酸ナトリウム液に2時間以上浸漬した後、通常の洗浄、棄却を行うこと。

## 4. 食品中に残留する総アフラトキシン及びアフラトキシンB<sub>1</sub>に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて

食品衛生法に定めている総アフラトキシン及びアフラトキシンB<sub>1</sub>試験法以外の方

法によって試験をする場合に、その試験法の妥当性を各試験機関が評価するためのガイドラインについて、平成19年11月15日付け食安発第1115001号「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ついて」を参考に以下の内容をカビ毒試験法評価委員会で検討した。

### 4-1. ガイドラインの趣旨

### 4-2. ガイドラインの対象

### 4-3. 用語の定義

### 4-4. 評価の方法

(1) 選択性

(2) 真度 (回収率)

(3) 精度

### 4-5. 添加を行う食品及び添加濃度

## C. 研究結果及び考察

### 1. カビ毒試験法評価委員会議事録

#### 1-1. 第1回議事録

平成21年6月3日(火) 国立医薬品食品衛生研究所で開催。

#### 1) 資料 :

・資料 1-1 「食品中のアフラトキシンの成分規格の設定に係る審議経緯等」

・ラボ結果 : HPLC、LCMS、HPLC 測定条件、LCMS 測定条件、プロトコール (表)

・分析法バリデーションの結果、マトリックス検量線、ピスタチオ (IAC) 各 A4 一枚

・平成20年度報告書

2) 内容 : (1) トータル(総)アフラトキシン試験法の妥当性の評価

(2) ピーナッツコラボラティブスタディについて

・CODEX が昨年木の実で基準値を設定し、日本でも設定への動きあり。

・アセトニトリルの供給不足の状況 (今年

初め)より、メタノール抽出多機能カラムの可能性を探る。

・LC/MS/MSでの定性、定量の可能性を見極める。

(3) トータルの基準値について平成21年6月2日に厚労省食品規格部会により決定

○落花生 加工用 15 µg/kg

○アーモンド、ピスタチオ、ヘーゼルナッツ 加工用 15 µg/kg

○落花生 直接消費用 10 µg/kg

・B1(6条)とトータル(11条)の両方で規制

・落花生の輸入が半分ぐらい加工になっているので、加工した落花生は10 µg/kgとCODEXより低濃度。

・規制値は検出されてはならない。規制の運用について→検出限界ではなく管理水準10 µg/kg(定量)として運用する。

・他の農産物：米、そば、トウモロコシの規制値の設定は、実態調査結果より検出頻度が低いので設定はしない。モニタリングを継続する。

(4) 基準値に関する質問・意見

・木の実(落花生、ピスタチオ、アーモンド、ヘーゼルナッツ)に限定。CODEXも。

・農薬は規制値の1/10の桁を四捨五入だがここは1/100の桁を四捨五入したらどうか。すなわち15.4まで基準以内15.5から違反。

・アメリカ：平均値で違反とするが、日本は一つでも基準を超えたら違反とするであろう。

・分析法だけでRSD10%として2σと考えると8から12、10±2となるので、1/100の桁を四捨五入という考えでよろしいのではないか。

・サンプリング、粉碎が加わるとRSD10%よりもさらにばらつきが大きくなるだろう

・規制値に対する測定値の丸め方はリスクマネージャーが決める問題。

(5) トータルアフラトキシンコラボの結果

について

○プロトコールの説明：多機能アセトニトリル、メタノール IAC メタノール多機能のみ自然汚染、多機能最終試験液 0.25 g/mL AC 最終試験液 0.5 g/mL

○添加液の濃度

A液 (B1: 16 µg/kg、B2: 2 µg/kg、G1: 12 µg/kg、G2: 2 µg/kg、トータル 32 µg/kg)

B液 (B1: 10 µg/kg、B2: 1.25 µg/kg、G1: 7.5 µg/kg、G2: 1.25 µg/kg、トータル 20 µg/kg)

C液 (B1: 4 µg/kg、B2: 0.5 µg/kg、G1: 3 µg/kg、G2: 0.5 µg/kg、トータル 8 µg/kg)

○結果説明：LCMSはB2、G2でRSDRが大きい値であった。HPLCはいずれの前処理でも良好の結果が得られた。

(6) コラボ結果に関する意見、質問

・AOACの場合 RSDR30%、RSDr15%、EUはRSDrは規定していないでカビ毒ごとにRSDRと回収率を決めている。

・EUのHorRat値は2以下とし、AOACは0.5~1.5としている。

・まとめには有効データの総平均値も記入すべき。バラツキのみではなく偏りがわかるので。

・トータルで規制するわけだからトータルでの統計データもB1、G1、B2、G2の隣の列に加えて評価すべきである。

・自然汚染サンプルでは回収率の表現はしない。平均値のみ。

・accuracyとしての不確かさはセンターラボが認証標準物質を用いて、かたより(バイアス)がどれだけばらつくかの標準偏差を出し、SDRとかたよりのばらつきの合成標準偏差から求まる。今回のコラボデータだけでは求まらない。

・HPLC、偏りは問題ない。

・規制値の定量1/10、定性1/2が測定できることが目安と農水省で聞いたことがある。

・検量線の範囲はコラボで用いたものはB1G1:B2G2=1:0.3だった。

・一般的には B1G1:B2G2=2:0.5 なのでそれに合わせる。フォトケミカルではこの比率で検出が同じ高さになる。TFA は同濃度で同じ高さになる。

・検量線の範囲は B1、G1 は 0.2~20 µg/kg、B2、G2 は 0.05~5 µg/kg とする。

・定量限界は多機能カラム ; B1、G1 0.8 µg/kg、B2、G2 0.24 µg/kg、トータル値で 2.08 µg/kg

・IAC では B1、G1 0.4 µg/kg、B2G2 0.12µg/kg トータル値で 1.04 µg/kg

・実態調査の場合は IAC とするなど。各機関で定量限界を低める努力をすべきだが基準値の場合は上記の考え方でいく。

#### (7) IAC カラムのバリデーション結果

・流速が早くて回収率の低かった AflaStar も流速をコントロールして再テストを行う。

#### (8) 検出限界設定 [マトリックス検量線結果]

・回収率 70~120 % の範囲で適合をみる。

・アーモンド G1 再テストが必要と判断された。

・一般には規制値の 1/10 で担保できないといけない。しかし今回の場合は 0.1 mg/kg 未満の測定ですから、残留農薬のルールでは規制値の 1/2、Codex の CCMAS の最新案では 2/5 で ok になる。

・バラツキも含めた検討が必要。

・アフラすべて同濃度でやっては？ コラボ A 液で現実的な汚染比率と考えた。

・各 4 種の定量限界を聞かれる？ この差は？ → 多機能、マトリックスの影響か。

#### (9) ピスタチオを用いての IAC カラム回収率

・B1,G1 の回収率が低いのは TFA の反応が悪いため、試薬、攪拌に注意。

#### (10) 今年度の検討課題

##### ①牛乳中の AFM1 妥当性試験

・M1 添加は 0.5 µg/kg。

・7 月中にプロトコルを作成する。

#### ②カビ毒分析法のバリデーション法の設定

・通知法以外にも分析者がバリデーションできれば採用可の方法もある。

・EU の設定をそのまま踏襲するのが妥当か。どのような根拠かわからないこともある。規制値を非常に厳しく設定し測れる分析法が存在しないこともあると聞く。

#### ③その他

サンプリング法について、本評価委員会で検討した結果を厚労省に報告した。トータルアフラトキシンの通知法が出るときに具申したサンプリング法が採用される可能性が高い。

#### 1-2. 第 2 回議事録

平成 22 年 3 月 11 日 (木) 国立医薬品食品衛生研究所で開催

##### 1) 議題 :

(1) アフラトキシシン M1 コラボの評価について

(2) 総アフラトキシシン分析のクライテリア (案) について

(3) 総アフラトキシシンおよび B1 分析通知法 (案) について

(4) その他

##### 2) 資料 :

・資料 1-1 アフラトキシシン M1 コラボ結果 まとめ

・資料 1-2 アフラトキシシン M1 コラボプロトコル他

・資料 1-3 アフラトキシシン M1 コラボ結果 検定表

・資料 2-1 総アフラトキシシン分析通知法 (案)

・資料 2-2 アフラトキシシン B<sub>1</sub> 分析通知法 (案)

・資料 2-3 (参考) アフラトキシシン B<sub>1</sub> 分析通知法 H20.7.28

・資料 2-4 アフラトキシシン試験法の妥当性