

図3 THP-1細胞生存率に及ぼすシトリニン (CIT) の影響
*** P<0.001

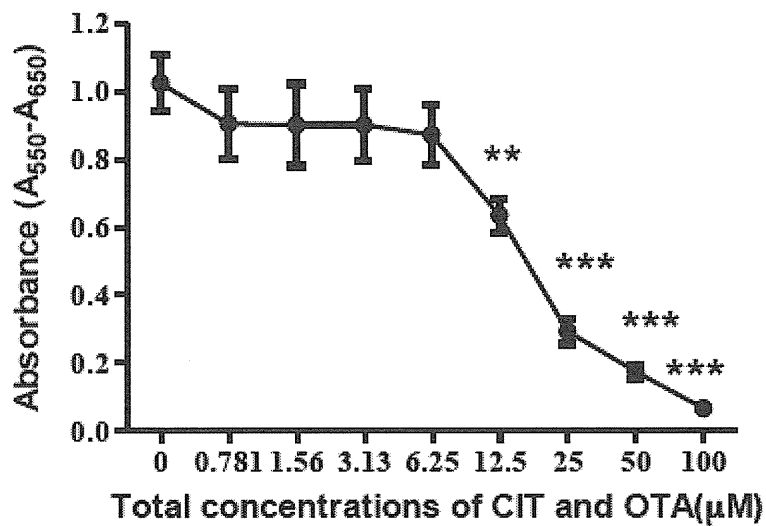


図4 THP-1細胞の生存率に及ぼすCITとOTAの複合影響
P<0.01, *P<0.001

個 表

小麦(国産)40検体 原産国/加工地	測定値 (ng/g)		
	T-2	HT-2	ZEN
北海道	ND	2.4	8.3
北海道	ND	ND	5.2
北海道	0.8	3.9	3.4
北海道	ND	tr(2.0)	12.0
北海道	ND	4.7	3.4
北海道	ND	ND	3.8
北海道	ND	ND	13.3
北海道	ND	ND	4.8
北海道	ND	ND	5.9
北海道	ND	ND	5.1
北海道	ND	ND	3.3
北海道	tr(0.4)	tr(1.4)	tr(0.3)
北海道	ND	tr(1.0)	3.4
北海道	tr(0.4)	2.4	1.2
北海道	tr(0.4)	tr(1.4)	0.9
北海道	ND	ND	0.4
北海道	0.6	3.1	ND
北海道	tr(0.2)	ND	0.5
北海道	ND	ND	2.4
北海道	tr(0.2)	tr(0.8)	1.7
北海道	0.5	tr(1.5)	0.7
北海道	2.1	12.7	0.9
北海道	1.9	9.1	3.2
北海道	1.5	6.9	1.5
岩手県	ND	ND	36.1
茨城県	ND	ND	0.8
栃木県	ND	ND	tr(0.3)
群馬県	ND	ND	ND
群馬県	ND	ND	ND
埼玉県	ND	ND	tr(0.3)
岐阜県	ND	ND	tr(0.3)
愛知県	ND	ND	ND
三重県	ND	ND	tr(0.2)
滋賀県	ND	ND	tr(0.3)
福岡県	ND	ND	0.4
福岡県	ND	ND	ND
福岡県	ND	ND	0.4
佐賀県	ND	ND	1.2
佐賀県	ND	ND	ND
熊本県	ND	ND	1.6

ng/g	T-2	HT-2	ZEN
検出限界	0.2	0.8	0.2
定量限界	0.5	2.4	0.4

大麦(国産)10検体 産地	測定値 (ng/g)		
	T-2	HT-2	ZEN
北海道	2.8	9.5	15.7
茨城県	ND	ND	1.2
栃木県	ND	ND	ND
栃木県	ND	ND	ND
富山県	ND	ND	0.9
福井県	ND	ND	7.4
岡山県	ND	ND	ND
福岡県	ND	ND	ND
佐賀県	ND	ND	0.9
佐賀県	ND	ND	4.0

ng/g	T-2	HT-2	ZEN
検出限界	0.10	0.38	0.10
定量限界	0.34	1.26	0.33

回収率(%)	T-2	HT-2	ZEN
5ng/g	92.7	82.9	99.1
高濃度*	89.3	91.2	99.2

*: DONは200ng/g、他は50ng/g

ハトムギ20検体		測定値 (ng/g)		
産地	T-2	HT-2	ZEN	
中国	ND	ND	17.1	
不明	ND	ND	1.9	
国産(宮城県)	ND	ND	tr(0.3)	
国産(宮城県)	25.2	13.9	2.0	
国産	ND	ND	tr(0.3)	
国産	3.7	5.5	ND	
ベトナム、タイ、日本等	ND	ND	17.6	
不明	ND	ND	1.9	
国産	1.3	ND	ND	
国産(栃木県)	ND	ND	ND	
国産(岩手県)	2.0	4.8	0.5	
韓国	3.5	4.5	152.9	
国産	ND	ND	tr(0.2)	
中国	ND	ND	61.7	
タイ	ND	ND	9.9	
不明	ND	ND	5.6	
不明	ND	ND	3.2	
不明	ND	ND	1.4	
不明	ND	ND	63.7	
タイ	ND	ND	7.7	

ng/g	T-2	HT-2	ZEN
検出限界	0.2	0.8	0.2
定量限界	0.5	2.4	0.4
回収率(%)	T-2	HT-2	ZEN
5ng/g	97.8	110.9	80.1
高濃度*	95.0	100.0	93.9

*: DONは200ng/g、他は50ng/g

コーンスナック 10検体		測定値 (ng/g)		
原産国/加工地	T-2	HT-2	ZEN	
不明	ND	ND	ND	
不明	ND	ND	ND	
不明	ND	ND	ND	
不明	ND	ND	ND	
不明	ND	ND	ND	
不明	ND	ND	ND	
不明	ND	ND	ND	
不明	ND	ND	ND	
不明	ND	ND	ND	
不明	ND	ND	ND	

ng/g	T-2	HT-2	ZEN
検出限界	0.10	0.24	0.06
定量限界	0.32	0.87	0.21
回収率(%)	T-2	HT-2	ZEN
5ng/g	103.7	108.8	75.5
高濃度*	101.6	111.2	71.5

*: DONは200ng/g、他は50ng/g

シリアル10検体		測定値 (ng/g)		
原産国/加工地	T-2	HT-2	ZEN	
不明	0.3	1.5	0.8	
不明	ND	ND	0.5	
不明	ND	ND	0.3	
不明	1.3	3.9	0.1	
不明	ND	ND	0.3	
不明	ND	ND	0.1	
不明	0.3	1.0	0.3	
不明	1.6	9.3	1.0	
不明	0.3	1.3	0.2	
不明	0.5	1.4	10.9	

ng/g	T-2	HT-2	ZEN
検出限界	0.02	0.10	0.01
定量限界	0.06	0.32	0.03
回収率(%)	T-2	HT-2	ZEN
5ng/g	94.2	99.7	85.1
高濃度*	72.4	97.3	77.8

*: DONは200ng/g、他は50ng/g

コーングリッツ
20検体

測定値 (ng/g)

原産国/加工地	T-2	HT-2	ZEN
アメリカ	ND	ND	30.7
アメリカ	ND	ND	4.7
中国	ND	ND	3.5
アメリカ	ND	ND	10.2
不明	ND	ND	3.7
北海道	25.8	23.1	12.7
アメリカ	ND	ND	13.3
不明	ND	ND	3.1
アメリカ	ND	ND	3.1
不明	ND	ND	11.4
アメリカ	ND	ND	3.1
アメリカ	ND	ND	3.5
不明	ND	ND	13.1
不明	ND	ND	12.1
不明	0.7	ND	3.1
不明	ND	ND	3.0
不明	ND	ND	3.4
アメリカ	ND	ND	3.6
オーストラリア	ND	ND	3.0
オーストラリア	ND	ND	3.6

ng/g	T-2	HT-2	ZEN
検出限界	0.016	0.61	0.11
定量限界	0.053	2.0	0.37

回収率(%)	T-2	HT-2	ZEN
5ng/g	90	84	95
高濃度*	102	110	87

*: DONは200ng/g、他は50ng/g

小豆10検体

測定値 (ng/g)

原産国/加工地	T-2	HT-2	ZEN
不明	tr(0.03)	ND	0.11
不明	0.56	0.93	35.54
不明	0.33	1.84	80.43
不明	1.04	2.59	86.90
不明	ND	ND	0.22
不明	0.27	0.66	50.91
不明	0.13	tr(0.20)	0.10
不明	0.67	1.76	6.59
不明	0.10	0.99	62.18
不明	tr(0.07)	0.37	49.52

ng/g	T-2	HT-2	ZEN
検出限界	0.03	0.08	0.03
定量限界	0.10	0.25	0.09

回収率(%)	T-2	HT-2	ZEN
5ng/g	89.1	94.9	79.7
高濃度*	94.1	96.6	79.9

*: DONは200ng/g、他は50ng/g

胚芽入り加工品
10検体

測定値 (ng/g)

原産国/加工地	T-2	HT-2	ZEN
不明	ND	0.10	0.10
不明	3.67	8.41	0.55
不明	ND	ND	0.43
不明	ND	ND	0.19
不明	tr(0.03)	tr(0.21)	0.35
不明	tr(0.06)	tr(0.20)	0.37
不明	3.58	10.67	0.57
不明	tr(0.05)	0.29	0.30
不明	tr(0.03)	ND	0.20
不明	ND	ND	0.14

ng/g	T-2	HT-2	ZEN
検出限界	0.03	0.08	0.03
定量限界	0.10	0.25	0.09

回収率(%)	T-2	HT-2	ZEN
5ng/g	86.1	96.3	75.8
高濃度*	79.4	91.2	68.1

*: DONは200ng/g、他は50ng/g

ゴマ10検体 原産国/加工地	測定値 (ng/g)		
	T-2	HT-2	ZEN
不明	ND	ND	9.13
不明	ND	ND	0.12
ミャンマー、パラグアイ	ND	ND	1.47
パラグアイ、ボリビア等	ND	ND	0.16
パラグアイ、ボリビア等	ND	ND	0.13
ミャンマー、中国等	ND	ND	5.30
パラグアイ、ミャンマー	ND	ND	10.49
グアテマラ、パラグアイ等	ND	ND	0.11
パラグアイ、グアテマラ等	ND	ND	0.42
パラグアイ、ミャンマー	ND	ND	19.93

ng/g	T-2	HT-2	ZEN
検出限界	0.002	0.007	0.005
定量限界	0.007	0.024	0.017

回収率(%)	T-2	HT-2	ZEN
低濃度*	74.0	80.8	47.0
50ng/g	82.7	81.9	58.6

*: DONは1.25ng/g、他は5ng/g

ビール10検体 原産国/加工地	測定値 (ng/g)				
	T-2	HT-2	ZEN	α-ZOL	β-ZOL
国産	0.08	tr(0.30)	ND	ND	ND
国産	0.05	0.58	ND	ND	ND
国産	ND	tr(0.13)	ND	ND	ND
国産	tr(0.02)	tr(0.11)	ND	ND	ND
国産	0.08	tr(0.21)	ND	ND	ND
国産	0.13	tr(0.34)	ND	tr(0.03)	ND
国産	0.03	tr(0.14)	ND	ND	ND
国産	ND	ND	ND	ND	ND
国産	0.05	ND	ND	tr(0.02)	ND
国産	tr(0.02)	tr(0.15)	ND	tr(0.02)	ND

ng/g	T-2	HT-2	ZEN	α-ZOL	β-ZOL
検出限界	0.01	0.11	0.01	0.01	0.03
定量限界	0.03	0.35	0.05	0.05	0.12

回収率(%)	T-2	HT-2	ZEN	α-ZOL	β-ZOL
5ng/g	80.5	90.4	99.6	87.3	81.1
高濃度*	84.6	86.9	105.1	88.4	77.8

*: DONは200ng/g、他は50ng/g

雑穀米20検体 原産国/加工地	測定値 (ng/g)		
	T-2	HT-2	ZEN
不明	0.2	ND	1.9
日本	ND	ND	1.1
岩手	0.7	0.9	2.0
一部日本	ND	ND	1.4
日本他	ND	ND	4.1
日本他	ND	ND	0.3
日本他	ND	ND	4.3
日本他	0.47	ND	0.9
日本他	ND	ND	7.5
日本	0.2	tr(0.24)	1.6
不明	ND	ND	2.3
日本他	0.2	ND	1.5
日本	1.4	1.7	1.1
日本他	tr(0.13)	ND	0.8
日本他	ND	ND	32.0
日本他	tr(0.11)	ND	4.7
日本他	ND	ND	2.4
日本	0.5	1.0	3.3
不明	ND	ND	1.0
日本	ND	ND	0.7

ng/g	T-2	HT-2	ZEN
検出限界	0.05	0.2	0.03
定量限界	0.2	0.5	0.07

回収率(%)	T-2	HT-2	ZEN
5ng/g	116	103	172
高濃度*	91.5	97.8	158

*: DONは200ng/g、他は50ng/g

付 録 1

付録 1

カビ毒試験法評価委員会報告

カビ毒試験法評価委員会委員

委員長：田中 敏嗣（神戸市環境保健研究所）

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）

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）

堀江 正一（大妻女子大学）

事務局

小西 良子（国立医薬品食品衛生研究所）

吉成 知也（国立医薬品食品衛生研究所）

要旨

実態調査および規格基準等の管理のために用いる試験法は、その妥当性を確認の上用いることが国際的な常識となりつつある。この潮流はカビ毒に限らず、食品汚染化学物質および微生物までも範疇にはいる。ISO や AOAC などですでに妥当性確認された試験法の場合は、実行する機関においては、精度管理に重点が置かれるが、新しく開発された試験法の場合は、AOAC や IUPAC などの指針に従った妥当性試験を行うことが望ましい。

カビ毒の試験法を確立するときには、まず妥当性試験を行う。評価には第三者的な評価機関を設けることが必要であることから、本研究事業でカビ毒試験法評価委員会を設置し、評価を行っている。委員は、分析、統計の専門家で構成されている。今年度は、公定法となった総アフラトキシン分析の試験法および実態調査を目的としたデオキシニバレノール、3-アセチルデオキシニバレノール及び15-アセチルデオキシニバレノールの分析法およびフモニシン類の分析法を評価した。

1. 総アフラトキシン分析の試験法について

試験法発出のための予備実験として、複数機関におけるコラボラティブスタディを実施した。

2011年 6月 第6回カビ毒試験法評価委員会にて、プロトコールの検討を行った。

検討の結果、試験濃度は基準値を踏まえた 10 ppb (B1、B2、G1、G2 それぞれ 2.5 ppb) と設定した。

2011年 7月 コラボラティブスタディ実施

2011年 8月 コラボラティブスタディの結果を踏まえ試験法案を修正し、15日に発出した。(参考1)

2012年 3月 第7回カビ毒試験法評価委員会にて、試験法に関する検査機関の要望に対する回答を検討した結果、以下の修正を提案することとした。

通知法の注釈 10) に以下の下線の文章を加える。

「多機能カラム精製では、夾雑物はカラムに保持されて遅れて溶出し、アフラトキシンはカラムに保持されず常に一定の濃度で溶出することから、初期溶出液 2 mL 程度が最も精製度が高い。カラムからの最初の溶出液を 2.2 mL 程度採り、これを抽出溶液として、その 2.0 mL (試料 0.5 g 相当) を量り採る。ただし、使用する多機能カラムによって溶出条件が異なるので、あらかじめ最適な溶出量を確認すること。」

2. コラボラティブスタディ「デオキシニバレノール、3-アセチルデオキシニバレノール及び 15-アセチルデオキシニバレノールの分析法」

2011 年 6 月 第 6 回カビ毒試験法評価委員会にて、プロトコールの検討を行った。

検討の結果、プロトコールに問題は無いと判断された。

2011 年 8 月 カビ毒試験法評価委員会の Web ページ上にて、パブリックコメントの募集を行った。

2011 年 10 月 委員会にてパブリックコメントに対する回答を検討後、公表した。(参考 2)

2011 年 11 月 カビ毒試験法評価委員会の Web ページにて、プロトコール (参考 3) を公開し、参加機関の募集を行った。

2012 年 1 月 10 機関においてコラボラティブスタディを実施した。

2012 年 3 月 第 7 回カビ毒試験法評価委員会にて、コラボラティブスタディの結果の検討を行った。

検討の結果、以下の結論を得た。

「回収率が他と比較して非常に低い機関が 2 機関あり、3ADON と 15ADON の分離が不完全な機関も認められている。しかし、全体的な統計パラメータはクライテリアを満たしているため、今回用いた分析法の妥当性は示されたと考える。」

3. コラボラティブスタディ「フモニシン類の分析法」の評価

2011 年 6 月 第 6 回カビ毒試験法評価委員会にて、プロトコールの検討を行った。

検討の結果、以下の助言を得た。

「添加試験の濃度が低い印象を受ける。実態を踏まえるとより高い濃度を設定した方が良い。また、3 種の濃度は同じにするのではなく、B2 と B3 は B1 よりも低い範囲を設定した方が良い。また、ブランクの試料に標準液を添加して測定するサンプルを追加することを勧める。」

2011 年 8 月 カビ毒試験法評価委員会の Web ページ上にて、パブリックコメントの募集を行った。

2011 年 10 月 委員会にてパブリックコメントに対する回答を検討後、公表した。(参考 2)

2011 年 11 月 カビ毒試験法評価委員会の Web ページにて、プロトコール (参考 4) を公開し、参加機関の募集を行った。

2012 年 1 月 11 機関においてコラボラティブスタディを実施した。

2012 年 3 月 第 7 回カビ毒試験法評価委員会にて、コラボラティブスタディの結果の検討を行った。

検討の結果、以下の結論を得た。

「マトリクス効果試験の結果は問題ないため、回収率の低い機関は操作に問題があることが予想される。しかし、全体的な統計パラメータはクライテリアを満たしているため、今回用いた分析法の妥当性は示されたと考える。」

「総アフラトキシンの試験法」

食品中の総アフラトキシシ（アフラトキシシ B1、B2、G1 及び G2）の試験は、I に示す試験法により実施することとし、I の試験法以外の方法による場合は、II に示す方法により当該試験法の妥当性を評価した上で実施するものとする。

I 総アフラトキシシ試験法

1. 装置

蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-FL）

液体クロマトグラフ・質量分析計（LC-MS）又は液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）

2. 試薬、試液等^{1),2)}

次に示すもの以外は、食品、添加物等の規格基準（昭和 34 年厚生省告示第 370 号）第 2 添加物の部 C 試薬・試液等の項に掲げるものを用いる。

アフラトキシシ B1 標準品 本品はアフラトキシシ B1 98%以上を含む。

アフラトキシシ B2 標準品 本品はアフラトキシシ B2 98%以上を含む。

アフラトキシシ G1 標準品 本品はアフラトキシシ G1 98%以上を含む。

アフラトキシシ G2 標準品 本品はアフラトキシシ G2 98%以上を含む。

アセトニトリル 高速液体クロマトグラフ用に製造されたもの。

水 超純水又は高速液体クロマトグラフ用に製造されたもの。

メタノール 高速液体クロマトグラフ用に製造されたもの。

生理的リン酸緩衝液（PBS） 塩化カリウム 0.20 g、リン酸二水素カリウム 0.20 g、リン酸水素二ナトリウム（無水）1.16 g（又はリン酸水素二ナトリウム 12 水和物 2.92 g）、塩化ナトリウム 8.0 g を 900 mL の水に溶解し、0.1 mol/L 塩酸又は水酸化ナトリウム溶液で pH 7.4 に調整し、1 L に定容する³⁾。

多機能カラム 逆相樹脂、陰イオン交換樹脂及び陽イオン交換樹脂の混合物を充てんしたもの⁴⁾又はこれと同等の分離特性を有するもの。

イムノアフィニティカラム アフラトキシシ特異抗体を結合させた樹脂を充てんしたもの⁵⁾又はこれと同等の分離特性を有するもの。

ろ紙 粒子保持能 1~2.5 μm ⁶⁾又は 7~25 μm ⁷⁾のセルロース繊維のもの。

ガラス繊維ろ紙 粒子保持能 1~1.5 μm のホウケイ酸ガラス繊維のもの。

3. 試験溶液の調製

（1）多機能カラムを用いた調製

本法は、穀類、豆類及び種実類に適用できる。

① 抽出

粉碎均一化した試料 50.0 g にアセトニトリル及び水（9：1）混液 200 mL を加え、ホモジナイズした後

8)、ろ過し⁹⁾、ろ液を抽出溶液とする。

② 精製

抽出溶液約 5 mL を多機能カラムに静かに注入し、毎分約 1 mL の流速で流出し、最初の溶出液 2.0 mL¹⁰⁾ を採る。

③ 誘導体化

溶出液を 45℃以下で窒素気流を用いて濃縮し、溶媒を除去する¹¹⁾。この残留物にトリフルオロ酢酸 0.1 mL を加え、密栓して激しく攪拌する。暗所で 15 分間放置した後、アセトニトリル及び水 (1 : 9) 混液 0.9 mL を加えてよく混合したものを試験溶液^{12), 13)}とする。

(2) イムノアフィニティカラムを用いた調製

本法は、香辛料 (とうがらし、パプリカ等) や加工食品、その他多機能カラムでは精製が不十分な試料に適用できる。

① 抽出

粉碎均一化した試料 50.0 g に塩化ナトリウム 5 g と水及びメタノール (1 : 4) 混液 200 mL を加え、ホモジナイズした後⁸⁾、ろ過する⁹⁾。ろ液 10.0 mL を量り採り、水を加えて正確に 50.0 mL とする¹⁴⁾。十分混合した後、ガラス繊維ろ紙を用いてろ過し、ろ液を抽出溶液とする¹⁵⁾。

② 精製

抽出溶液 10.0 mL¹⁶⁾をイムノアフィニティカラムに注入¹⁷⁾した後、毎秒約 1~2 滴の流速で流出し、流出液は捨てる。次いで、水約 15 mL を注入し、流出液を捨てた後¹⁸⁾、アセトニトリル 3 mL を注入し、溶出液を採る^{19), 20)}。

③ 誘導体化

溶出液を 45℃以下で窒素気流を用いて濃縮し、溶媒を除去する¹¹⁾。この残留物にトリフルオロ酢酸 0.1 mL を加え、密栓して激しく攪拌する。暗所で 15 分間放置した後、アセトニトリル及び水 (1 : 9) 混液 0.9 mL を加えてよく混合したものを試験溶液^{12), 13)}とする。

4. 検量線の作成

各アフラトキシン標準品の 0.5~10 µg/L 溶液 (アセトニトリル) を数点調製し、それぞれ 1.0 mL を採り、45℃以下で窒素気流を用いて溶媒を除去する。残留物にトリフルオロ酢酸 0.1 mL を加え、密栓して激しく攪拌し、暗所で 15 分間放置した後、アセトニトリル及び水 (1 : 9) 混液 0.9 mL を加えてよく混合する。それぞれ 20 µL を HPLC に注入し²¹⁾、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。

5. 定量

試験溶液 20 µL を HPLC に注入し²¹⁾、4 で得られた検量線により小数第 2 位まで各アフラトキシンの分析値を求める。それぞれの値について小数第 2 位を四捨五入し、得られた値を合算し、さらに小数第 1 位を四捨五入して総アフラトキシンの定量値とする。

6. 確認試験

3 (1) ②で得られた多機能カラムからの溶出液 2.0 mL 又は 3 (2) ②で得られたイムノアフィニテ

イカラムからの溶出液全量を採り、45℃以下で窒素気流を用いて溶媒を除去した後、移動相 1.0 mL に溶解し、LC-MS 又は LC-MS/MS に注入して確認する²²⁾。

7. 測定条件例

検出器：FL (励起波長 365 nm、蛍光波長 450 nm)

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径 4.6 mm、長さ 150 mm 又は 250 mm、粒径 3~5 µm

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル、水及びメタノール (1 : 6 : 3) 混液²³⁾

流速：1.0 mL/min

8. 定量限界

アフラトキシン B1	1.0 µg/kg	アフラトキシン B2	1.0 µg/kg
アフラトキシン G1	1.0 µg/kg	アフラトキシン G2	1.0 µg/kg

<注解>

1) アフラトキシンは強い発がん性を有する物質であるため、取扱いに注意すること。なお、試験に用いた器具、前処理用カラム、検体等は、廃棄又は洗浄する前に、0.5-1.0% (v/v) 濃度の次亜塩素酸ナトリウムに 2 時間以上浸漬すること。

2) 正確に濃度調製された市販標準溶液 (各アフラトキシン濃度が同じもの) が使用可能である。また、各アフラトキシン結晶品からの標準溶液の調製方法として、AOAC 掲載の方法 (Mary W. Trucksess : Official Methods of Analysis of AOAC International (18th Edition) Chapter 49, p.3-5, 2005) が有用である。調製方法の例を以下に示す。

正確に 1.0 mg の秤量が保証されたもの又は正確に 1.0 mg を秤量したアフラトキシン B1、B2、G1 又は G2 にアセトニトリル 50 mL を加え、激しく攪拌し、標準原液 (各 20 mg/L) とする。標準原液は密栓し、アルミニウム箔で覆い冷蔵庫中に保存する。各アフラトキシン標準原液 0.5 mL ずつを採り、正確にアセトニトリルで 200 mL とし、混合標準原液 (各 50 µg/L) を調製する。その混合標準原液 1.0 mL を採り、アセトニトリルで 20.0 mL とし、混合標準溶液 (各 2.5 µg/L) を調製する。

3) 市販の錠剤が使用可能である。

4) 市販のカラムが使用可能である。コンディショニングを行わずそのまま用いる。使用するカラムによって溶出パターンが異なるので、標準溶液を用いて事前に溶出量を確認すること。

5) 市販のカラムが使用可能である。なお、使用前にカラム中のゲルに亀裂や気泡が生じていないことを確認し、亀裂や気泡が生じている場合には、カラム上部から注射器等で圧力を加えて除去すること。

6) 多機能カラムを用いた調製を行う場合に使用する。

7) イムノアフィニティカラムを用いた調製を行う場合に使用する。

8) 5 分間ホモジナイズ又は 30 分間振とうしてもよい。

9) 遠心分離して、その上澄液を用いてもよい。

10) 多機能カラム精製では、夾雑物はカラムに保持されて遅れて溶出し、アフラトキシンはカラムに保持されず常に一定の濃度で溶出することから、初期溶出液 2 mL 程度が最も精製度が高い。カラムからの最初の溶出液を 2.2 mL 程度採り、これを抽出溶液として、その 2.0 mL (試料 0.5 g 相当) を量り採る。

11) 溶出液から溶媒を除去する際にアフラトキシンが容器に吸着することがある。この場合、シラン処理した容器 (使用前に 20~30%アセトニトリル水等で洗浄し、乾燥させたもの) を用いることが望ましい。

12) アフラトキシン B1 及びアフラトキシン G1 の蛍光強度を増加させるために、それぞれ水酸化体にする。なお、アフラトキシン B2 及びアフラトキシン G2 は誘導体化されない。トリフルオロ酢酸による誘導体化法のほかに、フォトケミカルリアクターによる誘導体化法 (PR 法, Joshua, H. et al. : J. chromatogr A., 654, 247-254, 1993) や電気化学的誘導体化法 (KC 法, Kok, W. T. et al. : J. Chromatogr., 367, 231-236, 1986, Papadopoulou-Bouraoui, A. et al. : J. AOAC Int., 85, 411-416, 2002) も応用可能である。PR 法はポストカラムで紫外線照射により生成するアフラトキシン B1 及びアフラトキシン G1 の水酸化体を、KC 法はポストカラムで電気化学的に生ずる臭素により生成するアフラトキシン B1 及びアフラトキシン G1 の臭素誘導体を測定する簡便な手法である。いずれもポストカラム反応であるため、高速液体クロマトグラフィーにおけるアフラトキシンの溶出順序がトリフルオロ酢酸によりプレカラムで誘導体化した場合と異なり、G2、G1、B2、B1 の順となる。PR 法及び KC 法の場合、トリフルオロ酢酸による反応を行わないため、イムノアフィニティカラムからの溶出液全量又は多機能カラムからの溶出液 2.0 mL を採り、45°C以下で窒素気流を用いて溶媒を除去し、残留物をアセトニトリル及び水混液 (1:9) 1 mL で溶解したものを試験溶液とする。溶解に用いるアセトニトリル及び水混液の比率は変更可能であるが、各アフラトキシンのピーク形状及び分離に留意し、HPLC への注入量を変更する必要がある。アセトニトリル及び水混液の比率が 1:9 の場合には 100 µL 以下、1:1 の場合には 30 µL 以下とする。なお、多機能カラムからの溶出液を直接 HPLC に注入することもできるが、アセトニトリル及び水混液の比率が 9:1 であるため、注入量は 10 µL 以下とする。また、HPLC 注入用の容器として、ガラス製品を用いるとシラン処理を行った容器においてもアフラトキシンが吸着することがあるため、ポリプロピレン製の樹脂製の容器を用いるとよい。PR 法及び KC 法の測定条件の例を以下に示す。

<PR 法>

検出器 : FL (励起波長 365 nm、測定波長 450 nm)

カラム : オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 4.6 mm、長さ 150 又は 250 mm、粒径 3~5 µm)

カラム温度 : 40°C

移動相 : 水及びメタノール (3:2) 混液

流速 : 0.7 mL/min

PR 反応システム : 245 nm 低圧水銀灯 (15 W) 照射システム

反応コイル : 内径 0.25 mm、長さ 15~20 m

注入量 : 10~100 µL

<KC 法>

検出器 : FL (励起波長 365 nm、測定波長 450 nm)

カラム : オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 4.6 mm、長さ 150 又は 250 mm、粒径 3~5 µm)

カラム温度：40℃

移動相：水及びメタノール（3:2）混液（1 Lにつき臭化カリウム 119 mg 及び 4 mol/L 硝酸 350 μL を加える）

流速：1.0 mL/min

KC 反応システム：100 μA 電流

注入量：10～100 μL

13) 必要に応じて、遠心処理等で不溶物を除去後、HPLC 用試験溶液とする。

14) 白コショウ等の香辛料において、水希釈時に発生する沈殿物にアフラトキシンが吸着し、回収率が低下することがある。この場合、ろ過後ポリソルベート 20 を含む水又は PBS で希釈する方法が有効である。なお、1 機関の結果であるが、白コショウについては 8% (w/v) ポリソルベート 20 を含む水で希釈する方法が適用できることが確認されている。

ナツメグ等の香辛料、カカオ豆やその加工品等において、水及びメタノール混液を用いた抽出では、アフラトキシンの回収率が 70%を下回る場合がある (Itoh, A. et al.: *Mycotoxins*, 58, 7-13, 2008)。この場合、塩化ナトリウムを加えずにアセトニトリル、水及びメタノール（6：4：1）混液を用いて抽出し、ろ過後ポリソルベート 20 を含む水又は PBS で希釈する方法が有効である。希釈は、使用するイムノアフィニティカラムの耐溶媒性を考慮して行う。また、希釈倍率を変更した場合には、試料量として 0.5 g 相当の抽出溶液をイムノアフィニティカラムに注入する必要がある。なお、2 機関の結果であるが、綿実、生のゴマ、ナツメグ及びカカオ豆について、アセトニトリル、水及びメタノール（6：4：1）混液で抽出し、ろ液をポリソルベート 20 を含む水（綿実及び生のゴマの場合は 2%(w/v)、ナツメグの場合は 4%(w/v)、カカオ豆の場合は 0.01%(w/v)）で 10 倍に希釈し、ガラス繊維ろ紙でろ過後、ろ液 20.0 mL をイムノアフィニティカラムに注入する方法が適用できることが確認されている。しかしながら、本方法を行う前にはそれぞれの機関で、かならず II. 妥当性評価の方法に準じて、その妥当性を確認すること。

15) ろ液を水で希釈すると沈殿が生じることがある。これを直接イムノアフィニティカラムに注入するとカラムが詰まることがあるため、ガラス繊維ろ紙を用いてろ過する。

16) 抽出溶液 10.0 mL は試料 0.5 g に相当する。

17) イムノアフィニティカラムの下部にストップコックを取り付け、これをバキュームマニホールド等に連結し、カラム内の溶液を全部流出させた後、カラム内に PBS を満たし全量を流出させ、カラムのコンディショニングを行う。その後、カラム内に PBS を満たし、カラム容量の約半分の量の PBS を流出させた後、ストップコックを閉め、リザーバー又は注射筒をコネクターを用いてカラムと連結する。

18) 洗浄する時にはストップコックで流速を調節する必要はない。また洗浄する際には、リザーバーをカラムから取り外した後、カラム内をピペット等を用いて水で満たし、その全量を排出させる操作を 5 回ほど繰り返すことが有効である。

19) アセトニトリル 1 mL をカラムに注入し、自然落下で溶出させた後 5 分間放置する。さらにアセトニトリル 1 mL をカラムに注入し溶出する。この操作をもう一度繰り返した後、注射器にリザーバーコネクターを取り付けたものを用意し、これをカラム上部に連結し、空気を押し出すことによりカラム中ゲル内のアセトニトリルを溶出する。

20) 試料によっては、抽出溶液をイムノアフィニティカラムに注入後、水による洗浄でカラム内ゲルの着色が取り除けず、その後の定量に影響を与えることがある。この場合、0.01% (w/v) ポリソルベート

20 を含む PBS 及び水それぞれ 10 mL 以上で順次洗浄した後、加圧してカラム内の水分を除去し、アセトニトリルで溶出することが有効である。

21) 検出器の性能により、注入量を変更してもよい。

22) LC-MS 又は LC-MS/MS の測定条件の例を以下に示す。

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 3~5 µm）

カラム温度：40℃

移動相：10 mmol/L 酢酸アンモニウム及びメタノール（3：2）混液

流速：0.2 mL/min

注入量：5~10 µL

イオン化モード：ESI（+）

検出イオン（m/z）：

<LC-MS>

アフラトキシシン B1 313

アフラトキシシン B2 315

アフラトキシシン G1 329

アフラトキシシン G2 331

<LC-MS/MS>

アフラトキシシン B1 プリカーサーイオン 313、プロダクトイオン 241、213

アフラトキシシン B2 プリカーサーイオン 315、プロダクトイオン 259、287

アフラトキシシン G1 プリカーサーイオン 329、プロダクトイオン 243、200

アフラトキシシン G2 プリカーサーイオン 331、プロダクトイオン 245、189

保持時間の目安：

アフラトキシシン B1 11.0 分

アフラトキシシン B2 8.7 分

アフラトキシシン G1 6.9 分

アフラトキシシン G2 5.5 分

これら条件を用いて、LC-MS 又は LC-MS/MS により各アフラトキシシンを定量することもできる。定量に際しては、内標準物質の添加又はブランク試料溶液を用いた検量線の作成等、定量性を十分確保して行う。また、HPLC 注入用の容器として、ガラス製品を用いるとシラン処理を行った容器においてもアフラトキシシンが吸着することがあるため、ポリプロピレン製の樹脂製の容器を用いるとよい。

23) 各アフラトキシシンのピークの形状又は分離が一定とならない場合には、移動相に最終濃度として 10 mmol/L となるように酢酸アンモニウム緩衝液（pH 5.0）を加えるとよい。

II 妥当性評価の方法

食品毎に、アフラトキシン（B1、B2、G1 及び G2）を含まない試料（ブランク試料）に各アフラトキシン（B1、B2、G1 及び G2）を添加した試料（添加試料）を、試験法に従って試験し、その結果から以下の性能パラメータを求め、それぞれ表に示す目標値等に適合していることを確認する。添加濃度は、原則として各アフラトキシンにつき 2.5 µg/kg とする。

なお、各パラメータの定義及び評価の手順は、「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」（平成 19 年 11 月 15 日付け食安発第 1115001 号別添）に準じるものとする。

1. 選択性

ブランク試料を試験法に従って試験し、定量を妨害するピークがないことを確認する。

妨害ピークを認める場合は、妨害ピークの面積（又は高さ）が、各アフラトキシン濃度 2.5 µg/kg の標準液から得られるピーク（又は高さ）と比較し 1/10 未満であることを確認する。

2. 真度（回収率）

同一濃度の添加試料 5 個以上を試験法に従って試験し、得られた定量値の平均値の添加濃度に対する比率を求め、真度を評価する。

3. 精度

添加試料の試験を繰り返し、得られた定量値の標準偏差及び相対標準偏差を求め、併行精度及び複数の実施者又は実施日による室内精度を評価する。

<表 真度及び精度の目標値>

評価対象	試行回数*	真度(%)	併行精度(%)	室内精度(%)
アフラトキシン B1	5	70 ~ 110	20 ≥	30 ≥
アフラトキシン B2	5	70 ~ 110	20 ≥	30 ≥
アフラトキシン G1	5	70 ~ 110	20 ≥	30 ≥
アフラトキシン G2	5	70 ~ 110	20 ≥	30 ≥

* 自由度 4 以上とする。

アセチル化DONの分析法とフモニシン類の分析法に対する意見募集の結果について

平成 23 年 10 月
カビ毒試験法評価委員会事務局

平成23年8月1日（月）から平成23年8月24日（水）にかけて、標記に係る意見募集を行ったところ、その結果は以下のとおりです。

1. 実施方法

- ・募集期間：平成23年8月1日（月）～平成23年8月24日（水）
- ・告知方法：カビ毒試験法評価委員会ホームページに掲載
- ・意見提出方法：電子メール

2. 提出意見数

6件（3者） 同様のご意見は一つにまとめましたことをご容赦下さい。

3. 提出されたご意見とそれに対する考え方

以下のとおり

No	いただいたご意見	ご意見に対する回答
アセチル化 DON の分析法のプロトコールについて		
1	イオン化法が APCI 法のみとなっているが、ESI 法等の他のイオン化法を用いることは可能か？	<p>予備実験において、複数種の多機能カラムを用いて検討を行いましたところ、APCI 法ではいずれのカラムを用いても良好な結果が得られましたが、ESI 法ではカラムによっては精製が不十分で、強いイオン化抑制が認められるものがありました。そのため、プロトコールの測定条件(例)のイオン化法にはイオン化抑制が生じにくい APCI 法を記載しております。</p> <p>しかし、今回のコラボラティブスタディで用います多機能カラムは、精製効率が高く、ESI 法で測定してもイオン化抑制が生じにくいことが確認されていますため、ESI 法を用いることも可能です。なお、各機関の分析法は統一することが望ましいため、イオン化は ESI 法とすることといたしました。</p>
2	検量線の作成において、各濃度の標準品をバイアル瓶に入れて窒素乾固するとあるが、バイアル瓶を用いるとばらつきが生じる可能性が高いと考える。メスフラスコを用いた調製を行う必要はないか？	<p>ご意見の通り、メスフラスコを用いる方がバイアル瓶よりもより正確な調製が可能と考えております。しかし、一般的に購入可能なメスフラスコの最小サイズは 5mL 容であり、そのサイズのものを用いますと必要以上のカビ毒希釈液が調製されてしまい、実験環境の汚染等の問題が懸念されました。そのため、今回は必要最低限の量が調製可能なバイアル瓶を用いることとしました。なお、予備実験においてバイアル瓶による調製においても定量を行うのに問題のない検量線が作成できることは確認しております。</p>
3	検量線の作成において、褐色シラン処理されたバイアルを使用するとあるが、試験溶液調製に使用する共栓付き試験管も同様の褐色シラン処理のものを使用すべきか？	<p>試験溶液調製に使用する共栓付き試験管につきましては、必ずしも褐色シラン処理済みのものである必要はありません。予備実験においては透明でシラン処理されていない試験管を用いましたが、良好な結果が得られております。なお、検量線の作成のための希釈に用いるバイアルも必ずしも褐色シラン処理済みのものである必要はありませんので、プロトコールの記載を変更いたしました。</p>
4	現在設定されている DON の暫定基準値(玄麦に対して 1.1ug/g)から考えると、標準品の最低濃度(1ng/mL)はかなり低いと考えるが、設定根拠を教えてください。	<p>今回のコラボラティブスタディの目的の一つは、DON 類の汚染の実態調査のための分析法の評価であります。そのため暫定基準値ではなく、DON の汚染実態を踏まえた範囲の検量線を作成することが望ましいと考えましたので、最低濃度を</p>

1ng/mL といたしました。

フモニシン類の分析法のプロトコールについて

5

サンプルを最終的に 0.8mL の移動相に溶解するとあるが、その操作はホールピペット等を用いて正確に行う必要があると考える。溶解に用いる移動相の量をホールピペットの一般的な容量 (0.5mL 又は 1mL) とし、それに合わせてイオン交換体カラムに負荷する抽出溶液の量も変更することを提案する。

ご提案を踏まえ、プロトコールを変更し、イオン交換体カラムに負荷する抽出液の量を 10mL に、乾固後に溶解に用いる移動相の量を 1mL といたします。

両プロトコールについて

6

複雑なマトリックスを分析するためのイムノアフィニティカラムを用いた精製法や、アフラトキシンの分析で行われているように多数のサンプルをスクリーニングするための ELISA やその他の簡易法を用いた検出法の検討も今後行うことを提案する。

今回のコラボラティブスタディでは、精製は多機能カラム (アセチル化 DON) 又はイオン交換カラム (フモニシン) を用い、検出は LC-MS/MS 法のみを予定しておりますが、ご意見を踏まえ、他の精製法や検出法の評価も必要に応じて検討したいと考えております。貴重なご意見誠にありがとうございました。

「デオキシニバレノール、3-アセチルデオキシニバレノール
及び 15-アセチルデオキシニバレノールの分析法」
コラボラティブスタディプロトコール

以下、デオキシニバレノールをDON、3-アセチルデオキシニバレノールを3ADON、15-デオキシニバレノールを15ADONと表記する。

操作手順

1. 前処理

検体を天秤で25.0 gを正確に量りとり、300 ml容の共栓付き三角フラスコに移す。添加用試料（試料番号1～8）の場合は、添加用DON、3ADON及び15ADONの3種混合溶液を250 µl添加して暗所に1時間放置後に抽出溶媒を加える。自然汚染試料（試料番号9～12）及び試料番号13及び14については添加を行わない。

これに抽出溶媒アセトニトリル：水（85：15）100 mlを加え、10分間室温で静置する。振とう機を用いて30分間激しく振り混ぜ、50 ml容プラスチック遠心チューブに入れて3,000 gで5分間遠心分離し、上清を抽出溶液とする。

2. 多機能ミニカラムによる精製

- 1) 多機能ミニカラムをカラム架台にセットする。抽出溶液10 mlを入れ、最初の流出液3 mlは捨て、次いで流出する2.4 mlを共栓付き試験管に採り、溶出液とする。
- 2) 溶出液2.0 mlを共栓付き試験管に正確にとり、アルミブロックヒーターを40℃以下で使用し窒素气流を送るか、エバポレーターを用いて、試験管中の溶媒を除去する。

なお、試料番号13及び14については、以下の操作を行う。スタンダード1及び2については「3. 2) 検量線の作成」に従って調製する。

溶出液2.0 mlを共栓付き試験管にとり、試料番号13の溶出液にはスタンダード1（1 µg/ml溶液）を75 µl入れ、試料番号14の溶出液にはスタンダード2（100 ng/ml溶液）を50 µl入れる。その後、溶媒の除去を行う。

- 3) 残留物にHPLC注入液アセトニトリル：水（1：9）0.5 mlを加えたものを試験管ミキサー等で完全に溶解する。溶かした後、HPLC用バイアルに移す。試験溶液が濁っている場合は1.5 ml容マイクロチューブ等に移し、10,000 g 以上、5 分間遠心し、その上清をHPLC用バイアルに移す。これをLC-MS/MS用試験溶液とする。なお、自然汚染試料においては、検量線から外れるものが多数存在する。そのため適宜試験溶液を希釈し、測定を行う。予備実験においては、原液とそれを10倍希釈した溶液を同時に測定し、検量線内に収まった値（両方とも収まった場合は原液の値）を用いた。