

III. 分担研究報告

食肉中のアフラトキシンの分析

研究分担者 穂山浩

星薬科大学薬学部

国立医薬品食品衛生研究所

動物性食品輸出の規制対策のための研究

食肉中のアフラトキシンの分析

研究分担者 穂山浩 星薬科大学薬学部 薬品分析化学研究

研究要旨

EU へ動物性食品を輸出する際は、牛肉中のアフラトキシンの分析による検査を行う必要がある。筋肉を対象としたアフラトキシンの分析法が必要であるが、アフラトキシンの分析法が整備されていない。牛筋肉を対象としたアフラトキシンの分析法の確立を検討した。試料の前処理に Captiva EMR-Lipid を使用した結果、カラムの汚染や試料溶液の懸濁が改善された。検量線は、0.05~5 ng/mL の濃度範囲で AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ いずれも $r=0.999$ 以上となり良好な直線性が得られた。定量下限値(MQL: $S/N>10$)はそれぞれ 0.006、0.024、0.012、0.018 および 0.006 ng/g であった。各 2.5 ng/g で添加回収実験を行ったが、平均回収率、併行精度、室内精度とも良好であった。

研究協力機関 (一財) 日本食品分析センター

A. 研究目的

EU へ動物性食品を輸出する際は、欧州理事会指令 96/23/EC および規則(EU)2017/625 に従って作成した残留物質モニタリング計画に基づき、B 物質(抗菌性物質、駆虫剤、抗コクシジウム剤、非ステロイド性抗炎症薬、カルバメート系農薬、ピレスロイド系農薬、有機塩素系農薬、PCB、有機リン系農薬、重金属・有害元素、マイコトキシン)のモニタリング検査を行う必要がある。アフラトキシン類(AFs)は、*Aspergillus* 属の一部が産生するかび毒であり、主に AFB₁、AFB₂、AFG₁ および AFG₂ などがあり、これらは強い発がん性を有している。本研究では、牛筋肉を対象としたアフラトキシンの分析法を確立し、迅速な対応が取れる体制を整備することを目的とした。

B. 研究方法

1. 試薬および試料 Afs (AFB₁、AFB₂、AFG₁ および AFG₂ 混合液、各 25 µg/mL) は和光純薬工業株式会社製を用いた。アセトニトリルおよびメタノール(いずれも HPLC 用)は富士フィルム和光純薬工業株式会社製を用いた。TFA(特級)は和光純

薬工業株式会社製を用いた。超純水は大和化研製を用いた。AfalaPat は GLSciences 社製のものを用いた。試料には、市販の国産和牛肉を用いた。使用した器具の洗浄は、予め次亜塩素酸ナトリウム(化学用)和光純薬工業株式会社製を 1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液に調製したもので2時間以上浸漬して Afs を十分に分解した後、中性洗剤で洗浄した。

2. 標準溶液の調製 Afs 混合液は、Afs 混合液(25 µg/mL)を 1 mL 正確に量り取り、アセトニトリルで 100 mL にメスアップしたものを標準原液(250 ng/mL)とした。この標準原液から精製水で適宜希釈したものを標準溶液とした。これらの標準原液と標準溶液は 10°C以下で保存した。

3. 抽出操作

国産和牛肉を 50 g を量り取り、高速ホモジェナイズし均質化した。そこに標準溶液を 500 µL 添加した。抽出液としてアセトニトリル 200 mL を加え、高速ホモジェナイズした。吸引ろ過により得たる液約 200 mL を試料溶液とした。

4. 固相分散抽出法(SPDE)

Captiva Lipid チューブに試料溶液 6 mL 分取し、5 分かけて自然落下で抽出ろ過を行った。この操作を 4 回行った。次に、Captiva Lipid のろ液 6 mL を AfalaPat に分取し、2 分かけて自然落下にて抽出を行い、初めのろ液が約 2 mL になった時点で滴下を止めた。同様の操作を 3 回行った。AfalaPat のろ液約 2 mL から正確に 2 mL をチューブに分取し、45°C で窒素乾固した。同じチューブを用いて、2 mL 分取し乾固するという操作を同様に 3 回行った。計 6 mL の窒素乾固を行い濃縮した。

5. 蛍光誘導体化法

濃縮を行ったチューブに TFA 0.1 mL を添加し、30 秒間ボルテックスミキサーで攪拌した。室温暗所で 15 分間放置した。ACN 0.9 mL を加えて全量を 1 mL とし、その 20 μ L を HPLC-FL で測定した。

6. 分析装置および測定条件

装置：HPLC-FL

【HPLC 条件】

ポンプ : GLSciences DG660B-2
Degussing Unit
分析カラム : L-column3 ODS (2.1 mm \times 150 mm i.d., 3 μ m)
移動相 : 精製水/アセトニトリル/メタノール混液(70:15:15, v/v)
流速 : 0.2 mL/min
カラム温度 : 40°C
注入量 : 20 μ L

【FL 条件】

蛍光検出器 : 日本分光 FP-4025
励起波長 : 365 nm
蛍光波長 : 435 nm

C. 研究結果及び考察

本研究では、輸出向け国産和牛肉中総 AFs 残留分析法を検討した。LC 分離において、既存の残留分析法を参考に、AFs の検出の際には精製水/アセトニトリル/メタノール混液(70:15:15, v/v)を使用した。

蛍光検出に際しても、既存の残留分析法を参考に、波長を設定した。試料溶液の調製において、試料抽出液が懸濁したため本法では、Captiva EMR-Lipid を使用した。その結果、カラムの汚染や試料溶液の懸濁が改善された。検出限界(MDL : S/N=3)は 4 ng/g、定量下限値(MQL : S/N>10)は 8 ng/g であった。

構築した方法で性能評価を検討したところ、検量線は、0.05~5 ng/mL の濃度範囲で AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ いずれも $r=0.999$ 以上となり良好な直線性が得られた。また、検出限界(MDL : S/N=3)はそれぞれ 0.002、0.008、0.004、0.006 および 0.002 ng/g、定量下限値(MQL : S/N>10)はそれぞれ 0.006、0.024、0.012、0.018 および 0.006 ng/g であった。

各 2.5 ppb 添加で AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ の各平均回収率は 102%、99%、118%、96% で、各併行精度は、6.3%、3.4%、6.0%、6.3%、各室内精度は、8.3%、3.2%、10.0%、7.2% であった。

D. 結論

本法は、国産和牛肉中の総 AFs の一斉分析に適用可能であることが確認された。今後、日本産の和牛を輸出する際の分析に適応できると考えられ、食品衛生分野での貢献が期待される。

E. 健康危険情報 なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

G. 研究発表

(論文発表)

Akiyama H, Takagi A, Inoue K, Suzuki Y, Ito R, Wakui N, Asai M, Sugiura J. Evaluation of a risk communication program for pesticide residues, *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 62, 187-192 (2021).

(学会発表) なし

H. 知的所有権の取得状況・登録状況なし