

(別添)

「総アフラトキシンの試験法」

I 総アフラトキシンの試験法

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。

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

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

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

アフラトキシン G₂ 標準品 本品はアフラトキシン 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 アフラトキシン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 µm⁶⁾又は 7~25 µm⁷⁾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°C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 10 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°C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°C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 μ L 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 μ L 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ィカラムからの溶出液全量を取り、45°C 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 μ m

カラム温度：40°C

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 μ g/kg アフラトキシン B₂ 1.0 μ g/kg

アフラトキシン G₁ 1.0 μ g/kg アフラトキシン G₂ 1.0 μ g/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℃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℃

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 μ L

<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 μ m）

カラム温度：40°C

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 μ L を加える）

流速：1.0 mL/min

KC 反応システム：100 μ A 電流

注入量：10～100 μ L

- 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、綿実、生ゴマ等において、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。この場合、塩化ナトリウムを加えずにアセトニトリル、水（9：1）で抽出し、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。上清が 2 層に分離する食品においては、アセトニトリル、水及びメタノール（6：4：1）混液を用いての抽出が有効であることが報告されている（Itoh, A. *et al.* : *Mycotoxins*, 58, 7-13, 2008）。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。これらの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。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。
- 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 3 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、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°C

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

アフラトキシン G₁ 329

アフラトキシン G₂ 331

<LC-MS/MS>

アフラトキシン 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：

アフラトキシン B₁ 11.0分

アフラトキシン B₂ 8.7分

アフラトキシン G₁ 6.9分

アフラトキシン 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 1.25 µg/L に相当するピークのアフラトキシンの面積 (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 B ₁	5	70 ~ 110	20 ≥	30 ≥
アフラトキシン B ₂	5	70 ~ 110	20 ≥	30 ≥
アフラトキシン G ₁	5	70 ~ 110	20 ≥	30 ≥
アフラトキシン G ₂	5	70 ~ 110	20 ≥	30 ≥

* 自由度 4 以上とする。