

LC-MS/MS を用いたナッツ類における 総アフラトキシン一斉試験法の妥当性評価

保健科学課 微量分析担当

1 はじめに

平成 23 年 3 月、厚生労働省通知¹⁾により、食品中の総アフラトキシン（アフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ の総和）に対して 10 µg/kg の規制値が設定された。同年 8 月には、「総アフラトキシンの試験法について」²⁾ が示された（以下、「通知」とする。）。

通知により試験法が示されたが、通知に示された試験法以外の方法による場合は、当該試験法の妥当性を評価した上で実施するものと記載されている。福岡市保健環境研究所では、蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ（以下、「HPLC-FL」とする。）を用いた試験法の検査実施標準作業書を作成し、妥当性評価を実施している。なお、定性確認試験については、高速液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（以下、「LC-MS/MS」とする。）を用いて、検査実施標準作業書に従い実施している。

HPLC-FL を用いた試験法における試験溶液の調製では、誘導体化が必要であり、LC-MS/MS を用いた試験法よりも操作が煩雑である。そのため、前処理時間の短縮を目的に、LC-MS/MS を用いた試験法の妥当性評価を実施した。妥当性評価試験については、平成 19 年に厚生労働省から通知された「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ついて」^{3, 4)}（以下、「ガイドライン」とする。）及び通知に準じて実施した。

2 実験方法

2.1 試料

福岡市内に流通する市販のカシューナッツ及び、脂質や塩といった夾雑成分が多いと考えられるバターピーナッツを用いた。

2.2 試薬等

標準原液：富士フィルム和光純薬社製 アフラトキシン混合標準液（アフラトキシン B₁, B₂, G₁, G₂ 各 25 µg/mL アセトニトリル溶液）

標準溶液：アフラトキシン混合標準原液をアセトニトリル及び水混液（1:9）で適宜希釈した。

多機能カラム：Romer Labs 社製 MultiSep™ #228 Afla Pat（6 mL）

ろ紙：アドバンテック東洋社製 ろ紙 5A

フィルター：アドバンテック社製 孔径 0.2 µm メンブレンフィルター

バイアル：GL サイエンス社製 1.5 mL スクリューバイアル PP 褐色

アセトニトリル：富士フィルム和光純薬社製 HPLC 用

メタノール：富士フィルム和光純薬社製 LC-MS 用

2.3 装置

LC部：Agilent社製 1260シリーズ

MS部：Agilent社製 Agilent 6470

2.4 測定条件

測定条件を表 1 に、対象化合物の測定イオンを表 2 に示す。

表 1 LC-MS/MS 測定条件 1

分析カラム	YMC 社製 YMC-Pack Pro C18 (50 mm×2 mm i.d., 5 µm)
カラム温度	40°C
注入量	5 µL
移動相	A 液：10 mmol/L 酢酸アンモニウム水 B 液：メタノール
グラジエント条件	B 液：10%(0 min)-100%(12 min)-100% (17 min)-10%(17.1 min)-10%(22 min)
流速	0.2 mL(0-17 min), 0.4 mL(17.1-22 min)
イオン化	ESI（ポジティブモード）
イオンスプレー電圧	4000 V
イオンソース温度	350°C

表2 対象化合物の測定イオン

No.	化合物名	Q1(m/z)	Frag(V)	定量イオン		確認イオン	
				Q3(m/z)	CE(V)	Q3(m/z)	CE(V)
1	アフラトキシンB ₁	313.1	120	241.0	44	213.0	50
2	アフラトキシンB ₂	315.1	120	287.0	28	259.0	36
3	アフラトキシンG ₁	329.1	120	243.0	32	200.0	48
4	アフラトキシンG ₂	331.1	120	313.0	28	189.0	50

2.5 試験溶液の調製

試験溶液の調製法を図1に示す。

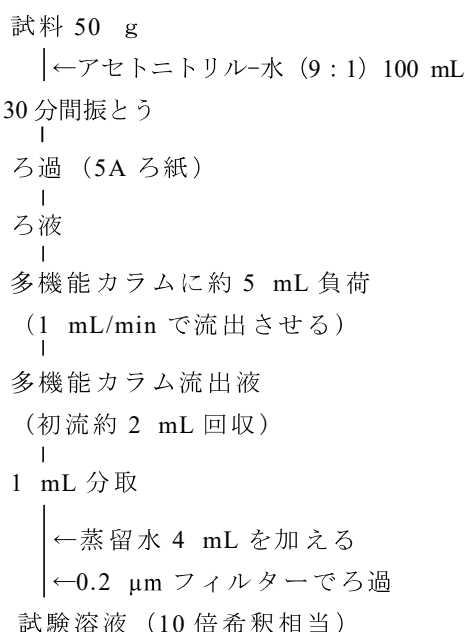


図1 試験溶液の調製法

2.6 妥当性評価の方法

カシューナッツ及びバターピーナッツにおいて、添加濃度 1 μg/kg での添加回収試験を実施者 5 名で 2 併行 1 日間行い、ガイドラインに従って選択性・真度(回収率)・精度(併行精度・室内精度)を評価した。通知に示された妥当性評価の方法においては、添加濃度を「原則として各アフラトキシンにつき 2.5 μg/kg とする」と記載している。しかし、食品中の各アフラトキシン含有量は不均等であることから、2.5 μg/kg 未満でも総アフラトキシンの規制値 10 μg/kg に影響すると考えられるため、当所の定量下限値である 1 μg/kg を添加濃度として妥当性評価を実施した。

3 結果及び考察

3.1 測定条件の検討

はじめに、当所の検査実施標準作業書に従って、蒸留水及びアセトニトリルを移動相として測定した。しかし、機器の更新により、検査実施標準作業書の測定条件では十分な感度が得られなかった。そのため、通知を参考に、移動相を 10 mmol/L 酢酸アンモニウム水及びメタノールに変更し測定した。また、測定時間短縮のため、グラジエント条件についても変更した。

当初の測定条件を表3に示す。

表3 LC-MS/MS 測定条件2

分析カラム	YMC 社製 YMC-Pack Pro C18 (50 mm×2 mm i.d., 5 μm)
カラム温度	40°C
注入量	5 μL
移動相	A 液: 蒸留水 B 液: アセトニトリル
グラジエント条件	B 液: 10%(0 min)-100%(15 min)-100% (25 min)-10%(25.1 min)-10%(30 min)
流速	0.2 mL(0-25 min), 0.4 mL(25.1-30 min)
イオン化	ESI (ポジティブモード)
イオンスプレー電圧	4000 V
イオンソース温度	350°C

条件を変更して測定した結果、0.1 μg/L で良好なピーク形状が得られたことから、LC-MS/MS 測定条件1を採用することとした。図2に各測定条件で測定した標準溶液のクロマトグラムを示す。

3.2 妥当性評価結果

評価結果を表4に示す。絶対検量線(0.05~1 μg/L)を作成し、試料中の各アフラトキシン濃度を算出した。カシューナッツは溶媒標準溶液を用いて定量したが、バターピーナッツについては、イオン化促進が生じたため、マトリックス添加標準溶液を用いて定量した。各アフラトキシンにおいて、検量線の決定係数は0.998以上と良好な結果が得られた。

対象の両食品ともに妨害ピークは定量下限値におけるピーク面積の1/10未満であることから目標を満たしていた。真度・精度においても、各アフラトキシンで通知の目標値(真度:70~110%, 併行精度:RSD%≤20, 室内精度:RSD%≤30)を満たしていた。

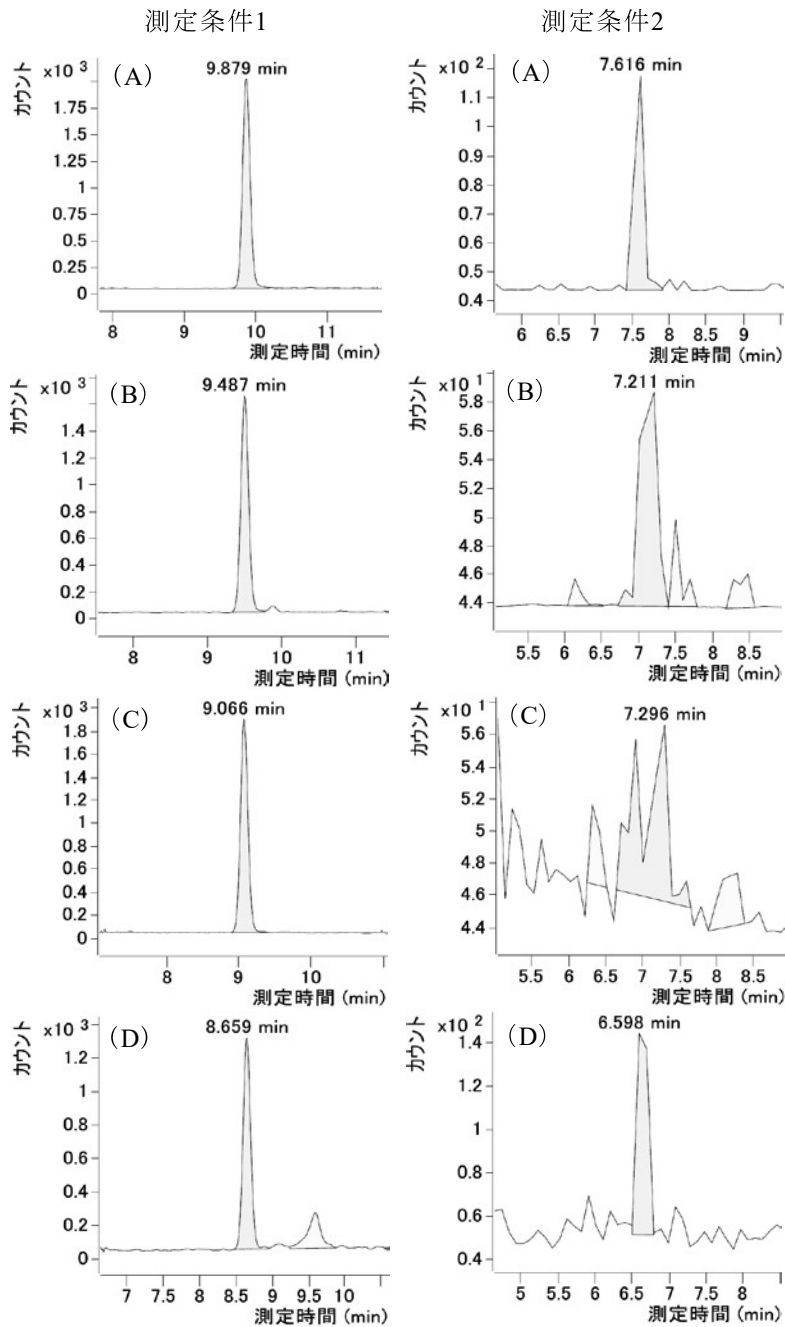


図2 各測定条件におけるクロマトグラム

(A) : アフラトキシン B₁, (B) : アフラトキシン B₂, (C) : アフラトキシン G₁, (D) : アフラトキシン G₂

表4 妥当性評価結果

No.	化合物名	カシューナッツ				バターピーナッツ			
		真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	評価	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	評価
1	アフラトキシンB ₁	96	2.9	2.5	○	97	3.0	3.5	○
2	アフラトキシンB ₂	95	4.5	3.9	○	91	2.6	2.7	○
3	アフラトキシンG ₁	97	2.5	2.8	○	92	5.6	6.8	○
4	アフラトキシンG ₂	99	2.5	2.7	○	91	6.1	5.6	○
	目標値	70~110	20≧	30≧		70~110	20≧	30≧	

4 まとめ

ナッツ類中の総アフラトキシン一斉試験法について、HPLC-FL 法から LC-MS/MS 法への切り替えのため、ガイドラインに準じて妥当性評価を行った。その結果、各アフラトキシンにおいて、全ての性能パラメーターは、通知の目標値等に適合したため、LC-MS/MS を用いた試験法は、規制値の適合判定を行う試験として有用であると考えられる。

文献

- 1)厚生労働省通知食安発 0331 第 5 号: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
- 2)厚生労働省通知食安発 0816 第 2 号:総アフラトキシンの試験法について、平成 23 年 8 月 16 日
- 3)厚生労働省通知食安発 1115 第 1 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、平成 19 年 11 月 15 日
- 4)厚生労働省通知食安発 1224 第 1 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の一部改正について、平成 22 年 12 月 24 日