

乳に含まれるアフラトキシン M1 の試験法の検討

宮地夏海・常松順子

福岡市保健環境研究所保健科学課

Study on the Analytical Method of Aflatoxin M1 in Milk

Natsumi MIYACHI and Junko TSUNEMATSU

Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

要約

平成 27 年 7 月 23 日, 厚生労働省からの通知により, アフラトキシン M1 は乳に対して 0.5 μ g/kg の規制値が設定され, 同時に, 乳に含まれるアフラトキシン M1 の試験法が通知された. 本市においても, これに対応するため, 2 種類の分析機器を用いて 0.05 μ g/kg 及び 0.5 μ g/kg となるように標準溶液を添加した試料を用いて添加回収試験を行った. 高速液体クロマトグラフ・蛍光検出器での回収率は 81.2~100.6%, 高速液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計での回収率は 78.8~99.5% であり良好な結果であった.

Key Words : アフラトキシン M1 aflatoxin M1, 乳 milk, 高速液体クロマトグラフ・蛍光検出器, HPLC-FLD, 高速液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計 LC-MS/MS

1 はじめに

平成 27 年 7 月 23 日, 厚生労働省からの通知¹⁾により, アフラトキシン M1 は乳に対して 0.5 μ g/kg の規制値が設定された. 同時に, 乳に含まれるアフラトキシン M1 の試験法が通知された²⁾. 本市においても, これに対応するため, 高速液体クロマトグラフ・蛍光検出器 (HPLC-FLD) 及び高速液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて測定条件の検討を行ったので報告する.

2 実験方法

2.1 試料

市内に流通する市販牛乳を試料とした.

2.2 試薬等

標準原液: 和光純薬工業(株)製 Aflatoxin M1 Standard Solution (0.5 μ g/mL アセトニトリル溶液)

標準溶液: 標準原液をアセトニトリルで適宜希釈した, それぞれ 1mL を採り, 溶媒を除去した. その残留物にアセトニトリル及び水 (1:4) 混液 1mL を加えて混合した

ものを標準溶液とした.

生理的リン酸緩衝液 (PBS) : Sigma-Aldrich 社製 Phosphate Buffered Saline Tablet 1 錠を 200mL の水で溶解し用いた.

イムノアフィニティカラム: 日本ハム(株)製 MycoCatch トータルアフラトキシンを使用した. 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った. その後, さらに PBS を満たし, カラム容量の約半分量まで PBS を流出させて使用した.

ろ紙: アドバンテック東洋(株)製 GA-100

アセトニトリル: 高速液体クロマトグラフ用及び LC/MS 用を使用した.

その他試薬類: 高速液体クロマトグラフ用を使用した.

2.3 装置

2.3.1 HPLC-FLD

液体クロマトグラフ: Agilent社製 1290シリーズ

蛍光検出器: Agilent社製 1290

2.3.2 LC-MS/MS

液体クロマトグラフ: 島津製作所製 NexeraXR

質量分析計: ABSCIEX社製 TQ6500

2.4 試験溶液の調製

2.4.1 試料の調製

乳を 37℃ に加温し、ガラス繊維ろ紙でろ過したものを試料とした。

2.4.2 精製及び試験溶液の調製

精製及び試験溶液の調製法を図 1 に示した。

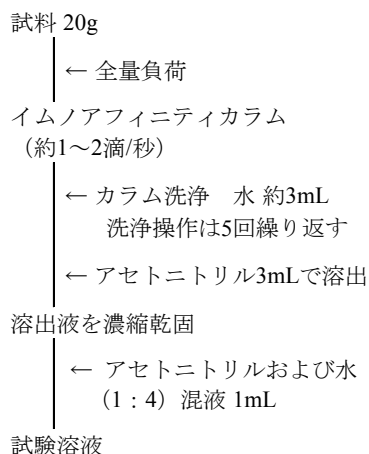


図 1 精製及び試験溶液調製法

標準溶液 (1µg/L) のシグナルノイズ比 (S/N 比) は 8.3 であったため、より検出感度を上げるために、カラムの内径及び粒径、移動相の流速を表 2 に示した条件に変更して標準溶液を測定した。標準溶液 (1µg/L) のクロマトグラムを図 2 に示した。

表 2 : HPLC-FLD の測定条件 2

分析カラム : ジーエルサイエンス(株)製 Inertsil ODS-3 2.1mm×100mm, 3µm
移動相 : A液 : 水, B液 : アセトニトリル A液 : B液 = 3 : 1 (アイソクラティック)
流速 : 0.2mL/min
カラム温度 : 40℃
注入量 : 20µL
波長 : 励起波長 (Ex) 365nm 蛍光波長 (Em) 435nm

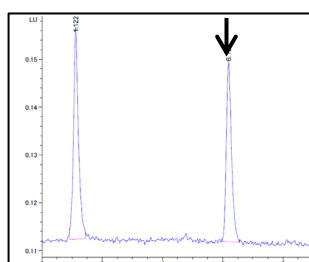


図 2 標準溶液 (1µg/L) のクロマトグラム
(使用カラム : 2.1mm×100mm, 3µm)

3 結果及び考察

3.1 測定条件の検討及び設定

3.1.1 HPLC-FLD の測定条件の検討

はじめに、測定条件例として示された仕様のカラムを使い標準溶液を測定した。測定条件を表 1 に示した。

表 1 : HPLC-FLD の測定条件 1

分析カラム : ジーエルサイエンス(株)製 Inertsil ODS-3 4.6mm×150mm, 5µm
移動相 : A液 : 水, B液 : アセトニトリル A液 : B液 = 3 : 1 (アイソクラティック)
流速 : 1.0mL/min
カラム温度 : 40℃
注入量 : 20µL
波長 : 励起波長 (Ex) 365nm 蛍光波長 (Em) 435nm

通知で示された定量限界値である 0.05µg/kg に対応する標準溶液 (1µg/L) のクロマトグラムを図 1 に示した。

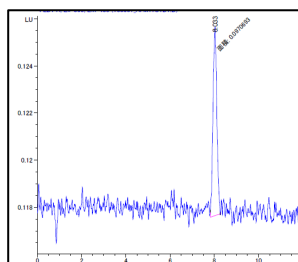


図 1 標準溶液 (1µg/L) のクロマトグラム
(使用カラム : 4.6mm×150mm, 5µm)

条件を変更して測定した標準溶液 (1µg/L) の S/N 比は 24.6 となり、測定条件変更前と比較して良好な感度が得られたことから、表 2 の測定条件を採用することとした。

3.1.2 LC-MS/MS の測定条件の設定

LC 部の測定条件を表 3 に示した。分析カラムは HPLC-FLD と同じカラムを使用し、その他の条件は通知の測定条件例のとおり設定した。

表 3 : LC 部の測定条件

分析カラム : ジーエルサイエンス(株)製 Inertsil ODS-3 2.1mm×100mm, 3µm			
移動相 : A液 : 10mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B液 : アセトニトリル			
グラジエント条件 :			
時間 (min)	A液 (%)	B液 (%)	流速 (mL/min)
0	70	30	0.20
8	20	80	0.20
9	20	80	0.20
9.1	70	30	0.20
15.0	70	30	0.20
カラム温度 : 40℃			
注入量 : 10µL			

次に、標準溶液をインフュージョン法により直接 MS 部に導入し、イオン化条件を検討した。通知で示されたプロダクトイオンの他、 m/z 115 が感度良く観測されたため確認用として追加した。MS 条件を最適化した結果を表 4 に示した。

表4 質量分析計の測定条件

イオン化	ESI(+)		
イオンスプレー電圧(V)	4500		
イオンソース温度(°C)	600		
Declustering Potential	76		
Entrance Potential	10		
Q1	Q3	CE	CXP
(m/z)	(m/z)	(V)	(V)
329	273	33	8
329	229	55	14
329	115	89	6

CE : collision energy

CXP : collision cell exit potential

3.2 添加回収試験

0.05µg/kg, 0.5µg/kgとなるよう試料に標準溶液を添加し, 添加回収試験を実施した。

3.2.1 ブランク試料の確認

定量を妨害するピークがないことを確認するため, 試料を図1に示した調製法で処理し, HPLC-FLD及びLC-MS/MSで測定した。図3にHPLC-FLDでの試料のクロマトグラムを, 図4にLC-MS/MSでの試料のクロマトグラムを示した。

HPLC-FLDではピークは検出されなかったが, LC-MS/MSでは定量及び確認イオンともにピークが検出され, 標準溶液とイオン比が一致していた。通知で示された定量限界値である0.05µg/kgに対応する標準溶液(1 µg/L)から得られるピーク面積と比較して, 40分の1の非常に小さなピークであったため, 本試料を添加回収試験に用いることとした。

なお, 平成13年度に, 国内の牛乳208検体を対象としたアフラトキシンM1の汚染実態調査を厚生労働省が実施している³⁾。その結果, 1検体を除く全ての検体から濃度範囲0.001~0.029µg/kgでアフラトキシンM1が検出されており, 試料中のアフラトキシンM1濃度もその範囲内であると推定された。

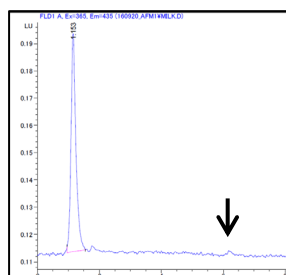


図3 HPLC-FLDでの試料のクロマトグラム

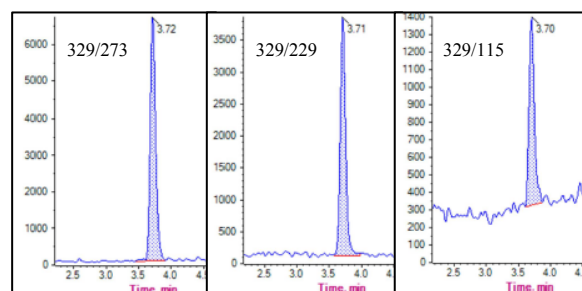


図4 LC-MS/MSでの試料のクロマトグラム

3.2.2 HPLC-FLD

添加回収試験の結果を表5に示した。それぞれの濃度で5回分析し, 0.05µg/kgとなるよう添加した試料の回収率は92.5~100.6%, 0.5µg/kgとなるよう添加した試料の回収率は81.2~94.5%となり良好な結果であった。

表5 添加回収試験結果 (HPLC-FLD)

添加濃度	0.05µg/kg			0.5µg/kg		
	回収率 (%)	平均値 (%)	CV (%)	回収率 (%)	平均値 (%)	CV (%)
添加試料1	99.5			82.5		
添加試料2	98.0			92.8		
添加試料3	100.6	97.9	2.9	87.7	87.7	6.1
添加試料4	92.5			94.5		
添加試料5	98.8			81.2		

3.2.3 LC-MS/MS

添加回収試験の結果を表6に示した。それぞれの濃度で3回分析し, 0.05µg/kgとなるよう添加した試料の回収率は96.4~99.5%, 0.5µg/kgとなるよう添加した試料の回収率は78.8~92.8%となり良好な結果であった。図5に標準溶液のクロマトグラムを示した。

表6 添加回収試験結果 (LC-MS/MS)

添加濃度	0.05µg/kg			0.5µg/kg		
	回収率 (%)	平均値 (%)	CV (%)	回収率 (%)	平均値 (%)	CV (%)
添加試料1	99.5			82.5		
添加試料2	98.0	98.0	1.3	78.8	84.7	7.0
添加試料3	96.4			92.8		

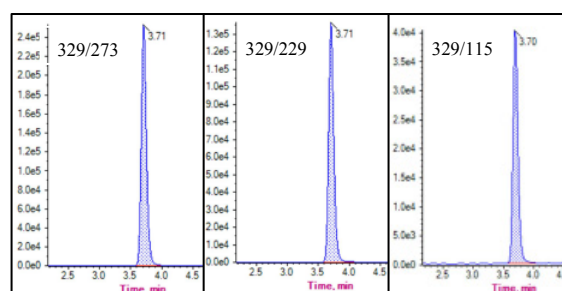


図5 標準溶液(1µg/L)のクロマトグラム

4 まとめ

通知で示された試験法について、本市で対応するため、測定条件の検討を行った。添加回収試験の結果は良好であったため、本試験法の検査実施標準作業書を作成し、市内に流通する乳に対して適用する予定である。

文献

1)厚生労働省通知食安発0723第1号：乳に含まれるアフラトキシンM1の取扱いについて，平成27年7月23日

2)厚生労働省通知食安発0723第5号：乳に含まれるアフラトキシンM1の試験法について，平成27年7月23日
3)食品安全委員会府食第 526 号：食品健康影響評価の結果の通知について，かび毒評価書，乳中のアフラトキシン M1 及び試料中のアフラトキシン B1，平成 25 年 7 月 1 日