

[ノート]

## カビ毒代謝物であるアフラトキシン M<sub>1</sub> の乳中からの分析法の検討

後藤 操\* 林 幸子 服部 涼子 吉田 昌史

### A Study on the Analytical Method of Determining the Toxic Fungal Metabolite Aflatoxin M<sub>1</sub> in Milk

Misao GOTOU\*, Sachiko HAYASHI, Ryoko HATTORI and Masashi YOSHIDA

*Health Science Research Division, Public Health Science Research Center, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Consumer Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

We examined a method based on liquid chromatography–fluorescence detection using a novel solid phase extraction (SPE) column for analysis of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk. Aflatoxin M<sub>1</sub> was purified from milk by dispersive SPE with a glass fiber filter and a mycotoxin-retentive functionalized SPE column at room temperature, and assessed using a total aflatoxin assay proposed by the Ministry of Health, Labour and Welfare. The rate of recovery from milk having a maximum residue limit of 0.5 µg/kg was 85.9 %, and the relative standard deviation of precision was 2.2 % for repeatability and 8.1 % for intermediate precision. All validation parameters met the target values. The limit of quantitation was confirmed to be 0.05 µg/g. This method proved to be simple and inexpensive with good sensitivity.

#### I はじめに

アフラトキシン M<sub>1</sub> (以降 AFM<sub>1</sub>) は、カビ毒の一種で、強い発がん性を有するアフラトキシン B<sub>1</sub> が動物体内で代謝されて生成した物質である (Fig.1) <sup>1-3)</sup>. この物質は、乳へ移行することから、牛乳及びその加工品における汚染が問題とされている <sup>1-8)</sup>. また、AFM<sub>1</sub> はアフラトキシン B<sub>1</sub> の約 1/10 の発がん性を有し遺伝毒性が認められる <sup>1-2)</sup>. そのため、2015 年に食品安全委員会の食品健康影響評価及び国際動向などを踏まえ、新たに乳中の AFM<sub>1</sub> について管理基準が厚生労働省から通知された <sup>9)</sup>. 同時に発出された AFM<sub>1</sub> の試験法 <sup>10)</sup> では、試料精製にイ

ムノアフィニティカラム (以降 IAC) を用い LC-FL で定量する方法となっている. IAC は、精製効果が高いため、LC の分析で夾雑ピークが少なく分離性に優れている <sup>11-12)</sup>. しかし、有効期限が短く、ロットにより回収率が変動するとされ <sup>12)</sup>、保存方法を含め取り扱いに慎重を要する <sup>11-13)</sup>. 近年、ポリマー固相にカビ毒を保持可能な官能基が修飾された新しいタイプの固相ミニカラムが、

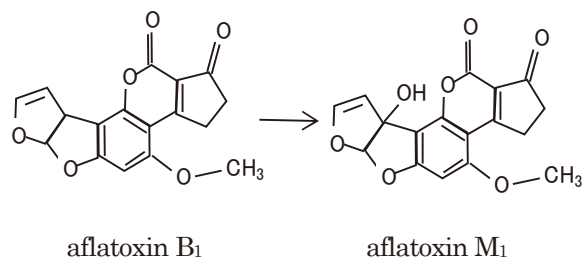


Fig.1 Chemical structures of aflatoxins

健康科学部

\*別刷請求先：〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町 2-1-29

兵庫県立健康生活科学研究センター

健康科学部 後藤 操

LC-MS/MS 用として開発された。このミニカラムは試料精製時にカビ毒を保持でき、IAC と比較し操作性が優位と考えられ、有効期限が長い、安価などの特長がある。そこで今回、牛乳中の AFM<sub>1</sub> について、本ミニカラムを試料精製に用いた方法を検討したので報告する。

## II 材料と方法

### 1. 試料

兵庫県内で流通していた市販の成分無調整牛乳、成分調整牛乳及び低脂肪牛乳を用いた。

### 2. 試薬及び試液

AFM<sub>1</sub> 標準品は、SUPELCO 製 10 µg/mL アセトニトリル標準液を用いた。検量線用の標準溶液は、標準液をアセトニトリルで適宜希釈し、濃縮乾固後アセトニトリル水 (1:4) 1.0 mL で溶解して使用した。酢酸アンモニウム、ギ酸、ヘキサンは和光純薬工業 (株) 製特級を用い、アセトニトリルは関東化学 (株) 製高速液体クロマトグラフ用を用いた。水は MilliQ 水を用いた。精製の固相ミニカラムは、Biotage 製の ISOLUTE Myco (以降、Myco カラム) をあらかじめアセトニトリル及び水各 2 mL で順次コンディショニングを行ったものを用いた。分散型の固相は、Biotage 製の C18(EC) (以降、C18) を使用した。ガラス繊維ろ紙は GE ヘルスケア・ジャパン (株) 製 Whatman934H、シリンジフィルターは Merck 製マイレクス-LG フィルター (0.20 µm, PTFE, 4 mm) を使用した。

### 3. 装置

HPLC-FL : (株)島津製作所製 Prominence LC-20A

遠心機 : 日立工機製 himac CF6RN

ミキサー : IKA 製 MS 3

### 4. 測定条件

カラム : Waters 製 X Bridge C18

(3.5 µm, 4.6 mm×150 mm)

移動相 : アセトニトリル水 (1:3)

カラム温度 : 40°C, 流速 : 1.0 mL/min.

測定波長 (励起波長/蛍光波長) : 365 nm/435 nm

注入量 : 20 µL

### 5. 試験溶液の調製

試料 20.0 mL を 50 mL のポリプロピレン製遠沈管に採取し、10 mM 酢酸アンモニウム溶液となるよう調製した。ガラス繊維ろ紙でろ過後、ろ液 5.0 g を分取し Myco カラ

ムに通液した。このカラムを水 3 mL 及びアセトニトリル水 (1:9) 3 mL で順次洗浄後、0.1%ギ酸-アセトニトリル 3 mL を用いて溶出した。溶出液に C18 100 mg を加え、ミキサーで 1 分間攪拌後、3,500 rpm で 5 分間遠心分離した。上清 1.5 mL を採取し N<sub>2</sub> 気流下で濃縮乾固後、アセトニトリル水 (1:4) 1.0 mL を加え溶解し、シリンジフィルターでろ過し、最適な試験溶液の調製方法とした。なお、AFM<sub>1</sub> はガラスに吸着する性質があるため、使用する容器は可能な限りポリプロピレン製を用いた<sup>14)</sup>。

### 6. 妥当性評価

妥当性評価については、総アフラトキシンの試験法<sup>15)</sup>を参考に以下の項目について試験を行った。成分無調整牛乳を対象とし、AFM<sub>1</sub> はろ過前の試料に対し基準値 (0.5 µg/kg) 相当となるよう添加した。なお、LC 分析時の試験溶液では基準値相当量が 1.25 µg/L である。

#### 6.1 選択性

AFM<sub>1</sub> を含有していないブランク試料を測定し、定量を妨害するピークが無いことを確認した。

#### 6.2 真度 (回収率) 及び精度

基準値相当の AFM<sub>1</sub> を添加した各試料について、分析者 1 名が 1 日に 5 試行を 1 日間及び分析者 1 名が 1 日に 2 試行を計 4 日間、それぞれ測定を実施した (n=13)。得られたデータから真度を求め、その結果を一元配置分散分析により解析し、並行精度及び室内精度を算出した。

## III 結果及び考察

### 1. 精製の固相ミニカラムに通液する試料溶液の調製方法の検討

通知試験法<sup>10)</sup>では、ろ過前の試料は 37°C 加温することとされているが、本法では室温によるろ過で良好な回収率が得られたため、加温工程を省略し迅速な試料溶液調製が可能となった。また、IAC への試料溶液の通液量は 20.0 g に設定されているが、本法では、操作の迅速化のため Myco カラムへの通液量の減量を検討した。本法の分析条件では、AFM<sub>1</sub> の標準溶液の検量線が 0.0128~10 µg/L の範囲で相関係数 0.999 以上の直線性が認められた。LC-FL への試験溶液量を 1.0 mL とした場合、通液量は 1 オーダー少ない量で可能と考えられた。そこで、通液量を 5.0 g で検討した結果、通知試験法<sup>10)</sup>で示されている定量限界値 (0.05 µg/kg) 相当を添加した試料でピーク高さは S/N ≥ 10 が得られ、検出限界値は 0.02 µg/kg となった。

## 2. 精製方法の検討

### 2.1 試料溶液通液後の固相ミニカラムの洗浄液量の検討

試料溶液通液後の Myco カラムの洗浄工程において、水及びアセトニトリル-水 (1 : 9) の液量を等量ずつで変化させ、AFM<sub>1</sub> の回収率を比較した (n=2)。その結果、各 3 mL で 82.1%、5 mL で 72.1%、8 mL で 57.9%であり、増量するにつれて低下する傾向が認められた。洗浄液量は、高回収率が得られる 3 mL を採用した。

### 2.2 脂質除去の検討

得られた溶出液は透明であったが、液の状態やクロマトグラムなどから脂質の除去が必要と考えられた。そこで、Myco カラムを水及びアセトニトリル-水 (1 : 9) で洗浄後、さらにヘキサンで洗浄を行ったが AFM<sub>1</sub> の回収率は 40~70%程度と低下した。また、脂質除去に汎用される C18 を Myco カラム洗浄後、操作性が高い分散型として添加量を変化させて適用性を検討した。溶出液 3 mL

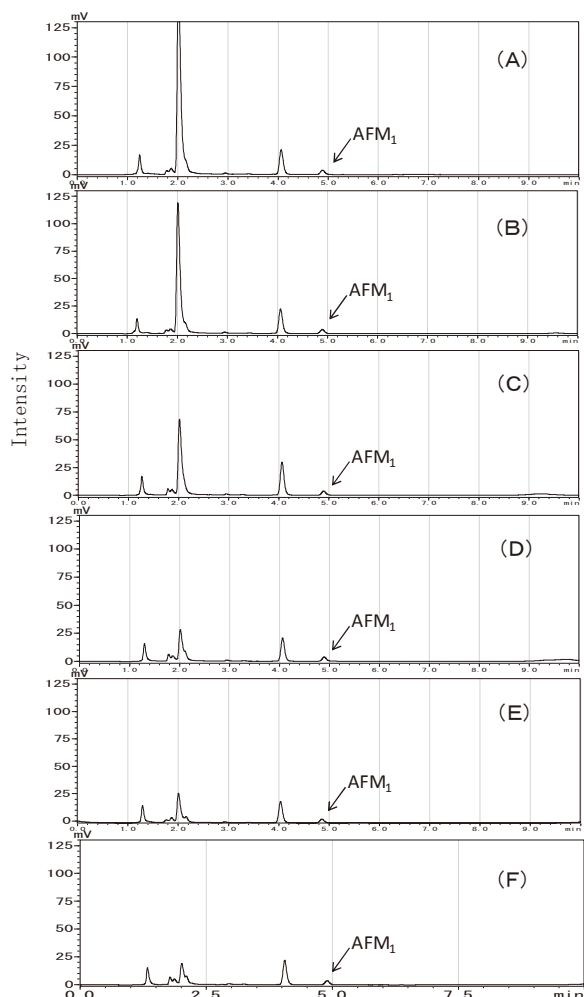


Fig.2 Effect of purification by dispersive solid phase extraction (C18) on the extraction of aflatoxin M<sub>1</sub> from milk

(A) C18 : 0 mg, (B) C18 : 20 mg, (C) C18 : 50 mg,

(D) C18 : 100 mg, (E) C18 : 200 mg, (F) C18 : 400 mg

に対し 20, 50, 100, 200, 400 mg の C18 を添加した結果、回収率は少し低くなったが 80%以上が得られ、液状は改善し夾雑ピークが減少した(Fig.2)。採取する液量を十分に確保し迅速な作業を行うため、C18 の添加量は取り扱いが容易で安定した回収率が期待できる 100 mg を選択した。

### 3. 妥当性評価

妥当性の評価方法は、AFM<sub>1</sub> の試験法<sup>10)</sup>では示されていないため、総アフラトキシンの試験法<sup>15)</sup>に準じて行った。成分無調整牛乳に AFM<sub>1</sub> を添加し本法で分析したクロマトグラムを Fig.3 に示した。夾雑ピークとの分離は良好で、選択性に問題はなかった。また、添加回収試験(真度)、並行精度及び室内精度の値を Table1 に示した。全てのパラメータで総アフラトキシンの試験法<sup>15)</sup>に示されている目標値(真度 70~110%、併行精度 $\leq$ 20%、室内精度 $\leq$ 30%)を満たしており、本法は成分無調整牛乳において AFM<sub>1</sub> の分析法として妥当であると考えられた。

また、成分調整牛乳及び低脂肪牛乳に基準値濃度の

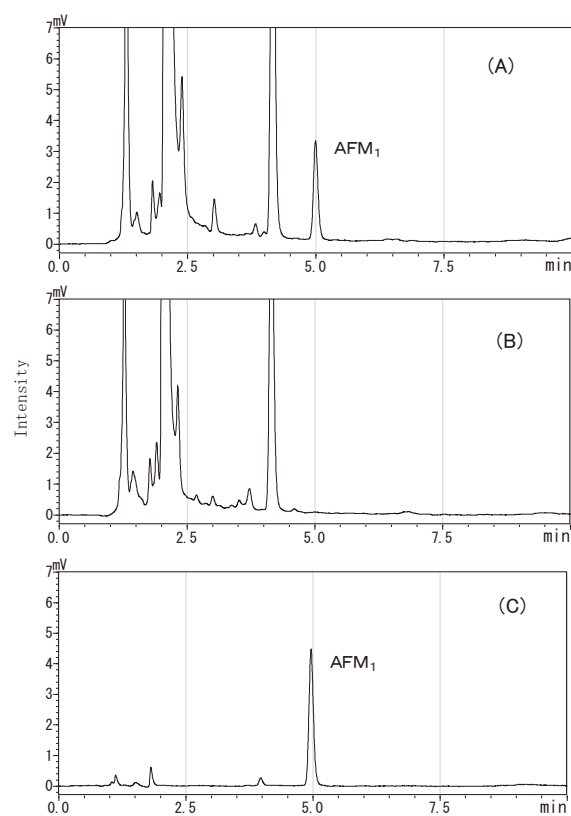


Fig.3 Chromatograms of aflatoxin M<sub>1</sub>

(A) Milk sample spiked with 0.5 µg/kg of aflatoxin M<sub>1</sub>

(B) Milk sample

(C) Aflatoxin M<sub>1</sub> standard solutions (1.25 µg/L#)

# : Equivalent to (A)

Table 1 Validation Results of aflatoxin M<sub>1</sub> in milks

Sample	Fortified level (µg/kg)	Mean recovery (%)	Repeatability (RSD %)	Intermediate Precision (RSD %)
Whole milk	0.5	85.9 <sup>a)</sup>	2.2 <sup>b)</sup>	8.1 <sup>b)</sup>
Composition-adjusted milk	0.5	91.2 <sup>c)</sup>	4.7 <sup>c)</sup>	—
Low-fat milk	0.5	83.4 <sup>c)</sup>	13.4 <sup>c)</sup>	—

a) n = 13, b) n = 10, c) n = 3

AFM<sub>1</sub> を添加し回収試験 (n=3) を実施した。その結果、平均回収率は成分調整牛乳で 91.2%、低脂肪牛乳で 83.4%、RSD はそれぞれ 4.7%、13.4%であった。

#### IV 結論

今回、牛乳中の AFM<sub>1</sub> についてカビ毒保持官能基が修飾された固相ミニカラムを試料精製に用いた分析方法を検討した。この固相ミニカラムに通液する試料溶液の調製では、通知試験法<sup>10)</sup>より簡便で迅速に行うことが可能であった。精製工程で溶出液の脂質除去に C18 を分散型として用いたときの平均回収率は 83.1~88.5%であった。また、成分調整牛乳及び低脂肪牛乳に基準値濃度 (0.5 µg/kg) を添加したときの平均回収率はそれぞれ 91.2%及び 83.4%であった。本分析法に採用した固相ミニカラムは取り扱いが容易であり、AFM<sub>1</sub> の分析に有用であると考えられた。今後、さらに多くの牛乳あるいは物理化学的性状の異なる牛乳加工品を対象に、改良も含めて検討する必要があるが AFM<sub>1</sub> の分析方法として選択肢の幅が広がると考えられた。

#### 文献

- 1) 小西良子, 久代真代: カビ毒, 渡部一仁, 土戸哲明, 坂上吉一編, 微生物孢子—制御と対策—, p. 155-161, サイエンスフォーラム, 千葉 (2011)
- 2) 井河和仁: 乳に含まれるアフラトキシン M<sub>1</sub> の取り扱いについて. 食品衛生研究, **65**, 29-32 (2015)
- 3) 伊藤誉志男: 食品衛生学, p. 66-68, 広川書店, 東京 (2000)

- 4) Sugiyama, K., Hiraoka, H. and Sugita-Konishi, Y.: Aflatoxin M<sub>1</sub> Contamination in Raw Bulk Milk and the Presence of Aflatoxin B<sub>1</sub> in Corn Supplied to Dairy Cattle in Japan. J. Food Hyg. Soc. Jpn., **49**, 352-35 (2008)
- 5) 田端節子: 東京都におけるカビ毒に関する調査研究. 東京健安研七年报, **65**, 13-24 (2015)
- 6) Iha, M. H., Barbosa, C. B., Okada, I. A. and Trucksess, M. W.: Aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and distribution and stability of aflatoxin M<sub>1</sub> during production and storage of yoghurt and cheese. Food Control., **29**, 1-6 (2013)
- 7) Fallah, A. A., Barani, A. and Nasiri, Z.: Aflatoxin M<sub>1</sub> in raw milk in Qazvin Province, Iran: a seasonal study. Food Additives & Contaminants: Part B, **8**, 195-198 (2015)
- 8) Soontornjanagit, M. and Kawamura, O.: Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in commercial powdered milk in Bangkok, Thailand. JSM Mycotoxins, **65**, 75-79 (2015)
- 9) 林美紀子, 古川明, 秋元京子, 山田友紀子: 飼料中のカビ毒に関するリスク管理 (アフラトキシンを事例に). JSM Mycotoxins, **64**, 161-165 (2014)
- 10) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 “乳に含まれるアフラトキシン M<sub>1</sub> の試験法について” 平成 27 年 7 月 23 日, 食安発第 0723 第 5 号(2015)
- 11) 中島正博, 谷口賢: 乳及び乳製品の アフラトキシン M<sub>1</sub> 試験法について. JSM Mycotoxins, **64**, 167-176 (2014)
- 12) 田端節子: カビ毒の分析法. 食衛誌, **53**, 129-138 (2012)
- 13) 谷口賢: イムノアフィニティカラムによる総アフラトキシン試験法. Mycotoxins, **62**, 127-131 (2012)
- 14) 小木基樹, 木村彩子, 近宗雅人, 齋藤真希, 竹本雅美, 渡井正俊: ニジマスの筋肉および肝臓中の 6 種の アフラトキシン類の高感度分析. 食衛誌, **52**, 161-166 (2011)
- 15) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 “総アフラトキシンの試験法について” 平成 23 年 8 月 16 日, 食安発第 0816 第 1 号(2011)

(平成 29 年 3 月 22 日受理)