

Application News

No. L506

高速液体クロマトグラフィー
High Performance Liquid Chromatography

“Prominence-i” と蛍光検出器 “RF-20Axs” による通知試験法に準拠した牛乳中のアフラトキシン M₁ の分析 Assay of Aflatoxin M₁ in Milk by “Prominence-i” and Fluorescence Detector “RF-20Axs”

アフラトキシン M₁ (AFM₁) は人に対する発がん性が疑われるカビ毒の一種であり、アフラトキシン B₁ に汚染された飼料を摂取した哺乳動物の乳中で検出されることがあります。

平成 27 年 7 月 23 日に通知された「乳に含まれるアフラトキシン M₁ の取扱いについて」(食安発 0723 第 1 号)¹⁾ では、乳中 AFM₁ の規制値は 0.5 µg/kg とされ、平成 28 年 1 月 23 日より適用されることになりました。

分析法については、同日に告知された「乳に含まれるアフラトキシン M₁ の試験法について」(食安発 0723 第 5 号)²⁾ に記載されており、以下の 2 つの試験法が示されています。

- ① 蛍光検出器付き HPLC で定量し、LC/MS または LC/MS/MS で確認する試験法
- ② 分析キットを用いるスクリーニング法

今回は、試験法①に準拠した市販牛乳の分析例をご紹介します。一体型 HPLC “Prominence-i” と蛍光検出器 “RF-20Axs” を用いて、牛乳中の AFM₁ を分析しました。その結果、日本の規制値の 1/10 相当濃度の AFM₁ でも十分に定量可能であることが分かりました。

H. Niwa A. Uchida M. Kobayashi

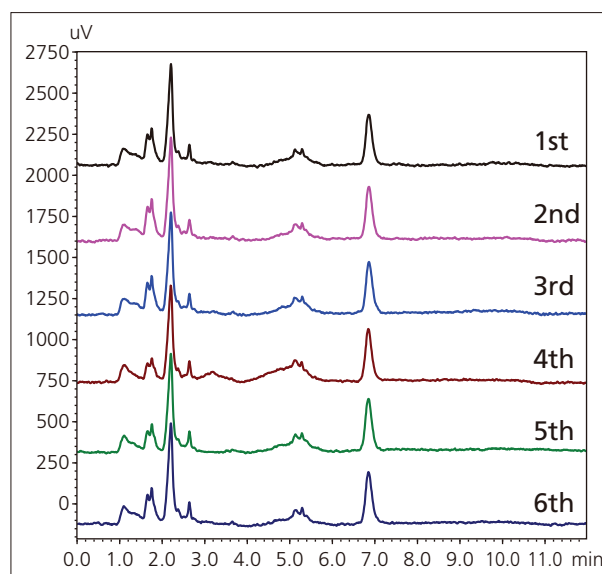


Fig. 1 規制値の1/100相当濃度 (0.1 µg/L) の AFM₁ 標準溶液のクロマトグラム (繰り返し試験 (n = 6))
Chromatograms of Standard AFM₁ Solution (0.1 µg/L, Repeatability (n = 6))

■ 標準試料溶液の分析

Analysis of Aflatoxin M₁ Standards

Fig. 1 に AFM₁ の標準試料溶液 (0.1 µg/L, 規制値の 1/100 相当濃度) を分析した際のクロマトグラムを、Table 1 にその分析条件を示します。6 回繰り返し分析した際の面積の相対標準偏差 (%RSD) は、3.4% でした。Fig. 2 に 0.1 ~ 20 µg/L の検量線を示します。この濃度範囲で寄与率 R²=0.9999 以上の良好な直線性が得られました。これらの結果より、蛍光検出器 “RF-20Axs” を用いることによって、極微量の AFM₁ を高感度かつ高精度で分析できることが分かります。

なお、標準溶液 0.1 µg/L は、Fig. 3 に示す通知法に従った方法で前処理した場合、乳中 AFM₁ の規制値の 1/100 (0.005 µg/kg) に相当します。

Table 1 HPLC分析条件
HPLC Analytical Conditions

System	: Prominence-i
Column	: Shim-pack VP-ODS (150 mm L. × 4.6 mm I.D., 5 µm)
Mobile Phase	: Water/Acetonitrile = 3/1(v/v)
Flow Rate	: 1.0 mL/min
Column Temp.	: 40 °C
Detection	: RF-20Axs, Ex. at 365 nm, Em. at 435 nm
RF Cell.	: Conventional Cell
Cell Temp.	: 25 °C
Injection Volume	: 100 µL

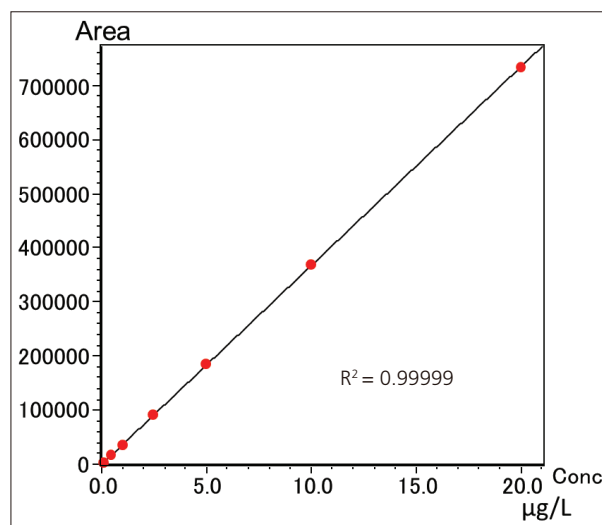


Fig. 2 AFM₁ 検量線 (0.1 µg/L - 20 µg/L)
Calibration Curve of Aflatoxin M₁ (0.1 µg/L - 20 µg/L)

■牛乳中の AFM₁ の分析

Analysis of Aflatoxin M₁ in Milk

食品試料への応用例として、市販牛乳および市販牛乳に AFM₁ を添加した試料を分析しました。添加量は牛乳中の濃度が 0.05 µg/kg (規制値の 1/10) となるようにし、通知法²⁾ に従って前処理を行いました。Fig. 3 に前処理手順を示します。詳細につきましては、通知法²⁾ をご参照ください。

夾雑成分の除去には Romer Labs 社製イムノアフィニティカラム "AflaStar™ R" * を用いました。Fig. 4 にこれらを分析した際のクロマトグラムを示します。(A) は AFM₁ を添加した牛乳、(B) は AFM₁ を添加していない牛乳のものです。

分析条件は Fig. 1 と同様に Table 1 に示しています。

* "AflaStar" は Romer Labs 社の登録商標です。
"AflaStar™ R" は株式会社島津ジーエルシーよりご購入いただけます。

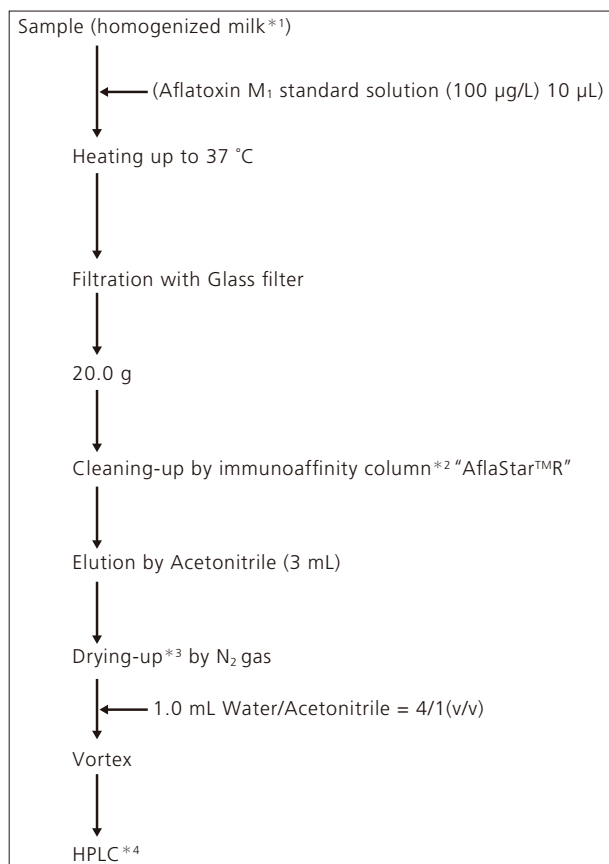


Fig. 3 牛乳の前処理手順
Pretreatment Procedure of Aflatoxin M₁ Test for Milk

- *1 生乳などの均質化されていない乳の場合は遠心処理を行う必要があります。詳細は参考文献²⁾をご参照ください。
- *2 イムノアフィニティカラムの使用法の詳細は、参考文献²⁾の注解をご参照ください。
- *3 乾固の際に AFM₁ が容器に吸着することがありますので、シラン処理した容器を 20～30 % アセトニトリル水で洗浄し、乾燥させたものを使用することをお勧めします。
- *4 HPLC 注入用の容器として、ガラス容器を用いるとシラン処理済のものでも AFM₁ が吸着することがありますので、樹脂製の容器を用いることをお勧めします。

[参考文献]

- 1) 「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, 食安発 0723 第 1 号)
- 2) 「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, 食安発 0723 第 5 号)

下記の Eqn. 1 に従い計算した回収率は 98 % となりました。蛍光検出器 RF-20Axs を用いれば、規制値の 1/10 濃度でも高感度かつ精度よく分析できることが分かりました。

なお、AFM₁ を添加していない牛乳からも、わずかながら AFM₁ の溶出位置にピークが確認されました。AFM₁ を添加していない牛乳を LC/MS/MS を用いて分析したところ、AFM₁ 由来であることが示唆され、その濃度は日本の規制値の 1/100 未満でした。

$$\text{回収率 [\%]} = \frac{(\text{標準添加した牛乳の AFM}_1 \text{ のピーク面積}) - (\text{標準添加なしの牛乳の AFM}_1 \text{ のピーク面積})}{\text{標準試料の AFM}_1 \text{ のピーク面積}} \times 100$$

Eqn. 1 回収率算出式
Definition of Recovery Rate

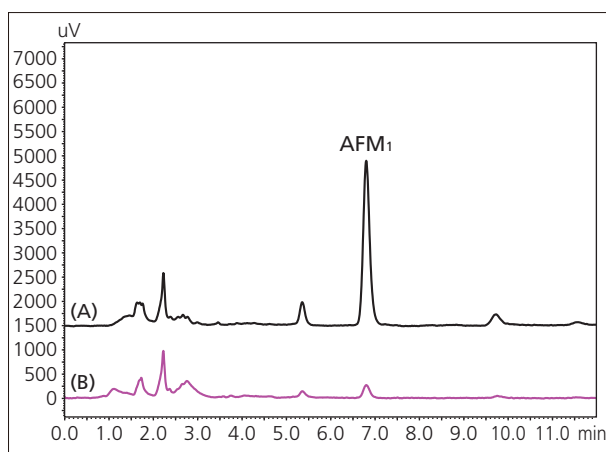


Fig. 4 市販牛乳の HPLC クロマトグラム
(A) AFM₁ 標準添加あり, (B) AFM₁ 標準添加なし
Chromatograms of Milk Matrix
(A) Standard Spiked, (B) Standard Unspiked