SHIMADZU

Application News

No.L435A

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

# 通知試験法に準拠した食品中総アフラトキシンのHPLCによる定量試験およびLC/MSによる確認試験

Assay by HPLC and Identification by LC/MS for Total Aflatoxins in Food

アフラトキシンは強い急性毒性と発ガン性のあるカビ毒の一種で，日本では総アフラトキシン（アフラトキシン $B_1$，$B_2$，$G_1$，$G_2$ の総和）を 10 µg/kg を越えて検出される食品は，食品衛生法第 6 条第 2 号に違反するとされます [1]。

これまで，L422，L428，L430 で，HPLC や UHPLC を用いてアフラトキシン 4 成分（$B_1$，$B_2$，$G_1$，$G_2$）を一斉分析する方法をご紹介してきました。今回は，平成 23 年 8 月 16 日に通知された試験法 [2] に従い，イムノアフィニティカラムを用いた前処理を行った上で，（1）試験法に準拠した HPLC による定量試験，（2）試験法に準拠した LC/MS による確認試験，（3）Nexera による迅速な定量 / 確認試験について，妥当性評価の結果と共にご紹介します。

A. Nomura　M. Kobayashi　K. Watanabe

## ■総アフラトキシン試験の流れ

Procedure of Total Aflatoxin Test

Fig. 1 に通知試験法による総アフラトキシン試験の流れを，Fig. 2 にアフラトキシンの構造式を示します。加工食品や香辛料の場合，有機溶媒を含む溶液で抽出を行った後，イムノアフィニティカラム（IAC）を用いてアフラトキシンを精製します。これをトリフルオロ酢酸（TFA）で処理してアフラトキシン $B_1$ および $G_1$ の蛍光強度を増加させ（前処理（A）），蛍光検出器を接続した HPLC にて定量試験を行います。基準値を上回る総アフラトキシンが検出された場合は，IAC からの精製液を乾固後，TFA 誘導体化せず移動相で再溶解し（前処理（B）），これを LC/MS に供して確認試験を行います。

アフラトキシンには紫外線で分解する，水溶液中ではガラス壁面に吸着するなどの性質があります。分析の際はあらかじめ洗浄した褐色シラン処理ガラスバイアルやポリバイアルを使用し，回収率低下を防ぐ注意が必要です。また，実試料分析時には，1 分析終了ごとに移動相中有機溶媒濃度を上げ，カラムを洗浄することをお勧めします。

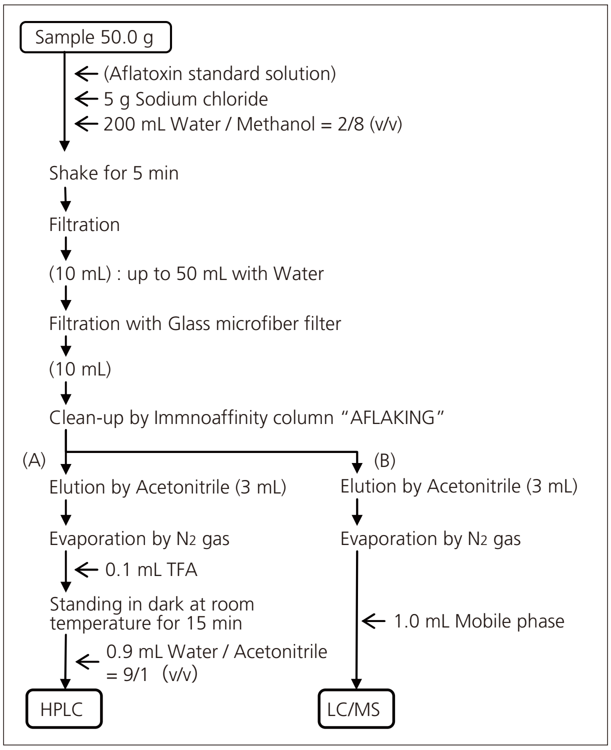


Fig. 1　総アフラトキシン試験の流れ
Procedure of Total Aflatoxin Test

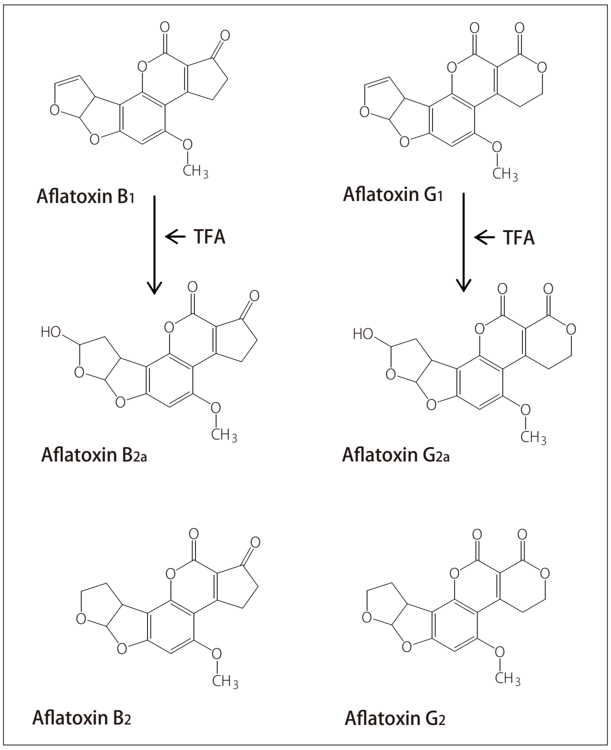


Fig. 2　アフラトキシンの構造式
Structures of Aflatoxins

## ■ (1) 試験法に準拠したHPLCによる定量試験－真度および併行精度の確認－

(1) Assay by HPLC - Accuracy and Precision -

アフラトキシンを添加した市販焙煎ピーナッツを Fig. 1（A）の方法で処理し，試験法に準拠した条件で HPLC にて分析し，その回収率（真度）と再現性（併行精度）を確認しました。分析条件を Table 1 に示します。

焙煎ピーナッツには，アフラトキシン $B_1$ および $G_1$ は 0.8 µg/kg，アフラトキシン $B_2$ および $G_2$ は 0.2 µg/kg になるように添加しました（総アフラトキシンで 2 µg/kg）。繰り返し試験（n=5）による各成分の回収率と併行精度を Table 2 に示します。回収率は 76 ～ 100 % となり，試験法記載の妥当性評価における真度の目標値（70 ～ 110 %）を満たしました。一方，併行精度は 5.7 ～ 9.6 % であり，これも目標値（20 % 未満）を満たしました。

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

| | |
|---|---|
| Column | : Shim-pack FC-ODS (150 mmL. × 4.6 mmI.D., 3 µm) |
| Mobile Phase | : Water / Methanol / Acetonitrile = 6/3/1 (v/v/v) |
| Flow Rate | : 0.8 mL/min |
| Column Temp. | : 40 °C |
| Detection | : RF-20Axs, Ex at 365 nm, Em at 450 nm |
| RF Cell | : Conventional Cell |
| Cell Temperature | : 25 °C |
| Injection Volume | : 20 µL |

Table 2 HPLC 定量試験における真度，併行精度
Accuracy and Precision of Assay by HPLC

| | Aflatoxin $B_1$ | Aflatoxin $B_2$ | Aflatoxin $G_1$ | Aflatoxin $G_2$ |
|---|---|---|---|---|
| Recovery (%) | 79 | 90 | 76 | 100 |
| %RSD | 9.6 | 8.9 | 7.3 | 5.7 |

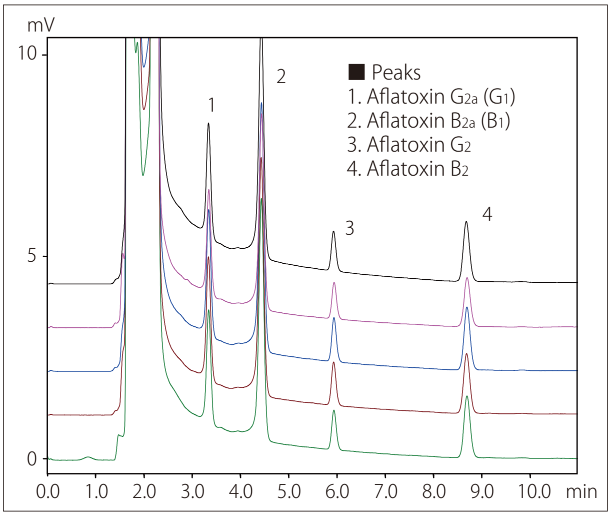


Fig. 3 アフラトキシン添加焙煎ピーナッツのクロマトグラム（HPLC による定量試験）
Chromatograms of Roast Peanuts Spiked with Aflatoxins (Assay by HPLC)

## ■ (2) 試験法に準拠したLC/MSによる確認試験

(2) Identification Test by LC/MS

市販焙煎ピーナッツにアフラトキシン標準液を添加せずに Fig. 1（B）の方法で乾固処理し，残渣を 10 % アセトニトリル溶液 1 mL で溶解することでマトリクス試料溶液（ブランク試料溶液）を調製しました。マトリクス試料溶液とアフラトキシン混合標準溶液を 1 : 1 で混合し，各 0.05，0.25，0.5，2.5，5 µg/L 標準添加マトリクス試料（各 0.2，1，2，10，20 µg/kg 相当）を調製して，トリプル四重極型 LC/MS/MS である "LCMS-8030" にて分析を行いました（n=6）。Fig. 4 に，0.5 µg/L 標準添加マトリクス試料の MRM ※クロマトグラムを，Table 3 および Table 4 に分析条件を示します。LCMS-8030 が確認試験に充分な感度を有していることがわかります。

※ MRM･･･Multiple Reaction Monitoring

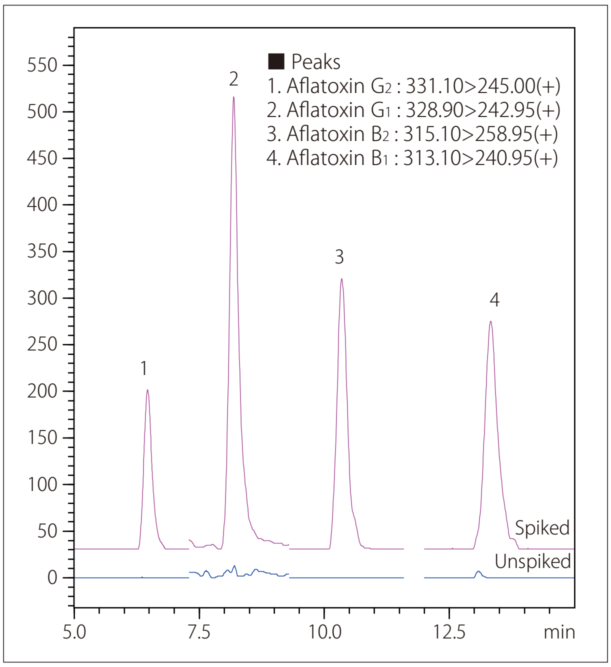


Fig. 4 焙煎ピーナッツマトリクスの MRM クロマトグラム（上段）アフラトキシン添加，（下段）添加なし
Chromatograms of Roast Peanuts Matrix (Upper) Spiked, (Lower) Unspiked

Table 3 分析条件
Analytical Conditions

| | |
|---|---|
| [HPLC] | |
| Column | : Shim-pack FC-ODS (150 mmL. × 2.0 mmI.D., 3 µm) |
| Mobile Phase | : 10 mmol/L Ammonium acetate water / Methanol = 3/2 (v/v) |
| Flow Rate | : 0.2 mL/min |
| Column Temp. | : 40 °C |
| Injection Volume | : 6 µL |
| [MS] | |
| Probe Voltage | : +4.5 kV ESI-Positive mode |
| Nebulizing Gas Flow | : 3 L/min |
| Drying Gas Flow | : 15 L/min |
| DL Temp. | : 250 °C |
| Heat Block Temp. | : 400 °C |

Table 4 MRM 分析条件
MRM Mode Parameter

| Compound | Transition | Dwell time (ms) | CE (V) | Resolution (Q1, Q3) |
|---|---|---|---|---|
| Aflatoxin $B_1$ | 313.10 > 240.95 | 200 | -40 | Unit |
| Aflatoxin $B_2$ | 315.10 > 258.95 | 200 | -33 | Unit |
| Aflatoxin $G_1$ | 328.90 > 242.95 | 200 | -30 | Unit |
| Aflatoxin $G_2$ | 331.10 > 245.00 | 200 | -32 | Unit |

また，標準添加法によるアフラトキシン定量の有効性を確認するために，マトリクス検量線の直線性と再現性を確認しました。Fig. 5 に検量線を，Table 5 に 0.25, 0.5, 5 µg/L のピークの平均面積値および再現性を示します。0.05 ～ 5 µg/L の範囲において寄与率 $r^2$=0.999 以上の良好な直線性が得られ，再現性も良好であることが確認されました。

このように，LCMS-8030 において，確認試験が可能であること，また標準添加マトリクス検量線による定量も有効であることが確認されました。

Table 5　平均面積値と再現性 (n=6)
Average and Repeatability of Peak Area (n=6)

| | 0.25 µg/L | | 0.5 µg/L | | 5 µg/L | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Area | %RSD | Area | %RSD | Area | %RSD |
| Aflatoxin $B_1$ | 1010 | 6.37 | 2033 | 3.92 | 22936 | 1.49 |
| Aflatoxin $B_2$ | 3156 | 1.87 | 6481 | 5.09 | 66012 | 0.54 |
| Aflatoxin $G_1$ | 2209 | 6.07 | 4517 | 3.74 | 45841 | 1.45 |
| Aflatoxin $G_2$ | 2296 | 5.96 | 4749 | 4.74 | 47250 | 0.83 |

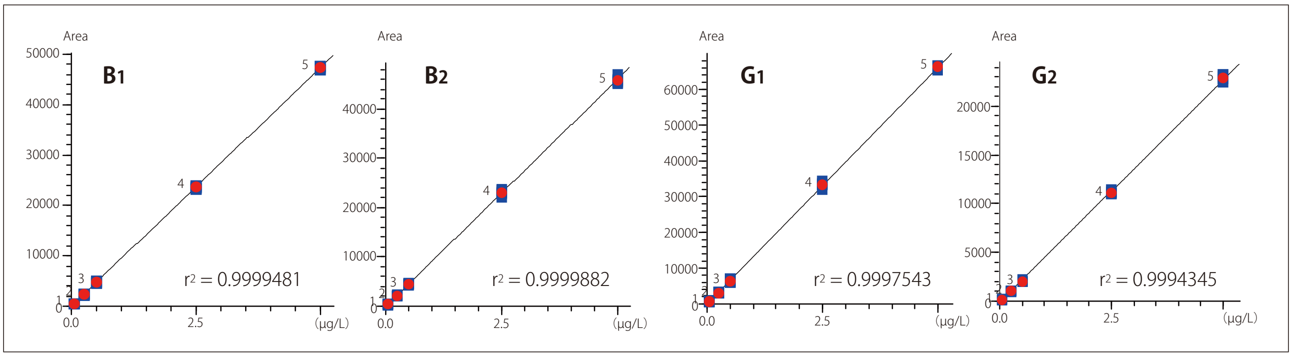


Fig. 5　標準添加マトリクス検量線（焙煎ピーナッツ，0.05 ～ 5 µg/L）
Calibration Curves of Matrix Samples Spiked with Aflatoxins (Roast Peanuts, 0.05 - 5 µg/L)

## ■ (3) Nexeraによる迅速な定量試験，確認試験

**(3) Rapid Assay and Identification by UHPLC "Nexera" with LCMS-8030**

通知試験法の HPLC による定量試験では TFA 誘導体化を行う一方，基準値を上回る総アフラトキシンが検出された場合の確認は TFA 誘導体化を行わずに分析することとなっているため，LC/MS 分析のためには再度，Fig. 1（B）の方法で前処理を行う必要があります。しかしながら，定量試験において誘導体化処理を行なわず直接検出で十分な感度で検出ができれば，Fig. 1（B）の方法のみでサンプルを調製し，定量試験および確認試験を同一処理サンプルで行うことができます。これにより，煩雑な前処理をやり直す必要はありません。また，分析に超高速液体クロマトグラフ（UHPLC）を用いれば，更なる効率化が可能となります。

Table 6　分析条件
Analytical Conditions

| | |
|---|---|
| Column | : Shim-pack XR-ODS Ⅱ (100 mmL. × 3.0 mmI.D., 2.2 µm) |
| Mobile Phase | : Water / Methanol / Acetonitrile = 6/3/1 (v/v/v) |
| Flow Rate | : 1.0 mL/min |
| Column Temp. | : 50 °C |
| Detection | : RF-20Axs Ex. at 365 nm, Em. at 450 nm |
| RF Cell | : Conventional cell |
| Cell Temp. | : 25 °C |
| Injection Volume | : 10 µL |

Table 7　直接検出，UHPLC 法での回収率と併行精度
Accuracy and Precision of Assay by UHPLC without Derivatization

| | Aflatoxin $B_1$ | Aflatoxin $B_2$ | Aflatoxin $G_1$ | Aflatoxin $G_2$ |
|---|---|---|---|---|
| Recovery (%) | 76 | 77 | 77 | 80 |
| %RSD | 4.5 | 5.1 | 6.1 | 6.5 |

Fig. 6 に，アフラトキシン添加焙煎ピーナッツを Fig. 1（B）の方法で前処理し，島津 UHPLC "Nexera" で定量試験を行った例を，Table 6 に分析条件を示します。添加量はアフラトキシン $B_1$ および $G_1$ は 2.4 µg/kg，アフラトキシン $B_2$ および $G_2$ は 0.6 µg/kg です。繰り返し試験（n=5）による各成分の回収率と併行精度を Table 7 に示します。回収率 76 ～ 80 %，併行精度 4.5 ～ 6.5 % といずれも試験法記載の妥当性評価目標値を満たしました。本分析方法の感度はアプリケーションニュース L422，L430 で示した通り非常に良好であることも併せ，本方法がアフラトキシンの迅速な定量試験に有効であることが確認できました。

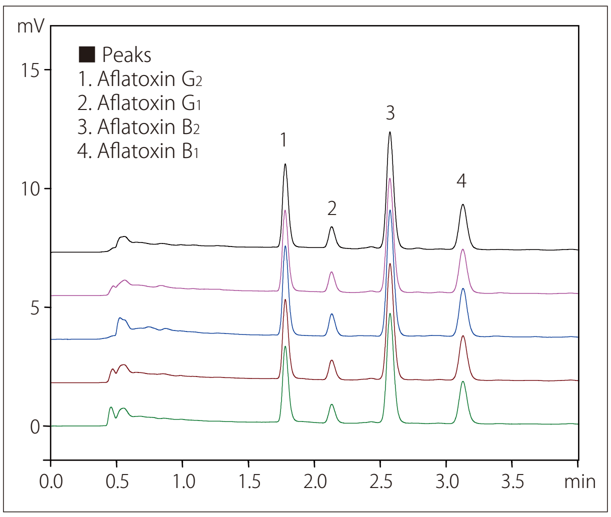


Fig. 6　アフラトキシン添加焙煎ピーナッツのクロマトグラム（直接検出）（10 µL 注入）
Chromatograms of Roast Peanuts Spiked with Aflatoxins (Direct Detection) (10 µL injected)

また，LCMS-8030 は UHPLC に対応可能な LC/MS/MS で，上記 Nexera による高速分析との組合わせによりアフラトキシンの迅速な確認試験も可能にします。

Fig. 7 に，Fig.4 と同じ試料を Table 8 および Table 9 の条件で高速分析した MRM クロマトグラムを示します。アフラトキシン 4 成分を 4 分以内に溶出でき，さらに，高速条件でも確認試験で求められる感度を充分に有していることがわかります。

Fig. 8 に HPLC 条件での分析（Fig. 5）と同様に標準添加マトリクス試料を用い作成した検量線を示します。0.05 ～ 25 μg/L の濃度範囲において寄与率 $r^2$=0.999 以上の良好な直線性が得られています。各アフラトキシン濃度 0.25 μg/L の標準添加マトリクス試料の面積値再現性（%RSD，n=6）は，$B_1$：14.24 %，$B_2$：5.33 %，$G_1$：5.45 %，$G_2$：18.9 % であり，高速分析でも十分な再現性が得られることが確認されました。

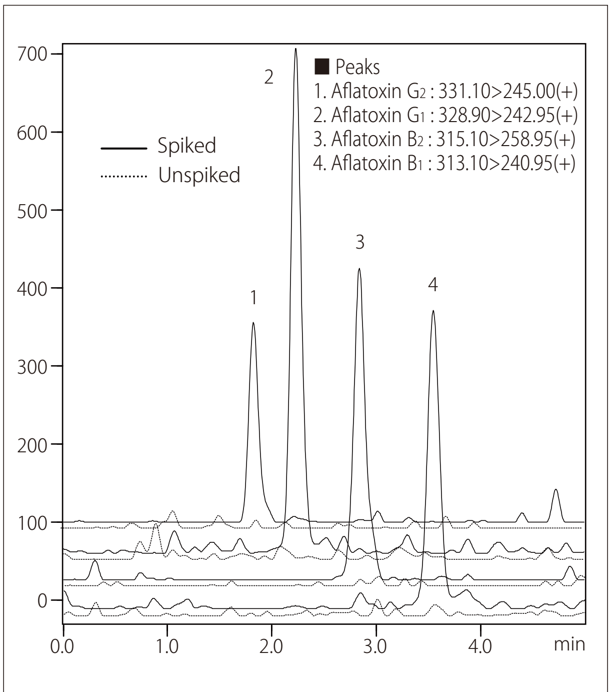


Fig. 7　焙煎ピーナッツマトリクスの MRM クロマトグラム
（上段，実線）アフラトキシン標準添加，（下段，破線）添加なし
Chromatograms of Roast Peanuts
(Upper, Solid Line) Spiked, (Lower, Dashed Line) Unspiked

Table 8　分析条件
Analytical Conditions

| | |
|---|---|
| [HPLC] | |
| Column | : Shim-pack XR-ODS Ⅱ (100 mmL. × 2.0 mmI.D., 2.2 μm) |
| Mobile Phase | : 10 mmol/L Ammonium acetate water / Methanol = 3/2 (v/v) |
| Flow Rate | : 0.45 mL/min |
| Column Temp. | : 50 °C |
| Injection Volume | : 6 μL |
| [MS] | |
| Probe Voltage | : +4.5 kV ESI-Positive mode |
| Nebulizing Gas Flow | : 3 L/min |
| Drying Gas Flow | : 15 L/min |
| DL Temp. | : 250 °C |
| Heat Block Temp. | : 400 °C |

Table 9　MRM 分析条件
MRM Mode Parameter

| Compound | Transition | Dwell time (ms) | CE (V) | Resolution (Q1, Q3) |
|---|---|---|---|---|
| Aflatoxin $B_1$ | 313.10 > 240.95 | 100 | -40 | Unit |
| Aflatoxin $B_2$ | 315.10 > 258.95 | 100 | -33 | Unit |
| Aflatoxin $G_1$ | 328.90 > 242.95 | 100 | -30 | Unit |
| Aflatoxin $G_2$ | 331.10 > 245.00 | 100 | -32 | Unit |

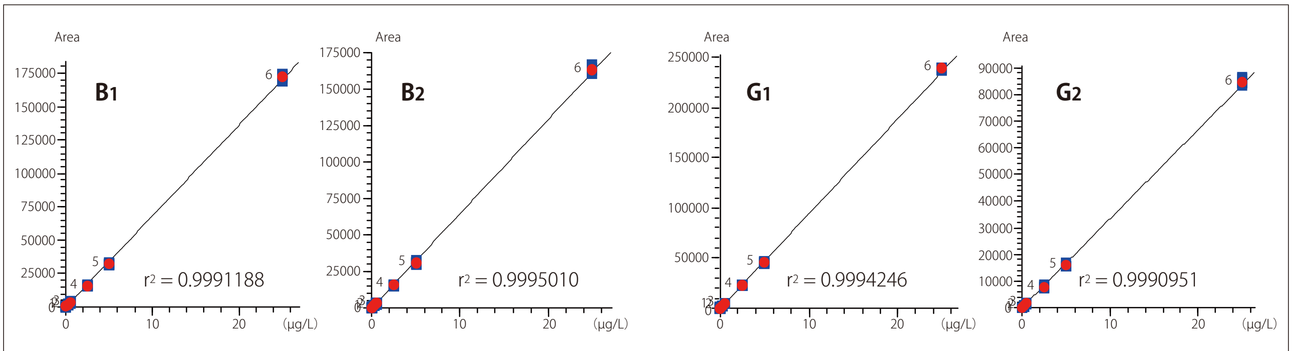


Fig. 8　標準添加マトリクス検量線（焙煎ピーナッツ，0.05 ～ 25 μg/L）
Calibration Curves of Matrix Samples Spiked with Aflatoxins (Roast Peanuts, 0.05 - 25 μg/L)

［参考文献］
1)「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 日厚生労働省食安発 0331 第 5 号）
2)「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 0816 第 1 号）

**A 改訂版発行：2012年 4 月**
初版発行：2012年3月

株式会社 島津製作所
分析計測事業部
応用技術部
島津コールセンター　0120-131691
(075)813-1691