

ノート

## 食品中のアフラトキシン分析法の検討

竹内 浩, 一色 博, 林 克弘, 川合啓之,  
林崎由美子, 大垣有紀, 志村恭子

### A Method of Analysis for Determination of Aflatoxins in Foods

Hiroshi TAKEUCHI, Hiroshi ISSHIKI, Katsuhiko HAYASHI, Hiroyuki KAWAI,  
Yumiko HAYASHIZAKI, Yuki OHGAKI, and Kyoko SHIMURA

2008 年 9 月, 農薬のメタミドホスやアセタミプリド, カビ毒のアフラトキシンによって汚染された「事故米」を食用と偽って転売する事件が発生した. 県内においては, 事故米から製造された可能性のあるでんぷんを使用した厚焼き卵が学校給食に提供されていたことが判明した. この事故米転売事件に伴い, 白米等の穀類を対象としたアフラトキシン分析法を検討した. その結果, 抽出液のクリーンアップ法として, イムノアフィニティーカラムを使用する通知法が有効であった. ピーナッツや酒等は 4 種アフラトキシン標品を用いて標準添加回収実験を行ったところ, いずれのアフラトキシンも回収率 80%以上の良好な結果であった. この方法を用いてとうもろこし, 酒, 米菓子等食品中のアフラトキシンを分析したところ, 供試した 13 種類の全てにおいてアフラトキシンは検出されなかった.

キーワード: アフラトキシン, カビ毒, イムノアフィニティーカラム, 事故米

### はじめに

2008 年 9 月, 農薬やカビ毒に汚染された事故米を食用と偽って転売した問題が発生した. 県の調査によれば, カビ毒の汚染があったとされる事故米のうち, 県内で流通していたものは, 2004 年当時のうるち米であることが判明したが, 県内の店舗で在庫はなく, 健康被害の報告もなかった. このため, 当研究所での行政検査には至らなかったが, カビ毒による食品汚染については, 国でも調査対象となっていることから, 本県においても検査体制の整備が必要となった.

本県においてこれまでカビ毒は食品収去検査の対象項目としていない. そこで本研究では, カビ毒の中でも特に問題となったアフラトキシンを対象として, 白米を用いたバリデーションと穀類, 米加工品および油等を用いた添加回収実験を実施した. その結果, 若干の知見が得られたので,

その詳細を報告する.

### 実験方法

#### 1. 試料

市販されている穀類 5 種 (白米, 玄米, とうもろこし, ピーナッツ, そば粉), 米菓子 1 種, 米加工品 3 種 (酒, みりん, 酢), 油 2 種 (なたね油, ピーナッツバター) その他 2 種 (チョコレート, しょう油) を用いた.

#### 2. 試薬

##### 1) アフラトキシン標準溶液

アフラトキシン  $B_1$  (AFB<sub>1</sub>),  $B_2$  (AFB<sub>2</sub>),  $G_1$  (AFG<sub>1</sub>) および  $G_2$  (AFG<sub>2</sub>) は SUPELCO 製標準試薬を用いた.

##### 2) 有機溶媒

アセトニトリルおよびメタノールは関東化学(株)製高速液体クロマトグラフィー用を用いた。

### 3) その他の試薬

酢酸は和光純薬工業(株)製精密分析用、酢酸アンモニウムは同社製特級、トリフルオロ酢酸 (TFA) は関東化学(株)製高速液体クロマトグラフィー用、Tween20 はバイオ・ラッド ラボラトリーズ(株)製、生理的リン酸塩 (PBS) タブレットは Sigma-Aldrich 製を用いた。

### 4) イムノアフィニティーカラム (IAC)

AFLAKING (株)堀場製作所製)を用いた。

### 5) アフラトキシン混合標準溶液 (AFs)

4 種のアフラトキシン原標準液 (各約 3 $\mu$ g/mL のベンゼン-アセトニトリル溶液 (98:2, v/v)) 各々 1mL を採り, 合わせたのち, AFs 濃度 100ng/mL となるようにアセトニトリルで希釈した。必要に応じてこれをさらにアセトニトリルで希釈して用いた。

## 3. 装置および測定条件

### 1) ホモジナイザー

(株)日本精機製作所製 エクセルオートホモジナイザー ED-001

### 2) RF-HPLC

液体クロマトグラフ:(株)島津製作所製 LC-10AD<sub>VP</sub>

蛍光検出器:同社製 RF-10A<sub>XL</sub>

カラム:(財)化学物質評価研究機構製逆相カラム L-column ODS (150mm $\times$ 4.6mm)

カラム槽温度:45 $^{\circ}$ C

移動相:アセトニトリル-メタノール-0.2M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH5.0) -水 (1:3:0.5:5.5, v/v/v/v)

流速:0.6mL/min

検出波長:励起波長 360nm, 蛍光波長 450nm

試料注入量:5 $\mu$ L (とうもろこしのみ 20 $\mu$ L)

## 4. 試験溶液の調製法

### 1) 白米, 玄米, ピーナッツ, とうもろこし, そば粉および米菓子

既報<sup>1,2)</sup>の方法を基に, 以下のとおり調製した。

各試料 50g (穀類, 米菓子) を採取し, アセトニトリル・水 (9:1, v/v) の混合溶媒 100mL (とうもろこし以外の試料) または 400mL (とうもろこし) を加えてホモジナイズ (8000rpm, 5min) した後, ろ紙 (Whatman No.4) でろ過した。ろ液 5mL を正確にとり, PBS または米菓子の場合は 0.01% Tween20-PBS 溶液で 50mL に希釈した。希釈液をガラス繊維ろ紙 (Whatman 934AH, そば粉の場合

は 934AH の後 GF/F を使用) でろ過し, ろ液 10mL を正確にとりイムノアフィニティーカラム (IAC) に負荷した。全てのろ液を溶出させた後, カラムを PBS または 0.01% Tween20-PBS 溶液 10mL および水 10mL で洗浄し, 加圧してカラム内の水分を十分に除去した。その後アセトニトリル 1mL を加え, 自然流下させた後 5 分間放置した。さらにアセトニトリル 1mL をカラムに注入し溶出させた。この操作をもう一度繰り返し AFs アセトニトリル溶液 3mL を得た。この溶液にアセトニトリルを加え正確に 5mL とし, 良く混合した。その内 2.5mL をシラーン処理バイアルビンへ正確にとり, 窒素気流下 (45 $^{\circ}$ C) で溶媒除去した。残留物に TFA 0.1mL を加え, 密栓し激しく攪拌した。室温, 暗所で 15 分間放置した後, アセトニトリル・水 (1:9, v/v) 0.9mL を加えたものを高速液体クロマトグラフィー用試験溶液とした。以上の操作法を図 1 に示した。

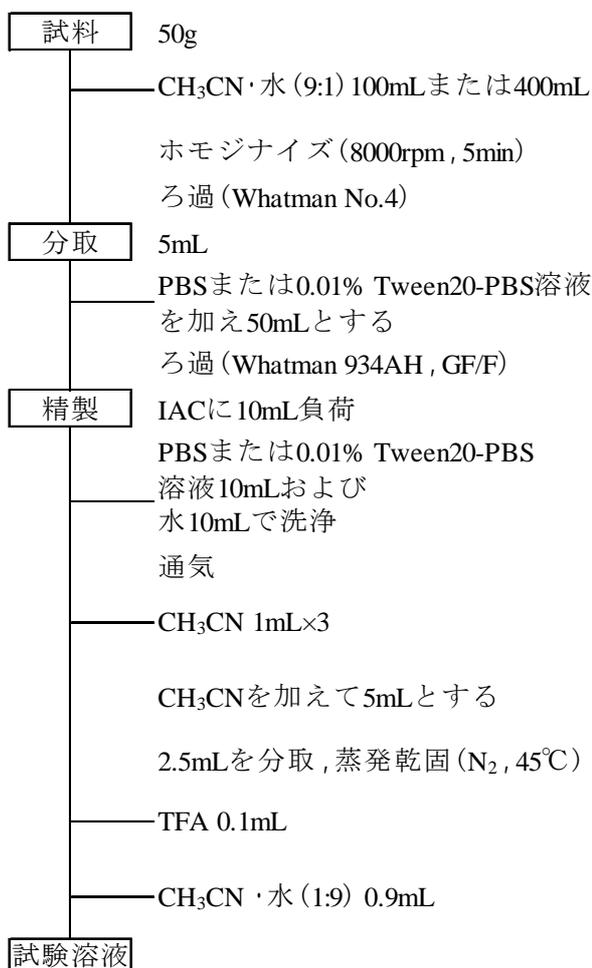


図 1 アフラトキシン試験溶液調製法 (白米, 玄米, ピーナッツ, とうもろこし, そば粉および米菓子)

### 2) チョコレート

チョコレートは既報<sup>3)</sup>の方法を基に, 以下のと

おり調製した。

試料 10g を採取し、アセトニトリル・メタノール・水 (6:1:4, v/v/v) の混合溶媒 40mL を加えてホモジナイズ (10000rpm, 5min) した後、ろ紙 (Whatman 934AH) でろ過した。ろ液 4mL を正確にとり、0.01% Tween20-PBS 溶液を加え 100mL に希釈した。希釈液をガラス繊維ろ紙 (Whatman 934AH) でろ過し、ろ液 50mL を正確にとりイムノアフィニティーカラム (IAC) に負荷した。全てのろ液を溶出させた後、カラムを 0.01% Tween20-PBS 溶液 10mL および水 10mL で洗浄し、加圧しカラム内の水分を十分に除去した。その後アセトニトリル 1mL を加え、自然流下させた後 5 分間放置した。さらにアセトニトリル 1mL をカラムに注入し溶出させた。この操作をもう一度繰り返し AFs アセトニトリル溶液 3mL を得た。この溶液を窒素気流下 (45°C) で溶媒除去した。残留物に TFA 0.1mL を加え、密栓し激しく攪拌した。室温、暗所で 15 分間放置した後、アセトニトリル・水 (1:9, v/v) 0.9mL を加えたものを高速液体クロマトグラフィー用試験溶液とした。以上の操作法を図 2 に示した。

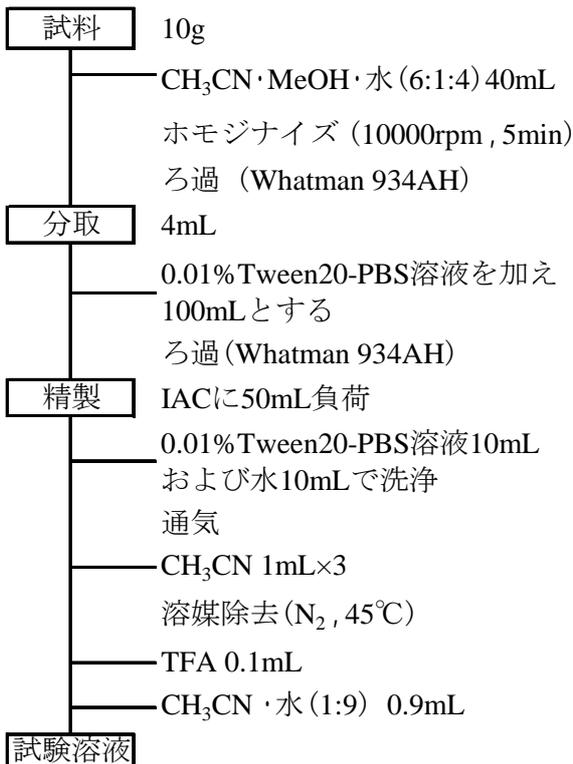


図 2 アフラトキシン試験溶液調製法 (チョコレート)

### 3) 酒, しょう油, みりんおよび酢

酒, しょう油, みりんおよび酢は既報<sup>4)</sup>の方法を基に, 以下のとおり調製した。

試料 10g を採取し, 0.01% Tween20-PBS 溶液を

加え 100mL とした。希釈液をガラス繊維ろ紙 (Whatman 934AH) でろ過し, ろ液 50mL を正確にとりイムノアフィニティーカラム (IAC) に負荷した。全てのろ液を溶出させた後, カラムを 0.01% Tween20-PBS 溶液 10mL および水 10mL で洗浄し, 加圧しカラム内の水分を十分に除去した。その後アセトニトリル 1mL を加え, 自然流下させた後 5 分間放置した。さらにアセトニトリル 1mL をカラムに注入し溶出させた。この操作をもう一度繰り返し AFs アセトニトリル溶液 3mL を得た。この溶液を窒素気流下 (45°C) で溶媒除去した。残留物に TFA 0.1mL を加え, 密栓し激しく攪拌した。室温, 暗所で 15 分間放置した後, アセトニトリル・水 (1:9, v/v) 0.9mL を加えたものを高速液体クロマトグラフィー用試験溶液とした。以上の操作法を図 3 に示した。

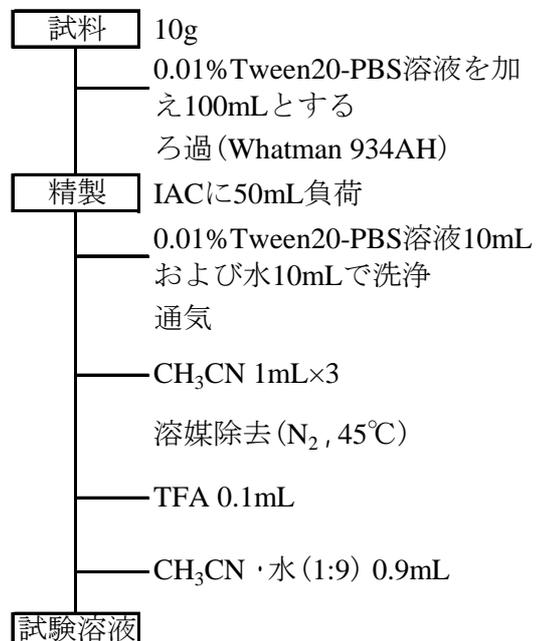


図 3 アフラトキシン試験溶液調製法 (酒, みりん, 酢およびしょう油)

### 4) ピーナッツバターおよびなたね油

ピーナッツバターおよびなたね油は既報<sup>4)</sup>の方法を基に, 以下のとおり調製した。

試料 10g を採取し, アセトニトリル・メタノール・水 (6:1:4, v/v/v) の混合溶媒 40mL を加えて振とう (5min) した後, 遠心分離 (3000rpm, 5 分間) を行った。上清 4mL を正確にとり, 0.01% Tween20-PBS 溶液を加え 100mL とした。希釈液をガラス繊維ろ紙 (Whatman 934AH) でろ過し, ろ液 50mL を正確にとりイムノアフィニティーカラム (IAC) に負荷した。全てのろ液を溶出させたのち, カラムを 0.01% Tween20-PBS 溶液 10mL および水 10mL で洗浄し, 加圧しカラム内

の水分を十分に除去した。その後アセトニトリル 1mL を加え、自然流下させた後 5 分間放置した。さらにアセトニトリル 1mL をカラムに注入し溶出させた。この操作をもう一度繰り返し AFs アセトニトリル溶液 3mL を得た。この溶液を窒素気流下 (45°C) で溶媒除去した。残留物に TFA0.1mL を加え、密栓し激しく攪拌した。室温、暗所で 15 分間放置した後、アセトニトリル・水 (1:9, v/v) 0.9mL を加えたものを高速液体クロマトグラフィー用試験溶液とした。以上の操作法を図 4 に示した。

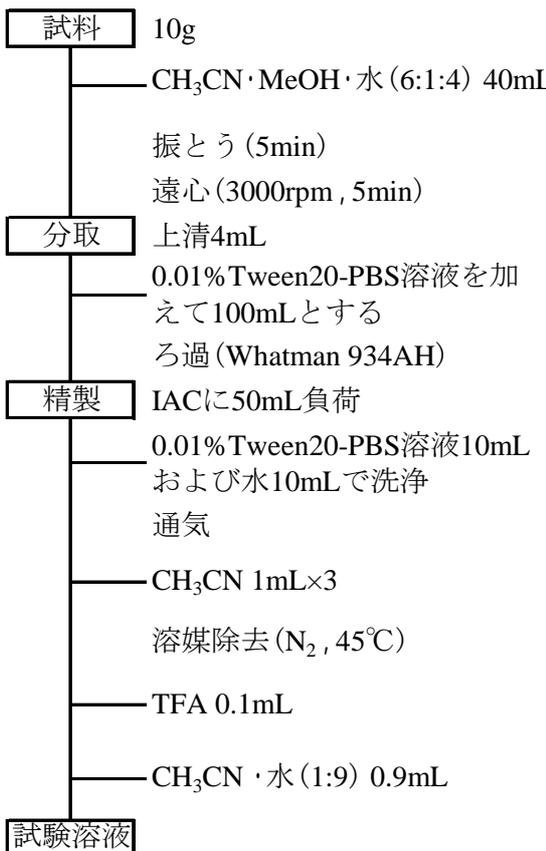


図 4 アフラトキシン試験溶液調製法 (ピーナツバターおよびなたね油)

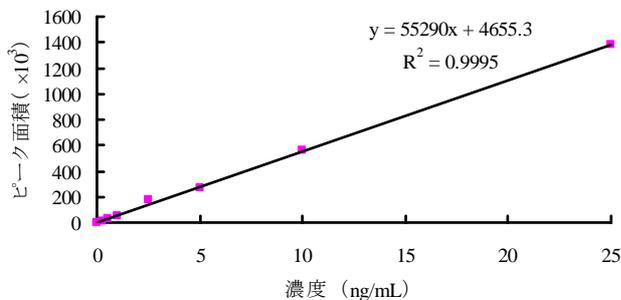


図 5A アフラトキシン B<sub>1</sub> の検量線

## 5 .バリデーション

試料 50g を採取し、AFs 標準溶液 100ng/mL を 5mL (10ppb 相当) または 50ng/mL を 5mL (5ppb 相当) 添加し、アセトニトリル・水 (9:1, v/v) 95mL を加え、以降、図 1 に従って操作したものをバリデーションの試験溶液とした。バリデーション<sup>5)</sup> は分析者 1 名が、同一ロットの白米から作成した添加試料を 1 日 2 回、5 日間分析する枝分かれ実験計画で実施した。

## 6 .標準添加回収実験

試料 50g (穀類および米菓子) および 10g (米加工品, 油, チョコレートおよびしょう油) を採取し、AFs 標準溶液 100ng/mL を加え 10ppb になるように調製し、以降、図 2 から図 4 に従って操作したものを標準添加回収実験の試験溶液とした。

## 実験結果および考察

### 1 .保持時間の確認と検量線および検出限界の検討

既報<sup>4)</sup>を参考に、4 種アフラトキシンの RF-HPLC による測定を行ったところ、各アフラトキシンのピークが良好に分離していることを確認した。

次に 4 種アフラトキシンの検量線の直線性の確認を行った。0.25~25ng/mL (検体が白米の場合、約 1~100ppb 相当) の濃度範囲で測定を行い、検量線を作成したところ、良好な直線性を示した (表 1 および図 5A~D)。また検出限界をクロマトグラム上の S/N 比 3 とすると、0.1~0.2ng/mL で、白米 10g に対する検出限界は 0.4~0.8ppb であった。

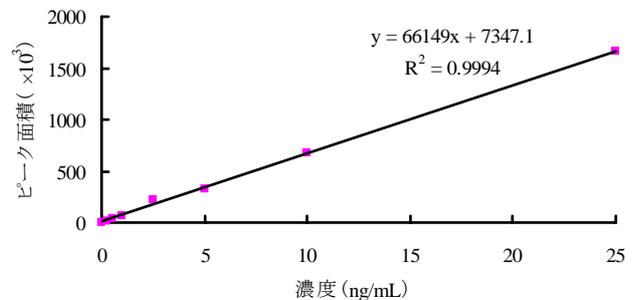


図 5B アフラトキシン B<sub>2</sub> の検量線

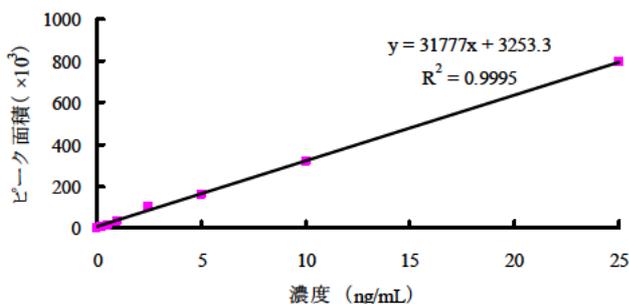


図 5C アフラトキシン G<sub>1</sub>の検量線

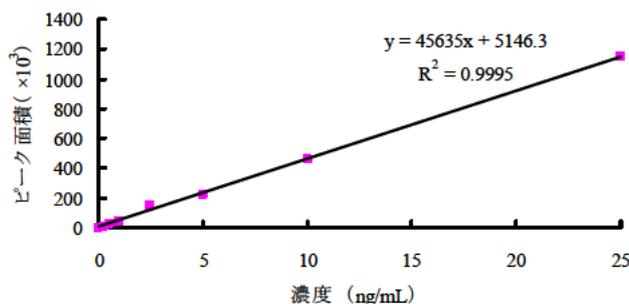


図 5D アフラトキシン G<sub>2</sub>の検量線

表 1 アフラトキシンの保持時間、検量線の直線性および検出限界

AFs	保持時間 (min)	濃度範囲		相関係数	検出限界	
		(ng/mL)	(ppb, 白米の場合)		(ng/mL)	(ppb, 白米の場合)
AFG <sub>1</sub>	5.50	0.25-25	1-100	0.9995	0.2	0.8
AFB <sub>1</sub>	6.94	0.25-25	1-100	0.9995	0.1	0.4
AFG <sub>2</sub>	9.10	0.25-25	1-100	0.9995	0.1	0.4
AFB <sub>2</sub>	12.85	0.25-25	1-100	0.9994	0.1	0.4

## 2. バリデーション

白米を用いたバリデーションの結果は、表 2, 3 に示すように、5ppb 添加時の平均回収率は 97.3 ~101.2%、10ppb 添加時の平均回収率は 95.3~

101.3%といずれの濃度においても良好な結果が得られた。併行精度および室内精度に関しては、濃度の高い 10ppb の結果すべてにおいて 5ppb よりも、良好な結果が得られた。

表 2 米のアフラトキシン標準添加回収実験結果 (添加濃度 5ppb)

併行回数		回収率					平均回収率 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
		1日目	2日目	3日目	4日目	5日目			
AFG <sub>1</sub>	2	95.2	93.1	99.7	100.6	108.2	98.4	2.5	6.3
		96.1	93.1	94.4	94.9	108.8			
AFB <sub>1</sub>	2	97.2	100.2	97.7	100.2	105.5	97.3	5.2	5.2
		98.2	96.2	92.0	87.6	98.6			
AFG <sub>2</sub>	2	101.8	99.2	105.8	104.5	98.8	101.2	2.3	2.9
		103.0	101.2	102.5	99.0	96.3			
AFB <sub>2</sub>	2	102.5	96.6	102.3	101.6	96.4	98.2	3.1	3.4
		99.4	96.3	99.4	93.4	94.0			

表 3 米のアフラトキシン標準添加回収実験結果 (添加濃度 10ppb)

併行回数		回収率					平均回収率 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
		1日目	2日目	3日目	4日目	5日目			
AFG <sub>1</sub>	2	98.2	95.4	100.0	98.7	109.6	101.3	2.0	5.7
		100.6	99.6	97.8	100.3	113.0			
AFB <sub>1</sub>	2	95.2	91.3	96.6	93.3	102.9	96.8	2.0	4.5
		99.4	94.8	95.0	95.4	104.4			
AFG <sub>2</sub>	2	99.8	94.2	99.3	98.1	99.8	98.6	0.8	2.3
		100.7	95.4	98.3	99.8	100.7			
AFB <sub>2</sub>	2	95.9	92.5	96.3	93.3	94.8	95.3	1.7	1.7
		98.0	96.4	95.1	94.6	96.2			

### 3. 標準添加回収率

玄米，ピーナッツおよびとうもろこし各 50g を採取し，AFs 標準溶液 100ng/mL を 5mL 加え (10ppb 相当)，以下図 1 に従って操作した (各 5 併行)．チョコレート，酒，みりん，酢およびしょう油各 10g を採取し，AFs 標準溶液 100ng/mL を 1mL 加え (10ppb 相当)，以下チョコレートは図 2 に従って，その他は図 3 に従って操作した (各 5 併行)．ピーナッツバターおよびなたね油は各 10g を採取し，AFs 標準溶液 100ng/mL を 1mL 加え (10ppb 相当) 以下図 4 に従って操作した (各 5 併行)．その結果，いずれもクロマトグラム上に妨害となるようなピークは認められず，4 種アフラトキシンの平均回収率は，表 4 に示すとおりであり，今回使用したイムノアフィニティーカラムは，様々な食品に適応できることが確認された．一例として，白米における標準添加回収実験のクロマトグラムを図 6 に示す．

### まとめ

アフラトキシン B<sub>1</sub>，B<sub>2</sub>，G<sub>1</sub> および G<sub>2</sub> の 4 種の分析法を検討し，以下の結果を得た．

1. RF-HPLC による検量線は，アフラトキシン 4 種いずれも 0.25～25ng/mL の範囲で良好な直線性を示した．
2. 白米 50g に対する検出限界は，アフラトキシン G<sub>1</sub> の場合，0.8ppb でそれ以外のアフラトキシンは 0.4ppb であった．
3. イムノアフィニティーカラムを使用した標準添加回収実験では，13 種類の食品全てにおいて，白米と同様，良好な回収率と精度が確認できた．

4. 今回使用したイムノアフィニティーカラムについては，塩類，アルコール類および油分などの夾雑物の多い食品に対して安定して良好な結果を得ることを確認した．

### 文献

- 1) カビ毒 (アフラトキシン) を含有する食品の取扱いについて，食安監発第 0728003 号、平成 20 年 7 月 28 日付け，厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知．
- 2) カビ毒 (アフラトキシン) を含有する食品の取扱いについて (訂正)，平成 20 年 9 月 26 日付け，厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課事務連絡．
- 3) ITHO A. *et al.*, : A method of analysis for determination of aflatoxins in chocolate , *Mycotoxins*, 58(1), 7-13 (2008)．
- 4) 中島正博：アフラトキシン試験法について－IAC 試験法および加工食品中の分析例－，食品衛生研究，59(2),7-15(2009)．
- 5) 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 日付け、厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知．

表 4 食品のアフラトキシン標準添加回収実験結果 (添加濃度：10ppb)

試料名	試料数	AFB <sub>1</sub>		AFB <sub>2</sub>		AFG <sub>1</sub>		AFG <sub>2</sub>	
		回収率 (%)	併行精度 (RSD%)						
白米	5	95.4	1.2	97.2	1.6	97.7	1.3	100.0	1.6
玄米	5	94.4	2.0	94.8	2.0	101.2	1.5	100.7	1.2
ピーナッツ	5	104.5	2.5	99.5	1.5	112.7	1.0	104.9	1.6
とうもろこし	5	90.0	4.4	91.5	3.8	94.2	3.6	94.7	3.4
日本酒	5	84.2	3.1	89.3	1.8	87.3	2.8	92.0	1.4
みりん	5	89.9	0.5	90.3	0.6	94.3	0.8	94.2	0.7
しょう油	4	88.4	2.7	90.3	2.5	92.1	2.7	93.1	2.6
酢	5	87.6	1.4	90.2	0.7	90.6	2.7	92.4	1.4
チョコレート	5	85.1	0.9	87.3	1.1	90.5	1.2	92.0	1.0
なたね油	5	84.7	1.2	90.7	1.1	92.9	0.8	93.6	1.9
ピーナッツバター	5	90.4	0.6	91.4	0.9	91.3	1.4	93.1	0.9
米菓子	5	103.2	2.3	100.8	2.1	103.6	1.7	104.5	1.6
そば粉	5	95.9	3.3	96.0	2.7	98.8	4.3	100.0	3.5

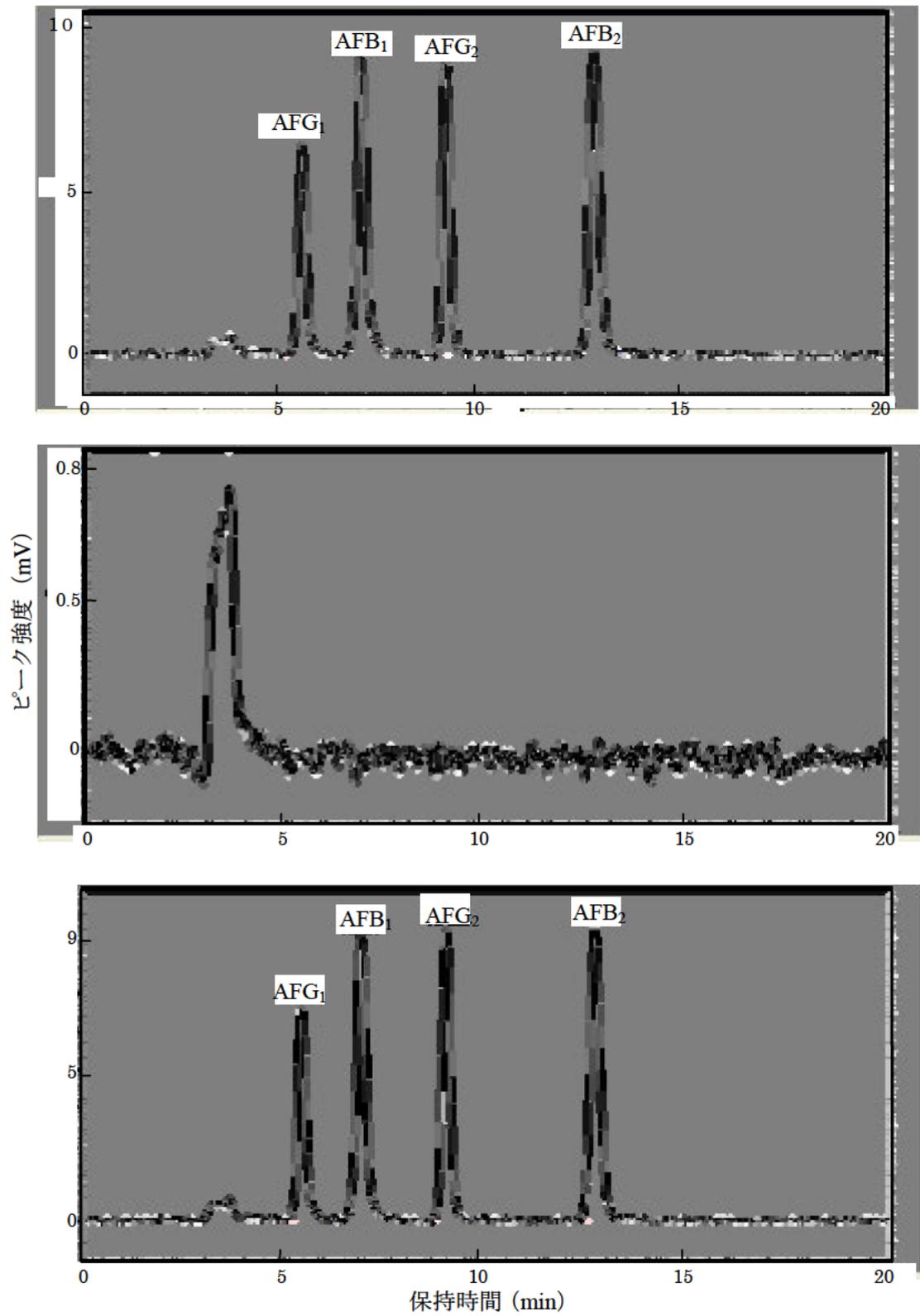


図6 AFBs標準溶液および試験溶液のクロマトグラム  
 (上から順に4種AFs混合標準液(2.5ng/mL), 白米ブランク, 白米標準添加(10ppb))