

事 務 連 絡
平成20年9月26日

各検疫所 御中

厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課

カビ毒（アフラトキシン）を含有する食品の取り扱いについて（訂正）

標記については、平成14年3月26日付け食監発第0326001号によりアフラトキシンを含有する食品の試験法を通知し、平成20年7月28日付け食監発第0728004号によりその試験法を改正したところですが、別紙「通知法正誤表」のとおり訂正等が生じ、別添のとおり改めることとしましたのでお知らせします。

別紙

通知法正誤表

頁	正	誤
6 頁注釈 9) 17 行目	最終標準溶液（「穀類、豆類及び種実類」では 1.0 mL、「香辛料類」では 0.25 mL）をスクリーキャップ付きバイアルあるいは共栓付の試験管や遠心管等へ正確にとり、窒素気流を送るかエバポレータを用いて溶媒を除去後、 <u>アセトニトリル・水 (1:9)</u> （「穀類、豆類及び種実類」では 1.0 mL、「香辛料類」では 0.5 mL）を加えて調製する。	最終標準溶液（「穀類、豆類及び種実類」では 1.0 mL、「香辛料類」では 0.25 mL）をスクリーキャップ付きバイアルあるいは共栓付の試験管や遠心管等へ正確にとり、窒素気流を送るかエバポレータを用いて溶媒を除去後、 <u>アセトニトリル・水 (9:1)</u> （「穀類、豆類及び種実類」では 1.0 mL、「香辛料類」では 0.5 mL）を加えて調製する。
7 頁注釈 13) 4 行目	EASI-EXTRACT AFLATOXIN (R-Biopharm Rhône 社、英国製)	加筆
7 頁注釈 13) 4 行目	RIDA Aflatoxin column (R-Biopharm AG社、 <u>ドイツ製</u> 、対象トータルアフラトキシン)	RIDA Aflatoxin column (R-Biopharm AG社、 <u>英国製</u> 、対象トータルアフラトキシン)
7 頁注釈 13) 9 行目	使用するイムノアフィニティーカラムは、あらかじめ、アフラトキシンB ₁ の回収率が、 <u>80%以上であることを確かめること</u> (AOAC掲載の方法 (Mary W. Trucksess: Official Methods of Analysis of AOAC International (18 th Edition) Chapter 49, <u>p. 31 (2005)</u>) 等が有用である。	使用するイムノアフィニティーカラムは、あらかじめ、 <u>使用する条件下でのアフラトキシンB₁の回収率が、穀類で90%以上(香辛料等の場合は80%以上)</u> であることを確かめること(AOAC掲載の方法(Mary W. Trucksess: Official Methods of Analysis of AOAC International (18 th Edition) Chapter 49, <u>p. 22-24, 34-37 (2005)</u>)等が有用である。

穀類、豆類、種実類及び香辛料類中のアフラトキシンB₁試験法

以下に示す高速液体クロマトグラフィーによる分析により、陽性と判断された場合には、高速液体クロマトグラフ質量分析計等により確認試験を実施する。

A. 多機能カラム法

1 機器、器具

ロータリーエバポレーター、高速液体クロマトグラフ(蛍光検出器付きのもの)およびクリーンアップ用カートリッジカラム(逆相樹脂、陰イオン交換樹脂、陽イオン交換樹脂を混合したものを充てんした多機能カラム^{注1), 2)})を用いる。

2 試薬・試液

次に示すもの以外は、食品、添加物等の規格基準(昭和34年厚生省告示第370号)第1 食品の部D 各条の項の○ 穀類、豆類、果実、野菜、種実類、茶及びホップの2 穀類、豆類、果実、野菜、種実類、茶及びホップの成分規格の試験法の目の(2) 試薬・試液に示すものを用いる。

トリフルオロ酢酸(冷暗所に保存する)

ろ紙 Whatman No.5 またはその同等品

3 標準品

アフラトキシンB₁標準原液の調製^{注3)} 精密に秤量を行ったアフラトキシンB₁からトルエン・アセトニトリル(9:1)又はアセトニトリルを用いて最終標準溶液(2.5ng/mL)を調製する。以下に調製例を示す。正確に1.0 mgの秤量が保証されたもの又は正確に1.0 mg秤量を行ったアフラトキシンB₁容器にトルエン・アセトニトリル(9:1)又はアセトニトリル 50 mLを加え、激しく攪拌し、標準原液(20 µg/mL)とする。標準原液は密栓しアルミニウム箔で覆い冷蔵庫中に保存する。標準原液 0.5 mLを採り、トルエン・アセトニトリル(9:1)又はアセトニトリルで 200 mLとし、標準第一溶液(50 ng/mL)を調製する。その標準第一溶液 1.0 mLを採り、トルエン・アセトニトリル(9:1)又はアセトニトリルで 20mL とし、最終標準溶液(2.5 ng/mL)を調製する。

4 試験溶液及び標準溶液の調製

① 穀類、豆類及び種実類^{注4)}

採取された検体を粉碎均一化した試料 50gをブレンダー容器あるいは共栓付き三角フラスコ等に量り採る。これにアセトニトリル・水(9:1) 100 mLを加え、5分間ブレンドまたは30分間振とう後、ろ紙でろ過又は遠心分離する。ろ液 5 mLを多機能カラム^{注1), 2)}に静かに注入し、1分間 1.0 mLの流速で流出する。最初に溶出される流出液約 1 mL^{注5)}を試験管

に集め、試験溶液とする。

その試験溶液 0.5 mL をスクリーキャップ付きバイアルあるいは共栓付の試験管や遠心管等へ正確にとり、窒素気流を送るかエバポレータを用いて溶媒を除去する。残留物にトリフルオロ酢酸 0.1 mL を加え、密栓して激しく攪拌する。室温、暗所で 15 分間、放置したのちアセトニトリル・水(1:9) 0.9 mL 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^(注6)とする。

別に最終標準溶液 1.0 mL をスクリーキャップ付きバイアルあるいは共栓付の試験管や遠心管等に正確にとり、窒素気流を送るかエバポレータを用いて減圧乾固したのち、それぞれにトリフルオロ酢酸 0.1 mL を加え、密栓して激しく攪拌する。室温、暗所で 15 分間、放置したのちアセトニトリル・水(1:9) 0.9 mL を加えたものを穀類、豆類及び種実類の高速液体クロマトグラフィー用標準溶液とする。

② 香辛料類^(注7)

採取された検体を粉碎均一化した試料 50g をブレンダー容器あるいは共栓付きナスフラスコ等に量り採る。これにアセトニトリル・水(9:1) 400 mL を加え、5 分間ブレンドまたは 30 分間振とう後、ろ紙でろ過又は遠心分離する。ろ液 5mL を多機能カラム^(注1)に静かに注入し、1 分間 1.0 mL の流速で流出する。最初に溶出される流出液約 1mL^(注5)を試験管に集め、試験溶液とする。

その試験溶液 0.5 mL をスクリーキャップ付きバイアルあるいは共栓付の試験管や遠心管等へ正確にとり、窒素気流を送るかエバポレータを用いて溶媒を除去する。残留物にトリフルオロ酢酸を 0.1 mL 加え、密栓して激しく攪拌する。室温、暗所で 15 分間、放置したのちアセトニトリル・水(1:9) 0.4 mL 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^(注6)とする。

別に最終標準溶液 0.25 mL をスクリーキャップ付きバイアルあるいは共栓付の試験管や遠心管等へ正確にとり、窒素気流を送るかエバポレータを用いて減圧乾固したのち、トリフルオロ酢酸 0.1 mL を加え、密栓して激しく攪拌する。室温、暗所で 15 分間、放置したのちアセトニトリル・水(1:9) 0.4 mL を加えたものを香辛料類の高速液体クロマトグラフィー用標準溶液とする。

5 操作法

a 高速液体クロマトグラフィーによる分析^(注8)、9)、10)

高速液体クロマトグラフィー用試験溶液及び高速液体クロマトグラフィー用標準溶液をそれぞれ 20 μ L について、次の条件で試験を行う。試験溶液から得られたクロマトグラム上のピークの保持時間を標準品のピークと比較して定性する。

高速液体クロマトグラフィー用試験溶液の測定から得られたピーク高さ又はピーク面積が、高速液体クロマトグラフィー用標準溶液の測定から得られたピーク高さ又はピーク面積を上回る場合は陽性と判断する。

操作条件

カラム充てん剤 オクタデシルシリル化シリカゲル(粒径 3~5 μm)^{注1)}を用いる。

カラム管 内径 4.6 mm、長さ 150 mm 又は 250 mm

カラム温度 40°C

移動相 アセトニトリル・メタノール・水(1:3:6)を用いる。

流速 1.0 mL/min

検出波長 励起波長 365 nm、蛍光波長 450 nm で測定する。

注入量 20 μL

b 高速液体クロマトグラフ質量分析による確認試験

A. 4で得られた試験溶液で高速液体クロマトグラフィー分析に 0.5 mL 使用后、残った試験溶液の内、0.4 mL を用いて確認試験を行う。

測定例

操作条件

カラム充てん剤 カラムクロマトグラフ用オクタデシルシリル化シリカゲル(粒径 5 μm)^{注1)}を用いる。

カラム管 内径 2.0 mm、長さ 150 mm

カラム温度 40°C

移動相 アセトニトリル・メタノール・10 mmol/L 酢酸アンモニウム(2:6:15)を用いる。

流速 0.2 mL/min

検出波長 励起波長 365 nm、蛍光波長 450 nm で測定する。

注入量 5-10 μL

質量分析計条件

イオン化モード ESI-positive

モニターイオン(m/z) アフラトキシンB₁ 313

6 アフラトキシンB₁の処理法

試験に用いた器具、前処理用カラム、検体等は、1%(v/v)濃度の次亜塩素酸ナトリウムに2時間以上浸けた後、処理すること。

B. イムノアフィニティーカラム法^{注12)}

1 機器、器具

A. 1に準ずる。

ただしクリーンアップ用カラムとしてイムノアフィニティーカラム^{注13)}を用いる。

2 試薬・試液

A. 2に準ずる。

ただし、ろ紙はWhatman No. 4 またはその同等品、ガラス繊維ろ紙はWhatman 934 AHまたはその同等品を用いる。生理的リン酸緩衝液 (pH 7.4、以下「PBS」という) - 0.20g KCl, 0.20g KH₂PO₄, 1.16g 無水Na₂HPO₄(または2.92g Na₂HPO₄・12H₂O), 8.00g NaCl を900mLの水に溶解後0.1 mol/L HCl またはNaOH でpH 7.4にあわせ、1Lに定容する^{注14)}。ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート (ICI社商標 Tween 20 相当品、以下「Tween 20」という)

3 標準品

A. 3に準ずる。

4 試験溶液及び標準溶液の調製

① 穀類、豆類及び種実類^{注4)}

採取された検体を粉碎均一化した試料50 gをブレンダー容器あるいは共栓付き三角フラスコ等に量り採る。これにアセトニトリル・水(9:1)^{注5)} 100 mLを加え、5分間ブレンドまたは30分間振とう後、ろ紙でろ過又は遠心分離する。ろ液5.0 mLを正確にとり、PBS^{注14)}を加え50.0mLとする。良く混合したのち、ガラス繊維ろ紙でろ過し^{注16)}、ろ液10.0mLを正確にとりイムノアフィニティーカラムに注入する^{注17)}。全てのろ液を溶出させたのち、カラムをPBS 10mL以上および精製水10mL以上で洗浄し^{注18)}、加圧しカラム内の水分を十分に追い出す^{注19)}。その後アセトニトリル3 mLで溶出し^{注20)}、アセトニトリルを用いて正確に5.0mLとし、良く混合し試験溶液とする。

その試験溶液2.5mLをスクリーキャップ付きバイアルあるいは共栓付の試験管や遠心管等へ正確にとり、窒素気流を送るかエバポレータを用いて溶媒を除去する^{注21)}。残留物にトリフルオロ酢酸0.1 mLを加え、密栓して激しく攪拌する。室温、暗所で15分間、放置したのちアセトニトリル・水(1:9)0.9 mL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する。

最終標準溶液の作成は、A. 4①に準ずる。

② 香辛料類

採取された検体を粉碎均一化した試料50 gをブレンダー容器あるいは共栓付きナスフラスコ等に量り採る。これにアセトニトリル・水(9:1)^{注5)} 400 mLを加え、5分間ブレンドまたは30分間振とう後、ろ紙でろ過又は遠心分離する。ろ液5.0 mLを正確にとり、2% Tween 20を含むPBS^{注22)}を加えて50.0mLとする。良く混合したのち、必要ならばガラス繊維ろ紙でろ過し^{注16)}、ろ液10.0mLを正確にとりイムノアフィニティーカラムに注入する^{注17)}

。全てのろ液を溶出させたのち、カラムを0.01% Tween 20を含むPBS 10mL以上および精製水 10mL以上で洗浄し^{注23)}、加圧シカラム内の水分を十分に追い出す^{注19)}。その後アセトニトリル 3mLで溶出し^{注20)}、アセトニトリルを用いて正確に 5.0mLとし、良く混合し試験溶液とする。

その試験溶液 2.5mLをスクリーキャップ付きバイアルあるいは共栓付の試験管や遠心管等へ正確にとり、窒素気流を送るかエバポレータを用いて溶媒を除去する^{注21)}。残留物にトリフルオロ酢酸 0.1 mLを加え、密栓して激しく攪拌する。室温、暗所で15分間、放置したのちアセトニトリル・水(1:9) 0.4 mL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する。

最終標準溶液の作成は、A. 4②に準ずる。

5 操作法

a 高速液体クロマトグラフィーによる分析

A. 5aに準ずる。

b 高速液体クロマトグラフ質量分析による確認試験

B. 4で得られた試験溶液で高速液体クロマトグラフィー分析に2.5 mL使用后、残った試験溶液の内、2.0 mLを用いて確認試験を行う。

6 アフラトキシンB₁の処理法

A. 6に準ずる。

【注解】

- 1) シリンジ型多機能カラムMultiSep #228(Romer Labs社製)、Autoprep MF-A (昭和電工(株)製)などが使用できる。コンディショニングは行わずそのまま用いる。また、使用するカラムによって溶出パターンは異なるので、標準溶液を用いて事前に溶出量を確認する。使用する多機能カラムはあらかじめ、アフラトキシンB₁の回収率が90%以上であることを確かめること(AOAC掲載の方法(Mary W. Trucksess: Official Methods of Analysis of AOAC International (18th Edition) Chapter 49, p. 26-27, (2005))が有用である。
- 2) 押し出し型多機能カラム MycoSep #226、MycoSep #228(Romer Labs社製)なども使用できる。
- 3) アフラトキシンは強力な発がん物質であるため、取り扱いに注意する必要がある。Sigma社等から入手可能な正確に秤量された市販品を用いると便利である。また、標準溶液調製法として、AOAC掲載の方法(Mary W. Trucksess: Official Methods of Analysis of AOAC International (18th Edition) Chapter 49, p. 3-5, (2005))が有用である。

- 4) アセトニトリル・水(9:1) 100 mL では試料が十分に攪拌抽出できない、もしくは、ろ液がとれない場合には、②香辛料類の方法を採用すること。
- 5) 多機能カラム精製では、夾雑物がカラムに保持し遅く溶出され、アフラトキシンはカラムに保持せず常に一定の濃度で溶出されることにより、精製される。従って多機能カラムからの初期溶出液 1.0 mL が最も精製度が高い。
- 6) 必要であれば、遠心処理等で不溶物を除去後、高速液体クロマトグラフィー用試験溶液とする。
- 7) 香辛料はチリペッパー、レッドペッパー及びナツメグが適応できる。
- 8) 香辛料試料及びHPLCカラムに保持が強い夾雑物が多く存在する試料を連続分析する際は、アフラトキシンB₁溶出後、アセトニトリルでHPLCカラムを5分から10分間洗浄後、移動相で10分間送液し、初期化する。
- 9) トリフルオロ酢酸による蛍光誘導化(TFA法)のほかに、フォトケミカルリアクターによる蛍光誘導化法(PR法, Joshua, H. *et al.* : J. chromatogr A., 654, 247-254, 1993) やコブラセル法(KC法, Kok, W. T. *et al.* : J. Chromatogr., 367, 231-236, 1986, Papadopoulou-Bouraoui, A. *et al.* : J. AOAC Int., 85, 411-416, 2002)も応用可能である。PR法は、ポストカラムで紫外線照射により生成する蛍光誘導体化合物を、KC法は、ポストカラムで電気化学的に生ずるブロムにより生成するブロム誘導体化合物を測定する簡便な手法である。ポストカラム反応であるためアフラトキシンの高速液体クロマトグラフィー上の溶出順序が異なり、G₂、G₁、B₂、B₁の順となる。PR法およびKC法の場合、トリフルオロ酢酸による反応を行わないため、高速液体クロマトグラフィー用標準溶液調製の際は、試験溶液 0.5 mLを、スクリューキャップ付きバイアルあるいは共栓付の試験管や遠心管等へ正確にとり、窒素気流を送るかエバポレータを用いて溶媒を除去後、アセトニトリル・水(1:9) (「穀類、豆類及び種実類」では 1.0 mL、「香辛料類」では 0.5 mL)を正確に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する。最終標準溶液 (「穀類、豆類及び種実類」では 1.0 mL、「香辛料類」では 0.25 mL) をスクリューキャップ付きバイアルあるいは共栓付の試験管や遠心管等へ正確にとり、窒素気流を送るかエバポレータを用いて溶媒を除去後、アセトニトリル・水(1:9) (「穀類、豆類及び種実類」では 1.0 mL、「香辛料類」では 0.5 mL)を加えて調製する。なお、PR法およびKC法の測定条件の一例を以下に示す。

<PR法>

高速液体クロマトグラフィーの条件

カラム: オクタデシルシリル化シリカゲルカラム^{注1)}(内径 4.6 mm、長さ 150 又は 250 mm、粒径 3~5 μm)、カラム温度: 40°C、移動相: メタノール・水(4:6)、流量: 0.7 mL/min、検出波長: 励起波長 365 nm、測定波長 450 nm、PR反応システム: 245 nm 低圧水銀灯 (15W) 照射システム、反応コイル: 内

径 0.25 mm、長さ 15~20 m、注入量:20 μ L

<KC 法>

高速液体クロマトグラフィーの条件

カラム:オクタデシルシリル化シリカゲルカラム^{注1)}(内径 4.6 mm、長さ 150 又は 250 mm、粒径 3~5 μ m)、カラム温度:40°C、移動相:メタノール・水(4:6) (1Lあたりに臭化カリウム 119 mgおよび 4 mol/L硝酸 350 μ Lを加える)、流量: 1.0 mL/min、検出波長:励起波長 365 nm、測定波長 450 nm、KC反応システム:コブラセル(R-Biopharm Rhône 社製)、電流 100 μ A、注入量: 20 μ L

- 10) 分離できない夾雑物が明らかに存在し、高速液体クロマトグラフィー用試験溶液の測定から得られたピーク高さ又はピーク面積が、高速液体クロマトグラフィー用標準溶液の測定から得られたピーク高さ又はピーク面積を上回る際は、イムノアフィニティー法が有用である。夾雑物の影響等に改善がみられない場合においてはカラムの長さや充てん剤の粒径、移動相を変更することができる。
- 11) Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス社製)、Shodex Silica C18M 4E (昭和電工(株)製)及び Cadenza CD-C18 CD006 (インタクト社製)などが使用できる。
- 12) 本法は、加工食品等で、多機能カラム法を用いた前処理では夾雑物や妨害物のためアフラトキシンB₁の陽性判定が疑わしい等、評価が困難である場合においてのみ行うこととする。
- 13) AFLAKING ((株)堀場製作所、日本製、対象トータルアフラトキシン、アフラトキシン M₁)、AflaStar Fit 3 (Romer社、オーストリア製、対象トータルアフラトキシン)、AflaTest WB (VICAM社、米国製、対象トータルアフラトキシン)、RIDA Aflatoxin column (R-Biopharm AG社、ドイツ製、対象トータルアフラトキシン)、EASI-EXTRACT AFLATOXIN (R-Biopharm Rhône社、英国製)、Neocolumn (Neogen社、米国製、対象トータルアフラトキシン)などが使用出来る。使用前にカラム中のゲルの状態を確認し、亀裂や泡が混入していないことを確認する必要がある。亀裂や泡がゲル中に混入している場合には、カラム上部から注射器等で圧を与えることによりこれらを取り除くことが出来る。使用するイムノアフィニティーカラムは、あらかじめ、アフラトキシン B₁の回収率が、80%以上であることを確かめること (AOAC掲載の方法 (Mary W. Trucksess: Official Methods of Analysis of AOAC International (18th Edition) Chapter 49, p. 31 (2005)) 等が有用である。
- 14) Phosphate Buffered Saline Tablet (Sigma-Aldrich 社製) などが使用出来る。イムノアフィニティーカラムによっては PBS の代わりに精製水も使用できるものもある。
- 15) アセトニトリル・水(9:1)の抽出が困難な場合は、アセトニトリル・水(6:4)、メタノール:水(7:3、8:2)等、既にバリデートされた抽出溶媒を用いることができる。上清が2層に分かれ

た場合には、抽出液に1容のメタノールを加えると有効な場合がある。

- 16) 試料抽出液を PBS にて希釈すると沈殿が生じることがある。これを直接イムノアフィニティーカラムに注入すると詰まることのあるため、ガラス繊維ろ紙によるろ過が必要である。また、試料によっては Whatman 934 AH ろ過では沈殿を取り除くことが出来ないことがある。その場合には Whatman GF/F によるろ過が有効である。
- 17) イムノアフィニティーカラムの下部にストップコックを取り付け、これをバキュームマニホールド等につなぎ、カラム内の溶液を全部排出させた後、カラム内に PBS を満たし全量を排出させ、カラムのコンディショニングを行う。その後カラム内の約半分量の PBS を注入し、ストップコックを閉め、リザーバー(30.0mL、Waters 社製や注射器等が利用できる)とコネクターを用いて連結する。試料希釈液を注入する際には、約1~2滴/秒の速度で溶出するように調節する必要がある。
- 18) 洗浄する時にはストップコックで流速を調節する必要はない。また洗浄液はカラム内をピペット等で満たし、その全量を排出させる操作を繰り返すことが有効である。また、着色したカラム内ゲルの色をなるべく落とすように洗浄液量を調節する。
- 19) 注射器にリザーバーコネクターを取り付けたものを用意し、これをカラム上部に連結し空気を押し出すことによりカラム内水分を追い出すことが可能である。
- 20) アセトニトリル 1mL をカラムに注入し、自然落下で溶出させた後 5 分間放置する。さらにアセトニトリル 1mL をカラムに注入し溶出させる。この操作をもう一度繰り返す。
- 21) 溶出液を蒸発乾固させる際にアフラトキシンがバイアルに吸着することがある。この場合、シラーン処理したバイアル(Supelco 社製等、使用前に 20~30 %アセトニトリル水等で洗浄し、乾燥させたもの)を用いることが望ましい。
- 22) 2% Tween 20 を含む PBS を用いて希釈することにより、香辛料由来の沈殿物を可溶化できる。希釈後に沈殿物がある場合にはガラス繊維ろ紙でろ過する必要がある。
- 23) 0.01% Tween 20 を含む PBS での洗浄は、着色したカラム内ゲルの脱色に有効である。