

技術レポート**7 アフラトキシンの液体クロマトグラフによる同時分析法の適用範囲をとうもろこしサイレージに拡大するための妥当性確認**高橋 雄一^{*1}, 嶋村 知紗^{*2}**Validation Study on Application of the Simultaneous Determination Method of Aflatoxins by LC to Corn Silage**Yuichi TAKAHASHI^{*1} and Chisa SHIMAMURA^{*2}

(^{*1} Nagoya Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC)
(Now Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC),

^{*2} Nagoya Regional Center, FAMIC (Now Audit Office, FAMIC))

We have made a validation study on the applicability of a simultaneous determination method of four aflatoxins (B₁, B₂, G₁ and G₂) in formula feed and corn using a liquid chromatograph with fluorescence (LC-FD) to corn silage. The method has been listed in the Feed Analysis Standard of Japan.

In the existing method, since the extraction solvent has been absorbed by the sample, we changed the volume of the sample and extraction solvent to 25 g and 150 mL respectively.

Aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂ (AFs) were extracted with acetonitrile-water (9:1), and the extracted solution was centrifuged. The supernatant was purified with a SPE column (MycoSep 226 AflaZon+, Romer Labs Inc.; Union, MO, USA.), and the eluted solution was concentrated to dryness. For derivatization, trifluoroacetic acid was added to the residue, and the sample solution was injected into the LC-FD to determine the concentration of AFs. The LC-FD separation was then carried out on an ODS column (Mightysil PR-18 GP, 4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm, Kanto Chemical Inc.; Tokyo, Japan) with an isocratic of water-methanol (3:2) as a mobile phase.

Recovery tests were conducted on corn silages. Corn silage was added with 0.0013~0.044 mg/kg of aflatoxin (AF) B₁, B₂ and G₁, and 0.00022~0.044 mg/kg of AFG₂ respectively. The resulting mean recoveries ranged from 85.0 % to 116 % for AFB₁, 84.0 % to 119 % for AFB₂, 88.1 % to 106 % for AFG₁ and 82.6 % to 101 % for AFG₂. The repeatability in the form of relative standard deviations (RSD_r) was less than 4.4 % for AFB₁, less than 4.2 % for AFB₂, less than 3.3 % for AFG₁, and less than 10 % for AFG₂.

This method was thus validated as useful for inspections of AFs in corn silage.

The limit of detection of AFs by the existing method for formula feed and corn was 0.0001 mg/kg each in the samples.

Key words: aflatoxin (AF) B₁, B₂, G₁ and G₂; liquid chromatograph with fluorescence (LC-FD); corn silage

キーワード : アフラトキシシ ; 液体クロマトグラフ ; とうもろこしサイレージ

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター, 現 肥飼料安全検査部

^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター, 現 業務監査室

1 緒 言

飼料自給率の向上は、食料自給率向上の重要な施策として位置づけられ、とうもろこしサイレージを含む粗飼料の増産対策が積極的に行われている。その一方で、平成 24 年度から農林水産省は調査事業として国産粗飼料中の重金属及びかび毒の含有実態調査を実施している。国産粗飼料について、将来的に飼料の有害物質の指導基準及び管理基準¹⁾に管理基準値が定められた場合に備えて、管理基準の遵守状況を確認するための分析法を整備することが必要となっているが、飼料分析基準²⁾に記載されているアフラトキシンの液体クロマトグラフ（以下「LC」という。）による同時分析法（以下「収載法」という。）の適用範囲は配合飼料及びとうもろこしであり、とうもろこしサイレージを対象としていない。

そこで、今回、とうもろこしサイレージへの収載法の適用の可否を検討したので、その概要を報告する。また、未設定であった収載法による配合飼料及びとうもろこし中のアフラトキシンの B₁、B₂、G₁ 及び G₂ の検出下限を求めたので併せて報告する。

参考にアフラトキシンの B₁、B₂、G₁ 及び G₂ の構造式等を Fig. 1 に示した。

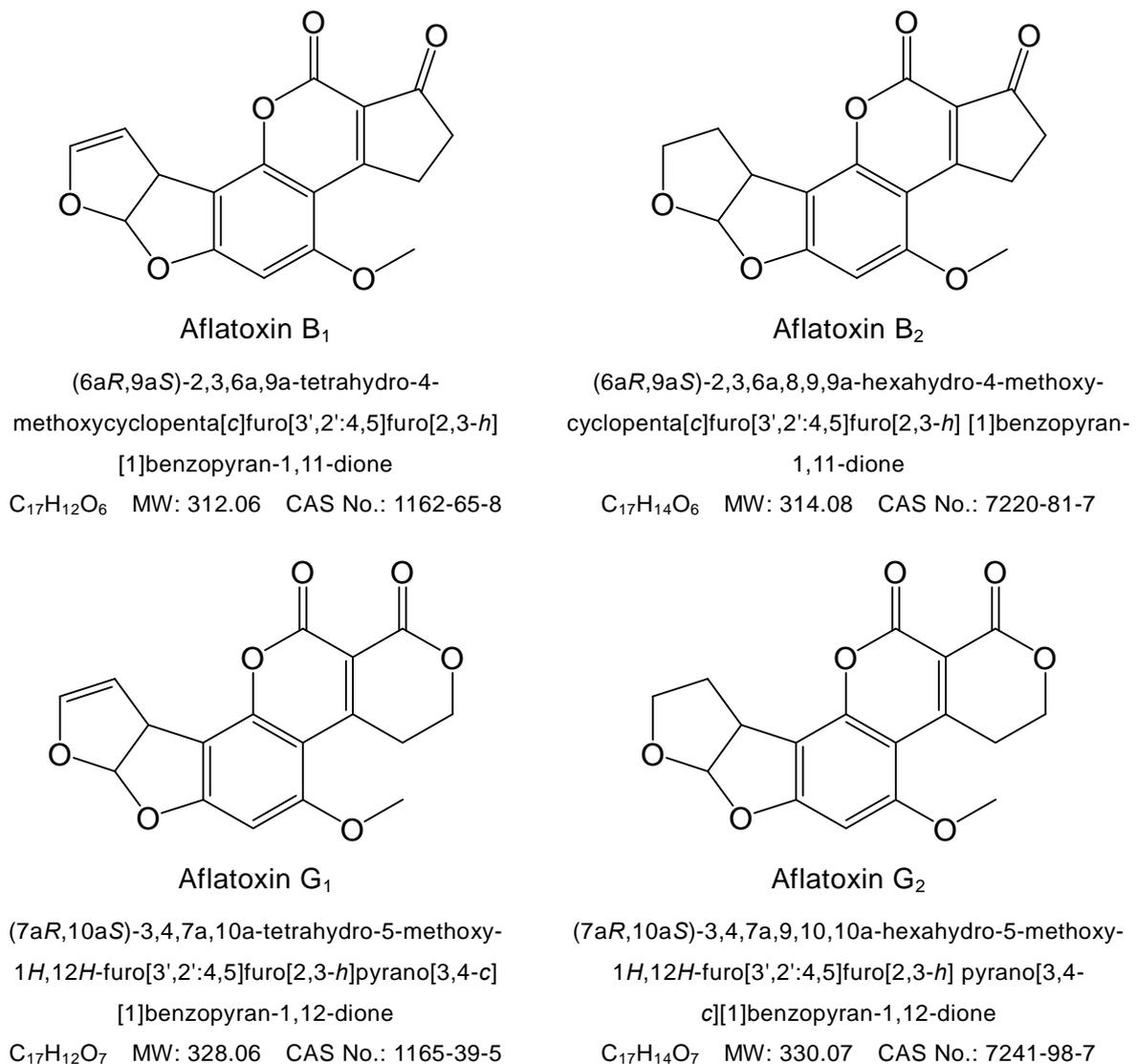


Fig. 1 Chemical structures of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂

2 実験方法

2.1 試料

配合飼料（鶏用及びほ乳期子牛育成用代用乳用）及びとうもろこしはそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕した。とうもろこしサイレージは 60 °C で 6 時間乾燥後、更に室内に静置して風乾した後、同様に粉砕した。

なお、検討に用いた配合飼料を Table 1 に示した。

Table 1 Compositions of the formula feed

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For poultry	Grains	58	Corn, brown rice
	Oil seed meals	28	Soybean meal, rapeseed meal, corn gluten meal
	Bran	8	Rice bran
	Animal by-product	2	Fish meal
	Others	4	Calcium carbonate, animal fat, calcium phosphate, salt, fermented milk powder, feed additives
For calf milk replacer	Animal by-products	72	Dried skim milk, concentrated whey protein
	Others	28	Vegetable oil, trehalose, glucose, calcium carbonate, lactose, vegetable gum-like substance, fructooligosaccharide syrup, dry yeast cell wall, fodder yeast, desugared sugarcane extract, albumin powder, fatty acid calcium, cellulose, salt, fermented milk powder, lactec acid bacteria, bifidobacteria, melon extract, feed additives

2.2 試薬

1) アセトニトリル及びメタノールは高速液体クロマトグラフ用（関東化学製）を用いた。トリフルオロ酢酸は Reagent Plus（Sigma-Aldrich 製）を用いた。水は Milli-Q Advantage（Merck Millipore 製）により精製した超純水（JIS K0211 の 5218 に定義された超純水）を用いた。

2) アフラトキシシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ 混合標準液

アフラトキシシン（B₁, B₂, G₁ 及び G₂）混合標準液（各 25 µg/mL, 富士フィルム和光純薬製）をアフラトキシシン混合標準原液とした。混合標準原液 1 mL を 50 mL の全量フラスコに入れ、標線までアセトニトリルを加えてアフラトキシシン混合標準液を調製した（この液 1 mL は、アフラトキシシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ として各 0.5 µg を含有する。）。

使用に際して、アフラトキシシン混合標準液の一定量をアセトニトリルで正確に希釈し、1 mL 中にアフラトキシシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ として各 20 ng を含有する混合標準液を調製した。

2.3 装置及び器具

- 1) 粉砕機： ZM 200 Retsch 製（1 mm スクリーン、使用時回転数 14000 rpm）
- 2) 振とう機： レシプロシユーカー SR-2W タイテック製（使用時振動数 300 rpm）
- 3) 多機能カラム： MycoSep 226 AflaZon+ Romer Labs 製

4) LC :

LC 部 : 1515 Series Waters 製

蛍光検出器部 : 2475 Multi λ Fluorescence Detector Waters 製

5) 試験管濃縮装置 : MGS- 2200G 東京理化学器械製

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 25.0 g を量って 300 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ, アセトニトリル-水 (9+1) 150 mL を加え, 30 分間振り混ぜて抽出した. 抽出液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ, 650 \times g で 5 分間遠心分離し, 上澄み液をカラム処理に供する試料溶液とした.

2) カラム処理

試料溶液 4.5 mL を試験管に入れ, 多機能カラムをゆっくり押し込み, 充てん剤を通過した流出液を誘導体化反応に供する試料溶液とした.

3) 誘導体化反応

試料溶液 1 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ, 40 $^{\circ}$ C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後, 窒素ガスを送って乾固した. 残留物にトリフルオロ酢酸 0.1 mL を正確に加え, なす形フラスコを密栓した後 15 分間静置し, 更に水-アセトン (9+1) 0.9 mL を先のなす形フラスコに正確に加えて振り混ぜた. この液をプラスチック製遠心沈殿管 (容量 1.5 mL) に入れ, 5000 \times g で 5 分間遠心分離し, 上澄み液を液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とした.

同時にアフラトキシン混合標準液 (0.5 μ g/mL) 2, 10, 20, 30, 40, 50 及び 60 μ L 並びに混合標準液 (20 ng/mL) 2.5, 5, 10 及び 25 μ L をそれぞれ 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ, トリフルオロ酢酸 0.1 mL を正確に加えた. 以下試料溶液と同様に操作し, 1 mL 中にアフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ としてそれぞれ 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 25 及び 30 ng 相当量を含有する各標準液を調製した.

4) 液体クロマトグラフィー

試料溶液及び各アフラトキシン混合標準液各 20 μ L を LC に注入し, Table 2 の測定条件に従って, クロマトグラムを得た.

Table 2 Operating conditions of LC

Column	Mightysil PR-18 GP (4.6 mm i.d. \times 250 mm, 5 μ m), Kanto Chemical
Mobile phase	Water-methanol (3:2)
Flow rate	0.8 mL/min
Column temperature	40 $^{\circ}$ C
Detector	Fluorescence detector (Ex: 365 nm, Em: 450 nm)

5) 計 算

得られたクロマトグラムからピーク面積及び高さを求めて検量線を作成し, 試料中のアフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ 量を算出した.

なお, 定量法の概要を Scheme 1 に示した.

Under the light-shielding conditions

Sample 25.0 g (300 mL amber Erlenmeyer flask)

- add 150 mL of acetonitrile-water (9:1)
- shake for 30 min
- centrifuge for 5 min at 650×g

Mycosep 226 AflaZon+

- transfer 4.5 mL of supernatant into test tube
- push Mycosep 226 AflaZon+ column into test tube

50 mL eggplant flask

- transfer 1 mL of effluent solution through Mycosep 226 AflaZon+ column
- evaporate under 40 °C and dry with N₂ gas

Derivatization

- add 0.1 mL of trifluoroacetic acid
- allow to stand for 15 min
- add 0.9 mL of water-acetone (9:1)
- centrifuge for 5 min at 5000×g

LC-fluorescence detector

Scheme 1 Analytical procedure for aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in corn silage

2.5 妨害物質の検討で用いた定量方法

LCによる測定時に2.4の4)の溶離液を水-メタノール(7+3)に変更して測定した。

2.6 添加回収試験

2.2の2)のアフラトキシシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ 混合標準原液をアセトニトリルで正確に希釈し添加に用いた。

とうもろこしサイレージについて、アフラトキシシン B₁, B₂ 及び G₁ として、原物換算して 0.0013, 0.011, 0.022 及び 0.044 mg/kg 相当量(最終試料溶液中で 0.5~17 ng/mL), アフラトキシシン G₂ として、原物換算して 0.00022, 0.011, 0.022 及び 0.044 mg/kg 相当量(最終試料溶液中で 0.083~17 ng/mL) になるようにそれぞれ添加後よく混合し、一夜静置した後に本法に従って添加回収試験を実施し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

なお、添加は風乾物試料に対してアフラトキシシン B₁, B₂ 及び G₁ として 0.003, 0.025, 0.05 及び 0.1 mg/kg 相当量, アフラトキシシン G₂ として 0.0005, 0.025, 0.05 及び 0.1 mg/kg 相当量になるよう行い、原物中濃度への換算は、原物中及び風乾物中の水分含有量を 60 % 及び 10 % と想定して、原物(水分含有量 60 %) 中濃度 = 風乾物(水分含有量 10 %) 中濃度 / 2.25 の式により行った。

2.7 収載法の検出下限の検討で用いた定量方法

飼料分析基準第5章第3節2の方法により定量した。振り混ぜることが困難な試料については、試料採取量を 25.0 g とした。

2.8 10 mL 容褐色共栓試験管を用いた誘導体化法の検討で用いた定量方法

2.4の2)で得られた試料溶液 1 mL を 10 mL の褐色共栓試験管に正確に入れ、40 °C 以下に設定した試験管濃縮装置で窒素ガスを送って濃縮乾固した。残留物にトリフルオロ酢酸 0.1 mL を正確に加え、褐色共栓試験管を密栓し、タッチミキサーで 10 秒程度振り混ぜた後 15 分間静置し、更に水-アセトン(9+1) 0.9 mL を先の褐色共栓試験管に正確に加え、タッチミキサーで 10 秒

程度振り混ぜた。この液をプラスチック製遠心沈殿管（容量 1.5 mL）に入れ、5000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

同時にアフラトキシン混合標準液（0.5 µg/mL）2, 4, 10, 20 及び 30 µL をそれぞれ 10 mL の褐色共栓試験管に正確に入れ、トリフルオロ酢酸 0.1 mL を正確に加えた。以下試料溶液と同様に操作し、1 mL 中にアフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ としてそれぞれ 1, 2, 5, 10 及び 15 ng 相当量を含む各標準液を調製した。測定及び計算は、2.4 の 4) 及び 5) により行った。

3 結果及び考察

3.1 検量線

2.2 の 2) 及び 2.4 の 3) により調製した各混合標準液各 20 µL を LC に注入し、得られたクロマトグラムからピーク面積及び高さを用いて検量線を作成した。

得られた検量線の一例は Fig. 2 のとおりであり、各 0.05~30 ng/mL（注入量として 0.001~0.6 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線の濃度範囲は、アフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ を 0.0003~0.18 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の各アフラトキシン濃度範囲に相当する。

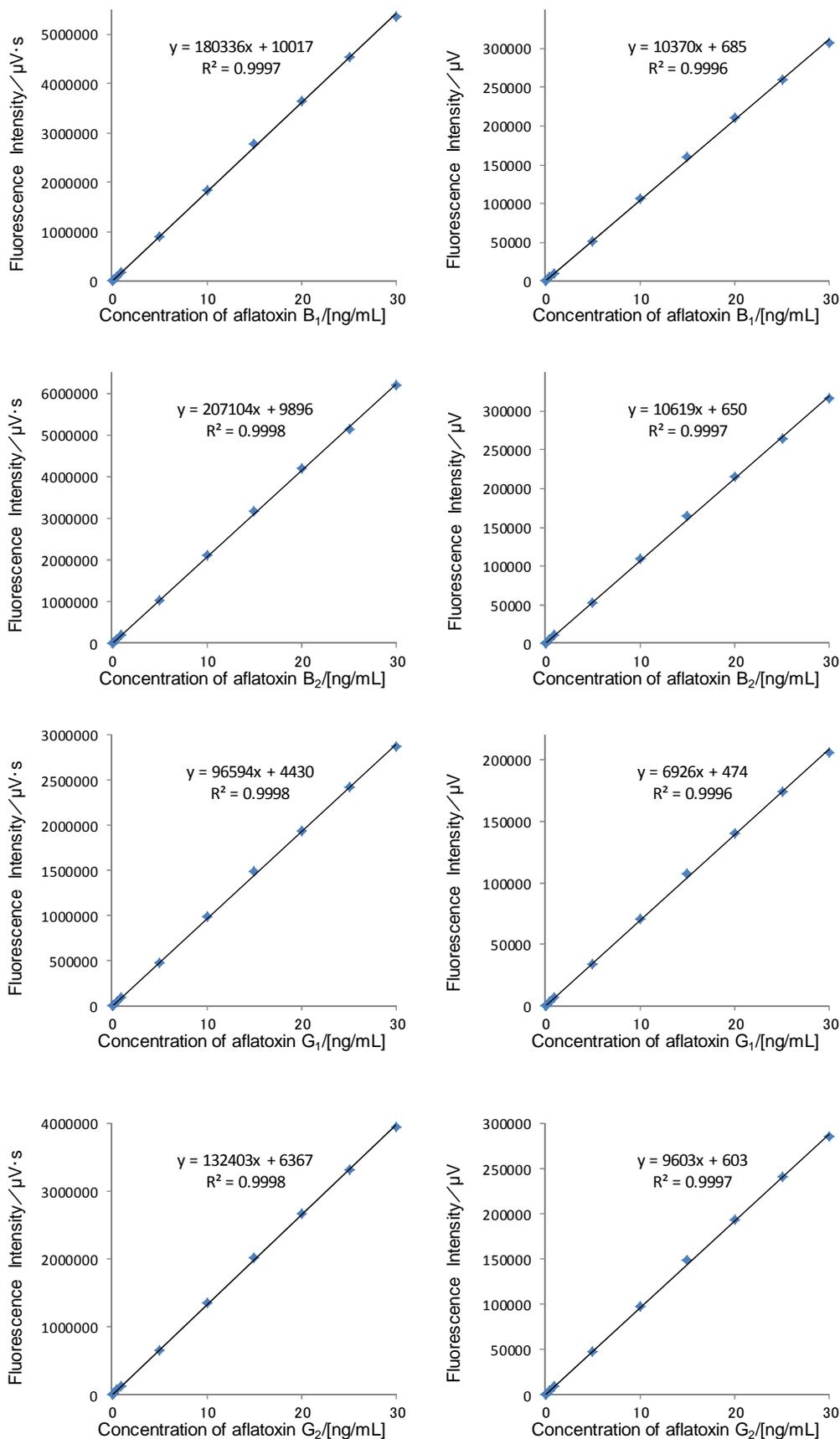


Fig. 2 Calibration curves of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ by peak area (left) and peak height (right)

3.2 抽出溶媒量の検討

最初に、飼料分析基準第 5 章第 3 節 2 に従い、抽出操作を行った。抽出操作は、分析試料 50.0 g を量りとり、抽出溶媒を 100 mL 加えて行うと規定されているが、とうもろこしサイレージに抽出溶媒が吸収され振り混ぜることが困難であった。そこで、飼料分析基準第 5 章第 3 節 2 の注 1 のとおり試料採取量を 25.0 g としたが、同様に振り混ぜることが困難であったため抽出溶媒量を 150 mL とした。

3.3 妨害物質の検討

とうもろこしサイレージ 3 検体を用い、本法により調製した試料溶液を LC に注入し、得られたクロマトグラムを確認したところ、Fig. 3 のように、全ての検体でアフラトキシン B₁ 及び B₂ について、各ピークの直前に妨害ピーク（風乾物試料に対して最大 0.0006 mg/kg）が、アフラトキシン G₁ について、定量ピークの直後に妨害ピーク（風乾物試料に対して最大 0.0006 mg/kg）が認められた。アフラトキシン G₂ について、定量を妨げるピークは認められなかった。

そこで、確認された各ピークがアフラトキシン B₁, B₂ 又は G₁ のピークか否か確認するため LC による測定条件を 2.5 に変更して測定したところ、Fig. 4 のとおり、アフラトキシン B₁, B₂ 及び G₁ の保持時間にピークは認められなかった。このことから、妨害ピークであると判断した。しかし、その面積は 3.5 で確認された定量下限に相当するピーク面積の 1/3 未満であり、飼料分析基準別表 3 の妥当性確認法ガイドライン（以下「妥当性確認法ガイドライン」という。）に定める選択性の許容範囲であることから、試験に支障のないものと判断した。

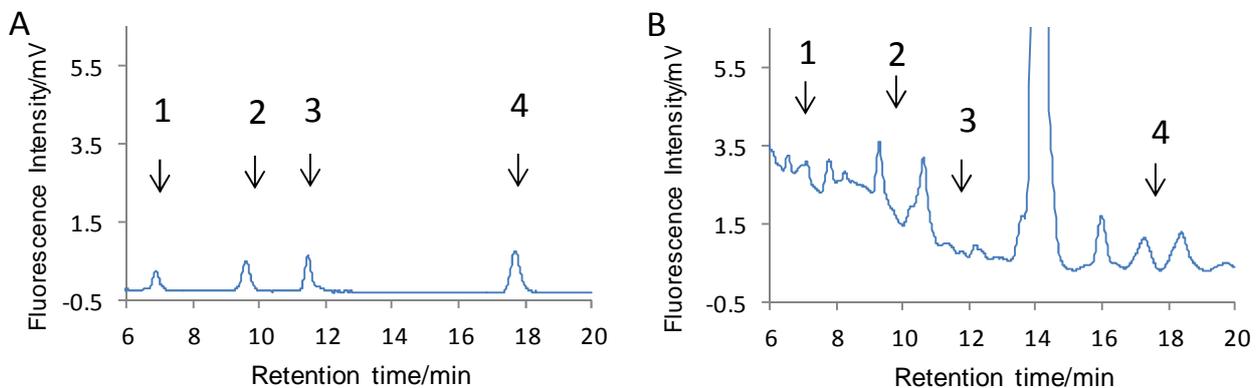


Fig. 3 Chromatograms of standard solution and blank sample solution

(LC conditions are shown in Table 2. Arrows indicate the retention times of 1:

afatoxin G₁, 2: aflatoxin B₁, 3: aflatoxin G₂ and 4: aflatoxin B₂)

A: Standard solution (The concentrations of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ are 0.1 ng/mL, respectively)

B: Sample solution of corn silage

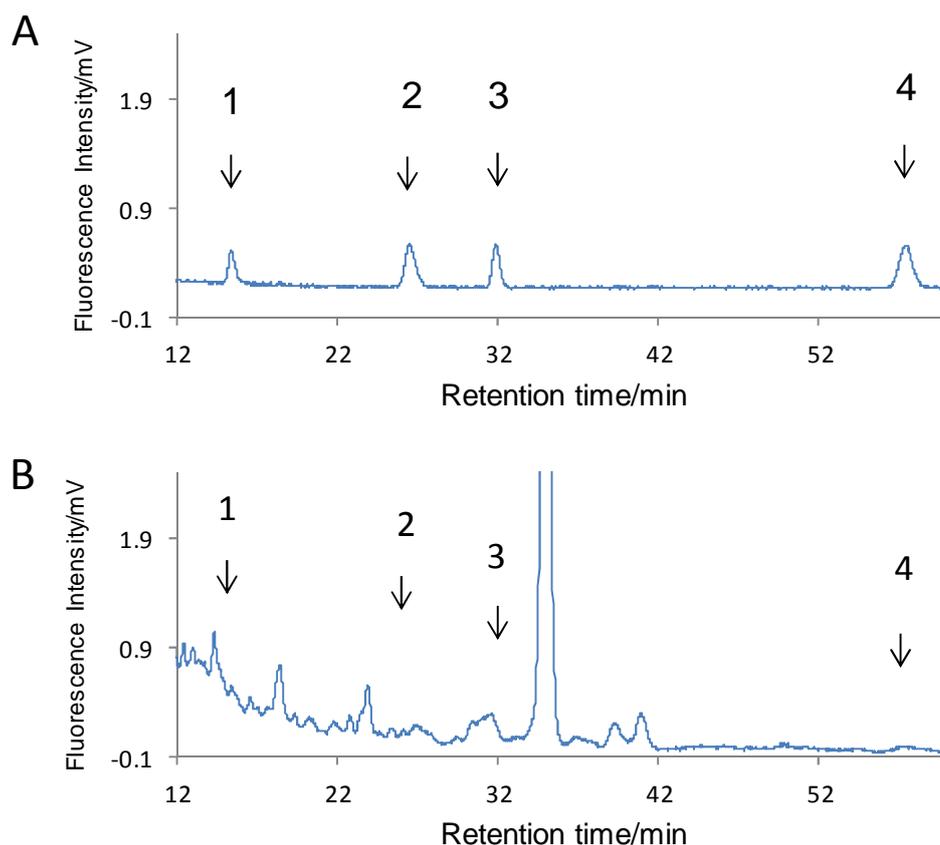


Fig. 4 Chromatograms of standard solution and blank sample solution (LC conditions except mobile phase are shown in Table 2. Mobile phase is water-methanol (7:3). Arrows indicate the retention times of 1: aflatoxin G₁, 2: aflatoxin B₁, 3: aflatoxin G₂ and 4: aflatoxin B₂)

A: Standard solution (The concentrations of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ are 0.1 ng/mL, respectively)

B: Sample solution of corn silage

3.4 添加回収試験

アフラトキシシン B₁, B₂ 及び G₁ には, 3.3 で妨害ピークが確認された. 妥当性確認法ガイドラインに定める選択性を満たすには妨害ピークの面積は定量下限に相当するピーク面積の 1/3 未満であることが必要となる. よって, アフラトキシシン B₁, B₂ 及び G₁ の最低添加濃度は, 3.3 で確認された妨害ピークの最大濃度 (原物換算して最大 0.00027 mg/kg, 風乾物試料に対して最大 0.0006 mg/kg) の 5 倍となる 0.0013 mg/kg (原物換算値. 風乾物中で 0.003 mg/kg) とした. アフラトキシシン G₂ については, 妨害ピークは確認されなかったことから, 収載法の定量下限 (試料中 0.0005 mg/kg) を参考に, 最低添加濃度を原物換算して 0.00022 mg/kg (風乾物中で 0.0005 mg/kg) と設定した.

2.6 に従って添加回収試験を実施した. その結果は Table 3 のとおり, アフラトキシシン B₁ については, 平均回収率は 85.0~116 %, その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 4.4 % 以下, アフラトキシシン B₂ については, 平均回収率は 84.0~119 %, RSD_r は 4.2 % 以下, アフラトキシシン G₁ については, 平均回収率は 88.1~106 %, RSD_r は 3.3 % 以下, アフラトキシシン G₂ については,

平均回収率は 82.6~101 %, RSD_r は 10 % 以下の成績が得られた。この結果は、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果であった。

なお、得られたクロマトグラムの一例を Fig. 5 に示した。

Table 3 Recoveries for aflatoxins in corn silages

Aflatoxin	Spiked level (mg/kg original matter)	Corn silage 1		Corn silage 2		Corn silage 3	
		Recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)
B ₁	0.0013	116	2.1	93.0	1.4	97.8	4.4
	0.011	—	—	92.5	1.6	—	—
	0.022	89.2	1.4	—	—	85.0	3.5
	0.044	92.7	1.7	—	—	—	—
B ₂	0.0013	104	2.1	119	2.2	113	4.2
	0.011	—	—	89.9	1.5	—	—
	0.022	88.7	1.1	—	—	84.0	3.2
	0.044	89.7	1.6	—	—	—	—
G ₁	0.0013	103	3.3	106	3.3	96.0	3.3
	0.011	—	—	96.1	2.3	—	—
	0.022	91.6	1.4	—	—	88.1	3.1
	0.044	95.3	2.2	—	—	—	—
G ₂	0.00022	93.8	6.3	94.8	10	82.6	2.6
	0.011	—	—	93.9	3.5	—	—
	0.022	91.7	0.8	—	—	87.5	2.6
	0.044	94.0	1.7	—	—	—	—

— : Not tested

a) The aflatoxins were spiked to air-dried corn silage samples one night prior to extraction. The spiked levels were 0.003, 0.025, 0.05 and 0.1 mg/kg air-dry matter for aflatoxin B₁, B₂ and G₁, and 0.0005, 0.025, 0.05 and 0.1 mg/kg air-dry matter for aflatoxin G₂, respectively. The levels of aflatoxins in original matter were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of corn silage samples was 60 % for original matter and 10 % for air-dry matter.

The levels of aflatoxins in original matter (moisture 60 %)

= the levels of aflatoxins in air-dry matter (moisture 10 %) / 2.25

b) Mean ($n = 5$)

c) Relative standard deviation of repeatability

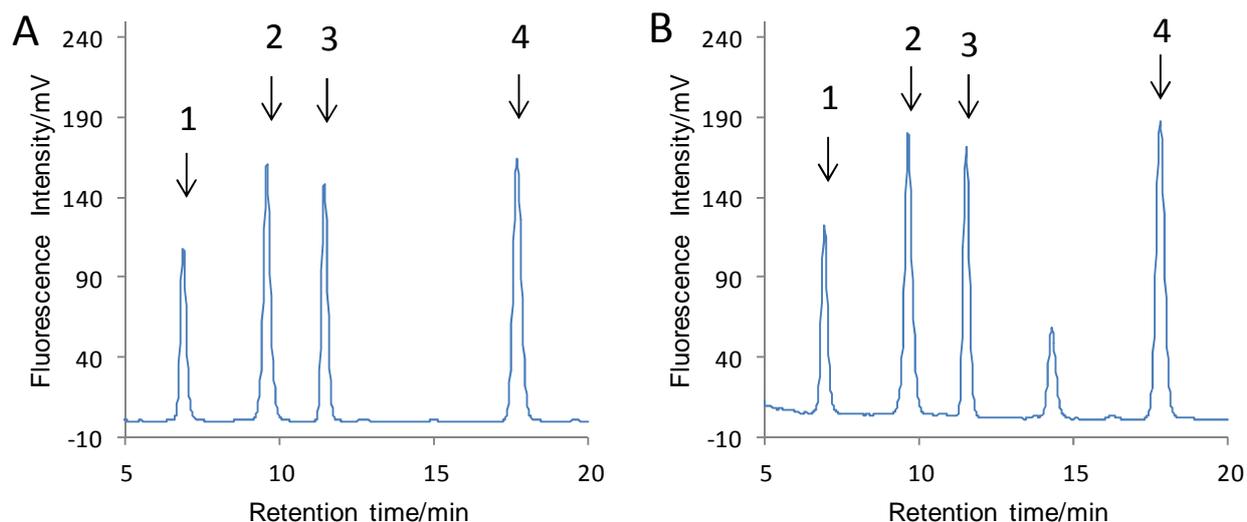


Fig. 5 Chromatograms of standard solution and spiked sample

(LC conditions are shown in Table 2. Arrows indicate the retention times of 1: aflatoxin G₁, 2: aflatoxin B₁, 3: aflatoxin G₂ and 4: aflatoxin B₂)

A: Standard solution (The concentrations of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ are 15 ng/mL, respectively)

B: Sample solution of corn silage (spiked at 0.044 mg/kg original matter of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ (corresponding to 16.7 ng/mL))

3.5 定量下限及び検出下限の検討

アフラトキシシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ の検量線が直線性を示した範囲, 各 0.05~30 ng/mL の下端付近となる濃度 (アフラトキシシン B₁, B₂ 及び G₁ については, とうもろこしサイレージ風乾物中で 0.003 mg/kg 相当量 (最終試料液中濃度 0.5 ng/mL 相当量), アフラトキシシン G₂ については, とうもろこしサイレージ風乾物中で 0.0005 mg/kg 相当量 (最終試料液中濃度 0.083 ng/mL 相当量)) の添加回収試験の結果から本法の定量下限及び検出下限を求めた. Fig. 3 のとおり, 各アフラトキシシンのピークの前後において妨害物質のピークが多数存在していることから, 定量値の標準偏差の 10 倍及び 4.26 倍 (自由度 4 の *t* 分布の 0.95 分位点の 2 倍) から定量下限及び検出下限を求めたところ, アフラトキシシン B₁, B₂ 及び G₁ の定量下限は風乾物中で 0.003 mg/kg, 検出下限は風乾物中で 0.001 mg/kg であり, アフラトキシシン G₂ の定量下限は風乾物中で 0.0005 mg/kg, 検出下限は風乾物中で 0.0002 mg/kg であった.

また, 配合飼料及びとうもろこしを対象とした収載法の検出下限が未設定であったため, 併せて検討を行った. 収載法では試料採取量は 50.0 g としているが, 抽出時に振り混ぜることが困難な試料については試料採取量を 25.0 g にしている.

2.2 の 2) のアフラトキシシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ 混合標準液 (0.5 µg/mL) をアセトニトリルで正確に希釈し添加に用いた.

配合飼料 (鶏用及びほ乳期子牛育成用代用乳用) 及びとうもろこしについて, アフラトキシシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ として 0.0005 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.25 ng/mL. 振り混ぜることが困難で 25.0 g 採取としたほ乳期子牛育成用代用乳用配合飼料については 0.125 ng/mL) になるようにそれぞれ添加後よく混合し, 一夜静置した後に 2.7 に従って添加回収試験を実施した. そ

の結果から得られるピークの SN 比が 3 以上となる濃度を求めたところ、配合飼料及びとうもろこし中のアフラトキシン B_1 , B_2 , G_1 及び G_2 の検出下限は、試料中で 0.0001 mg/kg であった。この濃度は、配合飼料における最も低いアフラトキシン B_1 の管理基準値 0.01 mg/kg に対して 1/100, とうもろこしのアフラトキシン B_1 の管理基準値である 0.02 mg/kg に対して 1/200 であり、妥当性確認法ガイドラインに定められた基準値に対する検出下限の目標値を満たしていた。

なお、Table 4 のとおり、添加回収試験結果は良好であった。得られたクロマトグラムの一例を Fig. 6 に示した。

Table 4 Recoveries for aflatoxins in corn and formula feeds

Aflatoxin	Spiked level (mg/kg)	Feed types					
		Formula feed for poultry		Formula feed for calf milk replacer ^{c)}		Corn	
		Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
B_1	0.0005	91.8	4.5	96.6	4.7	94.2	2.7
B_2	0.0005	88.9	2.5	90.2	2.5	87.5	1.7
G_1	0.0005	94.9	3.7	83.5	8.5	91.9	1.6
G_2	0.0005	93.5	2.4	89.9	5.3	91.4	0.8

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Weighed volume set to 25.0 g

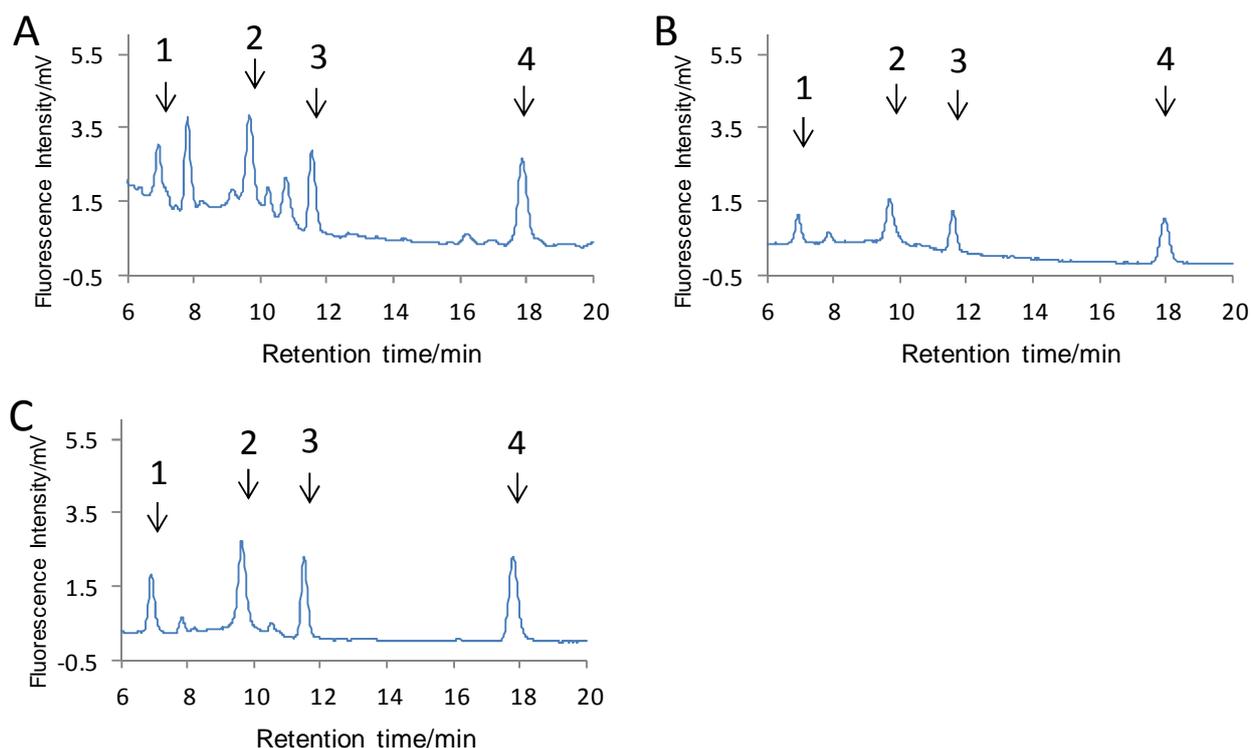


Fig. 6 Chromatograms of spiked samples

(LC conditions are shown in Table 2. Arrows indicate the retention times of 1: aflatoxin G₁, 2: aflatoxin B₁, 3: aflatoxin G₂ and 4: aflatoxin B₂)

A: Sample solution of formula feed for poultry (spiked at 0.0005 mg/kg of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ (corresponding to 0.25 ng/mL))

B: Sample solution of formula feed for calf milk replacer (spiked at 0.0005 mg/kg of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ (corresponding to 0.125 ng/mL))

C: Sample solution of corn (spiked at 0.0005 mg/kg of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ (corresponding to 0.25 ng/mL))

3.6 誘導体化反応容器の比較

本法では、50 mL のなす形フラスコを使用して誘導体化反応を行っている。ここで、より小型の容器が誘導体化反応に適していると考えられたことから、誘導体化反応に使用する容器の容量の違いによる定量値への影響を検討した。

2.2 の 2) のアフラトキシシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ 混合標準液をアセトニトリルで正確に希釈し添加に用いた。

とうもろこしサイレージについて、各アフラトキシシンとして、0.025 及び 0.05 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 4.2 及び 8.3 ng/mL）になるようにそれぞれ添加後よく混合し、一夜静置した後に本法及び 2.8 に従って添加回収試験を実施し、平均定量値及び繰返し精度を求めた。

その結果は Table 5 のとおりであり、10 mL の褐色共栓試験管を使用した場合のアフラトキシシンの平均回収率は 84.9~96.4 %，その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD_r) として 3.0 % 以下、50 mL のなす形フラスコを使用した場合のアフラトキシシンの平均回収率は 84.0~96.1 %，その繰返し精度は、RSD_r として 3.5 % 以下であり、いずれも妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値を満たした。

また、誘導体化反応時に使用する容器の容量の違いによる定量値に有意な差があるか確認するため、有意水準 5 % で両側検定の t -検定を行った。その結果、アフラトキシン B₁ については $t(2) = -0.692$, $p = 0.560$, アフラトキシン B₂ については $t(2) = 7.432$, $p = 0.0176$, アフラトキシン G₁ については $t(2) = 0.659$, $p = 0.577$, アフラトキシン G₂ については $t(2) = 3.548$, $p = 0.071$ であり、アフラトキシン B₂ については 10 mL の褐色共栓試験管を使用した方が平均定量値が高く有意な差が認められ、それ以外では有意な差は認められなかった。

これらのことから、誘導体化反応の際は、50 mL のなす形フラスコを 10 mL の褐色共栓試験管に変更しても同等又はそれ以上の結果が得られることから、より小型の容器に変更しても差し支えないと考えられた。

Table 5 Comparison of reaction containers used for derivatization reaction

Aflatoxin	Feed types	Spiked level (mg/kg air dry matter)	Reaction container					
			10 mL brown stoppered test tube			50 mL eggplant flask		
			Quantitative value ^{a)} (mg/kg)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Quantitative value ^{a)} (mg/kg)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
B ₁	Corn silage 1	0.05	0.0450	90.0	1.8	0.0446	89.2	1.4
	Corn silage 2	0.025	0.0223	89.3	2.0	0.0231	92.5	1.6
	Corn silage 3	0.05	0.0424	84.9	2.4	0.0425	85.0	3.5
B ₂	Corn silage 1	0.05	0.0463	92.7	1.6	0.0443	88.7	1.1
	Corn silage 2	0.025	0.0231	92.5	1.8	0.0225	89.9	1.5
	Corn silage 3	0.05	0.0434	86.7	3.0	0.0420	84.0	3.2
G ₁	Corn silage 1	0.05	0.0471	94.2	2.9	0.0458	91.6	1.4
	Corn silage 2	0.025	0.0236	94.4	2.7	0.0240	96.1	2.3
	Corn silage 3	0.05	0.0448	89.7	2.4	0.0440	88.1	3.1
G ₂	Corn silage 1	0.05	0.0480	96.0	2.0	0.0459	91.7	0.8
	Corn silage 2	0.025	0.0241	96.4	1.6	0.0235	93.9	3.5
	Corn silage 3	0.05	0.0445	89.0	2.2	0.0438	87.5	2.6

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

4 まとめ

とうもろこしサイレージ中のアフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ の定量法として、収載法の適用の可否について検討したところ、試料採取量を 50.0 g から 25.0 g, 抽出溶媒量を 100 mL から 150 mL に変更することで、以下の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

また、未設定であった配合飼料及びとうもろこし中の収載法によるアフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ の検出下限について検討したところ、以下の結果が得られた。

1) 検量線はそれぞれ 0.05~30 ng/mL 相当量 (注入量として 0.001~0.6 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線の濃度範囲は、アフラトキシン B₁, B₂, G₁ 及び G₂ を 0.0003~0.18 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の各アフラトキシン濃度範囲に相当する。

- 2) アフラトキシシ B_1 , B_2 及び G_1 について, 本法に従って得られたクロマトグラムに定量を妨げるピークが認められたが, 妥当性確認法ガイドラインに定める選択性を満たしていた. アフラトキシシ G_2 について, 本法に従って得られたクロマトグラムに定量を妨げるピークは認められなかった.
- 3) 原物中に換算してアフラトキシシ B_1 , B_2 及び G_1 として 0.0013, 0.011, 0.022 及び 0.044 mg/kg 相当量, アフラトキシシ G_2 として 0.00022, 0.011, 0.022 及び 0.044 mg/kg 相当量を添加し, 本法に従って 5 点併行分析を実施し, 回収率及び繰返し精度を求めたところ, 妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた.
- 4) 本法のとうもろこしサイレージ中のアフラトキシシ B_1 , B_2 及び G_1 の定量下限は風乾物中で 0.003 mg/kg, 検出下限は 0.001 mg/kg, アフラトキシシ G_2 の定量下限は風乾物中で 0.0005 mg/kg, 検出下限は 0.0002 mg/kg であった.
- 5) 収載法における配合飼料及びとうもろこし中のアフラトキシシ B_1 , B_2 , G_1 及び G_2 の検出下限は, 試料中で 0.0001 mg/kg であった. この濃度は妥当性確認法ガイドラインに定められた目標を満たしていた.
- 6) 誘導体化反応の際, 10 mL の褐色共栓試験管を用いて添加回収試験を実施し, 回収率及び繰返し精度を求めたところ, 妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた.

文 献

- 1) 農林水産省畜産局長通知: 飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について, 昭和 63 年 10 月 14 日, 63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 2) 農林水産省消費・安全局長通知: 飼料分析基準の制定について, 平成 20 年 4 月 1 日, 19 消安 第 14729 号 (2008).