

## 「乳中のアフラトキシンM1の分析法」

コラボラティブスタディプロトコール

[ ] 内数字は、実施要領参照

### 操作手順

#### 1. 前処理

添加用牛乳の場合：37℃に温めて、ガラス棒やマグネチックスターラー [5.1 (28)] で均一になるように穏やかに攪拌後、5分間超音波 [5.1 (20)] をかける。約40mLを50mL容プラスチック遠心チューブ [5.1 (22)] に移し、遠心分離（3000 rpm、5分間、室温または25℃） [5.1 (25)] する。上層の脂肪層を除き、液体層をガラスロート [5.1 (7)] にガラス繊維ろ紙 [5.1 (6)] をセットし、ろ過する。ろ液を三角フラスコまたはビーカー [5.1 (8)] にとる。天秤 [5.1 (1)] で正確に20.0gを量り、三角フラスコまたはビーカーに [5.1 (8)] にとる。これに添加用アフラトキシンM1溶液20 μLをピペッター等 [5.1 (2)] で加え、穏やかに攪拌する。

自然汚染牛乳の場合：37℃に温めて、ガラス棒やマグネチックスターラー [5.1 (28)] で均一になるように穏やかに攪拌後、5分間超音波 [5.1 (20)] をかける。約40mLを50mL容プラスチック遠心チューブ [5.1 (22)] に移し、遠心分離（3000 rpm、5分間、室温または25℃） [5.1 (25)] する。上層の脂肪層を除き、液体層をガラスロート [5.1 (7)] にガラス繊維ろ紙 [5.1 (6)] をセットし、ろ過する。ろ液を三角フラスコまたはビーカーに [5.1 (8)] にとる。天秤 [5.1 (1)] で正確に20.0gを量り、三角フラスコまたはビーカーに [5.1 (8)] にとる。

粉末乳の場合：室温に戻した後、天秤 [5.1 (1)] で正確に5.0gを共栓付き三角フラスコ [5.1 (5)] に量りとり、50℃の水 [4.1 (2) B] 30mL程度 に溶かし、良く攪拌後5分間超音波 [5.1 (20)] をかける。20℃程度に冷やした後、50mLメスフラスコ [5.1 (4)] に移し、約20℃の水 [4.1 (2) B] で容器を洗い込み、正確に50mLにする。ガラスロート [5.1 (7)] にガラス繊維ろ紙 [5.1 (6)] をセットし、ろ過する。ろ過が困難な場合は遠心分離（3000 rpm、5分間、室温または25℃） [5.1 (25)] する。ろ液を三角フラスコまたはビーカーに [5.1 (8)] にとる。

※ろ過した試料溶液は、出来るだけ早く、イムノアフィニティーカラムに注入する。  
(時間が経過するとう液がカラムに詰まる場合あり。)

#### 2. カラム（イムノアフィニティーカラム）による精製法

<イムノアフィニティーカラムの取り扱い上の注意>

カラム内には防腐剤入りPBS が充填されていて、カラム上部には僅かに空気が入っている。そのため、横に倒すと空気が充填剤に触れてしまい、その結果良好な回収率が得

られなくなるため、保存時から分析終了時まで直立の状態を保っている必要がある。もし、充填剤上の白いフリット表面に気泡が溜まっていたら、タッピングして除去すること。

- ① イムノアフィニティーカラム (配付) [4.2 (1)] は室温になるまで放置する。
- ② きり等 [5.1 (13)] でイムノアフィニティーカラムの上キャップに穴を開けてから上キャップをはずした後、下キャップをはずし、必要であればストップコック [5.1 (10)] を取り付け、カラム架台あるいはバキュームマニホールド [5.1 (9)] 等にセットする。カラム内溶液を自然落下で排出後、あらたにPBS [4.1 (3)] でカラム内を満たし、自然落下で排出させる。再度PBS [4.1 (3)] でカラム内を満たし、PBS [4.1 (3)] を半分程排出させた後、ストップコック [5.1 (10)] を閉じるか下キャップを付ける。
- ③ アダプター [5.1 (12)] でリザーバー [5.1 (11)] とカラムを連結する。
- ④ 添加用牛乳および自然汚染牛乳の前処理溶液をピペッター等 [5.1 (2)] でイムノアフィニティーカラムに全量注入する。試料溶液が入っていた容器を少量の精製水 [4.1 (2) B] で洗い、それをアフィニティカラムに注入する。粉末乳を処理した試料溶液については20.0mLをピペッター等 [5.1 (2)] で正確に注入する。ストップコック [5.1 (10)] 等を開き、1~2滴/秒の速さで滴下させる。途中、排出速度が非常に遅くなった場合には、充填剤上の白いフリット表面に泡が付着していることがあるので、リザーバー [5.1 (11)] およびカラムを手で保持し、試料溶液がこぼれないよう注意し、カラムを指等でタッピングし泡を取り除く。リザーバー中の全ての試料溶液が排出したのち、リザーバー [5.1 (11)] を取り除く。(ポリプロピレン等のプラスチック製リザーバーの場合、リザーバーの洗浄は必要無いが、ガラス製注射筒を用いた場合には、注射筒中の全ての試料溶液を排出させる前に少量の精製水 [4.1 (2) B] で注射筒内を洗浄し、イムノアフィニティーカラムに注入する。) カラムを精製水 [4.1 (2) B] 15mL 以上で洗浄する。(精製水 [4.1 (2) B] でカラム内を満たし排出させる操作を5回繰り返す。) 洗浄操作中は、カラム内の精製水 [4.1 (2) B] がすべて滴下し、充填剤表面が乾燥することのないよう注意する。5回目の精製水 [4.1 (2) B] がカラム内から排出された後、アダプターを取り付けたシリンジ [5.1 (21)] 等で強く通気しカラム内の水分を十分に追い出す。その後、アセトニトリル [4.1 (1)] 1mLを加え、キャップ付きバイアルあるいは同等品 [5.1 (17)] に溶出させる。5分間放置後、アセトニトリル [4.1 (1)] を1mL ずつ2回、合計3mL で溶出させ、さらにアダプターを取り付けたシリンジ [5.1 (21)] 等で強く通気し、充填剤内のアセトニトリルを排出させる。
- ⑤ アルミブロックヒーター [4.1 (14)] を使用し窒素気流 [5.1 (15)] を送るか、エバポレーター [5.1 (16)] を用いて、バイアル中の溶媒を除去する。
- ⑥ HPLC注入液 [4.1 (5)] アセトニトリル：水 (2:8) 1.0mLを加えたものを試験管ミキサー等 [5.1 (19)] で完全に溶解する。HPLC用バイアル [5.1 (18)] にうつす。試験溶液が濁っ

ている場合はエッペンドルフ用チューブ [5.1 (26)] 等につし、10,000rpm 以上、5 分間遠心 [5.1 (27)] し、その上清をHPLC 用バイアル [5.1 (18)] につす。これをHPLC 用試験溶液とする。

### 3. 高速液体クロマトグラフ (HPLC) による測定

HPLC [5.1 (23)] を用いて試験溶液について測定を行う。

#### (1) 測定条件 (例)

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  $\mu\text{m}$ ) を用いる。

カラム [5.1 (24)] 内径4.6 mm、長さ150 mm 又は250 mm

カラム温度 40  $^{\circ}\text{C}$

HPLC 移動相 [4.1 (4)] アセトニトリル : 水 (25 : 75) を用いる。

流速 0.6-1.0 mL/min

検出波長 励起波長365 nm、蛍光波長435 nm で測定する。

注入量 20-100  $\mu\text{L}$  (100  $\mu\text{L}$ を推奨)

#### (2) アフラトキシンM1検量線の作成

- ① アフラトキシンM1標準液 (配付) [4.2 (2)] を室温に戻した後、100  $\mu\text{L}$  をピペッター [5.1 (2)] でキャップ付きバイアル (褐色シラン処理) [5.1 (17)] にとり、アセトニトリル [4.1 (1)] 900  $\mu\text{L}$  を加え密栓後、試験管ミキサー等 [5.1 (19)] で完全に溶解する。(スタンダード1 : 100ng/mL 溶液)
- ② ①で作製したスタンダード1 : 100ng/mL 標準溶液100  $\mu\text{L}$  をキャップ付きバイアル (褐色シラン処理) [5.1 (17)] にとり、アセトニトリル [4.1 (1)] 900  $\mu\text{L}$  を加え密栓後、試験管ミキサー等 [5.1 (19)] で完全に溶解する。(スタンダード2 : 10ng/mL 溶液)
- ③ ②で作製したスタンダード2 : 10ng/mL 標準溶液100  $\mu\text{L}$  をキャップ付きバイアル (褐色シラン処理) [5.1 (17)] にとり、アセトニトリル [4.1 (1)] 900  $\mu\text{L}$  を加え密栓後、試験管ミキサー等 [5.1 (19)] で完全に溶解する。(スタンダード3 : 1ng/mL 溶液)
- ④ その後、次頁の表に従い、スタンダード1、2、3 をHPLC 用バイアル [5.1 (18)] にピペッター [5.1 (2)] で分注し、窒素気流 [5.1 (15)] を送るかエバポレーター [5.1 (16)] を用いて溶媒を除去する。
- ⑤ 除去したのち、HPLC注入液 [4.1 (5)] アセトニトリル : 水 (2:8) 1.0mL を加えて、よく混和したものをHPLC 用検量線溶液とする。
- ④ 作製した8濃度の検量線用溶液100  $\mu\text{L}$  (試験溶液の注入量に合わせる) をHPLC に注入し、ピークの高さまたはピークの面積で検量線を作成する。

検量線用溶液	1	2	3	4	5	6	7	8
M1 濃度 (ng/mL)	0.1	0.2	0.5	1.0	2.0	5.0	10.0	20.0
スタンダード 1 (100ng/mL 標準液)		-	-	-	20 $\mu$ L	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L	200 $\mu$ L
スタンダード 2 (10ng/mL 標準液)		20 $\mu$ L	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L				
スタンダード 3 (1ng/mL 標準液)	100 $\mu$ L							

### (3) 定量

試験溶液をHPLC に注入し、得られたクロマトグラムにおいてアフラトキシンM1の保持時間と一致するピークの高さまたはピークの面積と「(2)アフラトキシンM1検量線の作成」で求めておいた検量線から試験溶液中の濃度を求める。試験溶液中の濃度と試料中の濃度の関係は以下である。

#### ①添加用牛乳、汚染牛乳の場合

$$\begin{aligned} \text{試料中のアフラトキシンM1の濃度 (ng/g)} &= \\ & \text{試験溶液中のアフラトキシンM1の濃度 (ng/mL)} \div W \\ & W = \text{牛乳量 (例 : 20.01 g)} \end{aligned}$$

#### ②粉末乳の場合

$$\begin{aligned} \text{試料中のアフラトキシンM1の濃度 (ng/g)} &= \\ & \text{試験溶液中のアフラトキシンM1の濃度 (ng/mL)} \div W/2.5 \\ & W = \text{粉末乳量 (例 : 5.00 g)} \end{aligned}$$

#### (注)

アフラトキシンM1は発ガン性があるので、操作は手袋を装着し、実験台にはベンチコート等を使用し、汚染に気をつけること。また、乳を使用した容器・器具は1%次亜塩素酸ナトリウム液に2時間以上浸漬した後、通常の洗浄を行うこと。