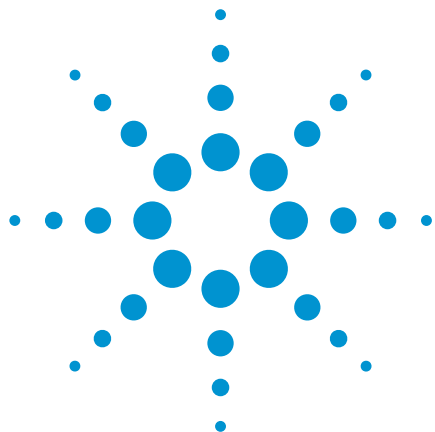




EMR Lipid を用いた LC/MS/MS による 乳児用調合乳中のアフラトキシン分析

アプリケーションノート

食品検査

著者

Megan Juck
Agilent Technologies, Inc.

概要

アフラトキシン M1 は、牛乳で主に検出されるアフラトキシンです。欧州では、欧州委員会 (EC) が勧告する最大許容レベルは、乳児用調合乳ではわずか 0.025 µg/kg となっています。米国では、アメリカ食品医薬品局 (FDA) が規定したアフラトキシンの最大許容レベルは、牛乳で 0.5 µg/kg です。このアプリケーションノートは、Agilent Bond Elut EMR Lipid を用いた、LC/MS/MS による乳児用調合乳中のアフラトキシン M1、G2、G1、B2、および B1 の測定について説明します。この実験では、QuEChERS 抽出を採用し、続いて EMR Lipid 分散 SPE (dSPE) によるクリーンアップを行いました。このメソッドは、あらゆるレベルのすべてのアフラトキシンについて、非常に高い回収率 (88 ~ 113 %) と精度 (RSD = 1.3 ~ 13.6 %) を実現します。広範にマトリックスを除去できるため、このメソッドの定量下限 (LOQ) は、米国と欧州の両方の規制限度を下回るようになりました。この単純で堅固なメソッドは、最小限の機器と専門知識のみを必要とするため、食品分析ラボで容易に実施できます。



Agilent Technologies

はじめに

マイコトキシンは、菌類の二次代謝物であり、世界で供給される食品および飼料中で最もまん延している混入物の 1 つであると見なされています。食糧農業機関 (FAO) は、世界の農産物の最大 25 % がマイコトキシンで汚染されていると推定しています。この汚染のために、特に穀物産業で、非常に大きな経済的損失が生じています [1]。アフラトキシン (表 1) は、さまざまな種の菌類 (特にアスペルギルス・フラブスおよびアスペルギルス・パラシチクス) によって生成されるマイコトキシンの一種です [2]。アフラトキシン M1 は、牛乳で最も一般的に検出されるマイコトキシンであり、アフラトキシン B1 で汚染された飼料を牛が摂取して代謝したときに生成されます [3]。アメリカ食品医薬品局 (FDA) および欧州委員会 (EC) はどちらも、さまざまな食品中のアフラトキシン含有量の限度を規定しています [4、5]。表 2 に、米国と欧州における FDA と EC のアフラトキシンの制限をまとめています。

アフラトキシンの規制限度は、特に乳児向けの乳製品のマトリックスおよび製剤では、非常に低く設定されています。低濃度での分析対象物のシグナルを改善するには、マトリックス干渉を除去するためのサンプル前処理が必要です。さまざまなマトリックスにおいて、アフラトキシンを含むマイコトキシンの分析には、一般にイムノアフィニティカラムが使用されます [6 ~ 9]。ただし、それらのカラムは高価であることがあり、食品分析ラボで実施しやすいとは限らない独特で特殊なワークフローを必要とします。QuEChERS (Quick (高速)、Easy (簡単)、Cheap (低価格)、Effective (効果的)、Rugged (高い耐久性)、Safe (安全)) では、サンプルに対して 3 つのステップ (抽出、クリーンアップ、および分析) からなる単純な手順を使用します。そのため、穀物および乳製品中のアフラトキシンを含むさまざまな分析対象物とマトリックスの前処理のために、魅力的なメソッドとなっています [3、10、11]。ただし、C18 または PSA による QuEChERS クリーンアップでは、肉類や牛乳などの脂質含有量の多いサンプルを分析する際に、いくつかの制限事項があります。ターゲット化合物と非選択的に相互作用すること、および主要な脂質類が十分に除去されないことが、これらの制限事項の原因となっています。残った脂質は分析流路に蓄積し、その結果、メンテナンス作業が増え、クロマトグラフィーが低下し、データの真度および精度も低下します。

Agilent Bond Elut EMR Lipid は、サイズ排除および疎水性相互作用を独自に組み合わせて使用し、分析対象を不必要に保持せずに、サンプルから主要な脂質類を選択的に除去する、まったく新しい充填剤です。この充填剤は、QuEChERS およびタンパク処理ワークフローによる dSPE クリーンアップとして使用することができ、シンプルで効果的なクリーンアップを容易に実行できるようにします [12、13]。この実験では、乳児用調合乳中の 5 種のアフラトキシンの分析について調査しました。脂質含有量とアフラトキシンの規制レベルを元に、このマトリックス用に乳児用調合乳を選択しました。QuEChERS 抽出を実施し、続いて EMR Lipid dSPE クリーンアップと、無水 MgSO₄ を使用する強化されたサンプル後処理を実施したため、徹底したマトリックス除去が行われました。このアプリケーションノートでは、3 つの異なる濃度でアフラトキシンを分析する場合の EMR Lipid の有効性を示します。

表 1. 5 種のアフラトキシンの化学的情報および物理的情報。

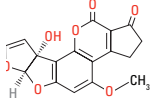
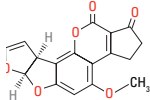
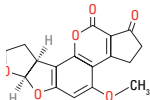
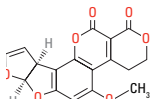
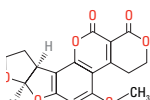
アフラトキシン	分子式	構造	pKa	logP
M1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇		11.4	0.93
B1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆		—	1.58
B2	C ₁₇ H ₁₄ O ₆		—	1.57
G1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇		—	1.37
G2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇		—	1.36

表 2. EC および FDA による関連マトリックスでのアフラトキシンの限度

アフラトキシシン	限度 (µg/kg)	マトリックス	規制機関
M1	0.025	乳児用調合乳	EC [5]
	0.05	生乳	EC [5]
	0.50	生乳	FDA [14]
B1	0.10	離乳食	EC [5]
	2 ~ 12*	一般食品	EC [5]
B1 + B2 + G1 + G2 (総濃度)	4 ~ 15*	ナッツ、イチジク、ドライフルーツ、シリアル、とうもろこし、香辛料	EC [5]
	20	一般食品	FDA [15]**
	20 ~ 300	動物飼料	FDA [16]**

* 特定のマトリックスに関する詳細については、欧州委員会規則 No 1881/2006 を参照してください [5]。

** アフラトキシシン B1 の同定は、化学誘導体形成によって確認する必要があります [15、16]。

実験方法

試薬および薬品

試薬はすべて、HPLC グレード以上のものを使用しました。アセトニトリル (ACN) およびメタノールは Honeywell (マスキーゴン、ミシガン州、米国) から購入しました。水は、EMD Millipore Milli-Q Integral System (ダルムシュタット、ドイツ) を使用して純水化しました。試薬グレードのギ酸 (FA、部品番号 G2453-85060) は Agilent Technologies から入手しました。欧州標準物質 ERM-BD283 (低レベルのアフラトキシシン M1 を含む全脂粉乳) は LGC Standards (テディントン、ミドルセックス、英国) から購入しました。アフラトキシシン M1 (ACN 中に 10 µg/mL)、アフラトキシシン混合液 (B1、G1、B2、G2 が ACN 中にそれぞれ 20 µg/mL)、およびギ酸アンモニウムは、Sigma-Aldrich, Corp. (セントルイス、ミズーリ州、米国) から購入しました。アフラトキシシン原液標準は、メーカーが推奨するように、2 ~ 8 °C (M1) および 2 ~ 20 °C (B1、B2、G1、G2 の混合) で保管しました。すぐに使用できる液体の乳児用調合乳は、地元の食料品店で購入しました。

装置

使用した装置と材料:

- エッペンドルフピペットおよびリピーター
- Vortexer および Multi-Tube Vortexer (VWR、ラドナー、ペンシルベニア州、米国)
- ジェノグラインダー (SPEX、メアチエン、ニュージャージー州、米国)
- Centra CL3R 遠心管 (Thermo IEC、マサチューセッツ州、米国)
- Turbopak LV (Biotage、シャーロット、ノースカロライナ州、米国)
- エッペンドルフ微小遠心管 (Brinkmann Instruments、ウェストベリー、ニューヨーク州、米国)
- Agilent Bond Elut オリジナル QuEChERS メソッド (バッファなし) 抽出キット (10 g のサンプル)、セラミックホモジナイザ入り (部品番号 5982-5550CH)
- Agilent Bond Elut EMR Lipid dSPE (部品番号 5982-1010)
- Agilent Bond Elut EMR Lipid MgSO4 脱水キットバック (部品番号 5982-0102)

装置構成

分析には、以下のものから構成される Agilent 1290 Infinity LC システムを使用しました。

- Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (G4220A)
- Agilent 1290 FC/ALS サーマスタット (G1330B) を搭載した Agilent 1290 Infinity 高性能オートサンブラ (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity カラムコンパートメント (G1316C)

LC システムを、Agilent Jet Stream エレクトロスプレーイオン化技術を備えた Agilent 6460A トリプル四重極 LC/MS/MS システムに連結しました。すべてのデータ取り込みと分析に、Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェアを使用しました。

サンプル前処理

液体乳児用調合乳 (10 mL) を、50 mL の遠心分離チューブに追加し、QC サンプル用の標準溶液を適宜スパイクしました。2 つのセラミックホモジナイザと 10 mL の ACN を追加し、サンプルを 2 分間ボルテックスしました。オリジナル (バフファなし、10 g のサンプル) QuEChERS 抽出塩キット パケットを、サンプルに追加しました。サンプルを、2 分間振とう機で混合し、次に 5 分間 5,000 rpm で遠心分離しました。水 (5 mL) を EMR Lipid dSPE チューブに追加し、ボルテックスしてから、5 mL の未処理のサンプル抽出液を追加しました。サンプルを直ちにボルテックスしてから、マルチチューブ Vortexer でさらに 60 秒間ボルテックスしました。次にサンプルを 5 分間 5,000 rpm で遠心分離し、空の 15 mL の遠心分離チューブに静かに移しました。脱水キットバックの無水硫酸マグネシウム (MgSO₄) を、抽出液に追加しました。塩を分散させるためにサンプルを直ちにボルテックスし、さらに 60 秒間ボルテックスし、3 分間 5,000 rpm で遠心分離しました。上澄みを、1.5 g の MgSO₄ (新しい脱水キットバックの) が入っている別の 15 mL 遠心分離チューブに移しました。サンプルを直ちにボルテックスしてから、再度 60 秒間ボルテックスします。3 分間 5,000 rpm で遠心分離した後に、最終サンプル (1 mL) を 16×100 mm のガラスのテストチューブに移し、乾くまで 50 °C で窒素下で蒸発させました。必要に応じて、乾燥する前に、ブランクのマトリックスに標準溶液をスパイクしました。サンプルを、0.1 % の FA/ACN (80/20) を含む 100 µL の H₂O で再溶解し、少なくとも 2 分間ボルテックスしました。必要な場合は、次にサンプルを超音波洗浄器にかけ、遠心分離しました。次に、最終サンプルを、LC/MS/MS 分析のためにインサート付きのバイアルに移しました。図 1 に、サンプル前処理手順の全体を示します。

機器条件

HPLC		
カラム:	Agilent Poroshell 120 SB-C18 2.1 × 100 mm、2.7 µm (部品番号 685775-902)	
ガード:	Agilent Poroshell 120 SB-C18 UHPLC Guard、2.1 mm × 5 mm、2.7 µm (部品番号 821725-912)	
移動相:	A) 0.1 % の FA を含む、5 mM のギ酸アンモニウムの水溶液 B) 0.1 % の FA を含む、5 mM のギ酸アンモニウムの ACN/メタノール (50/50) 溶液	
流量:	0.3 mL/min	
カラム温度:	40 °C	
オートサンブラ温度:	4 °C	
注入量:	5 µL	
ニードル洗浄:	0.2 % の FA を含む 1:1:1:1 の ACN/メタノール/イソプロパノール/水	
グラジエント:	時間 (分)	%B
	0	20
	7	70
	7.25	95
ストップタイム:	11 分	
ポストタイム:	2 分	

MS		
エレクトロスプレーイオン化 (ESI)、ポジティブモード		
ガス温度:	325 °C	
ガス流量:	10 L/min	
ネブライザ:	50 psi	
シースガスヒーター:	350 °C	
シースガス流量:	11 L/min	
キャピラリ:	4,000 V	
デルタ EMV (+):	300 V	
タイムセグメント:	番号	時間 (分)
	1	0
	2	2
		ダイバータバルブ 廃液へ MS へ



図 1. Agilent Bond Elut EMR Lipid クリーンアップと MgSO_4 を使用した強化された脱水処理を用いた、液体乳児用調合乳中のアフラトキシンのサンプル前処理プロトコル。

キャリブレーション標準と品質管理

アフラトキシン作業溶液を、原液から、 $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ (アフラトキシン M1) および $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ (アフラトキシン G2、G1、B2、および B1) の ACN 溶液として調製しました。アフラトキシン M1 の濃度は、他のアフラトキシンの 5 分の 1 にして、さまざまな規制限度を超えないようにしました。キャリブレーションと QC 標準は、作業溶液を適宜希釈することによって、100 倍の最終濃度になりました。表 4 には、乳児用調合乳でのキャリブレーションサンプルおよび QC サンプルの最終濃度を示します。作業溶液とすべてのキャリブレーション標準および QC 標準を、 $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ で茶色のバイアルに保管しました。抽出の前に、マトリックスブランク乳児用調合乳に、 $100\text{ }\mu\text{L}$ の対応する QC 標準をスパイクしました。マトリックス適合検量線のため、乾燥の前に、 $10\text{ }\mu\text{L}$ の適切な標準溶液を、 $990\text{ }\mu\text{L}$ のマトリックスブランク ACN 抽出物にスパイクしました。

表 4. 乳児用調合乳でのプレススパイク QC サンプルおよびポストスパイクキャリブレーションサンプルの最終濃度。

標準*	アフラトキシン M1 (ng/mL)	アフラトキシン B1、B2、G1、G2 (ng/mL)
キャリブレーション 1	0.01	0.05
キャリブレーション 2	0.02	0.10
キャリブレーション 3	0.10	0.50
キャリブレーション 4	0.50	2.50
キャリブレーション 5	1.00	5.00
キャリブレーション 6	2.50	12.5
低 QC	0.025	0.125
中 QC	0.25	1.25
高 QC	2.00	10.0

*スパイク用に 100 倍の最終濃度で調製された標準。

表 3. ターゲット化合物の LC/MS/MS dMRM パラメータおよびリテンションタイム

分析対象物	RT (分)	プロダクトイオン					
		プリカーサイオン (m/z)	フラグメンター (V)	定量イオン (m/z)	CE (V)	定性イオン (m/z)	CE (V)
アフラトキシン M1	4.28	329.1	143	273.1	21	229	45
アフラトキシン G2	4.55	331.1	164	313.1	25	245	33
アフラトキシン G1	4.88	329.07	149	243.1	25	115.1	80
アフラトキシン B2	5.13	315.09	174	287.1	25	259.1	29
アフラトキシン B1	5.44	313.07	169	241	41	128	80

結果と考察

メソッドの最適化

EMR Lipid は、除タンパク処理と QuEChERS ワークフローの両方で使用できます。液体乳児用調合乳中のアフラトキシン分析には、除タンパク処理と QuEChERS 手順の両方が適していることが、初期の検査で示されました。ただし、従来から行われている除タンパク処理に関連する希釈係数が大きくなったため、このアプリケーションでは QuEChERS 手法を選択しました。このアプリケーションでは、予備実験の後に、オリジナル QuEChERS 抽出塩キットを選択しましたが、AOAC 抽出キットおよび EN 抽出キットも使用可能です。

S/N 比に基づいて、望ましいアフラトキシン M1 の定量下限 (LOQ) に到達するには濃縮ステップが必要であると判断しました。5 倍、10 倍、および 20 倍の濃度を評価しました。所定の機器のセットアップでは 10 倍の濃度が LOQ およびメソッドのニーズに適合します。QuEChERS 抽出、EMR Lipid クリーンアップ、および MgSO_4 による強化された脱水処理を実施した後の、乳児用調合乳中のアフラトキシンの LC/MS/MS dMRM クロマトグラムを、図 2 に示します。

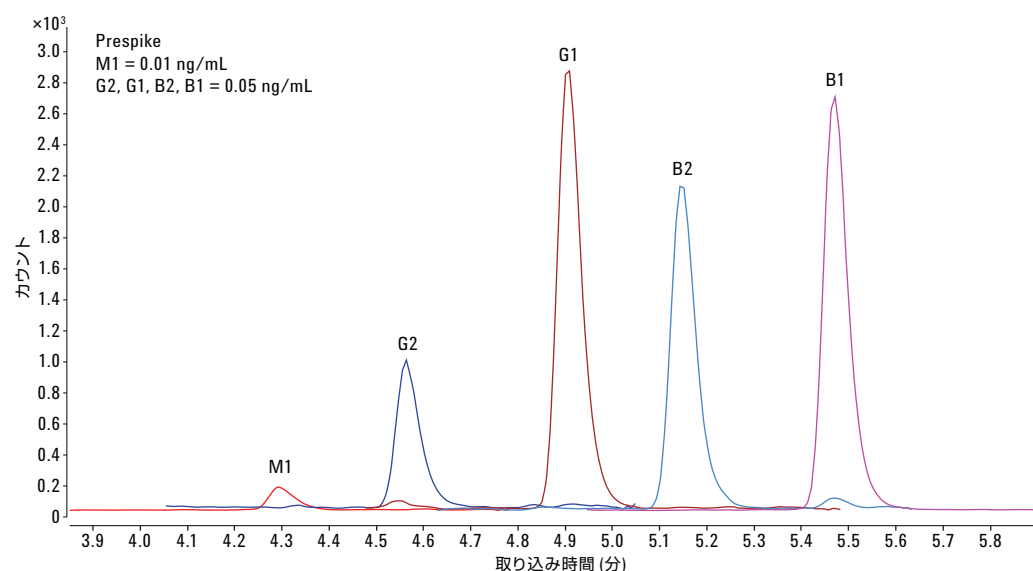


図 2. QuEChERS 抽出と、Agilent Bond Elut EMR Lipid dSPE クリーンアップおよび MgSO_4 を使用した強化された脱水処理の後の、液体乳児用調合乳中のアフラトキシンの LC/MS/MS dMRM クロマトグラム

マトリックス除去

液体乳児用調合乳には、脂肪、タンパク質、炭水化物、ビタミン、ミネラルなどの、さまざまなマトリックス成分が含まれています。このようにマトリックスが複雑であるため、特にアフラトキシンの濃度は一般的に非常に低いので、サンプル前処理が難しくなることがあります。図 3 には、クリーンアップをしない場合と、C18/PSA または EMR Lipid dSPE クリーンアップを行った場合について、乳児用調合乳の 10 倍濃縮した試料のマトリックスブランクサンプルの GC/MS フルスキャンを重ね表示したクロマトグラムを示します。クリーンアップをしないマトリックスブランクと比較した場合、特にクロマトグラムの後の方の溶出領域では、C18/PSA が除去するマトリックスは非常にわずかです。しかし、赤で示されている EMR Lipid は、独自の作用メカニズムにより、10 倍濃縮した試料でもサンプル前処理中にかなりの量のマトリックスを除去していることがわかります。

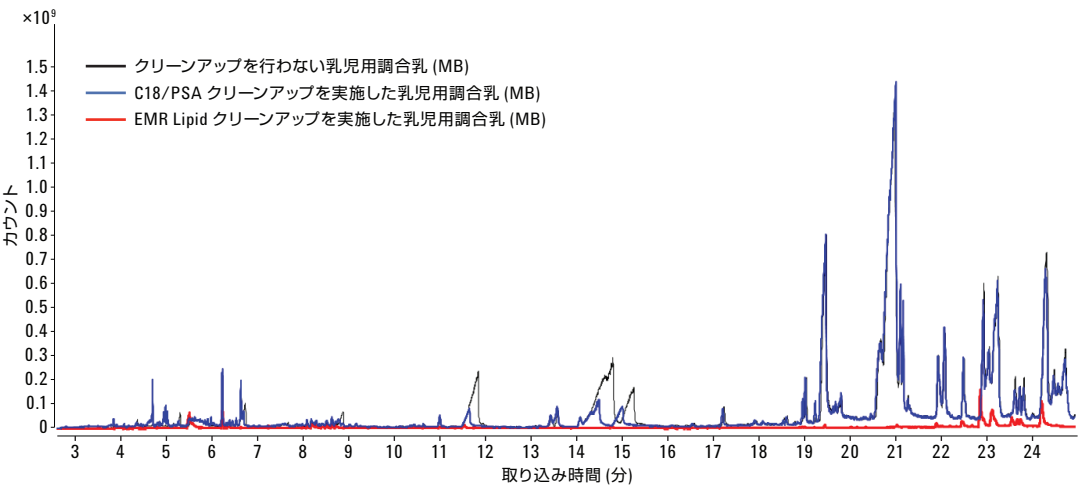


図 3. クリーンアップなし、C18/PSA dSPE クリーンアップ、および Agilent Bond Elut EMR Lipid クリーンアップの場合について、乳児用調合乳のマトリックスブランク (MB) を示す GC/MS フルスキャンを重ね表示したクロマトグラム。

ポストスパイクされた乳児用調合乳からのピーク強度 (面積) と、それに相当する溶媒標準を比較することによって、マトリックス効果を評価しました (表 5)。アフラトキシ M1 のサンプルは 0.025 ng/mL の濃度でスパイクし、アフラトキシ G2、G1、B2、および B1 のサンプルは 0.125 ng/mL でスパイクしました。このメソッドでは、大きなマトリックス効果が出ない許容できる範囲までマトリックス除去が行われることが分かります。

表 5. 5 種のアフラトキシンのマトリックス効果 (%)。ポストスパイクした乳児用調合乳でのピーク強度と、それに相当する溶媒標準を比較することによって、マトリックス効果を評価しました (n = 5)。

アフラトキシ	マトリックス効果 (%)
M1	+ 12
G2	- 13
G1	- 10
B2	- 11
B1	- 9

直線性および LOQ

乳児用調合乳中で、アフラトキシン M1 の直線範囲は 0.01 ～ 2.50 ng/mL、アフラトキシン G2、G1、B2、および B1 の直線範囲は 0.05 ～ 12.5 ng/mL でした。表 6 に、この実験でのアフラトキシンごとのキャリブレーション範囲、回帰/重みと R² 値、および LOQ を示します。LOQ は、メソッドの性能に基づいて実験で測定しました。アフラトキシン M1 の LOQ は、米国の最大許容レベルと欧州の最大許容レベルを下回っています。

表 6. アフラトキシンごとのキャリブレーションの詳細 (回帰適合、重量、R² 値、直線範囲、および LOQ)

アフラトキシン	回帰適合、重み	R ²	直線範囲 (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
M1	直線、1/x ²	0.9931	0.01～2.50	0.01
G2	直線、1/x	0.9990	0.05～12.5	0.05
G1	直線、1/x	0.9994	0.05～12.5	0.05
B2	直線、1/x	0.9986	0.05～12.5	0.05
B1	直線、1/x	0.9987	0.05～12.5	0.05

回収率と再現性

このメソッドの回収率と再現性を評価しました。アフラトキシン M1 について 0.025、0.25、および 2.00 ng/mL の濃度でブランクの液体乳児用調合乳をスパイクすることによって、QC 標準 (n = 6) を調製しました。さらに、アフラトキシン G2、G1、B2、および B1 については 0.125、1.25、および 10.0 ng/mL で QC 標準を調製しました。次に、このアプリケーションノートで説明した手順を使用して、サンプルを抽出しました。前述のように一連のキャリブレータを調製し、分析の間 n = 6 で注入し、レスポンスに変化が見られたかどうかを調べましたが、大きな変化はありませんでした。プレスパイク QC サンプルの回収率は、マトリックス検量線と照合して、そのレスポンスに対して計算しました。図 4 および図 5 に、回収率と、相対標準偏差 (RSD) のデータを示します。3 つのすべての QC レベルで、5 種のアフラトキシンすべての平均回収率はおよそ 101 % であり、平均 RSD は 5.0 % 未満でした。

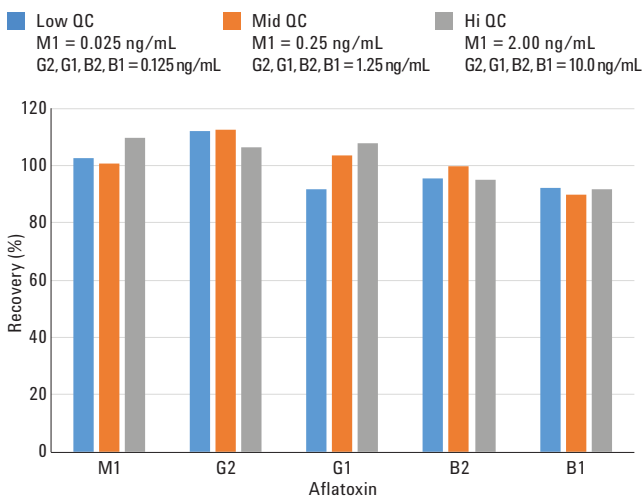


図 4. Agilent Bond Elut EMR Lipid クリーンアップを使用した場合の液体乳児用調合乳中の 5 種のアフラトキシンの回収率 (%). (n = 6)

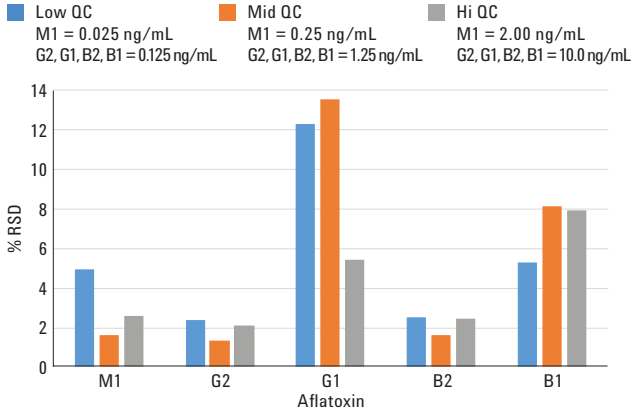


図 5. Agilent Bond Elut EMR Lipid クリーンアップを使用した場合の液体乳児用調合乳中の 5 種のアフラトキシンの RSD (%). (n = 6)

分析済みサンプル

アフラトキシンを含む既知濃度の乳児用調合乳の参照標準試料は提供されておらず、購入できませんでした。そのため、このアプリケーションノートで詳細に説明したメソッドをさらに評価するために、欧州標準物質 (ERM) - BD283 (低レベルのアフラトキシン M1 を含む全脂粉乳) を入手しました。報告されているこの標準の認証値は $0.111 \pm 0.018 \mu\text{g/kg}$ でした [17]。全脂粉乳標準は、ERM 認定レポートで詳細に説明されているメーカーの推奨事項に従って再溶解しました。手短に言うと、100 mL の水を 10 g の全脂粉乳に加えて、10 倍の希釈係数を導入しました。そのため、再溶解されたミルク中の濃度は、報告された濃度の 10 分の 1 ($0.0093 \sim 0.0129 \text{ ng/mL}$) になると予測されます。次に、この再溶解されたサンプルを、前述の手順と同じ手順に従って抽出します。この標準サンプル ($n = 1$) を、すべてのキャリブレーションと 3 段階の QC レベルサンプルと一緒に分析しました ($n = 3$)。標準サンプルが、LOQ (アフラトキシン M1 では 0.01 ng/mL) に近いレベルで定量されると予測したため、 0.01 ng/mL の LOQ QC ($n = 3$) を追加しました。表 7 にこの分析の結果を示します。ERM-BD283 が 0.0101 ng/mL で定量されました。これは、参照物質で予測される範囲内です。このことは、乾燥乳児用調合乳 (水を加える) および液体乳児用調合乳サンプルを分析する場合の両方に、このメソッドが適用できる可能性を示します。

表 7. 分析済みサンプル ($n = 1$) および QC サンプル ($n = 3$) のアフラトキシン M1 の結果。

サンプル	予測濃度 (ng/mL)	計算された濃度 (ng/mL)	真度	RSD
低 QC	0.025	0.0219	88	1.9
中 QC	0.25	0.2378	95	1.1
高 QC	2.00	2.0285	101	0.6
LOQ QC	0.01	0.0107	107	4.7
ERM-BD283	0.0111	0.0101	91	N/A

結論

LC/MS/MS によって乳児用調合乳中のアフラトキシンを分析するための、シンプルで効果的なメソッドが開発されました。QuEChERS 手順を使用し、続いて Agilent Bond Elut EMR Lipid dSPE クリーンアップと、 MgSO_4 を使用した強化された脱水処理を実施して、サンプルを抽出しました。このメソッドは、広い直線範囲全体で、非常に高い回収率 (平均 101 %) および精度 (平均で RSD が 5.0 % 未満) を示しました。不要なマトリックス効果を伴わない濃縮ステップによって、LOQ が規制値を下回りました。

この手法では、望ましくない成分損失を発生させずに、EMR Lipid によって顕著なマトリックス除去を実現できます。優れた器具によるクリーンアップにより、クロマトグラフィーが改善され、メンテナンスとトラブルシューティングの作業は減少し、時間と費用の両方を節約できます。このソリューションは、専門知識と機器をあまり必要とせず、食品分析ラボで容易に実施できます。このアプリケーションはマイコトキシンの 1 つの種だけに特化していますが、EMR Lipid は多成分残留物を対象とするアプリケーションです。そのため、イムノアフィニティカラムとは異なり、EMR Lipid は、複数の種類のマイコトキシンの分析に容易に適用できます。今後も引き続き、他の複雑な高脂質サンプルで EMR Lipid クリーンアップについて調査します。

参考文献

- Jard, G.; Liboz, T.; Mathieu, F.; Guyonvarc'h; Lebrihi, A. Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Additives and Contaminants: Part A*. **2011**, 28(11), 1590–1609.
- Wang, H.; Zhou, X. J.; Liu, Y. Q.; Yang, H. M.; Guo, Q. L. Determination of aflatoxin M1 in milk by triple quadrupole liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants: Part A*. **2010**, 27(9), 1261–1265.
- Sartori, A. V.; Swenson de Mattos, J.; Paulino de Moraes, M. H.; Wanderley de Nóbrega, A. Determination of Aflatoxins M1, M2, B1, B2, G1, and G2 and Ochratoxin A in UHT and Powdered Milk by Modified QuEChERS Method and Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods* **2015**, 8(9), 2321–2330.
- Anon. Guidance for Industry. Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed; <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ChemicalContaminantsMetalsNaturalToxinsPesticides/ucm077969.htm#afla>. Accessed on 7 October **2015**.

5. Anon. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs; <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:02006R1881-20140701> Accessed on 11 February **2016**.
6. Meucci, V.; Razzuoli, E.; Soldani, G.; Massart, F. Mycotoxin detection in infant formula milks in Italy. *Food Additives & Contaminants: Part A*. **2010**, *27*(1), 64–71.
7. Dragacci, S.; Grosso, F.; Gilbert, J. Immunoaffinity Column Cleanup with Liquid Chromatography for Determination of Aflatoxin M₁ in Liquid Milk: Collaborative Study. *J. of AOAC International* **2001**, *84*(2), 437–443.
8. Iha, M. H.; Barbosa, C. B.; Okada, I. A.; Trucksess, M. W. Occurrence of aflatoxin M₁ in dairy products in Brazil. *Food Control* **2011**, *22*, 1971–1974.
9. Shundo, L.; Sabino, M. Aflatoxin M₁ in milk by immunoaffinity column cleanup with TLC/HPLC determination. *Brazilian Journal of Microbiology*. **2006**, *37*, 164–167.
10. Bursić, V. P.; Vuković, G. Lj.; Jajić, I. M.; Lazić, S. D.; Cara, M. H.; Čolović, R. R.; Vukmirović, D. M. Analysis of Aflatoxins B₁ and G₁ in Maize by QuEChERS. *Jour. Nat. Sci, Matica Srpska Novi Sad* **2013**, *124*, 51–57.
11. Filigenzi, M. S.; Ehrke, N.; Aston, L. S.; Poppenga, R. H. Evaluation of a rapid screening method for chemical contaminants of concern in four food-related matrices using QuEChERS extraction, UHPLC and high resolution mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A*. **2011**, *28* (10), 1324–1339.
12. Zhao, L.; Lucas, D. *Multiresidue Analysis of Pesticides in Avocado with Agilent Bond Elut EMR—Lipid by LC/MS/MS*; Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-6098EN, **2015**.
13. Zhao, L.; Lucas, D. *Multiresidue Analysis of Veterinary Drugs in Bovine Liver by LC/MS/MS*; Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-6096EN, **2015**.
14. Anon. *CPG Sec. 527.400 Whole Milk, Lowfat Milk, Skim Milk - Aflatoxin M₁*; <http://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/ucm074482.htm> Accessed on 7 October **2015**.
15. Anon. *CPG Sec. 555.400 Foods - Adulteration with Aflatoxin*; <http://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/ucm074555.htm> Accessed on 7 October **2015**.
16. Anon. *CPG Sec. 683.100 Action Levels for Aflatoxins in Animal Feeds*. <http://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/ucm074703.htm> Accessed on 7 October **2015**.
17. Josephs, R.D.; Koeber, R.; Bernreuther, A.; Schimmel, H.; Ulberth, F.; *EUR Report 21202 EN – DG Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements*, **2005**. https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/rm/ERM-BD284_report.pdf

詳細情報:

本書に記載されたデータは典型的な結果です。アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

本資料掲載の製品は、すべて研究用です。診断目的では使用できません。

本資料に記載の情報は、予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2016

Printed in Japan March 31, 2016

5991-6818JAJP



Agilent Technologies