

Laboratory

Fig. 2. Xbar, R chart and Z-score for CaM amount in M810H samples

Individual data are represented as a closed circle (in Xbar chart and Z-score; ○) or a cross (in R chart; ×). The mean (central limit) of each value is illustrated as bold horizontal lines in the Xbar chart and R chart. Upper and lower control limits are represented as mean \pm 2 S.D. Data outside the upper or lower control limit are represented by a square (□).

Abbreviations; See the footnote of Fig. 1.

り、食発 1113001 号に記載の方法（通知 mini 法）と比較した場合、DNA をカラムから溶出した後に行うアルコール沈殿操作が不要となり、簡便化と収量の安定化が達成できるものと考えられた。また、通知 mini 法では DNA 沈殿の溶解に一晩の静置が必要であったが、これも不要となることから、試験時間も大幅に短縮される。M810L および M810H 各試料から得られた、通知 mini 法ならびに改良 mini 法の結果について解析したところ、M810H から得られた O.D. 260 nm/230 nm、および両試料から得られた DNA 収量に有意差が認められた。O.D. 260 nm/230 nm については、改良 mini 法で若干の上昇が認められたが、M810H についてのみであり、明確な結論は得られなかった。これに対し、収量は、M810L、M810H ともに改良 mini 法で 150% 以上の増加が認められており、また抽出点間でのばらつきについても小さくなっている (Table 4)。さらに、それぞれの抽出 DNA を対象に得られた CaM および Mon810 混入率には、有意差が認められなかった (Table 4)。これらの結果から、改良 mini 法は簡便化、収量の安定化、また操作時間の短縮に有効であると判断され、食安発 0628001 号（平成 16 年 6 月 28 日）¹⁵⁾ によって厚生労働省より通知された。

(3) 定量下限

M810L から得られた CaM 混入率について解析した結果、Xbar-R 管理図および Z-スコアが管理限界を超えた機関は認められなかった。しかし、CaM 測定値が $^{100}\text{LOQ}_{\text{method}}$ を満たさなかった機関が 4 機関あり、統計解析に含めることができなかった。これら機関から報告されたデータならびに調査項目について詳細に解析した結果、測定値が $^{100}\text{LOQ}_{\text{method}}$ に満たなかった要因には以下の 4 つが考えられた。1) 採用した DNA 抽出法依存的な要因。2) 定量 PCR 機器に依存した要因。3) 試験実施者の操作上の誤差に依存した要因。4) 上記 1)~3) の複合要因。上記 4 機関中、機関 6 は定量 PCR 機器に LC を使用しており、LC の試験法上、 $^{100}\text{LOQ}_{\text{method}}$ が ABI 社製の PCR 機器に比べて高く (40 コピー) なることが結果に影響を与えている可能性も考えられた。機関 6 以外の 3 機関においては、DNA 抽出法にシリカゲル膜タイプキット法以外の方法 (CTAB 法: 機関 21 および 26, シリカベースレジックタイプキット法: 機関 17) が採用されていた。

(4) 内在性遺伝子 (*SSI7b*) 測定値の解析 1 (DNA 抽出法依存的な *SSI7b* 測定値の差異とそのばらつき; 定量下限への影響)

GM トウモロコシの混入率は、トウモロコシに普遍的に含まれる内在性遺伝子 (*SSI7b*) の測定値と GM トウモロコ

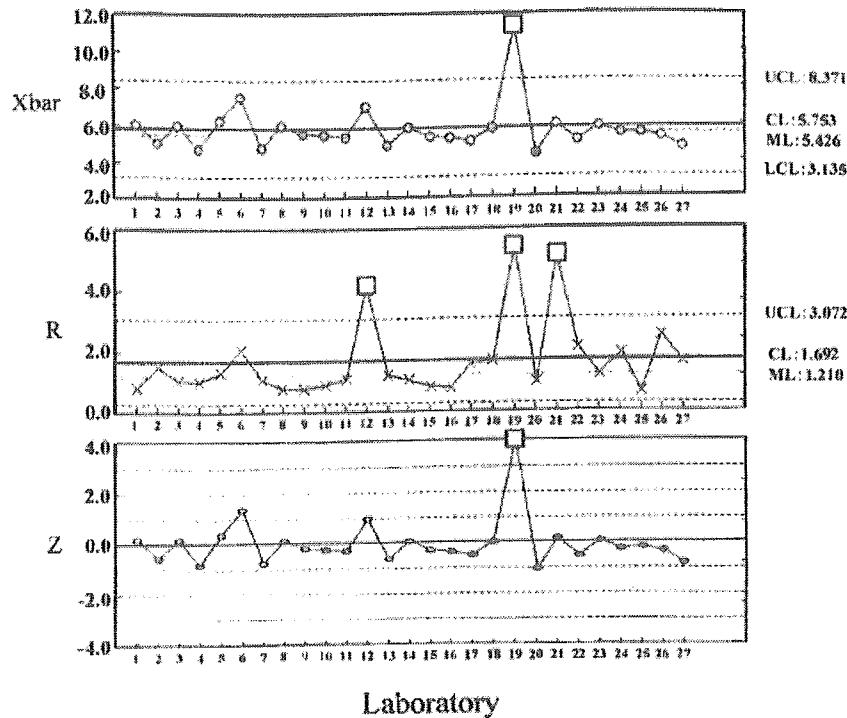


Fig. 8. Xbar, R chart and Z-score for Mon810 amount in M810H samples

Individual data are represented as a closed circle (in Xbar chart and Z-score; ○) or a cross (in R chart; ×). The mean (central) limit of each value is illustrated as bold horizontal lines in the Xbar chart and R chart. Upper and lower control limits are represented as mean \pm 2 S.D. Data outside the upper or lower control limit are represented by a square (□).

Abbreviations: See the footnote of Fig. 1.

ンに含まれる組換え DNA 配列の測定値の比を求め、これに換算係数 (内標比) を乗じて算出されるため、どのような GM トウモロコシ系統を対象とした定量分析を行う場合においても、必ず *SSIb* の測定を同時に行う。また、同一試料から、同一の DNA 抽出法を用いて抽出された DNA 試料から測定される *SSIb* 測定値は、基本的には、安定して一定の値を示すと考えられる。これらのことから、*SSIb* 測定値の大きさやそのばらつきを指標とした解析を行うことは、GM トウモロコシ定量分析により問題のある結果が得られた場合、その要因を明らかにする上で重要であると考えた。そこで、系統特異的定量試験のうち Mon810 混入率を算出するための試験結果から、9 検体の DNA 試料液について得られた *SSIb* 測定値を抽出し、平均値を算出した (Fig. 6)。その結果、*SSIb* 測定値の平均は、シリカゲル膜タイプキット法を採用した 22 機関の平均 \pm S.D. が 34599.8 ± 7386.7 コピー、CTAB 法を採用した 4 機関の平均 \pm S.D. が 22461.8 ± 6856.4 コピーであった。また、シリカベースレジソタイプキット法を採用した 1 機関の *SSIb* 測定値の平均 \pm S.D. は 31393.3 ± 3937.1 コピーであった。さらに、同一試料に由来する複数の検体間に認められる *SSIb* 測定値のばらつきについて明らかにすることを目的に、先に平均値を算出した 9 検体の *SSIb* 測定値の R.S.D. を求め機関ごとに示した

(Table 6)。その結果、全機関から報告された *SSIb* 測定値の R.S.D. が 17% であったのに対し、M810L を対象とした試験において CaM 測定値が $^{ab}LOQ_{method}$ を下回った機関のうち、CTAB 法を採用した機関 21 および 26 から報告された *SSIb* 測定値の R.S.D. は、それぞれ 68.5%、66.2% であり、明らかに大きな値を示した。これらの解析結果から、CTAB 法を DNA 抽出法に採用した場合には、得られる測定値が他の方法に比べて小さくなることに加え、上記 2 機関においては抽出操作のばらつきあるいは DNA 濃度測定の不備が原因となり、それらの複合的な結果として、CaM 測定値が $^{ab}LOQ_{method}$ を下回ったのではないかと推測された。また、機関 17 も同様に M810L を対象とした試験において CaM 測定値が $^{ab}LOQ_{method}$ を下回っていたが、同じ DNA 抽出法を採用している機関がほかにないため、データの比較から考察することができなかった。

(5) 内在性遺伝子 (*SSIb*) 測定値の解析 2 (*SSIb* 測定値のラン間再現性; LC に認められた問題)

M810H を対象とした試験においては、LC を定量 PCR 機器として使用した機関から報告された CaM、Mon810 混入率のいずれもが、Xbar および Z-スコアにおいて管理限界を超えていた。その要因を明らかにするため、同一検体の測定試験を繰り返し行った場合の *SSIb* 測定値のばら

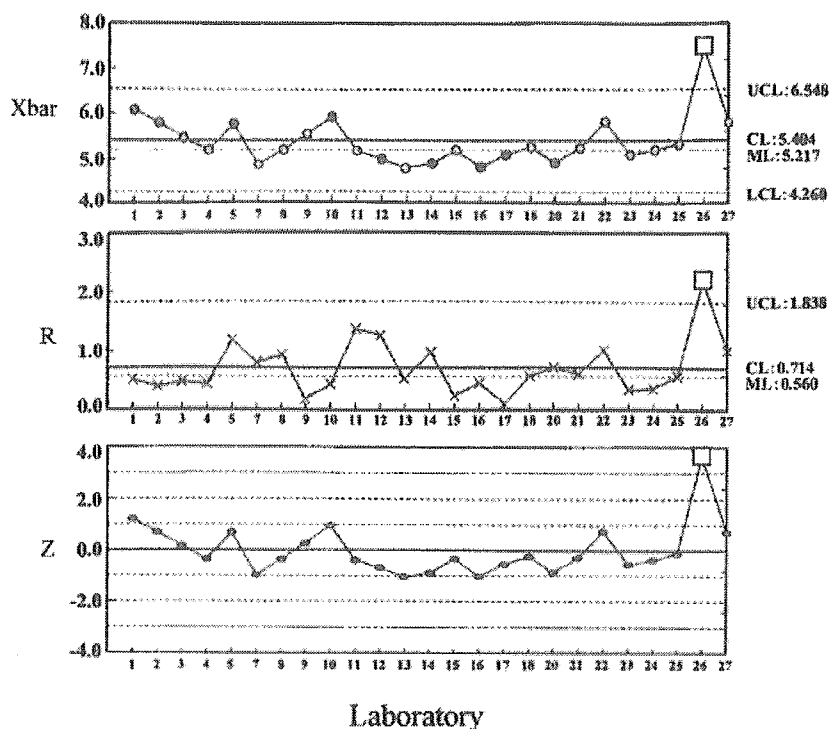


Fig. 4. Xbar, R chart and Z-score for CaM amount in M810H samples (except for the values reported from laboratories in which a LightCycler was used)

Individual data are represented as a closed circle (in Xbar chart and Z-score; ○) or a cross (in R chart; ×). The mean (central limit) of each value is illustrated as bold horizontal lines in the Xbar chart and R chart. Upper and lower control limits are represented as mean \pm 2 S.D. Data outside the upper or lower control limit are represented by a square (□).

Abbreviations; See the footnote of Fig. 1.

つき (ラン間再現性) に関して, M810H から抽出された DNA 試料のうち同一の DNA 試料液を用いて行われた CaM ならびに GA2I 混入率 (スクリーニング試験), および Mon810 混入率 (系統特異的試験) を分析するための計 3 回のランについて, 各機関から報告された測定値のうち *SSIIb* 測定値を抽出し, R.S.D. を求め比較した。その結果, Table 6 に示したように, LC におけるラン間再現性は, 各抽出 DNA について, 機関 6 においては 56.8%, 53.8%, 48.5% (R.S.D. の平均; 53.0%), 機関 19 においては 40.3%, 38.5%, 28.9% (同平均; 35.9%) であった。これに対し, ABI 社製定量 PCR 機器を使用した機関のうち機関 26 を除く機関でのラン間再現性は $7.4 \pm 3.8\%$ であった。これらの結果から, LC により得られる測定値のラン間再現性が低い傾向が示唆された。

しかしラン間再現性が低いということのみでは, LC 使用機関から報告された混入率が, 真値と大きく異なっていた結果を十分に説明することができない。そこで, LC 使用機関から分析に供した DNA 試料液を回収し, 国立衛研において再分析した。回収した 5 検体分の DNA 試料液における CaM 混入率を分析することを目的に 3 回の繰返し測定を実施した結果, 5 検体における *SSIIb* 測定値の R.S.D. の平均は 7.9%, また, CaM 混入率の平均値 \pm S.D.

は $4.93 \pm 0.60\%$ であり, その他の機関から報告された値に比べて, 著しい差異は認められなかった。また, 操作方法については担当者への聞き取り調査を行ったが, 特別な問題を見つけることができなかった。これらの結果は, 参加機関が使用した定量 PCR 試薬あるいは機器に起因する要因がラン間再現性, さらに算出される混入率に影響を与えたことを示唆するものと考えられた。なお, ABI 社製定量 PCR 機器を用いた機関から報告された *SSIIb* 測定値の R.S.D. の平均値を算出する際に除外した機関 26 においては, 通知法とは異なり PCR プレートのフタにキャップを使用した旨報告されており, 測定値も他の機関と同一に解析することができない大きな異常を示していたため, 抽出 DNA にも大きな問題が含まれていると考えられた。また, 規定された測定方法, 測定回数に従わなかった機関 (機関 3, 13, 21, 24) から報告された測定値についても, ラン間再現性の解析は行わなかった。

(6) その他の機関で認められた問題

LC を除く機関について解析した結果, 前述の機関 26 から報告された M810H における CaM 混入率については, Xbar および Z-スコアが管理限界を超え, さらに R 管理図においても管理限界を上回っていた。また, Mon 810 混入率の解析結果においては, Xbar および Z-スコア

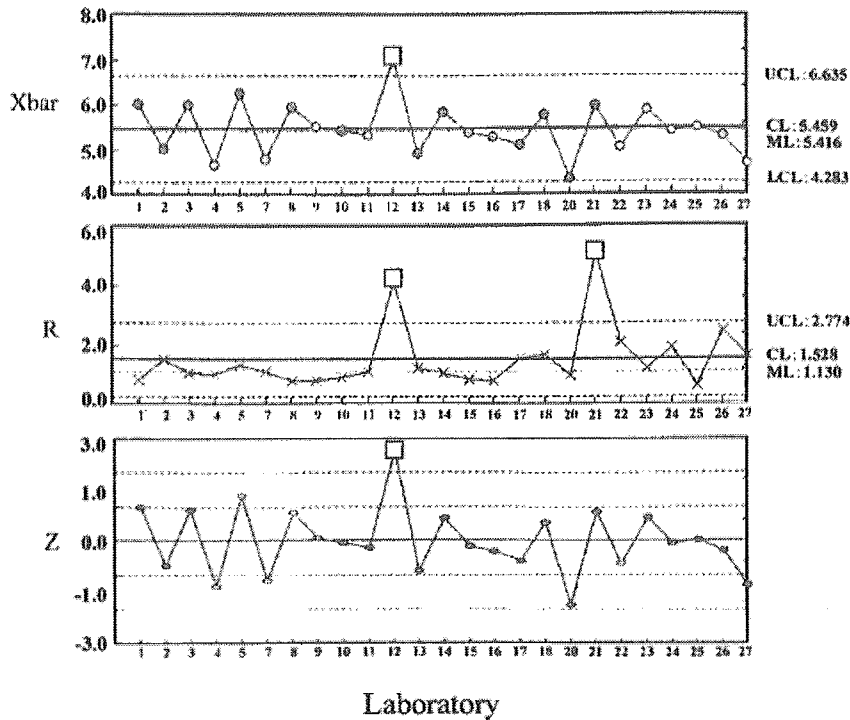


Fig. 5. Xbar, R chart and Z-score for Mon810 amount in M810H samples (except for the values reported from laboratories in which a LightCycler was used)

Individual data are represented as a closed circle (in Xbar chart and Z-score; ○) or a cross (in R chart; ×). The mean (central limit) of each value is illustrated as bold horizontal lines in the Xbar chart and R chart. Upper and lower control limits are represented as mean ± 2 S.D. Data outside the upper or lower control limit are represented by a square (□).

Abbreviations; See the footnote of Fig. 1.

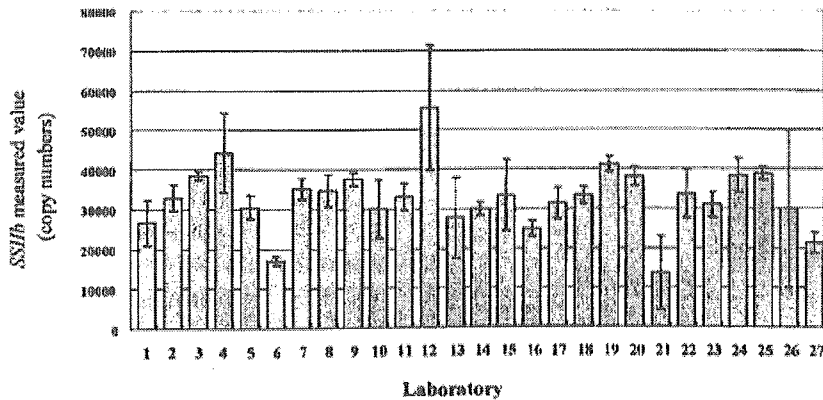


Fig. 6. SSI7b measured values obtained from 9 test portions, derived by dividing M810H samples

The CTAB method and a silica-based resin type kit was used in Laboratories 16, 21, 26, 27 and 17, respectively. The other laboratories extracted DNA using a silica-gel membrane type kit. Data represent means ± S.D. (n=9).

ア上の管理限界を機関 12 が、また、R 管理図上の管理限界を機関 12 および機関 21 が超えていた。これら 2 機関について DNA 抽出の結果をみると、Table 5 に示したとおり、機関 12 については同一の DNA 抽出法を採用した他機関に比べ、比較的収量が少なく (M810H から抽出された 9 点の検体の平均が 12.93 μg)、また、検体間でのば

らつきが大きいこと (R.S.D. が 29.64%) が観察されており、また、機関 21 については収量の平均およびばらつきに問題は認められなかったものの、DNA の質を示す O.D. 260 nm/230 nm の値が同法を採用した他機関に比べて、大きな値 (O.D. 260/230 値の平均が 2.47) を示した。このように、LC を定量 PCR 機器として使用した機関を除

Table 6. Dispersion of *SSIIb* Measured Values Obtained from the M810H DNA Samples with Quantitative PCR Method

Laboratory	DNA extraction method*	R.S.D. (%) for <i>SSIIb</i> measured values obtained from three independent measurements for each test portion				R.S.D. (%) for <i>SSIIb</i> measured values in 9 test portions for M810H***
		Test portion			Average**	
		1	2	3		
1	A	5.6	4.7	6.2	5.5	21.5
2	A	3.7	7.1	3.2	4.7	10.0
3	A		one measurement		not calculated	2.8
4	A	4.5	9.4	9.5	7.8	22.8
5	A	3.0	7.0	7.6	5.9	9.9
6	A	56.8	53.8	48.5	53.0	16.4
7	A	23.6	24.4	10.7	19.6	7.3
8	A	5.9	10.3	7.2	7.8	11.5
9	A	4.5	5.3	6.2	5.3	4.2
10	A	4.6	10.4	2.6	5.9	24.3
11	A	6.7	6.3	5.3	6.1	10.3
12	A	8.3	14.3	12.0	11.5	28.6
13	A		two measurements		not calculated	37.1
14	A	5.3	3.8	2.1	3.7	5.5
15	A	0.9	4.4	7.2	4.2	26.9
16	B	5.7	14.5	6.3	8.8	7.9
17	C	8.8	6.3	9.8	8.3	12.6
18	A	4.7	6.7	9.4	6.9	6.6
19	A	40.3	38.5	28.9	35.9	36.0
20	A	5.7	7.0	2.8	5.2	6.4
21	B		two measurements		not calculated	68.5
22	A	8.8	15.4	11.0	11.7	18.1
23	A	1.8	2.7	2.3	2.3	10.6
24	A		two measurements		not calculated	11.4
25	A	5.2	6.7	6.9	6.3	4.3
26	B	99.2	87.1	92.5	92.9	66.2
27	B	6.1	18.1	5.0	9.7	12.0

* DNA extraction method, A: Silica-gel membrane type kit, B: CTAB method, C: Silica-based resin type kit

** The averages were calculated from the R.S.D. (%) for *SSIIb* measured values obtained from three test portions for M810H. The independent measurement was repeated three times for each test portion. The average means the repeatability of quantitative PCR measurement in each laboratory.

*** The nine *SSIIb* measured values, which were obtained from nine test portions for M810H, were used for calculation of the R.S.D. (%) for *SSIIb* measured value in each laboratory. The R.S.D. (%) indicates the repeatability of DNA extraction method.

The R.S.D. (%) was 17%, calculating from 243 *SSIIb* measured values reported from all laboratories.

いた解析の結果 (Fig. 4, 5), DNA 試料の収量, 質, あるいはそれらのばらつきにおける 1 つ以上の問題が指摘された。また, 機関 21 ならびに 26 については先に考察したとおり, 9 検体の抽出 DNA 試料液間で得られる *SSIIb* 測定値のばらつきが大きいことから, 定量 PCR 法に供された DNA 試料液に含まれる問題を指摘することが可能であると考える (Table 6)。一方, 機関 12 の R.S.D. の平均は 28.6% であり, 若干高めではあるものの, 他機関との顕著な差は認められなかった。しかし, 調査項目に記載を求めた試験日を考慮すると, DNA の収量および質に日差変動が認められた。また, 測定された *SSIIb* 測定値の平均も他の機関に比べ高めの傾向が認められる (Fig. 6)。これらの点から, DNA 抽出法の習熟が不十分であるために起こる抽出間誤差, DNA 濃度測定, および定量 PCR に供する反応液の調製の不確かさが複合要因となって混入率に影響を与えたものと推察された。

以上のように, LC を除く機関を対象とした解析におい

て Xbar-R 管理図および Z-スコアで管理限界を上回る定量値を報告した機関に関しては, DNA 試料の収量, 質, あるいはそれらのばらつきにおける 1 つ以上の問題が認められた。また DNA 抽出法別に見ると, CTAB 法を使用した 4 機関のうち 2 機関が管理限界を超えており, いずれの機関についても DNA 試料の質が定量 PCR に影響した可能性が考えられた。しかし, CTAB 法を採用した残り 2 機関の結果からは定量 PCR 法により得られた測定値も含め, 問題は認められていない。CTAB 法はシリカゲル膜タイプキット法に比べ操作が煩雑なため, 定量 PCR 法に適した DNA を抽出するにはより熟練を要する。このため, 今回管理限界を上回った参加機関においては, CTAB 法を用いた DNA 抽出の経験が不十分, あるいは正確な操作を習得できていない可能性が考えられた。

まとめ

遺伝子組換えトウモロコシを対象とした外部精度管理試

験を実施した結果, M810L を対象とした CaM 定量法を用いた試験において, 測定値を得ることができない機関が認められた。また, M810H を対象とした試験において, LC を使用した 2 機関からともに, Xbar および Z-スコアが管理限界を大きく超える結果が報告されており, 算出される混入率が定量 PCR 機種依存的に異なる可能性が示唆された。その原因として, 報告された測定値からはラン間誤差が大きいことが明らかにされ, また, PCR 試薬あるいは機器に起因する問題がラン間再現性, さらに算出される混入率に影響を与えた可能性が, 追跡調査によって示唆された。LC を使用した機関以外に問題の認められた機関に関しては, 報告様式に規定した各種分析値および調査項目の返答内容を精査した結果, すべての機関において抽出 DNA の収量, 質またはそれらのばらつきのうちの 1 つ以上に問題が認められており, これらが主原因となって混入率が影響を受けたものと推察された。また, 上述の各種要因について考察を行うに当たり, SSIFb 測定値を指標とし, 測定値のばらつきを明確にすることが大変有効であった。さらに, 本共同試験に併せて改良されたシリカゲル膜タイプネット法を用いることで, より簡便かつ短時間で, 高収量の DNA を抽出することが可能であった。

謝 辞

本研究は, 食品等試験検査費および厚生労働科学研究費補助金 (食品安全性確保研究事業) により実施した。本研究にご協力いただいた検査機関諸氏に深謝いたします。

文 献

- James, C., Global status of commercialized biotech/GM crops: 2004. *ISAAA*: Ithaca, NY, No. 32 (2004).
- Hino, A., Safety assessment and public concerns for genetically modified food products: the Japanese experience. *Toxic. Pathology*, **30**, 126-128 (2000).
- 厚生省告示第 282 号 (2000) “食品, 添加物等の規格基準の一部改正” 平成 12 年 5 月 1 日。
- 厚生省告示第 233 号 (2000) “組換え DNA 技術応用食品及び添加物の安全性審査の手續き” 平成 12 年 5 月 1 日。
- 厚生労働省医薬局食品保健部長通知 “食品衛生法施行規則及び乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部改正” 平成 13 年 3 月 15 日, 食発第 79 号 (2001)。
- 厚生労働省医薬局食品保健部長通知 “組換え DNA 技術応用食品の検査方法について” 平成 13 年 3 月 27 日, 食発第 110 号 (2001)。
- 厚生労働省医薬局食品安全部長通知 “組換え DNA 技術応用食品の検査方法について (一部改正)” 平成 17 年 5 月 17 日, 食発第 0517001 号 (2005)。
- 食品衛生法施行規則 (昭和 23 年厚生省令第 23 号)。
- Watanabe, T., Kasama, K., Wakui, C., Shibuya, M., Matsuki, A., Akiyama, H., Maitani, T., Laboratory-performance study of the notified methods to detect genetically modified maize (CBH351) and potato (NewLeaf Plus and NewLeaf Y). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **44**, 281-288 (2003)。
- Kikuchi, H., Watanabe, T., Kasama, K., Wakui, C., Matsuki, A., Akiyama, H., Maitani, T., Laboratory-performance study of the notified methods to detect genetically modified papaya (55-1). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **46**, 21-27 (2005)。
- 磯山 浩, 渡邊敬浩, 笠間菊子, 松木容彦, 米谷民雄: “食品衛生外部精度管理調査研究の概要 (第 1 報) 遺伝子組換えトウモロコシ (CBH351) および遺伝子組換えジャガイモ (NewLeaf Plus and NewLeaf Y) の検知用試料の作製と調査成績について”, *食品衛生研究*, **54** (4) 25-35 (2004)。
- Kasama, K., Watanabe, T., Kikuchi, H., Suzuki, T., Tokishita, S., Sakata, K., Matsuki, A., Hino, A., Akiyama, H., Maitani, T., Laboratory-performance study of the Japanese official notified methods to detect genetically modified soybeans (Roundup Ready Soybean 40-3-2). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, in press.
- 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 “組換え DNA 技術応用食品の検査方法について (一部改正)” 平成 15 年 11 月 13 日, 食発第 1113001 号 (2003)。
- Kuribara, H., Shindo, Y., Matsuoka, T., Takubo, K., Futo, S., Aoki, N., Hirano, T., Akiyama, H., Goda, Y., Toyoda, M., Hino, A., Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean. *J. AOAC Int.*, **85**, 1,077-1,089 (2002)。
- Thompson, M., Wood, R., International harmonized protocol for proficiency testing of (chemical) analytical laboratories. *J. AOAC Int.*, **76**, 926-939 (1993)。
- Horwitz, W. ed., “Official methods of analysis of AOAC International” 17th Ed., Gaithersburg, MD, AOAC International, Appendix D, 2000, p. 2-11. (ISBN 0-935584-7-6)。
- 大嶋 昇: “精度管理における統計的データ解析” *食品衛生学会誌*, **39**, J-325-J-332 (1998); **40**, J-325-J-331; (1999), **41**, J-238-J-242 (2000); **41**, J-316-J-322 (2000)。
- 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 “組換え DNA 技術応用食品の検査方法について (一部改正)” 平成 16 年 6 月 28 日, 食発第 0628001 号 (2004)。

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

「検査機関の信頼性確保に関する研究」

平成 17 年度

研究成果に関する刊行物

学会発表

一日分析に主眼を置いた残留農薬分析法の検討

大阪府立公衆衛生研究所

○起橋雅浩、北川陽子、阿久津和彦、
尾花裕孝、田中之雄

【目的】食品衛生法の一部を改正する法律が公布され、規格、基準の見直しや、監視及び検査体制が強化されることになった。この為、農薬等の残留分析部門では、より多数で広範囲の項目について分析することが求められる。しかし、実際問題として全ての農薬を分析対象としていては、1検体当たりの労力が膨大になり、限られた時間と人員では結果的に検体数をこなすことができない。現実的な対処としては、農薬の使用実態や、残留性、検出報告例等を参考にした項目を選択することが考えられる。そして分析方法を簡素にし、分析労力を減らすことに反比例して、検体数を増やすことができるであろう。今回検討した方法は、分析時間の短縮に主眼を置き、1日で試料を測定できる状態にすることを目標にした。そのため、使い捨てのキャップ付きPP製50mL遠心管を使用してホモジナイズと塩析脱水を行い、一度の遠心分離で抽出液を得ている。

【方法】フードプロセッサーで均一化した試料10gをキャップ付きPP製50mL遠心管にとり、アセトニトリル20mL、酢酸0.1mLを加えてホモジナイザーで1分間攪拌抽出する。これに無水硫酸マグネシウム4gと塩化ナトリウム1gを加え、フタを閉めて手で激しく振盪する。その後6000rpm、10分間遠心し上清を抽出液とする。抽出液16mLを0.5%酢酸を含むアセトニトリル/トルエン(3:1)30mLでコンディショニングしたグラファイトカーボン/PSA二層式固相抽出カラム(500mg/500mg)に負荷し、さらにアセトニトリル/ト

ルエン(3:1)50mLで溶出させる。溶出液を40°C以下で減圧濃縮後10%アセトン/n-ヘキサン8mLに溶解し、試験液とする。試料と試験液の関係は最終的に1g/mL相当となる。測定にはリン系農薬用にGC-FPD(島津GC-17A/カラム:DB-1701)、塩素系、ピレスロイド系農薬用に負化学イオン化法GC-MS(島津QP-2010/カラム:DB-5)、その他農薬にイオントラップ型GC-MS(ThermoPORALIS Q/カラム:Rtx-5ms)を用いて測定した。

【結果】リンゴ、バナナ、グレープフルーツ、オレンジ、パプリカ、レタス、トマト、ブロッコリー、ハウレンソウの農産物を用いて、リン系、塩素系、ピレスロイド系、カーバメート系農薬等合計約180種を試料中で0.05または0.1ppmとなるように添加し、添加回収実験を行った。一部の組合わせで回収されなかったり妨害を受けて測定できなかった農薬があったが、170以上の農薬で回収率は70~105%の範囲に収まり、RSDは25%以下であった。分析の迅速性は簡便性に左右され、容器の移し替え、使用器具の洗浄、遠心分離、濃縮等の基本的操作を減らしたことにより、かなりの省力化が達成できた。実際に一人で朝から作業を行い、均一化済み試料から12検体分を分析して、午後からは測定を始めることができ、翌日には全てのデータが得られた。律速段階になる工程は濃縮のみで、検体数や測定機器の数によっては、当日に結果を出すことも可能であると思われる。

簡易抽出法による GC/MS/MS を用いた 柑橘類中の防カビ剤の分析

大阪府立公衆衛生研究所

○起橋雅浩、北川陽子、高取 聡、田中之雄

[目的] 防カビ剤は柑橘類等の貯蔵に際して用いられる食品添加物である。これらの分析方法は、酸とアルカリを用いた液-液分配による複雑な抽出と、液体クロマトグラフィーの蛍光検出器と UV 検出器を用いた測定が一般的である。柑橘類は妨害成分が多く検出され、特に UV 検出器で測定する Imazalil は測定が困難になりがちである。JAOAC Int. 86,412-431(2003) に掲載された M. Anastassiades らの論文は、「Quick、Easy、Cheap、Effective、Rugged and Safe (QuEChERS)」と題して簡素な残留農薬分析法を提案しており、細切均一化が済んだ試料であれば 1 人で 6-12 検体を 1 時間以内で処理できる、としている。そこで、今回この QuEChERS 法を防カビ剤の分析に適用し、分析操作の簡易化と GC/MS/MS による測定を試みたので報告する。

[方法] フードプロセッサーで均一化した試料 10g をキャップ付き PP 製 50mL 遠心管にとり、安定同位体の内部標準品を各 10 μ g 加える。その後アセトニトリル 10mL を加えて手で 1 分間激しく振盪抽出する。これに無水硫酸マグネシウム 4g と塩化ナトリウム 1g を加え、フタを閉めて手で激しく振盪する。その後 3000rpm、10 分間遠心し上清 8mL を遠心可能なフタ付き試験管に移す。そこへ無水硫酸マグネシウム 1.2g と PSA 粉末 0.2g を加え、手でよく振盪する。再度 3000rpm、10 分間遠心し、上清を試験液とする。これを GC/MS/MS で測定した。

ガスクロマトグラフ / 質量分析計

Thermo PORALIS Q (イオントラップ型 / EI)

注入口：250°C、イオン源：200°C

カラム：RESTEK Rtx-5ms 30m \times 0.25mm,

0.25 μ m, キャリアガス流量:1.5mL/min (He)

カラム温度:60°C (1 分) -8°C / 分 -280°C (5 分)

	precursor ion(m/z)	monitor ion(m/z)
Diphenyl	154	152
<i>o</i> -Phenylphenol	170	141
Thiabendazole	174	130
Imazalil	215	173
Thiabendazole- ¹³ C ₆	180	136
Imazalil-d ₆	220	173

[結果] 輸入品のオレンジ、レモン、国産のミカンを用いて、Diphenyl、*o*-Phenylphenol、Thiabendazole、Imazalil を試料中で 1ppm となるように添加し、添加回収実験を行った。輸入柑橘類では、元来防カビ剤が含まれている場合が多く、Thiabendazole や Imazalil の添加実験は良い値を得られなかった。これは凍結していた試料を解凍した際に、試料の均一性が失われていた為でないかと推測された。そこで、防カビ剤の使用されていない国産ミカンを用いて添加回収実験 (n=5) を行った結果、安定同位体を内部標準品を使った Thiabendazole と Imazalil の平均回収率はそれぞれ 93、89% となり、RSD は 14、4% であった。また、GC/MS での測定では妨害成分の影響を受け易かったが、GC/MS/MS を用いたことにより良好なクロマトグラムが得られた。今後は Diphenyl と *o*-Phenylphenol の安定同位体を内部標準品に用いて検討する予定である。

GC/MSによる農畜水産物中の残留農薬一斉分析と トリプルデータベース相対定量法の比較

神戸市環境保健研究所 ○上田泰人、伊藤光男、小島信彰、田中敏嗣

西川計測株式会社 山上 仰、中島晋也

横河アナリティカルシステムズ株式会社 瀧川義澄

1. 目的

農薬等のポジティブリスト制への対応が求められており、その一助として、近年 Scan 法による定性定量を目的とした GC/MS 分析解析ソフトが開発されている。トリプルデータベース相対定量法 (NAGINATA、西川計測、TDB 法と略す) は、農薬成分等の保持時間、マススペクトル及び検量線情報がデータベース化され定性定量ができるとされている。今回、同一試料を SIM 法と TDB 法で測定し比較したので報告する。

2. 方法

1) 畜水産物

①対象農薬：TDB 法に登録済み 13 種 (アトラジン、アフラコロール、イブプロフェン、エトキシジフル、クロルピリホスメチル、クロロネブ、クレソキシムメチル、カルボキシチン、クロルフェナピル、ジフルト、ジフェニルアミン、ジフルフェニカン、シマジン) 及び当所で登録した 7 種 (エチオン等)

②試料調製：牛の筋肉、牛の肝臓、サケ、エビ、鶏卵、牛乳に農薬を各 0.1 μg/g 添加し、H16.8 厚生労働省通知「畜水産物中の残留農薬 GC/MS 一斉分析法 (案)」で調製した。

③GC/MS 測定 GC/MS=Agilent5973N

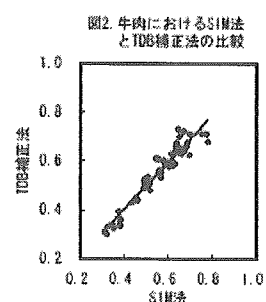
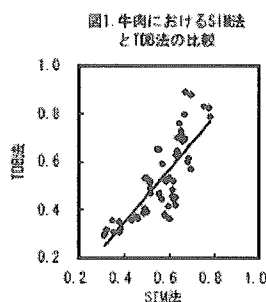
	SIM 法	TDB 法 (内蔵標準法)
カラム	DB-5MS, 0.25mm×30m, 0.25 μm	HP-5MS, 0.25mm×30m, 0.25 μm
カラム温度	50°C (1min) → 25/-125 (0)	70 (2) → 25/-150 (0) → 3/-200 (0)
検出器温度	-10/-300 (26.5)	-8/-280 (10) → 20/-300 (5)

TDB 法では、標準物質を用いなくても相対定量は可能であるが、本検討では標準物質も同時に測定し補正した (TDB 補正法)。

2) 農産物：市場流通品で農薬の検出された農産物を、「農産物中の残留農薬 GC/MS 一斉分析法 (案)」で調製したものを、1) ③と同様に測定した。

3. 結果

1) 畜水産物：牛肉の SIM 法と TDB 法、SIM 法と TDB 補正法の値の相関図を図 1、図 2 に示す。TDB 法は SIM 法より若干低い値を示し、濃度範囲は SIM 法の 0.60~1.33 倍で、相関係数は $R^2=0.63$ であった。TDB 補正法は、濃度範囲が SIM 法の 0.87~1.13 倍、 $R^2=0.92$ と向上した。牛の肝臓、サケ、エビ、鶏卵、牛乳においても TDB 補正法で R^2 が改善された。



2) 農産物：農産物でも畜水産物同様に、SIM 法と TDB 補正法は、数値がよく一致した。

4. まとめ

Scan 法及び GC/MS 分析・解析ソフトウェアを用いた定性能力・定量性について 20 農薬について検証した。本法は定性能力が十分であるとともに、定量性においても標準物質を測定し補正を行えば正確な値が得られることが示唆された。今後農薬、農産物を拡大し、さらに検討をしていきたい。

GC/MS と GC/FPD を用いた

240 農薬の簡易分析法の開発

○起橋雅浩、北川陽子、阿久津和彦、尾花裕孝、田中之雄
大阪府立公衆衛生研究所

はじめに

食品衛生法の一部を改正する法律が公布され、規格、基準の見直しや、監視及び検査体制が強化されることになった。この為、農薬等の残留分析部門では、より多数で広範囲の項目について分析することが求められる。しかし、実際問題として全ての農薬を分析対象としていては、1検体当たりの労力が膨大になり、限られた時間と人員では結果的に検体数をこなすことができない。現実的な対処としては、農薬の使用実態や、残留性、検出報告例等を参考にした項目を選択することが考えられる。そして分析方法を簡素にし、分析労力を減らすことに反比例して、検体数を増やすことができるであろう。今回検討した方法は、分析時間の短縮に主眼を置き、1日で試料を測定できる状態にすることを目標にした。そのため、使い捨てのキャップ付き PP 製 50mL 遠心管を使用してホモジナイズと塩析脱水を行い、一度の遠心分離で抽出液を得ている。昨年の第 27 回農薬残留分析研究会では約 100 種類の農薬について報告したが、さらに 200 種以上の農薬について検討を行ったので報告する。

器具、試薬

抽出用遠心管：Becton Dickinson 製 BLUE MAX 50 mL ポリプロピレンコニカルチューブ

精製カラム：Supelco 製 Supelclean ENVI-Carb/PSA (500 mg / 500 mg)

ホモジナイザー：日立製作所製 HG30 遠心分離機：日立製作所製 Himac SCR 20B

農薬標準品：和光純薬、林純薬、関東化学、Riedel de Haen、Dr. Ehrenstorfer G.m.b.H. より購入した農薬標準品をアセトンで溶解し、1000ppm 液を作成した。各農薬標準液を適宜グループ化して混合し、10～40 数種類入りの 20～100ppm 混合溶液を作成した。

装置

ガスクロマトグラフ：島津 GC-17A (FPD)

注入口：250℃、検出器：250～280℃

カラム：J&W DB-1701 30m × 0.32mm, 0.25um、キャリアガス流量：2.0mL/min (He)

カラム温度：80℃ (2分) -20℃ / 分 -180℃ -4℃ / 分 -260℃ -10℃ / 分 -280℃ (5分)

ガスクロマトグラフ/質量分析計：Thermo PORALIS Q (イオントラップ型/EI)

注入口：250℃、トランスファーライン：280℃、イオン源：200℃

カラム：RESTEK Rtx-5ms 30m × 0.25mm, 0.25um、キャリアガス流量：1.5mL/min (He)

カラム温度：60℃ (1分) -8℃/分 -280℃ (5分)

ガスクロマトグラフ/質量分析計：島津 GCMS-QP2010 (四重極型/NCI)

注入口：250℃、インターフェイス：250℃、イオン源：200℃、反応ガス：メタン

カラム：J&W DB-5 30m × 0.25mm, 0.25um、キャリアガス流量：1.7mL/min (He)

カラム温度：60℃ (1分) -20℃/分 -170℃ -6℃/分 -300℃ (7分)

分析方法

フードプロセッサーで均一化した試料 10g をキャップ付き PP 製 50mL 遠心管にとり、アセトニトリル 20mL、酢酸 0.1mL を加えてホモジナイザーで 1 分間攪拌抽出する。これに無水硫酸マグネシウム 4g と塩化ナトリウム 1g を加え、フタを閉めて手で激しく振盪する。その後 3000rpm、10 分間遠心し上清を抽出液とする。抽出液 16mL を 0.5% 酢酸を含むアセトニトリル/トルエン (3:1) 30mL でコンディショニングしたグラファイトカーボン/PSA 二層式固相抽出カラム (500mg/500mg) に負荷し、さらにアセトニトリル/トルエン (3:1) 50mL で溶出させる。溶出液を 40℃以下で減圧濃縮後 10% アセトン/n-ヘキサン 8mL に溶解し、試験液とする。試料と試験液の関係は最終的に 1g/mL 相当となる。(分析工程図解参照) 測定はリン系農薬用に GC-FPD、塩素系、ピレスロイド系農薬用に負化学イオン化法 GC-MS、それ以外の農薬用にイオントラップ型 GC-MS を用いて測定した。

添加回収実験

キャップ付き PP 製遠心管に入れた試料 10g に、リン系、塩素系、ピレスロイド系、カーバメート系農薬等を、0.05、0.1、0.2ppm となるように添加し、30 分以上放置してから分析を開始した。定量にはブランク抽出液で希釈した標準品を用いた。

結果及び考察

リンゴ、バナナ、グレープフルーツ、オレンジ、パプリカ、レタス、トマト、ブロッコリー、ハウレンソウ、ナスの農産物を用いて、リン系、塩素系、ピレスロイド系、カーバメート系農薬等合計約 260 種の添加回収実験を行った。今回、検疫所の平成 17 年度輸入食品等モニタリング計画に挙げられた農薬の適否を調査すべく、Chlordane 以外の 199 農

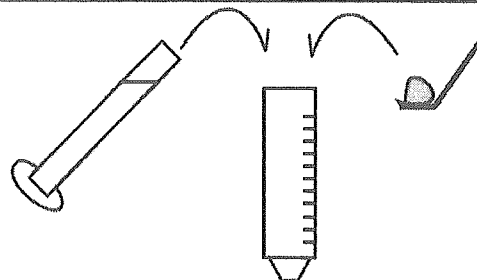
分析工程図解

Step 1

検体をフードプロセッサーで均一化

Step 2

均一化した試料10gをPP製遠心管へ採取し、
酢酸0.1mLとアセトニトリル20mLを加える。



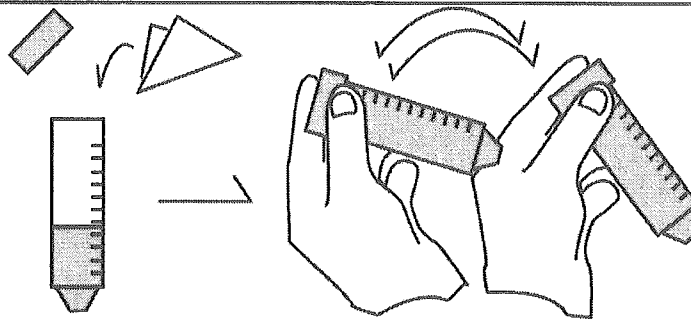
Step 3

ホモジナイザーで約1分間攪拌抽出を行う。



Step 4

塩化ナトリウム1gと
硫酸マグネシウム4gを加え、
素早くフタをして
約1分間激しく振盪する。



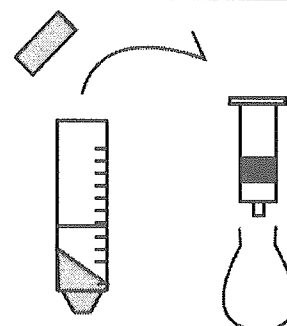
Step 5

3000rpmで10分間遠心分離を行う。

Step 6

アセトニトリル層16mLをENVI-Carb/PSAに負荷し、
50mLアセトニトリル/トルエン (3:1) で溶出する。

#ENVI-Carb/PSAはあらかじめ
アセトニトリル/トルエン/酢酸 (150:50:1) 30mLで
コンディショニングしておく。

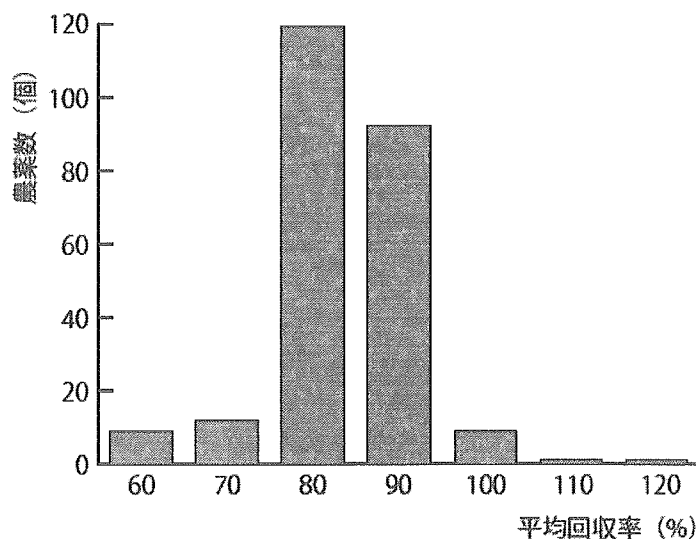


Step 7

溶出液をエバポレーターで濃縮し、アセトン/n-ヘキサン (1:9) で8mLに定容する。

薬も測定項目に加えた。一部の農薬はGC/MS (EI) での感度が低いか、あるいはピークを確認できない為、測定できなかった。また、Chinomethionate、Clodinafop propargyl、Flumiclorac pentyl、Pyraflufen ethyl は回収率が50%未満になり、この分析方法には適さないと考えられた。これら以外でも、一部の試料と農薬の組み合わせで回収されなかったり、妨害を受けて測定できなかった事例があったが、今回測定可能であった243農薬の95%で回収率は70～120%の範囲に収まり、またRSDが25%以上になった農薬も5%程度であった。各農薬毎の平均回収率の分布を図に示したが、60、120%台を示したものは一部の分解し易い有機リン系農薬や本来GC分析に不向きなカーバメート系農薬等であった。(測定農薬一覧参照) 検疫所のモニタリング計画の測定対象のうち、182農薬は測定可能であった。

分析の迅速性は簡便性に左右され、容器の移し替え、使用器具の洗浄、遠心分離、濃縮等の基本的操作を減らしたことにより、かなりの省力化が達成できた。キャップ付きPP製50mL遠心管を使うことにより、ホモジナイズ、塩析脱水、遠心分離を短時間で行うことができる。実際に一人で朝から作業を行い、均一化済み試料から12検体分を分析して、午後からは測定を始めることができ、翌日には全てのデータが得られた。ただし、100を超える数の農薬のGC/MSでの定量解析は容易ではなく、GC/FPDのようなチャート紙1枚で確認できる手段は非常に有用であると感じられた。分析作業全体では、律速段階になる工程は精製と濃縮のみで、検体数や測定機器の数によっては、当日に結果を出すことも可能であると思われる。今後はGC/MS/NCIでの測定対象農薬を増やし、EIで測定困難であった農薬を追補検討していく予定である。



243農薬の平均回収率分布図

測定農薬一覧

四重極型GC/MSによるNCIで測定

28農薬

α -BHC
 β -BHC
 γ -BHC
 δ -BHC
pp'-DDE
pp'-DDD
op'-DDT
pp'-DDT
 Aldrin
 Dieldrin
 Endrin
 Captafol
 Captan
 Chlorobenzilate
 Chlorothalonil
 Dicofol
 Heptachlor
 Heptachlor-epoxide
 Procymidone
 Cyfluthrin
 Cyhalothrin
 Cypermethrin
 Deltamethrin
 Fenvalerate
 Flucythrinate
 Fluralinate
 Permethrin
 Tefluthrin

GC/FPDで測定

66農薬

Acephate
 Anilofos
 Azinphos methyl
 Bromophos
 Butamifos
 Cadusafos
 Chlorfenvinphos
 Chlorpyrifos
 Chlorpyrifos methyl
 Cyanofenphos
 Cyanophos
 Diazinon
 Dichlofenthion
 Dichlorvos
 Dimethoate
 Dimethylvinphos
 Dioxabenzofos
 Disulfoton
 Edifenphos
 EPN
 Ethion
 Ethionophos
 Etrifos
 Fenamifos
 Fenchlorphos
 Fenitrothion
 Fensulfothion
 Fenthion
 Formothion
 Fosthiazate
 Iprobenfos
 Isazophos
 Isofenphos
 Isoxathion
 Malathion
 Methacrifos
 Methamidophos
 Methidathion
 Mevinphos
 Monocrotophos
 Naled
 Omethoate
 Parathion
 Parathion methyl
 Phenthoate
 Phorate
 Phosalone
 Phosmet
 Phosphamidon
 Piperophos
 Pirimiphos ethyl
 Pirimiphos methyl
 Profenofos
 Propaphos
 Prothiofos
 Pyraclofos
 Pyrazophos
 Pyridaphenthion
 Quinalphos
 Sulprofos
 Terbufos
 Tetrachlorvinphos
 Thiometon
 Tolclofos methyl
 Triazophos
 Tribuphos

イオンラップ型GC/MSによるEIで測定

149農薬

Acetochlor	Ethofumesate	Oxadixyl
Acrinathrin	Etobenzanid	Oxyfluorfen
Alachlor	Etoxazole	Pacrobutrazol
Allidochlor	Fenarimol	Penconazole
Ametryn	Fenobucarb	Pencycuron
Atrazine	Fenothiocarb	Pendimethalin
Azoxystrobin	Fenoxanil	Phenothrin
Benalaxyl	Fenoxycarb	Picolinafen
Bendiocarb	Fenpropathrin	Pirimicarb
Benfluralin	Fenpropimorf	Pretilachlor
Benfuresate	Fipronil	Probenazole
Benoxacor	Flamprop methyl	Promecarb
Bifenthrin	Fluacrypyrim	Prometryn
Bitertanol	Fludioxonil	Propachlor
Bromacil	Flufenoxuron	Propanil
Bromobutide	Fluquinconazole	Propargite
Bupirimate	Flusilazole	Propham
Buprofezin	Flutolanil	Propiconazole
Butachlor	Flutriafol	Propoxur
Butafenacil	Fthalide	Propyzamide
Carbaryl	Furametpyr	Pyributicarb
Carbofuran	Furathiocarb	Pyrifenoxy
Carfentrazone ethyl	Furilazole	Pyrimethanil
Chlorfenapyr	Hexaconazole	Pyrimidifen
Chlorpropham	Hexazinone	Pyriminobac methyl
Chlorthal-dimethyl	Hexythiazox	Pyriproxyfen
Clomazone	Indoxacarb-MP	Quinoxifen
Clomeprop	Iprodione	Quintozene
Cloquintocet-1-methylhexyl ester	Iprovalicarb	Simazine
Cyanazine	Isoprocarb	Simeconazole
Cyflufenamid	Isoprothiolane	Simetryn
Cyhalofop-butyl	Kresoxim methyl	Tebuconazole
Cyproconazole	Lactofen	Tebufenpyrad
Cyprodinil	Lenacil	Tecnazene
Diclobutrazol	Mefenacet	Terbacil
Diclofop methyl	Mepronil	Terbutryn
Dicloran	Metalaxyl	Tetraconazole
Diethofencarb	Methiocarb	Thenylchlor
Difenoconazole	Methoxychlor	Thiazopyr
Diflufenican	Metolachlor	Thifluzamide
Dimethametryn	Metolcarb	Thiobencarb
Dimethenamid	Metominostrobin	Triadimefon
Diofenolan	Metribuzin	Tri-allat
Diphenamid	Molinate	Trifloxystrobin
Diphenylamine	Myclobutanil	Triflumizole
Dithiopyr	Napropamide	Trifluralin
Endosulfan	Nitrothal isopropyl	Uniconazole P
Esprocarb	Norflurazon	Vinclozolin
Ethalfuralin	Oxadiazon	XMC
Ethiofencarb		Xylylcarb

243農薬の平均回収率 88%
 平均標準偏差 10%
 n=5~55、添加濃度0.05~0.2 μ g/g

選択的 GPC および CC 精製を用いた農作物中スピノサドの分析

愛知県衛生研究所

○上野英二、大島晴美、松本 浩

【はじめに】

我々は、これまで 10 年以上にわたって数多くの農薬を対象に残留モニタリングを実施し、農薬の検出頻度や農作物への使用量の推移などを考慮した上で残留実態に即した農薬を選抜し、効率的なアセトニトリル抽出、ゲル浸透クロマトグラフィー (gel permeation chromatography, GPC) およびカラムクロマトグラフィー (column chromatography, CC) 精製、デュアルカラム-デュアル選択検出器付き GC、GC/MS および LC/MS 測定などを組み合わせた実用的な多成分分析法を開発してきている。

昨年度、我々は LC/MS を用いた多成分分析において市販のキャベツなどからスピノサドを検出した。スピノサドは、土壌放線菌サッカロポリス・ポラスピノサが産生する天然の殺虫活性成分を有し、作用機作がクロロニコチニル系を始めとした他の殺虫剤とは異なっている。また、毒性も低く、環境に対して負荷の少ない農薬として使用されている。分析対象成分は、高い殺虫活性を有するスピノシン A および D (Fig. 1) であるが、合成農薬に比べて大きな分子であり、分子の大きさの順に溶出される GPC では油脂やクロロフィルなどの色素と同様に早く溶出するため、通常の農薬画分 (フルバリネート (m.w. 502) の溶出開始～チアベンダゾール (m.w. 201) の溶出終了) では、その 40% 程度しか分取できない。そこで、環境省より示されている作物残留試験法に準じて、アセトニトリル-水で抽出し、酢酸エチル転溶、シクロヘキシルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH-CC)、次いでシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Silica gel-CC) により精製後、フォトダイオードアレイ検出器 (DAD) 付き HPLC により定量を試みたところ、農作物によってはクロマトグラム上に妨害ピークが出現したり、色素の多い葉菜類では定量値が予想された値を大きく下回るなどの問題が見られた。また、操作も煩雑なことから、限られた労力と機器の中にあつてスピノサドの残留モニタリングは容易ではないと考えられた。

そこで今回、本県においてスピノサドの使用についての経過措置を延長されているオオバ (青ジソの葉) を含めて代表的な適用作物を対象に、多成分分析で得られた試料粗抽出液を用いて、自動式 GPC によりスピノシン A および D を選択的に分取精製すると同時に CC 精製後、HPLC-DAD/MS で測定する分析法について検討したところ、有用性が確認されたので報告する。

【方法】

試験溶液の調製: Fig. 2 に準じて調製した。GPC装置は島津GPCクリーンアップシステムに Shodex の分離カラム CLNpak EV-2000 (20 mm.i.d. × 300 mm) およびガードカラム CLNpak EV-G (20 mm.i.d. × 100 mm) を装着し、移動相としてアセトン-シクロヘキサン (3:7)、流速 5 mL/min を用いた。グラファイトカーボン-CHカラムは、Fig. 3 に示したように用事作製し、フラクションコレクターに装

着して用いた。

HPLC-DAD/MS測定: 島津製のLC-VP高圧グラジエントシステム、オートサンブラSIL-HTA、フォトダイオードアレイ紫外可視検出器SPD-M10AVP、高速液体クロマトグラフ質量分析計LCMS-2010A、カラム:資生堂CAPCELL PAK C18 MG II (100mm×2mmid, 3µm)および同ガードカラム(10mm×2mm id, 3µm)、移動相:10mM酢酸アンモニウム-アセトニトリル(25:75)2液混合、流量:0.25mL/min、カラム温度:40°C、注入量:10µL、DAD測定波長:245nm、MSインターフェイス:ESI(Positive, 4.5kV)、MSスキャン範囲および速度:100-850m/z(1000amu/sec)

【結果および考察】

HPLC-DAD/MS条件: DAD付きLC/MSを用い、移動相は多成分分析と同様に10mM酢酸アンモニウムとアセトニトリルの2液混合とした。分離カラムは酢酸アンモニウムを用いた中性条件下で低極性を示すスピノシンAおよびDの保持に優れるものを用いた。溶出条件は、類似したスピノシンAおよびDを十分に分離でき、ベースライン変動の少ないアイソクラティック条件を採用した。なお、DADは定量に、高い定性能力を有するが定量性にやや難のあるMSは確認に用いた。Fig. 4に標準溶液のクロマトグラムおよびマススペクトルを示した。

抽出法: Fig. 5 に示した円筒形分液ロートを用いた吸引ろ過装置を考案した。試料からのホモジナイズ抽出液をろ過、塩析および水層分離後、アセトニトリル層の一定量を分取することができることから、吸引鐘などを用いる従来法に比べて多数の試料における操作性が向上して抽出時間の大幅な短縮が可能となった。Table 1 に水-アセトニトリル(1:4)100mLにスピノシンAおよびDを添加し、塩析およびアセトニトリル層の分取操作での回収率を示した。スピノシンAおよびD共に90%以上の良好な回収率が得られた。

GPCおよびCC精製法: 作物残留試験法を残留モニタリングに適用する場合の問題点として、(1)選択性に劣る波長250nmを用いた測定に対して精製が十分でない。(2)煩雑な精製操作の間にスピノシンAおよびDが徐々に光分解する。(3)ガラス器具類への吸着性がやや強く、水の含んだ溶媒使用時に損失する。(4)活性にばらつきのある市販シリカゲルミニカラムを使用する。特に、(5)油脂やクロロフィルおよびカロテノイド色素を多量に含有する農作物では、CH-CCによる精製操作においてスピノシンAおよびDがアセトニトリル、次いでアセトン洗浄時に溶出することが判明した。

我々は、油脂など高分子の食品成分を効果的に除去し、また、各種CCにおける過負荷を防ぎ、その性能を最大限に発揮させるために、GPCを基本とした試料精製法を検討してきている。特に、成分がほぼ分子の大きさの順に分離溶出されるGPCは、特定の農薬成分のみを選択的に分取精製する個別分析において性能を最も発揮すると考えられた。また、GPC移動相にアセトン→クロロヘキサン(3:7)を用いることによって、GPCから溶出してきたスピノシンAおよびDがコンディショニングを行うことなくCH固相に強く吸着することを見出した。しかし、Table 1に示したようにスピノシンAおよびDのGPC溶出画分にはクロロフィルおよびカロテノイド色素の多くが混入し、これらを多量に含有するオオバなどでは、作物残留試験法の場合と同様にCH固相の吸着力が大きく

低下することが予想された。そこで、CH 固相上にグラファイトカーボンを積層して色素を保持させることとした。スピノシン A および D を添加したオオバの粗抽出液(試料 5g 相当)を GPC に注入し、その溶出画分(45~65mL)を CH 固相 1000mg 上にグラファイトカーボン 0~500mg を積層したカラムに直接負荷したのち、GPC 移動相 10mL で洗浄、アセトニトリル-トリエチルアミン(98:2) 5mL で溶出した。その結果、Table 2 に示したようにスピノシン A および D は、グラファイトカーボンを積層しないとクロロフィルおよびカロテノイド色素と共に洗浄液中に溶出してしまうが、グラファイトカーボンを 300mg 以上積層すると保持され、溶出液中にはほぼ全量が回収された。そこで、色素を余裕をもって保持できるグラファイトカーボンの量として 500mg を充填することにした。Fig. 3 に示したように CH 固相とグラファイトカーボンを積層したガラスリザーバーに、自然流下で 1.5mL/min 程度となるように適当な長さとしたチューブを付けて GPC 装置のコレクター部に装着した。これにより遮光下で、カラム洗浄までの精製操作を自動化した。なお、カラム溶出以降は照明を暗くし、褐色のガラス器具を使用することにした。その結果、Table 1 に示したように選択的 GPC および CC 精製により油脂や色素を除去しながら、95%以上の良好な回収率が得られた。

作物残留試験法では、CH-CC に次いで Silica gel-CC により精製を行うこととしている。しかし、活性にばらつきのある市販ミニカラムを用いるために、スピノシン A および D の吸着、洗浄および溶出の条件設定が煩雑で相当の時間を要する。その上、効果も高くないことから Silica gel-CC による精製は省くこととした。

水の割合を多くするとガラスへの吸着と考えられるスピノシン A および D の損失が認められたため、アセトニトリル-水(6:4)により試験溶液を調製した。本精製法により得られた試料を溶解したところ、検討したすべての農作物で不溶物は全く認められなかった。また、デュラポア(PVDF)を始めとした多くのメンブレンフィルターでスピノシン A および D の吸着が認められたことから試料ろ過は省くこととした。

添加回収実験: 色素など妨害成分の多いオオバ、スピノサドが使用される代表的な農作物としてキャベツ、イチゴおよびイチジクのブランク試料に、試料中濃度として 0.05 および 0.25 $\mu\text{g/g}$ になるようにスピノシン A および D を添加後、30 分放置したものについて回収率を求め、その結果を Table 3 に示した。0.25 $\mu\text{g/g}$ 添加ではスピノシン A および D 共に 90%以上、添加回収率の相対標準偏差は 5%未満、0.05 $\mu\text{g/g}$ 添加でもそれぞれ 80%以上、10%未満と良好であった。本法および作物残留試験法に準じて調製したオオバの試験溶液より得られた DAD クロマトグラムを Fig. 6 に示した。また、スピノシン A および D を添加したオオバのブランク試験溶液のクロマトグラムから S/N が 3 を示す農薬量を求め、これを試料中の濃度に換算した検出限界値は、スピノシン A および D 共に DAD で 0.005 $\mu\text{g/g}$ 、MS で 0.001 $\mu\text{g/g}$ であり、食品衛生法で要求される検出限界値を十分にクリアした(Table 4)。

市販農作物への適用: 本法を用いて、代表的な 25 種類の適用作物を対象に残留モニタリングを実施し、その結果を Table 4 に示した。51 検体中キャベツ 2 検体およびイチジク 1 検体からスピノサドが食品衛生法の基準値を大きく下回る濃度で検出された。代表例としてスピノサドが

0.02 μ g/g検出されたキャベツのクロマトグラムおよびマススペクトルをFig. 7 に示したように、検討したすべての農作物でスピノシンAおよびDの溶出位置付近に妨害となるようなピークは認められなかった。以上のことから、本法がスピノサドの残留モニタリングに適用可能な簡便かつ定量性に優れた分析法であることが確認された。

農薬ポジティブリストの情報分析

○村田 弘、住本建夫、田中之雄 (大阪府立公衆衛生研究所)

1 はじめに

平成15年5月の食品衛生法の改正により、いよいよ平成18年5月をもって「ポジティブリスト制」がスタートする。この改正に伴い、対象となる(分析する)農薬数は246から515に倍増するが、検査側の人員等はこれに伴って急増することは困難と思われる。現状としてはこれらの分析法等も含め、いかに効率的な対策を講ずるかが急務となっている。このような背景から農薬ポジティブリスト情報の構築、共有及び有効活用を行うことは、不可欠であると考え、情報面からのアプローチを検討したので報告する。

2 方法

農薬PLのデータベースの構築

農薬数約600種(農薬の残留基準設定数(最終案)+ α)について、最新かつ高い信頼性のある文献やWEB情報から農薬ポジティブリスト(以下、農薬PLとする)のデータ収集、農薬標準品からの情報の登録および複数の質量分析計(以下、MSとする)による測定データ等から約100項目を目途に収載中である。主な項目は農薬名、厚労省番号、CAS登録番号、分子式、分子量、物性値(溶解度、Log Pow等)、GC情報(保持時間)、MS情報(スペクトル等)、ADI、毒性データ、生産量、規制等をExcelに蓄積している。(現在データ充足率32%)

3 結果および考察

農薬PL情報の構築、活用等の概要を図1に示した。

3-1 標準品管理情報

標準品情報、成績証明書情報、納入履歴、使用履歴、有効期限および危険物情報のデータ管理やトレーサビリティを厚労省番号にも対応できるようにしてカルテ型データベースのFile Makerに登録(図2)、さらにExcelに蓄積している農薬PLのデータベースへエクスポートした。

3-2 MSデータ情報

EIおよびCI-NEGのGC/MS、GC/MS/MSおよびLC/MS/MSから得られたMSデータ及びスペクトルデータ集のMSデータ情報を農薬PLのデータベースに収録しており、その中からCI-NEGのGC/MS、GC/MS/MSのデータを用いて、市販の野菜ジュースにフェンパレレート0.01ppm添加した試料でSCAN(MC)法、SIM法、MS/MS法の3種類の測定を行った(図3)。その結果、SCANよりSIM、SIMよりMS/MSがフェンパレレートを感度・正確度も良好に定量できた。

3-3 ビジュアルデータマイニング

農薬PL情報のデータ間での意味のある情報を探索することを目的としたビジュアルデータマイニング(視覚化データ処理技術)を行った結果、Log Pow(生物への蓄積性の指標)とLC/MS/MSのRT(保持時間)との間に関連性が認められた(図4)。

3-4 農薬プライオリティリスト

図5は、LC/MS/MSのクロマト上にlog Powの大きさを示したもので、生物への蓄積性の高い農薬がクロマトの後半部分に出現した。それらの農薬のGC/MS/MSとLC/MS/MSが同感度であればLC/MS/MSで測定することで農薬監視の重要度・優先性の評価を行う場合に有効であると考えられた。また物性情報、毒性情報、使用量情報等とのスコア化をすることで農薬プライオリティリストを示すことが可能になると思われる。

3-5 GCMS情報データベースによるスクリーニング

GC情報及びMS情報から標準品が無くても農薬の存在可能性をスクリーニングすることが出来る多成分一斉検索法を検討した。(図6)

3-6 農作物中の残留農薬検査情報

各年度に実施された行政検査における農作物中の残留農薬検査結果をデータベースに取りまとめている。他機関からのそれらの情報も文献やWEBから併せて集計して検出率の高い農薬を把握するようにしている。

3-7 農薬PLに関するknowledge management(知識管理)

一斉分析法、GC-MSのベンダー、マトリックス等から得られた経験や教訓を蓄積・共有・利用やknow how、know whoを特定できる仕組みを作るための情報の構築を行っている。

4 まとめ

農薬PLの情報面での取り組みを「ポジティブリスト制」がスタートすることもあり始めた。データ充足率が少ないレベルでの情報分析ではあるが、より効率的、実用的な農薬PLの対策を講ずる手がかりになると期待できる。今後、更に定量性を含めデータを充実させていく必要があるが、個人一機関だけでは限界があり、共同研究や交流の場を通じて「農薬PLに関するあらゆる情報提供のアピール(呼びかけ)」を行うものである。今後、地方衛生研究所において農薬PL情報の構築、共有化はますます重要になり、このようなシステムを機能させていく必要があると考える。