

セット, GM トウモロコシ系統別 DNA M810-2 オリゴヌクレオチドセット, GM トウモロコシ系統別 DNA GA21-3 オリゴヌクレオチドセット, GM トウモロコシプラスミドセット-CoIE1/TE (オリゴヌクレオチドおよびプラスミドはすべて(株)ニッポンジーン社製)を用いた。水は(株)ニッポンジーン社製造遺伝子工学用を用いた。他の試薬はすべて市販の特級品を用いた。

### 3. 機器

均一性試験, DNA 抽出法の検討など著者らが実施した試験に使用した機器は以下のとおり。高速遠心式粉砕・混合機: ZM 100 (Retch 社製), 恒温槽: ドライサーモユニット DTU-1B (タイテック社製), 冷却遠心機: Avanti HP25 (Beckman 社製), 桌上遠心機: KR-1000 (フナコシ社製), タッチミキサー: MT-51 (ヤマト社製), 分光光度計: ND-1000 (NanoDrop Technologies 社製), 定量 PCR 機器: 安定性試験には ABI PRISM<sup>®</sup> 7000 (ABI 社製), その他の試験には ABI PRISM<sup>®</sup> 7700 (ABI 社製)。

### 4. DNA 抽出法

#### (1) 均一性試験および安定性試験

均一性試験および安定性試験においては, 実施時に最新であった食安発第 1113001 号 2.2.1.2 項に記載のシリカゲル膜タイプキット法 (通知 mini 法) を用いて DNA を抽出した。

#### (2) 通知 mini 法の改良

通知 mini 法に操作の簡便化と結果の安定性向上を目的に改良を加え, 「改良 mini 法」とした。通知 mini 法においては, DNA をカラムから溶出する際には蒸留水 (Distilled water: DW) を用い, その後, イソプロパノール沈殿操作によって DNA を濃縮し, さらに TE 緩衝液に再溶解する。一方, 改良 mini 法においては, カラムからの DNA 溶出に TE 緩衝液を用いるため, イソプロパノール沈殿操作以降の操作を必要としない。改良 mini 法の改良点に該当する操作の内容は以下のとおりである。「Mini spin column をキットの遠沈管に移し, あらかじめ 65°C に温めておいた TE 緩衝液 70  $\mu$ L を加え 5 分間静置した後, 10,000 $\times g$  以上の条件で 1 分間遠心し DNA を溶出した。再度 TE 緩衝液添加以後の操作を繰り返し行い, 得られた溶出液を合わせ, DNA 試料原液とした。」

#### (3) 共同試験

共同試験においては, 食安発第 1113001 号に記載された 3 種の DNA 抽出法 (シリカベースレジソタイプキット法, CTAB 法, シリカゲル膜タイプキット法) を採用可能であったが, 共同試験にあたり送付したマニュアルには, シリカゲル膜タイプキット法としては改良 mini 法のみを記載し, 同法を採用する場合には改良 mini 法に従うものと規定した。

### 5. 定量 PCR 法

食安発第 1113001 号に記載の条件を遵守した。なお, 本稿において Mon810 系統特異的定量法 (Mon810 定量

法), GA21 系統特異的定量法 (GA21 定量法) および CaM 定量法とは, GM トウモロコシに含まれる各 DNA 配列を特異的に測定するための M810-2 オリゴヌクレオチドセット, GA21-3 オリゴヌクレオチドセット, P35S-1 オリゴヌクレオチドセットのそれぞれと, トウモロコシの内在性遺伝子 (Starch synthase IIb をコードする遺伝子: SSIIb) を測定するための SSIIb-3 オリゴヌクレオチドセット, および共通のキャリブレーションスタンダードとなる GM トウモロコシプラスミドセットを組み合わせて用いる定量 PCR 法を意味する。

### 6. 均一性試験

M810L および M810H のそれぞれに対し, 50 本の小分け試料の 12% に相当する 6 本の小分け試料を使用して, 均一性確認試験を実施した。各小分け試料から 2 g のトウモロコシ検体をひょう量分取し, 前述の「通知 mini 法」に従い DNA を抽出した。20 ng/ $\mu$ L の濃度に調整した抽出 DNA を定量 PCR 法における DNA 試料液とし, 分析を行った。CaM および Mon810 定量法の両法を用い, また, 2 回の繰返し測定を行うことで GM トウモロコシ (特定しない) 混入率 (CaM 混入率) ならびに Mon810 混入率を算出した。得られた混入率は一元配置の分散分析により解析した。なお, 共同試験の試験スキームにおいては GA21 定量法を用いた試験も行うこととしたが, これを用いて試験した結果, 検量線の最低濃度により理論的に規定される絶対的定量下限値 (absolute limit of quantification: <sup>95</sup>LOQ<sub>method</sub>) 以下のシグナルが検出されたのみであったため, 解析を行わなかった。なお, 検討に使用した ABI PRISM 7700 の場合, <sup>95</sup>LOQ<sub>method</sub> は 20 コピーである。

### 7. 安定性試験

試料送付直前, M810L および M810H の各小分け試料 4 本から 2 g のトウモロコシ検体を秤量分取し, 前述の「通知 mini 法」に従い DNA を抽出した後, 定量 PCR 法による分析を行い, CaM ならびに Mon810 混入率を算出した。また, 上記試験に用いた小分け試料 4 本を -20°C で共同試験期間として設定した約 1 か月間保存した後にも同様の方法にて試験を行い, 混入率を算出した。保存前後で得られた混入率について Student t 検定により解析した。

### 8. 参加機関における試験スキーム

共同試験における試験スキームは, 食安発第 1113001 号 3.2.1 項に記載された「安全性審査済み GM トウモロコシを対象とした定量 PCR」をもとに作成した。以下, 試験スキームを示す。「スターリング試験として, M810L ならびに M810H から 3 点の検体をひょう量し, DNA を抽出する。抽出された 3 点の DNA 試料液に対し, CaM ならびに GA21 定量法を用いた試験を行い, それぞれ算出される混入率の合算値を求める。その結果, GM トウモロコシ (系統は区別せず) の混入率が 4.5% を超えた試料に関しては, 系統特異的定量試験として新たに

6点の検体からDNAを抽出し(スクリーニング試験と合わせて計9点の検体)、Mon810ならびにGA21定量法を用いた試験を実施する。4.6%を超えた試料におけるGMトウモロコシ混入率は、Mon810ならびにGA21混入率の合算値とする。また、本試験スキームを試験マニュアル中に明記した。

### 9. 試験の実施

均一性の確認されたM810LならびにM810Hの小分け試料各1本をドライアイスとともに包装後、参加各機関に送付し、到着後は $-20^{\circ}\text{C}$ で保存するよう指示した。検体送付時には、諸注意事項を含む実施要領、食安発第1113001号に準じて作成した試験マニュアル、調査項目ならびに試験結果についての報告方法を規定した各種報告様式を送付した。

調査項目としては、GM食品検査全般についての経験年数、GM食品各検査の品目、分析法別検査実績、検査実施環境および実験機器、器具共有の有無、各種機器のメーカー、採用したDNA抽出法、使用試薬のロットを取り上げ、検査全般にわたって詳細な調査が行えるよう配慮した。試験結果については、抽出されたDNAの吸光度(230, 260, 280ならびに320 nm)と収量、各種定量法を用いて作成される検量線の精度、標的DNA配列の測定値(コピー数)およびそれらを元に算出されるGMトウモロコシ混入率を報告するものとした。これら試験方法の作成に当たってはThompsonらによる報告<sup>26)</sup>ならびにAssociation of Official Analytical Chemists (AOAC) Internationalのマニュアル<sup>27)</sup>を参考にした。共同試験の実験期間は平成15年2月1日から3月5日までとした。

### 10. 試験結果の回収ならびに解析

返送された試験結果のうち、CaMおよびMon810混入率について、統計解析ソフトウェアJUSE-QCAS(株)日本科学技術研修所)を用いて統計処理を行い、各種統計量、Zスコアの算出、Xbar-R管理図の作成を行った。なお、Zスコアの算出においては各機関の平均値(Xbar)の平均を使用し、またXbarの管理限界は総平均 $\pm 2$  S.D.とした(Zスコアの絶対値2に相当)。統計解析の詳細については大隅の報告<sup>2)</sup>を参照した。また、参加各機関はABI PRISM<sup>TM</sup> 5700, 7700, 7000, 7900HT96および384 well (いずれもABI社製)、Roche LightCycler System

(LC; ロシ社製)のいずれかの定量PCR機器を用いて測定を行ったが、統計処理の結果から、使用した機種依存的に混入率に差が生じた可能性が考えられた。他機種との差が大きな測定値を報告した機種がLCであったことから、これを使用した機関から報告された混入率を除外し、ABI社製定量PCR機器を使用した機関から報告された混入率のみについて、別途同様の統計処理を行った。統計解析の結果、管理限界を超える混入率が認められた場合には、その原因について考察した。その際には、分析値に加え、調査項目に対する返答を参考にした。

## 結 果

### 1. 均一性ならびに安定性試験

M810LおよびM810Hの均一性について検討するため、各試料につき6本の小分け試料を対象に、CaMならびにMon810定量法の2定量法を用い、それぞれ2回の繰返し測定を行った。各小分け試料から得られた測定値に基づき算出された混入率の平均値(各試料におけるCaMならびにMon810混入率)は、以下のとおりである。M810Lを対象とした場合、CaM混入率: 0.35%, Mon810混入率: 0.35%, Mon810Hを対象とした場合、CaM混入率: 5.68%, Mon810混入率: 5.45% (Table 1)。また、各小分け試料から得られたCaMおよびM810混入率をロジット変換した後、それぞれを一元配置の分散分析により解析した結果、いずれの試料に対しても、混入率のF比は有意水準( $p=0.05$ )を下回った (Table 2)。

共同試験期間として設定した1か月間、規定した $-20^{\circ}\text{C}$ の条件で保存した場合の試料の安定性について検討した。上記条件下で保存する直前(共同試験開始直前)と、約1か月間保存した後(試験終了直後)に、各小分け試料4本を対象にCaMならびにMon810定量法を用いて分析を行った。保存の前後に得られた混入率について、Student t検定により解析した結果、試料、定量法の違いによらず有意水準( $p=0.05$ )での有意な差は認められなかった (Table 3)。

### 2. DNA抽出法の改良

共同試験に先立ち、操作の簡便化と結果の安定性向上を目的に、食安1113001号記載のシリカゲル膜タイプキット法(通知mini法)の改良法(改良mini法)について

Table 1. Results of Homogeneity Study

| Method | Sample | Number of measurements | Run 1           |            | Run 2           |            | Total           |            |
|--------|--------|------------------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|
|        |        |                        | Amount (%)      | R.S.D. (%) | Amount (%)      | R.S.D. (%) | Amount (%)      | R.S.D. (%) |
| CaM    | M810L  | 6                      | 0.38 $\pm$ 0.05 | 13.2       | 0.33 $\pm$ 0.05 | 15.2       | 0.35 $\pm$ 0.06 | 17.1       |
|        | M810H  | 6                      | 6.11 $\pm$ 0.49 | 8.0        | 5.26 $\pm$ 0.34 | 6.5        | 5.68 $\pm$ 0.60 | 12.0       |
| Mon810 | M810L  | 6                      | 0.38 $\pm$ 0.04 | 10.5       | 0.32 $\pm$ 0.07 | 21.9       | 0.33 $\pm$ 0.05 | 14.3       |
|        | M810H  | 6                      | 5.02 $\pm$ 0.47 | 9.4        | 5.87 $\pm$ 0.37 | 6.3        | 5.45 $\pm$ 0.60 | 11.0       |

Data represent means  $\pm$  S.D.

Table 2. Results of One-way Analysis of Variance on Homogeneity Study

| Method | Sample | Source of variation | df | Sum of squares | Mean square | F      | Critical value of F (p=0.05) |
|--------|--------|---------------------|----|----------------|-------------|--------|------------------------------|
| CaM    | M810L  | Between samples     | 5  | 0.032          | 0.0064      | 1.9637 | 4.3874                       |
|        |        | Analytical          | 6  | 0.020          | 0.0033      |        |                              |
|        | M810H  | Between samples     | 5  | 0.044          | 0.0088      | 3.6200 | 4.3874                       |
|        |        | Analytical          | 6  | 0.015          | 0.0024      |        |                              |
| Mon810 | M810L  | Between samples     | 5  | 0.038          | 0.0076      | 1.4462 | 4.3874                       |
|        |        | Analytical          | 6  | 0.032          | 0.0053      |        |                              |
|        | M810H  | Between samples     | 5  | 0.025          | 0.0051      | 1.7766 | 4.3874                       |
|        |        | Analytical          | 6  | 0.017          | 0.0028      |        |                              |

Table 3. Results of Stability Study

| Method | Number of measurements | Sample | Amount (%) |           | Recovery (%) |
|--------|------------------------|--------|------------|-----------|--------------|
|        |                        |        | Before     | After     |              |
| CaM    | 4                      | M810L  | 0.42±0.02  | 0.43±0.05 | 102.38       |
|        | 4                      | M810H  | 5.66±0.16  | 5.39±0.19 | 95.23        |
| Mon810 | 4                      | M810L  | 0.35±0.03  | 0.26±0.04 | 74.29        |
|        | 4                      | M810H  | 4.67±0.32  | 4.68±0.19 | 100.21       |

Data represent means ± S.D.

Table 4. Quality and Yield of DNA Extracted from the Samples with the Modified Silica-gel Membrane Method, and the GM Maize Representation in the DNAs

| Sample | DNA extraction method | Ratio         |               | DNA (μg)    | Amount (%) |           |
|--------|-----------------------|---------------|---------------|-------------|------------|-----------|
|        |                       | 260 nm/280 nm | 260 nm/230 nm |             | CaM        | Mon810    |
| M810L  | mini                  | 1.80±0.02     | 1.97±0.06     | 9.38±1.97   | 0.38±0.05  | 0.37±0.04 |
|        | modified mini         | 1.81±0.01     | 2.00±0.05     | 16.79±0.92* | 0.37±0.04  | 0.30±0.08 |
| M810H  | mini                  | 1.82±0.01     | 1.96±0.07     | 12.67±1.35  | 6.11±0.49  | 5.02±0.47 |
|        | modified mini         | 1.82±0.01     | 2.27±0.04*    | 21.35±0.41* | 6.48±0.41  | 5.15±0.34 |

Data represent means ± S.D. (n=6).

The asterisks indicate significant difference from each value obtained from the same sample using the mini method.

検討した。M810L および M810H 各試料につき 6 本の小分け試料を対象に、上記 2 種の mini 法を用いて DNA 抽出を行い、それぞれの抽出 DNA の吸光度比 (O.D. 260 nm/280 nm, 260/230 nm) および収量について算出した後、Student t 検定により解析した。また、それぞれの抽出 DNA を対象に定盤 PCR 法を用いた分析を行い、得られた CaM および Mon810 混入率についても同様の統計解析を行った。Table 4 に示したとおり、O.D. 260 nm/280 nm 比に関しては有意水準 (p=0.05) での有意な差は認められなかったが、O.D. 260 nm/230 nm 比および DNA の収量に関しては有意差が認められた。特に改良 mini 法を用いた場合の DNA の収量は、通常 mini 法を用いた場合に比べて増加した。また、CaM ならびに Mon810 混入率に関しては、有意差が認められなかった (Table 4)。

### 3. 共同試験結果の解析

#### (1) DNA 抽出

抽出 DNA について、質ならびに収量、およびそれらのばらつきについて検討するため、M810H から分取された計 9 点の検体を対象に実施された DNA 抽出の結果について解析した。共同試験全体として、22 機関がシリカゲル膜タイプキット法を、4 機関が CTAB 法を採用し、シリカベースレジンを採用した機関は 1 機関のみであった。Table 5 に示したとおり、同一の DNA 抽出法を採用している機関間においても平均収量の大小が認められており、調査項目に記載を求めた遠心機器、吸光度測定装置などの使用機器、また、遠心、加温などの処理条件が系統的な差を生じる要因となっている可能性が考えられた。さらに、抽出法間で DNA 収量について比較した結果、シリカゲル膜タイプキット法による平均収量 (19.65±5.42 μg) が CTAB 法による平均収量 (6.24±6.11 μg) に比べ 3 倍程度高いことが明らかとなった。また検体間におけるばらつきには、両法に明確な差は認められなかった。しかしなが

Table 5. Quality and Yield of DNA Extracted Using Three DNA Extraction Methods

| Method                       | Laboratory | DNA ( $\mu$ g)   | R.S.D. (%)      | Ratio           |                 |                 |
|------------------------------|------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                              |            |                  |                 | 280 nm/280 nm   | 280 nm/230 nm   |                 |
| Silica-gel membrane type kit | 1          | 29.29 $\pm$ 7.08 | 24.18           | 1.74 $\pm$ 0.05 | 2.05 $\pm$ 0.12 |                 |
|                              | 2          | 25.56 $\pm$ 1.19 | 4.67            | 1.80 $\pm$ 0.12 | 1.93 $\pm$ 0.18 |                 |
|                              | 3          | 22.41 $\pm$ 0.98 | 4.36            | 2.08 $\pm$ 0.06 | 1.79 $\pm$ 0.01 |                 |
|                              | 4          | 15.58 $\pm$ 3.93 | 25.20           | 2.50 $\pm$ 0.58 | 1.82 $\pm$ 0.18 |                 |
|                              | 5          | 22.19 $\pm$ 2.16 | 9.71            | 1.58 $\pm$ 0.08 | 1.92 $\pm$ 0.16 |                 |
|                              | 6          | 20.42 $\pm$ 1.33 | 6.59            | 1.75 $\pm$ 0.01 | 2.07 $\pm$ 0.16 |                 |
|                              | 7          | 13.32 $\pm$ 2.98 | 22.38           | 1.61 $\pm$ 0.01 | 2.04 $\pm$ 0.07 |                 |
|                              | 8          | 23.68 $\pm$ 3.65 | 15.43           | 1.83 $\pm$ 0.17 | 2.05 $\pm$ 0.30 |                 |
|                              | 9          | 13.33 $\pm$ 0.73 | 5.47            | 1.72 $\pm$ 0.01 | 1.87 $\pm$ 0.03 |                 |
|                              | 10         | 14.08 $\pm$ 3.15 | 22.40           | 1.80 $\pm$ 0.01 | 2.28 $\pm$ 0.04 |                 |
|                              | 11         | 24.78 $\pm$ 1.66 | 6.71            | 1.73 $\pm$ 0.03 | 1.87 $\pm$ 0.14 |                 |
|                              | 12         | 12.93 $\pm$ 3.83 | 29.64           | 2.35 $\pm$ 0.46 | no data         |                 |
|                              | 13         | 14.08 $\pm$ 4.22 | 30.00           | 1.97 $\pm$ 0.11 | 1.80 $\pm$ 0.04 |                 |
|                              | 14         | 21.93 $\pm$ 1.50 | 7.28            | 1.77 $\pm$ 0.02 | 2.13 $\pm$ 0.11 |                 |
|                              | 15         | 20.07 $\pm$ 2.49 | 12.43           | 1.76 $\pm$ 0.05 | 1.51 $\pm$ 0.55 |                 |
|                              | 18         | 23.40 $\pm$ 1.03 | 4.42            | 1.79 $\pm$ 0.02 | 2.14 $\pm$ 0.15 |                 |
|                              | 19         | 9.43 $\pm$ 1.79  | 18.97           | 1.87 $\pm$ 0.01 | 1.80 $\pm$ 0.08 |                 |
|                              | 20         | 16.03 $\pm$ 1.56 | 9.73            | 1.86 $\pm$ 0.03 | 2.12 $\pm$ 0.06 |                 |
|                              | 22         | 15.81 $\pm$ 1.58 | 10.01           | 1.91 $\pm$ 0.07 | 0.62 $\pm$ 0.52 |                 |
|                              | 23         | 23.97 $\pm$ 2.50 | 10.42           | 1.78 $\pm$ 0.01 | 1.95 $\pm$ 0.61 |                 |
|                              | 24         | 25.34 $\pm$ 1.26 | 4.98            | 1.79 $\pm$ 0.01 | 2.07 $\pm$ 0.07 |                 |
|                              | 25         | 24.60 $\pm$ 1.54 | 6.28            | 1.80 $\pm$ 0.03 | 2.07 $\pm$ 0.15 |                 |
|                              | CTAB       | 16               | 3.34 $\pm$ 0.43 | 12.87           | 2.02 $\pm$ 0.03 | 0.60 $\pm$ 0.05 |
|                              |            | 21               | 3.18 $\pm$ 0.10 | 3.08            | 1.81 $\pm$ 0.06 | 2.47 $\pm$ 0.73 |
|                              |            | 26               | 3.04 $\pm$ 0.41 | 13.55           | 1.75 $\pm$ 0.03 | no data         |
| 27                           |            | 15.40 $\pm$ 1.20 | 7.77            | 1.74 $\pm$ 0.02 | 1.02 $\pm$ 0.02 |                 |
| Silica based-resin type kit  | 17         | 55.60 $\pm$ 5.84 | 10.50           | 1.81 $\pm$ 0.01 | 2.03 $\pm$ 0.18 |                 |

Data represent means  $\pm$  S.D. (The data obtained from nine test portions for M810H were calculated.)

ら機関別に見ると、相対標準偏差 (R.S.D.) が 25% を超え、明らかにばらつきが大きいと判断される機関 (機関 4, 12, 13) が認められており、この収量のばらつきの原因については、調査項目に記載を求めた DNA 抽出試薬のロットとの間に明確な相関が認められなかったことから、遠心上昇の分離など、手技の習熟や操作上の誤差が原因となった可能性が高いと考えられた。

## (2) 定量 PCR 法

スクリーニング試験の結果において、GA21 定量法により得られた測定値 (コピー数) が検量線の最低濃度 (ABI 社製定量 PCR 機器: 7900 HT 384 well において 16 コピー、その他機種において 20 コピー、Roche 社製 LC: 40 コピー) を上回った機関はなかった。また系統特異的定量試験の結果において、GA21 測定値が検量線の最低濃度を上回った機関は、1 機関の 1 測定のみであった。このため、スクリーニング試験の場合は、CaM 混入率について、また系統特異的定量試験の場合は、Mon810 混入率についてのみ解析を行った。

M810L における CaM 混入率について解析を行い、Fig. 1 に Xbar-R 管理図および Z-スコアを示した。解析にあたり、CaM 混入率を報告していない機関が 4 機関認められたため (機関 6, 17, 21, 26)、これら機関について

データを精査した結果、CaM 測定値が、検量線の最低濃度を下回っていることが明らかになった。これら機関から報告された結果については、絶対的定量下限 ( $^{20}LOQ_{method}$ ) を測定値が満たしておらず、この測定値に基づいて算出される混入率の信頼性を確保することができないため、解析から除外した。前述の 4 機関を除く 23 機関から報告された CaM 混入率の平均  $\pm$  S.D. は、0.33  $\pm$  0.06% であり、Xbar および R とともに管理限界を超えた機関はなかった。また、使用された定量 PCR 機器の機種に依存して混入率が変動するような傾向は認められなかった。さらに Z-スコア上の管理限界を超えた機関も認められなかった (Fig. 1)。

次に M810H における CaM および Mon810 混入率について解析を行った。M810H を対象とした試験においては、測定値が  $^{20}LOQ_{method}$  に満たない機関は認められなかった。Fig. 2 に、M810H における CaM 混入率について、Xbar-R 管理図および Z-スコアを示した。M810H について報告された CaM 混入率の平均  $\pm$  S.D. は、5.79  $\pm$  1.48% であった。また、LC を使用した機関 (機関 6, 19) から報告された混入率は、他の定量 PCR 機器を使用した機関から報告された混入率に比べ、著しく高い傾向が認められ、Xbar および Z-スコアが管理限界を超えていた

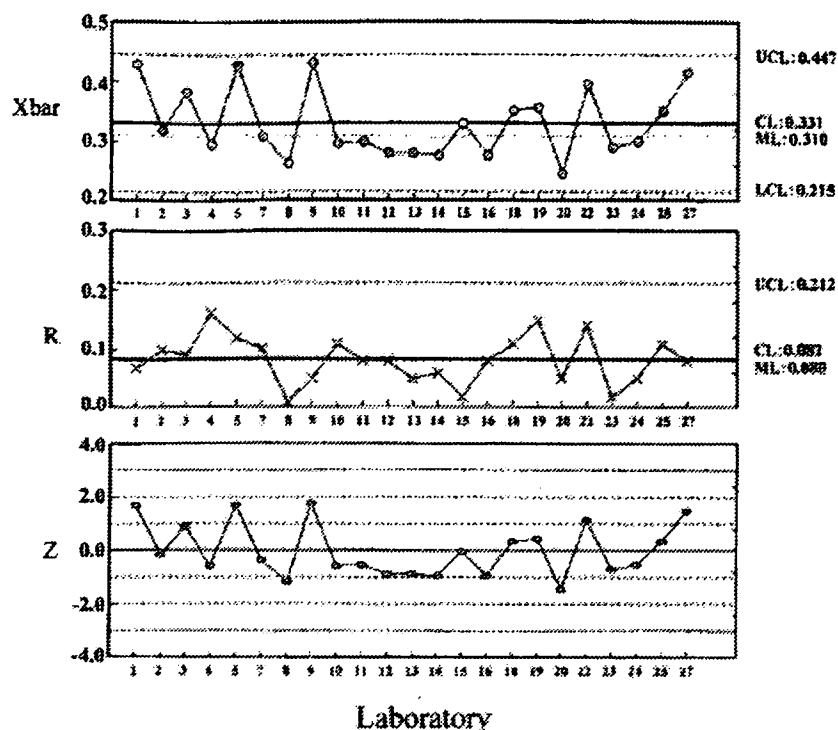


Fig. 1. Xbar, R chart and Z-score for CaM amount in M810L samples

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. Abbreviations: UCL: Upper control limit, CL: Central limit (Mean), LCL: Lower control limit, ML: Median

(Fig. 2). M810HにおけるMon810混入率の平均 $\pm$ S.D.は、 $5.75 \pm 1.31\%$ であった。また先述したCaM混入率と同様に、Mon810混入率についても、LCを使用した機関のうち1機関(機関19)から報告された混入率が、著しく高い傾向が認められ、Xbar, RおよびZスコアが管理限界を超えていた(Fig. 3)。また上記機関以外にも、Rが管理限界を超えた機関が2機関認められた。

前述のとおり、参加機関から報告されたすべての混入率について解析した結果、XbarおよびZスコアが管理限界を超えた機関において使用されていた定量PCR機器が、いずれもLCであったため、定量PCR機器の機種依存的に混入率に差が生じている可能性が考えられた。このため、当該機関から報告された混入率を除いたデータについても解析を行った。

LCを使用した機関を除く25機関(以下LCを除く機関とする)から報告されたM810HにおけるCaM混入率の平均 $\pm$ S.D.は、 $5.40 \pm 0.57\%$ であった。また、Fig. 4に示したように、XbarおよびZスコアが管理限界を超えた機関が1機関あり、この機関においてはRの管理限界も上回っていた。CaM混入率と同様に、Mon810混入率についても解析した結果、各機関から報告されたMon810混入率の平均 $\pm$ S.D.は、 $5.46 \pm 0.59\%$ であった。またFig. 5に示すように、Zスコア、Xbarが管理限界を超え

る混入率を報告した機関が1機関、Rが管理限界を超える混入率を報告した機関が2機関認められた。

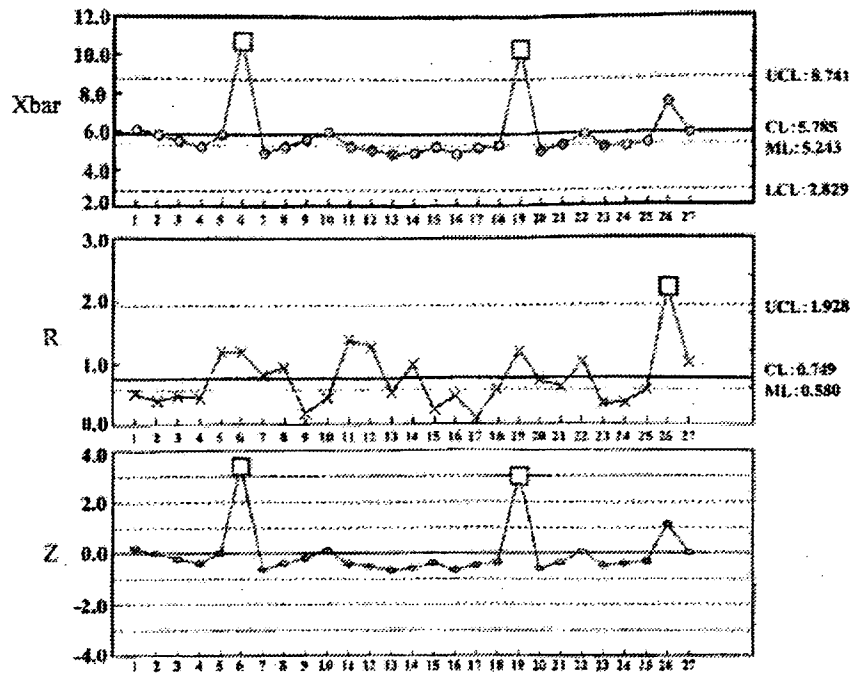
#### 考察

##### (1) 試料の妥当性

調製した各試料から得られた混入率について解析した結果、M810HはM810Lに対し重量換算で5.0%となるようMon810試料を混合して調製した試料であるが、同試料から得られた混入率は、CaM混入率として5.68%、Mon810混入率として5.45%であった。M810LにおけるCaM、Mon810混入率がそれぞれ0.35%であったことから、実測される混入率としても、重量混合比率に照らして妥当な結果が得られる試料であると考えられた(Table 1)。また、一元配置の分散分析の結果、F比は有意水準を下回り、試料の均一性が確認された(Table 2)。さらに、試験マニュアルに規定した期間、規定した保存条件で保存した場合、その前後に得られるそれぞれの混入率に有意な変動が認められなかったことから、試料の安定性が確認された(Table 3)。

##### (2) シリカゲル膜タイプキット法の改良

本研究で検討したシリカゲル膜タイプキット法の改良法(改良mini法)においては、シリカゲル膜カラムに吸着させたDNAを直接TE緩衝液で溶出する。この改良によ



### 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）<sup>18</sup>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) 定価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は定価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（SSIB）測定値の解析1（DNA抽出法依存的なSSIB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（SSIB）の測定値とGMトウモロコ

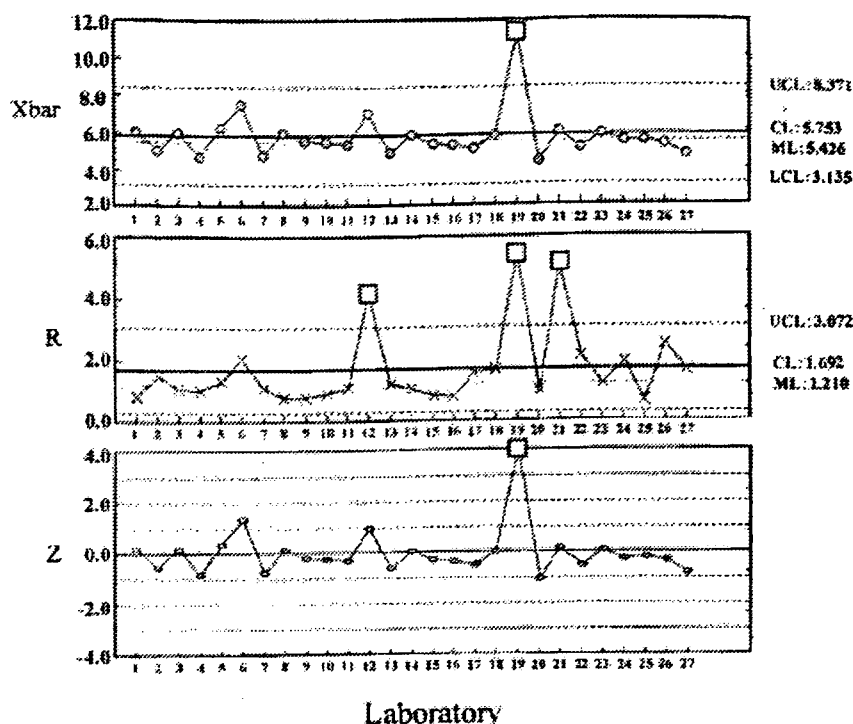


Fig. 3. Xbar, R chart and Z-score for Mon810 amount in M810H samples

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 *SSI7b* 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 *SSI7b* 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、*SSI7b* 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 *SSI7b* 測定値を抽出し、平均値を算出した (Fig. 6)。その結果、*SSI7b* 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  $34599.8 \pm 7386.7$  コピー、CTAB 法を採用した 4 機関の平均  $\pm$  S.D. が  $22461.8 \pm 6866.4$  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 *SSI7b* 測定値の平均  $\pm$  S.D. は  $31393.3 \pm 3937.1$  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 *SSI7b* 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 *SSI7b* 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 *SSI7b* 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  $^{99b}$ LOQ<sub>method</sub> 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 *SSI7b* 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  $^{99b}$ LOQ<sub>method</sub> 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  $^{99b}$ LOQ<sub>method</sub> 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 (*SSI7b*) 測定値の解析 2 (*SSI7b* 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 検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 *SSI7b* 測定値のばら

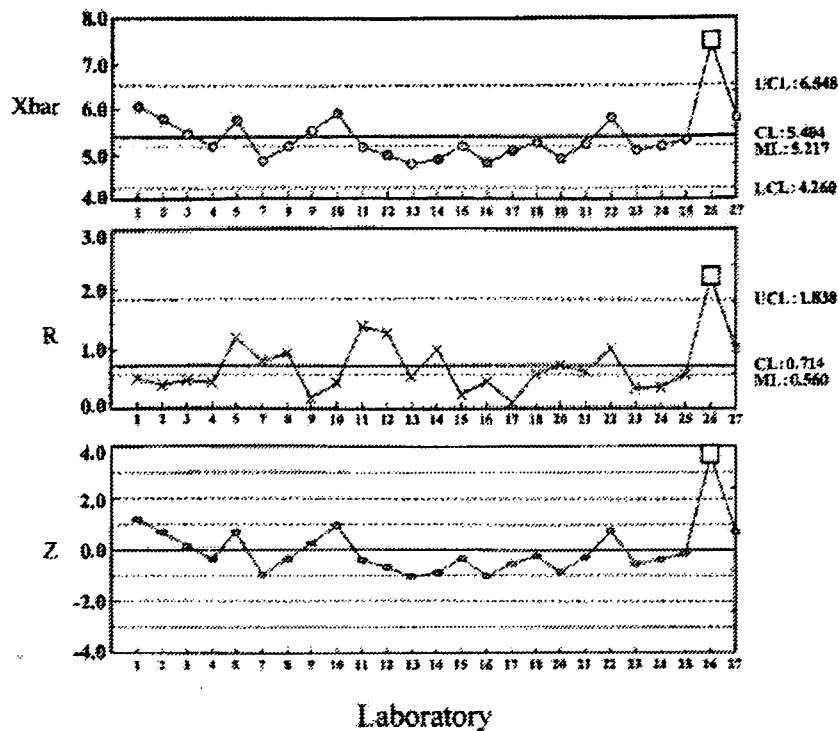


Fig. 4. Xbar, R chart and Z-score for CaM amount in M810H samples (except for the values reported from laboratories in which a LightCycler was used)

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 GA21 混入率 (ヌタリーニング試験), 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 *SSIb* 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 *SSIb* 測定値の R.S.D. の平均は 7.5%. 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 *SSIb* 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, さらには 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



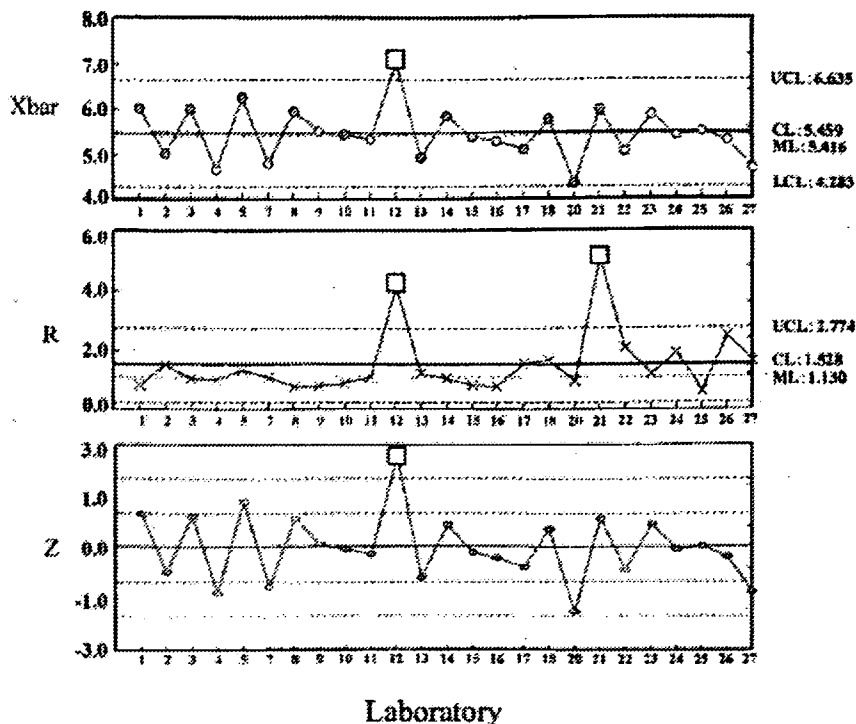


Fig. 5. Xbar, R chart and Z-score for Mon810 amount in M810H samples (except for the values reported from laboratories in which a LightCycler was used)

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.

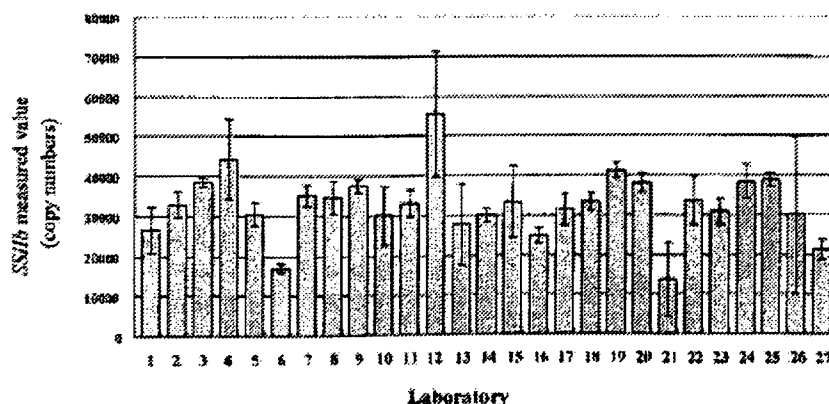


Fig. 6. SSIIb measured values obtained from 9 test portions, derived by dividing M810H samples

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 *SSI/b* Measured Values Obtained from the M810H DNA Samples with Quantitative PCR Method

| Laboratory | DNA extraction method* | R.S.D. (%) for <i>SSI/b</i> measured values obtained from three independent measurements for each test portion |                  |      |                | R.S.D. (%) for <i>SSI/b</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            | 22.9  |
| 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                      | 4.3  | 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            | 25.9  |
| 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  | 5.7              | 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 | 62.5  |
| 22         | A                      | 6.8  | 15.4             | 11.0 | 11.7           | 18.1  |
| 23         | A                      | 1.8  | 2.7              | 2.3  | 2.3            | 10.5  |
| 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 *SSI/b* 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 *SSI/b* measured values, which were obtained from nine test portions for M810H, were used for calculation of the R.S.D. (%) for *SSI/b* 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 *SSI/b* 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 *SSI/b* 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 (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 *SSI/b* 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常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 機関が管理限界を越えており、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 定置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  $\sigma$  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た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。さらには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、*SSIIb* 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キ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

- 1) James, C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2004. *ISAAA: Ithaca, NY*, No. 32 (2004).
- 2) Hino, A. Safety assessment and public concerns for genetically modified food products: the Japanese experience. *Toxic Pathology*, 30, 126-128 (2000).
- 3) 厚生省告示第 232 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。
- 4) 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。
- 5) 厚生労働省医薬部食品保健部長通知 “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)。
- 6) 厚生労働省医薬部食品保健部長通知 “組換え DNA 技術応用食品の検査方法について” 平成 13 年 5 月 27 日、食発第 110 号 (2001)。
- 7) 厚生労働省医薬部食品保健部長通知 “組換え DNA 技術応用食品の検査方法について (一部改正)” 平成 17 年 5

月 17 日、食発第 0517001 号 (2005)。

- 8) 食品衛生法施行規則 (昭和 23 年厚生省令第 23 号)。
- 9) 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).
- 10) 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).
- 11) 橋山 浩, 渡邊敬浩, 笠間壽子, 松本容彦, 米谷昆雄: “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).
- 12) 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.
- 13) 厚生労働省医薬部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)。
- 14) 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).
- 15) Thompson, M., Wood, R. International harmonized protocol for proficiency testing of (chemical) analytical laboratories. *J. AOAC Int.*, 76, 928-939 (1993).
- 16) 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.
- 17) 大隅 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).
- 18) 厚生労働省医薬部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 0625001 号 (2004)。

## Determination of Spinosad in Vegetables and Fruits by High-Performance Liquid Chromatography with UV and Mass Spectrometric Detection After Gel Permeation Chromatography and Solid-Phase Extraction Cleanup on a 2-Layered Column

EIJI UENO, HARUMI OSHIMA, and HIROSHI MATSUMOTO

Aichi Prefectural Institute of Public Health, Tsuji-machi, Kita-ku, Nagoya, Aichi 462-8576, Japan

ISAO SAITO

Tokai COOP Federation, Food Safety and Quality Research Center, Sagamine, Yazako, Nagakute-cho, Aichi 480-1103, Japan

HIROTO TAMURA

Meijo University, Faculty of Agriculture, Department of Environmental Bioscience, Shiogamaguchi, Tempaku-ku, Nagoya, Aichi 468-8502, Japan

A simple and reliable method was developed for the determination of spinosyns A and D, the active ingredients of spinosad, in vegetables and fruits, by high-performance liquid chromatography with UV detection (HPLC-UV) and confirmation by mass spectrometry (MS); the method uses selected gel permeation chromatography (GPC) and a 2-layered column for solid-phase extraction system. An aliquot of the crude sample extract obtained by acetonitrile extraction is loaded into the GPC system. The fraction containing spinosyns A and D is selectively collected and loaded directly onto a 2-layered column consisting of graphitized carbon (upper layer) and cyclohexyl-bonded silica gel (lower layer). After the column is washed with the GPC mobile phase acetone-cyclohexane (3 + 7), the column is eluted with acetonitrile containing 2% triethylamine. The eluate is used for HPLC-UV/MS analysis. Average recoveries from fortified cabbage, green perilla, fig, and strawberry at analyte concentrations of 0.05 and 0.25  $\mu\text{g/g}$  were >85%, and the relative standard deviations were <9%. The detection limits for spinosyns A and D in green perilla were 0.005  $\mu\text{g/g}$  by UV detection and 0.001  $\mu\text{g/g}$  by MS detection.

Spinosad is an insecticide derived from the soil bacterium *Saccharopolyspora spinosa*. Its distinct mode of action is effective on a variety of insecticide-resistant strains of insects, and it has low mammalian toxicity and a favorable environmental profile (1). Spinosad has been registered in Japan for use on a variety of vegetables, fruits, and ornamental crops since 1999 (2, 3). Because spinosad is a mixture of the

active ingredients spinosyns A and D (Figure 1), vegetables and fruits should be analyzed for both ingredients during regulatory monitoring under the Japanese Food Sanitation Law (4). This law does not apply to the metabolites such as *n*-demethyl spinosyn D, spinosyn B, and spinosyn K, which are not harmful, judging from a comparison of the characteristics and severity of their toxicities with those of the parent ingredients (5).

In 2004, spinosyns A and D were detected in cabbage in Aichi Prefecture when a multiresidue method combining high-performance liquid chromatography (HPLC) with mass spectrometry (MS) and our reported sample preparation based on gel permeation chromatography (GPC) cleanup (6) was used. Because of their large molecular size, spinosyns A and D were eluted early in the GPC cleanup, and a considerable number of analytes were discarded with the large molecular matrixes such as lipids and pigments in the GPC procedure. Moreover, our current observations have revealed that, although HPLC-MS is suitable for the rapid semiquantitative screening of multiclass residues, the matrixes in the sample solution often cause suppression or promote the ionization of analytes during HPLC-MS analysis. Therefore, the sample must be reanalyzed by other selective-detection methods after adequate cleanup in order to have the precise quantitation needed for regulatory monitoring. Accordingly, the positive samples were reanalyzed by HPLC with UV detection (HPLC-UV) based on the Japanese official method (Figure 2; 7), with some necessary modifications such as replacement of dichloromethane with ethyl acetate because of environmental restrictions (8). The use of the Japanese official method has also been reported by other researchers (9, 10). Nevertheless, the method, which consists of acetonitrile extraction, liquid-liquid partitioning, and solid-phase extraction (SPE) on a cyclohexyl-bonded silica gel (CH) cartridge followed by a silica gel (silica) cartridge, involves labor-intensive procedures and strict requirements for the SPE conditions, because a low wavelength near 250 nm is needed

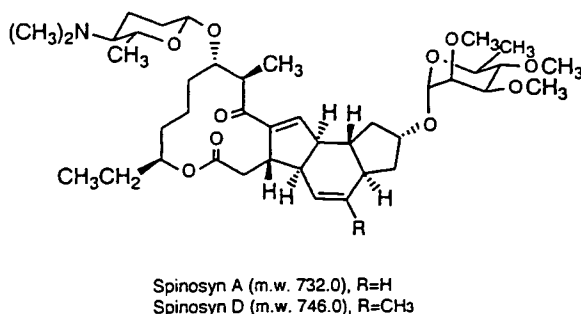


Figure 1. Structures of spinosyn A and spinosyn D.

to obtain adequate sensitivity for the analytes. However, significant interfering peaks were still observed in the chromatograms of the purified extracts from green vegetables, cabbage, and especially green perilla. Moreover, because the presence of an excess amount of lipids and pigments like chlorophyll and carotenoid in the crude extracts decreased the affinity of the analytes for CH and silica, considerable quantities of spinosyns A and D were discharged during the cartridge-washing procedures.

Therefore, the study described in this paper focused on the development of a simple and reliable sample cleanup procedure for the determination of spinosad residues in vegetables and fruits by HPLC-UV with MS confirmation (Figure 2). Our improved routine method extends the current conventional multiresidue methods (6, 11–13) by incorporating spinosad into the regulatory monitoring program.

## Experimental

### Reagents and Materials

(a) *Solvents and chemicals*.—Acetonitrile, sodium chloride, ethyl acetate, anhydrous sodium sulfate, acetone, and cyclohexane were pesticide-analytical grade (Wako Pure Chemical, Osaka, Japan). Water was purified by using an Auto Pure WT100 system (Yamato Scientific, Tokyo, Japan). Acetonitrile and water only for HPLC were LC/MS grade (Wako Pure Chemical), and all other reagents were analytical grade (Wako Pure Chemical). Rapeseed oil, chlorophyll oil, and  $\beta$ -carotene were purchased from Wako Pure Chemical.

(b) *Analytical standards*.—The pesticide standards for spinosyns A and D were purchased from Hayashi Pure Chemical (Osaka, Japan). Each standard was dissolved in methanol to obtain a stock solution of 1 mg/mL. Equal volumes of the stock solutions were mixed and diluted with acetonitrile to obtain the mixed spiking solutions and working standard solutions. The standard solutions were stored in amber vials at 4°C.

(c) *Graphitized carbon-CH 2-layered column*.—Graphitized carbon (Supelclean ENVI-carb II) and CH (Bondesil-CH) were purchased from Supelco (Bellefonte, PA) and Varian (Harbor City, CA), respectively.

### Apparatus

(a) *Dispersing unit*.—Ultra-Turrax T-25 with a stainless dispersion tool S25N-10G (IKA Labortechnik, Staufen, Germany).

(b) *Suction filter system (Figure 3)*.—A Kiriya funnel (Cat. No. SU-60; Nippon Rikagaku Kikai, Tokyo, Japan) fitted with a filter paper (Cat. No. 5A-60; Nippon Rikagaku Kikai) was connected by a vacuum SPC joint (Cat. No. 3047-19; Sibata Scientific Technology, Tokyo, Japan) to a 125 mL graduated cylindrical separatory funnel (Cat. No. 3027-19100; Sibata Scientific Technology). A maximum of 12 units was supported by a wooden stand (available by special order from Iwahana Kamidana, Takayama, Japan).

(c) *Rotary vacuum evaporator*.—Rotavapor with vacuum controller V-800 (Büchi Labortechnik, Flawil, Switzerland).

(d) *GPC-SPE cleanup system*.—An automated GPC cleanup system (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a CLNpak EV-2000 column (300 × 20 mm id), a CLNpak EV-G guard column (100 × 20 mm id), and an AO-50 column oven (Showa Denko, Tokyo, Japan) were used for sample cleanup. Acetone-cyclohexane (3 + 7) was the mobile phase, and the flow rate was 5 mL/min. Column temperature was maintained at 40°C, and the UV detector was set at 245 nm. Injection volume was 2 mL. As shown in Figure 4, a glass reservoir (16 mL; GL Sciences, Tokyo, Japan) connected to a flow-control tube (60 mm; Supelco) was used as the column. Glass wool (5–8  $\mu$ m; Nippon Rikagaku Kidai) was placed at the bottom of the column as a filter, and 1 g CH, 0.5 g graphitized carbon, and 0.5 g anhydrous sodium sulfate were placed in series on the filter. This graphitized carbon-CH 2-layered column supported on the 50 mL tall beaker by a rack (available on special order from Iwahana Kamidana) was preconditioned with 10 mL cyclohexane followed by 10 mL acetone before use. A maximum of 16 columns was mounted in the GPC fraction collector.

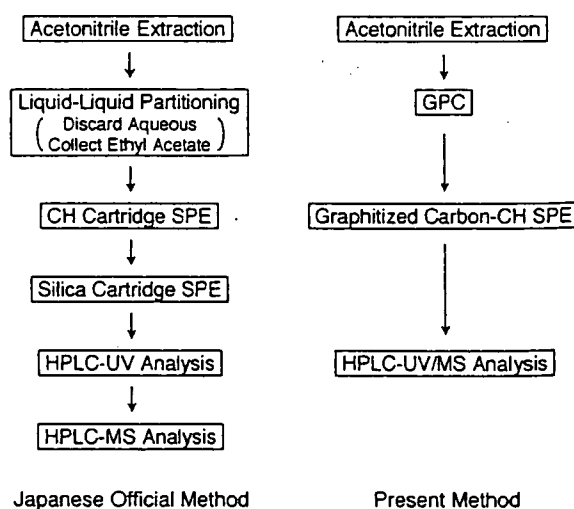
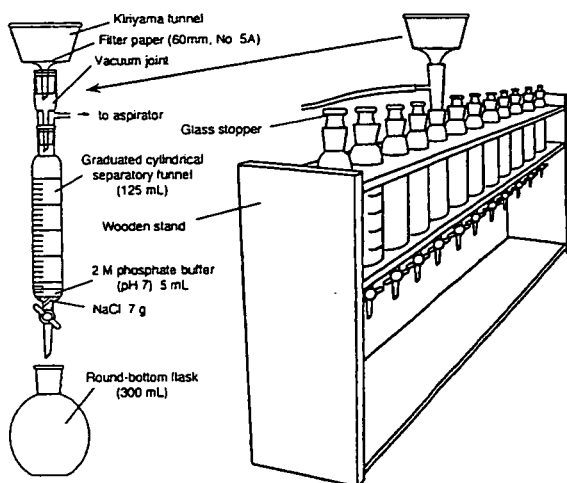


Figure 2. Flow charts of the Japanese official method and the present method for the determination of spinosad in vegetables and fruits.



**Figure 3.** Suction filter system using a graduated cylindrical separatory funnel.

(e) *HPLC-UV/MS system.*—A Shimadzu LCMS-2010A instrument equipped with a binary LC-10ADvp pump, an SIL-HTA autosampler, a CTO-10ACvp column oven, and an SPD-M10Avp photodiode-array detector was used for the HPLC-UV/MS analysis. The HPLC column was a CAPCELL PAK C18 MG II (100 × 2.0 mm id, 3 μm particle size) with a guard column (10 × 2.0 mm id, 3 μm particle size; Shiseido, Tokyo, Japan). The mobile phase was 10 mM ammonium acetate-acetonitrile (25 + 75), isocratic elution was used, and the flow rate was 0.25 mL/min. The column temperature was maintained at 40°C, and the detection wavelength was set at 245 nm. The single-quadrupole mass spectrometer was optimized by the instrument software in the electrospray positive ionization mode. Typical operating conditions were capillary voltage, 4.5 kV; nebulizer nitrogen gas flow rate,

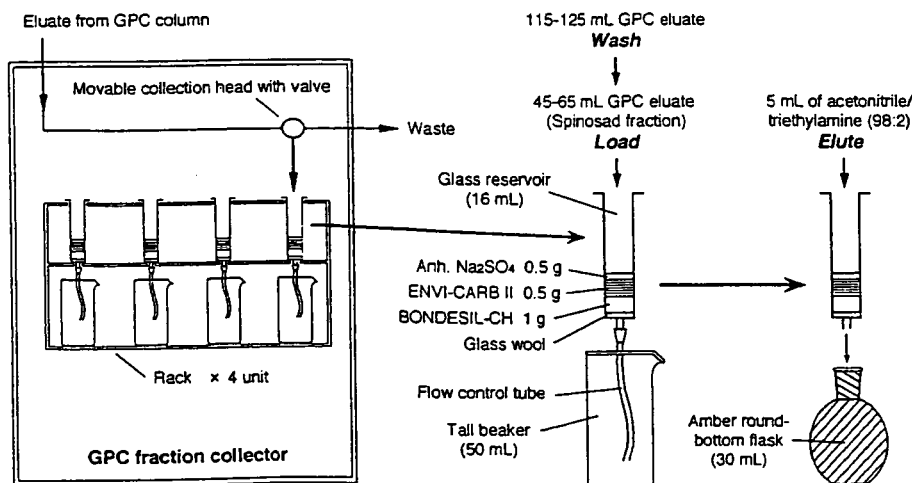
1.5 L/min; drying nitrogen gas flow rate, 10 L/min; heat block temperature, 200°C; curved desolvation line (CDL) temperature, 250°C; CDL voltage, 25 V; Q-array DC voltage, 55 V; Q-array RF voltage, 150 V. The chromatograms were recorded under full-scan (100–850 *m/z* at 0.75 scans/s) conditions. The data were processed with Shimadzu LCMS solution Ver.3.3 analysis software.

**Sample Preparation**

The vegetables and fruits were obtained from retail markets in Aichi Prefecture. Pesticide-free vegetables and fruits were used for the recovery test. About 500 g roughly chopped sample was chopped in a conventional food processor for 2 min to obtain a thoroughly mixed homogenate.

**Extraction**

A 20 g portion of the homogenate was weighed into a 250 mL centrifuge tube and extracted with 60 mL acetonitrile for 2 min by using a dispersing unit. The extract was centrifuged for 5 min at 3000 rpm, and the supernatant was filtered with a suction filter system (Figure 3) into a 125 mL graduated cylindrical separatory funnel containing 7 g NaCl and 5 mL 2 M phosphate buffer (pH 7). The contents of the centrifuge tube were again extracted with an additional 20 mL acetonitrile, and the extract was filtered into the same graduated cylindrical separatory funnel. The filtrate was shaken with a mechanical shaker for 5 min to salt out the water layer. The acetonitrile extract in a 300 mL round-bottom flask was evaporated to near dryness with a rotary vacuum evaporator. A 50 mL portion of ethyl acetate and 20 g anhydrous sodium sulfate were added to the residue, and the contents of the flask were sonicated for 1 min. The resultant mixture was filtered through glass wool placed above the narrow neck of a funnel into a 200 mL round-bottom flask. The 300 mL round-bottom flask was rinsed twice with 20 mL ethyl acetate, and the rinses were filtered through the glass wool. The filtrate was evaporated to near dryness with a rotary



**Figure 4.** Graphitized carbon-CH 2-layered column cleanup after GPC.

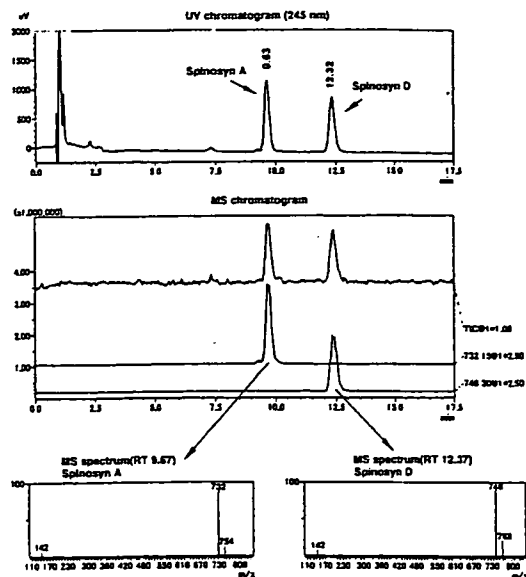


Figure 5. UV chromatogram, MS chromatograms, and MS spectra obtained for the standard mixture of spinosyn A and spinosyn D (each at 0.25 mg/mL).

vacuum evaporator. The residue was dissolved in acetone-cyclohexane (3 + 7), the volume was adjusted to 8 mL, and the mixture was centrifuged for 5 min at 3000 rpm. The supernatant was ready for cleanup.

Cleanup

A 2 mL aliquot of the extract (the supernatant from the previous step), equivalent to 5 g sample, was loaded into the GPC system. As shown in Figure 4, the first 45 mL eluate was discarded and the next 45–65 mL eluate (spinosad fraction) was directly loaded onto the 2-layered column. After an additional 65–115 mL eluate was discarded, the 2-layered column was automatically washed with the next 115–125 mL eluate. These automatic operations were conducted at 25 min intervals in the dark GPC fraction collector. After the 50 mL

tall beaker was exchanged for a 30 mL amber round-bottom flask and the flow-control tube was removed, the 2-layer column was eluted with 5 mL acetonitrile-triethylami (98 + 2). The eluate was evaporated to near dryness by using rotary vacuum evaporator, and evaporation was completed under a gentle stream of nitrogen. The residue was dissolved in acetonitrile-water (75 + 25), and the volume was adjusted to 1 mL in an amber SPE concentration tube (GL Science). The 1 mL test solution corresponded to 5 g sample.

HPLC-UV/MS Analysis

A 10 µL aliquot of the test solution was analyzed HPLC-UV/MS by using the parameters described in the Apparatus section. The UV chromatogram was used for quantitation, which was based on the external standard method. A minimum of 5 points was used for the calibration graph (peak area versus concentration) constructed for each analyte. The sum of both analyte concentrations was assumed to be the analytical value for spinosad. The MS chromatograms and MS spectra were used to confirm the identities of the analytes.

Recovery Test

The recovery test was conducted 5 times for each sample: cabbage, green perilla, fig, and strawberry. Spinosad is registered for cabbage, fig, and strawberry in Japan and has been provisionally registered for green perilla in Aichi Prefecture. A 0.5 mL aliquot of the standard solution of spinosyn at 2 or 10 µg/mL was added to 20 g chopped sample and the sample was left for 60 min at room temperature before extraction.

Extraction and Cleanup Studies

The rates of extraction of the analytes from water, elution profiles of the analytes, and representative matrices (rapeseed oil, chlorophyll, and β-carotene) in the GPC and column cleanup procedures were investigated to find a suitable method for sample preparation. These tests were conducted 3 times through each procedure.

To determine the extraction rate from water, 0.5 mL spinosad solution containing spinosyns A and D, each

Table 1. Extraction of spinosyn A and spinosyn D from water, and elution of spinosyn A, spinosyn D, and representative matrices from GPC and the CH column

| Compound     | Extraction from water | Extraction or elution rate, % <sup>a</sup> |    |    |    |    |                   |            |
|--------------|-----------------------|--|----|----|----|----|-------------------|------------|
|              |                       | GPC elution volume, mL                     |    |    |    |    | CH column elution |            |
|              |                       | 30   | 35 | 45 | 55 | 65 | Fraction 1        | Fraction 2 |
| Rapeseed oil |                       | 17   | 73 | 6  |    |    | 95                | 0          |
| Chlorophyll  |                       |  | 47 | 43 | 5  | 1  | 98                | 0          |
| β-Carotene   |                       |  |    | 88 | 7  | 2  | 99                | 0          |
| Spinosyn A   | 94                    |  |    | 65 | 32 | 4  | 0                 | 9          |
| Spinosyn D   | 97                    |  |    | 68 | 31 | 3  | 0                 | 9          |

<sup>a</sup> Mean of 3 replicates.

**Table 2.** Elution of spinosyn A and spinosyn D in the extract of green perilla from a graphitized carbon-CH 2-layered column

| Graphitized carbon, mg <sup>a</sup> | Compound    | Recovery, % <sup>b</sup>   |                              |   |
|-------------------------------------|-------------|----------------------------|------------------------------|---|
|                                     |             | 45–65 mL GPC eluate (load) | 115–125 mL GPC eluate (wash) | 5 mL acetonitrile–triethylamine (98 + 2; elute) |
| 0                                   | Spinosyn A  | 81                         | 16                           | 1   |
|                                     | Spinosyn D  | 85                         | 14                           | 1   |
|                                     | Chlorophyll | +++ <sup>c</sup>           | +                            |   |
|                                     | Carotenoid  | +++                        | +                            |   |
| 100                                 | Spinosyn A  | 49                         | 33                           | 16  |
|                                     | Spinosyn D  | 48                         | 30                           | 18  |
|                                     | Chlorophyll | +                          | ++                           | +   |
|                                     | Carotenoid  | ++                         | ++                           |   |
| 200                                 | Spinosyn A  | 0                          | 12                           | 84  |
|                                     | Spinosyn D  | 0                          | 11                           | 86  |
|                                     | Chlorophyll |                            |                              |   |
|                                     | Carotenoid  |                            | ++                           | +   |
| 300                                 | Spinosyn A  | 0                          | 0                            | 101   |
|                                     | Spinosyn D  | 0                          | 0                            | 99  |
|                                     | Chlorophyll |                            |                              |   |
|                                     | Carotenoid  |                            | +                            | +   |
| 400                                 | Spinosyn A  | 0                          | 0                            | 97  |
|                                     | Spinosyn D  | 0                          | 0                            | 95  |
|                                     | Chlorophyll |                            |                              |   |
|                                     | Carotenoid  |                            |                              |   |
| 500                                 | Spinosyn A  | 0                          | 0                            | 98  |
|                                     | Spinosyn D  | 0                          | 0                            | 102   |
|                                     | Chlorophyll |                            |                              |   |
|                                     | Carotenoid  |                            |                              |   |

<sup>a</sup> Quantity of CH was 1000 mg in each case.

<sup>b</sup> Mean of 3 replicates.

<sup>c</sup> Recoveries shown as +++, ++, and + were evaluated by observation.

10 µg/mL, was added to 20 mL water in a separatory funnel. The water was thoroughly mixed with 80 mL acetonitrile, and the solution was transferred to a 125 mL graduated cylindrical separatory funnel containing 7 g NaCl and 5 mL 2 M phosphate buffer (pH 7). The mixture was shaken to salt out the water layer. The acetonitrile layer was evaporated to near dryness with a rotary vacuum evaporator, and evaporation was completed under a gentle stream of nitrogen. The residue was dissolved in ≤4 mL acetonitrile–water (75 + 25). Each compound was determined by HPLC-UV.

To optimize the GPC elution profile, 2 mL individual solution (spinosyns A and D, each at 50 µg/mL and rapeseed oil, chlorophyll, and β-carotene, each at 1000 µg/mL) was loaded into the GPC system. Each compound was determined by GPC with UV detection (GPC-UV).

To determine the elution profile in the CH column, 20 mL individual solution (spinosyns A and D, each at 10 µg/mL, and rapeseed oil, chlorophyll, and β-carotene, each at 200 µg/mL) was loaded onto the column packed with 1 g CH, which was then eluted with 10 mL acetone–cyclohexane (3 + 7); Fraction 1): The column was again eluted with 5 mL acetonitrile–triethylamine (98 + 2; Fraction 2). Each fraction was evaporated separately to near dryness with a rotary vacuum evaporator and dissolved in ≤4 mL acetone–cyclohexane (3 + 7). A 2 mL aliquot of the resulting solution was loaded into the GPC system. Each compound was determined by GPC-UV.

## Results and Discussion

### HPLC-UV/MS Conditions

Because spinosyns A and D are relatively poor polar compounds under neutral conditions (1), a reversed-phase



Table 3. Recovery of spinosyn A and spinosyn D from cabbage, green perilla, fig, and strawberry

| Compound   | Spiking level,<br>$\mu\text{g/g}$ | Cabbage                   |        | Green perilla |        | Fig          |        | Strawberry   |        |
|------------|-----------------------------------|---------------------------|--------|---------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|
|            |                                   | Avg. rec., % <sup>a</sup> | RSD, % | Avg. rec., %  | RSD, % | Avg. rec., % | RSD, % | Avg. rec., % | RSD, % |
| Spinosyn A | 0.05                              | 88                        | 7      | 92            | 8      | 86           | 8      | 92           | 8      |
|            | 0.25                              | 92                        | 3      | 94            | 3      | 92           | 4      | 96           | 3      |
| Spinosyn D | 0.05                              | 85                        | 8      | 89            | 9      | 91           | 6      | 91           | 5      |
|            | 0.25                              | 93                        | 4      | 93            | 5      | 92           | 3      | 95           | 4      |

<sup>a</sup>  $n = 5$ .

mobile phase, 10 mM ammonium acetate–acetonitrile (25 + 75), and a binary pumping system were used for routine HPLC analysis. Several mobile phase (isocratic and gradient elution of 10 mM ammonium acetate–acetonitrile from [10 + 90, v/v] to [95 + 5, v/v]) and stationary phase conditions were evaluated to obtain suitable conditions and analysis times for the separation of the analytes and other unidentified compounds in vegetables and fruits. Satisfactory results were obtained by using a CAPCELL PAK C18 MG II column with a mobile phase of 10 mM ammonium acetate–acetonitrile (25 + 75) with isocratic elution. By using the isocratic system, less fluctuation in the baseline of the UV chromatogram and a short analytical time were obtained. Spinosyns A and D were detected in their UV spectra at 245 nm, with retention times of 9.63 and 12.32 min, respectively (Figure 5). The calibration plots were linear in the concentration range of 0.05–50  $\mu\text{g/mL}$  (correlation coefficient, 0.999). Furthermore, the peaks corresponding to spinosyns A and D were confirmed with high sensitivity and selectivity by their MS chromatograms and MS spectra in which characteristic molecular ions were observed at  $m/z$  732.2 for spinosyn A and at  $m/z$  746.2 for spinosyn D.

#### Extraction

Because spinosyns A and D are easily dissolved in acetonitrile under neutral conditions (1), we applied our simple and reliable multiresidue extraction method (6, 12, 13), which uses acetonitrile extraction and salting-out by the addition of NaCl in phosphate buffer (pH 7). As a result, spinosyns A and D were sufficiently partitioned ( $\geq 94\%$ ) into the acetonitrile layer (Table 1). A suction filter system (Figure 3) was devised to provide a more simple and rapid extraction. With the suction filter system, the extraction time for a large number of samples was shortened, compared with that of the traditional extraction system that uses an open top and side tabulation bell jar.

#### Cleanup

To develop a reliable autocleanup system before HPLC determination, GPC and a laboratory-made graphitized carbon-CH<sub>2</sub>-layered SPE column were combined. GPC allows the compounds in the sample to be separated by a molecular size-exclusion mechanism (6, 12–15), CH is a medium-polarity sorbent that exhibits unique selectivities for specific

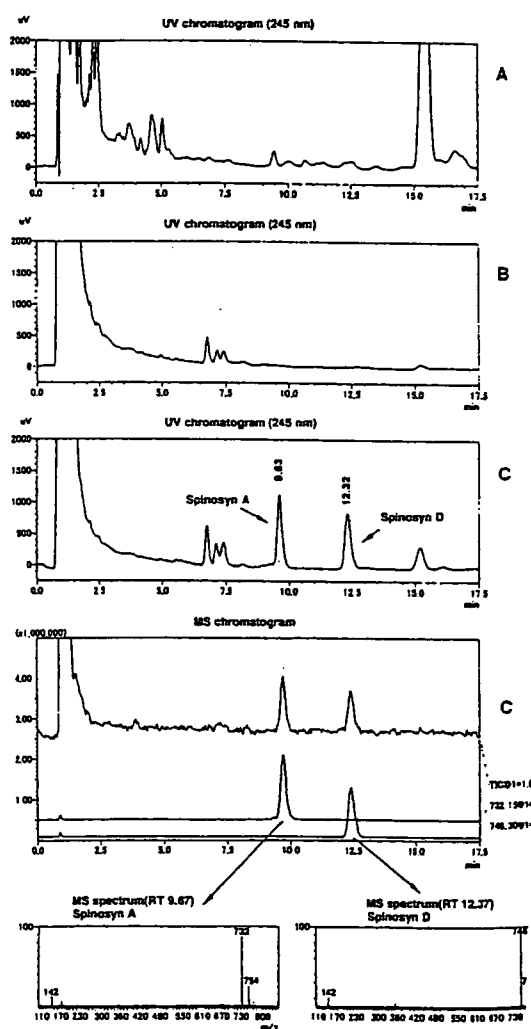


Figure 6. UV chromatograms, MS chromatograms and MS spectra of extracts of a green perilla: (A) extract analyzed by the Japanese official method; (B) blank extract analyzed by the present method; (C) extract of sample spiked with spinosyn A and spinosyn D (each 0.05  $\mu\text{g/g}$ ) and analyzed by the present method.

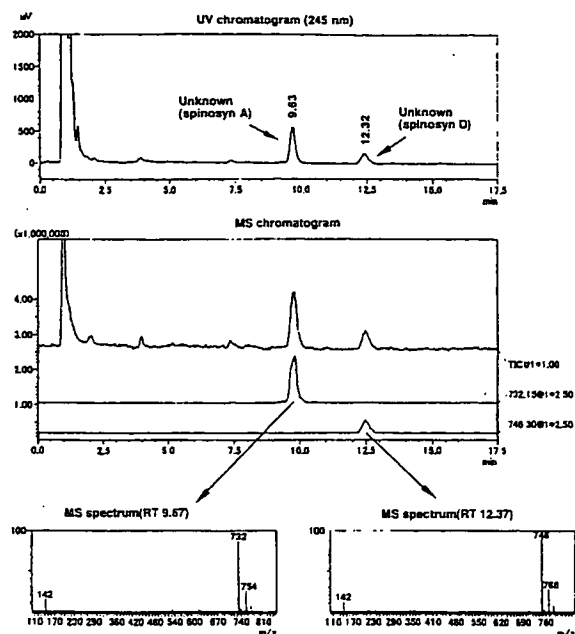


Figure 7. UV chromatogram, MS chromatograms, and MS spectra of a cabbage extract.

compounds (9, 10), and C18 for the HPLC separation is a poor polar sorbent. Therefore, we speculated that the GPC cleanup would be most selective when the analytes were compounds of a specific molecular size or a single compound such as spinosad; moreover, the selective GPC based on a separation mechanism different from that of the C18 separation would be effective for removing interferences from a sample before the HPLC determination. The elution profiles of spinosyns A and D from the GPC column are shown in Table 1. The mean elution times of spinosyns A and D were  $10.6 \pm 0.1$  min ( $53 \pm 0.5$  mL) and  $10.4 \pm 0.1$  min ( $52 \pm 0.5$  mL), respectively, and the relative standard deviation (RSD) was within 1%. A hard type gel CLNpak EV column restrains swelling during the change in solvents, and by using the special column oven, the column maintained at 40°C provides good reproducible elution times for the loaded compounds.

The spinosyns A and D eluted from the GPC column were directly retained on the CH sorbent when the GPC mobile phase was acetone–cyclohexane (3 + 7). Accordingly, spinosyns A and D loaded with 20 mL acetone–cyclohexane (3 + 7) were completely retained with an additional 10 mL acetone–cyclohexane (3 + 7; Fraction 1), and they were eluted with 5 mL acetonitrile–triethylamine (98 + 2; Fraction 2; Table 1). Rapeseed oil, chlorophyll, and  $\beta$ -carotene were eluted in Fraction 1 (Table 1); polarity matrixes and fatty acids such as stearic acid, palmitic acid, etc., were also eluted in Fraction 1 (data not shown). However, a significant part of the spinosad fraction (45–65 mL eluate) and the fraction containing chlorophyll and  $\beta$ -carotene still overlapped each other in the GPC elution (Table 1). Because the presence of an excess amount of pigments in the extracts of vegetables and

fruits, especially green vegetables, decreased the affinity of the analytes for the CH sorbent as mentioned above, a considerable amount of analytes may be discarded with the pigments during the SPE loading and washing procedure. Accordingly, because a 2-layered column with graphitized carbon placed on CH had played a significant role in retaining the pigments (6), we applied it to the determination of spinosad in this study. The elution profile of spinosyns A and D in the extract of green perilla, which contained 1.25  $\mu$ g each of spinosyns A and D in 2 mL extract, equivalent to 5 g sample, is shown in Table 2. Although spinosyns A and D were discarded with the pigments in the SPE loading and washing procedures in the absence of graphitized carbon, they were completely retained when the quantity of the graphitized carbon used was >300 mg. From this result, we concluded that the amount of graphitized carbon needed to remove an excess amount of pigments from green vegetables was 500 mg. Thus, a 2-layered column (Figure 4) consisting 0.5 g graphitized carbon and 1 g CH was used for cleanup. A glass reservoir provided sufficient space for the addition of the GPC eluate. Anhydrous sodium sulfate prevented the graphitized carbon from floating in the added GPC eluate. Filtration through glass wool and the use of a flow-control tube resulted in an appropriate elution rate (approximately 2 mL/min).

Additional cleanup with silica-SPE (7, 9, 10) was not needed, and the cleaned sample extracts were not filtered through a 0.20–0.45  $\mu$ m filter because the solutions were highly purified and certain types of filters were found to adsorb the analytes (data not shown).

#### Recovery Test

The recoveries from the representative vegetables and fruits, i.e., cabbage, green perilla, fig, and strawberry, and the corresponding RSD values are listed in Table 3. Spinosyns A and D spiked at 2 levels were sufficiently recovered in the range of 85–96% with a 3–9% RSD. Spinosyns A and D are relatively photodegradable compounds (1). Photodegradation increased with increasing purity during the sample cleanup procedures (data not shown). Sample cleanup in a dark GPC system, with the use of amber glass tools, might be effective for avoiding possible photodegradation of the purified analytes.

Interfering peaks were still observed in the chromatograms of the cleaned extracts of green perilla, which contains not only high levels of pigments but also various matrix components, prepared by the Japanese official method (Figure 6A). In contrast, with the use of the present method, these interfering components were effectively removed with minimal loss of analytes (Figure 6B and C).

The detection limits for spinosyns A and D in samples, which were estimated by Shimadzu LCMS solution analysis software as the lowest concentration of the analytes detectable with an RSD of 33% ( $= 3\sigma$ ), based on the noise level in the chromatograms of the cleaned blank extract of green perilla and the respective standard peaks, were sufficient (0.005  $\mu$ g/g by UV, 0.001  $\mu$ g/g by MS) for monitoring spinosad residues in vegetables and fruits.

Table 4. Vegetables and fruits examined and the MRLs for spinosad

| Sample                 | No. found/analyzed | Residue found, $\mu\text{g/g}$ | MRL, $\mu\text{g/g}$ <sup>a</sup> |                          |
|------------------------|--------------------|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
|                        |                    |                                | Before final draft                | Final draft <sup>b</sup> |
| Apple                  | 0/2                |                                | 0.5                               | 0.5                      |
| Asparagus              | 0/1                |                                | —                                 | 5                        |
| Broccoli               | 0/1                |                                | 2                                 | 2                        |
| Cabbage                | 2/6                | 0.03, 0.02                     | 2                                 | 2                        |
| Cabbage, Chinese       | 0/2                |                                | 8                                 | 8                        |
| Iyo orange             | 0/1                |                                | 0.3                               | 0.3                      |
| Cucumber               | 0/2                |                                | 0.5                               | 0.5                      |
| Edible chrysanthemum   | 0/1                |                                | 8                                 | 8                        |
| Eggplant               | 0/2                |                                | 2                                 | 2                        |
| Fig                    | 1/2                | 0.02                           | 0.3                               | 0.3                      |
| Japanese radish (leaf) | 0/1                |                                | 1                                 | 1                        |
| Japanese radish (root) | 0/1                |                                | 0.2                               | 0.2                      |
| Lettuce                | 0/3                |                                | 8                                 | 8                        |
| Melon                  | 0/1                |                                | 0.3                               | 0.3                      |
| Qing gin cai           | 0/2                |                                | 2                                 | 2                        |
| Sunny lettuce          | 0/4                |                                | 8                                 | 8                        |
| Green perilla          | 0/3                |                                | —                                 | 10                       |
| Peach                  | 0/1                |                                | 0.2                               | 0.2                      |
| Pimientos              | 0/1                |                                | 2                                 | 2                        |
| Potherb mustard        | 0/2                |                                | 5                                 | 5                        |
| Shallot                | 0/1                |                                | —                                 | 5                        |
| Spring onion           | 0/2                |                                | —                                 | 5                        |
| Strawberry             | 0/5                |                                | —                                 | 1                        |
| Tomato                 | 0/3                |                                | 0.5                               | 0.5                      |
| Watermelon             | 0/1                |                                | 0.3                               | 0.3                      |
| Total                  | 3/51               |                                |                                   |                          |

<sup>a</sup> MRL = Maximum residue limit.

<sup>b</sup> Final draft of the Japanese positive list system.

### Application to Commercial Samples

In 2004, the applicability of this method to routine analyses was tested with 51 commercial vegetable and fruit samples. All the commercial samples were successfully analyzed for spinosad without any seriously interfering peaks. Figure 7 shows the representative UV chromatogram, MS chromatograms, and MS spectra obtained from analysis of a cabbage sample in which spinosad was detected at a concentration of 0.02  $\mu\text{g/g}$ . Details are listed in Table 4. Although spinosad was detected at concentrations of 0.02–0.03  $\mu\text{g/g}$  in 2 cabbage samples and 1 fig sample, these residue levels were lower than the maximum residue limits (MRLs) of the final draft of the Japanese positive list system, which became effective on May 29, 2006.

Therefore, the newly developed method has an advantage for such routine residue analyses. Additionally, about 10 extracts prepared for the multiresidue analysis can be processed within 1 working day (8 h).

### Conclusions

An HPLC-UV/MS method was developed for the determination and confirmation of spinosad in vegetables and fruits. An autocleanup system combining GPC and graphitized carbon-CH<sub>2</sub>-layered column SPE makes it possible to easily and effectively remove sample matrix with minimal loss of analytes. The recovery and commercial sample data show that this newly developed residue method, which uses a GPC-SPE cleanup system, is a simple, rapid, and reliable tool for monitoring spinosad in vegetables and fruit

## References

- (1) Tomlin, C.D.S. (2003) *The Pesticide Manual*, 13th Ed., British Crop Protection Council, Surrey, UK, pp 898–900
- (2) Incorporated Administrative Agency, Agricultural Chemicals Inspection Station (2004) *Nouyaku Tekiyō Ichiranhyō 2005*, Japan Plant Protection Association, Tokyo, Japan, p. 860
- (3) Shibuya, S., Kawahata, Y., Kawahata, M., & Shimazaki, I. (2005) *Shibuya Index 2005*, Shibuya Index Research Group, Tokyo, Japan, p. 67
- (4) Notification No. 0124001 of the Pharmaceutical and Food Safety Bureau (January 24, 2005) Ministry of Health, Labor and Welfare, Tokyo, Japan
- (5) Notification No. 1129001 of the Pharmaceutical and Food Safety Bureau (November 29, 2005) Ministry of Health, Labor and Welfare, Tokyo, Japan
- (6) Ueno, E., Oshima, H., Saito, I., Matsumoto, H., Yoshimura, Y., & Nakazawa, H. (2004) *J. AOAC Int.* 87, 1003–1015
- (7) Ueji, M., Kobayashi, H., & Nakamura, K. (2001) *Analytical Methods of Pesticide Residues 2002*, Soft Science, Tokyo, Japan, pp 457–459
- (8) Ordinance No. 54 of the Prime Minister's Office (December 27, 1993) Prime Minister Office, Tokyo, Japan
- (9) West, S.D., & Turner, L.G. (2000) *J. Agric. Food Chem.* 48, 366–372
- (10) West, S.D., Yeh, L.T., Turner, L.G., Schwedler, D.A., Thomas, A.D., & Duebelbeis, D.O. (2000) *J. Agric. Food Chem.* 48, 5131–5137
- (11) Fillion, J., Hindle, R., Lacroix, M., & Selwyn, J. (1995) *J. AOAC Int.* 78, 1252–1266
- (12) Ueno, E., Oshima, H., Saito, I., & Matsumoto, H. (2000) *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 41, 178–187
- (13) Ueno, E., Oshima, H., Saito, I., & Matsumoto, H. (2003) *J. AOAC Int.* 86, 1241–1251
- (14) Specht, W., & Tillkes, M. (1985) *Fresenius Z. Anal. Chem.* 322, 443–455
- (15) Saito, I., Ueno, E., Oshima, H., & Matsumoto, H. (2004) *J. Pestic. Sci.* 29, 117–120