

定分析法からは逸脱しているため、修正することが望ましいと考えられる。

機関11および18からは、GA21LおよびGA21Hスクリーニング試験について、機関15からはGA21Hスクリーニング試験について、いずれもCaM混入率に関しZスコアが管理限界を超える結果が報告された(Fig.1およびFig.4)。また、機関18に関しては、GA21Lより得られた総GMトウモロコシ混入率についてもZスコアが管理限界を超えていた(Fig.3)。これらの機関はいずれもDNA抽出法にCTAB法を採用しており、定量PCRに供したDNAの質や、PCR組成液に規定量のDNAを添加出来なかったこと等が混入率に影響を与えた可能性が考えられた。しかし一方で、機関18ではすべての試験項目において、全32機関の平均値に比べ高めの混入率が算出される傾向が認められ、またそれらのばらつきも小さいことから、PCR用試薬もしくは定量PCR機器の精度、あるいはDNA抽出法自体に系統誤差が含まれている可能性も考えられる。

機関19からはGA21Lスクリーニング試験について、GA21混入率のZスコアが管理限界を超える値が報告された(Fig.2)。また、GA21Hスクリーニング試験におけるGA21混入率、ならびに総GMトウモロコシ混入率についてはRが管理限界を上回った(Fig.5およびFig.6)。機関19については先に言及したとおり、DNA収量およびSSIIb測定値のばらつきが大きいことが明らかになっている。さらに、DNA収量ならびにSSIIb測定値の解析に供した9検体について、検体ごとにDNA収量とSSIIb測定値の相関性について検討した結果、概してDNA収量の少ない検体ほどSSIIb測定値が高い傾向が認められ、この結果からも抽出DNAの吸光度測定に問題がある可能性が考えられた。

さらに機関20、21および29においては、GA21H系統定量試験におけるMON810混入率、機関25においては、GA21Lスクリーニング試験におけるGA21混入率および総GMトウモロコシ混入率、機関31においては、GA21Hスクリーニング試験におけるGA21混入率に関し、Zスコアが管理限界を超えていた(Fig.2、3、5およびFig.7)。しかし、これらの機関については、報告された各測定値および調査項目からその原因について考察することが出来なかった。

また、前述の機関以外にも、機関番号3、4、24、29および31から報告された混入率に、Rの管理限界を超える結果が含まれていた(Fig.2、5、7およびFig.8)。これらのばらつきの要因について、報告された各測定値および調査項目からは明らかにすることができなかった。しかし、栗原らの報告¹⁹⁾によれば、GMトウモロコシを対象とした定量PCR法により得られる混入率の室内再現性(R.S.D.r)は、対象とするGMトウモロコシ系統およびその濃度によって変動はあるものの、概して20%程度であることが示されている。全32機関から報告された混入率についてR.S.D.rを算出したところ、Rが管理限界を超えた機関のうち機関3、12、24を除く機関に関しては、他機関にくらべて大きめではあるが、R.S.D.rは20%程度であることが明らかになった。Rは、併行試験された複数検体から得られた混入率の最大値と最小値の差であるため、簡

便にばらつきを判断することが可能であるが、本研究において実施した共同試験の結果からは、Rにより分析結果のばらつきを直接評価することが難しい場合があることが示唆された。また、本研究における管理限界は各機関から報告された値の総平均±2S.D.として設定したが、この場合、全参加機関数の5%に相当する数の機関が必ず管理限界を超える結果になるため、分析法としてのばらつきを加味した上で分析精度の管理を行うのであれば、共同試験の結果として得られたばらつきを試験用試料の認証値に付与することで管理限界を設定するという方法も、方策のひとつとして検討すべきであると考えられる。

V まとめ

遺伝子組換えトウモロコシ(GA21ならびにMON810系統)を対象とした外部精度管理を目的に、試験的に実施した共同試験の結果、データの確認体制に不備のある機関がみられた。また、手技の習熟および試験法の理解が不十分であることに起因すると考えられる不正確な結果を報告した機関があった。また精度管理上の管理限界を超えた機関から報告された分析値を詳細に解析した結果、DNA収量、質およびそれらのばらつき、またSSIIb測定値のばらつきが明らかとなり、DNA抽出操作の不安定さ、吸光度測定およびPCR組成液の調製操作の不正確さが分析結果に重大な影響を与える要因であることが強く示唆された。その他として、分析結果のばらつきの評価法および管理限界の設定法に関して、分析法そのものが有するばらつきを加味することについても、今後検討していく必要があると考えられた。

VI 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。

VII 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続き”平成12年5月1日。
- 5) 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).
- 6) 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).
 - 7) 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) 穂山浩, 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).
 - 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)*, 46, 270-276 (2005).
 - 13) 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).
 - 14) 独立行政法人 農林水産消費技術センター:JAS分析試験ハンドブック“遺伝子組み換え食品検査・分析マニュアル 改訂第2版”(2002).
 - 15) Thompson, M., Wood, R., International harmonized protocol for proficiency testing of (chemical) analytical laboratories. *J. AOAC Int.* 76, 926-939 (1993).
 - 16) Horwitz, W. ed., “Official methods of analysis of AOAC International” 17th Ed., Gaithersburg, MD, AOAC International, Appendix D, pp 2-11 (ISBN 0-935584-67-6).
 - 17) 大隅 昇: “精度管理における統計的データ解析”*食品衛生学雑誌*, 39(4),J-325-332(1998), 40(4),J-325-331(1999), 41(3),J-238-242(2000), 41(5),J-316-322(2000).
 - 18) Watanabe, T., Kasama, K., Kikuchi, H., Suzuki, T., Tokishita, S., Sakata, K., Matsuki, A., Hino, A., Akiyama, H., Maitani, T., Examination of a system for laboratory-performance study of quantitative PCR methods to analyze an approved genetically modified maize(Mon810 line). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, in press.
 - 19) 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, 1077-1089 (2002).

定量PCR法による遺伝子組換えトウモロコシの定量分析に 適用される4種のDNA抽出法の比較検討

(2006年4月17日受付)

(2006年6月30日受理)

渡邊敬浩^{a)}、時下祥子^{a)}、菊地博之^{a)}、坂田こずえ^{a)}、日野明寛^{b)}、穉山浩^{a)}、米谷民雄^{a)}

a) 国立医薬品食品衛生研究所

b) (独) 食品総合研究所

Comparative study of four methods to extract genomic DNA for quantification of genetically modified maize by a real-time polymerase chain reaction

(Received April 17, 2006)

(Accepted June 30, 2006)

Takahiro Watanabe^{a)}, Shoko Tokishita^{a)}, Hiroyuki Kikuchi^{a)},
Kozue Sakata^{a)}, Akihiro Hino^{b)}, Hiroshi Akiyama^{a)}, Tamio Maitani^{a)}

a) National Institute of Health Sciences

b) National Food Research Institute

Abstract

A method based on the real-time polymerase chain reaction (PCR) has been developed as the Japanese official standard method for the quantitative analysis of approved genetically modified (GM) maize by the Ministry of Health, Labour, and Welfare (MHLW) and the Ministry of Agriculture, Forestry, and Fisheries (MAFF). MHLW also defines three methods to extract genomic DNA used as analytes in the real-time PCR method. These three DNA extraction methods include a method using a silica-gel membrane kit (mini method), a silica-based resin type kit (WIZARD method), and the method using a buffer containing cetyltrimethylammonium bromide (CTAB method). On the other hand, the DNA extraction method using a larger size silica-gel membrane kit (MAXI method), which was employed in collaborative studies to evaluate the performance of the real-time PCR method, has been identified by MAFF for the same purpose. However, the influence of the DNA extraction methods on the GM maize quantitative value using the real-time PCR method has not been demonstrated. Therefore, genomic DNA was extracted from the mixed flour-sample containing a known amount of MON810 and GA21 line, according to four different DNA extraction methods, and analyzed by the real-time PCR method with the aim of examining the influence of the extraction methods on the GM maize quantitative value.

Keywords : DNA抽出法、遺伝子組換えトウモロコシ、定量PCR、検査方法

DNA extraction method, genetically modified maize, quantitative polymerase chain reaction, testing method

1 緒言

厚生労働省は、「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、一部改正:平成17年5月17日、食安発第0517001号)^{1),2)}を通知し、遺伝子組換え(GM)食品に関する検査方法(通知法)を定めた。本通知法において、安全性審査を終了したGMトウモロコシの定量分析法として、定量PCR法が定められている。また定量PCR法における直接の分析対象物質となるDNAを抽出・精製する方法については、3種の方法(シリカゲル膜タイプキット法;

mini法、シリカベースレジンタイプキット法;WIZARD法、セチルトリメチルアンモニウムブロミド法;CTAB法)が併記されている。一方で、国立医薬品食品衛生研究所ならびに(独)食品総合研究所が中心となり実施した、定量PCR法の妥当性確認試験においては、上記3種のDNA抽出法とは異なる方法(シリカゲル膜タイプキット法;MAXI法)がDNA抽出法として採用された。このため、定量PCR法によりGMトウモロコシの含有率(定量値)を算出する際に使用される換算係数(内標比;内在性遺伝子とGM作物に特異的なDNA配列のコピー数の比)には、MAXI法により抽出されたDNA試

連絡先: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1 国立医薬品食品衛生研究所 渡邊敬浩

Corresponding author: Takahiro Watanabe, National Institute of Health Sciences,
1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

料を用いた共同試験の結果として得られた実測値が規定されている。またMAXI法は、(独)農林水産消費技術センターにより監修されているJAS分析試験ハンドブック³⁾において、定量PCR法に供するDNAを抽出・精製するための方法として示されている。これらのことを背景に、安全性審査を終了したGMトウモロコシを対象とした定量分析を行う場合には、試験者はまず、通知法あるいはJAS分析試験ハンドブックのいずれに従うかによって、MAXI法もしくは、それ以外の3種のDNA抽出法を選択する。また、通知法に従う場合には、3種のDNA抽出法と定量PCR法との組み合わせに試験法上の制限がされていないことから、いずれかのDNA抽出法を任意に選択する。このため、事実上、試験者は4種のDNA抽出法を任意に選択することが可能である。しかし、これらDNA抽出法の違いが分析結果に与える影響についてはこれまでに明らかにされていない。

本研究においては、異なる方法を用いて抽出されたDNAが、定量PCR法により得られるGMトウモロコシの定量値に与える影響について明らかにすることを目的とし、各DNA抽出法を用いて抽出されたDNAの質ならびに収量、DNA分解の程度、さらに定量PCR法により得られる定量値について詳細な比較解析を行った。

II 実験方法

1. 試料

GMトウモロコシ(GA21ならびにMON810系統)試料は厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課を通じ、米国モンサント社より入手した。また、擬似混入試料調製時のマトリクスとして使用した非遺伝子組換え(non-GM)トウモロコシ試料(米国产トウモロコシ)は、米国の商事会社を通じて入手した。入手した全てのトウモロコシ試料を500 μm のスクリーンを取り付けた高速遠心式粉碎器を用いて粉碎した。均一に粉碎した各種トウモロコシ試料を凍結乾燥処理した後、GA21ならびにMON810系統の粉碎試料はそれぞれ、100%GMトウモロコシ試料(GA21試料およびMON810試料)として用いた。また、Non-GMトウモロコシ試料を粉碎および凍結乾燥処理して調製したマトリクス試料に対し、GA21ならびにMON810試料を重量換算でそれぞれ1.0%となるよう混合した試料を低濃度試料(GA21L)、GA21試料を5.0%、MON810試料を1.0%となるよう混合した試料を高濃度試料(GA21H)とした。なお、これら擬似混入試料は小分け試料とした後に、平成16年度に実施した外部精度管理試験において配付した試料であり、その均一性、 -20°C の条件で保存した場合の定量値の安定性が確認されている⁴⁾。

2. 試薬

DNAの抽出精製にはmini法として、QIAGEN社製DNeasy Plant Mini Kit、MAXI法としてQIAGEN社製DNeasy Plant Maxi Kit、WIZARD法としてPromega社製Wizard DNA Clean-

up system、また、CTAB法としてセチルトリメチルアンモニウムブロミドを含む各種試薬を用いた。PCRにはTaqMan[®] Universal PCR Master Mix(アプライドバイオシステムズ:ABI社製)、トウモロコシ内在性DNA SSIIBオリゴヌクレオチドセット、組換えDNA P35S-1オリゴヌクレオチドセット、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全て(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遺伝子工学用を用いた。他の試薬は全て市販の特級品を用いた。

3. 装置

各種試料の粉碎および混合には、ZM 100(Retch社製)を使用した。試料からのDNA抽出・精製および濃度測定には、以下の機器を使用した。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:Avantii HP25(Beckman社製)、卓上遠心機: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装置には、ABI PRISM[®] 7700(ABI社製)を使用した。

4. DNA抽出法

MON810試料、GA21試料、GA21LおよびGA21Hの計4種の試料を共通の試料として用い、mini法、WIZARD法、CTAB法およびMAXI法を用いてDNAを抽出・精製した。各DNA抽出法は、食安発第0517001号もしくはJAS分析試験ハンドブックに記載されている方法に従った。MAXI法を用いた場合には、各試料について、1点あたり1gとなるように秤量分取した小分け試料6点(計24点)からDNAを抽出した。その他のDNA抽出法を用いた場合には、GA21LおよびGA21Hに関しては6点ずつ、MON810試料ならびにGA21試料に関しては3点ずつ、計18点の小分け試料からDNAを抽出した。

また、抽出したDNAの吸光度を200 nmから320 nmの波長域で連続的に測定し、O.D. 230 nm、260 nm、280 nmでの吸光値から260 nm/280 nmおよび260 nm/230 nmの比を求めることで精製度の確認を行った。また、O.D. 260 nmの吸光値1を50 ng/ μL DNAとしてDNA濃度を算出した。

5. 電気泳動

各試料、各DNA抽出法の組み合わせにより抽出されたDNAをアガロースゲル電気泳動により分離した。電気泳動時には0.7%の濃度で調製したアガロースゲル(6 cm \times 11 cm)を用い、マーカーとして λ -HindIII digestを用いた。20 ng/ μL の濃度に調製した各DNA試料液15 μL とLoading Buffer 2 μL をよく混合させた後、各ウェルにアプライし、100 V定圧で約30分間泳動した。泳動終了後のゲルは、エチジウムブロミド溶液中(150 ng/mL)で30分間染色し、その後、水中で30分間脱染色した。脱染色後のゲルをUV照射装置上で画像解析した。

6. 定量PCR法

食安発第0517001号に記載の方法に準拠した。すなわち、CaM定量値およびCaM内標比は、P35S-1オリゴヌクレオチドセットとSSIIb-3オリゴヌクレオチドセット、GA21定量値およびGA21内標比は、GA21-3オリゴヌクレオチドセットとSSIIb-3オリゴヌクレオチドセットをそれぞれ組み合わせ、GMトウモロコシプラスミドセットを共通のキャリブレーションスタンダードとして用いる定量PCR法により測定されたコピー数に基づき算出した。

なお、GA21LおよびGA21Hについては、MAXI法を用いた場合、抽出されたDNA試料に対して繰り返し2回測定し、それ以外のDNA抽出法を用いた場合には、1回の測定を行った。内標比を測定することを目的とした場合には、MAXI法については2回、それ以外のDNA抽出法については3回の測定を行った。

7. 統計解析

MAXI法により得られた結果と、その他のDNA抽出法により得られた結果との有意差検定として、各種統計解析を行った。

まず、GA21LおよびGA21Hと各DNA抽出法の組み合わせにより得られた定量値のそれぞれについて正規性を確認した。正規性が確認されなかった一群の定量値に関しては、マン・ホイットニー-U検定により有意差を検定した。正規性の確認された一群の定量値に関しては、MAXI法と他のDNA抽出法との間で分散分析を行い、等分散を確認した後に、Student t検定を用いて有意差を検定した。

III 結果および考察

1. DNAの収量、質およびそれらのばらつきの比較

本研究において対象とした4種のDNA抽出法のそれぞれ

を用いて抽出されるDNAの収量、質およびそれらのばらつきについて明らかにするため、各抽出法を用いてMON810試料、GA21試料、GA21LおよびGA21HのそれぞれからDNAを抽出し、測定した吸光値に基づき収量の算出および純度検定を行った。各抽出法を通して同数の小分け試料を用いたことから、GA21LならびにGA21Hをあわせて計12点の試料として扱い、抽出法別DNA収量の平均値を算出した。その結果、MAXI法によるDNAの平均収量は 43.21 μ gで最も高く、これに対し、CTAB法でのDNA収量が2.81 μ gで最低であった。また、mini法、WIZARD法を用いた場合のDNAの平均収量はそれぞれ19.36 μ gおよび13.16 μ gであった (Table 1)。

上記の通り、異なるDNA抽出法を用いることによりDNAの収量が異なることが明らかとなったが、その主たる原因は各DNA抽出法に含まれる縮分操作であると考えられる。MAXI法では1gの試料から縮分操作を行うことなくDNAを抽出する。これに対し、CTAB法、mini法、WIZARD法のいずれにおいても、2gの試料を対象に抽出を開始するものの、抽出緩衝液を添加し均一化した混合液の一部を分取し、それ以降の操作を行うという縮分操作が規定されている。CTAB法、mini法、WIZARD法の縮分率はそれぞれ1/75、1/13.27、1/40であり、おおよそDNAの収量と相関していると考えられた。また、実際の検査に際しては、試料によっては複数系統のGMトウモロコシが含まれており、系統別の定量値を算出するために繰り返し測定を行う必要が生じる場合も考えられる。このような場合には、収量の少ない抽出法を採用することで、DNA試料が不足する可能性が予測された。

DNA収量のばらつきに関しては、CTAB法を用いてGA21試料から抽出を行った場合に、相対標準偏差 (Relative Standard Deviation; R.S.D.) が30%程度の高いばらつきを示したが、その結果を除けばDNA抽出法および試料の種類によらずR.S.D.は20%を下回っており、安定した量のDNAが抽出されていると判断された。

Table 1. Quality and yield of DNA extracted from the samples using the four official DNA extraction methods

Method	Sample	Number of test portions	DNA (μ g)	R.S.D. (%)	Ratio	
					260 nm/280 nm	260 nm/230 nm
MAXI	GA21L	6	43.28 \pm 4.07	9.41	1.84 \pm 0.00	2.14 \pm 0.03
	GA21H	6	43.13 \pm 1.64	3.81	1.84 \pm 0.00	2.16 \pm 0.02
	GA21	6	33.58 \pm 6.75	20.09	1.86 \pm 0.00	2.25 \pm 0.03
	MON810	6	35.93 \pm 2.09	5.82	1.87 \pm 0.01	2.29 \pm 0.02
mini	GA21L	6	19.03 \pm 1.63	8.57	1.83 \pm 0.01	2.03 \pm 0.02
	GA21H	6	19.69 \pm 2.98	15.13	1.84 \pm 0.14	2.03 \pm 0.06
	GA21	3	18.22 \pm 0.67	3.65	1.83 \pm 0.02	2.29 \pm 0.02
	MON810	3	17.15 \pm 0.28	1.63	1.81 \pm 0.00	2.36 \pm 0.03
CTAB	GA21L	6	2.80 \pm 0.10	3.63	1.81 \pm 0.02	1.66 \pm 0.06
	GA21H	6	2.81 \pm 0.26	9.35	1.81 \pm 0.01	1.65 \pm 0.10
	GA21	3	2.05 \pm 0.67	32.47	1.88 \pm 0.06	1.42 \pm 0.18
	MON810	3	2.30 \pm 0.31	13.58	1.87 \pm 0.01	1.58 \pm 0.06
WIZARD	GA21L	6	12.91 \pm 0.54	4.20	1.78 \pm 0.02	0.32 \pm 0.14
	GA21H	6	13.41 \pm 0.30	2.22	1.80 \pm 0.01	0.22 \pm 0.04
	GA21	3	14.37 \pm 0.25	1.75	1.80 \pm 0.01	0.22 \pm 0.04
	MON810	3	16.08 \pm 0.41	2.53	1.81 \pm 0.01	0.20 \pm 0.04

Data represent means \pm S.D.

R.S.D.: Relative Standard Deviation

DNAの質について考察するために実施した純度検定においては、O.D. 260 nm / 280 nm、260 nm / 230 nmの比を求め、それぞれの値が1.8、2.0以上であることを良好な精製が行われたことの判断基準とした。Table 1に示したとおり、タンパク質残存の指標となる O.D. 260 nm / 280 nm比に関しては、すべてのDNA抽出法と試料の組み合わせにおいて基準を下回ることがなかったのに対し、糖類等の残存の指標とされる O.D. 260 nm / 230 nm比に関してはCTAB法およびWIZARD法を用いた場合に、すべての試料から得られたDNAについて基準を下回った。CTAB法に関しては、抽出緩衝液中に含まれるEDTAが230 nm付近に強い吸光を有するため、これが残存した場合にO.D. 260 nm / 230 nm比が低下することが指摘されている⁴⁾。またWIZARD法に関しては、抽出緩衝液に含まれるグアニジン化合物が230 nmに吸光を有することが知られており、これが残存したため、O.D. 260 nm / 230 nm比が低下したものと考えられた。

2. 抽出DNAの分子量分布

抽出されたDNAが極度に分解し低分子化していた場合、定量PCR法における鋳型となり得ず、内在性遺伝子もしくはGM作物特異的DNA配列を正しく計測することができなると考えられる⁵⁾。このため、各抽出法により抽出されたDNA試料中に含まれるDNAの分子量分布について明らかにするため、電気泳動法により分離し確認した。その結果、23 kbp付近のバンドを中心に、低分子方向にむけて薄い帯をひく、いわゆるスメア状の電気泳動像がすべての抽出法および試料の組み合わせにおいて観察された。また、GA21LおよびGA21Hにおいて特に顕著であるが、WIZARD法により抽出したDNA試料を分離した場合には、その他の抽出法により抽出したDNA試料を分離した場合に比べ、スメアな像がわずかに濃く染色されていた。この結果は、WIZARD法を用いてDNAを抽出した場合、他の抽出法に比べてDNAの低分子化が進みやすい傾向があることを示唆している。しか

し、極端に低分子化したDNAのみが観察されるといった明確な差は認められなかった(Fig. 1)。

植物組織からインタクトな高分子量ゲノミックDNAの抽出を試みた場合、Fig. 1にみられるように、DNAサイズマーカーで観察されるところの23 kbp以上の長さのバンドが強く観察され、様々な分子量に分解したDNAの存在を示す、スメアな像は観察されない⁶⁾。検討を行ったいずれのDNA抽出法を用いた場合にもスメアな像が観察されたことは、これらの抽出法を用いて抽出されたDNA試料に含まれるDNAが部分的に分解し、断片化が生じていることを示唆している。しかし、前述のとおり、特定のDNA抽出法によって顕著に低分子化したDNAが観察されるといったことがなかったことから、各DNA抽出法によって抽出されるDNAの分子量分布の点において、定量PCR法の結果に重大な影響を与える要因は認められないと考えられた。

3. 内在性遺伝子のコピー数比較

(1) 同一のDNA抽出法を用いて調製された複数のDNA試料間に認められたばらつき

定量PCR法を用いる場合、GMトウモロコシの定量値は、トウモロコシに普遍的に含まれる内在性遺伝子(*SSI1b*)の測定値(コピー数)とGMトウモロコシに含まれる組換えDNA配列のコピー数の比を求め、これに換算係数(内標比)の逆数を乗じて算出される。この分析法において、同一試料から同一のDNA抽出法を用いて抽出されたDNA試料から計測される*SSI1b*コピー数は、基本的には安定して一定の値を示すと考えられる。また、理論的には規定質量のDNAに含まれる内在性遺伝子のコピー数は一定であるため、計測されるコピー数にDNA抽出法による差異は生じないことが期待される。そこで、抽出法ごとに6点の独立したGA21HからDNAを併行抽出し、得られた6点のDNA試料を対象に、*SSI1b*コピー数を計測し比較した。その結果、抽出法ごとに抽出された各6点のDNA試料から計測されたコピー数のばらつきは



Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of DNAs extracted from four powder samples including GA21H*, GA21L**, GA21 and MON810. Lane M, molecular marker λ *Hind*III; lanes 1, 5, 9 and 13, DNAs extracted using the maxi method; lanes 2, 6, 10 and 14, DNAs extracted using the mini method; lanes 3, 7, 11 and 15, DNAs extracted using the CTAB method; lanes 4, 8, 12 and 16, DNAs extracted using the WIZARD method.

*GA21H is the mixed powder sample containing 5% GA21 and 1% MON810 line.

**GA21L is the mixed powder sample each containing GA21 and MON810 line in 1% concentration.

MAXI法、mini法、CTAB法、WIZARD法についてそれぞれのR.S.D.が3.25、11.48、8.05、13.02%であった(Table 2)。この結果は、平成16年度のGMトウモロコシを対象とした外部精度管理の結果から解析された28機関で認められたばらつきの平均値(R.S.D.として12.19%)⁴⁾と同等、もしくはそれ以下であり、いずれの抽出法を用いても、併行再現性よく*SSIIb*コピー数を計測可能なDNA試料を抽出できることが示唆された。

(2) 異なるDNA抽出法を用いて得られたコピー数の比較

先述の通り、同一のDNA抽出法を用いて調製された複数点のDNA試料間での*SSIIb*コピー数のばらつきは十分に小さな値を示し、各DNA抽出法の併行再現性が良好であることが示唆された。次に、異なるDNA抽出法により得られるコピー数の大きさについて比較することを目的に解析を行った。その結果、MAXI法、mini法、CTAB法、WIZARD法により得られたコピー数の平均±S.D.はそれぞれ34464±1120、26426±3035、28314±2281、23908±3112コピーであり、最大コピー数と最小コピー数の差は約15000コピーであった(Table 2)。Table 2にまとめたデータは、先述の通り、6点の独立したGA21Hから特定のDNA抽出法により併行抽出された6点のDNA試料を1セット(定量PCR機器で同時に計測する1組)とし、セットごとに異なるラン(PCRから測定値を得るまでの一連の操作)を実施することで得られたコピー数の平均±S.D.である。このため、特定のセットとしてPCRに供された各DNA試料は、反応温度の制御や蛍光シグナル計測の感度等、PCR機器の精度の影響を一様に受けていると考えられる。また、蛍光シグナル強度からコピー数への変換にも、同一のキャリブレーションスタンダードが用いられるため、特定のセットに含まれる6点のDNA試料間での併行再現性を評価することが可能であった。これに対し、異なるセットとして計測されたコピー数は、上述のPCR機器の精度および、キャリブレーションスタンダードが異なることの影響を受けていると考えられる(キャリブレーションスタンダードはランが異なるごとに新たに調製する)。このため、DNA抽出法間でデータを比較する場合には、ランが異なることによる影響(ラン間差)についても考慮しなければならない。そこで、定量PCR法で得られる測定値のラン間差について考察するため、Table 2にまとめたデータの内、6点の独立したDNA試料で構成されるセットについて、ランを2回実施して得られた計12点分のコピー数の平均±S.D.として示したMAXI法の結果をランごとに分割し、比較した。その結果、コピー数の平均±S.D.は1回目のランで34387±1224、

2回目のランで34541±1118であり、その平均値の差は154コピーであった。詳細には、ランの回数を増やし明らかにすべきと考えるが、少なくとも上記の結果からすれば、同一のDNA抽出法により抽出されたDNA試料から計測されるコピー数のラン間での差は、異なるDNA抽出法間で比較した場合に得られたコピー数の差の10分の1程度の大きさであった。これらの結果より、異なるDNA抽出法間に認められた*SSIIb*コピー数の差へのラン間差の寄与率は非常に小さいと考えられ、DNA抽出法が異なることが定量PCR法により得られる*SSIIb*コピー数に差を生じる原因として強く示唆される。

DNA抽出法が異なることにより計測される*SSIIb*コピー数の大きさに差を生じる原因としては、Fig. 1に示した電気泳動の結果からは判断することのできないDNA分子の状態、PCRに影響を及ぼす未知の不純物などが影響を与えているのかもしれない。特に、DNAの質量を260 nmの吸光度測定値に基づき換算しているため、特定のDNA抽出法に特徴的に260 nmの吸光度に影響を与える不純物が残存する場合には、DNA質量の算出が不正確となり、PCRに供されるDNA質量に誤差が生じ、これによって*SSIIb*コピー数が増減することが考えられる。しかし、一連のDNA抽出操作の結果として計測されるDNAの質量と質、コピー数の関係については、不明な点が多く、今後明らかにすべき課題の一つである。また、GMトウモロコシの定量値は*SSIIb*コピー数と組換えDNA配列のコピー数比に基づき算出されるため、この2つのコピー数がともに同じ傾向をもって変動した場合には、定量値は変動しない(PCRに供されるDNA質量に誤差が生じた場合などがこれにあたる)。よって、DNA抽出法が異なることで計測される*SSIIb*コピー数に差が認められることと、DNA抽出法が異なることでGMトウモロコシの定量値に差が認められることは必ずしも同義ではない。

4. 通知記載の内標比を用いて算出されたGMトウモロコシ定量値の比較

DNA抽出法の異なりによるGMトウモロコシ定量値への影響を評価するため、疑似混入試料(GA21LおよびGA21H)を対象とし、CaMならびにGA21定量値を算出し、得られた定量値のばらつき(R.S.D.)および差について比較した。その結果、各試料、定量PCR法、およびDNA抽出法の組み合わせによって得られたそれぞれの定量値のばらつき(R.S.D.)は、最大でも13.3%であり、DNA抽出法と定量PCR法の組み合わせによらず、同一試料内での併行再現性は良好であること

Table 2. Copy numbers measured for taxon-specific gene (*SSIIb*) in the DNA extracted using the four extraction methods

Sample	DNA extraction method	Number of measurements	Repeat number of measurements	Copy number of <i>SSIIb</i>	R.S.D. (%)
GA21 H	MAXI	6	2	34464±1120	3.25
	mini	6	1	26426±3035	11.48
	CTAB	6	1	28314±2281	8.05
	WIZARD	6	1	23908±3112	13.02

Data represent means ± S.D.

R.S.D.: Relative Standard Deviation

が明らかになった (Table 3)。

MAXI法は、通知記載の内標比を計測するための共同試験および、定量PCR法の妥当性検証試験に採用されたDNA抽出法であるため⁷⁾、本研究で検討した4種のDNA抽出法の中で最も検証の進められているDNA抽出法であると考えられる。そこで、MAXI法により得られた各定量値と、その他のDNA抽出法により得られた定量値のうち対応する定量値とを比較し、その差をバイアスとして算出した。その結果、WIZARD法とMAXI法により得られた各定量値のバイアスは、すべての試料と定量PCR法の組み合わせを通して、±10%以内であった。これに対し、mini法およびCTAB法のそれぞれと、MAXI法により得られた各定量値のバイアスは、試料および定量PCR法の組み合わせによって大きさに差が認められるが、最小が12.2%、最大が33.9%であった (Table 3)。さらに、3種のDNA抽出法により得られた各定量値と、それぞれに対応するMAXI法により得られた定量値との間で有意差検定を行った結果、mini法およびCTAB法で得られた

すべての定量値とMAXI法で得られた定量値との間に、信頼区間95%での有意差が認められた (Table 4)。

5. DNA抽出法別内標比の計測と定量値の再計算

mini法およびCTAB法により得られた定量値とMAXI法により得られた定量値とのバイアスが比較的大きく、かつ、試料と定量PCR法の組み合わせのすべてを通じて高値であった結果は、mini法およびCTAB法により得られる定量値に系統誤差が含まれていることを示唆している。Table 3に示したすべての定量値は、通知に記載された内標比を用いて算出しており、先述のとおり、この内標比はMAXI法により抽出されたDNA試料を対象に計測された換算係数である。このため、mini法とCTAB法により抽出されたDNAを対象として計測される内標比が、MAXI法により抽出されたDNAを対象として計測される内標比とは異なっていた場合、系統誤差を生じる最大の要因になり得るのではないかと考えられた。そこで、擬似混入試料調製時に添加した100%GMトウ

Table 3. GMO amount calculated using the conversion factors defined in the official standard methods

Quantitative PCR method	Sample	DNA extraction method	Number of measurements	GMO Amount (%)	R.S.D. (%)	Bias (%)
CaM	GA21L	MAXI	12	1.58±0.20	12.7	
		mini	6	1.95±0.19	9.8	23.7
		CTAB	6	2.05±0.19	9.1	30.2
		WIZARD	6	1.61±0.21	13.3	2.4
	GA21H	MAXI	12	1.61±0.16	9.8	
		mini	6	1.99±0.20	9.9	24.0
		CTAB	6	2.15±0.19	8.7	33.9
		WIZARD	6	1.65±0.15	9.2	2.6
GA21	GA21L	MAXI	12	1.34±0.09	6.4	
		mini	5	1.56±0.09	5.6	16.5
		CTAB	6	1.50±0.15	9.8	12.2
		WIZARD	6	1.35±0.08	6.1	0.9
	GA21H	MAXI	12	6.38±0.35	5.5	
		mini	6	7.44±0.28	3.8	16.5
		CTAB	6	7.63±0.50	6.6	19.6
		WIZARD	6	5.95±0.38	6.4	-6.8

Data represent means ± S.D.

R.S.D.: Relative Standard Deviation

Table 4. Statistical analysis for GMO amount measured in the DNA extracted using the four different extraction methods

Quantitative PCR method	Sample	DNA extraction method	Number of measurements	F	Critical value of F (p=0.05)	t value	Critical value of t (p=0.05)	U	Critical value of U (Lower, p=0.05)
CaM	GA21 L	mini	6	1.099	4.704	3.778	2.120		
		CTAB	6	1.158	4.704	4.856	2.120		
		WIZARD	6	0.879	4.704	0.368	2.120		
	GA21 H	mini	6	0.641	4.704	4.499	2.120		
		CTAB	6	0.711	4.704	6.505	2.120		
		WIZARD	6	1.093	4.704	0.532	2.120		
GA21	GA21 L	mini	5	0.978	5.936	4.805	2.131		
		CTAB	6	0.341	4.704	2.991	2.120		
		WIZARD	6	1.099	4.704	0.295	2.120		
	GA21 H	mini	6	1.592	4.704	6.339	2.120		
		CTAB	6	0.497	4.704			4	14
		WIZARD	6	0.853	4.704	2.385	2.120		

GMO amount was calculated with the conversion factors defined in the Japanese official standard methods.

モロコシ試料 (MON810ならびにGA21試料) から mini法およびCTAB法を用いて抽出したDNA試料を用いて内標比を計測した。また、測定に使用した定量PCR機器の影響により、厳密には通知記載の内標比とは異なる内標比が計測される可能性が考えられたため、MAXI法により100%GMトウモロコシ試料から抽出したDNA試料についても、同様に内標比を測定した。その結果、通知記載のCaM内標比が0.39であるのに対し、測定されたCaM内標比の平均±S.D.はMAXI法で 0.42 ± 0.02 、mini法で 0.45 ± 0.01 、CTAB法で 0.44 ± 0.04 であった。一方、通知記載のGA21内標比が2.01であるのに対し、測定されたGA21内標比の平均±S.D.はMAXI法で 2.18 ± 0.06 、mini法で 2.25 ± 0.10 、CTAB法で 2.25 ± 0.10 であった (Table

5)。ついで、測定された内標比および、Table 3にまとめた定量値を算出するために計測した測定値(コピー数)に基づき定量値を再計算した結果、すべての試料および定量PCR法の組み合わせにおいて、mini法およびCTAB法により得られた各定量値と、対応するMAXI法により得られた各定量値とのバイアスは再計算前に比べて小さくなり、最小が8.2%、最大が27.9%であった (Table 6)。しかし、再計算された定量値についてMAXI法とmini法、あるいはCTAB法の間で有意差検定を行った結果、最もバイアスの小さかったGA21LからCTAB法を用いて抽出したDNA試料について算出されたGA21定量値を除き、依然として信頼区間95%での有意差が認められた (Table 7)。

Table 5. Conversion factors measured in the DNA extracted using the three different methods

Quantitative PCR method	Sample	DNA extraction method	Number of measurements		Conversion factor	R.S.D. (%)
			Samples	Runs		
CaM	Mon810	MAXI	6	2	0.42 ± 0.02	5.7
		mini	3	3	0.45 ± 0.01	3.1
		CTAB	3	3	0.44 ± 0.04	8.1
GA21	GA21	MAXI	6	2	2.18 ± 0.06	2.6
		mini	3	3	2.25 ± 0.10	4.3
		CTAB	3	3	2.25 ± 0.10	4.3

Data represent means ± S.D.

R.S.D.: Relative Standard Deviation

Table 6. Re-calculation of GMO amount using the conversion factors specified for the three DNA extraction methods

Quantitative PCR method	Sample	DNA extraction method	Number of measurements	GMO Amount (%)	R.S.D. (%)	Bias (%)
CaM	GA21L	MAXI	12	1.46 ± 0.19	12.7	
		mini	6	1.69 ± 0.17	9.8	15.5
		CTAB	6	1.82 ± 0.17	9.1	24.3
	GA21H	MAXI	12	1.49 ± 0.15	9.8	
		mini	6	1.73 ± 0.17	9.9	15.7
		CTAB	6	1.91 ± 0.17	8.7	27.9
GA21	GA21L	MAXI	12	1.23 ± 0.08	6.4	
		mini	5	1.39 ± 0.08	5.6	12.9
		CTAB	6	1.33 ± 0.13	9.8	8.2
	GA21H	MAXI	12	5.88 ± 0.33	5.5	
		mini	6	6.64 ± 0.25	3.8	12.9
		CTAB	6	6.79 ± 0.45	6.6	15.4

Data represent means ± S.D.

R.S.D.: Relative Standard Deviation

Table 7. Statistical analysis for the re-calculated GMO amount using the conversion factors specified for the three DNA extraction methods

Quantitative PCR method	Sample	DNA extraction method	Number of measurements	F	Critical value of F (p=0.05)	t value	Critical value of t (p=0.05)	U	Critical value of U (Lower, p=0.05)
CaM	GA21 L	mini	6	1.262	4.704	2.512	2.120		
		CTAB	6	1.271	4.704	3.956	2.120		
	GA21 H	mini	6	0.736	4.704	3.030	2.120		
		CTAB	6	0.780	4.704	5.434	2.120		
GA21	GA21 L	mini	5	1.042	5.936	3.780	2.131		
		CTAB	6	0.367	4.704	2.056	2.120		
	GA21 H	mini	6	1.695	4.704	4.982	2.120		
		CTAB	6					6	14

The GMO amount was re-calculated using the conversion factors which was measured in this study for the DNA extracted by the three DNA extraction methods. For the conversion factor specified for the DNA extraction methods, see Table 5.

6. 定量値の評価手法

Table 3に示したとおり、通知記載の内標比を換算係数として用いた場合、mini法、CTAB法により得られる定量値はMAXI法により得られる定量値に対し12.2%~33.9%のバイアスを示し、一般的な統計解析手法に従って評価した場合、有意差が認められた(Table 4)。また、Table 6に示したとおり、DNA抽出法に固有の値として内標比を新たに計測し、その値を用いて定量値を再計算した場合、通知記載の内標比を用いた場合に比べ観察されるバイアスが小さくなった。これらの結果は、DNA抽出法に応じて内標比が変動し、DNA抽出法に依らない共通の内標比を換算係数として用いることによる誤差が系統的に生じる可能性を示唆している。しかしTable 7に示したとおり、DNA抽出法に固有の内標比を用いてもなお、一般的な統計解析手法により評価した場合には有意差が認められた。検査法の準用について鑑みた場合、DNA抽出法に固有の内標比を規定することは実際的ではない。むしろ定量PCR法により得られる定量値の評価を行うという目的に特化した評価基準を設定する必要があるのではないかと考えられた。すなわち、本研究において使用したStudent t検定や、U検定といった一般的な統計解析手法およびそこで設定される有意水準と、定量PCR法により得られる定量値の差異を評価すべき方法および水準とが合致しておらず、 α 過誤が起きているのではないかと考えられる。

定量PCR法において、特定のDNA配列を計測するための基本原理であるPCRには、酵素反応による高度な増幅過程が含まれる。このため、他の理化学的な分析方法により得られる計測値に比べ、温度や阻害物質などの要因変動による初期DNA配列計測値への影響が少なくないと考えられる。さらに、直接の分析対象物質であるDNAは、分子量や化学修飾の状態が異なるヘテロジニアスな物質群として調製される。これらの点から考えれば、本研究で検討したDNA抽出法を含む分析法自体の影響はもちろんのこと、試料については特に、品種、産地、生育状態、保存期間などにより試料中の成分さらには、DNAそのものが大きく変化する可能性が考えられるため、今後、十分な検討を行うべき課題であると思われる。実際に本研究で調製したGA21LならびにGA21Hは、それぞれ重量混合比として1%ずつのMON810試料とGA21試料、1%のMON810試料と5%のGA21試料を含む疑似混入試料として調製したが、均一であることは確認されたものの、重量混合比を真値とした場合、いずれのDNA抽出法を用いても妥当であると評価しうる定量値は得られていない。さらに、非常に困難ではあるが、分析方法、試料、分析者等の複数の要因が組み合わされた場合の影響についても知見を蓄積し、これらの影響を不確かさとして加味した上で評価可能な手法を開発していくことが望ましいと思われる。また、現在可能な方策の一つとしては、これまでに我々が試験的に実施してきた外部精度管理試験の結果や、定量PCR法の妥当性検証試験の結果から、定量値のばらつきやバイアスについての情報を抽出し、それらの解析を通じて、新たな評価基準の設定、不確かさを加味した評価手法の開

発が可能ではないかと考える。

定量PCR法により得られる定量値を対象とした実際的な評価手法の開発が進められることにより、新たに開発される定量PCR法の妥当性をより適切に評価すること、また外部精度管理試験においてより適正な管理を行うことが可能となり、ひいては定量PCR法という分析方法の信頼性がさらに向上することが期待される。

V まとめ

DNA抽出法が定量PCR法により得られるGMトウモロコシ定量値に与える影響について明らかにすることを目的に、公定分析法に規定されている4種のDNA抽出法について、DNAの質、収量、DNA分解の程度、およびGMトウモロコシ定量値について詳細な解析を行った。その結果、CTAB法とWIZARD法において、DNAの質の評価基準とされる吸光度比のうち、260 nm/230 nm比が顕著に低下することが示された。また、DNAの収量に関しては、4種のDNA抽出法の間でばらつきに差は認められなかったが、CTAB法を用いた場合の平均収量が明らかに少なくなることが示された。さらに、電気泳動により分離し得られた像から判断する限り、DNA分解の程度に明確な差は認められなかった。

MAXI法により得られた定量値を比較中心として、一般的な統計解析手法により有意差を検定した結果、mini法ならびにCTAB法を用いて得られる定量値との間に有意差が認められた。定量値の算出に使用される換算係数である内標比がDNA抽出法ごとに変動し、定量値に影響を与える可能性が考えられたため、各DNA抽出法により調製したDNAごとに内標比を計測し、それらを用いて定量値を再解析した。しかし、再解析された定量値を検定してもなお、一般的な統計解析手法を用いた場合には有意差が認められた。これらの結果から、DNA抽出法が異なることによる定量値への影響を評価するためには、それに特化した評価手法が必要ではないかと考えられた。さらに、本研究で検討したDNA抽出法を含む分析方法の全体、試料、分析者等複数の要因が定量値に与える影響を不確かさとして加味した上で評価手法を開発していくことが、新たに開発される定量PCR法の妥当性をより適切に評価するため、また外部精度管理試験においてより適正な管理をおこなうためには必要であると考えられた。

VI 謝辞

本研究は、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)により実施した。

VII 文献

- 1) 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)

- 2) 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17年5月17日, 食発第0517001号(2005)
- 3) 独立行政法人 農林水産消費技術センター: JAS分析試験ハンドブック“遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル 改訂第2版”(2002)
- 4) Watanabe T., Tokishita S., Kasama K., Suzuki T., Ohshima Y., Kikuchi H., Hino A., Akiyama H., Maitani T.: Laboratory-performance Study of Quantitative PCR Methods to Analyze Approved Genetically Modified Maize (GA21 and MON810 lines), *Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Jpn. J. Food. Chem.)*, 13(1), 18-28 (2006)
- 5) Yoshimura T., Kuribara H., Matsuoka T., Kodama T., Shigematsu M., Watanabe T., Akiyama H., Maitani T., Furui S., Hino A.: Applicability of the Quantification of Genetically Modified Organisms to Foods Processed from Maize and Soy. *J. Agric. Food Chem.*, 53(6), 2052-2059 (2005)
- 6) Watanabe T., Teranishi K., Minegishi Y., Furui S., Hino A., Takeda M., Akiyama H., Maitani T.: The effective conditions of the heat-treatment by autoclaving to avoid the contamination on GMO detection using PCR methods, *Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Jpn. J. Food. Chem.)*, 12(1), 28-34 (2005)
- 7) 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, 1077-1089 (2002)

Simultaneous Analysis of 260 Pesticide Residues in Agricultural Products by Gas Chromatography/Triple Quadrupole Mass Spectrometry

MASAHIRO OKIHASHI, SATOSHI TAKATORI, YOKO KITAGAWA, and YUKIO TANAKA

Osaka Prefectural Institute of Public Health, Nakamichi 1-3-69, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan

A method for simultaneous analysis of about 260 pesticides by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry (GC/MS/MS) with a triple quadrupole analyzer (QqQ) has been studied. The pesticides were extracted with acetonitrile and cleaned up by a bilayer cartridge. A single injection method was developed for the monitoring of all of the targeted pesticides. Two MS/MS transitions were selected for each analyte using the intensity ratio obtained from them as a confirmatory parameter. By using matrix-matched standards, 260 pesticides could be determined in most matrixes with recoveries of 70-120% and a standard deviation of ≤ 20 at 2 different fortification levels of 0.02 and 0.1 $\mu\text{g/g}$. The developed method was applied to the monitoring of 173 agricultural product samples from local market. The sensitivities of this method were lower than with most of selective GC detectors, such as flame photometric or single MS. The selectivity of QqQ gives a very clean chromatogram, making compound identification and confirmation easy. The quick and reliably monitoring was achieved by combination with rapid extraction and cleanup.

In Japan, all agricultural chemicals are regulated under the uniform limit (0.01 $\mu\text{g/g}$) except maximum residue levels (MRLs), which have been set for about 800 pesticides and veterinary drugs in 2006 (1). This system does not require analyzing all pesticides before distribution, but the demands of quality evaluation of commodities are increasing for various pesticides. These demands require a great amount of analytical labour. Until now, many multiresidue methods were developed to achieve effective analysis (2-7). These methods used gas chromatography (GC) that coupled with selective detectors and/or single mass spectrometry (MS) for determination of pesticides. Numerous target pesticides required more than one analysis by GC/MS or several kind of detectors. Recently, GC coupled to tandem mass spectrometry

(GC/MS/MS) has been used for the determination of agricultural chemicals (8-14). The MS/MS analysis is superior to single MS analysis. In the process, a narrow range of target masses is selected from all ions like selected ion monitoring (SIM) mode. Then, this selected range of masses is fragmented and the product ions are monitored. A fragmentation depends on the chemical structure of analytes and provides superior selectivity to SIM mode and other conventional detections. An ion trap detector (ITD) allows product ion scan analysis in the MS/MS mode. On the other hand, a triple quadrupole (QqQ) analyzer can operate in the multiple reaction monitoring (MRM) mode, which monitors a few product ions/analyte. In these MS/MS measurements, the number of compounds that can be determined simultaneously is limited by the scan speed of the mass filters and data points of chromatographic peaks. It takes a very short time to monitor 1 or 2 product ions compare to that required for the product scan mode. Because of this advantage, QqQ could monitor approximately 50 MRM ions/s while ITD could analyze several product scans. Some research papers have been published about pesticide residue analysis by GC/ITD/MS (8-11) and GC/QqQ/MS (12-14). These reports determined from 50 to 130 pesticides with 1 or 2 injections. To achieve quick and effective monitoring, a large number of pesticides should be determined in a short time. The sensitivity and selectivity of QqQ have great potential that enables efficient screening. The aim of this work was to develop a method for the simultaneous analysis of more than 250 pesticide residues by GC/QqQ/MS with 1 injection.

Experimental

Apparatus

(a) *GC/QqQ/MS instrument.* — The extracts were analyzed with a Waters/Micromass (Manchester, UK) Quattro Micro GC QqQ instrument coupled with an Agilent (Little Falls, DE) 6890 gas chromatograph. The mass spectrometer was used in the MRM mode with electron impact ionization. The system was equipped with a split/splitless injection inlet, electronic pressure control, and 7683B autosampler. MassLynx and TargetLynx software were used for instrument control and data analysis respectively.

(b) *Capillary column.* — DB-5ms capillary column, 30 m, 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness (Agilent, Folsom, CA).

Table 1. Conditions of the MRM transitions

Pesticide	F ^a	RT ^b	Precursor > product ion (m/z) ^c	
			Collision energy (eV)	
			MRM1	MRM2
Methamidophos	1	6.10	141 > 95 (6)	141 > 79 (18)
Dichlorvos	1	6.25	185 > 93 (10)	187 > 93 (12)
Allidochlor	1	6.70	132 > 56 (4)	134 > 56 (4)
Diphenyl	1	7.85	154 > 153 (10)	154 > 152 (22)
Mevinphos	1	8.21	192 > 127 (8)	193 > 127 (4)
Acephate	1	8.27	136 > 94 (10)	136 > 42 (6)
Propham	1	8.64	179 > 137 (4)	179 > 93 (10)
Metolcarb	1	8.68	108 > 107 (12)	108 > 79 (12)
Methacrifos	1	9.09	208 > 180 (4)	240 > 180 (8)
2-Phenylphenol	1	9.44	170 > 169 (16)	170 > 141 (20)
Isoprocarb	1	9.59	136 > 121 (6)	121 > 103 (10)
Molinate	1	9.73	187 > 126 (4)	126 > 55 (14)
XMC	1	9.92	122 > 107 (8)	122 > 121 (14)
Omethoate	2	10.29	156 > 110 (8)	110 > 79 (10)
Tecnazene	2	10.33	261 > 203 (8)	215 > 179 (6)
Xylylcarb	2	10.38	122 > 107 (10)	107 > 77 (12)
Fenobucarb	2	10.49	121 > 77 (18)	150 > 121 (10)
Propoxur	2	10.51	110 > 64 (14)	152 > 110 (5)
Propachlor	2	10.52	196 > 120 (6)	169 > 120 (6)
Diphenylamine	3	10.80	169 > 168 (10)	168 > 167 (10)
Ethoprophos	3	10.89	158 > 114 (6)	200 > 158 (6)
Ethalfiuralin	3	11.00	276 > 202 (12)	316 > 276 (6)
Chlorpropham	3	11.16	213 > 171 (6)	213 > 127 (12)
Trifluralin	3	11.21	306 > 264 (6)	306 > 160 (18)
Benfluralin	3	11.28	292 > 264 (6)	292 > 206 (10)
Bendiocarb	3	11.33	166 > 151 (10)	223 > 166 (6)
Dioxabenzofos	3	11.36	216 > 138 (10)	216 > 137 (20)
Monochlorophos	3	11.43	127 > 109 (10)	192 > 127 (10)
Cadusafos	4	11.55	159 > 97 (12)	158 > 114 (4)
Promecarb	4	11.59	150 > 135 (8)	135 > 115 (10)
Pencycuron	4	11.60	180 > 125 (8)	125 > 89 (14)
Phorate	4	11.65	260 > 75 (8)	231 > 203 (4)
BHC, α -	4	11.77	219 > 183 (6)	181 > 145 (12)
Thiometon	4	11.96	88 > 60 (6)	246 > 88 (6)
Dicloran	4	12.07	206 > 176 (8)	208 > 178 (8)
Dimethoate	4	12.07	229 > 87 (6)	125 > 79 (6)
Carbofuran	5	12.22	164 > 149 (10)	164 > 131 (16)
Furilazole	5	12.22	262 > 220 (4)	264 > 222 (6)
Simazine	5	12.26	201 > 173 (4)	201 > 138 (10)
Atrazine	5	12.37	215 > 200 (4)	200 > 122 (8)
BHC, β -	5	12.39	219 > 183 (6)	181 > 145 (12)
Dimethipin	5	12.39	124 > 76 (4)	118 > 58 (2)
Clomazone	5	12.47	125 > 89 (12)	204 > 107 (16)
Quintozene	5	12.47	249 > 214 (10)	295 > 237 (16)
BHC, γ -	6	12.62	219 > 183 (6)	181 > 145 (12)
Cyanophos	6	12.72	243 > 109 (10)	243 > 127 (6)
Terbufos	6	12.72	231 > 175 (10)	288 > 231 (4)
Propyzamide	6	12.80	173 > 145 (12)	173 > 109 (22)
Diazinon	6	12.88	199 > 93 (16)	304 > 179 (12)
Pyrimethanil	7	13.00	199 > 198 (8)	198 > 118 (26)

Table 1. (continued)

Pesticide	F ^a	RT ^b	Precursor > product ion (m/z) ^c	
			Collision energy (eV)	
			MRM1	MRM2
Chlorothalonil	7	13.01	264 > 168 (18)	266 > 170 (18)
Flufenoxuron	7	13.08	268 > 241 (14)	331 > 276 (16)
Disulfoton	7	13.16	274 > 88 (5)	186 > 142 (5)
Terbacil	7	13.16	161 > 88 (16)	160 > 76 (10)
Isazophos	7	13.19	257 > 162 (4)	257 > 119 (16)
Tefluthrin	7	13.24	177 > 127 (14)	197 > 141 (10)
Etrifos	7	13.29	292 > 181 (6)	292 > 153 (16)
BHC, δ -	7	13.33	219 > 183 (6)	181 > 145 (12)
Tri-allate	7	13.35	268 > 184 (16)	270 > 186 (16)
Pirimicarb	8	13.49	238 > 166 (6)	166 > 96 (12)
Iprobenfos	8	13.55	204 > 91 (6)	204 > 122 (10)
Benoxacor	8	13.62	259 > 120 (12)	261 > 120 (10)
Formothion	8	13.67	198 > 170 (4)	170 > 93 (6)
Ethiofencarb	8	13.70	168 > 107 (8)	168 > 77 (30)
Phosphamidon	9	13.85	264 > 127 (10)	227 > 127 (6)
Benfuresate	9	13.89	256 > 163 (8)	163 > 121 (4)
Dichlofenthion	9	13.91	279 > 223 (12)	223 > 205 (12)
Dimethenamid	9	13.93	230 > 154 (8)	232 > 154 (8)
Propanil	9	13.95	217 > 161 (8)	161 > 99 (22)
Acetochlor	9	14.03	224 > 148 (8)	223 > 146 (6)
Chlorpyrifos-methyl	9	14.06	286 > 93 (16)	286 > 271 (10)
Bromobutide	9	14.07	232 > 176 (8)	232 > 114 (6)
Metribuzin	9	14.07	198 > 82 (10)	198 > 110 (8)
Vinclozolin	10	14.17	285 > 212 (8)	214 > 174 (10)
Parathion-methyl	10	14.23	263 > 109 (10)	263 > 246 (4)
Atachlor	10	14.25	189 > 131 (18)	189 > 160 (8)
Simeconazole	10	14.25	195 > 75 (10)	211 > 121 (12)
Tolclofos-methyl	10	14.25	265 > 250 (12)	265 > 93 (22)
Simetryn	11	14.35	213 > 170 (8)	213 > 185 (6)
Carbaryl	11	14.39	144 > 115 (20)	144 > 116 (8)
Metalaxyl	11	14.44	206 > 132 (14)	206 > 162 (6)
Ametryn	11	14.46	227 > 185 (4)	227 > 170 (8)
Heptachlor	11	14.46	272 > 237 (12)	274 > 239 (14)
Fenchlorphos	11	14.50	285 > 270 (10)	287 > 272 (12)
Prometryn	11	14.53	226 > 184 (6)	241 > 184 (8)
Dithiopyr	11	14.57	354 > 306 (6)	354 > 286 (12)
Pyrimiphos-methyl	12	14.79	290 > 151 (14)	305 > 180 (6)
Terbutryn	12	14.85	241 > 185 (4)	170 > 128 (6)
Fenitrothion	12	14.86	277 > 260 (4)	277 > 109 (14)
Methiocarb	12	14.90	168 > 153 (6)	153 > 109 (6)
Ethofumesate	12	14.92	207 > 161 (6)	207 > 137 (10)
Bromact	12	14.93	205 > 188 (12)	207 > 190 (20)
Probenazole	12	14.96	159 > 130 (6)	159 > 103 (20)
Esprocarb	12	15.09	222 > 91 (12)	162 > 91 (6)
Malathion	12	15.09	173 > 127 (6)	173 > 99 (10)
Thiazopyr	12	15.12	327 > 277 (24)	381 > 361 (6)
Quinoclamine	12	15.14	207 > 172 (8)	209 > 172 (10)
Metolachlor	13	15.22	238 > 162 (10)	238 > 133 (24)
Chlorpyrifos	13	15.26	314 > 258 (12)	316 > 260 (12)
Diethofencarb	13	15.31	267 > 225 (8)	267 > 168 (16)

Table 1. (continued)

Pesticide	F ^a	RT ^b	Precursor > product ion (m/z) ^c	
			Collision energy (eV)	
			MRM1	MRM2
Dimethyvinphos	13	15.31	295 > 109 (16)	297 > 109 (16)
Thiobencarb	13	15.31	100 > 72 (4)	125 > 89 (12)
Aldrin	13	15.37	263 > 193 (22)	263 > 191 (24)
Chlorthal-dimethyl	13	15.37	299 > 221 (18)	301 > 223 (18)
Cyanazine	13	15.37	225 > 189 (10)	225 > 198 (8)
Fenthion	13	15.38	278 > 109 (16)	278 > 169 (14)
Parathion	14	15.46	291 > 109 (10)	291 > 137 (4)
Fenpropimorph	14	15.47	128 > 110 (6)	128 > 70 (8)
Tetraconazole	14	15.52	336 > 218 (12)	336 > 204 (24)
Triadimefon	14	15.54	208 > 181 (6)	208 > 127 (10)
Nitrothal-isopropyl	14	15.65	236 > 194 (6)	236 > 148 (14)
4,4'-dichloro-benzophenone (Dicofol decomposed)	14	15.66	250 > 139 (8)	250 > 215 (4)
Fthalide	14	15.70	243 > 215 (14)	241 > 213 (14)
Pirimiphos-ethyl	14	15.80	304 > 168 (10)	318 > 166 (12)
Bromophos	14	15.81	331 > 316 (10)	329 > 314 (12)
Diphenamid	14	15.83	239 > 167 (4)	167 > 165 (16)
Fosthiazate	14	15.86	195 > 103 (6)	195 > 139 (4)
Pendimethalin	15	16.08	252 > 162 (8)	252 > 191 (8)
Chlorfenvinphos α	15	16.09	323 > 267 (12)	325 > 269 (12)
Cyprodinil	15	16.12	225 > 224 (8)	224 > 208 (16)
Fipronil	15	16.18	367 > 213 (22)	367 > 255 (18)
Penconazole	15	16.25	246 > 157 (18)	248 > 192 (10)
Dimethametryn	15	16.26	212 > 122 (8)	212 > 94 (18)
Isfenphos	15	16.31	213 > 121 (14)	213 > 185 (6)
Heptachlor-epoxide	15	16.34	353 > 263 (12)	355 > 265 (12)
PyrifenoX Z	15	16.34	262 > 200 (14)	262 > 91 (14)
Chlorfenvinphos β	15	16.36	323 > 267 (12)	325 > 269 (12)
Bioallethrin	16	16.46	123 > 81 (6)	168 > 123 (6)
Phenthoate	16	16.49	274 > 121 (8)	274 > 125 (16)
Quinalphos	16	16.52	146 > 118 (10)	146 > 91 (22)
Captan	16	16.58	149 > 105 (2)	149 > 70 (12)
Procymidone	16	16.58	283 > 96 (6)	283 > 68 (16)
Triadimenol	16	16.60	168 > 70 (8)	128 > 65 (18)
Dimepiperate	16	16.63	145 > 112 (6)	145 > 69 (12)
Triflumizole	16	16.63	206 > 179 (12)	278 > 73 (6)
Methidathion	17	16.86	145 > 85 (6)	145 > 58 (12)
Hexythiazox	17	16.94	164 > 149 (4)	227 > 149 (6)
Propaphos	17	16.94	220 > 140 (8)	304 > 220 (10)
Chinomethionat	17	16.97	234 > 206 (8)	206 > 148 (14)
PyrifenoX E	17	16.98	262 > 200 (14)	262 > 91 (14)
Tetrachlorvinphos	17	17.01	329 > 109 (18)	331 > 109 (18)
Paclobutrazol	17	17.07	236 > 125 (10)	236 > 167 (8)
Butachlor	17	17.09	237 > 160 (8)	176 > 146 (20)
Fenothiocarb	17	17.14	160 > 72 (6)	161 > 72 (6)
Endosulfan α	18	17.28	241 > 206 (12)	195 > 160 (8)
Butamifos	18	17.29	286 > 202 (12)	286 > 185 (22)
Flutriafol	18	17.36	219 > 123 (10)	123 > 75 (22)

Table 1. (continued)

Pesticide	F ^a	RT ^b	Precursor > product ion (m/z) ^c	
			Collision energy (eV)	
			MRM1	MRM2
Fenamiphos	18	17.41	303 > 195 (4)	303 > 288 (6)
Napropamide	18	17.43	271 > 128 (4)	271 > 72 (10)
Flutolanil	18	17.47	281 > 173 (10)	173 > 145 (14)
Metominostrobin E	18	17.54	191 > 160 (8)	238 > 210 (10)
Fludioxonil	18	17.55	248 > 127 (22)	248 > 154 (16)
Hexaconazole	18	17.57	214 > 159 (16)	256 > 159 (16)
Prothiofos	18	17.58	267 > 239 (8)	309 > 239 (12)
Isoprothiolane	19	17.62	290 > 118 (10)	290 > 204 (2)
Pretlachlor	19	17.62	262 > 202 (10)	162 > 147 (10)
Profenofos	19	17.69	337 > 267 (12)	339 > 269 (12)
DDE, <i>pp'</i> -	19	17.80	246 > 176 (26)	248 > 176 (26)
Oxadiazon	19	17.80	258 > 175 (4)	175 > 112 (8)
Thifluzamide	19	17.80	449 > 429 (10)	194 > 125 (18)
Uniconazole P	19	17.81	234 > 165 (6)	234 > 137 (12)
Fiamprop-methyl	19	17.84	276 > 105 (4)	230 > 170 (12)
Tribuphos	19	17.87	202 > 147 (4)	202 > 113 (12)
Myclobutanil	19	17.90	179 > 125 (14)	179 > 152 (6)
Oxyfluorfen	20	17.92	300 > 223 (12)	361 > 300 (10)
Dieldrin	20	17.94	263 > 193 (22)	263 > 191 (24)
Flusilazole	20	17.94	233 > 165 (16)	233 > 152 (14)
Bupirimate	20	17.95	273 > 193 (4)	273 > 108 (14)
Buprofezin	20	17.97	172 > 57 (12)	105 > 104 (8)
Kresoxim-methyl	20	17.98	206 > 116 (4)	206 > 131 (10)
Metominostrobin Z	20	18.03	191 > 160 (8)	238 > 210 (10)
Diclobutrazol	20	18.06	270 > 159 (8)	272 > 161 (8)
Iprovalicarb	20	18.11	116 > 98 (4)	158 > 116 (2)
Chlorfenapyr	20	18.19	247 > 227 (10)	247 > 200 (22)
Cyflufenamid	21	18.23	223 > 203 (10)	294 > 237 (4)
Isoxathion	21	18.28	177 > 130 (6)	313 > 177 (6)
Cyproconazole	21	18.32	222 > 125 (18)	222 > 82 (8)
Fenoxanil	21	18.37	293 > 155 (16)	189 > 125 (8)
Endrin	21	18.46	263 > 193 (22)	263 > 191 (24)
Pyriminobac-methyl Z	21	18.56	302 > 256 (12)	302 > 230 (12)
Chlorobenzilate	21	18.59	251 > 139 (12)	253 > 141 (10)
Fensulfothion	21	18.66	293 > 125 (12)	293 > 97 (18)
Endosulfan β	21	18.71	241 > 206 (12)	195 > 160 (8)
Oxadixyl	21	18.78	163 > 132 (8)	233 > 146 (10)
Ethion	22	18.83	231 > 175 (10)	231 > 129 (18)
DDD, <i>pp'</i> -, DDT, <i>op'</i> -	22	18.86	235 > 165 (18)	237 > 165 (16)
Fluacrypyrim	22	19.00	189 > 129 (10)	204 > 129 (18)
Mepronil	22	19.15	269 > 119 (10)	269 > 210 (6)
Triazophos	22	19.19	161 > 134 (6)	257 > 162 (4)
Sulprofos	22	19.22	322 > 156 (8)	322 > 139 (12)
Carfentrazone-ethyl	22	19.36	340 > 312 (8)	330 > 310 (8)
Benalaxyl	22	19.39	266 > 148 (8)	204 > 176 (4)
Norflurazon	22	19.49	303 > 145 (14)	305 > 145 (18)
Cyanofenphos	23	19.51	303 > 141 (12)	303 > 169 (4)
Trifloxystrobin	23	19.51	222 > 130 (8)	190 > 130 (6)
Edifenphos	23	19.56	173 > 109 (6)	310 > 173 (10)

Table 1. (continued)

Pesticide	F ^a	RT ^b	Precursor > product ion (m/z) ^c	
			Collision energy (eV)	
			MRM1	MRM2
Propiconazole	23	19.56	259 > 69 (8)	259 > 173 (12)
Quinoxifen	23	19.59	237 > 208 (22)	272 > 237 (10)
Diofenolan	23	19.61	300 > 186 (6)	186 > 157 (14)
Pyriminobac-methyl E	23	19.61	302 > 256 (12)	302 > 230 (12)
Lenacil	23	19.65	153 > 136 (12)	153 > 82 (14)
Pyraflufen-ethyl	23	19.69	412 > 349 (8)	349 > 307 (10)
Ciodinafop-propargyl	23	19.73	349 > 266 (6)	349 > 238 (12)
DDT,pp'-	23	19.75	235 > 165 (18)	237 > 165 (16)
Hexazinone	24	19.85	171 > 71 (12)	171 > 85 (12)
Theriychlor	24	19.96	288 > 141 (10)	127 > 59 (6)
Tebuconazole	24	20.08	250 > 125 (14)	252 > 127 (14)
Diclofop-methyl	24	20.09	253 > 162 (12)	340 > 253 (8)
Diffufenican	24	20.12	394 > 266 (8)	266 > 246 (10)
Propargite	24	20.12	135 > 107 (10)	173 > 135 (14)
Captafol	24	20.28	150 > 79 (6)	313 > 79 (18)
Pyributicarb	25	20.54	181 > 108 (8)	181 > 93 (20)
Pyridaphenthion	25	20.66	340 > 199 (6)	340 > 109 (16)
Iprodione	25	20.67	314 > 245 (10)	316 > 247 (10)
Carbosulfan	25	20.69	160 > 104 (8)	118 > 76 (6)
Phosmet	25	20.87	160 > 77 (18)	160 > 133 (10)
Bifenthrin	25	20.91	181 > 166 (10)	181 > 165 (20)
EPN	25	20.94	169 > 141 (8)	169 > 77 (20)
Piperophos	25	20.97	320 > 122 (8)	140 > 98 (8)
Bromopropylate	26	20.97	341 > 185 (12)	343 > 185 (12)
Picolinafen	26	20.99	376 > 239 (10)	376 > 238 (16)
Fenoxycarb	26	21.03	186 > 109 (12)	255 > 186 (6)
Cloquintocet-1-methylhexyl	26	21.07	192 > 162 (18)	192 > 127 (28)
Etoxadole	26	21.10	300 > 270 (20)	204 > 176 (8)
Methoxychlor	26	21.10	227 > 169 (22)	227 > 141 (32)
Fenpropathrin	26	21.14	265 > 210 (10)	265 > 89 (26)
Tebufenpyrad	26	21.28	333 > 171 (16)	276 > 171 (8)
Anilofos	26	21.30	226 > 184 (4)	226 > 157 (12)
Bifenox	26	21.31	341 > 310 (6)	341 > 189 (16)
Furametpyr	27	21.43	298 > 123 (16)	157 > 76 (18)
Clomeprop	27	21.45	288 > 169 (12)	323 > 288 (4)
Furathiocarb	27	21.50	325 > 194 (4)	163 > 107 (10)
Tetradifon	27	21.59	354 > 159 (8)	356 > 159 (8)
Phenothrin	27	21.64	123 > 81 (5)	183 > 153 (12)
Phosalone	27	21.74	367 > 182 (8)	182 > 138 (6)
Azinphos-methyl	27	21.84	160 > 77 (12)	160 > 104 (6)
Cyhalothrin	28	21.95	208 > 181 (8)	197 > 141 (10)
Pyriproxyfen	28	21.97	136 > 96 (8)	136 > 78 (18)
Cyhalofop-butyl	28	22.02	256 > 120 (6)	357 > 256 (8)
Mefenacet	28	22.05	192 > 136 (12)	193 > 137 (12)
Lactofen	28	22.19	344 > 223 (12)	344 > 300 (6)
Acinathrin	28	22.39	209 > 181 (6)	290 > 93 (8)
Pyrazophos	28	22.42	221 > 193 (6)	232 > 204 (6)
Fenarimol	28	22.45	251 > 139 (14)	219 > 107 (10)
Pyraclufos	28	22.80	360 > 194 (8)	360 > 139 (14)

Table 1. (continued)

Pesticide	F ^a	RT ^b	Precursor > product ion (m/z) ^c	
			Collision energy (eV)	
			MRM1	MRM2
Bitertanol	29	23.15	170 > 141 (18)	170 > 115 (28)
Fluquinconazole	29	23.39	340 > 298 (14)	340 > 286 (20)
Permethrin	29	23.40	183 > 168 (12)	183 > 153 (12)
Pyridaben	29	23.45	309 > 147 (14)	147 > 117 (18)
Prochloraz	29	23.47	310 > 70 (14)	308 > 70 (14)
Butafenacil	29	23.60	331 > 180 (14)	333 > 182 (14)
Cafenstrole	29	23.81	100 > 72 (4)	188 > 119 (18)
Etobenzanid	29	23.81	179 > 149 (6)	179 > 121 (10)
Fenbuconazole	29	23.91	198 > 129 (8)	129 > 102 (12)
Cyfluthrin	29	24.05	163 > 127 (4)	226 > 206 (12)
Halfenprox	29	24.45	263 > 117 (10)	265 > 117 (10)
Cypermethrin	29	24.49	163 > 127 (4)	165 > 127 (4)
Flucythrinate	29	24.57	199 > 157 (8)	199 > 107 (20)
Silafluofen	29	24.96	286 > 258 (10)	286 > 207 (12)
Pyrimidifen	30	25.28	184 > 169 (16)	186 > 171 (18)
Flumioxazin	30	25.47	287 > 259 (10)	354 > 326 (4)
Fluvalinate	30	25.69	250 > 55 (14)	250 > 200 (18)
Fenvalerate	30	25.83	167 > 125 (6)	225 > 119 (14)
Difenoconazole	30	26.19	323 > 265 (12)	325 > 267 (12)
Indoxacarb-MP	30	26.39	203 > 134 (10)	218 > 203 (6)
Deltamethrin	30	26.65	253 > 174 (8)	253 > 93 (14)
Tralomethrin	30	26.65	253 > 174 (8)	253 > 93 (14)
Flumiclorac-pentyl	30	26.86	423 > 318 (6)	423 > 308 (12)
Azoxystrobin	30	26.90	344 > 329 (10)	388 > 345 (14)

^a F = Function number.

^b RT = Retention time, min.

^c m/z = Mass-to-charge ratio.

(c) *Solid-phase extraction (SPE) cartridge.*— Double-layer cartridge with 500 mg graphitized carbon black (GCB) and 500mg primary secondary amine (PSA) was obtained from Supelco (Bellefonte, PA) as ENVI-Carb II/PSA. The cartridge was preconditioned with 30 mL acetonitrile-toluene (3:1).

(d) *Food processor and homogenizer.*— A Toshiba (Tokyo, Japan) QS-7 food processor was used to comminute fruit and vegetable samples. A Hitachi (Tokyo, Japan) HG30 homogenizer was used to blend sample and acetonitrile in the extraction step.

(e) *Tube and centrifuge.*— For the extraction step, Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ) BLUE MAX 50 mL polypropylene conical tubes were used. A Hitachi Himac SCR 20B centrifuge was used for these tubes.

(f) *Analytical balance.*— A Sartorius (Westbury, NY) BP2100S top-loading balance was used to weigh the chopped samples and solid reagents.

(g) *Solvent evaporator.*— An Iwaki (Asahi Techno Glass, Chiba, Japan) REN-1000 and REN-1 rotary evaporators were used to concentrate eluates.

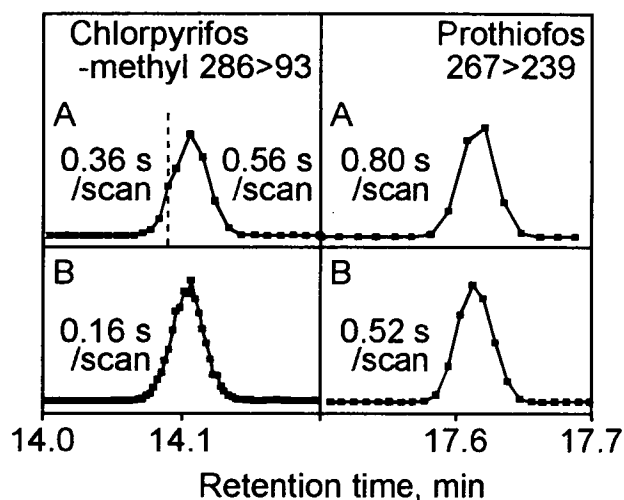


Figure 1. Peak shapes of the pesticide with the lowest scan rate. A: 0.20–0.80 s/scan, B: 0.04–0.52 s/scan.

Reagents

(a) Chemicals. — Acetonitrile, toluene, acetone and n-hexane were of pesticide analysis grade; anhydrous magnesium sulfate and sodium chloride were of analytical grade (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan).

(b) Pesticide standard. — Pesticide standards certified (Wako; Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan; Riedel-de-Haën, Seelze, Germany; Hayashi Pure Chemical, Osaka, Japan; Ehrenstorfer Laboratories GmbH, Augsburg, Germany). Each compound was dissolved in acetone to make a 1 mg/mL stock standard solution. Mixed-compound intermediate solutions were prepared from stock solutions at concentrations ranging from 40 to 100 µg/mL. Two groups of spiking solutions were prepared from intermediate solutions containing approximately 140 compounds at the concentration of 5 µg/mL. Spiking solutions were used for fortifying the samples and also for the calculation after appropriate dilution.

Extraction and Cleanup Procedure

The sample was extracted according to our previous report (7). An aliquot of 10 g of sample was homogenized with 20 mL acetonitrile. The homogenate was shaken with 4g MgSO₄ and 1 g NaCl to separate the sediment and water from the acetonitrile. An aliquot of 16 mL of the acetonitrile layer was loaded into a GCB/PSA SPE cartridge, and 30 mL acetonitrile-toluene (3 + 1) was used to elute the retained pesticides. The eluate was evaporated, and the residue was dissolved in 8 mL acetone-hexane (1 + 9) for GC/QqQ/MS analysis. The concentration of the sample represented by the test solution was 1 g/mL.

Fortifications

In recovery studies, 40 or 200 µL of 2 spiking solutions were added to each 10 g carrot, banana, and grapefruit

individually. The tubes containing fortified sample were left for 30 min to give them time to interact with the matrix.

Preparation of Matrix-Matched Calibration Standards

Calibration was achieved by preparing matrix-matched calibration standards from the extracts of blank samples in order to compensate for the matrix effects (15). Analytes were quantified by using from 3 to 6 points of matrix-matched calibration standards.

Analysis

GC/QqQ/MS analysis was conducted under the following conditions: column, DB-5ms; helium carrier gas flow, 1.5 mL/min; injector temperature, 250°C; injection volume, 1 µL (splitless); MS interface temperature, 250°C; ion source temperature, 250°C; oven temperature program: 60°C for 1 min, then 20°C/min to 140°C and 8°C/min to 300°C, and held for 5 min. The total run time was 30 min. The MRM parameters were summarized in Table 1. MRM1 was used for quantification, and the intensity ratio of MRM1 and 2 was used as the confirmatory parameter.

Crosscheck Analysis

GC with a flame photometric detector (GC/FPD), GC/ITD/MS, and GC/MS analyses were conducted according to earlier papers (6,7).

Results and discussion

GC/QqQ/MS Method Development

An MS/MS measurement method is usually constructed by some groups of MRM ions, which is called "function" by the system software. Start and end time of each function can be defined individually. More than 2 functions can operate simultaneously. A measurement method can be constructed with 1 to 32 functions that can monitor up to 32 MRM ions. It is calculated that 1024 MRM ions (32 × 32) could be measured in one analysis. Practically, the chromatographic

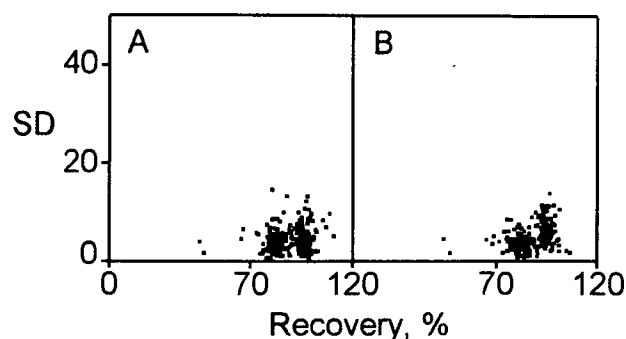


Figure 2. Summary of recovery tests in carrot measured by 2 different scan speeds. A: 0.20–0.80 s/scan, B: 0.04–0.52 s/scan.

Table 2. The list of final time window

Function No.	No. of MRM ions	Start time, min	End time, min
1	26	5.00	10.1
2	12	10.10	10.7
3	22	10.70	11.6
4	16	11.30	12.30
5	16	12.10	12.60
6	10	12.50	13.00
7	20	12.80	13.55
8	10	13.40	13.90
9	18	13.70	14.25
10	10	14.10	14.40
11	16	14.25	14.75
12	22	14.60	15.30
13	18	15.05	15.60
14	22	15.30	16.05
15	18	16.00	16.60
16	18	16.40	16.80
17	18	16.70	17.30
18	20	17.15	17.70
19	20	17.50	18.05
20	20	17.80	18.40
21	20	18.05	19.00
22	18	18.60	19.70
23	22	19.40	19.90
24	14	19.70	20.45
25	14	20.45	21.10
26	24	20.80	21.50
27	14	21.20	22.00
28	18	21.85	23.00
29	27	22.80	25.10
30	18	25.10	28.00

peak shape, which depends on scan speed, restricts the number of simultaneous analysis.

Reported measurements with GC/ITD/MS targeted less than 100 pesticides (8-11), and other methods using GC/QqQ/MS analyzed less than 130 pesticides simultaneously (12-14). Some of these methods needed 2 injections. In the beginning of our experiments, the retention time and MRM transitions of 270 pesticides were determined to construct the GC/QqQ/MS method. Two MRM transitions were selected for determination and confirmation of each pesticide. All compounds were sorted by their retention times and divided into 30 groups corresponding to 30 functions. Each function monitored 10 to 27 MRM ions. Some functions overlapped with neighbors. In these periods, 26 to 40 MRM ions were monitored simultaneously. The dwell time of all

MRM ions was set for 0.01 s, and another 0.01 s was needed for inter channel delay time. In this method, the scan speeds of MRM ions ranged from 0.20 to 0.80 s/scan (low speed). To evaluate the effect of scan speed, this GC/QqQ/MS method was divided into 2 analysis methods that monitored 140 compounds each. In these methods, the scan speeds were reduced to from 0.04 to 0.52 s/scan (high speed).

Extraction procedure has been investigated in our previous reports (6,7). The features of the extraction procedure were a rapid process and effective cleanup. The concentration of extract and the injection volume were less than those of other reports (8-14). It was calculated that our method injected 10 - 50 times less sample equivalents into the instrument than other methods. The extraction procedure showed good recoveries and precision in our previous work. Three parallel trials of recovery tests were conducted in carrot for 270 compounds at a level of 100 ng/g to confirm reliability of the analytical method. The spiked samples and matrix-matched standards were measured by low and high speed methods, and the recovery results were calculated. Figure 1 shows the typical chromatograms of spiked pesticides measured by the low and high speed methods. The peak of prothiofos appeared in the most crowded period in the chromatogram and was indicated with 6 points at 0.80 s/scan. There were no differences in the recovery between 2 scan speeds as shown in the following results: chlorpyrifos-methyl (A; low speed) $83 \pm 4\%$, (B; high speed) $82 \pm 3\%$; prothiofos (A) $94 \pm 3\%$, (B) $93 \pm 4\%$. Figure 2 shows the results of the recovery tests. Almost all of the compounds were recovered in the range of 70 to 120% with low standard deviations (SDs) of ≤ 20 . It was concluded that the simultaneous analysis of 270 compounds had good precision and was feasible for monitoring. Table 2 shows the final time window for 270 compounds.

Further recovery tests were conducted with carrot, banana, and grapefruit at levels of 20 and 100 ng/g, and all compounds were measured simultaneously (Table 3). Typical calibration graphs and chromatograms of MRM transitions are shown in Figure 3. TargetLynx software reported the limits of detection values that were calculated based on a signal-to-noise) ratio of 3 with the matrix-matched standard analyses. The results of 222 pesticides indicated an acceptable range of recovery between 70 and 120% and SD values of ≤ 20 in all cases. Another 38 compounds showed good results but failed in 1 or 2 samples. The remaining 10 pesticides gave poor results. The standard of dicofol gave 2 peaks in the chromatograms for the original and decomposed. In the recovery tests, decomposed dicofol gave high recoveries, and no original dicofol was detected. Chinomethionat and chlorothalonil were retained by PSA in the SPE cleanup. In total, 260 pesticides showed sufficient recoveries and low SDs. Moreover, the proposed method could detect most pesticides at lower levels than the uniform limit (0.01 $\mu\text{g/g}$) required by legislation.

Table 3. Mean recovery, precision, and limit of detection values

Pesticide	Recovery, % and SD												LOD, ng/g
	Carrot (<i>n</i> = 4, 3) ^a				Banana (<i>n</i> = 3)				Grapefruit (<i>n</i> = 5)				
	20 ng/g		100 ng/g		20 ng/g		100 ng/g		20 ng/g		100 ng/g		
Acephate	95	11	79	6	81	3	72	10	31	18	37	11	6.5
Acetochlor	85	4	82	4	100	4	99	5	83	16	96	3	2.8
Acrinathrin	96	17	100	8	84	13	63	4	NC ^b	— ^c	120	13	10.7
Aldrin	79	6	84	8	80	6	90	2	94	13	92	7	3.3
Allidochlor	88	3	83	7	88	6	89	4	88	7	87	4	0.8
Ametryn	90	7	79	3	96	5	95	4	80	8	89	4	2.4
Anilofos	98	3	97	5	110	5	92	3	100	9	112	7	1.5
Atrazine	85	6	85	5	96	6	94	3	90	4	89	5	1.6
Azinphos-methyl	105	7	95	2	110	5	80	6	89	8	105	3	1.9
Azoxystrobin	84	6	98	4	106	3	78	1	81	15	92	8	3.7
Benalaxyl	86	4	76	3	98	3	90	8	95	5	108	6	1.0
Bendiocarb	85	7	82	6	97	6	93	3	90	4	98	5	1.9
Benfluralin	96	5	93	4	95	5	89	3	84	6	93	4	2.6
Benfuresate	89	5	96	5	109	4	96	2	96	5	96	3	1.4
Benoxacor	99	4	96	7	101	4	96	3	92	6	100	4	1.4
BHC, α-	103	9	93	5	90	5	90	2	90	5	95	5	0.7
BHC, β-	105	17	93	6	91	6	94	3	101	6	103	3	0.9
BHC, γ-	101	2	90	3	92	2	88	2	96	8	98	2	0.9
BHC, δ-	102	9	90	5	89	4	94	2	91	10	98	2	0.3
Bifenoxy	94	17	100	2	103	20	98	12	110	24	108	3	4.1
Bifenthrin	87	2	84	4	91	2	94	6	94	11	102	1	1.5
Bioallethrin	90	8	86	4	91	11	86	15	91	30	82	7	2.2
Bitertanol	89	2	78	5	104	6	98	5	88	9	100	4	2.9
Bromacil	100	5	94	9	104	2	100	3	92	12	91	4	3.6
Bromobutide	94	11	101	5	106	7	85	5	95	22	95	5	2.5
Bromophos	93	6	92	6	99	1	93	2	97	6	95	2	1.0
Bromopropylate	94	3	85	5	93	5	97	6	95	10	110	4	1.8
Bupirimate	79	10	81	4	84	11	93	6	102	13	97	5	2.2
Buprofezin	97	9	80	4	89	8	90	2	102	17	102	12	2.3
Butachlor	89	7	80	5	86	3	91	6	104	13	99	6	2.7
Butafenacil	79	4	79	5	89	1	92	3	91	9	108	6	2.5
Butamifos	85	6	99	5	108	4	102	11	108	9	104	4	2.4
Cadusafos	91	5	96	3	110	5	95	3	89	7	95	2	1.3
Cafenstrole	94	4	97	4	106	7	89	5	87	6	93	6	2.1
Carbaryl	88	13	80	1	90	9	96	6	82	7	96	4	2.4
Carbofuran	88	3	102	6	111	8	107	6	106	17	103	7	2.9
Carfentrazone-ethyl	77	8	97	3	111	2	97	6	108	9	109	3	3.2
Chlorfenapyr	98	10	90	5	107	7	92	6	29	41	95	3	2.2
Chlorfenvinphos α	93	3	85	3	98	2	93	2	93	5	96	5	1.7
Chlorfenvinphos β	87	10	83	6	93	4	96	2	87	7	96	2	1.7
Chlorobenzilate	90	5	83	4	98	3	98	4	100	7	113	3	1.1
Chlorpropham	88	7	76	2	94	3	98	2	98	3	91	5	1.7

Table 3. (continued)

Pesticide	Recovery, % and SD												LOD, ng/g
	Carrot (<i>n</i> = 4, 3) ^a				Banana (<i>n</i> = 3)				Grapefruit (<i>n</i> = 5)				
	20 ng/g		100 ng/g		20 ng/g		100 ng/g		20 ng/g		100 ng/g		
Chlorpyrifos	90	7	83	2	90	6	96	6	100	9	96	4	2.1
Chlorpyrifos-methyl	101	6	83	4	96	4	88	3	86	4	94	4	2.1
Chlorthal-dimethyl	94	6	95	5	107	5	101	3	91	6	94	5	1.2
Clodinafop-propargyl	39	6	66	7	92	8	91	12	97	12	112	10	3.0
Clomazone	93	5	97	2	101	4	96	2	91	7	93	2	1.4
Clomeprop	79	6	80	15	101	7	98	10	124	67	133	18	2.2
Cloquintocet-1-methylhexyl	96	3	96	5	101	1	97	0	96	10	105	3	2.7
Cyanazine	80	10	83	4	96	3	94	4	95	16	98	8	2.5
Cyanofenphos	83	5	81	4	90	8	88	8	101	23	109	9	1.9
Cyanophos	92	3	83	3	89	4	93	3	93	6	99	2	1.4
Cyflufenamid	82	7	96	5	111	1	100	5	82	12	102	7	2.1
Cyfluthrin	97	5	96	3	82	5	91	2	95	7	98	6	0.8
Cyhalofop-butyl	89	3	96	4	102	5	108	1	103	9	107	3	1.4
Cyhalothrin	87	4	82	7	86	5	94	4	97	5	110	5	1.6
Cypermethrin	96	9	97	3	92	6	93	5	94	14	102	5	0.5
Cyproconazole	91	9	96	4	107	8	103	3	86	12	98	5	2.3
Cyprodinil	83	7	81	3	93	7	94	3	87	5	94	1	1.7
DDD, <i>pp'</i> -, DDT, <i>op'</i> -	87	5	82	4	91	1	95	6	92	4	98	3	1.1
DDE, <i>pp'</i> -	90	5	83	5	85	4	95	5	85	6	91	3	0.6
DDT, <i>pp'</i> -	83	4	82	5	95	5	93	6	90	2	96	2	1.9
Deltamethrin	89	3	89	6	69	2	88	2	101	9	96	2	1.5
Diazinon	99	18	83	1	93	5	101	4	85	9	91	7	1.7
Dichlofenthion	90	3	95	5	103	5	96	2	91	5	96	1	1.0
Dichlorvos	76	3	89	2	91	11	69	8	123	9	118	5	1.9
Diclobutrazol	94	6	85	4	97	4	98	3	99	8	113	5	3.3
Diclofop-methyl	77	6	83	5	93	5	95	6	104	7	106	4	1.6
Dicloran	99	4	93	2	102	2	96	3	85	8	98	5	1.6
Dieldrin	85	32	100	10	88	11	96	8	102	14	119	10	2.5
Diethofencarb	79	8	76	2	90	7	101	5	89	12	94	6	2.7
Difenoconazole	93	9	95	1	89	3	86	1	89	7	102	2	2.7
Diflufenican	89	2	96	3	105	1	94	0	96	11	108	5	2.0
Dimepiperate	88	4	83	5	90	1	95	4	94	5	98	4	1.8
Dimethametryn	87	3	81	4	94	2	95	4	90	4	96	3	0.9
Dimethenamid	92	5	94	6	101	7	95	2	90	4	98	4	1.7
Dimethipin	111	8	92	4	98	6	101	6	88	16	85	6	2.0
Dimethoate	114	14	111	5	119	10	107	4	90	23	87	13	3.7
Dimethylvinphos	87	8	85	1	90	8	94	1	85	6	96	5	2.3
Diufenolan	83	11	97	5	109	4	96	1	99	10	109	3	5.3
Dioxabenzofos	95	13	97	1	100	7	88	2	98	8	93	6	1.7
Diphenamid	83	5	83	1	96	4	94	3	96	7	96	4	0.9
Diphenyl	66	6	89	1	87	2	69	5	74	4	72	4	1.8
Diphenylamine	83	6	95	3	145	22	88	1	87	3	89	3	2.3

Table 3. (continued)

Pesticide	Recovery, % and SD												LOD, ng/g
	Carrot (<i>n</i> = 4, 3) ^a				Banana (<i>n</i> = 3)				Grapefruit (<i>n</i> = 5)				
	20 ng/g		100 ng/g		20 ng/g		100 ng/g		20 ng/g		100 ng/g		
Disulfoton	83	11	90	6	87	5	93	6	97	10	89	11	1.5
Dithiopyr	90	3	93	8	105	4	95	1	84	6	88	3	1.8
Edifenphos	97	2	97	2	104	6	97	3	95	3	108	2	1.7
Endosulfan α	94	13	96	1	118	9	100	8	86	5	101	8	2.5
Endosulfan β	104	23	97	12	113	14	97	7	115	29	109	8	2.2
Endrin	83	11	91	5	91	4	99	8	87	20	102	5	1.5
EPN	90	9	83	5	NC	—	NC	—	104	17	111	4	4.7
Esprocarb	87	6	95	9	108	2	93	2	88	9	95	3	1.6
Ethalfuralin	88	12	89	6	115	11	90	2	91	13	94	4	1.5
Ethiofencarb	82	8	94	2	104	3	95	3	77	7	107	7	1.7
Ethion	86	6	86	4	92	5	94	6	93	5	101	5	1.8
Ethofumesate	89	7	81	2	99	2	96	3	87	7	92	2	1.7
Ethoprophos	108	8	89	3	89	2	93	3	96	9	91	3	0.8
Etobenzanid	90	5	98	4	86	5	79	2	96	13	101	4	2.1
Etoxazole	73	5	82	6	98	9	92	7	97	11	95	5	2.3
Etrimfos	84	4	82	3	88	6	94	2	95	6	95	4	1.2
Fenamiphos	79	11	77	2	101	10	101	7	101	12	104	5	4.3
Fenarimol	97	3	95	3	106	2	101	3	99	13	105	4	2.3
Fenbuconazole	80	3	79	4	95	1	95	5	82	5	91	6	2.4
Fenchlorphos	90	6	85	1	91	3	92	3	89	5	95	2	1.9
Fenitrothion	103	5	92	7	102	4	98	5	98	8	108	3	1.9
Fenobucarb	85	10	84	3	91	5	95	3	90	7	95	4	0.6
Fenothiocarb	106	9	83	2	93	3	93	3	96	9	103	3	2.7
Fenoxanil	84	7	78	8	99	5	102	7	83	10	91	8	1.9
Fenoxycarb	91	4	79	6	90	5	92	4	95	18	116	11	2.2
Fenpropathrin	83	7	82	4	88	7	91	6	88	19	106	3	1.9
Fenpropimorph	88	6	84	3	101	6	95	2	87	11	93	3	1.8
Fensulfthion	85	11	80	3	92	18	91	9	97	4	108	11	2.9
Fenthion	93	1	97	4	93	4	94	1	91	10	96	4	1.1
Fenvalerate	93	3	90	3	77	3	93	2	87	6	107	4	1.6
Fipronil	90	7	79	3	88	0	87	4	93	6	100	4	2.8
Flamprop-methyl	91	7	84	2	93	6	95	2	95	9	112	5	3.0
Fluacrypyrim	89	3	97	2	114	13	100	5	99	8	99	2	1.7
Flucythrinate	84	9	91	3	86	3	92	4	94	8	99	4	1.4
Fludioxonil	92	5	95	6	106	11	105	7	89	8	97	4	1.3
Flumiclorac-pentyl	73	14	98	8	107	14	57	1	95	21	94	7	9.0
Flumioxazin	83	5	99	2	100	5	70	5	79	17	96	11	2.3
Fluquinconazole	87	7	82	3	79	1	75	6	95	9	100	3	2.3
Flusilazole	88	2	96	5	106	9	94	2	88	7	96	5	1.8
Flutolanil	85	4	81	4	94	1	98	5	97	5	103	2	1.8
Flutriafol	92	4	95	4	103	7	100	6	90	10	93	7	2.5
Fluvalinate	84	5	97	5	71	1	84	2	100	22	100	2	1.6