

分析スキーム 2. (穀類対象, LC/MS/MS#)



#: GC/MS, GC-FPD 分析にあたっては、別個の抽出用遠心管に 5.0 g の試料を採取し、同等の抽出・精製操作を経て、最終的にヘキサン/アセトン (9:1) で定容して試験液とする。



Easy and Intelligent Comprehensive Analysis by GC-MS coupled with Triple Database

IV - Improvement of RRF Database for Reliable Screening Multi-Residues Pesticides Analysis in Foods

Y. Ueda^{a)}, M. Ito^{a)}, N. Kojima^{a)}, T. Tanaka^{a)}, T. Yamagami^{a)}, Y. Ogawa^{a)}, Y. Ono^{a)}, S. Nakashima^{a)}, S. Naka^{a)}, K. Tsuboi^{a)}, S. Nakamura^{a)}, N. Sakai^{a)}, Y. Takigawa^{a)}, S. Harada^{a)}, T. Ueda^{a)}, Y. Kimura^{a)}, D. Ijima^{a)}, K. Kadokami^{b)},
 a) Kobe Institute of Health, b) Nishikawa Keisoku, c) Saitaka Electric, Fukuoka 812-0016, d) Agilent Technologies, e) HAYASHI PURE CHEMICAL, f) Kitakyushu City Institute of Environmental Sciences

Introduction

An improved relative response factor method (IM-RRF) using the standard to correct the factor was applied to multi-residues pesticides analysis in foods. Each sample of 7 agricultural products spiked with 25 pesticides was extracted, clean-upped and analyzed by GC-MS. The quantification of agricultural chemicals was analyzed by using 3 analytical method systems such as IM-RRF, RRF (non-correction relative response factor method) and SIM as Reference Analytical Method for pesticides in Japan proposed by Ministry of Health, Labour and Welfare official method. Also, each sample of 6 animal and fishery products spiked with 20 agricultural chemicals was extracted, clean-upped and analyzed by GC-MS.

Experimental

Sample preparation based on MHLW method

Sample Preparation	agricultural products	animal and fisher products
spiked products	apple, crown rice, cabbage, soy bean, spinach, orange, potato (14 kinds)	beef(lever), beef(muscl), egg, milk, salmon, shrimp (6 kinds)
spiked concentration	0.14 µg/g	0.14 µg/g
number of spike	25	20

Official method, RRF method and improved RRF method are same sample preparation except to add 7 µl of internal standard solution in test solution for both RRF method and improved RRF method.

agricultural products

- 1) extract with acetonitrile
- 2) add NaCl and phosphate buffer and shake and take
- 3) EnviCarb/NH2 column chromatography

animal and fisher products

- 1) extract with organic solvent
- 2) defat(lever),beef(muscl),salmon,shrimp: acetone-hexane(1:2), egg,milk: acetonitrile
- 3) KPC
- 4) FSA column chromatography (liver:additional operation: Silica gel column chromatography)

Agilent 6890N GC / 5973 inert MS

Condition of GC/MS	official method	RRF method and IM-RRF method
Column	J&W DB-5MS	Agilent 6890N GC/MS
Injector	Agilent 6890N GC/MS	Agilent 6890N GC/MS
Carrier gas	He	He
Column Pressure	1.0000000000000000	1.0000000000000000
Temp. program	60(1min)→100(1min)→150(1min)→200(1min)→250(1min)→300(1min)→350(1min)→400(1min)→450(1min)→500(1min)→550(1min)→600(1min)→650(1min)→700(1min)→750(1min)→800(1min)→850(1min)→900(1min)→950(1min)→1000(1min)	60(1min)→100(1min)→150(1min)→200(1min)→250(1min)→300(1min)→350(1min)→400(1min)→450(1min)→500(1min)→550(1min)→600(1min)→650(1min)→700(1min)→750(1min)→800(1min)→850(1min)→900(1min)→950(1min)→1000(1min)
MS interface temp.	200	200
SI constant	100	100
MS Mode	SCAN	SCAN
MS tuning	Auto tuning	Auto tuning
MS quad temp.	150	150
MS source temp.	150	150

Order of Injection (agricultural products)

official method	Blank0 → 0.05ppm → Blank1 → 0.1ppm → spike1 → 0.15ppm → spike2 → 0.2ppm → spike3 → 0.4ppm
RRF method and IM-RRF method	Blank → 0.2ppm → spike1 → 0.2ppm → spike2 → 0.2ppm → spike3 → 0.2ppm
(animal and fisher products)	
official method	Blank02 → 0.05ppm → Blank1 → 0.05ppm → Blank2 → 0.12ppm → spike1 → 0.25ppm → spike2 → 0.50ppm → spike3 → 1.0ppm
RRF method and IM-RRF method	Blank → 0.5ppm → spike1 → 0.5ppm → spike2 → 0.5ppm → spike3 → 0.5ppm

Method of calibration

official method	Prepare linear type calibration curve using several concentration of resulting standard chromatograms as follows: Agricultural products: 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 and 0.4ppm Animal and fisher products: 0.03, 0.06, 0.12, 0.25, 0.5 and 1.0ppm
RRF method	Use quadratic type calibration curve recorded in the "NAGNATA" database
IM-RRF method	Use quadratic type calibration curve recorded in the "NAGNATA" database. Compensate quantitative result using correction factors calculated by the result of fortified sample. Fortified concentrations was 0.2ppm for agricultural products, and 0.5ppm for animal and fisher products

Results and Discussion

Agricultural products

Chromatograms of spinach are shown in Fig.1 and Fig.2. The quantitative results by three different methods are presented in Fig.3. On the spinach, the ratios of quantitative results for RRF method and official method were 1.07-4.42, and those for IM-RRF method and official method were 0.68-1.19. The number of components of which quantitative result ranged from 80% to 120% compared to those provided by official method, was 4(16%) for RRF method and 23(92%) for IM-RRF method, respectively.

Table 1, Table 2, Fig.4, and Fig.5 show the comparison of results by three methods for seven crops including spinach. For another crops, the quantitative results provided by IM-RRF correspond with those by official method as well as the case of spinach.

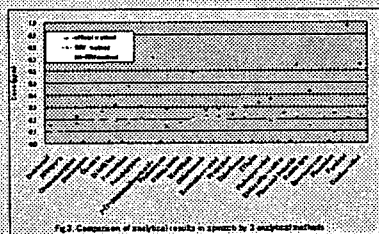
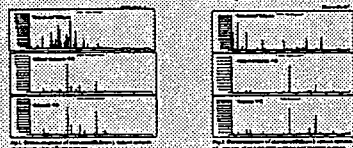


Fig.3 Comparison of analytical results in spinach by 3 analytical methods

Table 1 Ratio of quantitative RRF method/official method

No.	Residue	RRF	IM-RRF	Official	RRF/Official	IM-RRF/Official
1	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
2	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
3	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
4	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
5	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
6	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
7	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
8	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
9	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
10	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
11	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
12	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
13	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
14	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
15	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
16	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
17	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
18	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
19	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
20	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
21	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
22	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
23	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
24	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
25	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00

Table 2 Ratio of quantitative IM-RRF method/official method

No.	Residue	RRF	IM-RRF	Official	RRF/Official	IM-RRF/Official
1	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
2	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
3	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
4	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
5	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
6	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
7	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
8	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
9	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
10	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
11	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
12	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
13	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
14	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
15	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
16	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
17	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
18	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
19	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
20	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
21	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
22	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
23	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
24	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
25	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00

Result and Discussion

Animal and fishery products

Fig.6 and Fig.7 are chromatograms of beef muscle, and Fig.8 shows the quantitative results by three different methods. On the beef muscle, the ratios of quantitative results for RRF method and official method were 0.66-1.33, and those for IM-RRF method and official method were 0.87-1.13. The number of components of which quantitative result ranged from 80% to 120% compared to those provided by official method, was 15(75%) for RRF method and 20(100%) for IM-RRF method, respectively. The comparison of results by three methods for 6 animal and fishery products including beef muscle are shown in Table 3, Table 4, Fig.9, and Fig.10. For another products, the quantitative results provided by IM-RRF correspond with those by official method as well as the trend of beef muscle.

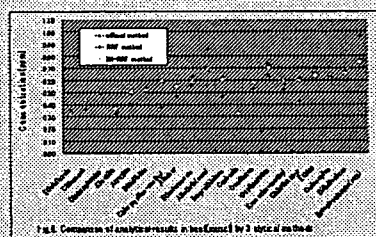
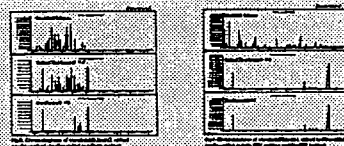


Fig.8 Comparison of analytical results in beef muscle by 3 analytical methods

Table 3 Ratio of quantitative RRF method/official method in animal and fishery products

No.	Residue	RRF	IM-RRF	Official	RRF/Official	IM-RRF/Official
1	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
2	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
3	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
4	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
5	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
6	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
7	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
8	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
9	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
10	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
11	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
12	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
13	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
14	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
15	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
16	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
17	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
18	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
19	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
20	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00

Table 4 Ratio of quantitative IM-RRF method/official method in animal and fishery products

No.	Residue	RRF	IM-RRF	Official	RRF/Official	IM-RRF/Official
1	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
2	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
3	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
4	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
5	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
6	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
7	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
8	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
9	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
10	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
11	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
12	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
13	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
14	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
15	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
16	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
17	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
18	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
19	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00
20	Chlorpyrifos	1.07	1.07	1.07	1.00	1.00

Conclusions

On the examination using 7 kinds of agricultural products and 25 pesticides, 30% of quantitative results for RRF and 79% of those for IM-RRF accorded well as measurement results provided by official method, ranging between 80% and 120% of those values. On the examination using 6 kinds of animal and fishery products and 20 pesticides, 63% of quantitative results for RRF and 95% of those for IM-RRF accorded well as measurement results provided by official method, ranging between 80% and 120% of those values. Although RRF method offers easy, simple, quick and standard-less detection and semi-quantification for multi trace analysis, quantitative result was sometimes affected by mainly "matrix effect". IM-RRF method is suggested to provide more accurate quantitative result following RRF method for detected compound, and it is suggested to make RRF method more useful.

Rapid Multiresidue Method for the Determination of Pesticide Residues in Food by GC/MS, GC/FPD and LC/MS/MS

M.Okiohashi ^{a)*}; Y.Kitagawa ^{a)}; H.Obana ^{a)}; Y.Tanaka ^{a)}; Y.Yamagishi ^{b)}; K.Sugitate ^{b)}; K.Saito ^{b)}; M.Kubota ^{b)}; M.Kanai ^{b)}; T.Ueda ^{c)}; S.Harada ^{c)}; Y.Kimura ^{c)}

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

b) *Thermo Electron K.K./ C-2F, 3-9 Moriya-cho, Kanagawa-ku, Yokohama, 221-0022, Japan*

c) *Hayashi Pure Chemical. IND., LTD./3-2-12 Uchihiranomachi, Chuo-ku, Osaka, 540-0037, Japan*

**Corresponding author: okiohashi@iph.pref.osaka.jp*

The aim of this study was to develop a simple and efficient sample preparation system in multiresidue analysis that shortened the analytical process during extraction and cleanup. An aliquot of 10 g of sample homogenate was weighed into a 50 ml polypropylene conical tube. The sample was extracted with acetonitrile using a high speed homogenizer. NaCl and anhydrous MgSO₄ were added and shaken immediately with the screw capped. The tube was centrifuged to separate the sediment and water from acetonitrile extract. The acetonitrile layer obtained after salting out was loaded into a graphitized carbon black and primary secondary amine double-layered solid phase extraction cleanup cartridge, followed by the elution with acetonitrile-toluene (3:1). The eluate was evaporated and the residue was dissolved in acetone-hexane (1:9) or methanol. The test solution was determined by GC/FPD for organophosphorous pesticides, GC/MS in a negative chemical ionization mode for organochlorine, pyrethroid and other halogenated pesticides, and GC/MS electronic ionization mode for other pesticides. LC/MS/MS was also used to determine hydrophilic pesticides.

Rapid Multi-Class Screening Method for the Determination of 240 Pesticide Residues in Food by Gas Chromatography Mass Spectrometry and Flame Photometric Detection

Okihashi, M.^{1,*}; Kitagawa, Y.¹; Obana, H.¹; Tanaka, Y.¹; Sugitate, K.²; Kubota, M.²; Kanai, M.²; Ueda, T.³; Harada, S.³; Kimura, Y.³

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

2. Thermo Electron K.K. C-2F, 3-9 Moriya-cho, Kanagawa-ku, Yokohama 221-0022, Japan

3. Hayashi Pure Chemical. IND., LTD. 3-2-12 Uchihiranomachi, Chuo-ku, Osaka 540-2237, Japan

* Corresponding author: okihasi@iph.pref.osaka.jp

KEY WORDS

multiresidue; pesticide; analysis; GC-MS; GC-FPD

ABSTRACT

To date, many multiresidue analytic methods have been reported that required special machines to automate extraction or cleanup. An automated procedure tended to run sequential; only one sample was processed at a time. The aim of this study was to develop a simple and efficient sample preparation system in multiresidue analysis that shortened the analytical process during extraction and cleanup. An aliquot of 10 g of sample homogenate was weighed into a 50 ml polypropylene conical tube. The sample was extracted with a 20 ml of acetonitrile with a homogenizer for 1 min. One gram of NaCl and 4 gram of anhydrous MgSO₄ were added and shaken immediately for about 30 seconds with the screw capped. The extract was centrifuged for 5 min at 3000 rpm to separate the sediment and water from acetonitrile extract. Next, 16 ml (equivalent to 8 g of sample) of the acetonitrile layer obtained after salting out was loaded into a graphitized carbon black and primary secondary amine (GCB/PSA) double-layered solid phase extraction cleanup cartridge, followed by the elution with 30 ml of acetonitrile-toluene (3:1). The fatty extract was passed through octadecyl column (C18) to eliminate fatty matrices before GCB/PSA. The eluate was evaporated and the residue was dissolved in 8 ml of acetone-hexane (1:9). An aliquot of 1 ml test solution represented 1 g sample. The test solution was determined by GC/FPD for organophosphorous pesticides, GC/MS in a negative chemical ionization (NCI) mode for organochlorine, pyrethroid and other halogenated pesticides, and GC/MS electronic ionization (EI) mode for other pesticides.

Recovery data were obtained by fortifying 6 matrices at 0.05-0.1 µg/g. Recoveries of 240 pesticides were mainly 70-120% and the relative standard deviations were below 20%. Limits of detection ranged between 0.01 and 0.05 µg/g for the tested pesticides. The proposed method shows good sensitivity and recovery and allows for rapid analysis. The method covers a wide range of pesticides, is applicable to various fruits and vegetables, and could be used in a regulatory monitoring.

Multiresidue Method for the Determination of Pesticide Residues in Food by GC/MS, GC/FPD and LC/MS/MS

M.Okihashi^{a)}, Y.Kitagawa^{a)}, H.Obana^{a)}, Y.Tanaka^{a)}, Y.Yamagishi^{b)}, K.Sugitate^{b)}, K.Saito^{b)}, M.Kubota^{b)}, M.Kanai^{b)}, T.Ueda^{c)}, S.Harada^{c)}, Y.Kimura^{c)}

a) Osaka Prefectural Institute of Public Health, 1-3-69 Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka, 537-0025, Japan; b) Thermo Electron K.K, C-2F, 3-9 Moriya-cho, Kanagawa-ku, Yokohama, 221-0022, Japan; c) Hayashi Pure Chemical. IND., LTD, 3-2-12 Uchihiranomachi, Chuo-ku, Osaka, 540-0037, Japan
E-mail:okihasi@iph.pref.osaka.jp

The aim of this study was to develop a simple and efficient sample preparation system in multiresidue analysis that shortened the analytical process during extraction and cleanup. An aliquot of 10 g of sample homogenate was weighed into a 50 ml polypropylene conical tube. The sample was extracted with acetonitrile using a high speed homogenizer. NaCl and anhydrous MgSO₄ were added and shaken immediately with the screw capped. The tube was centrifuged to separate the sediment and water from acetonitrile extract. The acetonitrile layer obtained after salting out was loaded into a graphitized carbon black and primary secondary amine double-layered solid phase extraction cleanup cartridge, followed by the elution with acetonitrile-toluene (3:1). The eluate was evaporated and the residue was dissolved in acetone-hexane (1:9) or methanol. The test solution was determined by GC/FPD for organophosphorous pesticides, GC/MS in a negative chemical ionization mode for organochlorine, pyrethroid and other halogenated pesticides, and GC/MS electronic ionization mode for other pesticides. LC/MS/MS was also used to determine less volatile pesticides.

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

神戸市環境保健研究所 ○上田泰人, 伊藤光男, 小島信彰, 田中敏嗣
西川計測株式会社 山上 仰, 中島晋也
横河アナリティカルシステムズ株式会社 瀧川義澄

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

【方法】①対象農薬: 既に登録済み2種(エンドスルファンスルファート, ジスルホトン)及び当所で登録した23種(ジクロミド等)

②試料調製: キャベツ, オレンジ, 玄米, 大豆, ばれいしょ, りんご, ほうれんそうの7種農作物に農薬を各0.1ppm添加し, H16.8厚生労働省通知「農産物中の残留農薬GC/MS一斉分析法(案)」で調製した(n=3)。未添加のブランク試料も併せて同様の処理を行った(n=1)。

③GC/MS測定: GC/MS=Agilent5973N

	SIM法	TDB法(内部標準法)
カラム	DB-5MS, 0.25mmx30m, 0.25µm	HP-5MS, 0.25mmx30m, 0.25µm
カラム温度	50°C(1min)-25/-125(0)	70(2)-25/-150(0)-3/-200(0)
温度	-10/-300(26.5)	-8/-280(10)-20/-300(5)

④定量: SIM法は試料毎に作成した0.05ppm~0.4ppmの標準液の検量線で定量し, TDB補正法は試料毎に0.2ppmの標準液で補正した。

【結果及び考察】ほうれんそうにおける添加回収試験の3法による結果を図1に示す。(TDB法/SIM法)比は1.07~4.42の範囲であったが, (TDB補正法/SIM法)比は0.675~1.19であった。25農薬中SIM法とのずれが20%以内であった農薬数は, TDB法で4農薬(16%)あったが, TDB補正法で23農薬(92%)あった。TDB補正法でずれた2農薬はクロルエトキシホス及びピノキサデンで, 共通して回収率が悪かった。

キャベツ, オレンジ, 玄米, 大豆, ばれいしょ, りんごの各農作物においてSIM法とのずれが20%以内であった農薬数はTDB法では12(48%), 10(40%), 2(8%), 9(36%), 10(40%), 4(16%)であったが, TDB補正法では20(80%), 17(68%), 18(72%), 22(88%), 19(76%), 18(72%)であり, TDB補正法はSIM法と数値がよく一致した。

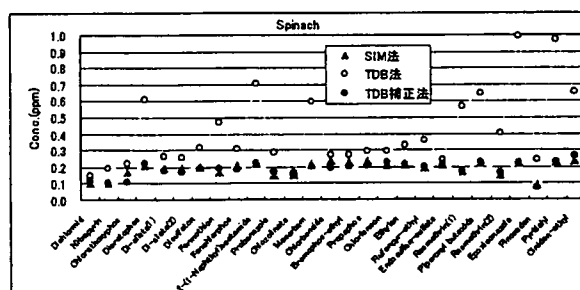


図1 ほうれんそうにおける結果

7種農作物25農薬において標準物質を測定したところ, 補正を行えば正確な定量値が得られることが示唆された。

GC/MSトリプルデータベースによる農産物中残留農薬一斉分析の検討

神戸市環境保健研究所 ○上田泰人, 伊藤光男, 小島信彰, 田中敏嗣

西川計測 (株) 小川義謙, 小野由紀子, 山上 仰, 中島晋也

横河アナリティカルシステムズ (株) 中村貞夫, 佐久井徳広, 瀧川義澄

新川電機 (株) 中 聡子, 東房健一

北九州市立大学 陣矢大助, 門上希和夫

【目的】農薬等のポジティブリスト制の施行により多成分を効率よく高感度に分析し、かつ迅速に測定結果を報告できる手法が求められており、近年 Scan 法での GC/MS 分析解析支援ソフトが開発されている。トリプルデータベース相対定量法 (NAGINATA, 西川計測, TDB 法と略す) は、農薬成分等の保持時間、マススペクトル及び検量線情報がデータベース化されており、自動検出による定性・定量ができるとされている。演者らは第 90 回・91 回本会において、より高い精度の測定結果が得られる TDB 補正法の開発と適用について報告した。

今回は、この TDB 補正法の実作物における添加回収率測定への有用性について検討した。検討にあたっては、厚生労働省の通知 GC/MS 一斉試験法で分析可能な約 220 農薬中 190 農薬について、SIM/Scan 同時取り込みを行い、Scan モードで TDB 補正法、SIM モードでは標準溶液を用いた定量を行った。又、マトリックス標準液を用いた分析も行った。

【方法】①対象農薬：190 農薬 (205 成分)
②試料調製：たまねぎ、にんじん、生姜等の農産物に農薬を各 0.1ppm 添加し、H17.11 厚生労働省通知「GC/MS による農薬等の一斉試験法」で調製した (n=3)。無添加試料も併せて同様の処理を行った (n=1)。

③GC/MS : Agilent 6890GC/5975inertMSD
カラム : HP-5MSi, 0.25mm x 30m, 0.25 μ m
カラム温度 : 70°C(2分)-25°C/分-150°C(0分)
-3°C/分-200°C(0分)-8°C/分
-280°C(10分)-20°C/分-300°C(20分)

【結果及び考察】添加濃度 0.1ppm で 4 倍濃縮した試料の添加回収試験では、ほとんどの成分が Scan 分析で定量可能であった。感度の得にくい シハルトリン等一部農薬は SIM モードで定量 (2 点検量線) した。TDB 補正法で測定ところ、たまねぎ及びにんじんにおいては、平均回収率 (n=3) が 70~120% の範囲に入ったのは 205 成分中 200 成分及び 197 成分であった。Scan モードで定量できる農薬については、TDB 補正法は 1 点濃度補正で添加回収率が計算できるため、添加回収試験の予備実験やルーチン分析中の確認においては、有用性の高いことが確認された。

たまねぎで低回収率であったフルミキサジン (22%) は、(マトリックス標準/溶媒標準) 比が 0.24 と低く、マトリックス標準液で定量すると回収率は 90% となった。このようにマトリックス存在下で大きく感度変動する場合にも補正 TDB 法が有効であると思われる。生姜では、たまねぎ及びにんじんに比べて、マトリックスの影響が大きかった。検討した詳細については、本会で報告する。

A reliable method with GPC and solid-phase extraction cleanup for monitoring pesticides in brown rice by GC/MS and LC/MS

Ueno, E.¹, Saito, I.², Kabashima, Y.¹, Oshima, H.¹, Matsumoto, H.¹

¹ *Aichi Prefectural Institute of Public Health, Nagoya 462-8576, Japan*

² *Tokai COOP Federation, Nagakute, Aichi 480-1103, Japan*

A multi-residue method of pesticides in brown rice, that enables quantitative, confirmative and tens of sequential analysis, has been developed. First, 114 important target compounds were selected for efficient monitoring, and then the appropriate internal standards for these pesticides, stable isotopically labeled pesticides (surrogates), were selected. An aliquot of the crude sample extract, obtained by our devised simple acetonitrile extraction method, was subjected to a cleanup system combining GPC and a graphitized carbon - PSA two-layered column solid-phase extraction, called the GPC-SPE cleanup system. The resultant cleaned sample extract was subjected to EI mode GC/MS and ESI mode LC/MS analysis. When necessary, the extract of positive sample was reanalyzed by other selective detection, such as normal - high voltage switching ESI mode LC/MS, after selective GPC-SPE cleanup.

The applicability of this method to routine analyses was tested on 150 commercial samples. The GPC-SPE cleanup system makes it possible to easily and effectively remove sample matrices with minimal loss of analytes. This method is a reliable tool for monitoring pesticides in brown rice.

Reference

Ueno, E., Oshima, H., Saito, I., Matsumoto, H. (2004) *J. AOAC Int.* 87, 1003-1015

Reliable method for monitoring pesticide residues in foods by NCI mode GC/MS and dual-column GC- μ ECD

E. Ueno^{a)}, Y. Kabashima^{a)}, H. Oshima^{a)}, H. Matsumoto^{a)}

a) Aichi Prefectural Institute of Public Health, Nagoya 462-8576, Japan

A method that enables quantitative, confirmative and tens of sequential analysis of pesticide residues in foods by NCI mode GC/MS and dual-column GC- μ ECD was studied. First, 65 target compounds were selected as agrochemicals commonly used in crop protection in this country, and/or found in agricultural products over the past 5 years (April 2000-March 2005) in Aichi Prefecture. An aliquot of the crude sample extract, obtained by our devised simple acetonitrile extraction method, was purified on a cleanup system combining gel permeation chromatography and a graphitized carbon column solid-phase extraction, called the GPC-SPE (graphitized carbon) cleanup system, and then by a tandem silica-gel/PSA cartridge column SPE.^{1,2)} The cleaned sample extract was subjected to NCI mode GC/MS analysis. When necessary, the extract of positive sample was reanalyzed by dual-column GC- μ ECD, after selective GPC-SPE (graphitized carbon/Florisil) cleanup.

The applicability of this method to routine analyses was tested on commercial samples. The GPC-SPE cleanup system makes it possible to easily and effectively remove sample matrices with minimal loss of analytes. This method is a reliable tool for monitoring pesticide residues in foods.

1) E. Ueno et al, J. Food Hyg. Soc. Jpn. **41**, 178 (2000).

2) E. Ueno et al, J. AOAC Int. **87**, 1003 (2004).

GC/MS一斉分析データベースソフトウェアを用いた 食品中残留農薬のモニタリング手法の検討

○上野英二、栴島由佳、大島晴美、大野 勉 (愛知県衛生研究所)

【目的】食品衛生法による残留農薬規制のポジティブリスト制がスタートし、GC/MSによる多成分一斉分析法が普及してきている。著者らは、分離能力に優れるGC/MSであっても一度に測定できる農薬数には限界があることから、また、標準溶液の調製や測定条件の作成/変更などの煩雑性を軽減するためにも、残留実態に即した100種程度の農薬を選抜した上で、定量性に優れたGC/MS(SIM)による一斉分析法(以下、SIM法)を作成している¹⁾。今回、SIM法を補完するために、数100種の農薬成分の保持時間、マススペクトルおよび検量線情報がデータベースにあらかじめ登録してあり、標準溶液を用いることなく、残留農薬の有無、およその存在量を確認できる一斉分析データベースソフトウェアを用いたGC/MS(スキャン)による一斉分析法(以下、スキャン法)を作成して、日常の残留分析への応用を試みたので、その検討結果について報告する。

【方法】試料: 野菜および果実 102 検体、**試験溶液の調製:** 既報¹⁾に準じて調製した。**GPC 装置:** Shodex の CLNpak EV-2000 カラム(20mm*i.d.* × 300mm) および CLNpak EV-G ガードカラム(20mm*i.d.* × 100mm)を装着した島津全自動 GPC クリーンアップシステムを用いた。グラファイトカーボンカラムは、ガラスリザーバー (Varian, 16mL) にグラファイトカーボン (Supelco, ENVI-carb II) - 微結晶セルロース (Merck, Avicel) (1:3) 1g、次いで無水硫酸ナトリウム 1g を充てんしたものを用いた。GPC フラグションコレクターのラックに装着して用いた。**GC/MS 装置(スキャン法):** 島津 GCMS-QP2010、カラム J&W DB-5ms 0.25mm*i.d.* × 30m 0.25mm、気化室温度 250°C、カラム温度 40°C(2min) → 8°C/min → 310°C(5min)、インターフェース温度 300°C、イオン源温度 200°C、キャリアーガス線速度 40cm/sec、イオン化法 EI、チューニングメソッド US EPA method 625、測定モード スキャン(33-600amu)、インターバル 0.3sec/scan、注入量 1mL、ワークステーション GCMSsolution Ver.2.4、Compound Composer Ver.1.1 および一斉分析用データベース(農薬 253 成分)

【結果と考察】スキャン法により残留モニタリングを実施し、53種農薬、延べ198農薬を検出した。検出された農薬は、必要により選択的GPC-SPE クリーンアップシステム²⁾を用いて精製を加えたのち、特異的な2種類の分離カラムを装着したデュアルカラム GC-mECD などで確認した。検出された農薬で、SIM法の対象としていなかった農薬はメパニピリムのみであった。ポジティブリスト制下において、各検査機関の施設や予算などに応じて、検出頻度の高い農薬を選抜して、少ないところは数十、通常100余の農薬を分析できる体制が完備されれば、通常の農産食品から検出される残留農薬の大部分をカバーできると考えられた。なお著者らは、メパニピリムは、代謝物を含めて LC/MS(SIM)による一斉分析法を作成して、日常の残留分析に応用してきている。スキャン法/SIM法の比は0.3-3.1の範囲、平均0.98、中央値1.00、標準偏差は0.63であった。一斉分析法ではあるが、農薬の損失が少なく精製度の高い試験溶液が得られる本試料調製法を採用することによって、スキャン法は20-30検体程度のスクリーニング分析に応用可能と判断される評価結果が得られたものと考えられた。また、ハイスループットな試料調製法の代表として QuEChERS 法³⁾を検証したところ、酢酸エチル不溶物を除去するといった濃縮後の溶媒置換などが無いために、試料によっては最終検液中に不溶物が認められるほど夾雑物が多く、注入口インサートのみならず分離カラム、イオン源などの汚染が予想以上に早く、農薬成分の吸着/分解、イオン化抑制、保持時間のずれなどが原因と考えられる。残留分析において最も避けなければならない False negative も認められたことから、日常の残留分析へのスキャン法の適用は困難と考えられた。

【文献】1) Ueno, E., Oshima, H., Saito, I., Matsumoto, H., J. AOAC Int. **87**, 1003-1015 (2004)、2) Ueno, E., Oshira, H., Matsumoto, H., Saito, I., H., J. AOAC Int. **89**, 1641-1649 (2006)、3) Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Stajnbaher, D., Schenck, F. J., J. AOAC Int., **86**, 412-431 (2003).

液相マイクロ抽出法を用いた GC/MS による河川水中ベンゾフェノン類の測定

○ 本田英博、川口 研、岩崎雄介、伊藤里恵、斉藤貢一、中澤裕之
(星薬大)

【緒言】

紫外線吸収剤として広く使用されているベンゾフェノン類 (BPs) は、内分泌かく乱作用が疑われている。しかし、環境中 BPs の汚染レベルは非常に低いことが予想される。この BPs の汚染状況を把握するためには、高感度かつ高精度な分析法が必要となる。本研究では、マイクロシリンジを用いて極少量の抽出溶媒により測定対象物質を抽出・濃縮する方法である液相マイクロ抽出 (LPME) 法を用いて河川水中 BPs の測定を試みた。

【実験】

Benzophenone (BP)、2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone (BP-3)、2-Hydroxy-4-methoxy-4'-Hydroxy-4-methoxy-4'-methylbenzophenone (BP-10)、2-Hydroxy-Benzophenone (2OH-BP)、を測定対象物質とした。

GC 条件

試料注入口はスプリットレス法を使用し、試料注入量は 2 μL とした。分離には、DB-5MS (0.25 mm x 30 m、膜厚 0.25 μm) を使い、移動相はヘリウム (99.9999%) を流速 1.2 mL/min で流した。カラム恒温槽は、初期温度 100 $^{\circ}\text{C}$ (1 min)-20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ -280 $^{\circ}\text{C}$ (4 min) で行った。

MS 条件

MS のイオン化法は電子イオン化 (EI) 法を採用し、検量線及び実試料の測定は、選択イオン検出 (SIM) 法で行った。モニタリングイオンはそれぞれ、BP: m/z 182、BP-3: m/z 227、BP-10: m/z 241、2OH-BP: m/z 197 とした。また、内標準物質のモニタリングイオンとしては BP-d: m/z 192 とした。

LPME 法

河川水 2 mL に内標準物質 (BP-d)、攪拌子を加えた。その後、10 μL 用マイクロシリンジを使用してトルエンを 2.5 μL 量り取り、シリンジ先端部を実試料の水面下 5 mm に固定した。そこで、シリンジ先端部にトルエン 2.5 μL の液滴を作り、500 rpm で攪拌しながら 15 min 保持させ抽出を行った。抽出後は、2 μL の抽出液を再びシリンジに取り、GC/MS へと導入することにより測定した。

【結果及び考察】

LPME 法の最適抽出時間を検討した結果、15 min 以上で平衡に達した。本法による河川水中 BPs の検出下限値 ($S/N = 3$) 及び定量下限値 ($S/N > 10$) は、5 ~ 20 pg/mL 及び 20 ~ 100 pg/mL であった。サロゲート物質を用いた内標準法による検量線は、100 ~ 5000 pg/mL の範囲において、相関係数が 0.99 以上と良好な検量線が得られた。添加回収試験 (100 及び 1000 pg/mL) をした結果、回収率 90 % 以上 ($n = 6$)、RSD (10 % 以下) という良好な結果が得られた。

本分析法は、簡便かつ高精度であり高感度な分析法であった。また、本法は河川水の測定に有用であることが示唆された。

LC-MS/MS によるベンゾフェノン類の一斉分析法の検討

○ 本田英博¹、川口 研^{1,2}、遠藤直幸¹、岩崎雄介¹、伊藤里恵¹、
齊藤貢一¹、中澤裕之¹ 1 星薬大学・2 学振 DC

【目的】ベンゾフェノン類(BPs)は、紫外線吸収剤として広く使用されている化学物質であり、内分泌かく乱作用が疑われており、近年、BPs の食品等への汚染が懸念されている。本研究では、容器包装資材から溶出してくる BPs を把握するため、液体クロマトグラフィ/タンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用いた BPs の一斉分析法を検討した。

【結果】ベンゾフェノンを含む類縁物質 9 種を測定対象物質とした。本法の検出限界(S/N=3)及び定量限界(S/N>10)は、0.01~1 ng/mL 及び 0.05~5 ng/mL であった。添加回収試験での結果は 80.1~99.0 % (RSD<10 %, n=3)であった。

【考察】本分析法は、高感度かつ高精度な分析法であり、様々な容器包装から溶出する BPs の測定に有用であることが示唆された。今後、本法を容器包装資材からの材質試験や溶出試験に適用することで、BPs の溶出実態の解明することが期待される。

遺伝子組換え食品定量検査における調製試料混合率と定量値の差について

(財)食品薬品安全センター
国立医薬品食品衛生研究所

○井上雪乃, 笠間菊子, 大島赴夫
渡邊敬浩, 穂山 浩, 米谷民雄

【目的】遺伝子組換え(GM)食品の定量検査の外部精度管理調査において、調査試料は、非遺伝子組換え(Non-GM)食品に GM 食品を重量混合して作製している。しかし、GM トウモロコシの定量検査の外部精度管理調査では、調査試料の混合率に比べ、各検査機関から報告された定量PCR法による定量値が高い傾向が認められた。一方、定量PCR法による GM トウモロコシの定量検査では、数々の要因により混合率と定量値が一致しない場合があることが指摘されてきた。本研究では、調査試料の原料としたトウモロコシ粉末を個別に分析することにより得られた情報から、今回の外部精度管理調査において認められた重量混合率と定量値の不一致の原因を明らかにすることを目的とし検討を行った。

【方法】外部精度管理調査試料の作製に使用した原料粉末である Non-GM トウモロコシ粉砕物、Mon810 粉砕物、GA21 粉砕物、Bt11 粉砕物について水分含量測定、DNA 抽出(シリカゲル膜タイプキット法)および定量PCR(ABI PRISM 7900HT 使用)による定量を行った。水分含量測定はカールフイッシャー電量滴定法により、DNA 抽出および定量 PCR 法は厚生労働省通知法¹⁾に従って実施した。得られた水分含量、DNA 抽出量および定量PCR法で得られた結果から重量混合率を補正し、予測値とした。この値を外部精度管理試料の定量PCR法による定量値と比較し、重量混合率と定量値に差が生じる原因について考察した。

【結果および考察】調査試料の混合率と定量値に差が生じた原因として、調査試料の調製に用いた個々の原料トウモロコシ粉末における水分含量の

影響および DNA 抽出量の影響について着目し検討を行った。各トウモロコシ原料粉末の水分含量には、0.66%-2.6%の間で差が認められた。そのため水分含量を補正した混合率を算出し比較したところ、補正前と補正後の混合率にはほとんど差がなかった。

DNA 抽出量に関しても各トウモロコシ原料粉末間で 17.01-25.97 μ g の間で差が認められたため、重量混合率に DNA 抽出量の比を乗じて補正し、予測値を算出した。その結果、予測値と定量値の間の差は小さくなったが、依然として定量値より低い値であった。

また抽出した DNA について GM 系統別の定量PCRを行ったところ、マトリックスとして使用した Non-GM トウモロコシには渡邊²⁾らが報告した Mon810 に加え、GA21 も微量ながら混入していることが判明した。定量PCR法で得られた定量値に、重量混合率を乗じて補正後加算し、GM 系統ごとに予測値を算出した。この値を定量値と比較した結果、定量値に近づいた。

以上の結果から、今回の外部精度管理調査試料においては、原料の水分含量の差は混合率と定量値に差が生じる主原因では無いことが明らかになった。一方、各原料トウモロコシからの DNA 抽出量の差および非遺伝子組換えトウモロコシへの他系統の混入は、それぞれ混合率と定量値に差が生じる原因の一つである可能性が示された。

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知、食安発第 0517001 号(2005)
- 2) 渡邊ら、日本食品化学学会誌,13,18-28(2006)

遺伝子組換えトウモロコシ(Bt11,GA21 および Mon810 系統) 定量検査法の外部精度管理について

○渡邊敬浩¹, 時下祥子¹, 菊地博之¹, 大島赴夫², 笠間菊子²,
鈴木達也², 井上雪乃², 日野明寛³, 穰山浩¹, 米谷民雄¹,
(国立医薬品食品衛生研究所, 2(財)食品薬品安全センター秦野研究所, 3(独)食品総合研究所)

【緒言】厚生労働省は、「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を改正する省令」(平成 13 年 3 月, 厚生労働省令第 23 号)を公布し, 本省令に基づく遺伝子組換え(GM)食品の表示制度を施行している. これに関連し, 表示内容の科学的検証を目的とした検知技術が開発され, 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, 食発第 110 号; 平成 18 年 6 月, 食安発第 0628002 号により一部改正)により GM 食品の検査法が定められている. 検査法の準用にあたっては, 検査結果に影響を与える種々の要因を明らかにし, その結果をもって信頼性確保の一助とすることが期待されるため, 精度管理の実施は分析試験において必須である. 本研究では, 検査法が定められている GM トウモロコシのうち, Bt11, Mon810 ならびに GA21 系統を対象とする定量検査法についての外部精度管理方法を検討することを目的とし, 30 機関による共同試験を実施し, 集計された共通未知試料の分析結果の相互比較を通じて, 検査機関によるばらつきの程度ならびにその要因について詳細な検討を行った.

【方法】試料: 各種 GM トウモロコシ試料は厚生労働省医薬食品局食品安全部を通じて入手した. また, 非遺伝子組換え(non-GM)トウモロコシ試料は米国から直接入手した. 入手した全てのトウモロコシ試料を粒径が均一に 500 μm となるよう粉碎した. Non-GM トウモロコシ試料については粉碎後, 定量 PCR 法により分析し, 0.4%程度の GM トウモロコシの混入(主として Mon810 系統)を確認した上で, マトリクス試料として用いた. マトリクス試料に対し, Mon810 ならびに GA21 試料を重量換算でそれぞれ 1.0%, Bt11 試料を重量換算で 5%となるよう混合した試料を疑似混合試料とした. 疑似混合試料は 20 g ずつ 50 mL 容遠沈管 72 本に秤量分注し小分け試料(配付試料)とした. 均一性試験: 72 本の小分け試料の 8.3%に相当する 6 本の小分け試料を使用し, 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秤量分取し, JAS 分析試験ハンドブック記載のシリカゲル膜タイプキット法を用いて DNA を抽出した. 濃度を調整した抽出 DNA を定量 PCR 法における DNA 試料溶液とし, 分析を行った. スクリーニング試験(CaM+GA21 定量法), Mon810, GA21 および Bt11 系統特異的定量試験の 4 試験を用い, また, 2 回の繰り返し測定を行うことで Mon810, GA21 ならびに Bt11 系統の定量値を算出した. 得られた定量値をロジット変換した後に一元配置の分散分析を実施し, 小分け試料の均一性を統計的に確認した. 安定性試験: 均一性試験に用いた小分け試料 6 本を -20°C で約 1 ヶ月間保存した後, 同様の方法にて分析し定量値を算出した. 均一性試験として実施した 2 回の繰り返し測定のうち, 任意の一測定により得られた定量値と保存後に得られた定量値のそれぞれについて等分散を確認した上で Student's *t* 検定により有意差を検定した. その結果, 保存の前後で得られた定量値には, いずれの定量系を用いた場合にも有意差は認められなかった. 試料の送付: 調製した配布試料 1 点および報告様式を, 本調査研究に参加した 30 機関に送付した. 試験期間は, 試料の発送日である平成 18 年 1 月 18 日から同年 2 月 20 日までとした. 結果の回収ならびに統計解析: 分析結果は, スクリーニング試験(CaM, GA21 定量値, 総 GM トウモロコシ含量), 系統特異的定量試験(Bt11, Mon810, GA21 定量値, 総 GM トウモロコシ系統含量)の 7 項目に分けて集計した. 各定量値は JUSE-QCAS (株)日本科学技術研修所)を用いて統計処理し,

基本統計量、順序統計量およびz-スコアを算出し、ヒストグラム、正規確率プロット、Xbar-R 管理図を作成した。

【結果及び考察】DNA 収量およびそのばらつき：単一の配付試料から分取された 9 検体から抽出された DNA の収量およびそのばらつきについて、機関および DNA 抽出法別に解析した結果、シリカゲル膜タイプキット法を採用した 27 機関から報告された機関別平均収量の平均値は 16.17 μg 、機関別収量のばらつき(相対標準偏差:R.S.D.)の平均値は 14.63%であった。また CTAB 法を用いた 2 機関における機関別平均収量はそれぞれ 8.50 μg 、18.35 μg であった。これら 2 機関のうち、収量の大きい機関についてはホモジナイズ操作に乳鉢を用いたことが報告されており、この操作が、2 機関に認められた DNA 収量の差の主原因であると考えられた。さらに、上記 2 機関における R.S.D.は、シリカゲル膜タイプキット法を採用した機関から報告された R.S.D.の平均値にくらべても小さく、併行再現性良く DNA 抽出が行われていると考えられた。シリカベースレジソタイプキット法を用いた 1 機関から報告された DNA の平均収量は、12.50 μg 、R.S.D.は 5.44%であり、当該機関においても併行再現性良く安定した DNA 抽出が行われていると考えられた。SSIIb 測定値(コピー数)のばらつき：系統特異的定量試験の結果得られた SSIIb コピー数を抽出し、9 検体間での R.S.D.および、繰り返し測定間における変動について解析した。その結果、全 30 機関のそれぞれで得られた R.S.D.の平均値(1 測定目：12.59%、2 測定目：13.13%)に比べ大きな変動を示す機関が数機関認められた。これらの機関については DNA 収量の算出が不正確であること、また検量線あるいは定量 PCR 機器の不良がその原因として強く疑われた。定量 PCR により得られるコピー数の繰り返し再現性が低い場合、特に試験対象試料に定量限界値付近の GM トウモロコシが含まれている場合には、繰り返し測定間での試験結果が一致しないことも考えられる。このため、コピー数の繰り返し再現性についても、定量 PCR 法を準用するに当たって管理されるべき項目であると考え。スクリーニング試験および系統特異的定量試験：全機関から報告されたスクリーニング試験における CaM および GA21 定量値の平均 \pm S.D.は、それぞれ 17.11 \pm 1.98 および 1.24 \pm 0.20%であった。さらに、CaM 定量値と GA21 定量値の合算値(総 GM トウモロコシ含量)の平均 \pm S.D.は 18.35 \pm 2.12%であった。また、系統特異的定量試験について全機関から報告された Mon810、Bt11 および GA21 定量値の平均 \pm S.D.は、それぞれ 1.77 \pm 0.27、7.36 \pm 0.94 および 1.21 \pm 0.15%であった。さらに、Mon810、Bt11 および GA21 定量値の合算値(総 GM トウモロコシ系統含量)の平均 \pm S.D.は 10.34 \pm 1.07%であった。全ての試験について、管理限界を超える結果が数機関から報告されたが、これら機関の多くには DNA 収量、あるいはコピー数のばらつきの問題がみとめられており、これらを指標に実験環境および実験手技の改善を図ることで試験精度が向上することが期待された。しかし一方で、管理限界を超えた機関の中には、検知技術自体が有するばらつきの範囲に含まれると判断されるばらつきを報告した機関も認められており、統計解析の方法についても改めていく必要性が考えられた。本研究により得られた結果を概観すると、これまでに実施してきた外部精度管理調査の結果に比べ、DNA 抽出、定量 PCR のいずれの手技においても、各機関での技術レベルの向上が窺われる。しかし、新たな調査機関あるいは試験者の参加、試験環境の変化のためか、手技の未習熟および試験法の理解不足に由来すると考えられる不正確な分析結果が報告される例が認められた。さらに本年度の結果からは、精度管理上の問題点として指摘されるにはいたらなかったが、今後得られる分析結果の信頼性を保つ上で、PCR 試薬や機器に由来するデータの不良性等の問題点も検討項目として管理する必要性が示唆された。今後の継続的な調査により、試験者のさらなる技術向上が図られることが期待され、また新たな項目についての管理方法が示されることが望まれる。

【謝辞】本研究は厚生労働省医薬食品局食品安全部の平成 17 年度食品等試験検査費により実施した。本試験にご参加いただきました各検査機関の諸氏に深謝いたします。

PO.05-26

Within-day variations in response of the mouse bioassay for diarrhetic shellfish poisoning toxin (okadaic acid)

Session: PO.05 - Toxin analysis

K Machii¹, M Kawasaki²

¹National Institute of Health Sciences,
TOKYO, Japan

²Food and Drug Safety Center,
KANAGAWA PREF., Japan

The mouse bioassay (MBA) for testing of marine biotoxins is still an important tool in food safety monitoring. During the symposium 'Marine and Freshwater Toxins Analysis' held in Baiona, Spain last year, we reported that following i.p. injection of PSP the mice showed a tendency to die more quickly when injected in the morning compared to those injected in the afternoon. Recently, we found the same phenomenon when okadaic acid (OA) was injected in mice. That is, mice injected with OA tended to die more quickly when injected in the morning than when injected in the afternoon. Further, the death time following injection of OA, was significantly different ($p < 0.05$) between normally-fed mice and starved mice. The time of injection may therefore influence the decision for regulation. Following the dose of OA we used (4 μg per mouse), the mice died after less than 12 h. We are now regulating the toxin dose to a death time of approximately 20 h. Using the lower doses of OA, we plan to examine again the differences in death time between mice injected in the morning and in the afternoon.

食品衛生外部精度管理調査に於ける下痢性貝毒検査用試料作製に関する基礎的研究

—オカダ酸の各種保存条件に於ける安定性について—

(財)食品薬品安全センター ○川崎勝、大島赴夫、

国立医薬品食品衛生研究所 山本茂貴、町井研士

【目的】

下痢性貝毒の主要原因物質としてオカダ酸が挙げられる。外部精度管理用の下痢性貝毒検査試料(リファレンスマテリアル)作製に於いて、リファレンスマテリアルを安定して供給するためには、現状では生鮮サンプルと混和せず市販のオカダ酸を毒性が出ると予想される濃度で別に添付する方法が最適であると考えている。しかし、その際に生じる問題点として、オカダ酸が保存中、輸送中、精製操作中等に本来の力価が失われる可能性が危惧される。そこでオカダ酸の回収率を様々な保存条件下、経時的に追跡調査を実施した。

今回の実験では結果をより早くモニターするために、実際予定される添加量の1/4の濃度で行った。保存方法は試料の状態としては①遮光スクリーバイヤル中にアセトン溶液で密栓、②遮光スクリーバイヤルの底に吸着風乾させる、そして③濾紙ディスクに吸着風乾させる3方法を、温度条件としては①冷凍(-35℃)、②冷蔵(5℃)、③室温(夏季)の3条件について追跡調査した。以上、保存方法と温度条件の組み合わせを変えて9種の保存条件につきオカダ酸の回収率を経時的に追跡した。

【実験】

試薬:オカダ酸標準品はワコー純薬製生化学用を用い、オカダ酸の250 μ g/mLのアセトン溶液を調製した。HPLCの内部標準物質として docosanoic acid (C10:0) GLサイエンス社製を用いた。蛍光化試薬はフナコシ製 9-anthryl diazometane (ADAM)試薬を用いた。反応用に0.1% ADAM MeOH溶液を調製した

オカダ酸の保存:オカダ酸をバイヤル中に溶液保存するサンプルは250 μ L容硝子インサートにオカダ酸アセトン溶液40 μ L(オカダ酸量として10 μ g)を分注しバイヤル中に密栓保存した。オカダ酸のバイ

ヤルまたは濾紙ディスクへの吸着は、同溶液40 μ Lを、1.5mL容バイヤルおよび濾紙ディスクに添着後風乾した。さらに濾紙ディスクは1.5mL容バイヤルに密栓保管した。

抽出:濾紙に吸着させたオカダ酸は濾紙を2mLのアセトンに浸漬して2min超音波抽出を行い、抽出液をエキクロディスク13CR(0.45 μ m)で加圧濾過する。同じ操作を3回繰り返し3回分の濾液を合し、窒素気流下濃縮乾涸してADAM化の試料とした。バイヤル中に保存したオカダ酸は直接ADAM化を行った。

ADAM試薬による蛍光HPLC法:Lee(1)らの方法を一部改良して行った。

オカダ酸の回収率の経時変化の測定頻度:0日、1週、2週、3週、4週と6週にn=5で行った。

測定データの解析:各データをJUSE-QCUSにより統計解析を行い、箱髭図を比較した。

【結果】

遮光バイヤルにアセトン溶液で密栓及び遮光バイヤルに吸着したオカダ酸は当初の予想に反し冷凍、冷蔵、室温のどの条件でも6週間安定であることが明らかとなり、現在更に長期に亘り観察中である。一方濾紙に吸着したオカダ酸はどの条件でも回収率は経時的に緩徐に減少することが明らかになったが、冷蔵及び冷凍条件下では3週間比較的安定であることが明らかになった。以上より実際に使用を予定している冷凍条件はどの条件でも外部精度管理用サンプルとして使用可能である事が示唆された。今後安定してオカダ酸を供給できる条件について更に検討を加える予定である。

1) J. S. Lee et. Al. Agric. Biol. Chem., 51 (2), 877 ~ 881, 1987

GC/MS、GC/PFPD 併用による農薬の一斉分析について

○住本建夫、村田 弘、高取 聡、北川陽子、柿本幸子、岡本 葉、田中之雄
(大阪府立公衆衛生研究所)

【はじめに】

残留農薬の問題について、消費者の関心が高まり、検査機関では多くの検査項目についての確かな検査と迅速性が要求されている。食品に残留する農薬等のポジティブリスト制が導入され、一律基準値が0.01ppmと定められたため、多くの検査機関では0.01ppmを定量下限値に設定し、農薬の一斉分析を行っている。今回、ガスクロマトグラフ(GC)に質量分析計(MS)とパルスド蛍光光度検出器(PFPD)を装着し、MSとPFPDによる同時分析により一律基準を定量下限値とする農薬の一斉分析法を検討したので報告する。

【方法】

1. 試料：平成19年2月～7月に搬入された野菜、果物類

2. 試験液の調製：フードプロセッサーで均一化した試料10gをポリプロピレン製遠心管に採取し、アセトニトリル20mLを加えて、ホモジナイザーで1分間攪拌抽出する。これに予め秤量しておいた塩化ナトリウム1g及び無水硫酸マグネシウム4gを加えて直ちに1分間振とう攪拌する。次に遠心分離(3000rpm、10分間)を行う。得られた上清8.0mLをアセトニトリル：トルエン(3:1)混液30mLでコンディショニングしたENVI-CarbII/PSA(500mg/500mg)に負荷し、アセトニトリル：トルエン(3:1)混液30mLで溶出する。負荷通過液及び溶出液を100mLナス型フラスコに分取し、40℃以下で減圧濃縮する。窒素気流下で乾固後、10%アセトン含有ヘキサンで溶解し、4.0mLに定容し、試験溶液として分析に供した。

3. 装置及び測定条件：

GC (Agilent6890N), MS (Agilent5973MSD) PFPD (Model 5380)

カラム：HP-5MSI(0.25mm x 30 m 膜厚0.25μm) カラム温度：50℃(1 min) →25℃/min→125℃(0 min) →10℃/min→300℃(6.5 min)

カラム流量：MSD側 1.0 mL、PFPD側 1.4 mL(クロロピリホスメチルでタイムロッキング)

注入量：2μL、イオン化法：電子イオン化法(EI) 測定モード：選択イオン検出(SIM) 測定

4. 測定農薬：検討した農薬を表1に示した。PFPDの欄、丸印がPFPDで測定可能農薬である。

表1 測定農薬

RT:リテンションタイム MS1:ターゲットイオン MS2:クオリファイアイオン

NO	農 薬	RT	MS1	MS2	PFPD
1	Dichlorvos	6.582	220	185	○
2	Ethoprophos	10.627	158	242	○
3	Trifluralin	11.027	306	264	
4	α-BHC	11.394	219	181	
5	Atrazine	11.840	200	215	
6	β-BHC	11.934	219	181	
7	γ-BHC	12.064	219	181	
8	Terbufos	12.134	231	243	○
9	Cyanophos	12.150	109	243	○
10	Propyzamide	12.183	173	255	
11	Pyrimethanil	12.297	198	199	
12	Diazinon	12.363	179	304	○
13	Disulfoton	12.469	274	186	○
14	Tefluthrin	12.511	177	197	
15	δ-BHC	12.548	219	181	
16	Isazophos	12.633	161	257	○
17	Etrimfos	12.675	292	181	○
18	Iprobenfos	12.799	204	288	
19	Benfuresate	13.063	163	256	
20	Bromobutide	13.182	119	232	
21	Acetochlor	13.270	148	223	
22	Metribuzin	13.293	198	214	
23	Vinclozolin	13.295	285	212	
24	Chlorpyrifos-methyl	13.331	286	125	○
25	Paration-methyl	13.336	263	125	○
26	Simeconazole	13.383	211	121	
27	Tolclophos-methyl	13.432	265	125	○
28	Ametrym	13.463	227	170	
29	Heptachlor	13.487	272	100	
30	Prometrin	13.534	241	226	
31	Metalaxyl	13.574	206	249	
32	Fenchorphos	13.613	285	125	○
33	Dithiopyr	13.773	354	306	
34	Fenitrochoin	13.858	277	260	○
35	Pirimiphos-methyl	13.874	290	305	○
36	Esprocarb	13.929	222	162	
37	Malation	14.047	173	125	○
38	Fenthion	14.227	278	169	○
39	Chlorpyrifos	14.259	314	197	○
40	Parathion	14.284	291	155	○

NO	農薬	RT	MS1	MS2	PFPD
41	Triadimefon	14.315	208	250	
42	Dicofol	14.325	139	250	
43	Fthalide	14.591	243	272	
44	Bromophos	14.619	331	125	○
45	Cyprodinil	14.750	224	210	
46	Dimethametryn	14.858	212	255	
47	Pendimethalin	14.876	252	281	
48	HCE1	14.947	353	317	
49	HCE2	14.947	353	183	
50	Isofenfos	15.050	213	255	○
51	Qunalphos	15.116	146	157	○
52	Phentoate	15.127	274	246	○
53	Procymidone	15.224	283	96	
54	Propaphos	15.365	220	304	○
55	Methidation	15.392	145	85	○
56	Tetrachlorvinphos	15.557	329	109	○
57	Fenamiphos	15.744	303	154	○
58	Butamifos	15.791	286	258	○
59	Futolanil	15.829	173	323	
60	Prothiofos	15.915	309	267	○
61	Isoprothiolane	15.938	290	189	
62	Profenofos	15.968	339	208	○
63	Fludioxonil	16.035	248	182	
64	p,p'-DDE	16.037	246	318	
65	Oxadiazon	16.083	175	344	
66	Kresoxim methyl	16.293	116	206	
67	Isoxathion	16.392	177	313	○
68	Cyflufenamide	16.446	412	91	
69	Chlorfenapyr	16.506	247	350	
70	p,p'-DDD	16.814	235	165	
71	o,p'-DDT	16.890	235	165	
72	Ethion	16.899	231	384	○
73	Fluacrypyrim	17.100	145	204	
74	Subprofos	17.118	322	156	○
75	Triazophos	17.142	257	161	○
76	p,p'-DDT	17.499	235	165	
77	Bromopropylate	18.410	341	183	
78	Bifenthrin	18.419	181	166	
79	EPN	18.434	157	169	○
80	Tebufenpyrad	18.606	318	333	
81	Indanofan	18.723	174	310	
82	Clomeprop	18.789	288	120	
83	Tetradifon	18.914	159	356	
84	Furametypr	18.917	157	298	
85	Pyriproxyfen	19.136	136	226	
86	Cyhalothrin1	19.189	181	197	
87	Cyhalothrin2	19.380	181	197	
88	Fenarimol	19.585	139	251	
89	Pyrazofos	19.632	221	232	
90	Permethrin1	20.121	183	163	
91	Permethrin2	20.240	183	163	
92	Cyfluthrin1	20.680	163	226	
93	Cyfluthrin2	20.759	163	226	
94	Cyfluthrin3	20.847	163	226	
95	Cyfluthrin4	20.876	163	226	
96	Cypermethrin1	20.988	163	181	
97	Halfenprox	21.052	263	183	
98	Cypermethrin2	21.077	163	181	
99	Cypermethrin3	21.160	163	181	
100	Cypermethrin4	21.186	163	181	
101	Fulcythirinate1	21.196	199	451	
102	Etfenprox	21.289	163	376	
103	Fulcythirinate2	21.380	199	451	
104	Fenvalerate1	21.914	225	419	
105	Fluvalinate1	22.093	250	502	
106	Fenvalerate2	22.125	225	419	
107	Fluvalinate2	22.149	250	502	
108	Deltamethrin	22.739	181	253	

【結果及び考察】

前処理を簡単にするため、QuEChERS法を改良し、試験溶液 (1 g/mL) を調製した。農薬の残留基準は農産物により基準値が異なっているため、一斉分析により数多くの残留農薬類を測定するには、一律基準0.01ppm が測定できることが望ましい。そこで、今回調製した試験溶液について、ダブルカラム法によって、MSのSIMモードによる測定と従来の炎光光度計に比べ、選択性に優れているPFPDによる測定を同時に行い検討した (図1)。PFPDはリン検出モードで使用したが、検討したリン含有農薬について、定量下限値を0.01ppm としても測定可能であった。また、農産物によっては0.005ppm の残留基準のあるエトプロホス、テルブホスについて、0.005ppm を定量下限値としても測定可能であった。PFPDで確認できずMSのみで測定を行った農薬類についても、ほぼ定量が可能であった。一部異性体の多く認められるシフルトリンやシペルメトリン等が0.01ppm を下限値とするには若干困難であったので、化学イオン化法 (CI) との併用が適していると思われる。

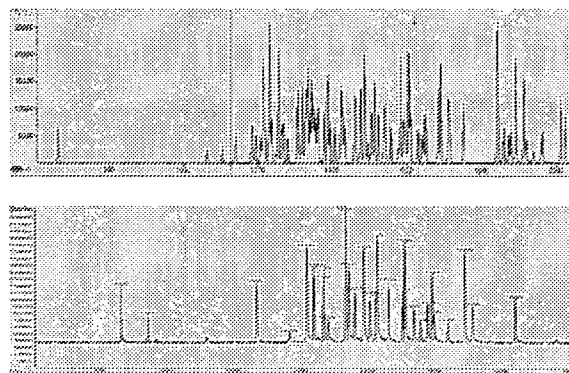


図1. 上段:PFPDによる標準物質のクロマトグラフ
下段:GC/MSによる標準物質のトータルイオンクロマトグラフ

【まとめ】

GC/MSとPFPDとの同時分析により、リテンションタイムが近似の農薬類も識別することができ、一斉分析によるスクリーニングが容易に行えた。今後、さらに測定農薬を増やし検討を行っていく予定である。

農薬等のポジティブリスト化に伴う検査の

精度管理に関する研究 (第2報)

○村田 弘¹、織田 肇¹、岩上正蔵¹、田中之雄¹、住本建夫¹、
高取 聡¹、北川陽子¹、柿本幸子¹、岡本 葉¹、酒井 洋²、
上野英二³、田中敏嗣⁴、宇野正清⁵、宇治田正則⁶、佐々木珠生⁷、
堤 泰造⁸、衛藤修一⁹

(¹大阪府立公衆衛生研究所、²新潟県保健環境科学研究所、³愛知県衛生研究所、
⁴神戸市環境保健研究所、⁵奈良県保健環境研究センター、⁶和歌山市衛生研究所、
⁷広島市衛生研究所、⁸徳島県保健環境センター、⁹北九州市環境科学研究所)

A. 目的

ポジティブリスト制度下における検査精度の確認ならびに検査結果の信頼性確保のために昨年度¹⁾に引き続き、地方衛生研究所の9参加機関(新潟県、愛知県、神戸市、奈良県、和歌山市、広島市、徳島県、北九州市、大阪府)の協力を得て、食品中の残留農薬のGC/MS及びLC/MS/MSによる外部精度管理、内部精度管理を実施した。また、検査精度を維持・向上するための主な要因(標準品、分析法、分析装置)も検討して実施した結果を報告する。

B. 方法

1. 実施期間

精度管理用試料等の配布: 内部精度管理試料(カボチャ、ニンジン、ホウレンソウ)及び市販の農薬混合液(140種類、関東化学製31・32)、GC/MSシステム評価用農薬標準試料(クライテリアサンプル、林純薬製)を平成18年8月28日に送付した。外部精度管理試料は平成18年10月10日に送付した。

結果報告書の提出: 平成18年12月15日までに結果の提出を求めた。

2. 添加農薬

市販の農薬混合液から30種類を添加農薬指定リストとし、その中から4種類の農薬を添加した。

3. 精度管理用試料の調製

精度管理用試料は、業務用の冷凍マイクロペースト状食材(12-16kg、(株)新進)を用いた。外部精度管理用添加農薬は和光純薬製残留農薬試験用を使用し、表1に示した添加農薬の種類及び設定濃度になるように農薬混合アセトン溶液を調製して添加した。この農薬添加試料と農薬無添加の対照試料を冷凍後、参加機関に冷凍宅配便で送付した。送付した試料の均質性は、試料15個から無作為に5個の容器を選び、容器毎に2回採取して測定を行い、調製試料の均質

性を確認した。調製試料の安定性は、調製後と-20℃、1ヶ月保存後に各食品につき無作為に5種類測定し、保存前後の添加濃度に変動のないことを確認した。

4. 検査方法

各機関の農薬検査標準作業書(SOP)に従って5回の分析を求めた。内部精度管理では、30項目の農薬についてカボチャ、ニンジン、ホウレンソウの3食品に0.1ppmになるように添加し、GC/MSによる測定により回収率を求めた。

GC/MSシステム状態が良好であること(一定レベルであること)の客観的かつ簡便な評価を目的としたクライテリアサンプルの中からクロロピリホスメチル、カブタホル、イソキサチオン、ペンタクロロフェノール、2,4-ジニトロアニリン、シマジン、フェニトロチオンの7項目の試料測定前と測定後のピーク形状(クロマトグラム)とピーク強度(定量値)の提出を求めた。

5. 評価方法

外部精度管理は、各機関から報告された定量値について、各々の検査項目毎に有意水準5%で異常値の棄却検定を行った後、基本統計量、ヒストグラム、正規確率プロット、Xbar-R管理図、zスコアを求めた。さらに精度を相対標準偏差(RSD)で評価した。内部精度管理は、平均回収率、相対標準偏差(RSD_r・RSD_b)、HorRat値により評価した。

C. 結果及び考察

添加農薬の均質性、安定性を統計的に確認したカボチャ、ニンジン、ホウレンソウに延べ12種類の外部精度管理調査を行った結果は、全機関が添加農薬の種類をすべて正しく検出した。GC/MSによる各農薬の全機関平均濃度は添加濃度の82%~105%、LC/MS/MSでは84%~110%と良好な結果が得られた。

Xbar-R管理図及びzスコアによる評価で、一部