

の項目で適正域に入っていない機関も認められたが、総合成績では前年度と比較してかなり良好な結果が得られた。すべての評価で「良好」が4機関あった。4機関の中で2機関は、2年連続「良好」な成績であった。GC/MSとLC/MS/MSによる測定値の比較では、LC/MS/MSの測定値がGC/MSの測定値と同程度あるいはそれ以上の精度の高い結果が得られた。相対標準偏差(20%以下が目安)で外部精度管理を評価すると、添加濃度の違いによる変動は概して認められず、カボチャ、ニンジン、ホウレンソウは全機関10%以下、ホウレンソウは全機関15%以下であった。Horwitzの各濃度と比較して良好な結果を示した。

標準品は、市販の農薬混合液(140成分)の同一ロットを使用した。このことが標準品による各機関の検査精度のばらつきによるファクターを少なくし、検査精度に大きく寄与したと思われる。

分析法(SOP)は、厚生労働省一斉分析法に準じた方法が5機関、独自法(愛知県法、兵庫県法、SFE法、QuEChERS改良法)が各1機関で実施された。各機関のSOPで得られた添加回収率、HorRat値(AOACのガイドラインでは、 $0.5 \leq \text{HorRat} \leq 2.0$ を許容範囲)による評価では、回収率が70%~120%、HorRat値が2を下回っていることから、各機関のSOPの精度が許容できる範囲であることを確認した。

検討した30農薬の添加回収率の結果は、厚生労働省による一斉分析法における添加回収のA評価(平均

回収率の中央値が70%~120%)と一致した。

濃度既知の内部精度評価と濃度未知の外部精度評価の関係は、どちらも概ね70%~120%の範囲内で示されており、内部精度評価で得られた結果と外部精度評価の結果は、ほぼ一致した。

GC/MS装置性能評価は、精度管理試料の注入後も注入口あるいは分離カラム部位における評価用農薬が、全機関とも概ね問題なく検出され、定量値・ピーク形状も良かったことから良好な状態のGC/MSによる測定が行われていたと推察された。

#### D. まとめ

今回の精度管理(外部精度管理及び内部精度管理)の結果は良好であり、「正確な(一定の)標準品」を用いて、「適正な分析法」で実施して、「良好な状態の分析装置」で測定することによって信頼性のある結果が得られることが示唆された。

#### E. 謝辞

本研究は平成18年度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。本研究にご協力いただきました各参加機関の諸氏に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) 住本建夫ら:第43回全化協講演集, 89-90 (2006)

表1 外部精度管理調査結果 (GC/MS)

調製試料名	添加農薬名	設定添加量 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	調製時 (平均値 $\pm$ 標準偏差)	全参加機関 (平均値 $\pm$ 標準偏差)	Xbar管理図 「良好」判定数	R管理図 「良好」判定数	z-スコア 「良好」判定数
カボチャ	アトラジン	50	46.49 $\pm$ 2.97	47.50 $\pm$ 5.20	9	9	8
	チオベンカルブ	50	46.08 $\pm$ 2.85	52.36 $\pm$ 5.61	9	9	9
	ブプロフェジン	300	274.61 $\pm$ 13.86	257.40 $\pm$ 3.97	9	9	9
	メタラキシル	100	92.01 $\pm$ 5.19	94.28 $\pm$ 10.92	9	9	8
ニンジン	エチオン	200	192.21 $\pm$ 6.19	164.90 $\pm$ 20.60	9	8	9
	プロピサミド	100	95.67 $\pm$ 3.03	85.85 $\pm$ 8.74	9	8	8
	マラチオン	200	193.96 $\pm$ 4.93	165.60 $\pm$ 20.00	9	9	9
	メタラキシル	100	93.69 $\pm$ 1.41	91.07 $\pm$ 11.15	9	9	9
ホウレンソウ	クロルピリホス	10	9.56 $\pm$ 0.46	10.28 $\pm$ 1.25	8	8	8
	テルブホス	10	9.45 $\pm$ 0.58	10.45 $\pm$ 1.76	7	9	9
	フルシトリネート	200	197.76 $\pm$ 7.79	167.90 $\pm$ 26.10	8	9	9
	メタラキシル	100	95.28 $\pm$ 6.36	90.12 $\pm$ 8.93	9	8	9

## LC/MS/MSによる農産物中残留農薬一斉分析法の検討

○小林ゆかり, 渡邊美奈子, 土田由里子, 酒井洋, 丹治敏英  
(新潟県保健環境科学研究所)

### 【はじめに】

平成18年に施行されたポジティブリスト制により、監視対象となる残留農薬が大幅に増加した。当所ではこれまでGC/MS(SCAN法)を用いた一斉分析法を検討してきたが、新たにLC/MS/MSを用いての分析を検討した。今回、主として分析に及ぼす作物成分の影響について調査した結果を報告する。

### 【実験方法】

#### 1 対象農薬

以下に示す農薬108成分を対象とした。

abamectin-B1a, acephate, acetamiprid, acibenzolar-s-methyl, aldicarb, aldoxycarb, aramite, azoxystrobin, barban, benzofenap, boscalid, butafenacil, carbaryl, carpropamid, chlorbufam, chloridazon, chloroxuron, chromafenozide, clofentezine, clomeprop, cloquintocet-mexyl, clothianidin, cumyluron, cyazofamid, cycloate, cycloprothrin, cyflufenamid, cyprodinil, daimuron, di-allate, dichlorvos, naled, diflubenzuron, dimethirimol, dimethomorph (isomer1, 2), dinotefuran, diuron, epoxiconazole, ethiofencarb, fenobucarb, fenoxaprop-ethyl, fenpyroximate (E, Z), flufenacet, flufenoxuron, furametpyr, furametpyr-metabolite, furathiocarb, hexaflumuron, hexythiazox, imazalil, imidacloprid, indanofan, indoxacarb, iprovalicarb, isoxaflutole, lactofen, linuron, lufenuron, mepanipyrim, methabenzthiazuron, methamidophos, methiocarb, methoxyfenozide, milbemectin (A3, A4), monolinuron, naproanilide, novaluron, omethoate, oxamyl, oxaziclomefone, oxycarboxin, pencycuron, pentoxazone, phenmedipham, propaquizafop, pyraclostrobin, pyrazolynate, pyrifthalid, quizalofop-ethyl, quizalofop-P-tefuryl, sethoxydim (isomer1, 2), silafluofen, simeconazole, spinosyn (A, D), tebufenozide, tebutiuron, teflubenzuron, tetrachlorvinphos, thiabendazole, thiacloprid, thiamethoxam, thiodicarb, methomyl, tralkoxydim (isomer1, 2), trichlorfon, tridemorph, triflumizole, triflumizole-metabolite, triflumuron, triforine (isomer1, 2), triticonazole

#### 2 試験方法

試料溶液の調製方法を図1に示した。また、LC/MS/MS測定条件を表1に示した。なお、当所のルーチン分析では、TPNの同時分析のため、野菜、果実については10%リン酸を試料の1/2量添加して細切均一化を行っているので、同様の前処理とした。

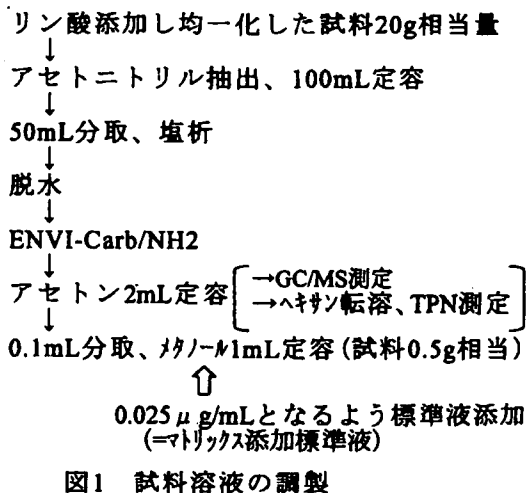


図1 試料溶液の調製

表1 LC/MS/MS測定条件

装置	Micromass Quattro Premier XE
カラム	Acuity UPLC system (Waters) Acuity UPLC™ BEH C18 (2.1mm × 50mm, 1.7 μm) (Waters)
カラム温度	40℃
注入量	5 μL
移動相	0.25mL/min A:5mmol/L酢酸アンモニウム 水溶液 B:5mmol/L酢酸アンモニウム メタノール溶液 (A:95%-60% (1min)-60% (3.5min) -50% (6min)-45% (8min) -5% (17.5-30.5min))
イオン源	ESI MRMモード

【結果及び考察】

1 各農薬の感度

今回検討した方法では、 $0.005 \mu\text{g/mL}$ が一律基準(作物中 $0.01\text{ppm}$ )に相当する。この濃度では、検討した108成分中、cycloate、cycloprothrin、di-allate、milbemectin-A3、milbemectin-A4、sethoxydim-1、tralkoxydim-1、tridemorph、triforine-1、triforine-2の10成分がS/N=10以下であったが検出は可能であった。他の98成分は十分な感度が得られた。

2 マトリックスの影響

試料溶液に標準液を添加した試料(マトリックス添加標準液)について測定し、マトリックスの影響について検討した。結果を図2に示す。標準液に対するマトリックス添加標準液のピーク強度は、多くの作物と農薬成分の組み合わせで90~110%の範囲に収まった。しかし、しゅんぎくのdiuron、furanetpyr、グレープフルーツのcarbaryl、furanetpyr-metabolite、hexythiazox、mepanipyrimで70%以下の強度となり、きゅうりのhexaflumuronで130%以上の強度となるなど、比較的影響の大きいものもあった。

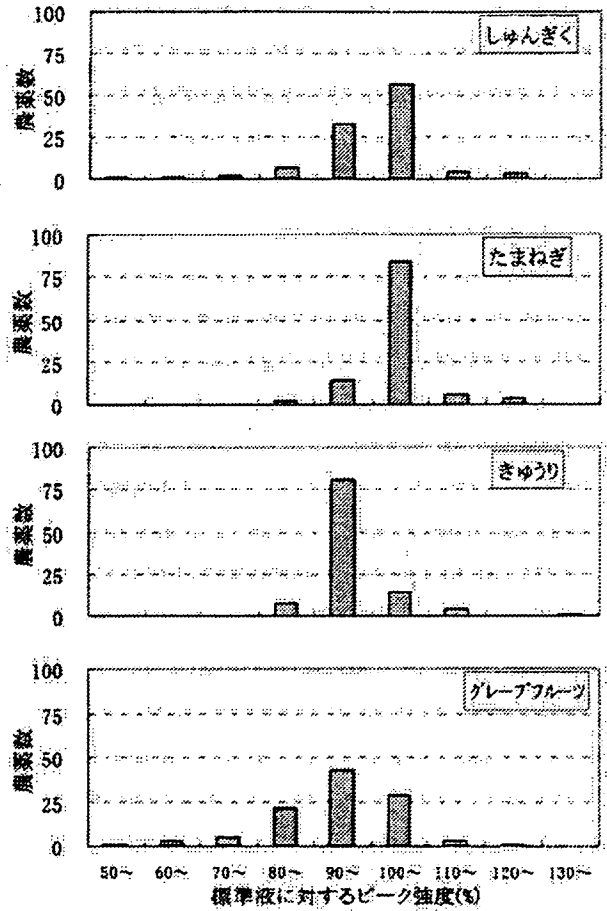


図2 マトリックスの影響

3 連続分析時の安定性

ルーチン分析を想定して、試料溶液3検体→標準溶液→試料溶液3検体→標準溶液→……の順に注入を繰り返し、連続分析時の標準溶液の測定値の安定性を調査した。結果の一部を図3に示す。sethoxydim-1、tralkoxydim-1はPeak Areaが次第に大きくなったが、これらはいずれも主ピークであるsethoxydim-2、tralkoxydim-2に比べて数%のAreaであり、合計Areaでは概ね安定した値であった。furanetpyr-metaboliteはAreaが次第に小さくなる傾向を示した。これらの傾向は日によって再現しない場合もあり、原因について今後検討が必要と考えられた。他の農薬成分については概ね安定した測定が可能であった。

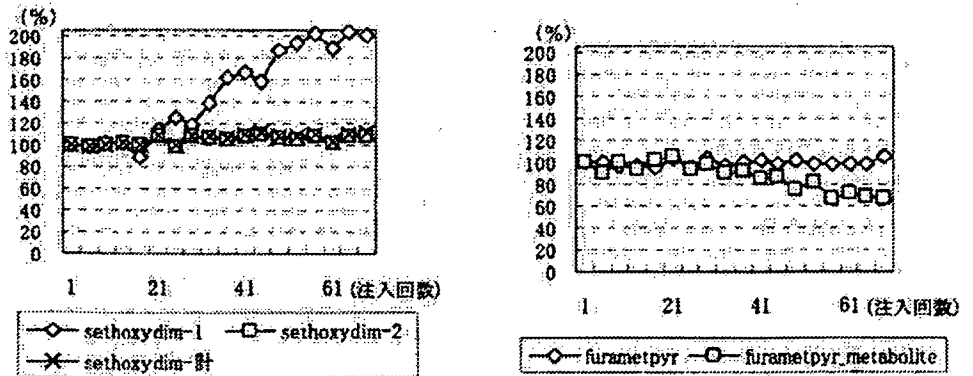


図3 連続分析時のピーク強度の変化

「化学物質モデルにおける多成分迅速一斉検査の精度管理等の検討」  
——LC/MS/MSによる農薬一斉分析の精度管理について——

伊藤光男、上田泰人、小島信彰、田中敏嗣、飯島義雄、伊藤正寛\* (神戸市環境保健研究所)  
大藤升美、山田豊、塩崎秀彰、井端泰彦 (京都府保健環境研究所)、北川陽子、高取聡、住本建夫、田中  
之雄、織田肇 (大阪府立公衆衛生研究所)、伊吹幸代\*、宇野正清、素輪善典、今井俊介\* (奈良県保健環  
境研究センター)、佐想善勇、谷口秀子、南隆之 (姫路市環境衛生研究所)、宇治田正則\*、吉増幸誠\*、  
中北照男\* (和歌山市衛生研究所) (\*:平成18年度所属)

【目的】

健康危機管理の対象となる化学物質は極めて多様であり、しかも技術の進歩と共に変化するため、これだけ対策をしておけば十分ということではなく、不断に検討を重ね、予期せぬ物質を分析するという危機への対応能力を高めておくことが重要である。

この目的のために、平成18年度は6機関が参加し、中～高極性化学物質のモデルとして加熱により分解し易い34農薬を用い、LC/MS/MSによる精度管理を行った。あわせて、分析法を新たに開発するという共同の作業を通して、いつでも地研間の情報の交換ができるという協力関係と、参加機関の連携強化を図った。

【参加機関】

参加した機関は、神戸市環境保健研究所、京都府保健環境研究所、大阪府立公衆衛生研究所、奈良県保健環境研究センター、姫路市環境衛生研究所、和歌山市衛生研究所の6地方衛生研究所である。

【方法】

ほうれんそう、りんご、オレンジ、トマト、にんじん、米の6作物に0.1ppmの混合標準農薬を添加し、無添加作物の分析を並行して行うことにより回収率を求めた。1作物の分析には3機関が参加した。

標準農薬はLC/MS用混合標準液(PL2005 LC/MS Mix ③ 10ppm、林純薬製)を用い、使用時にメタノールで適宜希釈した。

測定機器として、アプライト・ハイシステムズ社製API-3000、API-3200 Q Trap、API-4000 Q Trapを用いた。分析方法は、厚生労働省の通知(平成17年11月29日)による「LC/MSによる農薬等の一斉試験法I(農産物)」によったが、測定方法が開発されていない17農薬については、参加機関の協力により新たに開発した。

【結果】

34農薬のうち24農薬は(表-1)、平均回収率の中央値が70%~120%の範囲であり、作物ごとに求めたHorRat値(AOAC International 18th, W. Horwitz, ed., 2005, Appendix D)が2以下で測定値が安定し

ていることから、LC/MSによる農薬等の一斉試験法Iによる分析が適していることが明らかとなった。

表-2に示す1農薬は、平均回収率の中央値が65.5%であり、HorRat値が1.3であるので、標準添加法等を用いなければ、一斉試験法Iが適用できないと思われる。

表-3に示す9農薬は、中性条件で水層から有機溶媒層に農薬を転溶する工程をもつ一斉試験法Iでは分析できないと考えられる。

表-4に検討した全ての農薬について、作物ごとの平均回収率、室間再現性(RSDR)、HorRat値、測定限界、本研究班の判定結果を示す。また参考として厚生労働省の検討結果が示されている農薬についてはそれを示した。本研究班の判定は、表-1, 2, 3に示すとおりHorRat値を加味して判定した。

表-1

平均回収率70~120%、且つHorRat値≤2.0の農薬
アセチアリド、イワロン、イザリル、イタクロブリン、イベンコザゾール、イベンコザゾール脱ベンゾル体、クロノアズロン、ジクロン、ジフルベンズロン、スピリシD、チアベンタゾール、テルベンズロン、バミチオン、ピラジリネート、フルジタム、フルフェクスロン、ベンシクロン、ベンゾピシクロン、メタベンチアズロン、メフェロン、イベンイト、ダイロン、トリクラゾール、フェンテザミド

表-2

平均回収率50~70%、且つHorRat値≤2.0の農薬
セキジム

表-3

平均回収率50%以下、又はHorRat値>2.0の農薬
1-ナフタリン酢酸、アセピル、アセピルヒドメキチン、エキキチン、チアベンタゾール代謝産物、トリブロンメチル、ピメロジン、プロバコルブ、タミトス

新たに検討した17農薬のうちアセチアリド、イワロン、イベンコザゾール、イベンコザゾール脱ベンゾル体、バミチオン、フルジタム、トリクラゾール、フェンテザミドの8農薬は、平均回収率の中央値が80%~110%であり、HorRat値が1.5以下であることから、LC/MSによる一斉試験法Iによる分析が適していると考えられる。



## A-20

### 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(第2報)

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

アジレント・テクノロジー(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いる。演者らは第90回・91回本会において, Scan法でのGC/MS分析解析支援ソフト「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)の有用性及び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。

また, 演者らは第92回本会において, 本法を用いた生姜等7野菜における190農薬(205成分)の添加回収試験を行い, 「GC/MSによる農薬等の一斉試験法(農産物)」及びマトリックス標準液による定量の有用性, 生姜におけるマトリックス影響について報告した。

今回は平成18年10月3日付け厚生労働省通知により「GC/MSによる農薬等の一斉試験法(農産物)」で分析が可能とされている240農薬(259成分)及びGCで分析が可能と考えられる90農薬(98成分)の合計330農薬(357成分)について, 果実7種における添加回収試験を行い, 有益な情報を得たので報告する。

#### 【方法】

①対象農薬: 330農薬(357成分)

②試料調製: アボガド, いちご, おうとう, バナナ, ぶどう, メロン, レモンの7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  
(SIM/Scan同時取り込み)

カラム: HP-5MS, 0.25mm x 30m, 0.25 $\mu$ m

カラム温度: 70 $^{\circ}$ C(2分)-25 $^{\circ}$ C/分-150 $^{\circ}$ C(0分)

-3 $^{\circ}$ C/分-200 $^{\circ}$ C(0分)-8 $^{\circ}$ C/分

-280 $^{\circ}$ C(10分)-20 $^{\circ}$ C/分-300 $^{\circ}$ C(20分)

④定量: ScanモードではTDB補正法, SIMモードでは標準溶液を用いた定量を行った。マトリックス標準液を用いた定量も併せて行った。

#### 【結果及び考察】

バナナにおいて, 標準溶液を用いた定量では平均回収率(n=3)が70~120%の範囲に入ったのは, GC/MS一斉分析が可能とされる259成分中251成分, GCで分析が可能とされる98成分中75成分であった。アボガド及びレモンは他の農産物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。

## 食品中の残留農薬分析における GC/MS/MS の活用

大阪府立公衆衛生研究所

○起橋雅浩、高取聡、北川陽子、田中之雄

### 【目的】

現在では、食品中の残留農薬分析では測定項目数の拡大需要が多いため、多成分一斉分析は不可欠となっている。最近、GC/MS/MS の高い感度と選択性を活用した多成分一斉分析が注目されている。我々はこの GC/MS/MS を用いて、270 農薬を一度の測定で分析する条件を確立し、さらにこの分析法を実試料に適用し、従来の GC/MS や GC/FPD との比較を行ったので報告する。

### 【方法】

装置：タンデム型質量分析計

Waters Micromass Quattro micro GC

インターフェイス :250°C、イオン源 :250°C

イオン化法 :EI、コリジョンガス :アルゴン

ガスクロマトグラフ：

Agilent Technologies 6890N

カラム :J&W DB-5ms 30m × 0.25mm, 0.25µm、

キャリアガス圧力 :120kPa(He)

注入口 :250°C 注入方法 :Splitless 注入量 :1µL

測定条件：各農薬の質量スペクトルを測定し、測定に適した2つのMRMイオンを選択した。各MRMイオンは0.01秒間ずつ測定し、モニターイオンの切替時間も0.01秒間とした。10農薬程度で1測定グループを形成し、各グループは測定対象農薬の保持時間に最適化させて開始時間と終了時間を設定した。各グループの測定期間は隣接するグループと一部重なり、重なった時間帯では、両方のグループの農薬を同時に測定するため、データ取得間隔が大きくなった。

添加回収試験：試料 10g に対しアセトニトリル 20mL を加えてホモジナイズし、硫酸マグネシウム 4g と塩化ナトリウム 1g を加えて振盪後遠心分離した。抽出液は GCB/PSA で精製し、1g/mL に定容した。

流通品モニタリング：試料 50g に対しアセトニトリル 100mL を加えてホモジナイズし、遠心分離後塩化ナトリウムを加えて振盪し、得られた抽出液を GCB で精製し 1g/mL に定容した。

### 【結果】

同時に 10～40 項目のMRMイオンを測定し、合計 270 農薬を測定する方法で、バナナ、ニンジン、グレープフルーツの3品種を用いて、0.02µg/g、0.1µg/g の2点の濃度で添加回収試験を行った。合計 6 試験を行ったうち、260 農薬は 4 試験以上で 70-120% の範囲内の回収率と 20% 以下の標準偏差が得られた。一部の感度の悪いものを除き、ほとんどの農薬で 0.01µg/g の測定が可能であり、検出限界は 0.5～5ng/g 程度であった。

市場流通品のモニタリング結果では、173 品目中 111 品目からのべ 217 農薬が検出された。このうち 70 品目の 105 農薬は 0.01ppm 以上であり、残りの 112 農薬は 0.01ppm 未満であった。検出された農薬のうち、120 農薬を GC/MS や GC/FPD で測定を行ったが、低濃度であった 65 農薬は、感度の不足のため確認できなかった。その他の 55 農薬については他の検出器で測定ができ、GC/MS/MS の測定値との近似性が高かった。以上のことより、GC/MS/MS は残留農薬分析に適していると考えられた。

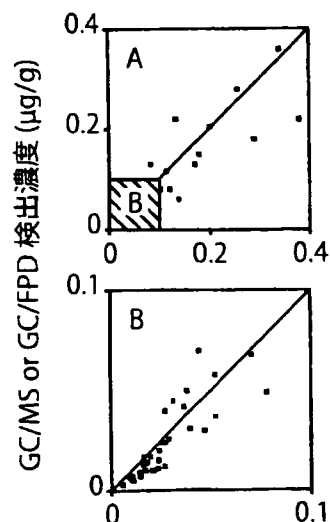


図1. 検出器間の測定値相関

## 多成分分析法による畜水産食品中の農薬残留実態調査

- NCI モード GC/MS および GC- $\mu$ ECD による分析 -

愛知県衛生研究所 ○上野英二、栞島由佳、大島晴美、大野 勉

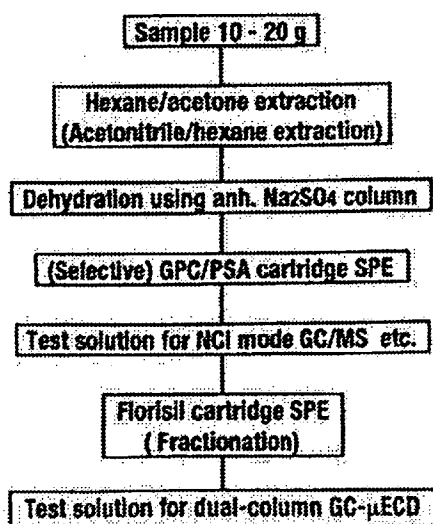
【目的】畜水産食品中の残留農薬については、理論最大一日摂取量 (TMDI) 方式では一日摂取許容量 (ADI) を超過するものも少なくなく、その残留実態の把握が急務となっている。演者らは、平成 4 年度から厚生省の全国調査などに協力してきているが、これまで牛肉、豚肉および牛乳中の $\gamma$ -HCH 始め 45 農薬成分について調査したのみであり、実態の概要を把握できるには至っていないと考えられる。そこで、より広範の残留実態を明らかにするために、選択的で高感度な NCI モード GC/MS および GC- $\mu$ ECD を主に用いた効率的で定量性に優れた多成分分析法を検討し、本調査に応用したので報告する。

【方法】調査期間：平成 18 年 9 月～平成 19 年 8 月、調査試料：牛肉、豚肉、鶏肉、鶏卵、牛乳、魚介類など 120 検体、調査農薬：293 成分 (NCI モード GC/MS 97 成分)、試験溶液の調製：自動式 GPC/SPE ジーエルサイエンス G-Prep GPC8100 を用い<sup>1)</sup>、Scheme 1 に準じて調製した。測定には NCI-SIM/Scan モード GC/MS 島津 QP2010 w/ ms NoVent-J、カラム Stx-CLPesticides2 w/ 5m Guard (0.25mm i.d.

$\times$ 30m)、試薬ガス メタン、注入口温度 250°C、インターフェース温度 300°C、イオン源温度 200°C、カラム温度 80°C(1min)-20°C/min-180°C-4°C/min-300°C(7min)、注入量 2 $\mu$ L、デュアルカラム GC- $\mu$ ECD Agilent6890 ①Stx-CLPesticides (0.25mm i.d. $\times$ 30m) ② Stx-CLPesticides2 (0.25mm i.d. $\times$ 30m)、注入口温度 250°C、検出器温度 300°C、カラム温度：80°C(1min)-20°C/min-180°C-4°C/min-280°C (12min)、注入量 2 $\mu$ L、ESI-MRM モード LC/MS/MS Applied Biosystems API4000 などを用いた。

【結果と考察】46 検体から 41 種/延べ 143 成分が検出された。検出頻度の高い成分は *p,p'*-DDE 始め DDT 類 (32 検体、1-44 ppb) で、カジキなどの大型魚や内湾産のボラ、コノシロから比較的高濃度に検出された。次いで、エンドスルファンスルファート (9 検体、Tr-4 ppb)、 $\gamma$ -HCH 始め HCH 類 (9 検体、1-3 ppb)、イソプロチオラン (5 検体、Tr-7 ppb) の順であった。また、シジミから水稲や柑橘類などに適用のある 24 種成分 (Tr-8 ppb) が検出された。検出された成分のうち、36 種/延べ 133 成分 (全体の 94%) は残留性の高い塩素などのハロゲン原子を含むものや、同様に電子親和性を有するカルボニル基やニトロ基を有するものであり、これらを選択的に検出可能な NCI モード GC/MS の有用性が示唆された。しかし、NCI モード GC/MS は、検量線の直線範囲が 2 オーダー程度と狭く、マトリックス効果によるピーク強度の上昇なども認められ、定量性の点ではやや問題があると考えられた。検出頻度などにより対象成分を選抜した上で、選択性の点では劣るが、抽出・精製法を選べば高感度で定量性に優れた GC- $\mu$ ECD を併用することによって、効果的で信頼性の高い残留実態調査が可能になると考えられた。

【文献】1) E. Ueno et al., J. AOAC Int. 89, 1641-1649 (2006).



Scheme 1 Sample preparation method



## 愛知県における野菜・果実中の農薬残留 (2001-2005年度)に関する検討

愛知県衛生研究所

○椛島由佳、上野英二、大島晴美、大野 勉

### 【目的】

2006年5月に施行されたポジティブリスト制度により、分析対象農薬は大幅に増大している。この新たな制度に対応して効果的な監視・検査業務を行うには、農薬の使用状況や食品中残留実態を把握した的確な対象農薬の選択が必要になる。今回、2001~2005年度の農薬残留モニタリングデータのうち、食品の種類が多く、多種類の農薬が検出されやすい野菜・果実を対象として、統計学的手法により、ポジティブリスト制度に対応した効率かつ効果的な検査を行うための高頻度検出農薬を抽出した。また食品から農薬が検出される割合の年次推移についても検討したので併せて報告する。

### 【方法】

1. 試料 2001~2005年度に愛知県内で市販されていた野菜・果実、国産品 601 検体、輸入品 222 検体の計 823 検体を対象とした。
2. 対象農薬 GCで分析可能な農薬 222 種類
3. GC装置
  - 1) GC/MS: HP社製 5972MSD カラム Restek社製 Rtx-5SILMS w/Integra Guard (0.25mm i. d. ×30m, 0.25μm)
  - 2) GC-ECD: 島津製 GC-17A デュアルカラム
    - ①Restek社製 Stx-CLPesticides(0.32mm i. d. ×30m, 0.5μm)
    - ②Restek社製 Stx-CLPesticides2(0.32mm i. d. ×30m, 0.25μm)
  - 3) GC-FPD/NPD: HP社製 5890 II デュアルカラム
    - ①Restek社製 Rtx-OPPesticides(0.32mm i. d. ×30m, 0.5μm)
    - ②Restek社製 Rtx-OPPesticides2(0.32mm i. d. ×30m, 0.32μm)

4. 分析方法 細切試料 50g について、アセトニトリル抽出、塩析による水層分離、酢酸エチル再溶解/脱水操作を行った後、自動式 GPC/グラファイトカーボン SPE、次いでシリカゲル/PSA ミニカラム SPE にて精製し、GC/MS および GC-FPD/NPD 用試験溶液とした。さらに、この溶液をフロリジルミニカラム SPE にて精製/2 画分としたものを GC-ECD 用試験溶液とした(試料濃度いずれも 5g/mL)。検出限界値は 0.001ppm とした。統計解析は SPSS for Windows ver. 11.5 を用い、高頻度検出農薬の抽出は度数分布表から求めた。また、食品から農薬が検出される割合の年次推移について、 $\chi^2$  検定、傾向性検定を行った。

### 【結果及び考察】

#### 1. 高頻度検出農薬の抽出

野菜・果実 823 検体について調査した結果、604 検体 (73.4%) から延べ 1833 農薬が検出された。検出頻度は高いものから順に、クロロフェナビル、イプロジオン、クロルピリホス、シベルメトリン、プロシミドンと続き、計 105 種類の農薬が検出された。このうち 61 種類で総検出農薬数の 95% を占めており、高頻度検出農薬の種類はかなり限られていた。

#### 2. 農薬が検出される割合の年次推移

農薬が検出される割合と年度間の関連について、国産品と輸入品別に調査した結果、国産品から農薬が検出される割合は年度間で有意に異なり ( $p < 0.001$ )、2001~2005 年度にかけて緩やかに減少する傾向が認められた ( $p < 0.001$ )。輸入品については、関連が認められなかった。

## LC/MSによる化学物質分析法の基礎的研究(33)

○花田喜文、梶原葉子、一田亜希子(北九州市環科研)、飛石和大、塚谷裕子(福岡県保環研)、佐々木和明、鎌田憲光(岩手県保環研)、吉澤正、清水明(千葉県環研)、長谷川敦子(神奈川県環科セ)、中澤剛、茨木剛、田辺顕子(新潟県保環研)、鈴木茂(中部大学)、中根知康(愛知県環調セ)、渡辺正敏、長谷川瞳(名古屋市環科研)、上堀美知子、今村清(大阪府環農総研)、古武家善成、吉田光方子(兵庫県健環研セ)、高良浩司(和歌山県環衛研セ)、森脇洋(信州大学)、八木正博、長谷川明彦(神戸市環保研)、浦山豊弘、吉岡敏行、剣持堅志(岡山県保環セ)、大野ちづ子(徳島県保環セ)、嘉村久美子、古谷典子(山口県保環セ)、

【はじめに】GC/MSでは測定困難な環境中化学物質について、LC/MSの適用可能性を検討した。本報は、環境省委託化学物質分析法開発調査における検討で得られた主な知見について取りまとめたものである。

【実験】水質試料中のi)チウラム、ii)m-アミノフェノール、iii)ヘキサコナゾールについてLC/MSによる分析法を検討した。

【結果と考察】チウラム(北九州市環科研)：農薬のチウラム(殺菌剤、年間使用量:395t、環境基準値:6 $\mu$ g/L)について高感度分析法を検討した。分析は、水試料1Lにサロゲートとしてチウラム-d<sub>12</sub>を添加し、昭和電工製Autoprep PS@Liq HQを用いて固相抽出した後、0.2mLまで濃縮後LC/MSで分析する方法を用いた。シングル型-質量分析計では、水質試料中の夾雑物による妨害を受け分析困難であったが、タンデム型-質量分析計を用いることにより、図i-1に示すように妨害ピークのない良好なクロマトグラムを得ることができた。また、精製水に0.010 $\mu$ g/Lとなるようにチウラムを添加した後、本分析法を用いて繰返し測定を行った。繰返し測定の平均値及び標準偏差は、各々0.0106 $\mu$ g/L(n=5)及び0.00571 $\mu$ g/L(相対標準偏差:5.4%)と良好な結果を示した。標準偏差から求めた分析法検出限界(MDL)は、0.0024 $\mu$ g/Lに達し、従来のHPLC-UV法の0.6 $\mu$ g/Lに比べ200倍以上高感度化することができた。LC/MSによるチウラムのピーク検出は、シングル型LC/MSでは、5ng/mL(試料換算:0.001 $\mu$ g/L)、タンデム型では図ii-2のように0.05ng/mL(試料換算:0.00001 $\mu$ g/L)までピークを観察することが可能であった。しかしながら、タンデム型の検出濃度レベルでは、検量線の落ち込みがみられ、極低濃度域の定量に課題が示された(図ii-3)。

Fundamental studies on chemical analysis by liquid chromatography/mass spectrometry (33)

Yoshifumi HANADA, Yoko KAJIWARA, Akiko ICHIDA(Kitakyushu City Inst. Env. Sci., 1-2-1 Shin-ike, Tobata, Kitakyushu, 804-0082, TEL: 093-882-0333, Fax: 093-871-2535), Kazuhiro TOBIISHI, Hiroko TSUKATANI (Fukuoka Inst. Health Env. Sci.), Kazuaki SASAKI, Norimitsu KAMADA (Res. Inst. Env. Sci. Pub. Health Iwate Pref.), Tadashi YOSHIZAWA, Akira SHIMIZU (Chiba Pref. Env. Res. Center), Atsuko HASEGAWA (Kanagawa Env. Res. Center), Tsuyoshi NAKAZAWA, Tsuyoshi IBARAKI, Akiko TANABE (Niigata Pref. Inst. Pub. Health Env. Sci.), Shigeru SUZUKI (Chubu Univ.), Tomoyasu NAKANE(Aichi Env. Res. Center), Masatoshi WATANABE, Hitomi HASEGAWA (Nagoya City Env. Sci. Res. Inst.), Michiko UEBORI, Kiyoshi IMAMURA (Res. Inst. Env. Agri. Fish., Osaka Pref. Gov.), Yoshinari KOBUKE, Mihoko YOSHIDA (Hyogo Pref. Inst. Pub. Health Env. Sci.), Koji TAKARA (Wakayama Pref. Center Env. Pub. Health), Hiroshi MORIWAKI (Shinshu Univ.), Masahiro YAGI, Akihiko HASEGAWA (Kobe Inst. Health), Toyohiro URAYAMA, Toshiyuki YOSHIOKA, Katashi KENMOTSU (Okayama Pref. Inst. Env. Sci. Pub. Health), Chizuko OHNO (Tokushima Pref. Inst. Pub. Health Env. Sci.), Kumiko KAMURA, Noriko FURUYA (Yamaguchi Pref. Res. Inst. Pub. Health)

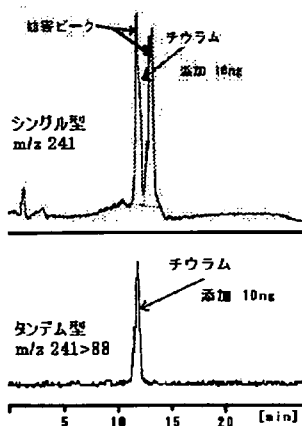


図 i-1 タンデム型の効果

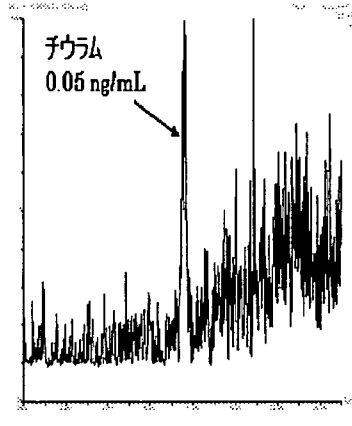


図 i-2 チウラム検出可能濃度

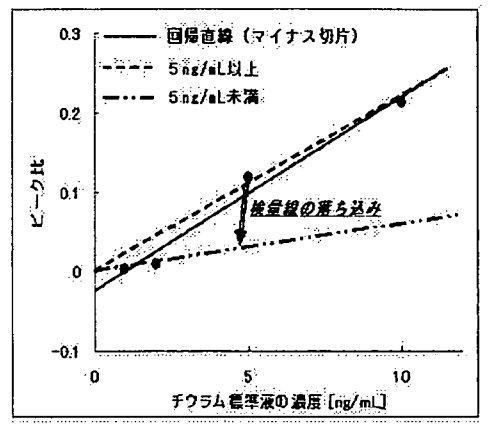


図 i-3 検量線の落ち込み

**m-アミノフェノール (福岡県保健研)：** 染料や医薬品中間体として使用される *m*-アミノフェノールの分析法を検討した。水質試料 100 mL を Waters 製 Oasis HLB Plus に通水した後、被検成分をメタノールで溶出し、シングル型 LC/MS で分析した。LC/MS によるアミノフェノール類の SIM クロマトグラムを図 ii-1 に示す。本分析法を用いることにより、存在するアミノフェノールの異性体 3 種を全て分離することが可能であった。また、MDL は  $0.007 \mu\text{g/L}$  であり、実試料 (海水) からの回収率及び相対標準偏差は 73% 及び 4.5% であった。さらに、環境試料中に存在する夾雑物の影響を低減するため、①固相吸着前に Sep-Pak tC18 カートリッジで試料水を洗浄、②吸着後のカートリッジを 2% メタノール溶液で洗浄、の 2 つのクリーンアップ法について検討した。その結果、どちらの方法も 80% 以上の回収率を示し、夾雑物の多い環境試料についても適用可能であることが示された。

**ヘキサコナゾール (福岡県保健研)：** 農薬のヘキサコナゾール (年間出荷量：約 3.4 t) の分析法を検討した。シングル型質量分析では、クロマトグラムのバックグラウンドが高いため、タンデム型質量分析計を使用した。タンデム型質量分析計による低濃度のクロマトグラムを図 iii-1 に示す。分析法は、水質試料 200 mL を Waters 製 Sep-Pak Plus tC18 に通水した後、被検成分をメタノールで溶出し、タンデム型 LC/MS で分析する方法を選択した。ただし、LC/MS 測定用の試料液の溶液組成を LC/MS 移動相に合わせるため、6 mL のメタノールで溶出した後、精製水 2 mL を加え混合したものを試料液とした。本分析法の MDL は、 $0.057 \mu\text{g/L}$  であった。また、海水を用いた添加回収試験では、回収率 90.4%、相対標準偏差 7.3% と良好な結果を示した。

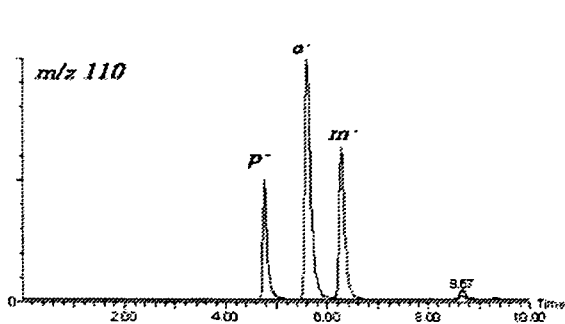


図 ii-1 アミノフェノール異性体の分離

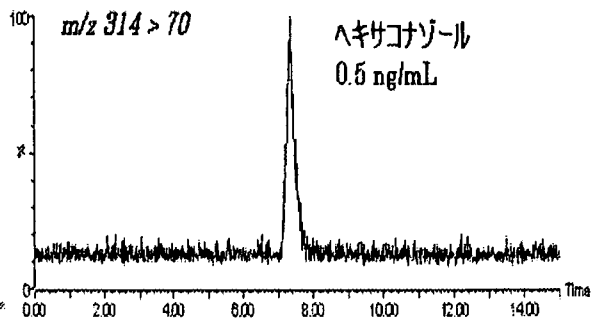


図 iii-1 タンデム型によるヘキサコナゾールの検出濃度

## LC/MS を用いたチウラムの高感度分析法の検討

北九州市環境科学研究所 ○花田 喜文、梶原 葉子、一田 亜希子

LC/MS Study on Sensitive Detection of Tetramethylthiuram Disulfide (Thiuram) in Environmental Water Samples, by Yoshifumi HANADA, Yoko KAJIWARA, Akiko ICHIDA (Kitakyushu Inst. of Env. Sci.)

### 【はじめに】

テトラメチルチウラムジスルフィド(チウラム)は、シマジンやチオベンカルブとともに水質の環境基準項目に指定されている代表的な環境汚染農薬である。そのため、河川や海域などの公共用水域では頻りにモニタリングが行われ、国内での年間測定頻度は、3,563件(2000年)に達している<sup>1)</sup>。

しかしながら、チウラムの環境基準は「人の健康の保護」を目的に設定されているため、基準濃度は $6\mu\text{g/L}$ と比較的高い。しかも、計測にはHPLC-UVが用いられていることから、モニタリングの検出下限値は、 $0.4\cdot 3\mu\text{g/L}$ と、現状ではppb濃度レベルの実態把握しかできず、殆どのモニタリング結果は不検出を羅列するに留まっている。

一方、環境省のリスク評価では、チウラムの生態への予測無影響濃度を $0.003\mu\text{g/L}$ と評価しており、「検出下限値を見直した上で、環境中濃度の測定を優先的に行う必要がある」物質に分類している<sup>2)</sup>。

演者らは、チウラムの環境モニタリングを人の健康保護のみではなく、生態系への影響についても把握できるようにする目的で、液体クロマトグラフィー/質量分析法(LC/MS)を用いたチウラムの高感度分析法について検討した。ここでは、検討を行う中で、低濃度領域で生じるいくつかの問題点に関する知見を得たので報告する。

### 【実験】

**装置:** 分析に使用した液体クロマトグラフ-質量分析計(LC-MS)は、シングル型LC-MSとしてAlliance 2690型HPLC装置付きZMD 4000型質量分析計(Waters)を、タンデム型LC-MSとしてAquity Ultra performance LC型HPLC装置付きQuattro Premier XE型質量分析計(Waters)を用いた。タンデム型によるLC/MS測定条件をTable 1に示す。なお、シングル型による測定は、タンデム型とほぼ同じ測定条件を用いた。

**分析操作:** 水質試料1Lにサロゲートとしてチウラム-d<sub>12</sub>を添加し、1M塩酸でpHを3.5に調整した後、コンディショニング済みの固相カートリッジ Autoprep PS@Liq HQ(昭和電工)に10~20 mL/minの流速で通水した。通水後、カートリッジを精製水5 mLで洗浄し、遠心分離で水分を除去した後、アセトニトリル5 mLで被検成分を溶出した。溶出液を窒素ガスで0.1 mLに濃縮し、ア

セトニトリル-水(1:1)で全量を0.2 mLとした後、LC/MSで分析した。

Table 1 Operating conditions for LC/MS

LC conditions	
Column	Shodex ODP2 HP-2B (50 mm, 2.0 mm)
Mobile phase	A: Acetonitrile B: 0.1% Formic acid 5% A(1min) → (liner gradient, 10min) → 70% A(9min) → (liner gradient, 5min) → 100% A (5min) → (liner gradient, 5 min) → 5% A(10min)
Flow rate	0.2 ml/min
Injection vol.	10 $\mu\text{l}$
MS conditions	
Ionization mode	Positive ion-ESI
Desolvation gas	Nitrogen, 1000 L/h
Desolvation temp.	450 $^{\circ}\text{C}$
Capillary voltage	5.0 kV
Cone voltage	10 V
Collision energy	10 eV
Ion source temp.	120 $^{\circ}\text{C}$
Monitor ion	m/z 241 > 88, 241>120 for thiuram m/z 253 > 94 for surrogate (thiuram-d <sub>12</sub> )

### 【結果及び考察】

**イオン化法の検討:** 10 mg/Lのチウラム標準溶液を質量分析計にシリンジポンプで直接導入し、大気圧化学イオン化法(APCI)及びエレクトロスプレーイオン化法(ESI)を用いて各々正イオン(pos-)及び負イオン(nega-)の被検成分を測定した。その結果、pos-ESIによる測定で、チウラムの擬分子イオン(m/z 241)がベースピークとなったため、測定にはpos-ESIを用いた。

**カラムの検討:** 一般にpos-ESIでの測定は、nega-ESIやnega-APCIでの測定に比べてバックグラウンドが高く、分析に支障を生じるきらいがある。分析カラムからのバックグラウンドの影響を評価するため、市販されている3種類の分析カラムについて、pos-ESIでのm/z 241イオンのバックグラウンドを測定した。その結果、Shodex ODP2 HP-2Bカラムからのバックグラウンドが最も低かったため、測定にはこのカラムを選択した。

**タンデム型 LC-MS の効果：** 精製水にチウラム 10ng

を添加し、所定の分析操作に従ってシングル型及びタンデム型 LC-MS を用いて測定を行った。その結果、シングル型では、水質試料中に存在する妨害物質の影響を受け、分析困難であったが、タンデム型を用いることにより、Fig. 1 に示すような妨害

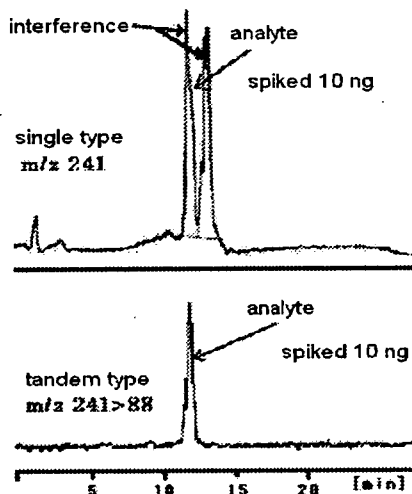


Fig. 1 Effect of tandem-type LC-MS

ピークのない良好なクロマトグラムを得ることができた。そのため、測定にはタンデム型 LC-MS を用いることとした。

**検量線及び低濃度域での感度変動：** LC/MS の測定条件をチウラムに合わせて最適化した。最適化条件を Table 1 に示す。最適化により、0.05  $\mu\text{g/L}$  の極微量濃度域までチウラムをピークとして検出することができた。0.05  $\mu\text{g/L}$  のチウラム標準溶液（試料換算濃度：0.00001  $\mu\text{g/L}$ ）のクロマトグラムを Fig.2 に示す。

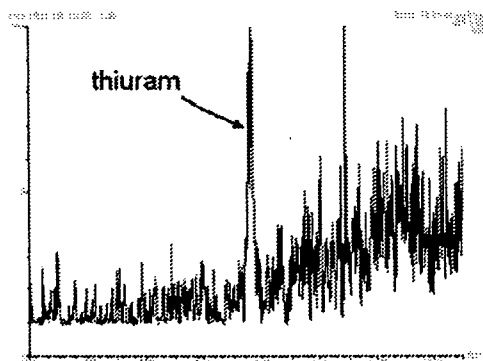


Fig.2 MRM chromatogram of the ultra trace level of thiuram (0.05  $\mu\text{g/L}$ )

しかしながら、この濃度域では、Fig. 3 に示すように感度変動による検量線の落ち込みが確認された。US-EPA は、化学物質分析の理論の中で、検出下限値を推定する方法の一つに検量線の落ち込みなど低濃度域での感度が明瞭に変化する濃度を挙げている<sup>2)</sup>。LC/MS では、装置を最適化することにより、0.05  $\mu\text{g/L}$  までピークを検出できるものの、定量分析法としては、5  $\mu\text{g/L}$ （試料換算濃度：0.001  $\mu\text{g/L}$ ）付近が分析装置の限界と考えられる。なお、5  $\mu\text{g/L}$  の標準溶液の繰返し測定から算出した装置検出限界は、0.5  $\mu\text{g/L}$ （試料換算濃度：0.0001  $\mu\text{g/L}$ ）であった。

**分析法検出下限値：** 精製水に 0.010  $\mu\text{g/L}$  となるようにチウラムを添加した後、本分析法を用いて繰返し測定を行った。繰返し測定の平均値及び標準偏差は、各々 0.0106  $\mu\text{g/L}$  (n=5) 及び 0.00571  $\mu\text{g/L}$ （相対標準偏差：5.4%）と良好な結果を示した。標準偏差から求めた分析法検出下限値は、0.0024  $\mu\text{g/L}$  に達し、従来の HPLC-UV 法の 0.4 - 3  $\mu\text{g/L}$  に比べ 160 - 1200 倍に高感度化することができた。

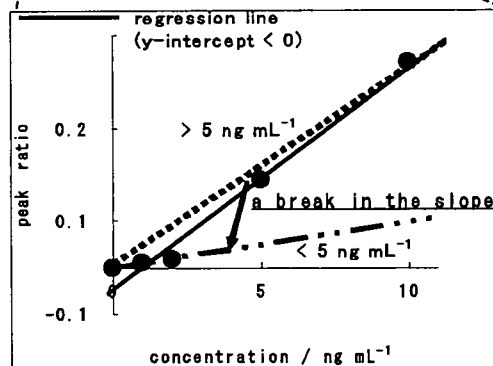
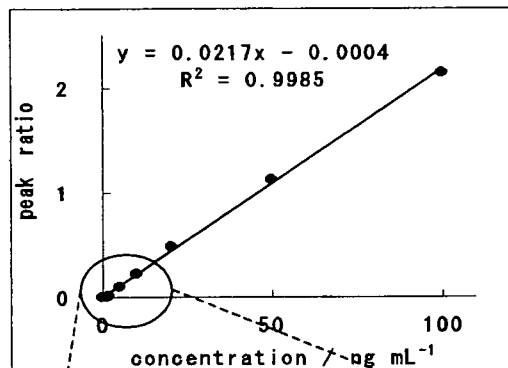


Fig.3 calibration curve and change in sensitivity at low analyte concentration (i.e. a break in the slope)

**【まとめ】**

LC/MS によるチウラムの高感度分析法を検討した結果、従来法に比べ 160-1200 倍高感度化することができた。今後は、河川水など実試料への適用を検討する予定である。

**謝辞** 本研究の一部は、環境省環境安全課からの化学物質環境実態調査委託業務を受けて実施したものである。研究の遂行にあたり、LC/MS 測定に関する有益なご助言を頂いた日本ウォーターズ㈱の米久保淳氏、カラム及び吸着剤の開発にご尽力頂いた昭和電工㈱の篠田昌子女史に深謝いたします。

**引用文献**

- 1) 環境省環境リスク評価室. '化学物質の環境リスク評価', 第 2 巻: [37]チウラム, 2003, pp. 431-436.
- 2) John A. Glaser, et al.: Trace analyses for wastewaters, *Environmental Science & Technology*, 15(12), 1426-1435 (1981)

40 mm 空けて  
下さい。  
事務局で使用い  
たします。

## PCRを応用した分析法 ～PCR分析法の要素と性質～

わたなべたかひろ  
渡邊敬浩 (国立医薬品食品衛生研究所)

E-mail, [tawata@nihs.go.jp](mailto:tawata@nihs.go.jp)

### 【はじめに】

PCRは、生物の生存に不可欠な機構の一つであるゲノミックDNAの複製を人為的に試験管内で再現し、温度制御の工夫を加えることにより反応を連鎖的に繰り返すことで、目的としたDNA配列を100万倍にも増幅する反応である。この反応が技術として確立された当初は、遺伝子の単離や発現量解析等、分子生物学の分野における強力な研究手法として使われるのみであったが、近年、分析化学の分野においても様々な方面への応用が試みられている。PCRは生化学反応を基本的な原理とする技術である。このため、PCRを応用した分析法(PCR法)は、生化学分析法(biochemical methods)として、物理化学の原理に基づく理化学分析法とは区別されることが多い。

そこで、分析の目的にあわせてPCR法を細分した後、特に定量分析を目的とするPCR法(定量PCR法)については、その要素と性質について、遺伝子組換え(GM)農作物を対象とした分析法を例に考察する。また、定量PCR法により得られるデータの解析を目的とし開発したアプリケーション(GiMIet)を用いた解析の実例についても紹介する。

### 【PCR法の細分】

分析の目的によってPCR法は定性法と定量法に大別されるが、いずれの場合においても分析対象物質はDNAである。

#### ・定性法

PCRを応用した定性法は、「DNAの特性を明らかにする」あるいは、「ある特性を持ったDNAの存在を明らかにする」のいずれを目的にするのかによってさらに細分できる。具体的に言えば、遺伝的疾患の診断や親子鑑定、農産物(作物、食肉、魚介)の品種判別等は前者に、遺伝子組換え作物やウイルスの検出は後者にあたるだろう。つまり、前者はDNA配列の同定や同定内容の比較を通じた判定を目的としており、後者は特定のDNA配列を検出することのみを目的としている。いわば化合物の同定と検出の関係に相当する。

#### ・定量法

正確には、「その過程を観測している」ということになるが、直感的には、PCR法によって測定される物質は、増幅された特定のDNA断片と言えるだろう。その方法としては、DNA断片の増幅と蛍光の放出とが対になるようにした上で蛍光強度を測定する方法(リアルタイムPCR; Hybprobe、サイクリングprobe、TaqMan probe等を使用する方法)や、DNA断片の増幅にともなって生じる副産物の濁度を測定する方法(LAMP法)等が挙げられる。しかし、いずれの方法によっても、もともと存在していた特定のDNA配列の量(初期DNA配列)を直接測定することはできない。あくまで、PCRにより増幅されたDNA断片の量を蛍光強度や増幅の副産物の量として測定し、その測定値から初期DNA配列数を推定する。また、初期DNA配列数の推定方法には、プラスミドDNA等を標準物質(標準試料)として使用し作成した検量線に内挿する方法や、標準試料及び分析試料の両方から測定される蛍光強度の増加割合を比較する方法等が用いられる。以後言及する定量法(定量PCR法)は、TaqMan probeを使用するリアルタイムPCRとプラスミドDNAを標準物質と

する検量線とを組み合わせた方法を意味するものとする。

また、実際の分析において、初期DNA配列数を知りたいということは希である。推定された初期DNA配列数からそのDNA配列を有する細胞や種子の量を、必要に応じて換算する。その特殊性については後述する。

【PCR法の要素と性質】

Codex Alimentarius Commission(国際食品規格委員会)は、FAO/WHO合同食品規格計画の下で食品規格、種々のガイドライン等を作成している。当Codexの手続きマニュアルには、Codex分析法の採択要件として1)特異性(specificity)、2)精確性(accuracy)、3)精度(precision; 併行再現性及び室間再現性)、4)検出限界(limit of detection)、5)感度(sensitivity)、6)実行性及び応用性(practicability及びapplicability)が挙げられ、これらについて明らかにすることが求められている。これらのうち、分析対象物質に依らず、全ての分析法に共通する基本的な要件は、特異性、精確性(真度及び精度)及び検出限界であろうと思われる。PCR法については、GM農作物を対象とした分析における一般要求事項がISO24276として規格化されており、この規格においても上記の要件について明らかにすることが求められている。以下、各要件に付随するPCR法の特徴について述べる。

【特異性】

PCR法の特異性は、基本的には、標的としたDNA配列(標的DNA配列)及びその増幅に必要なプライマーと呼ばれるオリゴヌクレオチドの特性によって決定される。プライマーは任意に設計することが可能である。しかし、プライマーと標的DNA配列との間で起こる相補対の形成が厳密に起こらない場合には、目的としたDNA断片が増幅されないあるいは、意図しないDNA断片が増幅されるといった特異性の低下が生じる。相補対の形成には、プライマーの塩基配列及びその影響を受ける会合(アニーリング)温度等が関与しているとされているが、明確な理論的裏づけがないのが現状である。

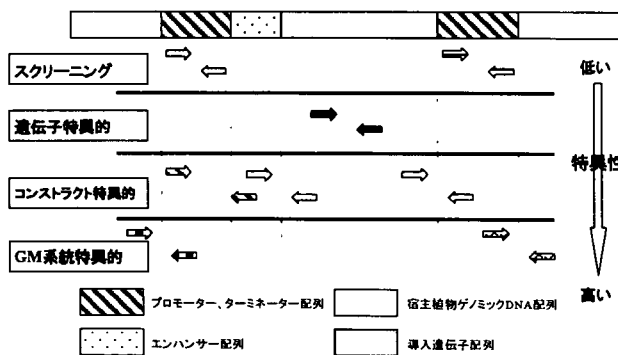


図1.GM農作物分析における特異性(選択性)の区別

また、分析法一般に共通する特異性という概念とは別に、PCR法に特有ともいえる特異性の概念が広まっている。GM農作物を例に挙げれば、同じ遺伝子が導入された複数の系統が存在している。これらに共通の、あるいは特定系統にのみ存在するDNA配列のいずれを標的DNA配列として設定するかによって、複数の系統が同時に、あるいは特定系統のみが分析されるかが変化する(図1)。このような標的DNA配列の特性に基づく分析結果の内容の違いが特異性として認識される場合があるが、これはいわば選択性と呼ぶのが妥当だと思われる。

【検出限界】

PCR法の検出限界は、理論的には標的DNA配列1分子である。現在の技術では、1分子の標的DNA配列を直接検出することは不可能であるが、PCRにより増幅すれば検出することが可能となる。この点において、他の化学物質を分析対象とした理化学分析とは大きく異なる。増幅という過程を共通項とすれば、生菌を培養によって増殖した後に検出する微生物を対象とした分析法

に近い。

また、PCR法の検出限界に関する特殊性は、検出限界濃度付近の試料を分析した場合に明確に観察される。例えば、1分子の標的DNA配列を含む溶液(マスターミックス)を2つに分割した場合、分割された溶液の一方には分子が存在しないことになる。従って、それぞれの溶液をPCR法で分析すると、一方の試験区では検出されるが、当然、もう一方の試験区では検出されないことになる。さらに、数分子の標的DNA配列を含むマスターミックスを複数に分割する場合には、分子が二項分布に従い試験区に分割されると考えられる。実際に上記の内容で試験を行い、各試験区に分割された標的DNA分子の数を測定してみると、まず、測定値の得られる試験区と得られない試験区が観察される(表1)。また、測定値が得られた試験区間でその値の比較を試みても、その差を明らかにすることは難しい(後述するCt値は、PCRの原理的には、標的DNA分子数が2倍の差を持つ場合に、1異なる。しかし、表1に示したCt値の大きさに明確な差は認められない)。これは、数分子の標的DNA分子の差を区別できるほどの精度を分析法が有していないことの表

れであろう。

Contents of LLRice 601 (DNA %)	Laboratory code							
	A				B			
	0	0.001	0.002	0.1	0	0.001	0.002	0.1
	—	—	38.41	33.01	—	38.41	35.93	32.30
	—	42.05	37.67	32.49	—	—	35.70	32.32
	—	36.93	36.78	33.01	—	—	—	32.85
	—	—	—	32.48	—	—	—	32.94
	—	37.32	36.14	32.16	—	—	38.12	32.23
Ct value	—	—	38.23	32.31	—	37.99	38.74	32.16
	41.93	37.07	—	32.00	—	37.13	36.82	32.28
	—	—	37.65	31.75	—	38.27	—	32.27
	—	39.72	36.37	31.86	—	38.41	—	31.99
	—	36.55	—	32.60	—	—	—	31.47

—, no PCR amplification occurred

表1. 検出限界濃度付近の試料を対象とした分析

### 【精確性(真度及び精度)】

#### ・真度

通常の理化学分析の場合、真度とは、分析対象物質の量をどれだけ確からしく定量可能かの程度を表す。例えば、SI単位にトレーサブルな量(濃度・mg/Lといった)として規定された標準物質を分析し、それに付与された値とどの程度一致した測定値が得られるかによって真度を測る。

一方、定量PCR法により得られる測定値は、DNA断片の増幅に伴い測定可能な蛍光強度等であり、さらにその測定値から初期DNA配列数が推定される。ゲノミックDNAの分子量は生物種によって異なり、また高分子物質であるため一意に決定できるものではない。これに対し、個別の定量PCR法で標的とされたDNA配列は低分子であり、その配列情報も明らかにされていることが多いことから、標的DNA配列の分子量を求め標準物質として規定することは可能かもしれない。しかし、いずれにせよ、トレーサブルであると考え得る量はDNA配列の数である。しかし先に言及したとおり、初期DNA配列数を知りたいということは希であり、推定された初期DNA配列数からそのDNA配列を有する細胞や種子の量が、必要に応じて換算される。GM農作物を対象とした分析法では、GM農作物の含有率を非GM農作物に対する、1)DNA配列数の比、2)種子数の比、3)種子粉砕物の重量比、とする考え方が提出されており、各国間における認識が異なっているのが現状である。つまり、測定単位(measurement unit)が規定されていない状態にある。このためと思われるが、ISO24276においても真度に関する規定は設けられておらず、今後、分析化学的な観点からの測定単位の規定と「何をもって真度を測るのか」の定義づけが必要であろう。

#### ・精度

定量PCR法の精度に関しては、分析法に求められる要件としての明確な規定がない。これは、



精度に影響を与える主要因の特定も含めた研究が十分に行われていないためであろうと思われる。そこで、リアルタイムPCRにより得られる一義的な測定量である蛍光データを、より高い自由度をもって解析するためのアプリケーション(GiMlet)を開発した。

まず、定量PCR法により最終的な値が得られるまでの一連の過程について、GM農作物の分析法を一例として説明する。リアルタイムPCRにより蛍光が生じた場合には、Ct値が得られる。リアルタイムPCRにより生じる蛍光には2種類があり、1種は特定のDNA配列の増幅に対応して強度が増加するreporter色素由来の蛍光であり、もう1種は試験区(well)間の位置効果の補正に使用されるreference色素由来の蛍光である。Ct値とは、reporter色素由来の蛍光値をreference色素の蛍光値によって除した値(Rn値)をベースライン補正して得られる値( $\Delta Rn$ 値)の経時的変動を、縦軸を $\Delta Rn$ 値、横軸をPCRのサイクル数として示したamplification plot curve上で、目的の $\Delta Rn$ 値に達したサイクル数(threshold lineとして規定)を意味する。さらに、得られたCt値を標準プラスミドDNAにより作成された検量線に内挿する。標準プラスミドDNAの量はコピー数として規定されているため、試験区から得られたCt値はコピー数に変換される(最終的なGM農作物の含有率は本コピー数に基づく算術によって求められる)。

このように、一義的な測定量が複数の変換を経た後に最終的な値として扱われるような分析法においては、またその変換が機器に付属のソフトウェアによってされる場合には、精度に影響を与える要因の特定が困難であり、また、ソフトウェア上の制限により適切な解析に不都合を生じる場合があることも考えられる。GiMletには、リアルタイムPCRの精度に影響を与える要因の特定とその大きさを評価可能とすることを目的に、1)各wellのPCR効率の算出、2)任意のベースライン補正等の機能を付与した。本アプリケーションを用い、ベースラインの補正方法や、機器精度の評価方法について検討した結果、1)ベースラインの補正方法を検量点の各点に応じ変動させることにより、各well由来の蛍光強度をより正確に補正することが可能であること、2)不良な測定値が得られる機器においては、各wellにおけるPCR効率が均一でないこと等が明らかになった。

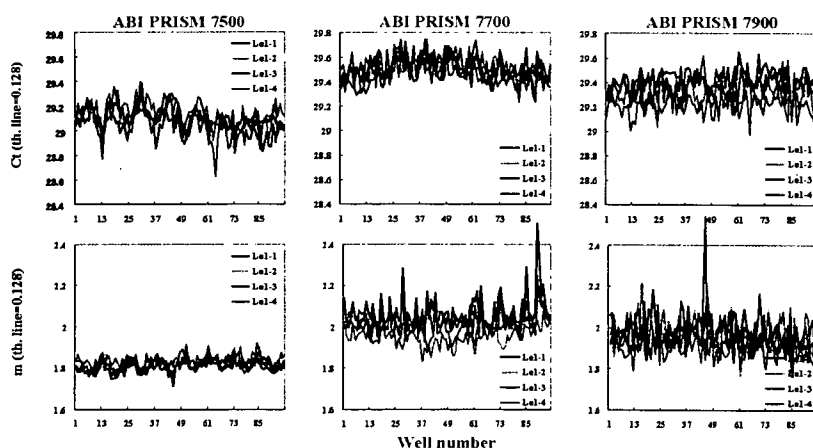


図2. GiMletを用いた解析の一例(リアルタイムPCR機器のwell間精度)

### 【おわりに】

PCR法は歴史の浅い分析法である。しかし、分析法として運用される以上はそれに求められる要件について明らかにし、必要に応じて改善していく努力が必要である。複雑な生体反応の一部として切り取られたとはいえ制限された生化学反応を原理とする以上、理化学分析とは異なる性質が明らかになる一方で、それらとの共通項についても明確な整理の下明らかにされていくべきものと考えられる。

Examination of factors related to the uncertainty of the measurements obtained from real-time PCR using the newly developed software (GiMlet).

Monitoring of the amplification of targeted DNA sequences by PCR is referred to as real-time PCR. In Japan, quantitative methods based on TaqMan chemistry, which is one of the techniques used for the detection of PCR products, has been developed and adopted as the official method to monitor approved GM crops. In this methodology, 5' nuclease oligoprobes are used and the instrument detects the fluorescence derived from the hydrolysis of the probe during specific amplification of the targeted DNA sequences by PCR. Most analysts use the data calculated by the instrument software rather than the fluorescence data. Thus, the extent of data analysis is limited by the software, and inadequacy of calculations may interfere with proper evaluation of the data. To analyze the fluorescence data directly and determine the factors related to uncertainty of the real-time PCR data, we developed a software (GiMlet) and analyzed the data for the quantification of GM crops. GiMlet can analyze the multicomponent data exported by ABI's real-time PCR instruments and calculate the PCR efficiency for each well under variable baseline settings. The results of the analyses with GiMlet revealed that 1) PCR efficiency varied among wells and the degree of variation differed among three types of instruments used; 2) variable baseline correction, in which each calibration point is corrected separately, was more suitable than the conventional baseline correction under a fixed condition; 3) the value of the threshold line was an important factor for minimizing the variance of measurements.

## E01

食肉中ゲンタマイシン測定におけるアフィニティーカラムの有用性の検討

○北村渉<sup>1</sup>、斉藤貢一<sup>1</sup>、椛沢圭介<sup>1</sup>、岡山明子<sup>2</sup>、堀江正一<sup>3</sup>、岩崎雄介<sup>1</sup>、

伊藤里恵<sup>1</sup>、中澤裕之<sup>1</sup>

<sup>1</sup>星葉大、<sup>2</sup>奈良県薬事研究センター、<sup>3</sup>埼玉衛研

【目的】食肉中に残留する薬物の分析においては、効率的に多種多様な夾雑成分を除去できる前処理法が必要とされている。本研究では、高い精製能力を持つアフィニティーカラムを用いた食肉中ゲンタマイシンのクリーンアップ法の構築を行った。

【結果】アフィニティーカラム及び固相抽出カートリッジによるクリーンアップを比較検討したところ、前者において夾雑成分の影響の少ない良好なクロマトグラムが得られた。ゲンタマイシンは3種の混合物 C1、C1a 及び C2 から構成されるが、作製したアフィニティーカラムは、その3成分とも十分な保持が可能であり、その回収率は89.3~96.8%となった。

【考察】アフィニティーカラムは固相抽出カートリッジよりも精製能に優れていることが分かり、選択的な前処理が可能であった。このことより、食肉中に残留するゲンタマイシン分析におけるアフィニティーカラムを用いた前処理法の有用性が示唆された。

## 27PW-pm157

アフィニティークロマトグラフィーを用いた食品中残留抗菌性物質の試料精製

○北村 渉<sup>1</sup>, 齊藤 貢一<sup>1</sup>, 椋沢 圭介<sup>1</sup>, 岡山 明子<sup>2</sup>, 加藤 美穂子<sup>3</sup>, 小平 司<sup>3</sup>,  
堀江 正一<sup>4</sup>, 岩崎 雄介<sup>1</sup>, 伊藤 里恵<sup>1</sup>, 中澤 裕之<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>星薬大, <sup>2</sup>奈良薬事研セ, <sup>3</sup>フロンティア研, <sup>4</sup>埼玉衛研)

【目的】食品中に残留する抗菌性物質の分析を行う際、精製効果の高い試料前処理法が必要となる。そのようなクリーンアップ法には、特定の抗菌剤の精製に有用であるアフィニティークロマトグラフィーを用いた方法がある。この手法の交差反応を活かして、目的成分と構造が類似している化合物もカラムに保持させることが可能である。本研究では、動物用医薬品として使用量の多いエンロフロキサシン及びその極性の高さから分析が困難とされるゲンタマイシンに特異的なアフィニティークラムをそれぞれ作製し、目的成分とその類縁化合物の保持能及び、食肉を試料としてその精製効果を検討した。

【方法】作製したエンロフロキサシンに特異的なアフィニティークラムにはキノロン系抗菌剤を、ゲンタマイシンについてはアミノグリコシド系抗生物質を負荷し、それぞれの保持能を確認した。また、食肉を用いて、アフィニティークラムと固相抽出カートリッジによる精製効果を比較した。抗菌剤測定には、高速液体クロマトグラフィー/蛍光検出法を用い、アミノグリコシド系抗生物質はFMOC試薬で蛍光誘導体化を行った。

【結果および考察】作製したエンロフロキサシンに特異的なアフィニティークラムには、エンロフロキサシン、シプロフロキサシン、ノルフロキサシン及びダノフロキサシンが、ゲンタマイシンの場合では、ゲンタマイシン、シソマイシン及びネチルマイシンが、残留分析に応用可能な保持能を有していた。また、作製したアフィニティークラムは他の固相抽出カートリッジに比べ、精製効果に優れており、アフィニティークラムを用いた目的成分と類縁化合物の同時分析及び試料精製への応用が示唆された。