

図5 RT73 *B. rapa* 検査法の流れ

表2 RT73 *B. rapa* 検査法のプライマー対とプローブ

検出用途	プライマー・プローブ	配列
B. rapa ACCg8 検出用	Brapa-ACCg8F	GGTTATATACGGCTTTGTGGTTGC
	Brapa-ACCg8R	AACATCAGGCTGTCCAAGAAAGAT
	Brapa-ACCg8	VIC-CTATGTCTGAGGAATTATAA-NFQ-MGB
B. napus BnC1 検出用	B. napus BnC1-969F	GAAGCTCTCCTTCGTGGCTAAA
	B. napus BnC1-1043R	TCACGAATTTGAATCTCGATACTCA
	B. napus BnC1-994T	FAM-ACGTGAATCTGATTTTGA-NFQ-MGB
RT73 検出用	RT73 primer 1	CCATATTGACCATCATACTCATTGCT
	RT73 primer 2	GCTTATACGAAGCAAGAAAAGGA
	RT73 probe	FAM-TTCCCGGACATGAAGATCATCCTCCTT-TAMRA
FatA 検出用	FatA primer 1	GGTCTCTCAGCAAGTGGGTGAT
	FatA primer 2	TCGTCCCGAACTTCATCTGTAA
	FatA probe	VIC-ATGAACCAAGACACAAGGCGGCTTCA-TAMRA

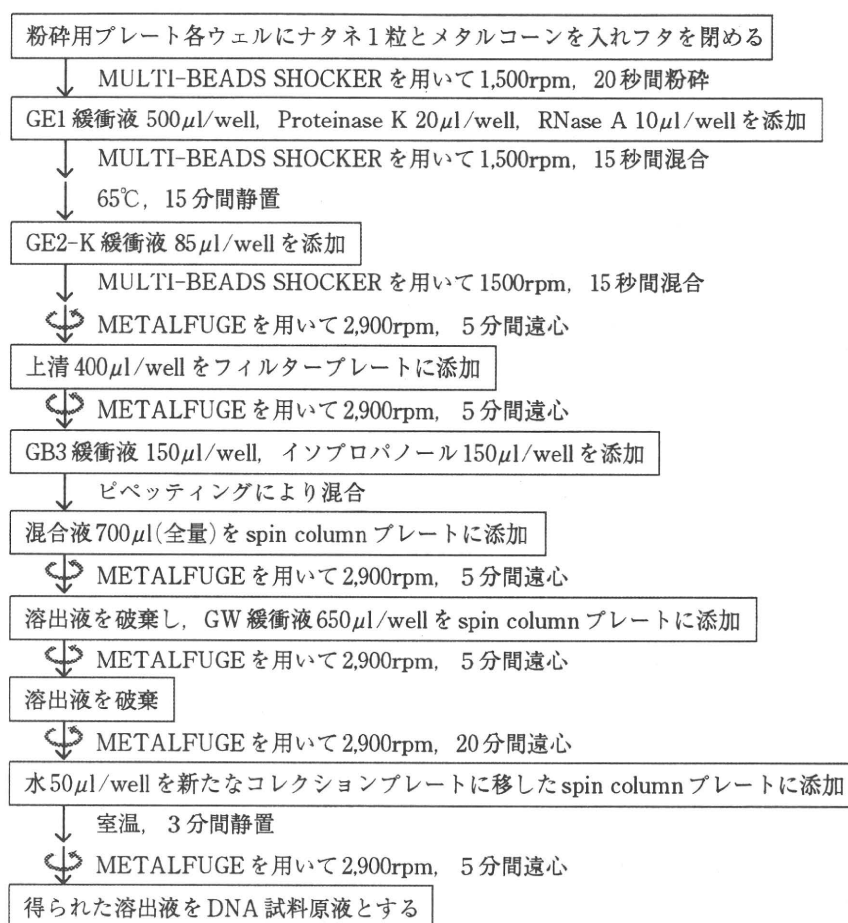


図6 ナタネ1粒DNA抽出法のフローチャート

090914号)で示された。検査法の流れを図5に示す。また検査法に用いるプライマー対とプローブを表2に示す。検体の粉碎試料を用いたスクリーニング検査により、*B. rapa*の混入とRT73が検出された場合、同検体の粒試料から無作為に採取した92粒を用いて粒確認検査を行う。

スクリーニング検査は、粉碎試料を用いて*B. rapa*識別試験とRT73検出試験の2種類の試験を行う。*B. rapa*識別試験のEnd-point解析結果で、DNA試料液のACCg8(VIC)の蛍光強度と*B. napus* Positive ControlのACCg8(VIC)の蛍光強度との比が2.04以上(ABI PRISM™ 7900)、1.40以上(ABI 7500)の場合、*B. rapa*が混入している

と判断する。さらに、RT73検出試験について、RT73検出用プローブ(FAM)を用いた試験で38未満のCt値が得られたウェルが1ウェルでもある場合にRT73陽性と判定する。スクリーニング検査において*B. rapa*の混入とRT73の増幅が確認された場合、同検体の粒試料から無作為に92粒を採取し、各粒ごとにDNA抽出を行い(図6)、各DNA試料原液を対象に、スクリーニング検査と同様の*B. rapa*識別試験とRT73検出試験の2種類の試験を行う。*B. rapa*識別試験のEnd-point解析結果で、DNA試料原液のACCg8(VIC)の蛍光強度と*B. napus* Positive ControlのACCg8(VIC)の蛍光強度との比が2.63以上(ABI PRISM™

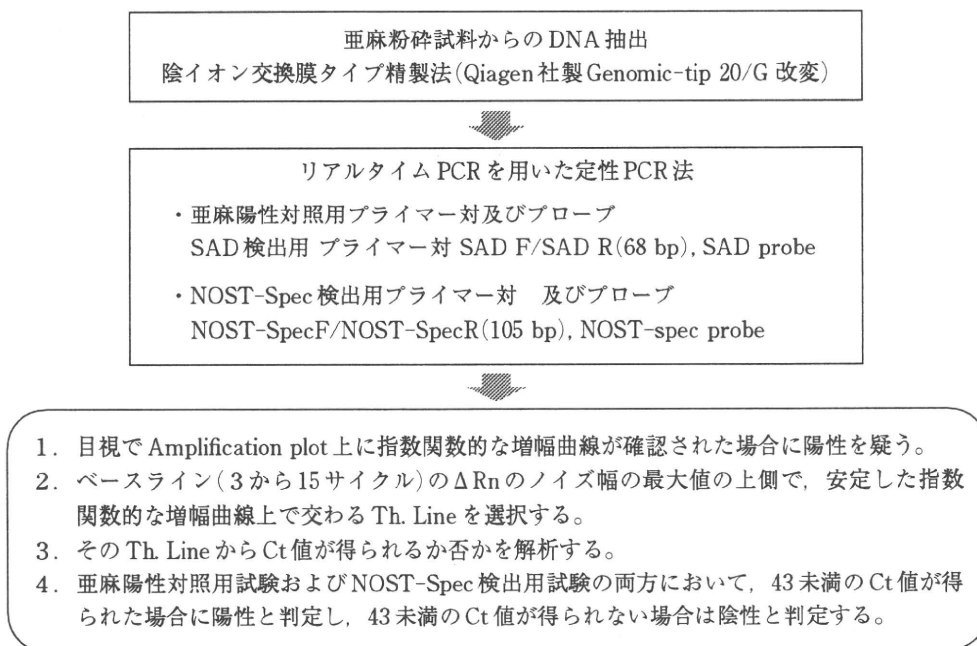


図7 GM亜麻 CDC Triffid(FP967)の検査法の流れ

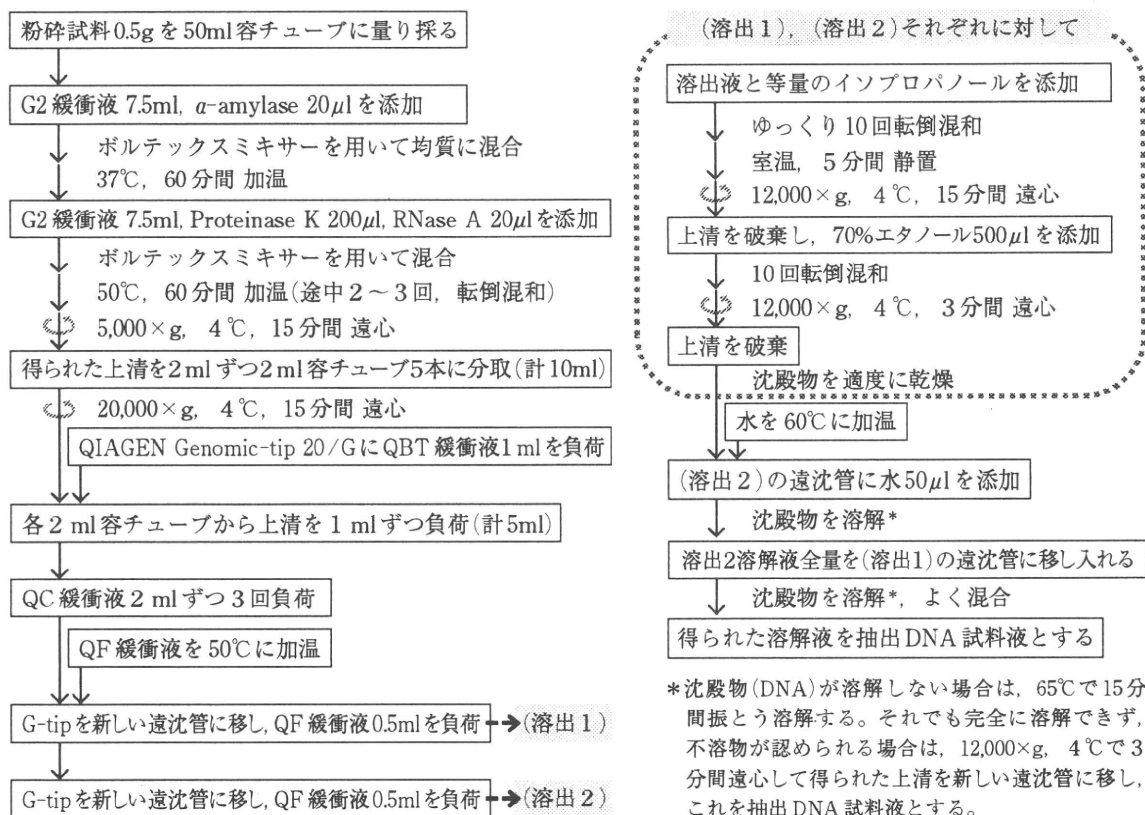


図8 GM亜麻 CDC Triffid(FP967)検査法のDNA抽出操作

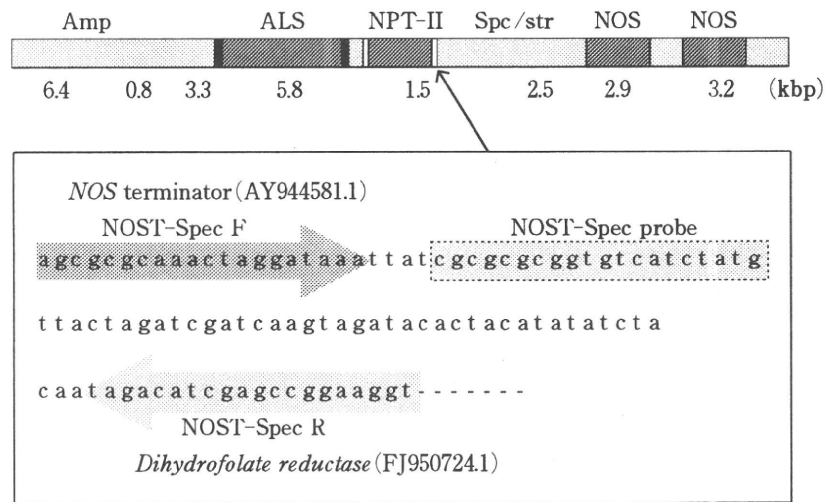


図9 GM亜麻CDC Triffid(FP967)の構造と検出部位

7900), 1.69以上(ABI 7500)で, BnC1(FAM)の蛍光強度と *B. napus* Positive Controlの蛍光強度の比が0.28以下(ABI PRISM™ 7900), 0.35以下(ABI 7500)の場合, そのDNA試料原液は *B. rapa*であると判断し, 同DNA試料原液のRT73の検出を確認する。さらに, RT73検出試験について, RT73検出用プローブ(FAM)を用いた試験で38未満のCt値が得られた場合はRT73陽性と判定する。粒確認試験の *B. rapa* 識別試験において *B. rapa*と判断され, かつRT73検出試験においてRT73陽性と判断されたDNA試料原液が1検体でもある場合は, 同検体はRT73 *B. rapa*陽性と判定する。

4 未承認GM亜麻(カナダ産FP967)

カナダにおいてGM亜麻CDC Triffid(FP967)は, スルフォニルウレア除草剤耐性の目的で開発された。2009年9月8日, EU食品・飼料緊急警告システム(RASFF)は, EU未承認のカナダ産FP967がドイツのシリアルやパンなどの食品に混入していたことを発表した。FP967は, わが国において未審査であるため, 「安全性未審査の遺

伝子組換え亜麻(FP967)の暫定検査法について」(2009年10月27日食安監発1027第2, 3号,)が通知された。検査法の流れを図7に示す。亜麻穀粒からのDNA抽出法にはイオン交換膜タイプ法(Qiagen社製 Genomic-tip 20/G改変)(図8)を用い, リアルタイム定性PCR法により検出する方法である(図9)。

IV 今後の動向と課題

多種多様なGM植物・生物が各国で開発されている現状では, 今後も意図せずに未承認GM植物・生物が食品として国内に流入, 流通するおそれがあることから, 国際的なGM植物・生物の開発情報を収集し, 新たな未承認GM食品を迅速に発見・解析する方法を開発することが望まれる。

また未承認GM食品の流通を可能な限り水際で止めるには, 新しい検知技術を導入し, 簡易, 迅速, 高感度な検査法の確立が急務と考えられる。

謝 辞

なお本研究は, 厚生労働科学研究費補助金によった。

参 考 文 献

- 1) 松岡 猛, 栗原秀夫, 末藤晴子, 三浦裕仁, 日下部裕子, 穂山 裕, 合田幸広, 一色賢司, 豊田正武, 日野明寛: 遺伝子組換えトウモロコシCBH351系統からの組換え遺伝子の検知法, 食衛誌, **42**, 197-201(2001)
- 2) Akiyama H., Sakata K., Spiegelhalter F., Furui S., Nakashima A., Kitta K., Teshima R.: Interlaboratory Validation of an Event-Specific Real Time Polymerase Chain Reaction Detection Method for Genetically Modified DAS59132 Maize, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (J. Food Hyg. Soc. Japan), **51**, 65-70(2010)
- 3) Watanabe T., Tokishita S., Spiegelhalter F., Furui S., Kitta K., Hino A., Matsuda R., Futo S., Akiyama H., Maitani T.: Development and Evaluation of Event-Specific Qualitative PCR Methods for Genetically Modified Bt10 Maize, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 1274-1279(2006)
- 4) 合田幸広, 浅野卓哉, 渋谷雅明, 日野明寛, 豊田正武: 遺伝子組換えパパイヤからの組み換え遺伝子の検知, 食衛誌, **42**, 231-236(2001)
- 5) Yamaguchi A., Shimizu K., Mishima T., Aoki N., Hattori H., Sato H., Ueda N., Watanabe T., Hino A., Akiyama H., Maitani T.: Detection method for genetically modified papaya using duplex PCR (Original). *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **47**, 146-150(2006)
- 6) Wakui, C., Akiyama, H., Watanabe, T., Fitch, M. M., Uchikawa, S., Ki, M., Takahashi, K., Chiba, R., Fujii, A., Hino, A., Maitani, T.: A Histochemical Method Using a Substrate of β -Glucuronidase for Detection of Genetically Modified Papaya, *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **45**, 19-24(2004)
- 7) 渡邊敬浩, 白政優子, 古井 聡, 橘田和美, 峯岸恭孝, 穂山 浩, 米谷民雄: 安全性未審査遺伝子組換えコメ(LL rice)を対象とした検知技術の開発と評価, 食衛誌, **48**, 170-178(2007)
- 8) Akiyama H., Sasaki N., Sakata K., Ohmori K., Toyota A., Kikuchi Y., Watanabe T., Furui S., Kitta K., Maitani T.: Indicated Detection of Two Unapproved Transgenic Rice Lines Contaminating Vermicelli Products, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 5942-5947(2007)
- 9) Nakamura K., Akiyama H., Yamada C., Satoh R., Makiyama D., Sakata K., Kawakami H., Mano J., Kitta K., Teshima R.: Novel Method to Detect a Construct-specific Sequence of the Acetolactate Synthase Gene in Genetically-modified Flax CDC Triffid (FP967), *Biol Pharm Bull.*, **33**, 532-534(2010)
- 10) Akiyama H., Watanabe T., Kikuchi H., Sakata K., Tokishita S., Hayashi Y., Hino A., Teshima R., Sawada J., Maitani T.: A Detection Method of CryIAC Protein for Identifying Genetically Modified Rice Using the Lateral Flow Strip Assay, *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **47**, 111-114(2006)



天地 45 mm

Report

Interlaboratory Validation of an Event-Specific Real Time Polymerase Chain Reaction Detection Method for Genetically Modified DAS59132 Maize

(Received September 16, 2009)

Hiroshi AKIYAMA^{1,*}, Kozue SAKATA¹, Frank SPIEGELHALTER², Satoshi FURUI³,
Akie NAKASHIMA⁴, Kazumi KITTA³ and Reiko TESHIMA¹

¹National Institute of Health Sciences: 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;

²Eurofins GeneScan, Inc.: 2315 N. Causeway Blvd., Metairie, LA 70001, USA;

³National Food Research Institute: 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan;

⁴Hiroshima Prefectural Institute of Public Health and Environment: 1-6-29 Minami-machi, Minami-ku, Hiroshima 734-0007, Japan; * Corresponding author

A real-time polymerase chain reaction (PCR) method specific for genetically modified (GM) maize event DAS59132 (E32) was adapted for qualitative detection of low level presence of E32. The method was validated by a collaborative trial with eight participating Japanese laboratories. Sensitivity was assessed with three different samples of corn flour fortified to 0%, 0.05% and 0.1% (w/w) E32 respectively. In addition, a 0.01% E32 DNA solution was used. The detection limit with DNA solution was estimated to be approximately 0.01%. In conclusion, the results of the study confirmed this real-time PCR method as a reliable tool for qualitative detection of E32 maize.

Key words: genetically modified maize; recombinant DNA; real time PCR; detection method; DAS59132

Introduction

Many types of genetically modified organisms (GMOs) have been introduced over the past decade or so, and the number of commercially available bio-engineered or genetically modified (GM) crops is increasing rapidly¹.

GM crops and their products have been authorized for food and/or feed use by many countries based on their respective criteria for safety assessment. In the European Union for example, the authorization and use of GM food and feed is governed by regulations (EC) No. 1829/2003 and (EC) No. 1830/2003^{2,3}. Japan implemented a mandatory safety assessment of GM foods and processed foods containing GM ingredients. Since April 1, 2001, any GM food that has not been authorized is prohibited from import or sale in Japan. Therefore, Japan requires detection methods for regulated and unauthorized GM crops and products. Previously, we reported the development of qualitative detection methods for GM products unauthorized in Japan, such as certain GM maize lines, GM potatoes (NewLeaf Plus, NewLeaf Y), GM papayas (Line 55-1 or its derivatives) and GM rice lines ('LibertyLink' rice and Chinese Bt rice lines)⁴⁻¹⁷.

In 2008, Dow AgroSciences LLC has voluntarily retrieved from US channels of distribution certain hybrid corn seed potentially containing adventitious, low levels of a regulated biotechnology maize event,

DAS59132, also referred to as event 32 or E32. Dow AgroSciences LLC. advised and cooperated with U.S. regulatory authorities in this matter. The situation creates no human, animal or environmental safety concerns, because the Bt proteins produced in the E32 maize are identical to those found in biotech hybrid maize sold commercially and deemed safe. However, under Japanese, Korean and EU regulations the E32 maize is unauthorized and the potential low level presence of E32 could require monitoring before import.

In the present study, we describe the results of an inter-laboratory study of an event-specific real-time PCR method to identify E32 maize. The experiments were conducted at eight laboratories in Japan.

Materials and Methods

Maize (zea mays) materials

Coarsely milled samples of E32 maize seed and non-GM maize seed were kindly provided by Dow AgroSciences LLC.

Preparation of the test samples

The E32 maize seeds and non-GM maize seeds were ground separately in an Ultra-Centrifugal Mill ZM100 (Retsch GmbH, Haan Germany) using a 0.5 mm sieve ring.

Two portions of the resulting non-GM maize flour sample were fortified with the E32 maize flour at 0.05% (w/w) and 0.1% E32, respectively, and were mixed well.

Since it did not necessarily seem practical to prepare a homogeneous fine flour mixture fortified with 0.01% E32, DNA extracted from the 0.05% E32 sample was diluted 1:5 with DNA extracted from non-GM maize, resulting in a 0.01% E32 DNA solution.

Samples were stored at -20°C until further use.

DNA extraction

Genomic DNAs were extracted from the flour samples using a silica-gel membrane-type kit (DNeasy Plant Mini; QIAGEN, Hilden, Germany) with modifications to the kit manual as described previously^{7), 8), 13)}. The DNA concentration was determined by measuring the UV absorption at 260 nm using an ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Rockland, DE). The purity of the extracted DNA was evaluated based on the ratio of absorbance at 260/280 nm, and the ratio was between 1.7 and 2.0. The extracted DNA was diluted with an appropriate volume of distilled water to a final concentration of 10 ng/mL and stored at -20°C until further use. These DNA samples were used for the subsequent PCR analysis.

Real-time PCR assay procedure

Real-time PCR assay was performed using an ABI PRISM™ 7900 Sequence Detection System instrument (AP7900) (Applied Biosystems), ABI PRISM™ 7500 Sequence Detection System instrument (AP7500) (Applied Biosystems) and ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System instrument (AP7700) (Applied Biosystems). According to the information provided by Agrigenetics, Inc., the 32f/32r primer pair amplifies a DNA sequence across a junction between genomic maize DNA sequence and the recombinant DNA sequences present in E32 maize. For fluorescence real-time PCR, the primer pair is to be used with the FAM dye-labeled E32 probe (Table 1). The reaction volume of 25 μL contained 2.5 μL of sample DNA solution, 12.5 μL of Universal Master Mix® (Applied Biosystems), 0.4 μM of 32f and 32r primers, and 0.2 μM 32 probe. The PCR program was as follows: 2 min at 50°C , and 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 15 sec at 95°C and 1 min 30 sec at 60°C . The primers and probes were synthesized and purified on a reversed-phase column by FASMAC Co., Ltd. (Atsugi,

Japan), diluted with an appropriate volume of distilled water to a final concentration of 60 mmol/L, and then stored at -20°C until further use.

The SSIb-3 system (SSIb 3-5' and SSIb 3-3' with SSIb-Taq) was used for real-time PCR detection of the taxon specific gene encoding the maize starch synthase IIb gene sequence (SSIb) as described previously^{17), 18)}.

Data analysis

Typically, the baseline was set to cycles 3 through 15. The ΔRn threshold for plotting Ct values was set to 0.1–0.5 during exponential amplification.

Reactions with a Ct value of less than 38 and exponential amplification plots were scored positive for E32, since both three ΔRn values of the cycle number (35, 36, 37) before the Ct value and of the cycle number (38, 39, 40) after the Ct value around the detection limit should be required to verify the exponential amplification in a 40 cycle run. If a Ct value could not be obtained, the reaction was scored negative for E32. The reactions with a Ct value of less than 38, but without exponential amplification as judged by visual inspection of the respective ΔRn plots and multi component plots were scored negative.

Homogeneity tests of the test materials

Before dispatch to the laboratories, the homogeneity of the test samples was verified by the National Institute of Health Sciences (NIHS) according to the procedure described in the International Harmonized Protocol for Proficiency Testing of Analytical Laboratories¹⁹⁾, except that the number of test samples was 10. As duplicate reactions for each test sample were tested, twenty reactions in total were analyzed using AP 7500. The obtained Ct values of the real-time PCR analyses were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA).

Inter-laboratory study

The inter-laboratory study, conducted with the participation of eight laboratories, was organized by NIHS. Non-GM maize flour, maize flour fortified with 0.05 and 0.1% (w/w) E32 maize and 0.01% E32 DNA solution were used as the four test samples. Each lab received as

Table 1. Primer and probe sequences of the real-time PCR system used in the present study

Name	Oligonucleotide sequence (5'-3')										
For the event-specific detection of E32 maize											
Primer	32f	CCC	CAA	TGT	GTT	ATT	AAG	TTG	TCT	AAG	
	32r	GGT	GAA	TGT	CGC	CGT	GTG	T			
Probe	32 probe	FAM-CAA	TTT	GTT	TAC	ACC	AGA	GGC	CGA	CAC	G-TAMRA
For the detection of taxon-specific SSIb gene (SSIb) for maize											
Primer	SSIb 3-5'	CCA	ATC	CTT	TGA	CAT	CTG	CTC	C		
	SSIb 3-3'	GAT	CAG	CTT	TGG	GTC	CGG	A			
Probe	SSIb-Taq	FAM-AGC	AAA	AAA	AGA	GCG	CTG	CAA-TAMRA			

blind samples 2 tubes with 2 g of each of the three flour samples and 2 tubes containing 30 μ L of the 0.01% E32 DNA solution. Thus, 64 blind samples in total were distributed and analyzed in the inter-laboratory study. The duplicate reactions for each sample were conducted in a real-time PCR assay. The participating laboratories also received aliquots of the oligonucleotides, other reaction components and the experimental protocol from the NIHS. We referred to the guidelines for collaborative study to determine the general procedure of the inter-laboratory study²⁰.

Table 2. Homogeneity test results of the samples

	Mean Ct	RSD % ^{a)}	n	F-ratio	Fcrit
0.05%	31.5	0.84	10	0.98	3.02
0.1%	33.6	1.11	10	1.38	3.02

Homogeneity test was carried out using AP7500 instruments.

a) RSD%: calculated from Ss (SD of sampling) and Sa (SD of analysis)

b) Fcrit: Critical F value

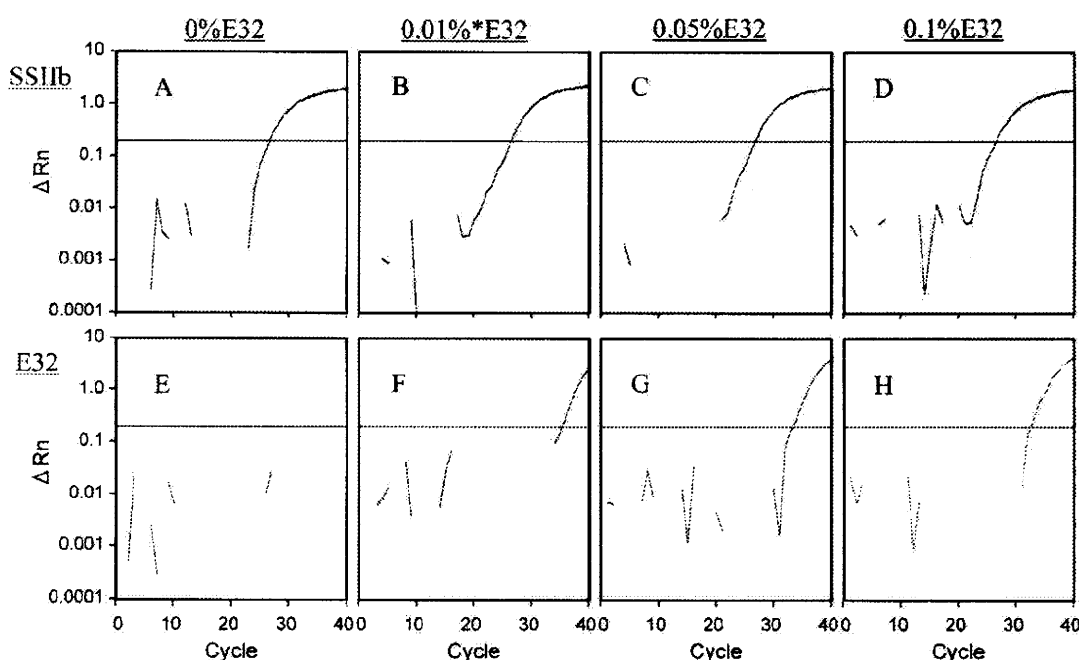


Fig. 1. Representative amplification plot curves of all the samples, obtained on AP7900 instruments

A: SSIIB detection for 0% E32 maize sample (non-GM), B: SSIIB detection for 0.01% E32 DNA solution, C: SSIIB detection for 0.05% E32 maize sample, D: SSIIB detection for 0.1% E32 maize sample. E: event-specific detection for 0% E32 maize sample (non-GM), F: event-specific detection for 0.01% E32 DNA solution, G: event-specific detection for 0.05% E32 maize sample, H: event-specific detection for 0.1% E32 maize sample.

Table 3. Summary of the results of all unknown samples

Real-time PCR instrument	Laboratory	Primer pair and probe	SSIIB 3-5'/SSIIB 3-3'/SSIIB-Taq				32f/32r/32 probe										
			Content %	0%	0.01%*	0.05%	0.10%	0%	0.01%*	0.05%	0.10%						
7900	A		+/+ ^{c)} +/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/- ^{c)} -/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	
	B		+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
	C		+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
7500	D		+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
	E		+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
7700	F		+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
	G		+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
	H		+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+

a) +: positive reaction

b) -: negative reaction

c) +/+, +/- and -/- show the results in duplicate reactions for each sample.

* 0.01% means 0.01% E32 DNA solution.

Results and Discussion

In-house validation and homogeneity of the test materials

We assessed the reliability of this detection method for E32 maize using mixed known samples fortified with E32 and three different types of real-time PCR instruments, AP7900, AP7700 and AP7500.

First, we confirmed that all three different types of real-time PCR instruments used in the study showed the characteristics expected for PCR amplification plots with pure E32 positive control samples (data not shown). Figure 1 shows examples of AP7900 amplification plots of all the samples used in the study. As anticipated, the SSIIB was detected in all samples, while

the E32 target sequence was detected in all samples except the non-GM maize sample. This suggests that the relative limit of detection (LOD) is approximately 0.01% in 20 ng of genomic DNA.

In terms of homogeneity of the fortified samples, Table 2 shows the average Ct value, the relative standard deviation (RSD) calculated from s_s (SD of sampling) and s_a (SD of analysis) as well as the F -ratios. The F -ratios of the homogeneity test at 0.05% and 0.1% were 1.1 and 0.98, respectively. The critical value of F was 3.02. Therefore, we concluded that the homogeneity of both test samples was acceptable for the inter-laboratory evaluation, because both F -ratios were lower than the critical F .

Table 4. Analysis of the results of inter-laboratory study

A	Primer pair and probe	SSIIB 3-5'/SSIIB 3-3'/SSIIB-Taq			
	No. of laboratories	8			
	No. of laboratories that have been evaluated	8			
	No. of samples/laboratory	8			
	No. of total samples	64			
	No. of total reactions	128			
	No. of accepted reactions	128			
	No. of samples containing target detection material	64			
	Target detection material content (w/w) %	0%	0.01%*	0.05%	0.10%
	No. of reactions	32	32	32	32
	No. of positive reactions	32	32	32	32
	No. of negative reactions	0	0	0	0
	Positive reaction ratio, %	100	100	100	100
	False-negative, %	0	0	0	0
B	Primer pair and probe	32f/32r/32 probe			
	No. of laboratories	8			
	No. of laboratories that have been evaluated	8			
	No. of samples/laboratory	8			
	No. of total samples	64			
	No. of total reactions	128			
	No. of accepted reactions	128			
	No. of samples containing target detection material	48			
	Target detection material content (w/w) %	0%	0.01%*	0.05%	0.10%
	No. of reactions	32	32	32	32
	No. of positive reactions	0	31	32	32
	No. of negative reactions	32	1	0	0
	Positive reaction ratio, %	0	96.9	100	100
	False-negative, %	0	3.1	0	0

A: detection of the SSIIB

B: event-specific detection of E32 maize

* 0.01% means 0.01% E32 DNA solution

Inter-laboratory study

Eight laboratories took part in the inter-laboratory study. The laboratories have the three different real-time PCR instruments. Three laboratories have AP7700 instruments, another three laboratories have AP7900 instruments and the other two laboratories used AP7500. Table 3 shows a summary of the results of all unknown samples and Table 4 shows an analysis of the results of the inter-laboratory study. The positive reaction rate and negative reaction rate were calculated from the 32 repetitions for each sample reaction.

For the SSIIb detection, the positive reaction rates of 0.1 (w/w), 0.05 (w/w), 0.01% (DNA solution) and 0% (w/w) samples were 100, 100, 100, and 100%, respectively (Table 4A).

For the event-specific detection of E32 maize, the positive reaction rates of 0.1, 0.05, and 0.01% samples were 100, 100 and 96.9%, respectively (Table 4B). Only laboratory B included a negative reaction in duplicate reactions for one of the two samples of 0.01% E32 DNA solution; although the negative reaction was amplified the Ct value was over 38 (38.54). This result suggests that the LOD of the method appears to be close to 0.01% E32 maize between 0.01% and 0.05%. False positive results for E32 maize were not observed.

Many validation studies have been performed and are still ongoing, based on European Regulation [(EC) NO. 1829/2003]. But almost all studies are only based on genomic DNA as the sample, omitting the DNA extraction step. Therefore, direct comparison of our results with those from the previous studies is not possible. However, for practical reasons, it is very important to know the overall uncertainty of the method. Therefore, inter-laboratory studies including the DNA extraction step are of high relevance.

Conclusions

The results obtained in this study demonstrated that this real-time PCR detection method for E32 maize is suitable for enforcement purposes with respect to its inter-laboratory reproducibility and transferability. The inter-laboratory study including the DNA extraction step was conducted in close adherence to internationally accepted guidelines for collaborative trials. In practical terms, this method could be readily adopted by the various laboratories. This real-time PCR detection method has an LOD of approximately 0.01% E32 maize. It provides a precise and reliable tool for the event-specific detection of E32 maize. This proposed test is able to accurately monitor E32 contamination in maize samples and is therefore an appropriate tool to implement Japanese regulatory requirements concerning unauthorized biotechnology products.

Acknowledgements

We thank the following collaborators for participating in the inter-laboratory study: Mr. H. Asaki, Mr. T. Kusama, Mr. T. Yoshida, Mr. H. Hashimoto (Food and Agricultural Materials Inspection Center, Japan), Mr. T.

Takahashi (Yokohama Plant Protection Station, Japan), Mr. T. Suzuki and Ms. A. Ogawa (Yokohama quarantine station, Japan), Mr. K. Takagi and Mr. T. Yamagishi (Kobe quarantine station, Japan). We would like to thank Dow AgroSciences LLC for providing E32 maize. We also thank Dr. S. Futo and Mr. H. Haraguchi (FASMAC Co., Ltd., Atsugi, Japan) for the useful suggestions. This study was supported by Health and Labour Science Research Grants for Research on Food Safety from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

References

- 1) James, C. ISAAA Briefs 2008, **39** (2008).
- 2) Regulation (EC) No. 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. Off. J. Eur. Commun. L268: 1-23.
- 3) Regulation (EC) No. 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC. Off. J. Eur. Commun. L268: 24-28.
- 4) Matsuoka, T., Kawashima, Y., Akiyama, H., Miura, H., Goda, Y., Sebata, T., Isshiki, K., Toyoda, M., Hino, A. A detection method for recombinant DNA from genetically modified soybeans and processed foods containing them. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **40**, 149-157 (1999).
- 5) Matsuoka, T., Kuribara, H., Suefuji, Y., Miura, H., Akiyama, H., Kusakabe, Y., Goda, Y., Isshiki, K., Toyoda, M., Hino, A. A detection method for recombinant DNA from genetically modified maize CBH351. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **42**, 197-201 (2001).
- 6) Goda, Y., Asano, T., Shibuya, M., Hino, A., Toyoda, M. Detection of recombinant DNA from genetically modified papaya. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **42**, 231-236 (2001).
- 7) Akiyama, H., Sugimoto, K., Matsumoto, M., Isuzugawa, K., Shibuya, M., Goda, Y., Toyoda, M. A detection method for recombinant DNA from genetically modified potato (NewLeaf Pluspotato) in snacks. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **43**, 24-29 (2002).
- 8) Akiyama, H., Watanabe, T., Wakui, C., Chiba, Y., Shibuya, M., Goda, Y., Toyoda, M. A detection method for recombinant DNA from genetically modified potato (NewLeaf Y potato). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **43**, 301-305 (2002).
- 9) Matsuoka, T., Kuribara, H., Takubo, K., Akiyama, H., Miura, H., Goda, Y., Kusakabe, Y., Isshiki, K., Toyoda, M., Hino, A. Detection of recombinant DNA segments introduced to genetically modified maize (*Zea mays*). *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 2100-2109 (2002).
- 10) Wakui, C., Akiyama, H., Watanabe, T., Fitch, M. M., Uchikawa, S., Ki, M., Takahashi, K., Chiba, R., Fujii, A., Hino, A., Maitani, T. A histochemical method using a substrate of beta-glucuronidase for detection of genetically modified papaya. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **45**, 19-24 (2005).
- 11) 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).
- 12) Yamaguchi, A., Shimizu, K., Mishima, T., Aoki, N., Hattori, H., Sato, H., Ueda, N., Watanabe, T., Hino, A., Akiyama, H., Maitani, T. Detection method for genetically modified papaya using duplex PCR. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **47**, 146-150 (2006).
- 13) Akiyama, H., Watanabe, T., Kikuchi, H., Sakata, K., Tokishita, S., Hayashi, Y., Hino, A., Teshima, R., Sawada, J., Maitani, T. A detection method of Cry1Ac protein for identifying genetically modified rice using the lateral flow strip assay. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **47**, 111-114 (2006).
- 14) Watanabe, T., Shiramasa, Y., Furui, S., Kitta, K., Minegishi, Y., Akiyama, H., Maitani, T. Development and evaluation of qualitative detection methods for unapproved genetically modified rice (LLRice) *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **48**, 170-178 (2007).
- 15) Watanabe, T., Tokishita, S., Spiegelhalter, F., Furui, S., Kitta, K., Hino, A., Matsuda, R., Akiyama, H., Maitani, T. Development and evaluation of event-specific qualitative PCR methods for genetically modified Bt10 maize. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 1274-1279 (2007).
- 16) Akiyama, H., Sasaki, N., Sakata, K., Ohmori, K., Toyota, A., Kikuchi, Y., Watanabe, T., Furui, S., Kitta, K., Maitani, T. Indicated detection of two unapproved transgenic rice lines contaminating vermicelli products. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 5942-5947 (2007).
- 17) Akiyama, H., Watanabe, T., Wakabayashi, K., Nakade, S., Yasui, S., Sakata, K., Chiba, R., Spiegelhalter, F., Hino, A., Maitani, T. Quantitative detection system for maize sample containing combined-trait genetically modified maize. *Anal. Chem.*, **77**, 7421-7428 (2005).
- 18) Akiyama, H., Sakata, K., Kondo, K., Tanaka, A., Liu, M. S., Oguchi, T., Furui, S., Kitta, K., Hino, A., Teshima, R. Individual detection of genetically modified maize varieties in non-identity-preserved maize samples. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 1977-1983 (2008).
- 19) Thompson, M., Wood, R. International harmonized protocol for proficiency testing of (chemical) analytical laboratories. *J. AOAC Int.*, **76**, 926-940 (1993).
- 20) Horwitz, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure Appl. Chem.*, **67**, 331-343 (1995).

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

「検査機関の信頼性確保に関する研究」

平成 20 年度～平成 22 年度

研究成果の刊行物・別刷

学会発表

Pesticide Analysis in Processed Foods

Okihashi M., Takatori S, Kitagawa Y, Okamoto Y, Obana H, Taguchi S

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

email okihasi@iph.pref.osaka.jp

In 2008 Feb, it was reported that two varieties of Chinese dumplings (thin dough packet containing ground meat and vegetables, fried before eat) which were laced with pesticide made at least 10 Japanese people ill. It was the first case of food poisoning which was caused by pesticides in imported food. The Japanese distributors quickly recalled these dumplings and other related products made by the same Chinese company. After that, up to 130 ppm of methamidophos was found from recalled frozen dumplings. Moreover, 110 ppm of dichlorvos was found from other lot of dumplings which had been recalled because of stink. A high-ranking government official said, "Judging from the circumstantial evidence, we'd have to think that it's highly likely to be a crime." But this case drove the Quarantine Station and other laboratories to analyze pesticides in the processed food. In Japan, many kinds of frozen ready-to-eat or ready-to-cook foods were imported and sold. For example, cut and boiled vegetables, deep-fried chicken or fish, beef or pork cutlet, hamburger, dumplings, pizza and the like. In spite of Japan's much dependence on food from China, many Japanese people scare.

Until now, analytical services have mainly monitored pesticide residues in raw foods, such as fruits, vegetables, grain and meat because results of processed or mixed food hardly fit to the regulation based on raw commodities. We have proposed the rapid multiresidue method which targeted raw foods. [1,2] In this study, we adapted the method for processed foods and checked recovery. Because processed foods usually contained high amount of fat, ethyl acetate was used to extract pesticides from fat. After centrifugation, extract was evaporated to dryness and reconstituted in hexane to perform hexane-acetonitrile partitioning. The acetonitrile layer was cleaned up by graphitized carbon black and PSA cartridge column. Pesticides were analyzed by GC-FPD, GC-MS(/MS) and LC-MS/MS. Targeted LOD of this method was 0.01 μ g/g for 290 pesticides.

References

- [1] Okihashi, M.; Kitagawa, Y.; Obana, H.; Tanaka, Y.; Yamagishi, Y.; Sugitate, K.; Saito, K.; Kubota, M.; Kanai, M.; Ueda, T.; Harada, S.; Kimura, Y., *Food 1* (2007) 101-110
- [2] Okihashi, M.; Takatori, S.; Kitagawa, Y.; Tanaka, Y.; J. *AOAC Int.* 90 (2007) 1165-1179

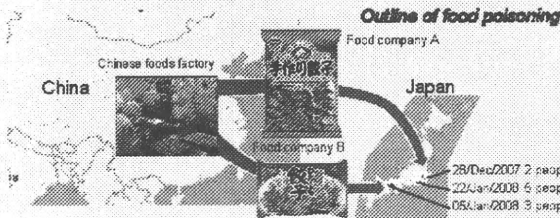
PA21 PESTICIDE ANALYSIS IN PROCESSED FOODS

Masahiro Okihashi, Satoshi Takatori, Yoko Kitagawa, You Okamoto, Hirota Obana, Shuzo Taguchi
Osaka Prefectural Institute of Public Health, Nakamichi 1-3-69, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan
E-mail okihashi@iph.pref.osaka.jp

Abstract

In 2008 Feb, it was reported that two varieties of Chinese dumplings (thin dough packet containing ground meat and vegetables, fried before eat) which were laced with pesticide made at least 10 Japanese people ill. It was the first case of food poisoning which was caused by pesticides in imported food. The Japanese distributors quickly recalled these dumplings and other related products made by the same Chinese company. After that, up to 130 ppm of methamidophos was found from recalled frozen dumplings. Moreover, 110 ppm of dichlorvos was detected from other lot of dumplings which had been recalled because of sick. A high-ranking government official said, "Judging from the circumstantial evidence, we'd have to think that it's highly likely to be a crime." But this case drove the Quarantine Station and other laboratories to analyze pesticides in the processed food. In Japan, many kinds of frozen ready-to-eat or ready-to-cook foods were imported and sold. In spite of Japan's much dependence on food from China, many Japanese people scars.

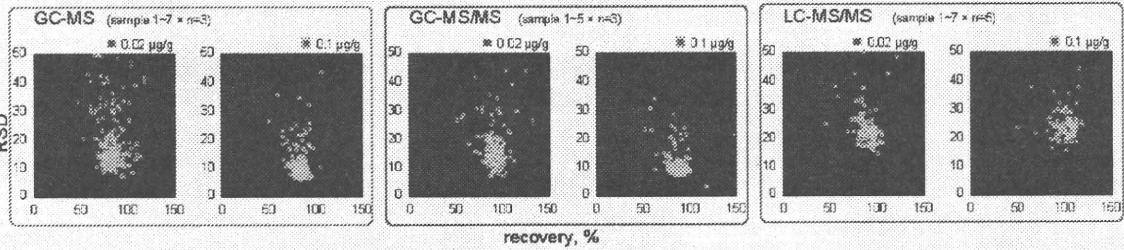
Until now, analytical services have mainly monitored pesticide residues in raw foods, such as fruits, vegetables, grain and meat because results of processed or mixed food hardly fit to the regulation based on raw commodities. We have proposed the rapid multiresidue method which targeted raw foods. [1,2] In this study, we adapted the method for processed foods and checked recovery. Because processed foods usually contained high amount of fat, ethyl acetate was used to extract pesticides from fat. After centrifugation, extract was evaporated to dryness and reconstituted in hexane to perform hexane-acetonitrile partitioning. The acetonitrile layer was cleaned up by graphitized carbon black and PSA cartridge column. Pesticides were analyzed by GC-MS/MS and LC-MS/MS. Targeted LOD of this method was 0.01 µg/g for 290 pesticides.



About 31,000 ppm of methamidophos was detected from the remains of food dumpling which victims have eaten.

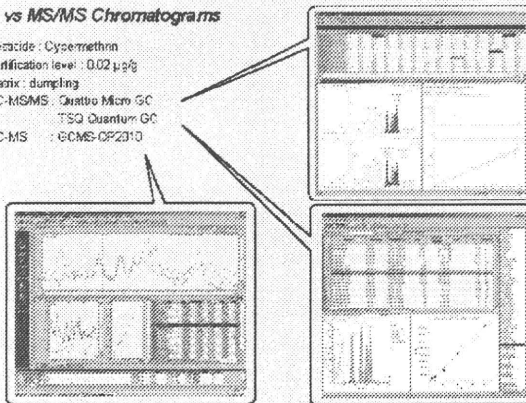
Recovery test

Spiked pesticides: GC 263, LC 116, Total 293
Fortification levels: 0.02 µg/g, 0.1 µg/g
Processed foods: Dumpling, Curry, Potato chips, Fried chicken, Fried fish, Hamburger and Kimpira (air-fried carrot and burdock)

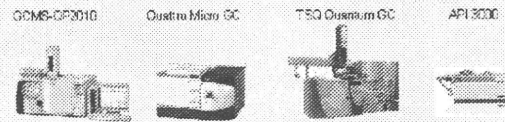
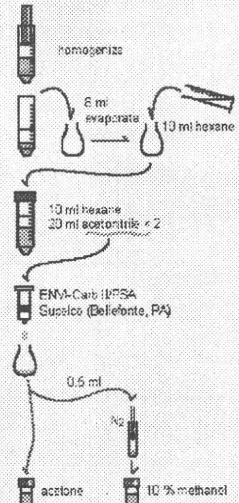
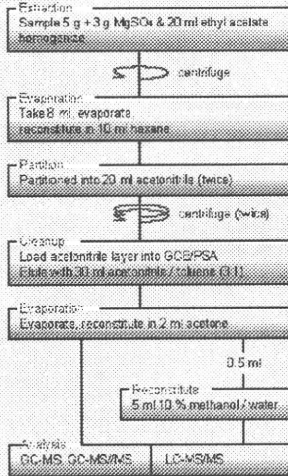


MS vs MS/MS Chromatograms

Pesticide: Cypermethrin
Fortification level: 0.02 µg/g
Matrix: dumpling
GC-MS/MS: Quattro Micro GC
TSQ Quantum GC
GC-MS: GCMS-QP2010



Extraction & cleanup



Conclusion

Tested processed foods contained about 5-20 % of fat. The ethyl acetate extract showed yellowish color. After hexane-acetonitrile partitioning, acetonitrile layer became colorless, and final solutions looked clear. Extracts from processed food contained more matrices than raw foods such as fruits and vegetables. Due to the matrices, the GC-MS chromatograms showed many interference peaks and they made target peaks detection difficult. In the case of GC-MS/MS analysis, better reproducibility was observed because of its high sensitivity and selectivity. As for LC-MS/MS analysis, the average pesticide recoveries of each food were widely varied then total RSD was relatively high compared to GC analysis. The number of pesticides which indicated >70 % of recoveries were: GC 248, LC 89, Total 270. The combination of quick extraction and simultaneous analysis for a large number of pesticides enables rapid and efficient monitoring.

References

- Okihashi, M., Kitagawa, Y., Okamoto, Y., Tomoda, Y., Yamagishi, Y., Sugitani, K., Sakai, K., Kitagawa, M., Kaai, M., Ueda, T., Harada, S. & Kimura, Y. (2007) Food 1, 101-110
- Okihashi, M., Takatori, S., Kitagawa, Y., Tomoda, Y. (2007) J. AOAC Int. 90, 1155-1179

加工食品中の残留農薬一斉分析法の開発 (1) - LC/MS/MS を用いた検討 -

大阪府立公衆衛生研究所 ○岡本 葉、高取 聡、福井直樹、北川陽子、
起橋雅浩、村田 弘、住本建夫、尾花裕孝

【目的】2007年12月及び2008年1月に、有機リン系農薬が混入していた中国製輸入冷凍餃子を喫食したことによって、中毒症状を発症する重大な健康被害が発生した。その後、餃子以外の加工食品からも相次いで農薬が検出された。農産物中の残留農薬に対しては、食品衛生法で残留基準が設定されているが、加工食品に対しては一部を除き基準値が設定されていない。加工食品から農薬が検出された場合は、食材の配合比率をもとに残留基準に適合しているか判断する必要があるため、検査されていないのが現状であった。現在、農産物だけでなく、加工食品中の残留農薬も、迅速かつ精度よく測定することが求められている。さらに、加工食品の中には農産物に比べて脂質を多く含むものもあり、農薬の抽出及び測定が困難となることが予想される。そこで、加工食品中の農薬の一斉分析法をLC/MS/MSを用いて検討し、一定の成果が得られたので報告する。

【方法】5種類の加工食品（餃子、レトルトカレー、フライドポテト、鶏肉唐揚げ、白身魚フライ）を検討に用いた。均一化した試料5gをポリプロピレン製遠心管に採取した。無水硫酸マグネシウム3gを加え、酢酸エチル20mLで抽出し、遠心分離後、酢酸エチル層8.0mL（試料2.0g相当）を分取し留去した。抽出物をヘキサンに再溶解し、アセトニトリル/ヘキサン分配法により脂質を除き、回収したアセトニトリル層をグラファイ

トカーボン/PSA 積層カラムにより精製した。減圧乾固後、アセトンで2mLに定容（GC用試験液）した。このうち0.5mLを窒素気流下で乾固し、25%メタノールで5.0mL（0.1g/mL）としたものをLC/MS/MS用試験液とした。添加回収試験においては、試料に99種類の農薬を20及び100ng/gになるように添加し、同様に抽出した。

【分析条件】

LC/MS/MS：API 3000

イオン化モード：ESI (+)

カラム：ASCENTIS C18, 2.1×100 mm, 3 µm

カラム温度：40℃

移動相：(A) 0.1% ギ酸水溶液

(B) 0.1% ギ酸含有メタノール溶液

グラジエント：(B) 25→95% (12分間, リニア) → 95% (8分間, 保持)

流速：200 µL/min 注入量：5.0 µL

【結果及び考察】20及び100ng/g両濃度について、それぞれの回収率を求めた。両濃度で良好な結果（回収率、70-120%；RSD、20%未満）となった農薬数は、餃子：72、レトルトカレー：65、フライドポテト：32、鶏肉唐揚げ：86、白身魚フライ：29であった。これらの項目においては、10ng/gレベルの評価も可能であった。本法を用いて市販の加工食品を分析したところ、1検体から原料のジャガイモに由来すると考えられるクロルプロファムが検出された。

加工食品中の残留農薬一斉分析法の開発（２） —GC/MS 及び GC/MS/MS を用いた検討—

大阪府立公衆衛生研究所 ○北川陽子、起橋雅浩、高取 聡、岡本 葉、
福井直樹、村田 弘、住本建夫、尾花裕孝

【目的】2007年12月及び2008年1月に中国製冷凍餃子を原因食品とする有機リン系農薬中毒事件が発生した。この事件以降、加工食品中の残留農薬について懸念が広がっている。

今回、「加工食品中の残留農薬一斉分析法の開発（１）」と同じ前処理方法を用いて、GC/MS及びGC/MS/MSによる加工食品中の残留農薬の一斉分析法の検討を行ったので報告する。

【方法】

1. 試料及び前処理方法

「加工食品中の残留農薬一斉分析法の開発（１）」と同様の方法を用いた。

2. 添加回収実験

260農薬を対象に添加回収実験を行った。添加濃度は20及び100 ng/gの2濃度とした（n=3）。

3. 分析条件

1) GC/MS分析条件

装置：Shimadzu GCMS-QP2010
カラム：Rtx-5ms, 0.25mm×30m, 0.25µm
注入量：1 µL（Splitless）

2) GC/MS/MS分析条件

装置1：
Waters Micromass Quattro micro GC
装置2：
Thermo Fisher Scientific TSQ Quantum GC
カラム：DB-5ms, 0.25mm×30m, 0.25µm
注入量：1 µL（Splitless）

【結果及び考察】260農薬のうち、感度不足等の理由によりGC/MSの測定可能農薬数は221農薬であった。添加濃度20及び100 ng/gの両濃度で良好な結果（回収率，70~120%；RSD，20%未満）となった農薬数を表に示す。

表 2 濃度の添加回収実験において良好な結果を得た農薬数

	GC/MS	GC/MS/MS
測定可能農薬数	221	260
餃子	192	234
レトルトカレー	147	214
フライドポテト	176	232
鶏肉唐揚げ	172	237
白身魚フライ	202	243

測定可能農薬数に対する割合は、GC/MSのレトルトカレーを除いて、概ね8割以上であった。下図に5種類の加工食品の平均回収率及びRSDの相関を示す。GC/MS/MSはGC/MSに比べ、RSDが小さい傾向であり、特に20 ng/g添加の結果において顕著であった。

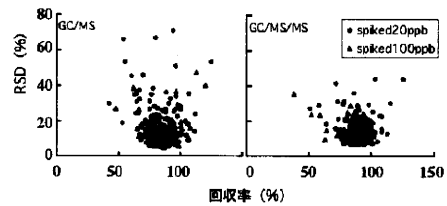


図 5種類の加工食品の平均回収率とRSDの相関

現在、市販の加工食品について、本法を用いた残留農薬の実態調査を行っている。

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3報）

○村田 弘¹、織田 肇¹、岩上正藏¹、田中之雄¹、尾花裕孝¹、
住本建夫¹、高取 聡¹、北川陽子¹、柿本幸子¹、岡本 葉¹、
土田由里子²、上野英二³、田中敏嗣⁴、宇野正清⁵、木野善夫⁶、
佐々木珠生⁷、堤 泰造⁸、花田喜文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)

はじめに

食品衛生法の改正により約800種類の農薬等に暫定基準または一律基準が設定された。この規制に対応するため検査機関では検査体制を再構築し、農薬検査の拡大を図ってきた。そこで17年度から継続して¹⁾、検査機関のポジティブリスト制度における一律基準値(10ppb)付近の農薬検査精度の確認ならびに検査結果の信頼性を確保するために地方衛生研究所の9参加機関の協力を得て外部精度管理調査を実施した。

方法

今回の外部精度管理調査の概要を表1に示した。ほうれん草及びとうもろこしのマイクロペースト食材(業務用8kg、株式会社新進)を基材とし、表に示した添加農薬を用いて精度管理試料を作製した。精度管理試料、無添加対照試料、標準混合液を参加協力機関に配布して検査を実施した。検査方法は、各機関で通常行っている検査操作手順書(SOP)に従って実施し、検査回数は5回とした。なお、ほうれん草には3種類の内部標準物質(サロゲート物質)を試料に加えGC/MS測定、とうもろこしはLC/MS/MS測定で行うこととした。また調査試料の最終試験液(1g/mL、大阪府立公衆衛生研究所で調製)を添加農薬名及び添加量をブラインドにして分析機器メーカーに送付し、ほうれん草は農薬データベースを搭載したGC/MS-SCAN測定、とうもろこしはLC/TOF/MS測定を実施した。

精度管理用試料の均一性試験は無作為に5個の小分け試料を選び、各小分け試料から2箇所採取して測定を行った。安定性試験は試料を送付してから2ヶ月後に無作為に5個の小分け試料を測定した。

結果の評価方法は、各機関の報告値を統計処理(基本統計量、Xbar-R管理図、Zスコア等)を行った。

結果及び考察

均一性、安定性を確認したほうれん草、とうもろこしの精度管理試料に、一律基準値付近の低濃度の農薬10種類を添加した結果、全機関が添加農薬をすべて正しく検出した。設定濃度が7~30ppbでフェンブコナゾールを除けば再現性(RSD)は約13%以下と比較的小さく、全体的に検査は精度良く実施されていた。各農薬の全体の平均値から10ppb付近でも良好な結果が得られることが分かった(表2)。Xbar-R管理図、Zスコアによる評価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良好な結果が得られた機関が多かった。

R管理図で適正域に入っていない機関(RSDが10%を超える)もサロゲート物質を内標準として補正した結果、再現性においてRSDが5%以下となり、安定同位体による補正は、検査精度の維持・向上に効果が高いことが証明された。

GC/MS-SIM、LC/MS/MS-MRM測定に加えGC/MS-SCAN法による解析ソフトウェアやLC/TOF/MS測定によるスクリーニング、定量性の検討を行った結果、農薬標準物質を用いなくてもデータベースや精密質量数から添加農薬及びその濃度を的確に検出し、その有用性が認められた。

参加協力機関の測定感度、添加回収率等の技術情報を相互に公開した結果、GC/MS対象農薬では244農薬(異性体等を含む274種類)及びLC/MS/MS対象農薬180農薬(異性体等を含む189種類)が、検出感度として一律基準値を満足していることが判明した。添加回収率では、農産物28種類(延べ47種類)について延べ352農薬の回収率の良否の情報が得られた。本研究で対象とした農薬以外にポジティブリスト制度における一律基準値を考慮した農薬検査の拡大、検査精度に役立つ知見が得られた。

表1 外部精度管理調査 2007

参加機関	新潟県保健環境科学研究所 愛知県衛生研究所 神戸市環境保健研究所 奈良県保健環境研究センター 和歌山市衛生研究所 広島市衛生研究所 徳島県保健環境センター 北九州市環境科学研究所 大阪府立公衆衛生研究所 (9機関)	
検査方法	厚生労働省一斉分析法(4機関) QcEChER5改良法(2機関) 超臨界流体抽出(SFE)法 愛知県法 兵庫県法	
測定機器	GC/MS	LC/MS/MS
精度管理材料	ほうれん草ベースト	とうもろこしベースト
配布標準混合液	GC/MS用農薬標準混合液 (85種類) 関東化学製農薬標準混合液31	LC/MS/MS用農薬混合液 和光純薬製農薬標準混合液PL-7-1 (30種類)
指定農薬リスト	アザナゾール アセトクロール アトラジン イソホス イソキサチオン イソプロチオラン アジンホスメチル アニロホス イプロバリカ イプロベンホス エチオン エトフメセート オキサジアゾン キントゼン クロルピリホスメチル インドキサカルブ クロマフェノジド シフ ジクロホップメチル ジフェナミド シマジン テクナゼン トリアジメホス ナプロバミド ビベロ ルフェナミド シメコナゾール ピリフタリド ホス フェナミホス フェンブコナゾール フサライド プロフェジン フルアクリピリム プロピザ フェノキシカルブ メトキシフェノジド (10種 ミド プロフェノホス プロホキシル プロメトリン γ-BHC クロルピリホス ダイアジノン (30 種類)	
内部標準物質	β-BHC- ¹³ C、クロルピリホス-d10 ダイアジノン-d10	
添加農薬	クロルピリホスメチル、ジクロホップメチル、フェンブコナゾール、プロモホス、γ-BHC、 クロルピリホス、ダイアジノン (7種類)	シフルフェナミド、シメコナゾール、 メトキシフェノジド (3種類)

表2 外部精度管理調査結果 2007

調製試料名	添加農薬名	設定濃度 (ppb)	試料調製後の定量値		全参加機関		Xbar管理図 「良好」数	R管理図 「良好」数	Z-スコア 「良好」数
			平均値 (ppb)	再現性 (RSD,%)	平均値 (ppb)	再現性 (RSD,%)			
ほうれん草	クロルピリホスメチル	30	28.4	(3.1)	30.0	(8.7)	9	8	8
	ジクロホップメチル	17	15.6	(3.2)	16.8	(12.5)	9	8	9
	フェンブコナゾール	10	11.1	(5.4)	12.6	(31.2)	7	8	7
	プロモホス	8	8.1	(3.8)	7.5	(8.6)	9	8	9
	γ-BHC	15	13.1	(3.7)	13.1	(11.2)	9	8	9
	クロルピリホス	7	7.5	(3.1)	6.9	(12.1)	9	8	9
	ダイアジノン	10	10.1	(3.3)	9.3	(9.2)	9	8	9
とうもろこし	シフルフェナミド	20	20.5	(2.2)	19.5	(9.8)	9	9	9
	シメコナゾール	15	15.4	(3.3)	14.6	(7.5)	9	7	9
	メトキシフェノジド	10	10.4	(5.8)	8.7	(7.4)	9	8	9

謝辞

本研究は平成19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いた関係各位に感謝いたします。

文献

- [1]住本建夫ら:第43回全化協講演集,89-90(2006)
- [2]村田 弘ら:第44回全化協講演集,123-124(2007)

加工食品中の残留農薬分析

起橋雅浩、北川陽子、高取聡、岡本葉、福井直樹、村田弘、住本建夫、尾花裕孝
大阪府立公衆衛生研究所

はじめに

2007年12月から2008年1月にかけて、中国製輸入冷凍餃子を原因食品とした健康被害事件が複数発生した。患者は有機リン系農薬による中毒症状を示したが、それは冷凍餃子中に高濃度で混入されていたメタミドホスが原因であった。この濃度は使用後の残留とは考えられなかったが、これを機に加工食品中の農薬に対する消費者の不安が増大した。また、加工食品は細菌検査は一般的に行われていたが、残留農薬は原材料が食品衛生法で規制されているため、検査が行われていなかった。このため、事件発覚後に多くの加工食品で残留農薬分析が行われ、いくつかの低濃度の検出事例が報告された。現在、農薬分析を行っている機関では、生鮮食品だけでなく加工食品中の残留農薬分析にも対応することが求められている。加工食品の種類は多岐にわたり、様々な種類の物質を含んだ製品の総称である。今回はその成分中に脂質を多く含む食品と、脂質が少ない食品に分けて、これまで生鮮食品で使用していた簡易一斉分析法をもとに、加工食品中の残留農薬の一斉分析法を検討したので報告する。

器具、試薬

フードプロセッサ：精米機 QS-7 (東芝)
ホモジナイザー：HG30 (日立製作所)、PT10-35GT (ポリトロン)
抽出用遠心管：50 mL コニカルチューブ (Thermo Fisher Scientific、BD Falcon)
GCB/PSA 固相カラム：Supelco 製 ENVI-Carb II/PSA (500 mg / 500 mg)
農薬標準品：和光純薬、林純薬、関東化学、Riedel de Haen、Dr. Ehrenstorfer より購入した農薬標準品をアセトンで溶解し、1mg/mL 液を作成した。これを適宜混合し、GC 用、LC 用に混合溶液を調製した。

装置

GC:MS/MS
装置 1：Quattro micro GC (Waters) (添加回収試験)
装置 2：TSQ Quantum GC (Thermo Fisher Scientific) (市販品モニタリング)
インターフェイス：250℃ イオン源：250℃
イオン化法：EI コリジョンガス：アルゴン

カラム：DB-5ms (J&W) 30m × 0.25mm, 0.25 μ m キャリアガス：He

注入口：250 $^{\circ}$ C 注入方法：Splitless 注入量：1 μ L

GC-MS

装置：GCMS-QP2010 (島津製作所)

カラム：Rtx-5ms (Restek) 0.25mm × 30m, 0.25 μ m キャリアガス：He

注入口：250 $^{\circ}$ C 注入方法：Splitless 注入量：1 μ L

LC-MS/MS

装置：API 3000 (Applied Biosystems)

イオン化モード：ESI (-)

カラム：ASCENTIS C18 2.1 × 100 mm, 3 μ m

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：(A) 0.1% ギ酸水溶液 (B) 0.1% ギ酸含有メタノール溶液

グラジエント：(B) 25% (0分) → 95% (12 ~ 20分)

流速：200 μ L/min 注入量：5 μ L

前処理方法

1、脂質含有加工食品

生鮮食品の前処理方法ではアセトニトリルで抽出していたが、アセトニトリルでは脂質中からの抽出能力に懸念があったため、抽出溶媒に酢酸エチルを用いた。また、抽出後に溶媒を置換してヘキサン/アセトニトリル分配を行い、抽出液より脂質を除去した。精製操作としては、これまで実績のあるグラファイトカーボン (GCB) /PSA の固相カラムを用いた。フードプロセッサで均一化した試料 5g をコニカルチューブにとり、無水硫酸マグネシウム 3g と酢酸エチル 20mL を加えてホモジナイザーで 1 分間攪拌抽出した。その後 3000rpm で 5 分間遠心分離を行い、上清を抽出液とした。この抽出液 8mL (試料 2.0g 相当) をなす型フラスコに分取し、濃縮して溶媒を留去した。残渣をヘキサンに溶解させつつコニカルチューブに移し、液量を約 10mL とした。そこにヘキサン飽和アセトニトリル 20mL を加え、激しく振盪した後に遠心分離を行い、アセトニトリル層を GCB/PSA 固相カラムに負荷した。残ったヘキサン層には再びヘキサン飽和アセトニトリル 20mL を加えて同じ操作を行い、得られたアセトニトリル層を同じ GCB/PSA 固相カラムに負荷した。固相カラムからの通過液は終始同一のなす型フラスコに採取し、さらにアセトニトリル/トルエン (3:1) 30mL で溶出させ、通過液とあわせた。これを 40 $^{\circ}$ C 以下で減圧濃縮後、アセトン 2mL に溶解して GC 用試験液とした。このうち 0.5mL を窒素気流下で乾固し、25%メタノールで 5mL (0.1g/mL) としたものを LC-MS/MS 用試験液とした。