

- products, and honey by LC-MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, 51, 122-127 (2010).
- 9) Stajnbaher, D., Zupancic-Kralj, L. Multiresidue method for determination of 90 pesticides in fresh fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, 1015, 185-198 (2003).
  - 10) Tomlin, C. D. S. eds. *The Pesticide Manual 14<sup>th</sup> edition*. British Crop Protection Council, UK, 2006, p. 872. (ISBN 1-901396-14-2)
  - 11) Nagayama, T., Kobayashi, M., Shioda, H., Morino, M., Ito, M., Tamura, Y. Simultaneous determination of *N*-methylcarbamate pesticides in agricultural products by liquid chromatography. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, 35, 470-478 (1994).
  - 12) Tsumura, Y., Nakamura, Y., Yoshii, K., Tonogai, Y., Higo, M., Shibata, T. Simultaneous determination of 21 *N*-methylcarbamates and metabolites in agricultural products by HPLC. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, 39, 357-367 (1998).
  - 13) Akiyama, Y., Yano, M., Mitsuhashi, T., Takeda, N., Tsuji, M. Simultaneous determination of pesticides in agricultural products by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, 37, 351-362 (1996).
  - 14) Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Stajnbaher, D., Schenck, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.*, 86, 412-431 (2003).
  - 15) Lehotay, S. J., de KoK, A., Hiemstra, M., van Bodegraven, P. Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. *J. AOAC Int.*, 88, 595-614 (2005).
  - 16) Lehotay, S. J., Mastovska, K., Lightfield, A. R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *J. AOAC Int.*, 88, 615-629 (2005).

*A Rapid and Simple Method for the  
Determination of 2-Alkylcyclobutanones in  
Irradiated Meat and Processed Foods*

**Yoko Kitagawa, Masahiro Okihashi,  
Satoshi Takatori, Keiji Kajimura,  
Hirotaka Obana, Masakazu Furuta &  
Toshimasa Nishiyama**

Food Analytical Methods

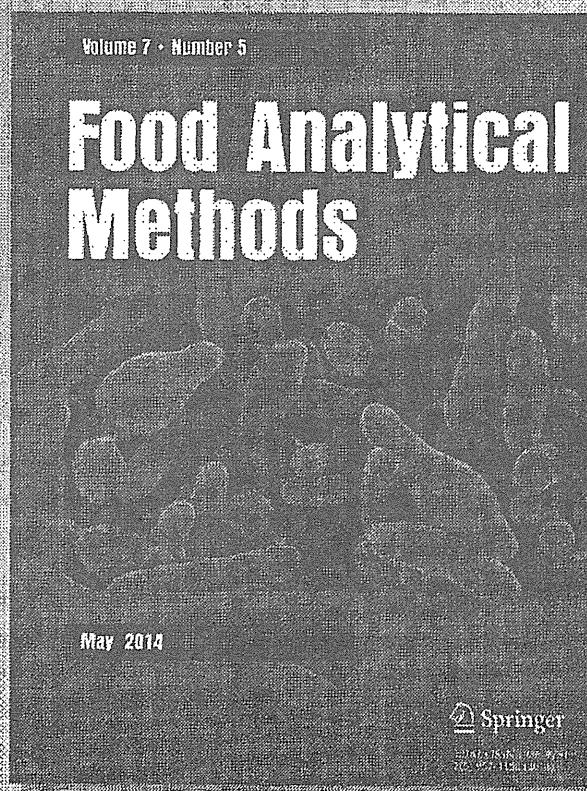
ISSN 1936-9751

Volume 7

Number 5

Food Anal. Methods (2014) 7:1066-1072

DOI 10.1007/s12161-013-9714-5



 Springer

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science +Business Media New York. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at [link.springer.com](http://link.springer.com)".

## A Rapid and Simple Method for the Determination of 2-Alkylcyclobutanones in Irradiated Meat and Processed Foods

Yoko Kitagawa · Masahiro Okihashi · Satoshi Takatori · Keiji Kajimura · Hirotaka Obana · Masakazu Furuta · Toshimasa Nishiyama

Received: 10 June 2013 / Accepted: 30 August 2013 / Published online: 13 September 2013  
© Springer Science+Business Media New York 2013

**Abstract** A rapid and simple method has been developed for the determination of 2-alkylcyclobutanone, 2-dodecylcyclobutanone (DCB), and 2-tetradecylcyclobutanone (TCB) in irradiated meat and processed foods. The procedure consists of extraction with *n*-hexane, following defatting and cleanup with a silica gel mini-column before gas chromatograph–mass spectrometry analysis. The method was evaluated using samples of beef, pork, Parmesan cheese, fried chicken, hamburger, *gyoza* (Chinese dumplings), and *gyudon* (boiled beef and onion seasoned with soy sauce and sugar). The recoveries of spiked DCB were 67–88 %, and those of TCB were 70–86 %. Furthermore, the method could detect DCB and TCB from samples irradiated at 1.0 and 2.6 kGy at levels dependent on dose; DCB and TCB were not detected in any nonirradiated samples. The method did not require special equipment, such as Soxhlet extraction, accelerated solvent extraction, or supercritical fluid extraction, for sample preparation. Thus, this method would be useful for determining DCB and TCB levels in irradiated meat and processed foods.

**Keywords** Irradiated food · 2-Alkylcyclobutanone · 2-Dodecylcyclobutanone · 2-Tetradecylcyclobutanone · GC-MS

### Introduction

The irradiation of food is effective for retaining safety and quality by controlling microorganisms and thus extending shelf life and has become a popular preservation technique worldwide (Loaharanu et al. 2001; Molins et al. 2001). The wholesomeness of irradiated foods and guidelines for the irradiation process have been endorsed by international organizations (Loaharanu et al. 2001). However, induced radioactivity, the formation of toxic by-products, and nutrient losses in food due to irradiation are some of the concerns expressed by consumers. Confirming the irradiation history of foods would promote consumer choice and greater acceptance of irradiated foods and may help in the enforcement of labeling regulations. Thus, methods for the detection of irradiated foods have been developed based on physical and chemical methods (Mcmurray et al. 1996; Crews et al. 2012)

2-Alkylcyclobutanones (ACBs) are specific radiolytic products in lipid-containing foods and are not present in the natural environment. Therefore, the detection of ACBs is a strong indicator that a food has been irradiated. European countries have adopted EN1785 (European Committee for Standardization 2003) as the official standard method for the analysis of ACBs in the detection of irradiated foods such as chicken, pork, and eggs. The Japanese government has also introduced EN1785 as an official method to detect irradiated fatty food samples (Department of Food Safety, Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan 2007). However, the procedure for this method is complex, consisting of a lengthy

Y. Kitagawa · T. Nishiyama  
Kansai Medical University, 2-5-1, Shin-machi, Hirakata,  
Osaka 573-1010, Japan

M. Okihashi · S. Takatori · K. Kajimura · H. Obana  
Osaka Prefectural Institute of Public Health, 1-3-69 Nakamichi,  
Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan

M. Furuta  
Radiation Research Center, Osaka Prefecture University, 1-2,  
Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8570, Japan

**Present Address:**  
Y. Kitagawa (✉)  
1-3-69 Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan  
e-mail: ykkitaga@iph.pref.osaka.jp



S Soxhlet extraction (6 h), followed by large-scale open column chromatography giving an overall analysis time of 2 days.

We had developed a method to detect 2-dodecylcyclobutanone (DCB) and 2-tetradecylcyclobutanone (TCB) using accelerated solvent extraction (ASE) to reduce the time for preparing the test solution and solvent usage (Obana et al. 2005, 2006, 2007). After extraction with ASE, the DCB and TCB were purified first by defatting under freezing conditions and then by a commercial silica gel column. Supercritical fluid extraction (SFE) can also be used to improve the extraction and cleanup process for the detection of DCB and TCB (Tewfik et al. 1999; Horvatovich et al. 2000; Stewart et al. 2001; Gadgil et al. 2002). However, these methods require specialized equipment not available in every organization.

In this study, we developed a rapid, simple, and precise method for the detection of irradiated lipid-rich foods without special equipment such as ASE and SFE. The method would be valuable for routine testing for irradiated foods.

## Materials and Methods

### Materials

DCB, TCB, and 2-cyclohexylcyclohexanone, which serves as an internal standard (I.S.) for gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) determination, were purchased from Hayashi Pure Chemical (Osaka, Japan). Each compound was dissolved in *n*-hexane to make a 1,000- $\mu\text{g}/\text{mL}$  stock solution. Two stock solutions were mixed in equal proportions and subsequently diluted with *n*-hexane for the running standard and spiking solution in the recovery tests. Particles of diatomaceous earth (Extrelute for refilling; particle size, 160–800  $\mu\text{m}$ ) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany) and used without further purification. Silica gel 60 (0.063–0.200 mm, for column chromatography) was also purchased from Merck.

### Preparation of a Handmade Silica Gel Column

Silica gel (1 g) was packed into a glass-wool-plugged Pasteur pipette (146 mm, AGC Techno Glass, Shizuoka, Japan). The column was connected to a glass syringe (10 mL), as a solvent reservoir, using a soft and flexible polyvinylidene fluoride (PVF) tube (Fig. 1). The column was rinsed with 10 mL of *n*-hexane for conditioning just before use.

### Food Commodities

Food samples (beef, pork, Parmesan cheese, fried chicken, hamburger, *gyoza*, and *gyudon*) were purchased from a market in Osaka. *Gyoza* is a Chinese dumpling made of pork and vegetables, and *gyudon* is boiled beef and onion seasoned

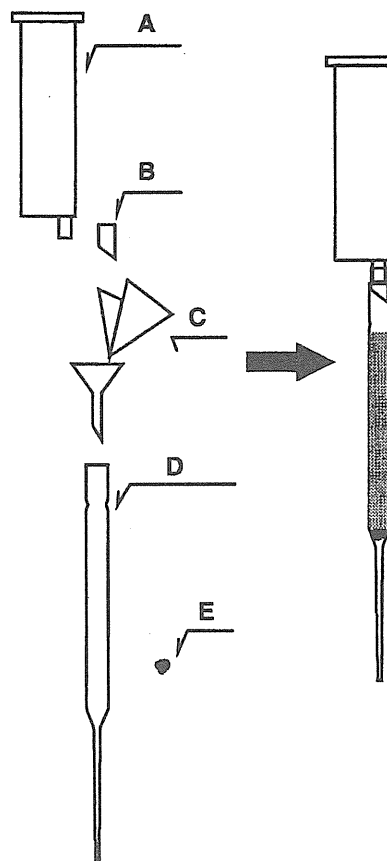


Fig. 1 The structure of handmade silica gel column: A glass syringe (10 mL), B flexible PVF tube, C 1 g of silica gel, D Pasteur pipette, and E glass wool

with soy sauce and sugar. Fried chicken and *gyoza* were provided as cooked frozen foods. Hamburger and *gyudon* were provided in retort pouches. About 200 g of the sample foods was chopped in a conventional food processor (MK-K61, Panasonic, Osaka, Japan) for 2 min to obtain homogeneous fat distribution in each sample. The samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis.

### Irradiation

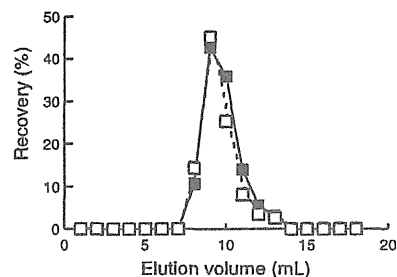
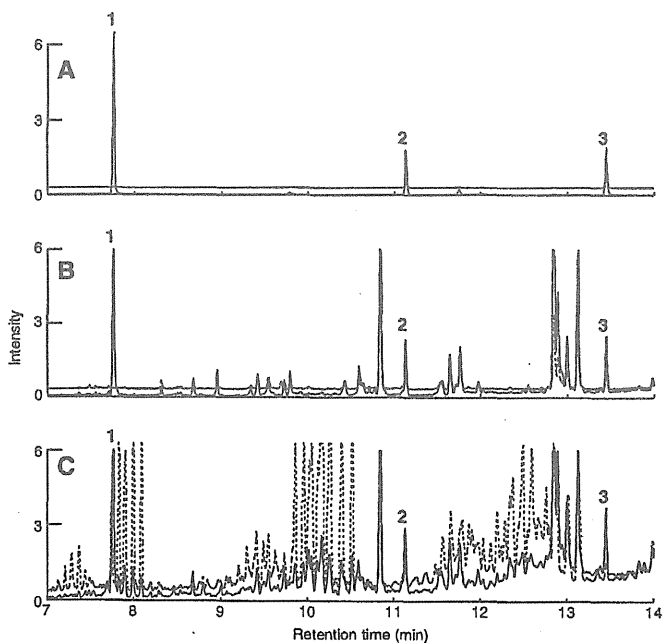
Frozen samples were irradiated with  $\gamma$ -rays from a  $^{60}\text{Co}$  source (15 kGy/h) in the irradiation pool at the Radiation Research Center (Osaka Prefecture University, Japan) at doses of 1.0 to 2.6 kGy at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The absorbed dose was determined with a Radiochromic dye film (FWT-60-1P, Far West Technology, Inc., CA, USA), which was put on each sample's

plastic bag. The calibration curve for determination was adjusted for frozen temperature, since the film was less sensitive at cool temperature. After irradiation, samples were stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until analysis. The irradiated samples were analyzed within 1 month after irradiation. Nonirradiated control samples were also stored under the same conditions.

#### Extraction

A 5-g aliquot of sample and 5 g of diatomaceous earth particles as a drying agent were ground in a mortar (12 cm i.d.) with a pestle until the mixture became homogeneous to facilitate solvent penetration into the sample matrix. The mixture was transferred into a 50-mL polypropylene conical test tube and shaken vigorously for 1 min after the addition of 30 mL of *n*-hexane. The mixture was centrifuged ( $1,290\times g$ , 10 min) with a Himac CR-GIII (Hitachi Koki, Tokyo, Japan). The supernatant was filtered with a filter paper (No. 5A, 125 mm, Advantec, Tokyo, Japan), and the precipitate was extracted with 20 mL of *n*-hexane again. These extracts were combined and evaporated. The remaining fat residue in the flask was heated at  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 30 min to remove the *n*-hexane completely before measuring the weight of fat, because ACBs were stable below  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Obana et al. 2006). The fat also could be a keeper of ACBs. Thus, the heating procedure would keep the ACBs in the fat without decomposition and vaporizing.

**Fig. 2** GC-MS chromatograms of the test solution purified with the handmade silica gel column and the commercially available silica gel column: *A* DCB and TCB standard solution at 50 ng/mL, *B* the handmade silica gel column, and *C* the commercially available silica gel column. Peak labels: 1, 2-cyclohexylcyclohexanone (I.S.); 2, DCB; and 3, TCB. The solid line indicates the monitoring ion ( $m/z$  98); the broken line indicates the qualifier ion ( $m/z$  112)



**Fig. 3** Elution patterns of DCB and TCB with the handmade silica gel column. The solid line with filled squares indicates DCB; the broken line with open squares indicates TCB

#### Defatting

An aliquot of 0.2 g of fat residue was weighed into a glass tube with a screw cap and dissolved using 2.5 mL of acetone. After the addition of 0.5 mL acetonitrile, the sample was mixed using a vortex mixer for 1 min and then cooled at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 30 min to precipitate the fat. The sample was centrifuged at  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $1,290\times g$ , 10 min), and the supernatant was collected in another glass tube to remove the precipitated fat. The solvent was completely removed with a nitrogen stream under warm conditions. The defatted sample was then weighed and dissolved in 2 mL *n*-hexane.

**Table 1** Recovery rates of DCB and TCB in meat and processed foods

Sample	DCB		TCB	
	Mean <sup>a</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	Mean <sup>a</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)
Beef	84	2	70	5
Pork	76	4	77	2
Parmesan cheese	67	12	73	5
Fried chicken	81	3	86	3
Hamburger	74	4	76	2
Gyoza	88	5	86	2
Gyudon	72	7	71	7

<sup>a</sup> Means of three experiments

<sup>b</sup> Relative standard deviation of three experiments

#### Cleanup

The defatted sample was passed through the handmade silica column prepared as described above. For a defatted sample weighing over 0.06 g, the sample load was divided between two silica gel columns. Ten milliliters of *n*-hexane and 5 mL of 2 % diethyl ether in *n*-hexane were eluted and discarded. The DCB and TCB fraction was eluted with 10 mL of 2 % diethyl ether in *n*-hexane and then dried with a nitrogen stream under warm conditions. The DCB and TCB fraction was reconstituted with 0.2 mL *n*-hexane containing 100 ng/mL of 2-cyclohexylcyclohexanone as I.S.

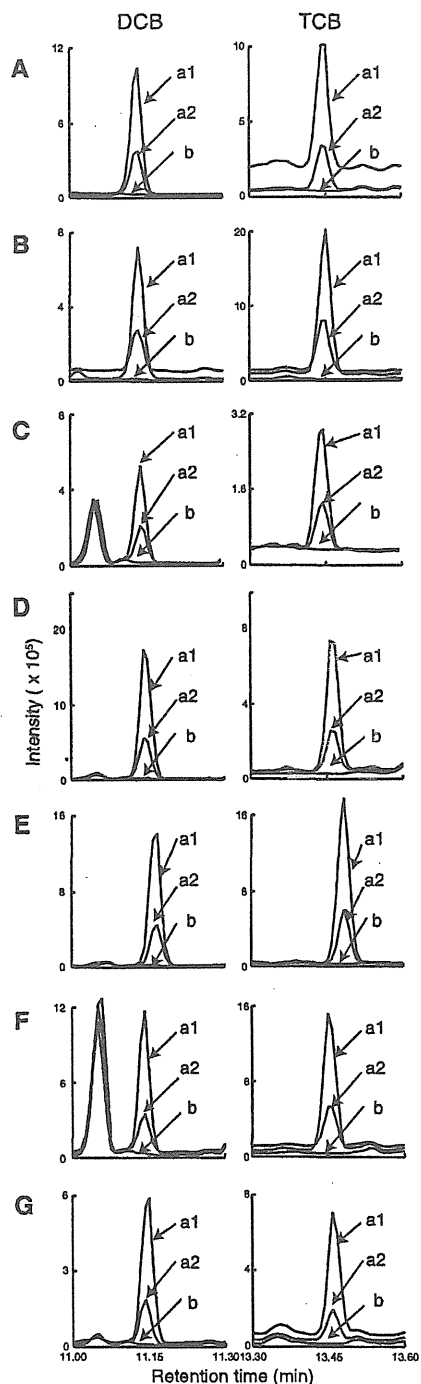
#### GC-MS Determination

The GC-MS used was QP2010 Ultra (Shimadzu, Kyoto, Japan). The GC conditions were as follows: column, DB-5MS (Agilent, CA, USA), i.d. 30 m × 0.25 mm, thickness 0.25 μm; column temperature program, 60 °C (1 min), 60–160 °C at 20 °C/min, 160–250 °C at 8 °C/min, 250–300 °C at 25 °C/min, 300 °C (5 min); carrier gas, He; injection temperature, 250 °C; injection volume, 1 μL; and injection mode, pulsed splitless. The MS conditions were as follows: ionization mode, electron ionization; ion detection, scan (*m/z* 95–115) and selected ion monitoring (*m/z* 98, 112); ionization voltage, 70 eV; ion source temperature, 200 °C; and transfer line temperature, 250 °C.

#### Calibration Curves for DCB and TCB Measurements

To compensate for the effects of any sample matrix remaining in the test solution on GC-MS analysis, DCB and TCB were quantified using an internal standard method. The relative

**Fig. 4** SIM chromatograms of DCB and TCB in irradiated food samples monitored at *m/z* 98: **A** beef, **B** pork, **C** Parmesan cheese, **D** fried chicken, **E** hamburger, **F** gyoza, and **G** gyudon (**a1**, irradiated at 2.6 kGy; **a2**, irradiated at 1.0 kGy; and **b**, nonirradiated)



peak area of DCB and TCB against the internal standard at 100 ng/mL was calculated for calibration.

## Results and Discussion

### Method Development for DCB and TCB

A typical method for the determination of DCB and TCB consists of the following three steps: (1) a fat extraction step, (2) a cleanup step including defatting, and (3) a GC-MS analysis step. Although the EN1785 (European Committee for Standardization 2003) method aims to extract all the fat in the sample with a Soxhlet extractor, the fat required for DCB and TCB determination would be an aliquot of that; only 0.2 g of fat is used. The time for extraction of fat with a Soxhlet extractor would be approximately 6 h. Furthermore, this process consumes solvent in large quantities; thus, direct extraction with solvent would be suitable for the development of a rapid and simple method for the determination of DCB and TCB. In this study, direct extraction with solvent was adopted as previously described (Hijaz et al. 2010; Tewfik 2008).

The extracted fat was processed with defatting and silica gel column cleanup before GC-MS analysis. Cleanup is the key step for developing a reliable and robust method for matrix-rich samples such as fatty foods. In EN1785 (European Committee for Standardization 2003), after fat extraction with Soxhlet apparatus, the cleanup depends only on a Florisil column. The cleanup step in EN1785 (European Committee for Standardization 2003) could be unsatisfactory for routine analysis because of the large-sized column and the large quantity of solvents used. To obtain a clear chromatogram for DCB and TCB, a selective extraction of DCB and TCB using an SFE system or further column cleanup would

be required (Stewart et al. 2001). In the present study, freezing out the fat in the solvent and a silica gel column were used for the cleanup process. In both these processes, special apparatus, such as SFE or ASE, were not used.

The proposed method could provide a versatile data expression, comparing with EN1785 (European Committee for Standardization 2003) and the previous method (Tewfik et al. 1999; Horvatovich et al. 2000; Stewart et al. 2001; Gadgil et al. 2002; Hijaz et al. 2010; Tewfik 2008). The DCB and TCB concentrations could be expressed on two bases, the fat basis or as sample weight, which enable comparisons with results from previous reports that use various ways to express the DCB and TCB concentrations in samples. The EN1785 method expressed results on the fat basis (European Committee for Standardization 2003) while SFE and the direct solvent extraction method expressed concentrations on the sample weight basis (Tewfik et al. 1999; Horvatovich et al. 2000; Stewart et al. 2001; Gadgil et al. 2002; Hijaz et al. 2010; Tewfik 2008).

### The Fat Extraction Step

The efficiency of fat extraction was compared between this method and a method using a Soxhlet extractor with a 5-g sample of beef in duplicate. The average of fat obtained by the two methods was 1.34 and 1.24 g, respectively, and there would be no significant differences between these methods in the efficiency of fat extraction. Furthermore, the times for extraction from the sample were 90 min and 1 day, respectively. The fat extraction step could be replaced by the direct solvent method.

### The Cleanup Step

The fat extract was defatted before passing through a silica gel column to avoid overloading. To remove almost all the fat

**Table 2** Concentration of radiation-induced DCB and TCB in meat and processed foods

Sample	DCB						TCB					
	0 kGy		1.0 kGy		2.6 kGy		0 kGy		1.0 kGy		2.6 kGy	
	Mean <sup>a</sup>	RSD <sup>b</sup>	Mean <sup>a</sup>	RSD <sup>b</sup>	Mean <sup>a</sup>	RSD <sup>b</sup>	Mean <sup>a</sup>	RSD <sup>b</sup>	Mean <sup>a</sup>	RSD <sup>b</sup>	Mean <sup>a</sup>	RSD <sup>b</sup>
Beef	ND	–	86	15	243	9	ND	–	65	8	185	7
Pork	ND	–	50	9	138	1	ND	–	139	8	361	6
Parmesan cheese	ND	–	72	8	168	6	ND	–	36	4	90	6
Fried chicken	ND	–	127	5	385	2	ND	–	48	2	155	2
Hamburger	ND	–	110	3	314	4	ND	–	118	3	335	4
Gyoza	ND	–	72	5	193	2	ND	–	92	7	272	1
Gyudon	ND	–	69	5	236	9	ND	–	61	6	243	8

ND not detected

<sup>a</sup> Means of three experiments (in nanograms per gram lipid)

<sup>b</sup> Relative standard deviation of three experiments (in percent)



from the fat extract, acetonitrile, a fat-insoluble solvent, was added to the fat extract dissolved in acetone and then cooled at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . After cooling, the insoluble fat precipitated and was easily removed by centrifugation. The optimal ratio of acetone to acetonitrile was 5:1 (2.5 and 0.5 mL). If the ratio was less than 5, the recovery of DCB and TCB declined; for a ratio more than 5, the fat remaining increased (data not shown).

We found that when using commercially available silica gel columns, unknown contaminants were eluted from the column to the DCB and TCB fraction. These contaminants overlapped both the SIM ( $m/z$  98 and 112) of DCB and TCB in GC-MS analysis (Fig. 2(C)). Even after proper conditioning before use, contaminants were detected from all the available silica gel columns we tested. To obtain further information of the contaminants, the extracts of one of commercially available silica gel column parts (cylinder unit, flit, and silica gel) with the eluate were analyzed in the same GC-MS conditions. The contaminants were mainly detected from the extract of the cylinder unit (data not shown). The peaks of contaminants consecutively appeared on chromatograms as shown in Fig. 2(C). The cylinder unit was made of polypropylene resin. Thus, the contaminants could be a mixture of paraffin- and/or olefin-like compounds reached from the cylinder units. The interference from these contaminants was successfully avoided by using our handmade silica gel column in which the usage of resin was minimal (Fig. 2(B)).

Figure 3 shows the typical elution profile of the silica gel column loaded with a defatted extract (0.04 g) obtained from 0.2 g beef fat containing 80  $\mu\text{g}$  each of DCB and TCB. After washing with 10 mL of *n*-hexane, 20 mL of 2 % diethyl ether in *n*-hexane was eluted and fractionated with every 1 mL. DCB and TCB were eluted into 5–15-mL fractions. The recovery rates of DCB and TCB from the column were 112 and 101 %, respectively.

#### Recovery Tests

In the recovery tests, fat extracted from nonirradiated foods was used as a blank sample. The blank samples (each 200-mg portion), spiked with DCB and TCB at 50 ng/g each, were used as positive samples. Recovery tests were conducted in triplicate for each food sample (Table 1). The mean values of recovery of DCB and TCB were 70–88 % with less than a 10 % relative standard deviation (RSD), except for the Parmesan cheese (DCB 67 %). This method would be applicable for the determination of DCB and TCB in almost all irradiated foods.

#### Analysis of Irradiated Food

The DCB and TCB levels in the food samples (beef, pork, Parmesan cheese, fried chicken, hamburger, *gyoza*, and

*gyudon*) irradiated at two dose levels, 1.0 and 2.6 kGy, were determined by our method in triplicate. Figure 4 illustrates typical chromatograms of DCB and TCB irradiated at two dose levels and of nonirradiated samples. Both the chromatograms at  $m/z$  98 and 112 were clear enough to identify and quantify both DCB and TCB (data not shown). Significant interference peaks could not be found beneath those for DCB and TCB in the negative control samples. DCB and TCB were detected in all irradiated samples at levels depending on the dose, but in none of the nonirradiated control samples (Table 2). Both DCB and TCB levels in these experiments also resembled those observed in our former reports (Obana et al. 2005, 2006), where the concentrations of DCB and TCB were determined in meat irradiated under similar conditions.

In conclusion, this method is simple, is rapid, and requires no special system for the preparation of the test solutions for GC-MS analysis. The time to prepare test solutions for GC-MS analysis from three samples was approximately 8 h by this method. This method would be a potential candidate for a routine analysis method for determining DCB and TCB levels in lipid-rich foods.

**Acknowledgments** This study was partly supported by a grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (Research on Food Safety, 2012) and by JSPS KAKENHI grant number 25460833.

**Conflict of Interest** Yoko Kitagawa declares that she has no conflict of interest. Masahiro Okikashi declares that he has no conflict of interest. Satoshi Takatori declares that he has no conflict of interest. Keiji Kajimura declares that he has no conflict of interest. Hirotaka Obana declares that he has no conflict of interest. Furuta Masakazu declares that he has no conflict of interest. Toshimasa Nishiyama declares that he has no conflict of interest. This article does not contain any studies with human or animal subjects.

#### References

- Crews C, Driffied M, Thomas C (2012) J Food Compos Anal 26:1
- Department of Food Safety, Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (2007) Notification 0706001 (July 6, 2007)
- European Committee for Standardization (2003) Foodstuff—detection of irradiated food containing fat—gas chromatographic/mass spectrometric analysis of 2-alkylcyclobutanones EN1785. European Committee for Standardization, Brussels
- Gadgil P, Hachmeister KA, Smith JS, Kropf DHK (2002) J Agric Chem 50:5746
- Hijaz F, Kumar A, Smith JS (2010) J Food Sci 75:T118
- Horvatovich P, Miesch M, Hassemann C, Marchioni E (2000) J Chromatogr A 897:259
- Loaharanu P, Thomas P (eds) (2001) Irradiation for food safety and quality: proceedings of FAO/IAEA/WHO international conference on ensuring the safety and quality of food through radiation processing. Technomic Publishing Company, Lancaster

- McMurray CH, Stewart EM, Gray R, Pearce J (eds) (1996) Detection methods for irradiated foods: current status. The Royal Society of Chemistry, Cambridge
- Molins RA (ed) (2001) Food irradiation: principles and application. Wiley, New York
- Obana H, Furuta M, Tanaka Y (2005) *J Agric Food Chem* 53:6603
- Obana H, Furuta M, Tanaka Y (2006) *J Health Sci* 52:375
- Obana H, Furuta M, Tanaka Y (2007) *J Health Sci* 53:215
- Stewart EM, McRoberts WC, Hamilton JTG, Graham WD (2001) *J AOAC Int* 84:976
- Tewfik I (2008) *Int J Food Sci Technol* 43:108
- Tewfik IH, Ismal HM, Sumar S (1999) *Int J Food Sci Nutr* 50:51

## ダイズおよびトウモロコシ抽出 DNA の精製度の検討

(2013 年 7 月 4 日受付)

(2013 年 9 月 25 日受理)

笠間 菊子<sup>a)</sup>、小熊 恭代<sup>a)</sup>、穂山 浩<sup>b)</sup>、鈴木 達也<sup>a)</sup>、渡辺 卓穂<sup>a)</sup>、小島 幸一<sup>a)</sup>

a) 一般財団法人 食品薬品安全センター 秦野研究所

b) 国立医薬品食品衛生研究所

## Qualitative study of DNA extracted from soybean and maize

(Received July 4, 2013)

(Accepted September 25, 2013)

Kikuko Kasama<sup>a)</sup>, Yasuyo Oguma<sup>a)</sup>, Hiroshi Akiyama<sup>b)</sup>, Tatsuya Suzuki<sup>a)</sup>, Takaho Watanabe<sup>a)</sup>, Koichi Kojima<sup>a)</sup>

a) Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center

b) National Institute of Health Sciences

## Abstract

The quality and yield of DNA extracted from soybean and maize samples were compared using two commercial DNA extraction kits, the DNeasy Plant Mini kit (Mini kit) and the GM quicker kit. Subsequent quantification of the extracted DNA samples by UV spectrophotometry and fluorometry revealed that the yields of soybean DNA extracted using the Mini kit were approximately three times higher when determined by UV spectrophotometry than when they were determined by fluorometry. Conversely, the yields of soybean DNA extracted using the GM quicker kit were only slightly higher when determined by UV spectrophotometry than when they were determined by fluorometry. However, the relative DNA yields of maize DNA samples estimated by UV spectrophotometry and fluorometry were 1.77 with the Mini kit and 1.52 with the GM quicker kit. To validate the soybean DNA yields obtained using both extraction kits, DNA samples were analyzed by agarose gel electrophoresis and real-time PCR of a reference gene. These analyses indicated that the Mini kit yields estimated by UV spectrometry were over-estimated, due to more low-intensity bands and fewer gene copies being observed, compared to DNA extracted with the GM quicker kit. Conversely, the maize DNA yields obtained using the Mini and GM quicker kits showed only slight differences between the real-time PCR and agarose gel electrophoresis analyses. The extracted DNA samples were then analyzed by size-exclusion chromatography. The results showed that the soybean DNA extracted using the Mini kit contained more low-molecular weight impurities than the DNA extracted using the GM quicker kit and maize extracts obtained with both extraction kits. Therefore, it appears that the presence of low molecular weight impurities in soybean DNA extracted with the Mini kit interferes with the UV quantification of DNA.

Keywords : DNA 抽出法、ダイズ、トウモロコシ、不純物、サイズ排除クロマトグラフィー  
DNA extraction method, soybean, maize, impurity, size exclusion chromatography

## I 緒言

安全性審査を受けていない遺伝子組換え (GM) 食品の流通防止および安全性審査済みの GM 食品の適正な表示とその検証のため、厚生労働省および消費者庁から組換え DNA 技術応用食品の検査方法<sup>1-2)</sup>が通知されている。GM 食品検査は各都道府県の衛生研究所および登録検査機関等で広く実施されているが、我々はこれらの検査機関における分析の

信頼性の確認および向上を目的として GM 食品検査に関する外部精度管理調査を実施してきた<sup>3-7)</sup>。

2006 年度および 2009 年度に実施したラウンドアップ・レディ・ダイズを対象とした遺伝子組換え食品検査外部精度管理調査において、定量 PCR 法により測定されたダイズ内在性遺伝子レクチンのコピー数は参加機関が採用した DNA 抽出法によって大きく異なり、GM quicker 法を使用した機関のレクチンのコピー数が、他の抽出法を採用した機関に比べ多

連絡先 : 〒 158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 穂山浩

Corresponding author: Hiroshi Akiyama, Division of Food Additives, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

くなる傾向が認められた。通知法<sup>2)</sup>の定量PCR測定は、あらかじめ規定の濃度に調製したDNA溶液の一定量を鋳型とし、標準プラスミドによる検量線から目的とする遺伝子のコピー数を求める。このためマトリックスがほぼ同じ試料であれば、抽出法に関わらず得られるコピー数は一定となると考えられる。しかし、ダイズにおいてGM quicker法による抽出DNAのレクチンのコピー数が他の抽出法によるコピー数より多くなる傾向は北村ら<sup>8)</sup>および佐藤ら<sup>9)</sup>によっても報告されている。一方、渡邊ら<sup>10)</sup>は4種の抽出法で抽出したダイズDNAの収量が260 nmの吸収から求めた場合(UV法)と、2本鎖DNAに特異的に結合する蛍光試薬の蛍光光度から求めた場合(蛍光法)とは異なることを報告した。また、渡邊ら<sup>11)</sup>はトウモロコシにおいてもDNA抽出法により定量PCRで得られるDNA当たりの目的遺伝子のコピー数が異なることを報告した。

これらの報告および外部精度管理調査結果は、DNA抽出法により、得られるDNAの精製度や断片化の程度が異なる可能性を示唆している。そのため本研究では通知法<sup>2)</sup>のDNA抽出法のうち外部精度管理調査において多くの機関で使用された、DNeasy Plant Mini kit (Miniキット)およびGM quicker (GM quickerキット)により抽出されるダイズおよびトウモロコシDNAの品質について検討を行ったので報告する。

## II 実験方法

### 1. 試料

市販のダイズ(カナダ産、品種不明)および国立医薬品食品衛生研究所より供与された非遺伝子組換えトウモロコシ(アメリカ産、品種不明)を試料として使用した。

### 2. 試薬

DNA抽出にはDNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)およびGM quicker (關ニッポンジーン)を使用した。DNA定量の蛍光試薬にはQuant-iT dsDNA High Sensitivity Assay Kit HS (ライフテクノロジーズジャパン)を使用した。ダイズおよびトウモロコシ内在性遺伝子のコピー数の測定にはダイズ内在性DNA Le1 オリゴヌクレオチドセット、GMダイズ(RRS)プラスミドセット-ColEI/TE、トウモロコシ内在性SS II b-3 オリゴヌクレオチドセット、GMトウモロコシプラスミドセット-ColEI/TE(以上關ニッポンジーン)およびTaqMan Universal PCR Master Mix (ライフテクノロジーズジャパン)を使用した。サイズ排除クロマトグラフィーは分析カラムにTSKgel G5000PW<sub>XL</sub> (關東ソー)を使用して実施した。また、DNAの分解にはDNase I recombinant, RNase-free (ロシユ・ダイアグノスティック)を使用した。

### 3. 装置

ダイズおよびトウモロコシの粉碎には高速遠心式粉碎機ZM200 (關レッチェ)を、DNA抽出には多用途小形遠心

機CF16RX (日立工機)およびDryThermoUnit DTU-2B (タイテック)を使用した。260 nmの吸光度測定にはGeneQuant pro (GEヘルスケアバイオサイエンス)、UV吸収スペクトルの測定にはUV-1700 (關島津製作所)、蛍光法の蛍光測定にはVarioskan Flash マイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific)を使用した。内在性遺伝子のコピー数の測定にはABI PRISM7900HTリアルタイムPCRシステム(ライフテクノロジーズジャパン)を、サイズ排除クロマトグラフィーには關島津製作所製、高速液体クロマトグラフ装置Prominence (LC-20AD、SPD-20A、SIL-20AC、CBM-20A、DGU-20A<sub>3</sub>、CTO20AC)を使用した。

### 4. DNA濃度の測定

DNAの濃度はUV法と、蛍光法を用いて測定した。UV法では260 nmにおける1 O.D.を50 ng/μL DNAとしてDNA濃度を算出した。蛍光法はQuant-iT dsDNA High Sensitivity Assay Kitのプロトコールに従って操作し、キット付属の標準品を測定して得た検量線からDNA濃度を求めた。

### 5. 内在性遺伝子のコピー数の測定

内在性遺伝子(レクチン、スタチンシンターゼII b (SS II b))のコピー数は通知法<sup>2)</sup>の定量PCRの項に従って測定した。なお、鋳型DNAには各抽出DNAをUV法の定量値および蛍光法の定量値に基づいて、ダイズにおいてはUV法20 ng/μL、蛍光法7 ng/μL、トウモロコシにおいてはUV法10 ng/μL、蛍光法6 ng/μLに調製したものを使用した。

### 6. アガロースゲル電気泳動

電気泳動はultraPURE™ Agarose-1000 (ライフテクノロジーズジャパン) 50 × TAE (遺伝子工学研究用、關ニッポンジーン)により作製した0.7%アガロースゲルを用い、泳動槽にMupid (關ADVANCE)を使用して実施した。また、エチジウムブロミド染色は前染色により行い、画像解析にはプリントグラフ(アトー)を使用した。

### 7. サイズ排除クロマトグラフィー

DNA溶液のサイズ排除クロマトグラフィーは分析カラムにTSKgel G5000PW<sub>XL</sub> (排除限界分子量 $2.5 \times 10^6$ )、高速液体クロマトグラフ装置Prominenceを使用して実施した。溶離液には0.4 mol/L塩化ナトリウムを含む0.2 mol/Lクエン酸緩衝液(pH 7.0)を使用し、流速0.6 mL/min、カラム温度23°Cの条件下、10 μLの試料を注入し、260 nmにおけるUV吸収を測定した。なお、試料には蛍光法による定量値に基づいて7 ng/μLに調製したダイズDNAおよび6 ng/μLに調製したトウモロコシDNA、さらにDNase I recombinant, RNase-freeを用い、付属のプロトコールに従って分解したダイズおよびトウモロコシDNAを使用した。さらにDNAのサイズ推定のため、電気泳動用DNAサイズマーカーのλ-Hind III digest (タカラバイオ)もあわせて分析した。

### III 結果

#### 1. DNA 収量

ダイズおよびトウモロコシから Mini キットおよび GM quicker キットにより通知法<sup>2)</sup>に従って抽出した DNA (以下 Mini-DNA および Quicker-DNA とする) を、UV 法および蛍光法により定量した。ダイズの Mini-DNA は、定量法間で収量に大きな差が認められ、UV 法収量は蛍光法収量の約 3 倍であった。一方、ダイズの Quicker-DNA では、UV 法収量は蛍光法収量の 1.24 倍で、Mini-DNA に比べ差が小さかった (Table 1)。

トウモロコシでは Mini-DNA の定量法間の収量の差はダイズほど大きくなかったが、ダイズと同様 Mini-DNA および Quicker-DNA のいずれでも UV 法による収量が蛍光法より高かった。なお UV 法収量は蛍光法収量に比して Mini-DNA で 1.77 倍、Quicker-DNA で 1.52 倍であった (Table 2)。

#### 2. 内在性遺伝子のコピー数

ダイズの Mini-DNA および Quicker-DNA を、UV 法および蛍光法による定量値それぞれに基づいて濃度調製し、通知<sup>2)</sup>に従って内在性遺伝子レクチンのコピー数を測定した。その結果、UV 法から濃度調製した DNA 溶液では、Quicker-DNA のコピー数は、Mini-DNA に比べて 2.72 倍多く測定された。一方、蛍光法から濃度調製した DNA 溶液では、Quicker-DNA のコピー数は Mini-DNA のコピー数と同程度

であった (Table 1)。この結果、ダイズにおいては蛍光法の定量値が PCR の鋳型 DNA の量を反映していること、および Mini-DNA には PCR の鋳型と異なる 260 nm に吸収を持つ成分が多く含まれることが示唆された。

トウモロコシについてもダイズと同様に Mini-DNA と、Quicker-DNA の濃度を UV 法および蛍光法による定量値に基づいて濃度調製し、通知<sup>2)</sup>に従って内在性遺伝子 SS II b のコピー数を測定した。その結果、UV 法から濃度調製した DNA 溶液では、Quicker-DNA のコピー数が、Mini-DNA に比べ 1.21 倍高く測定されたが、その差はダイズに比べて低かった。また、蛍光法から濃度調製した DNA 溶液では、Quicker-DNA のコピー数と Mini-DNA のコピー数はほぼ同等であった (Table 2)。以上の結果、トウモロコシでは DNA 溶液を UV 法、蛍光法のいずれに基づいて調製しても、得られる SS II b のコピー数に抽出キット間でそれほど差がないことから、Mini-DNA と Quicker-DNA に含まれる不純物の割合には差が少ないことが示唆された。

#### 3. 抽出 DNA の UV 吸収スペクトル

内在性遺伝子の測定結果から、試料 (ダイズおよびトウモロコシ) および使用する抽出キット (Mini キット、GM quicker キット) により、得られる DNA 溶液の精製度に差がある可能性が示唆されたため、ダイズおよびトウモロコシの Mini-DNA と Quicker-DNA の UV 吸収スペクトルを検討した。その結果、ダイズ、トウモロコシともに Mini-DNA と Quicker-DNA

Table 1. Yield and lectin copies in soybean DNAs extracted using Mini kit and GM quicker kit

Extraction method	Quantification of DNA			Lectin copy number	
	Method	Yield ( $\mu\text{g}$ )	Yield ratio (UV / Fluorometry)	copy/100 ng <sup>1)</sup> of DNA	copy/35 ng <sup>2)</sup> of DNA
Mini kit	UV	9.45 $\pm$ 0.62	2.96	30353 $\pm$ 3069	—
	Fluorometry	3.19 $\pm$ 0.34		—	30434 $\pm$ 3386
GM quicker kit	UV	5.19 $\pm$ 0.10	1.24	82616 $\pm$ 7244	—
	Fluorometry	4.19 $\pm$ 0.63		—	34259 $\pm$ 3160
Ratio of lectin copy (GM quicker kit/Mini kit)				2.72	1.13

Yield and lectin copy number represents the mean  $\pm$  S.D. of 3 extractions.

1) DNA contents were adjusted according to the UV spectrophotometry

2) DNA contents were adjusted according to the fluorometry

Table 2. Yield and SSIIB copies in maize DNA extracted using Mini kit and GM quicker kit

Extraction method	Quantification of DNA			SSIIB copy number	
	Method	Yield ( $\mu\text{g}$ )	Yield ratio (UV / Fluorometry)	copy/50 ng <sup>1)</sup> of DNA	copy/30 ng <sup>2)</sup> of DNA
Mini kit	UV	12.32 $\pm$ 0.74	1.77	11373 $\pm$ 825	—
	Fluorometry	6.95 $\pm$ 0.62		—	12810 $\pm$ 1212
GM quicker kit	UV	3.03 $\pm$ 0.09	1.52	13753 $\pm$ 1062	—
	Fluorometry	2.00 $\pm$ 0.13		—	12191 $\pm$ 660
Ratio of SSIIB copy (GM quicker kit/Mini kit)				1.21	0.95

Yield and SSIIB copy number represents the mean  $\pm$  S.D. of 3 extractions.

1) DNA contents were adjusted according to the UV spectrophotometry

2) DNA contents were adjusted according to the fluorometry

の UV 吸収スペクトルの形状には明確な差は認められなかった (Fig. 1)。また、精製度の指標となる 260 nm/280 nm の吸光度比は、Mini-DNA と Quicker-DNA のそれぞれで、ダイズでは 1.77 および 1.75、トウモロコシでは 1.74 および 1.65 といずれも良好であった。以上の結果、UV 吸収スペクトルからは抽出 DNA の質的な差は確認できなかった。

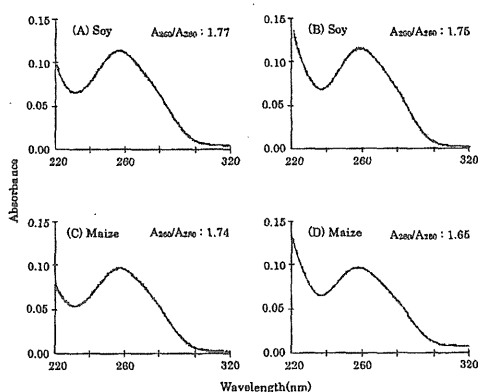


Fig. 1. UV spectra of soybean and maize DNAs extracted using Mini kit (A, C) and GM quicker kit (B, D)

#### 4. 抽出 DNA のアガロースゲル電気泳動

ダイズでは UV 法で濃度調整した DNA 溶液のレクチンのコピー数には Mini-DNA と Quicker-DNA の間で約 3 倍の開きが認められたが、両者の UV 吸収スペクトルには差が認められなかったため、Mini-DNA は、ゲノミック DNA と類似した吸収スペクトルを持つ DNA 断片を含む可能性が考えられた。このため、各抽出 DNA の断片化を 0.7% アガロースゲルを用いた電気泳動により検討し、結果を Fig. 2 に示した。ダイズの Mini-DNA と Quicker-DNA を、UV 法から濃度調整して電気泳動した結果、ゲノミック DNA のバンドの濃さは Quicker-DNA が Mini-DNA に比べて目視で判断できるほど高かった。一方、蛍光法から濃度調整して電気泳動した結果では、ゲノミック DNA のバンドの濃さは Mini-DNA と Quicker-DNA で目視上ほぼ等しく、DNA の低分子化を示す幅広く検出されるバンドについても差は認められなかった。トウモロコシについても同様に Mini-DNA と Quicker-DNA を UV 法および蛍光法から濃度調整して電気泳動した結果、ゲノミック DNA のバンドの濃さは濃度調整の方法に関わらず Mini-DNA と Quicker-DNA で目視上ほぼ等しく、低分子化を示すバンドについても差は認められなかった。また、ダイズ、トウモロコシとも低分子化した DNA の有無を確認するためさらに 3% ゲルを用いて電気泳動を実施したが、いずれも低分子化した DNA と考えられるバンドは検出されなかった (データは示さず)。

以上の結果、ダイズ、トウモロコシともにアガロースゲル電気泳動からは DNA の断片化は確認できなかった。しかし、

ダイズでは UV 法により濃度調整した Mini-DNA のゲノミック DNA のバンドの濃さが同濃度の Quicker-DNA のそれに比べて薄かったことから、ダイズ Mini-DNA は 2 本鎖 DNA に結合する蛍光試薬 (ゲル染色に用いたエチジウムブロミドは蛍光試薬の一つ) では検出できない成分を含むことが示唆された。

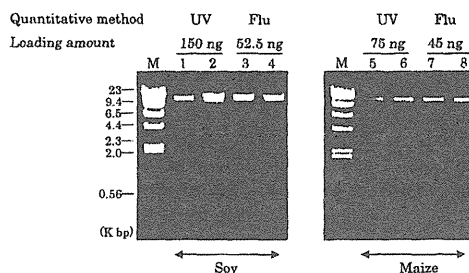


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of soybean and maize DNAs

Loading amount of the each DNA was adjusted using UV spectrophotometry (UV) and fluorometry (Flu). Lane M, molecular marker  $\lambda$ -HindIII; lanes 1, 3, 5 and 7, Mini kit extract; lanes 2, 4, 6 and 8, GM quicker kit extract.

#### 5. サイズ排除クロマトグラフィー

以上ダイズの Mini-DNA には 260 nm に吸収を持ち、蛍光法では検出されない不純物が含まれることが強く示唆された。このため、ダイズおよびトウモロコシの抽出 DNA について 260 nm の吸収を指標としてサイズ排除クロマトグラフィーにより 260 nm に吸収を持つ成分の分析を行い、ダイズの結果を Fig. 3 に、トウモロコシの結果を Fig. 4 に示した。

ダイズでは、排除限界がそれより大きい成分が溶離される 8.5 分付近のピークの高さは Mini-DNA と Quicker-DNA でほぼ等しく、その後 15 分までの溶離パターンには大きな差は認められなかった。しかし、Mini-DNA では 16 分付近および 18 分付近に大きなピークが観察されたのに対し、Quicker-DNA では 18 分付近に小さなピークが観察されたのみであった。また、Mini-DNA および Quicker-DNA を DNase により分解後、同様に測定した結果、いずれのクロマトグラムでも 15 分以前の溶離物は消失した。

トウモロコシでは 8.5 分付近のピークは Quicker-DNA が Mini-DNA に比べて高かった。しかしダイズとは異なり Mini-DNA でも 16 分以降の溶離物は少なく、Mini-DNA と Quicker-DNA の溶離パターンの差も小さかった。また、Mini-DNA および Quicker-DNA を DNase により分解後、同様に測定した結果、いずれのクロマトグラムでも 15 分以前の溶離物は消失した。

なお、参考のため測定したアガロースゲル電気泳動用サイズマーカー  $\lambda$ -Hind III digest のクロマトグラムでは、125 bp が約 12 分、564 bp が約 11 分に溶離され、2027 bp 以上の DNA は 8.5 分付近にまとめて溶離された。



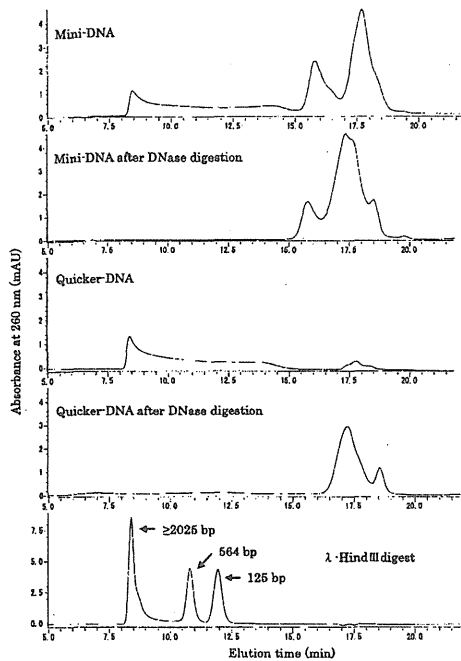


Fig. 3. Chromatograms of soybean DNAs in size exclusion chromatography

#### IV 考察

ダイズでは、レクチンのコピー数、アガロースゲル電気泳動の結果から、Mini-DNA および Quicker-DNA を UV 法の定量値から同濃度に調製した場合、実際の DNA 含量は、Mini-DNA が Quicker-DNA に比べ少なく調製されることが示唆された。また、蛍光法から濃度調製した場合、Mini-DNA と Quicker-DNA の濃度がほぼ等しく調製されることも示唆された。しかし、Mini-DNA および Quicker-DNA の間には UV 吸収スペクトルの形状、260 nm/280 nm の吸光度比においては、明確な差は認められなかった。このため、ダイズの Mini-DNA は 260 nm に吸収を持ち、UV 吸収スペクトルの形状が DNA に類似し、PCR の鋳型とならない不純物を含むことが強く示唆された。

これを確認するため、260 nm の吸収を指標としてサイズ排除クロマトグラフィーを実施し、DNA 抽出液に含まれる 260 nm に吸収を持つ成分の分析を行った。ダイズの Mini-DNA および Quicker-DNA のクロマトグラムを比較した結果、8.5 分から 15 分までの溶離パターンには大きな差は認められなかったが、Mini-DNA には 16 分付近および 18 分付近に溶離物の大きなピークが認められた。一方、DNase 処理を行った試料では、15 分までの溶離物は消失したため、DNA は 15 分以前に溶離されていると考えられ、16 分付近および 18 分

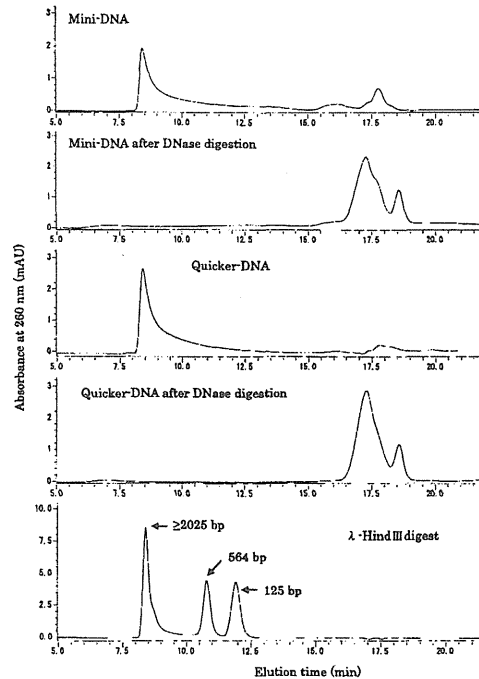


Fig. 4. Chromatograms of maize DNAs in size exclusion chromatography

付近に認められた溶離物が DNA である可能性は低いと考えられた。さらに 3% アガロースゲル電気泳動の結果からも、この溶離物は低分子化した DNA ではないことが支持された。以上の結果から、ダイズの Mini-DNA は 260 nm に吸収を持つ DNA 以外の成分を含んでいることが明らかになり、DNA 以外の成分による干渉により、Mini-DNA の UV 法による収量が蛍光法の収量の約 3 倍となったものと考えられた。これに比べ、Quicker-DNA は 15 分以降の溶離物が少なく、UV 法と蛍光法による収量の差も小さいことから、260 nm に吸収を持つ不純物の含量は少ないものと考えられた。

トウモロコシでは、Mini-DNA および Quicker-DNA の SS II b のコピー数は、DNA 濃度調製に UV 法、蛍光法のいずれの結果を用いても抽出キット間での差は小さかった。また、アガロースゲル電気泳動においても、抽出法による差は認められなかった。さらにサイズ排除クロマトグラフィーでは、15 分以降に溶離される不純物は Mini-DNA、Quicker-DNA のいずれにおいても微量であり、両者の質的差は小さいものと考えられた。しかし、Mini-DNA および Quicker-DNA の UV 法と蛍光法による収量にはともに 1.5 倍以上差があるため、サイズ排除クロマトグラフィーの結果からは説明できない不純物を含んでいる可能性もあると考えられた。

以上、ダイズにおいては UV 法による定量では、Mini-DNA の量を正確に測定できないことが明らかになった一方、

蛍光法による定量では、ゲノミック DNA の量を反映した定量値が得られることが示された。また、トウモロコシの Mini-DNA で、サイズ排除クロマトグラフィーで 15 分以降に溶離される不純物が微量であったことから、ダイズの Mini-DNA で認められた不純物はダイズ特有の成分である可能性が高いと考えられた。

GM 食品検査のうち PCR 法を用いた定量試験法は、抽出 DNA について GM 遺伝子と内在性遺伝子のコピー数をそれぞれ測定し、GM 遺伝子コピー数の内在性遺伝子コピー数に対する割合と内標比から GM 混入率 (%) を算出するものである。この時、GM 遺伝子と内在性遺伝子の測定には同じ DNA 溶液を使用するため、DNA 溶液の濃度が正確に調製されていない場合、混入率は理論上影響を受けない。しかし、ダイズの定性試験においては、鑄型 DNA のコピー数が検出感度として結果に直接影響するため、PCR 反応液に加える DNA 濃度を一定にすることが必須であると考えられる。本研究の結果、同じ試料でも抽出法によっては不純物の混入量が異なり、UV 法では DNA の量を正確に測定できない場合があることが明らかになった。今後、DNA 抽出法が複数種規定されている定性試験では、PCR 反応液に加える DNA 濃度を一定にするため、UV 法による定量結果と DNA 量の関係を個々の抽出法について確認する必要があると考えられる。

## V 謝辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金により行った。

## VI 文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“安全性未審査の組換え DNA 技術応用食品の検査方法について”平成 24 年 11 月 16 日、食安発 1116 第 3 号 (2012)。
- 2) 消費者庁次長通知“安全性審査済みの組換え DNA 技術応用食品の検査方法について”平成 24 年 11 月 16 日、消食表第 201 号 (2012)。
- 3) Watanabe, T., Kasama, K., Wakui, C., Shibuya, M., Matsuki, A., Akiyama, H., Maitani, T.: Laboratory-performance study of the notified methods to detect genetically modified maize (CBH351) and potato (NewLeaf Plus and NewLeaf Y). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, 44, 281-288 (2003).
- 4) Kasama, K., Watanabe, T., Kikuchi, H., Suzuki, T., Tokishita, S., Sakata, K., Matsuki, A., Hino, A., Akiyama, H., Maitani, T.: Laboratory performance study of the quantitative detection method for genetically modified soybeans (roundup ready soybeans 40-3-2). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, 46, 270-276 (2005).
- 5) 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).
- 6) Watanabe, T., Kasama, K., Kikuchi, H., Suzuki, T., Tokishita, S., Sakata, K., Matsuki, A., Hino, A., Akiyama, H., Maitani, T.: Laboratory-performance study of quantitative PCR methods to analyze an approved genetically modified maize (Mon810 Line). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, 47, 15-27 (2006).
- 7) Kasama, K., Inoue, Y., Akiyama, H., Suzuki, T., Sakata, K., Nakamura, K., Ohshima, Y., Kojima, K., Kondo, K., Teshima, R.: Proficiency testing of unauthorized genetically modified rice using plasmid DNA test samples. *Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Jpn. J. Food Chem. Safety)*, 19, 215-222 (2012).
- 8) Kitamura, M., Tanabe, E., Yamabe, S., Koeduka, K., Imanaka, M.: Comparison of DNA extraction methods for genetically modified soybean. *Okayamaken Kankyo Hoken Senta Nempo (Annual Report of Okayama Prefectural Institute for Environmental Science and Public Health)*, 31, 133-136 (2007).
- 9) Sato, N., Sugiura, Y., Kikuchi, H., Tanaka, T.: Application of DNA extraction kit 'GM quicker' for detection of genetically modified soybeans. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Saf. Sci.)*, 53, 39-44 (2012).
- 10) Watanabe, T., Sekino, A., Shiramasa, Y., Matsuda, R., Maitani, H.: Effect of non-genetically modified (non-GM) soy varieties on the measured value of GM soy by a quantitative PCR method. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, 49, 294-302 (2008).
- 11) Watanabe, T., Tokishita, S., Kikuchi, H., Sakata, K., Hino, A., Akiyama, H., Maitani, T.: Comparative study of four methods to extract genomic DNA for quantification of genetically modified maize by real-time polymerase chain reaction. *Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Jpn. J. Food Chem.)*, 13, 63-71 (2006).

食品添加物検査の外部精度管理調査について  
(平成25年5月 第105回 日本食品衛生学会学術講演会シンポジウム  
—食品中の食品添加物分析の現状と課題—)

渡辺 卓穂\*

External Quality Control for Food Additives Inspection

Takaho WATANABE

Division of Food Hygiene, Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center:  
792-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa 257-8523, Japan

### 1. はじめに

食品分析を行う機関にとって分析値は食品の安全性を考えるうえで大切であり、信頼性を確保して提示することが重要である。その信頼性を確保するための一般的な手法は、内部精度管理と外部精度管理である。たとえば、理化学検査において、同じ検体を複数の機関で分析したとき、試験検査機関の分析能力の違いから、各機関で異なる分析結果を出していたのでは、行政処分等の対策もとれない。食品分野においては、平成8年にGLP (Good Laboratory Practice) が導入され、厚生省 (現厚生労働省) は「食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について」(平成9年4月1日)を通知し、内部精度管理と外部精度管理を規定して、食品の分析データの信頼性を確保している。このGLPはデータの信頼性確保のための極めて有用なシステムであり、検査結果の信頼性を保証するためには不可欠である。平成9年度より財団法人食品薬品安全センター-秦野研究所が厚生省の適合性の確認を受けて、検査所、衛生研究所、保健所、そのほか自治体の公的検査機関や食品衛生登録検査機関を対象とした食品衛生外部精度管理調査 (理化学、微生物学)を開始している。これに加え、平成12年度からは民間の分析機関を対象とした食品衛生精度管理比較調査も行っている。他方、食品衛生法の改正により、平成18年5月ポジティブリスト制度が導入され、約800種類の農薬、動物用医薬品に対して、一律に残留基準値が設定された。これに伴い、分析対象物質が大幅に増え、一段と分析値に対する信頼性が要求されることになった。一方、FAO/WHO合同食品規格計画の下で活動している国際食品規格委員会 (通称、コーデックス委員会) では、食品の輸出入にかかわる試験所の条件として、①試験所認定に適合していること (ISO/IEC17025 (2005) など)、②適切な Proficiency Testing (PT) に参加してい

ること、③妥当性が確認された方法を用いていること、④内部精度管理を行っていること、をそのガイドラインで挙げている。特に、第三者機関が行う外部精度管理 (外部 (品) 質査定) に参加することで、試験所が出す分析値の信頼性を保証することができる。この査定の1つにPTがあり、JISでは「技能試験」と呼ばれ、試験所間の分析技能レベルの比較を行うために用いられており、国際的にハーモナイズされたプロトコールが作成されている。これらの試験では、分析値が統計的に処理され、参加機関による結果の一覧、 $\bar{x}$ スコアによる分布図等を示した報告書が送付される。その結果を基に各試験所では自機関の現状を掌握し、全体の中での技能レベルの位置づけの確認の手段としている。このように、試験データの信頼性を確保するうえで、外部精度管理は非常に重要な役割を担っている。

平成9年に外部精度管理調査がスタート後、食品添加物検査は定量のみであったが、平成14年度より食品添加物Iで食用色素の定性検査と食品添加物IIで定量検査が始まり、食品添加物検査は理化学検査の中で参加者が最も多い項目となった。

本編では、一般財団法人食品薬品安全センターが行っている食品衛生外部精度管理調査の中の食品添加物検査についてご紹介する。

### 2. 食品衛生外部精度管理調査の流れ

食品衛生外部精度管理調査は図1に示すような流れで行われている。まず食品薬品安全センターにおいて外部精度管理調査の計画を策定し年度の事業として参加機関に対して参加申込書を送付する。計画に従って調査試料の作製と配布を行い、参加機関は検査を実施し、結果を報告する。一方、食品薬品安全センターで報告された結果の統計解析を行い、報告書の作成を行う。調査結果は厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課および食品衛生外部精度管理調査成績評価会において評価する。参加機関は結果を確認し、必要であれば改善を行う。

\* 一般財団法人 食品薬品安全センター-秦野研究所: 〒257-8523 神奈川県秦野市落合 729-5

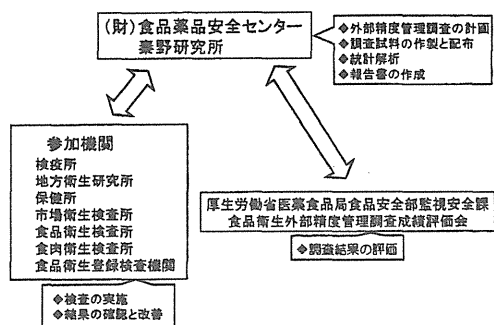


図1. 食品衛生外部精度管理の流れ

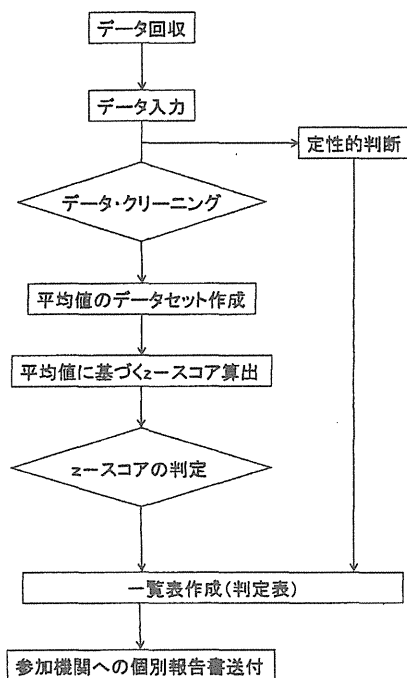


図2. 外部精度管理調査の解析フロー

3. 食品衛生外部精度管理調査の理化学検査の統計処理

これまでの評価法（従来法）における外部精度管理調査の解析フローを図2に示す。各参加検査機関よりデータを回収後、範囲を大きく外れた機関、すなわち、理化学検査では添加量の1/10以下および10倍以上の報告値を含む機関を除外し、添加量が明確でないときには外部精度管理調査機関の測定値を暫定値として同様の処理を行う。一方、報告値が5個未満を回答した機関については、その機関の報告値すべてを以後の解析対象から除外する。すなわち、5個の報告値がそろっていない場合、統計的に処理できないのである。次いで各検査機関間、検査機関内の変動を $\bar{X}-R$ 管理図を代用する方法で観察した後、各検査機関か

らの報告値の平均値について、基本統計量、順序統計量、ヒストグラムおよび正規確率プロットを作成することによりデータ全体の様相を掌握する。分布に極端なひずみやとがりが観察された場合には2シグマ（平均値 $\pm 2 \times$ 標準偏差）以上の値を報告した検査機関を除外した後、同様の処理を行い、最終的に各検査機関のzスコアと $\bar{X}-R$ 管理図に基づいて各検査機関の解析を行う。また、理化学調査における定性検査については、報告結果を入力した後、判定結果について表示する。

一方、平成21年度より、新たにロバスト統計量による解析法の導入を行い、これまでの解析法による従来方式とロバスト方式による評価法を併記している。ロバスト方式は、食品衛生や分析化学に関与する検査機関の技能試験に関連して、測定データの分析評価に用いるさまざまな統計手法が、IUPAC、FAPAS、AOAC、ISOまたはJISなどから提案されている。統計手法の導入に関心を示す理由の1つには、こうした手法が測定値の分布の観測ツールとして有効であるだけでなく、測定法や測定値の構造がしだいに複雑になり、より科学的、客観的な評価法が求められているからである。たとえば、現実の測定値の分布には、はずれ値やゴミの混入を伴うことがあり、これへの解析上の対応策が必要とされている。こうしたはずれ値の影響を受けにくい統計量の1つとしてロバスト統計量（頑健統計量）があり、近年、これの利用を薦める提案が多くなってきている。食品衛生外部精度管理調査でもこうした解析手法の導入を図るため、種々の方法のあるなかHuberの提唱したProposal2「H15」と呼ばれる方式を用いて解析を行っている。すなわち、データ・クリーニング済みのデータのメジアン $\pm$ メジアン $\times 50\%$ の範囲を超える報告値を除外した後、ロバスト統計量に基づくzスコアによる各検査機関の解析を行う。

ここでzスコアを算出するには指示値が必要であり、指示値は、食品マトリックス中の分析対象物の真値の代用値として「The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories (2006)」においてはいくつかの方法によって求められるとされている。ここで推奨している1つの方法として専門試験室グループによる平均値の利用が提案されているが、この方法による評価は当面実施困難である。そこで、まず、従来方式では、まず暫定的に検査機関の報告値については全体に影響を与えるような報告値をデータ・クリーニング（添加量の10倍以上、1/10以下を除外）を行った後、各検査機関の報告値の機関別平均値の平均値（つまり総平均値 $\bar{x}$ ）を求めて、それを指示値としてみなすこととしている。また、ヒストグラムの分布に外れ値が観測されたときは、さらに2シグマ以上（総平均値 $\bar{x} \pm 2 \times$ 標準偏差 $s$ の範囲を超える）の値を報告した検査機関のすべての測定値を除外して、同様に指示値を再度算出することとしている。こうして得た平均値と標準偏差を用いて、zスコアを算出する。なお、ロバスト方式の場合は、上のデータ・

クリーニングのほかに、さらに必要に応じてメジアンを用いたクリーニングを行う。その後、各検査機関の報告値の機関別平均値を用いて、ロバスト平均値とロバスト標準偏差を推定し、これを用いて $z$ -スコアを算出する。 $z$ -スコアとは標準化の操作をいい、 $z$ -スコアの平均値は「0」となる。図3に $z$ -スコアの分布図を示す。典型的な化学分析の結果は正規分布になるので、結果の大部分は平均値付近に集まるが、当然いくつかの結果は分布の外れにきてしまう。 $z$ -スコアの絶対値が2以上のデータ数は全体の約4.5%、3以上のデータ数は全体の約0.3%となる。よって、評価基準は、測定値にこうした仮定が満たされたときに成り立つ関係であることに注意すべきである。たとえば、Codex, IUPAC, AOAC, ISOでは、この $z$ -スコアは同一検査機関内で時系列的に観測することとしており、その評価基準は図3に示すとおりである。食品衛生外部精度管理調査もほぼこの解釈に従っている。すなわち、 $z$ -スコアの絶対値が2未満であれば「良好」、2以上3未満であれば「改善措置が必要か否かの検討が必要」、3以上であれば「改善措置の必要あり」とする。この $z$ -スコアは当該検査機関の報告値が全検査機関に対してどのような成績にあるのか、その位置づけを測定値の標準化を行うことで相対的に示したものである。したがって、 $z$ -スコアの絶対値が3以上の場合には、“調査に参加した検査機関全体の分布の傾向と比較”して大きくずれが生じているため、測定法の再点検と何らかの対策を取ることが必要である。このことから $z$ -スコアの絶対値が4や5となる場合には、その外れた値は確率から考えて、全体の傾向から明らかにずれを生じていると判断しよう、と考える。しかし、現実的には調査項目によっては機関別平均値が総平均値付近に集中する傾向がある（すなわち「尖度」が大きくなる傾向にある）、つまり、大半の検査機関の報告値の機関内変動が少なくなる傾向になる。一方、この集中化現象から外れる測定値を報告する検査機関も存在する。結果として、機関別平均値の分布の変動（分散、標準偏差）が過小に評価され

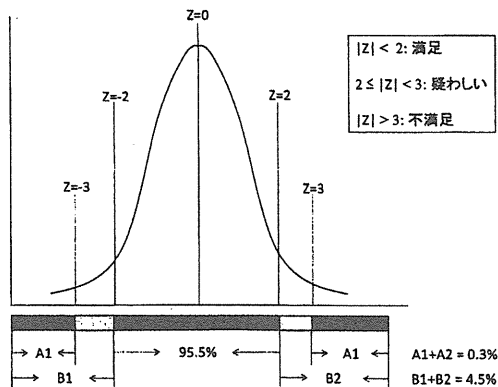


図3.  $z$ -スコアの分布図

ることとなり、調査項目によっては、この影響が変動係数の大小に関係する。なお、ロバスト方式を用いた場合も、上述したロバスト統計量（ロバスト平均値、ロバスト標準偏差）を用いる算出式で得た $z$ -スコアについて、この同じ評価基準を適用している。

$z$ -スコアのほかに解析する評価法として $\bar{X}$ - $R$ 管理図（図4）がある。 $\bar{X}$ - $R$ 管理図は米国のシューハートにより提唱された方法で、“quality control chart”と命名された総計的手法を導入した製品の工程管理の方法である。この管理図の特色はデータに変動（ばらつき）があることを認め、管理図の中に管理限界線を置いて工程の稼働状況を客観的に評価しようとする点にある。 $\bar{X}$ - $R$ 管理図では、工程から数個の試料を逐次的に抽出し、その平均値 $\bar{X}$ やばらつきの測定としての範囲 $R$ を計算しプロットしたものである。管理図には管理限界を示す一対の管理限界線を引き、これに測定値を表す点を打つ。その点が管理限界線の内側にあるか、外側にあるかによって製造工手が良い状態にあるかどうかを知ることができる。管理図に記入した多くの点が管理限界線の内側に収まって入れば、その製造工程は安定した状態にあるとみなせるが、点がこの外側にあるときは、製造工程に見逃せないばらつきを生み出す原因があるので、原因を究明し改善処置を取らなければならないことを示す。通常の $\bar{X}$ - $R$ 管理図は、前述のとおり各工程から抽出されたある大きさの試料（群）が時間軸に沿って時系列的に観測される測定値で、ある母集団から順次サンプリングされた試料であるとの前提で考えている。しかし、外部精度管理調査では、各検査機関を単に1つの群と見なして、この群内（検査機関内）変動（測定値のばらつき）と検査機関間における群間変動（平均値のばらつき）とを総合的に比較し観察するために同管理図を代用している。 $\bar{X}$ と $R$ は検査機関ごとの結果報告（理化学調査では $n=5$ ）から求め、縦軸に配列しプロットする。 $R$ はある検査機関の $n$ 個の測定値内の（最大値-最小値）を示す。外部精度管理調査において $\bar{X}$ の管理限界線はJISの方法ではなく基本的には添加量を用いて計算している。すなわち理化学調査での上部管理限界線（UCL）は添加量の120%、下部管理限界線（LCL）は70%と設定している。なお、理化学調査における管理限界線設定値は添加回収試験における回収率の目安である添加量の70~120%を参考として設定している。一方、 $R$ の上部管理線（UCL）は $\bar{R}$ に係数を乗じて求める。すなわち理化学調査では $n=5$ 測定であるため係数表より係数は2.115となる。

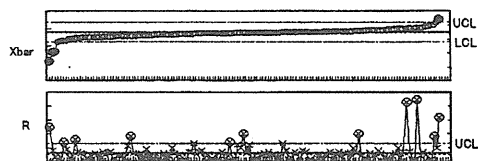


図4.  $\bar{X}$ - $R$ 管理図の例

表1. 食品添加物検査に採用した調査対象と使用基材

調査項目	調査対象	使用基材	
食品添加物	安息香酸+ソルビン酸	つゆ	
	ソルビン酸	ジャム, シロップ, 漬物	
	サッカリンナトリウム	シロップ, しょう油, ジャム, 飲料	
	パラオキシ安息香酸ブチル+パラオキシ安息香酸イソプロピル	清涼飲料水	
	安息香酸+パラオキシ安息香酸ブチル	清涼飲料水	
	安息香酸+ソルビン酸	シロップ	
	安息香酸	しょう油	
	食用色素	赤色102号	ジャム
		赤色102号+黄色4号+青色1号	清涼飲料水
		黄色4号+黄色5号	ジャム
赤色102号+黄色4号+黄色5号+青色1号		ゼリー	
赤色40号+赤色105号+赤色106号		清涼飲料水	
赤色102号+赤色106号		漬物	
赤色40号+赤色102号+黄色5号		漬物	
黄色4号+黄色5号+赤色102号		漬物	
黄色4号+赤色2号+赤色40号+赤色106号		漬物	
赤色2号+赤色102号+黄色4号+緑色3号		漬物	
黄色4号+赤色2号+赤色8号+赤色105号	ゼリー菓子		

#### 4. 食品添加物検査について

食品衛生外部精度管理調査では、食用色素の定性検査と食品添加物の定量検査を行っている。表1にこれまで食品添加物検査に採用した調査対象と使用基材を示す。食品添加物の基材は液体を中心に採用してきたが、昨年度は漬物を基材として使用した。固体部と液体部からの測定となったので、一部の参加者から固体部と液体部を分けて測るのかなど、質問を受けた。固体部と液体部で濃度が同じであることを確認済みであったが、その点においては基材として適切であったのか反省材料となった。一方、食用色素については、当初単独の色素の定性であったのが、現在は種々の色素のミックスでなおかつ濃度も低くしてあることから、不検出機関も多い傾向にある。食用色素の定性の約半数はTLC法であり、HPLC法は2003年より約10%増え、おおよそ40%であることがアンケートよりわかった。また、図5に使用したTLCの種類を推移を示す。調査を開始した2003年より化学修飾型、シリカゲルおよびセルロースの使用比率がほとんど変わっていないことも確認できた。しかし、タール系色素の定性では、公定法には化学修飾型とシリカゲルで行うことになっていることを考えると、標準操作手順書の見直しなどはほとんどされていない印象を受ける。

また、食品添加物の定量において、 $z$ -スコアのはずれ機関を調査した結果、検量線外での定量を行っていることが頻繁に観察された。そこで、参加機関で検量線のプロット数を確認したところ、10年前ぐらいまでは1点あるいは2点検量線での定量が行われていたが、現在はほぼ半数以上が5点以上のプロット数での検量線を採用していることがわかった。その中で原点を検量線に含めていたのが10年ぐらい前までは半数あったのが、現在は約30%と減少していることも確認された。このように、検量線の作成法も以前と変わりつつあり、適正な検量線になりつつある。た

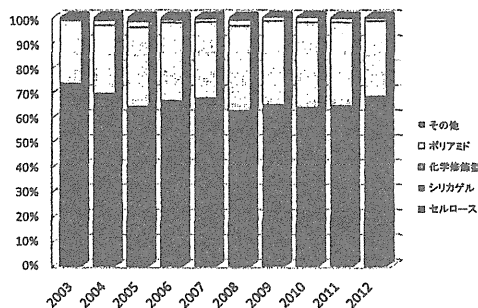


図5. 使用したTLCの種類を推移

だし、ここで取り上げた検量線に関しては、食品添加物に限らずほかの定量でも見受けられることを追記しておく。表2に食品添加物検査における変動係数を示す。これらの濃度範囲において、Horwitzの修正式と比較すると、全体的に近い変動係数（室間相対標準偏差）を示し、ロバスト法での変動係数が従来法と比べて小さいことが分かる。これは、ばらついた測定値を置き換えることにより、ばらつきが小さくなり、はずれ機関が多くなることが分かる。

#### 5. 解析結果の基本的な考え方

理化学調査における解析結果の基本的な考え方を示す。まず、データ・クリーニングまたは2シグマ処理によって除外された場合は、報告値が参加機関全体の平均値から大きく離れていることを意味する。すなわち、信頼性確保システムの基本的な管理および運営に問題がある可能性がある。試験品の管理、試験法、機器の管理、試薬等の管理、報告書の作成、内部点検、信頼性保証体制について検証する必要がある。特に、データ・クリーニングで除外された場合には単位の付け間違い、転記ミス、希釈倍率など