

201426036A

厚生労働科学研究費補助金
(食品の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26年度
総括・分担報告書

■主任研究者

一般財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所 渡 辺 卓 穂

■分担研究者

大阪府立公衆衛生研究所 尾 花 裕 孝

星薬科大学 薬品分析化学教室 齊 藤 貢 一

独立行政法人 産業技術総合研究所 鎗 田 孝

一般財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所 渡 辺 卓 穂

平成27年(2015年)5月

厚生労働科学研究費補助金
(食品の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 26 年度
総括・分担報告書

■主任研究者

一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所 渡辺 卓穂

■分担研究者

大阪府立公衆衛生研究所 尾花 裕孝

星薬科大学 薬品分析化学教室 斉藤 貢一

独立行政法人 産業技術総合研究所 鎗田 孝

一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所 渡辺 卓穂

平成 27 年(2015 年)5 月

目次

I. 総括研究報告書	
検査機関の信頼性確保に関する研究	3
渡辺 卓穂	
II. 分担研究報告	
1. 残留分析の測定に与える食品成分の影響に関する研究	35
尾花 裕孝	
2. 食品中に残留するマイコトキシン分析に係る精度管理体制の構築に関する研究	89
斉藤 貢一	
3. 同位体希釈質量分析法による残留農薬の高信頼性分析に関する研究	101
鎗田 孝	
4. 食品衛生外部精度管理調査用適正試料(理化学検査、微生物学検査、アレルギー物質検査、組換え DNA 技術応用食品検査、カビ毒検査)の作製検討と信頼性確保に関する研究	115
渡辺 卓穂	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	197
IV. 研究成果の刊行物・別刷	201

厚生労働科学研究費補助金(食品の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 26 年度 総括研究報告書

主任研究者 渡辺 卓穂

平成 27 年(2015 年)5 月

検査機関の信頼性確保に関する研究

総括研究報告書

主任研究者 渡辺 卓穂 一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所 部長

研究要旨

輸入食品及び国内の流通食品が急増する中、多種多様な食品を対象とした食品衛生検査が実施されている。食品の安全性を確保するためには、重金属、残留農薬、病原微生物、動物用医薬品、遺伝子組み換え食品、アレルギー性物質、カビ毒などの汚染物質を含む多くの検査項目について、どの検査機関で実施しても正確で同等の結果が得られることが必要である。そのためには、検査結果の信頼性を確保する必要性があり、このひとつとして精度管理が挙げられる。特に外部精度管理は、共通試料を各検査機関に配布した後、各検査機関で検査を実施し、この結果を解析することにより、評価を行う。そのため、共通試料として用いる外部精度管理調査試料における均一性や安定性の担保、さらにはより実際の食材に近い調査試料の提供が求められる。すなわち、精度管理実施体制の整備や適正な精度管理用調査試料の開発と、これに付随した精度管理の実施は、検査機関における検査精度の確認や信頼性の確保に大きな役割を果たすこととなり、結果として食品の安全性の確保に対して大きく貢献するものと考えられる。そこで初年度は、1. 残留分析の測定値に与える食品成分の影響に関する研究（尾花分担研究）、2. 食品中に残留するマイコトキシン分析に関する精度管理体制の構築に関する研究（斉藤分担研究）、3. 同位体希釈質量分析法による残留農薬の高信頼性分析に関する研究（鎗田分担研究）、4. 食品衛生外部精度管理調査用適正試料（理化学検査、微生物学検査、アレルギー物質検査、組換えDNA技術応用食品検査、カビ毒検査）の作製検討と信頼性確保に関する研究（渡辺分担研究）の4課題について実施した。

分担研究者名＝尾花裕孝（大阪府立公衆衛生研究所衛生化学部長）、斉藤貢一（星薬科大学教授）、鎗田孝（（独）産業技術総合研究所上級主任研究員）、渡辺卓穂（（一財）食品薬品安全センター秦野研究所食品衛生事業部長）

A. 研究目的

輸入食品や国内食品の流通段階において、ヒトの健康に悪影響を与える恐れのある様々な危害物質等を行政検査により検査、確認して国民の食生活に安全と安心を提供することは国民に対する食品安全確認行政の重要な課題である。その一貫として食品衛生に関わる検査施設の検査精度や検査成績の信頼性を確保することは必要不可欠で

ある。特に食品衛生検査機関から提出される検査成績の信頼性を確保するためには、継続的にその検査精度を確認することが求められる。精度管理体制の充実を図ることは極めて重要であり、加えて農薬のポジティブリスト制の導入、残留農薬検査における試験法の妥当性確認ガイドラインが設定されるなど、一層の体制強化が求められている。

食品衛生法の一部改正に伴い導入された食品衛生検査機関に対する理化学的検査ならびに微生物学的検査の外部精度管理調査について、その進め方や得られた結果の基本的な評価方法を構築してきたが、いまだ十分とは言えず、とりわけ新規項目の検討や新規基材の選択と高品質な調査試料の作製などについては、継続した検討が必要である。

他方、輸入食品の急増に伴い、検疫所をはじめとする輸出入関連の食品衛生検査機関において ISO/IEC17025 試験所認定取得のために技能試験（外部精度管理）への参加が必須となり、外部精度管理調査のより一層の充実が求められている。近年、残留農薬検査には GC/MS や LC-MS/MS など質量分析が多用される一方で、食品マトリックスが測定系に影響を与えることが知られている。これらの検査対象物質を定量するにあたり、複雑な食品マトリックスの影響をどのように評価するかは、より正確な検査結果を得るうえでも非常に重要である。また、高信頼性分析により、外部精度管理で用いるマトリックスに依存しない絶対的な評価指標を得ることも必要である。

組換え DNA 技術応用食品検査では、標準品を持たない組換え DNA 技術応用食品も検

出されており、標準プラスミドや組換えタンパク質を代用品とした検査法も導入されてきている。また、アレルギー関連物質検査についても 7 品目が指定されており、精度管理調査もさらに充実を図る必要がある。これらに加えて食品中に含まれる微量危害物質（マイコトキシン等）の分析法については、検査結果のばらつきを抑えることにより、その結果が信頼性の高いものとなることに加え、国際的にも優れた水準の精度管理に関する検討と精度管理体制の構築が期待される。

食品衛生検査に関わる精度管理体制の構築は、食品の広範囲な流通により国内外を問わず、その分析精度を確認するうえでますます重要な課題として認識されている。食品衛生検査に関わる精度管理用調査試料の作製に加えて、アレルギー物質検査ならびに組換え DNA 技術応用食品検査における精度管理体制の構築、マイコトキシンの分析法と精度管理体制の整備については、信頼性確保の面からも急務である。

これらの検討結果は、精度管理システムの整備ならびに精度管理のための適正調査試料の作製検討とその提供に生かされ、食品衛生に関する検査機関から提出される検査成績の信頼性確保を一層充実させ、円滑な行政活動に資することが当研究班の目的である。

B. 研究方法

1 残留分析の測定値に与える食品成分の影響に関する研究（尾花分担研究）

残留農薬の GC-MS (MS) 分析時に生ずるマトリックス効果を抑制し、マトリックスマッチング検量線に匹敵するような汎用性の

高いマトリックス添加検量線を探索することを目的として共同研究を行った。農産物（ほうれん草およびえだまめマイクロペースト）から抽出した試験液に既知濃度の標準溶液を添加し、種々の検量線を用いて定量を行った。検量線に添加する汎用マトリックスとしてどのようなものが有効か、また試験液の調製方法、試験液濃度、注入量および使用機器の違いによる定量値への影響等について考察した。GC-MS (/MS) のイオン化法は電子イオン化法 (EI) とした。

協力機関に試験内容および事前準備が必要な試薬の説明を行うため、実施要領を事前送付した。農薬混合標準溶液 3 種類 [PL-1-2 (31 農薬)、PL-2-1 (31 農薬) および PL-3-3 (27 農薬) ; 各 20 ppm, アセトン溶液;和光純薬工業(株)製] のアンプル(1.2 mL, 各 2 本)、ブランク試料 2 種類 (マイクロペースト ; ほうれん草 500 g, えだまめ 1000 g ; (株) 新進製)、内部標準物質 (IS) としてリン酸トリフェニル [TPP ; 一級、25 g ; 和光純薬工業 (株) 製] を協力機関に送付した。なお、PEG については、各協力機関においてポリエチレングリコール 300 [ポリエチレングリコール 300 ; 一級、500 g ; 和光純薬工業 (株) 製] を調達し、野菜果実ジュース [充実野菜 ; (株) 伊藤園製] は班会議時に配布した。

大阪府の事前検討 (大阪府) 試験液調製方法は以下のように行った。すなわち、試料または野菜果実ジュース 10.0 g をポリプロピレン製 50 mL 遠心管に精秤した。これにアセトニトリルを正確に 20 mL 加え、ホモジナイザーで 1 分間抽出した。次に塩化ナトリウム 1 g および無水硫酸マグネシウム 4 g、クエン酸三ナトリウム二水和物 1 g

およびクエン酸二ナトリウムセスキ水和物 0.5 g を添加して 1 分間強く振とうした後、遠心分離 (3000 rpm ; 10 分間) した。次にアセトニトリル層をあらかじめアセトニトリル/トルエン (3/1, v/v) 30 mL でコンディショニングした GCB/PSA カラム [ENVI-CARB II/PSA, 500/500 mg ; SUPELCO] に 8 mL 負荷し、30 mL のアセトニトリル/トルエン (3/1, v/v) で溶出した。抽出液を負荷した際の通過液と溶出液は、100 mL のナス型フラスコに回収し 40°C の水浴上で減圧濃縮した。乾固直前で減圧濃縮を終了し、残余の溶媒は窒素気流下で除去し、アセトン/ヘキサン (1/1, v/v) を用いて正確に 1 mL に溶解した (試料 : 4 g/mL 相当)。

なお、抽出液を C18 カラム [ENVI-18, 1000 mg ; SUPELCO] で追加精製する場合は、GCB/PSA カラムの上方に C18 カラム (あらかじめアセトニトリル 10 mL でコンディショニングしたもの) を接続し精製を行った。遠心分離後のアセトニトリル層を C18 カラムに 8 mL 負荷し、10 mL のアセトニトリルで溶出した。溶出後、C18 カラムを取り除き、残った GCB/PSA カラムに 30 mL のアセトニトリル/トルエン (3/1, v/v) を注入し溶出した。抽出液を負荷した際の通過液と溶出液は、100 mL のナス型フラスコに回収し 40°C の水浴上で減圧濃縮した。乾固直前で減圧濃縮を終了し、残余の溶媒は窒素気流下で除去し、アセトン/ヘキサン (1/1, v/v) を用いて正確に 1 mL に溶解した (試料 : 4 g/mL 相当)。

一方、各協力機関の試験液調製方法は、各協力機関が残留農薬試験で用いる SOP に準じた方法を用いた。

検量線の調製には以下の 5 種類の検量線

(A～E) を用いて、定量を行った。

検量線 A：マトリックスマッチング

検量線 B：溶媒標準

検量線 C：VFJ 添加

検量線 D：PEG 添加

検量線 E：VFJ+PEG 添加

また、各標準溶液および試験液には、絶対検量線法または内部検量線法のどちらでも評価できるよう、IS を一定濃度（試料 1 g に対して 50 ng）添加した。

調製方法については、ブランク試験液、PEG 溶液、農薬混合標準溶液、リン酸トリフェニル溶液をホールピペット（0.2 または 0.5 mL）を用いて等量ずつ混合して、検量線を調製した。試験液は、ほうれん草およびえだまめのブランク試験液に試料 1 g に対し 50 ng の濃度になるよう標準溶液を添加した。また、検量線 D および E に関しては、定量に用いる試験液にも PEG を添加する共注入法を採用した。試験液、農薬標準溶液および試薬の濃度は、「最終試験液 X g/mL 相当の試験液を GC-MS (MS) に Y μ L 注入する」としたとき、以下の計算式に基づいて算出した。

- ・ブランク試験液および VFJ：試料換算 [4 \times X] g/mL 相当の液を調製する。
- ・PEG 溶液：[0.2/Y] % の PEG300 溶液を調製する。
- ・農薬混合標準溶液：3 種類の農薬混合標準溶液を混合し、[400 \times X]，[300 \times X]，[200 \times X]，[100 \times X] ppb に順次希釈する。
- ・リン酸トリフェニル溶液：[200 \times X] ppb 溶液を調製する。

なお、上記の濃度の算出に関しては、計算シートを配布し、計算ミスの防止を行った。

残留農薬分析の SOP に準じた方法でほうれん草、えだまめおよび野菜果実ジュースのブランク試験液を調製した（通常 SOP で分析する試験液濃度の 4 倍濃度の試験液：4 g/mL）。大阪府の SOP では、ほうれん草および野菜果実ジュースの精製には GCB/PSA を単独で用い、えだまめの精製には C18 と GCB/PSA を併用しているが、本研究では精製によるマトリックス効果の影響を検討するため、ほうれん草およびえだまめの精製は GCB/PSA 単独と C18+GCB/PSA の併用の 2 種類とした。野菜果実ジュースは SOP に準じ GCB/PSA のみで精製を行った。

PEG 溶液は 0.5% の濃度にアセトン/ヘキサン（1/1, v/v）で希釈した。リン酸トリフェニル溶液は 200 ppb の濃度になるよう、アセトン/ヘキサン（1/1, v/v）で希釈し調製した。

5 種類の検量線を調製し、ブランク試験液に農薬混合標準溶液を 50 ppb になるよう添加した試験液を各検量線で定量した。検量線は試験液の分析前後に 2 回測定を行い、平均面積値で検量線の傾き、切片、相関係数 (r^2) を算出した。

絶対検量線法（IS 補正なし）および相対検量線法（IS 補正あり）を用い、50 ppb と定量された場合を回収率 100% として、それぞれの試験液における回収率を算出し、マトリックス補正効果の指標とした。判定基準は、回収率が 100 \pm 10% の範囲を「良好な結果」として判定した。

一方、各協力機関の試験液調製方法は、各機関の農薬 SOP に準じた方法で行い、計算シートに基づき算出した濃度の試験液、PEG 溶液およびリン酸トリフェニル溶液の調製を行った。

検量線は5種類調製した。各協力機関は、GC-MS (MS) のカラムおよびインサートを新品に交換し、一定の安定化を行った後にシークエンスを作成し、分析を行った。初めに、検量線 A (マトリックスマッチング) を用いて試験を行い、絶対検量線法を用いた定量結果について、各協力機関の測定可能な農薬数の9割以上が回収率90~110%の範囲であることを確認した。これによってGC-MS (MS) の状況を含めて実験系が正常であることが確認される。90~110%の回収率に入る農薬数が9割に満たない場合は、再度、装置の安定化、農薬混合標準溶液の再調製を行い、9割以上が良好な結果を得ていることを確認した。

その後、検量線 B、C、D および E の検量線による定量を順次行った。

マトリックス補正効果の判定基準は、事前検討と同様に、回収率が100±10%の範囲を補正可能な目安として「良好な結果」と判定した。

評価方法として、各協力機関には、あらかじめ送付しておいたエクセルファイルに、試料毎に検量線に用いた標準溶液、試験液(ブランクおよび添加)の面積値を入力し、ファイルを大阪府に提出することを求めた。

提出されたデータから絶対検量線法および相対検量線法のそれぞれについて、検量線の傾き、切片、 r^2 を計算し、各農薬の回収率を算出した。算出した回収率から度数分布表を作成し、マトリックス補正効果について考察した。

2 食品中に残留するマイコトキシン分析に係る精度管理体制の構築に関する研究(斉藤分担研究)

試料には、東京都内で市販されているとうもろこし(アメリカ産およびフランス産)、落花生(中国産および日本産)、白コショウ(インドネシア産、スリランカ産およびマレーシア産)および黒コショウ(インド産、スリランカ産およびマレーシア産)を用いた。抽出操作は、ハンドミキサーにより粉碎均一化した試料2.5 gを50 mL容のポリプロピレン製遠沈管に取り、これに塩化ナトリウム0.25 gと精製水およびメタノール(1:4)混液10 mLを加え、30分間振とう機を用いて振とう抽出した。抽出溶液を桐山ロートで吸引ろ過し、ろ液5 mLを量り採り、7% TritonX 水溶液(とうもろこしおよび落花生はPBS)を加えて正確に25 mLとした。十分混合した後、遠心分離(5000×g、5分間)し、上清10 mLを試料抽出液とした。SPDE法によるクリーンアップは以下のように行った。すなわち、固相抽出用ゲル(以下、固相と略)を調製するため、予め、カートリッジからイムノアフィニティーゲルを全量取り出し、PBS 1 mLに懸濁させた。この懸濁液を抽出操作で作製した抽出液10 mLが入った15 mLの遠沈管に添加した。試料中に固相を分散させるためにボルテックスミキサーにより30秒間攪拌させた後、遠心分離(2500×g、20秒間)を行い、固相と液相を分離させた。次にマイクロピペットにより液相を取り除き、洗浄液としてPBS 6 mLを加えて固相を再度分散させ、同様の操作を行った。その後、精製水6 mLを加え、同様の手順で固相を再度洗浄後、液相を1 mL程度残して除去した。

固相蛍光誘導体化法の操作方法は、SPDE法によるクリーンアップで調製した固相の懸濁液をマイクロピペットを用いてキャッ

プチューブ™に移動させた。固相内の水分を除去するために、遠心分離(2500×g、20秒間)を行い、TFA 100 μLを添加後、ボルテックスミキサーで30秒間攪拌し、10分間暗所で放置した。その後、遠心分離(2500×g、20秒間)を行い、溶出液として精製水 900 μLで固相を分散させ同様に遠心分離後、先の溶出液(TFA 100 μL)と合わせ、その50 μLをHPLC-FLで測定した。HPLCには、日立社製 L-6300 Intelligent Pumpを、検出器には島津製作所製 RF-10A_{XL}を用い、励起波長は365nm、蛍光波長は450nmとした。カラムには、化学物質評価研究機構製 L-column2 ODS (250 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm)を用い、移動相にはアセトニトリル/メタノール/水 = (1:3:6)を用いた。カラム温度は40℃、移動相流速は0.5 mL/min、試料注入量は50 μLとした。

精度管理試験として、真度、併行精度および室内再現精度など分析法バリデーションのために、市販のとうもろこし、落花生、白コショウおよび黒コショウを対象として添加回収試験を行った。抽出・クリーンアップおよび蛍光誘導体化操作は上記に準じて行なった。AFs添加濃度は1.0 ng/gとし、一日に3回測定を繰り返し、これを5日間行って得られたデータを一元配置分散分析法で統計解析した。

3 同位体希釈質量分析法による残留農薬の高信頼性分析に関する研究(鎗田分担研究)

IDMSにおけるマトリックス効果を検証するために、マトリックスの有無別の検量線溶液を用いて検量線を作成し、その差異を検討した。その際、平成25年度外部精

度管理調査試料(残留農薬検査I)の基材であったとうもろこしペーストを、平成17年1月24日付け食安発第0124001号の通知試験法(一斉試験法)に準拠して処理した前処理液を、マトリックスとして用いた。前述の一斉試験法と、同通知における個別試験法をベースとしたIDMSによって、平成26年度に実施した残留農薬検査Iの調査試料(かぼちゃペースト)を分析し、その結果を参照値や参加機関の結果と比較した。

試料として、とうもろこしペースト、平成26年度外部精度管理調査(残留農薬検査I)の調査試料(かぼちゃサンプル)、及びその基材であるかぼちゃペーストは、食品薬品安全センター秦野研究所より提供された。標準品は、測定対象農薬の高純度標準品を用いた。

質量比混合法によってマトリックス効果の検証用溶液は以下のように調製した。9種類の分析対象農薬およびその標識体を、各々の濃度が62.5 mg/kgとなるようにアセトン(Ac)に希釈した。また、各標識体を6.25 mg/kgとなるようにAcに希釈した。両溶液とAcを混合し、6種類の検量線溶液(マトリックス無、以下MF検量線溶液A)を調製した。検量線溶液中の分析対象農薬の濃度は0.25~6.25 mg/kg、各標識体の濃度は1.25 mg/kgとした。あらかじめ分析対象農薬とその標識体を含むかないことを確認したもろこしペーストを、前処理法によって処理した。得られたブランク溶液を窒素気流で乾固し、MF検量線溶液Aに溶解させることにより、マトリックスマッチングした検量線溶液(以下MM検量線溶液A)を調製した。また、

外部精度管理調査試料の分析用溶液は以下のように調製した。3.153 mg/kg の EPN- d_5 、0.5018 mg/kg の クロルピリホス- d_{10} を含む Ac 溶液を調製し、内標準溶液とした。また、Ac 中に 61.08 mg/kg を含む アラクロール溶液を調製し、さらにこの一部を Ac に希釈して 1.593 mg/kg とした シリンジスパイク溶液を調製した。次に、12.39 mg/kg の EPN、2.112 mg/kg の クロルピリホスを含む Ac 溶液(農薬混合溶液)を調製し、これと内標準溶液、アラクロール溶液、Ac を混合し、0.7846 mg/kg の EPN、0.1338 mg/kg の クロルピリホス、0.8894 mg/kg の EPN- d_5 、0.1441 mg/kg の クロルピリホス- d_{10} 、1.520 mg/kg の アラクロールを含む混合溶液を調製した。あらかじめ分析対象農薬とその標識体を含有しないことを確認したかぼちゃペーストを、前処理法によって処理した。得られたブランク溶液を窒素気流で乾固し、前述の混合溶液に溶解させることにより、マトリックスマッチングした検量線溶液 B を調製した。

とうもろこしペーストの前処理及び測定と、外部精度管理調査試料の分析には分析法 1 を適用し、また、外部精度管理調査試料の分析は分析法 2 によっても行った。

マトリックス効果の検証をするために標識体に対する分析対象農薬の含有量比と面積比との関係を表した検量線を作成し、その傾き等からマトリックス効果の影響を評価した。

外部精度管理調査試料の分析について次式から農薬濃度を求めた。

$$C = F_c \times \frac{R_s}{R_c} \times \frac{F_c \times M_c \times C_c \times P \times M_{sp(s)}}{M_s \times M_{sp(c)}}$$

ただし、 C : 試料中の農薬濃度、 F_c : 前処理の精度に関わる係数 (= 1)、 R_s : 試料溶液測定における分析対象農薬の標識体に対する面積比、 R_c : 検量線用液 B の測定における分析対象農薬の標識体に対する面積比、 F_c : 検量線用液 B の調製ばらつきに関わる係数 (= 1)、 M_c : 検量線用液 B 中の農薬混合液の質量、 C : 農薬混合液中の測定対象農薬の高純度標準品の濃度、 P : 分析対象農薬の高純度標準品の純度、 $M_{sp(s)}$: 試料に添加した内標準溶液の質量、 M_s : 試料量、 $M_{sp(c)}$: 検量線用液 B 中の内標準溶液の質量、である。その不確かさは、(1) 式の各項の不確かさを評価し、これらを合成して求めた。

4 食品衛生外部精度管理調査用適正試料(理化学検査、微生物学検査、アレルギー物質検査、組換え DNA 技術応用食品検査、カビ毒検査)の作製検討と信頼性確保に関する研究(渡辺分担研究)

4.1 理化学検査のための適正調査試料の作製検討:

市販の玄米および精米のそれぞれ新米(平成 26 年産)ならびに古米(平成 22 年産)、以下、米類、枝豆ペースト(新進)を用いた。試料作製として、玄米および精米は基材成分の農薬に対する影響の確認として、玄米および精米それぞれの古米ならびに新米を用い、加熱処理の有無の違いについて、添加農薬の回収率および安定性を検討した。加熱処理を行う場合は、条件を 60°C で 6 時間とし、加熱後、室温まで放冷し、以下の操作を行った。基材である米類をそれぞれ遠心粉砕機で粉砕、粉末化後、直ちに 10 g をそれぞれ量り採り、添加用農薬混合標準液(ダイアジノン、クロ

ルピリホスおよびマラチオン 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、フェニトロチオン 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、アセトン溶液) 1 mL を正確に加え、試料に十分浸潤させた(理論値:ダイアジノン、クロルピリホスおよびマラチオン 0.1 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、フェニトロチオン 0.2 $\mu\text{g}/\text{g}$)。また、同様に粉碎、粉末化した米類それぞれに、添加用農薬混合標準液の代わりにアセトン 1 mL を添加し、ブランク試料とした。

これらの試料について、各農薬の回収率および冷蔵保存(加熱した米類については 0、5、10、20、30 および 60 日間、非加熱の米類は 0、5、10、20 および 30 日間)における安定性を検討した(各 $n=3$)。

枝豆ペーストに水分および油分として大豆油を添加し、均質化した基材に農薬標準液を添加したものについて、冷凍保存による安定性(0、1、2、3、6 および 9 か月間)を評価した。

ブrikサーを用いて均質化した枝豆ペースト 2 kg に、水を 5%、10% および 20%、ならびに大豆油を 2%、5% および 10% となるように各々添加後、ブrikサーを用いて均質化した。これに添加用農薬混合標準液(ダイアジノン 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、クロルピリホス 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、マラチオンおよびフェニトロチオン 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、アセトン溶液) 10 mL を正確に加え、更に、ブrikサーを用いて混合した。各々 100 g を量りとり、容器に入れ冷凍保存した(理論値:ダイアジノン 0.01 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、クロルピリホス 0.3 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、マラチオンおよびフェニトロチオン 0.5 $\mu\text{g}/\text{g}$)。また、同様に前処理をした枝豆ペーストに水 5%、10% および 20%、ならびに大豆油を 2%、5% および 10% となるように各々添加後、添加用農薬

混合標準液の代わりにアセトンを添加し、同様に操作して得られた試料を、水 5%、10% および 20%、および油 2%、5% および 10% ブランク試料とした。これらの、冷凍保存における安定性を検討した。

測定操作は、「食品衛生検査指針 残留農薬編(2003)」に準じた。すなわち、試料 10.0 g を量り採り、アセトン 100 mL で 1 回、更に 50 mL で 2 回オムニミキサーを用い、抽出した。抽出液を合わせ、40°C 以下でアセトンを留去した。濃縮物に飽和塩化ナトリウム溶液 100 mL を合わせ、これに *n*-ヘキサン 100 mL を加え振とうした。*n*-ヘキサン層をとり、残った水層に酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1:4) 100 mL を加え、上記の操作を 2 回繰り返す。酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1:4) 層を *n*-ヘキサン層に合わせた。これに適量の無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら 15 分間放置後、40°C 以下で酢酸エチル/*n*-ヘキサンを留去した。残留物に *n*-ヘキサンを加えて溶解させ、正確に 10 mL とした後、GC (FPD) で測定した。

なお、玄米および精米試料の測定においては、試料採取後、水 20 mL を加え 2 時間膨潤させた後、アセトンによる抽出操作を行った。また、酢酸エチル/*n*-ヘキサンを留去後、以下の操作を行った。残留物をアセトニトリル飽和 *n*-ヘキサン 30 mL に溶解し、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加えて振とうした。アセトニトリル層をとり、残った *n*-ヘキサン層に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え、上記の操作を 2 回繰り返す。アセトニトリル層を合わせた後、アセトニトリルを留去した。残留物に *n*-ヘキサンを加えて溶解

させ、正確に 10 mL とした後、GC (FPD) で測定した。なお、各農薬の定量には絶対検量線を用いた。

4.2 微生物学検査のための適正調査試料の作製検討：

試験菌株は、秦野研究所に保存してある以下の菌株を用いた。また、試験菌株は 5 継代以内のものを使用した。

腸炎ビブリオ検査用調査試料の検討では、外部精度管理調査試料の滅菌ロットに相当する 40 個単位で調製を行い、調査試料の基材であるこうや豆腐の有用性を検討した。試験操作は国立医薬品食品衛生研究所 HP で公開されている NIHSJ-06-ST3 (定性試験法) および NIHSJ-07-ST2 (定量試験法) に従って実施した。樹脂製容器 40 個に個別に収納したこうや豆腐 (約 16.5 g/1 個) を 121°C で 40 分間高圧蒸気滅菌後、その全てについて無菌性を確認した。

無菌性が確認された方法で滅菌したこうや豆腐を用い、調査試料の安定性確認試験を実施した。Marine agar (Difco) に 37°C で 24 時間培養した試験菌を添加剤含有 Marine broth (Difco) に接種し、同様に培養した培養液を適宜希釈したものを試験菌液とした。試験菌液 50 mL を滅菌済こうや豆腐に添加したものを調査試料とした。調査試料は冷蔵保存し、保存 0、7、14、21、28 日後に定性試験、寒天平板表面塗抹法および最確数法による生菌数測定を実施した。併せて損傷菌の回復に効果があるとの報告があるピルビン酸を添加した試験菌液で調査試料を作製し、保存 14、21、28 日後に同様の試験を実施してピルビン酸による生菌数低下の抑制効果を検討した。定性試験お

よび最確数法では、TCBS 寒天培地 (日水製薬、栄研化学、極東製薬、OXOID、MERCK)、X-VP 寒天培地「ニッスイ」(日水製薬)、CHROMagar Vibrio (関東化学)、ビブリオ寒天培地「ニッスイ」(日水製薬)、ES ビブリオ寒天培地 (栄研化学) の 9 種の選択寒天培地を使用した。最確数法の結果は、3%NaCl 添加標準寒天培地を用いて寒天平板混釈法で得られた生菌数と比較した。

セレウス菌検査用調査試料の検討については、外部精度管理調査試料の滅菌ロットに相当する 30 個単位で調製を行い、調査試料の基材である米飯の有用性を検討した。試験操作は食品衛生検査指針 (微生物編) に収載の試験法に準拠して定性試験および定量試験を実施した。調査試料は 121°C で 40 分間高圧蒸気滅菌した米飯を使用した。高濃度 NaCl 溶液で 10^5 CFU/mL に調整した試験菌液 (芽胞液) を滅菌済の米飯に接種し、十分に吸収させたものを調査試料とした。調査試料は、冷蔵および 32.5°C で保存し、接種 0、4、8 週間後に定性試験および定量試験を実施した。定性試験では NGKG 寒天培地 (日水製薬)、MYP 寒天培地 (OXOID)、セレウス選択培地 (MERCK) の 3 種の選択寒天培地を使用した。定量試験では、標準寒天培地を用いた寒天平板表面塗抹法または寒天平板混釈法による生菌数測定、ならびに定性試験の 3 種の選択寒天培地を用いた寒天平板表面塗抹法による生菌数測定を実施した。

微生物担体による安定化技術の検討については、現在運用している調査試料の菌数の安定化を妨げる要因として、食品と微生物が直接接触していることが挙げられる。この問題を解消する手段として、バイオリ

アクター等に利用されている人造いくらの作製方法を用いて微生物担体を作製し、その安定性を検討した。

標準寒天培地で培養した試験菌を生理食塩液に懸濁し、 10^4 CFU/mL 相当の試験菌液を調製した。試験菌液を 0.5%アルギン酸ナトリウム含有生理食塩液に加え、約 0.05 mL ずつ 5%塩化ナトリウム溶液に滴下した。なお、微生物担体 1 個 (約 0.05 mL) あたりの生菌数が 50~100 CFU となるように調製した。滴下 30 秒後に形状を崩さないように塩化ナトリウム溶液から回収し、生理食塩液に浮遊させた。これを冷蔵保存し、保存 0、1、2、5、6、7 日後に微生物担体 10 個の生菌数を測定した。併せて試験菌液の残液を試験対照とし、同様に保存および生菌数測定を実施して 0.05 mL あたりの生菌数を算出した。

4.3 アレルギー関連物質検査のための適正調査試料の作製検討：

落花生は国産生落花生 (千葉半立種)、中国産生落花生およびアメリカ産生落花生、その他にレトルトパウチ食品であるゆで落花生 (千葉半立種) をそれぞれ購入して使用した。食品は原材料の欄に落花生を使用した旨の表示が無い、こしあん、チョコレートクリーム、白がゆ、かぼちゃペースト、とうもろこしペースト、ブロッコリーペースト、豆腐、高野豆腐、カスタードクリーム、いちごジャム、ビスケット、鶏がらスープの素、いりごま、米粉、小麦粉、ハンバーグ、あさり缶詰、魚肉ソーセージ、鯖缶詰、オリーブオイル、ココアパウダー、ミルクココア、チョコレート、チョコクッキー、シナモン、ミックスベリーを購入し

て使用した。

落花生からのタンパク質抽出は通知法標準品規格に記載の方法に従って実施した。落花生はミルサー IFM-700G (岩谷産業株式会社) で粉碎したものを使用した。抽出には振とう機：RECIPRO SHAKER NR-I および Double Shaker R-30 mini (以上 TAITEC)、遠心機：himac CF 16RX (日立工機株式会社) を使用した。落花生から抽出したタンパク質の濃度は 2-D Quant Kit (GE ヘルスケアバイオサイエンス株式会社) を用いて定量した。

特定原材料 (落花生) タンパク質の定量は ELISA 法により実施した。すなわち日本ハム社製の FASTKIT™ エライザ Ver. III 落花生キット (N キット)、森永生科学研究所製の FASPEK エライザ II 落花生キット (M キット) およびプリマハム社製のアレルゲンアイ® ELISA II 落花生キット (P キット) を使用した。吸光度測定および濃度計算にはマイクロプレートリーダー EL 808IU および計算ソフトウェア DeltaSoft JV Ver. 1.80 (Bio-Tek Instruments, Inc.) を使用した。また、SDS-PAGE はゲルに SDS-PAGE mini (テフコ) を使用し、電気泳動槽 STC-808 (テフコ) により行った。泳動後のゲルはコロイド CBB 染色キット (テフコ) で染色した。分子量マーカーには SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (invitrogen) を使用した。

試料の作製は、中国産生落花生よりタンパク質抽出を行い、落花生タンパク質溶液を調製した。次に、こしあんおよびチョコレートクリームに落花生タンパク質溶液をそれぞれ 10.7 μ g/g、10.8 μ g/g となるよう添加し、フードプロセッサー：MK-K58 (松下電器産業株式会社) で均質になるまで混合した

後、遠沈管に分注して試料を作製した。作製した試料はいずれも-20℃で凍結保存した。

4.4 組換え DNA 技術応用食品検査のための適正調査試料の作製検討：

外部精度管理調査試料の調製には、国立医薬品食品衛生研究所より供与された遺伝子組換えコメ陽性コントロールプラスミド（以下、陽性プラスミドとする）および ColE1/TE、また、神奈川県内で購入した国産米粉 2 種（米粉①および米粉②）およびタイ産ライスヌードル 1 種を使用した。なお、タイ産ライスヌードルは孔径 1.0 mm のスクリーンを装着した超遠心粉砕機 ZM200（レッチェ）で粉砕したもの（ライスヌードル粉砕物）を使用した。米粉①から Genomic-tip100/G（QIAGEN）を使用し通知法のプロトコールに従って DNA 溶液を抽出し、水で 10 ng/ μ L に調整したものを nonGM コメ DNA 溶液とした。なお、遠心分離には多用途小形遠心機 CF16RX（日立工機）、恒温槽には DryThermoUnit DTU-2B（TAITEC）、吸光度測定には Gene Quant pro（GE ヘルスケアバイオサイエンス）を使用した。

外部精度管理調査試料の調製として、DNA 溶液試料は、陽性プラスミドを nonGM コメ DNA 溶液で希釈し、試料 C（高濃度陽性試料；100 コピー/ウェル）、試料 A（中濃度陽性試料；40 コピー/ウェル）および試料 B（低濃度陽性試料；20 コピー/ウェル）を調製した。また、nonGM コメ DNA 溶液を試料 D（陰性試料）とした。

コメ粉砕物試料は米粉②を 15 mL 容の遠沈管に 500 mg ずつ分注し、このうち半分は ColE1/TE で希釈した陽性プラスミド溶液

（3000 copies/ μ L）を 10 μ L ずつ添加し、試料 1（GM quicker2 抽出用 陽性試料）とした。残り半分には陽性プラスミド溶液を添加せず、試料 2（GM quicker2 抽出用 陰性試料）とした。また、ライスヌードル粉砕物を 50 mL 容の遠沈管に 2.0 g ずつ分注し、同様に陽性プラスミド溶液（6000 copies/ μ L）を 10 μ L ずつ添加し、試料 4（Genomic-tip100/G 抽出用 陽性試料）とした。残り半分にはプラスミド溶液を添加せず、試料 3（Genomic-tip 100/G 抽出用 陰性試料）とした。

外部精度管理調査の実施については、外部精度管理調査参加機関には DNA 溶液試料 4 試料（試料 A、試料 B、試料 C および試料 D）各 1 本、コメ粉砕物試料 4 試料（試料 1、試料 2、試料 3 および試料 4）各 2 本を、実施要領および報告書書式とともに送付した。参加機関での検査は通知法に従うこととした。ただし、コメ粉砕物試料から DNA を抽出する際、試料 1 および試料 2 は GM quicker2 を、試料 3 および試料 4 は Genomic-tip 100/G を用いてそれぞれ 2 併行で実施することとし、試料の秤量は行わずに試料の入った遠沈管に直接抽出緩衝液を添加し、以降の操作を実施するよう依頼した。

すなわち参加機関は、通知法に従ってコメ粉砕物試料から抽出した DNA と、DNA 溶液試料のそれぞれについてコメ陽性対照用試験および CpTI 検出用試験のリアルタイム PCR 測定を実施した。次に各測定について Amplification plot を確認し、指数関数的な増幅が確認された場合は、Th. Line を 0.2 に設定して得られた Ct 値が 48 未満か否かにより、陰性試料または陽性試料の判

定を行った。

外部精度管理調査結果の統計解析については、参加機関の測定結果は試料ごとにまとめ、正答率を算出した。また、参加機関の Ct 値は、試料 A、試料 B および試料 C については CpTI 検出用試験、試料 1 および試料 4 についてはコメ陽性対照用試験および CpTI 検出用試験について、それぞれ正規確率プロットおよび z-スコア管理図を作成し、リアルタイム PCR 法による定性試験の結果の評価法について検討した。さらに試料 1 および試料 4 についてはコメ陽性対照用試験と CpTI 検出用試験の Ct 値の差についても同様に検討した。

4.5 カビ毒検査のための適正試料の作製検討：

アフマトキシン (AF) とグループ特異的に反応するマウスモノクローナル抗体 (MoAb2-3) は、「知の拠点あいち」重点研究プロジェクトを通して、堀場製作所製からマウス腹水として提供された。抗体は、33%飽和度の硫酸により不溶化させ、腹水中から分画した。この抗体分画を PBS (10 mmol/L リン酸ナトリウム、150 mmol/L 塩化ナトリウム；pH 7.0) に溶解し、さらに PBS を用いて透析を行い、抗体標品を得た。純度は、SDS-PAGE により 90%以上であることを確認した。

AFB1 のオキシム化は、AFB1 20 μmol をピリジン：メタノール：蒸留水 (1:4:1; v/v) 5.0 mL に溶解し、アミノオキシ酢酸ヘミ塩酸塩 72 μmol を加えて混合した。この混合液を加熱しながら 2 時間環流させることにより、AFB1 のカルボニル基にアミノオキシ酢酸ヘミ塩酸塩を結合させ、オキ

シム化を行った。

シリカゲルカラムクロマトグラフィー (1 g) (展開溶媒；クロロホルム：メタノール (9:1; v/v)) を用いて、上記反応液からオキシム化 AFB1 を含むフラクションを分画し、さらに、エバポレーターを用いて減圧濃縮を行い、オキシム化 AFB1 を得た。

HRP 標識 AFB1 の調製には、オキシム化 AFB1 20 μmol と、これと等量 (モル当量) の N-ヒドロキシスクシンイミド及び、EDC を脱水した DMSO 2.0 mL 中で混合した。この混合溶液を、室温で 1.5 時間静置し、オキシム化 AFB1 のカルボキシル基に N-ヒドロキシスクシンイミドを結合し、活性エステル化した。HRP 10 mg を PBS 1 mL に溶解し、上記の活性エステル 440 μL を加えた。室温で 1.5 時間ゆっくり攪拌しオキシム化 AFB1 のカルボキシル基と HRP に存在するリジン残基の ϵ アミノ基をアミド結合させた。

さらに、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー (担体：Sephadex G-25 Super-Fine (GE Healthcare) $\phi 15 \times 500$ mm, 展開溶媒：PBS) により HRP 標識 AFB1 を精製した。

直接競合 ELISA の構築では、96 ウェルマイクロタイタープレートに 5 $\mu\text{g/mL}$ 抗マウス IgG/10 mM PBS を 100 μL /ウェルで添加後、4℃で一晩静置し固相した。その後、0.4% BSA/10 mM PBS を 300 μL /ウェルで添加後、室温で 30 分静置し、ブロッキングを行った。そこに、0.2% BSA/10 mM PBS で 15 ng/mL に希釈した MoAb2-3 を 100 μL /ウェルで添加後、室温で 1 時間静置した。反応後、0.02% Tween20/10 mM PBS でウェルを洗浄し、0.2% BSA/10 mM PBS で 15 ng/mL に希釈した HRP 標識 AFB1 と測定対象 AF との等量混合液を 100 μL /ウェルで添

加し、室温で1時間静置して、競合反応させた。反応後、ウェルを洗浄し、HRP に対する基質（テトラメチルベンジジン）を加えて室温で10分間発色させ、0.5 mol/L 硫酸で発色を停止させた後、分光光度計（BIO-RAD 製 X-Mark）を用いて450 nmにおける各ウェルの吸光度を測定した。

4種AF（B1, B2, G1, G2）に対する反応性の確認においては、各AFを400、200、100、50、25、12.5、6.25、0（ブランク）pg/mLとなるように10%メタノールで希釈し、上記の測定対象AFとして直接競合ELISAに供試した。

添加回収試験として、市販の輸入ピーナッツバター（原材料名：ピーナッツ、砂糖、植物油、食塩）を用いて、AFの添加回収試験を実施した。ピーナッツバター2.5gに対して、NaCl 0.25g、80%メタノール10mLを加え、ピーナッツバター調製液とした。メタノールで1 μg/mLに希釈した各AF4種、及びそれらの等量混合物（各0.25 μg/mL）をそれぞれ、ピーナッツバター調製液に25 μLずつ添加した（試料中最終AF量：10 ng/g）。これらを30分間室温で振とうし、遠心分離により得られた上清を10%メタノール相当となるように蒸留水で希釈した。さらに、上記で構築した直接競合ELISAの測定範囲に収めるために、10%メタノールで15倍希釈した。これらの希釈液を上記の測定対象AFとして直接競合ELISAに供試した。

C. D. 研究結果および考察

1 尾花分担研究

検量線によるマトリックス補正効果の比較については、評価対象農薬89農薬のうち、ピレトリンは感度が低く、検出することが

できなかった。また、ほうれん草から微量のシペルメトリンが検出されたため、ほうれん草に関してはシペルメトリンを対象項目から除外した。このため、事前検討はピレトリンを除いた88農薬（ほうれん草はシペルメトリンをさらに除いた87農薬）を対象とした。検量線A（マトリックスマッチング）では、検量線、追加精製の有無および試料に関わらず、測定可能な農薬数（ほうれん草87農薬、えだまめ88農薬）の9割以上が回収率90~110%の範囲に入った。当該検量線では、試験液と標準溶液中のマトリックスが一致しているため、良好な結果が得られた。検量線B（溶媒標準）において、絶対検量線法では、追加精製の有無および試料に関わらず、ほうれん草およびえだまめ共に、回収率200%を超えるものが多かった。これは、いわゆるマトリックス効果による定量値の過大評価を如実に示していると考えられた。溶媒標準では、GC内の活性点に農薬が吸着し、質量分析計に到達する農薬が、マトリックスを含む試験液に比べ減少していることが要因と考えられた。相対検量線法を用いて定量した場合、ほうれん草およびえだまめ共に回収率が100%以下となる農薬が多数確認された。また、追加精製を行った場合、若干の回収率の改善が認められたが、当該検量線では、内部標準による補正を用いても良好な回収率を示す農薬は少なかった。検量線C（VFJ添加）において、ほうれん草では、農薬の回収率が広範囲に分布する傾向が認められた。この傾向は検量線の種類、追加精製の有無に関わらず同じであった。絶対検量線法では過剰定量される農薬が多い傾向が認められたが、追加精製を行うことで良好な結果

を示す農薬数が増加した。相対検量線法では、検量線 B と同じく、回収率は低めの傾向を示したが、検量線 B よりも良好な結果を示す農薬数は増加した。えだまめに関しては、多くの農薬が良好な回収率を示した。特に C18 による追加精製を行った場合、絶対検量線法、相対検量線法ともに 88 農薬中 60 農薬以上が良好な結果を示した。検量線 D (PEG 添加) においては、一部の農薬 (シハロトリン、シフルトリン、フェンバレレートおよびホスメット等) に関して、ピーク面積値が低下した。これらの農薬では、濃度とピーク面積値の間での比例関係が脆弱であり、検量線の直線性の指標となる r^2 も 0.990 を下回った。これらの現象については追試確認を行い、1-2 および 1-3 の項で記述した。定量値は、検量線の直線性に関わらず、得られた検量線で定量し、度数分布に反映した。試料および追加精製の有無に関わらず、絶対検量線法では過剰定量される農薬が多かった。相対検量線法では過剰定量の傾向は認められるものの、絶対検量線法に比べて若干の回収率の改善が認められた。検量線 E (VFJ+PEG 添加) では、絶対検量線法において、ほうれん草およびえだまめ共に良好な結果を示す農薬の割合が高かった。また、追加精製により良好な結果を示す農薬数は増加し、ほうれん草で 87 農薬中 56 農薬、えだまめで 88 農薬中 67 農薬が良好な結果を示した。相対検量線法においては、絶対検量線法に比べて若干過剰定量の傾向が認められた。ほうれん草にその傾向が強く、追加精製を行った場合、110~130%の回収率を示す農薬の度数が最も多くなり (87 農薬中 56 農薬)、良好な結果を示す農薬数は 7 農薬にとどまった。一

方、えだまめは、精製度に関わらず 6 割以上の農薬が良好な結果を示した。

標準溶液連続測定による農薬感度とその安定性の比較では、前述のとおり検量線 D において、一部の農薬に関してピーク面積値の低下、ならびに濃度とピーク面積値の間で比例関係の脆弱性 (検量線の直線性の低下; $r^2=0.990$ 未満) が認められた。これらの現象の要因を検証するため、各検量線 B~E に含まれる濃度点 (50 ppb) を代表濃度点として調製し、連続 (25 回) 分析を行った。最初の 5 回は機器の安定化を図るための捨て分析とし、残りの 20 回のピーク面積値について平均値、標準偏差および相対標準偏差 (RSD) を算出した。相対面積値を比較すると、検量線 C は、検量線 B と比較して概ね 200~400%のマトリックス効果を示した。検量線 D は、200~1000%のマトリックス効果を示す農薬がある一方で、農薬 (ホスメット、シハロトリン、フルキンコナゾール、シフルトリン、シペルメトリン、フルシトリネート、フェンバレレート、フルバリネートおよびデルタメトリン) 等は PEG を添加しても面積値が増大せず、検量線 B の約 60%以下の強度に低下していた。これらの傾向は、検量線 E では面積値増大の傾向が認められたが、100~250%程度にとどまった。RSD を比較すると、マトリックスを添加した検量線 C~E は概ね 5%以下と安定した面積値を保った。しかし、PEG 添加で面積値の低下が認められたホスメット、シハロトリン、フルキンコナゾール、シフルトリン、シペルメトリン、フルシトリネート、フェンバレレート、フルバリネートおよびデルタメトリンは RSD が 20%を超えた。すなわち、検量線 D の濃度と面積

値の間での比例関係の脆弱性が認められた農薬は、連続測定で RSD が高かった農薬と一致しており、これらは PEG の添加による影響と考えられた。

注入時の PEG 添加量が農薬の感度に及ぼす影響について検討した。検量線 B の代表濃度点 (50 ppb) に対して、1 インジェクションあたり、0、100、250、500 および 750 ng の注入量となるよう PEG をそれぞれ添加し、分析を行った。PEG の添加量が増加するに伴って、多くの農薬の感度は増加する傾向が認められ、概ね 500 ng の PEG 添加により十分なマトリックス効果が得られることが確認された。一方で、ホスメット、シハロトリン、フルキンコナゾール、シフルトリン、シペルメトリン、フルシトリネート、フェンバレレート、フルバリネート、デルタメトリンについては、PEG の添加量が増加するにつれ、ピーク面積値が減少した。

各協力機関の測定結果については、配布したほうれん草中に微量のシペルメトリンが検出されたため、ほうれん草に関してはシペルメトリンを項目から除外している。

全体的な傾向として、検量線 A においては IS 補正の有無に関わらず、ほぼ 90% 以上の農薬が良好な結果を示した。検量線 B では、絶対検量線法では過剰定量、相対検量線法では過小定量の傾向が認められた。検量線 C および D に関しては、各機関に差が認められたが、相対検量線法で定量することにより、良好な結果を示す農薬数が増加した。検量線 E は絶対検量線法ある相対検量線法のいずれかで良好な結果を示す農薬数が最大になった。

マトリックス補正効果の比較では、絶対

検量線法での各機関のえだまめの定量結果について、回収率が $100 \pm 10\%$ の範囲に入る農薬 (補正可能農薬; 良好な結果) の数を各々算出し、測定可能な農薬数に対する割合 (%) で示した。検量線 D に関しては、補正可能な農薬の割合が高い機関と低い機関が混在していたが、検量線 E では割合が低い機関の結果が改善され、機関による差が縮小した。検量線 C と検量線 E の傾向は類似していたが、一機関を除く全ての機関において、補正可能な農薬の割合が検量線 E で 10% 程度増加した。えだまめの相対検量線法での結果については、IS 補正により、補正可能な農薬の割合は各検量線とも増加した。検量線 D では、IS 補正により各機関での割合の差は縮小したが、検量線 C および E と比べると、機関間の差は大きかった。ほうれん草の場合は回収率 $100 \pm 10\%$ となった農薬数を基準にした場合、検量線 C、D、E の間にえだまめの様に明解な傾向が認められなかったため、回収率 $100 \pm 20\%$ の農薬を補正可能農薬とした。その結果、ほうれん草の結果はえだまめの傾向に類似し、検量線 E がどの機関についても汎用性の高い検量線となった。検量線 D においては機関間の差が大きく、汎用性は認められなかった。IS による補正効果は、いずれの検量線についても、えだまめの結果と同様に効果的であった。

PEG の影響については、大阪府の事前検討において、一部の農薬 (シハロトリン、シフルトリン、フェンバレレート、ホスメット等) に PEG 添加による感度低下が認められた。同様の傾向を示したのは、機関 a のみであり、機関 e においては、フルバリネートのみ感度低下の傾向を示した。

大阪府と機関 b および機関 e は同じメーカーの GC-MS/MS を使用し、GC の分析条件にも大きな違い（注入口温度、インサートライナーの種類、スプリットレス時の圧力等）はない。しかし、PEG に対する挙動は異なっており、感度低下の要因となる因子は特定できなかつた。今後、要因の因子解明についてさらに検討を行っていく予定である。また、試験液の影響については、大阪府および協力機関の試験液調製方法は、以下の 2 種類に大別された。

イ. QuEChRS 法をベースとした方法（大阪府、機関 a、c、e および f）

ロ. 厚生労働省の一斉分析法をベースとした方法（機関 b および d）

このうち、機関 f は、検量線 C、D および E 全てについて良好なマトリックス補正効果が認められた。QuEChRS 法をベースとした方法を採用している機関は 4 機関であり、補正効果が試験液調製方法によるものであるとは確定できなかつた。今後、試験液の精製度および負荷量による差について検討を行う予定である。機器については、大阪府および協力機関の機器の内訳は、Agilent 社製の GC-MS が 1 機関、GC-MS/MS が 5 機関、Thermo 社製の GC-MS が 1 機関であった。機関 f は Agilent 社製の GC-MS/MS を使用し、かつ注入口の仕様がアイスティサイエンス社製の胃袋型インサートによる大量注入方式であった。機関 f は検量線 C、D および E において良好なマトリックス補正効果が認められたが、1 機関のみの結果であったため、補正効果の要因が胃袋型インサートによる大量注入方式であるとは確定できなかつた。他の機関の結果からは、機器による明白な差は認められなかつた。

2 齊藤分担研究

SPDE 法および固相蛍光誘導体化法を併用するために、固相の種類および固相蛍光誘導体化の至適条件（反応時間、TFA の添加量および溶出液）を併せて検討した。まず、固相の種類については Oasis® HLB、多機能カラムおよびイムノアフィニティーゲル（厚生労働省の公定検査法で推奨されている市販製品 4 種類）を用いて比較検討した。その結果、最も高いクリーンアップ効果および良好な回収率が得られ、且つ有機溶媒耐性に優れたイムノアフィニティーゲル（AFLAKING）を採用した。

なお、多機能カラムについては、夾雑物を固相に保持させ、目的物質を素通りさせるクリーンアップ法のため、誘導体化のために窒素気流下での溶媒除去が必要となり、実験者への AFs 曝露が危惧されることが考えられた。更に、この手法では、後述する固相に目的物質を保持させた状態で誘導体化する固相蛍光誘導体化法には適さなかつた。

従来の TFA によるプレカラム蛍光誘導体化法では、試料抽出液をイムノアフィニティーカラムでクリーンアップした後に、溶出液を窒素気流下で溶媒除去する必要があるため、誘導体化の際に時間を要してしまうことや、クリーンアップ操作と同様に実験者への AFs 曝露が危惧されるといった問題点がある。このような問題点を克服する方法として固相誘導体化法が知られている。そこで本研究では、AFs を固相に保持させた状態で蛍光誘導体化する固相蛍光誘導体化法を採用し、その至適条件を検討した。

固相蛍光誘導体化の至適条件については、