

固相に TFA 100  $\mu\text{L}$  を添加し、反応時間を 0~15 分の範囲で検討した。その結果、5 分以内ではバラツキが大きかったため反応時間 10 分を採用した。TFA の添加量については 25~200  $\mu\text{L}$  の範囲で検討した結果、50  $\mu\text{L}$  以下では固相全体に TFA を完全に浸透させることが困難だったが、100  $\mu\text{L}$  以上で回収率はプラトーに達したため、100  $\mu\text{L}$  を採用した。溶出液については、従来のイムノアフィニティーゲルではアセトニトリルが汎用されているが、固相蛍光誘導体化後の溶出には精製水もしくは 25%以下の低いアセトニトリル濃度において高い回収率が得られたため、精製水を採用した。

分析法バリデーションを行った結果、AFs の検出限界 (LOD、 $S/N = 3$ ) および定量限界 (LOQ、 $S/N > 10$ ) はそれぞれ 0.06~0.11 ng/mL および 0.21~0.36 ng/mL であり、検量線を作成したところ、各 LOQ~10 ng/mL の範囲で良好な直線性が得られた。

本法の食品への適用性を評価するため、規制値よりも低い濃度 (1.0 ng/g) における添加回収試験を行った。その結果、とうもろこしでは約 80%、落花生、白コショウおよび黒コショウでは約 75%の回収率と、残留試験法としては十分に高い回収率が得られた。また、併行精度および室内精度は共に 5%前後と高い再現性が得られた。

更に、方法検出限界 (MDL、 $S/N = 3$ ) および方法定量限界 (MQL、 $S/N > 10$ ) を算出したところ、いずれの試料においても AFs の MDL は 0.14~0.29 ng/g、MQL は 0.50~0.96 ng/g であった。

落花生を用い、多機能カラムを用いたクリーンアップ法と本法のイムノアフィニティーゲルを用いた SPDE 法によるクリーン

アップ効果を比較検討した。その結果、多機能カラムによるクリーンアップでは夾雑物由来の妨害ピークが AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub> および AFG<sub>1</sub> のピークと重なってしまい、定量が困難であった。他方、イムノアフィニティーゲルを用いた SPDE 法では、従来法と比較して夾雑物の影響が少ない良好なクロマトグラムが得られた。

従来法 (公定検査法) と、本研究で構築した SPDE 法と固相蛍光誘導体化法を併用した方法において、それぞれの操作性 (操作時間) を比較検討した。試料には白コショウを用いた。その結果、従来法の操作では、クリーンアップ操作に 40 分、窒素乾固に 60 分、誘導体化に 20 分、合計で 120 分を要した。他方、SPDE 法と固相蛍光誘導体化法を併用した方法では、クリーンアップ操作に 30 分、誘導体化に 15 分、合計 45 分で操作を完了することができ、従来法に比べて 1 時間以上 (75 分) も短縮することができたことから、構築した方法の操作性が優れていることを確認した。

構築した前処理法を用いて、とうもろこし (アメリカ産 2 製品、フランス産 1 製品)、落花生 (中国産 2 製品、日本産 1 製品)、白コショウ (インドネシア産 1 製品、スリランカ産 1 製品、マレーシア産 1 製品) および黒コショウ (インド産 1 製品、スリランカ産 1 製品、マレーシア産 1 製品) を対象として実態調査を行った。その結果、いずれの試料においても AFs は検出限界 (0.14~0.29 ng/g) 以下であった。しかし、AFs については、現在でも輸入食品からの検出事例が続いていることから、今後も実態調査を続け、食品の安全性を確保する必要があると考えられる。

以上の結果から、本法は規制値（総 AFs で 10 ng/g（各濃度で 2.5 ng/g）以下）より低濃度においても測定可能であることから、穀類、豆類および香辛料など様々な食品への適用が可能であると推察された。

### 3 鎗田分担研究

MF 検量線溶液 A と MM 検量線溶液 A のそれぞれについて検量線を作成した。各対象農薬とその標識体の含有比と、両者の面積比は良好な直線関係 ( $R^2 > 0.999$ ) を示した。一方で、ほとんどの対象農薬について、MF 検量線溶液 A を用いて作成した検量線の方が、MM 検量線溶液 A を用いて作成した検量線よりも傾きは大きくなり、特にフェニトロチオンとイソキサチオンでは 15 % 以上も大きくなった。IDMS の検量線の傾きが試料マトリックスに包括的に影響されるという事象は、報告者が知る限りこれまでに報告はなかった。検量線の傾きの差が大きい農薬ほど、MF 検量線溶液 A の測定における標識体ピークの強度が、測定対象農薬のピーク強度に対して相対的に小さくなることが確認され、両化合物の同位体平衡が完全には成立していないことが示唆された。昨年度の本研究において、マトリックスのない検量線溶液を用いた場合には IDMS における回収率が低くなることを報告したが、本研究の結果は、その原因を明らかにしたものである。

GC におけるマトリックス効果は、GC 装置内での分析対象物質の不可逆的な吸着に起因し、特に試料注入孔の寄与が大きいと考えられている。そこで、スプリットレス注入法よりも吸着が少ないと考えられるオンカラム注入法を適用した。注入方式

の違いによって傾きの比が異なることから、注入孔において分析対象農薬とその標識体の吸着様相が異なっていることが示された。ただし、オンカラム注入法を用いた場合でも、検量線の傾きが 1 より明らかに大きい農薬もあり、注入孔以外への吸着も無視できないと考えられた。

以上のように、標識体を内標準に用いた IDMS においても、マトリックス効果の影響を完全に排除することは困難であった。そのため IDMS においても、マトリックスマッチングした検量線溶液を用いることが、高信頼性分析のために有効であることが示された。

外部精度管理調査試料の分析においては、前項で精確さを確認した分析法 1 と、別途精確さを確認した分析法 2 によって、平成 26 年度外部精度管理調査（残留農薬検査 I）の調査試料を分析した。クロルピリホスの定量値は分析法 1 が 40.30 ~ 41.53  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、分析法 2 が 41.06  $\mu\text{g}/\text{kg}$  及び 41.78  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、EPN の定量値は分析法 1 が 231.5 ~ 240.8  $\mu\text{g}/\text{g}$ 、分析法 2 が 240.6  $\mu\text{g}/\text{g}$  及び 246.2  $\mu\text{g}/\text{g}$  であり（分析法 1 :  $n=5$ 、分析法 2 :  $n=2$ ）、両法の結果はほぼ一致していた。そこで、分析法毎に (1) 式の  $F_c$ 、 $R_s$ 、 $R_c$ 、 $M_{sp(s)}$ 、 $M_s$  に係わる不確かさから算出した合成標準不確かさを重みとして、重み付け平均値とその不確かさを算出したところ、クロルピリホス：(41.2 ± 1.7)  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、EPN：(241 ± 15)  $\mu\text{g}/\text{kg}$ （重み付け平均値 ± 拡張不確かさ（包含係数：2））であった。

調査試料の調製における分析対象農薬の添加濃度は、クロルピリホスが 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、EPN が 240  $\mu\text{g}/\text{kg}$  であり、IDMS によ

る定量結果はこれと良く一致した。一方、外部精度管理調査の参加機関の結果から決定した付与値（ $2\sigma$  処理後の従来方式による）とその標準偏差の2倍は、クロルピリホスが  $(37.027 \pm 7.978) \mu\text{g/kg}$ 、EPNが  $(214.064 \pm 61.672) \mu\text{g/kg}$  であった。IDMS による定量値はこれよりクロルピリホスについて11%、EPNについて12%高かった。また、その原因として、参加機関のほとんどが試料前処理における分析対象農薬の回収率（損失）を補正していないためと考えられた。一方、参加機関間の報告値のばらつき（標準偏差）に対して、IDMS による定量値の不確かさはクロルピリホスについて21%、EPNについて25%であり、IDMS の不確かさは充分小さいことが示された。

#### 4 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：

粉碎・粉末化した米類に農薬を添加し冷蔵保存におけるそれらの経日的安定性（農薬添加後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）を検討した。併せて、米自体が持つ酵素等が影響を与える可能性を考慮して、それらを失活させる目的で、同種の米類を加熱後、農薬を添加し、その後の冷蔵保存による安定性（農薬添加後0、5、10、20 および30日間）を検討した。その結果、非加熱の米類に添加した農薬は、いずれも、農薬添加後経日的に緩い減少傾向を示したものの、30日間で添加濃度に対し、80%以上の回収率であった。精米および玄米を比較すると、い

ずれの農薬でも添加後30日において玄米の方が精米より添加濃度に対する回収率がわずかに高い傾向があり、マラチオンを除き、他の3種の農薬は、添加後30日間においても添加濃度に対し約90%の回収率が得られた。また、新米および古米の比較では、精米および玄米ともに顕著な差は認められなかった。また、農薬の中では、クロルピリホスがいずれの米の種類でも比較的安定した回収を示し、特に玄米の古米および新米とも添加後30日間で90%以上の良好な回収が得られた。また、フェニトロチオンは、玄米の古米および新米において添加後30日間で90%以上の良好な回収を示した。一方、加熱した米類に添加した農薬はいずれの米類も農薬添加後、経日的に顕著な減少傾向を示した。精米および玄米を比較すると、いずれの農薬でも添加後30日間において、非加熱の米類と同様に玄米の方が精米より添加濃度に対する回収率が高い傾向があった。しかしながら、添加後30日においては、クロルピリホスおよびフェニトロチオンを除く他の2種については、添加濃度に対し約80%以下の回収率であった。また、農薬の中では、非加熱の米類と同様にクロルピリホスがいずれの米の種類でも比較的安定した回収を示し、玄米の古米および新米とも添加後30日間で80%以上の回収が得られた。非加熱の米類では、フェニトロチオンが、良好な回収を示したことに反し、加熱した米類では、添加後60日で約80%以下にまで減少した。加熱処理をした米類の方が、非加熱の米類と比較し、概して減少傾向が著しく、添加農薬の安定を図るには適さないと考えられた。

今回の実験では、非加熱の米類において、添加後 30 日間では、農薬の著しい減少傾向は認められずこれまでの結果に反しているが、約半年から 1 年で半減した試料は、酢酸エチルの農薬標準液に浸漬し、乾燥後、粉碎機を用いることで、若干の熱負荷がある点などが異なり、作製条件を考慮した安定性の確認も必要である。一般的には、今回使用した有機りん系農薬は、アルカリには不安定だが、酸には比較的安定とされている。今回の安定性の確認を目的とした試験設定と酢酸エチル溶液を添加した場合の試料とで農薬の安定性に大きく影響を及ぼす要因があるかについても精査する必要があると考えられた。

先の米類などの固体試料とは別に、これまでの野菜ペーストに加えて新たに枝豆ペーストを基材とした調査試料の作製を検討した。今年度は、それらの冷凍保存における安定性を検討し、適切な水分あるいは油分の添加量を選択することとした。水分添加基材については、作製後 9 か月までの間、いずれの農薬のいずれの測定時点でも、F 値が有意水準 5% 点の 3.020 未満であり、安定して良好な均一性を示す結果が得られたが、水分添加量の異なる 3 条件とも、4 種農薬で添加量に対する回収率は、減少傾向であった。特に、水分を 20% 添加した場合はダイアジノンの回収率が作製後 6 か月以降で急激に低下し、回収率が比較的安定であったクロルピリホスも 9 か月で回収率が 80% 以下となった。油分添加基材については、作製後 9 か月までの間、いずれの農薬のいずれの測定時点でも、F 値が有意水準 5% 点の 3.020 未満であり、安定して良好な均一性を示す結果が

得られたが、水分添加基材と同様に、添加量の異なる 3 条件とも、4 種農薬で添加量に対する回収率は、減少傾向であった。油分の添加量の違いによる回収率および安定性の明らかな差は見られなかったが、油分 10% については、均一性はあるものの概して測定値のバラツキがやや大きく、さらには冷凍保存 9 か月間で 4 種農薬すべての保持時間付近にブランク試料由来の妨害ピークが出現し、測定が困難となった。また本来の枝豆の成分とは脂質の点において異なることから、油分 10% 添加基材は適切ではないと考えられた。

#### 4.2 微生物学検査のための適性調査試料の作製検討：

腸炎ビブリオ検査用調査試料の検討においては、外部精度管理調査試料の滅菌ロットに相当する 40 個を同時に滅菌した結果、樹脂製容器の変形もなく、基材であるこや豆腐についても滅菌後の無菌性が確認された。定性試験では、用いた 9 種の寒天培地上で保存 28 日後まで腸炎ビブリオを判定することが可能であった。陰性菌である *V. fluvialis* では、一部の酵素基質培地上で陽性を疑う集落が確認されたが、NIHSJ-06-ST3 では腸炎ビブリオと推定される集落について同定試験を実施することとなっているため問題とはならないと考えられた（定性試験に関するデータは示していない）。最確数法では、保存 28 日後まで陰性、陽性ともに集落の発育を認めたが、選択培地上の陽性集落のみを計測したため、陰性菌は陽性反応を検出した CHROMagar を除いて <3.0 との結果が得られた。陽性菌では、保存 14 日後以降減少傾向が認められた

ものの、いずれの寒天培地を用いた場合でも保存 28 日後まで腸炎ビブリオが検出可能であった。このことから、NIHSJ-07-ST2 (定量試験法) に従った試験のための調査試料として有用であることが示唆された。しかしながら最確数法による生菌数測定を行うための調査試料では 1400 CFU/g を超えないよう試験菌を接種する必要がある、保存 14 日後以降の菌数の減少傾向を抑制することが必要と考えられた。VBNC 状態のビブリオ属菌に対する回復効果の報告のあるピルビン酸を加えた調査試料について同様に冷蔵保存試験を実施したところ、ピルビン酸を含まない調査試料よりも生菌数の減少幅が大きくなる結果となった。これより、最確数法による定量試験のための調査試料としては、ピルビン酸の添加は不適と判断し、定量試験用の調査試料については添加剤等のさらなる検討が必要だと考えられた。以上のことから、こうや豆腐を用いた調査試料は定性試験において有用性が認められた。併せて定性試験用の調査試料の検討が今後の課題であると示唆された。

セレウス菌検査用調査試料の検討において、調査試料の基材として米飯を使用し、食品衛生検査指針（微生物編）に記載の試験法に従って定性試験、定量試験を実施した。定性試験では、セレウス菌を接種した調査試料において、冷蔵ならびに 32.5℃ 保存の両者で、接種 8 週間後まで用いたすべての選択寒天培地上で陽性集落が確認された。一方、陰性菌として接種した枯草菌において、NGKG 寒天培地上では集落の発育が認められなかったが、MYP 寒天培地およびセレウス選択寒天培地では陰性集落の形成（発育）が認められた。国内では入手の容

易さや過去の実績などから多くの機関が定性試験に NGKG 寒天培地を選択している可能性が高いことから、陰性菌が NGKG 寒天培地上で発育しない点については十分な検討が必要と思われた。定量試験では、標準寒天培地による生菌数測定の結果、いずれの試験菌も保存開始から 8 週間にわたってほぼ同等の菌数が維持されたことから、非常に安定性の高い調査試料であることが示唆された。また、32.5℃ で保存した調査試料でも菌数の変動が認められなかったことから、実際に外部精度管理調査試料として送付した場合に予想される温度変化による試験結果への影響が低いことが示唆された。定性試験用の寒天培地による生菌数測定では、NGKG 寒天培地において枯草菌が発育しないことから 1000 CFU/g となったが、MYP 寒天培地およびセレウス選択寒天培地では、陽性菌は標準寒天培地の生菌数測定結果と同等、陰性菌はそれより低い数値であったものの保存条件に関わらず試験期間にわたって菌数が維持された。なお、陽性集落と陰性集落は集落外縁の培地色や不透明帯などの違いで判別されるが、見慣れていない場合は誤判定も考えられるため、陰性菌の集落数についても計測を実施した。以上のことから、国内で利用が多いと思われる NGKG 培地で発育する陰性菌の探索などの課題を残すものの、定量試験用の調査試料としての有用性が認められた。

微生物担体による安定化技術の検討調製については、直後の微生物担体の生菌数は、目標とした生菌数の範囲内であった。このことから、任意の生菌数の微生物担体の作製が可能であることが示唆された。微生物担体中の生菌数の挙動を確認したところ、

黄色ブドウ球菌では個々の微生物担体から得られた生菌数測定値のばらつきが大きく、担体間で10倍以上の差が認められた。黄色ブドウ球菌では、他の試験菌に比べて試験対照での生菌数の変化も大きいことから、試験菌の特徴に起因することが考えられた。大腸菌およびサルモネラ属菌では個々の微生物担体から得られた生菌数測定値のばらつきが小さく、生菌数の平均値と試験対照での生菌数の変化についても安定的な挙動を示した。以上のことから、試験菌による差は認められるものの、人造いからの製法で作製した微生物担体に一定量の微生物を封入することが可能であり、少なくとも7日間は安定であることが確認された。事前に実施した予備検討の結果から、培地やリン酸緩衝液にアルギン酸ナトリウムを溶解して調製した微生物担体を冷蔵保存した場合、または生理食塩液にアルギン酸ナトリウムを溶解して調製した微生物担体を15℃前後で保存した場合も生菌数が安定しないことが明らかとなっている。これらのことから、微生物担体を調製する際に使用する溶液として培地やリン酸緩衝液は適当ではないこと、保存温度によっては微生物担体中に封入した微生物が増殖すると考えられ、微生物を封入した担体は保存条件を十分に検討する必要があることが示唆された。また、7日間の生菌数が最も安定して推移したサルモネラ属菌についても、7日後には接種時の半分以下の菌数まで低下していることから、更に長期間安定な担体とするためには保存剤の添加を含めた保存条件の検討が必要であると考えられた。

#### 4.3 アレルギー物質検査のための適正試

#### 料の作製検討検討：

基材に添加する落花生タンパク質の調製を行うにあたり、基材の添加に適した落花生を選定するために、生落花生3種類〔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〕およびゆで落花生1種類〔国産ゆで落花生（千葉半立種）〕からそれぞれタンパク質を抽出し、各落花生タンパク質抽出液中の総タンパク質濃度を比較した。その結果、生落花生3種のタンパク質濃度は落花生標準品規格に記載のタンパク質濃度をいずれも満たしていた。一方、国産ゆで落花生のタンパク質濃度は落花生標準品規格を上回っており、国産生落花生の約2倍のタンパク質が抽出された。

次に、各落花生タンパク質抽出液をそれぞれ10 µg/mLとなるよう希釈後、3種類のELISAキットで測定し、落花生タンパク質の回収率を比較した。その結果、生落花生3種の回収率は各キット内でそれぞれ同程度であったが、キット間で比較すると、Pキット、Nキット、Mキットの順に高かった。また、国産ゆで落花生の回収率はNキットでは75.4%であり、同キットの国産生落花生の回収率と同程度であったが、MキットおよびPキットではそれぞれ22.5%および51.1%と低く、同キットの国産生落花生の回収率の約2分の1であった。以上のことから、添加用落花生タンパク質溶液には国産ゆで落花生を除く生落花生3種のうち、ELISA測定値の比較的高かった中国産生落花生を使用することとした。

選定した中国産生落花生から抽出した落花生タンパク質溶液をこしあんおよびチョコレートクリームにそれぞれ添加し、落花生タンパク質添加試料を作製した。この落

花生タンパク質添加試料について、調製直後、冷凍保存 1 ヶ月後および冷凍保存 2 ヶ月後の回収率を調べ、安定性を評価した。なお、回収率は 3 種類の ELISA キットの測定値から算出したタンパク質量を添加タンパク質量で除することで求めた。また、安定性は冷凍保存 1 ヶ月後および冷凍保存 2 ヶ月後の測定値から算出したタンパク質量を保存前（調製直後）の測定値から算出したタンパク質量で除することで求めた。その結果、調製直後の回収率は、こしあん試料およびチョコレートクリーム試料でそれぞれ P キットが 170.3%、133.6%、N キットが 104.4%、64.0%、M キットが 73.5%、73.7%と、P キット、N キット、M キットの順に高く、落花生タンパク質溶液の結果と同様にキット間差が大きかった。さらに、N キットおよび P キットでは試料間差も大きく、こしあん試料はチョコレートクリーム試料に比べて回収率が高かった。冷凍保存 1 ヶ月後および冷凍保存 2 ヶ月後の安定性は、P キットでは保存期間が長くなるにつれて回収率が低くなる傾向がみられたが、N キットおよび M キットでは両試料の安定性がいずれも 100%程度と良好であった。以上のことから、3 種類のうち 2 種類の ELISA キットでは 2 ヶ月間安定であることが確認されたことから、これらの試料が外部精度管理用調査試料として適用できる可能性はあるが、長期安定性を確保するための更なる検討が必要であることが示唆された。

こしあん試料とチョコレートクリーム試料の落花生 ELISA キットの測定値はキット間差に加え、基材間差も大きかった。このことから、落花生 ELISA キットの測定は食品夾雑物の影響を受けやすいと考えられた。

また、現在使用している変性剤に亜硫酸ナトリウムを用いた改良型 ELISA キットは、発売されてからの期間が浅く、様々な食品に対する反応性についての知見が少ない。そこで、落花生の外部精度管理用調査試料に用いる適正な基材を探索することを目的として、落花生 ELISA キットにおける食品夾雑物の影響について検討した。検討には 20 種類の食品を使用し、2 種類の方法で試験を行った。

まず、食品抽出液からの落花生タンパク質の回収率についてキット毎に比較した結果、M キットではすべての食品で回収率が 80~120%の範囲内、N キットではほとんどの食品で回収率が 90~130%の範囲内にあり、いずれも良好であった。一方、P キットではほとんどの食品で回収率が 110~190%程度と範囲が広く、200%を超える食品もあった。また、N キットにおいて、回収率が 150%を超えた食品 3 種（ココアパウダー、いりごま、小麦粉）については、食品抽出液落花生標準品を添加しないブランク試料でも ELISA 測定値が 1 µg/g 以上であったことから、疑陽性反応あるいは原材料に落花生が含まれていた可能性が考えられた（データは示さず）。

次に、食品からの落花生タンパク質の回収率についてキット毎に比較した結果、M キットでは回収率が全体的に低かったが、ほとんどの食品で 60~110%程度と比較的良好であった。一方、N キットおよび P キットではほとんどの食品で回収率がそれぞれ 90~150%、100~160%程度と広範囲であった。また、N キットおよび M キットではハンバーグ、P キットではココアパウダーで回収率が 50%以下であった。これらの

食品については、原材料中に測定阻害物質が含まれている可能性が考えられた。かぼちゃペースト、とうもろこしペースト、鶏がらスープの素、オリーブオイルの4食品はすべてのELISAキットで回収率が80～120%であったことから、外部精度管理用調査試料に用いる基材として利用できる可能性が考えられた。

落花生の主要なアレルゲンであるAra h1はプロアントシアニジンと結合して複合体を形成することが知られており<sup>1)</sup>、PキットはAra h1に対するモノクローナル抗体を用いて測定するため、ポリクローナル抗体を用いて測定する他キットに比べプロアントシアニジンの影響を受けやすいと推測された。プロアントシアニジンによる測定阻害は小麦グリアジン測定用のELISAキットにおいても確認されており、プロアントシアニジンと結合性のあるゼラチンを抽出液に添加することで回収率が向上するとの報告がある。落花生ELISAキットにおいても測定阻害にプロアントシアニジンが関与している場合、ゼラチンを抽出液に添加することで、プロアントシアニジンがゼラチンに吸着され、回収率が向上すると考えられた。そこで、回収率が極端に低かったココアパウダーおよびシナモンについて、プロアントシアニジンと結合性のある魚ゼラチン(FG)およびウシゼラチン(BG)を添加した抽出液を用いて落花生タンパク質の添加回収試験を行い、回収率が向上するか確認した。その結果、測定阻害がみられたMキットのシナモン、Pキットのココアパウダーおよびシナモンでは無添加区よりもゼラチン添加区で回収率が高かった。このことから、ゼラチン添加による回収率の向上が落

花生ELISAキットにおいても確認された。以上のことから、シナモンやココアパウダーを含む食品を基材として採用する場合、落花生タンパク質の回収率が実際の含有量よりも低くなることが予想されるが、基材へのゼラチン添加により改善できる可能性が考えられた。また、より難易度の高い外部精度管理用調査試料を作製する場合にはこれらプロアントシアニジンを多く含む食品が利用できると思われる。

#### 4.4 組換えDNA技術応用食品検査のための適正試料の作製検討：

外部精度管理調査結果におけるDNA溶液試料の解析について、CpTIコメの検査法は定性試験ではあるが、測定にリアルタイムPCRを使用しており、増幅が認められた測定については、Ct値が得られる。そこで、参加機関から収集したCt値を用いて、定量試験の外部精度管理で用いる統計手法を適用し、定性試験による外部精度管理結果をより詳細に解析できないか検討した。DNA溶液試料はDNA抽出および濃度調整の操作が含まれないためPCR反応液に含まれる銹型の量には機関間差が少なく、Ct値はほぼ一定になると予想される。このため、試料A、試料Bおよび試料CについてはCt値をそのまま解析した。正規確率プロットを確認したところ、機関番号13の報告値がすべての試料で平均値から大きく離れていた。このため、2シグマ処理( $z$ -スコアの絶対値が2以上のデータを除く操作)を実施したところ、1機関(機関番号13)が除外され、正規確率プロットはいずれの試料においてもひずみ、とがりが小さくなり、正規分布に近い形状となった。2シグマ処理で

除外された機関番号 13 はすべての CpTI 検出用試験で Ct 値が他機関より 4 サイクル程度大きいため、プライマー・プローブの濃度調製に問題があった可能性が示唆された。2 シグマ処理後の z-スコア管理図において、z-スコアの絶対値が 2 以上となった機関は試料 A では機関番号 11、機関番号 29、試料 B では機関番号 11、機関番号 15、機関番号 29、試料 C では機関番号 11、機関番号 29 であった。試料 A、試料 B および試料 C のいずれでも z-スコアが 2 以上であった機関番号 11 および機関番号 29 について、リアルタイム PCR 測定時の増幅曲線を確認したところ、ベースラインの継続的増加が認められた。ベースラインの増加分は増幅による蛍光増加分から差し引かれるため、増幅曲線は緩やかになり、Ct 値が大きくなったと考えられた。また、試料 B において z-スコアが -2 以下であった機関番号 15 については、反応がプラトーに達した時の蛍光強度が他の機関に比べて大きいことから、PCR 反応液の調製あるいは装置の設定が Ct 値に影響した可能性が考えられた。以上のことから、DNA 溶液試料において Ct 値を用いた解析を行うことで参加機関の測定精度より詳しく推定できる可能性が示唆された。

コメ粉砕物試料について平成 24 年度と同様に Ct 値の差を用いた解析を行い、DNA 濃度の誤差を補正できるか検討した。コメ陽性対照用試験および CpTI 検出用試験の Ct 値をそのまま用いて統計解析を実施した場合、試料 1 では DNA の濃度差による Ct 値のばらつきが解析結果に影響している可能性が考えられた。一方、試料 4 では DNA の濃度差による Ct 値のばらつきが小さく、解析結果への影響は比較的少ないと考えられ

た。陽性プラスミドを添加した試料では、DNA 抽出操作が異なると DNA 溶液に含まれる陽性プラスミドの割合も異なる可能性があることから、Ct 値をそのまま用いた解析と Ct 値の差を用いた解析の両者から検査精度を評価する必要があると思われる。また、抽出キットあるいは抽出操作の違いが陽性プラスミドの抽出量にどの程度影響するかについては不明であり、今後の課題としたい。

#### 4.5 カビ毒検査のための適正調査試料の作製検討：

直接競合 ELISA における各 AF の反応性を検討した結果、AF を加えないブランクの反応性を 20% 阻害する濃度 (IC<sub>20</sub> 値) を測定下限、80% 阻害する濃度 (IC<sub>80</sub> 値) を測定上限とした場合に、AFB1 と 6.2-120 pg/mL、AFB2 と 8.5-240 pg/mL、AFG1 と <6.3-100 pg/mL、AFG2 と 6.5-250 pg/mL の範囲で測定できることが分かった。この結果から、MoAb2-3 を用いて構築した直接競合 ELISA は、非常に高感度であり、4 種類の AF において比較的同等の反応性で測定できることが判った。このような総 AF の測定に適した抗体は、文献を調査しても他に存在しない。この条件は、今後さらに検討することで、より好適な性能に改善する可能性がある。添加回収試験において、AF 未添加のブランク試料について、G1 及び B2 の検量線から AF 量を読み取った結果、4.5 及び 8.4 ng/g であった。今回構築した直接競合 ELISA は、G1 が最も感度が高く、B2 が低い。これらの結果から、購入したピーナッツバター中には、AF が 4.5 -8.4 ng/g 含まれていたことになる。そこで、添加回収試験では、実際の測定値

と、この値から AFG1 及び AFB2 の検量線を得られたブランク値を引いた値を示した (A: 測定値-ブランク値 (AFG1)、B: 測定値-ブランク値 (AFB2))。即ち、A 条件による回収率は 156%-201%、B 条件による回収率は 111%-156%となった。総 AF の検査においては偽陰性が出ないことが求められる。今回の結果は、構築した直接競合 ELISA が真値よりやや高い濃度を示すことを示唆したが、偽陰性は生じにくく総 AF 検査に適していることを示唆した。

## E. 結論

### 1 尾花分担研究

本研究結果より、マトリックスマッチング検量線に匹敵する汎用マトリックス添加検量線としては、検量線 D および E が有用であり、IS による補正も有効であった。しかし、検量線 D は機関間の補正効果および感度の安定性の差が大きく、補正効果が期待できない場合も考えられた。今回、共同研究を行った各機関の試験液調製方法、試験液濃度、注入量および分析機種は多種多様であったが、少なくとも検量線 E を用いた場合、すべての機関で補正可能な農薬の割合が最も安定していた。以上のことから、PEG と VFJ を併用する検量線 E は汎用マトリックス検量線として有用であると考えられた。

### 2 斉藤分担研究

食品中 AFs の分析に関して、従来の公定検査法では操作が煩雑であること、実験者への AFs の曝露が危惧されること、食品の種類によって夾雑物の種類や量が異なることから、前処理法を使い分けなければなら

ないといった問題点があった。そこでこれらの問題点を克服するために、食品中 AFs の前処理法としてイムノアフィニティーゲルを用いた SPDE 法および固相蛍光誘導体化法を構築し、とうもろこし、落花生、白コショウおよび黒コショウへの適用性を評価した。

その結果、本法ではクリーンアップ中に蛍光誘導体化を行うことが可能となった。これにより、誘導体化の際に必要なだった窒素乾固の操作が不要となり、分析法の簡便化に繋がった。更に、本法では実験者への AFs の曝露が低減され、実用性の高い AFs の微量分析法を構築することができた。

以上の結果から、本法は従来法のような問題点を克服し、食品中 AFs の微量分析に有用であることが示唆された。本法は、マイコトキシン汚染が懸念される様々な食品への対応が可能であり、食品衛生分野での貢献が期待される。

### 3 鎗田分担研究

マトリックスマッチング法を適用した IDMS によって、食品マトリックス中農薬を精確に分析することが可能になった。また、この方法によって平成 26 年度外部精度管理調査 (残留農薬検査 I) の調査試料を分析した結果、同法によって真度が高くかつ不確かさが小さい分析値を得られることを確認した。以上の結果から、本法は外部精度管理調査試料中の分析対象農薬の高信頼性分析に有効な定量法であると考えられた。

### 4 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：

精度管理調査における適正な調査試料作製は重要であり、調査対象項目の濃度の同等性および調査期間中の濃度の安定性の確保が必須となる。そこで、これらの必須項目を満たす調査試料の作製を目的とし、実分析をふまえた調査試料の作製を検討し、以下の結論を得た。

新たに、固体試料である穀類の粉末試料を基材として、玄米および精米の適用の可能性を検討したところ、非加熱の玄米において比較的安定した添加農薬の回収が得られた。また、古米あるいは新米で、回収率および安定性に顕著な差が見られなかったことから、随時市販品を購入し作製できることが明らかとなった。今後数か月～6か月程度までさらなる安定性を確認する必要がある。

枝豆ペーストを基材として試料作製を試みた結果、枝豆自体が本来もつ水分あるいは油分を適宜添加し均質な基材とした後、農薬を添加混合することで、良好な均一性および安定性が得られた。

実試料化に向けて、今後は、凍結融解安定性および60～100kgの実作製量に応じた作製方法の検討が必要である。

#### 4.2 微生物学検査のための適正調査試料の作製検討：

新規検査項目として検討を行っている腸炎ビブリオ検査用調査試料では、保存28日後まで腸炎ビブリオを検出することが可能であり、陰性菌についても使用したほとんどの培地で陰性集落の発育による判定が可能であったことから、定性試験用の調査試料として有用と判断された。最確数法によ

る定量試験に用いる場合、調査試料中で1400 CFU/g以下の菌数を維持することが求められるが、現状での運用を考慮すると、6週間程度菌数が安定的に維持できることが求められるため、菌数の安定的な維持が課題として明らかとなった。セレウス菌検査用調査試料では、添加した試験菌の菌数が保存温度に関わらず8週間にわたり安定であることが明らかとなった。これにより外部精度管理調査試料として重要な安定性が確保されたと判断した。セレウス菌用調査試料ではNGKG寒天培地で陰性菌(枯草菌)が発育しないことが明らかとなっているため、菌株の探索などより良い調査試料とするための検討が必要であると考えられた。

基材中の菌数安定化を目的とした微生物担体の検討では、「実試料に近い菌数を含んだ調査試料」の実現に向け、微生物担体を用いた菌数の安定化技術について検討した。これまででも外部精度管理調査において実食材に近い基材の採用や新規検査項目の設定など、参加機関からの要望に対応すべく検討を進めているが、食材と微生物が接触することから接種菌数の低減や新しい食材の選択等で問題点が多いのが現状である。今回検討した微生物担体は、試験菌による挙動の相違や保存条件の検討など課題はあるものの、一定量の微生物を封入し、その菌数のある程度の期間維持できることが確認された。

調査試料中に存在する生菌数に関わらず、陰性、陽性の判定は最終選択培地上に発育した集落で実施することが調査試料の理想である。陰性菌でも最終培地まで確実に発育すること、陽性菌は選択培地による生菌数測定にも耐えられることなど、新規検査

項目の検討結果を踏まえて実用化に向けた十分な検討を継続することに加え、添加する菌株の検索や使用される定性試験用寒天培地上での挙動・反応の把握など、より広い視野での検討が必要であることが示唆された。

#### 4.3 アレルギー物質検査のための適正試料の作製検討：

落花生の外部精度管理用調査試料の作製を目的として、4種類の落花生よりタンパク質を抽出し、3キットのELISA測定値から最も回収率の高かった中国産落花生を選定した。また、MキットおよびPキットではゆで落花生の測定値が生落花生の測定値よりも低く、これらELISAキットは加熱変性タンパク質を認識できない可能性が考えられた。さらに、こしあんおよびチョコレートクリームを基材とした落花生タンパク質添加試料については、Nキット、Mキットで測定した場合は2ヶ月間の安定性が確認されたが、Pキットで測定した場合は保存期間が長くなるにつれ、回収率が低下する傾向が認められたことから、長期安定性を確保するための更なる検討が必要であることが示唆された。

落花生ELISAキットの測定に影響を及ぼす食品についての検討では、Mキットは、ELISA法の測定段階および抽出段階のいずれでも食品夾雑物の影響を受けにくかったが、Nキットは抽出段階で、Pキットは測定段階で食品夾雑物の影響を受けやすいことが明らかとなった。また、かぼちゃペースト、トウモロコシペースト、鶏がらスープの素、オリーブオイルの4食品はすべてのELISAキットで落花生タンパク質の回収率

が80~120%であったことから、外部精度管理用調査試料に用いる基材として利用できる可能性が考えられた。また、プロアントシアニジンを多く含む食品ではMキットおよびPキットで測定阻害がみられたが、抽出液にゼラチンを添加することで、回収率が向上することが確認された。

#### 4.4 組換えDNA技術応用食品検査のための適正試料の作製検討：

外部精度管理調査の際、リアルタイムPCR測定で得られる参加機関のCt値について正規確率プロットおよびzスコア管理図を作成し、グラフの形状を検討した。その結果、DNA溶液試料についてはCpTI検出用試験のCt値の正規確率プロットはひずみ、とがり共に小さく、正規分布に近い分布を示していた。この時、zスコアが2以上となった機関についてCt値がはずれた原因が推定でき、Ct値の解析により、外部精度管理参加機関における測定精度をより詳しく推定できる可能性が示された。

コメ粉砕物試料において、試料1ではCt値をそのまま用いて解析した場合よりも、コメ陽性対照用試験とCpTI検出用試験のCt値の差を用いて解析した場合のほうが正規確率プロットの形状がより正規分布に近くなったことから、Ct値の差を用いることによりDNA濃度の誤差を補正できる可能性が示唆された。一方、試料4では、Ct値をそのまま用いた場合のほうがCt値の差を用いた場合よりも正規確率プロットの形状はより正規分布に近かったが、Ct値の差を用いた場合のzスコアが2以上となった機関が、DNA溶液試料の場合と一致したことから、試料4においてもDNA濃度の誤差が

補正された可能性が考えられた。このことから、コメ粉砕物試料についても Ct 値を用いた解析により、測定精度をより詳しく推定できる可能性が示された。

#### 4.5 カビ毒検査のための適正試料の作製検討：

より迅速・簡便・高感度な直接競合 ELISA の開発を目指した。その結果、 $<6.3\text{-}250$  pg/mL と極めて高感度で、AFB1, B2, G1, G2 間においてほぼ同等に測定可能であり、総 AF 検査に適する直接競合 ELISA を開発することができた。添加回収試験の結果は、回収率が 111-201% の範囲であり、スクリーニング検査として十分に実用に耐える性能を持つことが示された。また、実試料を測定に供したところ、規制値に近い AF を検出した。国内の市場には、これらの汚染食品が実際に多く流通している可能性がある。今後は、構築した直接競合 ELISA を用いたスクリーニングを進めることで、その実用性能を確認していきたい。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 2. 学会発表

1) 梅津麻実、佐藤夏岐、鈴木達也、渡辺卓穂：特定原材料の外部精度管理用調査試料の作製検討～落花生 ELISA キットの測定に影響を及ぼす原材料についての検討～：第 108 回 日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014.

#### H. 知的所有権の取得状況

なし

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 分担研究報告書

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

分担研究者 尾花 裕孝

平成 26 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進事業）

検査機関の信頼性確保に関する研究

分担研究報告書

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

研究代表者	渡辺卓穂	一般財団法人食品薬品安全センター
研究分担者	尾花裕孝	大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者	伴埜行則	京都市衛生環境研究所
	中島 涼	神戸市環境保健研究所
	角谷直哉	大阪市立環境科学研究所
	山下浩一	奈良県保健研究センター
	神藤正則	堺市衛生研究所
	高良浩司	和歌山県環境衛生研究センター
	梶村計志	大阪府立公衆衛生研究所
	起橋雅浩	大阪府立公衆衛生研究所
	高取 聡	大阪府立公衆衛生研究所
	北川陽子	大阪府立公衆衛生研究所
	吉光真人	大阪府立公衆衛生研究所
	福井直樹	大阪府立公衆衛生研究所
	小阪田正和	大阪府立公衆衛生研究所
	山口聡子	大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨

【背景・目的】近年、食品中に残留する農薬や動物用医薬品の分析は、多成分を一度に検出する一斉分析法が多用されている。一斉分析法では、試験液中に残存する食品由来成分（マトリックス）により、分析値が過小あるいは過大評価される場合があり、「マトリックス効果」とよばれている。マトリックス効果は、分析値の精度に大きな影響を及ぼすため、制御方法の確立は重要である。本研究は、マトリックスが機器分析に与える影響に焦点を当て、マトリックス効果を引き起こす要因の解明および制御法を検証する。今年度は、GC-MS（/MS）分析におけるマトリックス効果とその制御方法について、地方衛生研究所と協力し、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の探索を行い、残留農薬分析検査における効率的な精度管理体制を構築する。

【大阪府事前検討】共同研究に先立ち、大阪府で事前検討を行った。食品試料としてほうれん草およびえだまめのマイクロペースト（市販品）を使用した。大阪府の試験法に準じて

調製したブランク試験液に既知濃度の農薬標準溶液、内部標準溶液（リン酸トリフェニル溶液）等を添加した試験液を種々の検量線で定量し、マトリックス補正効果を比較した。その結果、絶対検量線法では、野菜果実ジュースから調製したブランクマトリックス試験液（VFJ）添加検量線、ポリエチレングリコール 300（PEG）添加検量線に若干のマトリックス補正効果が認められたものの、多くの農薬に過剰定量の傾向が認められた。しかし VFJ と PEG を併用した検量線では、マトリックスマッチング検量線に近い補正効果を示した。内部標準による補正および試験液調製における追加精製は、全ての検量線において有効であった。PEG 添加を行った場合、フルバリネート等の一部の農薬にピーク面積値および安定性の低下が認められ、GC 注入口での分解に起因するものと考えられた。

【共同研究】6 機関の地方衛生研究所の協力を得て、共同研究を行った。事前検討と同様に、ブランク試験液に既知濃度の農薬標準溶液および内部標準溶液等を添加した試験液を種々の検量線を用いて定量し、マトリックス補正効果の比較を行った。ブランク試験液の調製方法は協力機関の試験法に準じ、試料は事前検討と同じほうれん草およびえだまめの 2 種類とした。その結果、各協力機関の試験液調製方法、試験液濃度、注入量および分析機種に関わらず、内部標準による補正は効果的であった。また VFJ と PEG を併用した検量線は全ての協力機関において補正効果が高く、汎用性が高い検量線と考えられた。PEG を添加した際の挙動は、協力機関の結果間に差があり、ピーク面積値および安定性の低下は、全ての協力機関で認められる現象ではなかった。

【結論】試験液調製方法、試験液濃度、注入量および分析機種が異なる協力機関が実施した共同研究の結果、VFJ と PEG を併用した検量線が有用なマトリックス補正効果を示し、VFJ と PEG を併用した検量線は汎用性の高い検量線であると判断できた。食品毎にブランク試験液を調製する必要があるマトリックスマッチング検量線と比較して、調製にかかるコストや時間が大幅に削減され、実用性も極めて高いと考えられる。本法を用いた定量法は、GC-MS (/MS) 分析を用いた精度管理体制の基礎を構築する上で、有用であると考えられた。

#### A. 研究目的

食品中に残留する農薬および動物用医薬品等の分析では、試験液に残存する食品由来成分（マトリックス）が測定に大きく関与し、分析結果の信頼性に大きな影響を及ぼす。本研究では、食品成分が残留分析の測定に与える影響に焦点を当て、原因の解明および制御法を検証する。

食品成分が機器分析の測定値に影響を及ぼす現象は、一斉分析法の普及と関連している。一斉分析法では、多様な物性を持つ化合物を同時に分析するため、的を絞った

精製が困難であり、単一成分の分析法に比べて、試験液の精製度は低くなる。このため試験液中には、多くのマトリックスが残存し、分析値への影響が大きくなると考えられる。一般にこのような現象は「マトリックス効果」と呼ばれており、質量分析計を用いた測定で顕著に観察される。タンデム型を含むガスクロマトグラフ質量分析（GC-MS (/MS)）では、GC 注入口における試験液の気化やキャピラリーカラムへの導入の際にマトリックスによる影響を受けると考えられている。マトリックスが共存する

ことにより、注入口における測定対象物質の吸着や熱分解が抑制され、シャープで良好なピーク形状となり、検出感度が上がる場合が多い。このため溶媒標準検量線を用いて GC-MS (MS) で定量した場合、過大な測定値を示す傾向にある。一方液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) では測定対象物質がイオン化する際にマトリックスが共存した場合、測定対象物質のイオン化が抑制または促進され、過小あるいは過大な測定値を示すと考えられる。本研究では、協力機関との連携の下、マトリックス効果の影響形式が基本的に異なる GC-MS (MS) と LC-MS/MS についてマトリックス効果の特徴把握、原因の解明および対策等の検討を実施し、より普遍的で効果的なマトリックス効果の制御法を検討する。得られた知見を協力機関と共有し、試験精度の向上に役立てることを目指す。

本年度は、GC-MS (MS) を用いた残留農薬分析におけるマトリックス効果の制御方法について検討を行う。一般的にマトリックス効果を解消するためには、1) 高度な精製を行う、2) 試験液を希釈する、3) 標準溶液にマトリックスを意図的に添加した検量線で定量する等の手段が用いられている。このうち高度な精製は、一斉分析法では、物性が異なる多数の農薬を同時に分析する必要があるため、精製にも限界がある。希釈は、LC-MS/MS と比較して GC-MS (MS) は定量下限が高く、一律基準相当の農薬を定量する上では限界がある。このため、GC-MS (MS) の定量には同一試料抽出液を添加したマトリックス添加検量線が多用されている。添加されるマトリックスには、試料と同じ種類の食品のブランク抽出液のほ

か、ポリエチレングリコール 300 (PEG) 等が用いられている。また、大阪府独自の手段として、野菜果実ジュースから調製したブランク試験液 (VFJ) を添加マトリックスに用いる方法もある。PEG および VFJ は多種類の食品に適用可能であることが期待でき、かつ一定の品質で再調製可能であることから、本報告書ではこれらを「汎用マトリックス」と定義する。

マトリックス効果に影響を及ぼす因子としては、添加するマトリックスの種類、試験液の調製方法、試験液の濃度および機器への注入量等が考えられる。本年度は、各種マトリックスを添加した種々の検量線を調製し、試験液を定量することでマトリックス効果補正能力の比較を行う。具体的には、共通の食品試料を用い、各協力機関の試験法で調製された試験液に、評価対象農薬を添加した添加試験液を作成した。これを種々の検量線で定量し、添加濃度と定量結果の一致度 (回収率) を指標に制御効果を評価した。検量線は、5 種類 (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 および PEG 添加検量線) を作成し、比較検討を行った。

本研究では他機関との共同研究によって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の探索を行い、残留農薬分析検査における効率的な精度管理体制を構築する。今年度は以下の 4 項目について、検討した。

1. 検量線のマトリックス効果制御能力の比較
2. 協力機関の試験法がマトリックス効果に及ぼす影響

3. 農薬のマトリックス効果に対する感受性の相違
4. 協力機関における最適なマトリックス効果制御方法の構築

## B. 研究方法

### 1. 実施機関

大阪府立公衆衛生研究所は、ブランク試料および標準品の送付、分析結果の解析、協力機関との連絡調整、報告書の作成および研究遂行に係る事務を行った。また研究に先立ち、協力機関とほぼ同条件で事前検討を実施した。

### 2. 協力機関

京都市衛生環境研究所、神戸市環境保健研究所、大阪市立環境科学研究所、奈良県保健研究センター、堺市衛生研究所および和歌山県環境衛生研究センターは、協力機関として研究に参画した。

### 3. 実施概要および日程

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。

協力機関に今年度の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、8月8日に実施要領を送付した。農薬混合標準溶液3種類 [PL-1-2, PL-2-1 および PL-3-3; 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 8 月 25 日に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] を調達することとした。さらに今年度の試験内容、日程等を説明するため、8月28日に第1回班会議を開催し、野菜果実ジュース [充実野菜; (株) 伊藤園製] を配布した。分析結果等の提出期限は10月31日とした。各機関の分析結果を比較検証するために、1月9日に第2回班会議を開催した。

### 4. 標準品

評価対象とする農薬は農薬混合標準溶液 3 種類 (PL-1-2, PL-2-1 および PL-3-3) に含まれる 89 農薬とした。表 1 に評価対象農薬の一覧を示す。

### 5. 試験液調製方法

#### 5-1. 事前検討 (大阪府) 試験液調製方法

大阪府が残留農薬試験で用いる標準作業書 (SOP) に準じて処理を行った。スキームを図 1 および 2 に示す。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℃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℃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)。

## 5-2. 協力機関試験液調製方法

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。図 3~8 に各協力機関の試験液調製方法を示す。

## 6. 機器条件

### 6-1. 事前検討 (大阪府) 分析機器条件

使用機器 : GC 部 ; GC7890A (Agilent)  
MS 部 ; 7000B (Agilent)

(GC 条件)

使用カラム : DB-5MS (カラム長 30 m, 内径 0.25 mm, 膜厚 0.25  $\mu$ m ; Agilent)

カラム昇温条件 : 50℃ (1 min)  $\rightarrow$  25℃/min  $\rightarrow$  125℃ (0 min)  $\rightarrow$  10℃/min  $\rightarrow$  310℃ (10 min)

注入口温度 : 250℃

トランスファーライン温度 : 280℃

注入方式 : パルスドスプリットレス

注入量 : 1  $\mu$ L

(MS 条件)

イオン化方式 : EI

MRM 条件 : 表 2 参照

### 6-2. 協力機関分析機器条件

各協力機関の使用機器および分析条件は、残留農薬の検査で用いる SOP に準じた機器および条件を使用した (表 3)。協力機関の使用機器の内訳は、四重極型 GC-MS : 1 機関、四重極型 GC-MS/MS : 4 機関、イオントラップ型 GC-MS : 1 機関であった。注入量は、1~25  $\mu$ L、最終試験液濃度は、試料換算 0.5~10 g/mL 相当であった。また、測定モードは、四重極型 GC-MS/MS を使用する 4 機関は MRM モード、イオントラップ型 GC-MS を使用する 1 機関が SCAN モード、四重極型

GC-MS を使用する 1 機関が SIM モードであった。

## 7. 検量線の調製方法

下記に示す 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。

調製方法を表 4 に示す。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  $\mu$ 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、第 1 回班会議において研究機関毎に聞き取り調査を行い、図 9 に示すような計算シートを配布し、計算ミスの防止を行った。

## 8. 試料の保管および発送

試料のマイクロペースト (2 種類 : ほうれん草およびえだまめ) および混合標準溶液 3 種類 (PL-1-2, PL-2-1 および PL-3-3 ; 各 20 ppm, アセトン溶液) のアンプル (1.2 mL, 各 2 本) は、送付まで  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。リン酸トリフェニルおよび野菜果実ジュースは、送付まで室温で保存した。マイクロペースト、混合標準溶液およびリン酸トリフェニルは、8 月 25 日に協力機関に冷凍宅配便にて送付した。PEG は、和光純薬工業 (株) 製一級のを各協力機関が購入した。

協力機関は、試験開始まで、マイクロペーストおよび農薬混合標準溶液を  $-20^{\circ}\text{C}$  で保管した。希釈した農薬混合標準溶液および野菜果実ジュースは  $4^{\circ}\text{C}$ 、PEG およびリン酸トリフェニルは室温で遮光保存した。

## 9. 試験方法

### 9-1. 事前検討 (大阪府)

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