

基本統計量	
データ数	24
最小値	26.69
最大値	32.09
平均値	28.289
標準偏差	1.034
ひずみ	2.021
とがり	7.579

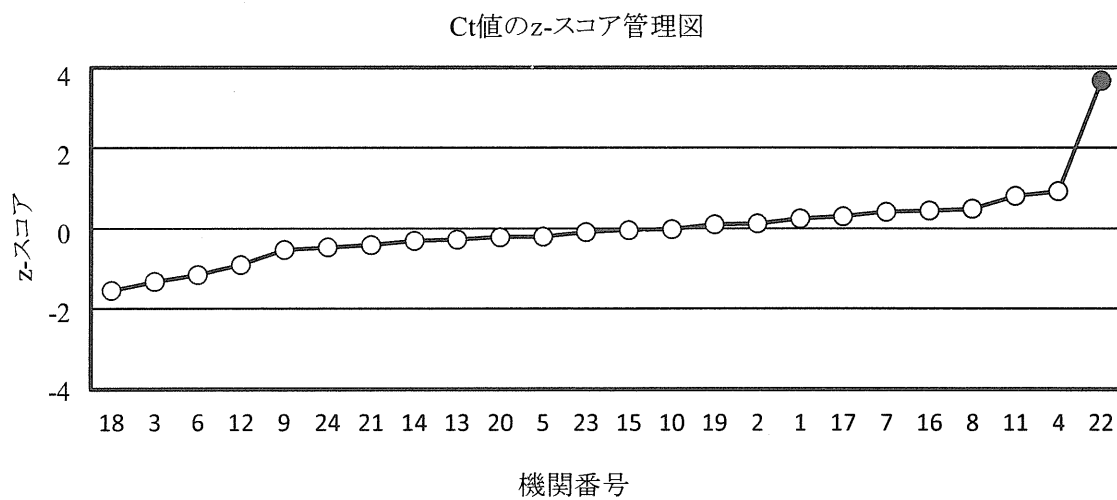
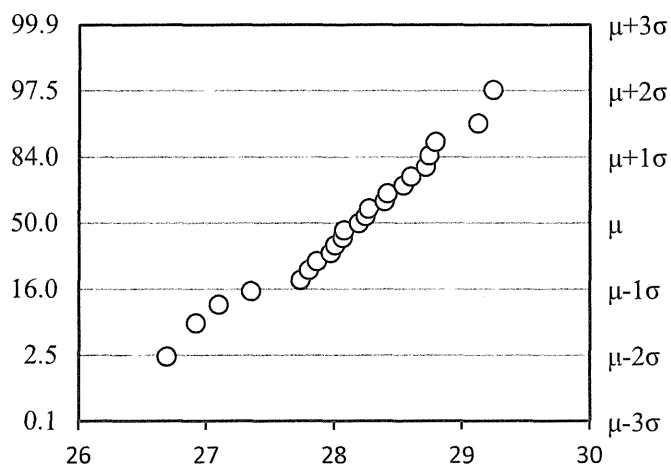


図4 試料1のコムギ陽性対照試験のCt値の解析

z-スコア管理図において、z-スコアの絶対値が2以上の機関を黒丸で示した。
 正規確率プロットにおいてz-スコアの絶対値が2以上の機関(2シグマ処理の対象機関)を黒丸で示した。

正規確率プロット



基本統計量	
データ数	23
最小値	26.69
最大値	29.25
平均値	28.124
標準偏差	0.658
ひずみ	-0.516
とがり	0.023

Ct値のz-スコア管理図

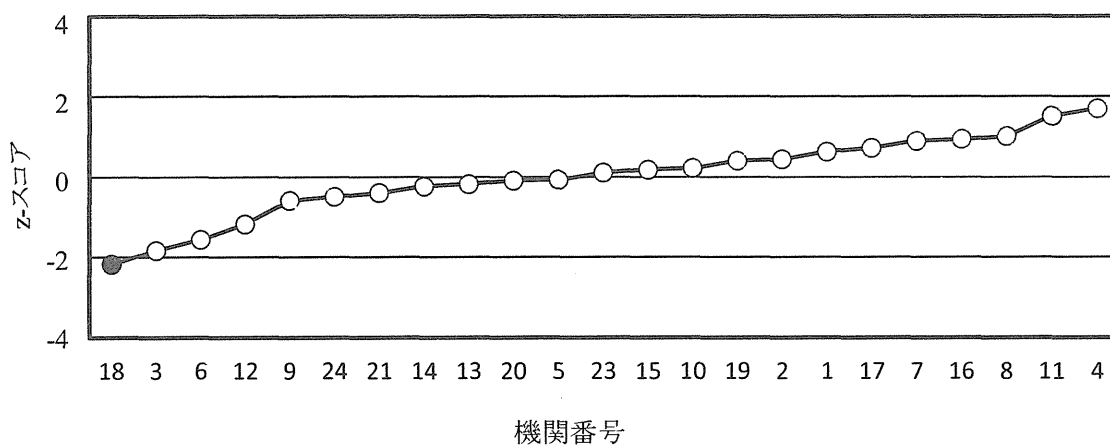
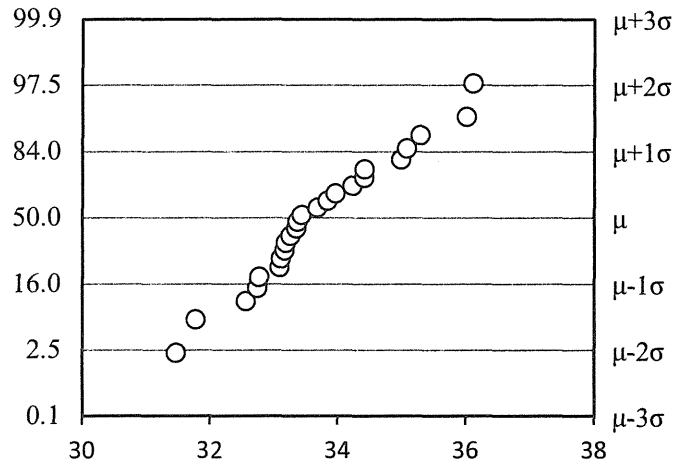


図5 試料1のコムギ陽性対照試験のCt値の解析(2シグマ処理後)

z-スコア管理図において、z-スコアの絶対値が2以上の機関を黒丸で示した。

正規確率プロット



基本統計量	
データ数	24
最小値	31.47
最大値	36.11
平均値	33.722
標準偏差	1.183
ひずみ	0.336
とがり	-0.064

Ct値のz-スコア管理図

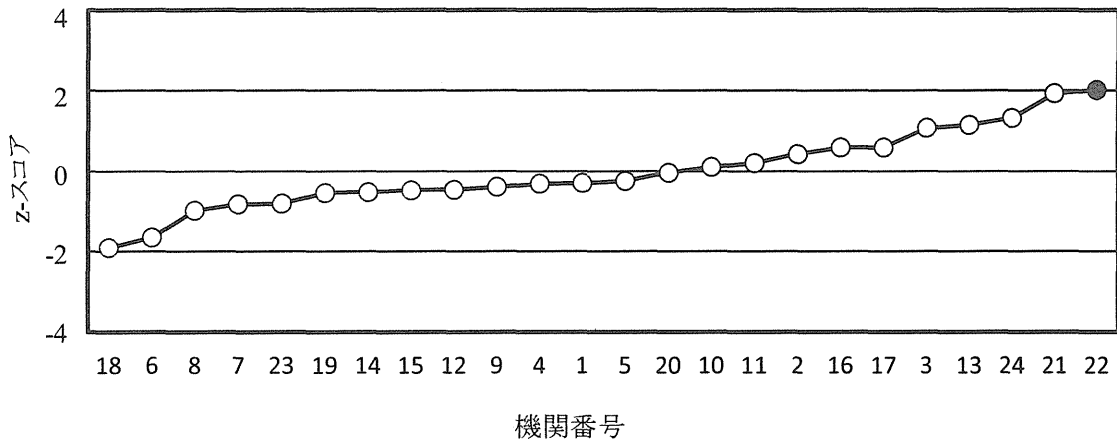
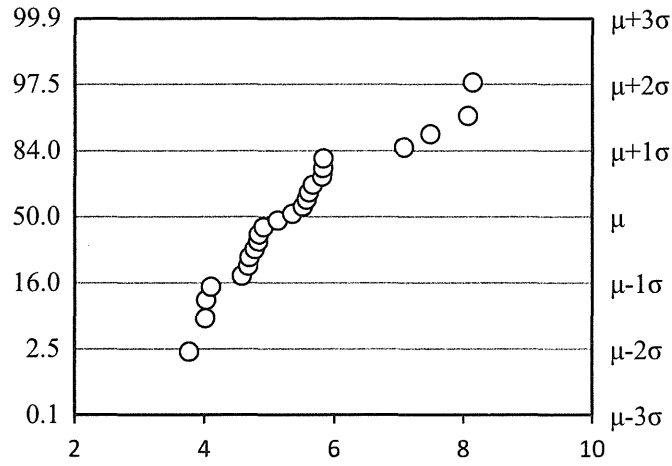


図6 試料1のMON71800検知試験のCt値の解析

z-スコア管理図において、z-スコアの絶対値が2以上の機関を黒丸で示した。

正規確率プロット



基本統計量	
データ数	24
最小値	3.78
最大値	8.15
平均値	5.433
標準偏差	1.210
ひずみ	0.991
とがり	0.475

Ct値のzスコア管理図

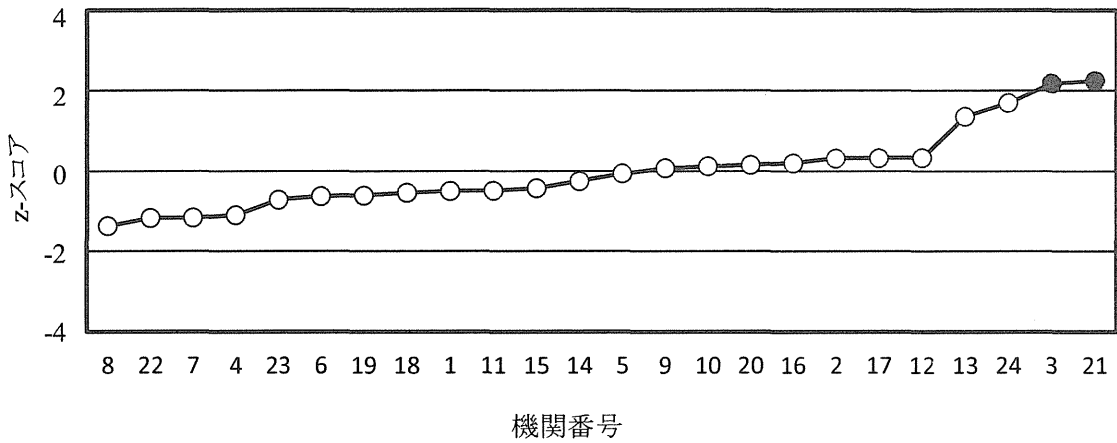


図7 試料1のコムギ陽性対照試験とMON71800検知試験のCt値の差の解析

zスコア管理図において、zスコアの絶対値が2以上の機関を黒丸で示した。

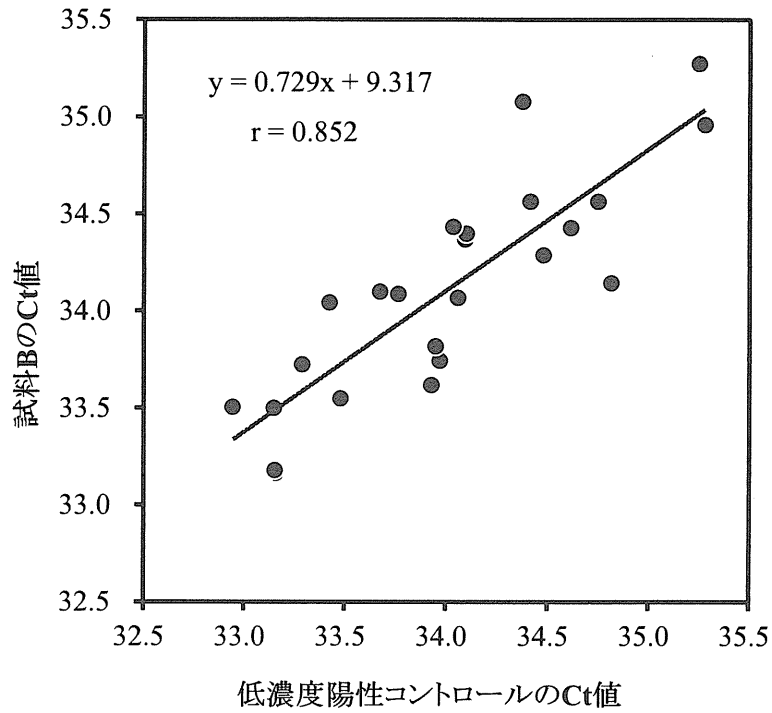


図 8 低濃度陽性コントロールと試料 B の MON71800 検知試験における Ct 値の相関

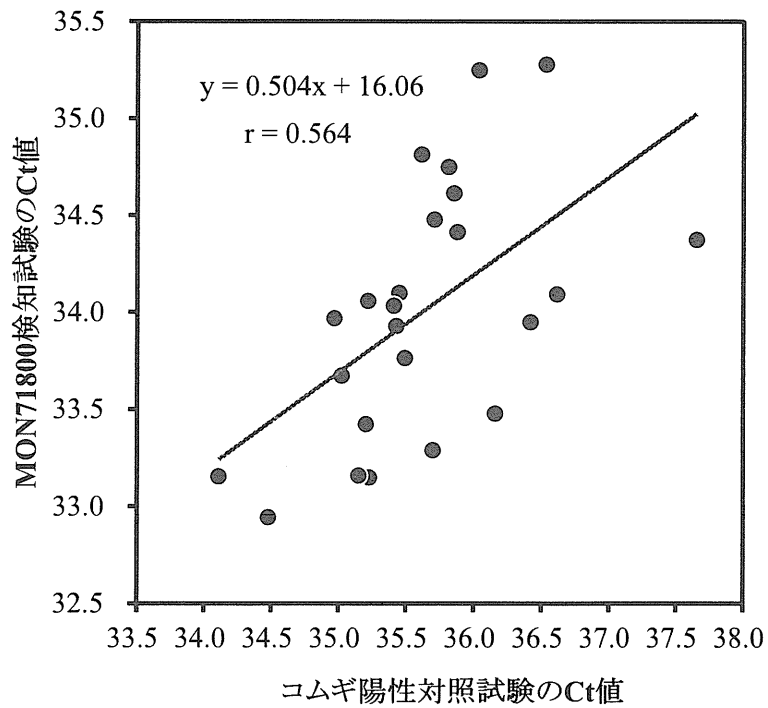


図 9 低濃度陽性コントロールのコムギ陽性対照試験と MON71800 検知試験の Ct 値の相関

平成 27 年度 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
研究分担報告書

食品衛生外部精度管理調査用適正試料の作製検討と
信頼性確保に関する研究（その 5）
—カビ毒検査のための適正調査試料の作製検討—

研究代表者 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
研究協力者 三宅 司郎 (公財)京都高度技術研究所 主幹研究員
平川 由紀 (公財)京都高度技術研究所 研究員
山崎 朋美 (公財)京都高度技術研究所 研究員
岩佐 精二 豊橋技術科学大学 環境・生命工学系 教授
佐藤 夏希 (一財)食品薬品安全センター 秦野研究所 研究員

研究要旨

食品中のカビ毒アフラトキシン (AF) は、2011 年 10 月から新たに総 AF (AFB₁, B₂, G₁, G₂) を対象とした規格が施行され、抗体を利用したイムノアフィニティーカラムが HPLC による測定時の試料調製方法として、新たに採用された。しかしこの方法は高度な技術と高価な装置を必要とすることから、現場においては、より簡便に測定が可能な ELISA キットの適用が求められている。そこで、測定対象の 4 種類の AF とほぼ等価に反応するモノクローナル抗体を利用して、直接競合 ELISA の構築を試みた。昨年度は、AFB₁ の測定範囲が 6.2-120 pg/mL と、基準値（総量で 10 ng/mL）と比較して 500 倍程度高感度な系を構築できた。しかし、製造ロットごとに測定範囲に違いが生じ、信頼性を確保できなかった。そのため今年度は、製造ロット間の生じにくい ELISA 条件の確立を試みた。その結果、AFB₁ の測定範囲が 50-200 pg/mL、B₂ が 50-230 pg/mL、G₁ が 60-370 pg/mL、G₂ が 60-600 pg/mL と、昨年度より感度が低下したものの基準値を測定可能で安定な直接競合 ELISA を構築できた。そこで、市販のピーナッツバターに含まれる AF 濃度を測定し、LC-MS/MS と比較したが、AFB₁ を検量線とした場合、 $y=1.26x+0.59$ 、相関係数 $R^2=0.98$ と良好な相関性を得た。最も感度が低かった AFG₂ を検量線とした場合は、 $y=1.87x+0.66$ 、相関係数 $R^2=0.95$ と勾配が立ち上がり、HPLC-MS/MS から得られる結果の 2 倍程度の値となるものの、スクリーニングには使用可能と考えられた。供試した市販ピーナッツバター中の AF は、LC-MS/MS の結果からそのほとんどが AFB₁ であった。AFB₁ が主体のピーナッツバター試料に関しては、定量精度の高い AFB₁ を検量線に、スクリーニング方法と位置付けるのが良いと考えられた。

Aspergillus 属のカビが産生するアフラトキシン (AF) は、国際ガン研究機関 IARC による発ガン性リスクの分類において、グ

A. 研究目的

ループ1（ヒトに対する発ガン性が認められる）と評価されている。継続的な摂取による肝臓がん発症リスクの増加や、大量摂取による肝機能障害の発症を引き起こす、危険性の高い自然毒であることが判っている。実際、2002年には、ケニアで患者数317名のうち125名が死亡する、AFによる重大な食中毒が発生した。

食品中のAF汚染の実態解明が進み、2011年10月から新たに総AF（AFB₁、B₂、G₁、G₂）を対象とした規格が施行された（厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知，食安発0331第5号（平成23年3月31日））。この通知により、総AFを10 μg/kgを超えて検出する食品は、食品衛生法第6条第2号に違反することになった。この規格の実施に伴い、AFクリーンアップ能力の高い、抗体を利用したイムノアフィニティーカラムがHPLCによる測定時の試料調製方法として採用された（厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知，食安発0816第1号（平成23年8月16日））。今後は、現場での迅速検査が必要になると見込まれ、免疫測定法によるキットが、多数市場に投入されている。

我々は、AF類に対してグループ特異的に反応するマウスモノクローナル抗体の作製に成功し、この抗体を用いてイムノアフィニティーカラムを開発した（*J. Agric. Food Chem.* 57, 8728-8734（2009））。昨年度は、このモノクローナル抗体を応用した直接競合ELISAキットの開発を試み、ピーナッツバターに添加したAFの回収試験において110-200%の回収率を得た。しかし、この条件では、測定範囲が大きく動き再現性の低いことが判った。そこで、直接競合ELISAの条件を見直し、再現性の高い系の構築を

目指した。

B. 研究方法

1. マウスモノクローナル抗体の調製

昨年度と同様に、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、堀場製作所製のマウス腹水として提供された。抗体は、33%飽和硫酸により不溶化させ、腹水中から回収した。ついでPBS（10mmol/Lリン酸ナトリウム、150mmol/L塩化ナトリウム；pH 7.0）に溶解し、PBSに対して透析を行い、抗体標品を得た。純度は、SDS-PAGEにより90%以上だった。

2. AFB₁のオキシム化

昨年度と同様に、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、オキシム化した。

シリカゲルカラムクロマトグラフィー（1g）（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。

3. HRP標識AFB₁の調製

昨年と同様に、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 μ L 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) ϕ 15 \times 500 mm、展開溶媒：PBS) により HRP 標識 AFB₁ を精製した。

4. 直接競合 ELISA の構築

96 ウェルマイクロタイタープレートに 5 μ g/mL 抗マウス IgG/10 mM PBS を 100 μ L/ウェルで添加後、4 $^{\circ}$ C で一晩静置し固相した。その後、0.4% BSA/10 mM PBS を 300 μ L/ウェルで添加後、室温で 30 分静置し、ブロッキングした。そこに、0.2% BSA/10 mM PBS で 40 ng/mL に希釈した MoAb2-3 を 100 μ L/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 10 ng/mL に希釈した HRP 標識 AFB₁ と測定対象 AF (10%メタノールに溶解) との等量混合液を 100 μ L/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 硫酸で発色を停止した。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。

（倫理面への配慮）

AF は毒性が高いため、使用後は直ちに自

重塩素酸溶液に浸漬して分解、無毒化した。

5. 直接競合 ELISA によるピーナッツバター中の AF の測定

AF に汚染されていない市販の国産ピーナッツを粘稠性が生じるまで磨砕均一化してピーナッツバターを調製し、AF の添加回収試験を実施した。また、市販の輸入ピーナッツバターを用いて、AF 汚染を調べた。

ピーナッツバター 2.5 g に対して、NaCl 0.25 g、80%メタノール 10 mL を加え、ピーナッツバター調製液とした。添加回収試験においては、メタノールで 500 ng/mL に希釈した各 AF4 種、及びそれらの等量混合物（各 0.25 μ g/mL）をそれぞれ、ピーナッツバター調製液に 100 μ L あるいは 20 μ L ずつ添加した（試料中最終 AF 量：10 ng/g あるいは 2 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、構築した直接競合 ELISA の測定範囲に収めるために、10%メタノールで適宜希釈した。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。

6. LC-MS/MS によるピーナッツバター中の AF の測定

サンプル 20 g を取り、2.5 g の NaCl を添加後、100 mL のメタノール溶液（水：メタノール=1:4）を加えて 5 分間ホモジェナイズした。3000 rpm で 15 分間遠心し、その上清を

25 mL 分取して水で 50 mL にフィルアップした。その 10 mL を取り、イムノアフィニティーカラム（AFLAKING 堀場製作所製）に

アプライしてアセトニトリル溶出液 3 mL を得た。窒素パージにより乾燥し、1.0 mL の溶解液 (10 mM 酢酸アンモニウム溶液 : メタノール = 6 : 4) で再溶解し、LC-MS/MS にかけた。LC は AQUITY UPLC (Waters 製)、検出器は Quattro Premier XE (Waters 製) を用いた。カラムは AQUITY UPLC BEH C18 (2.1×50 mm, 粒径 1.7 μm), 移動相は A 液 : 10 mM 酢酸アンモニウム (pH 5.0), B 液 : MeOH, グラジエント条件は A:B=0 min (95:5) -5 min (20:80) -5.1 min (95:5), カラム温度 40°C、流速 0.5 mL/min, サンプル注入量 5 μL だった。

C. D. 結果および考察

1. 直接競合 ELISA における各 AF の反応性

AF による 20% 阻害濃度 (IC_{20} 値) を測定下限、80% 阻害濃度 (IC_{80} 値) を測定上限とした場合、図 1 に示した通り、 AFB_1 は測定範囲 : 50-200 pg/mL、 AFB_2 は測定範囲 : 50-230 pg/mL、 AFG_1 は測定範囲 : 60-370 pg/mL、 AFG_2 は測定範囲 : 60-600 pg/mL となった。この結果から、MoAb2-3 を用いて構築した直接競合 ELISA は、基準値を測定するうえで十分に高感度であり、最大 2 倍程度反応性が異なるものの、4 種類の AF を測定できることが判った。また、直接競合 ELISA の安定性を確認するために、ELISA の製造日間の違いを調べた。その結果は、図 2 に示したとおり、図 1 と比較しても同様の値を示すとともに、3 回の製造ロット間差が小さく、安定して製造できたことが判った。

2. 添加回収試験

国産ピーナッツ由来のピーナッツバター

に AFB_1 , B_2 , G_1 , G_2 を各 2 ng/g と 10 ng/g 添加し、回収試験を試みた。検量線には、添加した AF を置いた場合と、すべてに G_2 を置いた場合を検討した。結果は表 1 に示したとおり、添加した AF を検量線にすることで 95%-119% と良好な回収率を得ることができた。一方、 G_2 を検量線に置いた場合は、114%-258% と、最大で 2.6 倍高い回収率となった。

構築した直接競合 ELISA は、ピーナッツバター中に汚染している AF を測定することができた。また、検量線に添加した AF と同じものを使用することで、高い定量性を得ることができた。しかし、各 AF の含量が実試料では不明なので、このような検量線を置くことはできない。そこで、最も感度の低かった G_2 を用いて添加回収試験を試みた。回収率は、最大 2.6 倍高くなるものの、偽陽性を生じにくい測定条件を確立できたと考えられた。

3. 輸入ピーナッツバター中の AF 汚染実態調査

添加回収試験での考察とは別の考え方として、ピーナッツバター中の各 AF の濃度分布が極端に偏っている場合には、その AF を検量線にすることで、定量性の高い測定条件を確立できたことになる。そこで、輸入ピーナッツバター中の AF 汚染頻度、濃度、各 AF の存在比率を知るために LC-MS/MS で測定を試みた。その結果、表 2 に示したように、AF 濃度が定量下限 (0.2 ng/g) 以下だったものは 23 検体中わずかに 5 検体だった。AF が汚染した全ての検体で、メジャーな AF は B_1 であり、その汚染濃度は 0.3-4.3 ng/g の範囲で分布していた。さらに、 G_1 と

G₂の検出例はなく、B₂のみ4検体で0.4-0.7 ng/gと微量検出した。

このように、ピーナッツバターの場合は、B₁が汚染源といえる。そこで、直接競合ELISAにおいても、B₁とG₂を検量線にAF濃度を測定し、LC-MS/MSと比較した。結果は、図3と図4に示したとおり、B₁を検量線にした場合は、 $y=1.26x+0.59$, $R^2=0.98$, $n=11$ とややELISAにバイアスがかかるが良好な相関性を得た。一方、G₂を検量線にした場合は、 $y=1.87x+0.66$, $R^2=0.95$, $n=11$ とELISA側が約2倍、値が高くなることが判った。輸入ピーナッツ汚染をELISAで測定する場合は、AFB₁を検量線にすれば多くのサンプルで定量性の高い結果を得られると考えられた。

E 結論

直接競合ELISAによる迅速・簡便・高感度なAF測定法の開発を目指した。その結果、基準値(10 ng/g)とその1/5濃度である2 ng/gのAFが汚染したピーナッツバターを測定可能な、実用的な直接競合ELISAを構築できた。最も高感度なB₁と低感度なG₂では、その感度に2倍程度の違いがあるが、定量精度を倍半分と見積もれば、十分に総AFを測定可能であることがわかった。また、供試したピーナッツバターには、何れもB₁がメジャーに含まれていた。即ち、B₁を検量線に用いることで定量精度の高い測定方法となることが判った。直接競合ELISAをスクリーニング方法と位置づけることにより、B₁検量線を用いて方がG₂がメジャーであったとしても、1/2濃度の値が得られることになる。B₁検量線を基にして5 ng/g以上のAFが存在していた場合は、LC-MS/MS

で確認することで、G₂の含量を確認することができる。構築した直接競合ELISAは、定量性の高いスクリーニング方法として有効と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 山崎朋美、佐藤夏岐、平山由紀、岩佐精二、渡辺卓穂、三宅司郎：カビ毒アフラトキシンに対するELISAの構築とその反応性：第110回日本食品衛生学会学術講演会、京都、2015.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

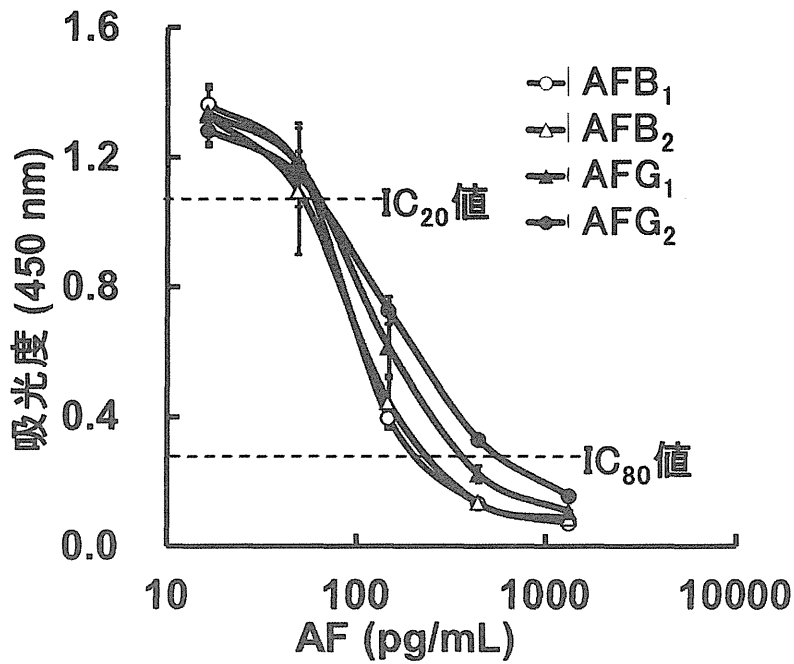
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



(サンプル数; n=5, 平均値±標準偏差)

図1. 直接競合 ELISA による各 AF (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) の標準曲線

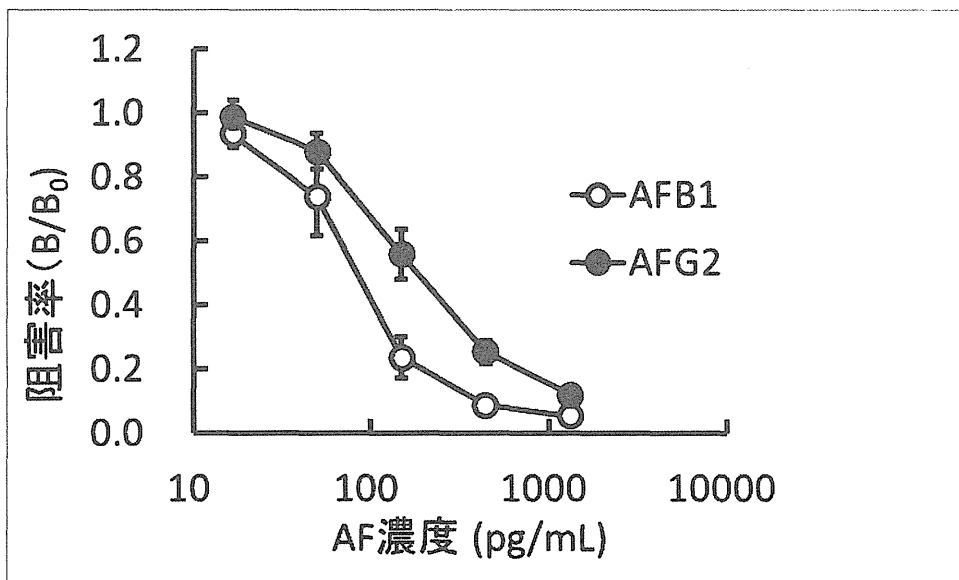


図2. 製造ロット日の違う直接競合 ELISA による AF (AFB₁, AFG₂) の標準曲線
結果は、別個に 3 回測定した平均値

表1. AFを添加したピーナッツバター の直接競合 ELISA による測定結果

添加したAF (ng/g)	検量線ごとの回収率 (%)				
	添加したAFを使用		G ₂ を使用		
	回収率	RSD	回収率	RSD	
B ₁	2	115	2.5	174	7.0
	10	111	0.9	258	1.5
B ₂	2	109	1.0	168	5.9
	10	95	3.3	187	1.1
G ₁	2	119	3.7	123	3.0
	10	98	4.0	114	4.6
G ₂	2	107	4.9	-	-
	10	96	1.7	-	-

結果は別個に5回測定した平均値

表2. ピーナッツバターを汚染するAFのLC-MS/MSによる測定

試料中濃度 (µg/kg)	AF				総アフラトキシン 濃度(µg/kg)	備考
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2		
A01	3.2	0.7	≦0.2	≦0.8	4	—
A03	≦0.2	≦0.4	≦0.2	ND	0	—
A04	0.4	≦0.4	≦0.2	ND	0	—
A05	0.6	≦0.4	ND	ND	1	—
A06	0.4	≦0.4	≦0.2	≦0.8	0	—
A07	0.6	≦0.4	≦0.2	ND	1	—
A08	1.0	≦0.4	≦0.2	ND	1	—
A09	1.9	0.4	≦0.2	ND	2	—
B01	0.4	≦0.4	≦0.2	ND	0	—
B02-1	0.4	≦0.4	≦0.2	ND	0	—
B02-2	0.4	≦0.4	≦0.2	ND	0	B02-1と同じ試料
B03	0.7	≦0.4	≦0.2	≦0.8	1	—
C01	0.9	≦0.4	≦0.2	ND	1	—
C02	4.3	0.7	≦0.2	ND	5	蒸留水で希釈後沈殿
C03	3.7	0.7	≦0.2	ND	4	蒸留水で希釈後沈殿
D01	0.3	≦0.4	ND	ND	0	—
D02	2.0	≦0.4	≦0.2	ND	2	—
E01	1.3	≦0.4	≦0.2	ND	1	蒸留水で希釈後白濁
E02	1.3	≦0.4	≦0.2	ND	1	蒸留水で希釈後白濁
F01	≦0.2	≦0.4	≦0.2	≦0.8	0	—
G01	≦0.2	≦0.4	≦0.2	ND	0	—
H01	≦0.2	≦0.4	≦0.2	ND	0	固形分少ない
H02	≦0.2	≦0.4	≦0.2	ND	0	固形分少ない
定量下限(µg/kg)	0.2	0.4	0.2	0.8		

ND,Not Detect

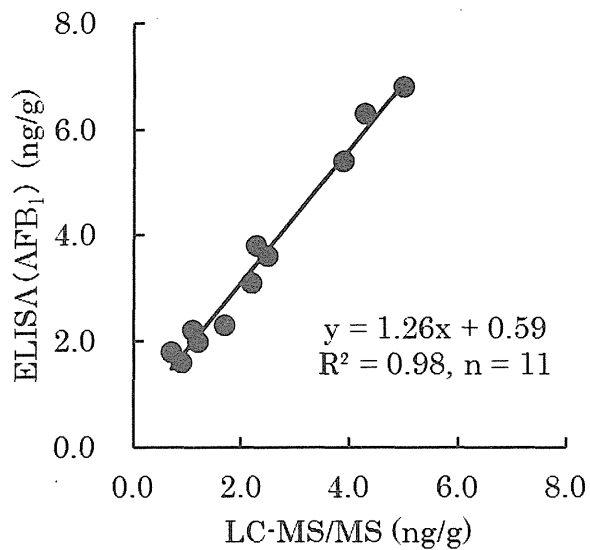


図3. AF汚染したピーナッツバターを用いたLC-MS/MSと直接競合ELISA(検量線にAFB₁を使用)との相関性の検討

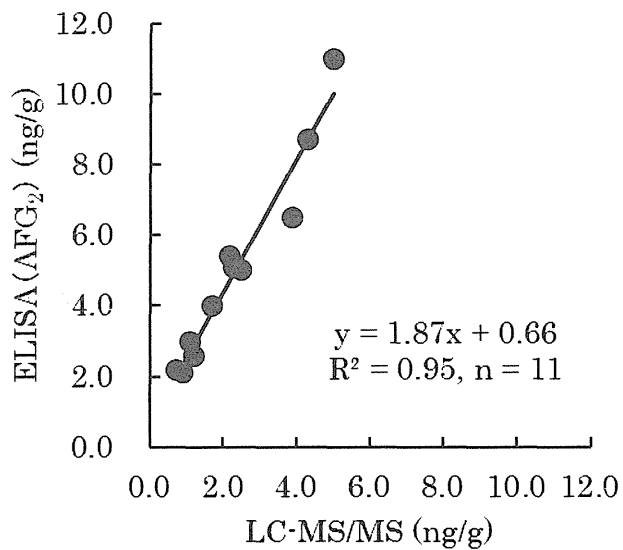


図4. AF汚染したピーナッツバターを用いたLC-MS/MSと直接競合ELISA(検量線にAFG₂を使用)との相関性の検討

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 27 年度

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

誌上発表

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
尾花裕孝： 福井直樹、高取聡、 山口聡子、北川陽子、 吉光真人、小阪田正 和、梶村計志、尾花 裕孝、	汎用マトリックス添加標準溶液 を活用した野菜類および果実類 中の残留農薬一斉分析法の妥当 性評価	食品衛生学雑誌	56	178-184	2015
鎗田孝： Takashi Yarita, Yoshie Aoyagi, Takamitsu Otake	Evaluation of the impact of matrix effect on quantification of pesticides in foods by gas chromatography-mass spectrometry using isotope-labeled internal standards.	J. Chromatogr. A	1396	109-116	2015

学会発表

発表者氏名	タイトル名	発表学会名	出版年
尾花裕孝： 北川陽子、吉光真人、高取 聡、福井直樹、小阪田正和、 山口聡子、起橋雅浩、梶村 計志、尾花裕孝、	GC-MS (MS) 測定におけるマトリッ クス効果補正用添加物質の検討 1	第 109 回日本食品衛生学会学術講 演会（東京）	2015
吉光真人、北川陽子、高取 聡、福井直樹、小阪田正和、 山口聡子、起橋雅浩、梶村 計志、尾花裕孝、伴埜行則、 中島涼、角谷直哉、山下浩 一、神藤正則、高良浩司	GC-MS (MS) 測定におけるマトリッ クス効果補正用添加物質の検討 2 —近畿地衛研 6 機関における共同 研究結果—	第 109 回日本食品衛生学会学術講 演会（東京）	2015

阿久津和彦、吉光真人、北川陽子、福井直樹、山口聡子、高取聡、梶村計志、尾花裕孝、	GC-MS/MS 測定における農薬群由来のマトリックス効果の検証—溶媒標準溶液中の農薬数の違いによるピーク応答の変化—	第 110 回日本食品衛生学会学術講演会（京都）	2015
吉光真人、阿久津和彦、北川陽子、福井直樹、山口聡子、高取聡、梶村計志、尾花裕孝、	高濃度農薬検出試験液の測定時に問題となりうる現象について—GC-MS/MS 測定における農薬群由来のマトリックス効果の顕在化—	第 110 回日本食品衛生学会学術講演会（京都）	2015
山口聡子、高取聡、吉光真人、阿久津和彦、北川陽子、福井直樹、小阪田正和、梶村計志、尾花裕孝、	残留農薬分析における野菜果実ジュースのマトリックス効果の比較	第 52 回全国衛生化学技術協議会年会（静岡）	2015
鎗田孝： 鎗田孝、大竹貴光、青柳嘉枝、沼田雅彦、高津章子	玄麦残留農薬分析に関する技能試験における 2 種類の付与値の比較	2015 年度 AOAC International 日本セッション年次大会（東京）	2015
大竹貴光、鎗田孝、	QuEChERS 法と一斉試験法による玄米中農薬の定量値の比較	第 110 回日本食品衛生学会学術講演会（京都）	2015
渡辺卓穂： 山崎朋美、佐藤夏岐、平川由紀、岩佐精二、渡辺卓穂、三宅司郎	カビ毒アフラトキシンに対する ELISA の構築とその反応特性	第 110 回日本食品衛生学会学術講演会（京都）	2015

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 27 年度

研究成果の刊行物・別刷

論文発表

妥当性評価

汎用マトリックス添加標準溶液を活用した野菜類および 果実類中の残留農薬一斉分析法の妥当性評価

(平成27年3月19日受理)

福井直樹* 高取 聡 山口聡子 北川陽子
吉光真人 小阪田正和 梶村計志 尾花裕孝

Validation Study on a Multi-Residue Method for Determination of Pesticide Residues in Vegetables and Fruits by using General Matrix Standard Solutions

Naoki FUKUI*, Satoshi TAKATORI, Satoko YAMAGUCHI, Yoko KITAGAWA, Masato YOSHIMITSU,
Masakazu OSAKADA, Keiji KAJIMURA and Hirotaka OBANA

Osaka Prefectural Institute of Public Health: 1-3-69 Nakamichi,
Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan; *Corresponding author

Quantitative methods using the matrix-matched standard solutions approach are widely used for multi-residue pesticide determination by GC-MS/MS to deal with the issue of matrix effects. However, preparing matrix-matched standard solutions in analyses of many kinds of samples is very time-consuming. In order to solve this problem, a method that employs general matrix standard solutions has been developed using polyethylene glycol (PEG), extract of vegetables-fruit juice (VFJm) and triphenyl phosphate (named the PEG-VFJm method). Here, a validation study for 168 pesticides was performed on three kinds of samples [potato, spinach and apple] at concentrations of 0.010 and 0.050 µg/g. In these three commodities, 144 to 158 pesticides satisfied the required criteria using the matrix-matched method and 129 to 149 pesticides satisfied the same criteria using the PEG-VFJm method. Our results suggest that application of general matrix standard solutions would enable rapid and effective analyses of pesticides.

(Received March 19, 2015)

Key words: 妥当性評価試験 method validation study; 残留農薬 pesticide residue; 一斉分析法 multi-residue method; ガスクロマトグラフィー/タンデム型質量分析計 GC-MS/MS; マトリックス効果 matrix effect

付録資料: 付録資料 (付録表S1, S2, S3およびS4) はJ-STAGEの日本食品衛生学雑誌 (<http://dx.doi.org/10.3358/shokueishi.56.178>) で閲覧できる。

緒 言

食品中に残留する農薬等に関する試験法について、平成25年12月13日までに「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」^{*1} (以下、ガイドライン) に則り評価を行うことが必要となった。筆者らは、QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safety) 法を参考に迅速な残留農薬一斉分析法を独自に開発し、ばれいしょ、ほうれんそうおよびりんご等の代

表的な野菜および果実類についてLC-MS/MSによる評価を行い既報¹⁾で報告した。今回はLC-MS/MSの測定では十分に感度が得られない農薬のうち、GC-MS/MSの測定に適した農薬を対象に妥当性評価を行った。

GC-MS/MSによる測定において、マトリックス効果の制御は不可欠である^{2)~7)}。マトリックス効果の制御法としては、マトリックスマッチング法が最も単純であり効果的である。本報では農薬を含まない試験品と同じ食品から調製した試験溶液 (濃縮ブランク試験溶液) をマトリックスとして標準溶液に添加したマトリックスマッチング標準溶液を使用する。しかし、多種類の試料をまとめて分析する場合、食品の種類ごとにマトリックスマッチング標準溶液を調製する必要があるため非効率的である。多岐に及ぶ食品の分析に適用するためには、特定の食品を対象が限定さ

* 連絡先 fukui@iph.pref.osaka.jp

大阪府立公衆衛生研究所: 〒537-0025 大阪市東成区中道1-3-69

^{*1} 「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について」 (平成22年12月24日付け食安発第1224第1号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知)

れない方法, 例えば, ポリエチレングリコールあるいは内標準等を活用した方法でマトリックス効果の制御法を確立しておく必要がある^{2), 3), 5), 7)~12)}. そこで, 新たにマトリックスマッチング標準溶液に代用可能であり, かつ多種類の試料に共用できる汎用的な標準溶液 (汎用マトリックス添加標準溶液) について, ポリエチレングリコール, 野菜果実ジュースから得たブランク試験溶液 (Vegetable-Fruit Juice matrix; VFJm) および内標準 (トリフェニルリン酸) を活用し検討した. VFJmは, 市販の野菜果実ジュースから調製するため, 単純な食品由来マトリックスと異なり, 一定の品質で再調製が可能であることが特長である.

汎用マトリックス添加標準溶液について検討した結果, ポリエチレングリコールおよびVFJmを併用し, 内標準による補正を加えて定量した場合 (PEG-VFJm併用法) において, マトリックスマッチング法に最も近いマトリックス効果の制御効率が認められた. そこでマトリックスマッチング法およびPEG-VFJm併用法により妥当性評価を行った.

本論文では, ばれいしょ, ほうれんそうおよびりんごを対象にマトリックス効果制御法について検討した結果に加えて, マトリックスマッチング法およびPEG-VFJm併用法の双方を活用して妥当性評価を行った結果についても報告する.

実験方法

1. 試薬

GC-MS/MSで高感度に検出できる168成分の農薬を対象とした (Table S1). 標準品は, 和光純薬工業 (株) (大阪), 関東化学 (株) (東京), 林純薬工業 (株) (大阪), Riedel-de-Haën (Seelze, Germany) および Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany) 製の残留農薬分析用標準品もしくはその同等品を用いた. 各農薬の標準品を1,000 µg/mLになるようにアセトンで溶解し標準原液とした. 混合標準溶液は, 各標準原液をすべて混合し, 2.5 µg/mLになるようにアセトンで調製した. これをアセトン-ヘキサン混合溶液 (1:1) で適宜希釈して, 検量線用混合標準溶液 (0.020~0.40 µg/mL) を作成した. アセトニトリル, アセトン, トルエン, ヘキサン, 塩化ナトリウム, クエン酸三ナトリウム二水和物, クエン酸二ナトリウムセスキ水和物, 無水硫酸マグネシウムは既報¹⁾ に準じた. トリフェニルリン酸 (一級) およびポリエチレングリコール 300 (一級, 以下PEG) は, 和光純薬工業 (株) 製を使用した. グラファイトカーボン (GCB)/PSA積層カラムは既報¹⁾ に準じた. 内標準には, トリフェニルリン酸を用い, これを0.2 µg/mLになるようアセトン-ヘキサン混合溶液で溶解した (内標準溶液). PEGは, 0.2% (w/v) になるようアセトン-ヘキサン混合溶液で溶解した (PEG溶液).

2. 試料

ばれいしょ, ほうれんそうおよびりんごを評価対象とした. ガイドラインの例示を参考に, デンプンを多く含む食

品としてばれいしょを, 葉緑素を多く含む食品としてほうれんそうを, 果実類としてりんごを選定した. これらは大阪府内および兵庫県内で入手した. 試料調製は既報¹⁾ に準じた.

野菜果実ジュースは, にんじんおよびりんごを主要原料とした野菜20種類および果実5種類を含む市販飲料を用いた. 原料の詳細はTable S2に示した.

3. 器具および機器

GC: 7890A (Agilent社製)

MS/MS: 7000B (Agilent社製)

50 mL PP製遠心管, フードプロセッサー, 高速ホモジナイザーおよび遠心分離装置は既報¹⁾ に準じた.

4. 測定条件

分析カラムはDB-5 ms (30 m×0.25 mm, 0.25 µm; Agilent社製) を使用した. 農薬の同定にあたり, クロロピリホスメチルの保持時間を13.443分にロックしたりテンションタイムロッキング機能を活用した. カラム昇温条件は次のとおりとした. 50°C (1 min)→25°C/min→125°C→10°C/min→310°C (10 min). 注入口温度250°C, トランスファーライン温度280°Cとした.

MS/MSのイオン化法はEI (70 eV) で行い, 各農薬のMS/MS条件はTable S1に示した. イオン源温度は280°C, 注入量は1 µLとした.

5. 実験操作

5.1 試験溶液の調製

試験溶液の調製は, 既報に準じた¹⁾. 試料10.0 gにアセトニトリルを正確に20 mL加え, 高速ホモジナイザーにより1分間抽出した. 抽出後, 塩析および脱水を経て得られた有機層をGCB/PSA積層カラムに正確に8 mL注入し, アセトニトリル-トルエン混合溶液30 mLで溶出した. カラム通過液および溶出液を回収して減圧濃縮乾固し, アセトン-ヘキサン混合溶液を正確に2 mL加えて溶解した (試験溶液; 1 mL当たり試料2 g相当量).

5.2 濃縮ブランク試験溶液 (1 mL当たり試料4 g相当量) の調製

マトリックスマッチング法の検量線に使用される濃縮ブランク試験溶液は, 各食品のブランク試料から5.1項に従って調製した. なお, 減圧濃縮乾固後にアセトン-ヘキサン混合溶液を正確に1 mL加えて, 1 mL当たり試料4 g相当量とした.

5.3 濃縮VFJm (1 mL当たり試料4 g相当量) の調製

濃縮VFJmは, 野菜果実ジュースから5.1項に従って調製した. 5.2項と同様に減圧濃縮乾固後にアセトン-ヘキサン混合溶液を正確に1 mL加えて, 1 mL当たり試料4 g相当量とした.

5.4 GC-MS/MS測定用試験溶液の調製

試験溶液0.2 mL, PEG溶液0.1 mLおよび内標準溶液0.1 mLを正確に混合し, GC-MS/MS測定用試験溶液 (1 mL当たり試料1 g相当量) とした.

Table 1. Various standard solutions and test solutions for study of matrix effects in GC-MS/MS analysis

Model solution	Remarks	Concentrations of components					Comparable sample solution
		Pesticides ($\mu\text{g/mL}$)	Internal standard* ($\mu\text{g/mL}$)	PEG [‡] (%)	Sample extract* (g/mL)	VFJm** (g/mL)	
Sample solution	α	0.05	0.05	None	1	—	—
	β			0.05	1	—	—
Standard solution	a	0.05	0.05	None	—	None	α
	b			0.05	—	None	β
	c			None	—	1	α
	d			0.05	—	1	β

* : Triphenyl phosphate (TPP)

‡ : Polyethylene glycol 300

* : Extract obtained from blank samples (potato, spinach and apple).

** : Extract obtained from blank sample of vegetable-fruit juice.

6. マトリックス効果および制御の検討

GC-MS測定時のマトリックス効果は注入口やカラム等の活性点が原因と考えられている^{2)~7)}。そこで、抽出および精製操作などにおける誤差要因を避けるために、農薬を含まない食品から調製した濃縮ブランク試験溶液に、添加濃度が0.050 $\mu\text{g/g}$ になるよう既知量の農薬を後添加した模擬試験溶液を調製した。効果の比較は、マトリックスマッチングにおいて各農薬 (0.050 $\mu\text{g/mL}$) に認められるマトリックス効果との一致度とした。模擬試験溶液は、濃縮ブランク試験溶液、検量線用混合標準溶液 (0.20 $\mu\text{g/mL}$) および内標準溶液を添加した模擬試験溶液 α (0.050 $\mu\text{g/mL}$) と、PEGの共注入を考慮してこれにさらにPEG溶液を添加した模擬試験溶液 β (0.050 $\mu\text{g/mL}$) をそれぞれ調製した。一方、標準溶液は、検量線用混合標準溶液 (0.20 $\mu\text{g/mL}$)、PEG溶液、内標準溶液、VFJmを組み合わせて添加した4種類の標準溶液 (a~d; 0.050 $\mu\text{g/mL}$) を調製した。これら模擬試験溶液 (α および β) と標準溶液 (a~d) の各農薬のピーク面積を比較した (Table 1)。ピーク面積比は以下の式で表現した。

$$\begin{aligned} & \text{ピーク面積比 (AR; \%)} \\ & = (\text{模擬試験溶液中の農薬のピーク面積}) \\ & \quad \div (\text{標準溶液中の農薬のピーク面積}) \times 100 \end{aligned}$$

実験は3日間行い、算出したARの平均値および相対標準偏差 (RSD) に基づいてカテゴリ (I~IV) に分類した (Table 2)。最終試験溶液調製段階までの農薬の損失は考慮せず、GC-MS/MSによる分析を経て、回収率が70~120%になることが期待できる範疇としてARが70%以上かつ120%以下になった農薬をカテゴリIに分類した。カテゴリIIおよびIIIはARが50~150%の範囲においてカテゴリIから逸脱しRSDが20%以下の農薬とし、カテゴリIVはカテゴリI~IIIに分類されない農薬とした。

7. 妥当性評価の検量線

7.1 検量線1 (マトリックスマッチング法)

各食品の濃縮ブランク試験溶液 (1 mL当たり試料4 g

Table 2. Criteria of study of matrix effects on GC-MS/MS analysis

Category	Average* (%)	RSD* (%)
I	$70 \leq \text{AR} \leq 120$	≤ 20
II	$50 \leq \text{AR} < 70$	≤ 20
III	$120 < \text{AR} \leq 150$	≤ 20
IV	Not meeting criteria for categories I, II and III	

* : Average of calculated values for peak area of test solution divided by that of standard solution.

* : Analyzed by GC-MS/MS ($n=3$).

相当量)、PEG溶液、内標準溶液および検量線用混合標準溶液を正確に等量混合して調製した (最終的に1 mL当たり試料1 g相当量になる)。調製後の各農薬の濃度は0.005, 0.010, 0.020, 0.050, 0.075および0.10 $\mu\text{g/mL}$ とした。

7.2 検量線2 (PEG-VFJm併用法)

濃縮VFJm (1 mL当たり試料4 g相当量)、PEG溶液、内標準溶液および検量線用混合標準溶液を正確に等量混合して調製した (最終的に1 mL当たりVFJm 1 g相当量となる)。調製後の各農薬の濃度は7.1項と同一とした。

8. 妥当性評価

既報¹⁾のとおり、0.010および0.050 $\mu\text{g/g}$ の各添加濃度について分析者1名が併行数2で5日間の枝分かれ試験を実施した。2.5または0.50 $\mu\text{g/mL}$ の農薬混合標準溶液 (アセトン溶液) 0.2 mLを正確に試料に添加し、30分間静置後、上記5項に従って試験溶液を調製した。なお定量は試験溶液を共有し、マトリックスマッチング法およびPEG-VFJm併用法の双方で行った。PEG-VFJm併用法では、共注入法であるため試験溶液にもPEGを添加している。この試験溶液を双方の検量線で同時に評価できるよう、本報ではマトリックスマッチング法においてもPEGを添加した。これらの検量線から、真度ならびに併行および室内精度をそれぞれ算出した。評価結果をTable 3のとおり分類した。