

平成 30 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）

食品衛生検査を実施する試験所における品質保証システムに関する研究

研究分担報告書

既存技能試験試料の改善および新規技能試験プログラムの導入に関する研究(4)

EU から検査を求められている物質に関する試験法の妥当性評価の実施

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	部長
研究協力者	鳥海 栄輔	(一財)日本食品分析センター 農薬試験課	課長
	小杉 正樹	(一財)日本食品分析センター 微量試験課	課長
	猪之鼻修一	(一財)日本食品分析センター	主任研究員
	福沢 栄太	(一財)日本食品分析センター	主任研究員

研究要旨

日本産畜産物をEUへ輸出するにあたり、EUから検査を求められている物質についてモニタリング検査を実施しなければならないが、それに用いる試験法は妥当性が評価された国際的にも信頼性の高いものであることが必要である。現在、EU輸出モニタリングに用いる試験法は「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」(平成22年12月24日 食安発1224第1号)に従って妥当性を評価しており、EU規則のCOMMISSION DECISION (2002/657/EC)に示された妥当性評価は一部の試験法でしか実施していない。そこで本研究では、EU規則による妥当性評価が未実施であるアフラトキシンB₁、B₂、G₁及びG₂とチルパロシンについてCOMMISSION DECISION (2002/657/EC)に従った妥当性評価を実施し、特異性、真度、精度が要求性能基準を満たしているか否かを確認するとともに、決定限界(CC)及び検出能力(CC)を算出した。

EU規則に従い実施した豚筋肉のアフラトキシンB₁、B₂、G₁及びG₂分析法及び鶏肝臓のチルパロシン分析法において、特異性、真度、精度はいずれも要求性能基準を満たしていることが確認でき、「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」で妥当性評価したアフラトキシンB₁、B₂、G₁及びG₂とチルパロシンの分析法はEU規則による要求性能基準も満たすことが示唆された。なお、アフラトキシンB₁、B₂、G₁及びG₂のCC はそれぞれ0.27、0.17、0.29、0.21 µg/kg、CC はそれぞれ0.36、0.24、0.41、0.31 µg/kgと算出され、チルパロシン及び3-0-アセチルタイロシンのCC はそれぞれ56.3、58.8 µg/kg、CC はそれぞれ62.6、67.7 µg/kgと算出

された。

また「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」で評価した豚、鶏、卵及び乳のEU輸出モニタリングに使用する試験法について、模擬的な内部精度管理を実施したところ、すべての試験法において、選択性と真度等の目標値を十分に満たした結果が得られた。これらの試験法を用いた日常的な試験は安定的に実施出来ていたことから、EU輸出モニタリングの実施が可能と考えられた。

A. 研究目的

日本産畜産物をEUへ輸出するにあたり、EUから検査を求められている物質についてモニタリング検査を実施しなければならないが、それに用いる試験法は国際的にも信頼の高いものであることが必要である。現在、EU輸出モニタリングに用いる試験法は「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」(平成22年12月24日 食安発1224第1号)(以下、ガイドライン)に従って妥当性を評価しており、EU規則のCOMMISSION DECISION (2002/657/EC)に示された妥当性評価は一部の試験法でしか実施していない。

そこでEU規則による妥当性評価が未実施であるアフラトキシンB₁、B₂、G₁及びG₂とチルバロシンについてCOMMISSION DECISION (2002/657/EC)に従った妥当性評価を実施し、特異性、真度(回収率)、精度が目標値に合致しているか否かを確認するとともに、決定限界(CC)及び検出能力(CC)を算出することを目的とした。

また、豚、鶏、卵及び乳のEU輸出モニタリングに使用するために開発した試験法について模擬的な内部精度管理を実施し、目標とした管理基準に対して、内部精度管理の結果の状況を確認することを目的とした。

B. 方法

1. EU規則に基づく妥当性評価

1-1 試料基材および試薬

アフラトキシンB₁、B₂、G₁及びG₂

試料基材として、豚筋肉を用い、標準品には富士フィルム和光純薬製のアフラトキシン混合標準液(アフラトキシンB₁、アフラトキシンB₂、アフラトキシンG₁及びアフラトキシンG₂ 各25 mg/L)を使用した。その他の試薬として富士フィルム和光純薬製のメタノール(高速液体クロマトグラフ用)、関東化学製のアセトニトリル(高速液体クロマトグラフ用)、昭和電工製のAutoprep MF-A 1000(多機能カートリッジカラム)を用いた。

チルバロシン

試料基材として、鶏肝臓を用い、標準品にはToronto Research Chemicals製のチルバロシン標準品及び3-*O*-アセチルタイロシン標準品(共に純度96%)を使用した。その他の試薬として関東化学製のアセトニトリル及びメタノール(高速液体クロマトグラフ用)、アセトン(残留農薬試験用)、ギ酸(特級)、Waters製のOasis HLB(ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム)を用いた。

1-2 使用機器および測定条件

アフラトキシンB₁、B₂、G₁及びG₂

試料作製用機器として、ロボ・クープ製のフードプロセッサ―(BLIXER-3D)を使用した。

試料溶液の抽出では、エスエムテ―製の水モジナイザ―及びコクサン製の遠心分離機を使用した。

試料溶液の測定は、島津製作所製の蛍光分光検出器(フォトケミカルリアクター装着)付き高速液体クロマトグラフ(HPLC) : LC-20ADを用いて行った。

HPLCによる測定には、カラムは Mightysil RP-18 GP(4.6 mm、長さ250 mm、粒径5 μm)、移動相には水及びメタノールの混液(60:40)、カラム流量は0.7 mL/min、オープン温度は40 °C、測定波長は蛍光励起波長365 nm、蛍光測定波長450 nmとした。

チルバロシン

試料作製用機器として、ロボ・クープ製のフードプロセッサ―(BLIXER-3D)を使用した。

試料溶液の抽出では、IKAジャパン製の水モジナイザ―を使用した。

試料溶液の測定は、SCIEX製の液体クロマトグラフ タンデム質量分析計(LC-MS/MS) : Triple Quad 6500+を用いて行った。

LC-MS/MSによる測定には、カラムは InertSustain C18 (2.1 mm、長さ150 mm、粒径5 μm)、移動相には水及びギ酸の混液(1000:1)とアセトニトリルを用いたグラジエント条件とした。カラム流量は0.2 mL/min、オープン温度は40 °C、イオン化時のコーン電圧及びコリジョンエネルギーはチルバロシンでそれぞれ46 V、45 eV、3-*O*-アセチルタイロシンでそ

れぞれ11 V、45 eVに設定し、ポジティブモードとした。

1-3 標準溶液の調製

アフラトキシン B₁、B₂、G₁及びG₂

アフラトキシン混合標準液を4 mL分取し、アセトニトリルで200 mLに定容し500 μg/Lの混合標準原液を調製した。混合標準原液をアセトニトリル及び水の混液(9:1)で適宜希釈し、5、2.5、0.625、0.25及び0.1 μg/Lの混合標準溶液を調製し、これを検量線用標準溶液とした。

チルバロシン

チルバロシン標準品約5 mgを精密に量り取り、50 mL容全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶解(超音波照射)した後定容し、これをチルバロシン標準原液(100 mg/L)とした。一方で3-*O*-アセチルタイロシンは標準品約2 mgを精密に量り取り、100 mL容全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶解(超音波照射)した後定容し、これを3-*O*-アセチルタイロシン標準原液(20 mg/L)とした。チルバロシン標準原液5 mLをメタノールで25 mLに定容し、20 mg/Lチルバロシン標準溶液を調製した。20 mg/Lチルバロシン標準溶液及び3-*O*-アセチルタイロシン標準原液各1 mLをメタノールで20 mLに定容し、1 mg/Lの混合標準溶液を調製した。この液を適宜メタノールで希釈し、0.002、0.001、0.0005、0.0002及び0.0001 mg/L混合標準溶液を調製し、これを検量線用標準溶液とした。

1-4 試料溶液の調製

アフラトキシンB₁、B₂、G₁及びG₂

試料基材には豚筋肉を、抽出溶媒にはアセトニトリル及び水の混液(9:1)を用いた。

試料50 gを500 mL容器に量り取り、アセトニトリル及び水の混液(9:1)200 mLを加え、ホモジナイザーで5分間攪拌後、2500 r/minで5分間遠心分離した抽出液の上清を綿栓ろ過した。

ろ液約5 mLをAutoprep MF-A 1000に負荷し、得られた溶出液約1.5 mLを試料溶液とした。

チルバロシン

試料基材には鶏肝臓を、抽出溶媒にはアセトンをを用いた。

試料10 gを250 mL容器に量り取り、アセトン100 mLを加え、ホモジナイザーで1分間攪拌後、吸引ろ過した。ろ過器上の残留物を広口ポリ瓶に戻し、アセトン50 mLを加えてホモジナイザーで1分間攪拌した後、吸引ろ過した。得られたろ液を200 mL容全量フラスコに合わせ、アセトンで定容した。抽出液4 mL(試料0.2 g相当)を遠心管に分取し、水15 mLを加え、Oasis HLB (あらかじめメタノール10 mL、水及びメタノールの混液(3:2)10 mLで洗浄したもの)に負荷した。遠心管内を水及びメタノールの混液(3:2)5 mLで洗い、洗液をカラムに負荷、洗浄する操作を2回繰り返した。メタノール10 mLで溶出し、10 mL容全量フラスコに定容したものを試験溶液とした。

1-5 定量

アフラトキシン B₁、B₂、G₁及びG₂

検量線用標準溶液の各 10 µL を高速液体クロマトグラフに注入し、得られたアフラトキシン B₁、アフラトキシン B₂、アフラトキシン G₁ 及びアフラトキシン G₂ のピーク高から検量線を作成した。

試料溶液 10 µL を高速液体クロマトグラフに注入し、検量線及び得られたアフラトキシン B₁、アフラトキシン B₂、アフラトキシン G₁ 及びアフラトキシン G₂ のピーク高から、試料溶液中の各物質の濃度を求めた。試料中の各物質の回収率を算出した。

チルバロシン

検量線用標準溶液の各 2 µL を液体クロマトグラフ - タンデム質量分析計に注入し、得られたチルバロシン及び 3-O-アセチルタイロシンのピーク面積から検量線を作成した。

試料溶液 2 µL を液体クロマトグラフ - タンデム質量分析計に注入し、検量線及び得られたチルバロシン及び 3-O-アセチルタイロシンのピーク面積から、試料溶液中の物質の濃度を求めた。試料中の各物質の回収率を算出した。

1-6 妥当性評価

アフラトキシンB₁、B₂、G₁及びG₂

1) 特異性

20個のブランク試料のデータを採取し、特異性を確認した。

2) 真度

CRM入手困難なため、添加回収率で評価した。豚筋肉試料50 gにアフラトキ

シンB₁、アフラトキシンB₂、アフラトキシンG₁及びアフラトキシンG₂がそれぞれ1、1.5、2 µg/kgとなるように添加し、本試験法に従って操作を行った。なお、試験は1日試行6回、3日間実施し、-50 % ~ +20 % (50 ~ 120 %) を評価基準とした。

3) 検量線

アフラトキシンB₁、アフラトキシンB₂、アフラトキシンG₁及びアフラトキシンG₂の検量線を作成した。測定に使用した標準溶液は5、2.5、0.625、0.25及び0.1 µg/Lの計5点とした。

4) 精度

添加試料の繰り返し分析により得られる試験所内変動係数(相対標準偏差; CV)が、Horwitz式(修正式)により求めた室間再現精度の2/3レベル(CV: 15 %)を超えないことを評価基準とした。

5) 決定限界(CC)

1-6 2)で実施した添加回収試験のデータについて、添加濃度をX軸、分析濃度をY軸にプロットし、y切片及びy切片の室内再現性の標準偏差を求め、以下の式からアフラトキシンB₁、アフラトキシンB₂、アフラトキシンG₁及びアフラトキシンG₂のCC を求めた。

$CC = y\text{切片の平均値} + y\text{切片の室内再現性の標準偏差の}2.33\text{倍}$

6) 検出能力(CC)

1-6 2)で求めたCC の値が定量限界(1 µg/kg)を下回ったことから、CC の算出には定量限界相当の添加回収試験のデータを使用した。

1-6 2)で実施した定量限界相当の添加回収試験結果(18個)に、2回の追加試験

の結果を加えた計20個のデータからCC を算出した。また、各アフラトキシン毎に全ての分析値の標準偏差を求め、以下の式からアフラトキシンB₁、アフラトキシンB₂、アフラトキシンG₁及びアフラトキシンG₂のCC を求めた。

$CC = CC + 20\text{個のデータの標準偏差の}1.64\text{倍}$

チルバロシン

1) 特異性

20個のブランク試料のデータを採取し、特異性を確認した。

2) 真度

CRM入手困難なため、添加回収率で評価した。鶏肝臓試料10 gにチルバロシン及び3-0-アセチルタイロシンがそれぞれ25、50、75 µg/kgとなるように添加し、本試験法に従って操作を行った。なお、試験は1日試行6回、3日間実施し、-20 % ~ +10 % (80 ~ 110 %) を評価基準とした。

3) 検量線

チルバロシン及び3-0-アセチルタイロシンの検量線を作成した。測定に使用した標準溶液は0.002、0.001、0.0005、0.0002及び0.0001 mg/Lの計5点とした。

4) 精度

添加試料の繰り返し分析により得られる試験所内変動係数(CV)が、Horwitz式(修正式)により求めた室間再現精度の2/3レベル(15 %)を超えないことを評価基準とした。

5) 決定限界(CC)

1-6 2)で実施した基準値(MRL)相当(50 µg/kg)の添加回収試験結果(18個)に、2回の追加試験の結果を加えた計20個のデ

ータからCC を求めた。

CC = 20個のデータの標準偏差の1.64倍

6)検出能力(CC)

CC は、先に算出したCC 相当濃度の添加試料を20回分析し、算出した標準偏差の1.64倍をCC 相当濃度に加算算出される。

本研究では、CC 相当濃度 = MRL相当濃度とし、MRL相当濃度の添加試料(50 µg/kg)を20回分析し、算出した標準偏差の1.64倍を決定限界(CC)相当濃度に加算算出した。

CC = CC + 20個のデータの標準偏差の1.64倍

2. 内部精度管理の実施

EU輸出モニタリングを実施する際には、適切な内部精度管理の実施が求められる。そこで、模擬的に内部精度管理を実施した。表-12に掲げた畜種ごとの30物質について、試験対象物質が検出しないことが明らかな試料(以下「陰性対照試料」)にEUのMRL以下の濃度(MRLが設定されていない物質については定量限界相当)となるように標準溶液を添加し、試行数1回で日を変えて3回実施した。また、各試験日には陰性対照試料についても同時に試験(ブランク試験)を実施した。選択性の許容範囲は、「定量限界 基準値 1/3」の場合、基準値相当濃度に相当するピークの1/10以下、「定量限界 > 基準値 1/3」及び「不検出」の場合、定量限界濃度に相当するピークの1/3以下とした。添加回収試験の回収率の許容範囲は70 ~ 120 %とした。また、3回の添加回収

試験の結果からCVを求め、Horwitz式(修正式)により求めた室間再現精度の2/3レベル(15 %)以内を暫定的な管理目標とした。

C. D. 研究結果および考察

1. EU 規則に基づく妥当性評価

アフラトキシン B₁、B₂、G₁及びG₂

1) 特異性

アフラトキシンB₁、アフラトキシンB₂、アフラトキシンG₁及びアフラトキシンG₂のいずれにおいても、定量を妨害するピークがないことを確認した。

2) 真度(回収率)

添加回収率の結果を表-1~4に示した。真度の評価基準、-50 % ~ +20 %(50 ~ 120 %)に対し、いずれの添加濃度においても基準を満たす結果が得られた。

3) 検量線

アフラトキシンB₁、アフラトキシンB₂、アフラトキシンG₁及びアフラトキシンG₂の検量線の一例を図-1に示した。

アフラトキシンB₁、アフラトキシンB₂、アフラトキシンG₁及びアフラトキシンG₂の決定係数はいずれも0.995以上の結果が得られた。

4) 精度

結果は表-1~4に併記した。いずれの添加濃度においても、アフラトキシンB₁、アフラトキシンB₂、アフラトキシンG₁及びアフラトキシンG₂は評価基準を満たす結果が得られた。

5) 決定限界(CC)

結果を表-5に示した。

6) 検出能力(CC)

結果を表-6及び表-7に示した。

チルバロシン

1) 特異性

チルバロシン及び3-*O*-アセチルタイロシンともに、定量を妨害するピークがないことを確認した。

2) 真度(回収率)

添加回収率の結果を表-8及び9に示した。真度の評価基準、-20 % ~ +10 % (80 ~ 110 %) に対し、いずれの添加濃度においても基準を満たす結果が得られた。

3) 検量線

チルバロシン及び3-*O*-アセチルタイロシンの検量線の一例を図-2に示した。

チルバロシン及び3-*O*-アセチルタイロシンの決定係数はいずれも0.995以上の結果が得られた。

4) 精度

結果は表-8及び9に併記した。いずれの添加濃度においても、チルバロシン及び3-*O*-アセチルタイロシンは評価基準を満たす結果が得られた。

5) 決定限界(CC)

結果を表-10及び11に示した。

6) 検出能力(CC)

チルバロシンのCC は62.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、3-*O*-アセチルタイロシンのCC は67.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と算出された。

以上のことから、アフラトキシンB₁、B₂、G₁及びG₂の試験法は豚筋肉を対象とした定量下限1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ での残留分析法として、また、チルバロシンの試験法は鶏肝臓を対象とした基準値50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を評価する残留分析法として、いずれも妥当であると評価された。

2. 内部精度管理の実施

表-12に3回のブランク試験結果、添加回収試験の回収率及び3回の添加回収率のCVを示した。いずれの分析法においてもブランク試験では定量を妨害するピークがないことを確認した。また、添加回収率は全て70 ~ 120 %を満たしていた。CVは乳のエリスロマイシンで14.7 %であったが、いずれの項目でも暫定目標とした15 %以内であり、管理目標として概ね妥当と考えられた。

以上のことから、試行回数3回と評価回数は少ないものの、設定した管理基準に対し、これらの試験はいずれも安定的に実施出来ている結果が得られた。

E. 結論

EU規則に従い実施した豚筋肉のアフラトキシンB₁、B₂、G₁及びG₂分析法及び鶏肝臓のチルバロシン分析法において、特異性、真度(回収率)、精度はいずれも目的値に合致していることが確認できた。EU規則では添加回収試験による真度や精度は3濃度で評価する点等、ガイドラインとは目的、手法の異なる点があるため留意する必要はあるが、ガイドラインで妥当性を評価した試験法が、EU規則が要求する性能基準を満たすことが示唆された。

また豚、鶏、卵及び乳のEU輸出モニタリングに使用する試験法について模擬的な内部精度管理を実施したところ、実施した30物質すべてにおいて、安定的実施出来ていたことから、EU輸出モニタリングの実施が可能であると考えられた。

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

なし

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

表-1 アフラトキシンB₁の添加回収試験の結果

試料	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)	
		試行	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目				全平均
豚筋肉	1	1日目	1.0498	1.0060	1.1016	1.0627	1.0350	1.0454	1.0239	102.4	3.8	5.9
		2日目	1.0113	1.0294	0.9396	0.9386	0.9598	0.9244				
		3日目	1.0239	1.0644	1.1100	0.9997	1.0877	1.0412				
	1.5	1日目	1.4864	1.4713	1.4544	1.5138	1.5299	1.4620	1.4781	98.5	2.3	3.7
		2日目	1.3903	1.4553	1.4110	1.4061	1.4564	1.4611				
		3日目	1.5202	1.5429	1.4476	1.5718	1.5132	1.5114				
	2	1日目	2.0295	2.0391	2.0193	2.0391	2.0378	1.9814	1.9900	99.5	2.5	5.2
		2日目	1.9282	1.8178	1.8970	1.9171	1.8919	1.8574				
		3日目	2.0740	2.0180	1.9895	2.0012	2.1708	2.1110				

表-2 アフラトキシンB₂の添加回収試験の結果

試料	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)	
		試行	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目				全平均
豚筋肉	1	1日目	0.9846	0.9799	1.0431	0.9931	1.0064	0.9864	0.9869	98.7	2.6	5.4
		2日目	0.9374	0.9744	0.9125	0.9257	0.9157	0.9388				
		3日目	1.0662	1.0231	1.0338	0.9811	1.0534	1.0092				
	1.5	1日目	1.4716	1.4673	1.4542	1.4630	1.4442	1.4348	1.4541	96.9	1.5	4.2
		2日目	1.3992	1.4104	1.3922	1.3599	1.3950	1.4114				
		3日目	1.5114	1.5572	1.4940	1.5313	1.4953	1.4816				
	2	1日目	1.9570	1.9662	2.0014	1.9518	2.0098	1.8907	1.9567	97.8	1.9	3.6
		2日目	1.9162	1.8323	1.8402	1.9378	1.9205	1.9053				
		3日目	2.0299	2.0056	2.0096	1.9909	2.0233	2.0316				

表-3 アフラトキシンG₁の添加回収試験の結果

試料	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値($\mu\text{g}/\text{kg}$)							平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)	
		試行	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目				全平均
豚筋肉	1	1日目	1.0568	1.1122	1.1636	1.1172	1.1365	1.1305	1.0626	106.3	3.6	8.6
		2日目	0.9920	0.9194	0.9256	0.9791	0.9482	1.0257				
		3日目	1.1229	1.0628	1.0727	1.1306	1.1524	1.0780				
	1.5	1日目	1.6043	1.5984	1.4983	1.5866	1.5571	1.5197	1.5554	103.7	3.4	4.0
		2日目	1.4656	1.5133	1.4911	1.5678	1.4902	1.5606				
		3日目	1.6315	1.6266	1.5043	1.5233	1.6845	1.5736				
	2	1日目	2.1417	2.1368	2.2002	2.1704	2.1297	2.1144	2.0893	104.5	2.0	4.8
		2日目	2.0124	2.0221	2.0030	1.9741	1.9697	1.9127				
		3日目	2.1835	2.0825	2.1735	2.0698	2.1173	2.1930				

表-4 アフラトキシンG₂の添加回収試験の結果

試料	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							全平均	平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
		試行	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目				
豚筋肉	1	1日目	1.0984	1.0766	1.1098	1.1036	1.1087	1.0861	1.0548	105.5	1.6	6.5
		2日目	0.9905	0.9914	0.9733	0.9839	0.9686	0.9602				
		3日目	1.1194	1.0805	1.0890	1.0596	1.1135	1.0728				
	1.5	1日目	1.5812	1.5579	1.5449	1.5665	1.5633	1.5371	1.5390	102.6	1.3	3.7
		2日目	1.4800	1.4864	1.4590	1.4594	1.4750	1.5124				
		3日目	1.5697	1.6153	1.5750	1.5958	1.5813	1.5412				
	2	1日目	2.0699	2.1359	2.1623	2.1137	2.0770	2.0152	2.0729	103.6	1.7	3.9
		2日目	2.0323	1.9503	1.9739	2.0157	1.9974	1.9786				
		3日目	2.1222	2.1201	2.1483	2.1130	2.1403	2.1469				

表-5 アフラトキシンB₁、アフラトキシンB₂、アフラトキシンG₁及びアフラトキシンG₂のCC の算出結果

	アフラトキシンB ₁	アフラトキシンB ₂	アフラトキシンG ₁	アフラトキシンG ₂
y切片の平均値 : (a)	0.048181	0.011300	0.029036	0.028297
y切片の室内再現性の 標準偏差 : (b)	0.091876	0.064957	0.108655	0.076687
(b) × 2.33 : (c)	0.214072	0.151349	0.253165	0.178680
(a)+(c)	0.262253	0.162649	0.282201	0.206977
CC	0.27	0.17	0.29	0.21

表-6 追加で試験した定量限界相当の添加回収試験結果(単位 : $\mu\text{g}/\text{kg}$)

	アフラトキシンB ₁	アフラトキシンB ₂	アフラトキシンG ₁	アフラトキシンG ₂
追加試験1回目	0.9608	1.0028	1.0758	1.0764
追加試験2回目	1.0313	1.0195	1.1294	1.1151

表-7 アフラトキシンB₁、アフラトキシンB₂、アフラトキシンG₁及びアフラトキシンG₂のCC の算出結果

	アフラトキシンB ₁	アフラトキシンB ₂	アフラトキシンG ₁	アフラトキシンG ₂
n=20の標準偏差 (SD)	0.054103	0.045216	0.076918	0.056864
1.64 × SD : (d)	0.088728	0.074154	0.126145	0.093257
CC +(d)	0.350981	0.236802	0.408346	0.300234
CC	0.36	0.24	0.41	0.31

表-8 チルバロシンの添加回収試験の結果

試料	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値($\mu\text{g}/\text{kg}$)								平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
		試行	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	全平均			
鶏肝臓	25	1日目	26.2598	26.5209	27.6753	24.6935	25.5547	24.7298	25.5924	102.4	6.0	6.0
		2日目	28.4264	26.0960	25.8069	24.7610	25.2414	23.7223				
		3日目	24.6058	23.8795	25.3324	24.3942	24.2542	28.7090				
	50	1日目	48.4422	47.6158	48.2320	47.8589	47.6373	49.6415	49.8269	99.7	7.0	8.3
		2日目	49.0453	47.8458	48.0527	46.9695	48.8451	49.7659				
		3日目	53.8606	54.4627	45.3092	46.0634	57.5996	59.6377				
	75	1日目	74.3550	74.8921	70.9227	71.9909	74.7689	70.9252	72.3384	96.5	2.0	3.8
		2日目	75.9626	73.3099	74.4980	72.7203	74.0410	75.8843				
		3日目	69.6336	70.3783	68.5645	70.5972	70.0059	68.6420				

表-9 3-0-アセチルタイロシンの添加回収試験の結果

試料	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	測定値($\mu\text{g}/\text{kg}$)								平均 回収率 (%)	併行 精度 (%)	室内 精度 (%)
		試行	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	全平均			
鶏肝臓	25	1日目	24.7901	26.4833	26.6497	24.5770	25.6568	23.9308	24.2247	96.9	4.9	9.1
		2日目	24.1056	21.3754	22.5502	21.0496	22.3792	20.5221				
		3日目	26.5863	23.5630	24.5496	25.4485	26.5320	25.2956				
	50	1日目	47.8695	45.2712	46.8005	50.1080	47.0636	48.2859	47.8872	95.8	3.7	13.8
		2日目	40.0295	42.4216	42.4514	42.3299	40.8355	41.8368				
		3日目	55.4465	55.9657	52.3429	50.5577	55.8422	56.5125				
	75	1日目	81.0024	72.5907	77.1592	84.3082	77.1777	84.0849	71.6894	95.6	4.6	10.6
		2日目	64.7492	66.6047	65.9929	64.8725	62.1989	70.5448				
		3日目	68.5661	72.3953	66.7070	70.9361	69.9749	70.5446				

表-10 チルバロシンのCC

添加濃度: 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当	
繰り返しNo.	濃度($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	48.44215
2	47.61577
3	48.23197
4	47.85885
5	47.63732
6	49.64145
7	49.04532
8	47.84582
9	48.05272
10	46.96952
11	48.84512
12	49.76587
13	53.86060
14	54.46272
15	45.30917
16	46.06340
17	57.59962
18	59.63767
19	47.47125
20	46.66655
標準偏差	3.824337744
1.64倍	6.2719139
CC	56.2719139

表-11 3-0-アセチルタイロシンのCC

添加濃度: 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当	
繰り返しNo.	濃度($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	47.86952
2	45.27117
3	46.80050
4	50.10797
5	47.06355
6	48.28585
7	40.02945
8	42.42160
9	42.45137
10	42.32985
11	40.83547
12	41.83677
13	55.44647
14	55.96565
15	52.34287
16	50.55765
17	55.84217
18	56.51245
19	44.25080
20	47.12640
標準偏差	5.390432375
1.64倍	8.840309094
CC	58.84030909

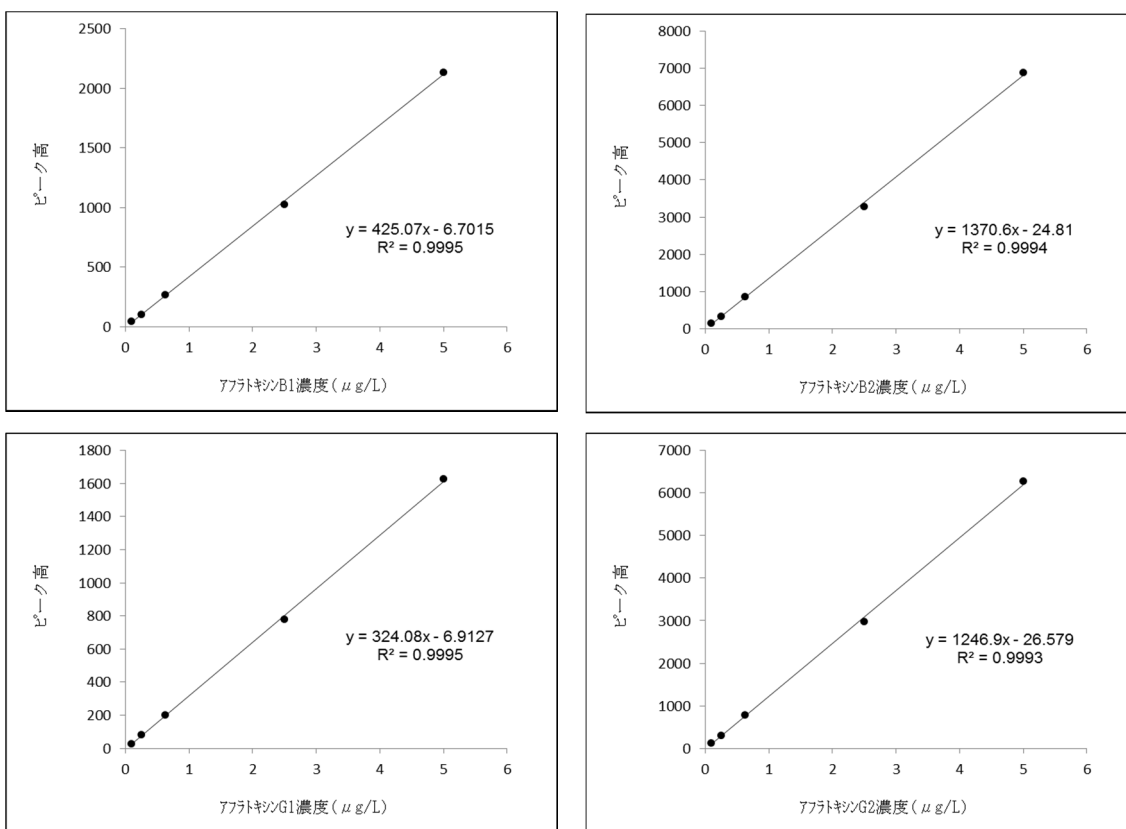


図-1 アフラトキシンB₁、アフラトキシンB₂、アフラトキシンG₁及びアフラトキシンG₂の検量線例

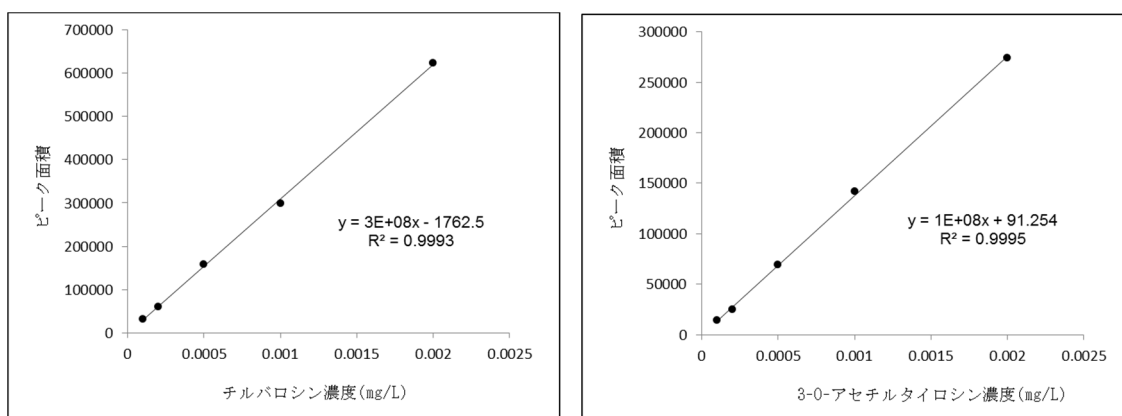


図-2 チルバロシン及び3-0-アセチルタイロシンの検量線例

表12 内部精度管理結果

畜種	試験項目名	測定物質	対象組織	試験方法	EU MRL (μg/kg)	定量下限 (μg/kg)	添加濃度 (μg/kg)	1日目		2日目		3日目		相対標準偏差(%)
								ブランク試験	添加回収率(%)	ブランク試験	添加回収率(%)	ブランク試験	添加回収率(%)	
豚	ジメチルテロール	ジメチルテロール	尿	LC-MS/MS	-	1	1	①	77.2	①	87.5	②	81.6	6.3
	シクロロール	シクロロール	尿	LC-MS/MS	-	0.5	0.5	①	96.1	①	104.3	②	93.8	5.6
	エンプロキサシ	エンプロキサシ	肝臓	LC-MS/MS	200	10	10	①	97.7	①	82.9	①	84.2	9.3
	フルプロキサシ	フルプロキサシ	肝臓	LC-MS/MS	-	10	10	①	77.3	①	95.5	①	79.3	11.9
	オフロキサシ	オフロキサシ	肝臓	LC-MS/MS	-	10	10	①	98.6	①	100.0	①	95.0	2.6
	オルビフロキサシ	オルビフロキサシ	肝臓	LC-MS/MS	-	10	10	①	86.5	①	87.3	①	82.2	3.2
	マルボフロキサシ	マルボフロキサシ	肝臓	LC-MS/MS	-	10	10	②	84.0	②	86.5	①	89.1	2.9
	ダフロキサシ	ダフロキサシ	肝臓	LC-MS/MS	150	10	10	①	103.7	①	101.1	①	97.7	3.0
	スルファモキシシ	スルファモキシシ	肝臓	LC-MS/MS	200	10	10	①	82.1	①	96.9	①	85.5	8.8
	スルファモキサシ	スルファモキサシ	肝臓	LC-MS/MS	100	10	50	①	88.0	①	82.4	①	103.8	12.1
	スルファモキサシ	スルファモキサシ	肝臓	LC-MS/MS	100	10	50	①	93.2	①	87.6	①	98.7	6.0
	スルファジメトキシ	スルファジメトキシ	肝臓	LC-MS/MS	100	10	50	①	85.9	①	88.7	①	102.1	9.4
	ハルネムリン	ハルネムリン	肝臓	LC-MS/MS	500	10	500	②	81.1	②	81.9	②	82.9	1.1
	エリスロマイシ	エリスロマイシ	腎臓	LC-MS/MS	200	10	100	①	101.5	①	92.9	①	110.2	8.5
	クリスチン	クリスチン	腎臓	LC-MS/MS	200	100	174.2	②	111.4	②	91.8	②	101.6	9.6
	鶏	ジメチルテロール	ジメチルテロール	肝臓	LC-MS/MS	-	5	5	①	83.1	①	82.2	①	97.3
シクロロール		シクロロール	肝臓	LC-MS/MS	-	0.5	0.5	①	98.7	①	99.5	①	103.8	2.7
チンツエニコール		チンツエニコール	肝臓	LC-MS/MS	50	10	50	①	100.3	①	97.8	①	92.9	3.9
チンツエニコール		チンツエニコール	肝臓	LC-MS/MS	2500	10	2500	①	100.3	①	99.6	①	99.4	0.5
リンコマイシ		リンコマイシ	腎臓	LC-MS/MS	1500	10	100	①	96.8	①	107.0	①	97.2	5.8
ヒパキサシ		ヒパキサシ	腎臓	LC-MS/MS	-	200	200	①	79.7	①	82.3	①	74.2	5.3
シメトリン(異性体の和)		シメトリン(異性体の和)	脂肪	LC-MS/MS	-	50	50	①	106.3	①	95.6	①	96.9	5.9
知サカ		知サカ	筋肉	LC-MS/MS	-	10	10	①	103.9	①	103.4	①	103.0	0.4
エンラマイシ		エンラマイシ	卵	LC-MS/MS	-	30	30	①	113.6	①	95.2	①	89.1	12.8
アンロキサシ		アンロキサシ	卵	LC-MS/MS	-	10	10	①	91.1	①	93.3	①	95.9	2.6
卵	チリマイシ	チリマイシ	卵	LC-MS/MS	-	5	5	①	72.0	①	73.4	①	75.8	2.6
	チロント	チロント	卵	LC-MS/MS	160	5	5	①	87.2	①	86.9	①	95.8	5.6
	エリスロマイシ	エリスロマイシ	乳	LC-MS/MS	40	10	10	①	103.6	①	82.0	①	109.3	14.7
	オキリニク酸	オキリニク酸	乳	LC-MS/MS	-	10	10	②	101.3	②	102.2	②	106.6	2.7
	クリスチン	クリスチン	乳	LC-MS/MS	50	50	43.55	②	113.9	②	100.3	②	104.9	6.5
	アミレリン	アミレリン	乳	LC-MS/MS	-	10	10	①	98.3	①	98.5	①	104.2	3.3

*:①妨害ピーク検出せず

②定量限界相当のピーク面積(高さ)の1/3以下のピーク

③基準値濃度に相当するピーク面積(高さ)の1/10以下のピーク