

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)

分担研究報告書

カビ毒の分析法の開発と汚染実態調査

研究分担者 吉成 知也 (国立医薬品食品衛生研究所・衛生微生物部)

研究要旨

デオキシニバレノール (DON) については、小麦において基準値 1.0 mg/kg が設定されている。オクラトキシン A (OTA) については、小麦と大麦について基準値の設定が 2023 年 12 月に了承された。小麦中の DON と OTA の分析については、両者で抽出溶媒の組成、精製カラム、分析機器が異なっている。そのため、OTA の基準値が設定された場合、同じ検体に対し、DON に加え OTA の検査も新たに実施する必要性が生じ、現場の負担の増加が懸念されている。そこで、本研究においては小麦における DON と OTA の同時分析法の開発を行った。小麦からの抽出液を多機能カラムで精製し、LC-MS/MS で定量を行う DON と OTA の同時分析法を考案した。その分析法の妥当性を評価するために、3 種の濃度の標準品添加試料と 2 種類の汚染試料の計 5 種の試料を用いた試験室間共同試験を実施した。9 機関から得られた分析値を解析した結果、回収率の平均値については DON で 88~89%、OTA で 91~96%であった。5 種の試料における併行相対標準偏差 (RSD_F) は DON で 1.0~5.0%、OTA で 2.6~7.3%で、室間再現性標準偏差 (RSD_R) は DON で 13~15%、OTA で 4.3~15%の範囲内となり、いずれも事前に設定したクライテリアを満たした。以上より、開発した多機能カラムを精製に用いる分析法は、小麦中の DON と OTA の同時分析に使用可能であることが示された。

モニリフォルミン (MON) は、新興カビ毒に分類される化合物で、2017 年に公表された欧州食品安全機関 (EFSA) の評価結果において、実験動物において致死毒性を示すこと、様々な穀類に検出されることが公表され、国際的な関心が高まっており、さらなる情報の収集が望まれている。そこで本研究は、日本に流通する食品における MON の汚染実態を調べ、MON の日本人におけるばく露量を推定することを目的とした。昨年度開発した陰イオン交換カートリッジによる精製とイオンペア剤を用いた HPLC 検出法を組み合わせた分析法について、6 種の穀類を対象とした単一試験室による妥当性評価を行った。その結果、回収率の平均値は 86~105%、併行精度は 0.52~5.9%、室内精度は 2.1~9.3%の範囲内であった。これらのパラメーターは、クライテリアを満たしたことから、汚染調査に用いる性能を有することが確認された。

研究協力者	原 有紀	三重県保健環境研究所	
青木 渉	国立医薬品食品衛生研究所	福光 徹	神奈川県衛生研究所
佐藤 英子	川崎市健康安全研究所	後藤麻美子	(一財) 食品分析開発センター
谷口 賢	名古屋市衛生研究所		SUNATEC

廣川有里加 (一財) 食品分析開発センター
SUNATEC

朝倉 敬行 (一財) 東京顕微鏡院

飯田 智成 (一財) 東京顕微鏡院

竹内 俊彦 (一財) 日本穀物検定協会

徳本 脩 (一財) 日本穀物検定協会

下山 晃 (一財) 日本食品検査

中村 歩 (一財) 日本食品分析センター

五十嵐奈津子 (一財) 日本食品分析センター

立石 晶浩 (一財) マイコトキシン検査協会

石田 和暁 (一財) マイコトキシン検査協会

A. 研究目的

世界的に汚染頻度が高く、健康被害が予測されるカビ毒は、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA) で毒性評価が行われ、コーデックス委員会で規格策定が行われている。日本は、コーデックス委員会の加盟国であることから、コーデックス規格を食品の規格基準に採用することが厚生労働省の方針として決められている。

日本においては、リンゴジュース中のパツリン、小麦玄麦中のデオキシニバレノール (DON)、全食品中の総アフラトキシン及び乳中のアフラトキシン M₁ に対して規制が行われている。また、コーデックス規格が定められているオクラトキシン A (OTA) やフモニシンに関しては、これまでの厚生労働科学研究で汚染実態調査が行われており、それらについては食品安全委員会においてリスク評価が実施された。また、JECFA において毒性評価が行われたタイプ A トリコテセン系化合物 (T-2 トキシン、HT-2 トキシン及び 4,15-ジアセトキシシルペノール)、ゼアラレノン (ZEN)、ステリグマトシスチン及びエンニアチン類についても汚染実態調査を行った^{1,2)}。これらカビ毒の汚染実態の情報は、JECFA においてリスク評価がなされる際に活用され、国際機関へ貢献するとともに、日本においてリスク管理を行う必要性を議論するための根拠データとしても活用され、行政施策に直接貢献する。

本事業は、DON、OTA 及びモニリフォルミン (MON) を研究対象とする。DON は、*Fusarium graminearum* などの麦類の赤カビ病の原因となるカビによって産生されるカビ毒で、世界中の穀類において汚染が認められる。日本においては、2022 年 4 月 1 日より小麦について DON の規格基準 1.0 mg/kg が適用された。それに先立ち、2021 年 9 月 30 日に DON の試験法が通知された。85%アセトニトリル水溶液

により DON を抽出後、多機能カラムによる精製を行い、HPLC 又は質量分析器を用いて定量を行う。OTA は、*Aspergillus* 属や *Penicillium* 属により産生されるカビ毒で、種実類、豆類や穀類での汚染が問題となっている。コーデックス委員会や EU においては、OTA の最大基準値が設定されているが、日本においては飼料、食品ともに設定されていない。これまで厚生労働科学研究によって 2004~2009 年度の 6 年間に亘って国内に流通する食品についての汚染実態調査が実施された。その結果、麦類やその加工品、カカオ製品、コーヒー豆などから OTA の検出が認められた³⁾。それら汚染実態調査や毒性試験の結果を踏まえ、食品安全委員会により日本人における食品からの OTA の摂取によるリスク評価 (自ら評価) が実施され、発がん性に関する TDI 15 ng/kg 体重/日が設定された。このような背景を受け、2023 年の薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食品規格部会において、基準値設定の議論がなされ、コーデックス委員会で基準が定められている小麦と大麦について、基準値を設定することが了承された。これまで日本で実施された OTA の汚染実態調査では、60%アセトニトリル水溶液により抽出後、イムノアフィニティーカラムによる精製を行い、HPLC で定量を行う分析法が用いられた。対象は同じ麦類であるが、DON と OTA の分析法は全く異なり、今後 OTA の基準値が設定された際、輸入検疫において DON に加え OTA の検査も実施する必要が生じ、現場の負担の増加が懸念されている。そこで、本研究においては小麦における DON と OTA の同時分析法を開発することとした。2022 年度には、イムノアフィニティーカラムによって DON と OTA を精製し、LC-MS/MS によって同時定量を行う分析法を開発し、その妥当性が確認された。ただ、OTA の回収率が低い結果となった機関があったこと、カラムが高価であること、精製操作が煩雑であ

るという課題が残った。そこで、今年度は、安価で精製操作が簡単な多機能カラムを用いた同時分析法を開発することとした。

MONは、*Fusarium avenaceum*や*Fusarium subglutinans*などの植物病原性真菌により産生されるカビ毒で、麦類やトウモロコシにおいて検出される。分子量が98と他のカビ毒と比較して小さく、水溶性が非常に高いという物性を有する。ラットに投与すると致死毒性を示す(LD₅₀ 19-25 mg MON/kg 体重) ことが報告されているが、詳細な毒性機構は明らかにされていない。EFSAによるリスク評価が行われ、2017年にその結果が公表されたことを受け、ヒトの健康に対する新たな危害要因の一つとして国際的な関心が高まっている⁴⁾。そこで本研究においては、MONが日本人の健康に対してリスクを有するかを判断し、将来的に規格基準を設定する必要があるかを議論する根拠となるデータを得ることを目的とする。2022年度には、穀類を対象とした分析法の開発を行った。今年度は、単一試験室による分析法の妥当性評価を実施することとした。

B. 研究方法

(1) DONとOTAの同時分析法

①試験室間共同試験(予備試験)における抽出・精製法

DON(終濃度1,000 µg/kg)とOTA(終濃度5 µg/kg)を添加した小麦(10.0 g)が入った50 mL容チューブに抽出溶媒(アセトニトリル:水(5:1)にギ酸を終濃度0.1%で添加したもの)20.0 mLを加え、振盪機を用いて200回/分で15分間往復振盪抽出した。チューブを遠心分離(1,000 rpm(190 g)、5分間)後、三角フラスコに抽出液を回収した。残渣に抽出溶媒20.0 mLを加え、タッピングにより沈殿物を破碎後、振盪機を用いて200回/分で15分間往復振盪抽出した。チューブを遠心分離(3,000 rpm(1,410

g)、10分間)後、1回目の抽出液を回収した三角フラスコに抽出液を回収し、よく混合した。

精製には、多機能カラム(PuriTox Total Myco-MS:R-Biopharm社製)を用いた。抽出液1.4 mLをカラムに加え、プランジャーを外筒にゆっくりと押し込み、抽出液を樹脂に通し、溶出液を1.5 mL容マイクロチューブに回収した。チューブ中の溶出液を試験管ミキサーにかけて均一にした後、400 µLを新たな1.5 mL容マイクロチューブに移した。精製水600 µLを加えて良く混ぜた後、12,000 gで5分間遠心し、その上清をLC-MS/MS測定用試験溶液とした。

②試験室間共同試験(本試験)における抽出・精製法

250 mL容プラスチックボトルに量り採った小麦破碎物10.0 gに抽出溶媒(アセトニトリル:水(5:1)にギ酸を終濃度0.1%で添加したもの)を50 mLを加え、振盪機を用いて200回/分で30分間往復振盪抽出した。振盪器から外したボトルを机の上に10分程度置き、検体と抽出液を分離した。

精製には、多機能カラム(PuriTox Total Myco-MS)を用いた。抽出液1.4 mLをカラムに加え、プランジャーを外筒にゆっくりと押し込み、抽出液を樹脂に通し、溶出液を1.5 mL容マイクロチューブに回収した。チューブ中の溶出液を試験管ミキサーにかけて均一にした後、500 µLを新たな1.5 mL容マイクロチューブに移した。精製水500 µLを加えて良く混ぜた後、12,000 gで5分間遠心し、その上清をLC-MS/MS測定用試験溶液とした。

③LC-MS/MSの測定条件

HPLC

カラム: InertSustain Swift C18 HP

2.1×150 mm, 3 µm

カラム温度: 40 °C

移動相: A 0.1%ギ酸水溶液

B 0.1%ギ酸含有アセトニトリル

分離条件： 0分 A : B = 95 : 5
18分 A : B = 20 : 80
23分まで保持

流速：0.2 mL/分

注入量：5 μ L

MS

イオン化：ESI positive

モニタリングイオン：

DON 297 [M+H]⁺ > 249, 203

OTA 404 [M+H]⁺ > 239, 102

(2) 試験室間共同試験（本試験）の試料

添加回収試験用のブランク試料については、日本国内で購入した全粒粉のうち、DON と OTA が不検出であったものを混合して調製した。DON と OTA の標準品溶液を添加して添加試料を作成した。添加濃度は、レベル1: DON 0.4 mg/kg と OTA 2 μ g/kg、レベル2: DON 1 mg/kg と OTA 5 μ g/kg、レベル3: DON 2 mg/kg と OTA 10 μ g/kg とした。汚染試料については、Trilogy 社から購入したオクラトキシン A 用の内部品質管理用試料 (Batch Code 121242(9.2B)) を汚染試料 No.1 として、小麦粒に DON (設計値 1 mg/kg) と OTA (設計値 25 μ g/kg) の標準品を均一に添加し、破碎した疑似汚染試料を No.2 として用いた。

国内の 10 分析機関にそれぞれ以下のものを配付し、(1) に記載の方法で分析を依頼した。

- ・DON と OTA 添加済みの小麦 (10 g) が入った 250 mL 容プラスチックボトル (3 レベルを各 2 本ずつ)
- ・汚染試料 No.1 (10 g) が入った 250 mL 容プラスチックボトル 2 本ずつ
- ・汚染試料 No.2 (10 g) が入った 250 mL 容プラスチックボトル 2 本ずつ
- ・乾固状態の DON と OTA 標準品が入った 1.5 mL チューブ 2 本 (予備 1 本)
- ・多機能カラム 14 本

汚染試料の均質性の確認については、汚染試料 No.1 と No.2 からそれぞれ 11g を 10 試料分取し、1 試料当たり 2 点の併行分析を行った。得られた分析値について、IUPAC の技能試験ハーモナイズドプロトコール 2006 年度版で示された Recommendation 7 並びに Recommendation 8 に従い解析し、均質性を評価した。

試験室間共同試験の結果の判断には、コーデックス委員会が公表する分析法の手順書に記載のクライテリアを参照した。各検体における回収率と室間再現性標準偏差 (RSD_R) のクライテリアを表 1 に示した。HorRat 値のクライテリアは 0.5~2 であることとした。

(3) マトリクスによるイオン化への影響の解析

添加回収試験用のブランク試料を用いて、(1) ①に記載の方法により調製した試験溶液に、DON を終濃度 1,000 μ g/kg、OTA を終濃度 5 μ g/kg とするよう添加した。共同試験の各参加機関において、(1) ③に記載の条件で定量を行い、マトリクスによる測定値への影響を調べた。

(3) MON の分析法

抽出は、破碎した試料 5 g にアセトニトリル：水 (85 : 15) 25 mL を加え、15 分間振盪することで行った。遠心分離 (470 g、10 分間) により抽出液を分離し、三角フラスコに回収した。沈殿にアセトニトリル：水 (85 : 15) 25 mL を加え、同じ抽出操作を行った。再度、沈殿にアセトニトリル：水 (85 : 15) 25 mL を加え、抽出操作後に遠心分離 (1410g、10 分間) により抽出液を分離し、計 3 回の抽出液を合わせた。抽出液 22.5 mL をガラス容器に移し、窒素気流により乾固後、2 mL のメタノールに懸濁した。抽出液からの MON の精製には強陰イオン交換

(SAX) カートリッジ (Agilent 社製 Bond Elut LRC SAX 500 mg) を用いた。メタノール 2 mL、水 2 mL 及び 0.1M リン酸水溶液 2 mL で平衡した SAX カートリッジにメタノール懸濁液を全量添加した。ガラス溶液をメタノール 2 mL で洗浄後、洗浄液をカラムに添加した。0.1M リン酸水溶液 2 mL と 10%アセトニトリル水溶液 2 mL でカートリッジを洗浄後、減圧してカラム内に残留する液体を除去した。3.5%硫酸水素テトラブチルアンモニウム含有 0.2M リン酸二水素カリウム水溶液 (pH7.0) 1.5 mL で溶出したものを試験溶液とした。

添加回収試験については、精製水に溶解した MON の標準溶液 (1 mg/mL) を精製水で適宜希釈し、試料中の終濃度が小麦、大麦、ライ麦、はと麦、コーンについては、50、300 µg/kg 又は 2,000 µg/kg、玄米については、50 又は 300 µg/kg となるよう添加し、30 分間放置後に抽出を行った。各濃度 2 試料調製し、計 5 日間分析を行い、得られた分析値から回収率、併行精度及び室内精度を算出した。

<HPLC の測定条件>

カラム : InertSustainSwift C18

4.6×250 mm, 5 µm

カラム温度 : 30 °C

移動相 : 水、7%硫酸水素テトラブチルアンモニウム含有 0.4M リン酸二水素カリウム水溶液 (pH7.0) と アセトニトリルの混液 (92 : 1 : 8)

分離時間 : 50 分

流速 : 1.0 mL/分

注入量 : 100 µL

C. 研究結果

(1) DON と OTA の同時分析法の試験室間共同試験

① 予備試験

DON と OTA を添加した小麦を各機関にて 2 試料ずつ分析し、得られた測定値を表 2 に、平均値、平均回収率、併行相対標準偏差 (RSD_r) 及び室間再現性標準偏差 (RSD_R) を表 3 に示した。DON 及び OTA の回収率はそれぞれ 90% 及び 108%、RSD_r はそれぞれ 1.6% 及び 3.4%、RSD_R はそれぞれ 26% 及び 14% であった。

② マトリクスによるイオン化への影響の解析

各機関において、ブランク試料由来の試験溶液に標準品を添加した検体を分析し、得られた測定値を表 4 に示した。DON については、機関 3、5 及び 8 においてイオン化率が 80% を下回り、その他の機関では 85~103% の範囲内に収まった。OTA については、機関 5 及び 8 でイオン化率が 80% を下回り、機関 3 及び 10 で 110% を上回った。その他の機関では 84~102% の範囲に収まった。

③ 汚染試料の均質性の確認

汚染試料 No.1 と No.2 について、計 20 試料の分析結果を表 5 に示した。これらの分析値から、DON と OTA の併行精度 (σ_{an}) と試験室間共同試験に諮られる分析法に予想される室間再現精度 (σ_p) を求め、その割合を算出した結果を表 6 に示した。2 種の汚染試料中の DON と OTA において、 σ_{an} / σ_p は 0.5 を下回り、IUPAC の技能試験ハーモナイズドプロトコール 2006 年度版で示された Recommendation 7 を満たした。また、 S_{sam}^2 と $F_1 \times \sigma_{all}^2 + F_2 \times S_{an}^2$ を算出した結果を表 7 に示した。2 種の汚染試料中の DON と OTA において、 S_{sam}^2 は $F_1 \times \sigma_{all}^2 + F_2 \times S_{an}^2$ を下回ったことから、IUPAC の技能試験ハーモナイズドプロトコール 2006 年度版で示された Recommendation 8 を満たした。以上の結果から、調製された 2 種の汚染試料の均質性が確認された。

④ 本試験

共同試験に参加した 10 機関のうち、測定値を

採用した 9 機関における DON と OTA の測定値を表 8 及び表 9 に、平均値、平均回収率、併行相対標準偏差 (RSD_r)、室間再現性標準偏差 (RSD_R) 及び HorRat を表 10 にそれぞれ示した。3 種の濃度の添加試料における DON の回収率は、88~89%であった。汚染試料 No.1 と No.2 の平均濃度はそれぞれ 203 及び 736 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。3 種の添加試料と 2 種の汚染試料における RSD_r は 1.0~5.0%、 RSD_R は 13~15%、HorRat は 0.7~0.9 の範囲内であった。3 種の濃度の添加試料における OTA の回収率は、91~96%であった。汚染試料 No.1 と No.2 の平均濃度はそれぞれ 9.8 及び 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。3 種の添加試料と 2 種の汚染試料における RSD_r は 2.6~7.3%、 RSD_R は 4.3~15%、HorRat は 0.2~0.7 の範囲内であった。

(2) MON の分析法の開発

昨年度開発した MON の分析法を用い、6 種の穀類において添加回収試験を実施し、回収率の平均値、併行精度及び室内精度を算出した結果を表 11 に示した。回収率の平均値は 86~105%、併行精度は 0.52~5.9%、室内精度は 2.1~9.3%の範囲内であった。

D. 考察

(1) DON と OTA の同時分析法の試験室間共同試験

研究代表者が開発した、多機能カラムを用いた DON と OTA の同時分析法について、試験室間共同試験により妥当性の評価を行った。第一段階として、添加試料 2 検体を用いた予備試験を実施した。回収率の平均値は DON と OTA ともにクライテリアを満たしたが、DON の回収率が機関 3 において 37%、機関 10 において 74%と 77%となり、80%を下回った。マトリクスによるイオン化への影響を解析した結果、機関 3 においては低いイオン化率を示したことから、

回収率が低い原因は残存するマトリクスによると考えられた。機関 3 において、マトリクスの影響を軽減するための検討を行った結果、HPLC への試験溶液の注入量を減らすことで回収率が改善した。また、OTA の回収率が 100%を超える機関が 10 機関中 6 機関であった。抽出を 2 回行い、合わせた抽出液の定容を行わなかったため、検体に吸収された抽出液の分、回収率が上がったと考えられた。定容を行うと簡便性が失われるので、本試験では 1 回抽出に変更し、用いる溶媒量を増やすこととした。

本試験の結果について、参加した 10 機関のうち 1 機関において、DON の回収率が 60%を下回った。予備試験において強いイオン化抑制が認められた機関であったことから、この機関が使用した HPLC は今回開発した多機能カラムを用いた分析法に適していないと考え、解析に用いないこととした。9 機関の測定値から得られた DON と OTA の回収率と RSD_R は、5 種類の試料いずれにおいても事前に設定したクライテリアを満たした。また、Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 22nd ed. の Appendix F : Guidelines for standard method performance requirement において、分析法における併行精度の期待値が 1 mg/kg では 11%であり、DON の測定値の RSD_r はこの値を下回った。また、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ における期待値は 21%であり、OTA の測定値の RSD_r はこの値を下回った。HorRat については、Appendix F において、0.5~2 の範囲に収まることが妥当とされている。DON の測定値の HorRat はその範囲に収まったが、OTA では 3 種の添加試料と人工汚染試料で 0.5 を下回った。原因は不明であるが、OTA の測定値の機関間のバラつきが非常に小さかったためと考えられる。以上の結果より、多機能カラムを用いた DON と OTA の同時分析法の妥当性が確認された。ただ、機関によってはマトリクスの影響によると想定されるイ

オン化抑制により、DON の回収率が 80%を下回った。今回検証した HPLC の条件は、研究代表者の装置に最適化されていた。異なる装置を用いる場合、マトリクスの影響を軽減する条件を各装置で設定する必要があると考えられた。

(2) MON の分析法の開発

コーデックス委員会が公表する分析法の手順書において、100 µg/kg~10 mg/kg の濃度の化学物質における回収率のクライテリアは 80~110%、室内精度のクライテリアは 100 µg/kg で 44%以下、1 mg/kg で 32%以下とされている。また、併行精度については、上述の AOAC のガイドラインにおいて 100 µg/kg で 15%以下、1 mg/kg で 11%以下とされている。今回実施した MON の添加回収試験の結果は、いずれもこれらのクライテリアを満たした。よって、開発した分析法は、6 種の穀類中の MON の汚染実態調査に用いることが可能な性能を有すると考えられた。

E. 結論

小麦からの抽出液を多機能カラムで精製し、LC-MS/MS で定量を行う DON と OTA の同時分析法を開発した。その分析法の妥当性を評価するために、国内の 10 分析機関による試験室間共同試験を実施した。その結果、添加回収試験と汚染試料の分析結果のいずれも事前に設定したクライテリアを満たした。以上より、開発した分析法は、小麦中の DON と OTA の同時分析に使用可能であることが示された。

MON の分析法については、単一試験室による妥当性評価を実施した結果、汚染実態調査に用いることが出来る性能を有することが確認された。

F. 参考

1) Yoshinari T. *et al.* Determination of

sterigmatocystin in foods in Japan: method validation and occurrence data. *Food Addit Contam Part A.* 2019; 36(9):1404-1410.

- 2) Yoshinari T. *et al.* Occurrence of beauvericin and enniatins in wheat flour and corn grits on the Japanese market, and their co-contamination with type B trichothecene mycotoxins. *Food Addit Contam Part A.* 2016;33(10):1620-1626.
- 3) Sugita-Konishi Y. *et al.* Exposure and risk assessment for ochratoxin A and fumonisins in Japan. *Food Addit Contam Part A.* 2016;30(8):1392-1401.
- 4) European Food Safety Authority. Risks to human and animal health related to the presence of moniliformin in food and feed. *EFSA Journal.* 2018;16(3):5082.

表 1 試験室間共同試験の結果を評価するクライテリア

A) 添加回収試験

	添加濃度 (µg/kg)					
	DON			OTA		
	400	1,000	2,000	2	5	10
回収率 (%)	80-110	80-110	80-110	60-115	60-115	60-115
室間再現性 標準偏差(%)	< 32	< 32	< 32	< 44	< 44	< 44

B) 汚染試料

汚染試料	室間再現性標準偏差の クライテリア(%)	
	DON	OTA
No.1	< 32	< 44
No.2	< 32	< 44

表 2 試験室間共同試験（予備試験）の各機関の測定値

機関No.	添加したカビ毒；濃度（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）			
	DON; 1,000		OTA; 5	
1	935	966	5.2	5.2
2	1,073	1,077	5.6	5.8
3	370	370	5.8	5.7
4	1,182	1,166	6.4	6.4
5	874	893	4.5	4.4
6	1,030	1,010	5.8	5.5
7	943	962	4.4	4.4
8	<u>1,085</u>	<u>937</u>	4.8	4.5
9	943	941	4.8	5.0
10	770	736	6.5	5.8

下線は Cochran 検定による外れ値

表 3 試験室間共同試験（予備試験）の結果

	添加したカビ毒； 濃度 (µg/kg)	
	DON;1,000	OTA;5
平均値 (µg/kg)	902	5.4
平均回収率 (%)	90	108
相対併行標準偏差RSD _T (%)	1.6	3.4
室間再現相対標準偏差RSD _R (%)	26	14

表 4 試験室間共同試験の参加機関におけるマトリクスによるイオン化への影響

機関No.	イオン化率 (%)	
	DON	OTA
1	86	94
2	94	98
3	39	115
4	103	89
5	69	75
6	100	102
7	85	84
8	70	66
9	103	98
10	86	141

表 5 汚染試料の均質性の確認

1) 自然汚染試料 (Trilogy 社内部品質管理用試料) の分析値

No.	Conc. (µg/kg)			
	DON		OTA	
1	236	244	7.4	8.3
2	233	232	7.9	10.2
3	228	234	7.0	7.4
4	236	232	8.0	8.4
5	223	255	8.2	7.3
6	231	225	8.7	8.3
7	223	232	7.9	7.7
8	216	229	7.2	7.7
9	219	210	7.3	7.1
10	227	221	8.7	7.6

2) 疑似汚染試料の分析値

No.	Conc. (µg/kg)			
	DON		OTA	
1	821	784	23.0	23.1
2	822	791	22.8	22.5
3	826	789	22.6	22.4
4	825	784	22.5	22.3
5	829	788	23.1	21.7
6	767	764	21.1	21.4
7	762	752	21.6	21.0
8	768	758	20.9	21.1
9	778	787	20.7	21.3
10	775	763	21.3	21.2

表 6 IUPAC2006 Recommendation 7 による分析試料の均質性の確認結果

	Analyte	σ_{an}	σ_p	σ_{an} / σ_p
Sample	DON	8.88	45.8	0.19
No.1	OTA	0.437	2.62	0.17
Sample	DON	19.5	130	0.15
No.2	OTA	0.379	4.82	0.079

表 7 IUPAC2006 Recommendation 8 による分析試料の均質性の確認結果

	Analyte	S_{sam}^2	$F1 \times \sigma_{all}^2 + F2 \times S_{an}^2$
Sample	DON	17.9	434
No.1	OTA	0.125	0.954
Sample	DON	267	3264
No.2	OTA	0.543	4.07

表 8 試験室間共同試験（本試験）における DON の測定値

機関No.	測定値 (µg/kg)									
	添加濃度 (µg/kg)						汚染試料 No.1		汚染試料 No.2	
	400	400	1,000	1,000	2,000	2,000				
A	364	415	944	919	<u>1,774</u>	<u>1,893</u>	193	187	790	739
B	361	348	901	910	1,800	1,781	198	197	747	764
C	396	391	963	970	1,976	1,984	222	221	790	805
D	273	282	758	715	1,448	1,430	164	155	603	599
E	404	436	1,058	1,078	2,085	2,112	242	246	906	879
F	388	396	984	949	1,888	1,903	221	225	785	808
G	288	267	727	745	1,552	1,531	160	167	618	603
H	354	369	914	900	1,783	1,759	222	224	743	754
I	343	312	799	757	1,622	1,578	199	203	678	637

下線は Cochran 検定による外れ値

表 9 試験室間共同試験（本試験）における OTA の測定値

機関No.	測定値 (µg/kg)									
	添加濃度 (µg/kg)						汚染試料 No.1		汚染試料 No.2	
	2	5	10							
A	<u>1.9</u>	<u>2.5</u>	4.5	4.8	9.0	9.2	9.0	10.9	22.1	20.2
B	2.0	2.1	4.6	4.3	8.9	8.3	10.0	8.8	20.8	19.5
C	2.0	2.2	4.8	4.7	9.9	10.2	9.1	10.1	21.2	20.7
D	2.0	1.8	4.6	4.3	8.5	8.7	7.4	7.3	19.8	19.6
E	1.8	1.9	4.5	4.7	9.1	9.3	11.7	11.1	20.7	20.3
F	2.1	2.2	5.1	5.0	9.9	9.9	12.0	11.6	19.7	20.1
G	1.9	1.8	4.6	4.5	9.3	9.3	10.5	10.2	20.1	19.8
H	1.9	1.9	4.7	4.5	8.7	9.2	10.4	9.1	19.2	19.3
I	1.8	1.6	4.0	4.1	8.2	8.3	9.3	8.2	19.1	18.6

下線は Cochran 検定による外れ値

表 10 試験室間共同試験（本試験）の結果

1) DON

	添加濃度 (µg/kg)			汚染試料 No.1	汚染試料 No.2
	400	1,000	2,000		
平均値 (µg/kg)	355	888	1,764	203	736
平均回収率 (%)	89	89	88	-	-
RSD _r (%)	5.0	2.1	1.0	1.8	2.6
RSD _R (%)	15	13	13	14	13
HorRat	0.8	0.8	0.9	0.7	0.8

2) OTA

	添加濃度 (µg/kg)			汚染試料 No.1	汚染試料 No.2
	2	5	10		
平均値 (µg/kg)	1.9	4.6	9.1	9.8	20
平均回収率 (%)	96	91	91	-	-
RSD _r (%)	4.0	3.0	2.6	7.3	2.9
RSD _R (%)	7.7	6.3	6.8	15	4.3
HorRat	0.3	0.3	0.3	0.7	0.2

表 11 MON の分析法の性能評価の結果

食品種	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回収率の 平均値(%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
小麦	50	94	3.0	7.9
	300	101	1.8	3.3
	2,000	99	1.4	3.3
大麦	50	98	3.1	6.8
	300	93	5.9	9.3
	2,000	97	0.87	3.6
ライ麦	50	98	5.9	5.9
	300	104	3.2	3.2
	2,000	104	1.6	2.1
はと麦	50	89	3.8	4.2
	300	87	0.52	3.5
	2,000	86	1.2	3.7
コーン	50	101	3.7	4.0
	300	105	1.5	2.6
	2,000	103	0.84	2.4
玄米	50	101	2.4	8.1
	300	100	2.0	3.8