

畜産物中残留農薬一斉分析法の妥当性評価

金行 良隆 佐々木 珠生 小中 ゆかり 松室 信宏

畜産物のうち、はちみつ、乳、鶏卵、鶏の筋肉について、GC/MS 法によるリン・塩素系残留農薬一斉分析法の妥当性評価を行った。「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」¹⁾(以下「ガイドライン」という)に基づき、当所で検査している GC/MS 項目について、それぞれの基準値を添加濃度(基準値が 0.1 $\mu\text{g/g}$ 以上のものは 0.1 $\mu\text{g/g}$)として妥当性評価を行ったところ、はちみつ、鶏卵、鶏の筋肉がそれぞれ 14 項目ずつ、乳が 9 項目について検査可能であった。

キーワード： GC/MS, 残留農薬, 妥当性評価

はじめに

当所では農畜水産物中の残留農薬や動物用医薬品等の試験を行っており、分析法の改良や精度管理にも精力的に取り組んでいる²⁾⁻⁶⁾が、平成 22 年に出された厚生労働省通知⁷⁾により、これらの試験方法について、妥当性評価を行う必要が生じた。これを受けて平成 25 年 12 月 13 日以降は、使用する試験法を評価したうえで結果を出すことが求められ、当所でも対応しているところである。

畜産物であるはちみつ、乳、鶏卵、鶏の筋肉のリン・塩素系残留農薬(GC/MS 項目)の分析について、従来は当所独自で開発した抽出法により測定を行っていたが、このたび、機器更新を機に分析法をゲル浸透クロマトグラフィー(以下 GPC)を用いた通知法⁷⁾に改め、妥当性評価を行ったので報告する。

方 法

1 妥当性評価対象試料

当所で実施している測定対象であるはちみつ、乳、鶏卵、鶏の筋肉のうち、対象項目の農薬が検出されないことを確認した試料を評価対象とした。

添加回収試験は、それぞれの項目の添加濃度が基準値(基準値が 0.1 $\mu\text{g/g}$ 以上のものについては 0.1 $\mu\text{g/g}$)となるように添加し、30 分静置後、試験に供した。

2 試薬

標準品は、フェンチオン、フェントエート、ホサロン及びメチダチオンが関東化学株式会社製、フェニトロチオン及びマラチオンが Dr. Ehrenstorfer GmbH 社製、EPN 及びクロルフェンビンホスが林純薬工業株式会社製、ジクロルボスが

Sigma Aldrich 社製、その他は和光純薬工業株式会社製を用いた。各標準品をアセトンに溶解し、それぞれの標準原液(200mg/L)を調製した。これらの標準原液を混合し、添加回収試験用の混合標準溶液及び検量線作成用の混合標準液(2mg/L)を調製した。

内部標準溶液は、林純薬工業株式会社製 PL 農薬サロゲート混合標準溶液 I をアセトン-ヘキサン(1:1)混液で 2mg/L に希釈して調製した。

エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムは、Agilent 社製 Bond Elut PSA(500mg)を、あらかじめアセトン-ヘキサン(1:1)混液 10ml でコンディショニングして使用した。

試験溶液や標準試料の調製に用いるアセトニトリル、ヘキサン、アセトン、塩化ナトリウム及び無水硫酸ナトリウムは残留農薬試験用を使用した。

GPC で用いる試薬については、アセトン及びシクロヘキサンについては、高速液体クロマトグラフ用を使用した。また、アクリナトリン及びトリシクラゾールは、林純薬工業株式会社製を用いた。

3 装置

GPC には、株式会社島津製作所製 prominence を使用した。ガスクロマトグラフ質量分析装置は、株式会社島津製作所製 GCMS-QP2010 Ultra を使用した。

4 機器条件

(1) GPC 条件

移動相:アセトン-シクロヘキサン(1:4)混液
流速:5ml/min

カラム: 昭和電工株式会社製 Shodex CLNpak EV-2000 AC(内径 20mm, 長さ 300mm)

ガードカラム: 昭和電工株式会社製 Shodex
CLNpak EV-G AC(内径 20mm, 長さ 100mm)
カラム温度: 40°C

(2) GC/MS 条件

注入量: 2µl
気化室温度: 250°C
カラム: Agilent 社製 DB-5MS(内径 0.25mm, 長さ 30m, 膜厚 0.25µm)
キャリアガス: ヘリウム
昇温条件: 50°C(1分)→25°C/minで125°C→10°C/minで300°C(10分保持)
カラム流量: 1ml/min
測定モード: SIM

イオン源温度: 230°C

インターフェース温度: 270°C

なお, 各化合物の定量イオンと確認イオンは表 1 のとおり。

5 試験溶液の調製

概ね通知法⁸⁾のとおりだが, 試験器具の容量の大きさに合わせてサイズダウンを行った。検液の最終定容量は 1ml で, 濃度は試料 5g 相当量/ml である。

6 検量線の作成

混合標準液をアセトン-ヘキサン(1:1)混液で希釈して検量線用標準液を調製した。ピーク面積法で検量線を作成した。

7 枝分かれ試験

枝分かれ試験は, 実施者 1 名が, 同一の添加試料を 1 日 2 回(2 併行), 5 日間実施する実験計画で行った。

結果と考察

ガイドラインに基づき, 評価を行った結果を示す。なお, 1 つの項目で複数の化合物があるものは, 平均して評価を行った。

1 はちみつ

はちみつではマトリクス効果が大きく, 検討の結果マトリクススタンダード法を採用した。

添加試料において保持時間がほとんど同じであるアルドリンとパラチオンでピークが干渉するといった不具合が見られた。このため, パラチオンの定量イオン及び確認イオンの変更を検討した。通知法では m/z291, 139, 87 が示されているが, この中で m/z139 は妨害が見られ, m/z87 は単品の標準液を測定してもピークが見られなかった。このため, 検討の結果 m/z235 を採用し, これを定量イオンとした。m/z291 は確認イオンとした。

(1) 選択性

ダイアジノンで m/z179 に妨害ピークが見られたため, m/z304 を定量イオンとした。これにより, 測定対象化合物について, 定量イオンの妨害ピークのレベルを基準値濃度の標準液から得られるピーク面積の 1/3 未満に改善した。

(2) 真度(回収率), 併行精度及び室内精度

表 2(次頁)のとおり。

なお, 網掛けしてある数値はガイドラインの目標値を満足できなかったものを示す。なお, (3) の理由によりメチダチオンの結果については掲載していない。

表 1 各化合物の保持時間, 定量及び確認イオン

	保持時間 (分)	定量イオン (m/z)	確認イオン (m/z)
α-BHC	12.6	218.8	182.9
β-BHC	13.2	218.8	180.9
γ-BHC	13.4	218.8	180.9
δ-BHC	13.9	218.8	182.9
o, p'-DDT	18.3	234.9	236.9
p, p'-DDT	19.0	234.9	236.9
p, p'-DDD	18.2	234.9	236.9
p, p'-DDE	17.4	317.9	245.9
エンドリン	18.0	262.8	264.8
アルドリン	15.6	262.9	260.9
デイルトリン	17.6	262.8	264.8
ヘプタクロル	14.9	271.8	273.8
ヘプタクロルエポキシド	16.4	352.9	350.9
EPN	19.9	156.9	169.0
ジクロルボス	7.3	184.9	186.9
ダイアジノン	13.4	304.1	199.0
パラチオン	15.6	235.0	291.1
フェントロチオン	15.1	277.0	260.0
マラチオン	15.2	173.1	125.0
クロルピリホス	15.4	314.0	316.0
α-クロルフェンピホス	16.0	267.0	323.0
β-クロルフェンピホス	16.3	267.0	323.0
ジメトエート	12.9	87.0	62.9
フェンチオン	15.5	278.0	279.0
フェントエート	16.4	274.0	90.1
ホサロン	20.5	181.9	121.0
エチオン	18.2	230.9	384.0
メチダチオン	16.7	145.0	58.1

表2 はちみつの真度(回収率)及び精度の結果

	回収率 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
総 BHC	75.5	2.0	3.8
総 DDT	63.0	2.3	8.2
エンドリン	83.2	4.1	8.0
アルトリン及び デイルトリン	62.5	1.0	2.6
ヘブタクロル及び ヘブタクロルエポキシト	74.6	2.8	7.1
EPN	76.7	1.8	7.1
シクロホス	51.1	5.8	11.2
ダイジノン	78.4	2.5	6.7
パラチオン	130	4.6	6.9
フェントチオン	96.9	2.6	16.3
マラチオン	82.4	2.0	2.6
クロルピリホス	76.3	1.7	4.0
クロルフェンピホス	79.9	4.4	9.4
ジメトエト	78.8	4.2	5.1
フェンチオン	76.7	2.6	6.0
フェントエト	75.8	3.2	9.8
ホサロン	76.9	2.5	6.7
エチオン	70.8	2.1	2.1

表3 乳の真度(回収率)及び精度の結果

	回収率 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
総 BHC	67.7	2.9	12.8
総 DDT	63.6	5.7	8.1
エンドリン	48.2	6.3	49.9
アルトリン及び デイルトリン	97.1	6.3	21.3
ヘブタクロル及び ヘブタクロルエポキシト	65.4	6.3	15.8
EPN	80.0	6.4	8.1
シクロホス	40.0	25.9	25.9
ダイジノン	76.9	4.8	4.8
パラチオン	57.3	2.7	9.8
フェントチオン	120	2.3	7.4
マラチオン	82.3	1.9	10.6
クロルピリホス	72.0	4.6	5.4
クロルフェンピホス	74.3	2.2	5.7
ジメトエト	96.2	1.6	11.0
フェンチオン	98.1	3.9	43.7
フェントエト	70.4	2.8	6.4
ホサロン	175	2.6	31.1
エチオン	57.0	4.5	6.6
メチダチオン	545	2.4	18.2

(3) 定量限界

メチダチオンで基準値添加試料のピークの S/N 比が 10 未満であり,改善を試みたが定量可能なレベルには至らなかった。

これらの検討の結果, はちみつについては表 2 において網掛けのない 14 項目を検査可能とした。

2 乳

乳, 鶏卵及び鶏の筋肉については, 検討の結果, 内部標準法を用いることとした。

(1) 選択性

それぞれの基準値に相当する濃度の標準液から得られるピーク面積の 1/3 を超える妨害ピークは見られなかった。

(2) 真度(回収率), 併行精度及び室内精度

表 3 のとおり。

この中で, ホサロン及びメチダチオンについては, 回収率が非常に高い結果となった。

原因を調査するための検討として, 非添加(ブランク)試料を調製し, 最後に 1ml とする段階で混合標準液を添加して 0.05mg/L にした検液を測定したところ, 同じ濃度の標準液と比較してホサロン

が約 1.7 倍, メチダチオンが約 1.3 倍の大きさのピークとなった。このためホサロンについては, マトリクス効果が原因ではないかと推定される。しかし今回検討した範囲では, メチダチオンについては回収率が異常に高くなった原因は不明で, また, 補正によって定量可能な状態にすることはできなかった。

(3) 定量限界

基準値が一律基準値 0.01µg/g 及びそれ以下のものについて, それぞれの基準値に相当する濃度の標準液から得られるピークは, S/N 比 10 以上であった。

これらの検討の結果, 乳については表 3 において網掛けのない 9 項目を検査可能とした。

3 鶏卵

(1) 選択性

それぞれの基準値に相当する濃度の標準液から得られるピーク面積の 1/3 を超える妨害ピークは見られなかった。

表 4 鶏卵の真度(回収率)及び精度の結果

	回収率 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
総 BHC	77.7	3.4	9.4
総 DDT	71.2	4.8	7.6
エンドリン	65.5	5.5	30.3
アルトリン及び デイルトリン	69.0	3.6	6.7
ヘプタクロル及び ヘプタクロルエポキシト	78.9	3.0	6.1
EPN	87.2	3.7	4.9
ジクロルボス	32.8	7.7	12.7
ダイジノン	81.1	2.6	5.2
パラチオン	84.9	6.7	8.3
フェントロチオン	83.4	1.5	3.5
マラチオン	91.0	5.9	13.9
クロルピリホス	83.5	3.1	5.8
クロルフェンピホス	94.8	5.9	11.4
ジメトエト	116	8.4	15.1
フェンチオン	231	4.8	13.4
フェントエト	95.0	6.5	8.7
ホサロン	160	4.3	24.7
エチオン	83.1	4.5	8.6
メタダチオン	116	1.3	10.2

(2) 真度(回収率), 併行精度及び室内精度

表 4 のとおり。

この中で、フェンチオン及びホサロンについては、回収率が非常に高い結果となった。

乳と同様に非添加試料に混合標準溶液を添加して測定したところ、フェンチオンで約 2.1 倍、ホサロンで約 1.6 倍の大きなピークが検出されたため、両方ともマトリクス効果が原因であると推定されたが、今回の検討の範囲では定量可能とすることはできなかった。

(3) 定量限界

基準値が一律基準値 0.01µg/g 及びそれ以下のものについて、それぞれの基準値に相当する濃度の標準液から得られるピークは、S/N 比 10 以上であった。

これらの検討の結果、鶏卵については表 4 において網掛けのない 14 項目を検査可能とした。

4 鶏の筋肉

(1) 選択性

それぞれの基準値に相当する濃度の標準液から

表 5 鶏の筋肉の真度(回収率)及び精度の結果

	回収率 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
総 BHC	95.2	3.3	12.3
総 DDT	111	8.5	8.5
エンドリン	113	8.2	8.2
アルトリン及び デイルトリン	97.5	5.4	5.4
ヘプタクロル及び ヘプタクロルエポキシト	106	2.3	2.6
EPN	111	4.8	5.6
ジクロルボス	34.0	7.1	8.1
ダイジノン	111	2.6	2.6
パラチオン	90.2	6.6	6.7
フェントロチオン	106	2.1	3.2
マラチオン	85.2	8.1	10.2
クロルピリホス	108	2.2	2.2
クロルフェンピホス	98.9	4.5	7.7
ジメトエト	20.7	4.5	14.8
フェンチオン	65.7	11.8	24.0
フェントエト	120	6.9	6.9
ホサロン	185	4.1	14.7
エチオン	99.2	3.0	4.3
メタダチオン	135	5.7	11.1

得られるピーク面積の 1/3 を超える妨害ピークは見られなかった。

(2) 真度(回収率), 併行精度及び室内精度

表 5 のとおり。

なお、今回検討した農薬類のうちジクロルボスについては、どの試料についても回収率が非常に低い結果となった。乳及び鶏卵と同様に非添加試料に混合標準溶液を添加して測定すると、いずれも回収率 30~50%程度の結果となったことから、試料溶液調製中に揮散しているものと考えられる。

(3) 定量限界

基準値が一律基準値 0.01µg/g のものについて、それぞれの基準値に相当する濃度の標準液から得られるピークは、S/N 比 10 以上であった。

これらの検討の結果、鶏の筋肉については表 5 において網掛けのない 14 項目を検査可能とした。

ま と め

はちみつ, 乳, 鶏卵及び鶏の筋肉について, リン・塩素系農薬 19 項目の妥当性評価を行ったとこ

ろ、はちみつ、鶏卵、鶏の筋肉がそれぞれ14項目ずつ、乳が9項目について検査可能であった。

はちみつについては、今回検討した他の試料と同様に内部標準法の採用の可否を検討しており、今後とも検査方法の改善に取り組んでいく予定である。

文 献

- 1) 厚生労働省通知, 食安発 1115001 号, 平成19年11月15日
- 2) 広島市衛生研究所生活科学部: 広島市衛生研究所年報, 26, 67~72(2007)
- 3) 広島市衛生研究所生活科学部: 広島市衛生研究所年報, 27, 51~55(2008)
- 4) 広島市衛生研究所生活科学部: 広島市衛生研究所年報, 28, 54~61(2009)
- 5) 金行良隆 他: LC/MS/MS 法による農産物中残留農薬一斉分析法の妥当性評価, 広島市衛生研究所年報, 32, 35~39(2013)
- 6) 金行良隆 他: LC/MS/MS 法による農産物中残留農薬一斉分析法の妥当性評価(第2報), 広島市衛生研究所年報, 33, 33~37(2014)
- 7) 厚生労働省通知, 食安発 1224 第1号, 平成22年12月24日
- 8) 厚生労働省通知, 食安発 0124001 号, 平成17年1月24日