

ノート

GC/MS/MS を用いた牛乳中の 有機塩素系農薬一斉分析法の妥当性評価

吉田真平, 内山恵美*, 原有紀, 渡部ひとみ, 吉村英基

Validation Study of a Multi-Residue Method for Determination of
Organochlorine Pesticide in milk by GC/MS/MS

Shinpei YOSHIDA, Emi UCHIYAMA, Yuki HARA,

Hitomi WATABE and Hideki YOSHIMURA

GC/MS/MS による牛乳中の有機塩素系農薬 11 剤 (α -BHC, β -BHC, γ -BHC, δ -BHC, アルドリン, pp'-DDE, ディルドリン, エンドリン, pp'-DDD, op'-DDT および pp'-DDT) 一斉分析法の妥当性評価を目的に, 実験者 1 名が牛乳を用いて 2 濃度 (0.001 μ g/g および 0.01 μ g/g), 2 併行, 5 日間で試験した結果, 添加濃度 0.001 μ g/g では真度 77.0~115.5%, 併行精度 1.5~10.2%, 室内精度 7.8~22.6%, 添加濃度 0.01 μ g/g では真度 79.7~107.2%, 併行精度 2.1~6.6%, 室内精度 7.9~17.5% となり, 妥当性評価ガイドラインの目標値を満たした. 本分析法を用いることで牛乳中の有機塩素系農薬 11 剤一斉分析法について, 精確な分析が可能と考えられた.

キーワード: 牛乳, 有機塩素系農薬, GC/MS/MS, 妥当性評価, BHC

緒言

牛乳は, 栄養価が高く小児の骨量増加を担う重要な食品である. 我が国においては, 1957 年頃から学校給食で牛乳の飲用が始まり^{1,2)}, 1964 年には 1 年を通じて国産品が提供されることとなった^{2,3)}. 国産牛乳について, 1969 年の残留有機塩素系農薬の調査⁴⁾により BHC 汚染が欧米に比較し高いレベルである報告を受けたことを契機に, 牛乳中の残留農薬の暫定許容基準が設定された^{5,6)}. 現在では, BHC を含む各種有機塩素系農薬の多くは, 農薬登録の失効⁷⁾により今後国内での使用量が増加することはないものの, 生体内への蓄積性もあることから⁸⁾, 牛乳を安心して飲用できるよう三重県においても牛乳中の残留農薬の検査を継続している⁹⁾. 我が国では食品中に残留

する農薬等について, 分析結果の信頼性を高めるため試験法の妥当性を評価するガイドライン (以下, ガイドライン) が通知されている¹⁰⁾. 本稿では, GC/MS/MS を用いた牛乳中の有機塩素系農薬 11 剤一斉分析法について, 妥当性評価を実施したので報告する.

実験方法

1. 試料

牛乳は県内量販店で入手し, 対象農薬の定量を妨害するピークがないことを確認したものを試料とした.

2. 対象農薬成分

α -BHC, β -BHC, γ -BHC, δ -BHC, アルドリン,

* 三重県立こころの医療センター診療技術部薬剤室

pp'-DDE, ディルドリン, エンドリン, pp'-DDD, op'-DDT および pp'-DDT を対象成分とした。

3. 試薬等

3.1 農薬標準溶液

関東化学(株)製農薬混合標準液 1598 (α -BHC, β -BHC, γ -BHC, アルドリン, ディルドリン, エンドリン, op'-DDT および pp'-DDT 含有) に, 富士フィルム和光純薬(株)製残留農薬試験用 δ -BHC, pp'-DDE および pp'-DDD を添加したものを農薬標準溶液とした。

3.2 添加用標準溶液

農薬標準溶液について, アセトンで希釈し 0.025 μ g/mL または 0.25 μ g/mL としたものを添加用標準溶液とした。

3.3 有機溶媒

アセトン, 酢酸エチルおよび n-ヘキサンは関東化学(株)製残留農薬試験用, ジエチルエーテルは富士フィルム和光純薬(株)製残留農薬試験用, シクロヘキサンは関東化学(株)製高速液体クロマトグラフ用を用いた。

3.4 その他の試薬

無水硫酸ナトリウムは関東化学(株)製残留農薬試験用を用いた。

3.5 精製用固相カラム

精製用固相カラムとして, ウォーターズ社製 Sep-Pak plus Florisil (カラム充填量 910 mg) を, あらかじめ n-ヘキサン 20mL でコンディショニングし使用した。

4. 試験溶液の調製

試験溶液の調製法を図 1 に示す。常温にした試料に 0.001 μ g/g または 0.01 μ g/g の濃度になるよう添加用標準溶液 (0.025 μ g/mL または 0.25 μ g/mL) を 1mL 添加し, 30 分間以上放置したのち抽出を行った。試料にアセトン・酢酸エチル・n-ヘキサン (2:9:9) 混合溶媒及び無水硫酸ナトリウムを加え, ホモジナイズ後にろ紙で吸引ろ過したものを減圧濃縮し, 残留物をアセトン・シクロヘキサン (1:4) で定容し遠心分離したのち GPC 装置で溶出させた。この溶出液を減圧濃縮したものを n-ヘキサンに溶かし, ジエチルエーテル・n-ヘキサン (2:98) により Sep-Pak plus Florisil ミニカートリッジカラムで精製した。ミニカラムで精製した溶出液を減圧濃縮

し, アセトンで定容したものを試験溶液とし GC/MS/MS で分析した。なお, 本試験法は既報⁹⁾ の試験法を改良し, 環境負荷軽減を目的に GPC に使用する移動相をジクロロメタン・シクロヘキサン (1:1) からアセトン・シクロヘキサン (1:4) に変更している。

試料 25 g

標準溶液 1mL 添加
(0.025 μ g/mL または 0.25 μ g/mL)
アセトン・酢酸エチル・n-ヘキサン
(2:9:9) 150mL
無水硫酸ナトリウム 150 g
ホモジナイズ (5,000rpm, 5 min)
吸引ろ過 (ろ紙 No.5C)
アセトン・酢酸エチル・n-ヘキサン
(2:9:9) で残渣を洗浄 (約 30mL×3 回)

ろ液

減圧濃縮・窒素吹付
アセトン・シクロヘキサン (1:4) で正確に
10mL とする
遠心分離 (3,000rpm, 10 min)

上澄液

8mL を GPC に注入
アセトン・シクロヘキサン (1:4) で溶出

溶出液 (70-115mL 画分)

減圧濃縮・窒素吹付
n-ヘキサン 2mL で溶解

負荷溶液

フロリジルミニカラム
n-ヘキサンで残渣を洗浄 (約 1mL×3 回)
ジエチルエーテル・n-ヘキサン (2:98)
20mL で溶出

溶出液

減圧濃縮・窒素吹付
アセトンで正確に 2mL とする

試験溶液

図 1 試験溶液の調製法

5. 装置および測定条件

ゲル浸透クロマトグラフ (GPC), ガスクロマトグラフ (GC), 質量分析装置 (MS/MS) による測定条件を表 1 に示す。また, GC/MS/MS による対象農薬成分の保持時間およびモニターイオンを表 2 に示す。

表1 GPC および GC/MS/MS による測定条件

ゲル浸透クロマトグラフ (GPC)	
装置	（株）島津製作所製 LC-10AT
カラム	Shodex CLNPakEV-2000（内径 20 mm i.d.×300 mm, 粒径 16 μm）
ガードカラム	Shodex CLNPakEV-G（内径 20 mm i.d.×100 mm, 粒径 16 μm）
移動相	アセトン・シクロヘキサン（1:4）
流速	5mL/min
注入量	4mL
分画範囲	14～23 min
ガスクロマトグラフ (GC)	
装置	（株）島津製作所製 GC-2010 Plus
カラム	Restek 社製 Rxi-5Sil MS（内径 0.25 mm i.d.×30 m, 膜厚 0.25 μm）
カラム温度	50°C（1min）→25°C/min→125°C（0min）→10°C/min→300°C（15min）
注入量	1μL
注入方法	スプリットレス
注入口温度	250°C
移動相（キャリアーガス）	ヘリウム（He） カラム流速 1.69mL/min
質量分析装置 (MS/MS)	
装置	（株）島津製作所製 GCMS-TQ8050
イオン化法	EI
測定モード	MRM
イオン化電圧	70eV
イオン源温度	230°C
コリジョンガス	アルゴン（Ar） 圧力 200kPa

表2 GC/MS/MS による対象農薬成分の保持時間およびモニターイオン

農薬	保持時間	定量イオン*		確認イオン (1) *		確認イオン (2) *	
		プリカーサー イオン(m/z)	プロダクト イオン(m/z)	プリカーサー イオン(m/z)	プロダクト イオン(m/z)	プリカーサー イオン(m/z)	プロダクト イオン(m/z)
α-BHC	11.217	180.90	144.90	218.90	182.90	218.90	144.90
β-BHC	11.694	180.90	144.90	218.90	182.90	218.90	144.90
γ-BHC	11.900	180.90	144.90	218.90	182.90	218.90	144.90
δ-BHC	12.421	180.90	144.90	218.90	182.90	218.90	144.90
アルドリン	14.114	262.90	191.00	262.90	193.00	292.90	219.90
pp'-DDE	15.965	246.00	176.00	317.90	248.00	246.00	211.00
ディルドリン	16.100	276.90	241.00	262.90	193.00	262.90	228.00
エンドリン	16.500	262.90	191.00	262.90	193.00	244.90	173.00
pp'-DDD	16.757	235.00	165.00	237.00	165.00	235.00	199.00
op'-DDT	16.820	235.00	165.00	237.00	165.00	235.00	199.00
pp'-DDT	17.474	235.00	165.00	237.00	165.00	235.00	199.00

* コリジョン電圧は全て 15 (V)

6. 検量線

農薬標準溶液について、アセトンで希釈し 0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.0125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.015 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の4点の濃度を調製し、各農薬標準溶液のピーク面積を求め検量線を作成した。

7. 妥当性評価

7.1 選択性

選択性は、ブランク試験溶液から得られたクロマトグラムで確認した。

7.2 定量限界

定量限界は、試料に 0.0005 $\mu\text{g}/\text{g}$ の濃度になるよう農薬標準溶液 (0.0125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を 1mL 添加し、30 分間以上放置したのち、抽出を行い試験溶液にしたものをクロマトグラムで確認した。これは、本分析法の対象農薬成分の中で、基準値が最も低いエンドリン (0.005 $\mu\text{g}/\text{g}$) の 1/10 の値である。

7.3 真度および精度

真度および精度は、ガイドラインに従い、試験実施者 1 名が 2 濃度 (0.001 $\mu\text{g}/\text{g}$ および 0.01 $\mu\text{g}/\text{g}$)、2 併行、5 日間の枝分かれ添加回収試験の結果から求めた。なお、0.01 $\mu\text{g}/\text{g}$ とした試験溶液は精製後に 10 倍希釈し、0.001 $\mu\text{g}/\text{g}$ の試験溶液と同じ検量線で定量した。ガイドラインの目標値は、真度 70~120% であり、精度は添加濃度 $\leq 0.001\text{ppm}$ の場合は併行精度 30% 未満、室内精度 35% 未満である一方、0.001 < 添加濃度 $\leq 0.01\text{ppm}$ の場合は併行精度 25% 未満、室内精度 30% 未満である。

結果および考察

1. 検量線

検量線用標準溶液を GC/MS/MS で測定した結果、0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.0125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.015 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲における回帰直線の決定係数 (R^2) は全ての農薬で 0.990 以上であり、検量線は良好な直線性を示した。

2. 妥当性評価

2.1 選択性

ブランク試料を分析した結果、pp'-DDE の妨害ピークを認めたが、当該妨害ピークの面積値は、基準値相当濃度のピーク面積値の 1/10 未満であったことから、ガイドラインにおける許容

範囲内であることが確認された。また、当該妨害ピーク的面積値から算出されるブランク試料定量値は、試験品試料の成分定量値の算出時に減算した。

2.2 定量限界

定量限界相当濃度 (0.0005 $\mu\text{g}/\text{g}$) である分析対象成分のピークが $S/N \geq 10$ であることが確認されたため、本分析法の定量限界を 0.0005 $\mu\text{g}/\text{g}$ とした。

2.3 真度および精度

各農薬の真度、併行精度および室内精度の結果を表 3 に示した。添加濃度 0.001 $\mu\text{g}/\text{g}$ では真度 77.0~115.5%、併行精度 1.5~10.2%、室内精度 7.8~22.6%、添加濃度 0.01 $\mu\text{g}/\text{g}$ では真度 79.7~107.2%、併行精度 2.1~6.6%、室内精度 7.9~17.5% であったため、測定対象とした有機塩素系農薬 11 剤全てでガイドラインの目標値を満たした。

まとめ

GC/MS/MS による牛乳中の有機塩素系農薬一斉分析法の妥当性評価を実施した。検量線の直線性や試験対象化合物の選択性においても良好な結果が得られ、対象有機塩素系農薬 11 剤全て、2 濃度でガイドラインの真度、併行精度および室内精度の目標値を満たした。本分析法を用いることで精確に有機塩素系農薬 11 剤 (α -BHC, β -BHC, γ -BHC, δ -BHC, アルドリン, pp'-DDE, デイルドリン, エンドリン, pp'-DDD, op'-DDT および pp'-DDT) の一斉分析が可能であることが示唆された。今後は抽出条件等のさらなる検討を行い、適用農薬を拡充していきたい。

文献

- 1) 足立達：ミルクの文化誌。東北大学出版会、(1998)。
- 2) 一般社団法人 J ミルク：日本におけるミルクの歴史、(2018)。
- 3) 文部事務次官・農林事務次官依命通知：学校給食用牛乳供給対策要綱、文体給第 265 号・39 畜 A 第 5421 号 (昭和 39 年 8 月 31 日)。
- 4) Uyeda M., Taue S., Nishimoto T: Study on pesticide residues in food (V), Residues of BHC Isomers and other organochlorine pesticides in fatty foods of

- Japan. J.Food Hyg.Soc.Japan, **11** (4), 256-263 (1970) .
- 5) 厚生省環境衛生局長通知：牛乳中の有機塩素系農薬残留の暫定許容基準について, 環乳第 60 号 (昭和 46 年 6 月 15 日) .
- 6) 厚生省環境衛生局長通知：牛乳中の農薬残留の減少対策の強化について, 環乳第 24 号 (昭和 46 年 3 月 4 日) .
- 7) 農林水産省：農薬の販売の禁止を定める省令 (平成十五年農林水産省令第十一号) .
- 8) 大柴恵一, 川北兵蔵：毒性物質と栄養の関係 (第 1 報) 農薬の生体内分布と蓄積量の経時的変化. 食品衛生学雑誌, **11** (3), 177-182 (1970) .
- 9) 大熊和行, 坂本晶子, 小川正彦 他：脱水抽出法を応用した牛乳中残留有機塩素系農薬の簡易迅速分析法. 三重保環研年報, 44-59. 第 1 号 (通巻第 44 号), (1999) .
- 10) 厚生労働省医薬局食品安全部長通知：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について, 食安発第 1224 第 1 号 (平成 22 年 12 月 24 日) .

表 3 GC/MS/MS による牛乳中有機塩素系農薬 11 剤の分析法の妥当性評価

農薬	添加濃度 (0.001 μ g/g)			添加濃度 (0.01 μ g/g)		
	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
α -BHC	77.0	7.0	16.6	79.7	3.8	8.1
β -BHC	95.8	2.2	9.3	91.1	2.9	7.9
γ -BHC	87.6	4.8	11.2	87.5	2.1	8.4
δ -BHC	93.4	1.5	11.5	91.9	2.5	8.8
アルドリン	89.5	3.1	22.6	85.6	3.0	10.3
pp'-DDE	105.5	3.3	9.1	95.0	2.0	16.5
ディルドリン	103.2	3.9	7.8	97.9	3.4	11.8
エンドリン	115.5	10.2	12.1	101.5	6.6	17.5
pp'-DDD	107.3	4.1	9.9	100.8	2.5	13.4
op'-DDT	102.2	5.4	11.5	98.6	2.6	12.9
pp'-DDT	112.3	6.0	12.0	107.2	3.2	14.2