

乳中における有機塩素系農薬の一斉分析法の検討

内山賢二・中村正規

福岡市保健環境研究所保健科学課

Simultaneous Determination Method for Organochlorine Pesticides in Milk

Kenji UCHIYAMA and Masanori NAKAMURA

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

要約

乳中における有機塩素系農薬 14 種 (α -BHC, β -BHC, γ -BHC, δ -BHC, ヘプタクロル, ヘプタクロルエポキシド, アルドリン, ディルドリン, *op'*-DDE, *pp'*-DDE, *op'*-DDD, *pp'*-DDD, *op'*-DDT, *pp'*-DDT) の一斉分析法を検討した。厚生労働省の通知法に準じてアセトニトリルで抽出を行った後, オクタデシルシリル化シリカゲル (C18) ミニカラムで脂肪を除去し, エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル (PSA) ミニカラムで精製後, GC-MS/MS で測定する方法を検討した。牛乳 20g に各農薬 1 μ g を添加したとき, 平均回収率 (n=3) が 74.3~98.3%, 相対標準偏差(RSD)が 1.0~6.8%と良好であり, 定量を妨害するようなピークも見られなかった。

Key Words : 乳 milk, 有機塩素系農薬 organochlorine pesticide, ベンゼンヘキサクロリド BHC, ヘプタクロル heptachlor, アルドリン aldrin, ディルドリン dieldrin, ガスクロマトグラフ・タンデム型質量分析計 GC-MS/MS

1 はじめに

有機塩素系農薬は, 化学的に安定で高脂溶性であるため, 環境中において残留性が高く, これによる環境汚染が問題となり, 現在, 多くの有機塩素系農薬はその製造, 輸入, 使用等が規制されている¹⁾。しかし, 規制後も畜水産物からの検出事例が報告されており²⁾, 畜水産物中の有機塩素系農薬を検査・監視していくことは非常に重要である。

一方, 平成 18 年 5 月 29 日に食品中に残留する農薬等のポジティブリスト制度が導入され, これに伴い厚生労働省は一斉分析法³⁾を通知し, 「GC/MS による農薬等の一斉試験法 (畜水産物)」が示された。通知法では, 抽出液をゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) およびエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル (PSA) カラムクロマトグラフィーで精製を行うこととなっている。しかし GPC による精製は, 1 検体あたりの処理に長時間を要するため, 多検体を同時並行で迅速に処理することができないこと, また, 大量の有機溶媒を必要とするた

め環境への負荷が大きいことがデメリットとして挙げられる。

GPC による精製の目的は, 主に食品中の脂肪分の除去 (脱脂) であるが, 同様の目的で広く簡易的に用いられている方法として, アセトニトリル/*n*-ヘキサン分配⁴⁾がある。また, 通知法³⁾「GC/MS による農薬等の一斉試験法 (農産物)」では脱脂操作にオクタデシルシリル化シリカゲル (C18) ミニカラムが使用されている。

そこで, 検査の迅速性の向上と環境負荷の軽減を目的に, GPC の代用としてアセトニトリル/*n*-ヘキサン分配および C18 ミニカラムによる前処理を比較し, 乳中における有機塩素系農薬 14 種の一斉分析法を検討したので報告する。

2 実験方法

2.1 試料

福岡市内で市販されていた牛乳を用いた。

2.2 試薬等

標準品：和光純薬工業（株），Dr.Ehrenstorfer GmbH社，Riedel de Haën社，ガスクロ工業株式会社製残留農薬分析用を使用した。

標準原液：アセトンまたはトルエンで 1000mg/L に調製した。

混合標準溶液：標準原液を混合し，1mg/L となるようにアセトンで調製後，同溶媒で適宜希釈して使用した。

オクタデシルシリル化シリカゲル（C18）ミニカラム：ジーエルサイエンス（株）製 InertSep C18（1g/6mL）をあらかじめアセトニトリル 10mL でコンディショニングして使用した。

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル（PSA）ミニカラム：VARIAN社製BOND ELUT LRC-PSA（500mg/3mL）をあらかじめアセトンおよび*n*-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。

ろ紙：アドバンテック東洋（株）製ろ紙5Aを使用した。
その他の試薬：残留農薬試験用を使用した。

2.3 装置

ガスクロマトグラフ：VARIAN社製 CP-3800
質量分析装置（MS/MS）：VARIAN社製 1200
ホモジナイザー：Kinematica社製 PT-MR 3100
遠心機：（株）コクサン製 H103-NR

表1 各農薬の保持時間および測定条件

農薬名	保持時間 (min)	測定条件	
		モニターイオン (m/z)	CE [*] (eV)
α-BHC	11.266	219→145	-20
β-BHC	11.807	219→145	-20
γ-BHC	11.949	219→145	-20
δ-BHC	12.541	219→145	-20
ヘプタクロル	13.402	237→143	-35
ヘプタクロルエポキシド	14.878	353→263	-15
アルドリン	14.118	263→193	-30
ディルドリン	16.109	263→193	-30
op'-DDE	15.369	246→176	-25
pp'-DDE	15.984	246→176	-25
op'-DDD	16.116	235→165	-25
pp'-DDD	16.785	235→165	-25
op'-DDT	16.828	235→165	-25
pp'-DDT	17.491	235→165	-25

※コリジョンエネルギー

2.4 測定条件

2.4.1 ガスクロマトグラフ

注入口温度：250℃

カラム：J&W Scientific社製 DB-5MS（0.25mm i.d.×30m, 0.25μm）

カラム温度：50℃（1min）-25℃/min-125℃（0min）-10℃/min-300℃（10min）

キャリアーガス流量：1mL/min（ヘリウム）

注入量：2μL（スプリットレス）

2.4.2 質量分析計

イオン化電流：150μA

イオン化モード（電圧）：EI（70 eV）

イオン源温度：225℃

インターフェース温度：250℃

その他の条件：表1に示す。

2.5 試験溶液の調製

2.5.1 抽出

試料20gにアセトニトリル100mLを加えて，ホモジナイズした後，毎分2500回転で5分間遠心分離し，上澄みをろ紙でろ過した。残留物にアセトニトリル50mLを加え再度ホモジナイズした後ろ過し，得られたろ液を合わせ，これに塩化ナトリウム5gを加えて振とうした。静置後，有機層を採りアセトニトリルで200mLに定容し抽出液とした。

2.5.2 精製

抽出液20mLをC18ミニカラムに負荷した後，さらにアセトニトリル2mLを負荷し溶出液を得た。溶出液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水しろ過した後，ろ液を40℃以下で減圧濃縮し溶媒を留去し，残留物にアセトンおよび*n*-ヘキサン（1:1）混液2mLを加えて転溶した。これをPSAミニカラムに負荷した後，アセトンおよび*n*-ヘキサン（1:1）混液20mLで溶出し，再び40℃以下で減圧濃縮し溶媒を留去した。残留物をアセトンおよび*n*-ヘキサン（1:1）混液1mLに溶かして試験溶液とした。

3 結果および考察

3.1 GPCに代わる前処理法の検討

3.1.1 アセトニトリル/*n*-ヘキサン分配の検討

アセトニトリル 20mL にアセトニトリル飽和 *n*-ヘキサン 10mL を加えたものに各農薬を 0.1μg 添加し，振とう後アセトニトリル層を分取した。残った *n*-ヘキサン層にアセトニトリル 20mL を加え再び振とうした後，アセトニトリル層を先に分取したものと合わせ，40℃以下で減圧濃縮し溶媒を留去した。残留物をアセトンおよび *n*-ヘキサン（1:1）混液 1mL に溶かして試験溶液とし，アセトニトリル/*n*-ヘキサン分配での回収率を測定した。回収率の結果を表2に示すが，アルドリンの回収率は約60%

で精度管理上の目標値である 70%を大きく下回り、前処理法として不十分であった。

3.1.2 C18 ミニカラム処理の検討

アセトニトリル 20mL に各農薬 0.1 μ g を添加したものを C18 ミニカラムに負荷した後、さらにアセトニトリル 2mL を負荷し溶出液を得た。これを 40 $^{\circ}$ C 以下で濃縮し溶媒を留去した後、残留物をアセトンおよび *n*-ヘキサン (1:1) 混液 1mL に溶かして試験溶液とし、C18 ミニカラム処理での回収率を測定した。アセトニトリル/*n*-ヘキサン分配で回収率の低かったアルドリンについては、回収率 73.8%となった。また、ほとんどの農薬で C18 ミニカラム処理した方が、良好な回収率が得られた。さらに、牛乳を 2.5 試験溶液の調製のとおり C18 ミニカラム処理した場合、サンプルに脂肪分らしき残留物は見られなかったため、GPC に代わる前処理法として C18 ミニカラムによる処理を用いることとした。

表 2 脱脂法の違いによる農薬の回収率

農薬名	回収率 (%)	
	アセトニトリル/ <i>n</i> -ヘキサン分配	C18 カラム処理
α -BHC	75.8	70.9
β -BHC	77.6	82.7
γ -BHC	76.8	76.9
δ -BHC	77.6	85.6
ヘプタクロル	74.7	76.0
ヘプタクロルエポキシド	83.2	91.4
アルドリン	60.2	73.8
ディルドリン	77.1	86.1
op'-DDE	69.9	81.6
pp'-DDE	65.2	79.9
op'-DDD	69.7	80.1
pp'-DDD	72.8	80.2
op'-DDT	68.8	85.2
pp'-DDT	90.6	101.3

3.2 検量線

各農薬とも検量線は 0.01~0.2 μ g/mL の範囲で相関係数 0.997~1.000 と良好な直線性を示した。また、定量下限はすべての農薬で、ポジティブリスト制度の一律基準である 0.01ppm を満足するものであった。

3.3 添加回収試験

試料 20g に各農薬 1 μ g (試料換算 0.05ppm) を添加し回収試験を行った結果を表 3 に示す。試験は n=3 で行い、各農薬の平均回収率は 74.3~97.8%であり、相対標準偏差

差も 1.0~6.8%と良好であった。

表 3 添加回収試験結果 (n=3)

農薬名	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)
α -BHC	86.9	6.8
β -BHC	98.3	5.2
γ -BHC	90.7	3.9
δ -BHC	97.3	2.8
ヘプタクロル	86.6	2.5
ヘプタクロルエポキシド	91.4	2.9
アルドリン	74.3	5.8
ディルドリン	89.8	2.9
op'-DDE	88.7	2.6
pp'-DDE	86.4	3.2
op'-DDD	90.9	1.4
pp'-DDD	91.1	1.4
op'-DDT	91.0	2.1
pp'-DDT	97.8	1.0

4 まとめ

乳中における有機塩素系農薬 14 種について、GC-MS/MS による一斉分析法を検討した。通知法³⁾に準じて抽出を行い、C18 ミニカラムおよび PSA ミニカラムで精製を行うこととした。牛乳を試料として、添加回収試験 (試料換算 0.05ppm) を実施したところ、平均回収率は 74.3~98.3%と良好であり、いずれの農薬についても定量に支障を与えるようなピークはほとんど見られなかった。以上の結果から、本法は乳中における有機塩素系農薬の一斉分析法として有用であると考えられる。

文献

- 1) 昭和 48 年 10 月 16 日法律第 107 号：化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律
- 2) 松本比佐志：大阪府下の市販食肉および食肉加工食品中の PCB および有機塩素系農薬の残留実態，食品衛生学雑誌，47，127~135，2006
- 3) 厚生労働省通知食安発第 0124001 号：食品に残留する農薬，飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法，平成 17 年 1 月 24 日
- 4) 岡本葉：LC-MS/MS による餃子中の農薬一斉分析法の検討，食品衛生学雑誌，50，10~15，2009