〔短　報〕

GC-MS/MSによる畜産物中の有機塩素系農薬試験法の妥当性評価

石川県保健環境センター　健康・食品安全科学部　細川　明香・小澤　祐子・山森　泰大
竹田　正美

〔和文要旨〕

当センターではこれまで，ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）装置およびGC-ECDを用いて畜産物中の有機塩素系農薬試験を実施してきた。今般，GPC装置を更新し，新たにGC-MS/MSを導入したことに伴い，試験法について妥当性評価を行った。有機塩素系農薬11成分について，分析条件および精製方法を検討し，分析カラムにVF-200ms，固相カラムにSAX/PSAカラムを用いた試験法により，牛肉で妥当性評価を行ったところ，すべての成分において妥当性が確認できた。

キーワード：GC-MS/MS，有機塩素系農薬，妥当性評価

1　はじめに

「食品，添加物等の規格基準」[1]の適合を判定する試験法については，平成25年12月13日以降「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」[2]（以下「ガイドライン」という。）により，妥当性評価を実施することが必須となっている。

当センターでは，畜産物中の有機塩素系農薬9成分について，ゲル浸透クロマトグラフィー（以下「GPC」という。）およびGC-ECDを用いて「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について」[3]（以下「通知試験法」という。）に準拠した試験法（以下「現行法」という。）で試験を実施してきた。今般，当センターでGPC装置を更新し，新たにGC-MS/MSを導入したことから，妥当性評価を行う必要が生じた。機器更新を機に分析条件の検討および精製法の検討を行い，妥当性評価を実施したのでその結果を報告する。

2　材料と方法

2・1　試　料

県内に流通していた牛の筋肉（もも肉）を使用した。

2・2　対象成分

現行法の対象であるp,p'-DDD，p,p'-DDT,o,p'-DDT，p,p'-DDE，アルドリン，ディルドリン，ヘプタクロル，ヘプタクロルエポキシド（cis），ヘプタクロルエポキシド（trans）に，エンドリンとヘキサクロロベンゼンを加えた11成分を評価対象とした。

2・3　試薬等

各標準品には，富士フイルム和光純薬㈱，Dr.Ehrenstorfer GmbH社，Riedel-de Haën社，Chem Service社製残留農薬分析用を用いた。各標準品10㎎を量りとり，ヘキサンで0.2mg/mLとなるよう標準原液を調整した。各標準原液を混合したものをヘキサンで希釈して，1μg/mLの混合標準液を調整した。

試薬には関東化学㈱製の残留農薬試験用アセトン，n-ヘキサン，シクロヘキサン，アセトニトリル，無水硫酸ナトリウム，富士フイルム和光純薬㈱製のダイオキシン類分析用ジエチエレングリコール，D-グルコノ-1,5-ラクトン（特級），D-ソルビトール（一級）を用いた。精製水には超純水（Milli-Q水）を用いた。

固相カラムにはアジレント・テクノロジー㈱製のBond Elut PSA（500mg/3mL）（以下「PSAカラム」という。），ジーエルサイエンス㈱製のInertSep SAX/

Validation of Determination Method for Organochlorine Pesticides in Livestock Products by GC-MS/MS. *by HOSOKAWA Sayaka, OZAWA Yuko, YAMAMORI Yasuhiro, TAKEDA Masami (Health and Food Safety Department, Ishikawa Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science)*

Key words：GC-MS/MS, Organochlorine Pesticides, Validation

PSA（500mg/500mg/6mL）（以下「SAX/PSAカラム」という。）を用いた。

メンブランフィルターは，AUTOVIAL 0.45µmPTFE Membrane（Whatman社製）を用いた。

GC-MS/MS測定用アナリティカルプロテクタント（以下「APs」という。）はD-グルコノ-1,5-ラクトン（1mg/mL）およびD-ソルビトール（0.5mg/mL）含有アセトニトリル溶液を用いた。

2・4　装置および測定条件

(1) GPC装置

機　器：PLC761ジーエルサイエンス㈱製
カラム：Shodex CLNpack EV-2000（20×300mm）
ガードカラム：Shodex CLNpack EV-G（20×100mm）
カラム温度：40℃
移動相：アセトン/シクロヘキサン（1：4）
流　速：5mL/min
注入量：8mL

(2) ガスクロマトグラフ（GC）

機　器：アジレント・テクノロジー㈱製　7890B
カラム：VF-200ms（0.25mm×30m，膜厚0.25µm）
カラム温度：50℃（1min）－25℃/min－125℃－10℃/min－300℃（10min）
注入量：サンプル1µL＋APs 0.5µLのサンドウィッチ注入
注入方法：パルスドスプリットレス
注入口温度：250℃
キャリアーガス：ヘリウム
キャリアーガス流量：1.54mL/min

(3) 質量分析装置（MS/MS）

機　器：アジレント・テクノロジー㈱製　7000D
インターフェース温度：280℃
イオン源温度：320℃
四重極温度：150℃
イオン化法：EI法
イオン化電圧：70eV
コリジョンガス：N2コリジョンガス　1.5mL/min
　　　　　　　　Heコリジョンガス　2.25mL/min
測定モード：MRM
イオン源クリーニング：水素流量0.47mL/min

なお，各成分の定量イオンと確認イオンは表1に示すとおりである。

2・5　試験溶液の調製

試験溶液の調製は，現行法を一部変更した方法で行った（図1）。

2・6　定　量

混合標準液をアセトン/n-ヘキサン（1：1）混液で適宜希釈し，4ng/mL～80ng/mLの検量線用標準液を作成した。

混合標準液および試験溶液それぞれ1µLにAPs 0.5µLをオートサンプラーでGC-MS/MSに注入し，ピーク面積から絶対検量線を作成し，定量した。

2・7　妥当性評価方法

ガイドラインに従い，選択性，定量限界，真度および精度の4項目について評価を行った。試料に各成分を検体中濃度が0.01ppm（一律基準）および0.05ppmになるように添加し，分析者3名が1日2併行で2日間の枝分かれ試験を行った。

3　結果および考察

3・1　測定条件の検討

GCの測定条件の検討を行った。分析用カラムに，当センターの農薬一斉試験法で使用しているVF-5msを用いて40ng/mLの混合標準液を測定したところ，p,p'-DDDとo,p'-DDTのピークが分離しなかった（図2-1）。このため，ハロゲン化物の分離に適したVF-200msを用いて測定したところ，11成分すべての分離定量が可能であっ

表1　各成分の測定条件

成分名	保持時間（分）	定量イオン プリカーサーイオン m/z	定量イオン プロダクトイオン m/z	定量イオン コリジョン電圧（V）	確認イオン プリカーサーイオン m/z	確認イオン プロダクトイオン m/z	確認イオン コリジョン電圧（V）
p,p'-DDD	15.34	284	214	36	284	249	20
p,p'-DDE	14.00	272	237	18	274	239	18
o,p'-DDT	14.75	263	193	34	255	220	14
p,p'-DDT	15.68	217	182	16	183	155	12
アルドリン	12.09	353	263	16	355	265	14
エンドリン	15.24	246	176	30	248	176	30
ディルドリン	14.81	235	165	24	237	165	24
ヘキサクロロベンゼン	9.56	263	193	38	277	241	8
ヘプタクロル	11.60	263	193	38	279	209	24
ヘプタクロルエポキシド（cis）	13.62	235	165	24	237	165	24
ヘプタクロルエポキシド（trans）	13.31	235	165	24	237	165	24

試料（筋肉20.0g）
｜　＋精製水　20mL
ホモジナイズ(2分間)
｜　＋ｱｾﾄﾝ/n-ﾍｷｻﾝ(1：2)100mL
ホモジナイズ(3分間)
｜
遠心分離（2500rpm、5分間）
├ 上澄
└ 残渣
　　｜　＋n-ﾍｷｻﾝ50mL
　　ホモジナイズ(3分間)
　　｜
　　遠心分離（2500rpm、5分間）
　　｜
　　上澄
（上澄を合わせる）
｜
脱水（無水硫酸ナトリウム）
｜
ろ過
｜
n-ヘキサンで200mL定容（抽出液）

抽出液 20mL
｜　40℃以下で減圧・乾固
アセトン/シクロヘキサン(1:4)で10mLに定容
｜
ろ過後GPCに8mL負荷
｜　70～110mL画分を分取
｜　40℃以下で減圧・乾固
アセトン/n-ヘキサン(1:1)で2mlとする(負荷液)
｜
SAX/PSAカラムに全量負荷
｜　アセトン/n-ヘキサン(1:1)10mLで
｜　コンディショニング
｜　アセトン/n-ヘキサン(1:1)20mLで溶出
負荷液・溶出液
｜　40℃以下で減圧・乾固
アセトン/n-ヘキサン(1:1)で2mLに定容(試験溶液)
｜
GC-MS/MS測定

図 1　試験溶液の調製

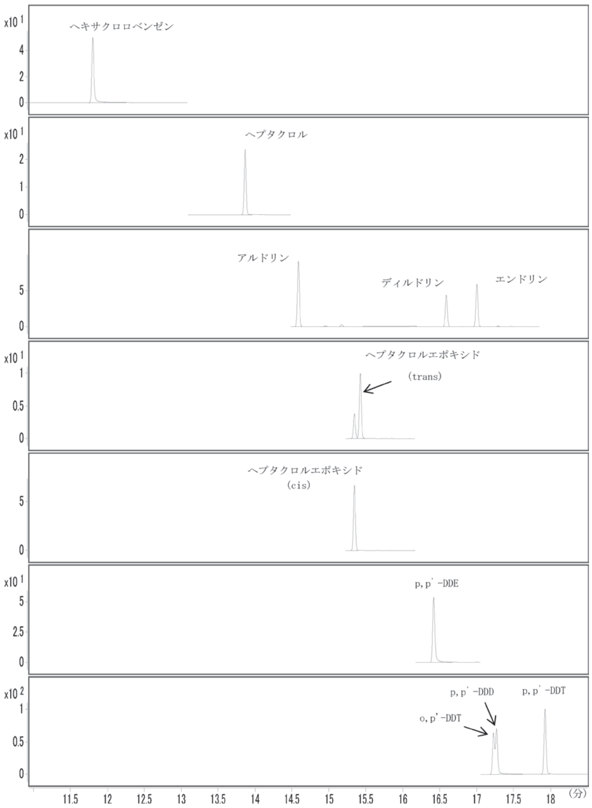

図 2-1　40ng/mL 混合標準液のクロマトグラム
VF-5ms(50℃(1min)-25℃/min-125℃-10℃/min-300℃(10min))

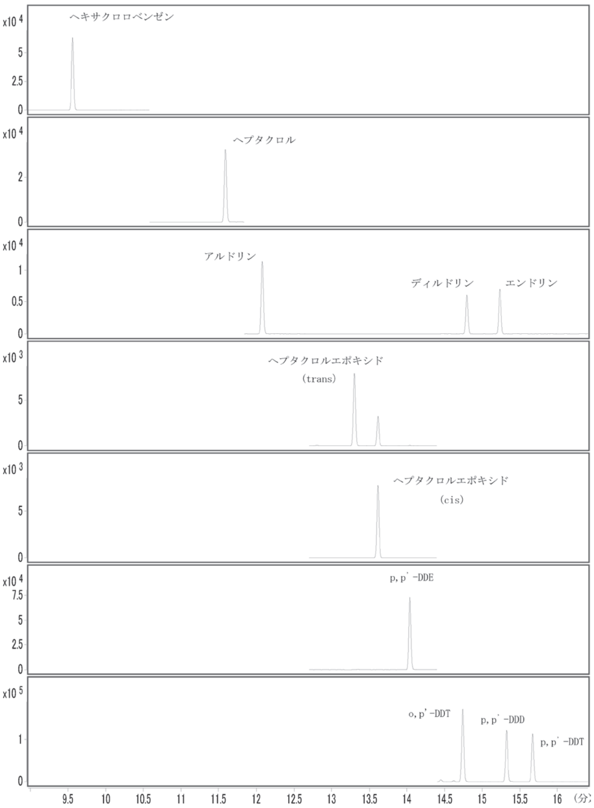

図 2-2　40ng/mL 混合標準液のクロマトグラム
VF-200ms(50℃(1min)-25℃/min-125℃-10℃/min-300℃(10min))

た（図2-2）。そこで，分析用カラムにはVF-200msを採用することとした。

3・2　精製方法の検討

（1）GPC条件の検討

現行法と同じGPC条件で，各成分の溶出状況を確認した。移動相の流速を5mL/分とし，10分から30分までの2分間隔で溶出溶媒を分取して，各画分における成分の溶出率を求めた。エンドリンとヘキサクロロベンゼン以外の成分は14分から溶出し，最も溶出が遅かったヘキサクロロベンゼンも，22分までにほぼ全量が溶出した。現行法では，60～150mL（12分から30分まで）の画分を分取していたが，分取量を減らすことで試験溶液中の夾雑物も減少するため，70～110mL（14分から22分まで）の画分を分取することとした。

（2）固相カラムによる精製方法の検討

現行法では，固相カラムとしてPSAカラムを用いているが，SAX/PSAカラムのほうが畜産物中の夾雑物の除去に効果的であるとの報告[4)]があることから，PSAカラムとSAX/PSAカラムの比較検討を行った。

試料中濃度が0.01ppmになるように，ブランク試料に混合標準液を添加し，各カラムで添加回収試験（n=3）を行った。その結果を表2に示した。いずれのカラムでも回収率はガイドラインの目標値（70～120%）に適合

表2　固相カラムによる回収率の比較

(n=3)

成分名	PSAカラムによる回収率(%)		SAX/PSAカラムによる回収率(%)	
	回収率(%)	標準偏差(%)	回収率(%)	標準偏差(%)
p,p'-DDD	99.5	4.6	109.4	5.4
p,p'-DDE	91.7	3.6	102.0	5.8
o,p'-DDT	97.2	2.6	104.4	5.0
p,p'-DDT	96.6	1.7	102.8	5.3
アルドリン	95.1	2.5	99.8	6.0
エンドリン	97.4	0.8	101.7	6.7
ディルドリン	90.5	5.7	102.6	4.1
ヘキサクロロベンゼン	90.4	3.7	91.0	7.1
ヘプタクロル	102.9	4.0	103.6	7.0
ヘプタクロルエポキシド(cis)	105.0	8.0	108.0	6.6
ヘプタクロルエポキシド(trans)	101.5	2.1	102.7	8.1

し，各カラムでの回収率に大きな差は見られなかった。

GC-MS/MSによる農薬分析において，標準液のレスポンスに対して，夾雑物の影響により試験溶液中の農薬のレスポンスが高くなる，マトリックス効果が問題となる。そこで，マトリックスの影響を確認するため，ブランク試料の試験溶液に混合標準液を8ng/mL（試料中濃度0.01ppm）になるように添加したマトリックス添加混合標準液と8ng/mLの混合標準液のピーク面積の比率（マトリックス比）を求め，その結果を表3に示した。マトリックス比が120%を超えるものは，PSAカラムでは，ディルドリン，ヘキサクロロベンゼン，ヘプタクロル，ヘプタクロルエポキシド（trans），SAX/PSAカラ

表3　固相カラムによるマトリックスの影響

成分名	PSAカラム	SAX/PSAカラム
	マトリックス比(%)	マトリックス比(%)
p,p'-DDD	110.9	114.7
p,p'-DDE	107.4	109.7
o,p'-DDT	107.3	110.6
p,p'-DDT	108.0	107.5
アルドリン	111.9	112.9
エンドリン	115.1	104.4
ディルドリン	125.0	101.3
ヘキサクロロベンゼン	120.6	121.9
ヘプタクロル	122.1	116.9
ヘプタクロルエポキシド(cis)	107.2	112.7
ヘプタクロルエポキシド(trans)	120.6	118.5

※網掛けはマトリックス比が120%を超えたもの

ムでは，ヘキサクロロベンゼンのみであった。以上から，回収率には明瞭な差は認められなかったが，よりマトリックス効果の小さいことが判明したSAX/PSAカラムを用いた精製方法を採用することにした。

3・3　妥当性評価試験結果

ガイドラインに従って，選択性，定量限界，真度および精度を評価した結果を表4に示した。

（1）選択性

ブランク試料を試験法に従って測定し，定量を妨害するピークの有無を確認した。妨害ピークが，0.01ppmに相当する濃度の標準液から得られるピーク面積の1/10未満のものを適合とした。すべての成分で妨害ピークは確認されなかった。

（2）定量限界

定量限界は，試料中濃度0.01ppmを目標値として設定した。ブランク試料の試験溶液に，0.01ppmとなるように混合標準液を添加して得られた成分のピークのS/N比が10以上となるものを適合とした。すべての成分でS/N比が10以上であり，目標値を満たしていた。

（3）真度および精度

すべての成分でガイドラインの真度および精度の目標値を満たした。

牛肉で妥当性評価を行った結果，11成分ですべての評価項目の目標値を満たしていた。今回は筋肉のみでの妥当性評価であったが、現行法では牛の脂肪も対象食品としていたため，今後は本試験法で脂肪についても検討を行いたい。

4　まとめ

(1) GC-MS/MSを用いた有機塩素系農薬11成分の測定条件を検討したところ，VF-200msを用いた場合にはすべての成分を分離および定量することができた。

(2) 試料の精製方法を検討した。GPCで溶媒の分取時

表4　妥当性評価結果

成分名	選択性	定量限界	添加濃度 0.05ppm 真度（%）	併行精度（%）	室内精度（%）	添加濃度 0.01ppm 真度（%）	併行精度（%）	室内精度（%）	総合判定
			目標値 70-120%	＜15%	＜20%	70-120%	＜25%	＜30%	
p,p'-DDD	○	○	100.9	5.4	4.9	93.6	2.3	4.1	○
p,p'-DDE	○	○	100.1	5.7	5.2	89.4	4.3	5.8	○
o,p'-DDT	○	○	99.2	5.4	5.3	94.3	2.5	3.8	○
p,p'-DDT	○	○	96.3	4.7	4.8	92.9	3.2	5.0	○
アルドリン	○	○	95.0	6.7	5.6	89.5	2.4	7.9	○
エンドリン	○	○	99.4	5.2	5.2	96.2	3.1	5.6	○
ディルドリン	○	○	99.8	6.9	5.8	88.3	5.0	7.6	○
ヘキサクロロベンゼン	○	○	83.2	14.2	15.9	83.3	3.0	9.9	○
ヘプタクロル	○	○	99.8	6.7	6.2	93.5	2.8	5.6	○
ヘプタクロルエポキシド（cis）	○	○	98.3	5.6	4.9	92.4	7.9	7.2	○
ヘプタクロルエポキシド（trans）	○	○	98.6	4.9	4.9	94.3	4.7	9.3	○

1）選択性，定量限界欄の「○」は，目標値に適合したことを示す。
2）総合判定欄の「○」は，評価項目すべてに適合したことを示す。

間を短くすることで，試験溶液中の夾雑物を減らすことができた。また，固相カラムにSAX/PSAカラムを用いることで，マトリックス効果を軽減することができた。

(3) 検討した試験法で，牛の筋肉の妥当性評価を行ったところ，対象とした11成分すべてで妥当性評価の目標値を満たし，妥当性を確認できた。

文　献

1）厚生労働省告示第370号：食品，添加物等の規格基準，昭和34年厚生省告示第370号
2）厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知食安発1224第1号：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の一部改正について，平成22年12月24日
3）厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知食安発第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について，平成17年1月24日
4）吉崎麻友子，小林ゆかり，清水正法，丸山浩一：アセトニトリル/n-ヘキサン分配および固相抽出精製を用いたGC-MSによる畜産物中の農薬一斉分析法の検討，食品衛生学雑誌，**56**，77-82（2015）