

牛乳中の残留農薬一斉試験法の妥当性評価

宮川あし子¹・小山 和志¹・上沼 由佳¹・土屋としみ¹

牛乳中の残留農薬一斉試験法について、選択性に優れる GC-MS/MS を用い、35 農薬、41 項目について 2 濃度、2 併行、5 日間の妥当性評価を実施した。その結果、33 農薬、39 項目が妥当性評価の目標値に適合した。評価の目標値に適合した項目の 0.01mg/kg 添加の真度は、74.0~119.6%、0.1mg/kg 添加の真度は 76.6~106.4% であった。妥当性評価の目標値に適合しなかったテルブホスおよびフェナミホスそれぞれの 0.01mg/kg 添加の真度は、64.2% および 120.6%、0.1mg/kg 添加の真度は 58.0% および 90.4% であった。

妥当性が認められなかったテルブホス、フェナミホスについて、濃縮方法およびマトリックス添加法について添加回収試験を行い検討した。テルブホスは、窒素吹付による乾固において少量の溶媒を残した結果、0.01mg/kg 添加の回収率は 83.2%、0.1mg/kg 添加では 83.6% であった。また、フェナミホスは、マトリックス添加法により検量線の直線性が向上し、0.01mg/kg 添加における回収率は 107.4% であった。さらに、妥当性評価の目標値には適合したが、0.01mg/kg 添加で真度が 100% を超えた 13 農薬についてマトリックス添加法による測定を行った結果、検量線の決定係数 (R^2) の値はいずれの項目についても改善した。中でもピラゾホスは顕著に検量線の直線性が改善し回収率は 112.6% となった。

キーワード：牛乳、残留農薬、妥当性評価、マトリックス添加法、GC-MS/MS

1 はじめに

牛乳は小児にとって主要かつ重要な食品であり、その汚染物質については社会の関心が高い。かつて、乳中の有機塩素系農薬の残留が注目され全国で実態調査が行われてきた^{1)~4)}。長野県では、原乳中の有機塩素系農薬の残留調査を 1970 年から開始し⁵⁾、2015 年からは、牛乳中の残留農薬および動物用医薬品等について「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」⁶⁾ (以下ガイドラインという) に従って妥当性を評価し、実態調査を実施している。

近年では、有機塩素系農薬の残留は減少し^{3), 4), 7)}、当所の検査でも 2015 年に妥当性評価を実施して以降の調査において、牛乳中から当該農薬は検出されていない。しかし、飼料から BHC やディルドリンが基準を超えて検出された例⁸⁾ もあり、安全性を確保するには継続して調査することが必要と考えられる。

今回、妥当性を評価するにあたり、有機塩素系農薬の残留実態をより詳細に把握するために、ディルドリン、アルドリン、エンドリン、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド A、ヘプタクロルエポキシド B、 γ -BHC の 7 項目 (4 農薬) をこれまでの分析対象項目に加えて、2 濃度、2 併行、5 日間妥当性評価を実施し

た。また、妥当性を評価する過程で、目標値に適合しなかったテルブホスおよびフェナミホスについて分析操作を検討した。

2 実験方法

2.1 試料

農薬が検出されないことを確認した市販の牛乳を用いた。

2.2 試薬

農薬標準品：富士フィルム和光純薬 (株) 製、Dr.Ehrenstorfer 社製、関東化学 (株) 製、SIGMA-ALDRICH 社製および Chem Service 社製の残留農薬試験用を用いた。

標準原液：各農薬標準品 25mg を精秤し、アセトンに溶解し 500mg/L としたものを標準原液とした。

混合標準溶液：各標準原液を混合しアセトン：n-ヘキサン (1:1) で希釈して、標準溶液を作成した (0.005mg/L~1.0mg/L)。

添加用混合標準液：各標準原液を混合しアセトンで希釈して、0.1mg/L および 1.0mg/L 添加用標準液を作成した。

1 長野県環境保全研究所 食品・生活衛生部 〒380-0944 長野市安茂里米村 1978

フルオランテン-d10 (内部標準物質)：富士フィルム和光純薬(株)製

PSA ミニカラム：アジレント・テクノロジー (株) 製 Bond Elut LRC-PSA (500mg) を用いアセトン：n-ヘキサン(1：1) 10mL でコンディショニングして用いた。

その他の試薬：アセトンおよびジエチレングリコール (DEG) は富士フィルム和光純薬 (株) 製を、アセトニトリル、n-ヘキサンおよびシクロヘキサンは関東化学 (株) 製を用いた。ポリエチレングリコール (PEG (300)) は和光純薬工業 (株) 製を用いた。

2. 3 装置および測定条件

ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC), GC-MS/MS および GC-MS：表 1 に示す。

高速ホモジナイザー：KINEMATICA 社製ポリトロ
ン PT10-35 GT

遠心分離機：(株) 久保田製作所製 S700T

減圧濃縮器：BUCHI 社製 R-210

表 1 装置および測定条件

ゲル浸透クロマトグラフィー	
装置	(株) 島津製作所製 LC-10ATvp
カラム	CLNPak EV-2000 (内径 20mm ×長さ 300mm×粒径 16μm)
ガードカラム	CLNPak EV-G (内径 20mm×長さ 100mm×粒径 16μm)
移動相	アセトン：シクロヘキサン (1：4)
流速	5mL/min
注入量	5mL
分画範囲	11.5min~32.5min
GC-MS/MS (GC-MS)	
GC 条件	
装置	アジレント・テクノロジー (株) 製 7890A
カラム	DB-5MS (内径 0.25mm×長さ 30m×膜厚 0.25μm)
カラム温度	50°C (1min) → (25°C/min) →125°C→ (10°C/min) →300°C (10min)
注入口温度	250°C
キャリアーガス	ヘリウム 流速 1mL/min
MS/MS (MS) 条件	
装置	アジレント・テクノロジー (株) 製 G7000B
イオン化モード	EI
測定モード	MRM, (スキャン)
イオン化電圧	70eV
クエンチガス	ヘリウム 流速 2.25mL/min
コリジョンガス	窒素 流速 1.5mL/min

2. 4 分析操作

平成 17 年の「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」⁹⁾ により示された「GC/MS による農薬等の一斉試験法 (畜水産物)」に準じて試験を実施した。各農薬を 0.1mg/kg および 0.01mg/kg となるように添加した試料 (2 濃度, 2 併行) 20g, サンプルブランク 20g および精製水 20g を用い、アセトニトリルで農薬を抽出し、GPC および PSA ミニカラムによるクリーンアップを実施した。調製した試験溶液 2 μL を GC-MS/MS に注入し定量した。これらの操作を 5 日間繰り返し、試験法の妥当性をガイドラインにより評価した。試験法の概略を図 1 に示す。

2. 5 濃縮方法およびマトリックス添加法の検討

テルブホスは、減圧濃縮器での損失¹⁰⁾ が知られている。そこで、キパー溶液 (DEG:アセトン=2:8) 0.1mL を加えて、減圧濃縮する方法および窒素吹付においてその都度少量の溶媒を残す添加回収試験 (n=5) を 0.1mg/kg または 0.01mg/kg の添加濃度について、一斉分析を実施しその効果を検討した。DEG の添加位置を図 1 に示す。

また、食品中の農薬は、そのマトリックスの影響によりレスポンスが標準試料に比べ高くなることが知ら

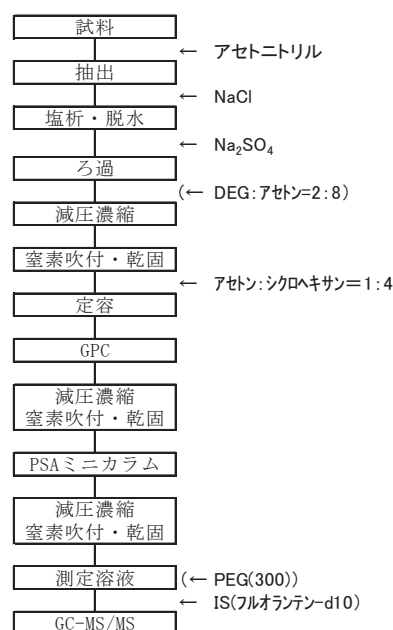


図 1 分析フロー

れている⁹⁾。特に低濃度でその影響が大きいと、疑似マトリックスとして PEG (300) を 0.02% となるように標準溶液および 0.01mg/kg 添加回収試験溶液 (n=5) に添加して測定し (図 1)、検量線の R² および回収率を、真度が 100% を超えた項目について比較検討した。

3 結果

3.1 妥当性評価

評価結果を表 2 に示す。妥当性を評価した 41 項目のうち 39 項目が妥当性評価の目標値に適合したが、テルブホスおよびフェナミホスは適合しなかった。

3.1.1 選択性および定量限界

ブランク試料について表 2 に示す定量イオンで分析した結果、定量下限値未満の DDE(4,4') が検出され、DDD(4,4'), DDT(4,4'), DDT(2,4'), DDT(4,4'), クロロベンジレート, ピリダベン, フェンブコナゾールおよびペンコナゾールに妨害が認められたが、いずれもガイドラインの許容範囲内であった。その他の農薬については妨害するピークは認められなかった。また、それぞれの農薬の定量下限値を表 2 に示した。

3.1.2 真度, 併行精度および室内精度

真度, 併行精度および室内精度を表 2 に示す。テルブホスおよびフェナミホスを除く農薬はすべてガイドラインの目標値を満足していた。テルブホスは真度および室内精度が 0.01mg/kg 添加および 0.1mg/kg 添加のいずれにおいても目標値を満足していなかった。フェナミホスは 0.01mg/kg 添加における真度および 2 濃度における室内精度が目標値を満足していなかった。

3.2 濃縮方法およびマトリックス添加法の検討

3.2.1 濃縮方法の検討

テルブホスは添加した 2 濃度のいずれにおいても真度が低く、室内精度も目標値を満足していなかった。そこでキパー溶液として DEG・アセトン溶液をアセトニトリル抽出後に加え、添加回収試験 (n=5) を実施した結果、0.01mg/kg 添加で平均回収率 86.9% と、妥当性評価の結果と比べると改善した。しかし、DDT (2,4'), DDT (4,4') およびエンドリン等において真度が 200% を超え、DEG による影響が認められた。

また、窒素吹付においてその都度少量の溶媒を残す

方法 (n=5) での回収率は 0.01mg/kg 添加で 83.2%, 併行精度の相対標準偏差 (RSD) は 5.7%, 0.1mg/kg 添加でそれぞれ 83.6% および 3.6% であった。

3.2.2 マトリックス添加法の検討

フェナミホスは 0.01mg/kg 添加で真度は 120.6%, 検量線の R² は 0.929 で直線性も悪かった。フェナミホスの PEG を添加しないときの検量線と、添加したときの検量線を図 2 に示す。PEG 添加では R² の値は 0.995 となり、明らかに直線性の改善が見られ、0.01mg/kg 添加 (PEG 添加, n=5) の回収率は 107.4%, 併行精度 (RSD) は 11.1% であった。

また、妥当性評価の目標値に適合した農薬のうち 0.01mg/kg 添加で真度が 100% を超え、マトリックスの影響を受けたと推測された 13 農薬およびフェナミホスについて、PEG 添加による回収率および検量線の R² の変化を表 3 に示す。13 農薬の回収率は、100.4~112.6% で、検量線の R² は全ての農薬で向上した。これらの結果を妥当性評価の結果 (表 2) と比較すると、ピラゾホスは、検量線の直線性が向上するとともに (図 3)、回収率は 112.6% (n=5) となり、PEG 添加による効果が認められたが、その他の 12 農薬には顕著な効果は認められなかった。

一方、PEG 添加した時、0.01mg/kg 添加での γ -BHC, DDT(4,4') 等の農薬の回収率は、PEG を添加しない時より明らかに大きくなる傾向にあった。

4 考察

妥当性を評価した 41 項目中 39 項目の真度は、0.01mg/kg 添加では 74.0~119.6%, 0.1mg/kg 添加では 76.6~106.4% となり、妥当性評価の目標値に適合していた。また、併行精度および室内精度も目標値に適合していた。しかし、0.01mg/kg 添加における検量線の R² の値が低い傾向にあり、特にピラゾホスは直線性が悪かった (図 3)。ピラゾホスは PEG の添加による添加回収試験で、検量線の直線性は改善され回収率 (n=5) はよくなったが、一方で回収率が大きくなる農薬が見られたことから、PEG の添加は慎重に行う必要があると推察された。なお、0.1mg/kg 添加における検量線の R² の値はいずれも 0.99 以上で、検量線の直線性に問題はなかった。

妥当性が認められなかったテルブホスは 0.01mg/kg 添加および 0.1mg/kg 添加双方において妥当性評価に

表2 妥当性評価結果

農 薬	ブライザーイオン プロダクトイオン (m/z)	添加濃度 (0.01mg/kg)			添加濃度 (0.1mg/kg)			定 量 下限値 (mg/kg)	評 価 結 果	
		真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)			
DDT	DDD (4,4')	237>165	90.1	2.0	4.9	87.9	2.7	4.9	0.001	○
	DDE (4,4')	246>176	81.9	2.5	5.9	81.8	3.4	3.9	0.001	○
	DDT (2,4')	235>165	79.6	1.1	4.7	79.8	3.3	6.4	0.001	○
	DDT (4,4')	235>165	84.5	2.4	7.4	84.2	4.2	7.9	0.001	○
γ-BHC		217>181	75.0	1.6	4.0	79.6	4.3	4.7	0.001	○
アトラジン		215>58	83.9	2.2	2.4	84.7	3.5	4.5	0.001	○
アルドリン及びデ ィルドリン	アルドリン	263>193	74.0	2.2	3.9	76.6	3.9	3.9	0.005	○
	ディルドリン	263>193	79.4	4.2	4.2	83.5	3.3	3.5	0.001	○
イソプロチオラン		290>118	106.1	3.8	6.9	97.5	2.7	3.9	0.005	○
エトプロホス		158> 97	81.4	9.2	9.2	83.1	4.7	6.5	0.001	○
エンドリン		263>193	93.1	1.6	5.6	95.3	3.5	4.7	0.002	○
キノキシフェン		307>237	101.4	1.9	5.2	93.6	2.7	3.5	0.002	○
クロルピリホス		314>258	87.9	1.9	5.2	88.9	3.1	4.9	0.001	○
クロルフェナビル		247>227	93.6	2.0	3.7	92.3	2.8	3.5	0.005	○
クロロベンジレート		251>139	101.6	3.1	5.7	98.1	2.9	5.0	0.005	○
シマジン		201>173	93.9	2.9	3.5	89.3	3.8	4.9	0.002	○
テフルトリン		177>127	82.3	3.1	3.8	83.6	3.5	4.5	0.0004	○
テルブホス		231>129	64.2	17.9	46.5	58.0	6.0	41.0	0.005	×
トリアジメホン		208>111	98.2	3.2	7.0	93.7	3.0	5.3	0.002	○
トリアゾホス		161>134	110.4	2.4	6.3	102.9	3.2	4.9	0.002	○
トリアレート		268>184	78.8	1.8	3.3	81.8	3.7	3.7	0.001	○
ピラゾホス		221>193	119.6	3.3	13.2	106.4	2.7	5.8	0.005	○
ピリダベン		147>117	92.3	3.1	8.2	83.0	3.9	6.7	0.002	○
ピリプロキシフェン		136> 78	108.1	1.2	6.9	98.6	3.7	3.8	0.002	○
ピリミカーブ		238>166	82.7	2.4	2.5	82.6	3.6	4.1	0.001	○
フェナミホス		303>195	120.6	20.0	59.0	90.4	10.9	48.6	0.005	×
フェナリモル		219>107	108.1	2.2	9.6	97.3	3.0	3.8	0.002	○
フェンブコナゾール		198>129	106.9	3.7	8.8	96.0	3.7	3.7	0.005	○
フェンプロバトリン		265>210	102.3	1.4	5.7	94.3	3.6	4.4	0.005	○
プロシミドン		283> 96	87.2	1.0	3.0	89.9	3.7	5.1	0.001	○
プロピザミド		173>145	87.0	4.9	6.0	85.7	3.1	5.6	0.001	○
プロマシル		205>188	111.8	6.9	7.4	104.2	6.2	7.5	0.005	○
プロメトリン		226>184	90.8	5.5	7.8	88.7	3.3	6.6	0.001	○
プロモプロビレート		341>183	111.1	2.1	6.1	104.9	3.1	5.4	0.005	○
へブタクロル		272>237	75.9	3.1	3.1	79.1	3.4	4.5	0.005	○
	へブタクロルエポキシド A	183>155	78.5	3.5	5.5	83.1	3.8	3.8	0.001	○
	へブタクロルエポキシド B	353>263	76.1	2.2	2.5	82.2	3.5	3.5	0.001	○
ベンコナゾール		248>157	96.7	3.7	6.5	93.6	3.2	5.6	0.002	○
マラチオン		173> 99	100.4	4.3	6.3	94.1	3.6	4.7	0.005	○
ミクロブタニル		179>125	104.0	3.5	6.9	95.0	3.3	4.4	0.001	○
メトキシクロール		227>141	93.4	2.8	8.3	90.8	3.6	8.0	0.002	○

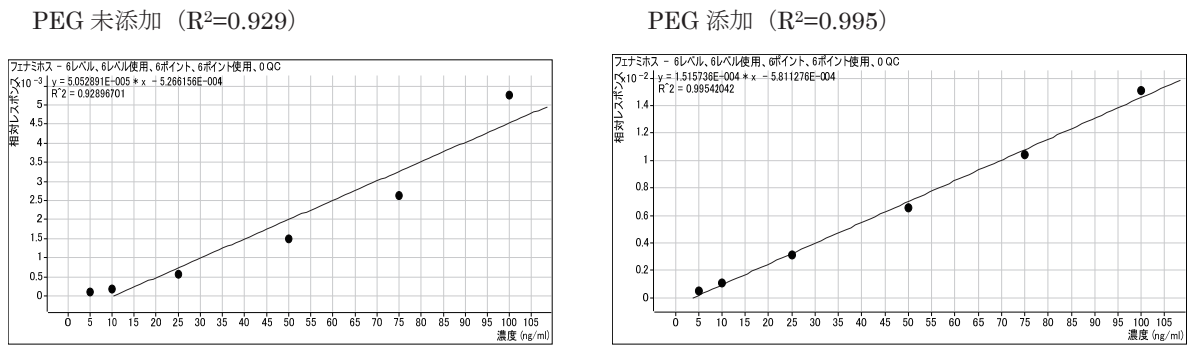


図2 フェナミホスの検量線 (濃度範囲: 5µg/L~100µg/L) におけるPEG添加の効果

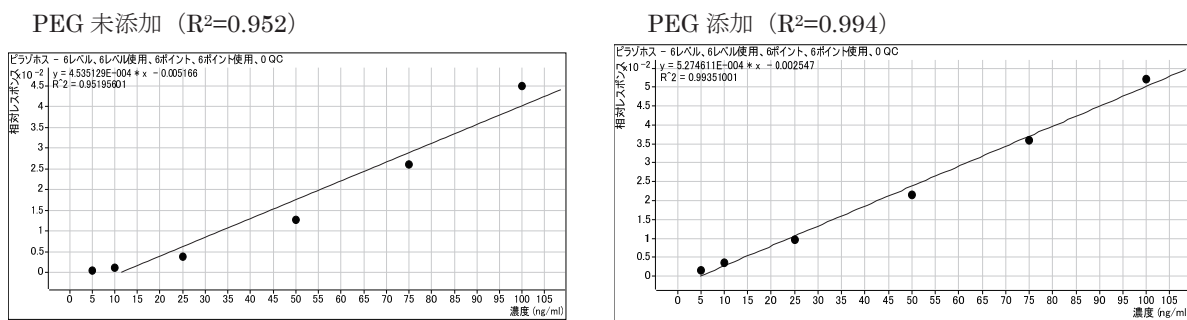


図3 ピラゾホスの検量線 (濃度範囲: 5µg/L~100µg/L) におけるPEG添加の効果

表3 13農薬およびフェナミホスのPEG添加による回収率*, 併行精度 (n=5) および検量線の決定係数 (R²) の変化

農薬	回収率 (%)	併行精度 (RSD%)	検量線**の R ²	
			PEG未添加	PEG添加
イプロロチオラン	111.6	4.8	0.970	0.998
キノキシフェン	101.6	3.1	0.994	0.999
クロロベンジレート	110.5	6.6	0.984	0.998
トリアゾホス	112.4	8.6	0.964	0.997
ピラゾホス	112.6	6.7	0.952	0.994
ピリプロキシフェン	111.3	3.2	0.972	0.997
フェナリモル	102.5	3.4	0.976	0.999
フェンブコナゾール	112.6	4.0	0.976	0.997
フェンプロバトリン	101.0	7.6	0.985	0.995
プロマシル	107.0	10.6	0.981	0.997
プロモプロピレート	103.5	8.7	0.978	0.997
マラチオン	100.4	4.3	0.986	0.995
ミクロブタニル	104.0	3.5	0.996	0.997
フェナミホス	107.4	11.1	0.929	0.995

* : 添加濃度 0.01mg/kg

** : 検量線の濃度範囲 5µg/L~100µg/L

おける真度および室内精度は悪かった。キーパー溶液を加え濃縮する添加回収試験 (n=5) では、回収率および併行精度 (RSD) は妥当性評価の結果と比較してよかった。しかし、DDT (2,4'), DDT (4,4')およびエンドリン等において回収率が200%を超えるなど、DEG添加によるマトリックス効果がみられた。このことから、キーパー溶液の添加は一定の効果はあるものの一斉分析には適さなかった。

一方、窒素吹付においてその都度少量の溶媒を残す方法では、0.01mg/kg 添加および 0.1mg/kg 添加で回収率および併行精度 (n=5) はよかった。しかし、残す溶媒の量が多いとアセトン・シクロヘキサン定容時に2層に分離する傾向が見られたことから、その量はごく少量とすることが望ましいと考えられた。

また、フェナミホスについてはピラゾホスと同様に 0.01mg/kg 添加における検量線の R² が低く検量線の直線性が悪かった。また、真度、併行精度および室内精度は、目標値を満たさなかった。しかしPEGの添加による回収率は 107.4% (n=5) で、検量線の R² の値も 0.995 となり直線性も改善され、PEG添加の効果が明らかであった (表3)。

以上のことから、テルブホスについては、窒素吹付・

乾固時に少量の溶媒を残す方法が有効であった。また、フェナミホスは検量線の直線性が悪く、真度が目標値を超えたため PEG の添加が有効であった。しかし、疑似マトリックスの添加は他の項目に影響を与えるため、さらに検討する必要があると考えられた。妥当性が認められなかったテルブホスとフェナミホスについては、改めて妥当性をとっていく必要があると考えられた。

今回、疑似マトリックスとして PEG を用いたが、Analyte Protectant(AP)を用いる方法¹¹⁾が検討され報告されており、PEG と比較して効果が高いという資料もある¹²⁾。マトリックス効果への対策については、AP を含めて検討していく必要があると考えられた。

今後追加した有機塩素系項目を含め、残留実態調査を継続していきたい。

文 献

- 1) 厚生省乳肉食品農薬汚染研究班 (1972) 乳肉食品中の残留農薬 (第1報), 食品衛生学雑誌, 13(4): 299-309
- 2) 星野庸二・堀江正一・飯島正雄・斉藤貢一・高橋邦彦・神戸正美・土屋みつ子・徳丸雅一 (1991) 牛乳中の有機塩素系農薬及びPCBの調査, 埼玉県衛生研究所報, 25: 224-225
- 3) 藤沼賢司・竹葉和江・坂本美穂・斉藤和夫・宮崎奉之 (2003) 生乳中の 残留有機塩素系農薬の年次推移 (1983-2002年度), 東京都健康安全研究センター年報, 54: 165-170
- 4) 橋本常生・八巻ゆみこ・笹本剛生・堀井昭三・牛尾房雄・平公崇・笹山優乃・鎌田国広 (2004) 牛乳及びチーズ中の残留有機塩素系農薬の実態調査, 東京都健康安全研究センター年報, 55: 221-223
- 5) 山浦由郎・前沢久・川又秀一・小林求 (1979) 長野県産原乳中の有機塩素系農薬の推移 (1970~1977), 長野県衛生公害研究所研究報告, 1: 11-14
- 6) 厚生労働省医薬食品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, 平成19年11月15日付け食安発第1115001号, 平成22年12月24日付け食安発1224第1号により一部改正
- 7) 桑原克義・松本比佐志・村上保行・堀伸二郎 (1997) 19年間(1977年~1995年)におけるトータルダイエット スタディー法による大阪在住成人のPCB及び有機塩素系農薬の1日摂取量の推移, 食品衛生学雑誌, 38: 286-295
- 8) 環境ニュース[国内] (2004): <https://www.ei.cor.jp/news/?act=view&word=&category=41&serial=7717&oversea=0.html>(2021年12月確認)
- 9) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知, 食品中に残留する農薬, 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日付け食安発第0124001号
- 10) 農薬残留分析法研究班 (2006) 最新農薬の残留分析法【改訂版】, 中央法規出版, 844-846
- 11) M. Anastassiades, K. Maštovská, S. J. Lehotay (2003) Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides, Journal of Chromatography A, 1015(1-2):163-184
- 12) (株) 島津製作所 Application News (2019) GC/MS/MSを用いた残留農薬分析におけるマトリックス効果対策の検討, No.M279

Validation study on a multi-residue analysis of pesticides in milk

Ashiko MIYAGAWA¹, Kazushi KOYAMA¹, Yuka UENUMA¹
and Toshimi TSUCHIYA¹

¹ Food and Pharmaceutical Science Division, Nagano Environmental Conservation Research Institute, 1978 Komemura, Amori, Nagano 380-0944, Japan