

畜産物における有機塩素系農薬の迅速検査法の検討（第1報）

食品薬品部

若林 勇輝 湯田 雄一郎¹ 駒場 直行 横塚 直子²
 松下 和裕 徳田 侑子 飯野 聡子 黒崎 かな子

(¹現薬務課、²前保健環境センター)

要旨

現在畜産物の脂肪中に残留する有機塩素系農薬の行政検査で使用している試験法について、検査に要する時間と使用溶媒量の削減を目的として、迅速検査法の検討を行った。抽出工程、精製工程の検討を重ねることにより、検査時間及び使用溶媒量を大幅に削減することができた。

キーワード：有機塩素系農薬、畜産物、脂肪、多孔性ケイ藻土カラム

1 はじめに

当センターでは年間10検体の豚、鶏、牛の主に脂肪について有機塩素系農薬の残留農薬検査を行っている。畜産物中の農薬検査においては、厚生労働省通知¹⁾により、精製にゲル浸透クロマトグラフィー（以下GPC）を使用することとされているが、当センターにはGPCが無いため、液-液抽出による独自の方法で行っている。しかし、この方法は操作が煩雑であるため時間を要し、さらに試験薬の使用量が多いという問題がある（図1）。

農産物中の残留農薬検査においては近年、QuEChERS法等の迅速分析法が多数報告されているが、畜産物中の有機塩素系農薬に関する迅速検査法の報告は少ない。そこで、当該検査の迅速簡易化を図る検討を行ったところ、若干の知見が得られたので報告する。

2 実験方法

2.1 検討項目

塩素系農薬5項目

総BHC（ α -BHC、 β -BHC、 γ -BHC、 δ -BHC）、総DDT（ p,p' -DDE、 p,p' -DDD、 o,p' -DDT、 p,p' -DDT）、アルドリン及びディルドリン、エンドリン、ヘプタクロール（ヘプタクロール、エキソエポキシド体及びエンドエポキシド体）の14化合物

2.2 試料

鶏、豚、牛の脂身

2.3 試薬

標準品には、和光純薬工業(株)、Riedel-de Haën社、AccuStandard, Inc社製残留農薬分析用を用いた。その他の試薬は、関東化学(株)及び和光純薬工業(株)製を、固相抽出カラム（C18、C18/PSA）、多孔性ケイ藻土カラムはジェーエルサイエンス(株)製を用いた。

2.4 前処理方法

図2 前処理フローにおける試験法(A) (B) (C)のとおり

2.5 標準液の調製方法

各農薬標準品10 mgを適宜溶解希釈混合し、混合標準

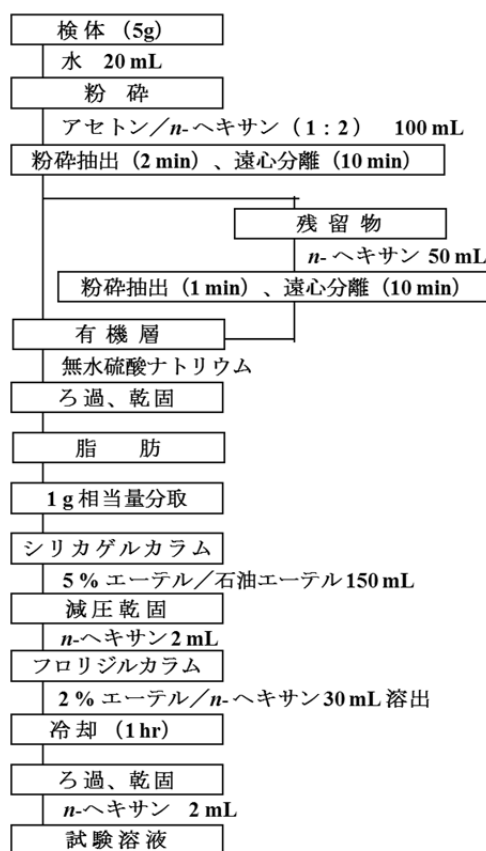


図1 現行法フロー

液（以下n-STD）を調製した。マトリクス添加標準液（以下M-STD）は各試験法により得られた試験溶液（以下MTBL）の一定量を採り、乾固した後、同量の混合標準液に再溶解して調製した。

2.6 添加回収試験

各試料にn=2で検討項目の基準値相当量になるよう添加し、試験法(A)ではn-STDを、試験法(B)、(C)ではM-STDを用いて、得られたピーク面積の比較により回収率を算出した。また、n=2で実施した添加回収試験液間の回収率の差を算出した。回収率の目標値は70~120%、回収率の差の目標値は10未満とした。

試験法(A)

検体 (5g)
+ 10 mL 超純水
粉砕 (2 min)
+ 40 mL 1% 酢酸含有アセトニトリル
粉砕抽出 (1 min)
+ 4 g 無水酢酸ナトリウム
+ 4 g 無水硫酸マグネシウム
振とう (1 min)
遠心分離(3200 rpm 10 min)
50 mL 定容
10 mL 分取
減圧濃縮、乾固
+ 2 mL アセトニトリル
C-18 ミニカラム (1g)
+ 20 mL アセトニトリル溶出
減圧濃縮、乾固
+ アセトン/ <i>n</i> -ヘキサン(1:1)
1 mL 定容

試験法(B)

検体 (5g)
+ 10 mL 超純水
粉砕 (1 min)
+ 40 mL <i>n</i> -ヘキサン
粉砕抽出 (1 min)
+ 4 g 無水硫酸マグネシウム
振とう (1 min)
遠心分離 (3200 rpm 10 min)
50 mL 定容
10 mL 分取
+ 50 mL ヘキサン飽和アセトニトリル
振とう (1 min)、静置 (30 min)
ヘキサン層
アセトニトリル層 + 50 mL ヘキサン飽和アセトニトリル
振とう (1 min)、静置 (30 min)
アセトニトリル層
濃縮・乾固
+ 2 mL アセトニトリル
C-18 ミニカラム (1g)
+ 20 mL アセトニトリルで溶出
濃縮・乾固
+ アセトン/ <i>n</i> -ヘキサン(1:1)
1 mL 定容

試験法(C)

検体 (5g)
+ 10 mL 超純水
粉砕 (1 min)
+ 40 mL <i>n</i> -ヘキサン
攪拌抽出 (1 min)
+ 4 g 無水硫酸マグネシウム
振とう (1 min)
遠心分離 (3200 rpm 10 min)
50 mL 定容
10 mL 分取
多孔性ケイ藻土カラム
静置 (10 min)、吸引 (10 min)
+ <i>n</i> -ヘキサン飽和アセトニトリル 60 mL 溶出
濃縮・乾固
+ 2 mL アセトニトリル
C-18/PSA ミニカラム (1g/ 500 mg)
+ 20 mL アセトニトリル溶出
濃縮・乾固
+ アセトン/ <i>n</i> -ヘキサン(1:1)
1 mL 定容

図2 前処理フロー

2.7 装置及び測定条件

装置：(株)島津製作所製 GC2010
 検出器：電子捕獲型検出器 (ECD)
 カラム：アジレント・テクノロジー社製 DB-5
 30m×0.25mm 膜厚0.25µm
 カラム温度：50°C(1min)－20°C/min－200°C－5°C/min
 －230°C(5min)－15°C/min－320°C
 (22min)
 キャリアガス：He

3 結果、考察

3.1 試験法(A)の検討

当センターの農産物の試験法であるが、回収率が目標値を満たさない項目が多かった(表1)。回収率が低い原因としては抽出が不十分であること、高すぎる原因としては脂肪等の夾雑物の影響が考えられた。

3.2 試験法(B)の検討

回収率の改善のため、抽出溶媒を検討したところ、極性の低い溶媒ほど回収率は高くなる傾向がみられた。そこで、抽出溶媒を *n*-ヘキサンとし、精製の有効性を検討するため、液液分配の工程を導入した。また、*n*-STD と *M*-STD を比較したところ、総 DDT やディルドリンにおいてピーク面積値に大きな差がみられ、ピークの分離についても違いがみられたため、添加回収試験の評価は *M*-STD を用いることとした(試験法(B))。その結果、試験法(A)と比べ、回収率には改善がみられたが、回収率の差が大きい項目が多くなった(表1)。また、精製は有効と思われたが、液液分配では、使用器具、溶媒量、処理

時間が増加し、当初の目的である迅速簡易化には適さないと考えられたため、試験法(B)について問題点を一つずつ検討することにした。

3.3 問題点の検討

3.3.1 回収率の差

n-ヘキサンによる粉砕抽出時には、ポリトロンシャフトに大量の付着物があり、これを回収する際に差が出たのではないかと考えられた。そこで、抽出方法を粉砕抽出からボルテックスミキサーによる攪拌抽出に変更したところ、器具への付着物はなくなり、回収率の差が小さくなった(表2)。

3.3.2 精製方法の迅速化

液液分配に替わる迅速簡易的な精製方法として、上野の方法²⁾を参考にして多孔性ケイ藻土カラム(以下カラム)を検討した。その結果、溶媒量、処理時間を約半分にすることができ、加えて使用器具の削減を図ることができたが、回収率の差の大きい項目もあった。要因は、*n*-ヘキサン抽出液をカラムに負荷後、アセトニトリルで溶出する際、カラム中に残っていた *n*-ヘキサン中に溶解した脂肪等の夾雑物が同時に溶出してしまうためと考えられた。そこで、抽出液をカラムに負荷した後、吸引を行って *n*-ヘキサンを十分に除去し、その後、アセトニトリルで溶出したところ、回収率はやや低下したものの全て目標値を満たし、回収率の差は非常に小さくなった。これは、*n*-ヘキサンを除去することにより、脂肪等の夾雑物が十分カラム内に吸着し、除去されたためと考えられた(表3)。

表1 各前処理方法の回収率及び回収率の差

試験法(A)

農業名	鶏				豚				牛			
	回収率(%)	回収率 平均値(%)		回収率の差	回収率(%)	回収率 平均値(%)		回収率の差	回収率(%)	回収率 平均値(%)		回収率の差
α-BHC	101.9	105.1	103.5	3.2	92.5	88.5	90.5	4.0	177.4	177.9	177.7	0.5
β-BHC	100.9	113.1	107.0	12.2	78.2	77.5	77.9	0.7	127.0	132.8	129.9	5.8
γ-BHC	77.2	76.9	77.1	0.3	120.1	134.7	127.4	14.6	100.7	112.8	106.8	12.1
δ-BHC	101.1	104.6	102.9	3.5	87.8	84.0	85.9	3.8	120.8	131.9	126.4	11.1
o,p'-DDT	67.9	69.1	68.5	1.2	65.1	64.1	64.6	1.0	93.3	105.2	99.3	11.9
p,p'-DDD	88.5	91.2	89.9	2.7	69.0	68.9	69.0	0.1	148.2	156.2	152.2	8.0
p,p'-DDE	58.0	58.4	58.2	0.4	54.4	59.6	57.0	5.2	71.7	76.8	74.3	5.1
p,p'-DDT	77.8	78.4	78.1	0.6	68.6	68.0	68.3	0.6	105.7	117.3	111.5	11.6
アルドリン	39.1	38.1	38.6	1.0	81.5	91.5	86.5	10.0	53.4	55.4	54.4	2.0
エンドリン	61.5	62.8	62.2	1.3	78.6	83.0	80.8	4.4	105.4	111.6	108.5	6.2
ディルドリン	56.1	58.9	57.5	2.8	80.7	85.9	83.3	5.2	83.0	87.1	85.1	4.1
ヘブタクロル	64.7	63.7	64.2	1.0	107.3	111.8	109.6	4.5	91.7	107.3	99.5	15.6
ヘブタクロルexo	76.3	77.2	76.8	0.9	103.7	109.7	106.7	6.0	102.8	107.9	105.4	5.1
ヘブタクロルendo	75.1	76.3	75.7	1.2	75.6	85.9	80.8	10.3	96.5	101.4	99.0	4.9
平均		75.7		2.3		84.9		5.0		109.3		7.4

試験法(B)

農業名	鶏				豚				牛						
	回収率(%)	回収率 平均値(%)	試験法(A)との 比較	回収率の差	回収率(%)	回収率 平均値(%)	試験法(A)との 比較	回収率の差	回収率(%)	回収率 平均値(%)	試験法(A)との 比較	回収率の差			
α-BHC	95.1	108.0	101.6	▼	12.9	97.7	83.4	90.6	△	14.3	81.4	70.3	75.9	▼	11.2
β-BHC	99.9	115.1	107.5	△	15.2	78.8	79.9	74.8	▼	7.9	91.6	99.5	95.6	▼	7.9
γ-BHC	87.6	98.9	93.3	△	11.3	95.6	89.2	92.4	▼	6.3	71.0	80.0	75.5	▼	9.0
δ-BHC	75.8	104.4	90.1	▼	28.6	95.6	89.2	92.4	△	6.3	82.5	61.7	72.1	▼	20.8
o,p'-DDT	77.9	89.9	83.9	△	12.0	93.8	86.6	90.2	△	7.2	77.9	74.3	76.1	▼	3.6
p,p'-DDD	119.3	142.3	130.8	△	23.0	122.5	112.0	117.3	△	10.5	104.6	101.0	102.8	▼	3.7
p,p'-DDE	92.0	107.5	99.8	△	15.5	97.6	88.7	93.2	△	8.9	80.0	76.2	78.1	△	3.9
p,p'-DDT	79.8	96.5	88.2	△	16.7	95.7	87.4	91.5	△	8.3	80.6	76.6	78.6	▼	4.0
アルドリン	87.8	98.9	93.4	△	11.1	97.6	85.0	91.3	△	12.6	71.2	65.7	68.4	▼	5.5
エンドリン	92.6	111.5	102.1	△	18.9	97.2	85.1	91.1	△	12.1	74.1	70.5	72.3	△	3.6
ディルドリン	94.9	112.3	103.6	△	17.4	101.8	90.3	96.0	△	11.6	81.0	78.3	79.7	▼	2.8
ヘブタクロル	89.3	98.9	94.1	△	9.6	94.2	88.0	91.1	▼	6.2	73.9	71.0	72.5	▼	2.8
ヘブタクロルexo	95.6	109.3	102.5	△	13.7	102.7	91.2	97.0	▼	11.5	77.4	77.3	77.3	▼	0.0
ヘブタクロルendo	95.0	109.2	102.1	△	14.2	103.9	92.4	98.2	△	11.5	77.7	77.1	77.4	▼	0.6
平均			99.5	△	15.7			93.4	△	9.7			78.7	▼	5.7

試験法(C)

農業名	鶏				豚				牛						
	回収率(%)	回収率 平均値(%)	試験法(B)との 比較	回収率の差	回収率(%)	回収率 平均値(%)	試験法(B)との 比較	回収率の差	回収率(%)	回収率 平均値(%)	試験法(B)との 比較	回収率の差			
α-BHC	77.9	81.3	79.6	▼	3.4	91.1	94.0	92.6	△	2.9	95.4	96.4	95.9	△	1.0
β-BHC	72.0	74.6	73.3	▼	2.6	113.9	104.4	109.2	△	9.5	92.6	89.3	90.9	▼	3.3
γ-BHC	72.6	75.1	73.9	▼	2.5	81.2	84.6	82.9	▼	3.4	85.3	83.5	84.4	△	1.8
δ-BHC	88.1	90.2	89.1	▼	2.1	91.4	94.6	93.0	△	3.2	84.9	83.9	84.4	△	1.0
o,p'-DDT	79.9	81.8	80.9	▼	1.9	85.7	85.7	85.7	▼	0.0	95.2	80.8	88.0	△	14.4
p,p'-DDD	117.9	120.0	118.9	▼	2.1	90.0	91.9	91.0	▼	1.9	103.2	82.8	93.0	▼	20.4
p,p'-DDE	88.4	90.3	89.4	▼	1.9	88.8	88.1	88.5	▼	0.7	97.0	81.1	89.0	△	15.9
p,p'-DDT	81.1	82.0	81.5	▼	0.9	84.4	85.1	84.8	▼	0.7	94.2	78.0	86.1	△	16.2
アルドリン	79.7	87.4	83.6	△	7.7	91.0	91.9	91.5	△	0.9	90.8	81.5	86.1	△	9.3
エンドリン	86.7	79.4	83.0	△	7.3	91.5	99.8	95.7	▼	8.3	95.7	97.0	96.3	△	1.3
ディルドリン	89.2	93.6	91.4	△	4.4	97.9	90.9	94.4	△	7.0	83.8	84.9	84.3	△	1.1
ヘブタクロル	97.9	89.0	93.4	△	8.9	110.4	112.1	111.3	△	1.7	94.1	86.6	90.4	△	7.5
ヘブタクロルexo	89.6	94.1	91.8	△	4.5	97.9	97.8	97.9	△	0.1	96.5	91.8	94.1	△	4.7
ヘブタクロルendo	89.9	94.1	92.0	△	4.2	95.9	96.5	96.2	▼	0.6	98.1	90.1	94.1	△	8.0
平均		87.3		▼	3.9			93.9	△	2.9			89.8	△	7.6

: 回収率の目標値を満たさなかった項目
 : 2回の差が10以上の項目
△ : 回収率が上がったもの
▼ : 回収率が下がったもの

表2 粉砕抽出時と攪拌抽出時の比較(豚)

農業名	粉砕抽出		攪拌抽出	
	回収率 平均値(%)	回収率の 差	回収率 平均値(%)	回収率の 差
α-BHC	90.6	14.3	77.0	6.4
β-BHC	74.8	7.9	105.5	2.6
γ-BHC	92.4	6.3	72.6	0.6
δ-BHC	92.4	6.3	75.8	0.4
o,p'-DDT	90.2	7.2	81.5	8.1
p,p'-DDD	117.3	10.5	100.9	11.8
p,p'-DDE	93.2	8.9	77.0	9.3
p,p'-DDT	91.5	8.3	81.5	11.6
アルドリン	91.3	12.6	76.5	6.7
エンドリン	96.0	11.6	70.1	3.2
ディルドリン	91.1	12.1	63.9	0.7
ヘブタクロル	91.1	6.2	82.4	6.1
ヘブタクロルexo	97.0	11.5	75.8	3.8
ヘブタクロルendo	98.2	11.5	79.1	6.2
平均値	93.4	9.7	80.0	5.5

: 回収率の目標値を満たさなかった項目
 : 2回の差が10以上の項目

表3 多孔性ケイ藻土カラム導入結果(豚)

農業名	液-液分配		ケイ藻土(吸引なし)		ケイ藻土(吸引あり)	
	回収率 平均値(%)	回収率の 差	回収率 平均値(%)	回収率の 差	回収率 平均値(%)	回収率の 差
α-BHC	90.6	14.3	83.6	13.0	88.3	2.0
β-BHC	74.8	7.9	112.9	8.5	87.0	4.2
γ-BHC	92.4	6.3	105.8	9.2	75.4	1.9
δ-BHC	92.4	6.3	102.8	15.4	74.1	0.6
o,p'-DDT	90.2	7.2	80.0	8.0	71.4	0.8
p,p'-DDD	117.3	10.5	100.7	11.0	90.4	1.2
p,p'-DDE	93.2	8.9	74.9	8.1	70.6	0.5
p,p'-DDT	91.5	8.3	78.5	8.6	70.7	0.5
アルドリン	91.3	12.6	75.6	8.1	72.8	0.6
エンドリン	91.1	12.1	121.8	15.3	96.9	2.2
ディルドリン	96.0	11.6	82.9	7.4	84.9	6.6
ヘブタクロル	91.1	6.2	76.1	6.6	74.5	1.2
ヘブタクロルexo	97.0	11.5	90.3	7.4	77.7	1.5
ヘブタクロルendo	98.2	11.5	88.1	7.2	75.7	1.4
平均値	93.4	9.7	91.0	9.6	79.3	1.8

: 回収率の目標値を満たさなかった項目
 : 2回の差が10以上の項目

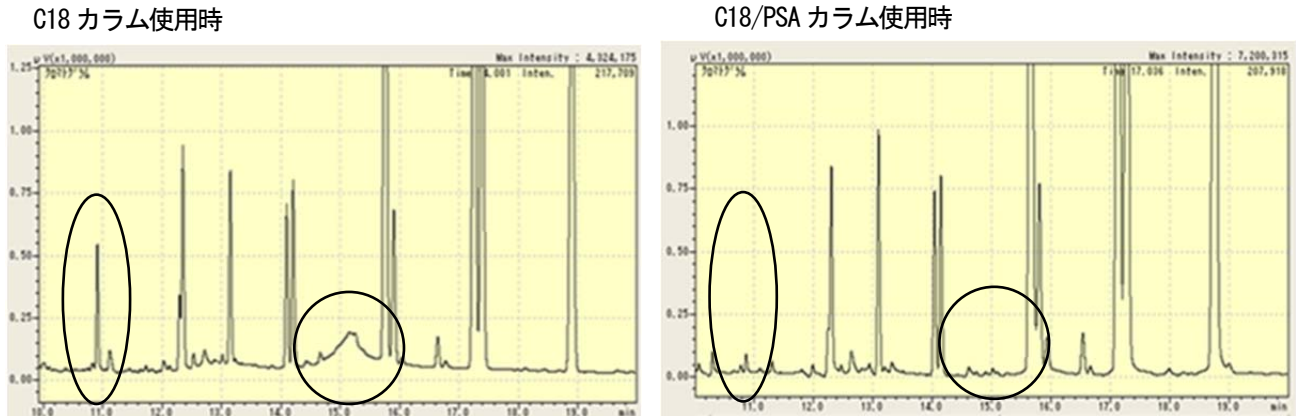


図3 M-STD クロマトグラム (豚)

3.4 精製工程の追加

MTBL 及びM-STD のクロマトグラム上で、脂肪や脂肪酸を含む夾雑物の影響と思われるベースラインの盛り上がりやピークが確認され、さらなる精製が必要と考えられた。そこで、脂肪酸除去を目的として、固相抽出カラムをC18 からC18/PSAに変更し検討した。その結果、MTBL、M-STD のクロマトグラムにおいて、夾雑ピークの減少及びベースラインの安定化がみられ、精製効果が向上したことが確認された (図3)。

3.5 試験法(C)の検討

3-3、3-4の結果を取り入れた試験法(C)を検討したところ、試験法(B)に比べ、牛の総DDTにおける回収率の差が大きくなった他は、鶏、牛について全項目で良好な回収率、回収率の差を得ることができた (表1)。また、現行法では、前処理に2~3日要し煩雑であるのに対し、試験法(C)では1日で処理が可能となり、大幅な迅速簡易化を図ることができた。さらに使用溶媒量は338mLから133.5mLと大幅に削減することができた。

4 まとめ

今回の検討の結果、*n*-ヘキサンによる攪拌抽出、多孔性ケイ藻土カラム及びC18/PSAカラムを使用することにより、良好にかつ迅速簡易的に畜産物の脂身から塩素系農薬を抽出できることがわかった。今後は、さらに精製方法を検討し、検査法を確立し、妥当性評価を行うこととする。

参考文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知、食安発第0124001号、平成17年1月24日
- 2) 上野英二、日本農薬学会誌、35、74-78(2010)