

2)超臨界流体抽出及びGC/MS法による農産物中の残留農薬迅速分析法の検討(第4報)

- リンゴ試料を用いた分析法バリデーション -

村川 弘 吉田 達雄 吉元 秀和 飛野 敏明

要 旨

当所において農作物中残留農薬一斉試験法として使用している超臨界流体抽出及びGC/MS法について、「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」に基づきリンゴ試料を用いた分析法バリデーションを実施した結果、添加回収濃度0.01ppmで214農薬成分がガイドラインの目標値に適合した。

キーワード：残留農薬，一斉分析法，SFE，GC/MS，バリデーション

はじめに

農作物中の残留農薬一斉分析法として、当所では平成13年度に超臨界流体抽出法(SFE法)とGC/MS法を組み合わせた試験法(以下、SFE-GC/MS法と略す。)を作成し、その後SFE法における抽出条件の検討を重ねてきた。(表1、SFE法¹⁾)

平成18年度からポジティブリスト制対応のためLC/MS/MSが導入されたことから、高極性農薬はLC/MS/MS法の分析対象に移行し、SFE-GC/MS法については、中～低極性農薬の高回収率が得られるSFE条件を設定した。(表1、SFE法)

残留農薬の試験に当たっては、試験毎、作物毎に毎回添加回収試験で確認を行い、回収率70～120%の項目のみを検査結果としてきた。しかし、試験法の妥当性評価の点から見ると、n=5程度の添加回収試験及び分析毎のn=1の添加回収試験の結果で判断しているに過ぎず、十分とは言えなかった。

平成17年1月に、厚生労働省からポジティブリスト制移行に向け通知分析法が示されたことから、SFE-GC/MS法及び通知法GC/MS一斉分析法についてミニトマト試料を用い、添加回収試験による精度の検証・比較と農薬含有実試料による比較検討を実施した³⁾。

これらの試験法バリデーションの結果は良好であったが、この時点ではポジティブリスト制に対応した残留農薬検査法のバリデーションガイドラインは呈示されていなかった。唯一示されていたガイドラインは「緊急時における畜水産食品中の新たな残留物質に関する検査法迅速作成ガイドライン」だけであり、当時の試

験法バリデーションもこのガイドラインに基づき検証を行った。

平成19年11月に厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知により「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」(以下、ガイドラインと略す。)が示された。今回、このガイドラインに基づき、現在当所で農作物の残留農薬一斉分析法として使用しているSFE-GC/MS法について、リンゴ試料を用いた試験法のバリデーションを実施したので報告する。

実験方法

1 バリデーション試験操作方法

1.1 試料の調整

表2に示す271種の農薬成分が不検出であることを確認したリンゴ(秋田県健康環境センターより受領)を試料とした。試料はフードカッターで細切し、ホモジナイザーで均質化したものを用いた。

1.2 バリデーションの対象となる試験法

SFE-GC/MS法(以下、本試験法と略す。検査フローを図1に示す。)

1.3 添加回収試験濃度

添加回収濃度は、試料中に各農薬成分が0.01ppm(低濃度)及び0.05ppm(高濃度)になるように農薬混合標準溶液(表2に示す271種の農薬成分を含有する。)を添加した。ただしメタミドホス、アセフェート及びアセタミプリドの添加回収濃度は低濃度0.05ppm、高濃度0.25ppmで行った。

1.4 検量線

本試験法では、最終試料濃度は原試料の2倍濃縮になるので、検量線は低濃度0.01ppm, 0.02ppm, 0.05ppm及び高濃度0.05ppm, 0.1ppm, 0.3ppmの各3点で作成した。標準液の希釈には試料抽出液を使用し、マトリックス一致標準液とした。

1.5 枝分かれ実験方法

併行精度及び室内精度を同時に評価するため、分析者3名がそれぞれ同一の添加試料を1日2回、2日間分析する枝分かれ実験を実施した。

2 装置及び測定条件

2.1 SFE

超臨界流体抽出装置：ISCO社 SFX1220
CO₂圧力：2000psi
抽出カートリッジ温度：40
リストラクター温度：60
スタティック抽出：15分
ダイナミック抽出：15分
捕集溶剤：アセトン

2.2 GC/MS

HP5890/5972MSD(HEWLETT PACKARD社製)
カラム：HP-5MS, 0.25mm × 30m, 膜厚0.25µm
昇温条件：80 (2分)-30 /分-180 (10分)-2 /分-200 -3 /分-280 (10分)
注入時圧：30psi (1.5分)
注入口温度：250
モード：コンスタントフロー
流量：1m /min
MSインターフェース温度：280
MS測定モード：SIM
注入量：3µ

結果及び考察

バリデーションの結果を表2に示す。また、ガイドラインに示されている各添加回収濃度毎の真度(回収率)及び精度の目標値を表3に示す。なお、今回バリデーションを行った271の農薬成分は全て通知試験法の「GC/MSによる農薬等の一斉試験法(農作物及び畜水産物)」に記載されているものである。

添加回収濃度0.01ppm(低濃度)では、ガイドラインの目標値に適合した農薬成分数は214、添加回収濃度0.05ppm(高濃度)では227であった。また、低高両濃度で目標値に適合した農薬成分数は181であった。ただし、メタミドホス、アセフェート及びアセタミプリドは市販の定濃度混合標準液を使用したため、添加回収濃度は低濃度で0.05ppm、高濃度で0.25ppmとなった。

目標値に適合しなかった農薬成分数は、低濃度において57、高濃度で44であった。

このうち真度(回収率)の不適合数が低濃度で55、高濃度で40であり、大部分の不適合農薬成分は回収率において目標値に適合していなかった。これらの真度不適合農薬成分の一部は個々の農薬成分に適した抽出条件を設定することで回収率の改善が可能である²⁾。

精度に関しては、低濃度では併行精度及び室内精度ともに不適合が4(うち真度不適合3)、室内精度不適合が6(うち真度不適合5)であった。また、高濃度では併行精度及び室内精度ともに不適合が1、併行精度不適合が1(真度不適合)、室内精度不適合が18(うち真度不適合15)であり、併行精度不適合の農薬成分は少数であった。

室内精度不適合の農薬成分では日間の数値のばらつきが大きいものが多く、原因は分析者間の試験操作の誤差によるものでなく、試料のGC/MSへの連続注入によるガスクロマトグラフ注入口、カラム等への試料マトリックスの吸着等による何らかの影響によるものと推測された。

まとめ

当所における残留農薬のルーチン試験では、本試験法でスクリーニングを行い、基準値超過が予想される農薬成分について通知法で再検査・確認を実施している。

今回、本試験法のリンゴ試料によるバリデーションを実施した結果、食品衛生法に定める残留農薬の一律基準に対応する試料添加濃度0.01ppmにおいて、214農薬成分がガイドラインの目標値に適合し、残留農薬一斉分析におけるスクリーニング法としての信頼性が確認された。今後さらに本試験法の野菜、穀類等の試料によるバリデーションを実施する予定である。

参考文献

- 1) 飛野敏明：日本農薬学会誌，**32**(3)，322(2007)。
- 2) 西名武士，村川 弘，福島孝兵，飛野敏明：熊本県保健環境科学研究所報，**33**，31(2003)。
- 3) 村川 弘，福島孝兵，西名武士，荒木誠士，飛野敏明：熊本県保健環境科学研究所報，**35**，45(2005)。