

農薬調査研究報告

第14号

令和4年

Research Report of Agricultural Chemicals

Vol. 14
2022



独立行政法人 農林水産消費安全技術センター
Food and Agricultural Materials Inspection Center
(Incorporated Administrative Agency)

Kodaira, Japan

はじめに

独立行政法人農林水産消費安全技術センター（FAMIC）は、農林水産省所管の独立行政法人であり、国の行政事務と密接に関連した事務・事業を執行する行政執行法人として、農薬取締法、肥料法、飼料安全法、JAS 法、輸出促進法等の法律に基づき、農業生産資材（農薬、肥料、飼料等）や食品を対象として科学的な検査・分析を行い、農業生産資材の安全性の確保、食品等の品質・表示の適正化等に技術で貢献することを使命に掲げ、業務を行っています。

農薬は、農薬取締法に基づく登録制度により農林水産大臣の登録を受けなければ製造、加工、輸入等を行うことができない仕組みとなっており、FAMIC 農薬検査部は農薬登録制度の根幹である農薬の審査業務を担っています。また、市場に流通する農薬の品質の確保のため、農林水産大臣の指示に基づき農薬製造場に対し立入検査を行っています。その他農林水産省と連携して、全国の農業生産現場における農薬の使用状況及び生産者から収集した農産物中の農薬の残留状況についての分析調査を行っています。

2018（平成30）年の農薬取締法改正により導入された登録農薬の再評価制度は、既に登録されている全ての農薬について、最新の科学的知見に基づく安全性等の評価が行われることとされており、農薬に関する新たな技術的知見の探求が更に高まっています。

今般、2021（令和3）年度の農薬検査部における調査研究成果を収録した農薬調査研究報告第14号を発行しました。農薬検査部の調査研究は、登録審査業務の遂行に必要な新たな知見や技術力の獲得、並びに残留農薬の調査に必要な分析技術の向上を目的としています。また、農林水産省との連携により、農薬登録制度の国際調和を進める上で必要な技術情報等を収集し、分析した結果を提供する役割も担っています。こうした観点から、調査研究の対象については、実験を伴うもののみならず、文献等により収集した情報の分析・考察も含めたものとしており、これらの成果は関係学会等での発表を通じて公表しています。

また、上述した再評価は、2025（令和7）年までに延べ76有効成分の再評価を行うことが決められており、業務を一層効率的に行っていかなければならないことから、調査研究についても取組を工夫していく必要があります。

農薬検査部では、今後も調査研究を積極的に取り組んでいくこととしていますので、この調査研究の充実のため、引き続き皆様からのご指導、ご鞭撻を賜りますようお願い申し上げます。

本報告書が関係者の皆様の業務の参考となれば幸いです。

2023（令和5）年2月

独立行政法人 農林水産消費安全技術センター
理事長 木内 岳志

目 次

ミツバチの田面水を介した農薬暴露実態の解明 －実態調査および採水場所の嗜好性調査－ 高野優美、市原直登、加藤貴央、横田典明、石原 悟……………	1
令和3年度学会等での発表実績一覧 ……………	1 3
【技術レポート】	
残留農薬分析業務における分析法の検討 (希釈の効果を用いた LC-MS/MS による茶中の残留農薬一斉試験法) 山本謙吾、友成真菜、金丸 正 ……………	1 4
残留農薬分析業務における分析法の検討 (LC-MS/MS を用いたなす中の残留農薬一斉試験法) 山本謙吾、友成真菜、金丸 正……………	3 1
【他誌掲載論文要旨】	
Relationship between the Vertical Distribution of Pesticides, Including Neonicotinoids, in Soils and Their Uptake by <i>Brassica rapa</i> L. var. <i>peruviridis</i> (ACS Agricultural Science & Technology 1, 362 ~ 371 (2021)) Yutaka Motoki, Takahiro Kato, Yoshihiro Akiyama, Nobuyasu Seike, and Takashi Iwafune ……………	3 8
【資料編】	
CIPAC の概要と活動 渡辺高志 ……………	4 9

ミツバチの田面水を介した農薬暴露実態の解明

－実態調査および採水場所の嗜好性調査－

高野優美*, 市原直登**, 加藤貴央*, 横田典明***, 石原 悟****

*独)農林水産消費安全技術センター 農薬検査部

**環境省 水・大気環境局

***独)農林水産消費安全技術センター 福岡センター

****農林水産省 消費・安全局

ミツバチの田面水を介した農薬暴露実態を解明するため、巣箱周辺で水稻を栽培している地域における野外実態調査および水田枠を用いた閉鎖空間における採水場所の嗜好性調査を行った。野外実態調査ではミツバチ試料（ミツバチ成虫および幼虫）を採取し、農薬成分の分析を行った。調査した4地点のうち、2019年度の調査では3地点、2021年度の調査では1地点のミツバチ試料から調査対象とした農薬成分が定量下限値以上で検出された。検出頻度は、2019年度の調査で4.7%（分析した試料計600頭のうち28頭から検出）、2021年度の調査で0.75%（分析した試料計400頭のうち3頭から検出）であった。閉鎖空間における採水場所の嗜好性調査では、ミツバチの採水場所に関する嗜好性は畦を模した盛り土で最も高く、次いで足場の安定する茎などで高い傾向が見られた。また、2019年度の調査で採水場所として好んでいた「巣箱上部に設置する給水器」から採水する個体は認められなかった。2021年度の調査では、水田枠を採水場所として認識して一定期間飼育した後に給水器を設置したため、給水器を採水場所として選択しなかった可能性が示唆された。

Keywords : ミツバチ, 蜜蜂, ポリネーター, リスク評価, 田面水, 野外調査, 採水, 嗜好性

緒 言

ミツバチが農薬に暴露する経路は、虫体に直接付着する接触暴露と農薬を含んだ食物などを摂取する経口暴露の2つの経路があり、農薬のミツバチに対するリスク評価では両方の暴露経路を考慮した評価が行われている¹⁾。ミツバチにとって花粉はタンパク源、花蜜はエネルギー源であり蜂群の維持に必須である。そのため、経口暴露の主な暴露源は花粉・花蜜とされている。ミツバチの摂餌量と花粉・花蜜の残留農薬濃度から科学的根拠に基づく経口暴露量の推定が可能であり、リスク評価が行われている。

水も花粉・花蜜と同様に蜂群の維持に必要であり²⁾、蜂蜜を幼虫に給餌するための希釈、ローヤルゼリーの生産、気化熱による巣箱内の温度調節など多様な目的で使用されている。外勤蜂の主な仕事は餌となる花粉や花蜜の採取であるが、一部の外勤蜂が、水集めを専門の仕事としていることが知られている³⁾。ミツバチの水利用に関しては一定の知見があるが、水を介した農薬暴露実態を定量的に示した知見は少ない。

評価の先行している欧米においても水を介した農薬のミツバチに対するリスク評価手法は完全には確立していない⁴⁾。しかしながら、日本の農地のおよそ半分は水田であり、農薬を施用した水田の水をミツバチが利用する可能性が高いため、田面水を介したミツバチに対する農薬の暴露実態を把握・解明することは、日本におけるミツバチに対する農薬のリスク評価を考える上で重要である。また、暴露実態を反映した田面水経由の農薬暴露について、リスク評価導入の可否を今後検討する必要がある。

2019年度の報告⁵⁾では、実際の養蜂現場周辺の水田における採水活動の調査のほか、閉鎖空間における蜂群の飼育方法の検討結果を報告した。2020年度の報告⁶⁾では、2019年度の調査で確立した閉鎖空間における蜂群の飼育方法を用いて、農薬成分および蛍光物質をトレーサーとした蜂群内における水を介した物質の動態調査の結果を報告した。

本報では、2019年度および2021年度に実施した養蜂現場におけるミツバチ成虫および幼虫の田面水経由の農薬暴露実態調査および水田枠を用いた閉鎖空間におけるミツバチの採水場所の嗜好性を調査した結果を報告する。

材料および方法

1 野外実態調査

飼養されているミツバチの田面水経由での農薬暴露実態を調べるため、2019年度および2021年度に埼玉県養蜂協会の協力を得て、埼玉県内の養蜂が行われている4地点で、水田に除草剤が施用される時期（水稻の移植直後の5月下旬～7月上旬）に水田付近に設置された巣箱からセイヨウミツバチ（*Apis mellifera* L.）成虫および幼虫を採取し、虫体中の農薬成分について分析を行った。

2021年度の調査では、ミツバチ成虫および幼虫に加えてミツバチの採水活動が認められた水田および周辺の用水路から採取した水の分析も行った。

また、2019年度の報告と同様に、2021年度に各調査地点において巣箱から半径2 kmの範囲内にある水田でミツバチの採水活動を調査した。

1.1 試料採取地点および採取日等

試料採取地点、採取日、採取日の最高/最低気温および水稻移植開始時期を表1に示す。

1.2 水田における採水活動の観察

採水活動の観察は試料採取と同日に行った。

それぞれの調査地点の半径2 km圏内における水田が占める割合は、AおよびB地点で約50%、C地点で約5%、D地点で約60%だった。A、BおよびD地点の巣箱設置場所周辺は水田に囲まれて

おり、C地点では巣箱の北西側約50 mおよび南側約30 mに水田が位置していた。調査はいずれもミツバチの活動が活発な午前9時から午後4時に水田の周囲を歩いて実施した。田面水の利用調査が目的であるため、調査は水田が湛水状態である水稻移植直後の5月から6月に実施した。

1.3 調査対象農薬成分

2019年度の調査では、埼玉県農業技術研究センターから得られた調査地点の周辺水田における使用予定除草剤の情報を参考に選定した。

2021年度の調査では、2019年度の調査対象成分、2019年度および2020年度に閉鎖空間内の試験に用いた成分に加え、巣箱周辺の水田の農家へ使用した除草剤について聞き取りを行い、巣箱周辺で使用されたと考えられる農薬成分を調査対象成分とした。

また、2021年度の調査では、ミツバチの採水活動が確認された巣箱周辺の水田については田面水を採取し、検出された成分を調査対象成分とした。プロモブチドおよびベンゾピシクロンは分解物も調査対象とした。

2019年度の調査対象成分を表2-1に、2021年度の調査対象成分を表2-2に示す。

表1. 試料採取日、採取日の天候および水稻移植時期

	調査地点	試料採取日	天候*	気温 (°C) * (最高/最低)	水稻移植時期
2019年度調査	A地点	2019年5月24日	晴	31.8/23.3	2019年5月18日頃
	B地点	2019年5月27日	晴	36.2/18.3	2019年5月18日頃
	C地点	2019年6月11日	曇後一時晴	24.3/15.3	2019年5月28日頃
	D地点	2019年7月8日	曇	24.9/18.7	2019年6月28日頃
2021年度調査	A地点	2021年5月17日	曇時々雨	22.8/18.5	2021年5月10日頃
	B地点	2021年5月24日	曇一時晴後雨	27.0/15.6	2021年5月18日頃
	C地点	2021年6月23日	曇後雨時々晴	28.1/18.9	2021年6月12日頃
	D地点	2021年7月6日	曇時々雨	29.1/22.1	2021年6月28日頃

* アメダスデータ（観測地点：埼玉県熊谷市）

1.4 成虫および幼虫の採取

試料の採取はミツバチが活動している日中に行った。成虫は採水蜂が活動している可能性が高い外側の巣板をビニール袋内で振り、払い落として採取し、保冷剤をいれたクーラーバッグ中で低温に維持して実験室に持ち帰り、冷凍庫（-80℃）で保管した。幼虫は蜂児域の巣板を実験室に持ち帰り、冷凍庫（-80℃）で保管した。後日、巣房から終齢幼虫と考えられる個体を採取した。なお、2021年度のA地点においては、幼虫試料が採取できなかったことから、幼虫の代わりに蛹を試料とした。

1.5 田面水の採取

ミツバチが採水していた場所から10 mL容ガラ

スパイラル瓶を用いて田面水を採取し、冷蔵庫（3℃）で保管した。

1.6 内勤蜂/外勤蜂の識別と農薬成分分析

2019年度の調査では、各地点で採取した試料からそれぞれ成虫100頭および幼虫50頭を無作為に選択し、表2-1に示した農薬成分のスクリーニング分析（定量下限値以上での検出を確認）を行った。2021年度の調査では、2019年度と同様に採取した成虫および幼虫50頭ならびに各地点で採取した田面水を用いて、表2-2に示した農薬成分について定量分析を行った。

虫体の分析はミツバチ一頭を分析試料とし、QuEChERS法による前処理を行い、試験溶液を調製した。成虫に関しては、2016年度に報告した手

表2-1. 調査対象成分（2019年度調査）

成分名	調査対象成分			
	A地点	B地点	C地点	D地点
イマゾ スルフロ	○	○	○	
オキサジ クロメ			○	
シハロップ フ			○	
ジメタメリン ^{b)}			○	
シメリン ^{a) b)}			○	
ダ イム			○	
テフリトリオン			○	
ビラクロニル ^{b)}	○	○	○	
ビラゾ スルフロニ			○	
ピリプロチン ^{a)}			○	
プロチナクトール ^{b)}			○	○
プロチナクトール ^{a) b)}	○	○	○	
プロチナクトール 脱臭素体				
ペンタヒドロシクロ			○	○
ペンタヒドロシクロ加水分解体				
ペンタヒドロシクロナトリウム塩			○	
モリネート			○	

○ 使用予定の除草剤に含まれる有効成分

a) 2019年度の閉鎖空間における調査で用いた成分

b) 2020年度の閉鎖空間における調査で用いた成分

表2-2. 調査対象成分（2021年度調査）

成分名	調査対象成分			
	A地点	B地点	C地点	D地点
イマゾ スルフロ		✓	✓	
オキサジ クロメ		✓		
シハロップ フ				
ジメタメリン ^{b)}		✓	✓	
シメリン ^{a) b)}				
ダ イム	◎	✓	✓	
テフリトリオン				
トリシラゾール ^{a) b)}		✓	✓	
ビラクロニル ^{b)}		✓	✓	✓
ビラゾ スルフロニ			✓	
ピリプロチン ^{a)}			✓	
プロチナクトール ^{a) b)}			✓	
プロチナクトール ^{b)}		✓		◎ ✓
プロチナクトール ^{a) b)}		✓		✓
プロチナクトール 脱臭素体				
ペンタヒドロシクロ			✓	◎ ✓
ペンタヒドロシクロ加水分解体				
ペンタヒドロシクロナトリウム塩				
モリネート				

◎ 農家への聞き取りで使用したことがわかっている成分

✓ 採取した水から検出された成分

a) 2019年度の閉鎖空間における調査で用いた成分

b) 2020年度の閉鎖空間における調査で用いた成分

法⁸⁾を用い、精製塩の色度座標を指標とした内勤蜂と外勤蜂の識別を行った。

田面水は、15,000 rpm で5分間遠心分離し、上清をアセトニトリルで10倍に希釈した後、再度15,000 rpm で5分間遠心分離し上清を試験溶液とした。

農薬成分の分析はLC-MS/MSを用い、表2-1および2-2に示す成分について一斉分析を行った。

2 水田枠を用いた閉鎖空間における採水場所の嗜好性調査

ミツバチの採水場所の嗜好性について要因を明らかにすることは、ミツバチが採水目的で水田へ飛来することを防ぐリスク管理措置の提案にも寄与するものと考えられる。

これまでの野外調査では、ミツバチは水田の湿った土壌が露出している部分から採水している様子が観察されている⁹⁾。一方、閉鎖空間における調査では、地面に設置した給水器ではなく巣箱上部に設置した給水器から採水する行動が確認されており、飼育環境により採水場所の嗜好性が異なることが示唆されている⁹⁾。

今回は、農薬検査部敷地内にある水田枠を用いて、水田が巣箱のすぐそばにある環境で採水場所の嗜好性を調査した。

調査は、2019年度の調査で確立した蜂群を閉鎖空間内（簡易ハウス内）で維持する手法⁶⁾に準じて行った。

2.1 供試生物

2021年6月29日に秋田屋本店（岐阜県）からセイヨウミツバチ（*Apis mellifera* L.）（巣板5枚群）を2群購入した。購入後、閉鎖空間（簡易ハウス内）に導入するまでの間、野外環境で飼育（順化）した。巣箱を簡易ハウス内に導入した日を順化開始日とし、7日間順化させた後、調査を開始した。

2.2 飼育環境および観察期間

田面水採取場所における条件の異なる以下の2つの試験区（試験区①および②）を設けた。各試験区は、水稻を移植した水田枠を簡易ハウスで覆

い、閉鎖空間とした（図1a）。簡易ハウスの側面は網（網目1mm）とし、通気性を確保した。

2021年8月30日から9月7日にかけて、畦への嗜好性調査を行い、9月8日から9月17日にかけて、それぞれの簡易ハウス内の天井から給水器を吊し、水田と給水器のどちらを採水場所として好むか調査した。

なお、播種から調査期間をとおして、水稻には農薬を使用せず栽培した。

2.2.1 試験区①（畦を模した湿った土壌経由）

畦を模して水田枠の端に土を盛った試験区（試験区①）（図1b）。

2.2.2 試験区②（田面水経由）

水田枠の端の株を刈り取り、水面を露出させた試験区（試験区②）（図1c）。

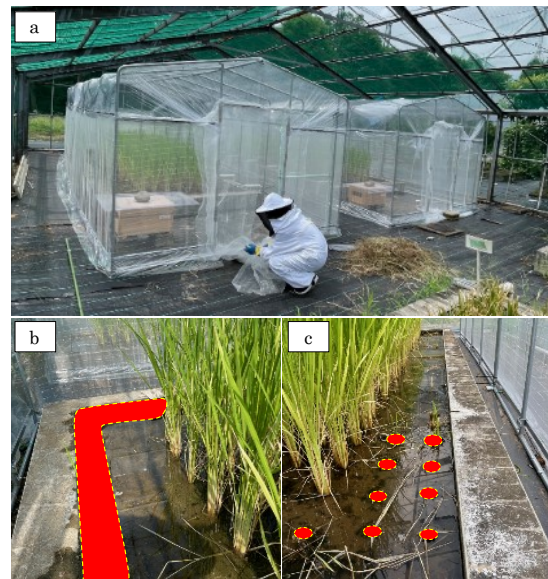


図1. 飼育環境および試験区の設定

- a. 全景（左が試験区①、右が試験区②）
- b. 試験区①（盛り土部分を赤色で図示）
- c. 試験区②（切り株の一部を赤色で図示）

2.3 観察項目

2.3.1 死虫数および蜂群強度

巣箱を簡易ハウス内に導入後、巣箱外で確認された死虫数を計測した。また、順化開始前および試験開始時に巣箱内部を確認（内検）し、巣板両

面を写真撮影（図2）して成虫総数（蜂群強度）を推定した。巣板片側全面をミツバチ成虫が覆っている状態を1,000頭と仮定して推定した。

死亡成虫数および生存成虫総数から、日ごとの死虫率を算出した。蜂群が安定している状態の目安は、死虫率が10%を超えないこととした。



図2. 成虫数推定に用いた写真の一例

2.3.2 気象条件

試験期間中の気象条件を、アメダスデータ（観測地点：東京都府中市）を元に記録した。

2.3.3 採水活動の調査

採水活動は、1日に1回、午前9時から水田枠

を3分程度で1周し観察を行った。採水を行っていた場合、採水場所を記録した。

2.3.4 採水場所の温度

スマートフォン用サーモカメラ（フリーアシステムズ社製、製品名：FLIR ONE PRO）を用いて、採水場所の温度を測定した。

結果および考察

1 野外実態調査

1.1 水田における採水活動の観察

試料採取地点周辺において観察されたミツバチの採水活動の様子を一例を図3に示す。2019年度に実施したD地点の調査結果について、本報告において併せて考察する。

2019年度の調査結果と同様に、2019年度のD地点および2021年度のいずれの地点においても、ミツバチの採水活動は巣箱近傍の水田でのみ観察された。また、2019年度の調査結果と同様に、湛水状態の田面水から直接採水している個体は観察されなかった。

1.2 田面水中の調査対象成分の濃度

2021年度にミツバチの採水活動が認められた場



図3. 各試料採取地点で観察されたミツバチの採水活動の様子

所から採取した水に含まれる調査対象成分の分析結果を表3に示す。

A地点の田面水から、ジメタメトリン 1.6 ppb、トリシクラゾール 13 ppb、プレチラクロール 2.7 ppb が検出された。B地点の用水路から採取した水から、イマゾスルフロン 5.5 ppb、トリシクラゾール 24 ppb、ピリプチカルブ 0.86 ppb、ブタクロール 3.4 ppb、ベンゾピシクロン 1.5 ppb が検出された。B地点の田面水から、トリシクラゾール 22 ppb が検出された。C地点およびD地点の田面水からは、定量下限値以上で検出された成分はなかった。A地点およびD地点では、農家への聞き取り調査により使用されていることが明らかとなった成分以外の成分も検出されたが、検出濃度は低く、用水路の水に由来するものと考えられた。

1.3 内勤蜂/外勤蜂の識別とミツバチ成虫および幼虫から検出された成分

内勤蜂/外勤蜂の識別結果および虫体中の調査対象成分の分析結果を別表1および別表2に示す。

2019年の調査では、調査対象成分は、A、BおよびC地点の24頭の成虫から、B地点の4頭の幼虫から定量下限値以上で検出された。

2021年度の調査では、調査対象成分は、D地点の成虫2頭から定量下限値以上で検出された（ダイムロン；0.72 ng/bee、ベンタゾンナトリウム塩；0.43 ng/bee）。また、D地点の幼虫1頭からトリシクラゾールが 1.1 ng/bee 検出された。

その他の試料からは、定量下限値以上で検出された成分は認められなかった。

1.4 考察

1.4.1 調査対象成分の水中濃度とミツバチから検出された量

2021年度の調査で、水から最も高濃度で検出された成分は、トリシクラゾールであり、B地点の用水路から 24 ppb で検出された（表3）。2019年度に閉鎖空間で行った調査では、採水蜂は1回の採水行動で平均 47 mg の水を持ち帰っていると推定された⁶⁾。推定採水量から、採水蜂から検出さ

表3. 採取した水に含まれる調査対象成分の分析結果

成分名	定量 下限値 (ppb)	分析値 (ppb)				
		A地点	B地点		C地点	D地点
		田面水	用水路*	田面水	田面水	田面水
イマゾスルフロン	4.0	-	5.5	-	+	-
オキサジクロメホン	0.8	-	-	+	-	-
シハロップフェチル	4.0	-	-	-	-	-
ジメタメトリン	0.8	1.6	+	-	-	-
シメトリン	4.0	-	-	-	-	-
ダイムロン	0.8	+	+	-	-	-
テフリルトリオン	2.0	-	-	-	-	-
トリシクラゾール	2.0	13	24	22	-	-
ピラクロニル	4.0	+	-	-	+	-
ピラゾスルフロンエチル	2.0	-	+	-	-	-
ピリプチカルブ	0.8	-	0.86	-	-	-
ブタクロール	2.0	-	3.4	+	-	-
プレチラクロール	0.8	2.7	-	-	-	+
プロモフチ	0.8	+	-	-	-	+
プロモフチ脱臭素体	0.8	-	-	-	-	-
ベンゾピシクロン	0.8	-	1.5	-	-	+
ベンゾピシクロン加水分解体	2.0	-	-	-	-	-
ベンタゾンナトリウム塩	0.8	-	-	-	-	-
モリネト	4.0	-	-	-	-	-

+ 定量下限値未満でピークが確認された成分 - 未検出

* 水田に隣接する用水路でもミツバチが採水を行っていたことから、用水路の水も採取し分析した。

れると考えられる農薬量を推算すると 1.1 ng/bee となる。一方で、本調査で分析した B 地点のミツバチ試料からトリシクラズールは定量下限値である 1.0 ng/bee を上回る量で検出されなかった。

A 地点では、田面水から複数成分が定量下限値以上検出されたが、虫体から定量下限値以上で検出されることはなかった。また、C 地点では、田面水および虫体から定量下限値以上で検出された調査対象成分はなかった。

野外調査全体では、調査した成分が虫体から定量下限値以上で検出されたのは、D 地点の試料からのみであった。

検出頻度は、2019 年度および 2021 年度でそれぞれ 4.7% および 0.75% であり、巣箱近傍で水稻作が行われている地域での調査であったが、田面水由来の農薬成分がミツバチ虫体から検出される頻度は高くなかった。

1.4.2 2 年間の調査のまとめ

2019 年度および 2021 年度の 2 回にわたり、野外における田面水を経由したミツバチの農薬暴露実態を調査した。巣箱周辺の水田ではミツバチが採水している様子がいずれの年の調査でも観察され、近くに水田があれば、水田を採水場所として利用していることが確認された。一方で、水田周

辺の巣箱からミツバチを採取し虫体中に含まれる農薬成分を分析した結果、田面水に由来する農薬成分が検出される頻度は高くなかった。また、検出された成分量は、田面水中濃度とミツバチの採水量から推定したミツバチ 1 頭あたりの農薬量よりも少なかった。この原因として、ミツバチが水田以外から採水している可能性や、巣箱内に水を持ち入れる前に排泄している可能性⁷⁾が推測された。

2 水田枠を用いた閉鎖空間における採水場所の嗜好性調査

2.1 採水場所の違いによる嗜好性調査

2.1.1 試験期間中の蜂群の状態

試験期間中の死虫率を図 4 に示す。

9 月 10 日までの死虫率は 10% を下回っており、蜂群状態は安定していた。一方で、9 月 10 日以降は試験区①での死虫率が 10% を超える日が続いた。また、試験区②においても 9 月 14 日に死虫率が 10% を超えた。

2.1.2 嗜好性調査結果

水田枠におけるミツバチの採水の様子を図 5 に示す。

試験開始直後は試験区①では畦を模した盛り土

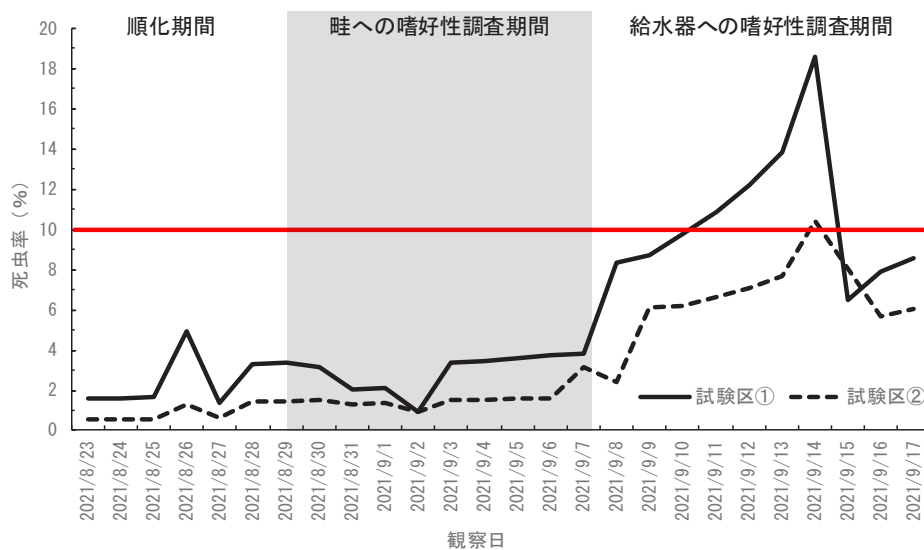


図4. 試験期間中の死虫率



図5. 採水の様子（8月30日撮影）

から採水しており、試験区②では刈り取った水稻の茎にしがみつきの採水している様子が観察された。いずれも水面から直接採水する様子は観察されず、土壌から浸出した水や、毛細管現象で茎の溝に吸い上げられた水を採水している様子が観察された。

表4に試験区①および②における採水活動の観察結果および気象条件を示す。

試験期間中、曇や雨、最高気温が30℃に達しない日が多く、観察を行った時間に採水活動が確認できたのは8月30日、9月8、13、14および15日であった。

採水活動の観察の結果、試験区①のミツバチは畦を模した盛り土からのみ採水しており、水面から直接採水している個体や、茎にしがみつきの採水している個体などは確認されなかった。一方、畦を模した盛り土を設けなかった試験区②では、水面上に露出した水稻の切り株から浸出した水や水稻の茎から採水する個体および、コンクリート枠の壁面にしがみつきの濡れた部分から採水する様子が観察された。

給水器への嗜好性調査期間では、試験区①では

表4. 採水場所の嗜好性調査結果

調査日	採水回数				気象条件*			備考
	試験区①		試験区②		気温(℃)		天候	
	畦から	その他	茎等から	その他	最高	最低		
2021/8/30	15	0	6	0	34.1	24.4	晴	
2021/8/31	0	0	0	0	31.3	20.7	曇	
2021/9/1	0	0	0	0	22.1	17.6	曇/雨	
2021/9/2	0	0	0	0	19.9	17.8	雨	
2021/9/3	0	0	0	0	20.6	18.3	雨/曇	
2021/9/4	0	0	0	0	21.6	18.5	雨/曇	
2021/9/5	0	0	0	0	24.4	18.1	雨/曇	
2021/9/6	0	0	0	0	20.5	17.8	曇/雨	
2021/9/7	0	0	0	0	23.8	14.9	曇	
2021/9/8	2	0	3	0	24.1	15.8	曇/雨	給水器を設置
2021/9/9	0	0	0	0	22.6	17.7	雨/曇	
2021/9/10	0	0	0	0	29.8	19.5	晴	
2021/9/11	0	0	0	0	29.0	21.9	曇/雨	試験区①で死虫率10%超
2021/9/12	0	0	0	0	25.8	22.3	曇	試験区①で死虫率10%超
2021/9/13	0	0	1	0	30.5	20.6	曇	試験区①で死虫率10%超
2021/9/14	0	0	6	0	25.7	19.3	曇	試験区①、②で死虫率10%超
2021/9/15	0	0	2	0	28.7	19.3	曇/晴	
2021/9/16	0	0	0	0	26.8	18.9	晴/曇	
2021/9/17	0	0	1	0	25.2	18.7	曇	

* アメダスデータ（観測地点：東京都府中市）

9月8日に畦を模した盛り土から採水する個体が確認された。その後、調査が終了するまでの間、午前9時の観察時においては採水する個体は確認されなかった。これは日ごとの死虫率が10%を超えるなど蜂群状態が安定しなかったことや、気象条件などが原因と考えられた。試験区②では9月8、13、14および15日に採水する個体が観察されたが、いずれも給水器を簡易ハウス内に導入する前の状況と変わらず、水稻の切り株や茎、コンクリート枠部分から採水するのみで、給水器から採水する個体は確認されなかった。

今回の調査の結果、ミツバチの採水場所に関する嗜好性は、畦を模した盛り土で最も高く、次いで足場の安定する茎などで高い傾向が見られた。

一方で、給水器に関してはミツバチの採水場所としての嗜好性は低かった。

2.2 考察

2021年度の観察で、給水器や水稻の茎と比較して、畦を模した盛り土への嗜好性が高い傾向が認められた。ミツバチが採水場所として好む場所と温度の関係を解析するため、サーモカメラを用いて採水場所の温度を測定した(図6)。

試験区①でミツバチが採水していた畦を模した盛り土の部分と茎部の温度はそれぞれ28.5℃、27.1℃であり、大きな違いは認められなかった。また、試験区②では茎部から採水していたが、茎部は31.4℃、水面は30.2℃であり、大きな違いは認められなかった。

また、畦を模した盛り土、茎部、給水器の温度も同様に大きな違いは認められなかった(図7)。

以上より、それぞれの採水場所で温度の違いは認められなかった。

2019年度の簡易テントを用いた閉鎖空間における調査では、天井から吊した給水器と地面に置いた給水器のどちらを採水場所として好むか比較した。その結果、天井から吊した給水器からのみ採水することが確認され⁹⁾、本結果より、ミツバチは巣箱上部に吊した給水器を採水場所として好むと考えていたが、今回の調査結果はそれとは異なる結果であった。

2021年度の調査では、順化期間中にミツバチが

水田枠の水を採水する活動を確認した上で調査を開始し、その後、簡易ハウスの天井から給水器を吊した。ミツバチは効率よく採餌するために、連続して同じ花に訪花する性質があることが知られている⁹⁾。採水行動においても同様に、最初に採水場所と認識した所から採水し続ける性質がある可能性が考えられた。

人工的な採水場所を設置してミツバチが採水目的で水田へ飛来することを防ぐためには、設置場所の環境だけでなく、水田に水を張る前から設置しミツバチに水田より先に採水場所として認識させるといった、設置のタイミングも重要である可能性が示唆された。

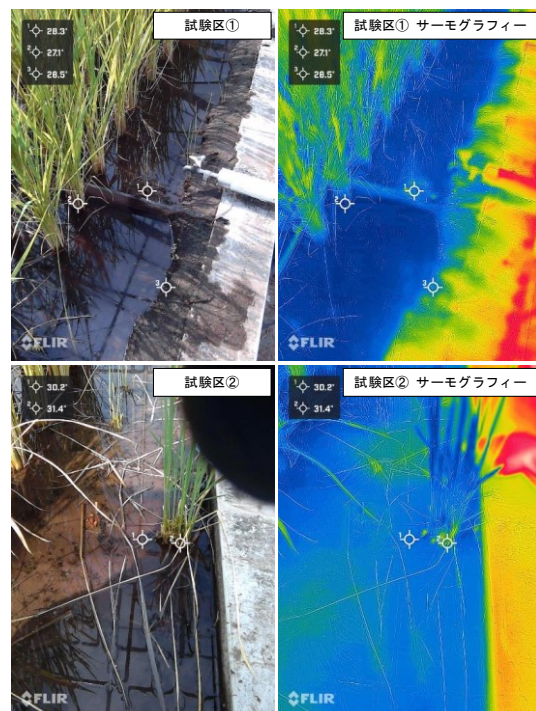


図6. 採水場所の温度(8月30日撮影)

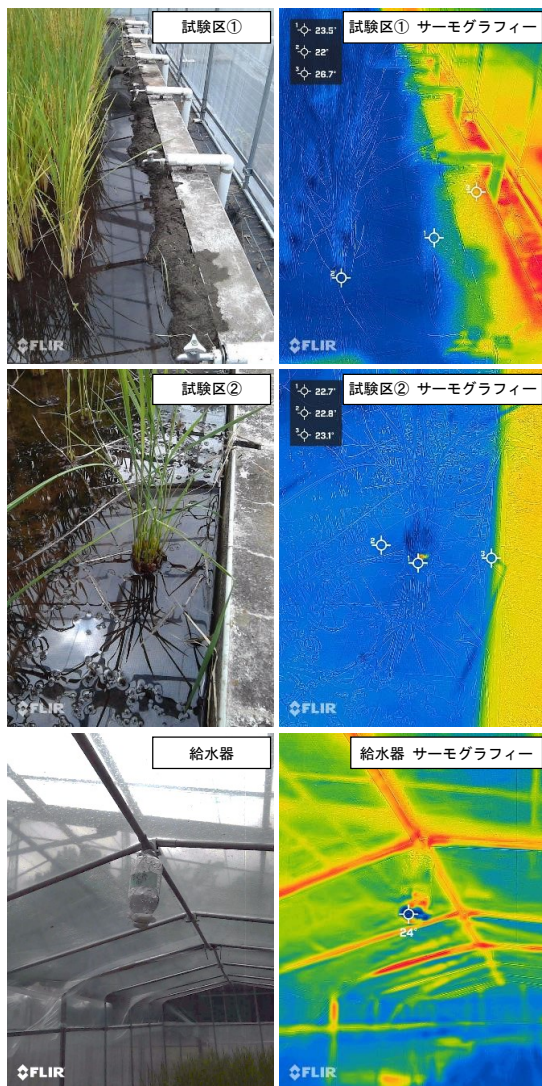


図7. 採水場所の温度（蛙，茎部，給水器の比較. 9月8日撮影）

引用文献

- 1) 農林水産省(2020): 農薬の登録申請において提出すべき資料について (平成 31 年 3 月 29 日付け 30 消安第 6278 号農林水産省消費・安全局長通知) 別紙 2 ミツバチへの影響評価ガイドランス
- 2) Seeley, T.D.(1995):THE WISDOM OF THE HIVE. The Social Physiology of Honey Bee Colonies,HARVARD UNIVERSITY PRESS,
- 3) Robinson,G.E., et al.(1984): A highly specialized water-collecting honey bee, *Apidologie* 15:355-358
- 4) EFSA(2013): EFSA Guidance Document on the risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees),p60
- 5) U.S.EPA(2014): Guidance for Assessing Pesticide Risks to Bees.
- 6) 市原直登, 加藤貴央, 木村穰, 石原悟(2019): 農薬調査研究報告書第 12 号, p.12-16
- 7) 市原直登, 加藤貴央, 高野優美, 木村穰, 石原悟 (2020): 農薬調査研究報告書第 13 号, p.14-23
- 8) 市原直登, 大石桂輔, 石原悟(2016): 農薬調査研究報告書第 9 号, p.1-4
- 9) 石井博(2006): ポリネーターの定花性, 日本生態学会誌 56, p.230-239

謝辞

本研究を進めるにあたり，野外調査にご協力いただいた埼玉県畜産会 金子氏，埼玉県養蜂協会 鈴木氏，間室氏，神田氏，埼玉県農業技術研究センター 成田氏にこの場を借りて深く感謝申し上げます。

別表1. 虫体中の調査対象成分の分析結果（2019年度調査）

成分名	定量 下限値 (ng/bee)	定量下限値以上の検出率*												
		A地点			B地点			C地点			D地点			
		成虫 (100)	幼虫 (50)	外勤 (32) 内勤 (68)	成虫 (100)	幼虫 (50)	外勤 (4) 内勤 (96)	成虫 (100)	幼虫 (50)	外勤 (18) 内勤 (82)	成虫 (100)	幼虫 (50)	外勤 (8) 内勤 (92)	
イミダズスルホン	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
オキサジノグロメリン	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
シロホップアブフィル	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.3%(1)	-	-
ジメタメトリン	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
シメトリン	2.0	-	-	-	-	-	-	3.2%(3)	-	-	-	-	-	-
ダライムロン	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
テアリルトリオン	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ピラクロニル	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ピラジスルフロロエチル	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ピリノチカルブ	0.4	-	-	-	-	-	-	1.1%(1)	-	-	-	-	-	-
プレチチカロール	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
フロロエチド	0.4	-	1.5%(1)	-	-	-	-	8.3%(8)	8.0%(4)	11%(2)	8.5%(7)	-	-	-
フロロエチド脱臭素体	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ペンジピシクロン	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ペンジピシクロン加水分解体	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ペンタジノナトリウム塩	0.4	-	-	-	-	-	-	1.1%(1)	-	-	-	-	-	-
モリネート	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- 未検出 * 括弧内は頭数

別表2. 虫体中の調査対象成分の分析結果 (2021年度調査)

成分名	定量 下限値 (ng/bee)	分析値* (ng/bee)											
		A地点			B地点			C地点			D地点		
		成虫 (50)	外勤 (7)	内勤 (43)	成虫 (50)	外勤 (19)	内勤 (31)	成虫 (50)	外勤 (8)	内勤 (42)	成虫 (50)	外勤 (9)	内勤 (41)
イマジン・スルフロン	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
オキサジノクロキチン	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
シロホアブ・アチル	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ジ・メタトリン ^{A)}	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
シメトリン	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ダ・イムロン	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.72 (1)
テアリルトリオン	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
トリンクラーゾール ^{A)} ・ ^{B)}	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.1 (1)
ピ・ラコニル	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ピ・ラジ・スルフロニエチル	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ピ・ラジ・チカルゾ ^{B)}	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ブ・タクロール ^{B)}	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ブ・レチカロール ^{A)}	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ブ・ロモジチド	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ブ・ロモジチド・脱臭素体	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ハ・ンジ・ピ・シカロ ^{B)}	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ハ・ンジ・ピ・シカロ加水分解体	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ハ・ンジ・ンナトリウム塩	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.43 (1)
モリネート	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- 未検出 * 括弧内は頭数

^{A)} A地点の田面水から定量下限値以上で検出された成分

^{B)} B地点の田面水または用水路から定量下限値以上で検出された成分

令和3年度学会等での発表実績一覧

1. 誌面発表

	誌名	課題名	発表者名
1	ACS Agricultural Science & Technology (2021年, vol. 1, pp. 362-371)	Relationship between the Vertical Distribution of Pesticides, Including Neonicotinoids, in Soils and Their Uptake by <i>Brassica rapa</i> L. var. <i>peruviridis</i>	<u>Yutaka Motoki,</u> <u>Takahiro Kato,</u> <u>Yoshihiro Akiyama,</u> Nobuyasu Seike, <u>Takashi Iwafune</u>

2. 口頭・ポスター発表

	学会名	題目	発表者名
1	第40回農薬製剤・施用 法シンポジウム (2021年10月15日 (金))	2020年及び2021年CIPAC 会議の概要	<u>渡辺高志、</u> 原田日路香、 上野敬規
2	環太平洋国際化学会議 2021 (Pacifichem 2021) (2021年12月 16日(木)~12月21日 (火))	Water-based extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of neonicotinoid insecticides and their metabolites in green pepper tomato samples	<u>Takashi Iwafune,</u> Tomomi Ogino, Eiki Watanabe

アンダーラインが引かれた者が、FAMIC 農薬検査部職員

【技術レポート】

残留農薬分析業務における分析法の検討

（希釈の効果を用いた LC-MS/MS による茶中の残留農薬一斉試験法）…………… 1 4

（LC-MS/MS を用いたなす中の残留農薬一斉試験法）…………… 3 1

残留農薬分析業務における分析法の検討

希釈の効果を用了 LC-MS/MS による茶中の残留農薬一斉試験法

山本謙吾*¹, 友成真菜*¹, 金丸正*¹

*¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター農薬検査部

高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた茶中の 56 農薬の残留農薬一斉試験法を検討した。茶にはカフェイン等の妨害成分が多く含まれているため、LC-MS/MS 測定への悪影響が大きいという問題があった。そこで、塩析負荷量の減少および試験溶液量の増加による希釈倍率の拡大、C18 ミニカラムの省略、GC/PSA から GC/NH₂ ミニカラムへの変更、ならびにシリカゲルミニカラムの追加を検討した。その結果、通知一斉試験法に対して、夾雑成分を低減させ、LC-MS/MS への悪影響を回避するとともに、分析対象農薬の同時分析および拡大を図ることができた。厚生労働省通知の「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」に基づき試験法の妥当性評価を行ったところ、53 農薬がガイドラインに示された目標値等に適合していることを確認した。

Keywords : 残留農薬, 茶, 妥当性評価, 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計, 一斉試験法

結 言

独立行政法人農林水産消費安全技術センター農薬検査部農薬実態調査課では、農林水産省の指示に基づき、国内産農産物における農薬の使用状況および残留状況について調査を行っている。調査の特徴としては、農薬を適正に使用した農産物に対して、農薬がどの程度残留しているかどうかを把握するために、定量限界値以上を正確に分析することが求められている。農産物に使用される農薬は、作物や栽培地域によって異なることから、調査においては、多くの農薬を効率的に分析することが必要であり、同時分析法は最重要な手法となっている。

令和 4 年度、茶の調査を実施するにあたり、厚生労働省通知一斉試験法¹⁾の導入を検討したが、次の 3 つの課題を解決する必要があった。通知一斉試験法は、①基準値レベルでの妥当性確認をしており、低濃度での妥当性確認をする必要があること、②国内で茶の栽培に使用することができる農薬のうち、45 農薬 (代謝物の妥当性確認が出来ていないものを除く。) を対象とするが、同時分析を保証していないこと、③精製が不十分であり、カフェイン等の妨害成分の影響により、LC-MS/MS 測定への悪影響が大きいこと、から通知一斉試験法を参考とする改良法を検討した。

改良法については、「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」^{2, 3)} (以下、ガイドライン) に基づき、妥当性評価を行ったのでその結果を報告する。

材料および方法

1. 試験室

農薬検査部農薬実態調査課

2. 対象農薬

国内で茶の栽培に使用することができる農薬のうち、通知一斉試験法で分析できる可能性がある、アクリナトリン、アセタミプリド、アゾキシストロビン、イソキサチオン、イミダクロプリド、エチプロール、エトキサゾール、エトフェンプロックス、クレソキシムメチル、クロチアニジン、クロマフェノジド、クロラントラニリプロール、クロルピリホス、クロルフェナピル、シアントラニリプロール、ジウロン、ジエトフェンカルブ、シエノピラフェン、ジフェノコナゾール、ジフルベンズロン、シメコナゾール、シラフルオフエン、スピノサド、ダイアジノン、チアクロプリド、チアメトキサム、テトラコナゾール、テブコナゾール、テブフェノジド、テブフェンピラド、テフルベンズロン、トリフルミゾール、トリフロキシストロビン、トルフェンピラド、ビフェントリン、ピラクロストロビン、ピラフルフェンエチル、ピ

リダベン, ピリプロキシフェン, ピリベンカルブ, フェントエート, フェンピロキシメート, フェンブコナゾール, フェンプロパトリン, ブプロフェジン, フルアジナム, フルバリネート, フルフェノクスロン, フルベンジアミド, プロバルギット, プロフェノホス, ボスカリド, ミクロブタニル, メチダチオン, メトキシフェノジド, ルフェヌロンの 56 農薬を検討対象とした。

3. 試料および添加濃度

3.1. 試料

対象農薬が検出されないことを確認したせん茶 (以下, ブランク試料) を用いた。

3.2. 添加濃度

0.02 mg/kg および 1 mg/kg の 2 濃度とした。ただし, LC-MS/MS においてイオン化しにくかったアクリナトリン, クロルピリホス, クロルフェナピル, シアントラニプロール, テフルベンズロン, フルアジナム, フルバリネート, ルフェヌロンの 8 農薬については, 0.3 mg/kg および 1 mg/kg の 2 濃度とした。

4. 試薬および器具

4.1. 標準品

農薬標準品: アクリナトリン, クロルピリホス, シアントラニプロール, テフルベンズロン, ピラフルフェンエチル, フルアジナム, フルバリネート, プロバルギットおよびルフェヌロンは富士フィルム和光純薬製の, クロルフェナピル, ピリベンカルブおよびピリベンカルブ代謝物は林純薬製の, 残留農薬試験用を用いた。各農薬標準品をアセトニトリルで溶解して 500 µg/mL の標準原液を調製した。それ以外の農薬は特注農薬混合標準溶液 (林純薬工業株式会社製) を用いた。

添加回収試験用および検量線用標準液: 標準原液および特注農薬混合標準溶液をアセトニトリルで適宜希釈し, 混合して調製した。

内標準品: リン酸トリフェニルは, 富士フィルム和光純薬製の和光一級を用いた。アセトンで溶解して 100 µg/mL の内標準原液を調製した。

内標準液: 内標準原液をアセトン/n-ヘキサン (1:1) で希釈して, 1 µg/mL に調製した。

4.2. 試薬

アセトニトリル (残留農薬試験用および液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS) 用), アセトン (残留農薬試験用), n-ヘキサン (残留農薬試

験用), メタノール (液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS) 用), 塩化ナトリウム (残留農薬試験用), リン酸水素二カリウム (特級), リン酸二水素カリウム (特級), 酢酸アンモニウム溶液 (高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用) およびケイソウ土 (セライト 545) を使用した。水は超純水製造装置 (Merck Millipore 製) で製造した超純水を使用した。

4.3. 調製試薬

0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0): リン酸水素二カリウム 52.7 g およびリン酸二水素カリウム 30.2 g を量り採り, 水約 500 mL に溶解し, 1 mol/L 水酸化ナトリウムまたは 1 mol/L 塩酸を用いて pH 7.0 に調製した後, 水を加えて 1 L とした。

4.4. ろ紙

桐山ロート用ろ紙 No.5A-60

4.5. 固相抽出ミニカラム

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムは, Waters 製 Sep-Pak Vac C18 (1000 mg) (以下, C18 ミニカラム) を, グラファイトカーボン/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムは, GL Science 製 InertSep GC/PSA (500 mg/500 mg) (以下, GC/PSA ミニカラム) を, グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムは, Sigma-Aldrich 製 ENVI-Carb/LC-NH2 (500 mg/500 mg) (以下, GC/NH2 ミニカラム) を, シリカゲルミニカラムは, Waters 製 Sep-Pak Vac Silica (500 mg) を使用した。C18 および GC/NH2 ミニカラムはアセトニトリル 10 mL で, GC/PSA ミニカラムはアセトニトリル/トルエン (3:1) 10 mL で, シリカゲルミニカラムは溶出時に使用するアセトン/n-ヘキサン 10 mL でコンディショニングしたものをを用いた。

4.6. メンブレンフィルター

アドバンテック東洋製 DISMIC-13HP (孔径 0.2 µm, 直径 13 mm, 親水性 PTFE)

5. 装置

5.1. ホモジナイザー

日本精機製作所製 エースホモジナイザー

5.2. 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計

LC 部: Waters 製 ACQUITY UPLC System

MS 部: Waters 製 ACQUITY TQD

6. 前処理方法

6.1. 抽出

図1の試験法フローチャートに従い、水を加えて膨潤させた試料から農薬をアセトニトリルで抽出し、抽出液に塩化ナトリウム、0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH7.0) およびアセトニトリルを加えて振とうしたのち、水層を分離除去した。

添加回収試験は、ホモジナイザー用容器に採取した試料に添加回収試験用標準液を添加し 30 分放置した後に抽出を開始した。

6.2. 精製

GC/NH2 ミニカラムおよびシリカゲルミニカラムで精製し、アセトニトリルに溶解させメンブレンフィルター処理したものを試験溶液とした。

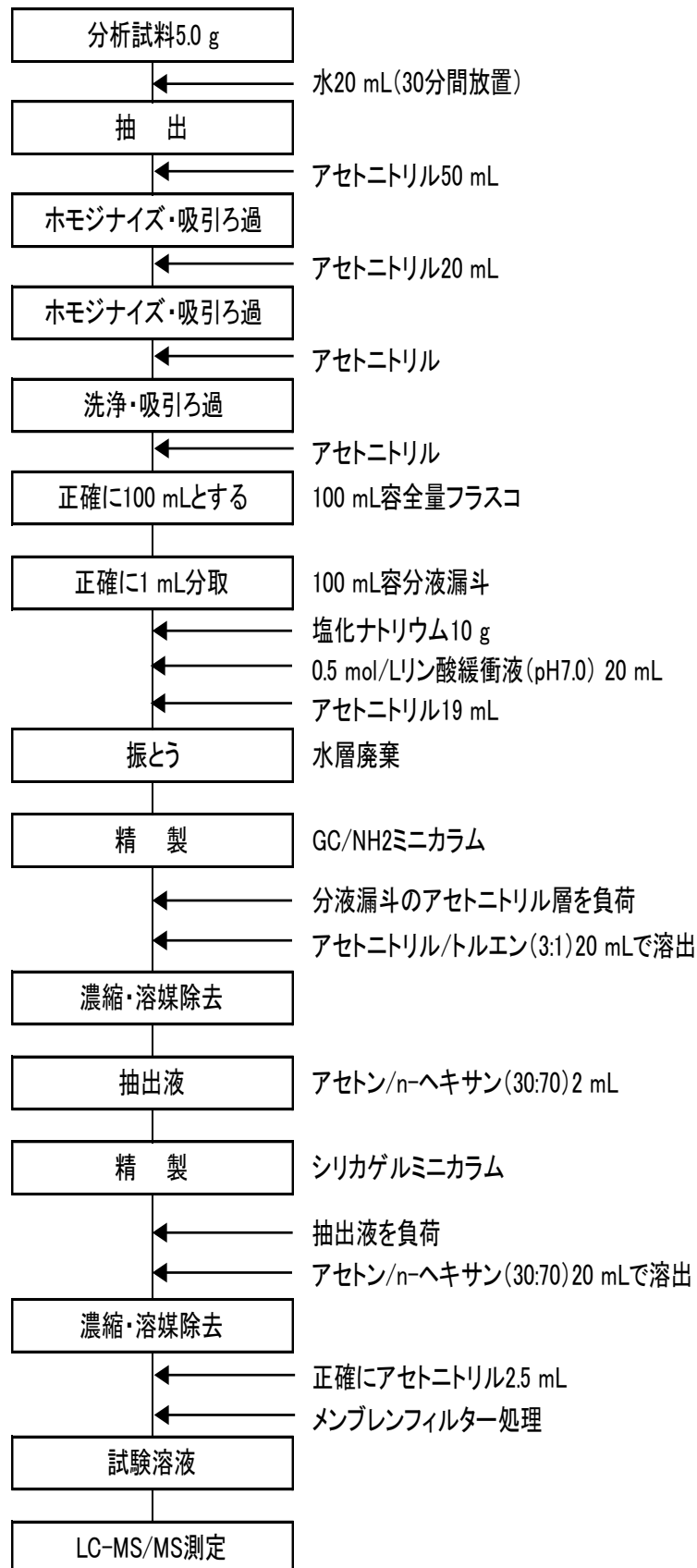


図1. LC-MS/MSによる一斉試験法(茶)フローチャート

7. 測定条件

LC-MS/MSによる各農薬の測定イオンおよび測定条件は、表1から表3のとおりとした。

表1. 測定イオン

農薬名	保持時間 (min)	測定 モード	定量イオン (m/z)	定性イオン (m/z)
アクリナトリン	16.4	+	559 > 208	559 > 181
アセタミプリド	5.8	+	223 > 126	223 > 90
アゾキシストロビン	10.2	+	404 > 372	404 > 344
イソキサチオン	13.2	+	314 > 105	314 > 97
イミダクロプリド	5.0	+	256 > 209	256 > 175
エチプロール	10.3	+	397 > 351	397 > 255
エトキサゾール	15.6	+	360 > 141	360 > 304
エトフェンプロックス	17.6	+	394 > 177	394 > 135
クレソキシムメチル	12.4	+	314 > 116	314 > 131
クロチアニジン	5.1	+	250 > 169	250 > 132
クロマフェノジド	11.3	+	395 > 175	395 > 339
クロラントラニリプロール	9.7	+	484 > 453	484 > 286
クロールピリホス	15.2	+	350 > 198	352 > 200
クロールフェナピル	13.9	-	349 > 131	349 > 81
シアントラニリプロール	8.7	+	475 > 444	475 > 286
ジウロン	9.5	+	233 > 72	233 > 160
ジエトフェンカルブ	10.1	+	268 > 226	268 > 124
シエノピラフェン	15.7	+	394 > 310	394 > 254
ジフェノコナゾール	13.3	+	406 > 251	406 > 337
ジフルベンズロン	11.9	+	311 > 158	311 > 141
シメコナゾール	11.3	+	294 > 70	294 > 73
シラフルオフェン	18.7	+	426 > 287	426 > 168
スピノシンA	17.2	+	732 > 142	732 > 98
スピノシンD	17.7	+	747 > 142	747 > 98
ダイアジノン	12.7	+	305 > 169	305 > 153
チアクロプリド	6.8	+	253 > 126	253 > 90
チアメトキサム	3.8	+	292 > 211	292 > 181
テトラコナゾール	11.3	+	372 > 159	372 > 70
テブコナゾール	12.3	+	308 > 70	308 > 125
テブフェノジド	11.9	+	353 > 297	353 > 105
テブフェンピラド	14.4	+	334 > 117	334 > 145
テフルベンズロン	14.8	-	379 > 339	379 > 196
トリフルミゾール	13.8	+	346 > 278	346 > 73
トリフルミゾール代謝物	11.3	+	295 > 73	295 > 278
トリフロキシストロビン	13.7	+	409 > 186	409 > 145
トルフェンピラド	14.7	+	384 > 197	384 > 91
ピフェントリン	17.6	+	440 > 181	440 > 166
ピラクロストロビン	13.0	+	388 > 194	388 > 163
ピラフルフェンエチル	12.6	+	413 > 339	413 > 253
ピリダベン	16.3	+	365 > 309	365 > 147
ピリプロキシフェン	15.2	+	322 > 96	322 > 227

ピリベンカルブ	11.2	+	362 > 239	362 > 207
ピリベンカルブ代謝物	10.4	+	362 > 122	362 > 239
フェントエート	12.3	+	321 > 247	321 > 163
フェンピロキシメート	15.9	+	422 > 366	422 > 214
フェンブコナゾール	11.6	+	337 > 70	337 > 125
フェンブプロパトリン	15.8	+	350 > 125	367 > 125
ブプロフェジン	14.6	+	306 > 201	306 > 106
フルアジナム	13.8	-	463 > 398	463 > 416
フルバリネート	16.7	+	503 > 181	503 > 208
フルフェノクスロン	15.5	+	489 > 158	489 > 141
フルベンジアミド	12.1	-	681 > 254	681 > 274
プロパルギット	15.5	+	368 > 231	368 > 175
プロフェノホス	14.1	+	375 > 305	373 > 303
ボスカリド	10.5	+	343 > 307	343 > 140
ミクロブタニル	10.8	+	289 > 70	289 > 125
メチダチオン	9.8	+	303 > 145	303 > 85
メトキシフェノジド	10.8	-	367 > 149	367 > 105
ルフェヌロン	14.9	-	509 > 175	509 > 326

表 2. 測定条件

LC部	:	Waters製 ACQUITY UPLC System
MS部	:	Waters製 ACQUITY TQD
カラム	:	Wako製 Wakopak Ultra C18-2 内径2.1 mm, 長さ100 mm, 2 μm
流量	:	0.353 mL/min
カラム温度	:	40 °C
注入量	:	2 μL
移動相	A液	: 5 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液
	B液	: 5 mmol/L 酢酸アンモニウムメタノール溶液
イオン化法	:	エレクトロスプレーイオン化法 (ESI+, ESI-)
測定法	:	多重反応モニタリング法 (MRM)
イオン源温度	:	150 °C
脱溶媒ガス温度	:	400 °C
脱溶媒ガス流量	:	800 L/hr

表 3. グラジエント条件

時間(分)	0	0.25	6.5	7.0	18.0	22.0
A 液(%)	85	85	55	40	1	1
B 液(%)	15	15	45	60	99	99

8. 妥当性評価

8.1. 枝分かれ試験

ガイドラインに示された実験例に基づき、各濃度の添加回収試験をそれぞれ2併行で、異なる実施日または実施者で5回繰り返した。

8.2. 選択性の確認

ブランク試料を6. 前処理方法に従って調製した試験溶液（以下、ブランク試料溶液）について、LC-MS/MSで測定し、対象農薬の定量を妨害するピークの有無を確認した。

8.3. 検量線の直線性の確認

対象農薬を混合した検量線用標準液（0.0002, 0.0005, 0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05 および 0.1 $\mu\text{g/mL}$ ）を LC-MS/MS に注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積から検量線を作成した。各対象農薬の検量線について、相関係数（ r ）が 0.995 以上であることをもって、検量線の直線性を確認した。

8.4. 検出限界および定量限界の確認

定量限界の目標値を 0.02 mg/kg、検出限界の目標値を 0.01 mg/kg とした。また、イオン化しにくかった 8 農薬については、残留農薬基準値を考慮し、定量限界の目標値を 0.3 mg/kg、検出限界の目標値を 0.1 mg/kg とした。

マトリックス添加標準液を測定して得られたピークの高さ(S)とピーク近傍のノイズ(N)の高さから S/N 比 3 相当および 10 相当の濃度を求め、試料中濃度換算したものをそれぞれ検出限界および定量限界とした。検出限界および定量限界の算出式を以下に示す。

・検出限界 = $3 \times (\text{ノイズの最大と最小の幅} \times 1/2) \times \text{標準液濃度} / \text{標準液ピーク高さ} \times 1 / \text{試験法における濃縮倍率}$

・定量限界 = $10 \times (\text{ノイズの最大と最小の幅} \times 1/2) \times \text{標準液濃度} / \text{標準液ピーク高さ} \times 1 / \text{試験法における濃縮倍率}$

8.5. 真度および精度の確認

ガイドラインに従い、各濃度について真度（回収率）、併行精度および室内精度が表 4 の目標値を満たすかどうかを確認した。

表 4. ガイドラインに示された真度および精度の目標値

濃度 (ppm)	真度 (%)	併行精度 (RSD %)	室内精度 (RSD %)
≤ 0.001	70~120	30 >	35 >
$0.001 < \sim \leq 0.01$	70~120	25 >	30 >
$0.01 < \sim \leq 0.1$	70~120	15 >	20 >
$0.1 <$	70~120	10 >	15 >

結果および考察

9. 改良法における各検討

9.1. 測定およびグラジエント条件

農薬実態調査課では、通知一斉試験法を分析する場合、通知一斉試験法に例示されている条件よりも高速かつ高分離能で分析できる坂部ら⁴⁾によるUHPLC条件で測定を行っている。今回、この条件で検討したところ、5~8分の間に農薬が集中し、多数のイオンを同時に測定する必要があり、感度が低下した。このため、坂部らの条件よりもグラジエントの勾配を緩やかにし、表3のとおり設定した。その結果、各農薬を分離させることで妥当性評価を行うための十分な感度を得ることができた。

9.2. 希釈の効果

通知一斉試験法では、夾雑成分の非常に多い茶に対する精製が不十分であるため、LC-MS/MS測定におけるイオン化阻害や機器汚染による感度低下を生じやすいなどの問題点があり、改良の必要性があった。そこで、精製工程の検討の前段階において、最も簡単に妨害成分による悪影響を低減できる方法として、希釈率を上げることにした。通知一斉試験法によるGC/PSAミニカラムでは、大量の色素が除去しきれずに溶出し、試験溶液に色素が残ることから、負荷する色素等夾雑成分の量そのものの低減を図った。具体的には、アセトニトリル100 mLから5 mLを分取して塩析を行っているが、1 mLに変更した。また、検量線の最小濃度および検出限界の目標値から算出して試験溶液の量を1 mLから2.5 mLに変更し、全体として通知一斉試験法よりも12.5倍希釈した。その結果、希釈の効果により、色素は溶出せずに試験溶液は無色透明に改善された。

9.3. C18 ミニカラム

通知一斉試験法では、C18 ミニカラムにより脂質等の低極性物質を除去する工程があり、溶出確認として、添加回収試験を実施した。方法は、アセトニトリルで調製した 0.005 µg/mL の標準液 20 mL を C18 ミニカラムに負荷し、通知一斉試験法の条件により溶出させて乾固後、アセトニトリル 2 mL に溶解させた溶液を LC-MS/MS で測定とした。各ミニカラムの回収率に対しては、改良法がガイドラインを満たすために、80%以上を目標とした。表 7 に示すとおり、シメコナゾール 13.6%、スピノシン A 0.0%、スピノシン D 0.0%、テブコナゾール 4.9% およびトリフルミゾール 76.2% の回収率が 80%未満であった。この結果から C18 ミニカラムでの精製により 5成分がガイドラインを満たさない可能性があり、C18 ミニカラムを省略できるかどうかを検討した。文部科学省の食品成分データベース⁵⁾による各作物の脂質含量および試験溶液中の脂質濃度を表 6 に示した。えだまめ、スイートコーン、ほうれんそう等に対する通知一斉試験法では、C18 ミニカラムによる脂質の除去を行っていない。脂質が除去されずにすべて残留すると仮定した場合、各試験溶液中の脂質濃度は、えだまめ 0.062 g/mL、スイートコーン 0.017 g/mL、およびほうれんそう 0.004 g/mL であり、9.2. 希釈の効果によるせん茶 0.00094 g/mL および玉露 0.00082 g/mL は非常に小さい値であった。この結果から、茶中の脂質による悪影響を考慮する必要はないと判断し、改良法においては C18 ミニカラムを省略することにした。

9.4. グラファイトカーボンおよび陰イオン交換ミニカラム

通知一斉試験法では、GC/PSA ミニカラムによる色素や有機酸を除去する工程があり、溶出確認として、添加回収試験を実施した。方法は、アセトニトリル/トルエン(3:1)で調製した 0.05 µg/mL の標準液 2 mL を GC/PSA ミニカラムに負荷し、通知一斉試験法の条件により溶出させて乾固後、アセトニトリル 2 mL に溶解させた溶液を LC-MS/MS で測定とした。表 7 に示すとおり、シアントラニプロール 73.9%、スピノシン A 70.8%、スピノシン D 71.5% およびフルアジナム

0.0%の回収率が 80%未満であり、4成分がガイドラインを満たさない可能性があった。そこで、GC/PSA ミニカラムよりも精製効果が弱い GC/NH₂ ミニカラムに変更することで 4成分の回収率が改善できるかどうかを確認するために、添加回収試験を実施した。方法は GC/PSA ミニカラム時と同様とした。その結果、全ての対象農薬について、回収率が 80%以上となった。GC/NH₂ ミニカラムは精製効果が弱くなるが、9.2. 希釈の効果により通知一斉試験法よりも夾雑成分を低減させていること、およびガイドラインを満たす可能性のある農薬が拡大することから、GC/NH₂ ミニカラムに変更することにした。

9.5. シリカゲルミニカラム

9.5.1 溶出確認

通知一斉試験法では、茶の主要な妨害成分であるカフェインの除去は難しいことが分かっている。そこで、岩屋ら⁶⁾によるカフェイン除去を参考とし、高極性の物質をよく吸着し、汎用性のあるシリカゲルミニカラムによる精製の追加を検討するため、アセトン/n-ヘキサンによる対象農薬の溶出確認として、添加回収試験を実施した。方法は、各アセトン/n-ヘキサン(15:85, 20:80, 25:75, 30:70 および 35:65)で調製した 0.05 µg/mL の標準液 2 mL をシリカゲルミニカラムに負荷し、対応したアセトン/n-ヘキサンの混合液 20 mL で溶出させて乾固後、アセトニトリル 2 mL に溶解させた溶液を LC-MS/MS で測定とした。表 7 に示すとおり、アセトン/n-ヘキサン(15:85)では、アセタミプリド 0.4%、イミダクロプリド 0.4%、エチプロール 69.3%、クロチアニジン 3.2%、チアクロプリド 1.4%、チアメトキサム 0.0%、フェンブコナゾール 25.7% およびマイクロブタニル 77.2% の回収率が 80%未満であった。アセトン/n-ヘキサン(20:80)ではアセタミプリド 63.0%、イミダクロプリド 68.5%、チアクロプリド 77.1% およびチアメトキサム 0.0% の回収率が 80%未満であった。アセトン/n-ヘキサン(25:75)では、チアメトキサム 20.7% の回収率が 80%未満であり、アセトン/n-ヘキサン(30:70)および(35:65)では、すべての対象農薬が 80%以上の回収率であった。

9.5.2 カフェイン除去効果

アセトン/n-ヘキサンにおけるシリカゲルミニ

カラムのカフェイン除去効果の確認として、茶からの抽出液を用いて、GC/MSを用いた内標準法によりカフェイン量を比較した。シリカゲルミニカラムの追加は、山口⁷⁾を参考にしてGC/NH2ミニカラムの後とした。茶の抽出液は、図1の試験法フローチャートに従い、各アセトン/n-ヘキサンに変更してシリカゲルミニカラムで処理して乾固後、内標準液 2.5 mL に溶解させたものをGC/MS 試験溶液とした。GC/MS の測定条件は、通知一斉試験法によるものとし、カフェイン(m/z 194)とリン酸トリフェニル(m/z 326)の面積比(以下、カフェイン比)を求めた。シリカゲルミニカラムで無処理のカフェイン比を 100 として、各アセトン/n-ヘキサンにおけるカフェイン残量の割合(%)を表5に示した。その結果、アセトン/n-ヘキサン(15:85)ではカフェイン残量の割合が 3.7% であり、強い除去効果がみられたが、その他のアセトン/n-ヘキサンでは、除去効果が期待できなかった。

表 5. 各アセトン/n-ヘキサンのカフェイン除去効果

アセトン/n-ヘキサン (比)	カフェイン残量の割合 (%)
無処理	100
(15:85)	3.7
(20:80)	84.5
(25:75)	94.5
(30:70)	95.2
(35:65)	95.4

9.5.3 着色挙動確認

次に、カフェイン以外の夾雑成分に対する精製の効果として、アセトン/n-ヘキサンにおけるシリカゲルミニカラム内の着色挙動を比較した。方法は、9.5.2 で使用したミニカラムを目視により確認した。その結果の一部を図2に示した。アセトン/n-ヘキサン(35:65)では着色がミニカラムの最下層まで達しており、夾雑成分がミニカラムから溶出したが、それ以外のアセトン/n-ヘキサンについては、着色はミニカラム内に留まっていた。着色挙動による精製効果および 9.5.1 溶出確認の結果により、カフェインの除去はできないが、その他

の夾雑成分を除去できたアセトン/n-ヘキサン(30:70) 20 mL によるシリカゲルミニカラムの精製を追加することとした。

なお、シリカゲルミニカラムの製造日からの経過期間によるロット間差がみられ、カラム内の着色挙動が異なる事例がみられた。そのため、細かい溶出画分による条件設定では改良法の頑健性を損なう可能性があるため、溶出液量 20 mL に限定した溶出確認および着色挙動確認の実施にとどめた。

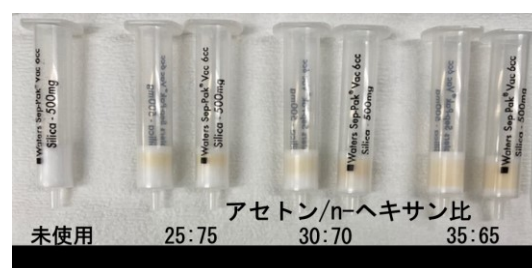


図 2. シリカゲルにおける着色の挙動

9.5.4 溶解性の差による精製効果

茶を用いた GC/NH2 ミニカラムからの溶出液の乾固物に対してアセトン/n-ヘキサン(30:70) 2 mL で溶解しようとしたところ、ナスフラスコの表面に固着して溶解しない残留物があつた。齊藤ら⁸⁾によると、大量に含まれるタンニン等の高極性の夾雑成分がアセトニトリル/トルエン(3:1)に溶解せず、固着したことを述べており、山口⁷⁾によるアセトン/n-ヘキサン(15:85)においても同様の現象がみられている。上記現象は、置換溶媒に対する溶解性の差により、一部の夾雑成分が溶解できなくなり、その夾雑成分が GC/PSA またはシリカゲルミニカラムでろ過されるため、精製効果の一つになっていると推察された。改良法では、アセトニトリル/トルエン(3:1)への置換工程を省略しているが、アセトン/n-ヘキサン(30:70)への置換時において、同様の現象が起り、通知一斉試験法と同等の精製効果があつた。これら固着した残留物については、超音波処理により溶液中に回収し、シリカゲルミニカラムに負荷することでもろ過された。

9.6. メンブレンフィルター

シリカゲルミニカラム精製後、溶媒を濃縮・除

去し、茶の残留物にアセトニトリル 2.5 mL を加えて溶解させた溶液については、目視による析出物の確認はできなかったが、LC-MS/MS への汚染等を回避し、良好な状態で継続的に分析ができるように維持するために、孔径の小さい 0.2 μm のメンブランフィルター処理の追加を検討した。目詰まりせずに通液を確認できたため、メンブランフィルター処理を追加した。

9.7 予備試験による添加回収試験

改良法について、茶の夾雑成分による影響を確認するために、予備試験として、添加回収試験 (1 mg/kg) を実施した。参考として、アセトン/n-ヘキサン(25:75)による添加回収試験も実施した。回収率については、ガイドラインを満たす 70 ~120 % を目標とした。表 7 に示すとおり、改良法では、チアメトキサム 40.1 % およびフルバリネート 63.7 % の回収率が 70 % 未満であった。アセトン/n-ヘキサン(25:75)では、シエノピラフェン 68.1 %、チアメトキサム 8.8 %、フルアジナム 46.2 % およびフルバリネート 25.3 % の回収率が 70 % 未満であり、ガイドラインを満たさない可能性のある農薬が拡大した。この改良法の結果から、チアメトキサムを除いた回収率が 60 % 以上の対象農薬 55 種類に対して、真度および精度の妥当性確認を実施することとした。

10. 妥当性評価結果

9.7.により決定した対象農薬について、ガイドラインに定められた選択性、真度、精度、定量限界に加え、検出限界および検量線の直線性の評価を行った。

10.1. 選択性

ブランク試料溶液の分析を行ったところ、いずれの対象農薬においても定量の妨害となるピークは認められず、選択性に問題はないことが確認された。

10.2. 検量線の直線性

検量線の相関係数 (r) は表 8 に示すとおり、全ての対象農薬について、定量限界の目標値を含んだ範囲で直線性 (相関係数 (r) が 0.995 以上) が確認された。

10.3. 検出限界および定量限界

検出限界および定量限界の結果を表 8 に示した。全ての対象農薬が目標値を満たしていた。

以上の結果から、検出限界は 0.01 mg/kg、定量限界は 0.02 mg/kg とし、イオン化しにくかったアクリナトリン、クロルピリホス、クロルフェナピル、シアントラニリプロール、テフルベンズロン、フルアジナム、フルバリネート、ルフェヌロンの検出限界は 0.1 mg/kg、定量限界は 0.3 mg/kg とした。

10.4. 真度および精度

対象農薬について、真度 (回収率) の平均値および精度 (併行精度および室内精度) の結果を表 9 に示した。フルアジナムおよびフルバリネートを除く 53 の対象農薬については、ガイドラインの目標値を満たしていた。

表 6. 各農作物の成分含量および試験溶液中の脂質濃度

食品成分	可食部 100 g あたりの含量 (g)				試験溶液中の脂質濃度 (g/mL)	
	水分	たんぱく質	炭水化物	脂質	通知一斉 試験法 (野菜・果実)	改良法
えだまめ/生	71.7	11.7	8.8	6.2	0.062	—
スイートコーン/未熟種子/生	77.1	3.6	16.8	1.7	0.017	—
さつまいも/塊根/皮つき/生	64.6	0.9	33.1	0.5	0.005	—
ほうれんそう/葉/通年平均/生	92.4	2.2	3.1	0.4	0.004	—
しゅんぎく/葉/生	91.8	2.3	3.9	0.3	0.003	—
りんご/皮つき/生	83.1	0.2	16.2	0.3	0.003	—
アスパラガス/若茎/生	92.6	2.6	3.9	0.2	0.002	—
キャベツ/結球葉/生	92.7	1.3	5.2	0.2	0.002	—
こまつな/葉/生	94.1	1.5	2.4	0.2	0.002	—
にんじん/根/皮つき/生	89.1	0.7	9.3	0.2	0.002	—
スナップえんどう/若ざや/生	86.6	2.9	9.9	0.1	0.001	—
セロリ/葉柄/生	94.7	0.4	3.6	0.1	0.001	—
チンゲンサイ/葉/生	96.0	0.6	2.0	0.1	0.001	—
すいか/赤肉種/生	89.6	0.6	9.5	0.1	0.001	—
日本なし/生	88.0	0.3	11.3	0.1	0.001	—
温室メロン/生	87.8	1.1	10.3	0.1	0.001	—
もも/白肉種/生	88.7	0.6	10.2	0.1	0.001	—
せん茶/茶	2.8	24.5	47.7	4.7	—	0.00094
玉露/茶	3.1	29.1	43.9	4.1	—	0.00082

表 7. 各ミニカラム等における添加回試験結果

農薬名	回収率(%) n=1									
	C18	GC/ PSA	GC/ NH2	シリカゲル (アセトン:n-ヘキサン)					予備試験 (アセトン:n-ヘキサン)	
				(15:85)	(20:80)	(25:75)	(30:70)	(35:65)	(25:75)	(30:70)
アクリナトリン	100.4	95.4	101.4	94.9	100.2	93.2	94.1	93.4	87.4	88.0
アセタミプリド	99.3	98.2	101.0	0.4	63.0	99.6	102.3	99.7	93.5	90.5
アゾキシストロピン	99.2	99.7	97.6	99.8	99.2	98.2	100.0	99.4	92.5	91.9
イソキサチオン	97.9	97.7	100.3	98.3	98.4	102.1	98.3	99.9	91.0	93.0
イミダクロプリド	99.1	96.1	101.5	0.4	68.5	100.5	99.0	99.7	93.1	90.2
エチプロール	100.8	102.0	98.8	69.3	97.5	99.6	99.2	96.8	94.4	86.9
エトキサゾール	101.8	97.7	104.4	99.5	101.1	99.1	100.9	104.5	114.8	102.0
エトフェンプロックス	105.0	100.0	104.0	101.5	103.0	95.9	101.1	101.6	88.1	85.0
クレソキシムメチル	97.9	100.1	98.5	101.1	98.5	100.4	98.1	97.3	95.9	94.5
クロチアニジン	103.0	98.4	103.4	3.2	87.4	100.3	99.1	93.9	90.8	90.7
クロマフェノジド	100.7	98.0	99.6	102.0	100.1	101.8	101.0	99.9	92.6	91.3

クロラントラニプロール	101.7	104.2	104.8	102.3	99.5	98.7	102.0	101.1	93.0	79.0
クロルピリホス	103.0	93.8	95.7	99.1	99.4	96.5	101.2	96.6	79.8	85.6
クロルフェナビル	99.7	100.9	102.6	102.4	97.3	106.9	101.6	100.7	87.5	94.1
シアントラニプロール	100.1	73.9	95.9	90.5	101.6	102.1	103.3	97.9	85.8	95.0
ジウロン	98.2	96.1	100.1	96.9	97.6	102.6	97.5	96.0	92.2	91.9
ジエトフェンカルブ	97.1	98.6	96.7	101.3	100.1	101.0	100.0	99.7	86.7	92.9
シエノピラフェン	108.5	93.6	103.7	106.2	110.1	106.4	107.9	110.9	68.1	84.1
ジフェノコナゾール	96.0	98.0	103.1	90.7	98.0	98.7	98.0	100.8	92.9	90.9
ジフルベンズロン	100.7	100.9	103.7	100.8	99.4	101.2	102.9	100.8	86.9	87.8
シメコナゾール	13.6	98.6	100.4	91.9	96.9	99.5	98.1	94.0	90.9	90.3
シラフルオフェン	104.3	101.3	102.5	100.4	101.6	97.3	101.2	98.3	82.9	83.0
スピノシン A	0.0	70.8	98.4	95.6	94.6	93.3	93.9	94.1	76.7	80.4
スピノシン D	0.0	71.5	96.2	90.5	92.8	91.2	92.5	92.4	76.2	75.0
ダイアジノン	97.8	95.6	96.3	93.7	93.8	95.7	92.5	91.1	85.5	79.7
チアクロプリド	97.7	97.3	102.0	1.4	77.1	99.5	100.7	100.2	92.0	91.8
チアメトキサム	99.1	97.5	101.3	0.0	0.0	20.7	91.9	101.7	8.8	40.1
テトラコナゾール	100.7	98.4	100.3	91.9	101.7	100.5	99.5	97.6	95.8	91.7
テブコナゾール	4.9	100.3	100.6	95.7	96.2	98.1	96.3	94.8	91.9	93.9
テブフェノジド	99.8	98.0	99.0	102.2	99.5	101.6	99.0	100.8	91.6	89.5
テブフェンピラド	100.9	96.2	102.3	98.0	100.1	99.0	97.8	101.6	99.6	89.5
テフルベンズロン	106.8	103.6	102.4	99.4	97.7	104.2	98.8	103.1	91.4	87.7
トリフルミゾール	76.2	100.1	102.0	99.1	98.7	99.8	100.4	100.1	84.4	88.0
トリフルミゾール代謝物	94.0	97.0	99.5	99.1	97.1	99.6	97.7	96.6	90.2	89.1
トリフロキシストロビン	100.1	99.8	100.8	101.2	99.9	97.4	98.8	101.9	97.2	102.2
トルフェンピラド	102.2	98.4	108.0	98.3	99.7	100.4	100.2	102.5	90.0	90.4
ビフェントリン	110.0	95.7	104.9	98.0	100.4	97.8	97.0	98.2	79.6	98.2
ピラクロストロビン	99.3	99.0	99.5	100.6	98.9	98.8	100.7	99.2	90.8	89.7
ピラフルフェンエチル	100.7	100.2	102.9	103.0	100.7	100.7	99.8	102.8	97.8	92.2
ピリダベン	101.6	96.1	100.7	99.3	102.5	98.1	99.7	99.8	84.5	86.1
ピリプロキシフェン	101.6	98.6	101.8	100.9	99.2	99.9	99.8	99.9	100.6	102.9
ピリベンカルブ	97.6	100.7	99.0	101.4	99.3	100.4	99.5	100.6	94.6	98.0
ピリベンカルブ代謝物	98.0	98.7	97.6	98.7	98.6	99.0	98.5	99.8	92.0	95.8
フェントエート	100.5	97.5	95.3	100.2	97.1	98.3	99.7	96.6	93.2	92.0
フェンピロキシメート	102.6	99.7	104.7	102.0	102.2	99.5	101.8	100.2	83.8	83.1
フェンブコナゾール	99.3	100.4	99.7	25.7	90.7	100.8	97.9	97.0	91.0	85.7
フェンプロパトリン	101.0	101.4	105.9	97.9	99.0	98.3	97.4	101.5	89.2	98.4
ブプロフェジン	100.4	98.0	102.2	99.9	98.5	99.3	99.0	101.4	98.9	87.2
フルアジナム	99.3	0.0	99.9	98.4	96.5	102.2	100.3	102.5	46.2	70.1
フルバリネート	105.0	99.4	104.9	99.1	104.2	93.4	103.1	103.6	25.3	63.7
フルフェノクスロン	103.9	99.7	107.8	99.9	97.5	97.8	103.2	102.0	87.7	85.3
フルベンジアミド	100.8	99.6	98.6	101.1	100.1	101.1	98.3	95.9	94.0	95.8

プロパルギット	100.2	101.9	100.7	98.5	101.4	94.7	98.4	101.0	113.6	95.5
プロフェノホス	101.4	96.8	104.0	99.5	98.3	100.8	99.9	101.7	86.1	89.1
ボスカリド	98.8	104.1	101.5	104.2	98.7	98.9	98.8	98.5	93.0	91.9
ミクロブタニル	99.3	100.8	100.2	77.2	97.7	101.4	99.8	100.5	94.1	95.2
メチダチオン	96.7	97.4	98.9	100.0	99.0	100.6	100.1	99.4	90.9	92.7
メトキシフェンジド	99.7	100.8	100.8	102.8	97.5	99.9	99.8	99.7	93.7	90.9
ルフェヌロン	98.7	97.1	109.5	91.6	110.0	100.8	94.4	95.8	94.7	95.2

表 8. 各農薬の検量線，検出限界および定量限界

農薬名	直線性の範囲 ($\mu\text{g/mL}$)	相関係数 (r)	検出限界 (mg/kg)	定量限界 (mg/kg)	(参考) 基準値 (mg/kg)
アクリナトリン	0.002-0.1	0.9991	0.0097	0.0324	10
アセタミプリド	0.0002-0.1	0.9998	0.0009	0.0030	30
アゾキシストロビン	0.0002-0.1	0.9992	0.0004	0.0013	10
イソキサチオン	0.0002-0.1	0.9998	0.0003	0.0011	0.5
イミダクロプリド	0.0002-0.1	0.9999	0.0012	0.0041	10
エチプロール	0.0002-0.1	0.9989	0.0024	0.0081	10
エトキサゾール	0.0002-0.1	0.9995	0.0009	0.0030	15
エトフェンブロックス	0.0002-0.1	0.9997	0.0041	0.0135	10
クレソキシムメチル	0.0002-0.1	0.9999	0.0018	0.0059	15
クロチアニジン	0.0002-0.1	0.9997	0.0017	0.0058	50
クロマフェンジド	0.0002-0.1	0.9982	0.0003	0.0010	20
クロラントラニリプロール	0.0002-0.1	0.9994	0.0004	0.0014	50
クオルピリホス	0.002-0.1	0.9998	0.0035	0.0118	10
クオルフェナピル	0.002-0.1	0.9999	0.0374	0.1246	40
シアントラニリプロール	0.002-0.1	1.0000	0.0012	0.0041	30
ジウロン	0.0002-0.1	1.0000	0.0021	0.0070	1
ジエトフェンカルブ	0.0002-0.1	0.9999	0.0008	0.0028	5
シエノピラフェン	0.0002-0.1	0.9998	0.0022	0.0073	60
ジフェノコナゾール	0.0002-0.1	0.9996	0.0003	0.0010	15
ジフルベンズロン	0.0002-0.1	0.9996	0.0008	0.0025	20
シメコナゾール	0.0002-0.1	0.9989	0.0016	0.0054	10
シラフルオフエン	0.0002-0.1	0.9997	0.0003	0.0011	80
スピノシン A	0.0002-0.1	0.9996	0.0004	0.0015	9
スピノシン D	0.0002-0.1	0.9996	0.0009	0.0031	9
ダイアジノン	0.0002-0.1	0.9998	0.0011	0.0038	0.1
チアクロプリド	0.0002-0.1	0.9999	0.0005	0.0017	25
テトラコナゾール	0.0002-0.1	0.9990	0.0004	0.0015	20
テブコナゾール	0.0002-0.1	1.0000	0.0006	0.0020	80
テブフェンジド	0.0002-0.1	0.9992	0.0011	0.0037	25
テブフェンピラド	0.0002-0.1	0.9995	0.0008	0.0028	2
テフルベンズロン	0.002-0.1	0.9999	0.0016	0.0053	20
トリフルミゾール	0.0002-0.1	0.9996	0.0006	0.0020	15

トリフルミゾール代謝物	0.0002-0.1	0.9992	0.0015	0.0051	15
トリフロキシストロビン	0.0002-0.1	0.9992	0.0004	0.0014	5
トルフェンピラド	0.0002-0.1	0.9996	0.0009	0.0031	30
ビフェントリン	0.0002-0.1	0.9993	0.0032	0.0108	30
ピラクロストロビン	0.0002-0.1	0.9996	0.0002	0.0005	25
ピラフルフェンエチル	0.0002-0.1	0.9990	0.0017	0.0057	0.05
ピリダベン	0.0002-0.1	0.9998	0.0007	0.0023	10
ピリプロキシフェン	0.0002-0.1	0.9997	0.0002	0.0007	15
ピリベンカルブ	0.0002-0.1	0.9993	0.0003	0.0010	40
ピリベンカルブ代謝物	0.0002-0.1	0.9995	0.0022	0.0072	40
フェントエート	0.0002-0.1	0.9998	0.0022	0.0072	0.02
フェンピロキシメート	0.0002-0.1	0.9996	0.0006	0.0020	40
フェンブコナゾール	0.0002-0.1	0.9997	0.0003	0.0009	30
フェンプロパトリン	0.0002-0.1	0.9996	0.0008	0.0026	25
ブプロフェジン	0.0002-0.1	0.9999	0.0029	0.0098	30
フルアジナム	0.002-0.1	1.0000	0.0052	0.0172	6
フルバリネート	0.002-0.1	0.9997	0.0041	0.0138	10
フルフェノクスロン	0.0002-0.1	0.9994	0.0003	0.0011	15
フルベンジアミド	0.0002-0.1	0.9994	0.0002	0.0006	50
プロバルギット	0.0002-0.1	1.0000	0.0008	0.0028	5
プロフェノホス	0.0002-0.1	1.0000	0.0008	0.0026	0.2
ボスカリド	0.0002-0.1	1.0000	0.0013	0.0043	60
ミクロブタニル	0.0002-0.1	0.9992	0.0007	0.0024	20
メチダチオン	0.0002-0.1	0.9994	0.0019	0.0062	1
メトキシフェノジド	0.0002-0.1	0.9996	0.0006	0.0020	40
ルフェヌロン	0.002-0.1	0.9998	0.0092	0.0307	10

表 9. 各農薬の回収率, 併行精度および室内精度

農薬名	回収率(%) n=10		併行精度 RSD(%)		室内精度 RSD(%)	
	低濃度	高濃度	低濃度	高濃度	低濃度	高濃度
アクリナトリン	85.3	81.0	6.1	8.1	10.6	9.3
アセタミプリド	94.6	90.5	7.1	2.7	7.1	5.3
アゾキシストロビン	90.1	88.8	7.1	5.3	7.1	6.6
イソキサチオン	95.0	89.8	8.3	4.2	8.3	4.9
イミダクロプリド	99.0	90.5	8.5	4.1	11.0	8.9
エチプロール	86.7	88.1	14.1	6.9	14.1	7.3
エトキサゾール	93.7	89.2	5.9	5.0	6.3	5.4
エトフェンプロックス	91.2	86.2	4.5	6.9	4.5	7.8
クレソキシムメチル	101.7	91.2	12.1	4.2	12.1	4.2
クロチアニジン	82.4	83.8	10.4	2.0	10.4	5.0
クロマフェノジド	91.4	92.4	3.7	3.7	9.3	6.4
クロラントラニリプロール	99.9	102.0	8.0	5.3	10.3	7.1
クロルピリホス	88.9	81.8	8.4	6.4	11.4	8.8

クロルフェナビル	94.0	85.2	9.9	7.3	9.9	7.8
シアントラニリプロール	98.6	89.9	6.8	5.4	10.9	8.2
ジウロン	94.0	90.8	4.6	3.4	8.8	3.7
ジエトフェンカルブ	95.5	89.9	4.8	3.4	10.9	3.9
シエノピラフェン	88.4	104.5	11.0	3.9	12.3	7.4
ジフェノコナゾール	92.7	88.6	7.3	4.0	10.7	5.4
ジフルベンズロン	96.1	83.3	10.2	6.5	13.0	7.7
シメコナゾール	95.8	91.3	7.7	4.7	9.4	6.0
シラフルオフェン	82.5	75.0	9.1	6.9	11.2	6.9
スピノシン A	88.7	83.3	4.8	5.6	6.2	7.7
スピノシン D	79.1	80.9	5.8	5.3	6.1	8.2
ダイアジノン	99.0	80.8	10.0	6.2	14.2	6.2
チアクロプリド	97.4	90.1	2.3	2.9	6.9	5.8
テトラコナゾール	92.0	92.0	5.3	4.3	6.3	5.3
テブコナゾール	112.8	91.8	5.7	4.3	5.7	5.2
テブフェノジド	92.6	94.0	11.9	6.3	11.9	8.8
テブフェンピラド	93.1	89.2	10.5	4.3	10.5	4.4
テフルベンズロン	96.2	97.8	4.7	7.5	7.7	7.5
トリフルミゾール	91.3	85.2	4.3	4.8	11.2	5.2
トリフルミゾール代謝物	97.2	89.4	13.3	4.4	13.3	5.9
トリフロキシストロビン	91.7	90.7	6.7	4.0	6.7	5.4
トルフェンピラド	89.9	89.4	13.0	5.0	13.0	5.0
ビフェントリン	91.7	80.8	7.9	2.9	8.2	6.0
ピラクロストロビン	83.6	89.4	12.4	4.4	12.4	5.1
ピラフルフェンエチル	97.9	90.1	12.1	4.3	12.1	4.3
ピリダベン	87.1	85.1	5.6	2.3	7.7	4.9
ピリプロキシフェン	96.9	89.4	10.3	4.9	10.3	5.0
ピリベンカルブ	85.8	90.7	10.4	3.7	10.4	5.7
ピリベンカルブ代謝物	94.9	89.0	10.5	3.1	11.3	4.8
フェントエート	97.3	89.5	8.9	4.5	8.9	5.7
フェンピロキシメート	88.5	85.8	13.3	5.9	13.3	6.2
フェンブコナゾール	90.9	89.6	12.5	2.6	12.7	5.0
フェンプロパトリン	97.1	89.4	11.6	7.1	11.9	7.7
ブプロフェジン	103.7	89.5	6.2	4.5	6.2	4.9
フルアジナム	65.5	68.9	7.8	18.4	17.6	18.4
フルバリネート	73.1	68.1	7.0	10.8	15.2	13.2
フルフェノクスロン	101.4	88.2	5.3	6.6	7.8	7.5
フルベンジアミド	93.9	90.9	10.6	5.0	11.6	6.4
プロパルギット	86.0	89.2	10.1	5.6	11.9	6.0
プロフェノホス	97.4	88.7	13.6	4.3	13.6	4.3
ボスカリド	98.4	90.1	6.0	5.5	9.2	5.5

ミクロブタニル	93.6	91.4	14.2	4.5	14.2	5.0
メチダチオン	101.6	91.1	4.7	5.8	8.2	6.1
メトキシフェノジド	105.4	89.6	10.6	5.2	10.6	5.8
ルフエヌロン	86.0	91.6	9.5	4.3	11.1	6.2

10. まとめ

通知一斉試験法を改良し、茶を対象として LC-MS/MS による残留農薬一斉試験法を開発した。試料を水で膨潤後、アセトニトリル抽出および塩析を行い、GC/NH₂ およびシリカゲルミニカラムで精製し、希釈の効果を用いた試験溶液をより高速かつ高分解能な UHPLC 条件の LC-MS/MS で分析する方法である。希釈の効果およびミニカラムの変更等により、夾雑成分を低減させ、LC-MS/MS への悪影響を回避するとともに、分析対象農薬の同時分析および拡大を図った。国内で茶の栽培に使用することができる農薬のうち、通知一斉試験法で分析できる可能性がある 56 農薬を対象とし、予備試験の結果により、回収率が低かったチアメトキサムを除く 55 農薬を妥当性評価の対象農薬とした。ガイドラインに基づき試験法の妥当性評価を行ったところ、フルアジナムおよびフルバリネートを除く 53 農薬について、妥当性評価のパラメータが目標値等に適合した。

以上の結果から、53 農薬について改良した一斉試験法による分析が可能であることが確認された。(表 10)

応答集 (Q&A) について、平成 23 年 12 月 8 日付け食安基発 1208 第 1 号。

- 4) 坂部亮介, 篠田隆祥, 友成真菜, 岸田繁二, 小塚健志, 塚田政範, 野村哲也, 竹村浩一: LC-MS/MS を用いたきゅうり中の残留農薬一斉試験法の妥当性評価, 農薬研究報告, 第 13 号, 49-54(2020).
- 5) 文部科学省, 食品成分データベース, <https://fooddb.mext.go.jp/>.
- 6) 岩屋あまね, 下堂菌栄子, 福司山郁恵, 榎元清美, 佐久間弘匡: 茶の残留農薬一斉分析における精製法の検討, 鹿児島県環境保健センター所報, 第 11 号, 102-108(2010).
- 7) 山口玲子: ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた茶の残留農薬一斉分析法の検討と妥当性評価, 千葉市環境保健研究所年報, 第 21 号, 51-56(2014).
- 8) 齊藤静夏, 根本了, 松田りえ子: LC-MS/MS による緑茶中の残留農薬一斉試験法, 日本食品化学学会誌, Vol.19(2), 104-110(2012).

参考文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知: 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 日付け食安発第 0124001 号.
- 2) 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の一部改正について, 平成 22 年 12 月 24 日付け食安発 1224 第 1 号.
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長通知: 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関する質疑

表 10. 結果のまとめ

農薬名	選択性	真度	精度 (併行)	精度 (室内)	定量 限界	判定
アクリナトリン	○	○	○	○	○	○
アセタミプリド	○	○	○	○	○	○
アゾキシストロビン	○	○	○	○	○	○
イソキサチオン	○	○	○	○	○	○
イミダクロプリド	○	○	○	○	○	○
エチプロール	○	○	○	○	○	○
エトキサゾール	○	○	○	○	○	○
エトフェンブロックス	○	○	○	○	○	○
クレソキシムメチル	○	○	○	○	○	○
クロチアニジン	○	○	○	○	○	○
クロマフェノジド	○	○	○	○	○	○
クロラントラニリプロール	○	○	○	○	○	○
クオルピリホス	○	○	○	○	○	○
クオルフェナピル	○	○	○	○	○	○
シアントラニリプロール	○	○	○	○	○	○
ジウロン	○	○	○	○	○	○
ジエトフェンカルブ	○	○	○	○	○	○
シエノピラフェン	○	○	○	○	○	○
ジフェノコナゾール	○	○	○	○	○	○
ジフルベンズロン	○	○	○	○	○	○
シメコナゾール	○	○	○	○	○	○
シラフルオフェン	○	○	○	○	○	○
スピノシン A	○	○	○	○	○	○
スピノシン D	○	○	○	○	○	○
ダイアジノン	○	○	○	○	○	○
チアクロプリド	○	○	○	○	○	○
テトラコナゾール	○	○	○	○	○	○
テブコナゾール	○	○	○	○	○	○
テブフェノジド	○	○	○	○	○	○
テブフェンピラド	○	○	○	○	○	○
テフルベンズロン	○	○	○	○	○	○
トリフルミゾール	○	○	○	○	○	○
トリフルミゾール代謝物	○	○	○	○	○	○
トリフロキシストロビン	○	○	○	○	○	○
トルフェンピラド	○	○	○	○	○	○
ビフェントリン	○	○	○	○	○	○
ピラクロストロビン	○	○	○	○	○	○
ピラフルフェンエチル	○	○	○	○	○	○

ピリダベン	○	○	○	○	○	○
ピリプロキシフェン	○	○	○	○	○	○
ピリベンカルブ	○	○	○	○	○	○
ピリベンカルブ代謝物	○	○	○	○	○	○
フェントエート	○	○	○	○	○	○
フェンピロキシメート	○	○	○	○	○	○
フェンブコナゾール	○	○	○	○	○	○
フェンプロバトリン	○	○	○	○	○	○
ブプロフェジン	○	○	○	○	○	○
フルアジナム	○	×	×	×	○	×
フルバリネート	○	×	×	○	○	×
フルフェノクスロン	○	○	○	○	○	○
フルベンジアミド	○	○	○	○	○	○
プロパルギット	○	○	○	○	○	○
プロフェノホス	○	○	○	○	○	○
ボスカリド	○	○	○	○	○	○
マイクロブタニル	○	○	○	○	○	○
メチダチオン	○	○	○	○	○	○
メトキシフェノジド	○	○	○	○	○	○
ルフェヌロン	○	○	○	○	○	○

残留農薬分析業務における分析法の検討

LC-MS/MS を用いたなす中の残留農薬一斉試験法

坂部亮介*¹，末永和也*¹，友成真菜*¹，岸田繁二*²

大原 望*²，塚田政範*³，野村哲也*³

*¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター農薬検査部

*² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター横浜事務所

*³ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（LC-MS/MS）を用いたなす中の残留農薬一斉試験法について、7 農薬を対象とし、厚生労働省通知の「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、3 試験室において妥当性評価を行った。その結果、5 農薬については、全ての試験室において、妥当性評価の性能パラメータがガイドラインに示された目標値に適合していた。

Keywords：残留農薬，なす，妥当性評価，液体クロマトグラフタンデム型質量分析計

結 言

独立行政法人農林水産消費安全技術センター農薬実態調査課（以下、センター）では、農林水産省の指示に基づき、国内産農産物における農薬の使用状況および残留状況について調査を行っている。農産物に使用される農薬は、作物や栽培地域によって異なることから、調査においては、農薬を効率よく分析することが重要である。

令和 4 年度に予定されている「なす」の調査において調査対象農薬の拡大と分析の効率化を図るため、センターの分析対象としていない 7 農薬（以下、新規対象農薬）について、厚生労働省通知¹⁾の「GC/MS・LC/MS による農薬等の一斉試験法（野菜・果実類）」（以下、一斉法）に基づき検討を行った。

試験法については、抽出および精製は一斉法に準じ、測定は LC-MS/MS に変更した。

妥当性は「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」^{2,3)}（以下、ガイドライン）に基づき、試験室毎に評価した。

材料および方法

1. 試験室

以下の 3 試験室で実施した。

- ・農薬検査部農薬実態調査課（以下、小平）
- ・横浜事務所農薬実態調査課（以下、横浜）
- ・神戸センター農薬実態調査課（以下、神戸）

2. 新規対象農薬

なすに使用されている農薬を事前調査し、使用実績のある次の 7 農薬を対象とした。

イソピラザム，シフルメトフェン，ピリベンカルブ，フェンピラザミン，フルチアニル，ミルベメクチン，メタフルミゾン

3. 試料および添加濃度

3.1. 試料

新規対象農薬が検出されないことを確認した国産なす（以下、ブランク試料）を用い、小平にて粉碎した試料を各試験室で使用した。

3.2. 添加濃度

新規対象農薬の中で最も低いフルチアニルおよびミルベメクチンの基準値に相当する 0.2 mg/kg（以下、高濃度）およびその 10 分の 1 にあたる 0.02 mg/kg（以下、低濃度）の 2 濃度とした。

4. 試薬および器具

4.1. 標準品

農薬標準品：イソピラザム（syn 体および anti 体の混合物），ピリベンカルブ，ピリベンカルブ代謝物 B，ミルベメクチン A3 およびミルベメクチン A4 は林純薬工業株式会社，シフルメトフェン，フェンピラザミン，フルチアニル，メタフルミゾン(E)，メタフルミゾン(Z)およびメタフルミゾン代謝物は富士フィルム和光純薬株式会社製

の粉末標準品をそれぞれ使用した。

混合標準液: イソピラザムおよびフェンピラザミンをアセトン, その他の粉末標準品をアセトニトリルにそれぞれ溶解して 500 µg/mL の標準溶液を調製後, これらを混合し, 20 µg/mL となるようアセトニトリルで希釈した。

添加回収試験用標準液および検量線用標準液: 混合標準液をアセトニトリルで適宜希釈して調製した。

4.2. 試薬

アセトニトリル(残留農薬試験用および液体クロマトグラフ質量分析計(LC/MS)用), アセトン(残留農薬試験用), トルエン(残留農薬試験用), n-ヘキサン(残留農薬試験用), メタノール(液体クロマトグラフ質量分析計(LC/MS)用), 塩化ナトリウム(残留農薬試験用), リン酸水素二カリウム(特級), リン酸二水素カリウム(特級), 無水硫酸ナトリウム(残留農薬試験用), 酢酸アンモニウム溶液(高速液体クロマトグラフィー(HPLC)用)およびケイソウ土(セライト545)を使用した。水は超純水製造装置(Merck Millipore製)で製造した超純水または超純水(LC/MS用)を使用した。

4.3. 調製試薬

0.5 mol/L リン酸緩衝液(pH 7.0): リン酸水素二カリウム 52.7 g およびリン酸二水素カリウム 30.2 g を量り採り, 水約 500 mL に溶解し, 1 mol/L 水酸化ナトリウムまたは 1 mol/L 塩酸を用いて pH 7.0 に調製した後, 水を加えて 1 L とした。

4.4. ろ紙

桐山ロート用ろ紙 No.5A-60

4.5. 固相抽出ミニカラム

グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム(以下, グラファイトカーボンミニカラム)は, Sigma-Aldrich 製 ENVI-Carb/LC-NH2 (500 mg/500 mg) をアセトニトリル・トルエン (3:1) 10 mL でコンディショニングしたものを用いた。

5. 装置

5.1. ホモジナイザー

日本精機製作所製 エースホモジナイザー

5.2. 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計

LC 部: Waters 製 ACQUITY UPLC System (小平, 神戸, 横浜)

MS 部: Waters 製 Premier XE (小平, 神戸)
: Waters 製 ACQUITY TQD (横浜)

6. 前処理方法

6.1. 抽出

図1の分析法フローチャートに従い, 試料から農薬をアセトニトリルで抽出し, 抽出液に塩化ナトリウムおよび 0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH7.0) を加えて振とうしたのち, 水層を分離除去した。

添加回収試験は, ホモジナイザー用容器に採取した試料に添加回収試験用標準液を添加し 30 分放置した後抽出を開始した。

6.2. 精製

無水硫酸ナトリウムを用いて脱水したアセトニトリル層をグラファイトカーボンミニカラムで精製し, アセトン・n-ヘキサン (1:1) 混液に溶解したものを試験溶液とした。

6.3. LC-MS/MS 測定用試験溶液

試験溶液 0.125 mL から溶媒を除去し, 残留物をアセトニトリルで 5 mL としたものを LC-MS/MS 測定用試験溶液とした。

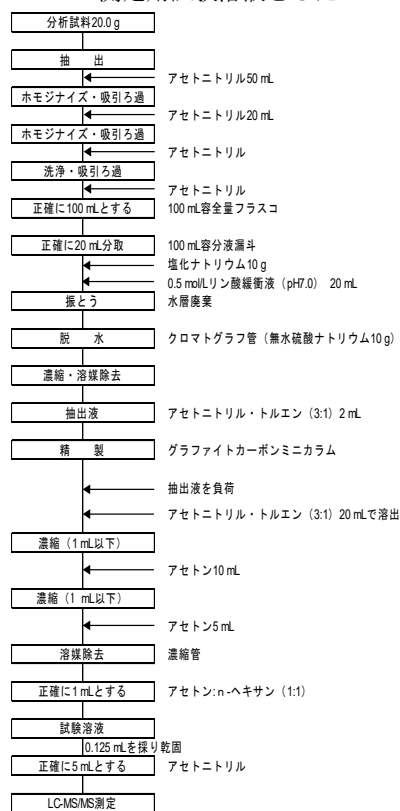


図1. LC-MS/MSによる一斉試験法(野菜・果実類)フローチャート

7. 測定条件

LC-MS/MS による測定イオンおよび測定条件は、表 1 から表 3 のとおりとした。

表 1. LC-MS/MS 測定イオン

農薬名	測定モード	モニターイオン	モニターイオン
		(定量) m/z	(定性) m/z
イソピラザム	+	360 > 340 (小平・神戸) 360 > 244 (横浜)	360 > 320
シフルメトフェン	+	465 > 173	465 > 249
ピリベンカルブ	+	362 > 207	362 > 239
ピリベンカルブ代謝物	+	362 > 207	362 > 239
フェンピラザミン	+	332 > 230	332 > 189
フルチアニル	+	427 > 411 (小平・神戸) 427 > 192 (横浜)	427 > 192 (小平・神戸) 427 > 132 (横浜)
ミルベメクチン A3	+	546 > 511	511 > 113 (小平・神戸) 546 > 113 (横浜)
ミルベメクチン A4	+	560 > 525	525 > 109 (小平・神戸) 560 > 507 (横浜)
メタフルミゾン (E)	-	505 > 302	505 > 117 (小平・神戸) 505 > 285 (横浜)
メタフルミゾン (Z)	-	505 > 302	505 > 117 (小平・神戸) 505 > 285 (横浜)
メタフルミゾン代謝物	-	288 > 142	288 > 145 (小平・神戸) 288 > 273 (横浜)

表 2. LC-MS/MS 測定条件

LC部	: Waters製 ACQUITY UPLC System
MS部	: Waters製 Premier XE (神戸), ACQUITY TQD (小平, 横浜)
カラム	: Wako製 Wakopak Ultra C18-2 内径 2.1 mm, 長さ100 mm, 2 μm
流量	: 0.2 mL/min (小平, 横浜) 0.353 mL/min (神戸)
カラム温度	: 40 °C
注入量	: 2 μL
移動相 A液	: 5 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液
B液	: 5 mmol/L 酢酸アンモニウムメタノール 溶液 (グラジエント条件: 表3)
イオン化法	: エレクトロスプレーイオン化法 (ESI +)
測定法	: 多重反応モニタリング法 (MRM)
イオン源温度	: 120 °C
脱溶媒ガス温度	: 250 °C
脱溶媒ガス流量	: 900 L/hr

表 3. グラジエント条件

	時間 (min)	A液:B液	→	A液:B液
		(比)		(比)
小平 横浜	0 ~ 0.51	85:15	→	60:40
	~ 2.17			60:40
	~ 3.85	60:40	→	50:50
	~ 5.17	50:50	→	45:55
	~ 11.51	45:55	→	5:95
神戸	~ 17.65			5:95
	0 ~ 0.29	85:15	→	60:40
	~ 1.23			60:40
	~ 2.18	60:40	→	50:50
	~ 2.93	50:50	→	45:55
	~ 6.52	45:55	→	5:95
	~ 8.52			5:95

8. 妥当性評価

8.1. 枝分かれ試験

ガイドラインに示された実験例に基づき、各試験室において低濃度および高濃度の添加回収試験をそれぞれ 2 併行で、異なる実施日または実施者で 5 回繰り返した。

8.2. 選択性の確認

ブランク試料を 6. 前処理方法に従って調製した試験溶液 (以下、ブランク試料溶液) について、LC-MS/MS で測定し、新規対象農薬の定量を妨害するピークの有無を確認した。

8.3. 検量線の直線性の確認

新規対象農薬を混合した検量線用標準溶液 (0.0005, 0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05 および 0.1 μg/mL) を LC-MS/MS に注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積から検量線を作成した。各対象農薬の検量線について、相関係数 (r) が 0.995 以上であることをもって、検量線の直線性を確認した。

8.4. 検出限界および定量限界の確認

定量限界の目標値を 0.02 mg/kg (新規対象農薬の中で最も低いフルチアニルおよびミルベメクチンの基準値 0.2ppm の 10 分の 1 に相当)、検出限界の目標値を 0.01 mg/kg とした。

各試験室において、標準溶液を測定して得られたピークの高さ (S) とピーク近傍のノイズ (N) の高さから S/N 比 3 相当および 10 相当の濃度を求め、試料中濃度換算したものをそれぞれ検出限界および定量限界とした。

8.5. 真度および精度の確認

ガイドラインに従い、低濃度は真度 (回収率) が 70~120 %, 併行精度が 15 %未満、室内精度が 20 %未満、高濃度は真度が 70~120 %, 併行精度が 10 %未満、室内精度が 15 %未満を目標値

(表 4 参照) とした。

表 4. ガイドラインに示された真度および精度の目標値

濃度 (ppm)	真度 (%)	併行精度 (RSD %)	室内精度 (RSD %)
≤0.001	70~120	30>	35>
0.001< ~ ≤0.01	70~120	25>	30>
0.01 < ~ ≤0.1	70~120	15>	20>
0.1 <	70~120	10>	15>

結果および考察

9. 妥当性評価結果

新規対象農薬について、ガイドラインに定められた選択性、検量線の直線性、検出限界および定量限界に加え、真度および精度の評価を行った。

9.1. 選択性

ブランク試料の分析を行ったところ、いずれの新規対象農薬においても定量の妨害となるピークは認められず、選択性に問題がないことを確認した。

9.2. 検量線の直線性

各試験室で作成した検量線の相関係数 (r) は表 5 に示すとおりであり、全ての新規対象農薬について、0.0005~0.1 μg/mL の範囲で直線性 (相関係数 (r) が 0.995 以上) が確認された。

9.3. 検出限界および定量限界

各試験室の検出限界および定量限界の結果を表 6 に示した。新規対象農薬について、目標値を満たしていたことから、検出限界を 0.01 mg/kg、定量限界を 0.02 mg/kg とした。

9.4. 真度および精度

新規対象農薬について、各試験室の真度 (回収率) の平均値および精度 (併行精度および室内精度) の結果を表 7 に示した。シフルメトフェン及びメタフルミゾンを除く 5 種の新規対象農薬については、ガイドラインに示された真度及び精度の目標値を満たした。

9.5. 室間再現性 (参考)

新規対象農薬について、全ての結果 (3 試験室それぞれにおいて 1 回当たり 2 併行、異なる実施日または異なる実施者で 5 回繰り返し戻しの枝分かれ試験) から求めた真度 (回収率) および精度 (併行精度および室間精度) を表 8 に示した。この結果についてもシフルメトフェン及びメタフルミゾンを除く 5 種の新規対象農薬でガイドラインの目標値 (表 4) を満たした。

表 5. 直線性の範囲と相関係数

農薬名	直線性の範囲 (μg/mL)	相関係数 (r)		
		小平	横浜	神戸
イソピラザム	0.0005-0.1	0.9992	0.9997	1.0000
シフルメトフェン	0.0005-0.1	0.9988	0.9998	0.9997
ピリベンカルブ	0.0005-0.1	0.9999	0.9999	0.9999
ピリベンカルブ代謝物	0.0005-0.1	0.9999	1.0000	0.9999
フェンピラザミン	0.0005-0.1	0.9991	0.9997	1.0000
フルチアニル	0.0005-0.1	0.9996	1.0000	0.9998
ミルベメクチン A3	0.0005-0.1	0.9992	0.9999	0.9994
ミルベメクチン A4	0.0005-0.1	0.9992	0.9999	0.9996
メタフルミゾン (E)	0.0005-0.1	0.9990	0.9990	0.9994
メタフルミゾン (Z)	0.0005-0.1	0.9999	0.9999	1.0000
メタフルミゾン代謝物	0.0005-0.1	0.9984	0.9997	0.9999

表 6. 検出限界および定量限界

農薬名 (目標値)	検出限界 (mg/kg)			定量限界 (mg/kg)		
	小平	横浜	神戸	小平	横浜	神戸
イソピラザム	0.00023	0.00032	0.00019	0.00075	0.00105	0.00063
シフルメトフェン	0.00013	0.00013	0.00008	0.00044	0.00043	0.00028
ピリベンカルブ	0.00030	0.00011	0.00025	0.00101	0.00036	0.00084
ピリベンカルブ代謝物	0.00067	0.00025	0.00054	0.00224	0.00084	0.00182
フェンピラザミン	0.00037	0.00022	0.00019	0.00123	0.00072	0.00063
フルチアニル	0.00142	0.00029	0.00063	0.00473	0.00095	0.00210
ミルベメクチン A3	0.00238	0.00094	0.00166	0.00792	0.00313	0.00553
ミルベメクチン A4	0.00131	0.00083	0.00133	0.00435	0.00278	0.00445
メタフルミゾン (E)	0.00033	0.00022	0.00021	0.00110	0.00074	0.00070
メタフルミゾン (Z)	0.00025	0.00012	0.00021	0.00083	0.00041	0.00071
メタフルミゾン代謝物	0.00085	0.00024	0.00079	0.00284	0.00080	0.00263

表 7. 新規対象農薬の回収率, 併行精度および室内精度

農薬名		回収率 (%) n=10		併行精度 RSD (%)		室内精度 RSD (%)	
		低濃度	高濃度	低濃度	高濃度	低濃度	高濃度
イソピラザム	小平	96.9	96.1	3.3	3.2	3.6	4.8
	横浜	98.8	98.7	3.3	1.7	5.6	2.1
	神戸	95.7	97.2	3.0	2.6	6.9	2.9
シフルメトフェン	小平	25.1	30.9	22.3	31.5	66.0	37.6
	横浜	86.0	90.0	3.4	7.0	7.5	12.3
	神戸	89.5	103.3	5.6	3.2	13.7	12.2
ピリベンカルブ	小平	101.1	97.3	3.1	3.8	4.8	4.6
	横浜	101.8	102.5	2.0	1.3	3.9	3.2
	神戸	94.3	94.2	3.9	1.5	6.5	3.6
ピリベンカルブ代謝物	小平	94.0	96.8	3.8	4.3	4.2	4.3
	横浜	104.0	100.0	6.8	1.6	6.8	2.1
	神戸	92.2	95.3	3.5	2.8	5.4	4.1
フェンピラザミン	小平	97.3	93.5	4.1	3.6	4.1	4.6
	横浜	95.7	101.8	2.1	2.0	4.6	2.3
	神戸	95.0	96.1	3.4	1.3	6.4	3.7
フルチアニル	小平	96.0	95.3	3.1	3.5	4.4	4.8
	横浜	103.2	98.3	3.2	1.0	3.9	2.5
	神戸	93.0	96.2	2.9	1.9	2.9	4.0
ミルベメクチン A3	小平	93.4	95.4	5.0	4.4	5.0	4.9
	横浜	98.1	96.9	7.9	3.1	9.2	4.9
	神戸	91.1	94.5	6.4	2.4	8.0	3.1
ミルベメクチン A4	小平	93.8	94.7	3.3	3.9	3.9	4.3
	横浜	95.2	100.2	5.0	2.4	5.6	2.8
	神戸	92.9	93.6	5.4	3.4	5.4	6.1
メタフルミゾン (E)	小平	91.3	91.9	6.7	1.0	11.2	8.0
	横浜	97.6	98.3	6.9	2.1	6.9	3.0
	神戸	95.2	97.0	3.7	3.3	5.7	4.4

メタフルミゾン(Z)	小平	93.7	94.3	2.2	2.5	5.1	3.2
	横浜	98.2	96.7	3.0	0.9	3.1	2.8
	神戸	92.0	98.0	5.3	2.8	7.3	4.8
メタフルミゾン代謝物	小平	21.5	32.0	55.2	28.7	55.2	28.7
	横浜	89.1	73.7	15.2	16.7	15.2	16.7
	神戸	74.2	82.1	10.2	6.3	15.0	11.0

※表4の目標値を満たさなかった数値を網掛け

表8. 3試験室の回収率, 併行精度および室間精度

農薬名	回収率(%) n=30		併行精度 RSD(%)		室間精度 RSD(%)	
	低濃度	高濃度	低濃度	高濃度	低濃度	高濃度
イソピラザム	97.1	97.3	3.2	2.6	5.3	3.4
シフルメトフェン	66.9	74.7	6.9	9.3	48.9	46.0
ピリベンカルブ	99.1	98.0	3.0	2.4	5.9	5.1
ピリベンカルブ代謝物	96.8	97.3	5.1	3.1	7.3	3.8
フェンピラザミン	96.0	97.1	3.3	2.5	4.9	5.0
フルチアニル	97.4	96.6	3.1	2.4	5.8	3.9
ミルベメクチン A3	94.2	95.6	6.6	3.4	7.9	4.3
ミルベメクチン A4	94.0	96.2	4.7	3.2	4.7	5.3
メタフルミゾン(E)	94.7	95.7	6.0	2.4	8.0	5.9
メタフルミゾン(Z)	94.6	96.3	3.7	2.2	5.8	3.9
メタフルミゾン代謝物	61.6	62.6	18.3	15.0	51.5	39.0

※表4の目標値を満たさなかった数値を網掛け

10. まとめ

新規対象農薬7種類について, LC-MS/MS測定によるなすの一斉法妥当性評価を行った。この結果, シフルメトフェンおよびメタフルミゾンを除くイソピラザム、ピリベンカルブ、フェンピラザミン、フルチアニルおよびミルベメクチンの5種の農薬は, 全ての試験室で妥当性評価のパラメータがガイドラインの目標値に適合した。シフルメトフェンは塩基性において分解することが報告されており⁵⁾, 抽出工程における分解等の影響が考えられるが, 回収率が低かった原因の解明には至っていない。

これらの結果から, 5農薬についてなすの一斉法による分析が可能であることが確認された。(表9)

なお, メタフルミゾンは, 令和4年12月17日以降, メタフルミゾン代謝物が規制対象から除外されるため, その日以降は, なすの一斉法による分析が可能である。

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知: 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日付け食安発第0124001号。
- 2) 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の一部改正について, 平成22年12月24日付け食安発1224第1号。
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長通知: 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関する質疑応答集(Q&A)について, 平成23年12月8日付け食安基発1208第1号。
- 4) JIS K 0136: 2015, 高速液体クロマトグラフィー質量分析通則。
- 5) 内閣府食品安全委員会委員長通知: 農薬評価書シフルメトフェン(第6版), 令和2年8月4日付け府食第537号。

<https://www.fsc.go.jp/fsciis/evaluationDocument/show/kya20200611081> (令和4年8月時点)

参考文献

表 9. 結果のまとめ

農薬名	選択性	真度	精度 (併行)	精度 (室内)	定量 限界	判定
イソピラザム	○	○	○	○	○	○
シフルメトフェン	○	×	×	×	○	×
ピリベンカルブ	○	○	○	○	○	○
ピリベンカルブ代謝物	○	○	○	○	○	
フェンピラザミン	○	○	○	○	○	○
フルチアニル	○	○	○	○	○	○
ミルベメクチン A3	○	○	○	○	○	○
ミルベメクチン A4	○	○	○	○	○	
メタフルミゾン(E)	○	○	○	○	○	×
メタフルミゾン(Z)	○	○	○	○	○	
メタフルミゾン代謝物	○	×	×	×	○	

【資料編】

CIPAC の概要と活動

渡辺高志

独)農林水産消費安全技術センター 農薬検査部

国際農薬分析法協議会 (CIPAC) は、1957 年に設立された欧州農薬分析法委員会を母体として、国際農薬分析法委員会を経て、1971 年に法人化された国際的な非営利・非政府機関であり、公的身分を有する分析化学者 (オフィシャルケミスト) で構成され、農薬の原体および製剤中の有効成分等の分析方法、農薬製剤の物理的・化学的性状の測定方法の標準化を行っている。CIPAC の主な活動は CIPAC 法の設定であり、試験実施者 (主に農薬メーカー) が分析方法を提案し、3~4 ヶ所の試験所が参加する「小規模共同試験」、続いて 8 ヶ所以上の試験所が参加する「大規模共同試験」が実施され、分析方法の性能が評価される。CIPAC 技術会議で承認を受けると、CIPAC 法 (full CIPAC method) となり、ハンドブックに掲載される。物理化学的性状の試験方法も分析方法に準拠して設定される。ハンドブックは、1 巻 (1970 年) から P 巻 (2021 年) までの全 16 巻について、紙版と CD-ROM 版の 2 種が発行されている。このうち、1 巻と 1A 巻は廃刊となっており、この 2 巻に掲載されている試験方法等は、一部が後に出版されたハンドブックに更新された以外は廃止されている。これまでに、有効成分の分析方法が約 590 成分に約 1700 法 (うち約 350 成分の約 990 法が有効)、不純物の分析方法が約 70 成分に約 170 法 (うち約 40 成分の約 80 法が有効)、物理化学的性状の測定方法が約 260 法 (うち約 160 法が有効) 設定され、ハンドブックに掲載されている。

Keywords : CIPAC, 農薬, 製剤, 分析方法, 物理化学的性状, 共同試験

緒 言

国際農薬分析法協議会 (Collaborative International Pesticides Analytical Council Limited : CIPAC) は、1957 年に設立された農薬 (衛生害虫防除資材を含む) の原体および製剤中の有効成分および不純物の分析方法、農薬製剤の物理的・化学的性状の測定方法 (以下、「CIPAC 法」という) の確立を行う国際的な機関である。

CIPAC に対応する国内機関である日本農薬分析法部会 (Japan Pesticides Analytical Council : JAPAC, 1983 年 2 月設立) は、1984 年に「CIPAC と JAPAC」を出版し、CIPAC の必要性・歴史・目的・会員、CIPAC 法の設定手順、CIPAC ハンドブック、JAPAC および我が国における農薬製剤の検査方法と CIPAC 法を解説した¹⁾。ただし、この図書の 3/4 を占める物理的・化学的性状の測定方法は、図書出版後に見直し (IV.4 を参照) を受け、試験方法としては維持されていないため、利用する場合は注意が必要である。一方で、約 40 年前の JAPAC 発足時のことが知れる歴史的な資料としては有用なものと考えられる。

百は、1989 年に「農薬製剤の CIPAC 分析法(1)」を「植物防疫」に掲載し²⁾、CIPAC の歴史と事業を説明した。この記事では、日本から提案した CIPAC 法の概要を説明する内容が主で、続編³⁾と合わせ、11 有効成分の分析方法を紹介している。中島は、1999 年に「国際農薬分析法協議会 (CIPAC)

について」を「食品衛生学雑誌」に掲載した⁴⁾。この記事は、1997 年に日産化学工業 (株) (現在の日産化学 (株)) がピリダベン⁵⁾の分析方法を CIPAC に提案し、承認されるまで流れを紹介したもので、CIPAC と JAPAC、CIPAC 国際標準化の流れ、農薬分析法の国際共同実験、分析法、実験結果の統計処理、国際共同実験結果を説明しており、特に、分析方法、結果の評価および統計処理が詳しく説明されている。

農林水産消費安全技術センター (FAMIC) は JAPAC には参加していたが、CIPAC には参加していなかった。CIPAC 事務局から CIPAC 関連会議の日本開催の要望があり、これを契機に 2012 年から出席し、2013 年には FAMIC 職員がフルメンバー (正会員) となった。FAMIC が CIPAC に初めて出席した CIPAC 関連会議を報告した「植物防疫」において、CIPAC の概要も簡単に紹介した⁵⁾。さらに、2013 年以降の日本農薬学会農薬製剤・施用法シンポジウムフォーラムにおいて、CIPAC 関連会議の報告に併せて CIPAC の概要が説明されている (参考 : http://pssj2.jp/abstract/?year_from=&year_to=&event=&taxonomy_other=&subject=CIPAC&speaker=&affiliation=&search=1) 。

国際的には、2007 年の CIPAC/FAO/WHO 合同会議における CIPAC 議長のプレゼンテーション資料がホームページに掲載⁶⁾、また、1960 年代から 1980 年代にかけて、CIPAC 会議の報告が「J. AOAC (Association of Official Analytical Chemists)」に掲載

されているが（参考：https://academic.oup.com/jaoac/search-results?page=1&q=CIPAC%20Meeting&fl_SiteID=6258&SearchSourceType=1&allJournals=1），両者とも CIPAC の説明は簡単なものである。さらに、Martijn は、2003 年に「Encyclopedia of Agrochemicals」に CIPAC を解説した⁷⁾。既存の CIPAC を説明した出版物の中でこの解説が、資料の性格上、最も詳しいと考えられる。

このように CIPAC を詳細かつ総合的に解説した資料は少なく、古く簡単なものが多いこと、ホームページの記載内容 (<https://www.cipac.org/>) が最も詳しいと思われるが、ホームページでは全体を俯瞰・閲覧できない等の欠点があり、かつ英語であることから、今般、CIPAC の概要とその活動について説明するので、今後、CIPAC 法を利用または提案する際の一助となれば幸いである。

I . CIPACの概要

CIPAC (Collaborative International Pesticides Analytical Council Limited : 国際農薬分析法協議会) は、農薬等の原体および製剤中の有効成分等の分析方法、農薬製剤の物理的・化学的性状の測定方法について、共同試験の結果に基づき CIPAC 法の確立を行う国際的な非営利・非政府機関である。

さらに、国や地域において、CIPAC の活動を補完する地域組織 (National PAC ; 地域 PAC) が活動している。これらの名称、略称、構成を表 1 に示す。我が国における CIPAC に対応する機関は、農林水産省、FAMIC、農薬製造者などで構成する JAPAC であり、加盟会社から提案された小規模共

表 1 National PAC (地域 PAC) の名称、略称、構成

略 称	名 称 (英名)	構 成
ESPAC	English Speaking Pesticides Analysis Advisory Committee	イギリス、アメリカ、アイランド、オーストラリア、スイス、ハンガリー、チェコ、デンマーク、フランス、ベルギー、オランダ
	DAPA	German Speaking Working Group for Plant Protection Product Analytics ⁸⁾
DAPF	German Speaking Working Group for Plant Protection Product Formulations ⁸⁾	ドイツ、スイス、オーストリア
JAPAC	Japan Pesticides Analytical Council	日本
CHIPAC	Chinese Pesticide Advisory Committee	中国

* : corresponding member

同試験および大規模共同試験の実施結果の評価と CIPAC に提案する資料の審査と承認を行っている。

1. CIPACの歴史

1.1. 1952 年

9 月 15～21 日、第 3 回国際植物薬学会議 (International Congress of Phytopharmacy) がフランス・パリで開催され、オランダ・アムステルダム大学の J. A. A. Ketelaar 教授が、農薬の物理的および化学的測定方法を標準化するための委員会の委員長に任命された⁹⁾。

9 月 15～20 日、第 3 回国際作物保護会議 (ICCP : International Congress of Crop Protection) がフランス・パリで開催され、農薬製剤の標準的分析方法を作成するために公式分析化学者の委員会の設置を推奨する決議が可決された^{7,10)}。

1.2. 1957 年

6 月 17～21 日、第 9 回国際連合食糧農業機関 (FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations) 欧州農業委員会 (ECA : European Commission on Agriculture) がイタリア・ローマで開催され、農薬分析に関する特別委員会により提案された試験に参加し、ICCP から依頼された作業である農薬の分析方法の作成を実行・促進する勧告が決議された^{11,12)}。

9 月 8～15 日、ドイツ・ハンブルグにおいて、第 4 回 ICIP が開催された⁹⁾。

ICCP の初日、R. de B. Ashworth 博士 (イギリス) は、農薬を評価するための分析方法に関する国際的な共同作業、徹底的な農薬の分析方法の検証、国際的な広報誌 (例、FAO Agricultural Bulletin) への掲載を行うための作業分担の必要性を述べた。その中で、各国は国内委員会を任命し、国際機関の支援の下で、国際的な欧州委員会に代表者を送り、分析方法が必要な化学物質を割り当てること、作業に参加しやすいように参加者をヨーロッパに限定することを提案した⁹⁾。

2 日目、この提案の検討のため、ハンブルグのキュリオハウスで、J. A. A. Ketelaar 教授、R. de B. Ashworth 博士、H. Müller 教授 (ドイツ)、J. Prat 博士 (フランス)、H. Zeumer 博士 (ドイツ) が出席した会議が開かれ、決議案を作成し全体会合に提出することとされた¹³⁾。

3 日目、全体会議において、欧州委員会を設立し、試験所間の協力によって、農薬の原体および製剤

の分析方法を確認し、公表する作業を行う決議が可決された。さらに、この検討のため、分析方法が必要な化学物質のリストを作成し、異なる国からなる専門家の適切なグループにこのリストを割り当てるためにベルギー、フランス、ドイツ、イギリス、イタリア、オランダ、スイスの専門家からなる小規模な委員会を任命することを満場一致で勧告した。なお、この委員会の設立は、イギリス農林水産省植物病理研究所(当時)の R. de B. Ashworth 博士が中心となって推進された^{7,10,11,13,14}。

ICCP で合意されたことを受け、アムステルダム大学の J. A. A. Ketelaar 教授を議長、R. de B. Ashworth 博士を事務局長に選出し、予備的会議(後の第 1 回 Collaborative Pesticides Analytical Committee of Europe (CPAC) 年次会合に相当する。)が開かれた。ICCP で提案された方針で進めることに合意し、26 の化学物質と物理性試験の試験方法がメンバー国に割り当てられた。この作業はその後完了し、合意された方法として公表された^{11,13}。

なお、CIPAC ハンドブック 1 巻および CIPAC ホームページでは、CPAC は European Committee と簡略化した記載となっている。

1.3. 1958 年

第 2 回 CPAC 年次会議がイギリス・ロンドンで開催され、規約が採択され、殺虫剤、殺菌剤、除草剤、殺鼠剤、誘引剤および忌避剤として作物保護に使用される材料およびその製剤の合意された分析方法の作成に関する共同作業を組織すること、分析方法には原体とその製剤の化学組成と物理性の測定を含むことが決定された^{11,13,15}。

1.4. 1967 年

6 月 5～10 日、第 11 回 CPAC 年次会議がイギリス・ロンドンで開催され、フルメンバーによる Management Committee Meeting (MCM: 運営委員会会議)において、米国および AOAC の全面的な参加を強調するため、委員会の広範な範囲と国際的な性格に合わせて、名称を「Collaborative International Pesticides Analytical Committee: 国際農薬分析法委員会」とし、頭文字をとって「CIPAC」とすることが決定された^{16,17}。

1.5. 1968 年

6 月 10～15 日、第 12 回 CIPAC (委員会) 年次会議がドイツ・ブラウンシュヴァイクで開催され、アメリカが正会員として参加した¹⁷。

1.6. 1970 年

6 月 8～13 日、第 14 回 CIPAC (委員会) 年次会議がベルギー・ジャンブルーで開催され、協議会 (Council Limited) とすることが可決された¹⁴。

1.7. 1971 年

CIPAC は英国で有限会社として法人化され、非営利団体として慈善事業法に基づく非営利団体として登録された^{7,10}。

10 月 4～9 日、第 15 回 CIPAC (協議会) 年次会議がアメリカ・ワシントン D.C. の農務省で開催された¹⁸。

2. 所在

CIPAC が発行する公式文書に記載されている住所は、17 Claygate Avenue, Harpenden, Herts, AL5 2HE England となっている。ここは登記上の住所で、会計担当の連絡先と同じ住所であり、一般的な事務所は設置されていない。実際の運営は、年 1 回開催される CIPAC 関連会議の他、事務局間での電子メールのやり取りやバーチャル・ミーティングで行われている。

3. 構成

3.1. 会員

CIPAC メンバーは、オフィシャルケミストで構成され、フルメンバーとコレスポンディング・メンバー (付随会員) に分かれる。両者とも、MCM で承認される必要がある。フルメンバーは、国から 1 名のみ選出、非公開会議を含め、全ての会議への出席が可能。コレスポンディング・メンバーは、1 つの国から複数名の選出が可能。技術会議の非公開部分を除き、非公開会議への出席はできない。

フルメンバーを地域別にみると、ヨーロッパ (EU (欧州連合) 加盟国) からは、アイルランド、イタリア、オーストリア、オランダ、ギリシア、スロベニア、チェコ、デンマーク、ドイツ、ハンガリー、フランス、ベルギーおよびルーマニアの 14 名、ヨーロッパ (EU 非加盟国) からは、イギリス、ウクライナおよびスイスの 4 名、アジアからはインド、タイ、中国および日本の 4 名、中米からパナマの 1 名、南米からはブラジルの 1 名、アフリカからは南アフリカの 1 名となっており、合計すると、23 ヶ国の 25 名であり (2022 年 7 月末現在)、ヨーロッパのメンバーが多く、地域的な偏りがみられる。なお、古いハンドブックを見ると、過去オセアニアと北米からのフルメンバーの参加が確認できるが、現在は参加していない状況にある。

3. 2. 事務局

事務局は、議長、事務局長、事務局長補佐、会計で構成されている。その他に、ホームページ担当を設置している。2022年7月末現在の事務局を表2に示す。なお、事務局および会員の活動は無報酬である。

表2 CIPAC 事務局(2022年7月末現在)

役職	氏名	所属国
議長 (Chairman)	Ralf Hänel	ドイツ
事務局長 (Secretary)	László Bura	ハンガリー
事務局長補佐 (Assistant Secretary)	Theo de Rijk	オランダ
会計 (Treasurer)	Brian E. Hocken	イギリス
ホームページ担当	Bruno Patrian	スイス

4. 業務

4. 1. 概要

CIPACは分析方法等の標準化を行い、CIPAC法として、農薬の原体および製剤中の有効成分および不純物の分析方法、農薬製剤の物理的・化学的性状の試験方法を設定することを主要な業務としており、そのために、次の業務を行っている。これらのうち、ハンドブック等の販売が活動資金になっている。

- ・分析方法を作成するためのガイドライン(指針)の作成。
- ・試薬の規格、溶液の調製方法、用語集、IR(赤外線)吸収スペクトル、標準品リストの作成(いずれも、最近の設定実績はない)。
- ・CIPAC法設定のため大規模共同試験の調整。
- ・共同試験の方法および結果の検討。
- ・上記課題を検討するための年次会議の開催。
- ・CIPAC法の設定。
- ・ハンドブック、CD-ROM等の販売。

4. 2 有効成分のコード番号¹⁹⁾

4. 2. 1. 有効成分本体

CIPACは、農薬の有効成分の名称として、ISO(International Organization for Standardization: 国際標準化機構)による一般名〔ISO 257: 2018「Pesticides and other agrochemicals - Principles for the selection of common names(農薬、及びその他の農業用化学品〜一般名選定の原則)」²⁰⁾で規定]を採用している。しかし、一般名は、国によって異なること、何らかの理由で変更されること、言語によって綴りが異なること等があるため、1968年11月の「FAO Working Party of Experts on the Official Control of Pesticides (Section B - Specifications): 農薬

の公的管理に係る専門家のFAO作業部会(部門B-規格)」の第4回会議(イタリア・ローマ)の議論に基づき、規格、分析方法、関連文書の分類システムが合意されたことにより、有効成分にコード番号を割り当てることとなった。コード番号は、ある化合物のISOによる一般名が承認され次第、割り当てることができる。コード番号は、分析方法の準備が意図されていない有効成分(例、天然物、微生物農薬)にも割り当てられている。これは、EUで農薬の統計業務を行っているEUROSTAT(Statistical Office of the European Union: 欧州連合統計局)より、データベースで用いる物質の番号付けにCIPACコード番号を利用したいとの要求があり、これを受け入れたためである。CIPACコード番号は、EUの他、FAO、WHO(World Health Organization: 世界保健機関)等でも使用されている。コード番号は、2022年7月末現在、1番の2,4-D(登録名: 2,4-PA)から1022番のcinmethylin(シンメチリン)まであり、エステル等に拡張番号が付けられているため、1053個の化合物にコード番号がある²¹⁾。

4. 2. 2. 塩・エステル

有効成分が塩・エステルの場合、酸・塩基部分に一般名が付けられているものと、塩・エステルに一般名が付けられているものがある。前者の場合、それぞれの塩、エステルを区別するため、イオンやアルキル基の拡張コードとして、ISO 257に基づく一般名に対して、当初、a(メチル)、b(エチル)、Na、K等が付けられていたが(例えば、アジンホスメチルは37.a、アジンホスエチルは37.b、2,4-Dは1、2,4-Dナトリウム塩は1.1Na)、ハンドブックE巻(1993年発行)に、イオンやアルキル基等を7つのサブグループに分けた3桁の拡張番号が掲載された²²⁾。代表的なイオン、アルキル基の拡張番号を表3に示す。ここで、「その他」は、塩酸塩やオキシ塩化物などの既存のグループに当てはまらない変種をカバーするためのものであり、十分な柔軟性を備えている。例えば、グリホサートイソプロピルアミン塩は、イソプロピルアミンの拡張番号が105であることから、284.105となる。トルクロホスメチルの場合、ISO名がメチルエステルに付けられていることから、メチルエステルとしてのコード番号は479となり、メチルの拡張番号201を付した479.201とはしない。

4. 3. 剤型コード

農薬の有効成分は微量で活性があることから、

表3 イオン・アルキル基の拡張番号(抜粋)

イオン・アルキル基の種類	拡張番号
無機陽イオン	
ナトリウム (Na ⁺)	011
カリウム (K ⁺)	019
有機陽イオン	
イソプロピルアンモニウム	105
トリメシウム *	114
アルキル基	
メチル	201
エチル	202
無機陰イオン	
塩素 (Cl ⁻)	302
硫酸 (SO ₄ ²⁻)	306
有機酸塩	
酢酸塩	401
アルキルベンゼンスルホン酸塩	415
アルキル基とイオンの混合	
メチル・ナトリウム	501
その他	
オキシ塩化物	601

*: トリメチルスルホニウムの ISO 257における一般名。

病害虫などに対する効果的な防除のためには有効成分を均一に散布する必要があり、製剤化されて使用される。JMPS (FAO/WHO Joint Meeting on Pesticide Specifications: 農薬規格に係る FAO/WHO 合同会議) は、製剤の形状や物理的・化学的性状、性能および用途から、剤型に相当するアルファベット 2 文字から成るコード (剤型コード) を用いて製剤を分類しており^{23,24)}、CIPAC は、当該コードを採用している。例えば、原体が TC、濃厚原液が TK、粉剤が DP、粒剤が GR、粉末状の水和剤が WP、顆粒水和水和剤が WG、フロアブルが SC、液剤が SL である。

5. CIPAC法の利用

CIPAC 法は国際機関でも利用され、FAO および WHO が、FAO 規格、WHO 規格または FAO/WHO 規格を設定するための分析・試験方法、FAO 規格等への適合を確認するための分析・試験方法として利用している。また、JMPS は、FAO/WHO 規格等を設定するときに CIPAC 法を必須としている。

共同試験の実施および共通法の標準化を目的として、1971 年に公的分析化学者協会 (AOAC International) と議定書を交わし、満足できる分析方法が作成された場合、共同試験を開始・実行した機関によって、AOAC/CIPAC 法または CIPAC/AOAC 法

とすることとされた¹⁾。なお、設定分野は、CIPAC が農薬と衛生害虫資材に限られるのに対して、AOAC は食品、飲料、環境、医薬品、農業資材等と多岐にわたっている。さらに、CIPAC 法は、各国における農薬登録のための公的な試験方法として利用されている。

II. CIPACの会議

CIPAC は、FAO および WHO と共同して、年 1 回、CIPAC 関連会議を開催し、この会議は Joint CIPAC/FAO/WHO Open Meeting (CIPAC/FAO/WHO 合同公開会議)、Symposium (シンポジウム)、Annual Meeting of Technical Meeting (TC: 技術会議)、Annual General Meeting (AGM: 年次総会)、MCM および Council Meeting (CM: 理事会) で構成されている。

1. CIPAC/FAO/WHO 関係会議

1.1. FAO²³⁾

FAO は、農薬の規格を設定するための「FAO Working Party on the Official Control of Pesticides (I. 4.2.1. 参照)」を 1963 年に設立した。この作業部会は 2 つに分割され、部門 B が農薬の規格を作成することとなった。さらに、1975 年に「FAO Panel of Experts on Pesticide Specifications, Registration Requirements and Application Standards: 農薬規格、登録要求および散布標準に係る FAO 専門家パネル (FAO EPS)」に名称変更され、部門 B は規格グループとなった。規格グループは、1977 年から CIPAC 会議に合わせて公式会議を開始し、1989 年、「Panel of Experts on Pesticide Specifications, Registration Requirements, Application Standards and Prior Informed Consent: 農薬規格、登録要求、散布標準および事前情報通知の専門家パネル」に統合された。規格設定の手順書は、FAO 規格マニュアルとして第 1 版が 1971 年に出版され (FAO Agricultural Development Paper No. 93)、1979 年 (FAO Plant Production and Protection Papers, No. 13)、1987 年 (FAO Plant Production and Protection Papers, No. 85)、1995 年 (同 No. 128)、1999 年 (同 No. 149) に改訂版が出版された。

1.2. WHO²³⁾

「WHO Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES): WHO 農薬評価スキーム」は 1960 年に設立された。4 つの評価段階と試験計画からなる現在の構造が 1982 年に確立され、衛生害虫防除用資材の規格は、

WHOPEs 作業部会で検討されることとなった²⁵⁾。

1999年の「Expert Committee on Vector Biology and Control：衛生害虫の生物学と管理に係る専門家委員会」において、規格設定の手順と過程についてFAOと調和することが提案された。2000年のFAOパネルにおいて、この提案の受け入れが合意されたため、2001年、FAOとWHOは勧告の履行のための専門家による会議(JMPS)の設置を合意した。

2014年にWHOPEsによる衛生害虫管理資材の評価をPQT(Prequalification Unit：事前認定ユニット)に移管することが決定され、2018年6月、WHO PQT/VCP(Vector Control Product Assessment Team：衛生害虫管理資材評価チーム)に移行した。これは、他の医療技術製品と同様、衛生害虫管理資材の安全性、品質、薬効を市販前に科学的に評価し、上市後は、製品の品質のモニタリング、製造施設への定期的な検査を行う等製品のライフサイクルに焦点を当てたためである。

1.3. FAO/WHO²³⁾

2001年、FAOとWHOは原体規格を設定するための「Manual on development and use of FAO and WHO specifications for pesticides(農薬のFAOおよびWHO規格に設定と使用に係るマニュアル)」案を合同で2001年に公開し、意見募集を行った。

JMPSは、2002年から農薬等の規格の検討を開始すると共に、上記案に対して提出された意見を反映させたマニュアルの初版を2002年に発行した。マニュアルは、科学技術の進歩、剤型、試験方法、データの評価方法を反映して修正されている。2022年5月、化学農薬と微生物農薬(作成中)を分冊し、2022年5月化学農薬の第2版が発行された。

1.4. CIPAC/FAO/WHO

農薬および衛生害虫防除資材の規格に関係する3機関が協力、産業界との連携を強化することで、より質の高い農薬等を提供することができることから、CIPAC、FAOおよびWHOの合同会議の第1回会議(公開)が2004年にチェコ・ブルノで開催された。

この会議では、CIPAC・FAO・WHOの1年間の活動内容、National Report(各国で流通している農薬等の公的な品質管理結果)の報告、参加組織の現況、CIPAC法の現状・出版状況・見直し、JMPS報告、FAO/WHO規格等の検討状況が報告される。

2. シンポジウム

口頭またはポスターによる化学、物理、健康、環境等に係る知見の発表があり(公開)、1967年から開催されている。

3. TC

3.1. 会議

共同試験結果、CIPAC法の提案、CIPACガイドラインの設定・改正、現行法に関する意見等を報告・検討する公開部分と、公開部分で提案されたCIPAC法の検討、FAO/WHO規格等に関する事項を検討する非公開部分で構成される。

3.2. 開催状況

CPACおよびCIPAC(委員会)として開催された会議を含めたCIPAC関係会議の開催状況を表4に示す。

なお、ドイツ統合は1990年10月3日。EUは1993年11月1日に発足しており、EUへの追加加盟は、オーストリア、スウェーデンが1995年1月1日、スロベニア、チェコおよびハンガリーが2004年5月1日、ルーマニアが2007年1月1日となっている。イギリスのEU脱退は2021年1月31日。

3.3. 分析方法の設定

CIPAC法を設定する標準的な流れを図1に示す。具体的には、試験責任者(主に農薬メーカー)から提案された分析方法に基づき、3~4ヶ所の試験所で「小規模共同試験」が行われ、この結果がCIPAC技術会議で報告され、分析方法の妥当性が検討される。分析結果が承認されれば、原則8ヶ所以上の試験所が参加する「大規模共同試験」が実施される。試験結果は、翌年以降のCIPAC技術会議において報告され、承認を受けると暫定CIPAC法(provisional CIPAC method)、次回以降の会議において反対意見がなければ正式CIPAC法(full CIPAC method)となる。

4. AGM

管財人報告、監査人報告、幹事の選出を行っている(非公開)。

5. MCMおよびCM

MCMおよびCMは合同で開催され、1年間の活動報告、会計報告、ハンドブックの出版、次回以降の会議予定、会員の承認・退任・除名、事務局の選出を行っている(非公開)。

表 4 CIPAC 関連会議の開催状況^{a)}

回数	年	都市名	国名	地域	回数	年	都市名	国名	地域
1	1957	ハヴルグ	西ドイツ ^{b)}	欧州1 ^{c)}	34	1990	ガマルト	チュニジア	アフリカ
2	1958	ロンドン	イギリス	欧州1	35	1991	ブラインシュヴァイク	ドイツ	欧州1
3	1959	アムステルダム	オランダ	欧州1	36	1992	チュリッヒ	スイス	欧州1
4	1960	パリ	フランス	欧州1	37	1993	パリ	フランス	欧州1
5	1961	ブラインシュヴァイク	西ドイツ	欧州1	38	1994	アナポリス	アメリカ	北米
6	1962	ヴェーデンスヴァイク	スイス	欧州1	39	1995	リマツール	キプロス	欧州3 ^{e)}
7	1963	ジャンプルー	ベルギー	欧州1	40	1996	北京	中国	アジア
8	1964	ウーニンゲン	オランダ	欧州1	41	1997	ロスキレ	デンマーク	欧州2 ^{d)}
9	1965	コペンハーゲン	デンマーク	欧州1	42	1998	ヨーク	イギリス	欧州2
10	1966	パリ	フランス	欧州1	43	1999	ブダペスト	ハンガリー	欧州3
11	1967	ロンドン	イギリス	欧州1	44	2000	グラナダ	スペイン	欧州2
12	1968	ブラインシュヴァイク	西ドイツ	欧州1	45	2001	バンコク	タイ	アジア
13	1969	オエiras	ポルトガル	欧州1	46	2002	ローマ	イタリア	欧州2
14	1970	ジャンプルー	ベルギー	欧州1	47	2003	ブカレスト	ルーマニア	欧州3
15	1971	ワシントン	アメリカ	北米	48	2004	ブルノ	チェコ	欧州2
16	1972	ストックホルム	スウェーデン	欧州1	49	2005	エトレヒト	オランダ	欧州2
17	1973	ウーニンゲン	オランダ	欧州1	50	2006	ジュネーブ	スイス	欧州3
18	1974	ロンドン	イギリス	欧州1	51	2007	ムンバઈ・ロックス	南アフリカ	アフリカ
19	1975	オエiras	ポルトガル	欧州1	52	2008	ブラインシュヴァイク	ドイツ	欧州2
20	1976	ヴェーデンスヴァイク	スイス	欧州1	53	2009	ソツパテ	エル・サルバドル	中米
21	1977	ブラインシュヴァイク	西ドイツ	欧州1	54	2010	リュブリャナ	スロベニア	欧州2
22	1978	ヴェルサイユ	フランス	欧州1	55	2011	北京	中国	アジア
23	1979	ボルチモア	アメリカ	北米	56	2012	ダブリン	アイルランド	欧州2
24	1980	サボア・レーニヤ	スペイン	欧州1	57	2013	キエフ	ウクライナ	欧州3
25	1981	ジャンプルー	ベルギー	欧州1	58	2014	リエージュ	ベルギー	欧州2
26	1982	ローマ	イタリア	欧州1	59	2015	アテネ	ギリシア	欧州2
27	1983	ブリスベン	オーストラリア	オセアニア	60	2016	東京	日本	アジア
28	1984	ボルチモア	アメリカ	北米	61	2017	ローマ	イタリア	欧州2
29	1985	コペンハーゲン	デンマーク	欧州1	62	2018	パナマ・シティ	パナマ	中米
30	1986	ウィーン	オーストリア	欧州1	63	2019	ブラインシュヴァイク	ドイツ	欧州2
31	1987	カスカイス	ポルトガル	欧州1	64	2020	メール会議	—	—
32	1988	ジュネーブ	スイス	欧州1	65	2021	オンライン会議	—	—
33	1989	ラゴニッシ	ギリシア	欧州1	66	2022	オンライン会議	—	—

- a) 1967年までは Collaborative Pesticides Analytical Committee of Europe (CPAC), 1970年までは Collaborative International Pesticides Analytical Committee (CIPAC) として開催, 1971年以降は Collaborative International Pesticides Analytical Council Limited (CIPAC) として開催。b) 1949年5月23日から1990年10月2日までのドイツ連邦共和国の通称。
c) 欧州1: EU (欧州連合) 発足前のヨーロッパ各国。d) 欧州2: EU に加盟しているヨーロッパ各国。
e) 欧州3: EU に加盟していないヨーロッパ各国。

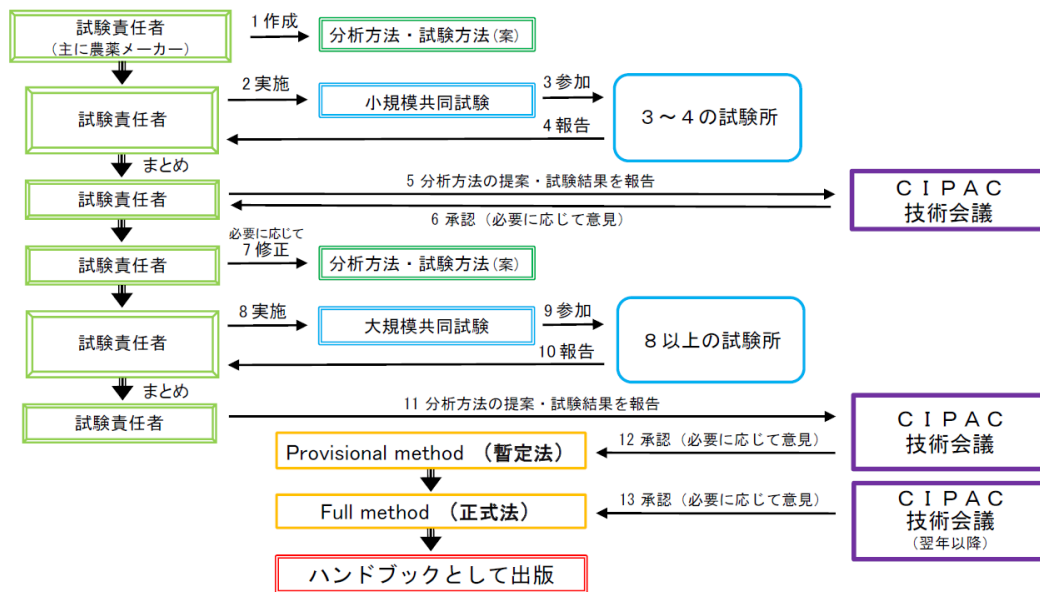


図 1 CIPAC 法設定の標準的な流れ

Ⅲ. ガイドライン

CIPAC は、分析方法を設定するためのガイドライン（指針）を設定しており、農薬原体および製剤中の有効成分の分析方法を作成するための指針²⁶⁻³⁰、分析方法の標準化を行うため共同試験を実施するための指針^{31,32}、既に CIPAC 法が設定されている適用範囲（剤型、濃度）を広げるための指針^{33,34}、原体および製剤中の不純物の分析方法を作成するための指針³⁵、特殊な製剤である LN (Long lasting insecticidal net : 長期残効性蚊帳) についての分析方法および物理的・化学的性状の測定方法を設定するための指針³⁶の全 11 種があり、これらの一覧を表 5 に示す。なお、物理的・化学的性状の測定方法を作成するための指針は設定されていないが、分析方法に準拠して作成されている。

1. 分析方法

1.1. 分析方法の設計

Guidelines for the design of chromatographic analytical methods intended for CIPAC collaborative studies²⁶は、クロマトグラフィーを用いた分析方法を設計するための基本的な原則を示した文書で、定量に用いる機器ごとに LC と GC に分かれている。

1.1.1. GC

GC を用いた分析方法は、キャピラリーカラム、スプリット式注入法、水素炎イオン化検出器

(FID)、内部標準法を用いることを基本原則としている。カラムは、内径 0.2~0.25 mm、長さ 10~25 m、膜厚 0.1~0.25 μm、液相としてジメチルポリシロキサン（溶融フェーズ）ドシリカキャピラリーカラムを用いる。カラム恒温槽は一定温度とするが、アジュバント除去のための温度プログラムは使用可能。試料注入量は 0.5~2 μL（通常、1 μL）。キャリアーガスは水素またはヘリウムとし、水素を推奨するが、還元性化合物と反応する可能性に留意する。カラム線速度は水素が 45~55 cm/sec、ヘリウムが 25~30 cm/sec。有効成分の保持時間の許容枠を指定し、これに収まるよう、共同試験参加者はカラム温度やカラムヘッド圧（≒流量）を調整しても良い。内部標準物質は入手が容易なもので、高純度で化学的に安定なものを用いる。

1.1.2. HPLC

HPLC を用いた分析方法は、逆相クロマトグラフィー、塩基を不活性エンドキャップ化したオクタデシルシリル結合シリカ（C18）カラム、カラムの温度制御、初期移動相での試料調製、紫外線（UV）吸光検出器、絶対検量線法を用いることを基本原則としている。

カラムは、内径 3~5 mm、長さ 100~250 mm、粒子径 3~5 μm のものを用いる。注入量は 5~20 μL、流速 0.5~2.0 mL/min、グラジエントも可能。

有効成分の保持時間の許容枠を指定し、これに収まるよう、共同試験参加者は移動相の組成（有機溶媒の組成比を±5%の範囲で調整が可能）を調整

表 5 CIPAC ガイドラインの一覧

項目	ガイドライン	名称
分析方法	分析方法の設計 (GC, LC)	Guidelines for the design of chromatographic analytical methods intended for CIPAC collaborative studies ²⁶
	分析方法の書き方	Instructions for writing CIPAC methods ²⁷
	妥当性の検証	Guidelines on method validation to be performed in support on analytical methods for agrochemical formulations (2003) ²⁸
	結果のまとめ方	Format for the presentation of the summary of the results of collaborative studies ²⁹
共同試験 (コラボ)	RSD の判断基準	Extension of the "Guidelines on method validation to be performed in support on analytical methods for agrochemical formulations" with the HorRat value (2019) ³⁰
	分担	Guideline on how to conduct a CIPAC collaborative trial (2018) ³¹
試験方法の拡張	実施手順	CIPAC guidelines for Collaborative Study Procedures for Assessment of Performance of Analytical Methods (1989) ³²
	手順	Extension of the scope of methods (2000) ³³
不純物	フローチャート	Extension of the scope of methods Flowchart ³⁴
	分析方法	Guidelines for analytical methods for the determination of relevant impurities referred to in FAO and/or WHO specifications for pesticide technical grade active ingredients and formulations (2009) ³⁵
LN*	分析・物化性	Work flow integration of analytical and physical-chemical methods for LN into related CIPAC methods for corresponding active guidelines (2009) ³⁶

* : LN 長期残効性蚊帳

しても良い。検出波長は、UV 吸収スペクトルの中で、傾きの変化が少ない波長（通常、最大部位）とする。

1.2. 分析方法の書き方

Instructions for writing CIPAC methods²⁷⁾は、分析方法の書き方を示した文書。

指針には明記されていないが、分析方法は英語で記載する。英語を母国語としない人々が使用することを念頭に置き、執筆者は分かりやすい表現を用いて、実施する手順を明確、簡潔、詳細、曖昧さのない記述で説明し、脚注は使用しない等の約束ごとがある。主な留意事項は次のとおり：

・有効成分

農薬の名称は ISO の一般名を用いる。

新規化合物の場合、有効成分に関する情報（構造式、化学名、CAS (Chemical Abstracts Service) 登録番号、分子式、分子量、融点、沸点、蒸気圧、溶解度等）を含める。

・試料

分析に必要な資材の量を明記する。

・同一性

定量に使用するクロマトグラフィーにおける保持時間の他に同一性を確認する方法（例、IR 吸収スペクトルの比較）を記載する。

・試薬

分析に必要な試薬はすべてリスト化する。

化学物質の名称は IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry : 国際純正・応用化学連合) 規則による化学名を用いる（長い名称の場合、略語も示せる）。

内部標準溶液（内部標準物質のみ）、標準溶液（標準物質と内部標準物質の混合または標準物質のみ）の調製方法を記載する。

・装置

最も重要な機器について、性能の面から示す。通常の実験器具は言及しない。

・分析手順

手順は命令形で書く。計量手順には必要な精度を示す。単位は SI 単位（国際単位系 : International System of Units）とする。

・構成

分析方法の構成は次の項目とする。

- (1) 分析機器の操作条件
- (2) 検量線の作成
- (3) 直線性の確認

(4) システムの安定性の確認

(5) 検量線

(6) 試料調製

(7) 定量

(8) 計算

有効成分の含有濃度を計算する式は、統一かつ標準化された記号を用いる。含有濃度は g/kg で表す。なお、原文は content（含有量）と記載されているが、本稿では、IUPAC の物理化学で用いられる量・単位・記号（グリーンブック）^{37,38)}に基づき、concentration（濃度）に修正した。以下同様。

(9) r および R (III. 2. 2. (14) 参照)

(10) クロマトグラムおよびスペクトル

図表は、分析方法に埋め込んで作成する。

1.3. 妥当性の検証

Guidelines on method validation to be performed in support on analytical methods for agrochemical formulations²⁸⁾は、分析方法の妥当性を確認するための検証方法を示した文書で、2003 年に作成された。

分析方法が満たすべき性能基準は次のとおり。

(1) 直線性 (linearity)

- ・分析対象成分の公称濃度±20%の範囲内で、3 濃度以上での併行測定における相関係数が 0.99 以上であること。

(2) 精度 (precision)

1) 化学分析

- ・5 回以上の繰り返し測定を行い、室内相対標準偏差 (RSD_r) を求める。なお、相対標準偏差 (RSD) は、標準偏差 (SD) / 平均値×100 から求める。
- ・外れ値に対する適切な検定 (Dixon または Grubbs 検定) を行うことができる。ここで、ISO 5725: 1986 「Precision of test methods - Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests (試験方法の精度—試験所間試験による試験方法標準化のための併行精度と室間再現性の決定)」³⁹⁾には、Cochran 検定および Dixon 検定が記載されていたが、更新版である ISO 5725-2: 2019 「Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method (測定方法及び測定結果の精確さ (真度及び精度) — 第 2 部 : 標準測定方法の併行精度及

び再現精度を求めるための基本的方法」⁴⁰⁾では Cochran 検定および Grubbs 検定に変更されていることもあり、最近の大規模共同試験で Dixon 検定が実施されることは少なくなっている。

- ・結果の許容範囲は、修正 Horwitz 式(1)に基づく。なお、この式は、PRSD_r と RSD_r の比 (HorRat 値) の判断基準を 1 未満とすることを意味している。

$$RSD_r < 2^{(1-0.5\log C)} \times 0.67 (PRSD_r) \cdots (1)$$

C は、濃度 (10 進法の分数)。

2) 物理化学的性状

妥当性の検証は必要ない。

(3) 精確度 (accuracy)

- ・4 つ以上の試料の調製および分析により回収率を測定する。
- ・回収率は、模擬製剤を調製し、次式から求める。

$$\text{回収率}(\%) = (\text{定量された含有濃度}) / (\text{理論的含有濃度}) \times 100 \cdots (2)$$

- ・回収率の許容範囲を表 6 に示す。なお、この基準は、EU における分析方法の妥当性検証の指針 (SANCO/3030/99) の rev.4⁴¹⁾ と同じであり、基準の多くに SANCO/3030/99 を引用している。

表 6 有効成分の回収率の許容範囲

名目上の濃度 (%)	許容範囲 (%)
> 10	98~102
1 ~ 10	97~103
< 1	95~105

(4) 妨害 : interference (選択性 : selectivity)

- ・補助成分による妨害があれば、精度に影響を与えるので、妨害がないことの証明には製剤ブランク (有効成分のみを含まない) を用いた分析が必要。
- ・有効成分中に特定の不純物が存在する場合、有効成分および内部標準物質の測定ピーク面積に対して不純物が 3%以上寄与しないことを確認する。

(5) 特異性 (specificity)

- ・分析種の同一性を確認する。GC/MS, LC/MS, ダイオードアレイ検出器等を用いる。分光法を用いた分析種の分光学的検査は、スペクトルの比較で行う。

1. 4. 結果のまとめ方

Format for the presentation of the summary of the results of collaborative studies²⁹⁾ は、共同試験結果の

要旨を発表する際の様式を示した文書。

要旨には、共同試験に参加した試験所の数、平均値、併行精度の SD_r と RSD_r、室間再現性の SD_R と RSD_R、併行許容差 r と室間再現許容差 R、Horwitz 式から計算される PRSD_R を記載する。ここで、r と R は、原文ではそれぞれ、repeatability と reproducibility となっているが、ISO 5725-1: 1994 「Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions (測定方法及び測定結果の精確さ (真度及び精度) - 第 1 部 : 一般的な原理及び定義)」⁴²⁾では、両者とも概念を示すものと定義されており、両者とも SD×2.8 で求めることから、本稿では、それぞれ、repeatability limit と reproducibility limit に修正した。なお、添え字の r と R は、それぞれ、試験所内での繰り返しと試験所間での繰り返しを表す。濃度の単位は g/kg とする。

1. 5. RSD (相対標準偏差) の判断基準

Extension of the "Guidelines on method validation to be performed in support on analytical methods for agrochemical formulations" with the HorRat value³⁰⁾ は、III. 1. 3. の「妥当性の検証」を補完する文書として 2019 年に作成された。共同試験結果における HorRat 値の判断基準を表 7 に示す。ここで、表 7 では有効数字を 1 桁として記載しているが、実際の運用は、表 8 の AOAC と同様、有効数字は 2 桁以上となっている。HorRat 値の解釈は次のとおり。

- ・HorRat 値が 1 に近い場合、再現性という意味で分析方法の精度は予測値に近い。
- ・HorRat 値が 1 より非常に大きい場合、その分析法は間違いなく期待/希望よりも悪い結果になる疑いがある (例えば、分析方法の欠陥、または妨害、汚染、試料の不均一性のため)。
- ・HorRat 値が 1 より非常に小さい場合、共同試験が正しく行われていないことが疑われ、楽観的すぎる精度の値が与えられる (例えば、参加者が

表 7 共同試験結果における HorRat 値の判断基準

HorRat 値	判断
HorRat < 0.3	許容範囲内だが、合理的な説明が必要
0.3 ≤ HorRat ≤ 1	完全に許容可能
1 < HorRat ≤ 2	許容範囲内だが、合理的な説明が必要
HorRat > 2	許容できない

少ないか、分析対象成分の含有濃度に関する予備知識がないため) ことを意味する。

2. 共同試験

2.1. 分担

Guideline on how to conduct a CIPAC collaborative trial³¹⁾ は、共同試験の組織化と実施に関わる関係者（CIPAC 事務局、共同試験実施者、共同試験参加者）の責務を説明した文書（以下、「共同試験分担指針」という。）で、2018年に作成された。

(1) 試験実施者

試験実施者は、分析方法を作成し、共同試験を主催する者をいう。

- ・連絡先、分析方法の概要、剤型の種類、時間枠、受け入れ最大数を記載した情報シート (Information sheet) を事務局に提出する。これが、共同試験の募集案内となる。
- ・試験に参加することに興味を示した試験所の数が予定数より多かった場合、選定手順を CIPAC 事務局に連絡する。
- ・試料の通関手続きにおける問題を最小化するために、CIPAC 事務局に対して、試料が実験室でのみ使用すること、さらなる商業的流通を意図していない旨を記載した書簡を要望できる。
- ・試料を発送する際は、ラベルや送り状に記載されている内容が明確で正しいことを保証する。誤った表示がある場合、試験所での受け入れが拒否されたり、試験への参加が見送られたりする可能性がある。
- ・試料容器のラベルと梱包には、GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals : 化学品の分類および表示に関する世界調和システム) や危険物輸送勧告 [Transportation of Dangerous Goods, IATA : International Air Transport Association (国際航空運送協会), RID : Regulations Concerning the International Carriage of Dangerous Goods by Rail (欧州危険物国際鉄道輸送規則), ADR : Agreement Concerning the International Carriage of Dangerous Goods by Road (欧州危険物国際道路輸送協定), IMDG : International Maritime Dangerous Goods Code (国際海上危険物規定)] に従い、正しいピクトグラムを用いて表示する。SDS (Safety Data Sheet : 安全データシート) も同封する。

(2) CIPAC事務局

- ・情報シートに必要な情報がすべて揃っているかどうか確認する。
- ・情報シートを一般へ配付（ホームページに掲載、メーリングリストによる送付）する。

(3) 試験参加者

- ・共同試験への参加希望者は、情報シートに従い、試験実施者に連絡する（CIPAC 事務局にも同報する）。
- ・指定された時間枠内に分析を実行し、報告する。
- ・分析方法に従って実施する。オリジナル法からの逸脱は文書化して、正当化する。著しい逸脱の場合、評価から除外される可能性がある。
- ・分析方法を改善するための検討は、共同試験とは別に行う。

2.2. 実施手順

CIPAC guidelines for Collaborative Study Procedures for Assessment of Performance of Analytical Methods³²⁾ は、共同試験を実施するための手順を示した文書（共同試験実施指針）で、1989年に作成された。大規模共同試験の実施を図2に示す。

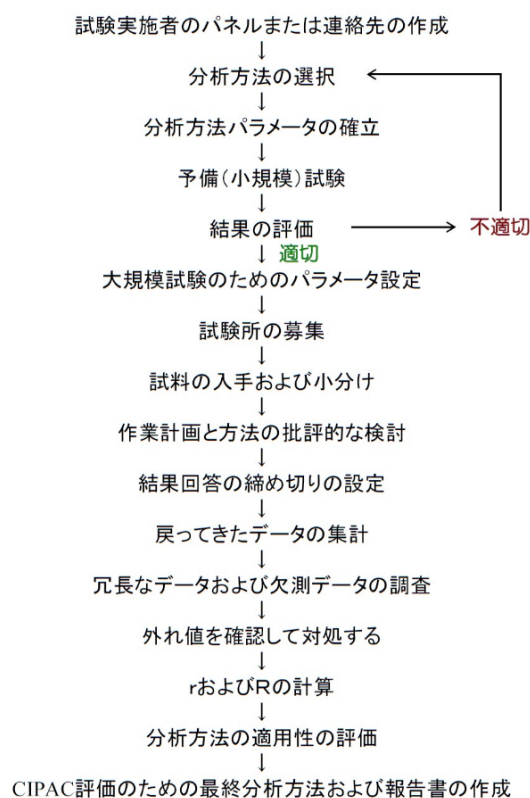


図2 大規模共同試験の実施手順

(1) 試験実施者の決定

国際的な共同試験によって検証された分析方法を作成する者は次のことを行う。その際、地域 PAC

等の意見を求めることが望ましい。

(2) 分析方法の作成

分析方法は、適用性(ある範囲の製品と濃度レベルに適用でき、選択性および感度を持つ)、信頼性(精確度、併行精度、室間再現性が許容可能)、実用性(迅速かつ低コスト、試薬・機器が容易に入手可能)を持つ必要がある。

(3) 分析方法の決定

分析方法は、事前に十分な試行を受けた方法とし、ISO Guide 18「Layout for a standard method of chemical analysis (1978) (化学分析の標準的な方法のレイアウト)」⁴³⁾を考慮して、CIPACで決められた形式で記載するとなっているが、当該ガイドは1979年に廃止され、1999年にISO 78-2「Chemistry - Layouts for standards Part 2: Method of chemical analysis (化学-標準のレイアウト - パート2: 化学分析の方法)」⁴⁴⁾が作成され、1999年に第2版に更新されている。

(4) 小規模共同試験の実施

3~4の試験所が参加する小規模共同試験を行う。ただし、小規模共同試験の実施は必須とされていない³⁰⁾。

参加試験所は、分析方法の改善について、方法の修正を提案できる。

(5) 結果の評価

予備試験(小規模共同試験)の結果から、大規模共同試験に進むかどうか決定する。その際、外れ値検定は行わない。不適切な場合、(2)へ戻る。

(6) 大規模共同試験の計画作成

試験計画に作成にあたって、次の事項を考慮する。

- ・分析用標準物質が利用可能なこと。
- ・流通する製品の剤型や濃度レベルに留意する。
- ・試験に必要な試料は5点以上、分析は日を変えた2回の繰り返しとし、送付する量を決定する。

(7) 試験所の募集

CIPAC事務局を通じて、情報シートを送付して、参加を呼びかける。

共同試験に参加する試験所は無作為に選び、8以上とする。製品が国際的に流通する場合、異なる国の試験所が参加できなければならない。

(8) 試料の配付

試験実施者は、試料の準備および発送に責任を持つ。発送する試料は、十分に均質化される必要がある。試料と関係書類は、別々の梱包で発送する。

試料には、荷物の内容物の価値が10ユーロ/米

ドルまたはそれに匹敵する低額な金額であることを明記した送り状を添付する。

(9) 分析実施の注意事項

分析方法に、次の①~⑨が記載されているか、確認する。

①試料の予備的採取および均質化に関する指示

②装置を平衡化させるための手順。例えば、注入回数や2回注入時の再現性。最新のハンドブックに記載されている代表的な方法は次のとおり：

別々に秤量を行った標準溶液を2つ調製する(C_AとC_Bとする)。C_Aを2回注入し、それぞれのレスポンスファクターの差が1%以内であることを確認する。C_AとC_Bを注入し、それぞれのレスポンスファクターの差が1%以内であることを確認し、装置が平衡となっていることを確認する。

③試料および検量線溶液の注入順序、標準溶液の数。本指針の注3に記載されている方法は次のとおり：

定量に使用される物質の重量をwとし、0.5w, 1w, 2wの濃度の標準溶液を用いて直線性を確認する。

定量は、標準溶液C_A(濃度は1w)、試料溶液A(S_A)、試料溶液A、標準溶液C_B、試料溶液B(S_B)、試料溶液B、標準溶液C_A、・・・と交互に注入し、挟むよう(ブラケット)にして定量する。標準溶液C_AとC_Bは、同じ濃度1wで、別々に計量する。

注入順： C_A, S_A, S_A, C_B, S_B, S_B, C_A, S_C, S_C, C_B・・・
 └──┬──┘ └──┬──┘ └──┬──┘
 1つめの 2つめの 3つめの
 ブラケット ブラケット ブラケット

④得られたデータを濃度に変換する計算式

前述の「Ⅲ.1.3. 妥当性の検証(1)直線性」において、検量線が原点を通ることが確認されていることにより、試料の定量には1点検量線を用いる。最新のハンドブックに記載されている代表的な計算式は次のとおり：

・レスポンスファクターの決定

標準溶液を用いた定量結果から、レスポンスファクター(検量線の傾きに相当)を求める。

$$\text{絶対検量線: } f_i = s \times P / H_s$$

$$\text{内部標準法: } f_i = I_r \times s \times P / H_s$$

ここで、 f_i はブラケットによる2回注入時のそれぞれのレスポンスファクター。

H_s は、標準溶液注入時の有効成分のピーク面積

I_r は、標準溶液注入時の内部標準物質のピーク面積

s は、標準溶液中の有効成分の重量(mg)

P は、標準品の純度(g/kg)

・試料の定量

1つのブラケットの定量結果から、レスポンスファクターを用いて含有濃度を計算する。

$$\text{絶対検量線: 含有濃度 (g/kg)} = f \times H_w / w$$

$$\text{内部標準法: 含有濃度 (g/kg)} = f \times H_w / (I_q \times w)$$

ここで、 f はブラケットを構成しているレスポンスファクターの平均値。

H_w は、試料溶液注入時の有効成分のピーク面積

I_q は、試料溶液注入時の内部標準物質のピーク面積

w は、試料採取量 (mg)

- ⑤有効数字の桁数
- ⑥試料, 溶液, 試薬の有効期間
- ⑦分析を中断することができるタイミング (必要に応じて)
- ⑧安全上の危険性および予防措置
- ⑨分析方法における重要なパラメータは遵守する。変化させることができるパラメータを明記する。

(10) 結果の締め切り

試験実施者は、結果の返却期限を示す。

試験実施者は、得られたデータを報告すべき結果に変換するために使用する式および計算を示した報告シートを準備する。試験参加者は、直線性、分析を 2 回繰り返した生データを記入して報告する。

(11) データの集計

試験実施者は、返却された結果を集計する。

(12) 冗長データ, 欠測データの確認

要求された数以上の反復, 試験結果の欠落を確認する。

(13) 外れ値検定

Cochran 検定, Grubs 検定を行う。外れ値が 22% (2/9) 以上となった場合, 除去を中止する。

(14) r と R の計算

r と R は, ISO 5725: 1986³⁹⁾ に準拠して計算する。ここで, ISO 5725: 1986 では, r と R は, それぞれ, repeatability value と reproducibility value と定義され, repeatability と reproducibility に省略できるとされており, 本指針でも, 後者の名称が採用されている。

しかし, ISO 5725: 1986 は廃止され, ISO 5725-1 ~ 5725-6 に改訂された。ISO 5725-1⁴²⁾ において, repeatability value と reproducibility value は, それぞれ, repeatability limit (r) と reproducibility limit (R) に変更され, 省略についての記載はなくなったことから正確な名称を用いるべきと考える。 r と R の定義は次のとおり。

• Repeatability limit (併行許容差)

併行条件で得られた 2 つの測定結果の差の絶対値が, 95% の確率でその値以下になると期待される値。記号に r を用いる。 r は, $2.8 \times SD_r$ から求める。

• Reproducibility limit (室間再現許容差)

再現条件で得られた 2 つの測定結果の差の絶対値が, 95% の確率でその値以下になると期待される値。記号に R を用いる。 R は, $2.8 \times SD_R$ から求める。

次に, RSD_R の測定結果が, Horwitz 式による計算値 ($PRSD_R$) 以下であれば, 方法は許容される。

$$RSD_R \leq 2^{(1-0.5 \log C)} (PRSD_R) \dots \dots (3)$$

なお, この式は, HorRat 値の判断基準を 1 以下とすることを意味しており, 表 7 との間に不整合を生じている。しかし, 表 7 は 2019 年の制定であり, 新しい基準を採用すべきと考える。

(15) 分析結果の評価

試験実施者は, 外れ値について, どのような措置を取るかを決定する。

(16) CIPAC 会議への報告書作成

分析方法と試験結果を記載した最終報告書を作成し, CIPAC 会議に提出・報告し, 最終評価を受ける。

2.3. 他の国際的ガイドラインとの比較

共同試験を実施するための国際的な指針は, III. 2.2. に示した CIPAC の「Guidelines for Collaborative Study Procedures for Assessment of Performance of Analytical Methods (1989)」³²⁾ の他, IUPAC が 1995 年に「Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies (Technical Report) (方法の性能試験の設計, 実施, 解釈に関するプロトコール(技術報告書)⁴⁵⁾」, AOAC International が 2002 年に, 「Official Method of Analysis, Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis (公的な分析方法, 付録 D: 分析方法の特性の妥当性を検証するための共同試験の実施手順についての指針)⁴⁶⁾」を設定している。AOAC 指針は, IUPAC 指針 (1995) を改訂して 2002 年に作成されたものである。

CIPAC 指針は, IUPAC の指針 (1988)⁴⁷⁾ をベースにしており, IUPAC (1988) は 1995 年に上記の指針に改定されている。従って, これらの指針を時系列に並べると, IUPAC (1988) → CIPAC (1989) → IUPAC (1995) → AOAC (2002) となり, 新しい指針は既存の指針を反映させて作成されている。

そこで, CIPAC の指針について, 最新の指針である AOAC との比較を行った (表 8)。材料数, 試験所数, 分析の繰り返し数, 分析方法の作成, 予備試験の実施と共同試験参加数等の重要な点に違いがなかった。特に, 外れ値検定は, 両者とも

表 8 共同試験の実施手順の比較

項目	AOAC (2002) ⁴⁶⁾	CIPAC (1989) ³²⁾
材料数 ^{a)}	5点以上(単一マトリックス, 単一濃度のときは3以上)。	5点以上。
試験所数	8以上。最適試験所数は、精度とコストのバランスから8～10。非常に高額な装置や専門の分析機関に限定される場合は5以上。	8以上を無作為に選ぶ。製品が国際的に流通する場合は、異なる国の試験所が参加できるようにする。
繰り返し分析数	室内の併行精度が必要な場合は2回。 室内の併行精度が不要の場合は1回。	2回(日を変えて行う)。
分析方法の作成	単一試験所において、分析方法を最適化する。 実施手順書は、ステップごとに明確に記載する。	分析方法は、適用性(ある範囲の製品と濃度レベルに適用でき、選択性および感度を持つ)、信頼性(精確度、併行精度、室内再現性が許容可能)、実用性(迅速かつ低コスト、試薬・機器が容易に入手可能)を持つ必要がある。 クロマトグラフィーを用いた分析法を設計するための基本原則を示した指針あり。 実施する手順について、明確、簡潔、詳細に説明する。
予備試験	時間と試料量に余裕があれば、3試験所で予備試験(小規模共同試験)を実施する。	3～4の試験所(任意)。
共同試験参加者の募集	参加可能な試験所リストから選定、招待状の送付、受け入れ可否を連絡し決定される。	CIPAC事務局を通じて募集を行う。 参加試験所の選定は主催者が行う。
分析	プロトコールに従って分析を行う。	分析方法に従って実施する。逸脱があった場合、文書化して正当化する。著しい逸脱は表から除外される可能性がある。 指定された時間枠内に分析を終了する。 直線性を確認した後、1点検量線を用いて定量する。
有効数字	標準偏差の有効数字は2桁とする。 平均値は、標準偏差の表示に合わせる。 例:SDが0.012のときは、濃度は0.147, RSDは8.2%	試験実施者が指定する。
分析者	1試験所1分析者。	規定なし。
試料送付	手順書に定めた必要量だけを送付する。 輸送規則に基づいて梱包し、曖昧さのない読みやすいラベルを貼付する。適切な保管方法を説明する。	試料のラベルと梱包は、GHSや危険物輸送報告に従う。
報告	共同試験の報告書を期限内に提出する責任を負う。 参加試験所は、加工しないデータを送付する。 分析結果とともに、検量線データに提出する。	試験実施者は、結果の返却期限を示す。 分析データを試験結果に変換する計算式を入力した報告シートを準備し、報告に用いる。
統計検定	外れ値検定は、Cochran検定(室内の外れ値を検出、危険率2.5%の片側検定)、外れ値1つのGrubbs検定(室内の外れ値を検出、危険率2.5%の両側検定)、外れ値2つのGrubbs検定(最高端2つ、最低端2つ、各端の1つずつの2つで、危険率2.5%の両側検定)の順で行う。 外れ値の棄却は、試験実施者が判断する。 外れ値として許容できる最大比率は29。 検定のフローチャートあり(IUPAC 1988 ⁴⁷⁾ に掲載されている内容と同じ)。	外れ値検定は、危険率5%として、Cochran検定、外れ値1つのGrubbs検定、外れ値2つのGrubbs検定を行う。 試験実施者は、外れ値についての対応を決め、外れ値が29(22%)以上となった場合、除去を中止する。
HorRatの評価基準	<0.5 : 試験の独立性がない等の測定方法の再現性に疑問がある 0.5 << 1.5 : 通常期待される室内再現性 1.5 << 2.0 : 通常期待されるよりも大きい室内再現性、考察が必要 2.0 < : 室内再現性に問題がある	≤0.3 : 許容可能であるが、合理的な説明が必要 0.3 < ≤1 : 完全に許容可能 1 < ≤2 : 許容可能であるが、合理的な説明が必要 2 < : 許容できない
最終報告書	記載する項目は次のとおり: 材料(濃度の昇順に記載)、外れ値検定の後に残った試験所室数、外れ値検定で除外された試験所数、平均値(単位)、既知ならば真値または設定値、併行標準偏差(s _p)、併行相対標準偏差(RSD _p)、併行許容差(r)、s _p が有効でないときのオプションとして総室内標準偏差(s _e)、室内再現標準偏差(s _r)、室内再現相対標準偏差(RSD _r)、HORRAT(化学分析値の場合)、室内再現許容差(R)、報告可能ならば回収率(%)	分析方法と分析結果を記載した最終報告書を作成し、CIPAC会議で報告し、評価を受ける。 報告書には、共同試験に参加した試験所数、分析結果の平均値、併行精度と室内再現性の標準偏差(s _p とs _r)および相対標準偏差(RSD _p とRSD _r)、併行精度許容差(r)と室内再現許容差(R)、室内再現性の予測値(PRSD)を記載する。

a) 1つの材料とは、1つのマトリックスにおける1成分1濃度をいう。

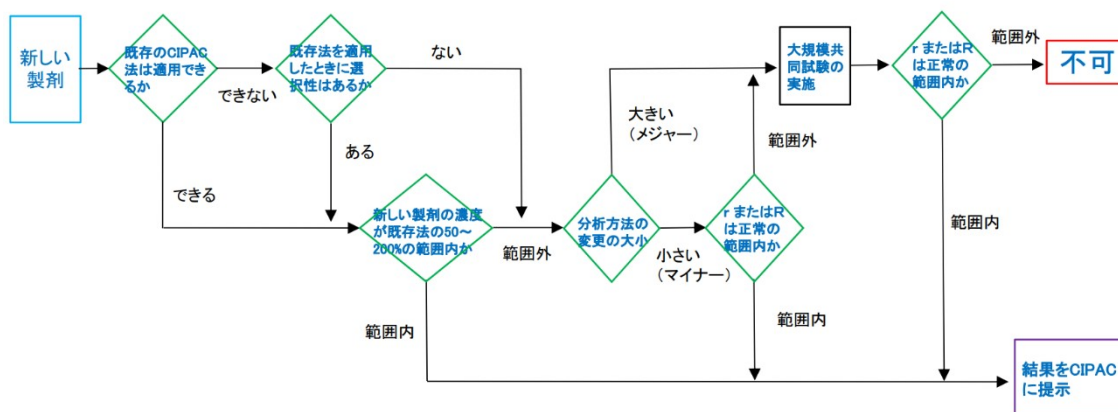


図3 試験方法の拡張手順

IUPAC (1988)に基づいており、同等とみなせる。しかし、細かい点として、共同試験参加者の募集と決定、分析における有効数字、試験所あたりの分析者数等に違いが見られた。HorRat 値の判断基準も違いがあるものの、HorRat 値が2 (または2.0) よりも大きい場合を不可とする点は同じであった。

3. 拡張

3.1. 手順

CIPAC 法は、分析対象となる有効成分に対して、剤型と適用濃度が定められている。この剤型と濃度範囲とは異なる新しい製剤に既存方法を適用する場合、新たな製剤を用いた共同試験を実施することは現実的ではなく、試験を行わずに方法を採用することは標準化の原則に反することから、試験方法の拡張 (Extension) が行われる。Extension of the scope of methods³³⁾は、このための手順を示した文書で、2000年に作成された。

拡張の手順は、

- ①既存の CIPAC 法が利用できるか、
- ②新しい製剤の濃度が 50～200%の範囲内にあるか、
- ③既存法を適用したときに選択性はあるか、
- ④分析方法の変更は大きいか小さいか、
- ⑤再現性が正常の範囲内か、

の5つの論点で検証される。

なお、2017年のTC (公開) において、分析方法の拡張における変更の大小 (マイナーとメジャー) の判断基準が明確ではないとの問題が提起されているが結論は出ていない。

3.2. フローチャート

Extension of the scope of methods Flowchart³⁴⁾は、拡張するための流れを示した文書。

3.1.の手順とフローチャート原文を踏まえて修正したフローを図3に示す。

4. 不純物の分析方法

不純物の分析方法はFAO および WHO の要請により妥当性の検討が始められ、FAO/WHO 規格で定義される原体および製剤中の毒性が懸念される不純物を定量するためのCIPACによる分析方法の開発、評価、採用、公開のプロセスを説明した文書として、Guidelines for analytical methods for the determination of relevant impurities referred to in FAO and/or WHO specifications for pesticide technical grade active ingredients and formulations³⁵⁾が2009年に作成された。

4.1. 分析方法の開発

有効成分の分析方法と同様、不純物の分析方法の信頼性を証明するデータが必要であり、当該分析方法を開発した試験所が、次の事項を作成する。

- ・同一性
適切な方法 (通常、IR 吸収スペクトル) で分析対象成分の同一性を確認する。
- ・特異性
原体および対象となるすべての剤型に対して影響のないこと。
- ・直線性
3濃度2回繰り返して測定する。
- ・精確度
原体およびすべての製剤を対象に、FAO/WHO 規格値付近での2回繰り返しの回収率を測定する。判断基準を表9に示す。標準添加法を用いても良い。なお、この基準は、SANCO/3030/99 rev.4⁴¹⁾と同じであり、最新の rev.5の規定とは異なる現状にある。

表9 不純物の回収率の許容範囲

含有濃度 (%)	許容範囲
>1	90~110
0.1 ~ 1	80~120
<0.1	75~125

・併行精度

原体およびすべての製剤を対象に、FAO/WHO 規格値付近での5回繰り返しによるRSD_rを測定する。評価には式(1)を用いる。

・定量限界

原体およびすべての製剤を対象に、LOQ（定量限界）を決定する。

4.2. ピアバリデーション

3つ以上の独立した試験所によるピアバリデーションを行う。大規模共同試験は不要で、4.1.と同様な項目を検討する。なお、同一性の試験は不要、併行精度は室間再現性（RSD_R）とする。

試験への招待は、情報シートを用いてCIPAC事務局を通じて行っても良いが、試験実施者自身または地域PACを通じて行っても良い。試験実施者は結果を取りまとめ、CIPAC会議で方法と結果を報告し、CIPACによる議論を経て、採用の可能性を検討する。

採用された分析方法は、CIPACホームページで公開され⁴⁸⁾、ハンドブックにも掲載される。ただし、分析方法はパブリックドメイン（公有の財産）として取り扱われる。不純物の分析には、「暫定」や「正式」のステータスはない。

5. LNの分析・物化性

Work flow integration of analytical and physical-chemical methods for LN into related CIPAC methods for corresponding active guidelines³⁶⁾は、LN中の有効成分の分析方法および物理的・化学的性状（特に、Retention Index：保持指数）の測定方法を作成するための文書で、2009年に作成された。

LNは、殺虫剤を含浸させた蚊帳であり、マラリアのような媒介性疾患の予防のために用いられる。殺虫剤には、主に合成ピレスロイドが用いられる。蚊帳には、ポリエチレンまたはポリエステルが使用され、前者は殺虫剤を練り込んで製造、後者は殺虫剤をコーティングして製造される。また、LNの性能を評価する物理的・化学的性状として、Release Rate（放出速度）やRetention Indexが使用される。両者は対の関係にあり、いずれも洗濯によってLNから除去される有効成分と除去されない有効成分の比を示す。このように、LNごとに違い

があることから、試料調製と分析のモジュールに分けて構成されている。

(1) 試料調製

資材が練り込み式かコーティング式かに合わせて、試料調製方法を定める。

(2) 分析

Retention Indexは、MT 195 Wash resistance index of LN's（ハンドブックO巻に収録）により測定する。有効成分は、適切な分析方法により定量する。

IV. CIPAC法とハンドブック

1. CIPAC法の歴史

1957年の第1回欧州農薬分析法委員会（CPAC）において、26有効成分の分析方法と物理的・化学的性状の測定方法を検討するための共同試験が開始され、適切とみなされた分析方法等は、他のヨーロッパ諸国の参加も得て、第3回CPACにおいて委員会法（Committee法、現在のCIPAC法）とすることが決定された¹⁾。

2. CIPAC法の種類

CIPAC法には、分析方法のM、物理化学的性状のMT、試薬のRE、標準品のPP、IR吸収スペクトルのIRのコードが付けられた種類がある。

2.1. M (Analytical Method)

農薬の原体および製剤中の有効成分を定量するための分析方法であり、化合物のコード番号と分析方法が適用される材料を組み合わせて使用される。例えば、コード番号500のアプロピロホスの原体（TC）の分析方法は、500/TC/M/-となる。原体中に安全性に懸念のある不純物が含まれる場合、不純物単独または有効成分の分析方法中に設定される。

ハンドブックに記載される分析方法は、承認状況に応じてM、(M)、mに分けられており、Mは正式法（full method）、(M)は暫定法（provisional method）、mは試行法（tentative method）を示す。

2.2. MT (Miscellaneous Techniques)

製剤の物理的・化学的性状を測定する方法であり、方法ごとに番号が付けられている。乳剤の安定性等の一般的な測定方法やCIPAC標準水の調製方法の他に、マイクロカプセル剤中の遊離有効成分を測定する方法のように特定の有効成分に特化したもの、ダイオキシン類やETU（エチレンチオ尿素）のような不純物の分析方法、フェノール酢酸系農薬の有効成分の分析方法等がある。

表 10 ハンドブックの発行状況および見直しの状況

ハンドブック巻名	出版年	状況	価格 ^{a)}		見直し (review)	
			紙媒体	CD-ROM		
I	1970	廃止 (廃刊)	絶版	—	M と RE は E 巻に反映	
1A	1980			1A-D ^{b)} 1: 80 ^{c)} 10: 720	MT は F 巻に反映 M は H 巻に反映	
1B	1983	有効	絶版	E-P 1: 300 ^{c)} 10: 2700	2009 年に終了	
1C	1985					
D	1988					
E	1993				55	2010 年に終了
F	1995				60	
G	1995				40	
H	1998				55	
J	2000				45	
K	2003				50	
L	2006				50	
M	2009				50	
N	2012				50	
O	2017				60	
P	2021	60	E-P(update ver) ^{d)} 1: 60 ^{c)} 10: 540	DAPA と ESPAC が見直しを行う予定		

a) 単位：英国ポンド

b) 紙媒体をスキャンしたもので、E-P 版と違い、検索機能は付属していない。

c) 利用人数が 1 人用と 10 人用。

d) ハンドブック P 巻のみを収録しており、利用にあたっては、E-O 巻を収録した CD-ROM が必要。

2. 3. RE (Reagents, Indicator and Solvents)

試薬・有機溶媒等の規格、濃度を指定した分析用の溶液・滴定用の指示薬の調製方法等を規定している。

2. 4. PP (Pure Pesticides)

有効成分ごとに、標準品の精製方法、純度の確認方法、保存方法を規定している。

2. 5. IR (Infrared Analysis)

有効成分の IR 吸収スペクトルが掲載されているが、後述 (IV. 5. 1. 参照) のように維持されていない。

2. 6. 植物防疫用語

植物防疫に関する用語を定義したもので、ハンドブック 1 巻に掲載された 43 語を更新して、1A 巻に 116 語が掲載されているが、同様に維持されていない。

3. ハンドブックの発行

CIPAC 法となった試験方法等は、ハンドブックに掲載される。ハンドブック 1 巻が 1970 年に出版されて以降、2021 年出版の P 巻まで全 16 巻が出

版されている。次のハンドブックとなる Q 巻は 2024 年に出版の予定である。2022 年 7 月末時点におけるハンドブックの出版状況と価格を表 10 に示す。ハンドブックは単体での販売であるが、CD-ROM 版は、ハンドブック 1A~D 巻および E~P 巻を収録した 2 種が発行されている。なお、紙媒体での 1~D 巻は絶版となっているので、CD-ROM 版でのみ入手が可能である。

CD-ROM 版は、利用者のネットワーク等で活用することにより複数人で利用することができるという問題点が MCM において指摘され、これに対応するため、利用人数を 1 人のみと 10 人とした 2 種類が発行されることになった。これらの紙媒体および CD-ROM 版のハンドブックは、CIPAC ホームページから注文できる。また、P 巻のみを収録したもの (update version という。) も販売されているが、使用にあたっては、旧版である E~O 巻の CD-ROM が必要である。これは、MCM において、新しいハンドブックが出版された時に当該部分だけの CD-ROM を作成して欲しいという要望があり、これに対応したものである。

4. CIPAC 法の見直し

有効成分や分析方法等にはライフサイクルがあり、毒性や残留性に懸念がある有効成分は使用禁止等の措置が取られ、分析技術にも新しい技術が

導入されている。このため、CIPAC では、公的分析機関での農薬の品質管理、農薬登録用の資料作成、FAO/WHO 規格に利用されているかを考慮して、出版されたハンドブックの見直し (review) を行っている (表 10)。

4.1. ハンドブック 1 巻と 1A 巻

1 巻は 1970 年に出版されたが見直しを受け、補遺という形で 1A 巻、1B 巻、1C 巻が出版された。さらに、1 巻と 1A 巻、ハンドブックとは別に出版された Proceeding (1980⁴⁹⁾, 1981⁵⁰⁾) に掲載されている方法等のうち、使われていると思われる方法の見直しの手続きを受け、1 巻中の分析方法と RE は E 巻に、MT は F 巻に、1A 巻と Proceeding 中の M は H 巻に更新されたが、これら以外の M はすべて維持されなくなった。このため、Cumulative Index (総合索引)⁵¹⁾には 1B 巻以降が掲載されている。

1 巻と 1A 巻は絶版・廃刊となっており、1 巻に掲載されている方法のほとんどは更新されているが、1 巻のみに掲載されている方法がある。事務局に確認したところ、必要があれば、更新することであるが、作成から 50 年以上経過しており、更新されていない方法には需要がないと推定される。

4.2. ハンドブック 1B 巻以降

1B～E 巻は 2009 年、F 巻は 2010 年にそれぞれ見直しが行われた。G～K 巻は 2018 年に見直し案が完成し、意見募集が行われている。今後、DAPA および ESPAC による L 巻の見直し作業が行われる予定となっている。

なお、見直し等により誤記があった場合、ホームページに公開される。

4.3. 廃止された方法⁵²⁾

CIPAC 法の中には、滴定法、比色法のように選択性が低い分析方法や、現在は主流ではなくなったバックドカラムを用いた GC 法等がある。このような方法は見直しを受け、廃止された方法 (non support method: 維持されなくなった方法, obsolete: 廃棄を含む。)となることが多い。これらは、CIPAC として有効な試験方法とは見なせなくなり、方法の拡張や質問への対応が不可能となる。しかし、試験方法の目的に合えば、試験方法としての利用は可能である。

5. 種類ごとの設定状況

CIPAC 法の種類ごとに、ハンドブック 1 巻から P 巻までに掲載されている試験方法等の設定状況を表 11 にまとめた。なお、廃止されているかどうかは CIPAC ホームページでのみ確認できる。

5.1. IR

IR 吸収スペクトルは、anthraquinone から tecnazene までの 50 種の有効成分が設定、異性体、塩、エステルを分けてカウントすると 60 成分 (一般名ベース) が、ハンドブック 1A 巻に掲載されているが、全て維持されていない。測定方法は、ヌジョールおよびヘキサクロロブタジエン溶液、四塩化炭素および二硫化炭素溶液、液状毛細管膜である。

5.2. PP

有効成分の標準品 (PP) は、PP 1 の 2,4-D から PP 261 の bupirimate まで、39 成分が設定、ハンドブック 1～1A 巻の 16 成分が廃止、1B～E 巻の 23 成分が有効となっている。

5.3. RE

分析用の試薬・溶液等 (RE) は、ハンドブック 1～E 巻において、RE 1 の Ammonia から RE 155 の Cyclohexane まで設定され、延べ 232 成分が設定 (うち 125 成分が有効)、異なる濃度の調製方法を含めると 353 種類が設定 (うち 195 種類が有効) された。ハンドブック 1～C 巻に掲載されている方法は全て E 巻に更新されたため、有効な方法は実成分が 121 成分、濃度違いを含めると 191 種類が設定されている。

5.4. MT

物理化学的性状の試験方法 (MT) は、MT 1 の「Freezing Point」から MT 200 の「Retention Properties Method of Pyriproxyfen MR」まで設定されている。MT 法は、1 つの測定項目に対して複数の測定方法があることがある。このため、MT 3 の「Specific Gravity, Density, and Weigh per Millilitre (比重、密度)」の場合、MT 3.1 の「Hydrometer 法」、MT 3.2 の「Pyknometer 法」、MT 3.3 の「SC の密度」のように枝番号が付いている。1～E 巻に設定された MT 法は見直しを受け、F 巻に掲載された。F 巻以降をまとめると、197 法 (枝番号として 259 法) が設定、うち、124 法 (枝番号として 161 法) が有効となっている (G～K 巻の見直しは含まない)。

表 11 CIPAC 法の設定状況

(1) IR, PP, RE, MT^{a)}

ハンド ブック 巻名	IR		PP		RE				MT			
	廃止		有効 ^{c)}	廃止 ^{c)}	成分 ^{d)}		濃度違い ^{d)}		主番号 ^{e)}		枝番号 ^{e)}	
	種類 ^{b)}	成分 ^{b)}			有効	廃止	有効	廃止	有効	廃止	有効	廃止
1	0	0	—	11	—	76	—	123	—	81	—	127
1A	50	60	—	5	—	31	—	35	—	40	—	47
1B	0	0	4	—	2	0	2	0	0	4	0	4
1C	0	0	14	—	2	0	2	0	0	9	0	24
D	0	0	3	—	0	0	0	0	0	4	0	4
E	0	0	2	—	121	0	191	0	0	0	0	0
F	0	0	0	—	0	0	0	0	76	73	112	98
G ^{f)}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H ^{f)}	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	5	0
J ^{f)}	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	7	0
K ^{f)}	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	6	0
L	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	6	0
M	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
N	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
O	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0	16	0
P	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	7	0
小計	50	60	23	16	125	107	195	158	124	73	161	98
合計			39		232 (実数 121) ^{g)}		353 (実数 191) ^{g)}		197		259	

(2) M^{h)}

ハンド ブック 巻名	有効成分								不純物							
	成分				分析方法				成分				分析方法			
	実数 ⁱ⁾		延べ数 ⁱ⁾		方法別 ^{j)}		剤型別 ^{j)}		実数		延べ数		方法別		剤型別	
	有効	廃止	有効	廃止	有効	廃止	有効	廃止	有効	廃止	有効	廃止	有効	廃止	有効	廃止
1	—	73	—	103	—	118	—	248	—	14	—	19	—	19	—	43
1A	—	57	—	80	—	79	—	160	—	11	—	14	—	12	—	34
1B	5	41	5	48	5	48	11	118	1	1	4	1	1	1	2	1
1C	46	48	47	46	73	55	124	104	0	0	0	0	0	0	0	0
D	33	13	34	14	27	14	82	29	1	1	1	1	1	1	2	3
E	35	9	33	9	40	9	118	21	12	1	16	1	12	4	29	6
F	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
G ^{f)}	20	0	20	0	24	0	74	0	4	0	4	0	4	0	7	0
H ^{f)}	61	0	68	0	62	0	163	0	6	0	8	0	8	0	15	0
J ^{f)}	19	0	21	0	23	0	58	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K ^{f)}	21	0	22	0	23	0	61	0	1	0	1	0	1	0	4	0
L	19	—	19	—	20	—	54	—	0	—	0	—	0	—	0	—
M	27	—	28	—	31	—	79	—	1 ^{k)}	—	2	—	2	—	2	—
N	16	—	16	—	18	—	59	—	4 ^{k)}	—	4	—	4	—	9	—
O	20	—	22	—	25	—	49	—	6	—	6	—	6	—	6	—
P	25	—	27	—	25	—	55	—	3 ^{k)}	—	3	—	3	—	5	—
小計	347	241	362	300	396	323	987	680	39	28	49	38	42	37	81	87
合計	588		662		719		1667		67		87		79		168	
	実数：386 ^{g)}		(有効255)						実数：62 ^{g)}		(有効33)					

「—」は該当なし。

- a) IR：赤外線吸収スペクトル，PP：有効成分の標準品，RE：試薬，溶媒等，MT：製剤の物理的・化学的性状の測定方法。
- b) 有効成分が塩，エステルの場合またはシス/トランス異性体の場合，これらを分けてカウントしたのが「成分」，母体となる酸・塩基や異性体をまとめてカウントしたのが「種類」。
- c) 有効：試験方法として維持されている (supported)。廃止：試験方法として維持されていない，または，廃止されている (no supported, obsolete)。
- d) 成分：試薬・溶媒等の名称。濃度違い：試験溶液や標準溶液において異なる濃度の溶液がある場合は別カウント。
- e) 主番号：MT法の試験項目を示す番号，枝番号：MT法の試験項目を細分化した試験方法。
- f) 緑枠で囲った数値は，ハンドブック G～K 巻の見直し案を反映。
- g) ハンドブック 1～P 巻までの実数，ハンドブック間に成分の重複があるため，ハンドブックごとの合計と合わない。
- h) M：農薬の原体および製剤の分析方法。
- i) 実数：各ハンドブック内の有効成分・不純物の重複を排除してカウント。延べ数：各ハンドブック内の有効成分の重複を排除しないでカウント (混合剤が反映される)。
- j) 方法別：各ハンドブック内の有効成分・不純物の分析方法を種類別にカウント。剤型別：有効成分・不純物に設定されている M 法 (例，○○/TC/M/-) をカウント。
- k) ホームページの「free relevant impurity」にも掲載されている。

5. 5. M

有効成分については，前述のコード番号 1022 番までのうち 997 番 (Cyetpyrafen (Etpyrafen)) までについて，延べ 588 成分 (実数として 386 成分)，延べ 1667 種類の M 法 (M は有効成分コード番号/TC/M/-として設定され，これを 1 つの種類とする) が設定されている。そのうち，347 成分 (実数として 255 成分)，延べ 987 種類の M 法が有効である (G～K 巻の見直しは含まない)。

不純物については，延べ 67 成分 (実数として 62 成分)，延べ 168 種類の M 法 (M は有効成分コード番号/TC/M/-として設定され，これを 1 つの種類とする) が設定されている。そのうち，39 成分 (実数として 33 成分)，延べ 81 種類の M 法が有効である (G～K 巻の見直しは含まない)。このうち，9 法が「Free relevant impurities methods」としてホームページでも公開 (IV. 7. 1. 参照) されている⁴⁸⁾。

6. ハンドブック発行前の分析方法等の公開

TC で承認された分析方法等でハンドブックに掲載される予定の分析方法は，「Pre-published methods」として CIPAC ホームページに掲載されており，有料で入手できる⁵³⁾。

7. 分析方法の無料公開

7. 1. 不純物

CIPAC 法として正式に採用された分析方法のうち，農薬原体・製剤中の毒性が懸念される不純物の分析方法は，安全性に関する事項のため，「Free relevant impurities methods」として CIPAC ホームページに無料で公開されている⁴⁸⁾。現在，次の 9 法 (10 成分) が公開され，一部がハンドブックにも掲載されている。

- terpyridines in diquat^{a)}
- terpyridines in paraquat^{a)}
- S-methylfenitrothion in fenitrothion^{b)}

- tetramethyl pyrophosphorothioate (TMPP) in fenitrothion^{b)}
- 1-chloro-2-methylpropene (1-CMP) and 3-chloro-2-methylpropene (3-CMP) in 1-methylcyclopropene (1-MCP)^{b)}
- 1,3-bis(4-trifluoromethoxyphenyl)urea and 4-(trifluoromethoxy)aniline in triflumuron^{c)}
- 1R-trans-permethric acid anhydride in transluthrin^{c)}
- prothioconazole-desthio in prothioconazole
- CGA 344605 in trifloxystrobin
 - a) ハンドブック M 巻にも掲載。
 - b) ハンドブック N 巻にも掲載。
 - c) ハンドブック P 巻にも掲載。

7. 2. マルチ分析法

製剤中の分析方法として検討されている「Multi method active ingredient」の案も CIPAC ホームページに掲載され，無料で入手できる⁵⁴⁾。これは，たくさんの者に分析方法を利用して貰い，データの蓄積や分析方法を改善するためである。詳細は V. 3. を参照。

V. 最近の話題

TC において最近検討された課題について，内容および結果が既に公開されているものを中心にもとめた。

1. HorRat の判定基準

CIPAC 法を設定するために実施された大規模共同試験等では，試験所における分析結果のばらつきを評価するために RSD を計算し，PRSD_r または PRSD_R と比較していた (式(1)，式(3)参照)。

2015 年の TC (公開) において，DAPA より，当時 EU で検討されていた分析方法の妥当性検証の指針 (後日，SANCO/3030/99 rev. 5⁵⁵⁾ として 2019 年に制定) を基にした RSD と PRSD の比 (HorRat) をこの評価に利用する案が提示され，意見が募集

された。なお、EUの指針 rev.5 は、0.3 未満に係る記述がない、RSD_rを用いる等一部内容が異なる点がある。

2016年のTC（公開）で、引き続き意見募集が行われ、2017年のTC（公開）において、DAPAは、HorRat値が2より大きい場合および0.3未満の場合の解釈を追加した修正案（表7参照）を提示、2018年のMCMで合意され、2019年7月10日付けでCIPACホームページに公開された³⁰⁾。

2. 共同試験実施に係るガイドライン

大規模共同試験を実施する際の関係者の責務と参加者を選定する明確な指針がなかった。そのため、2018年のTC（公開）において、DAPAは、試験実施者、CIPAC事務局、試験参加者の責務を明記した指針を提案し、その中で、試験参加者の選定方法も示した。具体的には、応募があった場合、1巡目として、世界をアメリカ、ヨーロッパ、アフリカ、アジア・オセアニアの4つに分け、その中から1試験所を選ぶ。定数に満たなかった場合は、2巡目として、全ての中から残りを選ぶ。選定は、いずれもCIPAC事務局が行う。また、選定結果は、落選者を含めて通知するというもの。

これに対して、次のような意見が出された：

- ・潜在的参加者が多い地域の試験所は、試験に参加できる可能性が少なくなることから、2巡目では、1巡目で選ばれた国を除外して選ぶ。
- ・共同試験に参加する試験所は、同じ年の他の試験に参加できないようにする。
- ・試験所の多様性が重要。
- ・外れた試験所は、他の共同試験で有利に扱われるべき。

2018年のTC（非公開）における検討結果を踏まえ、合意に至らなかった試験所の選定基準を除外した内容が、2018年12月1日付けで公開された³¹⁾。そのため、選定方法は、試験実施者にまかされるという現状にあり、先着順が多い。

3. Multi Active Ingredient and Matrix Methods (MAIMM)

CIPAC法における農薬原体および製剤中の有効成分の分析方法は、現在、有効成分の種類・製剤の種類ごとに設定されている。当該資材の分析に当たっては、指定されている商品名・内径・長さ等のカラム、有機溶媒・移動相、内部標準物質等を揃える必要がある。特にカラムは高価で経済的な負担にもなり、保管する場所も広く取るという問題点があった。

このため、残留分析等で広く用いられているマルチ分析法を原体や製剤に適用した分析方法の開発についての関心が高まり、2016年のシンポジウムにおいて、アイルランドより「Muti-active method in the formulation laboratory」が発表された⁵⁵⁾。

続いて、2018年のTC（公開）において、ESPACより、マルチ分析法をCIPAC法として利用するためのガイドラインが提案された。これに対し、CropLife Internationalからは、マルチ分析法を義務化することを望んでいないとの指摘があった。

2019年のシンポジウムにおいて、2016年に発表した分析方法を改良した内容がアイルランドより提案された⁵⁷⁾。さらに、BVL (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit；英名：The Federal Office of Consumer Protection and Food Safety, 連邦消費者保護・食品安全庁、ドイツ)⁵⁸⁾ およびFMCコーポレーション(アメリカ)⁵⁹⁾より、マルチ分析法を農薬の品質管理の手法に適用している事例が紹介されたように、既に一部の分析機関では導入されている。

マルチ分析法を義務としないことを明確にするため、ガイダンスとして作成することが2019年のMCMで合意された。また、マルチ分析法の適用性および信頼性を確立するため、マルチ分析法を用いた検証データがあれば、アイルランドのフルメンバーに提供願いたいとの申し出があり、これらを反映した分析方法の修正案を2020年の会議で報告することとなった。しかし、その後のCOVID-19の世界的な蔓延のため、CIPAC関連会議は、2020年がメール会議、2021年と2022年がオンライン会議となり、MAIMMは議題に上がっていないため検討が進んでいない現状にある。

なお、2019年CIPACシンポジウムで発表された分析方法の修正版が、「Free method」として2019年11月19日付けでCIPACホームページに公開されている⁵⁴⁾。

4. GCのキャリアーガス

日本国内で分析を行っている分析機関や試験所のほとんどは、キャピラリーGCのキャリアーガスにヘリウムを使用している。これは、分解能が高く、引火の危険がないためである。しかし、世界的にヘリウムの供給が不安定になったことから⁶⁰⁾、JAPACは、2014年に代替ガスとしての窒素の検討し、その結果を「Nitrogen as alternate GC carrier gas for agrochemicals」として2014年のシンポジウムでポスター発表した⁶¹⁾。この発表を受け、2014年の

表 12 GC を用いた大規模共同試験におけるキャリアーガスの使用状況

年次	2018 ⁶²⁾	2019 ⁶³⁾	2020 ⁶⁴⁾	2021 ⁶⁵⁾	2022 ⁶⁶⁾
農薬名	プロピコナゾール	アトラジン	メトリブジン	アムトリン	ジフェノコナゾール
試験所数	21	15	17	15	22
指定ガス	水素	水素	ヘリウム	ヘリウム	水素
実	ヘリウム	6	<u>11</u>	<u>2</u>	11
際	水素	<u>7</u>	1	0	<u>7</u>
	窒素	3	5	6	4
評価概要	全ての種類のガスを 用いた評価が行われ た。	全ての種類のガスを 用いた評価が行われ た。	ヘリウムを使用したデ ータセットによる評価 が行われた	全ての種類のガスを 用いた評価が行われ た。	事前にシス体とトランス 体の分離を確認すべ ば、水素とヘリウムの利 用が可能とされた

注：アンダーラインは、指定されたガスを使用。

TC (公開) において、JAPAC ではキャピラリーGC のキャリアーガスをヘリウムから窒素に変更することを検討し、これが試験方法の拡張に該当するかどうか懸念していることが追加議題として取り上げられた。CIPAC ガイドライン²⁵⁾では、GC を用いた分析におけるキャリアーガスには、ヘリウムまたは水素を推奨しており、窒素の使用は認められておられず、窒素を使用した場合、分解能が低下し、保持時間も長くなる。水素は低価格であり、分解能も良好であることから、水素の使用を推奨するとの意見があり、ガイドラインは現行のままとなっている。

ヘリウムの供給不足は依然継続しており、2018 年からの 5 年間に報告された大規模共同試験におけるキャリアーガスの事例⁶²⁻⁶⁶⁾を表 12 にまとめた。指定されたキャリアーガスと異なるガスが使用されていても問題とされなかった事例や、ヘリウムのみ、ヘリウムと水素を用いたデータにより評価が行われた事例がある。

DAPA は、CIPAC ガイドラインの改正を検討しており、キャリアーガスについても検討される予定となっている。

5. ラベル表示

2018 年に実施された大規模共同試験において、共同試験用試料を輸出する際の税関の規制が複雑という問題を回避するため、試験実施者が試験用試料の送り状やラベル表示を実際とは異なる製品として送付するという事例があった。

共同試験分担指針³⁰⁾では、試験実施者の責務として正しくラベル付けすることが記載されており、試験実施者がガイドラインを遵守しなかったことによるものであることから、2019 年の TC (公

開) において、共同試験のための試料は適切なラベル表示が必要であることが強調された。

謝辞

本原稿の作成にあたり、情報提供にご協力を頂いた CIPAC 事務局の Ralf Hänel 氏および László Bura 氏、第 4 回国際作物保護会議報告書の入手にあたって情報提供を頂いた三井化学アグロ(株)大河内武夫リサーチフェロー(日本農薬学会製剤・施用法研究会委員長)に感謝を申し上げます。

引用文献

- (全 URL のリンクについての確認は、2022 年 11 月 29 日に実施)
- 1) 日本農薬分析法部会：CIPAC と JAPAC，東京 (1984)
 - 2) 百弘：農薬製剤の CIPAC 分析法(1)，植物防疫，**43**，398-401 (1989)
 - 3) 百弘：農薬製剤の CIPAC 分析法(2)，植物防疫，**43**，451-455 (1989)
 - 4) 中島彩子：国際農薬分析法協議会(CIPAC)について，食品衛生学雑誌，**40**，J284-J286 (1999)
 - 5) 渡辺高志：CIPAC の概要および関連会合の報告，植物防疫，**67**，241-243 (2013)
http://jppa.or.jp/archive/pdf/67_04_49.pdf
 - 6) R. Hänel, L. Bura and M. D. Müller：What is CIPAC? (2007)
https://www.cipac.org/images/pdf/about_CIPAC_open_meeting_umhlanga_rock07_rh.pdf
 - 7) A. Martijn：CIPAC in “Encyclopedia of Agrochemicals (ed. by J. R. Plimme, D. W. Gammon, N. N. Ragsdale)”, Vol. 1, p. 379-381 (2003)

- <https://doi.org/10.1002/047126363X.agr050>
- 8) BVL : International BVL Involvement on Boards and Committees, Overview of the European and International Commitment of BVL's experts
https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/Internationales/Gremien_EN.pdf?__blob=publicationFile&v=3
 - 9) R. de B. Ashworth : Collaborative analytical work with particular reference to mercury, dinoseb and MCPA, Proceedings of the IVth International Congress of Crop Protection, Hamburg, September 1957, Vol. 2, 1129-1132 (1960)
 - 10) CIPAC : History
<https://www.cipac.org/index.php/what-we-do/history>
 - 11) R. de B. Ashworth : International Collaboration on Analytical Methods and Specifications for Pesticides, *Chemistry and Industry*, **1965**, 430-432
 - 12) Food and Agriculture Organization of the United Nations: Report of the Ninth Session of the European Commission on Agriculture, Report No. FAO/57/8/5274, pp88 (1957)
 - 13) R. de B. Ashworth, J. Henriet and J. F. Lovett: CIPAC Handbook Vol. 1, Analysis of Technical and Formulated Pesticides (1970)
 - 14) Resolutions, Proceedings of the IVth International Congress of Crop Protection, Hamburg, September 1957, Vol. 1, p15-20 (1959)
 - 15) M. S. Schechter: Report on Meeting of the Collaborative Pesticides Analytical Committee of Europe, *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, **49**, 158-159 (1966)
<https://doi.org/10.1093/jaoac/49.1.158>
 - 16) M. S. Schechter and R. L. Caswell: Report on Eleventh Annual Meeting of the Collaborative Pesticides Analytical Committee of Europe, *ibid.*, **51**, 421-422 (1968)
<https://doi.org/10.1093/jaoac/51.2.421>
 - 17) R. L. Caswell and M. S. Schechter : Report on Twelfth Annual Meeting of the Collaborative International Pesticides Analytical Committee (CIPAC), *ibid.*, **52**, 357-358 (1969)
<https://doi.org/10.1093/jaoac/52.2.357>
 - 18) M. S. Schechter and R. L. Caswell : Report on the 15th and 16th Annual Meetings of the Collaborative International Pesticides Analytical Council, *ibid.*, **56**, 765-766 (1973)
<https://doi.org/10.1093/jaoac/56.3.765>
 - 19) CIPAC : What are CIPAC Code Numbers?
https://www.cipac.org/images/pdf/what_are_CIPAC_Code_Numbers_new_110415.pdf
 - 20) Technical Committee, ISO/TC 81 Common names for pesticides and other agrochemicals : ISO 257, Pesticides and other agrochemicals - Principles for the selection of common names (2018)
 - 21) CIPAC : Download CIPAC Codes by Excel
https://www.cipac.org/images/excel/CIPAC_numbers.xlsx
 - 22) CIPAC : Handbook O, Appendix C, CIPAC Codes for Ions and Ester Radicals
https://www.cipac.org/images/Handbook-O/DC_App_C_290_292.pdf
 - 23) Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization : Manual on development and use of FAO and WHO specifications for pesticides, Second Edition. (2022)
<https://www.fao.org/3/cb8401en/cb8401en.pdf>,
https://extranet.who.int/pqweb/sites/default/files/documents/WHOVC-SP_Manual_development_FAO-WHO_specifications_2nd_EditionEN.pdf
 - 24) 渡辺高志 : 農薬製剤の剤型の国際的な分類, 日本農薬学会農薬製剤・施用法研究会 40 周年記念誌「農薬製剤・施用技術の発展」, p.25-34, 東京 (2021)
 - 25) FAO/WHO Joint Meeting on Pesticide Specifications (JMPS) : Manual on development and use of FAO and WHO specifications for pesticides, third revision of the First Edition. (2016)
https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/JMPS_Manual_2016/3rd_Amendment_JMPS_Manual.pdf
 - 26) CIPAC : Guidelines for the design of chromatographic analytical methods intended for CIPAC collaborative studies
<https://www.cipac.org/images/pdf/CIPAC4105R.pdf>
 - 27) CIPAC : Instructions for writing CIPAC methods
<https://www.cipac.org/images/pdf/methods1.pdf>
 - 28) CIPAC : Guidelines on method validation to be performed in support on analytical methods for agrochemical formulation (2003)
<https://www.cipac.org/images/pdf/validat.pdf>
 - 29) CIPAC : Format for the presentation of the summary of the results of collaborative studies

- <https://www.cipac.org/images/pdf/Format%20col%20studies.pdf>
- 30) CIPAC : Extension of the "Guidelines on method validation to be performed in support on analytical methods for agrochemical formulations" with the HorRat value (new) (2019)
https://www.cipac.org/images/pdf/guidance%20documents/HorRat_CIPAC.pdf
 - 31) CIPAC : Guideline on how to conduct a CIPAC collaborative trial (new) (2018)
<https://www.cipac.org/images/pdf/guidance%20documents/CIPAC%20Guideline%20on%20collaborative%20trials.pdf>
 - 32) CIPAC : CIPAC guidelines for Collaborative Study Procedures for Assessment of Performance of Analytical Methods (1989)
<https://www.cipac.org/images/pdf/study.pdf>
 - 33) CIPAC : Extension of the scope of methods (2000)
<https://www.cipac.org/images/pdf/extenmet.pdf>
 - 34) CIPAC : Extension of the scope of methods Flowchart
<https://www.cipac.org/images/pdf/extflow.pdf>
 - 35) CIPAC : Guidelines for analytical methods for the determination of relevant impurities referred to in FAO and/or WHO specifications for pesticide technical grade active ingredients and formulations (2009)
https://www.cipac.org/images/pdf/CIPAC_Guideline%20Relevant%20impurities_June%202009.pdf
 - 36) CIPAC : Work flow integration of analytical and physical-chemical methods for LN into related CIPAC methods for corresponding active guidelines (2009)
https://www.cipac.org/images/pdf/CIPAC_LN_work_flow_May_09_final_090526.pdf
 - 37) International Union of Pure and Applied Chemistry, Physical and Biophysical Chemistry Division : Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry, Third Edition (2007)
<https://iupac.org/wp-content/uploads/2019/05/IUPAC-GB3-2012-2ndPrinting-PDFsearchable.pdf>
 - 38) 日本化学会監修, 産業技術総合研究所計量標準総合センター訳: IUPAC 物理化学で用いられる量・単位・記号, 講談社サイエンティフィック
https://unit.aist.go.jp/nmij/public/report/translation/IUPAC/iupac/iupac_green_book_jp.pdf
 - 39) International Organization for Standardization, ISO / TC69 / SC6 Measurement methods and results : ISO 5725 Precision of test methods - Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests (Withdrawn) (1986)
 - 40) International Organization for Standardization, ISO / TC69 / SC6 Measurement methods and results : ISO 5725-2, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method (2019)
 - 41) European Commission, Directorate General Health and Consumer Protection : Technical Material and Preparations: Guidance for generating and reporting methods of analysis in support of pre- and post-registration data requirements for Annex II (part A, Section 4) and Annex III (part A, Section 5) of Directive 91/414. (Working document) (2000) ; SANCO/3030/99 rev. 4
 - 42) Technical Committee, ISO/TC 69/SC 6 Measurement methods and results : ISO 5725-1, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions (1994)
 - 43) Technical Committee, ISO/TMBG Technical Management Board - groups : ISO Guide 18, Layout for a standard method of chemical analysis (Withdrawn) (1978)
 - 44) Technical Committee, ISO/TC 47 Chemistry : ISO 78-2, Chemistry - Layouts for standards - Part 2: Methods of chemical analysis (1999)
 - 45) International Union of Pure and Applied Chemistry, Analytical, Applied and Clinical Chemistry Divisions Interdivisional Working Party on Harmonization of Quality Assurance Schemes for Analytical Laboratories : Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies (Technical Report), *Pure Appl. Chem.* **67**, 331-343 (1995)
<http://publications.iupac.org/pac/pdf/1995/pdf/6702x0331.pdf>
 - 46) AOAC International : AOAC Official Methods of Analysis, Appendix D, Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis (2002)
http://www.eoma.aoc.org/app_d.pdf
 - 47) International Union of Pure and Applied Chemistry, Analytical, Applied and Clinical Chemistry Divisions Interdivisional Working Party for

- Harmonization of Quality Assurance Schemes for Analytical Laboratories : Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Collaborative Studies, *Pure Appl. Chem.* **60**, 855-864 (1988)
<http://publications.iupac.org/pac/pdf/1988/pdf/6006x0855.pdf>
- 48) CIPAC : Free relevant impurities methods
<https://www.cipac.org/index.php/methods-publications/free-methods/freerelevant-impurities-methods>
- 49) CIPAC : CIPAC Proceeding (1980)
- 50) CIPAC : *ibid.* (1981)
- 51) CIPAC : Cumulative Index of Handbook 1A-P
https://cipac.org/images/Handbook-O/DG_CUM_I_ND_312_339.pdf
- 52) CIPAC : CIPAC Methods "No longer supported"
<https://www.cipac.org/index.php/methods-publications/further-information/no-longer-supported-methods>
- 53) CIPAC : Pre-published method
<https://www.cipac.org/index.php/methods-publications/pre-published-methods>
- 54) CIPAC : Multi-Active Method for the Analysis of Active Substances in Formulated Products to Support Quality Control
https://www.cipac.org/images/pdf/MAM_Method_Rev_21_June_2020.pdf
- 55) European Commission, Directorate General Health and Consumer Protection : Technical Active Substance and Plant protection products: Guidance for generating and reporting methods of analysis in support of pre- and post-registration data requirements for Annex (Section 4) of Regulation (EU) No 283/2013 and Annex (Section 5) of Regulation (EU) No 284/2013 ; SANCO/3030/99 rev. 5 (2019)
https://ec.europa.eu/food/system/files/2019-03/pesticides_ppp_app-proc_guide_phys-chem-ana_3030.pdf
- 56) J. Garvey and D. Carr : MAIMM Muti-active method in the formulation laboratory, Presentations and posters from the last CIPAC Symposium in Tokyo, Japan, 2016
- 57) J. Garvey : Update on the development of a Multi-Active Methods for the analysis of formulated product active substances, Presentations and posters from the last CIPAC Symposium in Braunschweig, Germany, 2019
https://www.cipac.org/images/pdf/2019/Presentations/04%20CIPAC%202019_Garvey%20MAM%20method.pdf
- 58) K. Dürkop (BVL) : Analysis of active substance and co-formulants in ppp – The use of standardised Inhouse and multi methods, Presentations and posters from the last CIPAC Symposium in Braunschweig, Germany, 2019
https://www.cipac.org/images/pdf/2019/Presentations/03%20CIPAC%202019_Dürkop.pdf
- 59) N. E. McNally (FMC) : Non-GLP validation of Multi-Analyte Method for Active Ingredients, Presentations and posters from the last CIPAC Symposium in Braunschweig, Germany, 2019
https://www.cipac.org/images/pdf/2019/Presentations/05%20CIPAC%202019_McNally.pdf
- 60) 産報出版 2012年12月7日付けニュース記事: ヘリウム需給, タイト感強まる 今夏から輸入減少 (2012)
<https://www.sanpo-pub.co.jp/topnews/2012/1207013701.html>
- 61) K. Tsunemi and T. Watanabe : Nitrogen as alternate GC carrier gas for agrochemicals, Presentations and posters from the CIPAC Symposium in Liège, Belgium, 2014
- 62) CIPAC : Minutes of the 62nd Annual meeting, CIPAC/5186/P (2018)
- 63) CIPAC : Minutes of the 63rd Annual meeting, CIPAC/5244/P (2019)
- 64) CIPAC : MINUTES OF THE 64th ANNUAL MEETING, CIPAC/5264/P (2020)
- 65) CIPAC : Minutes of the 65th Annual meeting, CIPAC/5294/P. (2021)
- 66) CIPAC : Minutes of the 66th Annual meeting, CIPAC/5332/P (2022)

Outline and Activities of Collaborative International Pesticides Analytical Council Limited (CIPAC)

Takashi Watanabe

Agricultural Chemicals Inspection Station, Food and Agricultural Materials Inspection Center

The Collaborative International Pesticides Analytical Council Limited (CIPAC) composed by analytical chemists working in national quality control laboratories (official chemists) is an international non-profit and non-governmental organization, and was incorporated in 1971 from its original body (Collaborative Pesticides Analytical Committee of Europe: CPAC) which was set up in 1957, through formerly CIPAC (Collaborative International Pesticides Analytical Committee). CIPAC standardizes analytical methods for active ingredients in technical grades and formulations of pesticides (including public health use), and methods to measure the physical chemical properties of pesticide formulations. The main activity of CIPAC is the establishment of the CIPAC method. The organizer of the study (mainly the pesticide manufacturer) proposes an analytical method, and "small scale collaborative study" involving three to four laboratories and "large scale collaborative study" involving eight or more laboratories are conducted to evaluate the performance of the analytical method. When the method is adapted by the CIPAC technical meeting, it becomes the full CIPAC method and will be published in the handbook. Test methods for physical chemical properties are also established in accordance with the analytical method. The handbook has been published in 16 volumes, from Volume 1 (1970) to Volume P (2021), each in paper and CD-ROM versions. The volumes 1 and 1A are no longer published, and the test methods and other information in these two volumes have been obsoleted, except for some of them that have been reviewed in later editions of the handbook. About 1,700 methods for the analysis of active ingredients have been established for about 590 components (about 990 methods for about 350 components are supported), about 170 methods for the analysis of impurities for about 70 components (about 80 methods for about 40 components are supported), and about 260 methods for the measurement of physical chemical properties (about 160 methods are supported), and these are listed in the handbook.

農林水産消費安全技術センター
農薬調査研究報告（第14号）

令和5年2月発行

発行： 独立行政法人 農林水産消費安全技術センター
農薬検査部

〒187-0011 東京都小平市鈴木町 2-772

電話：050-3797-1865 FAX：042-385-3361

印刷： 株式会社芳文社

