

残留農薬分析業務における分析法の検討1

ペンチオピラド試験法の導入のための妥当性検証

加藤直樹*1, 守山智章*1, 鈴木徹也*2, 山田篤司*2, 青山吉一*3, 白井裕一*3

*1独) 農林水産消費安全技術センター 農薬検査部

*2独) 農林水産消費安全技術センター 本部横浜事務所

*3独) 農林水産消費安全技術センター 神戸センター

ペンチオピラド試験法(農産物)について、レタス、ピーマン、なすおよび日本なしを供試作物とし、厚生労働省の「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試験室において単一試験室による妥当性確認(シングルラボバリデーション)を行った結果、すべての試験室において、妥当性評価の分析性能パラメータが、ガイドラインに示されたそれぞれの目標値に適合していることを確認した。

Keywords : ペンチオピラド, 妥当性評価ガイドライン, 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計

緒言

ペンチオピラドは、三井化学アグロが開発した野菜、果樹、芝などの作物病害を対象とした殺菌剤であり、平成20年7月に国内登録がされている。ペンチオピラド試験法は、「食品中に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」第3章個別試験法ペンチオピラド試験法(農産物)(以下、通知法)にLC/MSによる測定方法が示されているが、LC/MS/MSによる測定方法の検証を実施した。検証は、「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」(平成22年12月24日付け食安発1224第1号。(以下、ガイドライン)に基づき、3試験室において単一試験室による妥当性確認(シングルラボバリデーション)を行った。

材料および方法

1. 検証を行った試験室

以下の3試験室で検証を行った。

- ・ 農薬検査部農薬実態調査課(以下、小平)
- ・ 本部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. 試料および添加濃度

2.1. 試料

試料は、レタス、ピーマン、なすおよび日本なしの4種とし、平成25年度に残留農薬調査試料として各試験室において受領したものとした。

2.2. 添加濃度

添加濃度は、通知法で示された定量限界濃度である0.01 ppm(以下、低濃度)およびその10倍にあたる0.1 ppm(以下、高濃度)の2濃度とした。添加回収試験は、試料に農薬標準溶液を添加した後、30分程度放置し試験操作を行った。

3. 試薬等

3.1. ペンチオピラド標準液

ペンチオピラド標準品(関東化学製、純度99.0%)12.5 mgを正確に量って25 mLの全量フラスコに入れ、標線までアセトニトリルを加えて溶かし、500 µg/mLのペンチオピラド標準原液を調製した。

検量線作成用標準液は、ペンチオピラド標準原液1 mLを25 mLの全量フラスコに正確に入れ、標線まで同溶媒を加え20 µg/mLのペンチオピラド標準液を作成した。この溶液1 mLを20 mLの全量フラスコに正確にとり、窒素を送って乾固した後にアセトニトリル:水(7:3)で正確に希釈し、1 µg/mLのペンチオピラド標準液を作成した。これを適宜、アセトニトリル:水(7:3)で希釈し検量線作成用標準液とした。

添加回収試験標準液は、ペンチオピラド標準原液1 mLを25 mLの全量フラスコに正確に入れ、

窒素を送って乾固した後にアセトンを加え 20 µg/mL のペンチオピラド標準液を作成した。これを適宜、アセトンで希釈し添加回収試験標準液とした。

3.2. ケイソウ土

関東化学製セライト 545 を使用した。

3.3. アセトン

残留農薬試験用を使用した。

3.4. アセトニトリル

精製は、残留農薬試験用を使用した。

LC/MS/MS 移動相は、HPLC 用（小平）、LC/MS/MS 用（横浜、神戸）を使用した。

3.5. 水

超純水製造装置（ミリポア製）を使用した。

3.6. 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）

LC 部：Waters 製 Alliance2795（横浜）

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

3.7. ロータリーエバポレーター

BÜCHI 製 R-200

3.8. グラファイトカーボンミニカラム

SUPELCO 製 Envi-Carb 500 mg

3.9. オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム

Waters 製 Sep-Pak Vac 6cc C18

4. 前処理方法

4.1. 抽出

図 1 のフローのとおり、通知法に従いアセトンで抽出し正確に 200 mL とした。

4.2. 精製

このうちの 5 mL を予めアセトン 5 mL でコンディショニングしたグラファイトカーボンミニカラム（500 mg）に負荷し、アセトン 15 mL で溶出

させ溶出液に水 10 mL を加えて、40°C 以下で約 10 mL まで濃縮した。

アセトニトリルおよび水各 5 mL でコンディショニングしたオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（1,000 mg）に先の濃縮液を注入した後、アセトニトリルおよび水（2:3）混液 10 mL を注入し流出液は捨てる。次いで、アセトニトリルおよび水（7:3）混液 10 mL を注入し、アセトニトリルおよび水（7:3）混液で正確に 10 mL としたものを試験溶液とした。

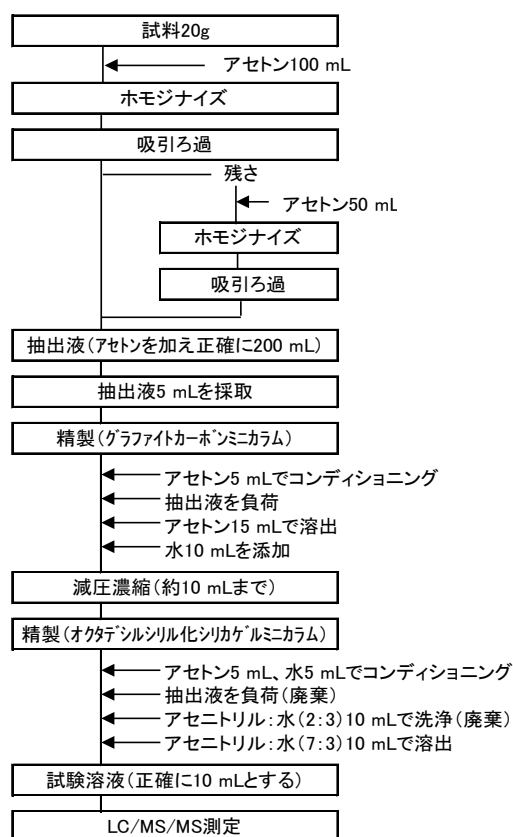


図1. ペンチオピラド試験法（農産物）の試験方法フロー

5. 測定条件

LC/MS/MSによる測定条件は、下表 1.および下
表 2.のとおりとした。

表 1.

カラム	: Waters製 UPLC HSS T3 2.1×30 mm, 1.8 μm (小平)
	: Waters製 Atlantis T3 2.1×100 mm, 3 μm (横浜)
	: Waters製 UPLC HSS T3 2.1×50 mm, 1.8 μm (神戸)
流量	: 0.4 mL/min (小平, 神戸), 0.2 mL/min (横浜)
カラム温度	: 40°C
注入量	: 2 μL (小平, 神戸), 10 μL (横浜)
移動相	: 2 mmol 酢酸アンモニウム水溶液 : アセトニトリル (40:60)
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	: 120°C
脱溶媒ガス温度	: 400°C (小平, 神戸), 350°C (横浜)
脱溶媒ガス流量	: 800 L/hr (小平, 神戸), 600 L/hr (横浜)

表 2.

ポジティブモード (ESI+)

試験室名	プリカーサー (m/z)	プロダクト (定量) (m/z)	プロダクト (定性) (m/z)	Cone (V)	Collision (eV)
小平	360	177	—	27	36
		—	276	27	14
横浜	360	177	—	31	35
		—	236	31	35
神戸	360	177	—	27	36
		—	256	27	20

ネガティブモード (ESI-) ※

試験室名	プリカーサー (m/z)	プロダクト (定量) (m/z)	プロダクト (定性) (m/z)	Cone (V)	Collision (eV)
小平	358	149	—	39	24
		—	109	39	44
横浜	358	149	—	40	25
		—	109	40	30
神戸	358	149	—	39	24
		—	208	39	24

※ ネガティブモードも同時測定した。

6. 試験法の妥当性評価方法

6.1. 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 併行で実施し、実施日を変える又は異なる実施者による 5 回の繰り返し試験を行う。

6.2. 選択性の確認

あらかじめペンチオピラドを含まないことを確認した試料 (以下、ブランク試料) の試験溶液を作製し、LC/MS/MS で測定して定量を妨害するピークの有無を確認する。

6.3. 検量線の直線性の確認

検量線作成用標準液 1 μg/mL を希釈し、0.0002, 0.0005, 0.001, 0.002, 0.005 および 0.01 μg/mL の溶液を作製する。これらの溶液を LC/MS/MS に注入し、得られたクロマトグラムからピーク面積から検量線を作成し、0.0002 μg/mL から順次、測定濃度を大きくして、0.01 μg/mL まで相関係数 r が 0.995 以上を維持していることを確認する。

6.4. 検出限界および定量限界の確認

定量限界はペンチオピラド試験法に示された 0.01 mg/kg を目標値とし、検出限界は 0.003 mg/kg を目標値とする。測定はクロマトグラムから当該農薬ピークの高さとピークの近傍 (ピークの半値幅の 10 倍程度の範囲) のノイズの高さから S/N 比 3 相当の濃度を求めて検出限界の実測値とし、同様に S/N 比 10 相当の濃度を求めて定量限界の実測値とする。いずれも有効数字一桁に丸めた値を検出限界および定量限界とする。

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

6.5. 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 25%未満, 室内精度が 30%未満, 高濃度は真度 (回収率) が 70~120%, 併行精度が 15%未満, 室内精度が 20%未満を目標値とし評価を行う。

表 3. 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 >

7. 結果および考察

7.1. 妥当性評価の結果

7.1.1. 選択性

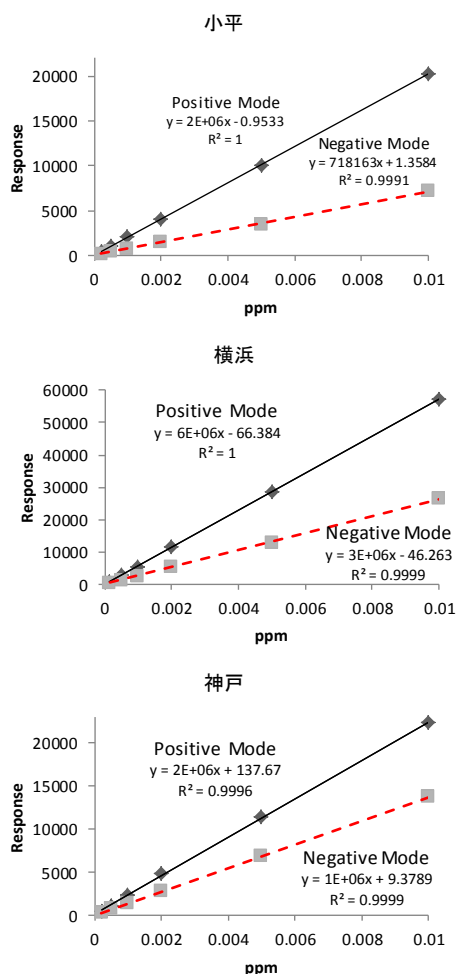
ブランク試料について分析を行ったところ、いずれの作物においてもペンチオピラドの定量の妨害となるピークは認められず、選択性に問題がないことを確認した。

7.1.2. 検量線の直線性

3 試験室の検量線の直線性の結果を表 4 に示した。いずれも 0.0002~0.01 ppm の範囲で、高い直線性 (相関係数 $r=0.999$ 以上) を有していることを確認した。

表 4. 直線性の範囲と相関係数

農薬名 (測定モード)	直線性の範囲 (ppm)	相関係数 (r)		
		小平	横浜	神戸
ペンチオピラド (ポジティブモード)	0.0002-0.01	1.0000	1.0000	0.9998
ペンチオピラド (ネガティブモード)	0.0002-0.01	0.9996	0.9999	1.0000



7.1.3. 検出限界および定量限界

3 試験室の検出限界および定量限界の結果を表 5 に示した。いずれも目標値より低い値を示した。

この結果から定量限界を一律基準である 0.01 mg/kg とし、検出限界をその 3 分の 1 の 0.003 mg/kg とした。

表 5. 検出限界および定量限界

試験室名	検出限界 (mg/kg)		定量限界 (mg/kg)	
	測定値	目標値	測定値	目標値
小平	0.0003	0.003	0.0009	0.01
横浜	0.0001	0.003	0.0003	0.01
神戸	0.0003	0.003	0.0009	0.01

7.1.4. 真度および精度

3 試験室の作物別の真度 (回収率) および精度 (併行精度および室内精度) の結果を表 6~表 9 に示した。

真度は、回収率がいずれもガイドラインに示された目標値 70~120% の範囲内であった。

併行精度および室内精度は、いずれもガイドラインに示された目標値を満たしていた。

表 6. レタスにおける回収率, 併行精度および室内精度
ポジティブモード

試験室名	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
小平	98.5	98.9	4.9	2.7	4.9	3.3
横浜	99.1	97.2	5.4	2.7	5.5	3.4
神戸	94.3	95.0	3.2	2.0	5.9	2.7

ネガティブモード

試験室名	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
小平	100.0	100.2	2.3	3.8	6.6	3.8
横浜	100.2	95.5	3.9	2.1	5.9	3.5
神戸	92.5	94.0	5.0	2.6	5.0	2.9

表 7. ピーマンにおける回収率, 併行精度および室内精度
ポジティブモード

試験室名	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
小平	98.7	101.0	6.1	2.6	6.1	3.2
横浜	97.1	93.7	1.7	3.1	5.3	3.1
神戸	94.7	97.8	4.2	3.4	7.5	3.8

ネガティブモード

試験室名	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
小平	97.0	99.6	3.9	2.7	6.3	2.8
横浜	96.1	96.8	2.1	4.1	5.4	4.2
神戸	95.1	93.6	3.9	2.6	3.9	4.5

表 8. なすにおける回収率, 併行精度および室内精度

ポジティブモード						
試験 室名	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
小平	97.1	102.0	5.7	2.8	5.7	3.4
横浜	102.0	99.5	3.2	2.5	4.8	2.5
神戸	93.9	96.1	4.8	2.3	4.8	2.3

ネガティブモード						
試験 室名	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
小平	99.9	98.9	4.9	2.1	4.9	2.5
横浜	99.1	96.2	3.6	1.8	8.2	6.8
神戸	93.9	97.8	5.0	1.7	5.0	5.1

表 9. 日本なしにおける回収率, 併行精度および室内精度

ポジティブモード						
試験 室名	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
小平	99.1	98.6	5.3	3.0	5.4	3.1
横浜	98.3	93.2	1.7	3.0	3.4	4.1
神戸	95.4	96.0	4.7	2.7	4.8	3.2

ネガティブモード						
試験 室名	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
小平	101.2	98.2	5.0	3.0	5.0	5.4
横浜	97.9	97.3	2.6	2.1	5.6	2.4
神戸	94.2	97.4	7.4	2.9	7.7	4.5

7.2. 室間再現精度の結果

参考として各試験室における5回繰り返しの併行測定結果の平均値(各試験室5個のデータ)について, 作物別の真度(回収率)および精度(併行精度および室間精度)の結果を表10に示した。この結果についてもすべてガイドラインの目標値を満たしていた。

表 10. 3試験室の測定結果(回収率, 併行精度および室間精度)

ポジティブモード						
作物名	回収率 (%) n=15		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
レタス	97.3	97.0	4.0	2.6	4.4	3.1
ピーマン	96.8	97.5	5.2	2.4	5.2	4.3
なす	97.7	99.2	3.5	1.9	5.2	3.4
日本なし	97.6	95.9	3.5	2.8	3.7	3.8

ネガティブモード						
作物名	回収率 (%) n=15		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
レタス	97.6	96.6	5.3	2.5	6.5	4.0
ピーマン	96.1	96.7	4.7	3.1	4.7	4.2
なす	97.7	97.7	4.8	4.9	5.4	4.9
日本なし	97.7	97.6	4.7	3.8	5.5	3.8

8. まとめ

通知法のペンチオピラド試験法を LC/MS/MS による測定方法についてガイドラインに基づき妥当性評価を行ったところ, 今回対象とした試料については, すべての試験室において, 妥当性評価の分析性能パラメータが, それぞれの目標値等に適合していることを確認した。

おわりに

以上の結果から, すべての試験室でペンチオピラド試験法を LC/MS/MS による測定が導入できると考えられた。

参考文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知, 食安発第 0124001 号第 3 章個別試験法(通知試験法)「ペンチオピラド試験法」(農産物)
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知, 食安発第 12241 号食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長通知, 食安基 1208 第 1 号食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインに関する質疑応答集(Q&A)について