

残留農薬分析業務における分析法の検討 1

(イプロジオンとその代謝物を LC/MS による一斉試験法に追加することの妥当性検証)

安本明弘¹, 加藤直樹¹, 中村圭介¹, 佐々木秀幸², 中山祐輔³, 鈴木徹也⁴
山田篤司⁴, 青山吉一⁵, 大谷有二⁶, 葛原茂広⁷, 臼井裕一⁷

イプロジオンとその代謝物について、厚生労働省の LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物) の最終試験液をメタノールからアセトニトリルに変更した試験法が導入可能か、各試験室においてシングルラボラトリーバリデーションを行い、妥当性が確認されたことから導入できると考えられた。

緒言

イプロジオンはジカルボキシイミド系の殺菌剤で幅広く農作物に使用されている。イプロジオンとその代謝物(以下「イプロジオン等」という。)は、最終試験液にメタノールを使用する厚生労働省の LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)¹⁾(以下「通知一斉試験法」という。)で分析可能とされている。しかし、農薬実態調査課では、通知一斉試験法による分析において、添加回収率が 70%を満たさず、妥当性が確認できなかった。イプロジオンはメタノール中で分解するとの報告^{2), 3)}もあり、最終試験溶液がアセトニトリルの個別試験法⁴⁾で対応している。

平成 24 年度、全国の農薬実態調査課では 110 検体について個別試験法で分析を行った。個別試験法は通知一斉試験法に比べると操作が煩雑で多くの時間を要することから、イプロジオン等の分析を通知一斉試験法に組み入れることが可能であるならば、分析業務について、かなりの効率化が見込まれる。そこで、最終試験液の溶媒としてアセトニトリルを追加した通知一斉試験法の改良法によるイプロジオン等の分析について、妥当性を検証したので報告する。

材料および方法

1. 検証を行った試験室

以下の 5 つの試験室で検証を行った。

- ・(独)農林水産消費安全技術センター(以下「FAMIC」という。)農薬検査部農薬実態調査課(以下「小平」という。)

- ・FAMIC 仙台センター 農薬実態調査課(以下「仙台」という。)
- ・FAMIC 本部横浜事務所 農薬実態調査課(以下「横浜」という。)
- ・FAMIC 名古屋センター 農薬実態調査課(以下「名古屋」という。)
- ・FAMIC 神戸センター 農薬実態調査課(以下「神戸」という。)

2. 試料および添加濃度

試料は、「平成 24 年度 国内産農産物における農薬の使用状況及び残留状況調査」⁵⁾による農薬使用履歴データより、イプロジオンの使用頻度の高い農産物であるなす、ねぎおよびメロンを選択した。

添加回収用試料および添加標準溶液は、各試験室がそれぞれ調製したものをを用いた。

各試験室の試料および添加濃度は、表 1 のとおり。

表 1. 各試験室が調製した試料およびイプロジオン等の添加濃度

試験室	試料	添加濃度 (ppm)	
		高濃度	低濃度
小平	メロン	0.5	0.05
	ねぎ	0.2	0.02
仙台, 神戸	メロン, ねぎ	0.5	0.05
横浜, 名古屋	メロン, なす	0.5	0.05

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仙台センター, 現 農薬検査部

³ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター, 現 表示監視部

⁴ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部横浜事務所

⁵ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター, 現 神戸センター

⁶ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター, 現 横浜事務所

⁷ 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

3. 試薬等

イプロジオンおよびイプロジオン代謝物は Dr. Ehrenstorfer 社製の農薬分析用標準品を使用した。

抽出、精製過程の有機溶媒は、残留農薬試験用を使用した。LC/MS の移動相のメタノールは、LC/MS 用を使用した。

その他試薬は、残留農薬試験用または特級を使用した。

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 (500 mg/500 mg) は、SIGMA-ALDRICH 社製の SUPELCO Supelclean ENVI-Carb/NH₂ 6 mL SPE Tube を使用した。

4. 前処理方法

前処理方法は通知一斉試験法の最終試験液をメタノールからアセトニトリルに変更し、アセトニトリル溶解時の希釈率を通知一斉試験法より 10 倍高くした方法とした。

4.1. 抽出

試料 20.0 g を量り採り、表 1 に示した添加濃度になるように調製した標準溶液を 1 mL 加えた。これにアセトニトリル 50 mL を加え、ワーリングブレンダー型またはポルトロン型ホモジナイザーを使用しホモジナイズした後、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトニトリル 20 mL を加え、同様にホモジナイズした後、吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とした。

抽出液 20 mL を採り、塩化ナトリウム 10 g および 0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH7.0) 20 mL を加え、振とうした。静置後、分離した水層を捨て、アセトニトリル層に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した。無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を 40°C 以下で減圧濃縮し、溶媒を留去した。残留物をアセトニトリル：トルエン (3:1) 混液 2 mL で溶解した。

4.2. 精製

アセトニトリル：トルエン (3:1) 混液 10 mL でコンディショニング済みの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に 4.1 で得られた溶液を負荷した。次にアセトニトリル：トルエン (3:1) 混液 20 mL で溶出し、全流出液を 40°C 以下で 1 mL 以下に減圧濃縮した。これにアセトン 10 mL を加えて 40°C 以下で 1 mL 以下に減圧濃縮し、再度アセトン 5 mL を加えて減圧濃縮し、溶媒を留去した。残留物をリン酸トリフェニル 1 µg/mL を含むアセトン：n-ヘキサン (1:1) 混液で溶解し、正確に 1 mL とした。

この試験溶液 0.125 mL をマイクロピペットで量り採り、窒素ガスを穏やかに吹き付けて溶媒を留去した。残留物をアセトニトリルで溶解し、正確に 5 mL とした。これをメンブレンフィルター (0.45 µm 以下) でろ過し、LC/MS 用試験溶液とした。

5. 測定条件

LC/MS の条件を表 2 に示した。

表 2. LC/MS 条件

LC conditions				
Column	ODS (i.d.×length, particle size) 2.1mm×100mm, 3µm			
Column temp.	40°C			
Injection volume	2 µL			
Solvent A	aq. 5mmol/L ammonium acetate			
Solvent B	MeOH. 5mmol/L ammonium acetate			
Gradient profile	Solvent A	%	Solvent B	%
Time (min.)	0	85	15	
	0.67	60	40	
	2.33	60	40	
	4	50	50	
	5.33	45	55	
	11.67	5	95	
	16.5	5	95	
	20	85	15	
Flow rate	0.2 mL/min			
MS conditions				
Ionization	ESI negative mode			
Date	SIM			
acquisition mode				
Monitor ion				
Iprodione	<i>m/z</i> 243 (Quantitative)			
	<i>m/z</i> 245 (Qualifier)			
Iprodion metabolite	<i>m/z</i> 328 (Quantitative)			
	<i>m/z</i> 330 (Qualifier)			

6. 試験法の妥当性評価方法

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」⁶⁾ (以下「ガイドライン」という。)に基づき、1 の各試験室において単一試験室による妥当性確認を行った。

農産物ごとに、試験対象である農薬を含まない試料 (ブランク試料) に試験対象の農薬を添加した試料 (添加試料) を試験法に従って試験し、その結果から以下の 6.1-4 に示した性能パラメータを求め、

それぞれの目標値（表 3）等に適合していることを確認した。

試験はガイドラインの枝分かれ実験計画（併行条件=2, 室内再現条件=5）に従った。

6. 1. 選択性

ブランク試料を試験法に従って試験を行い、定量を妨害するピークの有無を確認した。

6. 2. 真度（回収率）

添加試料 10 検体を試験法に従って試験を行い、得られた試験結果の平均値の添加濃度に対する比を求めた。

6. 3. 精度

添加試料の試験を繰り返し、得られた試験結果の標準偏差および相対標準偏差を求め、併行精度および複数の分析者または分析日による室内精度を評価した。

6. 4. 定量限界

標準溶液を機器分析したクロマトグラムのピークとノイズから S/N=10 相当の濃度を定量限界とした。

結果および考察

通知一斉試験法の最終試験液をメタノールからアセトニトリルに変更した結果、添加回収率が 70% を下回ることになった。また、最終試験液を 10 倍希釈したことにより LC/MS 分析でのキャリーオーバーの影響がなくなった。

1. 妥当性評価の結果

1. 1. 選択性

ブランク試料について試験を行ったところ、すべての試験室において、いずれの試料でもイプロジオン等の定量を妨害す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。

1. 2. 真度（回収率）および精度

すべての試験室で、真度（回収率）および精度（併行精度および室内精度）は、いずれの試料でもガイドラインに示された目標値を満たしていた。表 4-8 に各試験室の結果をまとめた（表 4：小平、表 5：仙台、表 6：横浜、表 7：名古屋、表 8：神戸）。

1. 3. 定量限界

定量限界は通知法に示された 0.01ppm よりもすべての試験室で低かった。

2. 室間再現精度

小平、仙台、横浜、名古屋および神戸の室間再現精度について、メロンの添加回収試験の結果より調査した（単一試験室妥当性確認に用いた各試験室におけるすべてのデータを併行データとした。）結果を表 9 にまとめた。

HORRAT 値⁷⁾を算出した結果、イプロジオンの高濃度添加では 0.33, 低濃度添加では 0.59, 代謝物では高濃度添加では 0.29, 低濃度添加では 0.53 と 2 を下回っており、本手法は FAMILIC 農薬実態調査課において十分な精度を持つことが確認された。

おわりに

すべての試験室、農産物において、単一試験室での妥当性評価の性能パラメータが、それぞれの目標値等に適合していることを確認した。

以上の結果から、検証を行ったすべての試験室において、イプロジオン等について最終試験液をアセトニトリルに変更した一斉試験法の改良法を導入できると考えられた。

引用文献

- 1) <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/zanryu3/3-002.html> (2014 年 10 月 30 日閲覧)
- 2) A. K. M. Anisuzzaman, T. Storehalder, D. C. Williams, N. Ogg, T. D. Kilbourne, J. J. Samuel, C. E. Cottrell, J. Agric. Food Chem., 56, pp. 502-506 (2008)
- 3) 織田哲郎, 新家薫子, 相川恵子, 四尾秋寿 石川県保健環境センター研究報告, 45, 32-42 (2008)
- 4) <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/zanryu3/2-020.html> (2014 年 10 月 30 日閲覧)
- 5) http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouyaku/140716_1.html (2014 年 10 月 30 日閲覧)
- 6) <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/zanryu2/dl/101224-1.pdf> (2014 年 10 月 30 日閲覧)
- 7) AOAC Inc. (2005). Appendix D : Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. In Official Methods of Analysis of AOAC Int. 18ed. Gaithersburg, MD, USA

表 3. 単一試験室妥当性確認の真度,併行精度および室内精度の目標値

Spike level (ppm)	Recovery %	RSD _r %	RSD _R %
0.01 < ~ ≤ 0.1	70 ~ 120	15 >	20 >
0.1 <	70 ~ 120	10 >	15 >

表 4. 小平における真度,併行精度および室内精度

Sample	Pesticide	Recovery % n=10		RSD _r %		RSD _R %	
		Low conc.	High conc.	Low conc.	High conc.	Low conc.	High conc.
Melon	Iprodione	101.7	99.3	5.4	9.9	8.9	7.9
	Iprodione metabollite	101.5	102.0	4.0	6.1	6.3	5.7
Green onion	Iprodione	91.0	80.3	8.1	2.2	13.3	4.9
	Iprodione metabollite	83.5	81.8	5.3	3.2	9.9	5.4

表 5. 仙台における真度,併行精度および室内精度

Sample	Pesticide	Recovery % n=10		RSD _r %		RSD _R %	
		Low conc.	High conc.	Low conc.	High conc.	Low conc.	High conc.
Melon	Iprodione	106.6	115.5	3.1	2.0	5.3	2.2
	Iprodione metabollite	106.2	113.8	4.5	1.6	8.2	2.2
Green onion	Iprodione	78.4	74.9	8.8	2.2	8.8	3.5
	Iprodione metabollite	85.4	84.4	3.6	3.8	10.4	4.5

表 6. 横浜における真度,併行精度および室内精度

Sample	pesticide	Recovery % n=10		RSD _r %		RSD _R %	
		Low conc.	High conc.	Low conc.	High conc.	Low conc.	High conc.
Melon	Iprodione	108.0	92.1	4.0	3.4	4.5	3.7
	Iprodione metabollite	106.2	94.6	3.4	4.2	3.9	5.4
Eggeplant	Iprodione	102.4	94.2	9.0	3.3	9.0	4.4
	Iprodione metabollite	105.8	104.6	6.4	3.3	7.4	5.7

表 7. 名古屋における真度,併行精度および室内精度

Sample	Pesticide	Recovery % n=10		RSD _r %		RSD _R %	
		Low conc.	High conc.	Low conc.	High conc.	Low conc.	High conc.
Melon	Iprodione	103.8	95.9	4.7	2.4	4.7	2.4
	Iprodione metabollite	103.6	99.3	2.5	2.1	3.4	2.4
Eggeplant	Iprodione	102.5	99.4	3.0	1.2	3.3	3.6
	Iprodione metabollite	109.2	99.7	0.8	2.0	3.6	3.5

表 8. 神戸における真度,併行精度および室内精度

Sample	Pesticide	Recovery % n=10		RSD _r %		RSD _R %	
		Low conc.	High conc.	Low conc.	High conc.	Low conc.	High conc.
Melon	Iprodione	93.9	94.3	4.1	4.8	5.5	6.0
	Iprodione metabolite	94.7	97.7	4.8	2.9	4.8	6.6
Green onion	Iprodione	93.2	91.3	2.8	6.2	8.2	6.6
	Iprodione metabolite	86.9	93.3	6.8	5.4	9.3	7.5

表 9. FAMIC における真度,併行精度および室内再現精度

Pesticide	Spike level (ppm)	Mean level (ppm)	Recovery %	RSD _r %	RSD _R %	PRSD _R %	HORRAT
Iprodione	0.05	0.0508	101.6	5.8	8.3	25.1	0.33
	0.5	0.496	99.2	4.8	10.5	17.8	0.59
Iprodion metabolite	0.05	0.0507	101.4	5.6	7.3	25.1	0.29
	0.5	0.510	102.0	4.8	9.3	17.6	0.53