

残留農薬分析業務における分析法の検討 2 (マンジプロパミド試験法の導入のための妥当性検証)

安本明弘¹, 加藤直樹¹, 中村圭介¹, 鈴木徹也², 山田篤司²
葛原茂広³, 白井裕一³

厚生労働省のマンジプロパミド試験法（農産物）について導入可能か、各試験所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

マンジプロパミドは平成 21 年 6 月に国内登録されたマンデル酸アミド系の殺菌剤で、ばれいしょ、トマトの疫病や大豆、ぶどう、はくさいなどのべと病に効果がある。

農薬実態調査課では、農林水産省が行っている「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」¹⁾の残留農薬分析を実施しており、平成 24 年度の本調査における野菜・果実類の試料のうち、マンジプロパミドは 22 件の使用履歴があったが試験法の妥当性確認をしていないため分析を行わなかった。

農林水産省から使用履歴のある農薬については分析対象にするよう要請されていることから、厚生労働省のマンジプロパミド試験法（農産物）²⁾（以下「通知試験法」という。）について、新規分析対象農薬に加えることを目的とし試験法の妥当性確認を行った。

材料および方法

1. 検証を行った試験室

以下の 3 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 本部横浜事務所 農薬実態調査課 (以下「横浜」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」による農薬使用履歴データより、マンジプロパミドの使用頻度の高い農産物であるほうれんそう、はくさいおよびトマトを選択した。トマトは小平のみ試験した。

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。

添加濃度は 0.1 ppm, 0.01 ppm の 2 濃度とした。

3. 試薬等

マンジプロパミドは 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 の移動相のアセトニトリルは、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。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (1000 mg) は、Waters 社製の Sep-Pak Vac 6cc (1 g) C18 Cartridge, グラファイトカーボンミニカラム (500 mg) は、SIGMA-ALDRICH 社製の SUPELCO Supelclean ENVI-Carb SPE Tube 0.5 g, 6 mL, シリカゲルミニカラム (690 mg) は、Waters 社製の Sep-Pak Plus Silica Cartridge を使用した。

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本部横浜事務所

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

4. 前処理方法

4.1. 抽出

試料 20.0 g を量り採り、添加濃度と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 100 mL を加え、ワーリングブレンダー型またはポリン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 50 mL を加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 200 mL とし、この 2 mL を採り、これに水 6 mL を加えた。

4.2. 精製

①オクタデシルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー及びグラファイトカーボンカラムクロマトグラフィー

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (1000 mg) にアセトニトリル及び水各 5 mL を順次注入し、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) にアセトニトリル及び水各 5 mL を順次注入し、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に、4.1 で得られた溶液を負荷した後、さらにアセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液 5 mL を注入し、流出液は捨てた。次いでこのカラムの下部にグラファイトカーボンミニカラムを接続し、アセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液 10 mL を注入し、流出液は捨てた。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを除去した後、グラファイトカーボンミニカラムにアセトニトリル及び水 (9 : 1) 混液 10 mL を注入し、流出液は捨てた。次いでアセトン 20 mL を注入し、溶出液を 40°C 以下で減圧濃縮し、溶媒を留去した。この残留物に酢酸エチル及び n-ヘキサン (1 : 4) 混液 5 mL を加えて溶かした。

②シリカゲルカラムクロマトグラフィー

シリカゲルミニカラム (690 mg) に酢酸エチル及び n-ヘキサン (1 : 4) 混液 5 mL を注入し、コンディショニングした。このカラムに①で得られた溶液を負荷した後、さらに酢酸エチル及び n-ヘキサン (1 : 4) 混液 5 mL を注入し、流出液は捨てた。次に酢酸エチル及び n-ヘキサン (2 : 3) 混液 10 mL を

注入し、溶出液を 40°C 以下で減圧濃縮し、溶媒を留去した。この残留物にアセトニトリル、ギ酸及び水 (500 : 1 : 500) 混液に溶解し、正確に 4 mL としたものを試験溶液とした。

5. 測定条件

LC/MS/MS の条件を表 1 に示した。

表 1. LC/MS/MS の条件

LC conditions	
Column	ODS(i.d.×length,particle size) 2.1×50mm, 1.8µm
Column temp.	40°C
Injection volume	2µL
Mobile phase	
Acetonitrile:Formic acid:water	500:1:500
Flow rate	0.2 mL/min
MS conditions	
Ionization	ESI positive mode
Date acquisition mode	MRM
Precursor ion	m/z 412
Product ion	m/z 328(quantitative) m/z 124 (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」³⁾ (以下「ガイドライン」という。) に基づき、各センター・事務所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等を含まない試料 (ブランク試料) に試験対象の農薬等を添加した試料 (添加試料) を、試験法に従って試験し、その結果から以下の性能パラメータを求め、それぞれの目標値 (表 2) 等に適合していることを確認した。

試験は枝分かれ実験計画 (併行条件=2, 室内再現条件=5) に従い行った。

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し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

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、いずれの試料でもマンジプロパミド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 3-5 に各試験室の結果をまとめた。（表 3：小平，表 4：横浜，表 5：神戸）

1.3. 定量限界

定量限界は通知試験法に示された 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、横浜および神戸の室間再現精度について、ほうれんそうおよびはくさい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 6 に示した。

HORRAT 値⁴⁾を算出した結果、ほうれんそうでは、低濃度添加回収試験で 0.24、高濃度添加回収試験で 0.28、はくさいでは、低濃度添加回収試験で 0.31、高濃度添加回収試験で 0.20 となり、2 を下回っており、通知試験法は、FAMIC 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、通知試験法を導入できると考えられた。

引用文献

- 1) http://www.maff.go.jp/j/press/syoutan/nouyaku/140716_1.html
(2014 年 10 月 30 日閲覧)
- 2) <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/zanryu3/dl/2-233.pdf>
(2014 年 10 月 30 日閲覧)
- 3) <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/zanryu2/dl/101224-1.pdf>
(2014 年 10 月 30 日閲覧)
- 4) 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 2. 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 %	RSDr %	RSDR %
0.001 < ~ ≤ 0.01	70 ~ 120	25 >	30 >
0.01 < ~ ≤ 0.1	70 ~ 120	15 >	20 >

表 3. 小平における真度, 併行精度および室内精度

Sample	Recovery % n=10		RSDr %		RSDR %	
	Low conc.	High conc.	Low conc.	High conc.	Low conc.	High conc.
Tomato	95.1	96.1	6.8	5.4	7.6	5.6
Spinach	92.2	98.9	7.2	3.5	7.8	5.9
Chinese cabbage	94.6	93.1	4.6	2.8	8.0	3.0

表 4. 横浜における真度, 併行精度および室内精度

Sample	Recovery % n=10		RSDr %		RSDR %	
	Low conc.	High conc.	Low conc.	High conc.	Low conc.	High conc.
Spinach	96.3	95.6	3.7	5.1	8.1	8.3
Chinese cabbage	99.8	97.7	9.0	4.4	9.8	5.5

表 5. 神戸における真度, 併行精度および室内精度

Sample	Recovery % n=10		RSDr %		RSDR %	
	Low conc.	High conc.	Low conc.	High conc.	Low conc.	High conc.
Spinach	90.0	94.0	3.8	2.6	6.0	4.4
Chinese cabbage	90.1	93.4	3.5	1.6	8.9	1.7

表 6. FAMIC における真度, 併行精度および室内再現精度

Sample	Spike level	Mean level	Recovery %	RSDr %	RSDR %	PRSDR %	HORRAT
	(ppm)	(ppm)	n=30				
Spinach	0.01	0.00928	92.8	7.2	7.6	32.0	0.24
	0.1	0.0962	96.2	6.1	6.4	22.6	0.28
Chinese cabbge	0.01	0.00948	94.8	8.6	9.8	32.0	0.31
	0.1	0.0947	94.7	3.8	4.5	22.6	0.20