

農薬調査研究報告

第9号

平成29年

Research Report of Agricultural Chemicals

Vol. 9
2017



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

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、農薬取締法、肥料取締法、飼料安全法、JAS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、登録制度等により厳しい規制が行われており、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ません。FAMIC農薬検査部は、農薬管理の要である農薬登録検査を主たる業務としています。また、農林水産省との密接な連携のもと、登録された農薬の市場における品質の確保のため農薬製造場への立入検査を実施するとともに、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。

今般、平成28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9号を発行しました。農薬検査部の調査研究は、登録検査業務の遂行に必要な技術力の向上や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、農林水産省との密接な連携のもと、農薬登録の国際調和を進める上で必要な技術情報等の提供といった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を分析・考察する調査や論考についても含めたものとしています。また、調査研究の成果は、関係学会等での発表を通じて公表に努めています。

この第9号では、実験を行いデータを得る手法を主にした調査研究の成果1論文と1技術レポート、文献等により収集した情報等を分析・考察した調査研究の成果1論文を掲載しています。また、学会誌等に掲載された調査研究の成果4論文を掲載元の許諾を得て転載しています。

本報告書が関係者の皆様の業務の参考になりますことを期待しています。また、農薬検査部では、今後も調査研究に積極的に取り組んでいくこととしています。調査研究の充実のためには、各方面の皆様からのご意見も不可欠ですので、ご指導のほどお願い申し上げます。

平成30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 木村 真人

目 次

ミツバチ群における内勤蜂と外勤蜂の識別手法の改良 市原直登, 大石桂輔, 石原 悟	1
拡張一世代繁殖毒性試験の試験法の概要および海外評価機関における要求状況の調査 勝山真多, 齊藤陽子, 大森正和	5
Development and validation of the SPEC model for simulating the fate and transport of pesticide applied to Japanese upland agricultural soil (Journal of Pesticide Science, 2016, 41(4), 152 ~ 162) Julien Boulange, Dang Quoc Thuyet, Piyanch Jaikaew, Satoru Ishihara and Hirozumi Watanabe	1 2
Effect of Time-Dependent Sorption on the Dissipation of Water-Extractable Pesticides in Soils (Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64, 4478 ~ 4486) Yutaka Motoki, Takashi Iwafune, Nobuyasu Seike, Keiya Inao, and Takashi Otani	2 3
室内培養によるカワヂシャ <i>Veronica undulata</i> の種子生産及び種子発芽率 (水草研究会誌, No. 102 (2015), 19~23) 加藤貴央, 石原 悟	3 2
温度変化が農薬の土壌残留性に及ぼす影響 (植調 Vol. 49, No. 11 (2016), 351~357) 元木 裕, 岩船 敬	3 7
平成28年度学会等での発表実績一覧	4 4
【技術レポート】 残留農薬分析業務における分析法の検討 (LC-MS/MSによる一斉試験法 (野菜・果実類) 対象農薬追加の妥当性検証) 佐々木秀幸, 守山智章, 山田篤司, 鈴木徹也, 青山吉一, 臼井裕一	4 6

ミツバチ群における内勤蜂と外勤蜂の識別手法の改良

市原直登, 大石桂輔, 石原 悟

独) 農林水産消費安全技術センター 農薬検査部

大石らはミツバチの内勤蜂と外勤蜂を識別する手法として、ミツバチ一頭を試料とする残留農薬分析の前処理工程で生じる精製塩の彩度を比較する手法を開発した。本手法は識別のために前処理の最終工程まで進める必要があり、一度に多量のサンプルを処理することが困難であった。本研究では作業の簡易化を図るため、残留農薬分析の前処理中の工程において、分光測色計を用いる方法（改良法 1）およびマイクロプレートリーダーを用いる方法（改良法 2）を検討した。

検討の結果、改良法 1 および改良法 2 でそれぞれ精製塩の色調の色度座標 (b^*) または抽出溶液の吸光度 (405 nm) を指標とすることで、既存の方法と同等の精度で内勤蜂と外勤蜂の識別が可能であった。

Keywords : ミツバチの分業, 農薬被害, 殺虫剤, 曝露経路

緒 言

ミツバチの活動範囲は、巣箱を中心に半径 2-6.5km と広く^{1,2)}、農薬が使用される農地とミツバチの活動範囲を明確に区分することはできない。そのため、農薬の使用に当たっては農薬のラベルに記載されたミツバチに関する注意事項の遵守が求められる。

2000 年代より、欧米においてミツバチを含めた花粉媒介者減少の懸念が高まっており、その要因の一つとして農薬が挙げられている^{3,4)}。このため、農林水産省は平成 25 年度から平成 27 年度までの 3 年間にわたり、農薬によるミツバチの被害事例について詳細な調査を行った⁵⁾。その結果、我が国における農薬が要因と考えられるミツバチ被害の多くは、水稻カメムシ防除に用いる殺虫剤にミツバチが直接曝露することにより発生していることが示唆された⁶⁾。しかしながら、現時点においては詳細な曝露経路の解明には至っていない⁷⁾。

真性社会性昆虫であるミツバチは、巣の内外で仕事を分業している⁸⁾。農薬の曝露量は巣の内部で働く内勤蜂と外部で働く外勤蜂とで異なることが考えられることから、曝露経路の解明には、内勤蜂と外勤蜂それぞれについて農薬の曝露量を解析する必要があると考えられる。

大石らは、ミツバチ一頭を試料とした残留農薬分

析（以下一頭分析という。）において生じる精製塩の彩度の違いによって内勤蜂と外勤蜂を識別する手法を開発した^{9,10)}。しかし、本手法は、一頭分析の最終工程まで進めなければ識別ができないこと、彩度の確認を画像解析で行うこと等から、一度に多量の試料を処理することは困難であった。本研究ではより簡易に識別する手法開発を目的に、分光測色計を用いる手法（改良法 1）およびマイクロプレートリーダーを用いる手法（改良法 2）を検討した。

材料および方法

1.改良法の妥当性の確認

1.1. 試料

野外飼育（巣板 5 枚群）の巣箱内部（育児圏の比率が高い巣板）で活動している成虫を内勤蜂、巣箱に隣接する植物に訪花している個体を外勤蜂と仮定し採取した各 33 頭を妥当性の確認に用いた。試料の採取は平成 28 年 5 月 30 日の午前中に行った。

1.2. 方法

一頭分析の工程における既存の識別手法（以下既存手法という。）および今回検討した 2 種類の改良法のフロー図を図 1 に示す。

改良法 1 では既存手法と同様に精製塩を測定試料とし、改良法 2 では抽出溶液を測定試料とした。

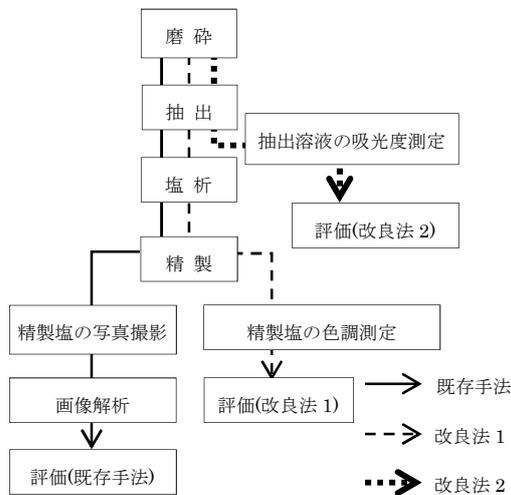


図 1. 既存手法および改良法のフロー図

1.2.1. 分光測色計を用いた方法(改良法 1)

一頭分析に用いる精製塩の色調について分光測色計(コニカミノルタ製, CR-20)を用い測定した。色調の評価は La^*b^* 色空間で表現した際の色度座標 b^* (黄色と青の間の座標の値) を指標として行った。

1.2.2. マイクロプレートリーダーを用いた手法(改良法 2)

一頭分析における抽出溶液を 96 穴マイクロプレートに 200 μ L 分注し, マイクロプレートリーダー(Thermo 製, multiskan jx)を用いて吸光度(測定波長 405 nm)を測定した。

結果および考察

1. 識別手法改良の検討

1.1. 分光測色計を用いた方法(改良法 1)

外勤蜂の b^* は内勤蜂に比べ有意に低い値を示した (t 検定, $p < 0.01$) (図 2)。

既存手法における彩度 (S) と改良法 1 における b^* の相関性を調べた結果, 高い正の相関 ($R^2=0.93$) が認められた (図 3)。本手法は既存手法と同等の精度で, より簡易に内勤蜂と外勤蜂を識別できることが示唆された。

個別別の b^* について解析した結果, 内勤蜂は $b^*=16\sim 26$ の間に分布し, 外勤蜂については $b^*=1\sim 6$ の間に分布していた (図 4)。本結果より, 内勤蜂

と外勤蜂を識別する際の目安として b^* が 10 以下のものを外勤蜂と識別することとした。

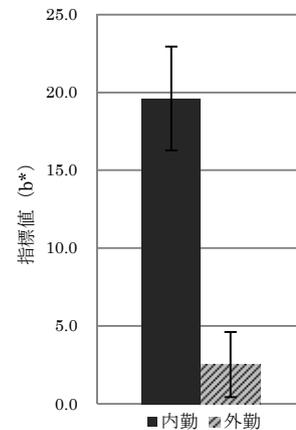


図 2. 内勤蜂および外勤蜂の指標値 (b^*) の平均値の比較

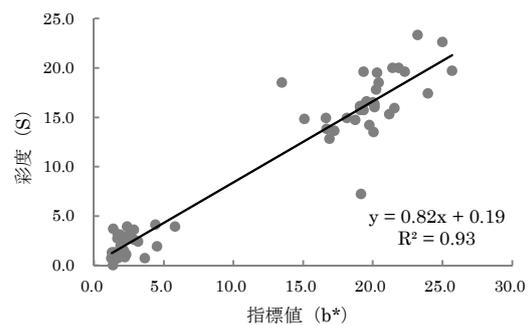


図 3. 彩度 (S) と指標値 b^* の相関

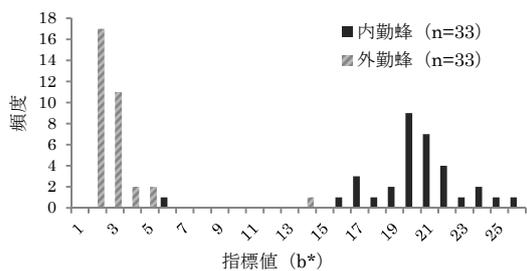


図 4. 指標値 b^* のヒストグラム

1.2. マイクロプレートリーダーを用いた手法(改良法 2)

外勤蜂の抽出溶液の吸光度 (405 nm) は内勤蜂に比べ有意に低い値を示した (t 検定, $p < 0.01$) (図 5)。

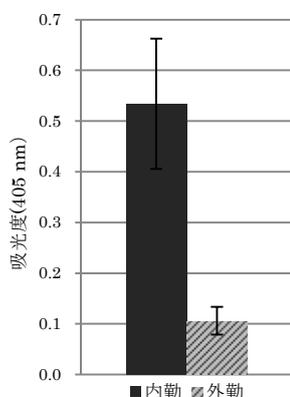


図 5. 内勤蜂および外勤蜂の吸光度(405 nm)の平均値の比較

既存手法における彩度 (S) と改良法 2 における吸光度 (405 nm) の相関性を調べた結果、高い正の相関 ($R^2=0.87$) が認められた (図 6)。本手法も改良法 1 と同様に既存手法と同等の精度で、より迅速に内勤蜂と外勤蜂を識別できることが示唆された。

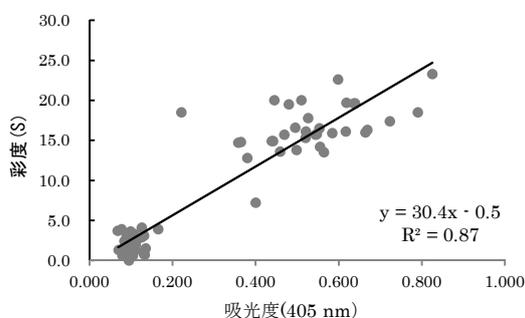


図 6. 彩度(S)と吸光度(405 nm)の相関

個体別の吸光度 (405 nm) について解析した結果、内勤蜂は 0.40~0.85 の間に分布し、外勤蜂は 0.05~0.15 に分布していた (図 7)。本結果より、内勤蜂と外勤蜂を識別する際の目安として吸光度が 0.30 以下のものを外勤蜂と識別することとした。

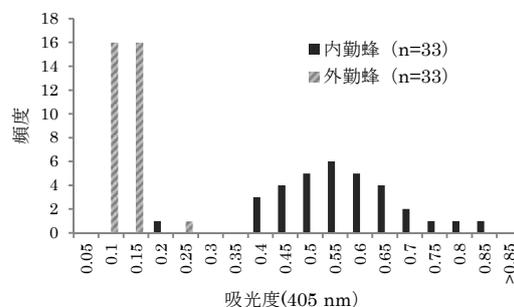


図 7. 吸光度(405 nm)のヒストグラム

おわりに

本検討では、大石らが開発した手法に改良を加え、ミツバチ群における内勤蜂と外勤蜂の識別法について簡易化を試みた。改良法 1 においては、一頭分析における精製塩の色度座標 (b^*) を測定することで、写真撮影および画像解析の工程を省略することができ省力化につながった。また、改良法 2 においては、抽出溶液の段階で識別できることから、既存手法および改良法 1 と比較し、さらに早い段階での識別が可能であった。ただし、改良法 2 については、夾雑物を多く含む抽出溶液を測定することから、試料の状態によっては外勤蜂の吸光度が増加し、識別が困難になる可能性があることに留意が必要である。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、ミツバチ試料の採取にご協力いただくとともにご提供いただいた (株) エスコ、古川雅也氏にこの場を借りて深く感謝の意を表します。

引用文献

(全 URL のリンクについての確認は、2017 年 7 月 21 日に実施。)

- 1) 坂上昭一:ミツバチの世界, 岩波新書, p.221, 1983.
- 2) 佐々木正己:養蜂の科学, サイエンスハウス, p.159, 2003.
- 3) <https://ojs.openagrar.de/index.php/JKA/article/viewArticle/140>
- 4) Johnson, R. M. et al. : Apidologie, 41, 312-331
- 5) http://www.maff.go.jp/j/nouyaku/n_mitubati/pdf/130530_mitubati.pdf

- 6) <http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouyaku/pdf/160707-02.pdf>
- 7) http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/press/laboratory/nilgs/053347.html
- 8) 渡辺 寛, 渡辺 孝: 近代養蜂, 日本養蜂振興会, p726, 1974.
- 9) 大石桂輔, 石原 悟: 農薬環境科学研究会要旨集, 23, 139-141 (2015)
- 10) 大石桂輔, 石原 悟: 植物防疫, 70, 63-66 (2016)

拡張一世代繁殖毒性試験の試験法の概要および

海外評価機関における要求状況の調査

勝山真多，齊藤陽子，大森正和

独)農林水産消費安全技術センター 農薬検査部

拡張一世代繁殖毒性試験は，OECDで2011年7月にテストガイドライン（TG）が採択された繁殖毒性を評価するための新規の試験法である。この試験では繁殖毒性だけでなく，発達神経毒性および発達免疫毒性も同一試験で評価することが可能である。また，毒性の程度によって二世代目を作成し，影響を評価する等試験項目を選択することができるという特徴を持っている。従来の手法より試験動物の有効活用（使用動物数の削減）や開発コストの軽減が見込めるため，当該試験を今後農薬登録申請における要求試験とすることについて検討がなされるものと考えられる。当該検討に資するため，OECDから公表されているテストガイドライン¹⁾をもとにその試験方法を調査したので，概要を紹介する。また，米国およびEUにおける当該試験の要求・評価状況についての調査も実施したので併せて紹介する。

Keywords：拡張一世代繁殖毒性試験，繁殖毒性，発達神経毒性，発達免疫毒性，OECD TG443，ガイダンス文書 117，コホート，EPA，EFSA，REACH

緒 言

拡張一世代繁殖毒性試験（TG443）は，Cooper等が2006年に発表した“ライフステージ試験への段階的アプローチ”を改良したもので，TGは2011年7月にOECDで採択された。本試験は，供試動物数の削減を図り動物愛護に資する試験である。

2016年に行われたOECD-WNT(Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme)において，将来的に二世代繁殖毒性試験（TG416）²⁾を廃止し，拡張一世代繁殖毒性試験に置き換えることが提案されており，この結果によっては「農薬の登録申請に係る試験成績について」（平成12年11月24日付け12農産第8147号農林水産省農産園芸局長通知）の大幅な見直しが必要となるが見込まれる。

このため，本調査では①拡張一世代繁殖毒性試験の内容，②従来法である二世代繁殖毒性試験との差異および③EUおよび米国の要求・評価状況を調査し，拡張一世代繁殖毒性試験を導入する際の課題を整理した。

1. 拡張一世代繁殖毒性試験の試験方法

1. 1. 目的

繁殖毒性試験は主にラットを用いて行われ，妊娠発育期における被験物質暴露の影響を評価するとともに，妊娠および授乳期の雌および出生した児動物への全身毒性の評価に資することができる。また，被験物質が雌雄の生殖器系の健全性および繁殖能（性周期・精子パラメータに対する影響，受胎率，胎児の生存率等）に与える影響についても確認できる。

拡張一世代繁殖毒性試験ではこれらに加え，児動物の一部を用いて，胎児～生後発達期の神経系（脳，脊髄，末梢神経等）の構造および運動・感覚機能に対する毒性である「発達神経毒性」，同時期のIgM抗体反応等の免疫系に対する毒性である「発達免疫毒性」も同時に評価することが可能である。

1. 2. 試験系

1. 2. 1. 動物種

背景データの充実，一般毒性試験との同等性の観点からラットが推奨されている。性的に成熟した雌雄を用い，雌は未経産・非妊娠とする。

1. 2. 2. 試験群

通常、少なくとも3段階の用量群と1つの対照群を設けなければならない。各群に対し妊娠した母動物20匹を得るために、十分な数の雌雄を割り当てる。

適切な用量を選定するため、他試験から得られた投与情報、妊娠または非妊娠動物の体内動態データ、乳汁への移行程度およびヒトでの暴露推定など入手可能な全ての情報を考慮する必要がある。最高投与量は体内動態において飽和状態にならない用量、もしくは当該動物に死亡や著しい苦痛を与えず、いくらかの全身毒性を引き起こす用量を選択する。

1. 2. 3. 投与

投与期間中は毎日混餌（混水）または強制経口投与により被験物質を投与する。

親世代 (P)

両性に対して2週間の交配前投与が求められる。この期間は雌では3~4回の発情周期、雄では精巣上体上での成熟精子の移動に必要な時間に等しく、性周期への影響および精子形成障害を検出することができる。

交配前投与、交配期間2週間を経て、雄には第一世代 (F₁) の離乳まで（投与開始から最低10週間）、雌には妊娠、哺育を経てF₁の離乳まで（投与開始から8~10週間）投与を継続する。

第一世代 (F₁)

離乳から成熟まで被験物質を投与する。第二世代 (F₂) を評価する場合は、F₂の離乳まで、または試験の終了まで投与を継続する。

投与スケジュールを図1に示す。

1. 2. 4. 交配, 出生児の調整

P世代の雌は同じ投与群から無作為に選択された血縁のない単独の雄と共に、交尾の証拠（膣栓あるいは精子）が見られるまで、あるいは2週間が経過するまで同居させる。

F₁は出生より4日後、それぞれの同腹児の数を、雌雄各5匹に近づくよう、過剰な児動物を無作為に選択して除外することで調整する。

1. 2. 5. コホートへの割付け

選抜したF₁は離乳時に、特定のサブグループ（コホート1~3）に割付け、各種検討を行う（詳細は後述）。

1. 2. 6. 試験項目の選択

規制当局の要求や被験物質に関する既知の情報をもとにF₂の評価を行うかどうか、発達神経毒性コホートや発達免疫毒性コホートを省略するかどうかを決定する。

F₁までの評価結果からF₂評価を行うかどうかをどのように判断するかについては、米国およびカナダにおける運用をもとに作成された別のガイダンス文書117³⁾に記載されている（後述）。



図1. 投与スケジュール

1. 3. 離乳後試験のための児動物の振り分け

離乳時に選抜されたF₁を無作為にコホート1から3に振り分ける。

- コホート1 (1A および 1B) : 繁殖毒性試験
- コホート2 (2A および 2B) : 発達神経毒性試験
- コホート3 : 発達免疫毒性試験

コホート1A (20匹/性/群) : 生殖器官への影響、一般毒性の評価用。最優先で振り分ける。

コホート1B (20匹/性/群) : 必要な場合、F₂作出に用いる。繁殖毒性/内分泌毒性の疑いがある場合またはコホート1Aの結果があいまいな場合に追加の病理組織学的データを取得のにも使用する。

コホート2A (10匹/性/群) : 神経行動学的/神経病理組織学的評価用。

コホート2B (10匹/性/群) : 離乳時神経病理組織学的評価用。匹数が足りない場合2Aを優先。

コホート3 (10匹/性/群) : T細胞依存性抗体産生検査 (TDAR) 用。陽性対照のため、対照群から追加の児動物が必要な場合がある。

各コホートの概要を表1に示す。

すべてのコホートに供給するだけの同腹中の児動物数が不十分な場合には、コホート1が優先する。被験物質に神経毒性、免疫毒性または繁殖毒性の疑いがある場合など、特別な懸念がある場合は追加の児動物をどのコホートに振り分けてもよい。これらの児動物は別の時点での検査に用いるか、または補足の評価指標の評価に用いてもよい。

コホートに振り分けられなかった児動物は血液生化学的検査および剖検にあてられる。

表1. 各コホートへの振り分け

親世代	コホート	用途	動物数/群	剖検時のおおよその週齢	性的成熟
母動物 20匹/群	1A	繁殖毒性	雌雄各20匹	13	済
	1B	繁殖毒性	雌雄各20匹	14 (F ₂ の評価を実施する場合20~25)	済
	2A	神経毒性	雌雄各10匹	11~12	済
	2B	神経毒性	雌雄各10匹	3	未
	3	免疫毒性	雌雄各10匹	8	済
	余剰	予備		3	未

1. 4. 第二世代(F₂)評価実施に関する判断基準(ガイダンス文書117)

ガイダンス文書117はF₂の評価が必要かどうかについて米国(米国EPA農薬プログラム部)およびカナダの規制当局(病虫害等管理規制庁)の判断

基準を示したものである。米国およびカナダが作成し、OECD-WNTで承認された後、拡張世代繁殖毒性試験と同時に公開された。表2に判断基準の概要を示す。

表2. F₂評価を推奨する基準

評価エンドポイント	F ₂ 評価が推奨される場合
成体	
P 受胎率 (着床, 妊娠率, 妊娠間隔)	受胎率の低下が見られるものの、それに付随した生物学的に関連性のある変化や用量依存性の変化が生殖組織に見られない場合
F ₁ 発情周期評価	発情周期の長さに関連性のある変化や用量依存性の変化が見られ、母動物に強い毒性が見られない場合 ^a

幼体	
F ₁ 同腹児パラメータ (同腹児の大きさ)	生物学的関連性および用量依存性の低下が見られ、母動物に強い毒性または致死性が見られない場合 ^a
F ₁ 発達標識 (AGD, 乳頭保持率, 性成熟, PPS, VO)	体重変化の影響ではない生物学的関連性および用量依存性の作用が見られる場合
F ₁ 出生後生存率低下	母動物に強い毒性が見られない場合 ^a
F ₁ 奇形	母動物に強い毒性が見られない場合 ^a
F ₁ 出生指数低下	母動物に強い毒性が見られない場合 ^a
F ₁ 体重低下	生物学的関連性のある低下であり、母動物に体重減少が見られない場合

a 作用の種類, 発生率, 規模および重大性は, 母動物の毒性と関連付けて考慮される。

2. 二世世代繁殖毒性試験との比較

拡張一世代繁殖毒性試験の繁殖毒性試験部分と、既存の二世世代繁殖毒性試験を比較した。

F₂ 世代：13 匹／腹×20 腹×4 群 誕生
 生後 4 日に雌雄各 5 匹／腹に調整（任意）
 生後 21 日に離乳, 剖検

使用動物計 2240 匹

2.1. 動物数

交配させた全ての雌が妊娠し, 13 匹の児動物 (F₁) を産むと仮定する (実際はより多くの動物数が必要)。

① 拡張一世代繁殖毒性試験 (一世代繁殖)

P 世代：雌雄各 20 匹×4 群
 (同時対照群+3 段階用量群)
 F₁ 世代：13 匹／腹×20 腹×4 群 誕生
 生後 4 日に雌雄各 5 匹／腹に調整 (任意)
 生後 21 日に離乳, 調整後各コホートに振り分ける
 コホート 1A：雄 1 匹と雌 1 匹／腹
 (雌雄各 20 匹) ×4 群
 コホート 1B：雄 1 匹と雌 1 匹／腹
 (雌雄各 20 匹) ×4 群

使用動物計 1200 匹

② 拡張一世代繁殖毒性試験 (二世代繁殖)

P 世代：雌雄各 20 匹×4 群
 (同時対照群+3 段階用量群)
 F₁ 世代：13 匹／腹×20 腹×4 群 誕生
 生後 4 日に雌雄各 5 匹／腹に調整 (任意)
 生後 21 日に離乳, 調整後各コホートに振り分ける
 コホート 1A：雄 1 匹と雌 1 匹／腹
 (雌雄各 20 匹) ×4 群
 コホート 1B：雄 1 匹と雌 1 匹／腹
 (雌雄各 20 匹) ×4 群→F₂ 作出

③ 二世世代繁殖毒性試験

P 世代：雌雄各 20 匹×4 群
 (同時対照群+3 段階用量群)
 F₁ 世代：13 匹／腹×20 腹×4 群 誕生
 生後 4 日に雌雄各 8 匹／腹に調整 (任意)
 生後 21 日に離乳 雄 1 匹と雌 1 匹／腹
 (雌雄各 20 匹) ×4 群→F₂ 作出
 F₂ 世代：13 匹／腹×20 腹×4 群 誕生
 生後 4 日に雌雄各 8 匹／腹に調整 (任意)
 生後 21 日に離乳, 剖検

使用動物計 2240 匹

繁殖毒性試験に限れば拡張一世代繁殖毒性試験で二世代にわたって評価する場合と従来の二世代繁殖毒性試験で使用する動物数は同等である。一方、毒性が低く、二世代目を評価する必要がない場合や発達神経毒性試験および発達免疫毒性試験を実施する必要がある場合には、拡張一世代繁殖毒性試験を選択することで、使用動物数およびコストを抑えることができる。

2.2. 試験期間

両試験において二世代繁殖を行う場合、P 世代交配後の期間に差はない。しかし、交配前投与期間は二世代繁殖毒性試験では 10 週間と定めているのに対し、拡張一世代繁殖毒性試験では 2 週間と定めていることから、拡張一世代繁殖毒性試験のほうが投与期間を短くすることができる。

2.3. 評価項目

両試験ガイドラインで要求されている一般毒性および繁殖毒性に関わる評価項目を以下に示す。

① 拡張一代繁殖毒性試験

P 世代：一般状態，体重，摂餌量，性周期，血液学的検査/血液生化学的検査，尿検査，精子パラメータ，肉眼的病理検査，着床痕，器官重量（生殖器官，脳，肝臓 etc.），病理組織学的検査（生殖器官，標的器官）

F₁ 世代（親/児）：一般状態，体重，摂餌量，母動物ごとの産児数，性，生存/死亡児数，肉眼的異常，肛門・生殖結節間距離，性成熟（陰開口・包皮分離），性周期，血液学的検査/血液生化学的検査，尿検査，精子パラメータ，肉眼的病理検査，（着床痕），器官重量（生殖器官，脳，肝臓 etc.），病理組織学的検査（生殖器官，標的器官）

(F₂ 世代)：体重，母動物ごとの産児数，性，生存/死亡児数，肉眼的異常，肛門・生殖結節間距離

② 二世世代繁殖毒性試験

P 世代：一般状態，体重，摂餌量，性周期，精子パラメータ，肉眼的病理検査，着床痕，器官重量（生殖器官，脳，肝臓 etc.），病理組織学的検査（生殖器官，標的器官）

F₁ 世代（親）：一般状態，体重，摂餌量，性周期，精子パラメータ，肉眼的病理検査，着床痕，器官重量（生殖器官，脳，肝臓 etc.），病理組織学的検査（生殖器官，標的器官）

F₁ 世代（児）：母動物ごとの産児数，性，生存/死亡児数，肉眼的異常，体重，身体的・行動異常，性成熟（陰開口・包皮分離），機能検査，肉眼的病理検査，器官重量（脳，脾臓，胸腺），病理組織学的検査（肉眼的異常組織，標的器官）

F₂ 世代：母動物ごとの産児数，性，生存/死亡児数，肉眼的異常，体重，身体的・行動異常，機能検査，（肛門・生殖結節間距離），肉眼的病理検査，器官重量（脳，脾臓，胸腺），病理組織学的検査（肉眼的異常組織，標的器官）

上記のように一般毒性および繁殖毒性に関しては，評価項目はほぼ同じである。拡張一代繁殖毒性試験では二世世代繁殖毒性試験に加え，血液学的/血液生化学的検査や尿検査などが追加で求められている。F₂の具体的な評価項目に関しては定められていない。

3. 海外の試験要求および評価状況

3.1. 試験要求状況

① EPA（米国）

連邦規則集（CFR Title 40, Chapter 1, Part158）⁴⁾では二世世代繁殖毒性試験および発達神経毒性試験が要求試験としてリストアップされており，それぞれのテストガイドラインが公開されている（OPPTS 870.3800⁵⁾，870.6300⁶⁾）。また，同規則集において発達神経毒性試験は繁殖毒性試験と組み合わせることが推奨されている。

一方，拡張一代繁殖毒性試験はリストアップされておらず，テストガイドラインも公開されていない。しかし，通常の二世世代繁殖毒性試験ガイドラインに従うか，拡張ガイドラインもしくは代替法を採用するかについては被験物質の情報をもとに決定されるという注釈がついており，試験開始前に試験プロトコルと科学的根拠を提出すれば代替法で行うことも可能とされている。

拡張一代繁殖毒性試験において二世代目を作成する基準（ガイダンス文書 117）が存在することから，当該試験はこの代替法の一つと考えられ，実施にあたっては具体的な試験方法（試験プロトコル）について EPA と事前協議がなされると考えられる。

② EFSA（EU）

委員会規則（EU No 283/2013⁷⁾⁸⁾によると農薬では少なくとも二世世代以上のラットにおける繁殖毒性試験が要求されており，OECD の二世世代繁殖毒性試験を基にしたテストガイドラインが公開されている（Regulation(EC)No 440/2008⁹⁾）。また，拡張一代繁殖毒性試験についても代替法として言及されている。

化学物質全般の管理について定めた REACH（Registration, Evaluation, Authorisation

and Restriction of Chemicals) では、動物愛護等の観点から拡張一世代試験が推奨されている¹⁰⁾。被験物質の暴露量、他試験から得られた情報およびF₁での結果を受け、F₂の評価を申請者が提案もしくはECHA（欧州化学機関：European Chemicals Agency）から申請者に求めることとされている。

3. 2. 評価状況

近年我が国で登録となった農薬原体 50 成分について、EPA および EFSA での評価状況を調査した。

その結果、EPA では 24 成分、EFSA では 26 成分で評価がなされていたが、拡張一世代繁殖毒性試験の実施例については確認できなかった。

このことから、農薬分野において拡張一世代繁殖毒性試験の二世代繁殖毒性試験代替法としての利用は進んでいないといえる。

4. 導入における課題

① 第二世代（F₂）への影響に関する情報が得られなくなることについて

拡張一世代繁殖毒性試験においてF₂評価を実施する場合は、既存の二世代繁殖毒性試験と得られる情報は大きく異ならないが、F₂評価を行わない場合、F₂への影響に関する情報は得られなくなる。このため、本試験を導入した場合、農薬の繁殖毒性を評価する上で十分な情報が得られるかについて、第二世代の実施に関する基準も含めて、評価機関等との十分な協議が必要と考える。

② 発達神経毒性試験および発達免疫毒性試験について

拡張一世代繁殖毒性試験には発達神経毒性試験および発達免疫毒性試験が含まれているが、現行の国内ガイドラインでは、これらの試験は要求していない。拡張一世代繁殖毒性試験の導入に際しては、発達神経毒性試験および発達免疫毒性試験の要否に関しても併せて検討する必要がある。

③ 試験の円滑な実施について

拡張一世代繁殖毒性試験ではF₂を評価するか、発達神経毒性コホート、発達免疫毒性コホートを省略するかについては規制当局の要

求や既存情報を反映することで決定される。これについて、米国ではガイダンス文書 117 のような基準を設け、EPA が判断している。我が国では登録・検査は農林水産省・FAMIC、リスク評価は食品安全委員会が行っているため、試験項目の選択に係る運用について関係機関との協議が必要と考えられる。

おわりに

拡張一世代繁殖毒性試験の特徴として、大きく以下の二点が挙げられる。

① F₁を3種のコホートに分けることで、繁殖毒性、発達神経毒性、発達免疫毒性をまとめて評価することができる。

② 繁殖毒性におけるF₂評価、発達神経毒性試験、発達免疫毒性試験の実施は規制当局の要請や既存情報により実施するかどうか選択することができる。

F₂評価を実施しない場合、発達神経毒性試験、発達免疫毒性試験を別に実施する場合において、当該試験は従来の二世代繁殖毒性試験と比較して使用動物数を抑えることができる。

米国やEUでは農薬に関しては原則二世代繁殖毒性試験を要求試験としており、拡張一世代繁殖毒性試験は要求試験ではなく、また、評価事例は確認出来なかった。ただし、米国およびEUでは二世代繁殖毒性試験の代替法として認められている。

本稿は現在の要求試験である二世代繁殖毒性試験に代わるとされる拡張一世代繁殖毒性試験について、OECDのテストガイドライン等をもとに、当該試験の内容、従来法との比較、海外における要求および評価事例を調査し、導入における課題を取りまとめたものである。当該試験について代替法としての導入を検討する際に参考となることを期待する。

参考文献

(全URLのリンクについての確認は、2017年7月21日に実施。)

- 1) OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS Test No.443: Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study (2012 OECD)
<http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9712211e.pdf?expires=1500597968&id=id&accname=guest&checksum=BF4E827367CC535C163040D06B00C964>

- 2) OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS Test No.416: Two-Generation Reproduction Toxicity Study (2001 OECD)
<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/43965303.pdf>
- 3) GUIDANCE DOCUMENT 117 ON THE CURRENT IMPLEMENTATION OF INTERNAL TRIGGERS IN TEST GUIDELINE 443 FOR AN EXTENDED ONE GENERATION REPRODUCTIVETOXICITY STUDY, IN THE UNITED STATES AND CANADA (2011 OECD)
[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2011\)21&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2011)21&docLanguage=En)
- 4) CODE OF FEDERAL REGULATIONS, Title40, Chapter 1, PART 158-DATA REQUIREMENTS FOR PESTICIDES(2007 Office of the Federal Register)
https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=1f3e01c0f6084c1db4047eee1828c05d&mc=true&node=pt40.26.158&rgn=div5#se40.26.158_133
- 5) Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.3800 Reproduction and Fertility Effects (1998 EPA)
https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/epa/epa_870_3800.pdf
- 6) Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.6300 Developmental Neurotoxicity Study (1998 EPA)
<https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/P100G6UI.PDF?Dockey=P100G6UI.PDF>
- 7) COMMISSION REGULATION (EU) No 283/2013 of 1 March 2013 setting out the data requirements for active substances, in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market
<http://www.reach-compliance.eu/web/english/legislations/EU/pesticides/docs/EC-283-2013.pdf>
- 8) Commission Communication in the framework of the implementation of Commission Regulation (EU) No 283/2013 of 1 March 2013 setting out the data requirements for active substances, in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market
http://ctgb.nl/docs/default-source/gewas.-toetsingskader/evaluation-manual-ppp-1107-2.0/commission_communication_2013_c95_01-data-requirements-for-plant-protection-products.pdf?sfvrsn=2
- 9) COUNCIL REGULATION (EC) No 440/2008 of 30 May 2008 laying down test methods pursuant to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH)
<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008R0440&qid=1500596592402&from=EN>
- 10) COMMISSION REGULATION (EU) 2015/282 of 20 February 2015 amending Annexes VIII, IX and X to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards the Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study
http://www.cea.adas.co.uk/Portals/0/EOGRTS%20Regulation%20EU%202015_282.pdf

[他誌掲載論文]

Journal of Pesticide Science, 2016, 41(4), 152~162 より転載

**Development and validation of the SPEC model for simulating
the fate and transport of pesticide applied to Japanese upland
agricultural soil**

Julien Boulange¹, Dang Quoc Thuyet², Piyanuch Jaikaew¹, Satoru Ishihara³
and Hirozumi Watanabe¹

¹ Department of International Environmental and Agricultural Sciences, Tokyo University of Agriculture
and Technology, 3-5-8 Saiwaicho Fuchu Tokyo 183-8509, Japan

² Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo,
1-1-1 Yayoi, Bunkyo, Tokyo 113-8657, Japan

³ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Agricultural Chemicals Inspection Station,
2-772 Suzuki-cho, Kodaira, Tokyo 187-0011, Japan

- 本論文の著作権は、日本農薬学会が所有していますが、著作権所有者の許可を得て転載しています。

Original Article

Development and validation of the SPEC model for simulating the fate and transport of pesticide applied to Japanese upland agricultural soil

Julien BOULANGE,¹ Dang Quoc THUYET,² Piyanuch JAIKAEW,¹
Satoru ISHIHARA³ and Hirozumi WATANABE^{1,*}

¹ Department of International Environmental and Agricultural Sciences, Tokyo University of Agriculture and Technology,
3-5-8 Saiwaicho Fuchu Tokyo 183-8509, Japan

² Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo, Tokyo 113-8657, Japan

³ Agricultural Chemicals Inspection Station, Food and Agricultural Materials Inspection Center, Tokyo, Japan

(Received March 1, 2016; Accepted July 20, 2016)

A pesticide fate and transport model, SPEC, was developed for assessing Soil-PEC (Predicted Environmental Concentrations in agricultural soils) for pesticide residues in upland field environments. The SPEC model was validated for predicting the water content and concentrations of atrazine and metolachlor in 5-cm deep soil. Uncertainty and sensitivity analyses were used to evaluate the robustness of the model's predictions. The predicted daily soil water contents were accurate regarding the number of observation points ($n=269$). The coefficient of determination (R^2) and Nash-Sutcliffe efficiency (N_{SE}) were equal to 0.38 and 0.22, respectively. The predicted daily concentrations of atrazine and metolachlor were also satisfactory since the R^2 and N_{SE} statistics were greater than 0.91 and 0.76, respectively. The field capacity, the saturated water content of the soil and the Q_{10} parameter were identified as major contributors to variation in predicted soil water content or/and herbicide concentrations. © Pesticide Science Society of Japan

Keywords: SPEC model, pesticide, fate and transport, upland soil.

Introduction

Pesticides have been commonly used in agriculture since the second half of the twentieth century.^{1,2)} The widespread use of pesticides, however, has resulted in drift, leaching, and the runoff of pesticide from target crops to off-target areas which can adversely impact the environment.²⁾ Indeed, agriculture has been reported as the main source of groundwater contamination and numerous monitoring studies have highlighted the presence of pesticides in agricultural soils and surface and ground bodies of water.³⁻⁵⁾ In Japan, the persistence of pesticides in agricultural soils is evaluated in accordance with the test guidelines prescribed by the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries⁶⁾ in limited conditions or simple scenarios. Meanwhile, the Ministry of Health, Labor and Welfare announced new standards for Maximum Residue Limits (MRLs) for pesticides in food and food additives (Positive List System) in 2003.⁷⁾ In the so-called Positive List System, MRLs of 0.01 ppm were assigned for all of the registered combinations of crops and pesticides that had been previously neglected. These low MRLs have raised con-

cerns about the increased probability of exceeding the MRLs in crops. Indeed, in agricultural fields where crop rotation is used, the residues of pesticides applied to the previous crop may be taken up by the next crop depending on the persistence and uptake characteristics.

To conduct realistic assessments of pesticide residues in soil for the purpose of adapting to the new regulations, a model simulation could be one practical alternative to pesticide monitoring and experiments that are often expensive and time consuming. By taking into account the major processes involved in the environmental fate of pesticides (sorption, degradation, leaching, volatilization, and runoff), models can be used for pesticide registration, mitigation, risk assessment, and screening purposes.⁸⁻¹⁰⁾ Modeling approaches vary in complexity and can be classified as deterministic or stochastic models with two subcategories, mechanistic and functional.¹¹⁾ Models based on simple lumped parameters are limited to the relative ranking of hazardous chemicals but have the potential to be used for preliminary risk assessment. In contrast, models based on distributed parameters are more comprehensive in the level of detail and can account for the heterogeneity of the environment. In practice, however their use is limited due to impractical data requirements.²⁾

In Japan, the development of pesticide models for investigating the fate and transport of pesticides applied to lowland rice paddy fields has been reported.¹²⁻¹⁷⁾ However there is not yet a

* To whom correspondence should be addressed.

E-mail: pochi@cc.tuat.ac.jp

Published online November 6, 2016

© Pesticide Science Society of Japan

pesticide fate and transport model that simulates the behavior of pesticides applied to Japanese upland agricultural soil. This could be due to the necessity of validating models through testing against high-quality field data sets.⁹⁾ The aim of this research was thus: (1) to develop a pesticide fate and transport model, the SPEC model, (2) to evaluate the predictions of the model using field monitoring data and, and (3) to conduct uncertainty and sensitivity analyses of the SPEC model.

Materials and Methods

1. Model description

The SPEC model was designed to assess the Soil-PEC (Predicted Environmental Concentrations in agricultural soils) of pesticides. The model, coded in Visual Basic for Application in MS Excel, is a lumped parameter, one-dimensional, field scale, and daily time-scale model. The properties of the soil layers are assumed to be homogeneous; a maximum of two soil layers can be defined in the model while a maximum of three successive applications of pesticide can be scheduled. The depth of the soil layers is defined by the user. Groundwater flow or recharge is not considered in the model. Then, the soil water content and pesticide concentrations are calculated successively, from top to bottom. The SPEC model does not simulate the subsurface lateral flow, macropore flow, bypass flow, or tile drainage. Fig. 1 shows the current conceptual SPEC model and the various hydrological and pesticide fate and transport processes considered by the model. The SPEC model estimates water runoff, leaching, and associated pesticide loading. The Soil Conservation Service (SCS) curve number technique developed by the USDS is used to estimate runoff whereas infiltration is determined by using a storage routing methodology. Such a scheme is often referred to as “tipping bucket” in the literature.¹⁸⁾ As compared with other pollutant fate and transport fate models (PRZM, HYDRUS,

MACRO), SPEC development focuses on having minimum input parameter requirements while maintaining physically based processes. The mass balance equation used by the SPEC model to calculate the amount of water in the soil layers is:

$$\begin{aligned} WC_{i+1,1} &= WC_{i,1} + Rain_i - Runoff_{i,1} - INF_{i,1} - ET_{i,1} \\ WC_{i+1,2} &= WC_{i,2} + INF_{i,1} - INF_{i,2} - ET_{i,2} \end{aligned} \quad (1)$$

$$WC_{i,j} = 10 \cdot depth_j \cdot \rho_b \cdot \theta_{i,j} \quad (2)$$

where the subscripts i and j specify the day and the soil layer of the variables. To clearly display the processes that are considered in soil layers 1 and 2 in Eq. (1), the subscript j was explicitly replaced by the soil layer number (1 or 2). $WC_{i+1,j}$ and $WC_{i,j}$ are the water contents expressed as water depths (using Eq. (2)) for day $i+1$ and i of the soil layer j (mm), respectively; $Rain_i$ is the amount of rainfall that occurred during day i (mm), $INF_{i,1}$ and $INF_{i,2}$ are the amount of infiltration on day i from soil layers 1 and 2 (mm), respectively; $ET_{i,1}$ and $ET_{i,2}$ are the amounts of water removed from soil layers 1 and 2 (mm) due to evapotranspiration; $depth_j$ is the depth of the soil layer j (cm); ρ_b is the bulk density of the soil ($g\ cm^{-3}$); and $\theta_{i,j}$ is the volumetric water content of soil layer j for day i (cm^3/cm^3). The methodology implemented to calculate each process is detailed in the next section while the processes considered to simulate pesticide fate and transport including pesticide loss through percolation, runoff, and biochemical and photochemical degradations are presented in Section 3.

2. Field-scale hydrological processes

2.1. Infiltration

The daily infiltration of water is related to the current water content of the soil and the soil's ability to hold water. Water infiltrates from a soil layer to the soil layer below if the water content of the soil layer exceeds the field capacity of that layer and the

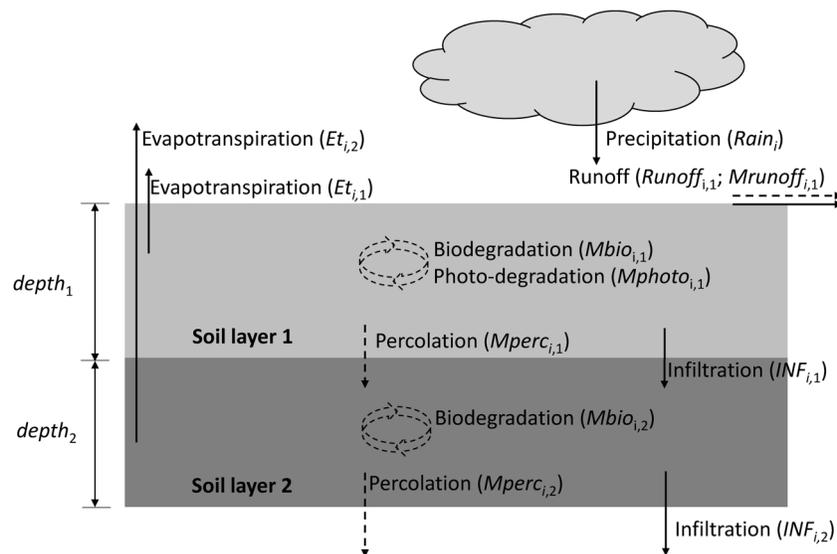


Fig. 1. Conceptual hydrological and pesticide fate and transport processes considered by the SPEC model in a bare soil, upland field. Plain arrows represent the hydrological processes while dashed arrows characterize the pesticide fate and transport processes.

layer below is not saturated. The amount of water available for infiltration in a soil layer is therefore given by:

$$WCX_{i,j} = \max(0, WC_{i,j} - FC_j) \quad (3)$$

where $WCX_{i,j}$ is the drainable volume of water through infiltration in soil layer j on day i (mm), and $WC_{i,j}$ and FC_j are the water content and field capacity at iteration i of soil layer j (mm), respectively. Next, the amount of water that actually moves from one soil layer to the soil layer below is calculated the storage routing methodology¹⁹⁾:

$$INF_{i,j} = WCX_{i,j} \left(1 - \exp \left(\frac{-\Delta t \cdot Ksat_j}{SAT_j - FC_j} \right) \right) \quad (4)$$

where $INF_{i,j}$ is the amount of water that infiltrates from soil layer j to the underlying soil layer at iteration i (mm), Δt is the length of the time step (h), $Ksat_j$ is the saturated hydraulic conductivity for layer j (mm/h), SAT_j is the saturated water content of layer j (cm^3/cm^3), and the other parameters are as previously defined.

2.2. Surface runoff

Pesticide losses through surface runoff depend on the amounts of available pesticides in the soil surface, their chemical properties, and the intensities of rainfall and runoff.²⁰⁾ In the SPEC model, surface runoff is only computed for the topsoil layer, using the SCS curve number procedure. The SCS curve method is an empirical method developed through more than 20 years of studies involving rainfall-runoff relationships across the USA.²¹⁾ The method was developed to take into account different categories of land use and soil type. While the SCS curve method was reported to be appropriate for Japanese soil conditions on a watershed scale, there have been few reports regarding its application on a field scale.²²⁾ The SCS curve number equation is defined as²³⁾:

$$Runoff_{i,1} = \frac{(Rain_i - I_a)^2}{(Rain_i - I_a + S_i)} \quad (5)$$

where $Runoff_{i,1}$ is the runoff amount generated at time i by the topsoil layer (mm), S_i is the retention parameter of the soil on day i (mm), and I_a is the initial abstraction which includes surface storage, interception and infiltration prior to runoff (mm). For runoff to occur, the condition $Rain_i > I_a$ must be met. In the SPEC model, I_a was approximated as $0.2S$ as it is commonly reported in the literature.¹⁹⁾ The curve number of the soil is related to the retention parameter of the soil S_i , as illustrated in Eq. (6):

$$S_i = 25.4 \left(\frac{1000}{CN_i} - 10 \right) \quad (6)$$

where CN_i is the curve number for day i of the top soil layer (dimensionless). Three moisture conditions are defined in the SCS curve number method: dry ($CN1$), average ($CN2$), and wet ($CN3$). $CN2$ is required as a parameter input; an appropriate value can be extracted from the literature for various combinations of land use and soil type.^{19,23)} Note that these CN values are recommended for a 5% slope; if the slope of the field is different, the CN number must be adjusted.

$$CN2_{\text{adjust}} = \frac{CN3 - CN2}{3} [1 - 2 \cdot \exp(-13.86 \cdot slp)] + CN2 \quad (7)$$

where $CN2_{\text{adjust}}$ is the $CN2$ value adjusted for slope and slp is the average slope of the field (%). $CN1$ and $CN3$ are respectively the lowest and highest boundaries of the CN value. They are evaluated once, at the beginning of the simulation, using Eqs. (8) and (9):

$$CN1 = CN2 - \frac{20 \cdot (100 - CN2)}{100 - CN2 + \exp(2.533 - 0.0636(100 - CN2))} \quad (8)$$

$$CN3 = CN2 \exp(0.00673(100 - CN2)) \quad (9)$$

$CN1$ and $CN3$ remain constant during the whole simulation and can be seen as properties of the soil. The retention parameter (S_i) varies depending on the daily moisture of the soil and is re-evaluated at each computation iteration using the following equation:

$$S_i = S_{\text{max}} \left(1 - \frac{WC_i - W_{\text{res}}}{WC_i - W_{\text{res}} + \exp(w_1 - w_2(WC_i - W_{\text{res}}))} \right) \quad (10)$$

where S_i is the retention parameter at time i (mm), S_{max} is the maximum value the retention parameter can achieve on any given day (mm), WC_i is the soil water content of the soil layer (mm), W_{res} is the water residue of the soil layer (mm), and w_1 and w_2 are shape coefficients. S_{max} can be calculated from Eq. (5) by replacing CN_i with $CN1$. Once the retention parameter of the soil for the day is known, the value of the daily curve number can be calculated by rearranging Eq. (6):

$$CN_i = \frac{25400}{S_i + 254} \quad (11)$$

where CN_i and S_i are the curve number and the retention parameter for day i (mm), respectively. In practice, the method is implemented as follows: first, the $CN1$ and $CN3$ of the soil are computed (Eqs. (8) and (9)). Then, every computation iteration, S_i is calculated using Eq. (10), and the amount of runoff is evaluated using Eq. (5).

An option to cancel runoff has been implemented in the model. Indeed, during field experiments conducted to validate the model, borders were installed between fields to avoid the potential cross-contamination of pesticides. As a result the surface runoff of each plot was confined within that plot.²⁴⁾ When the “no-runoff” option is used, water that was supposed to be lost due to water runoff is routed to infiltration therefore increasing the amount of infiltrating water. Note that, in the case of irrigation, the amount of irrigation water was added to the amount of precipitation as input water.

2.3. Evapotranspiration

Two options have been implemented in the SPEC model regarding evapotranspiration (ET). The first option is used when no data are available. A constant daily value is used throughout the simulation. The second option uses the Penman-Monteith equation to predict daily evapotranspiration (ET_c). The procedure for calculating all variables can be found in Allen *et al.*²⁵⁾

Since ET_c is computed by assuming that the plant had opti-

mum soil water conditions, the actual evapotranspiration of the field must be adjusted to reflect current field conditions. The actual amount of water removed from the two soil layers by evapotranspiration is proportional to the depth of the soil layers and is calculated using Eq. (12):

$$\begin{aligned} ET_{i,1} &= \min \left(WC_{i,1} - FC_1, ET_c \frac{depth_1}{depth_1 + depth_2} \right) \\ ET_{i,2} &= \min \left(WC_{i,2} - FC_2, ET_c \frac{depth_2}{depth_1 + depth_2} \right) \end{aligned} \quad (12)$$

where $ET_{i,1}$ and $ET_{i,2}$ are the actual evapotranspiration losses at day i from soil layers 1 and 2 (mm), respectively, $WC_{i,1}$ and $WC_{i,2}$ are the amounts of water held in soil layers 1 and 2 (mm), respectively, FC is the soil field capacity (mm) of the soil layer, and $depth_1$ and $depth_2$ are the depths of soil layers 1 and 2 (cm), respectively.

3. Pesticide fate and transport

Pesticide is introduced in the model by scheduling a pesticide application. The user is required to input the date and the rate pesticide application. Then, the fate and transport of the pesticide in the field are simulated by considering various pesticide degradations, loss of pesticide by surface runoff, and pesticide transport through vertical percolation in and out of the soil layers. Consequently, the equation used to predict pesticide concentrations in the two soil layers is:

$$\begin{aligned} Mp_{i,1} &= Mp_{i-1,1} - Mrunoff_{i,1} - Mperc_{i,1} - Mphoto_{i,1} - Mbio_{i,1} \\ Mp_{i,2} &= Mp_{i-1,2} + Mperc_{i,1} - Mperc_{i,2} - Mbio_{i,2} \end{aligned} \quad (13)$$

where $Mp_{i,1}$ and $Mp_{i,2}$ are the mass of pesticide in soil layers 1 and 2 at time i (mg), respectively, $Mp_{i-1,1}$ and $Mp_{i-1,2}$ are the masses of pesticide in soil layer 1 and 2 at time $i-1$ (mg), respectively, $Mrunoff_{i,1}$ is the mass of pesticide lost through runoff from the topsoil layer at time i (mg), and $Mperc_{i,1}$ and $Mperc_{i,2}$ are the masses of pesticide lost through percolation at time i by soil layers 1 and 2 (mg), respectively. $Mphoto_{i,1}$ is the mass of pesticide loss through photodegradation in the topsoil layer at time i (mg), and $Mbio_{i,1}$, $Mbio_{i,2}$ and are the masses of pesticide loss through biochemical degradation at time i (mg), in soil layers 1 and 2, respectively.

3.1. Pesticide transported by surface runoff

The mass of pesticide loss from the soil top layer through water runoff is calculated by:

$$Mrunoff_{i,1} = Area \cdot Runoff_{i,1} \frac{Cs_1}{K_d} \quad (14)$$

where Cs_j is the pesticide concentration in soil layer j (mg/kg), K_d is the soil adsorption coefficient of the pesticide in the soil (L/kg) and the other parameters are as previously defined. The soil adsorption coefficient of the pesticide in the soil is related to the soil organic content, Oc (%). The relation is given as:

$$K_d = K_{oc} \frac{Oc}{100} \quad (15)$$

where K_{oc} is the soil organic-water partitioning coefficient of the pesticide (L/kg) and Oc is the percentage of soil organic carbon (%). Note that the transport of pesticide sorbed to soil particles with surface runoff is not considered in the current model.

3.2. Pesticide transport via vertical percolation

In the SPEC model, the amount of pesticide that is transported with percolating water is a function of infiltration:

$$Mperc_{i,j} = Area \cdot INF_{i,j} \frac{Cs_j}{K_d} \quad (16)$$

where $Mperc_{i,j}$ is the mass of pesticide loss from soil layer j at iteration i (mg), $INF_{i,j}$ is the amount of water that percolates from the layer j (mm), and all other variables are as previously defined. The mass of pesticide loss by percolation by soil layer j is added to the mass of pesticide in the soil layer $j+1$ (Eq. (13)).

3.3. Pesticide biochemical degradation

Pesticide biochemical degradation was described by a first-order equation:

$$Mbio_{i,j} = 10 \cdot depth_j \cdot Area \cdot \rho_b \cdot k_{bio} \cdot Cs_j \quad (17)$$

where $Mbio_{i,j}$ is the mass of pesticide loss from soil layer j at iteration i by biochemical degradation (mg), ρ_b is the bulk density of the soil (g/cm³), and k_{bio} is the first-order rate constant of the pesticide biochemical degradation in the soil (1/day). The first-order rate constant degradation is calculated from the half-life of the pesticide's biochemical degradation:

$$k_{bio} = \frac{\ln(2)}{HL_{bio}} \quad (18)$$

where HL_{bio} is the pesticide half-life of biochemical degradation (day).

The influence of temperature on the degradation rate can be accounted for in the temperature data as: (1) two average temperatures with their corresponding periods, (2) daily average temperatures, and (3) hourly average temperatures. Using the first option, two degradation rates are computed and used during the appropriate periods. In contrast, when using options 2 and 3, the degradation rate can change on a daily or hourly basis. The equation used to adjust the half-life of a pesticide due to temperature is given as²⁶⁾:

$$k_{bio} = k_{bio_{ref}} Q_{10}^{(t_1 - 25)/10} \quad (19)$$

where $k_{bio_{ref}}$ is the reference pesticide's half-life at 25°C (day), Q_{10} is the change of half-life given a 10°C change in temperature (unitless), and t_1 is the temperature at which the half-life of the pesticide must be calculated (°C).

3.4. Photochemical degradation

Photodegradation was reported to be one of the most destructive pathways for pesticides after their release into the environment.²⁷⁾ This process in soil surfaces is only significant if there is no foliage covering the ground. In the SPEC model, this process is only considered in 2-mm depth of the topsoil layer. To accu-

rately determine the loss of pesticide by photodegradation, the level of solar radiation reaching the ground must be known. This is evaluated using the following equation which was originally developed for paddy fields¹⁵⁾:

$$\frac{R_{UVB-a} - R_{UVB-b}}{R_{UVB-a}} = f_{R-ab} \cdot t \quad (20)$$

where R_{UVB-a} and R_{UVB-b} are the daily UV-B radiation above and below the plant canopy (MJ/m^2), respectively, f_{R-ab} is the slope of the fitted line obtained from the relative difference of the radiation above and below the plant canopy that accounts for the light attenuation by the growing crop, and t is the time (day). The UV-B radiation reaching the ground can be calculated as:

$$R_{UVB-b} = f_{US} R_{S-a} (1 - f_{R-ab} \cdot t) \quad (21)$$

where f_{US} is the fraction of the UV-B radiation over the solar radiation, and R_{S-a} is the solar radiation below the plant canopy. When no plants are growing in the field (bare soil condition), f_{R-ab} is equal to 0 and the UV-B radiation above and below the plant canopy is identical. The final equation used to compute the mass of pesticide loss by photodegradation is:

$$M_{photo,i,1} = 2 \cdot Area \cdot R_{UVB-b} \cdot k_{photo} \cdot Cs_1 \quad (22)$$

where $M_{photo,i,1}$ is the mass of pesticide loss by photodegradation (mg), k_{photo} is the first-order rate coefficient of photochemical degradation with respect to cumulative UV-B radiation ($\text{m}^2\text{M}/\text{J}$), and all other parameters are as previously defined. The first-order rate coefficient of photochemical degradation with respect to cumulative UV-B radiation can be calculated from the half-life of pesticide photodegradation.

$$k_{photo} = \frac{\ln(2)}{HL_{photo} \cdot f_{US} \cdot Solar} \quad (23)$$

where HL_{photo} is the photochemical degradation half-life of the pesticide (day), and $Solar$ is the average solar radiation measured during the experiment duration ($\text{MJ}/\text{m}^2/\text{day}$). While determining k_{photo} experimentally at a site is preferable for accurately predicting the photodegradation of pesticides, Eq. (22) can be used to derive k_{photo} from existing pesticide databases.

4. Field experiments

We attempted to validate the SPEC model so as to predict: (1) soil water content and (2) the concentrations of two herbicides: atrazine and metolachlor. All observed data were acquired over a two-year monitoring period (2013–2014) at the experimental farm of Tokyo University of Agriculture and Technology (TUAT experimental farm), Tokyo, Japan. Details of the experiment can be found elsewhere.²⁴⁾ Briefly, the field was divided into three experimental plots that were surrounded by plastic borders buried approximately 10 cm in the ground. Note that the borders prevented surface runoff from the plots. The texture of the soil was identified as clay-loam while its taxonomic order is andisol. It contained 29.6% sand, 33.4% silt, and 23.4% clay. Some characteristics of the soil are reported in Table 1. Atrazine and

metolachlor were applied twice, on June 10, 2013 and December 6, 2013 to the whole surface of the plots. The commercial formulation of the herbicides (Geza non gold[®] Syngenta, Tokyo, Japan) was diluted with distilled water and applied at the recommended rates of 771.3 and 732 g a.i./ha for atrazine and metolachlor, respectively. Neither herbicide was applied to the field prior to the experiment and no crops were grown on the plots. In addition, no irrigation water was applied to the field during the entire duration of the experiment.²⁴⁾ Precipitation, soil temperature, and soil moisture contents at 5.0 cm deep were recorded hourly.²⁴⁾ Soil samples were collected at a depth of 5 cm at specified intervals from the three plots using soil cores 5 cm in diameter. A composite sample was created for each plot by mixing three samples taken randomly from each plot. The procedure used to clean up the composite samples and extract the pesticide can be found in the literature.²³⁾

5. Model parameterization

The input parameters used for predicting soil moisture and concentrations of atrazine and metolachlor at the TUAT experimental farm are reported in Table 1. Soil layers 1 and 2 were 1 cm and 4 cm deep, respectively. The data used to parameterize the model were taken from the literature or database. When no data were available, the inputs were calibrated.^{21,24,28,29)} The curve number value used in the simulation was extracted from the tables provided by the SCS Engineering Division and is appropriate for a 5% slope with bare soil (no crop residue) and a soil with moderate infiltration rate.¹⁹⁾ Previous analysis indicated that the curve number method was applicable for the andisol soil plot scale with bare soil. The method was, however, sensitive regarding the initial moisture content of the soil.³⁰⁾ Nevertheless, further validation of the method of application in Japan for other combinations of land cover and soil conditions is necessary. Hourly monitored precipitation and temperature data were used for the simulation. Daily average solar radiation as well as minimum, maximum, and average daily air temperature data was downloaded from the AMEDAS weather station located about 500 m from the monitoring site in Fuchu City, Tokyo (Japan).³¹⁾ These data were used to calculate the daily amount of evapotranspiration from the TUAT experimental farm.²⁵⁾

6. Sensitivity and uncertainty analyses

The possible application of any model and its validation procedures are largely determined by the model's sensitivity.¹¹⁾ Indeed, input parameters are variable which can be attributed to (1) protocols and analytical methods and (2) spatial variability that occurs naturally.¹¹⁾ Since input parameters must be estimated whenever data are missing, characterizing and ranking input parameters as to their influence on model predictions are absolutely necessary to correctly interpret a models' output. Uncertainty and sensitivity analyses were performed by applying Monte Carlo (MC) techniques to the SPEC model. To noticeably recognize the effects of uncertainty included in input parameters on the predicted soil water content and pesticide concentrations,

two MC scenarios were created. The first MC scenario (MC scenario 1) included only input parameters related to soil properties while the second MC scenario (MC scenario 2) consisted of input parameters related to pesticide characteristics.

The water residue (W_{res}), the saturated hydraulic conductivity (K_{sat}), the saturated water content (SAT_j) and the field capacity (FC_j) of the soil were included in the first MC scenario for a total of four investigated input parameters. Three parameters were considered in the second MC scenario: the photodegradation half-life (HL_{photo}), the Q_{10} , and the soil organic-water partitioning coefficient of the pesticide (K_{oc}). To avoid redundancy, the k_{bio} was not included in the analysis, since it is nested with the Q_{10} parameter (Eq. (18)). In addition, accurate k_{bio} data from laboratory experiments (unpublished data, Table 1) were available for both atrazine and metolachlor. The sample size used for the MC simulations was 250 for both soil and pesticide parameter scenarios. This sample size proved sufficient for a pesticide fate and transport model in the case of pesticide applied in rice paddies.³² Uniform distributions were given to all investigated parameters. All parameters except the Q_{10} parameter were allowed to vary a maximum of $\pm 10\%$ from the values used in the deterministic scenario presented in Table 1. The range of the Q_{10} parameter was 1.0 to 2.2. A value of 1.0 indicates that temperature has no effect on the degradation half-life. A value of 2.2 was recommended for use when no site data was available.²⁶ Note that the maximum range of the saturated water content of the soil was to 1.0 as values higher than 1.0 are not physically possible. For evaluating model response the soil water content and herbicide concentrations, target outputs were selected 24 days after the herbicide applications. This corresponds to the half-

life period of appreciable herbicide concentrations; therefore the data set is representative of each season.

To visualize the evolution of output uncertainty every computation step, the 95th percentiles of the predicted soil water content and herbicide concentrations were plotted together with the predictions of the deterministic scenario.

The method used to measure input sensitivity was reported previously.^{32,33} The method relies on a stepwise regression analysis that computes standard rank regression coefficients (SRRCs) for the predictors (inputs) that have the most significant influence on the predictions (outputs). By ranking the input parameters by absolute values of SRRCs, the model's most sensitive parameters can be highlighted.

7. Model evaluation

The model's accuracy regarding the predictions of soil water content and herbicide concentrations was evaluated using statistical indices. The coefficient of determination (R^2) which describes the degree of collinearity between the simulated and measured data was reported to be extremely sensitive to extremely high values (outliers) and insensitive to additive and proportional differences between model predictions and measured data.³⁴ Therefore to appropriately interpret the accuracy of a model, it is necessary to report additional statistical indices such as the Nash-Sutcliffe efficiency (N_{SE}). N_{SE} is a normalized statistic that compares the measured data variance to the relative magnitude of the residual variance.³⁵ N_{SE} statistic range between $-\infty$ and 1.0, the latter being the optimal value. Positive values are generally viewed as acceptable levels of performance. In contrast, negative values indicate that the mean of the observed

Table 1. List of the input parameters used to simulate the soil water content and the concentrations of atrazine and metolachlor in TUAT experimental farm

SPEC model inputs	Abbreviations	Units	Atrazine	Metolachlor
Field				
Organic carbon	O_c	%	6.95 ²⁴⁾	
Bulk density	ρ_b	g/cm	0.5 ²⁴⁾	
Saturated water content	SAT	cm ³ /cm	0.95 ²⁴⁾	
Water residue	W_{res}	cm ³ /cm	0.10 ^a	
Saturated hydraulic conductivity	K_{sat}	Cm/h	10.80 ^a	
Curve number	CN	—	86 ²³⁾	
Slope	slp	%	5 ²⁴⁾	
Field capacity	FC	cm ³ /cm	0.40 ²⁴⁾	
Pesticide				
Date of applications	—	Date	10 June 2013, 6 December 2013	
Application rate	—	g/ha	771.3 ²⁴⁾	732.5 ²⁴⁾
Partitioning water organic coefficient	K_d	L/kg	100 ²⁸⁾	120 ²⁴⁾
Half-life biochemical degradation	HL_{bio}	day	23.5 ²⁸⁾	24.7 ²⁸⁾
Half-life photo-degradation	HL_{photo}	day	100 ²⁹⁾	199 ^a
Average solar radiation	$Solar$	kJ/m	14 ²⁴⁾	14 ^a
Q_{10}	Q_{10}	—	1.35 ²⁴⁾	1.42 ²⁴⁾

Note: ^a Input was calibrated.

value is a better predictor than is the simulated value.³⁶⁾

The root mean square error (*RMSE*) is an error statistic because it indicates error in the units of the variable of interest (cm^3/cm^3 for the soil water content and mg/L for herbicide concentrations).³⁶⁾ A value of 0 indicates a perfect fit. Having an *RMSE* value of less than half the standard deviation of the measured data was reported to be appropriate.³⁷⁾ The coefficient of residual mass (*CRM*) indicates if the model overestimate or underestimate the observations, a perfect fit is indicated by a value of 0. Positive values indicate that the model has a tendency to underestimate the data while negative values indicate that the model tends to overestimate the observations.³⁸⁾ The equations used to compute the different indices have been commonly reported in the literature.^{36,38)}

Results and Discussion

1. Model validation for the prediction of soil water content

During field monitoring, the daily volumetric average of the soil water content varied from 0.34 to 0.40 cm^3/cm^3 during the summer and winter seasons, respectively.²⁴⁾ There is a clear correlation between precipitation and increased the soil water content (Fig. 2). In major precipitation events, soil water content increased sharply, since runoff amounts were rerouted to the percolation component, as indicated previously. In the field, no sign of ponding was observed during these intense precipitation events, indicating that significant runoff was unlikely to have occurred. However, the validation of runoff and the corresponding pesticide discharge components of the SPEC model is required. In general, the SPEC model accurately predicted the soil water content of the TUAT experimental farm for the duration of monitoring (Fig. 2). The sensor used to record the soil water content failed starting on the March 5, 2014 (Fig. 2). Consequently, the evaluation of the model is based on recording prior to the sensor's failure.

Two scenarios were used to simulate the soil water content. In the first scenario, a constant value for ET (0.1 cm/day) was

used during the entire simulation period (dotted line in Fig. 2). In contrast, for the second scenario, daily ETs computed by the Penman-Monteith algorithm were used in the model (solid line in Fig. 2). The effect of ET on the simulated soil water content was particularly clear during the winter season (Fig. 2). Indeed, the default ET value (0.1 cm/day) seems to be too high during the winter season (dotted line in Fig. 2). The average ETs calculated using the Penman-Monteith method were 0.1 and 0.06 cm/day for the summer and winter seasons, respectively. As a result, too much water is removed from the soil, which results in the underestimation of soil water content during this period. In contrast, using daily ET values greatly improved the accuracy of the simulations of soil water content.

The statistical evaluations of the SPEC model for the two scenarios are reported in Table 2. The *CRM* statistic indicates that the model has a slight tendency to overestimate the soil water content. The N_{SE} and *RMSE* statistics were similar for the two scenarios using constant and daily ET values. In contrast, the R^2 value increased significantly for the simulation using daily ET values. Indeed, the high linear relationship between the predicted and observed soil water content can be observed graphically in Fig. 2. While the predicted daily soil water content values did not always match the observed values, the general trend of the observations is very well captured by the model's simulation. In general, regarding the number of observation points ($n=269$), the temporal and spatial variations of the observed water contents and the daily predictions for both scenarios were classified as good.

2. Model validation for the prediction of atrazine and metolachlor concentrations

Atrazine and metolachlor concentrations were simulated from June 10, 2013 to May 5, 2014, using the input parameter values reported in Table 1 and the scenarios for constant and daily ET values. The deterministic simulations using the daily ET values are reported in Fig. 3 while the statistical evaluations of the model for both scenarios are reported in Table 2. The predicted

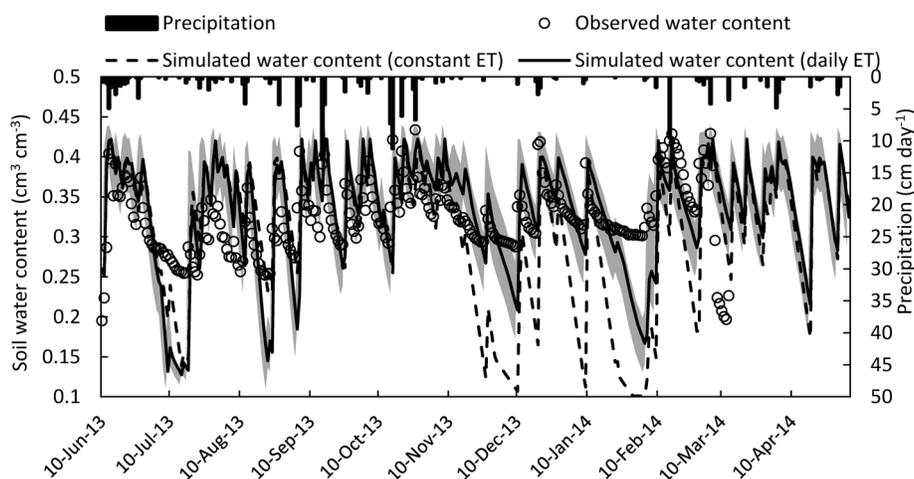


Fig. 2. Predicted and observed daily water content in 5-cm deep soil at TUAT experimental farm from 10 June 2013 to 5 May 2014. The grey band indicates the 95th percentile confidence interval of the predicted soil water content acquire from the MC simulation 1.

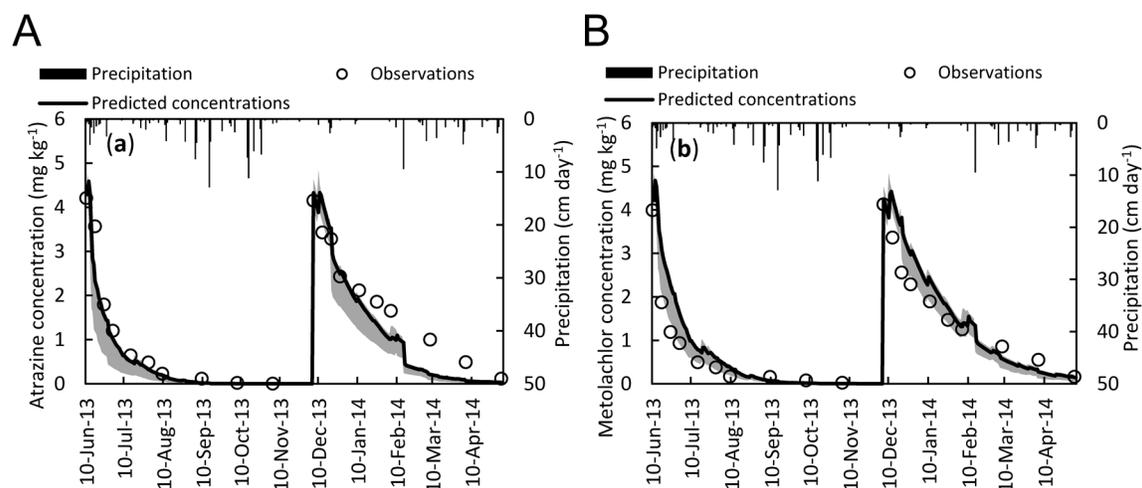


Fig. 3. Predicted and observed concentrations of atrazine (A) and metolachlor (B) in 5-cm deep soil for the 1st MC scenario (parameter related to soil properties). Grey bands indicate 95th percentile confidence interval.

Table 2. Statistical evaluation of the SPEC model regarding the prediction of soil water content, atrazine and metolachlor concentrations

Outputs	Water content		Atrazine		Metolachlor	
	Const. ET	Daily ETs	Const. ET	Daily ETs	Const. ET	Daily ETs
R^2	0.16	0.34	0.93	0.92	0.91	0.93
N_{SE}	-3.88	-1.06	0.91	0.89	0.82	0.76
$RMSE$	0.09	0.05	0.41	0.45	0.53	0.61
CRM	0.09	-0.003	0.12	0.07	-0.21	-0.27

Table 3. Percentage of atrazine and metolachlor dissipated by various processes as compared to herbicides applied mass for the summer and winter seasons

Processes	Unit	Atrazine		Metolachlor	
		Summer	Winter	Summer	Winter
Biochemical degradation	%	39	49	57	57
Photo-degradation	%	3	5	5	7
Percolation	%	58	46	39	33
Runoff	%	0	0	0	0
Residual dissolved into soil-water	%	<0.1	<0.1	<0.1	0.1
Residual sorbed onto soil-particles	%	<0.1	0.2	<0.1	2

Note: Runoff simulation was disabled for this simulation.

herbicide concentrations for the two ET scenarios were similar, since the statistical evaluations of the two scenarios yield similar statistics for atrazine and metolachlor (Table 2). The model was flagged by the CRM statistics as slightly underestimating atrazine concentrations and overestimating metolachlor concentrations. Those trends were also confirmed by a visual inspection of the deterministic simulations of atrazine and metolachlor (Fig. 3). Nevertheless, the predicted herbicide concentrations are in range of the observations. Moreover, the N_{SE} was positive for all scenarios while the R^2 was higher than 0.90 for all scenarios. Thus, the model accurately simulated atrazine and metolachlor concentrations on the TUAT experimental farm.

The dissipation behavior of the two herbicides was different between the summer and winter seasons as reported by the herbicide mass balance (Table 3). At the end of the seasons, the amounts of atrazine and metolachlor remaining in the soil layers were small. More herbicide was transported with vertical percolation during the summer season due to frequent and abundant precipitation events as compared to the winter season (Fig. 3). Note that since surface runoff was prevented due to the installation of borders surrounding the plot, herbicide was only transported through vertical percolation (Eq. (1)). It was anticipated that more herbicide mass would be lost through degradation during the summer season due to the effect of temperature on deg-

radation. However, the percentage of atrazine loss through biochemical degradation during the winter season was higher than that of the summer season. The percentages of metolachlor loss through biochemical degradation in the summer and winter seasons were identical (Table 3). In the winter, less atrazine was lost through percolation, resulting in more chemicals available for biochemical degradation during the winter as compared to in the summer (Fig. 3). The amounts of herbicides lost through photodegradation during the summer and winter seasons were similar.

On February 15, 2014, a 9.5-cm precipitation event caused a great drop in predicted herbicide concentrations due to its transport through percolation below soil 5 cm deep (Fig. 3). However, the monitored herbicide concentrations, while decreasing, did not drop suddenly as the simulation had suggested. A possible explanation is that the model does not consider the effect of snowfall and snowmelt that occur at that time of the year. It was observed that snow melted gradually in the field and therefore, the actual amount of water that the soil received during a snowfall event was probably less than indicated in the data recorded by the logger. Note that the slight decline of observed herbicide concentrations due to precipitation on December 27 is well simulated by the model suggesting that the model's assumptions are appropriate when there is no snowfall.

3. Uncertainty analyses

The effects of input uncertainty on the predicted soil water content and herbicide concentrations were investigated using two MC scenarios which consisted of: (1) soil parameter inputs and (2) herbicide characteristic inputs. The effects of uncertainty in soil parameters on the predictions of soil water content are reported in Fig. 2. The thickness of the 95th percentile confidence interval was constant through the simulation period, indicating that the influence of parameters' uncertainty did not vary during the summer and winter seasons.

The results of the uncertainty analysis for the prediction of

herbicide concentrations in soil are displayed in Fig. 3A, B for MC scenario 1 and in Fig. 4A, B for MC scenario 2, respectively. The effects of the soil property uncertainties on herbicide concentrations were consistent in the summer and winter seasons, as the thickness of the 95th percentile confidence interval remained constant throughout the simulation period (Fig. 3A, B). The 95th percentile confidence interval computed for atrazine was greater than that for metolachlor. Since the K_{oc} of atrazine is lower than that of metolachlor (Table 1), atrazine was simulated to be transported easily through water percolation which was flagged as a main route for herbicide dissipation (Table 3).

The herbicide characteristic uncertainties did not affect the predicted herbicide concentrations during the summer season (Fig. 4). In contrast, the predicted herbicide concentrations in the winter season were greatly affected by the herbicide characteristic uncertainties, as indicated with the greater thickness of the 95th percentile confidence interval. The K_{oc} parameter is used to predict the amount of herbicide transported with surface runoff and vertical percolation (Eqs. (14)–(16)). The Q_{10} parameter is used together with the soil temperature to adjust the half-life of the biochemical degradation of herbicides (Eqs. (17)–(19)). Both infiltration and temperature data were reported to be significantly different between summer and winter seasons at the TUAT experimental farm (Table 3).²⁴ Therefore, the differences in the effects of uncertainty included in herbicides' characteristics between the summer and winter seasons on the predicted herbicide concentrations are due to different combinations of the interrelated parameters of K_{oc} and infiltration (Eqs. (14)–(16)) or Q_{10} and temperature (Eqs. (17)–(19)). This result also suggests that it is appropriate to investigate the sensitivity of input parameters separately for summer and winter datasets. Note that solar radiation data were similar for the summer and winter seasons, 13.6 ± 6.6 and 12.9 ± 6.8 MJ m⁻², respectively. Consequently, the effect of the HL_{photo} input's uncertainty on herbicide concentrations is constant regardless of the sea-

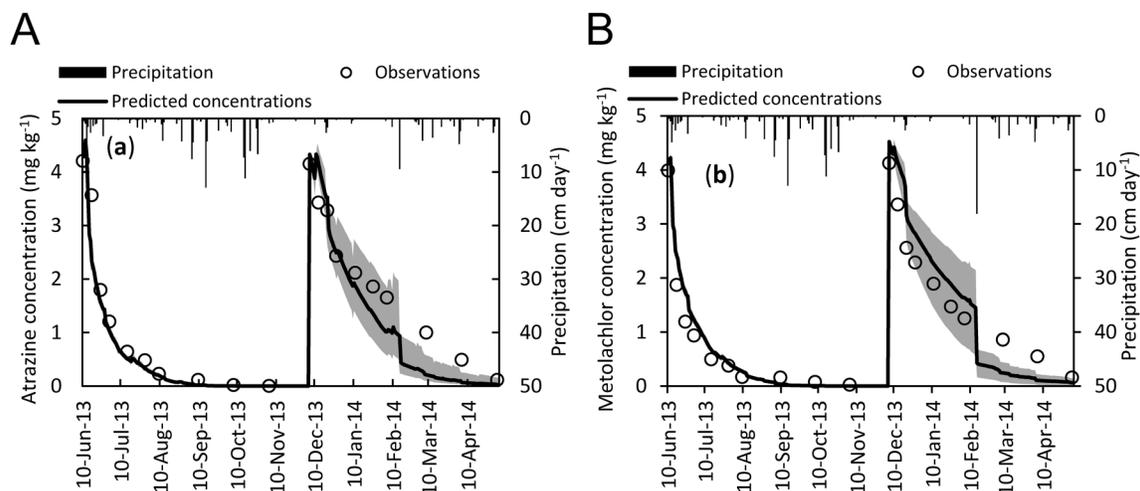


Fig. 4. Predicted and observed concentrations of atrazine (A) and metolachlor (B) in 5-cm deep soil for the 2nd MC scenario (parameter related to pesticide characteristics). Grey bands indicate 95th percentile confidence interval.

son (Eq. (22)). In the SPEC model, the parameter f_{US} (Eq. (21)) was constant during the simulation period. However, in practice this parameter fluctuates; therefore photodegradation was likely overestimated during the winter season.

4. Sensitivity analyses

Prior to the sensitivity analysis, all data generated by the MC simulations was assessed and showed no evidence of skewness or kurtosis for any of the input parameters and outputs. Consequently, a stepwise regression analysis was performed using an SPSS software package for statistical analysis.³⁹⁾ There was no evidence that any of the input parameters exerted undue influence on the regression models. Moreover, no indication of multicollinearity (two or more highly correlated predictor variables) in the data was found. The standardized rank regression coefficients (SRRCs) obtained using stepwise regression methodology are presented in Tables 4 and 5 for MC scenario 1 and 2, respectively. SRRC values can vary from -1 to 1 , and high absolute values of SRRCs indicate for sensitive parameters. A positive SRRC indicates that increasing the parameter value will increase the output considered, and vice versa.

For MC scenario 1, the ranking of the sensitive parameters was consistent, regardless of the season (Table 4). While the “no-runoff” option is used, the field capacity (FC) and the saturated water content of the soil (SAT) were flagged as the most sensitive parameters regarding the prediction of soil water content. The SRRCs of these parameters were positive since increasing both parameters increases the predicted soil water content. Indeed, increasing the SAT and FC allows the soil to: (1) store more water, (2) retain more water in periods of no rainfall, and (3)

generate less percolation (Eqs. (2) and (3)). The same parameters were retained by stepwise regression methodology that uses herbicide concentrations as outputs. The sign of the reported SRRCs helps to gain some insight into the model’s behavior. Increasing the field capacity of the soil decreases predicted herbicide concentrations. In contrast, increasing the saturated water content of the soil increases predicted concentrations of herbicide. The field capacity of the soil determines the amount of water that is available for infiltration (Eq. (2)) and consequently, increasing this parameter increases the loss of herbicide due to percolation. A field’s saturated water content is primarily used to determine the amount of percolating water (Eq. (3)). By setting a higher SAT_j value, the amount of percolating water will be reduced, thereby limiting the transport of herbicide.

MC scenario 2 also produced a consistent ranking of the sensitive parameter. However, the season affected the ranking of the parameters (Table 5). For the summer season, the photodegradation half-life was flagged as the most sensitive parameter. This result is caused by not including the biochemical degradation rate (k_{bio}) in the sensitivity analysis to avoid redundancy with the Q_{10} parameter. In the summer, temperatures are close to the reference temperature of 25°C ; consequently, the Q_{10} parameter does not impact the rate of k_{bio} . The analysis of the mass balance of the two herbicides (Table 3), however revealed that the mass of herbicides lost through biochemical degradation is 8 to 10 times higher than that lost through photodegradation. Consequently, accurate k_{bio} parameters are absolutely crucial for accurately determining the fate and transport of atrazine and metolachlor in both summer and winter. Increasing the HL_{photo} slows the degradation of herbicide in the field, which results in higher herbicide concentrations in the soil. For the winter season, the Q_{10} was highlighted as the most sensitive parameter. The Q_{10} parameter is an indication as to what extent the half-life of a pesticide will deviate from its default value at 25°C when the temperature changes by $\pm 10^\circ\text{C}$. Indeed, the Q_{10} and k_{bio} are nested together (Eq. (18)), and the high sensitivity of the Q_{10} , therefore, implies that the k_{bio} has to be accurately determined to accurately predict herbicide concentrations (Table 3). In addition, there is limited information about Q_{10} values for pesticide; this was reflected in the parameter’s rather wide range (1 to 2.2) which also contributed to the high overall sensitivity of the parameter (see Fig. 4 winter). During monitoring, the average temperature in the winter was $5 \pm 4^\circ\text{C}$.²⁴⁾ Since there is approximately a 20°C difference between the reference temperature of 25°C and the average temperature in winter, the half-life of the herbicides in winter was divided by the square of the Q_{10} (Eq. (18)), resulting in much slower herbicide degradation. During the summer season, the temperatures were closer to the reference temperature and, thus, the Q_{10} did not affect predicted herbicide concentrations.

Conclusion

The SPEC model was developed to assess Soil-PEC (Predicted Environmental Concentrations in agricultural soils). The model

Table 4. Standardized rank regression coefficients of the SPEC model parameters for the 1st MC scenario (parameter related to pesticide characteristics)

Outputs	Sensitive parameters	MC scenario 1	
		Summer	Winter
Water content	FC	0.87	0.87
	SAT	0.30	0.30
Atrazine	FC	-0.60	-0.58
	SAT	0.47	0.48
Metolachlor	FC	-0.62	-0.63
	SAT	0.46	0.46

Table 5. Standardized rank regression coefficients of the SPEC model parameters for the 2nd MC scenario (parameter related to pesticide characteristics)

Outputs	Sensitive parameters	MC scenario 2	
		Summer	Winter
Atrazine	HL_{photo}	0.78	—
	Q_{10}	—	0.75
Metolachlor	HL_{photo}	0.55	—
	Q_{10}	—	0.55

was then validated using a field experiment carried out from June 10, 2013, to May 5, 2014 in which the soil water content and concentrations of atrazine and metolachlor were monitored. The soil water content predicted were accurate regarding the time step, and R^2 and N_{SE} statistics were equal to 0.38 and 0.22, respectively. The predicted atrazine and metolachlor concentrations were also adequate, and the R^2 and N_{SE} statistics were higher than 0.91 and 0.76, respectively.

The performance of the model with uncertain inputs was investigated using the Monte Carlo technique. The model's predictions were influenced constantly throughout the simulation period due to the uncertainty encompassed in soil properties. In contrast, only the predicted herbicide concentrations in the winter season were influenced by uncertainty arising from pesticide properties. While preventing surface runoff in the model, the field capacity and the saturated water content of the soil were identified as major contributors to variation in predicted soil water content and herbicide concentrations. In addition, the Q_{10} parameter was also flagged as a major contributor to variation in predicted herbicide concentrations, especially during the winter season.

The SPEC model therefore, has the potential to accurately predict water content and pesticide concentrations in soil. Moreover, the detailed pesticide mass balance given by the model can be used to identify major dissipation pathways and evaluate the best options for improving environmental conditions associated with pesticide residues in agricultural soil. Future improvements include: (1) the validation of the runoff component that was disabled in this study, (2) the creation of multiple soil layers for the improved prediction of soil water content, and (3) the dynamic adjustment of UV-B radiation over solar radiation's dependence on environmental factors for improving predictions of photodegradation.

Acknowledgements

This research was supported by the Environment Research and Technology Development Fund (4-1303). DQ Thuyet is a JSPS postdoctoral research fellow at the Graduate School of Agricultural and Life Science, The University of Tokyo.

References

- 1) A. Pivato, A. Barausse, F. Zecchinato, L. Palmeri, R. Raga, M. C. Lavagnolo and R. Cossu: *Atmos. Environ.* **111**, 136–150 (2015).
- 2) M. M. Hantush, M. A. Mariño and M. R. Islam: *J. Hydrol. (Amst.)* **227**, 66–83 (2000).
- 3) D. D. Giannouli and V. Z. Antonopoulos: *J. Environ. Manage.* **150**, 508–515 (2015).
- 4) A. Hildebrandt, M. Guillamón, S. Lacorte, R. Tauler and D. Barceló: *Water Res.* **42**, 3315–3326 (2008).
- 5) L. Guzzella, F. Pozzoni and G. Giuliano: *Environ. Pollut.* **142**, 344–353 (2006).
- 6) Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan (MAFF): <http://www.acis.famic.go.jp/shinsei/8147/8147.pdf> (Accessed 1 Sep., 2016; in Japanese).
- 7) T. Nagayama: *J. Pestic. Sci.* **30**, 418–425 (2005) (in Japanese).
- 8) J. M. Marín-Benito, V. Pot, L. Alletto, L. Mamy, C. Bedos, E. Barriuso and P. Benoit: *Sci. Total Environ.* **499**, 533–545 (2014).
- 9) J. J. T. I. Boesten and B. Gottesbüren: *Agric. Water Manage.* **44**, 283–305 (2000).
- 10) M. Trevisan, G. Errera, C. Vischetti and A. Walker: *Agric. Water Manage.* **44**, 357–369 (2000).
- 11) R. Calvet: *Eur. J. Agron.* **4**, 473–484 (1995).
- 12) H. Watanabe and K. Takagi: *Environ. Technol.* **21**, 1379–1391 (2000).
- 13) H. Watanabe and K. Takagi: *Environ. Technol.* **21**, 1393–1404 (2000).
- 14) J. Tournebize, H. Watanabe, K. Takagi and T. Nishimura: *Paddy Water Environ.* **4**, 39–51 (2006).
- 15) H. Watanabe, K. Takagi and S. H. Vu: *Pest Manag. Sci.* **62**, 20–29 (2006).
- 16) K. Inao and Y. Kitamura: *Pestic. Sci.* **55**, 38–46 (1999).
- 17) N. Iwasaki, K. Inao, T. Iwafune, T. Horio and H. Obara: *Limnology* **13**, 221–235 (2012).
- 18) M. Trevisan, G. Errera, G. Goerlitz, B. Remy and P. Sweeney: *Agric. Water Manage.* **44**, 317–335 (2000).
- 19) S. L. Neitsch, J. G. Arnold, J. R. Kiniry and J. R. Williams: “Soil and water Assessment Tool, Theoretical Documentation, Version 2009” Texas Water Resources Institute, College Station, Temple, Texas, 2011.
- 20) K. Siimes, S. Rämö, L. Welling, U. Nikunen and P. Laitinen: *Agric. Water Manage.* **84**, 53–64 (2006).
- 21) W. C. Boughton: *Aust. J. Soil Res.* **27**, 511–523 (1989).
- 22) J. Boulange, H. Watanabe, K. Inao, T. Iwafune, M. Zhang, Y. Luo and J. Arnold: *J. Hydrol. (Amst.)* **517**, 146–156 (2014).
- 23) USDA: “National Engineering Handbook, Section 4: Hydrology,” 1972.
- 24) P. Jaikaew, J. Boulange, D. Q. Thuyet, F. Malhat, S. Ishihara and H. Watanabe: *Environ. Monit. Assess.* **187**, 760 (2015).
- 25) R. G. Allen, L. S. Pereira, D. Raes and M. Smith: “Crop evapotranspiration: Guidelines for computing crop water requirements. FAO Irrigation and Drainage Paper No. 56,” 1998.
- 26) Soil Modelling Workgroup (FOCUS): *Soil persistence models and EU registration* (1997) http://ec.europa.eu/food/plant/docs/pesticides_ppp_app-proc_guide_fate_soil-persistence-1997.pdf (Accessed 1 Sep., 2016).
- 27) T. Katagi: *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **182**, 1–189 (2004).
- 28) K. A. Lewis, A. Green, J. Tzilivakis and D. Warner: The Pesticide Properties DataBase (PPDB), Agriculture & Environment Research Unit (AERU), University of Hertfordshire, <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/> (Accessed 1 Sep., 2016).
- 29) F. Xiaozhen, L. Bo and G. Aijun: *J. Hazard. Mater.* **117**, 75–79 (2005).
- 30) F. Malhat: *International SWAT-Asia Conference IV (SWAT-Asia IV)*, Tsukuba, (Ibaraki, Japan), 2015.
- 31) Japan Meteorological Agency: <http://www.jma.go.jp/jma/index.html> (Accessed 1 Sep., 2016).
- 32) J. Boulange, K. Kondo, T. K. Phong and H. Watanabe: *J. Pestic. Sci.* **37**, 323–332 (2012).
- 33) K. Kondo, J. Boulange and W. Hirozumi: *J. Pestic. Sci.* **37**, 312–322 (2012).
- 34) D. R. Legates and G. J. McCabe Jr.: *Water Resour. Res.* **35**, 233–241 (1999).
- 35) J. E. Nash and J. V. Sutcliffe: *J. Hydrol. (Amst.)* **10**, 282–290 (1970).
- 36) D. N. Moriasi, J. G. Arnold, M. W. Van Liew, R. L. Bingner, R. D. Harmel and T. L. Veith: *Trans. ASABE* **50**, 885–900 (2007).
- 37) J. Singh, H. V. Knapp, J. G. Arnold and M. Demissie: *J. Am. Water Resour. Assoc.* **41**, 343–360 (2005).
- 38) Y. Hosaini, M. Homae, N. A. Karimian and S. Saadat: *Int. J. Plant Prod.* **3**, 91–104 (2009).
- 39) IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0, (Released 2013).

[他誌掲載論文]

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64, 4478~4486 より
転載

Effect of Time-Dependent Sorption on the Dissipation of Water-Extractable Pesticides in Soils

Yutaka Motoki¹, Takashi Iwafune², Nobuyasu Seike¹, Keiya Inao¹,
and Takashi Otani¹

¹ National Institute for Agro-Environmental Sciences, 3-1-3 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8604, Japan

² Food and Agricultural Materials Inspection Center, Agricultural Chemicals Inspection Station,
2-772 Suzuki-cho, Kodaira, Tokyo 187-0011, Japan

- 本論文の著作権は、American Chemical Society に帰属していますが、
American Chemical Society の転載要件を満たしていることを確認の
上転載しています。

Effect of Time-Dependent Sorption on the Dissipation of Water-Extractable Pesticides in Soils

Yutaka Motoki,^{†,§} Takashi Iwafune,[‡] Nobuyasu Seike,^{*,†} Keiyo Inao,[†] and Takashi Otani[†]

[†]National Institute for Agro-Environmental Sciences, 3-1-3 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8604, Japan

[‡]Food and Agricultural Materials Inspection Center, Agricultural Chemicals Inspection Station, 2-772 Suzuki-cho, Kodaira, Tokyo 187-0011, Japan

S Supporting Information

ABSTRACT: The dissipation behavior of water-extractable pesticides in soils is important when assessing the phytoavailability of pesticides in soils. This process is less understood than pesticide extraction with organic solvents. To elucidate the dissipation behavior of water-extractable pesticides in soils, we conducted an incubation study using 27 pesticides and five Japanese soils. The rate of decrease of the level of pesticides in water extracts was faster in soils than that of total extracts (water extracts and acetone extracts). This suggests that time-dependent sorption contributed to the difference in the dissipation between the pesticides in water and total extracts from soils. Increased apparent sorption coefficients ($K_{d,app}$) with time were positively and significantly correlated with $K_{d,app}$ values of a 0 day incubation [$K_{d,app}(t_0)$]. This empirical relationship suggests that $K_{d,app}(t_0)$ values can predict the time-dependent increase in $K_{d,app}$ and the dissipation of water-extractable pesticides in soils.

KEYWORDS: pesticides, soil, fate, aging, time-dependent sorption, water extraction, phytoavailability

INTRODUCTION

Recently in Japan, some agricultural chemicals that had been applied to previously grown crops and then remained in the soil were detected in succeeding crops. Selling or distributing crops in Japan that contain pesticides above their maximal residue limits (MRLs), or a concentration of 0.01 mg/kg if the MRL has not been established, is prohibited.¹ Thus, these farmers suffer economic loss. When newly developed pesticides are registered in Japan, soil dissipation studies in two fields having different soil types are required.² These studies must be performed to assess the risk of contamination succeeding crops by pesticide residue in soils; that is, studies of residues in succeeding crops² are required only if the half-lives of pesticides in the soil are more than 100 days.

In soil dissipation studies, the extraction of pesticides from soils is conducted using organic solvents such as acetone. However, the extractability of organic solvents is too high to assess the phytoavailability of residual pesticides in soil,³ i.e., the organic solvent extracts soil-sorbed pesticides, which are not taken up by the plant. Therefore, to estimate the plant uptake of residual pesticides in soils, the concentrations of phytoavailable pesticides in soils should be measured. Our previous study indicated that the concentrations of pesticides such as clothianidin, thiacloprid, procymidone, and tetraconazole in leafy vegetables cultivated in four different soils containing the pesticide residues were positively and significantly correlated with the concentrations of water-extractable pesticides rather than total extractable pesticides (water extracts and acetone extracts) in these soils.⁴ This result implies that the residual levels of pesticides in crops are estimated using the concentrations of water extracts from soils. In addition, the study showed that the coefficients of determination (R^2) calculated using the concentrations of water extracts from soils at harvest were higher than those at sowing. Therefore,

assessing the dissipation of water-extractable pesticides in soils and predicting the concentration of the aqueous soil extracts at harvesting time are important for estimating the residue levels in crops before harvest, preferably before sowing, and for preventing the production and distribution of pesticide-contaminated crops. On the other hand, the water-extractable concentrations of pesticides can be calculated using the pesticide concentrations extracted with an organic solvent and the soil sorption coefficient (K_d), which describes the distribution of pesticides between soil and water. Hence, understanding the variability in K_d values is also important for estimating the uptake concentrations of pesticides from soils by crops.

K_d values measured by the batch equilibrium method⁵ are required for four different soils under the Japanese registration system.² The registration data for the soil dissipation study and the soil sorption study may be available for estimating the residual concentrations of water-extractable pesticides in soils and the uptake concentrations in crops. However, it was reported that the K_d values of various pesticides, including insecticides,^{6–9} fungicides,^{10,11} and herbicides,^{9,11–15} increased with aging time. Hence, if the effect of aging on the K_d values is not considered, the concentrations of water-extractable pesticides predicted using the K_d values seem to be higher than the actual values. Many previous studies^{6–8,10,12–15} describing and assessing time-dependent sorption have been conducted on either individual pesticides or several pesticides, and thus, the time-dependent changes in K_d values have not

Received: March 2, 2016

Revised: May 16, 2016

Accepted: May 19, 2016

Published: May 27, 2016

Table 1. Properties of Test Soils

soil	experiment	classification ^a	texture ^b	OC ^c (%)	CEC ^d (cmol(+) kg ⁻¹)	clay (%)	pH (H ₂ O)	EC ^e (mS cm ⁻¹)
LS1 ^f	laboratory	Typic Udipsamments	sand	0.06	3.4	2.4	7.5	0.04
LS2 ^f		Typic Hapludults	light clay	1.02	11.4	39.0	5.3	0.09
LS3 ^f		Typic Endoaquents	silty clay	1.46	18.2	25.3	5.8	0.17
LS4 ^f		Typic Hapludands	loam	5.21	33.8	10.8	5.5	0.15
LS5 ^f		Pachic Melanudands	silty loam	8.65	35.4	1.8	5.8	0.05
FS	field	Typic Hapludands	silty loam	4.93	26.0	7.3	6.3	0.31

^aAccording to U.S. Department of Agriculture Soil Taxonomy.¹⁷ ^bAccording to the International Society of Soil Science.¹⁹ ^cOrganic carbon content. ^dCation exchange capacity. ^eElectrical conductivity. ^fData were obtained from our previous report.²⁰ Soils LS1–LS5 correspond to soils S1, S3, S5, S7, and S8, respectively, in the previous report.

Table 2. Hydrophobicities and Analytical Groups of Test Compounds

compound	CAS Registry No.	pesticide type ^a	substance group	log <i>P</i> _{ow} ^b	log <i>S</i> _w ^c	analytical group ^d	
						laboratory test	field test
dinotefuran	165252-70-0	I	neonicotinoid	-0.549	4.60	A	A
imidacloprid	138261-41-3	I	neonicotinoid	0.570	2.79	A	A
dimethoate	60-51-5	I	organophosphate	0.704	4.60	A	
clothianidin	210880-92-5	I	neonicotinoid	0.905	2.53	A	A
thiacloprid	111988-49-9	I	neonicotinoid	1.26	2.26	A	A
fosthiazate	98886-44-3	I	organophosphate	1.68	3.95	A	A
metalaxyl	57837-19-1	F	phenylamide	1.75	3.92	A	A
ethiprole	181587-01-9	I	phenylpyrazole	1.99	0.964	A	
azoxystrobin	131860-33-8	F	methoxyacrylate	2.50	0.826	C	
methidathion	950-37-8	I	organophosphate	2.57	2.38	A	
fenobucarb	3766-81-2	I	carbamate	2.78	2.62	B	C
boscalid	188425-85-6	F	pyridinecarboxamide	2.96	0.663	B	
flutolanil	66332-96-5	F	phenylbenzamide	3.17	0.904	B	C
procymidone	32809-16-8	F	dicarboximide	3.30	0.391	B	C
fenitrothion	122-14-5	I	organophosphate	3.32	1.28	C	
kresoxim-methyl	143390-89-0	F	oximinoacetate	3.40	0.301	B	
tetraconazole	112281-77-3	F	triazole	3.56	2.19	C	
chloroneb	2675-77-6	F	chlorophenyl	3.58	0.903	B	
diazinon	333-41-5	I	organophosphate	3.69	1.78	C	
propiconazole	60207-90-1	F	triazole	3.72	2.18	C	
fipronil	120068-37-3	I	phenylpyrazole	3.75	0.577	C	
cadusafos	95465-99-9	I	organophosphate	3.85	2.39	B	
diclocymet	139920-32-4	F	carboxamide	3.97	0.805	C	
trifloxystrobin	141517-21-7	F	oximinoacetate	4.50	-0.215	B	
tolclofos-methyl	57018-04-9	F	organophosphate	4.56	-0.150	C	C
tetradifon	116-29-0	I	bridged diphenyl	4.61	-1.11	C	
fenthion	55-38-9	I	organophosphate	4.84	0.623	B	

^aAbbreviations: I, insecticides; F, fungicides. ^bOctanol–water partition coefficient obtained from the Pesticide Properties Database of IUPAC,²¹ except for the *P*_{ow} of diclocymet, which was obtained from ref 22. ^cWater solubility (milligrams per liter) obtained from the Pesticide Properties Database of IUPAC,²¹ except for the *S*_w of ethiprole, which was obtained from ref 22. ^dThe details of analytical methods are described in our previous report.²⁰

been extensively evaluated using various pesticides with different physicochemical properties for a given soil.

Because the soil organic matter is a main sorbent of a nonionic pesticide,¹⁶ it is likely to play an important role in the time-dependent increase in the *K*_d values for nonionic pesticides. However, there is no report on the time-dependent changes in *K*_d values in soils having a wide range of organic carbon (OC) contents. On the other hand, Japan is a typical volcanic country; volcanic ash soil (andisol), which is one of the major upland soils and is also widely distributed in other circum-Pacific regions such as the western coast of the American continents, the Philippine Islands, and New Zealand,¹⁷ contains high OC content. Therefore, Japanese soils have a wide range of OC contents¹⁸ and are useful for

elucidating the relationships between the time-dependent changes in *K*_d values and the OC content.

The aims of this study are to elucidate the dissipation behavior of the concentrations of pesticides in water extracts and total extracts (water extracts and acetone extracts) from soils and the time-dependent changes in the *K*_d values in laboratory experiments using five Japanese soils with different OC contents and 27 pesticides with different physicochemical properties. Furthermore, we attempted to develop an estimation method that can predict the dissipation of the water-extractable pesticides using the initial *K*_d values (i.e., the 0 day values after application of pesticides), based on the results of the laboratory studies, and verify this estimation method in the field.

MATERIALS AND METHODS

Soils and Pesticides. Five typical Japanese agricultural soils with a wide range of OC contents were used in the laboratory studies. Soil samples were air-dried and passed through a 2.0 mm sieve. The soil properties are listed in Table 1. The methods for measuring the reported properties have been described previously.²⁰ The 27 pesticides (chemical purity of >97.0%) were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan), Kanto Chemicals (Tokyo, Japan), and Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany) (Table 2). Pesticides belonging to various chemical groups were chosen on the basis of hydrophobicity, i.e., the range of their octanol–water partition coefficients ($\log P_{ow}$) and water solubility ($\log S_w$). To permit simultaneous analysis, the pesticides were divided into three analytical groups on the basis of the analytical methods described in Pesticide Analysis. Stock solutions (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ each) of the pesticides were prepared in acetone for each group.

Laboratory Incubation. Air-dried soil equivalent to 8 g of dry weight (DW) was placed in a 50 mL glass centrifuge tube. The water content of the soils was adjusted to approximately 60% of water holding capacity (WHC). Duplicate samples were incubated at 25 ± 2 °C in the dark. After a preincubation period of 10 days, 80 μL of an acetone stock solution of each pesticide group was added dropwise to a soil sample in a test tube so that the sample concentration was 1 $\mu\text{g}/\text{g}$ of DW of the initial pesticide concentration. The soil samples were thoroughly mixed using a microspatula, and the openings of the tubes were covered with aluminum foil. The soil samples were incubated in the dark at 25 ± 2 °C for 0, 2, 7, 14, 30, 60, and 120 days. The moisture content was maintained at 50–60% of WHC by adding distilled water once every 10 days. After each incubation period, the soil samples were analyzed using a sequential extraction method using distilled water and acetone.⁴

Sequential Extraction of Soils. Forty milliliters of distilled water was added to the test tubes so that the soil/solution ratio was approximately 1/5. The tubes were agitated on a thermostat shaker (TAITEC, Saitama, Japan) for 24 h at 25 ± 2 °C in the dark. After being shaken, the mixtures were centrifuged at 1200g for 30 min. Fifteen milliliters of supernatant was withdrawn and used to quantify the water-extractable pesticides, and then 20 mL of supernatant was discarded. Subsequently, 30 mL of acetone was added to the remaining sample; the tubes were shaken in a thermostat shaker for 20 min at 25 ± 2 °C and centrifuged at 1200g for 10 min, and then the supernatant was carefully decanted. This extraction procedure was repeated twice. The collected supernatant was evaporated in a rotary evaporator to reduce the volume to <15 mL, which was then used to quantify the acetone-extractable pesticides.

Pesticide Analysis. The aliquots (15 mL) of water extracts and concentrates (<15 mL) of acetone extracts from soils were analyzed using three different methods for each analytical group, as described in our previous report.²⁰ In brief, the aliquots and concentrates were cleaned with a diatomite column (InertSep K-solute 20 mL; GL Sciences, Tokyo, Japan) followed by these solid phase extraction (SPE) cartridges: a PSA column (500 mg; Supelco, Bellefonte, PA), an Accell CM column (500 mg; Waters, Milford, MA), and an ENVI-Carb II/PSA column (500 mg/500 mg; Supelco) for groups A–C, respectively (Table 2). The cleaned samples were analyzed by liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for group A and gas chromatography and mass spectrometry (GC–MS) for groups B and C. The LC–MS/MS and GC–MS operating conditions are given in Supporting Information section SI-1. In the case of the high matrix effects of cleaned samples, the quantification of pesticides using GC–MS was performed using matrix-matched standards.²³

The mass fraction of water-extractable pesticides in the soil, C_W (micrograms per gram of DW), was calculated from

$$C_W = C_{aq}(V_{add} + V_{sw})/M_{soil} \quad (1)$$

where C_{aq} (micrograms per milliliter) is the mass concentration of pesticide in the aqueous phase after shaking for 24 h, V_{add} is the volume of distilled water added (milliliters), V_{sw} is the volume of soil

water (milliliters), and M_{soil} is the soil's dry mass (grams). The mass fraction of total extractable pesticides in the soil, C_T (micrograms per gram of DW), was represented as

$$C_T = [C_{aq}(V_{aliq} + V_{disc}) + m_E]/M_{soil} \quad (2)$$

where V_{aliq} is the volume of the aliquot taken from the supernatant (milliliters), V_{disc} is the volume of the discarded supernatant (milliliters), and m_E is the mass of the pesticides extracted by acetone from the remaining sample after V_{aliq} and V_{disc} were removed (micrograms).

Two kinetic models were used to describe the dissipation in C_W and C_T with time: a single-first-order (SFO; eq 3) model and a double-first-order in parallel (DFOP; eq 4) model.²⁴ The DFOP model describes the dissipation as a sum of two first-order dissipation steps each in different parts of the soil compartment. The dissipation parameters were obtained by using the least-squares method with Microsoft Excel Add-In Solver.

$$C(t) = C_0 e^{-kt} \quad (3)$$

$$C(t) = C_0 [f e^{-k_1 t} + (1 - f) e^{-k_2 t}] \quad (4)$$

where $C(t)$ is the C_W or C_T value after t days, C_0 is the C_W or C_T value at time zero, k is the rate constant (inverse days), f is the fraction of C_0 applied to the first compartment, and k_1 and k_2 are the rate constants in the first and second compartments, respectively.

For the SFO model, DT_{50} (days), which is the time taken for a 50% decrease in C_W or C_T , was calculated using

$$DT_{50} = \ln 2/k \quad (5)$$

For the DFOP model, the DT_{50} values were calculated by using the goal-seek function in Microsoft Excel.²⁴

The apparent sorption coefficients ($K_{d,app}$, milliliters per gram) after different incubation periods, taking the dissipation of C_T and C_W with time into consideration, were determined using

$$K_{d,app} = C_{sorb}/C_{aq} = (C_T - C_W)/C_{aq} \quad (6)$$

where C_{sorb} is the mass fraction of soil-sorbed pesticides (micrograms per gram of DW).

Pesticide recovery tests were conducted with distilled water and all test soils.²⁰ Samples of distilled water (15 mL) spiked with a pesticide concentration of 1 ng/mL for all group pesticides were analyzed using the methods mentioned above. Each soil (5 g) spiked with 5 and 3 ng/g for group A and groups B and C, respectively, was mixed with 10 mL of distilled water and subsequently extracted three times with 30 mL of acetone for 20 min at 25 ± 2 °C. The acetone extracts were analyzed in a similar way. The mean recovery from the four replicates for group A and five replicates for groups B and C ranged from 73.2 to 117.0% for all compounds; the coefficients of variation (CVs) were $\leq 19.0\%$. The limits of quantification (LOQs) were calculated in accordance with Japanese Industrial Standard (JIS) K 0312.²⁵ The LOQs for all compounds in distilled water and all test soils were in the ranges of 0.14–1.29 ng/mL and 0.23–5.93 ng/g, respectively.

Field Studies. Field studies were conducted in our experimental field located in Tsukuba City, Japan, and started on May 12, 2015. The daily mean temperature of Tsukuba City during the experiment ranged from 16 to 30 °C (mean of 23 °C). The characteristics of the field soil (FS) are listed in Table 1. Ten pesticides, dinotefuran, imidacloprid, clothianidin, thiacloprid, fosthiazate, metalaxyl, fenobucarb, flutolanil, procymidone, and tolclofos-methyl, were used in the field study (Table 2). One liter of a mixed solution of the 10 pesticides (200 mg/L each), prepared by water dilution of commercial formulations (i.e., emulsifiable concentrates, water-soluble powders, and water-dispersible powders), was evenly applied to triplicate plots (1 m \times 1 m) using a watering can. Subsequently, the soil surface (approximately 0–20 cm depth) was tilled with a walking-type tilling apparatus. The initial concentration of pesticides in the 0–20 cm soil depth after tilling was calculated using the actual bulk density (0.45 g/cm³) and was 2.2 $\mu\text{g}/\text{g}$ of DW for each pesticide. Four cores were taken from each plot 0 (immediately after tilling), 2, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56,

63, 70, 77, and 84 days after application of the pesticides using cylindrical cans (8 cm inner diameter, 10 cm depth). The cores were combined for each plot and were mixed well. An approximately 15 g sample of the soil was dried at 105 °C to measure the moisture content, and an aliquot equivalent to 5 g of DW was analyzed using a sequential extraction method in the same way that was used in the laboratory experiment; i.e., the samples were first extracted three times with 25 mL of distilled water for 24 h at 25 ± 2 °C and subsequently with 30 mL of acetone for 20 min at 25 ± 2 °C.

RESULTS AND DISCUSSION

Dissipation Behavior of Water-Extractable and Total Extractable Pesticides in Laboratory Studies. The

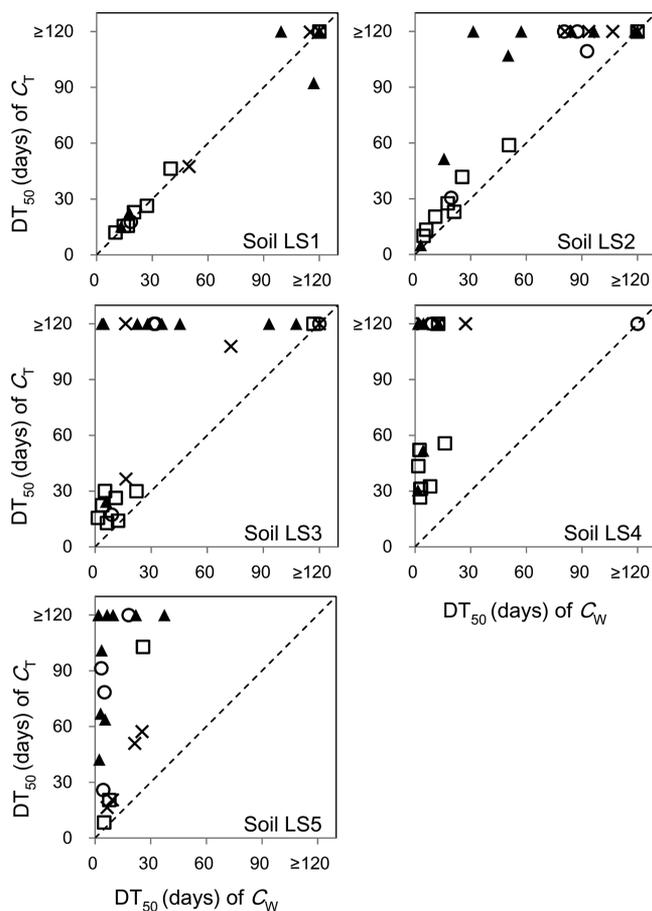


Figure 1. Comparison of DT_{50} values between water extracts (C_W) and total extracts (C_T) from soil: (O) neonicotinoids, (□) organophosphates, (▲) fungicides, and (×) others. The dashed line shows the 1/1 line.

applicability of a sequential extraction method was verified on the basis of the mass balance (MB, %), which was calculated by dividing the C_T value by the initial concentration of pesticides in soil, of the sample after incubation for 0 days (Supporting Information section SI-2). The MB differed depending on the type of pesticide and type of soil. From the results of recovery tests, i.e., the mean recovery of pesticide in water and soil samples was $\geq 73.2\%$ (see Materials and Methods, Pesticide Analysis), when the MB was $< 70\%$, the method was judged to be inapplicable because of biodegradation or hydrolysis during the 24 h water extraction. The MB of several pesticides, especially in LS5, was $< 70\%$, and these samples were excluded from the succeeding data analysis.

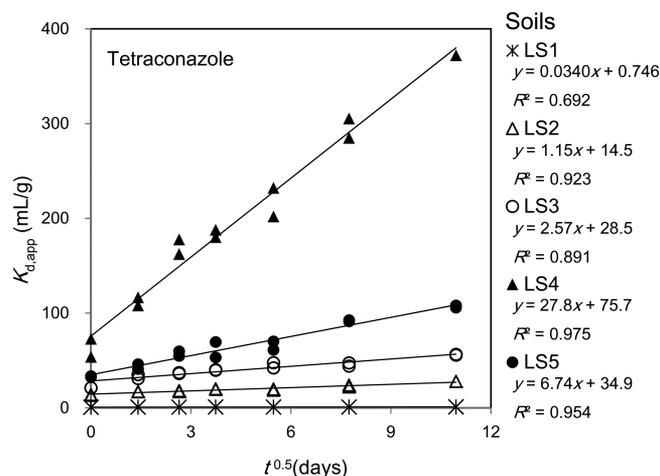


Figure 2. Time-dependent changes in the apparent sorption coefficient ($K_{d,app}$) of tetraconazole.

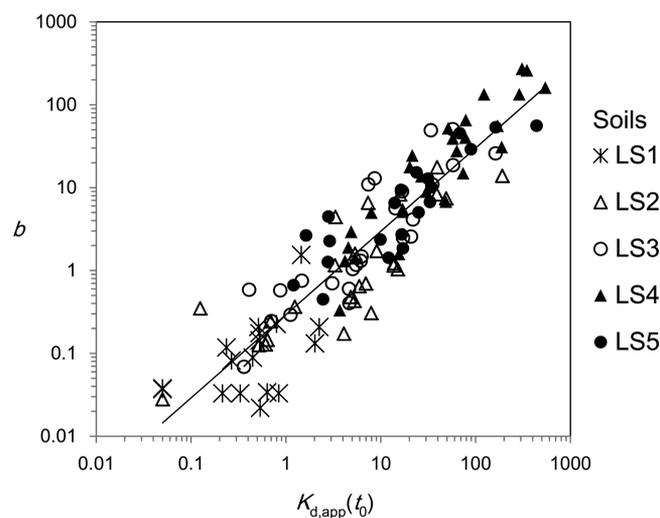


Figure 3. Fitted parameter b for eq 7 plotted as a function of apparent sorption coefficient for the 0 day incubation [$K_{d,app}(t_0)$].

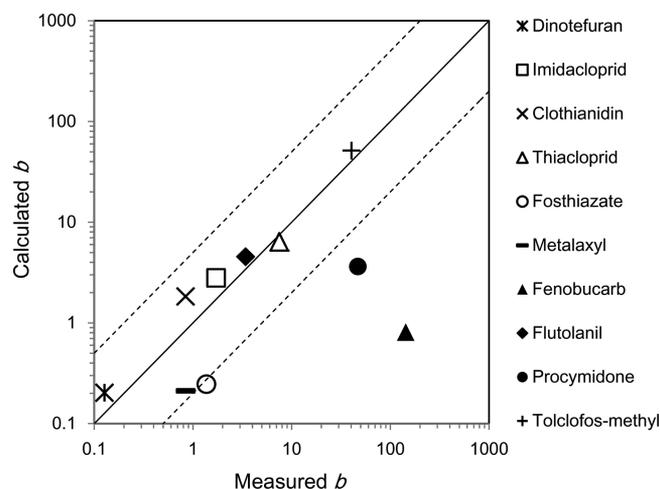


Figure 4. Comparison between measured and calculated b values for eq 7. The solid line shows the 1/1 line, and the dashed lines show the 1/5 and 5/1 lines.

Figure 1 shows a comparison of the DT_{50} values of C_W and C_T . The DT_{50} values were calculated using two kinetic models,

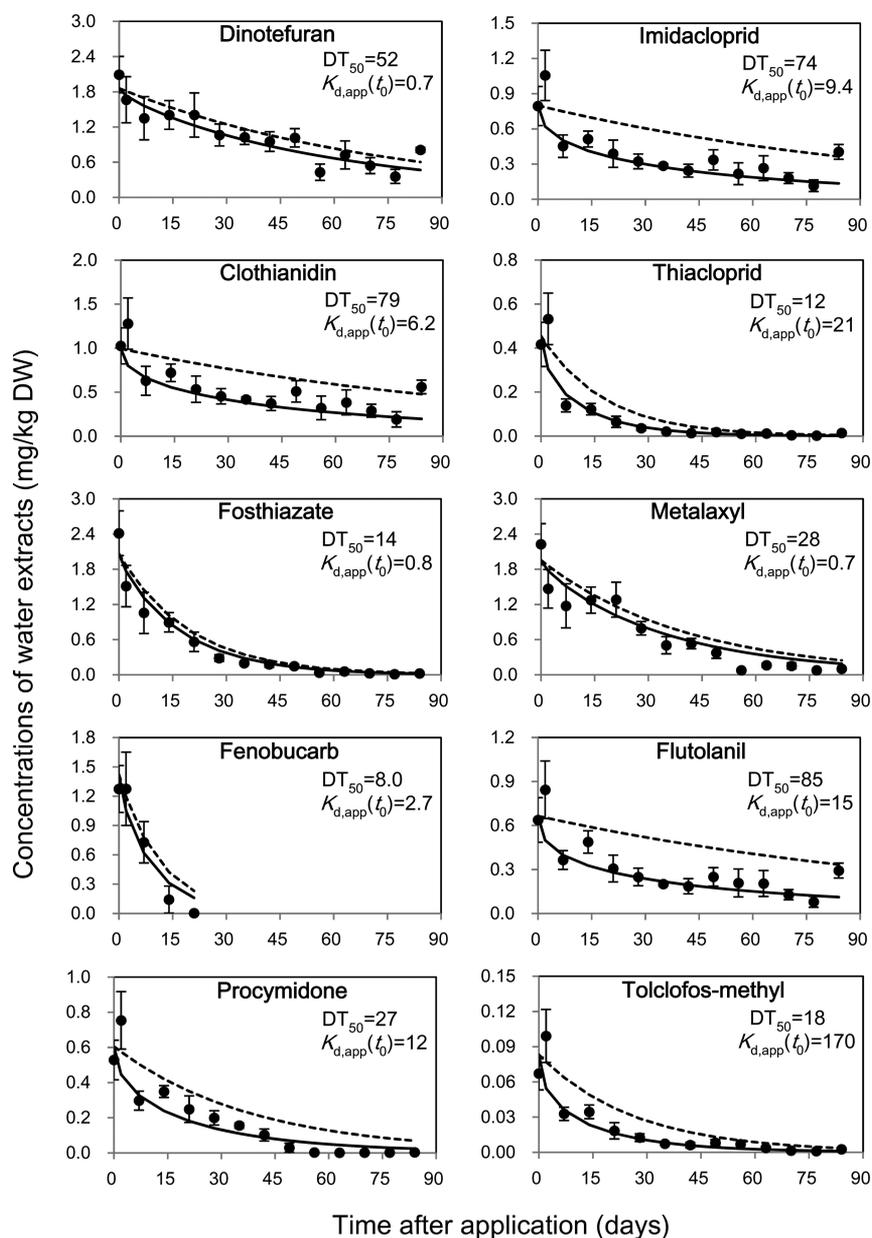


Figure 5. Comparisons between calculated and measured concentrations of water extracts from soil: (●) measured values, (—) values predicted using apparent sorption coefficients calculated by eq 9, and (---) values predicted using the apparent sorption coefficient of the 0 day incubation [$K_{d,app}(t_0)$ (milliliters per gram)]. DT_{50} (days) indicates the values of total extracts from soil calculated by eq 5. Error bars indicate the standard error. The measured values of fenobucarb were less than the LOQ on day 28 and after 28 days.

SFO and DFOP. The goodness of fit to the individual models was verified using the model error calculated by the χ^2 value,²⁴ and the DT_{50} values calculated by the model that had the smaller error level were adopted in Figure 1. The DT_{50} values of C_T were greater than those of C_W for all test soils except soil LS1. The details of the DT_{50} values and error levels for each model are summarized in Supporting Information section SI-2. The error levels of the two models of C_T were approximately equal to each other. In contrast, the error levels of the DFOP model of C_W were smaller than those of the SFO model, especially for soil LS4. Furthermore, previous research²⁶ on the dissipation of pharmaceuticals, which are organic chemicals as well as pesticides, in soil pore-water was better fitted to the biphasic DFOP and first-order multicompartiment (FOMC) models rather than the SFO model. Although our chemicals are not classified as pharmaceuticals, these results suggest that the

dissipation of water-elutable or water-extractable organic chemicals in soils is better described by biphasic models.

For the DT_{50} of C_T , many fungicides showed relatively high values among the tested compounds, and in particular, the values of metalaxyl, boscalid, procymidone, tetraconazole, and diclocymet were >120 days for all soil samples (Supporting Information section SI-2). Japanese registration data also show long DT_{50} values (>100 days) for boscalid and diclocymet under laboratory conditions.²⁷ On the other hand, the DT_{50} values of organophosphorus compounds such as dimethoate, fosthiazate, methidathion, fenitrothion, diazinon, tolclofos-methyl, and fenthion were relatively low. It was reported that the organophosphorus pesticides such as diazinon, dimethoate, and fenitrothion could be easily degraded by microorganisms; in other words, the DT_{50} values of these pesticides were ≤ 41 days.²⁸ Focusing on the differences among test soils, we found

Table 3. Statistical Analysis of the Measured and Predicted Concentrations of Water Extracts from Soil

soil	compound	uniform sorption ^a		time-dependent sorption ^b	
		RMSE ^c	NSE ^d	RMSE ^c	NSE ^d
FS	dinotefuran	58.8	0.78	53.1	0.97
	imidacloprid	80.7	0.05	52.5	0.88
	clothianidin	71.1	0.20	51.0	0.90
	thiacloprid	70.4	0.82	64.4	0.87
	fosthiazate	44.8	0.92	36.0	0.97
	metalaxyl	60.0	0.82	51.3	0.95
	fenobucarb	15.7	0.97	14.5	0.95
	flutolanil	87.9	-0.21	51.2	0.88
	procymidone	82.6	0.71	62.9	0.87
	tolclofos-methyl	74.7	0.73	63.9	0.84

^aPrediction using the apparent sorption coefficient for the 0 day incubation. ^bPrediction using apparent sorption coefficients calculated by eq 9. ^cRoot-mean-square error (%). ^dNash–Sutcliffe model efficiency.

soil LS5 indicated relatively low DT₅₀ values of C_T for various pesticides as well as organophosphates. The dissipation of a pesticide is thought to be affected by photolysis, hydrolysis depending on soil pH, and biodegradation.²⁹ In this study, the incubation of soil samples was conducted in a dark place, and the pH of soil LS5 was almost the same as the pH of soils LS3 and LS4. Therefore, hydrolysis and photolysis seemed not to be a direct cause of the fast dissipation of pesticides in soil LS5, and thus, biodegradation is thought to be the main contributor to dissipation.

Unlike the dissipation behavior of C_T, the DT₅₀ values of C_W for many pesticides tended to decrease in the following order of soils: LS1 ≥ LS2 ≥ LS3 ≥ LS5 ≥ LS4. The DT₅₀ values of C_W in soil LS1 with an extremely low OC content were longer than those of the other soils and exhibited a trend similar to those of C_T. On the other hand, the dissipation of C_W of two andisols (LS4 and LS5) having high OC content was faster than that of other soils. The OC content tends to be positively correlated with microbial activity in soils, and a positive correlation between the degradation rate of weakly sorbed compounds with high bioavailability and OC contents of soils has often been reported.^{30,31} Because C_W is the readily bioavailable fraction,^{9,13} the DT₅₀ of C_W seemed to vary depending on microbial activity, which is influenced by the OC content of the soils. However, if we focus on the results of soils LS4 and LS5, the DT₅₀ values of soil LS4 for many pesticides, especially for hardly degradable fungicides, were lower than those of soil LS5, which had the highest OC content (Supporting Information section SI-2). Furthermore, it is known that the dominant sorbent in soils of nonionic pesticides is organic matter consisting of OC.¹⁶ Therefore, there is a possibility that the sorption of pesticides to OC affects the dissipation of C_W; i.e., the DT₅₀ values decrease with an increase in the K_d values. According to our previous report,²⁰ the K_d values obtained in the standard batch sorption tests⁵ were higher for soil LS4 than for soil LS5 because of the difference in the organic carbon quality; i.e., soil LS4 had an aromatic carbon content higher than that of soil LS5 and an O-alkyl carbon content lower than that of soil LS5. Several reports show that the OC-normalized sorption coefficients (K_{oc}) of pesticides were positively correlated with aromatic carbon content and negatively correlated with O-alkyl carbon content.^{20,32–34}

The dissipation of C_W showed a behavior different from that of C_T. The reason for this is that the dissipation of C_W, which is the readily bioavailable fraction, is more affected by biodegradation than that of C_T. Furthermore, the dissipation of C_W is also affected by the soil sorption, making the investigation of sorption properties, especially time-dependent changes in K_d, necessary for better understanding the contribution of soil sorption to the dissipation of C_W.

Time-Dependent Sorption in Laboratory Studies. As mentioned in previous reports,^{6–15} the K_{d,app} values of many pesticides increased with an increase in incubation time. It is suggested that the time-dependent changes in soil sorption are attributed to the slow diffusion of pesticides into organic matter and the nanopore structures in soil particles.³ The pesticides are considered to move from the surface site of the soil particles to the interior sites, i.e., less accessible sites, with aging time. According to previous reports,^{10,12,14} the changes in K_{d,app} with time could be represented as

$$K_{d,app} = a + bt^{0.5} \quad (7)$$

where *a* and *b* are empirical parameters and *t* is the time of incubation. Although this empirical equation has no theoretical basis, it is suggested that the amounts of sorbed chemicals, which are controlled by diffusion, are proportional to the square root of time.^{35,36} Figure 2 shows an example of tetraconazole to illustrate the time-dependent changes in sorption. The details of the linear regression analysis for all pesticides are summarized in Supporting Information section SI-3. The soil samples, except for soil LS1, exhibited significant positive correlation (*P* < 0.05) between the K_{d,app} values and the square root of time for many pesticides. In the case of soil LS1, which has the lowest OC content, the time-dependent increase in K_{d,app} was not observed for many pesticides and the coefficient of determination values (*R*²) were extremely low.

Parameters *a* and *b* play an important role in the prediction of time-dependent changes in the K_{d,app} values. When a good fit to eq 7 was achieved, the *a* and *b* values were relatively high, with the condition that the OC content of soils and the log *P*_{ow} of pesticides were both high and the log *S*_w of the pesticides was low (Supporting Information section SI-3), i.e., the condition of an increasing level of soil sorption of nonionic pesticides,¹⁶ and the *a* values, which represent K_{d,app} at time zero, were approximated as the measured K_{d,app} values of the 0 day incubation sample [K_{d,app}(*t*₀)] (Supporting Information section SI-3). Moreover, the *b* values were proportional to the K_{d,app}(*t*₀) values, as shown in Figure 3. The linear regression equation describing the relationship between *b* and K_{d,app}(*t*₀) is

$$\log b = -0.532 + 1.005 \times \log K_{d,app}(t_0) \quad (8)$$

with *R*² = 0.838, *P* < 0.001, and *n* = 116. Thus, eq 8 suggests that parameter *b* can be estimated using the K_{d,app}(*t*₀) values that roughly indicate the degree of sorption to the surface sites of soil particles. Li et al.³⁷ investigated the soil sorption of atrazine using batch experiments combined with an online microfiltration (MF)–high-performance liquid chromatography technique; they showed that the intraparticle diffusion rate was proportional to labile surface sorption, i.e., labile surface coverage. In the study presented here, it is hard to clearly distinguish labile surface sorption from nonlabile sorption caused by intraparticle diffusion because K_{d,app}(*t*₀) is likely to include a small degree of nonlabile sorption occurring rapidly during the water extraction time of 24 h. However, the positive

correlation between the $K_{d,app}(t_0)$ values and the b values of eq 7, i.e., the increased rate of $K_{d,app}$, implies that a slow diffusion process contributes to the time-dependent increase in $K_{d,app}$. However, Supporting Information section SI-3 also shows that the easily degradable pesticides such as methidathion, fenitrothion, kresoxim-methyl, and fenthion, which have low DT_{50} values of C_T (Supporting Information section SI-2), exhibit relatively high b values for $K_{d,app}(t_0)$. Cox et al.⁶ and Koskinen et al.⁸ reported that the time-dependent increase in K_d values for imidacloprid and its metabolites was due to degradation in solution and on labile sites when the degradation rate was higher than the rate of desorption from soil. Thus, the time-dependent increase in $K_{d,app}$ in this study was thought to be affected not only by diffusion into nonlabile sites but also by fast dissipation in solution and on labile sites.

Although two reasons may contribute to the time-dependent increase in $K_{d,app}$, the empirical relationships between $K_{d,app}(t_0)$ and the parameters of eq 7 (a and b) allow us to rewrite eq 7 by using $K_{d,app}(t_0)$ as

$$K_{d,app} = K_{d,app}(t_0) + 0.294K_{d,app}(t_0)^{1.005}t^{0.5} \quad (9)$$

Thus, it appears to be possible to estimate the time-dependent changes in the $K_{d,app}$ values based on the $K_{d,app}(t_0)$ values.

The soil sorption, given as $K_{d,app}$ values, of pesticides increased with time. The rate of the increase in $K_{d,app}$ with time was high when $K_{d,app}(t_0)$, which represented the initial sorption strength, was high. As mentioned in Dissipation Behavior of Water-Extractable and Total Extractable Pesticides in Laboratory Studies, the DT_{50} values of C_W decreased with increasing K_d values without previous incubation. Therefore, it is suggested that the dissipation of C_W is influenced by the time-dependent increase in soil sorption. Taking this into account is important for predicting the dissipation of C_W .

Prediction of Water-Extractable Pesticides in a Field.

The field study was conducted to validate the estimation method of the time-dependent $K_{d,app}$ based on $K_{d,app}(t_0)$ suggested by the laboratory study. The time-dependent changes in the $K_{d,app}$ values in the field study were fitted to eq 7. Supporting Information section SI-4 shows the details of the linear regression analysis between the $K_{d,app}$ values and the square root of time. Figure 4 shows that measured b values for all pesticides, except for fenobucarb and procymidone, are in good agreement with predicted b values using eq 8. The measured b values of fenobucarb and procymidone exceeded the predicted values by ≥ 10 -fold. The $K_{d,app}$ values of fenobucarb and procymidone were extremely high on days 14 and 49 and after 14 and 49 days, respectively, and the fit to eq 7 for these two pesticides was poor ($R^2 < 0.3$), as shown in Supporting Information section SI-4. This is likely because the C_{aq} values, i.e., the concentrations of pesticides in the aqueous phase, for two pesticides decreased up to a level near the LOQ with time.

As discussed in Dissipation Behavior of Water-Extractable and Total Extractable Pesticides in Laboratory Studies, the dissipation behaviors of C_W and C_T differed from each other; i.e., the dissipation of C_T could be described by the SFO model, whereas the dissipation of C_W was more rapid than that of C_T and was better fitted to the biphasic model. As the reason for this, the time-dependent increase in soil sorption was thought to affect the dissipation of C_W . Therefore, the prediction of dissipation of C_W was performed by compensating for the

dissipation of C_T using the time-dependent $K_{d,app}$. The predicted C_W was determined using the following equation:

$$C_W = C_T \frac{r}{r + K_{d,app}} \quad (10)$$

where C_T was calculated using the SFO model (eq 3) and r is the ratio of solution to soil (milliliters per gram) of water extraction (the mean value of the field study was 5.6). The $K_{d,app}$ calculated by eq 9 and $K_{d,app}(t_0)$ were used in eq 10 with and without consideration of time-dependent sorption, respectively. The goodness of fit to each estimation method was assessed using the root-mean-square error (RMSE) and the Nash–Sutcliffe model efficiency (NSE) calculated by the following equation:^{38,39}

$$RMSE = \frac{100}{\bar{O}} \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (P_i - O_i)^2} \quad (11)$$

$$NSE = \left[\sum_{i=1}^n (O_i - \bar{O})^2 - \sum_{i=1}^n (O_i - P_i)^2 \right] / \sum_{i=1}^n (O_i - \bar{O})^2 \quad (12)$$

where P_i and O_i are the predicted and observed values, respectively, \bar{O} is the average of the observed values, and n is the number of observations.

Figure 5 shows the comparison between the measured C_W and the predicted C_W values with and without consideration of the increase in $K_{d,app}$ with time. In the case of pesticides having low $K_{d,app}(t_0)$ values (< 1 mL/g), such as dinotefuran, metalaxyl, and fosthiazate, the predicted values with and without consideration of the time-dependent $K_{d,app}$ almost coincided with each other. On the other hand, when the $K_{d,app}(t_0)$ values of pesticides were > 6 mL/g, the C_W values predicted using the $K_{d,app}(t_0)$ values overestimated the measured values. The differences between the values predicted using the $K_{d,app}(t_0)$ values and the measured values, especially for clothianidin, imidacloprid, and flutranil, were larger than those for other pesticides. In contrast, the C_W values predicted using $K_{d,app}$ estimated by eq 9 showed good agreement with the measured C_W values. Table 3 shows RMSE and NSE values for each pesticide. The RMSE values calculated using the C_W values predicted by time-dependent $K_{d,app}$ were lower than those predicted by the $K_{d,app}(t_0)$ values. Furthermore, the NSE values were closer to 1 when the time-dependent increase in $K_{d,app}$ was considered. In particular, the NSE values of clothianidin, imidacloprid, and flutranil were obviously improved with the consideration of time-dependent sorption. These three pesticides had DT_{50} values of C_T higher than those of other pesticides. When the dissipation of C_T was slow, the prediction of C_W using $K_{d,app}(t_0)$ was inadequate and the consideration of time-dependent sorption was required for prediction of C_W . Thus, the estimation method of C_W using the dissipation of C_T and the time-dependent $K_{d,app}$, which was calculated by eq 9, was capable of reproducing the biphasic dissipation of the measured C_W .

Our results demonstrate that dissipation of C_W was faster than that of C_T , and the time-dependent increase in $K_{d,app}$ affected the difference in the dissipation rate between C_W and C_T . Therefore, it is possible that the dissipation of C_W , which can be used to assess phytoavailability, is predicted by correcting the dissipation of C_T by time-dependent $K_{d,app}$. The increased rates of $K_{d,app}$ with time were proportional to

$K_{d,app}(t_0)$ values, and this empirical relationship suggests that $K_{d,app}(t_0)$ plays an important role in the prediction of the time-dependent increase in $K_{d,app}$ and dissipation of C_W . The estimation method, which predicted the dissipation of C_W using the time-dependent $K_{d,app}$ calculated on the basis of $K_{d,app}(t_0)$, was demonstrated in the field study. These results imply that the residual concentrations in leafy vegetables cultivated in pesticide-contaminated soils can be estimated before sowing by using the correlations between the C_W values at harvesting time, which were predicted by the estimation method described above, and the uptake concentrations for the vegetables reported in our previous study.⁴

■ ASSOCIATED CONTENT

● Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jafc.6b01028.

Sections SI-1–SI-4, including Tables S1–S7 (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Telephone and fax: +81 29 838 8329. E-mail: seike@affrc.go.jp.

Present Address

[§]Y.M.: Food and Agricultural Materials Inspection Center, Agricultural Chemicals Inspection Station, 2-772 Suzuki-cho, Kodaira, Tokyo 187-0011, Japan.

Funding

This research was supported by the Environmental Research and Technology Development Fund (5-1302) of the Ministry of the Environment, Japan.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank Shintaro Kanbayashi (Wesada University, Tokyo, Japan) for his help with laboratory studies. The test soils were kindly supplied by Aichi Agricultural Research Center and Tochigi Prefectural Agricultural Experiment Station.

■ REFERENCES

- (1) Hori, S. The Japanese positive list system for agricultural chemical residues in foods and food additives. *Foods Food Ingredients J. Jpn.* **2007**, *212*, 496–508.
- (2) Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan. Guidelines for Preparation of Study Results Submitted When Applying for Registration of Agricultural Chemicals (<http://www.acis.famic.go.jp/eng/shinsei/8147annex.pdf>) (accessed February 5, 2015).
- (3) Alexander, M. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environ. Sci. Technol.* **2000**, *34*, 4259–4265.
- (4) Motoki, Y.; Iwafune, T.; Seike, N.; Otani, T.; Akiyama, Y. Relationship between plant uptake of pesticides and water-extractable residue in Japanese soils. *J. Pestic. Sci.* **2015**, *40*, 175–183.
- (5) *Adsorption-Desorption Using a Batch Equilibrium Method; Guideline for Testing of Chemicals No. 106*; OECD: Paris, 2000.
- (6) Cox, L.; Koskinen, W. C.; Yen, P. Y. Changes in sorption of imidacloprid with incubation time. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1998**, *62*, 342–347.
- (7) Oi, M. Time-dependent sorption of imidacloprid in two different soils. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 327–332.

(8) Koskinen, W. C.; Cox, L.; Yen, P. Y. Changes in sorption/bioavailability of imidacloprid metabolites in soil with incubation time. *Biol. Fertil. Soils* **2001**, *33*, 546–550.

(9) Laabs, V.; Amelung, W. Sorption and aging of corn and soybean pesticides in tropical soils of Brazil. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 7184–7192.

(10) Beigel, C.; Barriuso, E.; Di Pietro, L. Time dependency of triticonazole fungicide sorption and consequences for diffusion in soil. *J. Environ. Qual.* **1997**, *26*, 1503–1510.

(11) Roy, C.; Gaillardon, P.; Montfort, F. The effect of soil moisture content on the sorption of five sterol biosynthesis inhibiting fungicides as a function of their physicochemical properties. *Pest Manage. Sci.* **2000**, *56*, 795–803.

(12) Walker, A. Evaluation of a simulation model for prediction of herbicide movement and persistence in soil. *Weed Res.* **1987**, *27*, 143–152.

(13) Regitano, J. B.; Koskinen, W. C.; Sadowsky, M. J. Influence of soil aging on sorption and bioavailability of simazine. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 1373–1379.

(14) Louchart, X.; Voltz, M. Aging effects on the availability of herbicides to runoff transfer. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 1137–1144.

(15) Regitano, J. B.; Koskinen, W. C. Characterization of nicosulfuron availability in aged soils. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 5801–5805.

(16) Wauchope, R. D.; Yeh, S.; Linders, J. B.; Kloskowski, R.; Tanaka, K.; Rubin, B.; Katayama, A.; Kördel, W.; Gerstl, Z.; Lane, M.; Unsworth, J. B. Pesticide soil sorption parameters: theory, measurement, uses, limitations and reliability. *Pest Manage. Sci.* **2002**, *58*, 419–445.

(17) U.S. Department of Agriculture. *Soil Taxonomy, A Basic System of Soil Classification for Making and Interpreting Soil Surveys*, 2nd ed.; Agricultural Handbook 436; U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 1999.

(18) Obara, H. Outline of the soil monitoring and soil quality changes of the arable land in Japan. *Pedologist* **2000**, *44*, 134–142 (in Japanese).

(19) International Society of Soil Science (ISSS). *Proceedings of the Congress of the International Society of Soil Science 4; Minutes of the first commission meetings, International Congress of Soil Science*, Washington, DC, 1927; ISSS: Washington, DC, 1927; pp 215–220.

(20) Motoki, Y.; Iwafune, T.; Seike, N.; Otani, T.; Asano, M. Effects of organic carbon quality on the sorption behavior of pesticides in Japanese soils. *J. Pestic. Sci.* **2014**, *39*, 105–114.

(21) IUPAC. THE PPDB (Pesticide Properties Database) (<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/index.htm>) (accessed February 5, 2016).

(22) Pesticide Handbook Editorial Committee. *The pesticide handbook 2011*; Japan Plant Protection Association: Tokyo, 2011 (in Japanese).

(23) Zrostlíková, J.; Hajšlová, J.; Poustka, J.; Begany, P. Alternative calibration approaches to compensate the effect of co-extracted matrix components in liquid chromatography–electrospray ionisation tandem mass spectrometry analysis of pesticide residues in plant materials. *J. Chromatogr. A* **2002**, *973*, 13–26.

(24) The forum for co-ordination of pesticide fate models and their use (FOCUS). Guidance Document on Estimating Persistence and Degradation Kinetics from Environmental Fate Studies on Pesticides in EU Registration; FOCUS, 2006.

(25) Japanese Industrial Standards Committee. JIS K 0312, Method for Determination of Tetra-Through Octa-Chlorodibenzo-p-Dioxins, Tetra-Through Octa-Chlorodibenzofurans, and Coplanar Polychlorobiphenyls in Industrial Water and Waste Water; Japanese Standards Association: Tokyo, 1999 (in Japanese).

(26) Carter, L. J.; Harris, E.; Williams, M.; Ryan, J. J.; Kookana, R. S.; Boxall, A. B. Fate and uptake of pharmaceuticals in soil–plant systems. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 816–825.

(27) Food and Agricultural Materials Inspection Center. A pesticide abstract and evaluation report (<http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/index.htm>) (accessed February 5, 2016) (in Japanese).

- (28) Singh, B. K.; Walker, A. Microbial degradation of organo-phosphorus compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* **2006**, *30*, 428–471.
- (29) Müller, K.; Magesan, G. N.; Bolan, N. S. A critical review of the influence of effluent irrigation on the fate of pesticides in soil. *Agric., Ecosyst. Environ.* **2007**, *120*, 93–116.
- (30) Di, H. J.; Aylmore, L. A. G.; Kookana, R. S. Degradation rates of eight pesticides in surface and subsurface soils under laboratory and field conditions. *Soil Sci.* **1998**, *163*, 404–411.
- (31) Ghafoor, A.; Moeys, J.; Stenström, J.; Tranter, G.; Jarvis, N. J. Modeling spatial variation in microbial degradation of pesticides in soil. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45*, 6411–6419.
- (32) Ahmad, R.; Kookana, R. S.; Alston, A. M.; Skjemstad, J. O. The nature of soil organic matter affects sorption of pesticides. 1. Relationships with carbon chemistry as determined by ¹³C CPMAS NMR spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, *35*, 878–884.
- (33) Ahangar, A. G.; Smernik, R. J.; Kookana, R. S.; Chittleborough, D. J. Clear effects of soil organic matter chemistry, as determined by NMR spectroscopy, on the sorption of diuron. *Chemosphere* **2008**, *70*, 1153–1160.
- (34) Mitchell, P. J.; Simpson, M. J. High affinity sorption domains in soil are blocked by polar soil organic matter components. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 412–419.
- (35) Crank, J. *The Mathematics of Diffusion*, 2nd ed.; Oxford University Press: London, 1975.
- (36) Kookana, R. S.; Aylmore, L. A. G.; Gerritse, R. G. Time-dependent sorption of pesticides during transport in soils. *Soil Sci.* **1992**, *154*, 214–225.
- (37) Li, J.; Langford, C. H.; Gamble, D. S. Atrazine sorption by a mineral soil: Processes of labile and nonlabile uptake. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 3672–3679.
- (38) Karpouzas, D. G.; Cervelli, S.; Watanabe, H.; Capri, E.; Ferrero, A. Pesticide exposure assessment in rice paddies in Europe: a comparative study of existing mathematical models. *Pest Manage. Sci.* **2006**, *62*, 624–636.
- (39) Andersen, H. E.; Kronvang, B.; Larsen, S. E.; Hoffmann, C. C.; Jensen, T. S.; Rasmussen, E. K. Climate-change impacts on hydrology and nutrients in a Danish lowland river basin. *Sci. Total Environ.* **2006**, *365*, 223–237.

[他誌掲載論文]

水草研究会誌, No. 102 (2015), 19～23 より転載

室内培養によるカワヂシャ *Veronica undulata* の
種子生産及び種子発芽率

加藤貴央, 石原 悟

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,
東京都小平市鈴木町 2-772

- ・本論文の著作権は、水草研究会が所有していますが、著作権所有者の許可を得て転載しています。

室内培養によるカワヂシャ *Veronica undulata* の 種子生産及び種子発芽率

加藤 貴 央¹⁾・石 原 悟¹⁾

Takahiro Kato and Satoru Ishihara : Seed production and germination rate of
Veronica undulata cultured under laboratory conditions

はじめに

農薬は水田や畑など主として野外で使用されるため、その使用にあたっては生態系への影響に関するリスク評価が求められている。水生植物に対する農薬の影響評価では、国際的な試験指針が定められている藻類 (OECD, 2006a) とウキクサ (*Lemna* sp.) (OECD, 2006b) の生長阻害試験の結果が主に活用されており、我が国では藻類 (単細胞緑藻 *Pseudokirchneriella subcapitata*) を用いた生長阻害試験 (農林水産省, 2000) が環境省の定める水産動植物への毒性に係る登録保留基準値の設定に活用されている。近年欧州を中心に、ホザキノフサモ (*Myriophyllum spicatum*) を供試生物とした生長阻害試験法 (OECD, 2014) が開発されるなど、供試可能な水生植物種の拡大が進められているものの、未だに水生植物に対する農薬の影響試験法は充実しているとは言えない。

農薬の生態系への影響に関するリスク評価法としては、曝露量と毒性値を比較し二者択一的にリスクの有無を評価する決定論的リスク評価が一般的であるが、より効率的な農薬のリスク管理を可能とする評価手法として、リスクを定量的な指標で表すことができる確率論的リスク評価が有効であると考えられている (永井ら, 2009)。確率論的リスク評価では、多種生物の薬剤感受性を統計学的に示した種の感受性分布 (SSD : Species Sensitivity Distribution) が用いられる。SSD

の推定には、最低でも5属以上の供試生物種が必要とされている (OECD, 1995 ; U.S. EPA, 1985) ことから、既に試験指針が定まっている生物種に加え、更なる生物種を追加することは意義深い。

これまでに我々は、国内に生息する単子葉水生植物のウキクサ (*Lemna* sp.)、ミジンコウキクサ (*Wolffia globosa*)、水生シダ植物のサンショウモ (*Salvinia natans*) などを供試生物種とした生長阻害試験の開発を進めてきた (石原ら, 2010 ; 石原, 2011, 2012)。双子葉の水生植物としては、カワヂシャ (*Veronica undulata*) が新たな供試生物種として有望であると考え検討を進めている。

カワヂシャは日本の在来種であり、本州以西の川岸や水田などの水湿地に自生するオオバコ科の双子葉被子植物である。カワヂシャは種子の発芽率が高く (佐々木, 2004)、その植物体サイズ及び生長速度等の性質から、幼体を用いることで室内培養による省スペースでの生長阻害試験の設計が可能であり、供試生物種としての適性が高い種であると考えられた。

そこで本研究では汎用性の高い生長阻害試験法の確立を目標に、生長阻害試験の供試生物としてのカワヂシャの適性を評価するため、種子採取のための室内培養法の検討、室内培養で採取した種子の発芽率の調査及び種子の保存法の検討を行った。

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 e-mail: takahiro_kato@acis.famic.go.jp

材料と方法

(1) 供試生物種の準備

2013年5月21日に東京都東久留米市落合川より採取したカワヂシャを当センター農薬検査部内の敷地へ移植して栽培したところ開花・結実が認められた(図1)。褐色を帯び種子が成熟したと考えられた果実を適宜採取し、乾燥・低温(4℃)・暗黒条件下で保存した。試験には、単一個体から得られた種子を用いた。

(2) 種子生産のための室内培養条件の検討

1.5%の寒天 SIS 培地(OECD, 2006b)に(1)で調製した種子を播種し、明期24時間、温度 17 ± 2 ℃、光量子量 $100 \pm 20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ の条件下で培養した。発芽後、明期16時間、温度18, 20, 22及び 24 ± 2 ℃の4段階の温度条件(各3連)で、播種後から90日間培養を行い、花芽形成に及ぼす温度条件を検討した。開花・結実した個体については開花時期、蕾数及び種子数を調査した。なお、本稿で示す全ての試験について、培養は光量子量 $100 \pm 20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ を維持するよう照明(NEC製、

FL8N, 昼白色蛍光灯)付き培養器(IKUTA製, A4201D 2L)内で行い、培養器内の水温は温度データロガー(T&G社製, RTR-52A)を、光量子量は光量子計(Senecom社製, SE-MQ200)を使用して測定した。

(3) 室内培養における種子の成熟期間

1.5%の寒天 SIS 培地に(1)で調製した種子を播種し、明期24時間、温度 17 ± 2 ℃、光量子量 $100 \pm 20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ の条件下で培養した。発芽後、明期16時間、温度 24 ± 2 ℃の温度条件で培養し、開花12日後、16日後及び20日後にそれぞれ種子を採取し、発芽試験を行った。発芽試験は、培地;液体 SIS 培地(1ウェル当たり200 μL)、明期24時間、温度 17 ± 2 ℃、光量子量 $100 \pm 20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ の環境条件で、96ウェルマルチディッシュプレート(nunc社製、丸形/平底)を用いて行った。

(4) 種子の保存法の検討

種子の保存法については、湿潤・低温(4℃)・暗黒条件及び乾燥・低温(4℃)・暗黒条件下で



図1. 試験に用いたカワヂシャ A: 野外での栽培の様子, B: 花及び葉緑の形態



図2. 各温度区における播種90日後の様子



図3. 室内で培養したカワヂシャの花及び果実

の保存を検討した。発芽試験は(3)と同条件で行い、保存種子の発芽率を調査した。

結果と考察

(1) 種子生産のための室内培養条件

90日間室内培養した結果、野外で栽培した場合よりも生育が劣るが、22及び24℃区において平均50日以内、20℃区において平均60日以内に花芽が形成された(図2)。18℃区では他温度区よりも強い矮化が認められ、90日後においても花芽は形成されなかった(図2)。また、90日後の20、22、

24℃区において、蕾は平均で13以上、種子は平均で200以上、最低でも100以上が得られた(表1)。一度の生長阻害試験の実施に必要な供試生物の最低数は45個体(対照区10連、溶剤対照区10連、曝露区5濃度×5連で試験を行った場合)であることから、検討した条件下において、1個体から播種後2ヶ月以内に生長阻害試験に供試するのに十分な数の種子が得られることが明らかになった。

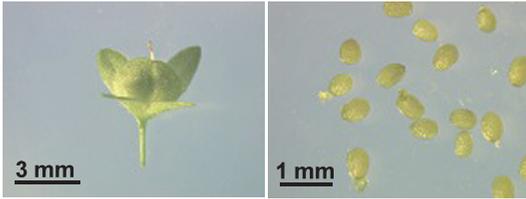
(2) 室内培養における種子の成熟期間

種子の外観は開花12日後で緑色、16日後でやや褐色に変色、20日以降では褐色であった(図4)。成熟度合いの異なる種子を用いて発芽試験を実施した結果、開花12日後の種子では発芽は見られなかったが、開花16日後、20日後の種子では高い発

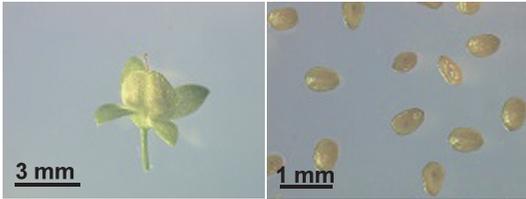
表1. 平均開花日数、種子数と発芽率

温度区(℃)	平均開花日数	1個体当たり平均		発芽率
		蕾数	種子数	
18	>90	-	-	-
20	57	14	232	98%
22	47	13	322	97%
24	47	15	316	98%

◆開花12日後



■開花16日後



▲開花20日後

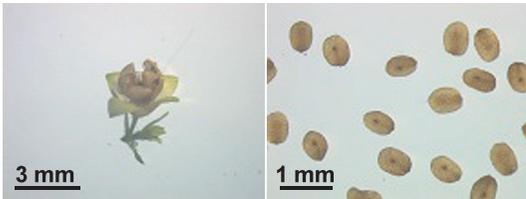


図4. 各成熟度合いの果実及び種子

芽率 (>97%) を示した (図5). このことから野外から採取された種子 (佐々木, 2004) に限らず室内培養における種子についても休眠性は認められず, 目視で成熟 (褐色化) が確認できた種子は直ちに試験に用いることができると考えられた.

(3) 種子の保存法の検討

湿潤・低温 (4℃)・暗黒条件下では, 6ヶ月後には, 発根及びカビの発生が認められた. 一方, 乾燥・低温 (4℃)・暗黒条件下では, 1年間保存していた種子でも高い発芽率 (>97%) が認められた. 本結果より, カワヂシャの種子は, 乾燥・低温 (4℃)・暗黒条件下で高い発芽率を維持したまま長期保存 (1年以上) が可能であることが明らかになった.

おわりに

カワヂシャの供試生物としての適性を評価するため, 室内培養での種子採取のための室内培養法の検討, 室内培養で採取した種子の発芽率の調査, 種子の保存法の検討を行った. その結果, カワヂシャは室内培養により容易かつ安定して発芽率の高い種子を供給できることから, 生長阻害試

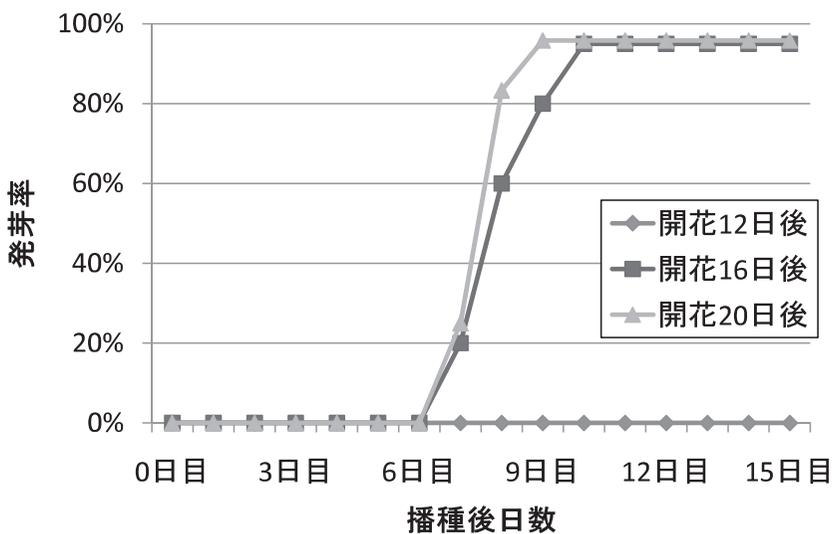


図5. 成熟度合いが異なる種子の発芽率

験の供試生物としての適正が高いことを確認した。

双子葉水生植物に対する化学物質の影響評価を行う試験としては、ホザキノフサモを用いた生長阻害試験 (OECD, 2014) が定められているが、当該試験は栄養繁殖体を供試生物に用いるため、試験準備として常に植物体の維持管理が必要である。また、培地にショ糖を用いるため、カビ等による汚染の危険性が高く、無菌的な供試生物の維持は難しいことから、藻類やウキクサの生長阻害試験と比較すると難易度が高い試験であると考えられる。一方、カワヂシャは概ねウキクサの生長阻害試験指針に沿った条件で試験が可能であると考えられることから、双子葉水生植物に対する化学物質の影響評価を行う簡易な試験方法としての活用が期待される。

引用文献

- 石原 悟, 2011. ミジンコウキクサを供試生物とした生長阻害試験法の検討. 農林水産消費安全技術センター 平成23年度調査研究報告.
- 石原 悟, 2012. 水生シダサンショウモ (栄養繁殖個体) を供試生物とした生長阻害試験法の検討. 農林水産消費安全技術センター 平成24年度調査研究報告.
- 石原 悟・佃 美和, 2010. *Lemna* 属ウキクサを用いた生長阻害試験の試験条件の検討. 雑草研究 55 : 152.
- 永井孝志・稲生圭哉・横山淳史・岩船 敬・堀尾剛, 2009. 水稲用除草剤の確率論的生態リスク評価. 日本リスク研究学会第21回年次大会講演論文集 22 : 397-402.
- 農林水産省, 2000. 農薬の登録申請に係る試験成績について (平成12年11月24日付け12農産第8147号農林水産省農産園芸局長通知).
- OECD, 1995. Guidance document for aquatic effects assessment. Organization for Economic Co-operation and Development.
- OECD, 2006a. OECD guidelines for the testing of chemicals freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test. Organization for Economic Co-operation and Development.
- OECD, 2006b. OECD guidelines for the testing of chemicals *Lemna* sp. growth inhibition test. Organization for Economic Co-operation and Development.
- OECD, 2014. OECD guidelines for the testing of chemicals Sediment-free *Myriophyllum spicatum* toxicity test. Organization for Economic Co-operation and Development.
- 佐々木英代, 2004. カワヂシャ. オオカワヂシャの発芽特性について—家庭用電気冷蔵庫を利用した発芽試験—. 水草研究会誌 80 : 6-10.
- 山崎 敬, 2003. ゴマノハグサ科. 清水建美編, 日本の帰化植物. pp.184-191. 平凡社.

[他誌掲載論文]

植調 Vol.49, No.11(2016), 351～357 より転載

温度変化が農薬の土壌残留性に及ぼす影響

元木 裕¹, 岩船 敬²

¹ 国立研究開発法人農業環境技術研究所
茨城県つくば市観音台 3-1-3

² 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,
東京都小平市鈴木町 2-772

- 本論文の著作権は、公益財団法人 日本植物調節剤研究協会が所有していますが、著作権所有者の許可を得て転載しています。

温度変化が農薬の土壌残留性に及ぼす影響

国立研究開発法人
農業環境技術研究所

元木 裕

独立行政法人
農林水産消費安全技術センター

岩船 敬

はじめに

圃場で使用された農薬の多くは土壌に入り、畑地では散布量の約90%、水田では50～80%程度が土壌に分布すると言われている(鎌塚・山本1998a)。従って、散布された農薬の土壌における消長、すなわち土壌残留性を評価することは、農薬の環境中運命を予測する上で重要な過程である。農薬の土壌残留性は、土壌処理剤の効果の持続性に影響を与える他、残留性が高い薬剤の場合には、土壌を経由して後作物に移行する可能性が高く、後作物における葉害や残留を引き起こす。我が国の農薬登録制度においても、農薬の土壌中での半減期が100日を超える場合は、後作物葉害試験および後作物残留試験の実施が義務付けられている(農林水産省2001)。このように、土壌を経由した農薬の作物への影響を評価する上でも、土壌残留性に関する知見は不可欠である。一方、農薬の土壌中での消失には、微生物分解、加水分解、土壌表面における光分解、土壌吸着、揮発、さらに降雨や灌水による下方への浸透移行、地表面流出など様々な要因が関係するが(Müller *et al.* 2007)、これらは直接的あるいは間接的に温度変化の影響を受ける。日本は中緯度に位置するため季節の変化が顕著であり、また、地形が複雑で南北に長い地域による気温差が大きい(森本ら1993)。このため、農薬の土壌残留性も季節間および地域間で異

なる可能性がある。本稿では、筆者らが実施した容器内土壌残留試験(以下、容器内試験)の結果を例として挙げながら、特に土壌中での分解と吸着に焦点をあてて、温度との関係を解説する。

1. 土壌における農薬の分解・消失速度と温度依存性

農薬の土壌中での減衰は一次反応速度論に従うと仮定され、次式により表現される(FOCUS 2006)。

$$M = M_0 e^{-kt} \quad (1)$$

ここで、 M : t 日後の農薬濃度(mg/kg 乾土)、 M_0 : 初期($t=0$)の農薬濃度(mg/kg 乾土)、 k : 速度定数(day^{-1})、 t : 時間(day)である。また、農薬の土壌中半減期($t_{1/2}$)は、式-1より求めた速度定数を用いて下記のとおり、算出される。

$$t_{1/2} = \ln 2/k \quad (2)$$

筆者らは農林水産省の旧テストガイドライン(鎌塚・山本1998b)に従っ

て、異なる温度環境下(10℃、25℃および35℃)における畑地状態での容器内試験を実施した。土壌中農薬の分析にあたっては、まず蒸留水を用いて25℃で24時間の振とう抽出(固液比1:5)を行い、次いでアセトンによる抽出を行った。この逐次抽出法により、水抽出された農薬濃度(C_{water} , mg/kg 乾土)と水およびアセトンで抽出された全農薬濃度(C_{total} , mg/kg 乾土)の経時的な消長を明らかにした。通常、土壌中農薬の抽出はアセトン等の有機溶媒を用いて行われているため、本項では C_{total} の消長に着目し、 C_{water} の消長については後述する。 C_{total} の消長について、試験結果の例を図-1に示す。フェンチオンの灰色低地土における農薬濃度は式-1に従って減衰し、インキュベーション温度が高いほど k が大きくなり、半減期が短いことが示されている。本試験は暗所下で実施しているため、フェンチオンの減衰に微生物分解や加水分解、揮発が関与し、これらが温度によって影響を受

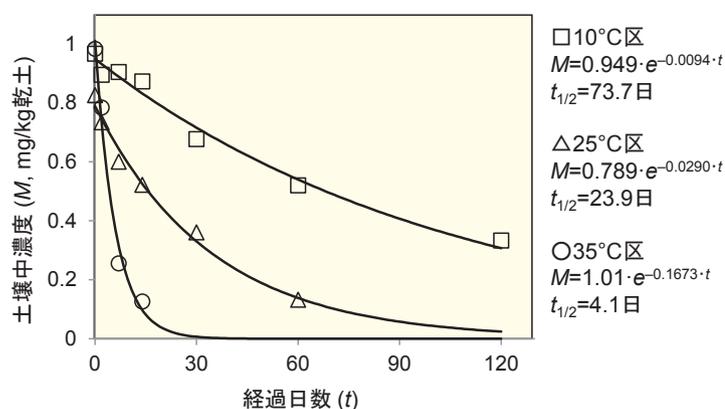


図-1 灰色低地土におけるフェンチオンの減衰

けたものと推察される。温度に依存した減衰速度の変化はアレニウスの式(式-3)で表せられる(PPR-Panel 2008)。

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (3)$$

ここで、 A : 頻度因子, E_a : 活性化エネルギー (kJ/mol), R : 気体定数 (8.314 J/mol·K), T : 絶対温度 (K) である。式-3について再びフェンチオンの例を図-2に示す。 $\ln k$ と $1/T$ の間には負の比例関係が成立するため、得られた回帰式の傾きから活性化エネルギーが算出される。図-2の例では、灰色低地土におけるフェンチオンの活性化エネルギーは80.6 kJ/molと計算された。この活性化エネルギーを用いることで、下記のとおり温度による半減期の補正が可能となる。

$$t_{1/2}(T_1) = t_{1/2}(T_2) \cdot \exp\left(\frac{E_a}{R}\left[\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right]\right) \quad (4)$$

ここで、 $t_{1/2}(T_1)$ および $t_{1/2}(T_2)$ は、それぞれ温度 T_1 および T_2 における半

減期である。活性化エネルギーは農薬と土壌の組合せにより異なる値を示すが、EFSA (欧州食品安全機関) の PPR-Panel (農薬残留専門委員会) は、53 農薬に関する 99 のデータセットを用いて活性化エネルギーの変動を解析している (PPR-Panel 2008)。解析の結果、各農薬について算出した活性化エネルギーの中央値は対数正規分布に従い、5、50 および 95 パーセントイル値は、それぞれ 45.8、65.4、93.3 kJ/mol であった。さらに同報告書では、農薬のクラス別に活性化エネルギーの変動を解析しており、イソプロツロン、クロロトルロンおよびリニュロンといったフェニルウレア系除草剤の値が他の農薬と比べて有意に低いことを示している (対数正規分布における中央値は 46.6 kJ/mol)。クロロトルロン (3 データ) およびリニュロン (2 データ) の活性化エネルギーは、8つのデータから得られたイソプロツロンにおける活性化エネルギーの分布の範囲内に取まることから、これ

ら3種の除草剤に共通する基本構造の開裂反応に温度が影響したことを指摘している。過去の知見によると、活性化エネルギーが30 kJ/molを下回る場合は微生物分解が、60 kJ/molを上回る場合は物理化学反応が農薬の土壌中での消失に主として寄与するとの報告がある (Cupples *et al.* 2000)。活性化エネルギーが低いフェニルウレア系除草剤に関しては数種の分解菌が単離されており、分解菌が産生するアリルアシルアミダーゼなどの加水分解酵素が開裂反応に関与することが明らかにされている (Sørensen *et al.* 2003)。従って、フェニルウレア系除草剤については、これらの酵素反応が温度によって影響を受けたものと推察される。一方、上述のフェンチオンの例では活性化エネルギーが80.6 kJ/molと算出されたため、土壌中での消失に微生物由来の酵素反応よりも物理化学反応、すなわち加水分解や揮発が寄与した可能性が高い。フェンチオンの農薬評価書 (食品安全委員会 2013) では、フェンチオンが滅菌土壌中でも分解し、その半減期が14~21日 (好氣的土壌中運命試験) であること、25°CにおけるpH7緩衝液中の半減期が6日 (加水分解試験) であることが示されていることから、フェンチオンの土壌中での消失が微生物の影響を排除した場合でも進行することが示唆される。しかし、一般に有機リン系農薬は微生物によって容易に分解されることが報告されており (Singh and Walker 2006)、土壌の種類が異なれば、フェンチオンの分解過程に

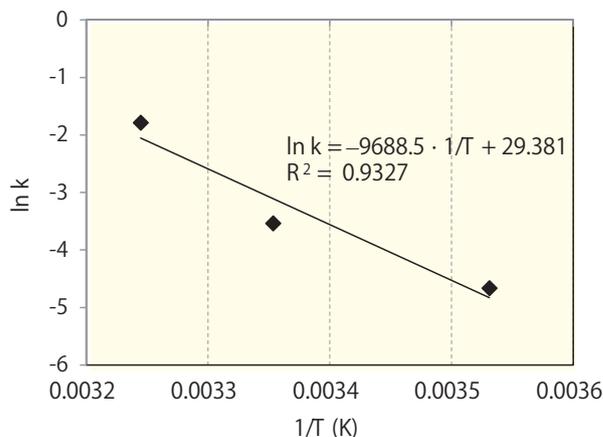


図-2 灰色低地土におけるフェンチオンの速度定数と温度の関係 (アレニウス・プロット)

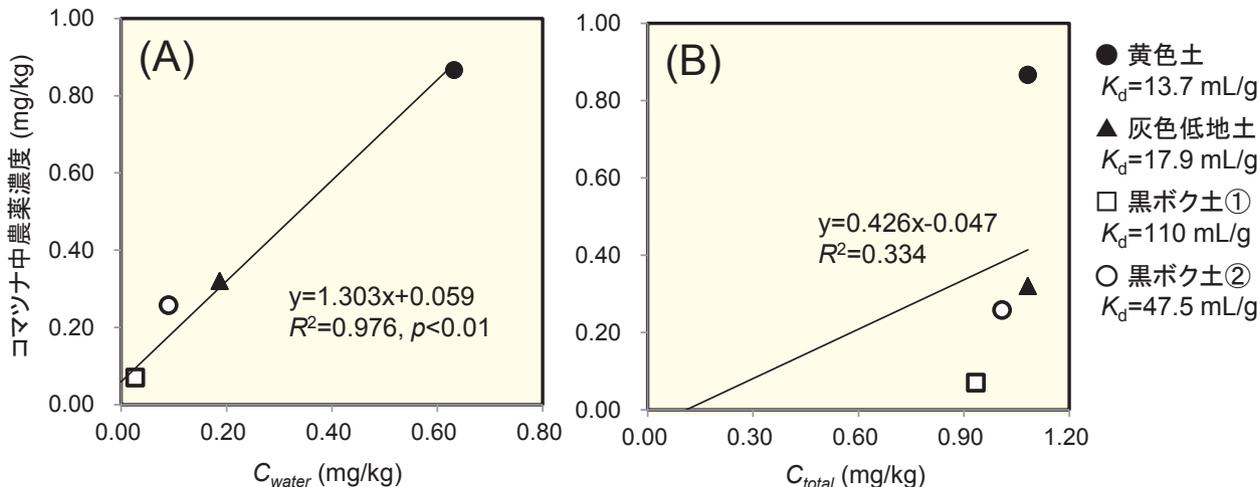


図-3 テトラコナゾールの土壤中農薬濃度 (A: 水抽出濃度 (C_{water}), B: 全抽出濃度 (C_{total})) とコマツナ中農薬濃度の関係 (Motoki *et al.* 2015 一部改変)

おける微生物の寄与および活性化エネルギーも大きく異なる可能性がある。本項で示した灰色低地土におけるフェンチオンの活性化エネルギーがその代表値ではないことを補足する。

2. 土壌残留農薬が作物に及ぼす影響

土壌残留性は農薬の後作物への影響を評価する上で重要な指標となる。一般に土壌中農薬の抽出には、抽出力の強い有機溶媒が用いられており、その概ね全量が抽出・定量される。農薬の登録申請のために実施される試験においても、土壌中農薬の定量のために、有機溶媒で土壌中の農薬が抽出されている。しかし、土壌に残留した全ての農薬が作物体へ吸収されるわけではなく、主に土壌粒子から土壌溶液へ溶出した農薬のみが作物体へ移行することが想定される。従って、作物への利用性（アベイラビリティ）の評価を試みる場合、有機溶媒で抽出された農薬量では土壌から作物へ移行した農薬量を精緻に評価できない可能性がある。筆者らは、農薬処理土壌で栽培したコマツナ中の農薬濃度が、 C_{total} （有機溶媒抽出の濃度に相当）よりも、 C_{water} との間でより高い正の相関を示すこと

を確認している (Motoki *et al.* 2015)。図-3 にテトラコナゾールの例を示す。理化学性の異なる4種の土壌でコマツナを栽培した場合、いずれの土壌も C_{total} は概ね一定の値を示したが、 C_{water} は土壌吸着係数 (K_d) が大きい土壌ほど低い値を示し、これに伴いコマツナ中の農薬濃度も低下した。また、杉山ら (1990) は、イタリアンライグラスに対する土壌に処理したペンディメタリンの活性が土壌水分当たりの水抽出濃度（水抽出濃度を土壌水分率で補正）との間で、高い相関関係を示したことを報告している。このように、土壌に残留した農薬の作物への移行量を評価するためには、土壌中農薬の水抽出濃度に着目する必要がある。

3. 土壌から水抽出される農薬の減衰特性

C_{total} の減衰および K_d (mL/g) が明らかになっている場合、 C_{water} は下記の式により算出される。

$$C_{water} = C_{total} \cdot \frac{a}{a+K_d} \quad (5)$$

ここで、 $a:K_d$ を測定した際の固液比 (1:a) である。農薬の登録申請時には、土壌残留試験成績および土壌吸

着試験成績が提出されるため、それぞれの試験より求められた C_{total} の減衰曲線および K_d は、 C_{water} の減衰を推測する上で重要な知見となりえる。土壌吸着試験は、OECD（経済開発協力機構）のテストガイドラインに準じて実施されており、試験結果の K_d は、農薬添加後概ね24時間以内におこる水相と土壌相の間の分配を示している (OECD 2000)。しかし、 K_d の経時変化を日単位あるいは月単位で見ると、時間の経過とともに高くなる 경우가多くの論文で報告されている (Walker 1987; Beigel *et al.* 1997; Cox *et al.* 1998; Cox and Walker 1999; Louchart and Voltz 2007)。従って、 K_d の経時変化を考慮しない場合には、 C_{water} を過大に推算してしまう可能性がある。容器内試験の結果である C_{total} と C_{water} の実測値から求めた半減期を図-4 に示した。全体的に C_{total} よりも C_{water} の半減期が短い傾向にあり、 C_{water} の消失に C_{total} とは異なる消失要因が関係していることが推察された。また、 C_{water} の半減期を土壌間で比較すると、半減期は砂丘未熟土>灰色低地土>黒ボク土の順で短い傾向を示し、有機炭素含量が多く土壌吸着が強い土壌ほど C_{water} の減衰は速やかであった。農薬の土壌吸着の経時的な

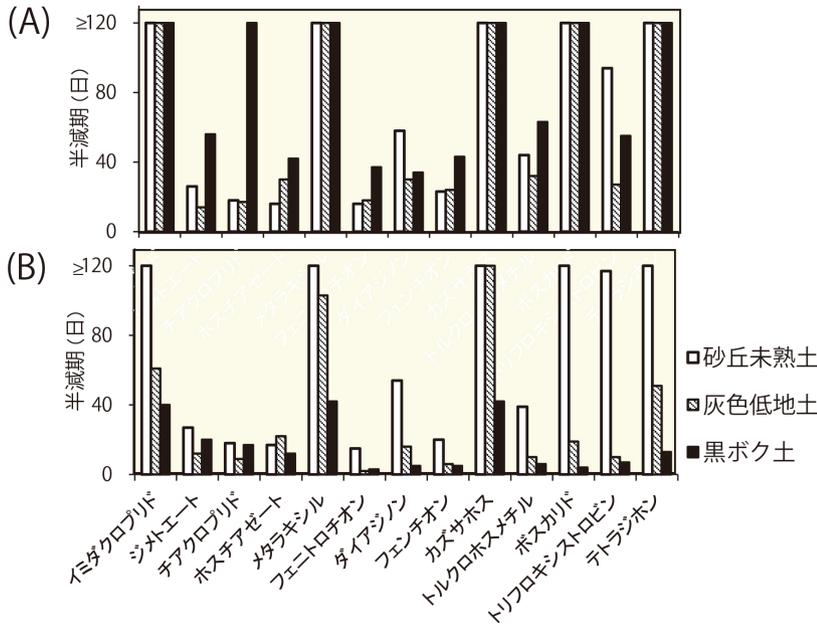


図-4 砂丘未熟土、灰色低地土および黒ボク土における13種の農薬の半減期 (A: 全抽出濃度, B: 水抽出濃度)

熟土<灰色低地土<黒ボク土の順で高かった。従って、有機炭素含量が多く土壤吸着が強い土壤ほど時間に依存した $K_{d,app}$ の増加率が高く、結果として C_{water} の半減期が短い値を示したことが示唆された。

4. 温度変化が農薬の土壤吸着に及ぼす影響

筆者らが実施した容器内試験の結果で示したように、 C_{water} の消長は土壤吸着の経時変化の影響を受けながら、 C_{total} よりも速やかに減衰した。一方、実圃場においては、農薬の消失に降雨や灌水によって生じる下方移行や地表面流出も寄与し、これらの消失要因も土壤吸着の経時変化の影響を受けることが想定される。農薬の土壤吸着は、大きく2つの過程に分けることができる。最初に農薬は土壤粒子の表層に吸着し (Fast process), 次いで土壤粒

増加要因の一つとして、農薬の脱着が起りやすい土壤粒子表層から、脱着が起りにくい土壤粒子内部 (細孔や土壤有機物内部) への拡散が指摘されている (Alexander 2000)。一般に粒子内拡散に起因する化学物質の吸着量の増加は、時間の平方根と正の比例関係にあることが理論的に導かれている (Kookana *et al.* 1992)。土壤への吸着量ではなく K_d の経時変化を示した式-6 は物理化学的な意味を持った理論式ではないが、 K_d もまた時間の平方根に比例して直線的に増加することが過去の知見 (Walker 1987; Beigel *et al.* 1997; Louchart and Voltz 2007) において報告されており、吸着過程への粒子内拡散の関与が示唆されている (式-6)。

$$K_d = k_1 + k_2 \sqrt{t} \quad (6)$$

ここで、 k_1 : 初期 ($t=0$) の K_d (mL/g), k_2 : 経時的な K_d の増加率 (t^{-1}) である。筆者らは容器内試験の結果から得られた C_{water} および C_{total} を用いて、見かけの土壤吸着係数 ($K_{d,app}$, mL/g) を算出した (式-7)。

$$K_{d,app} = \frac{C_{sorb}}{C_{aq}} = \frac{C_{total} - C_{water}}{C_{aq}} \quad (7)$$

ここで、 C_{sorb} : 土壤に吸着した農薬濃度 ($\mu\text{g/g}$ 乾土), C_{aq} : 水相の農薬濃度 ($\mu\text{g/mL}$) である。 $K_{d,app}$ の経時変化についてフルトラニルの例を図-5に示す。砂丘未熟土の場合、 $K_{d,app}$ の経時変化は少なく式-6に対する適合度 (R^2) は低い傾向にあったが、灰色低地土および黒ボク土では R^2 が高く、良好な相関関係が得られた。また、回帰式の傾きである k_2 値は、砂丘未

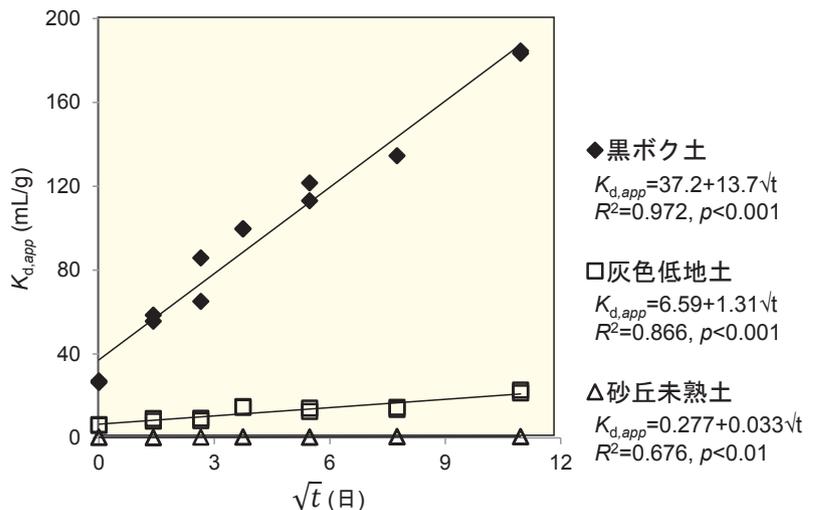


図-5 見かけの土壤吸着係数 ($K_{d,app}$) の経時変化 (25°C におけるフルトラニルの例)

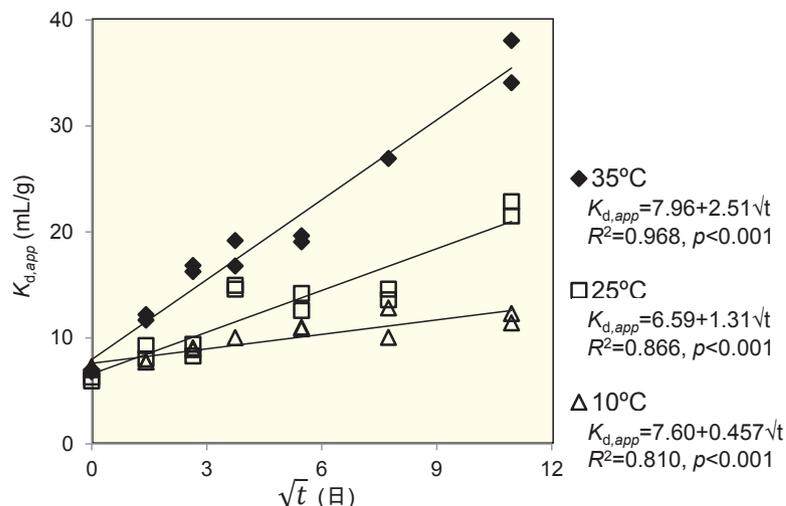


図-6 温度変化が見かけの土壤吸着係数 ($K_{d,app}$) に及ぼす影響 (灰色低地土におけるフルトラニルの例)

子の内部へ拡散する (Slow process)。農薬の土壤吸着に対する温度の影響を解析する場合、この2つの過程に及ぼす影響をそれぞれ分けて考える必要がある。熱力学的に見ると、次式により表現されるギブズの自由エネルギー変化が負の値を示す場合に吸着反応は自発的に進行する (Ten Hulscher and Cornelissen 1996)。

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (8)$$

ここで、 ΔG :ギブズの自由エネルギー変化 (kJ/mol), ΔH :エンタルピー変化 (kJ/mol), ΔS :エントロピー変化 (kJ/mol/K)である。また、 ΔG と分配係数 (K_p , mol/mol) との間には下記の関係式が成立する。

$$\Delta G = -RT \cdot \ln K_p \quad (9)$$

従って、式-8および式-9より、ファンツ・ホッフの式が導出される (式-10)。

$$d(\ln K_p)/d(1/T) = -\Delta H/R \quad (10)$$

Fast processにおける配置エントロピーを考えると、吸着に伴い吸着分子の運動の自由度が減少するので、 ΔS は負の値を示す。従って、吸着反応が進行するためには ΔH が負の値を示す必要がある。この場合、反応は発熱的であり、温度の上昇に伴って吸着量は減少する (北原 1994)。Brücher (1997) らは、平衡化時間を16~25時間で実施した試験で求めたりニュロンの K_d が、温度の上昇に伴って低くなることを示している。Ten Hulscher (1996) らは式-10から算出される ΔH に着目し、土壤または底質における ΔH の変動を種々の有機化学物質について解析してい

る。 ΔH の平均値は、疎水性相互作用による吸着の場合は -0.25 kJ/mol (平衡化時間:2~70時間)、水素結合などの静電的な吸着の場合は -8 kJ/mol (平衡化時間:2時間~6日間、ほとんどが24時間)であり、多くの化学物質が負の値を示した。平衡化時間が24時間前後の場合、土壤または底質における有機化学物質の吸着は発熱反応であったため、2つの吸着過程のうち主にFast processが温度の影響を受けたものと考えられる。一方、Slow processの解析にあたっては、土壤有機物のモデル物質として用いたポリウレタンやラバー等の種々のポリマーにおける有機化学物質の拡散過程に着目し、 ΔH の平均値が3.5 kJ/molであることを示している (Ten Hulscher and Cornelissen 1996)。Fast processとは対照的にSlow processである粒子内拡散の過程では、反応が吸熱的に進行し、温度が高くなると吸着量が増加することが推察される。筆者らは異なる温度 (10°C, 25°Cおよび35°C)で容器内試験を実施し (水抽出時の温度は25°Cで一定)、その結果から得られた $K_{d,app}$ の経時変化に基づいて、Slow processにおける温度の影響を解析した (図-6)。いずれの温度区において

もフルトラニルの $K_{d,app}$ は式-6に従って経時的に増加し、増加率を示す k_2 は高温下で高い値を示した。本結果は、土壤吸着のSlow processが高温下で促進されるというTen Hulscher (1996) らの仮説を支持している。

一方、農薬の土壤粒子および土壤溶液における分解と吸着平衡の関係に着目すると、土壤中の農薬は土壤粒子に吸着した状態では分解されにくく、土壤粒子から土壤溶液中に脱着・溶出された農薬が分解される (Alexander 2000)。土壤溶液における農薬の分解が遅く、分解速度よりも土壤粒子からの脱着速度が速い場合には、土壤粒子と土壤溶液間の農薬の分配平衡は維持されるため、 K_d は一定値を示す。しかし、農薬の土壤溶液中での分解速度が速く、土壤粒子からの脱着速度を上回る場合には、 K_d は分解速度に依存して変動し、分解速度が速く土壤溶液中の農薬濃度が低いほど高い値を示す (Cox *et al.* 1998)。農薬の土壤溶液中の分解速度は温度の上昇に伴って速くなることから、結果として K_d の増加率は高温下で上昇する。Coxら (1999) はリニュロンとイソプロツロンを用いて容器内試験を実施し、インキュベーション温度が高い場合に時間経過に伴う K_d の増加率が大きかったことを示

した。高温下で経時的な K_d の増加率が大きかった原因として、粒子内拡散に加えて、農薬の土壌溶液中の分解速度が温度の影響を受けたことを挙げている。 K_d の経時変化が温度の影響を受ける要因としては、土壌粒子内部への拡散速度と水相（土壌溶液）における分解速度の両者が関係しているものと考えられる。

以上より、農薬の土壌吸着には Fast process と Slow process が関与し、これら2つの吸着過程が受ける温度の影響は相反関係にあると言える。一般に農薬の土壌吸着は OECD 法で測定されるため Fast process を評価している場合が多く、土壌吸着と温度変化との関係についても Fast process に関する報告が多い。しかし、実圃場における土壌吸着の変動を長期的に解析するためには、両吸着過程を考慮した複合的な解析が必要であろう。

おわりに

本稿では土壌残留性に及ぼす温度の影響について、筆者らが実施した容器内試験の結果を交えながら基礎的な理論の解説を行った。土壌中農薬の消失は低温下で抑制されることから、実圃場においても気温が低い冬季または高緯度地域では農薬の土壌中での減衰が遅く、半減期は長くなると推察される。現行の農薬登録制度においては、土壌残留試験の実施に際して試験時期の指定はなく、試験期間中の気温条件は報

告されているものの、半減期の算定には考慮されていない。今後は、土壌残留性の評価にあたって温度補正の概念が必要かもしれない。また、土壌に残留した農薬の後作物における薬害および残留性の評価に関しては、土壌から水抽出される農薬濃度に着目する必要がある、その減衰には土壌吸着の経時変化が寄与している。土壌吸着の温度依存性については未解明な部分が多く、今後さらなる知見の集積が必要であるが、これらは土壌における作物が吸収可能な農薬濃度の減衰を季節変動あるいは地域間差の観点から解析する上でも重要な知見となろう。

謝辞

本研究は、環境省の環境研究総合推進費「適切な農薬の後作物残留リスク評価に基づく実効的な管理技術の開発(5-1302)」の一環として実施いたしました。

参考文献

Alexander, M. 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 34, 4259-4265.
Beigel, C. *et al.* 1997. Time dependency of triticonazole fungicide sorption and consequences for diffusion in soil. *J. Environ. Qual.* 26, 1503-1510.
Brücher, J. and L. Bergström 1997. Temperature dependence of linuron sorption to three different agricultural soils. *J. Environ. Qual.* 26, 1327-1335.
Cox, L. *et al.* 1998. Changes in sorption

of imidacloprid with incubation time. *Soil Sci. Soc. AM. J.* 62, 342-347.

Cox, L. and A. Walker 1999. Studies of time-dependent sorption of linuron and isoproturon in soils. *Chemosphere* 38, 2707-2718.

Cupples, A.M. *et al.* 2000. Effect of soil conditions on the degradation of cloransulam-methyl. *J. Environ. Qual.* 29, 786-794.

FOCUS (The forum for co-ordination of pesticide fate models and their use) 2006. Guidance Document on Estimating Persistence and Degradation Kinetics from Environmental Fate Studies on Pesticides in EU Registration. European Union.

北原文雄 1994. 界面・コロイド化学の基礎. 講談社サイエンティフィク, pp72-73.

Kookana, R. S. *et al.* 1992. Time-dependent sorption of pesticides during transport in soils. *Soil sci.* 154, 214-225.

鎌塚昭三・山本広基 1998a. 土と農薬. (社) 日本植物防疫協会, p.59.

鎌塚昭三・山本広基 1998b. 土と農薬. (社) 日本植物防疫協会, pp.69-73.

Louchart, X. and M. Voltz 2007. Aging effects on the availability of herbicides to runoff transfer. *Environ. Sci. Technol.* 41, 1137-1144.

森本陸世ら 1993. 気象情報と農作物生育被害予測. 全国農林統計協会連合会, pp.60-61.

Motoki, Y. *et al.* 2015. Relationship between plant uptake of pesticides and water-extractable residue in Japanese soils. *J. Pestic. Sci.* 40, 175-183.

Müller, K. *et al.* 2007. A critical review of the influence of effluent irrigation on the fate of pesticides in soil. *Agric. Ecosyst. Environ.* 120, 93-116.

農林水産省 2001. 「農薬の登録申請に係る試験成績について」の運用について. 13 生産第 3986 号農林水産省生産局生産資材課長通知生産局生産資材課長通知. 一部改正

- 2014.
- OECD 2000. Adsorption-Desorption Using a Batch Equilibrium Method; Guideline for Testing of Chemicals No. 106. Paris.
- PPR-Panel 2008. Opinion on a request from EFSA related to the default Q10 value used to describe the temperature effect on transformation rates of pesticides in soil. The EFSA J. 622, 1-32.
- 食品安全委員会 2013. 農業評価書 フェンチオン (第2版). <http://www.fsc.go.jp/fsciis/evaluationDocument/show/kya20110117003> (2015年12月22日閲覧).
- Singh, B. K. and A. Walker, 2006. A. Microbial degradation of organophosphorus compounds. FEMS Microbiol. Rev. 30, 428-471.
- Sørensen, S.R. *et al.*. 2003. Microbial degradation of isoproturon and related phenylurea herbicides in and below agricultural fields. FEMS Microbiol. Ecol. 45, 1-11.
- 杉山浩ら 1990. ペンディメタリンの土壌中濃度の経時的変動と植物の生育に及ぼす影響. 雑草研究 35 (2), 122-128.
- Ten Hulscher, T. E. and G. Cornelissen, 1996. Effect of temperature on sorption equilibrium and sorption kinetics of organic micropollutants-a review. Chemosphere 32, 609-626.
- Walker, A. 1987. Evaluation of a simulation model for prediction of herbicide movement and persistence in soil. Weed Res. 27, 143-152.

平成 28 年度学会等での発表実績一覧

1. 誌面発表

	誌名	題目	発表者名
1	Journal of Agricultural and Food Chemistry (2016, 64), pp. 4478-4486)	Effect of Time-Dependent Sorption on the Dissipation of Water-Extractable Pesticides in Soils	Yutaka Motoki, <u>Takashi Iwafune</u> , Nobuyasu Seike, Keiya Inao, Takashi Otani
2	Journal of Pesticide Science (2016, 41 (4), pp. 152-162)	Development and validation of the SPEC model for simulating the fate and transport of pesticide applied to Japanese upland agricultural soil	Julien Boulange, Dang Quoc Thuyet, Piyanuch Jaikaew, <u>Satoru Ishihara</u> , Hirozumi Watanabe
3	植物防疫 70(8), 561-564	ミツバチ群における内勤蜂と外勤蜂の識別手法の検討	<u>大石桂輔</u> 、 <u>石原悟</u>
4	ぶんせき 2016(7), 257-264	農薬の環境モニタリングおよび残留農薬分析法の検討に必要な情報：河川水試料および土壌試料を中心に	岩船敬、 <u>元木裕</u> 、 <u>石原悟</u>

2. 口頭・ポスター発表

	学会名	題目	発表者名
1	第 25 回環境化学討論会 (2016.6.8～10)	カボチャ中へプタクロル類残留を未然に防止するための土壌診断法 第 1 報 ほ場内のへプタクロル類等 POPs 濃度分布様式の評価 (ポスター)	清家伸康、 <u>元木裕</u> 、並木小百合
2	第 36 回農薬製剤・施用法シンポジウム (2016.10.6～7)	2016 年 CIPAC 会議の概要 (口頭)	<u>塚田勇輝</u> 、 <u>渡辺高志</u>
3	第 34 回農薬環境科学研究会 (2016.11.10～11)	親水性相互作用液体クロマトグラフィーを用いた LC-MS/MS によるネライストキシン及びアミトラズ代謝物の分析法の検討 (ポスター)	<u>大石桂輔</u> 、 <u>石原悟</u>

4	第 34 回農薬環境科学 研究会 (2016.11.10～11)	作物への移行性を考慮した 土壌における農薬の動態評 価（口頭）	<u>元木裕</u>
5	第 34 回農薬環境科学 研究会 (2016.11.10～11)	土壌から水抽出される農薬 の消長－室内試験による深 度別評価－（ポスター）	<u>秋山嘉大</u> 、 <u>元木裕</u> 、 岩船敬、清家伸康
6	日本農薬学会第 42 回 大会 (2017.3.6～8)	農薬の後作物残留リスク評 価に関する研究 第 13 報 土壌から水抽出される農薬 の消長-室内試験による深 度別評価-（口頭）	<u>秋山嘉大</u> 、 <u>元木裕</u> 、 岩船敬、清家伸康
7	日本農薬学会第 42 回 大会 (2017.3.6～8)	農薬の後作物残留リスク評 価に関する研究 第 14 報 黒ボク土畑ほ場における農 薬の土壌－土壌溶液間の分 配係数（口頭）	<u>元木裕</u> 、岩船敬、清 家伸康、稲生圭哉、 並木小百合
8	日本農薬学会第 42 回 大会 (2017.3.6～8)	FT-IR を用いた集取農薬と 農薬見本の同等性の確認 第 2 報 液剤と粒剤への適 用（口頭）	<u>渡辺高志</u>

アンダーラインが FAMIC 農薬検査部職員（発表時点）

【技術レポート】

残留農薬分析業務における分析法の検討

(LC-MS/MS による一斉試験法 (野菜・果実類) 対象農薬追加の妥当性検証) …… 46

残留農薬分析業務における分析法の検討

LC-MS/MS による一斉試験法（野菜・果実類）対象農薬追加の妥当性検証

佐々木秀幸*1, 守山智章*1, 山田篤司*2, 鈴木徹也*2, 青山吉一*3, 臼井裕一*4

野菜・果実類を対象とした LC-MS/MS 測定による一斉試験法に新たに 24 農薬の追加が可能か検証を行った。検証対象農薬は、センターで分析を行っていない 12 農薬、個別法等で分析を行っている 10 農薬および GC/MS 測定による一斉試験法で分析を行っている 2 農薬の計 24 農薬とした。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 試験室において妥当性評価を行った。その結果、すべての試験室において、分析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おり、調査対象農薬の拡大と分析法の集約による効率化が図られると考えられた。

Keywords : 残留農薬, 野菜・果実類, 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

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、国内産農産物の残留農薬分析を行っている。平成 27 年度は、野菜・果実類において計 124 種の農薬を対象とした。

このうち、厚生労働省通知¹⁾の一斉試験法を基にした「GC/MS・LC/MS による農薬等の一斉試験法（野菜・果実類）」（以下、一斉試験法（野菜・果実類））により、GC/MS で 50 農薬、LC-MS/MS で 35 農薬を、厚生労働省通知による個別試験法または個別試験法の精製工程等に一部修正を加えた方法（以下、個別法）により 24 農薬を、センターで開発した「センター法残留農薬一斉試験法（野菜・果実類）」²⁾（以下、センター法）により 15 農薬の分析を行っている。

今回、調査対象農薬の拡大と分析法の集約による効率化を目的として、一斉試験法（野菜・果実類）のうち、LC-MS/MS における妥当性検証を行い、良好な結果を得たので報告する。

検証対象は、厚生労働省通知の一斉試験法の分析対象から、センターで妥当性未確認のため分析を行っていない 12 農薬、個別法またはセンター

法で分析を行っている 10 農薬、GC/MS 測定による一斉試験法で分析を行っている農薬の一部である 2 農薬の計 24 農薬とした。

検証法は「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」^{3, 4)}（以下、ガイドライン）に基づく、試験室毎のシングルラボバリデーションとした。

材料および方法

1. 検証を行った試験室

次の 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）
- ・ 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. 対象農薬

2.1. 新規分析農薬（妥当性未確認）

エチプロール、クロラントラニリプロール、シアナジン、ノバルロン、ピラクロストロビン、ファモキサドン、フィプロニル、フェンブコナゾール、フルオピコリド、プロピザミド、プロメトリン、ベンチアバリカルブイソプロピルの 12 農薬。

*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、現 名古屋センター

*4 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

2.2. 個別法またはセンター法で分析を行っている農薬（分析法変更）

個別法：シエノピラフェン，ジフェノコナゾール，シラフルオフェン，フルベンジアミド，ヘキサコナゾール，ペンチオピラド，マンジプロパミドの7農薬。

センター法：ピリミホスメチル，ブタミホス，フルバリネートの3農薬。

2.3. GC/MS 測定による一斉試験法で分析を行っている農薬（測定方法変更）

イソキサチオン，メチダチオンの2農薬。

3. 試料および添加濃度

3.1. 試料

平成27年度までのセンターにおける試験対象の中から代表的な作物として、ほうれんそう、なす、かぶ（根）、かきを選定した。試料は農薬の使用履歴が明らかな国内産で、各試験室毎に同一のものを用いた。

3.2. 添加濃度

一律基準である0.01 mg/kg（以下、低濃度）およびその10倍にあたる0.1 mg/kg（以下、高濃度）の2濃度とした。

4. 試薬等

4.1. 標準品

農薬標準品：クロラントラニリプロール，シエノピラフェン，ジフェノコナゾール，シラフルオフェン，フェンブコナゾール，フルベンジアミド，ヘキサコナゾール，ペンチオピラドおよびマンジプロパミドは農薬混合標準溶液（特注品：林純薬工業株式会社，各20 µg/mL，5 mLアンプル瓶，溶媒（アセトニトリル））を使用した。ファモキサドンはDr.Ehrenstorfer GmbH社製，エチプロール，シアナジン，ノバルロン，ピラクロストロビン，ピリミホスメチル，フィプロニル，フルオピコリド，プロピザミド，プロメトリン，ベンチアバリカルブイソプロピルは和光純薬（株）製，ブタミホス，フルバリネートは林純薬工業（株）製，イソキサチオンは関東化学（株）製，メチダチオンはシグマアルドリッチ社製の，残留農薬試験用またはその同等品を使用した。農薬混合標準溶液に含まれない農薬は，各農薬標準品をアセトニ-

トリルで溶解し500 µg/mLの標準原液を調製した。

試験標準液：各標準原液を混合しアセトニトリルで希釈して20 µg/mLの混合標準液を調製した。混合標準液と農薬混合標準溶液を混合し，アセトニトリルで希釈して2 µg/mLの試験標準液とした。

添加回収試験用標準液および検量線用標準液：試験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用），トルエン（残留農薬試験用），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用），リン酸トリフェニル（特級），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），水酸化ナトリウム（特級），塩酸（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用）およびケイソウ土（セライト545）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に調整した後，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. 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

SUPELCO 製 ENVI-Carb/LC-NH2 500 mg/500 mg

4.6. 水

超純水製造装置（メルクミリポア製）で製造した超純水を使用した。

4.7. ロータリーエバポレーター

BÜCHI 製 R-200, R-210

4.8. 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)

5. 前処理方法

5.1. 抽出

図1の一斉試験法(野菜・果実類)前処理フロー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 (pH 7.0) を加えて振とうした後, 水層を分離除去した.

添加回収試験は, 試料に添加回収試験用標準液を添加し 30 分程度放置した後抽出を開始した.

5.2. 精製

アセトニトリル層を脱水の後, 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で精製し, リン酸トリフェニル (内標準物質) 1 µg/mL を含むアセトンおよび n-ヘキサン (1:1) 混液を加えて, 試験溶液とした (GC/MS 用試験溶液).

この試験溶液 0.125 mL を採り乾固後, アセトニトリルで 0.5 mL としたものを LC-MS/MS 用試験溶液とした.

6. 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. なお, 既に妥当性を確認している 35 農薬の測定条件はそのままとし, 新たに 24 農薬が同時に測定できる条件を作成した.

注入は各測定条件毎に行うこととした.

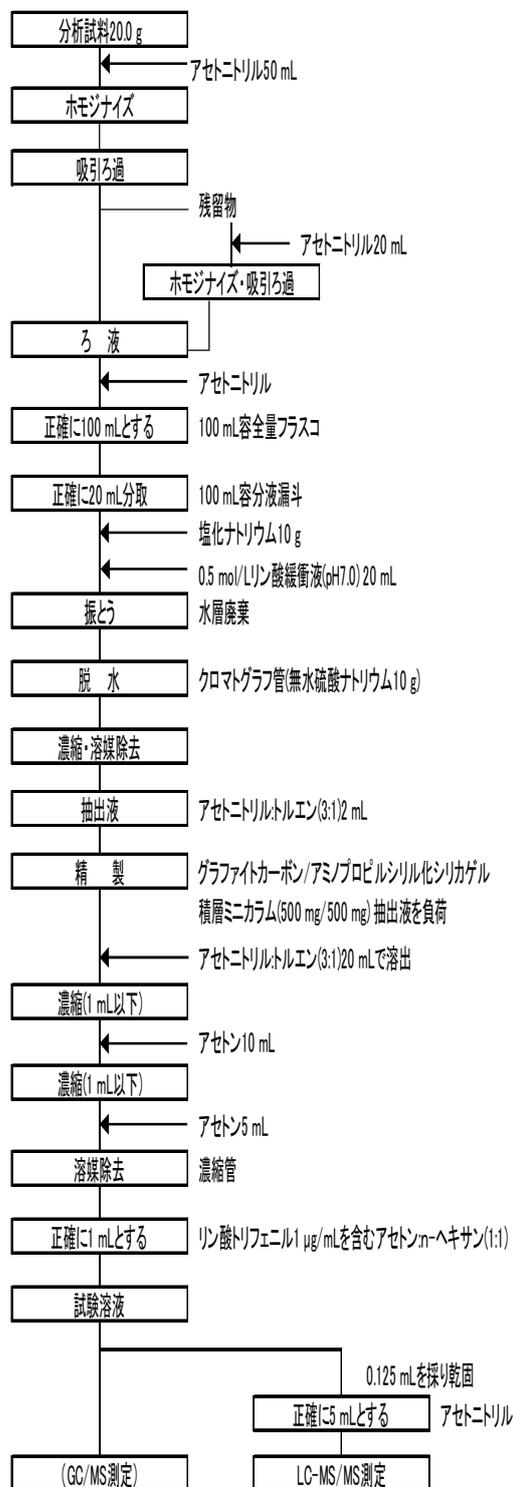


図1. 一斉試験法(野菜・果実類)前処理フロー

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 (定量) m/z	モニターイオン (定性) m/z
イキチオン	+	314 > 105	314 > 97
エチプロール	+	397 > 351	397 > 255
クロラントラニプロール	+	484 > 286	484 > 453
シアジン	+	241 > 214	241 > 96
シエビラフェン	+	394 > 310	394 > 254
ジフェコナゾール	+	406 > 251	406 > 337
シラフルオフェン	+	426 > 287	426 > 168
ノルフロン	+	493 > 158	493 > 141
ピラロキシプロン	+	388 > 194	388 > 163
ピリメタメチル	+	306 > 108	306 > 164
フロキサドロン	+	392 > 331	392 > 238
フィプロール	-	435 > 330	435 > 250
フェンコナゾール	+	337 > 70	337 > 125
ブタミホス	+	333 > 152	333 > 180
フルベコリド	+	385 > 175	385 > 173
フルベリネート	+	503 > 208	503 > 181
フルベンジアミド	-	681 > 254	681 > 274
プロピザミド	+	256 > 190	256 > 173
プロトリン	+	242 > 158	242 > 200
ヘキサコナゾール	+	314 > 70	316 > 70
ベンチオバリカルブイプロピル	+	382 > 116	382 > 180
ベンチオピラト	+	360 > 276	360 > 177
マンジプロバミド	+	412 > 328	412 > 356
メチチオン	+	303 > 145	303 > 85

表 2. LC-MS/MS 測定条件

カラム	: Wako 製 Wakopak Ultra C18-2 2.1 mm i.d. × 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 (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+, 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
脱溶媒ガス流量	: 800 L/hr

表 3. グラジエント条件

時間 (min)	A 液:B 液 (比)		A 液:B 液 (比)
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
~ 10			5:95

7. 試験法の妥当性評価方法

7.1. 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。

7.2. 選択性の確認

あらかじめ検証の対象となる農薬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した。

7.3. 検量線の直線性の確認

0.0005, 0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05 および 0.1 μg/mL の検量線用標準液を調製した。これらの標準液を 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、0.0005 μg/mL から順次、測定濃度を大きくして、0.1 μg/mL まで相関係数 (r) が 0.995 以上を維持しているか確認した。

7.4. 検出限界および定量限界の確認

検出限界の目標値は 0.005 mg/kg、定量限界の目標値は 0.01 mg/kg とした。ブランク試料溶液に 0.0005 μg/mL となるように標準液を添加したものを 10 回、ブランク試料溶液を 5 回ランダムに測定し、正味の測定値 (ブランク試料溶液の測定値を差し引いた測定値) から試料中濃度に換算した値の標準偏差 σ を求めた。標準偏差 σ に 3.67⁵⁾ を乗じた値を検出限界とし、標準偏差 σ に 10 を乗じたものを定量限界とした。

7.5. 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、高濃度は真度が 70~120 %、併行精度が 15 % 未満、室内精度が 20 % 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 >

8. 結果および考察

8.1. 妥当性評価の結果

8.1.1. 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。

8.1.2. 検量線の直線性

各試験室の検量線の直線性の結果を表5に示した。すべての農薬について、0.0005~0.1 µg/mLの範囲で相関係数 (r) が0.995以上であることを確認した。

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
イソキサチオン	0.0005-0.1	1.0000	0.9999	1.0000
エチプロール	0.0005-0.1	0.9999	0.9998	0.9994
クロラントリプリブ ロール	0.0005-0.1	0.9999	0.9998	0.9997
シアナジン	0.0005-0.1	0.9999	0.9997	0.9999
シエビラフェン	0.0005-0.1	1.0000	0.9998	1.0000
ジフェノコナゾール	0.0005-0.1	0.9999	0.9999	0.9999
シラフルオフェン	0.0005-0.1	1.0000	0.9999	1.0000
ノバルロン	0.0005-0.1	1.0000	0.9996	0.9995
ピラカロストロビン	0.0005-0.1	0.9996	0.9999	0.9998
ピリミホスメチル	0.0005-0.1	1.0000	0.9999	0.9999
ファミキサトロン	0.0005-0.1	1.0000	0.9999	0.9999
フィプロニル	0.0005-0.1	1.0000	0.9999	1.0000
フェンプロコナゾール	0.0005-0.1	0.9999	0.9992	0.9995
ブタミホス	0.0005-0.1	0.9998	0.9999	1.0000
フルオビコリト	0.0005-0.1	0.9999	0.9998	1.0000
フルバリンネート	0.0005-0.1	0.9999	1.0000	1.0000
フルベシジファミド	0.0005-0.1	0.9999	0.9991	0.9998
プロピザミド	0.0005-0.1	1.0000	0.9999	0.9998
プロメトリン	0.0005-0.1	1.0000	0.9998	0.9999
ヘキサコナゾール	0.0005-0.1	0.9998	0.9991	0.9992
ベンチアバリカルブ	0.0005-0.1	0.9996	0.9998	1.0000
イソプロピル				
ベンチオビラト	0.0005-0.1	1.0000	0.9997	0.9998
マンジプロバミド	0.0005-0.1	0.9999	0.9995	1.0000
メチダチオン	0.0005-0.1	1.0000	0.9997	1.0000

8.1.3. 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から表9に示した。いずれも目標値を満たしていた。

8.1.4. 真度および精度

各試験室の真度 (回収率) および精度 (併行精度および室内精度) の結果を表10から表13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。

8.1.5. 空間再現精度の結果

参考としてすべての結果 (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回繰り返しの枝分かかれ試験) から求めた真度 (回収率) および精度 (併行精度および室内精度) を表14から表17に示した。この結果についてもすべての農薬でガイドラインの目標値を満たしていた。

表 6. 検出限界および定量限界（ほうれんそう）

農薬名	検出限界 (mg/kg)			定量限界 (mg/kg)		
	小平	横浜	神戸	小平	横浜	神戸
イソキサチオン	0.0022	0.0020	0.0007	0.0060	0.0054	0.0018
エチプロール	0.0021	0.0023	0.0011	0.0058	0.0062	0.0030
クロラントラニリプロール	0.0033	0.0021	0.0019	0.0091	0.0058	0.0052
シアナジン	0.0015	0.0008	0.0004	0.0040	0.0022	0.0011
シエノピラフェン	0.0012	0.0007	0.0003	0.0034	0.0020	0.0009
ジフェノコナゾール	0.0015	0.0015	0.0008	0.0042	0.0042	0.0022
シラフルオフエン	0.0015	0.0009	0.0010	0.0042	0.0026	0.0027
ノバルロン	0.0024	0.0025	0.0012	0.0065	0.0069	0.0033
ピラクロストロビン	0.0023	0.0016	0.0020	0.0064	0.0042	0.0055
ピリミホスメチル	0.0031	0.0017	0.0013	0.0084	0.0045	0.0035
ファモキサドン	0.0030	0.0024	0.0017	0.0081	0.0067	0.0046
フィプロニル	0.0031	0.0012	0.0028	0.0085	0.0031	0.0076
フェンブコナゾール	0.0018	0.0010	0.0016	0.0050	0.0029	0.0044
ブタミホス	0.0032	0.0028	0.0017	0.0086	0.0077	0.0046
フルオピコリド	0.0033	0.0015	0.0011	0.0090	0.0042	0.0029
フルバリネート	0.0012	0.0019	0.0014	0.0033	0.0050	0.0039
フルベンジアミド	0.0017	0.0019	0.0035	0.0048	0.0052	0.0095
プロピザミド	0.0016	0.0019	0.0018	0.0043	0.0053	0.0048
プロメトリン	0.0018	0.0017	0.0010	0.0050	0.0047	0.0027
ヘキサコナゾール	0.0028	0.0015	0.0022	0.0075	0.0040	0.0060
ベンチアバリカルブイソプロピル	0.0017	0.0013	0.0011	0.0047	0.0034	0.0029
ベンチオピラド	0.0019	0.0007	0.0009	0.0050	0.0019	0.0024
マンジプロパミド	0.0033	0.0013	0.0008	0.0089	0.0034	0.0022
メチダチオン	0.0031	0.0011	0.0012	0.0084	0.0029	0.0032

表 7. 検出限界および定量限界（なす）

農薬名	検出限界 (mg/kg)			定量限界 (mg/kg)		
	小平	横浜	神戸	小平	横浜	神戸
イソキサチオン	0.0027	0.0028	0.0011	0.0074	0.0076	0.0030
エチプロール	0.0029	0.0029	0.0008	0.0079	0.0079	0.0023
クロラントラニリプロール	0.0029	0.0027	0.0007	0.0078	0.0073	0.0019
シアナジン	0.0009	0.0007	0.0004	0.0026	0.0020	0.0010
シエノピラフェン	0.0006	0.0021	0.0004	0.0015	0.0057	0.0011
ジフェノコナゾール	0.0017	0.0012	0.0006	0.0047	0.0033	0.0015
シラフルオフエン	0.0011	0.0009	0.0005	0.0029	0.0024	0.0012
ノバルロン	0.0020	0.0024	0.0009	0.0055	0.0065	0.0024
ピラクロストロビン	0.0026	0.0022	0.0013	0.0071	0.0060	0.0036
ピリミホスメチル	0.0023	0.0036	0.0017	0.0062	0.0097	0.0047
ファモキサドン	0.0020	0.0036	0.0034	0.0055	0.0097	0.0093
フィプロニル	0.0023	0.0025	0.0026	0.0061	0.0067	0.0071
フェンブコナゾール	0.0018	0.0030	0.0015	0.0048	0.0081	0.0040
ブタミホス	0.0021	0.0029	0.0033	0.0057	0.0080	0.0089
フルオピコリド	0.0020	0.0033	0.0016	0.0054	0.0090	0.0044
フルバリネート	0.0018	0.0009	0.0018	0.0049	0.0025	0.0048
フルベンジアミド	0.0021	0.0027	0.0018	0.0059	0.0073	0.0049
プロピザミド	0.0024	0.0021	0.0014	0.0065	0.0057	0.0037
プロメトリン	0.0018	0.0026	0.0004	0.0048	0.0069	0.0011
ヘキサコナゾール	0.0017	0.0020	0.0033	0.0046	0.0056	0.0089
ベンチアバリカルブイソプロピル	0.0017	0.0027	0.0007	0.0046	0.0074	0.0018
ベンチオピラド	0.0014	0.0020	0.0005	0.0038	0.0054	0.0015
マンジプロパミド	0.0023	0.0028	0.0007	0.0062	0.0075	0.0019
メチダチオン	0.0026	0.0014	0.0010	0.0070	0.0039	0.0028

表 8. 検出限界および定量限界（かぶ（根））

農薬名	検出限界 (mg/kg)			定量限界 (mg/kg)		
	小平	横浜	神戸	小平	横浜	神戸
イソキサチオン	0.0018	0.0022	0.0010	0.0050	0.0061	0.0028
エチプロール	0.0023	0.0023	0.0011	0.0063	0.0063	0.0030
クロラントラニリプロール	0.0029	0.0014	0.0019	0.0079	0.0039	0.0053
シアナジン	0.0008	0.0008	0.0003	0.0021	0.0023	0.0009
シエノピラフェン	0.0007	0.0007	0.0003	0.0020	0.0018	0.0009
ジフェノコナゾール	0.0012	0.0011	0.0009	0.0033	0.0031	0.0024
シラフルオフエン	0.0012	0.0008	0.0006	0.0032	0.0021	0.0016
ノバルロン	0.0014	0.0026	0.0008	0.0039	0.0072	0.0021
ピラクロストロビン	0.0021	0.0021	0.0019	0.0058	0.0057	0.0051
ピリミホスメチル	0.0026	0.0018	0.0009	0.0070	0.0049	0.0024
ファモキサドン	0.0021	0.0028	0.0034	0.0056	0.0077	0.0092
フィプロニル	0.0032	0.0013	0.0032	0.0087	0.0034	0.0088
フェンブコナゾール	0.0016	0.0011	0.0018	0.0044	0.0031	0.0050
ブタミホス	0.0015	0.0028	0.0011	0.0041	0.0077	0.0029
フルオピコリド	0.0024	0.0015	0.0009	0.0066	0.0040	0.0024
フルバリネート	0.0014	0.0024	0.0006	0.0038	0.0064	0.0016
フルベンジアミド	0.0018	0.0024	0.0033	0.0049	0.0065	0.0089
プロピザミド	0.0021	0.0016	0.0011	0.0058	0.0043	0.0030
プロメトリン	0.0020	0.0015	0.0012	0.0055	0.0041	0.0033
ヘキサコナゾール	0.0031	0.0011	0.0021	0.0083	0.0029	0.0058
ベンチアバリカルブイソプロピル	0.0020	0.0009	0.0011	0.0054	0.0024	0.0030
ベンチオピラド	0.0019	0.0010	0.0009	0.0052	0.0026	0.0026
マンジプロパミド	0.0022	0.0014	0.0012	0.0060	0.0038	0.0032
メチダチオン	0.0015	0.0011	0.0011	0.0041	0.0029	0.0031

表 9. 検出限界および定量限界（かき）

農薬名	検出限界 (mg/kg)			定量限界 (mg/kg)		
	小平	横浜	神戸	小平	横浜	神戸
イソキサチオン	0.0016	0.0021	0.0009	0.0044	0.0058	0.0026
エチプロール	0.0027	0.0027	0.0009	0.0072	0.0074	0.0025
クロラントラニリプロール	0.0031	0.0019	0.0018	0.0086	0.0053	0.0050
シアナジン	0.0006	0.0003	0.0004	0.0016	0.0009	0.0012
シエノピラフェン	0.0007	0.0014	0.0005	0.0019	0.0037	0.0014
ジフェノコナゾール	0.0007	0.0015	0.0007	0.0020	0.0040	0.0020
シラフルオフエン	0.0008	0.0011	0.0004	0.0023	0.0030	0.0011
ノバルロン	0.0018	0.0022	0.0009	0.0048	0.0061	0.0026
ピラクロストロビン	0.0018	0.0014	0.0015	0.0049	0.0039	0.0040
ピリミホスメチル	0.0019	0.0032	0.0023	0.0053	0.0087	0.0063
ファモキサドン	0.0027	0.0019	0.0021	0.0073	0.0052	0.0057
フィプロニル	0.0022	0.0011	0.0017	0.0060	0.0030	0.0048
フェンブコナゾール	0.0016	0.0030	0.0013	0.0043	0.0083	0.0036
ブタミホス	0.0019	0.0025	0.0028	0.0051	0.0068	0.0077
フルオピコリド	0.0025	0.0021	0.0018	0.0068	0.0057	0.0049
フルバリネート	0.0013	0.0016	0.0010	0.0036	0.0043	0.0028
フルベンジアミド	0.0023	0.0021	0.0020	0.0062	0.0057	0.0055
プロピザミド	0.0018	0.0029	0.0023	0.0049	0.0080	0.0062
プロメトリン	0.0021	0.0021	0.0009	0.0057	0.0057	0.0024
ヘキサコナゾール	0.0021	0.0018	0.0013	0.0056	0.0050	0.0034
ベンチアバリカルブイソプロピル	0.0012	0.0022	0.0010	0.0032	0.0061	0.0027
ベンチオピラド	0.0023	0.0019	0.0008	0.0061	0.0053	0.0022
マンジプロパミド	0.0030	0.0028	0.0007	0.0083	0.0077	0.0020
メチダチオン	0.0021	0.0007	0.0010	0.0057	0.0018	0.0026

表 10. 3 試験室の回収率、併行精度および室内精度（ほうれんそう）

農薬名		回収率 (%) n=10		併行精度 (RSD %)		室内精度 (RSD %)	
		目標値		低濃度	高濃度	低濃度	高濃度
		70~120	70~120	< 25	< 15	< 30	< 20
イソキサチオン	小平	95.2	99.1	5.5	8.2	9.4	8.2
	横浜	102.1	100.4	4.2	6.0	5.4	6.2
	神戸	104.5	99.3	4.0	6.0	7.4	7.3
エチプロール	小平	99.7	97.3	6.7	4.3	8.6	6.8
	横浜	106.1	100.7	3.3	4.6	7.6	5.5
	神戸	101.0	99.6	5.9	8.6	9.6	8.6
クロラントラニリプロール	小平	98.4	95.3	3.4	7.4	11.8	8.9
	横浜	107.9	109.3	7.8	3.6	8.8	6.0
	神戸	99.1	102.0	12.6	5.7	12.6	8.5
シアナジン	小平	101.2	98.9	2.9	5.2	5.5	6.4
	横浜	105.2	102.8	2.8	3.4	3.2	3.5
	神戸	100.6	99.1	2.6	4.7	7.2	5.8
シエノピラフェン	小平	84.5	83.8	5.7	5.9	7.0	10.6
	横浜	89.3	88.4	2.4	2.4	6.6	5.6
	神戸	84.9	86.8	5.5	6.7	9.7	9.5
ジフェノコナゾール	小平	98.3	95.9	8.5	5.3	9.4	5.3
	横浜	100.5	101.3	7.2	2.9	7.2	3.8
	神戸	98.9	98.6	6.3	5.6	6.9	7.2
シラフルオフェン	小平	92.9	92.6	5.7	10.5	6.1	12.3
	横浜	93.6	92.6	2.1	2.5	7.0	4.9
	神戸	101.8	98.3	2.8	5.9	7.6	9.3
ノバルロン	小平	94.8	96.6	12.4	4.5	16.0	4.6
	横浜	97.3	99.4	3.7	2.8	8.1	4.8
	神戸	88.1	96.0	6.6	9.4	14.2	12.9
ピラクロストロビン	小平	97.0	96.7	7.3	7.6	7.3	7.6
	横浜	100.8	100.4	11.0	4.2	11.0	4.2
	神戸	95.9	100.5	10.8	3.9	10.8	9.1
ピリミホスメチル	小平	97.3	94.9	12.0	6.3	12.0	7.3
	横浜	97.5	100.6	4.5	3.1	5.7	5.7
	神戸	94.3	98.5	7.2	6.3	8.7	8.1
ファモキサドン	小平	95.6	95.7	7.6	6.6	12.8	9.7
	横浜	102.4	98.9	5.6	4.5	12.6	4.5
	神戸	94.8	97.8	10.3	5.9	10.3	8.3
フィプロニル	小平	94.0	96.9	9.9	9.4	9.9	9.8
	横浜	97.2	101.6	0.9	3.3	4.9	4.0
	神戸	97.4	97.2	7.4	2.8	14.3	8.2
フェンブコナゾール	小平	98.4	97.2	9.7	5.3	12.6	6.2
	横浜	100.0	99.7	6.1	3.8	6.1	4.4
	神戸	98.4	99.3	6.4	4.5	8.9	6.0
ブタミホス	小平	96.9	95.5	9.0	5.7	10.6	5.7
	横浜	100.9	98.1	11.1	3.9	11.1	3.9
	神戸	101.5	96.3	9.3	4.1	10.4	5.5
フルオピコリド	小平	94.2	100.4	9.0	3.9	9.6	5.3
	横浜	99.8	100.8	7.5	2.6	9.2	4.5
	神戸	96.1	102.3	5.3	5.0	5.8	8.2
フルバリネート	小平	88.9	84.9	4.6	7.5	12.0	10.1
	横浜	98.4	95.8	9.0	1.4	11.0	4.2
	神戸	101.9	97.3	5.1	8.9	10.3	8.9
フルベンジアミド	小平	100.3	100.9	4.7	6.3	10.3	8.1
	横浜	99.6	100.7	5.4	3.9	10.9	6.1
	神戸	98.9	99.2	7.5	7.5	11.5	9.0
プロピザミド	小平	103.9	98.7	12.0	8.0	12.0	8.0
	横浜	100.1	99.7	4.1	3.3	6.7	3.8
	神戸	96.8	96.8	9.5	6.9	12.5	6.9
プロメトリン	小平	97.0	100.3	10.7	7.0	10.7	7.8
	横浜	105.2	102.3	8.1	4.5	9.0	4.5
	神戸	98.5	99.9	4.4	7.4	5.2	7.4
ヘキサコナゾール	小平	104.2	99.8	6.3	5.4	7.4	5.5
	横浜	104.4	100.8	2.9	2.4	6.0	4.2
	神戸	99.8	98.7	4.1	5.7	9.3	7.5
ベンチアバリカルブイソプロピル	小平	103.0	98.3	13.7	7.9	13.7	7.9
	横浜	104.2	101.6	4.2	3.6	6.1	3.6
	神戸	95.5	100.2	5.9	4.3	9.3	9.4
ベンチオピラド	小平	94.6	99.2	6.7	8.3	8.1	8.3
	横浜	100.4	101.1	6.3	4.7	6.3	5.2
	神戸	99.3	99.5	5.0	3.8	7.2	7.0
マンジプロパミド	小平	96.4	96.7	8.7	6.5	10.6	6.5
	横浜	104.4	99.8	7.2	4.2	7.4	6.0
	神戸	102.7	100.0	3.0	7.7	7.4	7.7
メチダチオン	小平	99.8	98.0	6.2	8.2	7.2	8.2
	横浜	103.1	101.5	5.8	3.9	5.8	4.6
	神戸	105.3	100.3	3.9	6.7	8.9	8.9

表 11. 3 試験室の回収率, 併行精度および室内精度 (なす)

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
		目標値	70~120	70~120	< 25	< 15	< 30
イソキサチオン	小平	97.4	93.1	9.9	5.0	9.9	6.1
	横浜	93.6	97.8	9.8	3.4	13.7	9.4
	神戸	99.4	96.6	6.1	5.5	7.5	6.1
エチプロール	小平	96.9	93.3	6.8	5.4	8.3	6.7
	横浜	85.3	97.8	3.2	3.4	6.8	9.8
	神戸	95.3	98.0	4.8	6.0	5.1	7.0
クロラントラニリプロール	小平	90.1	87.5	10.8	4.7	16.9	5.7
	横浜	102.0	110.7	7.6	2.4	8.4	6.0
	神戸	102.2	95.8	5.5	7.1	8.6	11.9
シアナジン	小平	95.0	94.7	3.9	4.7	4.3	4.7
	横浜	91.9	99.0	2.1	1.6	3.9	5.5
	神戸	98.4	97.9	4.0	5.7	4.0	5.8
シエノピラフェン	小平	88.9	86.0	3.5	4.4	8.6	8.0
	横浜	84.7	89.4	10.0	1.7	10.0	6.4
	神戸	92.8	92.2	2.4	5.6	4.3	9.4
ジフェノコナゾール	小平	94.8	93.2	3.8	4.5	8.3	5.7
	横浜	92.8	99.0	5.6	2.8	7.0	8.8
	神戸	99.4	93.8	5.3	4.6	5.3	8.2
シラフルオフェン	小平	96.0	95.0	6.1	2.4	7.2	3.7
	横浜	103.1	100.4	2.3	2.7	9.9	8.8
	神戸	102.0	99.0	4.2	5.6	4.2	6.8
ノバルロン	小平	99.0	98.2	14.2	9.9	14.2	10.4
	横浜	96.1	98.8	9.9	3.4	15.0	8.9
	神戸	98.8	98.9	10.2	9.0	12.4	9.1
ピラクロストロビン	小平	89.5	93.2	8.3	5.4	8.3	5.4
	横浜	90.3	97.3	12.9	4.5	12.9	5.9
	神戸	95.8	94.9	11.8	9.7	17.2	9.7
ピリミホスメチル	小平	90.0	85.5	10.4	2.9	11.2	7.1
	横浜	86.0	95.8	9.3	1.9	9.3	4.5
	神戸	97.3	91.8	6.1	7.3	7.9	8.5
ファモキサドン	小平	88.2	91.8	12.6	6.1	16.3	9.1
	横浜	92.9	93.2	8.8	3.5	8.8	5.2
	神戸	98.9	93.9	8.6	3.0	10.4	10.0
フィプロニル	小平	92.0	93.7	7.8	6.7	9.3	7.1
	横浜	95.7	97.9	6.8	1.2	6.8	8.0
	神戸	98.9	100.9	7.5	5.6	10.7	9.1
フェンブコナゾール	小平	103.1	95.8	9.4	5.7	9.4	5.7
	横浜	91.8	99.1	10.5	1.8	10.5	9.9
	神戸	100.2	97.5	5.7	6.8	6.8	9.4
ブタミホス	小平	92.6	93.8	10.0	4.7	10.0	6.3
	横浜	93.1	95.4	4.6	2.7	9.6	12.9
	神戸	95.9	94.1	11.0	6.3	11.0	8.8
フルオピコリド	小平	93.6	93.6	11.2	5.5	13.2	5.5
	横浜	94.8	95.0	13.3	5.0	13.8	9.9
	神戸	98.6	99.0	5.7	5.9	6.5	7.2
フルバリネート	小平	92.4	95.0	9.1	4.2	9.1	4.2
	横浜	99.1	99.1	6.0	2.1	13.1	8.2
	神戸	103.7	97.2	2.6	5.1	8.3	7.2
フルベンジアミド	小平	95.2	95.2	8.4	5.4	11.3	5.8
	横浜	94.4	95.9	6.2	3.0	7.5	7.3
	神戸	100.7	100.8	4.8	4.9	7.2	7.1
プロピザミド	小平	96.0	89.4	11.5	4.2	11.7	8.8
	横浜	96.3	96.8	8.4	4.0	12.7	7.3
	神戸	97.9	96.0	7.2	9.0	7.2	9.0
プロメトリン	小平	85.5	91.7	7.2	6.3	10.3	6.3
	横浜	92.7	97.8	3.9	2.6	4.1	7.3
	神戸	96.9	96.1	4.0	6.1	5.8	8.4
ヘキサコナゾール	小平	89.1	96.3	12.0	3.4	14.0	4.7
	横浜	96.0	100.3	5.4	2.0	5.9	9.8
	神戸	95.7	94.9	10.7	9.4	10.7	9.4
ベンチアバリカルブイソプロピル	小平	96.1	95.1	5.9	5.4	5.9	5.6
	横浜	96.2	99.1	9.1	4.0	10.1	5.4
	神戸	104.0	100.3	4.2	6.2	6.8	8.3
ベンチオピラド	小平	96.3	93.1	9.2	6.2	10.5	6.2
	横浜	93.3	99.3	7.1	1.6	7.5	6.3
	神戸	99.3	98.4	3.0	4.8	3.0	7.7
マンジプロバミド	小平	99.7	95.3	14.2	4.2	14.2	4.8
	横浜	93.9	98.0	5.5	2.8	7.8	6.8
	神戸	99.9	98.6	5.0	7.2	7.3	7.2
メチダチオン	小平	92.3	90.9	8.3	3.0	8.3	6.8
	横浜	92.4	97.1	5.1	2.1	8.0	7.4
	神戸	97.6	96.4	3.3	5.7	4.1	5.7

表 12. 3 試験室の回収率, 併行精度および室内精度 (かぶ (根))

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
		目標値	70~120	70~120	< 25	< 15	< 30
イソキサチオン	小平	95.3	97.9	6.0	6.9	7.2	6.9
	横浜	101.6	103.0	6.3	4.7	8.7	4.8
	神戸	98.9	95.1	4.6	2.4	9.1	3.8
エチプロール	小平	98.9	96.7	8.4	6.2	8.4	6.2
	横浜	103.9	102.2	10.2	4.6	11.0	5.0
	神戸	98.3	97.2	7.7	2.5	10.3	7.3
クロラントラニリプロール	小平	95.0	92.7	10.2	4.3	10.2	6.9
	横浜	107.8	110.9	6.5	4.3	9.7	5.9
	神戸	97.3	98.7	12.8	2.9	13.0	7.0
シアナジン	小平	101.1	97.9	2.0	6.1	4.1	6.1
	横浜	105.3	103.5	4.7	2.5	5.2	3.5
	神戸	96.3	97.2	4.7	2.4	10.7	5.1
シエノピラフェン	小平	85.8	84.5	2.7	4.6	7.8	9.3
	横浜	94.0	93.6	4.6	2.5	6.4	5.9
	神戸	84.7	83.6	3.9	3.8	12.6	7.2
ジフェノコナゾール	小平	99.6	96.1	4.8	3.9	4.8	4.0
	横浜	101.0	102.1	8.9	2.7	8.9	3.9
	神戸	97.5	94.9	2.7	3.3	12.2	4.0
シラフルオフェン	小平	99.6	102.9	5.1	5.2	6.6	8.1
	横浜	101.6	100.8	4.6	4.4	5.7	5.7
	神戸	97.9	91.8	4.8	2.9	15.5	11.4
ノバルロン	小平	96.7	99.9	17.2	9.4	17.2	9.4
	横浜	102.8	103.3	9.3	6.0	12.9	6.3
	神戸	96.5	95.5	13.8	9.4	14.1	17.9
ピラクロストロビン	小平	96.2	97.0	10.1	6.0	11.4	6.2
	横浜	107.1	102.5	1.9	4.7	6.7	5.4
	神戸	96.8	97.2	7.9	2.7	13.9	6.6
ピリミホスメチル	小平	92.8	90.5	5.5	6.5	11.4	10.1
	横浜	104.0	102.0	5.1	2.0	7.5	6.1
	神戸	88.8	90.0	4.7	2.8	12.7	9.4
ファモキサドン	小平	95.6	95.6	10.0	6.5	10.0	7.5
	横浜	104.3	99.3	7.0	3.9	9.5	4.0
	神戸	98.6	96.4	3.1	5.4	14.6	7.4
フィプロニル	小平	95.9	98.6	11.3	7.8	11.7	7.8
	横浜	101.2	104.6	4.3	3.0	8.0	3.5
	神戸	100.5	97.7	6.1	5.9	11.1	7.6
フェンブコナゾール	小平	94.3	96.9	9.5	6.2	12.0	6.2
	横浜	103.2	102.2	4.7	4.9	8.0	5.9
	神戸	102.3	97.1	3.1	3.4	10.4	4.8
ブタミホス	小平	95.1	97.4	4.7	8.8	5.8	8.8
	横浜	104.7	101.3	9.6	3.9	9.6	4.0
	神戸	95.4	95.9	6.0	2.7	13.4	8.1
フルオピコリド	小平	98.0	98.8	9.9	6.3	9.9	6.3
	横浜	103.9	102.9	4.0	2.4	4.0	3.6
	神戸	94.6	99.7	9.9	2.1	9.9	5.1
フルバリネート	小平	102.8	100.8	2.7	4.2	5.0	6.9
	横浜	101.2	101.4	6.6	6.5	6.6	7.1
	神戸	98.7	97.1	4.1	3.5	13.6	4.3
フルベンジアミド	小平	96.0	99.1	8.0	4.2	8.0	5.1
	横浜	105.8	105.2	7.2	2.8	9.7	5.4
	神戸	95.2	96.3	3.8	2.5	9.6	5.8
プロピザミド	小平	97.1	95.5	6.7	4.6	6.7	7.6
	横浜	102.1	100.9	4.3	2.8	7.5	4.7
	神戸	90.3	95.6	4.9	4.1	8.8	8.7
プロメトリン	小平	101.5	100.2	7.9	4.7	11.6	5.9
	横浜	103.8	103.3	7.9	3.7	11.2	4.4
	神戸	96.0	96.2	2.0	2.8	9.2	5.3
ヘキサコナゾール	小平	101.0	99.2	7.2	3.9	7.2	3.9
	横浜	105.3	101.6	5.7	4.0	6.2	4.1
	神戸	94.0	96.4	11.0	9.0	11.0	9.0
ベンチアバリカルブイソプロピル	小平	98.6	98.4	5.3	6.7	11.9	6.7
	横浜	101.7	103.9	6.6	4.1	9.7	4.3
	神戸	96.5	99.8	5.1	1.3	7.6	7.1
ベンチオピラド	小平	96.5	97.6	5.2	4.0	5.2	5.2
	横浜	105.2	101.8	4.6	3.8	4.9	4.1
	神戸	94.6	94.8	4.5	5.4	12.0	6.4
マンジプロパミド	小平	97.6	95.0	7.0	5.5	15.1	6.4
	横浜	104.6	102.3	7.6	3.1	8.6	5.5
	神戸	95.7	96.9	6.2	3.2	10.1	5.0
メチダチオン	小平	100.1	98.0	5.3	7.4	9.7	7.4
	横浜	101.9	102.1	5.4	3.0	6.9	4.5
	神戸	95.9	96.5	5.9	2.0	13.4	6.1

表 13. 3 試験室の回収率, 併行精度および室内精度 (かき)

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
		目標値	70~120	70~120	< 25	< 15	< 30
イソキサチオン	小平	95.3	95.1	5.9	6.4	8.0	7.3
	横浜	105.6	104.5	4.4	2.8	5.9	5.8
	神戸	100.6	98.8	2.8	3.0	4.7	3.0
エチプロール	小平	93.5	100.0	13.6	7.0	13.6	7.1
	横浜	95.4	101.1	9.6	4.9	10.1	5.7
	神戸	99.3	101.9	4.9	2.0	5.0	2.6
クロラントラニリプロール	小平	94.4	93.3	10.8	8.3	12.2	8.3
	横浜	106.4	114.9	14.3	2.7	14.3	3.8
	神戸	98.5	104.2	10.9	2.6	10.9	4.6
シアナジン	小平	97.7	98.2	5.2	5.0	6.4	5.2
	横浜	96.8	100.0	3.0	2.5	3.8	4.8
	神戸	98.8	101.5	2.4	2.1	3.6	2.1
シエノピラフェン	小平	90.3	86.6	5.2	4.7	9.1	10.3
	横浜	88.9	93.0	8.0	1.6	8.0	3.5
	神戸	94.6	96.7	3.5	2.1	5.2	3.0
ジフェノコナゾール	小平	95.9	95.7	6.3	4.1	7.1	4.1
	横浜	97.9	107.1	9.8	3.7	9.8	5.8
	神戸	96.2	99.8	4.8	1.7	4.8	2.0
シラフルオフェン	小平	94.1	96.8	4.3	4.4	6.0	6.1
	横浜	106.0	104.9	3.4	3.0	6.3	7.0
	神戸	99.3	101.0	4.2	1.5	6.2	2.7
ノバルロン	小平	104.0	102.2	6.9	7.8	11.1	7.8
	横浜	100.6	102.6	9.4	1.7	11.3	6.2
	神戸	101.8	102.0	3.0	3.4	7.6	5.1
ピラクロストロビン	小平	100.2	99.2	8.5	5.2	8.5	5.5
	横浜	98.1	104.0	5.2	1.9	14.5	2.8
	神戸	95.3	100.9	16.7	2.6	16.7	2.6
ピリミホスメチル	小平	83.0	83.7	8.2	6.8	9.3	13.2
	横浜	96.9	99.1	9.9	2.4	15.0	3.9
	神戸	90.6	87.4	7.4	3.6	14.5	9.2
ファモキサドン	小平	101.4	94.5	5.0	9.0	5.0	9.8
	横浜	101.9	99.6	7.9	2.8	11.4	3.1
	神戸	98.7	104.2	7.7	1.8	7.9	6.6
フィプロニル	小平	96.9	99.6	11.2	6.9	11.2	7.4
	横浜	102.4	99.7	5.9	3.0	5.9	4.9
	神戸	98.9	105.1	6.2	2.4	8.3	4.3
フェンブコナゾール	小平	92.3	97.4	11.7	4.1	11.7	7.0
	横浜	104.5	106.2	6.0	4.6	9.2	7.7
	神戸	100.3	101.3	4.6	2.6	6.2	2.8
ブタミホス	小平	90.0	97.3	8.2	6.6	8.2	6.7
	横浜	101.3	103.0	12.8	4.9	12.8	6.1
	神戸	95.9	96.5	9.9	3.9	9.9	5.2
フルオピコリド	小平	97.4	100.8	9.0	5.4	10.3	7.2
	横浜	101.2	102.6	2.4	3.0	8.7	5.1
	神戸	101.8	101.8	8.8	1.1	9.2	3.1
フルバリネート	小平	92.7	97.4	7.0	5.6	7.8	5.8
	横浜	102.8	102.8	9.4	4.5	11.6	7.0
	神戸	98.2	99.3	2.4	2.9	5.0	3.1
フルベンジアミド	小平	98.9	99.6	5.8	3.2	5.8	5.7
	横浜	104.6	102.0	4.4	1.6	7.4	3.9
	神戸	96.3	103.1	10.9	4.0	10.9	5.7
プロピザミド	小平	96.9	89.7	13.6	7.4	13.6	8.5
	横浜	97.9	100.3	11.4	2.4	15.8	5.3
	神戸	97.2	95.9	8.6	3.3	10.5	4.4
プロメトリン	小平	91.2	93.6	9.8	8.1	9.8	8.4
	横浜	95.2	102.6	8.1	3.3	8.1	5.1
	神戸	94.5	97.0	4.2	1.9	6.9	2.8
ヘキサコナゾール	小平	99.9	97.1	9.3	6.5	12.2	8.9
	横浜	102.0	107.7	2.9	4.2	6.3	7.1
	神戸	95.6	100.3	10.8	2.5	10.8	4.2
ベンチアバリカルブイソプロピル	小平	96.6	97.5	8.9	5.9	11.9	5.9
	横浜	103.0	106.3	3.6	5.3	7.6	5.3
	神戸	103.0	102.3	3.8	1.9	3.8	3.0
ベンチオピラド	小平	98.3	98.8	9.4	7.4	9.9	7.4
	横浜	103.6	103.4	3.1	3.4	5.0	3.8
	神戸	102.2	101.1	4.1	3.1	4.1	3.1
マンジプロバミド	小平	102.2	97.7	10.4	7.1	10.4	7.1
	横浜	95.2	103.6	6.0	3.0	6.0	3.3
	神戸	97.7	101.5	3.4	4.1	4.0	4.1
メチダチオン	小平	94.2	94.7	7.2	5.9	10.3	7.6
	横浜	94.6	101.8	3.6	3.3	3.9	5.1
	神戸	98.0	98.7	3.7	3.1	6.0	3.8

表 14. 3 試験室の回収率, 併行精度および室間精度 (ほうれんそう)

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
	目標値	70~120	70~120	< 25	< 15	< 30
イソキサチオン	100.6	99.6	4.6	6.8	8.2	6.8
エチプロール	102.3	99.2	5.4	6.2	8.6	6.9
クロラントラニリプロール	101.8	102.2	8.7	5.6	10.8	9.4
シアナジン	102.3	100.2	2.8	4.5	5.5	5.4
シエノピラフェン	86.2	86.4	4.7	5.3	7.8	8.5
ジフェノコナゾール	99.3	98.6	7.4	4.7	7.5	5.8
シラフルオフエン	96.1	94.5	3.8	7.1	7.8	9.3
ノバルロン	93.4	97.3	8.4	6.2	13.1	8.0
ピラクロストロピン	97.9	99.2	9.9	5.5	9.9	6.7
ピリミホスメチル	96.4	98.0	8.5	5.4	8.5	7.2
ファモキサドン	97.6	97.4	7.9	5.7	11.5	7.5
フィプロニル	96.2	98.5	7.1	5.9	9.7	7.6
フェンブコナゾール	98.9	98.7	7.5	4.5	9.1	5.4
ブタミホス	99.7	96.6	9.9	4.6	10.0	4.9
フルオピコリド	96.7	101.1	7.4	4.0	8.4	5.9
フルバリネート	96.4	92.7	6.6	6.7	12.0	9.6
フルベンジアミド	99.6	100.3	6.0	6.1	10.2	7.5
プロビザミド	100.3	98.4	9.3	6.4	10.0	6.4
プロメトリン	100.2	100.8	8.2	6.4	8.4	6.4
ヘキサコナゾール	102.8	99.8	4.6	4.7	7.5	5.7
ベンチアバリカルブイソプロピル	100.9	100.0	9.0	5.5	9.2	6.9
ベンチオピラド	98.1	99.9	6.0	5.9	7.0	6.1
マンジプロパミド	101.2	98.8	6.7	6.3	8.8	6.6
メチダチオン	102.7	99.9	5.3	6.5	7.4	7.1

表 15. 3 試験室の回収率, 併行精度および室間精度 (なす)

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
	目標値	70~120	70~120	< 25	< 15	< 30
イソキサチオン	96.8	95.8	8.7	4.7	10.0	7.3
エチプロール	92.5	96.4	5.3	5.0	8.7	7.9
クロラントラニリプロール	98.1	98.0	8.0	5.0	12.4	12.8
シアナジン	95.1	97.2	3.5	4.3	4.8	5.3
シエノピラフェン	88.8	89.2	6.0	4.3	8.1	8.1
ジフェノコナゾール	95.7	95.3	5.0	4.0	7.2	7.8
シラフルオフエン	100.3	98.1	4.4	3.8	7.7	6.9
ノバルロン	97.9	98.6	11.6	8.0	12.8	9.0
ピラクロストロピン	91.9	95.2	11.2	6.9	12.9	6.9
ピリミホスメチル	91.1	91.0	8.7	4.7	10.4	8.0
ファモキサドン	93.4	93.0	10.0	4.4	12.3	7.9
フィプロニル	95.5	97.5	7.4	5.0	9.2	8.3
フェンブコナゾール	98.3	97.5	8.7	5.2	9.3	8.1
ブタミホス	93.9	94.4	9.0	4.8	9.2	9.2
フルオピコリド	95.7	95.8	10.5	5.5	11.3	7.6
フルバリネート	98.4	97.1	6.3	4.0	10.5	6.6
フルベンジアミド	96.8	97.3	6.6	4.6	8.9	6.9
プロビザミド	96.7	94.1	9.2	6.2	10.3	8.8
プロメトリン	91.7	95.2	5.1	5.2	8.5	7.5
ヘキサコナゾール	93.6	97.2	9.7	5.8	10.6	8.3
ベンチアバリカルブイソプロピル	98.8	98.2	6.6	5.3	8.3	6.7
ベンチオピラド	96.3	96.9	6.9	4.6	7.7	7.0
マンジプロパミド	97.8	97.3	9.4	5.1	10.0	6.2
メチダチオン	94.1	94.8	5.9	3.9	7.1	6.9

表 16. 3 試験室の回収率, 併行精度および室間精度 (かぶ (根))

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
	目標値	70~120	70~120	< 25	< 15	< 30
イソキサチオン	98.6	98.6	5.7	5.0	8.4	6.1
エチプロール	100.3	98.7	8.9	4.7	9.7	6.3
クロラントラニリプロール	100.0	100.8	10.0	4.0	11.9	9.9
シアナジン	100.9	99.5	4.0	4.0	7.6	5.4
シエノピラフェン	88.2	87.2	3.9	3.7	9.8	8.8
ジフェノコナゾール	99.4	97.7	6.1	3.3	8.1	5.0
シラフルオフェン	99.7	98.5	4.8	4.4	9.6	9.4
ノバルロン	98.7	99.6	13.6	8.4	13.6	11.4
ピラクロストロビン	100.0	98.9	7.2	4.7	11.5	6.3
ピリミホスメチル	95.2	94.2	5.1	4.1	12.1	10.0
ファモキサドン	99.5	97.1	7.2	5.4	11.3	6.4
フィプロニル	99.2	100.3	7.7	5.8	10.1	6.7
フェンブコナゾール	99.9	98.7	6.2	5.0	10.4	6.0
ブタミホス	98.4	98.2	7.3	5.8	9.9	6.6
フルオピコリド	98.8	100.4	8.3	4.0	8.5	4.7
フルバリネート	100.9	99.8	4.7	4.9	8.5	6.3
フルベンジアミド	99.0	100.2	6.6	3.3	10.0	6.4
プロビザミド	96.5	97.3	5.4	3.9	8.9	7.2
プロメトリン	100.4	99.9	6.7	3.8	10.7	5.8
ヘキサコナゾール	100.1	99.1	8.1	6.0	8.9	6.0
ベンチアバリカルブイソプロピル	98.9	100.7	5.7	4.6	9.6	6.2
ベンチオピラド	98.8	98.1	4.8	4.4	8.7	5.9
マンジプロパミド	99.3	98.1	7.0	4.0	11.5	6.2
メチダチオン	99.3	98.8	5.5	4.7	9.9	5.8

表 17. 3 試験室の回収率, 併行精度および室間精度 (かき)

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
	目標値	70~120	70~120	< 25	< 15	< 30
イソキサチオン	100.5	99.5	4.5	4.3	7.3	6.7
エチプロール	96.1	101.0	9.8	5.0	9.8	5.3
クロラントラニリプロール	99.8	104.1	12.3	4.9	12.4	10.0
シアナジン	97.7	99.9	3.7	3.4	4.6	4.3
シエノピラフェン	91.3	92.1	5.8	3.0	7.1	7.5
ジフェノコナゾール	96.7	100.8	7.3	3.3	7.3	6.3
シラフルオフェン	99.8	100.9	3.9	3.2	7.7	6.3
ノバルロン	102.1	102.2	6.9	5.0	9.7	6.1
ピラクロストロビン	97.9	101.4	11.1	3.5	12.6	4.1
ピリミホスメチル	90.2	90.1	8.7	4.4	14.3	11.4
ファモキサドン	100.7	99.4	7.0	5.3	8.2	7.8
フィプロニル	99.4	101.5	8.1	4.5	8.1	6.0
フェンブコナゾール	99.0	101.6	7.8	3.9	10.1	7.0
ブタミホス	95.7	98.9	10.7	5.2	10.7	6.5
フルオピコリド	100.1	101.7	7.3	3.6	9.2	5.1
フルバリネート	97.9	99.8	7.0	4.4	9.3	5.8
フルベンジアミド	99.9	101.5	7.4	3.1	8.1	5.1
プロビザミド	97.3	95.3	11.4	4.7	12.8	7.5
プロメトリン	93.6	97.8	7.7	5.0	7.7	6.8
ヘキサコナゾール	99.2	101.7	8.3	4.6	9.8	8.0
ベンチアバリカルブイソプロピル	100.9	102.0	5.8	4.7	8.4	5.8
ベンチオピラド	101.4	101.1	6.0	5.0	6.7	5.3
マンジプロパミド	98.4	101.0	7.4	5.0	7.4	5.1
メチダチオン	95.6	98.4	5.1	4.2	7.0	6.2

9. まとめ

4種類の野菜および果実を用いて、LC-MS/MS測定による一斉試験法（野菜・果実類）に新たに24農薬の適用が可能か検証を実施し、ガイドラインに基づく妥当性評価を行った。その結果、センターで妥当性の確認を行っていない12農薬、個別法またはセンター法で分析を行っている10農薬および一斉試験法GC/MS測定で分析を行っている2農薬の計24農薬について、すべての試験室で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。

おわりに

妥当性評価の結果から、すべての試験室において、野菜および果実を対象試料とし、LC-MS/MS測定による一斉試験法（野菜・果実類）の対象農薬に24農薬の追加が可能であり、調査対象農薬の拡大と分析法の集約による効率化が図られると考えられた。

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，食安発第0124001号。
- 2) 柿本芳久：食衛誌45，165-174（2004）。
- 3) 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，食安発1224第1号。
- 4) 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，食安基発1208第1号。
- 5) JIS K 0136：2015，高速液体クロマトグラフィー質量分析通則。