

令和3年度厚生労働行政推進調査事業費補助金 食品の安全確保推進研究事業

輸出先国のリスク管理に対応した残留農薬データ等の補完に関する研究

研究分担報告書

近年国際的に求められているリスク管理のための新規分析手法の開発と

国内導入に関する研究

研究代表・分担者 渡邊敬浩

国立医薬品食品衛生研究所安全情報部

研究要旨

農林水産物・農産加工品(農産品等)の輸出促進のためには、食品安全行政の国際整合を進め、その結果に基づき取り組むことが基本となる。農薬残留物の規制に関しては、国際整合した考え方や方法論に基づき、輸出先国により設定された最大残留基準値(MRL)への適合を確実にすることや、MRL が設定されていない場合には設定申請(インポートトレランス申請)することが具体的な方策となる。規制の目的で使用可能な簡易で迅速な分析法を輸出先国に提示することも、農産品等の輸出促進のために必要な取組の1つである。しかし、わが国においてそのような分析法の開発や検証は十分でなく、また国内導入も進んでいない。そのため、農産品等輸出促進の障壁となり、また国内における検査効率向上の妨げとなる可能性があり、解決すべき課題である。

本研究では、農薬を投与した結果としての残留物を含む試料(インカード試料)を用い、公的に示された従来の分析法との比較を行いながら、農薬残留物の簡易で迅速な分析法として国際的にも急速に認められつつある QuEChERS 法の厳密な性能評価を試みた。本年度研究においては、スルホキサフロル並びにブプロフェジンの残留物を含む玄米・インカード試料、及びジノテフラン並びにトルフェンピラドを含む茶・インカード試料の作成に成功し、これら試料を適正な実験計画に従い分析することで QuEChERS 法の性能を評価しその妥当性を確認する一方で、性能差に留意することの重要性を指摘した。

研究協力者

明治薬科大学薬学部

永山敏廣

日本食品分析センター

中村歩 渡邊文子 河野洋一 伊佐川聡

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 植物防疫研究部門

佐藤安志

東京農業大学応用生物科学部

加藤 拓

国立医薬品食品衛生研究所安全情報部

松田りえ子

A. 研究目的

現在のわが国政府の方針として、農林水産物・農産加工品(農産品等)の輸出促進が示されている。食品安全行政の国際整合を進めることは、この政府方針に沿った取組の基礎を構築することに等しく、極めて重要である。例えば、輸出先国に設定された最大残留基準値(MRL)に対して、輸出農産品等における農薬残留物濃度の適合を確実にすること、また MRL が設定されていない場合等には、輸出先国が要求するデータを科学的根拠として示し MRL 設定を申請(インポートトレランス申請)することが、国際整合した食品安全行政に基づく輸出促進のための取組の具体例となる。国際標準の MRL 設定あるいはインポートトレランス申請には、農薬残留物濃度を示すデータ等の他に、規制目的で使用可能な簡易で迅速な分析法の提示が求められる。しかし、これまでのわが国においては、そのような分析法が十分に検証されておらず、また国内導入も進んでいない。そのため、農産品等輸出促進の障壁となり、また国内における検査効率向上の妨げとなる可能性があり、解決すべき課題である。

近年、農薬残留物の簡易で迅速な分析法として QuEChERS 法が開発された。QuEChERS とは、Quick(迅速)、Easy(簡単)、Cheap(安価)、Effective(効率的)、Rugged(頑健)、Safe(安全)の混成語であり、農薬残留物の分析に求められる様々な要件を満た

す分析法として期待されている。農薬残留物の規制分野において、国際的にも急速に認められつつあり、規制のための分析法としてだけではなく、作物残留試験データの取得にも利用され始めている。国内においても、QuEChERS 法の利用が検討され始めているが、公的に示されてきた従来の分析法(公示分析法)との比較も含めた厳密な性能評価が最重要課題とされている。

QuEChERS 法は、簡易で迅速な分析法の総称であり多様性を有する。そのため本研究では、QuEChERS 法と呼称される分析法のうち代表的な方法である EU 法(EN 15662)に基づき、玄米と茶に適用可能な分析法を構築した。構築した QuEChERS 法と公的に示されている従来の分析法の両方を用いて、使用基準に従い農薬を投与した結果としての残留物を含む玄米と茶のインカード試料を計画的に分析し、得られた分析値を比較することで、QuEChERS 法の性能を厳密に評価することを目的とした。

B. 研究方法

B-1. QuEChERS 法の厳密な性能評価

B-1-1. 試薬等

B-1-1-1. 標準品

- ・スルホキサフロル標準品:純度 99.9%(林純薬工業製)
- ・ブプロフェジン標準品:純度 99.4%(富士フィルム和光純薬製)
- ・ジノテフラン標準品:純度 99.8%(富士フィルム和光純薬製)
- ・トルフェンピラド標準品:純度 99.7%

(林純薬工業製)

B-1-1-2. 試薬

- ・アセトン、アセトニトリル：残留農薬試験用(関東化学製)
- ・メタノール：高速液体クロマトグラフ用(関東化学製)
- ・塩化ナトリウム、酢酸アンモニウム：試薬特級(関東化学製)
- ・くえん酸三ナトリウム二水和物、無水硫酸マグネシウム：試薬特級(富士フィルム和光純薬製)
- ・くえん酸水素二ナトリウム 1.5 水和物：和光一級(富士フィルム和光純薬製)

B-1-1-3. 試液の調製

- ・1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液：酢酸アンモニウム 15.43 g を水に溶解し 200 mL とした。
- ・2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液：1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 2 mL に水を加えて 1000 mL とした。

B-1-1-4. 標準溶液の調製

標準原液の調製

- ・スルホキサフロル標準原液：スルホキサフロル標準品 10 mg を精密に量り、50 mL 容全量フラスコに入れた。アセトンを加え、超音波を照射して溶解した後に定容し、これをスルホキサフロル標準原液(200 mg/L)とした。
- ・ブプロフェジン標準原液：ブプロフェジン標準品 25 mg を精密に量り、上記と同

様に調製し、ブプロフェジン標準原液(500 mg/L)とした。

- ・ジノテフラン標準原液：ジノテフラン標準品 25 mg を精密に量り、上記と同様に調製し、ジノテフラン標準原液(500 mg/L)とした。

- ・トルフェンピラド標準原液：トルフェンピラド標準品 25 mg を精密に量り、上記と同様に調製し、トルフェンピラド標準原液(500 mg/L)とした。

添加用混合標準溶液の調製

- ・スルホキサフロル及びブプロフェジン添加用混合標準溶液(2.5 mg/L 及び 1 mg/L)：スルホキサフロル標準原液(200 mg/L)2.5 mL 及びブプロフェジン標準原液(500 mg/L)1.0 mL を 20 mL 容全量フラスコに採り、アセトニトリルを加えて定容し、希釈用標準溶液(25 mg/L)を調製した。次いで、希釈用標準溶液 2.0 mL を 20 mL 容全量フラスコに、または希釈用標準溶液 1.0 mL を 25 mL 容全量フラスコにそれぞれ採り、アセトニトリルを加えて定容した。
- ・ジノテフラン及びトルフェンピラド添加用混合標準溶液(10 mg/L 及び 5 mg/L)：ジノテフラン標準原液(500 mg/L)及びトルフェンピラド標準原液(500 mg/L)のそれぞれ 1 mL を 20 mL 容全量フラスコに採り、アセトニトリルを加えて定容し、希釈用混合標準溶液(25 mg/L)を調製した。次いで、希釈用標準溶液 4.0 mL を 10 mL 容全量フラスコに、または希釈用標準溶液 4.0 mL を 20 mL 容全量フラスコにそれぞれ採り、アセトニトリルを加えて定容した。

検量線用混合標準溶液の調製

スルホキサフロル及びブプロフェジンの場合には表 1 に、ジノテフラン及びトルフェンピラドの場合には表 2 に従って希釈し、測定用混合標準溶液を調製した。試料から検出された濃度に応じて選択した一部の測定用混合標準溶液(5 点以上)を検量線用混合標準溶液とした。

B-1-2. 装置

- ・超遠心粉碎機：ZM-200

[Retsch 製]

- ・小型粉碎機：ABSOLUTE3

[Vitamix 製]

- ・ホモジナイザー：T25 digital ULTRA-TURRAX

[IKA 製]

- ・エルビスシェーカー

[スギヤマゲン製]

- ・多本架冷却遠心機：H-80Rα

[コクサン製]

- ・高速液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計(LC-MS/MS)

機種：LC 部；Nexera X2(LC30-AD)

[島津製作所製]

MS 部；LCMS-8050

[島津製作所製]

解析ソフト：LabSolutions LCMS (ver. 5.96)

[島津製作所製]

カラム：InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm)

[ジーエルサイエンス製]

カラム温度：40°C

B-1-3. 試料の調製

B-1-3-1. 分析用試料(インカード試料及びコントロール試料)の調製

玄米試料の調製

稲の栽培時に使用基準に従い農薬を投与し調製した玄米をインカード試料、農薬を投与せず調製した玄米をコントロール試料とした。約 1 kg のインカード試料、及びコントロール試料を 0.5 mm メッシュを装備した超遠心粉碎機を用いて粉碎することにより、分析用試料を調製した。調製した分析用試料は、-20°C の条件で冷凍保存した。

茶試料の調製

チャノキの栽培時に使用基準に従い農薬を投与し調製した荒茶をインカード試料、農薬を投与せず調製した荒茶をコントロール試料とした。小型粉碎機を用いて約 100 g のインカード試料及び約 150 g のコントロール試料を粉碎し分析用試料を調製した。調製した分析用試料は、-20°C の条件で冷凍保存した。

B-1-3-2. 管理用試料の調製

適正な分析操作が行われたことを確認するとともに、確認がされた場合には分析法の妥当性確認の根拠とすることを目的に、管理用試料を調製しインカード試料とともに併行分析した。また、凍結保存するインカード試料中での残留物の安定性を確認するための管理用試料を調製し、一定の期間保存後に分析した。各管理用試料の調製方法は以下の通りである。

玄米管理用試料の調製

B-1-3-1.に示した方法に従い調製した玄米コントロール試料を、基本分析法の場合には 10.0 g、QuEChERS 法の場合には 5.0 g 採取後、それぞれの試料について濃度が 0.1 mg/kg になるようにスルホキサフロル及びブプロフェジン標準品を添加することで管理用試料を調製した。具体的には、基本分析法の場合には添加用混合標準溶液(1 mg/L)1 mL、QuEChERS 法の場合には添加用混合標準溶液(2.5 mg/L)200 µL を、それぞれ量り取った玄米コントロール試料に添加した。調製した管理用試料をインカード試料との併行分析、及び凍結保存安定性の確認に使用した。

茶管理用試料の調製

B-1-3-1.に示した方法に従い調製した茶コントロール試料を、基本分析法の場合には 5.0 g、QuEChERS 法の場合には 5.0 g あるいは 2.0 g 採取後、それぞれの試料について濃度が 1 mg/kg になるようにジノテフラン及びトルフェンピラド標準品を添加し、インカード試料と併行分析するための管理用試料を調製した。具体的には、試料量が 5.0 g の場合には添加用混合標準溶液(2.5 mg/L)200 µL、2.0 g の場合には添加用混合標準溶液(10 mg/L)200 µL を、それぞれ量り取った茶コントロール試料に添加した。また同様に、0.1 mg/kg の濃度の管理用試料を調製し、凍結保存安定性の確認に使用した。

B-1-4. 分析

B-1-4-1. 分析対象化合物

インカード試料の作成に用いる有効成分の選択においては、残留の程度、土壌残留等の圃場への影響、物理的・化学的特性による分析への影響、高温加水分解等に関連した加工への影響を総合的に考慮した。その結果として、稲の栽培時にはスルホキサフロル並びにブプロフェジンを、チャノキの栽培時にはジノテフラン並びにトルフェンピラドを有効成分として含む農薬を投与した。上記有効成分は、農薬投与の結果、残留物として農産物に含まれる可能性があり、国際的な残留物の定義及び本研究の分析対象化合物に一致する。インカード試料の作成方法については、加藤による分担研究報告書を参照のこと。各有効成分(分析対象化合物)の物理的・化学的特性の 1 つとして、LogPoW を以下に示す。

スルホキサフロル(Sulfoxaflor):0.802

ブプロフェジン(Buprofezin):4.3

ジノテフラン(Dinotefuran):-0.549

トルフェンピラド(Tolfenpyrad):5.61

B-1-4-2. 分析法

B-1-4-2-1. 測定用溶液の調製

玄米試料を対象とする基本分析法

本研究では、玄米試料に含まれるスルホキサフロル及びブプロフェジンを対象とする基本分析法として、別添 1 に示した公示一斉分析法及び別添 2 に示した個別分析法(スルホキサフロル/農産物)が採用している抽出溶媒を変更せず、LC-MS/MS による測定を前提として、以下の分析法を構

築し使用した。

試料 10.0 g に水 20 mL を加え 30 分間静置した。アセトニトリル 100 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトニトリル 50 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 200 mL とし抽出液とした。抽出液を 1 mL 分取し、メタノールで 20 mL に定容し測定用溶液とした*。測定用溶液を LC-MS/MS に注入し、B-1-4-2-2. に示した条件に従い測定した。*保存安定性を検証するための分析においては、2 mL を分取し 25 mL に定容した。

玄米試料を対象とする QuEChERS 法

本研究では、玄米試料に含まれるスルホキサフロル及びブプロフェジンを対象とする QuEChERS 法として以下を構築し使用した。

試料 5.0 g に水 10 g 及びアセトニトリル 10 mL を加え、シェイカーを用いて 250 rpm で 1 分間振とうした。無水硫酸マグネシウム 4 g、塩化ナトリウム 1 g、くえん酸三ナトリウム二水和物 1 g 及びくえん酸水素二ナトリウム 1.5 水和物 0.5 g を加え、250 rpm で 1 分間振とうした。3000 rpm で 5 分間遠心分離し、アセトニトリル層を抽出液として得た。抽出液を 0.5 mL 分取し、メタノールで 100 mL に定容し測定用溶液とした。測定用溶液を LC-MS/MS に注入し、B-1-4-2-2. に示した条件に従い測定した。

茶試料を対象とする基本分析法

本研究では、茶試料に含まれるジノテフラン及びトルフェンピラドを対象とする基本分析法として、別添 1 に示した公示一斉分析法及び別添 3 に示した個別分析法(ジノテフラン/農産物)が採用している抽出溶媒を変更せず、LC-MS/MS による測定を前提として、以下の分析法を構築し使用した。

試料 5.0 g に水 20 mL を加え 30 分間静置した。アセトニトリル 100 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトニトリル 50 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 200 mL とし抽出液とした。抽出液を 1 mL 分取し、メタノールで 100 mL に定容し測定用溶液とした*。測定用溶液を LC-MS/MS に注入し、B-1-4-2-2. に示した条件に従い測定した。*保存安定性を検証するための分析においては、4 mL を分取し 25 mL に定容した。

茶試料を対象とする QuEChERS 法

本研究では、茶試料に含まれるジノテフラン及びトルフェンピラドを対象とする QuEChERS 法として以下を構築し使用した。

試料 2.0 g* に水 10 g 及びアセトニトリル 10 mL を加え、シェイカーを用いて 250 rpm で 1 分間振とうした。無水硫酸マグネシウム 4 g、塩化ナトリウム 1 g、くえん酸三ナトリウム二水和物 1 g 及びくえん酸水素二ナトリウム 1.5 水和物 0.5 g を加え、250 rpm で 1 分間振とうした。3000

rpm で 5 分間遠心分離し、アセトニトリル層を抽出液として分取した。抽出液を 0.5 mL 分取しメタノールで 20 mL に定容後、1mL を分取しさらにメタノールで 20 mL に定容し測定用溶液とした。測定用溶液を LC-MS/MS に注入し、B-1-4-2-2.に示した条件に従い測定した。* QuEChERS 法の基礎とした EN15662 : 2018 において、水分含量が 15%未満であり複雑なマトリクスをもつ植物性試料(スパイス、コーヒー、茶等)については、分析に供する試料量を 2g とすることが明記されている。本研究では、EN15662 : 2018 による他の試料への指示並びにわが国の公示分析法による指示に従い、茶の試料量を 5g とする分析も行った。しかし、加える水とアセトニトリルとの比率が適切でないためと考えられるが、試料が十分に膨潤せず均質なスラリーとはならない場合もあったことから、参考として結果は示すものの考察等は行わない。

B-1-4-2-2. 測定条件

1)スルホキサフロル測定のための LC-MS/MS 操作条件例

移動相 : A 液 ; 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液

B 液 ; メタノール

A 液 : B 液(50 : 50)

流量 : 0.2 mL/min

注入量 : 2 μ L

コリジョンガス : アルゴン

モニターイオン等 : 表 3 の通り

2)ブプロフェジン測定のための LC-MS/MS 操作条件

移動相 : A 液 ; 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液

B 液 ; メタノール

A 液 : B 液(15 : 85)

流量 : 0.2 mL/min

注入量 : 2 μ L

コリジョンガス : アルゴン

モニターイオン等 : 表 4 の通り

3)ジノテフラン測定のための LC-MS/MS 操作条件

移動相 : A 液 ; 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液

B 液 ; メタノール

A 液 : B 液(85 : 15)

流量 : 0.2 mL/min

注入量 : 2 μ L

コリジョンガス : アルゴン

モニターイオン等 : 表 5 の通り

4)トルフェンピラド測定のための LC-MS/MS 操作条件

移動相 : A 液 ; 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液

B 液 ; メタノール

A 液 : B 液(20 : 80)

流量 : 0.2 mL/min

注入量 : 2 μ L

コリジョンガス : アルゴン

モニターイオン等 : 表 6 の通り

B-1-4-2-3. 検量線の作成

分析時ごとに、検量線用混合標準溶液を測定して、各分析対象化合物の重量とピーク面積から、最小二乗法により得た一次回帰式を検量線として用いた。いずれの検量線についても、決定係数は ≥ 0.999 となった。

B-1-4-3. 濃度の計算

各測定用溶液を LC-MS/MS に注入し計測されたピーク面積から、検量線を用いて各分析対象化合物の重量を逆推定後、分析法と分析対象化合物との組合せごとに、次式に従い試料における濃度を算出した。保存安定性を検証するための分析においては B-1-4-2-1. に記載の変更点を踏まえて濃度を算出した。

玄米試料を対象とする基本分析法

公示分析法に基づき構築した基本分析法によるスルホキサフロル並びにブプロフェジンの分析時には、下式に従い、試料における濃度を算出した。

- ・スルホキサフロル濃度(mg/kg) = 検量線から求めた重量(ng) $\times 1/2 \mu\text{L} \times 200 \text{ mL} \times 20 \text{ mL}/1 \text{ mL} \times 1/10 \text{ g}$
- ・ブプロフェジン濃度(mg/kg) = 検量線から求めた重量(ng) $\times 1/2 \mu\text{L} \times 200 \text{ mL} \times 20 \text{ mL}/1 \text{ mL} \times 1/10 \text{ g}$

玄米試料を対象とする QuEChERS 法

EN15662 に基づき構築した QuEChERS 法によるスルホキサフロル並びにブプロフェジンの分析時には、下式に従い、試料における濃度を算出した。

・スルホキサフロル濃度(mg/kg) = 検量線から求めた重量(ng) $\times 1/2 \mu\text{L} \times 10 \text{ mL} \times 100 \text{ mL}/0.5 \text{ mL} \times 1/5 \text{ g}$

・ブプロフェジン濃度(mg/kg) = 検量線から求めた重量(ng) $\times 1/2 \mu\text{L} \times 10 \text{ mL} \times 100 \text{ mL}/0.5 \text{ mL} \times 1/5 \text{ g}$

茶試料を対象とする基本分析法

公示分析法に基づき構築した基本分析法によるジノテフラン並びにトルフェンピラドの分析時には、下式に従い、試料における濃度を算出した。

・ジノテフラン濃度(mg/kg) = 検量線から求めた重量(ng) $\times 1/2 \mu\text{L} \times 200 \text{ mL} \times 100 \text{ mL}/1 \text{ mL} \times 1/5 \text{ g}$

・トルフェンピラド濃度(mg/kg) = 検量線から求めた重量(ng) $\times 1/2 \mu\text{L} \times 200 \text{ mL} \times 100 \text{ mL}/1 \text{ mL} \times 1/5 \text{ g}$

茶試料を対象とする QuEChERS 法

EN15662 に基づき構築した QuEChERS 法によるスルホキサフロル並びにブプロフェジンの分析時には、下式に従い、試料における濃度を算出した。

- ・ジノテフラン濃度(mg/kg) = 検量線から求めた重量(ng) $\times 1/2 \mu\text{L} \times 10 \text{ mL} \times 20 \text{ mL}/0.5 \text{ mL} \times 20 \text{ mL}/1 \text{ mL} \times 1/2 \text{ g}$
- ・トルフェンピラド濃度(mg/kg) = 検量線から求めた重量(ng) $\times 1/2 \mu\text{L} \times 10 \text{ mL} \times 20 \text{ mL}/0.5 \text{ mL} \times 20 \text{ mL}/1 \text{ mL} \times 1/2 \text{ g}$

B-1-4-4. 定量下限値(LOQ)の推定

各分析法の LOQ は、検量線の最下点として設計した分析対象化合物の量と、希釈を含む測定用溶液の調製手順から、以下の通り、計算により推定した。

玄米試料を対象とする基本分析法の LOQ

・スルホキサフロル並びにブプロフェジンについて： $0.0004 \text{ ng} \times 1/2 \mu\text{L} \times 200 \text{ mL} \times 20 \text{ mL}/1 \text{ mL} \times 1/10 \text{ g} = 0.08 \text{ mg/kg}$

玄米試料を対象とする QuEChERS 法の LOQ

・スルホキサフロル並びにブプロフェジンについて： $0.0004 \text{ ng} \times 1/2 \mu\text{L} \times 10 \text{ mL} \times 100 \text{ mL}/0.5 \text{ mL} \times 1/5 \text{ g} = 0.08 \text{ mg/kg}$

茶試料を対象とする基本分析法の LOQ

・ジノテフラン並びにトルフェンピラドについて： $0.0004 \text{ ng} \times 1/2 \mu\text{L} \times 200 \text{ mL} \times 100 \text{ mL}/1 \text{ mL} \times 1/5 \text{ g} = 0.8 \text{ mg/kg}$

茶試料を対象とする QuEChERS 法の LOQ

・ジノテフラン並びにトルフェンピラドについて： $0.0004 \text{ ng} \times 1/2 \mu\text{L} \times 10 \text{ mL} \times 20 \text{ mL}/0.5 \text{ mL} \times 20 \text{ mL}/1 \text{ mL} \times 1/2 \text{ g} = 0.8 \text{ mg/kg}$

C. D. 結果及び考察

CD-1-1. 分析法の構築と管理用試料(添加試料)の分析

CD-1-1-1. 基本分析法並びに QuEChERS の構築

別添 1～別添 3 に示したとおり、わが国において公的に示されている農産品中のスルホキサフロル、ブプロフェジン、ジノテフラン、トルフェンピラドを対象とする分析法は、アセトニトリルを溶媒としてホモジナイズ抽出した後に精製し、LC-MS(MS)により測定することを骨格としている。本研究における公的に示された分析法の役割は、QuEChERS 法の性能を評価するための基準を与えることである。その

ため、測定には QuEChERS 法と共通して LC-MS/MS 系を使用することとした。そうすることで、インカード試料の分析を通じた評価において特に注目すべき抽出効率について、より適切に考察することができるようになると考えた。測定用溶液の希釈により、妨害ピークの影響を受けずに測定が可能であったため、ミニカラム等を用いた精製工程は不要であると判断した。以上の考察と基礎データに基づき構築した基本分析法、及び EN15662 を基礎として構築した QuEChERS 法を、本報告書の方法 B-1-4-2. に示した。また、構築した基本分析法及び QuEChERS 法により得られるクロマトグラム並びに検量線の一例を、それぞれ図 1～図 4、図 5～図 8 に示す。図 1～図 4 に示した標準品の測定またインカード試料の分析により得られたクロマトグラムは、左右対称なピークが妨害ピークの影響なく測定されていることを示している。また、コントロール試料からは、分析対象化合物としたスルホキサフロル、ブプロフェジン、ジノテフラン、トルフェンピラドは検出されなかったことが分かる。

本研究において構築した QuEChERS 法は、同じく構築した基本分析法と比較して 1/2 の費用と 1/5 の時間で実施することができる。上記のコスト比較の対象とした基本分析法も精製工程を含まないため、精製工程や誘導体化の工程を含む、他の分析法に比べた場合には、コストがより低くなるかも知れない。しかし、食品と分析対象化合物の組合せを考慮せず、また分析法の性

能を比較することなしにコストだけを比較することはできない。

CD-1-1-2.管理用試料(添加試料)の分析結果に基づく妥当性確認

コントロール試料に標準品を添加することで管理用試料(添加試料)を調製し、インカード試料とともに併行分析(n=6)した。その結果、異常な分析値が得られることはなかった。このことから、予期せぬ人為的なミスや装置の不具合等がなく適切な分析が行われたことが確認された。以下、玄米と茶とに分けて管理用試料の分析結果を示し考察する。

玄米試料

玄米に設定されているスルホキサフロル及びブプロフェジンの MRL はそれぞれ 0.5 mg/kg と 1 mg/kg である。また本研究においては、国内登録されている使用基準中、残留量が最大になる使用基準を選択して農薬を投与しインカード試料を作成している。以上のとおり、MRL の値並びに農薬投与の実際から予想される濃度、及びインカード試料の予備分析の結果を踏まえて、玄米管理用試料におけるスルホキサフロル及びブプロフェジンの濃度を 0.1 mg/kg とすることを決めた。

玄米コントロール試料にそれぞれの濃度が 0.1 mg/kg になるようにスルホキサフロル及びブプロフェジン標準品を添加し調製した管理用試料を、インカード試料とともに併行分析した。基本分析法及び QuEChERS 法により得られたスルホキサ

フロル及びブプロフェジンの分析値をそれぞれ表 7 及び表 8 に示す。表 7 及び表 8 に示したとおり、玄米中のスルホキサフロル及びブプロフェジンを対象とする基本分析法並びに QuEChERS 法の併行精度 (RSD%) はそれぞれ 5% 未満、回収率は 90% ~ 110% の範囲に含まれていた。これら性能の推定値は、「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」(平成 22 年 12 月 24 日食安発 1224 第 1 号)(以下、「妥当性評価ガイドライン」という。)により示された性能規準の値を満たしている。そのため、管理用試料の分析値に基づけば、基本分析法並びに QuEChERS 法ともに妥当性が確認されたと判断される。

管理用試料から得られたスルホキサフロル及びブプロフェジンの分析値を基本分析法と QuEChERS 法との間で比較した結果、QuEChERS 法を用いた場合のブプロフェジン回収率が若干低値となった。これらの回収率を与えたブプロフェジン分析値を対象に non-paired t-test を用いた検定を行った結果、有意差が認められた ($P < 0.01$)。なお、スルホキサフロル分析値についても同様に t 検定を行ったが、有意差は認められなかった。

茶試料

茶に設定されているジノテフラン及びトルフェンピラドの MRL はそれぞれ 25 mg/kg と 30 mg/kg である。また本研究においては、玄米と同様に茶についても、国内登録されている使用基準中、残留量が最

大になる使用基準を選択して農薬を投与しインカード試料を作成している。以上のとおり、MRLの値並びに農薬投与の実際から予想される濃度、及びインカード試料の予備分析の結果を踏まえ、また分析法の性能が反映されることも期待して、茶管理用試料におけるジノテフラン及びトルフェンピラドの濃度を1.0 mg/kgとすることを決めた。

茶コントロール試料にそれぞれの濃度が1.0 mg/kgになるようにジノテフラン及びトルフェンピラド標準品を添加し調製した管理用試料を、インカード試料とともに併行分析した。基本分析法及びQuEChERS法により得られたジノテフラン及びトルフェンピラドの分析値をそれぞれ表9及び表10に示す。本研究では、構築するQuEChERS法の基礎としてEN15662を採用していることから、当該規格に指示されている2gを試料量とするのが適当である。一方でEN15662は、穀物等他の植物性材料の場合には試料量を5gとすることを指示している。そのため、試料量を5gとした分析も行い、その結果も併せて表に示した。しかし5gの茶管理用試料に対してQuEChERS法を適用した場合には、試料に加える水とアセトニトリルの量が不足し、添加後のスラリーの状態が十分ではない場合が認められた。そのため結果は参考として示すのみとし、考察はしない。

茶試料中のジノテフラン及びトルフェンピラドを対象とする基本分析法並びに

QuEChERS法の併行精度はそれぞれ5%未満、回収率は90%~110%の範囲に含まれていた。これら性能の推定値は、妥当性評価ガイドラインにより示された性能規準の値を満たしている。そのため、管理用試料の分析値に基づけば、基本分析法並びにQuEChERS法ともに、妥当性が確認されたと判断される。

管理用試料から得られたジノテフラン及びトルフェンピラドの分析値を基本分析法とQuEChERS法との間で比較した結果、いずれの残留物についてもQuEChERS法を用いた場合に回収率が若干低値となった。これらの回収率を与えた分析値を対象にnon-paired t-testを用いた検定を行った結果、有意差が認められた($P < 0.01$)。

CD-1-1-3.インカード試料の凍結保存安定性の確認

管理用試料を、インカード試料と同一の条件(-20°C)で凍結保存し、0日目及び100日目に、基本分析法を用いて併行分析($n=2$)した。結果を玄米試料と茶試料に分けて以下に示す。

玄米試料

0.1 mg/kgの濃度でスルホキサフロル及びブプロフェジンを含む玄米管理用試料を凍結保存の前後に分析した。表11に示したとおり、スルホキサフロル及びブプロフェジンともに、0日目と100日目に実施した併行分析の結果に、異常なばらつきは認められなかった。また0日目の分析値に対する100日目の分析値の割合(残存率%)

を計算した結果、スルホキサフロルとブプロフェジンのそれぞれについて 99%及び 98%であった。これらの結果により、スルホキサフロルとブプロフェジンは、凍結保存された試料において最低 100 日間は安定であることが確認された。

茶試料

0.1 mg/kg の濃度でジノテフラン及びトルフェンピラドを含む茶管理用試料を凍結保存の前後に分析した。表 12 に示したとおり、ジノテフラン及びトルフェンピラドともに、0 日目と 100 日目に実施した併行分析の結果に、異常なばらつきは認められなかった。また 0 日目の分析値に対する 100 日目の分析値の割合(残存率%)を計算した結果、ジノテフランとトルフェンピラドのそれぞれについて 98%及び 100%であった。これらの結果により、ジノテフランとトルフェンピラドは、凍結保存された試料において最低 100 日間は安定であることが確認された。

CD-1-2. インカード試料の分析通じた QuEChERS 法の性能評価

最初に、基本分析法を用いてインカード試料を分析し、その結果に基づき農薬残留物濃度の値付けをした。次いで、QuEChERS 法により得た分析値と値付けした値とを比較することで、QuEChERS 法の性能評価を試みた。なお、分析までの凍結保存期間は、玄米試料については 78 日以内、茶試料については 94 日以内であり、各試料に含まれる残留物の安定性は保証

されている。

玄米試料

玄米インカード試料を基本分析法、及び QuEChERS 法のそれぞれにより併行分析 (n=6)した。得られたスルホキサフロルとブプロフェジンの分析値を表 13 及び図 9 に示す。

玄米インカード試料から得られたスルホキサフロルの分析値は、基本分析法を用いた場合には 0.3958 mg/kg~0.4221 mg/kg の範囲に含まれ平均値は 0.40 mg/kg、QuEChERS 法を用いた場合には 0.3908 mg/kg~0.4058 mg/kg の範囲に含まれ平均値は 0.40 mg/kg であった。分析値の範囲に若干の違いが認められたが、平均値はよく一致しており、noparid t-test を用いた検定によっても有意差は認められなかった。また、基本分析法により値付けされた値を真値とすると QuEChERS 法の回収率は 97%~100%と推定された(図 10)。精度及び真度ともに、妥当性評価ガイドラインにされた性能規準値を高い水準で満たしており、玄米に含まれるスルホキサフロルを対象とする基本分析法と QuEChERS 法との間には、注意すべき性能の違いはないと考えられる。

玄米インカード試料から得られたブプロフェジンの分析値は、基本分析法を用いた場合には 0.2007 mg/kg~0.2171 mg/kg の範囲であり平均値は 0.21 mg/kg、QuEChERS 法を用いた場合には 0.1924 mg/kg~0.2093 mg/kg の範囲であり平均値は 0.20 mg/kg であった。分析値の範囲ま

た平均値とともに、基本分析法に比べて QuEChERS 法を用いた場合により低値となった。これらの分析値を対象に、noparid t-test を用いた検定を行った結果、有意差が認められた($P<0.01$)。基本分析法に比べて QuEChERS 法により得られる分析値が低値になる結果は、管理用試料の分析結果とも一致している。基本分析法により値付けされた値を真値とすると QuEChERS 法の回収率は 91%~99%と推定される。そのため、妥当性が確認されたと判断してよい(図 10)。しかし先に言及したとおり、管理用試料並びにインカード試料の分析結果からは、QuEChERS 法により得られる値は、それほど大きな差ではないが、基本分析法により得られる値に比べて低くなる可能性が高いと考えられる。

スルホキサフロル及びブプロフェジンの logPow はそれぞれ 0.802 及び 4.3、水溶解度は 570.0 mg/L 及び 0.387 mg/L であることから、スルホキサフロルは水溶性が高く、ブプロフェジンは脂溶性が高い。昨年度研究において検討したジノテフランとエトフェンプロックスと同様に、脂溶性が高い農薬を対象として QuEChERS 法により得られる分析値は、分析法の妥当性には影響を及ぼさない範囲で、真値に比べて低値になりやすいことが強く示唆された。

茶試料

茶インカード試料を基本分析法、及び QuEChERS 法のそれぞれにより併行分析($n=6$)した。得られたジノテフランとトルフェンピラドの分析値を表 14 及び図 11

に示す。

茶インカード試料から得られたジノテフランの分析値は、基本分析法を用いた場合には 20.8 mg/kg~22.6 mg/kg の範囲に含まれ平均値は 22.0 mg/kg、QuEChERS 法を用いた場合には 19.7 mg/kg~20.7 mg/kg の範囲に含まれ平均値は 20.0 mg/kg であった。上記の通り、基本分析法と QuEChERS 法を用いて茶試料から得られたジノテフラン分析値の範囲には重なりがない。このことは、一般に考えれば、分析による変動を考慮しても、同一試料から一致した分析値が得られる確率が低いことを意味する。noparid t-test を用いた検定によっても有意差が認められた($P<0.01$)。また、基本分析法により値付けされた値を真値とすると QuEChERS 法の回収率は 90%~94%と推定された(図 12)。

茶インカード試料から得られたトルフェンピラドの分析値は、基本分析法を用いた場合には 15.3 mg/kg~16.3 mg/kg の範囲であり平均値は 16.0 mg/kg、QuEChERS 法を用いた場合には 14.1 mg/kg~14.5 mg/kg の範囲であり平均値は 14.0 mg/kg であった。ジノテフランの場合と同様、トルフェンピラドの場合にも、同一試料から基本分析法と QuEChERS 法のそれぞれを用いて得られた分析値の範囲に重なりはなかった。すなわち、ジノテフランの場合と同様に、同一試料から一致した分析値が得られる確率は低いと考えられる。noparid t-test を用いた検定によっても有意差が認められた($P<0.01$)。また、基本分析法により値

付けされた値を真値とすると QuEChERS 法の回収率は 90%~93%と推定された(図 12)。

茶インカード試料に含まれるジノテフラン並びにトルフェンピラドを対象として QuEChERS 法により得られる分析値が、基本分析法により得られる分析値に比べて低値になることは、管理用試料(添加試料)から得られた分析値からも予想されていたことかもしれない(表 9 及び表 10)。

ジノテフラン及びトルフェンピラドの logPow はそれぞれ-0.549 及び 5.61、水溶解度は 570.0 mg/L 及び 0.387 mg/L であることから、ジノテフランは水溶性が高く、トルフェンピラドは脂溶性が高い。これまでの研究により得られたエトフェンプロックスとブプロフェジンを用いた検討の結果から、玄米試料に含まれる残留物の脂溶性が高い場合には、QuEChERS 法を用いて得られる分析値が基本分析法を用いて得られる分析値に比べて低値になることが強く示唆されている。しかし茶試料については、残留物がもつ脂溶性という物理的・化学的特性に依らずに、検討した 2 つの残留物の回収率が QuEChERS 法を用いた場

合により低くなった。玄米試料に含まれるジノテフランを対象とする場合には、基本分析法と QuEChERS 法により得られる分析値に有意差がないことが示されている。茶インカード試料から得られる分析値が基本分析法と QuEChERS 法との間で有意差を生じた今回の結果について、その原因解明を含むより明確な結論を得るためには、他の農薬残留物を対象にするなど、さらに検討が必要である。

E. 研究発表

1. 論文発表

渡邊敬浩, 永山敏廣, 鳥海栄輔, 中村歩, 渡邊文子, 伊佐川聡, 加藤拓, 松田りえ子, 畝山智香子: 葉菜類のインカード試料を用いた QuEChERS 法と公定法との性能比較, 第 44 回残留農薬分析研究会プロシーディング

2. 学会発表

渡邊敬浩, 永山敏廣, 鳥海栄輔, 中村歩, 渡邊文子, 伊佐川聡, 加藤拓, 松田りえ子, 畝山智香子: 葉菜類のインカード試料を用いた QuEChERS 法と公定法との性能比較, 第 44 回残留農薬分析研究会, 2021, 11.17

表 1 スルホキサフロル及びブプロフェジン測定用混合標準溶液の調製

名称	調製濃度 (mg/L)	使用溶液	使用量 (mL)	定容量 (mL)
標準溶液A	0.04	1 mg/L	1	25
標準溶液B	0.01	標準溶液A	5	20
標準溶液C	0.008	標準溶液A	4	20
標準溶液D	0.006	標準溶液A	3	20
標準溶液E	0.004	標準溶液A	2	20
標準溶液F	0.002	標準溶液A	1	20
標準溶液G	0.0015	標準溶液B	3	20
標準溶液H	0.001	標準溶液B	2	20
標準溶液I	0.0008	標準溶液C	2	20
標準溶液J	0.0006	標準溶液D	2	20
標準溶液K	0.0004	標準溶液E	2	20
標準溶液L	0.0002	標準溶液F	2	20

[調製溶媒：メタノール]

試料から検出された濃度に応じて標準溶液 F～L から 5 点以上を選択し、検量線用混合標準溶液として使用した。

表 2 ジノテフラン及びトルフェンピラド測定用混合標準溶液の調製

名称	調製濃度 (mg/L)	使用溶液	使用量 (mL)	定容量 (mL)
標準溶液A	1	25 mg/L	1	25
標準溶液B	0.04	標準溶液A	1	25
標準溶液C	0.01	標準溶液B	5	20
標準溶液D	0.008	標準溶液B	4	20
標準溶液E	0.006	標準溶液B	3	20
標準溶液F	0.004	標準溶液B	2	20
標準溶液G	0.002	標準溶液B	1	20
標準溶液H	0.001	標準溶液C	2	20
標準溶液I	0.0008	標準溶液D	2	20
標準溶液J	0.0006	標準溶液E	2	20
標準溶液K	0.0004	標準溶液F	2	20
標準溶液L	0.0002	標準溶液G	2	20
標準溶液M	0.0001	標準溶液G	1	20

[調製溶媒：メタノール]

試料から検出された濃度に応じて標準溶液 C～M から 5 点以上を選択し、検量線用混合標準溶液として使用した。

表3 イオン化法、モニターイオン、Q1 Pre Bias、コリジョンエネルギー(CE)及び保持時間の目安(スルホキサフロル)

	イオン化法	プレカーサーイオン (<i>m/z</i>)	プロダクトイオン (<i>m/z</i>)	Q1 Pre Bias (V)	CE (eV)	保持時間の 目安(分)
スルホキサフロル	ESI (-)	276	213	14	10	3.6

表4 イオン化法、モニターイオン、Q1 Pre Bias、コリジョンエネルギー(CE)及び保持時間の目安(ブプロフェジン)

	イオン化法	プレカーサーイオン (<i>m/z</i>)	プロダクトイオン (<i>m/z</i>)	Q1 Pre Bias (V)	CE (eV)	保持時間の 目安(分)
ブプロフェジン	ESI (+)	306	116	-13	-17	7.2

表5 イオン化法、モニターイオン、Q1 Pre Bias、コリジョンエネルギー(CE)及び保持時間の目安(ジノテフラン)

	イオン化法	プレカーサーイオン (<i>m/z</i>)	プロダクトイオン (<i>m/z</i>)	Q1 Pre Bias (V)	CE (eV)	保持時間の 目安(分)
ジノテフラン	ESI (+)	203	113	-14	-12	6.0

表6 イオン化法、モニターイオン、Q1 Pre Bias、コリジョンエネルギー(CE)及び保持時間の目安(トルフェンピラド)

	イオン化法	プレカーサーイオン (<i>m/z</i>)	プロダクトイオン (<i>m/z</i>)	Q1 Pre Bias (V)	CE (eV)	保持時間の 目安(分)
トルフェンピラド	ESI (+)	384	197	-11	-26	6.9

表 7 玄米管理用試料(添加試料)に含まれるスルホキサフロルの分析結果

	基本分析法		QuEChERS法	
	分析値 mg/kg	回収率 %	分析値 mg/kg	回収率 %
Repeat 1	0.1040	104	0.1048	105
Repeat 2	0.1083	108	0.1030	103
Repeat 3	0.1080	108	0.1082	108
Repeat 4	0.1072	107	0.1072	107
Repeat 5	0.1038	104	0.1036	104
Repeat 6	0.1026	103	0.1086	109
Mean	0.11		0.11	
SD	0.0025		0.0024	
RSD(%)	2.3		2.3	

表 8 玄米管理用試料(添加試料)に含まれるブプロフェジンの分析結果

	基本分析法		QuEChERS法	
	分析値 mg/kg	回収率 %	分析値 mg/kg	回収率 %
Repeat 1	0.1046	105	0.09660	97
Repeat 2	0.1036	104	0.09554	96
Repeat 3	0.1002	100	0.09806	98
Repeat 4	0.1065	107	0.09724	97
Repeat 5	0.1050	105	0.09128	91
Repeat 6	0.1020	102	0.09624	96
Mean	0.10		0.10	
SD	0.0023		0.0024	
RSD(%)	2.2		2.5	

表9 茶管理用試料(添加試料)に含まれるジノテフランの分析結果

	基本分析法		QuEChERS法 (5 g)		QuEChERS法 (2 g)	
	分析値 mg/kg	回収率 %	分析値 mg/kg	回収率 %	分析値 mg/kg	回収率 %
Repeat 1	1.014	101	0.866	87	0.941	94
Repeat 2	1.008	101	0.837	84	0.945	95
Repeat 3	1.024	102	0.866	87	0.906	91
Repeat 4	0.993	99	0.886	89	0.960	96
Repeat 5	1.083	108	0.820	82	0.949	95
Repeat 6	0.987	99	0.840	84	0.920	92
Mean	1.0		0.85		0.94	
SD	0.035		0.024		0.020	
RSD(%)	3.4		2.8		2.1	

表10 茶管理用試料(添加試料)に含まれるトルフェンピラドの分析結果

	基本分析法		QuEChERS法 (5 g)		QuEChERS法 (2 g)	
	分析値 mg/kg	回収率 %	分析値 mg/kg	回収率 %	分析値 mg/kg	回収率 %
Repeat 1	1.008	101	0.915	92	0.931	93
Repeat 2	1.019	102	0.964	96	0.900	90
Repeat 3	1.010	101	0.906	91	0.906	91
Repeat 4	1.035	104	0.919	92	0.944	94
Repeat 5	0.995	100	0.811	81	0.942	94
Repeat 6	1.051	105	0.888	89	0.915	92
Mean	1.0		0.90		0.92	
SD	0.020		0.051		0.019	
RSD(%)	2.0		5.6		2.0	

表11 凍結保存安定性 (玄米試料)

保存日数	Repeat	スルホキサフロル		ブプロフェジン	
		分析値(mg/kg)	残存率(%)	分析値(mg/kg)	残存率(%)
0日	1	0.1007		0.09863	
	2	0.1045		0.09992	
	Mean	0.10		0.10	
100日	1	0.1014		0.09553	
	2	0.1026		0.09932	
	Mean	0.10	99	0.10	98

表 12 凍結保存安定性 (茶試料)

保存日数	Repeat	ジノテフラン		トルフェンピラド	
		分析値(mg/kg)	残存率(%)	分析値(mg/kg)	残存率(%)
0日	1	0.1029		0.09722	
	2	0.0999		0.09973	
	Mean	0.10		0.10	
100日	1	0.1004		0.09818	
	2	0.0986		0.09896	
	Mean	0.10	98	0.10	100

表 13 玄米インカード試料の分析結果

	スルホキサフロル		ブプロフェジン	
	基本分析法	QuEChERS法	基本分析法	QuEChERS法
Rep.1	0.4015	0.4019	0.2007	0.1924
Rep.2	0.4221	0.3992	0.2171	0.2093
Rep.3	0.3970	0.3978	0.2113	0.1985
Rep.4	0.4002	0.3908	0.2162	0.1960
Rep.5	0.3992	0.3950	0.2092	0.2039
Rep.6	0.3958	0.4058	0.2063	0.1976
Min	0.3958	0.3908	0.2007	0.1924
Max	0.4221	0.4058	0.2171	0.2093
Median	0.3997	0.3985	0.2103	0.1981
Mean	0.40	0.40	0.21	0.20
SD	0.0098	0.0052	0.0062	0.0060
RSD(%)	2.4	1.3	2.9	3.0

表 14 茶インカード試料の分析結果

	ジノテフラン			トルフェンピラド		
	基本分析法	QuEChERS法 (5 g)	QuEChERS法 (2 g)	基本分析法	QuEChERS法 (5 g)	QuEChERS法 (2 g)
Rep.1	22.50	19.30	19.70	15.50	13.30	14.20
Rep.2	20.80	18.50	19.90	16.30	14.80	14.50
Rep.3	21.90	18.80	20.70	15.50	14.40	14.30
Rep.4	21.80	18.70	19.80	15.30	14.40	14.10
Rep.5	22.40	18.70	20.10	15.50	14.20	14.30
Rep.6	22.60	18.70	19.90	15.40	13.90	14.40
Min	20.80	18.50	19.70	15.30	13.30	14.10
Max	22.60	19.30	20.70	16.30	14.80	14.50
Median	22.15	18.70	19.90	15.50	14.30	14.30
Mean	22	19	20	16	14	14
SD	0.67	0.27	0.36	0.36	0.52	0.14
RSD(%)	3.1	1.4	1.8	2.3	3.6	1.0

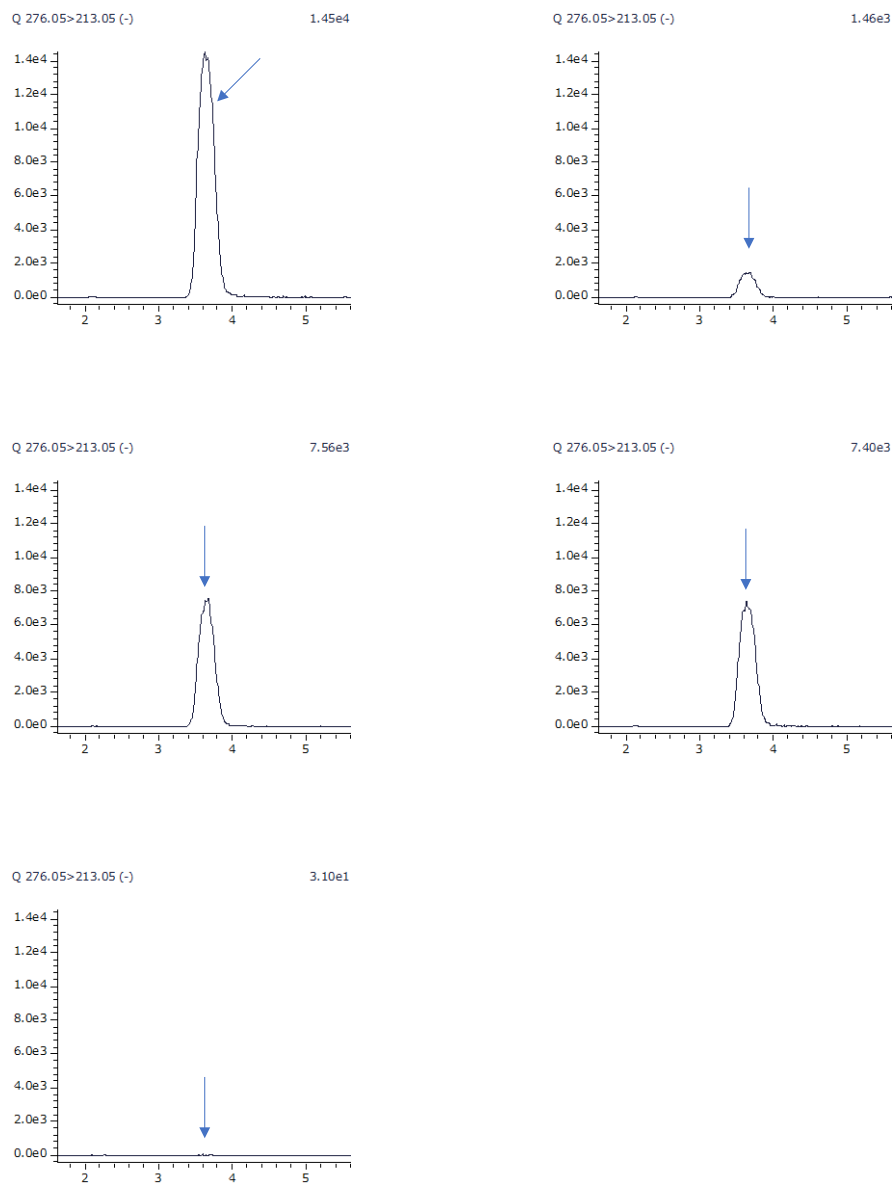
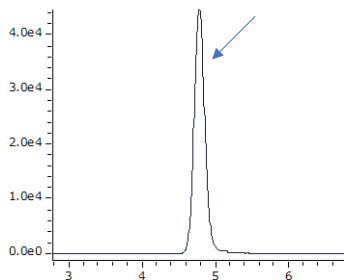
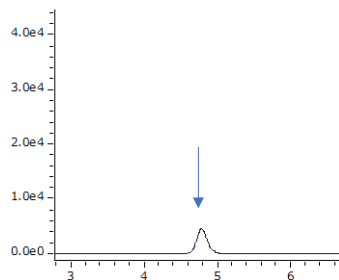


図1 スルホキサフロルのクロマトグラムの一例

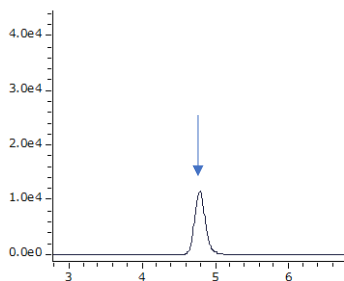
標準溶液 0.002 mg/L
Q 306.16>116.05 (+) 4.46e4



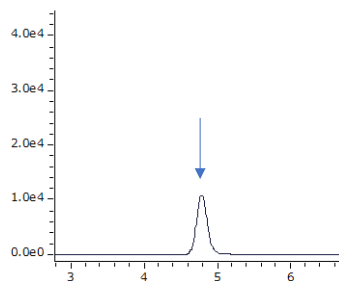
標準溶液 0.0002 mg/L
Q 306.16>116.05 (+) 4.42e3



基本分析法 (インカード試料)
Q 306.16>116.05 (+) 1.15e4



QuEChERS法 (インカード試料)
Q 306.16>116.05 (+) 1.08e4



基本分析法(コントロール試料)
Q 306.16>116.05 (+) 6.80e1

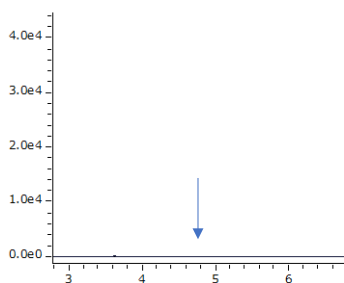


図2 ブプロフェジンのクロマトグラムの一例

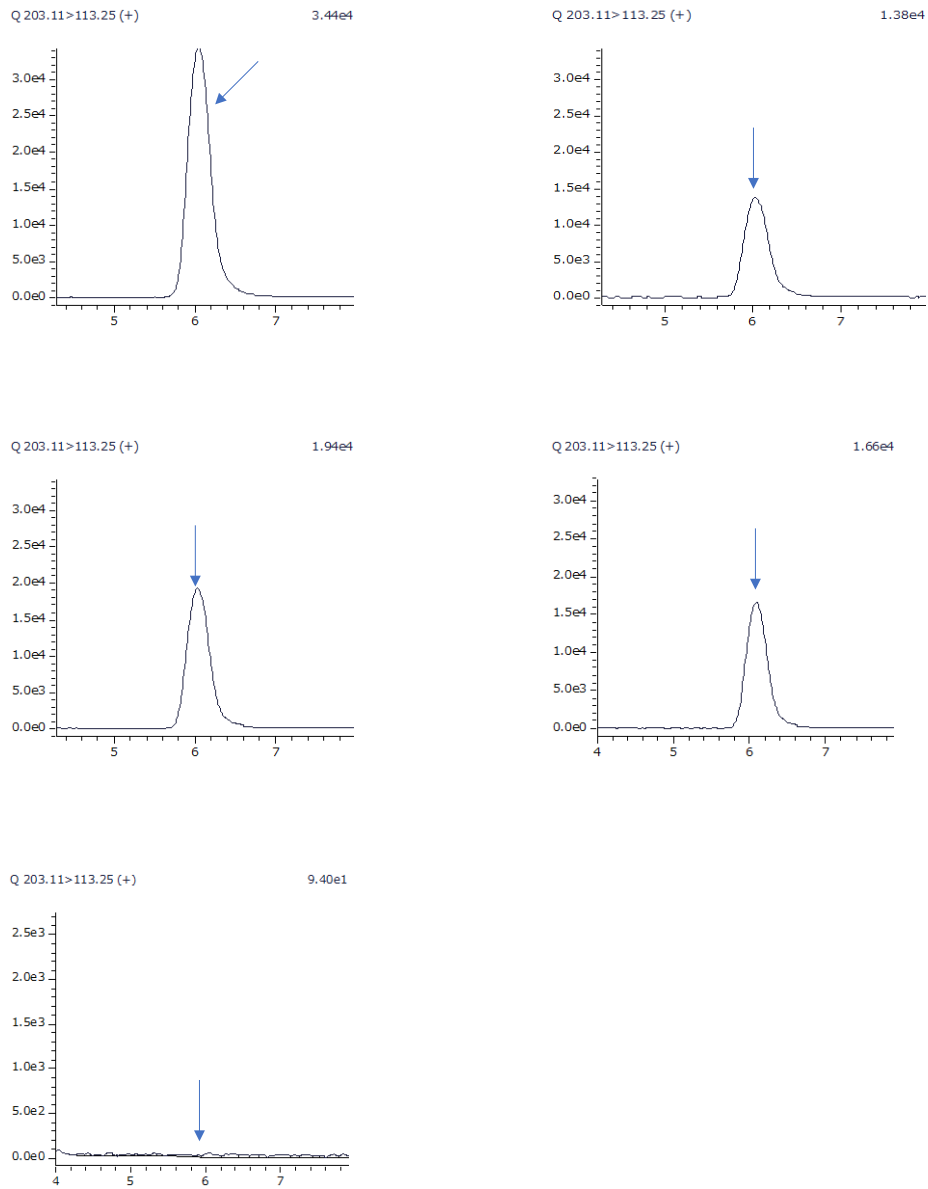


図3 ジノテフランのクロマトグラムの一例

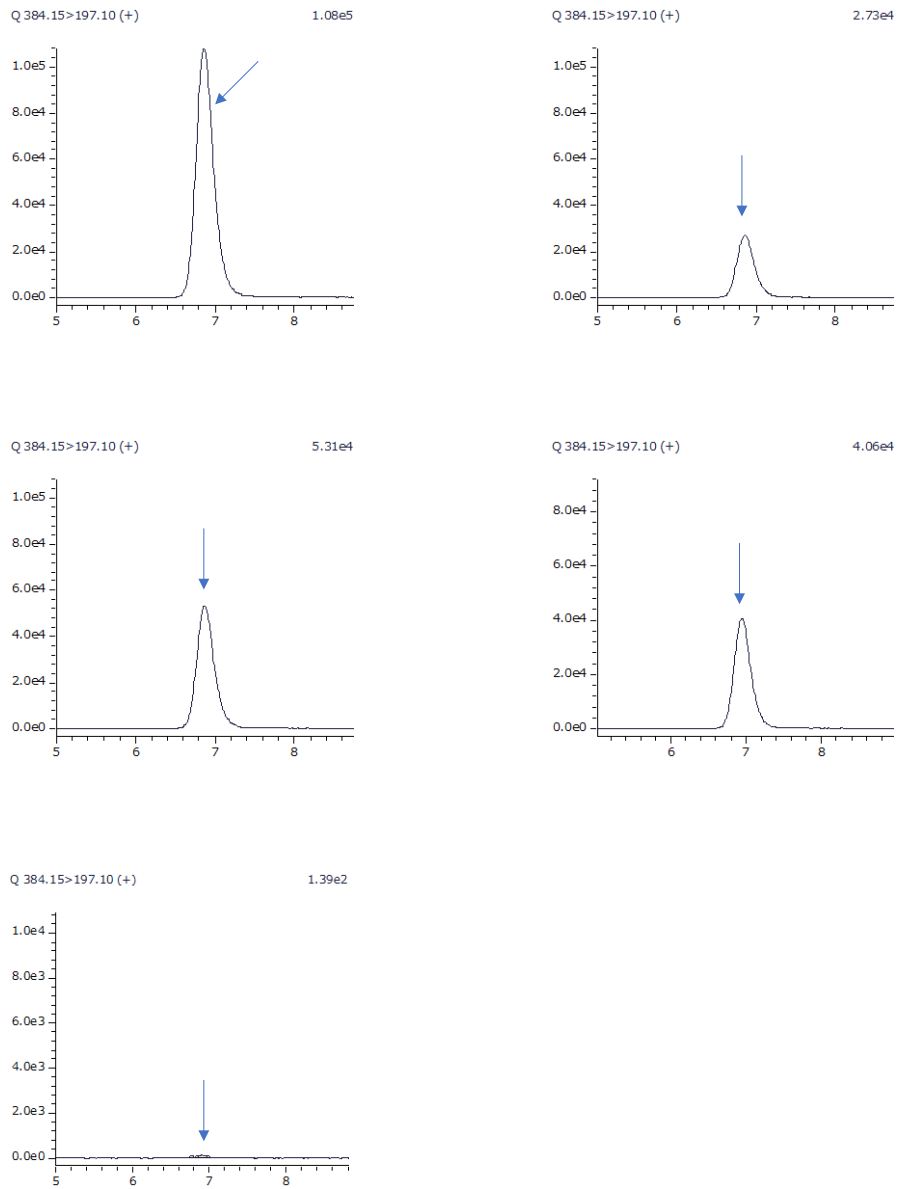


図4 トルフェンピラドのクロマトグラムの一例

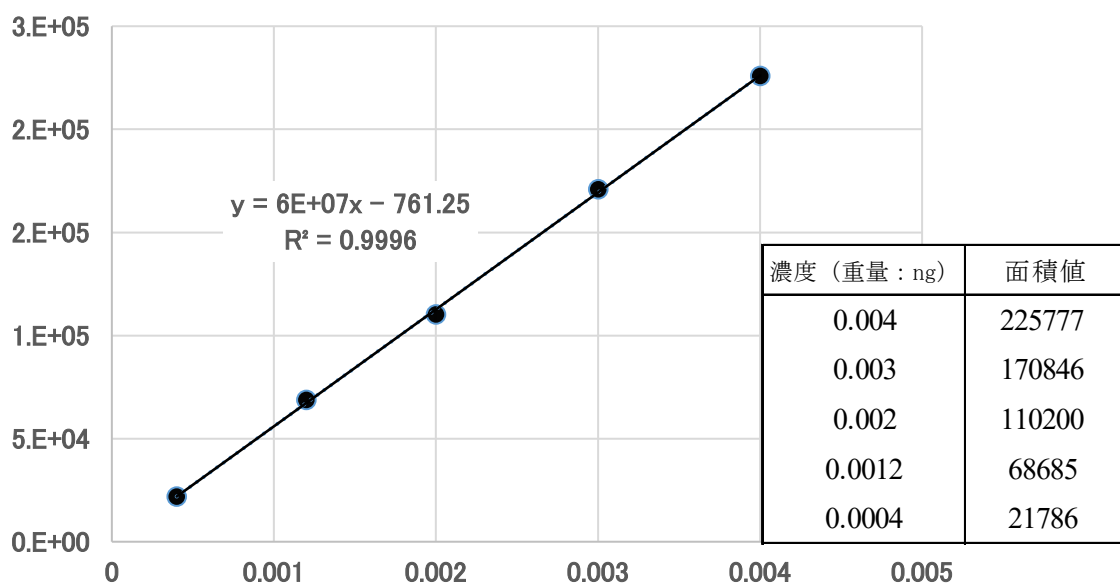


図 5 スルホキサフロル検量線の一例

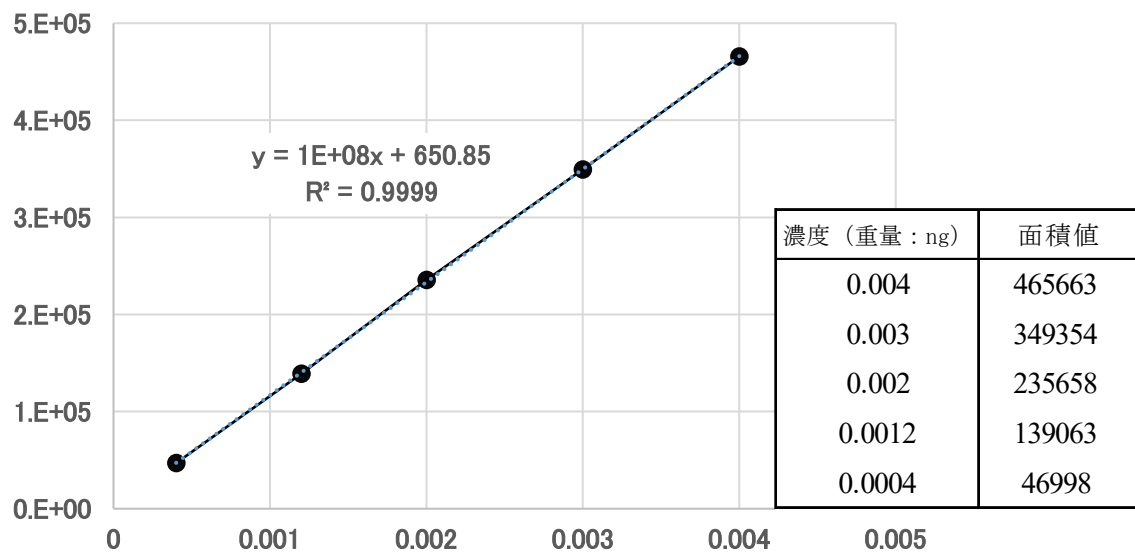


図 6 ブプロフェジン検量線の一例

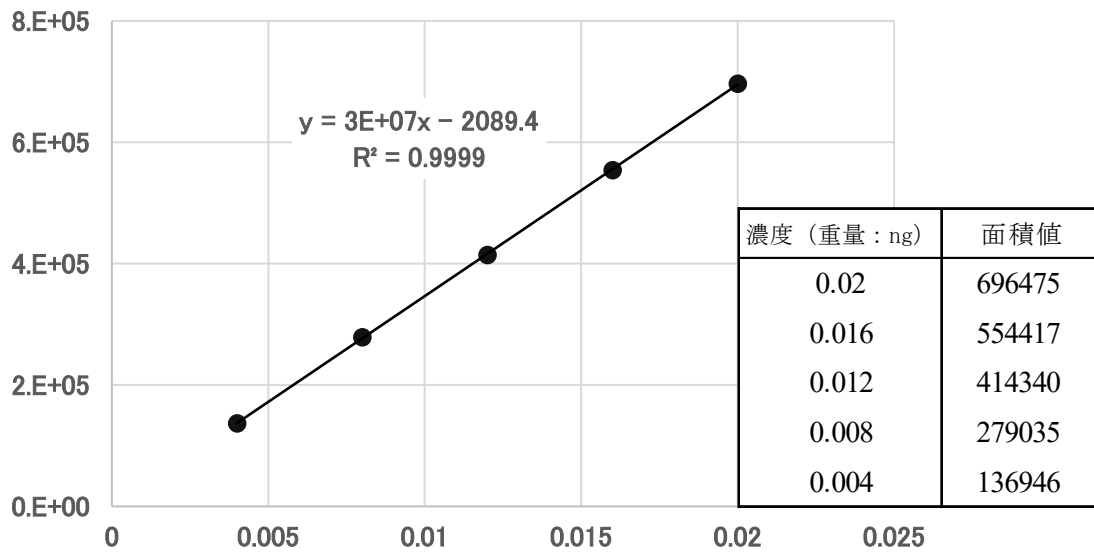


図 7 ジノテフラン検量線の一例

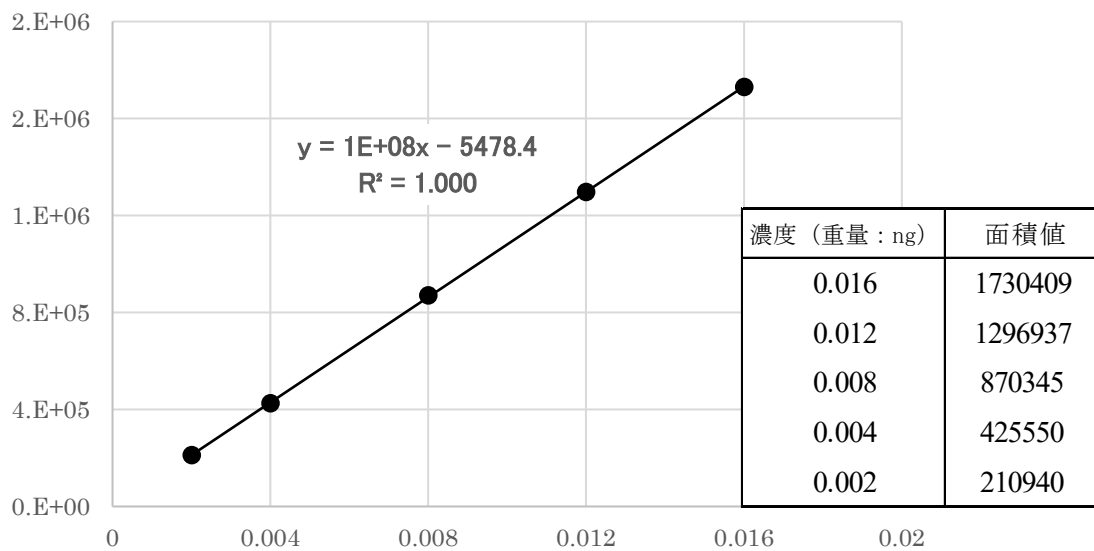


図 8 トルフェンピラド検量線の一例

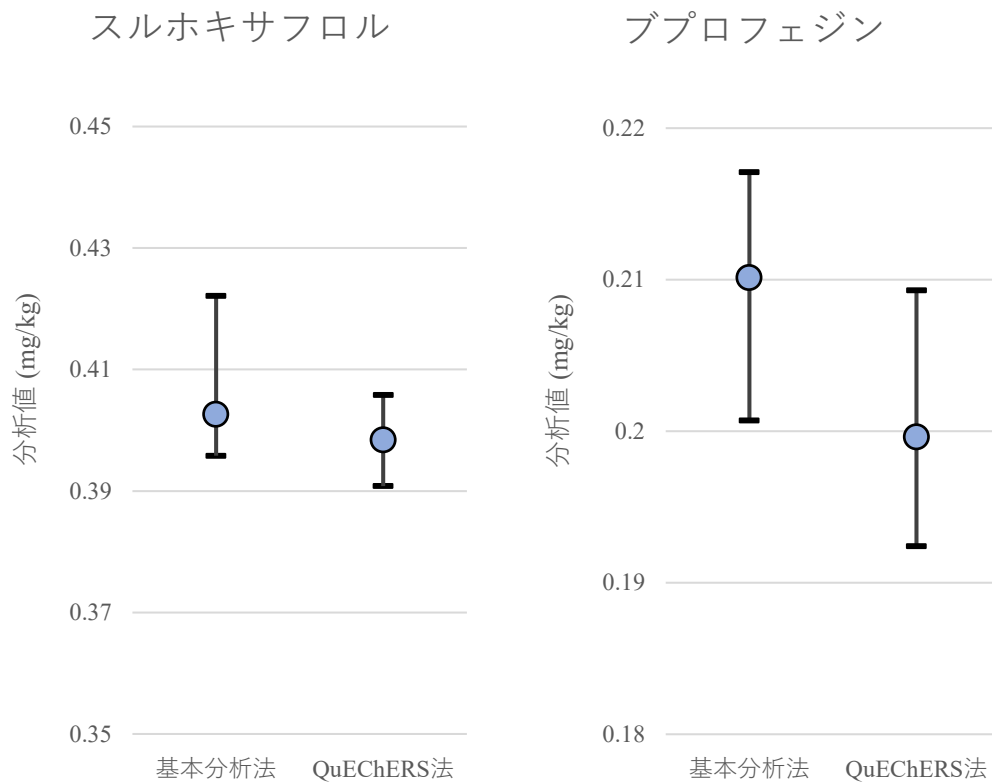


図 9 玄米インカード試料から得られた分析値の比較

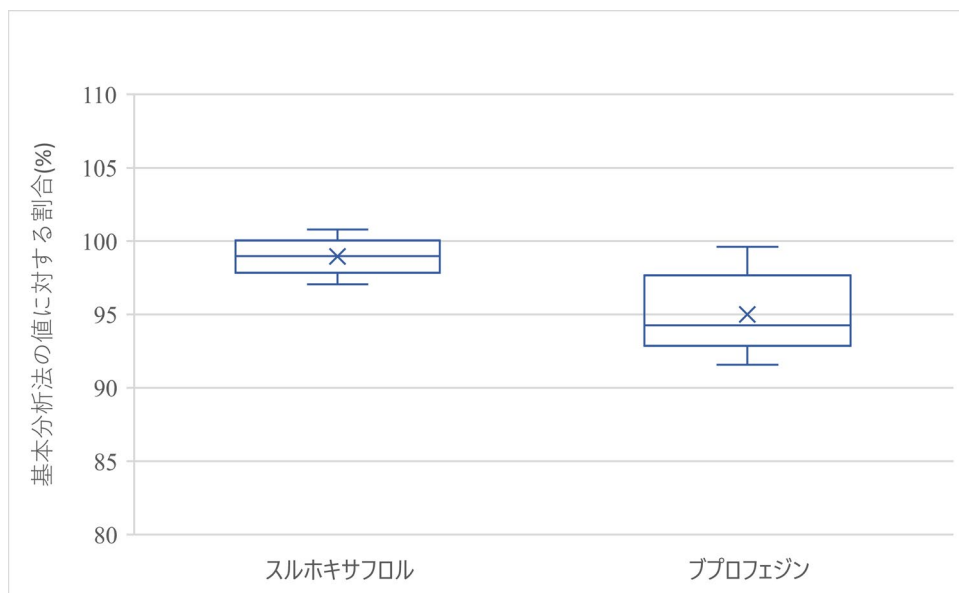


図 10 基本分析法により得られた値を真値とした場合の QuEChERS 法の回収率 (玄米)

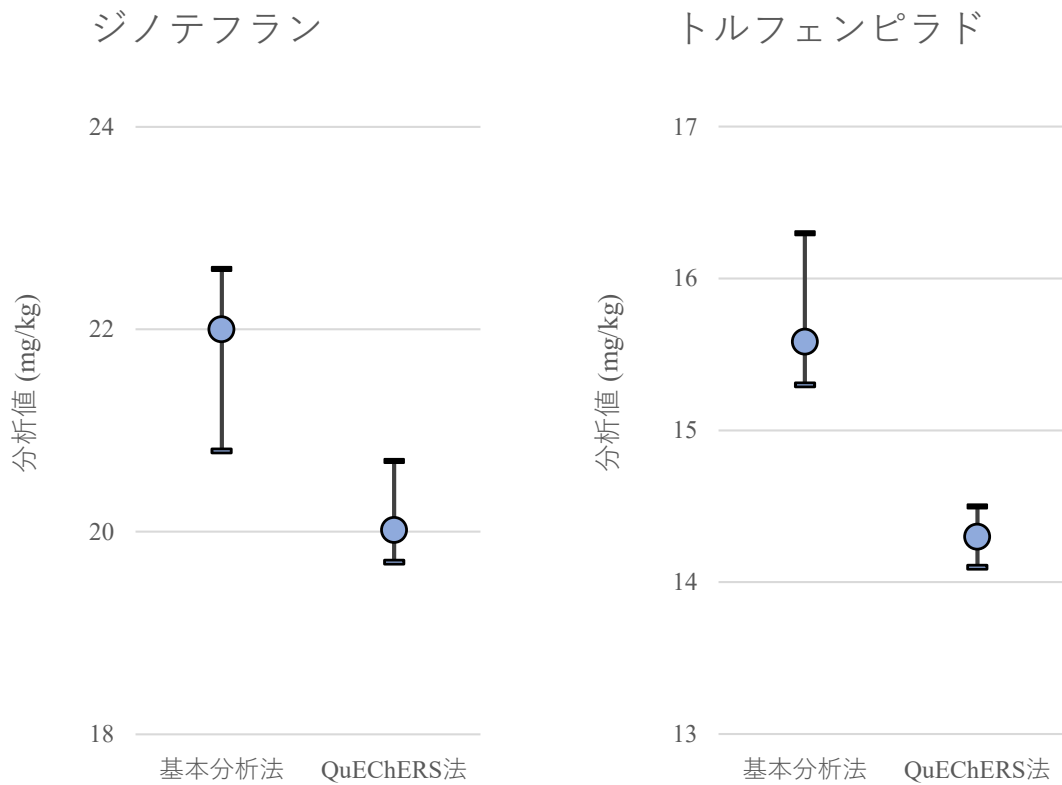


図 11 茶インカード試料から得られた分析値の比較

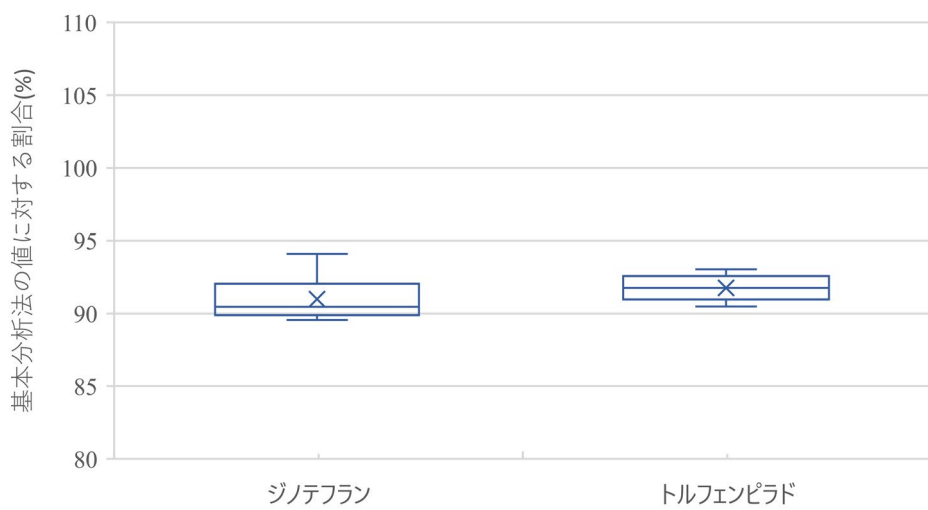


図 12 基本分析法により得られた値を真値とした場合の QuEChERS 法の回収率 (茶)

LC/MS による農薬等の一斉試験法 I(農産物)

1. 分析対象化合物

トルフェンピラド、ブプロフェジンを含む

2. 装置

液体クロマトグラフ・質量分析計(LC-MS)又は液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計(LC-MS/MS)

3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の 3 に示すものを用いる。

グラファイトカーボン/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム(500 mg/500 mg) 内径 12~13 mm のポリエチレン製のカラム管に、上層にグラファイトカーボンを、下層にエチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルを各 500 mg 充填したもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

0.5 mol/L リン酸緩衝液(pH 7.0) リン酸水素二カリウム(K₂HPO₄)52.7 g 及びリン酸二水素カリウム(KH₂PO₄)30.2 g を量り採り、水約 500 mL に溶解し、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液又は 1 mol/L 塩酸を用いて pH を 7.0 に調整した後、水を加えて 1 L とする。各農薬等標準品 各農薬等の純度が明らかなものを用いる。(各農薬等の個別試験法で、標準品の純度が示されている場合にはそれに従う。示されていない場合には、純度 95%以上のものを使用することが望ましい。)

4. 試験溶液の調製

穀類、豆類及び種実類の場合

1) 抽出

試料 10.0 g に水 20 mL を加え、30 分間放置する。これにアセトニトリル 50 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトニトリル 20 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とする。この溶液から正確に 20 mL を分取し、塩化ナトリウム 10 g 及び 0.5 mol/L リン酸緩衝液(pH 7.0)20 mL を加え、10 分間振とうする。静置した後、分離した水層を捨てる。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム(1,000 mg)にアセトニトリル 10 mL を注入し、流出液は捨てる。このカラムに上記のアセトニトリル層を注入し、更にアセトニトリル 5 mL を注入する。全溶出液を採り、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトニトリル及びトルエン(3 : 1)混液 2 mL を加えて溶かす。

2) 精製

グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム(500 mg/500 mg)に、アセトニトリル及びトルエン(3 : 1)混液 10 mL を注入し、流出液は捨てる。この

カラムに1)で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル及びトルエン(3:1)混液 20 mL を注入し、全溶出液を 40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をメタノールに溶かし、正確に 4 mL としたものを試験溶液とする。

茶及びホップの場合

1) 抽出

試料 5.00 g に水 20 mL を加え、30 分間放置する。これにアセトニトリル 50 mL を加えホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトニトリル 20 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とする。この溶液から正確に 5 mL を分取し、アセトニトリル 15 mL を加え、更に塩化ナトリウム 10 g 及び 0.5 mol/L リン酸緩衝液(pH 7.0)20 mL を加え、10 分間振とうする。静置した後、分離した水層を捨てる。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム(1,000 mg)にアセトニトリル 10 mL を注入し、流出液は捨てる。このカラムに上記のアセトニトリル層を注入し、更にアセトニトリル 5 mL を注入する。全溶出液を採り、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトニトリル及びトルエン(3:1)混液 2 mL を加えて溶かす。

2)精製

グラファイトカーボン/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム(500 mg/500 mg)に、アセトニトリル及びトルエン(3:1)混液 10 mL を注入し、流出液は捨てる。このカラムに1)で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル及びトルエン(3:1)混液 20 mL を注入し、全溶出液を 40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をメタノールに溶かし、正確に 1 mL としたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

各農薬等の標準品を適切な溶媒に溶かして標準原液を調製する。各標準原液を適宜混合して適切な濃度範囲の各農薬等を含むメタノール溶液を数点調製し、それぞれ LC-MS 又は LC-MS/MS に注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液を LC-MS 又は LC-MS/MS に注入し、5. の検量線で各農薬等の含量を求める。

7. 確認試験

LC-MS 又は LC-MS/MS により確認する。

8. 測定条件

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径 2~2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3~3.5µm

カラム温度：40°C

移動相：A 液及び B 液について下表の濃度勾配で送液する。

A 液：5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液

B 液：5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液

時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
0	85	15
1	60	40
3.5	60	40
6	50	50
8	45	55
17.5	5	95
35	5	95

イオン化モード：ESI(+)及びESI(-)

主なイオン(m/z)：別表 1 及び別表 2 参照

注入量：5 μ L

保持時間の目安：別表 1

9. 定量限界

別表 1 及び別表 2 参照

10. 留意事項

1) 試験法の概要

各農薬等を試料からアセトニトリルで抽出し、塩析で水を除いた後、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びグラファイトカーボン/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムで精製し、LC-MS 又は LC-MS/MS で定量及び確認する方法である。

11. 類型 C

スルホキサフロル分析法(農産物)

1. 分析対象化合物

スルホキサフロル(各異性体の和)

2. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計(LC-MS/MS)

3. 試薬、試液

スルホキサフロル : 分析用標準品

アセトニトリル : LC/MS 用、残留農薬試験用

アセトン : 残留農薬試験用

水 : PURELAB Flex System(Veolia Water Solutions & Technologies 製)で精製したもの

その他の試薬 : 特級

C18 ミニカラム : Intersep C18-C、1 g/6 mL(ジーエルサイエンス製)

PSA ミニカラム : Intersep Slim-J、500 mg(ジーエルサイエンス製)

4. 試験溶液の調製

1)抽出

均一化した試料 20 g にアセトニトリル及び水(4 : 1, v/v)混液 100 mL を加え、60 分間振とうした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物を 50 mL の同混液で洗い、同様にろ過する。得られたろ液を合わせて、同混液で正確に 200 mL とする。そのうちの 2 mL を取り、2%(v/v)ジエチレングリコール含有アセトン溶液 0.5 mL を添加し、40°C以下で減圧濃縮する。

2)誘導體化、加水分解など

1)で得た濃縮液に 0.01 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 4 mL を加えて混合し、密栓して 50°C で 30 分加水分解する。室温で放冷後、反応液に 0.25%(v/v)ギ酸溶液 1 mL を加え混合する。10 mg/mL(w/v)グルコシダーゼ水溶液 2 mL を加えて混合し、密栓して 50°C で 90 分加水分解し、室温で放冷する。

3)精製

C18 ミニカラム及び PSA ミニカラムの連結カラムによる精製

C18 ミニカラムにアセトニトリル 5 mL 及び水 10 mL を順次注入し、流出液は捨てる。PSA ミニカラムにアセトニトリル 5 mL、水及びアセトニトリル(3 : 2, v/v)混液 5 mL を順次注入し、流出液は捨てる。4. 2)で得た溶液を C18 ミニカラムに注入して流出液は捨てる。水及びアセトニトリル(9 : 1, v/v)混液 10 mL で容器を洗浄し、洗浄液も C18 ミニカラムに注入して、流出液は捨てる。C18 ミニカラムの溶出口に PSA ミニカラムを連結し、水及びアセトニトリル(3 : 2, v/v)混液 8 mL を注入し、溶出液を回収する。同混液で 10 mL に定容し、試験溶液とする。

5. 検量線の作成

スルホキサフロル標準品をアセトニトリルに溶解し、10 µg/mL の標準原液を調製する。調製した標準原液をアセトニトリルで希釈して検量線用の標準液を数点調製し、それぞれ LC-MS/MS に注入し、ピーク面積法で検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、5. の検量線を用いて含量を定量する。

7. 測定条件

(例)

HPLC ; 1200 HPLC(Agilent Technologies 製)

MS ; 6410 Triple Quad(Agilent Technologies 製)

カラム : Synergi Hydro-RP 8A、粒径 ; 4 µm、2.0 mm i.d.×150 mm (Phenomenex 製)

カラム温度 : 40 °C

移動相 : 移動相 A ; 0.1%酢酸

移動相 B ; 0.1%酢酸含有アセトニトリル(v/v)

グラジエント

プログラム :

時間(分)	0.0	0.5	13.0	17.0	STOP
移動相 A(%)	90	90	5	5	90
移動相 B(%)	10	10	95	95	10

流量 : 0.2 mL/min

注入量 : 10 µL

保持時間の目安 : スルホキサフロル ; 9.6 分

イオン化モード : ESI(+)

イオン検出

モニタリング

イオン :

	プリカーサーイオン (<i>m/z</i>)	プロダクトイオン (<i>m/z</i>)
スルホキサフロル	278.1	174.2

法 : MRM 法

8. 定量限界

0.01 ppm

9. 添加回収試験を実施した食品

ほうれんそう

ジノテフラン試験法(農産物)

1. 分析対象化合物

ジノテフラン

2. 装置

紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ(HPLC-UV)

液体クロマトグラフ・質量分析計(LC/MS)

3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

ジノテフラン標準品 本品はジノテフラン 99%以上を含み、融点は 107.5°Cである。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

穀類、豆類及び種実類の場合は試料 10.0 g に水 20 mL を加え、2 時間放置する。

果実、野菜及びハーブの場合は試料 20.0 g を量り採る。

茶の場合は試料 5.00 g に水 20 mL を加え、2 時間放置する。

これにアセトニトリル 100 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物に、アセトニトリル 50 mL を加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせて、アセトニトリルを加え正確に 200 mL とする。この 50 mL(茶の場合は 10 mL)を 40°C以下で約 5 mL まで濃縮する。

2)精製

(1)多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィー

1)で得られた溶液に水 10 mL を加え、多孔性ケイソウ土カラム(20 mL 保持用)に流し入れ、10 分間放置する。n-ヘキサン 100 mL を注入し、流出液は捨てる。次いで酢酸エチル 200 mL を注入し、溶出液を 40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に酢酸エチル 5 mL を加えて溶かす。

(2)グラファイトカーボンカラムクロマトグラフィー

グラファイトカーボンミニカラム(500 mg)に酢酸エチル 5 mL を注入し、流出液は捨てる。このカラムに(1)で得られた溶液を注入した後、酢酸エチル 15 mL を注入する。全溶出液を 40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に酢酸エチル 5 mL を加えて溶かす。

(3)中性アルミナカラムクロマトグラフィー

中性アルミナミニカラム(1,710 mg)に酢酸エチル 5 mL を注入し、流出液は捨てる。このカラムに(2)で得られた溶液を注入した後、酢酸エチル 15 mL を注入し、流出液は捨てる。次いでアセトン 20 mL を注入し、溶出液を 40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物を水に溶解し、穀類、豆類、種実類及び茶の場合は正確に 1 mL、果実、野菜及びハーブの場合は正確に 2 mL としたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

ジノテフラン標準品の 0.025～0.5 mg/L 水溶液を数点調製し、それぞれ 40 μ L を HPLC に注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液 40 μ L を HPLC に注入し、5 の検量線でジノテフランの含量を求める。

7. 確認試験

LC/MS により確認する。

8. 測定条件

1) HPLC

検出器：UV(波長 270 nm)

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル(粒径 3～5 μ m)、内径 4.6 mm、長さ 150～250 mm

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：アセトニトリル及び水(1：9)混液

保持時間の目安：8分

2) LC/MS

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル(粒径 6～5 μ m)、内径 2～2.1 mm、長さ 150 mm

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：アセトニトリル及び 2 mmol/L 酢酸アンモニウム(1：9)混液

イオン化モード：ESI(+)

主なイオン(m/z)：203

注入量：2 μ L

保持時間の目安：5分

9. 定量限界

0.01 mg/kg(茶の場合は 0.1 mg/kg)

10. 留意事項

1) 試験法の概要

ジノテフランを試料からアセトニトリルで抽出し、多孔性ケイソウ土カラム、グラファイトカーボンミニカラム及び中性アルミナミニカラムにより精製した後、HPLC-UV で測定、LC/MS で確認する方法である。

2) 注意点

(1)抽出時、豆類等の試料が十分に分散しない場合には、水で膨潤させた試料にケイソウ土を加えた後、アセトニトリルを加えてホモジナイズし、抽出効率の向上を図る。

(2)夾雑成分の多い試料では HPLC 分析において、ジノテフラン溶出後に移動相を十分に流しカラム内に残存する夾雑物を溶出させた後に、次の分析を行う。

11. 参考文献

環境省告示第 35 号「ジノテフラン試験法」(平成 14 年 4 月 24 日)

12. 類型 C