

令和4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

国際統合した食品安全行政の下でこそ、農産物等の輸出が促進されうる。農薬残留物の規制に関する国際統合としては、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取組となる。インポートトレランス申請時には、規制目的で使用可能な、農産物等に含まれる農薬残留物を対象とする簡易で迅速な分析法を輸出先国に提示することも必要とされる。しかし、そのような分析法のわが国における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、農産物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、メプロニル並びにトリシクラゾールの残留物を含む玄米・インカード試料、及びチアクロプリド並びにピフルブミド(及びピフルブミド代謝物 B)を含む茶・インカード試料の作製に成功し、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とともに、性能差について考察した。

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

農研機構植物防疫研究部門果樹茶病虫害防除研究領域

佐藤安志

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

農林水産物・農産加工品(農産品等)の輸出促進は、現在のわが国における重要な政策の1つであり政府方針である。令和3年には、この政府方針に沿った取組の成果として、農産品等の輸出額が初めて1兆円を達成した。今後も輸出額を継続的に増加させるためには、政府方針に沿った取組の基礎となり、輸出先国による受容性の向上につながることから、食品安全行政の国際整合を進めることが極めて重要である。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の際には、農薬残留物濃度データ等の他に、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、そのような分析法の開発事例は少なく、また十分に検証されてもおらず、その結果、国内導入も進んでいない。より高性能であるが煩雑な工程を含む分析法が主として、現在も広く用いられている。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。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インポート申請時等において提出が求められるだけでなく、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重要課題の1つである。

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)に着目して、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

- ・チアクロプリド標準品：純度 98.1% (富士フィルム和光純薬製)
- ・トリシクラゾール標準品：純度 98.85% (Dr.Ehrenstorfer 製)
- ・ピフルブミド標準品：純度 98.6% (富士フィルム和光純薬製)
- ・ピフルブミド代謝物 B 標準品：純度 99.4% (富士フィルム和光純薬製)
- ・メプロニル標準品：純度 99% (富士フィルム和光純薬製)

#### 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

- ・チアクロプリド標準原液：チアクロプリド標準品 25 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定容し、これをチアクロプリド標準原液(500 mg/L)とした。
- ・トリシクラゾール標準原液：トリシクラゾール標準品 25 mg を精密に量り、上記と同様に調製し、トリシクラゾール標準原液(500 mg/L)とした。
- ・メプロニル標準原液：メプロニル標準品 25 mg を精密に量り、上記と同様に調製し、メプロニル標準原液(500 mg/L)とした。
- ・ピフルブミド標準原液：ピフルブミド標準品 10 mg を精密に量り、上記と同様に調製し、ピフルブミド標準原液(200 mg/L)とした。
- ・ピフルブミド代謝物 B 標準原液：ピフルブミド代謝物 B 標準品 10 mg を精密に量り、上記と同様に調製し、ピフルブミド代謝物 B 標準原液(200 mg/L)とした。

##### 添加用混合標準溶液の調製

- ・トリシクラゾール及びメプロニル添加用混合標準溶液(各 1.0 mg/L)：トリシクラゾール標準原液(500 mg/L)及びメプロニル標準原液(500 mg/L)それぞれ 1.0 mL を 25 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、混合標準溶液(20 mg/L)を調製した。次いで、その 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、添加用混合標準溶液(各 1.0 mg/L)を調製した。

・チアクロプリド、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B 添加用混合標準溶液(10 mg/L、5.0 mg/L 及び 1.0 mg/L)：チアクロプリド標準原液(500 mg/L)1.0 mL、ピフルブミド標準原液(200 mg/L)2.5 mL、及びピフルブミド代謝物 B 標準原液 2.5 mL を 25 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た。その 10.0 mL、5.0 mL 又は 1.0 mL をそれぞれ 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、添加用混合標準溶液(10.0 mg/L、5.0 mg/L 又は 1.0 mg/L)を調製した。

#### 検量線用混合標準溶液の調製

トリシクラゾール及びメプロニルの場合には表 1 に、チアクロプリド、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B 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. 5.114)

[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 200 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とおりである。

#### 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 になるようにトリシクラゾール及びメプロニル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(1 mg/L)0.5 mL を、それぞれ量りとし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 2.0 g 採取後、それぞれの試料について濃度が 1 mg/kg になるようにチアクロプリド、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B 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、添加用混合標準溶液(10 mg/L)200 µL を、それぞれ量りとし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製に用いる農薬有効成分の選択においては、残留の程度、土壌残留等による圃場への影響、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、稲の栽培時にはトリシクラゾール並びにメプロニルを、チャノキの栽培時にはチアクロプリド並びにピフルブミ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、残留物として農産品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。ピフルブミドに関しては、ピフルブミド代謝物 B

(3'-isobutyl-1,3,5-trimethyl-4'-[2,2,2-trifluoro-1-methoxy-1-(trifluoromethyl)ethyl]pyrazole-4-carboxanilide (P-NH)が残留物の定義に含まれる。なお、ピフルブミドの残留物の定義は、わが国と国際標準である JMPR との間で一致していない。わが国における規制を目的とした残留物の定義にはピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B が含まれる。一方、JMPR による残留物の定義には、暴露評価を目的とする場合のみ、ピフルブミド代謝物 B(P-NH)が含まれる。

インカード試料の作製方法については、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。

トリシクラゾール(Tricyclazole):1.41

メプロニル(Mepronil):3.66

チアクロプリド(Thiacloprid):1.26

ピフルブミド(Pyflubumide):5.34

ピフルブミド代謝物 B (P-NH) :5.02

## 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トリシクラゾール及びメプロニル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(LC/MS 一斉試験法 I)及び別添2及び別添3に示した個別分析法(トリシクラゾール/農産物、アラクロール等メプロニルを含む/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。アセトン 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、アセトンを加えて正確に 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トリシクラゾール及びメプロニルを対象とする 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、茶試料に含まれるチアクロプリド及びピフルブミ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(LC/MS 一斉試験法 I)及び別添 4 に示した個別分析法(ピフルブミド/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、チアクロプリド及びピフルブミドを対象にそれぞれ以下の分析法を構築し使用した。

##### ・チアクロプリド

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 2 mL 分取し、メタノールで 25 mL に定容し、保存安定性試験においてはこれを測定用溶液とした。その他の分析においては、定容した溶液の 2 mL を分取し、メタノールで 10 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。

##### ・ピフルブミド及びピフルブミド代謝物

試料 5.0 g に水 20 mL を加え 30 分間静置した。アセトン 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

留物にアセトン 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、アセトンを加えて正確に 200 mL とし抽出液とした。抽出液を 4 mL 分取し、メタノールで 25 mL に定容し、保存安定性試験においてはこれを測定用溶液とした。その他の分析においては、定容した溶液の 2.5 mL を分取し、メタノールで 10 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 QuEChERS 法

本研究では、茶試料に含まれるチアクロプリド、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B 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 25 mL に定容した。チアクロプリドの分析時には定容液 2mL を分取しメタノールで 20 mL に定容し測定用溶液とした。ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B の分析時には定容液 2.5 mL を分取しメタノールで 10 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。

#### B-1-4-2-2. 測定条件

1) トリシクラゾール測定のための 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(40 : 60)

流量 : 0.2 mL/min

注入量 : 4  $\mu$ L

コリジョンガス : アルゴン

モニターイオン等 : 表 3 のとおり

2) メプロニル測定のための 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  $\mu$ L

コリジョンガス : アルゴン

モニターイオン等 : 表 4 のとおり

3) チアクロプリド測定のための 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(65 : 35)

流量 : 0.2 mL/min

注入量 : 1  $\mu$ L

コリジョンガス : アルゴン

モニターイオン等 : 表 5 のとおり

4) ピフルブミド及びピフルブミド代謝物

B 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 : 4  $\mu$ L

コリジョンガス : アルゴン

モニターイオン等 : 表 6 のとおり

#### 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 $\geq 0.999$ 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トリシクラゾール並びにメプロニルの分析時には、下式に従い、試料における濃度を算出した。

- ・トリシクラゾール濃度(mg/kg) = 検量線から求めた重量 (ng) 20 mL / 注入量 (μL) × 200 mL / 1 mL × 1/10 g
- ・メプロニル濃度(mg/kg) = 検量線から求めた重量 (ng) × 20 mL / 注入量 (μL) × 200 mL / 1 mL × 1/10 g

#### 玄米試料を対象とする QuEChERS 法

EN15662 に基づき構築した QuEChERS 法によるトリシクラゾール並びにメプロニルの分析時には、下式に従い、試料における濃度を算出した。

- ・トリシクラゾール濃度(mg/kg) = 検量線から求めた重量 (ng) × 100 mL / 注入量 (μL) × 10 mL / 0.5 mL × 1/5 g
- ・メプロニル濃度(mg/kg) = 検量線から求めた重量 (ng) × 100 mL / 注入量 (μL) × 10 mL / 0.5 mL × 1/5 g

#### 保存安定性試験時の分析

保存安定性試験におけるトリシクラゾール並びにメプロニルの分析時には、下式

に従い、試料における濃度を算出した。

- ・トリシクラゾール及びメプロニル濃度 (mg/kg) = 検量線から求めた重量 (ng) × 25 mL / 注入量 (μL) × 200 mL / 2 mL × 1/10 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チアクロプリド、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B の分析時には、下式に従い、試料における濃度を算出した。

- ・チアクロプリド濃度(mg/kg) = 検量線から求めた重量 (ng) × 25 mL / 注入量 (μL) × 200 mL / 2 mL × 10 mL / 2 mL × 1/5 g
- ・ピフルブミド濃度(mg/kg) = 検量線から求めた重量 (ng) × 25 mL / 注入量 (μL) × 200 mL / 4 mL × 10 mL / 2.5 mL × 1/5 g
- ・ピフルブミド代謝物 B 濃度(mg/kg) = 検量線から求めた重量 (ng) × 25 mL / 注入量 (μL) × 200 mL / 4 mL × 10 mL / 2.5 mL × 1/5 g × 25 mL / 注入量 (μL) × 200 mL / 4 mL × 10 mL / 2.5 mL × 1/5 g

#### 茶試料を対象とする QuEChERS 法

EN15662 に基づき構築した QuEChERS 法によるチアクロプリド、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B の分析時には、下式に従い、試料における濃度を算出した。

- ・チアクロプリド濃度(mg/kg) = 検量線から求めた重量 (ng) × 25 mL / 注入量 (μL) × 10 mL / 0.5 mL × 20 mL / 2 mL × 1/2 g
- ・ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B 濃度(mg/kg) = 検量線から求めた重量 (ng) × 25 mL / 注入量 (μL) × 10 mL / 0.5 mL × 10

mL/2.5 mL×1/2 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、以下のとおり、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

・トリシクラゾールについて：0.0008 ng×20 mL/4 μL×200 mL/1 mL×1/10 g=0.08 mg/kg

・メプロニルについて：0.0004 ng×20 mL/2 μL×200 mL/1 mL×1/10 g=0.08 mg/kg

##### 玄米試料を対象とする QuEChERS 法の LOQ

・トリシクラゾールについて：0.0008 ng×100 mL/4 μL×10 mL/0.5 mL×1/5 g=0.08 mg/kg

・メプロニルについて：0.0004 ng×100 mL/2 μL×10 mL/0.5 mL×1/5 g=0.08 mg/kg

##### 茶試料を対象とする基本分析法の LOQ

・チアクロプリドについて：0.0002 ng×25 mL/1 μL×200 mL/2 mL×10 mL/2 mL×1/5 g=0.5 mg/kg

・ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B について：0.0016 ng×25 mL/4 μL×200 mL/4 mL×10 mL/2.5 mL×1/5 g=0.4 mg/kg

##### 茶試料を対象とする QuEChERS 法の LOQ

・チアクロプリドについて：0.0002 ng×25 mL/1 μL×10 mL/0.5 mL×20 mL/2 mL×1/2 g=0.5 mg/kg

・ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B について：0.0016 ng×25 mL/4 μL×10

mL/0.5 mL×10 mL/2.5 mL×1/2 g=0.4 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 4 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トリシクラゾール、メプロニル、チアクロプリド、ピフルブミドを対象とする分析法は、アセトンあるい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/MS)、GC-FTDあるいはGC-NPD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。測定系を同一にすることにより、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って考えた。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 5、図 6～図 10 に示す。図 1～図 5 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トリシクラゾール、メプロニル、チアクロプリド、ピフルブミド、ピフルブミド代謝物 B 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、精製工程や誘導體化の行程を含む、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しれない。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、分析が適切に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トリシクラゾール及びメプロニルの MRL はそれぞれ 3 mg/kg と 2 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製している。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トリシクラゾール及びメプロニルの濃度を 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 になるようにトリシクラゾール及びメプロニル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 法により得られたトリシクラゾール及びメプロニル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、玄米中のトリシクラゾール及びメプロニル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 3%未満、回収率は 90%～105% 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トリシクラゾール及びメプロニルの分析値を基本分析法と QuEChERS 法との間で比較した結果、QuEChERS 法を用いた場合のトリシクラゾール回収率が若干低値となった。これらの回収率を与えたトリシクラゾール分析値を対象に unpaired 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、メプロニ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チアクロプリド及びピフルブミドの MRL はそれぞれ 25 mg/kg と 50 mg/kg である。ピフルブミドに対する MRL は、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B をピフルブミドに換算したものの和として設定されている。従って、ピフルブミド残留物の濃度が MRL の値を下回り、食品規格に適合しているかを判定するための検査においては、ピフルブミド並びにピフルブミド代謝物 B の両方が分析対象化合物となる。

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製している。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チアクロプリド、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B 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 になるようにチアクロプリド、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B 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 法により得られたチアクロプリド、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B の分析値をそれぞれ表 9、表 10 及び表 11 に示す。

本研究においては、EN15662 を基礎として構築した QuEChERS 法を荒茶に適用する場合の試料量は、当該規格の指示に従い 2 g とした。これに対し、公的に示された分析法を基礎として構築した基本分析法を荒茶に適用する場合の試料量は、公的に示された分析法の指示に従い 5 g とした。その結果として、性能を比較する分析法の試料量に違いが生じた。なお、QuEChERS 法を荒茶に適用する場合の試料量を 5 g とした場合、水並びにアセトニトリルを添加した後のスラリー状態が十分でないことは、昨年度の研究成果として報告したとおりである。スラリー状態を改善するための水やアセトニトリル添加量の増加が容易に考えられるが、どのような量と比率で増加するかによって異なる分析法に派生することを意識することが重要であると考える。

茶試料中のチアクロプリド、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B 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チアクロプリド、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B 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 unpaired 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. マトリクス効果の検証

図1～図5に示したクロマトグラムにより、分析対象化合物に由来する左右対称のピークが検出され、その測定を妨害するピークがないことが確認された。このクロマトグラムによる確認に加え、測定用溶液に標準品を添加したマトリクス添加標準溶液の測定を通じて、試料マトリクス由来成分の測定に対する影響を検証した。

コントロール試料を基本分析法及び QuEChERS 法により操作し、管理用試料の添加濃度にあわせて標準品を添加した。こうして調製したマトリクス添加標準溶液と、溶媒を用いて通常どおり調製した対応する濃度の標準溶液を交互に 2 回測定し、

マトリクス添加標準溶液から得られたピーク面積値の平均値と溶媒標準溶液から得られたピーク面積値の平均値の比を求めた。トリシクラゾールのピーク面積値比は基本分析法で 1.024、QuEChERS 法で 1.002、メプロニルのピーク面積値比は基本分析法で 0.987、QuEChERS 法で 0.980、チアクロプリドのピーク面積値比は基本分析法で 1.028、QuEChERS 法で 1.039、ピフルブミドのピーク面積値比は基本分析法で 1.005、QuEChERS 法で 1.001、ピフルブミド代謝物 B のピーク面積値比は基本分析法で 0.989、QuEChERS 法で 0.992 であった。いずれの化合物についても、基本分析法と QuEChERS 法ともに、分析値のバイアスにつながるような試料由来マトリクス成分が測定用溶液に含まれていないこと、すなわち、いわゆるマトリクス効果がないことが確認された。

### CD-1-1-4. 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、玄米試料の場合には 0 日目及び 44 日目に、茶試料の場合には 0 日目及び 110 日目に基本分析法を用いて併行分析(n=2)した。結果を試料ごとに以下に示す。

#### 玄米試料

0.1 mg/kg の濃度でトリシクラゾール及びメプロニルを含む玄米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、トリシクラゾール及びメプロニル

ともに、0日目と44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44日目の分析値の割合(残存率%)を計算した結果、トリシクラゾール及びメプロニルのそれぞれについて94%及び95%であった。これらの結果により、トリシクラゾールとメプロニルは、凍結保存された試料において最低44日間は安定であることが確認された。

#### 茶試料

0.1 mg/kgの濃度でチアクロプリド、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物Bを含む茶管理用試料を凍結保存の前後に分析した。表13に示したとおりチアクロプリド、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物Bとともに、0日目と110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110日目の分析値の割合(残存率%)を計算した結果、チアクロプリド、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物Bのそれぞれについて109%、99%及び101%であった。これらの結果により、チアクロプリド、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物Bは、凍結保存された試料において最低110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を通じた 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約40日、茶試料については約80日であり、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。得られたトリシクラゾールとメプロニルの分析値を表14及び図11に示す。

玄米インカード試料から得られたトリシクラゾールの分析値は、基本分析法を用いた場合には1.819 mg/kg~1.887 mg/kgの範囲に含まれ平均値は1.850 mg/kg、QuEChERS法を用いた場合には1.752 mg/kg~1.856 mg/kgの範囲に含まれ平均値は1.820 mg/kgであった。QuEChERS法により得られた分析値の範囲が若干、低値側に広い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95%~100%と推定された(図12)。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、玄米に含まれるトリシクラゾー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。

先述のとおり、トリシクラゾールを含む管理用試料を用いた検討においては、基本分析法に比べ QuEChERS 法により得られる分析値が若干低値となり noparid t-test を用いた検定により有意差が認められている。つまり、トリシクラゾールに関しては、管理用試料とインカード試料を用いた検討の間で検定結果が異なることとなったが、その原因は不明である。インカード試料分析時には、基本分析法と QuEChERS 法の抽出力が同程度になった結果かもしれないが証明はできない。管理用試料の濃度が 0.1 mg/kg であるのに対し、インカード試料の濃度がその 20 倍程高いことが分析値に影響した可能性もある。小数試料の繰り返し分析結果から区別することが困難な程に、性能差が小さいともいえるだろう。このような場合、実際に分析する試料により近い特性を持つと考えられるインカード試料の分析に基づく性能評価結果を優先すべきと考える。

玄米インカード試料から得られたメプロニルの分析値は、基本分析法を用いた場合には 1.309 mg/kg～1.366 mg/kg の範囲であり平均値は 1.339 mg/kg、QuEChERS 法を用いた場合には 1.318 mg/kg～1.382 mg/kg の範囲であり平均値は 1.362 mg/kg であった。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、有意差が認められなかった( $P < 0.01$ )。基本分析法と QuEChERS 法を用いて得られる分析値に有意差が認められなかったこと

は、管理用試料の場合と同じである。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 98%～103% と推定される(図 12)。この結果に基づき、妥当性が確認されたと判断してよい。

トリシクラゾール及びメプロニルの logPow はそれぞれ 1.41 及び 3.66、水溶解度は 596.0 mg/L(20-25 °C) 及び 8.23 mg/L(20°C)であり、トリシクラゾールの脂溶性が比較的強く水溶性が高いものの、これらの物理的・化学的特性は分析値に影響を与えなかったものと考えられた。これまでの研究において、エトフェンプロックスやブプロフェジンのよう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ている。しかし、logPow や水溶解度を指標とした脂溶性の高さ以外の要素が、試料となる食品と農薬残留物の組合せによっては、QuEChERS 法の性能に影響を与える可能性も考えられる。

#### 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。得られたチアクロプリド、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B の分析値を表 15 及び図 13 に示す。

茶インカード試料から得られたチアクロプリドの分析値は、基本分析法を用いた場合には 10.91 mg/kg～11.15 mg/kg の範囲

に含まれ平均値は 11.00 mg/kg、QuEChERS 法を用いた場合には 10.54 mg/kg～10.75 mg/kg の範囲に含まれ平均値は 10.66 mg/kg であった。上記のとおり、基本分析法と QuEChERS 法を用いて茶試料から得られたチアクロプリド分析値の範囲には重複がない。このことは、一般に考えれば、分析に起因す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 96%～98%と推定された(図 14)。

茶インカード試料から得られたピフルブミドの分析値は、基本分析法を用いた場合には 1.98 mg/kg～2.08 mg/kg の範囲であり平均値は 2.05 mg/kg、QuEChERS 法を用いた場合には 1.97 mg/kg～2.04 mg/kg の範囲であり平均値は 2.01 mg/kg であった。基本分析法と QuEChERS 法により得られたピフルブミド分析値は良く一致しており範囲の重なりも非常に大きかった。noparid t-test を用いた検定により有意差も認められていない。そのため、先述のトリシクラゾールと同様に、管理用試料から得られた分析値とインカード試料から得られた分析値との間で検定結果が矛盾することになった。検定結果に矛盾を生じた原因についても、トリシクラゾールと同様に不明である。ただし、トリシクラゾールについて得られた結果の原因の 1 つとして考察した濃度については、ピフルブミドに

については 2 倍程度の違いしかないため、原因から除外されるものと考え。判断についても同じであり、実際の検査試料により性質が類似したインカード試料の分析値に基づく評価結果を尊重すべきと考える。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 96%～99%と推定された(図 14)。

茶インカード試料から得られたピフルブミド代謝物 B の分析値は、基本分析法を用いた場合には 3.95 mg/kg～4.21 mg/kg の範囲に含まれ平均値は 4.13 mg/kg、QuEChERS 法を用いた場合には 3.77 mg/kg～3.96 mg/kg の範囲に含まれ平均値は 3.88 mg/kg であった。上記のとおり、基本分析法と QuEChERS 法を用いて茶試料から得られたピフルブミド代謝物 B の分析値の範囲にはほぼ重複がなく、チアクロプリド分析値の分布に類似していた。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 91%～96%と推定された(図 14)。

基本分析法と QuEChERS 法を用いて管理用試料(添加試料)から得られたピフルブミド分析値には有意差が認められたが、インカード試料から得られた分析値には有意差が認められなかった。その原因は不明である。一方で、チアクロプリド並びにピフルブミド代謝物 B については、インカード試料と管理用試料(添加試料)から得られた分析値が同じ傾向を示してお



り、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)の分析結果からも推測可能であったかもしれない(表9及び表11)。

チアクロプリド、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物BのlogPowはそれぞれ1.26、5.34及び5.02、水溶解度は185.0 mg/L(20-25°C)、 $2.7 \times 10^{-4}$  mg/L (20-25°C)、及び $1.23 \times 10^{-2}$  mg/L (20°C)であることから、チアクロプリドは水溶性が高く、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物Bは脂溶性が高い。先に言及したとおり、玄米インカード試料を用いた研究からは、エトフェンプロックスやブプロフェジンのような脂溶性の高い農薬残留物が対象となった場合に、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。一方で、茶インカード試料を用いたこれまでの研究によって、脂溶性が大きく異なるジノテフラン(logPoW;-0.549)、トルフェンピラド(logPoW; 5.61)とともに、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示されていた。チアクロプリド並びにピフルブミド代謝物Bを対象とした場合に、基本分析法により得られる分析値に比べてQuEChERS法により得られる分析値が有意に小さくなる結果もまた、脂溶性や水溶解度以外の特性が基本分析法とQuEChERS法との性能差の要因になること、さらに性能差の要

因となる要素が食品と農薬残留物の組合せによっては異なることを示唆している。しかし、基本分析法とQuEChERS法との間で性能差を生じる要因を明らかにするためには、食品と農薬残留物のより多様な組合せを対象にするなど、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, 中村歩, 渡邊文子, 河野洋一, 伊佐川聡, 加藤拓, 荒川史博, 松田りえ子, 畝山智香子: 玄米インカード試料を用いたQuEChERS法と公定法との性能比較, 第45回残留農薬分析研究会プロシーディング, 45, 171-180 (2022)

### 2. 学会発表

渡邊敬浩, 永山敏廣, 中村歩, 渡邊文子, 河野洋一, 伊佐川聡, 加藤拓, 荒川史博, 松田りえ子, 畝山智香子: 玄米インカード試料を用いたQuEChERS法と公定法との性能比較, 第45回残留農薬分析研究会, 2022, 11.24

渡邊敬浩, 永山敏廣, 中村歩, 渡邊文子, 河野洋一, 伊佐川聡, 加藤拓, 荒川史博, 松田りえ子, 畝山智香子: 玄米インカード試料を用いたQuEChERS法の厳密な性能評価, 日本農薬学会第48回大会, 2023, 3.10

表 1 トリシクラゾール及びメプロニル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	20 mg/L	1	20
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
標準溶液N	0.00004	標準溶液K	1	10

[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～N 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 チアクロプリド、ピフルブミド及びピフルブミド代謝物 B 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	20 mg/L	1	20
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
標準溶液N	0.00004	標準溶液K	1	10

[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～N 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(トリシクラゾール)

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)
トリシクラゾール	ESI(+)	190	163	-14	-25	3.4

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(メプロニル)

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)
メプロニル	ESI(+)	270	119	-10	-22	3.3

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(チアクロプリド)

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)
チアクロプリド	ESI(+)	253	126	-19	-22	10.1

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(ピフルブミド及びピフルブミド代謝物B)

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)
ピフルブミド	ESI(+)	536	155	-30	-30	7.3
ピフルブミド代謝物B	ESI(+)	466	382	-10	-37	5.7

表 7 玄米管理用試料(添加試料)に含まれるトリシクラゾールの分析結果

	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	0.1039	104	0.0973	97
Repeat 2	0.1038	104	0.0939	94
Repeat 3	0.1027	103	0.0947	95
Repeat 4	0.1028	103	0.0951	95
Repeat 5	0.1014	101	0.1001	100
Repeat 6	0.1012	101	0.0926	93
Mean	0.1026		0.0956	
SD	0.0011		0.0027	
RSD(%)	1.1		2.8	

表 8 玄米管理用試料(添加試料)に含まれるメプロニルの分析結果

	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	0.0980	98	0.09410	94
Repeat 2	0.1023	102	0.09494	95
Repeat 3	0.0959	96	0.09318	93
Repeat 4	0.0959	96	0.09458	95
Repeat 5	0.0963	96	0.09612	96
Repeat 6	0.0980	98	0.09345	93
Mean	0.0977		0.0944	
SD	0.0024		0.0011	
RSD(%)	2.5		1.1	

表 9 茶管理用試料(添加試料)に含まれるチアクロプリドの分析結果

	基本分析法		QuEChERS法	
	分析値	回収率	分析値	回収率
	mg/kg	%	mg/kg	%
Repeat 1	0.989	99	0.898	90
Repeat 2	0.975	98	0.917	92
Repeat 3	1.004	100	0.943	94
Repeat 4	0.958	96	0.927	93
Repeat 5	1.007	101	0.898	90
Repeat 6	1.026	103	0.903	90
Mean	0.993		0.914	
SD	0.024		0.018	
RSD(%)	2.5		2.0	

表 10 茶管理用試料(添加試料)に含まれるピフルブミドの分析結果

	基本分析法		QuEChERS法	
	分析値	回収率	分析値	回収率
	mg/kg	%	mg/kg	%
Repeat 1	0.997	100	0.946	95
Repeat 2	1.011	101	0.960	96
Repeat 3	1.006	101	0.980	98
Repeat 4	1.019	102	0.949	95
Repeat 5	1.006	101	0.920	92
Repeat 6	1.010	101	0.959	96
Mean	1.008		0.952	
SD	0.007		0.020	
RSD(%)	0.7		2.1	

表 11 茶管理用試料(添加試料)に含まれるピフルブミド代謝物 B の分析結果

	基本分析法		QuEChERS法	
	分析値	回収率	分析値	回収率
	mg/kg	%	mg/kg	%
Repeat 1	1.029	103	0.933	93
Repeat 2	1.068	107	0.942	94
Repeat 3	1.059	106	0.989	99
Repeat 4	1.049	105	0.920	92
Repeat 5	1.063	106	0.926	93
Repeat 6	1.037	104	0.882	88
Mean	1.051		0.932	
SD	0.015		0.035	
RSD(%)	1.5		3.7	

表 12 凍結保存安定性 (玄米試料)

保存日数	Repeat	トリシクラゾール		メプロニル	
		分析値(mg/kg)	残存率(%)	分析値(mg/kg)	残存率(%)
0日	1	0.0991		0.09881	
	2	0.0978		0.09625	
	Mean	0.10		0.10	
44日	1	0.0916		0.09099	
	2	0.0928		0.09350	
	Mean	0.09	94	0.09	95

表 13 凍結保存安定性 (茶試料)

保存日数	Repeat	チアクロプリド		ピフルブミド		ピフルブミド代謝物B	
		分析値(mg/kg)	残存率(%)	分析値(mg/kg)	残存率(%)	分析値(mg/kg)	残存率(%)
0日	1	0.0864		0.09204		0.09452	
	2	0.0837		0.08941		0.09001	
	Mean	0.09		0.09		0.09	
110日	1	0.1005		0.08969		0.09299	
	2	0.0848		0.09053		0.09352	
	Mean	0.09	109	0.09	99	0.09	101

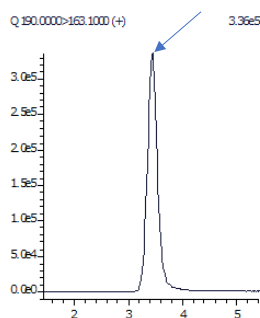
表 14 玄米インカード試料の分析結果

	トリシクラゾール		メプロニル	
	基本分析法	QuEChERS法	基本分析法	QuEChERS法
Rep.1	1.819	1.817	1.309	1.349
Rep.2	1.887	1.752	1.366	1.318
Rep.3	1.874	1.817	1.343	1.368
Rep.4	1.859	1.849	1.344	1.382
Rep.5	1.841	1.856	1.331	1.377
Rep.6	1.819	1.828	1.341	1.377
Min	1.819	1.752	1.309	1.318
Max	1.887	1.856	1.366	1.382
Median	1.850	1.823	1.342	1.373
Mean	1.850	1.820	1.339	1.362
SD	0.028	0.037	0.019	0.024
RSD(%)	1.5	2.0	1.4	1.8

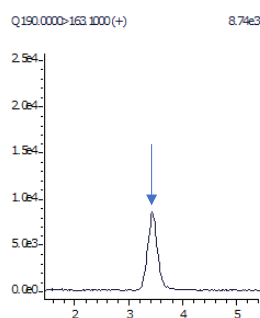
表 15 茶インカード試料の分析結果

	チアクロプリド		ピフルブミド		ピフルブミド代謝物B	
	基本分析法	QuEChERS法	基本分析法	QuEChERS法	基本分析法	QuEChERS法
Rep.1	11.02	10.54	2.076	2.039	4.070	3.861
Rep.2	10.91	10.73	1.984	1.965	3.950	3.773
Rep.3	10.95	10.69	2.060	2.038	4.165	3.934
Rep.4	10.98	10.55	2.055	2.033	4.207	3.923
Rep.5	11.15	10.68	2.071	2.000	4.182	3.962
Rep.6	10.97	10.75	2.072	1.991	4.210	3.806
Min	10.91	10.54	1.98	1.97	3.95	3.77
Max	11.15	10.75	2.08	2.04	4.21	3.96
Median	10.97	10.68	2.07	2.02	4.17	3.89
Mean	11.00	10.66	2.05	2.01	4.13	3.88
SD	0.08	0.09	0.03	0.03	0.10	0.08
RSD(%)	0.8	0.8	1.7	1.5	2.5	2.0

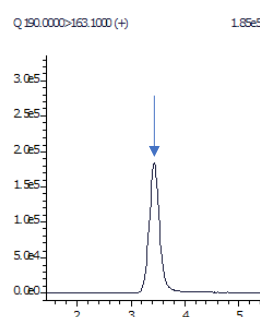
標準溶液 0.008 mg/L



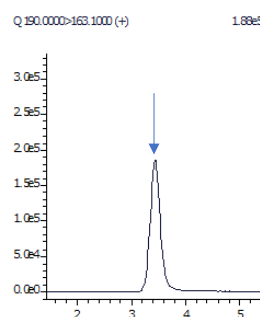
標準溶液 0.0002 mg/L



基本分析法 (インカード試料)



QuEChERS法 (インカード試料)



基本分析法(コントロール試料)

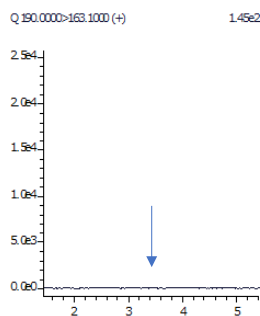
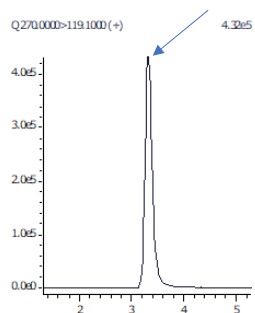


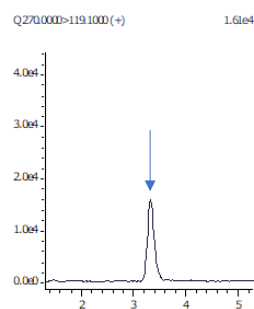
図1 トリシクラゾールのクロマトグラムの一例



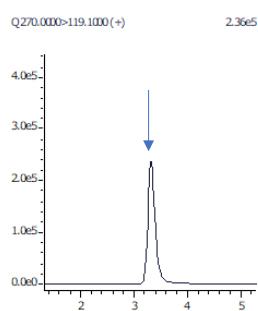
標準溶液 0.006 mg/L



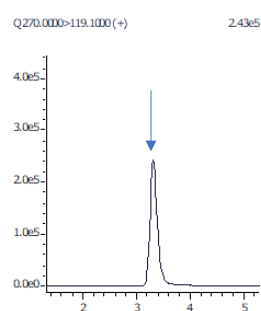
標準溶液 0.0002 mg/L



基本分析法 (インカード試料)



QuEChERS法 (インカード試料)



基本分析法(コントロール試料)

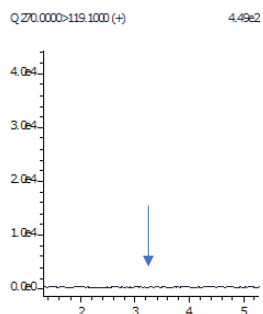
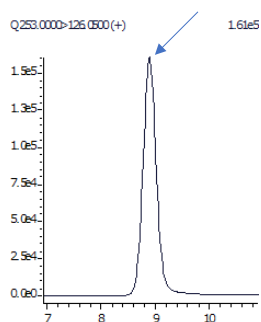
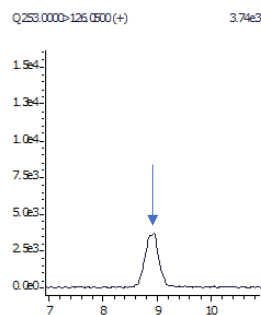


図2 メプロニルのクロマトグラムの一例

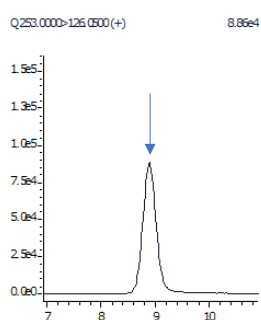
標準溶液 0.008 mg/L



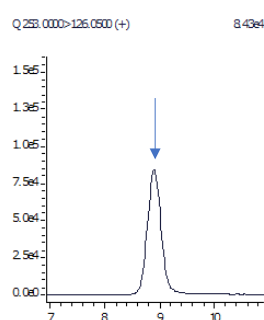
標準溶液 0.0002 mg/L



基本分析法 (インカード試料)



QuEChERS法 (インカード試料)



基本分析法(コントロール試料)

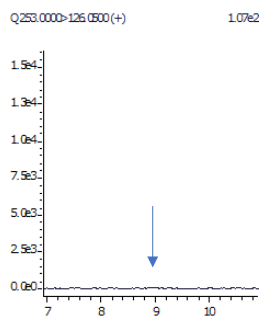
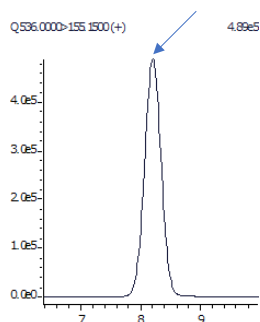
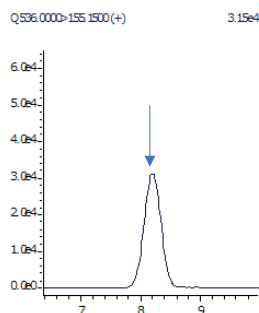


図3 チアクロプリドのクロマトグラムの一例

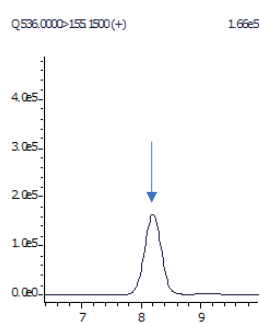
標準溶液 0.006 mg/L



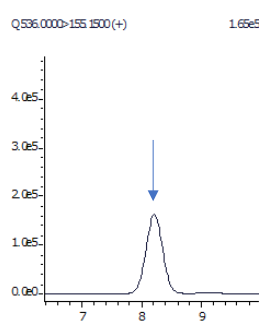
標準溶液 0.0004 mg/L



基本分析法 (インカード試料)



QuEChERS法 (インカード試料)



基本分析法(コントロール試料)

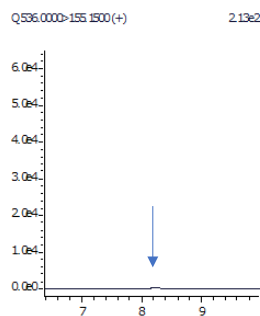
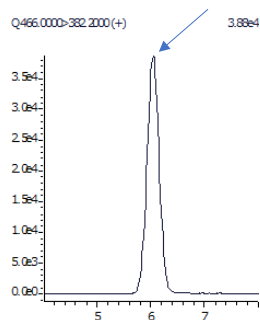
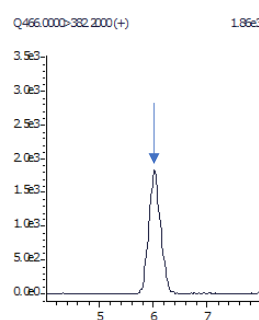


図4 ピフルブミドのクロマトグラムの一例

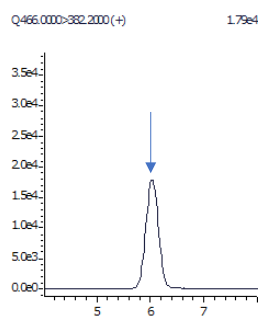
標準溶液 0.008 mg/L



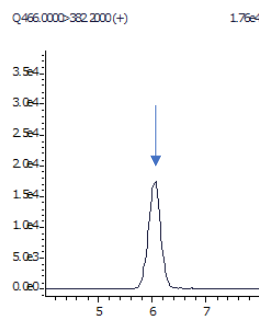
標準溶液 0.0004 mg/L



基本分析法 (インカード試料)



QuEChERS法 (インカード試料)



基本分析法(コントロール試料)

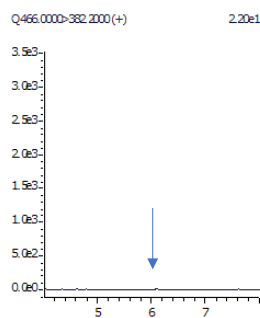
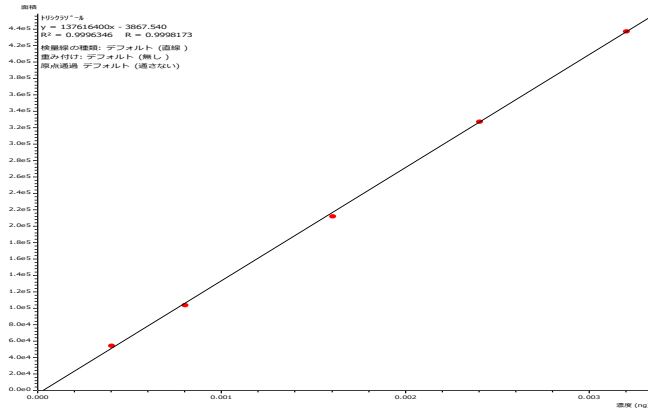


図 5 ピフルブミド代謝物 B のクロマトグラムの一例

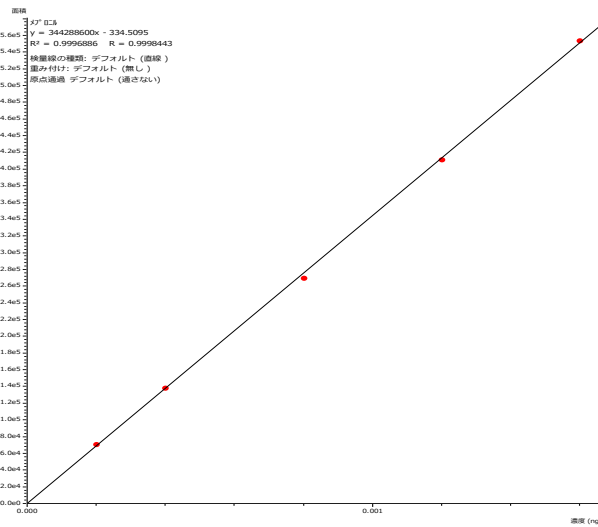


濃度 (重量 : ng)	面積値
0.0032	437476
0.0024	327791
0.0016	212511
0.0008	103961
0.0004	54902

$$y=137616400x-3867.540$$

$$r^2=0.9996346$$

図 6 トリクラゾール検量線の一例

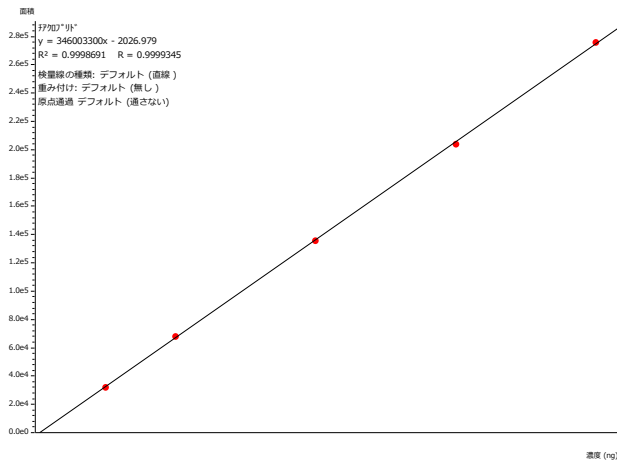


濃度 (重量 : ng)	面積値
0.0016	553691
0.0012	411364
0.0008	269720
0.0004	138606
0.0002	70959

$$y=344288600x-334.5095$$

$$r^2=0.9996886$$

図 7 メプロニル検量線の一例

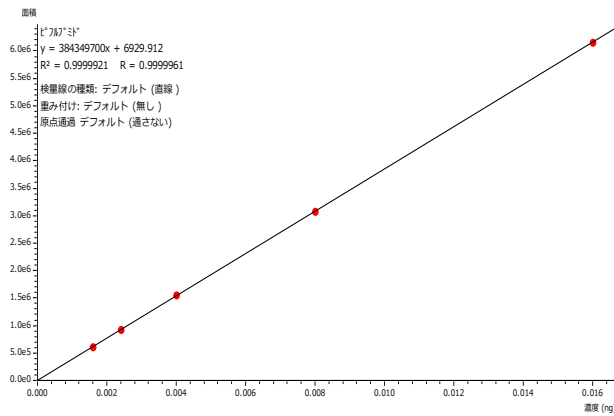


濃度 (重量 : ng)	面積値
0.0008	275899
0.0006	204078
0.0004	135868
0.0002	68320
0.0001	32309

$$y=346003300x-2026.979$$

$$r^2=0.9998691$$

図 8 チアクロプリド検量線の一例

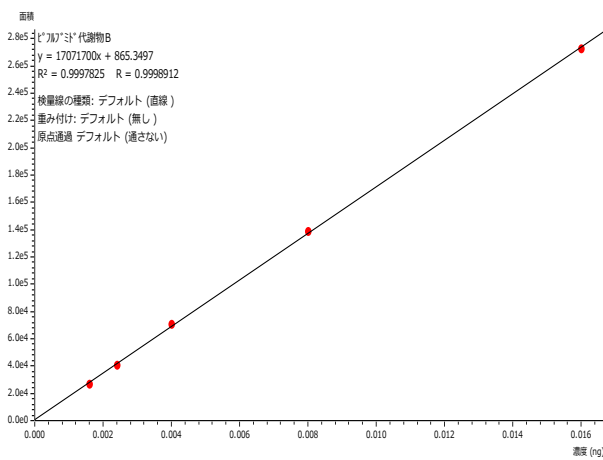


濃度 (重量 : ng)	面積値
0.016	6156829
0.008	3077211
0.004	1554418
0.0024	929779
0.0016	615604

$$y=384349700x+6929.912$$

$$r^2=0.9999921$$

図 9 ピフルブミド検量線の一例



濃度 (重量 : ng)	面積値
0.016	273201
0.008	138669
0.004	71111
0.0024	40737
0.0016	26904

$$y=17071700x+865.3497$$

$$r^2=0.9997825$$

図 10 ピフルブミド代謝物 B 検量線の一例

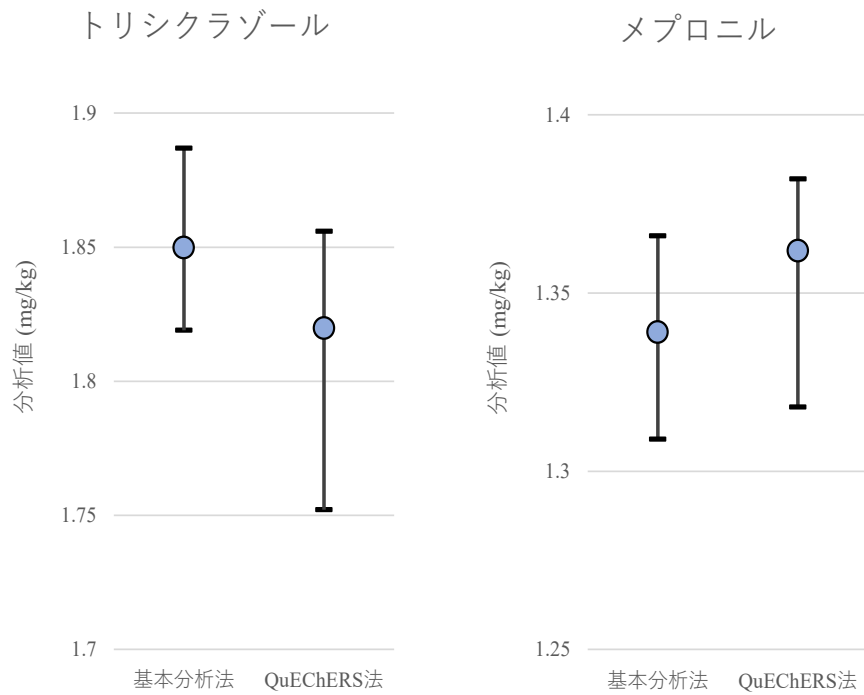


図 11 玄米インカード試料から得られた分析値の比較

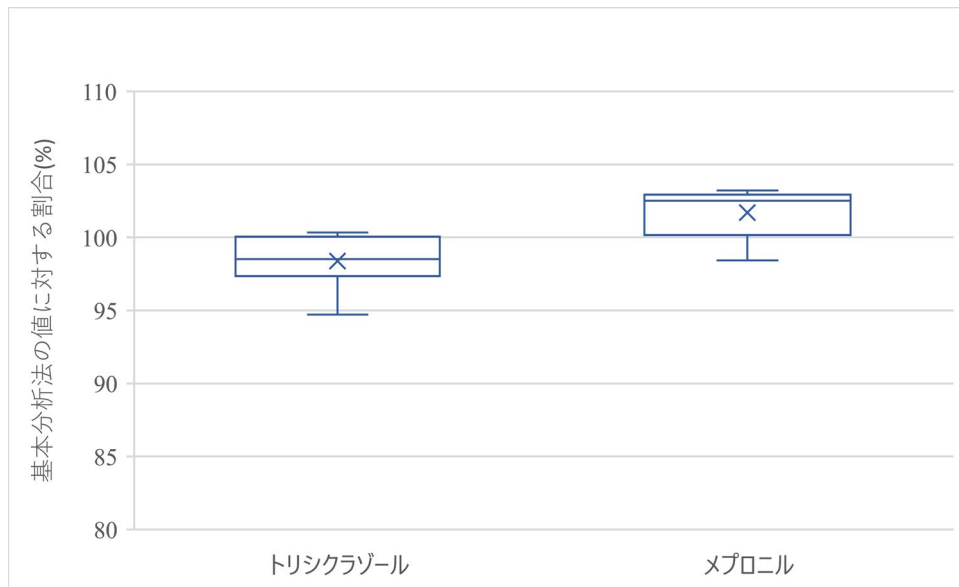


図 12 基本分析法により得られた値を真値とした場合の QuEChERS 法の回収率 (玄米)

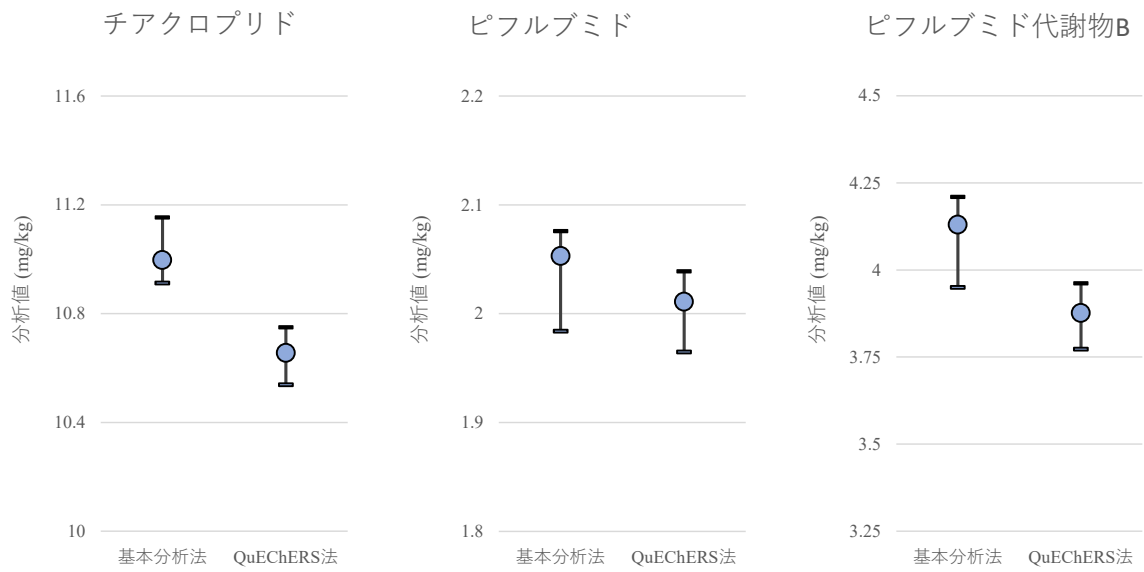


図 13 茶インカード試料から得られた分析値の比較

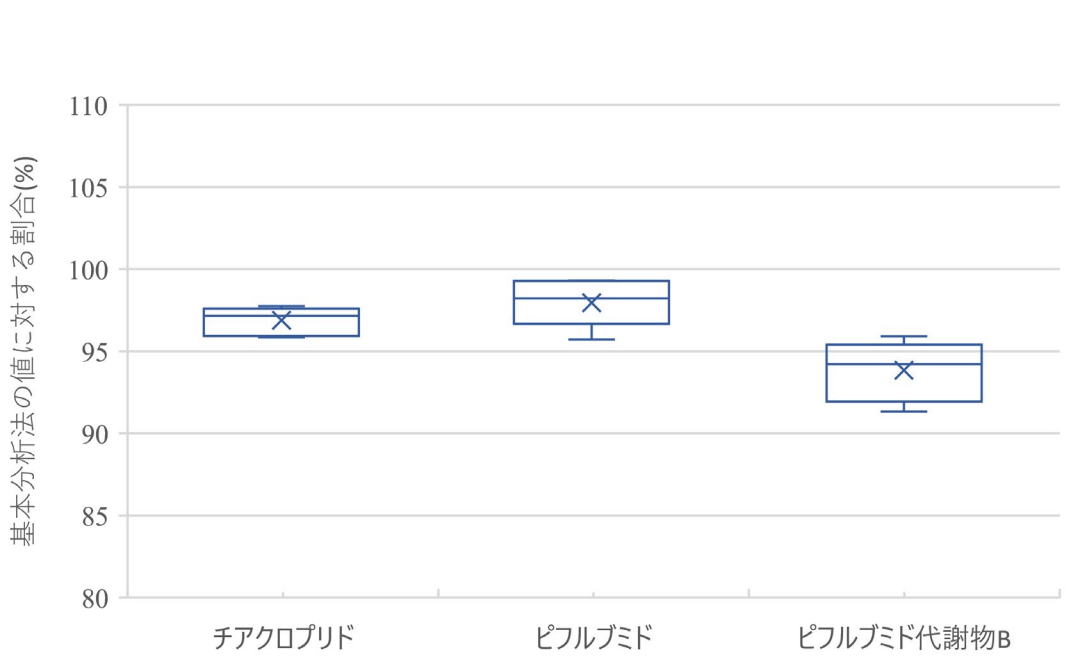


図 14 基本分析法により得られた値を真値とした場合の QuEChERS 法の回収率 (茶)



## 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

トリシクラゾール、メプロニル、チアクロプリドを含む

### 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( $K_2HPO_4$ )52.7 g 及びリン酸二水素カリウム( $KH_2PO_4$ )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°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/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  $\mu$ 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

## トリシクラゾール分析法(農産物)

### 1. 分析対象化合物

トリシクラゾール

### 2. 装置

アルカリ熱イオン化検出器又は高感度窒素・リン検出器付きガスクロマトグラフ及びガスクロマトグラフ・質量分析計を用いる。

### 3. 試薬、試液

総則の3に示すものを用いる。

### 4. 標準品

トリシクラゾール 本品はトリシクラゾール 99%以上を含む。

融点 本品の融点は 187~188°Cである。

## 4. 試験溶液の調製

### a 抽出法

検体を 420  $\mu\text{m}$  の標準網ふるいを通るように粉碎した後、その 10.0 g を量り採り、水 20 mL を加え、2 時間放置する。これにアセトン 100 mL を加え、3 分間細砕した後、ケイソウ土を 1 cm の厚さに敷いたろ紙を用いてすり合わせ減圧濃縮器中に吸引ろ過する。ろ紙上の残留物を採り、アセトン 50 mL を加え、3 分間細砕した後、上記と同様に操作して、ろ液をその減圧濃縮器中に合わせ、40°C以下で約 30 mL に濃縮する。これをあらかじめ 10%塩化ナトリウム溶液 100 mL を入れた 300 mL の分液漏斗に移す。酢酸エチル 100 mL を用いて上記の減圧濃縮器のナス型フラスコを洗い、洗液を上記の分液漏斗に合わせる。振とう機を用いて 5 分間激しく振り混ぜた後、静置し、酢酸エチル層を 300 mL の三角フラスコに移す。水層に酢酸エチル 50 mL を加え、上記と同様に操作して、酢酸エチル層を上記の三角フラスコに合わせる。これに適量の無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら 15 分間放置した後、すり合わせ減圧濃縮器中にろ過する。次いで酢酸エチル 20 mL を用いて三角フラスコを洗い、その洗液でろ紙上の残留物を洗う操作を 2 回繰り返す。両洗液をその減圧濃縮器中に合わせ、40°C以下で酢酸エチルを除去する。この残留物に n-ヘキサン 2 mL を加えて溶かす。

### b 精製法

シリカゲルミニカラム(690 mg)に、n-ヘキサン 10 mL を注入し、流出液は捨てる。このカラムに a 抽出法で得られた溶液を注入した後、エーテル 10 mL を注入し、流出液は捨てる。次いでアセトン及び n-ヘキサンの混液(1 : 1)10 mL を注入し、流出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、40°C以下でアセトン、エーテル及び n-ヘキサンを除去する。この残留物に n-ヘキサンを加えて溶かし、正確に 5 mL として、これを試験溶液とする。

## 6. 操作法

### a 定性試験

次の操作条件で試験を行う。試験結果は標準品と一致しなければならない。

#### 操作条件

カラム 内径 0.25 mm、長さ 30 m のケイ酸ガラス製の細管に、ガスクロマトグラフィー用メチルシリコンを 0.25  $\mu\text{m}$  の厚さでコーティングしたもの。

カラム温度 50°Cで2分間保持し、その後毎分 10°Cで昇温し、240°Cに到達後 10分間保持する。

試験溶液注入口温度 230°C

注入方式 スプリットレス

検出器 230°Cで操作する。

ガス流量 キャリヤーガスとしてヘリウムを用いる。トリシクラゾールが約 25 分で流出する流速に調整する。空気及び水素の流量を至適条件に調整する。

### b 定量試験

a 定性試験と同様の操作条件で得られた試験結果に基づき、ピーク高法又はピーク面積法により定量を行う。

### c 確認試験

a 定性試験と同様の操作条件でガスクロマトグラフィー・質量分析を行う。試験結果は標準品と一致しなければならない。また、必要に応じ、ピーク高法又はピーク面積法により定量を行う。

## 7. 定量限界

0.02 mg/kg

## 8. 留意事項

なし

## 9. 参考文献

なし

## 10. 類型

A

アラクロール、イソプロカルブ、クレソキシムメチル、ジエトフェンカルブ、テニルクロール、テブフェンピラド、パクロブトラゾール、ビテルタノール、ピリプロキシフェン、ピリミノバックメチル、フェナリモル、ブタクロール、フルトラニル、プレチラクロール、メトラクロール、メフェナセット、メプロニル及びレナシル試験法(農産物)

#### 1. 分析対象化合物

メプロニルを含む

#### 2. 装置

アルカリ熱イオン化検出器又は高感度窒素・リン検出器付きガスクロマトグラフ及びガスクロマトグラフ・質量分析計を用いる。

#### 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。

メプロニル 本品はメプロニル 99%以上を含む。

融点 本品の融点は 94°Cである。

#### 4. 試験溶液の調製

##### 1)抽出

##### (1) 穀類、豆類及び種実類の場合

検体を 420  $\mu$ m の標準網ふるいを通るように粉碎した後、その 10.0 g を量り採り、水 20 mL を加え、2 時間放置する。

これにアセトン 100 mL を加え、3 分間細砕した後、ケイソウ土を 1 cm の厚さに敷いたろ紙を用いてすり合わせ減圧濃縮器中に吸引ろ過する。ろ紙上の残留物を採り、アセトン 50 mL を加え、3 分間細砕した後、上記と同様に操作して、ろ液をその減圧濃縮器中に合わせ、40°C以下で約 30 mL に濃縮する。

これをあらかじめ 10%塩化ナトリウム溶液 100 mL を入れた 300 mL の分液漏斗に移す。酢酸エチル 100 mL を用いて上記の減圧濃縮器のナス型フラスコを洗い、洗液を上記の分液漏斗に合わせる。振とう機を用いて 5 分間激しく振り混ぜた後、静置し、酢酸エチル層を 300 mL の三角フラスコに移す。水層に酢酸エチル 50 mL を加え、上記と同様に操作して、酢酸エチル層を上記の三角フラスコに合わせる。これに適量の無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら 15 分間放置した後、すり合わせ減圧濃縮器中にろ過する。次いで酢酸エチル 20 mL を用いて三角フラスコを洗い、その洗液でろ紙上の残留物を洗う操作を 2 回繰り返す。両洗液をその減圧濃縮器中に合わせ、40°C以下で酢酸エチルを除去する。

この残留物に n-ヘキサン 30 mL を加え、100 mL の分液漏斗に移す。これに n-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え、振とう機を用いて 5 分間激しく振り混ぜた後、静置し、アセトニトリル層をすり合わせ減圧濃縮器中に移す。n-ヘキサン層に n-ヘキサン飽和アセ

トニトリル 30 mL を加え、上記と同様の操作を 2 回繰り返す、アセトニトリル層をその減圧濃縮器中に合わせ、40°C以下でアセトニトリルを除去する。この残留物に n-ヘキサン 2 mL を加えて溶かす。

## 2) 精製

内径 15 mm、長さ 300 mm のクロマトグラフ管に、カラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウム 5 g を n-ヘキサンに懸濁したもの、次いでその上に無水硫酸ナトリウム約 5 g を入れ、カラムの上端に少量の n-ヘキサンが残る程度まで n-ヘキサンを流出させる。このカラムに 1) 抽出で得られた溶液を注入した後、エーテル及び n-ヘキサン(1:99)混液 50 mL を注入し、流出液は捨てる。次いでアセトン及び n-ヘキサン(3:7)混液 50 mL を注入し、溶出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、40°C以下でアセトン、エーテル及び n-ヘキサンを除去する。この残留物にアセトンを加えて溶かし、正確に 5 mL として、これを試験溶液とする。

## 5. 操作法

### 1) 定性試験

次の操作条件で試験を行う。試験結果は標準品と一致しなければならない。

操作条件

カラム：内径 0.25 mm、長さ 30m のケイ酸ガラス製の細管に、ガスクロマトグラフィー用 5%フェニルーメチルシリコンを 0.25 $\mu$ m の厚さでコーティングしたもの。

カラム温度：160°Cで 1 分間保持し、その後毎分 10°Cで昇温し、190°Cに到達後 1 分間保持する。次に毎分 2°Cで昇温し、210°Cに到達後 2 分間保持する。さらに毎分 5°Cで昇温し、240°Cに到達後、1 分間保持し、その後毎分 10°Cで昇温し、260°Cに到達後 6 分間保持する。

試験溶液注入口温度：210°C

検出器：210°Cで操作する。

ガス流量：キャリアガスとしてヘリウムを用いる。空気及び水素の流量を至適条件に調整する。

### 2) 定量試験

1) 定性試験と同様の操作条件で得られた試験結果に基づき、ピーク高法又はピーク面積法により定量を行う。

### 3) 確認試験

1) 定性試験と同様の操作条件でガスクロマトグラフィー・質量分析を行う。試験結果は標準品と一致しなければならない。また、必要に応じ、ピーク高法又はピーク面積法により定量を行う。

## 6. 定量限界

メプロニル 0.01 mg/kg

## 7. 留意事項

1)ピリミノバックメチルは、ピリミノバックメチル(E 体)及びピリミノバックメチル(Z 体)のそれぞれについて定量を行い、これらの和を分析値とする。

2)定量限界は、果実、野菜及びハーブを試料とした場合の値を示したものであり、穀類、豆類及び種実類の場合は概ね2倍、茶及びホップの場合は概ね4倍の値となる。基準値が定量限界より低い試料の場合は、試験溶液を濃縮する、ガスクロマトグラフへの注入量を増やすなどによって対応する。

## 8. 参考文献

なし

## 12. 類型

A



## ピフルブミド分析法(農産物)

### 1. 分析対象化合物

- ・ピフルブミド
- ・3'-イソブチル-1,3,5-トリメチル-4'-[2,2,2-トリフルオロ-1-メトキシ-1-(トリフルオロメチル)エチル]ピラゾール-4-カルボキサニリド(代謝物 B)

### 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

アセトン、アセトニトリル、ヘキサン、メタノール： 残留農薬試験用

メタノール： LC-MS 用

水： 脱イオン水を Milli-Q System(Millipore 製)で精製したもの分析用標準品

ピフルブミド、代謝物 B： 分析用標準品

その他の試薬： 特級

グラファイトカーボンミニカラム： InertSep GC、150 mg/3 mL(ジーエルサイエンス製)

### 4. 試験溶液の調製

#### 1)抽出

##### ① 果実の場合

均一化した試料 20.0 g にアセトン 100 mL を加え、30 分間振とう抽出した後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン 50 mL を加え、同様にろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトンを加えて正確に 200 mL とする。この溶液から正確に 2 mL を分取し、これに飽和食塩水 4 mL を加え、n-ヘキサン 6 mL で振とう抽出する。その後、n-ヘキサン層を分取する。

##### ② 茶の場合

粉碎した試料 5.0 g に水 20 mL を加え、2 時間放置する。これにアセトン 80 mL を加え、30 分間振とう抽出した後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン及び水(4:1)混液 50 mL を加えて、同様にろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトン及び水(4:1)混液を加えて正確に 200 mL とする。この溶液から正確に 2 mL を分取し、これに飽和食塩水 4 mL を加え、n-ヘキサン 6 mL で振とう抽出する。その後、n-ヘキサン層を分取する。

#### 2)精製

グラファイトカーボンミニカラムに n-ヘキサン 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、n-ヘキサン 4 mL を注入し、全ての溶出液を 40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に水及びメタノール(2:3)混液を加えて溶

かし、20～100 mL としたものを試験溶液とする。

#### 5. 検量線の作成

ピフルブミド及び代謝物 B の標準品をアセトニトリルに溶解し、500 mg/L 標準溶液を調製する。この溶液を水及びメタノール(2 : 3)混液で希釈して数点調製し、それぞれ LCMS/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)

装置 Agilent 1290 シリーズ HPLC

Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS

カラム : Zorbax SB-C18 (2.1 $\mu$ m、1.8 mm i.d.×100mm、Agilent 製)

カラム温度 : 40°C

移動相 : メタノール/0.1%酢酸 60:40(2 分間保持)–90:10(3 分間保持)

流量 : 0.3 mL/min

注入量 : 2  $\mu$ L

保持時間の目安 : ピフルブミド ; 3.6 分、代謝物 B ; 3.3 分

イオン化法 : ESI(positive)

モニタリングイオン

: プリカーサーイオン( $m/z$ )

プロダクトイオン( $m/z$ )

ピフルブミド 536.2 155.1

代謝物 B 466.1 137.1

#### 8. 定量限界

ピフルブミド : 0.01～0.05 ppm

代謝物 B : 0.02～0.06 ppm

#### 9. 添加回収を実施した食品

りんご、茶、あずき、ピーマン、なす、きゅうり、すいか、メロン、さやいんげん、みかん、なつみかん、日本なし、もも、うめ、おうとう、いちご、ぶどう、かき及びいちじく。

#### 10. 留意事項

特になし

※ 本分析法は、農産物における作物残留試験等において用いられた残留農薬分析法であり、

新たな試験法の開発等に際して参考として下さい。なお、当該分析法をもとに開発した試験法を食品規格への適合判定のために使用する場合には、「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の一部改正について(平成 22 年 12 月 24 日薬食発 1224 第 1 号)」に従って使用する試験法の妥当性を評価する必要があります。