液体クロマトグラフ - タンデム型質量分析計による

玄米中残留農薬一斉分析法の妥当性評価

小鍛治 好恵^a, 山本 和興^a, 富澤 早苗^a, 藤原 卓士^a, 上條 恭子^a,
齋藤 友里^a, 高田 朋美^a, 大澤 佳浩^a, 野口 舞子^a, 田原 正一^a

昨年, 農薬283成分を対象に開発した玄米中残留農薬一斉分析法の対象農薬を拡充し, 対象外としていた126成分について, 異なる機種液体クロマトグラフ - タンデム型質量分析計を用いて玄米中残留農薬一斉分析法の妥当性評価を行った. 2濃度 (0.01および0.1 µg/g), 2併行, 5日間の添加回収試験を実施し, 妥当性評価ガイドラインの適否判断を行ったところ, 126成分中124成分 (98.4%) が目標値に適合した. 昨年開発した一斉分析法では250成分が妥当性評価ガイドラインの目標値に適合しており, 本実験と重複している68成分を考慮すると, 妥当性評価ガイドラインの目標値に適合した農薬数は計306成分 (250 + 124 - 68 = 306) となった. 本実験により, 計306成分の農薬について開発法における試料前処理法の有用性が示され, 行政検査への活用が可能になった.

キーワード: 残留農薬, 玄米, 液体クロマトグラフ - タンデム型質量分析計, LC-MS/MS, 妥当性評価

はじめに

日本人の主食である米 (玄米) の残留農薬については都民の関心が高く, 東京都では食品衛生監視指導計画に基づき, 都内搬入米重金属等汚染検査事業¹⁾として毎年重点的に行政検査に取り組んでいる.

当研究室では, 農産物中の残留農薬検査にQuEChERS法をベースとした一斉分析法²⁾ (以下, 既法) を用いており, 玄米の行政検査にも既法を用いてきた. しかし, 玄米には分析の妨害となるタンパク質や脂肪酸等の成分³⁾が多く含まれており, 既法での分析には課題があったことから, 昨年, 農薬283成分について液体クロマトグラフ - タンデム型質量分析計 (以下, LC-MS/MS) を用いた新規分析法の開発を行った⁴⁾ (以下, 開発法). この開発法における対象農薬の更なる拡充を目的に, 今回, 開発法で対象外としていた126成分 (うち69成分は開発法と重複) について, 開発法とは異なる機種を用いて妥当性評価を行ったので, その結果を報告する.

実験方法

1. 試料

妥当性評価には, 分析対象農薬が残存していないことを確認した国内産玄米をブランク試料に用いた. 試料は電動ミルで細かく粉碎後, 十分に混和, 均一化し, 使用まで室温 (1~30°C) ⁵⁾で保存した.

2. 分析対象農薬

行政検査での対象農薬のうち, 開発法で対象外としていた126成分 (うち69成分は開発法と重複) を分析対象農薬

とした. 126成分の内訳はTable 2に示し, 開発法と重複する69成分には下線を引いた.

3. 試薬

混合標準品には, 関東化学 (株) 製, 農薬混合標準液 54, 58, 74, 75, 76, 78および85を使用した. その他の標準品には, 富士フィルム和光純薬 (株) 製および関東化学 (株) 製の残留農薬試験用の標準品を用いた.

これらの標準品を開発法に則って希釈・混合し, 1 µg/mLに調製したアセトニトリル溶液を混合標準溶液とした. ブランク試料への添加にもこの混合標準溶液を使用した.

一般試薬, ヘキサン洗浄蒸留水, 分析用水 (以下, 水) および精製用固相ミニカラム (ジーエルサイエンス (株) 製のカスタムメイド固相InertSep™ GC/NH2 (200 mg/200 mg, 6 mL)) は開発法と同じものを用いた. なお, 精製用固相ミニカラムは, アセトン, およびアセトニトリル: トルエン (3:1) であらかじめコンディショニングしたものを使用した.

4. 器具, 装置および分析条件

以下に記す器具および装置を使用した. 抽出用チューブ: AGCテクノグラス (株) 社製, IWAKI遠沈管100 mL (自立型, レーザーマーカ目盛付), シャフト型ホモジナイザー: (株) マイクロテックニチオン社製, ヒスコトロン (ジェネレーターシャフト, シールドタイプ, 楕型密閉万能タイプ), 遠心分離機: (株) トミー精工社製, 多本架冷却遠心機AX-320, 定量用試験管: 東京硝子器械

^a 東京都健康安全研究センター食品化学部残留物質研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

Table 1. LC-MS/MS conditions

HPLC system	ACQUITY UPLC I-Class PLUS (Waters Corporation)
HPLC column	ACQUITY UPLC HSS T3 Column (Waters Corporation, 100Å, 2.1 i.d. mm × 100 mm, 1.8 μm)
Column temperature	40°C
Flow rate	0.4 mL/min
Mobile phase	(A) 0.1% Formic acid in water (B) 0.1% Formic acid in acetonitrile
Gradient	(A% : B%) = Initial (99 : 1) → 1.0min (99 : 1) → 9.0 min (5 : 95) → 12.0 min (5 : 95) → 12.1 min (99 : 1) → 15.0 min (99 : 1)
Injection volume	1 μL
MS system	MS/MS : Xevo TQ-S micro (Waters Corporation)
Ionization	ESI (+)
Capillary voltage	1.00 kV
Cone voltage	30.00 V
Source temperature	150°C
Desolvation temperature	500°C
Cone gas flow	50 L/hr
Desolvation gas flow	1200 L/hr
Analysis mode	Multiple reaction monitoring (MRM)

(株)社製, Fine共通摺合共栓試験管50mL (茶褐色, 目盛付, 栓22/20), ロータリーエバポレーター: 東京理化学器械(株)社製, EYELAロータリーエバポレーター N-1200型, 窒素吹付濃縮装置: バイオタージ・ジャパン(株)社製, TurboVap® LV (旧型), 卓上遠心分離機: アズワン(株)社製, 卓上遠心分離機AS165W.

また, LC-MS/MSの分析条件および各農薬の測定パラメータをTable 1およびTable 2に示した.

5. 試料前処理法 (開発法より抜粋, 一部改変)

1) 抽出

玄米試料を抽出用チューブに5.0 gはかり取り, ヘキサン洗浄蒸留水10 mLを添加して混和した後30分間放置した. ここにアセトニトリル (残留農薬・PCB試験用) 30 mLを加え, シャフト型ホモジナイザーで1分間ホモジナイズした. 無水硫酸マグネシウム4 g, クエン酸3ナトリウム2水和物1 g, クエン酸水素2ナトリウム1.5水和物0.5 g, 塩化ナトリウム3 gを加え, ガラス製のかくはん棒で1分間かくはんし, その後手振りで1分間振とうした. これを遠心分離 (1,800×g, 10分間, 4°C) した後, 定量用試験管に上清を全量分取し, アセトニトリル (残留農薬・PCB試験用) で40 mLに定容して抽出液 (8倍希釈液) とした.

2) 精製

精製用固相ミニカラムに抽出液8 mLを負荷し, アセトニトリル:トルエン (3:1) 25 mLで溶出させた. この負荷通過液および溶出液をロータリーエバポレーター (35°C) で濃縮乾固後, アセトン:ヘキサン (1:1) 1 mLで溶解した (等倍液). 溶解液 0.5 mLを分取し, 窒素吹付濃縮装置を用いて40°Cで濃縮乾固した後, アセトニトリル (LC/MS用) 1 mLで再溶解した. この溶液を水と等量混合し, 遠心分離 (6,950×g, 5分間) 後, その上清をLC-MS/MS用試験溶液 (4倍希釈液) とした.

6. 検量線 (開発法より抜粋, 一部改変)

混合標準溶液を水, およびアセトニトリル:水 (1:1) で適宜希釈し, 0.5, 2.5, 5, 10, 25 および 50 ng/mLの検量線用混合標準溶液を調製し, この6点を用いて絶対検量線法による定量を行った.

7. 妥当性評価 (開発法より抜粋, 一部改変)

妥当性評価ガイドライン⁶⁾に従い, 0.01 および 0.1 μg/g の2濃度について, 分析者1名, 2併行, 5日間の添加回収試験を実施した. 各定量値から真度, 併行精度および室内精度を算出し, 妥当性評価ガイドラインで定める目標値, すなわち 0.01 μg/g では真度 70~120%, 併行精度 25%未満, 室内精度 30%未満, 0.1 μg/g では真度 70~120%, 併行精度 15%未満, 室内精度 20%未満への適否を判断した.

選択性および試料における定量限界については, ブランク試験溶液 (ブランク試料を5. 試料前処理法 (開発法より抜粋, 一部改変) に則って抽出・精製した試験溶液) および0.01 μg/g相当のマトリクス添加標準溶液のクロマトグラムを比較し, 評価した.

8. 妥当性評価ガイドライン不適合農薬の原因究明実験

妥当性評価ガイドラインの目標値に適合しなかった農薬について, その原因を究明するため追加で実験を行った.

試料中濃度0.1 μg/g相当となるよう, 試料5.0 gに混合標準溶液を添加し, 5. 試料前処理法 (開発法より抜粋, 一部改変) の1) 抽出に則って前処理を行った溶液 (抽出液) (n=3) を調製した. 装置への負担を考慮し, この抽出液を更に5倍希釈してLC-MS/MS測定に供した. 希釈溶液の組成は妥当性評価試験と同じく, アセトニトリル:水 (1:1) となるよう調製した.

Table 2. LC-MS/MS parameters

Analyte	Transition 1 ^a (<i>m/z</i>)	Transition 2 ^b (<i>m/z</i>)	Cone Energy 1 (V)	Cone Energy 2 (V)	Collision Energy 1 (eV)	Collision Energy 2 (eV)	
1	Acephate	184 > 49	184 > 125	5	5	20	18
2	Acetamiprid	223 > 126	223 > 56	30	30	20	15
3	Aldicarb	116 > 89	116 > 61	10	10	8	8
4	Aldoxycarb	223 > 148	223 > 86	35	35	10	14
5	Ametryn	228 > 186	228 > 68	38	38	18	36
6	Aminocarb	209 > 152	209 > 137	25	25	15	25
7	Anilofos	368 > 199	368 > 125	30	30	15	34
8	Azoxystrobin	404 > 344	404 > 372	25	25	25	25
9	Benalaxyl	326 > 148	326 > 91	26	26	20	34
10	Bendiocarb	224 > 167	224 > 109	15	15	10	15
11	Benfuracarb	411 > 195	411 > 190	5	5	23	13
12	Bensulide	398 > 314	398 > 158	18	18	10	24
13	Benthiavalicarb isopropyl	382 > 180	382 > 116	30	30	39	29
14	Bitertanol	338 > 99	338 > 70	21	21	8	16
15	Boscalid	343 > 140	343 > 307	40	40	20	20
16	Buprofezin	306 > 201	306 > 57	31	31	12	20
17	Carbaryl	202 > 145	202 > 127	30	30	10	25
18	Carbendazim	192 > 160	192 > 132	30	30	15	30
19	Carbetamide	237 > 192	237 > 118	5	5	10	15
20	Carbofuran	222 > 123	222 > 165	5	5	20	10
21	Chlorantraniliprole	482 > 284	482 > 451	15	15	23	25
22	Chlorfenvinphos	359 > 155	359 > 99	28	28	12	30
23	Chlorfluazuron	540 > 383	540 > 158	42	42	20	20
24	Chlorpyrifos	350 > 198	350 > 97	36	36	20	32
25	Clethodim	360 > 268	360 > 164	25	25	10	20
26	Clothianidin	250 > 169	250 > 132	10	10	17	21
27	CPF	199 > 128	199 > 126	36	36	14	20
28	Cyproconazole	292 > 125	292 > 70	36	36	24	18
29	Diazinon	305 > 169	305 > 97	31	31	22	35
30	Diethofencarb	268 > 226	268 > 124	28	28	10	40
31	Difenoconazole	406 > 251	406 > 111	46	46	25	60
32	Diflubenzuron	311 > 158	311 > 141	34	34	12	15
33	Dimethametryn	256 > 186	256 > 71	42	42	20	32
34	Dimethenamid	276 > 244	276 > 168	26	26	14	26
35	Dimethoate	230 > 199	230 > 125	24	24	10	20
36	Dimethomorph	388 > 301	388 > 165	30	30	20	40
37	Dinotefuran	203 > 129	203 > 113	10	10	17	17
38	Edifenphos	311 > 111	311 > 109	32	32	26	32
39	EPN	324 > 296	324 > 157	40	31	15	25
40	Ethion	385 > 199	385 > 143	10	10	15	35
41	Ethiprole	397 > 351	397 > 255	34	34	20	36
42	Ethoprophos	243 > 131	243 > 97	32	32	31	20
43	Famoxadone	331 > 238	331 > 195	5	5	14	24
44	Fenamidone	312 > 236	312 > 92	10	10	20	35
45	Fenbuconazole	337 > 125	337 > 70	38	38	20	36
46	Fenobucarb	208 > 95	208 > 152	25	25	15	10
47	Fenoxycarb	302 > 88	302 > 116	10	10	20	11
48	Fenpropimorph	304 > 147	304 > 57	50	50	28	30
49	Fenpyroximate	422 > 366	422 > 138	5	5	20	30
50	Flamprop methyl	336 > 105	336 > 77	24	24	16	48
51	Flonicamid	230 > 203	230 > 174	35	35	15	25
52	Fluazifop P butyl	384 > 328	384 > 282	38	38	16	22
53	Flubendazole	314 > 282	314 > 123	68	68	25	35
54	Flufenoxuron	489 > 158	489 > 141	10	10	22	46
55	Fluometuron	233 > 72	233 > 46	40	25	15	20
56	Fluopicolide	383 > 173	383 > 109	40	40	20	66
57	Flusilazole	316 > 247	316 > 165	36	36	18	28
58	Flutolanil	324 > 262	324 > 65	34	34	18	40
59	Flutriafol	302 > 70	302 > 123	32	32	29	18
60	Hexaconazole	314 > 70	314 > 159	40	40	22	28
61	Imazalil	297 > 159	297 > 69	20	20	30	30
62	Imidacloprid	256 > 209	256 > 175	25	25	15	20
63	Indoxacarb	528 > 150	528 > 203	5	5	25	30

Table 2. LC-MS/MS parameters (Continued)

Analyte	Transition 1 ^a (<i>m/z</i>)	Transition 2 ^b (<i>m/z</i>)	Cone Energy 1 (V)	Cone Energy 2 (V)	Collision Energy 1 (eV)	Collision Energy 2 (eV)	
64	<u>Isocarbofos</u>	291 > 231	291 > 121	21	21	13	30
65	<u>Isoprocarb</u>	194 > 95	194 > 137	24	24	14	8
66	<u>Isoprothiolane</u>	291 > 231	291 > 189	26	26	12	22
67	<u>Isoxathion</u>	314 > 105	314 > 97	31	31	14	35
68	<u>Kresoxim methyl</u>	314 > 267	314 > 116	15	24	5	12
69	<u>Malathion</u>	331 > 127	331 > 99	20	20	12	24
70	<u>Mandipropamid</u>	412 > 328	412 > 125	35	35	15	35
71	<u>Mepronil</u>	270 > 119	270 > 91	36	36	28	44
72	<u>Metalaxyl</u>	280 > 220	280 > 192	26	26	13	17
73	<u>Metconazole</u>	320 > 125	320 > 70	5	5	30	25
74	<u>Methamidophos</u>	142 > 94	142 > 125	28	28	13	13
75	<u>Methidathion</u>	303 > 145	303 > 85	18	18	10	20
76	<u>Methiocarb</u>	226 > 169	226 > 121	25	25	10	20
77	<u>Methomyl</u>	163 > 88	163 > 106	10	10	10	10
78	<u>Methoxyfenozide</u>	369 > 149	369 > 91	15	5	15	25
79	<u>Metominostrobin (E)</u>	285 > 238	285 > 196	2	2	10	12
80	<u>MPMC</u>	180 > 123	180 > 108	20	20	19	18
81	<u>MTMC</u>	166 > 109	166 > 94	25	25	10	30
82	<u>Myclobutanil</u>	289 > 125	289 > 70	34	34	32	18
83	<u>Nitenpyram</u>	271 > 126	271 > 73	15	30	30	45
84	<u>Omethoate</u>	214 > 183	214 > 125	26	26	11	22
85	<u>Oxadixyl</u>	279 > 219	279 > 132	40	40	10	34
86	<u>Oxamyl</u>	237 > 72	237 > 90	5	5	10	10
87	<u>Paclobutrazole</u>	294 > 125	294 > 70	36	36	38	20
88	<u>Penthiopyrad</u>	360 > 177	360 > 276	30	30	47	21
89	<u>PHC</u>	210 > 111	210 > 93	15	15	15	25
90	<u>Phenthoate</u>	321 > 79	321 > 135	15	15	40	20
91	<u>Phosphamidon</u>	300 > 174	300 > 127	28	28	14	25
92	<u>Piperonyl butoxide</u>	356 > 177	356 > 119	26	26	11	37
93	<u>Piperophos</u>	354 > 171	354 > 143	31	31	22	32
94	<u>Pirimicarb</u>	239 > 182	239 > 72	25	25	15	20
95	<u>Pirimiphos methyl</u>	306 > 164	306 > 108	36	36	22	32
96	<u>Profenofos</u>	373 > 303	373 > 128	36	36	20	40
97	<u>Prometryn</u>	242 > 200	242 > 158	26	26	17	25
98	<u>Propachlor</u>	212 > 170	212 > 94	31	31	14	25
99	<u>Propiconazole</u>	342 > 159	342 > 69	46	46	34	22
100	<u>Pymetrozine</u>	218 > 105	218 > 79	15	15	20	30
101	<u>Pyraclostrobin</u>	388 > 163	388 > 194	5	5	25	12
102	<u>Pyrazophos</u>	374 > 222	374 > 194	44	44	22	32
103	<u>Pyributicarb</u>	331 > 181	331 > 108	30	30	21	40
104	<u>Pyridaben</u>	365 > 309	365 > 147	28	28	12	24
105	<u>Pyrimethanil</u>	200 > 107	200 > 82	51	51	24	24
106	<u>Pyriminobac methyl (E)</u>	362 > 330	362 > 284	30	30	19	33
107	<u>Pyriproxyfen</u>	322 > 96	322 > 227	32	32	14	14
108	<u>Quinalphos</u>	299 > 163	299 > 97	24	24	24	30
109	<u>Simazine</u>	202 > 124	202 > 96	40	40	16	22
110	<u>Tebuconazole</u>	308 > 70	308 > 125	40	40	22	40
111	<u>Tebufenozide</u>	353 > 133	353 > 297	10	10	10	5
112	<u>Tebufenpyrad</u>	334 > 145	334 > 117	52	52	28	34
113	<u>Tepraloxydim</u>	342 > 250	342 > 166	26	40	12	20
114	<u>Tetraconazole</u>	372 > 159	372 > 70	41	41	30	20
115	<u>Thiabendazole</u>	202 > 175	202 > 131	15	15	25	30
116	<u>Thiacloprid</u>	253 > 126	253 > 90	40	40	20	35
117	<u>Thiacloprid amide</u>	271 > 126	271 > 254	20	20	37	17
118	<u>Thiamethoxam</u>	292 > 211	292 > 132	25	25	10	20
119	<u>Thiodicarb</u>	355 > 88	355 > 108	26	26	16	16
120	<u>Tiadinil</u>	268 > 101	268 > 45	42	42	18	28
121	<u>Triadimefon</u>	294 > 197	294 > 69	31	31	15	20
122	<u>Triadimenol</u>	296 > 70	296 > 99	18	18	12	15
123	<u>Triazophos</u>	314 > 162	314 > 119	31	31	18	35
124	<u>Tricyclazole</u>	190 > 163	190 > 136	41	41	22	27
125	<u>Trifloxystrobin</u>	409 > 186	409 > 145	34	34	16	40
126	<u>XMC</u>	180 > 123	180 > 108	20	20	15	35

a: Quantitative Transition b: Qualitative Transition under line: analyzed pesticides in both this method and the developed method

Table 3. Validation data for 126 pesticides

Analyte	0.01 µg/g		0.1 µg/g		0.01 µg/g		0.1 µg/g	
	Trueness (%)		Repeatability (RSD%)		Within-laboratory reproducibility (RSD%)			
1 Acephate	96.8	99.3	3.0	3.8	4.3	3.8		
2 <u>Acetamiprid</u>	98.3	100.6	3.1	3.4	3.9	3.4		
3 <u>Aldicarb</u>	107.0	104.1	7.5	6.9	7.5	6.9		
4 <u>Aldoxycarb</u>	110.4	107.3	4.2	2.9	4.7	2.9		
5 Ametryn	99.3	100.6	3.7	3.0	4.0	3.0		
6 <u>Aminocarb</u>	95.7	99.4	4.1	3.4	4.8	3.4		
7 <u>Anilofos</u>	102.1	102.2	4.6	4.2	4.7	4.2		
8 <u>Azoxystrobin</u>	100.5	102.9	5.5	3.4	9.1	4.3		
9 Benalaxyl	103.3	103.2	4.6	4.1	5.5	4.5		
10 <u>Bendiocarb</u>	104.5	103.8	5.1	2.8	5.1	3.2		
11 Benfuracarb	0.5	1.2	316.2	50.9	316.2	219.4		
12 Bensulide	100.2	102.6	4.2	4.2	4.3	4.2		
13 Benthiavalicarb isopropyl	100.8	102.4	4.5	4.8	4.7	4.8		
14 Bitertanol	98.8	101.7	6.4	4.0	6.4	4.0		
15 <u>Boscalid</u>	91.9	94.0	6.0	3.9	9.6	6.4		
16 Buprofezin	100.1	100.6	4.9	4.0	5.0	4.5		
17 <u>Carbaryl</u>	101.9	102.0	2.7	3.0	4.3	3.0		
18 Car bendazim	78.3	85.2	9.2	6.8	9.2	6.8		
19 Carbetamide	102.6	103.5	3.7	2.9	3.7	2.9		
20 <u>Carbofuran</u>	103.4	104.3	4.2	3.0	4.2	3.4		
21 <u>Chlorantraniliprole</u>	97.1	101.3	3.7	4.0	3.7	4.0		
22 Chlorfenvinphos	85.4	88.7	5.3	4.1	8.2	6.8		
23 Chlorfluazuron	86.9	88.8	3.5	4.0	4.6	4.9		
24 <u>Chlorpyrifos</u>	89.1	84.1	13.8	3.4	13.8	5.5		
25 Clethodim	95.3	97.6	6.3	5.9	6.4	6.9		
26 <u>Clothianidin</u>	97.6	100.5	4.2	4.4	4.8	4.4		
27 <u>CPF</u>	98.8	100.9	3.4	2.5	5.3	2.5		
28 Cyproconazole	98.6	102.6	5.1	3.8	6.1	4.0		
29 Diazinon	98.0	100.4	4.5	4.3	4.5	4.3		
30 <u>Diethofencarb</u>	101.1	104.4	5.7	3.9	6.8	4.0		
31 Difenoconazole	98.1	100.1	4.4	4.2	6.0	5.0		
32 <u>Diflubenzuron</u>	93.3	97.3	5.8	3.4	7.5	3.4		
33 <u>Dimethametryn</u>	98.3	102.1	3.2	4.1	4.0	4.3		
34 <u>Dimethenamid</u>	102.6	102.7	5.8	3.8	7.8	4.8		
35 <u>Dimethoate</u>	95.9	97.6	2.9	2.3	6.0	4.0		
36 <u>Dimethomorph</u>	98.5	99.6	3.9	4.4	3.9	4.4		
37 <u>Dinotefuran</u>	102.7	102.6	3.4	4.4	4.4	4.4		
38 <u>Edifenphos</u>	92.1	95.5	3.9	4.7	9.3	7.8		
39 <u>EPN</u>	94.3	98.5	14.1	5.6	14.1	9.0		
40 <u>Ethion</u>	85.8	88.3	3.2	3.0	3.9	3.0		
41 <u>Ethiprole</u>	98.7	102.0	5.7	4.7	6.6	4.7		
42 Ethoprophos	96.3	99.0	5.3	4.1	6.2	4.1		
43 Famoxadone	97.4	98.5	7.8	4.6	10.5	4.6		
44 <u>Fenamidone</u>	101.6	102.8	5.6	4.1	5.6	4.1		
45 Fenbuconazole	98.3	100.7	3.9	3.9	4.4	3.9		
46 <u>Fenobucarb</u>	99.9	102.9	3.8	4.3	6.1	4.8		
47 <u>Fenoxycarb</u>	102.3	103.8	5.5	3.0	5.5	3.3		
48 Fenpropimorph	99.6	103.3	5.6	4.5	5.6	4.5		
49 <u>Fenpyroximate</u>	94.0	96.3	3.4	3.2	3.7	3.2		
50 Flamprop methyl	101.7	102.4	4.4	3.3	6.2	4.3		
51 <u>Flonicamid</u>	98.5	100.5	3.8	3.7	5.0	3.7		
52 Fluazifop P butyl	104.5	103.4	3.5	3.4	5.2	3.6		
53 Flubendazole	85.7	89.2	5.1	3.6	5.1	4.4		
54 <u>Flufenoxuron</u>	95.0	102.0	6.2	4.3	6.2	6.4		
55 Fluometuron	101.7	101.4	3.9	3.4	3.9	3.4		
56 Fluopicolide	100.4	100.9	5.2	3.5	6.6	5.0		
57 Flusilazole	97.4	99.0	4.7	4.1	5.0	4.1		
58 Flutolanil	105.3	105.6	5.2	2.1	6.7	3.0		
59 Flutriafol	101.4	104.3	5.5	2.5	7.1	4.4		
60 Hexaconazole	100.0	101.1	3.1	5.2	4.0	5.2		
61 <u>Imazalil</u>	93.8	98.5	3.8	4.3	6.7	4.3		
62 <u>Imidacloprid</u>	103.2	104.9	2.0	3.0	4.8	3.3		
63 <u>Indoxacarb</u>	100.6	103.6	3.7	4.7	5.0	4.7		

Table 3. Validation data for 126 pesticides (Continued)

Analyte	0.01 µg/g		0.1 µg/g		0.01 µg/g		0.1 µg/g	
	Trueness (%)		Repeatability (RSD%)		Within-laboratory reproducibility (RSD%)			
64	<u>Isocarbofos</u>	102.6	104.0	4.1	2.8	4.5	2.8	
65	<u>Isoprocarb</u>	97.2	99.8	4.8	3.7	4.8	3.9	
66	<u>Isoprothiolane</u>	106.4	105.7	3.3	3.3	3.3	3.6	
67	<u>Isoxathion</u>	101.8	104.3	3.9	4.0	5.7	4.7	
68	<u>Kresoxim methyl</u>	93.0	95.5	4.1	3.8	5.6	4.0	
69	<u>Malathion</u>	91.2	98.6	5.7	2.1	7.6	3.0	
70	<u>Mandipropamid</u>	107.7	107.3	4.3	3.5	4.5	3.5	
71	<u>Mepronil</u>	101.6	103.7	4.5	4.4	4.8	4.4	
72	<u>Metalaxyl</u>	104.1	104.8	3.0	3.4	3.0	3.4	
73	<u>Metconazole</u>	96.9	98.2	4.7	2.9	6.6	2.9	
74	<u>Methamidophos</u>	86.2	90.2	4.1	3.2	5.5	3.7	
75	<u>Methidathion</u>	101.2	102.2	10.9	6.1	10.9	6.1	
76	<u>Methiocarb</u>	100.9	103.1	4.3	3.6	5.1	3.7	
77	<u>Methomyl (Total)^a</u>	91.4	88.4	3.9	3.7	4.7	3.7	
78	<u>Methoxyfenozide</u>	101.8	102.9	4.0	4.7	4.0	4.7	
79	<u>Metominostrubin (E)</u>	101.4	104.5	3.1	3.9	4.1	3.9	
80	<u>MPMC</u>	99.9	100.6	2.8	3.1	5.8	3.1	
81	<u>MTMC</u>	92.8	96.3	5.5	4.4	6.6	4.4	
82	<u>Myclobutanil</u>	98.5	102.3	4.8	4.0	5.2	4.0	
83	<u>Nitenpyram</u>	98.4	101.6	4.6	2.9	4.6	2.9	
84	<u>Omethoate</u>	100.7	102.1	5.2	3.3	5.2	3.3	
85	<u>Oxadixyl</u>	106.9	109.1	7.0	4.1	7.0	4.1	
86	<u>Oxamyl</u>	104.2	106.9	4.2	3.8	4.7	3.8	
87	<u>Paclbutrazole</u>	98.5	101.3	4.1	3.8	4.1	3.8	
88	<u>Penthiopyrad</u>	101.1	101.4	3.6	4.2	5.6	5.6	
89	<u>PHC</u>	103.9	103.1	4.4	3.1	4.4	3.1	
90	<u>Phenthoate</u>	93.1	94.9	6.0	5.7	6.0	5.7	
91	<u>Phosphamidon</u>	102.2	103.4	3.4	3.7	4.2	4.0	
92	<u>Piperonyl butoxide</u>	105.2	106.9	3.9	4.0	5.3	4.2	
93	<u>Piperophos</u>	108.0	108.0	3.5	3.7	3.5	3.8	
94	<u>Pirimicarb</u>	100.5	103.0	4.6	4.5	5.8	4.5	
95	<u>Pirimiphos methyl</u>	100.0	101.1	4.6	3.2	5.2	4.6	
96	<u>Profenofos</u>	96.9	100.3	11.6	3.5	11.6	4.4	
97	<u>Prometryn</u>	97.8	101.1	5.0	2.5	5.0	2.5	
98	<u>Propachlor</u>	90.5	92.5	5.0	3.6	6.2	6.2	
99	<u>Propiconazole</u>	97.4	99.9	4.1	3.8	4.3	3.8	
100	<u>Pymetrozine</u>	61.7	67.2	4.8	2.5	5.7	2.5	
101	<u>Pyraclostrobin</u>	105.2	104.7	4.7	3.0	4.7	3.0	
102	<u>Pyrazophos</u>	99.8	101.5	3.8	4.3	3.8	4.3	
103	<u>Pyributicarb</u>	90.3	91.6	3.4	2.8	5.2	2.8	
104	<u>Pyridaben</u>	95.1	95.9	3.9	3.1	6.8	4.3	
105	<u>Pyrimethanil</u>	97.6	101.2	4.3	3.0	4.3	3.0	
106	<u>Pyriminobac methyl (E)</u>	102.6	102.7	5.0	3.1	6.7	3.7	
107	<u>Pyriproxyfen</u>	98.7	99.7	4.0	2.9	4.0	3.5	
108	<u>Quinalphos</u>	98.6	98.9	3.9	5.2	3.9	5.2	
109	<u>Simazine</u>	101.1	103.2	4.3	4.2	5.0	4.2	
110	<u>Tebuconazole</u>	97.9	100.0	4.5	3.1	6.7	4.2	
111	<u>Tebufenozide</u>	101.2	100.9	3.0	3.8	5.3	3.8	
112	<u>Tebufenpyrad</u>	97.0	99.9	5.9	4.5	7.8	4.5	
113	<u>Tepraloxymid</u>	88.9	86.9	3.2	5.4	10.0	8.2	
114	<u>Tetraconazole</u>	95.7	98.7	5.6	3.8	6.5	3.8	
115	<u>Thiabendazole</u>	82.4	88.9	3.3	2.8	3.3	2.8	
116	<u>Thiacloprid</u>	101.2	102.8	3.4	4.3	3.7	4.3	
117	<u>Thiacloprid amide</u>	97.2	101.6	3.0	4.0	3.1	4.0	
118	<u>Thiamethoxam</u>	100.6	102.5	4.6	4.4	4.6	4.4	
119	<u>Thiodicarb</u>	—	—	—	—	—	—	
120	<u>Tiadinil</u>	99.1	101.4	4.7	4.5	6.1	4.5	
121	<u>Triadimefon</u>	100.7	101.1	6.0	3.9	7.0	5.4	
122	<u>Triadimenol</u>	98.9	101.4	4.1	3.8	4.1	3.8	
123	<u>Triazophos</u>	101.9	102.7	4.2	3.8	5.1	3.8	
124	<u>Tricyclazole</u>	97.3	100.1	4.3	3.7	5.0	3.7	
125	<u>Trifloxystrobin</u>	106.6	104.7	4.2	3.8	5.2	5.0	
126	<u>XMC</u>	98.3	100.7	6.1	2.7	6.1	2.7	

a: include converting Thiodicarb to Methomyl under line: analyzed pesticides in both this method and the developed method

Table 4. Method for converting Thiodicarb to Methomyl in validation data

$$\begin{aligned}
 C^a_{\text{(Total as Methomyl)}} &= C_{\text{(Methomyl)}} + (2 \times Mw^b_{\text{(Methomyl)}} / Mw_{\text{(Thiodicarb)}}) \times C_{\text{(Thiodicarb)}} \\
 &= C_{\text{(Methomyl)}} + (2 \times 162.2/354.5) \times C_{\text{(Thiodicarb)}} \\
 &= C_{\text{(Methomyl)}} + 0.915 \times C_{\text{(Thiodicarb)}}
 \end{aligned}$$

a: concentration b: molecular weight

結果および考察

1. 直線性

検量線用混合標準溶液6点 (0.5~50 ng/mL) での検量線について、すべての成分が $R^2 > 0.990$ であることを確認し、良好な直線性を得ることができた。

2. 選択性

ブランク試料を5. 試料前処理法 (開発法より抜粋, 一部改変) に従って抽出・精製し, 本実験で用いる装置で分析したところ, 定量を妨害するピークがないことを確認した。

3. 試料における定量限界

試料中濃度0.01 $\mu\text{g/g}$ 相当となるよう添加した試料を5. 試料前処理法 (開発法より抜粋, 一部改変) に従って抽出・精製し, 本実験で用いる装置で分析したところ, ベンフラカルブ以外のすべての成分において $S/N \geq 10$ であること確認した。なお, ベンフラカルブは本実験での妥当性評価における真度が極端に低く, 試料における定量限界を評価できなかったため, ブランク試験溶液に試料中濃度0.01 $\mu\text{g/g}$ 相当となるよう混合標準溶液を添加した試験溶液を測定に供し, $S/N \geq 10$ であること確認した。

4. 真度および精度

添加した2濃度 (0.01および0.1 $\mu\text{g/g}$) について, 各成分の真度, 併行精度および室内精度の結果をTable 3に示した。

添加濃度0.01 $\mu\text{g/g}$ では, 124/126成分 (98.4%) が真度78.3~110.4%, 併行精度2.0~14.1%, 室内精度3.0~14.1%となり, 妥当性評価ガイドラインの目標値に適合した。一方, 添加濃度0.1 $\mu\text{g/g}$ でも, 124/126成分 (98.4%) が真度84.1~109.1%, 併行精度2.1~6.9%, 室内精度2.5~9.0%となり, 妥当性評価ガイドラインの目標値に適合した。チオジカルブおよびメソミルについては, チオジカルブをメソミル含量に換算した値とメソミルの和を算出し, 「チオジカルブおよびメソミル」として適否を判断した。チオジカルブをメソミル含量に換算する方法はTable 4に示した⁷⁾。Table 3のチオジカルブにおいては, メソミル含量に換算後, メソミルとの和を算出し, メソミル (合計) として結果を示した。

妥当性評価ガイドラインの目標値に適合しなかった成分は, 2濃度ともに2成分 (ピメトロジンおよびベンフラカルブ) であった。ピメトロジンは添加濃度0.01 $\mu\text{g/g}$ での真度

は61.7%, 添加濃度0.1 $\mu\text{g/g}$ での真度は67.2%, ベンフラカルブは添加濃度0.01 $\mu\text{g/g}$ での真度は0.5%, 添加濃度0.1 $\mu\text{g/g}$ での真度は1.2%であった。なお, ピメトロジンは開発法においても妥当性評価ガイドラインの目標値に適合しなかった。

5. 妥当性評価ガイドライン不適合農薬の原因究明実験

ピメトロジンおよびベンフラカルブについて, ブランク試験溶液に試料中濃度0.01 および0.1 $\mu\text{g/g}$ 相当になるよう混合標準溶液を添加した試験溶液を測定に供したところ, 負のマトリクス効果の影響を受けていないことを確認したため, この2成分の真度が低い値を示す原因は試料前処理法にあると推察された。そこで, 5. 試料前処理法 (開発法より抜粋, 一部改変) の1) 抽出の後, 2) 精製の工程を経ずに希釈した抽出液をそのまま測定に供したところ, ピメトロジンおよびベンフラカルブの平均回収率はそれぞれ67.2%, 0.0%となった。この値は, 妥当性評価での真度とほぼ同じ値であることから, 2成分の真度が低い原因は抽出工程にあると考えられた。ピメトロジンはピリジンアゾメチン系殺虫剤であり⁸⁾, 著しい酸性条件下では不安定な農薬である^{8,9)}。抽出工程では, 添加する塩類により, 液性が酸性に傾いている⁹⁾ことから, 抽出工程においてピメトロジンの分解がわずかに生じ, 真度が低下したものと推察された。一方, ベンフラカルブは, 代謝分解によりカルボフランに変換されるカルボフラン誘導体のカルバメート系殺虫剤であり¹⁰⁾, 加水分解されやすく, 酸性有機溶媒中においても分解されやすいことが認められている¹¹⁾。抽出工程では, はじめにヘキサン洗浄蒸留水を添加しており, また, 前述のとおり, 抽出液は酸性傾向にあるため, ベンフラカルブが抽出工程で分解され, 真度が極端に低くなったものと考えられた。両成分の試料前処理法 (抽出工程) については改良が必要であり, 今後の課題として検討を進めていく。

まとめ

開発法の対象農薬 (283成分) を拡充し, 対象外としていた126成分について, 異なる機種⁷⁾のLC-MS/MSを用いて玄米中残留農薬一斉分析法の妥当性評価を行った。2濃度 (0.01および0.1 $\mu\text{g/g}$), 2併行, 5日間の添加回収試験を実施し, 妥当性評価ガイドラインの適否判断を行ったところ, 126成分中124成分 (98.4%) が目標値に適合した。昨年⁷⁾の開発法では250成分が妥当性評価ガイドラインの目標値に適合しており, 本実験では69成分が分

析対象農薬として開発法と重複し、更にそのうち1成分が目標値不適合となっている。そのため、開発法と本実験の結果を合わせると、妥当性評価ガイドラインの目標値に適合した農薬数は計306成分 ($250 + 124 - 68 = 306$) となった。本実験により、計306成分の農薬について開発法における試料前処理法の有用性が示され、行政検査への活用が可能になった。

文 献

- 1) 東京都保健医療局健康安全部長：5保医健食第1470号，令和6年度都内搬入米重金属等汚染調査事業の実施について（通知），令和6年3月29日。
- 2) 中島崇行，大塚健治，富澤早苗，他：食衛誌，**61**，154-160, 2020.
- 3) 医歯薬出版：日本食品成分表2021八訂，栄養計算ソフト・電子版付，12-15, 2021, 医歯薬出版，東京。
- 4) 小鍛治好恵，富澤早苗，上條恭子，他：食衛誌，**64**，246-252, 2023.
- 5) 厚生労働省：告示第220号，第十八改正日本薬局方，通則，令和3年6月7日。
- 6) 厚生労働省医薬局食品安全部長：食安発第1224第1号，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（通知），平成22年12月24日。
- 7) 残留農薬分析国際交流会：食品および食餌中の残留農薬分析のための分析的品質管理および分析法バリデーション手順，SANTE/11945/2015，
https://www.zanryu-nouyaku.org/technical/docs/sante_11945_2015.pdf（2024年11月20日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある）
- 8) 食品安全委員会：資料3-2 農薬評価書 ピメトロジン（第2版），
<https://www.mhlw.go.jp/content/11120000/000673094.pdf>（2024年11月20日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある）
- 9) 永井雄太郎：日本農薬学会誌，**37**，362-371, 2012.
- 10) 中央環境審議会土壤農薬部会農薬小委員会（第78回）：資料5水質汚濁に係る農薬登録基準として環境大臣の定める基準の設定に関する資料（案），
<https://www.env.go.jp/council/10dojo/y104-83/900432376.pdf>（2024年11月20日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある）
- 11) 食品安全委員会農薬専門調査会：資料1-2（案）農薬評価書 ベンフラカルブ，
<https://www.mhlw.go.jp/content/11120000/000598788.pdf>（2024年11月20日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある）

Validation Study for the Simultaneous Determination of Pesticide Residues in Brown Rice Using LC-MS/MS

Yoshie KOKAJI^a, Kazuoki YAMAMOTO^a, Sanae TOMIZAWA^a, Takushi FUJIWARA^a, Kyoko KAMIJO^a,
Yuri SAITO^a, Tomomi TAKADA^a, Yoshihiro OHSAWA^a, Maiko NOGUCHI^a, and Shoichi TAHARA^a

Last year, the simultaneous determination of 283 pesticide residues in brown rice was developed using LC-MS/MS. In this study, a validation study for this determination method of new pesticide residues in brown rice was conducted using another LC-MS/MS. Two concentrations (0.01 and 0.1 µg/g) of 126 pesticides were validated using the determination method based on the validation guideline of the Ministry of Health, Labor, and Welfare in Japan. Of the 126 pesticides, 124 were detected satisfactorily. This method satisfactorily detected 306 pesticide residues in total. Therefore, this method is useful for the simultaneous determination of pesticide residues in brown rice. This method will be expectedly utilized for the administrative inspection.

Keywords: pesticide residue, brown rice, LC-MS/MS, validation study

---

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan