

ノート

茶中の残留農薬一斉試験法の妥当性評価について

内山恵美, 大市 真梨乃*, 竹内 浩, 吉村英基

Validation of Simultaneous Determination Method of Pesticide Residues in Tea

Emi UCHIYAMA, Marino OICHI*, Hiroshi TAKEUCHI and Hideki YOSHIMURA

厚生労働省通知の「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)」を改良した試験法について, 厚生労働省の「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」(以下「ガイドライン」という.) に基づき, LC-MS/MS を用いて三重県内で使用実績のある農薬をもとに選定した 50 化合物について, 茶における妥当性評価を行った. その結果, 対象としたすべての化合物において 2.5-100 ng/mL の範囲で決定係数 0.98 以上の検量線が得られるとともに, 真度の目標値も満足した. 併行精度, 室内精度については, テトラニプロロールを除く 49 の化合物でガイドラインに示された目標値を満足した. 対象とした農薬 50 化合物の一斉分析について, 分析条件の妥当性が概ね確認できたことから, 本法は三重県産茶の収去検査において適用可能と考えられる.

キーワード: 妥当性評価, 茶, 残留農薬, LC-MS/MS, 一斉分析

はじめに

2005 年 11 月 29 日に通知された「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について (一部改正)」¹⁾において「GC/MS による農薬等の一斉試験法 (農産物)」、「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)」、「LC/MS による農薬等の一斉試験法 II (農産物)」等が追加され, 茶の残留農薬検査の前処理方法は溶媒抽出法が主流となった. さらに「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)」は, 茶では精製が不十分であり測定の際に試料マトリックスによる影響を受けやすい欠点が報告された²⁾こと等から, 2017 年 6 月 20 日付けの「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」の一部改正について³⁾により「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)」は改正されている.

三重県は茶の生産量が全国三位であり⁴⁾, 食品衛生法に基づく収去検査においても茶の残留農薬検査を毎年行っている. しかしその試験法は 2004 年に制定したもので, 2007 年に試験項

目の追加に伴う改定を行った以降はほとんど改定されておらず, 前処理法として熱湯抽出法を用いる方法であった.

今回, 溶媒抽出法の導入と試験項目の見直しを行い茶の残留農薬試験法を改定するために, 改正された「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)」に一部改良を加えた試験法 (以下「改良法」という.) を用いて, 三重県内で使用実績のある農薬をもとに選定した 50 化合物についてガイドライン⁵⁾に基づき茶における妥当性評価を行ったので報告する.

方法

1. 試料

対象農薬の残留が無いと確認した市販の荒茶約 100 g を粉碎均一化し, 425 μm の標準網ふるいを通過したものを試料とした.

2. 測定対象農薬

これまでの三重県内での使用実績を勘案し, 表 2 の農薬を対象として選定した.

* 三重県津保健所

3. 試薬等

各農薬成分の標準品は富士フィルム和光純薬(株)製、林純薬工業(株)製のものをを用いた。

農薬標準品をアセトンに溶解して 200 µg/mL としたものを標準原液とした。

アセトン、トルエンは関東化学(株)製の残留農薬試験・PCB 試験用をアセトニトリル、メタノール、移動相の水は関東化学(株)製の LC/MS 用蒸留水を、1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液は富士フィルム和光純薬(株)製の高速液体クロマトグラフ用を用いた。

リン酸水素二カリウム、リン酸二水素カリウム、水酸化ナトリウムは富士フィルム和光純薬(株)製の特級を、塩化ナトリウムは富士フィルム和光純薬(株)製の残留農薬試験用を用いた。

0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) はリン酸水素二カリウム 52.7 g 及びリン酸二水素カリウム 30.2 g を量り採り、水約 500 mL に溶解し、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いて pH を 7.0 に調整した後、水を加えて 1 L とした。

水は Merck Milipore 社製 Milli-Q Integral 3 により精製した超純水を用いた。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (1,000 mg) は Agilent Technologies 社製 Mega Bond Elut C18 (1 g/6 mL) を、グラフアイトカーボン/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) はジーエルサイエンス社製の InertSep GC/PSA (500 mg/500 mg) を用いた。

ろ紙は東洋濾紙(株)製 ADVANTEC No.5C 70 mm を用いた。

メンブランフィルターは Merck Millipore 社製 Millex LG 0.20 µm を用いた。

4. 装置および測定条件

pH メータ: 東亜ディーケーケー(株)製 MM60R

ホモジナイザー: (株)日本精機製作所製エクセルオートホモジナイザー

振とう器: ヤマト科学(株)製 SA31

遠心分離機: (株)トミー精工製 LX-130

HPLC: (株)島津製作所製 ProminenceUFLC

MS: AB SCIEX 社製 API3200QTRAP

カラム: ジーエルサイエンス社製 Inertsil ODS-4 (内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒子径 3 µm)

ガードカラム: ジーエルサイエンス社製

Inertsil ODS-4 (内径 1.5 mm, 長さ 10 mm, 粒子径 3 µm)

カラム温度: 40 °C

流速: 0.2 mL/min

注入量: 5 µL

移動相: 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (A 液), 5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液 (B 液)

表 1 移動相のグラジエント条件

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
30	5	95

イオン化モード: ESI (+)

主なイオン(m/z): 表 2 参照

測定モード: MRM (Multiple Reaction Monitoring)

Collision Energy (CE): 表 2 参照

Curtain Gas: 20 psi

Collision Gas: 3

Ion Spray Voltage: 5,500 V

Ion Source Temperature: 400 °C

Ion Source Gas1: 50 psi

Ion Source Gas2: 80 psi

5. 試験溶液の調製法

厚生労働省通知の「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)」では最終の測定溶液が 1 mL であり、収去検査に適用するには溶液量が不足するため、抽出液を 2 本分取り精製を行い、最後の固相カラム溶出液を合わせることで測定溶液を 2 mL とする改良を加えた。(図 1)

6. 妥当性評価

ガイドラインに従い、実施者 1 名が 1 日 1 回 (2 併行) 5 日間実施する枝分かれ実験計画に基づき、基準値の添加濃度で添加回収試験を行った。

添加用標準溶液は試料 5 g に 1 mL 添加したときに基準値となるように、各標準原液を混合して濃縮し調製した。

試料に添加用標準溶液を 1 mL 添加し、30 分程度放置した後に抽出操作を行った。

表2 測定対象化合物と測定イオン

農薬名	測定対象化合物	定量イオン			確認イオン			
		プリカーサーイオン	プロダクトイオン	CE(V)	プリカーサーイオン	プロダクトイオン	CE(V)	
1	アセタミプリド	アセタミプリド	223.0	126.0	30	223.0	99.0	55
2	アゾキシストロビン	アゾキシストロビン	404.0	372.0	19	404.0	344.1	31
3	イミダクロプリド	イミダクロプリド	256.0	175.0	25	256.0	209.0	25
4	エチプロール	エチプロール	397.0	351.0	30	397.0	255.0	50
5	エトキサゾール	エトキサゾール	360.0	141.0	45	360.0	113.0	85
6	クレソキシムメチル	クレソキシムメチル	314.0	206.0	10	331.0	206.0	15
7	クロマフェノジド	クロマフェノジド	395.2	175.1	23	395.2	91.2	79
8	クロルピリホス	クロルピリホス	352.0	200.0	25	352.0	324.0	15
9	クロルフルアズロン	クロルフルアズロン	540.0	383.0	30	540.0	158.0	30
10	シアントラニリプロール	シアントラニリプロール	475.0	286.0	25	475.0	444.0	25
11	ジエトフェンカルブ	ジエトフェンカルブ	226.0	124.0	35	268.0	124.0	40
12	シエノピラフェン	シエノピラフェン	394.0	310.0	35	394.0	254.0	45
13	シクラニリプロール	シクラニリプロール	604.0	286.0	30	602.0	112.0	110
14	ジノテフラン	ジノテフラン	203.0	129.0	15	203.0	157.0	10
15	ジフェノコナゾール	ジフェノコナゾール	406.0	251.0	35	408.0	253.0	35
16	シメコナゾール	シメコナゾール	294.1	70.1	33	294.1	73.1	43
17	ジメトエート	ジメトエート	230.0	125.0	25	230.0	199.0	15
18	シラフルオフェン	シラフルオフェン	426.0	287.0	20	287.0	168.0	30
19	スピノサド	スピノシンA	733.0	142.0	40	733.0	98.0	90
20	スピノサド	スピノシンD	747.0	142.0	40	747.0	98.0	100
21	スピロジクロフェン	スピロジクロフェン	411.0	71.0	30	411.0	313.0	20
22	チアクロプリド	チアクロプリド	253.0	126.0	27	255.0	128.3	30
23	チアメトキサム	チアメトキサム	292.0	211.0	20	292.0	181.0	30
24	テトラニリプロール	テトラニリプロール	545.0	356.0	20	545.0	376.0	35
25	テブコナゾール	テブコナゾール	308.0	70.0	45	310.0	70.0	45
26	トリアジメホン	トリアジメホン	294.0	197.0	20	294.0	225.0	20
27	トリフルミゾール	トリフルミゾール	346.0	278.0	15	346.0	73.0	25
28	トリフルミゾール	トリフルミゾール代謝物	295.0	278.0	20	295.0	215.0	30
29	トリフロキシストロビン	トリフロキシストロビン	409.0	186.0	30	409.0	145.0	60
30	ピフルブミド	ピフルブミド	536.5	155.0	35	536.5	111.0	80
31	ピフルブミド	ピフルブミド代謝物B	466.0	137.0	50	466.0	111.0	50
32	ピラクロストロビン	ピラクロストロビン	388.0	194.0	20	388.0	163.0	30
33	ピラクロホス	ピラクロホス	361.0	257.0	30	361.0	138.0	50
34	ピリダベン	ピリダベン	365.0	309.0	15	365.0	147.0	35
35	ピリプロキシフェン	ピリプロキシフェン	322.0	96.0	25	322.0	185.0	30
36	ピリベンカルブ	ピリベンカルブ	362.0	239.0	25	362.0	207.0	40
37	ピリベンカルブ	ピリベンカルブ代謝物B	362.1	239.0	25	362.1	122.0	45
38	ピリミジフェン	ピリミジフェン	378.0	184.0	35	378.0	150.0	50
39	ピリミホスメチル	ピリミホスメチル	306.0	108.0	40	306.0	164.0	30
40	フェンピロキシメート-E	フェンピロキシメート-E	422.0	366.0	25	422.0	135.0	45
41	フェンブコナゾール	フェンブコナゾール	337.0	125.0	45	337.0	70.0	35
42	フェンプロバトリン	フェンプロバトリン	367.0	125.0	25	350.0	125.0	20
43	ブプロフェジン	ブプロフェジン	306.0	201.0	15	306.0	57.0	35
44	フルフェノクスロン	フルフェノクスロン	489.0	158.0	30	489.0	141.0	75
45	プロバルギット	プロバルギット	368.0	175.0	20	368.0	231.0	15
46	ボスカリド	ボスカリド	343.0	307.0	30	343.0	271.0	45
47	マンデストロビン	マンデストロビン	314.0	119.0	40	314.0	160.0	25
48	ミクロブタニル	ミクロブタニル	289.0	70.0	35	289.0	125.0	45
49	メチダチオン	メチダチオン	303.0	145.0	15	303.0	85.0	25
50	メトキシフェノジド	メトキシフェノジド	369.0	149.0	25	313.0	149.0	20

結果および考察

1. 選択性

標準溶液を添加しないブランク試料を改良法に従って試験し、定量を妨害するピークがないことを確認した。

2. 検量線

検量線用標準溶液は、添加用標準溶液のアセトンを濃縮乾固した後メタノールに転溶したものを適宜メタノールで希釈して使用した。

各標準原液を混合してアセトンを濃縮乾固した後メタノールに転溶して適宜メタノールで希釈した標準溶液 (2.5, 5, 10, 20, 50, 100, 200 ng/mL) について、ピーク面積法による検量線を作成し決定係数 (R^2) を求めたところ、シメコナゾールとメトキシフェノジドを除く 48 化合物で 0.98 以上であった。2 化合物に関しても 2.5-100 ng/mL の範囲で 0.98 以上を満たした。

3. 真度, 併行精度, 室内精度及び定量限界

ガイドラインが示す目標値を表 3 に、得られた測定値より真度, 併行精度, 室内精度を算出した結果を表 4 に示す。

真度については、すべての項目で目標値を満たした。

精度については、テトラニリプロールのみ併行精度の目標値を満たさなかった。その理由は、感度があまり良くないことと、添加濃度が高いため測定時の希釈倍率が大きくなることから、データがばらついたと推測される。テトラニリプロールの分析結果は、参考値としては十分な分析精度を持つものの、今後より高精度の結果が得られるように、引き続き検討を行う必要がある。

一律基準である 0.01 $\mu\text{g/g}$ 相当の標準溶液 (2.5 ng/mL) を測定して S/N 比を算出したところ、すべての化合物で $S/N \geq 10$ であった。そのため定量限界を 0.01 $\mu\text{g/g}$ とした。

4. 試料マトリックスの測定への影響

図 1 に示す手順で調製した測定溶液を、添加濃度が 1 ppm と 2 ppm の化合物は 10 倍に、3 ppm ~ 10 ppm の化合物は 50 倍に、15 ppm ~ 25 ppm

表 3 ガイドラインに示す各目標値

濃度 (ppm)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
≤ 0.001	70 ~ 120	30 >	35 >
0.001 < ~ ≤ 0.01	70 ~ 120	25 >	30 >
0.01 < ~ ≤ 0.1	70 ~ 120	15 >	20 >
0.1 <	70 ~ 120	10 >	15 >

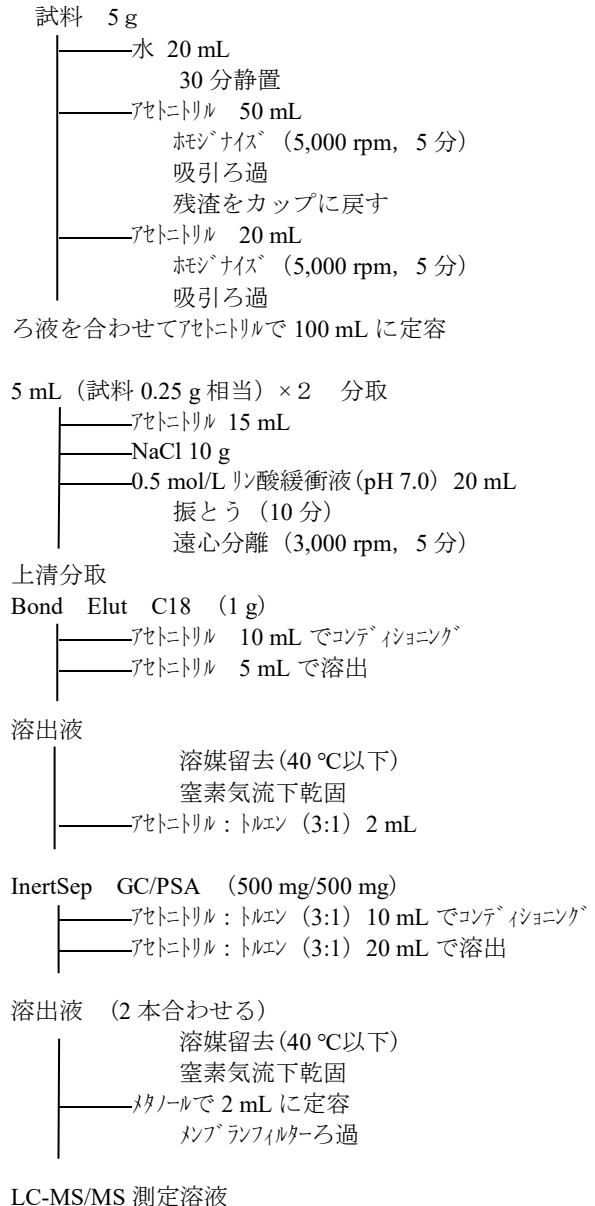


図 1 試験溶液の調製

の化合物は 100 倍に 30 ppm ~ 80 ppm の化合物は 500 倍にメタノールで希釈して測定している。各測定溶液のマトリックスの影響を確認するため、ブランク試料から調製した測定溶液をメタノールで 10 倍希釈する際に、標準原液のアセトンをメタノールに転溶して希釈した標準溶液 (1000 ng/mL) 1 mL を添加しマトリックス標準溶液 (100 ng/mL) を調製した。この溶液と検量線用標準溶液 (100 ng/mL) の各化合物のピーク面積比を求めたところ、全ての化合物が 0.80 ~ 1.20 の範囲であった。このことから試料マトリックスの測定への影響は少ないと考えられた。

表4 妥当性評価結果

農薬名	測定対象化合物	添加濃度 (ppm)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	
1	アセタミプリド	アセタミプリド	30	95	3	5
2	アゾキシストロビン	アゾキシストロビン	10	96	6	6
3	イミダクロプリド	イミダクロプリド	10	104	8	8
4	エチプロール	エチプロール	10	99	5	5
5	エトキサゾール	エトキサゾール	15	87	2	3
6	クレソキシムメチル	クレソキシムメチル	15	98	4	5
7	クロマフェノジド	クロマフェノジド	20	104	2	6
8	クロルピリホス	クロルピリホス	10	93	2	3
9	クロルフルアズロン	クロルフルアズロン	10	98	4	5
10	シアントラニリプロール	シアントラニリプロール	30	100	8	8
11	ジエトフェンカルブ	ジエトフェンカルブ	5	93	5	5
12	シエノピラフェン	シエノピラフェン	60	85	3	5
13	シクラニリプロール	シクラニリプロール	50	96	5	6
14	ジノテフラン	ジノテフラン	25	82	6	9
15	ジフェノコナゾール	ジフェノコナゾール	15	97	2	2
16	シメコナゾール	シメコナゾール	10	94	8	8
17	ジメトエート	ジメトエート	1	99	5	7
18	シラフルオフエン	シラフルオフエン	80	95	4	5
19	スピノサド	スピノシンA	2	92	4	10
20	スピノサド	スピノシンD	2	94	2	6
21	スピロジクロフェン	スピロジクロフェン	20	77	4	8
22	チアクロプリド	チアクロプリド	25	109	4	8
23	チアメトキサム	チアメトキサム	20	100	8	8
24	テトラニリプロール	テトラニリプロール	50	91	13	13
25	テブコナゾール	テブコナゾール	80	99	2	2
26	トリアジメホン	トリアジメホン	1	99	4	7
27	トリフルミゾール	トリフルミゾール	15	86	4	4
28	トリフルミゾール	トリフルミゾール代謝物	15	97	5	5
29	トリフロキシストロビン	トリフロキシストロビン	5	98	3	5
30	ピフルブミド	ピフルブミド	50	89	1	3
31	ピフルブミド	ピフルブミド代謝産物B	50	101	2	3
32	ピラクロストロビン	ピラクロストロビン	25	99	3	3
33	ピラクロホス	ピラクロホス	5	97	2	3
34	ピリダベン	ピリダベン	10	96	5	11
35	ピリプロキシフェン	ピリプロキシフェン	15	99	2	2
36	ピリベンカルブ	ピリベンカルブ	40	95	2	2
37	ピリベンカルブ	ピリベンカルブ代謝産物B	40	97	7	8
38	ピリミジフェン	ピリミジフェン	3	85	3	3
39	ピリミホスメチル	ピリミホスメチル	10	93	4	4
40	フェンピロキシメートーE	フェンピロキシメートーE	40	92	5	5
41	フェンブコナゾール	フェンブコナゾール	30	95	6	6
42	フェンプロパトリン	フェンプロパトリン	25	98	2	3
43	ブプロフェジン	ブプロフェジン	30	89	3	3
44	フルフェノクスロン	フルフェノクスロン	15	94	4	4
45	プロバルギット	プロバルギット	5	94	2	3
46	ボスカリド	ボスカリド	60	98	1	3
47	マンデストロビン	マンデストロビン	40	97	4	4
48	マイクロブタニル	マイクロブタニル	20	102	5	5
49	メチダチオン	メチダチオン	1	93	6	9
50	メトキシフェノジド	メトキシフェノジド	40	97	3	7

結 語

本研究では茶中の残留農薬一斉試験法の妥当性評価を行った。その結果、50化合物中テトラニリプロール以外の49化合物において妥当性評価ガイドラインの目標値を満たした。以上のことから本法は茶の収去検査に適用可能であると考えられる。

謝 辞

三重県産の茶における農薬の使用状況について、三重県農業研究所茶業研究室の方々に御助言をいただきました。ここに記して、感謝申し上げます。

文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知:食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について(一部改正), 食安発第 1129002 号, 2005 年 11 月 29 日.
- 2) 根本 了 他: LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物) [茶: 溶媒抽出法] の妥当性評価について. 第 54 回全国衛生化学技術協議会年会講演集, 70-71(2017).
- 3) 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生・食品安全部長通知: 「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」の一部改正について, 生食発 0620 第 1 号, 2017 年 6 月 20 日.
- 4) 農林水産省: 令和 3 年度茶の摘採面積, 生葉収穫量及び荒茶生産量 (主産県).
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知: 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について, 食安発 1224 第 1 号, 2010 年 12 月 24 日.