調査・資料

食品衛生法告示エスプロカルブ等5農薬試験法の評価

(平成11年12月6日受理)

佐々木久美子^{*1} 辰 濃 隆^{*2} 中村宗知^{*3} 今 澤 剛^{*4}
 大島辰之^{*5} 近藤安昭^{*6} 田形 肇^{*7} 千葉 実^{*8}
 松田りえ子^{*1} 豊田正武^{*1}

Method-performance Studies of Notified Analytical Method for Esprocarb and Other 4 Pesticides

Kumiko SASAKI^{*1}, Takashi TATSUNO^{*2}, Munetomo NAKAMURA^{*3}, Tsuyoshi IMAZAWA^{*4}, Tatsuyuki OHSHIMA^{*5},
 Yasuaki KONDO^{*6}, Hajime TAGATA^{*7}, Minoru CHIBA^{*8}, Rieko MATSUDA^{*1} and Masatake TOYODA^{*1}

(^{*1}National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;

^{*2}Japan Food Hygiene Association: 2-6-1, Jingumae, Shibuya-ku, Tokyo 150-0001, Japan;

^{*3}Japan Food Research Laboratories: 6-11-10, Nagayama, Tama-shi, Tokyo 206-0025, Japan;

^{*4}Tokyo Kenbikyoin Foundation Center of Food & Environmental Sciences: 44-1, Nihonbashi Hakozaki-cho, Chuo-ku, Tokyo 103-0015, Japan; ^{*5}Japan Oilstuff Inspectors' Corporation: 1-10-4, Mikagetsukamachi, Higashinada-ku, Kobe 658-0044, Japan; ^{*6}Japan Food Hygiene Association: 22-6, Koyashiki, Yaizu-shi, Shizuoka 425-0076, Japan;

^{*7}Japan Frozen Foods Inspection Corporation: 2-12-9, Sachiura, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0003, Japan; ^{*8}Japan Grain Inspection Association:

2-17-3, Arai Ichikawa-shi, Chiba 272-0144, Japan)

Method-performance studies were conducted for the notified revised analytical method for esprocarb, chlorpropham, thiobencarb, pyributicarb and pendimethalin. The five pesticides spiked in rice, soybeans, potato, cabbage, onion, cucumber, radish and lemon at the level of 0.1 $\mu\text{g/g}$ were analyzed in replicate in 6 laboratories.

Means of esprocarb recoveries ranged from 89.0 to 99.4%. Repeatability relative standard deviations (RSD_r) of the recoveries in each crop ranged from 1.5 to 9.1% and reproducibility relative standard deviations (RSD_R) ranged from 8.8 to 14.8%.

Means of chlorpropham recoveries ranged from 91.7 to 102.0%. The RSD_r and RSD_R ranged from 1.1 to 6.5% and from 7.9 to 17.3%, respectively. For thiobencarb, the means of recoveries, RSD_r and RSD_R were 87.2~102.2%, 1.7~6.1% and 8.9~16.4%, respectively. For pyributicarb, the means of recoveries, RSD_r and RSD_R were 87.8~96.0%, 2.4~9.6% and 8.5~14.4%, respectively. For pendimethalin, they were 88.6~99.4%, 2.7~8.5% and 8.1~16.4%.

Detection limits were 0.0001~0.01 $\mu\text{g/g}$ for pyributicarb and 0.00005~0.005 $\mu\text{g/g}$ for the other 4 pesticides.

(Received December 6, 1999)

Key words: 試験法評価 method-performance study; 共同実験 interlaboratory study; 告示試験法 notified analytical method; エスプロカルブ esprocarb; クロルプロファム chlorpropham; チオベンカルブ thiobencarb; ピリブチカルブ pyributicarb; ペンディメタリン pendimethalin; 併行再現性 repeatability; 室間再現性 reproducibility

^{*1} 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

^{*2} 日本食品衛生協会: 〒150-0001 東京都渋谷区神宮前 2-6-1

^{*3} 日本食品分析センター多摩研究所: 〒206-0025 東京都多摩市永山 6-11-10

^{*4} 東京顕微鏡院食と環境の科学センター: 〒103-0015 東京都中央区日本橋箱崎町 44-1

^{*5} 日本油料検定協会総合分析センター: 〒658-0044 神戸市東灘区御影塚町 1-10-4

^{*6} 日本食品衛生協会食品衛生研究所: 〒425-0076 静岡県焼津市小屋敷 22-6

^{*7} 日本冷凍食品検査協会: 〒236-0003 横浜市金沢区幸浦 2-12-9

^{*8} 日本穀物検定協会中央研究所: 〒272-0144 千葉県市川市新井 2-17-3

緒 言

平成 11 年 11 月 22 日付け告示¹⁾で、食品衛生法食品成分規格の残留農薬、エスプロカルブ、クロルプロファム、チオベンカルブ、ピリブチカルブ及びペンディメタリンに対して新しい試験法が告示された。この試験法は従来アラクロールなど試験法²⁾に含まれていたエスプロカルブ、チオベンカルブ及びペンディメタリンの 3 農薬と、単独試験法であったピリブチカルブ試験法²⁾のピリブチカルブ及びクロルプロファム試験法³⁾のクロルプロファムの 5 農薬を同時に分析する方法である。

これら 5 農薬は、フロリジルカラムクロマトグラフィーの際、比較的極性が低い溶媒で溶出することが知られている^{2), 4)}。新試験法ではフロリジルカラムから 15% エーテル-*n*-ヘキサンで溶出させることから、30% アセトン-*n*-ヘキサンで溶出させるアラクロールなど試験法²⁾のクリーンアップより精製効果が高いことが期待される。

これまで残留農薬告示試験法について、共同実験 (Interlaboratory study) によって回収率の精度を評価した報告はない。告示試験法は検査機関などで普遍的に使用されるものであることから、共同実験による精度評価を行うことは意義がある。そこで、新たに告示された試験法について、6 分析機関で添加回収試験を実施し、回収率の平均値、併行再現性及び室間再現性を評価したので報告する。

実験方法

1. 分 析 法

分析法は告示試験法¹⁾に従った。

1.1 試薬

農薬標準混合溶液：エスプロカルブ、クロルプロファム、チオベンカルブ、ピリブチカルブ及びペンディメタリンのアセトン溶液を調製し、それらを混合、希釈して 1 $\mu\text{g/mL}$ 溶液を調製した。

n-ヘキサン、アセトン及びエーテル：残留農薬試験用試薬を使用した。

1.2 装置

ガスクロマトグラフ：GC-NPD (Hewlett Packard 社製 5890 及び 6890) 又は GC-FTD ((株)島津製作所製 GC-14B) を使用した。

1.3 GC 測定条件

カラム：DB-1 (J & W 社), Ultra 1 (Hewlett Packard 社) 又は SPB-1 (スペルコ社), 内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25 μm

カラム温度：50°C (1 min)-20°C/min-240°C (11 min)-20°C/min-280°C (10 min)

注入口温度：250~280°C

検出器温度：280~300°C

キャリアーガス：ヘリウム

注入方法：スプリットレス

1.4 試験溶液の調製

玄米及び大豆は、粉碎したものを 10.0 g に水 20 mL を

加えて 2 時間放置した後、アセトン 100 mL 及び 50 mL で 2 回抽出した。吸引ろ過して得たる液を 40°C 以下で約 30 mL に濃縮し、10% 塩化ナトリウム溶液 100 mL を加えて、*n*-ヘキサン 100 mL 及び 50 mL で 2 回抽出した。抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、40°C 以下で濃縮乾固した。残留物に *n*-ヘキサン 30 mL を加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL で 3 回抽出した。抽出液を 40°C 以下で濃縮乾固し、残留物を *n*-ヘキサン 5 mL に溶かした。

野菜はホモジナイズしたもの 20.0 g をアセトン 100 mL 及び 50 mL で 2 回抽出し、吸引ろ過して得たる液を 40°C 以下で約 30 mL に濃縮した。これに 10% 塩化ナトリウム溶液 100 mL を加え、*n*-ヘキサン 100 mL 及び 50 mL で 2 回抽出した。抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、40°C 以下で濃縮乾固し、残留物を *n*-ヘキサン 5 mL に溶かした。

フロリジル 5 g を *n*-ヘキサンで湿式充てんし、上に無水硫酸ナトリウム約 5 g を積層したカラム (内径 15 mm) に、上記の抽出液を負荷し、15% エーテル-*n*-ヘキサン 100 mL で溶出して、溶出液を濃縮し、正確に 2 mL としたものを試験溶液とした。

1.5 定量

試験溶液 2 μL をガスクロマトグラフに注入し、ピーク高法 (分析機関 C, E, F) 又はピーク面積法 (分析機関 A, B, D) により定量を行った。

2. 共同実験

共同実験のデザインは IUPAC のプロトコール⁵⁾を参考に、試料数：8 (プロトコールでは最低 5)、試験室数：6 (プロトコールでは最低 8、高価な機器や特別な試験室を必要とするなどの事情がある場合は 5)、繰返し数：2 (プロトコールでは 2) とした。

すなわち、玄米、大豆、ばれいしょ、キャベツ、たまねぎ、きゅうり、だいこん及びレモンの 8 作物について、6 分析機関でエスプロカルブなど 5 農薬の添加回収試験を実施した。各機関で粉碎又はホモジナイズした作物に各農薬 0.1 $\mu\text{g/g}$ となるように農薬標準混合溶液 (1 $\mu\text{g/mL}$ アセトン溶液) 1~2 mL を添加し、1 時間後に抽出を開始した。無添加 1 試料及び添加 2 試料を分析し、添加試料の分析値から無添加試料の分析値を差し引いて回収率を求めた。

3. 実験結果の統計処理

各作物について得られた 12 個 (6 分析機関 $\times$ 2 個) の回収率の値を AOAC の統計処理マニュアル⁶⁾に従って解析し、各作物ごとに回収率の平均値、併行再現性及び室間再現性を求めた。解析に際して、「はずれ値」の棄却は行わなかった。再現性評価の基準として Horwitz の式⁷⁾を使用した。

結果及び考察

6 分析機関で分析した 8 作物の無添加試料 (48 検体)

Table 1. Results of Recovery Test of Esprocarb

Laboratory	Recovery (%)															
	Rice		Soybeans		Potato		Cabbage		Onion		Cucumber		Radish		Lemon	
A	83.0	84.6	79.7	97.2	92.7	80.1	87.5	82.9	88.3	93.0	100.9	102.3	95.6	99.3	95.6	91.5
B	74.9	83.0	95.1	96.9	87.4	86.9	83.4	91.1	100.4	98.8	96.6	100.7	95.6	96.6	79.2	84.4
C	107.1	99.4	94.5	112.8	101.2	98.8	76.4	92.2	85.1	89.7	80.2	77.1	116.0	113.6	72.5	89.4
D	98.8	97.1	89.6	83.0	80.8	77.6	102.0	106.6	104.0	105.5	79.2	78.7	86.5	88.0	110.6	96.5
E	100.7	100.2	99.9	101.7	92.3	97.0	97.7	101.2	113.4	110.7	110.6	107.3	107.8	109.2	114.1	112.8
F	104.1	104.3	101.5	117.5	88.2	85.0	81.8	85.7	83.9	82.8	101.8	103.7	92.3	91.8	108.0	106.9
Mean (%)	94.8		97.4		89.0		90.7		96.3		94.9		99.4		96.8	
RSD _r (%)*	3.5		9.1		4.7		6.2		2.2		2.0		1.5		6.9	
RSD _R (%)**	11.6		11.2		8.8		10.7		11.6		13.7		10.5		14.8	

Sample size was 20.0 g except rice and soybeans (10.0 g) and spiked level of each pesticide was 0.1 µg/g.

* Repeatability of recovery

** Reproducibility of recovery

Table 2. Results of Recovery Test of Chlorpropham, Thiobencarb, Pyributicarb and Pendimethalin

Pesticide	Recovery (%)								
	Rice	Soybeans	Potato	Cabbage	Onion	Cucumber	Radish	Lemon	
Chlorpropham	Mean (%)*	102.0	96.0	91.7	93.7	100.1	96.6	97.5	95.6
	RSD _r (%)**	1.1	4.0	6.3	4.7	2.0	2.2	3.9	6.5
	RSD _R (%)***	7.9	13.6	15.3	12.3	9.8	17.3	11.4	17.1
Thiobencarb	Mean (%)	102.2	94.4	87.2	87.3	94.9	90.3	95.5	97.8
	RSD _r (%)	2.8	6.1	3.2	3.7	3.3	2.0	1.7	2.8
	RSD _R (%)	13.2	11.5	8.9	15.3	14.5	16.4	11.5	9.9
Pyributicarb	Mean (%)	96.0	90.9	87.8	89.5	89.4	91.2	93.4	89.9
	RSD _r (%)	5.6	5.8	4.8	5.4	2.4	3.7	8.3	9.6
	RSD _R (%)	13.8	8.7	14.0	13.4	10.9	8.5	12.6	14.4
Pendimethalin	Mean (%)	99.4	89.7	88.6	95.0	96.8	93.7	91.5	92.9
	RSD _r (%)	3.4	7.8	3.5	6.9	2.7	4.8	4.5	8.5
	RSD _R (%)	11.9	12.1	8.1	9.9	14.6	12.7	16.4	15.8

Sample size was 20.0 g except rice and soybeans (10.0 g) and spiked level of each pesticide was 0.1 µg/g.

* Mean of recoveries in 6 laboratories

** Repeatability of recovery

*** Reproducibility of recovery

Fig. 1. Gas chromatograms of standard solution of 5 pesticides (each 2 ng) (A), sample solutions prepared from unspiked crops, cabbage (B), unpolished rice (C) and soybeans (D)

Peak number 1: chlorpropham; 2: thiobencarb; 3: esprocarb; 4: pendimethalin; 5: pyributicarb

Column: DB-1 (0.25 mm i.d. $\times$ 30 m, 0.25 μ m)

Column oven temp.: 50°C (1 min)-20°C/min-240°C (1 min)-20°C/min-280°C (10 min)

からはエスプロカルブ 0.001~0.005 $\mu\text{g/g}$ (6検体), クロルプロファム 0.001~0.04 $\mu\text{g/g}$ (8検体), チオベンカルブ 0.001~0.009 $\mu\text{g/g}$ (3検体) 及びペンディメタリン 0.001~0.006 $\mu\text{g/g}$ (2検体) に相当するピークが検出されたので, これらを差し引いて回収率を求めた。

エスプロカルブの回収率データとそれらを統計処理して求めた平均値, 併行再現性の相対標準偏差 (RSD_r) 及び室間再現性の相対標準偏差 (RSD_R) を Table 1 に示した。他の4農薬については, 回収率平均値, RSD_r 及び RSD_R を Table 2 に示した。

各農薬, 各作物の6分析機関平均回収率はチオベンカルブ/ばれいしょの 87.2% からチオベンカルブ/玄米の 102.2% の範囲内にあり, 満足すべき結果であった。

エスプロカルブ回収率の RSD_r は 1.5~9.1% であり, RSD_R は 8.8~14.8% であった。クロルプロファムではそれぞれ 1.1~6.5% と 7.9~17.3%, チオベンカルブでは 1.7~6.1% と 8.9~16.4%, ピリブチカルブでは 2.4~9.6% と 8.5~14.4%, ペンディメタリンでは 2.7~8.5% と 8.1~16.4% であった。 RSD_r 及び RSD_R の値に農薬による大きな差は認められず, エスプロカルブなど試験法はこれら5農薬に対して同等の再現性を有することが分かった。一般に 0.1 $\mu\text{g/g}$ レベルの分析値の RSD_R は, Horwitz の式⁷⁾ に従えば 22.6% であり, RSD_r は RSD_R の 1/2~2/3 といわれている。今回得られた RSD_R は最大 17.3% であり, 22.6% を下回っていた。また, RSD_r は最大 9.6% であり, 22.6% の 1/2 (=11.3%) より小さく, 併行再現性, 室間再現性ともに良好と言える。

標準品及び無添加試料のガスクロマトグラム例 (玄米, 大豆, キャベツ) を Fig. 1 に示した。いずれの作物でも成分由来の大きな妨害ピークは認められなかった。

標準溶液のガスクロマトグラムから $S/N=3$ を示す農薬量を求め, 試料 20 g 中の濃度に換算した値を検出限界としたとき, 各農薬の検出限界は分析機関による差が大き

かった。検出限界が最も高かったのはピリブチカルブ (0.0001~0.01 $\mu\text{g/g}$) であり, 他の4農薬は 0.00005~0.005 $\mu\text{g/g}$ の範囲であった。これら5農薬の残留基準値は最も低く設定された作物でも 0.05 ppm であることから, 本試験法の検出限界は行政検査目的にかなっているものと考えられる。

謝 辞

本研究は厚生省生活衛生局の汎用農薬分析調査研究費により, 食品衛生指定検査機関協議会・技術検討委員会 (残留農薬作業部会) の協力で実施した。関係各位に深謝いたします。

文 献

- 1) 厚生省告示第237号 (1999) “食品, 添加物等の規格基準の一部を改正する件” 平成11年11月22日。
- 2) 厚生省告示第245号 (1998) “食品, 添加物等の規格基準の一部を改正する件” 平成10年10月12日。
- 3) 厚生省告示第239号 (1992) “食品, 添加物等の規格基準の一部を改正する件” 平成4年10月27日。
- 4) Committee on Analytical Method of Pesticide Residue, Development of analytical methods for multiresidue of pesticides, Shokuhin Eisei Kenkyu (Food Sanitation Research), 45(9), 31-49 (1995).
- 5) Horwitz, W., Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. Pure Appl. Chem., 67, 331-343 (1995).
- 6) Youden, W. J., Steiner, E. H., “Statistical manual of the Association of Official Analytical Chemists”, Arlington, 1975, p. 72~83. (ISBN 0-935584-15-3)
- 7) Pocklington, W. D., Harmonized protocols for the adoption of standardized analytical methods and for the presentation of their performance characteristics. Pure Appl. Chem., 62, 149-162 (1990).