

農薬調査研究報告

第10号

平成30年

Research Report of Agricultural Chemicals

Vol. 10
2018



独立行政法人 農林水産消費安全技術センター
Food and Agricultural Materials Inspection Center
(Incorporated Administrative Agency)

Kodaira, Japan

はじめに

農林水産消費安全技術センター（FAMIC）は、農林水産省所管の独立行政法人であり、農薬取締法、肥料取締法、飼料安全法、JAS法等の法律に基づき、農業生産資材（農薬、肥料、飼料等）や食品を対象として科学的な検査・分析を行い、農業生産資材の安全の確保、食品等の品質・表示の適正化等に技術で貢献することを使命に掲げ、業務を行っています。

農薬は、登録制度等により厳しい規制が行われており、農林水産大臣の登録を受けなければ、製造、加工、輸入等を行うことができません。FAMIC農薬検査部は、農薬管理の要である農薬登録審査を主たる業務としています。また、農林水産省との密接な連携のもと、登録された農薬の市場における品質の確保のため農薬製造場への立入検査を実施するとともに、全国の農業生産現場における農薬の使用状況及び生産者から収集した農産物中の農薬の残留状況についての分析調査を行っています。

今般、平成29年度の農薬検査部における調査研究成果を収録した農薬調査研究報告第10号を発行しました。農薬検査部の調査研究は、登録審査業務の遂行に必要な技術力の向上や残留農薬の調査に必要な分析技術の向上を目的としています。また、農林水産省との密接な連携のもと、農薬登録の国際調和を進める上で必要な技術情報等の提供といった役割も担っています。こうした観点から、調査研究の対象については、実験を伴うもののみならず、文献等により収集した情報を分析・考察する調査や論考についても含めたものとしています。また、調査研究の成果は、関係学会等での発表を通じて公表に努めています。

この第10号では、実験を行いデータを得る手法を主にした調査研究の成果1論文と1技術レポート、文献等により収集した情報等を分析・考察した調査研究の成果1論文を掲載しています。また、学会誌に掲載された調査研究の成果1論文を掲載元の許諾を得て転載しています。

本報告書が関係者の皆様の業務の参考になりますことを期待しています。また、農薬検査部では、今後も調査研究に積極的に取り組んでいくこととしています。調査研究の充実のためには、各方面の皆様からのご意見も不可欠ですので、ご指導のほどお願い申し上げます。

平成31年2月

独立行政法人 農林水産消費安全技術センター
理事長 木村 真人

目 次

農薬集取品の分析における効率化の検討

木村 穰, 渡辺高志, 塚田勇輝, 倉浪佑実子…………… 1

農薬の蜂に対する急性リスクの削減に関する米国環境保護庁の方針について

石原 悟, 木村 穰, 大泉輝明, 市原直登…………… 1 0

Differential uptake and translocation of organic chemicals by several plant species from soil

(Journal of Pesticide Science, 2018, 43(2), 96 ~ 107)

Sayuri Namiki, Takashi Otani, Yutaka Motoki, Nobuyasu Seike and Takashi Iwafune 1 7

平成29年度学会等での発表実績一覧…………… 2 9

【技術レポート】

残留農薬分析業務における分析法の検討

(LC-MS/MSを用いた野菜・果実類中の残留農薬の同時分析法の開発)

佐々木秀幸, 守山智章, 山田篤司, 鈴木徹也, 臼井裕一, 野村哲也…………… 3 0

農薬集取品の分析における効率化の検討

木村 穰*, 渡辺高志*, 塚田勇輝**, 倉浪佑実子*

* 独)農林水産消費安全技術センター 農薬検査部

** 農林水産省消費・安全局

現在、農林水産消費安全技術センター（FAMIC）では、立入検査で集取した農薬製剤（集取品）の分析方法として見本検査法を採用しているが、国際農薬分析法協議会（Collaborative International Pesticides Analytical Council, 以下「CIPAC」という。）では、農薬製剤の品質管理に用いる定量方法として、標準品や溶媒の使用量や分析時間が少なくすむ簡便な「ブラケット法」を採用している。集取品の分析における同法の採用の可否を検討するため、高速液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィーまたは紫外可視分光法で分析する9種類の有効成分について、有効成分の含有率が低濃度から高濃度までの製剤7種（乳剤、水和剤、粒剤、粉剤および水溶剤）を用いて、見本検査法とブラケット法における検量線および分析結果を比較した。いずれも原点付近を通る直線性の良い検量線が得られたこれらの農薬においては、見本検査法（4～5点検量線）による分析結果とブラケット法（1点検量線）による分析結果は同等となった。また、試料の分析点数の違いによる有効成分の含有率の比較から、分析点数を2点とした場合でも十分な精度を持つことが確認された。従って、ブラケット法は集取品の分析におけるスクリーニング分析法として導入可能と判断された。

Keywords：農薬、製剤分析、ブラケット法、CIPAC

緒 言

農薬登録申請時には、農薬製剤の品質管理に係る資料として、農薬の見本、農薬登録申請見本検査書および農薬の見本の検査に関する資料等を提出する必要がある^{1,2)}。見本中の有効成分の含有率の検査方法（見本検査法）は、有効成分の含有率が表示値に適合しているかどうかを検査する方法であるため高い精度が求められ、選択性、直線性、精確性、再現性といった妥当性が確認された方法である³⁾。FAMIC 農薬検査部では、新規申請された農薬の登録検査時に、見本検査法の検証を行っている。一般的な見本検査法の概要を以下に示す（表1(1)参照）。

- ・濃度の異なる標準溶液（見本検査法標準溶液）を4～5点調製し、分析機器を用いて定量する。
- ・最小二乗法を用いて濃度等－レスポンス（ピーク面積、面積比、吸光度等）の検量線（見本検査法検量線）を作成する。
- ・試料溶液は5点調製して定量し、得られたレスポンスから濃度等を逆推定する。これらを平均して、製剤中の有効成分の含有率を算出する（4～5点検量線）。

さらに、FAMIC 農薬検査部は、品質不良農薬や無登録農薬等の流通を防止するため、農薬取締法

に基づく農林水産大臣の指示による農薬製造者への立入検査を行い、その際に集取した農薬（集取品）中の有効成分の含有率の検査も実施している。検査結果は監督処分等の根拠とされるものである一方、所定の期限内に農林水産大臣宛に報告する必要があるため、高い精度かつ短期間での分析が求められている。現在は集取品の分析にも見本検査法が採用されているが、検量線用に作成する標準溶液や分析点数が多く、高価な標準品や溶媒等を多量に必要とし、さらに分析にも時間を要するという欠点がある。

一方、農薬は国際流通商品であることから、FAO（国際連合食糧農業機関）・WHO（世界保健機関）が共同で製剤および原体の規格を定めており、この規格への適合性を確認するための試験方法をCIPACが定めている（CIPAC法）。この試験方法は、国際的な共同試験を実施した上で定められていることから信頼性かつ堅牢性の高い方法であるが、ここでは、試料溶液を標準溶液ではさみ、一点検量線により定量する簡便な方法（以下「ブラケット法」という。）が採用されている⁴⁾。ブラケット法の概要を以下に示す（表1(2)参照）。

- ・試料を定量する時の溶液濃度（ C_1 ）、その0.5倍量の濃度および2倍量の濃度の標準溶液（CIPAC法標準溶液）を調製し、分析機器を用

表 1. 見本検査法とブラケット法の標準溶液の調製点数と標準品使用量の比較 (例)

| | |
|------------------------------|-----------|
| (1) 見本検査法 | |
| 【検量線 1】 | |
| 検量線 1 (標準品 1mg/mL) | |
| 検量線 2 (標準品 2mg/mL) | |
| 検量線 3 (標準品 3mg/mL) : 1 倍量に相当 | |
| 検量線 4 (標準品 4mg/mL) | |
| 検量線 5 (標準品 5mg/mL) | |
| 【試料分析】 | |
| 試料 1 | |
| 試料 2 | |
| 試料 3 | |
| 試料 4 | |
| 試料 5 | |
| 【検量線 2】: 実施する場合 | |
| 検量線 1 | |
| 検量線 2 | |
| 検量線 3 | |
| 検量線 4 | |
| 検量線 5 | |
| 試料点数 : 10 点 | |
| 定量点数 : 10~15 点 | |
| 標準品使用量 | |
| (1+2+3+4+5) = 15mg | |
| (2) ブラケット法 | |
| 【試料分析】 | |
| 標準溶液 1-1 (標準品 3mg/mL) | } 1 ブラケット |
| 試料 1 | |
| 標準溶液 1-2 (標準品 3mg/mL) | } 2 ブラケット |
| 試料 2 | |
| 標準溶液 1-1 | } 3 ブラケット |
| 試料 3 | |
| 標準溶液 1-2 | |
| 試料 4 | |
| 標準溶液 1-1 | |
| 試料 5 | |
| 標準溶液 1-2 | |
| 【直線性確認】(事前の確認) | |
| 0.5 倍量 標準溶液 (標準品 1.5mg/mL) | |
| 1 倍量 (標準溶液 1-1 を使用) | |
| 2 倍量 標準溶液 (標準品 6mg/mL) | |
| 試料点数 : 9 点 | |
| 定量点数 : 11 点 | |
| 標準品使用量 | |
| (3+3+1.5+6) = 13.5mg | |

いて定量する。

・得られたレスポンスから、見本検査法と同様、検量線 (CIPAC 法検量線) を作成し、直線性および検量線が原点付近を通ることを事前に確認する。

・試料の定量にあたって、濃度 C_1 の標準溶液を 2 点 (C_{1-1} , C_{1-2} : ブラケット法標準溶液) 調製する。試料溶液は、原則として 2 点調製し、試料溶液を標準溶液ではさみながら定量する (1 点検量線)。

・ C_{1-1} および C_{1-2} におけるレスポンスファクターを求め、次式よりレスポンス (面積等) から濃度を算出し、平均して製剤中の有効成分の含有率を算出する。このとき、試料の定量は 1 つのブラケット内で行う。

$$f = s P / H_s$$

$$\text{content (g/kg)} = H_w f / w$$

ここで、 f はレスポンスファクター、 H_s は標準溶液におけるピーク面積、 H_w は試料溶液におけるピーク面積等、 s は標準溶液中の標準物質重量 (mg)、 w は試料採取量 (mg)、 P は標準物質の純度 (g/kg)、 content は製剤中の有効成分の含有率。

ブラケット法と見本検査法と比較するとブラケット法の方が検量線に係るコストと労力が少ない (表 1)。さらに、見本検査法では 5 点の試料分析が行われているが、CIPAC 法では通常 2 点の試料分析を採用していることから、分析に必要な時間も短い。従って、ブラケット法が導入できれば、分析時間の短縮、さらに標準品や溶媒の使用量の削減等の検査の合理化が期待される。しかし、5 点検量線を 1 点検量線に変更、5 点の試料分析から 2 点の試料分析に変更することにより精度が低下するおそれがある。そのため、本調査研究では、ブラケット法と見本検査法を用いて農薬製剤を分析し、その結果を比較し、分析上の精度が低下した場合に、その程度が許容できるかどうかを検討し、集取品の分析業務へのブラケット法の導入の可能性について検討した。

材料および方法

1. 供試製剤等

1.1. 供試製剤

集取品分析において、見本検査法からブラケット法への代替が可能かどうか検討するため、供試製剤は、剤型、有効成分含有率、定量原理に幅を持たせるよう選定した。

剤型は、乳剤 1 点、水和剤 3 点（粉状 2 点、フロアブル 1 点）、粒剤 1 点、粉剤 1 点、水溶剤 1 点の計 7 製剤を選定した。うち 2 製剤は混合剤である。

有効成分含有率は、10%以下の成分を 3 点、10%超 50%未満の成分を 3 点、50%以上の成分を 3 点の計 9 種類を選定した。選定した有効成分を、以下、A~I と表記する。

分析方法は、高速液体クロマトグラフ（以下「HPLC」という。）で分析する成分が 6 点、ガスクロマトグラフ（以下「GC」という。）で分析する成分が 2 点、紫外可視分光光度計（以下「UV」という。）で分析する成分が 1 点であった。

1.2. 分析機器

HPLC はフォトダイオードアレイ紫外可視吸光検出器 (PDA) 付き島津製作所製 LC-20 を用いた。

GC は水素炎イオン化検出器 (FID) 付き Agilent 社製 6890N を用いた。

UV は日本分光製 V-630 を用いた。

1.3. 標準品、内部標準物質および溶媒

有効成分の標準品は、林純薬工業株式会社または和光純薬工業株式会社より入手した。

内部標準物質は、和光純薬工業株式会社、東京化成工業株式会社または関東化学株式会社製試薬を用いた。

溶媒は、和光純薬工業株式会社製高速液体クロマトグラフ用または特級を用いた。

1.4. 標準溶液の調製

1.4.1. 見本検査法標準溶液

標準溶液は、申請者より提出された見本検査書に記載された方法に準じて、濃度の異なる溶液を 4~5 点調製した。

1.4.2. ブラケット法

1.4.2.1. CIPAC 法標準溶液

定量する試料溶液の濃度を 1 倍量とし、0.5 倍量および 2 倍量の濃度に相当する標準溶液を 1 点ずつ調製した。この標準溶液は直線性の確認のみに用いる。

1.4.2.2. ブラケット法標準溶液

定量する試料溶液の濃度を 1 倍量とし、1 倍量に相当する標準溶液を 2 点（以下「標準溶液 1-1 (C_{1,1})」および「標準溶液 1-2 (C_{1,2})」という。）調製した。

なお、標準溶液 1-1 と標準溶液 1-2 は、標準物質を別々に秤量して作成した。

1.5. 試料溶液の調製

見本検査法およびブラケット法とも、申請者より提出されている見本検査法に準拠して、試料溶液を調製した。

1.6. 農薬製剤の分析

農薬製剤の分析方法は、以下のとおり、見本検査法に記載されている方法で実施した。

A は無極性カラムを用いた GC で分析し、定量には内部標準法を用いた。

B は高極性カラムを用いた GC で分析し、定量には内部標準法を用いた。

C, D, E, F, H および I は逆相カラムを用いた HPLC で分析し、定量には内部標準法を用いた。

G は UV で分析し、定量には絶対検量線法を用いた。

2. 検量線パラメータ

1.4 で作成した見本検査法標準溶液、CIPAC 法標準溶液およびブラケット法標準溶液を用いて検量線を作成した。

2.1. 選択性

これらの標準溶液を用いて、定量する成分の分離状況を確認し、妨害する成分の有無を調べた。

2.2. 直線性

見本検査法標準溶液および CIPAC 法標準溶液を用いて、濃度等とレスポンス（ピーク面積等）が直線関係にあるかどうかを確認するため、最小二乗法により検量線を作成し、相関係数を検討した。

2.3. 切片

検量線が原点から大きく外れる場合には、原点を通る一点検量線により測定した場合の誤差が大きくなると考えられるため、見本検査法標準溶液および CIPAC 法標準溶液を用いて作成した検量線の切片について検討した。

3. レスポンスの再現性（ブラケット法のみ）

ブラケット法標準溶液を用いて、標準溶液 1-1 を 2 回連続で測定した場合の 1 回目と 2 回目のレスポンスの差および標準溶液 1-1、標準溶液 1-2 を連続で測定した場合の標準溶液 1-1 と標準溶液 1-2

のレスポンスの差を評価した。標準溶液 1-1, 標準溶液 1-2 は別々に調製したため, 標準物質の秤量値が異なるので, レスポンスの差を評価する際は, 単位濃度あたりのレスポンスを求めた。評価には次式により求めた測定間のレスポンスの差の百分率 (以下「変動率」という。) を用いた。

$$\text{変動率} = \frac{(\text{最大レスポンス} - \text{最小レスポンス})}{\text{最大レスポンス}} \times 100 (\%)$$

4. ブラケット法の導入可能性

4~5 点検量線を用いて見本検査法および 1 点検量線を用いてブラケット法で試料 5 点を分析した製剤中の A~I の分析値および相対標準偏差等を比較した。

また, ブラケット法については, 試料を 5 点分析した場合の分析値と 2 点分析した場合の分析値を比較した。

結果および考察

1. 検量線パラメータ

1.1. 選択性

クロマトグラフで測定する有効成分 (A~F, H 及び I), 内部標準物質およびその他の成分は完全に分離, また, UV で測定する有効成分 G のブランクの吸光度はほぼ 0 であり, 定量を妨害する成分は認められなかった。

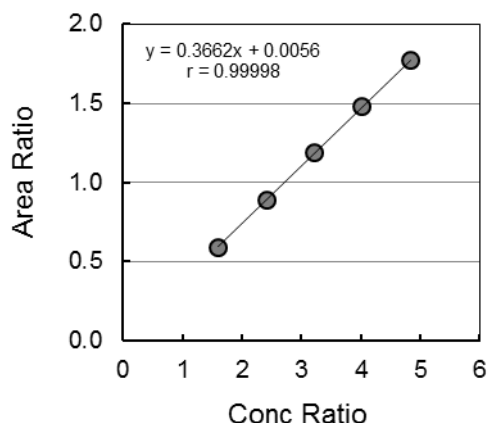


図 1. 見本検査法による 5 点検量線の例 (有効成分 A)

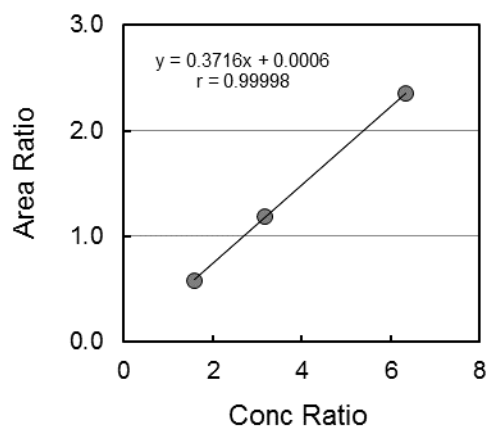


図 2. CIPAC 法による 3 点検量線の例 (有効成分 A)

1.2. 直線性

見本検査法による 5 点検量線および CIPAC 法による 3 点検量線として, 有効成分 A の例をそれぞれ図 1 と図 2 に示す。

見本検査法標準溶液および CIPAC 法標準溶液の濃度範囲, 濃度等とレスポンスにおける相関式のパラメータと相関係数を表 2 に示す。

直線性の判断基準は, AOAC INTERNATIONAL (Association of Official Analytical Chemists International) で採用されている食品分析における妥当性確認の基準である「相関係数は 0.99 以上であること」⁵⁾とした。その結果, 見本検査法および CIPAC 法の検量線の相関係数は, いずれの有効成分も 0.99 以上であり, 見本検査法および CIPAC 法とも試験した濃度範囲では良好な直線性が認められた。

1.3. 切片

見本検査法検量線および CIPAC 法検量線における切片 α の 95% 信頼区間を求め, この区間に原点が含まれているかどうかを確認した^{6,7)}。その結果, 供試した有効成分について, 見本検査法および CIPAC 法とも信頼区間に原点が含まれていた。また, 見本検査法における切片の 95% 信頼区間は, CIPAC 法における信頼区間よりも狭い傾向にあった (表 2)。これは, 検量線の点数が多いため, 誤差が小さくなるためと考えられた。

表 2. 見本検査法と CIPAC 法の検量線の測定結果

| ai | 検量線 | 濃度範囲 | 係数 α | 係数 β | r | β/β | 切片の 95%信頼区間 |
|----|---------------|--------------|-------------|--|----------|---------------|----------------|
| A | 見本検査法 (5 点) | 0.64-1.9 | 0.0056 | β_{ref} :0.3662 | 0.99998 | 1.014 | -0.0050~0.0162 |
| | CIPAC 法 (3 点) | 0.64-2.6 | 0.0006 | β_{c3} :0.3716 β_{c1} :0.3715 | 0.99998 | 1.000 | -0.1195~0.1208 |
| B | 見本検査法 (5 点) | 2.7-8.0 | -0.0006 | β_{ref} :0.4256 | 0.999998 | 1.003 | -0.0035~0.0023 |
| | CIPAC 法 (3 点) | 2.7-11 | -0.0019 | β_{c3} :0.4268 β_{c1} :0.4251 | 0.999990 | 0.996 | -0.0442~0.0556 |
| C | 見本検査法 (5 点) | 0.0048-0.024 | -0.0003 | β_{ref} :10.5581 | 0.999996 | 1.022 | -0.0045~0.0039 |
| | CIPAC 法 (3 点) | 0.010-0.040 | 0.0057 | β_{c3} :10.7860 β_{c1} :10.8469 | 0.999996 | 1.006 | -0.0442~0.0556 |
| D | 見本検査法 (5 点) | 0.40-2.0 | -0.0013 | β_{ref} :0.6261 | 0.999991 | 0.998 | -0.0077~0.0051 |
| | CIPAC 法 (3 点) | 0.60-2.4 | 0.0022 | β_{c3} :0.6248 β_{c1} :0.6272 | 0.999995 | 1.004 | -0.0393~0.0437 |
| E | 見本検査法 (5 点) | 0.0070-0.035 | -0.0012 | β_{ref} :0.9590 | 0.99997 | 1.000 | -0.0050~0.0026 |
| | CIPAC 法 (3 点) | 0.010-0.040 | -0.0016 | β_{c3} :0.9590 β_{c1} :0.9517 | 0.999998 | 0.992 | -0.0101~0.0068 |
| F | 見本検査法 (5 点) | 0.033-0.17 | 0.0031 | β_{ref} :2.0559 | 0.99998 | 1.005 | -0.0374~0.0313 |
| | CIPAC 法 (3 点) | 0.050-0.20 | 0.0179 | β_{c3} :2.0665 β_{c1} :2.0860 | 0.999990 | 1.018 | -0.1812~0.2169 |
| G | 見本検査法 (5 点) | 0.010-0.050 | -0.0001 | β_{ref} :15.1759 | 0.999995 | 1.008 | -0.0032~0.0030 |
| | CIPAC 法 (3 点) | 0.010-0.040 | 0.0002 | β_{c3} :15.2950 β_{c1} :15.2964 | 0.999995 | 1.000 | -0.0169~0.0172 |
| H | 見本検査法 (5 点) | 0.10-0.50 | 0.0025 | β_{ref} :4.3733 | 0.99998 | 0.993 | -0.0084~0.0134 |
| | CIPAC 法 (3 点) | 0.15-0.60 | 0.0005 | β_{c3} :4.3435 β_{c1} :4.3448 | 0.999998 | 1.000 | -0.0343~0.0353 |
| I | 見本検査法 (4 点) | 0.15-0.60 | 0.0034 | β_{ref} :3.7242 | 0.999995 | 1.001 | -0.0101~0.0170 |
| | CIPAC 法 (3 点) | 0.19-0.76 | -0.0005 | β_{c3} :3.7277 β_{c1} :3.7984 | 0.999998 | 0.999 | -0.0311~0.0301 |

ai : 有効成分名. 濃度の単位 : mg/mL. 係数 α と係数 β : 重量比または濃度を説明変数(x), 面積比または吸光度を目的変数(y)としたときの相関式を $y=\alpha+\beta x$ とし, 係数 α は切片, 係数 β は傾き. r : 相関係数. β/β : 上段は β_{c3}/β_{ref} , 下段は β_{c1}/β_{c3} . β_{ref} : 見本検査法検量線の傾き. β_{c3} : CIPAC 法検量線の傾き. β_{c1} : ブラケット法標準溶液を用いた 1 点検量線の傾き. 切片の 95%信頼区間 : 回帰分析における切片の 95%信頼区間.

2. レスポンスの再現性

標準溶液のレスポンスの再現性 (system equilibration) である標準溶液の繰り返し注入および 2 つの標準溶液間での変動率は, 最新の CIPAC ハンドブック O では, amisulbrom が $\pm 1.0\%$, brodifacoum が $\pm 1\%$ のようになっている⁸⁾.

標準溶液 1-1, 1-2 を連続して分析した場合および標準溶液 1-1 の連続分析を行った場合の変動率を求めた結果, いずれの有効成分も全て 1.0%以下であり, 秤量操作, 試料調製, 機器による定量値等の再現性に問題のないことが確認された(表 3).

表 3. レスポンスの再現性

| ai | 標準溶液 1-1 を連続注入した場合の変動率 | 標準溶液 1-1 と標準溶液 1-2 を連続注入した場合の変動率 |
|----|------------------------|----------------------------------|
| A | 0.52 | 0.81 |
| B | 0.37 | 0.95 |
| C | 0.72 | 0.11 |
| D | 0.04 | 0.38 |
| E | 0.04 | 0.36 |
| F | 0.88 | 0.52 |
| G | 0.06 | 0.95 |
| H | 0.14 | 0.67 |
| I | 0.13 | 0.36 |

ai : 有効成分名, 単位 : %

3. ブラケット法の導入可能性

1で得られた検量線を用いて、見本検査法、ブラケット法のそれぞれで試料5点の分析値の比較を行うとともに、ブラケット法を集取品の分析に採用するに当たっての条件・課題について検討した。

3.1. 分析値の比較

供試製剤を見本検査法およびブラケット法を用いて分析した結果は表4のとおりとなった。

HorRat⁹⁾は、見本検査法およびブラケット法とも2以下であった。

次に、見本検査法およびブラケット法を用いて定量された結果を比較した。各試料についてのブラケット法における分析値の見本検査法における

分析値に対する比率は、98.8~100.5%の範囲であった（調製した試料をブラケット法と見本検査法の両方で分析した試料に限る）。さらに、該当する25試料中9試料の比率が99.9~100.1%の範囲内にあり、見本検査法の分析値と概ね一致がみられた。

ブラケット法では、標準試料の数が少なく、標準試料の調製作業で生じる誤差が平準化されにくいこと、強制的に原点を通る検量線を引くことによって、得られる分析値に一定のバイアスがかかる可能性がある。有効成分 A, F, H, I では、両分析法の分析値に一定の大小関係が見られ、このようなバイアスが影響している可能性は否定できないが、いずれにせよ、分析値に及ぼす影響はそれほど大きくないと判断される。

表4. 見本検査法とブラケット法を用いた分析結果の比較

| ai | 方法 | 含有率 (%) | | | | | | 標準偏差 | 相対標準偏差 | HorRat |
|----|--------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 平均 | | | |
| A | 見本検査法 | 77.18 | 77.02 | 77.27 | 77.34 | 76.94 | 77.15 | 0.17 | 0.22 | 0.19 |
| | ブラケット法 | 77.11 | 76.86 | 77.17 | 77.25 | 76.90 | 77.06 | 0.17 | 0.22 | 0.20 |
| | 比率 (%) | 99.9 | 99.8 | 99.9 | 99.9 | 99.9 | 99.9 | | | |
| B | 見本検査法 | 40.25 | 40.65 | 40.63 | 40.44 | 40.63 | 40.52 | 0.18 | 0.43 | 0.27 |
| | ブラケット法 | 40.97 | 41.02 | 40.71 | 40.10 | 40.45 | 40.65 | 0.38 | 0.94 | 0.60 |
| | 比率 (%) | | | | | | 100.3 | | | |
| C | 見本検査法 | 50.93 | 50.57 | 50.92 | 50.60 | 50.79 | 50.76 | 0.17 | 0.34 | 0.24 |
| | ブラケット法 | 51.03 | 50.64 | 51.01 | 50.71 | 50.78 | 50.83 | 0.18 | 0.35 | 0.25 |
| | 比率 (%) | 100.2 | 100.1 | 100.2 | 100.2 | 100.0 | 100.1 | | | |
| D | 見本検査法 | 23.61 | 23.75 | 23.85 | 23.92 | 23.94 | 23.81 | 0.14 | 0.57 | 0.28 |
| | ブラケット法 | 23.94 | 23.92 | 23.91 | 23.86 | 23.89 | 23.90 | 0.030 | 0.13 | 0.06 |
| | 比率 (%) | | | | | | 100.4 | | | |
| E | 見本検査法 | 0.484 | 0.481 | 0.479 | 0.488 | 0.490 | 0.484 | 0.0046 | 0.95 | 0.48 |
| | ブラケット法 | 0.485 | 0.485 | 0.496 | 0.498 | 0.486 | 0.490 | 0.0064 | 1.3 | 0.66 |
| | 比率 (%) | | | | | | 101.2 | | | |
| F | 見本検査法 | 2.52 | 2.50 | 2.51 | 2.46 | 2.51 | 2.50 | 0.023 | 0.94 | 0.60 |
| | ブラケット法 | 2.49 | 2.47 | 2.49 | 2.46 | 2.48 | 2.48 | 0.013 | 0.53 | 0.34 |
| | 比率 (%) | 98.8 | 98.8 | 99.2 | 100.0 | 98.8 | 99.1 | | | |
| G | 見本検査法 | 39.66 | 40.12 | 40.10 | 39.77 | 39.70 | 39.87 | 0.22 | 0.56 | 0.35 |
| | ブラケット法 | 40.16 | 39.91 | 40.01 | 40.17 | 39.52 | 39.95 | 0.27 | 0.67 | 0.42 |
| | 比率 (%) | | | | | | 100.2 | | | |
| H | 見本検査法 | 1.003 | 0.984 | 0.980 | 0.995 | 0.987 | 0.990 | 0.0092 | 0.93 | 0.52 |
| | ブラケット法 | 1.004 | 0.985 | 0.985 | 1.005 | 0.992 | 0.994 | 0.0098 | 0.99 | 0.55 |
| | 比率 (%) | 100.1 | 100.1 | 100.5 | 101.0 | 100.5 | 100.4 | | | |
| I | 見本検査法 | 75.24 | 75.37 | 75.22 | 74.67 | 75.27 | 75.15 | 0.28 | 0.37 | 0.32 |
| | ブラケット法 | 75.43 | 75.74 | 75.55 | 74.97 | 75.63 | 75.46 | 0.30 | 0.40 | 0.34 |
| | 比率 (%) | 100.3 | 100.5 | 100.4 | 100.4 | 100.5 | 100.4 | | | |

ai : 有効成分名, HorRat : 実験で求められた相対標準偏差と Horwitz 式 ($2^{(1-0.5 \log C)} \times 0.67$ (Cは分析対象有効成分の重量分率)) を用いて求めた相対標準偏差の比, 相対標準偏差 : % 比率は同一試料を見本検査法とブラケット法で定量した場合のみ記載した。

3.2. 1点検量線の採用によるバイアスの推定

見本検査法に準拠して作成した検量線はいずれも原点付近を通り、切片の95%信頼区間に原点が含まれていたが、真の検量線が95%信頼区間の上限又は下限に相当するものであった場合には、原点を通る1点検量線を用いるブラケット法におけるバイアスが大きくなる可能性がある。このため、見本検査法で、同じデータを用い、それぞれ切片を表2の上限又は下限に固定して、最小二乗法による検量線を作成し直し、それにより得られる分析値について、ブラケット法での分析値と再度比較を行った(表5)。

その結果、ブラケット法における分析値の見本検査法における分析値に対する比率は98.5~101.0%となり、表5中の切片下限と切片上限を代入して求めた濃度は、HorwitzのRSDから求められる濃度範囲内であり、バイアスは大きくないと判断された。しかし、これは今回対象とした9農薬に限った検証結果であり、検量線の相関係数が低くなれば、切片の95%信頼区間も広くなり、ブ

表5 見本検査法検量線における切片の上限値と下限値を固定した場合の計算結果

| ai | ブラケット法 | 切片下限値 | 通常切片 | 切片上限値 |
|----|--------|-------|-------|-------|
| A | 77.06 | 77.08 | 77.15 | 77.22 |
| | — | 100.0 | 100.1 | 100.2 |
| B | 40.65 | 40.46 | 40.52 | 40.53 |
| | — | 99.5 | 99.7 | 99.7 |
| C | 50.83 | 50.85 | 50.76 | 50.76 |
| | — | 100.0 | 99.9 | 99.9 |
| D | 23.90 | 23.79 | 23.81 | 23.83 |
| | — | 99.5 | 99.6 | 99.7 |
| E | 0.490 | 0.483 | 0.484 | 0.486 |
| | — | 98.5 | 98.8 | 99.2 |
| F | 2.48 | 2.49 | 2.50 | 2.50 |
| | — | 100.6 | 100.8 | 101.0 |
| G | 39.95 | 39.97 | 39.87 | 40.12 |
| | — | 100.1 | 99.8 | 100.6 |
| H | 0.994 | 0.988 | 0.990 | 0.992 |
| | — | 99.4 | 99.6 | 99.8 |
| I | 75.46 | 74.99 | 75.15 | 75.34 |
| | — | 99.4 | 99.6 | 99.8 |

ai: 有効成分名, 上段は有効成分濃度, 下段はブラケット法定量値との比率(%)

ラケット法による分析値における潜在的なバイアスはこれよりも大きくなる。このため、ブラケット法の採用に当たっては、直線性を検証する三点検量線において、切片の95%信頼区間に原点が含まれるだけでなく、相関係数が今回の分析対象と同等(0.9999以上)であることを条件とすべきと考えられる。なお、見本検査法として提出されている分析法の大半は、相関係数が0.9999以上となっている。

3.3. 試料点数の影響

ブラケット法では見本検査法に比べ試料点数が少ないため、秤量や抽出の操作に関連する要因により、本来あるべき濃度からのずれが大きい試料が作成された場合、分析値が真の値からずれるリスクが大きくなる。そこで、見本検査法、ブラケット法のそれぞれについて、5点の試料の分析値の標準偏差に基づき、見本検査法については標本数が5、ブラケット法については標本数が2の場合の標準誤差を算出した。標本の分析値の平均の95%信頼区間は、母集団平均±2標準誤差となることから、各農薬について、両法で95%信頼区間にどの程度の差が出るかを検証した。

その結果、表6に示したように、今回対象とした9農薬の比率は98.2~103.3%となり、ブラケット法と見本検査法で3%程度分析値がずれる可能性があることが示された。

集取品の分析においては、農薬製剤中の有効成分の含有濃度が、登録票に示された濃度から一定の管理幅¹⁰⁾の範囲内にあるか否かを判断することとなる。実際の有効成分の含有濃度が、管理幅の中央付近にある場合には、上記のずれや一点検量線の採用によるバイアスが結果に影響する可能性は少ないが、含有濃度が管理幅の上限又は下限付近にある製剤では、これらが無視できなくなると考えられる。

従って、ブラケット法による分析の結果、有効成分濃度が管理幅の範囲外となった場合や、上限又は下限付近となった場合(例えば、分析値が管理幅の80%相当の範囲外となる)は、見本検査法でも分析し、その上で指導・監督処分を講じることとすべきと考えられる。

表6 見本検査法とブラケット法で定量した場合の分析値の信頼下限と信頼上限

| ai | 見本検査法 | | ブラケット法 | |
|----|-------|-------|----------------|----------------|
| | 信頼下限 | 信頼上限 | 信頼下限 | 信頼上限 |
| A | 77.00 | 77.30 | 76.67 99.6 | 77.45 100.2 |
| B | 40.36 | 40.68 | 39.64 98.2 | 41.48 102.0 |
| C | 50.61 | 50.92 | 50.45 99.7 | 51.23 100.6 |
| D | 23.69 | 23.94 | 23.82 100.5 | 23.98 100.2 |
| E | 0.480 | 0.489 | 0.479 99.6 | 0.505 103.3 |
| F | 2.48 | 2.52 | 2.45 98.6 | 2.51 99.4 |
| G | 39.67 | 40.07 | 39.20 98.8 | 40.50 101.1 |
| H | 0.982 | 0.998 | 0.975 99.3 | 1.015 101.7 |
| I | 74.91 | 75.40 | 74.59 99.6 | 76.13 101.0 |

ai : 有効成分名

上段 : 分析値 (%)

下段 : 信頼下限と信頼上限についてのブラケット法/
見本検査法の比率 (%)

結論

集取品の分析にブラケット法による定量法を導入できるかを確認するため、剤型、有効成分含有率、定量原理に幅を持たせて選定した農薬を用いて、見本検査法とブラケット法を用いて試料を5点分析した結果を比較した。

検量線パラメータは、いずれの有効成分においても、見本検査法検量線およびCIPAC法検量線とも選択性に問題はなく、直線性は良好、両者の傾きは同等、原点を通ることが確認された。

4~5点検量線による見本検査法と1点検量線によるブラケット法の分析値は同等であり、見本検査法とブラケット法は同等の精度をもつことが確認できた。

また、農薬の分析方法の国際的な標準化を図っているCIPACは、通常2点の試料分析としたブラ

ケット法を採用しており、集取品の分析においても、少ない分析点数で5点分析と同様な結果が得られれば、分析時間の短縮や溶媒使用量等の削減に繋がる。このため、ブラケット法における分析点数を2点とした場合の精度低下について検討したところ、試料5点による分析値と同等となることが確認された。

農薬の品質に問題があった場合、農薬取締法による監督処分の対象となり、その場合の検査方法(分析方法)は公定法を用いることとされている¹⁾。公定法は1970年代を最後に制定が行われていないため、現在国内で登録のある有効成分に適用できるものは少ない。そのため、FAMICでは、登録申請時に提出された見本の検査方法(分析方法)を適用している。見本検査法は前述のように5点の検量線と5点の試料分析を基本としているため、高い精度での分析が行われるものの多くの時間と経費を有するという問題点がある。今回、国際的な分析方法に用いられているブラケット法(1点検量線と2点の試料分析)と見本分析法が同等の結果を示すことが確認されたことから、集取品の分析にあたり、まず、分析方法を見本検査法に準拠したブラケット法での定量をスクリーニングとして行い、農薬の品質管理上の問題が生じた場合に、妥当性が確認されている見本検査法を用いて再分析を行うことが合理的と判断される。

謝辞

本研究の実施にあたり、農薬登録申請時に提出された見本の検査法を参考にさせていただきましたので、この場を借りて当該農薬の申請者の方々にお礼申し上げます。

なお、供試製剤及び分析方法の詳細は、提出した企業の知的財産に該当するため、記載を省略させていただきます。

引用文献およびURL

(全URLのリンクについての確認は、2018年12月1日に実施。)

- 1) 農薬取締法(昭和23年7月1日法律第82号), http://elaws.e-gov.go.jp/search/elawsSearch/elaws_search/lsg0500/detail?lawId=323AC0000000082
- 2) 農薬の登録申請書等に添付する資料等について(13生産第3987号農林水産省生産局長通知) <http://www.acis.famic.go.jp/shinsei/3987.pdf>

- 3) 「農薬の登録申請書等に添付する資料等について」の運用について (13 生産第 3988 号農林水産省生産局生産資材課長通知)
<http://www.acis.famic.go.jp/shinsei/3988/3988.pdf>
- 4) CIPAC : CIPAC Guidelines for Collaborative Study Procedures for Assessment of Performance of Analytical Methods
<http://www.cipac.org/images/pdf/study.pdf>
- 5) AOAC INTERNATIONAL : AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals
http://aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf
- 6) AOAC INTERNATIONAL : AOAC Official Methods of Analysis Appendix K, Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals (2013)
http://www.eoma.aoac.org/app_k.pdf
- 7) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター : 肥料等試験法 (2018)
http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikenho_2018_10.pdf#page=29
- 8) Collaborative International Pesticides Analytical Council : CIPAC HANDBOOK VOLUME O (ed. by M. C. Cardeal de Oliveria and J. Garvey) (2017)
- 9) FAO/WHO : GUIDELINES ON ANALYTICAL TERMINOLOGY (CAC/GL 72-2009)
http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCAC%2BGL%2B72-2009%252Fcxg_072e.pdf
- 10) FAO/WHO : Manual on the Development and Use of FAO and WHO Specifications for Pesticides, First edition, third revision (2016)
http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/JMPS_Manual_2016/3rd_Amendment_JMPS_Manual.pdf

農薬の蜂に対する急性リスクの削減に関する

米国環境保護庁の方針について

石原 悟, 木村 穰, 大泉輝明, 市原直登

独)農林水産消費安全技術センター 農薬検査部

2015年5月29日, 米国環境保護庁(EPA)は接触曝露によりミツバチに対して高い急性毒性を示す農薬の茎葉散布時に, 管理されたミツバチを保護することを目的とした「急性毒性を有する農薬の蜂への曝露を軽減するための提案」を公表した. 本提案はその後, より柔軟で実用的なリスク管理が可能となるよう修正され, 2017年1月12日に「農薬の蜂に対する急性リスクを軽減するための方針」として改めて公表された.

2017年に示された方針では, 蜂に対する急性リスク削減を目的とした「農薬製剤ラベルの注意事項による使用制限」が提案されている. 2015年の提案(方針の原案)はミツバチ成虫に対する急性接触毒性(LD₅₀)が11 µg/bee未満の有効成分を含む製剤を制限(ハザード評価に基づいた制限)するとしていたが, 方針では経済的損失等を考慮して基準が見直されている(リスク比が0.4を超える適用に限定; リスク評価に基づいた制限). また, 使用制限に係る二つの例外, ①RT₂₅(Residual Time to 25% Bee Mortality)が6時間より短い場合, すなわち残留毒性が低い場合ミツバチが野外で活動しない「日の入り2時間前から日の出8時間前の期間」に限り開花期も散布可能, ②開花期間が長い, または定まっていない作物や種子採取用植物に散布される場合, ミツバチが野外で活動しない「日の入り2時間前から日の出まで」もしくは「散布場所の温度が10.0°C以下の時」に限り開花期も散布可能が設定されている.

本方針では, 農薬のミツバチ等花粉媒介者に対する急性リスクの削減のために, 上記の新たな制限による取り組みに加え, 飼養蜂の保護計画(MP3s: Managed Pollinator Protection Plans)行動を推奨している.

Keywords: ハナバチ, ミツバチ, ポリネーター, リスク評価, リスク管理

結 言

近年, 欧米においてミツバチ等花粉媒介者(以下, ポリネーターという)の減少に関する懸念が高まっており, その要因の一つとして農薬の影響が挙げられている. このため, 欧米では農薬のポリネーターに対する新たなリスク評価手法^{1,2)}が策定され, その運用が始まっている.

農薬の花粉媒介者に対するリスクを管理する手法の一つとして, 農薬製剤のラベルに注意事項を記載する措置がある. 米国では, 農薬製剤に記載するポリネーターに対する全般的な注意事項は, 原則としてマニュアル(EPA Label Review Manual Chapter8³⁾)に従いミツバチ成虫に対する接触毒性の強さを指標として決定されている.

ネオニコチノイド系殺虫剤のポリネーターへの

影響に対する懸念の高まりを受け, 米国環境保護庁(以下EPAという)は2013年に花粉媒介者へ対する有害性が高いネオニコチノイド系殺虫剤を含む製剤におけるラベルの注意事項を見直した⁴⁾. また, 2015年には契約受粉サービスの下で管理されたポリネーター(以下, 飼養蜂という)への農薬曝露を減らすための対策として, 新たなラベル制限によるリスク管理手法⁵⁾が提案され, 後に方針としてとりまとめられた.

本報では, 2017年1月12日公表された「農薬の蜂に対する急性リスクを軽減するための方針⁶⁾」および方針策定時に実施された経済的損失の試算結果⁷⁾について紹介する. また, 本方針では, 農薬の蜂に対する急性リスクの削減に, 飼養蜂の保護計画(MP3s: Managed Pollinator Protection Plans, 以下MP3sという)の活動を推奨していることから

MP3s の取り組みについても概要を報告する。

1. 急性毒性を有する農薬からの蜂への曝露を軽減するための提案 (EPA's Proposal to Mitigate Exposure to Bees from Acutely Toxic Pesticide Products., 2015.5)

1.1. 背景

2014年6月、米国のオバマ大統領（当時）はミツバチその他ポリネーターの健康状況を向上させるための連邦レベルの戦略（大統領覚書⁸⁾）を提示した。その戦略の一つとしてポリネーターの損失をなくすために連邦政府の一層の努力と、官民が協力して問題に取り組む必要性が示された。これを受け2015年5月、EPAは飼養蜂への農薬曝露と大量死を減らすため、急性毒性の強い農薬についてラベルによる使用制限【開花期中の使用禁止】を義務付けることを提案した⁵⁾。本案は以下に示す3つの条件を満たす製品について【開花期中の使用禁止】を求めるものであった。

- ①液状または粉状で散布する
- ②屋外で契約受粉サービスを利用する可能性がある農作物に茎葉散布する
- ③ミツバチに対する接触急性毒性が高い（LD₅₀が11 µg/bee未満）有効成分が含まれる製剤を使用する

1.2. パブリックコメント(Response to Public Comments Submitted on the Environmental Protection Agency's Proposal to Mitigate Exposure to Bees from Acutely Toxic Pesticide Products., 2017.1)

2015年5月に行われた意見募集（90日間のパブリックコメント、2015年8月28日終了）では、10万件を超えるコメントが寄せられた。コメントの多くはEPAの提案した殺虫剤の急性リスクから花粉媒介者を保護する方策を支持するものであった。EPAはコメントの内容を精査し約450件の重要なコメントについて項目別に分類し慎重な検討を行った。検討された項目は以下のとおり⁹⁾。

- ・適用の範囲（契約受粉サービスの下で管理された花粉媒介者、野生バチ、その他の昆虫？）
- ・新たなリスク管理措置（ラベル表示、注意事項）が養蜂家と農家の関係におよぼす影響

- ・注意事項に用いられる用語の定義
- ・定量的リスクに基づく取り組み、残留毒性データを活用した柔軟性ある取り組み
- ・MP3sの取り組み
- ・個別の適用作物（アーモンド、リンゴ、アボカド等）に関する要望

2. 急性毒性を有する農薬からのミツバチへの曝露を軽減するための提案の検討結果および修正

前述のパブリックコメントを受け、EPAは農家への潜在的な影響等を解析し、より定量的で柔軟性の高い規制のあり方について検討が行われた。本項では、2015年5月の提案を潜在的な経済的影響の観点から検討した結果⁷⁾および検討結果を受け修正されたEPAの方針⁶⁾の概要について紹介する。

2.1. 授粉サービスを利用する代表的な作物に対するラベル規制による影響の試算(Impact Estimates from Proposed and Revised Pollinator Labeling for Representative Blooming Agricultural Crops Utilizing Commercial Pollination Services., 2017.1)

EPAが2015年に示した提案はハザードベースの評価（基準は、有効成分の急性接触毒性LD₅₀が11 µg/bee未満）に基づいているため、ミツバチへの急性接触毒性の強いほとんどの殺虫剤と数種の除草剤は基準をクリアできずに使用が制限されることが予測され、農家が大きな経済的影響を受けることが懸念された。そこでEPAはリスクベースの評価に基づく制限手法について検討を行った。具体的には、評価対象農薬の単位面積あたりの使用量からミツバチの接触曝露量を推定し、その値を当該有効成分のミツバチへの急性接触毒性値（LD₅₀）で除すことによりリスク比（RQ: Risk Quotient）を求め、その値が急性影響評価における懸念レベル（LOC: Level of Concern）である0.4を超える（＝RQが0.4を超える）製剤に限りて制限を行うというものである。なお、上記判断基準は2014年に公表された北米における新たなリスク評価手法²⁾の初期段階評価（Tier1）の基準に準じている。

飼養蜂への農薬曝露を減らすための新たな制限に対する農家の対応として、以下に示す実行可能な4つの代替案が示された。

- ①ミツバチに対する急性接触毒性が強くない代替剤（茎葉散布）の施用
- ②茎葉散布ではない方法で施用
- ③化学農薬を使用しないで栽培
- ④開花期を避けた農薬の施用

上記①～④いずれの案であっても、収益の減少と代替案への切り替えに伴うコスト増加による影響が予想されるが、一般的な影響を把握するため、いくつかの作物グループ（表1）について、代表的な栽培体系下での経済的損失および代替コストが試算された。

表1. 経済的影響を解析した作物グループ

| 作物グループ | 選定理由等 |
|------------------------|--|
| アーモンド | 授粉サービスへの依存度と利用者数が最も多い。 |
| りんご | 仁果、核果の代表。東部・西部で分けて解析。 |
| いちご、ホイテゴ、ブルーベリー、クランベリー | 授粉サービスの依存度が高い。小型の果物の代表。 |
| ウリ科作物 | 多様な生産状況に対応するため、きゅうり、カンタロープ（メロンの代表）、パンプキン、スクワッシュを地域ごとに解析。 |
| アルファルファ種子 | 種子作物（飼料含む）の代表。 |
| ヒマワリ | 授粉サービスの利用額2位。 |

ハザードベースの制限（以下、原案という）を行った場合とリスクベースの制限（以下、修正案という）を行った場合のそれぞれについてコスト増加による影響を解析した結果、原案では、東部の仁果、核果、いちご、ホイテゴ、ウリ科作物、種子作物の損失が大きいと推定された。また、ブルーベリー、クランベリーは影響する面積が不明なため、中程度の損失と見積もられた（表2）。修正案では、種子作物とウリ科作物、いちごを除いて大きな損失はないと推定された。種子作物とウリ科作物については、特定の病害虫に対する防除手段がないために原案と同様に損失は大きいと推定された。一方、仁果、核果、ホイテゴ、ブルーベリー、クランベリーの影響は代替によるコストのみとなった（表3）。

使用制限により予想される影響は、代替剤がない

場合に生じる損失が大部分であり、代替剤がある場合の追加コストは比較的小さいと見積もられた。また、開花期が長い作物、開花期が定まっていない作物は損失が大きくなることが明らかになった。

2.2. 蜂に対する農薬製剤の急性リスクを軽減するための米国環境保護庁の方針(U.S. Environmental Protection Agency's Policy to Mitigate the Acute Risk to Bees from Pesticide Products., 2017.1)

EPAが2015年に示した提案による経済的影響の検討では、開花期が長いまたは開花期が定まっていない作物の栽培において、新たな制限の導入により多額の損失を生じると結論づけられた。本検討結果を受け、より現実的な方針案がまとめられ、2017年1月12日、EPAは農薬について契約受粉サービスの下で管理された花粉媒介者を保護する施策として「農薬の蜂に対する急性リスクを軽減するための方針⁶⁾」を公表した。

本方針は、以下の基準*すべてを満たす製品に適用される。

- ①液状または粉状で散布する
- ②屋外で契約受粉サービスを利用する可能性がある農作物に茎葉散布する
- ③ミツバチの急性接触毒性および曝露量に基づくRQが許容できる急性リスクの懸念レベル(LOC: 0.4)を超える投下量で使用する*
(*③が原案と異なる修正部分、①および②は原案と同じ内容)

上記条件に該当する農薬ラベルの注意事項を、急性リスクを低減するため、以下の内容に変更することが提案された。

【契約受粉サービスを利用している場合、開花期が完了するまで、作物への茎葉散布を禁止。ただし、州、先住民族自治区、認可された地元の保健局または防疫機関によって決定された公共および動物の健康への脅威を防止または抑制するための散布（以下、緊急防除のための散布という）は除く】

本方針でEPAは液状または粉状で散布される製

品を有する有効成分のリストを作成し、ミツバチへの急性接触毒性の強さから3段階（Group1-3）に分類した。現時点ではGroup1のみ具体的に成分が示されており、急性接触毒性が高い（LD₅₀が11 µg/bee未満）と評価されている43の有効成分が掲載されている。Group2, 3については今後整備する予定となっている。また、本指針には、契約受粉サービスを利用する農作物リスト、契約受粉サービスを利用する農作物で開花期が定まっていない作物のリストなど、ポリネーターに対する農薬のリスクを考察する上で有用な情報が記載されている。

EPAはパブリックコメントによる意見を考慮し、本方針をより柔軟性のある提案とするため、上記制限に対して特別な例外（ラベル注意事項の緩和に関する2種の例外）を提示した。以下に概要を記載する。

例外1：

【残留毒性が低い（RT₂₅が6時間より短い場合）】

RT₂₅とは、残留毒性試験¹⁰⁾の結果示されるミツバチ成虫の死亡率が25%まで下がるのに必要な時間である。RT₂₅が6時間以下を示す場合、すなわち残留毒性が低いと評価される有効成分については、ミツバチの野外での活動が活発でないと考えられる時間帯における使用を認め、先に示したラベルの注意事項を以下のように改訂することを可能としている。

【契約受粉サービスを利用している場合、開花期が完了するまで、作物への茎葉散布を禁止。ただし、緊急防除のための散布または日の入り2時間前から日の出8時間前の期間の散布は除く】

例外2：

【開花期間が長いまたは開花期が定まっていない作物や種子採取用植物に散布される場合】

開花期間が長いまたは開花期が定まっていない作物や種子採取用植物に散布される場合、ミツバチの野外での活動が活発でないと考えられる時間帯および気温における使用を認め、ラベルの注意事項は以下のように改訂することを可能としている。

【契約受粉サービスを利用している場合、開花期が完了するまで、作物への茎葉散布を禁止。ただし、緊急防除のための散布、日の入り出2時間前から日の出までの散布および気温が50°F（摂氏10.0度）以下の時の散布は除く】

3. 契約受粉サービスの下で管理された花粉媒介者の保護計画（MP3s: Managed Pollinator Protection Plans）

飼養蜂への農薬曝露を減らすため、農家と養蜂家の双方で飼養蜂が農薬に曝露する機会をより少なくする”リスク削減対策”を講じることは重要である¹¹⁾。

米国においても農家と養蜂家を含む関係各者の密接で適時な連携が飼養蜂への農薬曝露を減らすために重要と考えられており、養蜂が盛んな州では以前よりMP3sが策定され運用されていた。本活動は前述の大統領覚書⁸⁾の発表により活発化しており、2015年6月には州-FIFRA問題研究評価グループ（SFIREG: State FIFRA Issues Research and Evaluation Group）がMP3sに関するガイダンス文書¹²⁾を公表している。

MP3sの第一の目標は、すべての関係者が直面する問題に意識を持ち、一体的に飼養蜂への農薬曝露を減らす解決策を策定することである。協調性を持った方法で問題に取り組むことで、作物生産と養蜂の両立が可能と考えられており、前章で紹介した方針⁶⁾においてもMP3sの重要性が示されている。

本項では、最も活発にMP3sに取り組んでいると考えられるカリフォルニア州が公表している計画¹³⁾を基にMP3sの具体的な取り組みについて紹介する。

1) MP3sの適用範囲

MP3sは、現在、対象が管理された花粉媒介者に限られており、受粉やその他のサービスのために人間によって管理される種が含まれる。管理された花粉媒介者は、主にセイヨウミツバチ（*Apis mellifera*）であるが、アルファルファハキリバチ（*Megachile rotundata*）や一部のツツハナバチ（*Osmia* spp.）、および一部のマルハナバチ（*Bombus* spp.）が含

まれるとされている。なお、EPA は、これら管理された花粉媒介者への農薬曝露のリスクを軽減するための戦略の大半が、野生蜂やハチ以外の花粉媒介者に対するリスクも削減すると考えている。

2) 害虫管理

カリフォルニア州では、カリフォルニア州農薬規制局 (DPR: California Department of Pesticide Regulation) とカリフォルニア州食糧・農業省 (CDE: California Department of Food and Agriculture) が、カリフォルニア州郡農業委員会 (CACs: California's County Agricultural Commissioners) と緊密に連携して農薬の使用を規制しリスクの低い害虫管理を推進している。これらの組織は、MP3s の活動で中心的役割を担っている。

3) アウトリーチ活動

飼養蜂への農薬曝露を減らすための各種アウトリーチ活動としてこれまで以下の取り組み等が実施されている。

- ・利害関係者会議の開催 (2014 年 3 月, DPR とカリフォルニアアーモンド協会 (ABC: Almond Board of California))
- ・ABC がカリフォルニア州養蜂協会 (CSBA: California State Beekeepers Association), DPR, EPA 等とステークホルダーグループを結成 (2014 年)
- ・上記ステークホルダーグループでアーモンド栽培の最良管理実施基準 (BMPs: Best Management Practices) の開発
- ・DPR 主催のシンポジウムの開催 (2015 年; "Bee Aware!", 2017 年; "Bee Safe")
- ・リーフレットの作成
 - a) 農家と養蜂家間における情報共有が重要であることを注意喚起するリーフレット¹⁴⁾
 - b) 養蜂場の位置を CACs へ登録することに関する注意喚起のリーフレット¹⁵⁾

4) 地域による取り組み

a) 通知地域 (notification region) の設置

アメリカにおけるミツバチの女王蜂の半数はカリフォルニア州北部 (サクラメント北部 3 郡: ビュ

ート, グレンおよびテハマ郡) で生産されている¹⁶⁾ ため, 飼養ミツバチにとって非常に重要な地域とされている。当該地域ではミツバチに有害な殺虫剤の使用が予定されている場合は, 少なくとも 48 時間前に所定の連絡窓口へ通知が必要とされている。

b) 柑橘/ミツバチ保護地域の設置

カリフォルニア州のサンホアキン・バレーの 3 つの郡 (フレズノ, カーンおよびテレア郡) における大規模柑橘類栽培地域は柑橘/ミツバチ保護地域として指定されている。当該地域の養蜂家は, 柑橘の開花期間 (3 月 15 日から 5 月 31 日) に特定の農薬の使用予定について事前通知を受けることとなっている。

5) 農家および養蜂家が注意すべき事項

飼養蜂への農薬曝露を減らすために注意すべき事項は農家および養蜂家で異なる。MP3s に記載されている農家および養蜂家のそれぞれが取り組める事項について以下にまとめた。

a) 農家や農薬使用者が取り組める事項

- ・農薬散布場所近辺 (半径 1 マイル内) にある巣箱の特定
- ・巣箱がある場合適切な緩衝域を確保した農薬の散布
- ・飼養蜂に有害な殺虫剤の使用を予定している場合の養蜂家への事前 (少なくとも 48 時間前) 通知
- ・農薬製剤のラベルを再確認しラベルの指示に従った農薬の施用の徹底
- ・飼養蜂の習性を理解し, 飼養蜂の活動していない時間帯での農薬の散布
- ・飼養蜂に対してより残留毒性の低い殺虫剤の選択
- ・各適用作物における飼養蜂が好む時期を理解し, 飼養蜂が訪花中の農薬散布を避ける
- ・低ドリフトの散布方法や低ドリフトのノズルを採用した農薬の施用
- ・強風時の散布を避ける
- ・総合的病害虫管理 (IPM: Integrated Pest Management) アプローチの適用

b) 養蜂家が取り組める事項

- ・ 地方農業委員会への巣箱の登録の徹底
- ・ 土地所有者との巣箱配置場所の十分な協議
- ・ 集中的な農薬散布時の巣箱の隔離や移動
- ・ 巣箱周辺で農薬が使用される時期について情報収集の実施
- ・ 清潔な水源の確保
- ・ 飼養蜂へ十分な栄養素を供給し、飼養蜂が採餌のために長距離飛翔を行わないよう蜂群を管理（長距離移動することでミツバチが農薬に曝露するリスクが高まるため）
- ・ 養蜂で使用する薬剤（ダニ駆除剤等）についてラベルの指示に従った施用の徹底
- ・ 農薬に関連した疑いのある飼養蜂の被害が発生した際、CACs へ適切な被害状況報告を行うことの徹底（今後の対策策定には被害情報の解析が不可欠であるため）

おわりに

米国における飼養蜂への農薬曝露を減らすための近年の取り組みを EPA が公開している情報等から明らかにした。ミツバチ等飼養蜂の活動範囲は広く、飼養蜂が農薬に曝露するリスクを完全になくすることはできない。米国における対策は、農家と養蜂家の双方でミツバチが農薬に曝露する機会をより少なくすることに重点を置いている。農家と養蜂家間を中心とした関係者間のリスク・コミュニケーションの重要性が改めて確認された。

花粉媒介者に対する農薬のリスク評価の歴史は浅い。花粉媒介者と農薬を巡る状況は日々変化しているため、各国が行っているリスク評価手法や有効と考えられているリスク管理手法等についても適宜改善が進められている。農薬の使用と花粉媒介者の関係に関する情報に関しては、常に最新の情報を収集し解析する必要がある。

引用文献

(全 URL のリンクについての確認は、2018 年 8 月 24 日に実施。)

- 1) <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2013.3295>
- 2) https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-06/documents/pollinator_risk_assessment_guidance_06_19_14.pdf

- 3) <https://archive.epa.gov/pesticides/news/web/pdf/lrm-chap1-18.pdf>
- 4) <https://www.epa.gov/sites/production/files/2013-11/documents/bee-label-info-ltr.pdf>
- 5) https://cals.arizona.edu/crop/vegetables/advisories/docs/062315_EPA-HQ-OPP-2014-0818-0002.pdf
- 6) U.S.EPA OPP(2017a): U.S.Environmental Protection Agency's Policy to Mitigate the Acute Risk to Bees from Pesticide Products
- 7) U.S.EPA(2015): Impact Estimates from Proposed and Revised Pollinator Labeling for Representative Blooming Agricultural Crops Utilizing Commercial Pollination Services
- 8) <https://obamawhitehouse.archives.gov/the-press-office/2014/06/20/presidential-memorandum-creating-federal-strategy-promote-health-honey-b>
- 9) U.S.EPA OPP(2017b): Response to Public Comments Submitted on the Environmental Protection Agency's Proposal to Mitigate Exposure to Bees from Acutely Toxic Pesticide Products
- 10) U.S.EPA OCSPP: Ecological Effects Test Guidelines OCSPP 850.3030 Honey Bee Toxicity of Residues on Foliage
- 11) 岡田一次(1955): 植物防疫 9.p.22-24
- 12) <https://aapco.files.wordpress.com/2015/08/sfir-eg-mp3-guidance-final.pdf>
- 13) https://www.cdpr.ca.gov/docs/enforce/pollinators/ca_managed_pollinator_protection_plan.pdf
- 14) https://www.cdpr.ca.gov/docs/enforce/pollinators/collaboration_brochure.pdf
- 15) https://www.cdpr.ca.gov/docs/enforce/pollinators/apiary_brochure.pdf
- 16) Eric C. Mussen and Robbin W. Thor (2000): ミツバチ科学 21(1).p1-8

表 2. ハザードベースの制限での影響
(LD₅₀が11μg/bee未満の有効成分を含む製剤の使用を制限)

| 作物 | 影響を受ける面積(%) | 代替コスト(\$) | 予想される損失(原因) | 影響の程度 |
|-----------|-------------|-----------|------------------------------------|-------|
| アーモンド | <10 | 79 | なし | 低 |
| 仁果・核果(東部) | 40-100 | 65-96 | 10-20%(ゾウムシ) | 高 |
| 仁果・核果(西部) | 40-50 | 7-31 | なし | 低-中 |
| いちご | <20 | 48 | 多額(アブラムシ, アザミウマ, カスミカメシ) | 高 |
| 木イチゴ | 100 | 28-65 | 多額(アブラムシ, アザミウマ) | 高 |
| ブルーベリー | 不明 | 不明 | 少額(アザミウマ) | 中 |
| クランベリー | 不明 | 不明 | 少額(西海岸北部のゾウムシ) | 中 |
| カンタロープメロン | 100 | 0-18 | 多額(アブラムシ, コナジラミ, アザミウマ, カメムシ) | 高 |
| きゅうり | 85 | 0-25 | 多額(アブラムシ, アザミウマ, ダニ, ウリハムシ(ミシガン州)) | 高 |
| パンプキン* | 10 | 0-25 | 多額(アブラムシ, コナジラミ, アザミウマ, 甲虫, カメムシ) | 高 |
| スクワッシュ* | 100 | 7-22 | 多額(アブラムシ, コナジラミ, アザミウマ, 甲虫, カメムシ) | 高 |
| アルファルファ種子 | 不明 | 不明 | 多額(カスミカメシ, アブラムシ) | 高 |
| ヒマワリ | 不明 | 不明 | 超多額(最大 100%) (ゾウムシ) | 高 |

*カボチャ

表 3. リスクベースの制限での影響
(RQが0.4を超える製剤の使用を制限)

| 作物 | 代替剤の有効成分 | 代替コスト(\$) | 予想される損失(原因) | 影響の程度 |
|-----------|-------------------|-----------|---------------------|-------|
| アーモンド | アセタミプリド | 53 | なし | 低 |
| 仁果・核果(東部) | アセタミプリド | 15-46 | なし | 低 |
| 仁果・核果(西部) | アセタミプリド | 0-24 | なし | 低 |
| いちご | アセタミプリド, ビフェナゼート | 0-52 | 少額(カスミカメシ) | 中-高 |
| 木イチゴ | アセタミプリド | 0-53 | なし | 低 |
| ブルーベリー | アセタミプリド | 不明 | なし | 低 |
| クランベリー | インドキサカルブ, アセタミプリド | 不明 | なし | 低 |
| カンタロープメロン | アセタミプリド | 22-76 | 少額(アザミウマ, 半翅目) | 中-高 |
| きゅうり | アセタミプリド | 0-87 | 少額(アザミウマ, 半翅目) | 中-高 |
| パンプキン* | アセタミプリド | 25-56 | 少額(アザミウマ, 半翅目) | 中-高 |
| スクワッシュ* | アセタミプリド | 54-107 | 少額(アザミウマ, 半翅目) | 中-高 |
| アルファルファ種子 | アセタミプリド, ノバルロン | 不明 | 少額(カスミカメシ, アブラムシ) | 高 |
| ヒマワリ | なし | 不明 | 超多額(最大 100%) (ゾウムシ) | 高 |

*カボチャ

[他誌掲載論文]

Journal of Pesticide Science, 2018, 43(2), 96~107 より転載

**Differential uptake and translocation of organic chemicals
by several plant species from soil**

Sayuri Namiki¹, Takashi Otani², Yutaka Motoki³, Nobuyasu Seike¹,
and Takashi Iwafune⁴

¹ Institute for Agro-Environmental Sciences, NARO, 3-1-3 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8604, Japan

² Central Region Agricultural Research Center, NARO, 2-1-18 Kannondai, Tsukuba,
Ibaraki 305-8666, Japan

³ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Agricultural Chemicals Inspection Station,
2-772 Suzuki-cho, Kodaira, Tokyo 187-0011, Japan

⁴ Food Safety Commission Secretariat, Akasaka Park Bld. 22nd F. Akasaka
5-2-20, Minato-ku, Tokyo 170-6122, Japan

- 本論文の著作権は、日本農薬学会が所有していますが、著作権所有者の許可を得て転載しています。

Differential uptake and translocation of organic chemicals by several plant species from soil

Sayuri NAMIKI,^{1,*} Takashi OTANI,² Yutaka MOTOKI,³ Nobuyasu SEIKE¹ and Takashi IWAFUNE⁴

¹Institute for Agro-Environmental Sciences, NARO, 3-1-3 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8604, Japan

²Central Region Agricultural Research Center, NARO, 2-1-18 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8666, Japan

³Food and Agricultural Materials Inspection Center, Agricultural Chemicals Inspection Station, 2-772 Suzuki-cho, Kodaira, Tokyo 187-0011, Japan

⁴Food Safety Commission Secretariat, Akasaka Park Bld. 22nd F. Akasaka 5-2-20, Minato-ku, Tokyo 170-6122, Japan

(Received December 3, 2017; Accepted January 21, 2018)

We performed uptake experiments with 12 different organic chemicals using 16 plant species and determined differences in the ability of plant species to take up and translocate these chemicals. There were differences among the plant species in the shoot and root concentrations of each organic chemical. The root concentration factor values increased with an increasing log of the *n*-octanol–water partition coefficient ($\log K_{OW}$) of organic chemicals. Thus, the concentrations in roots may be predicted to a certain extent because the root concentration factor values were related to the $\log K_{OW}$. The root-to-shoot translocation was related to the $\log K_{OW}$ because the shoot-to-root concentration ratio decreased with an increasing $\log K_{OW}$; however, there was no clear relationship between the shoot concentration factor value and the $\log K_{OW}$ and this differed among plant species. © Pesticide Science Society of Japan

Keywords: pesticide, plant uptake, root concentration factor, shoot-root concentration ratio.

Introduction

Agricultural land can be burdened with various anthropogenic organic chemicals, including pesticides applied intentionally for production and pollutants mixed unintentionally. These organic chemicals can cause various problems, such as crop contamination from pesticides exceeding the maximum residue limits (MRLs).¹⁾ Recently, in Japan, agricultural chemicals used on preceding crops and persisting in the soil were detected in succeeding crops at levels exceeding the MRLs.¹⁾ In these situations, production areas may be forced to take emergency measures, such as the self-imposed stoppage of shipments or the extensive inspection of soils and crops. At present, countermeasures for these problems are carried out on a case-by-case basis, and a strong need exists for measures that use science-based risk evaluation of crop contamination. As a preemptive strategy, it is important to predict the uptake of organic compounds by plants based on physicochemical properties and plant physiology.

In general, plant uptake of organic chemicals is influenced by their chemical properties, especially those that determine the *n*-octanol–water partition coefficient (K_{OW}) or, more often, $\log K_{OW}$. In a hydroponic experiment with *Hordeum vulgare*,^{2,3)}

as hydrophobicity increased (*i.e.*, $\log K_{OW}$ increased), organic chemicals were concentrated in the roots. On the other hand, the relationship between translocation to shoots and $\log K_{OW}$ produced a bell-shaped curve.²⁻⁶⁾ It was also reported that the relationship between translocation to shoots and $\log K_{OW}$ followed a negative sigmoid curve.⁷⁾ Based on the relationship between $\log K_{OW}$ and accumulation in roots or translocation to aboveground tissues *via* xylem, a number of plant uptake models for xenobiotic organic chemicals have been developed.⁸⁻¹⁴⁾ However, in these studies, differences among plant species in the uptake and translocation of organic chemicals were not considered.

Numerous screening data are available concerning the concentrations in soils and residues in crops or vegetables of pesticides applied to soils. However, these screenings have focused on pesticide residues in edible parts, and so the parts in which concentrations were measured have differed—in some cases fruit and in others leaves and stems. Moreover, in these screenings, the cultivation periods differed with the crop or vegetable growth speed, and so the periods of pesticide uptake from soil by plants were also different. In this study, we intended to observe differences in the organic chemical concentrations in shoots and roots under the same growing conditions—that is, the chemical concentration in the soil, the plant uptake period, and plant size (especially root size). By choosing different pre-growing periods and plant densities, the tested plants were grown for the same period (21 days) in soil treated with the tested organic chemi-

* To whom correspondence should be addressed.

E-mail: namikisayuri@affrc.go.jp

Published online March 23, 2018

© Pesticide Science Society of Japan

cals, and the concentrations in shoots and roots were compared. Using the results, we discussed the different abilities among plant species to take up organic chemicals from the soil into their roots and to translocate the chemicals from their roots to their shoots. In addition, we considered the chemical properties affecting the concentrations of organic chemicals in shoots and roots among the plant species.

Materials and Methods

1. Preparation of the test soil

For plant uptake experiments, we used 12 organic chemicals with a wide range of log K_{OW} levels: -0.6 to 5 . The tested chemicals were 10 pesticides and β -HCH and dieldrin, which are persistent organic pollutants (Table 1). These organic chemicals were chosen because they are relatively hard to degrade in soil and they are not herbicides affecting plant growth. The organic chemicals were dissolved and mixed in acetone to 50 mg/L. One liter of the mixture was added to 278 g of Celite[®] powder (No. 545; Wako Pure Chemical, Osaka, Japan), and the acetone evaporated for 4 hr at room temperature in a draft chamber. Because chemicals were volatilized while evaporating the acetone, their final contents in 1 g of Celite[®] were 124.9 μ g of dinotefuran, 122.7 μ g of clothianidin, 128.2 μ g of imidacloprid, 129.7 μ g of thiacloprid, 122.7 μ g of metalaxyl, 133.6 μ g of fosthiazate, 82.7 μ g of fenobucarb, 81.0 μ g of procymidone, 104.0 μ g of flutolanil, 102.9 μ g of tolclofos-methyl, 100.6 μ g of β -HCH, and 92.6 μ g of dieldrin. These organic chemicals were added to an uncontaminated Andosol (soil texture, loam; pH [H₂O], 5.5; cation exchange capacity, 33.8 cmol/kg; organic carbon, 52.1 g/kg; and water-holding capacity [WHC], 747.1 mL/kg soil).

2. Plant culture in the test soil

Plastic pots (600 mL) were filled with prepared soil (450 g of uncontaminated soil mixed with 5 g of Celite[®] prepared as above). The soil in each pot was fertilized with 5 g of chemical fertilizer (0.4 g nitrogen, 0.17 g phosphorus, and 0.34 g potassium) and 5 g of dolomite. We raised plants of 16 species (Table 2). Seeds were sown in nursery soil and germinated in a growth chamber (Koito Kogyo, Tokyo, Japan) at 20°C under a 14:10 hr light:dark cycle. At 7–28 days, the seedlings were transplanted into pots and raised in the same conditions for 21 days. Growth periods and plant densities were chosen to obtain approximately equal amounts of biomass so that the root dry weights were 1–2 g per species (Table 2). The soil moisture was maintained at 50–70% water holding capacity (WHC). Twenty-one days after transplanting, shoots and roots were harvested. The roots were washed in running tap water and sonicated in distilled water for 5 min to remove soil particles. For each sample, the fresh weight of shoots and roots was measured, and then cut finely, mixed, and divided into two subsamples. One subsample was dried at 70°C to measure the moisture content, and the other was used to measure organic chemical contents. These uptake experiments were conducted in quadruplicate.

3. Analysis of organic chemical concentrations in the soil and soil solution

To analyze organic chemicals in a soil solution, we mixed 667 mg of prepared Celite[®] into 60 g of uncontaminated soil in a 100 mL stainless steel vessel, adjusted the water content to 60% WHC with Milli-Q water, added the lid, and placed the vessel in darkness at 20°C. After 1, 3, 7, 14, and 22 days, the soil solution was collected by centrifuging at 15,800×g for 60 min. The experiment was conducted in quadruplicate.

Table 1. Physicochemical properties of 10 pesticides, β -HCH, and dieldrin.

| Chemicals | Pesticide type | Substance group | Octanol-water partition coefficient (log K_{OW}) | | |
|------------------|----------------------|-----------------|---|------------|------------|
| Dinotefuran | Insecticide | Neonicotinoid | -0.549^a | -0.549^c | -0.549^d |
| Imidacloprid | Insecticide | Neonicotinoid | 0.57^a | 0.57^c | 0.57^d |
| | Veterinary substance | | | | |
| Clothianidin | Insecticide | Neonicotinoid | 0.7^a | 0.7^c | 0.905^d |
| Thiacloprid | Insecticide | Neonicotinoid | 0.74^a | 1.26^c | 1.26^d |
| | Molluscicide | | | | |
| Fosthiazate | Insecticide | Organophosphate | 1.68^a | 1.68^c | 1.68^d |
| | Nematicide | | | | |
| Metalaxyl | Fungicide | Phenylamide | 1.75^a | 1.75^b | 1.75^c |
| Fenobucarb | Insecticide | Carbamate | 2.67^a | | 2.67^c |
| Procymidone | Fungicide | Dicarboximide | 3.14^a | 3.14^b | 3.30^c |
| Flutolanil | Fungicide | Phenylbenzamide | 3.17^a | | 3.77^c |
| β -HCH | | Organochlorine | | 3.8^b | |
| Tolclofos-methyl | Fungicide | Chlorophenyl | 4.56^a | | 4.56^c |
| Dieldrin | | Organochlorine | | 5.20^b | 3.7^d |

^{a)} Values obtained from The Pesticide Manual (16th ed.).¹⁵⁾ ^{b)} Values obtained from Illustrated Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals Vol. V Pesticide Chemicals (selected properties at 25°C).¹⁶⁾ ^{c)} Values obtained from The 2011 Pesticide Handbook.¹⁷⁾ ^{d)} Values obtained from the Footprint Pesticide Database of IUPAC.¹⁸⁾

Table 2. Plant growth period and density per pot.

| Plant name | Family name | Cultivar name | Growing days | | Plant density per pot |
|--|----------------|---------------|-----------------|--------------|-----------------------|
| | | | in nursery soil | in test soil | |
| <i>Hordeum distichon</i> L. | Poaceae | Hayadori-2 | 7 | 21 | 10 |
| <i>Zea mays</i> L. | Poaceae | Gold dent | 7 | 21 | 2 |
| <i>Glycine max</i> Merrill | Fabaceae | Fukuyutaka | 14 | 21 | 3 |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> L. | Fabaceae | | 10 | 21 | 3 |
| <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i> | Brassicaceae | Irodori | 14 | 21 | 3 |
| <i>Brassica rapa</i> L. var. <i>peruviridis</i> | Brassicaceae | Yokattana | 21 | 21 | 3 |
| <i>Chrysanthemum coronarium</i> L. | Asteraceae | Satoyutaka | 21 | 21 | 3 |
| <i>Lactuca sativa</i> L. | Asteraceae | Sun valley | 21 | 21 | 2 |
| <i>Allium wakegi</i> Araki | Amaryllidaceae | Jakkoh gold | 28 | 21 | 20 |
| <i>Apium graveolens</i> L. var. <i>dulce</i> | Apiaceae | Top seller | 28 | 21 | 10 |
| <i>Solanum lycopersicum</i> Mill. | Solanaceae | Magnet | 21 | 21 | 3 |
| <i>Capsicum grossum</i> L. | Solanaceae | | 21 | 21 | 3 |
| <i>Cucumis sativus</i> L. | Cucurbitaceae | Sharp-1 | 14 | 21 | 2 |
| <i>Cucurbita maxima</i> Duch. | Cucurbitaceae | Ebisu | 10 | 21 | 2 |
| <i>Spinacia oleracea</i> L. | Amaranthaceae | Summers | 28 | 21 | 5 |
| <i>Beta vulgaris</i> L. var. <i>cicla</i> | Amaranthaceae | | 14 | 21 | 5 |

To purify of dinotefuran, clothianidin, imidacloprid, thiacloprid, fosthiazate, and metalaxyl, a 10 mL aliquot of the soil solution was cleaned using the method applied for group A from Motoki *et al.* (2015).¹⁹⁾ The dinotefuran, clothianidin, imidacloprid, thiacloprid, fosthiazate, and metalaxyl in the purified samples were measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS; ACQUITY UPLC-Quattro Micro API; Waters Corporation, Milford, MA, USA) equipped with an ACQUITY UPLC HSS T3 (30 mm× ϕ 2.1, 1.8 μ m particle size; Waters).

To purify of fenobucarb procymidone, flutolanil, and tolclofos-methyl, a 10 mL aliquot of soil solution was cleaned using the method applied for group B from Motoki *et al.* (2015).¹⁹⁾ The fenobucarb procymidone, flutolanil, and tolclofos-methyl in the purified samples were measured by a gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS; HP6890–5973N; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with an ENV-8MS capillary column (ϕ 0.25 mm×30 m×0.25 μ m film thickness; Kanto Chemical, Tokyo, Japan).

To purify of β -HCH and dieldrin in the soil solution, a 5 mL aliquot was spiked with 100 ng each of D₆- γ -HCH and ¹³C₁₂-dieldrin (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA) as an internal standard. The soil solution was extracted with 2 mL of *n*-hexane twice with shaking for 1 min. The extract was passed through Na₂SO₄ for dehydration, syringe-spiked with 100 ng each of ¹³C₁₂-2,4,4'-trichlorobiphenyl and ¹³C₁₂-2,2',4,4',6,6'-hexachlorobiphenyl (Wellington Laboratories, Guelph, Ontario, Canada), and then concentrated to 100 μ L under a gentle stream of nitrogen gas. The β -HCH and dieldrin in the purified extracts were measured by GC-high resolution MS (AutoSpec Ultima; now Waters/Micromass, Milford, MA, USA) equipped with an ENV-8MS capillary column.

To analyze organic chemicals in the soil, we mixed 89 mg of prepared Celite[®] into 8 g dry weight of the uncontaminated soil, placed the soil in a 50 mL centrifuge tube, adjusted the water content to 60% WHC with Milli-Q water, covered the tube top with cling film, and placed the tube in darkness at 20°C. After 1, 3, 7, 14, and 22 days, the test soil was extracted with 30 mL of acetone by shaking for 20 min at 20°C. The solution was centrifuged at 2000×*g* for 10 min, and the supernatant was collected. This extraction was performed twice, and the combined acetone extract was adjusted to 100 mL. The experiment was conducted in quadruplicate.

To purify of dinotefuran, clothianidin, imidacloprid, thiacloprid, fosthiazate, and metalaxyl, a 10 mL aliquot of soil acetone extract was added to 10 mL of water. The extract was concentrated in a rotary evaporator. To the concentrated extract, 1 g of NaCl was added and then purified as for the soil solution. The dinotefuran, clothianidin, imidacloprid, thiacloprid, fosthiazate, and metalaxyl in the purified extract were measured as for the soil solution.

To purify of fenobucarb procymidone, flutolanil, and tolclofos-methyl, a 10 mL aliquot of soil acetone extract was added to 10 mL of water. The extract was concentrated in a rotary evaporator. The concentrated extract was purified as for the soil solution. The fenobucarb procymidone, flutolanil, and tolclofos-methyl in the purified extract were measured as for the soil solution.

To purify of β -HCH and dieldrin, a 10 mL aliquot was spiked with the same internal standard as above. Each extract was washed through an InterSep K-solute[®] column with 100 mL of *n*-hexane, and the eluate was concentrated in a rotary evaporator. The concentrated extract was purified through a graphite column and an ENVI-Carb-II/PSA column. The sample was

syringe-spiked and then concentrated to 100 μL under a gentle stream of nitrogen gas. The β -HCH and dieldrin in the purified samples were measured by a GC-MS instrument equipped with an ENV-8MS capillary column.

4. Analysis of organic chemical concentrations in plants

To extract pesticide, each 10 g of the shoot and root sample was homogenized in 100 mL of acetone. The extract was passed through a filter and adjusted to 200 mL.

To test for dinotefuran, imidacloprid, clothianidin, and thiacloprid, a 4 mL aliquot of the extract was concentrated. Then 3 mL of water and 1 g of NaCl were added to the concentrated extract, and it was adsorbed with a for 10 min and washed through a InterSep K-solute[®] column with 40 mL of *n*-hexane. An InterSep GC-e[®] column (GL Sciences, Tokyo, Japan) was connected below the diatomite column and then eluted with 80 mL of ethyl acetate. The eluate was concentrated and dried. The dried residue was dissolved in 2 mL of water:methanol (50:50) and then passed through a 0.2 μm filter. The dinotefuran, imidacloprid, clothianidin, and thiacloprid in the purified samples were measured by LC-MS/MS (AQUITY UPLC-Xevo TQ MS; Waters) equipped with an AQUITY UPLC BET C18 column (φ 2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm particle size; Waters).

To test for fosthiazate, metalaxyl, fenobucarb, procymidone, flutolanil, and tolclofos-methyl, a 20 mL aliquot of the extract with 200 mL of 5% NaCl aq was extracted with 100 mL of dichloromethane with shaking. We collected the dichloromethane, and then extracted 50 mL of dichloromethane with shaking. The collected dichloromethane was concentrated and dried. The dried residue was dissolved in 5 mL of ethyl acetate and then adsorbed with a graphite column and an InterSep GC/NH2[®] column (GL Sciences) and then eluted with 15 mL of ethyl acetate. The eluate was concentrated and dried. The dried residue was dissolved in acetone and adjusted to 10 mL.

To test for fosthiazate, metalaxyl, fenobucarb, and flutolanil, a 2 mL aliquot of the extract was concentrated and dried. The dried residue was dissolved in 2 mL of acetonitrile and then passed through a 0.2 μm filter. The purified samples were measured by an LC-MS/MS instrument equipped with an AQUITY UPLC BET C18 column.

To test for procymidone, a 2 mL aliquot of the extract was concentrated and dried. The dried residue was dissolved in 2 mL of *n*-hexane adsorbed with a Sep-Pak Florisil[®] Plus column (Waters) washed with 10 mL of diethyl ether:*n*-hexane (4:96) and then eluted with 20 mL of acetone:*n*-hexane (5:95). The eluate was concentrated and crystallized. The residue was dissolved in 1 mL of *n*-hexane. The purified samples were measured by a GC-electron capture detector (GC-ECD 6890; Agilent Technologies) equipped with a DB-1701 column (φ 0.25 mm \times 30 m, 0.25 μm film thickness; Agilent Technologies).

To test for tolclofos-methyl, a 5 mL aliquot of the extract was concentrated and dried. The dried residue was dissolved in acetone and adjusted to 1 mL. The samples were measured by a

GC-flame photometric detector (GC-FPD 6890; Agilent Technologies) equipped with a VF-200MS column (φ 0.25 mm \times 30 m, 0.25 μm film thickness; Agilent Technologies).

To extract β -HCH and dieldrin, the shoot and root samples were homogenized with 150 mL of acetone for 3 min. The extract was passed through a 0.8 μm glass fiber filter and concentrated to 50 mL in a rotary evaporator. A 5 mL aliquot of plant extracts was purified as for the soil acetone extract. The β -HCH and dieldrin in the purified extract were measured as for the soil extracts.

5. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using SPSS 23 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Analysis of variance (ANOVA) was followed by Tukey's multiple comparison test using a pairwise comparison matrix to determine which samples differed significantly.

Results

1. Organic chemical concentrations in the soil and soil solution

We defined the acetone-extractable organic chemicals as the total organic chemicals in the soil, and the organic chemicals in the soil solution as phytoavailable organic chemicals (Table 3). The half-lives ($\tau_{1/2}$) of the total and phytoavailable organic chemicals were calculated from the changes in concentrations as:

$$C_t = C_0 e^{-kt} \quad (1)$$

$$\tau_{1/2} = \ln(2)/k \quad (2)$$

where k is the rate constant, C_t is the final concentration, C_0 is the initial concentration, and t is the number of days from start to end. We calculated the mean concentrations of organic chemicals in the soil and soil solution during the experiment period by integrating Eq. (1) over 1–22 days and dividing the integral by 21.²⁰⁾

The concentrations of total organic chemicals were approximately constant during the experiment, although the concentrations decreased by 30% for fosthiazate and by 20% for metalaxyl. The mean concentrations of total organic chemicals calculated from the regression formula were in the range of 1000–1300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, except for fenobucarb, procymidone, and β -HCH which had concentrations of 742, 976, and 941 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively.

The initial concentrations of organic chemicals in the soil solution were quite different: 900 $\mu\text{g}/\text{L}$ for fosthiazate and metalaxyl; 500 $\mu\text{g}/\text{L}$ for dinotefuran and fenobucarb; 20–100 $\mu\text{g}/\text{L}$ for imidacloprid, clothianidin, thiacloprid, procymidone, flutolanil, and β -HCH; and 2–5 $\mu\text{g}/\text{L}$ for tolclofos-methyl and dieldrin. The concentrations in the soil solution had greater differences among tested organic chemicals than did the total concentrations in soil; concentrations decreased during the experiment with half-lives of around 6–20 days. The mean concentrations of chemicals in the soil solution calculated using the regression formula were 180–360 $\mu\text{g}/\text{L}$ for dinotefuran, fosthiazate, metalaxyl, and fenobucarb; 7.5–30 $\mu\text{g}/\text{L}$ for imidacloprid, clothianidin,

Table 3. Concentrations of total and phytoavailable organic chemicals in soil.

| Chemicals | Concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$, $\mu\text{g}/\text{L}$) ^{a)} | | | | | $C_t = C_0 e^{-kt}$ | | | $\tau_{1/2}$ (days) | Mean Conc. ($\mu\text{g}/\text{kg}$, $\mu\text{g}/\text{L}$) |
|--|--|--------|--------|--------|--------|---------------------|-------|-------|------------------------|--|
| | 1 d | 3 d | 7 d | 14 d | 22 d | C_0 | k | r^2 | | |
| Total organic chemicals in soil | | | | | | | | | | |
| Dinotefuran | 1263.0 | 1399.8 | 1372.0 | 1291.4 | 1295.9 | 1341.5 | 0.001 | 0.08 | >22 | 1319.4 |
| Imidacloprid | 1300.7 | 1475.5 | 1355.1 | 1234.1 | 1313.5 | 1377.3 | 0.003 | 0.20 | >22 | 1323.8 |
| Clothianidin | 1317.9 | 1392.6 | 1262.8 | 1156.1 | 1163.5 | 1355.3 | 0.008 | 0.77 | >22 | 1234.0 |
| Thiacloprid | 1289.7 | 1557.8 | 1363.9 | 1294.8 | 1364.6 | 1397.7 | 0.002 | 0.05 | >22 | 1364.9 |
| Fosthiazate | 1422.6 | 1479.5 | 1144.5 | 1009.3 | 1039.7 | 1421.6 | 0.018 | 0.74 | >22 | 1159.9 |
| Metalaxyl | 1272.0 | 1294.5 | 1071.6 | 1006.9 | 1061.3 | 1250.5 | 0.010 | 0.60 | >22 | 1111.0 |
| Fenobucarb | 827.0 | 879.3 | 665.1 | 693.9 | 728.3 | 810.8 | 0.008 | 0.31 | >22 | 742.4 |
| Procymidone | 1033.9 | 1158.7 | 844.0 | 959.0 | 962.6 | 1033.8 | 0.005 | 0.14 | >22 | 976.0 |
| Flutolanil | 1396.5 | 1590.6 | 1155.6 | 1383.0 | 1326.6 | 1410.2 | 0.004 | 0.07 | >22 | 1353.0 |
| β -HCH | 864.5 | 1080.6 | 947.0 | 915.5 | 925.9 | 959.7 | 0.002 | 0.03 | >22 | 940.6 |
| Tolclofos-methyl | 1149.7 | 1289.7 | 869.9 | 935.3 | 942.7 | 1146.8 | 0.012 | 0.38 | >22 | 1000.9 |
| Dieldrin | 1205.2 | 1278.8 | 1310.8 | 1122.8 | 1254.7 | 1248.4 | 0.001 | 0.04 | >22 | 1229.2 |
| Phytoavailable organic chemicals in soil | | | | | | | | | | |
| Dinotefuran | 511.6 | 427.8 | 396.0 | 271.4 | 255.3 | 491.9 | 0.033 | 0.92 | 20.8 | 335.2 |
| Imidacloprid | 40.2 | 28.6 | 20.2 | 11.9 | 11.3 | 34.9 | 0.060 | 0.88 | 11.6 | 17.5 |
| Clothianidin | 64.0 | 44.5 | 35.4 | 20.6 | 19.0 | 56.2 | 0.057 | 0.89 | 12.3 | 29.3 |
| Thiacloprid | 20.0 | 12.9 | 8.5 | 4.9 | 4.6 | 16.5 | 0.068 | 0.86 | 10.2 | 7.5 |
| Fosthiazate | 857.1 | 533.4 | 390.3 | 215.3 | 171.8 | 727.4 | 0.073 | 0.92 | 9.5 | 314.3 |
| Metalaxyl | 946.7 | 565.5 | 406.2 | 250.2 | 212.9 | 761.9 | 0.066 | 0.87 | 10.5 | 357.0 |
| Fenobucarb | 426.5 | 268.4 | 300.6 | 118.2 | 96.0 | 402.9 | 0.070 | 0.90 | 9.9 | 179.6 |
| Procymidone | 45.2 | 24.6 | 23.6 | 9.3 | 8.2 | 38.1 | 0.079 | 0.88 | 8.8 | 15.4 |
| Flutolanil | 101.4 | 44.4 | 40.5 | 14.5 | 12.2 | 77.3 | 0.095 | 0.87 | 7.3 | 26.0 |
| β -HCH | 33.7 | 21.9 | 16.3 | 11.4 | 10.5 | 27.6 | 0.051 | 0.84 | 13.6 | 15.3 |
| Tolclofos-methyl | 5.4 | 2.4 | 1.8 | 0.6 | 0.5 | 4.1 | 0.109 | 0.90 | 6.3 | 1.2 |
| Dieldrin | 1.6 | 1.2 | 0.7 | 0.8 | 0.6 | 1.3 | 0.037 | 0.71 | 18.9 | 0.9 |

^{a)} The concentration of total organic chemicals were expressed in $\mu\text{g}/\text{kg}$ per dry soil, and those of phytoavailable organic chemicals were expressed in $\mu\text{g}/\text{L}$.

thiacloprid, procymidone, flutolanil, and β -HCH; and $1\ \mu\text{g}/\text{L}$ for tolclofos-methyl and dieldrin.

2. Organic chemical concentrations in shoots and roots of 16 plants

Shoot and root dry weights and transpiration rates are shown in Table 4. Shoot dry weights varied 1.2–5 times among plant species; those of *Allium wakegi*, *Apium graveolens*, and *Capsicum grossum* were low. The root dry weights of all species were approximately the same, except that *A. wakegi*, *A. graveolens*, and *Lactuca sativa* were low, and those of *Zea mays* and *Solanum lycopersicum* were high. Transpiration rates were low for *A. wakegi*, *A. graveolens*, and *C. grossum* and high for *Brassica oleracea*, *Brassica rapa*, and *Chrysanthemum coronarium*.

The shoot and root concentrations of test chemicals are shown in Table 5. The shoot concentrations of dinotefuran, imidacloprid, clothianidin, and thiacloprid in *B. oleracea*, *B. rapa*, and *C. coronarium* were approximately 2–5 times higher than those in the other plant species. The concentrations of these chemicals in *Spinacia oleracea* were also high; however, the con-

centration of thiacloprid was below the detection limit. The concentrations of fosthiazate, metalaxyl, fenobucarb, and flutolanil in *C. coronarium* were about 10 times those in other plant species. The concentrations of dieldrin were clearly higher in cucurbits such as *Cucumis sativus* and *Cucurbita maxima*, at 10–50 times higher than in other species. There were no marked differences in the shoot concentrations of procymidone and β -HCH between plant species. However, as compared with the root concentrations of each species—although there were differences of several magnitudes in the concentrations of dinotefuran, imidacloprid, clothianidin, thiacloprid, fosthiazate, and metalaxyl in shoots—differences between the plant species were smaller for shoot concentrations. The concentrations of fenobucarb, procymidone, flutolanil, β -HCH, tolclofos-methyl, and dieldrin in *C. coronarium* were 5–50 times higher than in other plant species.

The trends for interspecific differences in concentration were not the same for shoots and roots. In fact, *B. oleracea*, *B. rapa*, *C. coronarium*, and *S. oleracea* had high shoot concentrations of chemicals with low $\log K_{OW}$, such as dinotefuran, imidacloprid, clothianidin, and thiacloprid; however, their root concentra-

Table 4. Shoot and root dry weights after 21 days of growth.

| Plant | Dry weight (dw-g per pot) | | Transpiration rate (L/21days per pot) |
|------------------------|---------------------------|----------|---------------------------------------|
| | Shoot | Root | |
| <i>H. distichon</i> | 7.59 ij | 1.91 e | 1.42 efg |
| <i>Z. mays</i> | 7.12 hi | 3.90 f | 0.83 b |
| <i>G. max</i> | 6.29 gh | 1.65 de | 1.25 de |
| <i>P. vulgaris</i> | 4.24 de | 1.22 bcd | 0.74 b |
| <i>B. oleracea</i> | 9.55 k | 1.40 cd | 1.70 h |
| <i>B. rapa</i> | 7.73 ij | 1.58 cde | 1.55 gh |
| <i>C. coronarium</i> | 5.51 fg | 1.63 de | 1.68 h |
| <i>L. sativa</i> | 5.01 ef | 0.81 ab | 0.71 b |
| <i>A. wakegi</i> | 2.67 ab | 0.64 a | 0.36 a |
| <i>A. graveolens</i> | 1.71 a | 0.73 ab | 0.40 a |
| <i>S. lycopersicum</i> | 8.60 jk | 2.03 e | 1.49 fg |
| <i>C. grossum</i> | 2.90 abc | 0.75 ab | 0.52 a |
| <i>C. sativus</i> | 7.57 ij | 1.21 bcd | 1.37 ef |
| <i>C. maxima</i> | 8.23 ij | 1.16 bcd | 1.11 cd |
| <i>S. oleracea</i> | 3.40 bcd | 1.20 bcd | 1.03 c |
| <i>B. vulgaris</i> | 4.10 cde | 1.11 abc | 1.06 c |

Data were compared using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test ($p < 0.05$). Within a column, means followed by the same letter are not significantly different.

tions were not high. *Chrysanthemum coronarium* also had high shoot concentrations of fosthiazate, metalaxyl, fenobucarb, and flutolanil, which had intermediate $\log K_{OW}$. In *C. coronarium*, the root concentrations of fenobucarb and flutolanil were high, but those of fosthiazate and metalaxyl were not. In brief, for *C. coronarium*, the concentrations of chemicals with $\log K_{OW}$ lower than that of metalaxyl were high in the shoot and low in the root; those with high $\log K_{OW}$, such as β -HCH, tolclofos-methyl, and dieldrin, were low in the shoot and high in the root; and those of fenobucarb and flutolanil with intermediate $\log K_{OW}$ were high in both the shoot and root. *Cucumis sativus* and *C. maxima* had high concentrations of dieldrin in the shoots and medium concentrations in the roots. This result was consistent with previous reports in which shoot concentrations of dieldrin in Cucurbitaceae were particularly high.²¹⁾

Discussion

1. Uptake and translocation of organic chemicals in 16 plant species

The concentrations of organic chemicals in shoots and roots differed among the plant species. To determine the factors important for these differences, we considered two processes: uptake from the soil solution to the root and root–shoot translocation. We defined the uptake amount of chemicals per root (*i.e.*, the amount of chemicals in the whole plant per dry weight of the root [mg/kg root]) as the uptake of chemicals from the soil (or soil solution) to the root (Table 6), and the shoot–root concentration ratio (S/R conc. ratio) as the translocation of chemicals from root to shoot (Table 7).

High shoot concentrations of chemicals necessitate a high up-

take by the root from the soil solution, and also high root–shoot translocation. If translocation is low and uptake is high, the root concentration will be high, but the shoot concentration will be low. Conversely, if uptake is low and translocation is high, the concentration of chemicals in the shoot will not be high because of a lack of supply from the root.

Brassica oleracea, *B. rapa*, and *C. coronarium*—which had 2–5 times higher shoot concentrations of dinotefuran, imidacloprid, clothianidin, and thiacloprid than the other species (Table 5)—had both high uptake (much uptake per root) and translocation (high S/R conc. ratios) of these chemicals. In other words, *B. oleracea*, *B. rapa*, and *C. coronarium* effectively took up these chemicals from the soil solution and transported them to the shoot. This seemed to result in high shoot concentrations of dinotefuran, imidacloprid, clothianidin, and thiacloprid and low root concentrations in *B. oleracea*, *B. rapa*, and *C. coronarium*. In *S. oleracea*, there were higher S/R conc. ratios of dinotefuran, imidacloprid, and clothianidin than in the other species. This high translocation ability compensated for the medium uptake of these chemicals, and their shoot concentrations in *S. oleracea* were high. *Hordeum distichon* was nearly equal to *B. oleracea*, *B. rapa*, and *C. coronarium* in the translocation of imidacloprid, clothianidin, and thiacloprid, but was inferior in their uptake. As a result, *H. distichon* had medium shoot concentrations of these chemicals as compared with other test plants.

Chrysanthemum coronarium had shoot concentrations of fosthiazate, metalaxyl, fenobucarb, and flutolanil about 10 times those of the other plant species; *C. coronarium* showed superior uptake of chemicals with a middle range of $\log K_{OW}$ values. However, the translocation of fosthiazate and metalaxyl was high, but that of fenobucarb and flutolanil was not. Therefore, it seems that the superior uptake of *C. coronarium* was the leading factor in the higher shoot concentrations of these chemicals, although the translocation of fenobucarb and flutolanil was not high.

Shoot concentrations of dieldrin in *C. sativus* and *C. maxima* were 10–50 times those of the other plant species, likely due to their evidently superior uptake and translocation. Cucurbitaceae have a specific transport mechanism for highly hydrophobic organic chemicals such as dieldrin; it was previously suggested that they have transport proteins that play an important role in root–shoot translocation of dieldrin.^{22,23)}

2. Bioconcentration factors of organic chemicals in roots and shoots

In the preceding section, we discussed differences in the uptake and translocation of organic chemicals among plant species. Here, we consider the effects of the properties of chemicals on their uptake and translocation by plants. It is thought that organic chemicals in the soil are taken up by roots through a soil solution and then transported from the roots to the shoots. Therefore, we regarded the soil solution as a medium in soil cultivation conditions. In this experiment, because the concentrations in the soil solution differed widely among the chemicals

Table 5. Concentration of organic chemicals in shoots and roots.

| Plants | Concentratin (mg/kg) | | | | | | | | | | | |
|------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------|---------------------|-------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------|
| | Dinotefuran | Imidacloprid | Clothianidin | Thiacloprid | Fosfiazate | Metalaxyl | Fenobucarb | Procymidone | Flutolanil | β -HCH | Tolclofos-methyl | Dieldrin |
| Shoot | | | | | | | | | | | | |
| <i>H. distichon</i> | 5.03 def | 0.32 cde | 0.86 ef | 0.11 abc | 0.47 ab | 1.04 abc | 0.24 a | 2.11 f | 0.15 a | 1.84 de | <0.02 ^{a)} | 0.32 a |
| <i>Z. mays</i> | 4.06 cde | 0.21 abc | 0.31 abc | 0.13 bcd | 2.90 bc | 2.37 c | 0.95 a | 1.66 ef | 0.57 b | 1.36 bcd | <0.02 ^{a)} | 0.19 a |
| <i>G. max</i> | 4.76 def | 0.36 de | 0.05 a | 0.20 de | 1.55 abc | 2.41 c | 0.58 a | 1.85 ef | <0.02 ^{a)} | 1.36 bcd | <0.02 ^{a)} | 0.32 a |
| <i>P. vulgaris</i> | 0.66 a | <0.02 ^{a)} | <0.02 ^{a)} | <0.02 ^{a)} | 0.62 ab | 0.13 a | 0.14 a | 0.26 a | <0.02 ^{a)} | 1.05 abc | <0.02 ^{a)} | 0.12 a |
| <i>B. oleracea</i> | 9.52 g | 0.54 fg | 0.81 def | 0.47 g | 3.15 c | 2.47 c | 0.24 a | 2.09 f | 0.05 a | 1.77 de | <0.02 ^{a)} | 0.15 a |
| <i>B. rapa</i> | 6.22 f | 0.38 de | 0.88 f | 0.27 e | 1.47 abc | 0.87 ab | 0.15 a | 2.20 f | <0.02 ^{a)} | 1.54 cd | <0.02 ^{a)} | 0.13 a |
| <i>C. coronarium</i> | 8.53 g | 1.10 h | 1.35 g | 0.68 f | 12.70 e | 9.29 d | 4.80 b | 0.98 cd | 0.86 c | 0.85 ab | 0.06 b | 0.13 a |
| <i>L. sativa</i> | 0.67 a | 0.14 a | 0.07 a | 0.05 ab | 0.12 a | 0.26 ab | <0.02 ^{a)} | 0.35 ab | 0.04 a | 0.52 a | <0.02 ^{a)} | 0.11 a |
| <i>A. wakegi</i> | 4.23 de | 0.29 bcd | 0.52 cd | 0.02 a | 1.02 abc | 0.10 a | 0.57 a | 2.07 f | 0.41 b | 1.86 de | <0.02 ^{a)} | 0.61 b |
| <i>A. graveolens</i> | 5.65 ef | 0.27 abcd | 0.55 cd | 0.11 abc | 7.69 d | 1.09 abc | 5.74 b | 0.20 a | <0.02 ^{a)} | <0.02 ^{a)} | 0.04 ab | 0.08 a |
| <i>S. lycopersicum</i> | 5.39 ef | 0.60 g | 0.57 cde | 0.15 cd | 0.99 abc | 0.04 a | 0.54 a | 1.82 ef | 0.12 a | 0.94 ab | <0.02 ^{a)} | 0.27 a |
| <i>C. grossum</i> | 3.44 bcd | 0.44 ef | 0.22 ab | <0.02 ^{a)} | 0.45 ab | 0.20 a | 0.08 a | 1.26 de | 0.04 a | 0.96 ab | <0.02 ^{a)} | 0.18 a |
| <i>C. sativus</i> | 2.58 bc | 0.24 abcd | 0.28 abc | 0.09 abc | 0.77 ab | 0.93 ab | 0.37 a | 1.62 ef | <0.02 ^{a)} | 1.72 de | 0.03 a | 2.18 c |
| <i>C. maxima</i> | 2.40 b | 0.24 abcd | 0.20 a | 0.12 bcd | 2.30 abc | 1.36 abc | 1.24 a | 0.89 bcd | <0.02 ^{a)} | 0.87 ab | <0.02 ^{a)} | 5.05 d |
| <i>S. oleracea</i> | 6.11 f | 0.56 fg | 1.54 g | <0.02 ^{a)} | 0.14 a | 0.10 a | 0.05 a | 0.42 abc | 0.12 a | 2.25 e | <0.02 ^{a)} | 0.14 a |
| <i>B. vulgaris</i> | 5.04 def | 0.17 ab | 0.49 bc | 0.03 a | 1.56 abc | 1.68 bc | 0.15 a | 0.90 bcd | 0.17 a | 1.01 abc | <0.02 ^{a)} | 0.07 a |
| Root | | | | | | | | | | | | |
| <i>H. distichon</i> | 0.16 abc | 0.03 a | 0.03 a | 0.03 a | 0.07 abc | 0.06 a | 0.15 ab | 0.24 ab | 0.21 ab | 1.07 a | 0.04 a | 9.19 ab |
| <i>Z. mays</i> | 0.39 d | 0.07 bc | 0.05 ab | 0.07 abcd | 0.20 bcde | 0.20 cd | 0.28 abc | 0.53 ab | 0.33 ab | 2.26 a | 0.40 a | 7.93 ab |
| <i>G. max</i> | 0.16 abc | 0.20 d | 0.13 c | 0.33 e | 0.17 de | 0.39 f | 0.39 abc | 1.37 abc | 0.21 ab | 3.87 ab | 0.70 a | 17.23 abc |
| <i>P. vulgaris</i> | 0.29 cd | 0.08 bc | 0.06 ab | 0.12 d | 0.12 abcd | 0.17 bc | 0.15 ab | 0.63 abc | 0.05 a | 1.94 a | 0.34 a | 3.63 a |
| <i>B. oleracea</i> | 0.10 ab | 0.06 abc | 0.04 a | 0.08 bcd | 0.06 a | 0.07 a | 0.17 ab | 0.46 ab | 0.26 ab | 5.36 ab | 0.57 a | 13.60 ab |
| <i>B. rapa</i> | 0.11 ab | 0.05 abc | 0.04 a | 0.07 abc | 0.08 abc | 0.11 ab | 0.12 a | 0.39 ab | 0.26 ab | 2.60 a | 0.31 a | 9.17 ab |
| <i>C. coronarium</i> | 0.06 ab | 0.07 bc | 0.05 ab | 0.09 cd | 0.26 ef | 0.07 a | 8.96 e | 14.08 e | 4.19 d | 37.93 d | 34.22 b | 85.00 e |
| <i>L. sativa</i> | 0.12 ab | 0.08 c | 0.03 a | 0.04 ab | 0.07 abc | 0.09 a | 0.04 a | 0.66 abc | 0.39 ab | 5.99 ab | 0.66 a | 46.37 d |
| <i>A. wakegi</i> | 1.24 e | 0.17 d | 0.15 c | 0.09 bcd | 0.32 f | 0.27 de | 1.59 abcd | 1.78 abc | 0.85 bc | 12.14 c | 0.74 a | 18.46 abc |
| <i>A. graveolens</i> | 0.41 d | <0.02 ^{a)} | <0.02 ^{a)} | <0.02 ^{a)} | 0.18 cde | 0.07 a | 2.05 d | 5.01 d | 0.41 ab | 5.45 ab | 3.58 a | 12.26 ab |
| <i>S. lycopersicum</i> | 0.27 cd | 0.07 bc | 0.06 ab | 0.08 bcd | 0.11 abcd | 0.12 ab | 0.10 a | 0.55 abc | 0.39 ab | 4.34 ab | 0.42 a | 13.61 ab |
| <i>C. grossum</i> | 0.27 cd | 0.04 ab | 0.03 a | 0.03 a | 0.06 ab | 0.06 a | 0.16 ab | 0.26 ab | 0.18 ab | 2.78 a | 0.20 a | 9.83 ab |
| <i>C. sativus</i> | 0.05 a | 0.06 abc | 0.03 a | 0.08 abcd | 0.32 f | 0.35 ef | 1.76 bcd | 2.48 c | 1.41 c | 5.68 ab | 2.34 a | 29.49 c |
| <i>C. maxima</i> | 0.20 bc | 0.06 abc | 0.06 ab | 0.08 abcd | 0.59 g | 0.50 g | 1.86 cd | 2.17 bc | 0.94 bc | 5.86 ab | 2.02 a | 21.92 bc |
| <i>S. oleracea</i> | 0.07 ab | 0.08 c | 0.08 b | 0.07 abc | <0.02 ^{a)} | 0.10 ab | 0.09 a | 0.73 abc | 0.20 ab | 8.51 bc | 0.16 a | 18.35 bc |
| <i>B. vulgaris</i> | 0.07 ab | 0.06 abc | 0.05 ab | 0.05 abc | 0.04 a | 0.06 a | 0.11 a | 0.21 a | 0.04 a | 1.02 a | 0.11 a | 8.73 ab |

Data were compared using one-way ANOVA followed by the Tukey's multiple comparison test ($p < 0.05$). Within a column, means followed by the same letter are not significantly different. ^{a)} Under the detection limit.

Table 6. The uptake amount of organic chemicals per roots.

| Plants | The uptake amount of chemicals per root (mg/kg root ^(a)) | | | | | | | | | | | |
|------------------------|--|--------------|--------------|-------------|-------------|-----------|------------|-------------|------------|--------------|------------------|----------|
| | Dinotefuran | Imidacloprid | Clothianidin | Thiacloprid | Fosthiazate | Metalaxyl | Fenobucarb | Procymidone | Flutolanil | β -HCH | Tolclofos-methyl | Dieldrin |
| <i>H. distichon</i> | 20.43 de | 1.30 bcde | 3.46 ef | 0.42 abcde | 1.92 a | 4.18 abc | 0.97 a | 8.48 efg | 0.60 a | 7.45 def | 0.05 a | 1.45 a |
| <i>Z. mays</i> | 7.72 abc | 0.39 ab | 0.55 ab | 0.24 abc | 5.29 abc | 4.29 abc | 1.73 a | 3.01 ab | 1.05 ab | 2.48 ab | 0.03 a | 0.39 a |
| <i>G. max</i> | 18.31 de | 1.40 cde | 0.18 a | 0.76 de | 5.84 abc | 9.07 bc | 2.12 a | 6.96 def | 0.04 a | 5.30 bcde | 0.04 a | 1.63 a |
| <i>P. vulgaris</i> | 2.64 abc | 0.05 a | 0.04 a | 0.04 a | 2.19 a | 0.46 a | 0.49 a | 0.92 ab | 0.04 a | 3.71 abc | 0.05 a | 0.44 a |
| <i>B. oleracea</i> | 65.46 g | 3.73 g | 5.56 g | 3.21 g | 21.63 d | 16.95 d | 1.63 a | 14.41 h | 0.34 a | 12.38 g | 0.10 a | 1.32 a |
| <i>B. rapa</i> | 30.76 f | 1.86 ef | 4.31 fg | 1.33 f | 7.22 abc | 4.27 abc | 0.73 a | 10.84 g | 0.10 a | 7.57 deg | 0.08 a | 0.84 a |
| <i>C. coronarium</i> | 30.04 ef | 3.85 g | 4.75 fg | 2.37 g | 45.17 e | 32.36 e | 16.95 c | 3.47 abc | 3.42 c | 5.39 bcde | 1.37 b | 1.05 a |
| <i>L. sativa</i> | 4.23 abc | 0.87 abcd | 0.46 ab | 0.32 abcd | 0.73 a | 1.58 a | 0.11 a | 2.16 ab | 0.24 a | 3.23 abc | 0.11 a | 0.85 a |
| <i>A. wakegi</i> | 19.35 de | 1.25 bcde | 2.23 cde | 0.10 ab | 4.26 ab | 0.41 a | 2.42 a | 8.83 efg | 1.76 b | 8.02 ef | 0.08 a | 3.07 a |
| <i>A. graveolens</i> | 13.60 bcd | 0.63 abc | 1.27 abcd | 0.25 abc | 17.90 cd | 2.53 ab | 13.32 bc | 0.47 a | 0.09 a | 0.13 a | 0.42 a | 0.23 a |
| <i>S. lycopersicum</i> | 23.19 def | 2.54 f | 2.40 de | 0.64 cde | 4.19 ab | 0.19 a | 2.31 a | 7.74 defg | 0.51 a | 3.98 bcd | 0.06 a | 1.32 a |
| <i>C. grossum</i> | 13.63 bcd | 1.71 def | 0.86 abc | 0.05 ab | 1.76 a | 0.78 a | 0.31 a | 4.89 bcd | 0.14 a | 3.72 abc | 0.05 a | 0.91 a |
| <i>C. sativus</i> | 16.28 cd | 1.53 cde | 1.78 bcd | 0.55 bcde | 4.84 abc | 5.83 abc | 2.31 a | 10.17 fg | 0.10 a | 10.86 fg | 0.20 a | 14.14 b |
| <i>C. maxima</i> | 18.19 d | 1.75 def | 1.43 abcd | 0.91 ef | 17.43 bcd | 10.03 c | 9.34 b | 6.52 cde | 0.12 a | 6.48 cde | 0.13 a | 37.70 c |
| <i>S. oleracea</i> | 17.55 cd | 1.62 def | 4.43 fg | 0.05 ab | 0.40 a | 0.30 a | 0.15 a | 1.22 a | 0.35 a | 6.53 cde | 0.04 a | 0.52 a |
| <i>B. vulgaris</i> | 18.62 d | 0.63 abc | 1.82 bcd | 0.12 ab | 6.04 abc | 6.42 abc | 0.56 a | 3.40 abc | 0.62 a | 3.75 abc | 0.08 a | 0.34 a |

Data were compared using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test ($p < 0.05$). Within a column, means followed by the same letter are not significantly different. ^(a) Amount of chemicals in whole plant per dry weight of root

Table 7. Shoot-root concentration ratios of organic chemicals.

| Plants | Shoot- root concentration ratios | | | | | | | | | | | | |
|------------------------|----------------------------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-----------|------------|-------------|------------|--------------|------------------|----------|--|
| | Dinotefuran | Imidacloprid | Clothianidin | Thiacloprid | Fosthiazate | Metaxyl | Fenobucarb | Procymidone | Flutolamil | β -HCH | Tolclofos-methyl | Dieldrin | |
| <i>H. distichon</i> | 34.02 ab | 12.50 ef | 24.58 d | 4.05 c | 6.55 a | 17.08 abc | 1.64 d | 8.85 e | 0.72 ab | 1.76 e | | 0.035 c | |
| <i>Z. mays</i> | 10.48 a | 3.13 a | 6.54 ab | 1.76 b | 13.93 a | 11.30 ab | 3.30 e | 3.14 bc | 1.74 b | 0.61 c | | 0.024 bc | |
| <i>G. max</i> | 31.49 ab | 1.86 a | 0.35 a | 0.63 ab | 9.24 a | 6.23 a | 1.47 cd | 1.37 ab | | 0.37 abc | | 0.019 b | |
| <i>P. vulgaris</i> | 2.28 a | | | | 5.32 a | 0.78 a | 0.98 abcd | 0.41 a | | 0.59 bc | | 0.034 c | |
| <i>B. oleracea</i> | 92.63 d | 9.18 cd | 22.68 d | 5.92 d | 58.06 b | 34.19 c | 1.37 bcd | 4.75 cd | 0.19 a | 0.35 abc | | 0.011 ab | |
| <i>B. rapa</i> | 61.63 bcd | 7.81 cd | 22.83 d | 3.96 c | 17.72 a | 7.76 a | 1.25 bcd | 5.83 d | 0.08 a | 0.60 bc | | 0.014 ab | |
| <i>C. coronarium</i> | 148.59 e | 15.54 f | 26.42 d | 7.44 e | 54.65 b | 130.31 d | 0.59 abc | 0.07 a | 0.22 a | 0.02 a | 0.002 a | 0.002 a | |
| <i>L. sativa</i> | 5.85 a | 1.69 a | 2.40 ab | 1.46 ab | 1.68 a | 2.92 a | 0.36 ab | 0.56 a | 0.10 a | 0.09 a | | 0.002 a | |
| <i>A. wakegi</i> | 3.47 a | 1.77 a | 3.57 ab | 0.28 a | 3.18 a | 0.36 a | 0.36 ab | 1.18 ab | 0.49 a | 0.16 a | | 0.034 c | |
| <i>A. graveolens</i> | 13.90 a | | | | 45.95 b | 16.58 abc | 2.94 e | 0.04 a | | | 0.012 b | 0.007 ab | |
| <i>S. lycopersicum</i> | 20.41 a | 8.36 cd | 9.90 bc | 1.81 b | 8.77 a | 0.36 a | 5.19 f | 3.39 c | 0.31 a | 0.22 a | | 0.020 bc | |
| <i>C. grossum</i> | 12.76 a | 10.81 de | 8.94 ab | | 7.12 a | 3.41 a | 0.49 abc | 5.04 cd | 0.20 a | 0.35 abc | | 0.018 bc | |
| <i>C. sativus</i> | 55.77 bcd | 4.04 ab | 8.78 ab | 1.08 ab | 2.39 a | 2.68 a | 0.21 a | 0.65 a | | 0.31 abc | | 0.074 d | |
| <i>C. maxima</i> | 12.32 a | 3.90 ab | 3.56 ab | 1.63 ab | 3.88 a | 2.78 a | 0.67 abcd | 0.42 a | | 0.15 a | | 0.231 e | |
| <i>S. oleracea</i> | 93.07 d | 6.69 bc | 18.53 cd | | | 1.03 a | 0.72 abcd | 0.57 a | 0.60 a | 0.27 ab | | 0.008 ab | |
| <i>B. vulgaris</i> | 68.63 cd | 3.02 a | 10.05 bc | 0.68 ab | 47.55 b | 32.09 bc | 1.40 cd | 4.79 cd | 4.41 c | 1.01 d | | 0.008 ab | |

Data were compared using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test ($p < 0.05$). Within a column, means followed by the same letter are not significantly different.

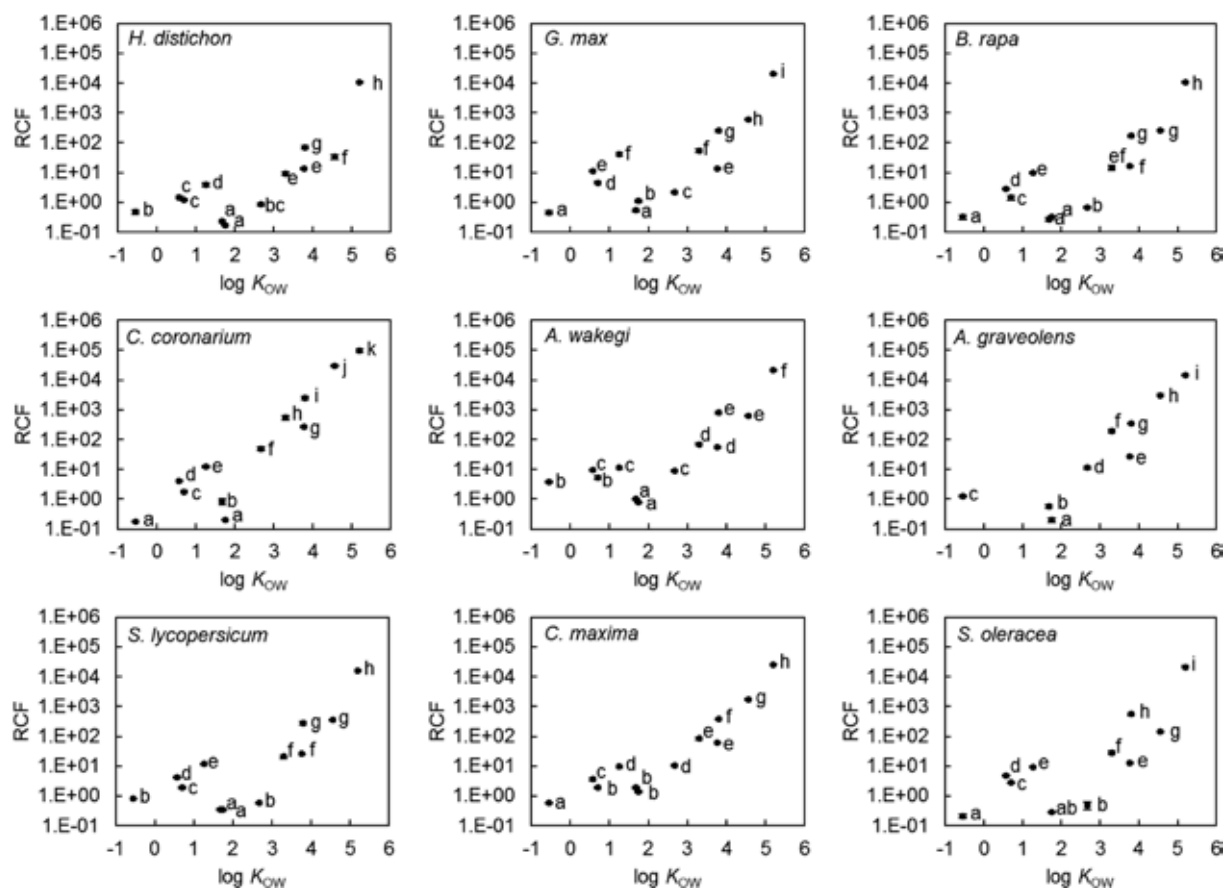


Fig. 1. Root concentration factors (RCFs) of organic chemicals. Error bars indicate standard errors of the mean ($n=4$). Log K_{OW} values were obtained from the literature.^{15,16} Data were compared using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test ($p<0.05$). Within a log K_{OW} value, means followed by the same letter are not significantly different.

(Table 3), we could not simply compare their concentrations in shoots or roots. When the concentrations of chemicals in media differ, the bioconcentration factor (BCF) is widely used to compare uptake or translocation.^{20,24–26} We used two kinds of BCFs to compare the uptake and translocation of plants. We defined the root concentration factor (RCF) as the concentration in the root divided by the concentration in the soil solution and the shoot concentration factor (SCF) as the concentration in the shoot divided by the concentration in the soil solution. Furthermore, we chose one plant per family from among the 16 test plant species (resulting in seven species): *H. distichon* (Poaceae), *Glycine max* (Fabaceae), *B. rapa* (Brassicaceae), *C. coronarium* (Asteraceae), *S. lycopersicum* (Solanaceae), *C. maxima* (Cucurbitaceae), and *S. oleracea* (Amaranthaceae). We plotted the log K_{OW} of the chemicals against the RCF (Fig. 1) or SCF (Fig. 2) and examined the relationships between the chemical properties and BCFs.

From low to high log K_{OW} , although the RCF values tended to decrease for fosthiazate, metalaxyl, and fenobucarb, the RCF values for the other chemicals increased exponentially. Moreover, the pattern for each chemical was roughly similar among the test plants. In general, organic chemicals are thought to be taken up by roots mainly by sorption, and if this sorption is strong, then

log K_{OW} is high. In a previous report, RCF values also increased exponentially with increasing log K_{OW} .²⁾ Therefore, we suggest that the plant uptake of these organic chemicals was mainly controlled by their hydrophobicity, as indicated by log K_{OW} values.

The SCF values remained around 10^1 for chemicals of log K_{OW} -0.5 to 1 (dinotefuran to thiacloprid), decreased from 10^0 to 10^{-1} for chemicals of log K_{OW} 1.5 – 2.5 , and, in *H. distichon*, *G. max*, *B. rapa*, *A. wakegi*, *S. lycopersicum*, and *S. oleracea*, tended to increase from 10^2 to 10^4 for chemicals having log $K_{OW}>3$ (procymidone to dieldrin). The SCF values in *C. maxima* were constant at 10^1 for chemicals of low to intermediate log K_{OW} , and those for chemicals of high log K_{OW} increased as they did for the above plant species. In *C. coronarium* and *A. graveolens*, the SCF values varied little in the range of 10^1 to 10^2 for chemicals of low to high log K_{OW} . The pattern of each graph did not show similar trends among the plants, and there were unclear relationships between translocation and log K_{OW} . Plant metabolism is an important factor for the plant uptake model of organic chemicals.²⁷⁾ In our study, however, the degree to which plants metabolized each organic chemical was not considered because it was difficult to confirm the material balance of the chemicals in the soil culture experiment. Therefore, to determine the detailed relationships between translocation and log K_{OW} of or-

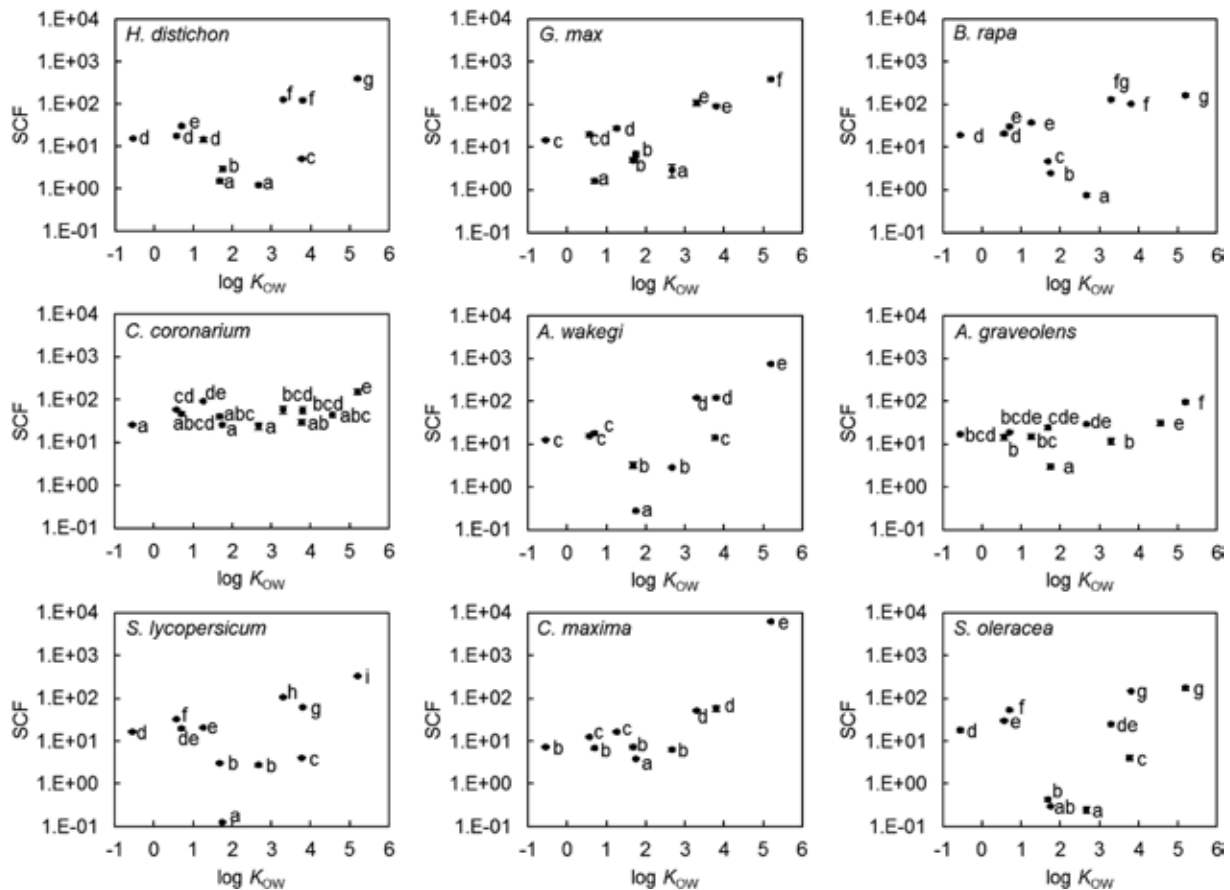


Fig. 2. Shoot concentration factors (SCFs) of organic chemicals. Error bars indicate standard errors of the mean ($n=4$). Log K_{OW} values were obtained from the literature.^{15,16} Data were compared using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test ($p<0.05$). Within a log K_{OW} value, means followed by the same letter are not significantly different.

ganic chemicals in plant species, further studies are needed with precise experiments using hydroponic medium or radioisotope-labeled chemicals.

3. General discussion

The shoot concentrations of each chemical were different among the plant species, and we found combinations of plant species and organic chemicals with high shoot concentrations. *Brassica oleracea*, *B. rapa*, and *C. coronarium* had high shoot concentrations of chemicals with low log K_{OW} such as dinotefuran, imidacloprid, clothianidin, and thiacloprid. Only *C. coronarium* also had high shoot concentrations of chemicals with intermediate log K_{OW} , such as fosthiazate, metalaxyl, fenobucarb, and flutolanil. *Cucumis sativus* and *C. maxima* had high shoot concentrations of, specifically, dieldrin, which has high log K_{OW} . It is also thought that a structural specificity may influence chemicals with low log K_{OW} (i.e., dinotefuran, imidacloprid, clothianidin, and thiacloprid) because these are all neonicotinoid chemicals.

We compared the concentrations of organic chemicals in roots and shoots, not in edible parts. Moreover, we did not take into account the various MRLs for combinations of plant species and organic chemicals. Although the possibility of exceeding the

MRLs cannot be determined directly using our data, the results will be useful in considering plant residue for pesticides remaining in the soil.

Plant uptake and the translocation of organic chemicals were related conventionally to log K_{OW} by data obtained in hydroponic experiments. If the RCF and SCF values can be correlated with the log K_{OW} , concentrations of certain organic chemicals in roots and shoots can be predicted from their concentrations in the soil solution. The concentrations in roots may be predicted to a certain extent because the RCF values can be related to log K_{OW} —RCF values increased with increasing log K_{OW} . However, for shoots, root–shoot translocation seemed to depend on log K_{OW} because the S/R conc. ratio decreased with increasing log K_{OW} but the relationship between the SCF value and log K_{OW} was not clear and showed different patterns according to plant species. Henceforth, it will be necessary to plan a more detailed study of plant physiological factors, for example, root morphology (fineness or surface area), lipid contents, chemical metabolism activity, and the possible existence of carriers that may cause differences in the concentration of organic chemicals among plant species.

Acknowledgements

This research was supported by the Environmental Research and Technology Development Fund (5-1302 and 5-1703) of the Ministry of the Environment, Japan.

References

- 1) S. Hori: *Foods Food Ingredients J. Jpn.* **212**, 496–508 (2007), in Japanese with English summary.
- 2) G. G. Briggs, R. H. Bromilow and A. A. Evans: *Pestic. Sci.* **13**, 495–504 (1982).
- 3) G. G. Briggs, R. H. Bromilow, A. A. Evans and M. Williams: *Pestic. Sci.* **14**, 492–500 (1983).
- 4) F. C. Hsu, R. L. Marxmiller and A. Y. Yang: *Plant Physiol.* **93**, 1573–1578 (1990).
- 5) F. Sicbaldi, G. A. Sacchi, M. Trevisan and A. A. M. DelRe: *Pestic. Sci.* **50**, 111–119 (1997).
- 6) J. G. Burken and J. L. Schnoor: *Environ. Sci. Technol.* **32**, 3379–3385 (1998).
- 7) E. M. Dettenmaier, W. J. Doucette and B. Bugbee: *Environ. Sci. Technol.* **43**, 324–329 (2009).
- 8) S. Trapp, M. Matthies, I. Scheunert and E. M. Topp: *Environ. Sci. Technol.* **24**, 1246–1252 (1990).
- 9) S. Trapp and M. Matthies: *Environ. Sci. Technol.* **29**, 2333–2338 (1995).
- 10) S. Trapp: *Environ. Sci. Pollut. Res.* **11**, 33–39 (2004).
- 11) C. Turgut: *Environ. Sci. Pollut. Res.* **12**, 342–346 (2005).
- 12) C. Collins, M. Fryer and A. Grosso: *Environ. Sci. Technol.* **40**, 45–52 (2006).
- 13) T. E. McKone and R. L. Maddalena: *Environ. Toxicol. Chem.* **26**, 2494–2504 (2007).
- 14) K. Takagi, A. J. Wade and C. D. Collins: *Environ. Sci. Technol.* **48**, 12073–12082 (2014).
- 15) C. MacBean: “The Pesticide Manual”, 16th Ed., British Crop Protection Council, Surrey, 2012.
- 16) D. Mackay, W. Y. Shiu and K. C. Ma: “Insecticides, *In Illustrated Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals*”, Vol. V, Pesticide Chemicals, Lewis Publishers, New York, pp. 334–648, 1997.
- 17) The 2011 Pesticide Handbook Editorial Committee: “The 2011 Pesticide Handbook” Japan Plant Protection Association, Tokyo, 2011 (in Japanese)
- 18) <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/> (Accessed 18 Jan., 2017)
- 19) Y. Motoki, T. Iwafune, N. Seike, T. Otani and Y. Akiyama: *J. Pestic. Sci.* **40**, 175–183 (2015).
- 20) S. Namiki, T. Otani and N. Seike: *Soil Sci. Plant Nutr.* **59**, 669–679 (2013).
- 21) T. Otani, N. Seike and Y. Sakata: *Soil Sci. Plant Nutr.* **53**, 86–94 (2007).
- 22) H. Murano, T. Otani, N. Seike and M. Sakai: *Environ. Toxicol. Chem.* **29**, 2269–2277 (2010).
- 23) S. Namiki, T. Otani, N. Seike and S. Satoh: *Environ. Toxicol. Chem.* **34**, 536–544 (2015).
- 24) J. C. White, Z. D. Parrish, M. Isleyen, M. P. N. Gent, W. Iannucci-Berger, B. D. Eitzer and M. I. Mattina: *Environ. Toxicol. Chem.* **24**, 987–994 (2005).
- 25) T. Saito, T. Otani, N. Seike and M. Okazaki: *Soil Sci. Plant Nutr.* **58**, 373–383 (2012).
- 26) S. Felizeter, M. S. McLachlan and P. D. Voogt: *J. Agric. Food Chem.* **62**, 3334–3342 (2014).
- 27) T. Fujisawa, K. Ichise, M. Fukushima, T. Katagi and Y. Takimoto: *J. Agric. Food Chem.* **50**, 532–537 (2002).

平成 29 年度学会等での発表実績一覧

1. 誌面発表

実績無し

2. 口頭・ポスター発表

| | 学会名 | 題目 | 発表者名 |
|---|--|---|--|
| 1 | 第 35 回農薬環境科学 研究会シンポジウム (2017.10.5～6) | ミツバチ群における内勤蜂 と外勤蜂の識別手法の改良 (ポスター) | <u>市原直登</u> 、 <u>大石桂輔</u> 、 <u>石原 悟</u> |
| 2 | 水草研究会第 39 回全 国集会 (2017.9.2～3) | イチョウウキゴケ (<i>Ricciocarpus natans</i> (L.) Corda) の室内培養法の検討 (ポスター) | <u>市原直登</u> 、 <u>石原 悟</u> |

アンダーラインが FAMIC 農薬検査部職員 (発表時点)

【技術レポート】

残留農薬分析業務における分析法の検討

(LC-MS/MS を用いた野菜・果実類中の残留農薬の同時分析法の開発) 30

残留農薬分析業務における分析法の検討

LC-MS/MS を用いた野菜・果実類中の残留農薬の同時分析法の開発

佐々木秀幸*1, 守山智章*2, 山田篤司*3, 鈴木徹也*4, 白井裕一*5, 野村哲也*5

液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた野菜・果実類中の 7 種の残留農薬 (クロルフルアズロン, ピラフルフェンエチル, ピリダリル, ピリミジフェン, フルアジナム, プロスルホカルブおよびペンディメタリン) の同時分析法を検討した。検討には, こまつな, たまねぎ, ばれいしょおよびみかんを用いた。試料からアセトンで抽出を行い, n-ヘキサンに転溶後, シリカゲルミニカラムおよびグラファイトカーボンミニカラムで精製し, LC-MS/MS で測定した。3 試験室で厚生労働省通知の「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」に基づき分析法の妥当性評価を行ったところ, すべての試験室において, ばれいしょにおけるピラフルフェンエチルを除くすべての組み合わせについて, 妥当性評価の性能パラメータがガイドラインに示された目標値等に適合していることを確認した。

Keywords : 残留農薬, 野菜・果実類, 妥当性評価, 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計

緒 言

独立行政法人農林水産消費安全技術センター農薬実態調査課 (以下, センター) では, 農林水産省の指示に基づき, 国内産農産物における農薬の使用状況および残留状況について調査を行っている。農産物に使用される農薬は, 作物や栽培地域によって異なることから, 調査においては, 多くの農薬を効率的に分析することが重要となっている。

そこで, 更なる調査対象農薬の拡大と分析の効率化を図るため, センターで分析対象としていなかった 4 農薬および個別に分析を行っている 3 農薬の計 7 農薬を同時に分析する方法 (以下, 同時分析法) を新たに開発することとした。

検討対象農薬に適用される, 厚生労働省通知¹⁾による個別試験法の抽出方法および精製方法における共通点を参考にして分析法を構築した。開発した同時分析法について, 「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について」^{2, 3)} (以下, ガイドライン) に基づき, 試験室毎に妥当性評価を行ったのでその結果を報告する。

材料および方法

1. 試験室

同時分析法の開発は農薬検査部農薬実態調査課 (以下, 小平) で実施した。

妥当性評価は小平, 横浜事務所農薬実態調査課 (以下, 横浜), 神戸センター農薬実態調査課 (以下, 神戸) の 3 試験室で実施した。

2. 対象農薬

2.1. センターで分析対象としていなかった農薬 (新規分析)

ピラフルフェンエチル, ピリミジフェン, フルアジナムおよびプロスルホカルブ

2.2. 個別に分析を行っている農薬 (分析法変更)

クロルフルアズロン, ピリダリルおよびペンディメタリン

3. 試料および添加濃度

3.1. 試料

こまつな, たまねぎ, ばれいしょおよびみかんとし, 3 試験室で同一のものを用いた。

*1 独立行政法人農林水産消費安全技術センター農薬検査部

*2 独立行政法人農林水産消費安全技術センター農薬検査部, 現 札幌センター

*3 独立行政法人農林水産消費安全技術センター横浜事務所, 現 表示監視部

*4 独立行政法人農林水産消費安全技術センター横浜事務所

*5 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

3.2. 添加濃度

一律基準である 0.01 mg/kg (以下, 低濃度) およびその 10 倍にあたる 0.1 mg/kg (以下, 高濃度) の 2 濃度とした。

4. 試薬および器具

4.1. 標準品

農薬標準品：ピラフルフェンエチルは林純薬工業製, ピリミジフェン, フルアジナムおよびプロスルホカルブは和光純薬工業製の, 残留農薬試験用を使用した。各農薬標準品をアセトニトリルで溶解し 500 µg/mL の標準原液を調製した。クロロフルアズロン, ピリダリルおよびペンディメタリンは林純薬工業製の標準溶液 (各 1000 µg/mL) を使用した。

混合標準液：各標準原液および各標準溶液を混合し 20 µg/mL のアセトニトリル溶液となるように調製した。

添加回収試験用標準液：混合標準液をアセトンに溶媒置換し, アセトンで適宜希釈して調製した。

検量線用標準液：混合標準液をアセトニトリルで適宜希釈して調製した。

4.2. 試薬

アセトン, n-ヘキサン, 酢酸エチル, トルエン, 塩化ナトリウムおよび無水硫酸ナトリウムは残留農薬試験用を用いた。アセトニトリルおよびメタノールは液体クロマトグラフ質量分析計用を用いた。1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液は高速液体クロマトグラフ用を, ケイソウ土はセライト 545 を使用した。水は超純水製造装置 (Merck Millipore 製) で製造した超純水または蒸留水 (高速液体クロマトグラフ用) を使用した。

4.3. ろ紙

桐山ロート用ろ紙 No.5A-60

4.4. 固相抽出ミニカラム

シリカゲルミニカラムは, Waters 製 Sep-Pak Vac Silica (500 mg) を, グラファイトカーボンミニカラムは, Sigma-Aldrich 製 Supelclean ENVI-Carb (250 mg) を使用した。シリカゲルミニカラムはあらかじめ n-ヘキサン 10 mL で, グラファイトカーボンミニカラムは酢酸エチル・n-ヘキサン (2:8)

溶液 10 mL でコンディショニングしたものを用いた。

5. 装置

5.1. ホモジナイザー

日本精機製作所製 エースホモジナイザー

5.2. 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計

LC 部：Waters 製 ACQUITY UPLC System (小平, 神戸, 横浜)

MS 部：Waters 製 Premier XE (小平, 神戸)
：Waters 製 ACQUITY TQD (横浜)

6. 前処理方法

図 1 の分析法フローチャートに従い行った。

添加回収試験は, ホモジナイザー用容器に採取した分析試料に添加回収試験用標準液を添加し 30 分放置した後に抽出を開始した。

6.1. 抽出

試料 20.0 g にアセトン 100 mL を加え, 3 分間ホモジナイズした後吸引ろ過した。残留物にアセトン 50 mL を加え 3 分間ホモジナイズ後吸引ろ過し, ろ液を合わせアセトンで 200 mL に定容した。この溶液から 5 mL 分取し, 10 %塩化ナトリウム溶液 20 mL および n-ヘキサン 20 mL を加えて 5 分間振とうしたのち, 水層を分離除去した。n-ヘキサン層に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し, ろ別したのち, 溶媒を 40 °C 以下で留去した。残留物に n-ヘキサン 2 mL を加えて溶解したものを抽出溶液とした。

6.2. 精製

あらかじめ n-ヘキサン 10 mL でコンディショニングしたシリカゲルミニカラムに抽出溶液を負荷し, n-ヘキサン 10 mL で洗浄した。試料を負荷したシリカゲルミニカラムの下に, あらかじめ酢酸エチル・n-ヘキサン (2:8) 溶液 10 mL でコンディショニングしたグラファイトカーボンミニカラムを連結し, 酢酸エチル・n-ヘキサン (2:8) 溶液 15 mL で溶出を行い, 溶出液を採取した。次いでシリカゲルミニカラムを取り外し, グラファイトカーボンミニカラムから酢酸エチル・トルエン (8:2) 溶液 25 mL で溶出を行い, 先の溶出液と合わせた。溶出液の溶媒を 40 °C 以下で 1 mL

以下に濃縮後、アセトン 10 mL を加え 40 °C 以下で留去し、残留物をアセトニトリル 5 mL で溶解したものを試験溶液とした。

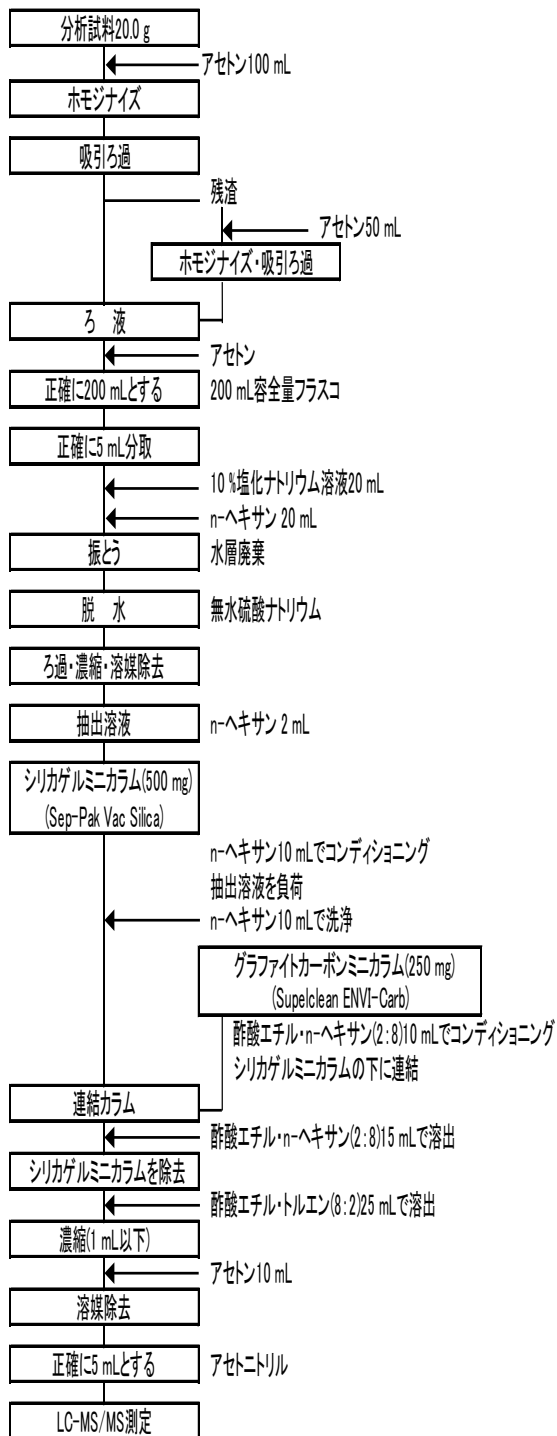


図1. 分析法フローチャート

7. 測定条件

LC-MS/MS による測定イオンおよび測定条件は、表 1 から表 3 のとおりとした。

表 1. LC-MS/MS 測定イオン

| 農薬名 | 測定モード | モニターイオン (定量) | モニターイオン (定性) |
|-------------------------|-------|-----------------|-----------------|
| | | m/z | m/z |
| クロルフルアス [®] ロン | — | 540 > 520 | 538 > 518 |
| ピラフルフェンエチル | + | 413 > 339 | 413 > 289 |
| ピリタ [®] リル | + | 490 > 109 | 490 > 164 |
| ピリミジフェン | + | 378 > 184 | 378 > 150 |
| フルアジ [®] ナム | — | 463 > 416 | 463 > 398 |
| プロスルホカルブ [®] | + | 252 > 91 | 252 > 128 |
| ベンデ [®] イメタリン | + | 282 > 212 | 282 > 194 |

表 2. LC-MS/MS 測定条件

| | |
|---------|--|
| カラム | : Wako 製 Wakopak Ultra C18-2 2.1 mm i. d. ×100 mm, 2 μm |
| 流量 | : 0.353 mL/min |
| カラム温度 | : 40 °C |
| 注入量 | : 2 μL |
| 移動相 | : 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 (グラジエント条件: 表 3) |
| イオン化法 | : エレクトロスプレーイオン化法 (ESI+, ESI-) |
| 測定法 | : 多重反応モニタリング法 (MRM) |
| イオン源温度 | : 120 °C |
| 脱溶媒ガス温度 | : 400 °C |
| 脱溶媒ガス流量 | : 800 L/hr |

表 3. グラジエント条件

| 時間 (min) | A 液:B 液 (比) | → | A 液:B 液 (比) |
|----------|-------------|---|-------------|
| 0 ~ 0.29 | 85:15 | → | 60:40 |
| ~ 1.23 | | | 60:40 |
| ~ 2.18 | 60:40 | → | 50:50 |
| ~ 2.93 | 50:50 | → | 45:55 |
| ~ 6.52 | 45:55 | → | 5:95 |
| ~ 10 | | | 5:95 |

8. 妥当性評価

8.1. 枝分かかれ試験

ガイドラインに示された実験例に基づき、各試験室において低濃度および高濃度の添加回収試験をそれぞれ 2 併行で、異なる実施日または実施者で 5 回繰り返した。

8.2. 選択性の確認

検討対象農薬を含まない試料 (以下、ブランク試料) の試験溶液を 6. 前処理方法に従い調製し、LC-MS/MS で測定して定量を妨害するピークの有無を確認した。

8.3. 検量線の直線性の確認

測定対象農薬を混合した検量線用標準溶液 (0.0003, 0.0005, 0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05 および 0.1 µg/mL) を LC-MS/MS に注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積から検量線を作成した。各検量線について、相関係数 (r) により直線性を確認した。

8.4. 検出限界および定量限界の確認

定量限界の目標値を一律基準濃度である 0.01 mg/kg，検出限界の目標値を 0.003 mg/kg とした。標準液を測定しピークの高さ (S) とピークの近傍のノイズ (N) の高さから S/N 比 3 相当の濃度を求めて試料中濃度に換算したものを検出限界とした。同様に S/N 比 10 相当の濃度を求めて試料中濃度に換算したものを定量限界とした。検出限界および定量限界の算出式を以下に示す。

・検出限界 = $3 \times (\text{ノイズの最大と最小の幅} \times 1/2) \times \text{標準液濃度} / \text{標準液ピーク高さ} \times 1 / \text{試験法における濃縮倍率}$

・定量限界 = $10 \times (\text{ノイズの最大と最小の幅} \times 1/2) \times \text{標準液濃度} / \text{標準液ピーク高さ} \times 1 / \text{試験法における濃縮倍率}$

8.5. 真度および精度の確認

ガイドラインに従い、低濃度は真度 (回収率) が 70~120%，併行精度が 25%未満，室内精度が 30%未満，高濃度は真度が 70~120%，併行精度が 15%未満，室内精度が 20%未満を目標値 (表 4 参照) とした。

表 4. ガイドラインに示された真度および精度の目標値

| 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 > |

結果および考察

9. 抽出法および精製法の検討

9.1. 抽出方法の検討

検討対象農薬に適用される個別試験法では、抽出にはアセトン、転溶には n-ヘキサンおよび 10% 塩化ナトリウム溶液を使用している。このことから、本検討でも抽出にはアセトン、転溶には n-ヘキサンおよび 10% 塩化ナトリウム溶液を使用した。

転溶について、液々分配による回収率の検討を行った。10% 塩化ナトリウム溶液 20 mL にアセトンで調製した 0.1 µg/mL の標準溶液 0.5 mL およびアセトン 4.5 mL を添加し n-ヘキサン 20 mL で振とう抽出して得られた回収率と、残った溶液をさらに n-ヘキサン 10 mL で振とう抽出して得られた回収率を比較した。その結果、表 5 に示すとおり 1 回目の抽出で 94%以上の農薬を抽出することができた。一方、2 回目の抽出では最大でも 0.3%とほとんど回収がみられなかった。このため、省力化の観点と合わせて、2 回目以降の振とう抽出は省略可能と判断した。

表 5. 振とう回数毎の n-ヘキサンへの回収率 (%)

| 農薬名 | 回収率 (%) n=1 | | 合計 |
|------------|-------------|--------|-------|
| | 20 mL | 10 mL | |
| | (1 回目) | (2 回目) | |
| クロルフルアズロン | 98.2 | 0.3 | 98.5 |
| ピラフルフェンエチル | 96.9 | 0.0 | 96.9 |
| ピリダリル | 99.6 | 0.0 | 99.6 |
| ピリミジフェン | 101.9 | 0.3 | 102.2 |
| フルアジナム | 94.1 | 0.3 | 94.4 |
| プロスルホカルブ | 98.5 | 0.0 | 98.5 |
| ベンディメタリン | 101.2 | 0.0 | 101.2 |

9.2. 精製方法の検討

9.2.1. シリカゲルミニカラム

検討対象農薬に適用される個別試験法では、精製カラムはピリダリルを除き順相吸着系のシリカゲルまたはフロリジルを使用している。そのため、精製法については、保持力が強く、また、汎用性のあるシリカゲルミニカラムを用いて検討を行った。

シリカゲルミニカラムに n-ヘキサンで調製した 0.025 µg/mL の標準溶液 2 mL を負荷し、n-ヘキサン 10 mL で洗浄したのち、混合割合を変えた酢酸エチル・n-ヘキサン溶液を用いて農薬を溶出

させ、溶出画分毎の農薬の溶出状況を比較した。結果を表 6 から表 8 に示す。

酢酸エチル・n-ヘキサン (1:19) 溶液では、ピラフルフェンエチル、ピリミジフェンおよびクロルフルアズロンの溶出率が 0~2 % と殆ど溶出せず、酢酸エチル・n-ヘキサン (1:9) 溶液では改善するものの 25 mL 流しても 80 % 未満に留まった。一方、酢酸エチル・n-ヘキサン (2:8) 溶液では全ての農薬が溶出量 15 mL までで 87~102 % 溶出した。以上の結果から、n-ヘキサン 2 mL で負荷し、n-ヘキサン 10 mL で洗浄後に酢酸エチル・n-ヘキサン (2:8) 溶液 15 mL で溶出を行うこととした。

表 6. 酢酸エチルおよび n-ヘキサン (1:19) 溶液を用いた場合のシリカゲルミニカラムからの溶出状況

| 農薬名 | 回収率 (%) n=1 | | | | 合計 |
|------------|-----------------|------------------------|---------|----------|-------|
| | ヘキサン | 酢酸エチルおよび n-ヘキサン (1:19) | | | |
| | 2 mL (負荷)+10 mL | 0-5 mL | 5-15 mL | 15-25 mL | |
| クロルフルアズロン | 0 | 0 | 0.3 | 1.8 | 2.1 |
| ピラフルフェンエチル | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ピリダリル | 0 | 102.9 | 0 | 0 | 102.9 |
| ピリミジフェン | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| フルアジナム | 0 | 95.1 | 3.6 | 0 | 98.7 |
| プロスルホカルブ | 0 | 99.1 | 0 | 0 | 99.1 |
| ペンディメタリン | 0 | 97.2 | 0 | 0 | 97.2 |

表 7. 酢酸エチルおよび n-ヘキサン (1:9) 溶液を用いた場合のシリカゲルミニカラムからの溶出状況

| 農薬名 | 回収率 (%) n=1 | | | | 合計 |
|------------|-----------------|-----------------------|---------|----------|-------|
| | ヘキサン | 酢酸エチルおよび n-ヘキサン (1:9) | | | |
| | 2 mL (負荷)+10 mL | 0-5 mL | 5-15 mL | 15-25 mL | |
| クロルフルアズロン | 0 | 0 | 57.8 | 19.1 | 76.9 |
| ピラフルフェンエチル | 0 | 0 | 23.0 | 55.8 | 78.8 |
| ピリダリル | 0 | 102.9 | 0 | 0 | 102.9 |
| ピリミジフェン | 0 | 0 | 20.4 | 51.5 | 71.9 |
| フルアジナム | 0 | 102.7 | 0 | 0 | 102.7 |
| プロスルホカルブ | 0 | 101.1 | 0 | 0 | 101.1 |
| ペンディメタリン | 0 | 102.7 | 0 | 0 | 102.7 |

表 8. 酢酸エチルおよび n-ヘキサン (2:8) 溶液を用いた場合のシリカゲルミニカラムからの溶出状況

| 農薬名 | 回収率 (%) n=1 | | | | 合計 |
|------------|-----------------|-----------------------|---------|----------|-------|
| | ヘキサン | 酢酸エチルおよび n-ヘキサン (2:8) | | | |
| | 2 mL (負荷)+10 mL | 0-5 mL | 5-15 mL | 15-25 mL | |
| クロルフルアズロン | 0 | 49.2 | 37.6 | 0 | 86.8 |
| ピラフルフェンエチル | 0 | 45.4 | 49.3 | 0 | 94.7 |
| ピリダリル | 0 | 98.2 | 0.6 | 0 | 98.8 |
| ピリミジフェン | 0 | 40.1 | 47.4 | 0.3 | 87.7 |
| フルアジナム | 0 | 90.1 | 0.5 | 0 | 90.6 |
| プロスルホカルブ | 0 | 102.0 | 0.4 | 0 | 102.4 |
| ペンディメタリン | 0 | 99.5 | 0 | 0 | 99.5 |

9.2.2. グラファイトカーボンミニカラムによる追加精製

シリカゲルミニカラムによる精製を試料に適用したところ、みかんのクロルフルアズロンの回収率が70%を下回る傾向が見られた。

原因として、みかんの試験溶液が着色していたことから、残存した試料マトリックスによりLC-MS/MS測定でイオン化抑制が生じて回収率が低下した可能性が考えられた。また、試験溶液中の色素による測定装置への影響も懸念されることから、シリカゲルミニカラムでは精製が不十分と考えられた。

このため、色素の除去に有効とされるグラファイトカーボンミニカラムを用いて精製を追加する検討を行った。なお、グラファイトカーボンミニカラムから平面構造を持つクロルフルアズロン、ピリダリルおよびピリミジフェンを溶出するため、トルエンを用いることとした。

シリカゲルミニカラムとグラファイトカーボンミニカラムの連結カラムおよびシリカゲルミ

ニカラム除去後のグラファイトカーボンミニカラムからの農薬の溶出状況を表9に示した。

表9より、酢酸エチル・n-ヘキサン(2:8)溶液15mLで連結カラムから溶出後、シリカゲルミニカラムを除去して酢酸エチル・トルエン(4:1)溶液20mLで溶出すると全ての農薬が良好に溶出した。カラムのロット差などを考慮し、溶出を確実にを行うため、酢酸エチル・トルエン(4:1)溶液は25mLで溶出することとした。

グラファイトカーボンミニカラムによる精製を追加し、こまつな、たまねぎ、ばれいしょおよびみかんを用いて添加回収試験を行ったところ、みかんのクロルフルアズロンの回収率が2点併行でそれぞれ101%、115%となり改善した。また、全ての試料で無色透明な試験溶液が得られた。

以上の結果から、シリカゲルミニカラムの下にグラファイトカーボンミニカラムを連結して精製を行うこととした。

表9. 連結カラムおよびシリカゲルミニカラム除去後のグラファイトカーボンミニカラムからの溶出状況

| 農薬名 | 回収率 (%) n=1 | | | | | 合計 |
|------------|------------------------|--------------------------|---------|--------------------|----------|------|
| | ヘキサン 2 mL(負荷)+10 mL | 酢酸エチルおよび n-ヘキサン (2:8) | | 酢酸エチルおよびトルエン (4:1) | | |
| | | 0-15 mL | 0-15 mL | 15-20 mL | 20-25 mL | |
| クロルフルアズロン | - | 0 | 84.0 | 1.4 | 0 | 85.4 |
| ピラフルフェンエチル | - | 86.8 | 4.0 | 0 | 0 | 90.8 |
| ピリダリル | - | 0 | 95.8 | 0.2 | 0 | 96.0 |
| ピリミジフェン | - | 4.6 | 82.7 | 0.4 | 0.1 | 87.8 |
| フルアジナム | - | 98.3 | 0.7 | 0 | 0 | 99.0 |
| プロスルホカルブ | - | 88.3 | 0.4 | 0 | 0 | 88.7 |
| ベンディメタリン | - | 84.1 | 0 | 0 | 0 | 84.1 |

10. 妥当性評価結果

10.1. 選択性

ブランク試料について分析を行ったところ、いずれの農薬においても定量の妨害となるピークは認められず、選択性に問題がないことが確認された。

10.2. 検量線の直線性

各試験室で作成した検量線の相関係数(r)は表10に示すとおりであり、すべての農薬について、0.0003~0.1 µg/mLの範囲で直線性(相関係数(r)が0.995以上)が確認された。

表10. 直線性の範囲と相関係数

| 農薬名 | 直線性の 範囲 (µg/mL) | 相関係数 (r) | | |
|------------|-----------------------|----------|--------|--------|
| | | 小平 | 横浜 | 神戸 |
| クロルフルアズロン | 0.0003-0.1 | 0.9998 | 0.9998 | 0.9999 |
| ピラフルフェンエチル | 0.0003-0.1 | 0.9999 | 1.0000 | 1.0000 |
| ピリダリル | 0.0003-0.1 | 0.9999 | 1.0000 | 0.9999 |
| ピリミジフェン | 0.0003-0.1 | 1.0000 | 0.9999 | 0.9999 |
| フルアジナム | 0.0003-0.1 | 1.0000 | 0.9993 | 0.9999 |
| プロスルホカルブ | 0.0003-0.1 | 0.9999 | 1.0000 | 0.9999 |
| ベンディメタリン | 0.0003-0.1 | 0.9999 | 0.9999 | 0.9996 |

10.3. 検出限界および定量限界

各試験室の検出限界および定量限界の結果は表 11 に示すとおりであり、いずれも目標値を満たしていた。

10.4. 真度および精度

各試験室の真度（回収率）および精度（併行精度および室内精度）の結果を表 12 から表 15 に示す。

ばれいしよのピラフルフェンエチルを除き、すべての農薬で目標値を満たした。ピラフルフェンエチルがばれいしよで殆ど回収されなかった原因は、ばれいしよ以外では真度が 70 %以上となったことから、ばれいしよ特有の成分の影響によ

り、前処理工程において分解等で損失した可能性が考えられた。

10.5. 室間再現性（参考）

すべての結果（3 試験室それぞれにおいて 1 回当たり 2 併行、異なる実施日または異なる実施者で 5 回繰り返しの枝分かれ試験）から求めた真度（回収率）および精度（併行精度および室間精度）を表 16 から表 19 に示す。この結果についてもばれいしよのピラフルフェンエチルを除いたすべての農薬でガイドラインの目標値を満たしていた。

表 11. 検出限界および定量限界

| 農薬名 | 検出限界 (mg/kg) | | | 定量限界 (mg/kg) | | |
|------------|--------------|---------|---------|--------------|---------|---------|
| | 小平 | 横浜 | 神戸 | 小平 | 横浜 | 神戸 |
| | 目標値 | 0.003 | 0.003 | 0.003 | 0.01 | 0.01 |
| クロルフルアズロン | 0.00045 | 0.00020 | 0.00027 | 0.00150 | 0.00067 | 0.00089 |
| ピラフルフェンエチル | 0.00027 | 0.00018 | 0.00008 | 0.00089 | 0.00059 | 0.00027 |
| ピリダリル | 0.00070 | 0.00081 | 0.00075 | 0.00232 | 0.00271 | 0.00251 |
| ピリミジフェン | 0.00011 | 0.00003 | 0.00004 | 0.00036 | 0.00011 | 0.00014 |
| フルアジナム | 0.00035 | 0.00013 | 0.00006 | 0.00118 | 0.00042 | 0.00021 |
| プロスルホカルブ | 0.00036 | 0.00010 | 0.00006 | 0.00120 | 0.00032 | 0.00019 |
| ペンディメタリン | 0.00094 | 0.00025 | 0.00028 | 0.00313 | 0.00083 | 0.00093 |

表 12. 3 試験室の回収率、併行精度および室内精度（こまつな）

| 農薬名 | | 回収率 (%) n=10 | | 併行精度 (RSD %) | | 室内精度 (RSD %) | |
|------------|----|--------------|--------|--------------|------|--------------|------|
| | | 低濃度 | 高濃度 | 低濃度 | 高濃度 | 低濃度 | 高濃度 |
| | | 目標値 | 70~120 | 70~120 | < 25 | < 15 | < 30 |
| クロルフルアズロン | 小平 | 95.7 | 90.5 | 8.6 | 6.5 | 10.6 | 9.1 |
| | 横浜 | 96.8 | 92.7 | 14.3 | 4.9 | 15.3 | 6.7 |
| | 神戸 | 93.0 | 92.7 | 11.4 | 5.8 | 11.4 | 9.4 |
| ピラフルフェンエチル | 小平 | 88.5 | 84.2 | 6.3 | 5.4 | 6.3 | 7.7 |
| | 横浜 | 94.5 | 90.3 | 3.1 | 0.5 | 3.1 | 0.7 |
| | 神戸 | 95.4 | 92.7 | 3.9 | 3.4 | 5.2 | 6.5 |
| ピリダリル | 小平 | 95.7 | 89.5 | 5.4 | 7.2 | 10.4 | 9.2 |
| | 横浜 | 92.7 | 88.1 | 8.0 | 5.8 | 11.0 | 9.1 |
| | 神戸 | 93.1 | 97.5 | 8.5 | 3.1 | 8.5 | 3.9 |
| ピリミジフェン | 小平 | 88.7 | 86.1 | 7.5 | 6.1 | 7.5 | 6.9 |
| | 横浜 | 90.3 | 87.9 | 1.1 | 0.9 | 1.8 | 4.2 |
| | 神戸 | 85.7 | 87.7 | 8.2 | 5.9 | 9.9 | 7.7 |
| フルアジナム | 小平 | 91.8 | 83.9 | 11.6 | 3.0 | 12.8 | 6.5 |
| | 横浜 | 91.4 | 88.7 | 4.3 | 1.5 | 4.3 | 4.3 |
| | 神戸 | 92.7 | 91.5 | 5.1 | 3.9 | 5.1 | 7.3 |
| プロスルホカルブ | 小平 | 97.9 | 92.4 | 7.7 | 4.5 | 7.7 | 5.6 |
| | 横浜 | 98.3 | 94.6 | 1.6 | 1.7 | 2.8 | 3.9 |
| | 神戸 | 99.6 | 101.0 | 13.9 | 3.1 | 13.9 | 8.2 |
| ペンディメタリン | 小平 | 102.1 | 87.9 | 4.9 | 6.8 | 7.5 | 9.6 |
| | 横浜 | 101.8 | 95.3 | 6.6 | 2.6 | 6.6 | 4.9 |
| | 神戸 | 95.9 | 92.3 | 4.6 | 5.2 | 6.4 | 5.2 |

表 13. 3 試験室の回収率, 併行精度および室内精度 (たまねぎ)

| 農薬名 | | 回収率 (%) n=10 | | 併行精度 (RSD %) | | 室内精度 (RSD %) | |
|------------|----|--------------|--------|--------------|------|--------------|------|
| | | 低濃度 | 高濃度 | 低濃度 | 高濃度 | 低濃度 | 高濃度 |
| | | 目標値 | 70~120 | 70~120 | < 25 | < 15 | < 30 |
| クロルフルアズロン | 小平 | 92.6 | 93.4 | 13.4 | 6.4 | 13.4 | 10.4 |
| | 横浜 | 99.7 | 95.6 | 11.7 | 3.5 | 16.3 | 3.5 |
| | 神戸 | 91.8 | 92.4 | 5.9 | 2.5 | 6.6 | 5.7 |
| ピラフルフェンエチル | 小平 | 90.9 | 91.8 | 5.7 | 5.2 | 8.7 | 5.3 |
| | 横浜 | 93.9 | 95.6 | 6.5 | 1.7 | 8.1 | 2.6 |
| | 神戸 | 93.3 | 88.7 | 3.2 | 3.0 | 4.7 | 3.5 |
| ピリダリル | 小平 | 94.6 | 94.5 | 5.1 | 6.2 | 5.1 | 8.9 |
| | 横浜 | 99.2 | 99.6 | 4.5 | 2.0 | 7.1 | 4.4 |
| | 神戸 | 94.7 | 92.0 | 5.2 | 2.9 | 5.9 | 7.3 |
| ピリミジフェン | 小平 | 88.7 | 88.5 | 3.8 | 5.2 | 6.6 | 6.8 |
| | 横浜 | 85.7 | 85.4 | 4.2 | 1.6 | 5.6 | 1.7 |
| | 神戸 | 83.2 | 81.0 | 4.5 | 5.2 | 7.2 | 8.0 |
| フルアジナム | 小平 | 96.3 | 97.1 | 4.1 | 4.9 | 4.1 | 8.7 |
| | 横浜 | 95.6 | 94.8 | 3.4 | 1.8 | 4.5 | 2.0 |
| | 神戸 | 87.1 | 87.4 | 9.1 | 5.3 | 10.7 | 6.8 |
| プロスルホカルブ | 小平 | 97.3 | 94.8 | 3.6 | 4.8 | 6.3 | 7.3 |
| | 横浜 | 94.0 | 93.6 | 3.2 | 2.3 | 3.7 | 2.9 |
| | 神戸 | 86.2 | 91.3 | 8.3 | 7.4 | 12.3 | 9.6 |
| ペンディメタリン | 小平 | 96.8 | 96.7 | 9.2 | 6.8 | 15.2 | 13.9 |
| | 横浜 | 96.0 | 93.4 | 14.9 | 2.6 | 14.9 | 3.2 |
| | 神戸 | 89.9 | 88.2 | 5.9 | 7.5 | 11.5 | 7.5 |

表 14. 3 試験室の回収率, 併行精度および室内精度 (ばれいしょ)

| 農薬名 | | 回収率 (%) n=10 | | 併行精度 (RSD %) | | 室内精度 (RSD %) | |
|------------|----|--------------|--------|--------------|------|--------------|------|
| | | 低濃度 | 高濃度 | 低濃度 | 高濃度 | 低濃度 | 高濃度 |
| | | 目標値 | 70~120 | 70~120 | < 25 | < 15 | < 30 |
| クロルフルアズロン | 小平 | 95.2 | 93.7 | 8.4 | 4.7 | 8.4 | 6.8 |
| | 横浜 | 96.7 | 92.9 | 11.1 | 4.7 | 12.1 | 4.7 |
| | 神戸 | 92.1 | 94.1 | 13.2 | 6.6 | 13.5 | 7.7 |
| ピラフルフェンエチル | 小平 | 0 | 0 | - | - | - | - |
| | 横浜 | 0 | 2.1 | - | - | - | - |
| | 神戸 | 0 | 0 | - | - | - | - |
| ピリダリル | 小平 | 94.3 | 95.7 | 2.7 | 5.9 | 6.4 | 5.9 |
| | 横浜 | 92.7 | 96.7 | 8.0 | 1.2 | 8.2 | 3.3 |
| | 神戸 | 93.9 | 90.9 | 6.6 | 3.2 | 9.6 | 10.3 |
| ピリミジフェン | 小平 | 84.0 | 85.8 | 4.9 | 6.4 | 7.3 | 6.4 |
| | 横浜 | 81.9 | 86.2 | 7.1 | 1.2 | 7.1 | 1.7 |
| | 神戸 | 87.5 | 82.3 | 7.2 | 3.6 | 7.2 | 10.5 |
| フルアジナム | 小平 | 91.6 | 92.1 | 3.4 | 6.3 | 5.2 | 6.3 |
| | 横浜 | 81.7 | 92.2 | 9.0 | 3.6 | 9.1 | 4.2 |
| | 神戸 | 90.9 | 87.9 | 12.4 | 3.0 | 12.4 | 10.5 |
| プロスルホカルブ | 小平 | 90.4 | 88.4 | 4.9 | 5.1 | 5.2 | 6.2 |
| | 横浜 | 84.9 | 91.5 | 6.1 | 1.7 | 6.4 | 3.1 |
| | 神戸 | 90.0 | 85.7 | 7.6 | 4.9 | 14.9 | 10.9 |
| ペンディメタリン | 小平 | 95.3 | 92.1 | 13.5 | 6.7 | 13.5 | 9.4 |
| | 横浜 | 94.6 | 88.0 | 7.8 | 9.3 | 10.2 | 9.3 |
| | 神戸 | 85.6 | 85.6 | 8.1 | 3.2 | 12.8 | 10.2 |

*検出限界未満の結果は「0」として計算した。精度は算出せず「-」と表記した。

表 15. 3 試験室の回収率、併行精度および室内精度（みかん）

| 農薬名 | | 回収率 (%) n=10 | | 併行精度 (RSD %) | | 室内精度 (RSD %) | |
|------------|----|--------------|--------|--------------|------|--------------|------|
| | | 低濃度 | 高濃度 | 低濃度 | 高濃度 | 低濃度 | 高濃度 |
| | | 目標値 | 70~120 | 70~120 | < 25 | < 15 | < 30 |
| クロルフルアズロン | 小平 | 98.8 | 96.3 | 8.8 | 4.5 | 11.0 | 4.7 |
| | 横浜 | 83.3 | 91.2 | 8.9 | 3.3 | 8.9 | 9.4 |
| | 神戸 | 103.1 | 88.7 | 9.7 | 2.5 | 12.0 | 4.3 |
| ピラフルフェンエチル | 小平 | 93.3 | 94.7 | 3.6 | 3.4 | 6.9 | 3.4 |
| | 横浜 | 89.3 | 90.5 | 2.8 | 4.0 | 8.7 | 8.6 |
| | 神戸 | 97.0 | 89.7 | 4.7 | 2.3 | 5.5 | 8.2 |
| ピリダリル | 小平 | 97.9 | 91.9 | 4.6 | 5.0 | 7.8 | 8.6 |
| | 横浜 | 94.9 | 91.3 | 5.8 | 3.6 | 8.1 | 6.6 |
| | 神戸 | 99.3 | 90.9 | 3.0 | 4.5 | 3.7 | 5.8 |
| ピリミジフェン | 小平 | 90.8 | 89.3 | 4.7 | 2.9 | 10.4 | 4.4 |
| | 横浜 | 82.6 | 84.5 | 3.8 | 3.7 | 7.8 | 8.4 |
| | 神戸 | 89.2 | 83.5 | 3.1 | 2.0 | 7.2 | 7.0 |
| フルアジナム | 小平 | 96.2 | 94.2 | 5.0 | 1.7 | 5.4 | 5.2 |
| | 横浜 | 86.3 | 88.3 | 5.5 | 4.2 | 9.0 | 7.8 |
| | 神戸 | 96.9 | 89.5 | 7.4 | 2.3 | 7.4 | 8.6 |
| プロスルホカルブ | 小平 | 99.7 | 93.2 | 6.3 | 2.3 | 10.5 | 4.7 |
| | 横浜 | 90.0 | 89.7 | 4.1 | 3.3 | 8.0 | 7.1 |
| | 神戸 | 102.5 | 91.2 | 8.8 | 1.5 | 8.8 | 3.0 |
| ペンディメタリン | 小平 | 96.7 | 90.3 | 5.1 | 5.2 | 11.5 | 10.0 |
| | 横浜 | 97.2 | 89.4 | 6.1 | 4.6 | 6.3 | 8.8 |
| | 神戸 | 96.0 | 90.7 | 6.9 | 4.3 | 11.3 | 7.4 |

表 16. 3 試験室の回収率、併行精度および室間精度（こまつな）

| 農薬名 | | 回収率 (%) n=30 | | 併行精度 (RSD %) | | 室間精度 (RSD %) | |
|------------|--|--------------|--------|--------------|------|--------------|------|
| | | 低濃度 | 高濃度 | 低濃度 | 高濃度 | 低濃度 | 高濃度 |
| | | 目標値 | 70~120 | 70~120 | < 25 | < 15 | < 30 |
| クロルフルアズロン | | 95.2 | 92.0 | 11.7 | 5.8 | 11.7 | 8.1 |
| ピラフルフェンエチル | | 92.8 | 89.1 | 4.6 | 3.6 | 5.7 | 6.8 |
| ピリダリル | | 93.9 | 91.7 | 7.4 | 5.5 | 9.2 | 8.6 |
| ピリミジフェン | | 88.2 | 87.2 | 6.4 | 4.9 | 7.2 | 6.2 |
| フルアジナム | | 92.0 | 88.0 | 7.7 | 3.0 | 8.0 | 6.8 |
| プロスルホカルブ | | 98.6 | 96.0 | 9.3 | 3.3 | 9.3 | 7.1 |
| ペンディメタリン | | 99.9 | 91.8 | 5.5 | 5.0 | 7.1 | 7.2 |

表 17. 3 試験室の回収率、併行精度および室間精度（たまねぎ）

| 農薬名 | | 回収率 (%) n=30 | | 併行精度 (RSD %) | | 室間精度 (RSD %) | |
|------------|--|--------------|--------|--------------|------|--------------|------|
| | | 低濃度 | 高濃度 | 低濃度 | 高濃度 | 低濃度 | 高濃度 |
| | | 目標値 | 70~120 | 70~120 | < 25 | < 15 | < 30 |
| クロルフルアズロン | | 94.7 | 93.8 | 10.9 | 4.4 | 12.9 | 6.8 |
| ピラフルフェンエチル | | 92.7 | 92.0 | 5.3 | 3.6 | 7.1 | 4.9 |
| ピリダリル | | 96.2 | 95.4 | 4.9 | 4.1 | 6.2 | 7.4 |
| ピリミジフェン | | 85.9 | 84.9 | 4.2 | 4.3 | 6.7 | 6.9 |
| フルアジナム | | 93.0 | 93.1 | 5.8 | 4.3 | 8.0 | 7.7 |
| プロスルホカルブ | | 92.5 | 93.2 | 5.3 | 5.2 | 9.1 | 6.9 |
| ペンディメタリン | | 94.2 | 92.8 | 10.8 | 6.0 | 12.7 | 9.7 |

表 18. 3 試験室の回収率、併行精度および室間精度（ばれいしょ）

| 農薬名 | | 回収率 (%) n=30 | | 併行精度 (RSD %) | | 室間精度 (RSD %) | |
|------------|--|--------------|--------|--------------|------|--------------|------|
| | | 低濃度 | 高濃度 | 低濃度 | 高濃度 | 低濃度 | 高濃度 |
| | | 目標値 | 70~120 | 70~120 | < 25 | < 15 | < 30 |
| クロルフルアズロン | | 94.7 | 93.6 | 11.0 | 5.4 | 11.2 | 6.2 |
| ピラフルフェンエチル | | 0 | 0.7 | - | - | - | - |
| ピリダリル | | 93.7 | 94.4 | 6.2 | 4.0 | 7.7 | 7.1 |
| ピリミジフェン | | 84.4 | 84.8 | 6.5 | 4.3 | 7.2 | 6.7 |
| フルアジナム | | 88.1 | 90.7 | 9.0 | 4.6 | 9.9 | 7.2 |
| プロスルホカルブ | | 88.4 | 88.5 | 6.3 | 4.2 | 9.8 | 7.4 |
| ペンディメタリン | | 91.8 | 88.6 | 10.3 | 6.9 | 11.9 | 9.4 |

*検出限界未満の結果は「0」として計算した。精度は算出せず「-」と表記した。

表 19. 3 試験室の回収率、併行精度および室間精度（みかん）

| 農薬名 | 回収率 (%) n=30 | | 併行精度 (RSD %) | | 室間精度 (RSD %) | |
|------------|--------------|--------|--------------|------|--------------|------|
| | 低濃度 | 高濃度 | 低濃度 | 高濃度 | 低濃度 | 高濃度 |
| | 目標値 | 70~120 | 70~120 | < 25 | < 15 | < 30 |
| クロルフルアズロン | 95.1 | 92.1 | 9.2 | 3.6 | 13.8 | 7.1 |
| ピラフルフェンエチル | 93.2 | 91.6 | 3.8 | 3.3 | 7.5 | 6.9 |
| ピリダリル | 97.4 | 91.4 | 4.6 | 4.4 | 6.7 | 6.7 |
| ピリミジフェン | 87.5 | 85.8 | 4.0 | 3.0 | 9.1 | 7.0 |
| フルアジナム | 93.1 | 90.7 | 6.1 | 2.9 | 8.3 | 7.4 |
| プロスルホカルブ | 97.4 | 91.4 | 6.9 | 2.5 | 10.4 | 5.1 |
| ペンディメタリン | 96.6 | 90.1 | 6.1 | 4.7 | 9.4 | 8.3 |

11. まとめ

分析対象農薬の拡大と効率化を図るため、7 農薬の同時分析法の開発を試み、アセトンで抽出後、n-ヘキサンに転溶し、シリカゲルミニカラムおよびグラファイトカーボンミニカラムで精製を行い、LC-MS/MS で測定する分析法を構築した。開発した同時分析法について、4 種類の農産物を用いて、ガイドラインに基づき単一試験室による妥当性評価を行った。この結果、7 農薬のうちピラフルフェンエチルを除いて、すべての試験室で妥当性評価の性能パラメータがそれぞれの目標値等に適合していることを確認した。なお、ピラフルフェンエチルは、4 作物のうち、ばれいしょのみ殆ど回収されず目標値を満たさなかった。原因として、ばれいしょ特有の成分により、分解等で損失した可能性が考えられた。

以上の結果から、ピラフルフェンエチルを除く 6 農薬（クロルフルアズロン、ピリダリル、ピリミジフェン、フルアジナム、プロスルホカルブおよびペンディメタリン）について、すべての試験室で同時分析法の導入が可能であり、分析対象農薬の拡大と効率化が図られると考えられた。

参考文献

- 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、平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号。
- 2) 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、平成 22 年 12 月 24 日付け食安発 1224 第 1 号。
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長通知：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に関する質疑応答集 (Q&A) について、平成 23 年 12 月 8 日付け食安基発 1208 第 1 号。