

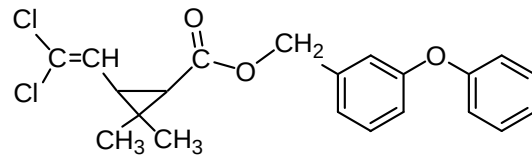
資料 2-1

農薬登録における作物のグループ化・残留分析詳細①
ペルメトリン・ビフェントリン

1. 分析対象物質

ペルメトリン

化学名： 3-phenoxybenzyl (1*RS*,3*RS*;1*RS*,3*SR*)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate
分子量： 391.3
分子式： $C_{21}H_{20}Cl_2O_3$
構造式：



性 状： 室温で部分的に結晶化する傾向がある黄褐色から褐色の液体
融 点： 34-35℃ ;シス異性体 63-65 °C ;トランス異性体 44-47 °C
蒸気圧： シス異性体 2.9×10^{-3} mPa ;トランス異性体 9.2×10^{-3} mPa (25℃)
分配係数： $\log P_{ow} = 6.1$ (20℃)
溶解性： 水 6×10^{-3} mg/L (pH7, 20℃)
キシレン, ヘキサン >1000, メタノール 258 (以上 g/kg, 25℃)
安定性： 熱に安定 (≧2 年, 20℃)
出 典： The Pesticide Manual (16th Edition)

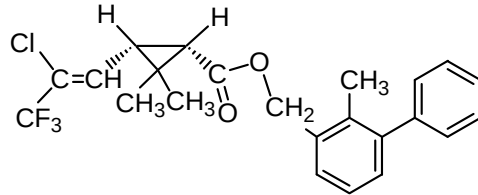
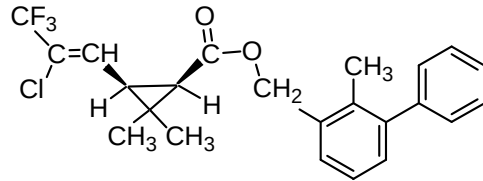
ビフェントリン

化学名： 2-methylbiphenyl-3-ylmethyl(*Z*)-(1*RS*,3*RS*)-3-(2-chloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate
分子量： 422.9
分子式： $C_{23}H_{22}ClF_3O_2$

すいか 処理区 A (ペルメトリン・ビフェントリン)

構造式：

(Z)-(1R)-cis-



(Z)-(1S)-cis-

性 状：	粘性液体;結晶又はワックス状の固体
融 点：	57-64.5℃
蒸気圧：	1.78×10^{-3} mPa (20℃)
分配係数：	$\log P_{ow} = >6$
溶解性：	水 1 µg/L (20℃) アセトン, クロロホルム, ジクロロメタン, ジエチルエーテル, トルエン に可溶 ヘプタン, メタノール にわずかに可溶
安定性：	25℃で 2 年安定 半減期 自然光下 255 日
出 典：	The Pesticide Manual (16th Edition)

2. 標準品及び試薬

ペルメトリン標準品	： 純度 99.0% (Dr.Ehrenstorfer GmbH)
ビフェントリン標準品	： 純度 99.5% (和光純薬工業製)
アセトン	： 試薬特級及び残留農薬試験用 (和光純薬工業製)
ヘキサン	： 試薬特級及び残留農薬試験用 (和光純薬工業製)
エーテル	： 試薬特級 (和光純薬工業製)
塩化ナトリウム	： 試薬特級 (和光純薬工業製)
無水硫酸ナトリウム	： 試薬特級 (和光純薬工業製)
GC/NH ₂ /SI ミニカラム	： InertSep GC/NH ₂ /SI (500mg/400mg/600mg) (ジーエルサイエンス製)

3. 装置及び機器

化学天秤：	島津製作所製 AUW220
上皿天秤：	メトラー・トレド製 PB8001-S/FACT
上皿天秤：	エー・アンド・ディ製 EK 1200i
ミキサー：	ワーリング製 CB-15T
ガスクロマトグラフ：	アジレント・テクノロジー製 7890A
データ処理装置：	アジレント・テクノロジー製 Chem Station

4. ガスクロマトグラフの操作条件

検出器：	μ-ECD
カラム：	Rtx-5 Amine (Restek 製), 内径 0.53 mm, 長さ 30 m, 膜厚 1.0 μm
温度：	温度 260 °C (23 分) 検出器 320 °C 注入口 280 °C
ガス流速：	キャリアガス He 12 mL/min. メイクアップガス N ₂ 60 mL/min.
試料注入量：	1 μL
保持時間：	約 5.0～5.2 min. (ペルメトリン) 約 3.0 min. (ビフェントリン)

5. 検量線の作成

ペルメトリン及びビフェントリン標準品 20.0 mg (各純度換算相当量) を精秤し、各々 100mL 容メスフラスコに移した。アセトンを加えて溶解して 200 mg/L の標準原液を調製した。各原液を等量ずつ混合し、ヘキサンで希釈してペルメトリン及びビフェントリン 0.0025, 0.005, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1 mg/L の混合標準溶液を調製した。この 1 μL を前記条件のガスクロマトグラフに注入し、データ処理装置を用いてペルメトリンはピーク面積、ビフェントリンはピーク高さを測定し、横軸に重量 (ng)、縦軸にピーク面積又はピーク高さをとって各検量線を作成した。

6. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料は重量を量り、つるを除去した。無処理区試料は各々を縦に 8 分割し、対角の 2 つを取り合わせ、4 組の試料を作成した。そのうちの 2 組を果肉分析試料とし、残りの 2 組を果実分析試料とした。2 組の果肉分析試料は果肉と果皮の境目に沿って包丁を入れ果肉と果皮にわけた後、各々の重量を測定した。その 1 組の果肉全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なイミベンコナゾール、アラニカルブ及びチオファネートメチル分析用試料とし、さらに 3 分割して試料を 3 組作製し、各々添加剤を加えて

すいか 処理区 A (ペルメトリン・ビフェントリン)

ミキサーで均一化した。2 組の果実分析試料のうち、1 組の全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なイミベンコナゾール、アラニカルブ及びチオファネートメチル分析用試料とし、さらに 3 分割して試料を 3 組作製し、各々添加剤を加えてミキサーで均一化した。

処理区試料は各々を縦に 8 分割し、対角の 2 つを取り合わせ、4 組の試料を作成した。そのうちの 2 組を果肉分析試料とし、残りの 2 組を果実分析試料とした。2 組の果肉分析試料は果肉と果皮の境目に沿って包丁を入れ果肉と果皮にわけた後、各々の重量を測定した。その 1 組の果肉全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なイミベンコナゾール分析用試料とし、添加剤を加えてミキサーで均一化した。2 組の果実分析試料のうち、1 組の全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なイミベンコナゾール分析用試料とし、添加剤を加えてミキサーで均一化した。

各々の試料は密封容器に入れて -20°C 以下で凍結保存した。また、量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比 (%) を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した試料 20 g を分液ロートにはかりとり、アセトン 100 mL を加えて 30 分間振とう抽出した。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣をアセトン 50 mL で 2 回洗浄し、同様にろ過した。ろ液を合わせ、 40°C 以下の水浴中で減圧濃縮し、アセトンを留去した。

6.1.3. 転溶

前項の濃縮液を少量の水を用いて分液ロートに移した後、10%塩化ナトリウム溶液 80mL 及びヘキサン 80 mL を加え 5 分間振とうした。静置分離後、ヘキサン層は無水硫酸ナトリウムをのせたろ紙 (No.5A) を通過させ、脱水した。さらにヘキサン 80mL を加え、前記操作をくり返した後、ヘキサン層を合わせ 40°C 以下の水浴中で約 10 mL まで減圧濃縮後、ヘキサンを用いて 20 mL に定容した。

6.1.4. GC/ NH_2 /SI ミニカラムによる精製

GC/ NH_2 /SI ミニカラムにヘキサン 10mL を注入し流下して前処理した。前項の定容液 2mL (試料 2g 相当量) を GC/ NH_2 /SI ミニカラムに流下した後、ヘキサン 15 mL を流下し、これらの流出液をすてた。エーテル/ヘキサン (5:95, v/v) 混液 15 mL を流下し、その全溶出液を取った。

6.1.5. 定量

前項の溶出液を 40°C 以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。残留物は直ちにヘキサンを用いて 4 mL に定容し、測定溶液とした。測定溶液は必要に応じてヘキサンで希釈した。

測定溶液の 1 μL を前記条件のガスクロマトグラフに注入し、ペルメトリンはピーク面積、ビフェントリンはピーク高さを求め、検量線よりペルメトリン及びビフェントリンの重量を求め、試料中の各残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値 (LOQ) 及び検出限界値 (LOD)

6.2.1. ペルメトリン

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	定量限界 (ppm)
0.005	2	4	1	0.01
最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)
0.0025	2	4	1	0.005

果肉，果実はいずれも同じ値

6.2.2. ビフェントリン

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	定量限界 (ppm)
0.005	2	4	1	0.01
最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)
0.0025	2	4	1	0.005

果肉，果実はいずれも同じ値

6.3. 回収率

分析法確認のため、市販品の果肉及び果実を用いて、0.01ppm (定量限界相当), 0.25ppm 及び 5ppm 添加濃度における回収試験を各 5 連分析で実施した。なお、試料 (市販品) は 2 連分析し、全て定量限界未満 (<0.01 ppm) であった。回収試験結果を表に示す。

6.3.1 果肉の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
<u>ペルメトリン</u>								
市販品	5	97	96	94	93	92	94	2.2
市販品	0.25	98	98	96	93	92	95	2.9
市販品	0.01	90	89	89	88	85	88	2.2
<u>ビフェントリン</u>								
市販品	5	94	91	90	86	83	89	4.9
市販品	0.25	86	83	82	82	77	82	4.0
市販品	0.01	88	83	77	69	69	77	11.0

6.3.2. 果実の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
<u>ペルメトリン</u>								
市販品	5	97	96	93	93	89	94	3.3
市販品	0.25	96	92	90	90	90	92	2.8
市販品	0.01	91	90	89	88	86	89	2.2
<u>ビフェントリン</u>								
市販品	5	92	91	89	87	86	89	2.9
市販品	0.25	88	85	85	83	82	85	2.7
市販品	0.01	95	76	76	70	67	77	14.1

7. 精度管理

「食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について」（平成 9 年 4 月 1 日付け衛食第 117 号厚生省生活衛生局食品保健課長通知）に基づき、内部精度管理を行った。

管理基準：20 検体を超えるごとに、各 1 検体の無処理試料及び 0.1ppm 添加試料（クォリティーコントロール試料）を分析した。

クォリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

また、2012 年 11 月実施の食品衛生精度管理比較調査（財団法人食品薬品安全センター）における Z スコアは全て $Z < 2$ であった。

7.1. クォリティーコントロール試料分析結果

7.1.1. 果肉

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>ペルメトリン</u>	2013/8/21	日植防茨城	84	<0.01
	2013/8/29	日植防茨城	100	<0.01
	2013/12/4	日植防高知	93	<0.01
	2013/12/11	日植防高知	86	<0.01
	2013/8/19	日植防宮崎	92	<0.01
	2013/8/26	日植防宮崎	94	<0.01
<u>ビフェントリン</u>	2013/8/21	日植防茨城	84	<0.01
	2013/8/29	日植防茨城	92	<0.01
	2013/12/4	日植防高知	89	<0.01
	2013/12/11	日植防高知	82	<0.01
	2013/8/19	日植防宮崎	80	<0.01
	2013/8/26	日植防宮崎	89	<0.01

7.1.2. 果実

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>ペルメトリン</u>	2013/8/21	日植防茨城	85	<0.01
	2013/8/29	日植防茨城	97	<0.01
	2013/12/4	日植防高知	94	<0.01
	2013/12/11	日植防高知	85	<0.01
	2013/8/19	日植防宮崎	97	<0.01
	2013/8/26	日植防宮崎	96	<0.01
<u>ビフェントリン</u>	2013/8/21	日植防茨城	83	<0.01
	2013/8/29	日植防茨城	88	<0.01
	2013/12/4	日植防高知	92	<0.01
	2013/12/11	日植防高知	85	<0.01
	2/13/8/19	日植防宮崎	82	<0.01
	2013/8/26	日植防宮崎	88	<0.01

8. マトリックス効果の確認

マトリックス標準溶液は、各圃場の無処理試料の最終液量 1mL をナス型フラスコに分取し、窒素気流下で溶媒を留去した後、ペルメトリン及びビフェントリンの各 0.05mg/L の検量線溶液 1mL に溶解して調製した。マトリック試料分析結果を表に示す。

8.1. 果肉

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>ペルメトリン</u>	日植防茨城	108
	日植防高知	90
	日植防宮崎	106
<u>ビフェントリン</u>	日植防茨城	103
	日植防高知	87
	日植防宮崎	103

8.2. 果実

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>ペルメトリン</u>	日植防茨城	107
	日植防高知	89
	日植防宮崎	106
<u>ビフェントリン</u>	日植防茨城	104
	日植防高知	87
	日植防宮崎	102

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料に各化合物を添加し、 -20°C 以下で凍結保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を評価した。保存安定性試験の結果を表に示す。

9.1. 果肉の保存安定性試験結果**9.1.1. ペルメトリン**

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	20 (13/8/9 - 13/8/29)	92	91
	日植防高知	28 (13/11/13 - 13/12/11)	89	86
	日植防宮崎	67 (13/6/20 - 13/8/26)	90	89

9.1.2. ビフェントリン

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	20 (13/8/9 - 13/8/29)	83	80
	日植防高知	28 (13/11/13 - 13/12/11)	88	86
	日植防宮崎	67 (13/6/20 - 13/8/26)	82	76

9.2. 果実の保存安定性試験結果**9.2.1. ペルメトリン**

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	20 (13/8/9 - 13/8/29)	92	88
	日植防高知	28 (13/11/13 - 13/12/11)	90	88
	日植防宮崎	67 (13/6/20 - 13/8/26)	84	84

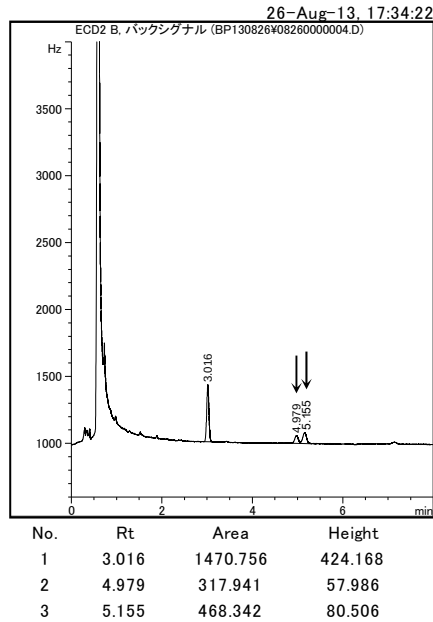
9.2.2. ビフェントリン

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	20 (13/8/9 - 13/8/29)	80	78
	日植防高知	28 (13/11/13 - 13/12/11)	88	87
	日植防宮崎	67 (13/6/20 - 13/8/26)	80	79

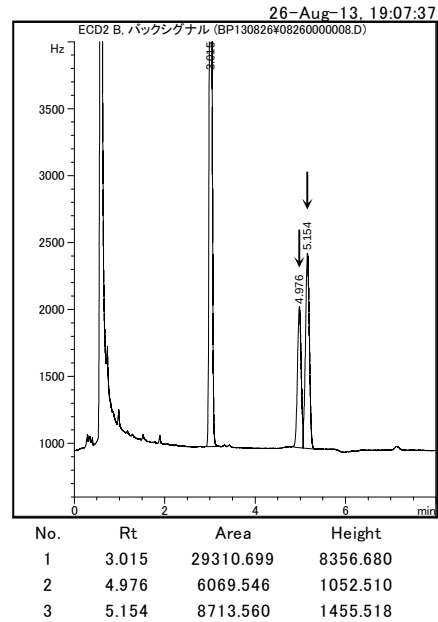
付図-1. 果肉のクロマトグラム (代表例)

付図-1-1. ペルメトリンのクロマトグラム

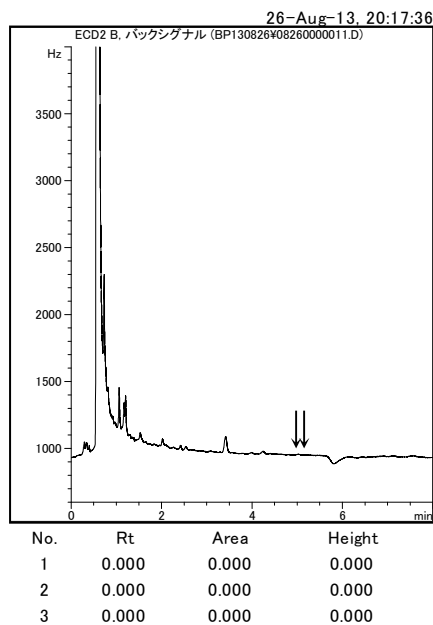
標準品 0.005ng



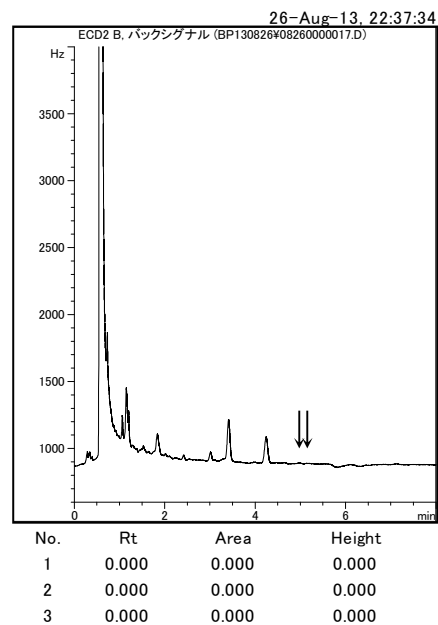
標準品 0.1ng



日植防茨城 無処理
4mL/1μL/2g

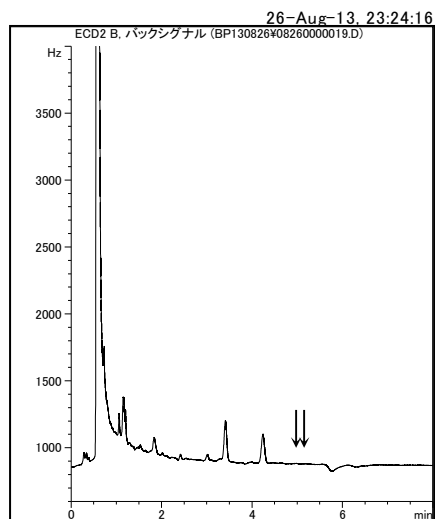


日植防茨城 5 回処理 1 日後
4mL/1μL/2g



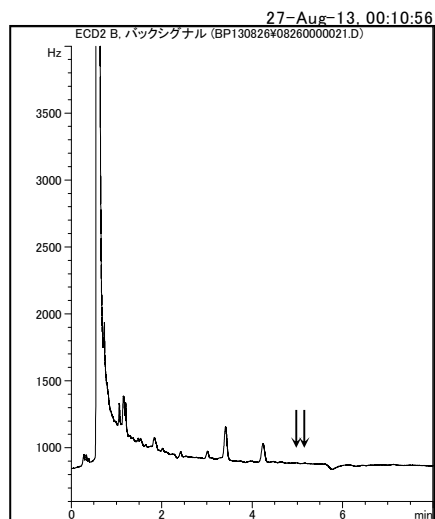
すいか 処理区 A (ペルメトリン・ビフェントリン)

日植防茨城 5 回処理 3 日後
4mL/1 μ L/2g



No.	Rt	Area	Height
1	0.000	0.000	0.000
2	0.000	0.000	0.000
3	0.000	0.000	0.000

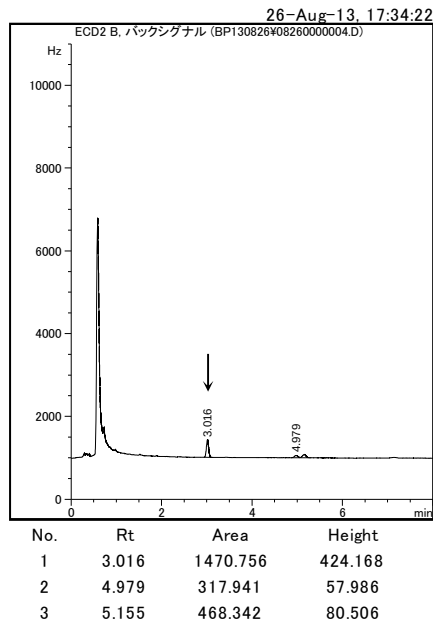
日植防茨城 5 回処理 7 日後
4mL/1 μ L/2g



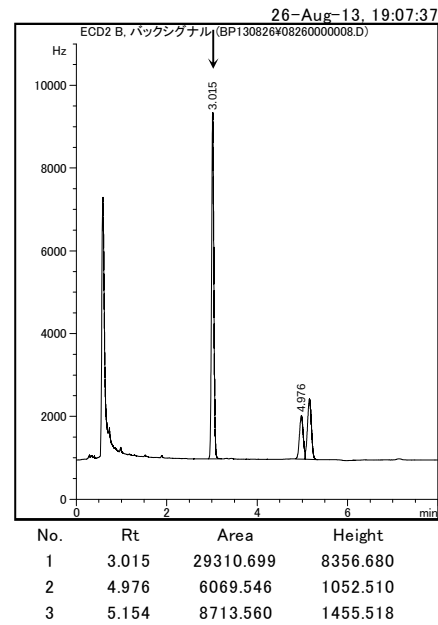
No.	Rt	Area	Height
1	0.000	0.000	0.000
2	0.000	0.000	0.000
3	0.000	0.000	0.000

付図-1-2. ビフェントリンのクロマトグラム

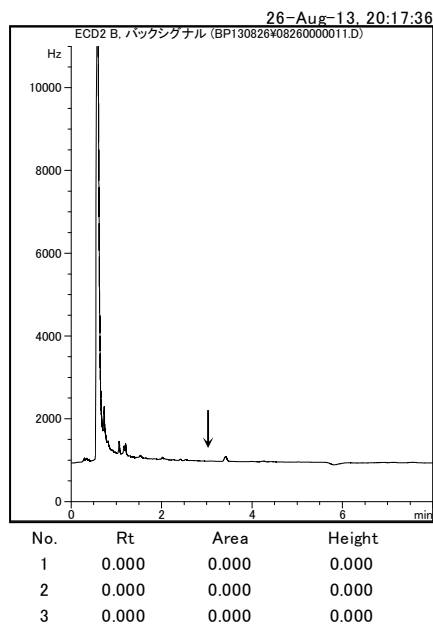
標準品 0.005ng



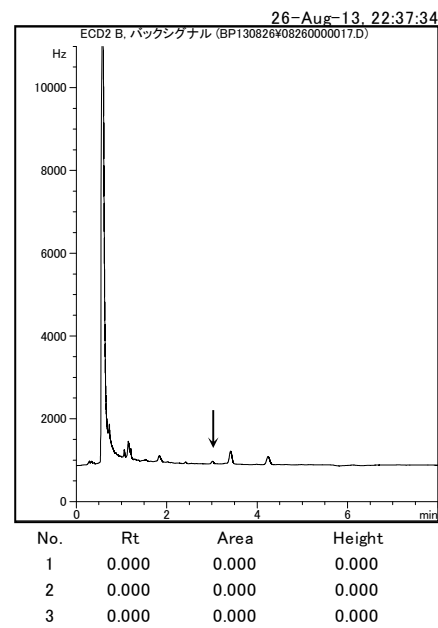
標準品 0.1ng



日植防茨城 無処理
4mL/1μL/2g

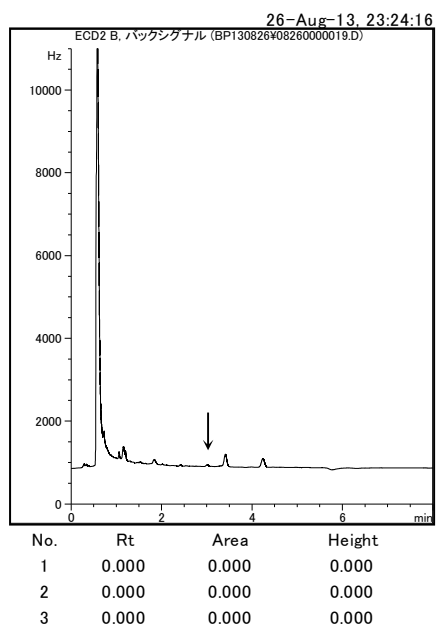


日植防茨城 4回処理 1日後
4mL/1μL/2g

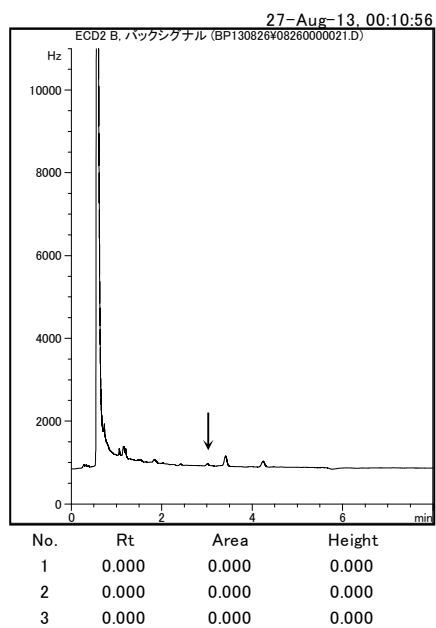


すいか 処理区 A (ペルメトリン・ビフェントリン)

日植防茨城 4 回処理 3 日後
4mL/1 μ L/2g

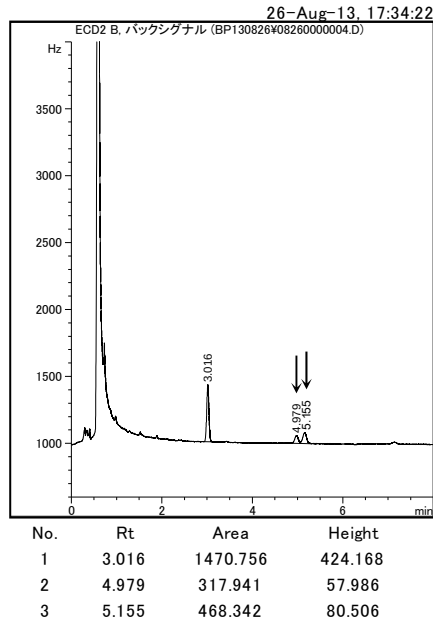


日植防茨城 4 回処理 7 日後
4mL/1 μ L/2g

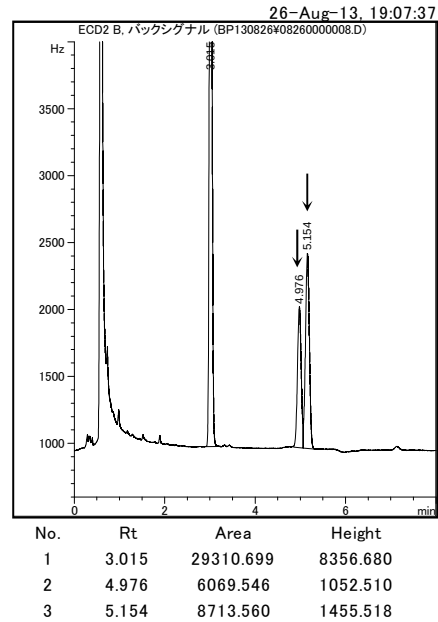


付図-2. 果実のクロマトグラム (代表例)
付図-2-1. ペルメトリンのクロマトグラム

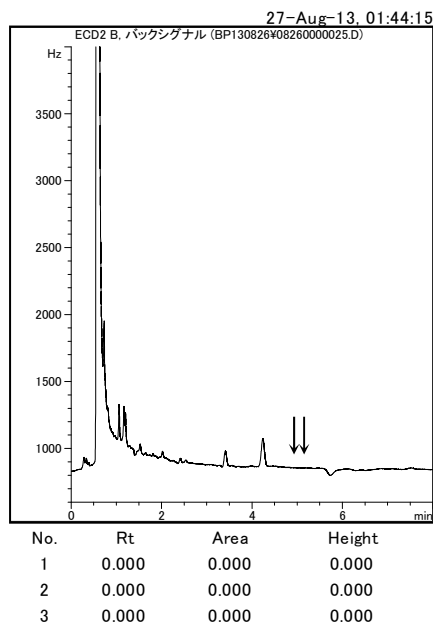
標準品 0.005ng



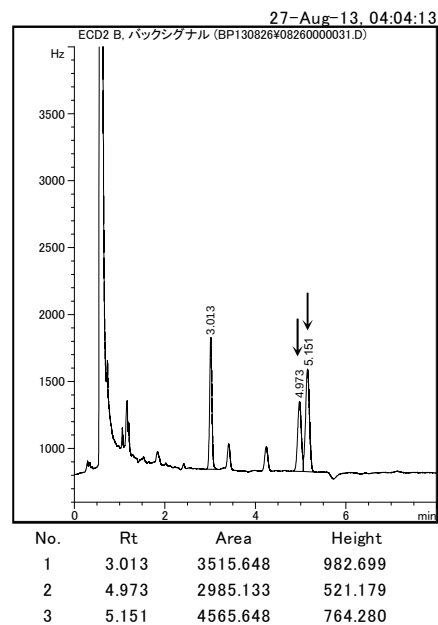
標準品 0.1ng



日植防茨城 無処理
4mL/1μL/2g

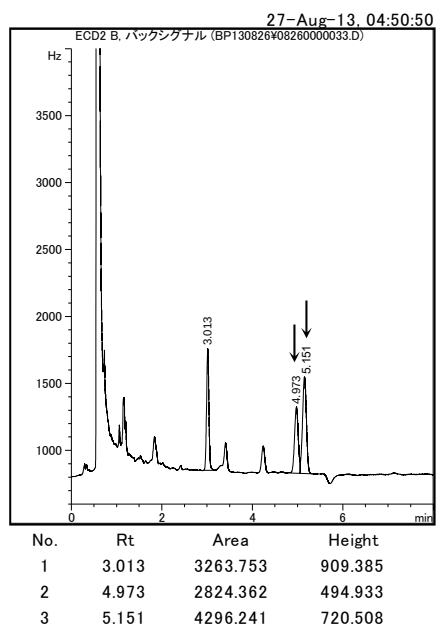


日植防茨城 5 回処理 1 日後
4mL/1μL/2g

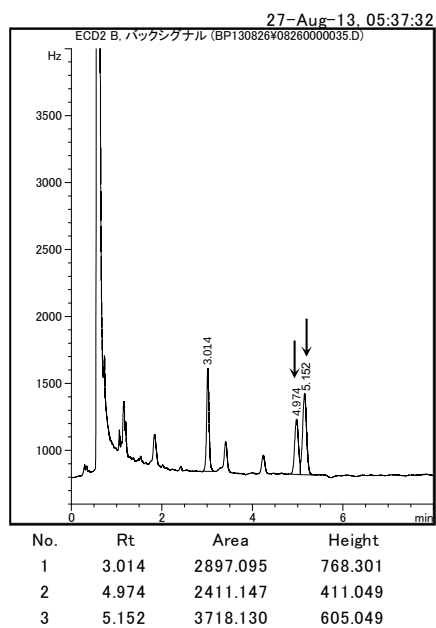


すいか 処理区 A (ペルメトリン・ビフェントリン)

日植防茨城 5 回処理 3 日後
4mL/1 μ L/2g

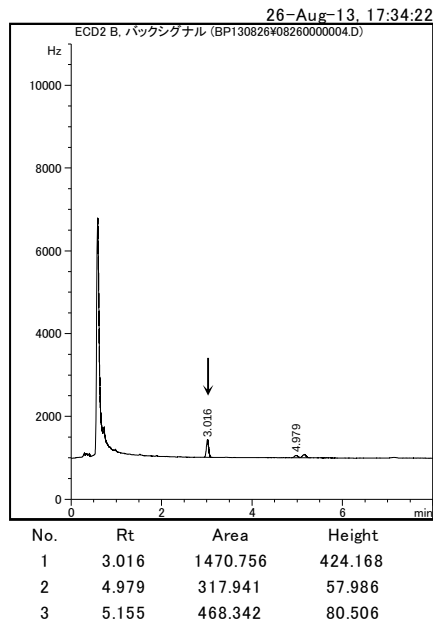


日植防茨城 5 回処理 7 日後
4mL/1 μ L/2g

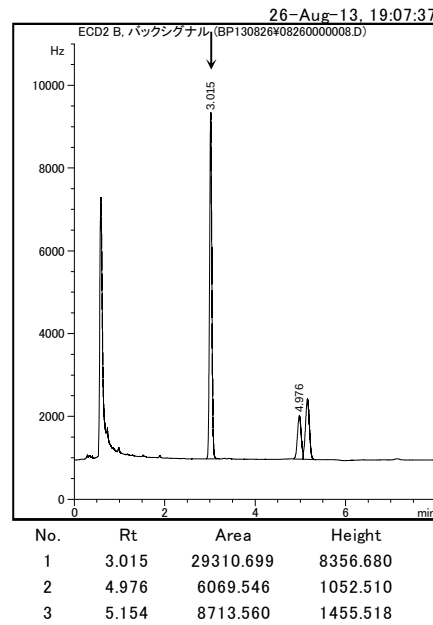


付図-2-2. ビフェントリンのクロマトグラム

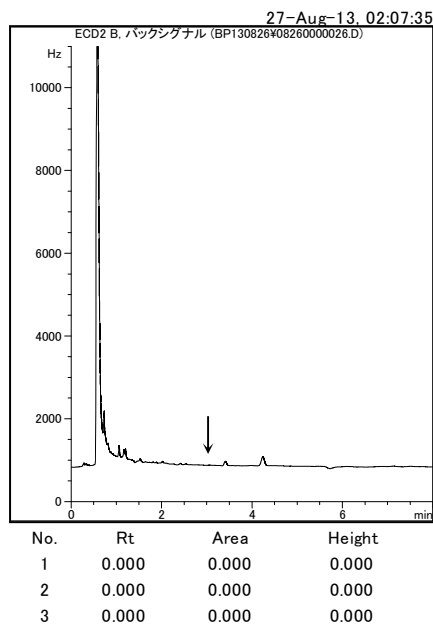
標準品 0.005ng



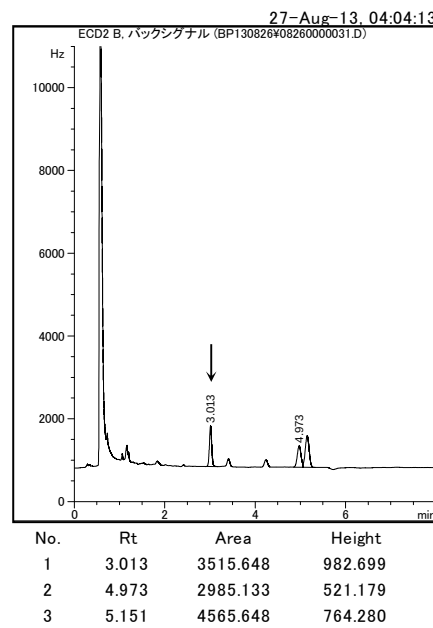
標準品 0.1ng



日植防茨城 無処理
4mL/1 μ L/2g

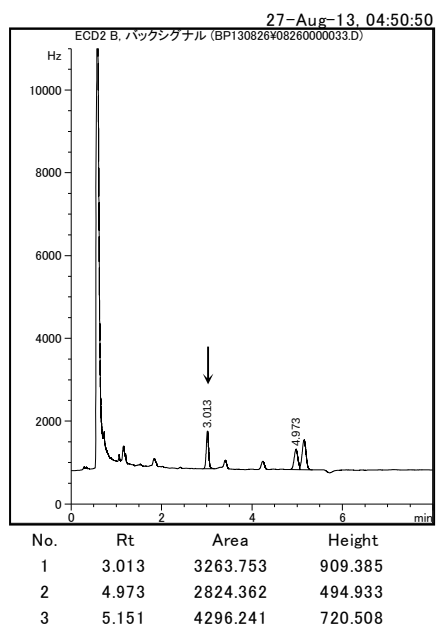


日植防茨城 4回処理 1日後
4mL/1 μ L/2g

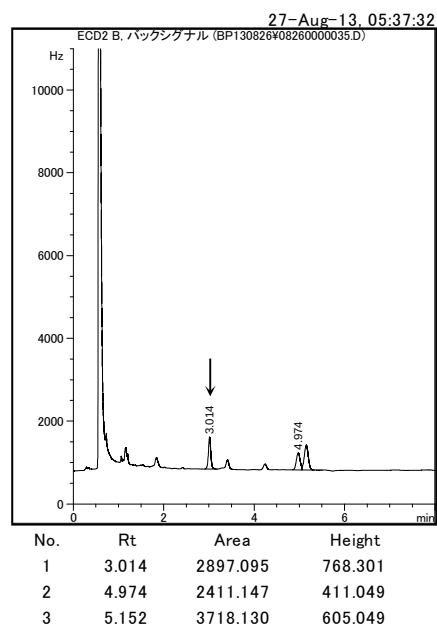


すいか 処理区 A (ペルメトリン・ビフェントリン)

日植防茨城 4 回処理 3 日後
4mL/1 μ L/2g



日植防茨城 4 回処理 7 日後
4mL/1 μ L/2g



農薬登録における作物のグループ化・残留分析詳細②
ピリダリル

1. 分析対象物質

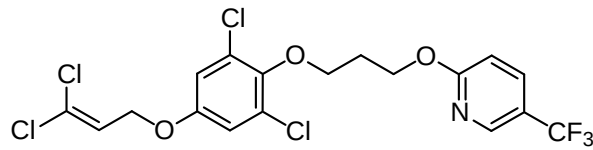
ピリダリル

化学名： 2,6-dichloro-4-(3,3-dichloroallyloxy)phenyl 3-[5-(trifluoromethyl)-2-pyridyloxy]propylether

分子量： 491.1

分子式： $C_{18}H_{14}Cl_4F_3NO_3$

構造式：



性 状： 液体

融 点： $< -17^{\circ}C$

蒸気圧： 6.24×10^{-5} mPa ($20^{\circ}C$)

分配係数： $\log P_{ow} = 8.1$ ($20^{\circ}C$)

溶解性： 水 0.15ppb ($20^{\circ}C$)

アセトン, アセトニトリル, クロロホルム, DMF, 酢酸エチル,
ヘキサン, n-オクタノール, キシレン > 1000 g/L
メタノール > 500 g/L

出 典： The Pesticide Manual (16th Edition)

2. 標準品及び試薬

ピリダリル標準品	: 純度 98.6 % (和光純薬工業製)
アセトン	: 試薬特級及び残留農薬試験用 (和光純薬工業製)
ヘキサン	: 試薬特級及び残留農薬試験用 (和光純薬工業製)
トルエン	: 残留農薬試験用 (和光純薬工業製)
塩化ナトリウム	: 試薬特級 (和光純薬工業製)
無水硫酸ナトリウム	: 試薬特級 (和光純薬工業製)
GC/NH ₂ /SI ミニカラム	: InertSep GC/NH ₂ /SI (500mg/400mg/600mg) (ジーエルサイエンス製)

3. 装置及び機器

化学天秤：	島津製作所製 AUW220
上皿天秤：	メトラー・トレド製 PB8001-S/FACT
上皿天秤：	エー・アンド・ディ製 EK 1200i
ミキサー：	ワーリング製 CB-15T
ガスクロマトグラフ：	アジレント・テクノロジー製 7890A
データ処理装置：	アジレント・テクノロジー製 Chem Station

4. ガスクロマトグラフの操作条件

検出器：	μ -ECD
カラム：	Rtx-5 Amine (Restek 製), 内径 0.53 mm, 長さ 30 m, 膜厚 1.0 μ m
温度：	温度 260 $^{\circ}$ C (25 分) 検出器 320 $^{\circ}$ C 注入口 280 $^{\circ}$ C
ガス流速：	キャリアガス He 12 mL/min. メイクアップガス N ₂ 60 mL/min.
試料注入量：	1 μ L
保持時間：	約 7.2 min.

5. 検量線の作成

ピリダリル標準品 20.0 mg (純度換算相当量) を精秤し、100mL 容メスフラスコに移した。アセトンを加えて溶解して 200 mg/L の標準原液を調製した。この原液をヘキサンで希釈して 0.0025, 0.005, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1 mg/L の標準溶液を調製した。この 1 μ L を前記条件のガスクロマトグラフに注入し、データ処理装置を用いてピリダリルのピーク高さを測定し、横軸に重量 (ng)、縦軸にピーク高さをとって検量線を作成した。

6. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料は重量を量り、つるを除去した。無処理区試料は各々を縦に 8 分割し、対角の 2 つを取り合わせ、4 組の試料を作成した。そのうちの 2 組を果肉分析試料とし、残りの 2 組を果実分析試料とした。2 組の果肉分析試料は果肉と果皮の境目に沿って包丁を入れ果肉と果皮にわけた後、各々の重量を測定した。その 1 組の果肉全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なイミベンコナゾール、アラニカルブ及びチオファネートメチル分析用試料とし、さらに 3 分割して試料を 3 組作製し、各々添加剤を加えてミキサーで均一化した。2 組の果実分析試料のうち、1 組の全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なイミベンコナゾール、アラニカルブ及びチオファネートメチ

ル分析用試料とし、さらに 3 分割して試料を 3 組作製し、各々添加剤を加えてミキサーで均一化した。

処理区試料は各々を縦に 8 分割し、対角の 2 つを取り合わせ、4 組の試料を作成した。そのうちの 2 組を果肉分析試料とし、残りの 2 組を果実分析試料とした。2 組の果肉分析試料は果肉と果皮の境目に沿って包丁を入れ果肉と果皮にわけた後、各々の重量を測定した。その 1 組の果肉全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なイミベンコナゾール分析用試料とし、添加剤を加えてミキサーで均一化した。2 組の果実分析試料のうち、1 組の全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なイミベンコナゾール分析用試料とし、添加剤を加えてミキサーで均一化した。

各々の試料は密封容器に入れて -20°C 以下で凍結保存した。また、量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比 (%) を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した試料 20 g を分液ロートにはかりとり、アセトン 100 mL を加えて 30 分間振とう抽出した。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣をアセトン 50 mL で 2 回洗浄し、同様にろ過した。ろ液を合わせ、 40°C 以下の水浴中で減圧濃縮し、アセトンを留去した。

6.1.3. 転溶

前項の濃縮液を少量の水を用いて分液ロートに移した後、10%塩化ナトリウム溶液 80mL 及びヘキサン 80 mL を加え 5 分間振とうした。静置分離後、ヘキサン層は無水硫酸ナトリウムをのせたるろ紙 (No.5A) を通過させ、脱水した。さらにヘキサン 80mL を加え、前記操作をくり返した後、ヘキサン層を合わせ 40°C 以下の水浴中で約 10 mL まで減圧濃縮後、ヘキサンを用いて 20 mL に定容した。

6.1.4. GC/ NH_2 /SI ミニカラムによる精製

GC/ NH_2 /SI ミニカラムにトルエン/アセトン (20:80, v/v) 混液 10mL を注入し流下して前処理した。前項の定容液 2mL (試料 2g 相当量) を GC/ NH_2 /SI ミニカラムに流下した後、トルエン/アセトン (20:80, v/v) 混液 30 mL を流下し、その全溶出液を取った。

6.1.5. 定量

前項の溶出液を 40°C 以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。残留物は直ちにヘキサンを用いて 4 mL に定容し、測定溶液とした。測定溶液は必要に応じてヘキサンで希釈した。

測定溶液の 1 μL を前記条件のガスクロマトグラフに注入し、ピーク高さを求め、検量線よりピリダリルの重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値 (LOQ) 及び検出限界値 (LOD)

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	定量限界 (ppm)
0.005	2	4	1	0.01

最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)
0.0025	2	4	1	0.005

果肉, 果実はいずれも同じ値

6.3. 回収率

分析法確認のため, 市販品の果肉及び果実を用いて, 0.01ppm (定量限界相当), 0.25ppm 及び 5ppm 添加濃度における回収試験を各 5 連分析で実施した。なお, 試料 (市販品) は 2 連分析し, 全て定量限界未満 (<0.01 ppm) であった。回収試験結果を表に示す。

6.3.1 果肉の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
<u>ピリダリル</u>								
市販品	5	88	83	83	82	80	83	3.6
市販品	0.25	83	79	78	78	76	79	3.3
市販品	0.01	87	85	85	83	82	84	2.3

6.3.2. 果実の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
<u>ピリダリル</u>								
市販品	5	90	84	83	82	82	84	4.0
市販品	0.25	82	81	79	77	76	79	3.2
市販品	0.01	108	91	88	86	83	91	10.8

7. 精度管理

「食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について」（平成 9 年 4 月 1 日付け衛食第 117 号厚生省生活衛生局食品保健課長通知）に基づき、内部精度管理を行った。

管理基準：20 検体を超えるごとに、各 1 検体の無処理試料及び 0.1ppm 添加試料（クォリティーコントロール試料）を分析した。

クォリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

また、2012 年 11 月実施の食品衛生精度管理比較調査（財団法人食品薬品安全センター）における Z スコアは全て Z<2 であった。

7.1. クォリティーコントロール試料分析結果

7.1.1. 果肉

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>ピリダリル</u>	2013/8/21	日植防茨城	82	<0.01
	2013/8/29	日植防茨城	90	<0.01
	2013/12/4	日植防高知	88	<0.01
	2013/12/11	日植防高知	82	<0.01
	2013/8/19	日植防宮崎	88	<0.01
	2013/8/26	日植防宮崎	90	<0.01

7.1.2. 果実

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>ピリダリル</u>	2013/8/21	日植防茨城	82	<0.01
	2013/8/29	日植防茨城	87	<0.01
	2013/12/4	日植防高知	84	<0.01
	2013/12/11	日植防高知	79	<0.01
	2013/8/19	日植防宮崎	86	<0.01
	2013/8/26	日植防宮崎	86	<0.01

8. マトリックス効果の確認

マトリックス標準溶液は、各圃場の無処理試料の最終液量 1mL をナス型フラスコに分取し、窒素気流下で溶媒を留去した後、0.05mg/L の検量線溶液 1mL に溶解して調製した。マトリック試料分析結果を表に示す。

8.1. 果肉

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>ピリダリル</u>	日植防茨城	96
	日植防高知	90
	日植防宮崎	96

8.2. 果実

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>ピリダリル</u>	日植防茨城	95
	日植防高知	91
	日植防宮崎	96

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料に化合物を添加し、 -20°C 以下で凍結保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を評価した。保存安定性試験の結果を表に示す。

9.1. 果肉の保存安定性試験結果

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	20 (13/8/9 - 13/8/29)	85	84
	日植防高知	28 (13/11/13 - 13/12/11)	86	83
	日植防宮崎	67 (13/6/20 - 13/8/26)	84	83

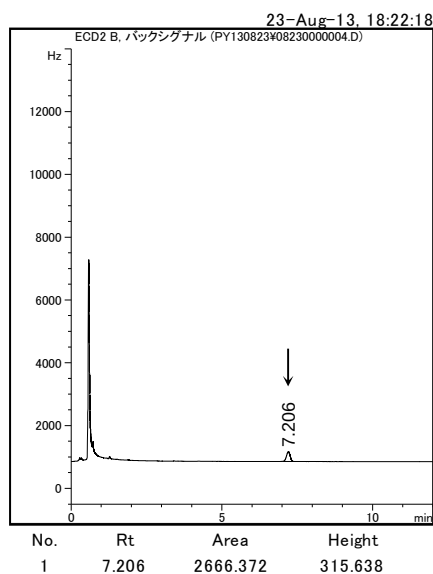
9.2. 果実の保存安定性試験結果

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	20 (13/8/9 - 13/8/29)	86	86
	日植防高知	28 (13/11/13 - 13/12/11)	85	83
	日植防宮崎	67 (13/6/20 - 13/8/26)	86	84

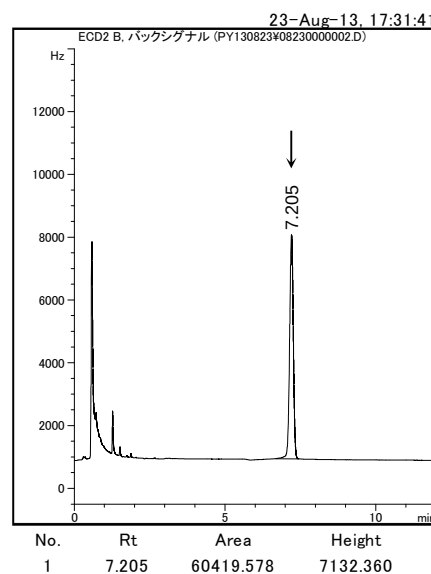
付図-1. 果肉のクロマトグラム (代表例)

付図-1-1. ピリダリルのクロマトグラム

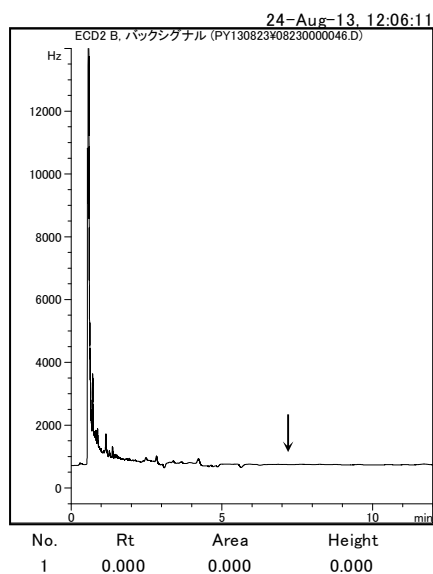
標準品 0.005ng



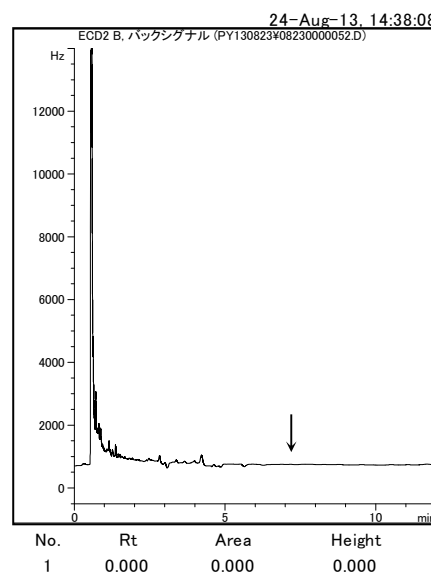
標準品 0.1ng



日植防茨城 無処理
4mL/1 μ L/2g

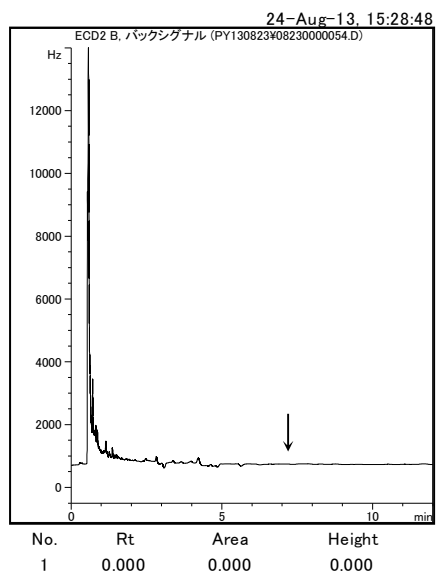


日植防茨城 2回処理 1日後
4mL/1 μ L/2g

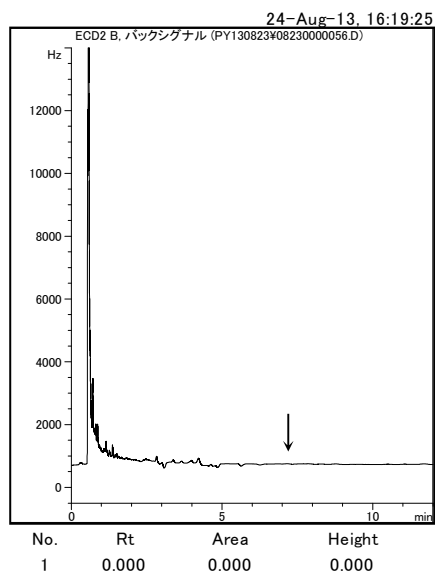


すいか 処理区 A (ピリダリル)

日植防茨城 2 回処理 3 日後
4mL/1 μ L/2g



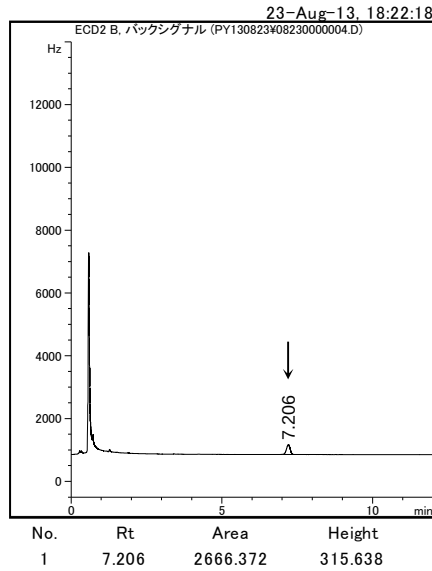
日植防茨城 2 回処理 7 日後
4mL/1 μ L/2g



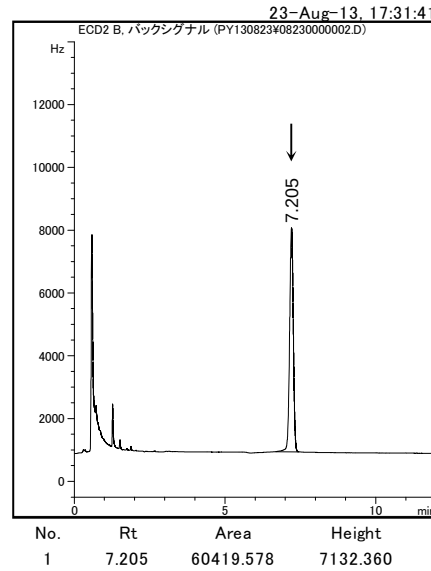
付図-2. 果実のクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. ピリダリルのクロマトグラム

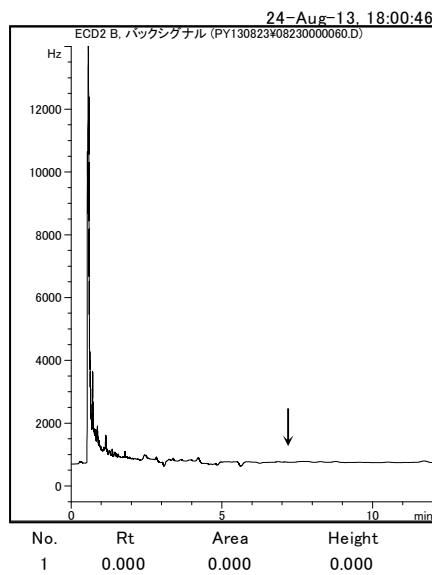
標準品 0.005ng



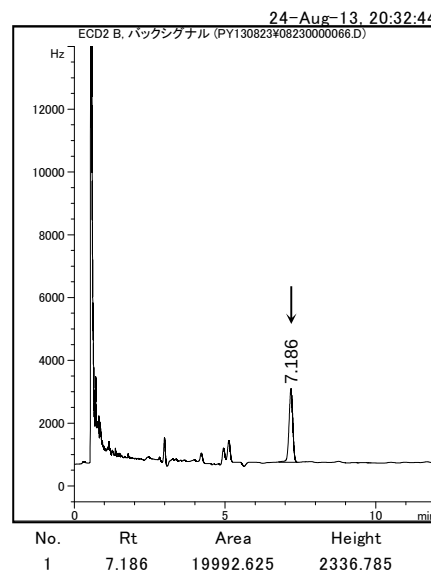
標準品 0.1ng



日植防茨城 無処理
4mL/1 μ L/2g

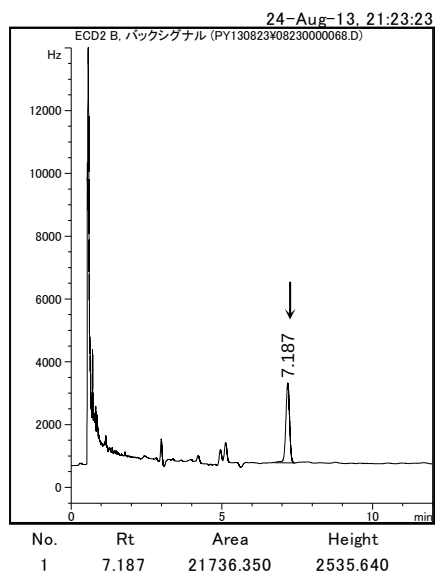


日植防茨城 2回処理 1日後
4mL/1 μ L/2g

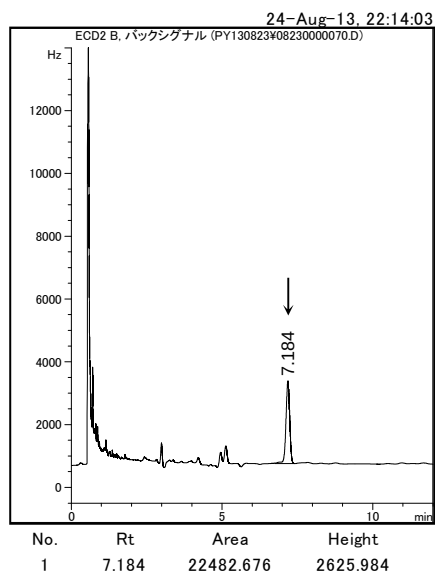


すいか 処理区 A (ピリダリル)

日植防茨城 2 回処理 3 日後
4mL/1 μ L/2g



日植防茨城 2 回処理 7 日後
4mL/1 μ L/2g



農薬登録における作物のグループ化・残留分析詳細③
テブフェンピラド

1. 分析対象物質

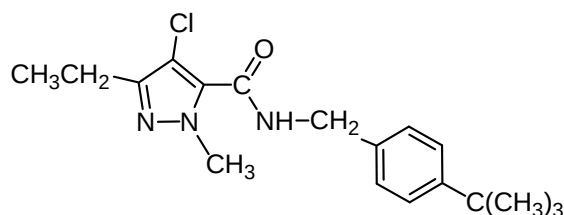
テブフェンピラド

化学名： *N*-(4-*tert*-butylbenzyl)-4-chloro-3-ethyl-1-methylpyrazole-5-carboxamide

分子量： 333.9

分子式： $C_{18}H_{24}ClN_3O$

構造式：



性 状： 無色結晶

融 点： 64-66°C

蒸気圧： $< 1 \times 10^{-2}$ mPa (25°C)

分配係数： $\log P_{ow} = 4.93$ (25°C)

溶解性： 水 2.61 mg/L (25°C)

ヘキサン 255, トルエン 772, ジクロロメタン 1044, アセトン 819
メタノール 818, アセトニトリル 785 (以上 g/L, 25°C)

安定性： 加水分解に対する安定性 (pH4,7 および 9)

水中光分解半減期 187 日 (pH7, 25°C)

出 典： The Pesticide Manual (16th Edition)

2. 標準品及び試薬

テブフェンピラド標準品 : 純度 98.1% (林純薬工業製)

アセトン : 試薬特級及び残留農薬試験用 (和光純薬工業製)

ヘキサン : 試薬特級 (和光純薬工業製)

塩化ナトリウム : 試薬特級 (和光純薬工業製)

無水硫酸ナトリウム : 試薬特級 (和光純薬工業製)

GC/NH₂/SI ミニカラム : InertSep GC/NH₂/SI (500mg/400mg/600mg)
(ジーエルサイエンス製)

3. 装置及び機器

化学天秤：	島津製作所製 AUW220
上皿天秤：	メトラー・トレド製 PB8001-S/FACT
上皿天秤：	エー・アンド・ディ製 EK 1200i
ミキサー：	ワーリング製 CB-15T
ガスクロマトグラフ：	アジレント・テクノロジー製 7890A
データ処理装置：	アジレント・テクノロジー製 Open LAB

4. ガスクロマトグラフの操作条件

検出器：	NPD
カラム：	Rtx-200 (Restek 製), 内径 0.53 mm, 長さ 15 m, 膜厚 1.5 μ m
温度：	温度 230 $^{\circ}$ C (16 分) 検出器 300 $^{\circ}$ C 注入口 280 $^{\circ}$ C
ガス流速：	水素 3 mL/min., 空気 60 mL/min. キャリアガス He 7.0 mL/min.
試料注入量：	2 μ L
保持時間：	約 2.5~2.6 min.

5. 検量線の作成

テブフェンピラド標準品 20.0 mg (純度換算相当量) を精秤し, 100mL 容メスフラスコに移した。アセトンを加えて溶解して 200 mg/L の標準原液を調製した。この原液をアセトンで希釈して 0.0125, 0.025, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/L の標準溶液を調製した。この 2 μ L を前記条件のガスクロマトグラフに注入し, データ処理装置を用いてテブフェンピラドのピーク高さを測定し, 横軸に重量 (ng), 縦軸にピーク高さをとって検量線を作成した。

6. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料は重量を量り, つるを除去した。無処理区試料は各々を縦に 8 分割し, 対角の 2 つを取り合わせ, 4 組の試料を作成した。そのうちの 2 組を果肉分析試料とし, 残りの 2 組を果実分析試料とした。2 組の果肉分析試料は果肉と果皮の境目に沿って包丁を入れ果肉と果皮にわけた後, 各々の重量を測定した。その 1 組の果肉全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なイミベンコナゾール, アラニカルブ及びチオファネートメチル分析用試料とし, さらに 3 分割して試料を 3 組作製し, 各々添加剤を加えてミキサーで均一化した。2 組の果実分析試料のうち, 1 組の全量をミキサーで均一化した。

残りの 1 組は添加剤が必要なイミベンコナゾール、アラニカルブ及びチオフアネートメチル分析用試料とし、さらに 3 分割して試料を 3 組作製し、各々添加剤を加えてミキサーで均一化した。

処理区試料は各々を縦に 8 分割し、対角の 2 つを取り合わせ、4 組の試料を作成した。そのうちの 2 組を果肉分析試料とし、残りの 2 組を果実分析試料とした。2 組の果肉分析試料は果肉と果皮の境目に沿って包丁を入れ果肉と果皮にわけた後、各々の重量を測定した。その 1 組の果肉全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なイミベンコナゾール分析用試料とし、添加剤を加えてミキサーで均一化した。2 組の果実分析試料のうち、1 組の全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なイミベンコナゾール分析用試料とし、添加剤を加えてミキサーで均一化した。

各々の試料は密封容器に入れて -20°C 以下で凍結保存した。また、量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比 (%) を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した試料 20 g を分液ロートにはかりとり、アセトン 100 mL を加えて 30 分間振とう抽出した。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣をアセトン 50 mL で 2 回洗浄し、同様にろ過した。ろ液を合わせ、 40°C 以下の水浴中で減圧濃縮し、アセトンを留去した。

6.1.3. 転溶

前項の濃縮液を少量の水を用いて、分液ロートに移した後、10%塩化ナトリウム溶液 80mL 及びヘキサン 80 mL を加え 5 分間振とうした。静置分離後、ヘキサン層は無水硫酸ナトリウムをのせたろ紙 (No.5A) を通過させ、脱水した。さらにヘキサン 80mL を加え、前記操作をくり返した後、ヘキサン層を合わせ 40°C 以下の水浴中で約 10 mL まで減圧濃縮後、ヘキサンを用いて 20 mL に定容した。

6.1.4. GC/ NH_2 /SI ミニカラムによる精製

GC/ NH_2 /SI ミニカラムにヘキサン 10mL を注入し流下して前処理した。前項の定容液 10mL (試料 10g 相当量) を GC/ NH_2 /SI ミニカラムに流下した後、ヘキサン 10 mL を流下し、これらの流出液をすてた。アセトン/ヘキサン (20:80, v/v) 混液 10 mL を流下し、その全溶出液を取った。

6.1.5. 定量

前項の溶出液を 40°C 以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。残留物は直ちにアセトンを用いて 4 mL に定容し、測定溶液とした。測定溶液は必要に応じてアセトンで希釈した。

測定溶液の 2 μL を前記条件のガスクロマトグラフに注入し、ピーク高さを求め、検量線よりテブフェンピラドの重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値 (LOQ) 及び検出限界値 (LOD)

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	定量限界 (ppm)
0.05	10	4	2	0.01

最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)
0.025	10	4	2	0.005

果肉, 果実はいずれも同じ値

6.3. 回収率

分析法確認のため, 市販品の果肉及び果実を用いて, 0.01ppm (定量限界相当), 0.25ppm 及び 5ppm 添加濃度における回収試験を各 5 連分析で実施した。なお, 試料 (市販品) は 2 連分析し, 全て定量限界未満 (<0.01 ppm) であった。回収試験結果を表に示す。

6.3.1 果肉の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
<u>テブフェンピラド</u>								
市販品	5	94	94	93	93	92	93	0.9
市販品	0.25	96	96	93	93	91	94	2.3
市販品	0.01	102	96	92	92	91	95	4.8

6.3.2. 果実の回収率

試料	添加濃度 (ppm)		回収率 (%)			平均回収率 (%)		RSDr
<u>テブフェンピラド</u>								
市販品	5	96	92	91	91	85	91	4.3
市販品	0.25	97	94	93	92	90	93	2.8
市販品	0.01	100	100	99	95	92	97	3.7

7. 精度管理

「食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について」（平成 9 年 4 月 1 日付け衛食第 117 号厚生省生活衛生局食品保健課長通知）に基づき、内部精度管理を行った。

管理基準：20 検体を超えるごとに、各 1 検体の無処理試料及び 0.1ppm 添加試料（クォリティーコントロール試料）を分析した。

クォリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

また、2012 年 11 月実施の食品衛生精度管理比較調査（財団法人食品薬品安全センター）における Z スコアは全て Z<2 であった。

7.1. クォリティーコントロール試料分析結果

7.1.1. 果肉

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>テブフェンピラド</u>	2013/8/21	日植防茨城	89	<0.01
	2013/8/29	日植防茨城	101	<0.01
	2013/12/4	日植防高知	94	<0.01
	2013/12/11	日植防高知	94	<0.01
	2013/8/19	日植防宮崎	91	<0.01
	2013/8/26	日植防宮崎	104	<0.01

7.1.2. 果実

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>テブフェンピラド</u>	2013/8/21	日植防茨城	89	<0.01
	2013/8/29	日植防茨城	104	<0.01
	2013/12/4	日植防高知	82	<0.01
	2013/12/11	日植防高知	92	<0.01
	2013/8/19	日植防宮崎	80	<0.01
	2013/8/26	日植防宮崎	104	<0.01

8. マトリックス効果の確認

マトリックス標準溶液は、各圃場の無処理試料の最終液量 1mL をナス型フラスコに分取し、窒素気流下で溶媒を留去した後、0.3mg/L の検量線溶液 1mL に溶解して調製した。マトリックス試料分析結果を表に示す。

8.1. 果肉

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>テブフェンピラド</u>	日植防茨城	108
	日植防高知	103
	日植防宮崎	107

8.2. 果実

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>テブフェンピラド</u>	日植防茨城	108
	日植防高知	104
	日植防宮崎	107

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料に化合物を添加し、 -20°C 以下で凍結保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を評価した。保存安定性試験の結果を表に示す。

9.1. 果肉の保存安定性試験結果

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	20 (13/8/9 - 13/8/29)	94	93
	日植防高知	28 (13/11/13 - 13/12/11)	99	97
	日植防宮崎	67 (13/6/20 - 13/8/26)	98	98

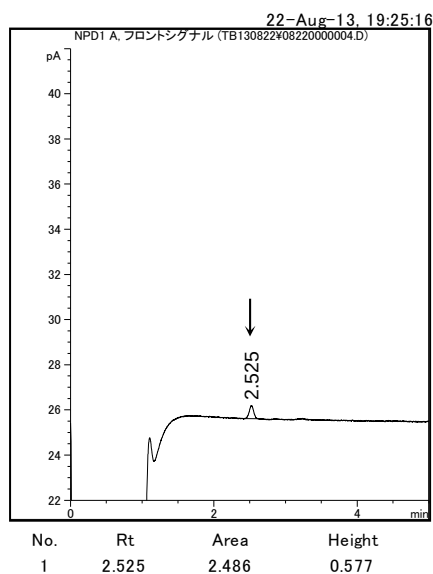
9.2. 果実の保存安定性試験結果

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	20 (13/8/9 - 13/8/29)	98	93
	日植防高知	28 (13/11/13 - 13/12/11)	96	94
	日植防宮崎	67 (13/6/20 - 13/8/26)	95	95

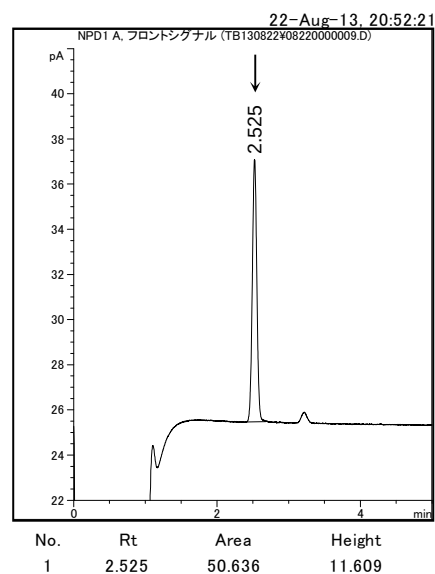
付図-1. 果肉のクロマトグラム (代表例)

付図-1-1. テブフェンピラドのクロマトグラム

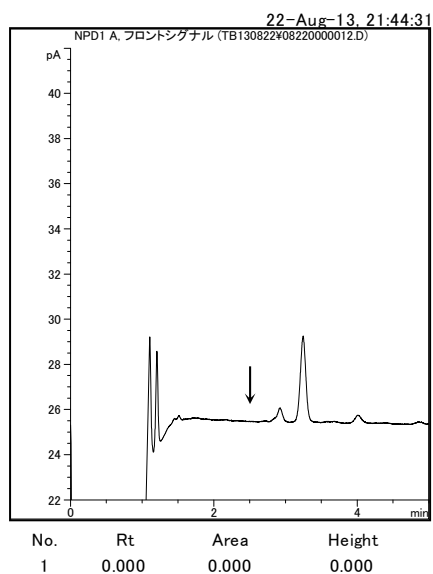
標準品 0.05ng



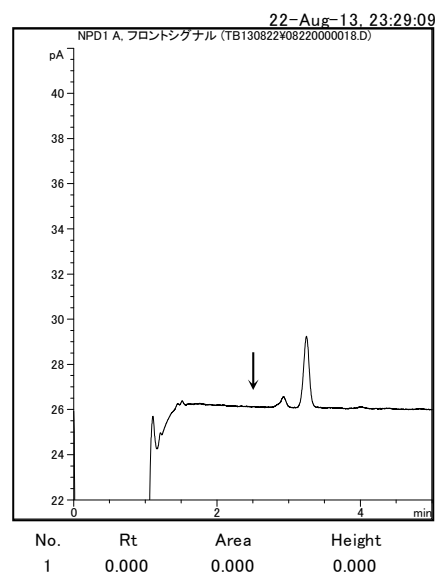
標準品 1ng



日植防茨城 無処理
4mL/2μL/10g

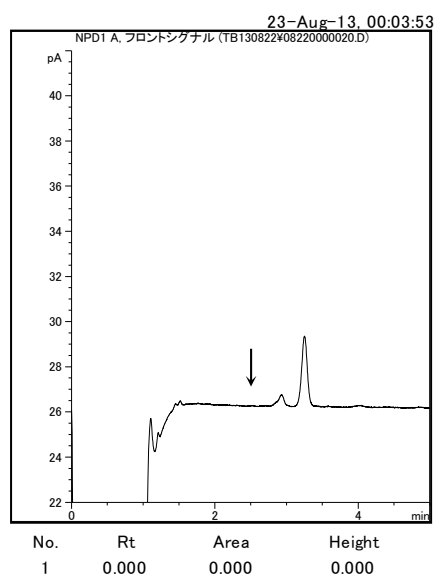


日植防茨城 1回処理 1日後
4mL/2μL/10g

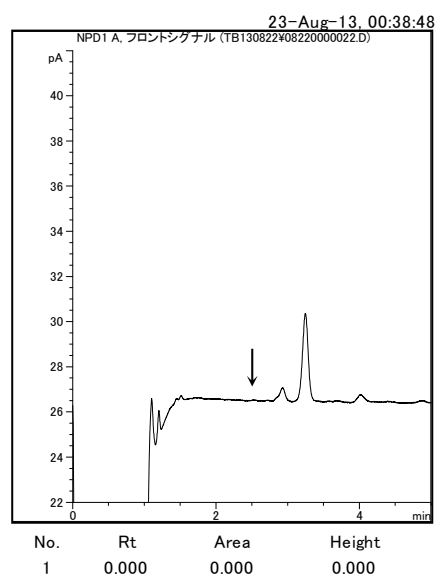


すいか 処理区 A (テブフェンピラド)

日植防茨城 1 回処理 3 日後
4mL/2 μ L/10g



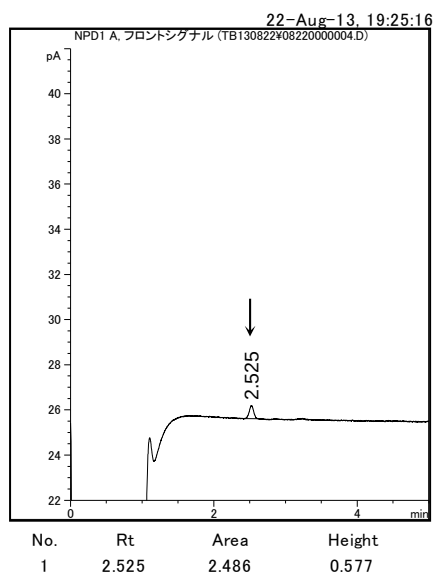
日植防茨城 1 回処理 7 日後
4mL/2 μ L/10g



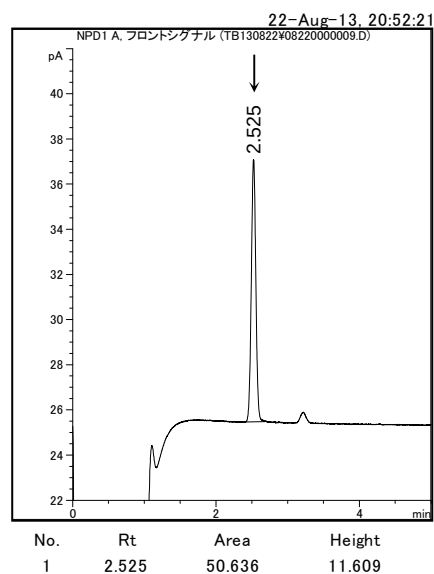
付図-2. 果実のクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. テブフェンピラドのクロマトグラム

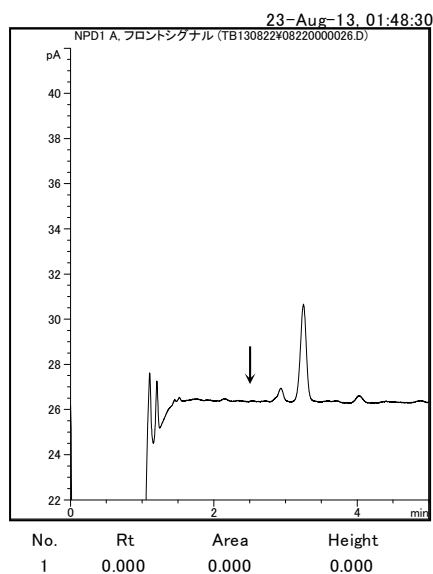
標準品 0.05ng



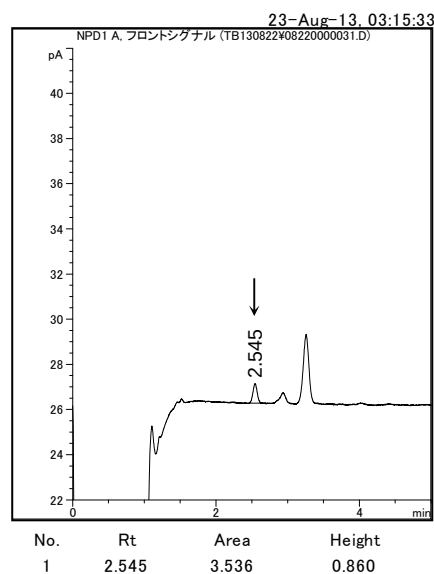
標準品 1ng



日植防茨城 無処理
4mL/2μL/10g

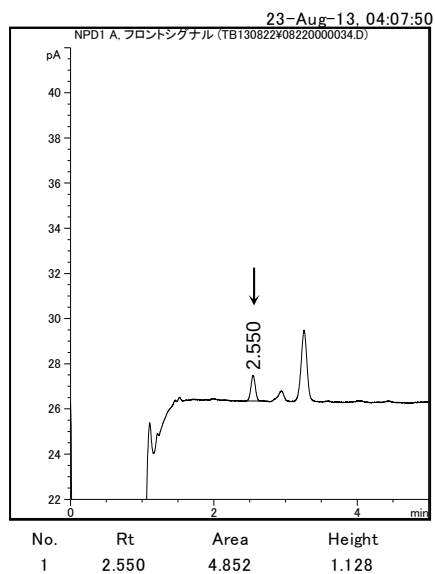


日植防茨城 1回処理 1日後
4mL/2μL/10g

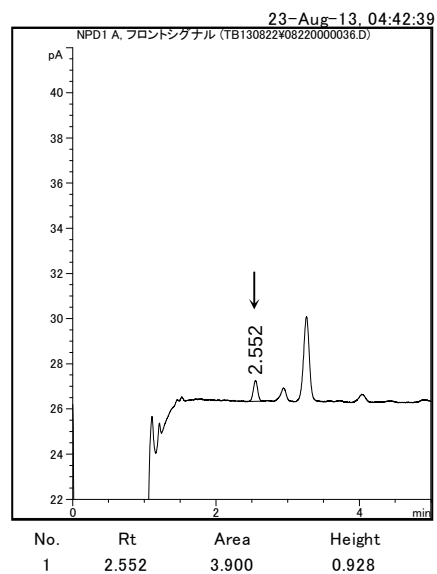


すいか 処理区 A (テブフェンピラド)

日植防茨城 1 回処理 3 日後
4mL/2 μ L/10g



日植防茨城 1 回処理 7 日後
4mL/2 μ L/10g



農薬登録における作物のグループ化・残留分析詳細④
イミベンコナゾール

1. 分析対象物質

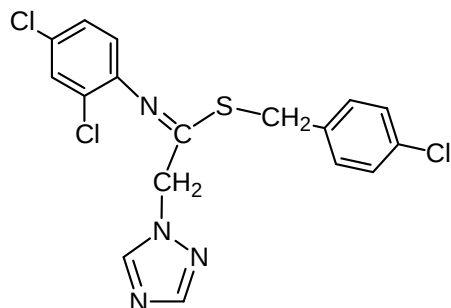
イミベンコナゾール

化学名 : *S*-(4-chlorobenzyl)*N*-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)acetimidothioate

分子量 : 411.7

分子式 : $C_{17}H_{13}Cl_3N_4S$

構造式 :



性 状 : 淡黄色性結晶

融 点 : 89.5-90°C

蒸気圧 : 8.5×10^{-5} mPa (25°C)

分配係数 : log Pow = 4.94

溶解性 : 水 1.7 mg/L (20°C)

アセトン 1063, ベンゼン 580, キシレン 250, メタノール 120
(以上 g/L, 25°C)

安定性 : 弱アルカリ性で安定, 酸性及び強アルカリ性で不安定

半減期 <1 日 (pH1), 14.5 日 (pH5), 186 日 (pH7), 62.1 日 (pH9),
<1 日 (pH13) (25°C)

出 典 : The Pesticide Manual (16th Edition)

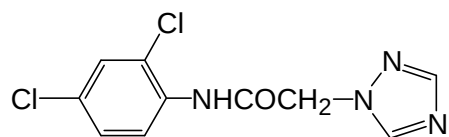
イミベンコナゾール脱ベンジル体

化学名 : 2',4'-Dichloro-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)-acetanilide

分子量 : 271.1

分子式 : $C_{10}H_8Cl_2N_4O$

構造式 :



出 典 : 和光純薬工業株式会社

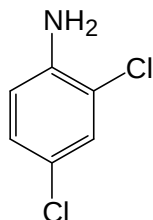
2,4-ジクロロアニリン

化学名 : 2',4'-Dichloroaniline

分子量 : 162.02

分子式 : $C_6H_5Cl_2N$

構造式 :



出 典 : 和光純薬工業株式会社

2. 標準品及び試薬

イミベンコナゾール標準品 : 純度 99.7 % (和光純薬工業製)

イミベンコナゾール脱ベンジル体標準品

: 純度 99.9 % (和光純薬工業製)

2,4-ジクロロアニリン標準品

: 純度 99.9 % (和光純薬工業製)

アセトニトリル : HPLC 用 (関東化学製)

アセトン : 残留農薬試験用 (和光純薬工業製)

ヘキサン : 残留農薬試験用 (和光純薬工業製)

酢酸エチル : 残留農薬試験用 (和光純薬工業製)

トルエン : 残留農薬試験用 (和光純薬工業製)

塩化ナトリウム : 試薬特級 (和光純薬工業製)

無水硫酸ナトリウム : 試薬特級 (和光純薬工業製)

炭酸水素ナトリウム : 試薬特級 (和光純薬工業製)

塩酸 : 試薬特級 (和光純薬工業製)

水酸化ナトリウム : 試薬特級 (和光純薬工業製)

ジエチレングリコール : 試薬特級 (和光純薬工業製)

合成ケイ酸マグネシウムミニカラム

: Sep Pak Plus Florisil Cartridges (Waters 製)

GC/NH₂/SI ミニカラム : InertSep GC/NH₂/SI (500mg/400mg/600mg)

(ジーエルサイエンス製)

GC/SAX/PSA ミニカラム : InertSep GC/SAX/PSA (500mg/500mg/500mg)

(ジーエルサイエンス製)

3. 装置及び機器

化学天秤：	島津製作所製 AUW220
上皿天秤：	メトラー・トレド製 PB8001-S/FACT
上皿天秤：	エー・アンド・ディ製 EK 1200i
ミキサー：	ワーリング製 CB-15T
液体クロマトグラフ・質量分析計システム (LC-MS/MS)：	島津製作所製 LC-20AD
	アプライドバイオシステムズジャパン製 API13200 Q TRAP
データ処理装置：	アプライドバイオシステムズジャパン製 Analyst

4. 液体クロマトグラフ・質量分析計の操作条件

4.1. 液体クロマトグラフ・質量分析計 (イミベンナゾール)

4.1.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム：	Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス製), 内径 3.0 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3 μ m
溶離液：	アセトニトリル/0.1%ギ酸溶液 (v/v) 80:20 (7 min.) – 95:5 (5 min.) – 80:20 (8 min.)
流速：	0.2 mL/min.
カラム温度：	40 °C
試料注入量：	2 μ L
保持時間：	約 9.6 min.

4.1.2. 質量分析計

イオン化法：	エレクトロスプレー(ESI), 正イオンモード
Ion Source Gas 1：	50 psi
Ion Source Gas 2：	50 psi (600°C)
IonSpray voltage：	–4500 V
Declustering Potential：	–56 V
Collision Energy：	–37 V
採取イオン：	Q1Mass m/z 413.0, Q3Mass m/z 125.1

4.2. 液体クロマトグラフ・質量分析計 (イミベンナゾール脱ベンジル体)

4.2.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム：	Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス製), 内径 3.0 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3 μ m
溶離液：	アセトニトリル/0.1%ギ酸溶液 (v/v) 80:20 (7 min.) – 95:5 (5 min.) – 80:20 (8 min.)
流速：	0.2 mL/min.
カラム温度：	40 °C
試料注入量：	2 μ L
保持時間：	約 4.3 min.

4.2.2. 質量分析計

イオン化法 : エレクトロスプレー(ESI), 正イオンモード
Ion Source Gas 1 : 50 psi
Ion Source Gas 2 : 50 psi (600°C)
IonSpray voltage : -4500 V
Declustering Potential : -56 V
Collision Energy : -37 V
採取イオン : Q1Mass m/z 271.1 , Q3Mass m/z 174.1

4.3. 液体クロマトグラフ・質量分析計 (2,4-ジクロロアニリン)

4.3.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム : Inertsil ODS-3 (ジールサイエンス製),
内径 3.0 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3µm
溶離液 : アセトニトリル/0.1%ギ酸溶液 (v/v)
80:20 (7 min.) – 95:5 (5 min.) – 80:20 (8 min.)
流速 : 0.2 mL/min.
カラム温度 : 40 °C
試料注入量 : 10 µL
保持時間 : 約 6.2 min.

4.3.2. 質量分析計

イオン化法 : エレクトロスプレー(ESI), 正イオンモード
Ion Source Gas 1 : 50 psi
Ion Source Gas 2 : 50 psi (600°C)
IonSpray voltage : -4500 V
Declustering Potential : -46 V
Collision Energy : -25 V
採取イオン : Q1Mass m/z 162.1 , Q3Mass m/z 126.1

5. 検量線の作成

5.1. イミベンコナゾール及びイミベンコナゾール脱ベンジル体

イミベンコナゾール及びイミベンコナゾール脱ベンジル体各標準品 20.0 mg (純度換算相当量) を精秤し, 100mL 容メスフラスコに移した。アセトンを加えて溶解して 200 mg/L の標準原液を調製した。各原液を等量ずつ混合し, アセトニトリル/水 (50:50, v/v) 混液で希釈して 0.0005, 0.001, 0.005, 0.01, 0.015, 0.02 mg/L の混合標準溶液を調製した。この 2 µL をイミベンコナゾールは 4-1 項, イミベンコナゾール脱ベンジル体は 4-2 項の条件の液体クロマトグラフ・質量分析計にそれぞれ注入し, データ処理装置を用いてイミベンコナゾール及びイミベンコナゾール脱ベンジル体のピーク高さを測定し, 横軸に重量 (ng), 縦軸にピーク高さをとって各検量線を作成した。

5.2. 2,4-ジクロロアニリン

2,4-ジクロロアニリン標準品 20.0 mg (純度換算相当量) を精秤し, 100mL 容メスフラスコに移した。アセトンを加えて溶解して 200 mg/L の標準原液を調製した。この原液をアセトニトリル/水 (50:50, v/v) 混液で希釈して 0.002, 0.004, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 mg/L の標準溶液を調製した。この 10 μ L を 4-3 項の条件の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入し, データ処理装置を用いて 2,4-ジクロロアニリンのピーク高さを測定し, 横軸に重量 (ng), 縦軸にピーク高さをとって検量線を作成した。

6. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料は重量を量り, つるを除去した。無処理区試料は各々を縦に 8 分割し, 対角の 2 つを取り合わせ, 4 組の試料を作成した。そのうちの 2 組を果肉分析試料とし, 残りの 2 組を果実分析試料とした。2 組の果肉分析試料は果肉と果皮の境目に沿って包丁を入れ果肉と果皮にわけた後, 各々の重量を測定した。その 1 組の果肉全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なイミベンコナゾール, アラニカルブ及びチオファネートメチル分析用試料とし, さらに 3 分割して試料を 3 組作製し, 各々添加剤を加えてミキサーで均一化した。2 組の果実分析試料のうち, 1 組の全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なイミベンコナゾール, アラニカルブ及びチオファネートメチル分析用試料とし, さらに 3 分割して試料を 3 組作製し, 各々添加剤を加えてミキサーで均一化した。

処理区試料は各々を縦に 8 分割し, 対角の 2 つを取り合わせ, 4 組の試料を作成した。そのうちの 2 組を果肉分析試料とし, 残りの 2 組を果実分析試料とした。2 組の果肉分析試料は果肉と果皮の境目に沿って包丁を入れ果肉と果皮にわけた後, 各々の重量を測定した。その 1 組の果肉全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なイミベンコナゾール分析用試料とし, 添加剤を加えてミキサーで均一化した。2 組の果実分析試料のうち, 1 組の全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なイミベンコナゾール分析用試料とし, 添加剤を加えてミキサーで均一化した。

各々の試料は密封容器に入れて -20°C 以下で凍結保存した。また, 量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比 (%) を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した試料* 28 g (試料 20 g 相当量) を分液ロートにはかりとり, アセトン 100 mL を加えて 30 分間振とう抽出した。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し, 残渣をアセトン 30 mL で 2 回洗浄し, 同様にろ過した。ろ液を合わせ, アセトンで 200 mL に定容した。

* 試料の前処理時, 試料 500g に対して 5%炭酸水素ナトリウム溶液を 200g 加えて, ミキサーで均一化したもの。

6.1.3. 転溶

前項の定容液から 40mL (試料 4g 相当量) を分液ロートに分取し、塩化ナトリウム 10g, 水 100 mL 及び酢酸エチル 100 mL を加え 5 分間振とうした。静置分離後、酢酸エチル層は無水硫酸ナトリウムをのせたろ紙 (No.5A) を通過させ脱水した。さらに酢酸エチル 50 mL を加え、前記操作をくり返した。次に水層に 6 mol/L 塩酸溶液 1mL を加えて 1 時間室温で放置した後、0.1 mol/L 及び 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いて水層を pH7~8 に調整し、酢酸エチル 50 mL を加え 5 分間振とうした。静置分離後、酢酸エチル層は無水硫酸ナトリウムをのせたろ紙 (No.5A) を通過させ脱水した。さらに酢酸エチル 30mL を加え、前記操作をくり返した後、全ての酢酸エチル層を合わせ、2%ジエチレングリコール含有アセトン溶液 1mL を加えて 40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮し、窒素気流下で溶媒を留去した後、残留物をアセトン/ヘキサン (10:90, v/v) 混液 5mL に溶解した。

6.1.4. 合成ケイ酸マグネシウムミニカラムによる精製

合成ケイ酸マグネシウムミニカラムにアセトン/ヘキサン (10:90, v/v) 混液 5 mL を注入し流下して前処理した。前項の溶解液を合成ケイ酸マグネシウムミニカラムに流下した後、アセトン/ヘキサン (10:90, v/v) 混液 10 mL を流下し、溶出液を全て取った。(2,4-ジクロロアニリン分析用)

次にアセトン/ヘキサン (40:60, v/v) 混液 20 mL を流下し、溶出液を全て取った。(イミベンコナゾール及びイミベンコナゾール脱ベンジル体分析用)

6.1.5. GC/NH₂/SI ミニカラムによる精製

(イミベンコナゾール及びイミベンコナゾール脱ベンジル体)

GC/NH₂/SI ミニカラムにトルエン/アセトニトリル (25:75, v/v) 混液 10 mL を注入し流下して前処理をした。前項のイミベンコナゾール及びイミベンコナゾール脱ベンジル体分析用溶出液を 40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮し、通風で乾固した。残留物をトルエン/アセトニトリル (25:75, v/v) 混液 5mL に溶解し GC/NH₂/SI ミニカラムに流下した。次にトルエン/アセトニトリル (25:75, v/v) 混液 20 mL を流下し、溶出液を全て取った。

6.1.6. GC/SAX/PSA ミニカラムによる精製 (2,4-ジクロロアニリン)

GC/SAX/PSA ミニカラムに酢酸エチル 10 mL を注入し流下して前処理をした。6.1.4 項の 2,4-ジクロロアニリン分析用溶出液に 2%ジエチレングリコール含有アセトン溶液 1mL を加えて 40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮し、窒素気流下で溶媒を留去した。残留物を酢酸エチル 5mL に溶解し GC/SAX/PSA ミニカラムに流下した。次に酢酸エチル 20 mL を流下し、溶出液を全て取った。

6.1.7. 定量

6.1.7.1. イミベンコナゾール及びイミベンコナゾール脱ベンジル体

6.1.5.項の溶出液を 40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮し、通風で乾固した。残留物は直ちにアセトニトリル/水 (50:50, v/v) 混液を用いて 4 mL に定容し、測定溶液とした。測定溶液は必要に応じてアセトニトリル/水 (50:50, v/v) 混液で希釈した。

測定溶液の 2 μL を 4.1.及び 4.2.項の高速液体クロマトグラフに注入し、ピーク高さを求め、検量線よりイミベンコナゾール及びイミベンコナゾール脱ベンジル体の重量を求め、試料中の各残留濃度を算出した。

6.1.7.2. 2,4-ジクロロアニリン

6.1.6.項の溶出液に 2%ジェチレングリコール含有アセトン溶液 1mL を加えて 40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮し、窒素気流下で溶媒を留去した。残留物は直ちにアセトニトリル/水 (50:50, v/v) 混液を用いて 2 mL に定容し、測定溶液とした。測定溶液は必要に応じてアセトニトリル/水 (50:50, v/v) 混液で希釈した。

測定溶液の 10 μL を 4.3.項の高速液体クロマトグラフに注入し、ピーク高さを求め、検量線より 2,4-ジクロロアニリンの重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値 (LOQ) 及び検出限界値 (LOD)

6.2.1. イミベンコナゾール・イミベンコナゾール脱ベンジル体

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	定量限界 (ppm)
0.002	4	4	2	0.001
最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)
0.001	4	4	2	0.0005

果肉、果実はいずれも同じ値

6.2.2. 2,4-ジクロロアニリン

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	定量限界 (ppm)
0.04	4	2	10	0.002
最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)
0.02	4	2	10	0.001

果肉、果実はいずれも同じ値

6.3. 回収率

分析法確認のため、市販品の果肉及び果実を用いて、イミベンコナゾール及びイミベンコナゾール脱ベンジル体 0.001 ppm (定量限界相当), 2,4-ジクロロアニリン 0.002 ppm (定量限界相当), 0.25ppm 及び 5ppm 添加濃度における回収試験を各 5 連分析で実施した。なお、試料 (市販品) は 2 連分析し、全て定量限界未満 (<0.001 ppm 又は<0.002 ppm) であった。回収試験結果を表に示す。

6.3.1. 果肉の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
<u>イミベンコナゾール</u>								
市販品	5	93	91	89	88	85	89	3.4
市販品	0.25	87	86	85	84	74	83	6.3
市販品	0.001	84	83	81	76	75	80	5.1
<u>イミベンコナゾール脱ベンジル体</u>								
市販品	5	96	96	96	94	92	95	1.9
市販品	0.25	90	86	86	84	83	86	3.1
市販品	0.001	98	94	93	86	79	90	8.4
<u>2,4-ジクロロアニリン</u>								
市販品	5	87	84	82	78	76	81	5.5
市販品	0.25	76	76	75	75	73	75	1.6
市販品	0.002	106	103	95	95	83	96	9.3

6.3.2. 果実の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
<u>イミベンコナゾール</u>								
市販品	5	95	92	90	89	87	91	3.4
市販品	0.25	91	90	90	88	86	89	2.2
市販品	0.001	96	94	93	92	90	93	2.4
<u>イミベンコナゾール脱ベンジル体</u>								
市販品	5	95	94	94	93	88	93	3.0
市販品	0.25	90	89	88	87	85	88	2.2
市販品	0.001	86	86	83	80	76	82	5.2
<u>2,4-ジクロロアニリン</u>								
市販品	5	78	76	75	75	72	75	2.9
市販品	0.25	78	77	74	73	73	75	3.1
市販品	0.002	96	85	82	80	80	85	7.9

7. 精度管理

「食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について」（平成 9 年 4 月 1 日付け衛食第 117 号厚生省生活衛生局食品保健課長通知）に基づき、内部精度管理を行った。

管理基準：20 検体を超えるごとに、各 1 検体の無処理試料及びイミベンコナゾール及びイミベンコナゾール脱ベンジル体 0.01 ppm 添加試料、2,4-ジクロロアニリン 0.02 ppm 添加試料（クオリティーコントロール試料）を分析した。

クオリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

また、2012 年 11 月実施の食品衛生精度管理比較調査（財団法人食品薬品安全センター）における Z スコアは全て Z<2 であった。

7.1. クオリティーコントロール試料分析結果

7.1.1. 果肉

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>イミベンコナゾール</u>	2013/10/16	日植防茨城	88	<0.001
	2013/11/5	日植防茨城	97	<0.001
	2013/12/2	日植防高知	90	<0.001
	2013/12/9	日植防高知	96	<0.001
	2013/10/9	日植防宮崎	98	<0.001
	2013/10/28	日植防宮崎	94	<0.001
<u>イミベンコナゾール 脱ベンジル体</u>	2013/10/16	日植防茨城	84	<0.001
	2013/11/5	日植防茨城	85	<0.001
	2013/12/2	日植防高知	84	<0.001
	2013/12/9	日植防高知	92	<0.001
	2013/10/9	日植防宮崎	88	<0.001
	2013/10/28	日植防宮崎	90	<0.001
<u>2,4-ジクロロアニ リン</u>	2013/10/16	日植防茨城	80	<0.002
	2013/11/5	日植防茨城	74	<0.002
	2013/12/2	日植防高知	72	<0.002
	2013/12/9	日植防高知	84	<0.002
	2013/10/9	日植防宮崎	77	<0.002
	2013/10/28	日植防宮崎	77	<0.002

7.1.2. 果実

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>イミベンコナゾール</u>	2013/10/16	日植防茨城	89	<0.001
	2013/11/5	日植防茨城	76	<0.001
	2013/12/2	日植防高知	87	<0.001
	2013/12/9	日植防高知	94	<0.001
	2013/10/9	日植防宮崎	95	<0.001
	2013/10/28	日植防宮崎	92	<0.001
<u>イミベンコナゾール</u> <u>脱ベンジル体</u>	2013/10/16	日植防茨城	86	<0.001
	2013/11/5	日植防茨城	90	<0.001
	2013/12/2	日植防高知	86	<0.001
	2013/12/9	日植防高知	86	<0.001
	2013/10/9	日植防宮崎	92	<0.001
	2013/10/28	日植防宮崎	90	<0.001
<u>2,4-ジクロロアニリ ン</u>	2013/10/16	日植防茨城	73	<0.002
	2013/11/5	日植防茨城	76	<0.002
	2013/12/2	日植防高知	74	<0.002
	2013/12/9	日植防高知	80	<0.002
	2013/10/9	日植防宮崎	78	<0.002
	2013/10/28	日植防宮崎	84	<0.002

8. マトリックス効果の確認

マトリックス標準溶液は、各圃場の無処理試料の最終液量 1mL をナス型フラスコに分取し、窒素気流下で溶媒を留去した後、イミベンコナゾール及びイミベンコナゾール脱ベンジル体は 0.01mg/L の検量線溶液 1mL に、2,4-ジクロロアニリンは 0.04 mg/L の検量線溶液 1mL に各々溶解して調製した。マトリック試料分析結果を表に示す。

8.1. 果肉

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>イミベンコナゾール</u>	日植防茨城	105
	日植防高知	102
	日植防宮崎	105
<u>イミベンコナゾール脱ベンジル体</u>	日植防茨城	93
	日植防高知	94
	日植防宮崎	103
<u>2,4-ジクロロアニリン</u>	日植防茨城	90
	日植防高知	104
	日植防宮崎	96

8.2. 果実

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>イミベンコナゾール</u>	日植防茨城	100
	日植防高知	100
	日植防宮崎	101
<u>イミベンコナゾール脱ベンジル体</u>	日植防茨城	95
	日植防高知	94
	日植防宮崎	99
<u>2,4-ジクロロアニリン</u>	日植防茨城	91
	日植防高知	97
	日植防宮崎	90

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料に各化合物を添加し、 -20°C 以下で凍結保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を評価した。保存安定性試験の結果を表に示す。

9.1. 果肉の保存安定性試験結果

9.1.1. イミベンコナゾール

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	88 (13/8/9 - 13/11/5)	73	71
	日植防高知	26 (13/11/13 - 13/12/9)	99	94
	日植防宮崎	130 (13/6/20 - 13/10/28)	87	87

9.1.2. イミベンコナゾール脱ベンジル体

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	88 (13/8/9 - 13/11/5)	94	87
	日植防高知	26 (13/11/13 - 13/12/9)	86	86
	日植防宮崎	130 (13/6/20 - 13/10/28)	92	88

9.1.3. 2,4-ジクロロアニリン

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	88 (13/8/9 - 13/11/5)	75	73
	日植防高知	26 (13/11/13 - 13/12/9)	72	71
	日植防宮崎	130 (13/6/20 - 13/10/28)	78	77

9.2. 果実の保存安定性試験結果

9.2.1. イミベンコナゾール

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	88 (13/8/9 - 13/11/5)	76	74
	日植防高知	26 (13/11/13 - 13/12/9)	88	88
	日植防宮崎	130 (13/6/20 - 13/10/28)	90	89

9.2.2. イミベンコナゾール脱ベンジル体

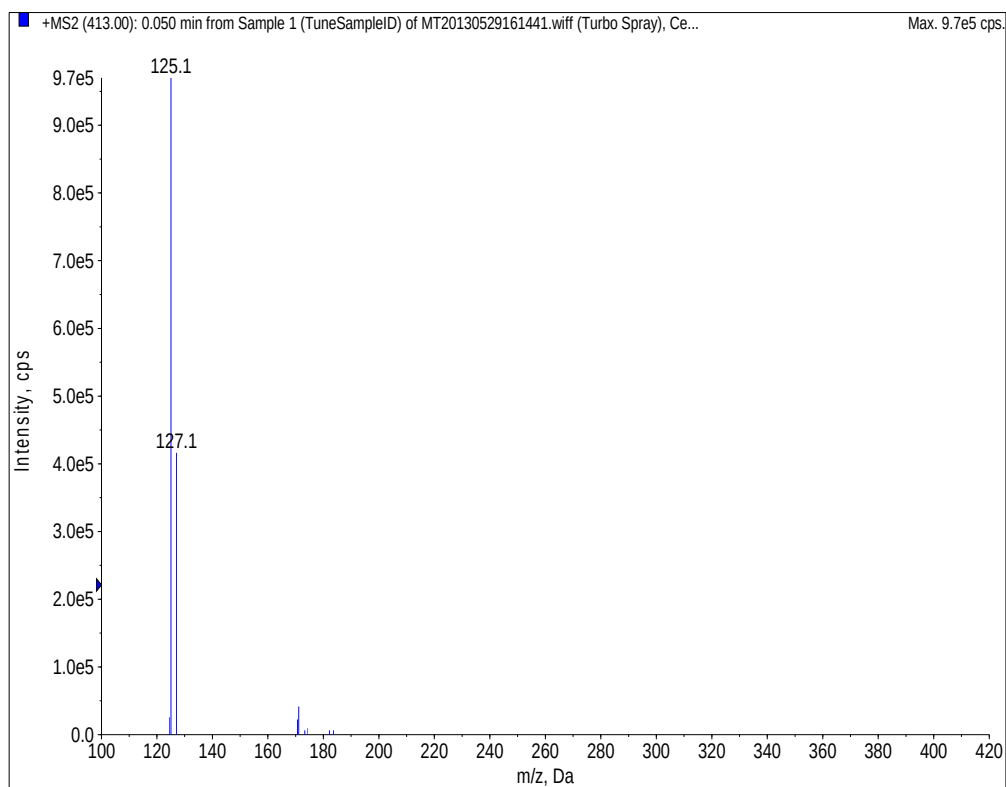
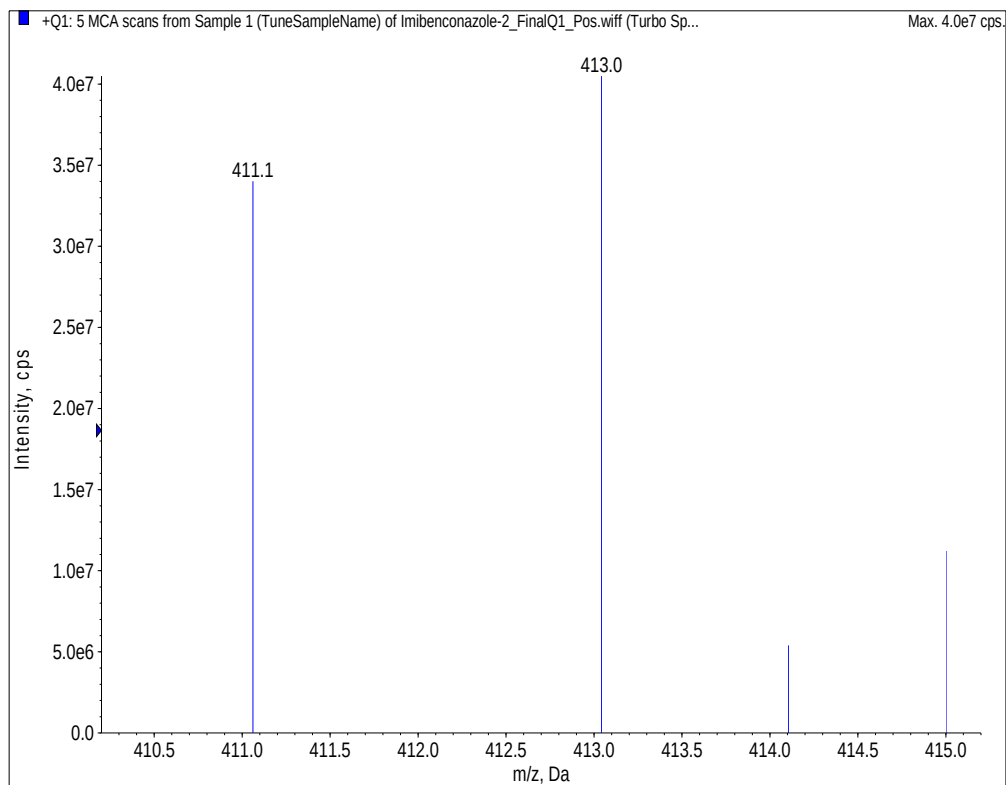
添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	88 (13/8/9 - 13/11/5)	102	95
	日植防高知	26 (13/11/13 - 13/12/9)	85	83
	日植防宮崎	130 (13/6/20 - 13/10/28)	91	90

9.2.3. 2,4-ジクロロアニリン

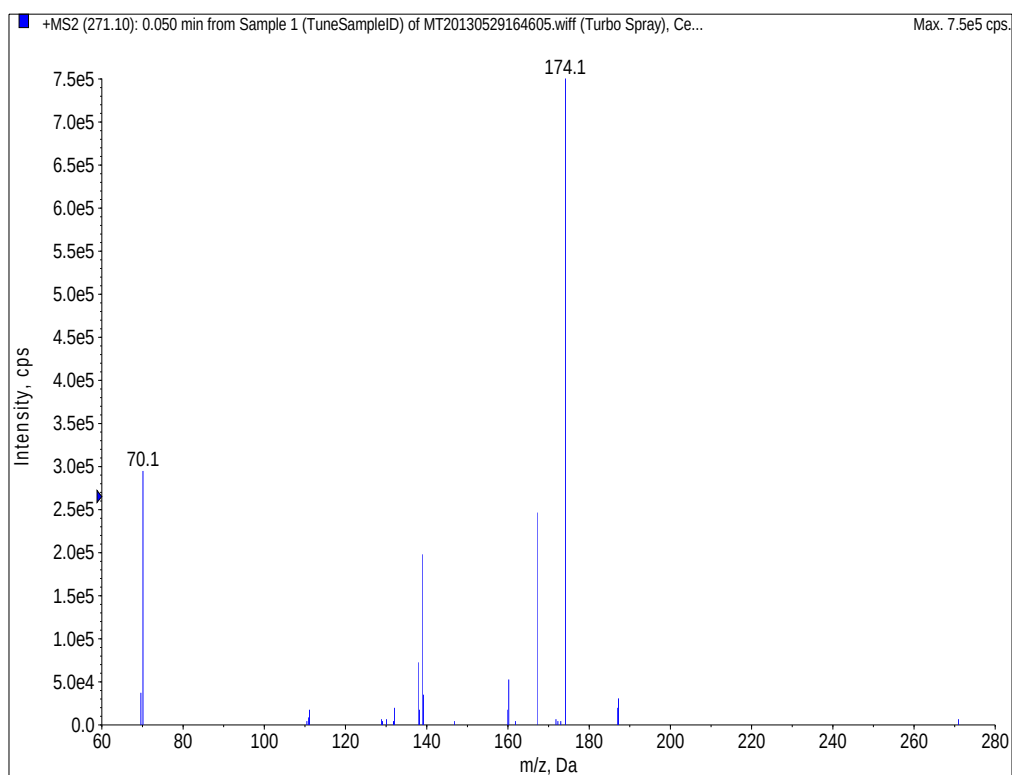
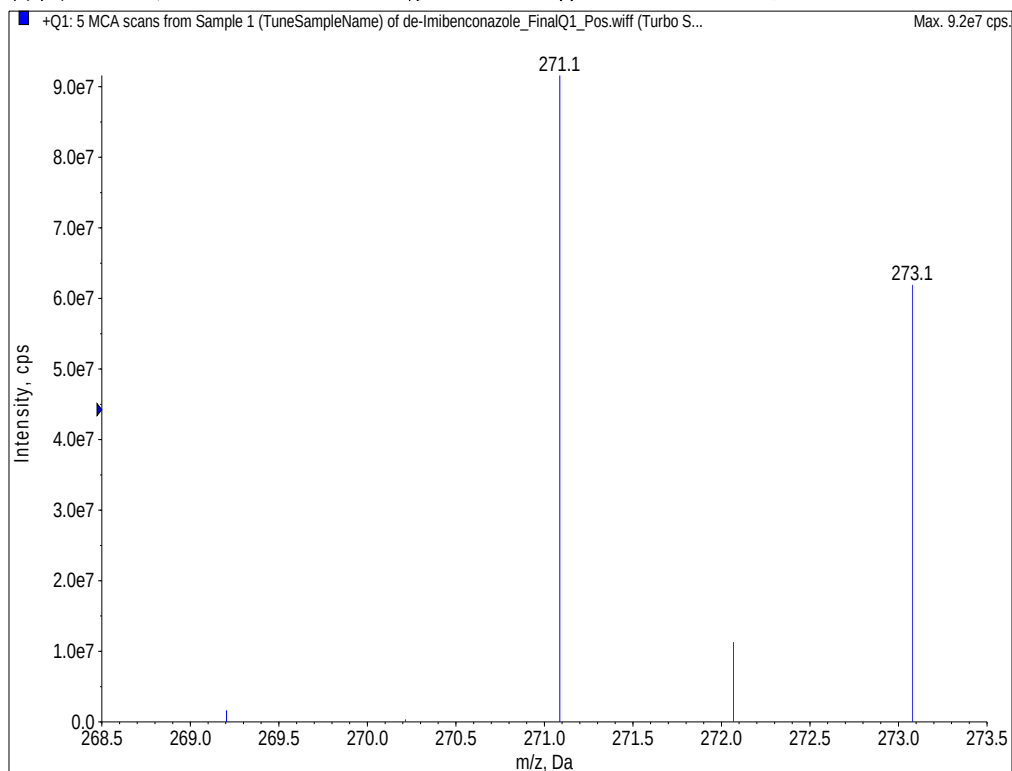
添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	88 (13/8/9 - 13/11/5)	80	76
	日植防高知	26 (13/11/13 - 13/12/9)	79	71
	日植防宮崎	130 (13/6/20 - 13/10/28)	83	82

付図-1. マススペクトル

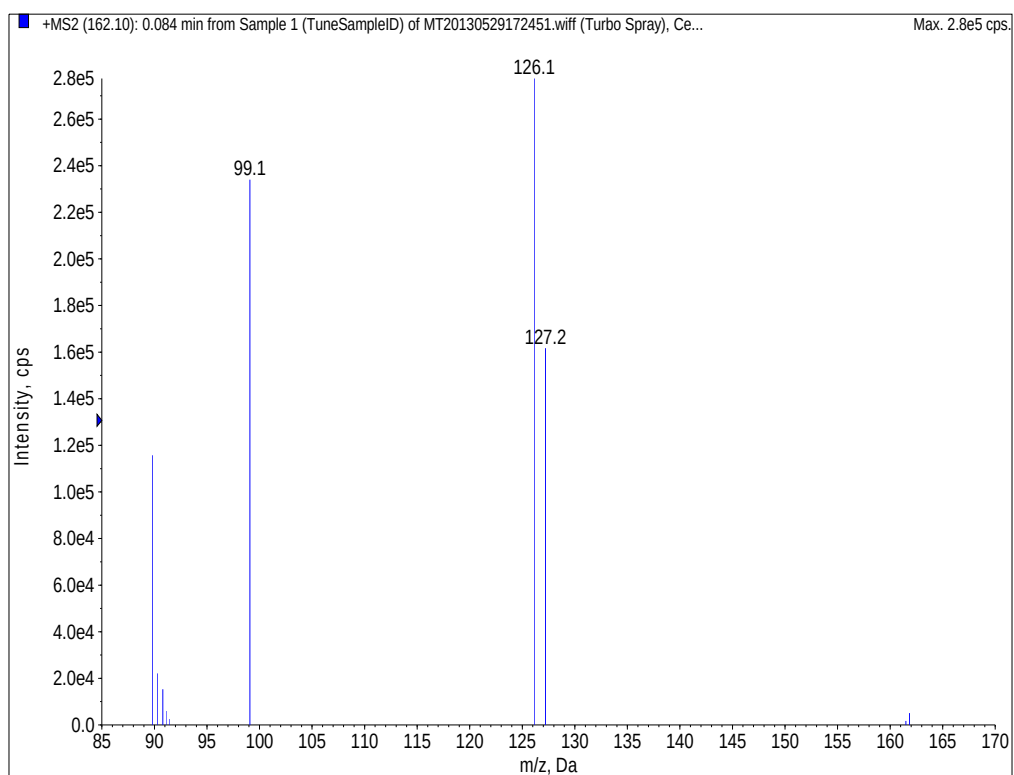
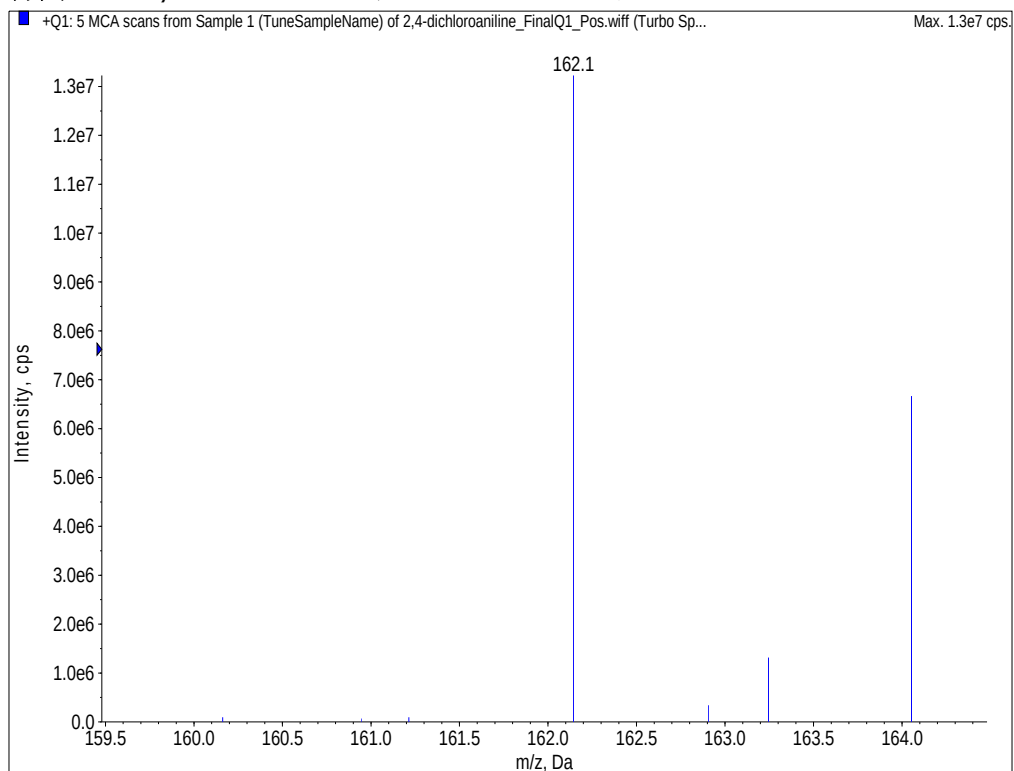
付図-1-1. イミベンコナゾールのマススペクトル



付図-1-2. イミベンコナゾール脱ベンジル体のマススペクトル



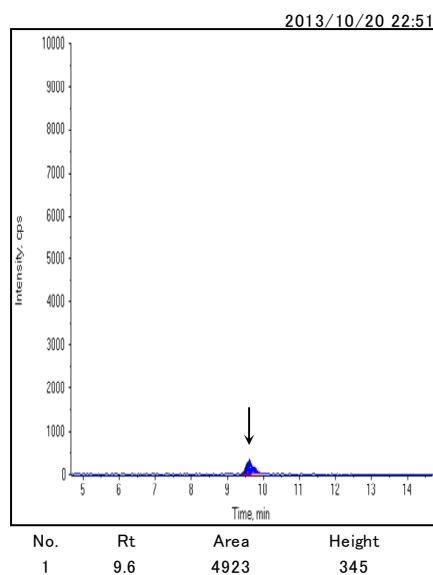
付図-1-3. 2,4-ジクロロアニリンのマススペクトル



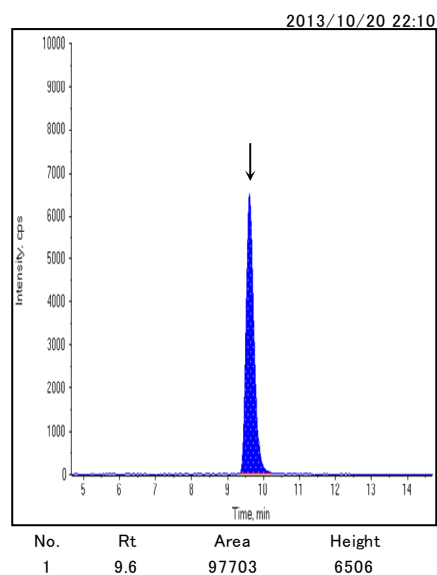
付図-2. 果肉のクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. イミベンコナゾールのクロマトグラム

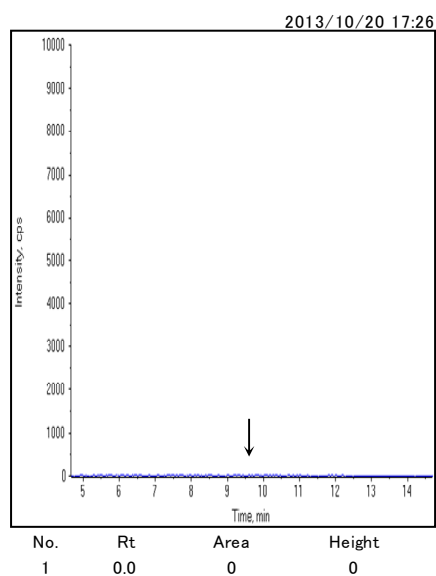
標準品 0.002ng



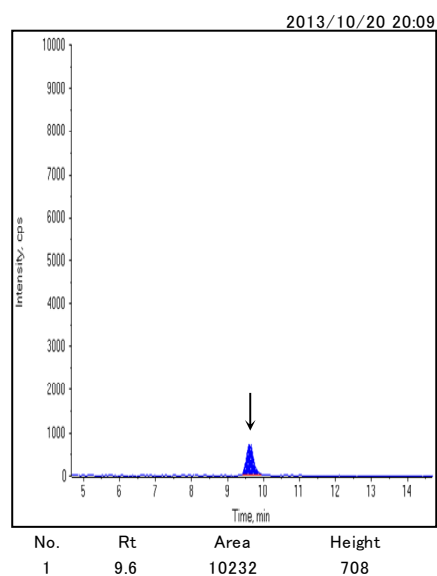
標準品 0.04ng



日植防茨城 無処理
4mL/2 μ L/4g

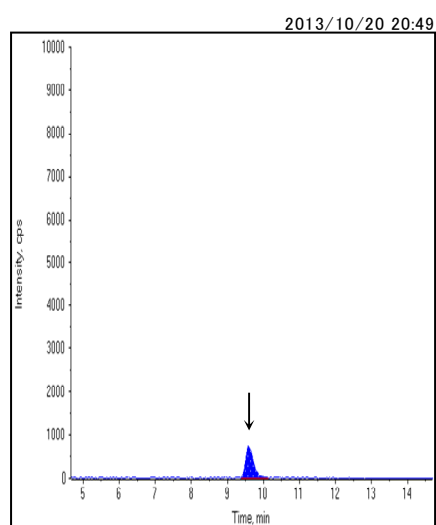


日植防茨城 4 回処理 1 日後
4mL/2 μ L/4g

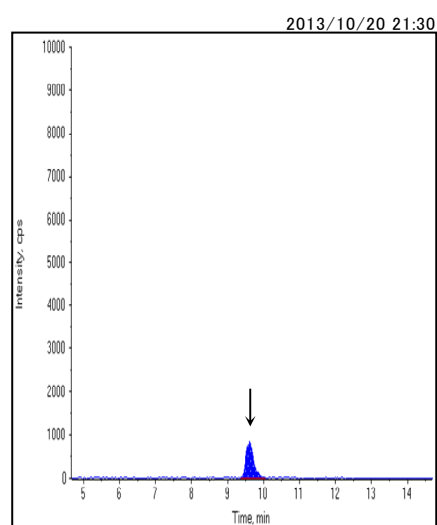


すいか 処理区 A (イミベンコナゾール)

日植防茨城 4 回処理 3 日後
4mL/2 μ L/4g

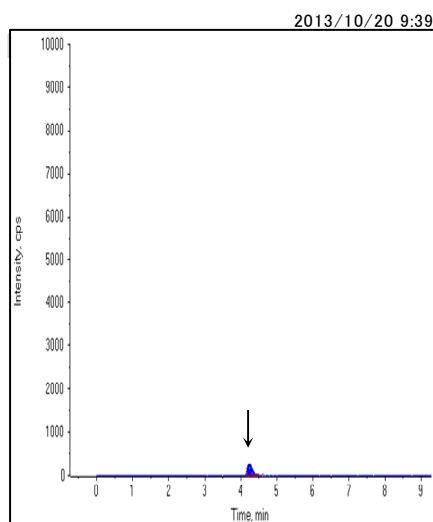


日植防茨城 4 回処理 7 日後
4mL/2 μ L/4g

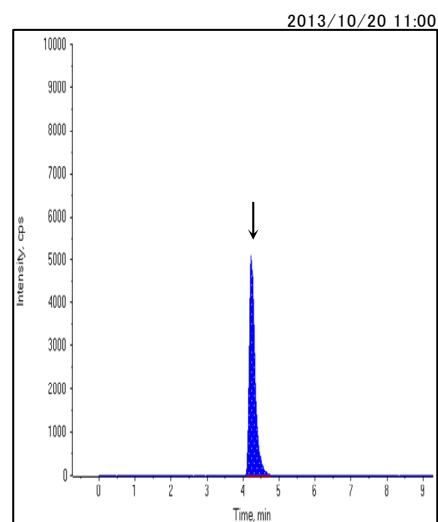


付図-2-2. イミベンコナゾール脱ベンジル体のクロマトグラム

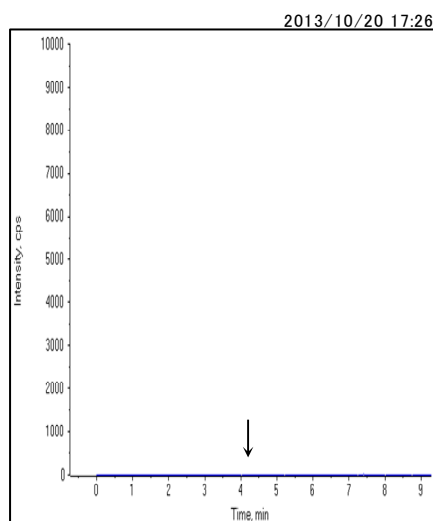
標準品 0.002ng



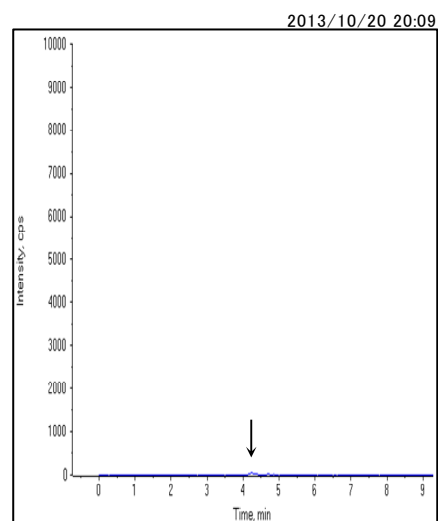
標準品 0.04ng



日植防茨城 無処理
4mL/2 μ L/4g

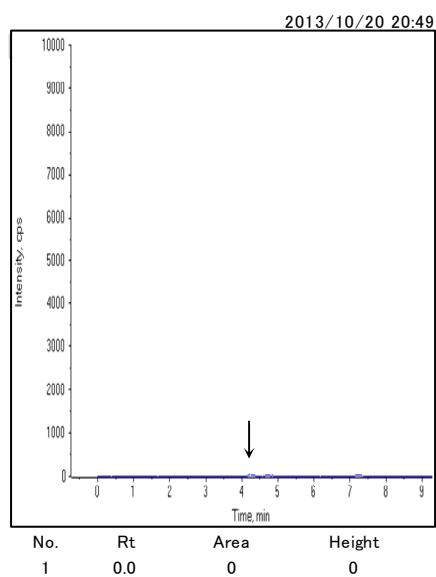


日植防茨城 4回処理 1日後
4mL/2 μ L/4g

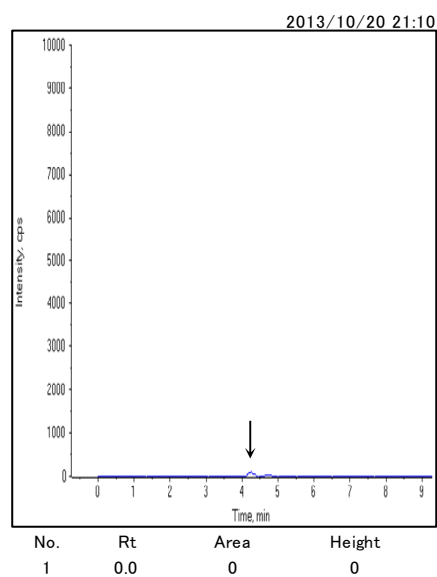


すいか 処理区 A (イミベンコナゾール)

日植防茨城 4 回処理 3 日後
4mL/2 μ L/4g

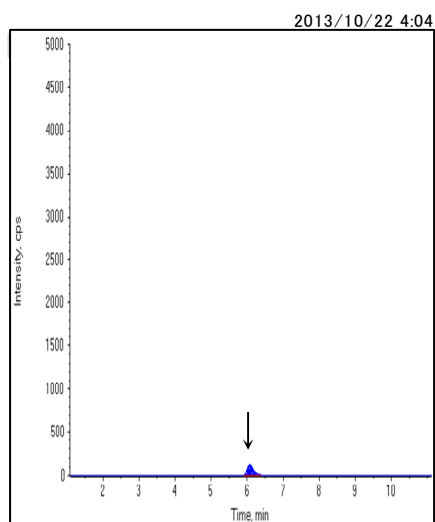


日植防茨城 4 回処理 7 日後
4mL/2 μ L/4g

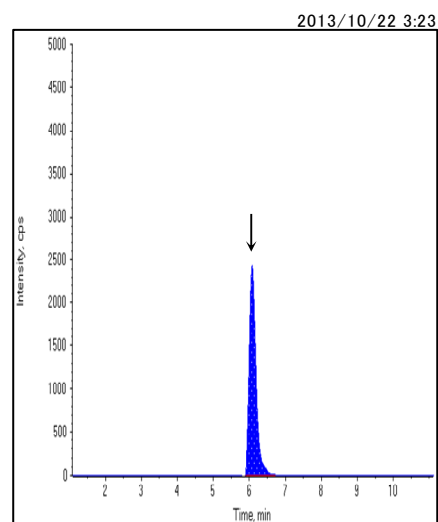


付図-2-3. 2,4-ジクロロアニリンのクロマトグラム

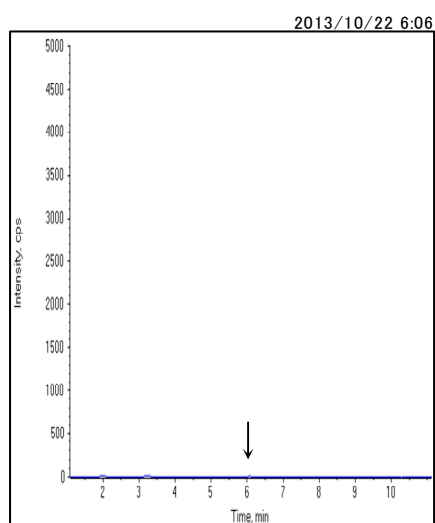
標準品 0.04ng



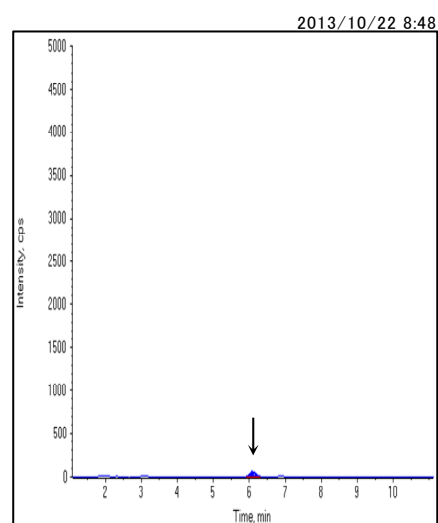
標準品 0.8ng



日植防茨城 無処理
2mL/10 μ L/4g

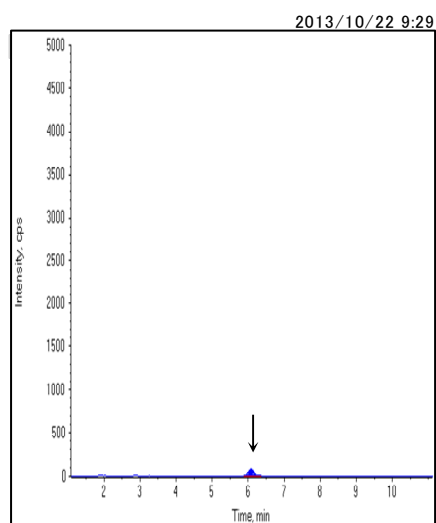


日植防茨城 4回処理 1日後
2mL/10 μ L/4g

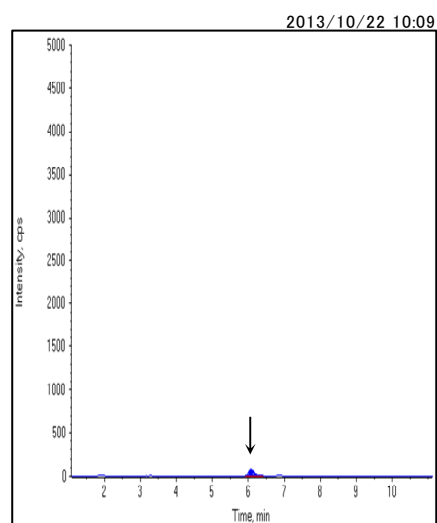


すいか 処理区 A (イミベンコナゾール)

日植防茨城 4 回処理 3 日後
2mL/10 μ L/4g



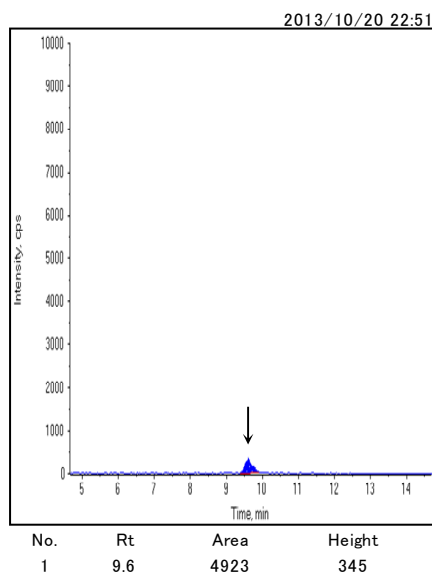
日植防茨城 4 回処理 7 日後
2mL/10 μ L/4g



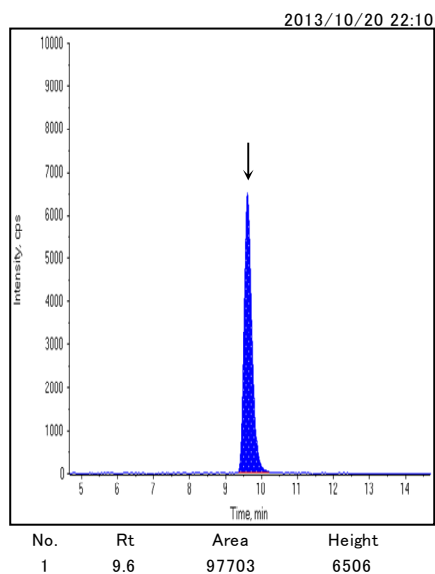
付図-3. 果実のクロマトグラム (代表例)

付図-3-1. イミベンコナゾールのクロマトグラム

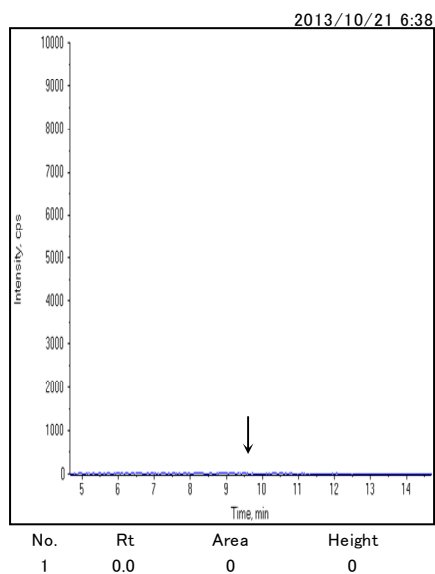
標準品 0.002ng



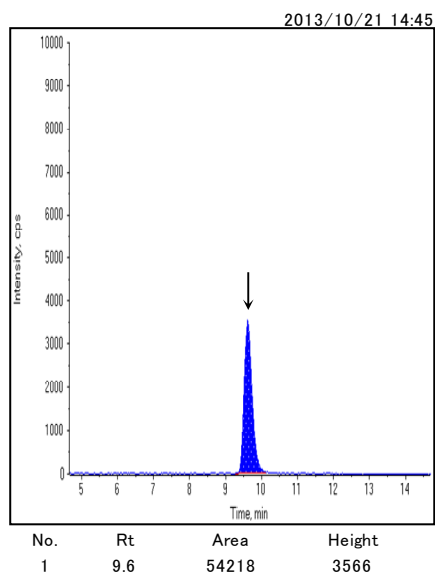
標準品 0.04ng



日植防茨城 無処理
4mL/2 μ L/4g

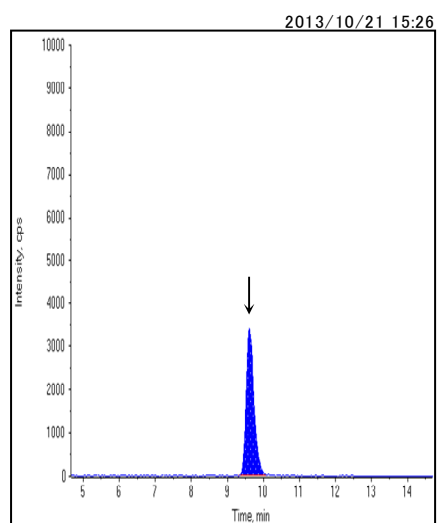


日植防茨城 4回処理 1日後
24mL/2 μ L/4g

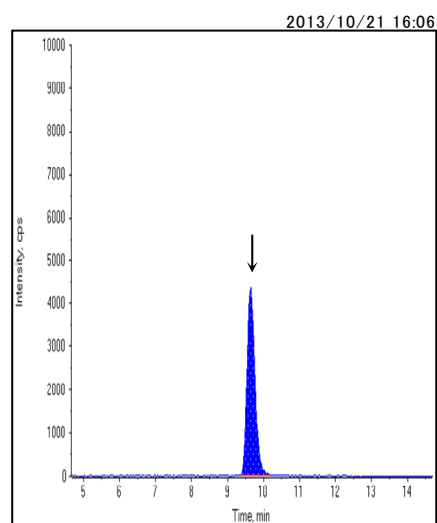


すいか 処理区 A (イミベンコナゾール)

日植防茨城 4 回処理 3 日後
20mL/2 μ L/4g

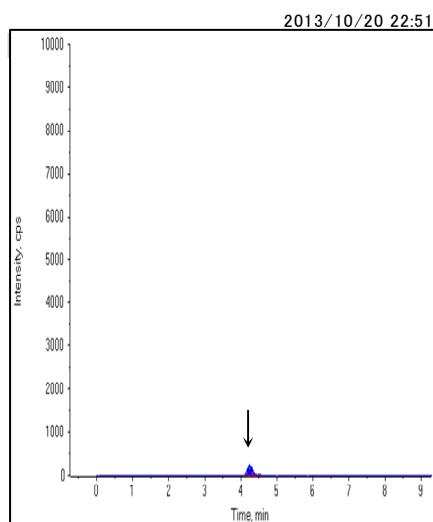


日植防茨城 4 回処理 7 日後
12mL/2 μ L/4g

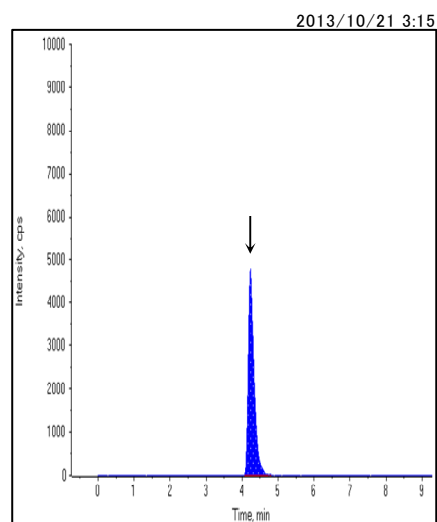


付図-3-2. イミベンコナゾール脱ベンジル体のクロマトグラム

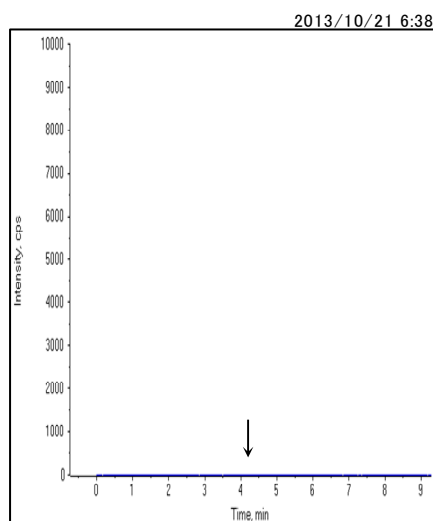
標準品 0.002ng



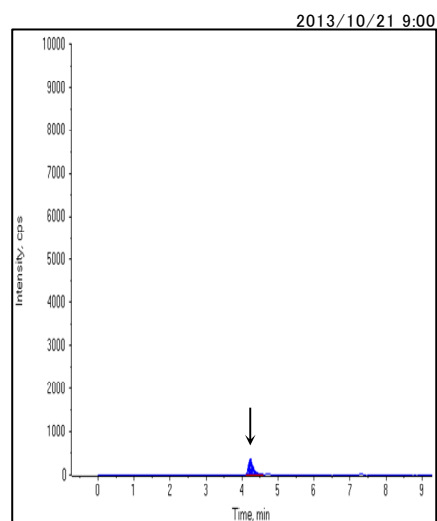
標準品 0.04ng



日植防茨城 無処理
4mL/2 μ L/4g

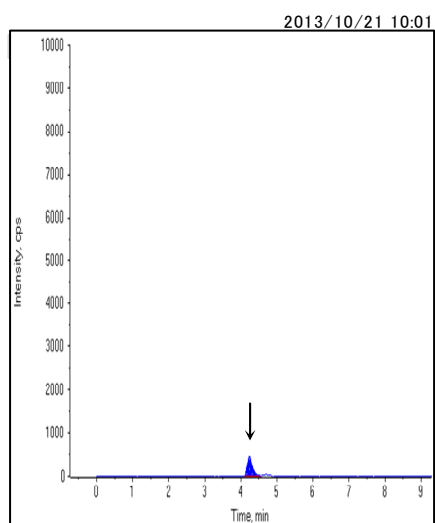


日植防茨城 4 回処理 1 日後
4mL/2 μ L/4g

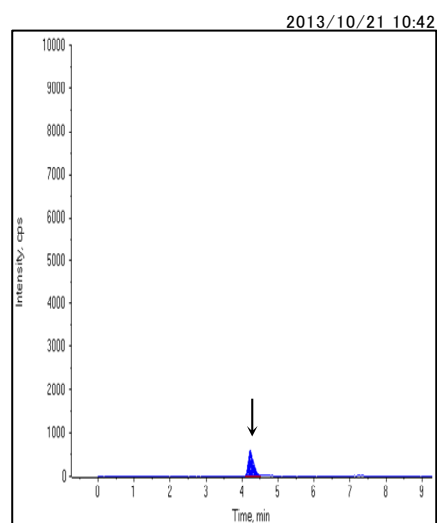


すいか 処理区 A (イミベンコナゾール)

日植防茨城 4 回処理 3 日後
4mL/2 μ L/4g

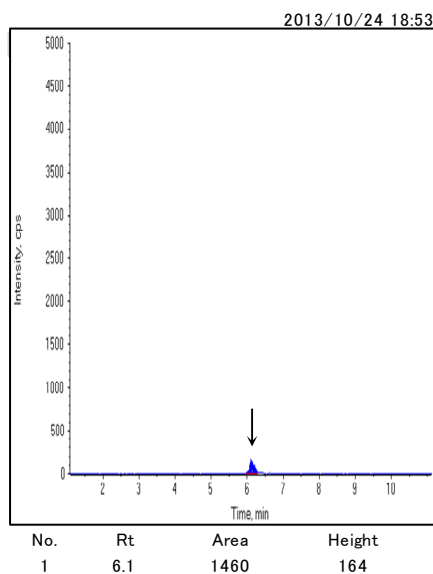


日植防茨城 4 回処理 7 日後
4mL/2 μ L/4g

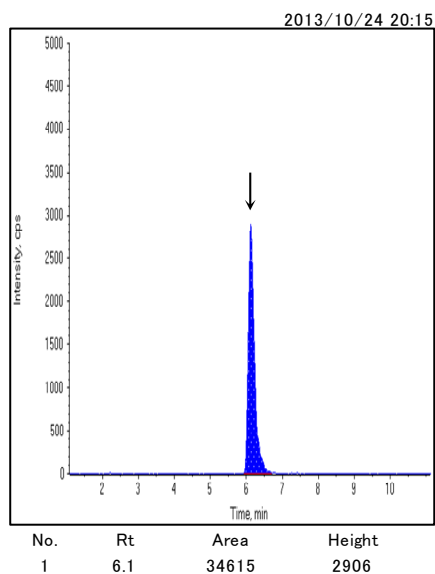


付図-3-3. 2,4-ジクロロアニリンのクロマトグラム

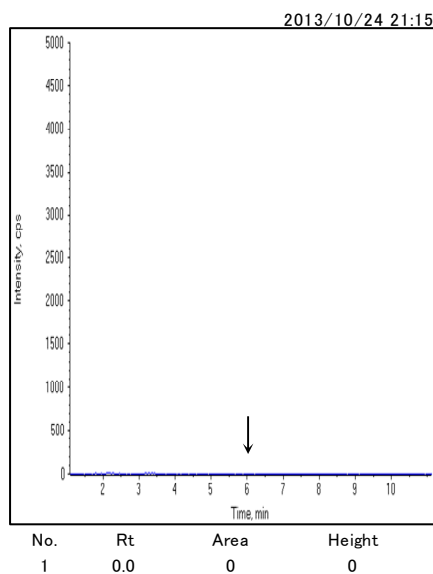
標準品 0.04ng



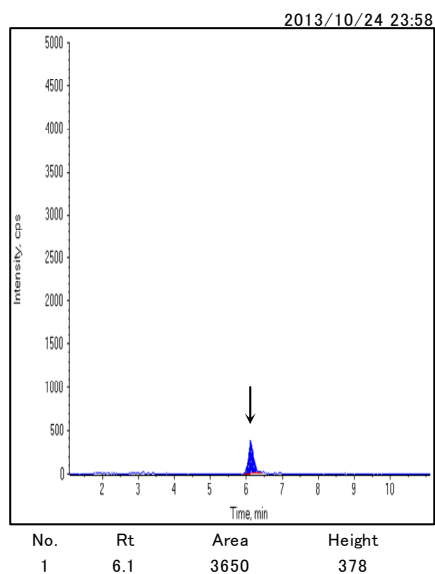
標準品 0.8ng



日植防茨城 無処理
2mL/10 μ L/4g

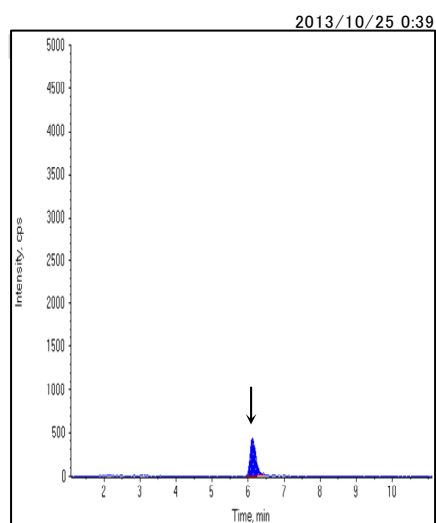


日植防茨城 4 回処理 1 日後
2mL/10 μ L/4g

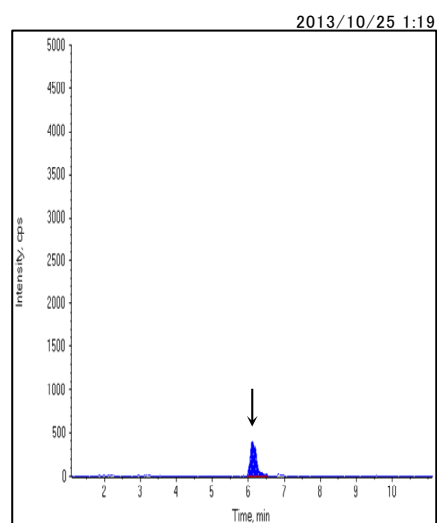


すいか 処理区 A (イミベンコナゾール)

日植防茨城 4 回処理 3 日後
2mL/10 μ L/4g



日植防茨城 4 回処理 7 日後
2mL/10 μ L/4g



10. 試料重量等

試料	処理	経過	平均重量	総平均重量	総重量	総重量の平均	重量比(%)		果皮の厚さ
	回数	日数	(kg/個)	(kg/個)	(kg)	(kg)	果肉	果皮	(mm)
茨城	0	—	1.74	2.14	17.4	12.9	85	15	4.6
	A	1	2.08		10.4		85	15	5.3
	A	3	2.34		11.7		86	14	5.4
	A	7	2.38		11.9		89	11	4.8
								平均 86:14	
高知	0	—	1.42	1.68	17.1	12.2	82	18	5.8
	A	1	1.78		10.7		82	18	4.8
	A	3	1.77		10.6		82	18	5.8
	A	7	1.73		10.4		82	18	5.4
								平均 82:18	
宮崎	0	—	1.75	1.72	19.2	12.5	87	13	4.4
	A	1	1.73		10.4		86	14	3.9
	A	3	1.62		9.69		86	14	4.8
	A	7	1.78		10.7		86	14	4.6
								平均 86:14	
3ほ場の総平均重量					3ほ場の総重量の平均				
1.85 kg/個					12.5 kg				

A: ペルメトリンは5回処理

ビフェントリン, イミベンコナゾールは4回処理

ピリダリルは2回処理

テブフェンピラドは1回処理

注) 宮崎 無処理試料の1個が輸送中に破損していたため, 破損試料を除いて重量等を求めた。

11. 作物写真の一例



日植防茨城 無処理



日植防茨城 処理 1 日後



日植防茨城 処理 3 日後



日植防茨城 処理 7 日後

資料 2-2

農薬登録における作物のグループ化・残留分析詳細①
スピロメシフェン

1. 分析対象物質

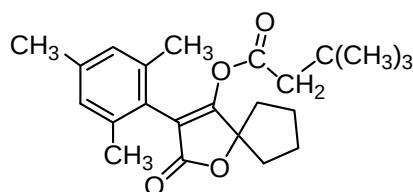
スピロメシフェン

化学名： 3-mesityl-2-oxo-1-oxaspiro[4.4]non-3-en-4-yl 3,3-dimethylbutyrate

分子量： 370.5

分子式： $C_{23}H_{30}O_4$

構造式：



性 状： 無色結晶

融 点： 96.7-98.7℃

蒸気圧： 7×10^{-3} mPa (20℃)分配係数： $\log P_{OW} = 4.55$ (緩衝剤なし, 20℃)

溶解性： 水 0.13 mg/L (pH 4-9, 20℃)

n-ヘプタン 23, イソプロピルアルコール 115, n-オクタノール 60,
キシレン, 1-2 ジクロロメタン, アセトン, 酢酸エチル, アセトニトリル
>250 (以上 g/L, 20℃)安定性： 加水分解半減期 53.3 日 (pH4), 24.8 日 (pH7), 4.3 日 (pH9) (25℃)
2.2 日 (pH4), 1.7 日 (pH7), 2.6 h (pH9) (50℃)

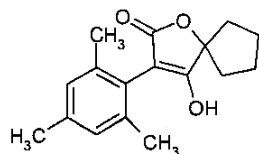
出 典： The Pesticide Manual (16th Edition)

スピロメシフェン エノール体

化学名： 4-hydroxy-3-(2,4,6-trimethylphenyl)-1-oxaspiro[4.4]non-3-en-2-one

分子量： 272.35

構造式：



出 典： メーカー提供資料

2. 標準品及び試薬

スピロメシフェン標準品	: 純度 98.5% (Dr.Ehrenstorfer GmbH)
スピロメシフェンエノール体標準品	: 純度 99.9% (Sigma-Aldrich)
アセトニトリル	: 高速液体クロマトグラフィー用 (関東化学製)
アセトニトリル	: 試薬特級 (和光純薬工業製)
メタノール	: 高速液体クロマトグラフィー用 (和光純薬工業製)
ヘキサン	: 試薬特級 (和光純薬工業製)
酢酸エチル	: 試薬特級 (和光純薬工業製)
ギ酸	: 試薬特級 (和光純薬工業製)
酢酸	: 試薬特級 (和光純薬工業製)
無水硫酸ナトリウム	: 試薬特級 (和光純薬工業製)
シリカゲルミニカラム	: InertSep Slim-J SI (1000mg) (ジーエルサイエンス製)
カルボキシメチルシリル化シリカゲルミニカラム	: BOND ELUT LRC-CBA (500mg) (アジレント・テクノロジー製)

3. 装置及び機器

化学天秤:	島津製作所製 AUW220
上皿天秤:	メトラー・トレド製 PB8001-S/FACT
上皿天秤:	メトラー・トレド製 MS6001S/02
上皿天秤:	エー・アンド・ディ製 GF-2000
ミキサー:	ワーリング製 CB-15T
液体クロマトグラフ	質量分析計システム (LC-MS): ヒューレット・パッカー製 HP-1100
データ処理装置:	ヒューレット・パッカー製 Chem Station

4. 液体クロマトグラフ・質量分析計の操作条件

4.1. 液体クロマトグラフ・質量分析計 (スピロメシフェン)

4.1.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム:	Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス製), 内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒径 4 μ m
溶離液:	0.2% 酢酸溶液/アセトニトリル (20:80, v/v)
流速:	0.2 mL/min.
カラム温度:	40 °C
試料注入量:	2 μ L
保持時間:	約 6.2 min.

4.1.2. 質量分析計

イオン化法：	エレクトロスプレー(ESI)、正イオンモード
乾燥ガス温度：	350℃
乾燥ガス流量：	12L/min.
ネブライザー圧力：	35psi
フラグメンター電圧：	80 V
キャピラリー電圧：	4000 V
採取イオン：	SIM m/z 273.1

4.2. 液体クロマトグラフ・質量分析計

4.2.1. 高速液体クロマトグラフ (スピロメシフェンエノール体)

カラム：	Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス製), 内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒径 4μm
溶離液：	0.2% 酢酸溶液/アセトニトリル (40:60, v/v)
流速：	0.2 mL/min.
カラム温度：	40 °C
試料注入量：	1 μL
保持時間：	約 5.5 min.

4.2.2. 質量分析計

イオン化法：	エレクトロスプレー(ESI)、正イオンモード
乾燥ガス温度：	350℃
乾燥ガス流量：	12L/min.
ネブライザー圧力：	35psi
フラグメンター電圧：	80 V
キャピラリー電圧：	4000 V
採取イオン：	SIM m/z 273.1

5. 検量線の作成

スピロメシフェン及びスピロメシフェンエノール体の各標準品 20.0 mg (各純度換算相当量) を精秤し、各々100mL 容メスフラスコに移した。アセトニトリルを加えて溶解して 200 mg/L の標準原液を調製した。この原液をアセトニトリルで希釈して 0.001, 0.002, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 mg/L の標準溶液を各々調製した。スピロメシフェンは 2 μL を 4.1. 項の条件の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入し、データ処理装置を用いてスピロメシフェンのピーク高さを測定し、横軸に重量 (ng)、縦軸にピーク高さをもって各検量線を作成した。スピロメシフェンエノール体は 1 μL を 4.2. 項の条件の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入し、データ処理装置を用いてスピロメシフェンエノール体のピーク高さを測定し、横軸に重量 (ng)、縦軸にピーク高さをもって各検量線を作成した。

6. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料は重量を量り、つるを除去した。無処理区試料は各々を縦に 8 分割し、対角の 2 つを取り合わせ、4 組の試料を作成した。そのうちの 2 組を果肉分析試料とし、残りの 2 組を果実分析試料とした。2 組の果肉分析試料は果肉と果皮の境目に沿って包丁を入れ果肉と果皮にわけた後、各々の重量を測定した。その 1 組の果肉全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なイミベンコナゾール、アラニカルブ及びチオファネートメチル分析用試料とし、さらに 3 分割して試料を 3 組作製し、各々添加剤を加えてミキサーで均一化した。2 組の果実分析試料のうち、1 組の全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なイミベンコナゾール、アラニカルブ及びチオファネートメチル分析用試料とし、さらに 3 分割して試料を 3 組作製し、各々添加剤を加えてミキサーで均一化した。

処理区試料は各々を縦に 8 分割し、対角の 2 つを取り合わせ、4 組の試料を作成した。そのうちの 2 組を果肉分析試料とし、残りの 2 組を果実分析試料とした。2 組の果肉分析試料は果肉と果皮の境目に沿って包丁を入れ果肉と果皮にわけた後、各々の重量を測定した。その 1 組の果肉全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なアラニカルブ及びチオファネートメチル分析用試料とし、さらに 2 分割して対角の 2 つを取り合わせ、試料を 2 組作製した。2 組の試料のうち、1 組の全量をアラニカルブ分析用試料として、残りの 1 組をチオファネートメチル分析用試料とし、各々添加剤を加えてミキサーで均一化した。2 組の果実分析試料のうち、1 組の全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なアラニカルブ及びチオファネートメチル分析用試料とし、さらに 2 分割して対角の 2 つを取り合わせ、試料を 2 組作製した。2 組の試料のうち、1 組の全量をアラニカルブ分析用試料として、残りの 1 組をチオファネートメチル分析用試料とし、各々添加剤を加えてミキサーで均一化した。

各々の試料は密封容器に入れて -20°C 以下で凍結保存した。また、量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比 (%) を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した試料 20 g を分液ロートに量りとり、アセトニトリル/水/ギ酸 (80:20:1, v/v/v) 混液 100 mL を加えて 30 分間振とう抽出した。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣をアセトニトリル/水/ギ酸 (80:20:1, v/v/v) 混液 50 mL で 2 回洗浄し、同様にろ過した。ろ液を合わせアセトニトリル/水/ギ酸 (80:20:1, v/v/v) 混液で 250 mL に定容した。

6.1.3. 転溶

前項の定容液から 25 mL (試料 2g 相当量) をナス型フラスコに分取し、 40°C 以下の水浴中で減圧濃縮し、溶媒を留去した。残留物は直ちに水 50 mL に溶解して分液ロートに移し、酢酸エチル/ヘキサン (5:95, v/v) 混液 80 mL を加え 5 分間振とうした。静置分離後、有機溶媒層は無水硫酸ナトリウムをのせたろ紙 (No.5A) を通過させ、脱水した。さらに酢酸エチル/ヘキサン (5:95, v/v) 混液 80 mL を加え、前記操作をくり返した後、有機溶

媒層を合わせ 40℃以下の水浴中で約 2 mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。残留物は直ちにヘキサン 5 mL で溶解した。

6.1.4. シリカゲルミニカラムによる精製

シリカゲルミニカラムにヘキサン 10 mL を流下して前処理した。前項の溶解液をシリカゲルミニカラムに流下した後、ヘキサン 10 mL を流下し、さらに酢酸エチル/ヘキサン (2:98, v/v) 混液 10 mL を流下し、これらの流出液を捨てた。次に酢酸エチル/ヘキサン (2:98, v/v) 混液 30 mL を流下し、溶出液を取り、40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。(スピロメシフェン分析用)

6.1.5. カルボキシメチルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製

メタノール 5 mL 及び水 10 mL を順次流下して前処理したカルボキシメチルシリル化シリカゲルミニカラムを前項のシリカゲルミニカラムの下部に連結した。酢酸エチル/ヘキサン/ギ酸 (25:75:0.1, v/v/v) 混液 20 mL を流下し、溶出液を取った。次にシリカゲルミニカラムを外し、酢酸エチル/ヘキサン/ギ酸 (25:75:0.1, v/v/v) 混液 10 mL を流下し、溶出液を取った。溶出液を合せ、40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。(スピロメシフェンエノール体分析用)

6.1.6. 定量

残留物は直ちにアセトニトリルを用いて各 4 mL に定容し、測定溶液とした。測定溶液は必要に応じてアセトニトリルで希釈した。

スピロメシフェンは測定溶液の 2 µL を 4.1.項の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入し、ピーク高さを求め、検量線よりスピロメシフェンの重量を求め、試料中の各残留濃度を算出した。

スピロメシフェンエノール体は測定溶液の 1 µL を 4.2.項の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入し、ピーク高さを求め、検量線よりスピロメシフェンエノール体の重量を求め、試料中の各残留濃度を算出した。また、エノール体の重量より換算係数 1.36*を乗じてスピロメシフェンの重量を求めた。

$$* \text{換算係数} = \frac{\text{スピロメシフェン分子量}}{\text{スピロメシフェンエノール体分子量}} = \frac{370.5}{272.35} = 1.36$$

6.2. 定量限界値 (LOQ) 及び検出限界値 (LOD)

6.2.1. スピロメシフェン

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	定量限界 (ppm)
0.004	2	4	2	0.004

最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)
0.002	2	4	2	0.002

果肉，果実はいずれも同じ値

6.2.2. スピロメシフェンエノール体

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	定量限界 (ppm)	定量限界 ¹⁾ (ppm)
0.002	2	4	1	0.004	0.006

最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)	検出限界 ¹⁾ (ppm)
0.001	2	4	1	0.002	0.003

¹⁾ スピロメシフェン換算値：スピロメシフェンエノール体×1.36

果肉，果実はいずれも同じ値

6.3. 回収率

分析法確認のため、市販品の果肉及び果実を用いて、0.004ppm(定量限界相当)、0.25ppm及び5ppm添加濃度における回収試験を各5連分析で実施した。なお、試料(市販品)は2連分析し、全て定量限界未満(<0.004 ppm)であった。回収試験結果を表に示す。

6.3.1 果肉の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
スピロメシフェン								
市販品	5	94	88	87	86	86	88	3.8
市販品	0.25	93	93	92	90	90	92	1.6
市販品	0.004	109	108	103	101	96	103	5.2
スピロメシフェンエノール体								
市販品	5	100	100	96	95	94	97	2.9
市販品	0.25	93	88	88	85	84	88	4.0
市販品	0.004	102	95	95	93	86	94	6.1

6.3.2. 果実の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
<u>スピロメシフェン</u>								
市販品	5	89	87	87	86	81	86	3.5
市販品	0.25	94	93	93	91	91	92	1.5
市販品	0.004	106	101	98	94	92	98	5.7
<u>スピロメシフェンエノール体</u>								
市販品	5	103	97	97	94	93	97	4.0
市販品	0.25	85	83	83	82	82	83	1.5
市販品	0.004	97	96	93	91	78	91	8.4

7. 精度管理

「食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について」（平成 9 年 4 月 1 日付け衛食第 117 号厚生省生活衛生局食品保健課長通知）に基づき、内部精度管理を行った。

管理基準：20 検体を超えるごとに、各 1 検体の無処理試料及び 0.04 ppm 添加試料（クオリティーコントロール試料）を分析した。

クオリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

また、2012 年 11 月実施の食品衛生精度管理比較調査（財団法人食品薬品安全センター）における Z スコアは全て $Z < 2$ であった。

7.1. クオリティーコントロール試料分析結果

7.1.1. 果肉

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>スピロメシフェン</u>	2013/9/10	日植防茨城	98	<0.004
	2013/9/27	日植防茨城	93	<0.004
	2013/12/6	日植防高知	100	<0.004
	2014/1/10	日植防高知	99	<0.004
	2013/9/10	日植防宮崎	94	<0.004
	2013/9/27	日植防宮崎	86	<0.004
<u>スピロメシフェン エノール体</u>	2013/9/10	日植防茨城	95	<0.004
	2013/9/27	日植防茨城	94	<0.004
	2013/12/6	日植防高知	101	<0.004
	2014/1/10	日植防高知	98	<0.004
	2013/9/10	日植防宮崎	96	<0.004
	2013/9/27	日植防宮崎	97	<0.004

7.1.2. 果実

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>スピロメシフェン</u>	2013/9/10	日植防茨城	92	<0.004
	2013/9/27	日植防茨城	90	<0.004
	2013/12/6	日植防高知	90	<0.004
	2014/1/10	日植防高知	106	<0.004
	2013/9/10	日植防宮崎	92	<0.004
	2013/9/27	日植防宮崎	86	<0.004
<u>スピロメシフェン エノール体</u>	2013/9/10	日植防茨城	95	<0.004
	2013/9/27	日植防茨城	100	<0.004
	2013/12/6	日植防高知	98	<0.004
	2014/1/10	日植防高知	98	<0.004
	2013/9/10	日植防宮崎	94	<0.004
	2013/9/27	日植防宮崎	97	<0.004

8. マトリックス効果の確認

マトリックス標準溶液は、各圃場の無処理試料の最終液量 1mL をナス型フラスコに分取し、窒素気流下で溶媒を留去した後、スピロメシフェン及びスピロメシフェンエノール体各 0.02mg/L の検量線溶液 1mL に溶解して調製した。マトリックス試料分析結果を表に示す。

8.1. 果肉

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>スピロメシフェン</u>	日植防茨城	93
	日植防高知	88
	日植防宮崎	97
<u>スピロメシフェンエノール体</u>	日植防茨城	101
	日植防高知	105
	日植防宮崎	105

8.2. 果実

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>スピロメシフェン</u>	日植防茨城	92
	日植防高知	87
	日植防宮崎	95
<u>スピロメシフェンエノール体</u>	日植防茨城	101
	日植防高知	94
	日植防宮崎	101

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料に各化合物を添加し、 -20°C 以下で凍結保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を評価した。保存安定性試験の結果を表に示す。

9.1. 果肉の保存安定性試験結果

9.1.1. スピロメシフェン

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	49 (13/8/9 - 13/9/27)	84	82
	日植防高知	58 (13/11/13 - 14/1/10)	94	92
	日植防宮崎	99 (13/6/20 - 13/9/27)	85	80

9.1.2. スピロメシフェンエノール体

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	49 (13/8/9 - 13/9/27)	103	103
	日植防高知	58 (13/11/13 - 14/1/10)	102	99
	日植防宮崎	99 (13/6/20 - 13/9/27)	102	102

9.2. 果実の保存安定性試験結果

9.2.1. スピロメシフェン

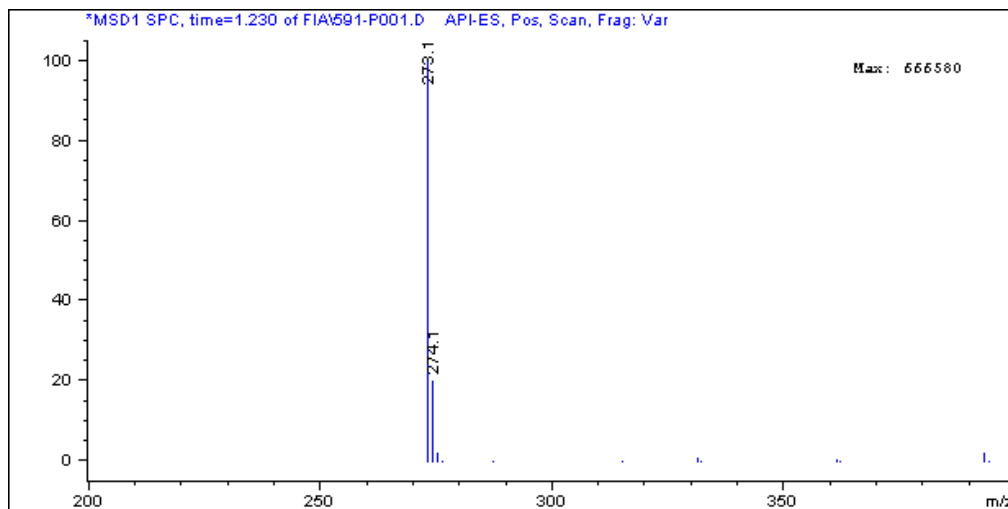
添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	49 (13/8/9 - 13/9/27)	85	81
	日植防高知	58 (13/11/13 - 14/1/10)	91	90
	日植防宮崎	99 (13/6/20 - 13/9/27)	84	81

9.2.2. スピロメシフェンエノール体

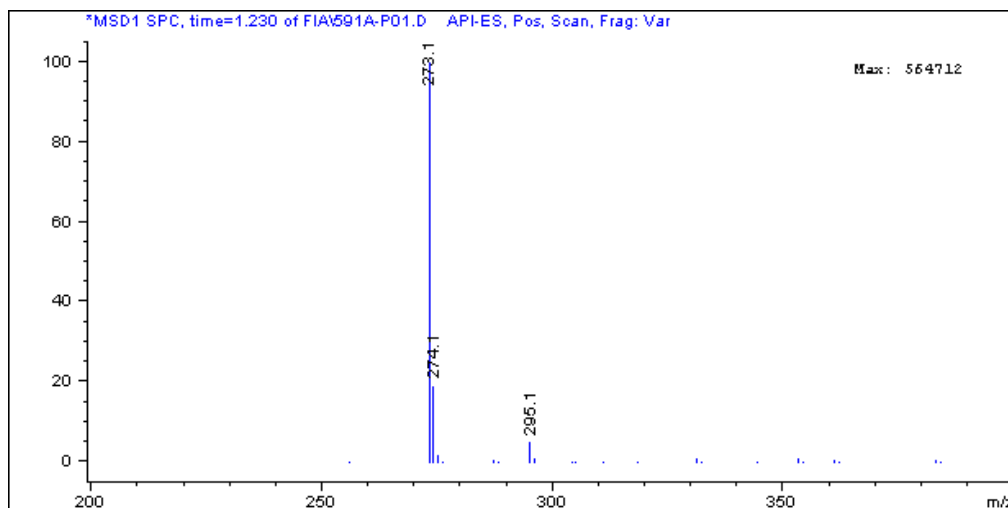
添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	49 (13/8/9 - 13/9/27)	100	99
	日植防高知	58 (13/11/13 - 14/1/10)	105	101
	日植防宮崎	99 (13/6/20 - 13/9/27)	101	94

付図-1. マススペクトル

付図-1-1. スピロメシフェンのマススペクトル



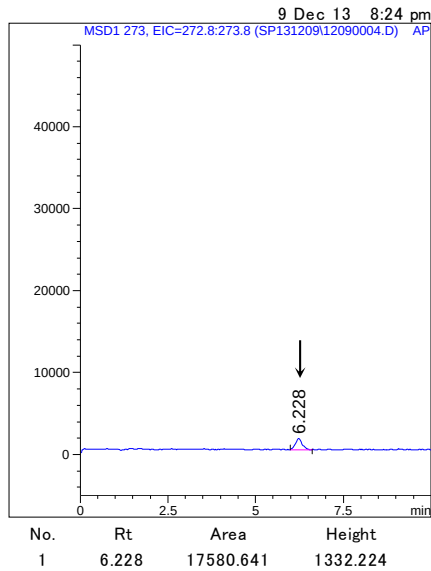
付図-1-2. スピロメシフェンエノール体のマススペクトル



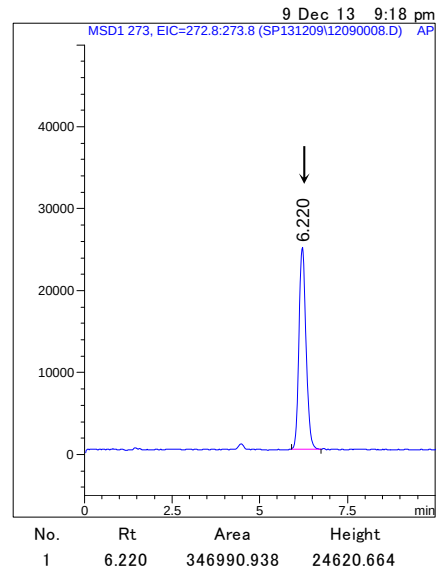
付図-2. 果肉のクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. スピロメシフェンのクロマトグラム

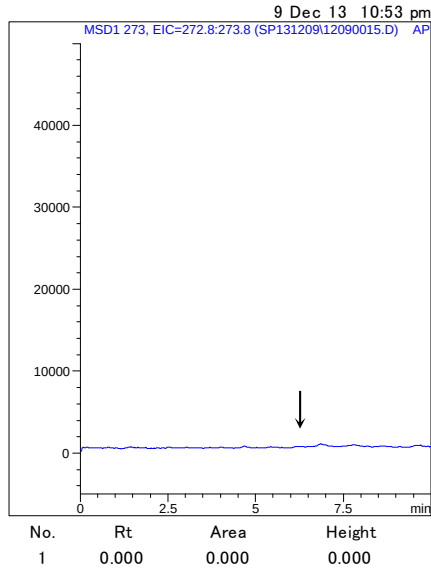
標準品 0.004ng



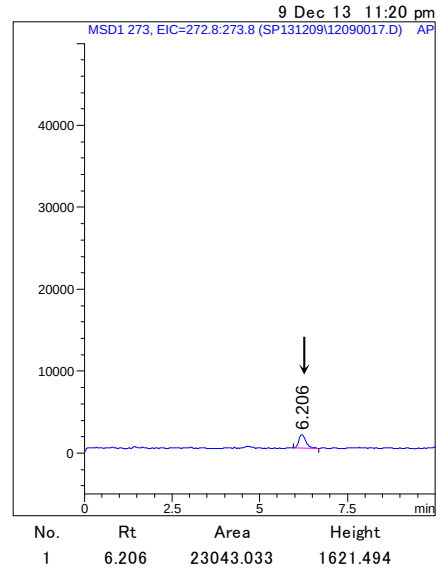
標準品 0.08ng



日植防高知 無処理
4mL/2μL/2g

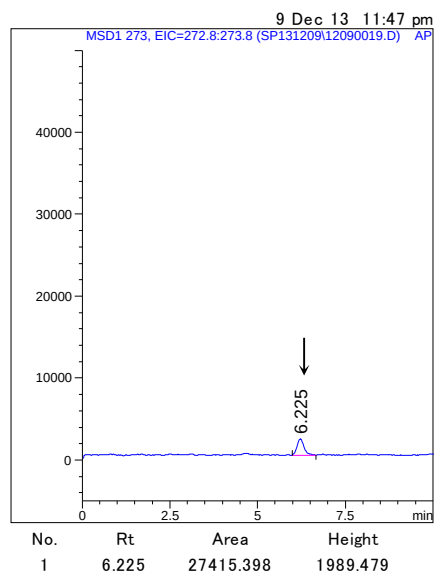


日植防高知 2 回処理 1 日後
4mL/2μL/2g

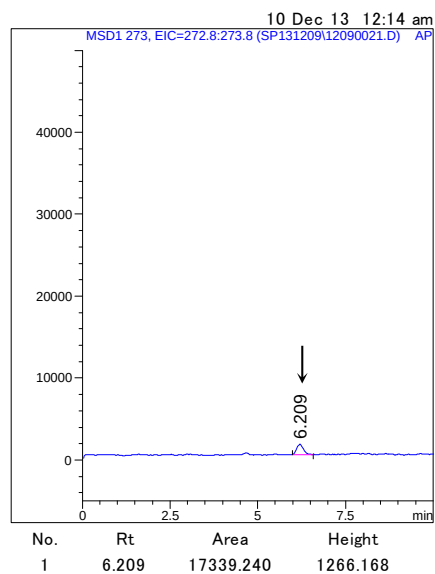


すいか 処理区 B (スピロメシフェン)

日植防高知 2 回処理 3 日後
4mL/2 μ L/2g

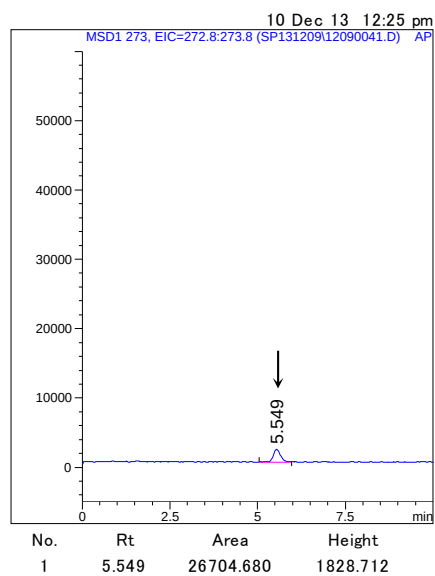


日植防高知 2 回処理 7 日後
4mL/2 μ L/2g

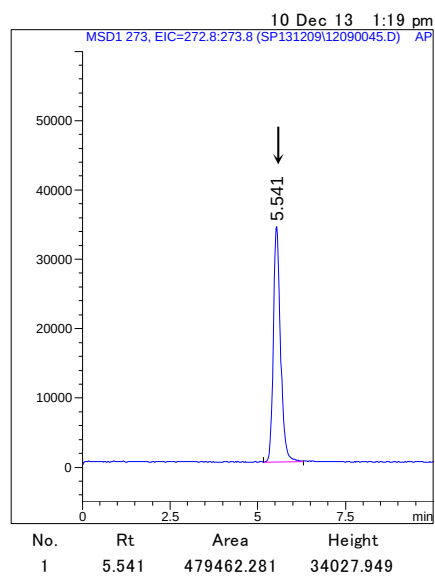


付図-2-2. スピロメシフェンエノール体のクロマトグラム

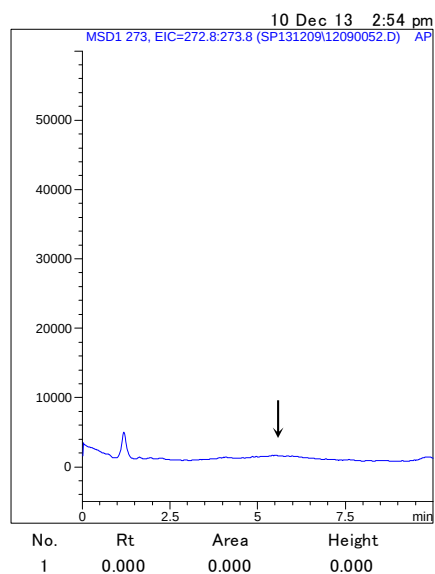
標準品 0.002ng



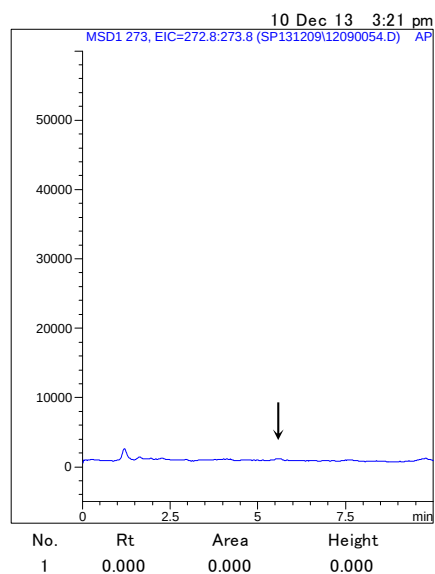
標準品 0.04ng



日植防高知 無処理
4mL/1μL/2g

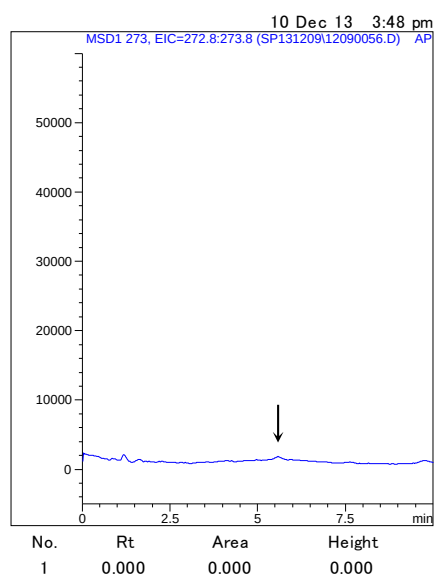


日植防高知 2回処理 1日後
4mL/1μL/2g

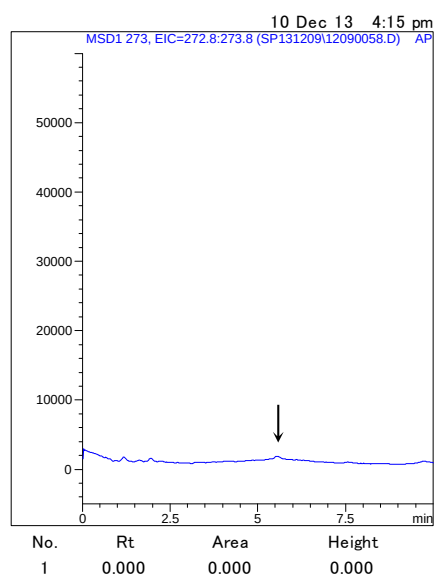


すいか 処理区 B (スピロメシフェン)

日植防高知 2 回処理 3 日後
4mL/1 μ L/2g



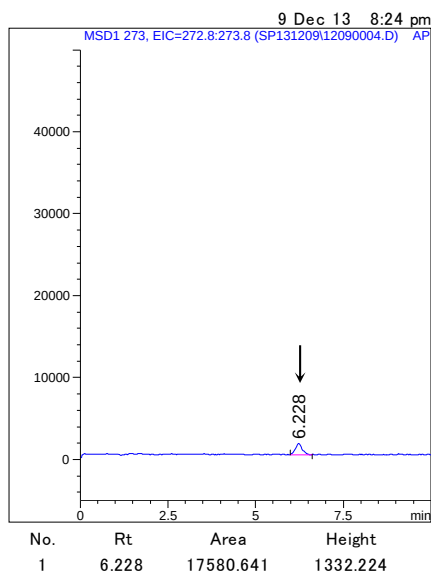
日植防高知 2 回処理 7 日後
4mL/1 μ L/2g



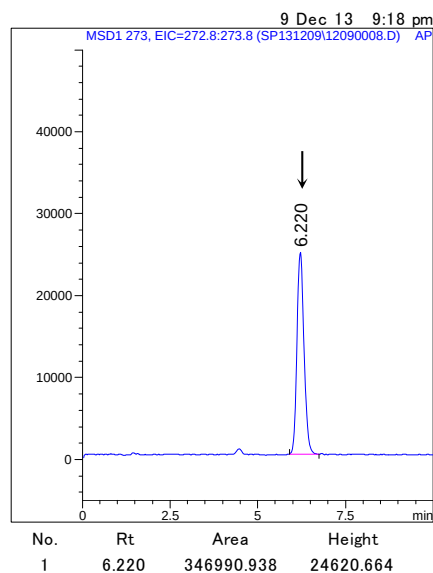
付図-3. 果実のクロマトグラム (代表例)

付図-3-1. スピロメシフェンのクロマトグラム

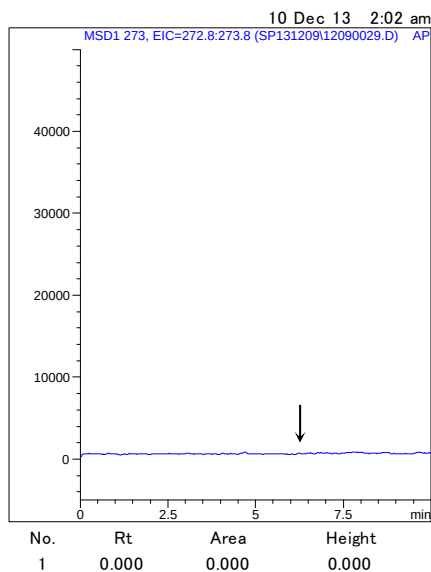
標準品 0.004ng



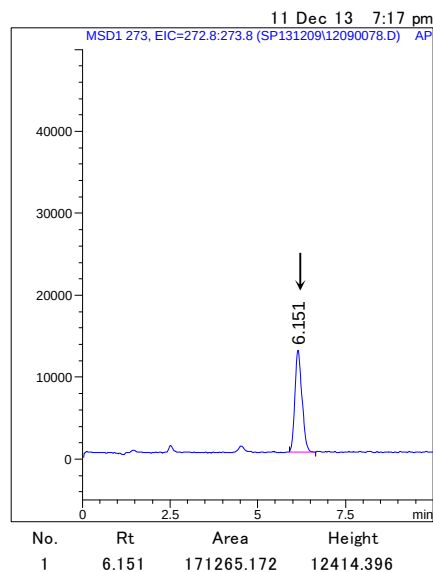
標準品 0.08ng



日植防高知 無処理
4mL/2μL/2g

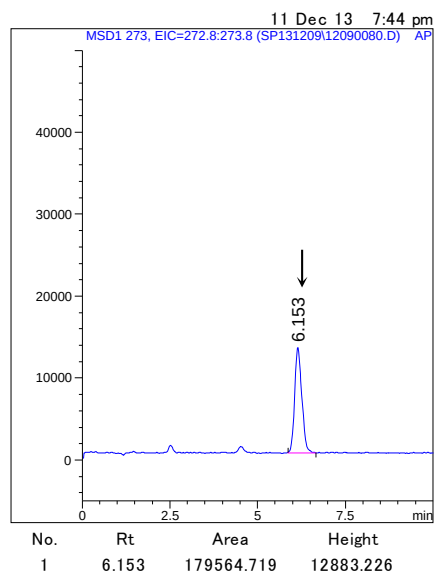


日植防高知 2回処理 1日後
12mL/2μL/2g

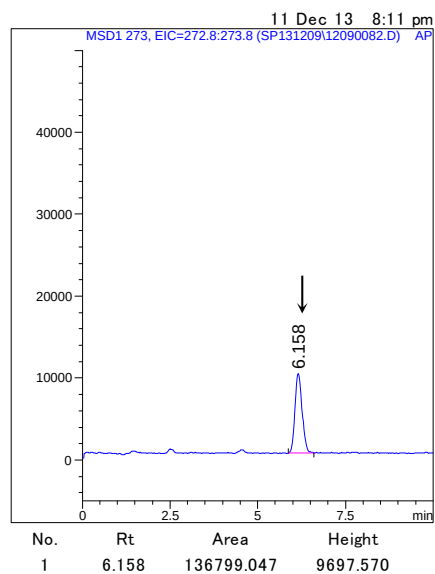


すいか 処理区 B (スピロメシフェン)

日植防高知 2 回処理 3 日後
12mL/2 μ L/2g

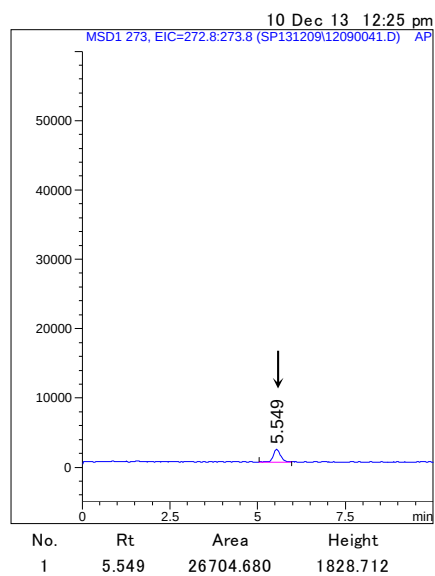


日植防高知 2 回処理 7 日後
12mL/2 μ L/2g

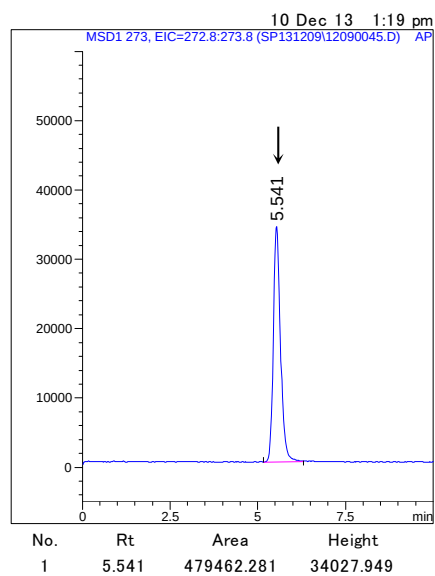


付図-3-2. スピロメシフェンエノール体のクロマトグラム

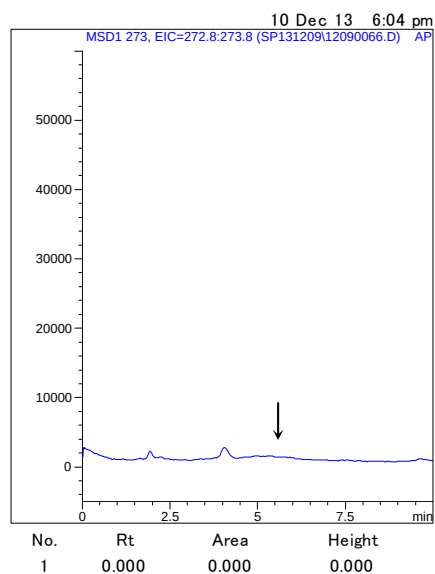
標準品 0.002ng



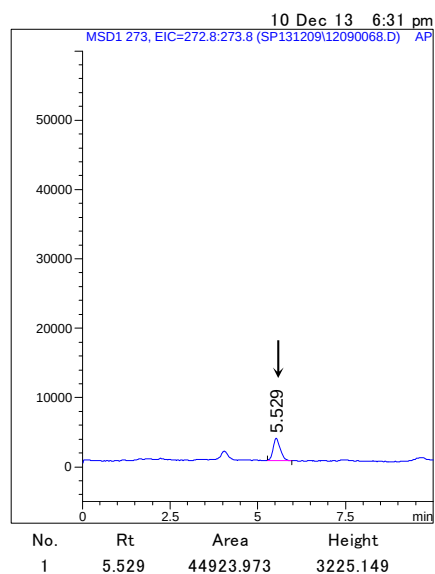
標準品 0.04ng



日植防高知 無処理
4mL/1μL/2g

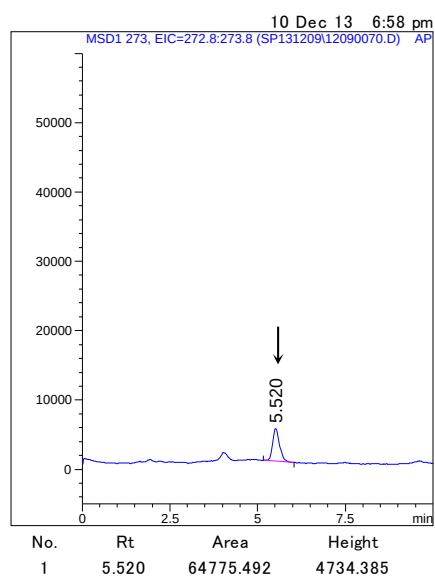


日植防高知 2回処理 1日後
4mL/1μL/2g

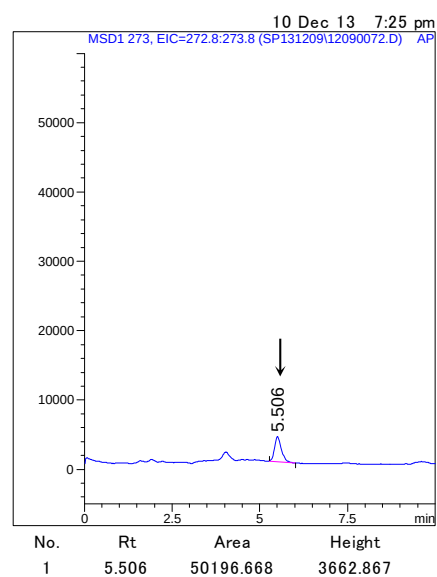


すいか 処理区 B (スピロメシフェン)

日植防高知 2 回処理 3 日後
4mL/1 μ L/2g



日植防高知 2 回処理 7 日後
4mL/1 μ L/2g



農薬登録における作物のグループ化・残留分析詳細②
アラニカルブ

1. 分析対象物質

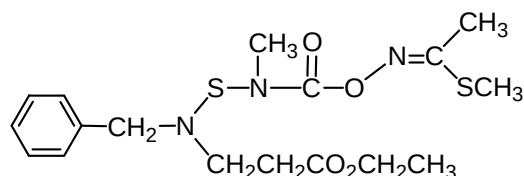
アラニカルブ

化学名： ethyl(*Z*)-*N*-benzyl-*N*-[[methyl(1-methylthioethylideneamino-oxycarbonyl)amino]thio]- β -alaninate

分子量： 399.5

分子式： $C_{17}H_{25}N_3O_4S_2$

構造式：



性 状： 結晶

融 点： 46.6-47.0℃

蒸気圧： $< 0.0047 \text{ mPa (20}^{\circ}\text{C)}$

分配係数： $\log \text{Pow} = 3.57 \pm 0.06$

溶解性： 水 29.6 mg/L (20°C)

トルエン，ジクロロメタン，メタノール，アセトン，酢酸エチル
 >1000 g/L (20℃)

安定性： 132℃で分解 中性及び弱塩基性で安定 酸性及び強塩基性で不安定

出 典 : The Pesticide Manual (16th Edition)

2. 標準品及び試薬

アラニカルブ標準品 : 純度 99.9 % (和光純薬工業製)

アセトニトリル : 高速液体クロマトグラフィー用 (関東化学製)

: 試薬特級 (和光純薬工業製)

トルエン : 残留農薬試験用 (和光純薬工業製)

アセトン : 試薬特級 (和光純薬工業製)

ヘキサシ : 試薬特級 (和光純薬工業製)

酢酸エチル : 試薬特級 (和光純薬工業製)

ギ酸 : 試薬特級 (和光純薬工業製)

塩化ナトリウム : 試薬特級 (和光純薬工業製)

水酸化ナトリウム : 試薬特級 (和光純薬工業製)

無水硫酸ナトリウム : 試薬特級 (和光純薬工業製)

リン酸二水素カリウム : 試薬特級 (関東化学製)

炭酸水素ナトリウム : 試薬特級 (和光純薬工業製)

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム

: InertSep Slim-J NH₂ 1000 mg (ジーエルサイエンス製)

GC/SAX/PSA ミニカラム : InertSep GC/SAX/PSA (500mg/500mg/500mg)

(ジーエルサイエンス製)

3. 装置及び機器

化学天秤 :	島津製作所製 AUW220
上皿天秤 :	メトラー・トレド製 PB8001-S/FACT
上皿天秤 :	メトラー・トレド製 MS6001S/02
上皿天秤 :	エー・アンド・ディ製 GF-2000
ミキサー :	ワーリング製 CB-15T
液体クロマトグラフ	質量分析計システム (LC-MS) :
	アジレント・テクノロジー製 6120
データ処理装置 :	アジレント・テクノロジー製 Open LAB

4. 液体クロマトグラフ・質量分析計の操作条件

4.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム :	Inertsil Ph-3 (ジーエルサイエンス製), 内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 5 μ m
溶離液 :	アセトニトリル/0.1% ギ酸溶液 (60:40, v/v)
流速 :	0.2 mL/min.
カラム温度 :	40 °C
試料注入量 :	2 μ L
保持時間 :	約 4.9 min.

4.2. 質量分析計

イオン化法 :	エレクトロスプレー(ESI), 正イオンモード
乾燥ガス温度 :	350 °C
乾燥ガス流量 :	12 L/min.
ネプライザー圧力 :	35 psi
フラグメンター電圧 :	100 V
キャピラリー電圧 :	3000 V
採取イオン :	SIM m/z 422.2

5. 検量線の作成

アラニカルブ標準品 20.0 mg (純度換算相当量) を精秤し, 100mL 容メスフラスコに移した。アセトニトリルを加えて溶解して 200 mg/L の標準原液を調製した。この原液をアセトニトリルで希釈して 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 mg/L の標準溶液を調製した。この 2 μ L を前記条件の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入し, データ処理装置を用いてアラニカルブのピーク高さを測定し, 横軸に重量 (ng), 縦軸にピーク高さをとって検量線を作成した。

6. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料は重量を量り、つるを除去した。無処理区試料は各々を縦に 8 分割し、対角の 2 つを取り合わせ、4 組の試料を作成した。そのうちの 2 組を果肉分析試料とし、残りの 2 組を果実分析試料とした。2 組の果肉分析試料は果肉と果皮の境目に沿って包丁を入れ果肉と果皮にわけた後、各々の重量を測定した。その 1 組の果肉全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なイミベンコナゾール、アラニカルブ及びチオファネートメチル分析用試料とし、さらに 3 分割して試料を 3 組作製し、各々添加剤を加えてミキサーで均一化した。2 組の果実分析試料のうち、1 組の全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なイミベンコナゾール、アラニカルブ及びチオファネートメチル分析用試料とし、さらに 3 分割して試料を 3 組作製し、各々添加剤を加えてミキサーで均一化した。

処理区試料は各々を縦に 8 分割し、対角の 2 つを取り合わせ、4 組の試料を作成した。そのうちの 2 組を果肉分析試料とし、残りの 2 組を果実分析試料とした。2 組の果肉分析試料は果肉と果皮の境目に沿って包丁を入れ果肉と果皮にわけた後、各々の重量を測定した。その 1 組の果肉全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なアラニカルブ及びチオファネートメチル分析用試料とし、さらに 2 分割して対角の 2 つを取り合わせ、試料を 2 組作製した。2 組の試料のうち、1 組の全量をアラニカルブ分析用試料として、残りの 1 組をチオファネートメチル分析用試料とし、各々添加剤を加えてミキサーで均一化した。2 組の果実分析試料のうち、1 組の全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なアラニカルブ及びチオファネートメチル分析用試料とし、さらに 2 分割して対角の 2 つを取り合わせ、試料を 2 組作製した。2 組の試料のうち、1 組の全量をアラニカルブ分析用試料として、残りの 1 組をチオファネートメチル分析用試料とし、各々添加剤を加えてミキサーで均一化した。

各々の試料は密封容器に入れて -20°C 以下で凍結保存した。また、量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比 (%) を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した試料*30 g (試料 20 g 相当量) を分液ロートに量りとり、アセトン 100 mL を加えて 30 分間振とう抽出した。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣をアセトン 50 mL で 2 回洗浄し、同様にろ過した。ろ液を合わせアセトンで 250 mL に定容した。

* 試料の前処理時、試料 1000g に対して 0.2 mol/L リン酸緩衝溶液 (pH8) **を 400g と飽和炭酸水素ナトリウム溶液を 100g 添加して、ミキサーで均一化した。

** 0.2 mol/L リン酸緩衝溶液 (pH8) :

リン酸二水素カリウム 13.61g を水に溶かして 500mL とした溶液 250mL と水酸化ナトリウム 4g を水にとかして 500mL とした溶液 231mL を混合し、水を加えて 1000mL とした。

6.1.3. 転溶

前項の定容液から 50mL (試料 4g 相当量) をナス型フラスコに分取し、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、溶媒を留去した。残留物を少量の水で分液ロートに移し、10%塩化ナトリウム溶液 70mL 及び酢酸エチル 100mL を加え 5 分間振とうした。静置分離後、酢酸エチル層は無水硫酸ナトリウムをのせたろ紙 (No.5A) を通過させ、脱水した。さらに酢酸エチル 50mL を加え、前記操作をくり返した後、酢酸エチル層を合わせ 40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。残留物は直ちにトルエン/アセトニトリル (25:75, v/v) 混液 5 mL で溶解した。

6.1.4. GC/SAX/PSA ミニカラムクロマトグラフィーによる精製

GC/SAX/PSA ミニカラムにトルエン/アセトニトリル (25:75, v/v) 混液 10mL を流下して前処理した。前項の溶解液を GC/SAX/PSA ミニカラムに流下した後、トルエン/アセトニトリル (25:75, v/v) 混液 20mL を流下し、全溶出液を取り、40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。残留物は直ちに酢酸エチル/アセトニトリル (10:90, v/v) 混液 5 mL で溶解した。

6.1.5. アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムクロマトグラフィーによる精製

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムに酢酸エチル 5 mL 及びヘキサン 10 mL を流下して前処理をした。前項の溶解液をアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムに流下した後、酢酸エチル/アセトニトリル (10:90, v/v) 混液 20mL を流下し、これらの流出液を捨てた。次に酢酸エチル/アセトニトリル (50:50, v/v) 混液 20mL を流下し、溶出液を取った。

6.1.6. 定量

前項の溶出液を 40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。残留物は直ちにアセトニトリルを用いて 4 mL に定容し、測定溶液とした。測定溶液は必要に応じてアセトニトリルで希釈した。

測定溶液の 2μL を 4.項の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入し、ピーク高さを求め、検量線よりアラニカルブの重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値 (LOQ) 及び検出限界値 (LOD)

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	定量限界 (ppm)
0.02	4	4	2	0.01
最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)
0.01	4	4	2	0.005

果肉、果実はいずれも同じ値

6.3. 回収率

分析法確認のため、市販品の果肉及び果実を用いて、0.01ppm (定量限界相当), 0.25ppm 及び 5ppm 添加濃度における回収試験を各 5 連分析で実施した。なお、試料 (市販品) は 2 連分析し、全て定量限界未満 (<0.01 ppm) であった。回収試験結果を表に示す。

6.3.1. 果肉の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
<u>アラニカルブ</u>								
市販品	5	97	89	89	87	85	89	5.1
市販品	0.25	98	94	90	90	86	92	5.0
市販品	0.01	85	82	76	73	70	77	8.1

6.3.2. 果実の回収率

試料	添加濃度 (ppm)		回収率 (%)			平均回収率 (%)		RSDr
<u>アラニカルブ</u>								
市販品	5	109	106	105	103	95	104	5.1
市販品	0.25	97	94	92	84	78	89	8.8
市販品	0.01	83	82	80	79	79	81	2.2

7. 精度管理

「食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について」（平成 9 年 4 月 1 日付け衛食第 117 号厚生省生活衛生局食品保健課長通知）に基づき、内部精度管理を行った。

管理基準：20 検体を超えるごとに、各 1 検体の無処理試料及び 0.1 ppm 添加試料（クォリティーコントロール試料）を分析した。

クォリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

また、2012 年 11 月実施の食品衛生精度管理比較調査（財団法人食品薬品安全センター）における Z スコアは全て Z<2 であった。

7.1. クォリティーコントロール試料分析結果

7.1.1. 果肉

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>アラニカルブ</u>	2013/8/9	日植防茨城	106	<0.01
	2013/8/14	日植防茨城	97	<0.01
	2013/8/16	日植防茨城	94	<0.01
	2013/8/20	日植防茨城	98	<0.01
	2013/11/12	日植防高知	104	<0.01
	2013/11/13	日植防高知	104	<0.01
	2013/11/15	日植防高知	104	<0.01
	2013/11/19	日植防高知	99	<0.01
	2013/6/20	日植防宮崎	85	<0.01
	2013/6/22	日植防宮崎	89	<0.01
	2013/6/26	日植防宮崎	92	<0.01

7.1.2. 果実

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>アラニカルブ</u>	2013/8/9	日植防茨城	106	<0.01
	2013/8/14	日植防茨城	98	<0.01
	2013/8/16	日植防茨城	94	<0.01
	2013/8/20	日植防茨城	98	<0.01
	2013/11/12	日植防高知	100	<0.01
	2013/11/13	日植防高知	100	<0.01
	2013/11/15	日植防高知	100	<0.01
	2013/11/19	日植防高知	98	<0.01
	2013/6/20	日植防宮崎	82	<0.01
	2013/6/22	日植防宮崎	92	<0.01
	2013/6/26	日植防宮崎	98	<0.01

8. マトリックス効果の確認

マトリックス標準溶液は、各圃場の無処理区試料の最終液量 1mL をナス型フラスコに分取し、窒素気流下で溶媒を留去した後、0.1mg/L の検量線溶液 1mL に溶解して調製した。マトリックス試料分析結果を表に示す。

8.1. 果肉

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>アラニカルブ</u>	日植防茨城	105
	日植防高知	100
	日植防宮崎	108

8.2. 果実

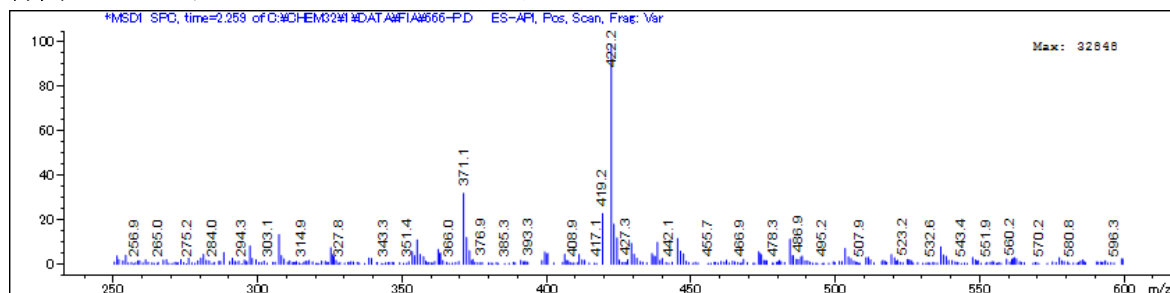
成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>アラニカルブ</u>	日植防茨城	106
	日植防高知	107
	日植防宮崎	108

9. 保存安定性試験

試料到着後直ちに分析を行ったため、保存安定性試験は実施しなかった。

付図-1. マススペクトル

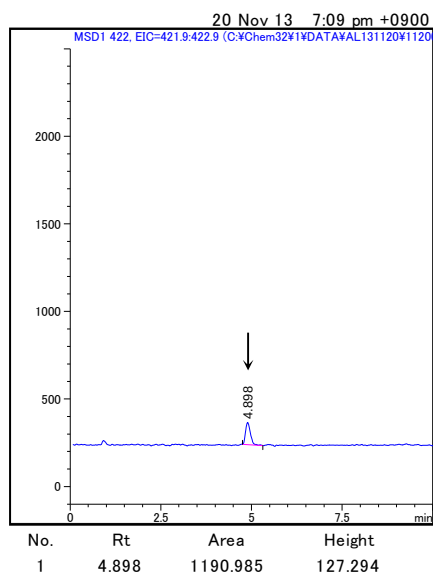
付図-1-1. アラニカルブのマススペクトル



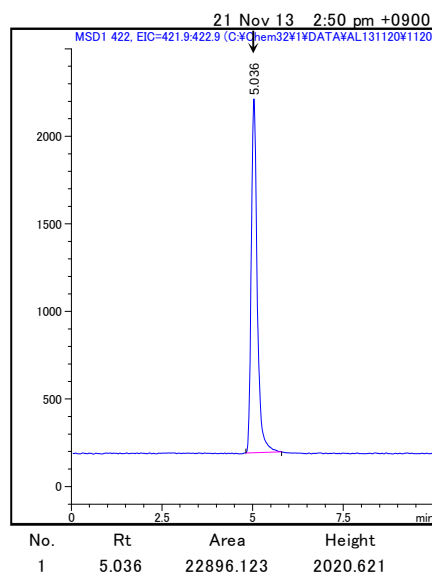
付図-2. 果肉のクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. アラニカルブのクロマトグラム

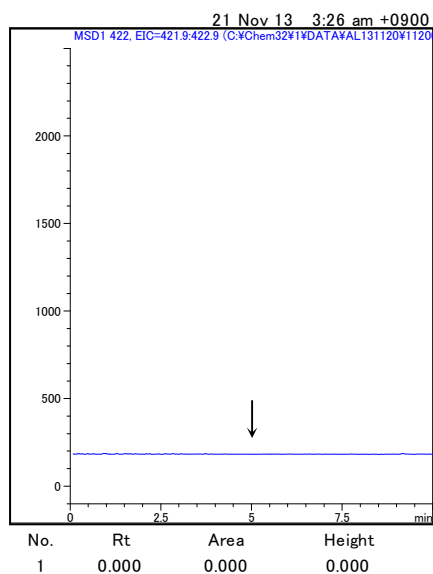
標準品 0.02ng



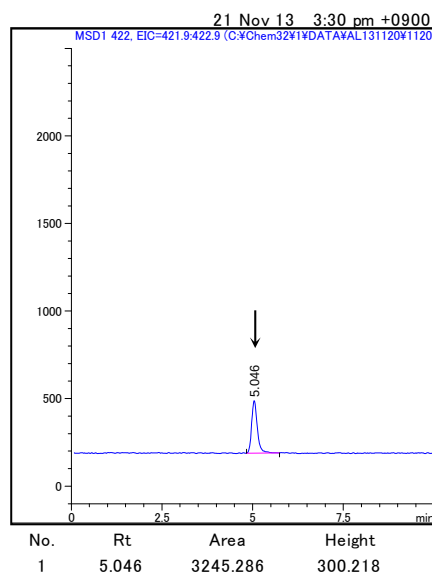
標準品 0.4ng



日植防高知 無処理
4mL/2μL/4g

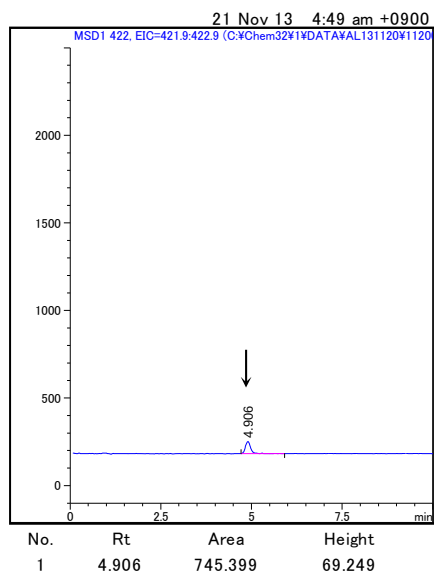


日植防高知 5回処理 1日後
4mL/2μL/4g

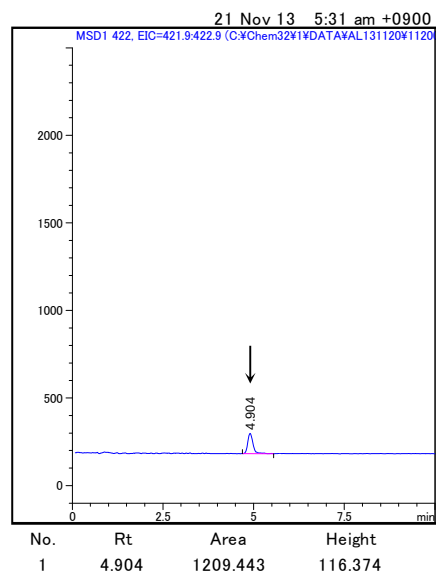


すいか 処理区 B (アラニカルブ)

日植防高知 5 回処理 3 日後
4mL/2 μ L/4g



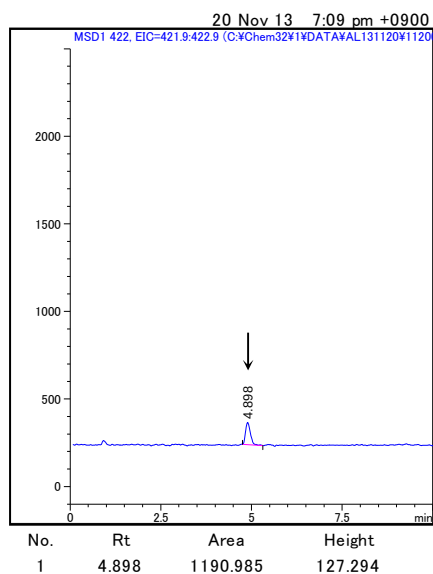
日植防高知 5 回処理 7 日後
4mL/2 μ L/4g



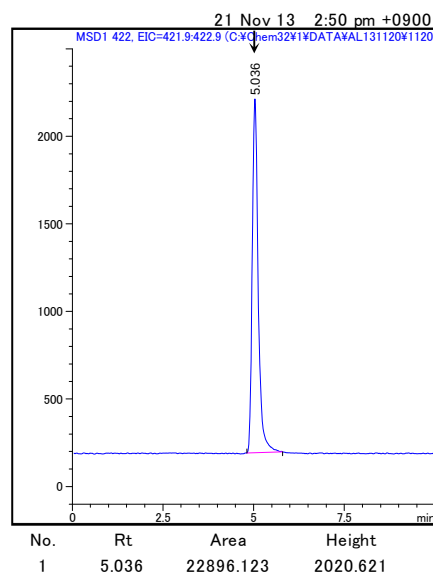
付図-3. 果実のクロマトグラム (代表例)

付図-3-1. アラニカルブのクロマトグラム

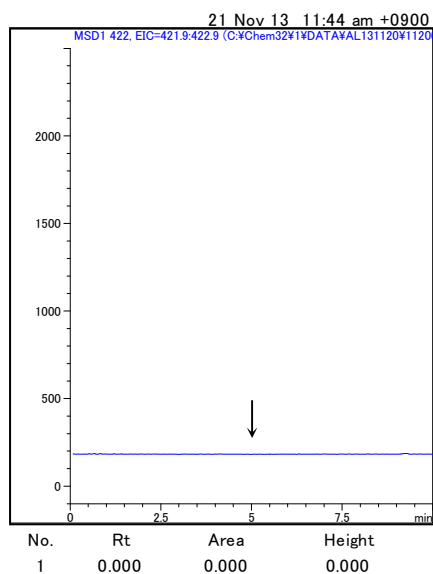
標準品 0.02ng



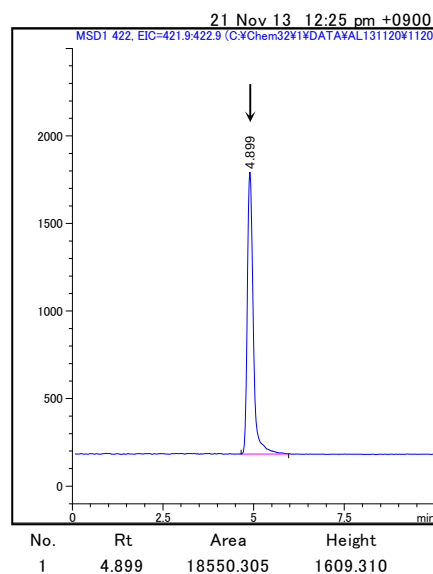
標準品 0.4ng



日植防高知 無処理
4mL/2μL/4g

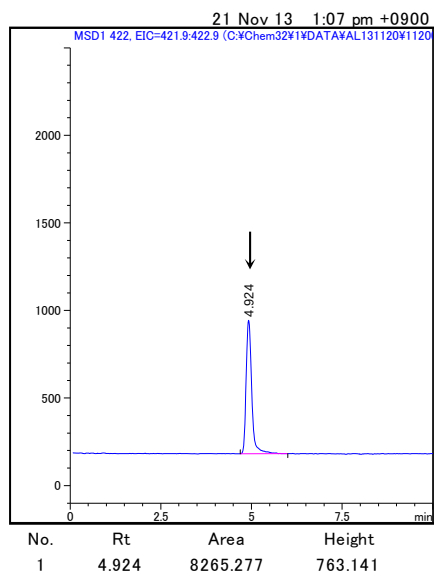


日植防高知 5回処理 1日後
4mL/2μL/4g

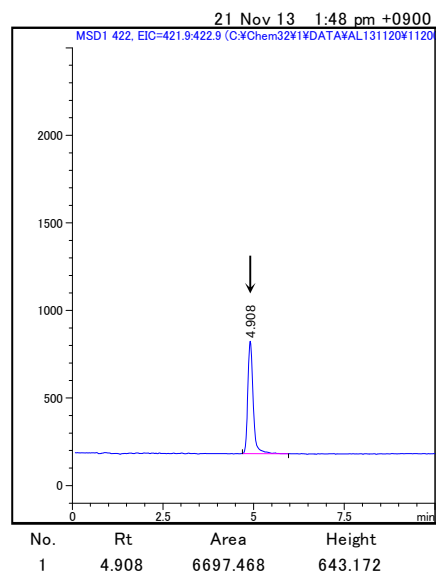


すいか 処理区 B (アラニカルブ)

日植防高知 5 回処理 3 日後
4mL/2 μ L/4g



日植防高知 5 回処理 7 日後
4mL/2 μ L/4g

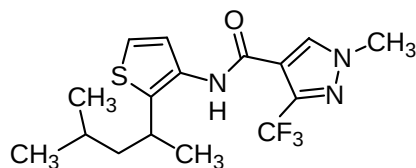


農薬登録における作物のグループ化・残留分析詳細③ ペンチオピラド

1. 分析対象物質

ペンチオピラド

化学名： (R*S*)-*N*-[2-(1,3-dimethylbutyl)-3-thienyl]-1-methyl-3-(trifluoromethyl)pyrazole-4-carboxamide
分子量： 359.4
分子式： C₁₆H₂₀F₃N₃OS
構造式：



性 状： 白色粉末
融 点： 152.7℃
蒸気圧： 6.43×10⁻³ mPa (25℃)
溶解性： 水 7.53 mg/L (20℃)
出 典： The Pesticide Manual (16th Edition)

2. 標準品及び試薬

ペンチオピラド標準品 : 純度 99.9 % (林純薬工業製)
アセトニトリル : 高速液体クロマトグラフィー用 (関東化学製)
アセトン : 試薬特級 (和光純薬工業製)
ヘキサン : 試薬特級 (和光純薬工業製)
ギ酸 : 試薬特級 (和光純薬工業製)
無水硫酸ナトリウム : 試薬特級 (和光純薬工業製)
塩化ナトリウム : 試薬特級 (和光純薬工業製)
グラファイトカーボンミニカラム :
Supelclean ENVI-Carb 500mg (SUPELCO 製)
アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム :
BOND ELUT JR-NH₂ 500mg (アジレント製)

3. 装置及び機器

化学天秤： 島津製作所製 AUW220
上皿天秤： メトラー・トレド製 PB8001-S/FACT
上皿天秤： メトラー・トレド製 MS6001S/02
上皿天秤： エー・アンド・ディ製 GF-2000

ミキサー：	ワーリング製 CB-15T
液体クロマトグラフ	質量分析計システム (LC-MS) ： アジレント・テクノロジー製 HP-1100
データ処理装置：	アジレント・テクノロジー製 Chem Station

4. 液体クロマトグラフ・質量分析計の操作条件

4.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム：	Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス製)， 内径 2.1 mm，長さ 100 mm，粒径 4 μ m
溶離液：	0.1%ギ酸溶液/アセトニトリル (30:70, v/v)
流速：	0.2 mL/min.
カラム温度：	40 $^{\circ}$ C
試料注入量：	1 μ L
保持時間：	約 4.0 min.

4.2. 質量分析計

イオン化法：	エレクトロスプレー(ESI)，正イオンモード
乾燥ガス温度：	350 $^{\circ}$ C
乾燥ガス流量：	12 L/min.
ネプライザー圧力：	35 psi
フラグメンター電圧：	70 v
キャピラリー電圧：	4000 v
採取イオン：	SIM m/z 360.0

5. 検量線の作成

ペンチオピラド標準品 20.0 mg (純度換算相当量) を精秤し， 100mL 容メスフラスコに移した。アセトニトリルを加えて溶解して 200 mg/L の標準原液を調製した。この原液をアセトニトリルで希釈して 0.0025, 0.005, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1 mg/L の標準溶液を調製した。この 1 μ L を前記条件の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入し，データ処理装置を用いてペンチオピラドのピーク高さを測定し，横軸に重量 (ng)，縦軸にピーク高さをもって検量線を作成した。

6. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料は重量を量り，つるを除去した。無処理区試料は各々を縦に 8 分割し，対角の 2 つを取り合わせ，4 組の試料を作成した。そのうちの 2 組を果肉分析試料とし，残りの 2 組を果実分析試料とした。2 組の果肉分析試料は果肉と果皮の境目に沿って包丁を入れ果肉と果皮にわけた後，各々の重量を測定した。その 1 組の果肉全量をミキサーで均

一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なイミベンコナゾール、アラニカルブ及びチオファネートメチル分析用試料とし、さらに 3 分割して試料を 3 組作製し、各々添加剤を加えてミキサーで均一化した。2 組の果実分析試料のうち、1 組の全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なイミベンコナゾール、アラニカルブ及びチオファネートメチル分析用試料とし、さらに 3 分割して試料を 3 組作製し、各々添加剤を加えてミキサーで均一化した。

処理区試料は各々を縦に 8 分割し、対角の 2 つを取り合わせ、4 組の試料を作成した。そのうちの 2 組を果肉分析試料とし、残りの 2 組を果実分析試料とした。2 組の果肉分析試料は果肉と果皮の境目に沿って包丁を入れ果肉と果皮にわけた後、各々の重量を測定した。その 1 組の果肉全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なアラニカルブ及びチオファネートメチル分析用試料とし、さらに 2 分割して対角の 2 つを取り合わせ、試料を 2 組作製した。2 組の試料のうち、1 組の全量をアラニカルブ分析用試料として、残りの 1 組をチオファネートメチル分析用試料とし、各々添加剤を加えてミキサーで均一化した。2 組の果実分析試料のうち、1 組の全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なアラニカルブ及びチオファネートメチル分析用試料とし、さらに 2 分割して対角の 2 つを取り合わせ、試料を 2 組作製した。2 組の試料のうち、1 組の全量をアラニカルブ分析用試料として、残りの 1 組をチオファネートメチル分析用試料とし、各々添加剤を加えてミキサーで均一化した。

各々の試料は密封容器に入れて -20°C 以下で凍結保存した。また、量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比 (%) を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した試料 20 g を分液ロートに量りとり、アセトン 100 mL を加えて 30 分間振とう抽出した。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣をアセトン 50 mL で 2 回洗浄し、同様にろ過した。ろ液を合わせアセトンで 250 mL に定容した。

6.1.3. 転溶

前項の定容液から 25mL (試料 2g 相当量) をナス型フラスコに分取し、 40°C 以下の水浴中で減圧濃縮し、溶媒を留去した。残留物を少量の水で分液ロートに移し、10%塩化ナトリウム溶液 100mL 及びヘキサン 80mL を加え 5 分間振とうした。静置分離後、ヘキサン層は無水硫酸ナトリウムをのせたらろ紙 (No.5A) を通過させ、脱水した。さらにヘキサン 80mL を加え、前記操作をくり返した後、ヘキサン層を合わせ 40°C 以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。残留物は直ちにアセトン 5mL で溶解した。

6.1.4. グラファイトカーボンミニカラムクロマトグラフィーによる精製

グラファイトカーボンミニカラムにアセトン 10mL を流下して前処理した。前項の溶解液をグラファイトカーボンミニカラムに流下した後、アセトン 15 mL を流下し、その全溶出液を取り、 40°C 以下の水浴中で約 2 mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。残留物は直ちにヘキサン 5 mL で溶解した。

6.1.5. アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムにヘキサン 10 mL を流下して前処理した。前項の溶解液をアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムに流下した後、アセトン/ヘキサン (10:90, v/v) 混液 10 mL を流下し、これらの流出液を捨てた。次にアセトン/ヘキサン (20:80, v/v) 混液 15 mL を流下し、溶出液を取った。

6.1.6. 定量

前項の溶出液を 40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。残留物は直ちにアセトニトリルを用いて 4 mL に定容し、測定溶液とした。測定溶液は必要に応じてアセトニトリルで希釈した。

測定溶液の 1 µL を 4.項の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入し、ピーク高さを求め、検量線よりペンチオピラドの重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値 (LOQ) 及び検出限界値 (LOD)

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (µL)	定量限界 (ppm)
0.005	2	4	1	0.01
最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (µL)	検出限界 (ppm)
0.0025	2	4	1	0.005

果肉、果実はいずれも同じ値

6.3. 回収率

分析法確認のため、市販品の果肉及び果実を用いて、0.01ppm (定量限界相当), 0.25ppm 及び 5ppm 添加濃度における回収試験を各 5 連分析で実施した。なお、試料 (市販品) は 2 連分析し、全て定量限界未満 (<0.01 ppm) であった。回収試験結果を表に示す。

6.3.1. 果肉の回収率

試料	添加濃度 (ppm)		回収率 (%)				平均回収率 (%)	RSDr
<u>ペンチオピラド</u>								
市販品	5	94	93	91	90	83	90	4.8
市販品	0.25	94	94	93	91	91	93	1.6
市販品	0.01	108	108	107	107	100	106	3.2

6.3.2. 果実の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
<u>ペンチオピラド</u>								
市販品	5	93	92	92	91	88	91	2.1
市販品	0.25	96	94	93	91	91	93	2.3
市販品	0.01	108	107	106	106	104	106	1.4

7. 精度管理

「食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について」（平成 9 年 4 月 1 日付け衛食第 117 号厚生省生活衛生局食品保健課長通知）に基づき、内部精度管理を行った。

管理基準：20 検体を超えるごとに、各 1 検体の無処理試料及び 0.1 ppm 添加試料（クォリティーコントロール試料）を分析した。

クォリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

また、2012 年 11 月実施の食品衛生精度管理比較調査（財団法人食品薬品安全センター）における Z スコアは全て Z<2 であった。

7.1. クォリティーコントロール試料分析結果

7.1.1. 果肉

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>ペンチオピラド</u>	2013/8/23	日植防茨城	94	<0.01
	2013/9/9	日植防茨城	96	<0.01
	2013/11/22	日植防高知	88	<0.01
	2013/12/24	日植防高知	98	<0.01
	2013/8/26	日植防宮崎	92	<0.01
	2013/9/9	日植防宮崎	100	<0.01

7.1.2. 果実

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>ペンチオピラド</u>	2013/8/23	日植防茨城	94	<0.01
	2013/9/9	日植防茨城	98	<0.01
	2013/11/22	日植防高知	88	<0.01
	2013/12/24	日植防高知	92	<0.01
	2013/8/26	日植防宮崎	89	<0.01
	2013/9/9	日植防宮崎	100	<0.01

8. マトリックス効果の確認

マトリックス標準溶液は、各圃場の無処理区試料の最終液量 1mL をナス型フラスコに分取し、窒素気流下で溶媒を留去した後、0.1mg/L の検量線溶液 1mL に溶解して調製した。マトリックス試料分析結果を表に示す。

8.1. 果肉

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>ペンチオピラド</u>	日植防茨城	100
	日植防高知	96
	日植防宮崎	101

8.2. 果実

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>ペンチオピラド</u>	日植防茨城	100
	日植防高知	91
	日植防宮崎	98

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料に化合物を添加し、 -20°C 以下で凍結保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を評価した。保存安定性試験の結果を表に示す。

9.1. 果肉の保存安定性試験結果

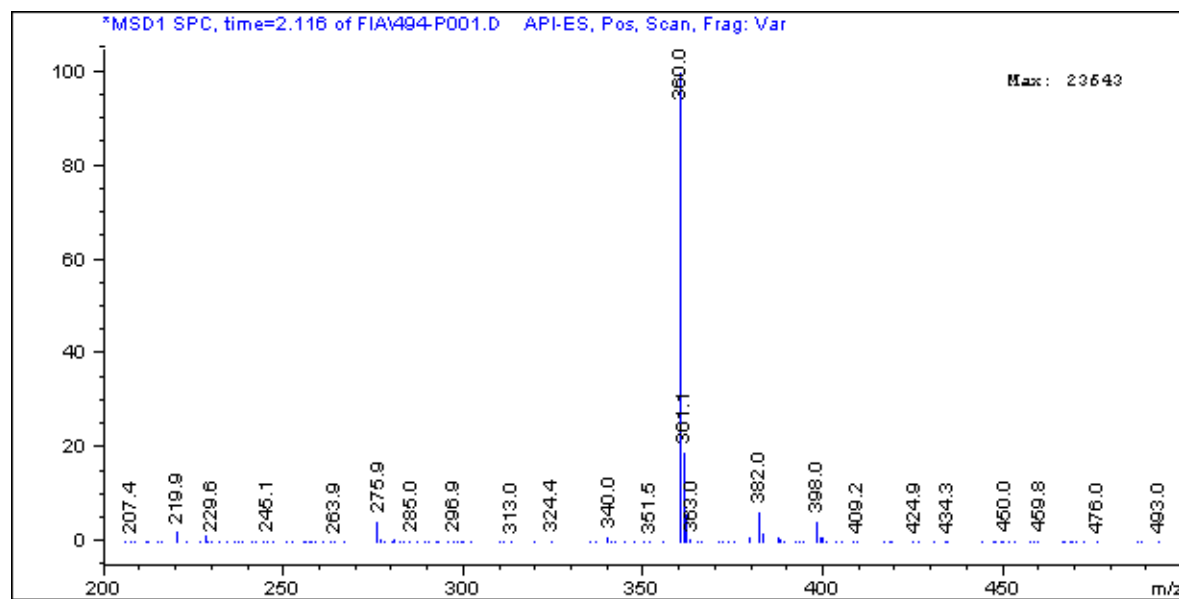
添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	31 (13/8/9 - 13/9/9)	96	93
	日植防高知	41 (13/11/13 - 13/12/24)	92	91
	日植防宮崎	81 (13/6/20 - 13/9/9)	97	96

9.2. 果実の保存安定性試験結果

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	31 (13/8/9 - 13/9/9)	97	97
	日植防高知	41 (13/11/13 - 13/12/24)	86	85
	日植防宮崎	81 (13/6/20 - 13/9/9)	93	90

付図-1. マススペクトル

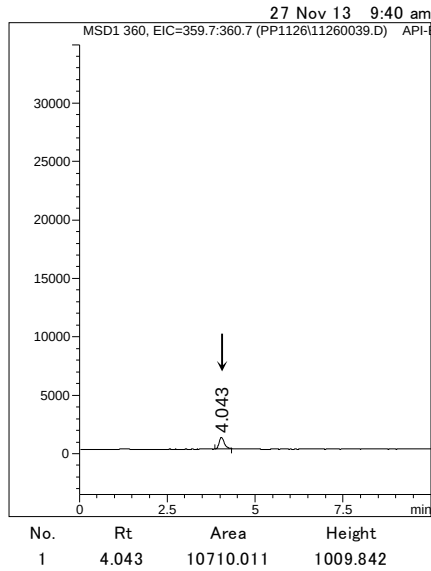
付図-1-1. ペンチオピラドのマススペクトル



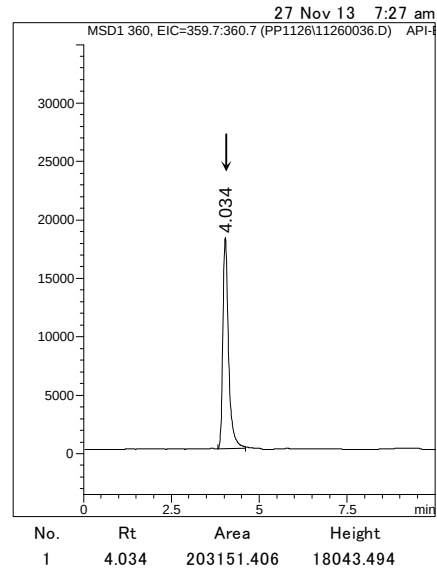
付図-2. 果肉のクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. ペンチオピラドのクロマトグラム

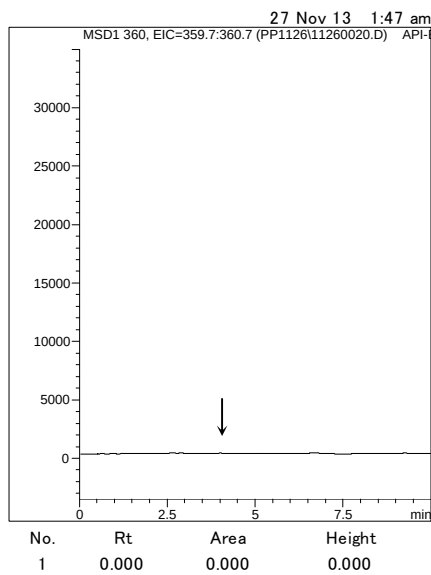
標準品 0.005ng



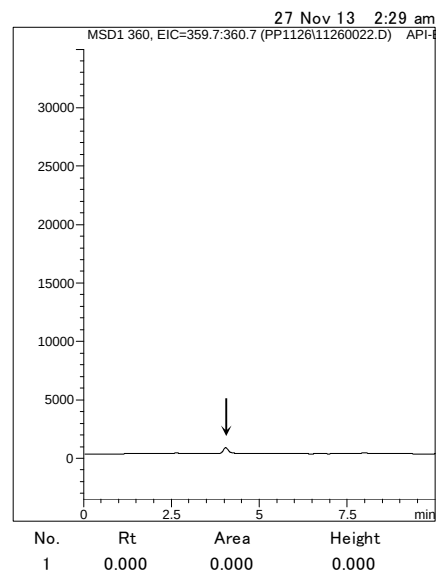
標準品 0.1ng



日植防高知 無処理
4mL/1 μ L/2g

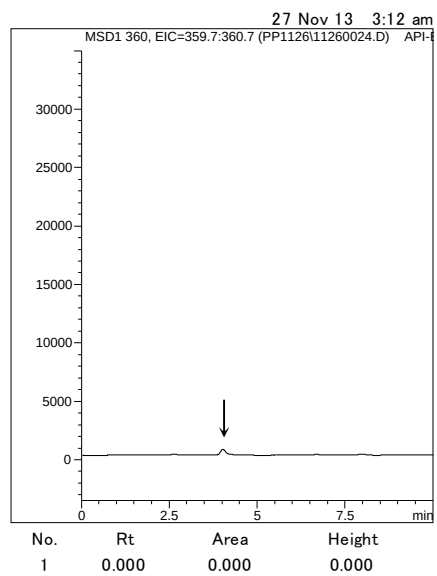


日植防高知 3回処理 1日後
4mL/1 μ L/2g

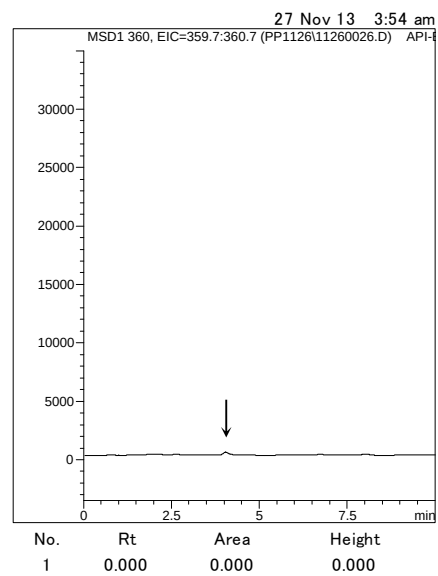


すいか 処理区 B (ペンチオピラド)

日植防高知 3 回処理 3 日後
4mL/1 μ L/2g



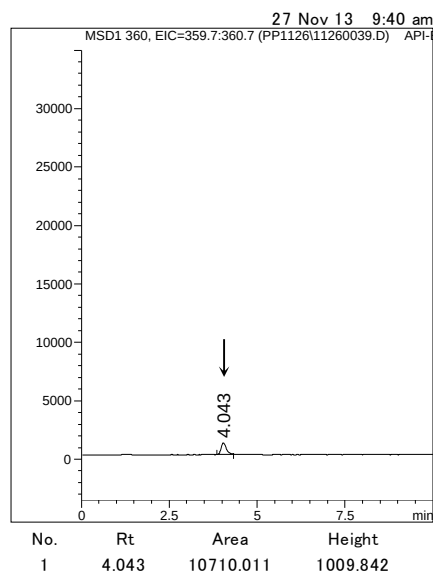
日植防高知 3 回処理 7 日後
4mL/1 μ L/2g



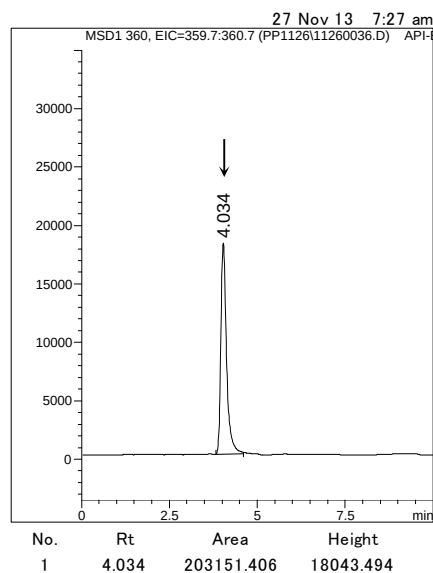
付図-3. 果実のクロマトグラム (代表例)

付図-3-1. ペンチオピラドのクロマトグラム

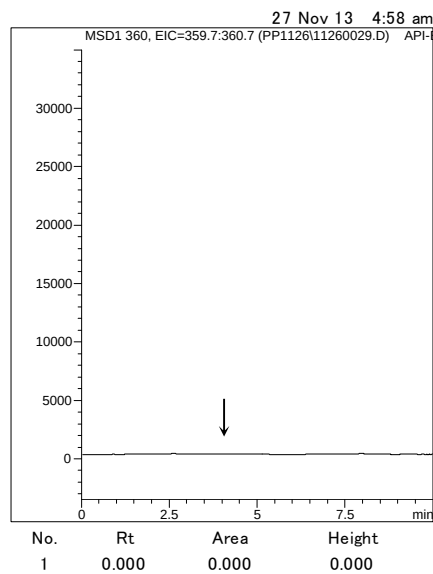
標準品 0.005ng



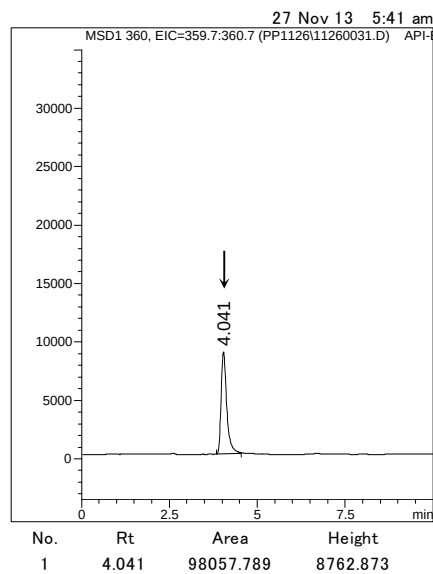
標準品 0.1ng



日植防高知 無処理
4mL/1μL/2g

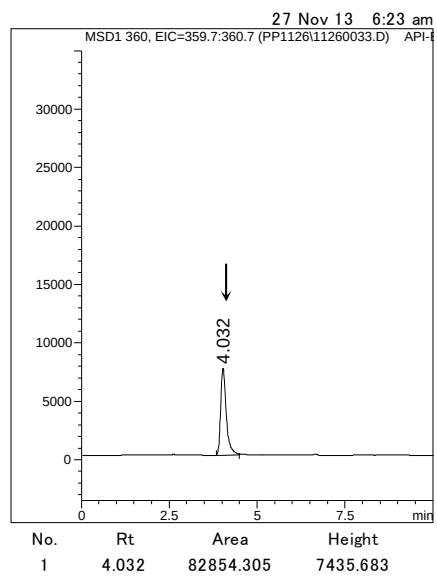


日植防高知 3 回処理 1 日後
4mL/1μL/2g

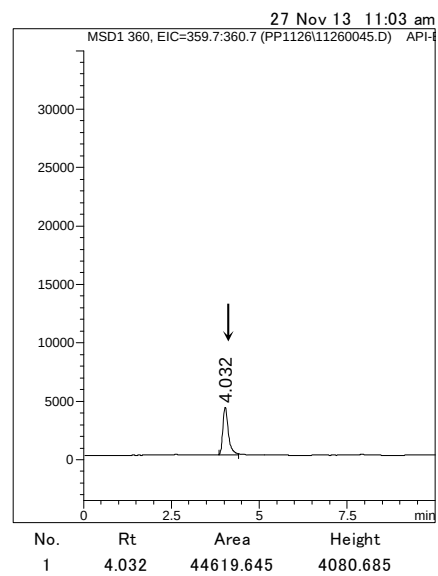


すいか 処理区 B (ペンチオピラド)

日植防高知 3 回処理 3 日後
4mL/1 μ L/2g



日植防高知 3 回処理 7 日後
4mL/1 μ L/2g

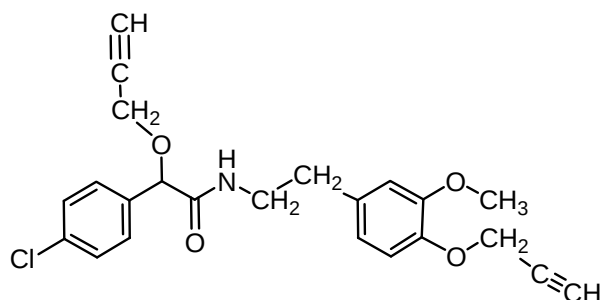


農薬登録における作物のグループ化・残留分析詳細④
マンジプロパミド

1. 分析対象物質

マンジプロパミド

化学名 : (R*S*)-2-(4-chlorophenyl)-*N*-[3-methoxy-4-(prop-2-ynyloxy)phenethyl]-2-(prop-2-ynyloxy)acetamide
分子量 : 411.9
分子式 : C₂₃H₂₂ClNO₄
構造式 :



性 状 : 淡いベージュ粉末
融 点 : 96.4-97.3℃
蒸気圧 : < 9.4 × 10⁻⁴ mPa (25℃)
分配係数 : log Pow = 3.2
溶解性 : 水 4.2 mg/L (25℃)
n-ヘキサン 0.042, n-オクタノール 4.8, トルエン 29, メタノール 66, 酢酸エチル 120, アセトン 300, ジクロロメタン 400 (以上 g/L, 25℃)
安定性 : pH4-9 で加水分解に対して安定
出 典 : The Pesticide Manual (16th Edition)

2. 標準品及び試薬

マンジプロパミド標準品 : 純度 99.0 % (Sigma-Aldrich)
アセトニトリル : 高速液体クロマトグラフィー用 (関東化学製)
アセトニトリル : 試薬特級 (和光純薬工業製)
ヘキサン : 試薬特級 (和光純薬工業製)
ギ酸 : 試薬特級 (和光純薬工業製)
酢酸エチル : 試薬特級 (和光純薬工業製)
トルエン : 残留農薬試験用 (和光純薬工業製)
無水硫酸ナトリウム : 試薬特級 (和光純薬工業製)
塩化ナトリウム : 試薬特級 (和光純薬工業製)
GC/SAX/PSA ミニカラム : InertSep GC/SAX/PSA (500mg/500mg/500mg)
(ジーエルサイエンス製)

3. 装置及び機器

化学天秤：	島津製作所製 AUW220
上皿天秤：	メトラー・トレド製 PB8001-S/FACT
上皿天秤：	メトラー・トレド製 MS6001S/02
上皿天秤：	エー・アンド・ディ製 GF-2000
ミキサー：	ワーリング製 CB-15T
液体クロマトグラフ	質量分析計システム (LC-MS) ： アジレント・テクノロジー製 HP-1100
データ処理装置：	アジレント・テクノロジー製 Chem Station

4. 液体クロマトグラフ・質量分析計の操作条件

4.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム：	Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス製), 内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒径 4 μ m
溶離液：	0.1%ギ酸溶液/アセトニトリル (50:50 v/v)
流速：	0.2 mL/min.
カラム温度：	40 °C
試料注入量：	1 μ L
保持時間：	約 8.9 min.

4.2. 質量分析計

イオン化法：	エレクトロスプレー(ESI), 正イオンモード
乾燥ガス温度：	350 °C
乾燥ガス流量：	12 L/min.
ネプライザー圧力：	35 psi
フラグメンター電圧：	120 v
キャピラリー電圧：	4000 v
採取イオン：	SIM m/z 412.1

5. 検量線の作成

マンジプロパミド標準品 20.0 mg (純度換算相当量) を精秤し, 100mL 容メスフラスコに移した。アセトニトリルを加えて溶解して 200 mg/L の標準原液を調製した。この原液をアセトニトリルで希釈して 0.002, 0.004, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 mg/L の標準溶液を調製した。この 1 μ L を前記条件の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入し, データ処理装置を用いてマンジプロパミドのピーク高さを測定し, 横軸に重量 (ng), 縦軸にピーク高さをとって検量線を作成した。

6. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料は重量を量り、つるを除去した。無処理区試料は各々を縦に 8 分割し、対角の 2 つを取り合わせ、4 組の試料を作成した。そのうちの 2 組を果肉分析試料とし、残りの 2 組を果実分析試料とした。2 組の果肉分析試料は果肉と果皮の境目に沿って包丁を入れ果肉と果皮にわけた後、各々の重量を測定した。その 1 組の果肉全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なイミベンコナゾール、アラニカルブ及びチオフアネートメチル分析用試料とし、さらに 3 分割して試料を 3 組作製し、各々添加剤を加えてミキサーで均一化した。2 組の果実分析試料のうち、1 組の全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なイミベンコナゾール、アラニカルブ及びチオフアネートメチル分析用試料とし、さらに 3 分割して試料を 3 組作製し、各々添加剤を加えてミキサーで均一化した。

処理区試料は各々を縦に 8 分割し、対角の 2 つを取り合わせ、4 組の試料を作成した。そのうちの 2 組を果肉分析試料とし、残りの 2 組を果実分析試料とした。2 組の果肉分析試料は果肉と果皮の境目に沿って包丁を入れ果肉と果皮にわけた後、各々の重量を測定した。その 1 組の果肉全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なアラニカルブ及びチオフアネートメチル分析用試料とし、さらに 2 分割して対角の 2 つを取り合わせ、試料を 2 組作製した。2 組の試料のうち、1 組の全量をアラニカルブ分析用試料として、残りの 1 組をチオフアネートメチル分析用試料とし、各々添加剤を加えてミキサーで均一化した。2 組の果実分析試料のうち、1 組の全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なアラニカルブ及びチオフアネートメチル分析用試料とし、さらに 2 分割して対角の 2 つを取り合わせ、試料を 2 組作製した。2 組の試料のうち、1 組の全量をアラニカルブ分析用試料として、残りの 1 組をチオフアネートメチル分析用試料とし、各々添加剤を加えてミキサーで均一化した。

各々の試料は密封容器に入れて -20°C 以下で凍結保存した。また、量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比 (%) を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した試料 20 g を分液ロートに量りとり、アセトニトリル 100 mL を加えて 30 分間振とう抽出した。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣をアセトニトリル 50 mL で 2 回洗浄し、同様にろ過した。ろ液を合せアセトニトリルで 250 mL に定容した。

6.1.3. 転溶

前項の定容液から 20 mL (試料 1.6 g 相当量) を分液ロートに分取し、10%塩化ナトリウム溶液 80 mL 及び酢酸エチル/ヘキサン (50:50, v/v) 混液 80 mL を加え 5 分間振とうした。静置分離後、有機溶媒層は無水硫酸ナトリウムをのせたるろ紙 (No.5A) を通過させ、脱水した。さらに酢酸エチル/ヘキサン (50:50, v/v) 混液 80 mL を加え、前記操作をくり返した後、有機溶媒層を合わせ 40°C 以下の水浴中で約 2 mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。残留物は直ちにトルエン/アセトニトリル (25:75, v/v) 混液 5 mL で溶解した。

6.1.4. GC/SAX/PSA ミニカラムクロマトグラフィーによる精製

GC/SAX/PSA ミニカラムにトルエン/アセトニトリル (25:75, v/v) 混液 10mL を流下して前処理した。前項の溶解液を GC/SAX/PSA ミニカラムに流下した後、トルエン/アセトニトリル (25:75, v/v) 混液 30 mL を流下し、その全溶出液を取った。

6.1.5. 定量

前項の溶出液を 40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。残留物は直ちにアセトニトリルを用いて 4 mL に定容し、測定溶液とした。測定溶液は必要に応じてアセトニトリルで希釈した。

測定溶液の 1 μ L を 4.項の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入し、ピーク高さを求め、検量線よりマンジプロパミドの重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値 (LOQ) 及び検出限界値 (LOD)

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μ L)	定量限界 (ppm)
0.004	1.6	4	1	0.01

最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μ L)	検出限界 (ppm)
0.002	1.6	4	1	0.005

果肉、果実はいずれも同じ値

6.3. 回収率

分析法確認のため、市販品の果肉及び果実を用いて、0.01ppm (定量限界相当), 0.25ppm 及び 5ppm 添加濃度における回収試験を各 5 連分析で実施した。なお、試料 (市販品) は 2 連分析し、全て定量限界未満 (<0.01 ppm) であった。回収試験結果を表に示す。

6.3.1. 果肉の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
<u>マンジプロパミド</u>								
市販品	5	99	98	96	95	89	95	4.1
市販品	0.25	103	103	102	102	100	102	1.2
市販品	0.01	101	98	96	96	93	97	3.0

6.3.2. 果実の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
マンジプロパミド								
市販品	5	92	91	91	90	90	91	0.9
市販品	0.25	95	94	94	93	92	94	1.2
市販品	0.01	101	98	97	95	91	96	3.9

7. 精度管理

「食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について」（平成 9 年 4 月 1 日付け衛食第 117 号厚生省生活衛生局食品保健課長通知）に基づき、内部精度管理を行った。

管理基準：20 検体を超えるごとに、各 1 検体の無処理試料及び 0.1 ppm 添加試料（クォリティーコントロール試料）を分析した。

クォリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

また、2012 年 11 月実施の食品衛生精度管理比較調査（財団法人食品薬品安全センター）における Z スコアは全て Z<2 であった。

7.1. クォリティーコントロール試料分析結果

7.1.1. 果肉

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>マンジプロパミド</u>	2013/8/23	日植防茨城	96	<0.01
	2013/9/9	日植防茨城	98	<0.01
	2013/12/4	日植防高知	98	<0.01
	2013/12/24	日植防高知	94	<0.01
	2013/8/10	日植防宮崎	92	<0.01
	2013/8/23	日植防宮崎	92	<0.01

7.1.2. 果実

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>マンジプロパミド</u>	2013/8/23	日植防茨城	99	<0.01
	2013/9/9	日植防茨城	100	<0.01
	2013/12/4	日植防高知	93	<0.01
	2013/12/24	日植防高知	86	<0.01
	2013/8/10	日植防宮崎	95	<0.01
	2013/8/23	日植防宮崎	94	<0.01

8. マトリックス効果の確認

マトリックス標準溶液は、各圃場の無処理区試料の最終液量 1mL をナス型フラスコに分取し、窒素気流下で溶媒を留去した後、0.1mg/L の検量線溶液 1mL に溶解して調製した。マトリック試料分析結果を表に示す。

8.1. 果肉

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>マンジプロパミド</u>	日植防茨城	100
	日植防高知	95
	日植防宮崎	101

8.2. 果実

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>マンジプロパミド</u>	日植防茨城	102
	日植防高知	97
	日植防宮崎	102

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料に化合物を添加し、-20℃以下で凍結保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を評価した。保存安定性試験の結果を表に示す。

9.1. 果肉の保存安定性試験結果

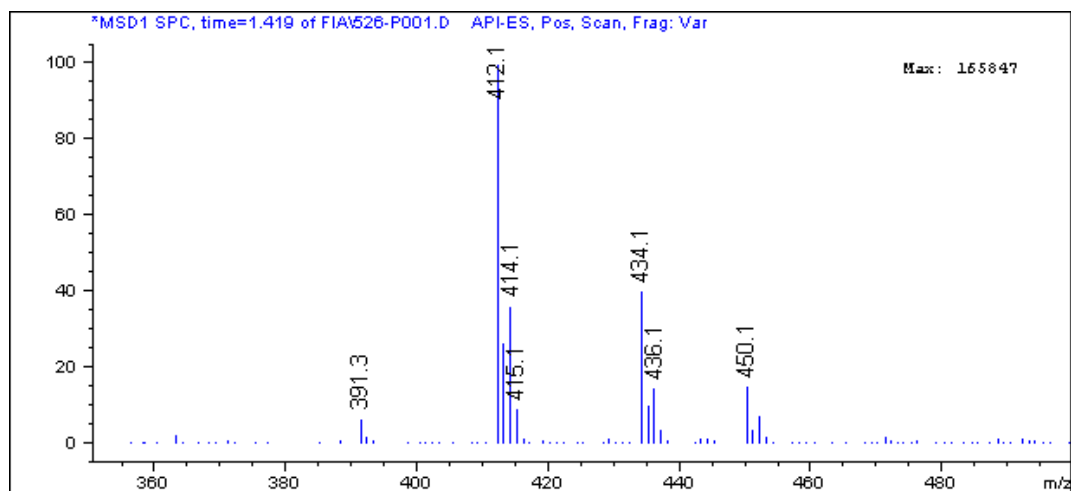
添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	31 (13/8/9 - 13/9/9)	94	92
	日植防高知	41 (13/11/13 - 13/12/24)	86	86
	日植防宮崎	64 (13/6/20 - 13/8/23)	91	88

9.2. 果実の保存安定性試験結果

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	31 (13/8/9 - 13/9/9)	92	90
	日植防高知	41 (13/11/13 - 13/12/24)	83	80
	日植防宮崎	64 (13/6/20 - 13/8/23)	94	87

付図-1. マススペクトル

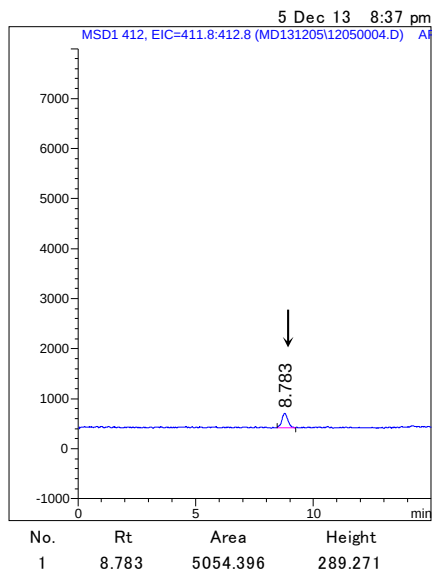
付図-1-1. マンジプロパミドのマススペクトル



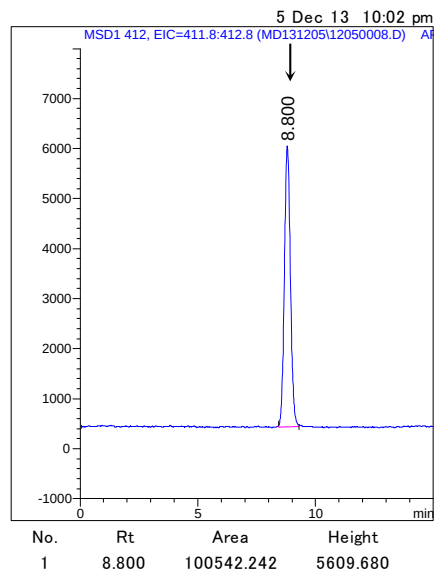
付図-2. 果肉のクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. マンジプロパミドのクロマトグラム

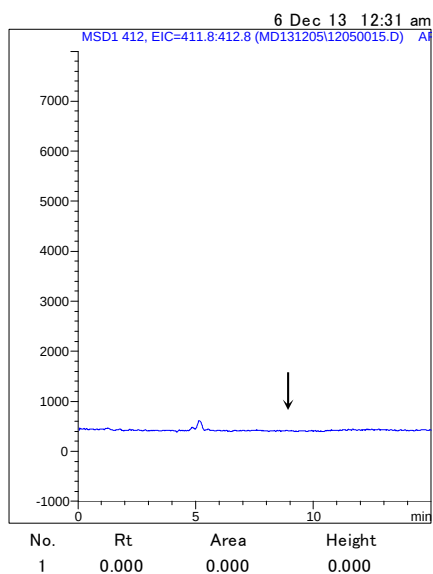
標準品 0.004ng



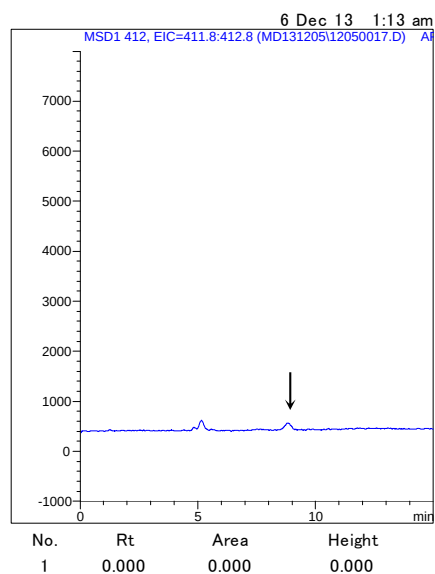
標準品 0.08ng



日植防高知 無処理
4mL/1 μ L/1.6g

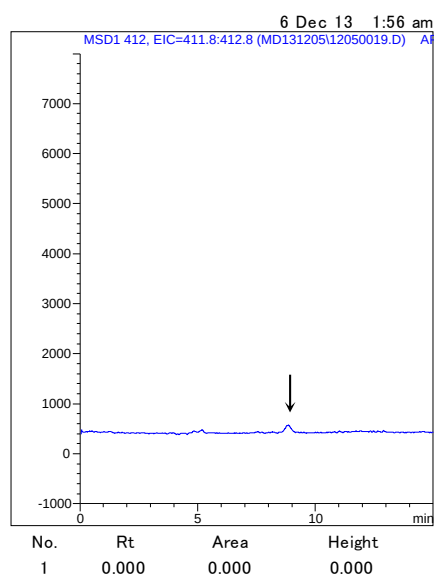


日植防高知 2回処理 1日後
4mL/1 μ L/1.6g

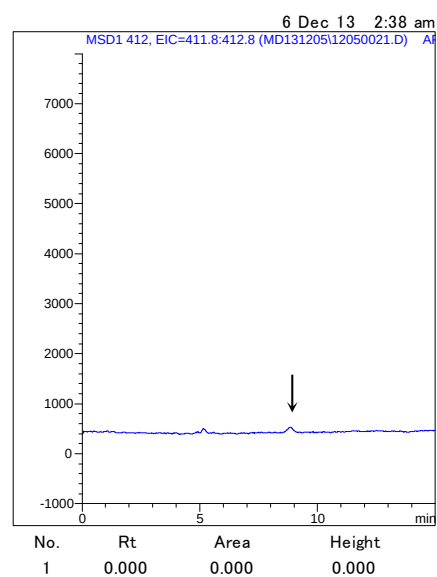


すいか 処理区 B (マンジプロパミド)

日植防高知 2 回処理 3 日後
4mL/1 μ L/1.6g



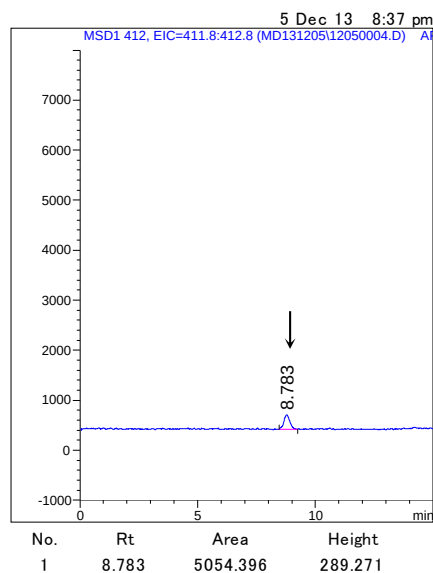
日植防高知 2 回処理 7 日後
4mL/1 μ L/1.6g



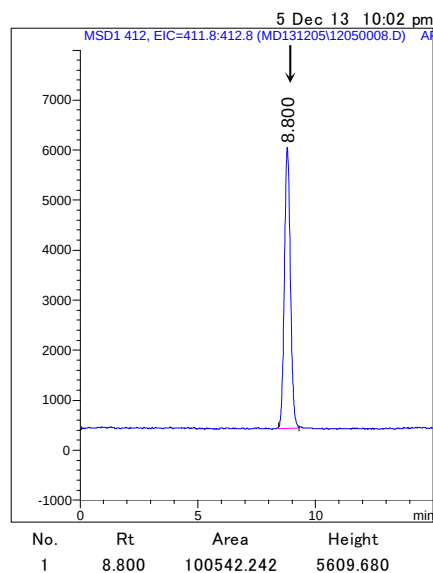
付図-3. 果実のクロマトグラム (代表例)

付図-3-1. マンジプロパミドのクロマトグラム

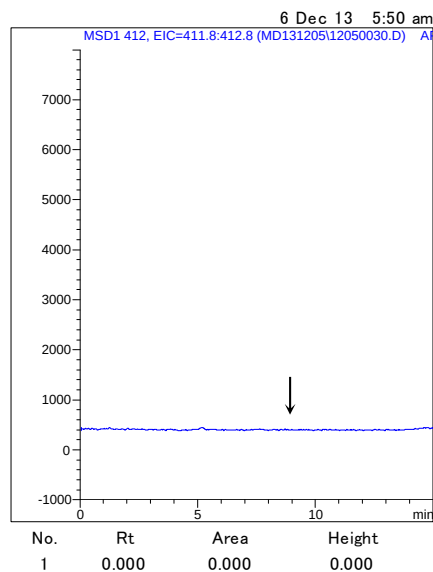
標準品 0.004ng



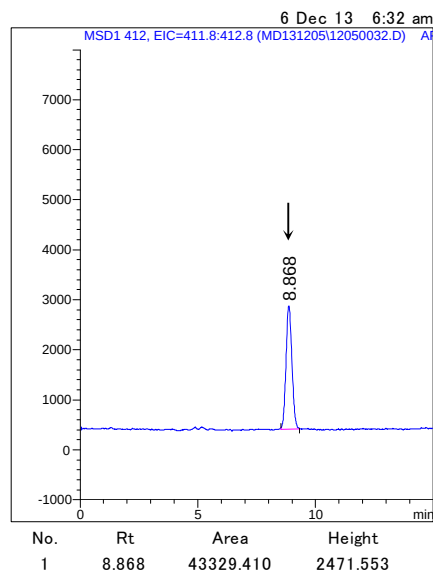
標準品 0.08ng



日植防高知 無処理
4mL/1 μ L/1.6g

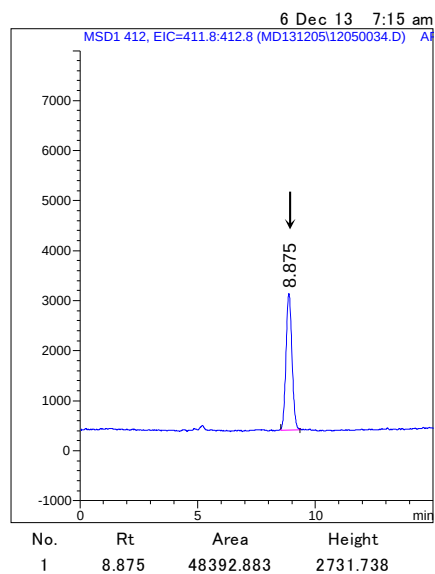


日植防高知 2 回処理 1 日後
4mL/1 μ L/1.6g

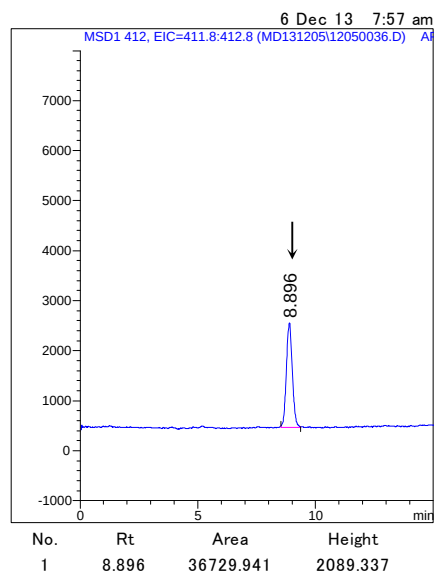


すいか 処理区 B (マンジプロパミド)

日植防高知 2 回処理 3 日後
4mL/1 μ L/1.6g



日植防高知 2 回処理 7 日後
4mL/1 μ L/1.6g



農薬登録における作物のグループ化・残留分析詳細⑤
チオファネートメチル (カルベンダジム)

1. 分析対象物質

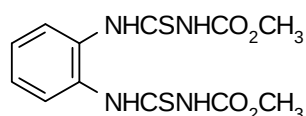
チオファネートメチル

化学名 : dimethyl 4,4'-(*o*-phenylene)bis(3-thioallophanate)

分子量 : 342.4

分子式 : $C_{12}H_{14}N_4O_4S_2$

構造式 :



性 状 : 無色結晶

融 点 : 165℃

蒸気圧 : 0.0095 mPa (25℃)

分配係数 : log Pow = 1.44

溶解性 : 水 0.0224 (pH4), 0.0221 (pH5), 0.0207 (pH6), 0.0185 (pH7)

0.0168 (pH7.5) (以上 g/L, 20℃)

アセトン 29, メタノール 6, アセトニトリル 13 (以上 g/L, 25℃)

酢酸エチル 7.21 g/L (23℃)

安定性 : 水溶液中 酸性溶液中で安定 (室温) アルカリ性溶液中で不安定

半減期 24.5 時間 (pH9, 22℃)

出 典 : The Pesticide Manual (16th Edition)

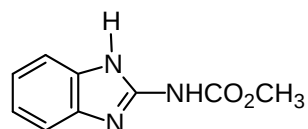
カルベンダジム

化学名 : methyl benzimidazol-2-ylcarbamate

分子量 : 191.2

分子式 : $C_9H_9N_3O_2$

構造式 :



性 状 : 結晶性粉末

融 点 : 302-307℃

蒸気圧 : 0.09 mPa (20℃), 0.15 mPa (25℃), 1.3 mPa (50℃)

分配係数 : log Pow = 1.38 (pH5), 1.51 (pH7), 1.49 (pH9)

溶解性 : 水 29 mg/L (pH4), 8 mg/L (pH7), 7 mg/L (pH8) (20℃)

DMF 5, アセトン 0.3, エタノール 0.3, クロロホルム 0.1,

酢酸エチル 0.135, ジクロロメタン 0.068, ベンゼン 0.036,

シクロヘキサン <0.01, ジエチルエーテル <0.01, ヘキサン 0.0005
(以上 g/L, 24℃)

安定性 : 融点で分解 50℃以下で少なくとも 2 年間は安定
アルカリ性溶液中でゆっくりと分解 (22℃)
半減期 >350 日 (pH5, pH7), 124 日 (pH9)

出典 : The Pesticide Manual (16th Edition)

2. 標準品及び試薬

チオファネートメチル標準品

: 純度 99.9 % (和光純薬工業製)

カルベンダジム標準品

: 純度 99.9 % (和光純薬工業製)

メタノール

: 高速液体クロマトグラフィー用 (和光純薬工業製)

: 試薬特級 (和光純薬工業製)

アセトン

: 試薬特級 (和光純薬工業製)

ヘキサン

: 試薬特級 (和光純薬工業製)

ギ酸

: 試薬特級 (和光純薬工業製)

酢酸エチル

: 試薬特級 (和光純薬工業製)

塩化ナトリウム

: 試薬特級 (和光純薬工業製)

水酸化ナトリウム

: 試薬特級 (和光純薬工業製)

リン酸二水素カリウム

: 試薬特級 (関東化学製)

リン酸水素二ナトリウム

: 試薬特級 (関東化学製)

L-アスコルビン酸ナトリウム

: 鹿特級 (関東化学製)

シリカゲルミニカラム

: InertSep Slim-J SI 1000mg (ジーエルサイエンス製)

3. 装置及び機器

化学天秤 :

島津製作所製 AUW220

上皿天秤 :

メトラー・トレド製 PB8001-S/FACT

上皿天秤 :

メトラー・トレド製 MS6001S/02

上皿天秤 :

エー・アンド・ディ製 GF-2000

ミキサー :

ワーリング製 CB-15T

(日植防茨城試料)

液体クロマトグラフ

質量分析計システム (LC-MS) :

アジレント・テクノロジー製 HP-1100

データ処理装置 :

アジレント・テクノロジー製 Chem Station

(日植防高知及び日植防宮崎試料)

液体クロマトグラフ

・質量分析計システム (LC-MS/MS) :

アジレント・テクノロジー製 HP-1100

アプライドバイオシステムズジャパン製 API2000

データ処理装置 :

アプライドバイオシステムズジャパン製 Analyst

4. 液体クロマトグラフ・質量分析計の操作条件

4.1. 液体クロマトグラフ・質量分析計 (日植防茨城試料)

4.1.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム :	Unison UK-C18 (インタクト製), 内径 2.0 mm, 長さ 75 mm, 粒径 3 μ m
溶離液 :	0.1%ギ酸溶液/メタノール (80:20, v/v)
流速 :	0.2 mL/min.
カラム温度 :	40℃
試料注入量 :	2 μ L
保持時間 :	約 3.9min.

4.1.2. 質量分析計

イオン化法 :	エレクトロスプレー(ESI), 正イオンモード
乾燥ガス温度 :	350℃
乾燥ガス流量 :	12L/min.
ネプライザー圧力 :	35psi
フラグメンター電圧 :	120v
キャピラリー電圧 :	4000v
採取イオン :	SIM m/z 192.1

4.2. 液体クロマトグラフ・質量分析計 (日植防高知及び日植防宮崎試料)

4.2.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム :	Unison UK-C18 (インタクト製), 内径 2.0 mm, 長さ 75 mm, 粒径 3 μ m
溶離液 :	0.1%ギ酸溶液/メタノール (80:20, v/v)
流速 :	0.2 mL/min.
カラム温度 :	40 °C
試料注入量 :	1 μ L
保持時間 :	約 3.5 min.

4.2.2. 質量分析計

イオン化法 :	エレクトロスプレー(ESI), 正イオンモード
Ion Source Gas 1 :	50 psi
Ion Source Gas 2 :	50 psi (400℃)
IonSpray voltage :	5500 V
Declustering Potential :	46 V
Collision Energy :	25 V
採取イオン :	Q1Mass m/z 192.1 , Q3Mass m/z 160.1

注) 日植防高知及び日植防宮崎の無処理試料を 4.1 項の測定条件で測定した結果, カルベンダジムの保持時間に妨害物質ピークを確認したため, 4.2.項の測定条件に変更し測定を行った。

5. 検量線の作成

カルベンダジム標準品 20.0 mg (純度換算相当量) を精秤し、100mL 容メスフラスコに移した。メタノールを加えて溶解して 200 mg/L の標準原液を調製した。この原液をメタノール/水 (50:50, v/v) 混液で希釈して 0.0025, 0.005, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1 mg/L の標準溶液を調製した。日植防茨城試料はこの 2 μ L を 4.1.項の条件の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入し、データ処理装置を用いてカルベンダジムのピーク高さを測定し、横軸に重量 (ng)、縦軸にピーク高さをもって検量線を作成した。日植防高知及び日植防宮崎試料はこの 1 μ L を 4.2.項の条件の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入し、データ処理装置を用いてカルベンダジムのピーク高さを測定し、横軸に重量 (ng)、縦軸にピーク高さをもって検量線を作成した。

6. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料は重量を量り、つるを除去した。無処理区試料は各々を縦に 8 分割し、対角の 2 つを取り合わせ、4 組の試料を作成した。そのうちの 2 組を果肉分析試料とし、残りの 2 組を果実分析試料とした。2 組の果肉分析試料は果肉と果皮の境目に沿って包丁を入れ果肉と果皮にわけた後、各々の重量を測定した。その 1 組の果肉全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なイミベンコナゾール、アラニカルブ及びチオファネートメチル分析用試料とし、さらに 3 分割して試料を 3 組作製し、各々添加剤を加えてミキサーで均一化した。2 組の果実分析試料のうち、1 組の全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なイミベンコナゾール、アラニカルブ及びチオファネートメチル分析用試料とし、さらに 3 分割して試料を 3 組作製し、各々添加剤を加えてミキサーで均一化した。

処理区試料は各々を縦に 8 分割し、対角の 2 つを取り合わせ、4 組の試料を作成した。そのうちの 2 組を果肉分析試料とし、残りの 2 組を果実分析試料とした。2 組の果肉分析試料は果肉と果皮の境目に沿って包丁を入れ果肉と果皮にわけた後、各々の重量を測定した。その 1 組の果肉全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なアラニカルブ及びチオファネートメチル分析用試料とし、さらに 2 分割して対角の 2 つを取り合わせ、試料を 2 組作製した。2 組の試料のうち、1 組の全量をアラニカルブ分析用試料として、残りの 1 組をチオファネートメチル分析用試料とし、各々添加剤を加えてミキサーで均一化した。2 組の果実分析試料のうち、1 組の全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なアラニカルブ及びチオファネートメチル分析用試料とし、さらに 2 分割して対角の 2 つを取り合わせ、試料を 2 組作製した。2 組の試料のうち、1 組の全量をアラニカルブ分析用試料として、残りの 1 組をチオファネートメチル分析用試料とし、各々添加剤を加えてミキサーで均一化した。

各々の試料は密封容器に入れて -20°C 以下で凍結保存した。また、量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比 (%) を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した試料*21 g (試料 20 g 相当量) を分液ロートに量りとり、メタノール 100 mL を加えて 30 分間振とう抽出した。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣をメタノール 50 mL で 2 回洗浄し、同様にろ過した。ろ液を合せメタノールで 250 mL に定容した。

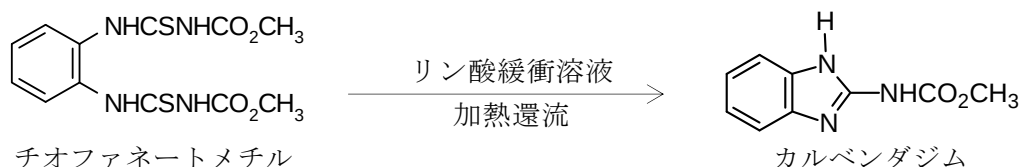
* 試料の前処理時、試料 100g に対して L-アスコルビン酸ナトリウムを 5g の割合で添加して、ミキサーで均一化した。

6.1.3. 閉環反応

前項の定容液から 50 mL (試料 4 g 相当量) をナス型フラスコに分取し、30℃以下の水浴中で減圧濃縮し、メタノールを留去した。残留物に 0.2 mol/L リン酸緩衝溶液*10 mL を加え密栓し、100℃の乾燥器中で 2 時間 30 分加熱反応させた。

* リン酸二水素カリウム 7.54 g とリン酸水素二ナトリウム 6.84 g に水を加えて 1 L とした。

〔閉環反応〕



6.1.3. 転溶

前項の反応液を放冷後、少量の水を用いて分液ロートに移し、10%塩化ナトリウム溶液 50 mL 及び酢酸エチル 50 mL を加え 5 分間振とうした。静置分離後、酢酸エチル層を分液ロートに移し、水層にさらに酢酸エチル 50 mL を加え、前記操作をくり返した後、酢酸エチル層にヘキサン 30 mL を加え 1 分間振とうした。静置分離後、有機溶媒層は液層分離ろ紙 (1PS) を通過させ、脱水し、40℃以下の水浴中で約 2 mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。残留物は直ちにアセトン/ヘキサン (10:90, v/v) 混液 5 mL で溶解した。

6.1.4. シリカゲルミニカラムクロマトグラフィーによる精製

シリカゲルミニカラムにアセトン/ヘキサン (10:90, v/v) 混液 10 mL を流下して前処理した。前項の溶解液をシリカゲルミニカラムに流下した後、アセトン/ヘキサン (10:90, v/v) 混液 20 mL を流下し、これらの溶出液捨てた。次にアセトン/ヘキサン (40:60, v/v) 混液、30 mL を流下し、その全溶出液を取った。

6.1.5. 定量

前項の溶出液を 40℃以下の水浴中で約 2 mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。残留物は直ちにメタノールを用いて 4 mL に定容し、測定溶液とした。測定溶液は必要に応じてメタノールで希釈した。

日植防茨城試料は測定溶液の 2 μL を 4.1.項の条件の高速液体クロマトグラフ質量分析計に、日植防高知及び日植防宮崎試料は測定溶液の 1 μL を 4.2.項の条件の高速液体クロマトグラフ質量分析計にそれぞれ注入し、ピーク高さを求め、検量線よりカルベンダジム

すいか 処理区 B (チオファネートメチル)

の重量を求め、換算係数 1.79*を乗じて試料中のチオファネートメチルの残留濃度を算出した。

$$* \text{換算係数} = \frac{\text{チオファネートメチル分子量}}{\text{カルベンダジム分子量}} = \frac{342.4}{191.2} = 1.79$$

6.2. 定量限界値 (LOQ) 及び検出限界値 (LOD)

6.2.1. チオファネートメチル

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	換算係数	定量限界 (ppm)
<u>日植防茨城</u>					
0.01	4	4	2	1.79	0.01
<u>日植防高知及び日植防宮崎</u>					
0.005	4	4	1	1.79	0.01
最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	換算係数	検出限界 (ppm)
<u>日植防茨城</u>					
0.005	4	4	2	1.79	0.005
<u>日植防高知及び日植防宮崎</u>					
0.0025	4	4	1	1.79	0.005

果肉，果実はいずれも同じ値

6.2.2. カルベンダジム

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	定量限界 (ppm)
<u>日植防茨城</u>				
0.01	4	4	2	0.005
<u>日植防高知及び日植防宮崎</u>				
0.005	4	4	1	0.005
最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)
<u>日植防茨城</u>				
0.005	4	4	2	0.003
<u>日植防高知及び日植防宮崎</u>				
0.0025	4	4	1	0.003

果肉，果実はいずれも同じ値

6.3. 回収率

分析法確認のため、市販品の果肉及び果実を用いて、0.01ppm (定量限界相当), 0.25ppm 及び 5ppm 添加濃度における回収試験を各 5 連分析で実施した。なお、試料 (市販品) は 2 連分析し、全て定量限界未満 (<0.01 ppm) であった。回収試験結果を表に示す。

6.3.1. 果肉の回収率**6.3.1.1. 日植防茨城**

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
<u>チオファネートメチル</u>								
市販品	5	74	74	74	72	72	73	1.5
市販品	0.25	78	77	77	77	76	77	0.9
市販品	0.01	76	70	70	64	63	69	7.6
<u>カルベンダジム</u>								
市販品	5	87	85	85	85	84	85	1.3
市販品	0.25	88	85	82	81	80	83	3.9
市販品	0.005	73	73	72	71	66	71	4.1

6.3.1.2. 日植防高知及び日植防宮崎

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
<u>チオファネートメチル</u>								
市販品	5	79	78	77	77	75	77	1.9
市販品	0.25	77	77	75	74	74	75	2.0
市販品	0.01	81	79	76	75	75	77	3.5
<u>カルベンダジム</u>								
市販品	5	109	106	105	105	104	106	1.8
市販品	0.25	83	82	80	80	80	81	1.7
市販品	0.005	84	83	83	83	81	83	1.3

6.3.2. 果実の回収率

6.3.2.1. 日植防茨城

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
チオファネートメチル								
市販品	5	78	77	75	74	73	75	2.8
市販品	0.25	72	72	71	70	70	71	1.4
市販品	0.01	78	75	72	71	68	73	5.3
カルベンダジム								
市販品	5	93	91	91	91	91	91	1.0
市販品	0.25	90	88	87	87	87	88	1.5
市販品	0.005	93	88	86	85	78	86	6.3

6.3.1.2. 日植防高知及び日植防宮崎

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
<u>チオファネートメチル</u>								
市販品	5	85	82	82	81	78	82	3.1
市販品	0.25	85	85	83	81	80	83	2.7
市販品	0.01	86	84	84	83	83	84	1.5
<u>カルベンダジム</u>								
市販品	5	91	89	89	89	88	89	1.2
市販品	0.25	89	89	88	87	87	88	1.1
市販品	0.005	81	79	77	76	75	78	3.1

7. 精度管理

「食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について」（平成 9 年 4 月 1 日付け衛食第 117 号厚生省生活衛生局食品保健課長通知）に基づき、内部精度管理を行った。

管理基準：20 検体を超えるごとに、各 1 検体の無処理試料及びチオファネートメチル 0.1 ppm 添加試料、カルベンダジム 0.05 ppm 添加試料（クオリティーコントロール試料）を分析した。

クオリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

また、2012 年 11 月実施の食品衛生精度管理比較調査（財団法人食品薬品安全センター）における Z スコアは全て $Z < 2$ であった。

7.1. クオリティーコントロール試料分析結果

7.1.1. 果肉

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>チオファネートメチル</u>	2013/10/18	日植防茨城	74	<0.01
	2013/10/23	日植防茨城	73	<0.01
	2013/12/11	日植防高知	75	<0.01
	2014/1/18	日植防高知	87	<0.01
	2013/12/12	日植防宮崎	74	<0.01
	2014/1/17	日植防宮崎	74	<0.01
<u>カルベンダジム</u>	2013/10/18	日植防茨城	86	<0.005
	2013/10/23	日植防茨城	88	<0.005
	2013/12/11	日植防高知	77	<0.005
	2014/1/18	日植防高知	100	<0.005
	2013/12/12	日植防宮崎	78	<0.005
	2014/1/17	日植防宮崎	86	<0.005

7.1.2. 果実

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>チオファネートメチル</u>	2013/10/18	日植防茨城	81	<0.01
	2013/10/23	日植防茨城	76	<0.01
	2013/12/11	日植防高知	74	<0.01
	2014/1/18	日植防高知	74	<0.01
	2013/12/12	日植防宮崎	75	<0.01
	2014/1/17	日植防宮崎	72	<0.01
<u>カルベンダジム</u>	2013/10/18	日植防茨城	84	<0.005
	2013/10/23	日植防茨城	86	<0.005
	2013/12/11	日植防高知	74	<0.005
	2014/1/18	日植防高知	93	<0.005
	2013/12/12	日植防宮崎	72	<0.005
	2014/1/17	日植防宮崎	81	<0.005

8. マトリックス効果の確認

マトリックス標準溶液は、各圃場の無処理区試料の最終液量 1mL をナス型フラスコに分取し、窒素気流下で溶媒を留去した後、0.05mg/L の検量線溶液 1mL に溶解して調製した。マトリックス試料分析結果を表に示す。

8.1. 果肉

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>カルベンダジム</u>	日植防茨城	105
	日植防高知	91
	日植防宮崎	93

8.2. 果実

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>カルベンダジム</u>	日植防茨城	102
	日植防高知	94
	日植防宮崎	93

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料に各化合物を添加し、 -20°C 以下で凍結保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を評価した。保存安定性試験の結果を表に示す。

9.1. 果肉の保存安定性試験結果**9.1.1. チオファネートメチル**

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	75 (13/8/9 - 13/10/23)	70	70	70
	日植防高知	66 (13/11/13 - 14/1/18)	85	76	80
	日植防宮崎	65 (13/11/13 - 14/1/17)	75	71	73

9.1.2. カルベンダジム

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	75 (13/8/9 - 13/10/23)	89	89	89
	日植防高知	66 (13/11/13 - 14/1/18)	99	97	98
	日植防宮崎	65 (13/11/13 - 14/1/17)	95	94	94

9.2. 果実の保存安定性試験結果**9.2.1. チオファネートメチル**

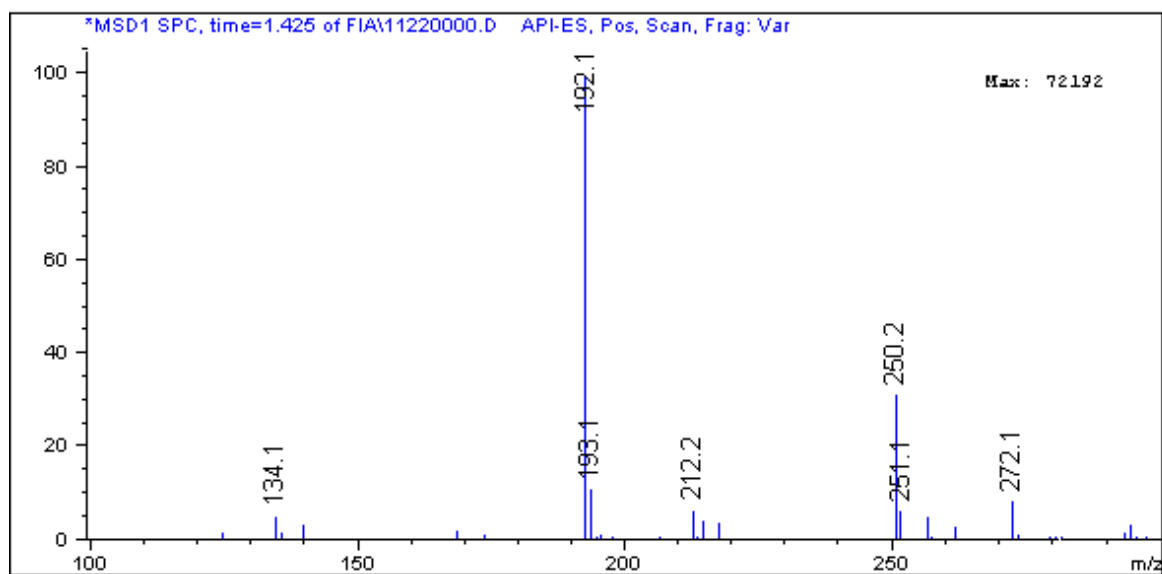
添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	75 (13/8/9 - 13/10/23)	72	71	72
	日植防高知	66 (13/11/13 - 14/1/18)	72	71	72
	日植防宮崎	65 (13/11/13 - 14/1/17)	73	70	72

9.2.2. カルベンダジム

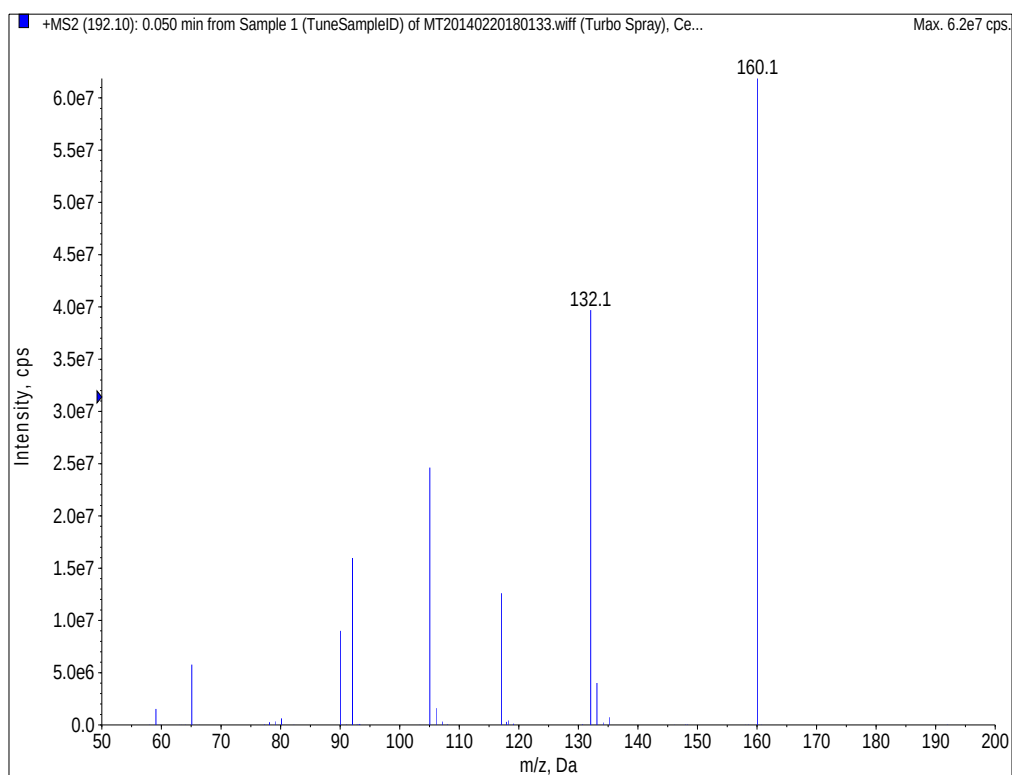
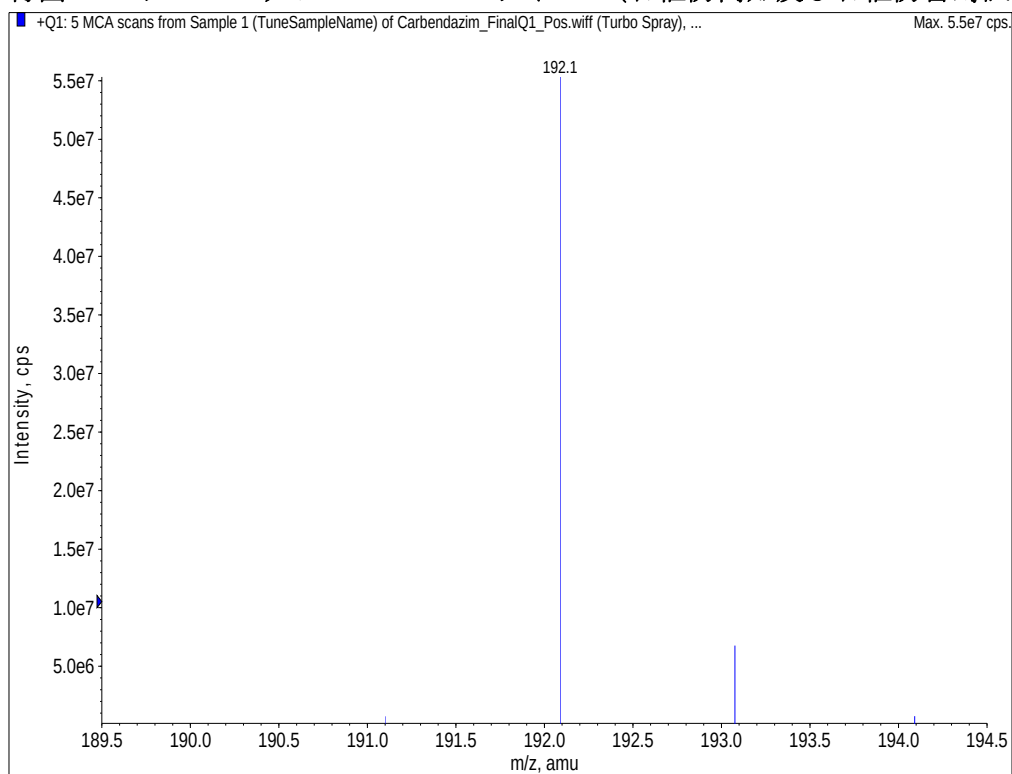
添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	75 (13/8/9 - 13/10/23)	89	88	88
	日植防高知	66 (13/11/13 - 14/1/18)	93	91	92
	日植防宮崎	65 (13/11/13 - 14/1/17)	92	92	92

付図-1. マススペクトル

付図-1-1. カルベンダジムのマススペクトル (日植防茨城試料測定時)



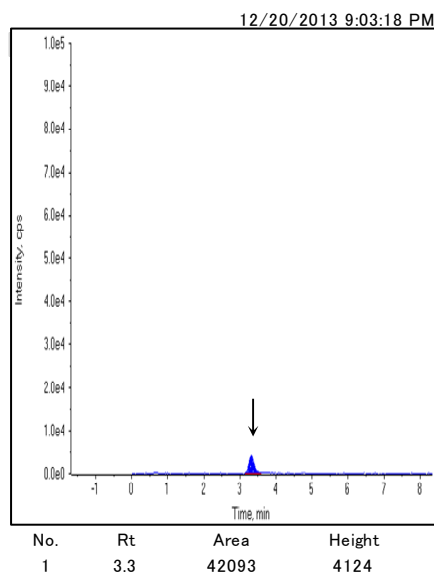
付図-1-2. カルベンダジムのマススペクトル (日植防高知及び日植防宮崎試料測定時)



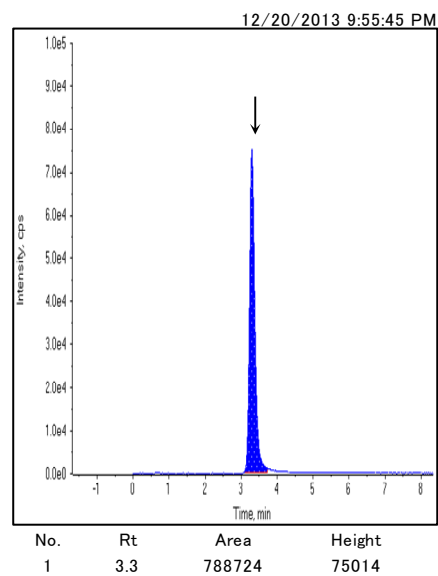
付図-2. 果肉のクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. カルベンダジムのクロマトグラム

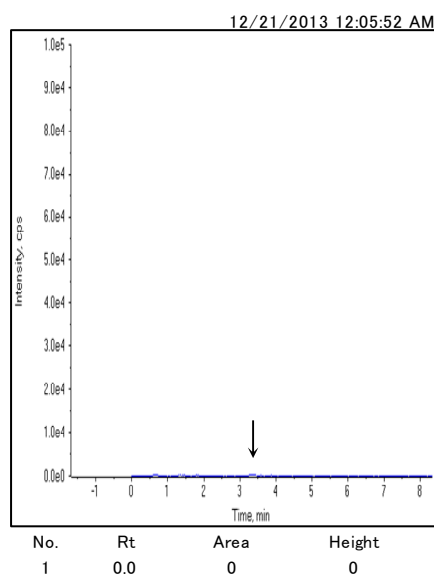
標準品 0.005ng



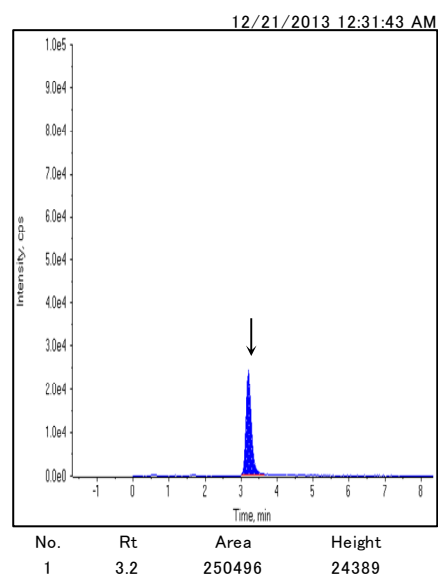
標準品 0.1ng



日植防高知 無処理
4mL/1 μ L/4g

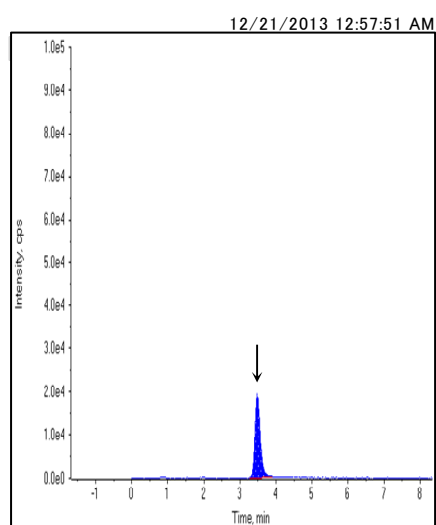


日植防高知 5 回処理 1 日後
4mL/1 μ L/4g

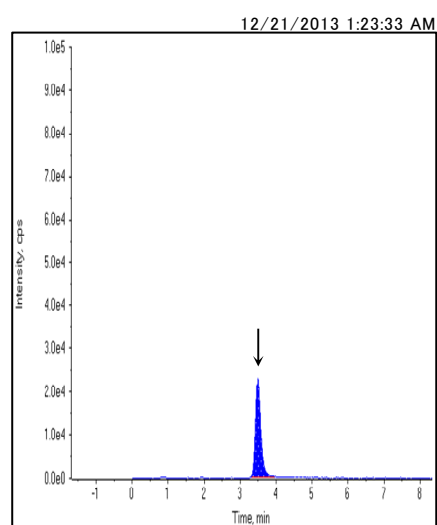


すいか 処理区 B (チオファネートメチル)

日植防高知 5 回処理 3 日後
4mL/1 μ L/4g



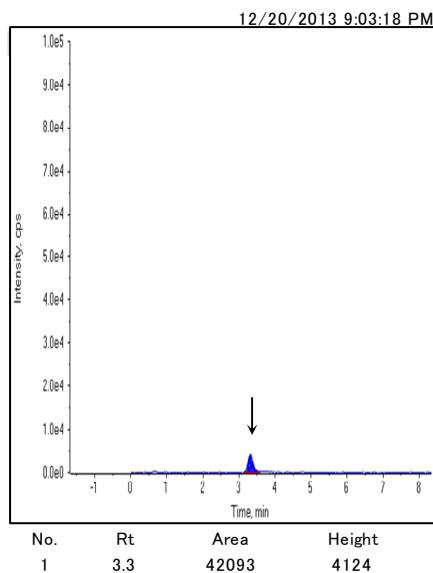
日植防高知 5 回処理 7 日後
4mL/1 μ L/4g



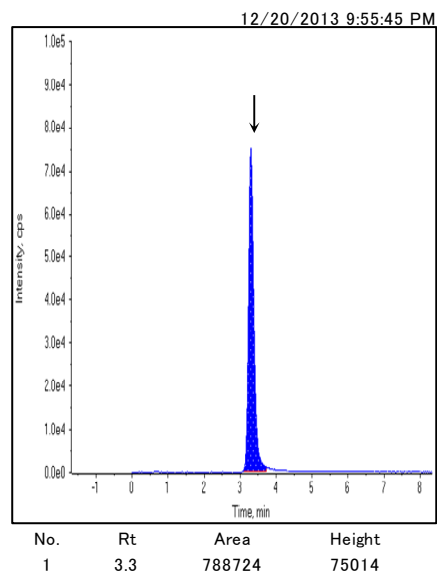
付図-3. 果実のクロマトグラム (代表例)

付図-3-1. カルベンダジムのクロマトグラム

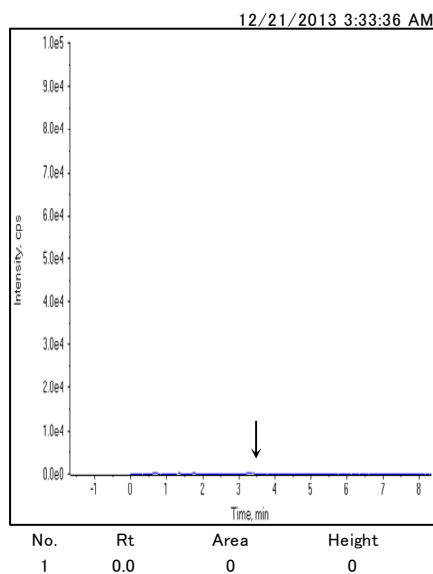
標準品 0.005ng



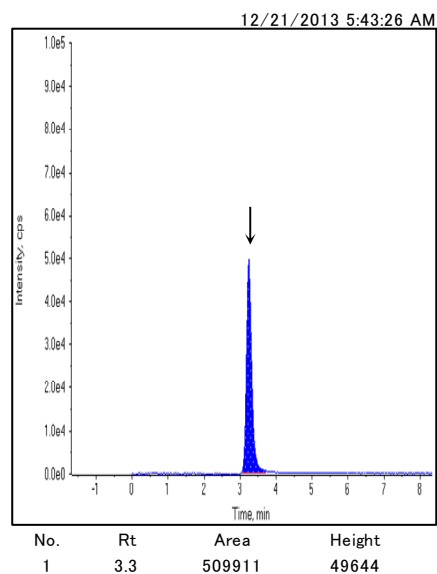
標準品 0.1ng



日植防高知 無処理
4mL/1 μ L/4g

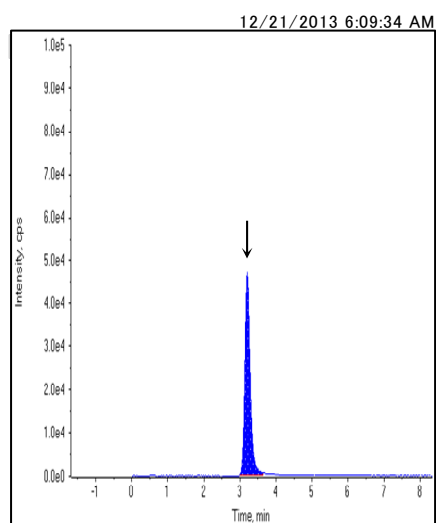


日植防高知 5 回処理 1 日後
16mL/1 μ L/4g

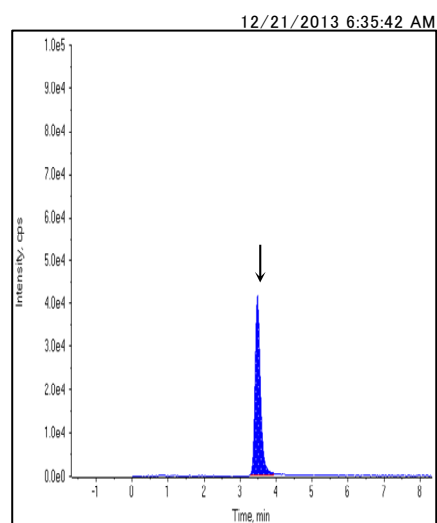


すいか 処理区 B (チオファネートメチル)

日植防高知 5 回処理 3 日後
16mL/1 μ L/4g



日植防高知 5 回処理 7 日後
16mL/1 μ L/4g



10. 試料重量等

試料	処理	経過	平均重量	総平均重量	総重量	総重量の平均	重量比(%)		果皮の厚さ
	回数	日数	(kg/個)	(kg/個)	(kg)	(kg)	果肉	果皮	(mm)
茨城	0	—	1.74	2.10	17.4	12.7	85	15	4.6
	B	1	1.97		9.86		85	15	5.1
	B	3	2.30		11.5		86	14	4.8
	B	7	2.40		12.0		89	11	4.6
							平均 86:14		
高知	0	—	1.42	1.67	17.1	12.2	82	18	5.8
	B	1	1.75		10.5		83	17	3.3
	B	3	1.75		10.5		81	19	5.9
	B	7	1.75		10.5		83	17	5.3
							平均 82:18		
宮崎	0	—	1.75	1.79	19.2	12.9	87	13	4.4
	B	1	1.75		10.5		86	14	4.3
	B	3	1.78		10.7		85	15	4.8
	B	7	1.87		11.2		86	14	4.3
							平均 86:14		
3ほ場の総平均重量					3ほ場の総重量の平均				
1.85 kg/個					12.6 kg				

B: アラニカルブ, チオファネートメチルは5回処理

ペンチオピラドは3回処理

スピロメシフェン, マンジプロパミドは2回処理

注) 宮崎 無処理試料の1個が輸送中に破損していたため, 破損試料を除いて重量等を求めた。

又, トップジンM水和剤(チオファネートメチル)の散布回数に不備があったため,

本試料ではチオファネートメチルの分析は実施せず, 秋作の試料で分析を実施した。

詳細は資料2-3の第10項参照。

11. 作物写真の一例



日植防高知 無処理



日植防高知 処理 1 日後



日植防高知 処理 3 日後



日植防高知 処理 7 日後

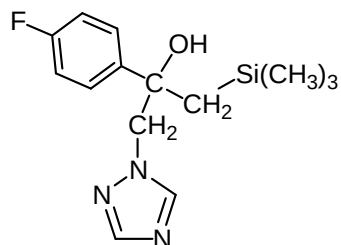
資料 2-3

農薬登録における作物のグループ化・残留分析詳細①
シメコナゾール・ジノテフラン

1. 分析対象物質

シメコナゾール

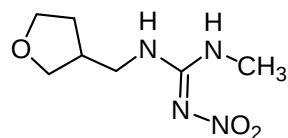
化学名： (R*S*)-2-(4-fluorophenyl)-1-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)-
3-(trimethylsilyl)propan-2-ol
分子量： 293.4
分子式： C₁₄H₂₀FN₃OSi
構造式：



性 状： 白色結晶
融 点： 118.5-120.5 °C
蒸気圧： 5.4×10^{-2} mPa (25°C)
分配係数： log P_{ow} =3.2
溶解性： 水 57.5 mg/L (20°C)
出 典： The Pesticide Manual (16th Edition)

ジノテフラン

化学名： (R*S*)-1-methyl-2-nitro-3-(tetrahydro-3-furylmethyl)guanidine
分子量： 202.2
分子式： C₇H₁₄N₄O₃
構造式：



性 状： 白色結晶固体
融 点： 107.5 °C
蒸気圧： $< 1.7 \times 10^{-3}$ mPa (30°C)
分配係数： log P_{ow} =-0.549 (25°C)
溶解性： 水 39.8 g/L (20°C),
ヘキサン 9.0×10^{-6} , ヘプタン 11×10^{-6} , キシレン 72×10^{-3} ,

すいか 処理区 C・D (シメコナゾール・ジノテフラン)

トルエン 150×10^{-3} , ジクロロメタン 61, アセトン 58, メタノール 57,
エタノール 19, 酢酸エチル 5.2 (以上 g/L, 20°C)
安定性 : 熱安定性 150°Cで安定 (DSC)
加水分解性 半減期 1 年以上 (pH4,7,9)
水中光分解性 半減期 3.8 時間
出典 : The Pesticide Manual (16th Edition)

2. 標準品及び試薬

シメコナゾール標準品 : 純度 99.1% (和光純薬工業製)
ジノテフラン標準品 : 純度 99.9% (和光純薬工業製)
アセトニトリル : 試薬特級及び高速液体クロマトグラフィー用
(和光純薬工業製)
メタノール : 高速液体クロマトグラフィー用 (和光純薬工業製)
トルエン : 残留農薬試験用 (和光純薬工業製)
アセトン : 試薬特級 (和光純薬工業製)
ヘキサン : 試薬特級 (和光純薬工業製)
塩化ナトリウム : 試薬特級 (和光純薬工業製)
リン酸二水素カリウム : 試薬特級 (和光純薬工業製)
リン酸水素二カリウム : 試薬特級 (和光純薬工業製)
GC/SAX/PSA ミニカラム : InertSep GC/SAX/PSA (500mg/500mg/500mg)
(ジーエルサイエンス製)
シリカゲルミニカラム : InertSep Slim-J SI (1000mg)
(ジーエルサイエンス製)

3. 装置及び機器

化学天秤 : 島津製作所製 AUW220
上皿天秤 : メトラー・トレド製 PB8001-S/FACT
上皿天秤 : エー・アンド・ディ製 FX 1200i
ミキサー : ワーリング製 CB-15T
フードプロセッサー : クイジナート製 DLC-NXJ2PS
液体クロマトグラフ : 質量分析計システム (LC-MS) :
アジレント・テクノロジー製 HP-1100 (シメコナゾール)
ヒューレット・パカード製 HP-1100 (ジノテフラン)
データ処理装置 : アジレント・テクノロジー製 Chem Station (シメコナゾール)
ヒューレット・パカード製 Chem Station (ジノテフラン)

4. 液体クロマトグラフ・質量分析計の操作条件

4.1. 液体クロマトグラフ・質量分析計 (シメコナゾール)

4.1.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム：	Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス製), 内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒径 4 μ m
溶離液：	0.1%ギ酸溶液/アセトニトリル (45:55, v/v)
流速：	0.2 mL/min.
カラム温度：	40 °C
試料注入量：	1 μ L
保持時間：	約 5.1 min.

4.1.2. 質量分析計

イオン化法：	エレクトロスプレー(ESI), 正イオンモード
乾燥ガス温度：	350 °C
乾燥ガス流量：	12 L/min.
ネプライザー圧力：	35 psi
フラグメンター電圧：	100 V
キャピラリー電圧：	4000 V
採取イオン：	SIM m/z 294.1

4.2. 液体クロマトグラフ・質量分析計 (ジノテフラン)

4.2.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム：	TSKgel ODS-100V (東ソー製), 内径 2.0 mm, 長さ 75 mm, 粒径 3 μ m
溶離液：	メタノール / 0.1%ギ酸溶液 (15:85, v/v)
流速：	0.2 mL/min.
カラム温度：	40 °C
試料注入量：	2 μ L
保持時間：	約 3.4 min.

4.2.2. 質量分析計

イオン化法：	エレクトロスプレー(ESI), 正イオンモード
乾燥ガス温度：	350 °C
乾燥ガス流量：	10 L/min.
ネプライザー圧力：	35 psi
フラグメンター電圧：	60 V
キャピラリー電圧：	4000 V
採取イオン：	SIM m/z 203.1

5. 検量線の作成

5.1. シメコナゾール

シメコナゾール標準品 20.0 mg (各純度換算相当量) を精秤し, 100mL 容メスフラスコに移した。アセトニトリルを加えて溶解して 200 mg/L の標準原液を調製した。この原液をアセトニトリル/水 (50:50, v/v) 混液で希釈して 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 mg/L の標準溶液を調製した。この 1 μ L を 4-1 項の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入し, データ処理装置を用いてシメコナゾールのピーク高さを測定し, 横軸に重量 (ng), 縦軸にピーク高さをとって検量線を作成した。

5.2. ジノテフラン

ジノテフラン標準品 20.0 mg (各純度換算相当量) を精秤し, 100 mL 容メスフラスコに移した。メタノールを加えて溶解して 200 mg/L の標準原液を調製した。この原液を水で希釈して 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 mg/L の標準溶液を調製した。この 2 μ L を 4-2 項の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入し, データ処理装置を用いてジノテフランのピーク高さを測定し, 横軸に重量 (ng), 縦軸にピーク高さをとって検量線を作成した。

6. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料は重量を量り, つるを除去した。無処理区試料は各々を縦に 8 分割し, 対角の 2 つを取り合わせ, 4 組の試料を作成した。そのうちの 2 組を果肉分析試料とし, 残りの 2 組を果実分析試料とした。2 組の果肉分析試料は果肉と果皮の境目に沿って包丁を入れ果肉と果皮にわけた後, 各々の重量を測定した。その 1 組の果肉全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なイミベンコナゾール, アラニカルブ及びチオファネートメチル分析用試料とし, さらに 3 分割して試料を 3 組作製し, 各々添加剤を加えてミキサーで均一化した。2 組の果実分析試料のうち, 1 組の全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なイミベンコナゾール, アラニカルブ及びチオファネートメチル分析用試料とし, さらに 3 分割して試料を 3 組作製し, 各々添加剤を加えてミキサーで均一化した。

処理区試料は各々を縦に 4 分割し, 対角の 2 つを取り合わせ, 2 組の試料を作製した。その 1 組を果肉分析用試料とし, 残りの 1 組を果実分析用試料とした。果肉分析用試料は, 果肉と果皮に分け, 果肉全量をミキサーで均一化した。果実分析用試料は全量をミキサーで均一化した。

各々の試料は密封容器に入れて -20°C 以下で凍結保存した。また, 量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比 (%) を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した試料 20 g を分液ロートにはかりとり, アセトニトリル 100 mL を加えて 30 分間振とう抽出した。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し, 残渣をアセトニトリ

ル 30 mL で 2 回洗浄し、同様にろ過した。ろ液を合わせアセトニトリルで 200 mL に定容した。

6.1.3. 転溶

前項の定容液から 40 mL (試料 4g 相当量) を分液ロートに分取し、塩化ナトリウム 10 g、リン酸緩衝溶液*15 mL 及びヘキサン 20 mL を加え 5 分間振とうした。静置分離後、アセトニトリル層を分取し、40℃以下の水浴中で約 2 mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。残留物は直ちにアセトニトリル/トルエン (75:25, v/v) 混液 5 mL で溶解した。

*リン酸二水素カリウム 61 g とリン酸水素二カリウム 105 g に水 850 mL を加え溶解後、1 mol/L 塩酸又は 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH7.0 に調整し、水を加えて 1 L とした。

6.1.4. GC/SAX/PSA ミニカラムによる精製

GC/SAX/PSA ミニカラムにアセトニトリル/トルエン (75:25, v/v) 混液 10 mL を注入し流下して前処理した。前項の溶解液を GC/SAX/PSA ミニカラムに流下した後、アセトニトリル/トルエン (75:25, v/v) 混液 20 mL を流下し、その全溶出液を取り、40℃以下の水浴中で約 2 mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。残留物は直ちにヘキサン 5mL で溶解した。

6.1.5 シリカゲルミニカラムによる精製

シリカゲルミニカラムにヘキサン 10 mL を注入し流下して前処理した。前項の溶解液をシリカゲルミニカラムに流下した後、アセトン/ヘキサン (10:90, v/v) 混液 20 mL を流下し、これらの流出液を捨てた。次にアセトン/ヘキサン (30:70, v/v) 混液 15 mL を流下し、溶出液を取った (シメコナゾール分析用)。さらにアセトン/ヘキサン (50:50, v/v) 混液 20 mL を流下し、溶出液を取った (ジノテフラン分析用)。

.

6.1.6. 定量

6.1.6.1. 定量 (シメコナゾール)

前項の溶出液 (シメコナゾール分析用) を 40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。残留物は直ちにアセトニトリル/水 (50:50, v/v) 混液を用いて 4 mL に定容し、測定溶液とした。測定溶液は必要に応じてアセトニトリル/水 (50:50, v/v) 混液で希釈した。

測定溶液の 1 μ L を 4.1 項の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入し、ピーク高さを求め、検量線よりシメコナゾールの重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

6.1.6.2. 定量 (ジノテフラン)

前項の溶出液 (ジノテフラン分析用) を 40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。残留物は直ちに水を用いて 4 mL に定容し、測定溶液とした。測定溶液は必要に応じて水で希釈した。

測定溶液の 2 μ L を 4.2 項の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入し、ピーク高さを求め、検量線よりジノテフランの重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値 (LOQ) 及び検出限界値 (LOD)

6.2.1. シメコナゾール

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	定量限界 (ppm)
0.01	4	4	1	0.01

最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)
0.005	4	4	1	0.005

果肉，果実はいずれも同じ値

6.2.2. ジノテフラン

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	定量限界 (ppm)
0.02	4	4	2	0.01

最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)
0.01	4	4	2	0.005

果肉，果実はいずれも同じ値

6.3. 回収率

分析法確認のため、日植防宮崎の果肉及び果実の無処理試料を用いて、0.01ppm（定量限界相当）、0.25ppm 及び 5ppm 添加濃度における回収試験を各 5 連分析で実施した。なお、無処理試料は 2 連分析し、全て定量限界未満（<0.01 ppm）であった。回収試験結果を表に示す。

6.3.1 果肉の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
<u>シメコナゾール</u>								
日植防宮崎	5	94	93	91	91	90	92	1.8
日植防宮崎	0.25	94	92	91	89	89	91	2.3
日植防宮崎	0.01	111	100	92	92	89	97	9.2
<u>ジノテフラン</u>								
日植防宮崎	5	88	86	85	84	84	85	2.0
日植防宮崎	0.25	83	82	81	80	80	81	1.6
日植防宮崎	0.01	93	88	88	87	85	88	3.4

6.3.2. 果実の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
<u>シメコナゾール</u>								
日植防宮崎	5	90	89	87	87	86	88	1.9
日植防宮崎	0.25	89	89	89	88	87	88	1.0
日植防宮崎	0.01	120	112	106	93	90	104	12.2
<u>ジノテフラン</u>								
日植防宮崎	5	87	86	85	83	83	85	2.1
日植防宮崎	0.25	87	84	83	83	81	84	2.6
日植防宮崎	0.01	96	94	93	89	87	92	4.0

7. 精度管理

「食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について」（平成 9 年 4 月 1 日付け衛食第 117 号厚生省生活衛生局食品保健課長通知）に基づき、内部精度管理を行った。

管理基準：20 検体を超えるごとに、各 1 検体の無処理試料及び 0.1ppm 添加試料（クォリティーコントロール試料）を分析した。

クォリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

また、2012 年 11 月実施の食品衛生精度管理比較調査（財団法人食品薬品安全センター）における Z スコアは全て Z<2 であった。

7.1. クォリティーコントロール試料分析結果

7.1.1. 果肉

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>シメコナゾール</u>	2013/8/27	日植防茨城	99	<0.01
	2013/9/12	日植防茨城	100	<0.01
	2013/11/25	日植防高知	96	<0.01
	2013/12/24	日植防高知	97	<0.01
	2013/12/12	日植防宮崎	98	<0.01
	2013/12/24	日植防宮崎	97	<0.01
<u>ジノテフラン</u>	2013/8/27	日植防茨城	88	<0.01
	2013/9/12	日植防茨城	86	<0.01
	2013/11/25	日植防高知	88	<0.01
	2013/12/24	日植防高知	88	<0.01
	2013/12/12	日植防宮崎	85	<0.01
	2013/12/24	日植防宮崎	84	<0.01

7.1.2. 果実

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>シメコナゾール</u>	2013/8/28	日植防茨城	95	<0.01
	2013/9/12	日植防茨城	96	<0.01
	2013/11/25	日植防高知	94	<0.01
	2013/12/24	日植防高知	94	<0.01
	2013/12/12	日植防宮崎	96	<0.01
	2013/12/24	日植防宮崎	98	<0.01
<u>ジノテフラン</u>	2013/8/28	日植防茨城	88	<0.01
	2013/9/12	日植防茨城	85	<0.01
	2013/11/25	日植防高知	93	<0.01
	2013/12/24	日植防高知	89	<0.01
	2013/12/12	日植防宮崎	84	<0.01
	2013/12/24	日植防宮崎	86	<0.01

8. マトリックス効果の確認

マトリックス標準溶液は、各圃場の無処理試料の最終液量 1mL をナス型フラスコに分取し、窒素気流下で溶媒を留去した後、シメコナゾール及びジノテフラン各 0.1mg/L の検量線溶液 1mL に溶解して調製した。マトリック試料分析結果を表に示す。

8.1. 果肉

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>シメコナゾール</u>	日植防茨城	102
	日植防高知	100
	日植防宮崎	102
<u>ジノテフラン</u>	日植防茨城	100
	日植防高知	104
	日植防宮崎	95

8.2. 果実

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>シメコナゾール</u>	日植防茨城	99
	日植防高知	99
	日植防宮崎	101
<u>ジノテフラン</u>	日植防茨城	106
	日植防高知	108
	日植防宮崎	97

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料に各化合物を添加し、 -20°C 以下で凍結保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を評価した。保存安定性試験の結果を表に示す。

9.1. 果肉の保存安定性試験結果**9.1.1. シメコナゾール**

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	34 (13/8/9 - 13/9/12)	97	95
	日植防高知	41 (13/11/13 - 13/12/24)	93	90
	日植防宮崎	41 (13/11/13 - 13/12/24)	99	93

9.1.2. ジノテフラン

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	34 (13/8/9 - 13/9/12)	88	87
	日植防高知	41 (13/11/13 - 13/12/24)	94	92
	日植防宮崎	41 (13/11/13 - 13/12/24)	89	89

9.2. 果実の保存安定性試験結果**9.2.1. シメコナゾール**

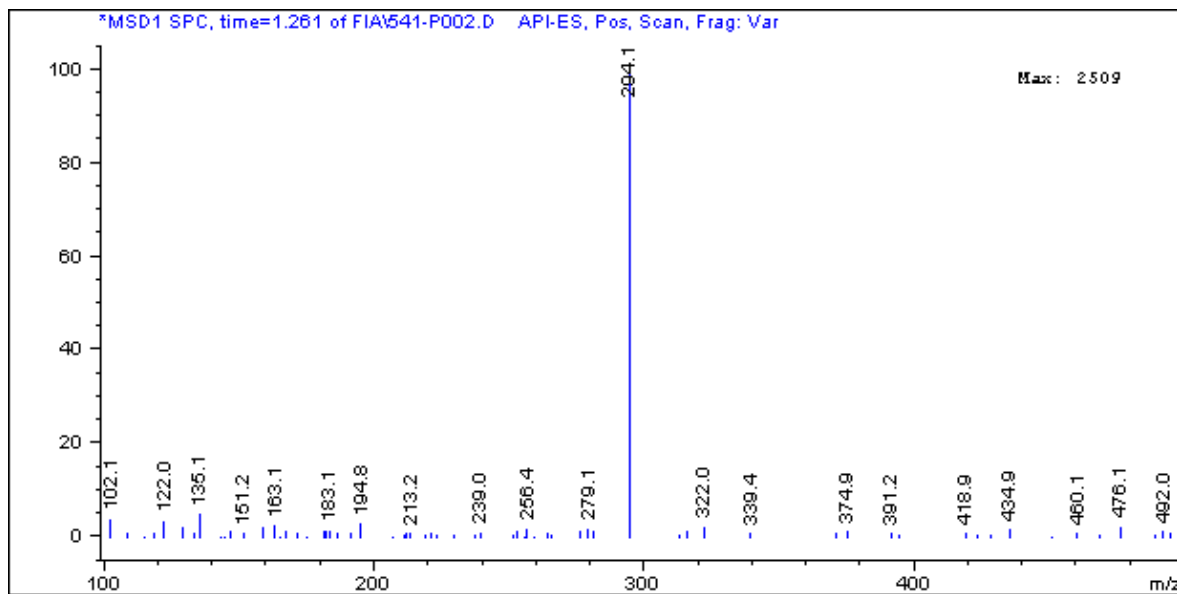
添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	34 (13/8/9 - 13/9/12)	96	95
	日植防高知	41 (13/11/13 - 13/12/24)	92	88
	日植防宮崎	41 (13/11/13 - 13/12/24)	92	91

9.2.2. ジノテフラン

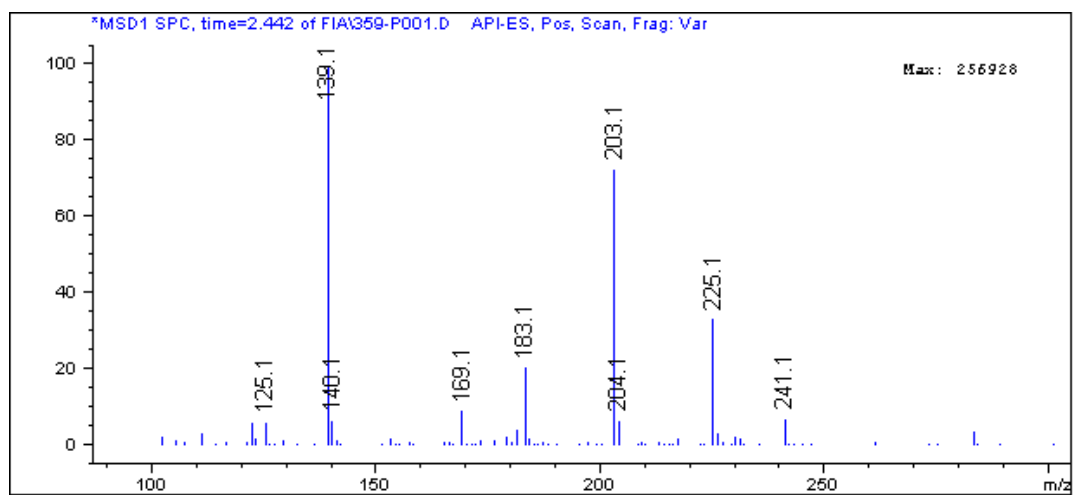
添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	34 (13/8/9 - 13/9/12)	83	83
	日植防高知	41 (13/11/13 - 13/12/24)	92	92
	日植防宮崎	41 (13/11/13 - 13/12/24)	92	90

付図-1. マススペクトル

付図-1-1. シメコナゾールのマススペクトル



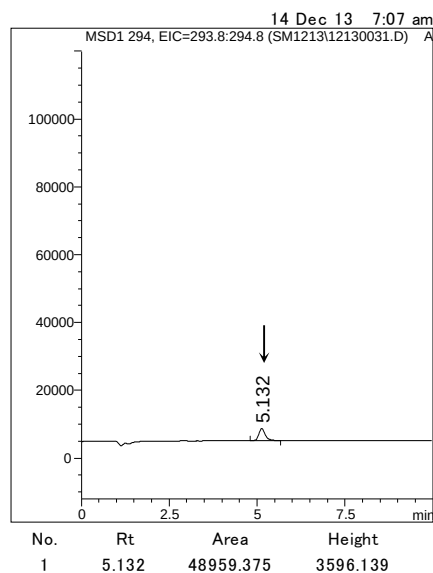
付図-1-2. ジノテフランのマススペクトル



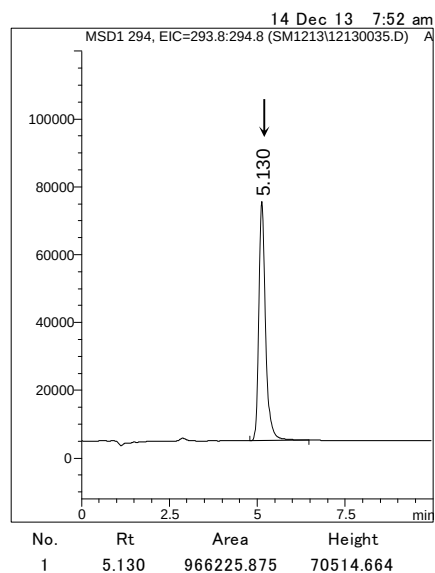
付図-2. 果肉のクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. シメコナゾールのクロマトグラム

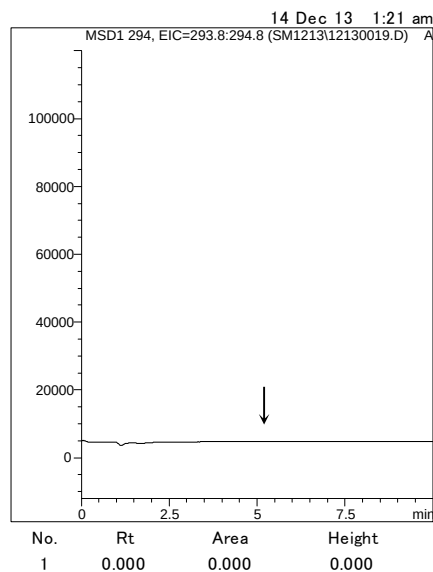
標準品 0.01ng



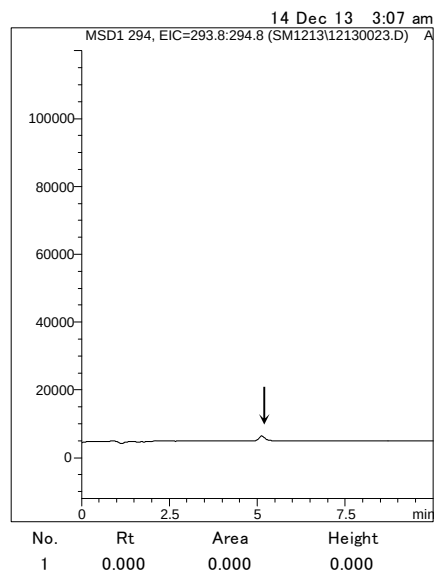
標準品 0.2ng



日植防宮崎 無処理
4mL/1μL/4g

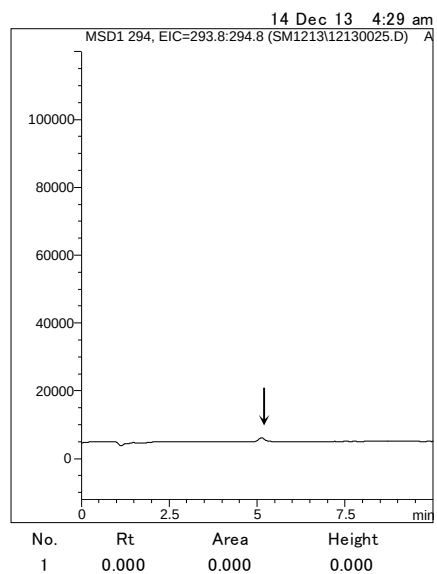


日植防宮崎 5回処理 7日後
4mL/1μL/4g

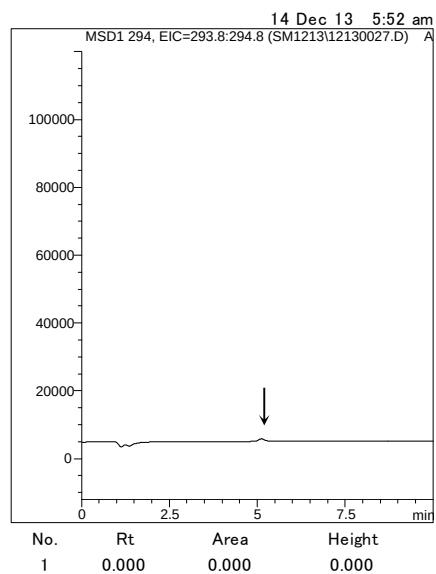


すいか 処理区 C・D (シメコナゾール・ジノテフラン)

日植防宮崎 5 回処理 14 日後
4mL/1 μ L/4g

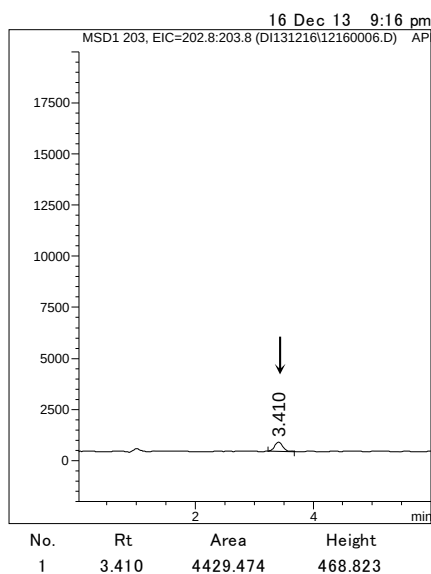


日植防宮崎 5 回処理 21 日後
4mL/1 μ L/4g

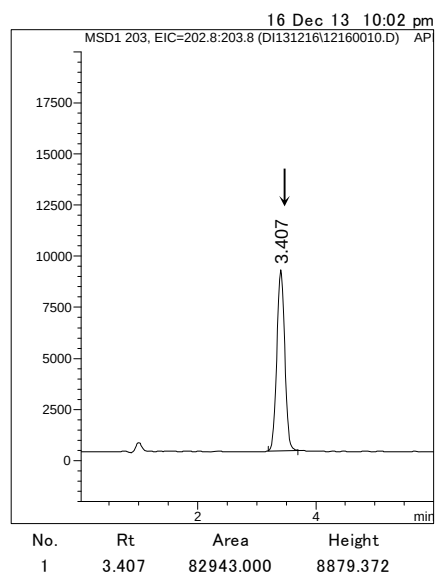


付図-2-2. ジノテフランのクロマトグラム

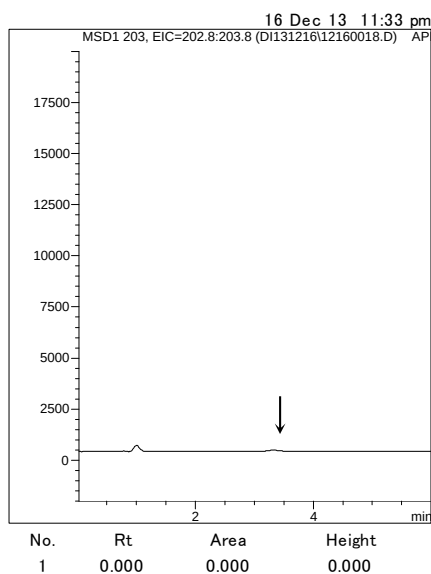
標準品 0.02ng



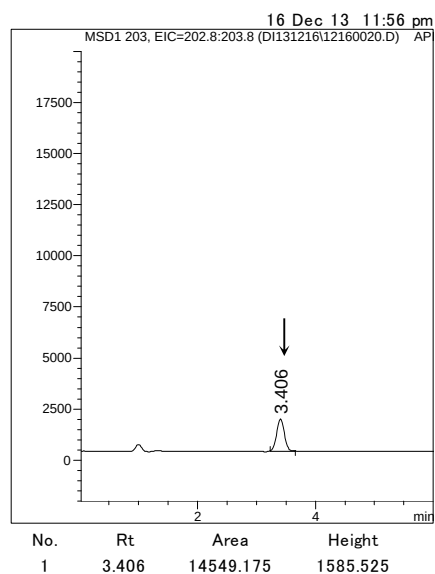
標準品 0.4ng



日植防宮崎 無処理
4mL/2μL/4g

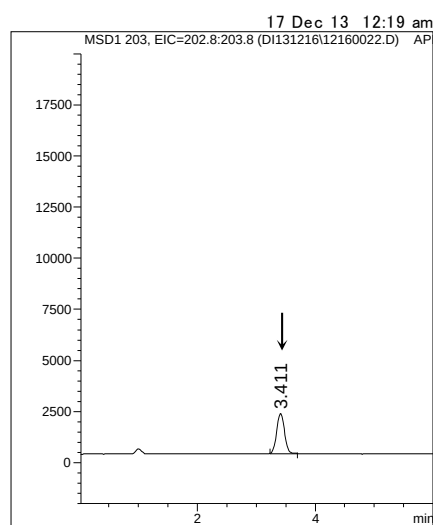


日植防宮崎 2回処理 7日後
4mL/2μL/4g

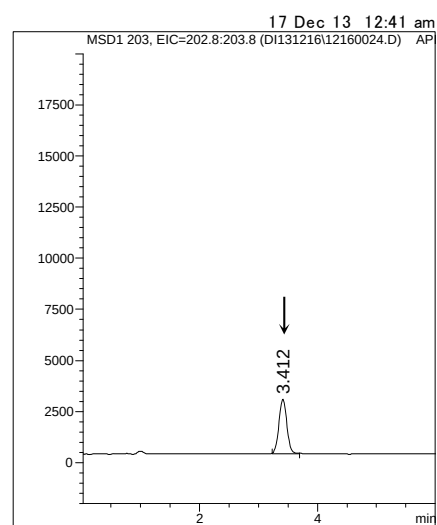


すいか 処理区 C・D (シメコナゾール・ジノテフラン)

日植防宮崎 2 回処理 14 日後
4mL/2 μ L/4g



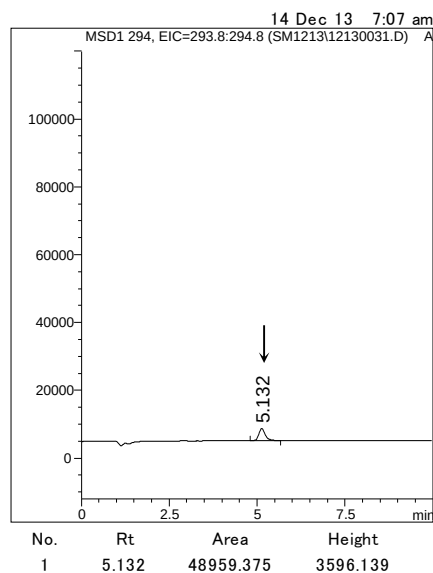
日植防宮崎 2 回処理 21 日後
4mL/2 μ L/4g



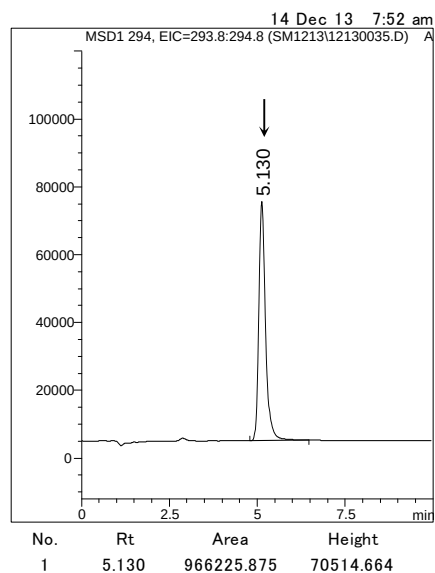
付図-3. 果実のクロマトグラム (代表例)

付図-3-1. シメコナゾールのクロマトグラム

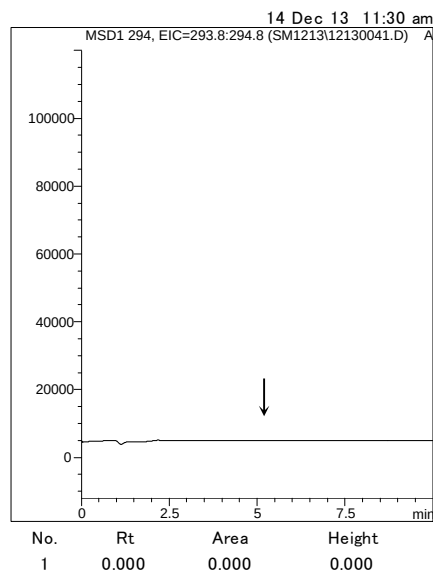
標準品 0.01ng



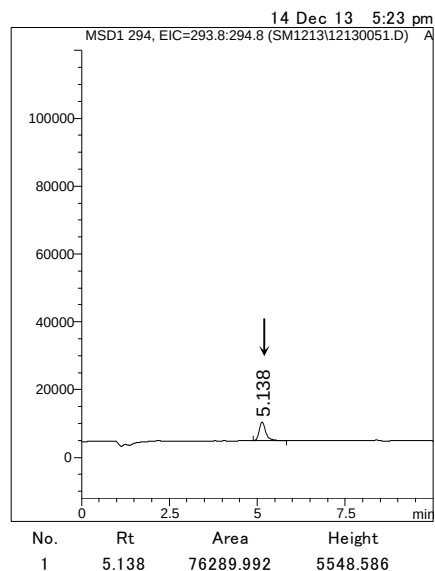
標準品 0.2ng



日植防宮崎 無処理
4mL/1μL/4g

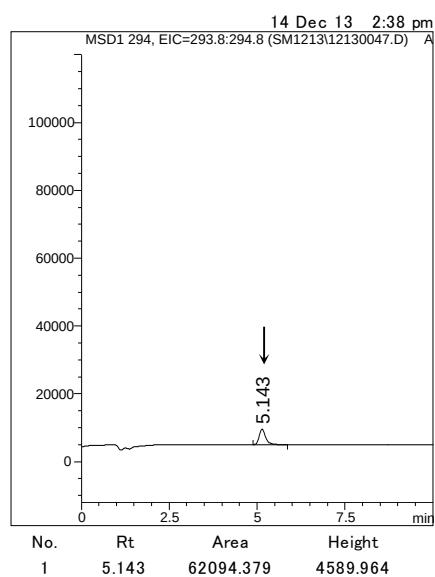


日植防宮崎 5回処理 7日後
4mL/1μL/4g

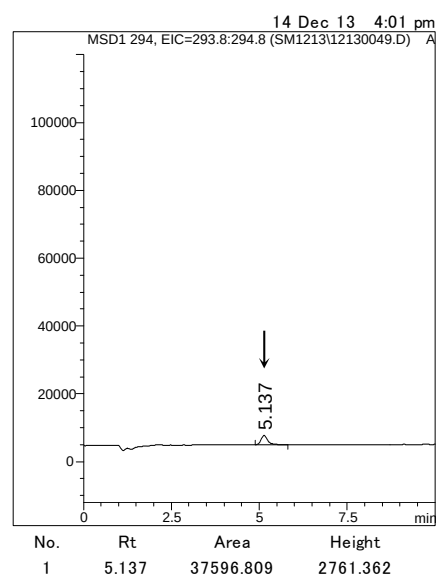


すいか 処理区 C・D (シメコナゾール・ジノテフラン)

日植防宮崎 5 回処理 14 日後
4mL/1 μ L/4g

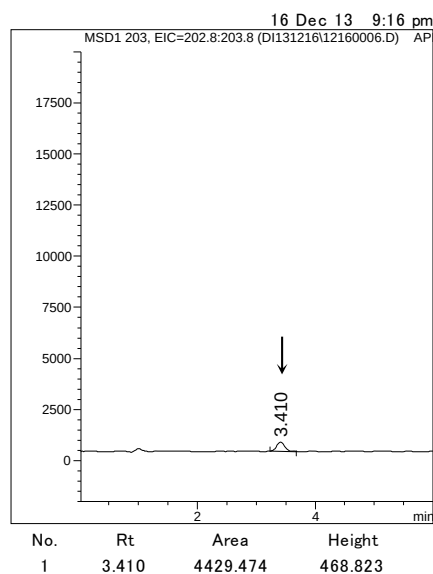


日植防宮崎 5 回処理 21 日後
4mL/1 μ L/4g

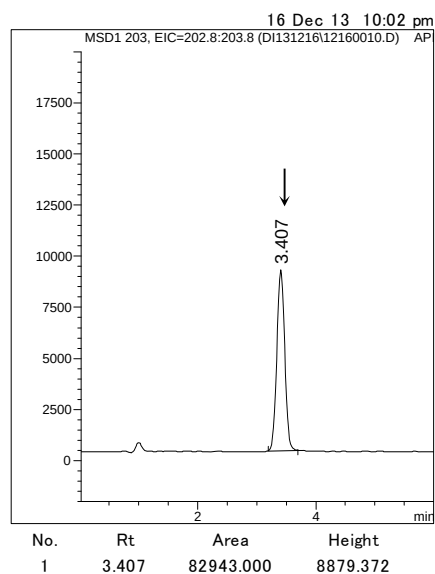


付図-3-2. ジノテフランのクロマトグラム

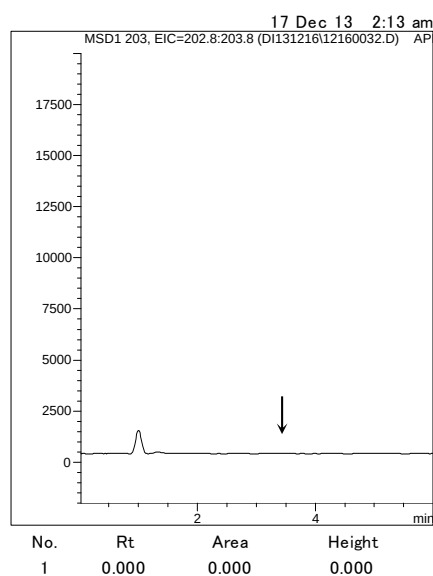
標準品 0.02ng



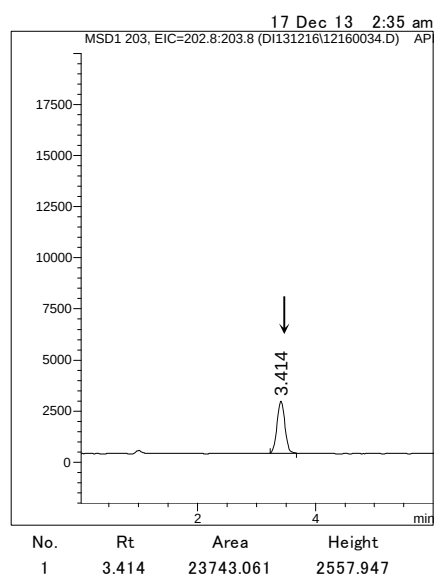
標準品 0.4ng



日植防宮崎 無処理
4mL/2 μ L/4g

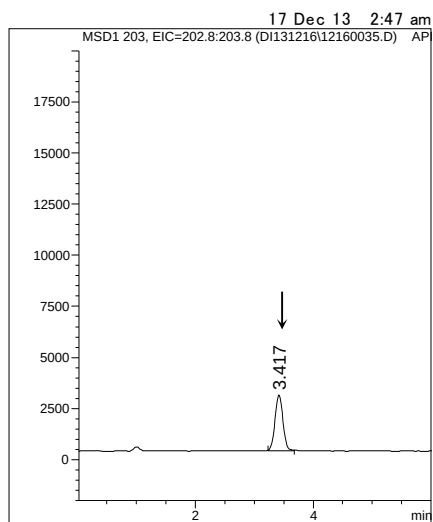


日植防宮崎 2回処理 7日後
4mL/2 μ L/4g

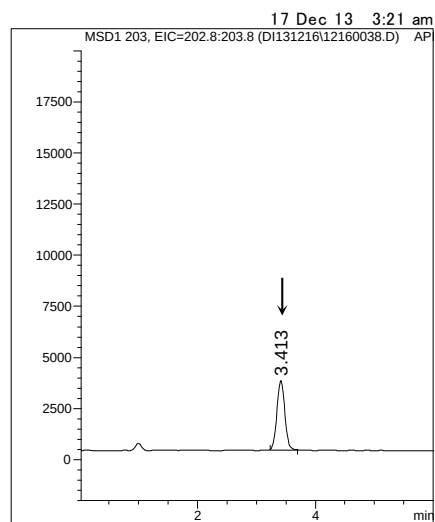


すいか 処理区 C・D (シメコナゾール・ジノテフラン)

日植防宮崎 2 回処理 14 日後
4mL/2 μ L/4g



日植防宮崎 2 回処理 21 日後
4mL/2 μ L/4g



農薬登録における作物のグループ化・残留分析詳細②

ジメトモルフ・メタラキシル M・フルフェノクスロン

1. 分析対象物質

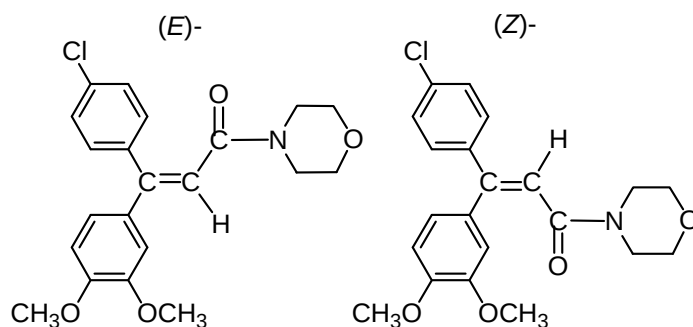
ジメトモルフ

化学名： (E,Z)-4-[3-(4-chlorophenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)acryloyl]morpholine

分子量： 387.9

分子式： $C_{21}H_{22}ClNO_4$

構造式：



性状： 無色から淡黄色の粉末結晶

融点： 125.2-149.2 °C

E 体：136.8-138.3 °C, Z 体：166.3-168.5 °C

蒸気圧： E 体： 9.7×10^{-4} mPa, Z 体： 1.0×10^{-3} mPa (25°C)

分配係数： $\log P_{ow} = 2.63$ (E), $\log P_{ow} = 2.73$ (Z) (20°C)

溶解性： 水 81.1 (pH4), 49.2 (pH7), 41.8 (pH9) (以上 mg/L, 20°C)
ヘキサン 0.076 (E), 0.036 (Z), トルエン 39.0 (E), 10.5 (Z),
ジクロロメタン 296 (E), 165 (Z), 酢酸エチル 39.9 (E), 8.4 (Z),
アセトン 84.1 (E), 16.3 (Z), メタノール 31.5 (E), 7.5 (Z) (以上 g/L)
n-ヘキサン 0.11, メタノール 39, 酢酸エチル 48.3, トルエン 49.5
アセトン 100, ジクロロメタン 461 (E,Z 以上 g/L)

安定性： 加水分解及び熱に安定
暗所で 5 年以上安定

出典： The Pesticide Manual (16th Edition)

メタラキシル M

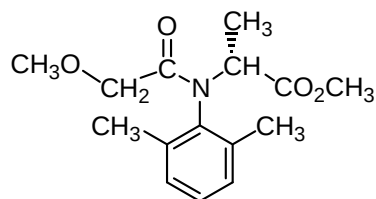
化学名： methyl N-(methoxyacetyl)-N-(2,6-xylyl)-D-alaninate

分子量： 279.3

分子式： $C_{15}H_{21}NO_4$

すいか 処理区 C・D (ジメトモルフ・メタラキシル M・フルフェノクスロン)

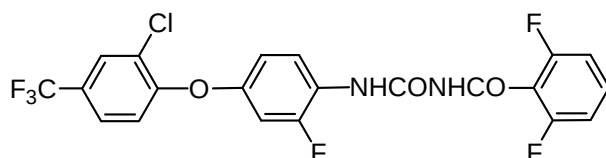
構造式：



性 状： 淡黄色から淡茶色の粘性液体
融 点： -38.7 °C
蒸気圧： 3.3 mPa (25°C)
分配係数： $\log P_{OW} = 1.71$ (25°C)
溶解性： 水 26 g/L (25°C),
n-ヘキサン 59 g/L
アセトン, 酢酸エチル, メタノール, ジクロロメタン, トルエン,
n-オクタノールに易溶
安定性： 酸性及び中性で加水分解に安定 (半減期 >200 日)
アルカリ性半減期 116 日 (pH 9, 25°C)
出 典： The Pesticide Manual (16th Edition)

フルフェノクスロン

化学名： 1-[4-(2-chloro- α,α,α -trifluoro-*p*-tolyl)oxy]-2-fluorophenyl]-
3-(2,6-difluorobenzoyl)urea
分子量： 488.8
分子式： $C_{21}H_{11}ClF_6N_2O_3$
構造式：



性 状： 白色結晶性固体
融 点： 169-172 °C
蒸気圧： 6.52×10^{-9} mPa (20°C)
分配係数： $\log P_{OW} = 4.0$ (pH7)
溶解性： 水 0.0186 (pH4), 0.00152 (pH7), 0.00373 (pH9) (以上 mg/L, 25°C)
キシレン 6, *n*-ヘキサン 0.11, シクロヘキサン 95, ジクロロメタン 18.8,
メタノール 3.5, アセトン 73.8 (以上 g/L, 25°C)
安定性： 190°C以下で安定
半減期 11 日 (緩衝溶液)
加水分解 (25°C) 半減期 112 日 (pH5), 104 日 (pH7), 36.7 日 (pH9),
2.7 日 (pH12)

すいか 処理区 C・D (ジメトモルフ・メタラキシル M・フルフェノクスロン)

出 典 : The Pesticide Manual (16th Edition)

2. 標準品及び試薬

ジメトモルフ標準品	: 純度 99.7% (和光純薬工業製)
メタラキシル M 標準品	: 純度 98.9% (和光純薬工業製)
フルフェノクスロン標準品	: 純度 99.2% (和光純薬工業製)
アセトニトリル	: 高速液体クロマトグラフィー用 (和光純薬工業製)
トルエン	: 残留農薬試験用 (和光純薬工業製)
アセトン	: 試薬特級 (和光純薬工業製)
ヘキサン	: 試薬特級 (和光純薬工業製)
酢酸エチル	: 試薬特級 (和光純薬工業製)
塩化ナトリウム	: 試薬特級 (和光純薬工業製)
無水硫酸ナトリウム	: 試薬特級 (和光純薬工業製)
GC/SAX/PSA ミニカラム	: InertSep GC/SAX/PSA (500mg/500mg/500mg) (ジーエルサイエンス製)
シリカゲルミニカラム	: InertSep Slim-J SI (1000mg) (ジーエルサイエンス製)

3. 装置及び機器

化学天秤 :	島津製作所製 AUW220
上皿天秤 :	メトラー・トレド製 PB8001-S/FACT
上皿天秤 :	エー・アンド・ディ製 FX 1200i
ミキサー :	ワーリング製 CB-15T
フードプロセッサー	クイジナート製 DLC-NXJ2PS
液体クロマトグラフ	質量分析計システム (LC-MS) : アジレント・テクノロジー製 HP-1100
データ処理装置 :	アジレント・テクノロジー製 Chem Station

4. 液体クロマトグラフ・質量分析計の操作条件

4.1. 液体クロマトグラフ・質量分析計 (ジメトモルフ)

4.1.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム :	Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス製), 内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒径 4 μ m
溶離液 :	0.1%ギ酸溶液/アセトニトリル (60:40, v/v)
流速 :	0.2 mL/min.
カラム温度 :	40℃
試料注入量 :	2 μ L
保持時間 :	約 10.9~11.0 min. (E 体) 約 12.2 min. (Z 体)

すいか 処理区 C・D (ジメトモルフ・メタラキシル M・フルフェノクスロン)

4.1.2. 質量分析計

イオン化法： エレクトロスプレー(ESI), 正イオンモード
乾燥ガス温度： 350℃
乾燥ガス流量： 12L/min.
ネプライザー圧力： 35psi
フラグメンター電圧： 100 V
キャピラリー電圧： 4000 V
採取イオン： SIM m/z 388.1

4.2. 液体クロマトグラフ・質量分析計 (メタラキシル M)

4.2.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム： Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス製),
内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒径 4μm
溶離液： 0.1%ギ酸溶液/アセトニトリル (60:40, v/v)
流速： 0.2 mL/min.
カラム温度： 40 °C
試料注入量： 1 μL
保持時間： 約 7.0~7.1 min.

4.2.2. 質量分析計

イオン化法： エレクトロスプレー(ESI), 正イオンモード
乾燥ガス温度： 350℃
乾燥ガス流量： 12L/min.
ネプライザー圧力： 35psi
フラグメンター電圧： 60 V
キャピラリー電圧： 4000 V
採取イオン： SIM m/z 280.1

4.3. 液体クロマトグラフ・質量分析計 (フルフェノクスロン)

4.3.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム： Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス製),
内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒径 4μm
溶離液： 0.1%ギ酸溶液/アセトニトリル (20:80, v/v)
流速： 0.2 mL/min.
カラム温度： 40 °C
試料注入量： 1 μL
保持時間： 約 4.0 min.

すいか 処理区 C・D (ジメトモルフ・メタラキシル M・フルフェノクスロン)

4.3.2. 質量分析計

イオン化法：	エレクトロスプレー(ESI)，正イオンモード
乾燥ガス温度：	350℃
乾燥ガス流量：	12L/min.
ネプライザー圧力：	35psi
フラグメンター電圧：	100 V
キャピラリー電圧：	4000 V
採取イオン：	SIM m/z 489.1

5. 検量線の作成

ジメトモルフ，メタラキシル M 及びフルフェノクスロンの各標準品 20.0 mg (各純度換算相当量) を各々精秤し，各々100 mL 容メスフラスコに移した。ジメトモルフはメタノールを加えて溶解して 200 mg/L の標準原液を調製した。メタラキシル M 及びフルフェノクスロンはアセトンを加えて溶解して 200 mg/L の標準原液を調製した。各原液を等量ずつ混合し，アセトニトリル/水 (50:50, v/v) 混液で希釈して 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 mg/L の混合標準溶液を調製した。ジメトモルフはこの 2 µL を 4-1 項，メタラキシル M はこの 1 µL を 4-2 項，フルフェノクスロンはこの 1 µL を 4-3 項の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入し，データ処理装置を用いてジメトモルフはピーク面積を測定し，横軸に重量 (ng)，縦軸にピーク面積をとって検量線を作成した。メタラキシル M 及びフルフェノクスロンはピーク高さを測定し，横軸に重量 (ng)，縦軸にピーク高さをとって各検量線を作成した。

6. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料は重量を量り，つるを除去した。無処理区試料は各々を縦に 8 分割し，対角の 2 つを取り合わせ，4 組の試料を作成した。そのうちの 2 組を果肉分析試料とし，残りの 2 組を果実分析試料とした。2 組の果肉分析試料は果肉と果皮の境目に沿って包丁を入れ果肉と果皮にわけた後，各々の重量を測定した。その 1 組の果肉全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なイミベンコナゾール，アラニカルブ及びチオファネートメチル分析用試料とし，さらに 3 分割して試料を 3 組作製し，各々添加剤を加えてミキサーで均一化した。2 組の果実分析試料のうち，1 組の全量をミキサーで均一化した。残りの 1 組は添加剤が必要なイミベンコナゾール，アラニカルブ及びチオファネートメチル分析用試料とし，さらに 3 分割して試料を 3 組作製し，各々添加剤を加えてミキサーで均一化した。

処理区試料は各々を縦に 4 分割し，対角の 2 つを取り合わせ，2 組の試料を作製した。その 1 組を果肉分析用試料とし，残りの 1 組を果実分析用試料とした。果肉分析用試料は，果肉と果皮に分け，果肉全量をミキサーで均一化した。果実分析用試料は全量をミキサーで均一化した。

各々の試料は密封容器に入れて -20℃ 以下で凍結保存した。また，量った果肉重量と果

すいか 処理区 C・D (ジメトモルフ・メタラキシル M・フルフェノクスロン)

皮重量を用いて果肉果皮重量比 (%) を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した試料 20 g を分液ロートにはかりとり、アセトン 100 mL を加えて 30 分間振とう抽出した。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣をアセトン 30 mL で 2 回洗浄し、同様にろ過した。ろ液を合わせアセトンで 200 mL に定容した。

6.1.3. 転溶

前項の定容液から 40 mL (試料 4g 相当量) を分取し、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、溶媒を留去した。残留物を 10 %塩化ナトリウム溶液 90mL で溶解し、酢酸エチル/ヘキサン (50:50, v/v) 混液 80 mL を加え 5 分間振とうした。静置分離後、酢酸エチル/ヘキサン (50:50, v/v) 混液層は無水硫酸ナトリウムをのせたろ紙 (No.5A) を通過させ、脱水した。さらに酢酸エチル/ヘキサン (50:50, v/v) 混液 80 mL を加え、前記操作をくり返した後、酢酸エチル/ヘキサン (50:50, v/v) 混液層を合せ、40℃以下の水浴中で約 2 mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。残留物は直ちにアセトニトリル/トルエン (75:25, v/v) 混液 5 mL で溶解した。

6.1.4. GC/SAX/PSA ミニカラムによる精製

GC/SAX/PSA ミニカラムにアセトニトリル/トルエン (75:25, v/v) 混液 10 mL を注入し流下して前処理した。前項の溶解液を GC/SAX/PSA ミニカラムに流下した後、アセトニトリル/トルエン (75:25, v/v) 混液 20 mL を流下し、その全溶出液を取り、40℃以下の水浴中で約 2 mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。残留物は直ちにヘキサン 5mL で溶解した。

6.1.5 シリカゲルミニカラムによる精製

シリカゲルミニカラムにヘキサン 10 mL を注入し流下して前処理した。前項の溶解液をシリカゲルミニカラムに流下した後、ヘキサン 20 mL を流下し、これらの流出液を捨てた。次にアセトン/ヘキサン (10:90, v/v) 混液 25 mL を流下し、溶出液を取った (メタラキシル M 及びフルフェノクスロン分析用)。さらにアセトン/ヘキサン (30:70, v/v) 混液 20 mL を流下し、溶出液を取った (ジメトモルフ分析用)。

6.1.6. 定量

6.1.6.1. 定量 (メタラキシル M 及びフルフェノクスロン)

前項の溶出液 (メタラキシル M 及びフルフェノクスロン分析用) を 40℃以下の水浴中で約 2 mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。残留物は直ちにアセトニトリル/水 (50:50, v/v) 混液を用いて 4 mL に定容し、測定溶液とした。測定溶液は必要に応じてアセトニトリル/水 (50:50, v/v) 混液で希釈した。

測定溶液の 1 µL を 4-2 項 (メタラキシル M) 及び 4-3 項 (フルフェノクスロン) の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入し、ピーク高さを求め、検量線よりメタラキシル M 及びフルフェノクスロンの重量を求め、試料中の各残留濃度を算出した。

すいか 処理区 C・D (ジメトモルフ・メタラキシル M・フルフェノクスロン)

6.1.6.2. 定量 (ジメトモルフ)

前項の溶出液 (ジメトモルフ分析用) を 40℃ 以下の水浴中で約 2 mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。残留物は直ちにアセトニトリル/水 (50:50, v/v) 混液を用いて 4 mL に定容し、測定溶液とした。測定溶液は必要に応じてアセトニトリル/水 (50:50, v/v) 混液で希釈した。

測定溶液の 2 µL を 4-3 項の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入し、ピーク面積を求め、検量線よりジメトモルフの重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値 (LOQ) 及び検出限界値 (LOD)

6.2.1. ジメトモルフ

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (µL)	定量限界 (ppm)
0.02	4	4	2	0.01

果肉、果実はいずれも同じ値

最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (µL)	検出限界 (ppm)
0.01	4	4	2	0.005

果肉、果実はいずれも同じ値

6.2.2. メタラキシル M

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (µL)	定量限界 (ppm)
0.01	4	4	1	0.01

果肉、果実はいずれも同じ値

最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (µL)	検出限界 (ppm)
0.005	4	4	1	0.005

果肉、果実はいずれも同じ値

すいか 処理区 C・D (ジメトモルフ・メタラキシル M・フルフェノクスロン)

6.2.3. フルフェノクスロン

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	定量限界 (ppm)
0.01	4	4	1	0.01

果肉，果実はいずれも同じ値

最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)
0.005	4	4	1	0.005

果肉，果実はいずれも同じ値

6.3. 回収率

分析法確認のため，市販品の果肉及び果実を用いて，0.01ppm（定量限界相当），0.25ppm 及び 5ppm 添加濃度における回収試験を各 5 連分析で実施した。なお，試料（市販品）は 2 連分析し，全て定量限界未満（<0.01 ppm）であった。回収試験結果を表に示す。

6.3.1 果肉の回収率

試料	添加濃度 (ppm)		回収率 (%)				平均回収率 (%)	RSDr
<u>ジメトモルフ</u>								
市販品	5	104	103	102	102	100	102	1.5
市販品	0.25	105	104	102	101	99	102	2.3
市販品	0.01	110	109	108	106	105	108	1.9
<u>メタラキシルM</u>								
市販品	5	93	91	90	90	88	90	2.0
市販品	0.25	96	94	94	92	90	93	2.5
市販品	0.01	93	93	92	92	82	90	5.2
<u>フルフェノクスロン</u>								
市販品	5	94	92	92	90	90	92	1.8
市販品	0.25	88	87	85	84	82	85	2.8
市販品	0.01	99	95	94	93	91	94	3.2

すいか 処理区 C・D (ジメトモルフ・メタラキシル M・フルフェノクスロン)

6.3.2. 果実の回収率

試料	添加濃度 (ppm)		回収率 (%)				平均回収率 (%)	RSDr
<u>ジメトモルフ</u>								
市販品	5	103	102	101	99	99	101	1.8
市販品	0.25	103	101	101	100	99	101	1.5
市販品	0.01	118	115	115	112	107	113	3.7
<u>メタラキシルM</u>								
市販品	5	103	102	101	100	100	101	1.3
市販品	0.25	105	102	101	100	100	102	2.0
市販品	0.01	94	93	93	79	78	87	9.4
<u>フルフェノクスロン</u>								
市販品	5	96	95	95	93	93	94	1.4
市販品	0.25	87	86	85	82	82	84	2.7
市販品	0.01	95	95	94	85	84	91	6.1

7. 精度管理

「食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について」(平成 9 年 4 月 1 日付け衛食第 117 号厚生省生活衛生局食品保健課長通知)に基づき、内部精度管理を行った。

管理基準：20 検体を超えるごとに、各 1 検体の無処理試料及び 0.1ppm 添加試料（クオリティーコントロール試料）を分析した。

クオリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

また、2012 年 11 月実施の食品衛生精度管理比較調査（財団法人食品薬品安全センター）における Z スコアは全て Z<2 であった。

7.1. クオリティーコントロール試料分析結果

7.1.1. 果肉

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>ジメトモルフ</u>	2013/9/6	日植防茨城	96	<0.01
	2013/10/7	日植防茨城	98	<0.01
	2013/11/26	日植防高知	97	<0.01
	2013/12/26	日植防高知	96	<0.01
	2013/12/13	日植防宮崎	102	<0.01
	2014/1/7	日植防宮崎	104	<0.01
<u>メタラキシルM</u>	2013/9/6	日植防茨城	94	<0.01
	2013/10/7	日植防茨城	96	<0.01
	2013/11/26	日植防高知	96	<0.01
	2013/12/26	日植防高知	98	<0.01
	2013/12/13	日植防宮崎	92	<0.01
	2014/1/7	日植防宮崎	98	<0.01
<u>フルフェノクスロン</u>	2013/9/6	日植防茨城	78	<0.01
	2013/10/7	日植防茨城	86	<0.01
	2013/11/26	日植防高知	104	<0.01
	2013/12/26	日植防高知	86	<0.01
	2013/12/13	日植防宮崎	82	<0.01
	2014/1/7	日植防宮崎	86	<0.01

すいか 処理区 C・D (ジメトモルフ・メタラキシル M・フルフェノクスロン)

7.1.2. 果実

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>ジメトモルフ</u>	2013/9/9	日植防茨城	97	<0.01
	2013/10/7	日植防茨城	98	<0.01
	2013/11/26	日植防高知	105	<0.01
	2013/12/26	日植防高知	96	<0.01
	2013/12/13	日植防宮崎	103	<0.01
	2014/1/7	日植防宮崎	103	<0.01
<u>メタラキシルM</u>	2013/9/9	日植防茨城	95	<0.01
	2013/10/7	日植防茨城	92	<0.01
	2013/11/26	日植防高知	96	<0.01
	2013/12/26	日植防高知	98	<0.01
	2013/12/13	日植防宮崎	92	<0.01
	2014/1/7	日植防宮崎	98	<0.01
<u>フルフェノクスロン</u>	2013/9/9	日植防茨城	81	<0.01
	2013/10/7	日植防茨城	84	<0.01
	2013/11/26	日植防高知	90	<0.01
	2013/12/26	日植防高知	83	<0.01
	2013/12/13	日植防宮崎	85	<0.01
	2014/1/7	日植防宮崎	88	<0.01

すいか 処理区 C・D (ジメトモルフ・メタラキシル M・フルフェノクスロン)

8. マトリックス効果の確認

マトリックス標準溶液は、各圃場の無処理試料の最終液量 1mL をナス型フラスコに分取し、窒素気流下で溶媒を留去した後、ジメトモルフ、メタラキシル M 及びフルフェノクスロン各 0.1mg/L の検量線溶液 1mL に溶解して調製した。マトリックス試料分析結果を表に示す。

8.1. 果肉

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>ジメトモルフ</u>	日植防茨城	91
	日植防高知	99
	日植防宮崎	103
<u>メタラキシルM</u>	日植防茨城	101
	日植防高知	96
	日植防宮崎	97
<u>フルフェノクスロ ン</u>	日植防茨城	88
	日植防高知	96
	日植防宮崎	96

8.2. 果実

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>ジメトモルフ</u>	日植防茨城	97
	日植防高知	96
	日植防宮崎	100
<u>メタラキシルM</u>	日植防茨城	101
	日植防高知	102
	日植防宮崎	95
<u>フルフェノクスロ ン</u>	日植防茨城	82
	日植防高知	94
	日植防宮崎	95

すいか 処理区 C・D (ジメトモルフ・メタラキシル M・フルフェノクスロン)

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料に各化合物を添加し、 -20°C 以下で凍結保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を評価した。保存安定性試験の結果を表に示す。

9.1. 果肉の保存安定性試験結果

9.2.1. ジメトモルフ

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	59 (13/8/9 - 13/10/7)	94	92
	日植防高知	43 (13/11/13 - 13/12/26)	95	95
	日植防宮崎	55 (13/11/13 - 14/1/7)	99	98

9.2.2. メタラキシル M

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	59 (13/8/9 - 13/10/7)	91	90
	日植防高知	43 (13/11/13 - 13/12/26)	98	97
	日植防宮崎	55 (13/11/13 - 14/1/7)	99	96

9.2.3. フルフェノクスロン

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	59 (13/8/9 - 13/10/7)	90	89
	日植防高知	43 (13/11/13 - 13/12/26)	78	78
	日植防宮崎	55 (13/11/13 - 14/1/7)	95	93

すいか 処理区 C・D (ジメトモルフ・メタラキシル M・フルフェノクスロン)

9.2. 果実の保存安定性試験結果

9.2.1. ジメトモルフ

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	59 (13/8/9 - 13/10/7)	94	87
	日植防高知	43 (13/11/13 - 13/12/26)	99	96
	日植防宮崎	55 (13/11/13 - 14/1/7)	100	95

9.2.2. メタラキシル M

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	59 (13/8/9 - 13/10/7)	86	86
	日植防高知	43 (13/11/13 - 13/12/26)	97	96
	日植防宮崎	55 (13/11/13 - 14/1/7)	98	93

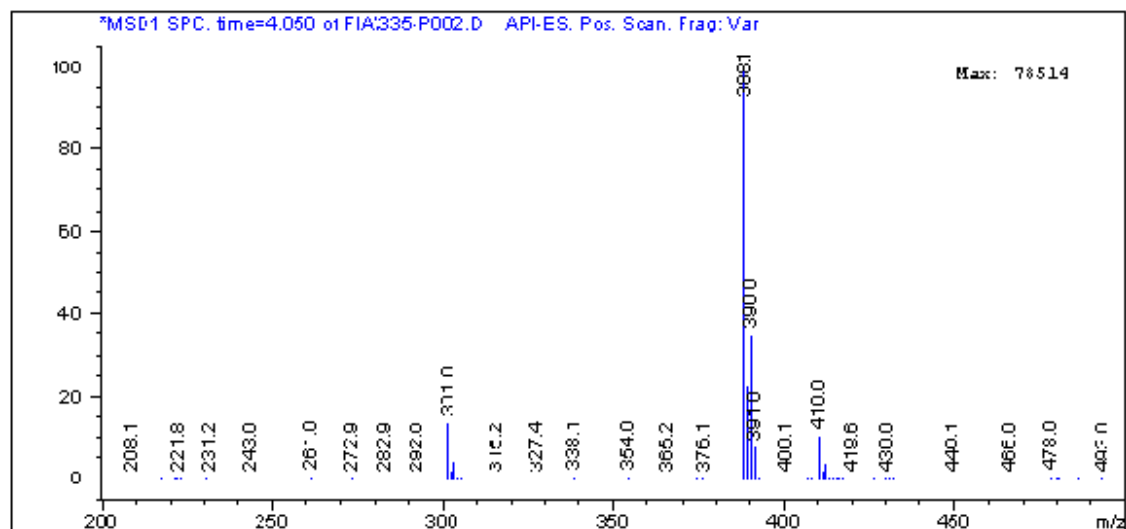
9.2.3. フルフェノクスロン

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	59 (13/8/9 - 13/10/7)	79	78
	日植防高知	43 (13/11/13 - 13/12/26)	98	98
	日植防宮崎	55 (13/11/13 - 14/1/7)	91	89

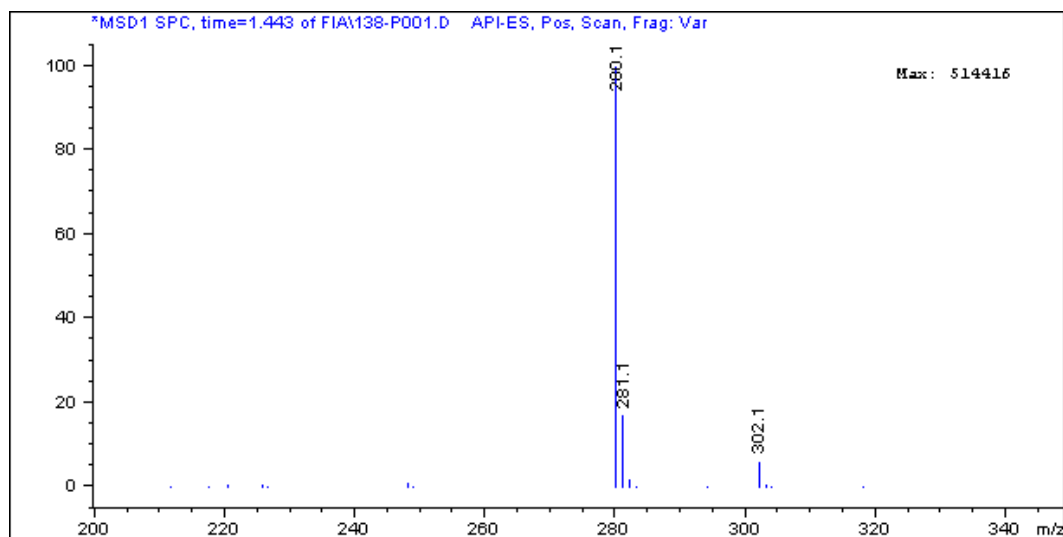
すいか 処理区 C・D (ジメトモルフ・メタラキシル M・フルフェノクスロン)

付図-1. マススペクトル

付図-1-1. ジメトモルフのマススペクトル

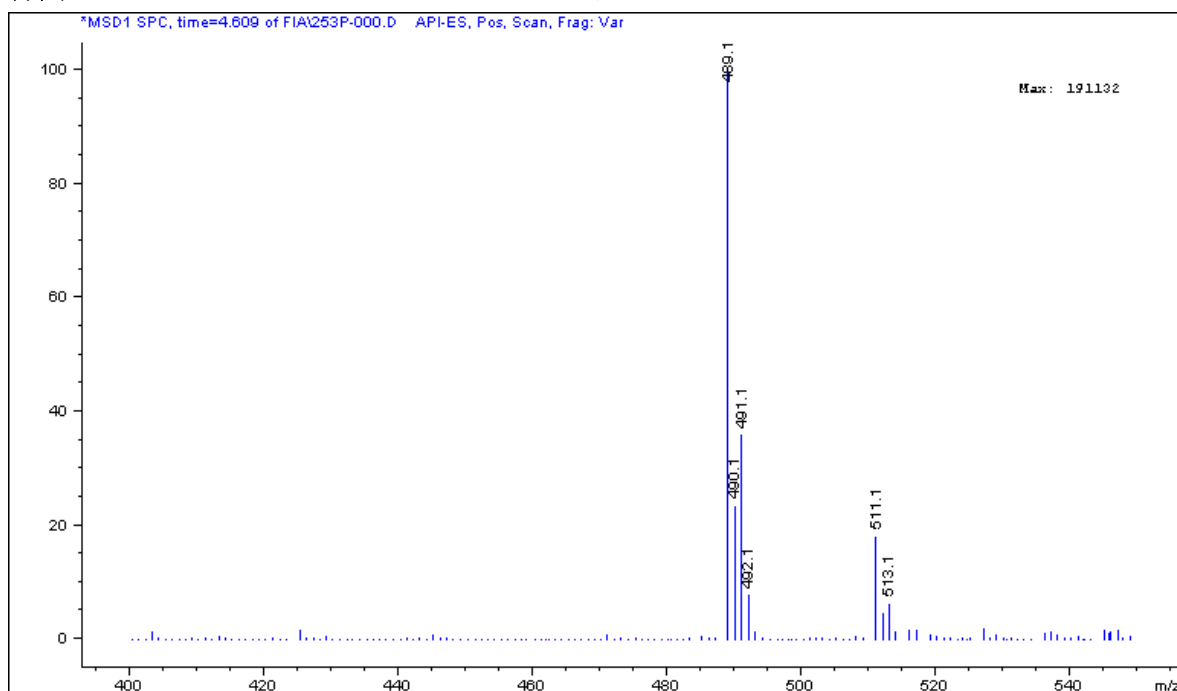


付図-1-2. メタラキシル M のマススペクトル



すいか 処理区 C・D (ジメトモルフ・メタラキシル M・フルフェノクスロン)

付図-1-3. フルフェノクスロンのマススペクトル

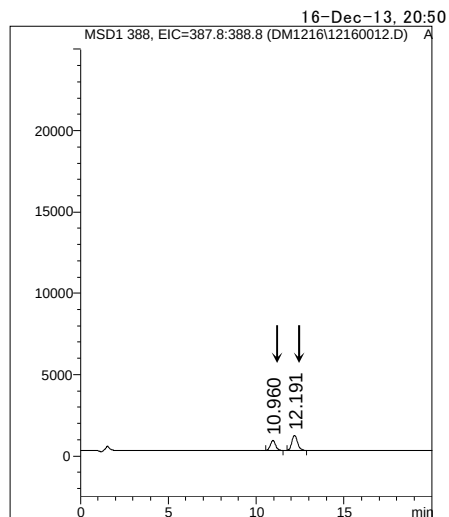


すいか 処理区 C・D (ジメトモルフ・メタラキシル M・フルフェノクスロン)

付図-2. 果肉のクロマトグラム (代表例)

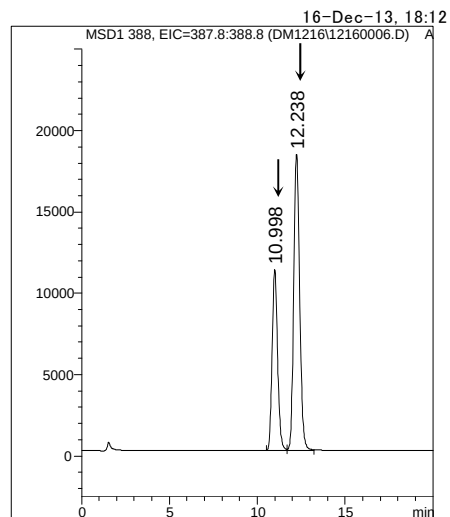
付図-2-1. ジメトモルフのクロマトグラム

標準品 0.02ng



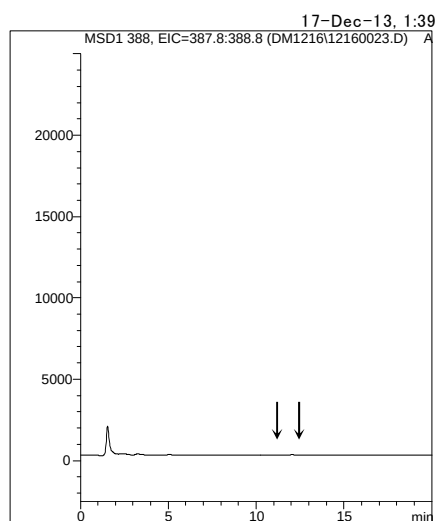
No.	Rt	Area	Height
1	10.960	12570.879	609.814
2	12.191	21177.500	944.249

標準品 0.4ng



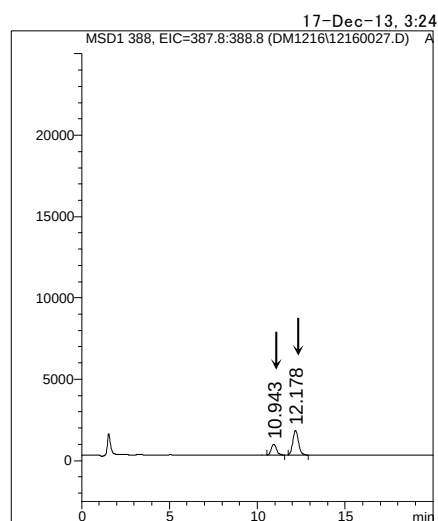
No.	Rt	Area	Height
1	10.998	240716.516	11117.950
2	12.238	428557.375	18221.947

日植防宮崎 無処理
4mL/2μL/4g



No.	Rt	Area	Height
1	0.000	0.000	0.000
2	0.000	0.000	0.000

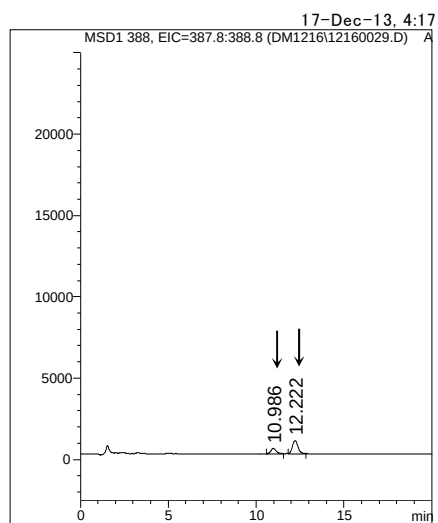
日植防宮崎 3回処理 7日後
4mL/2μL/4g



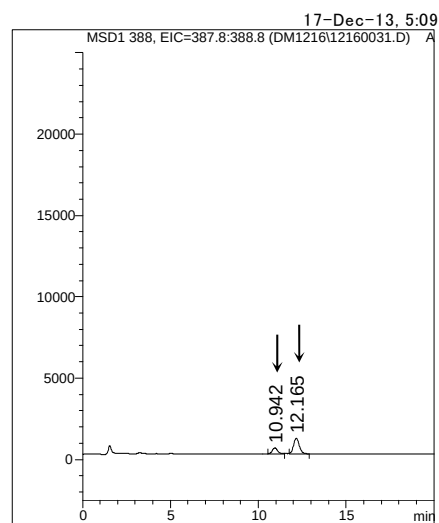
No.	Rt	Area	Height
1	10.943	14429.782	681.838
2	12.178	34843.535	1522.127

すいか 処理区 C・D (ジメトモルフ・メタラキシル M・フルフェノクスロン)

日植防宮崎 3 回処理 14 日後
4mL/2 μ L/4g



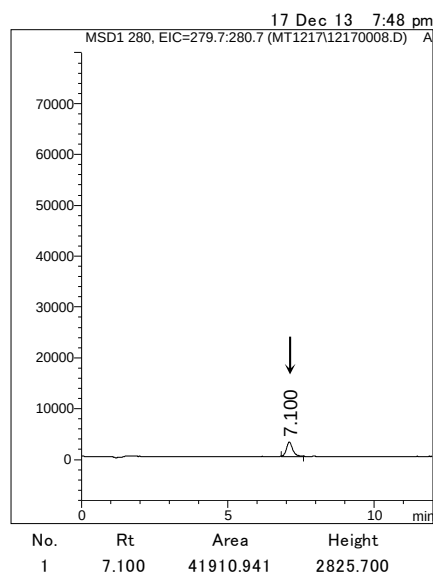
日植防宮崎 3 回処理 21 日後
4mL/2 μ L/4g



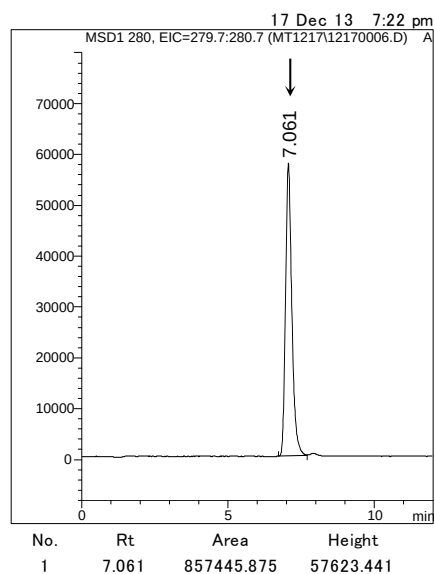
すいか 処理区 C・D (ジメトモルフ・メタラキシル M・フルフェノクスロン)

付図-2-2. メタラキシル M のクロマトグラム

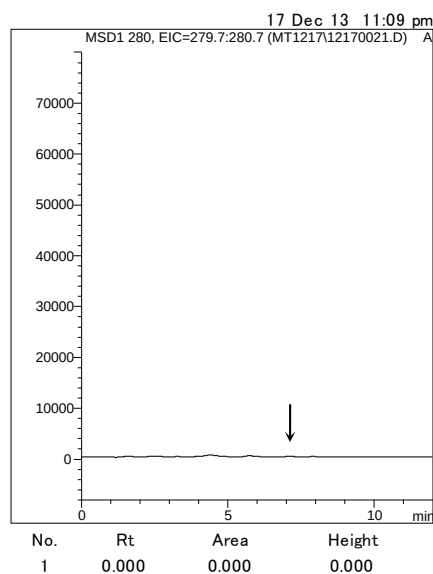
標準品 0.01ng



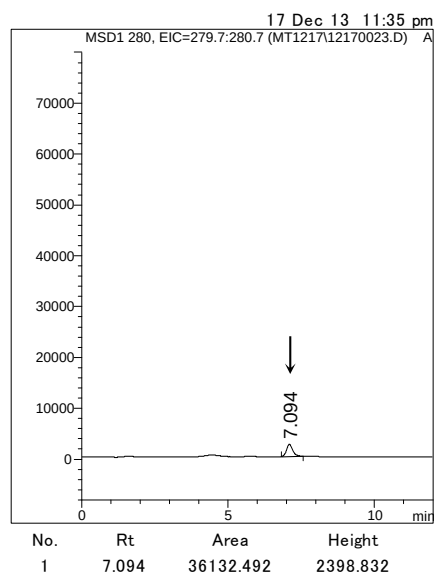
標準品 0.2ng



日植防宮崎 無処理
4mL/1μL/4g

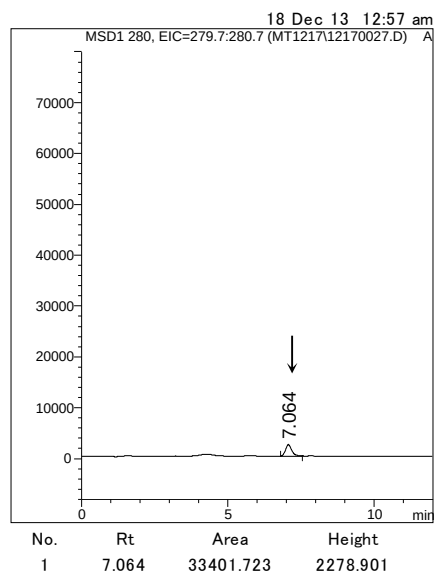


日植防宮崎 3回処理 7日後
4mL/1μL/4g

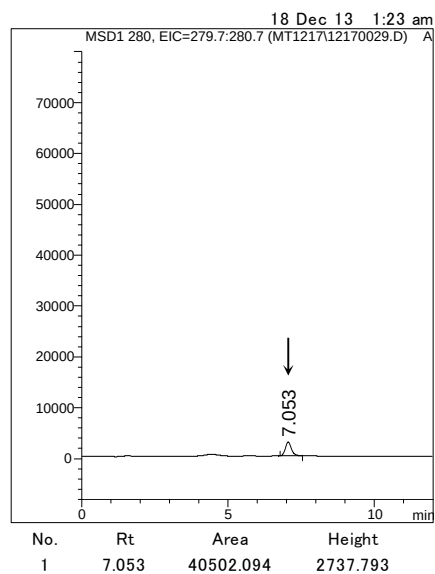


すいか 処理区 C・D (ジメトモルフ・メタラキシル M・フルフェノクスロン)

日植防宮崎 3 回処理 14 日後
4mL/1 μ L/4g



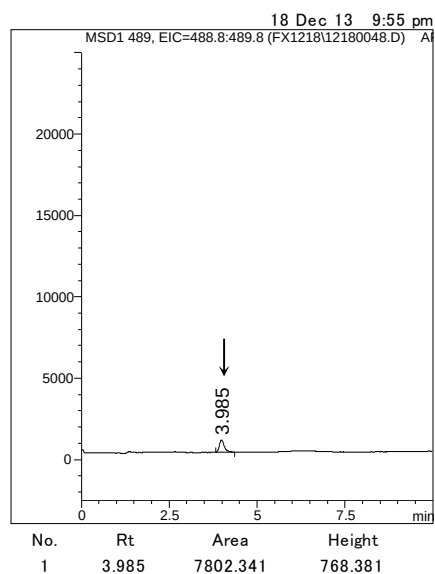
日植防宮崎 3 回処理 21 日後
4mL/1 μ L/4g



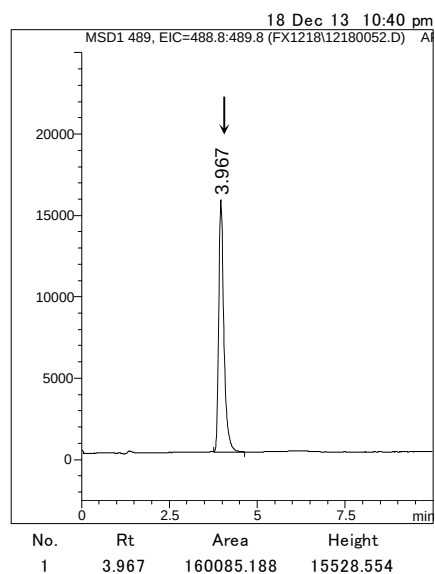
すいか 処理区 C・D (ジメトモルフ・メタラキシル M・フルフェノクスロン)

付図-2-3. フルフェノクスロンのクロマトグラム

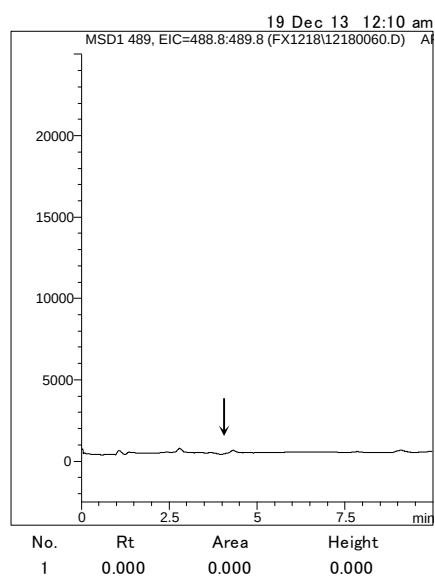
標準品 0.01ng



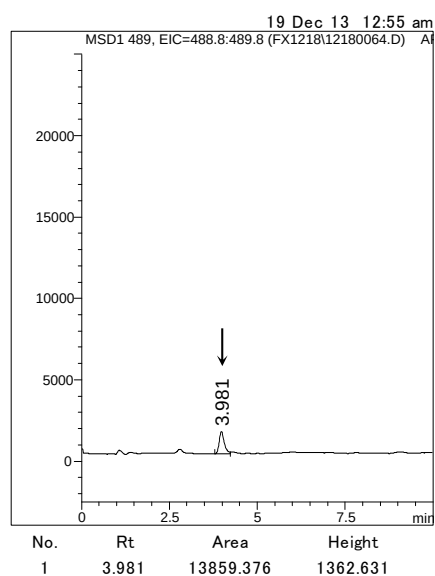
標準品 0.2ng



日植防宮崎 無処理
4mL/1μL/4g

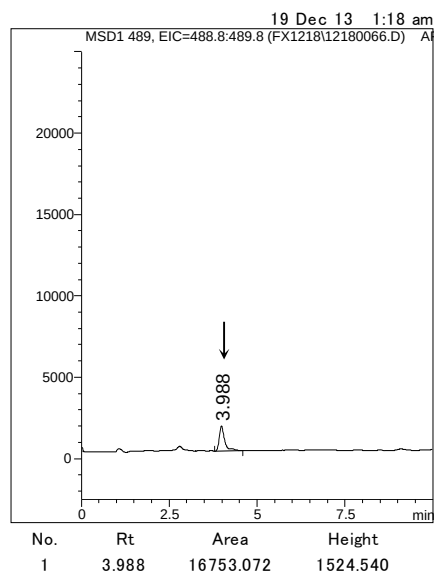


日植防宮崎 4回処理 7日後
4mL/1μL/4g

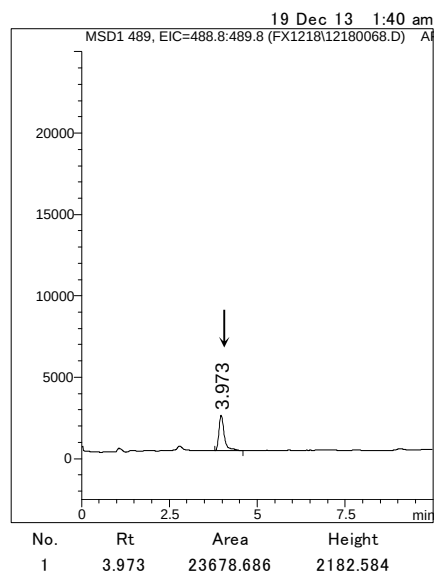


すいか 処理区 C・D (ジメトモルフ・メタラキシル M・フルフェノクスロン)

日植防宮崎 4 回処理 14 日後
4mL/1 μ L/4g



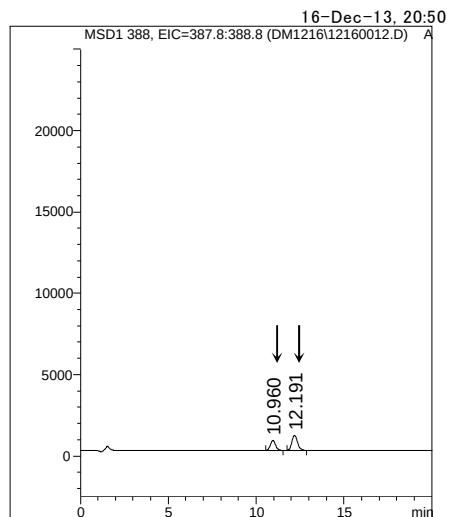
日植防宮崎 4 回処理 21 日後
4mL/1 μ L/4g



付図-3. 果実のクロマトグラム (代表例)

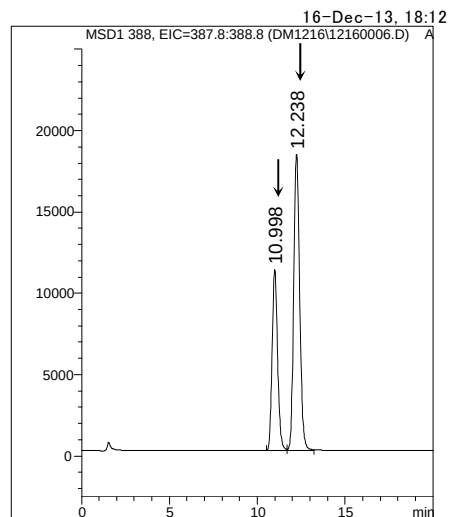
付図-3-1. ジメトモルフのクロマトグラム

標準品 0.02ng



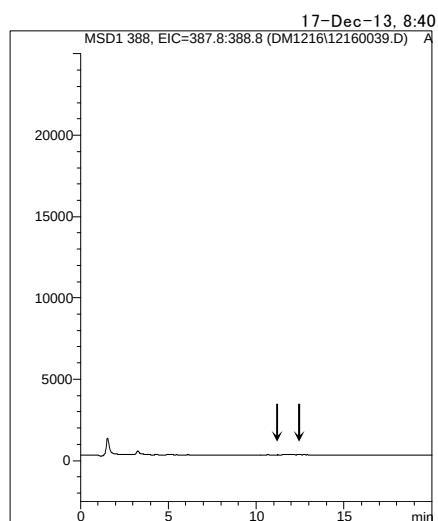
No.	Rt	Area	Height
1	10.960	12570.879	609.814
2	12.191	21177.500	944.249

標準品 0.4ng



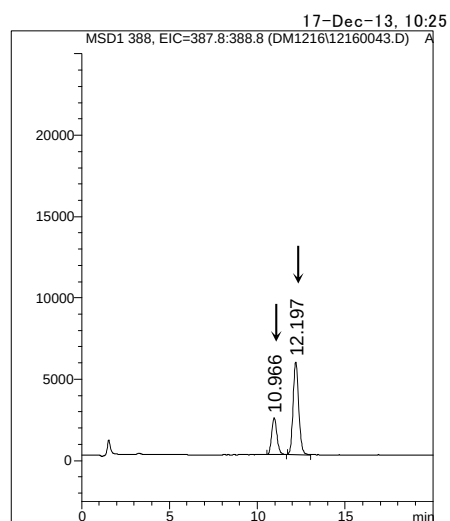
No.	Rt	Area	Height
1	10.998	240716.516	11117.950
2	12.238	428557.375	18221.947

日植防宮崎 無処理
4mL/2μL/4g



No.	Rt	Area	Height
1	0.000	0.000	0.000
2	0.000	0.000	0.000

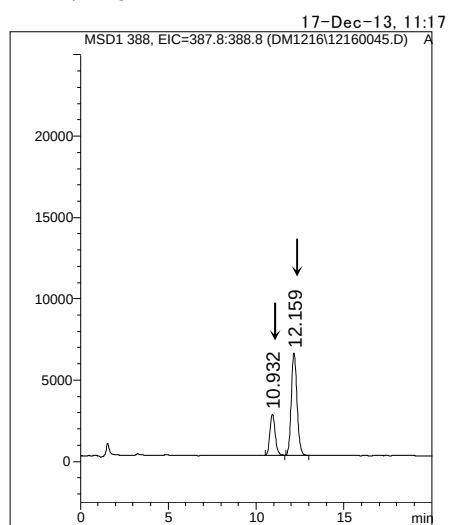
日植防宮崎 3 回処理 7 日後
4mL/2μL/4g



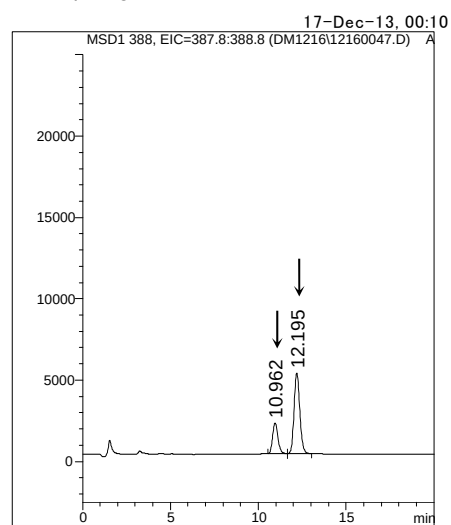
No.	Rt	Area	Height
1	10.966	48206.301	2290.131
2	12.197	127021.219	5719.458

すいか 処理区 C・D (ジメトモルフ・メタラキシル M・フルフェノクスロン)

日植防宮崎 3 回処理 14 日後
4mL/2 μ L/4g



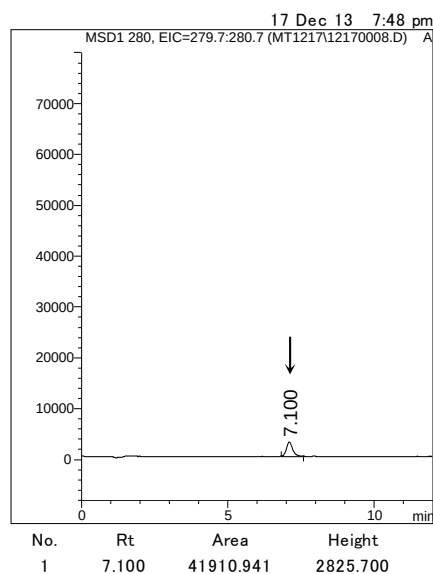
日植防宮崎 3 回処理 21 日後
4mL/2 μ L/4g



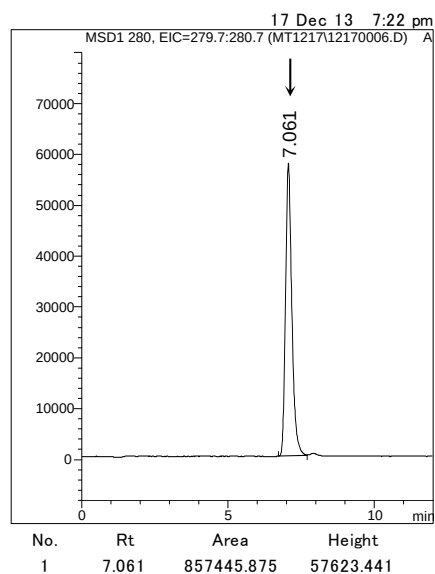
すいか 処理区 C・D (ジメトモルフ・メタラキシル M・フルフェノクスロン)

付図-3-2. メタラキシル M のクロマトグラム

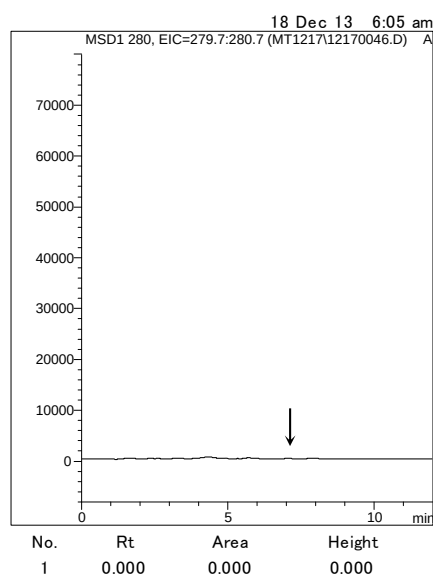
標準品 0.01ng



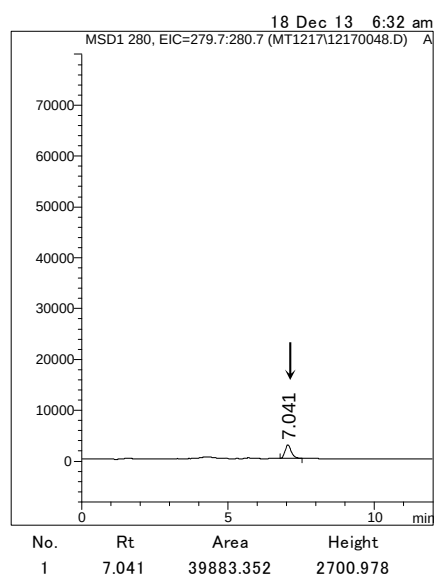
標準品 0.2ng



日植防宮崎 無処理
4mL/1μL/4g

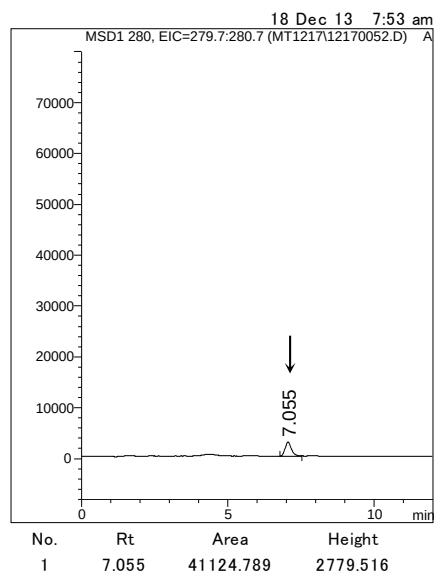


日植防宮崎 3回処理 7日後
4mL/1μL/4g

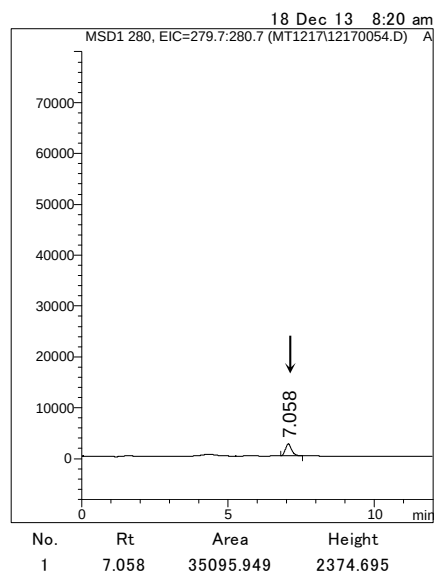


すいか 処理区 C・D (ジメトモルフ・メタラキシル M・フルフェノクスロン)

日植防宮崎 3 回処理 14 日後
4mL/1 μ L/4g



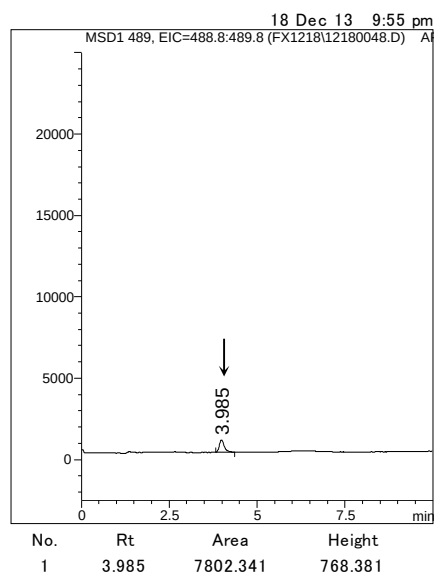
日植防宮崎 3 回処理 21 日後
4mL/1 μ L/4g



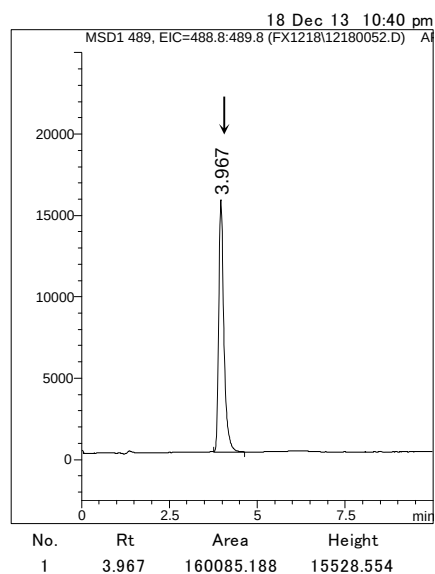
すいか 処理区 C・D (ジメトモルフ・メタラキシル M・フルフェノクスロン)

付図-3-3. フルフェノクスロンのクロマトグラム

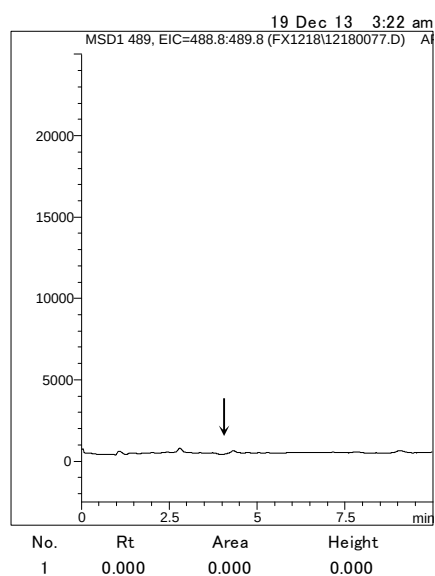
標準品 0.01ng



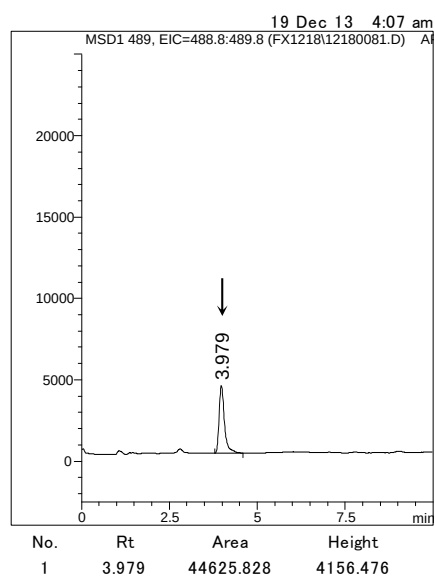
標準品 0.2ng



日植防宮崎 無処理
4mL/1μL/4g

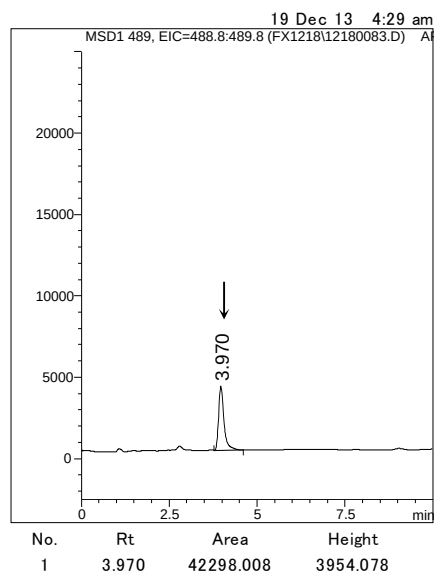


日植防宮崎 4回処理 7日後
4mL/1μL/4g

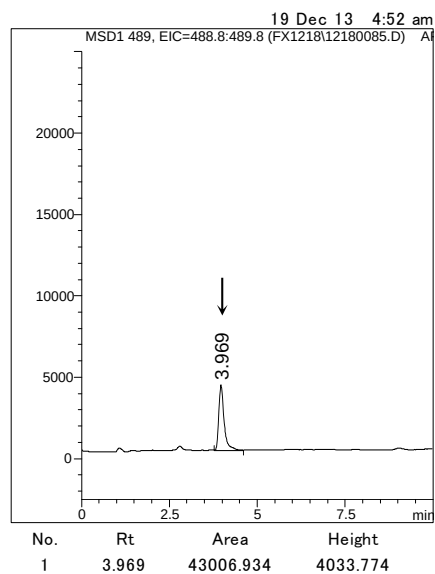


すいか 処理区 C・D (ジメトモルフ・メタラキシル M・フルフェノクスロン)

日植防宮崎 4 回処理 14 日後
4mL/1 μ L/4g



日植防宮崎 4 回処理 21 日後
4mL/1 μ L/4g



10. 試料重量等

試料	処理 回数	経過 日数	平均重量 (kg/個)	総平均重量 (kg/個)	総重量 (kg)	総重量の平均 (kg)	重量比(%)		果皮の厚さ (mm)
茨城	0	—	1.74	2.05	17.4	12.4	85	15	4.6
	C	7	2.06		10.3		83	17	5.1
	C	14	2.28		11.4		87	13	5.0
	C	21	2.10		10.5		88	12	4.9
								平均 86:14	
高知	0	—	1.42	1.68	17.1	12.2	82	18	5.8
	C	7	1.82		10.9		82	18	5.0
	C	14	1.75		10.5		83	17	5.3
	C	21	1.73		10.4		82	18	5.6
								平均 82:18	
宮崎	0	—	1.42	1.47	15.6	10.0	81	19	5.0
	C	1	1.32		7.94		78	22	6.1
	C	3	1.22		7.35		81	19	5.8
	C	7	1.58		9.45		84	16	5.6
	C	14	1.59		9.53		82	18	5.2
	C	21	1.70		10.2		83	17	5.1
								平均 82:18	
3圃場の平均			3ほ場の総平均重量 1.73 kg/個		3ほ場の総重量の平均 11.5 kg				

チオファネートメチルは処理1日後, 3日後, 7日後試料について分析を実施
 その他の5剤については処理7日後, 14日後, 21日後試料について分析を実施

C・D: シメコナゾールは5回処理
 フルフェノクスロンは4回処理
 ジメトモルフ, メタラキシルMは3回処理
 ジノテフランは2回処理

11. 作物写真の一例



日植防宮崎 無処理



日植防宮崎 処理 1 日後



日植防宮崎 処理 3 日後



日植防宮崎 処理 7 日後



日植防宮崎 処理 14 日後



日植防宮崎 処理 21 日後