

資料 2-5

農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業

(①すいか、メロン)

残留分析詳細(すいか試料)：クロルフルアズロン

1. 分析対象物質

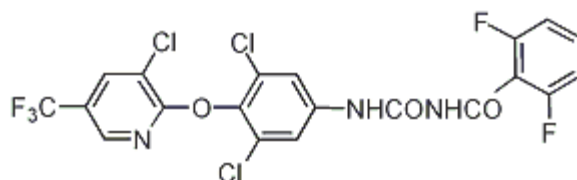
クロルフルアズロン

化学名： 1-[3,5-dichloro-4-(3-chloro-5-trifluoromethyl-2-pyridyloxy)phenyl]-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea

分子式： $C_{20}H_9Cl_3F_5N_3O_3$

分子量： 540.7

構造式：



性 状： 白色結晶

融 点： 221.2～223.9°C

蒸気圧： $< 1.559 \times 10^{-3}$ mPa (20°C)

分配係数： $\log P_{ow} = 5.9$

溶解性： 水 0.012 mg/L (20°C)

ヘキサン 0.00639, オクタノール 1, キシレン 4.67, メタノール 2.68,
トルエン 6.6, イソプロパノール 7, ジクロロメタン 20,
アセトン 55.9, シクロヘキサノン 110 (以上 g/L, 20°C)

安定性： 熱, 光, 加水分解に対して安定

出 典： The e-Pesticide Manual 15th Edition. ver. 5.0

2. 標準品及び試薬

クロルフルアズロン標準品：純度 99.7% (和光純薬工業製)

アセトン, トルエン, メタノール：残留農薬試験用 (和光純薬工業製)

メタノール：LC/MS 用 (和光純薬工業製)

水：PURELAB Flex System で精製した水

(Veolia Water Solutions & Technologies, France)

ギ酸：試薬特級 (和光純薬工業製)

酢酸アンモニウム：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：InertSep GC, 500 mg/6 mL (ジーエルサイエンス製)

3. 装置及び機器

ミキサー： ロボクーブ BLIXER-5Plus, R-23 (エフ・エム・アイ製)

液体クロマトグラフ・質量分析計システム (LC-MS/MS)：

ACQUITY UPLC I-Class (Waters 製)

Xevo TQ-S (Waters 製)

データ処理装置： MassLynx 4.1 (Waters 製)

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： ACQUITY UPLC HSS C18 (Waters 製)
 内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒径 1.8 μ m
 溶離液： A : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール
 B : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム
 A:B = 60:40 (1 min)－(3.5 min)－98:2 (1.5 min)
 流速： 0.3 mL/min
 カラム温度： 40°C
 注入量： 2 μ L
 保持時間： 約 5.0 min

4.2. 質量分析計

イオン化法： エレクトロスプレー イオン化法 (ESI)
 負モード
 コーンガス流量： 150 L/h (N₂)
 脱溶媒ガス流量： 1000 L/h (N₂)
 脱溶媒ガス温度： 500°C
 ソースブロック温度： 150°C
 キャピラリー電圧： 3.0 kV
 コーン電圧： 40 V
 コリジョン電圧： 10 V
 (コリジョンガス; Ar)
 イオン検出法： MRM
 モニタリングイオン： プリカーサーイオン m/z 539.7
 プロダクトイオン m/z 519.7

5. 検量線の作成

クロルフルアズロン標準品10.0 mgを50 mL容メスフラスコに精秤し、アセトンに溶解して200 mg/L標準原液を調製した。この原液をアセトンで希釈して2 mg/L標準溶液を調製し、さらにこの溶液をメタノールで希釈して0.2 mg/L標準溶液を調製した。この溶液をメタノールで希釈して0.0005, 0.001, 0.002, 0.005, 0.01及び0.02 mg/Lの標準溶液を調製した。この溶液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クロルフルアズロンの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。

6. 分析操作

6.1. 試料の前処理

試料は各々を縦に8分割し、対角の2つを取り合わせた(4組作製)。その2組を果実分析用試料とし、残りの2組を果肉分析用試料とした。果肉分析用試料は果肉と果皮に分け、果皮の厚さを測定した。又、果実、果肉及び果皮の各部位の全重量を測定した。

2組の果実分析用試料のうち1組をミキサーで均一化して調製試料を作製した。果肉分析用試料についても果実と同様に調製試料を作製した。各調製試料は2組以上作製し、それぞれ密封して冷凍保存した。分析時にその1組を取り、分析に供した。

6.2. 抽出

均一化した試料20 gをはかりとり、アセトン100 mLを加え、30分間振とうした。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で洗い、同様にろ過した。ろ液を合わせ、アセトンで200 mL定容とし、その2.5 mL(試料0.25 g相当量)を分取した。

6.3. グラファイトカーボンミニカラムによる精製

グラファイトカーボンミニカラムにメタノール及び水を順次5 mLずつ流下し前処理した。分取した抽出液に水2.5 mLを添加して混和した後、グラファイトカーボンミニカラムに流下した。さらにメタノール/水 (70:30, v/v) 混液 5 mLで容器内を洗浄後、グラファイトカーボンミニカラムに移して流下し、これらの流出液を捨てた。次に3%ギ酸含有メタノール5 mL, メタノール/トルエン (75:25, v/v) 混液 20 mLを順次流下し、これらの溶出液を分取した。溶出液は40°C以下の水浴中で減圧濃縮し、最後は窒素気流下で溶媒を留去した。

6.4. 定量

残留物を適量のメタノールに溶解した。この溶液を前記条件の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入してピーク面積を求め、検量線よりクロルフルアズロンの重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

7. 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 (mg/kg)
0.002	0.25	2.5	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 (mg/kg)
0.001	0.25	2.5	2	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、高知試料*を用いて、0.01 mg/kg（定量限界相当）、0.25及び5 mg/kg 添加濃度における回収試験を各5連分析で実施した。尚、無添加試料は2連分析し、全て定量限界未満であった。回収率の算出結果を示す。

* H25農薬登録に係る調理加工試験導入に関する調査事業の無処理試料を均一化したもの

8.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSD (%)
高知	5	97, 94,	95, 90	94,	94	3
高知	0.25	96, 93,	95, 87	94,	93	4
高知	0.01	86, 77,	82, 76	79,	80	5

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSD (%)
高知	5	94, 91,	93, 91	92,	92	1
高知	0.25	93, 87,	92, 79	89,	88	6
高知	0.01	87, 80,	82, 77	80,	81	5

9. 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 mg/kg添加試料（内部精度管理試料）を分析した。その結果、下表に示すように問題は認められなかった。又、2016年8月実施のFAPAS技能試験（Fera Science Ltd.）におけるZスコアは全てZ<2であった。

9.1. 果肉

分析日*	使用したほ場	回収率 (%)	無処理区の分析値 (mg/kg)
2016/8/18	宮崎	92	<0.01
9/15	茨城	88	<0.01
11/10	高知	85	<0.01
12/13	高知	85	<0.01

回収試料の添加濃度：0.1 mg/kg

*抽出日を記載

9.2. 果実

分析日*	使用したほ場	回収率 (%)	無処理区の分析値 (mg/kg)
2016/8/18	宮崎	90	<0.01
9/15	茨城	93	<0.01
11/10	高知	84	<0.01
12/13	高知	81	<0.01

回収試料の添加濃度：0.1 mg/kg

*抽出日を記載

10. 保存安定性確認

均一化した各無処理試料にクロルフルアズロンを添加し、冷凍暗所（－20℃以下）に保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を確認した。保存安定性の結果を示す。

10.1. 果肉

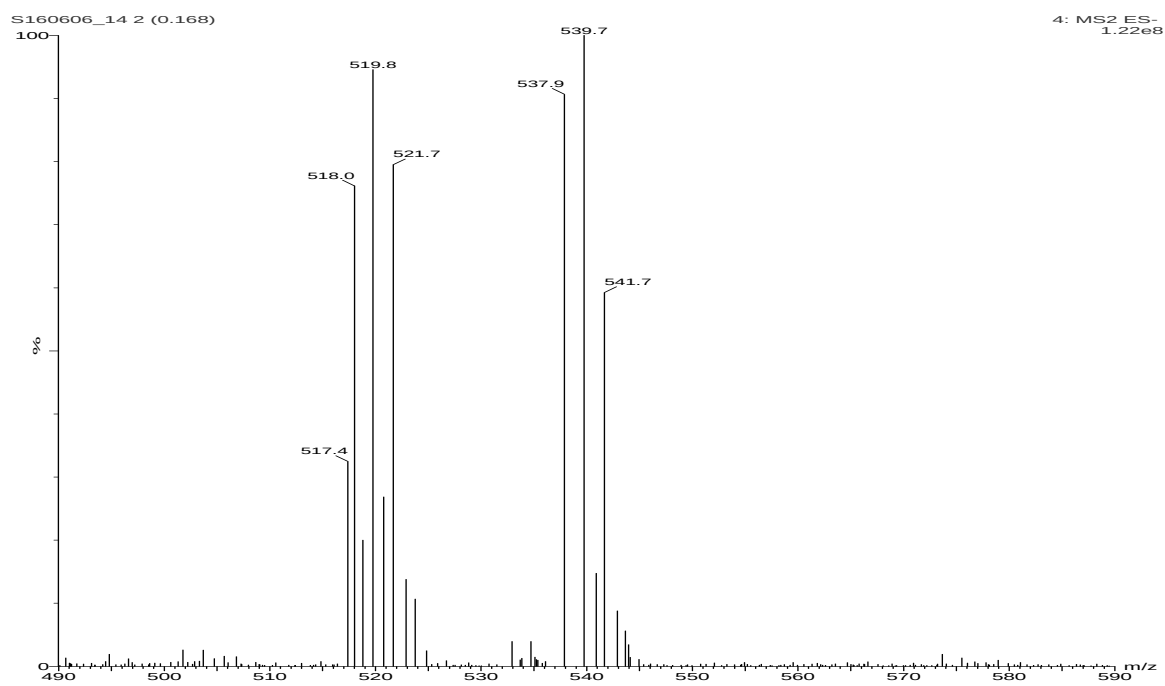
ほ場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	0.5	126 (2016/8/9-12/13)	88,	85	86
高知	0.5	69 (2016/10/5-12/13)	88,	86	87
宮崎	0.5	144 (2016/7/22-12/13)	88,	83	86

10.2. 果実

ほ場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	0.5	126 (2016/8/9-12/13)	90,	89	90
高知	0.5	69 (2016/10/5-12/13)	87,	86	86
宮崎	0.5	144 (2016/7/22-12/13)	89,	82	86

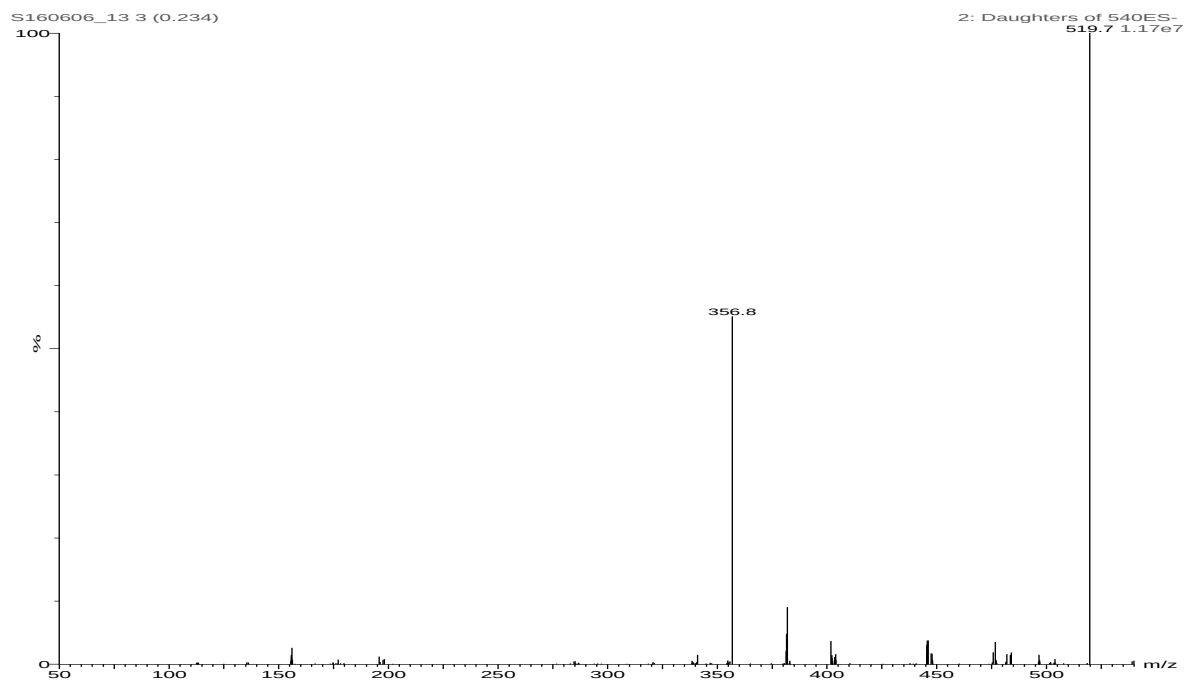
付図-1. マススペクトル

マススペクトル (一次イオン) の一例



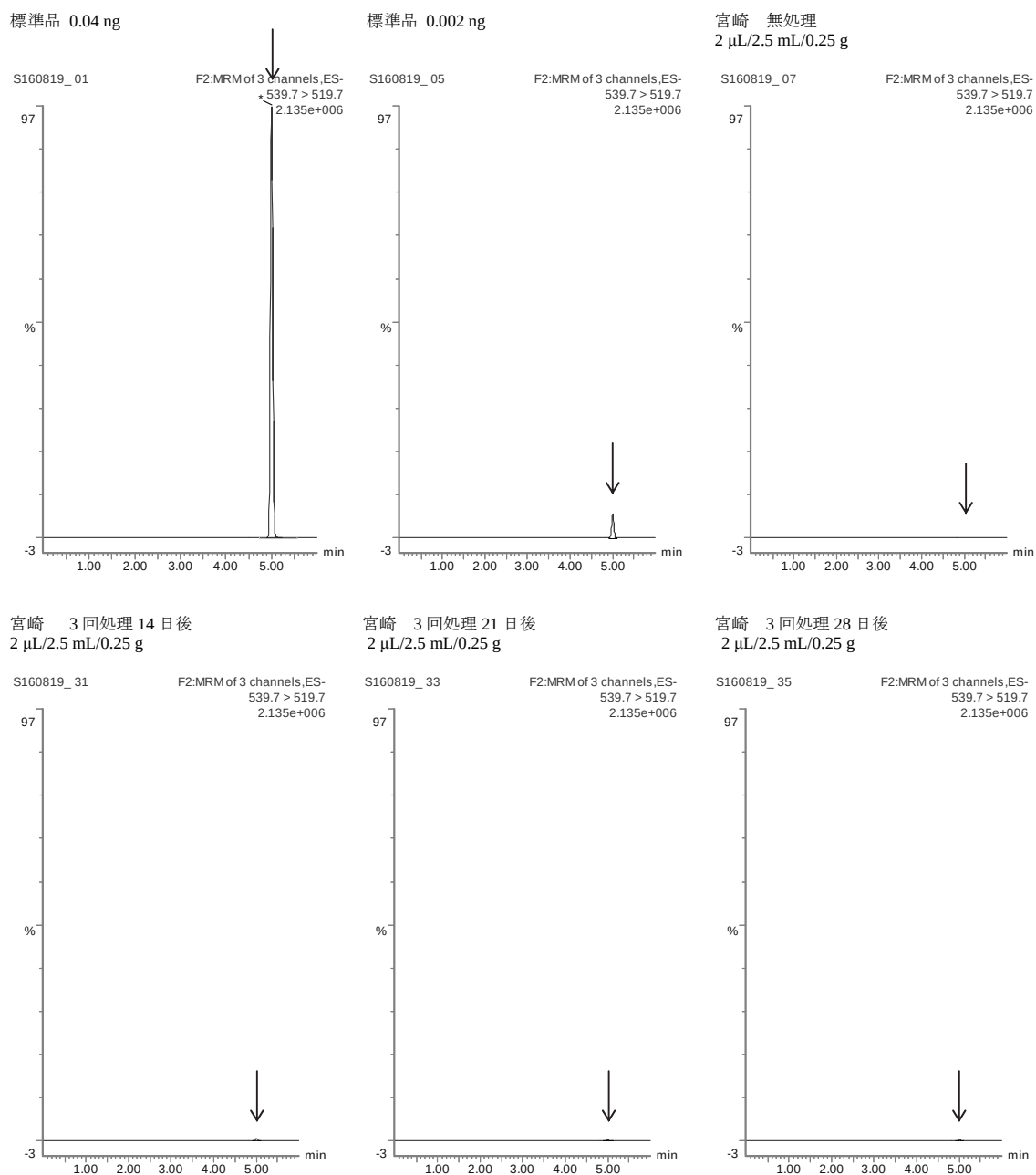
プロダクトスキャンスペクトルの一例

(プリカーサーイオン ; $m/z=539.7$, 負モード)



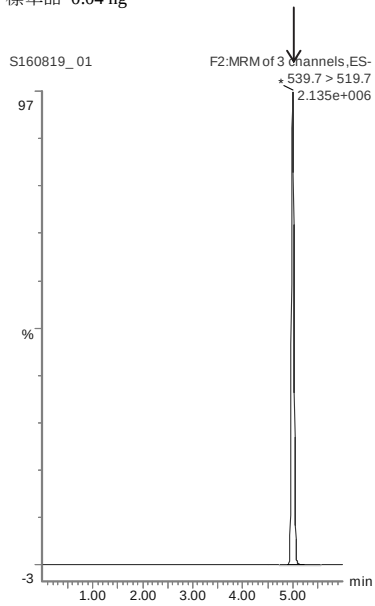
付図-2. クロマトグラム (代表例)

付図-2-1. 果肉

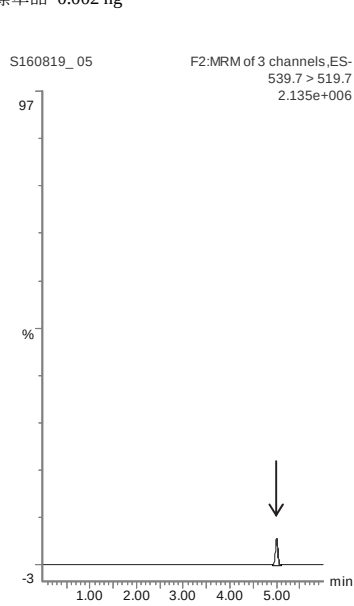


付図-2-2. 果実

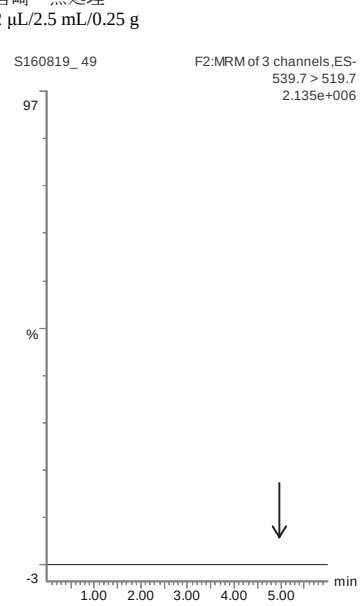
標準品 0.04 ng



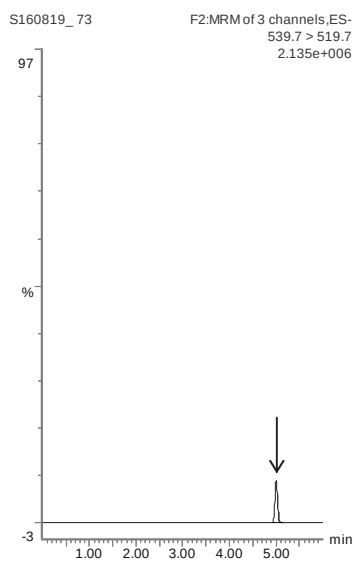
標準品 0.002 ng



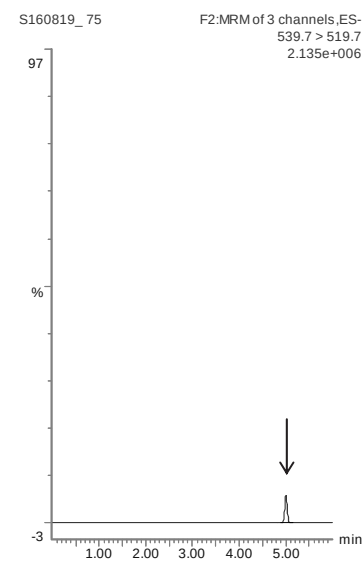
宮崎 無処理
2 μL/2.5 mL/0.25 g



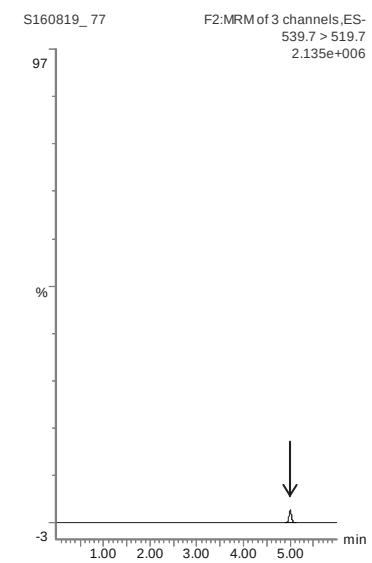
宮崎 3回処理 14日後
2 μL/2.5 mL/0.25 g



宮崎 3回処理 21日後
2 μL/2.5 mL/0.25 g



宮崎 3回処理 28日後
2 μL/2.5 mL/0.25 g



残留分析詳細(すいか試料)：キャプタン

1. 分析対象物質

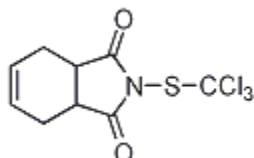
キャプタン

化学名： N-(trichloromethylthio)cyclohex-4-ene-1,2-dicarboximide

分子式： $C_9H_8Cl_3NO_2S$

分子量： 300.6

構造式：



性 状： 無色結晶

融 点： 178°C

蒸気圧： <1.3 mPa (25°C)

分配係数： $\log P_{OW} = 2.8$ (25°C)

溶解性： 水 3.3 mg/L (25°C)

キシレン 20, クロロホルム 70, アセトン 21, シクロヘキサン 23,
ジオキサン 47, ベンゼン 21, トルエン 6.9, イソプロパノール 1.7,
エタノール 2.9, ジエチルエーテル 2.5 (以上g/kg, 26°C)

安定性： 中性溶液中で緩やかに加水分解,

アルカリ溶液中では速やかに加水分解

加水分解半減期(20°C)；32.4時間(pH5), 8.3時間(pH7), 2分未満(pH10)

出 典：The e-Pesticide Manual 15th Edition. ver. 5.0

2. 標準品及び試薬

キャプタン標準品：純度 99.2% (和光純薬工業製)

アセトン, ヘキサン：残留農薬試験用 (和光純薬工業製)

水：PURELAB Flex System で精製した水

(Veolia Water Solutions & Technologies, France)

リン酸：試薬特級 (和光純薬工業製)

ガラス繊維ろ紙：GFP (桐山製作所製)

無水硫酸ナトリウム：試薬特級 (和光純薬工業製)

フロリジルミニカラム：Sep-Pak フロリジルカートリッジ, プラス (Waters 製)

ガラス繊維ろ紙：GFP (桐山製作所製)

3. 装置及び機器

ミキサー： ロボクーブ BLIXER-5Plus (エフ・エム・アイ製)
 超音波洗浄機：FU-30C, UT-305 (シャープ製)
 ガスクロマトグラフ (GC-ECD)：7890A (Agilent製)
 データ処理装置：OpenLAB CDS ChemStation Edition (Agilent 製)

4. ガスクロマトグラフの操作条件

カラム： Rtx-1 (Restek 製)
 内径 0.53 mm, 長さ 30 m, 膜厚 1.0 μ m
 温度： カラム 180°C(17.5 min)－40°C/min－280°C (3 min),
 注入口 280°C, 検出器 300°C
 ガス流量： キャリヤー (He) 6 mL/min
 メイクアップガス (N₂) 54 mL/min
 注入量： 2 μ L
 保持時間： 約 15.4 min

5. 検量線の作成

キャプタン標準品10.1 mg (純度補正10.0 mg相当)を50 mL容メスフラスコに精秤し、アセトンに溶解して200 mg/L標準原液を調製した。この原液をヘキサンで希釈して10 mg/L標準溶液を調製し、さらにこの溶液をヘキサンで希釈して1 mg/L標準溶液を調製した。この溶液をヘキサンで希釈して0.0005, 0.001, 0.002, 0.005, 0.01及び0.02 mg/Lの標準溶液を調製した。この溶液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キャプタンの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。

6. 分析操作

6.1. 試料の前処理

試料は各々を縦に8分割し、対角の2つを取り合わせた (4組作製)。その2組を果実分析用試料とし、残りの2組を果肉分析用試料とした。果肉分析用試料は果肉と果皮に分け、果皮の厚さを測定した。又、果実、果肉及び果皮の各部位の全重量を測定した。

2組の果実分析用試料のうち1組を適切な大きさに細切した。細切試料に10%リン酸を加えてミキサーで均一化し、調製試料を作製した。果肉分析用試料についても果実と同様に調製試料を作製した。各調製試料は2組以上作製し、それぞれ密封して冷凍保存した。分析時にその1組を取り、分析に供した。

6.2. 抽出

均一化した試料30 g (試料20 g相当量)をはかりとり、アセトン100 mLを加え、30分間

振とうした。抽出物をガラス繊維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で洗い、同様にろ過した。ろ液を合わせ、アセトンで200 mL定容とし、その2.5 mL（試料0.25 g相当量）を分取した。

6.3. 精製

6.3.1. ヘキサン転溶

分取した抽出液にヘキサン50 mL及び10%塩化ナトリウム溶液50 mLを加え、振とう機を用いて5分間激しく振とうした。暫時放置後、有機溶媒層を分取し、水層にはヘキサン25 mLを加え同様の振とう及び分取の操作を繰り返した。全有機溶媒層を無水硫酸ナトリウムで脱水ろ過し、ろ液を合わせ、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、最後は窒素気流下で溶媒を留去した。

6.3.2. フロリジルミニカラムによる精製

フロリジルミニカラムにヘキサンを5 mL流下し前処理した。残留物をヘキサン5 mLに溶解し、超音波処理した後、フロリジルミニカラムに流下した。さらにヘキサン／アセトン (100:2, v/v) 混液5 mLで容器内を洗浄し、超音波処理した後、フロリジルミニカラムに流下し、これらの流出液を捨てた。次に、ヘキサン／アセトン (95:5, v/v) 混液25 mLで容器内を洗浄し、超音波処理した後、フロリジルミニカラムに流下し、溶出液を取り、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、最後は窒素気流下で溶媒を留去した。

6.4. 定量

残留物を適量のヘキサンに溶解した。この溶液を前記条件のガスクロマトグラフに注入してピーク面積を求め、検量線よりキャプタンの重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

7. 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 (mg/kg)
0.002	0.25	2.5	2	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 (mg/kg)
0.001	0.25	2.5	2	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、茨城及び宮崎の無処理試料を用いて、0.01 mg/kg（定量限界相当）、0.25及び5 mg/kg添加濃度における回収試験を各5連分析で実施した。尚、無処理試料は各ほ場2連分析し、全て定量限界未満であった。回収率の算出結果を示す。

8.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSD (%)
茨城	5	76,	76,		73	4
宮崎		73,	70,	70		
茨城	0.25	83,	81,		82	7
宮崎		91,	81,	76		
茨城	0.01	85,	84,		85	2
宮崎		87,	87,	84		

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSD (%)
茨城	5	76,	75,		75	4
宮崎		79,	72,	71		
茨城	0.25	83,	81,		84	3
宮崎		87,	86,	82		
茨城	0.01	95,	90,		93	2
宮崎		94,	93,	93		

9. 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 mg/kg添加試料（内部精度管理試料）を分析した。その結果、下表に示すように問題は認められなかった。又、2016年8月実施のFAPAS技能試験（Fera Science Ltd.）におけるZスコアは全てZ<2であった。

9.1. 果肉

分析日*	使用したほ場	回収率 (%)	無処理区の分析値 (mg/kg)
2016/9/28	茨城	97	<0.01
11/17	高知	82	<0.01
12/1	高知	105	<0.01

回収試料の添加濃度：0.1 mg/kg *抽出日を記載

9.2. 果実

分析日*	使用したほ場	回収率 (%)	無処理区の分析値 (mg/kg)
2016/9/28	茨城	96	<0.01
11/17	高知	93	<0.01
12/1	高知	97	<0.01

回収試料の添加濃度：0.1 mg/kg *抽出日を記載

10. 保存安定性確認

均一化した各無処理試料にキャプタンを添加し、冷凍暗所（－20℃以下）に保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を確認した。保存安定性の結果を示す。

10.1. 果肉

ほ場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	0.5	111 (2016/8/9-11/28)	85,	83	84
高知	0.5	54 (2016/10/5-11/28)	76,	72	74
宮崎	0.5	129 (2016/7/22-11/28)	81,	78	80

10.2. 果実

ほ場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	0.5	111 (2016/8/9-11/28)	85,	84	84
高知	0.5	54 (2016/10/5-11/28)	75,	70	72
宮崎	0.5	129 (2016/7/22-11/28)	83,	82	82

付図-1.キャプタンのクロマトグラム（代表例）

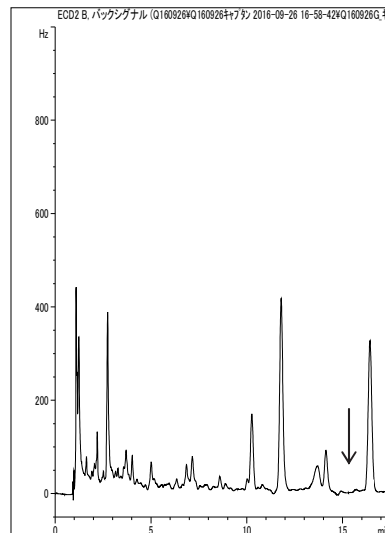
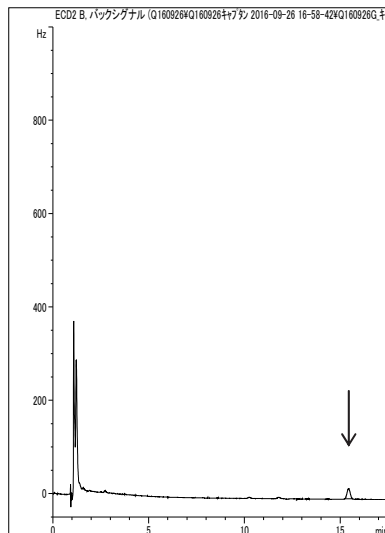
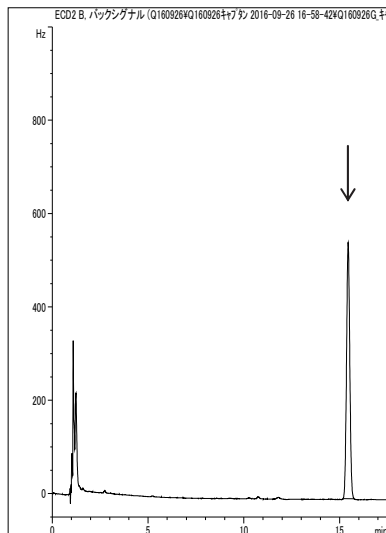
付図-1-1. 果肉

標準品 0.04 ng

標準品 0.002 ng

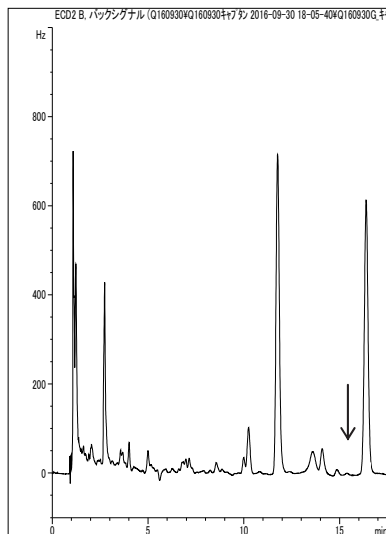
茨城 無処理

2 μ L/2.5 mL/0.25 g



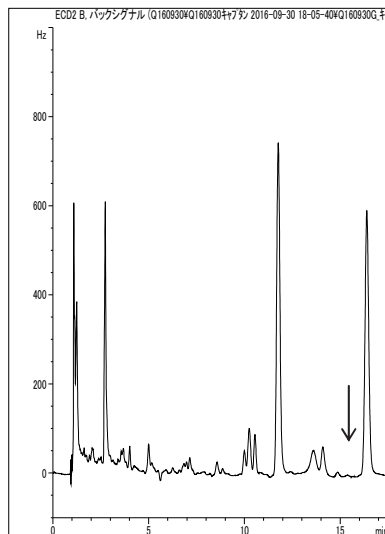
茨城 5 回処理 14 日後

2 μ L/2.5 mL/0.25 g



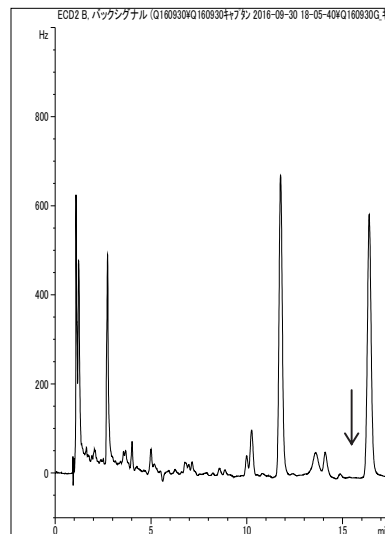
茨城 5 回処理 21 日後

2 μ L/2.5 mL/0.25 g



茨城 5 回処理 28 日後

2 μ L/2.5 mL/0.25 g



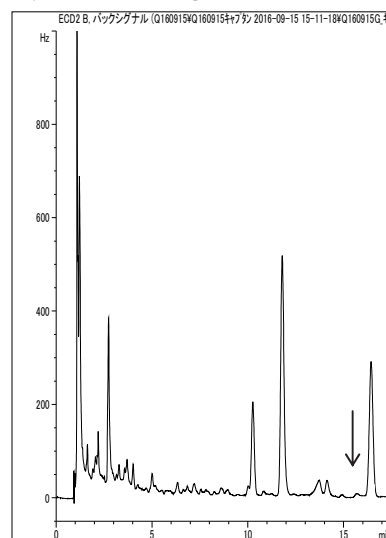
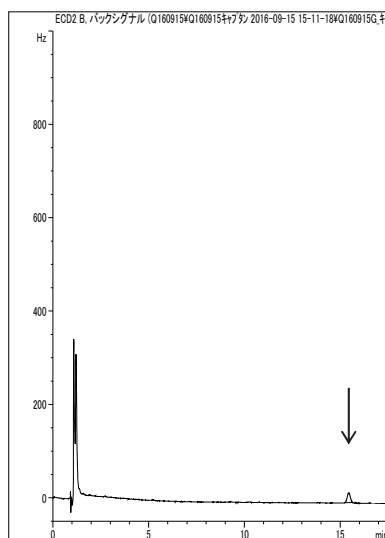
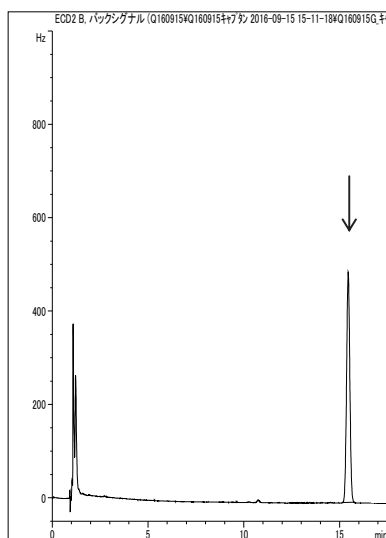
付図-1-2. 果実

標準品 0.04 ng

標準品 0.002 ng

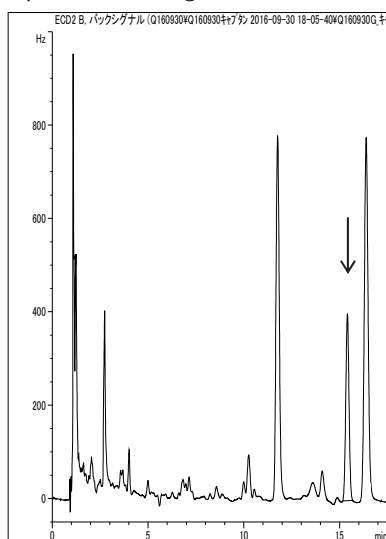
茨城 無処理

2 μ L/2.5 mL/0.25 g



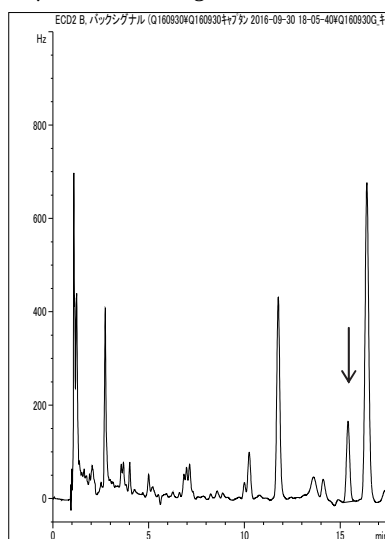
茨城 5回処理 14日後

2 μ L/2.5 mL/0.25 g



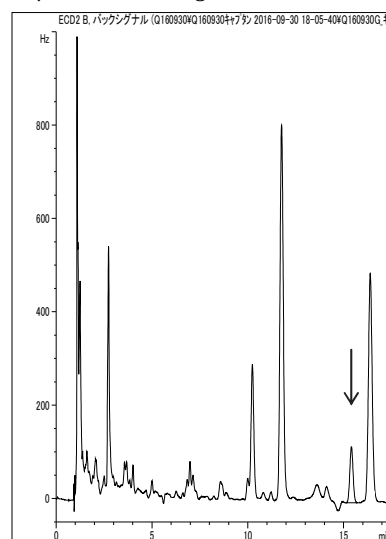
茨城 5回処理 21日後

2 μ L/2.5 mL/0.25 g



茨城 5回処理 28日後

2 μ L/2.5 mL/0.25 g



残留分析詳細(すいか試料) : 試料重量, 作物写真

1. 試料重量等

試料	処理	経過	平均重量	総平均重量	送付量	送付量の平均	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	—	1.68	1.75	30.3	15.6	74	26	6.9
	E	14	1.46		8.73		73	27	6.4
	E	21	1.75		10.5		77	23	4.4
	E	28	2.12		12.7		78	22	4.3
							平均 76:24		平均 5.5
高知	0	—	1.34	1.74	24.2	12.1	77	23	5.9
	E	14	1.86		9.29		78	22	2.9
	E	21	1.77		8.86		82	18	3.6
	E	28	1.97		5.90		78	22	4.1
							平均 79:21		平均 4.1
宮崎	0	—	1.67	1.34	25.0	12.8	72	28	5.2
	E	14	1.56		9.33		77	23	4.5
	E	21	1.11		8.85		70	30	4.4
	E	28	1.00		8.02		71	29	4.2
							平均 73:27		平均 4.6
3 ほ場の総平均重量									
1.61 kg/個									

E : クロルフルアズロンは3回処理

キャプタンは5回処理

2.作物写真

2.1.茨城



茨城 無処理



茨城 処理14日後



茨城 処理21日後



茨城 処理28日後

2.2.高知



高知 無処理



高知 処理14日後



高知 処理21日後



高知 処理28日後

2.3.宮崎



宮崎 無処理



宮崎 処理14日後



宮崎 処理21日後



宮崎 処理28日後

農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業

(①すいか、メロン)

残留分析詳細(すいか試料)：ジフルベンズロン

1. 分析対象物質

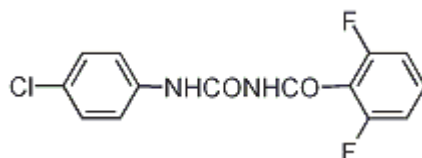
ジフルベンズロン

化学名： 1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea

分子式： $C_{14}H_9ClF_2N_2O_2$

分子量： 310.7

構造式：



性 状： 無色結晶

融 点： 228°C

蒸気圧： 1.2×10^{-4} mPa (25°C)

分配係数： $\log P_{ow} = 3.89$

溶解性： 水 0.08 mg/L (pH 7, 25°C)

ヘキサン 0.063, トルエン 0.29, ジクロロメタン 1.8, アセトン 6.98,
酢酸エチル 4.26, メタノール 1.1 (以上 g/L, 20°C)

安定性： 溶液中では光の影響を受けるが固体状態では光に対して安定

加水分解半減期； >180日 (pH 5, pH 7, 20°C), 32.5日 (pH 9, 20°C)

出 典： The e-Pesticide Manual 15th Edition. ver. 5.0

2. 標準品及び試薬

ジフルベンズロン標準品：純度 99.6% (和光純薬工業製)

アセトン, トルエン, メタノール：残留農薬試験用 (和光純薬工業製)

メタノール：LC/MS 用 (和光純薬工業製)

水：PURELAB Flex System で精製した水

(Veolia Water Solutions & Technologies, France)

ギ酸：試薬特級 (和光純薬工業製)

酢酸アンモニウム：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：InertSep GC, 500 mg/6 mL (ジーエルサイエンス製)

3. 装置及び機器

ミキサー： ロボクーブ BLIXER-5Plus, R-23 (エフ・エム・アイ製)

液体クロマトグラフ・質量分析計システム (LC-MS/MS)：

ACQUITY UPLC I-Class (Waters 製)

Xevo TQ-S (Waters 製)

データ処理装置： MassLynx 4.1 (Waters 製)

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： ACQUITY UPLC HSS C18 (Waters 製)
 内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒径 1.8 μ m
 溶離液： A : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール
 B : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム
 A:B = 60:40 (1 min)－(3.5 min)－98:2 (1.5 min)
 流速： 0.3 mL/min
 カラム温度： 40°C
 注入量： 2 μ L
 保持時間： 約 3.7 min

4.2. 質量分析計

イオン化法： エレクトロスプレー イオン化法 (ESI)
 正モード
 コーンガス流量： 150 L/h (N₂)
 脱溶媒ガス流量： 1000 L/h (N₂)
 脱溶媒ガス温度： 500°C
 ソースブロック温度： 150°C
 キャピラリー電圧： 3.0 kV
 コーン電圧： 40 V
 コリジョン電圧： 10 V
 (コリジョンガス; Ar)
 イオン検出法： MRM
 モニタリングイオン： プリカーサーイオン m/z 311.1
 プロダクトイオン m/z 157.9

5. 検量線の作成

ジフルベンズロン標準品10.0 mgを50 mL容メスフラスコに精秤し、アセトンに溶解して200 mg/L標準原液を調製した。この原液をアセトンで希釈して2 mg/L標準溶液を調製し、さらにこの溶液をメタノールで希釈して0.2 mg/L標準溶液を調製した。この溶液をメタノールで希釈して0.0005, 0.001, 0.002, 0.005, 0.01及び0.02 mg/Lの標準溶液を調製した。この溶液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ジフルベンズロンの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。

6. 分析操作

6.1. 試料の前処理

試料は各々を縦に8分割し、対角の2つを取り合わせた(4組作製)。その2組を果実分析用試料とし、残りの2組を果肉分析用試料とした。果肉分析用試料は果肉と果皮に分け、果皮の厚さを測定した。又、果実、果肉及び果皮の各部位の全重量を測定した。

2組の果実分析用試料のうち1組をミキサーで均一化して調製試料を作製した。果肉分析用試料についても果実と同様に調製試料を作製した。各調製試料は2組以上作製し、それぞれ密封して冷凍保存した。分析時にその1組を取り、分析に供した。

6.2. 抽出

均一化した試料20 gをはかりとり、アセトン100 mLを加え、30分間振とうした。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で洗い、同様にろ過した。ろ液を合わせ、アセトンで200 mL定容とし、その2.5 mL(試料0.25 g相当量)を分取した。

6.3. グラファイトカーボンミニカラムによる精製

グラファイトカーボンミニカラムにメタノール及び水を順次5 mLずつ流下し前処理した。分取した抽出液に水2.5 mLを添加して混和した後、グラファイトカーボンミニカラムに流下した。さらにメタノール/水 (70:30, v/v) 混液 5 mLで容器内を洗浄後、グラファイトカーボンミニカラムに移して流下し、これらの流出液を捨てた。次に3%ギ酸含有メタノール5 mL, メタノール/トルエン (75:25, v/v) 混液 20 mLを順次流下し、これらの溶出液を分取した。溶出液は40°C以下の水浴中で減圧濃縮し、最後は窒素気流下で溶媒を留去した。

6.4. 定量

残留物を適量のメタノールに溶解した。この溶液を前記条件の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入してピーク面積を求め、検量線よりジフルベンズロンの重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

7. 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 (mg/kg)
0.002	0.25	2.5	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 (mg/kg)
0.001	0.25	2.5	2	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、高知試料*を用いて、0.01 mg/kg（定量限界相当）、0.25及び5 mg/kg 添加濃度における回収試験を各5連分析で実施した。尚、無添加試料は2連分析し、全て定量限界未満であった。回収率の算出結果を示す。

* H25農薬登録に係る調理加工試験導入に関する調査事業の無処理試料を均一化したもの

8.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSD (%)
高知	5	100, 94,	97, 90	95,	95	4
高知	0.25	91, 87,	90, 83	89,	88	4
高知	0.01	83, 76,	81, 75	77,	78	4

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSD (%)
高知	5	95, 89,	92, 88	91,	91	3
高知	0.25	87, 83,	87, 74	84,	83	6
高知	0.01	80, 76,	79, 74	78,	77	3

9. 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 mg/kg添加試料（内部精度管理試料）を分析した。その結果、下表に示すように問題は認められなかった。又、2016年8月実施のFAPAS技能試験（Fera Science Ltd.）におけるZスコアは全てZ<2であった。

9.1. 果肉

分析日*	使用したほ場	回収率 (%)	無処理区の分析値 (mg/kg)
2016/8/18	宮崎	79	<0.01
9/15	茨城	82	<0.01
11/10	高知	99	<0.01
12/13	高知	82	<0.01

回収試料の添加濃度：0.1 mg/kg

*抽出日を記載

9.2. 果実

分析日*	使用したほ場	回収率 (%)	無処理区の分析値 (mg/kg)
2016/8/18	宮崎	83	<0.01
9/15	茨城	77	<0.01
11/10	高知	92	<0.01
12/13	高知	89	<0.01

回収試料の添加濃度：0.1 mg/kg

*抽出日を記載

10. 保存安定性確認

均一化した各無処理試料にジフルベンズロンを添加し、冷凍暗所（－20℃以下）に保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を確認した。保存安定性の結果を示す。

10.1. 果肉

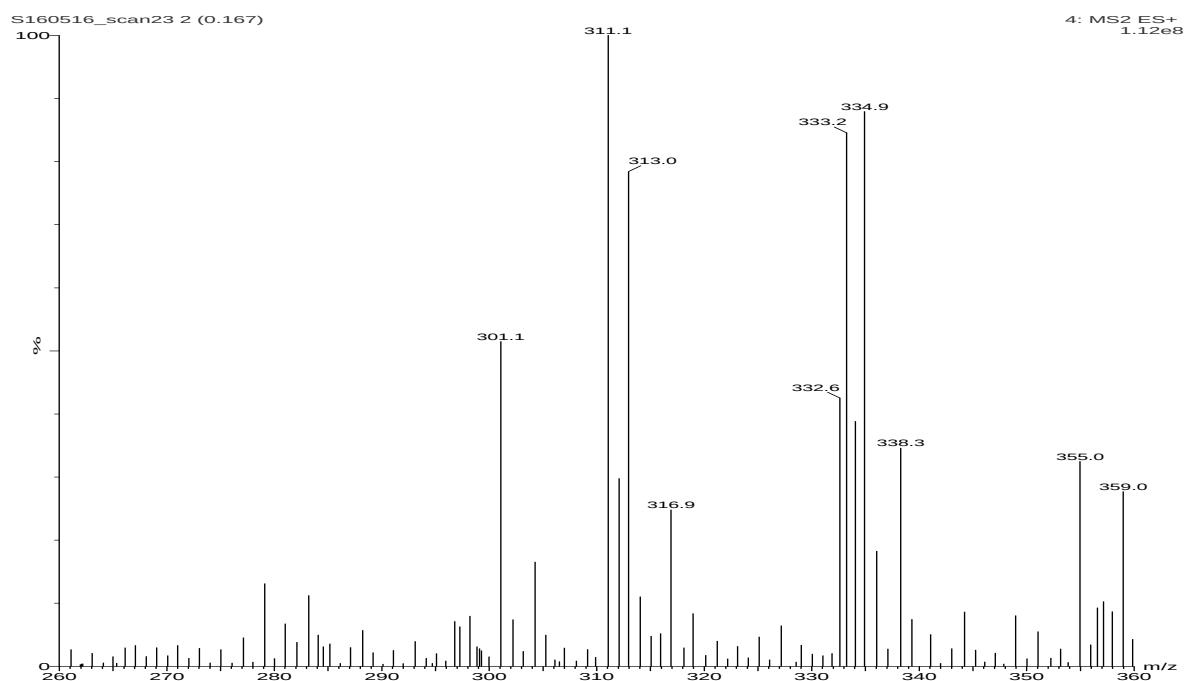
ほ場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	0.5	126 (2016/8/9-12/13)	81,	81	81
高知	0.5	69 (2016/10/5-12/13)	82,	79	80
宮崎	0.5	144 (2016/7/22-12/13)	89,	80	84

10.2. 果実

ほ場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	0.5	126 (2016/8/9-12/13)	81,	78	80
高知	0.5	69 (2016/10/5-12/13)	87,	79	83
宮崎	0.5	144 (2016/7/22-12/13)	78,	74	76

付図-1. マススペクトル

マススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)



プロダクトスキャンスペクトルの一例

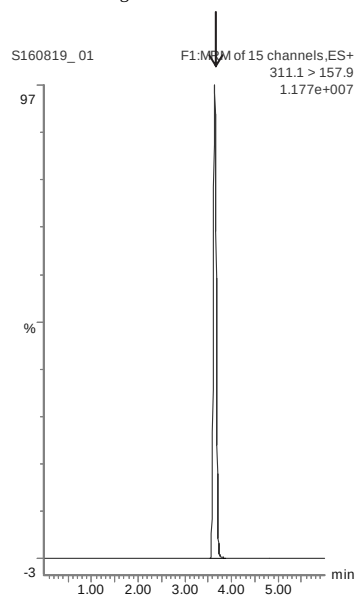
(プリカーサーイオン ; $m/z=311.1$, 正モード)



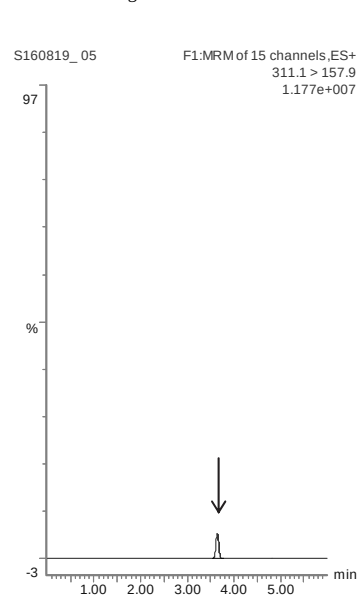
付図-2. クロマトグラム (代表例)

付図-2-1. 果肉

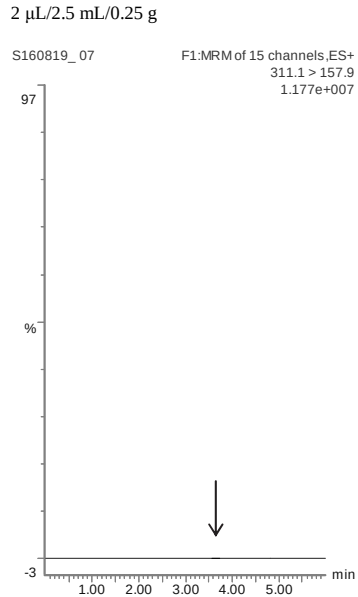
標準品 0.04 ng



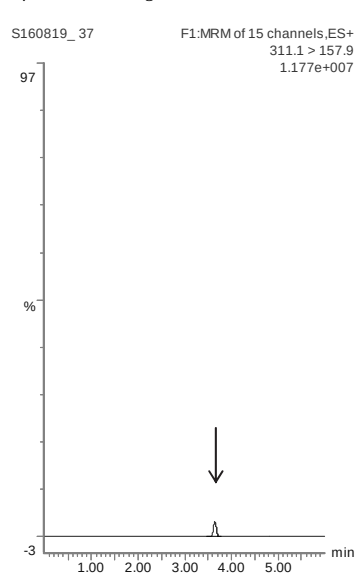
標準品 0.002 ng



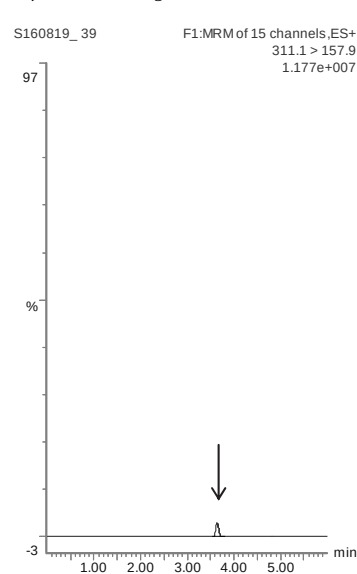
宮崎 無処理
2 μ L/2.5 mL/0.25 g



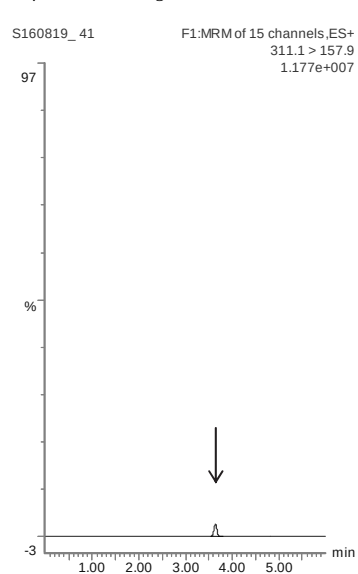
宮崎 3 回処理 7 日後
2 μ L/2.5 mL/0.25 g



宮崎 3 回処理 14 日後
2 μ L/2.5 mL/0.25 g

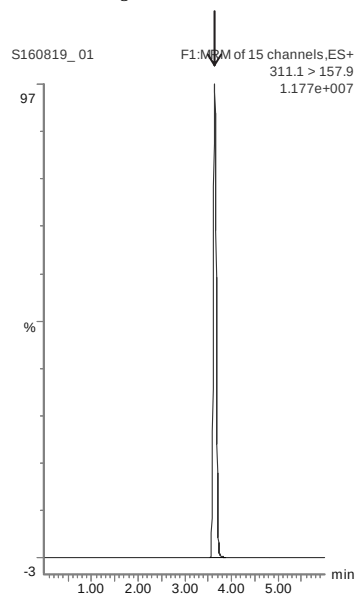


宮崎 3 回処理 21 日後
2 μ L/2.5 mL/0.25 g

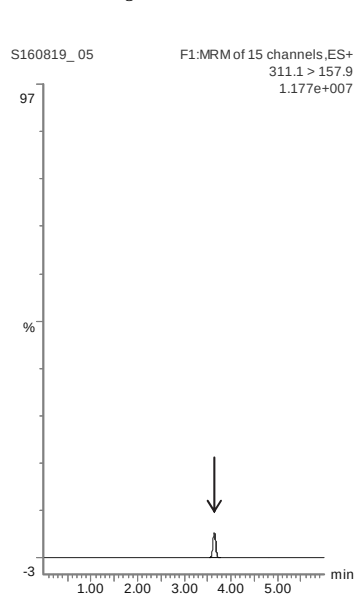


付図-2-2. 果実

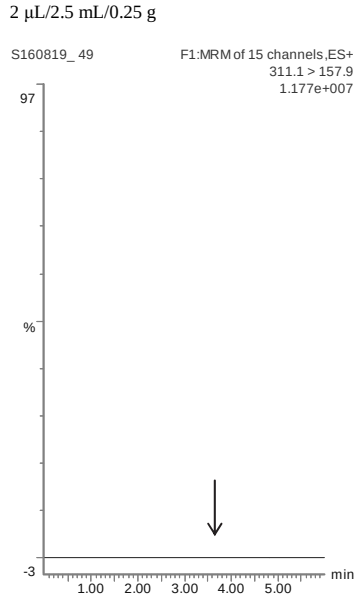
標準品 0.04 ng



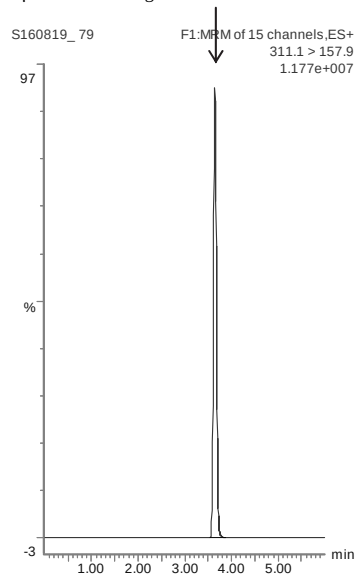
標準品 0.002 ng



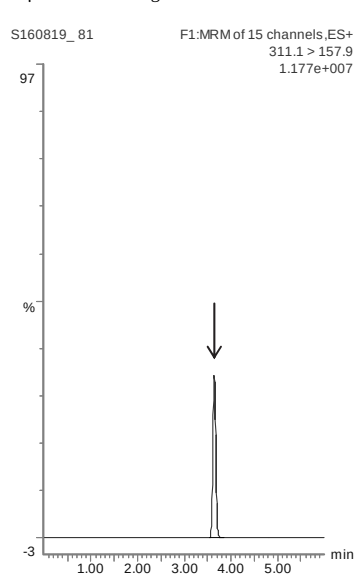
宮崎 無処理
2 μ L/2.5 mL/0.25 g



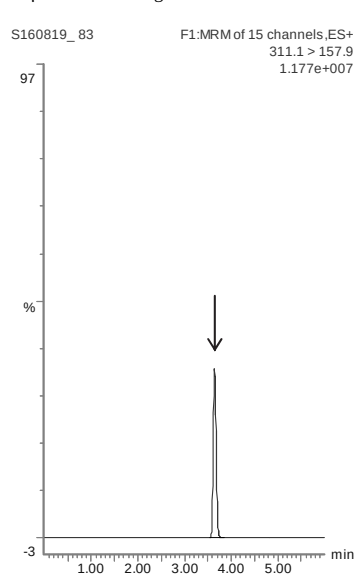
宮崎 3 回処理 7 日後
2 μ L/2.5 mL/0.25 g



宮崎 3 回処理 14 日後
2 μ L/2.5 mL/0.25 g



宮崎 3 回処理 21 日後
2 μ L/2.5 mL/0.25 g

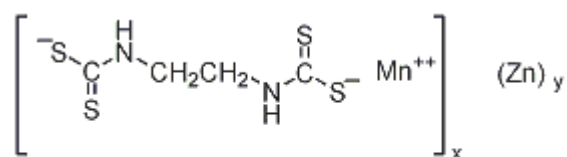


残留分析詳細(すいか試料)：マンゼブ

1. 分析対象物質

マンゼブ

化学名： manganese ethylenebis(dithiocarbamate) (polymeric)complex with zinc salt
 分子式： $[C_4H_6MnN_2S_4]_xZn_y$
 分子量： 271.2 (構造上)
 構造式：

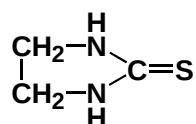


$$x:y = 1:0.091$$

性 状： 灰黄色粉末
 融 点： 172°C以上で分解
 蒸気圧： $< 1.33 \times 10^{-2}$ mPa (20°C)
 分配係数： $\log P_{OW} = 0.26$
 溶解性： 水 6.2 ppm (pH 7.5, 25°C)
 多くの有機溶媒に不溶
 安定性： 通常の乾燥条件下で安定，熱や水分で徐々に分解
 加水分解半減期(25°C)；20時間 (pH 5), 21時間 (pH 7), 27時間 (pH 9)
 出 典： The e-Pesticide Manual 15th Edition. ver. 5.0

エチレンチオウレア

化学名： 2-imidazolidinethione
 分子式： $C_3H_6N_2S$
 分子量： 102.2
 構造式：



性 状： 白色針状結晶
 融 点： 203～204°C
 溶解性： 水 2 g/100 mL (30°C)
 メタノール，エタノール，エチレングリコール，ピリジンに僅溶
 アセトン，エーテル，クロロホルム，ベンゼンに不溶

出 典： Merck Index 11th ed.

2. 標準品及び試薬

マンゼブ標準品：純度 91.0% (和光純薬工業製)

マンネブ標準品：純度 90.2% (和光純薬工業製)

エチレンチオウレア標準品：純度 100% (和光純薬工業製)

アセトニトリル，アセトン，メタノール，ジクロロメタン，ヘキサン：

残留農薬試験用 (和光純薬工業製)

アセトニトリル：LC-MS 用，HPLC 用 (和光純薬工業製)

水：PURELAB Flex System で精製した水

(Veolia Water Solutions & Technologies, France)

システイン塩酸塩一水和物：試薬特級 (和光純薬工業製)

エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物：特級 (関東化学製)

ヨードメタン：試薬特級 (和光純薬工業製)

硫酸水素テトラブチルアンモニウム：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：特級 (和光純薬工業製)

塩酸：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)

フッ化カリウム：試薬特級 (和光純薬工業製)

塩化アンモニウム：特級 (関東化学製)

システイン-エチレンジアミン四酢酸溶液 (システイン-EDTA 溶液)：用時調製

システイン塩酸塩一水和物 50.0 g 及びエチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物 50.0 g を約 500 mL の水に加えた。

12 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加えながら溶解させた後，同溶液で pH9.6～10.0 に調整し，水で 1 L に定容したもの

メチル化溶液：ヘキサン 792 mL 及びアセトン 108 mL 混液にヨウ化メチル (ヨードメタン) 6 mL を加えたもの

pH 調整溶液：水 20 mL，システイン-EDTA 溶液 150 mL，硫酸水素テトラブチルアンモニウム溶液 10 mL を混和し，6 mol/L 塩酸で pH 7.5～7.7 に調整し，水で 200 mL に定容したもの

硫酸水素テトラブチルアンモニウム溶液：

硫酸水素テトラブチルアンモニウム 27.2 g を水に溶解し，200 mL に定容したもの

多孔性ケイソウ土カラム：InertSep K-Solute, 20 mL 容 (ジーエルサイエンス製)

アルミナ N ミニカラム：Sep-Pak アルミナ N カートリッジ，プラス (Waters 製)

C₁₈ ミニカラム：InertSep C₁₈, 1 g/6 mL (ジーエルサイエンス製)

3. 装置及び機器

ミキサー：ロボクープ BLIXER-5Plus (エフ・エム・アイ製)

ホモジナイザー：PT 10/35 (Kinematica製)

pHメーター：F-72 (堀場製作所製)

遠心分離機：7780II (久保田製作所製)

液体クロマトグラフ・質量分析計システム (LC-MS/MS)：

ACQUITY UPLC I-Class (Waters 製)

Xevo TQ-S (Waters 製)

データ処理装置：MassLynx 4.1 (Waters 製)

高速液体クロマトグラフ (HPLC-UV)：

1260 Infinity Series (Agilent 製)

データ処理装置：OpenLAB CDS (Agilent 製)

4. 測定機器の操作条件

4.1. マンゼブ (液体クロマトグラフ・質量分析計)

4.1.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム：ACQUITY UPLC HSS C18 (Waters 製)
 内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒径 1.8 µm

溶離液：A：5 mmol/L 酢酸アンモニウム
 B：アセトニトリル
 A:B = 60:40 (0.5 min)－(3 min)－10:90

流速：0.3 mL/min

カラム温度：40°C

注入量：2 µL

保持時間：約 2.4 min

4.1.2. 質量分析計

イオン化法：エレクトロスプレー イオン化法 (ESI)
 正モード

コーンガス流量：150 L/h (N₂)

脱溶媒ガス流量：1000 L/h (N₂)

脱溶媒ガス温度：500°C

ソースブロック温度：150°C

キャピラリー電圧：3.0 kV

コーン電圧：10 V

コリジョン電圧：20 V

(コリジョンガス; Ar)

イオン検出法: MRM

モニタリングイオン*: プリカーサーイオン m/z 240.8

プロダクトイオン m/z 133.9

* エチレンビスジチオカルバミン酸ジメチル (EBDC)

4.2. エチレンチオウレア (高速液体クロマトグラフ)

カラム: Hypercarb (サーモフィッシャーサイエンティフィック製)

内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 5 μ m

溶離液: 水/アセトニトリル

100:0 (4.5 min) – (1.5 min) – 5:95

流速: 0.3 mL/min

測定波長: 235 nm

カラム温度: 40°C

注入量: 15 μ L

保持時間: 約 4.1 min

5. 検量線の作成

5.1. マンゼブ

マンゼブ標準品9.65 mg (二硫化炭素5.00 mg相当) を50 mL容メスフラスコに精秤し, システイン-EDTA溶液に溶解して100 mg/L標準原液を調製した。システイン-EDTA溶液150 mLにマンゼブ標準原液1 mL及び硫酸水素テトラブチルアンモニウム溶液10 mLを加え, 6 mol/L塩酸でpH 7.5~7.7に調整し, 水で200 mLに定容 (0.5 mg/L) した。この溶液の20 mLを分取し, 塩化ナトリウム4 gを加えて溶解した後, 多孔性ケイソウ土カラムに流下した。10分間放置後, メチル化溶液60 mLを流下 (1 mL/minに調整, マンゼブをEBDCに変換) し, 溶出液を分取した。溶出液にアセトン/ジエチレングリコール (99:1, v/v) 混液0.5 mLを添加した後, 40°C以下の水浴中で約2 mLまで減圧濃縮し, 窒素気流下で溶媒を留去した。残留物にアセトニトリル/水 (80:20, v/v) 混液50 mLを加え0.2 mg/L標準溶液を調製した。この溶液を同混液で希釈して0.00005, 0.0001, 0.0002, 0.0005, 0.001及び0.002 mg/Lの標準溶液を調製した。この溶液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EBDCの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。

5.2. エチレンチオウレア

エチレンチオウレア標準品10.0 mgを50 mL容メスフラスコに精秤し, メタノールに溶解して200 mg/L標準原液を調製した。この原液をメタノールで希釈して10 mg/L標準溶液を調

製し、さらにこの溶液を水／アセトニトリル (98:2, v/v) 混液で希釈して2 mg/L標準溶液を調製した。この溶液を同混液で希釈して0.01, 0.02, 0.04, 0.1, 0.2及び0.4 mg/Lの標準溶液を調製した。この溶液を前記条件の高速液体クロマトグラフに注入し、データ処理装置を用いてエチレンチオウレアの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。

6. 分析操作

6.1. 試料の前処理

試料は各々を縦に8分割し、対角の2つを取り合わせた(4組作製)。その2組を果実分析用試料とし、残りの2組を果肉分析用試料とした。果肉分析用試料は果肉と果皮に分け、果皮の厚さを測定した。又、果実、果肉及び果皮の各部位の全重量を測定した。

2組の果実分析用試料のうち1組を適切な大きさに細切した。マンゼブ分析用試料は、細切試料にシステインーEDTA溶液を加えてミキサーで均一化し、調製試料を作製した。エチレンチオウレア分析用試料は、システインー塩酸塩を加えてミキサーで均一化し、調製試料を作製した。果肉分析用試料についても果実と同様に調製試料を作製した。各調製試料は2組以上作製し、それぞれ密封して冷凍保存した。分析時にその1組を取り、分析に供した。

6.2. マンゼブ

6.2.1. 抽出

均一化した試料40 g(試料20 g相当量)をはかりとり、システインーEDTA溶液80 mL及びジクロロメタン50 mLを加えてホモジナイザーで磨砕抽出した。シャフトに付着した試料をジクロロメタン10 mLで洗浄し、洗浄液を合わせた。抽出物を遠心分離(2500 rpm, 5分間)し、システインーEDTA溶液層を分取した。残留物にシステインーEDTA溶液50 mLを加えてホモジナイザーで磨砕抽出し、同様の遠心分離及び分取の操作を繰り返した。全システインーEDTA溶液層を合わせ、硫酸水素テトラブチルアンモニウム溶液10 mLを加えて6 mol/L塩酸でpH 7.5~7.7に調整した後、水で200 mLに定容し、その4 mL(試料0.4 g相当量)を分取した。

6.2.2. メチル化

分取した抽出液にpH調整溶液15 mLを加え混和した後、塩化ナトリウム4 gを加えて溶解し、多孔性ケイソウ土カラムに流下した。10分間放置後、メチル化溶液100 mLを流下(1 mL/minに調整、マンゼブをEBDCに変換)し、溶出液を分取した。溶出液にアセトン／ジエチレングリコール (99:1, v/v) 混液0.5 mLを添加した後、40°C以下の水浴中で約2 mLまで減圧濃縮した後、窒素気流下で溶媒を留去した。

6.2.3. アルミナNミニカラムによる精製

アルミナNミニカラムにアセトン5 mLを流下し前処理した。残留物をアセトン5 mLに溶解し、アルミナNミニカラムに流下した。さらにアセトン20 mLを流下し、これらの溶出液

を分取した。溶出液にアセトン／ジエチレングリコール (99:1, v/v) 混液0.5 mLを添加した後、40°C以下の水浴中で約2 mLまで減圧濃縮し、窒素気流下で溶媒を留去した。

6.2.4. 定量

残留物を適量のアセトニトリル／水 (80:20, v/v) 混液に溶解した。この溶液を前記条件の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入してEBDCピーク面積を求め、検量線より二硫化炭素の重量を求め、換算係数1.78*を乗じ、試料中のマンゼブ残留濃度を算出した。

*換算係数1.78 (マンゼブ分子量271.2／二硫化炭素2分子量152.3)

6.3. エチレンチオウレア

6.3.1. 抽出

均一化した試料22 g (試料20 g相当量)をはかりとり、フッ化カリウム15 g、メタノール80 mL及び水20 mLを加え、30分間振とうした。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で洗い、同様にろ過した。ろ液を合わせ、メタノールで200 mL定容とし、その50 mL (試料5 g相当量)を取り、40°C以下の水浴中で減圧濃縮し、メタノールを留去した。

6.3.2. C₁₈ミニカラムによる精製

C₁₈ミニカラムにアセトニトリル及び水を順次5 mLずつ流下し前処理した。濃縮液をC₁₈ミニカラムに流下した。さらに水 10 mLを流下し、全溶出液を分取した。溶出液に1%塩化アンモニウム1 mL及び5 mol/L水酸化ナトリウム溶液0.8 mLを添加し、pH8～pH9に調整した。

6.3.3. 多孔性ケイソウドカラムによる精製

前記溶液を多孔性ケイソウ土カラムに流下し、15分間放置した後、ジクロロメタン100 mLを流下し、溶出液を分取した。溶出液に2%ジエチレングリコール含有アセトン溶液0.5 mLを添加後、40°C以下の水浴中で減圧濃縮し、最後は窒素気流下で溶媒を留去した。

6.3.4. 定量

残留物を適量の水／アセトニトリル (98:2, v/v) 混液に溶解した。この溶液を前記条件の高速液体クロマトグラフに注入してピーク面積を求め、検量線よりエチレンチオウレアの重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

7. 定量限界値(LOQ)及び検出限界値(LOD)

7.1. マンゼブ

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* (mg/kg)
0.0002	0.4	20	2	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* (mg/kg)
0.0001	0.4	20	2	0.003

*二硫化炭素としての値

7.2. エチレンチオウレア

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 (mg/kg)
0.3	5	2.5	15	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 (mg/kg)
0.15	5	2.5	15	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、高知試料*又は本事業の茨城、宮崎試料を用いて、0.01 mg/kg（定量限界相当）、0.25及び5 mg/kg添加濃度における回収試験を各5連分析で実施した。尚、無添加試料又は無処理試料は各ほ場2連分析し、全て定量限界未満であった。回収率の算出結果を示す。

* H25農薬登録に係る調理加工試験導入に関する調査事業の無処理試料を均一化したもの

8.1. 果肉

8.1.1. マンゼブ

試料	添加濃度* (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSD (%)
高知	5	95, 87,	95, 84	92,	91	5
高知	0.25	86, 72,	75, 71	75,	76	8
高知	0.005	116, 88,	113, 88	109,	103	13

*二硫化炭素としての値

8.1.2. エチレンチオウレア

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSD (%)
茨城 宮崎	5	83, 83,	83, 81	80,	82	2
茨城 宮崎	0.25	82, 79,	81, 78	77,	79	3
茨城 宮崎	0.01	88, 90,	87, 88	83,	87	3

8.2. 果実

8.2.1. マンゼブ

試料	添加濃度* (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSD (%)
高知	5	107, 91,	99, 87	96,	96	8
高知	0.25	106, 91,	103, 90	102,	98	8
高知	0.005	114, 94,	112, 90	111,	104	11

*二硫化炭素としての値

8.2.2. エチレンチオウレア

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSD (%)
茨城 宮崎	5	83, 83,	83, 82	82,	83	1
茨城 宮崎	0.25	85, 85,	83, 83	79,	83	3
茨城 宮崎	0.01	84, 79,	78, 78,	75	79	4

9. 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二硫化炭素として0.05 mg/kg、エチレンチオウレア0.1 mg/kg添加試料（内部精度管理試料）を分析した。その結果、下表に示すように問題は認められなかった。又、2016年8月実施のFAPAS技能試験（Fera Science Ltd.）におけるZスコアは全てZ<2であった。

9.1. 果肉

9.1.1. マンゼブ

分析日*	使用したほ場	回収率 (%)	無処理区の分析値** (mg/kg)
2016/7/22	宮崎	77	< 0.005
7/29	宮崎	94	< 0.005
8/5	宮崎	71	< 0.005
8/9	茨城	84	< 0.005
8/16	茨城	76	< 0.005
8/23	茨城	110	< 0.005
10/14	高知	81	< 0.005
10/17	高知	91	< 0.005
10/24	高知	77	< 0.005
10/31	高知	71	< 0.005

回収試料の添加濃度：二硫化炭素として0.05 mg/kg

* 抽出日を記載

** 二硫化炭素としての値

9.1.2.エチレンチオウレア

分析日*	使用したほ場	回収率 (%)	無処理区の分析値 (mg/kg)
2016/11/21	茨城	74	< 0.01
11/28	茨城	75	< 0.01

回収試料の添加濃度：0.1 mg/kg

* 抽出日を記載

9.2.果実

9.2.1.マンゼブ

分析日*	使用したほ場	回収率 (%)	無処理区の分析値** (mg/kg)
2016/7/22	宮崎	90	< 0.005
7/29	宮崎	95	< 0.005
8/5	宮崎	74	< 0.005
8/9	茨城	74	< 0.005
8/16	茨城	72	< 0.005
8/23	茨城	103	< 0.005
10/14	高知	80	< 0.005
10/17	高知	82	< 0.005
10/24	高知	74	< 0.005
10/31	高知	70	< 0.005

回収試料の添加濃度：二硫化炭素として0.05 mg/kg

* 抽出日を記載

** 二硫化炭素としての値

9.2.2.エチレンチオウレア

分析日*	使用したほ場	回収率 (%)	無処理区の分析値 (mg/kg)
2016/11/16	茨城	84	<0.01
11/25	宮崎	72	<0.01

回収試料の添加濃度：0.1 mg/kg

* 抽出日を記載

10. 保存安定性確認

10.1. マンゼブ

試料到着後直ちに分析したため、保存中の安定性試験は実施しなかった。

10.2. エチレンチオウレア

均一化した各無処理試料にエチレンチオウレアを添加し、冷凍暗所（-20℃以下）に保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を確認した。保存安定性の結果を示す。

10.1. 果肉

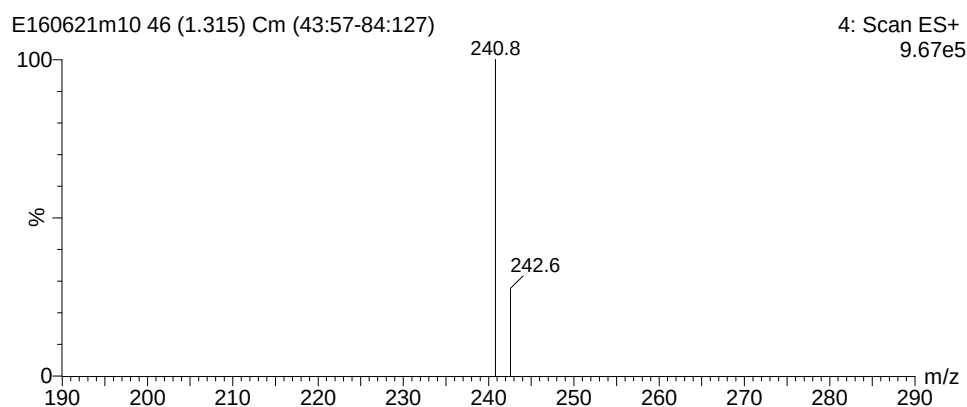
ほ場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	0.5	111 (2016/8/9-11/28)	83,	70	76
高知	0.5	54 (2016/10/5-11/28)	81,	79	80
宮崎	0.5	129 (2016/7/22-11/28)	83,	80	82

10.2. 果実

ほ場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	0.5	108 (2016/8/9-11/25)	76,	70	73
高知	0.5	51 (2016/10/5-11/25)	75,	74	74
宮崎	0.5	126 (2016/7/22-11/25)	80,	73	76

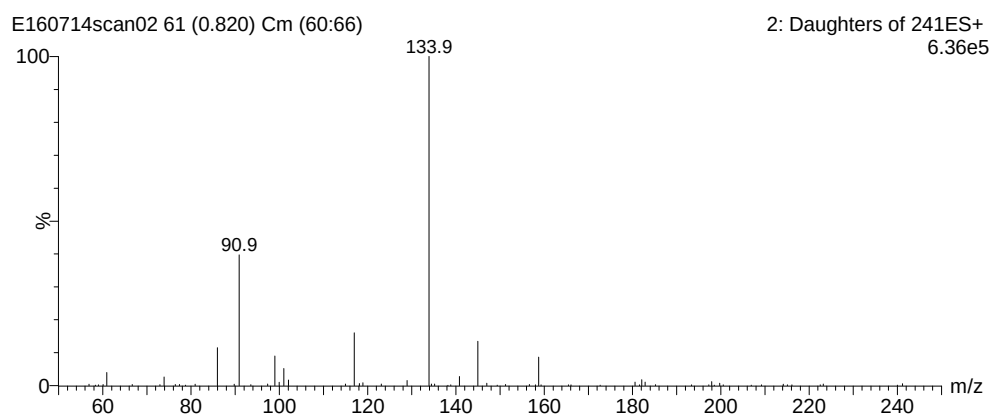
付図-1. EBDCのマススペクトル

EBDCマススペクトル（一次イオン）の一例（正モード）



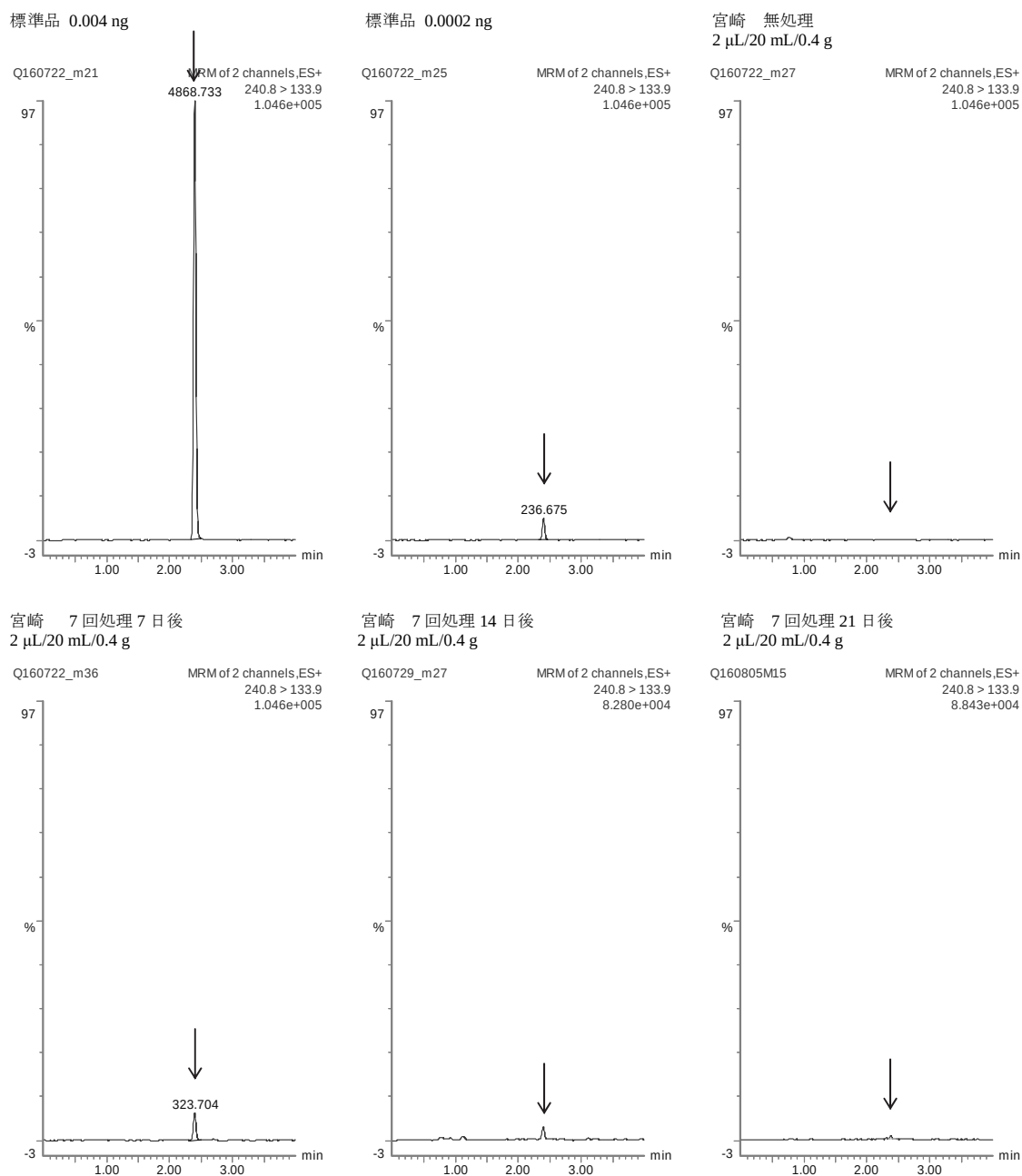
EBDCのプロダクトスキャンスペクトルの一例

（プリカーサーイオン； $m/z=240.8$, 正モード）



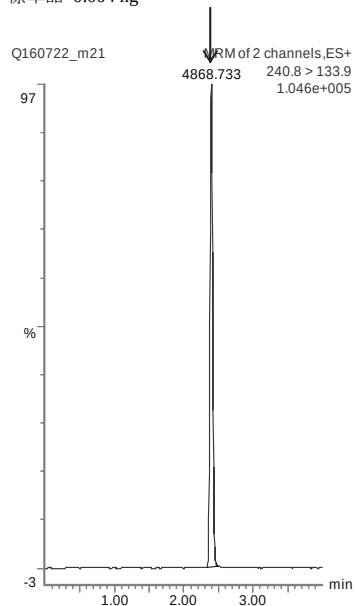
付図-3.マンゼブのクロマトグラム（代表例）

付図-3-1. 果肉

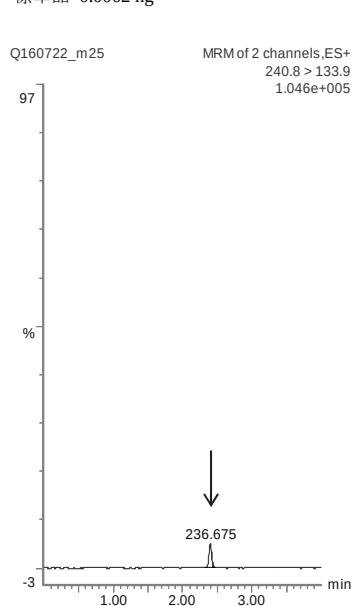


付図-3-2. 果実

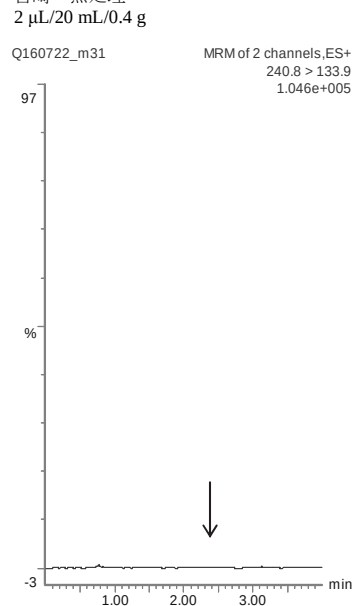
標準品 0.004 ng



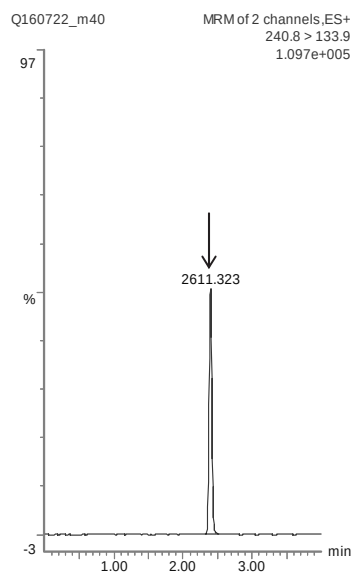
標準品 0.0002 ng



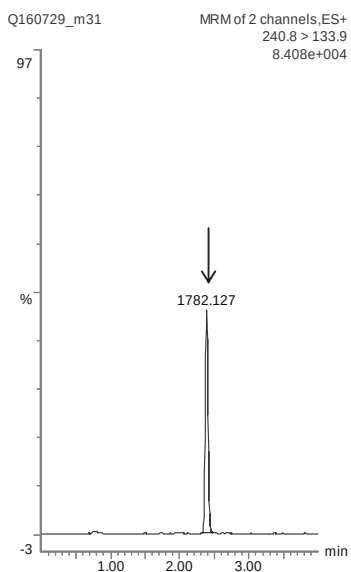
宮崎 無処理
2 μ L/20 mL/0.4 g



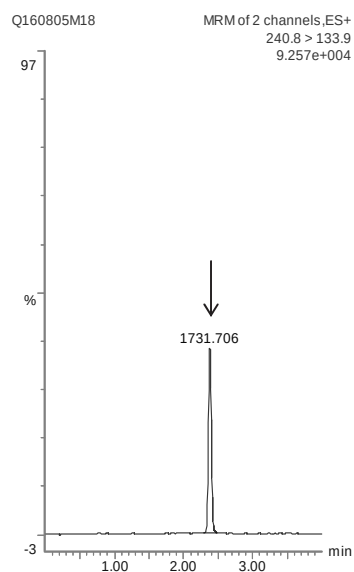
宮崎 7 回処理 7 日後
2 μ L/200 mL/0.4 g



宮崎 7 回処理 14 日後
2 μ L/80 mL/0.4 g



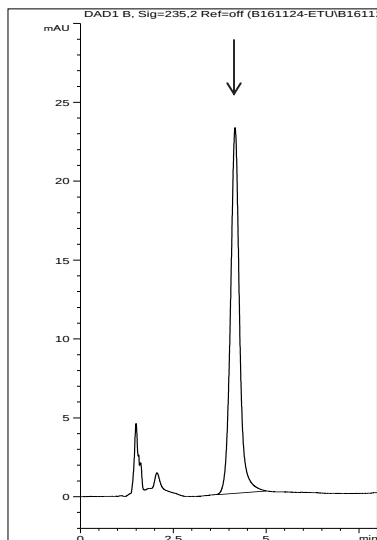
宮崎 7 回処理 21 日後
2 μ L/80 mL/0.4 g



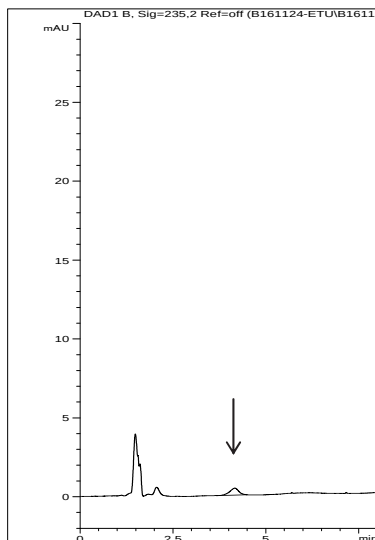
付図-4.エチレンチオウレアのクロマトグラム (代表例)

付図-4-1. 果肉

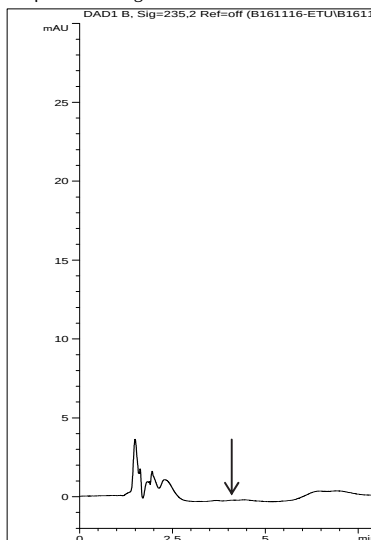
標準品 6 ng



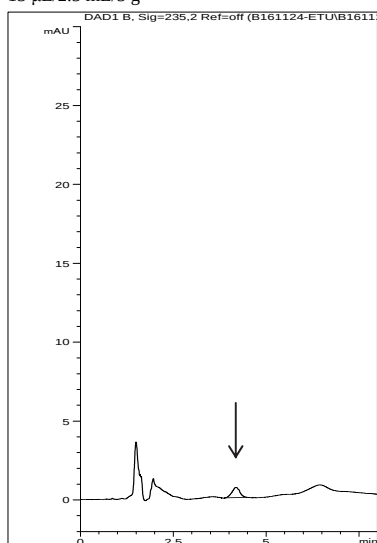
標準品 0.3 ng



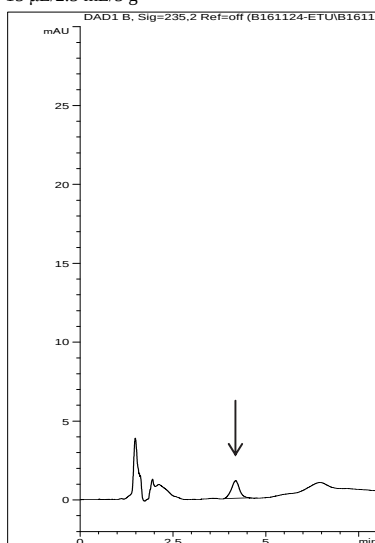
宮崎 無処理
15 μ L/2.5 mL/5 g



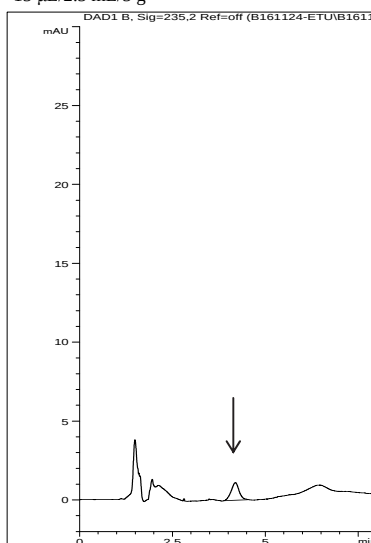
宮崎 7回処理7日後
15 μ L/2.5 mL/5 g



宮崎 7回処理14日後
15 μ L/2.5 mL/5 g



宮崎 7回処理21日後
15 μ L/2.5 mL/5 g



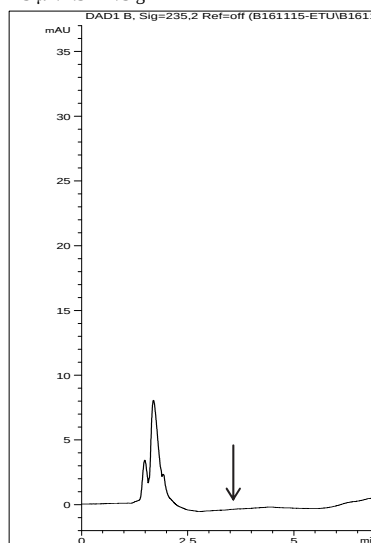
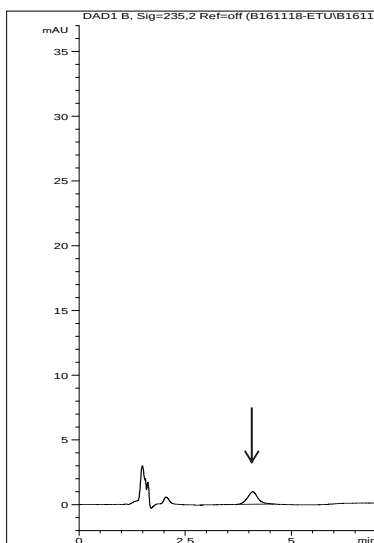
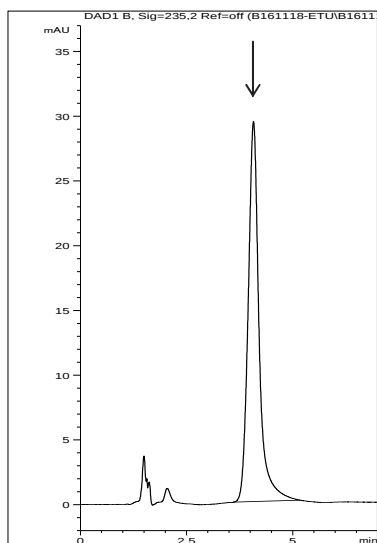
付図-4.2. 果実

標準品 6 ng

標準品 0.3 ng

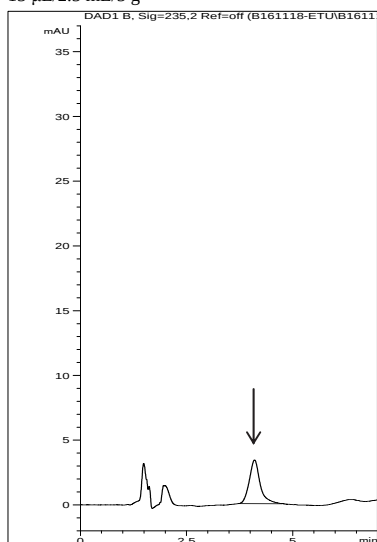
宮崎 無処理

15 μ L/2.5 mL/5 g



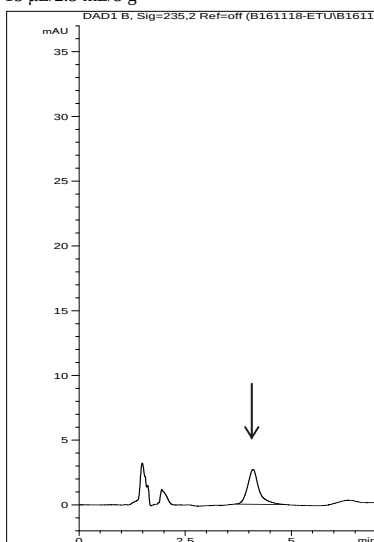
宮崎 7回処理 7日後

15 μ L/2.5 mL/5 g



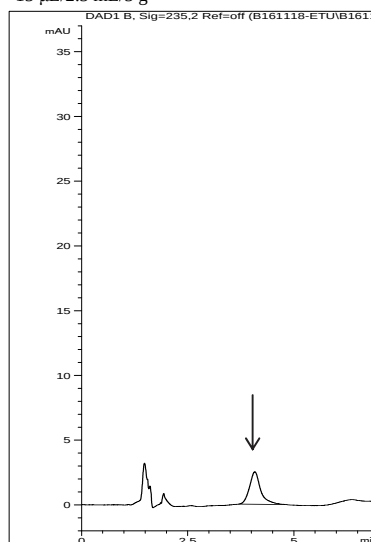
宮崎 7回処理 14日後

15 μ L/2.5 mL/5 g



宮崎 7回処理 21日後

15 μ L/2.5 mL/5 g



残留分析詳細(すいか試料) : ミルベメクチン

1. 分析対象物質

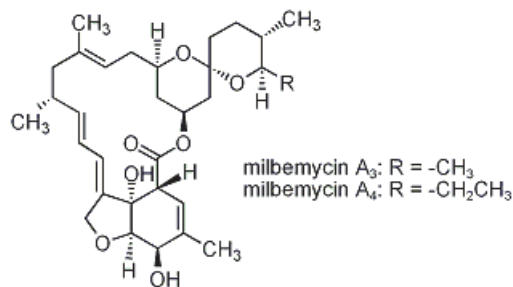
ミルベメクチン

化学名 : A mixture of : (10*E*,14*E*,16*E*,22*Z*)-(1*R*,4*S*,5'*S*,6*R*,6'*R*,8*R*,13*R*,20*R*,21*R*,24*S*)-21,24-dihydroxy-5',6',11,13,22-pentamethyl-3,7,19-trioxatetracyclo [15.6.1.1^{4,8}.0^{20,24}]pentacosa-10,14,16,22-tetraene-6-spiro-2'-tetrahydropyran-2-one and (10*E*,14*E*,16*E*,22*Z*)-(1*R*,4*S*,5'*S*,6*R*,6'*R*,8*R*,13*R*,20*R*,21*R*,24*S*)-6'-ethyl-21,24-dihydroxy-5',11,13,22-tetramethyl-3,7,19-trioxatetracyclo [15.6.1.1^{4,8}.0^{20,24}]pentacosa-10,14,16,22-tetraene-6-spiro-2'-tetrahydropyran-2-one in the ratio 3 to 7

分子式 : A₃; C₃₁H₄₄O₇, A₄; C₃₂H₄₆O₇

分子量 : A₃; 528.7, A₄; 542.7

構造式 :



性 状 : 白色結晶粉末

融 点 : A₃; 212~215°C, A₄; 212~215°C

蒸気圧 : 1.3 x 10⁻⁵ mPa (20°C)

分配係数 : A₃; log P_{OW} = 5.3, A₄; log P_{OW} = 5.9

溶解性 : A₃; 水 0.88 ppm (20°C)

メタノール 64.8, エタノール 41.9, アセトン 66.1, *n*-ヘキサン 1.4, ベンゼン 143.1, 酢酸エチル 69.5 (以上 g/L, 20°C)

A₄; 水 7.2 ppm (20°C)

メタノール 458.8, エタノール 234.0, アセトン 365.3, *n*-ヘキサン 6.5, ベンゼン 524.2, 酢酸エチル 320.4 (以上 g/L, 20°C)

安定性 : A₄; 加水分解半減期 ; 11.6日 (pH 5), 260日 (pH 7), 226日 (pH 9)

出 典 : The e-Pesticide Manual 15th Edition. ver. 5.0

2. 標準品及び試薬

ミルベメクチン A₃ 標準品 : 純度 99.2% (林純薬工業製)

ミルベメクチン A₄ 標準品 : 純度 99.2% (林純薬工業製)

アセトニトリル, アセトン, トルエン, メタノール : 残留農薬試験用 (和光純薬工業製)
メタノール : LC/MS 用 (和光純薬工業製)

水 : PURELAB Flex System で精製した水

(Veolia Water Solutions & Technologies, France)

酢酸アンモニウム : 試薬特級 (和光純薬工業製)

C₁₈ ミニカラム : InertSep C18-C, 1 g/6 mL (ジーエルサイエンス製)

グラファイトカーボンミニカラム : InertSep GC, 500 mg/6 mL (ジーエルサイエンス製)

3. 装置及び機器

ミキサー : ロボクーブ BLIXER-5Plus, R-23 (エフ・エム・アイ製)

液体クロマトグラフ・質量分析計システム (LC-MS/MS) :

Nexera X2 System (島津製作所製)

Triple Quad 4500 (AB Sciex 製)

データ処理装置 : Analyst (AB Sciex 製)

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 : ZORBAX Eclipse Plus C18 (Agilent 製)
内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒径 1.8 µm
溶離液 : A : メタノール
B : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム
A:B = 85:15 (1 min) – (3 min) – 98:2 (1 min)
流速 : 0.3 mL/min
カラム温度 : 40°C
注入量 : 5 µL
保持時間 : ミルベメクチン A₃ ; 約 3.8 min
ミルベメクチン A₄ ; 約 4.2 min

4.2. 質量分析計

イオン化法 : エレクトロスプレー イオン化法 (ESI)
正モード
イオン化温度 : 700°C
イオンスプレー電圧 : 5500 V
Declustering Potential : ミルベメクチン A₃ ; 6 V
ミルベメクチン A₄ ; 56 V
Collision Energy : ミルベメクチン A₃ ; 17 V

ミルベメクチンA₄; 11 V

Collision Cell Exit Potential : ミルベメクチンA₃; 10 V

ミルベメクチンA₄; 14 V

イオン検出法 : MRM

モニタリングイオン : ミルベメクチンA₃; プリカーサーイオン m/z 546.2
 プロダクトイオン m/z 511.3
 ミルベメクチンA₄; プリカーサーイオン m/z 560.2
 プロダクトイオン m/z 525.4

5. 検量線の作成

ミルベメクチンA₃標準品5.04 mg (純度補正5.00 mg相当) を25 mL容メスフラスコに精秤し、アセトニトリルに溶解して200 mg/L標準原液を調製した。ミルベメクチンA₄標準品10.1 mg (純度補正10.0 mg相当) を50 mL容メスフラスコに精秤し、アセトニトリルに溶解して200 mg/L標準原液を調製した。各原液を各々アセトニトリルで希釈して10 mg/L標準溶液を調製した。各10 mg/L標準溶液を等量ずつ混合し、メタノールで希釈して0.2 mg/L混合標準溶液を調製した。この溶液をメタノールで希釈して0.00025, 0.0005, 0.001, 0.0025, 0.005及び0.01 mg/Lの混合標準溶液を調製した。この溶液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ミルベメクチンA₃, ミルベメクチンA₄の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各検量線を作成した。

6. 分析操作

6.1. 試料の前処理

試料は各々を縦に8分割し、対角の2つを取り合わせた (4組作製)。その2組を果実分析用試料とし、残りの2組を果肉分析用試料とした。果肉分析用試料は果肉と果皮に分け、果皮の厚さを測定した。又、果実、果肉及び果皮の各部位の全重量を測定した。

2組の果実分析用試料のうち1組をミキサーで均一化して調製試料を作製した。果肉分析用試料についても果実と同様に調製試料を作製した。各調製試料は2組以上作製し、それぞれ密封して冷凍保存した。分析時にその1組を取り、分析に供した。

6.2. 抽出

均一化した試料20 gをはかりとり、アセトン100 mLを加え、30分間振とうした。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で洗い、同様にろ過した。ろ液を合わせ、アセトンで200 mL定容とし、その4 mL (試料0.4 g相当量) を分取した。

6.3. C₁₈ミニカラム及びグラファイトカーボンミニカラムの連結カラムによる精製

C₁₈ミニカラム及びグラファイトカーボンミニカラムにメタノール及び水を順次5 mLずつ流下し前処理した。分取した抽出液に水4 mLを添加して混和した後、C₁₈ミニカラムに流下した。さらにメタノール/水 (80:20, v/v) 混液 5 mLで容器内を洗浄後、C₁₈ミニカラム

に移して流下し、これらの流出液を捨てた。C₁₈ミニカラムの下にグラファイトカーボンミニカラムを連結し、連結カラムにメタノール10 mLを流下し、流出液を捨てた。C₁₈ミニカラムを取り外し、メタノール／トルエン (75:25, v/v) 混液10 mLを流下し、溶出液を分取した。溶出液は40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、最後は窒素気流下で溶媒を留去した。

6.4. 定量

残留物を適量のメタノールに溶解した。この溶液を前記条件の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入してピーク面積を求め、検量線よりミルベメクチンA₃、ミルベメクチンA₄の重量を求め、試料中の各残留濃度を算出した。

7. 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*	
0.0025	0.4	4	5	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*	
0.00125	0.4	4	5	0.003	

*ミルベメクチンA₃、ミルベメクチンA₄はいずれも同じ値

8. 回収率

分析法確認のため、高知試料*を用いて、0.005 mg/kg（定量限界相当）、0.25及び5 mg/kg 添加濃度における回収試験を各5連分析で実施した。尚、無添加試料は2連分析し、全て定量限界未満であった。回収率の算出結果を示す。

* H25農薬登録に係る調理加工試験導入に関する調査事業の無処理試料を均一化したもの

8.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSD (%)
ミルベメクチンA ₃						
高知	5	102, 85,	101, 82	86,	91	10
高知	0.25	106, 99,	102, 93	101,	100	5
高知	0.005	97, 79,	92, 78	88,	87	9
ミルベメクチンA ₄						
高知	5	95, 84,	95, 83	84,	88	7
高知	0.25	93, 83,	92, 80	84,	86	7
高知	0.005	99, 92,	98, 88	93,	94	5

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSD (%)
ミルベメクチンA ₃						
高知	5	105, 90,	98, 84	94,	94	8
高知	0.25	104, 98,	104, 89	102,	99	6
高知	0.005	96, 87,	96, 83	96,	92	7
ミルベメクチンA ₄						
高知	5	105, 95,	103, 89	97,	98	7
高知	0.25	110, 89,	102, 79	92,	94	13
高知	0.005	113, 102,	105, 94	103,	103	7

9. 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0.05 mg/kg添加試料（内部精度管理試料）を分析した。その結果、下表に示すように問題は認められなかった。又、2016年8月実施のFAPAS技能試験（Fera Science Ltd.）におけるZスコアは全てZ<2であった。

9.1. 果肉

9.1.1. ミルベメクチンA₃

分析日*	使用したほ場	回収率 (%)	無処理区の分析値 (mg/kg)
2016/8/18	宮崎	77	<0.005
9/15	茨城	77	<0.005
11/10	高知	83	<0.005
11/21	高知	92	<0.005

回収試料の添加濃度：0.05 mg/kg

*抽出日を記載

9.1.2. ミルベメクチンA₄

分析日*	使用したほ場	回収率 (%)	無処理区の分析値 (mg/kg)
2016/8/18	宮崎	84	<0.005
9/15	茨城	86	<0.005
11/10	高知	94	<0.005
11/21	高知	114	<0.005

回収試料の添加濃度：0.05 mg/kg

*抽出日を記載

9.2.果実**9.2.1.ミルベメクチンA₃**

分析日*	使用したほ場	回収率 (%)	無処理区の分析値 (mg/kg)
2016/8/18	宮崎	91	<0.005
9/15	茨城	71	<0.005
11/10	高知	93	<0.005
11/21	高知	85	<0.005

回収試料の添加濃度：0.05 mg/kg

*抽出日を記載

9.2.2. ミルベメクチンA₄

分析日*	使用したほ場	回収率 (%)	無処理区の分析値 (mg/kg)
2016/8/18	宮崎	77	<0.005
9/15	茨城	87	<0.005
11/10	高知	75	<0.005
11/21	高知	70	<0.005

回収試料の添加濃度：0.05 mg/kg

*抽出日を記載

10. 保存安定性確認

均一化した各無処理試料にミルベメクチンA₃, ミルベメクチンA₄を添加し, 冷凍暗所 (−20℃以下) に保存した。一定期間保存した後, 同様に分析して回収率を求め, 保存中の安定性を確認した。保存安定性の結果を示す。

10.1. 果肉

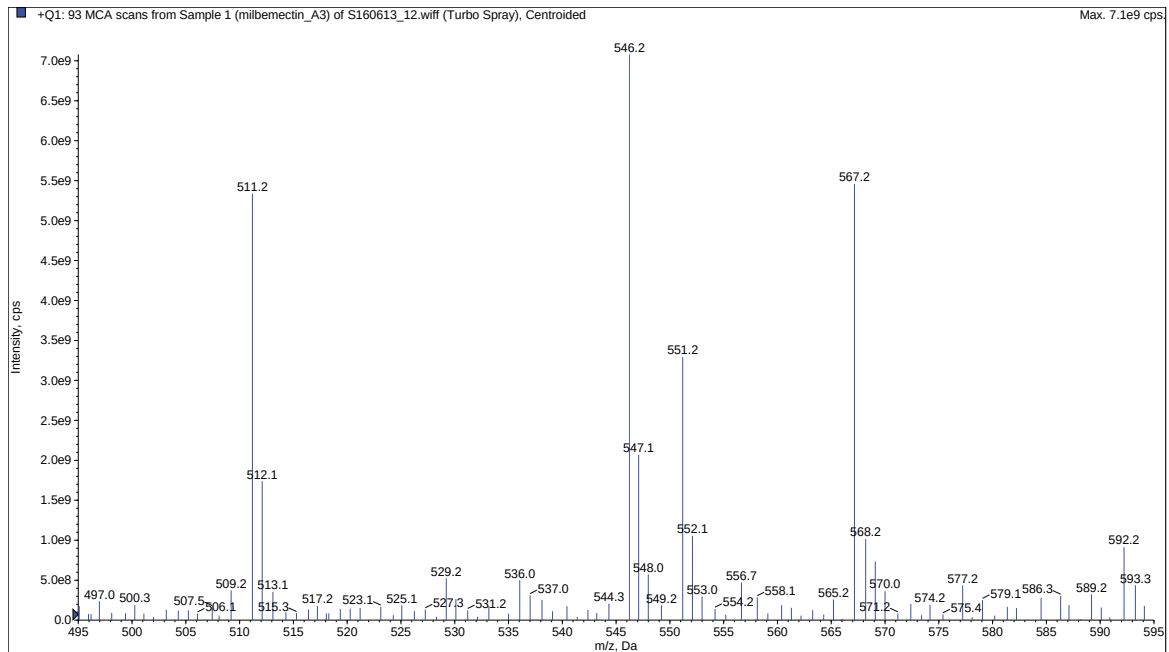
ほ場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
ミルベメクチンA ₃					
茨城	0.5	104 (2016/8/9-11/21)	100,	90	95
高知	0.5	47 (2016/10/5-11/21)	99,	78	88
宮崎	0.5	122 (2016/7/22-11/21)	93,	82	88
ミルベメクチンA ₄					
茨城	0.5	104 (2016/8/9-11/21)	83,	77	80
高知	0.5	47 (2016/10/5-11/21)	103,	90	96
宮崎	0.5	122 (2016/7/22-11/21)	95,	83	89

10.2. 果実

ほ場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
ミルベメクチンA ₃					
茨城	0.5	104 (2016/8/9-11/21)	76,	71	74
高知	0.5	47 (2016/10/5-11/21)	80,	75	78
宮崎	0.5	122 (2016/7/22-11/21)	77,	73	75
ミルベメクチンA ₄					
茨城	0.5	104 (2016/8/9-11/21)	77,	73	75
高知	0.5	47 (2016/10/5-11/21)	87,	84	86
宮崎	0.5	122 (2016/7/22-11/21)	85,	83	84

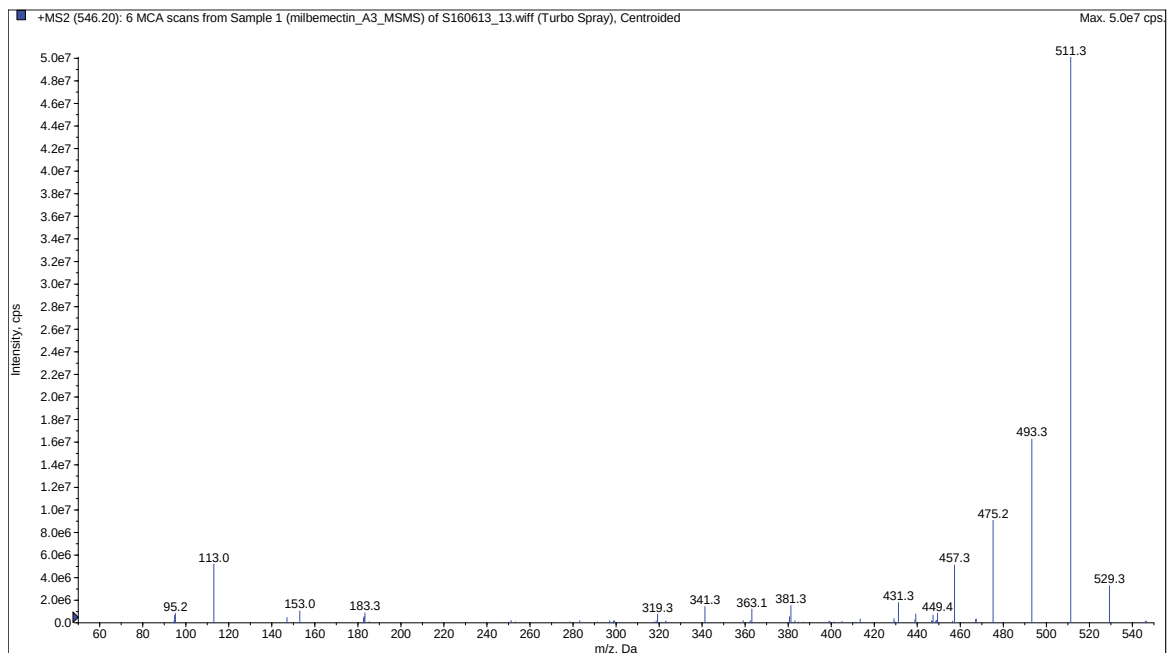
付図-1. ミルベメクチンA₃のマススペクトル

ミルベメクチンA₃のマススペクトル（一次イオン）の一例（正モード）



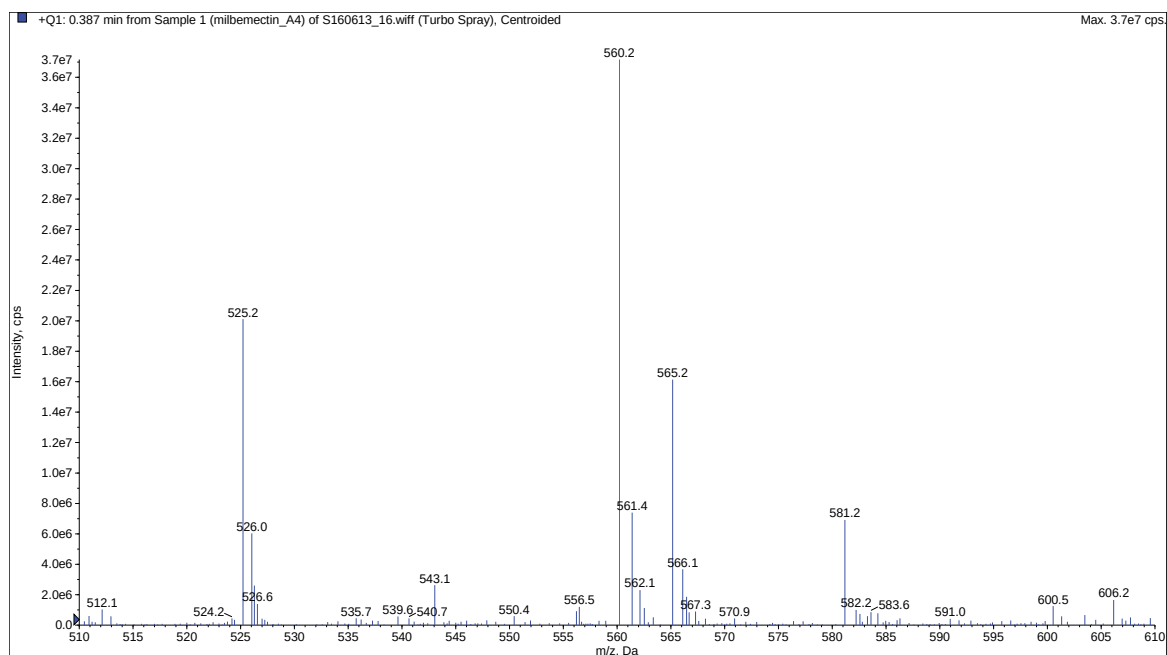
ミルベメクチンA₃のプロダクトスキャンスペクトルの一例

（プリカーサーイオン； $m/z=546.2$ ，正モード）



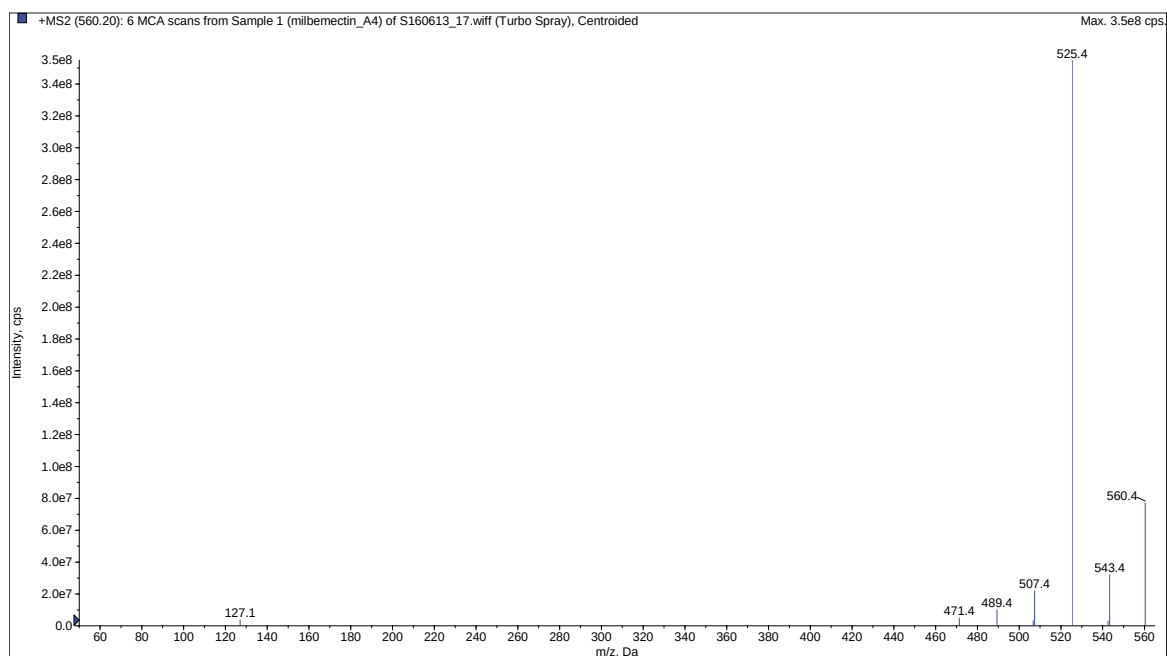
付図-2. ミルベメクチンA₄のマススペクトル

ミルベメクチンA₄のマススペクトル（一次イオン）の一例（正モード）



ミルベメクチンA₄のプロダクトスキャンスペクトルの一例

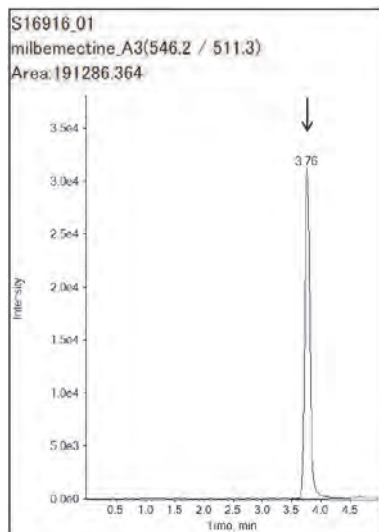
（プリカーサーイオン； $m/z=560.2$ ，正モード）



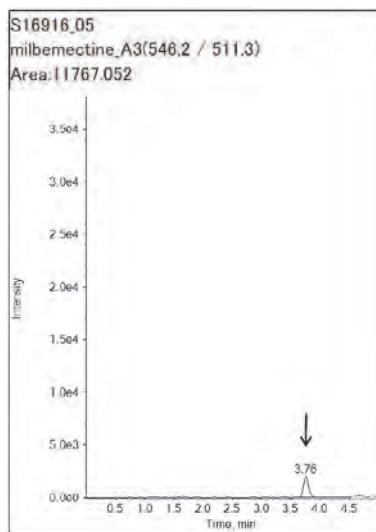
付図-3. ミルベメクチンA₃のクロマトグラム (代表例)

付図-3-1. 果肉

標準品 0.05 ng



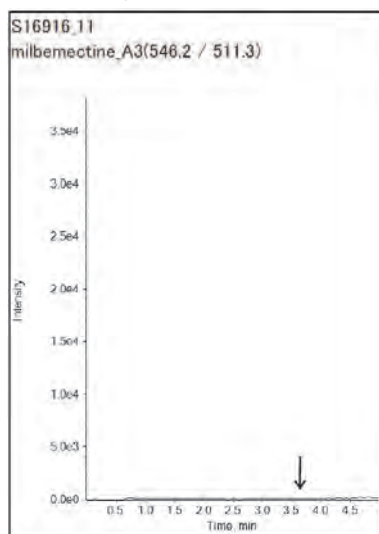
標準品 0.0025 ng



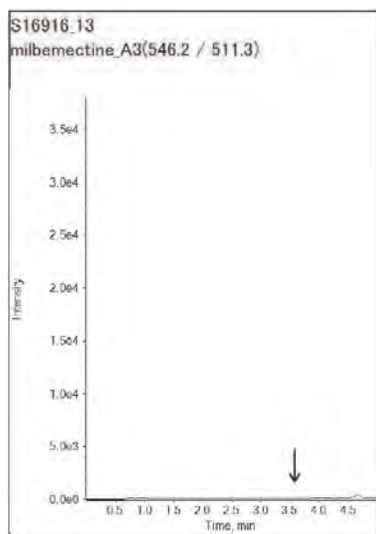
茨城 無処理
5 μ L/4 mL/0.4 g



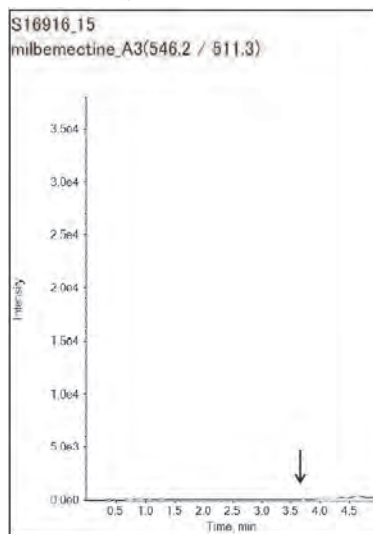
茨城 2 回処理 7 日後
5 μ L/4 mL/0.4 g



茨城 2 回処理 14 日後
5 μ L/4 mL/0.4 g



茨城 2 回処理 21 日後
5 μ L/4 mL/0.4 g

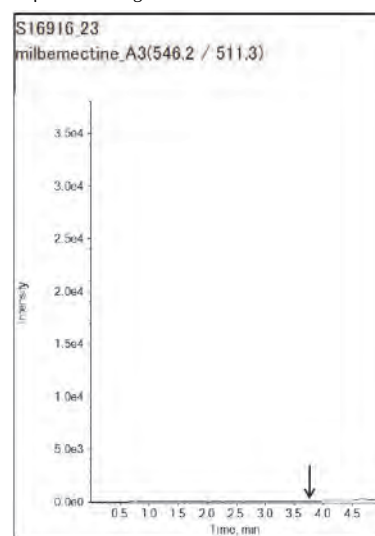
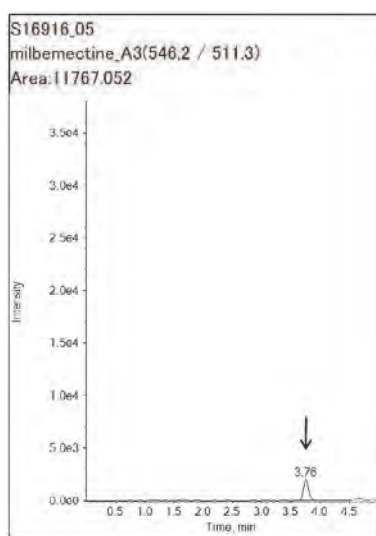
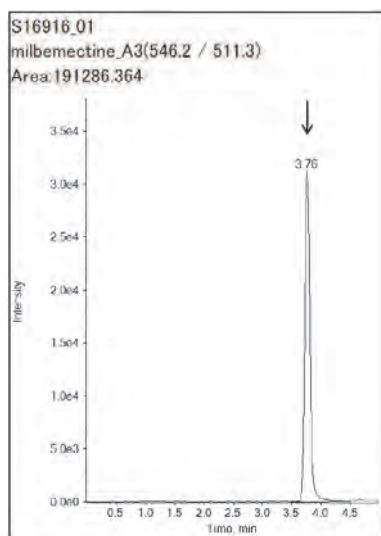


付図-3-2. 果実

標準品 0.05 ng

標準品 0.0025 ng

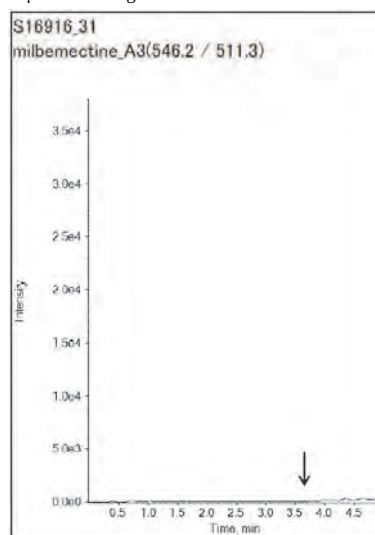
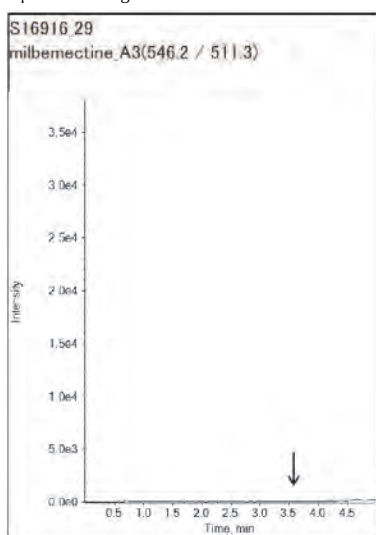
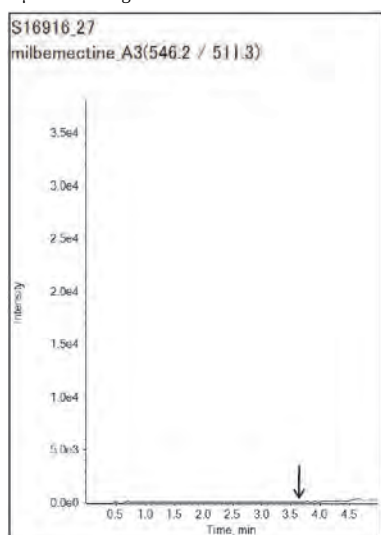
茨城 無処理
5 μ L/4 mL/0.4 g



茨城 2 回処理 7 日後
5 μ L/4 mL/0.4 g

茨城 2 回処理 14 日後
5 μ L/4 mL/0.4 g

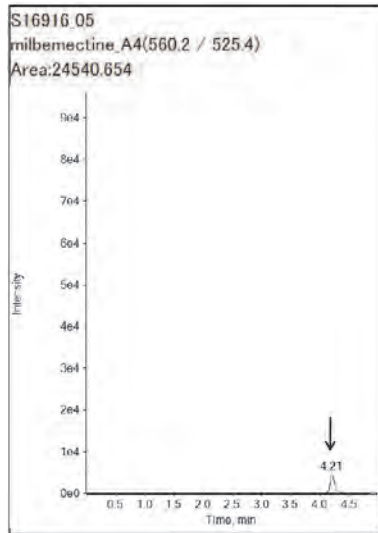
茨城 2 回処理 21 日後
5 μ L/4 mL/0.4 g



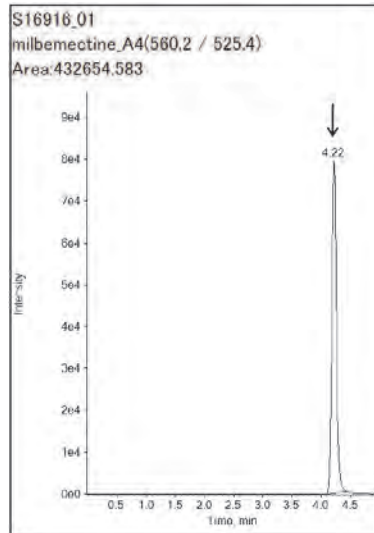
付図-4. ミルベメクチンA₄のクロマトグラム (代表例)

付図-4-1. 果肉

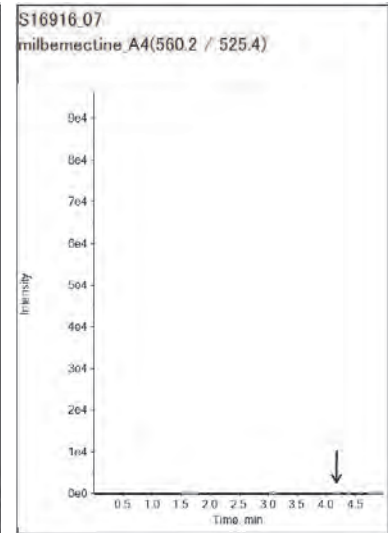
標準品 0.05 ng



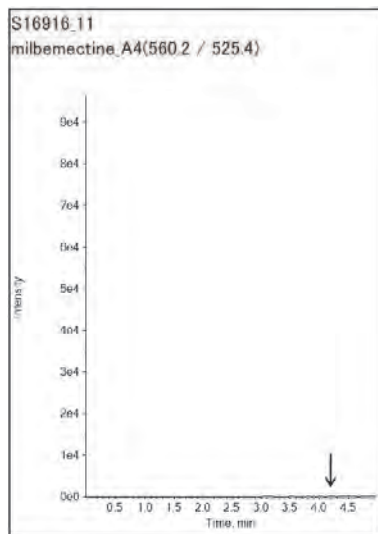
標準品 0.0025 ng



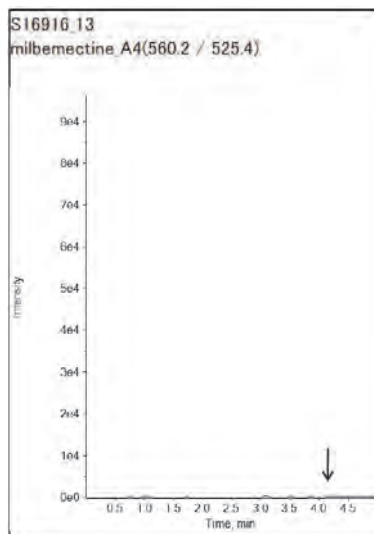
茨城 無処理
5 μ L/4 mL/0.4 g



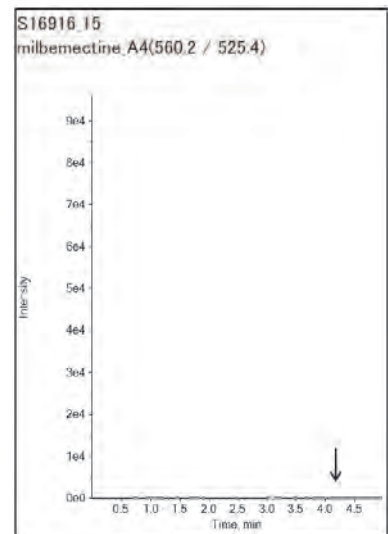
茨城 2 回処理 7 日後
5 μ L/4 mL/0.4 g



茨城 2 回処理 14 日後
5 μ L/4 mL/0.4 g



茨城 2 回処理 21 日後
5 μ L/4 mL/0.4 g

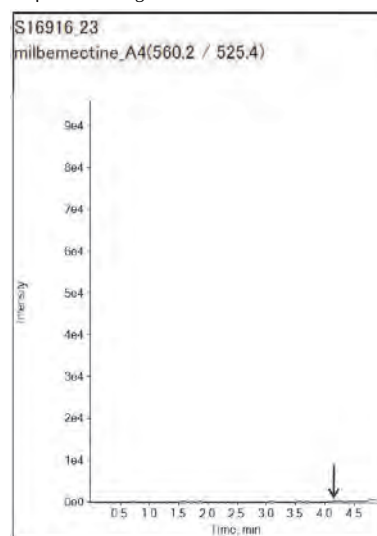
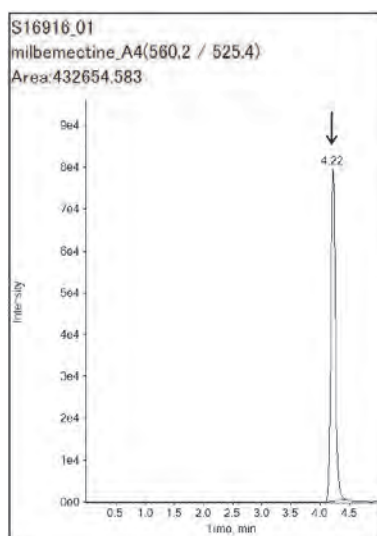
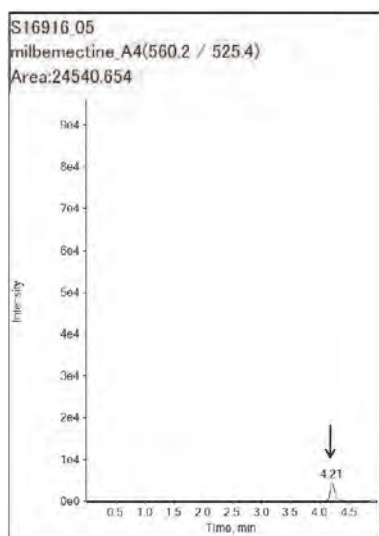


付図-4.2. 果実

標準品 0.05 ng

標準品 0.0025 ng

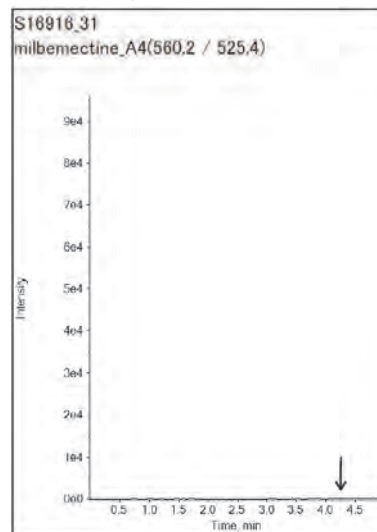
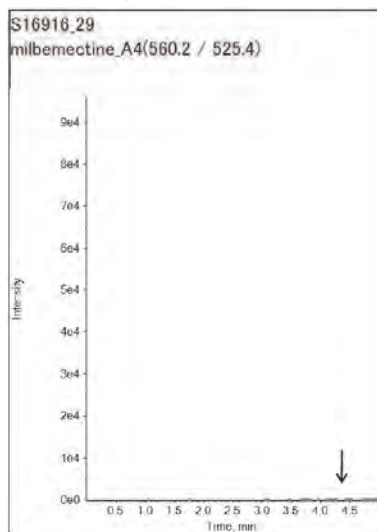
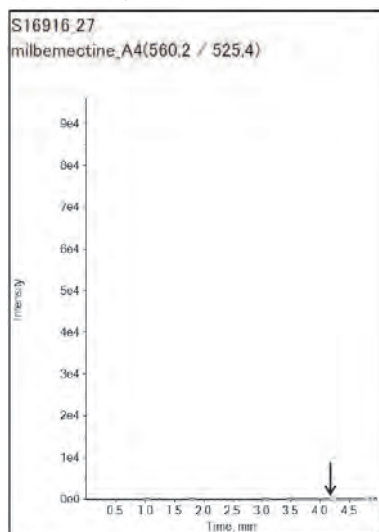
茨城 無処理
5 μ L/4 mL/0.4 g



茨城 2 回処理 7 日後
5 μ L/4 mL/0.4 g

茨城 2 回処理 14 日後
5 μ L/4 mL/0.4 g

茨城 2 回処理 21 日後
5 μ L/4 mL/0.4 g



残留分析詳細(すいか試料)：試料重量，作物写真

1.試料重量等

試料	処理	経過	平均重量	総平均重量	送付量	送付量の平均	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	—	1.68	1.81	30.3	15.5	74	26	6.9
	F	7	1.52		9.12		69	31	7.3
	F	14	1.75		8.75		77	23	4.7
	F	21	2.28		13.7		81	19	4.5
								平均 75:25	平均 5.9
高知	0	—	1.34	1.86	24.2	13.7	77	23	5.9
	F	7	1.90		9.52		80	20	2.9
	F	14	1.98		9.92		79	21	2.9
	F	21	2.22		11.1		83	17	4.3
								平均 80:20	平均 4.0
宮崎	0	—	1.67	1.46	25.0	13.1	72	28	5.2
	F	7	1.59		9.53		72	28	4.8
	F	14	1.37		8.19		75	25	4.0
	F	21	1.20		9.59		74	26	4.0
								平均 73:27	平均 4.5
3 ほ場の総平均重量									
1.71 kg/個									

F：ジフルベンズロンは3回処理

マンゼブは7回処理

ミルベメクチンは2回処理

2.作物写真

2.1.茨城



茨城 無処理



茨城 処理7日後



茨城 処理14日後



茨城 処理21日後

2.2.高知



高知 無処理



高知 処理7日後



高知 処理14日後



高知 処理21日後

2.3.宮崎



宮崎 無処理



宮崎 処理7日後



宮崎 処理14日後



宮崎 処理21日後