

資料 2-7

平成26年度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
残留分析詳細① フルバリネート

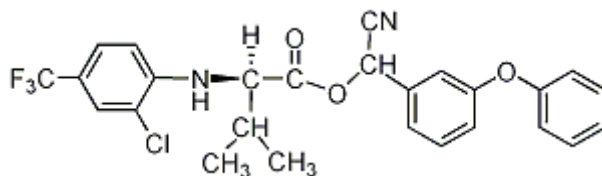
1. 分析対象物質

化学名： (RS)- α -cyano-3-phenoxybenzyl N-(2-chloro- α, α, α -trifluoro-*p*-tolyl)
-DL-valinate

分子式： $C_{26}H_{22}ClF_3N_2O_3$

分子量： 502.9

構造式：



性 状： 黄色粘性液体

融 点： 164°C(0.07 mmHg)

蒸気圧： 9×10^{-8} mPa (20°C)

分配係数： $\log P_{OW} = 4.26$ (25°C)

溶解性： 水 1.03 ppb(pH7, 20°C)

トルエン, アセトニトリル, イソプロパノール,
ジメチルホルムアミド, 1-オクタノールに可溶
イソオクタン 108 g/L

安定性： 室温で2年間安定 (20~28°C)

太陽光の照射により分解

加水分解による半減期 (25°C)

48日 (pH=5), 38.5日 (pH=7), 1.1日 (pH=9)

出 典： The Pesticide Manual 15th Edition

2. 標準品及び試薬

フルバリネート標準品：純度97.2% (関東化学製)

アセトン, アセトニトリル, 酢酸エチル, ジエチルエーテル, ヘキサン：

残留農薬試験用 (関東化学製)

水：ピュアライトPAR-0015-0V1 (オカノ製) 及びピューリックZ II (オカノ製)

で精製した水

多孔性ケイソウ土カラム：InertSep K-solute 5 mL (ジーエルサイエンス製)

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)

3. 装置及び機器

ミキサー：クイジナートDLC-NXJ2PS (クイジナート・アメリカ製)

ガスクロマトグラフ (GC μ ECD)：HP6890 GC System, μ ECD (アジレント製)

データ処理装置：ChemStation (アジレント製)

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 15 m, 膜厚 1.5 μ m
温度：	カラム 150°C (1 min) - (20°C/min) - 250°C (4 min) 注入口 280°C, 検出器 280°C
ガス流量：	キャリアー (He) 10 mL/min 窒素 40 mL/min
注入量：	2 μ L
保持時間：	約 7.2 min

5. 検量線の作成

フルバリネート標準品20.6 mgを20 mL容メスフラスコに精秤し, アセトンに溶解して1000 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20 mg/L標準溶液を調製し, さらにこの標準溶液をヘキサンで希釈して0.001, 0.002, 0.004, 0.02及び0.04 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フルバリネート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組をフルバリネート分析用試料とし、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(−20℃以下)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)を取り、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、アセトンを留去した。

6.3. 多孔性ケイソウ土カラムによる精製

濃縮液にアセトニトリル/水(50:50,v/v)混液を加え約5 gに調整した後、多孔性ケイソウ土カラムに流下した。5分間放置後、ヘキサン/酢酸エチル(80:20,v/v) 30 mLで容器内を洗って多孔性ケイソウ土カラムに移して流下し、溶出液を分取した。溶出液を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. フロリジルミニカラムによる精製

〈果肉〉

フロリジルミニカラムにヘキサン5 mLを流下し前処理した。残留物をヘキサン5 mLに溶解してフロリジルミニカラムに移して流下し、その流出液を捨てた。次にヘキサン/ジエチルエーテル(95:5, v/v)混液10 mLを流下した後、ヘキサン/ジエチルエーテル(85:15, v/v)混液20 mLを流下した。全ての溶出液を合わせ取り、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。

〈果実〉

フロリジルミニカラムにヘキサン5 mLを流下し前処理した。残留物をヘキサン5 mLに溶解してフロリジルミニカラムに移して流下した後、ヘキサン/ジエチルエーテル(95:5, v/v)混液10 mLを流下し、これらの流出液を捨てた。次に、ヘキサン/ジエチルエーテル(85:15, v/v)混液20 mLを流下し、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。

6.5. 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高さを求め、検量線よりフルバリネートの重量を求め、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)
0.004	0.4	2	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)
0.002	0.4	2	2	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、宮崎試料及び茨城試料の無処理試料*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。

*本事業の無処理試料

8.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
茨城	5	93, 81,	88, 78	88,	86	7.0
茨城	0.25	97, 91,	96, 81	94,	92	7.0
茨城	0.01	110, 110,	110, 100	110,	108	4.1

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
宮崎	5	90, 84,	90, 81	87,	86	4.5
宮崎	0.25	91, 83,	88, 78	88,	86	6.0
宮崎	0.01	90, 80,	80, 70	80,	80	8.8

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フルバリネット 0.1 mg/kg 添加試料（クオリティーコントロール試料）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、2013年10月実施の食品衛生精度管理比較調査（一般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。

9.1. 果肉

分析日*	使用した圃場	回収率 (%)	無 処 理 区 の 分析値 (mg/kg)
2014/9/19	宮崎	120	<0.01
2014/9/24	茨城	102	<0.01
2014/9/26	高知	97	<0.01
2014/10/1	宮崎	96	<0.01
2014/10/2	茨城	85	<0.01
2014/10/6	高知	94	<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*	使用した圃場	回収率 (%)	無 処 理 区 の 分析値 (mg/kg)
2014/9/22	宮崎	86	<0.01
2014/9/25	茨城	77	<0.01
2014/9/29	高知	84	<0.01
2014/10/1	宮崎	87	<0.01
2014/10/2	茨城	75	<0.01
2014/10/6	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フルバリネートを添加し、冷凍暗所（－20℃以下）に凍結保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を確認した。保存安定性の結果を示す。

10.1.果肉

圃場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	1.0	71 (2014/7/23-10/2)	72,	70	71
高知	1.0	63 (2014/8/4-10/6)	82,	79	80
宮崎	1.0	88 (2014/7/5-10/1)	80,	79	80

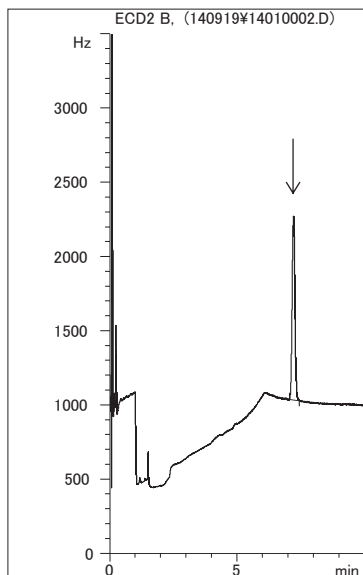
10.2.果実

圃場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	1.0	71 (2014/7/23-10/2)	79,	77	78
高知	1.0	63 (2014/8/4-10/6)	78,	74	76
宮崎	1.0	88 (2014/7/5-10/1)	85,	76	80

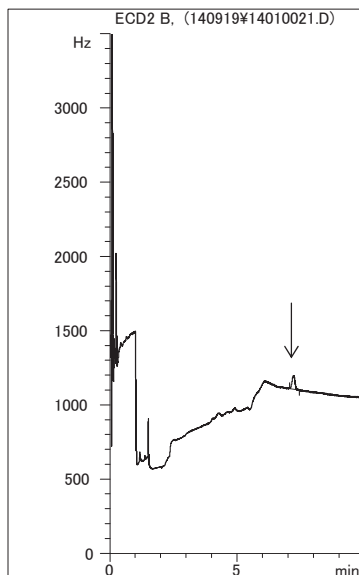
付図-1. フルバリネットのクロマトグラム (代表例)

付図-1-1. 果肉

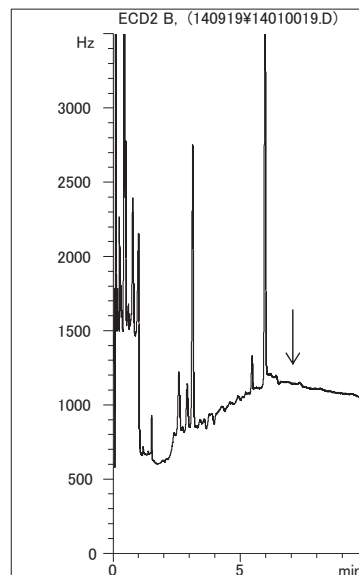
標準品 0.08 ng



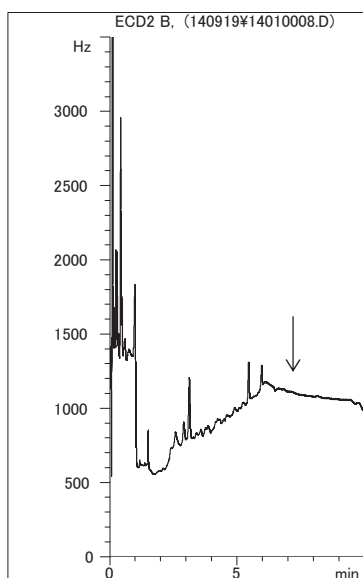
標準品 0.004 ng



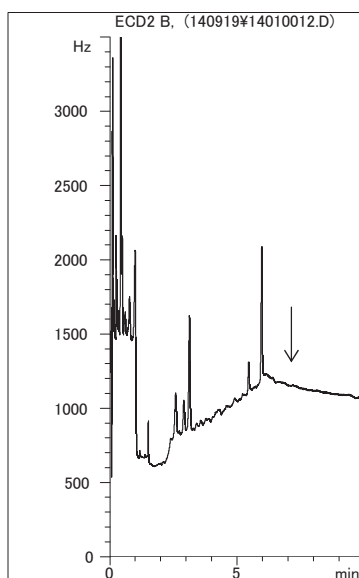
宮崎 無処理
2 μ L/2 mL/0.4 g



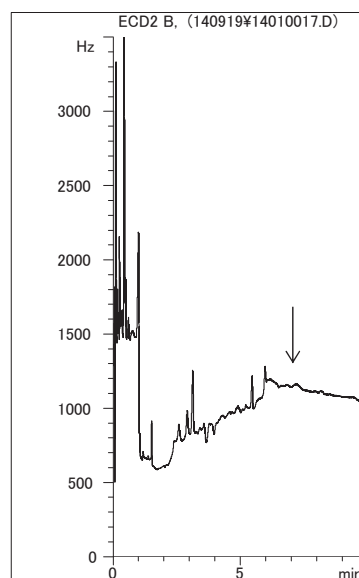
宮崎 2 回処理 3 日後
2 μ L/2 mL/0.4 g



宮崎 2 回処理 7 日後
2 μ L/2 mL/0.4 g



宮崎 2 回処理 14 日後
2 μ L/2 mL/0.4 g

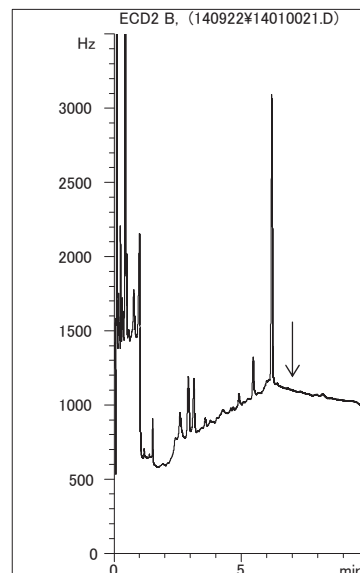
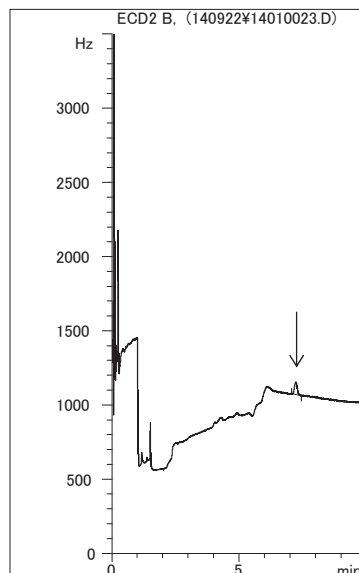
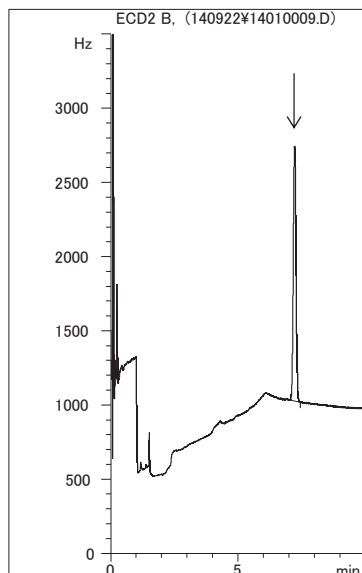


付図-1-2. 果実

標準品 0.08 ng

標準品 0.004 ng

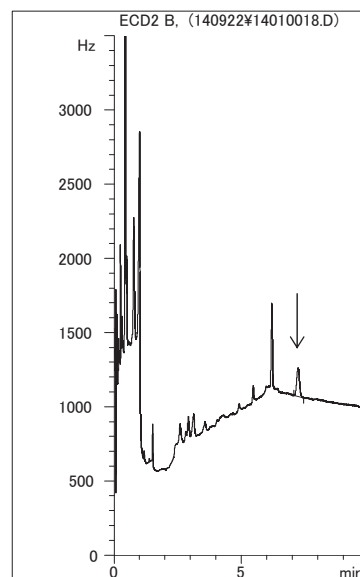
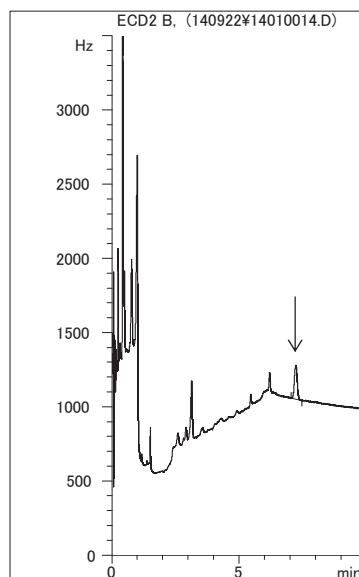
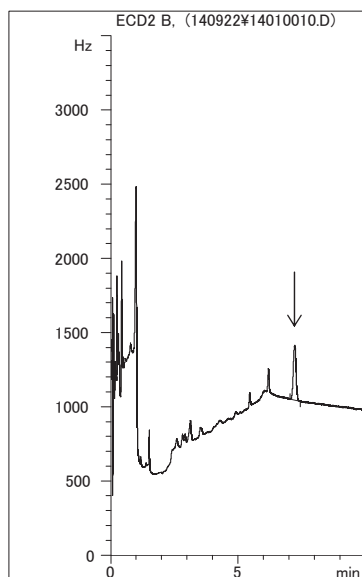
宮崎 無処理
2 μ L/2 mL/0.4 g



宮崎 2回処理 3日後
2 μ L/5 mL/0.4 g

宮崎 2回処理 7日後
2 μ L/5 mL/0.4 g

宮崎 2回処理 14日後
2 μ L/5 mL/0.4 g



平成26年度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
残留分析詳細② ヘキシチアゾクス

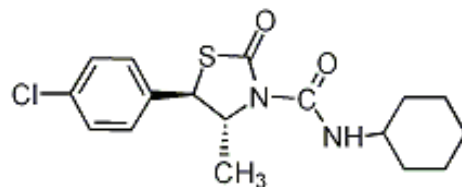
1. 分析対象物質

化学名： (4*RS*,5*RS*)-5-(4-chlorophenyl)-*N*-cyclohexyl-4-methyl-2-oxo-
-1,3-thiazolidine-3-carboxamide

分子式： $C_{17}H_{21}ClN_2O_2S$

分子量： 352.9

構造式：



性 状： 無色結晶

融 点： 108.0～108.5℃

蒸気圧： 0.0034mPa (20℃)

分配係数： $\log P_{OW} = 2.53$

溶解性： 水 0.5 mg/L (20℃)

クロロホルム 1379, キシレン 362, メタノール 206,

アセトン 160, アセトニトリル 28.6, ヘキサン 4 (以上 g/L, 20℃)

安定性： 光, 空気及び熱に安定。

300℃まで安定

pH5, 7及び9の水溶液中で安定

水中光分解 (太陽光) による半減期 16.7日

出 典： The Pesticide Manual 15th Edition.

2. 標準品及び試薬

ヘキシチアゾクス標準品：純度 99.7% (関東化学製)

アセトン, アセトニトリル, 酢酸エチル, ジエチルエーテル, ヘキサン：

残留農薬試験用 (関東化学製)

メタノール：LC-MS 用 (関東化学製)

水：ピュアライトPAR-0015-0V1(オカダ/製)及びピュアリックZII(オカダ/製)

で精製した水

多孔性ケイソウ土カラム：InertSep K-solute 5mL (ジーエルサイエンス製)

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)

3. 装置及び機器

ミキサー：クイジナートDLC-NXJ2PS (クイジナート・アメリカ製)

液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC-MS/MS)：

Agilent 6410 Triple Quad LC/MS (アジレント製)

データ処理装置：MassHunter (アジレント製)

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の操作条件

カラム：Atlantis T3 (Waters 製)

内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3 μ m

溶離液：メタノール／4 mmol/L 酢酸アンモニウム含有 0.1%ギ酸
(85:15,v/v)

流量：0.2 mL/min

カラム温度：40°C

注入量：2 μ L

保持時間：約 6.7 min

4.2. 質量分析計の操作条件

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)

正モード

乾燥ガス温度：300°C

乾燥ガス流量：10 L/min

ネブライザー圧力：30 psi

イオン導入電圧：3000 V

フラグメンター電圧：100 V

コリジョン電圧：20 V (コリジョンガス; N₂)

イオン検出法： MRM 法
モニタリングイオン： プリカーサーイオン； m/z 352.9
プロダクトイオン； m/z 227.9

5. 検量線の作成

ヘキシチアゾクス標準品20.1 mgを20 mL容メスフラスコに精秤し、アセトンに溶解して1000 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20 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, 0.01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ヘキシチアゾクス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組をヘキシチアゾクス分析用試料とし、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 (−20℃以下) 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) を取り、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、アセトンを留去した。

6.3. 多孔性ケイソウ土カラムによる精製

濃縮液にアセトニトリル／水 (50:50,v/v) 混液を加え約5 gに調整した後、多孔性ケイソウ土カラムに流下した。5分間放置後、ヘキサン／酢酸エチル (80:20,v/v) 30 mLで容器内を洗って多孔性ケイソウ土カラムに移して流下し、溶出液を分取した。溶出液を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. フロリジルミニカラムによる精製

〈果肉〉

フロリジルミニカラムにヘキサン5 mLを流下し前処理した。残留物をヘキサン5 mLに溶解してフロリジルミニカラムに移して流下し、その流出液を捨てた。次にヘキサン／ジエチルエーテル (95:5, v/v) 混液10 mLを流下した後、ヘキサン／ジエチルエーテル (85:15, v/v) 混液20 mLを流下した。全ての溶出液を合わせ取り、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。

〈果実〉

フロリジルミニカラムにヘキサン5 mLを流下し前処理した。残留物をヘキサン5 mLに溶解してフロリジルミニカラムに移して流下した後、ヘキサン/ジエチルエーテル (95:5, v/v) 混液10 mLを流下し、これらの流出液を捨てた。次に、ヘキサン/ジエチルエーテル (85:15, v/v) 混液20 mLを流下し、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。

6.5. 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、検量線よりヘキシチアゾクスの重量を求め、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	0.4	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 (mg/kg)
0.001	0.4	4	2	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、宮崎試料及び茨城試料の無処理試料*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。

*本事業の無処理試料

8.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
茨城	5	96, 93,	95, 90	95,	94	2.5
茨城	0.25	106, 102,	104, 101	103,	103	1.9
茨城	0.01	120, 120,	120, 120	120,	120	0.0

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
宮崎	5	100, 94,	96, 93	95,	96	2.8
宮崎	0.25	99, 96,	97, 88	96,	95	4.4
宮崎	0.01	110, 100,	100, 100	100,	102	4.4

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0.1 mg/kg添加試料（クォリティーコントロール試料）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、2013年10月実施の食品衛生精度管理比較調査（一般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。

9.1.果肉

分析日*	使用した圃場	回収率 (%)	無 処 理 区 の 分析値 (mg/kg)
2014/9/19	宮崎	96	<0.01
2014/9/24	茨城	90	<0.01
2014/9/26	高知	94	<0.01
2014/10/1	宮崎	99	<0.01
2014/10/2	茨城	103	<0.01
2014/10/6	高知	98	<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*	使用した圃場	回収率 (%)	無 処 理 区 の 分析値 (mg/kg)
2014/9/22	宮崎	99	<0.01
2014/9/25	茨城	87	<0.01
2014/9/29	高知	94	<0.01
2014/10/1	宮崎	104	<0.01
2014/10/2	茨城	92	<0.01
2014/10/6	高知	92	<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ヘキシチアゾクスを添加し、冷凍暗所（－20℃以下）に凍結保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を確認した。保存安定性の結果を示す。

10.1.果肉

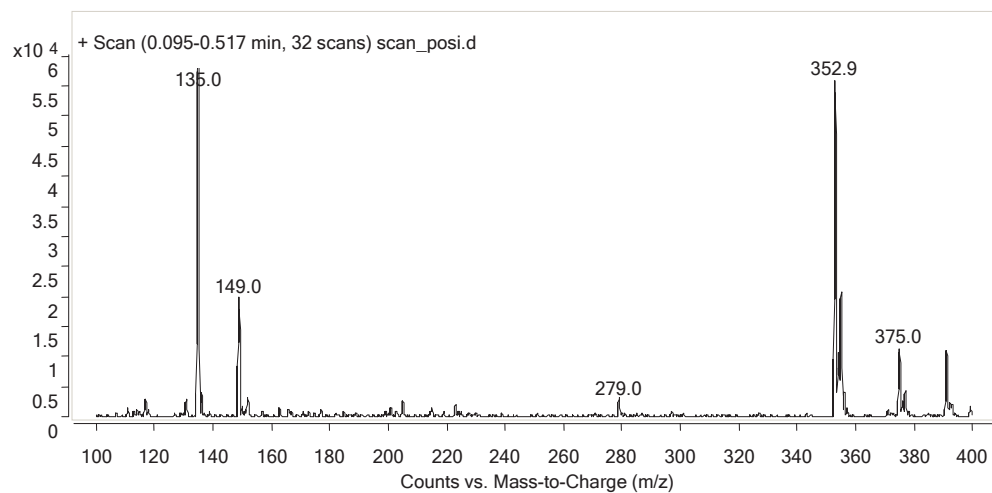
圃場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	1.0	71 (2014/7/23-10/2)	97,	94	96
高知	1.0	63 (2014/8/4-10/6)	87,	86	86
宮崎	1.0	88 (2014/7/5-10/1)	91,	87	89

10.2.果実

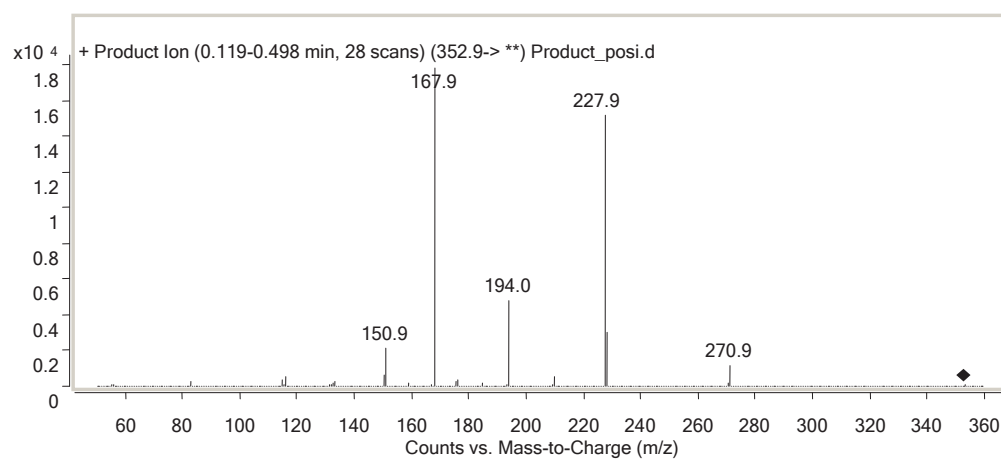
圃場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	1.0	71 (2014/7/23-10/2)	94,	90	92
高知	1.0	63 (2014/8/4-10/6)	90,	89	90
宮崎	1.0	88 (2014/7/5-10/1)	94,	93	94

付図-1. マススペクトル

ヘキシチアゾクスのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)



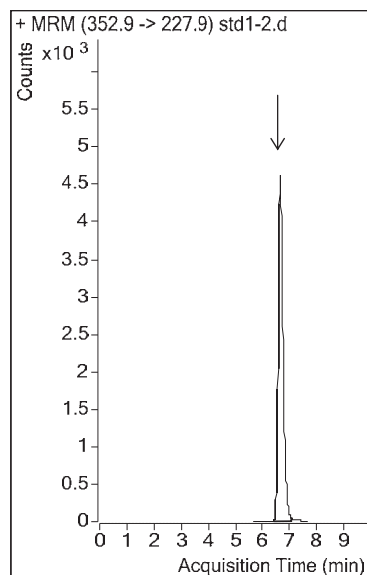
ヘキシチアゾクスのプロダクトスキンスペクトルの一例
(プリカーサーイオン m/z=352.9, 正モード)



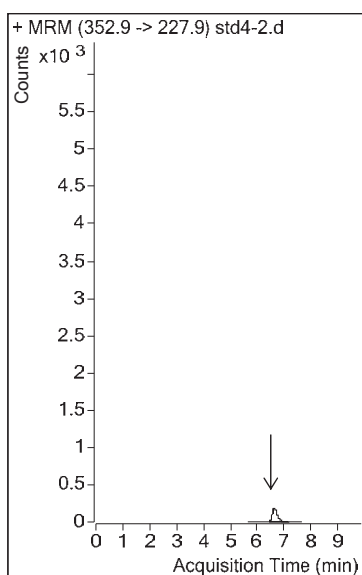
付図-2. ヘキシチアゾクスのクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. 果肉

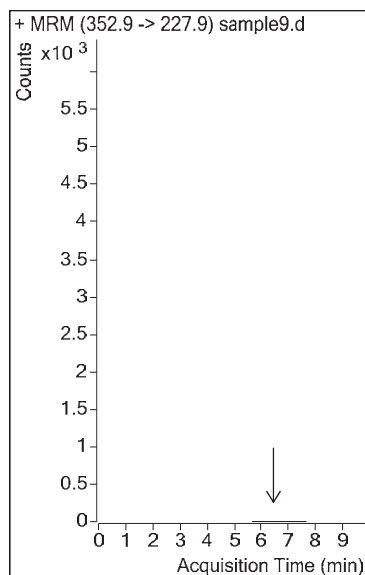
標準品 0.04 ng



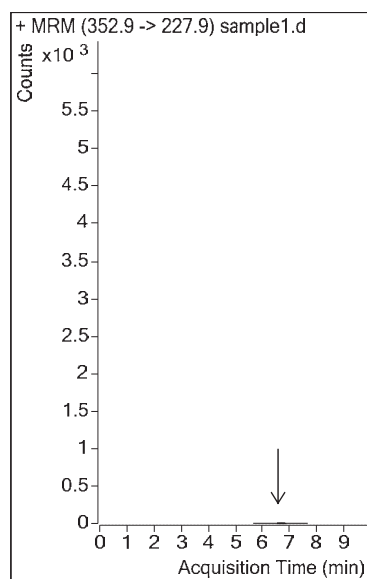
標準品 0.002 ng



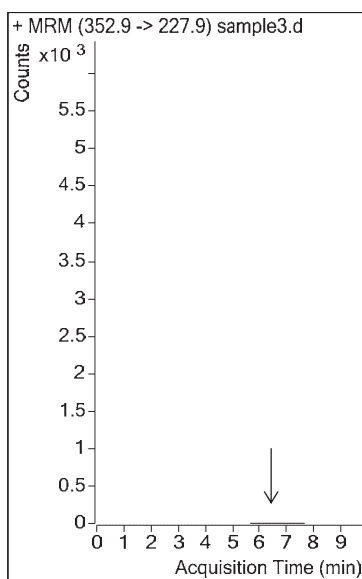
宮崎 無処理
2 μ L/4 mL/0.4 g



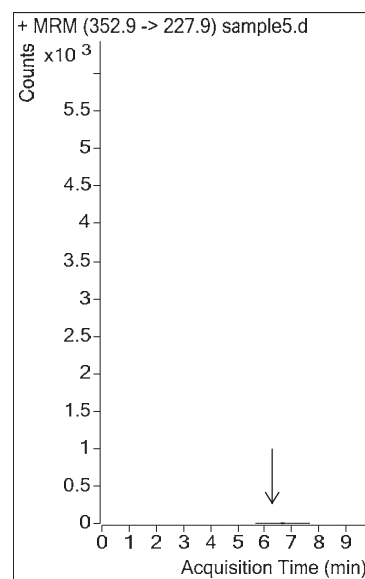
宮崎 2回処理 3日後
2 μ L/4 mL/0.4 g



宮崎 2回処理 7日後
2 μ L/4 mL/0.4 g



宮崎 2回処理 14日後
2 μ L/4 mL/0.4 g

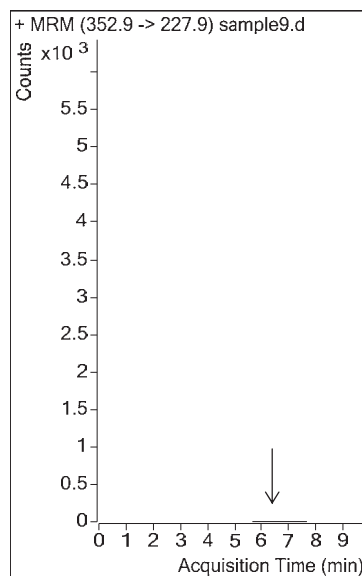
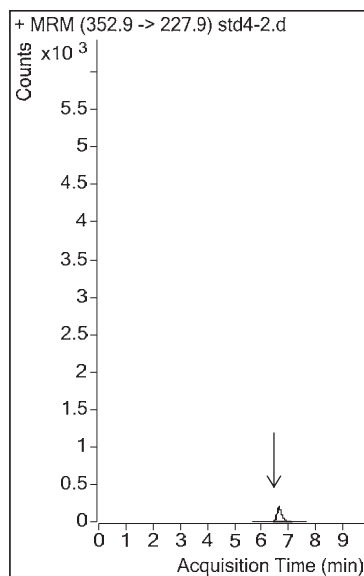
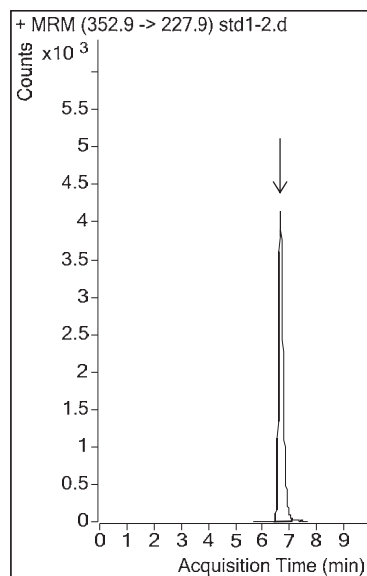


付図-2-2. 果実

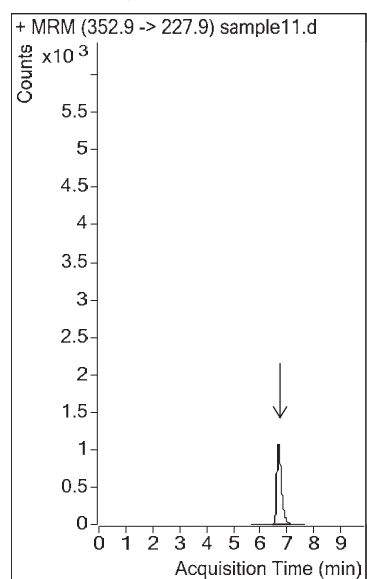
標準品 0.04 ng

標準品 0.002 ng

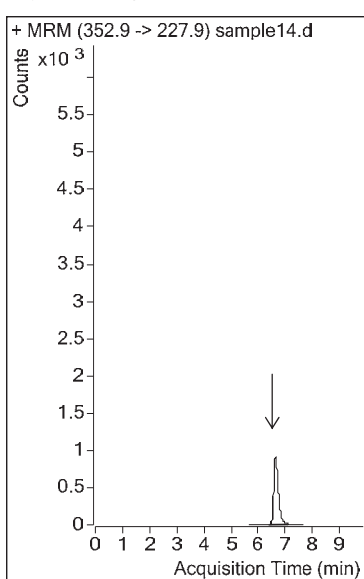
宮崎 無処理
2 μ L/4 mL/0.4 g



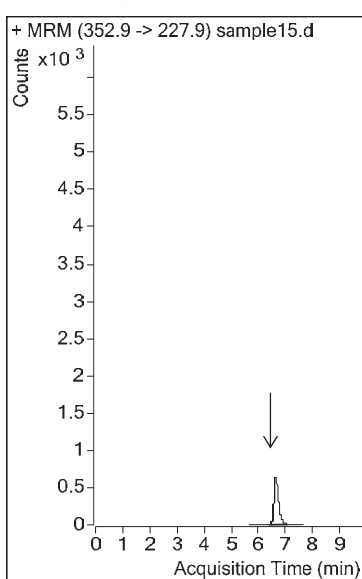
宮崎 2 回処理 3 日後
2 μ L/4 mL/0.4 g



宮崎 2 回処理 7 日後
2 μ L/4 mL/0.4 g



宮崎 2 回処理 14 日後
2 μ L/4 mL/0.4 g



平成26年度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
 残留分析詳細③ 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	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	—	1.86	2.02	22.3	13.4	94	6	1.2
	2	3	1.97		9.85		93	5	1.4
	2	7	2.06		10.3		94	6	1.4
	2	14	2.20		11.0		94	6	1.4
							平均 94:6		平均 1.4
高知	0	—	1.41	1.54	14.1	9.50	93	7	1.3
	2	3	1.58		7.90		93	7	1.5
	2	7	1.58		7.90		93	7	1.3
	2	14	1.60		8.00		93	7	1.3
							平均 93:7		平均 1.4
宮崎	0	—	2.29	2.19	34.3	18.3	85	15	1.8
	2	3	2.20		13.2		88	12	1.7
	2	7	2.10		12.6		92	8	1.7
	2	14	2.17		13.0		93	7	1.6
							平均 90:11		平均 1.7
3 ほ場の総平均重量				3 ほ場の総重量の平均					
1.92 kg/個				13.7 kg					

2.作物写真

2.1.茨城



茨城 無処理

茨城 処理3日後



茨城 処理7日後

茨城 処理14日後

2.2.高知



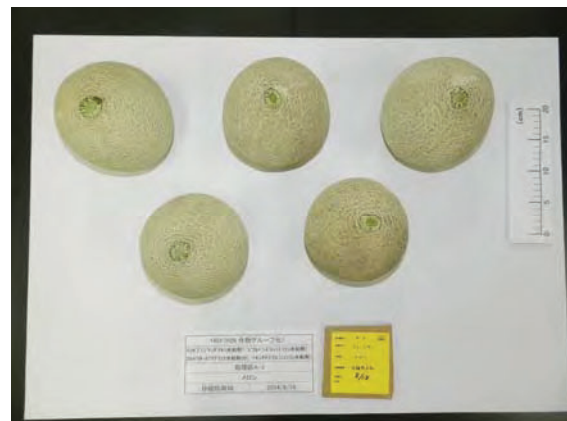
高知 無処理



高知 処理3日後



高知 処理7日後



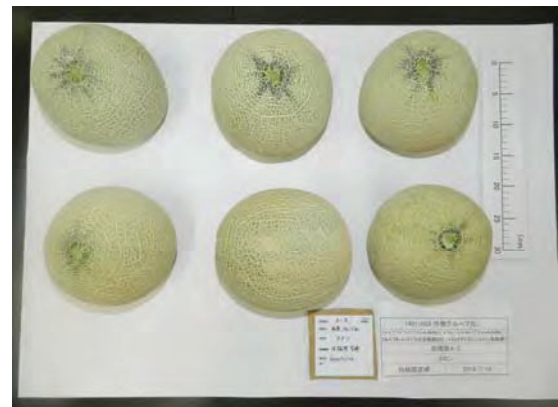
高知 処理14日後

2.3.宮崎



宮崎 無処理

宮崎 処理3日後



宮崎 処理7日後

宮崎 処理14日後

資料 2-8

平成26年度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
残留分析詳細① マンゼブ

1. 分析対象物質

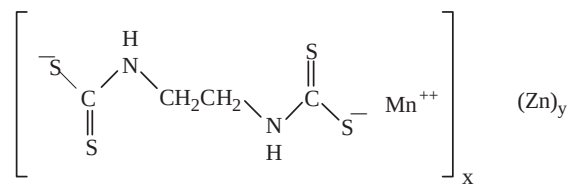
マンゼブ

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 mg/L (pH=7.5, 25°C)

ほとんどの有機溶媒に不溶

安定性 : 通常の乾燥保存条件下で安定

熱及び水分により徐々に分解

加水分解による半減期 (25°C)

20時間 (pH=5), 21時間 (pH=7), 27時間 (pH=9)

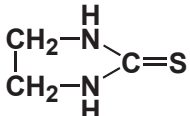
出 典 : The Pesticide Manual 15th Edition

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℃

溶解性： 水 2 g/100 mL (30℃)

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)

二硫化炭素：分光分析用 純度 99.9% (関東化学製)

エチレンチオウレア標準品：純度 100% (和光純薬工業製)

エタノール，ジクロロメタン，ヘキサン，メタノール：残留農薬試験用 (関東化学製)

メタノール：LC-MS 用 (関東化学製)

水：ピュアライト PRA-0015-0V1 (オルカノ製) 及びピュリック Z II (オルカノ製) で精製した水

塩酸：有害金属測定用 (関東化学製)

塩化第一スズ：精密分析用 (関東化学製)

アセトン，アンモニア水，硫酸，水酸化ナトリウム，ふっ化カリウム，

L-システイン塩酸塩一水和物：特級 (関東化学製)

多孔性ケイソウ土カラム：InertSep K-solute 5 mL (ジーエルサイエンス製)

3. 装置及び機器

分解蒸留装置：図 1 参照

ミキサー：クイジナート DLC-NXJ2 (クイジナート・アメリカ製)

pHメーター：F-72 (堀場製作所製)

<マンゼブ (二硫化炭素) 分析>

ガスクロマトグラフ (GC FPD-S)：HP6890 GC system, FPD Sフィルター

(アジレント製)

データ処理装置：ChemStation (アジレント製)

<エチレンチオウレア分析>

液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC-MS) : HP-1100SL (アジレント製)

データ処理装置 : ChemStation (アジレント製)

4. 測定機器の操作条件

4.1. ガスクロマトグラフ<マンゼブ (二硫化炭素) >の操作条件

カラム : DB-WAX (アジレント製)
 内径 0.53 mm, 長さ 30 m, 膜厚 1.0 μ m
 温度 : カラム 50°C, 注入口 250°C, 検出器 250°C
 ガス流量 : キャリヤー (He) 15 mL/min
 水素 3 mL/min, 空気 60 mL/min
 注入量 : 4 μ L
 保持時間 : 約 0.86 min

4.2. 液体クロマトグラフ・質量分析計<エチレンチオウレア>の操作条件

カラム : Pursuit XRs 3u DP (VARIAN 製)
 内径 2.0 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3 μ m
 溶離液 : 水/メタノール (98:2, v/v)
 流量 : 0.2 mL/min
 カラム温度 : 40°C
 注入量 : 2 μ L
 保持時間 : 約 4.9 min

4.3. 質量分析計の操作条件

イオン化法 : エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)
 正モード
 乾燥ガス温度 : 300°C
 乾燥ガス流量 : 10 L/min
 ネブライザー圧力 : 30 psi
 イオン導入電圧 : 3000 V
 フラグメンター電圧 : 50 V
 イオン検出法 : SIM 法
 モニタリングイオン : m/z 103.1

5. 検量線の作成

5.1. マンゼブ

50 mL容メスフラスコにエタノール約45 mLを取り、栓をして秤量した。これに二硫化炭素約1 mLを手早く加え、栓をして秤量した後、エタノールで定容した。重量差から二硫化炭素の濃度を求め、エタノールで希釈して0.0125, 0.025, 0.1, 0.25及び0.5 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二硫化炭素のピーク面積を測定し、横軸に重量 (ng), 縦軸にピーク面積の平方根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20 mgを20 mL容メスフラスコに精秤し、メタノールに溶解して1000 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20 mg/L標準溶液を調製し、さらにこの標準溶液を水/メタノール(98:2, v/v)混液で希釈して0.001, 0.002, 0.004, 0.02及び0.04 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組をマンゼブ分析用試料とし、細切した。残りの1組をエチレンチオウレア分析用試料とし、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各調製試料を作製した。各調製試料は2組以上作製し、その1組を分析に供した。残りの各分析用試料は密封して冷凍保存(−20℃以下)した。

6.2. マンゼブ

6.2.1. 抽出

第一吸収管に10%水酸化ナトリウム溶液30 mL，第二吸収管に硫酸20 mLを入れ，第三吸収管にエタノール10 mLを正確に入れて，ドライアイス及びアセトンを用いて冷却した。細切した試料50 gを1 L容丸底フラスコにはかりとり，塩化第一スズ10 g，水150 mL及び少量のガラスビーズを加えた。分解蒸留装置をセットし，穏やかに吸引しながら6 mol/L塩酸200 mLをフラスコに加えて加熱した。沸騰してから45分後に加熱を止め，第三吸収管のエタノールを共栓付試験管に移して室温に戻した。

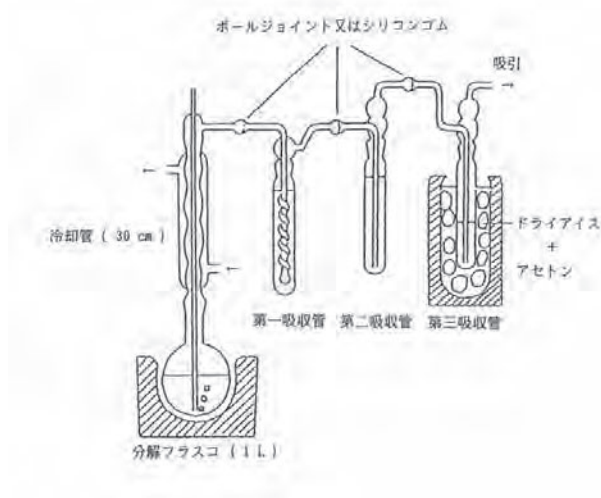


図1.分解蒸留装置

6.2.2. 定量

この検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の平方根を求め，検量線より二硫化炭素の重量を求め，換算係数1.77*を乗じ，試料中のマンゼブ残留濃度を算出した。

*換算係数1.77（マンゼブ分子量269.6／二硫化炭素2分子量152.2）

6.3. エチレンチオウレア

6.3.1. 抽出

均一化した試料20 gをはかりとり，L-システイン塩酸塩2 g，ふっ化カリウム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／水（80:20，v/v）混液50 mLで洗い，同様にろ過した。ろ液を合わせ同混液で200 mL定容とし，その4 mL（試料0.4 g相当量）を分取した。

6.3.2. ヘキサン洗浄

L-システイン塩酸塩2 g及びふっ化カリウム15 gを水50 mLに溶解し、その10 mLを分取した抽出液に加え、分液ロートに移した。ヘキサン15 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、水層を分取した。

6.3.3. 多孔性ケイソウ土カラムによる精製

分取した溶液にアンモニア水0.3～0.4 mLを添加してpH=8～9に調整した後、水3 mLを加え、多孔性ケイソウ土カラムに流下した。10分間放置後、ジクロロメタン100 mLで容器内を洗って多孔性ケイソウ土カラムに移して流下し、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。

6.3.4. 定量

残留物を適量の水／メタノール（98:2, 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)
0.1	50	10	4	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)
0.05	50	10	4	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)
0.004	0.4	2	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)
0.002	0.4	2	2	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、市販品*を用いて、定量限界相当 (0.01 mg/kg), 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。

*茨城県牛久市内の小売店で2014年6月20日に購入した茨城県産のメロン (15.7 kg/10個)

8.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)		平均回収率 (%)		RSDr (%)
<u>マンゼブ</u>						
市販品	5	76, 74,	76, 70	76,	74	3.5
市販品	0.25	77, 74,	77, 72	76,	75	2.9
市販品	0.01	120, 120,	120, 110	120,	118	3.8
<u>エチレンチオウレア</u>						
市販品	5	97, 87,	94, 83	89,	90	6.2
市販品	0.25	102, 96,	101, 94	98,	98	3.4
市販品	0.01	90, 70,	80, 70	70,	76	11.8

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
<u>マンゼブ</u>						
市販品	5	80, 74,	77, 73	74,	76	3.8
市販品	0.25	84, 74,	80, 74	75,	77	5.8
市販品	0.01	120, 110,	120, 110	110,	114	4.8
<u>エチレンチオウレア</u>						
市販品	5	109, 92,	104, 87	93,	97	9.4
市販品	0.25	102, 90,	91, 89	90,	92	5.9
市販品	0.01	100, 70,	90, 70	90,	84	16.0

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、マンゼブ 0.1 mg/kg及びエチレンチオウレア 0.1 mg/kg添加試料（クオリティーコントロール試料）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、2013年10月実施の食品衛生精度管理比較調査（一般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。

9.1.果肉

成分名	分析日*	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の分析値 (mg/kg)
<u>マンゼブ</u>	2014/7/ 9	宮崎	71	<0.01
	2014/7/17	宮崎	104	<0.01
	2014/7/28	茨城	75	<0.01
	2014/8/ 4	茨城	71	<0.01
	2014/8/12	高知	87	<0.01
	2014/8/19	高知	76	<0.01
<u>エチレンチオウレア</u>	2014/7/ 9	宮崎	103	<0.01
	2014/7/17	宮崎	98	<0.01
	2014/7/28	茨城	95	<0.01
	2014/8/ 4	茨城	110	<0.01
	2014/8/12	高知	94	<0.01
	2014/8/19	高知	96	<0.01

回収試料の添加濃度：マンゼブ0.1 mg/kg, エチレンチオウレア0.1 mg/kg

*抽出日を記載

9.2.果実

成分名	分析日*	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の分 析値 (mg/kg)
<u>マンゼブ</u>	2014/7/ 9	宮崎	74	<0.01
	2014/7/17	宮崎	104	<0.01
	2014/7/28	茨城	70	<0.01
	2014/8/ 4	茨城	77	<0.01
	2014/8/12	高知	90	<0.01
	2014/8/19	高知	72	<0.01
<u>エチレンチオウレア</u>	2014/7/ 9	宮崎	93	<0.01
	2014/7/17	宮崎	108	<0.01
	2014/7/28	茨城	98	<0.01
	2014/8/ 4	茨城	109	<0.01
	2014/8/12	高知	98	<0.01
	2014/8/19	高知	99	<0.01

回収試料の添加濃度：マンゼブ0.1 mg/kg, エチレンチオウレア0.1 mg/kg

*抽出日を記載

10. 保存安定性確認

試料到着後直ちに分析したため、保存中の安定性確認は実施しなかった。

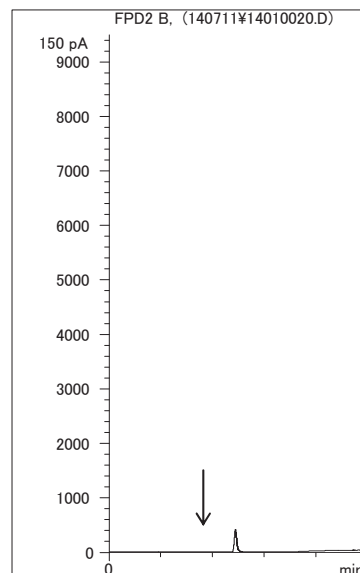
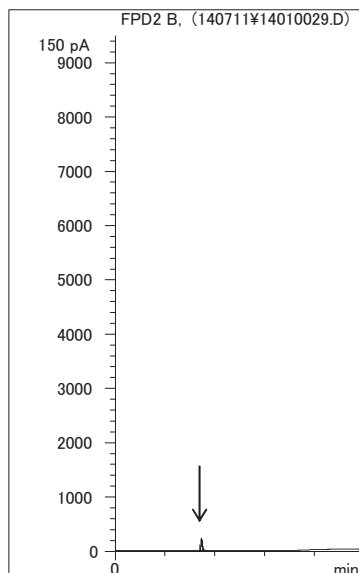
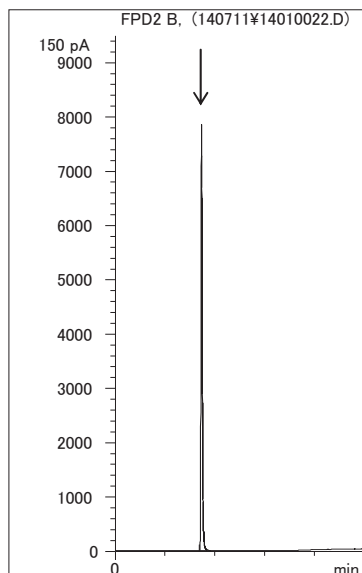
付図-1. 二硫化炭素のクロマトグラム (代表例)

付図-1-1. 果肉

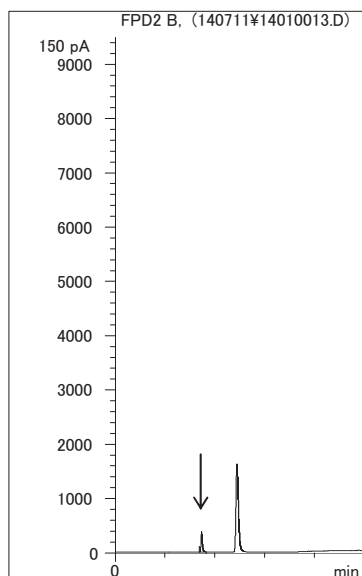
標準品 2.0 ng

標準品 0.1 ng

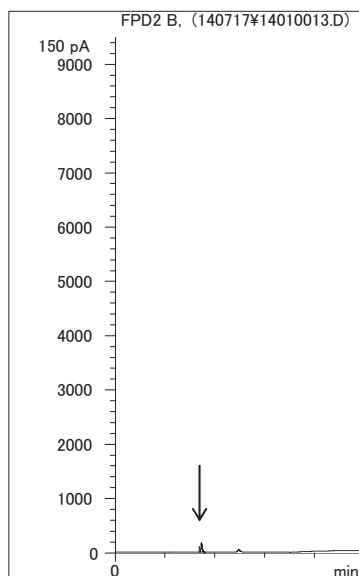
宮崎 無処理
4 μ L/10 mL/50 g



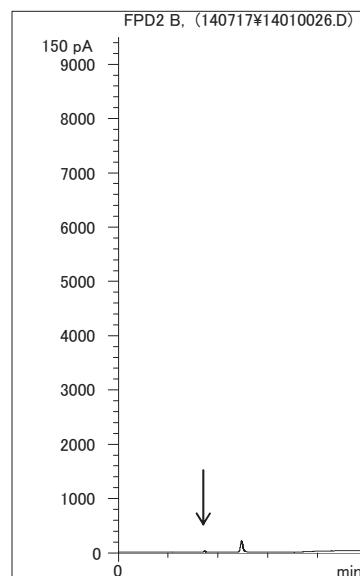
宮崎 5 回処理 7 日後
4 μ L/10 mL/50 g



宮崎 5 回処理 14 日後
4 μ L/10 mL/50 g



宮崎 5 回処理 21 日後
4 μ L/10 mL/50 g

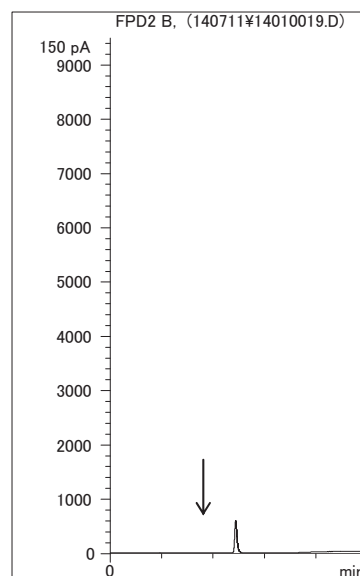
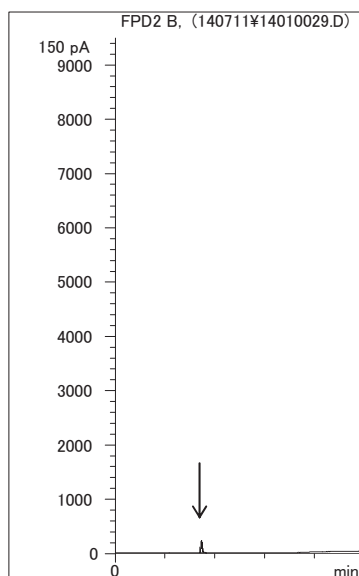
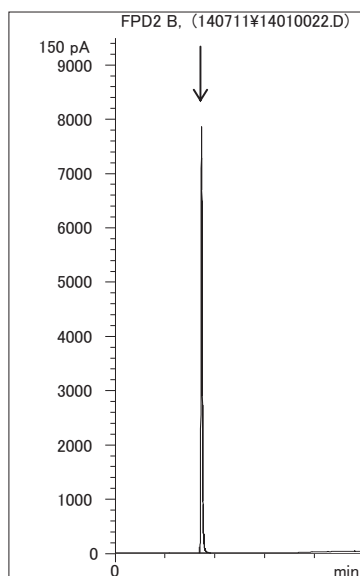


付図-1-2. 果実

標準品 2.0 ng

標準品 0.1 ng

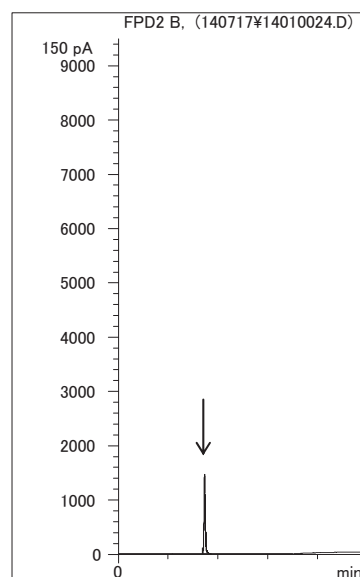
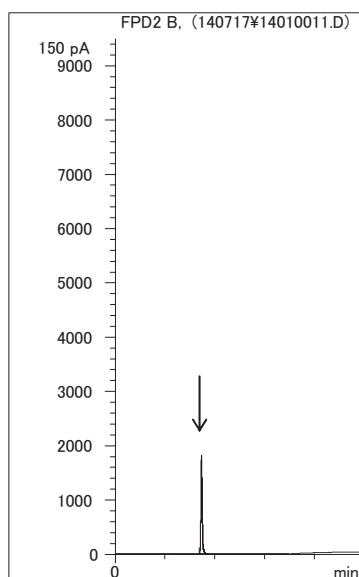
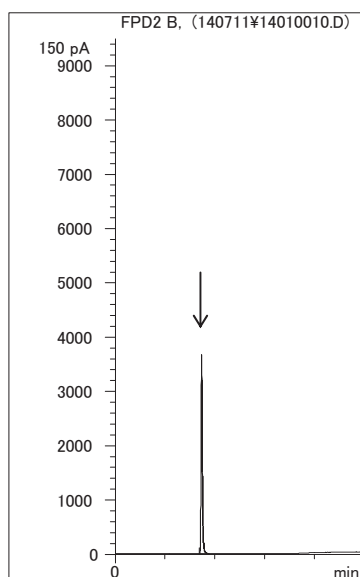
宮崎 無処理
4 μ L/10 mL/50 g



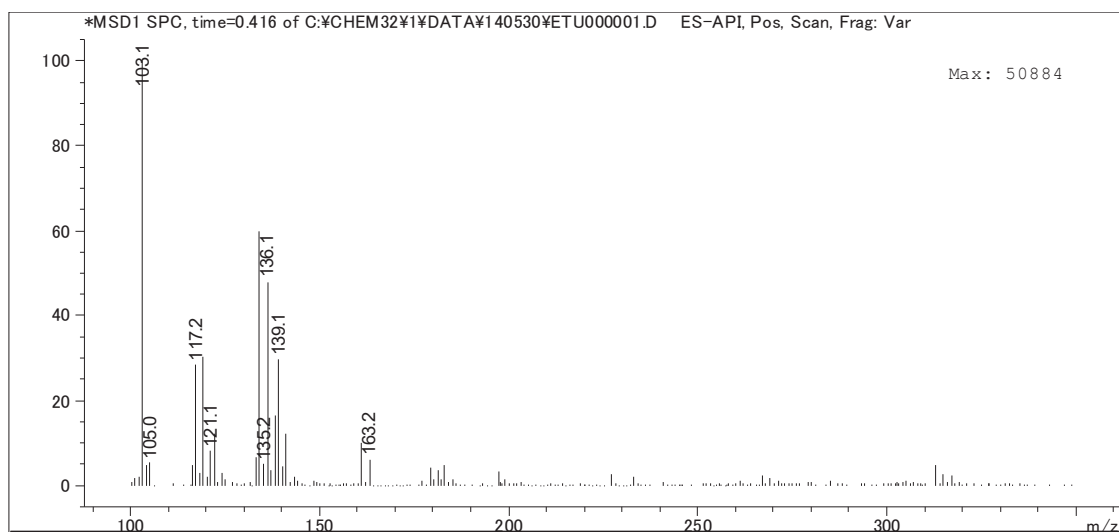
宮崎 5 回処理 7 日後
4 μ L/250 mL/50 g

宮崎 5 回処理 14 日後
4 μ L/250 mL/50 g

宮崎 5 回処理 21 日後
4 μ L/200 mL/50 g



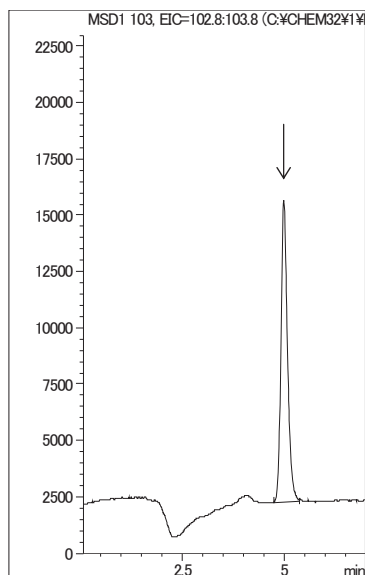
付図-2. エチレンチオウレアのマススペクトルの一例



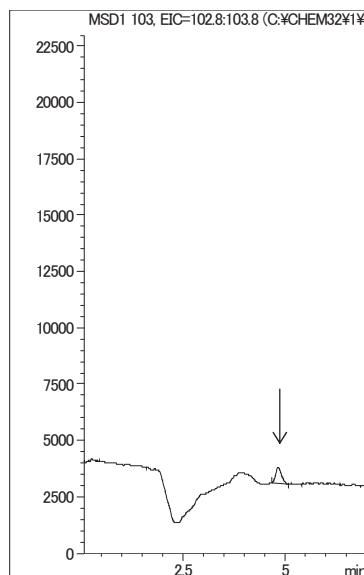
付図-3.エチレンチオウレアのクロマトグラム (代表例)

付図-3-1. 果肉

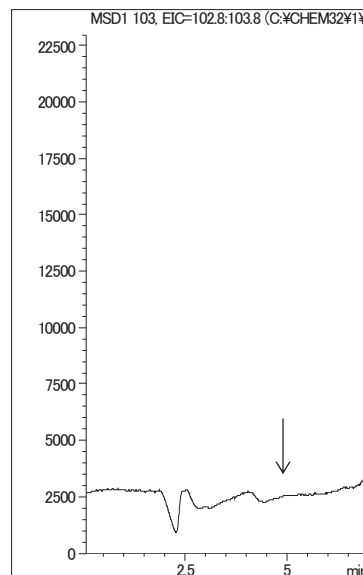
標準品 0.08 ng



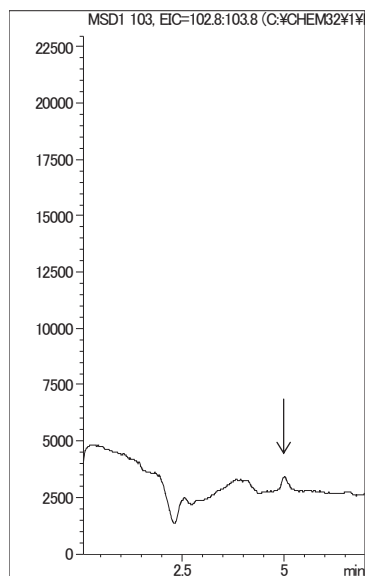
標準品 0.004 ng



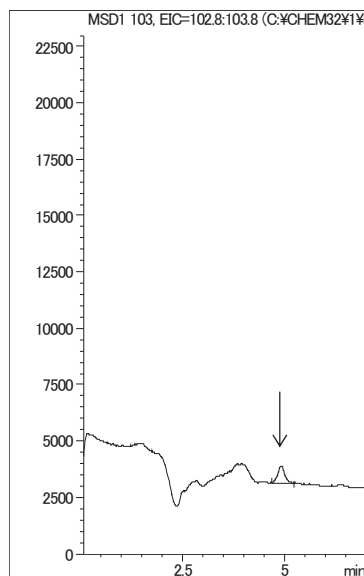
宮崎 無処理
2 μ L/2 mL/0.4 g



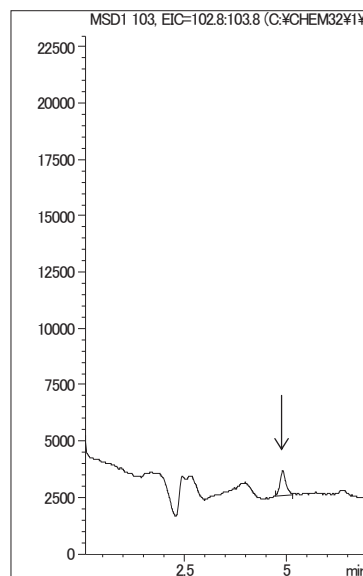
宮崎 5 回処理 7 日後
2 μ L/2 mL/0.4 g



宮崎 5 回処理 14 日後
2 μ L/2 mL/0.4 g

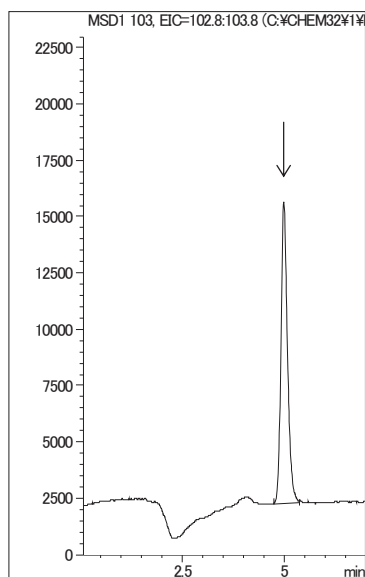


宮崎 5 回処理 21 日後
2 μ L/2 mL/0.4 g

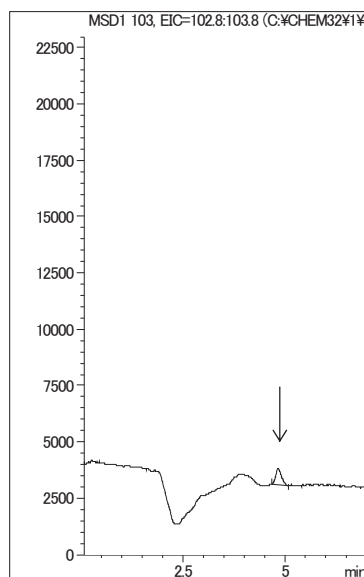


付図-3-2. 果実

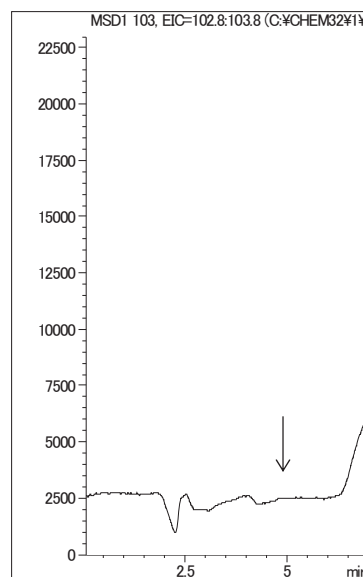
標準品 0.08 ng



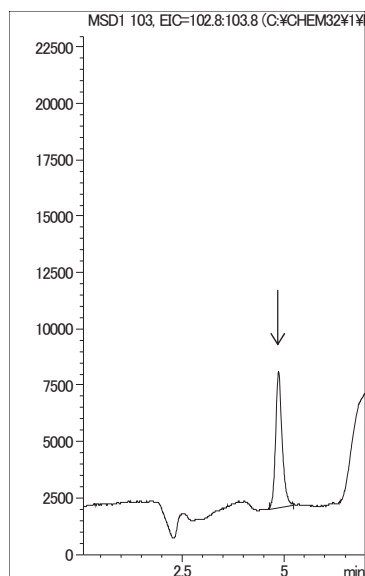
標準品 0.004 ng



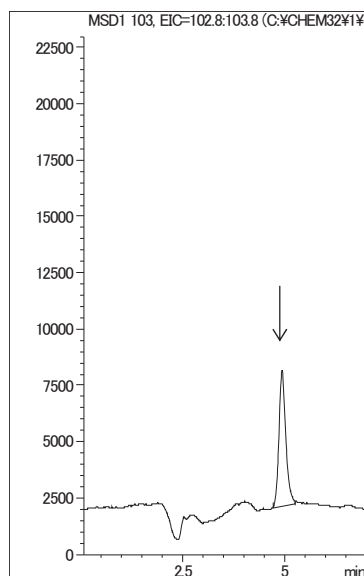
宮崎 無処理
2 μ L/2 mL/0.4 g



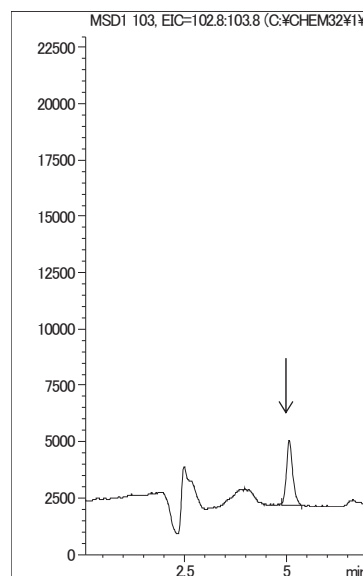
宮崎 5 回処理 7 日後
2 μ L/2 mL/0.4 g



宮崎 5 回処理 14 日後
2 μ L/2 mL/0.4 g



宮崎 5 回処理 21 日後
2 μ L/2 mL/0.4 g



平成26年度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
残留分析詳細② ジフルベンズロン

1. 分析対象物質

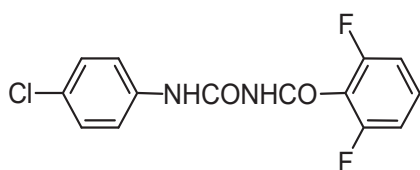
ジフルベンズロン

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℃

溶解性： 水 0.08 mg/L (pH=7, 25℃)
ヘキサン 0.063, ジクロロメタン 1.8, メタノール1.1 (g/L, 20℃)

安定性： 溶液中では光に不安定，固体では太陽光に安定。
水溶液中での加水分解半減期 (20℃)；pH=5及び7で180日以上
pH=9で32日

出 典：The Pesticide Manual 15th Edition.

2. 標準品及び試薬

ジフルベンズロン標準品：純度 99.5% (Dr.Ehrenstorfer 製)

アセトニトリル, アセトン, 酢酸エチル, ジエチルエーテル, ヘキサン：

残留農薬試験用 (関東化学製)

メタノール：LC-MS 用 (関東化学製)

水：ピュアライト PRA-0015-0V1 (オルガノ製) / ヒューリック Z II (オルガノ製) で精製した水

多孔性ケイソウ土カラム：InertSep K-solute 5 mL (ジーエルサイエンス製)

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)

3. 装置及び機器

ミキサー：クイジナートDLC-NXJ2PS (クイジナート・アメリカ製)

液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC-MS/MS)：

Agilent 6410 Triple Quad LC/MS (アジレント製)

データ処理装置：MassHunter (アジレント製)

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の操作条件

カラム：Atlantis T3 (Waters 製)

内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3 μ m

溶離液：メタノール / 4 mmol/L 酢酸アンモニウム含有 0.1% ギ酸
(85:15, v/v)

流量：0.2 mL/min

カラム温度：40°C

注入量：2 μ L

保持時間：約 3.6 min

4.2. 質量分析計の操作条件

イオン化法：	エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)
	正モード
乾燥ガス温度：	300℃
乾燥ガス流量：	10 L/min
ネブライザー圧力：	30 psi
イオン導入電圧：	3000 V
フラグメンター電圧：	100 V
コリジョン電圧：	20 V (コリジョンガス; N ₂)
イオン検出法：	MRM 法
モニタリングイオン：	プリカーサーイオン ; m/z 310.7, プロダクトイオン ; m/z 158.0

5. 検量線の作成

ジフルベンズロン標準品20.1 mgを20 mL容メスフラスコに精秤し、アセトンに溶解して1000 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20 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0.0005, 0.001, 0.002, 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組をジフルベンズロン分析用試料とし、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 (−20℃以下) 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) を取り、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、アセトンを留去した。

6.3. 多孔性ケイソウ土カラムによる精製

濃縮液にアセトニトリル／水（50:50, v/v）混液を加え5 gに調整し，多孔性ケイソウ土カラムに流下した。5分間放置後，ヘキサン／酢酸エチル（80:20, v/v）混液30 mLで容器内を洗って流下した。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. 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5 mLを流下し前処理した。残留物をヘキサン5 mLに溶解してフロリジルミニカラムに移して流下し，その流出液を捨てた。次にヘキサン／ジエチルエーテル（95:5, v/v）混液10 mLで容器内を洗って流下した後，ヘキサン／ジエチルエーテル（85:15, v/v）混液20 mLで同操作を行い，これらの流出液を捨てた。次にヘキサン／ジエチルエーテル（70:30, v/v）混液30 mLを流下した後，ヘキサン／ジエチルエーテル（50:50, v/v）混液10 mLを流下した。全ての溶出液を合わせ取り，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。

6.5. 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	0.4	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 (mg/kg)
0.001	0.4	4	2	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、茨城試料及び宮崎試料の無処理試料*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。

*本事業の無処理試料

8.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
茨城	5	100, 97,	99, 96	98,	98	1.6
茨城	0.25	103, 99,	101, 97	100,	100	2.2
茨城	0.01	100, 100,	100, 100	100,	100	0.0

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
宮崎	5	93, 90,	92, 86	91,	90	3.0
宮崎	0.25	92, 91,	92, 88	91,	91	1.8
宮崎	0.01	100, 100,	100, 90	100,	98	4.6

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ジフルベンズロン0.1 mg/kg添加試料（クオリティーコントロール試料）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、2013年10月実施の食品衛生精度管理比較調査（一般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。

9.1.果肉

分析日*	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値 (mg/kg)
2014/ 9/19	宮崎	85	<0.01
2014/ 9/24	茨城	90	<0.01
2014/ 9/26	高知	96	<0.01
2014/10/ 1	宮崎	93	<0.01
2014/10/ 2	茨城	88	<0.01
2014/10/ 6	高知	89	<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*	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値 (mg/kg)
2014/ 9/22	宮崎	93	<0.01
2014/ 9/25	茨城	89	<0.01
2014/ 9/29	高知	91	<0.01
2014/10/ 1	宮崎	94	<0.01
2014/10/ 2	茨城	89	<0.01
2014/10/ 6	高知	87	<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、保存中の安定性を確認した。保存安定性の結果を示す。

10.1.果肉

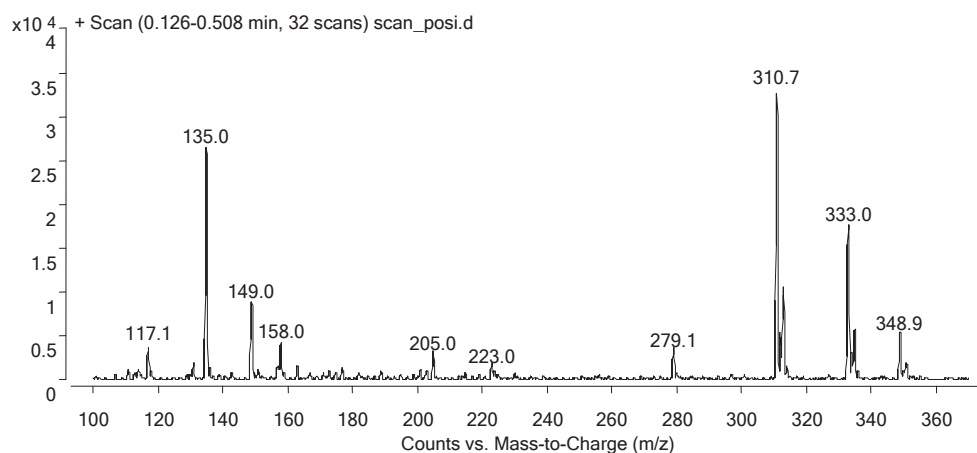
圃場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	1.0	71 (2014/7/23-10/2)	89,	88	88
高知	1.0	63 (2014/8/4-10/6)	88,	87	88
宮崎	1.0	88 (2014/7/5-10/1)	89,	83	86

10.2.果実

圃場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	1.0	71 (2014/7/23-10/2)	93,	93	93
高知	1.0	63 (2014/8/4-10/6)	85,	84	84
宮崎	1.0	88 (2014/7/5-10/1)	90,	88	89

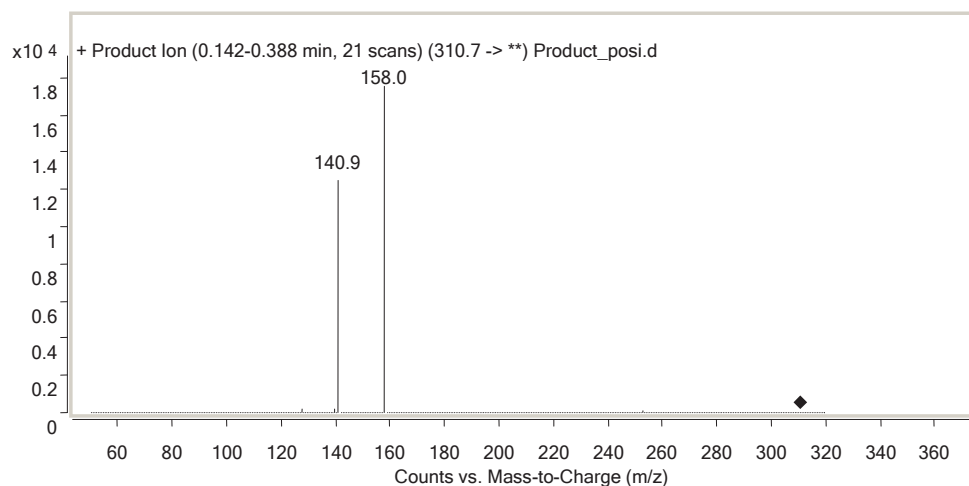
付図-1. マススペクトル

ジフルベンズロンのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)



ジフルベンズロンのプロダクトスキャンスペクトルの一例

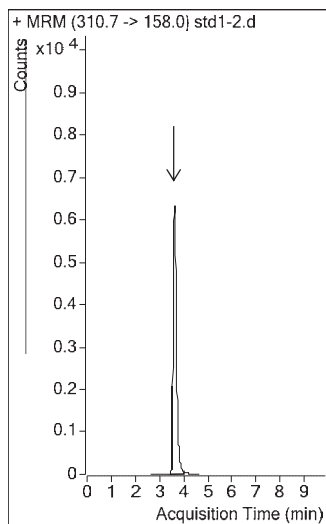
(プリカーサーイオン m/z=310.7, 正モード)



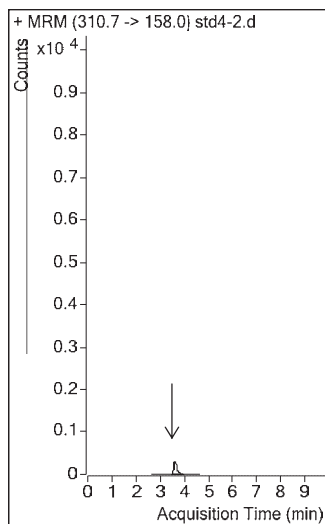
付図-2. ジフルベンズロンのクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. 果肉

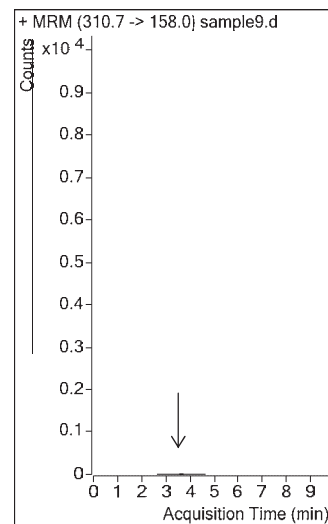
標準品 0.04 ng



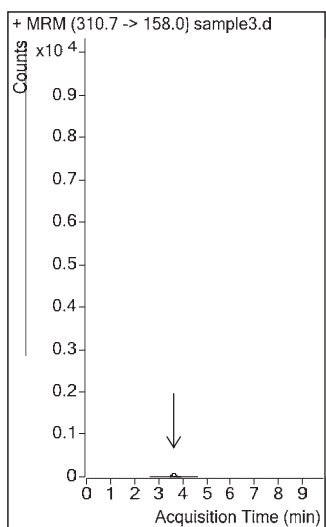
標準品 0.002 ng



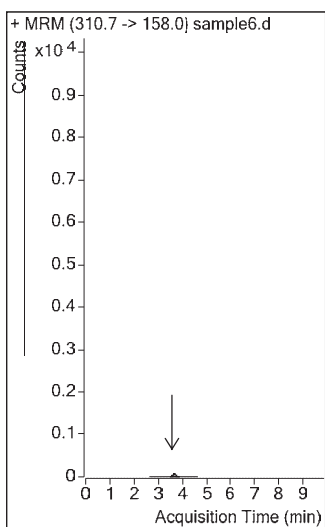
宮崎 無処理
2 μ L/4 mL/0.4 g



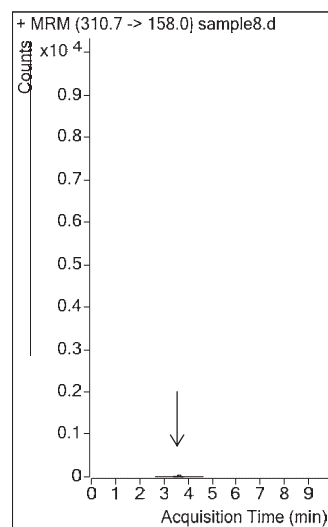
宮崎 3回処理 7日後
2 μ L/4 mL/0.4 g



宮崎 3回処理 14日後
2 μ L/4 mL/0.4 g

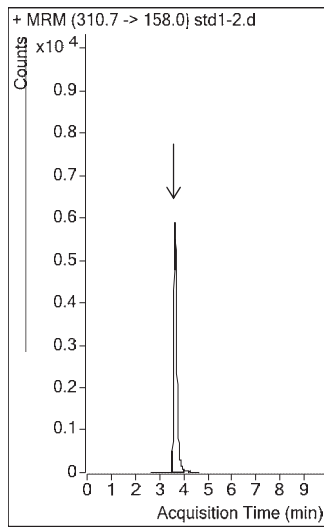


宮崎 3回処理 21日後
2 μ L/4 mL/0.4 g

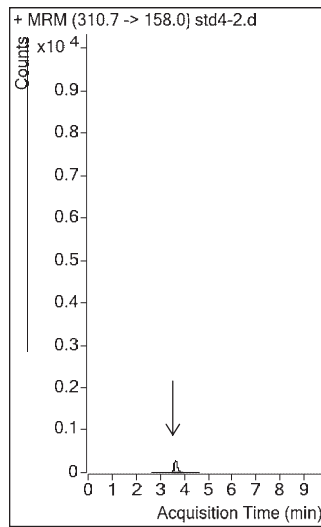


付図-2-2. 果実

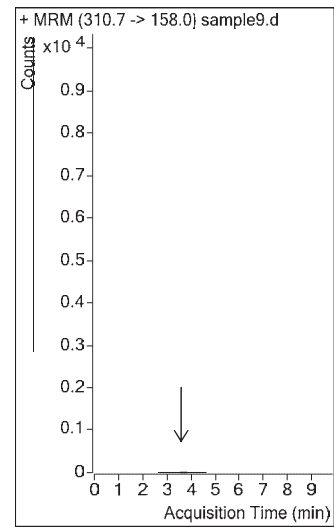
標準品 0.04 ng



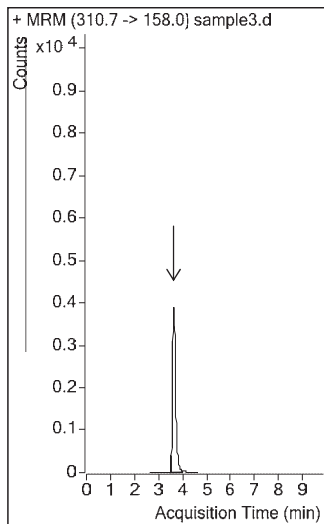
標準品 0.002 ng



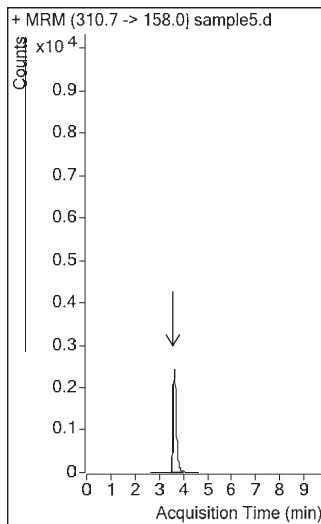
宮崎 無処理
2 μ L/4 mL/0.4 g



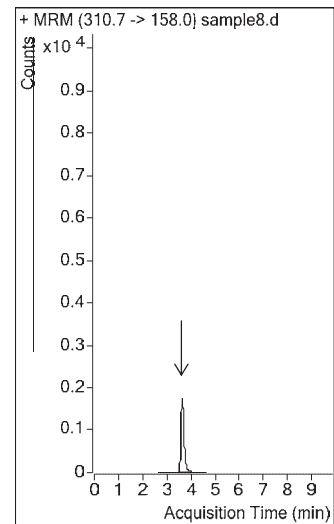
宮崎 3 回処理 7 日後
2 μ L/10 mL/0.4 g



宮崎 3 回処理 14 日後
2 μ L/10 mL/0.4 g



宮崎 3 回処理 21 日後
2 μ L/10 mL/0.4 g



平成26年度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
 残留分析詳細③ 試料重量，作物写真

1.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	—	1.86	2.09	22.3	13.7	94	6	1.2
	AB	7	2.06		10.3		94	6	1.4
	AB	14	2.20		11.0		94	6	1.4
	AB	21	2.22		11.1		94	6	1.1
	平均 94:6								平均 1.3
高知	0	—	1.41	1.55	14.1	9.50	93	7	1.3
	AB	7	1.58		7.90		93	7	1.3
	AB	14	1.60		8.00		93	7	1.3
	AB	21	1.60		8.00		91	9	1.3
	平均 93:7								平均 1.3
宮崎	0	—	2.29	2.18	34.3	18.2	85	15	1.8
	AB	7	2.10		12.6		92	8	1.7
	AB	14	2.17		13.0		93	7	1.6
	AB	21	2.17		13.0		92	8	2.1
	平均 91:10								平均 1.8
3 ほ場の総平均重量					3 ほ場の総重量の平均				
1.94 kg/個					13.8 kg				

AB：ジフルベンズロンは3回処理

マンゼブは5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

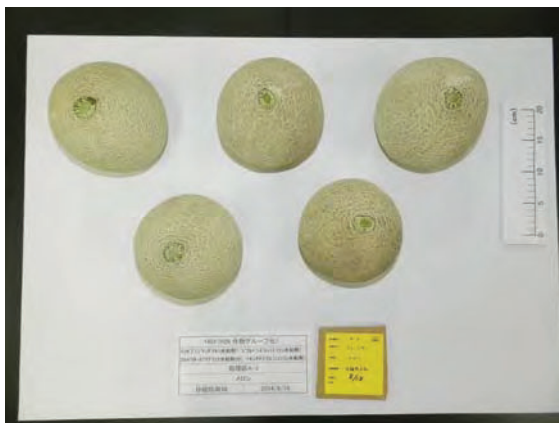
2.2.高知



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

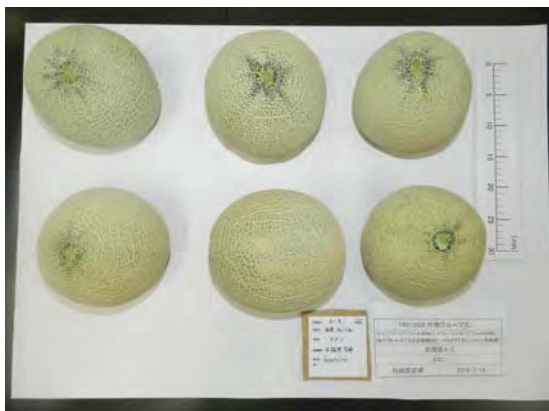
2.3.宮崎



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

資料 2-9

平成26年度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
残留分析詳細① プロシミドン

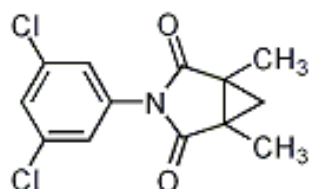
1. 分析対象物質

プロシミドン

化学名： *N* - (3,5-dichlorophenyl)-1,2-dimethylcyclopropane-1,2-dicarboximide分子式： $C_{13}H_{11}Cl_2NO_2$

分子量： 284.1

構造式：



性 状： 無色結晶

融 点： 166～166.5℃

蒸気圧： 18 mPa (25℃)

分配係数： $\log P_{OW} = 3.14$ (26℃)

溶解性： 水 4.5 mg/L (25℃)

アセトン 180, キシレン 43, クロロホルム 210, DMF 230,
メタノール 16 (以上 g/L, 25℃)

安定性： 通常の保存条件下で安定

光, 熱及び湿気に安定

出 典：The Pesticide Manual 15th Edition

2. 標準品及び試薬

プロシミドン標準品：純度 98.0% (Dr.Ehrenstorfer 製)

アセトン, 酢酸エチル, ヘキサン：残留農薬試験用 (関東化学製)

水：ピュアライト PRA-0015-0V1 (オカノ製) 及びピュアリック Z II (オカノ製) で精製した水

塩化ナトリウム：特級 (関東化学製)

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

GC/PSA/SI 3 層ミニカラム：InertSep GC/PSA/SI 500 mg/500 mg/500 mg/20 mL
(ジーエルサイエンス製)

3. 装置及び機器

ミキサー：クイジナート DLC-NXJ2 (クイジナート・アメリカ製)

ガスクロマトグラフ (GC NPD)：HP-6890 GC System, NPD (アジレント製)

データ処理装置：ChemStation (アジレント製)

4. ガスクロマトグラフの操作条件

カラム：	Rtx-200 (RESTEK 製)
	内径 0.53 mm, 長さ 15 m, 膜厚 1.5 μ m
温度：	カラム 220°C, 注入口 250°C, 検出器 250°C
ガス流量：	水素 4 mL/min, 空気 60 mL/min
注入量：	4 μ L
保持時間：	約 6.3 min

5. 検量線の作成

プロシミドン標準品 20.4 mg を 20 mL 容メスフラスコに精秤し, アセトンに溶解して 1000 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 20 mg/L 標準溶液を調製し, さらにこの標準溶液をアセトンで希釈して 0.025, 0.05, 0.1, 0.5 及び 1.0 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プロシミド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

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（-20℃以下）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、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、アセトンを留去した。

6.3. 多孔性ケイソウ土カラムによる精製

濃縮液に5%塩化ナトリウム水溶液を加え15 gに調整し、多孔性ケイソウ土カラムに移した。5分間放置後、ヘキサン／酢酸エチル（80:20, v/v）混液100 mLで容器内を洗って多孔性ケイソウ土カラムに流下した。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. GC／PSA／SIミニカラムによる精製

GC／PSA／SIミニカラムにヘキサン5 mLを流下し前処理した。残留物をヘキサンに溶解し、20 mLに定容した。この10 mL（試料10 g相当量）を分取し、前処理したGC／PSA／SIミニカラムに移し、流出液を捨てた。次に、ヘキサン／アセトン（95:5, v/v）混液10 mLで容器内を洗って流下した。さらにヘキサン／アセトン（85:15, v/v）混液10 mLを流下し、全ての溶出液を合わせ取り、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。

6.5. 定量

残留物を適量のアセトンに溶解した。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高さを求め、検量線よりプロシミドンの重量を求め、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)
0.2	10	2	4	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)
0.1	10	2	4	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、茨城試料及び宮崎試料の無処理試料*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。

*本事業の無処理試料

8.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
茨城	5	95, 90,	93, 87	91,	91	3.3
茨城	0.25	101, 95,	99, 95	98,	98	2.7
茨城	0.01	120, 110,	120, 110	120,	116	4.7

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
宮崎	5	95, 90,	94, 83	92,	91	5.2
宮崎	0.25	110, 109,	110, 100	110,	108	4.1
宮崎	0.01	120, 110,	120, 110	120,	116	4.7

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プロシミドン0.1 mg/kg（クォリティーコントロール試料）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、2013年10月実施の食品衛生精度管理比較調査（一般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。

9.1. 果肉

分析日*	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値 (mg/kg)
2014/10/8	茨城	80	<0.01
2014/10/8	高知	90	<0.01
2014/10/8	宮崎	104	<0.01
2014/10/27	宮崎	120	<0.01
2014/10/28	茨城	93	<0.01
2014/10/29	高知	90	<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*	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値 (mg/kg)
2014/10/10	宮崎	81	<0.01
2014/10/14	茨城	89	<0.01
2014/10/15	高知	86	<0.01
2014/10/27	宮崎	115	<0.01
2014/10/28	茨城	96	<0.01
2014/10/29	高知	82	<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プロシミドンを添加し、冷凍暗所（－20℃以下）に凍結保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を確認した。保存安定性の結果を示す。

10.1.果肉

圃場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	1.0	98 (2014/7/22-10/28)	78,	77	78
高知	1.0	86 (2014/8/ 4-10/29)	81,	80	80
宮崎	1.0	109 (2014/7/10-10/27)	92,	92	92

10.2.果実

圃場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	1.0	98 (2014/7/22-10/28)	83,	80	82
高知	1.0	86 (2014/8/ 4-10/29)	72,	71	72
宮崎	1.0	109 (2014/7/10-10/27)	106,	105	106

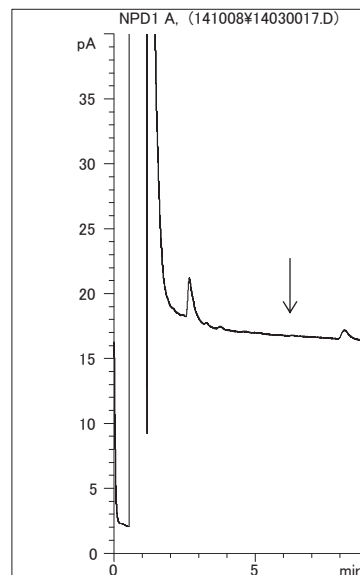
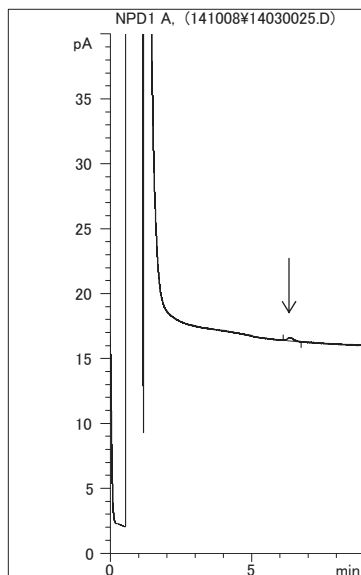
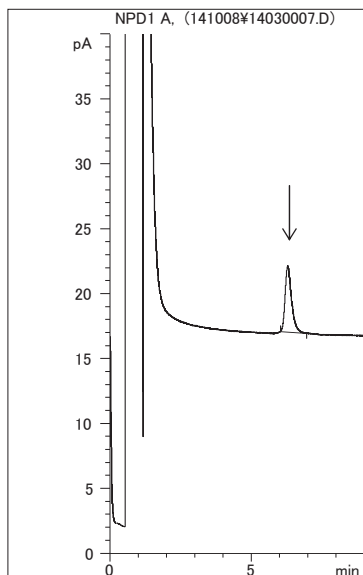
付図-1. プロシミドンのクロマトグラム (代表例)

付図-1-1. 果肉

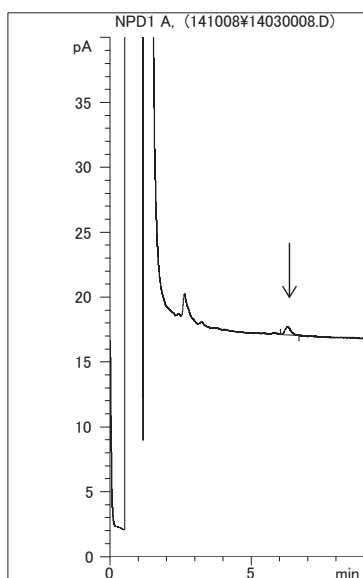
標準品 4.0 ng

標準品 0.2 ng

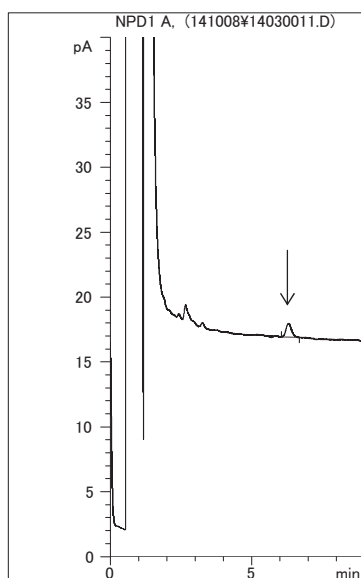
宮崎 無処理
4 μ L/2 mL/10 g



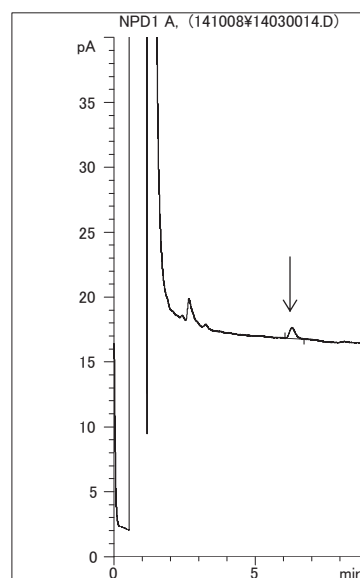
宮崎 3 回処理 1 日後
4 μ L/2 mL/10 g



宮崎 3 回処理 3 日後
4 μ L/2 mL/10 g



宮崎 3 回処理 7 日後
4 μ L/2 mL/10 g

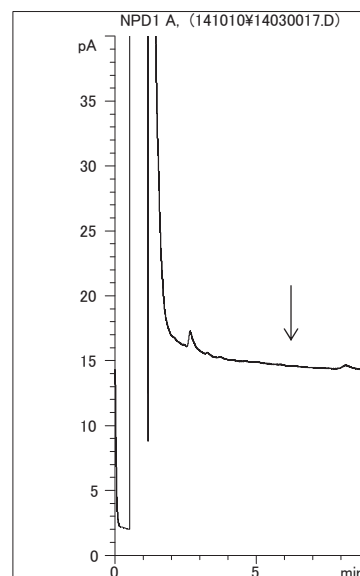
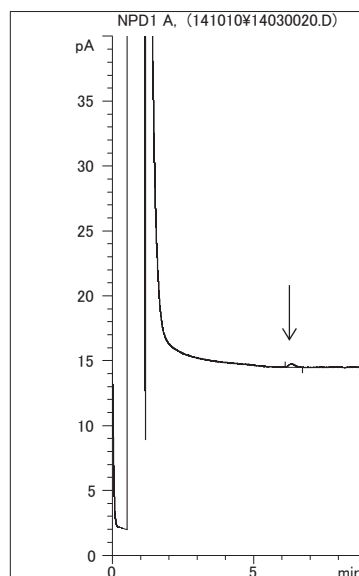
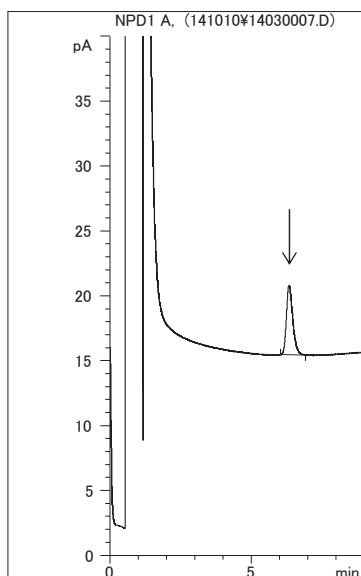


付図-1-2. 果実

標準品 4.0 ng

標準品 0.2 ng

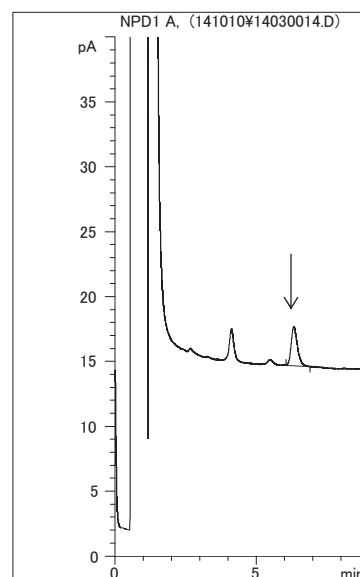
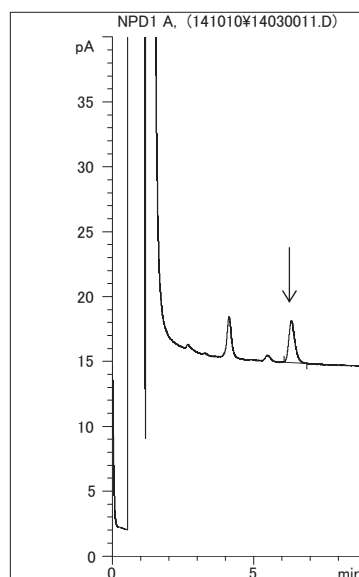
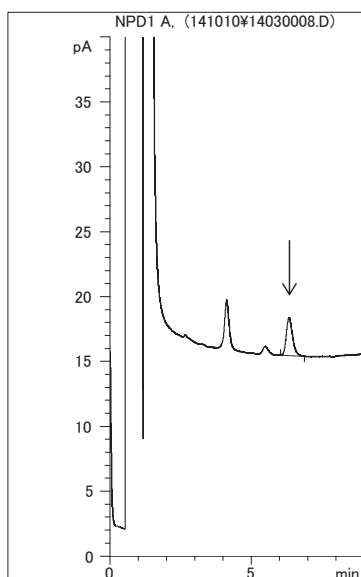
宮崎 無処理
4 μ L/2 mL/10 g



宮崎 3回処理 1日後
4 μ L/8 mL/10 g

宮崎 3回処理 3日後
4 μ L/8 mL/10 g

宮崎 3回処理 7日後
4 μ L/8 mL/10 g

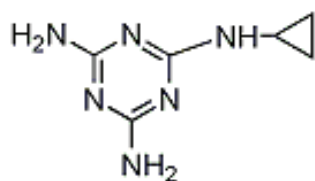


平成26年度農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業
残留分析詳細② シロマジン

1. 分析対象物質

シロマジン

化学名： *N* cyclopropyl-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine
分子式： $C_6H_{10}N_6$
分子量： 166.2
構造式：



性 状： 無色結晶
融 点： 224.9℃
蒸気圧： 4.48×10^{-4} mPa (25℃)
分配係数： $\log P_{ow} = -0.061$ (pH=7.0)
溶解性： 水 13 g/L (pH=7.1, 25℃)
メタノール 22, イソプロパノール 2.5, アセトン 1.7,
n-オクタノール 1.2, ジクロロメタン 0.25, トルエン 0.015,
ヘキサン 0.0002 (以上 g/kg, 20℃)
安定性： 熱安定性 310℃まで安定
加水分解に対して70℃まで28日間安定

出 典： The Pesticide Manual 15th Edition

2. 標準品及び試薬

シロマジン標準品：純度 99.0% (Dr.Ehrenstorfer 製)

アセトニトリル, メタノール：残留農薬試験用 (関東化学製)

メタノール：LC-MS 用 (関東化学製)

水：ピュアライト PRA-0015-0V1 (オルガノ製) 及びピュリック Z II (オルガノ製) で精製した水

塩酸：有害金属測定用 (関東化学製)

アンモニア水：特級 (関東化学製)

陽イオン交換ミニカラム：HF Bond Elut SCX 500 mg/3 mL (アジレント製)

3. 装置及び機器

ミキサー：クイジナート DLC-NXJ2 (クイジナート・アメリカ製)

液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC-MS/MS)：

Agilent 6410 Triple Quad LC/MS (アジレント製)

データ処理装置：MassHunter (アジレント製)

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の操作条件

カラム：	CAPCELL PAK CR 1:20 S5 (資生堂製) 内径 2.0 mm, 長さ 150 mm, 粒径 5 µm
溶離液：	メタノール／4 mmol/L 酢酸アンモニウム含有 0.1%ギ酸 (60:40,v/v)
流量：	0.2 mL/min
カラム温度：	40℃
注入量：	2 µL
保持時間：	約 10.0 min

4.2. 質量分析計の操作条件

イオン化法：	エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)
	正モード
乾燥ガス温度：	350℃
乾燥ガス流量：	12 L/min
ネブライザー圧力：	50 psi
イオン導入電圧：	3000 V
フラグメンター電圧：	100 V
コリジョン電圧：	20 V (コリジョンガス; N ₂)
イオン検出法：	MRM 法
モニタリングイオン：	プリカーサーイオン ; m/z 167.1
	プロダクトイオン ; m/z 85.1

5. 検量線の作成

シロマジン標準品20.2 mgを20 mL容メスフラスコに精秤し、メタノールに溶解して1000 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20 mg/L標準溶液を調製し、さらにこの標準溶液をメタノールで希釈して0.00025, 0.0005, 0.001, 0.005及び0.01 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シロマジ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 (−20℃以下) 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、メタノール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定容とした。その1 mL (試料0.1 g相当量) を取り、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、メタノールを留去した。

6.3. SCXミニカラムによる精製

SCXミニカラムにメタノール5 mL及び0.1mol/L塩酸水溶液10 mLを順次流下し前処理した。濃縮液に水10 mLを加えSCXミニカラムに移した後、0.1 mol/L塩酸水溶液5 mLで容器内を洗って流下した。さらにメタノール／水（50:50, v/v）混液2 mLで同操作を行った。これらの流出液は捨てた。次に、メタノール／アンモニア水（95:5, v/v）混液5 mLを流下し、溶出液を取り、溶出液にアセトニトリル20 mLを加えて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、検量線よりシロマジンの重量を求め、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)
0.001	0.1	2	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)
0.0005	0.1	2	2	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、茨城試料及び宮崎試料の無処理試料*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。

*本事業の無処理試料

8.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
茨城	5	99, 96,	99, 94	99,	97	2.4
茨城	0.25	102, 100,	102, 99	102,	101	1.4
茨城	0.01	110, 100,	100, 100	100,	102	4.4

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
宮崎	5	102, 98,	99, 94	98,	98	2.9
宮崎	0.25	103, 98,	100, 96	99,	99	2.6
宮崎	0.01	110, 90,	100, 80	100,	96	11.9

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シロマジン 0.1 mg/kg添加試料（クオリティーコントロール試料）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、2013年10月実施の食品衛生精度管理比較調査（一般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。

9.1.果肉

分析日*	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値 (mg/kg)
2014/12/ 4	宮崎	98	<0.01
2014/12/ 5	茨城	91	<0.01
2014/12/ 5	高知	92	<0.01
2014/12/23	茨城	75	<0.01
2014/12/23	高知	81	<0.01
2014/12/23	宮崎	78	<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*	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値 (mg/kg)
2014/12/ 8	宮崎	99	<0.01
2014/12/ 9	茨城	97	<0.01
2014/12/ 9	高知	94	<0.01
2014/12/23	茨城	76	<0.01
2014/12/23	高知	76	<0.01
2014/12/23	宮崎	76	<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シロマジンを添加し、冷凍暗所（－20℃以下）に凍結保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を確認した。保存安定性の結果を示す。

10.1.果肉

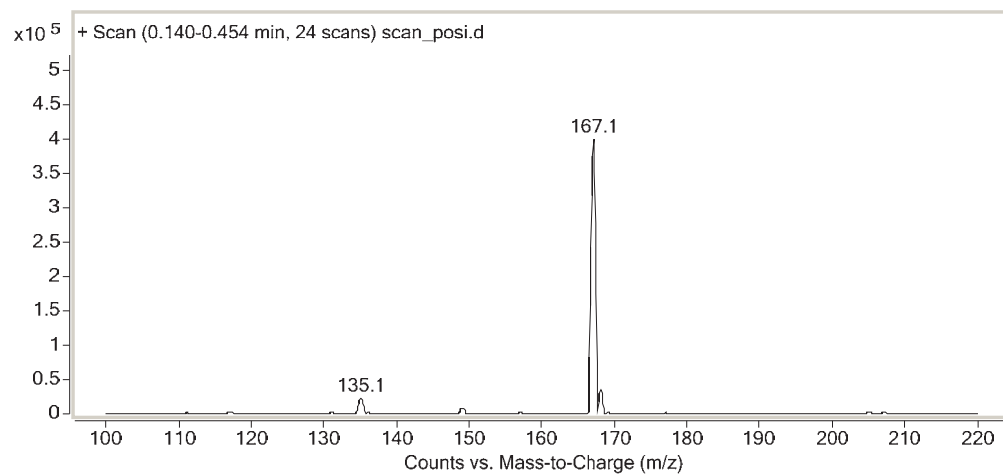
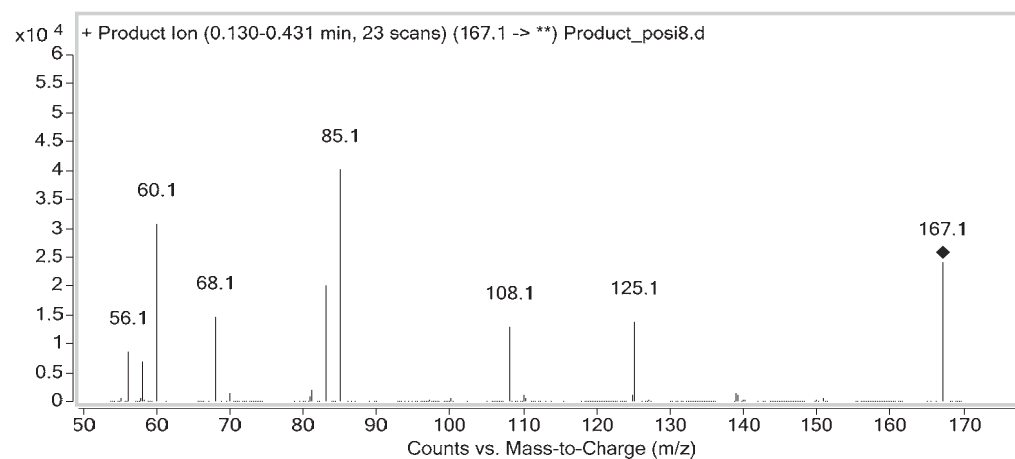
圃場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	1.0	154 (2014/7/22-12/23)	85,	84	84
高知	1.0	141 (2014/8/ 4-12/23)	87,	85	86
宮崎	1.0	166 (2014/7/10-12/23)	88,	86	87

10.2.果実

圃場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	1.0	154 (2014/7/22-12/23)	83,	83	83
高知	1.0	141 (2014/8/ 4-12/23)	86,	84	85
宮崎	1.0	166 (2014/7/10-12/23)	87,	87	87

付図-1. マススペクトル

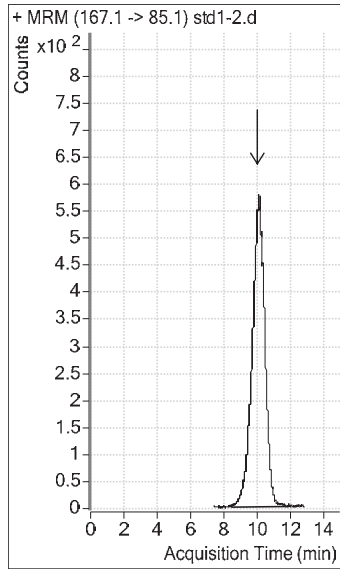
シロマジンのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)

シロマジン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=167.1)

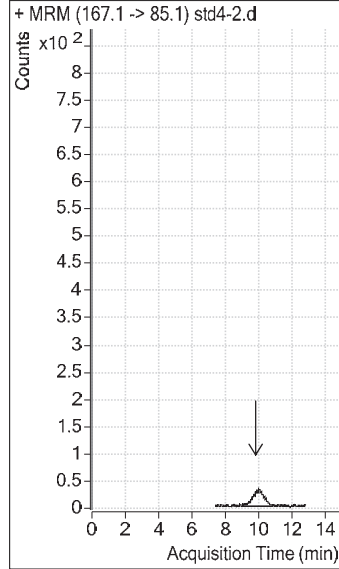
付図-2. シロマジンのクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. 果肉

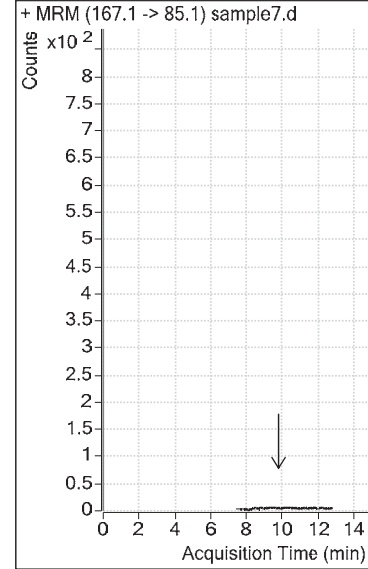
標準品 0.02 ng



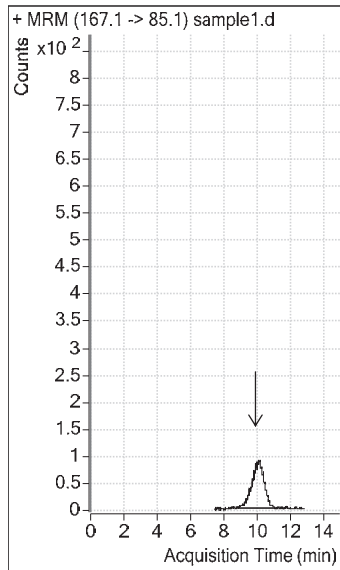
標準品 0.001 ng



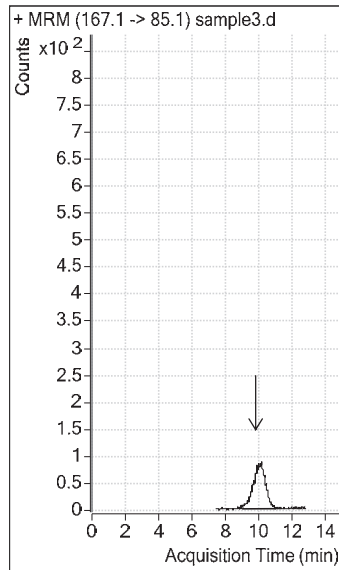
宮崎 無処理
2 μ L/2 mL/0.1 g



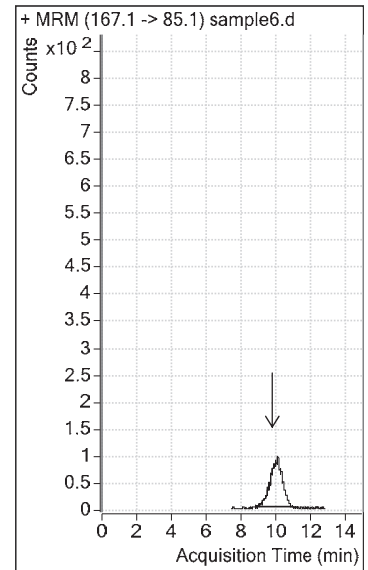
宮崎 3 回処理 1 日後
2 μ L/2 mL/0.1 g



宮崎 3 回処理 3 日後
2 μ L/2 mL/0.1 g

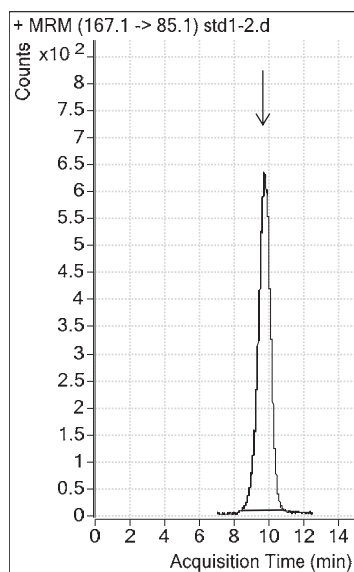


宮崎 3 回処理 7 日後
2 μ L/2 mL/0.1 g

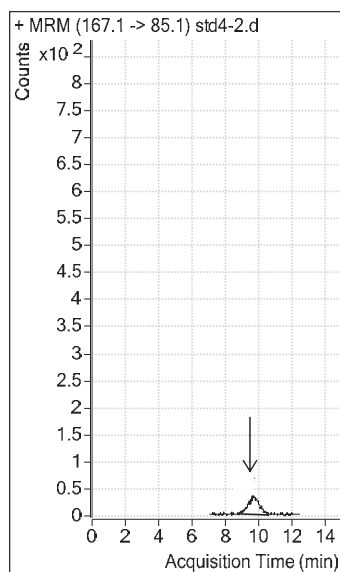


付図-2-2. 果実

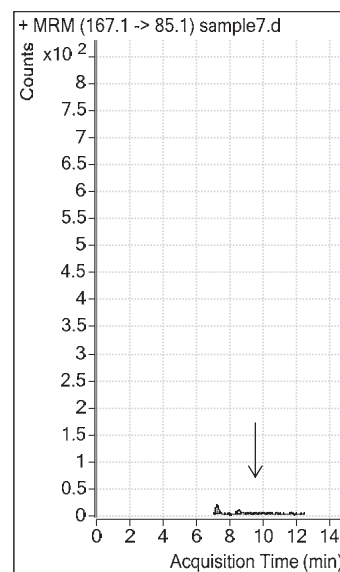
標準品 0.02 ng



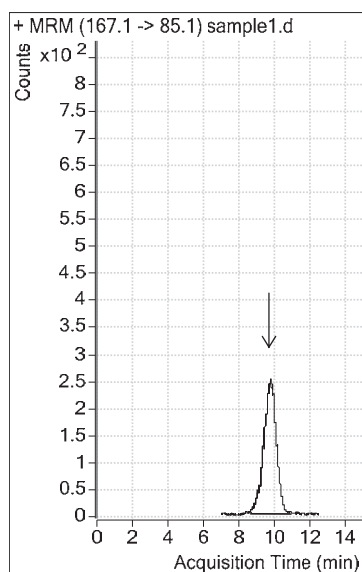
標準品 0.001 ng



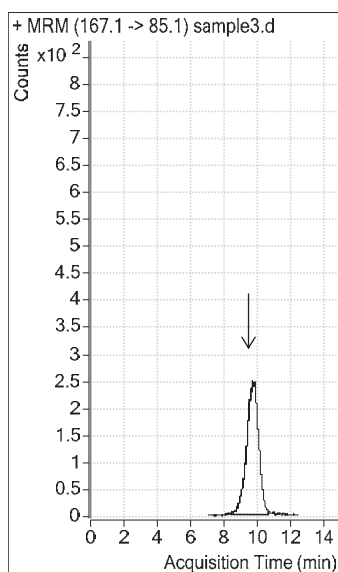
宮崎 無処理
2 μ L/2 mL/0.1 g



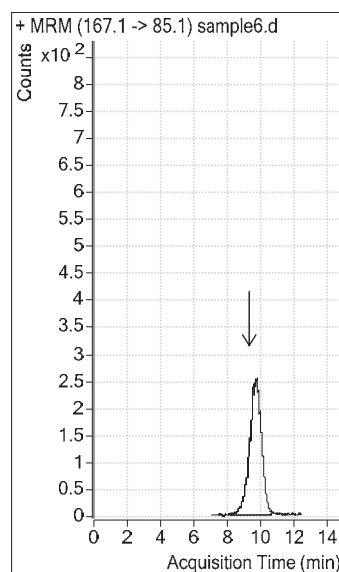
宮崎 3 回処理 1 日後
2 μ L/4 mL/0.1 g



宮崎 3 回処理 3 日後
2 μ L/4 mL/0.1 g



宮崎 3 回処理 7 日後
2 μ L/4 mL/0.1 g



平成26年度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
残留分析詳細③ BPMC

1. 分析対象物質

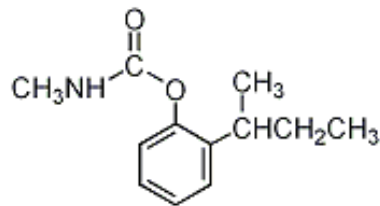
BPMC

化学名： 2-*sec*-butylphenyl methylcarbamate

分子式： $C_{12}H_{17}NO_2$

分子量： 207.3

構造式：



性 状： 無色結晶

融 点： 31.4℃

蒸気圧： 9.9 mPa (20℃)

分配係数： $\log P_{OW} = 2.67$ (25℃)

溶解性： 水 420 mg/L (20℃), 610 mg/L (30℃)

アセトン 930, ヘキサン 74, トルエン 880, ジクロロメタン 890,
酢酸エチル 890 (以上 g/L, 20℃)

安定性： 通常の保存条件下で安定

熱安定性 150℃まで安定

光に対して安定

加水分解による半減期 7.8日 (pH=9, 25℃)

出 典： The Pesticide Manual 15th Edition

2. 標準品及び試薬

BPMC 標準品：純度 98.4% (関東化学製)

アセトン, 酢酸エチル, ヘキサン：残留農薬試験用 (関東化学製)

メタノール：LC-MS 用 (関東化学製)

水：ピュアライト PRA-0015-0V1 (オルガノ製) 及びピュアリック Z II (オルガノ製) で精製した水

塩化ナトリウム：特級 (関東化学製)

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

3. 装置及び機器

ミキサー：クイジナート DLC-NXJ2PS (クイジナート・アメリカ製)

液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC-MS/MS)：

Agilent 6410 Triple Quad LC/MS (アジレント製)

データ処理装置：MassHunter (アジレント製)

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の操作条件

カラム：	Atlantis T3 (Waters 製) 内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3 μ m
溶離液：	メタノール／4 mmol/L 酢酸アンモニウム含有 0.1%ギ酸 (70:30,v/v)
流量：	0.2 mL/min
カラム温度：	40°C
注入量：	2 μ L
保持時間：	約 5.8 min

4.2. 質量分析計の操作条件

イオン化法：	エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)
	正モード
乾燥ガス温度：	300℃
乾燥ガス流量：	10 L/min
ネブライザー圧力：	30 psi
イオン導入電圧：	3000 V
フラグメンター電圧：	100 V
コリジョン電圧：	10 V (コリジョンガス; N ₂)
イオン検出法：	MRM 法
モニタリングイオン：	プリカーサーイオン ; m/z 207.3
	プロダクトイオン ; m/z 95.1

5. 検量線の作成

BPMC標準品10.2 mgを10 mL容メスフラスコに精秤し、アセトンに溶解して1000 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20 mg/L標準溶液を調製し、さらにこの標準溶液をメタノールで希釈して0.0005, 0.001, 0.002, 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BPMC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 (−20℃以下) 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、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、アセトンを留去した。

6.3. 多孔性ケイソウ土カラムによる精製

濃縮液に5%塩化ナトリウム水溶液を加え15 gに調整し、多孔性ケイソウ土カラムに移した。5分間放置後、ヘキサン／酢酸エチル（80:20, v/v）混液100 mLで容器内を洗って多孔性ケイソウ土カラムに流下した。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。残留物をヘキサンに溶解し、20 mLに定容した後、その10 mLを分取した。分取した10 mLからさらに0.2 mL（試料0.2 g相当量）を取り、窒素気流下でヘキサンを留去した。

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BPMC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	0.2	2	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	0.2	2	2	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、茨城試料及び宮崎試料の無処理試料*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。

*本事業の無処理試料

8.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
茨城	5	104, 98,	103, 93	102,	100	4.5
茨城	0.25	110, 108,	110, 108	110,	109	1.0
茨城	0.01	110, 100,	110, 100	110,	106	5.2

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
宮崎	5	105, 102,	103, 99	103,	102	2.1
宮崎	0.25	106, 104,	105, 104	104,	105	0.9
宮崎	0.01	110, 110,	110, 110	110,	110	0.0

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BPMC 0.1mg/kg添加試料（クォリティーコントロール試料）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、2013年10月実施の食品衛生精度管理比較調査（一般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。

9.1.果肉

分析日*	使用した圃場	回収率 (%)	無 処 理 区 の 分析値 (mg/kg)
2014/10/ 8	茨城	70	<0.01
2014/10/ 8	高知	90	<0.01
2014/10/ 8	宮崎	90	<0.01
2014/10/27	宮崎	90	<0.01
2014/10/28	茨城	110	<0.01
2014/10/29	高知	80	<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*	使用した圃場	回収率 (%)	無 処 理 区 の 分析値 (mg/kg)
2014/10/10	宮崎	100	<0.01
2014/10/14	茨城	90	<0.01
2014/10/15	高知	100	<0.01
2014/10/27	宮崎	70	<0.01
2014/10/28	茨城	80	<0.01
2014/10/29	高知	110	<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BPMCを添加し、冷凍暗所（－20℃以下）に凍結保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を確認した。保存安定性の結果を示す。

10.1.果肉

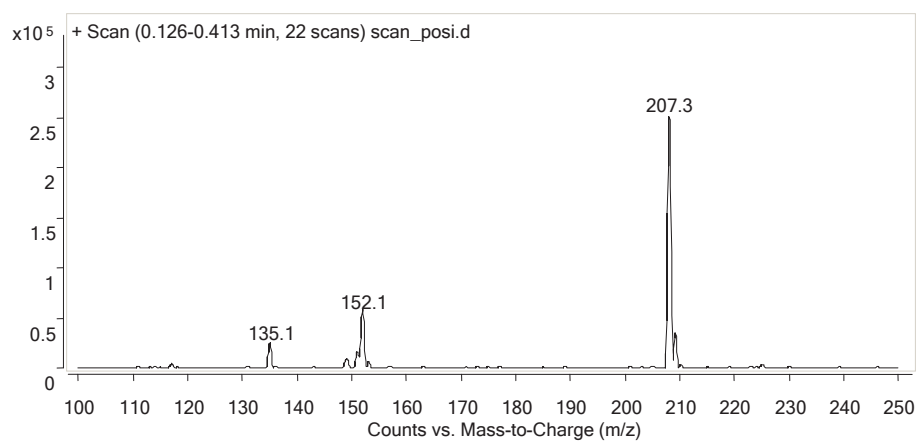
圃場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	1.0	98 (2014/7/22-10/28)	101,	72	86
高知	1.0	86 (2014/8/ 4-10/29)	103,	71	87
宮崎	1.0	109 (2014/7/10-10/27)	107,	100	104

10.2.果実

圃場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	1.0	98 (2014/7/22-10/28)	95,	73	84
高知	1.0	86 (2014/8/ 4-10/29)	88,	71	80
宮崎	1.0	109 (2014/7/10-10/27)	109,	106	108

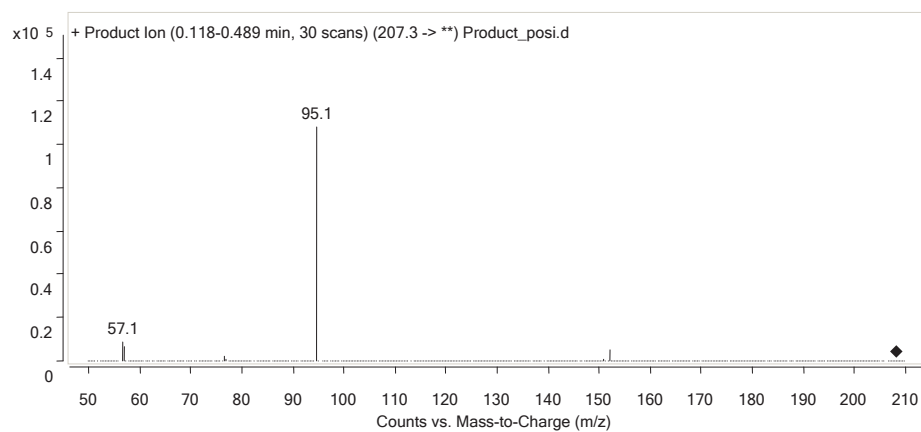
付図-1. マススペクトル

BPMCのマススペクトル（一次イオン）の一例（正モード）



BPMCのプロダクトスキンスペクトルの一例

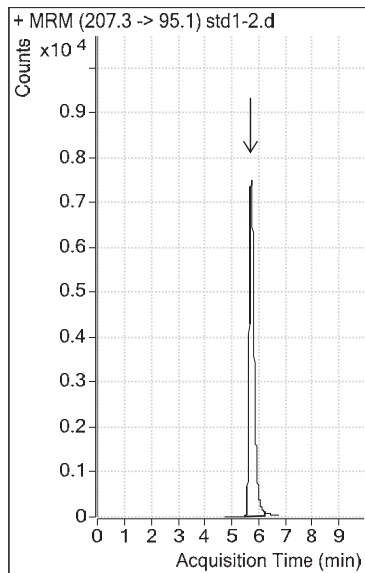
(プリカーサーイオン m/z=207.3)



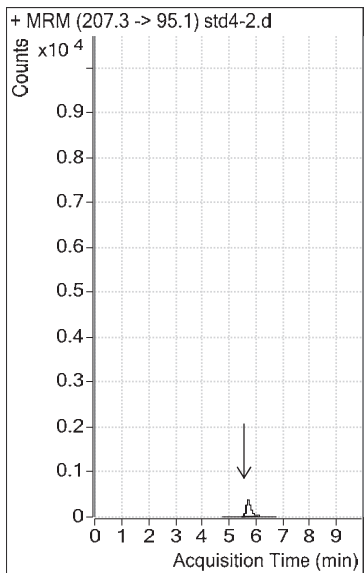
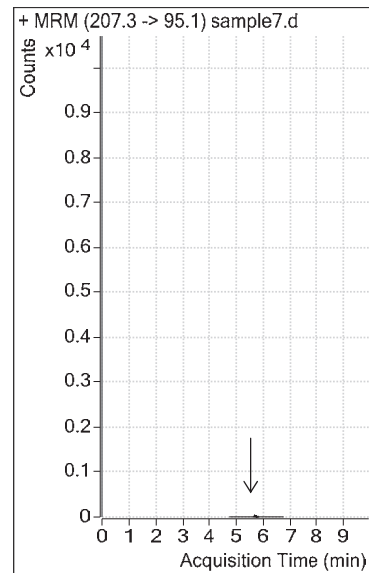
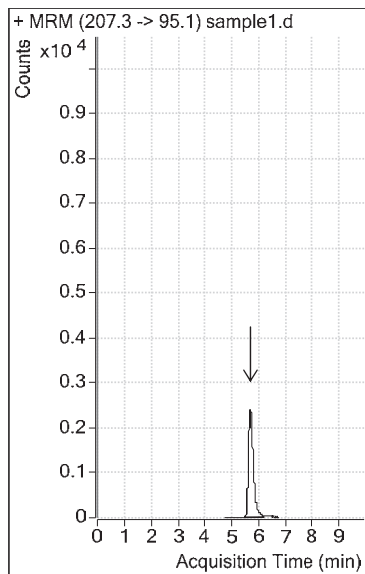
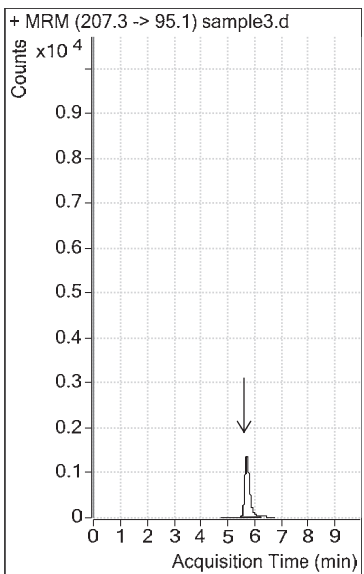
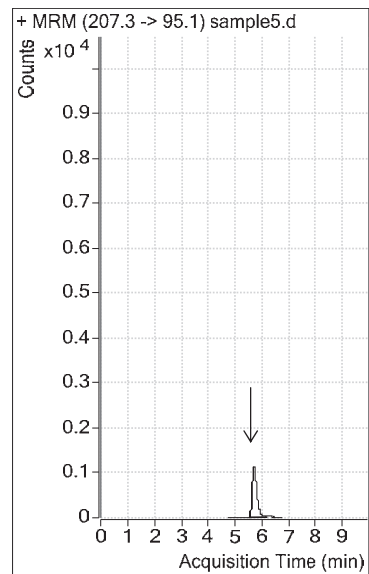
付図-2. BPMCのクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. 果肉

標準品 0.04 ng



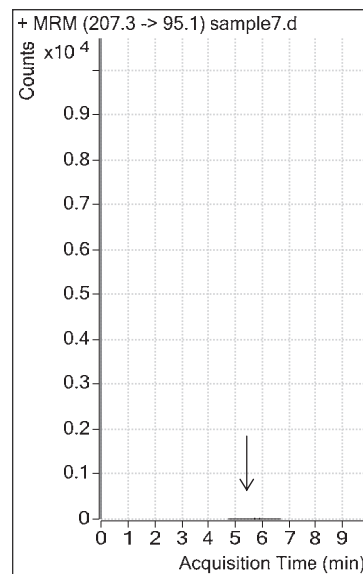
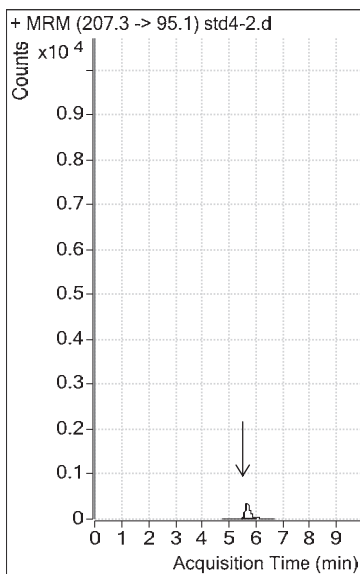
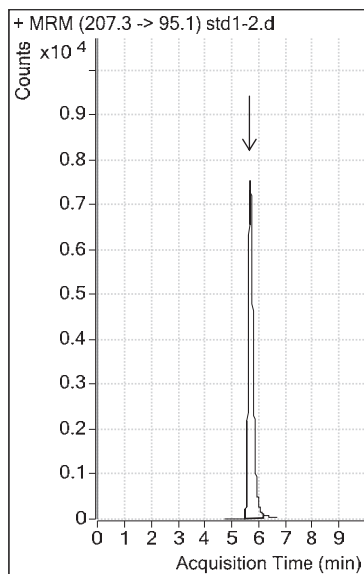
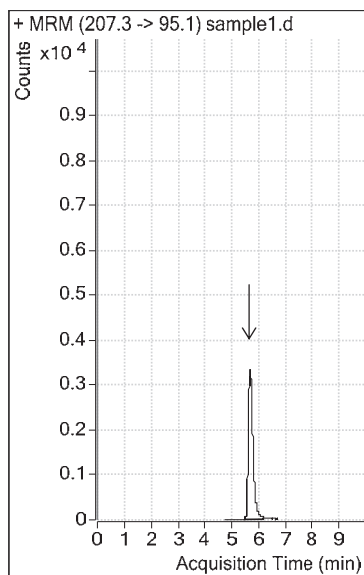
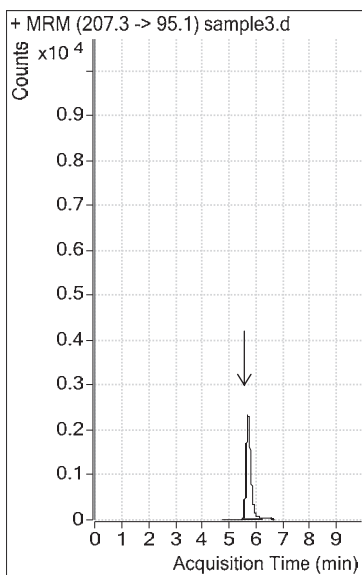
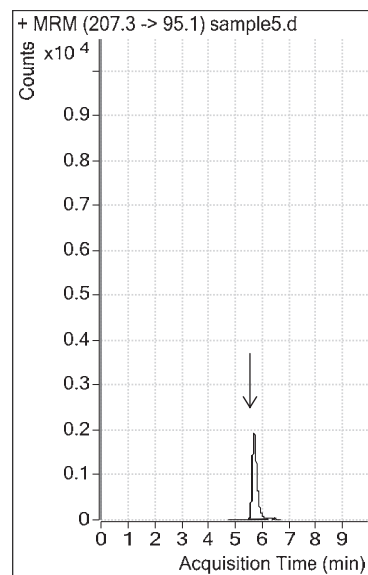
標準品 0.002 ng

宮崎 無処理
2 μ L/2 mL/0.2 g宮崎 4回処理 1日後
2 μ L/2 mL/0.2 g宮崎 4回処理 3日後
2 μ L/2 mL/0.2 g宮崎 4回処理 7日後
2 μ L/2 mL/0.2 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 mL/0.2 g宮崎 4 回処理 1 日後
2 μ L/6 mL/0.2 g宮崎 4 回処理 3 日後
2 μ L/6 mL/0.2 g宮崎 4 回処理 7 日後
2 μ L/6 mL/0.2 g

平成26年度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
 残留分析詳細④ 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	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	—	1.86	2.00	22.3	13.2	94	6	1.2
	C	1	1.96		9.82		94	6	1.3
	C	3	2.02		10.1		94	6	1.2
	C	7	2.14		10.7		94	6	1.3
							平均 94:6		平均 1.3
高知	0	—	1.41	1.54	14.1	9.46	93	7	1.3
	C	1	1.57		7.84		92	8	1.3
	C	3	1.58		7.92		92	8	1.3
	C	7	1.60		7.98		90	10	1.6
							平均 92:8		平均 1.4
宮崎	0	—	2.29	2.17	34.3	18.2	85	15	1.8
	C	1	2.10		12.6		93	7	1.2
	C	3	2.17		13.0		93	7	1.3
	C	7	2.13		12.8		93	7	1.6
							平均 91:9		平均 1.5
3 ほ場の総平均重量					3 ほ場の総重量の平均				
1.90 kg/個					13.6 kg				

C:プロシミドン，シロマジンは3回処理

BPMCは4回処理

2.作物写真

2.1.茨城



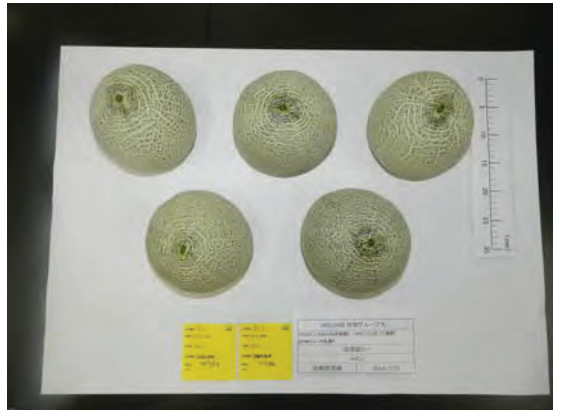
茨城 無処理



茨城 処理1日後



茨城 処理3日後



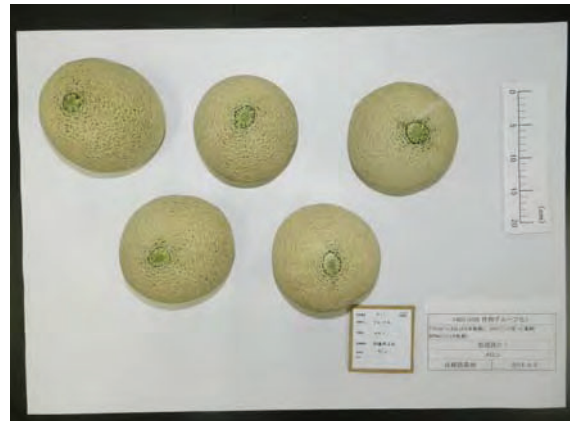
茨城 処理7日後



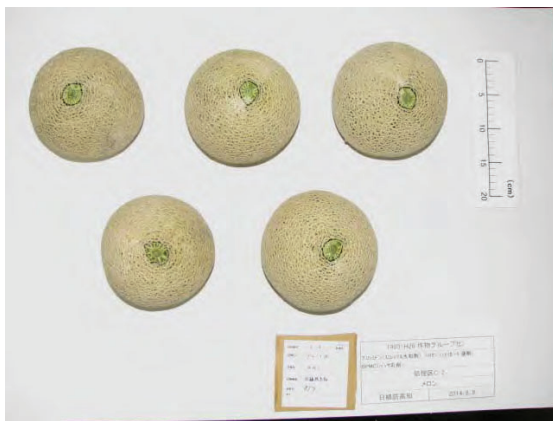
2.2.高知



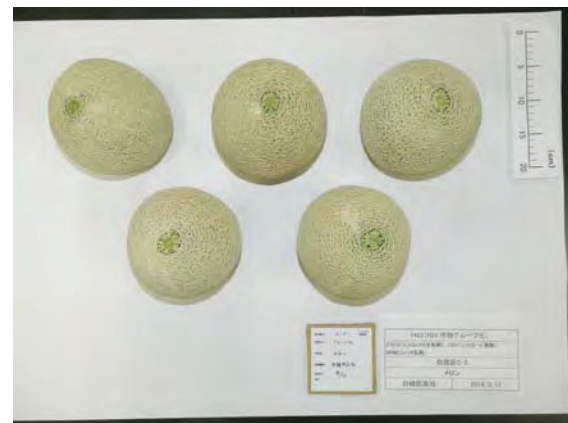
高知 無処理



高知 処理1日後



高知 処理3日後



高知 処理7日後

2.3.宮崎



宮崎 無処理

宮崎 処理1日後



宮崎 処理3日後

宮崎 処理7日後

平成26年度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
残留分析詳細① 1-ナフタレン酢酸

1. 分析対象物質

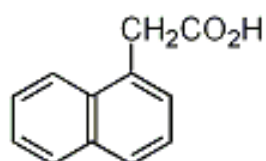
1-ナフタレン酢酸

化学名： 1-naphthylacetic acid

分子式： $C_{12}H_{10}O_2$

分子量： 186.2

構造式：



性 状： 無色結晶

融 点： 134～135℃

蒸気圧： <0.01 mPa (25℃)

分配係数： $\log P_{OW} = 2.6$

溶解性： 水 420 mg/L (20℃)

キシレン 55, 四塩化炭素 10.6 (以上 g/L, 26℃)

アセトン及びアルコールに易溶

ジエチルエーテル及びクロロホルムに可溶

安定性： 通常保管条件下で非常に安定

出 典： The Pesticide Manual 15th Edition

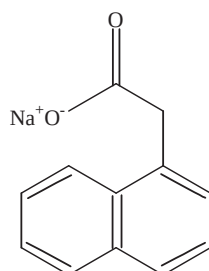
1-ナフタレン酢酸ナトリウム

化学名： sodium 2-naphthalene-1-ylacetate

分子式： $C_{12}H_9O_2Na$

分子量： 208.2

構造式：



性 状： 白色粉末

融 点： 280.07～281.74℃

蒸気圧： 2.0×10^{-4} Pa未満 (25℃)

分配係数： $\log P_{ow} = -1.03$ (25℃, 蒸留水)

溶解性： 水 295.5 g/L (20℃)

メタノール 274.1 g/L (20℃)

p-キシレン 0.3592, *n*-ヘプタン 0.1520, 1,2-ジクロロメタン 7.033

酢酸エチル 31.57, アセトン 133.7 (以上 mg/L, 20℃)

安定性： 150℃未満では分解及び化学変化は起こらず安定

pH4, 5, 7及び9 (25℃) における加水分解による半減期は1年以上

出 典：独立行政法人 農林水産消費安全技術センター H.P.

http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/1-naphthaleneacetic-acid/1-naphthaleneacetic-acid_01.pdf

2. 標準品及び試薬

1-ナフタレン酢酸標準品：純度 99.8% (関東化学製)

アセトン, 酢酸エチル, ヘキサン, メタノール：残留農薬試験用 (関東化学製)

メタノール：LC-MS 用 (関東化学製)

塩酸：有害金属測定用 (関東化学製)

酢酸：特級 (関東化学製)

水：ピュアライト PAR-0015-0V1(オルガノ製)及びピュアリック Z II(オルガノ製)で精製した水

多孔性ケイソウ土カラム：InertSep K-solute 5 mL (ジーエルサイエンス製)

ポリマー系ミニカラム：InertSep PLS-2 1g/6 mL (ジーエルサイエンス製)

シリカゲルミニカラム：Bond Elut SI 500 mg/3 mL (アジレント製)

HPLC 用ディスクフィルター：HLC-DISK 25, 孔径 0.45 μm , 水系 溶媒系 (関東化学製)

3. 装置及び機器

ミキサー：クイジナートDLC-NXJ2PS (クイジナート・アメリカ製)

乾熱恒温器：DS400 (ヤマト科学製)

高速液体クロマトグラフ (FLD)：Agilent 1100 Series, FLD (アジレント製)

データ処理装置：ChemStation (アジレント製)

4. 測定機器の操作条件

4.1. 高速液体クロマトグラフの操作条件

カラム：	L-column ODS (化学物質評価機構製) 内径 4.6 mm, 長さ 250 mm, 粒径 5 μm
溶離液：	メタノール／水／酢酸 (500:500:2,v/v/v)
流量：	1.0 mL/min
測定波長：	蛍光波長;330 nm, 励起波長;220 nm
カラム温度：	40°C
注入量：	20 μL
保持時間：	約 18.0 min

5. 検量線の作成

1-ナフタレン酢酸標準品20.0 mgを20 mL容メスフラスコに精秤し、アセトンに溶解して1000 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20 mg/L標準溶液を調製し、さらにこの標準溶液をメタノール／水／酢酸 (500:500:2,v/v/v) 混液で希釈して0.01, 0.02, 0.04, 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1-ナフタレン酢酸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。