

図 4-4. 日植防宮崎試料のクロマトグラム

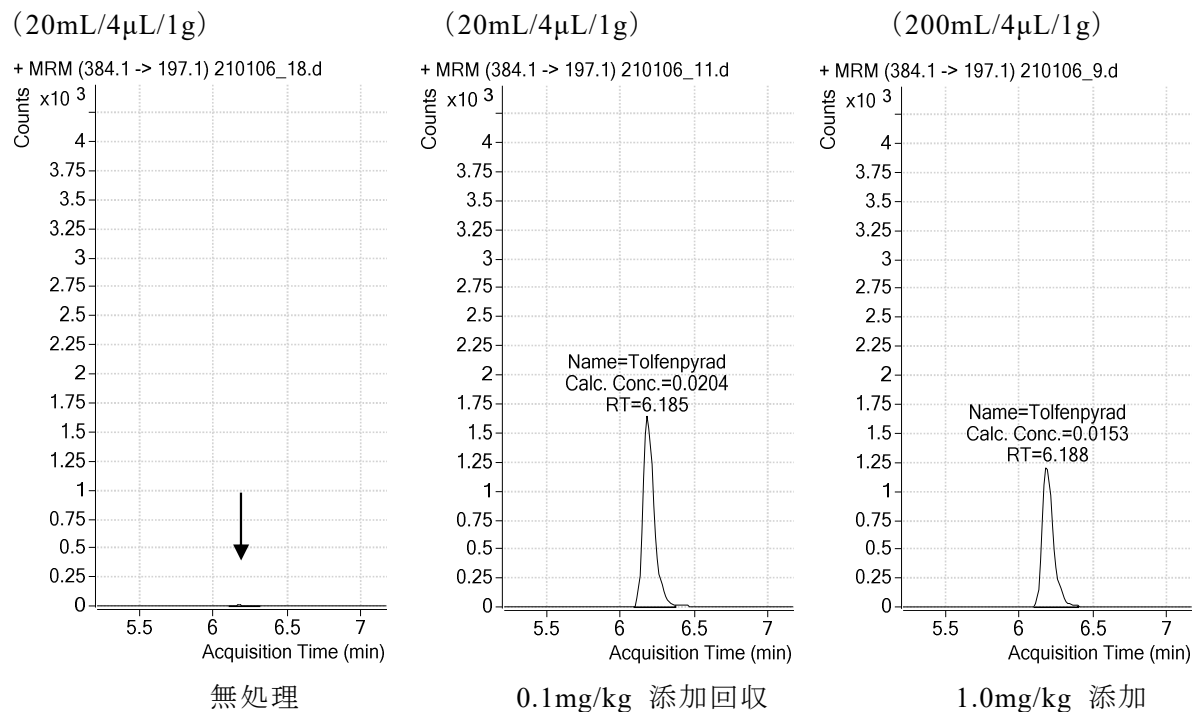


図 5. 内部精度管理のクロマトグラム

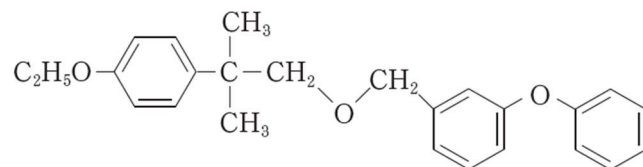
図 6. 保存安定性試料
のクロマトグラム

④ エトフェンプロックス

1. 分析対象物質

エトフェンプロックス

化学構造式：



化学名：2-(4-ethoxyphenyl)-2-methylpropyl 3-phenoxybenzyl ether

化学式：C₂₅H₂₈O₃

分子量：376.5

性状：白色結晶，僅かに芳香臭

融点：37.4±0.1℃

蒸気圧：8.13×10⁻⁷ Pa (25℃換算値)

オクタノール／水分配係数：log Pow=6.9 (20℃)

溶解性：水 22.5g/L，ヘキサン 667 g/L，トルエン 862 g/L，ジクロロメタン 924 g/L，アセトン 877 g/L，メタノール 49 g/L (以上 20℃)

安定性：熱；安定 加水分解性半減期；1 年以上 (pH5, pH 7, pH 9, 25℃)
水中光分解性半減期；4.7 日 (緩衝液, 25℃)，7.9 日 (自然水, 25℃)

出典：農薬ハンドブック 2016 年版

2. 標準品及び試薬

エトフェンプロックス標準品：純度 99.0% (富士フイルム和光純薬製)

アセトン，ヘキサン，酢酸エチル，ジエチルエーテル：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)

塩化ナトリウム：特級 (関東化学製)

1mol/L 酢酸アンモニウム：高速液体クロマト用 (関東化学製)

ギ酸：特級 (関東化学製)

水：ピュアライト PRA-0015-0V1 (オルガノ製) 及びピューリック ZII (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 5mL 容 (ジューエルサイエンス製)

フロリジルミニカラム：Sep-Pak FL plus long cartridge 910mg (waters 製)

濾紙：No.5A (桐山製作所製)

ガラス繊維濾紙：GFP (桐山製作所製)

3. 装置及び機器

電子天秤：XSR205, XS4002S, PG2002 (メラー・トレド製)，S-BOX WP (イシダ製)

ミキサー：クイジナート DLC-NXJ2 (クイジナート製)

振とう機：EL-01 (スギヤマゲン製)

減圧濃縮器：R-134 (柴田科学器械工業製)

液体クロマトグラフ／タンデム型質量分析計(LC-MS/MS):

Agilent 6410 Triple Quad LC-MS (アジレント・テクノロジー製)

データ処理ソフトウェア: MassHunter (アジレント・テクノロジー製)

4. 測定機器の操作条件

4.1. 液体クロマトグラフの操作条件

カラム: Atlantis T3 (waters 製)

径 2.1mm, 長さ 150mm, 粒径 3 μ m

溶離液: A 液 4mM 酢酸アンモニウム含有 1% 酸水溶液

B 液 メタノール

[グラジエントテーブル]

時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
3	5	95
9.5	5	95
10.5	30	70

流量: 0.3 μ L/min

カラム温度: 40°C

注入量: 4 μ L

保持時間: 約 7.7 分

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

脱溶媒ガス流量: 10L/min

脱溶媒ガス温度: 300°C

ネブライザー: 30psi

キャピラリー電圧: 3kV

コーン電圧: 50V

コリジョン電圧: 20V

イオン抽出方法: MRM 法

モニタリングイオン: プリカーサーイオン; m/z 394.3

プロダクトイオン; m/z 359.2

5. 検量線の作成

エトフェンプロックス標準品 20.2mg を精秤後アセトンで溶解し, 20mL 定容とし 1000mg/L 標準原液を調製した。この原液をアセトンで希釈して 40mg/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順次希釈して 0.00025, 0.0005, 0.001, 0.005 及び 0.01mg/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／タンデム型質量分析計に注入し, データ処理装置を用いてエトフェンプロッ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、有姿のまま冷凍庫（-20℃設定）に保管した。分析直前にミキサーを用いて全量を磨砕均一化した。

6.2. 抽出

磨砕均一化した試料 20g をはかりとり、アセトン 100mL を加え振とう機を用い 30 分間振とう抽出した。抽出物を濾紙とガラス繊維濾紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過した後、残渣をアセトン 50mL で洗い同様にろ過した。ろ液を合わせ、アセトンで 200mL に定容した。この 10mL（試料 1g 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

濃縮液に水を加え約 4g に調整後、塩化ナトリウムを 0.5g 加え振り混ぜた。この液を多孔性ケイソウ土カラムに流下し 5 分間放置後、酢酸エチル 20mL で容器内を洗い込み、カラムに流下した。さらに、酢酸エチル 20mL で同様の操作を繰り返し、全流出液を合わせ取り溶出液とした。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

フロリジルミニカラムにヘキサン 5mL を流下し前処理をした。残留物をヘキサン 5mL で溶解しミニカラムに流下し、流出液は捨てた。次に、ヘキサン 5mL で容器内を洗い込みカラムに流下し、流出液は捨てた。次に、ジエチルエーテル／ヘキサン（50:50, v/v）10mL で容器内を洗い込みミニカラムに流下し、エトフェンプロックスを溶出した。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。

6.5. 定量

残留物を適量のメタノールで溶解し、前記条件の液体クロマトグラフ／タンデム型質量分析計に注入してピーク面積を求め、検量線よりエトフェンプロックスの重量を求めて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	1	20	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)
0.001	1	20	4	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、日植防茨城の無処理試料を用いて、定量限界相当 (0.01mg/kg) 及び 1mg/kg 添加濃度における回収試験を 5 連分析で実施した。回収率の算出結果を示す。

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
日植防 茨城	1.0	83,	81,	80,	77,	70	78	7
	0.01	120,	120,	110,	110,	100	112	8

9. 試料分析結果

試料調製場所	経過日数	分析値 (mg/kg)	
		乳 剤	水 和 剤
日植防茨城	散布前	<0.01	
	散布 1 日後	0.21	0.21
	散布 3 日後	0.10	0.10
	散布 7 日後	0.02	0.02
日植防高知	散布前	<0.01	
	散布 1 日後	0.19	0.24
	散布 3 日後	0.09	0.14
	散布 7 日後	0.03	0.04
日植防宮崎	散布前	<0.01	
	散布 1 日後	0.18	0.25
	散布 3 日後	0.15	0.17
	散布 7 日後	0.05	0.07

試験区試料の分析は 1 連で実施

10. 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：各調製場所の実試料分析と保存安定性試験を行うごとに、各 1 検体の無処理試料及びエトフェンプロックス 0.1mg/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 2019 年 6 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) における結果は良好であった。

分析日 (抽出日)	回収率 (%)	無処理試料 の分析値 (mg/kg)	使用した 無処理試料	対象試料
2020/12/21	82	< 0.01	日植防茨城	日植防茨城
12/22	78	< 0.01	日植防高知	日植防高知
12/23	87	< 0.01	日植防宮崎	日植防宮崎
2021/ 1/ 6	79	< 0.01	日植防茨城	日植防宮崎 保存安定性試料

11. 保存安定性確認

磨砕均一化した無処理試料（日植防茨城）にエトフェンプロックスを添加し，冷凍暗所（-20℃設定）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。

添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
1.0	82(2020/10/16－ 2021/1/6)	79, 77	78

実試料最長保存日数：日植防茨城 66 日間，日植防高知 46 日間，日植防宮崎 39 日間

12. 参考添付図

各クロマトグラムの一例を示す。

図 1. エトフェンプロックス標準品のクロマトグラム

図 2. 全操作試薬ブランクのクロマトグラム

図 3. 回収率のクロマトグラム

図 4-1. 散布前試料のクロマトグラム

4-2. 日植防茨城試料のクロマトグラム

4-3. 日植防高知試料のクロマトグラム

4-4. 日植防宮崎試料のクロマトグラム

図 5. 内部精度管理のクロマトグラム

図 6. 保存安定性試料のクロマトグラム

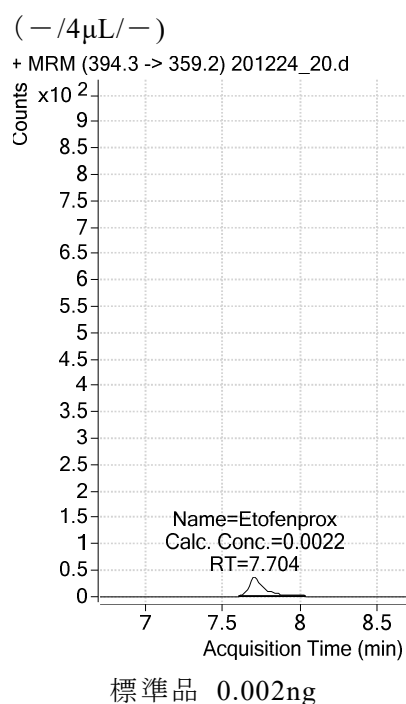
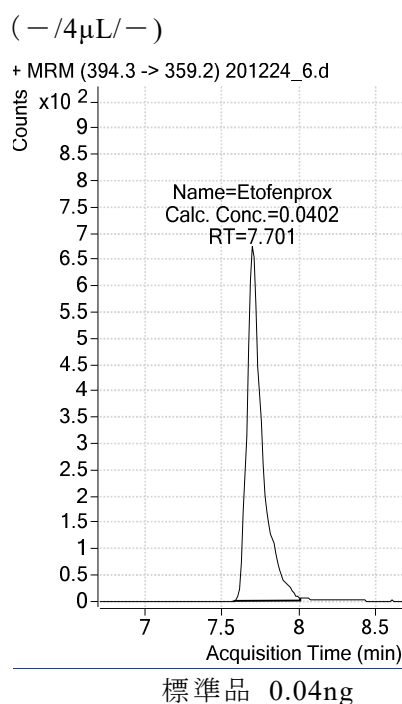
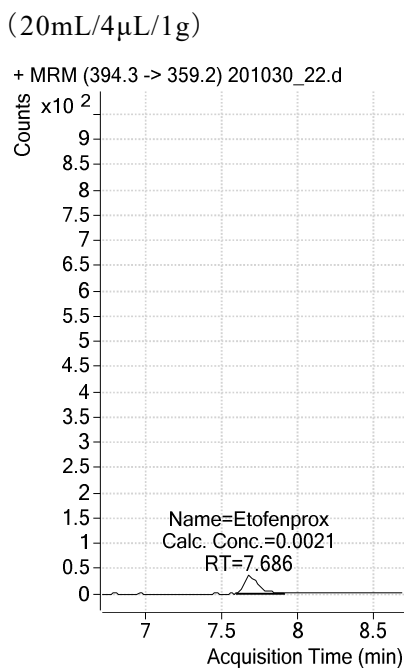
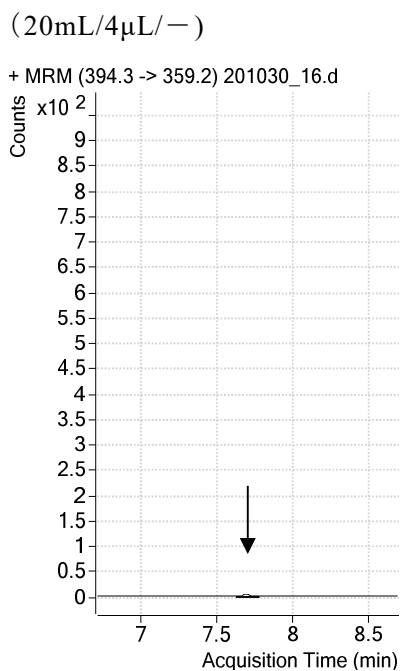
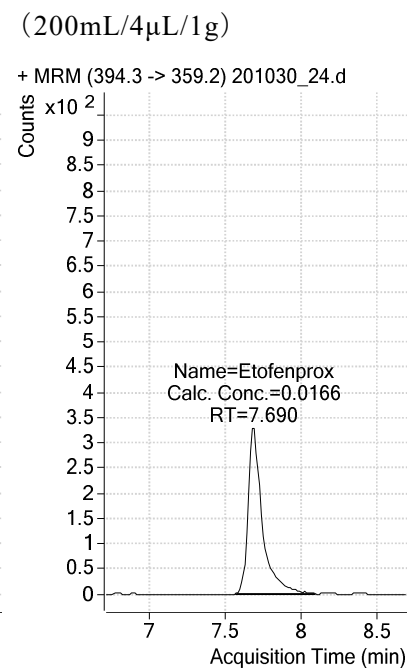


図 1. エトフェンプロックス標準品のクロマトグラム



0.01mg/kg 添加回収



1.0mg/kg 添加回収

図 2. 全操作試薬ブランク
のクロマトグラム

図 3. 回収率のクロマトグラム

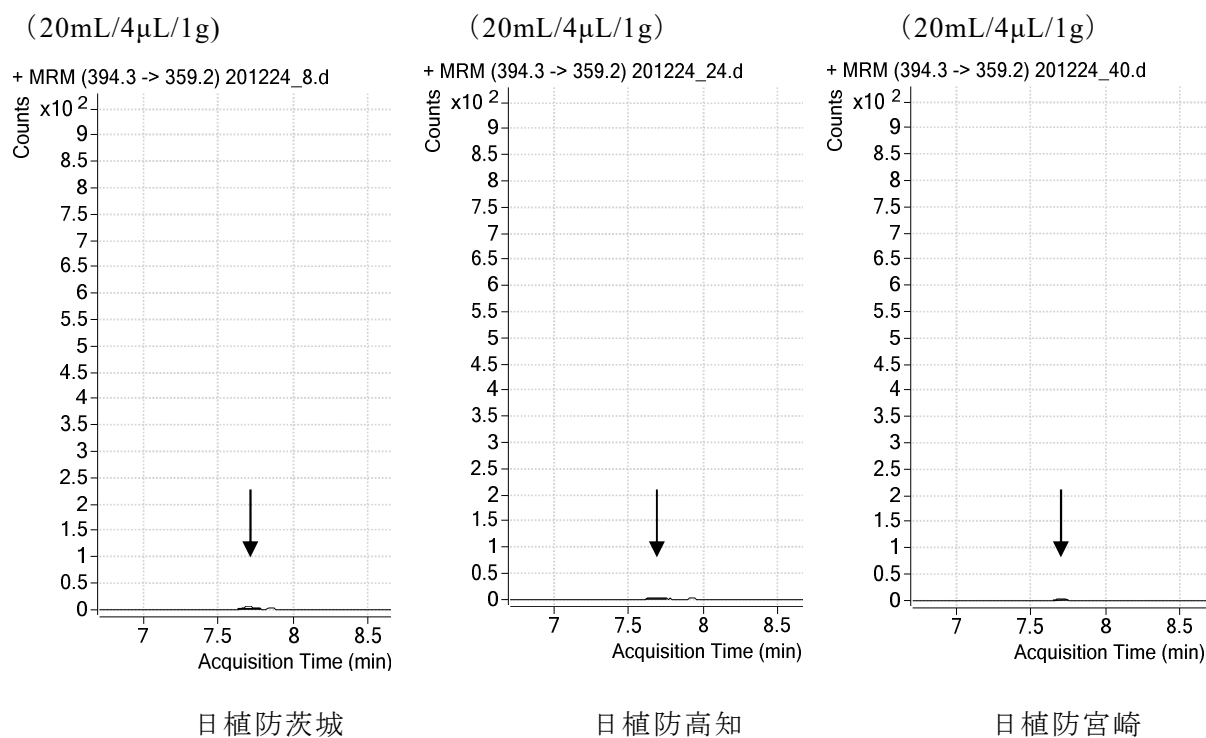
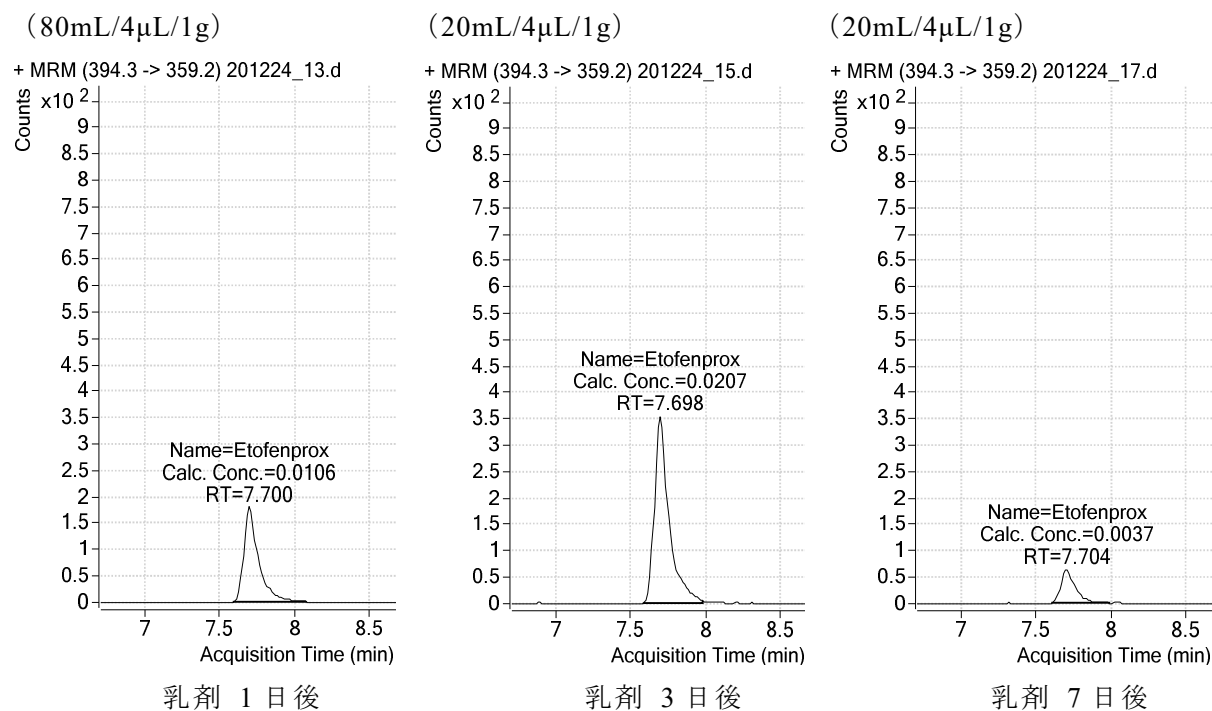


図 4-1. 散布前試料のクロマトグラム



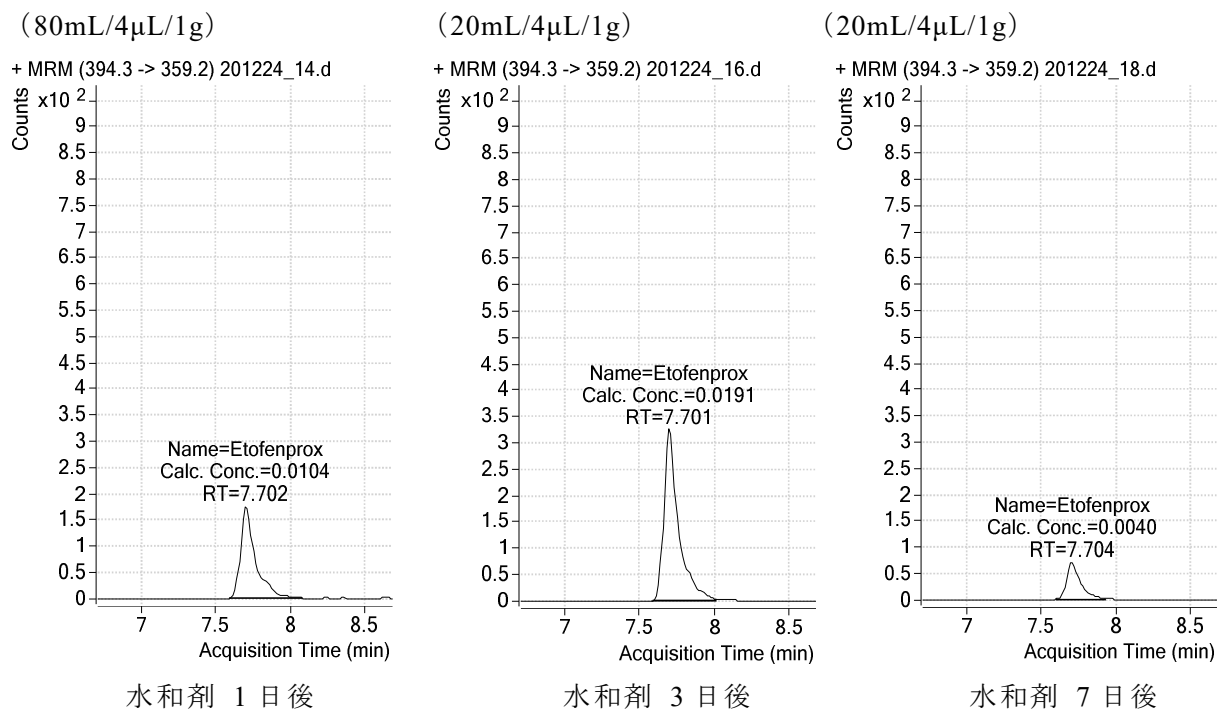
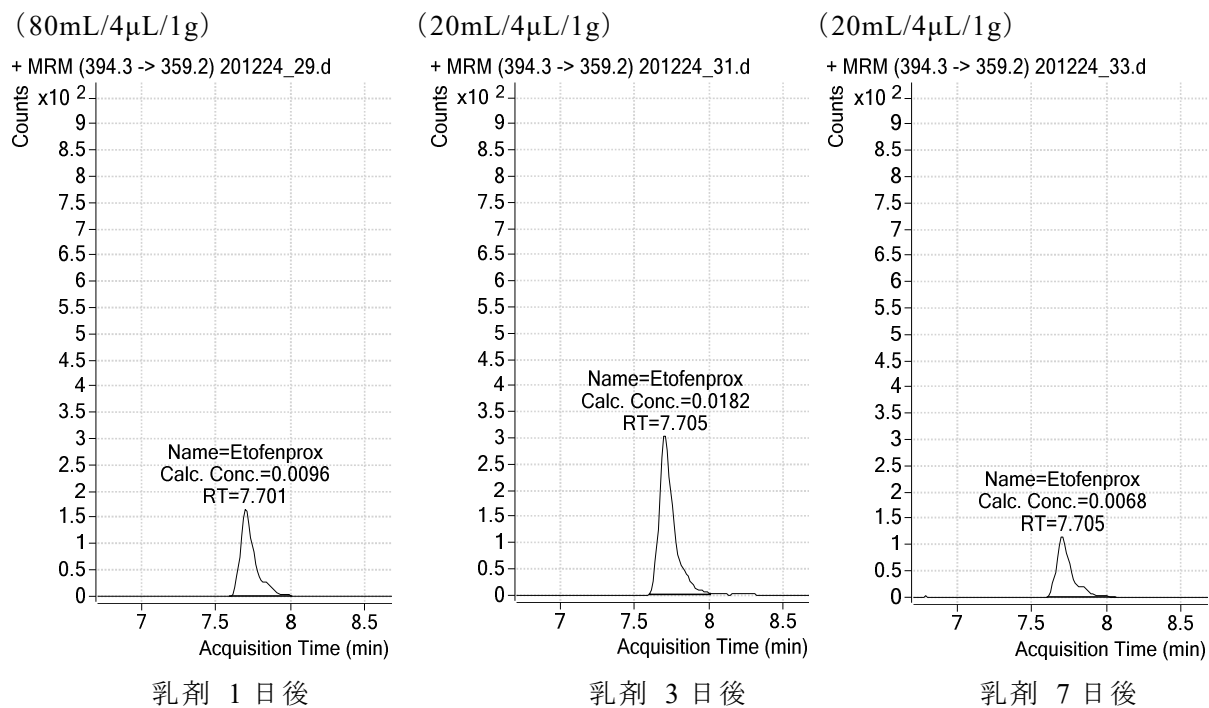


図 4-2. 日植防茨城試料のクロマトグラム



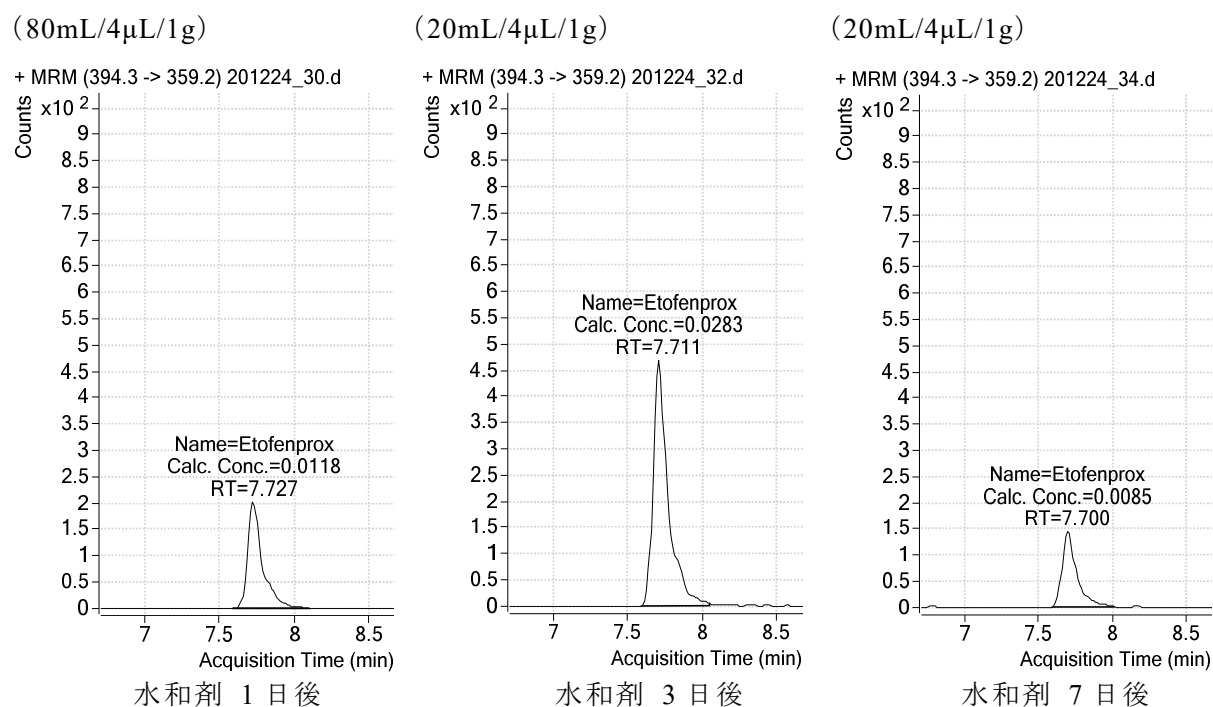
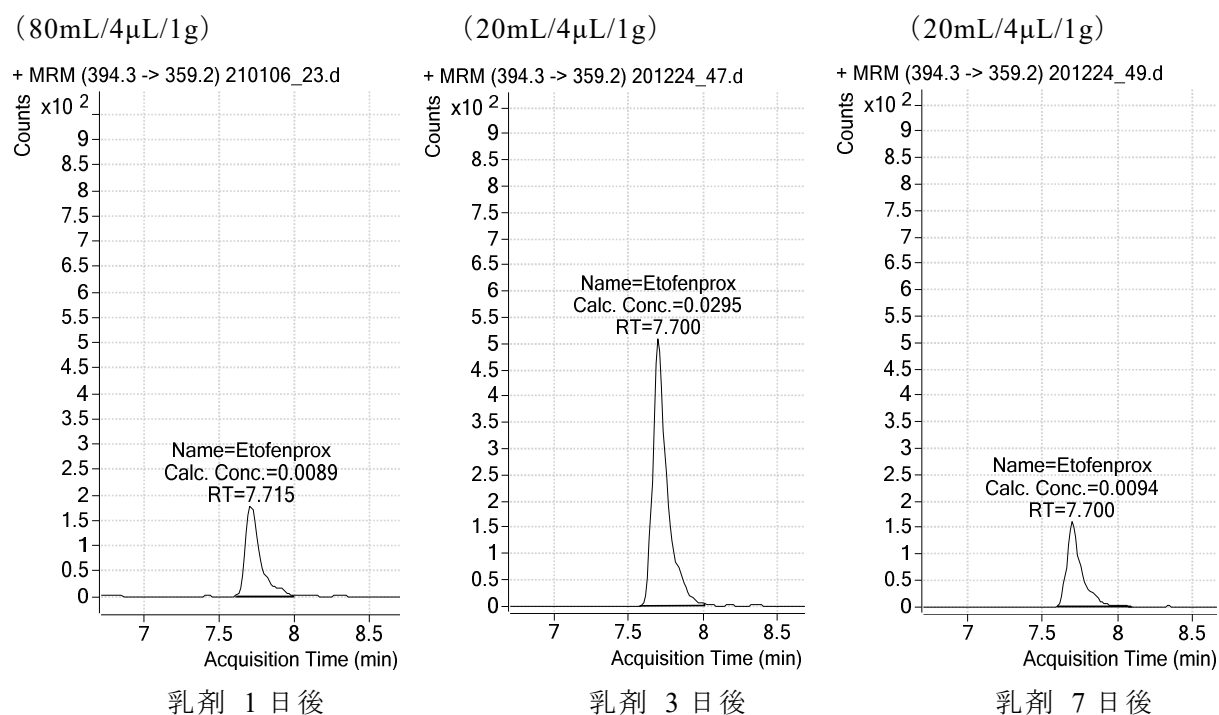


図 4-3. 日植防高知試料のクロマトグラム



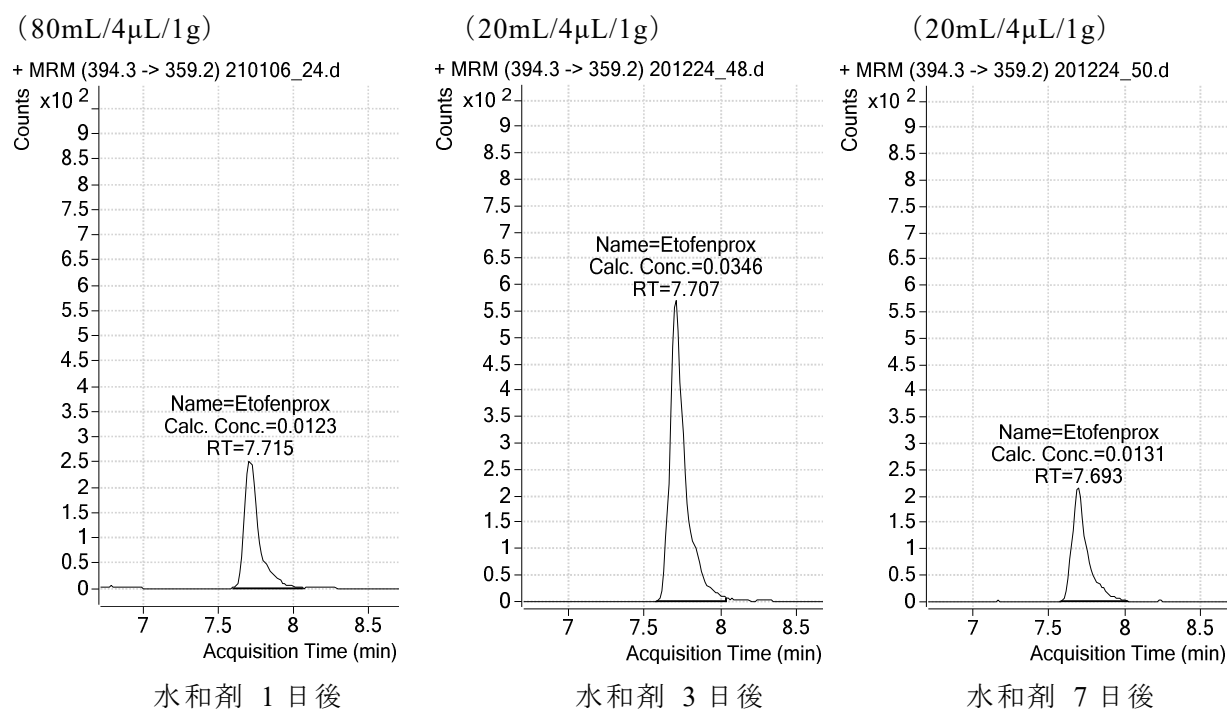


図 4-4. 日植防宮崎試料のクロマトグラム

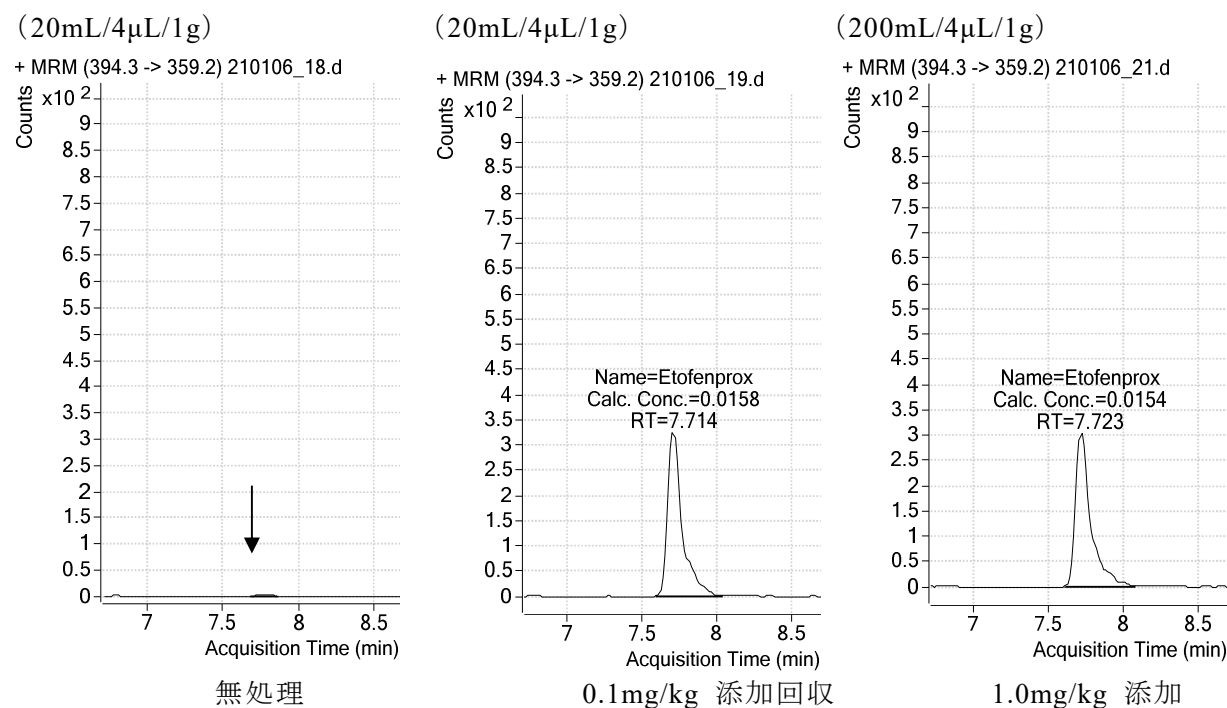


図 5. 内部精度管理のクロマトグラム

図 6. 保存安定性試料
のクロマトグラム

⑤ 作物写真及び試料重量等

1. 作物写真

1-1. ミクロブタニル



茨城 散布前



茨城 散布 1 日後／乳剤



茨城 散布 1 日後／水和剤



茨城 散布 3 日後／乳剤



茨城 散布 3 日後／水和剤



茨城 散布 7 日後／乳剤



茨城 散布 7 日後／水和剤



高知 散布前



高知 散布 1 日後／乳剤



高知 散布 1 日後／水和剤



高知 散布 3 日後／乳剤



高知 散布 3 日後／水和剤



高知 散布 7 日後／乳剤



高知 散布 7 日後／水和剤



宮崎 散布前



宮崎 散布 1 日後／乳剤



宮崎 散布 1 日後／水和剤



宮崎 散布 3 日後／乳剤



宮崎 散布 3 日後／水和剤



宮崎 散布 7 日後／乳剤



宮崎 散布 7 日後／水和剤

1.2. MEP



茨城 散布前



茨城 散布 1 日後／乳剤



茨城 散布 1 日後／水和剤



茨城 散布 3 日後／乳剤



茨城 散布 3 日後／水和剤



茨城 散布 7 日後／乳剤



茨城 散布 7 日後／水和剤



高知 散布前



高知 散布 1 日後／乳剤



高知 散布 1 日後／水和剤



高知 散布 3 日後／乳剤



高知 散布 3 日後／水和剤



高知 散布 7 日後／乳剤



高知 散布 7 日後／水和剤



宮崎 散布前



宮崎 散布 1 日後／乳剤



宮崎 散布 1 日後／水和剤



宮崎 散布 3 日後／乳剤



宮崎 散布 3 日後／水和剤



宮崎 散布 7 日後／乳剤



宮崎 散布 7 日後／水和剤

1.3. トルフェンピラド



茨城 散布前



茨城 散布 1 日後／乳剤



茨城 散布 1 日後／フロアブル



茨城 散布 3 日後／乳剤



茨城 散布 3 日後／フロアブル



茨城 散布 7 日後／乳剤



茨城 散布 7 日後／フロアブル



高知 散布前



高知 散布 1 日後／乳剤



高知 散布 1 日後／フロアブル



高知 散布 3 日後／乳剤



高知 散布 3 日後／フロアブル



高知 散布 7 日後／乳剤



高知 散布 7 日後／フロアブル



宮崎 散布前



宮崎 散布 1 日後／乳剤



宮崎 散布 1 日後／フロアブル



宮崎 散布 3 日後／乳剤



宮崎 散布 3 日後／フロアブル



宮崎 散布 7 日後／乳剤



宮崎 散布 7 日後／フロアブル

1.4. エトフェンプロックス



茨城 散布前



茨城 散布 1 日後／乳剤



茨城 散布 1 日後／水和剤



茨城 散布 3 日後／乳剤



茨城 散布 3 日後／水和剤



茨城 散布 7 日後／乳剤



茨城 散布 7 日後／水和剤



高知 散布前



高知 散布 1 日後／乳剤



高知 散布 1 日後／水和剤



高知 散布 3 日後 / 乳剤



高知 散布 3 日後 / 水和剤



高知 散布 7 日後 / 乳剤



高知 散布 7 日後 / 水和剤



宮崎 散布前



宮崎 散布 1 日後／乳剤



宮崎 散布 1 日後／水和剤



宮崎 散布 3 日後／乳剤



宮崎 散布 3 日後／水和剤



宮崎 散布 7 日後／乳剤



宮崎 散布 7 日後／水和剤

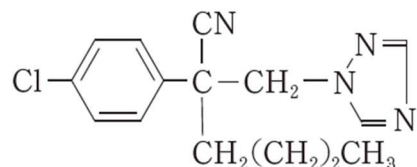
3-3. 温州みかん

① ミクロブタニル

1. 分析対象物質

ミクロブタニル

化学構造式：



化学名：(RS) -2-(4-chlorophenyl)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)hexanenitrile

化学式：C₁₅H₁₇ClN₄

分子量：288.8

性状：無色針状結晶，芳香臭

融点：71.7℃

蒸気圧：1.72×10⁻⁶Pa (25℃)

オクタノール／水分配係数：log Pow = 1.98

溶解性：水 142mg/L (22℃)

メタノール >1000g/L, アセトン >1000g/L, ジクロロメタン >1000g/L,

キシレン 197.8g/L, n-ヘキサン 1.22g/L (以上 20℃)

安定性：熱；安定，加水分解性；pH5.0, pH7.0, pH9.0 で安定，

水中光分解性 半減期；591 時間（自然水 31℃）

出典：農薬ハンドブック 2016 年版

2. 標準品及び試薬

ミクロブタニル標準品：純度 99.8%（富士フイルム和光純薬製）

アセトン，ヘキサン，酢酸エチル，ジエチルエーテル：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）

塩化ナトリウム：特級（関東化学製）

1mol/L 酢酸アンモニウム：高速液体クロマト用（関東化学製）

水：ピュアライト PRA-0015-0V1（オルガノ製）及びピューリック ZII（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 5mL 容（ジエールサイエンス製）

フロリジルミニカラム：Sep-Pak FL plus long cartridge 910mg（waters 製）

グラファイトカーボンミニカラム：Supelclean ENVI-Carb SPE Tube 250mg/6mL
（シグマ アルドリッチ製）

濾紙：No.5A（桐山製作所製）

ガラス繊維濾紙：GFP（桐山製作所製）

3. 装置及び機器

電子天秤：XSR205, XS4002S, PG2002（メラー・トレド製），S-BOX WP（インダ製）

ミキサー:クイジナート DLC-NXJ2(クイジナート製), グラインドミックス GM200(Retche 製)
 振とう機:EL-01(スギヤマゲン製)
 減圧濃縮器:R-134(柴田科学器械工業製)
 液体クロマトグラフ/タンデム型質量分析計(LC-MS/MS):Xevo TQ-S micro(Waters 製)
 データ処理ソフトウェア:MassLynx(Waters 製)

4. 測定機器の操作条件

4.1. 液体クロマトグラフの操作条件

カラム:ACQUITY UPLC HSS T3 (waters 製)

径 2.1mm, 長さ 100mm, 粒径 1.8 μ m

溶離液:A 液 2mM 酢酸アンモニウム水溶液

B 液 2mM 酢酸アンモニウム含有メタノール溶液

[グラジエントテーブル]

時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
0	30	70
3	5	95
9.5	5	95
10.5	30	70

流量:0.3 mL/min

カラム温度:40°C

注入量:2 μ L

保持時間:約 2.4 分

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

コーンガス流量:50 L/h (N₂)

脱溶媒ガス流量:1000L/h (N₂)

ソースブロック温度:150°C

キャピラリー電圧:1.0kV

コーン電圧:22V

コリジョン電圧:24V

イオン抽出方法:MRM 法

モニタリングイオン:プリカーサーイオン; m/z 289.15

プロダクトイオン; m/z 150.97

5. 検量線の作成

ミクロブタニル標準品 20.0mg を精秤後アセトンで溶解し, 20mL 定容とし 1000mg/L 標準原液を調製した。この原液をアセトンで希釈して 40mg/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順次希釈して 0.00125, 0.0025, 0.005, 0.025 及び 0.05mg/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/タン

デム型質量分析計に注入し、データ処理装置を用いてミクロブタニル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、へたを除去し冷凍庫 (-20℃設定) に保管した。分析直前にミキサーを用いて全量を磨砕均一化した。

6.2. 抽出

磨砕均一化した試料 20g をはかりとり、アセトン 100mL を加え振とう機を用い 30 分間振とう抽出した。抽出物を濾紙とガラス繊維濾紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過した後、残渣をアセトン 50mL で洗い同様にろ過した。ろ液を合わせ、アセトンで 200mL に定容した。この 10mL (試料 1g 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

濃縮液に水を加え約 4g に調整後、塩化ナトリウムを 0.5g 加え振り混ぜた。この液を多孔性ケイソウ土カラムに流下し 5 分間放置後、酢酸エチル 20mL で容器内を洗い込みカラムに流下した。さらに、酢酸エチル 20mL で同様の操作を繰り返し、全流出液を合わせ取り溶出液とした。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

フロリジルミニカラムにヘキサン 5mL を流下し前処理をした。残留物をヘキサン 5mL で溶解しミニカラムに流下し、流出液は捨てた。次に、ヘキサン 5mL で容器内を洗い込みカラムに流下し、流出液は捨てた。次に、ジエチルエーテル／ヘキサン (50:50, v/v) 10mL で容器内を洗い込みミニカラムに流下し、流出液は捨てた。次に、アセトン／ヘキサン (50:50, v/v) 10mL を流下し、ミクロブタニルを溶出した。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。

6.5. 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アセトン 5mL、ヘキサン 10mL を順次流下し前処理をした。残留物をヘキサン／アセトン (80:20, v/v) 10mL で溶解しミニカラムに流下した。次に、同混液 10mL で容器内を洗い込み流下した。同様の操作を 2 回繰り返し行い、全流出液を合わせ溶出液とした。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。

6.6. 定量

残留物を適量のメタノールで溶解し，前記条件の液体クロマトグラフ／タンデム型質量分析計に注入してピーク面積を求め，検量線よりミクロブタニルの重量を求めて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)
0.005	1	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)
0.0025	1	4	2	0.005

8. 回収率

分析法確認のため，日植防高知の無処理試料を用いて，定量限界相当（0.01mg/kg）及び 1mg/kg 添加濃度における回収試験を 5 連分析で実施した。回収率の算出結果を示す。

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
日植防 高知	1.0	87,	86,	85,	84,	84	85	2
	0.01	90,	90,	90,	90,	80	88	5

9. 試料分析結果

試料調製場所	経過日数	分析値(mg/kg)	
		乳剤	水和剤
日植防茨城	散布前	<0.01	
	散布 1 日後	0.17	0.15
	散布 3 日後	0.16	0.16
	散布 7 日後	0.14	0.13
日植防高知	散布前	<0.01	
	散布 1 日後	0.15	0.15
	散布 3 日後	0.16	0.19
	散布 7 日後	0.19	0.13

	散布前	<0.01	
日植防宮崎	散布 1 日後	0.20	0.17
	散布 3 日後	0.14	0.16
	散布 7 日後	0.21	0.14

試験区試料の分析は 1 連で実施

10. 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：各調製場所の実試料分析と保存安定性試験を行うごとに、各 1 検体の無処理試料及びミクロブタニル 0.1mg/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 2019 年 6 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）における結果は良好であった。

分析日 (抽出日)	回収率 (%)	無処理試料 の分析値 (mg/kg)	使用した 無処理試料	対象試料
2020/10/28	83	<0.01	日植防高知	日植防高知
10/29	85	<0.01	日植防高知	日植防宮崎
11/ 4	85	<0.01	日植防高知	日植防高知
11/10	84	<0.01	日植防高知	日植防宮崎
12/ 1	84	<0.01	日植防高知	日植防茨城
12/ 4	90	<0.01	日植防高知	保存安定性試料

11. 保存安定性確認

磨砕均一化した無処理試料（日植防高知）にミクロブタニルを添加し、冷凍暗所（-20℃設定）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。

添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
1.0	87(2020/9/8－2020/12/4)	96, 96	96

実試料最長保存日数：日植防茨城 20 日間，日植防高知 55 日間，日植防宮崎 47 日間

12. 参考添付図

各クロマトグラムの一例を示す。

図 1. ミクロブタニル標準品のクロマトグラム

図 2. 全操作試薬ブランクのクロマトグラム

図 3. 回収率のクロマトグラム

図 4-1. 散布前試料のクロマトグラム

4-2. 日植防茨城試料のクロマトグラム

4-3. 日植防高知試料のクロマトグラム

4-4. 日植防宮崎試料のクロマトグラム

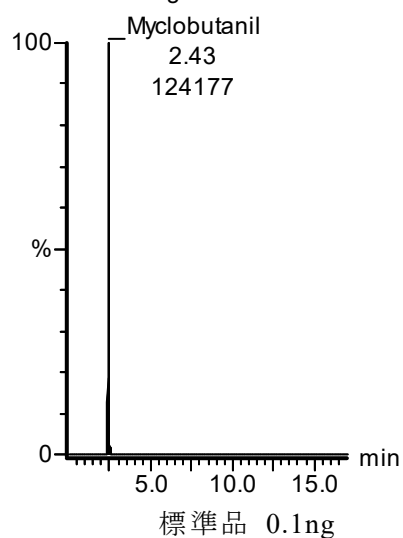
図 5. 内部精度管理のクロマトグラム

図 6. 保存安定性試料のクロマトグラム

(- /2 μ L/-)

201102_06

std/0.02or0.1ng



(- /2 μ L/-)

201102_23

std/0.001or0.005ng

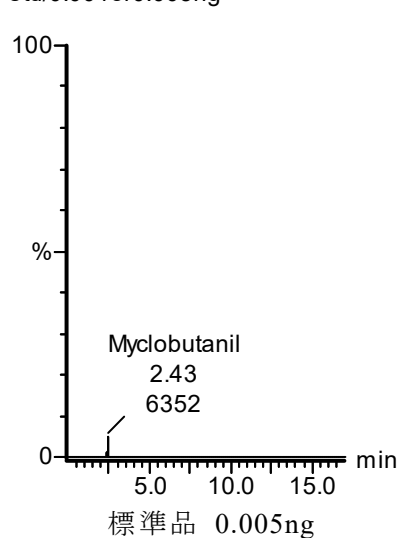
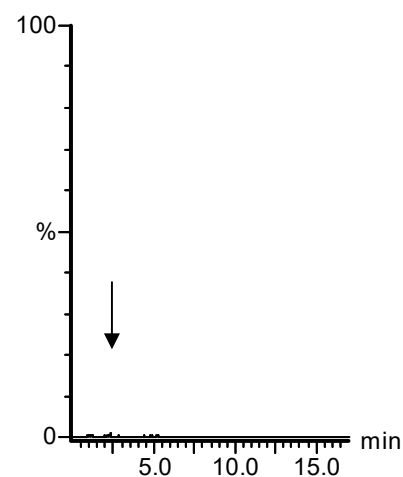


図 1. ミクロブタニル標準品のクロマトグラム

(4mL/2 μ L/-)

201007_09

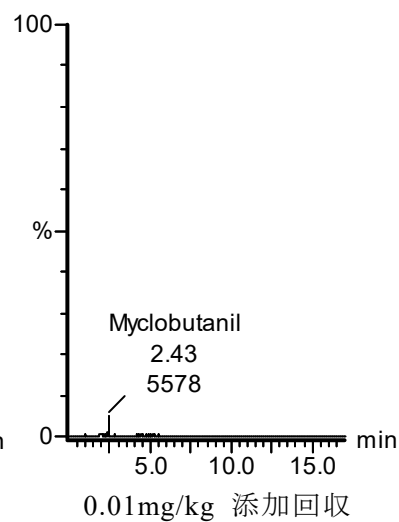
MYC T



(4mL/2 μ L/1g)

201007_16

MYC S-1



(40mL/2 μ L/1g)

201007_28

MYC L1.0-1

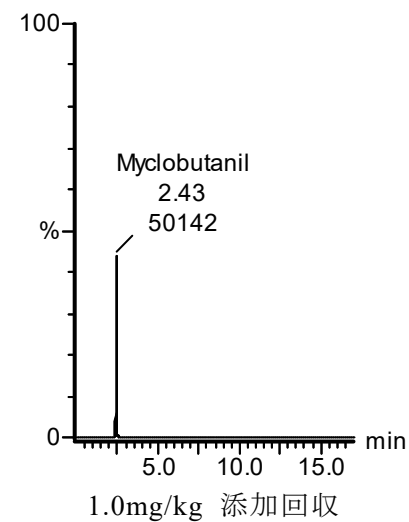


図 2. 全操作試薬ブランク
のクロマトグラム

図 3. 回収率のクロマトグラム

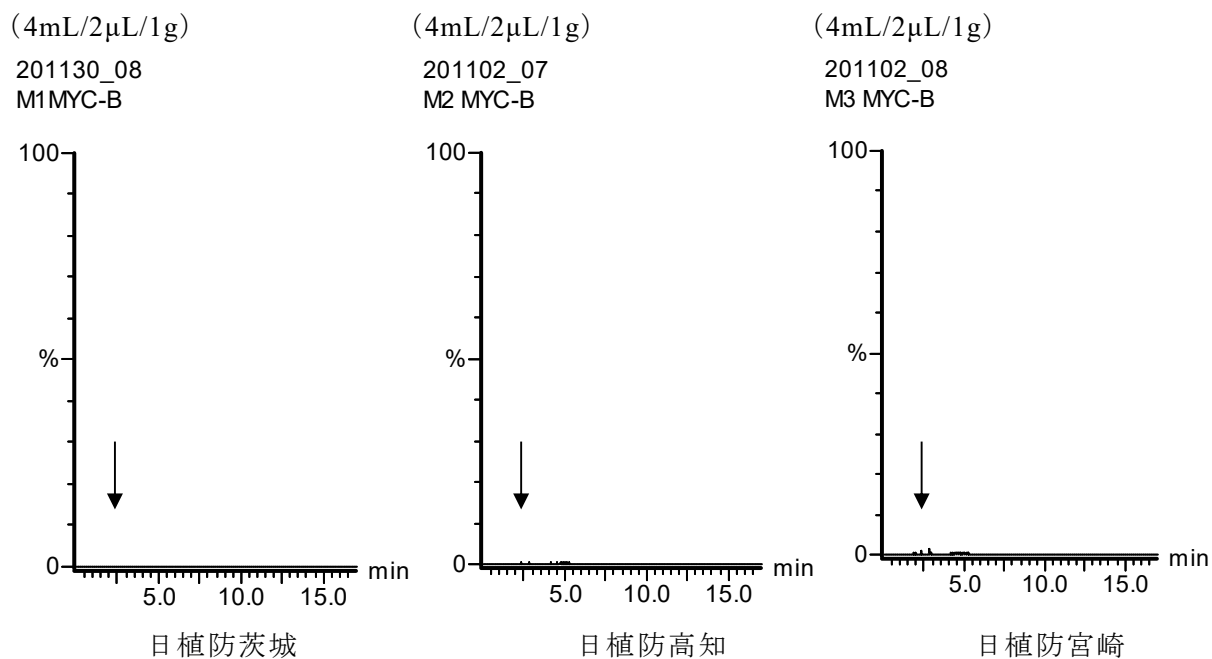
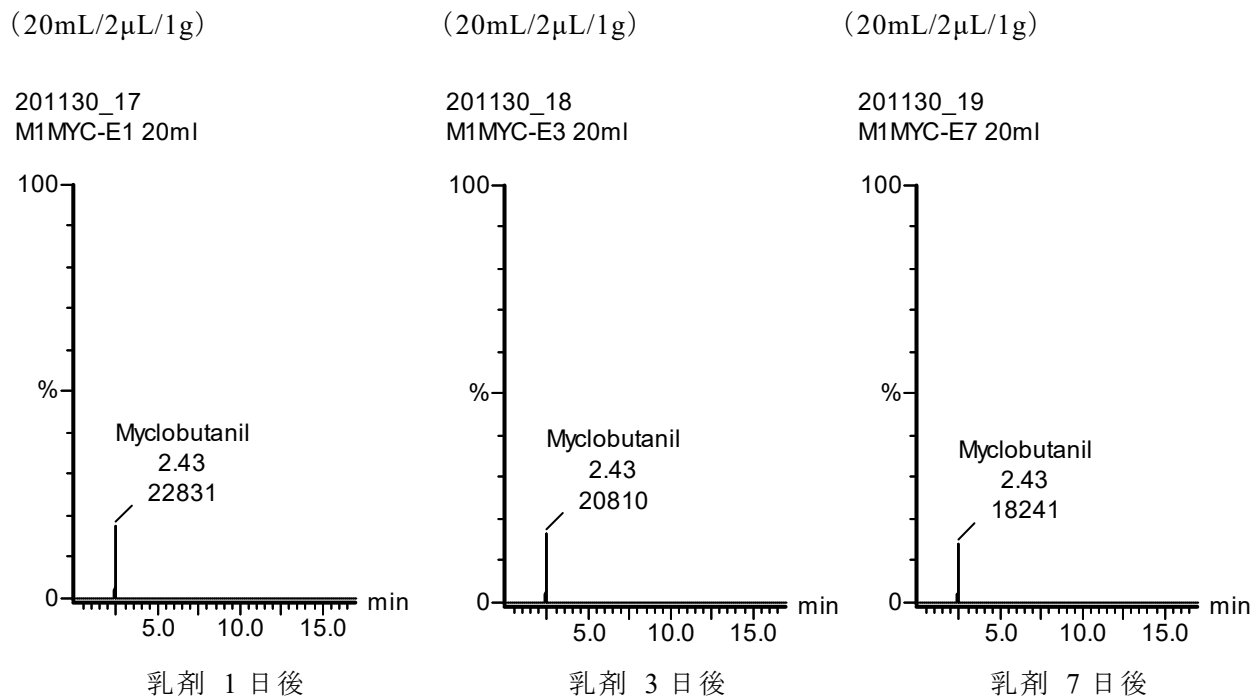
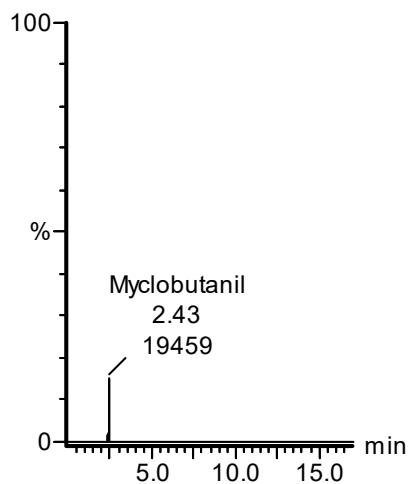


図 4-1. 散布前試料のクロマトグラム



(20mL/2 μ L/1g)

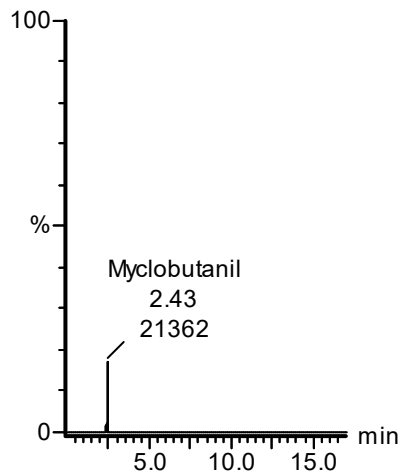
201130_12
M1MYC-W1 20ml



水和剤 1 日後

(20mL/2 μ L/1g)

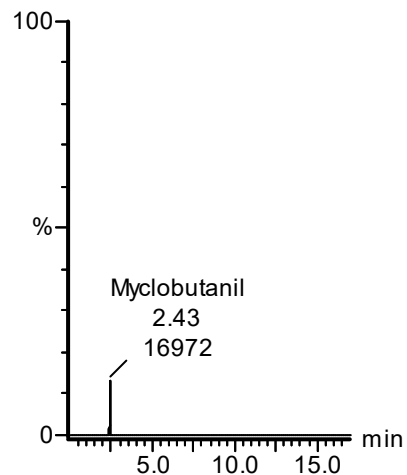
201130_13
M1MYC-W3 20ml



水和剤 3 日後

(20mL/2 μ L/1g)

201130_14
M1MYC-W7 20ml

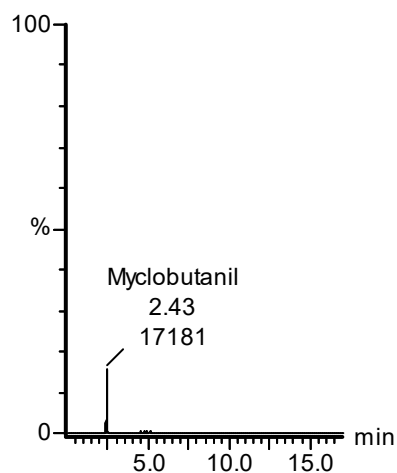


水和剤 7 日後

図 4-2. 日植防茨城試料のクロマトグラム

(20mL/2 μ L/1g)

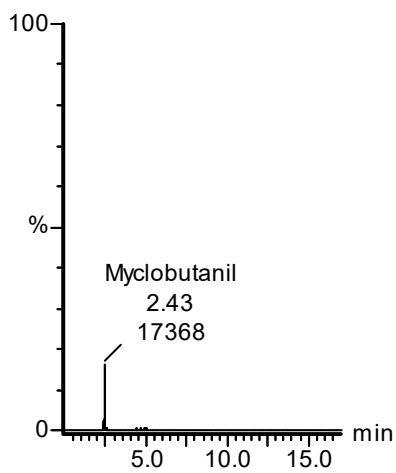
201103_39
MYC-E1 20mL



乳剤 1 日後

(20mL/2 μ L/1g)

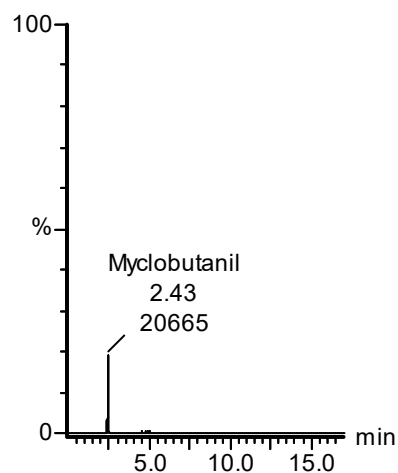
201103_40
MYC-E3 20mL



乳剤 3 日後

(20mL/2 μ L/1g)

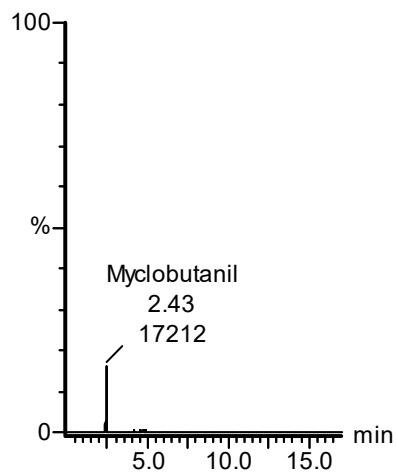
201103_41
MYC-E7 20mL



乳剤 7 日後

(20mL/2μL/1g)

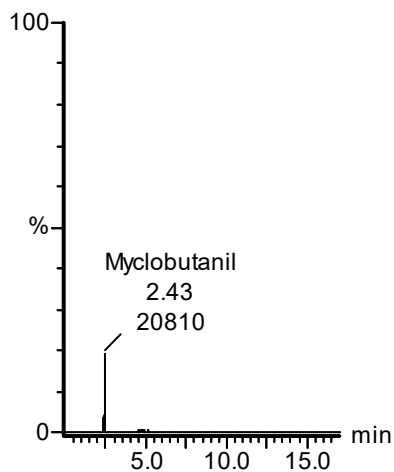
201103_34
MYC-W1 20mL



水和剤 1 日後

(20mL/2μL/1g)

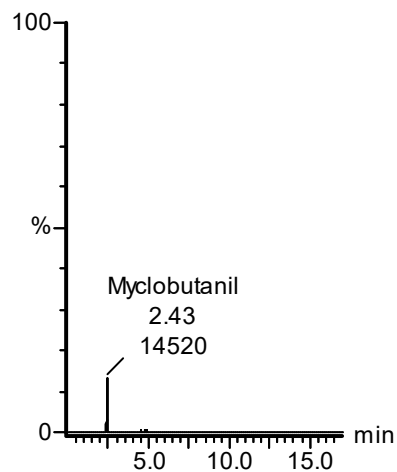
201103_35
MYC-W3 20mL



水和剤 3 日後

(20mL/2μL/1g)

201103_36
MYC-W7 20mL

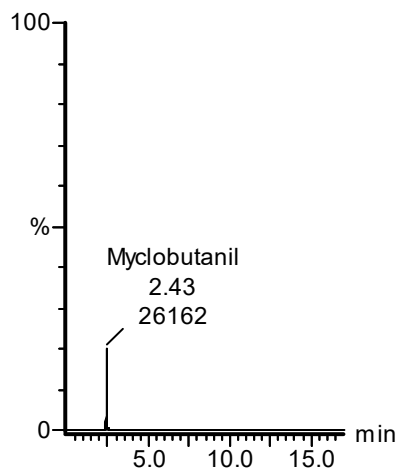


水和剤 7 日後

図 4-3. 日植防高知試料のクロマトグラム

(20mL/2μL/1g)

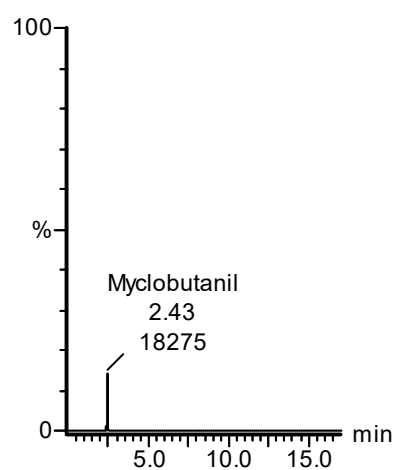
201110_27
M3MYC-E1 20mL



乳剤 1 日後

(20mL/2μL/1g)

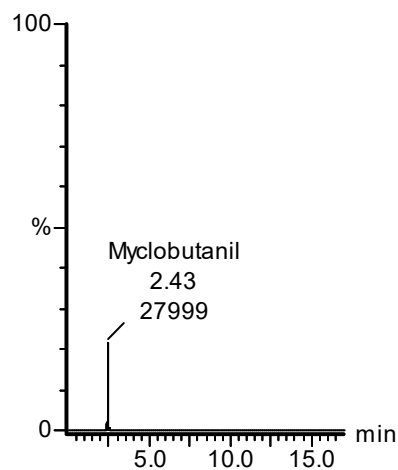
201110_28
M3MYC-E3 20mL



乳剤 3 日後

(20mL/2μL/1g)

201110_29
M3MYC-E7 20mL



乳剤 7 日後

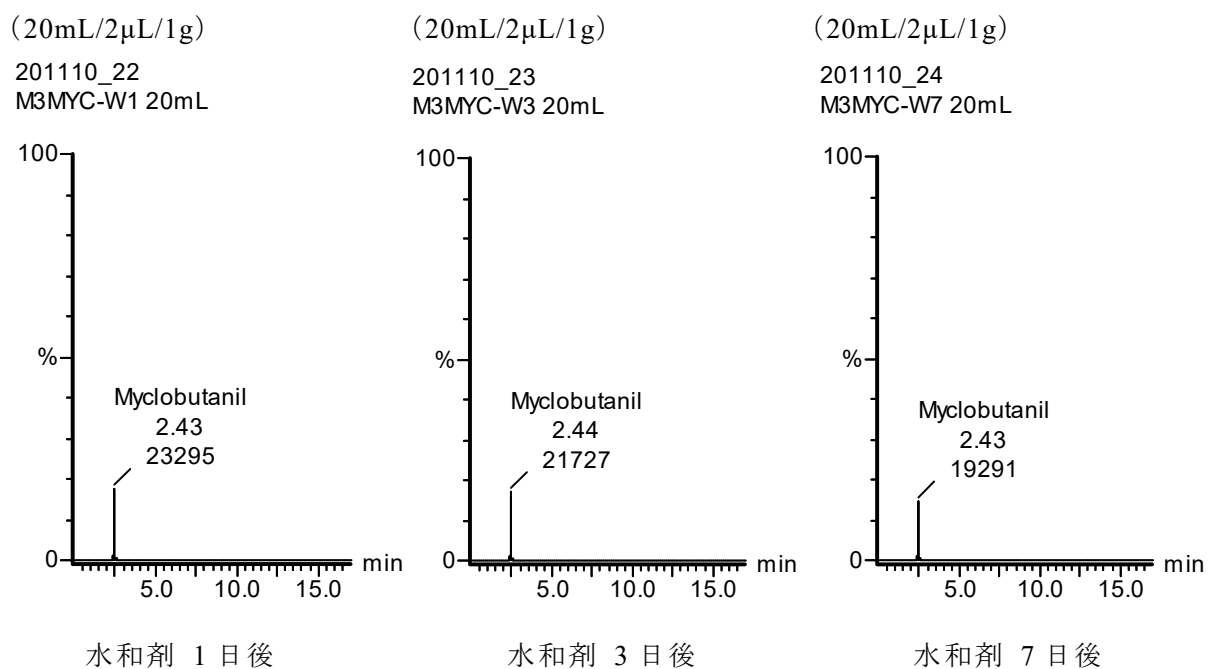


図 4-4. 日植防宮崎試料のクロマトグラム

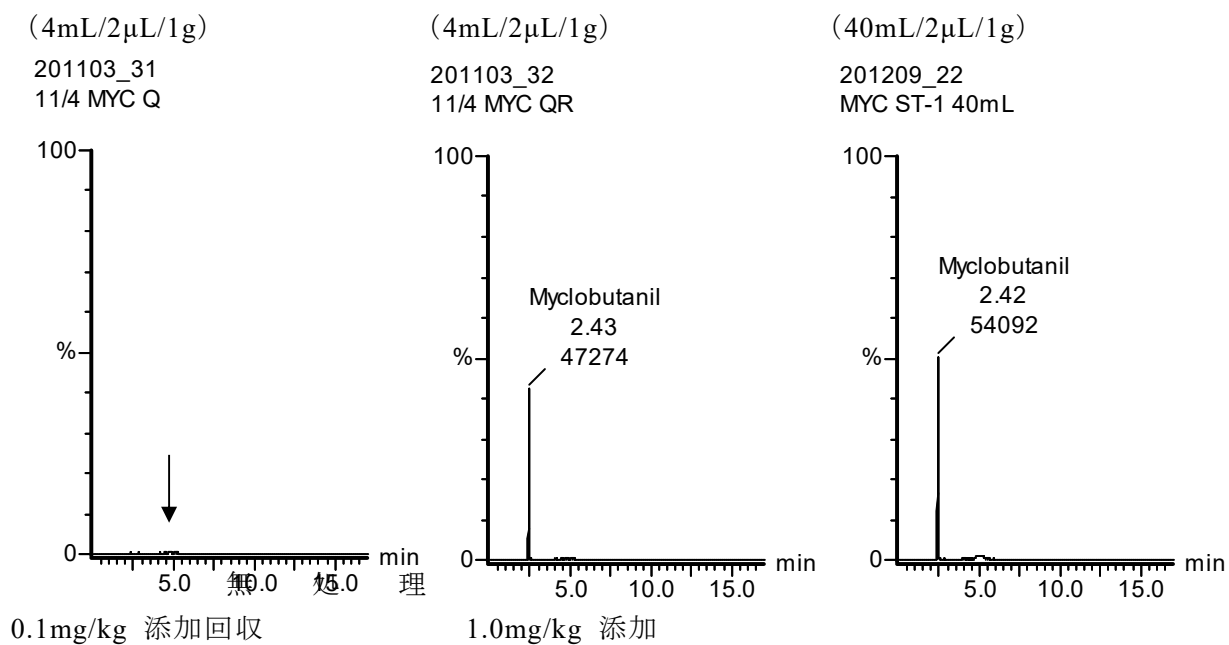


図 5. 内部精度管理のクロマトグラム

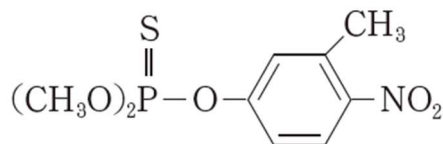
図 6. 保存安定性試料
のクロマトグラム

② MEP

1. 分析対象物質

MEP

化学構造式：



化学名：O,O-dimethyl O-4-nitro-m-tolyl phosphorothioate

化学式：C₉H₁₂NO₅PS

分子量：277.2

性状：淡黄色澄明な液体，わずかに特異なにおい

融点：常温で液体

蒸気圧：1.57×10⁻³ Pa (25℃)

オクタノール／水分配係数：log Pow=3.43 (20℃)

溶解性：水 19.0 mg/L，ヘキサン 25 g/L，イソプロパノール 146 g/L，
その他の有機溶剤に易溶（以上 20℃）

安定性：熱；室温で安定（150～190℃で酸素と反応）

加水分解性半減期；57 日（pH 7.1，30℃）水中光分解半減期；1.1 日
（河川水）

出典：農薬ハンドブック 2016 年版

2. 標準品及び試薬

MEP 標準品：純度 99.3%（富士フイルム和光純薬製）

アセトン，ヘキサン，ジエチルエーテル：残留農薬試験用（関東化学製）

塩化ナトリウム：特級（関東化学製）

水：ピュアライト PRA-0015-0V1（オルガノ製）及びピューリック ZII（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 5mL 容（ジューエルサイエンス製）

フロリジルミニカラム：Sep-Pak FL plus long cartridge 910mg（waters 製）

グラファイトカーボンミニカラム：Supelclean ENVI-Carb SPE Tube 250mg/6mL
（シグマ アルドリッチ製）

濾紙：No.5A（桐山製作所製）

ガラス繊維濾紙：GFP（桐山製作所製）

3. 装置及び機器

電子天秤：XSR205，XS4002S，PG2002（メトラー・トレド製），S-BOX WP（イシダ製）

ミキサー：クイジナート DLC-NXJ2（クイジナート製），グラインドミックス GM200（Retche 製）

振とう機：EL-01（スギヤマゲン製）

減圧濃縮器：R-134（柴田科学器械工業製）

ガスクロマトグラフ (GC) : HP6890 (アジレント・テクノロジー製)
データ処理ソフトウェア : ChemStation (アジレント・テクノロジー製)

4. ガスクロマトグラフの操作条件

検出器 : FPD

カラム : RESTEK-5 (RESTEK 製)

内径 0.53mm, 長さ 15m, 膜厚 1.5 μ m

ガス流量 (ヘリウム) : 2 mL/min

カラム温度 : カラム槽温度 ; 100 $^{\circ}$ C \rightarrow 25 $^{\circ}$ C/分 \rightarrow 220 $^{\circ}$ C(2.2 分) \rightarrow 30 $^{\circ}$ C/分 \rightarrow 250 $^{\circ}$ C(1 分)

注入口温度 : 200 $^{\circ}$ C

検出器温度 : 250 $^{\circ}$ C

注入方式 : パルスドスプリットレス

注入量 : 2 μ L

保持時間 : 約 5.2 分

5. 検量線の作成

MEP 標準品 20.1mg を精秤後アセトンで溶解し, 20mL 定容とし 1000mg/L 標準原液を調製した。この原液をアセトンで希釈して 40mg/L 標準溶液を調製し, さらにこの標準溶液をアセトンで順次希釈して 0.0125, 0.025, 0.05, 0.25 及び 0.5mg/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 MEP 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, へたを除去し冷凍庫 (-20 $^{\circ}$ C設定) に保管した。分析直前にミキサーを用いて全量を磨砕均一化した。

6.2. 抽出

磨砕均一化した試料 20g をはかりとり, アセトン 100mL を加え振とう機を用い 30 分間振とう抽出した。抽出物を濾紙とガラス繊維濾紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過した後, 残渣をアセトン 50mL で洗い同様にろ過した。ろ液を合わせ, アセトンで 200mL に定容した。この 50mL (試料 5g 相当量) を取り, 40 $^{\circ}$ C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

濃縮液に水を加え約 4g に調整後, 塩化ナトリウムを 0.5g 加え振り混ぜた。この液を多孔性ケイソウ土カラムに流下し 5 分間放置後, ヘキサン 10mL で容器内を洗い込みカラムに流下した。さらに, ヘキサン 20mL で同様の操作を繰り返し, 全流出液を合わせ取り溶出液とした。溶出液を 40 $^{\circ}$ 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. 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 5mL を流下し前処理をした。残留物をヘキサン 5mL で溶解しミニカラムに流下し，流出液は捨てた。次に，ヘキサン 5mL で容器内を洗い込みカラムに流下し，流出液は捨てた。次に，ジエチルエーテル／ヘキサン（50:50, v/v）10mL で容器内を洗い込みミニカラムに流下し，MEP を溶出した。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。

6.5. 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アセトン 5mL，ヘキサン 10mL を順次流下し前処理をした。残留物をヘキサン／アセトン（80:20,v/v）10mL で溶解しミニカラムに流下した。次に，同混液 10mL で容器内を洗い込み流下した。同様の操作を 2 回繰り返し行い，全流出液を合わせ溶出液とした。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。

6.6. 定量

残留物を適量のアセトンで溶解し，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 MEP の重量を求めて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)
0.05	5	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)
0.025	5	2	2	0.005

8. 回収率

分析法確認のため，日植防高知の無処理試料を用いて定量限界相量（0.01mg/kg），1.0mg/kg 及び 4.0mg/kg の添加濃度における回収試験を 5 連分析で実施した。回収率の算出結果を示す。

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
日植防 高知	4.0	76,	75,	75,	74,	73	75	1
	1.0	98,	98,	97,	97,	94	97	2
	0.01	110,	110,	110,	100,	90	104	9

9. 試料分析結果

試料調製場所	経過日数	分析値(mg/kg)	
		乳剤	水和剤
日植防茨城	散布前	<0.01	
	散布 1 日後	0.96	1.21
	散布 3 日後	0.80	0.90
	散布 7 日後	0.56	0.67
日植防高知	散布前	<0.01	
	散布 1 日後	1.64	1.63
	散布 3 日後	1.35	1.66
	散布 7 日後	1.34	1.57
日植防宮崎	散布前	<0.01	
	散布 1 日後	1.03	0.93
	散布 3 日後	1.02	0.62
	散布 7 日後	0.93	0.57

試験区試料の分析は 1 連で実施

10. 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：各調製場所の実試料分析と保存安定性試験を行うごとに、各 1 検体の無処理試料及び MEP 0.1mg/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 2019 年 6 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）における結果は良好であった。

分析日 (抽出日)	回収率 (%)	無処理試料 の分析値 (mg/kg)	使用した 無処理試料	対象試料
2020/10/28	101	< 0.01	日植防高知	日植防高知
10/29	101	< 0.01	日植防高知	日植防宮崎
11/ 5	90	< 0.01	日植防高知	日植防高知
11/16	107	< 0.01	日植防高知	日植防宮崎
11/30	99	< 0.01	日植防高知	日植防茨城
12/ 4	97	< 0.01	日植防高知	保存安定性試料

11. 保存安定性確認

磨砕均一化した無処理試料（日植防高知）に MEP を添加し，冷凍暗所（-20℃設定）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。

添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
1.0	87(2020/9/8－2020/12/4)	89 , 86	88

実試料最長保存日数：日植防茨城 19 日間，日植防高知 56 日間，日植防宮崎 53 日間

12. 参考添付図

各クロマトグラムの一例を示す。

図 1. MEP 標準品のクロマトグラム

図 2. 全操作試薬ブランクのクロマトグラム

図 3. 回収率のクロマトグラム

図 4-1. 散布前試料のクロマトグラム

4-2. 日植防茨城試料のクロマトグラム

4-3. 日植防高知試料のクロマトグラム

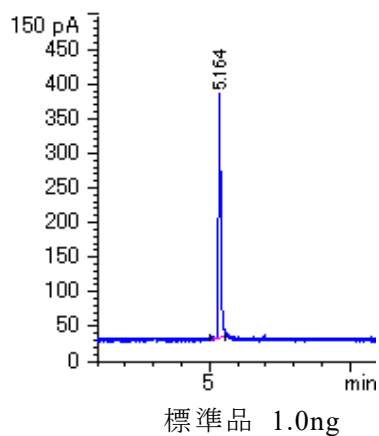
4-4. 日植防宮崎試料のクロマトグラム

図 5. 内部精度管理のクロマトグラム

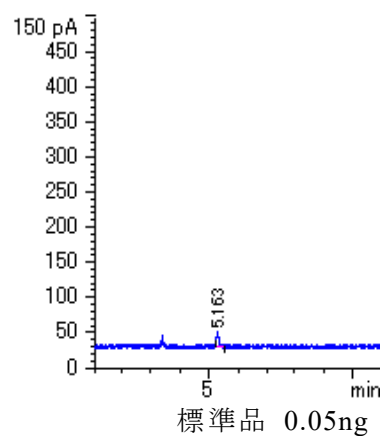
図 6. 保存安定性試料のクロマトグラム



(- / 2 μ L / -)



(- / 2 μ L / -)



(2mL / 2 μ L / -)

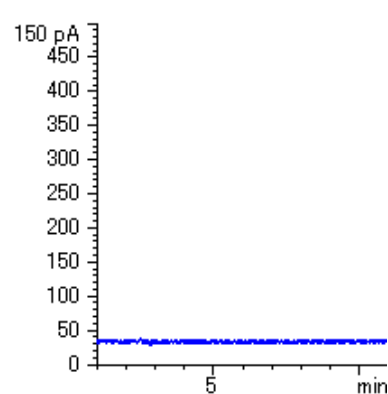
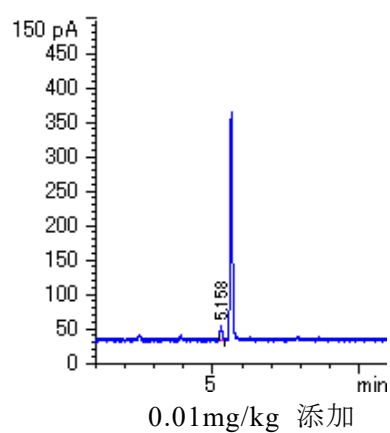


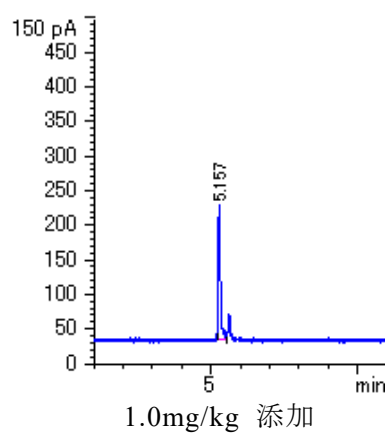
図 1. MEP 標準品のクロマトグラム

図 2. 全操作試薬ブランク
のクロマトグラム

(2mL / 2 μ L / 5g)



(20mL / 2 μ L / 5g)



(80mL / 2 μ L / 5g)

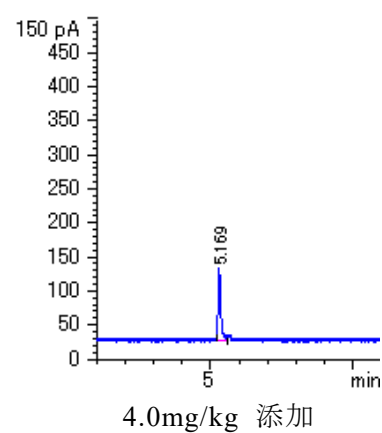


図 3. 回収率のクロマトグラム

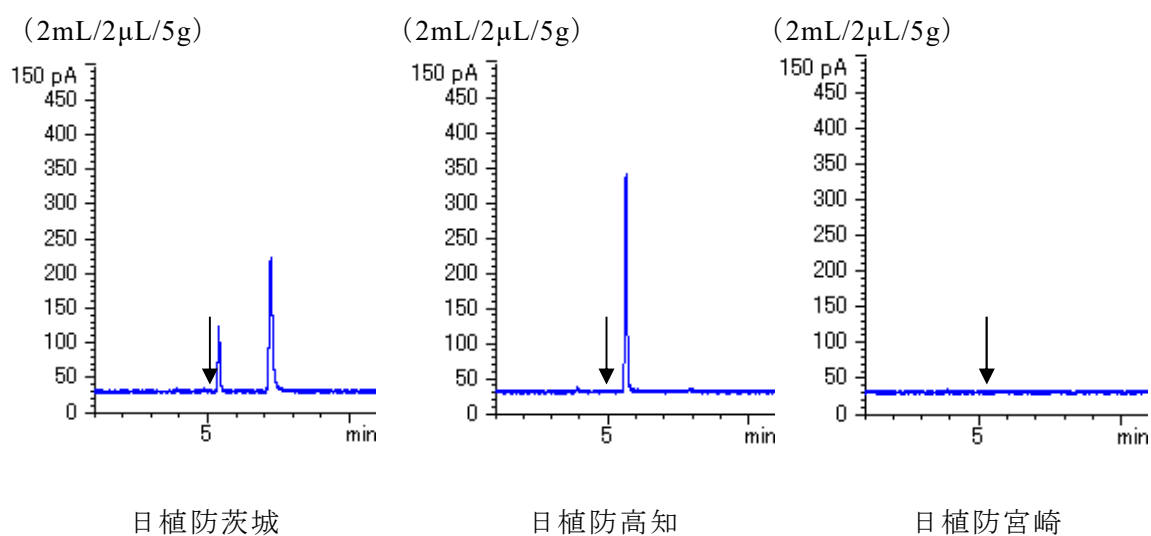


図 4-1. 散布前試料のクロマトグラム

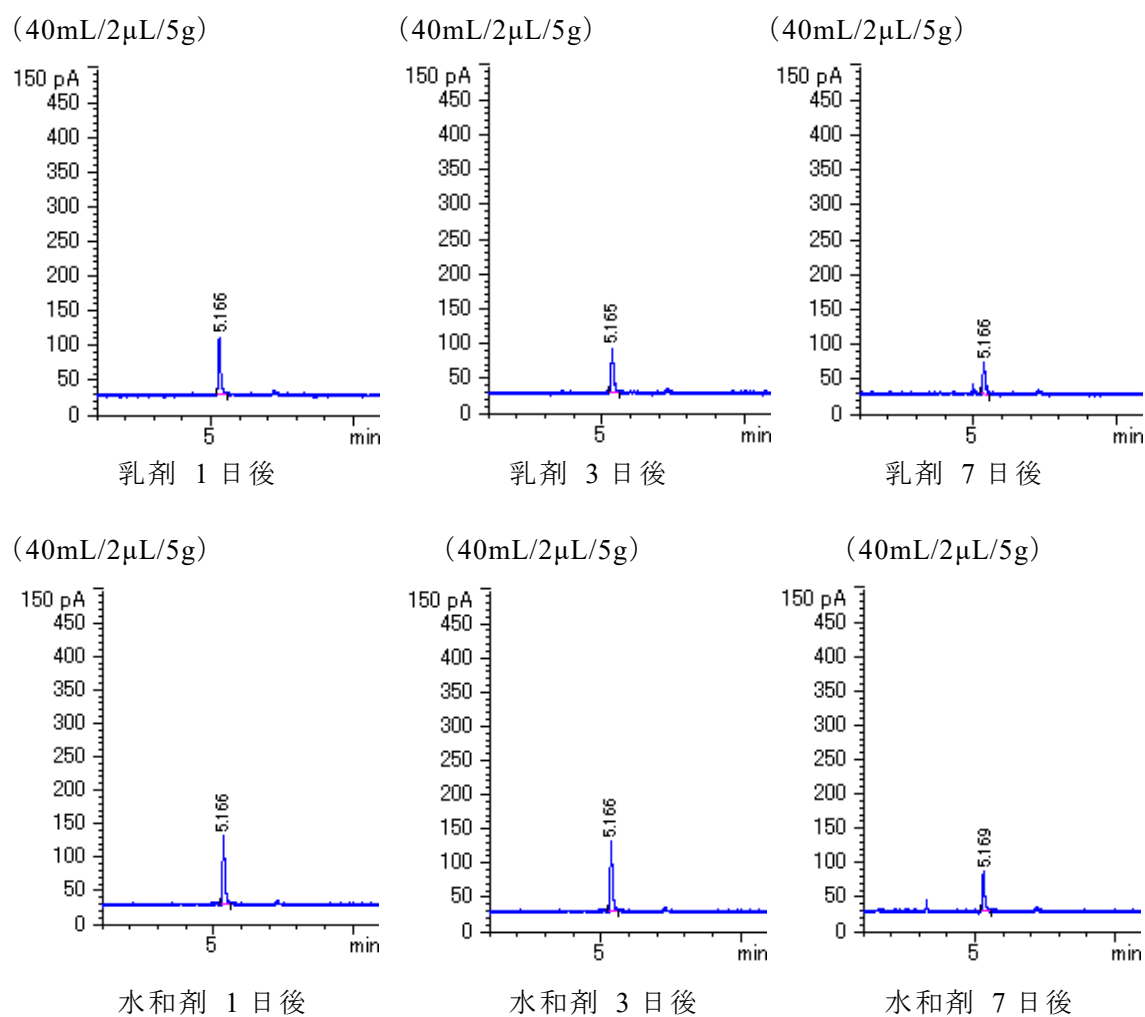


図 4-2. 日植防茨城試料のクロマトグラム

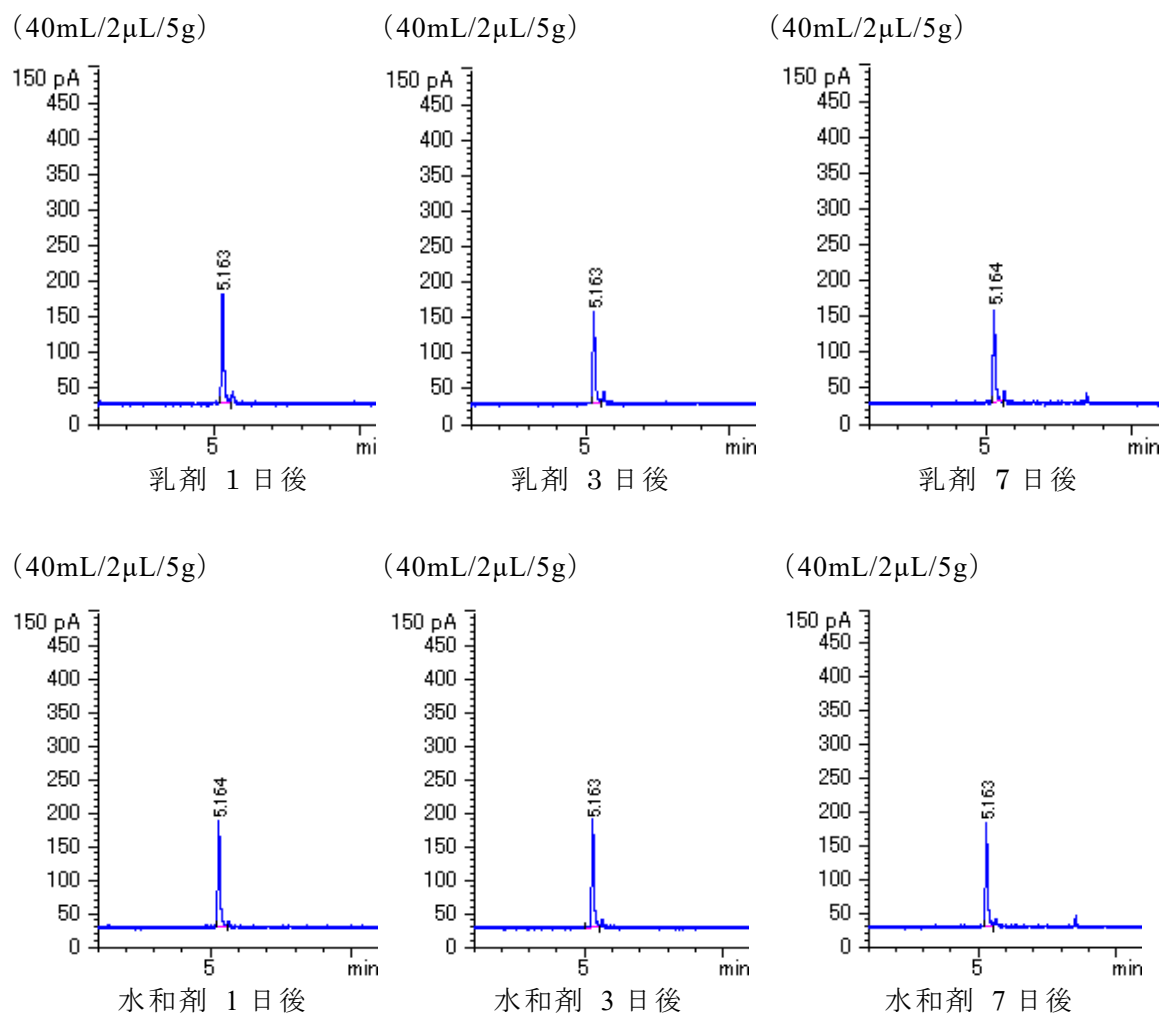
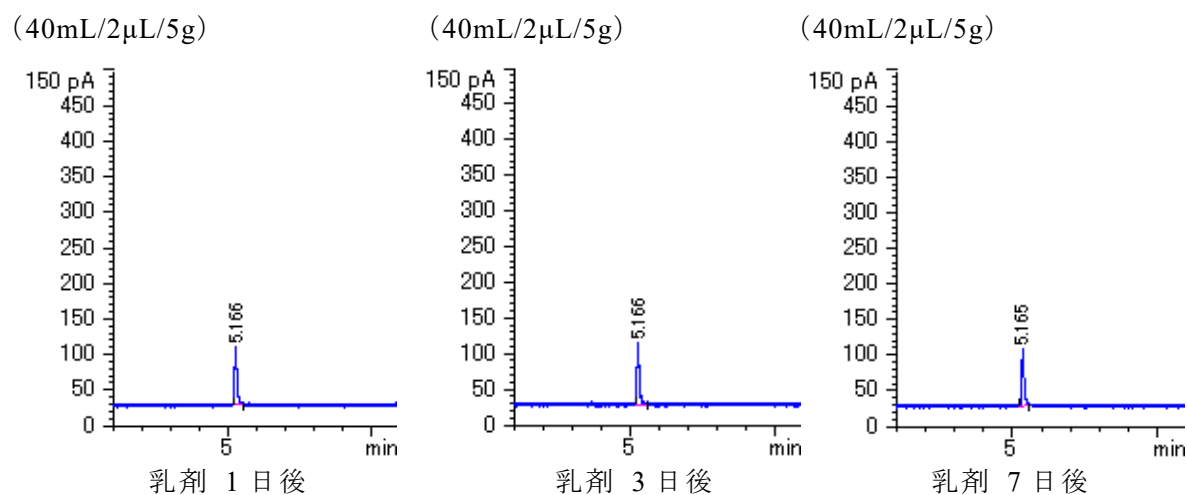


図 4-3. 日植防高知試料のクロマトグラム



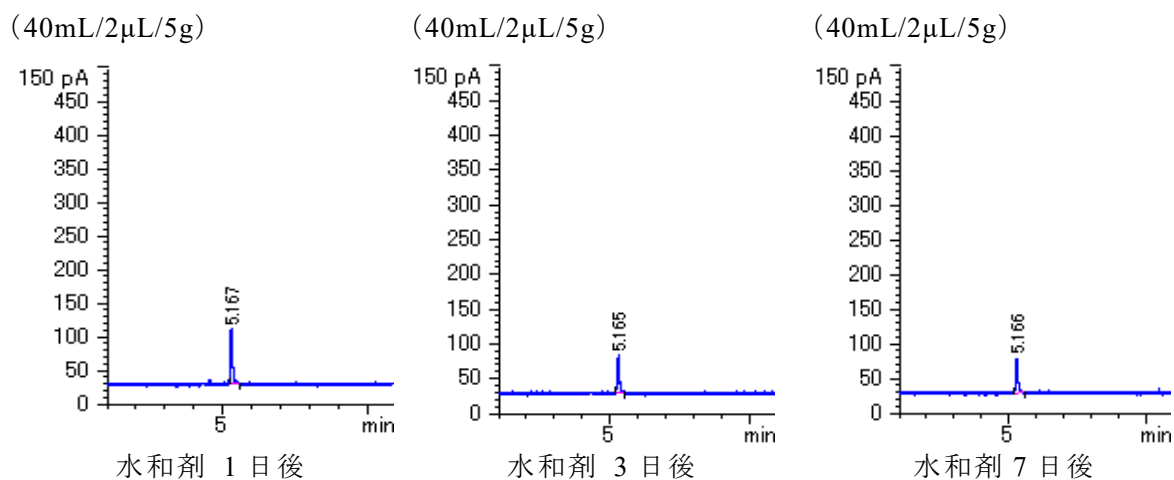


図 4-4. 日植防宮崎試料のクロマトグラム

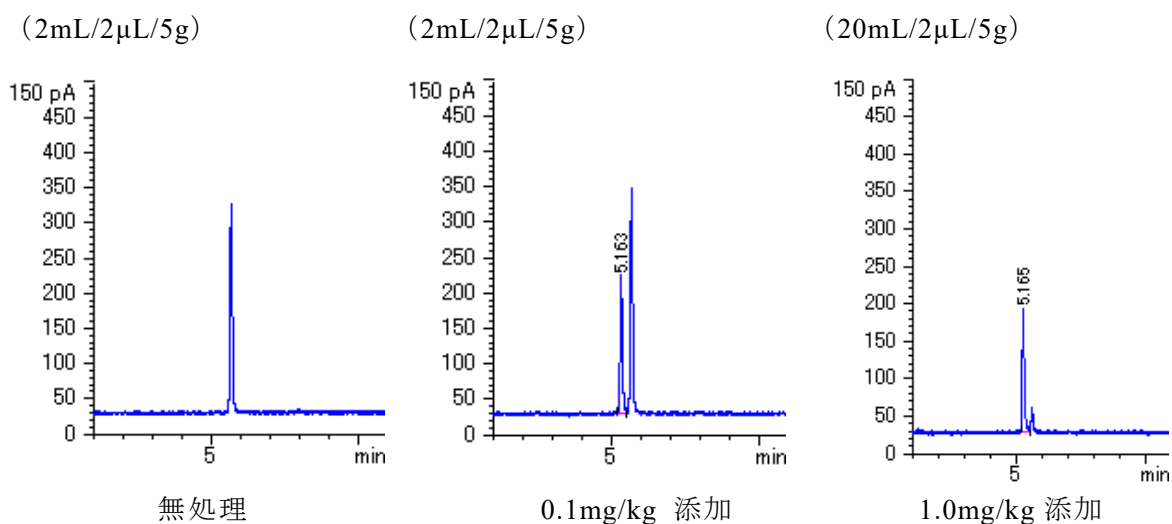


図 5. 精度管理のクロマトグラム

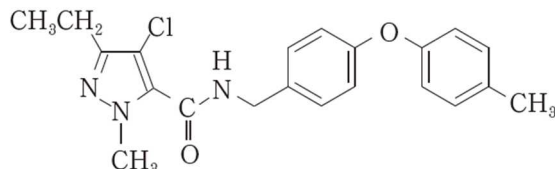
図 6. 保存安定性試料
のクロマトグラム

③ トルフェンピラド

1. 分析対象物質

トルフェンピラド

化学構造式：



化学名：4-chloro-3-ethyl-1-methyl-N- [4-(*p*-tolylloxy)benzyl] pyrazole-5-carboxamide

化学式：C₂₁H₂₂ClN₃O₂

分子量：383.9

性状：類白色粉末，無臭

融点：87.8～88.2℃

蒸気圧：5×10⁻⁷ Pa (20℃)

オクタノール／水分配係数：log Pow=5.61 (25℃)

溶解性：水 0.087 mg/L, n-ヘキサン 7.41 g/L, トルエン 366 g/L, メタノール 59.6 g/L, ジクロロメタン >500 g/L, アセトン 368 g/L, 酢酸エチル 339 g/L (以上 25℃)

安定性：熱；安定，加水分解性半減期 (25℃) ;1 年以上 (pH 4, pH 7, pH 9)
水中光分解性半減期 (25℃) ;11.4 日 (蒸留水，太陽光)，11.3 日 (自然水，太陽光)

出典：農薬ハンドブック 2016 年版

2. 標準品及び試薬

トルフェンピラド標準品：純度 99.8% (関東化学製)

アセトン，ヘキサン，酢酸エチル，ジエチルエーテル：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)

塩化ナトリウム：特級 (関東化学製)

1mol/L 酢酸アンモニウム：高速液体クロマト用 (関東化学製)

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

フロリジルミニカラム：Sep-Pak FL plus long cartridge 910mg (waters 製)

グラファイトカーボンミニカラム：Supelclean ENVI-Carb SPE Tube 250mg/6mL
(シグマ アルドリッチ製)

濾紙：No.5A (桐山製作所製)

ガラス繊維濾紙：GFP (桐山製作所製)

3. 装置及び機器

電子天秤：XSR205, XS4002S, PG2002 (メトラー・トレド製), S-BOX WP (イシダ製)

ミキサー：クイジナート DLC-NXJ2(クイジナート製), グラインドミックス GM200(Retche 製)

振とう機：EL-01(スギヤマゲン製)

減圧濃縮器：R-134(柴田科学器械工業製)

液体クロマトグラフ／タンデム型質量分析計(LC-MS/MS)：Xevo TQ-S micro (Waters 製)

データ処理ソフトウェア：MassLynx (Waters 製)

4. 測定機器の操作条件

4.1. 液体クロマトグラフの操作条件

カラム：ACQUITY UPLC HSS T3 (waters 製)

径 2.1mm, 長さ 100mm, 粒径 1.8 μ m

溶離液：A 液 2mM 酢酸アンモニウム水溶液

B 液 2mM 酢酸アンモニウム含有メタノール溶液

[グラジエントテーブル]

時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
0	30	70
3	5	95
9.5	5	95
10.5	30	70

流量：0.3 mL/min

カラム温度：40°C

注入量：2 μ L

保持時間：約 4.3 分

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

コーンガス流量：50 L/h (N₂)

脱溶媒ガス流量：1000L/h (N₂)

ソースブロック温度：150°C

キャピラリー電圧：1.0kV

コーン電圧：58V

コリジョン電圧：26V

イオン抽出方法：MRM 法

モニタリングイオン：プリカーサーイオン；m/z 384.24

プロダクトイオン；m/z 197.06

5. 検量線の作成

トルフェンピラド標準品 20.0mg を精秤後アセトンで溶解し, 20mL 定容とし 1000mg/L 標準原液を調製した。この原液をアセトンで希釈して 40mg/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順次希釈して 0.00025, 0.0005, 0.001, 0.005 及び 0.01mg/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／タンデム型質量分析計に注入し，データ処理装置を用いてトルフェンピラド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，へたを除去し冷凍庫 (-20℃設定) に保管した。分析直前にミキサーを用いて全量を磨砕均一化した。

6.2. 抽出

磨砕均一化した試料 20g をはかりとり，アセトン 100mL を加え振とう機を用い 30 分間振とう抽出した。抽出物を濾紙とガラス繊維濾紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過した後，残渣をアセトン 50mL で洗い同様にろ過した。ろ液を合わせ，アセトンで 200mL に定容した。この 10mL (試料 1g 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

濃縮液に水を加え約 4g に調整後，塩化ナトリウムを 0.5g 加え振り混ぜた。この液を多孔性ケイソウ土カラムに流下し 5 分間放置後，酢酸エチル 20mL で容器内を洗い込みカラムに流下した。さらに，酢酸エチル 20mL で同様の操作を繰り返し，全流出液を合わせ取り溶出液とした。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

フロリジルミニカラムにヘキサン 5mL を流下し前処理をした。残留物をヘキサン 5mL で溶解しミニカラムに流下し，流出液は捨てた。次に，ヘキサン 5mL で容器内を洗い込みカラムに流下し，流出液は捨てた。次に，ジエチルエーテル／ヘキサン (50:50, v/v) 10mL で容器内を洗い込みミニカラムに流下した。次に，アセトン／ヘキサン (50:50, v/v) 10mL を流下し，全流出液を合わせ取り溶出液とした。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。

6.5. 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アセトン 5mL，ヘキサン 10mL を順次流下し前処理をした。残留物をヘキサン／アセトン (80:20, v/v) 10mL で溶解しミニカラムに流下した。次に，同混液 10mL で容器内を洗い込み流下した。同様の操作を 2 回繰り返し行い，全流出液を合わせ溶出液とした。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。

6.6. 定量

残留物を適量のメタノールで溶解し、前記条件の液体クロマトグラフ／タンデム型質量分析計に注入してピーク面積を求め、検量線よりトルフェンピラドの重量を求めて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)
0.001	1	20	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)
0.0005	1	20	2	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、日植防高知の無処理試料を用いて、定量限界相当（0.01mg/kg）及び 1mg/kg 添加濃度における回収試験を 5 連分析で実施した。回収率の算出結果を示す。

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
日植防 高知	1.0	94,	93,	90,	89,	89	91	3
	0.01	80,	80,	80,	80,	80	80	0

9. 試料分析結果

試料調製場所	経過日数	分析値 (mg/kg)	
		乳剤	フロアブル
日植防茨城	散布前	<0.01	
	散布 1 日後	0.43	0.58
	散布 3 日	0.51	0.54
	〃 散布 7 日	0.41	0.72
	〃		
日植防高知	散布前	<0.01	
	散布 1 日後	0.39	0.40
	散布 3 日	0.37	0.34
	〃 散布 7 日	0.37	0.30
	〃		

	散布前	<0.01	
日植防宮崎	散布 1 日後	0.57	0.55
	散布 3 日	0.42	0.58
	散布 7 日	0.44	0.50

試験区試料の分析は 1 連で実施

10. 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：各調製場所の実試料分析と保存安定性試験を行うごとに、各 1 検体の無処理試料及びトルフェンピラド 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 2019 年 6 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）における結果は良好であった。

分析日 (抽出日)	回収率 (%)	無処理試料 の分析値 (mg/kg)	使用した 無処理試料	対象試料
2020/10/28	86	< 0.01	日植防高知	日植防高知
10/29	83	< 0.01	日植防高知	日植防宮崎
10/30	86	< 0.01	日植防高知	日植防高知
11/ 6	89	< 0.01	日植防高知	日植防宮崎
12/ 3	86	< 0.01	日植防高知	日植防茨城
12/ 4	99	< 0.01	日植防高知	保存安定性試料

11. 保存安定性確認

磨砕均一化した無処理試料（日植防高知）にトルフェンピラドを添加し、冷凍暗所（-20℃設定）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。

添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
1.0	87(2020/9/8－2020/12/4)	99, 93	96

実試料最長保存日数：日植防茨城 22 日間、日植防高知 50 日間、日植防宮崎 43 日間

12. 参考添付図

各クロマトグラムの一例を示す。

図 1. トルフェンピラド標準品のクロマトグラム

図 2. 全操作試薬ブランクのクロマトグラム

図 3. 回収率のクロマトグラム

図 4-1. 散布前試料のクロマトグラム

4-2. 日植防茨城試料のクロマトグラム

4-3. 日植防高知試料のクロマトグラム

4-4. 日植防宮崎試料のクロマトグラム

図 5. 内部精度管理のクロマトグラム

図 6. 保存安定性試料のクロマトグラム

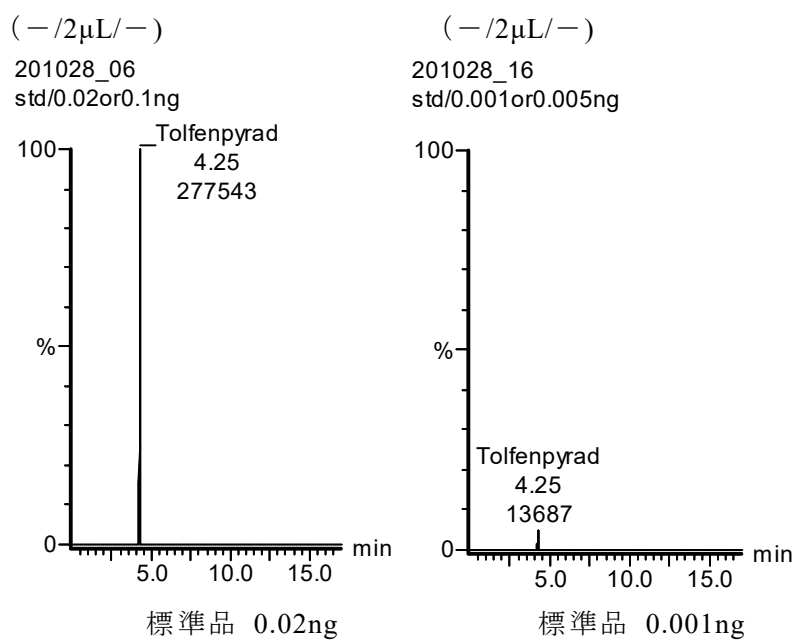


図 1.トルフェンピラド標準品のクロマトグラム

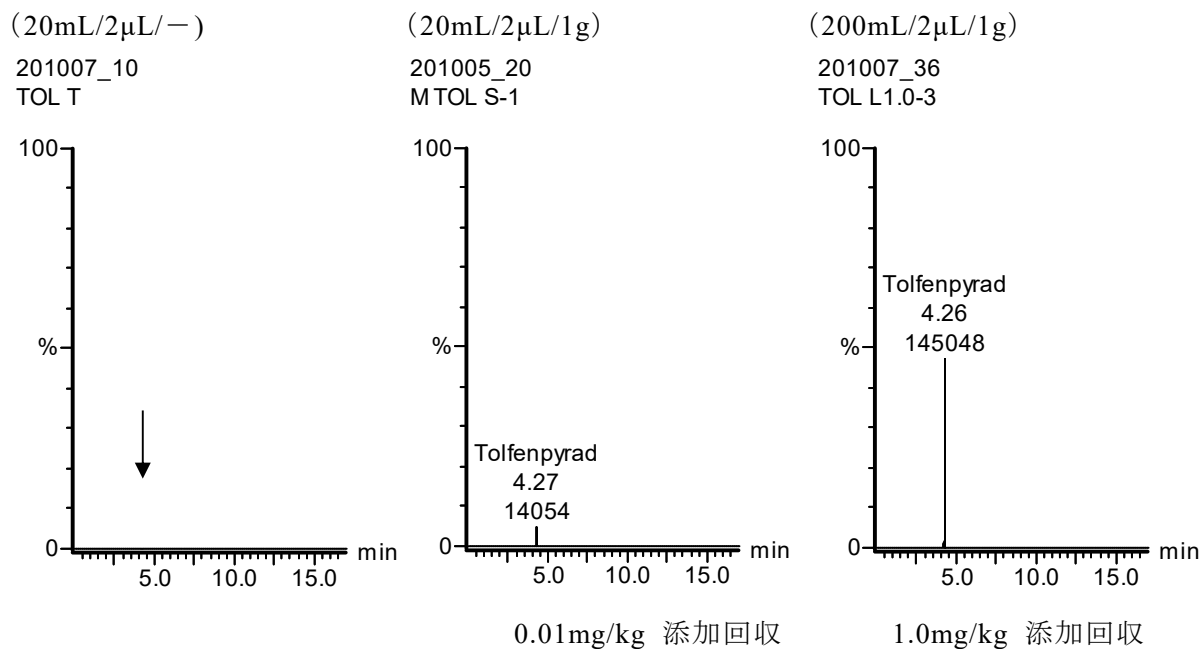
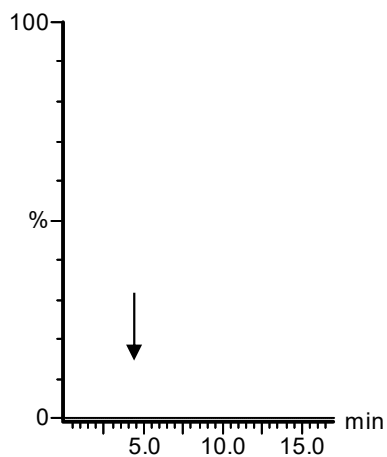


図 2. 全操作試薬ブランク
のクロマトグラム

図 3. 回収率のクロマトグラム

(20mL/2 μ L/1g)

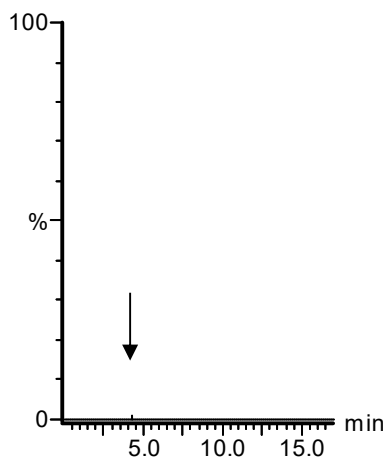
201209_09
M1TOL-B



日植防茨城

(20mL/2 μ L/1g)

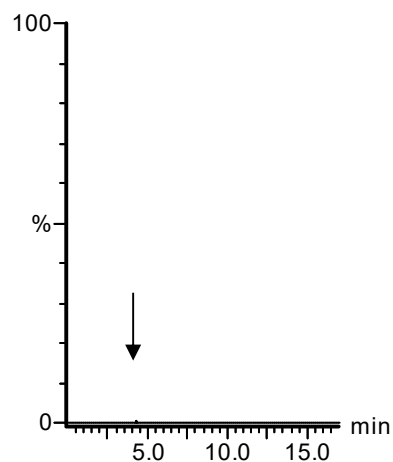
201028_13
M2 TOL-B



日植防高知

(20mL/2 μ L/1g)

201029_13
M3 TOL-B

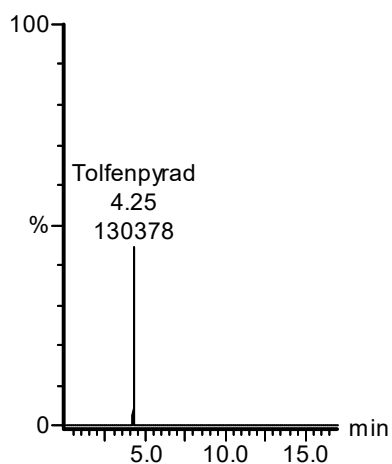


日植防宮崎

図 4-1. 散布前試料のクロマトグラム

(100mL/2 μ L/1g)

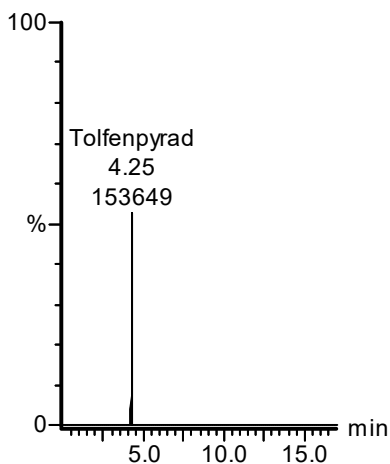
201209_16
M1TOL-E1 100mL



乳剤 1 日後

(100mL/2 μ L/1g)

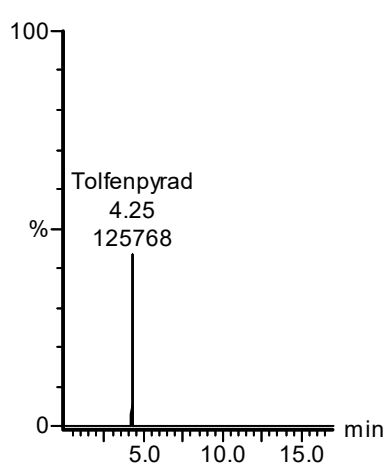
201209_17
M1TOL-E3 100mL



乳剤 3 日後

(100mL/2 μ L/1g)

201209_18
M1TOL-E7 100mL



乳剤 7 日後

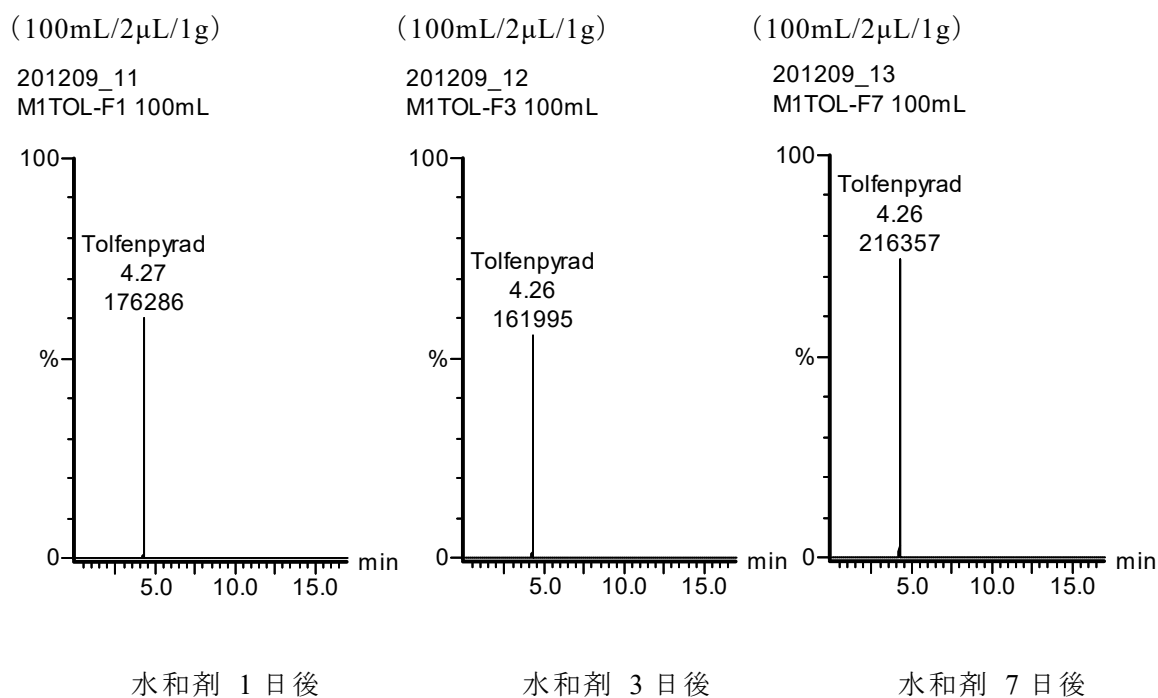
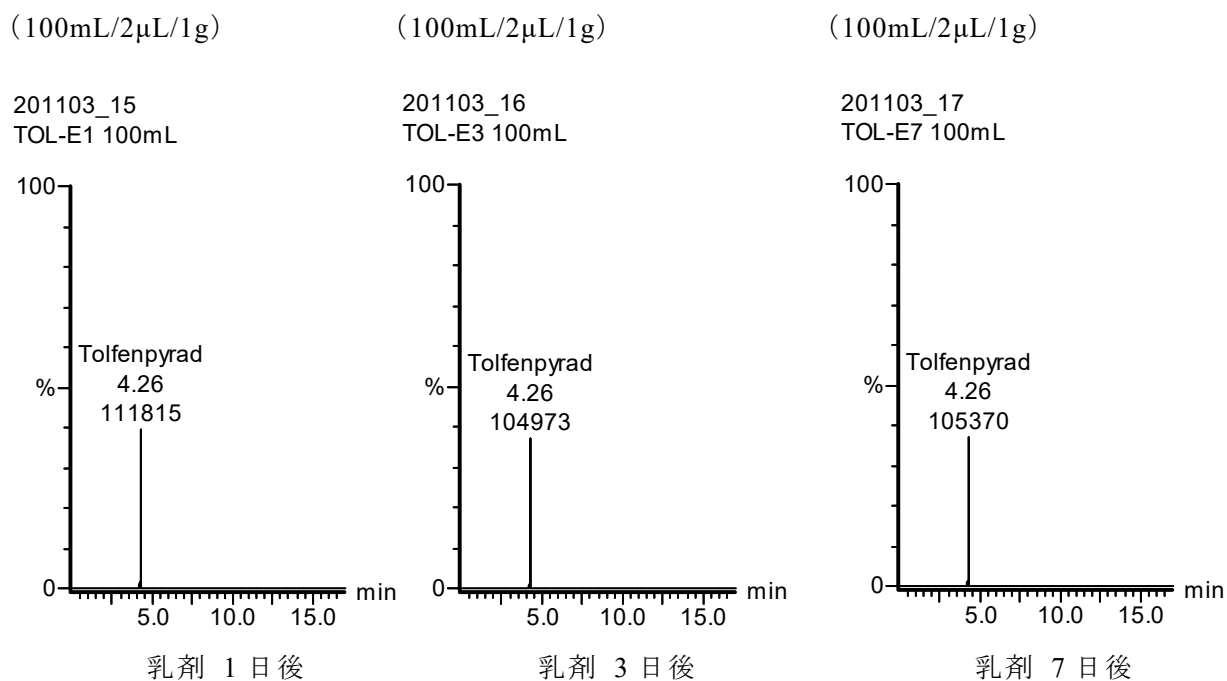
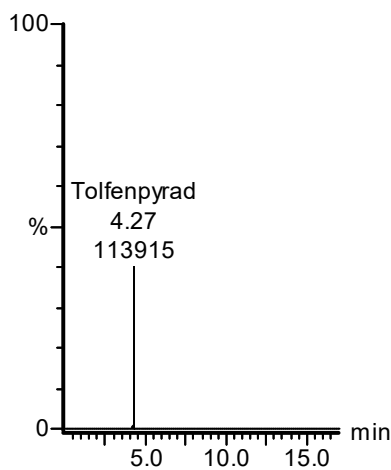


図 4-2. 日植防茨城試料のクロマトグラム



(100mL/2μL/1g)

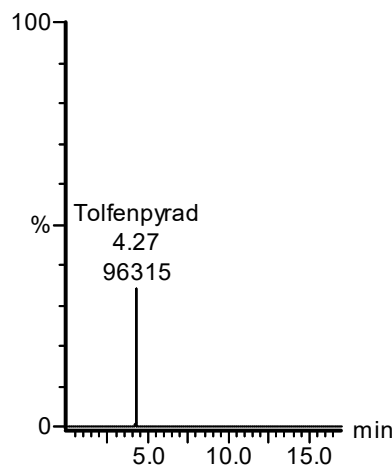
201103_10
TOL-F1 100mL



水和剤 1 日後

(100mL/2μL/1g)

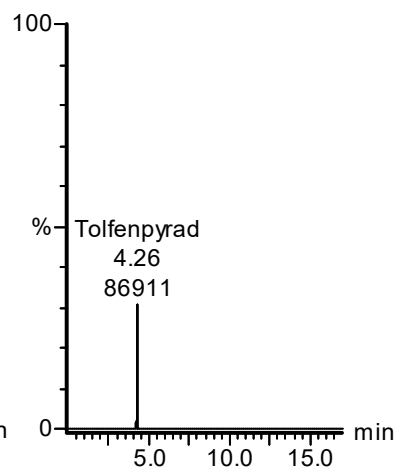
201103_11
TOL-F3 100mL



水和剤 3 日後

(100mL/2μL/1g)

201103_12
TOL-F7 100mL

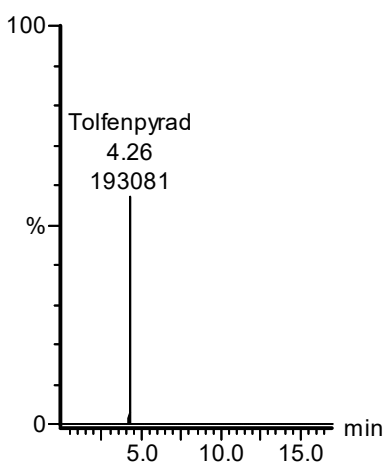


水和剤 7 日後

図 4-3. 日植防高知試料のクロマトグラム

(100mL/2μL/1g)

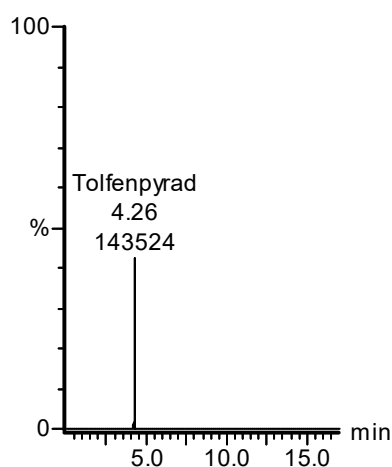
201106_16
M3 TOL-E1



乳剤 1 日後

(100mL/2μL/1g)

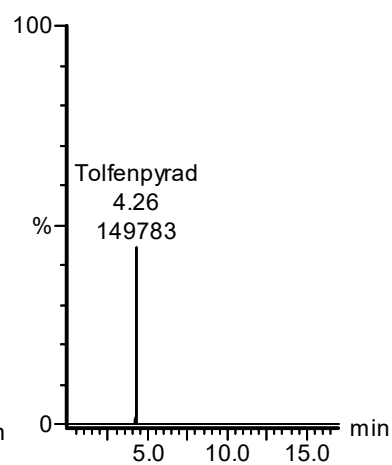
201106_17
M3 TOL-E3



乳剤 3 日後

(100mL/2μL/1g)

201106_18
M3 TOL-E7



乳剤 7 日後

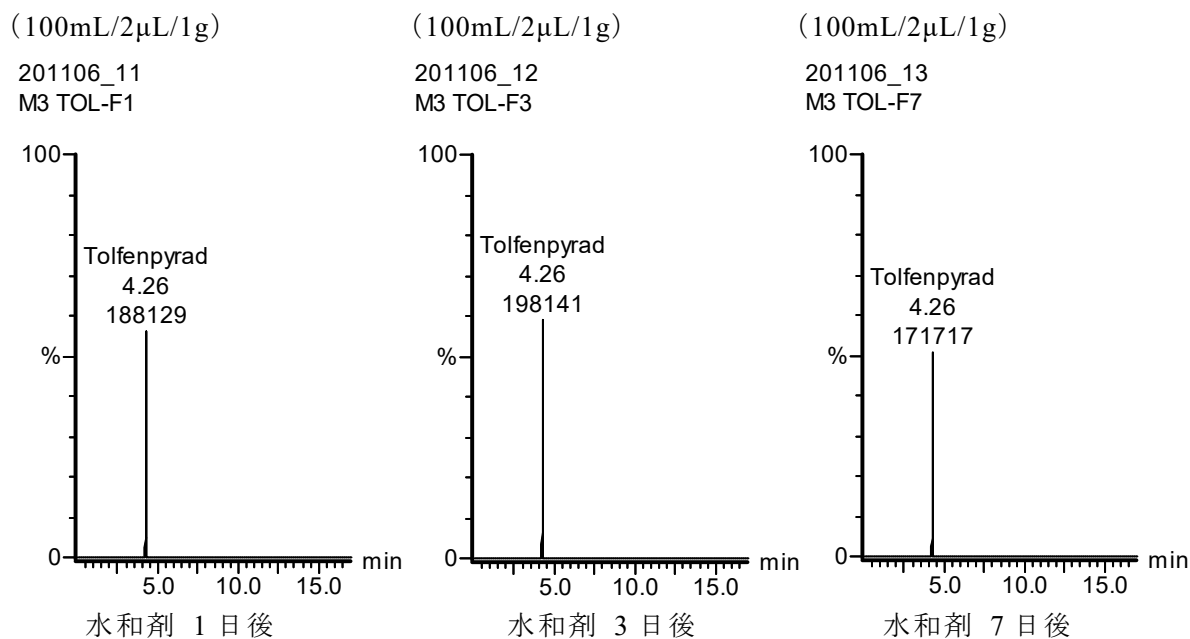


図 4-4. 日植防宮崎試料のクロマトグラム

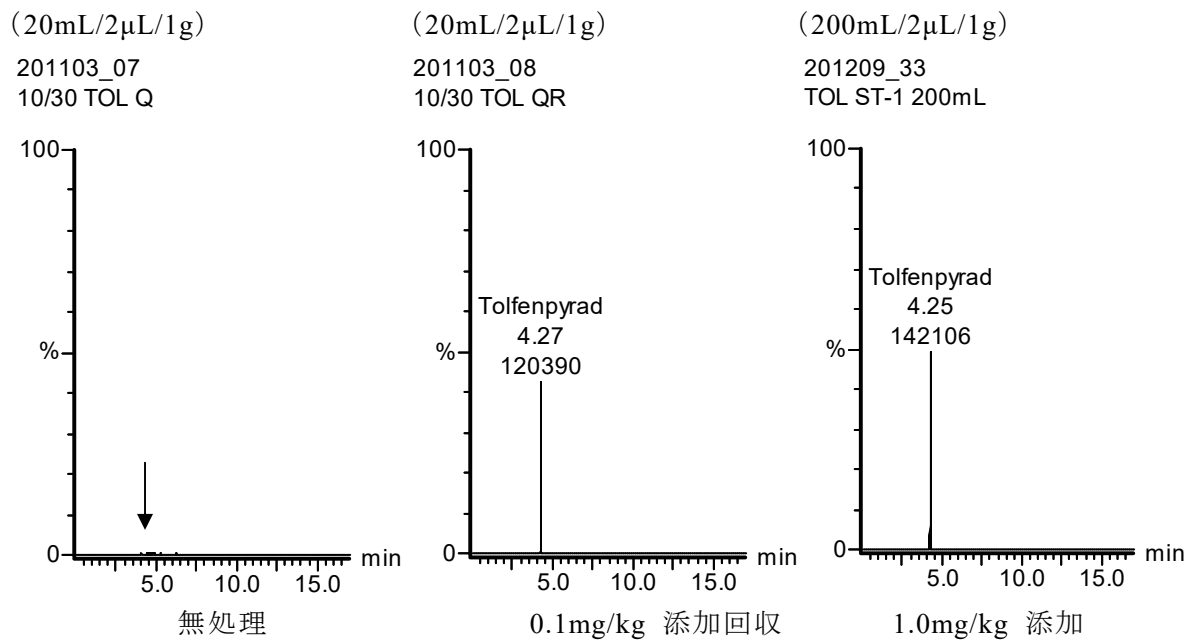


図 5. 内部精度管理のクロマトグラム

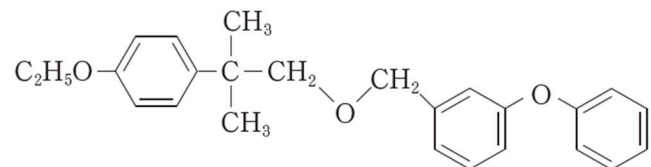
図 6. 保存安定性試料のクロマトグラム

④ エトフェンプロックス

1. 分析対象物質

エトフェンプロックス

化学構造式：



化学名：2-(4-ethoxyphenyl)-2-methylpropyl 3-phenoxybenzyl ether

化学式：C₂₅H₂₈O₃

分子量：376.5

性状：白色結晶，僅かに芳香臭

融点：37.4±0.1℃

蒸気圧：8.13×10⁻⁷ Pa (25℃換算値)

オクタノール／水分配係数：log Pow=6.9 (20℃)

溶解性：水 22.5g/L，ヘキサン 667 g/L，トルエン 862 g/L，ジクロロメタン 924 g/L，アセトン 877 g/L，メタノール 49 g/L (以上 20℃)

安定性：熱；安定 加水分解性半減期；1 年以上 (pH5, pH 7, pH 9, 25℃)

水中光分解性半減期；4.7 日 (緩衝液, 25℃)，7.9 日 (自然水, 25℃)

出典：農薬ハンドブック 2016 年版

2. 標準品及び試薬

エトフェンプロックス標準品：純度 99.0% (富士フイルム和光純薬製)

アセトン，ヘキサン，酢酸エチル，ジエチルエーテル：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)

塩化ナトリウム：特級 (関東化学製)

1mol/L 酢酸アンモニウム：高速液体クロマト用 (関東化学製)

水：ピュアライト PRA-0015-0V1 (オルガノ製) 及びピューリック ZII (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 5mL 容 (ジエールサイエンス製)

フロリジルミニカラム：Sep-Pak FL plus long cartridge 910mg (waters 製)

グラファイトカーボンミニカラム：Supelclean ENVI-Carb SPE Tube 250mg/6mL
(シグマ アルドリッチ製)

濾紙：No.5A (桐山製作所製)

ガラス繊維濾紙：GFP (桐山製作所製)

3. 装置及び機器

電子天秤：XSR205, XS4002S, PG2002 (メトラー・トレド製)，S-BOX WP (イシダ製)

ミキサー：クイジナート DLC-NXJ2 (クイジナート製)，グラインドミックス GM200 (Retche 製)

振とう機：EL-01 (スギヤマゲン製)

減圧濃縮器:R-134(柴田科学器械工業製)

液体クロマトグラフ／タンデム型質量分析計(LC-MS/MS):Xevo TQ-S micro(Waters 製)

データ処理ソフトウェア:MassLynx(Waters 製)

4. 測定機器の操作条件

4.1. 液体クロマトグラフの操作条件

カラム:ACQUITY UPLC HSS T3 (waters 製)

径 2.1mm, 長さ 100mm, 粒径 1.8 μ m

溶離液:A 液 2mM 酢酸アンモニウム水溶液

B 液 2mM 酢酸アンモニウム含有メタノール溶液

[グラジエントテーブル]

時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
0	30	70
3	5	95
9.5	5	95
10.5	30	70

流量:0.3 mL/min

カラム温度:40°C

注入量:2 μ L

保持時間:約 5.7 分

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

コーンガス流量:50 L/h (N₂)

脱溶媒ガス流量:1000L/h (N₂)

ソースブロック温度:150°C

キャピラリー電圧:1.0kV

コーン電圧:34V

コリジョン電圧:8V

イオン抽出方法:MRM 法

モニタリングイオン:プリカーサーイオン;m/z 394.24

プロダクトイオン;m/z 359.21

5. 検量線の作成

エトフェンプロックス標準品 20.2mg を精秤後アセトンで溶解し, 20mL 定容とし 1000mg/L 標準原液を調製した。この原液をアセトンで希釈して 40mg/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順次希釈して 0.00025, 0.0005, 0.001, 0.005 及び 0.01mg/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／タンデム型質量分析計に注入し, データ処理装置を用いてエトフェンプロッ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、へたを除去し冷凍庫（-20℃設定）に保管した。分析直前にミキサーを用いて全量を磨砕均一化した。

6.2. 抽出

磨砕均一化した試料 20g をはかりとり、アセトン 100mL を加え振とう機を用い 30 分間振とう抽出した。抽出物を濾紙とガラス繊維濾紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過した後、残渣をアセトン 50mL で洗い同様にろ過した。ろ液を合わせ、アセトンで 200mL に定容した。この 10mL（試料 1g 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

濃縮液に水を加え約 4g に調整後、塩化ナトリウムを 0.5g 加え振り混ぜた。この液を多孔性ケイソウ土カラムに流下し 5 分間放置後、酢酸エチル 20mL で容器内を洗い込みカラムに流下した。さらに、酢酸エチル 20mL で同様の操作を繰り返し、全流出液を合わせ取り溶出液とした。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

フロリジルミニカラムにヘキサン 5mL を流下し前処理をした。残留物をヘキサン 5mL で溶解しミニカラムに流下し、流出液は捨てた。次に、ヘキサン 5mL で容器内を洗い込みカラムに流下し、流出液は捨てた。次に、ジエチルエーテル／ヘキサン（50:50, v/v）10mL で容器内を洗い込みミニカラムに流下し、エトフェンプロックスを溶出した。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。

6.5. 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アセトン 5mL、ヘキサン 10mL を順次流下し前処理をした。残留物をヘキサン／アセトン（80:20, v/v）10mL で溶解しミニカラムに流下した。次に、同混液 10mL で容器内を洗い込み流下した。同様の操作を 2 回繰り返し行い、全流出液を合わせ溶出液とした。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。

6.6. 定量

残留物を適量のメタノールで溶解し、前記条件の液体クロマトグラフ／タンデム型質量分析計に注入してピーク面積を求め、検量線よりエトフェンプロックスの重量を求めて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)
0.001	1	20	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)
0.0005	1	20	2	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、日植防高知の無処理試料を用いて、定量限界相当（0.01mg/kg）及び 1mg/kg 添加濃度における回収試験を 5 連分析で実施した。回収率の算出結果を示す。

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)	平均回収率 (%)	RSDr
日植防 高知	1.0	94, 92, 91, 86, 80	89	5
	0.01	110, 110, 110, 100, 100	106	6

9. 試料分析結果

試料調製場所	経過日数	分析値(mg/kg)	
		乳剤	水和剤
日植防茨城	散布前	<0.01	
	散布 1 日後	0.82	0.42
	散布 3 日後	0.73	0.47
	散布 7 日後	0.48	0.39
日植防高知	散布前	<0.01	
	散布 1 日後	0.53	0.39
	散布 3 日後	0.59	0.35
	散布 7 日後	0.42	0.28
日植防宮崎	散布前	<0.01	
	散布 1 日後	0.62	0.59
	散布 3 日後	0.59	0.40
	散布 7 日後	0.58	0.50

試験区試料の分析は 1 連で実施

10. 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：各調製場所の実試料分析と保存安定性試験を行うごとに、各 1 検体の無処理試料及びエトフェンプロックス 0.1mg/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 2019 年 6 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)における結果は良好であった。

分析日 (抽出日)	回収率 (%)	無処理試料 の分析値 (mg/kg)	使用した 無処理試料	対象試料
2020/10/28	84	< 0.01	日植防高知	日植防高知
10/29	88	< 0.01	日植防高知	日植防宮崎
11/ 2	90	< 0.01	日植防高知	日植防高知
11/ 9	82	< 0.01	日植防高知	日植防宮崎
12/ 2	84	< 0.01	日植防高知	日植防茨城
12/ 4	102	< 0.01	日植防高知	保存安定性試料

11. 保存安定性確認

磨砕均一化した無処理試料(日植防高知)にエトフェンプロックスを添加し、冷凍暗所(-20℃設定)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。

添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
1.0	87(2020/9/8－2020/12/4)	106, 101	104

実試料最長保存日数：日植防茨城 21 日間，日植防高知 53 日間，日植防宮崎 46 日間

12. 参考添付図

各クロマトグラムの一例を示す。

図 1. エトフェンプロックス標準品のクロマトグラム

図 2. 全操作試薬ブランクのクロマトグラム

図 3. 回収率のクロマトグラム

図 4-1. 散布前試料のクロマトグラム

4-2. 日植防茨城試料のクロマトグラム

4-3. 日植防高知試料のクロマトグラム

4-4. 日植防宮崎試料のクロマトグラム

図 5. 内部精度管理のクロマトグラム

図 6. 保存安定性試料のクロマトグラム

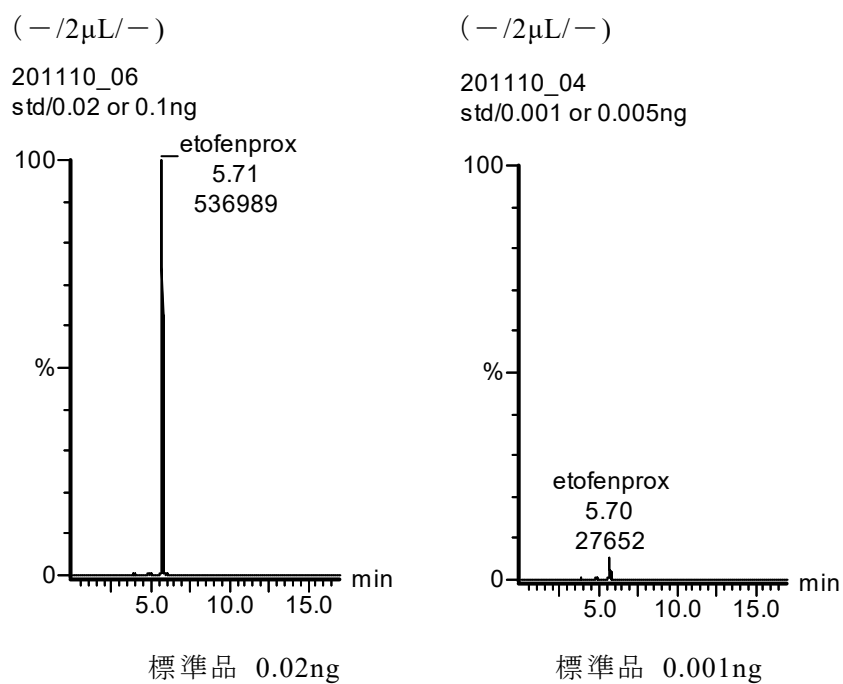


図 1. エトフェンプロックス標準品のクロマトグラム

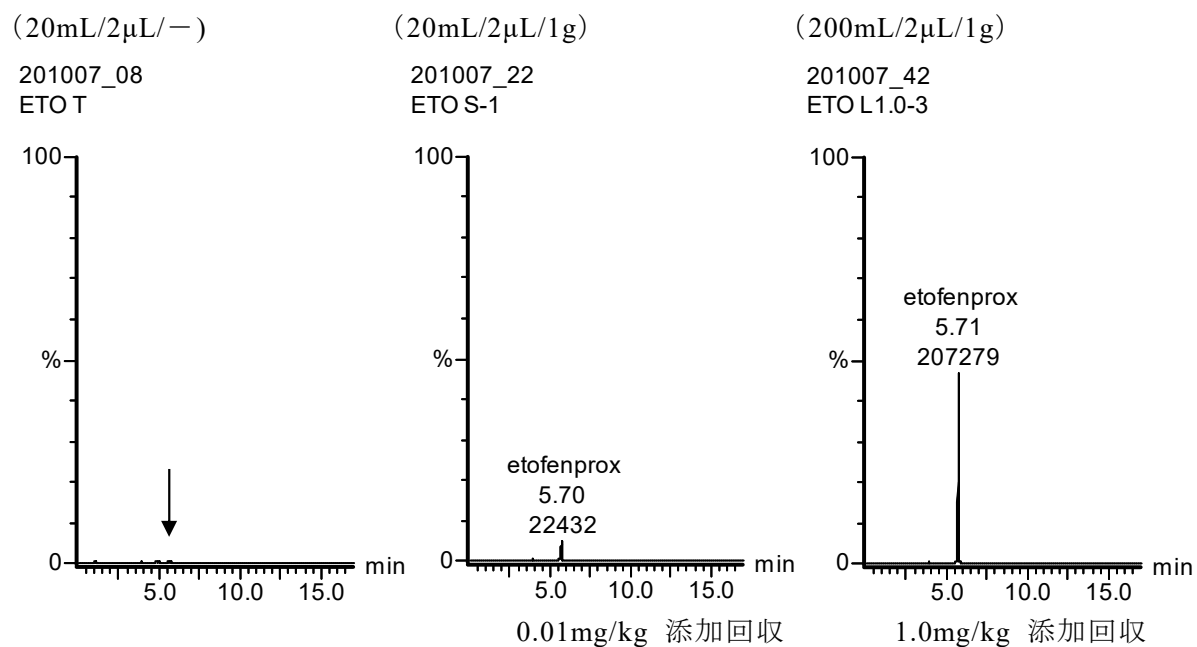
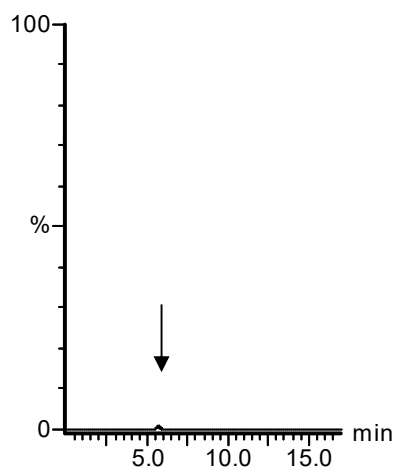


図 2. 全操作試薬ブランク
のクロマトグラム

図 3. 回収率のクロマトグラム

(20mL/2 μ L/1g)

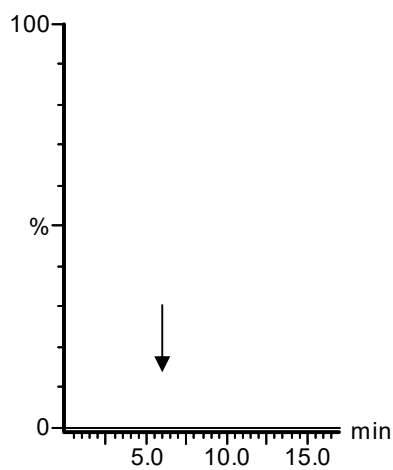
201202_08
M1ETO-B



日植防茨城

(20mL/2 μ L/1g)

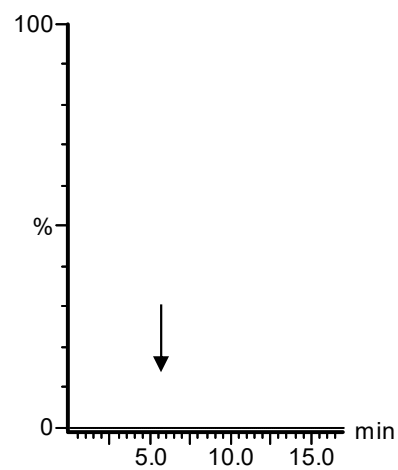
201102_09
M2 ETO-B



日植防高知

(20mL/2 μ L/1g)

201102_10
M3 ETO-B

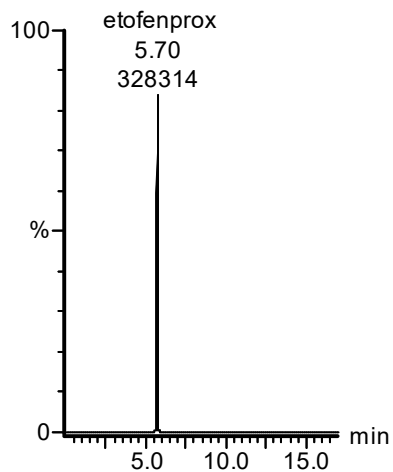


日植防宮崎

図 4-1. 散布前試料のクロマトグラム

(100mL/2 μ L/1g)

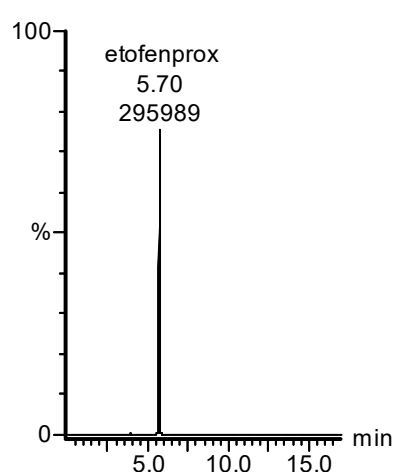
201202_17
M1ETO-E1



乳剤 1 日後

(100mL/2 μ L/1g)

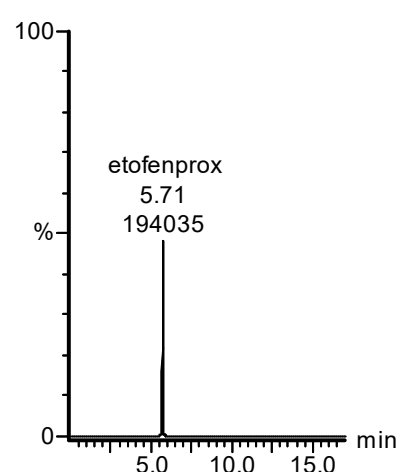
201202_18
M1ETO-E3



乳剤 3 日後

(100mL/2 μ L/1g)

201202_19
M1ETO-E7



乳剤 7 日後

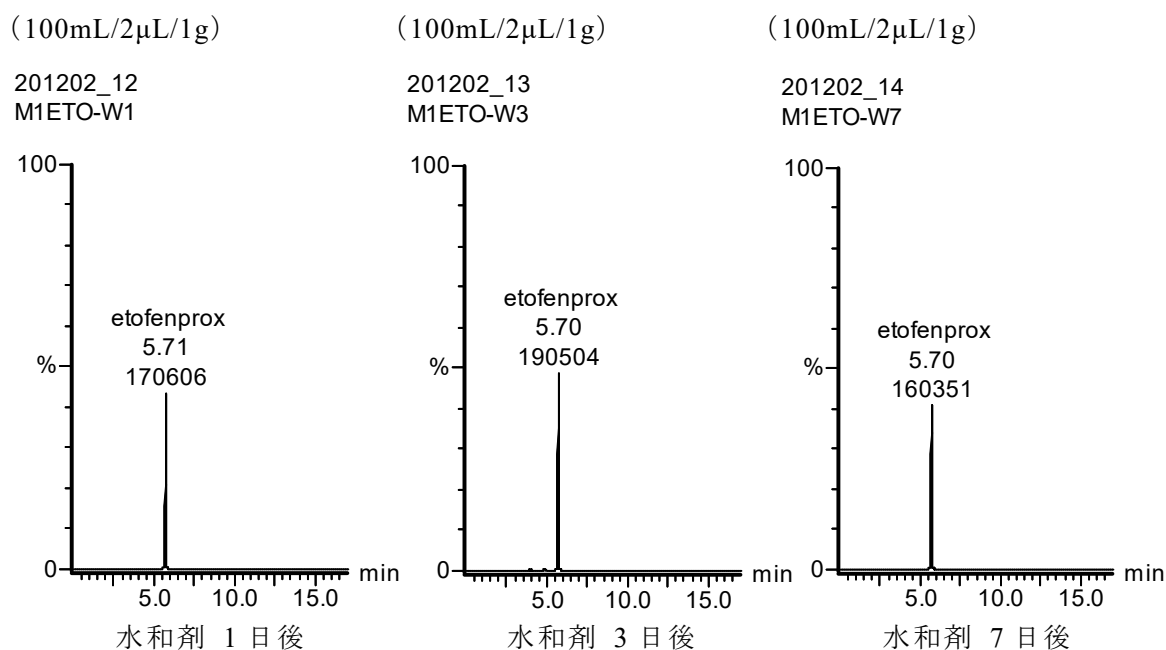
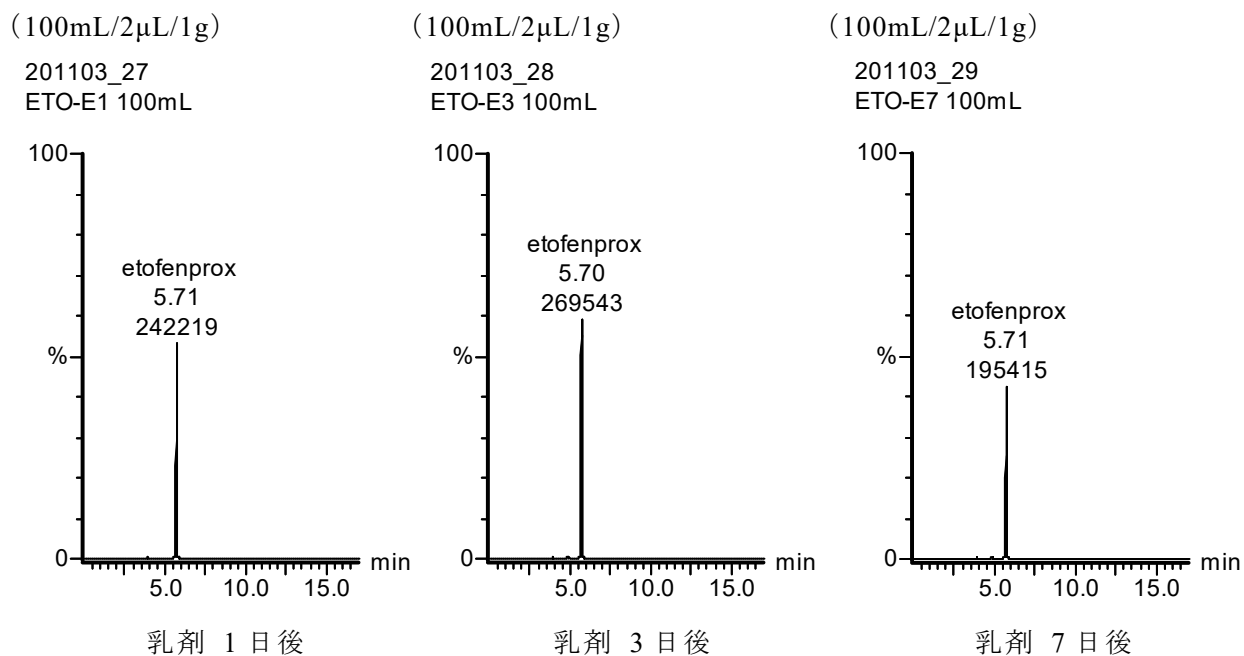
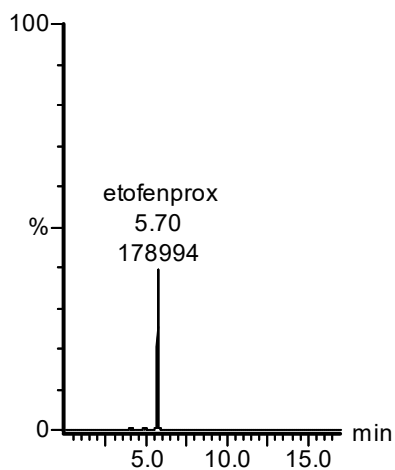


図 4-2. 日植防茨城試料のクロマトグラム



(100mL/2 μ L/1g)

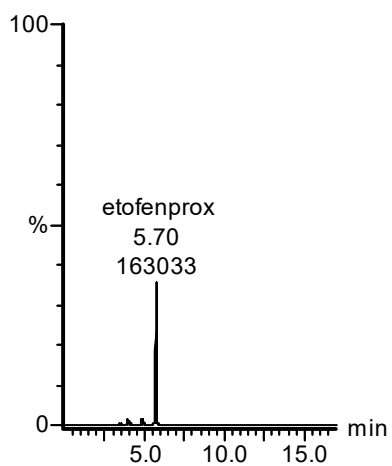
201103_22
ETO-W1 100mL



水和剤 1 日後

(100mL/2 μ L/1g)

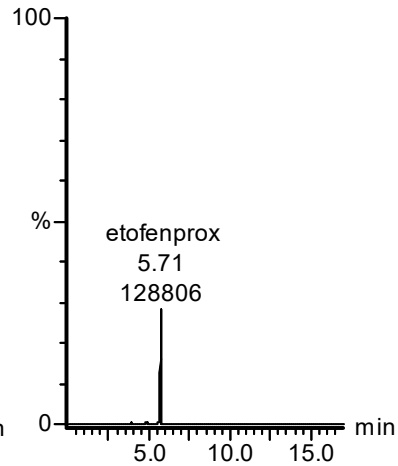
201103_23
ETO-W3 100mL



水和剤 3 日後

(100mL/2 μ L/1g)

201103_24
ETO-W7 100mL

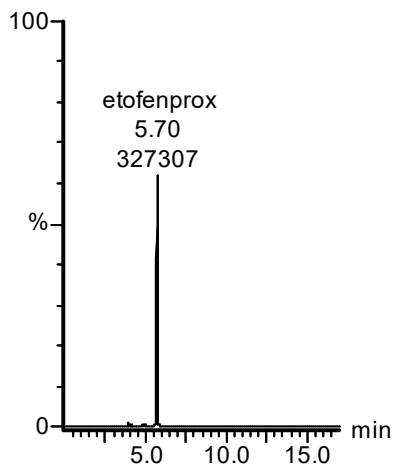


水和剤 7 日後

図 4-3. 日植防高知試料のクロマトグラム

(100mL/2 μ L/1g)

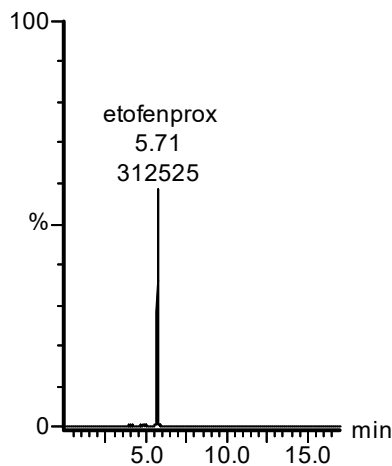
201110_15
M3ETO-E1 100mL



乳剤 1 日後

(100mL/2 μ L/1g)

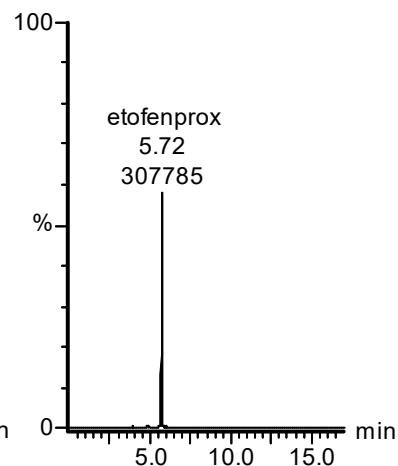
201110_16
M3ETO-E3 100mL



乳剤 3 日後

(100mL/2 μ L/1g)

201110_17
M3ETO-E7 100mL



乳剤 7 日後

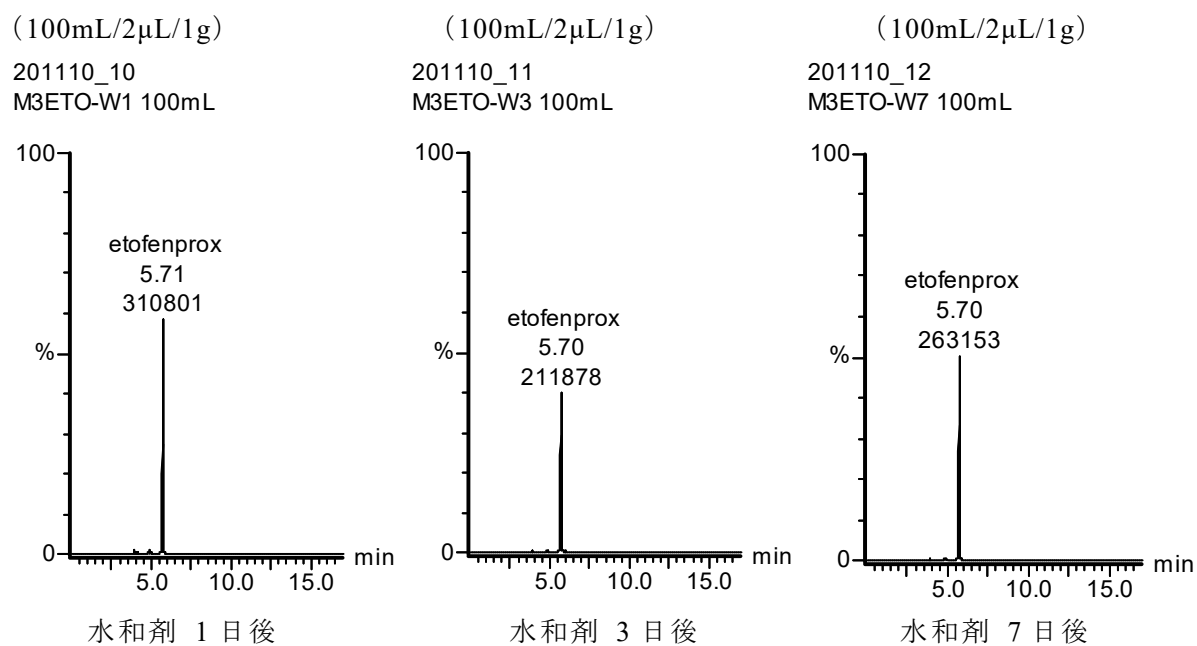


図 4-4. 日植防宮崎試料のクロマトグラム

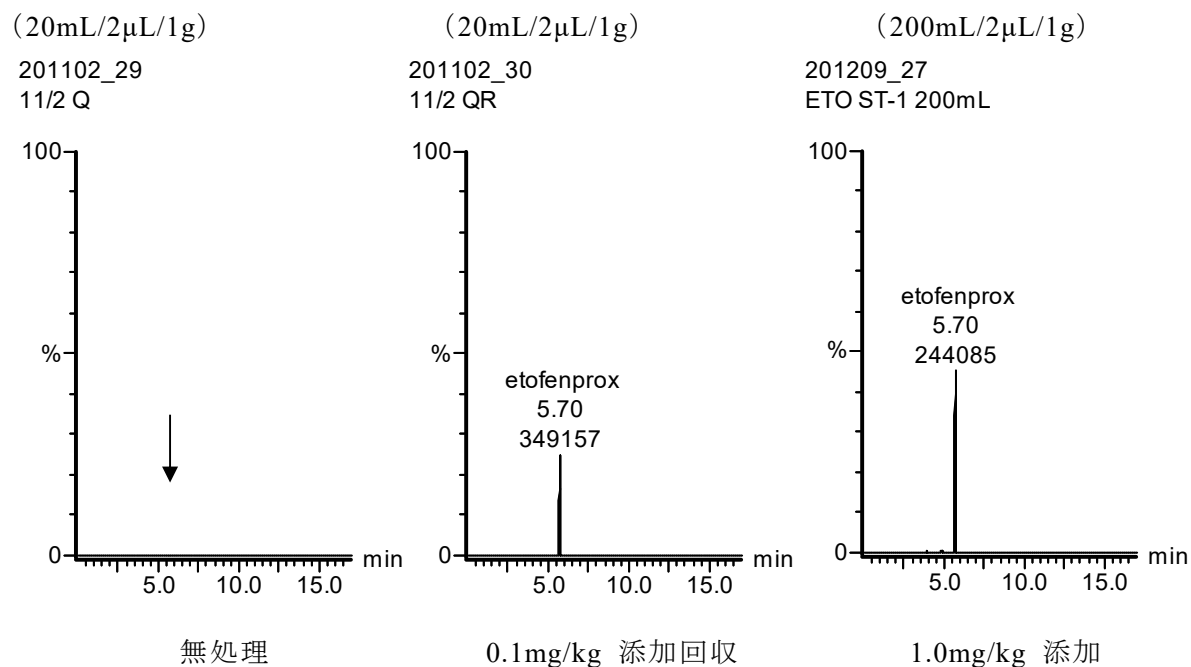


図 5. 内部精度管理のクロマトグラム

図 6. 保存安定性試料
のクロマトグラム

⑤ 作物写真及び試料重量等

1. 作物写真

1-1. ミクロブタニル



茨城 散布前



茨城 散布1日後／乳剤



茨城 散布1日後／水和剤



茨城 散布3日後／乳剤



茨城 散布3日後／水和剤





高知 散布 3 日後／乳剤



高知 散布 3 日後／水和剤



高知 散布 7 日後／乳剤



高知 散布 7 日後／水和剤



宮崎 散布前



宮崎 散布 1 日後／乳剤



宮崎 散布 1 日後／水和剤



宮崎 散布 3 日後／乳剤



宮崎 散布 3 日後／水和剤



宮崎 散布 7 日後／乳剤



宮崎 散布 7 日後／水和剤

1.2. MEP



茨城 散布前



茨城 散布 1 日後／乳剤



茨城 散布 1 日後／水和剤



茨城 散布 3 日後／乳剤



茨城 散布 3 日後／水和剤



茨城 散布 7 日後／乳剤



茨城 散布 7 日後／水和剤



高知 散布前



高知 散布 1 日後／乳剤



高知 散布 1 日後／水和剤



高知 散布 3 日後／乳剤



高知 散布 3 日後／水和剤



高知 散布 7 日後／乳剤



高知 散布 7 日後／水和剤



宮崎 散布前

1.3. トルフェンピラド



茨城 散布前



茨城 散布 1 日後／乳剤



茨城 散布 1 日後／フロアブル



茨城 散布 3 日後／乳剤



茨城 散布 3 日後／フロアブル



茨城 散布 7 日後／乳剤



茨城 散布 7 日後／フロアブル



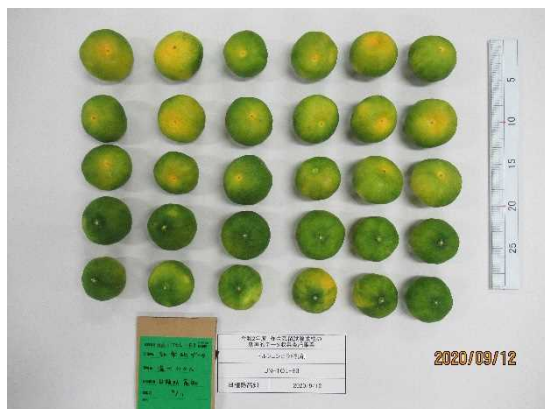
高知 散布前



高知 散布 1 日後／乳剤



高知 散布 1 日後／フロアブル



高知 散布 3 日後／乳剤



高知 散布 3 日後／フロアブル



高知 散布 7 日後／乳剤



高知 散布 7 日後／フロアブル



宮崎 散布前



宮崎 散布 1 日後／乳剤



宮崎 散布 1 日後／フロアブル



宮崎 散布 3 日後／乳剤



宮崎 散布 3 日後／フロアブル



宮崎 散布 7 日後／乳剤



宮崎 散布 7 日後／フロアブル

1.4. エトフェンプロックス



茨城 散布前



茨城 散布 1 日後／乳剤



茨城 散布 1 日後／水和剤



茨城 散布 3 日後／乳剤



茨城 散布 3 日後／水和剤



茨城 散布 7 日後／乳剤



茨城 散布 7 日後／水和剤



高知 散布前



高知 散布 1 日後／乳剤



高知 散布 1 日後／水和剤



高知 散布 3 日後／乳剤



高知 散布 3 日後／水和剤



高知 散布 7 日後／乳剤



高知 散布 7 日後／水和剤



宮崎 散布前



宮崎 散布 1 日後／乳剤



宮崎 散布 1 日後／水和剤



宮崎 散布 3 日後／乳剤



宮崎 散布 3 日後／水和剤



宮崎 散布 7 日後／乳剤



宮崎 散布 7 日後／水和剤