

登録作物のグループ化・残留分析詳細①

イミノクタジンアルベシル酸塩

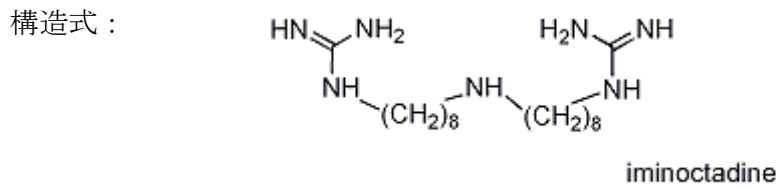
1. 分析対象物質

イミノクタジン

化学名： 1,1'-iminodi(octamethylene)diguanidine

分子式： $C_{18}H_{41}N_7$

分子量： 355.6



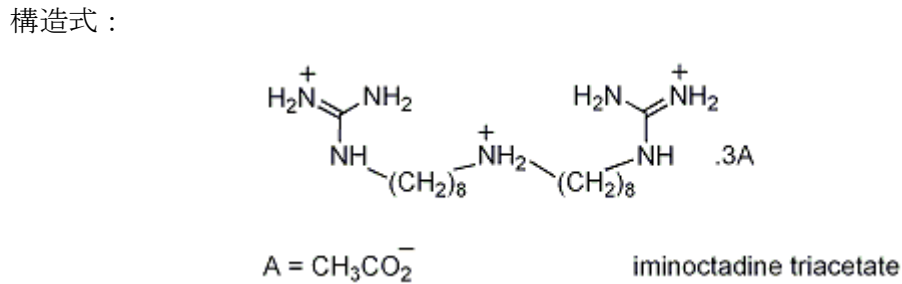
出 典： The Pesticide Manual, 14th Edition.

イミノクタジン三酢酸塩

化学名： 1,1'-iminodi(octamethylene)diguanidinium triacetate

分子式： $C_{24}H_{53}N_7O_6$

分子量： 535.7



性 状： 無色結晶

融 点： 143.0～144.2℃

蒸気圧： <0.4 mPa (23℃)

分配係数： $\log P_{OW} = -2.33$ (pH=7)

溶解性： 水 764 g/L

エタノール 117, メタノール 777 (以上g/L, 25℃)

出 典： The Pesticide Manual, 14th Edition.

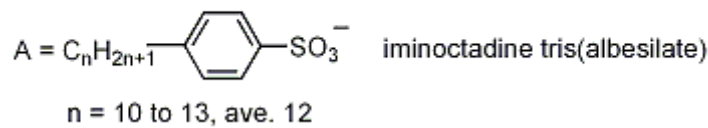
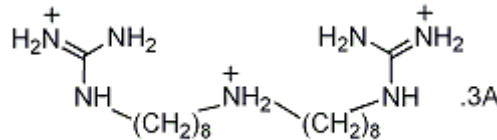
イミノクタジンアルベシル酸塩

化学名： 1,1'-iminodi(octamethylene)diguanidinium tris(alkylbenzenesulfonate)

分子式： $C_{72}H_{131}N_7O_9S_3$ (平均)

分子量： 1335 (平均)

構造式：



性 状： 薄茶色，ろう様の物質

融 点： 92～96℃

蒸気圧： $< 1.6 \times 10^{-1} \text{ mPa (60}^\circ\text{C)}$

分配係数： $\log P_{OW} = 2.05 \text{ (pH=7)}$

溶解性： 水 6 mg/L (20℃)

メタノール 5660, エタノール 3280, イソプロパノール 1800,

ベンゼン 0.22, アセトン 0.55 (以上g/L)

アセトニトリル, ジクロロメタン, *n*-ヘキサン, キシレン,

二硫化炭素及び酢酸エチル (20℃) に不溶

出 典： The Pesticide Manual, 14th Edition.

2. 標準品及び試薬

イミノクタジン三酢酸塩標準品：

純度 99.6% (和光純薬工業製)

アセトニトリル, クロロホルム, メタノール：

残留農薬試験用 (和光純薬工業製)

アセトニトリル： LC-MS 用 (和光純薬工業製)

水： PURELAB Flex System (Veolia Water Solutions & Technologies, Saint Maurice, France) で精製した水

グアニジン塩酸塩： 鹿特級 (関東化学製)

イオンペアー試薬： IPC-PFFA-5 (LC-MS 用),
以下 IPC と略す (東京化成工業製)

水酸化ナトリウム： 特級 (関東化学製)

塩酸： 試薬特級 (和光純薬工業製)
塩化ナトリウム： 試薬特級 (和光純薬工業製)
リン酸二水素カリウム： 試薬特級 (和光純薬工業製)
リン酸緩衝液： リン酸二水素カリウム 2.713 g を水に溶解して 1 L とした後，
0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加え，
pH メーターで pH=6 に調整したもの。
陽イオン交換ミニカラム
： InertSep CBA, 500 mg/6 mL (ジーエルサイエンス製)
ガラス繊維ろ紙： GFP (桐山製作所製)

3. 装置及び機器

電子天秤： メトラー・トレド AG245及びXS2002S
台秤： エー・アンド・デイ FG-60KBM及びFV-60KA2
ミキサー： パナソニック MX-X108
pH メーター： F-72 (堀場製作所製)

<果肉試料分析>

液体クロマトグラフ・質量分析計システム (LC-MS) :
アジレント 1100 LC/MSD
データ処理装置： アジレント ChemStation

<果皮試料分析>

液体クロマトグラフ・質量分析計システム (LC-MS) :
島津製作所 LC-20A
島津製作所 LCMS-2010EV
データ処理装置： 島津製作所 LCMS Solution

4. 測定機器の操作条件

4.1. 液体クロマトグラフ・質量分析計<果肉試料>

4.1.1. 高速液体クロマトグラフ

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

4.1.2. 質量分析計

イオン化法：	エレクトロスプレー イオン化法 (ESI)
	正モード
乾燥ガス温度：	350°C
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：	200 V
イオン検出法：	SIM
モニタリングイオン：	m/z 356.3

4.2. 液体クロマトグラフ・質量分析計＜果皮試料測定時＞

4.2.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム：	Inertsil ODS-4 (ジーエルサイエンス製)
	内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 5 µm
溶離液：	5 mmol/L IPC／アセトニトリル
	65:35－(10 min)－55:45
流速：	0.2 mL/min
カラム温度：	40°C
試料注入量：	5 µL
保持時間：	6.5 min

4.2.2. 質量分析計

イオン化法：	エレクトロスプレー イオン化法 (ESI)
	正モード
ネブライザーガス流量：	1.5 L/min
ヒートブロック温度：	200°C
検出器電圧：	1.5 kV
インターフェイス電圧：	自動調整値
脱溶媒管電圧：	自動調整値
Q-array電圧：	自動調整値
イオン検出法：	SIM
モニタリングイオン：	m/z 356.3

5. 検量線の作成

イミノクタジン三酢酸塩の標準品15.2 mg（イミノクタジンとして10.0 mg相当）を50 mLのメスフラスコに精秤し、メタノールに溶解して200 mg/L標準原液を調製した。この原液を、メタノールで希釈して10 mg/L標準溶液を調製し、さらにこの標準溶液をアセトニトリル／5 mmol/L IPC (50:50, v/v) 混液で希釈して0.00025, 0.0005, 0.0025, 0.005及び0.01 mg/Lの標準溶液を調製した。その5 µL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イミノクタ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. 分析法

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料は重量を量り、各々を縦に6分割したものから対角の2つを取り合わせた後、果肉と果皮に分け、それぞれの有姿試料を作製した。果肉の場合は、重量を量った後、細切して無作為に取り、試料200 gに対してグアニジン塩酸塩50 gを添加してミキサーで磨砕均一化した後、密封して冷凍保存（-20℃設定）した。果皮の場合は、重量を量った後、細切して無作為に取り、試料100 gに対して水100 g及びグアニジン塩酸塩50 gを添加してミキサーで磨砕均一化した後、密封して冷凍保存（-20℃設定）した。また、量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比（%）を算出した。

6.1.2. 抽出

6.1.2.1. 果肉

均一化した試料25 g（試料20 g相当量）を三角フラスコにはかりとり、2 mol/L水酸化ナトリウム含有メタノール溶液150 mLを加えて30分間振とう抽出した。抽出物をガラス繊維ろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣をメタノール40 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に定容し、その20 mL（試料2 g相当量）を分取した。

6.1.2.2. 果皮

均一化した試料25 g（試料10 g相当量）を三角フラスコにはかりとり、2 mol/L水酸化ナトリウム含有メタノール溶液150 mLを加えて30分間振とう抽出した。抽出物をガラス繊維ろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣をメタノール40 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に定容し、その20 mL（試料1 g相当量）を分取した。

6.1.3. クロロホルム転溶

分取した抽出液に10%塩化ナトリウム溶液10 mL及びクロロホルム20 mLを加え、振とう機を用いて5分間激しく振とうした。暫時放置後、有機溶媒層を分取し、水層にはクロロホルム20 mLを加え同様の振とう及び分取の操作を繰り返した。全有機溶媒層を合わせ、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、最後は窒素気流下で溶媒を留去した。

6.1.4. 陽イオン交換ミニカラムによる精製

陽イオン交換ミニカラムにメタノール5 mL, 水5 mL及びリン酸緩衝液5 mLを順次流下し前処理した。残留物をリン酸緩衝液5 mLに溶解し, 超音波処理した後, 陽イオン交換ミニカラムに流下した。さらに, リン酸緩衝液5 mL及びメタノール10 mLを流下し, これらの流出液を捨てた。次に, 50 mmol/L塩酸含有メタノール15 mLを流下し, 溶出液を分取した。

6.1.5. 定量

陽イオン交換ミニカラムの溶出液にアセトニトリル/5 mmol/L IPC (50:50, v/v) 混液を加え20 mLに定容し, 必要に応じて同混液で希釈した。この溶液の5 µL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, 検量線よりイミノクタジンの重量を求め, 試料中の残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値 (LOQ) 及び検出限界値 (LOD)

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (µL)	定量限界 (ppm)
<u>果肉</u>				
0.0025	2	40	5	0.01
<u>果皮</u>				
0.0025	1	20	5	0.01
最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (µL)	検出限界 (ppm)
<u>果肉</u>				
0.00125	2	40	5	0.005
<u>果皮</u>				
0.00125	1	20	5	0.005

6.3. 回収率

分析法確認のため、宮崎の果肉及び果皮の無処理試料を用いて、0.01 ppm（定量限界相当）、0.25 ppm及び5 ppm添加濃度における回収試験を各5連分析で実施した。さらに果皮については、宮崎の無処理試料を用いて10 ppm添加回収試験を5連分析で実施した。なお、無処理試料は2連分析し、全て定量限界未満（<0.01 ppm）であった。回収試験結果を表に示す。

6.3.1. 果肉の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
宮崎	5	94, 86,	92, 83	88,	89	5.0
宮崎	0.25	81, 72,	80, 71	74,	76	6.1
宮崎	0.01	81, 73,	80, 70	73,	75	6.4

6.3.2. 果皮の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
宮崎	10	106, 96,	98, 94	97,	98	4.7
宮崎	5	109, 107,	109, 103	107,	107	2.3
宮崎	0.25	100, 84,	99, 82	98,	93	9.5
宮崎	0.01	96, 79,	85, 70	81,	82	11.6

7. 精度管理

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

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

クォリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

また、2011年10月実施の食品衛生精度管理比較調査（財団法人食品薬品安全センター）におけるZスコアは全て $Z < 2$ であった。

7.1.クォリティーコントロール試料分析結果

7.1.1.果肉

分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
2013/3/14	茨城	70	<0.01
2013/3/15	高知	70	<0.01
2013/3/13	宮崎	81	<0.01
2013/3/18	宮崎	73	<0.01

7.1.2.果皮

分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
2013/3/14	茨城	78	<0.01
2013/3/15	高知	77	<0.01
2013/3/13	宮崎	79	<0.01
2013/3/18	宮崎	90	<0.01

8. マトリックス効果の確認

マトリックス標準溶液は、各圃場の無処理試料の最終溶液1 mLをナス型フラスコに分取し、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、窒素気流下で溶媒を留去した後、0.005 mg/Lの検量線用標準溶液1 mLに溶解して調製した。マトリックス試料分析結果を表に示す。

8.1.1.果肉

試料	マトリックス効果 (%)
茨城	82
高知	97
宮崎	71

8.1.2.果皮

試料	マトリックス効果 (%)
茨城	101
高知	78
宮崎	106

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料に化合物を添加し、 -20°C 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。保存安定性試験の結果を表に示す。

9.1.果肉の保存安定性試験結果

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	243 (2012/7/18-2013/3/18)	77,	74	76
0.5	高知	229 (2012/8/1-2013/3/18)	78,	73	76
0.5	宮崎	256 (2012/7/5-2013/3/18)	75,	75	75

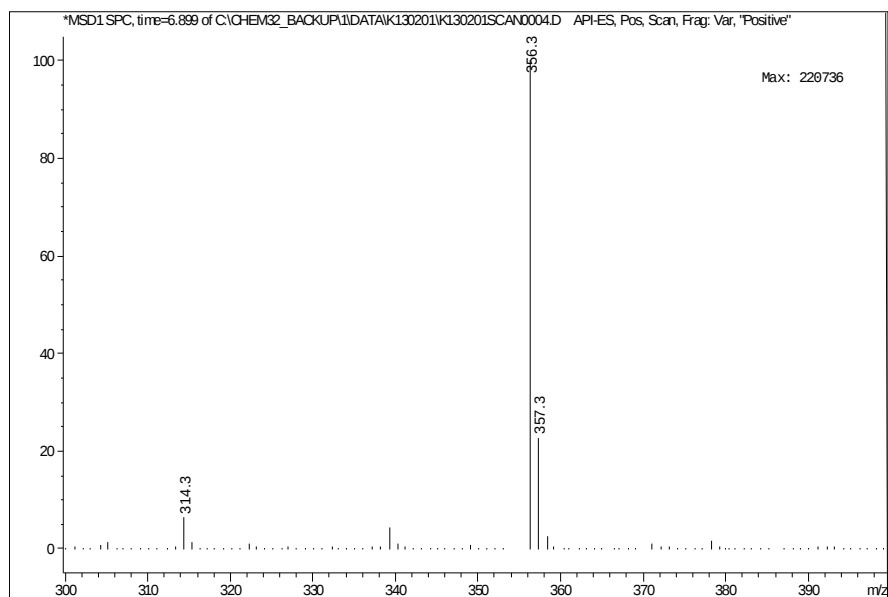
9.2.果皮の保存安定性試験結果

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	243 (2012/7/18-2013/3/18)	98,	97	98
0.5	高知	229 (2012/8/1-2013/3/18)	104,	99	102
0.5	宮崎	256 (2012/7/5-2013/3/18)	98,	94	96

付図-1. イミノクタジンのマススペクトル

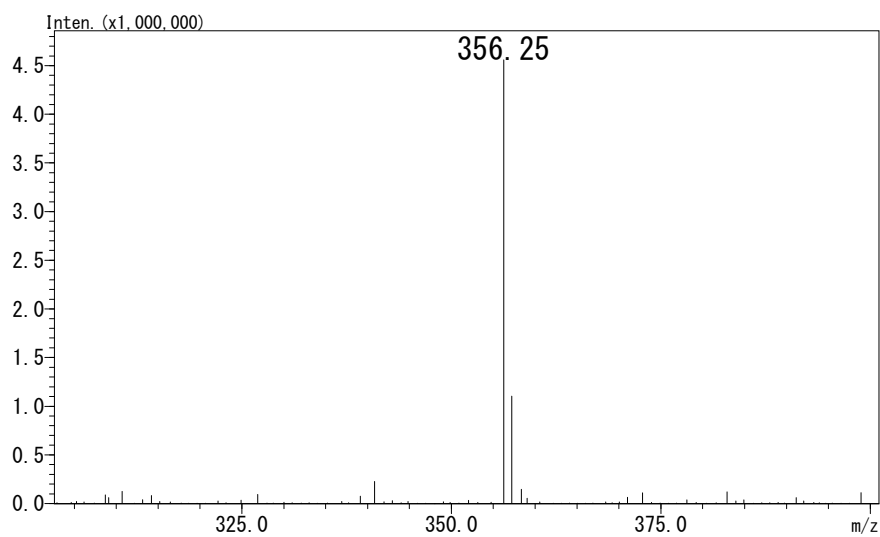
付図-1-1. イミノクタジンのマススペクトル <果肉試料測定時>

アジレント 1100 LC/MSD



付図-1-2. イミノクタジンのマススペクトル <果皮試料測定時>

島津製作所 LCMS-2010EV



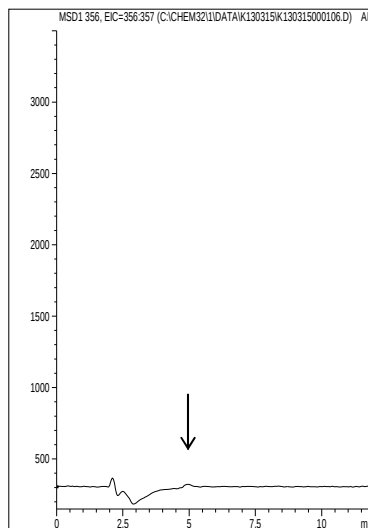
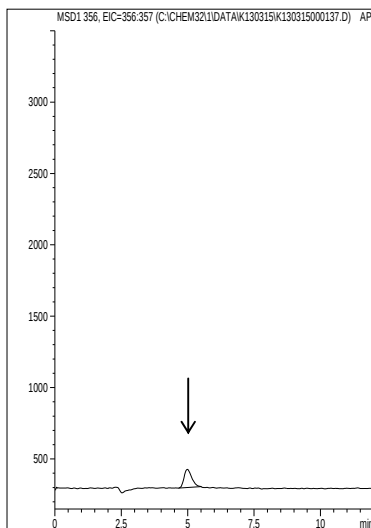
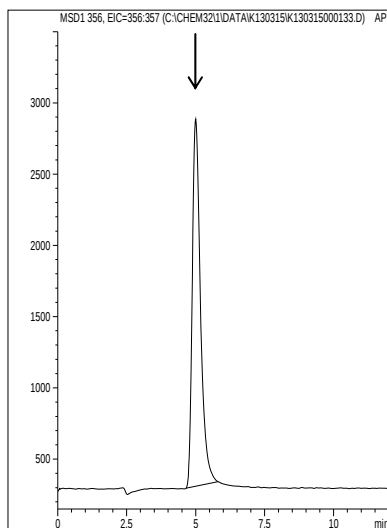
メロン 処理区A (イミノクタジンンアルベシル酸塩)

付図-2. 果実のクロマトグラム (代表例)

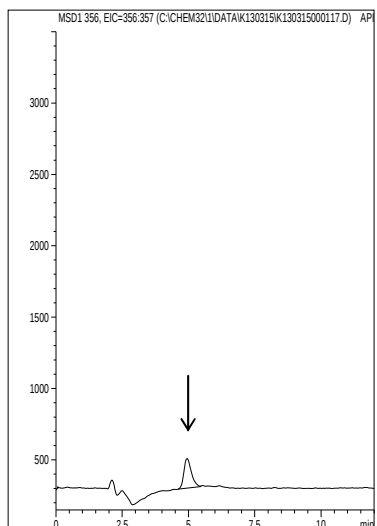
標準品 0.05 ng

標準品 0.0025 ng

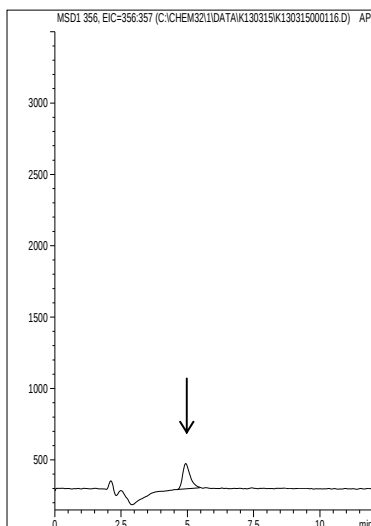
宮崎 無処理
5 μ L/40 mL/2 g



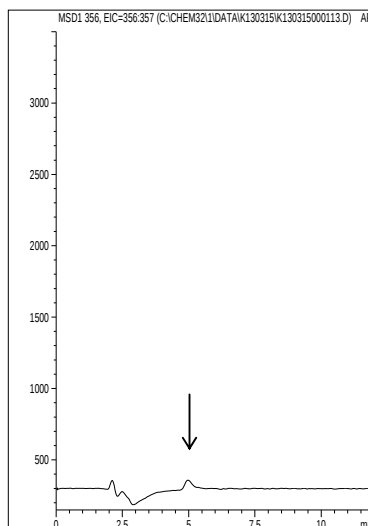
宮崎 5 回処理 1 日後
5 μ L/40 mL/2 g



宮崎 5 回処理 3 日後
5 μ L/40 mL/2 g

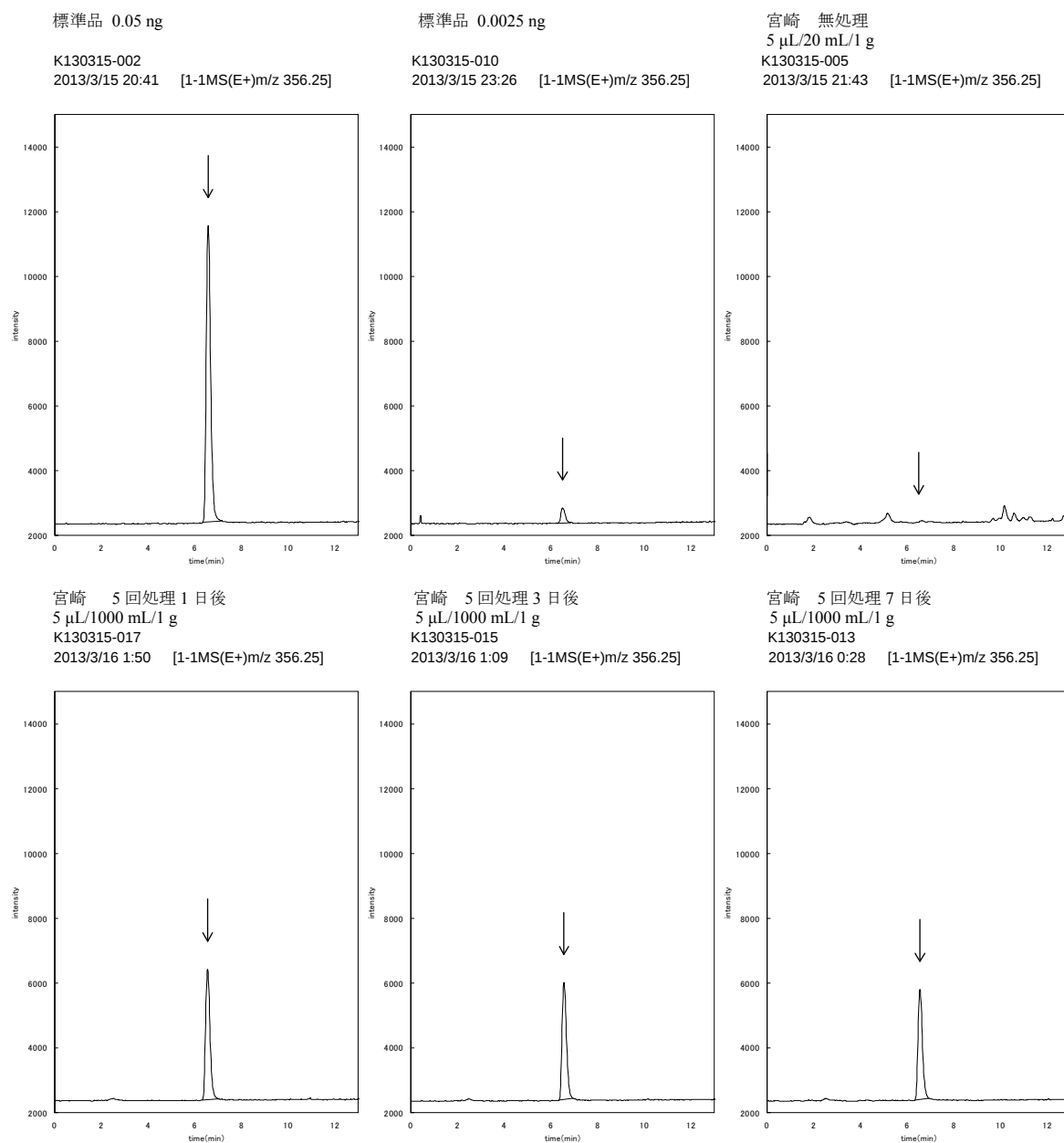


宮崎 5 回処理 7 日後
5 μ L/40 mL/2 g



メロン 処理区A (イミノクタジンアルベシル酸塩)

付図-3. 果皮のクロマトグラム (代表例)



登録作物のグルーブ化・残留分析詳細②
シモキサニル, メタラキシルM

1. 分析対象物質

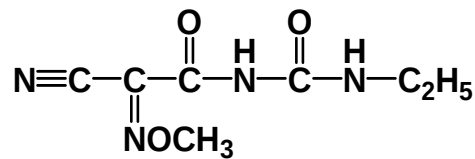
シモキサニル

化学名 : 1-(2-cyano-2-methoxyiminoacetyl)-3-ethylurea

分子式 : $C_7H_{10}N_4O_3$

分子量 : 198.2

構造式 :



性 状 : 無色結晶

融 点 : 160～161℃

蒸気圧 : 0.15 mPa (20℃)

分配係数 : $\log P_{OW} = 0.59$ (pH=5), 0.67 (pH=7)

溶解性 : 水 890 mg/kg (pH=5, 20℃),
ヘキサン 0.037, トルエン 5.29, アセトニトリル 57, 酢酸エチル 28,
n-オクタノール 1.43, メタノール 22.9, アセトン 62.4,
ジクロロメタン 133.0 (以上g/L, 20℃)

出 典 : The Pesticide Manual, 14th Edition.

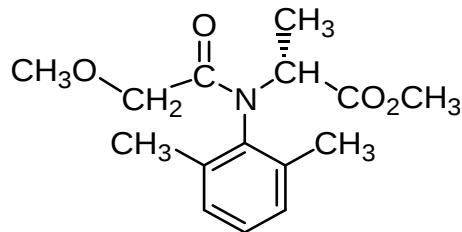
メタラキシルM

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

分子式 : $C_{15}H_{21}NO_4$

分子量 : 279.3

構造式 :



性 状 : 淡黄色粘潤性液体

蒸気圧 : 3.3 mPa (25℃)

溶解性 : 水 26 g/L (25℃), *n*-ヘキサン 59 g/L,
アセトン, 酢酸エチル, メタノール, ジクロロメタン, トルエン,

n-オクタノールに可溶

出典：The Pesticide Manual, 14th Edition.

2. 標準品及び試薬

シモキサニル標準品： 純度 99.9% (和光純薬工業製)
メタラキシル M 標準品： 純度 98.9% (和光純薬工業製)
アセトニトリル, アセトン, メタノール： 残留農薬試験用 (和光純薬工業製)
アセトニトリル： LC-MS 用 (和光純薬工業製)
酢酸： 試薬特級 (和光純薬工業製)
水： PURELAB Flex System (Veolia Water Solutions & Technologies, Saint Maurice, France) で精製した水
グラファイトカーボンミニカラム
： InertSep GC, 500 mg/6 mL (ジーエルサイエンス製)

3. 装置及び機器

電子天秤： メトラー・トレド AG245 及び XS2002S
台秤： エー・アンド・デイ FG-60KBM 及び FV-60KA2
ミキサー： エフ・エム・アイ ロボクープ BLIXER-5Plus
ホモジナイザー： kinematica PT 10/35, PT3100
液体クロマトグラフ・質量分析計システム (LC-MS/MS)：
ウォータース 2695 HPLC
ウォータース Quattro micro
データ処理装置： ウォータース MassLynx 4.0

4. 液体クロマトグラフ・質量分析計の操作条件

4.1. 液体クロマトグラフ・質量分析計

4.1.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム： Luna Phenyl-Hexyl (Phenomenex 製)
内径 2.0 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3 µm
溶離液： 水／アセトニトリル／2%酢酸 (65:30:5, v/v/v)
流速： 0.2 mL/min
カラム温度： 40°C
試料注入量： 10 µL
保持時間： シモキサニル； 6.5 min
メタラキシル M； 15.6 min

4.1.2. 質量分析計

イオン化法:	エレクトロスプレー イオン化法 (ESI)
	正モード
コーンガス流量:	50 L/h (N ₂)
脱溶媒ガス流量:	600 L/h (N ₂)
脱溶媒ガス温度:	350°C
ソースブロック温度:	130°C
キャピラリー電圧:	3.2 kV
コーン電圧:	シモキサニル; 10 V
	メタラキシルM; 17 V
コリジョン電圧:	シモキサニル; 10 V
	メタラキシル; 15 V
	(コリジョンガス; Ar)
イオン検出法:	MRM
モニタリングイオン:	シモキサニル; プリカーサーイオン m/z 199.0
	プロダクトイオン m/z 127.9
	メタラキシルM; プリカーサーイオン m/z 280.1
	プロダクトイオン m/z 220.1

5. 検量線の作成

シモキサニル及びメタラキシルMの各標準品10.0及び10.1 mg (各10.0 mg相当)を各々50 mLのメスフラスコに精秤し、アセトンに溶解して200 mg/L標準原液を調製した。各原液を等量ずつ混合し、水/アセトニトリル(75:25, v/v)混液で希釈して0.0005, 0.001, 0.005, 0.01 及び0.02 mg/Lの混合標準溶液を調製した。その10 µL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モキサニル及びメタラキシルMのピーク面積を測定し、横軸に重量 (ng), 縦軸にピーク面積をとって各検量線を作成した。

6. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料は重量を量り、各々を縦に6分割したものから対角の2つを取り合わせた後、果肉と果皮に分け、それぞれの有姿試料を作製した。重量を量った後、密封して冷凍保存 (-20°C設定) した。果肉分析時には果肉の有姿試料を取り、細切し、ミキサーで均一化した。果皮分析時には果皮の有姿試料を取り、細切し、ミキサーで均一化した。また、量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比 (%) を算出した。

6.1.2. 抽出

6.1.2.1. 果肉

均一化した試料20 gを三角フラスコにはかりとり、アセトン100 mLを加えて30分間振とう抽出した。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣をアセトン50 mLで洗い、同様にろ過した。ろ液を合わせアセトンで200 mLに定容し、その4 mL（試料0.4 g相当量）を分取した。分取した抽出液に水10 mLを添加した後、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、アセトンを留去した。

6.1.2.2. 果皮

均一化した試料10 gを三角フラスコにはかりとり、アセトン70 mLを加えてホモジナイザーで磨砕抽出した。シャフトに付着した試料をアセトン30 mLで洗浄し、洗浄液を合わせ、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に定容し、その8 mL（試料0.4 g相当量）を分取した。分取した抽出液に水10 mLを添加した後、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、アセトンを留去した。

6.1.3. グラファイトカーボンミニカラムによる精製

グラファイトカーボンミニカラムにメタノール5 mL及び水5 mLを順次流下し前処理した。前項の濃縮液を前処理したグラファイトカーボンミニカラムに流下した後、さらに水／アセトン（80:20, v/v）混液10 mLを流下し、これらの流出液を捨てた。次にメタノール15 mLを流下し、溶出液を分取した。分取した溶出液にアセトニトリル10 mLを添加後、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。

6.1.4. 定量

残留物を水／アセトニトリル（75:25, v/v）混液4 mLに溶解し、必要に応じて同混液で希釈した。この溶液の10 µL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、検量線よりシモキサニル及びメタラキシルMの重量を求め、試料中の各残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値（LOQ）及び検出限界値（LOD）*

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	定量限界 (ppm)
<u>果肉</u>				
0.01	0.4	4	10	0.01
<u>果皮</u>				
0.01	0.4	4	10	0.01
最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)
<u>果肉</u>				
0.005	0.4	4	10	0.005
<u>果皮</u>				
0.005	0.4	4	10	0.005

*シモキサニル，メタラキシルMはいずれも同じ値

6.3. 回収率

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

*平成23年度農薬等安全性確保強化実態調査事業の宮崎II無処理試料を使用

6.3.1. 果肉の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
シモキサニル						
宮崎II	5	98, 91,	97, 87	97,	94	5.1
宮崎II	0.25	92, 88,	91, 86	91,	90	2.8
宮崎II	0.01	107, 97,	106, 92	99,	100	6.3
メタラキシルM						
宮崎II	5	107, 104,	107, 102	104,	105	2.1
宮崎II	0.25	109, 101,	102, 95	101,	102	4.9
宮崎II	0.01	98, 95,	97, 94	96,	96	1.6

6.3.2. 果皮の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
シモキサニル						
宮崎II	5	120, 107,	109, 105	109,	110	5.3
宮崎II	0.25	100, 97,	99, 94	97,	97	2.4
宮崎II	0.01	117, 110,	115, 103	113,	112	4.9
メタラキシルM						
宮崎II	5	98, 97,	98, 97	98,	98	0.6
宮崎II	0.25	90, 87,	90, 86	87,	88	2.1
宮崎II	0.01	97, 91,	96, 89	92,	93	3.6

7. 精度管理

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

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

クオリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

また、2011年10月実施の食品衛生精度管理比較調査（財団法人食品薬品安全センター）におけるZスコアは全て $Z < 2$ であった。

7.1.クオリティーコントロール試料分析結果

7.1.1.果肉

成分名	分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>シモキサニル</u>	2012/8/23	茨城	110	<0.01
	2012/8/29	高知	92	<0.01
	2012/8/16	宮崎	102	<0.01
	2012/9/5	宮崎	102	<0.01
<u>メタラキシルM</u>	2012/8/23	茨城	101	<0.01
	2012/8/29	高知	89	<0.01
	2012/8/16	宮崎	101	<0.01
	2012/9/5	宮崎	103	<0.01

7.1.2.果皮

成分名	分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>シモキサニル</u>	2012/8/27	茨城	109	<0.01
	2012/8/31	高知	110	<0.01
	2012/8/22	宮崎	104	<0.01
	2012/9/5	宮崎	109	<0.01
<u>メタラキシルM</u>	2012/8/27	茨城	93	<0.01
	2012/8/31	高知	94	<0.01
	2012/8/22	宮崎	102	<0.01
	2012/9/5	宮崎	107	<0.01

8. マトリックス効果の確認

マトリックス標準溶液は、各圃場の無処理試料の最終溶液1 mLをナス型フラスコに分取し、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、窒素気流下で溶媒を留去した後、0.01 mg/Lの検量線用標準溶液1 mLに溶解して調製した。マトリックス試料分析結果を表に示す。

8.1.1.果肉

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>シモキサニル</u>	茨城	105
	高知	77
	宮崎	96
<u>メタラキシルM</u>	茨城	102
	高知	98
	宮崎	100

8.1.2.果皮

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>シモキサニル</u>	茨城	88
	高知	102
	宮崎	100
<u>メタラキシルM</u>	茨城	101
	高知	103
	宮崎	113

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料に各化合物を添加し、 -20°C 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。保存安定性試験の結果を表に示す。

9.1.果肉の保存安定性試験結果

9.1.1.シモキサニル

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	49 (2012/7/18-9/5)	97,	96	96
0.5	高知	35 (2012/8/1-9/5)	99,	98	98
0.5	宮崎	62 (2012/7/5-9/5)	101,	100	100

9.1.2.メタラキシルM

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	49 (2012/7/18-9/5)	95,	95	95
0.5	高知	35 (2012/8/1-9/5)	93,	93	93
0.5	宮崎	62 (2012/7/5-9/5)	93,	93	93

9.2.果皮の保存安定性試験結果**9.2.1.シモキサニル**

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	49 (2012/7/18-9/5)	104,	104	104
0.5	高知	35 (2012/8/1-9/5)	104,	104	104
0.5	宮崎	62 (2012/7/5-9/5)	106,	105	106

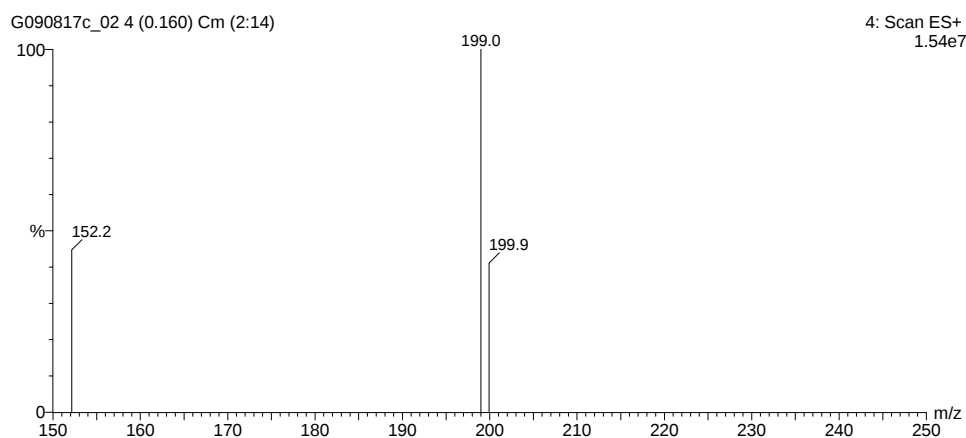
9.2.2.メタラキシルM

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	49 (2012/7/18-9/5)	96,	95	96
0.5	高知	35 (2012/8/1-9/5)	92,	92	92
0.5	宮崎	62 (2012/7/5-9/5)	97,	95	96

付図-1. マススペクトル

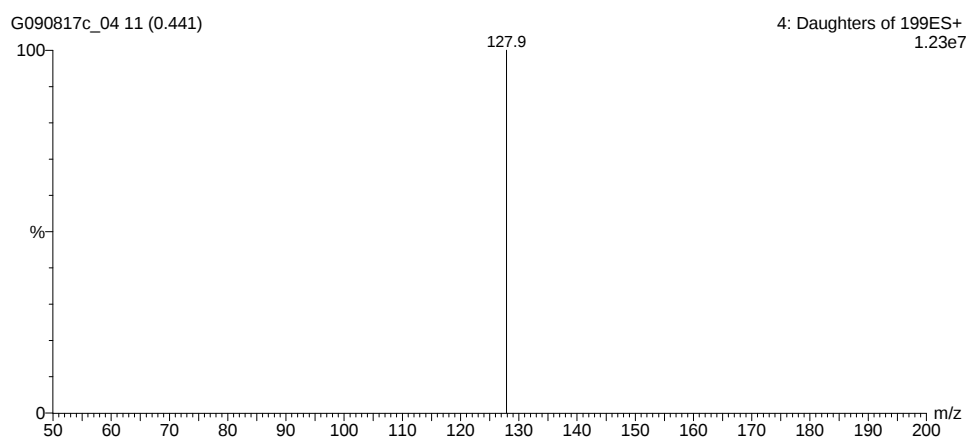
付図-1-1. シモキサニルのマススペクトル

シモキサニルのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)



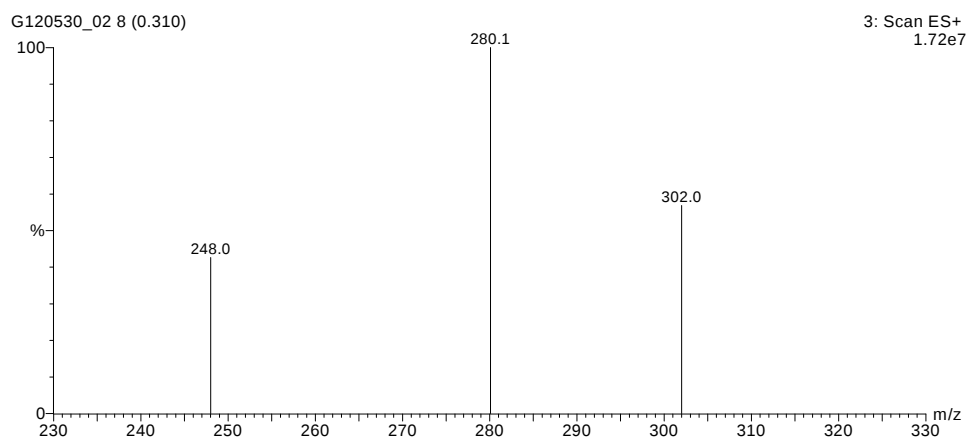
シモキサニルのプロダクトスキャンスペクトルの一例

(プリカーサーイオン ; $m/z=199.0$, 正モード)



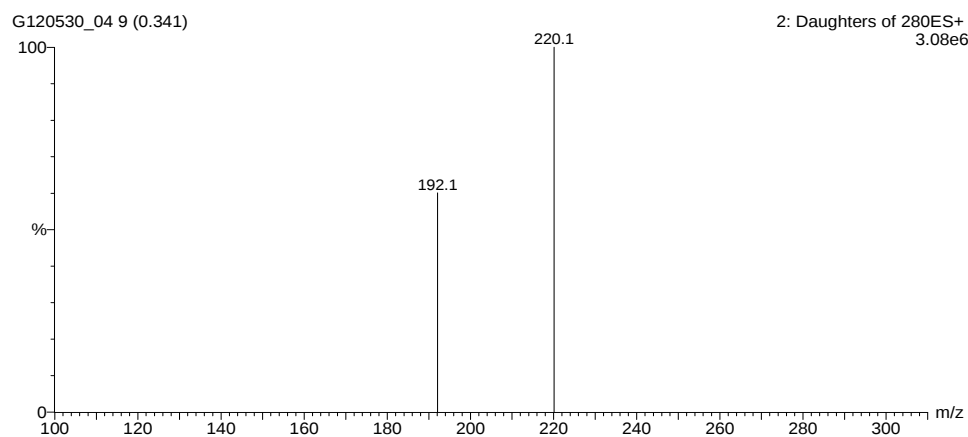
付図-1-2. メタラキシルMのマススペクトル

メタラキシルMのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)



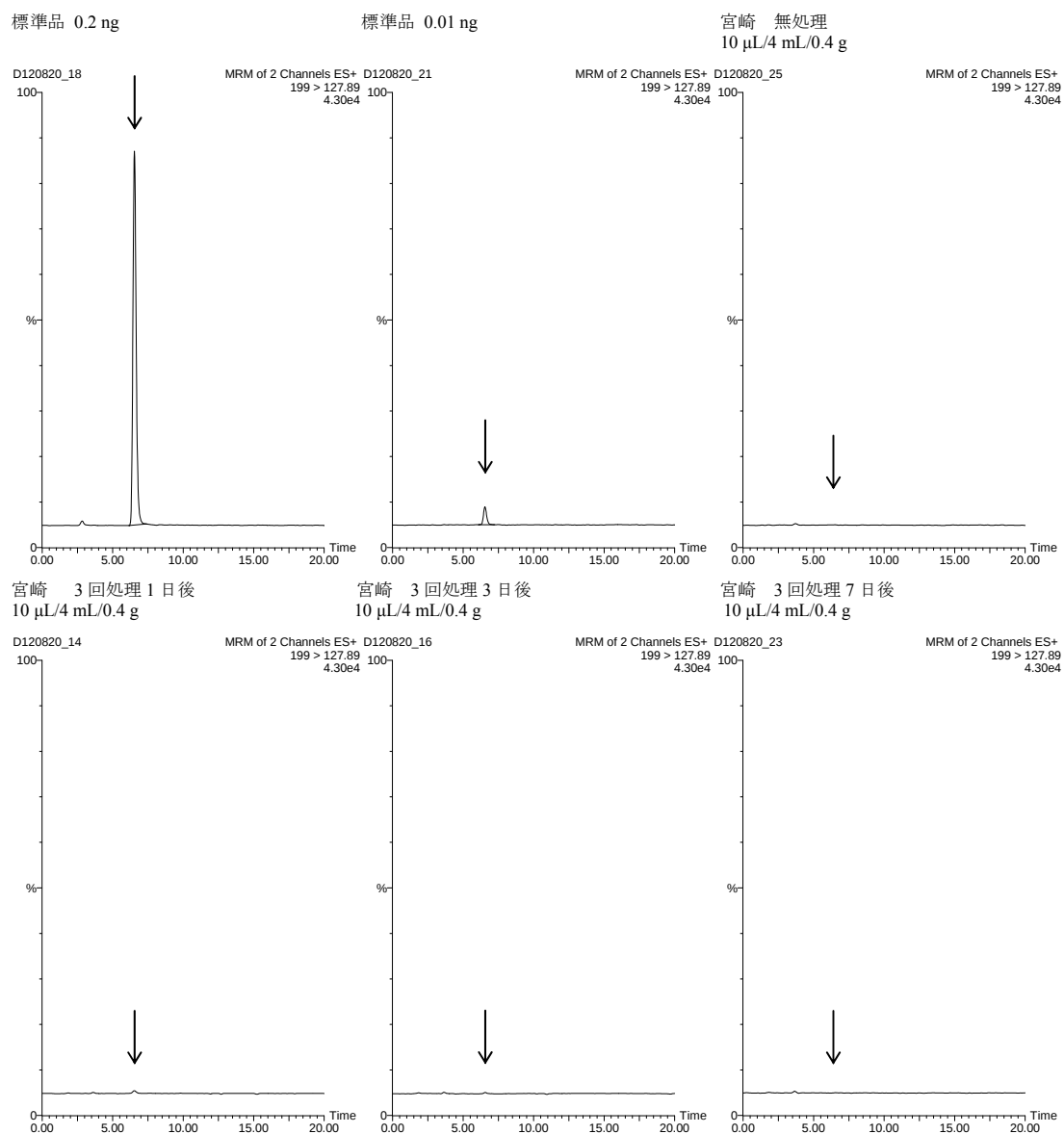
メタラキシルMのプロダクトスキャンスペクトルの一例

(プリカーサーイオン ; $m/z=280.1$, 正モード)

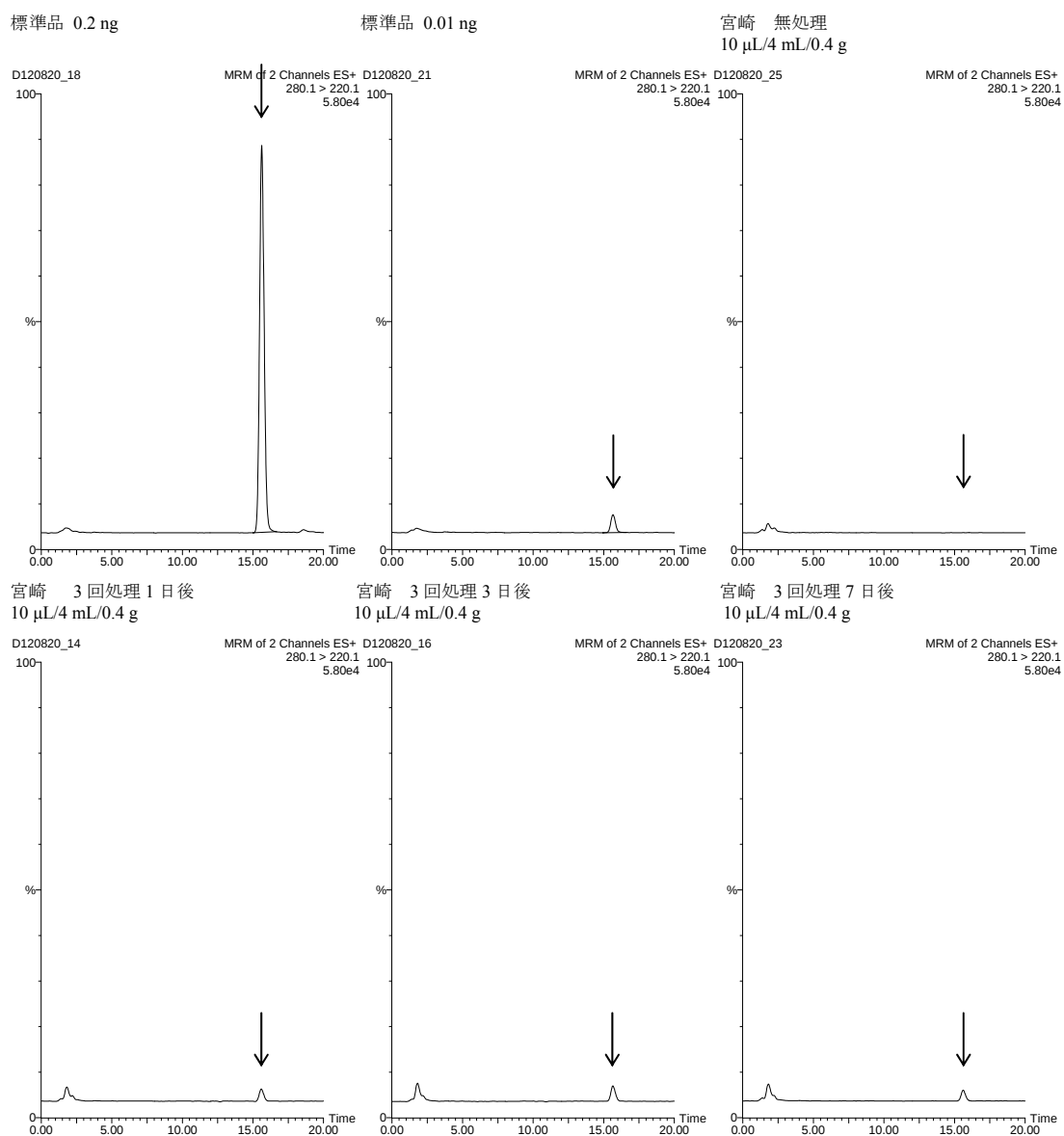


付図-2. 果実のクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. シモキサニルのクロマトグラム

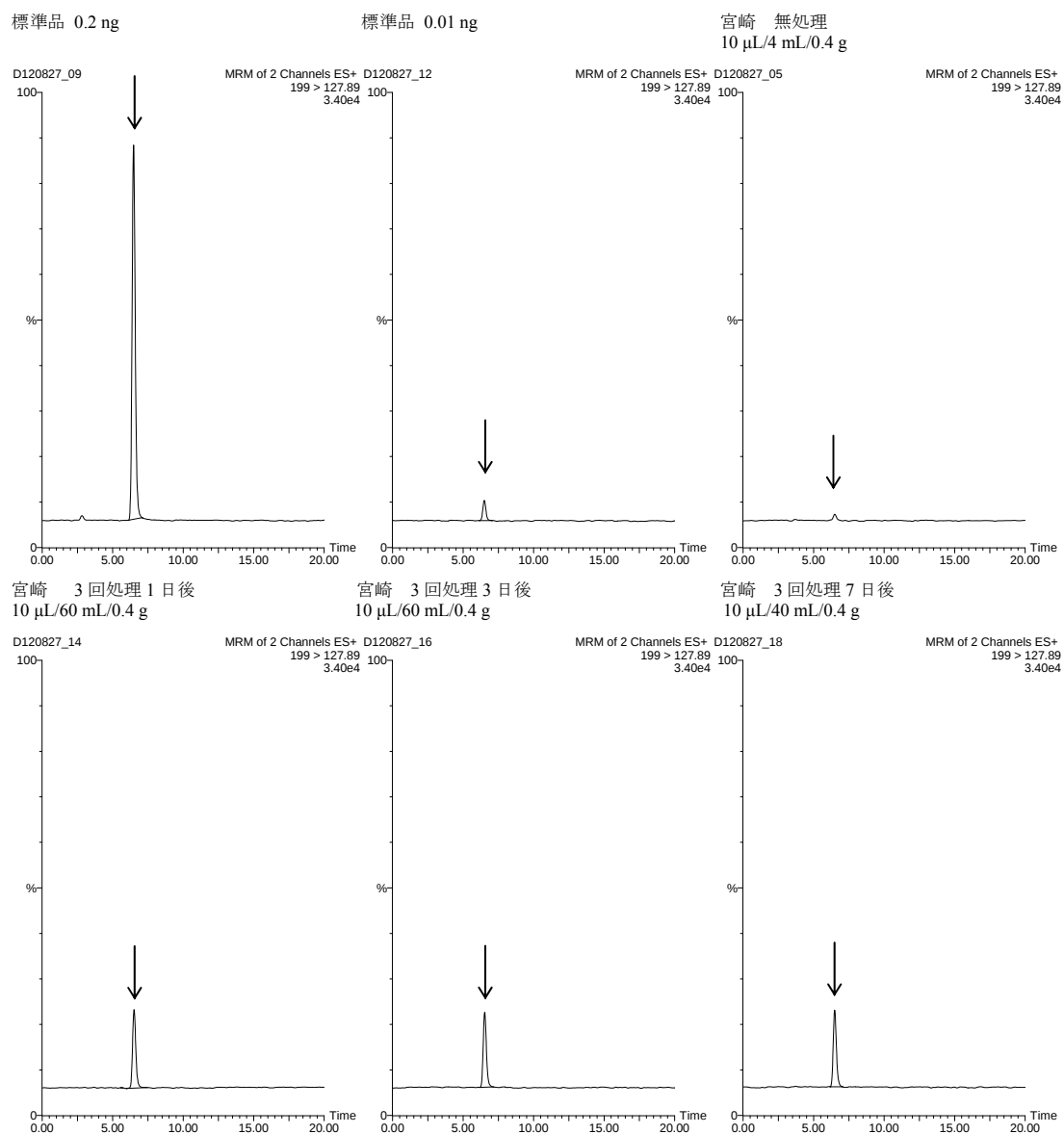


付図-2-2. メタラキシルMのクロマトグラム

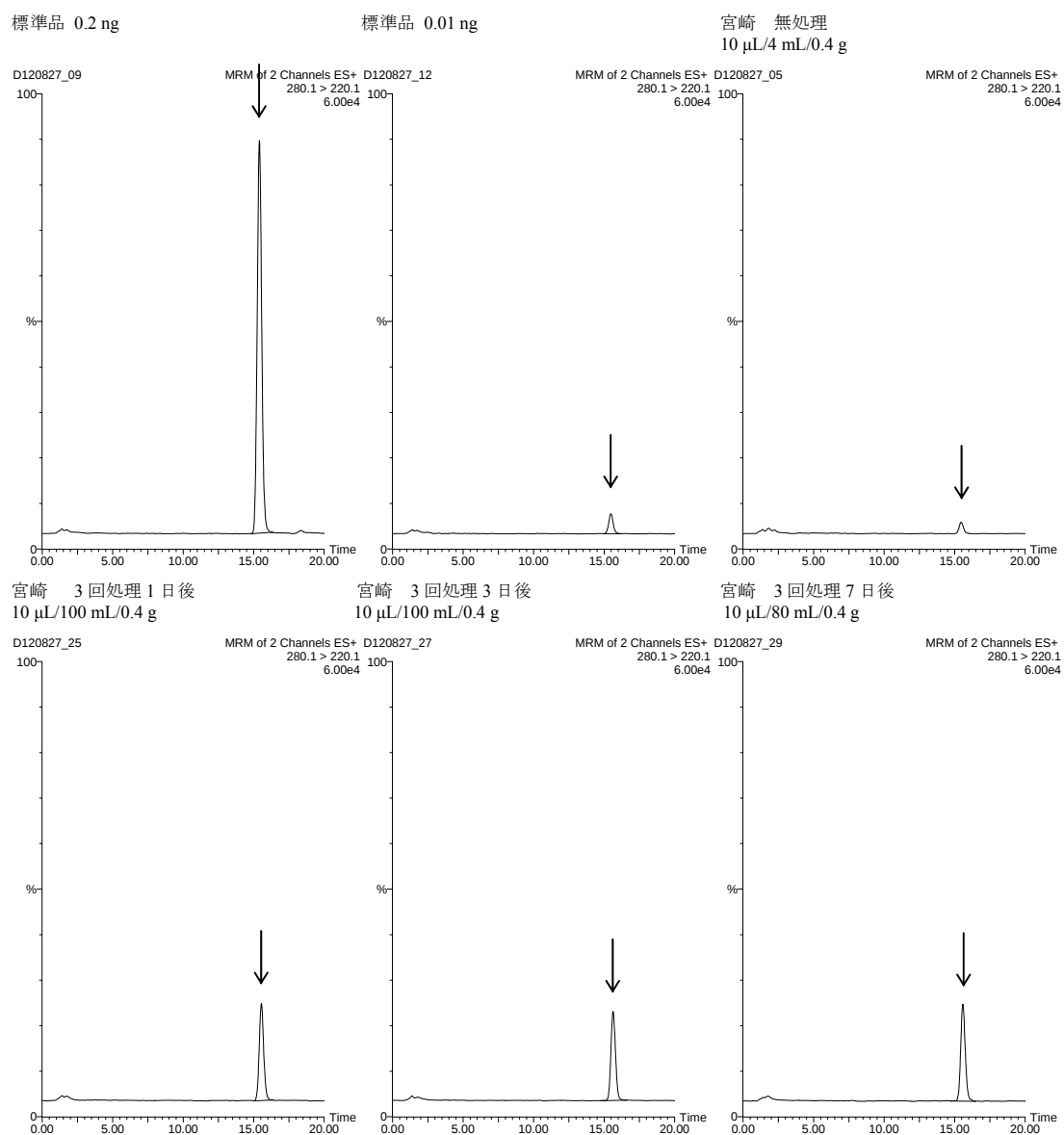


付図-3. 果皮のクロマトグラム (代表例)

付図-3-1. シモキサニルのクロマトグラム



付図-3-2. メタラキシルMのクロマトグラム



登録作物のグループ化・残留分析詳細③
スピノサド (スピノシンA, スピノシンD)

1. 分析対象物質

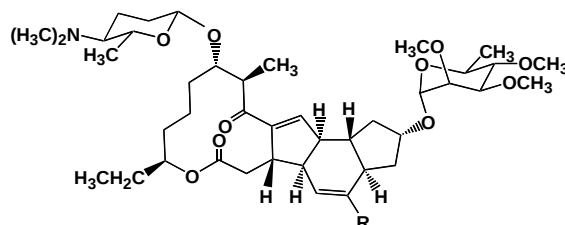
スピノシンA

化学名 : (2R,3aS,5aR,5bS,9S,13S,14R,16aS,16bR)-2-(6-deoxy-2,3,4-tri-O-methyl- α -L-mannopyranosyloxy)-13-(4-dimethylamino-2,3,4,6-tetradecoxy- β -D-erythro-pyranosyloxy)-9-ethyl-2,3,3a,5a,5b,6,7,9,10,11,12,13,14,15,16a,16b-hexadecahydro-14-methyl-1H-8-oxacyclododeca [b] as-indacene-7,15-dione

分子式 : $C_{41}H_{65}NO_{10}$

分子量 : 732.0

構造式 :



スピノシンA : R=H, スピノシンD : R=CH₃

性 状 : 淡灰白色結晶

融 点 : 84~99.5℃

蒸気圧 : 3.0×10^{-5} mPa (25℃)

分配係数 : $\log P_{OW} = 2.8$ (pH=5), 4.0 (pH=7) , 5.2 (pH=9)

溶解性 : 水 89 ppm (蒸留水, 20℃), 235 ppm (pH=7, 20℃)

アセトン 16.8, アセトニトリル 13.4, ジクロロメタン 52.5,
ヘキサン 0.448, メタノール 19.0, *n*-オクタノール 0.926,
トルエン 45.7 (以上g/L, 20℃)

出 典 : The Pesticide Manual, 14th Edition.

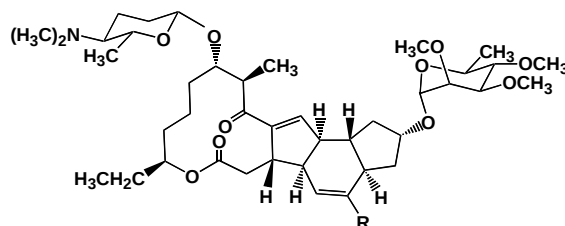
スピノシンD

化学名 : (2S,3aR,5aS,5bS,9S,13S,14R,16aS,16bR)-2-(6-deoxy-2,3,4-tri-O-methyl- α -L-mannopyranosyloxy)-13-(4-dimethylamino-2,3,4,6-tetradecoxy- β -D-erythro-pyranosyloxy)-9-ethyl-2,3,3a,5a,5b,6,7,9,10,11,12,13,14,15,16a,16b-hexadecahydro-4,14-dimethyl-1H-8-oxacyclododeca [b] as-indacene-7,15-dione

分子式： $C_{42}H_{67}NO_{10}$

分子量：746.0

構造式：

スピノシンA：R=H，スピノシンD：R=CH₃

性 状：淡灰白色結晶

融 点：161.5～170℃

蒸気圧： 2.0×10^{-5} mPa (25℃)分配係数： $\log P_{OW} = 3.2$ (pH=5), 4.5 (pH=7), 5.2 (pH=9)

溶解性：水 0.5 ppm (蒸留水, 20℃), 0.33 ppm (pH=7, 20℃)
 アセトン 1.01, アセトニトリル 0.255, ジクロロメタン 44.8,
 ヘキサン 0.743, メタノール 0.252, *n*-オクタノール 0.127,
 トルエン 15.2 (以上g/L, 20℃)

出 典：The Pesticide Manual, 14th Edition.

2. 標準品及び試薬

スピノシン A 標準品：純度 94.3% (林純薬工業製)

スピノシン D 標準品：純度 96.9% (林純薬工業製)

アセトニトリル：残留農薬試験用 (和光純薬工業製)

アセトニトリル：LC-MS 用 (和光純薬工業製)

トリエチルアミン：試薬特級 (和光純薬工業製)

酢酸アンモニウム：試薬特級 (和光純薬工業製)

水：PURELAB Flex System (Veolia Water Solutions & Technologies, Saint Maurice, France) で精製した水

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

3. 装置及び機器

電子天秤：メトラー・トレド AG245及びXS2002S

台秤：エー・アンド・デイ FG-60KBM及びFV-60KA2

ミキサー：エフ・エム・アイ ロボクーブ BLIXER-5Plus

ホモジナイザー：kinematica PT 10/35, PT3100

液体クロマトグラフ・質量分析計システム (LC-MS/MS)：

データ処理装置： ウォータース 2695 HPLC
ウォータース Quattro micro
ウォータース MassLynx 4.0

4. 液体クロマトグラフ・質量分析計の操作条件

4.1. 液体クロマトグラフ・質量分析計

4.1.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム：	InertSustain C18 HP (ジーエルサイエンス製)
	内径 2.1 mm，長さ 100 mm，粒径 3 μm
溶離液：	アセトニトリル／5 mmol/L 酢酸アンモニウム (85:15, v/v)
流速：	0.2 mL/min
カラム温度：	40℃
試料注入量：	10 μL
保持時間：	スピノシン A；5.6 min
	スピノシン D；6.6 min

4.1.2. 質量分析計

イオン化法：	エレクトロスプレー イオン化法 (ESI)
	正モード
コーンガス流量：	50 L/h (N ₂)
脱溶媒ガス流量：	500 L/h (N ₂)
脱溶媒ガス温度：	350℃
ソースブロック温度：	100℃
キャピラリー電圧：	3.2 kV
コーン電圧：	40 V (各成分)
コリジョン電圧：	30 V (各成分)
	(コリジョンガス; Ar)
イオン検出法：	MRM
モニタリングイオン：	スピノシンA ; プリカーサーイオン m/z 732.5
	プロダクトイオン m/z 142.1
	スピノシンD ; プリカーサーイオン m/z 746.5
	プロダクトイオン m/z 142.1

5. 検量線の作成

スピノシンA及びスピノシンDの各標準品10.6及び10.3 mg（各10.0 mg相当）を各々50 mLのメスフラスコに精秤し、アセトニトリルに溶解して200 mg/L標準原液を調製した。各原液を等量ずつ混合し、アセトニトリルで希釈して0.0001, 0.0002, 0.0008, 0.004及び0.008 mg/Lの混合標準溶液を調製した。その10 µL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スピノシンA及びスピノシンDのピーク面積を測定し、横軸に重量（ng）、縦軸にピーク面積をとって各検量線を作成した。

6. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料は重量を量り、各々を縦に6分割したものから対角の2つを取り合わせた後、果肉と果皮に分け、それぞれの有姿試料を作製した。重量を量った後、密封して冷凍保存（-20℃設定）した。果肉分析時には果肉の有姿試料を取り、細切し、ミキサーで均一化した。果皮分析時には果皮の有姿試料を取り、細切し、ミキサーで均一化した。また、量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比（%）を算出した。

6.1.2. 抽出

6.1.2.1. 果肉

均一化した試料20 gを三角フラスコにはかりとり、アセトニトリル／水（50:50, v/v）混液100 mLを加えて30分間振とう抽出した。抽出物をガラス繊維ろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣を同混液50 mLで洗い、同様にろ過した。ろ液を合わせ同混液で200 mLに定容し、その2 mL（試料0.2 g相当量）を分取した。

6.1.2.2. 果皮

均一化した試料10 gを三角フラスコにはかりとり、アセトニトリル／水（50:50, v/v）混液70 mLを加えてホモジナイザーで磨砕抽出した。シャフトに付着した試料を同混液30 mLで洗浄し、洗浄液を合わせ、30分間振とうした。抽出物をガラス繊維ろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣を同混液50 mLで洗い、同様にろ過した。ろ液を合わせ同混液で200 mLに定容し、その4 mL（試料0.2 g相当量）を分取した。

6.1.3. CHミニカラムによる精製

CHミニカラムにアセトニトリル5 mL及び水5 mLを順次流下し前処理した。前項の分取した抽出液を前処理したCHミニカラムに流下した後、アセトニトリル10 mLを流下し、これらの流出液を捨てた。次にアセトニトリル／トリエチルアミン（98:2, v/v）混液10 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。

6.1.4. 定量

残留物をアセトニトリル5 mLに溶解し、必要に応じてアセトニトリルで希釈した。この溶液の10 µL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、検量線よりスピノシンA及びスピノシンDの重量を求め、試料中の各残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値（LOQ）及び検出限界値（LOD）*

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	定量限界 (ppm)
<u>果肉</u>				
0.002	0.2	5	10	0.005
<u>果皮</u>				
0.002	0.2	5	10	0.005
最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)
<u>果肉</u>				
0.001	0.2	5	10	0.003
<u>果皮</u>				
0.001	0.2	5	10	0.003

*スピノシンA，スピノシンDはいずれも同じ値

6.3. 回収率

分析法確認のため、宮崎II*の果肉及び果皮の無処理試料を用いて、0.005 ppm（定量限界相当）、0.25 ppm及び5 ppm添加濃度における回収試験を各5連分析で実施した。なお、無処理試料は2連分析し、全て定量限界未満（<0.005 ppm）であった。回収試験結果を表に示す。

*平成23年度農薬等安全性確保強化実態調査事業の宮崎II無処理試料を使用

6.3.1. 果肉の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
<u>スピノシンA</u>						
宮崎II	5	98, 97,	98, 94	97,	97	1.7
宮崎II	0.25	101, 97,	99, 81	98,	95	8.5
宮崎II	0.005	103, 95,	102, 91	99,	98	5.1
<u>スピノシンD</u>						
宮崎II	5	97, 94,	96, 94	96,	95	1.4
宮崎II	0.25	103, 97,	101, 82	101,	97	8.8
宮崎II	0.005	88, 81,	85, 80	85,	84	3.9

6.3.2. 果皮の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
スピノシンA						
宮崎II	5	93, 90,	93, 88	91,	91	2.3
宮崎II	0.25	97, 94,	96, 91	95,	95	2.4
宮崎II	0.005	97, 90,	96, 86	92,	92	4.9
スピノシンD						
宮崎II	5	92, 89,	91, 87	90,	90	2.1
宮崎II	0.25	99, 89,	97, 88	97,	94	5.4
宮崎II	0.005	81, 79,	81, 74	79,	79	3.6

7. 精度管理

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

管理基準：20検体を超えるごとに、各1検体の無処理試料及び0.05 ppm添加試料（クォリティーコントロール試料）を分析した。

クォリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

また、2011年10月実施の食品衛生精度管理比較調査（財団法人食品薬品安全センター）におけるZスコアは全て $Z < 2$ であった。

7.1.クォリティーコントロール試料分析結果

7.1.1.果肉

成分名	分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>スピノシンA</u>	2012/8/23	茨城	101	<0.005
	2012/8/29	高知	85	<0.005
	2012/8/16	宮崎	108	<0.005
	2012/9/5	宮崎	93	<0.005
<u>スピノシンD</u>	2012/8/23	茨城	99	<0.005
	2012/8/29	高知	90	<0.005
	2012/8/16	宮崎	103	<0.005
	2012/9/5	宮崎	94	<0.005

7.1.2.果皮

成分名	分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>スピノシンA</u>	2012/8/27	茨城	98	<0.005
	2012/8/31	高知	97	<0.005
	2012/8/22	宮崎	99	<0.005
	2012/9/5	宮崎	86	<0.005
<u>スピノシンD</u>	2012/8/27	茨城	97	<0.005
	2012/8/31	高知	100	<0.005
	2012/8/22	宮崎	91	<0.005
	2012/9/5	宮崎	86	<0.005

8. マトリックス効果の確認

マトリックス標準溶液は、各圃場の無処理試料の最終溶液1 mLをナス型フラスコに分取し、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、窒素気流下で溶媒を留去した後、0.004 mg/Lの検量線用標準溶液1 mLに溶解して調製した。マトリックス試料分析結果を表に示す。

8.1.1.果肉

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>スピノシンA</u>	茨城	114
	高知	104
	宮崎	108
<u>スピノシンD</u>	茨城	106
	高知	109
	宮崎	106

8.1.2.果皮

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>スピノシンA</u>	茨城	113
	高知	103
	宮崎	115
<u>スピノシンD</u>	茨城	101
	高知	105
	宮崎	107

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料に各化合物を添加し、 -20°C 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。保存安定性試験の結果を表に示す。

9.1.果肉の保存安定性試験結果

9.1.1.スピノシンA

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	49 (2012/7/18-9/5)	90,	89	90
0.5	高知	35 (2012/8/1-9/5)	88,	88	88
0.5	宮崎	62 (2012/7/5-9/5)	91,	88	90

9.1.2.スピノシンD

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	49 (2012/7/18-9/5)	88,	87	88
0.5	高知	35 (2012/8/1-9/5)	88,	87	88
0.5	宮崎	62 (2012/7/5-9/5)	87,	85	86

9.2.果皮の保存安定性試験結果

9.2.1.スピノシンA

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	49 (2012/7/18-9/5)	89,	88	88
0.5	高知	35 (2012/8/1-9/5)	87,	85	86
0.5	宮崎	62 (2012/7/5-9/5)	88,	86	87

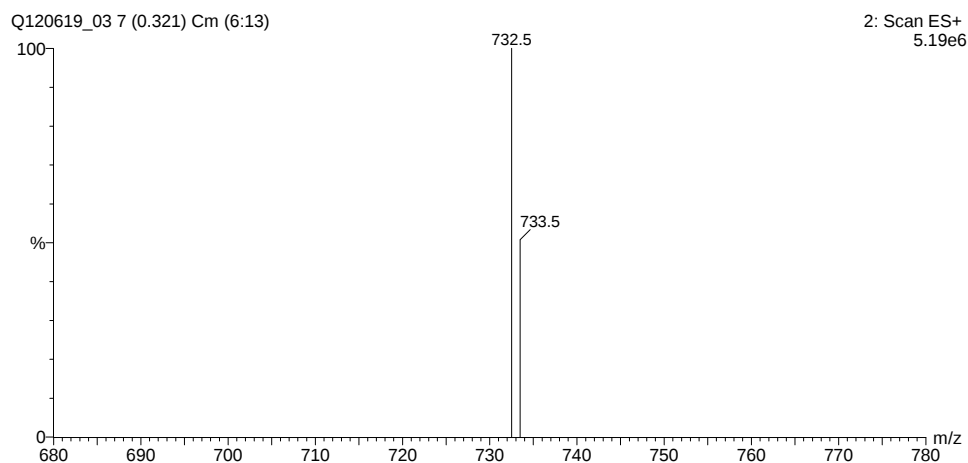
9.2.2.スピノシンD

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	49 (2012/7/18-9/5)	87,	87	87
0.5	高知	35 (2012/8/1-9/5)	87,	86	86
0.5	宮崎	62 (2012/7/5-9/5)	84,	83	84

付図-1. マススペクトル

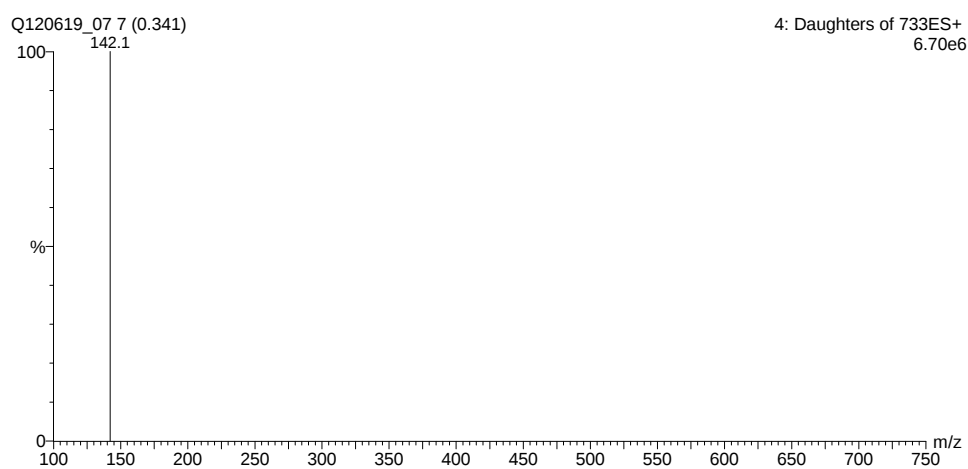
付図-1-1. スピノシンAのマススペクトル

スピノシンAのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)



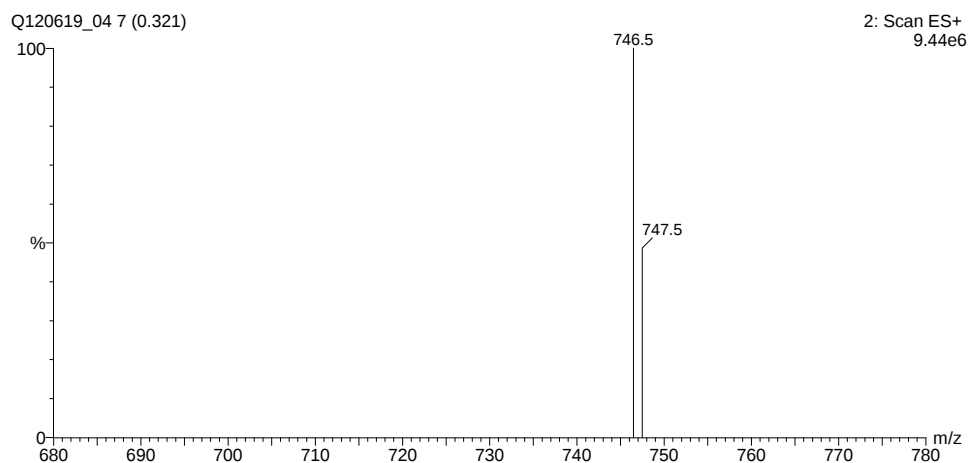
スピノシンAのプロダクトスキャンスペクトルの一例

(プリカーサーイオン ; $m/z=732.5$, 正モード)



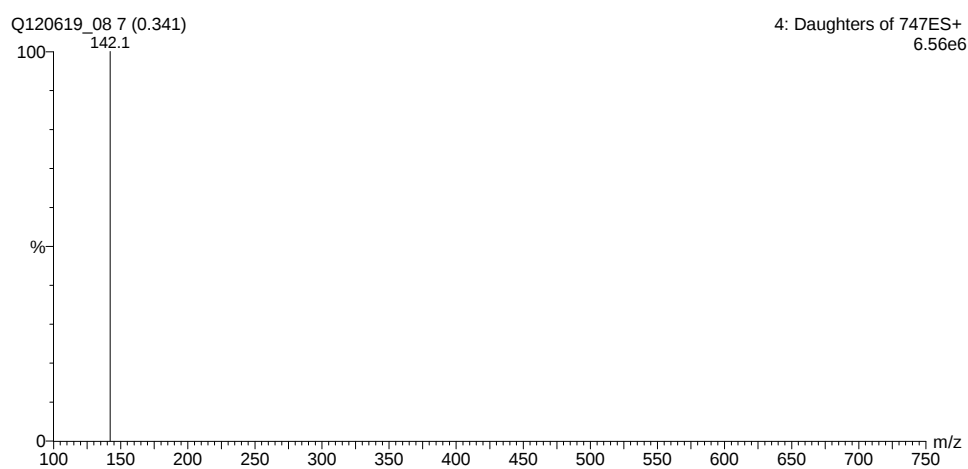
付図-1-2. スピノシンDのマススペクトル

スピノシンDのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)



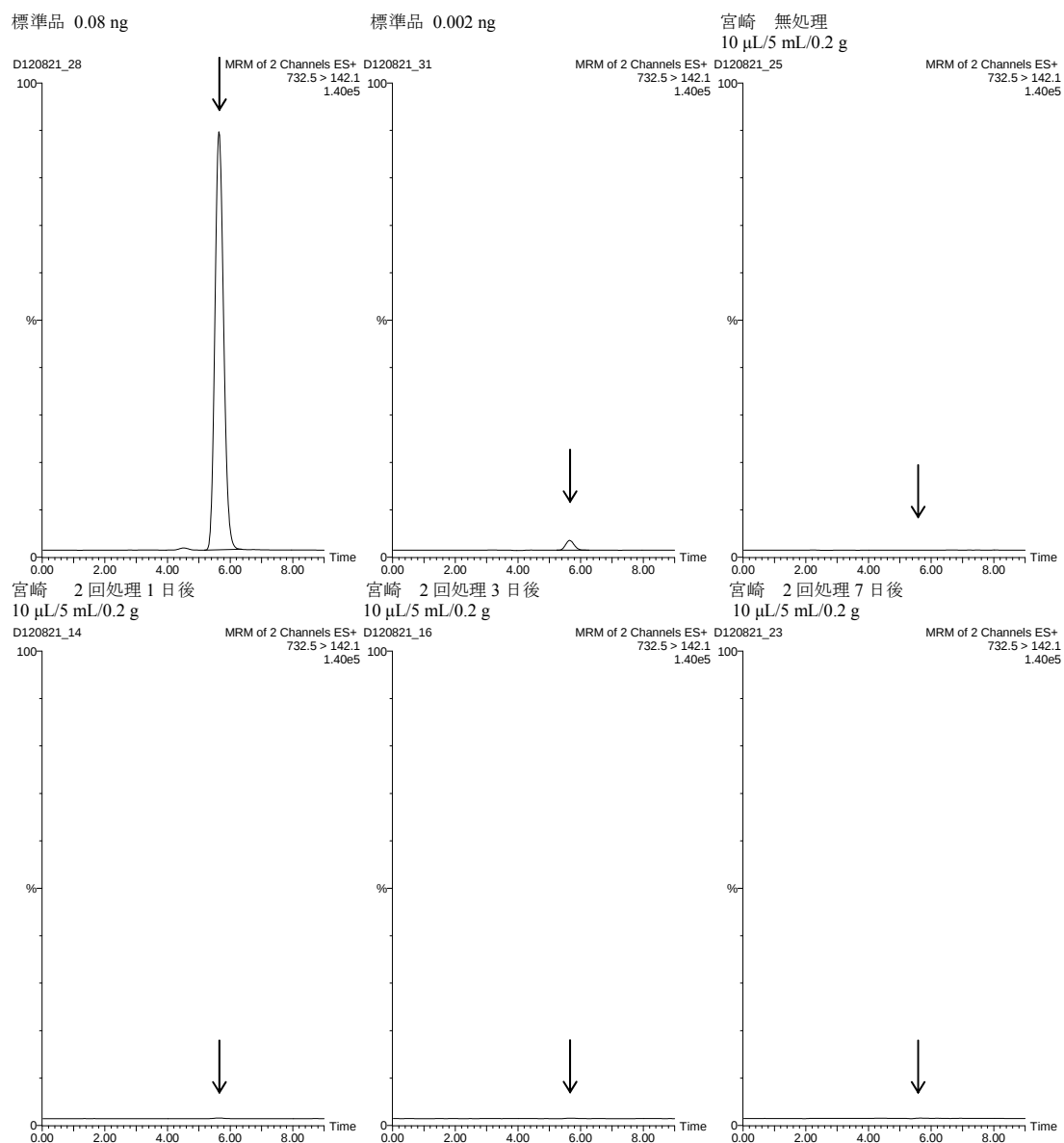
スピノシンDのプロダクトスキャンスペクトルの一例

(プリカーサーイオン ; m/z=746.5, 正モード)

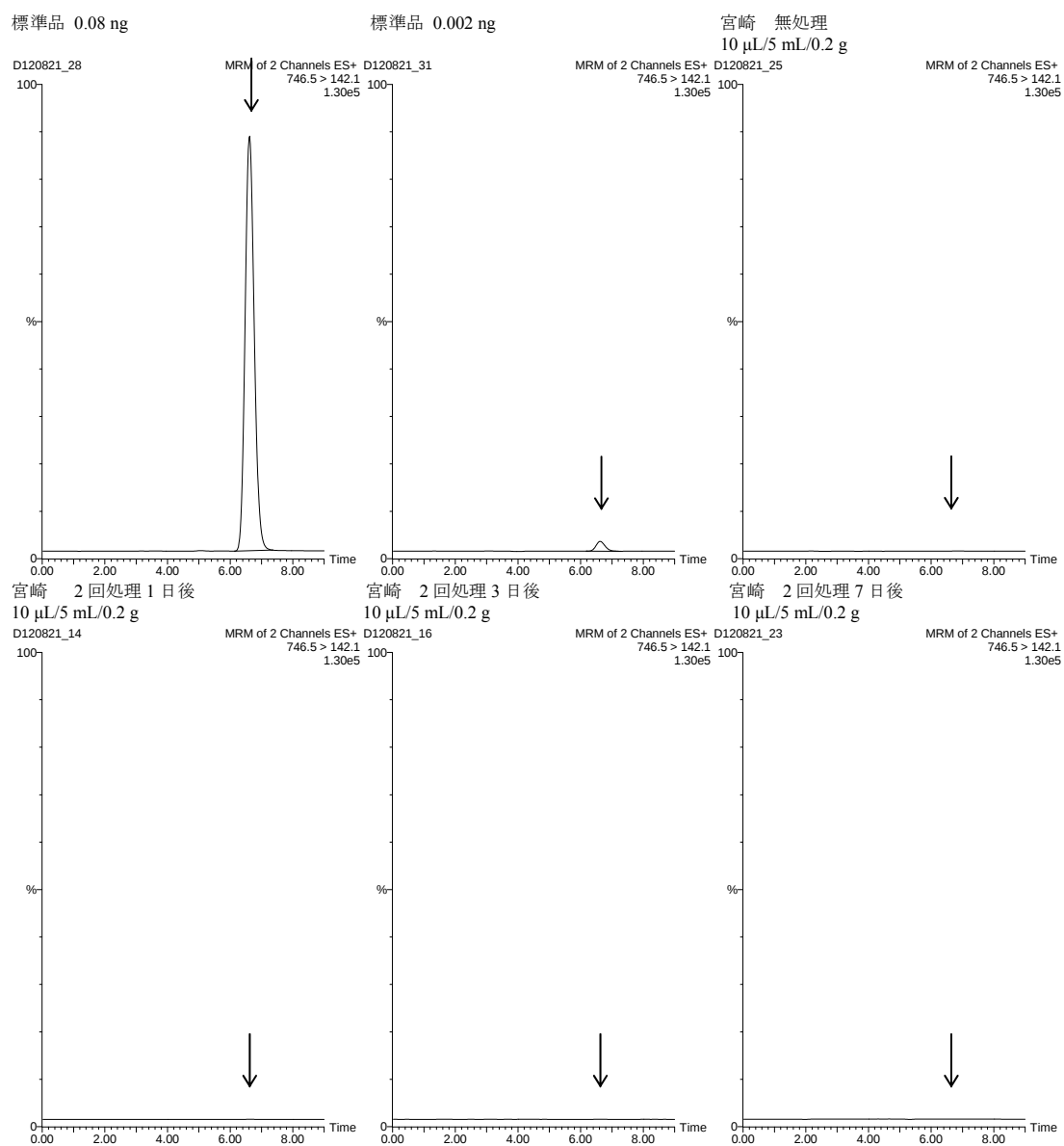


付図-2. 果実のクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. スピノシンAのクロマトグラム

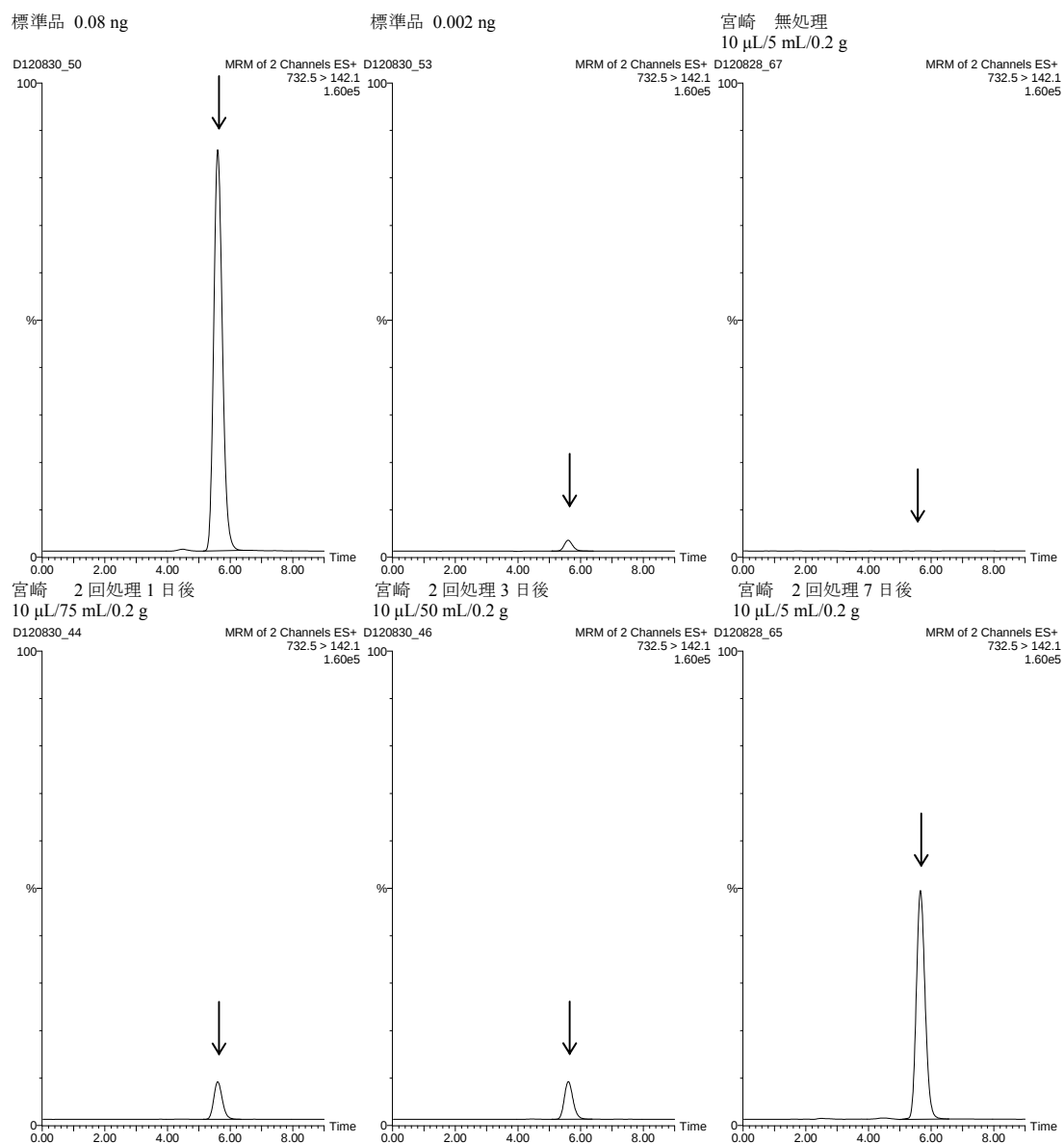


付図-2-2. スピノシンDのクロマトグラム

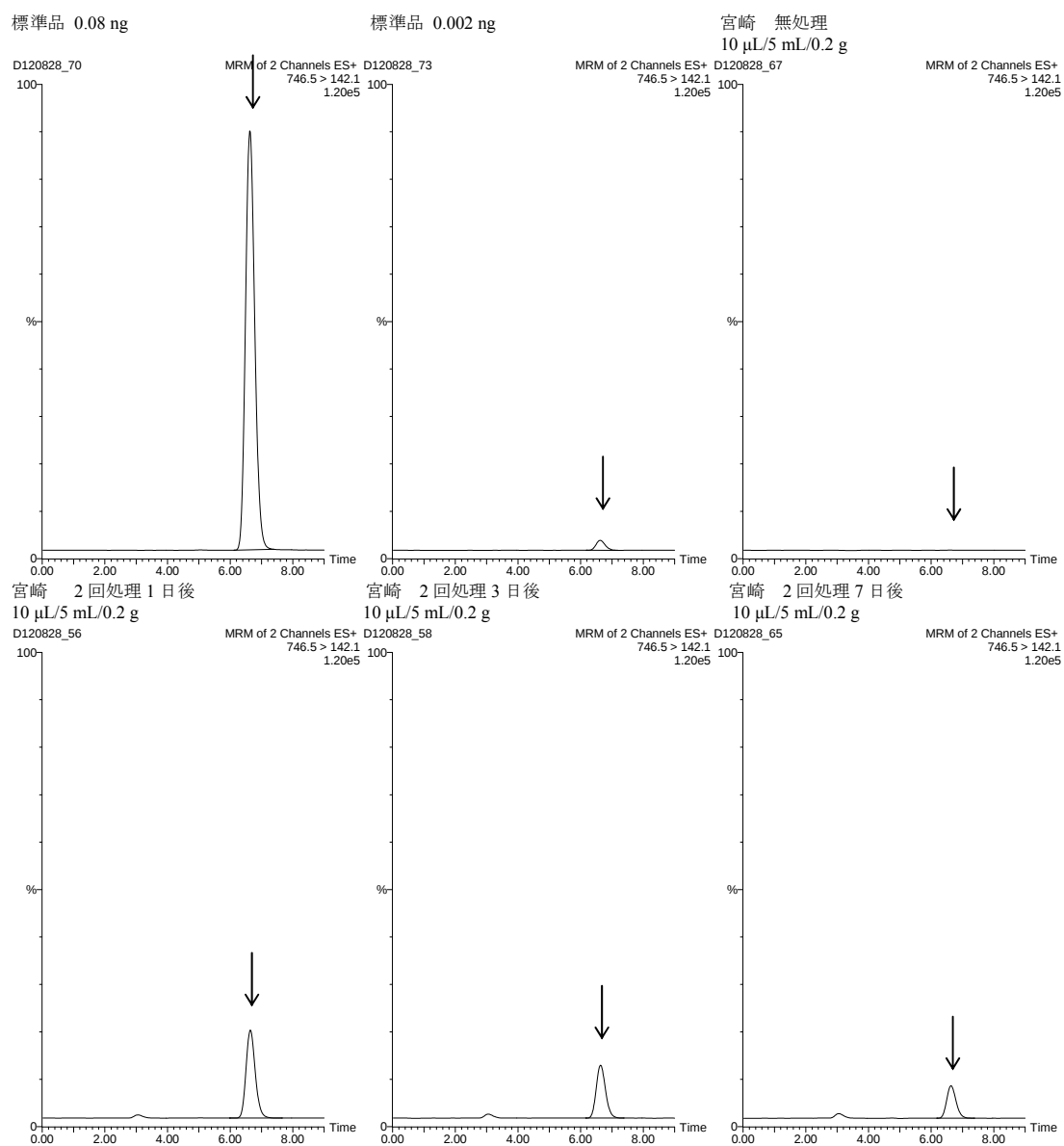


付図-3. 果皮のクロマトグラム (代表例)

付図-3-1. スピノシンAのクロマトグラム



付図-3-2. スピノシンDのクロマトグラム



登録作物のグループ化・残留分析詳細④

シアゾファミド

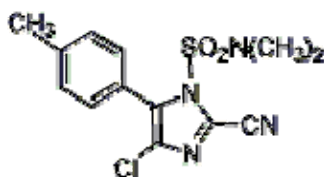
1. 分析対象物質

シアゾファミド

化学名： 4-chloro-2-cyano-*N,N*-dimethyl-5-*p*-tolylimidazole-1-sulfonamide分子式： $C_{13}H_{13}ClN_4O_2S$

分子量： 324.8

構造式：



性 状： 淡黄色粉末

融 点： 152.7°C

蒸気圧： $< 1.3 \times 10^{-2}$ mPa (35°C)分配係数： $\log P_{OW} = 3.2$ (25°C)

溶解性： 水 0.121 (pH=5), 0.107 (pH=7), 0.109 (pH=9) (以上ppm, 20°C)
 アセトン 41.9, トルエン 5.3, ジクロロメタン 101.8, ヘキサン 0.03,
 エタノール 1.54, 酢酸エチル 15.63, オクタノール 0.25,
 アセトニトリル 29.4, イソプロパノール 0.39 (以上g/L, 20°C)

出 典： The Pesticide Manual, 14th Edition.

2. 標準品及び試薬

シアゾファミド標準品： 純度 99.4% (和光純薬工業製)

アセトニトリル： 残留農薬試験用 (和光純薬工業製)

アセトニトリル： LC-MS 用 (和光純薬工業製)

酢酸： 試薬特級 (和光純薬工業製)

水： PURELAB Flex System (Veolia Water Solutions & Technologies, Saint Maurice, France) で精製した水

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

3. 装置及び機器

電子天秤： メトラー・トレド AG245及びXS2002S

台秤： エー・アンド・デイ FG-60KBM及びFV-60KA2

ミキサー： エフ・エム・アイ ロボクーブ BLIXER-5Plus

ホモジナイザー： kinematica PT 10/35, PT3100
 液体クロマトグラフ・質量分析計システム (LC-MS/MS) :
 ウォータース Acquity UPLC
 ウォータース Quattro premier XE
 データ処理装置： ウォータース MassLynx 4.0

4. 液体クロマトグラフ・質量分析計の操作条件

4.1. 液体クロマトグラフ・質量分析計

4.1.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム： ACQUITY UPLC BEH C18 (ウォータース製)
 内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒径 1.7 μ m
 溶離液： アセトニトリル／0.1%酢酸 (60:40, v/v)
 流速： 0.3 mL/min
 カラム温度： 40°C
 試料注入量： 2 μ L
 保持時間： 2.7 min

4.1.2. 質量分析計

イオン化法： エレクトロスプレー イオン化法 (ESI)
 正モード
 コーンガス流量： 50 L/h (N₂)
 脱溶媒ガス流量： 800 L/h (N₂)
 脱溶媒ガス温度： 350°C
 ソースブロック温度： 120°C
 キャピラリー電圧： 3.5 kV
 コーン電圧： 20 V
 コリジョン電圧： 20 V
 (コリジョンガス; Ar)
 イオン検出法： MRM
 モニタリングイオン： プリカーサーイオン m/z 325.2
 プロダクトイオン m/z 107.6

5. 検量線の作成

シアゾファミドの標準品10.1 mg (10.0 mg相当) を50 mLのメスフラスコに精秤し、アセトニトリルに溶解して200 mg/L標準原液を調製した。この原液をアセトニトリル／水 (80:20, v/v) 混液で希釈して0.0001, 0.0002, 0.001, 0.005及び0.01 mg/Lの標準溶液を調製した。その2 μ Lを前記条件の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入し、データ処理装置を用いてシアゾファミ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. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料は重量を量り、各々を縦に6分割したものから対角の2つを取り合わせた後、果肉と果皮に分け、それぞれの有姿試料を作製した。重量を量った後、密封して冷凍保存（-20℃設定）した。果肉分析時には果肉の有姿試料を取り、細切し、ミキサーで均一化した。果皮分析時には果皮の有姿試料を取り、細切し、ミキサーで均一化した。また、量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比（%）を算出した。

6.1.2. 抽出

6.1.2.1. 果肉

均一化した試料20 gを三角フラスコにはかりとり、アセトニトリル100 mLを加えて30分間振とう抽出した。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣をアセトニトリル50 mLで洗い、同様にろ過した。ろ液を合わせアセトニトリルで200 mLに定容し、その2 mL（試料0.2 g相当量）を分取した後、水3 mLを加えて混合した。

6.1.2.2. 果皮

均一化した試料10 gを三角フラスコにはかりとり、アセトニトリル70 mLを加えてホモジナイザーで磨砕抽出した。シャフトに付着した試料をアセトニトリル30 mLで洗浄し、洗浄液を合わせ、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、残渣をアセトニトリル50 mLで洗い、同様にろ過した。ろ液を合わせアセトニトリルで200 mLに定容し、その4 mL（試料0.2 g相当量）を分取した後、水6 mLを加えて混合した。

6.1.3. C₁₈ミニカラムによる精製

C₁₈ミニカラムにアセトニトリル5 mL及び水5 mLを順次流下し前処理した。前項の溶液を前処理したC₁₈ミニカラムに流下した後、水／アセトニトリル（60:40, v/v）混液5 mLを流下し、これらの流出液を捨てた。次に水／アセトニトリル（20:80, v/v）混液8 mLを流下し、溶出液を分取した。

6.1.4. 定量

溶出液にアセトニトリル／水（80:20, v/v）混液を加え10 mLに定容し、必要に応じて同混液で希釈した。この溶液の2 µL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、検量線よりシアゾファミドの重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値 (LOQ) 及び検出限界値 (LOD)

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	定量限界 (ppm)
<u>果肉</u>				
0.0004	0.2	10	2	0.01
<u>果皮</u>				
0.0004	0.2	10	2	0.01
最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)
<u>果肉</u>				
0.0002	0.2	10	2	0.005
<u>果皮</u>				
0.0002	0.2	10	2	0.005

6.3. 回収率

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

*平成23年度農薬等安全性確保強化実態調査事業の高知II無処理試料を使用

6.3.1. 果肉の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
高知II	5	89, 88,	88, 86	88,	88	1.2
高知II	0.25	89, 86,	88, 86	86,	87	1.6
高知II	0.01	113, 105,	112, 104	107,	108	3.8

6.3.2. 果皮の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
高知II	5	92, 89,	90, 86	90,	89	2.5
高知II	0.25	89, 81,	87, 81	82,	84	4.5
高知II	0.01	93, 81,	89, 73	85,	84	9.2

7. 精度管理

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

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

クォリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

また、2011年10月実施の食品衛生精度管理比較調査（財団法人食品薬品安全センター）におけるZスコアは全て $Z < 2$ であった。

7.1.クォリティーコントロール試料分析結果

7.1.1.果肉

分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
2012/8/23	茨城	101	<0.01
2012/8/29	高知	92	<0.01
2012/8/16	宮崎	96	<0.01
2012/9/7	宮崎	91	<0.01

7.1.2.果皮

分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
2012/8/27	茨城	96	<0.01
2012/8/31	高知	97	<0.01
2012/8/22	宮崎	100	<0.01
2012/9/7	宮崎	94	<0.01

8. マトリックス効果の確認

マトリックス標準溶液は、各圃場の無処理試料の最終溶液1 mLをナス型フラスコに分取し、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、窒素気流下で溶媒を留去した後、0.005 mg/Lの検量線用標準溶液1 mLに溶解して調製した。マトリックス試料分析結果を表に示す。

8.1.1. 果肉

試料	マトリックス効果 (%)
茨城	107
高知	111
宮崎	109

8.1.2. 果皮

試料	マトリックス効果 (%)
茨城	112
高知	102
宮崎	110

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料に各化合物を添加し、-20℃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。保存安定性試験の結果を表に示す。

9.1. 果肉の保存安定性試験結果

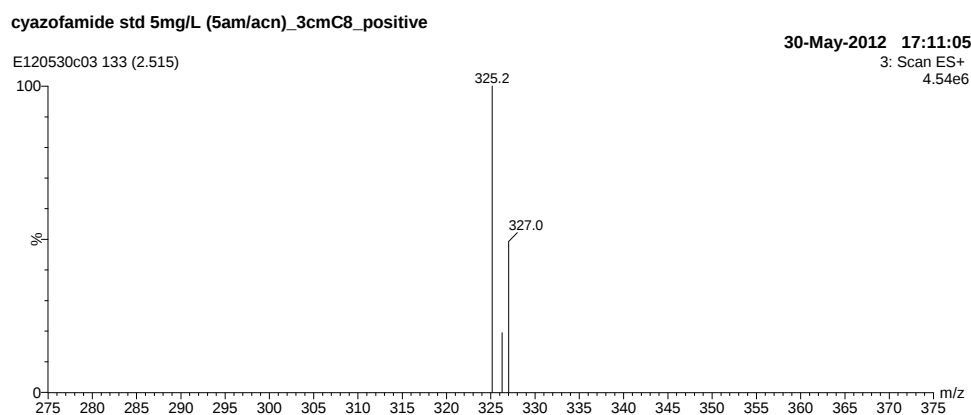
添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	51 (2012/7/18-9/7)	95,	88	92
0.5	高知	37 (2012/8/1-9/7)	99,	95	97
0.5	宮崎	64 (2012/7/5-9/7)	93,	91	92

9.2.果皮の保存安定性試験結果

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	51 (2012/7/18-9/7)	92,	90	91
0.5	高知	37 (2012/8/1-9/7)	93,	90	92
0.5	宮崎	64 (2012/7/5-9/7)	90,	90	90

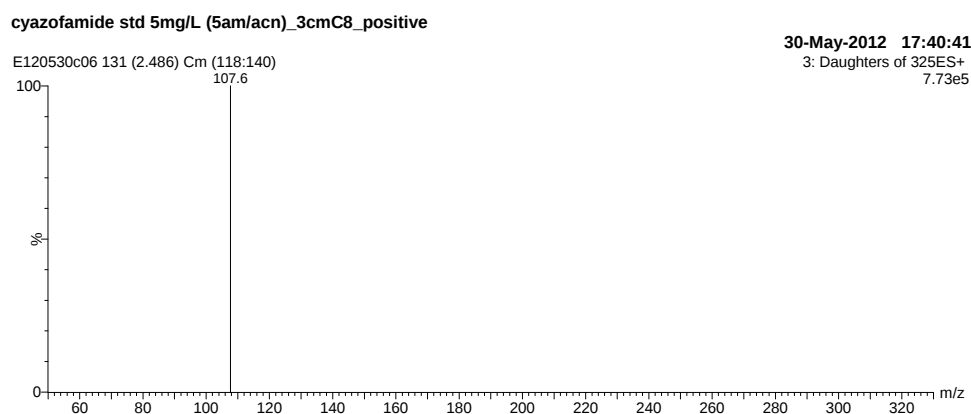
付図-1. マススペクトル

マススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)

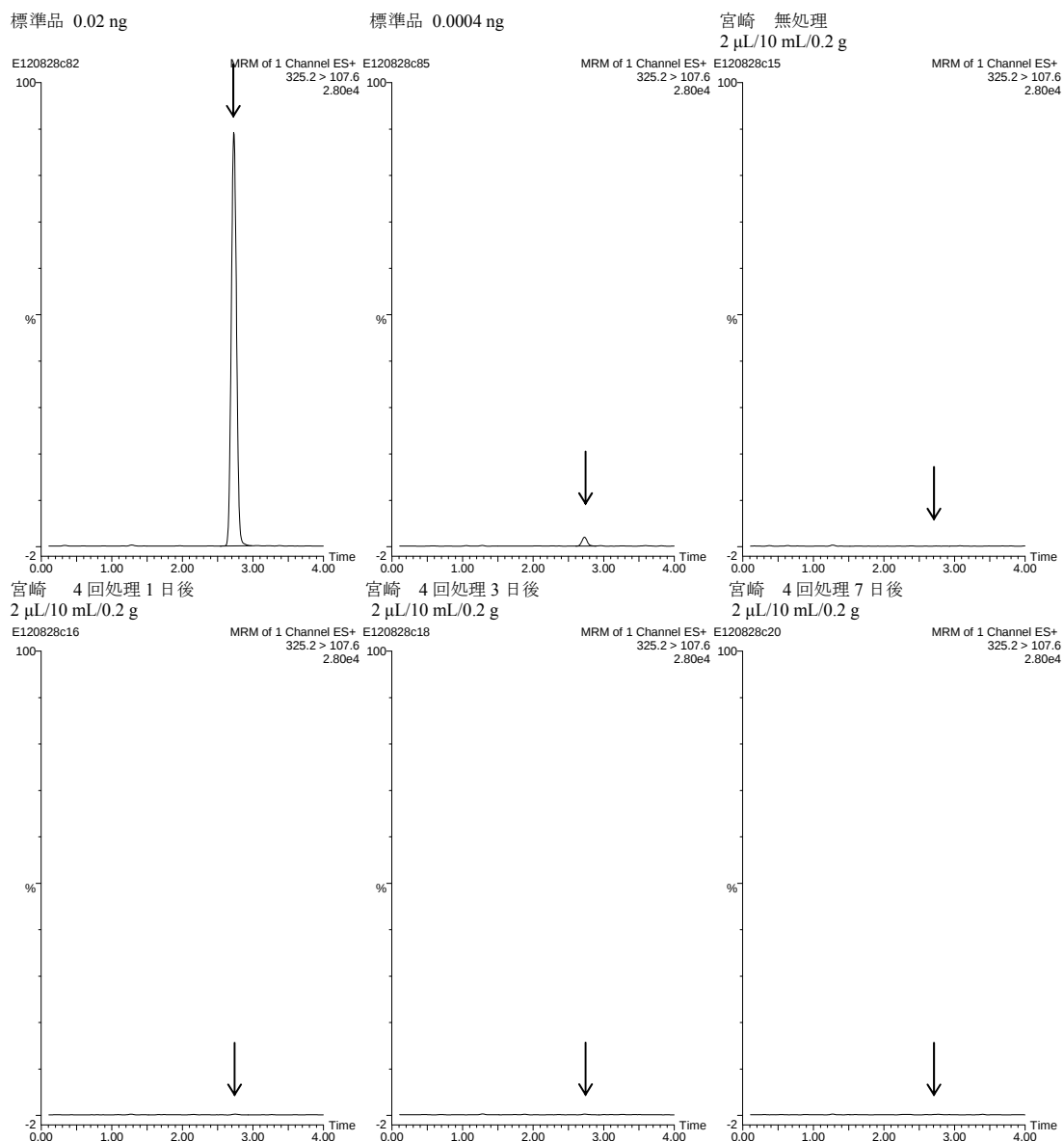


プロダクトスキャンスペクトルの一例

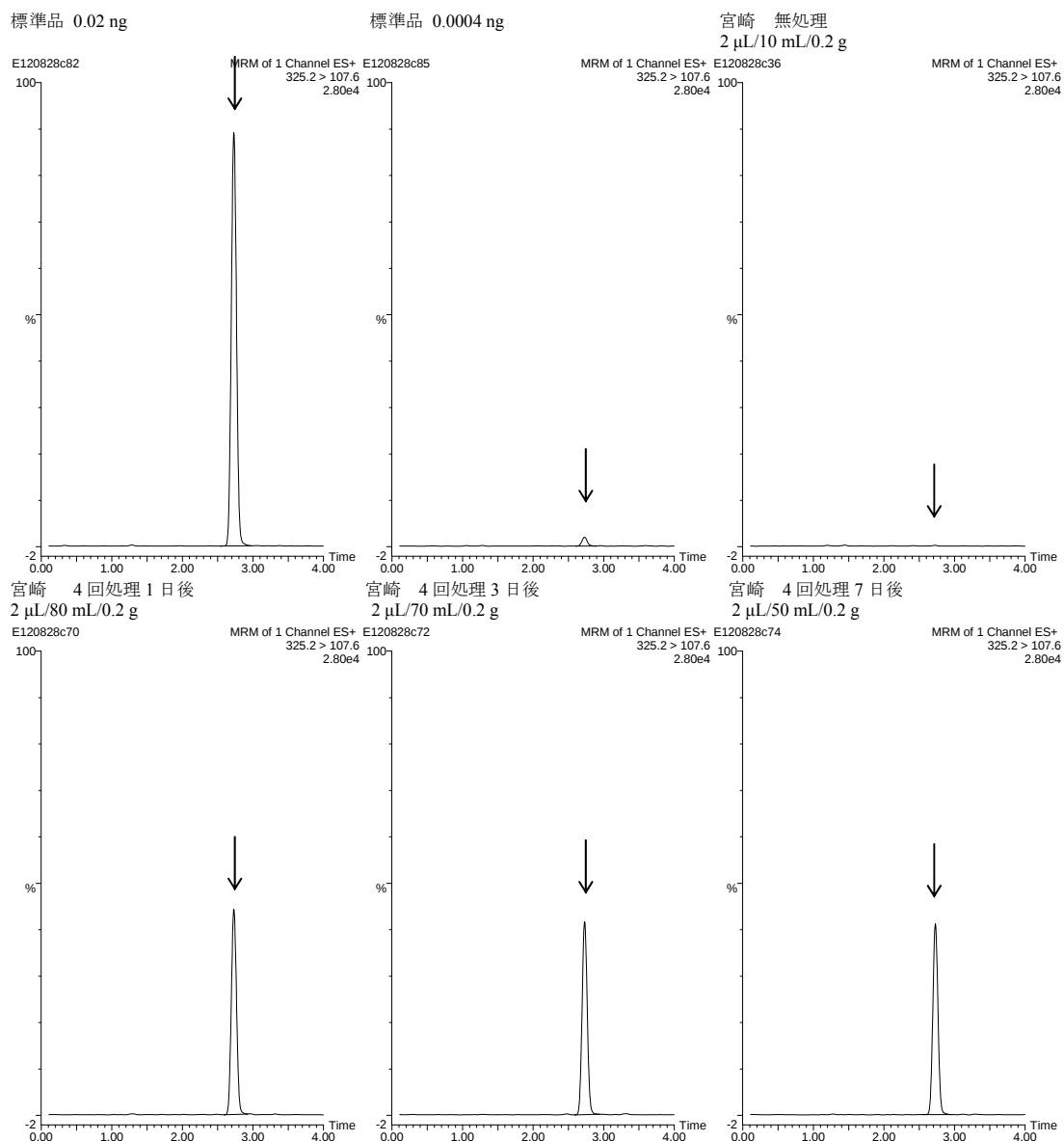
(プリカーサーイオン ; $m/z=325.2$, 正モード)



付図-2. 果実のクロマトグラム (代表例)



付図-3. 果皮のクロマトグラム (代表例)



登録作物のグループ化・残留分析詳細⑤
試料重量等，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	—	1.97	1.88	9.84	9.38	92	8	2.6
	A	1	1.80		9.00		92	8	1.0
	A	3	1.74		8.68		94	6	2.0
	A	7	2.00		10.0		95	5	2.0
							平均 93:7		平均 1.9
高知	0	—	1.72	1.69	17.2	11.9	91	9	3.2
	A	1	1.65		9.90		91	9	3.1
	A	3	1.67		10.0		90	10	2.8
	A	7	1.72		10.3		92	8	2.8
							平均 91:9		平均 3.0
宮崎	0	—	1.84	1.98	18.4	12.2	92	8	1.8
	A	1	1.94		9.68		92	8	1.4
	A	3	1.98		9.88		92	8	1.8
	A	7	2.16		10.8		92	8	1.4
							平均 92:8		平均 1.6
3 ほ場の総平均重量				3 ほ場の総重量の平均					
1.85 kg/個				11.2 kg					

A：イミノクタジンアルベシル酸塩は5回処理

シモキサニル，メタラキシルMは3回処理

スピノサドは2回処理

シアゾファミドは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

登録作物のグループ化・残留分析詳細①
メパニピリム

1. 分析対象物質

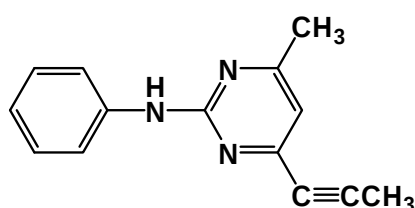
メパニピリム

化学名： N-(4-methyl-6-prop-1-ynylpyrimidin-2-yl)aniline

分子式： $C_{14}H_{13}N_3$

分子量： 223.3

構造式：



性 状： 白色結晶

融 点： 132.8℃

蒸気圧： 2.32×10^{-2} mPa (25℃)

分配係数： $\log P_{OW} = 3.28$ (20℃)

溶解性： 水 3.10 (蒸留水), 4.60 (pH=4), 2.08 (pH=7), 1.94 (pH=9)

以上mg/L, 20℃

アセトン 139, メタノール 15.4, *n*-ヘキサン 2.06, 酢酸エチル 102,

トルエン 55.4, ジクロロメタン 277, アセトニトリル 102

以上g/L, 20℃

出 典： The Pesticide Manual, 14th Edition.

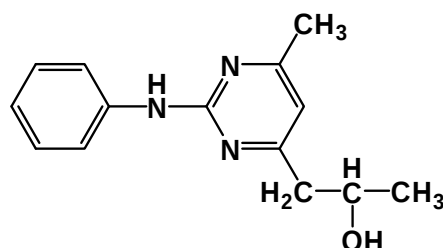
メパニピリムプロパノール体

化学名： 1-(2-anilino-6-methylpyrimidin-4-yl)-2-propanol

分子式： $C_{14}H_{17}N_3O$

分子量： 243.3

構造式：



性 状： 淡黄色粉末
 融 点： 115.0～116.0℃
 溶解性： 水 183 mg/L (20℃)
 出 典：メパニピリム剤残留分析法（メロン）報告書（作21P-2-045）

2. 標準品及び試薬

メパニピリム標準品：純度 99.8%（林純薬工業製）
 メパニピリムプロパノール体標準品：純度 99.5%（林純薬工業製）
 アセトニトリル，アセトン，トルエン：残留農薬試験用（和光純薬工業製）
 アセトニトリル： LC-MS 用（和光純薬工業製）
 酢酸ナトリウム： 試薬特級（和光純薬工業製）
 酢酸： 試薬特級（和光純薬工業製）
 酢酸アンモニウム： 試薬特級（和光純薬工業製）
 酢酸緩衝液： 0.2 mol/L 酢酸ナトリウム溶液に 0.2 mol/L 酢酸を加え、pH=5
 に調製したもの
 β-グルコシダーゼ： β-Glucosidase, from almonds（シグマアルドリッチ製）
 セルラーゼ： Cellulase from *Aspergillus niger*（東京化成工業製）
 水： PURELAB Flex System(Veolia Water Solutions &
 Technologies, Saint Maurice, France)で精製した水
 ポリマー系ミニカラム： InertSep PLS-2, 500 mg/6 mL（ジーエルサイエンス製）
 グラファイトカーボンミニカラム
 : InertSep GC, 500 mg/6 mL（ジーエルサイエンス製）

3. 装置及び機器

電子天秤： メトラー・トレド AG245及びXS2002S
 台秤： エー・アンド・デイ FG-60KBM及びFV-60KA2
 ミキサー： エフ・エム・アイ ロボクープ BLIXER-5Plus
 ホモジナイザー： kinematica PT 10/35, PT3100
 pHメーター： F-22（堀場製作所製）
 恒温振とう機： NTS-220, NTS-221（東京理化学器械製）
 ML-10F（タイテック製）
 液体クロマトグラフ・質量分析計システム（LC-MS/MS）：
 アジレント 1290 HPLC
 アジレント 6460 Triple Quad LC/MS
 データ処理装置： アジレント MassHunter

4. 液体クロマトグラフ・質量分析計の操作条件

4.1. 液体クロマトグラフ・質量分析計

4.1.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム：	ZORBAX SB-C18 (アジレント製)
	内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒径 1.8 μ m
溶離液：	5 mmol/L 酢酸アンモニウム／アセトニトリル
	80:20－(8 min)－40:60 (2 min)
流速：	0.3 mL/min
カラム温度：	40°C
試料注入量：	5 μ L
保持時間：	メパニピリム； 8.7 min
	メパニピリムプロパノール体； 5.8 min

4.1.2. 質量分析計

イオン化法：	エレクトロスプレー イオン化法 (ESI)
	正モード
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：	45 psi
シースガス温度：	250°C
シースガス流量：	5 L/min
イオン導入電圧：	5000 V
フラグメンター電圧：	メパニピリム； 100 V
	メパニピリムプロパノール体； 100 V
コリジョン電圧：	メパニピリム； 45 V
	メパニピリムプロパノール体； 18 V
	(コリジョンガス; N ₂)
イオン検出法：	MRM
モニタリングイオン：	メパニピリム；プリカーサーイオン m/z 223.9
	プロダクトイオン m/z 77.0
	メパニピリムプロパノール体；プリカーサーイオン m/z 244.0
	プロダクトイオン m/z 226.1

5. 検量線の作成

メパニピリム及びメパニピリムプロパノール体の各標準品10.0及び10.1 mg (各10.0 mg 相当) を各々50 mLのメスフラスコに精秤し、アセトンに溶解して200 mg/L標準原液を調

製した。各原液を等量ずつ混合し、アセトニトリル／水(50:50, v/v)混液で希釈して0.0001, 0.0002, 0.001, 0.002及び0.004 mg/Lの混合標準溶液を調製した。その5 µL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メパニピリム及びメパニピリムプロパノール体のピーク面積を測定し、横軸に重量 (ng), 縦軸にピーク面積をとって各検量線を作成した。

6. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料は重量を量り、各々を縦に6分割したものから対角の2つを取り合わせた後、果肉と果皮に分け、それぞれの有姿試料を作製した。重量を量った後、密封して冷凍保存（-20℃設定）した。果肉分析時には果肉の有姿試料を取り、細切し、ミキサーで均一化した。果皮分析時には果皮の有姿試料を取り、細切し、ミキサーで均一化した。また、量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比（%）を算出した。

6.1.2. 抽出

6.1.2.1. 果肉

均一化した試料20 gを三角フラスコにはかりとり、アセトン100 mLを加えて30分間振とう抽出した。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣をアセトン50 mLで洗い、同様にろ過した。ろ液を合わせアセトンで200 mLに定容し、その2 mL（試料0.2 g相当量）を分取した。

6.1.2.2. 果皮

均一化した試料10 gを三角フラスコにはかりとり、アセトン70 mLを加えてホモジナイザーで磨砕抽出した。シャフトに付着した試料をアセトン30 mLで洗浄し、洗浄液を合わせ、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に定容し、その4 mL（試料0.2 g相当量）を分取した。

6.1.3. 酵素加水分解

分取した抽出液に0.35 mg/mL(w/v) β-グルコシダーゼ及び0.40 mg/mL(w/v) セルラーゼ含有酢酸緩衝液25 mLを加え混合後、密栓して恒温振とう機（設定温度37℃）で16時間緩やかに振とうし、メパニピリムプロパノール体の抱合体を加水分解した後、室温で放冷した。

6.1.4. ポリマー系ミニカラムによる精製

ポリマー系ミニカラムにアセトニトリル5 mL及び水5 mLを順次流下し前処理した。前項の反応液を前処理したポリマー系ミニカラムに流下した後、水／アセトニトリル（60:40, v/v）混液5 mLを流下し、これらの流出液を捨てた。ポリマー系ミニカラムを吸引乾燥した後、アセトニトリル10 mLを流下し、溶出液を分取した。

6.1.5. 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トルエン5 mL及びアセトニトリル5 mLを順次流下し前処理した。前項の溶出液を前処理したグラファイトカーボンミニカラムに流下し、この流出液を捨てた。次にアセトニトリル／トルエン（70:30, v/v）混液10 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。

6.1.6. 定量

残留物をアセトニトリル／水（50:50, v/v）混液5 mLに溶解し、必要に応じて同混液で希釈した。この溶液の5 µL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、検量線よりメパニピリム及びメパニピリムプロパノール体の重量を求め、試料中の各残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値（LOQ）及び検出限界値（LOD）*

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (µL)	定量限界 (ppm)
<u>果肉</u>				
0.001	0.2	5	5	0.005
<u>果皮</u>				
0.001	0.2	5	5	0.005
最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (µL)	検出限界 (ppm)
<u>果肉</u>				
0.0005	0.2	5	5	0.003
<u>果皮</u>				
0.0005	0.2	5	5	0.003

*メパニピリム、メパニピリムプロパノール体はいずれも同じ値

6.3. 回収率

分析法確認のため、宮崎II*の果肉及び果皮の無処理試料を用いて、0.005 ppm（定量限界相当）、0.25 ppm及び5 ppm添加濃度における回収試験を各5連分析で実施した。さらにメパニピリムの果皮については、本年度の高知の無処理試料を用いて10 ppm添加回収試験を5連分析で実施した。なお、無処理試料は2連分析し、全て定量限界未満（<0.005 ppm）であった。回収試験結果を表に示す。

*平成23年度農薬等安全性確保強化実態調査事業の宮崎II無処理試料を使用

6.3.1. 果肉の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
<u>メパニピリム</u>						
宮崎II	5	95, 90,	93, 89	91,	92	2.6
宮崎II	0.25	90, 88,	88, 87	88,	88	1.2
宮崎II	0.005	92, 90,	91, 77	91,	88	7.2
<u>メパニピリムプロパノール体</u>						
宮崎II	5	97, 95,	97, 93	95,	95	1.8
宮崎II	0.25	99, 93,	95, 92	93,	94	3.0
宮崎II	0.005	92, 89,	91, 88	91,	90	1.8

6.3.2. 果皮の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
メパニピリム						
高知	10	101, 94,	98, 92	97,	96	3.7
宮崎II	5	93, 91,	92, 86	92,	91	3.0
宮崎II	0.25	90, 83,	89, 83	86,	86	3.8
宮崎II	0.005	94, 87,	92, 85	91,	90	4.1
メパニピリムプロパノール体						
宮崎II	5	95, 93,	95, 90	95,	94	2.3
宮崎II	0.25	101, 86,	94, 86	92,	92	6.8
宮崎II	0.005	89, 87,	89, 83	88,	87	2.9

7. 精度管理

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

管理基準：20検体を超えるごとに、各1検体の無処理試料及び0.05 ppm添加試料（クォリティーコントロール試料）を分析した。

クォリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

また、2011年10月実施の食品衛生精度管理比較調査（財団法人食品薬品安全センター）におけるZスコアは全て $Z < 2$ であった。

7.1.クォリティーコントロール試料分析結果

7.1.1.果肉

成分名	分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>メパニピリム</u>	2012/10/25	茨城	81	<0.005
	2012/11/ 2	高知	94	<0.005
	2012/10/23	宮崎	85	<0.005
	2012/12/ 3	宮崎	92	<0.005
<u>メパニピリムプロパ</u>	2012/10/25	茨城	89	<0.005
<u>ノール体</u>	2012/11/ 2	高知	96	<0.005
	2012/10/23	宮崎	93	<0.005
	2012/12/ 3	宮崎	95	<0.005

7.1.2.果皮

成分名	分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>メパニピリム</u>	2012/10/30	茨城	90	<0.005
	2012/11/ 6	高知	89	<0.005
	2012/10/25	宮崎	93	<0.005
	2012/11/30	宮崎	103	<0.005
<u>メパニピリムプロパ</u>	2012/10/30	茨城	95	<0.005
<u>ノール体</u>	2012/11/ 6	高知	95	<0.005
	2012/10/25	宮崎	91	<0.005
	2012/11/30	宮崎	95	<0.005

8. マトリックス効果の確認

マトリックス標準溶液は、各圃場の無処理試料の最終溶液1 mLをナス型フラスコに分取し、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、窒素気流下で溶媒を留去した後、0.002 mg/Lの検量線用標準溶液1 mLに溶解して調製した。マトリックス試料分析結果を表に示す。

8.1.1. 果肉

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>メパニピリム</u>	茨城	102
	高知	101
	宮崎	102
<u>メパニピリムプロパ</u>	茨城	105
<u>ノール体</u>	高知	104
	宮崎	106

8.1.2. 果皮

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>メパニピリム</u>	茨城	109
	高知	107
	宮崎	111
<u>メパニピリムプロパ</u>	茨城	104
<u>ノール体</u>	高知	107
	宮崎	107

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料に各化合物を添加し、 -20°C 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。保存安定性試験の結果を表に示す。

9.1.果肉の保存安定性試験結果**9.1.1.メパニピリム**

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	138 (2012/7/18-12/3)	81,	80	80
0.5	高知	124 (2012/8/1-12/3)	81,	77	79
0.5	宮崎	151 (2012/7/5-12/3)	82,	75	78

9.1.2.メパニピリムプロパノール体

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	138 (2012/7/18-12/3)	84,	84	84
0.5	高知	124 (2012/8/1-12/3)	88,	87	88
0.5	宮崎	151 (2012/7/5-12/3)	83,	82	82

9.2.果皮の保存安定性試験結果

9.2.1.メパニピリム

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	135 (2012/7/18-11/30)	83,	81	82
0.5	高知	121 (2012/8/1-11/30)	85,	81	83
0.5	宮崎	148 (2012/7/5-11/30)	83,	82	82

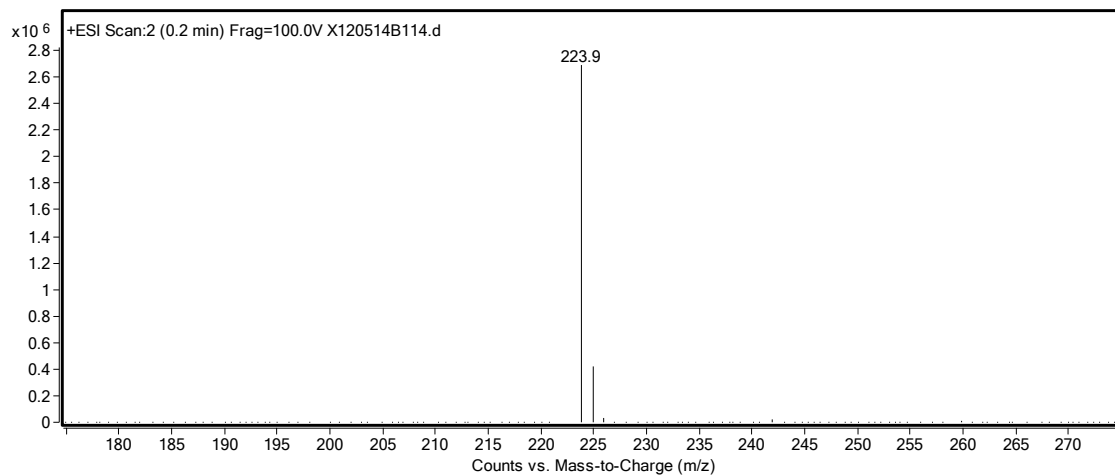
9.2.2.メパニピリムプロパノール体

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	135 (2012/7/18-11/30)	90,	88	89
0.5	高知	121 (2012/8/1-11/30)	88,	82	85
0.5	宮崎	148 (2012/7/5-11/30)	84,	83	84

付図-1. マススペクトル

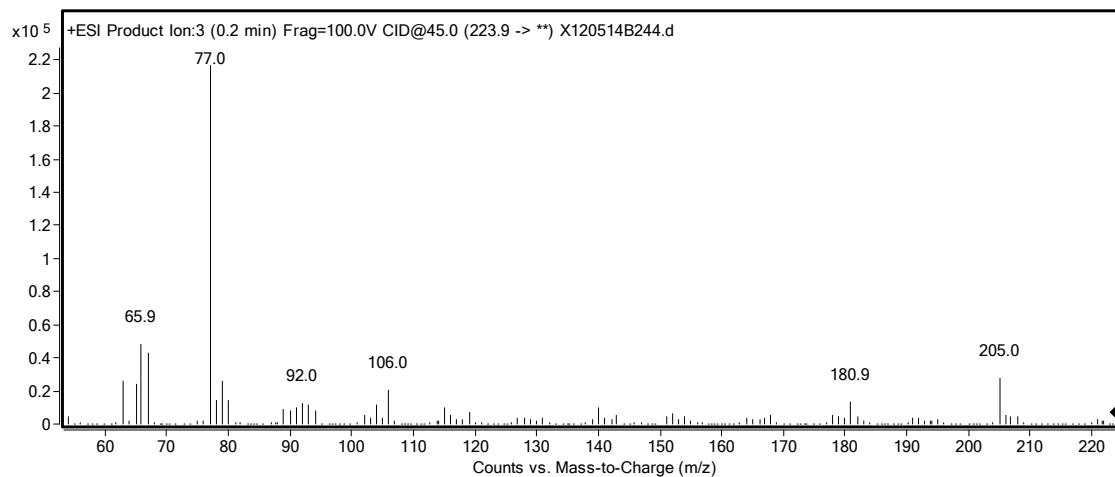
付図-1-1. メパニピリムのマススペクトル

メパニピリムのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)



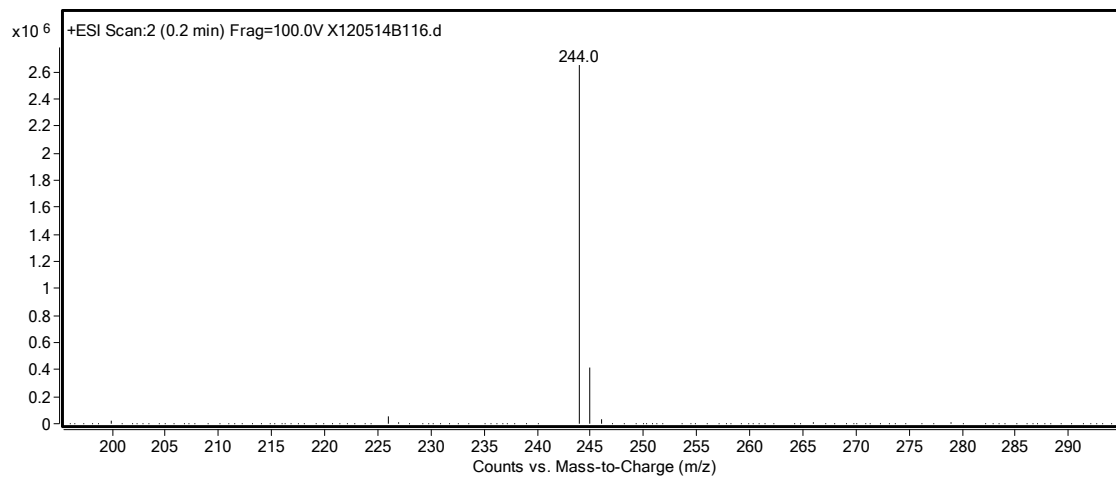
メパニピリムのプロダクトスキンスペクトルの一例

(プリカーサーイオン ; m/z =223.9, 正モード)



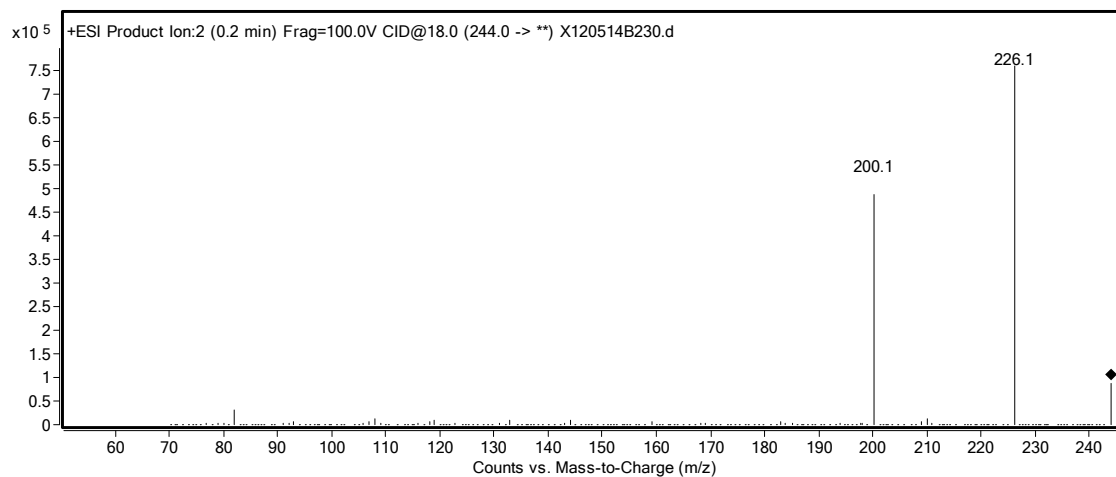
付図-1-2. メパニピリムプロパノール体のマススペクトル

メパニピリムプロパノール体のマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)



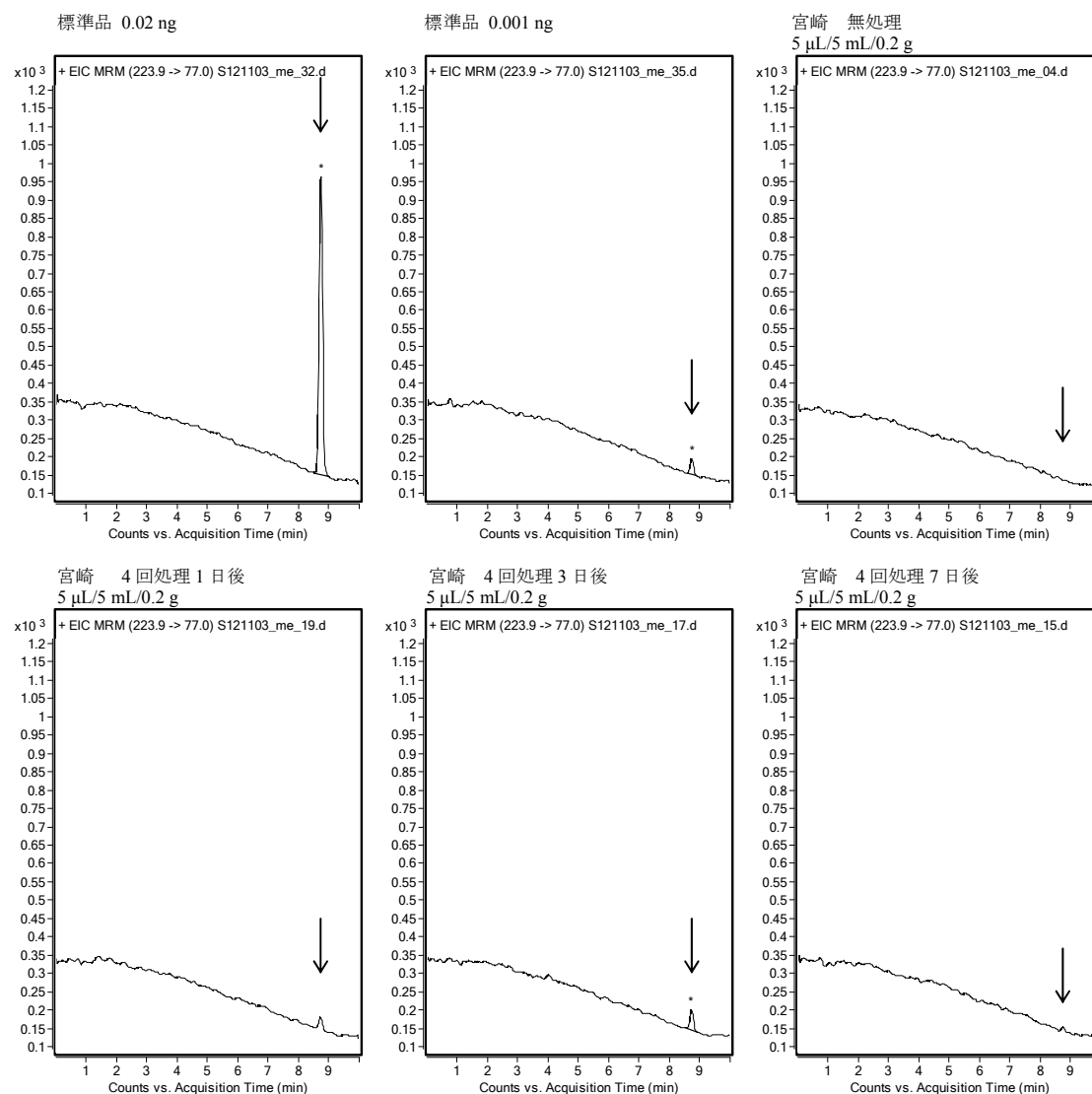
メパニピリムプロパノール体のプロダクトスキャンスペクトルの一例

(プリカーサーイオン ; $m/z=244.0$, 正モード)

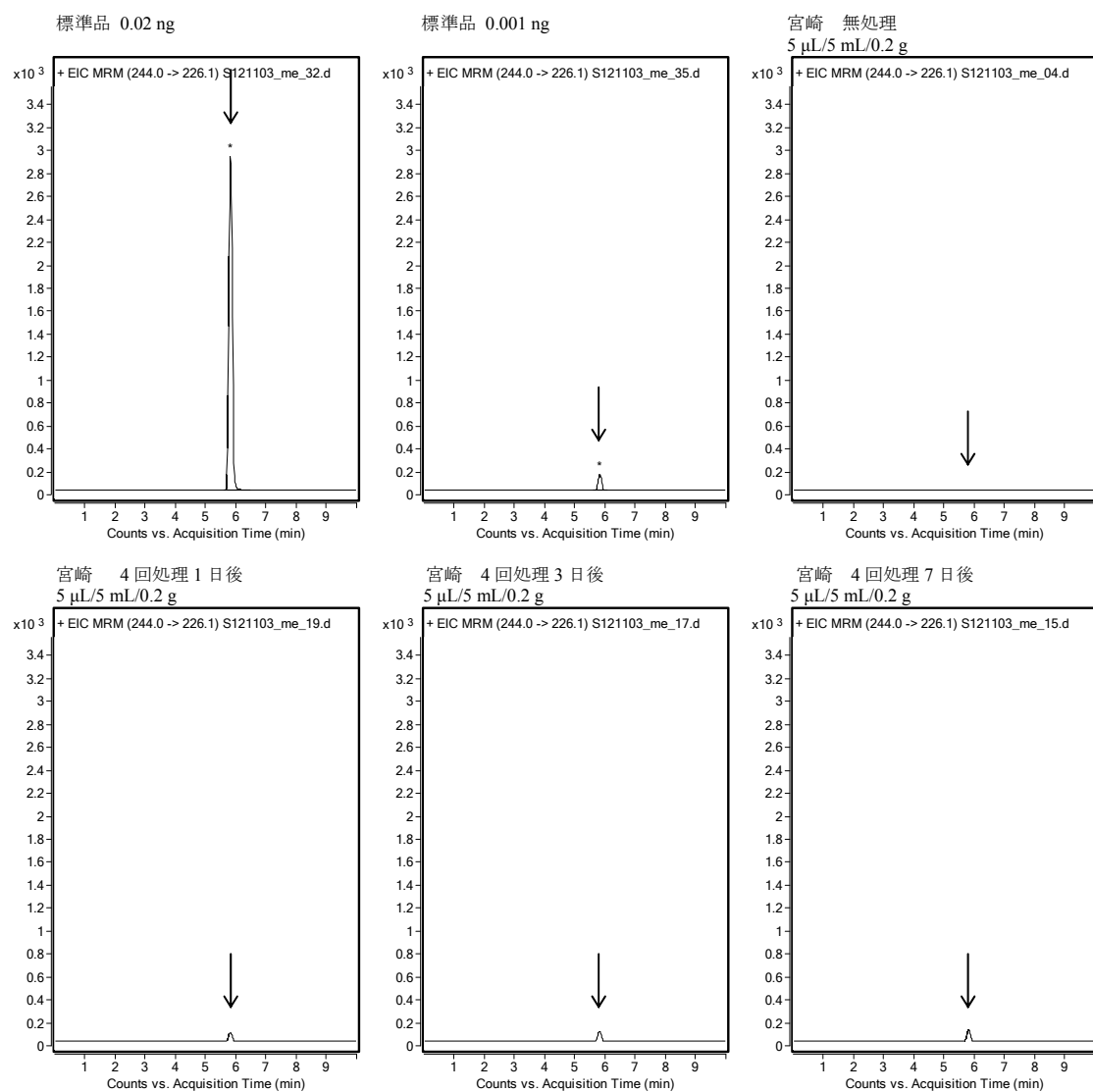


付図-2. 果実のクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. メパニピリムのクロマトグラム

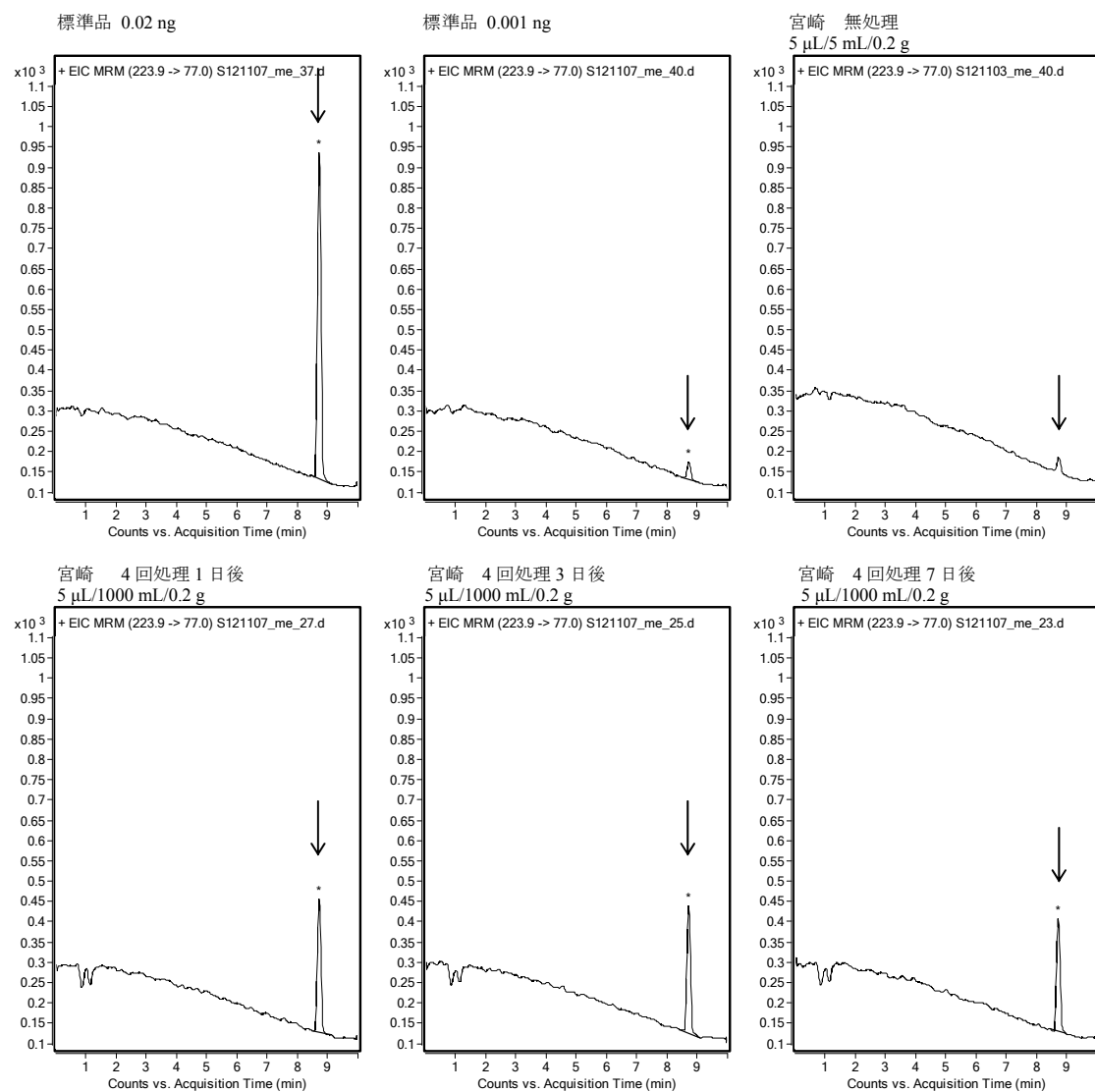


付図-2-2. メパニピリムプロパノール体のクロマトグラム

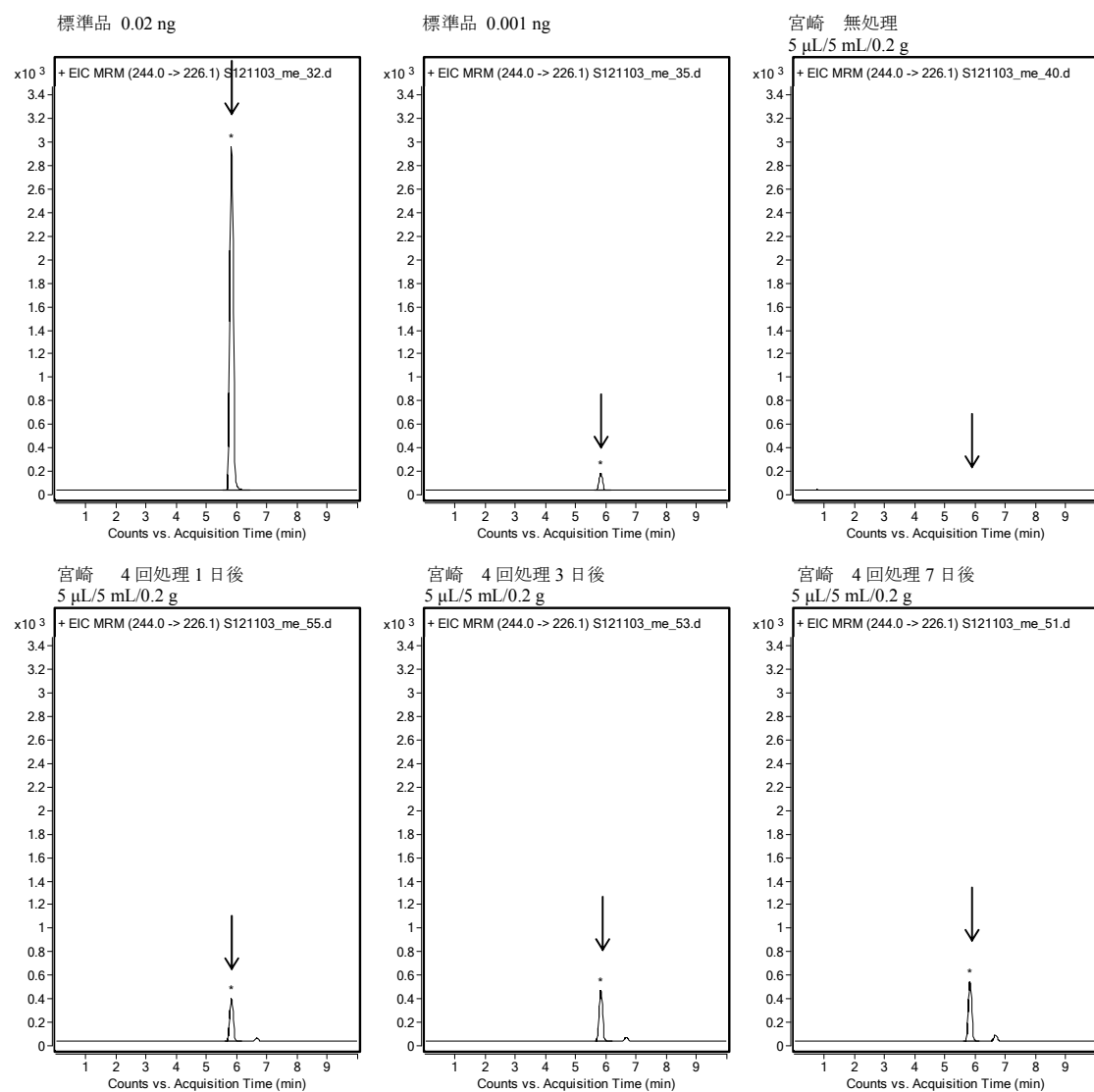


付図-3. 果皮のクロマトグラム (代表例)

付図-3-1. メパニピリムのクロマトグラム



付図-3-2. メパニピリムプロパノール体のクロマトグラム



登録作物のグループ化・残留分析詳細②

ジフェノコナゾール, ファモキサドン, テブフェンピラド

1. 分析対象物質

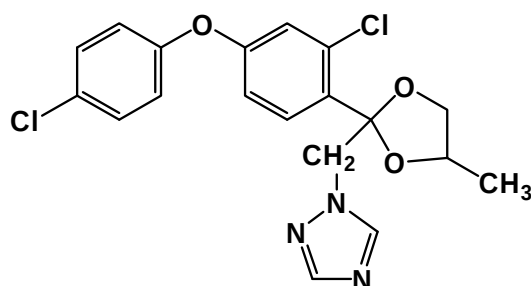
ジフェノコナゾール

化学名 : *cis,trans*-3-chloro-4-[4-methyl-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-2-yl]phenyl 4-chlorophenyl ether

分子式 : $C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_3$

分子量 : 406.3

構造式 :



性 状 : 淡灰色結晶

融 点 : 82.0～83.0℃

蒸気圧 : 3.3×10^{-5} mPa (25℃)

分配係数 : $\log P_{OW} = 4.4$ (25℃)

溶解性 : 水 15 mg/L (25℃),
エタノール 330, アセトン 610, トルエン 490,
n-ヘキサン 3.4, *n*-オクタノール 95 (以上g/L, 25℃)

出 典 : The Pesticide Manual, 14th Edition.

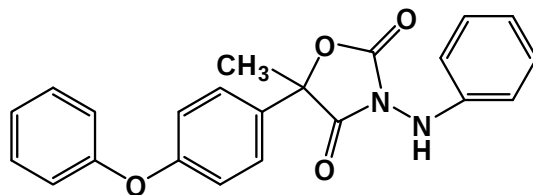
ファモキサドン

化学名 : 3-anilino-5-methyl-5-(4-phenoxyphenyl)-1,3-oxazolidine-2,4-dione

分子式 : $C_{22}H_{18}N_2O_4$

分子量 : 374.4

構造式 :



性 状 : 乳白色粉末

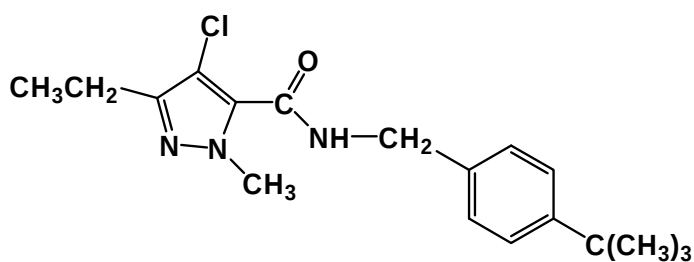
メロン 処理区B (ジフェノコナゾール, ファモキサドン, テブフェンピラド)

融 点 : 141.3~142.3°C
蒸気圧 : 6.4×10^{-4} mPa (20°C)
分配係数 : $\log P_{OW} = 4.65$ (pH=7)
溶解性 : 水 52 (pH=7.8~8.9), 243 (pH=5), 111 (pH=7), 38 (pH=9)
(以上 $\mu\text{g/L}$, 20°C)
アセトン 274, トルエン 13.3, ジクロロメタン 239, ヘキサン 0.048,
メタノール 10, 酢酸エチル 125.0, *n*-オクタノール 1.78,
アセトニトリル 125 (以上g/L, 25°C)

出 典 : The Pesticide Manual, 14th Edition.

テブフェンピラド

化学名 : *N*-(4-*tert*-butylbenzyl)-4-chloro-3-ethyl-1-methylpyrazole-5-carboxamide
分子式 : $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{ClN}_3\text{O}$
分子量 : 333.9
構造式 :



性 状 : 無色結晶
融 点 : 64~66°C
蒸気圧 : $< 1 \times 10^{-2}$ mPa (25°C)
分配係数 : $\log P_{OW} = 4.93$ (25°C)
溶解性 : 水 2.61 mg/L (25°C)
アセトニトリル, *n*-ヘキサン, アセトン, 酢酸エチル,
メタノール > 100 g/L (25°C)

出 典 : The Pesticide Manual, 14th Edition.

2. 標準品及び試薬

ジフェノコナゾール標準品：純度 100% (和光純薬工業製)

ファモキサドン標準品：純度 99.0% (和光純薬工業製)

テブフェンピラド標準品：純度 98.1% (和光純薬工業製)

アセトニトリル, アセトン, メタノール：残留農薬試験用 (和光純薬工業製)

アセトニトリル： LC-MS 用 (和光純薬工業製)

酢酸アンモニウム： 試薬特級 (和光純薬工業製)

水： PURELAB Flex System (Veolia Water Solutions & Technologies, Saint Maurice, France) で精製した水
グラファイトカーボンミニカラム

: InertSep GC, 500 mg/6 mL (ジーエルサイエンス製)

3. 装置及び機器

電子天秤： メトラー・トレド AG245及びXS2002S

台秤： エー・アンド・デイ FG-60KBM及びFV-60KA2

ミキサー： エフ・エム・アイ ロボクープ BLIXER-5Plus

ホモジナイザー： kinematica PT 10/35, PT3100

液体クロマトグラフ・質量分析計システム (LC-MS/MS)：

アジレント 1290 HPLC

アジレント 6460 Triple Quad LC/MS

データ処理装置： アジレント MassHunter

4. 液体クロマトグラフ・質量分析計の操作条件

4.1. 液体クロマトグラフ・質量分析計

4.1.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム： ZORBAX SB-C18 (アジレント製)

内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒径 1.8 µm

溶離液： アセトニトリル／5 mmol/L 酢酸アンモニウム

50:50－(6 min)－85:15 (1 min)

流速： 0.3 mL/min

カラム温度： 40°C

試料注入量： 5 µL

保持時間： ジフェノコナゾール； 4.3 min

ファモキサドン； 4.3 min

テブフェンピラド； 5.4 min

4.1.2. 質量分析計

イオン化法:	エレクトロスプレー イオン化法 (ESI)
	正モード
乾燥ガス温度:	300°C
乾燥ガス流量:	5 L/min
ネブライザー圧力:	45 psi
シースガス温度:	250°C
シースガス流量:	5 L/min
イオン導入電圧:	5000 V
フラグメンター電圧:	ジフェノコナゾール ; 150 V
	ファモキサドン ; 100 V
	テブフェンピラド ; 200 V
コリジョン電圧:	ジフェノコナゾール ; 30 V
	ファモキサドン ; 10 V
	テブフェンピラド ; 40 V
	(コリジョンガス; N ₂)
イオン検出法:	MRM
モニタリングイオン:	ジフェノコナゾール ; プリカーサーイオン m/z 406.0
	プロダクトイオン m/z 251.0
	ファモキサドン ; プリカーサーイオン m/z 392.0
	プロダクトイオン m/z 331.2
	テブフェンピラド ; プリカーサーイオン m/z 334.0
	プロダクトイオン m/z 117.1

5. 検量線の作成

ジフェノコナゾールの標準品10.0 mgを50 mLのメスフラスコに精秤し、メタノールに溶解して200 mg/L標準原液を調製した。ファモキサドン及びテブフェンピラドの各標準品10.1及び10.2 mg（各10.0 mg相当）を各々50 mLのメスフラスコに精秤し、アセトンに溶解して200 mg/L標準原液を調製した。各原液を等量ずつ混合し、アセトニトリル／水(50:50, v/v)混液で希釈して0.0001, 0.0002, 0.001, 0.002及び0.004 mg/Lの混合標準溶液を調製した。その5 µL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ェノコナゾール、ファモキサドン及びテブ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各検量線を作成した。

6. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料は重量を量り、各々を縦に6分割したものから対角の2つを取り合わせた後、果肉と果皮に分け、それぞれの有姿試料を作製した。重量を量った後、密封して冷凍保存（-20℃設定）した。果肉分析時には果肉の有姿試料を取り、細切し、ミキサーで均一化した。果皮分析時には果皮の有姿試料を取り、細切し、ミキサーで均一化した。また、量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比（%）を算出した。

6.1.2. 抽出

6.1.2.1. 果肉

均一化した試料20 gを三角フラスコにはかりとり、アセトン100 mLを加えて30分間振とう抽出した。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣をアセトン50 mLで洗い、同様にろ過した。ろ液を合わせアセトンで200 mLに定容し、その2 mL（試料0.2 g相当量）を分取した。分取した抽出液に水10 mLを添加した後、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、アセトンを留去した。

6.1.2.2. 果皮

均一化した試料10 gを三角フラスコにはかりとり、アセトン70 mLを加えてホモジナイザーで磨砕抽出した。シャフトに付着した試料をアセトン30 mLで洗浄し、洗浄液を合わせ、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に定容し、その4 mL（試料0.2 g相当量）を分取した。分取した抽出液に水10 mLを添加した後、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、アセトンを留去した。

6.1.3. グラファイトカーボンミニカラムによる精製

グラファイトカーボンミニカラムにアセトン5 mL及び水5 mLを順次流下し前処理した。前項の濃縮液を前処理したグラファイトカーボンミニカラムに流下した後、さらにアセトン／水（50:50, v/v）混液10 mLを流下し、これらの流出液を捨てた。次にアセトン／水（80:20, v/v）混液20 mL及びアセトン20 mLを流下し、全溶出液を取り、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。

6.1.4. 定量

残留物をアセトニトリル／水（50:50, v/v）混液10 mLに溶解し、必要に応じて同混液で希釈した。この溶液の5 µL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、検量線よりジフェノコナゾール、ファモキサドン及びテブフェンピラドの重量を求め、試料中の各残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値 (LOQ) 及び検出限界値 (LOD) *

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	定量限界 (ppm)
<u>果肉</u>				
0.001	0.2	10	5	0.01
<u>果皮</u>				
0.001	0.2	10	5	0.01
最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)
<u>果肉</u>				
0.0005	0.2	10	5	0.005
<u>果皮</u>				
0.0005	0.2	10	5	0.005

*ジフェノコナゾール, ファモキサドン, テブフェンピラドはいずれも同じ値

6.3. 回収率

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

*平成23年度農薬等安全性確保強化実態調査事業の宮崎II無処理試料を使用

6.3.1. 果肉の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
ジフェノコナゾール						
宮崎II	5	106, 102,	104, 101	104,	103	1.9
宮崎II	0.25	103, 100,	103, 96	102,	101	2.9
宮崎II	0.01	96, 95,	96, 94	96,	95	0.9
ファモキサドン						
宮崎II	5	92, 89,	91, 86	90,	90	2.6
宮崎II	0.25	100, 92,	96, 91	96,	95	3.8
宮崎II	0.01	120, 95,	99, 93	98,	101	10.8
テブフェンピラド						
宮崎II	5	103, 99,	101, 96	101,	100	2.6
宮崎II	0.25	104, 98,	102, 96	101,	100	3.2
宮崎II	0.01	119, 90,	116, 89	99,	103	13.8

6.3.2. 果皮の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)		平均回収率 (%)	RSDr (%)
ジフェノコナゾール					
宮崎II	5	111, 108,	110, 104	109, 108	2.5
宮崎II	0.25	105, 101,	105, 101	103, 103	1.9
宮崎II	0.01	93, 89,	92, 88	92, 91	2.4
ファモキサドン					
宮崎II	5	104, 89,	104, 84	102, 97	9.7
宮崎II	0.25	110, 91,	103, 87	92, 97	9.9
宮崎II	0.01	117, 85,	100, 85	89, 95	14.4
テブフェンピラド					
宮崎II	5	111, 105,	109, 101	108, 107	3.6
宮崎II	0.25	105, 103,	105, 103	103, 104	1.1
宮崎II	0.01	112, 88,	93, 82	91, 93	12.2

7. 精度管理

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

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

クオリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

また、2011年10月実施の食品衛生精度管理比較調査（財団法人食品薬品安全センター）におけるZスコアは全てZ<2であった。

7.1.クオリティーコントロール試料分析結果

7.1.1.果肉

成分名	分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>ジフェノコナゾール</u>	2012/10/25	茨城	96	<0.01
	2012/11/ 2	高知	105	<0.01
	2012/10/23	宮崎	100	<0.01
	2012/12/ 3	宮崎	102	<0.01
<u>ファモキサドン</u>	2012/10/25	茨城	90	<0.01
	2012/11/ 2	高知	104	<0.01
	2012/10/23	宮崎	103	<0.01
	2012/12/ 3	宮崎	81	<0.01
<u>テブフェンピラド</u>	2012/10/25	茨城	103	<0.01
	2012/11/ 2	高知	110	<0.01
	2012/10/23	宮崎	101	<0.01
	2012/12/ 3	宮崎	107	<0.01

メロン 処理区B (ジフェノコナゾール, ファモキサドン, テブフェンピラド)

7.1.2.果皮

成分名	分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>ジフェノコナゾール</u>	2012/10/30	茨城	94	<0.01
	2012/11/ 6	高知	106	<0.01
	2012/10/25	宮崎	100	<0.01
	2012/11/30	宮崎	102	<0.01
<u>ファモキサドン</u>	2012/10/30	茨城	108	<0.01
	2012/11/ 6	高知	85	<0.01
	2012/10/25	宮崎	97	<0.01
	2012/11/30	宮崎	92	<0.01
<u>テブフェンピラド</u>	2012/10/30	茨城	94	<0.01
	2012/11/ 6	高知	105	<0.01
	2012/10/25	宮崎	100	<0.01
	2012/11/30	宮崎	106	<0.01

8. マトリックス効果の確認

マトリックス標準溶液は，各圃場の無処理試料の最終溶液1 mLをナス型フラスコに分取し，40℃以下の水浴中で減圧濃縮し，窒素気流下で溶媒を留去した後，0.002 mg/Lの検量線用標準溶液1 mLに溶解して調製した。マトリックス試料分析結果を表に示す。

8.1.1.果肉

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>ジフェノコナゾール</u>	茨城	97
	高知	103
	宮崎	96
<u>ファモキサドン</u>	茨城	104
	高知	92
	宮崎	99
<u>テブフェンピラド</u>	茨城	99
	高知	109
	宮崎	103

8.1.2.果皮

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>ジフェノコナゾール</u>	茨城	98
	高知	102
	宮崎	99
<u>ファモキサドン</u>	茨城	102
	高知	79
	宮崎	117
<u>テブフェンピラド</u>	茨城	106
	高知	100
	宮崎	99

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料に各化合物を添加し、 -20°C 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。保存安定性試験の結果を表に示す。

9.1.果肉の保存安定性試験結果**9.1.1.ジフェノコナゾール**

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	138 (2012/7/18-12/3)	92,	89	90
0.5	高知	124 (2012/8/1-12/3)	86,	86	86
0.5	宮崎	151 (2012/7/5-12/3)	87,	84	86

9.1.2.ファモキサドン

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	138 (2012/7/18-12/3)	81,	72	76
0.5	高知	124 (2012/8/1-12/3)	84,	81	82
0.5	宮崎	151 (2012/7/5-12/3)	80,	73	76

9.1.3.テブフェンピラド

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	138 (2012/7/18-12/3)	93,	89	91
0.5	高知	124 (2012/8/1-12/3)	86,	84	85
0.5	宮崎	151 (2012/7/5-12/3)	87,	87	87

9.2.果皮の保存安定性試験結果

9.2.1.ジフェノコナゾール

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	135 (2012/7/18-11/30)	98,	97	98
0.5	高知	121 (2012/8/1-11/30)	101,	97	99
0.5	宮崎	148 (2012/7/5-11/30)	97,	96	96

9.2.2.ファモキサドン

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	135 (2012/7/18-11/30)	91,	89	90
0.5	高知	121 (2012/8/1-11/30)	93,	92	92
0.5	宮崎	148 (2012/7/5-11/30)	92,	77	84

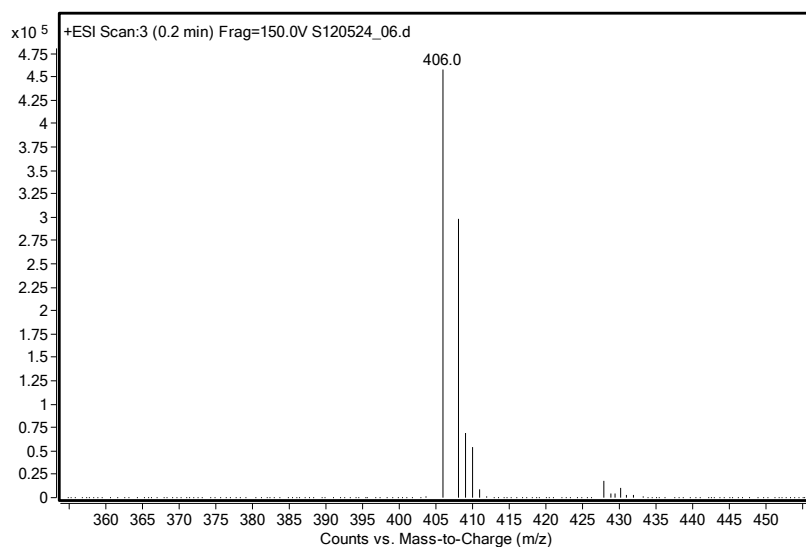
9.2.3.テブフェンピラド

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	135 (2012/7/18-11/30)	98,	96	97
0.5	高知	121 (2012/8/1-11/30)	97,	94	96
0.5	宮崎	148 (2012/7/5-11/30)	97,	92	94

付図-1. マススペクトル

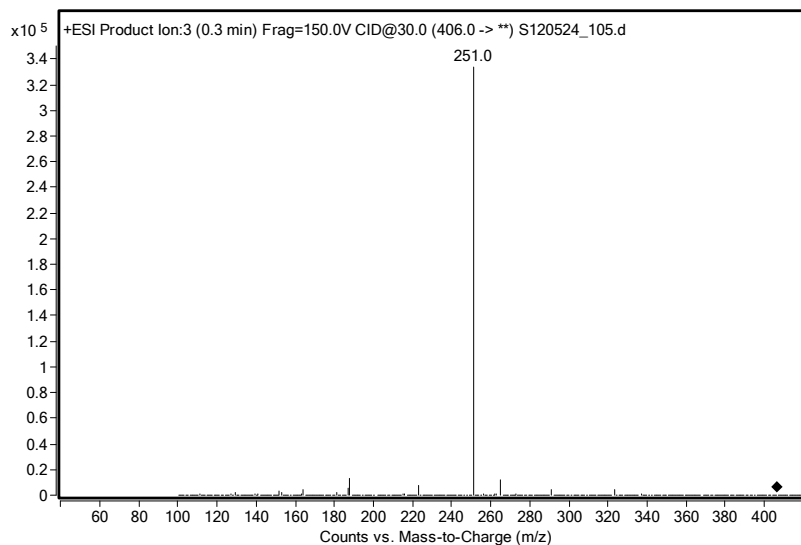
付図-1-1. ジフェノコナゾールのマススペクトル

ジフェノコナゾールのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)



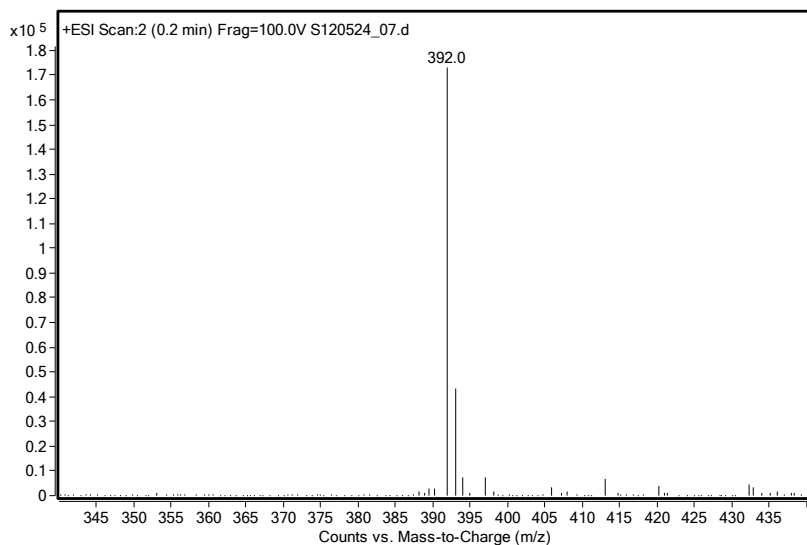
ジフェノコナゾールのプロダクトスキャンスペクトルの一例

(プリカーサーイオン ; m/z=406.0, 正モード)



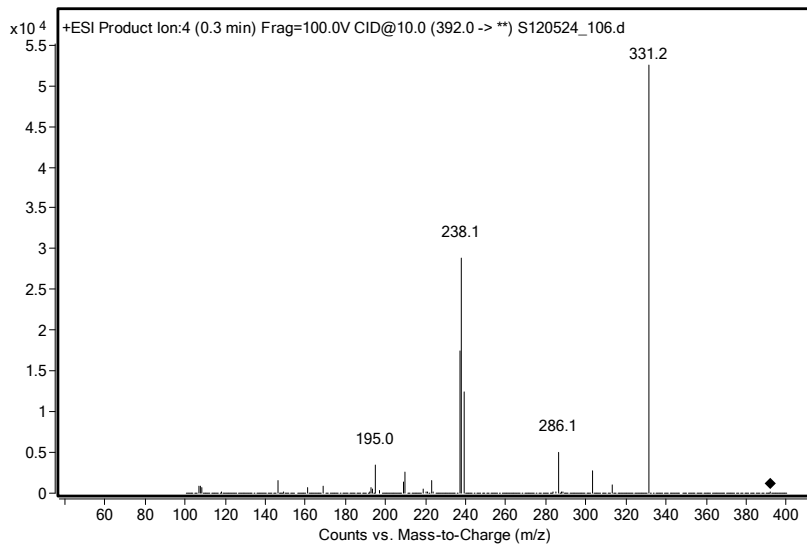
付図-1-2. ファモキサドンのマススペクトル

ファモキサドンのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)



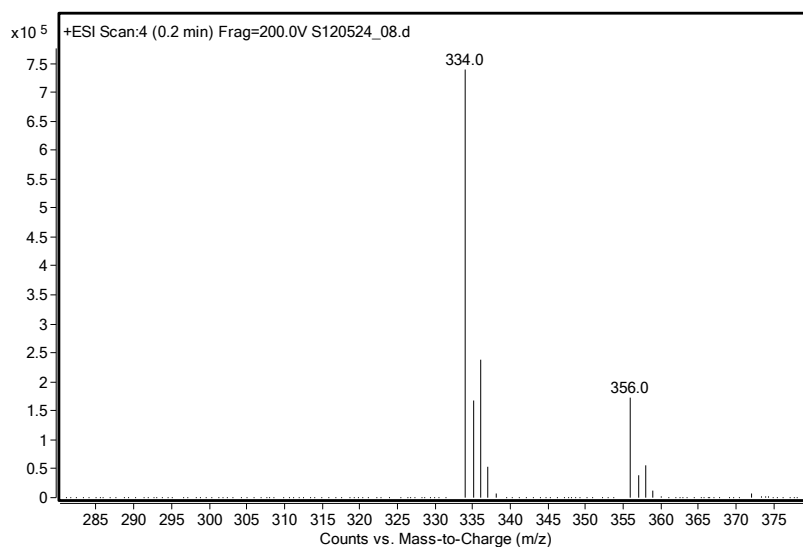
ファモキサドンのプロダクトスキンスペクトルの一例

(プリカーサーイオン ; m/z=392.0, 正モード)



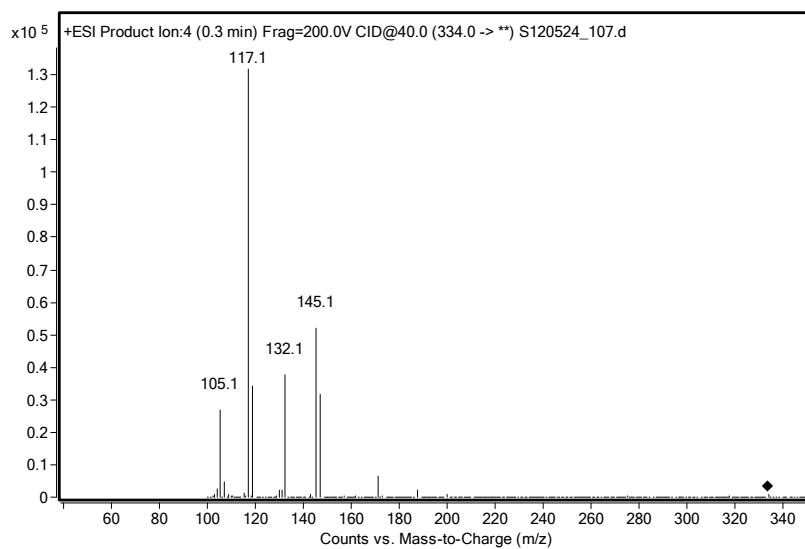
付図-1-3. テブフェンピラドのマススペクトル

テブフェンピラドのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)



テブフェンピラドのプロダクトスキャンスペクトルの一例

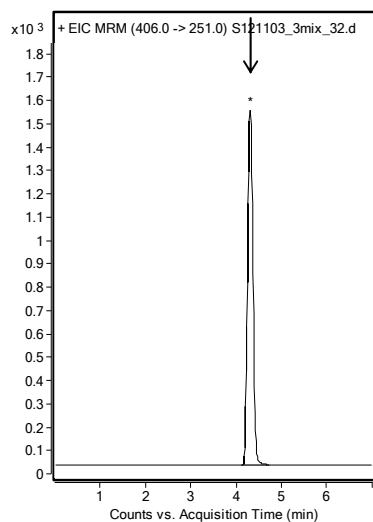
(プリカーサーイオン ; m/z=334.0, 正モード)



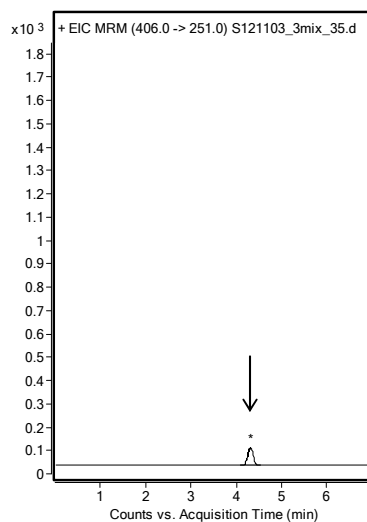
付図-2. 果実のクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. ジフェノコナゾールのクロマトグラム

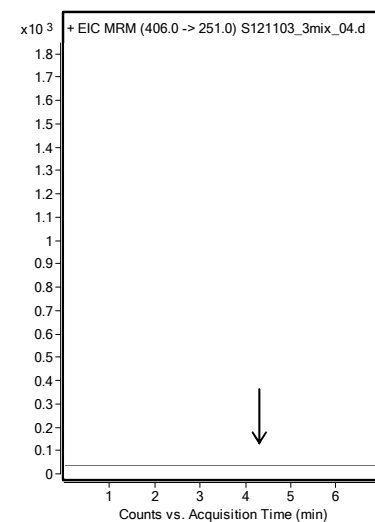
標準品 0.02 ng



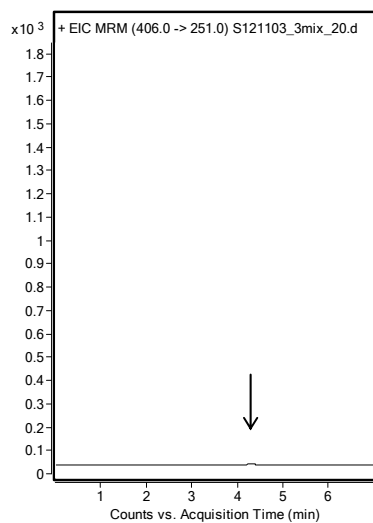
標準品 0.001 ng



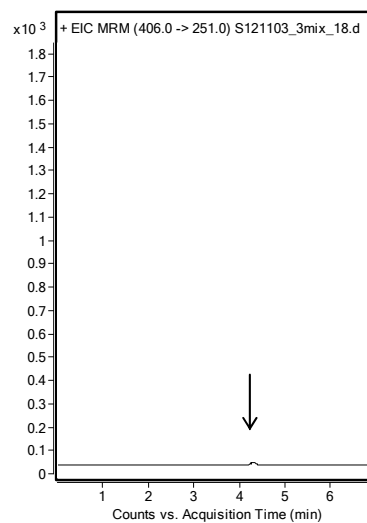
宮崎 無処理
5 μ L/10 mL/0.2 g



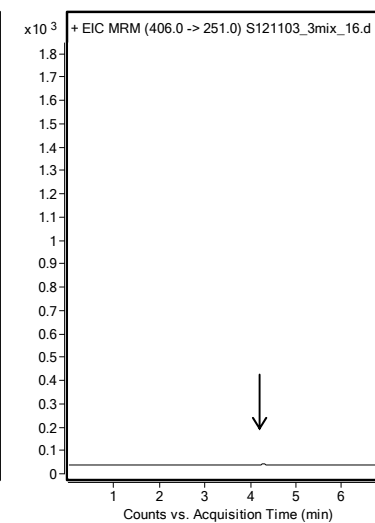
宮崎 3回処理 1日後
5 μ L/10 mL/0.2 g



宮崎 3回処理 3日後
5 μ L/10 mL/0.2 g

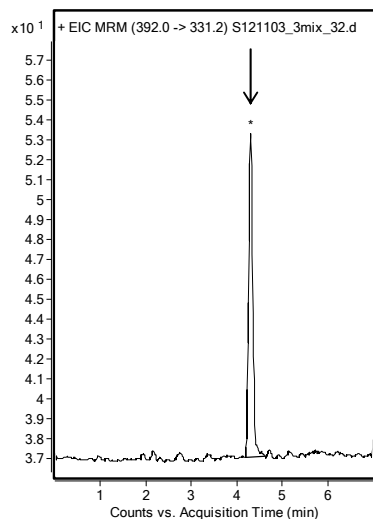


宮崎 3回処理 7日後
5 μ L/10 mL/0.2 g

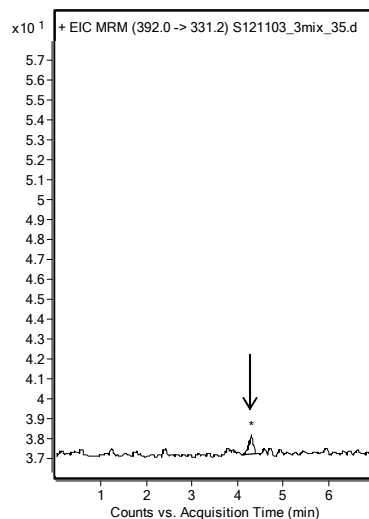


付図-2-2. ファモキサドンのクロマトグラム

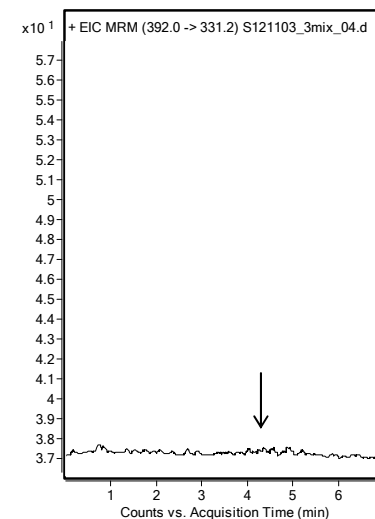
標準品 0.02 ng



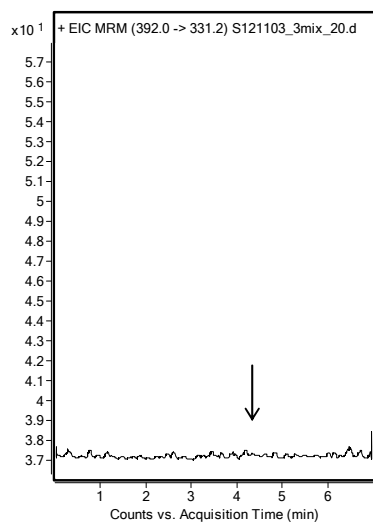
標準品 0.001 ng



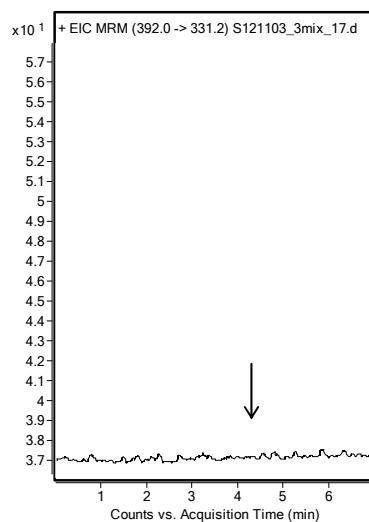
宮崎 無処理
5 μ L/10 mL/0.2 g



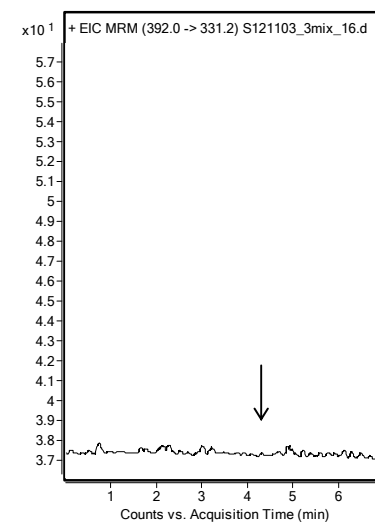
宮崎 3 回処理 1 日後
5 μ L/10 mL/0.2 g



宮崎 3 回処理 3 日後
5 μ L/10 mL/0.2 g

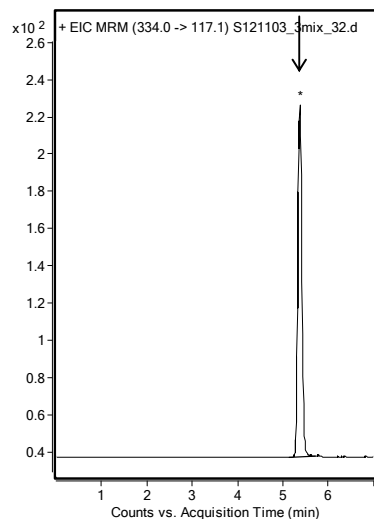


宮崎 3 回処理 7 日後
5 μ L/10 mL/0.2 g

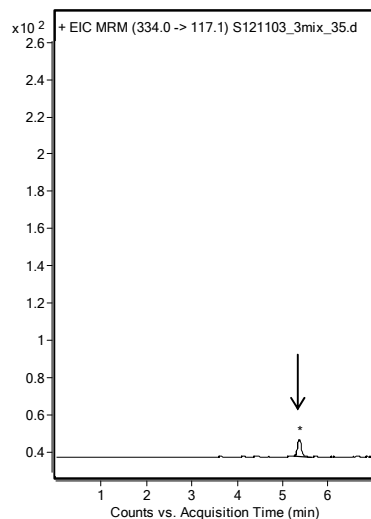


付図-2-3. テブフェンピラドのクロマトグラム

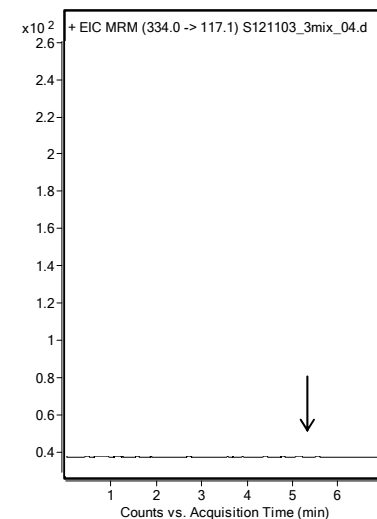
標準品 0.02 ng



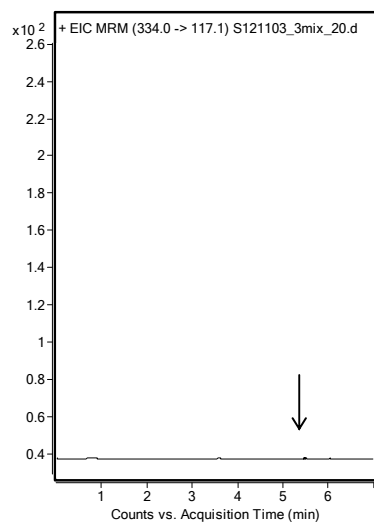
標準品 0.001 ng



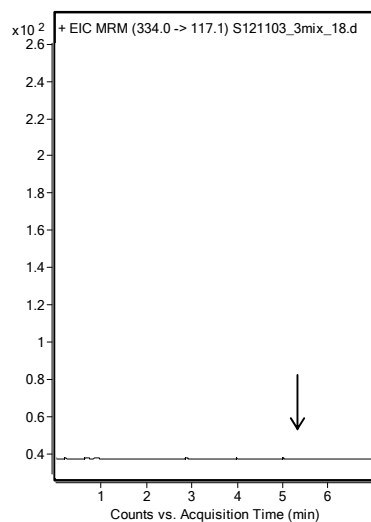
宮崎 無処理
5 μ L/10 mL/0.2 g



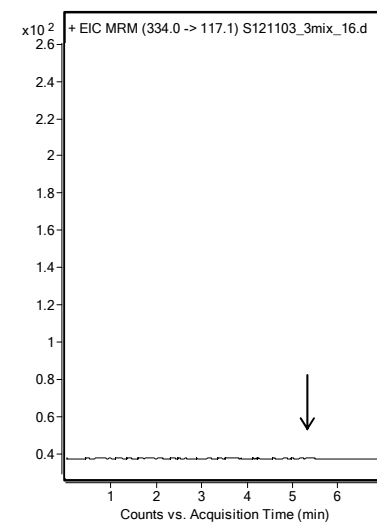
宮崎 1 回処理 1 日後
5 μ L/10 mL/0.2 g



宮崎 1 回処理 3 日後
5 μ L/10 mL/0.2 g



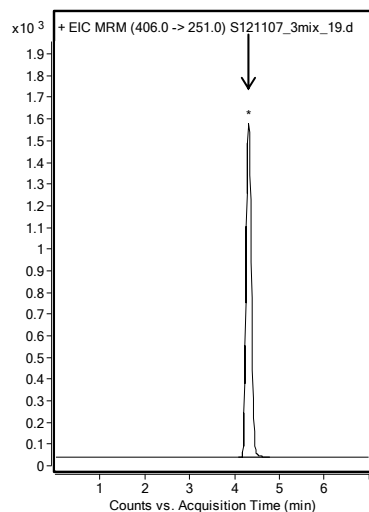
宮崎 1 回処理 7 日後
5 μ L/10 mL/0.2 g



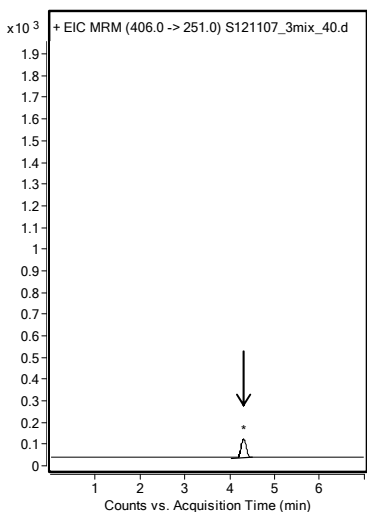
付図-3. 果皮のクロマトグラム (代表例)

付図-3-1. ジフェノコナゾールのクロマトグラム

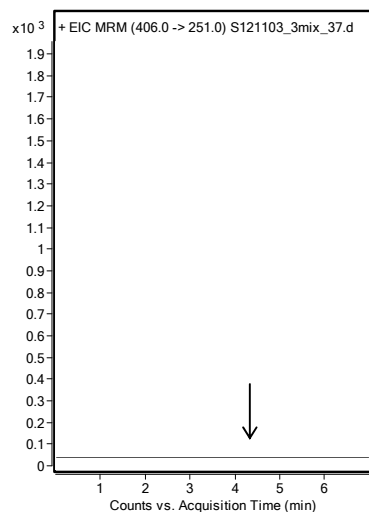
標準品 0.02 ng



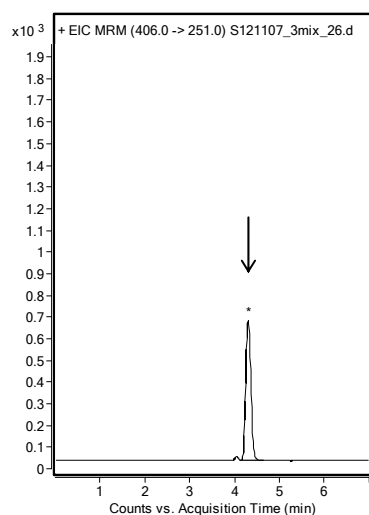
標準品 0.001 ng



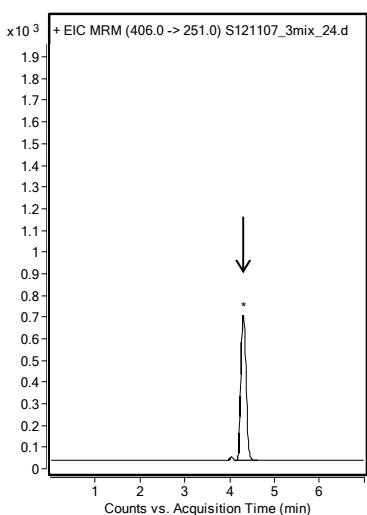
宮崎 無処理
5 μ L/10 mL/0.2 g



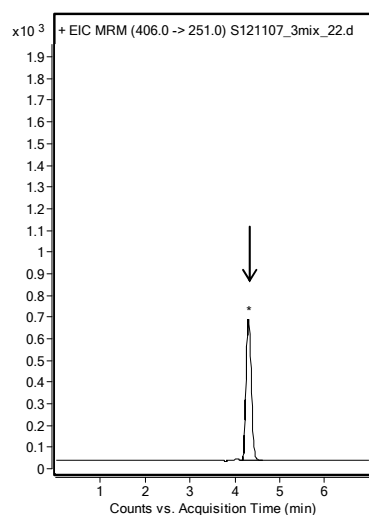
宮崎 3回処理 1日後
5 μ L/200 mL/0.2 g



宮崎 3回処理 3日後
5 μ L/200 mL/0.2 g

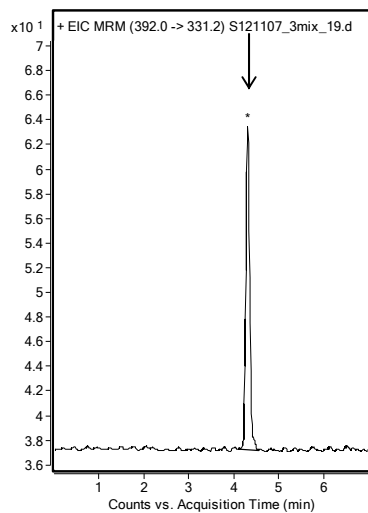


宮崎 3回処理 7日後
5 μ L/200 mL/0.2 g

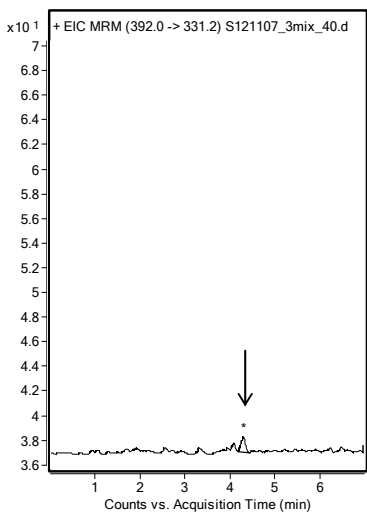


付図-3-2. ファモキサドンのクロマトグラム

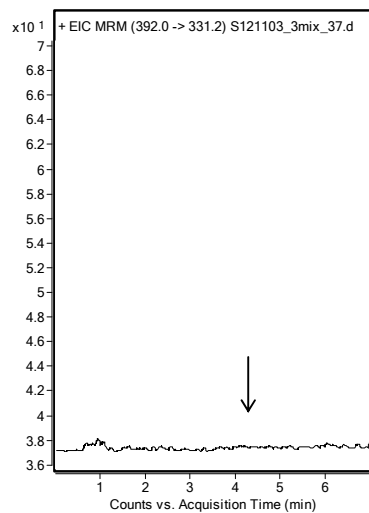
標準品 0.02 ng



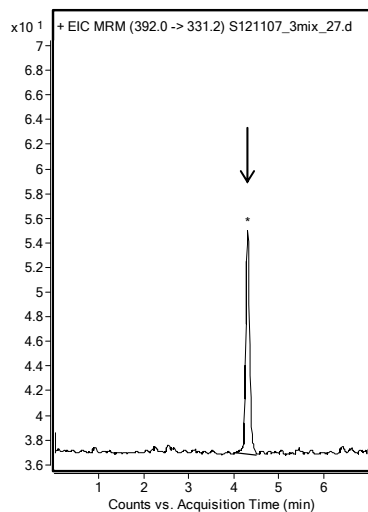
標準品 0.001 ng



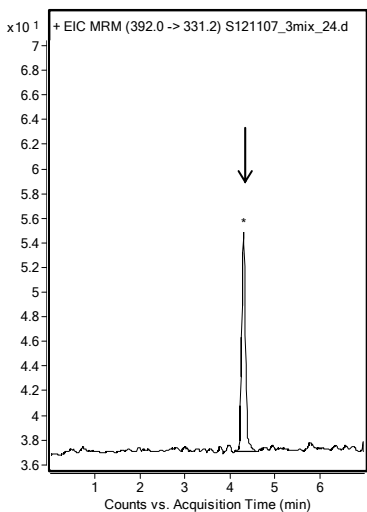
宮崎 無処理
5 μ L/10 mL/0.2 g



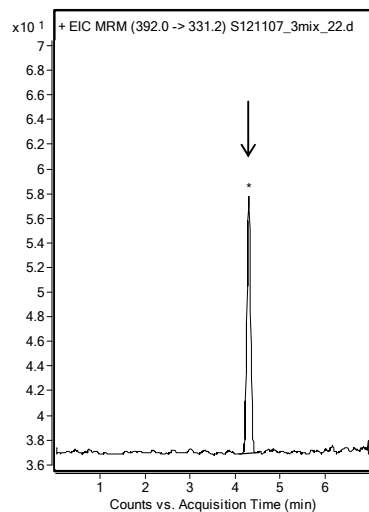
宮崎 3 回処理 1 日後
5 μ L/200 mL/0.2 g



宮崎 3 回処理 3 日後
5 μ L/200 mL/0.2 g

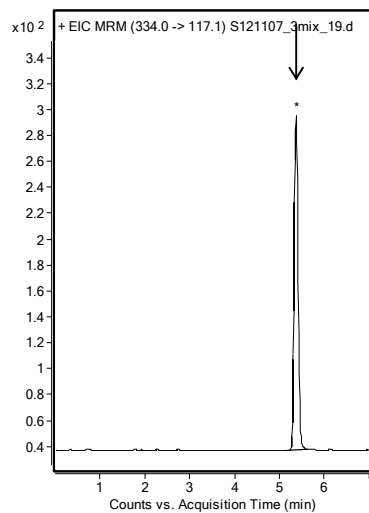


宮崎 3 回処理 7 日後
5 μ L/200 mL/0.2 g

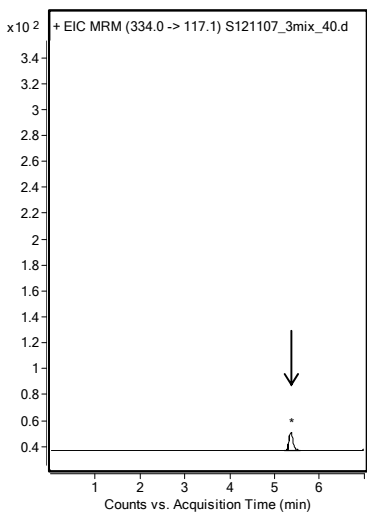


付図-3-3. テブフェンピラドのクロマトグラム

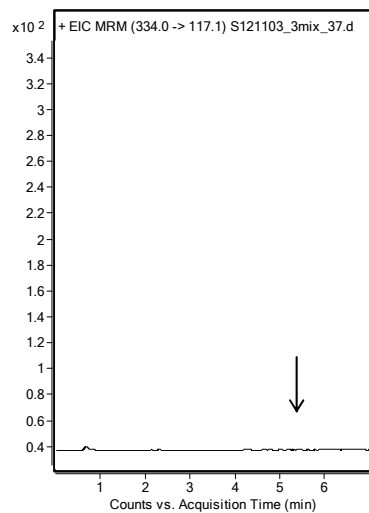
標準品 0.02 ng



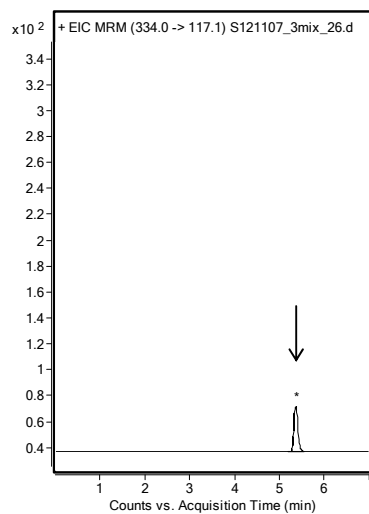
標準品 0.001 ng



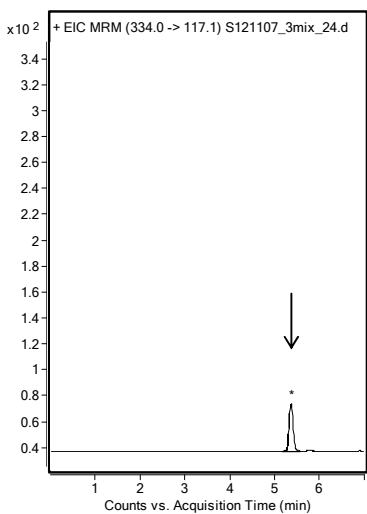
宮崎 無処理
5 μ L/10 mL/0.2 g



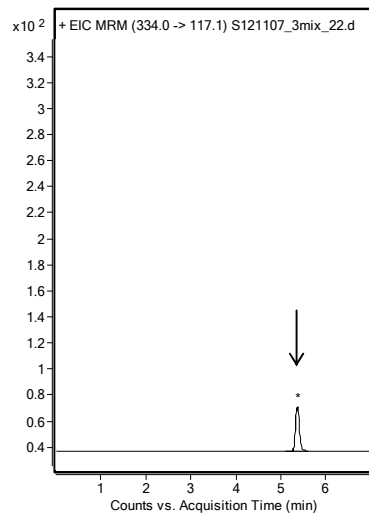
宮崎 3 回処理 1 日後
5 μ L/200 mL/0.2 g



宮崎 3 回処理 3 日後
5 μ L/200 mL/0.2 g



宮崎 3 回処理 7 日後
5 μ L/200 mL/0.2 g



登録作物のグループ化・残留分析詳細③

イミベンコナゾール

1. 分析対象物質

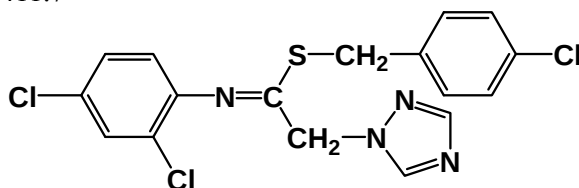
イミベンコナゾール

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

分子式： $C_{17}H_{13}Cl_3N_4S$

分子量： 411.7

構造式：



性 状： 淡黄色結晶

融 点： 89.5～90℃

蒸気圧： 8.5×10^{-5} mPa (25℃)

分配係数： $\log P_{OW} = 4.94$

溶解性： 水 1.7 mg/L (20℃),
アセトン 1063, ベンゼン 580, キシレン 250,
メタノール 120 (以上g/L, 25℃)

出 典： The Pesticide Manual, 14th Edition.

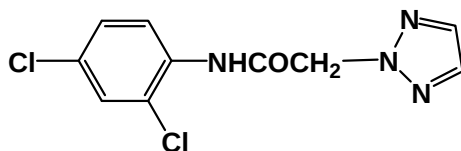
イミベンコナゾール脱ベンジル体

化学名： 2,4-dichloro-2-(1,2,4-triazol-1-yl)acetanilide

分子式： $C_{10}H_8Cl_2N_4O$

分子量： 271.1

構造式：



性 状： 白色結晶

融 点： 178～179.5℃

溶解性： 水 87 mg/L (20℃),
アセトン, メタノール等に可溶

出 典： イミベンコナゾール剤残留分析法（ももー果肉）報告書（作15P-8-176）

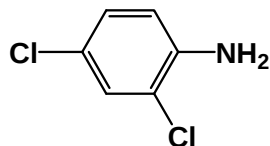
2,4-ジクロロアニリン

化学名： 2,4-dichloroaniline

分子式： $C_6H_5Cl_2N$

分子量： 162.0

構造式：



性 状： 白色結晶

融 点： 63℃

溶解性： 水に微溶，アセトン，メタノール等に可溶

出 典：イミベンコナゾール剤残留分析法（ももー果肉）報告書（作15P-8-176）

2. 標準品及び試薬

イミベンコナゾール標準品：

純度 99.7%（和光純薬工業製）

イミベンコナゾール脱ベンジル体標準品：

純度 99.9%（和光純薬工業製）

2,4-ジクロロアニリン標準品：

純度 99.9%（和光純薬工業製）

アセトニトリル，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（和光純薬工業製）

アセトニトリル： LC-MS 用（和光純薬工業製）

酢酸アンモニウム： 試薬特級（和光純薬工業製）

水： PURELAB Flex System(Veolia Water Solutions & Technologies, Saint Maurice, France)で精製した水

炭酸水素ナトリウム： 試薬特級（和光純薬工業製）

塩酸： 試薬特級（和光純薬工業製）

水酸化ナトリウム： 試薬特級（和光純薬工業製）

ジエチレングリコール： 試薬特級，以下 DEG と略す（和光純薬工業製）

塩化ナトリウム： 試薬特級（和光純薬工業製）

無水硫酸ナトリウム： 試薬特級（和光純薬工業製）

 C_{18} ミニカラム： InertSep C_{18} -C, 1 g/6 mL（ジーエルサイエンス製）

陰イオン交換ミニカラム：

InertSep SAX, 500 mg/6 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（ウォーターズ製）

グラファイトカーボンミニカラム

: InertSep GC, 500 mg/6 mL (ジーエルサイエンス製)

3. 装置及び機器

電子天秤:	メトラー・トレド AG245及びXS2002S
台秤:	エー・アンド・デイ FG-60KBM及びFV-60KA2
ミキサー:	パナソニック MX-X108
pHメーター:	堀場製作所 F-22
超音波洗浄機:	東京硝子器械 FU-30C
液体クロマトグラフ・質量分析計システム (LC-MS/MS):	
	アジレント 1290 HPLC
	アジレント 6460 Triple Quad LC/MS
データ処理装置:	アジレント MassHunter
ガスクロマトグラフ・質量分析計システム (GC-MS):	
	アジレント 6890 GC-MSD
データ処理装置:	アジレント ChemStation

4. 測定機器の操作条件

4.1. 液体クロマトグラフ・質量分析計

4.1.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム:	ZORBAX SB-C18 (アジレント製)
	内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒径 1.8 µm
溶離液:	5 mmol/L 酢酸アンモニウム/アセトニトリル
	90:10—(8 min)—5:95 (1 min)
流速:	0.3 mL/min
カラム温度:	40°C
試料注入量:	5 µL
保持時間:	イミベンコナゾール; 7.7 min
	イミベンコナゾール脱ベンジル体; 4.3 min

4.1.2. 質量分析計

イオン化法:	エレクトロスプレー イオン化法 (ESI)
	正モード
乾燥ガス温度:	300°C
乾燥ガス流量:	5 L/min
ネブライザー圧力:	45 psi
シースガス温度:	400°C

メロン 処理区B (イミベンコナゾール)

シースガス流量： 11 L/min
 イオン導入電圧： 5000 V
 フラグメンター電圧： イミベンコナゾール；100 V
 イミベンコナゾール脱ベンジル体；100 V
 コリジョン電圧： イミベンコナゾール；30 V
 イミベンコナゾール脱ベンジル体；30 V
 (コリジョンガス；N₂)
 イオン検出法： MRM
 モニタリングイオン： イミベンコナゾール；プリカーサーイオン m/z 412.9
 プロダクトイオン m/z 125.0
 イミベンコナゾール脱ベンジル体；プリカーサーイオン m/z 270.9
 プロダクトイオン m/z 173.9

4.2. ガスクロマトグラフ・質量分析計

4.2.1. ガスクロマトグラフ

カラム：	HP-5MS (アジレント製) 内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25 μm
温度：	50℃ (1 min)－25℃/min－125℃－10℃/min－300℃ (6.5 min) 注入口 250℃
注入方式：	パルスドスプリットレス注入法 (パルス時間 0.5 min, パルス圧力 150 kPa, パージ時間 1 min)
ガス流量：	キャリアー (He) 1 mL/min
試料注入量：	4 μL
保持時間：	7.6 min

4.2.2. 質量分析計

イオン化法：	電子衝撃法（EI）
加速エネルギー：	70 eV
インターフェース温度：	315℃
イオン源温度：	230℃
イオン検出法：	SIM法
モニタリングイオン：	定量イオン；m/z 161 参照イオン；m/z 90

5. 検量線の作成

5.1. イミベンコナゾール及びイミベンコナゾール脱ベンジル体

イミベンコナゾール及びイミベンコナゾール脱ベンジル体の各標準品10.0 mgを各々50 mLのメスフラスコに精秤し、アセトンに溶解して200 mg/L標準原液を調製した。各原液を等量ずつ混合し、アセトニトリル／水(50:50, v/v)混液で希釈して0.00005, 0.0001, 0.0005, 0.001及び0.002 mg/Lの混合標準溶液を調製した。その5 µL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イミベンコナゾール及びイミベンコナゾール脱ベンジル体のピーク面積を測定し、横軸に重量 (ng), 縦軸にピーク面積をとって各検量線を作成した。

5.2. 2,4-ジクロロアニリン

2,4-ジクロロアニリンの標準品10.0 mgを50 mLのメスフラスコに精秤し、アセトンに溶解して200 mg/L標準原液を調製した。この原液を1%DEG含有アセトン溶液で希釈して0.0005, 0.001, 0.005, 0.01及び0.02 mg/Lの標準溶液を調製した。その4 µLを前記条件のガスクロマトグラフ・質量分析計に注入し、データ処理装置を用いて2,4-ジクロロアニリンのピーク面積を測定し、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. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料は重量を量り、各々を縦に6分割したものから対角の2つを取り合わせた後、果肉と果皮に分け、それぞれの有姿試料を作製した。果肉の場合は、重量を量った後、細切して無作為に取り、試料500 gに対して5%炭酸水素ナトリウム水溶液200 gを添加してミキサーで磨砕均一化した後、密封して冷凍保存（-20℃設定）した。果皮の場合は、重量を量った後、細切して無作為に取り、試料200 gに対して5%炭酸水素ナトリウム水溶液80 gを添加してミキサーで磨砕均一化した後、密封して冷凍保存（-20℃設定）した。また、量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比（%）を算出した。

6.1.2. 抽出

6.1.2.1. 果肉

均一化した試料28 g（試料20 g相当量）を三角フラスコにはかりとり、アセトン100 mLを加えて30分間振とう抽出した。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣をアセトン50 mLで洗い、同様にろ過した。ろ液を合わせアセトンで200 mLに定容した。

イミベンコナゾール及びイミベンコナゾール脱ベンシル体は、その2 mL（試料0.2 g相当量）を分取し、水10 mLを添加した後、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、アセトンを留去した。

2,4-ジクロロアニリンは、その20 mL（試料2 g相当量）を分取した。

6.1.2.2. 果皮

均一化した試料14 g (試料10 g相当量) を三角フラスコにはかりとり、アセトン100 mLを加えて30分間振とう抽出した。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣をアセトン50 mLで洗い、同様にろ過した。ろ液を合わせアセトンで200 mLに定容した。

イミベンコナゾール及びイミベンコナゾール脱ベンシル体は、その4 mL (試料0.2 g相当量) を分取し、水10 mLを添加した後、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、アセトンを留去した。

2,4-ジクロロアニリンは、その40 mL (試料2 g相当量) を分取した。

6.1.3. 精製

6.1.3.1. イミベンコナゾール及びイミベンコナゾール脱ベンジル体

6.1.3.1.1. C₁₈ミニカラムによる精製

C₁₈ミニカラムにアセトニトリル5 mL及び水5 mLを順次流下し前処理した。前項の濃縮液を前処理したC₁₈ミニカラムに流下した後、さらに水／アセトニトリル (70:30, v/v) 混液5 mLを流下し、これらの流出液を捨てた。次に水／アセトニトリル (30:70, 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。

6.1.3.1.2. 陰イオン交換ミニカラムによる精製

陰イオン交換ミニカラムにメタノール5 mLを流下し前処理した。残留物をメタノール5 mLに溶解し、超音波処理した後、陰イオン交換ミニカラムに流下した。さらにメタノール25 mLを流下し、全溶出液を取り、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。

6.1.3.1.3. 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／アセトン (95:5, v/v) 混液5 mLを流下し前処理した。残留物を同混液5 mLに溶解し、超音波処理した後、フロリジルミニカラムに流下した。さらに同混液5 mLを流下し、これらの流出液を捨てた。次にヘキサン／アセトン (60:40, v/v) 混液30 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。

6.1.3.2. 2,4-ジクロロアニリン

6.1.3.2.1. 酢酸エチル転溶 (抱合体の加水分解を含む)

分取した抽出液に水100 mL、塩化ナトリウム10 g及び酢酸エチル100 mLを添加し、振とう機を用いて5分間激しく振とうした。暫時放置後、酢酸エチル層を分取し、水層には酢酸エチル50 mLを加え同様の振とう及び分取を繰り返した。

次に、水層に6 mol/L塩酸1 mLを添加後、1時間放置して抱合体を加水分解した。1 mol/L及び0.1 mol/L水酸化ナトリウム水溶液を添加してpH7～8に調整した後、酢酸エチル50 mLを添加し、振とう機を用いて5分間激しく振とうした。暫時放置後、酢酸エチル層を分取し、

水層には酢酸エチル30 mLを加え同様の振とう及び分取繰り返した。

全酢酸エチル層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水ろ過し、1%DEG含有アセトン溶液2 mL添加後、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。

6.1.3.2.2. 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酢酸エチル5 mLを流下し前処理した。残留物を酢酸エチル10 mLに溶解し、超音波処理した後、グラファイトカーボンミニカラムに流下した。さらに酢酸エチル10 mLを流下し、全溶出液を取り、1%DEG含有アセトン溶液2 mL添加後、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。

6.1.3.2.3. 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10 mLを流下し前処理した。残留物をヘキサン5 mLに溶解し、超音波処理した後、フロリジルミニカラムに流下した。さらにヘキサン5 mLを流下し、これらの流出液を捨てた。次にヘキサン／酢酸エチル (90:10, v/v) 混液10 mLを流下し、溶出液を取り、1%DEG含有アセトン溶液2 mL添加後、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。

6.1.4. 定量

6.1.4.1. イミベンコナゾール及びイミベンコナゾール脱ベンジル体

残留物をアセトニトリル／水 (50:50, v/v) 混液2 mLに溶解し、必要に応じて同混液で希釈した。この溶液の5 μ Lを前記条件の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入してピーク面積を求め、検量線よりイミベンコナゾール及びイミベンコナゾール脱ベンジル体の重量を求め、試料中の各残留濃度を算出した。

6.1.4.2. 2,4-ジクロロアニリン

残留物をアセトン2 mLに溶解し、必要に応じて1%DEG含有アセトン溶液で希釈した。この溶液の4 μ Lを前記条件のガスクロマトグラフ・質量分析計に注入してピーク面積を求め、検量線より2,4-ジクロロアニリンの重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値 (LOQ) 及び検出限界値 (LOD)

6.2.1. イミベンコナゾール及びイミベンコナゾール脱ベンジル体*

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	定量限界 (ppm)
<u>果肉</u>				
0.0005	0.2	2	5	0.001
<u>果皮</u>				
0.0005	0.2	2	5	0.001

最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)
<u>果肉</u>				
0.00025	0.2	2	5	0.0005
<u>果皮</u>				
0.00025	0.2	2	5	0.0005

*イミベンコナゾール、イミベンコナゾール脱ベンジル体はいずれも同じ値

6.2.2. 2,4-ジクロロアニリン

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	定量限界 (ppm)
<u>果肉</u>				
0.004	2	2	4	0.001
<u>果皮</u>				
0.004	2	2	4	0.001

最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)
<u>果肉</u>				
0.002	2	2	4	0.0005
<u>果皮</u>				
0.002	2	2	4	0.0005

6.3. 回収率

分析法確認のため、宮崎II*の果肉及び果皮の3回処理7日後試料を用いて、0.001 ppm（定量限界相当）、0.25 ppm及び5 ppm添加濃度における回収試験を各5連分析で実施した。さらにイミベンコナゾールの果皮については、本年度の茨城及び高知の無処理試料を用いて20 ppm添加回収試験を各3連、計6連分析で実施した。なお、無処理試料は2連分析し、全て定量限界未満（<0.001 ppm）であった。回収試験結果を表に示す。

*平成23年度農薬等安全性確保強化実態調査事業の宮崎II 3回処理7日後試料を使用

6.3.1. 果肉の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
イミベンコナゾール						
宮崎II	5	83, 79,	83, 78	81,	81	2.8
宮崎II	0.25	85, 83,	85, 80	83,	83	2.5
宮崎II	0.001	96, 88,	90, 75	88,	87	8.8
イミベンコナゾール脱ベンジル体						
宮崎II	5	92, 82,	84, 82	83,	85	5.0
宮崎II	0.25	87, 81,	87, 81	84,	84	3.6
宮崎II	0.001	120, 102,	110, 89	108,	106	10.8
2,4-ジクロロアニリン						
宮崎II	5	85, 83,	85, 77	83,	83	4.0
宮崎II	0.25	89, 83,	89, 79	84,	85	5.0
宮崎II	0.001	104, 95,	97, 91	96,	97	4.9

6.3.2. 果皮の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
イミベンコナゾール						
茨城	20	87,	86,	80,	86	3.5
高知	20	89,	86,	86		
宮崎II	5	87,	87,	85,	86	1.6
		85,	84			
宮崎II	0.25	89,	89,	88,	87	2.9
		87,	83			
宮崎II	0.001	72,	67,	66,	67	4.5
		66,	64			
イミベンコナゾール脱ベンジル体						
宮崎II	5	90,	87,	86,	87	2.0
		86,	86			
宮崎II	0.25	88,	88,	87,	86	3.4
		85,	81			
宮崎II	0.001	84,	82,	80,	77	9.8
		69,	68			
2,4-ジクロロアニリン						
宮崎II	5	83,	77,	75,	76	5.7
		73,	72			
宮崎II	0.25	81,	80,	77,	76	6.7
		71,	70			
宮崎II	0.001	94,	94,	91,	91	4.2
		89,	85			

7. 精度管理

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

管理基準：20検体を超えるごとに、各1検体の無処理試料及び0.01 ppm添加試料（クォリティーコントロール試料）を分析した。

クォリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

また、2011年10月実施の食品衛生精度管理比較調査（財団法人食品薬品安全センター）におけるZスコアは全て $Z < 2$ であった。

7.1.クォリティーコントロール試料分析結果

7.1.1.果肉

成分名	分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>イミベンコナゾール</u>	2012/ 9/19	茨城	92	<0.001
	2012/10/ 1	高知	82	<0.001
	2012/ 9/ 7	宮崎	73	<0.001
	2012/10/18	宮崎	94	<0.001
<u>イミベンコナゾール</u>	2012/ 9/19	茨城	101	<0.001
<u>脱ベンジル体</u>	2012/10/ 1	高知	92	<0.001
	2012/ 9/ 7	宮崎	89	<0.001
	2012/10/18	宮崎	73	<0.001
<u>2,4-ジクロロアニリン</u>	2012/ 9/19	茨城	100	<0.001
	2012/10/ 1	高知	87	<0.001
	2012/ 9/ 7	宮崎	85	<0.001
	2012/10/15	宮崎	95	<0.001

7.1.2.果皮

成分名	分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>イミベンコナゾール</u>	2012/ 9/25	茨城	79	<0.001
	2012/10/ 5	高知	93	<0.001
	2012/ 9/13	宮崎	75	<0.001
	2012/10/18	宮崎	81	<0.001
<u>イミベンコナゾール</u>	2012/ 9/25	茨城	81	<0.001
<u>脱ベンジル体</u>	2012/10/ 5	高知	103	<0.001
	2012/ 9/13	宮崎	86	<0.001
	2012/10/18	宮崎	94	<0.001
<u>2,4-ジクロロアニリン</u>	2012/ 9/25	茨城	84	<0.001
	2012/10/ 5	高知	94	<0.001
	2012/ 9/13	宮崎	73	<0.001
	2012/10/15	宮崎	98	<0.001

8. マトリックス効果の確認

マトリックス標準溶液は、各圃場の無処理試料の最終溶液1 mLをナス型フラスコに分取し、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、窒素気流下で溶媒を留去した後、イミベンコナゾール及びイミベンコナゾール脱ベンジル体は0.001 mg/Lの検量線用混合標準溶液1 mL、2,4-ジクロロアニリンは0.01 mg/Lの検量線用標準溶液1 mLに溶解して調製した。マトリックス試料分析結果を表に示す。

8.1.1. 果肉

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>イミベンコナゾール</u>	茨城	84
	高知	81
	宮崎	82
<u>イミベンコナゾール</u>	茨城	96
<u>脱ベンジル体</u>	高知	96
	宮崎	98
<u>2,4-ジクロロアニリン</u>	茨城	101
	高知	101
	宮崎	113

8.1.2.果皮

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>イミベンコナゾール</u>	茨城	75
	高知	93
	宮崎	74
<u>イミベンコナゾール</u>	茨城	95
<u>脱ベンジル体</u>	高知	102
	宮崎	100
<u>2,4-ジクロロアニリン</u>	茨城	104
	高知	97
	宮崎	116

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料に各化合物を添加し、 -20°C 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。保存安定性試験の結果を表に示す。

9.1. 果肉の保存安定性試験結果

9.1.1. イミベンコナゾール

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	92 (2012/7/18-10/18)	81,	80	80
0.5	高知	78 (2012/8/1-10/18)	79,	78	78
0.5	宮崎	105 (2012/7/5-10/18)	85,	80	82

9.1.2. イミベンコナゾール脱ベンジル体

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	92 (2012/7/18-10/18)	82,	80	81
0.5	高知	78 (2012/8/1-10/18)	77,	77	77
0.5	宮崎	105 (2012/7/5-10/18)	82,	77	80

9.1.3. 2,4-ジクロロアニリン

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	89 (2012/7/18-10/15)	83,	82	82
0.5	高知	75 (2012/8/1-10/15)	82,	82	82
0.5	宮崎	102 (2012/7/5-10/15)	86,	86	86

9.2.果皮の保存安定性試験結果

9.2.1.イミベンコナゾール

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	92 (2012/7/18-10/18)	80,	75	78
0.5	高知	78 (2012/8/1-10/18)	83,	75	79
0.5	宮崎	105 (2012/7/5-10/18)	84,	82	83

9.2.2.イミベンコナゾール脱ベンジル体

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	92 (2012/7/18-10/18)	83,	80	82
0.5	高知	78 (2012/8/1-10/18)	80,	79	80
0.5	宮崎	105 (2012/7/5-10/18)	82,	81	82

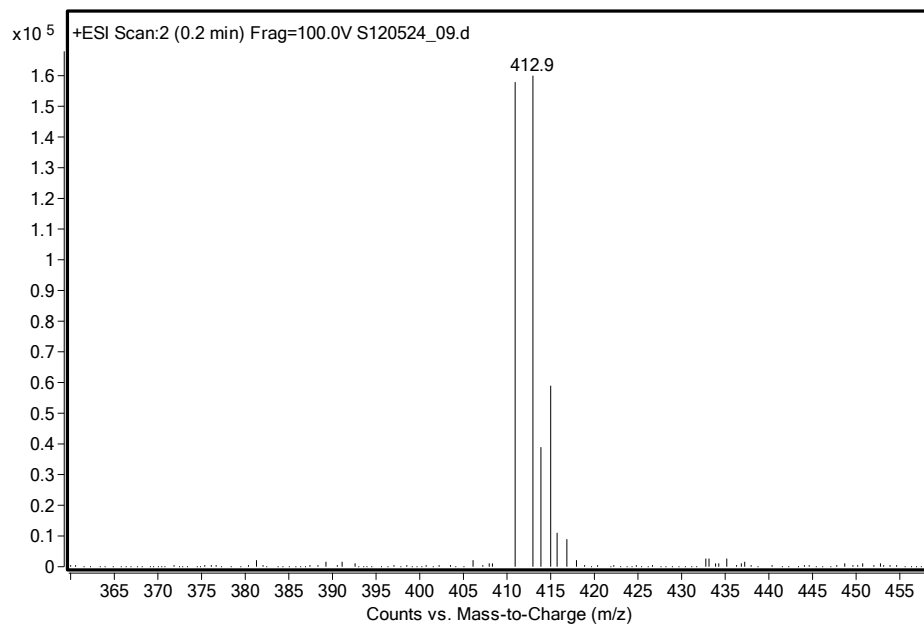
9.2.3. 2,4-ジクロロアニリン

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	89 (2012/7/18-10/15)	76,	76	76
0.5	高知	75 (2012/8/1-10/15)	74,	73	74
0.5	宮崎	102 (2012/7/5-10/15)	72,	72	72

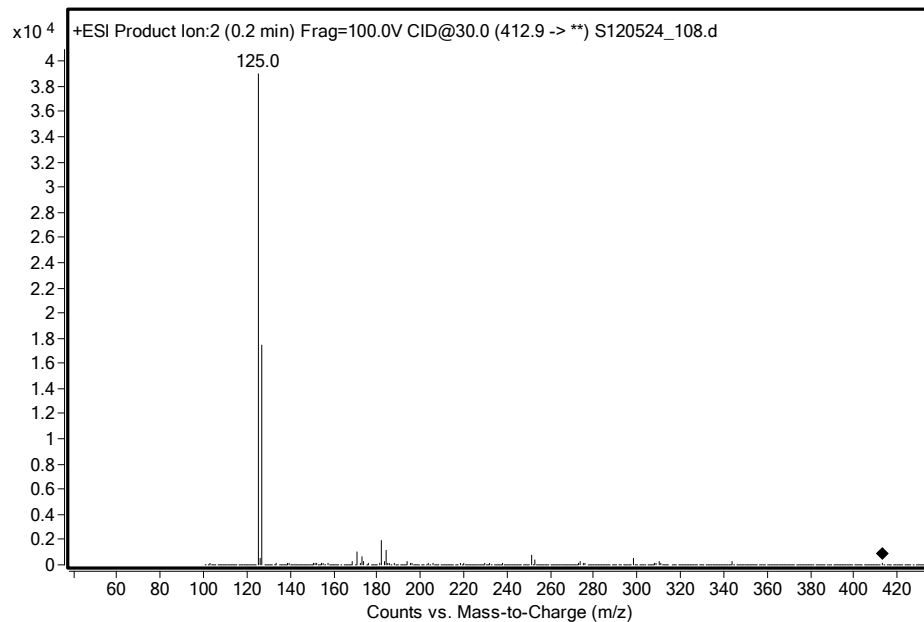
付図-1. マススペクトル

付図-1-1. イミベンコナゾールのマススペクトル (LC-MS/MS)

イミベンコナゾールのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)

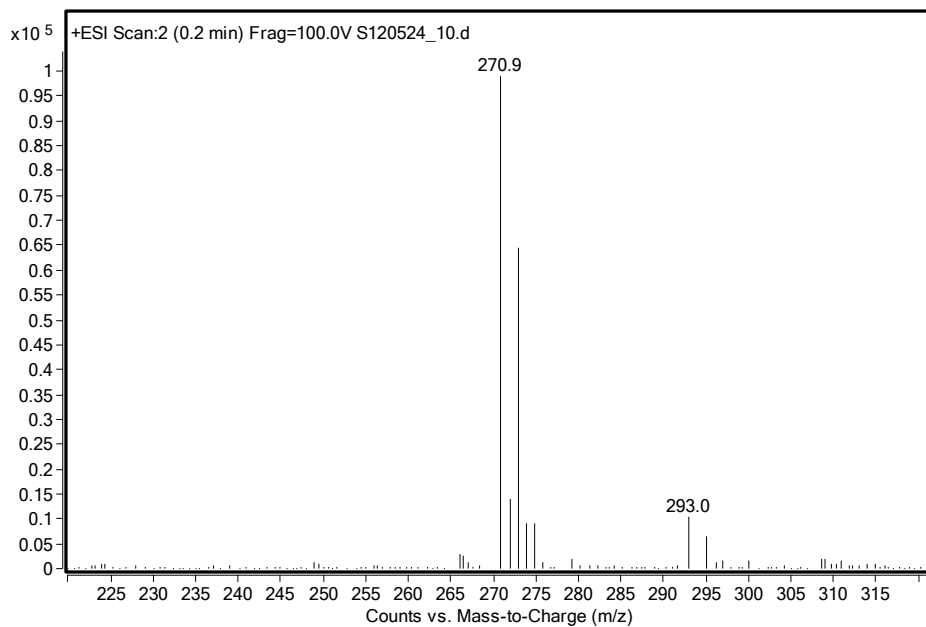


イミベンコナゾールのプロダクトスキャンスペクトルの一例
(プリカーサーイオン ; m/z =412.9, 正モード)

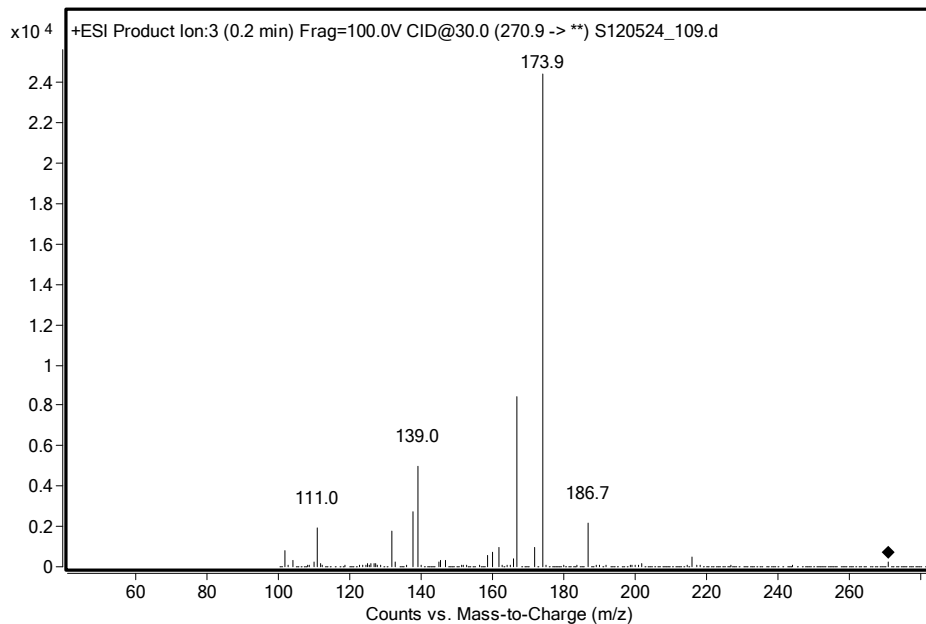


付図-1-2. イミベンコナゾール脱ベンジル体のマススペクトル (LC-MS/MS)

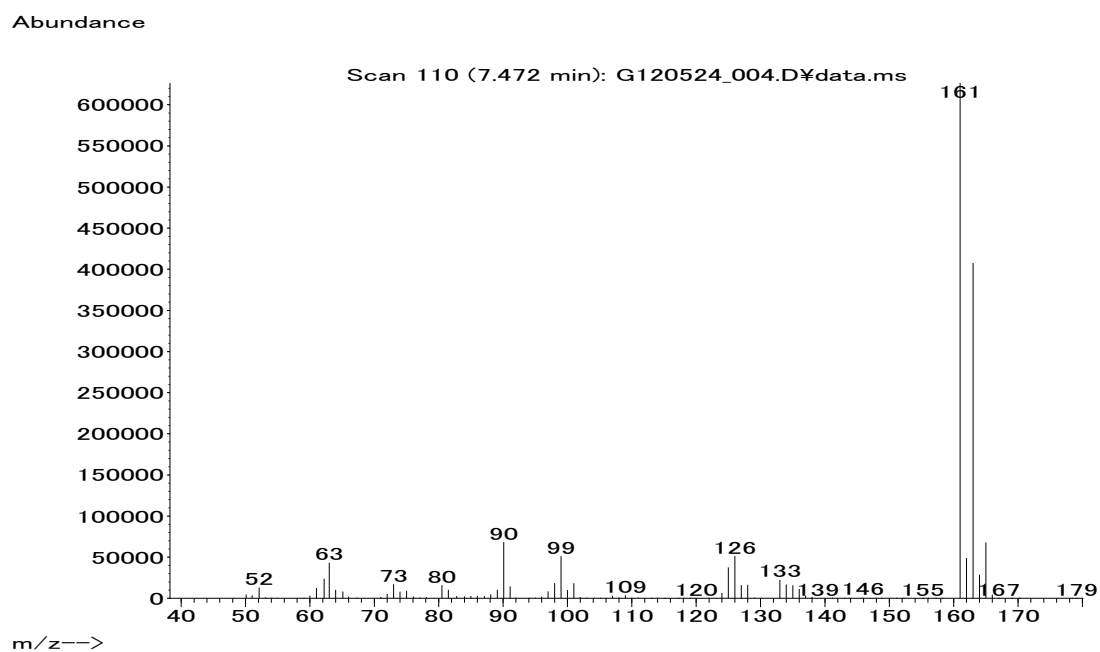
イミベンコナゾール脱ベンジル体のマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)



イミベンコナゾール脱ベンジル体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=270.9, 正モード)



付図-1-3. 2,4-ジクロロアニリンのマススペクトル (GC-MS)



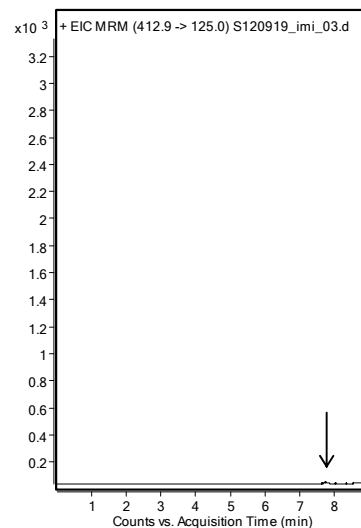
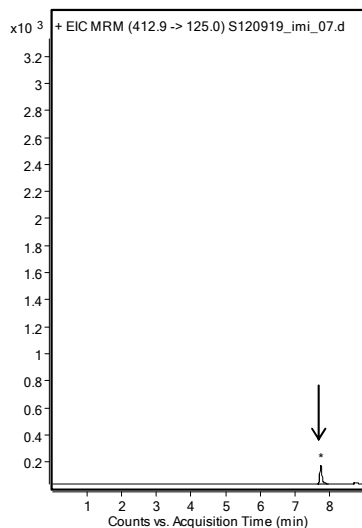
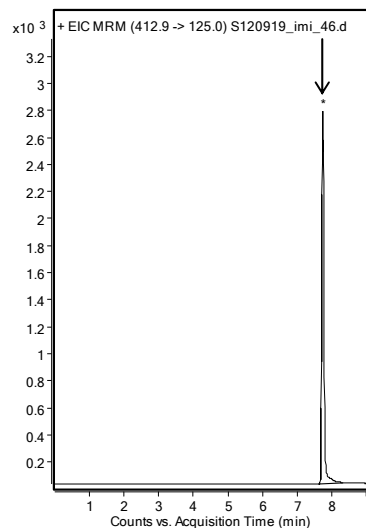
付図-2. 果実のクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. イミベンコナゾールのクロマトグラム

標準品 0.01 ng

標準品 0.0005 ng

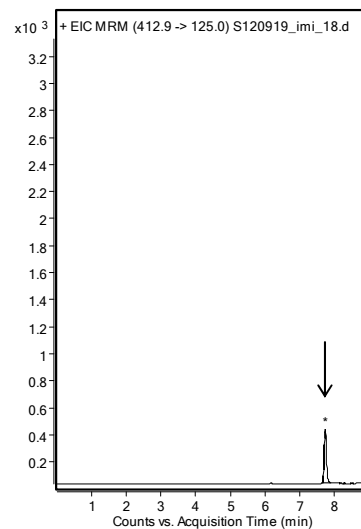
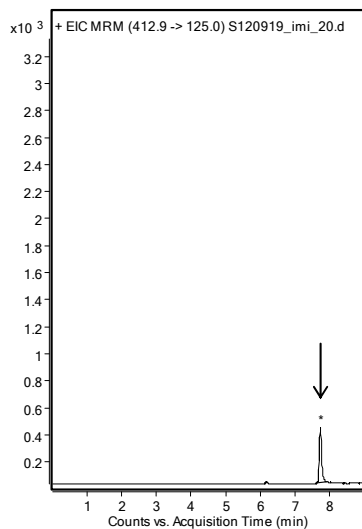
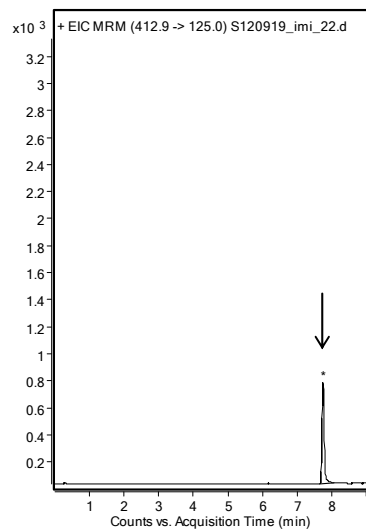
宮崎 無処理
5 μ L/2 mL/0.2 g



宮崎 4 回処理 1 日後
5 μ L/2 mL/0.2 g

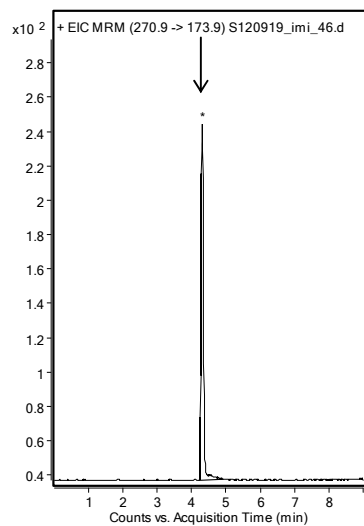
宮崎 4 回処理 3 日後
5 μ L/2 mL/0.2 g

宮崎 4 回処理 7 日後
5 μ L/2 mL/0.2 g

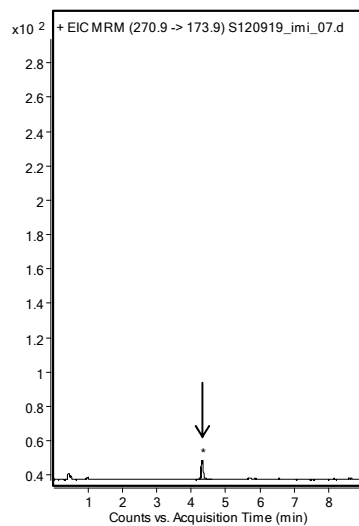


付図-2-2. イミベンコナゾール脱ベンジル体のクロマトグラム

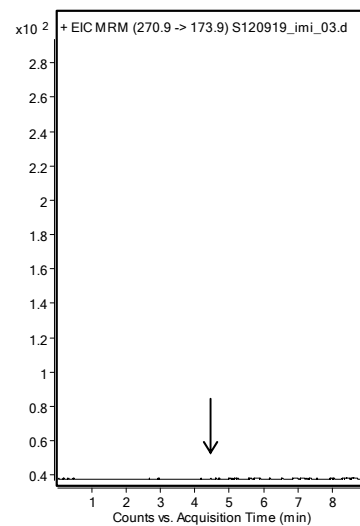
標準品 0.01 ng



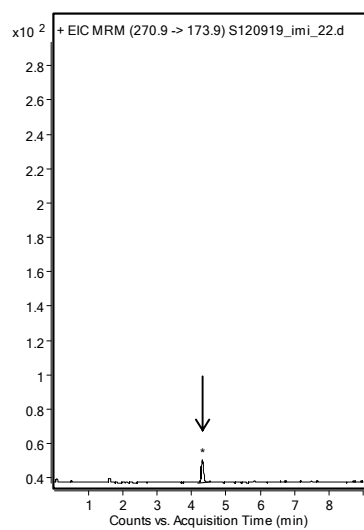
標準品 0.0005 ng



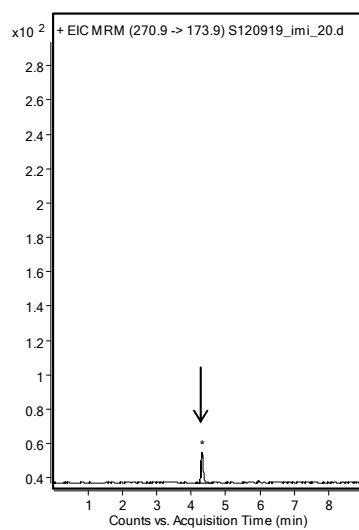
宮崎 無処理
5 μ L/2 mL/0.2 g



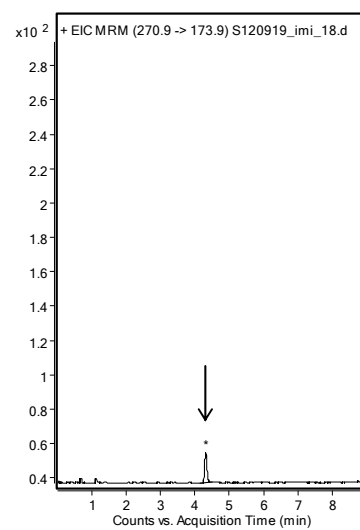
宮崎 4 回処理 1 日後
5 μ L/2 mL/0.2 g



宮崎 4 回処理 3 日後
5 μ L/2 mL/0.2 g

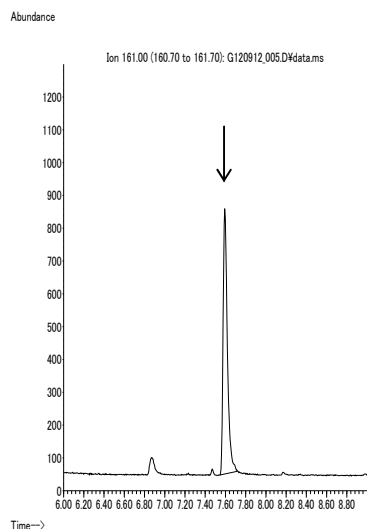


宮崎 4 回処理 7 日後
5 μ L/2 mL/0.2 g



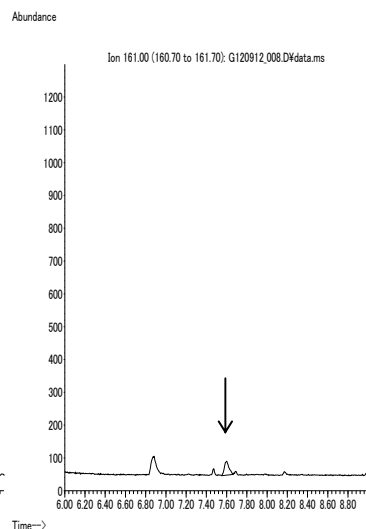
付図-2-3. 2,4-ジクロロアニリンのクロマトグラム

標準品 0.08 ng



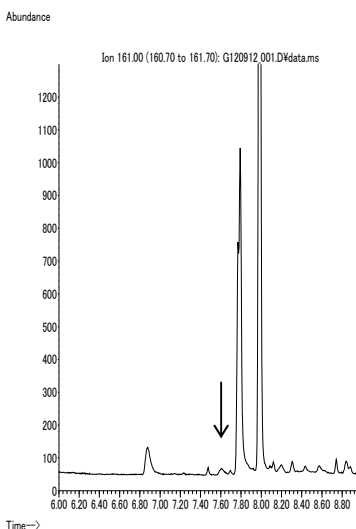
宮崎 4 回処理 1 日後
4 μ L/2 mL/2 g

標準品 0.01 ng

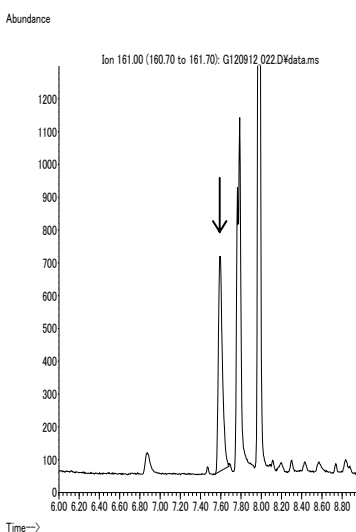
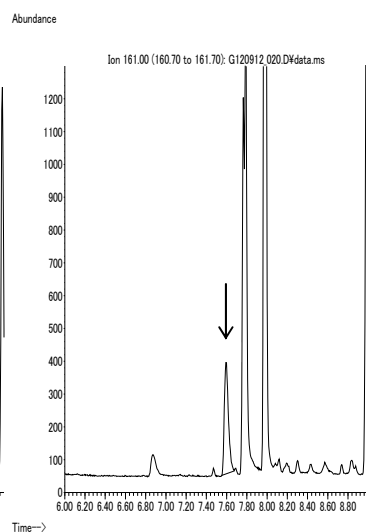
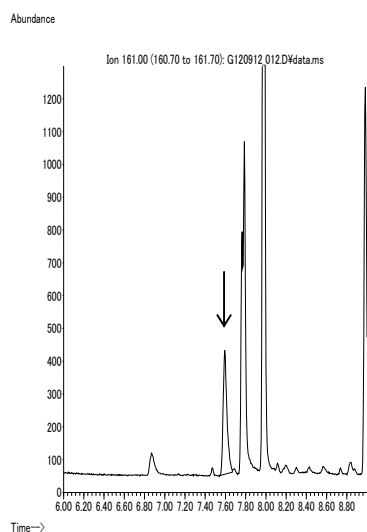


宮崎 4 回処理 3 日後
4 μ L/2 mL/2 g

宮崎 無処理
4 μ L/2 mL/2 g



宮崎 4 回処理 7 日後
4 μ L/2 mL/2 g



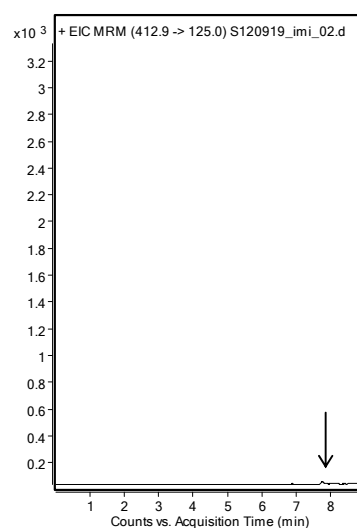
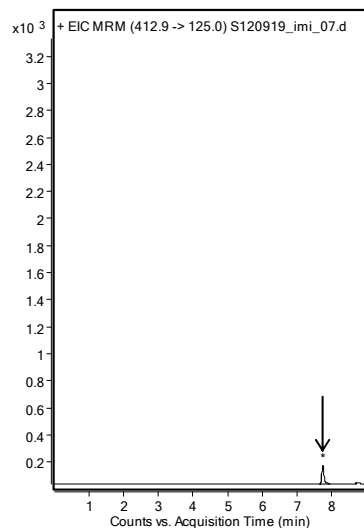
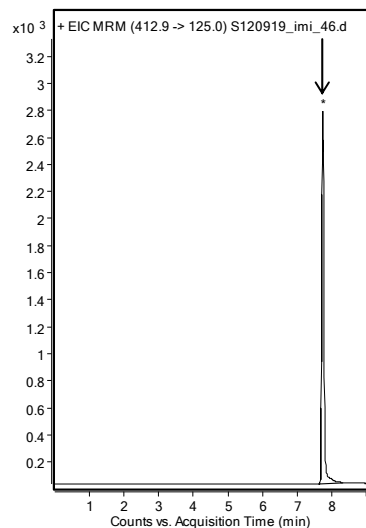
付図-3. 果皮のクロマトグラム (代表例)

付図-3-1. イミベンコナゾールのクロマトグラム

標準品 0.01 ng

標準品 0.0005 ng

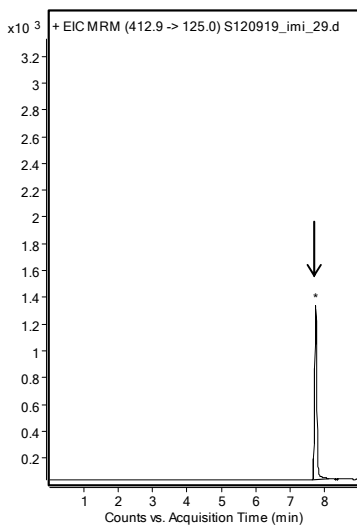
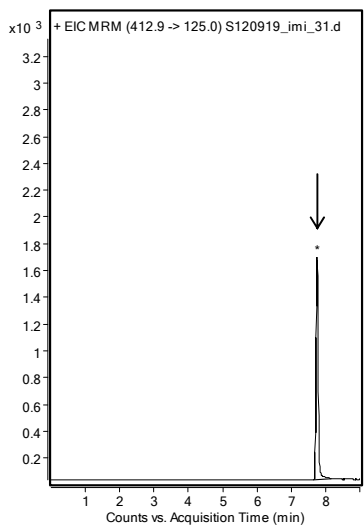
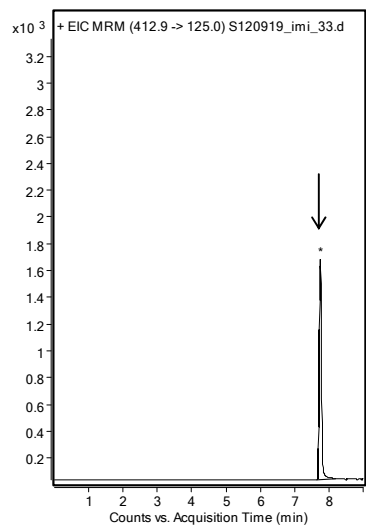
宮崎 無処理
5 μ L/2 mL/0.2 g



宮崎 4回処理 1日後
5 μ L/800 mL/0.2 g

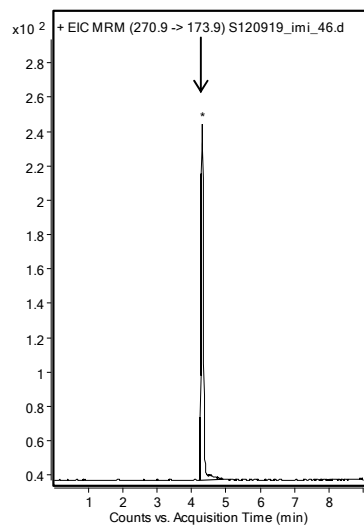
宮崎 4回処理 3日後
5 μ L/800 mL/0.2 g

宮崎 4回処理 7日後
5 μ L/800 mL/0.2 g

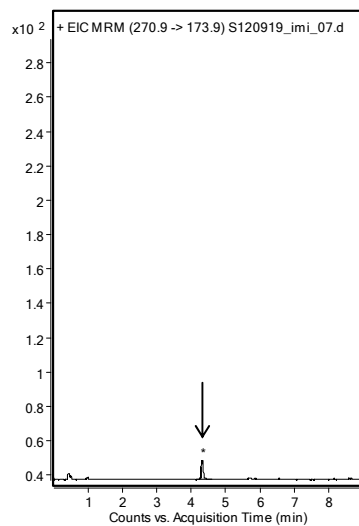


付図-3-2. イミベンコナゾール脱ベンジル体のクロマトグラム

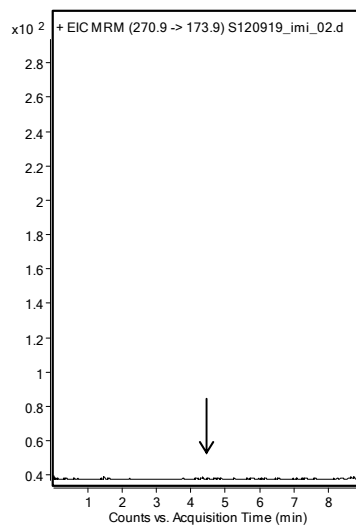
標準品 0.01 ng



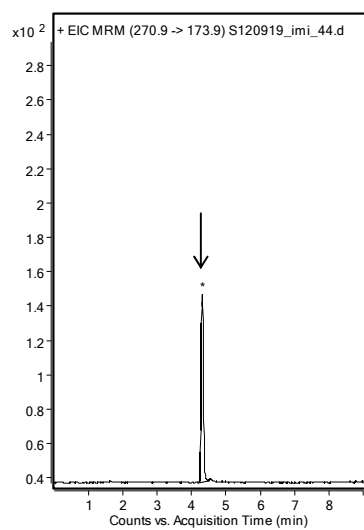
標準品 0.0005 ng



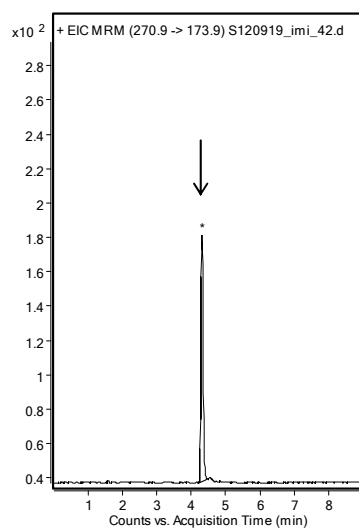
宮崎 無処理
5 μ L/2 mL/0.2 g



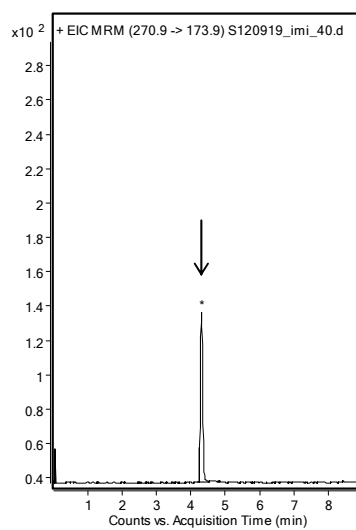
宮崎 4 回処理 1 日後
5 μ L/40 mL/0.2 g



宮崎 4 回処理 3 日後
5 μ L/40 mL/0.2 g

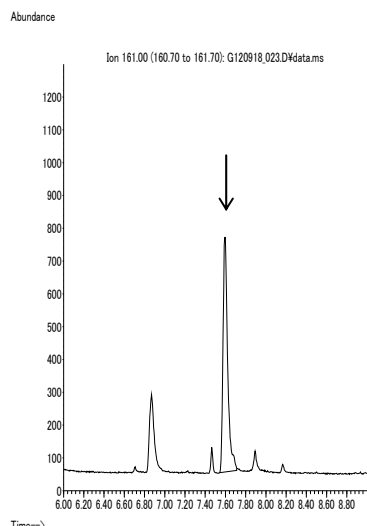


宮崎 4 回処理 7 日後
5 μ L/80 mL/0.2 g

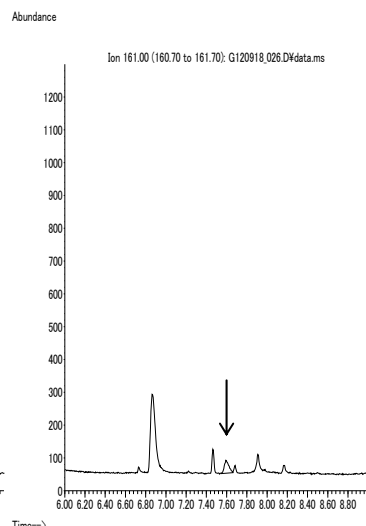


付図-3-3. 2,4-ジクロロアニリンのクロマトグラム

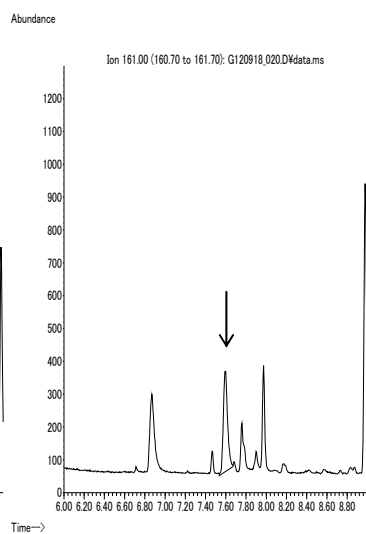
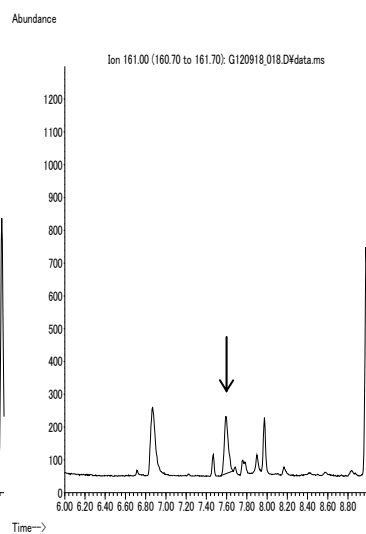
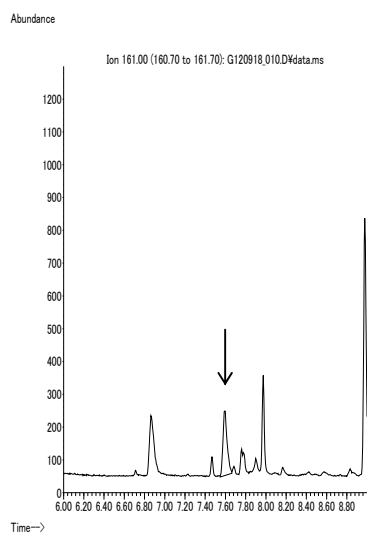
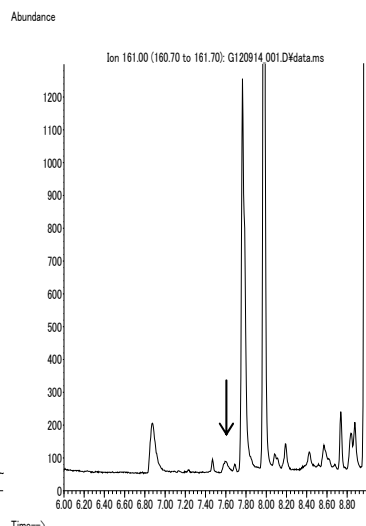
標準品 0.08 ng



標準品 0.01 ng



宮崎 無処理
4 μ L/2 mL/2 g



登録作物のグループ化・残留分析詳細④
試料重量等，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	—	1.97	1.95	9.84	9.75	92	8	2.6
	B	1	1.96		9.82		93	7	1.0
	B	3	1.86		9.32		94	6	1.5
	B	7	2.00		10.0		93	7	2.2
								平均 93:7	平均 1.8
高知	0	—	1.72	1.72	17.2	12.0	91	9	3.2
	B	1	1.72		10.3		92	8	2.6
	B	3	1.72		10.3		92	8	2.3
	B	7	1.72		10.3		93	7	2.6
								平均 92:8	平均 2.7
宮崎	0	—	1.84	1.84	18.4	11.5	92	8	1.8
	B	1	1.77		8.84		92	8	1.1
	B	3	1.84		9.18		93	7	1.7
	B	7	1.91		9.54		93	7	1.4
								平均 93:7	平均 1.5
3 ほ場の総平均重量				3 ほ場の総重量の平均					
1.84 kg/個				11.1 kg					

B：メパニピリム，イミベンコナゾールは4回処理

ジフェノコナゾール，ファモキサドンは3回処理

テブフェンピラドは1回処理

2.作物写真の一例

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

資料 2-6

登録作物のグループ化・残留分析詳細①

エトキサゾール, アクリナトリン, フェンプロパトリン, ビフェントリン

1. 分析対象物質

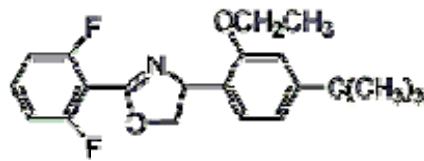
エトキサゾール

化学名 : (RS)-5-tert-butyl-2-[2-(2,6-difluorophenyl)-4,5-dihydro-1,3-oxazol-4-yl]phenetole

分子式 : $C_{21}H_{23}F_2NO_2$

分子量 : 359.4

構造式 :



性 状 : 白色粉末

融 点 : 101~102°C

蒸気圧 : 7.0×10^{-3} mPa (25°C)

分配係数 : $\log P_{OW} = 5.59$ (25°C)

溶解性 : 水 75.4 µg/L (20°C)

アセトン 300, メタノール 90, エタノール 90, シクロヘキサノン 500,
テトラヒドロフラン 750, アセトニトリル 80, 酢酸エチル 250,
キシレン 250, *n*-ヘキサン 13, *n*-ヘプタン 13 (以上g/L, 20°C)

出 典 : The Pesticide Manual, 14th Edition.

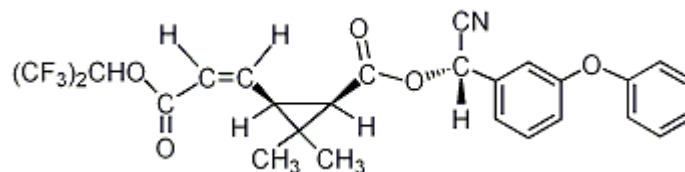
アクリナトリン

化学名 : (S)-α-cyano-3-phenoxybenzyl (Z)-(1R,3S)-2,2-dimethyl-3-[2-(2,2,2-trifluoro-1-trifluoromethylethoxycarbonyl)vinyl]cyclopropanecarboxylate

分子式 : $C_{26}H_{21}F_6NO_5$

分子量 : 541.4

構造式 :



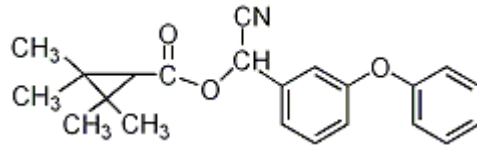
メロン 処理区C (エトキサザール, アクリナトリン, フェンプロパトリン, ビフェントリン)

性 状 : 白色粉末
融 点 : 81.5°C
蒸気圧 : 4.4×10^{-5} mPa (20°C)
分配係数 : $\log P_{OW} = 5.6$ (25°C)
溶解性 : 水 ≤ 0.02 mg/L (25°C)
アセトン, クロロホルム, ジクロロメタン, 酢酸エチル,
ジメチルホルムアミド > 500,
ジイソプロピルエーテル 170, エタノール 40, ヘキサン 10,
n-オクタノール 10 (以上g/L)

出 典 : The Pesticide Manual, 14th Edition.

フェンプロパトリン

化学名 : (RS)- α -cyano-3-phenoxybenzyl 2,2,3,3-tetramethylcyclopropanecarboxylate
分子式 : $C_{22}H_{23}NO_3$
分子量 : 349.4
構造式 :



性 状 : 黄褐色固体
融 点 : 45~50°C
蒸気圧 : 0.730 mPa (20°C)
分配係数 : $\log P_{OW} = 6$ (20°C)
溶解性 : 水 14.1 μ g/L (25°C)
キシレン, シクロヘキサノン 1000, メタノール 337 (以上g/kg, 25°C)

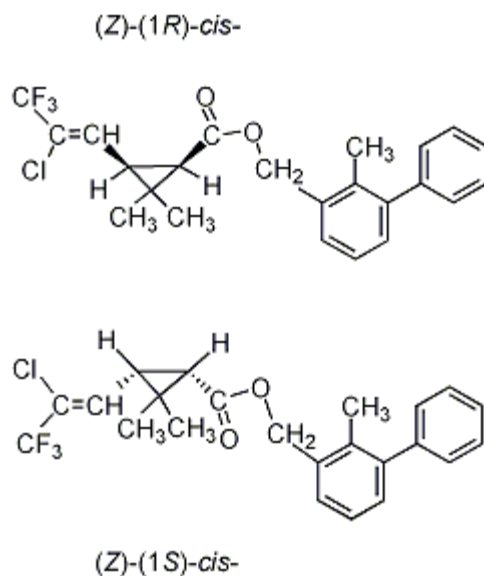
出 典 : The Pesticide Manual, 14th Edition.

ビフェントリン

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

メロン 処理区C (エトキサゾール, アクリナトリン, フェンプロパトリン, ビフェントリン)

構造式：



性 状： 粘着性の液体；結晶状もしくはろう状の固体

融 点： 68～70.6℃

蒸気圧： 0.024 mPa (25℃)

分配係数： $\log P_{ow} > 6$

溶解性： 水 < 1 µg/L

アセトン，クロロホルム，ジクロロメタン，ジエチルエーテル，
トルエンに可溶

ヘプタン及びメタノールに僅溶

出 典：The Pesticide Manual, 14th Edition.

2. 標準品及び試薬

エトキサゾール標準品： 純度 100% (和光純薬工業製)

アクリナトリン標準品： 純度 98.7% (和光純薬工業製)

フェンプロパトリン標準品： 純度 100% (和光純薬工業製)

ビフェントリン標準品： 純度 99.5% (関東化学製)

アセトニトリル，アセトン： 残留農薬試験用 (和光純薬工業製)

テトラヒドロフラン： HPLC 用 (和光純薬工業製)

アセトニトリル： LC-MS 用 (和光純薬工業製)

酢酸アンモニウム： 試薬特級 (和光純薬工業製)

水： PURELAB Flex System (Veolia Water Solutions & Technologies, Saint Maurice, France) で精製した水

グラファイトカーボンミニカラム

: InertSep GC, 500 mg/6 mL (ジーエルサイエンス製)

3. 装置及び機器

電子天秤 : メトラー・トレド AG245及びXS2002S
台秤 : エー・アンド・デイ FG-60KBM及びFV-60KA2
ミキサー : エフ・エム・アイ ロボクーブ BLIXER-5Plus
ホモジナイザー : kinematica PT 10/35, PT3100
液体クロマトグラフ・質量分析計システム (LC-MS/MS) :
アジレント 1290 HPLC
アジレント 6460 Triple Quad LC/MS
データ処理装置 : アジレント MassHunter

4. 液体クロマトグラフ・質量分析計の操作条件

4.1. 液体クロマトグラフ・質量分析計 (エトキサゾール, フェンプロパトリン, ビフェントリン)

4.1.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム : ZORBAX SB-C18 (アジレント製)
内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒径 1.8 µm
溶離液 : アセトニトリル/5 mmol/L 酢酸アンモニウム
70:30—(7 min)—95:5 (1 min)
流速 : 0.3 mL/min
カラム温度 : 40°C
試料注入量 : 10 µL
保持時間 : エトキサゾール ; 3.9 min
フェンプロパトリン ; 4.3 min
ビフェントリン ; 6.1 min

4.1.2. 質量分析計

イオン化法 : エレクトロスプレー イオン化法 (ESI)
正モード
乾燥ガス温度 : 300°C
乾燥ガス流量 : 5 L/min
ネブライザー圧力 : 45 psi
シースガス温度 : 250°C
シースガス流量 : 5 L/min
イオン導入電圧 : 5000 V

フラグメンター電圧： エトキサゾール；150 V
フェンプロパトリン；50 V
ビフェントリン；50 V
コリジョン電圧： エトキサゾール；30 V
フェンプロパトリン；14 V
ビフェントリン；8 V
(コリジョンガス；N₂)
イオン検出法： MRM
モニタリングイオン： エトキサゾール；プリカーサーイオン m/z 360.0
プロダクトイオン m/z 141.1
フェンプロパトリン；プリカーサーイオン m/z 367.1
プロダクトイオン m/z 125.2
ビフェントリン；プリカーサーイオン m/z 440.0
プロダクトイオン m/z 181.1

4.2. 液体クロマトグラフ・質量分析計（アクリナトリン）

4.2.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム： ZORBAX SB-C18 (アジレント製)
内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒径 1.8 μm
溶離液： アセトニトリル／5 mmol/L 酢酸アンモニウム
70:30－(7 min)－95:5
流速： 0.3 mL/min
カラム温度： 40°C
試料注入量： 5 μL
保持時間： 4.8 min

4.2.2. 質量分析計

イオン化法： エレクトロスプレー イオン化法 (ESI)
負モード
乾燥ガス温度： 300°C
乾燥ガス流量： 5 L/min
ネブライザー圧力： 45 psi
シースガス温度： 400°C
シースガス流量： 11 L/min
イオン導入電圧： 3500 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; N₂)
イオン検出法： MRM
モニタリングイオン： プリカーサーイオン m/z 540.0
プロダクトイオン m/z 300.1

5. 検量線の作成

5.1. エトキサゾール, フェンプロパトリン及びビフェントリン

エトキサゾール, フェンプロパトリン及びビフェントリンの各標準品10.0, 10.0及び10.1 mg (各10.0 mg相当) を各々50 mLのメスフラスコに精秤し, アセトンに溶解して200 mg/L標準原液を調製した。各原液を等量ずつ混合し, アセトニトリル/水(50:50, v/v)混液で希釈して0.0001, 0.0002, 0.001, 0.002及び0.004 mg/Lの混合標準溶液を調製した。その10 µLを第4-1項の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入し, データ処理装置を用いてエトキサゾール, フェンプロパトリン及びビフェントリ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各検量線を作成した。

5.2. アクリナトリン

アクリナトリンの標準品10.1 mg (10.0 mg相当) を50 mLのメスフラスコに精秤し, アセトンに溶解して200 mg/L標準原液を調製した。この原液をアセトニトリル/水(50:50, v/v)混液で希釈して0.0002, 0.0004, 0.002, 0.004及び0.008 mg/Lの標準溶液を調製した。その5 µLを第4-2項の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入し, データ処理装置を用いてアクリナトリ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. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料は重量を量り, 各々を縦に6分割したものから対角の2つを取り合わせた後, 果肉と果皮に分け, それぞれの有姿試料を作製した。重量を量った後, 密封して冷凍保存 (−20℃設定) した。果肉分析時には果肉の有姿試料を取り, 細切し, ミキサーで均一化した。果皮分析時には果皮の有姿試料を取り, 細切し, ミキサーで均一化した。また, 量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比 (%) を算出した。

6.1.2. 抽出

6.1.2.1. 果肉

均一化した試料20 gを三角フラスコにはかりとり, アセトン100 mLを加えて30分間振と

う抽出した。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣をアセトン50 mLで洗い、同様にろ過した。ろ液を合わせアセトンで200 mLに定容し、その2 mL (試料0.2 g相当量) を分取した。分取した抽出液に水10 mLを添加した後、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、アセトンを留去した。

6.1.2.2. 果皮

均一化した試料10 gを三角フラスコにはかりとり、アセトン70 mLを加えてホモジナイザーで磨砕抽出した。シャフトに付着した試料をアセトン30 mLで洗浄し、洗浄液を合わせ、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に定容し、その4 mL (試料0.2 g相当量) を分取した。分取した抽出液に水10 mLを添加した後、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、アセトンを留去した。

6.1.3. グラファイトカーボンミニカラムによる精製

グラファイトカーボンミニカラムにアセトン5 mL及び水5 mLを順次流下し前処理した。前項の濃縮液を前処理したグラファイトカーボンミニカラムに流下した後、アセトン／水 (50:50, v/v) 混液10 mLを流下し、これらの流出液を捨てた。グラファイトカーボンミニカラムを1分間吸引乾燥した後、テトラヒドロフラン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。

6.1.4. 定量

残留物をアセトニトリル／水 (50:50, v/v) 混液5 mLに溶解した (アクリナトリン分析用最終検液)。さらにこの溶液を同混液で2倍希釈した (エトキサゾール, フェンプロパトリン及びビフェントリン分析用最終検液)。これらの溶液は必要に応じて同混液で希釈した。

エトキサゾール, フェンプロパトリン及びビフェントリン分析用最終検液は、その10 µLを第4-1項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、検量線よりエトキサゾール, フェンプロパトリン及びビフェントリンの重量を求め、試料中の各残留濃度を算出した。

アクリナトリン分析用最終検液は、その5 µLを第4-2項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、検量線よりアクリナトリンの重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値 (LOQ) 及び検出限界値 (LOD)**6.2.1. エトキサゾール, フェンプロパトリン, ビフェントリン***

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	定量限界 (ppm)
<u>果肉</u>				
0.002	0.2	10	10	0.01
<u>果皮</u>				
0.002	0.2	10	10	0.01

最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)
<u>果肉</u>				
0.001	0.2	10	10	0.005
<u>果皮</u>				
0.001	0.2	10	10	0.005

*エトキサゾール, フェンプロパトリン, ビフェントリンはいずれも同じ値

6.2.2. アクリナトリン

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	定量限界 (ppm)
<u>果肉</u>				
0.002	0.2	5	5	0.01
<u>果皮</u>				
0.002	0.2	5	5	0.01

最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)
<u>果肉</u>				
0.001	0.2	5	5	0.005
<u>果皮</u>				
0.001	0.2	5	5	0.005

6.3. 回収率

分析法確認のため、宮崎II*の果肉及び果皮の無処理試料を用いて、0.01 ppm（定量限界相当）、0.25 ppm及び5 ppm添加濃度における回収試験を各5連分析で実施した。さらにフェンプロパトリンの果皮については、本年度の高知の無処理試料を用いて10 ppm添加回収試験を5連分析で実施した。なお、無処理試料は2連分析し、全て定量限界未満（<0.01 ppm）であった。回収試験結果を表に示す。

*平成23年度農薬等安全性確保強化実態調査事業の宮崎II無処理試料を使用

6.3.1. 果肉の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)		平均回収率 (%)	RSDr (%)
エトキサゾール					
宮崎II	5	101, 100,	101, 96	100,	100 2.1
宮崎II	0.25	103, 95,	101, 93	95,	97 4.5
宮崎II	0.01	109, 101,	103, 98	102,	103 3.9
アクリナトリン					
宮崎II	5	92, 81,	85, 78	82,	84 6.3
宮崎II	0.25	91, 82,	88, 75	86,	84 7.4
宮崎II	0.01	95, 86,	93, 84	91,	90 5.2
フェンプロパトリン					
宮崎II	5	102, 97,	101, 94	98,	98 3.3
宮崎II	0.25	95, 86,	94, 83	89,	89 5.8
宮崎II	0.01	96, 92,	94, 91	92,	93 2.2

6.3.1. 果肉の回収率 (続き)

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
<u>ビフェントリン</u>						
宮崎II	5	98, 91,	95, 90	92,	93	3.5
宮崎II	0.25	92, 85,	90, 81	86,	87	5.0
宮崎II	0.01	84, 75,	83, 67	75,	77	9.0

6.3.2. 果皮の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
<u>エトキサゾール</u>						
宮崎II	5	94, 87,	91, 85	89,	89	3.9
宮崎II	0.25	87, 80,	85, 76	84,	82	5.4
宮崎II	0.01	82, 76,	79, 74	78,	78	3.9
<u>アクリナトリン</u>						
宮崎II	5	93, 88,	93, 85	90,	90	3.8
宮崎II	0.25	94, 87,	89, 85	88,	89	3.8
宮崎II	0.01	101, 86,	95, 84	93,	92	7.5

6.3.2. 果皮の回収率 (続き)

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
フェンプロパトリン						
高知	10	106, 95,	98, 92	97,	98	5.3
宮崎II	5	105, 103,	105, 98	103,	103	2.8
宮崎II	0.25	104, 93,	101, 92	95,	97	5.4
宮崎II	0.01	101, 87,	94, 83	89,	91	7.6
ビフェントリン						
宮崎II	5	101, 94,	100, 88	97,	96	5.5
宮崎II	0.25	97, 83,	94, 79	87,	88	8.5
宮崎II	0.01	94, 81,	87, 81	83,	85	6.5

7. 精度管理

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

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

クォリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

また、2011年10月実施の食品衛生精度管理比較調査（財団法人食品薬品安全センター）におけるZスコアは全てZ<2であった。

7.1.クォリティーコントロール試料分析結果

7.1.1.果肉

成分名	分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>エトキサゾール</u>	2012/11/26	茨城	99	<0.01
	2012/12/13	高知	104	<0.01
	2012/11/13	宮崎	104	<0.01
	2012/12/25	宮崎	117	<0.01
<u>アクリナトリン</u>	2012/11/26	茨城	111	<0.01
	2012/12/13	高知	115	<0.01
	2012/11/13	宮崎	113	<0.01
	2012/12/25	宮崎	113	<0.01
<u>フェンプロパトリン</u>	2012/11/26	茨城	102	<0.01
	2012/12/13	高知	74	<0.01
	2012/11/13	宮崎	101	<0.01
	2012/12/25	宮崎	102	<0.01

7.1.1.果肉 (続き)

成分名	分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>ビフェントリン</u>	2012/11/26	茨城	100	<0.01
	2012/12/13	高知	101	<0.01
	2012/11/13	宮崎	111	<0.01
	2012/12/25	宮崎	115	<0.01

7.1.2.果皮

成分名	分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>エトキサゾール</u>	2012/12/13	茨城	100	<0.01
	2012/12/13	高知	114	<0.01
	2012/11/21	宮崎	103	<0.01
	2012/12/25	宮崎	114	<0.01
<u>アクリナトリン</u>	2012/12/13	茨城	116	<0.01
	2012/12/13	高知	118	<0.01
	2012/11/21	宮崎	120	<0.01
	2012/12/25	宮崎	116	<0.01
<u>フェンプロパトリン</u>	2012/12/13	茨城	81	<0.01
	2012/12/13	高知	111	<0.01
	2012/11/21	宮崎	93	<0.01
	2012/12/25	宮崎	93	<0.01

7.1.2.果皮 (続き)

成分名	分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>ビフェントリン</u>	2012/12/13	茨城	105	<0.01
	2012/12/13	高知	112	<0.01
	2012/11/21	宮崎	111	<0.01
	2012/12/25	宮崎	108	<0.01

8. マトリックス効果の確認

マトリックス標準溶液は、各圃場の無処理試料の最終溶液1 mLをナス型フラスコに分取し、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、窒素気流下で溶媒を留去した後、エトキサゾール、フェンプロパトリン及びビフェントリンは0.002 mg/Lの検量線用標準溶液1 mLに溶解して調製し、アクリナトリンは0.004 mg/Lの検量線用標準溶液1 mLに溶解して調製した。マトリックス試料分析結果を表に示す。

8.1.1. 果肉

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>エトキサゾール</u>	茨城	98
	高知	106
	宮崎	99
<u>アクリナトリン</u>	茨城	104
	高知	108
	宮崎	101
<u>フェンプロパトリン</u>	茨城	86
	高知	71
	宮崎	85
<u>ビフェントリン</u>	茨城	90
	高知	71
	宮崎	104

8.1.2.果皮

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>エトキサゾール</u>	茨城	110
	高知	108
	宮崎	95
<u>アクリナトリン</u>	茨城	113
	高知	115
	宮崎	99
<u>フェンプロパトリン</u>	茨城	81
	高知	71
	宮崎	73
<u>ビフェントリン</u>	茨城	100
	高知	109
	宮崎	90

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料に各化合物を添加し、 -20°C 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。保存安定性試験の結果を表に示す。

9.1.果肉の保存安定性試験結果

9.1.1.エトキサゾール

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	160 (2012/7/18-12/25)	88,	87	88
0.5	高知	146 (2012/8/1-12/25)	84,	84	84
0.5	宮崎	173 (2012/7/5-12/25)	87,	84	86

9.1.2.アクリナトリン

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	160 (2012/7/18-12/25)	97,	95	96
0.5	高知	146 (2012/8/1-12/25)	97,	95	96
0.5	宮崎	173 (2012/7/5-12/25)	99,	94	96

9.1.3.フェンプロパトリン

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	160 (2012/7/18-12/25)	89,	88	88
0.5	高知	146 (2012/8/1-12/25)	89,	88	88
0.5	宮崎	173 (2012/7/5-12/25)	90,	90	90

9.1.4.ビフェントリン

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	160 (2012/7/18-12/25)	93,	92	92
0.5	高知	146 (2012/8/1-12/25)	90,	90	90
0.5	宮崎	173 (2012/7/5-12/25)	91,	89	90

9.2.果皮の保存安定性試験結果**9.2.1.エトキサゾール**

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	160 (2012/7/18-12/25)	73,	71	72
0.5	高知	146 (2012/8/1-12/25)	71,	70	70
0.5	宮崎	173 (2012/7/5-12/25)	81,	71	76

9.2.2.アクリナトリン

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	160 (2012/7/18-12/25)	108,	107	108
0.5	高知	146 (2012/8/1-12/25)	105,	98	102
0.5	宮崎	173 (2012/7/5-12/25)	100,	97	98

9.2.3.フェンプロパトリン

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	160 (2012/7/18-12/25)	86,	86	86
0.5	高知	146 (2012/8/1-12/25)	85,	81	83
0.5	宮崎	173 (2012/7/5-12/25)	86,	85	86

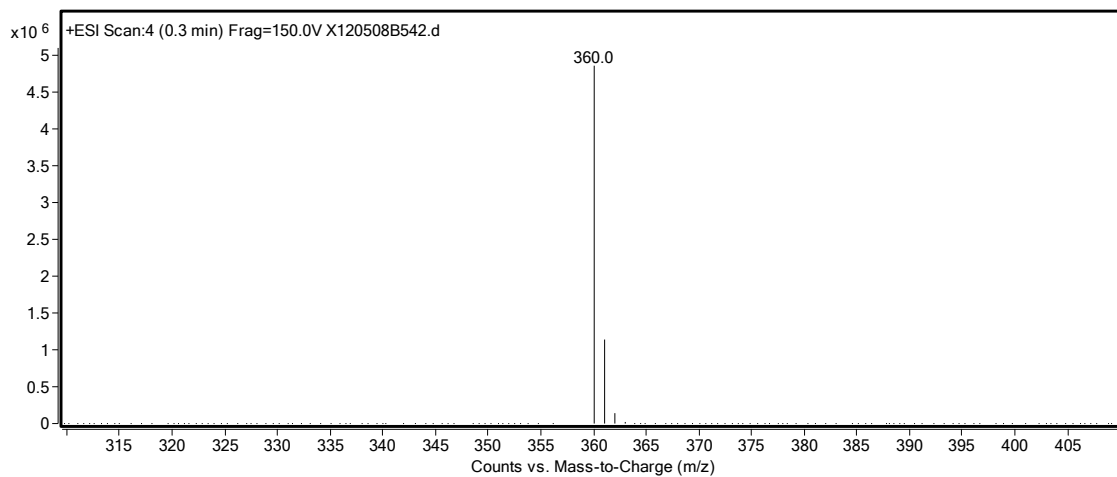
9.2.4.ビフェントリン

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	160 (2012/7/18-12/25)	80,	72	76
0.5	高知	146 (2012/8/1-12/25)	85,	79	82
0.5	宮崎	173 (2012/7/5-12/25)	83,	81	82

付図-1. マススペクトル

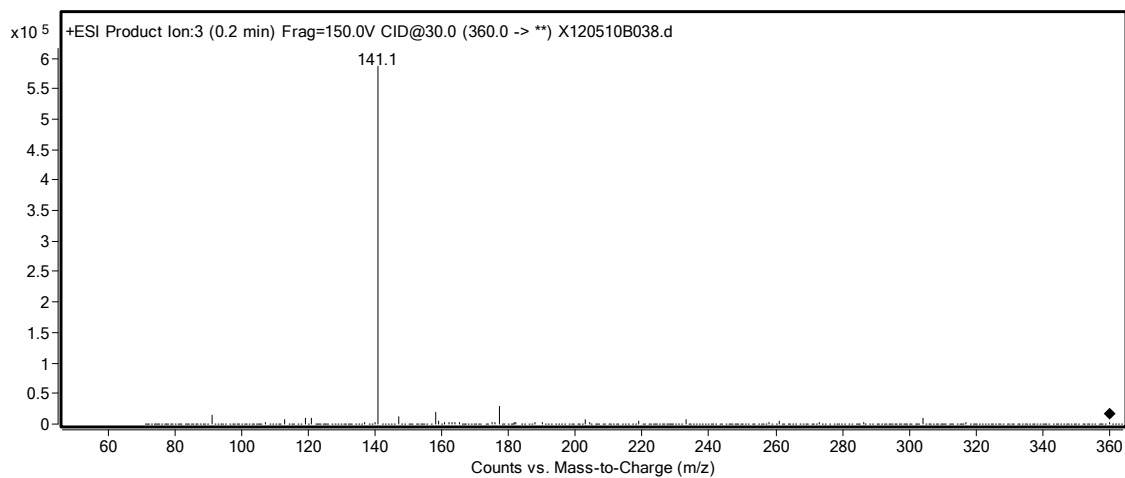
付図-1-1. エトキサゾールのマススペクトル

エトキサゾールのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)



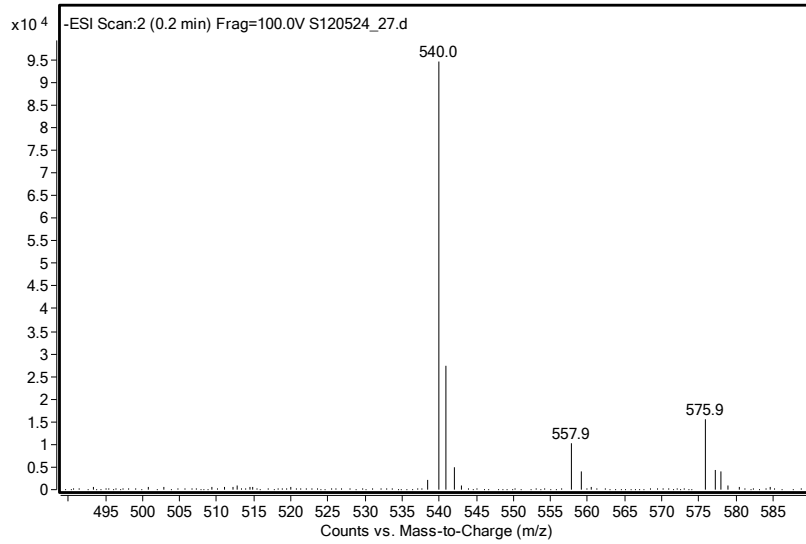
エトキサゾールのプロダクトスキンスペクトルの一例

(プリカーサーイオン ; $m/z=360.0$, 正モード)



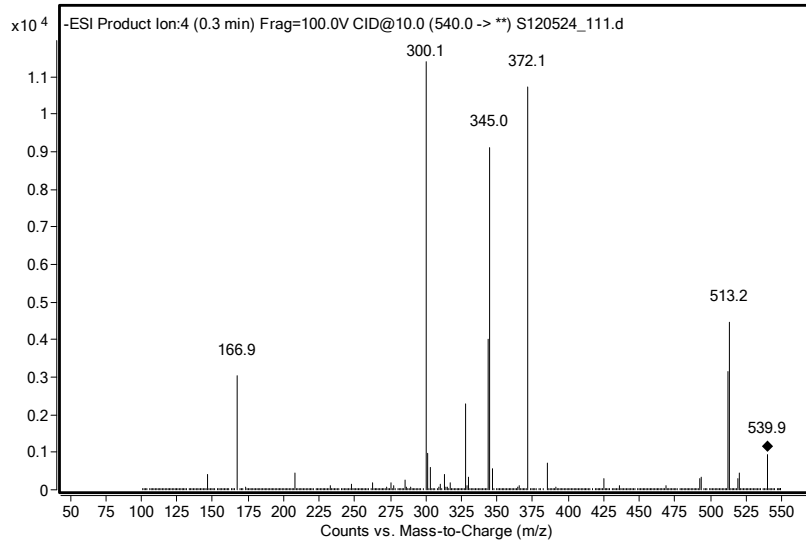
付図-1-2. アクリナトリンのマススペクトル

アクリナトリンのマススペクトル (一次イオン) の一例 (負モード)



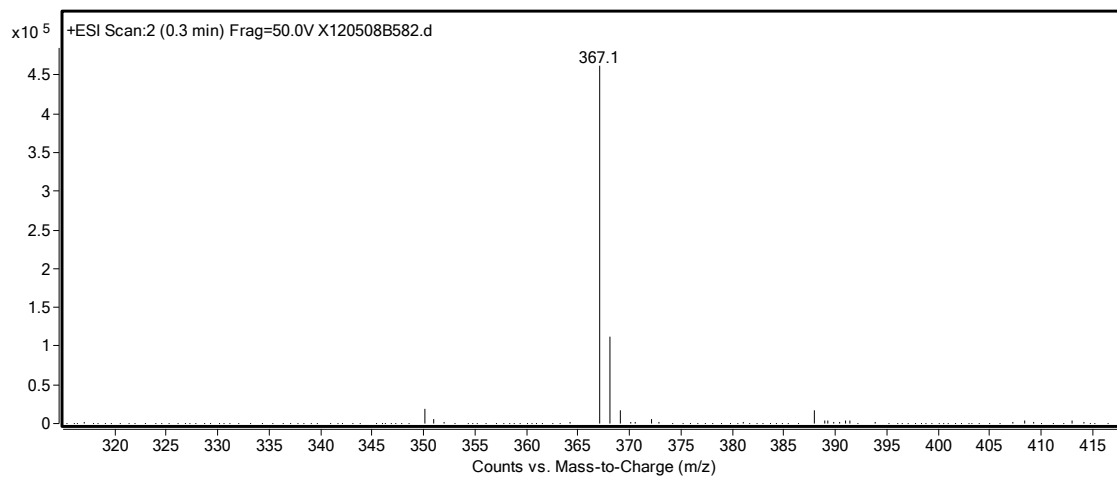
アクリナトリンのプロダクトスキンスペクトルの一例

(プリカーサーイオン ; m/z=540.0, 負モード)



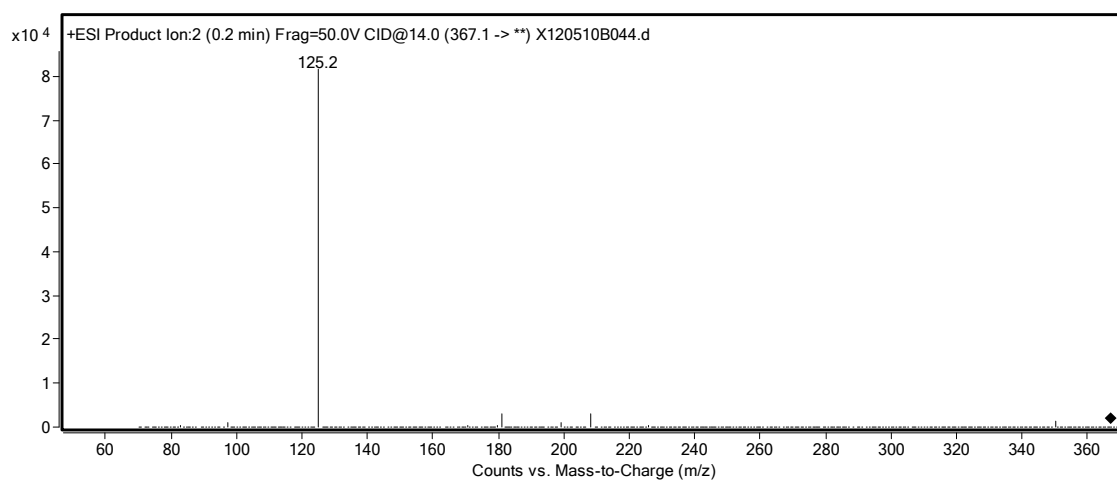
付図-1-3. フェンプロパトリンのマススペクトル

フェンプロパトリンのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)



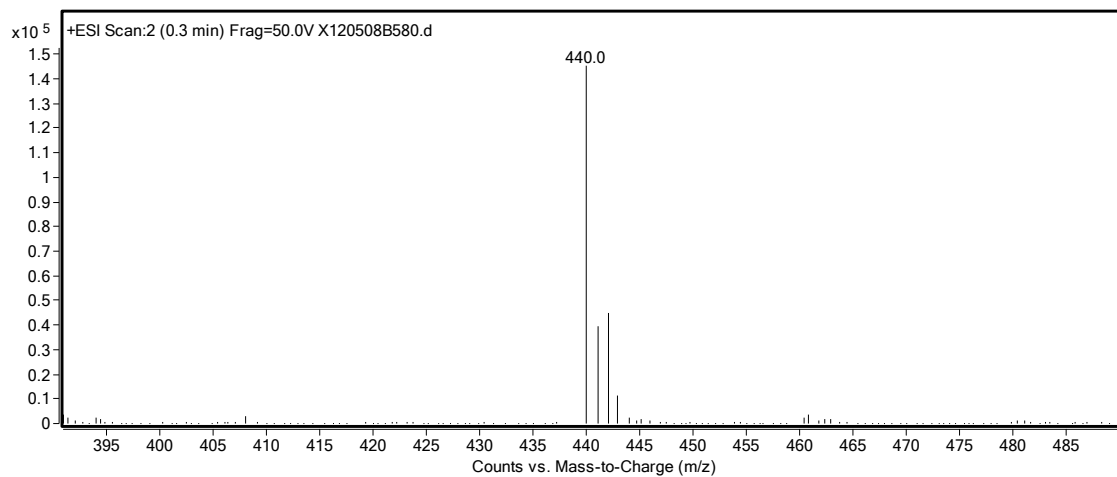
フェンプロパトリンのプロダクトスキャンスペクトルの一例

(プリカーサーイオン ; m/z=367.1, 正モード)



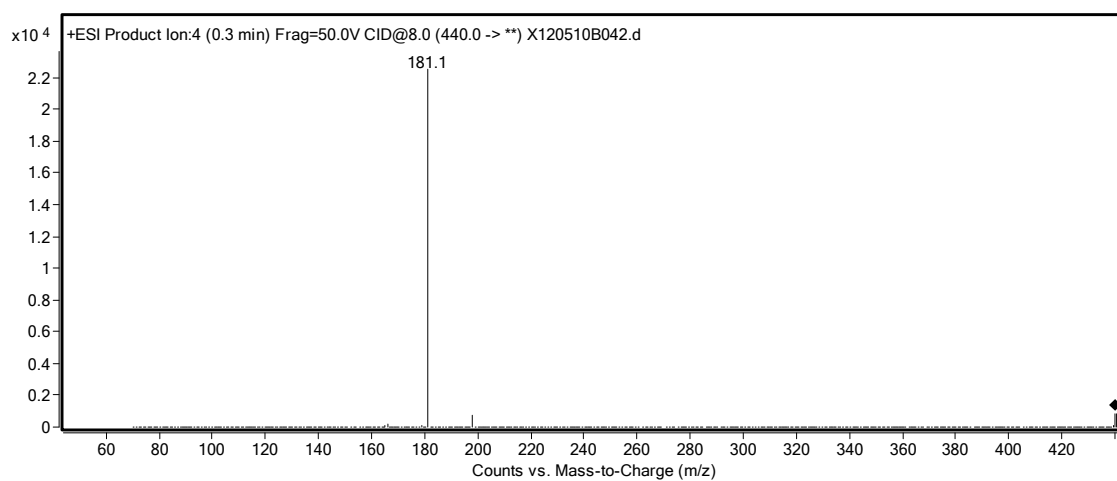
付図-1-4. ビフェントリンのマススペクトル

ビフェントリンのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)



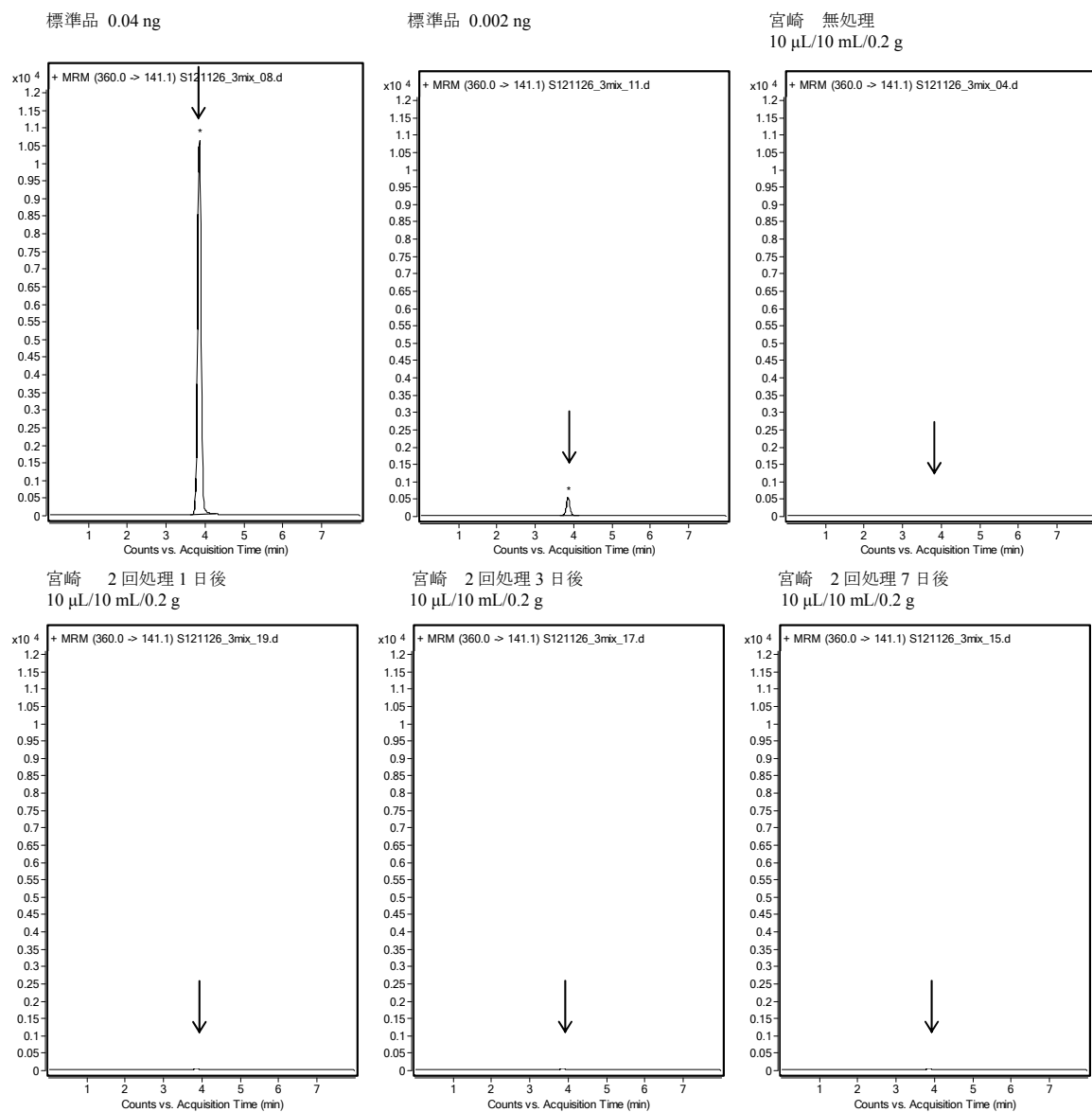
ビフェントリンのプロダクトスキンスペクトルの一例

(プリカーサーイオン ; m/z=440.0, 正モード)

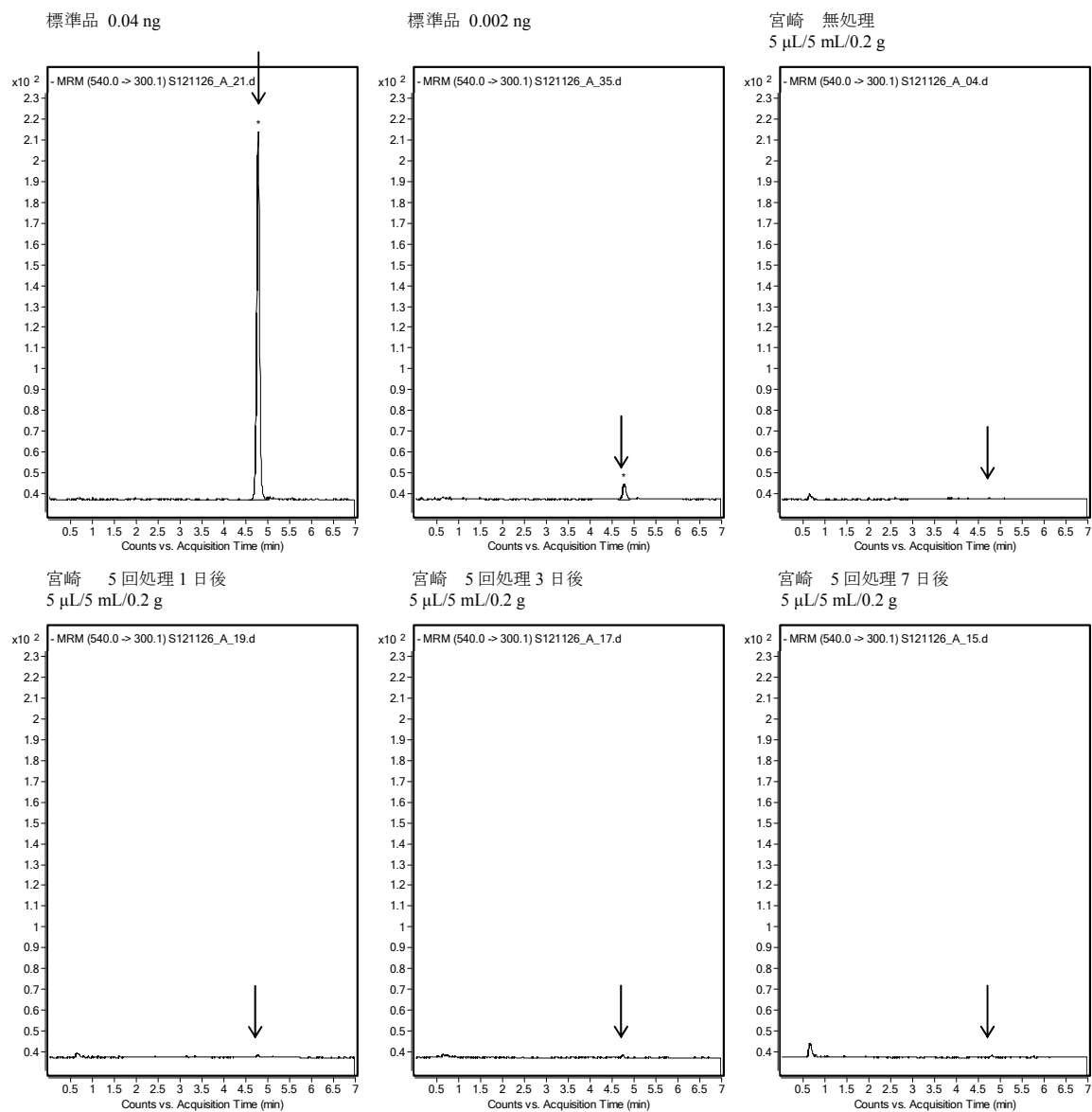


付図-2. 果実のクロマトグラム (代表例)

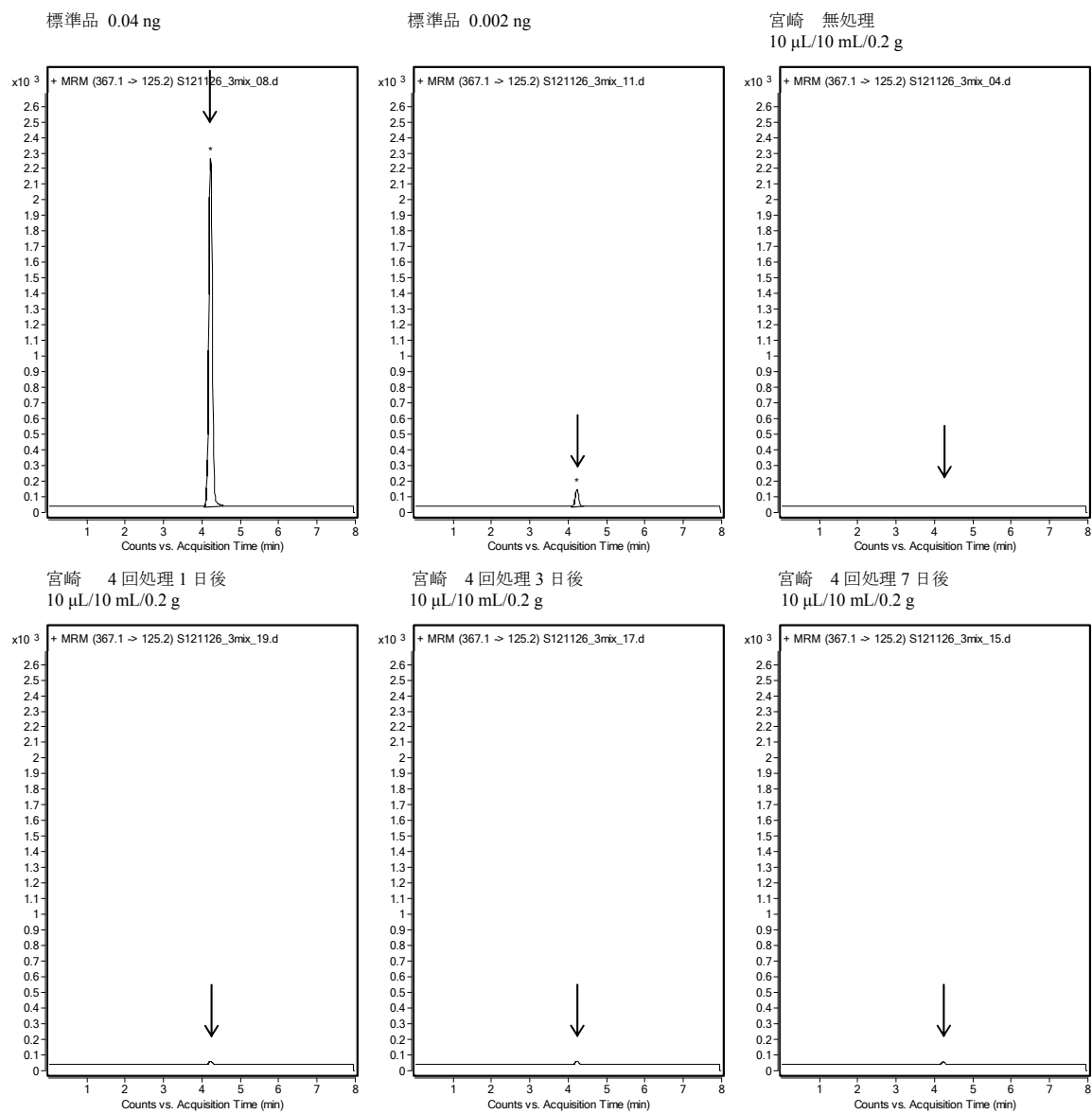
付図-2-1. エトキサゾールのクロマトグラム



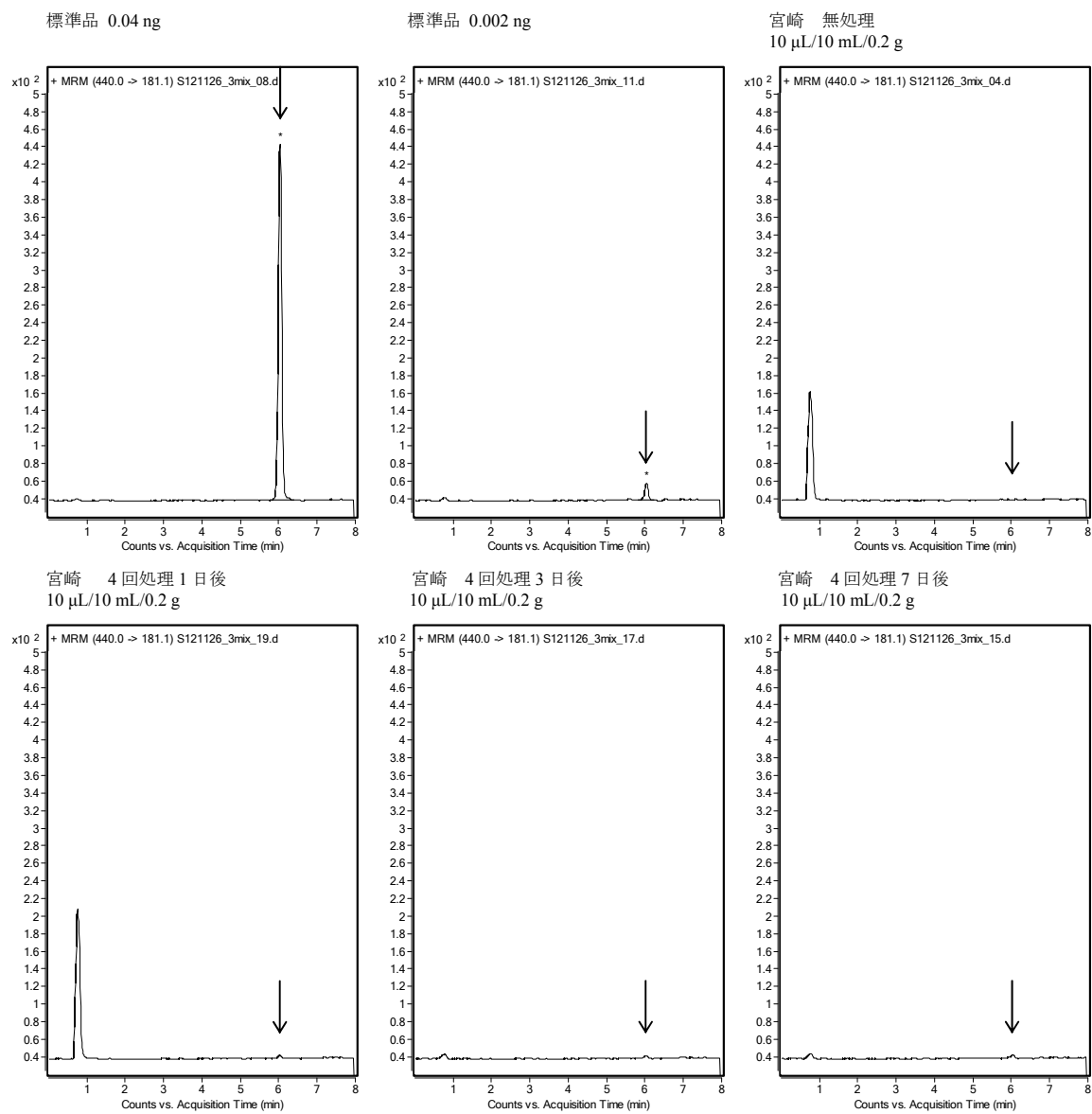
付図-2-2. アクリナトリンのクロマトグラム



付図-2-3. フェンプロパトリンのクロマトグラム

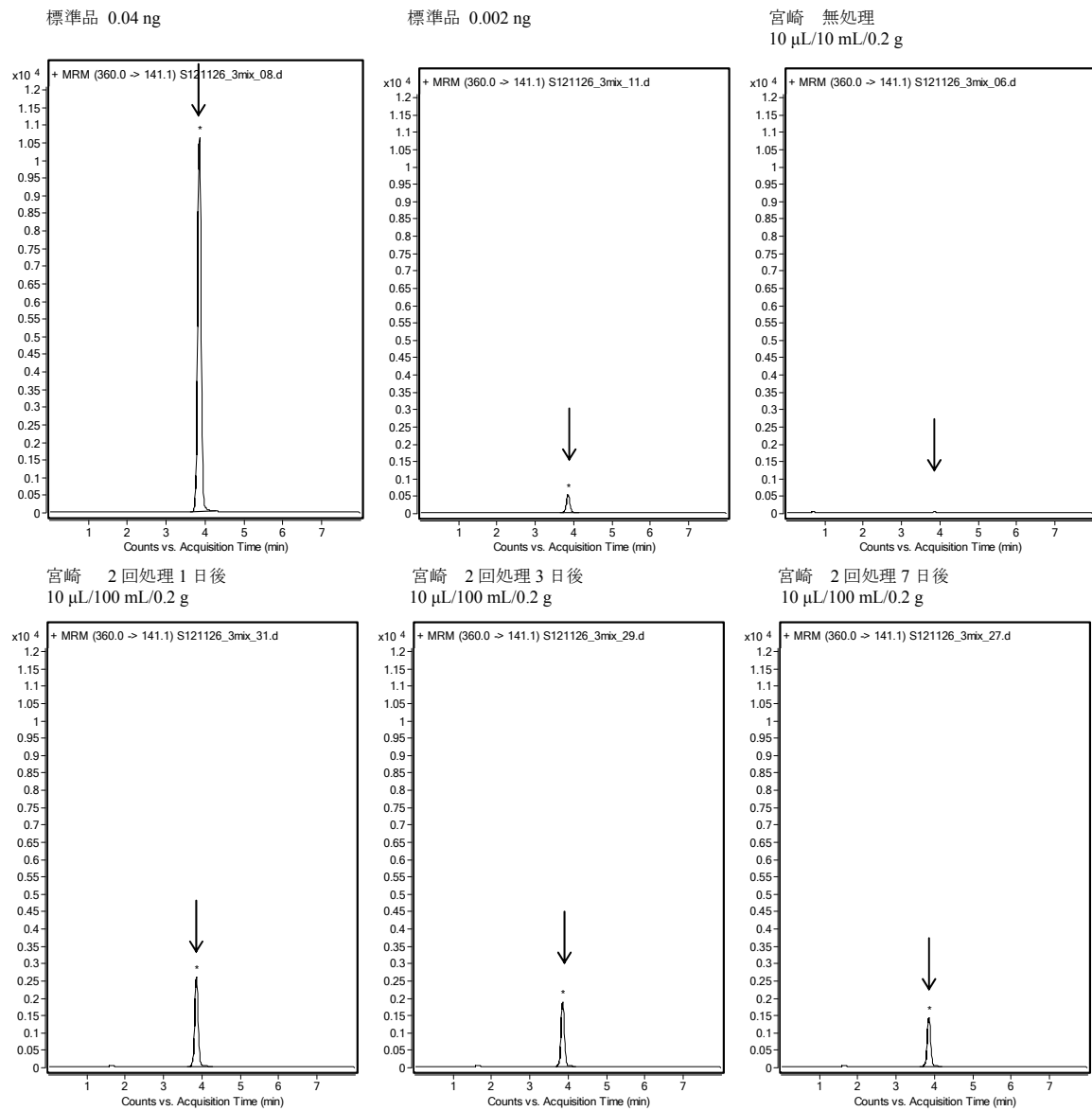


付図-2-4. ビフェントリンのクロマトグラム

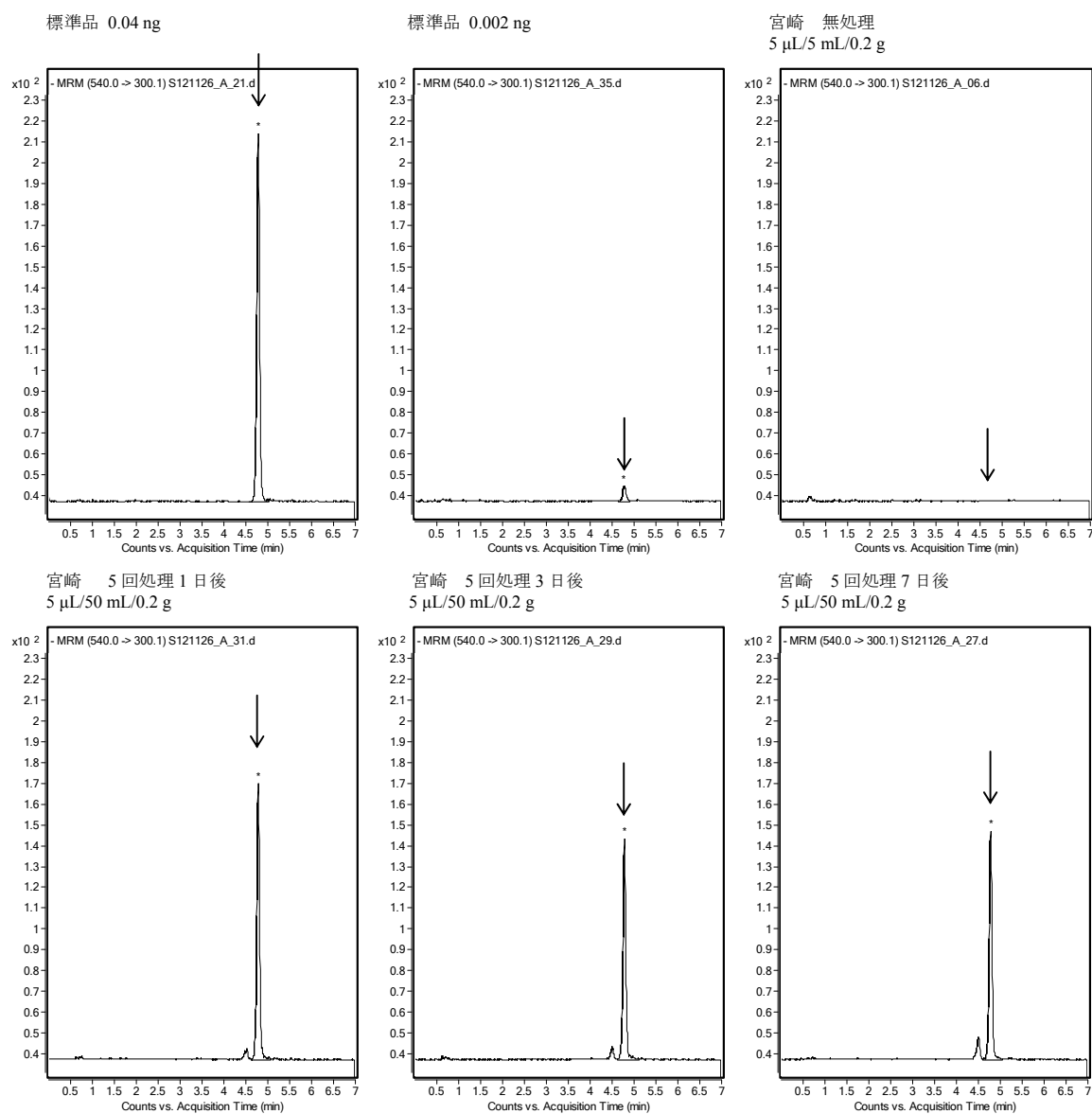


付図-3. 果皮のクロマトグラム (代表例)

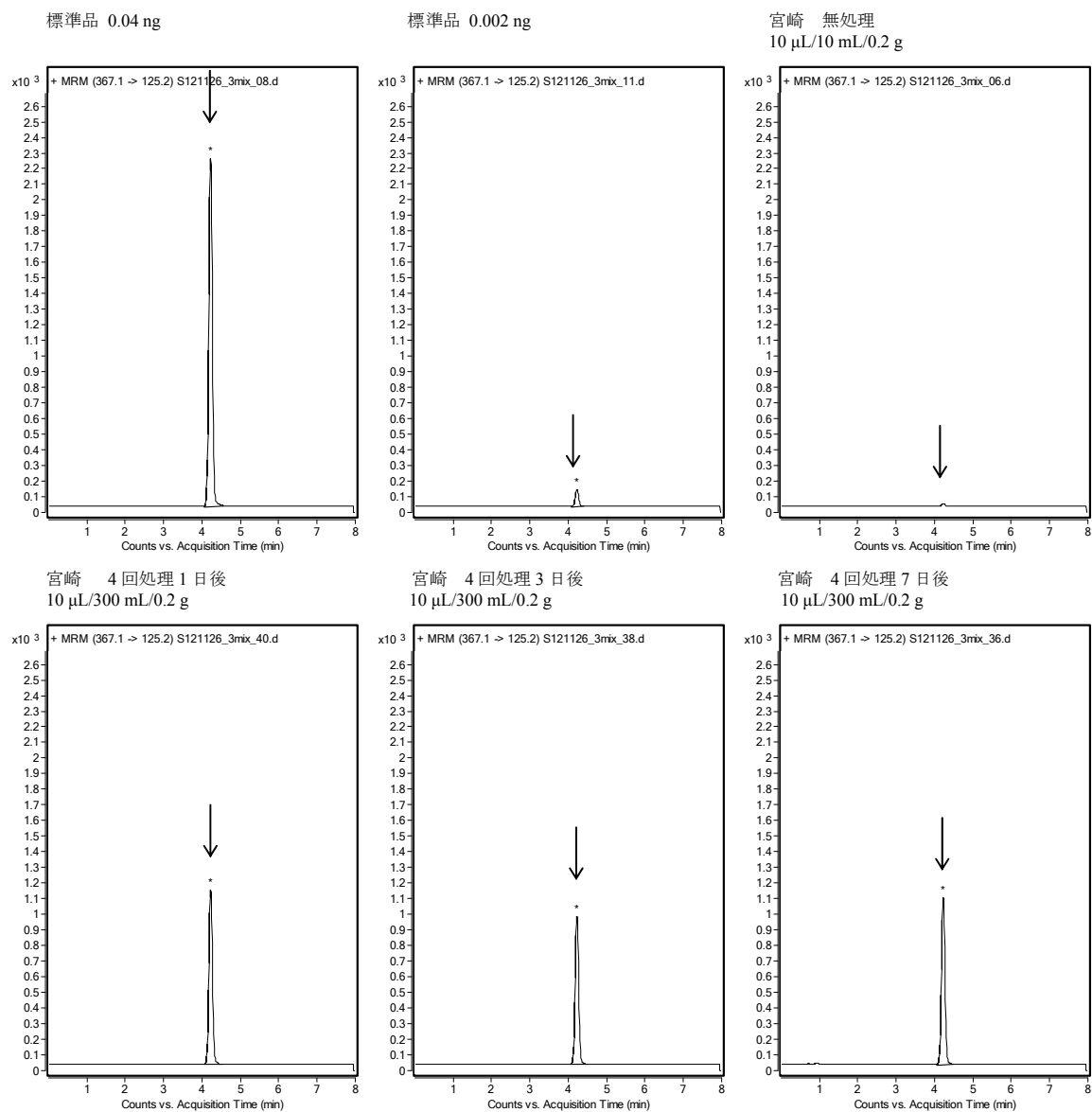
付図-3-1. エトキサゾールのクロマトグラム



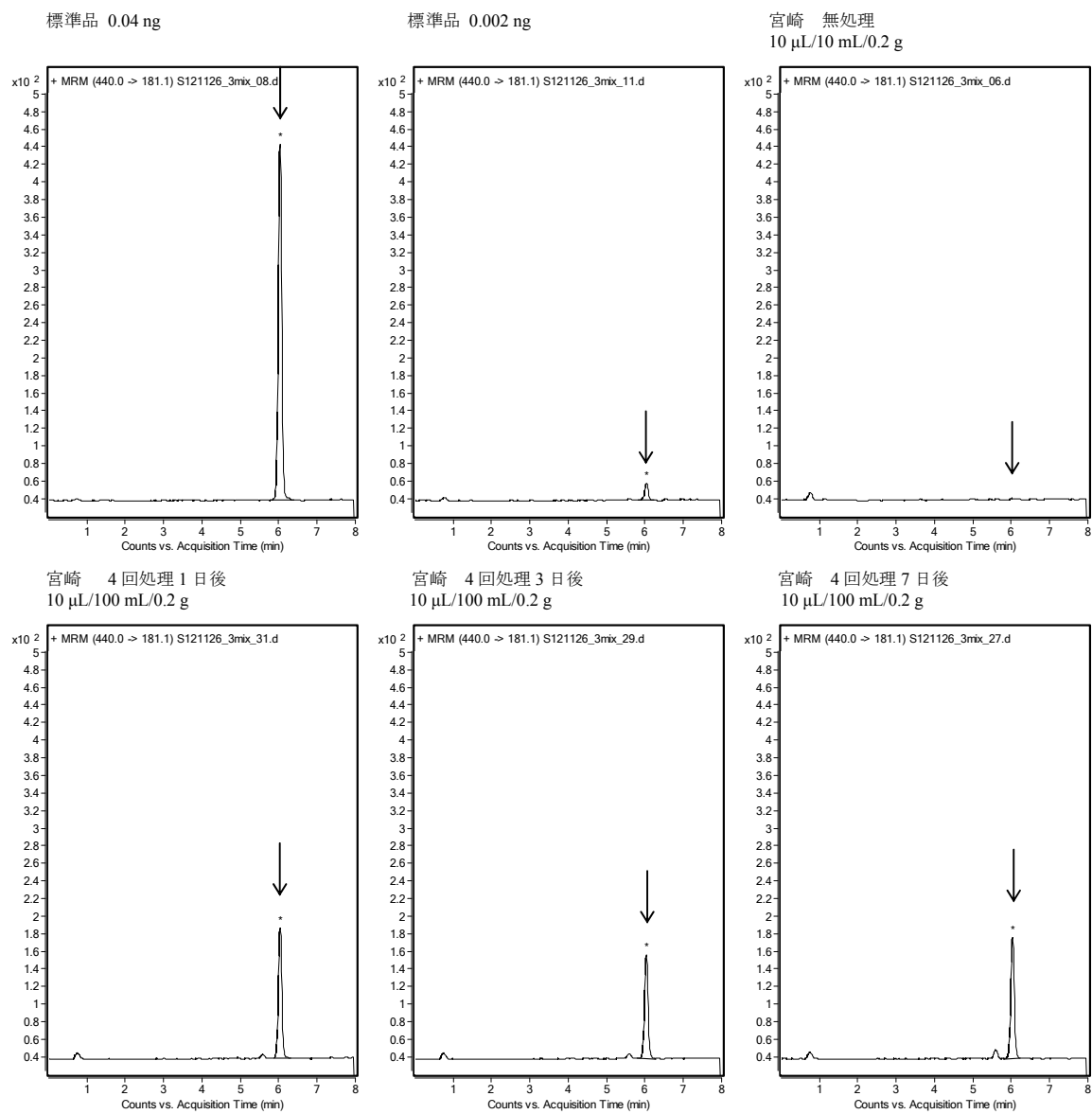
付図-3-2. アクリナトリンのクロマトグラム



付図-3-3. フェンプロパトリンのクロマトグラム



付図-3-4. ビフェントリンのクロマトグラム



登録作物のグループ化・残留分析詳細②

シフルメトフェン

1. 分析対象物質

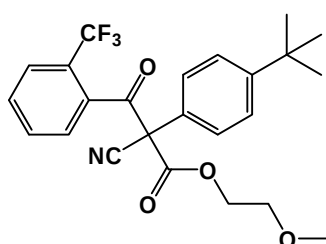
シフルメトフェン

化学名： 2-methoxyethyl (RS)-2-(4-*tert*-butylphenyl)-2-cyano-3-oxo-3-(α,α,α -trifluoro-*o*-tolyl)propionate

分子式： $C_{24}H_{24}F_3NO_4$

分子量： 447.5

構造式：



性 状： 白色固体（粉末）

融 点： 77.9～81.7℃

蒸気圧： $< 5.9 \times 10^{-3}$ mPa (25℃)

分配係数： $\log P_{ow} = 4.3$

溶解性： 水 0.0281 mg/L (pH=7, 20℃)

n-ヘキサン 5.23, メタノール 99.9,

アセトン, ジクロロメタン, 酢酸エチル, トルエン > 500

(以上g/L, 20℃)

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

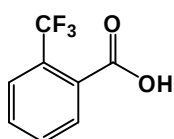
シフルメトフェン代謝物

化学名： α,α,α -trifluoro-*o*-toluic acid

分子式： $C_8H_5F_3O_2$

分子量： 190.1

構造式：



性 状： 白色固体 (粉末)
融 点： 109～113℃
出 典：シフルメトフェン剤残留分析法 (かき) 報告書 (作21P-1-011)

2. 標準品及び試薬

シフルメトフェン標準品：純度 99.4% (和光純薬工業製)
シフルメトフェン代謝物標準品
：純度 100 % (和光純薬工業製)
アセトニトリル, 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 (和光純薬工業製)
アセトニトリル： LC-MS 用 (和光純薬工業製)
塩酸： 試薬特級 (和光純薬工業製)
ギ酸： 試薬特級 (和光純薬工業製)
ジエチレングリコール： 試薬特級, 以下 DEG と略す (和光純薬工業製)
ギ酸アンモニウム： 試薬特級 (和光純薬工業製)
水： PURELAB Flex System (Veolia Water Solutions &
Technologies, Saint Maurice, France) で精製した水
グラファイトカーボンミニカラム：
Supelclean ENVI-Carb, 0.5 g/6 mL (シグマアルドリッチ製)
液相分離ろ紙： Whatman 1PS (GE ヘルスケアジャパン製)

3. 装置及び機器

電子天秤： メトラー・トレド AG245及びXS2002S
台秤： エー・アンド・デイ FG-60KBM及びFV-60KA2
ミキサー： エフ・エム・アイ ロボクーブ BLIXER-5Plus
ホモジナイザー： kinematica PT 10/35, PT3100
液体クロマトグラフ・質量分析計システム (LC-MS/MS)：
ウォータース Acquity UPLC
ウォータース Quattro premier XE
データ処理装置： ウォータース MassLynx 4.0

4. 液体クロマトグラフ・質量分析計の操作条件

4.1. 液体クロマトグラフ・質量分析計

4.1.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム：	ACQUITY UPLC BEH C18 (ウォータース製)
	内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒径 1.7 μ m
溶離液：	0.1%ギ酸含有 5 mmol/L ギ酸アンモニウム／アセトニトリル
	70:30 (2 min)－(1.5 min)－20:80 (2.5 min)
流速：	0.3 mL/min
カラム温度：	40°C
試料注入量：	2 μ L
保持時間：	シフルメトフェン；5.3 min
	シフルメトフェン代謝物；2.5 min

4.1.2. 質量分析計

イオン化法：	エレクトロスプレー イオン化法 (ESI)
	正モード：シフルメトフェン
	負モード：シフルメトフェン代謝物
コーンガス流量：	50 L/h (N ₂)
脱溶媒ガス流量：	800 L/h (N ₂)
脱溶媒ガス温度：	350°C
ソースブロック温度：	120°C
キャピラリー電圧：	3.0 kV
コーン電圧：	シフルメトフェン；20 V
	シフルメトフェン代謝物；20 V
コリジョン電圧：	シフルメトフェン；20 V
	シフルメトフェン代謝物；12 V
	(コリジョンガス; Ar)
イオン検出法：	MRM
モニタリングイオン：	シフルメトフェン；プリカーサーイオン m/z 465.4
	プロダクトイオン m/z 172.8
	シフルメトフェン代謝物；プリカーサーイオン m/z 188.9
	プロダクトイオン m/z 144.8

5. 検量線の作成

シフルメトフェン及びシフルメトフェン代謝物の各標準品10.1及び10.0 mg (各10.0 mg 相当) を各々50 mLのメスフラスコに精秤し、アセトニトリルに溶解して200 mg/L標準原液を調製した。各原液を等量ずつ混合し、水／アセトニトリル (60:40, v/v) 混液で希釈し

て0.0025, 0.005, 0.025, 0.05及び0.1 mg/Lの混合標準溶液を調製した。その2 µLを前項の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入し、データ処理装置を用いてシフルメトフェン及びシフルメトフェン代謝物のピーク面積を測定し、横軸に重量 (ng), 縦軸にピーク面積をとって各検量線を作成した。

6. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料は重量を量り、各々を縦に6分割したものから対角の2つを取り合わせた後、果肉と果皮に分け、それぞれの有姿試料を作製した。重量を量った後、密封して冷凍保存（-20℃設定）した。果肉分析時には果肉の有姿試料を取り、細切し、ミキサーで均一化した。果皮分析時には果皮の有姿試料を取り、細切し、ミキサーで均一化した。また、量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比 (%) を算出した。

6.1.2. 抽出

6.1.2.1. 果肉

均一化した試料20 gを三角フラスコにはかりとり、アセトニトリル／水 (90:10, v/v) 混液100 mLを加えて30分間振とう抽出した。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣を同混液50 mLで洗い、同様にろ過した。ろ液を合わせアセトニトリルで200 mLに定容し、その10 mL（試料1 g相当量）を分取後、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、アセトニトリルを留去した。

6.1.2.2. 果皮

均一化した試料10 gを三角フラスコにはかりとり、アセトニトリル／水 (90:10, v/v) 混液70 mLを加えてホモジナイザーで磨砕抽出した。シャフトに付着した試料を同混液30 mLで洗浄し、洗浄液を合わせ、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、残渣を同混液50 mLで洗い、同様にろ過した。ろ液を合わせアセトニトリルで200 mLに定容し、その20 mL（試料1 g相当量）を分取後、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、アセトニトリルを留去した。

6.1.3. ヘキサン／酢酸エチル混液転溶

濃縮液に水90 mL及びヘキサン／酢酸エチル (90:10, v/v) 混液50 mLを加え、振とう機を用いて5分間激しく振とうした。暫時放置後、有機溶媒層を分取し、水層には同混液50 mLを加え同様の振とう及び分取の操作を繰り返した。全有機溶媒層を合わせ、液相分離ろ紙でろ過した。

6.1.4. シフルメトフェン代謝物抱合体の加水分解

前項の有機溶媒層を分取した残りの水層に塩酸4 mLを加え、冷却管を取り付け、マントルヒーターで1時間加熱還流を行い、シフルメトフェン代謝物抱合体を加水分解した。

6.1.5. ヘキサン／酢酸エチル混液転溶

前項の反応液にヘキサン／酢酸エチル（90:10, v/v）混液50 mLを加え、振とう機を用いて5分間激しく振とうした。暫時放置後、有機溶媒層を分取し、水層には同混液50 mLを加え同様の振とう及び分取の操作を繰り返した。全有機溶媒層を液相分離ろ紙でろ過し、6.1.3項のろ液と合わせ、2%DEG含有アセトン溶液0.5 mLを添加後、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。

6.1.6. グラファイトカーボンミニカラムによる精製

グラファイトカーボンミニカラムにメタノール／アセトン（60:40, v/v）混液5 mLを流下し前処理した。残留物を同混液5 mLに溶解し、グラファイトカーボンミニカラムに流下した。さらに同混液10 mLを流下し、全溶出液を取り、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。

6.1.7. 定量

残留物を水／アセトニトリル（60:40, v/v）混液2 mLに溶解し、必要に応じて同混液で希釈した。この溶液の2 µL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、検量線よりシフルメトフェン及びシフルメトフェン代謝物の重量を求め、試料中の各残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値（LOQ）及び検出限界値（LOD）*

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (µL)	定量限界 (ppm)
<u>果肉</u>				
0.01	1	2	2	0.01
<u>果皮</u>				
0.01	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 (µL)	検出限界 (ppm)
<u>果肉</u>				
0.005	1	2	2	0.005
<u>果皮</u>				
0.005	1	2	2	0.005

*シフルメトフェン、シフルメトフェン代謝物はいずれも同じ値

6.3. 回収率

分析法確認のため、宮崎II*の果肉及び果皮の3回処理7日後試料を用いて、0.01 ppm（定量限界相当）、0.25 ppm及び5 ppm添加濃度における回収試験を各5連分析で実施した。なお、無処理試料は2連分析し、全て定量限界未満（<0.01 ppm）であった。回収試験結果を表に示す。

*平成23年度農薬等安全性確保強化実態調査事業の宮崎II 3回処理7日後試料を使用

6.3.1. 果肉の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
<u>シフルメトフェン</u>						
宮崎II	5	98, 92,	93, 91	92,	93	3.0
宮崎II	0.25	94, 92,	94, 91	92,	93	1.4
宮崎II	0.01	105, 96,	102, 95	98,	99	4.2
<u>シフルメトフェン代謝物</u>						
宮崎II	5	94, 82,	93, 80	82,	86	7.8
宮崎II	0.25	92, 80,	88, 79	81,	84	6.8
宮崎II	0.01	113, 90,	105, 84	96,	98	11.8

6.3.2. 果皮の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
シフルメトフェン						
宮崎II	5	96, 90,	92, 89	91,	92	2.9
宮崎II	0.25	102, 95,	99, 94	97,	97	3.3
宮崎II	0.01	107, 92,	105, 91	104,	100	7.7
シフルメトフェン代謝物						
宮崎II	5	93, 83,	87, 82	87,	86	5.0
宮崎II	0.25	82, 80,	82, 77	82,	81	2.7
宮崎II	0.01	75, 73,	75, 72	75,	74	1.9

7. 精度管理

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

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

クォリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

また、2011年10月実施の食品衛生精度管理比較調査（財団法人食品薬品安全センター）におけるZスコアは全てZ<2であった。

7.1.クォリティーコントロール試料分析結果

7.1.1.果肉

成分名	分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>シフルメトフェン</u>	2012/11/26	茨城	82	<0.01
	2012/12/13	高知	89	<0.01
	2012/11/13	宮崎	95	<0.01
	2013/ 2/21	宮崎	106	<0.01
<u>シフルメトフェン</u>	2012/11/26	茨城	75	<0.01
<u>代謝物</u>	2012/12/13	高知	84*	0.02*
	2012/11/13	宮崎	70	<0.01
	2013/ 2/21	宮崎	70	<0.01

*無処理区に0.02 ppm検出されたため、その分を差し引いて回収率を算出

7.1.2.果皮

成分名	分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>シフルメトフェン</u>	2012/12/13	茨城	108	<0.01
	2012/12/13	高知	100	<0.01
	2012/11/21	宮崎	104	<0.01
	2013/ 2/21	宮崎	111	<0.01
<u>シフルメトフェン</u>	2012/12/13	茨城	97	<0.01
<u>代謝物</u>	2012/12/13	高知	79*	0.02*
	2012/11/21	宮崎	71	<0.01
	2013/ 2/21	宮崎	73	<0.01

*無処理区に0.02 ppm検出されたため、その分を差し引いて回収率を算出

8. マトリックス効果の確認

マトリックス標準溶液は、各圃場の無処理試料の最終溶液1 mLをナス型フラスコに分取し、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、窒素気流下で溶媒を留去した後、0.05 mg/Lの検量線用標準溶液1 mLに溶解して調製した。マトリックス試料分析結果を表に示す。

8.1.1.果肉

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>シフルメトフェン</u>	茨城	95
	高知	108
	宮崎	101
<u>シフルメトフェン</u>	茨城	101
<u>代謝物</u>	高知	97*
	宮崎	104

*無処理区に0.02 ppm検出されたため、無処理区2連の平均面積値を差し引いて算出

8.1.2.果皮

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>シフルメトフェン</u>	茨城	98
	高知	96
	宮崎	99
<u>シフルメトフェン</u>	茨城	111
<u>代謝物</u>	高知	95*
	宮崎	115

*無処理区に0.02 ppm検出されたため、無処理区2連の平均面積値を差し引いて算出

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料に各化合物を添加し、 -20°C 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。保存安定性試験の結果を表に示す。

9.1.果肉の保存安定性試験結果**9.1.1.シフルメトフェン**

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	218 (2012/7/18-2013/2/21)	95,	81	88
0.5	高知	204 (2012/8/1-2013/2/21)	87,	83	85
0.5	宮崎	231 (2012/7/5-2013/2/21)	85,	80	82

9.1.2.シフルメトフェン代謝物

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	218 (2012/7/18-2013/2/21)	85,	83	84
0.5	高知	204 (2012/8/1-2013/2/21)	87*,	85*	86
0.5	宮崎	231 (2012/7/5-2013/2/21)	87,	86	86

*無処理区に0.02 ppm検出されたため、その分を差し引いて回収率を算出

9.2.果皮の保存安定性試験結果

9.2.1.シフルメトフェン

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	218 (2012/7/18-2013/2/21)	89,	85	87
0.5	高知	204 (2012/8/1-2013/2/21)	83,	81	82
0.5	宮崎	231 (2012/7/5-2013/2/21)	90,	87	88

9.2.2.シフルメトフェン代謝物

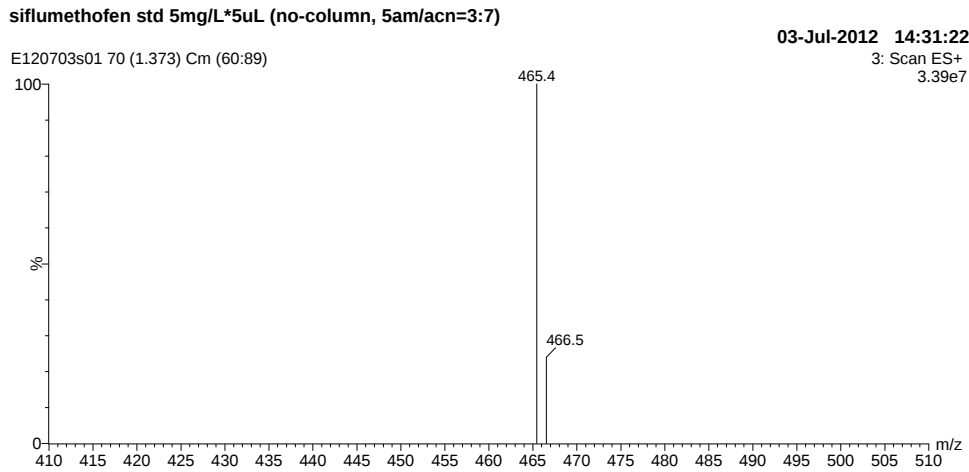
添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	218 (2012/7/18-2013/2/21)	82,	76	79
0.5	高知	204 (2012/8/1-2013/2/21)	80*,	78*	79
0.5	宮崎	231 (2012/7/5-2013/2/21)	86,	78	82

*無処理区に0.02 ppm検出されたため、その分を差し引いて回収率を算出

付図-1. マススペクトル

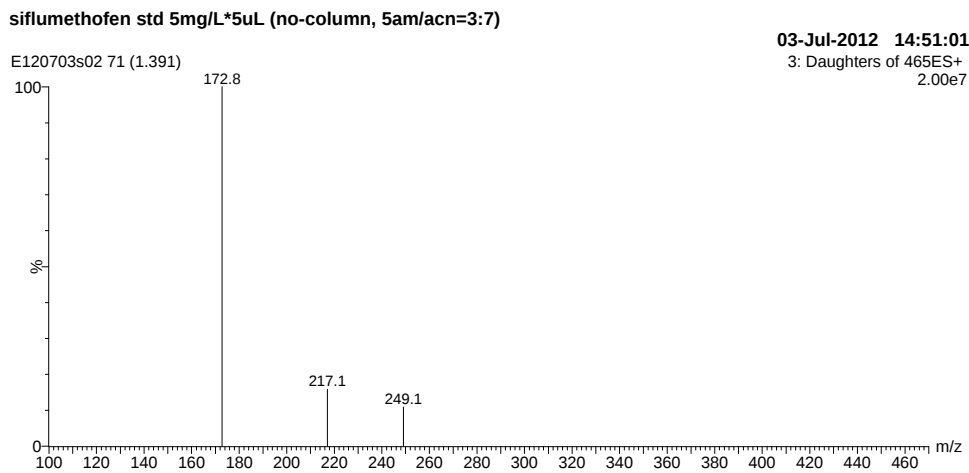
付図-1-1. シフルメトフェンのマススペクトル

シフルメトフェンのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)



シフルメトフェ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=465.4, 正モード)



付図-1-2. シフルメトフェン代謝物のマススペクトル

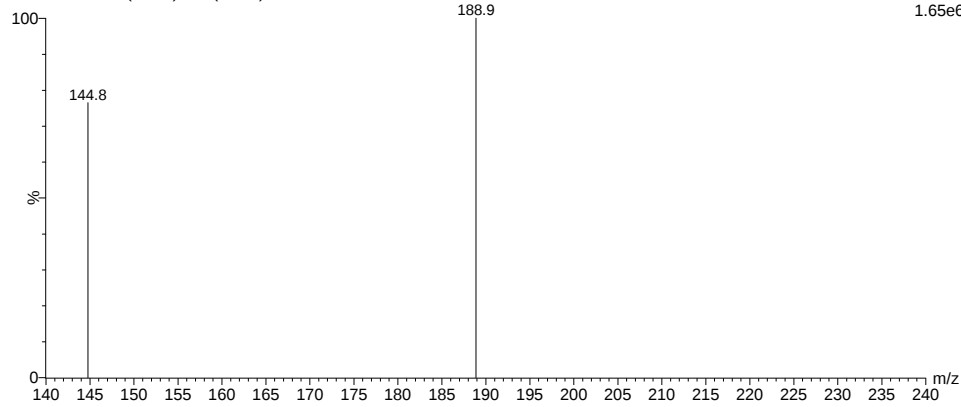
シフルメトフェン代謝物のマススペクトル (一次イオン) の一例 (負モード)

B-1 std 5mg/L*5uL (3cm_C8, 5am/acn=5:5) negative

03-Jul-2012 15:10:29

E120703s05 24 (0.533) Cm (24:29)

3: Scan ES-
1.65e6



シフルメトフェン代謝物のプロダクトスキンスペクトルの一例

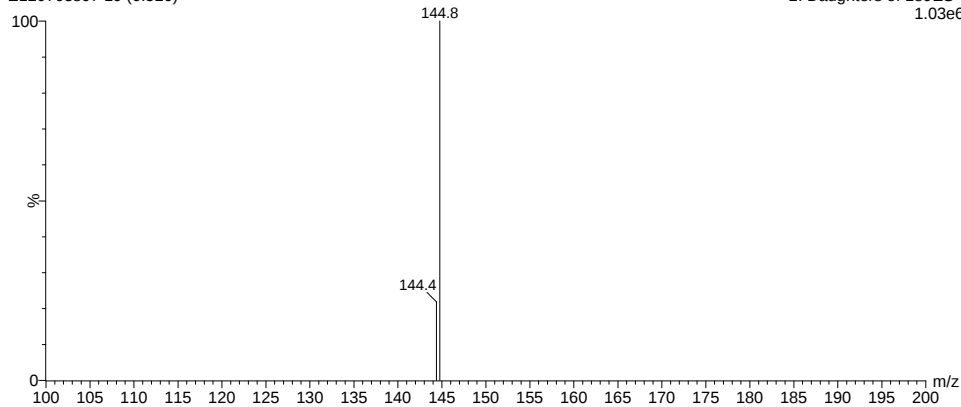
(プリカーサーイオン ; m/z=188.9, 負モード)

B-1 std 5mg/L*5uL (3cm_C8, 5am/acn=5:5) negative

03-Jul-2012 15:36:14

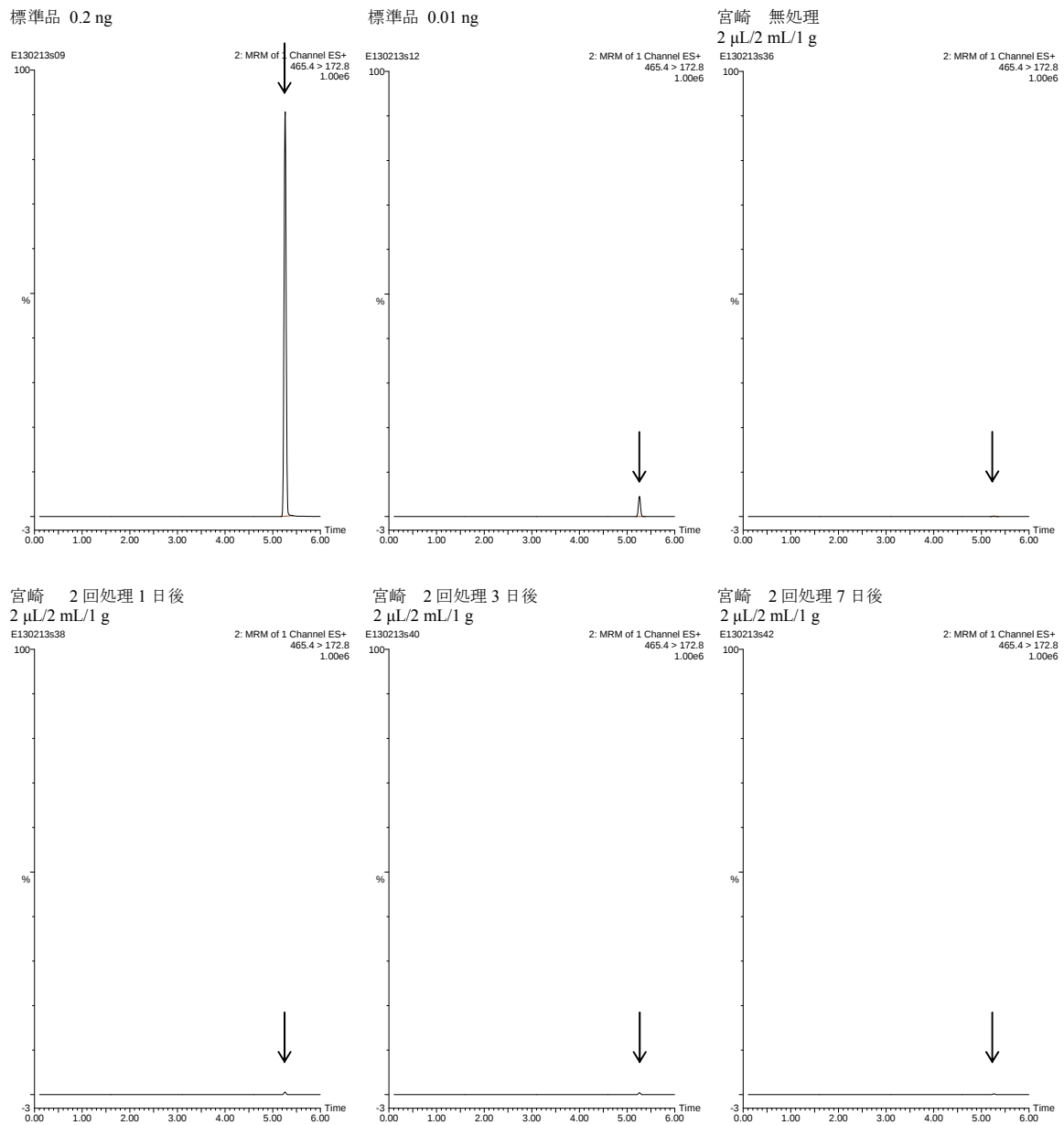
E120703s07 19 (0.520)

2: Daughters of 189ES-
1.03e6

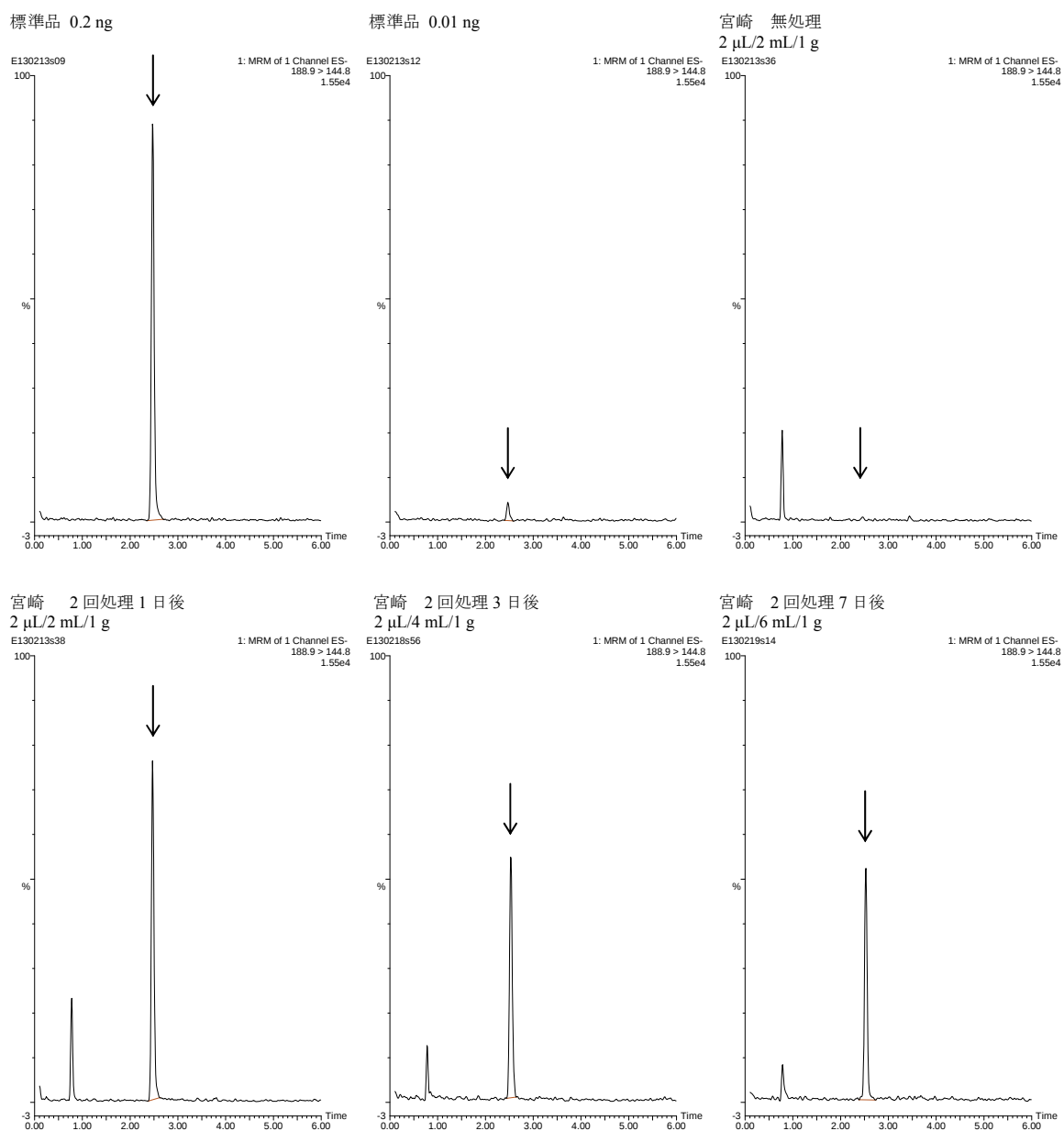


付図-2. 果実のクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. シフルメトフェンのクロマトグラム

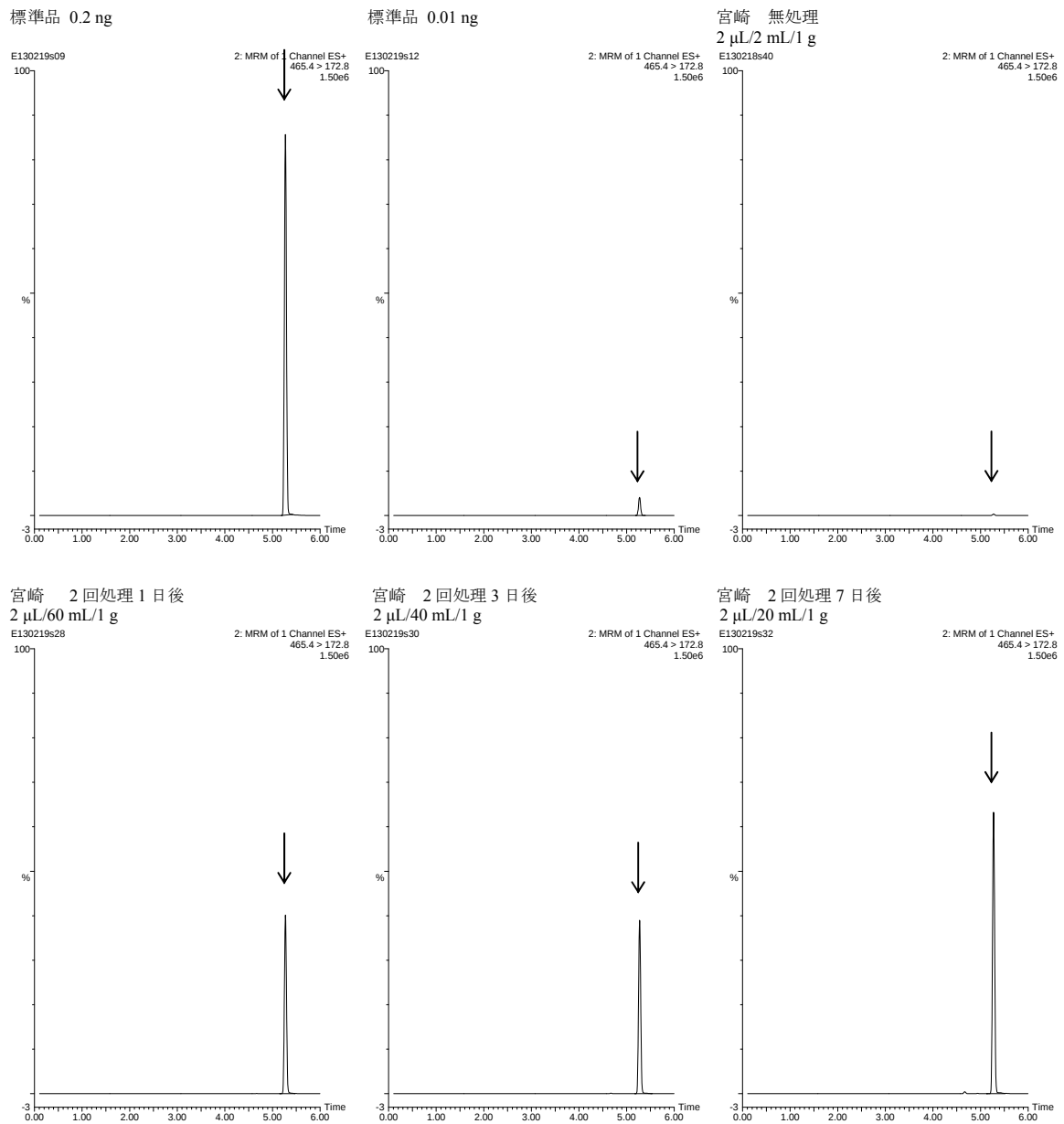


付図-2-2. シフルメトフェン代謝物のクロマトグラム

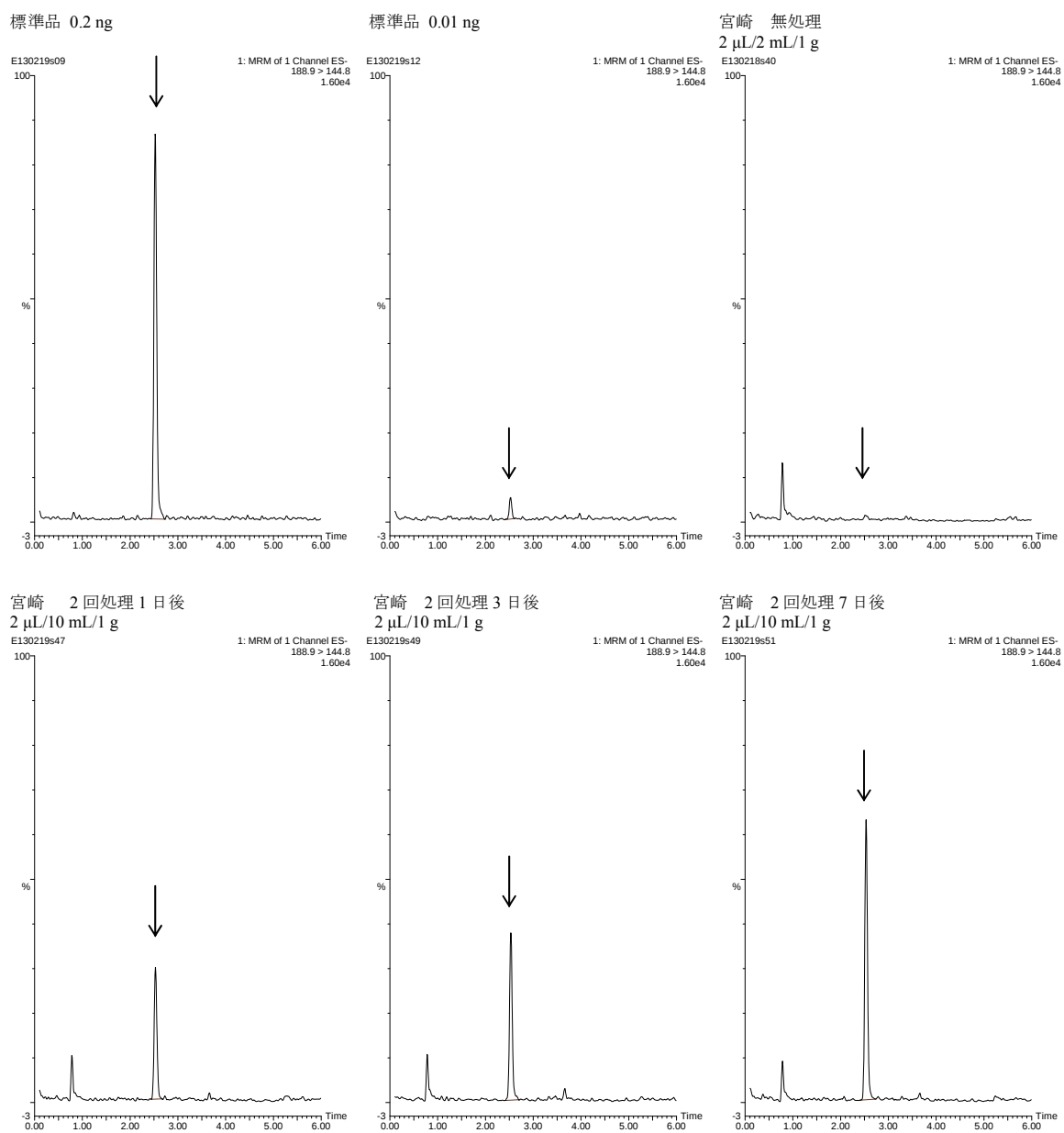


付図-3. 果皮のクロマトグラム (代表例)

付図-3-1. シフルメトフェンのクロマトグラム



付図-3-2. シフルメトフェン代謝物のクロマトグラム



登録作物のグループ化・残留分析詳細③

アセキノシル

1. 分析対象物質

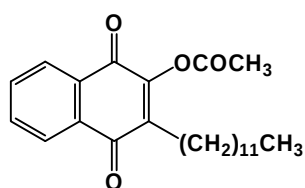
アセキノシル

化学名： 3-dodecyl-1,4-dihydro-1,4-dioxo-2-naphthyl acetate

分子式： $C_{24}H_{32}O_4$

分子量： 384.5

構造式：



性 状： 薄黄色結晶

融 点： 59.6°C

蒸気圧： 1.69×10^{-3} mPa (25°C)分配係数： $\log P_{ow} > 6.2$ (25°C)

溶解性： 水 6.69 µg/L (20°C)

n-ヘキサン 44, トルエン 450, ジクロロメタン 620, アセトン 220,
 メタノール 7.8, ジメチルホルムアミド 190, 酢酸エチル 290,
 イソプロピルアルコール 29, アセトニトリル 28,
 ジメチルスルホキシド 25, オクタノール 31,
 エタノール 23, キシレン 730 (以上g/L, 20°C)

出 典： The Pesticide Manual, 14th Edition.

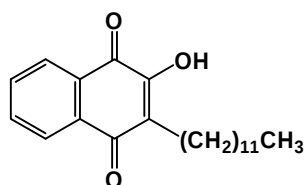
アセキノシルヒドロキシ体

化学名： 3-dodecyl-2-hydroxy-1,4-naphthoquinone

分子式： $C_{22}H_{30}O_3$

分子量： 342.5

構造式：



性 状： 黄色針状結晶
 融 点： 95～96℃
 溶解性： 水 50～100 µg/L
 ヘキサン 1.0, アセトン 8.2, メタノール 1.1, アセトニトリル 0.6,
 酢酸エチル 14 (以上g/L)

出 典：アセキノシル剤残留分析法（ピーマン）報告書（作19P-8-142）

2. 標準品及び試薬

アセキノシル標準品： 純度 99.3%（和光純薬工業製）

アセキノシルヒドロキシ体標準品

: 純度 99.9 %（林純薬工業製）

アセトニトリル, アセトン, ヘキサン, ジエチルエーテル

: 残留農薬試験用（和光純薬工業製）

メタノール： LC-MS 用（和光純薬工業製）

酢酸アンモニウム： 試薬特級（和光純薬工業製）

酢酸： 試薬特級（和光純薬工業製）

塩化ナトリウム： 試薬特級（和光純薬工業製）

水： PURELAB Flex System(Veolia Water Solutions & Technologies, Saint Maurice, France)で精製した水

液相分離ろ紙： 1PS（Whatman 製）

陽イオン交換ミニカラム

: Bond Elut SCX, 1 g/6 mL（アジレント製）

3. 装置及び機器

電子天秤： メトラー・トレド AG245及びXS2002S

台秤： エー・アンド・デイ FG-60KBM及びFV-60KA2

ミキサー： エフ・エム・アイ ロボクーブ BLIXER-5Plus

ホモジナイザー： kinematica PT 10/35, PT3100

液体クロマトグラフ・質量分析計システム（LC-MS/MS）：

アジレント 1290 HPLC

アジレント 6460 Triple Quad LC/MS

データ処理装置： アジレント MassHunter

4. 液体クロマトグラフ・質量分析計の操作条件

4.1. 液体クロマトグラフ・質量分析計

4.1.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム：	ZORBAX Eclipse Plus C18 (アジレント製)
	内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒径 1.8 μ m
溶離液：	メタノール／0.1%酢酸含有 5 mmol/L 酢酸アンモニウム
	70:30－(8 min)－98:2 (2 min)－(0.05 min)－100:0 (5.95 min)
流速：	0.3 mL/min
カラム温度：	40°C
試料注入量：	5 μ L
保持時間：	アセキノシル；9.1 min
	アセキノシルヒドロキシ体；8.6 min

4.1.2. 質量分析計

イオン化法：	エレクトロスプレー イオン化法 (ESI)
	正モード：アセキノシル
	負モード：アセキノシルヒドロキシ体
乾燥ガス温度：	300°C
乾燥ガス流量：	5 L/min
ネブライザー圧力：	45 psi
シースガス温度：	200°C
シースガス流量：	5 L/min
イオン導入電圧：	5000 V：アセキノシル
	3500 V：アセキノシルヒドロキシ体
フラグメンター電圧：	アセキノシル；50 V
	アセキノシルヒドロキシ体；200 V
コリジョン電圧：	アセキノシル；10 V
	アセキノシルヒドロキシ体；30 V
	(コリジョンガス；N ₂)
イオン検出法：	MRM
モニタリングイオン：	アセキノシル；プリカーサーイオン m/z 402.2
	プロダクトイオン m/z 343.2
	アセキノシルヒドロキシ体；プリカーサーイオン m/z 341.1
	プロダクトイオン m/z 186.0

5. 検量線の作成

アセキノシル及びアセキノシルヒドロキシ体の各標準品10.1及び10.0 mg（各10.0 mg相当）を各々50 mLのメスフラスコに精秤し、アセトニトリルに溶解して200 mg/L標準原液を調製した。各原液を等量ずつ混合し、アセトニトリルで希釈して0.00005, 0.0001, 0.0005, 0.001及び0.002 mg/Lの混合標準溶液を調製した。その5 µLを前項の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入し、データ処理装置を用いてアセキノシル及びアセキノシルヒドロキシ体のピーク面積を測定し、横軸に重量 (ng), 縦軸にピーク面積をとって各検量線を作成した。

6. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料は重量を量り、各々を縦に6分割したものから対角の2つを取り合わせた後、果肉と果皮に分け、それぞれの有姿試料を作製した。重量を量った後、密封して冷凍保存（-20℃設定）した。果肉分析時には果肉の有姿試料を取り、細切し、ミキサーで均一化した。果皮分析時には果皮の有姿試料を取り、細切し、ミキサーで均一化した。また、量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比 (%) を算出した。

6.1.2. 抽出

6.1.2.1. 果肉

均一化した試料20 gを三角フラスコにはかりとり、アセトン100 mLを加えて30分間振とう抽出した。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣をアセトン50 mLで洗い、同様にろ過した。ろ液を合わせアセトンで200 mLに定容し、その20 mL（試料2 g相当量）を分取した。

6.1.2.2. 果皮

均一化した試料10 gを三角フラスコにはかりとり、アセトン70 mLを加えてホモジナイザーで磨砕抽出した。シャフトに付着した試料をアセトン30 mLで洗浄し、洗浄液を合わせ、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に定容し、その20 mL（試料1 g相当量）を分取した。

6.1.3. ヘキサン転溶

分取した抽出液に5%塩化ナトリウム溶液20 mL及びヘキサン20 mLを加え、振とう機を用いて5分間激しく振とうした。暫時放置後、有機溶媒層を分取し、水層にはヘキサン20 mLを加え同様の振とう及び分取の操作を繰り返した。全有機溶媒層を合わせ、液相分離ろ紙でろ過した後、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。

6.1.4. 陽イオン交換ミニカラムによる精製

陽イオン交換ミニカラムにヘキサン10 mLを流下し前処理した。残留物をヘキサン5 mLに溶解し、超音波処理した後、陽イオン交換ミニカラムに流下した。同様の操作を繰り返し、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（98:2, v/v）混液30 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。

6.1.5. 定量

果肉の場合は、残留物をアセトニトリル80 mLに溶解し、必要に応じてアセトニトリルで希釈した。果皮の場合は、残留物をアセトニトリル40 mLに溶解し、必要に応じてアセトニトリルで希釈した。これらの溶液の5 µL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、検量線よりアセキノシル及びアセキノシルヒドロキシ体の重量を求め、試料中の各残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値（LOQ）及び検出限界値（LOD）*

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (µL)	定量限界 (ppm)
<u>果肉</u>				
0.0005	2	80	5	0.004
<u>果皮</u>				
0.0005	1	40	5	0.004
最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (µL)	検出限界 (ppm)
<u>果肉</u>				
0.00025	2	80	5	0.002
<u>果皮</u>				
0.00025	1	40	5	0.002

*アセキノシル、アセキノシルヒドロキシ体はいずれも同じ値

6.3. 回収率

分析法確認のため、宮崎II*の果肉及び果皮の無処理試料を用いて、0.004 ppm（定量限界相当）、0.25 ppm及び5 ppm添加濃度における回収試験を各5連分析で実施した。なお、無処理試料は2連分析し、全て定量限界未満（<0.004 ppm）であった。回収試験結果を表に示す。

*平成23年度農薬等安全性確保強化実態調査事業の宮崎II無処理試料を使用

6.3.1. 果肉の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
<u>アセキノシル</u>						
宮崎II	5	107, 94,	102, 90	102,	99	6.9
宮崎II	0.25	85, 84,	85, 83	84,	84	1.0
宮崎II	0.004	89, 75,	82, 73	81,	80	7.9
<u>アセキノシルヒドロキシ体</u>						
宮崎II	5	99, 91,	96, 90	96,	94	4.0
宮崎II	0.25	98, 92,	95, 92	94,	94	2.6
宮崎II	0.004	95, 87,	89, 85	87,	89	4.3

6.3.2. 果皮の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
アセキノシル						
宮崎II	5	90, 82,	84, 82	83,	84	4.0
宮崎II	0.25	98, 95,	98, 95	98,	97	1.7
宮崎II	0.004	91, 88,	90, 87	90,	89	1.8
アセキノシルヒドロキシ体						
宮崎II	5	96, 88,	96, 88	93,	92	4.4
宮崎II	0.25	89, 87,	88, 84	88,	87	2.2
宮崎II	0.004	118, 101,	108, 98	106,	106	7.3

7. 精度管理

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

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

クォリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

また、2011年10月実施の食品衛生精度管理比較調査（財団法人食品薬品安全センター）におけるZスコアは全てZ<2であった。

7.1.クォリティーコントロール試料分析結果

7.1.1.果肉

成分名	分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>アセキノシル</u>	2012/11/26	茨城	70	<0.004
	2012/12/13	高知	77	<0.004
	2012/11/13	宮崎	70	<0.004
	2012/12/25	宮崎	74	<0.004
<u>アセキノシル</u>	2012/11/26	茨城	99	<0.004
<u>ヒドロキシ体</u>	2012/12/13	高知	105	<0.004
	2012/11/13	宮崎	98	<0.004
	2012/12/25	宮崎	78	<0.004

7.1.2.果皮

成分名	分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>アセキノシル</u>	2012/12/13	茨城	88	<0.004
	2012/12/13	高知	71	<0.004
	2012/11/21	宮崎	70	<0.004
	2012/12/25	宮崎	70	<0.004
<u>アセキノシル</u>	2012/12/13	茨城	99	<0.004
<u>ヒドロキシ体</u>	2012/12/13	高知	98	<0.004
	2012/11/21	宮崎	109	<0.004
	2012/12/25	宮崎	112	<0.004

8. マトリックス効果の確認

マトリックス標準溶液は、各圃場の無処理試料の最終溶液1 mLをナス型フラスコに分取し、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、窒素気流下で溶媒を留去した後、0.001 mg/Lの検量線用標準溶液1 mLに溶解して調製した。マトリックス試料分析結果を表に示す。

8.1.1.果肉

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>アセキノシル</u>	茨城	99
	高知	97
	宮崎	96
<u>アセキノシル</u>	茨城	101
<u>ヒドロキシ体</u>	高知	92
	宮崎	94

8.1.2.果皮

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>アセキノシル</u>	茨城	114
	高知	102
	宮崎	105
<u>アセキノシル</u>	茨城	97
<u>ヒドロキシ体</u>	高知	87
	宮崎	117

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料に各化合物を添加し、 -20°C 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。保存安定性試験の結果を表に示す。

9.1.果肉の保存安定性試験結果

9.1.1.アセキノシル

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	160 (2012/7/18-12/25)	80,	79	80
0.5	高知	146 (2012/8/1-12/25)	71,	70	70
0.5	宮崎	173 (2012/7/5-12/25)	80,	79	80

9.1.2.アセキノシルヒドロキシ体

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	160 (2012/7/18-12/25)	77,	75	76
0.5	高知	146 (2012/8/1-12/25)	77,	72	74
0.5	宮崎	173 (2012/7/5-12/25)	78,	70	74

9.2.果皮の保存安定性試験結果

9.2.1.アセキノシル

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	160 (2012/7/18-12/25)	87,	79	83
0.5	高知	146 (2012/8/1-12/25)	73,	73	73
0.5	宮崎	173 (2012/7/5-12/25)	78,	77	78

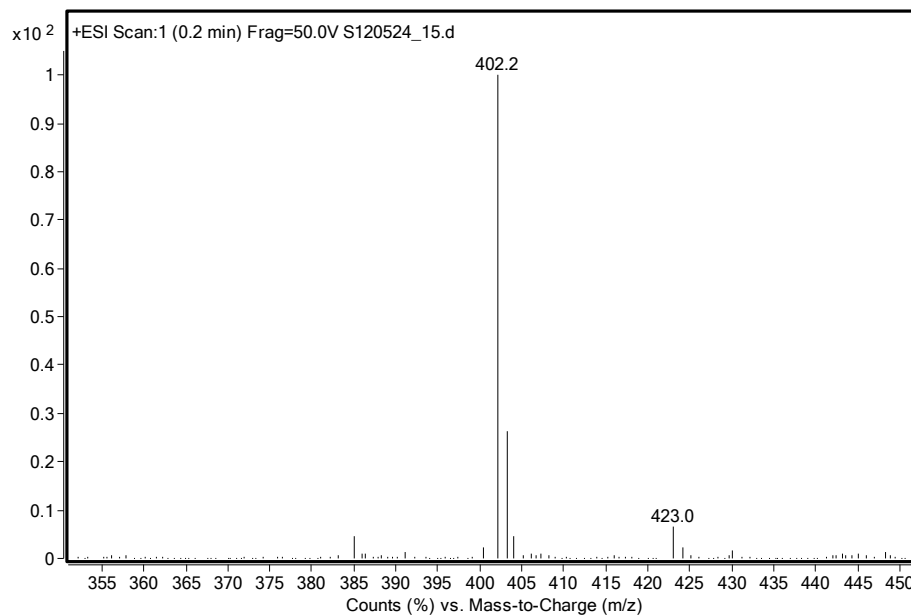
9.2.2.アセキノシルヒドロキシ体

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	160 (2012/7/18-12/25)	93,	83	88
0.5	高知	146 (2012/8/1-12/25)	88,	83	86
0.5	宮崎	173 (2012/7/5-12/25)	93,	81	87

付図-1. マススペクトル

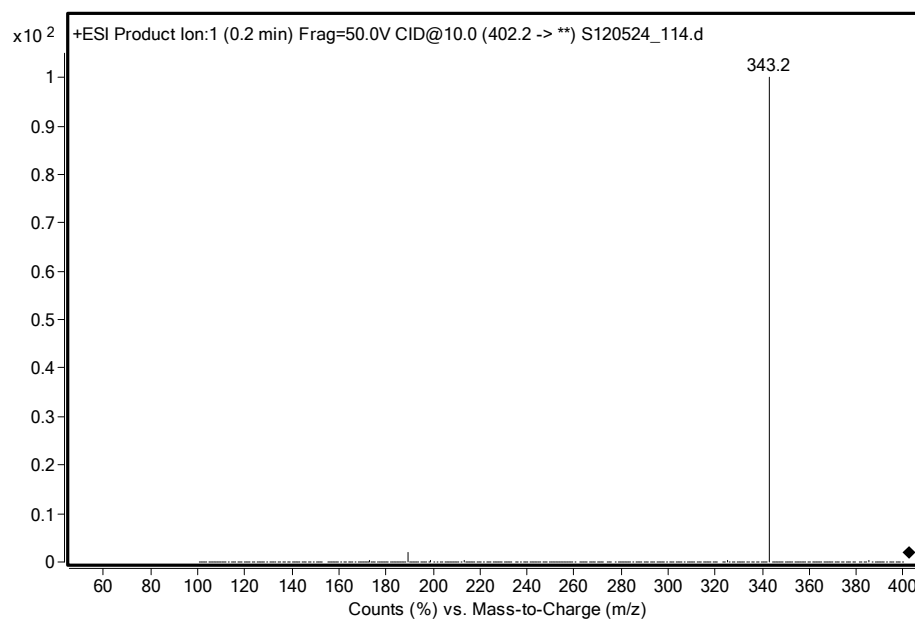
付図-1-1. アセキノシルのマススペクトル

アセキノシルのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)



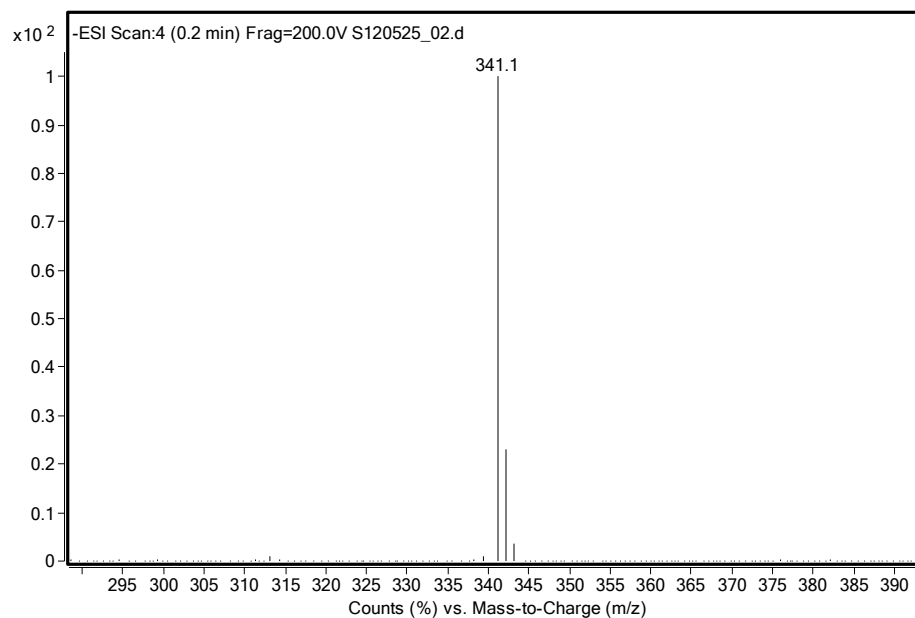
アセキノシルのプロダクトスキャンスペクトルの一例

(プリカーサーイオン ; $m/z=402.2$, 正モード)

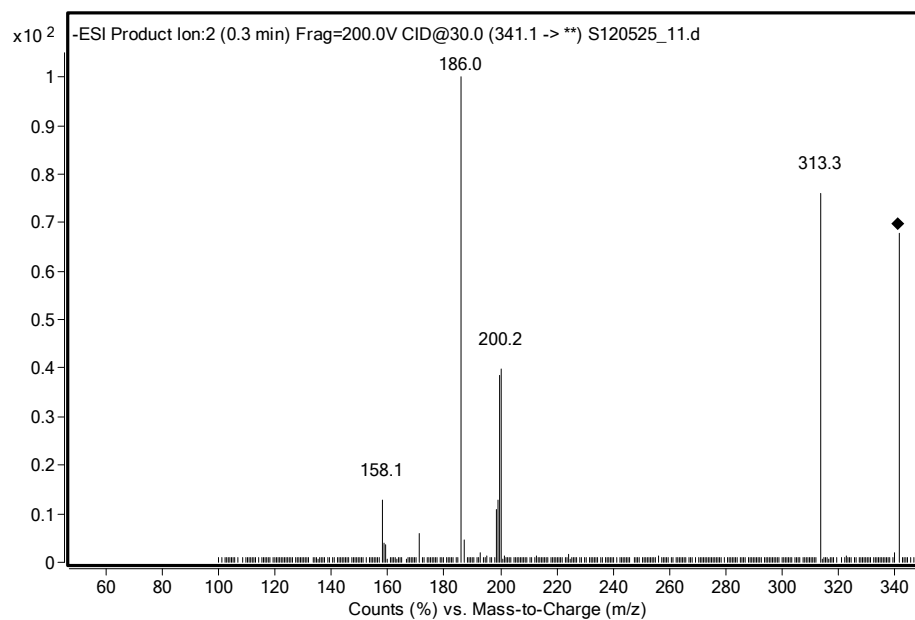


付図-1-2. アセキノシルヒドロキシ体のマススペクトル

アセキノシルヒドロキシ体のマススペクトル（一次イオン）の一例（負モード）

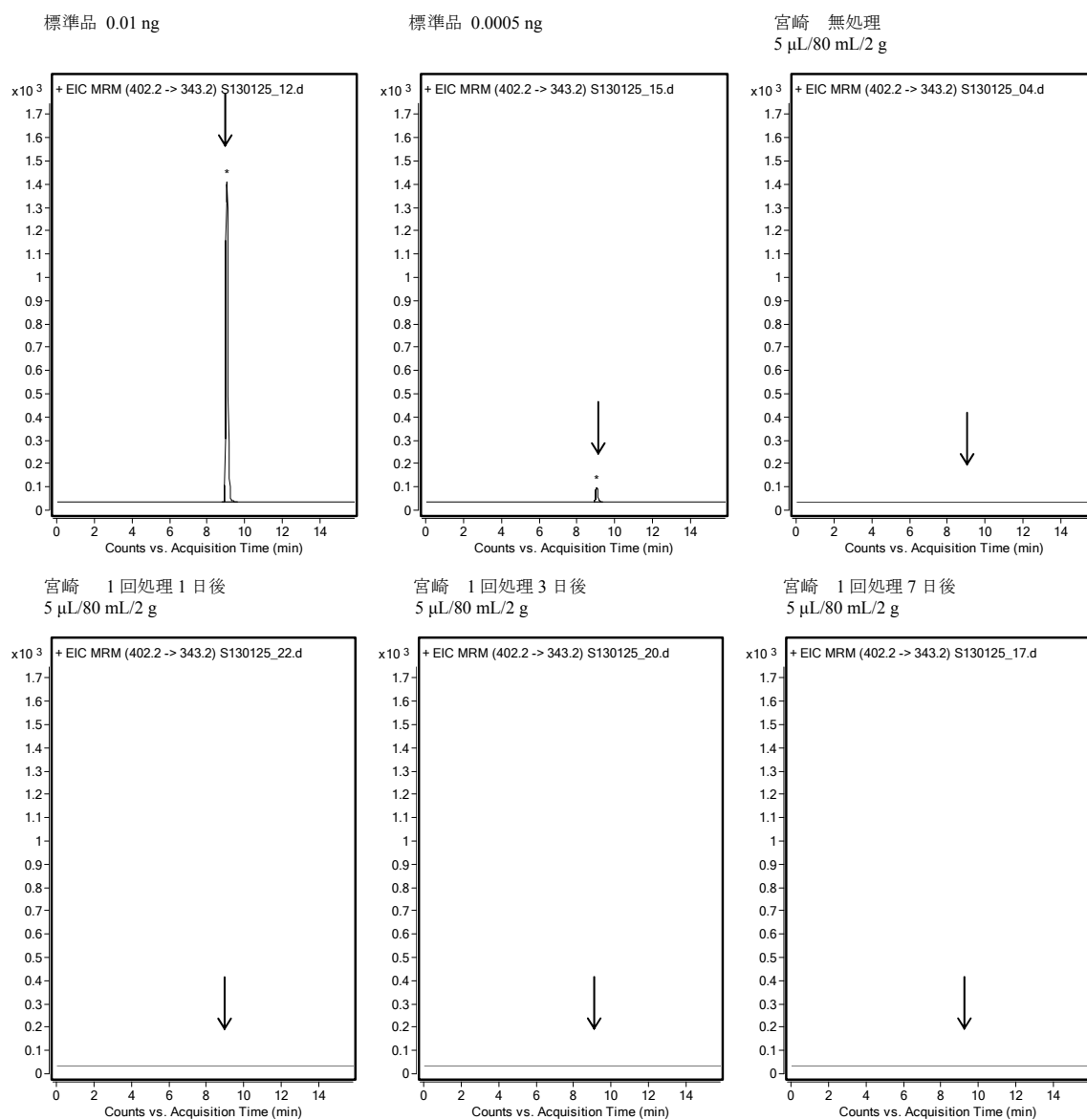


アセキノシルヒドロキシ体のプロダクトスキャンスペクトルの一例
(プリカーサーイオン ; $m/z=341.1$, 負モード)

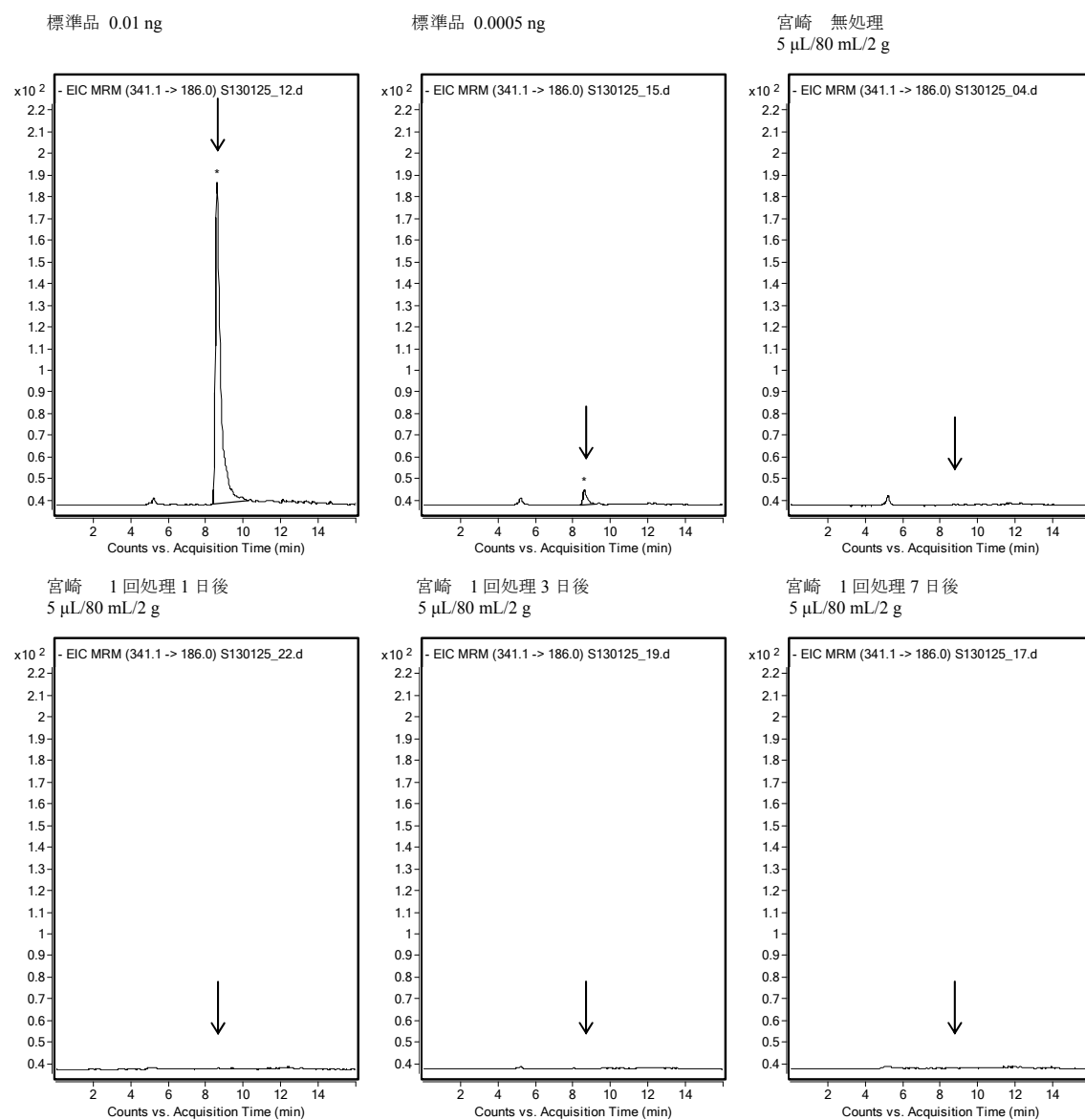


付図-2. 果実のクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. アセキノシルのクロマトグラム

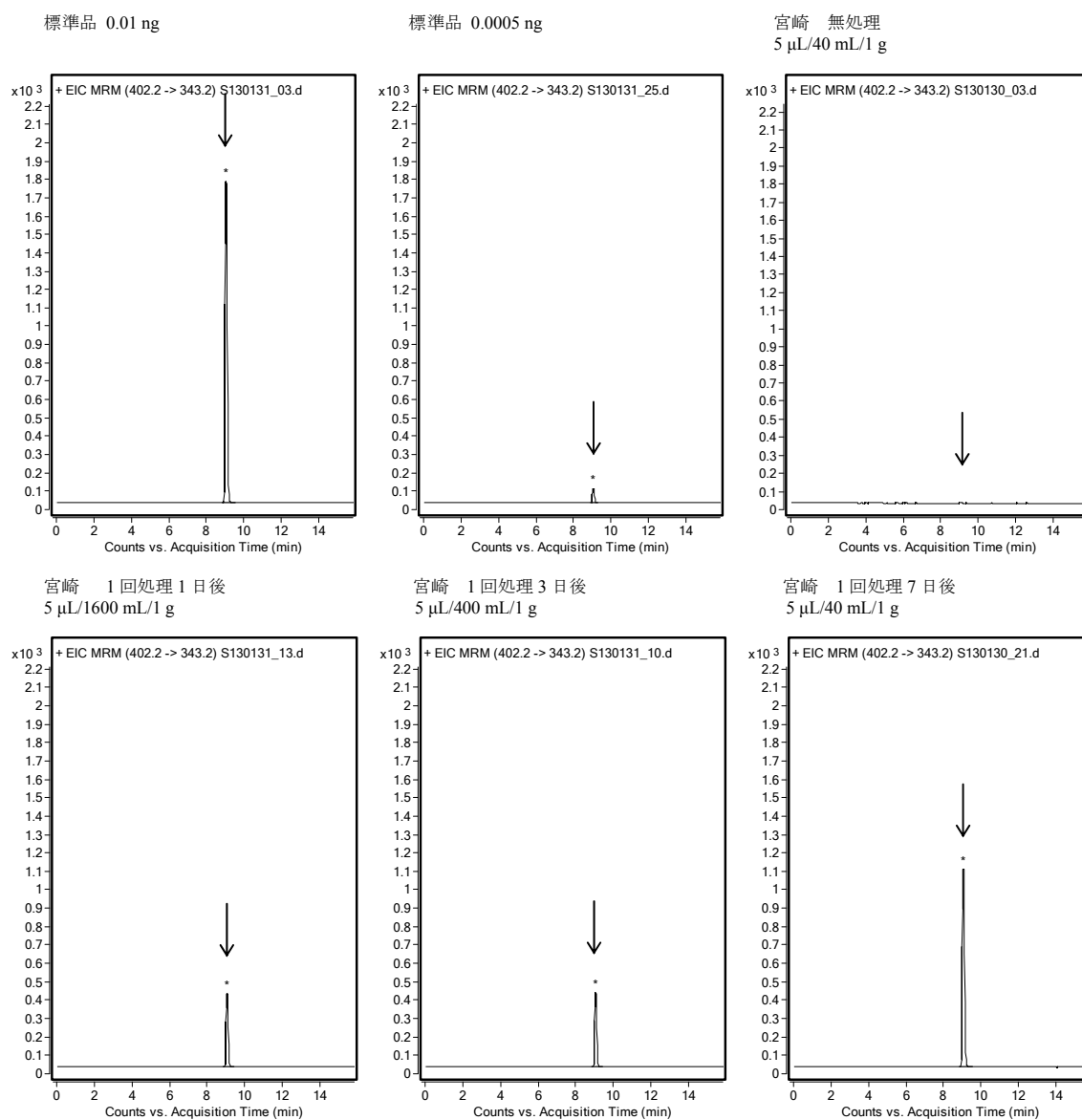


付図-2-2. アセキノシルヒドロキシ体のクロマトグラム

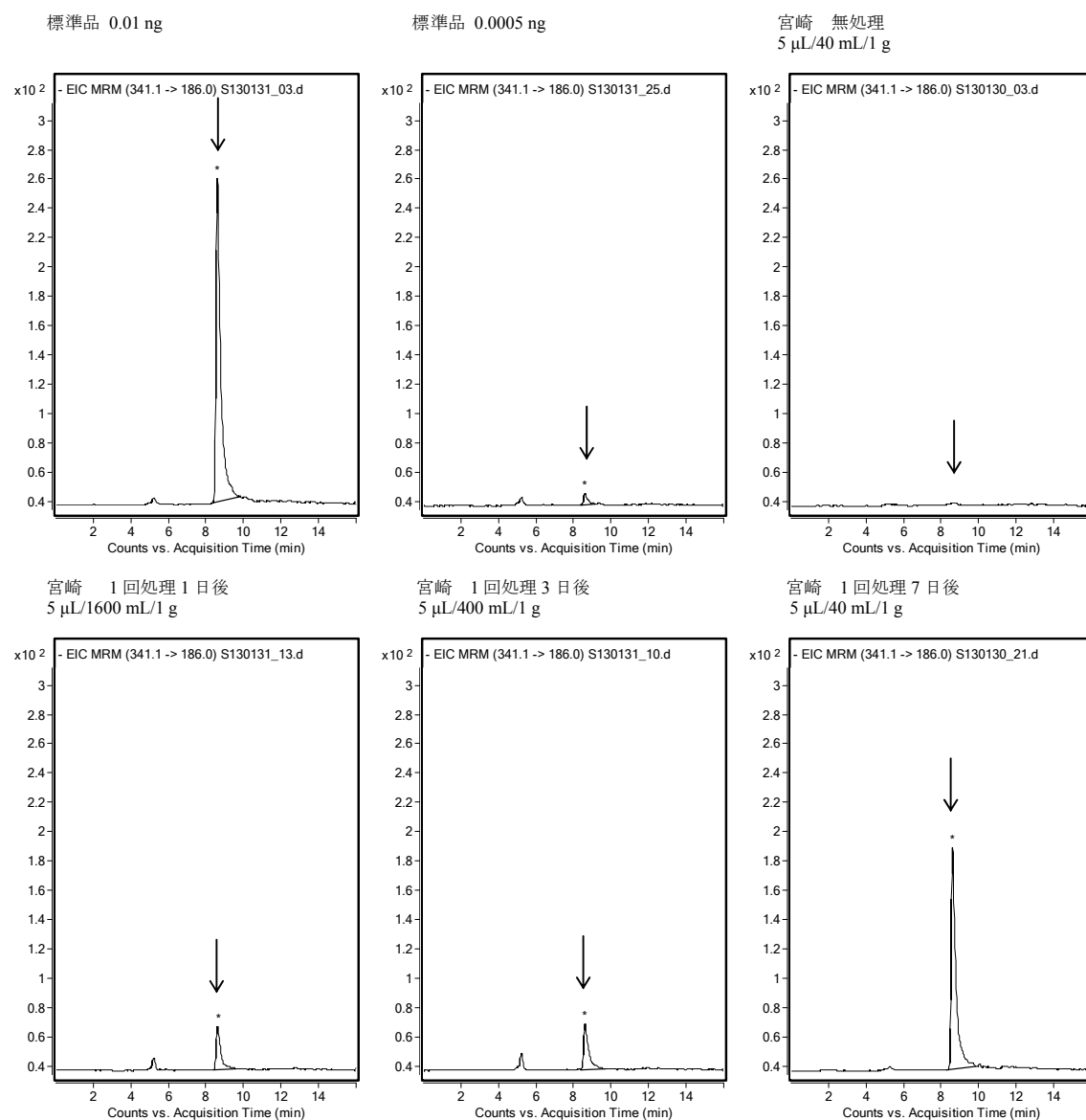


付図-3. 果皮のクロマトグラム (代表例)

付図-3-1. アセキノシルのクロマトグラム



付図-3-2. アセキノシルヒドロキシ体のクロマトグラム



登録作物のグループ化・残留分析詳細④
試料重量等，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	—	1.97	1.95	9.84	9.72	92	8	2.6
	C	1	1.88		9.38		93	7	1.1
	C	3	1.91		9.56		94	6	1.5
	C	7	2.02		10.1		94	6	2.1
							平均 93:7		平均 1.8
高知	0	—	1.72	1.70	17.2	11.9	91	9	3.2
	C	1	1.67		10.0		91	9	2.9
	C	3	1.70		10.2		92	8	3.1
	C	7	1.70		10.2		93	7	2.6
							平均 92:8		平均 3.0
宮崎	0	—	1.84	1.87	18.4	11.7	92	8	1.8
	C	1	1.85		9.26		91	9	1.6
	C	3	1.87		9.36		92	8	1.8
	C	7	1.92		9.60		93	7	1.9
							平均 92:8		平均 1.8
3 ほ場の総平均重量					3 ほ場の総重量の平均				
1.84 kg/個					11.1 kg				

C：エトキサゾールは2回処理

アクリナトリンは5回処理

シフルメトフェンは2回処理

フェンプロパトリン，ビフェントリンは4回処理

アセキノシルは1回処理

2.作物写真の一例

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