

農薬登録における作物のグループ化・残留分析詳細①
イプロジオン

1. 分析対象物質

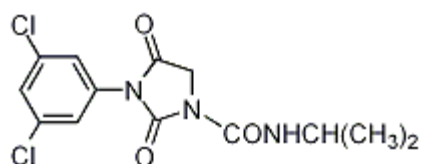
イプロジオン

化学名： 3-(3,5-dichlorophenyl)-N-isopropyl-2,4-dioxoimidazolidine-1-carboxamide

分子式： $C_{13}H_{13}Cl_2N_3O_3$

分子量： 330.2

構造式：



性 状： 白色粉末

融 点： 134°C

蒸気圧： 5×10^{-4} mPa (25°C)

分配係数： $\log P_{ow} = 3.0$ (pH=3及びpH=5)

溶解性： 水 13 mg/L (20°C)

オクタノール 10, アセトニトリル 168, トルエン 150,
酢酸エチル 225, アセトン 342, ジクロロメタン 450,
ヘキサン 0.59 (以上 g/L, 20°C)

安定性： 酸性条件下で比較的安定, 塩基性条件下で分解

半減期; 1~7日 (pH=7), 1時間未満 (pH=9)

水溶液中では紫外線により分解, 疑似太陽光では比較的安定

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

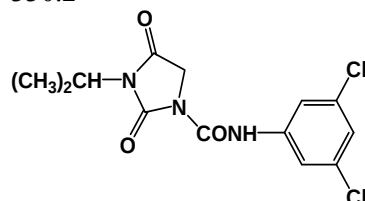
イプロジオン代謝物

化学名： *N*-(3,5-dichlorophenyl)-3-isopropyl-2,4-dioxoimidazolidine-1-carboxamide

分子式： $C_{13}H_{13}Cl_2N_3O_3$

分子量： 330.2

構造式：



性 状： 白色粉末

融 点： 199.5°C

出 典：イプロジオン剤残留分析法（ミニトマト）報告書（作16P-5-137）

2. 標準品及び試薬

イプロジオン標準品：純度 98.2%（関東化学製）

イプロジオン代謝物標準品：純度 99.6%（和光純薬工業製）

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）

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

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）

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 R-45
及びロボクーブ BLIXER-5Plus

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. 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：	アセトニトリル／5 mmol/L 酢酸アンモニウム 50:50 (1 min)－(4 min)－90:10
流速：	0.3 mL/min
カラム温度：	40°C
試料注入量：	10 μ L
保持時間：	イプロジオン；約 3.7 min イプロジオン代謝物；約 4.7 min

4.2. 質量分析計

イオン化法：	エレクトロスプレー イオン化法 (ESI) 負モード
乾燥ガス温度：	300°C
乾燥ガス流量：	3 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：	12 L/min
イオン導入電圧：	5000 V
フラグメンター電圧：	イプロジオン 75 V イプロジオン代謝物 50 V
コリジョン電圧：	イプロジオン 2 V イプロジオン代謝物 5 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：	イプロジオン プリカーサーイオン m/z 327.9 プロダクトイオン m/z 242.9 イプロジオン代謝物 プリカーサーイオン m/z 327.9 プロダクトイオン m/z 141.2

5. 検量線の作成

イプロジオン及びイプロジオン代謝物の各標準品10.2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0.000125, 0.00025, 0.00125, 0.0025及び0.005 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イプロジオン及びイプロジオ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

受領した試料の重量を量った後、各々を縦に8分割し、それぞれの対角の2つを取り合わせた (4組作製)。その2組を果実分析用試料とし、残りの2組を果肉分析用試料とした。2組の果実分析用試料のうち、1組の全量をミキサーで均一化した (残りの1組は添加剤が必要なアラニカルブ分析用試料とした)。2組の果肉分析用試料は、果肉と果皮に分けた。その1組の全量をミキサーで均一化した (残りの1組は添加剤が必要なアラニカルブ分析用試料とした)。

量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比 (%) を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した果肉試料又は果実試料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2.5 mL (試料0.25 g相当量) を分取した。

6.1.3. C₁₈ミニカラムによる精製

C₁₈ミニカラムに0.1%酢酸含有アセトニトリル5 mL及び0.1%酢酸5 mLを順次流下し前処理した。前項の抽出液に0.1%酢酸5 mLを加えて混和した後、前処理したC₁₈ミニカラムに流下した。さらに0.1%酢酸含有アセトニトリル／水 (50:50, v/v) 混液5 mLを流下し、これらの流出液を捨てた。次に、0.1%酢酸含有アセトニトリル／水 (70:30, v/v) 混液10 mLを流下し、溶出液を取り、40°C以下の水浴中で減圧濃縮し、最後は窒素気流下で溶媒を留去した。

6.1.4. 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，必要に応じて同混液で希釈した。この溶液の10 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，検量線よりイプロジオン及びイプロジオ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 (μ L)	定量限界 (ppm)
0.0025	0.25	5	10	0.005

最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μ L)	検出限界 (ppm)
0.00125	0.25	5	10	0.003

*イプロジオン，イプロジオン代謝物はいずれも同じ値，
また，果肉，果実についてもいずれも同じ値

6.3. 回収率

分析法確認のため、高知試料の果肉無処理試料*及び宮崎試料の果実無処理試料**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24年度 農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業の試料を使用

**平成24年度 生産資材安全確保推進事業の試料を使用

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>イプロジオン</u>						
高知	5	101, 97,	98, 93	97,	97	3.0
高知	0.25	96, 91,	96, 89	93,	93	3.3
高知	0.005	113, 105,	107, 91	105,	104	7.8
<u>イプロジオン代謝物</u>						
高知	5	96, 91,	95, 91	92,	93	2.5
高知	0.25	92, 91,	91, 90	91,	91	0.8
高知	0.005	103, 98,	101, 93	101,	99	3.9

6.3.2. 果実の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
<u>イプロジオン</u>						
宮崎	5	100, 93,	95, 93	95,	95	3.0
宮崎	0.25	91, 86,	91, 85	89,	88	3.2
宮崎	0.005	116, 108,	114, 106	109,	111	3.8
<u>イプロジオン代謝物</u>						
宮崎	5	94, 88,	91, 88	89,	90	2.8
宮崎	0.25	90, 86,	89, 86	88,	88	2.0
宮崎	0.005	105, 98,	101, 98	100,	100	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、2012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>イプロジオン</u>	2013/9/19	茨城	90	<0.005
	2013/9/20	高知	88	<0.005
	2013/9/18	宮崎	89	<0.005
	2013/10/2	宮崎	103	<0.005
<u>イプロジオン代謝物</u>	2013/9/19	茨城	94	<0.005
	2013/9/20	高知	91	<0.005
	2013/9/18	宮崎	92	<0.005
	2013/10/2	宮崎	114	<0.005

7.1.2.果実

成分名	分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>イプロジオン</u>	2013/9/19	茨城	95	<0.005
	2013/9/20	高知	92	<0.005
	2013/9/18	宮崎	93	<0.005
	2013/10/2	宮崎	89	<0.005
<u>イプロジオン代謝物</u>	2013/9/19	茨城	98	<0.005
	2013/9/20	高知	95	<0.005
	2013/9/18	宮崎	94	<0.005
	2013/10/2	宮崎	109	<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°C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、0.0025 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. 果肉

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>イプロジオン</u>	茨城	99
	高知	92
	宮崎	86
<u>イプロジオン代謝物</u>	茨城	105
	高知	96
	宮崎	99

8.2. 果実

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>イプロジオン</u>	茨城	95
	高知	89
	宮崎	104
<u>イプロジオン代謝物</u>	茨城	99
	高知	97
	宮崎	99

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料にイプロジオン、イプロジオン代謝物をそれぞれ別々に添加し、 -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. イプロジオン

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	71 (2013/7/23-10/2)	96,	85	90
0.5	高知	57 (2013/8/6-10/2)	80,	75	78
0.5	宮崎	86 (2013/7/8-10/2)	84,	82	83

9.1.2. イプロジオン代謝物

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	71 (2013/7/23-10/2)	94,	90	92
0.5	高知	57 (2013/8/6-10/2)	94,	93	94
0.5	宮崎	86 (2013/7/8-10/2)	89,	87	88

9.2.果実の保存安定性試験結果

9.2.1.イプロジオン

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	71 (2013/7/23-10/2)	92,	87	90
0.5	高知	57 (2013/8/6-10/2)	101,	92	96
0.5	宮崎	86 (2013/7/8-10/2)	94,	91	92

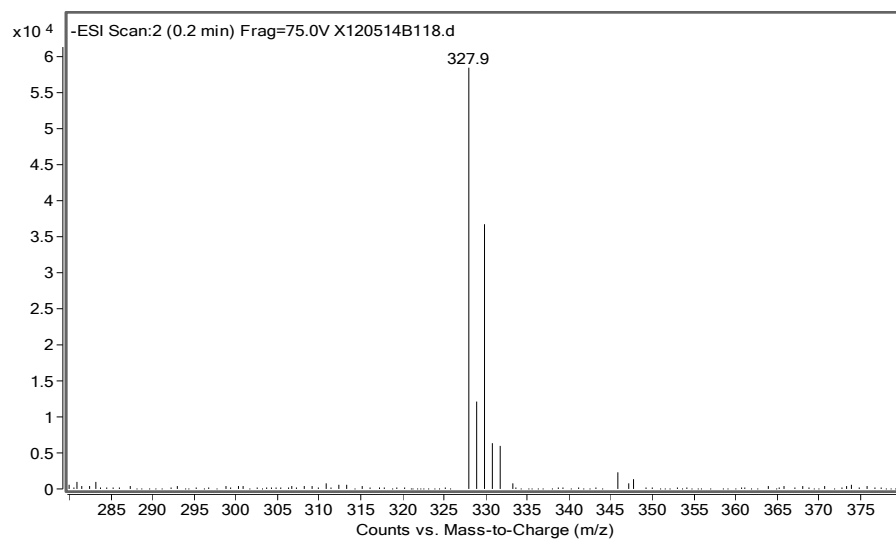
9.2.2.イプロジオン代謝物

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	71 (2013/7/23-10/2)	90,	87	88
0.5	高知	57 (2013/8/6-10/2)	90,	81	86
0.5	宮崎	86 (2013/7/8-10/2)	85,	81	83

付図-1. マススペクトル

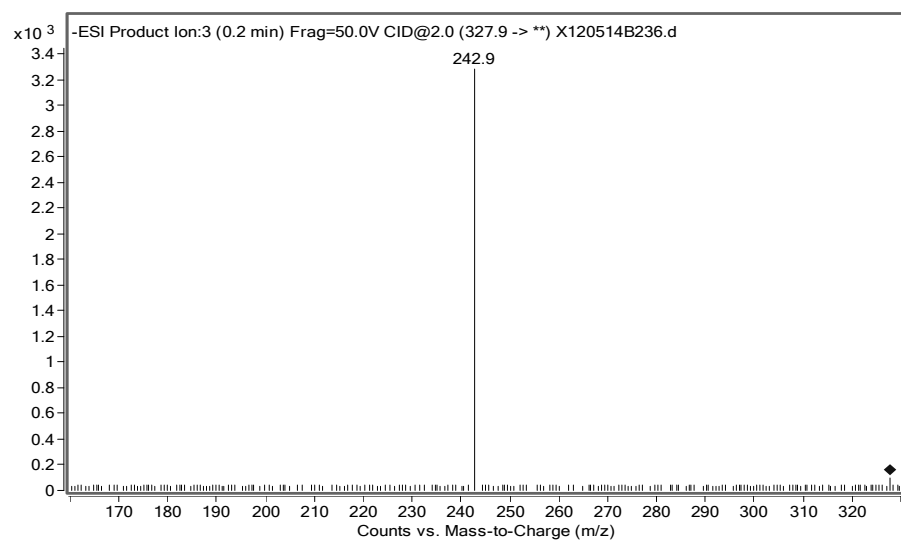
付図-1-1. イプロジオンのマススペクトル

イプロジオンのマススペクトル (一次イオン) の一例 (負モード)



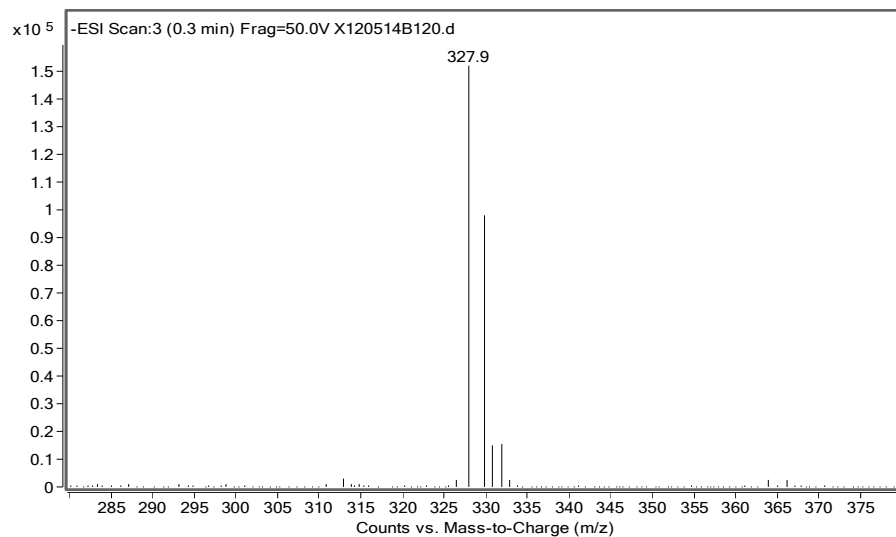
イプロジオンのプロダクトスキンスペクトルの一例

(プリカーサーイオン ; m/z=327.9, 負モード)

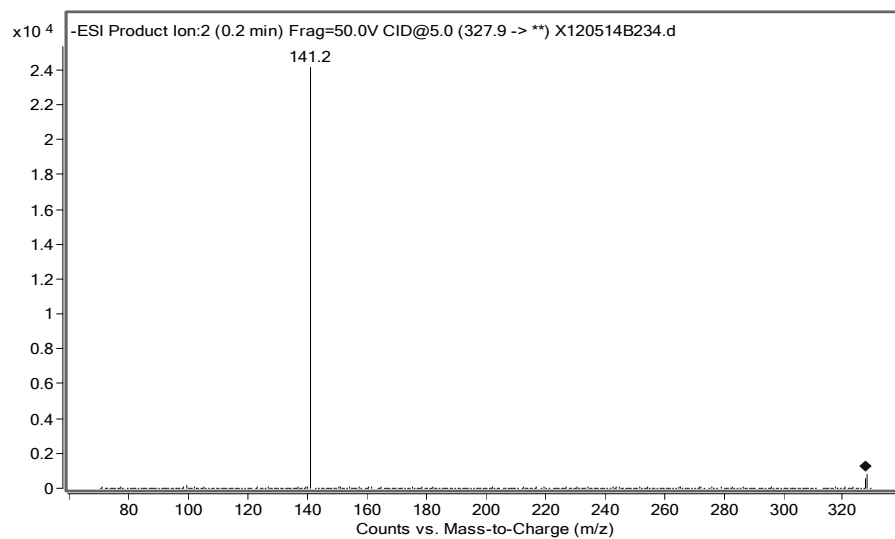


付図-1-2. イプロジオン代謝物のマススペクトル

イプロジオン代謝物のマススペクトル (一次イオン) の一例 (負モード)

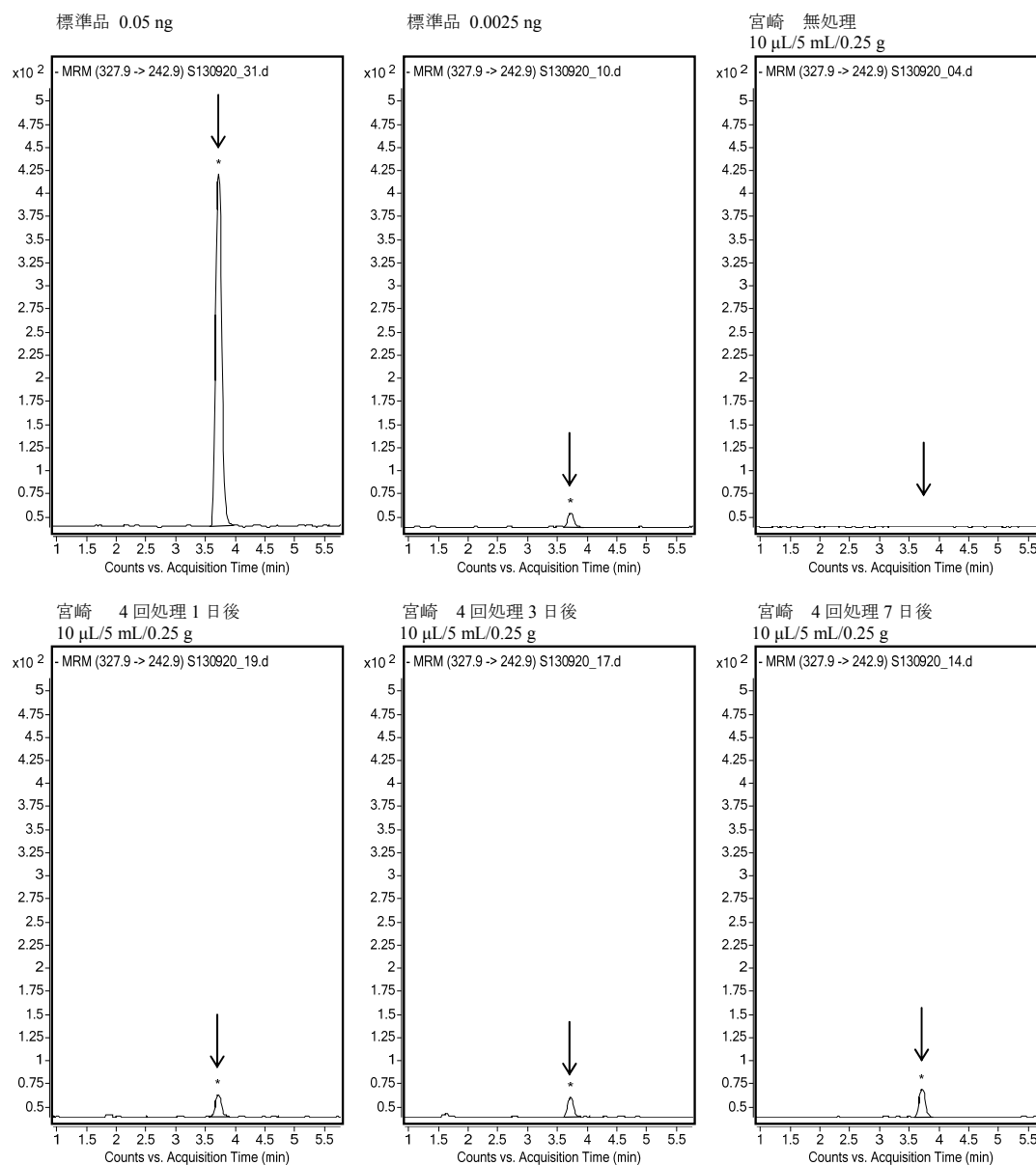


イプロジオン代謝物のプロダクトスキャンスペクトルの一例
(プリカーサーイオン ; m/z=327.9, 負モード)

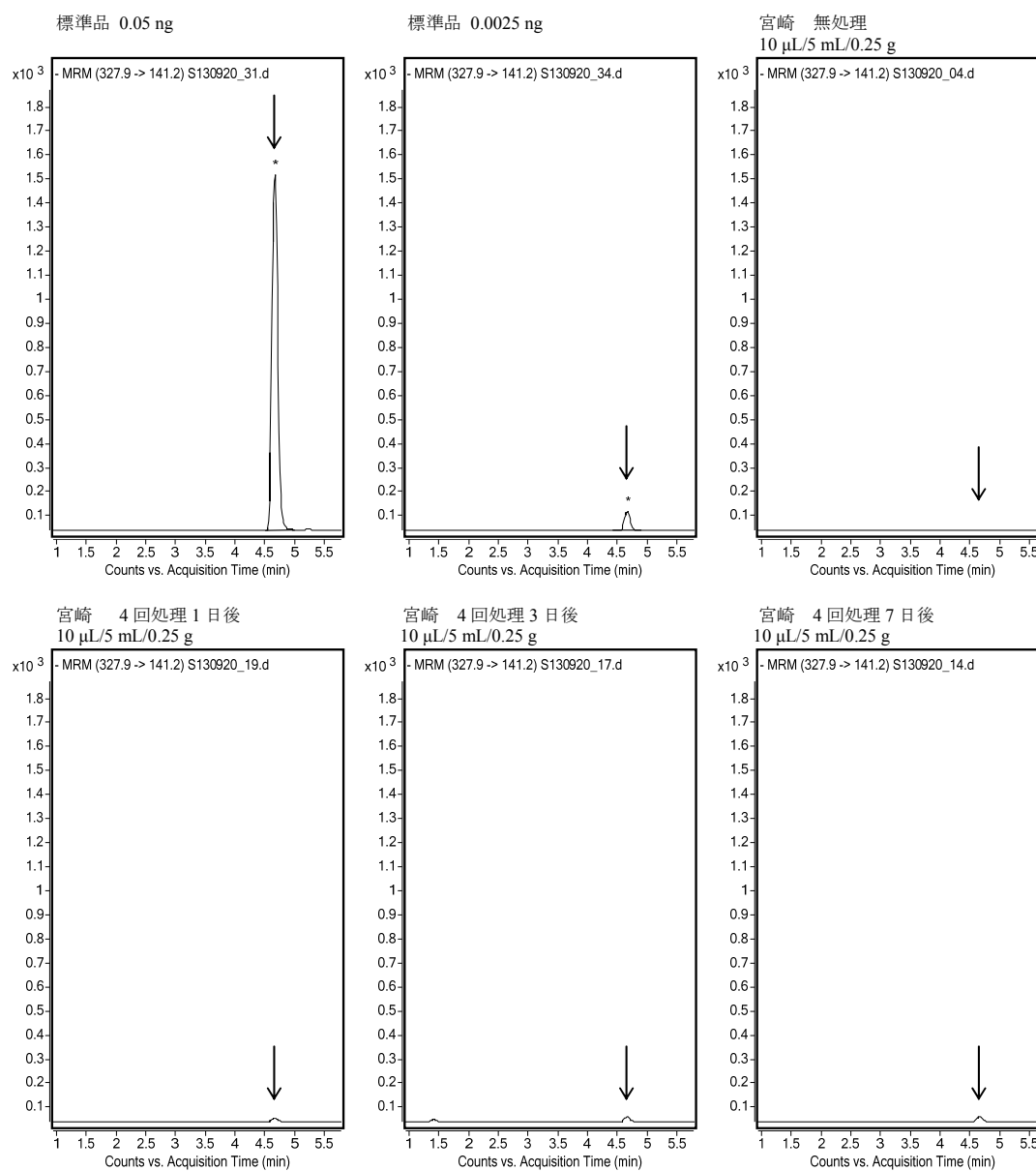


付図-2. 果肉のクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. イプロジオンのクロマトグラム

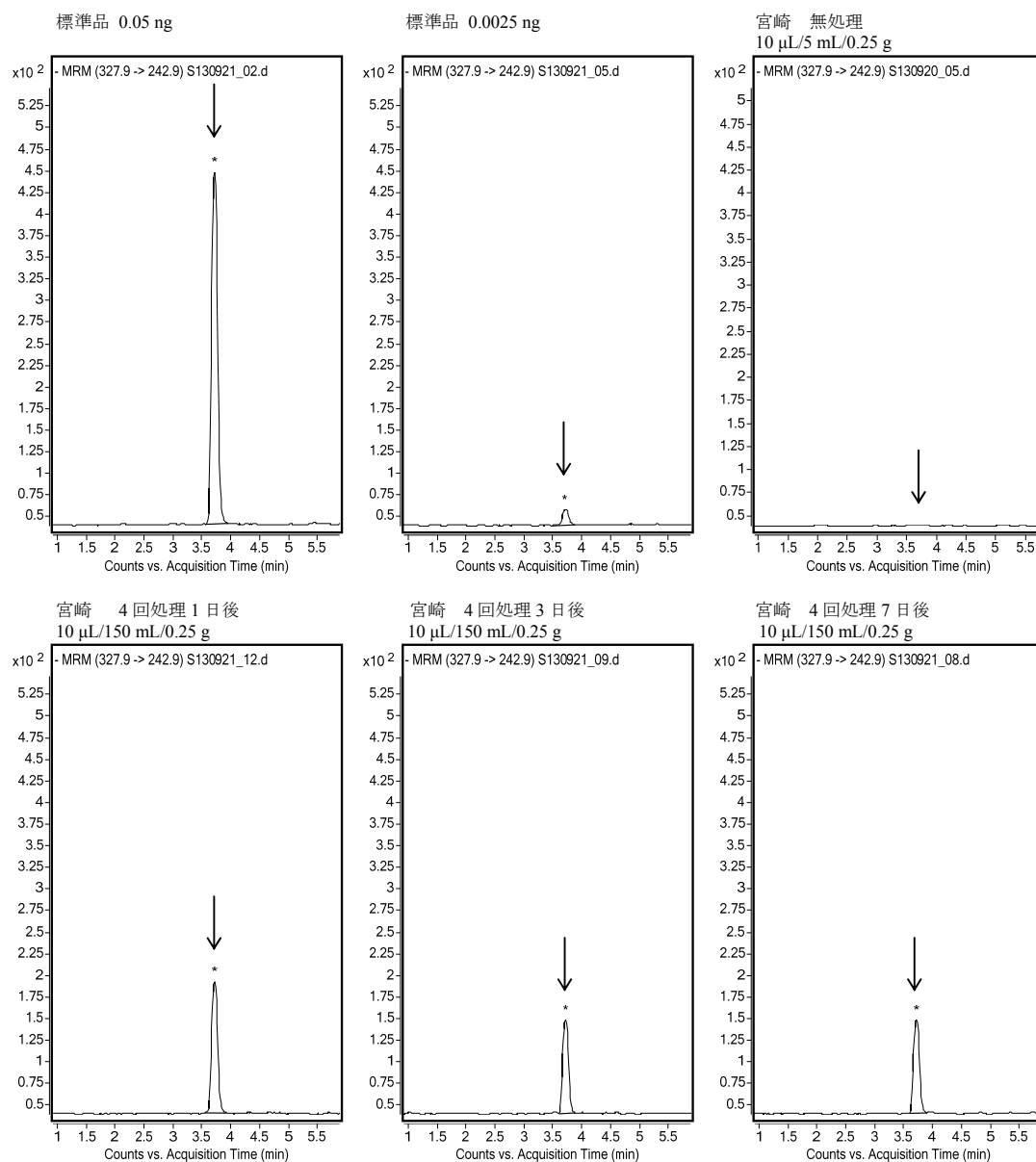


付図-2-2. イプロジオン代謝物のクロマトグラム

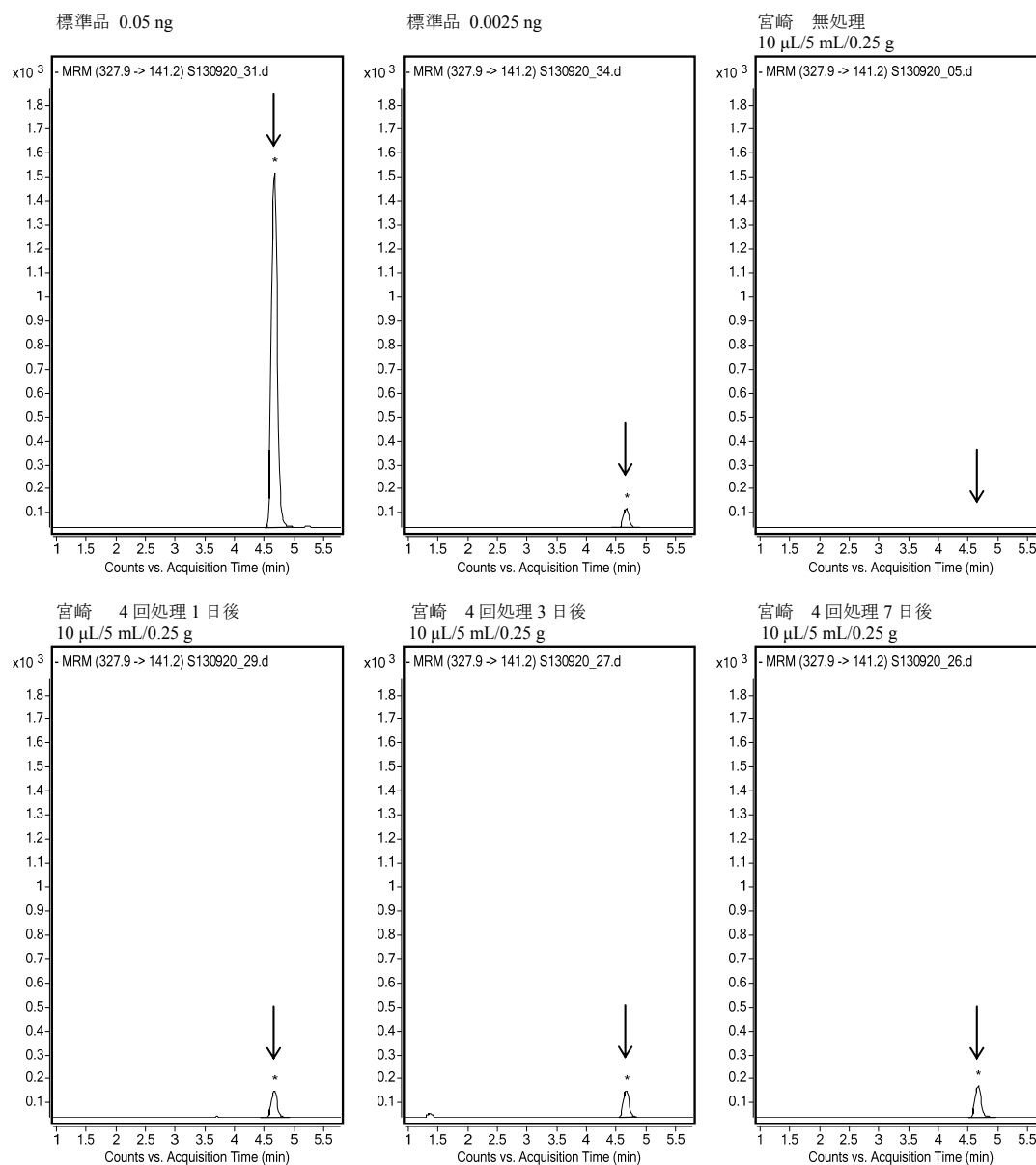


付図-3. 果実のクロマトグラム (代表例)

付図-3-1. イプロジオンのクロマトグラム



付図-3-2. イプロジオン代謝物のクロマトグラム



農薬登録における作物のグループ化・残留分析詳細②
エトフェンプロックス

1. 分析対象物質

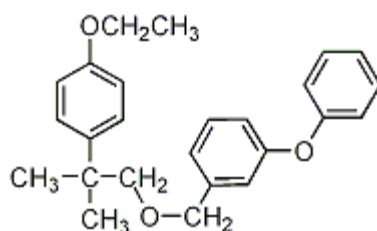
エトフェンプロックス

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

分子式： $C_{25}H_{28}O_3$

分子量： 376.5

構造式：



性 状： 白色結晶

融 点： $37.4 \pm 0.1^\circ\text{C}$

蒸気圧： $8.13 \times 10^{-4} \text{ mPa}$ (25°C)

分配係数： $\log P_{\text{OW}} = 6.9$ (20°C)

溶解性： 水 22.5 $\mu\text{g/L}$ (25°C)

ヘキサン 667, ヘプタン 621, キシレン 856, トルエン 862,
ジクロロメタン 924, アセトン 877, メタノール 49, エタノール 98,
酢酸エチル 837 (以上 g/L , 20°C)

安定性： 150°C まで安定

加水分解半減期；1年以上 ($\text{pH}=4, 7, 9/25^\circ\text{C}$)

光分解半減期；2日 (中性滅菌水中/ 25°C)

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

2. 標準品及び試薬

エトフェンプロックス標準品：純度 99.9% (林純薬工業製)

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

メタノール：LC-MS 用 (和光純薬工業製)

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

酢酸アンモニウム：試薬特級 (和光純薬工業製)

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

3. 装置及び機器

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 R-45 及びロボクーブ BLIXER-5Plus
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. 高速液体クロマトグラフ

カラム：	SunFire C18, 3.5 μ m (ウォータース製) 内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3.5 μ m
溶離液：	メタノール／5 mmol/L 酢酸アンモニウム (90:10, v/v)
流速：	0.2 mL/min
カラム温度：	40°C
試料注入量：	10 μ L
保持時間：	約 7.6 min

4.2. 質量分析計

イオン化法：	エレクトロスプレー イオン化法 (ESI) 正モード
コーンガス流量：	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：	10 V
コリジョン電圧：	20 V (コリジョンガス; Ar)
イオン検出法：	MRM
モニタリングイオン：	プリカーサーイオン m/z 394.3 プロダクトイオン m/z 177.2

5. 検量線の作成

エトフェンプロックスの標準品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。この標準原液をメタノールで希釈して0.00025, 0.0005, 0.0025, 0.005及び0.01 mg/Lの標準溶液を調製した。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、データ処理装置を用いてエトフェンプロックスのピーク面積を測定し、横軸に重量(ng), 縦軸にピーク面積をとって検量線を作成した。

6. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料の重量を量った後、各々を縦に8分割し、それぞれの対角の2つを取り合わせた(4組作製)。その2組を果実分析用試料とし、残りの2組を果肉分析用試料とした。2組の果実分析用試料のうち、1組の全量をミキサーで均一化した(残りの1組は添加剤が必要なアラニカルブ分析用試料とした)。2組の果肉分析用試料は、果肉と果皮に分けた。その1組の全量をミキサーで均一化した(残りの1組は添加剤が必要なアラニカルブ分析用試料とした)。

量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比(%)を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した果肉試料又は果実試料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。

6.1.3. C₁₈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。前項の抽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た。さらにアセトニトリル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/トルエン(75:25, v/v)混液30 mLを流下し、溶出液を取り、40°C以下の水浴中で減圧濃縮し、最後は窒素気流下で溶媒を留去した。

6.1.4. 定量

残留物をメタノール4 mLに溶解し、必要に応じてメタノールで希釈した。この溶液の10 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、検量線よりエトフェンプロックスの重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値(LOQ)及び検出限界値(LOD)*

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μ L)	定量限界 (ppm)
0.005	0.2	4	10	0.01

最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μ L)	検出限界 (ppm)
0.0025	0.2	4	10	0.005

*果肉、果実はいずれも同じ値

6.3. 回収率

分析法確認のため、高知試料の果肉無処理試料*及び宮崎試料の果実無処理試料**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24年度 農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業の試料を使用

**平成24年度 生産資材安全確保推進事業の試料を使用

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	5	97, 96,	97, 95	97,	96	0.9
高知	0.25	99, 96,	97, 96	97,	97	1.3
高知	0.01	101, 96,	99, 96	97,	98	2.2

6.3.2. 果実の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
宮崎	5	99, 97,	98, 96	98,	98	1.2
宮崎	0.25	95, 94,	95, 93	95,	94	1.0
宮崎	0.01	111, 101,	105, 95	102,	103	5.7

7. 精度管理

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

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

クォリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

また、2012年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/ 9/ 6	茨城	93	<0.01
2013/ 9/10	高知	91	<0.01
2013/ 9/ 4	宮崎	98	<0.01
2013/10/ 2	宮崎	94	<0.01

7.1.2.果実

分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
2013/ 9/ 6	茨城	92	<0.01
2013/ 9/10	高知	91	<0.01
2013/ 9/ 4	宮崎	96	<0.01
2013/10/ 2	宮崎	95	<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. 果肉

試料	マトリックス効果 (%)
茨城	104
高知	105
宮崎	102

8.2. 果実

試料	マトリックス効果 (%)
茨城	109
高知	101
宮崎	100

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料にエトフェンプロックスを添加し、 -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

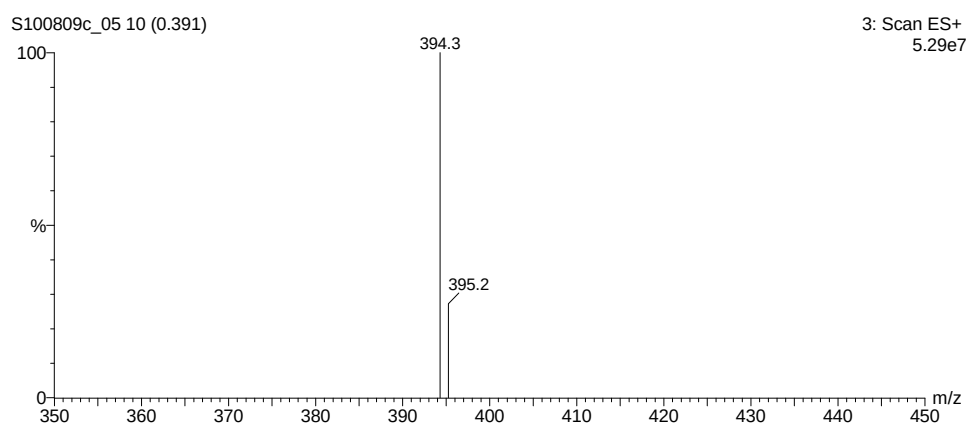
添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	71 (2013/7/23-10/2)	93,	89	91
0.5	高知	57 (2013/8/6-10/2)	94,	93	94
0.5	宮崎	86 (2013/7/8-10/2)	81,	81	81

9.2.果実の保存安定性試験結果

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	71 (2013/7/23-10/2)	92,	90	91
0.5	高知	57 (2013/8/6-10/2)	96,	92	94
0.5	宮崎	86 (2013/7/8-10/2)	94,	93	94

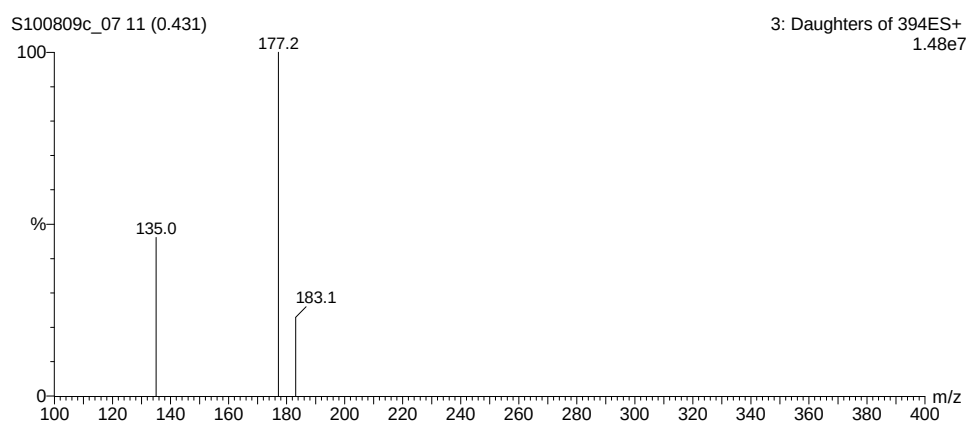
付図-1. マススペクトル

エトフェンプロックスのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)



エトフェンプロックス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 ; $m/z=394.3$, 正モード)

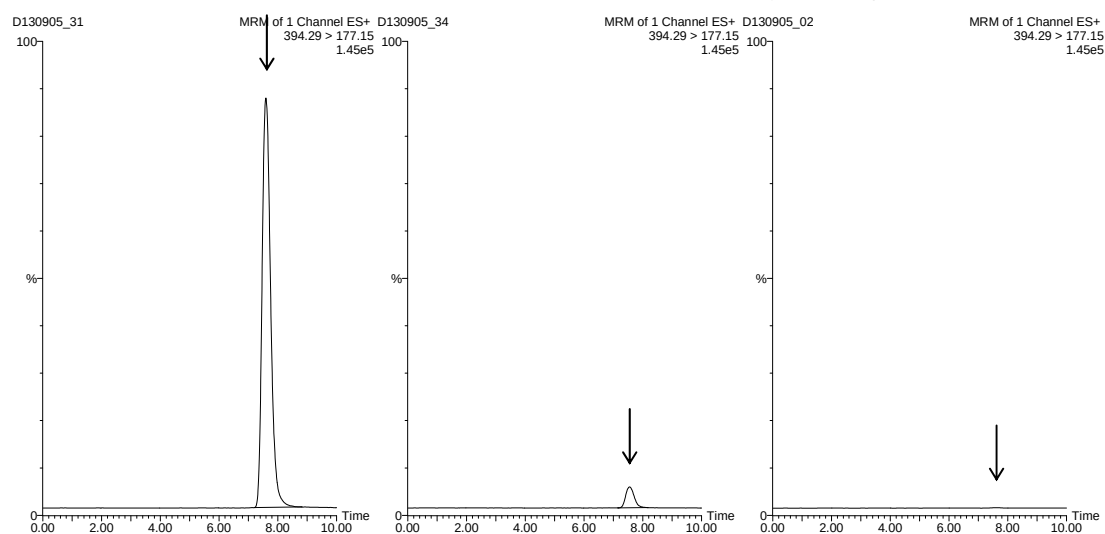


付図-2. 果肉のクロマトグラム (代表例)

標準品 0.1 ng

標準品 0.005 ng

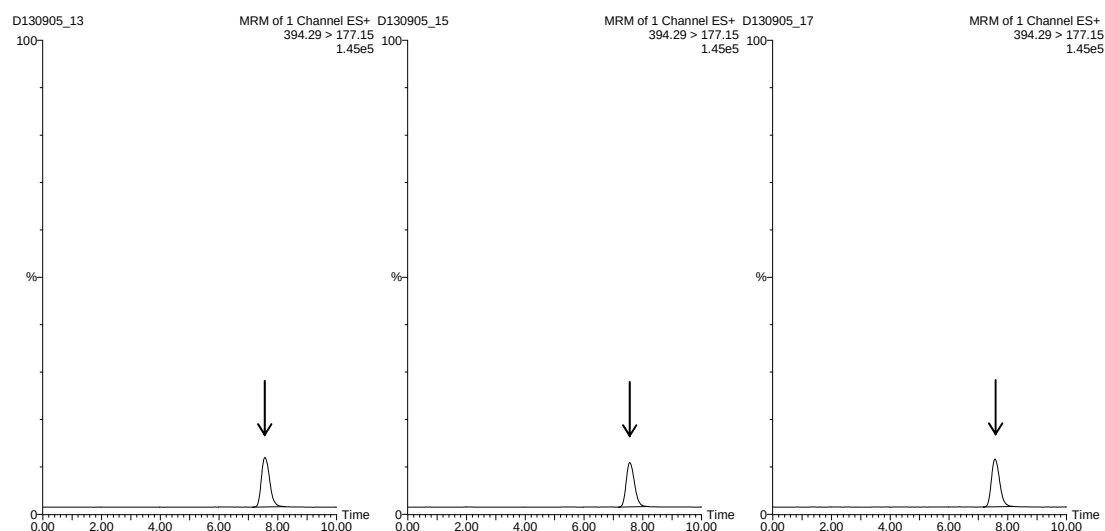
宮崎 無処理
10 μ L/4 mL/0.2 g



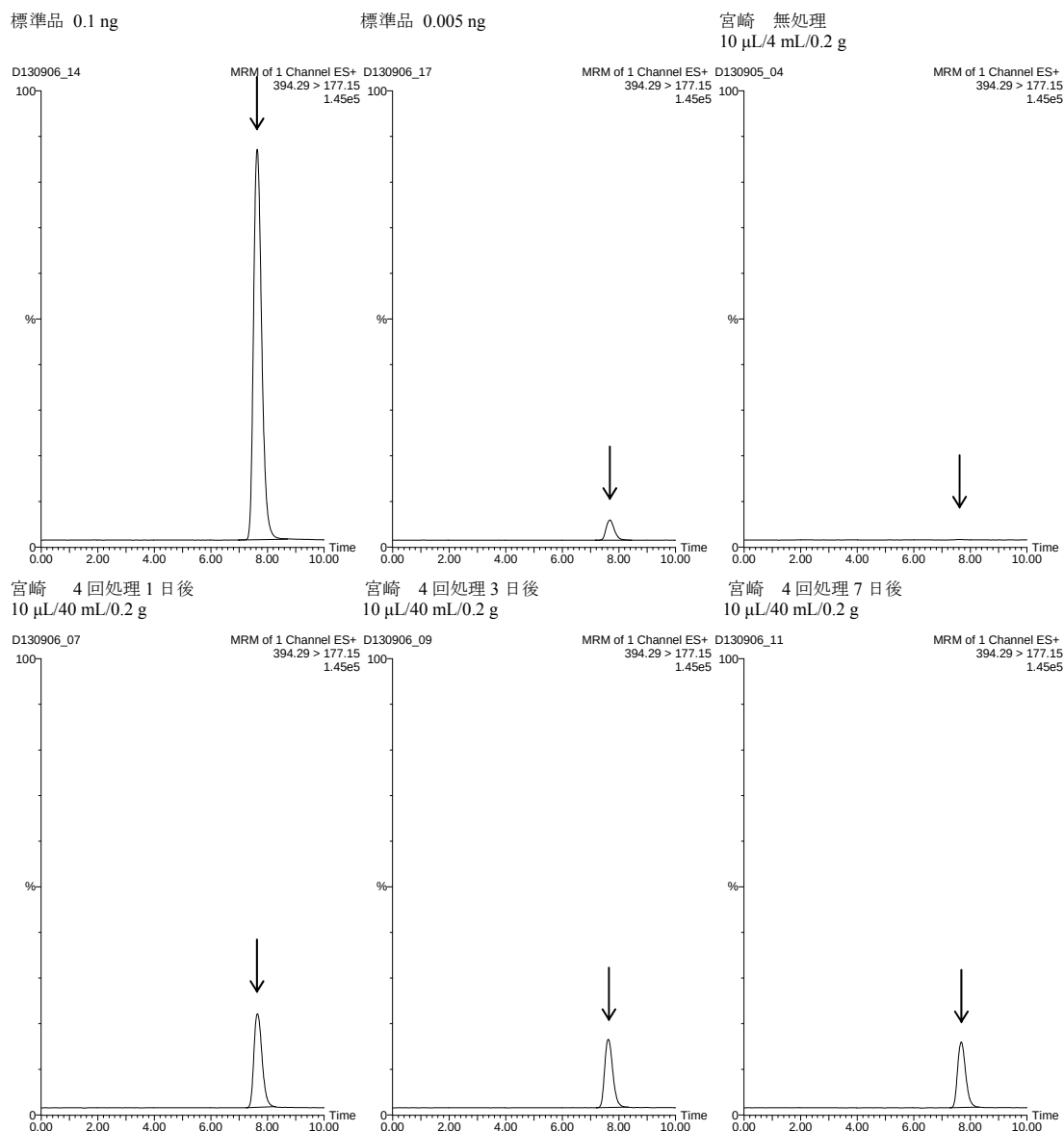
宮崎 4 回処理 1 日後
10 μ L/4 mL/0.2 g

宮崎 4 回処理 3 日後
10 μ L/4 mL/0.2 g

宮崎 4 回処理 7 日後
10 μ L/4 mL/0.2 g



付図-3. 果実のクロマトグラム (代表例)



農薬登録における作物のグループ化・残留分析詳細③

シハロトリン

1. 分析対象物質

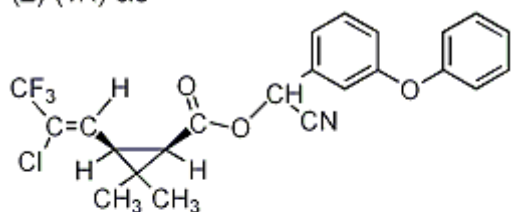
シハロトリン

化学名： (RS)- α -cyano-3-phenoxybenzyl (Z)-(1RS,3RS)-3-(2-chloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate

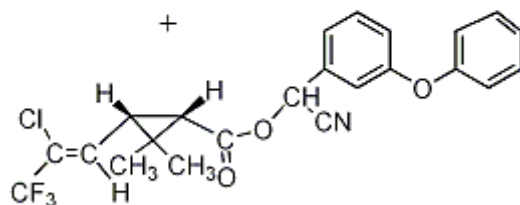
分子式： $C_{23}H_{19}ClF_3NO_3$

分子量： 449.9

構造式： (Z)-(1R)-cis-



+



(Z)-(1S)-cis-

性 状： 黄褐色粘性油状液体

蒸気圧： 0.0012 mPa (20°C)

分配係数： $\log P_{OW} = 6.9$ (20°C)

溶解性： 水 0.0042 mg/L (pH=5, 20°C)

アセトン, ジクロロメタン, メタノール, ジエチルエーテル,
酢酸エチル, ヘキサン, トルエン > 500 g/L (20°C)

安定性： 暗所, 50°Cで4年間安定

275°Cで分解

光に対して安定

pH=7~9で緩やかに, pH=9以上で速やかに分解

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

2. 標準品及び試薬

シハロトリン標準品：純度 99.7% (和光純薬工業製)

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

メタノール：LC-MS 用 (和光純薬工業製)

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

ギ酸アンモニウム：試薬特級 (和光純薬工業製)

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

3. 装置及び機器

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 R-45
及びロボクーブ BLIXER-5Plus

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. 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 µm

溶離液：メタノール / 5 mmol/L ギ酸アンモニウム

60:40 (1 min) – (4 min) – 90:10 – (2 min) – 95:5 (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：約 6.5 min

4.2. 質量分析計

イオン化法：	エレクトロスプレー イオン化法 (ESI)
	正モード
乾燥ガス温度：	300°C
乾燥ガス流量：	6 L/min
ネブライザー圧力：	60 psi
シースガス温度：	250°C
シースガス流量：	12 L/min
イオン導入電圧：	5000 V
フラグメンター電圧：	100 V
コリジョン電圧：	10 V
	(コリジョンガス; N ₂)
イオン検出法：	MRM
モニタリングイオン：	プリカーサーイオン m/z 467.0
	プロダクトイオン m/z 224.9

5. 検量線の作成

シハロトリンの標準品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。この標準原液をメタノール／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の標準溶液を調製した。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、データ処理装置を用いてシハロ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

受領した試料の重量を量った後、各々を縦に8分割し、それぞれの対角の2つを取り合わせた（4組作製）。その2組を果実分析用試料とし、残りの2組を果肉分析用試料とした。2組の果実分析用試料のうち、1組の全量をミキサーで均一化した（残りの1組は添加剤が必要なアラニカルブ分析用試料とした）。2組の果肉分析用試料は、果肉と果皮に分けた。その1組の全量をミキサーで均一化した（残りの1組は添加剤が必要なアラニカルブ分析用試料とした）。

量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比（%）を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した果肉試料又は果実試料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。

6.1.3. 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。前項の抽出液に水5 mLを加えて混和した後、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。さらにアセトン／水（60:40, v/v）混液5 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吸引乾燥した後、アセトニトリル／トルエン（75:25, 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

残留物をメタノール／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、検量線よりシハロ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) *

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (µL)	定量限界 (ppm)
0.001	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)
0.0005	0.2	10	5	0.005

* 果肉、果実はいずれも同じ値

6.3. 回収率

分析法確認のため、高知試料の果肉無処理試料*及び宮崎試料の果実無処理試料**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24年度 農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業の試料を使用

**平成24年度 生産資材安全確保推進事業の試料を使用

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	5	102, 99,	100, 88	100,	98	5.7
高知	0.25	100, 93,	97, 93	94,	95	3.2
高知	0.01	96, 89,	95, 82	91,	91	6.1

6.3.2. 果実の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
宮崎	5	99, 96,	99, 95	98,	97	1.9
宮崎	0.25	97, 91,	94, 86	91,	92	4.4
宮崎	0.01	103, 97,	101, 90	98,	98	5.1

7. 精度管理

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

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

クォリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

また、2012年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)
2013/9/19	茨城	99	<0.01
2013/9/20	高知	99	<0.01
2013/9/18	宮崎	95	<0.01
2013/10/2	宮崎	103	<0.01

7.1.2.果実

分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
2013/9/19	茨城	93	<0.01
2013/9/20	高知	101	<0.01
2013/9/18	宮崎	94	<0.01
2013/10/2	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、0.002 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. 果肉

試料	マトリックス効果 (%)
茨城	88
高知	100
宮崎	91

8.2. 果実

試料	マトリックス効果 (%)
茨城	96
高知	105
宮崎	96

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料にシハロトリンを添加し、 -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

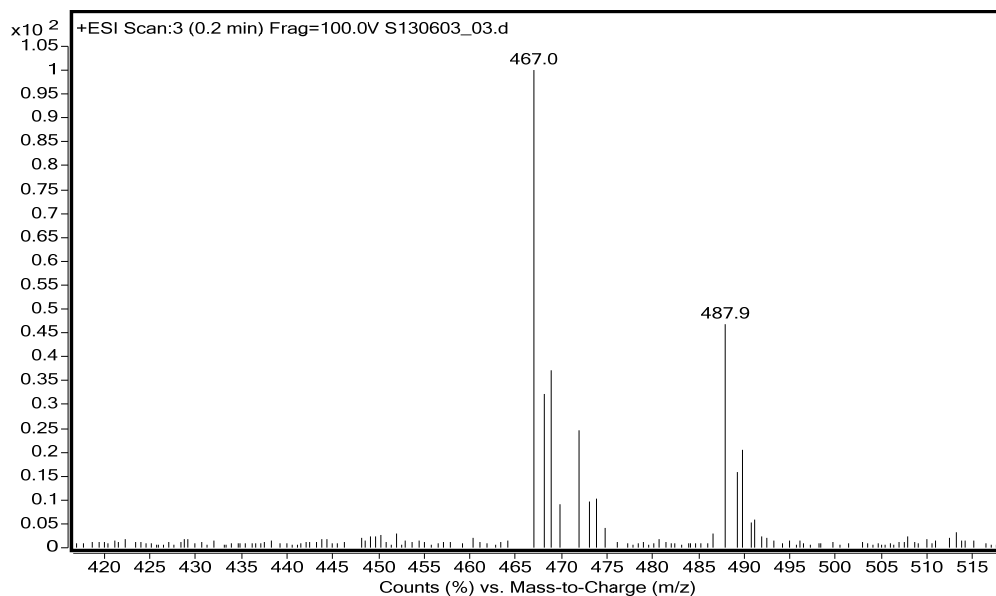
添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	71 (2013/7/23-10/2)	88,	87	88
0.5	高知	57 (2013/8/6-10/2)	95,	93	94
0.5	宮崎	86 (2013/7/8-10/2)	84,	72	78

9.2. 果実の保存安定性試験結果

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	71 (2013/7/23-10/2)	94,	71	82
0.5	高知	57 (2013/8/6-10/2)	96,	92	94
0.5	宮崎	86 (2013/7/8-10/2)	88,	74	81

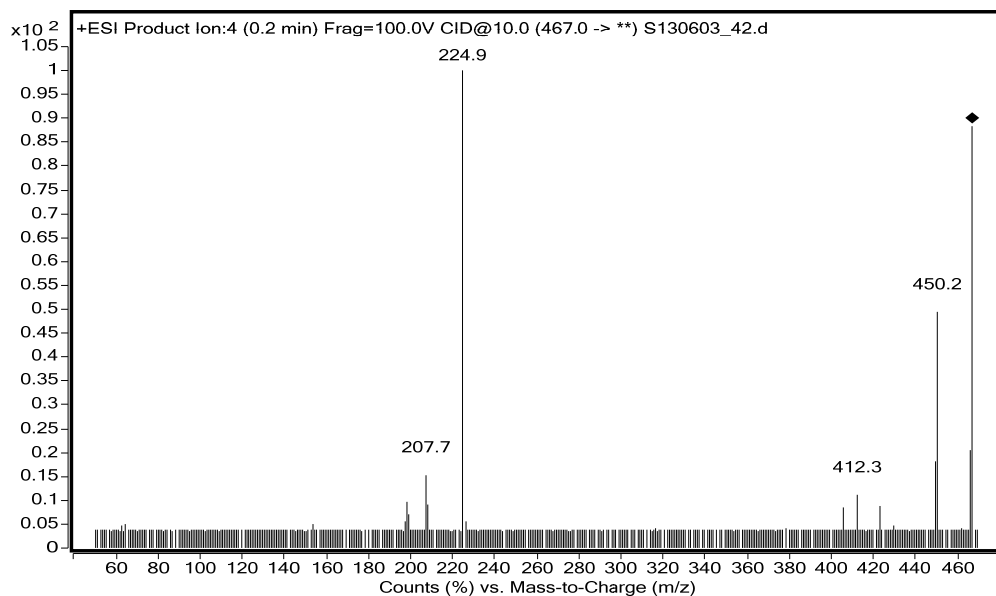
付図-1. マススペクトル

シハロトリンのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)

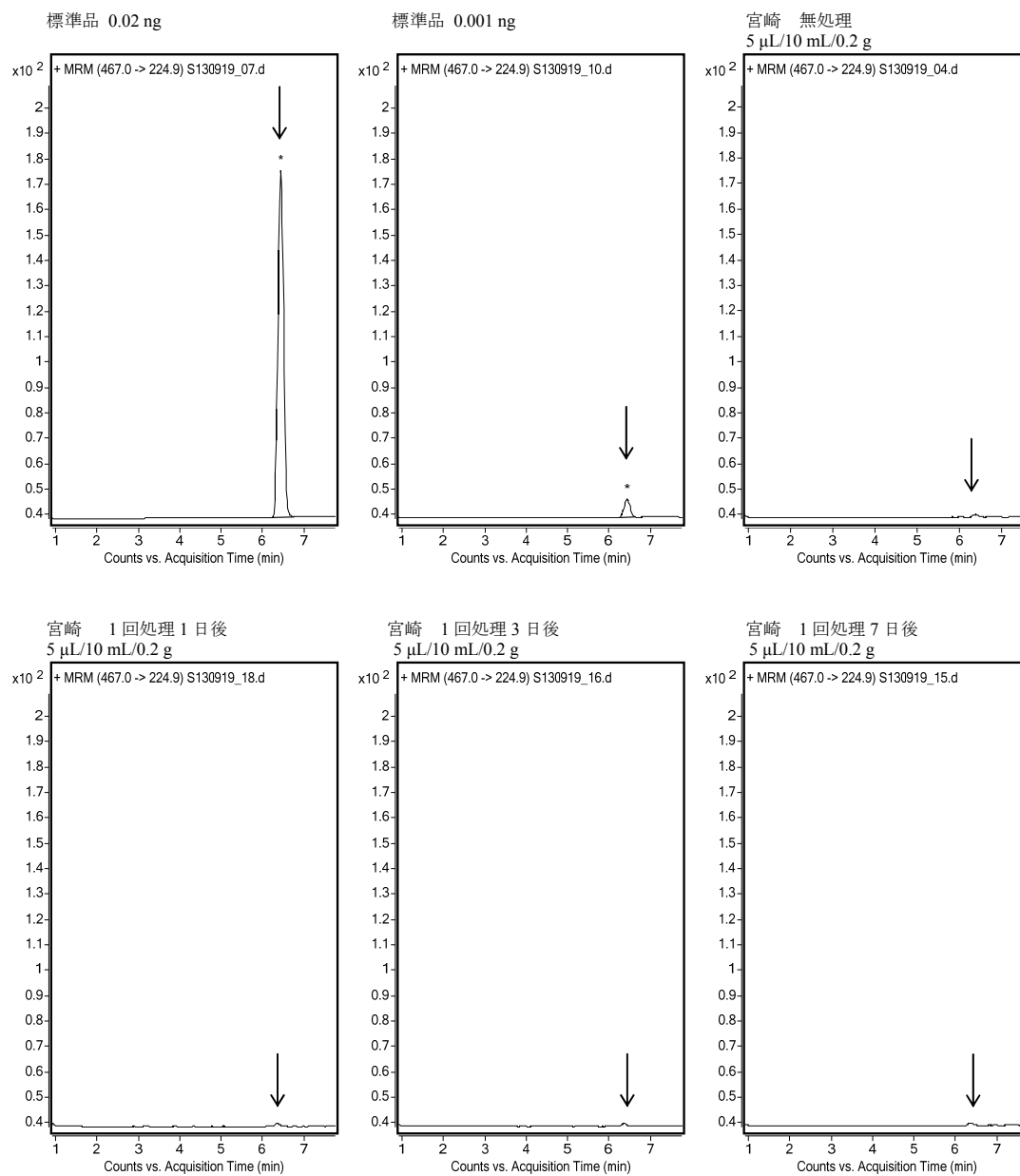


シハロトリンのプロダクトスキャンスペクトルの一例

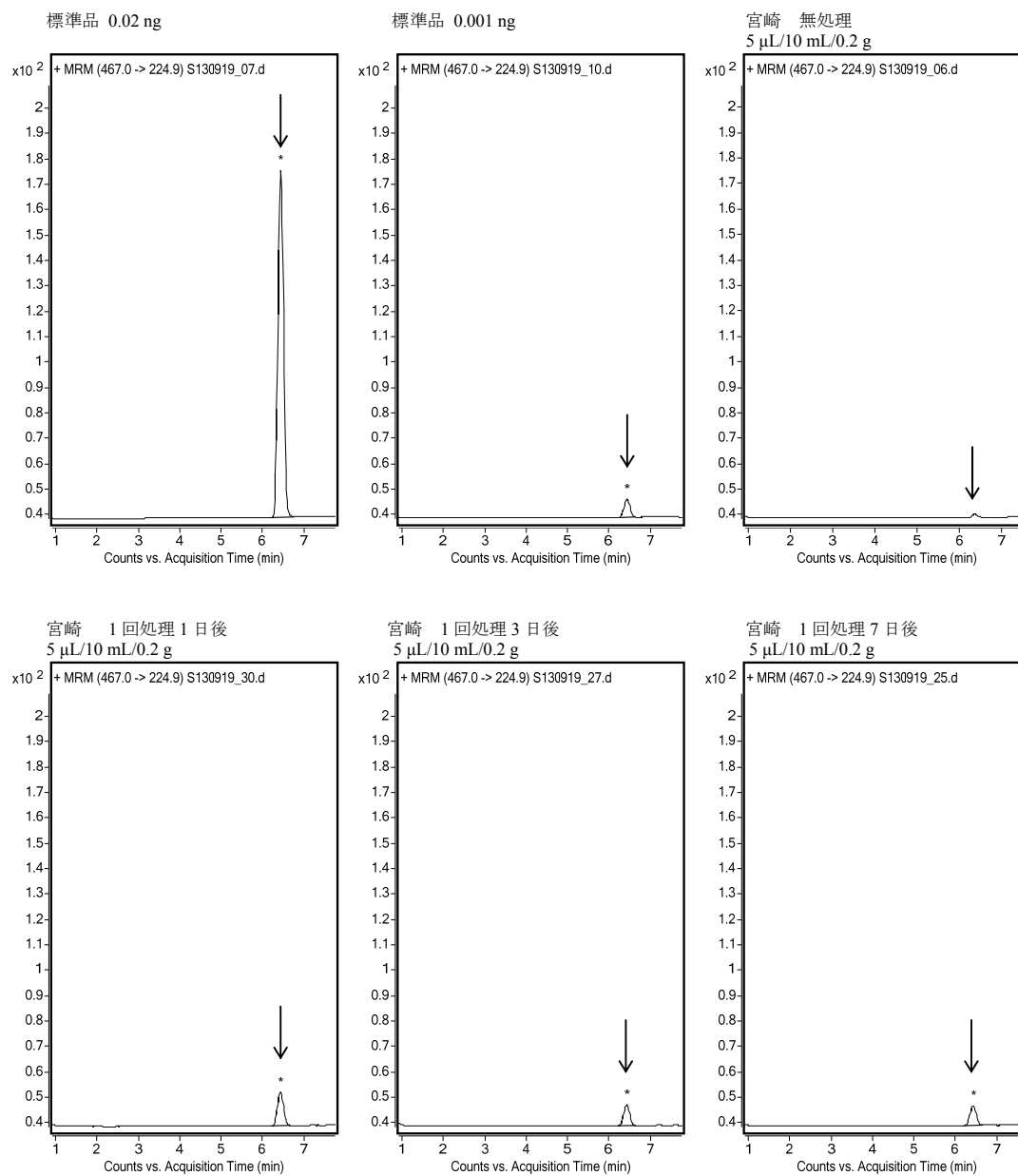
(プリカーサーイオン ; m/z=467.0, 正モード)



付図-2. 果肉のクロマトグラム (代表例)



付図-3. 果実のクロマトグラム (代表例)



農薬登録における作物のグループ化・残留分析詳細④

レピメクチン

1. 分析対象物質

レピメクチン (レピメクチンA3とレピメクチンA4の混合物)

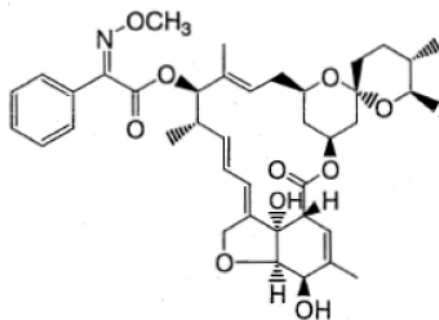
レピメクチンA3

化学名： (10*E*, 14*E*, 16*E*, 22*Z*)-(1*R*, 4*S*, 5' *S*, 6*R*, 6' *R*, 8*R*, 12*R*, 13*S*, 20*R*, 21*R*, 24*S*)-21, 24-ジヒドロキシ-12-[(2*Z*)-2-メトキシイミノ-2-フェニルアセトキシ]-5', 6', 11, 13, 22-ヘンタメチル-3, 7, 19-トリオキサテトラシクロ[15. 6. 1. 1^{4,8}. 0^{20,24}]ヘンタコサ-10, 14, 16, 22-テトラエン-6-スビロ-2'-テトラヒドロピラン-2-オン

分子式： C₄₀H₅₁NO₁₀

分子量： 705.8

構造式：



性 状： 白色固体

融 点： 153.8～155.5℃

分配係数： log P_{OW} = 6.5

溶解性： 水 103.47 ppb

安定性： 光に不安定

出 典：レピメクチン剤残留分析法 (かぶ一葉) 報告書 (作22P-9-197)

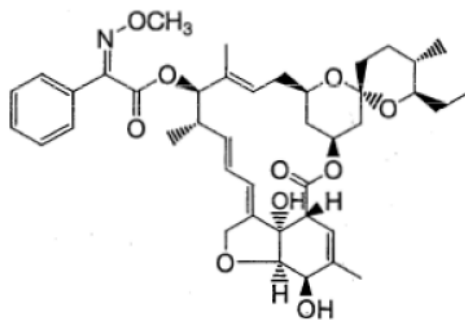
レピメクチンA4

化学名： (10*E*, 14*E*, 16*E*, 22*Z*)-(1*R*, 4*S*, 5' *S*, 6*R*, 6' *R*, 8*R*, 12*R*, 13*S*, 20*R*, 21*R*, 24*S*)-6'-エチル-21, 24-ジヒドロキシ-12-[(2*Z*)-2-メトキシイミノ-2-フェニルアセトキシ]-5', 11, 13, 22-テトラメチル-3, 7, 19-トリオキサテトラシクロ[15. 6. 1. 1^{4,8}. 0^{20,24}]ヘンタコサ-10, 14, 16, 22-テトラエン-6-スヒドロ-2'-テトラヒドロピラン-2-オン

分子式： C₄₁H₅₃NO₁₀

分子量： 719.9

構造式：



性 状： 白色固体

融 点： 152.3～154.0°C

分配係数： log P_{OW} = 7.0

溶解性： 水 46.79 ppb

安定性： 光に不安定

出 典：レピメクチン剤残留分析法 (かぶー葉) 報告書 (作22P-9-197)

2. 標準品及び試薬

レピメクチン標準品：純度 99.5% (関東化学製)

アセトニトリル, アセトン, トルエン, メタノール

: 残留農薬試験用 (和光純薬工業製)

アセトニトリル: HPLC 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

リン酸: 試薬特級 (和光純薬工業製)

トリエチルアミン, トリフルオロ酢酸無水物: 和光特級 (和光純薬工業製)

リン酸二水素ナトリウム二水和物: 特級 (関東化学製)

10 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH=2.6): リン酸二水素ナトリウム二水和物 0.78 g 及びリン酸 0.34 mL を水に溶かして 1 L としたもの

恒温振とう機: NTS-220 (東京理化工機製), ML-10F (タイテック製)

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

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

3. 装置及び機器

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 R-45 及びロボクーブ BLIXER-5Plus
高速液体クロマトグラフ（蛍光検出器）：	アジレント 1100 HPLC
データ処理装置：	アジレント Chemstation

4. 高速液体クロマトグラフの操作条件

カラム：	Inertsil ODS-3（ジーエルサイエンス製） 内径 4.6 mm，長さ 150 mm，粒径 5 μ m
溶離液：	アセトニトリル／10 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (92:8, v/v)
流速：	1 mL/min
測定波長：	蛍光波長；460 nm，励起波長；368 nm
カラム温度：	40°C
試料注入量：	10 μ L
保持時間：	レピメクチン A3 約 11.0～12.3 min レピメクチン A4 約 13.1～14.8 min

5. 検量線の作成

レピメクチンの標準品25.1 mg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500 mg/L標準原液を調製した。この標準原液をアセトニトリルで希釈して40 mg/Lアセトニトリル溶液を調製した。この40 mg/Lアセトニトリル溶液 1 mLを分取し，40°C以下の水浴中で減圧濃縮し，最後は窒素気流下で溶媒を留去した。残留物にトルエン1 mL，トリエチルアミン0.05 mL及びトリフルオロ酢酸無水物0.1 mLを添加後，密栓して恒温振とう機（設定温度40°C）で30分間振とうし，レピメクチンA3及びレピメクチンA4を蛍光誘導体化した。反応後，40°C以下の水浴中で減圧濃縮し，最後は窒素気流下で溶媒を留去した。残留物をアセトニトリルに溶解して2 mg/Lの標準溶液を調製した。この2 mg/L標準溶液をアセトニトリルで希釈して0.005，0.01，0.05，0.1及び0.2 mg/Lの標準溶液を調製した。この溶液の10 μ Lを前記条件の高速液体クロマトグラフに注入し，データ処理装置を用いてレピメクチンA3及びレピメクチンA4の各ピーク面積を測定し，横軸に重量（ng），縦軸に各ピーク面積の含量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

受領した試料の重量を量った後、各々を縦に8分割し、それぞれの対角の2つを取り合わせた（4組作製）。その2組を果実分析用試料とし、残りの2組を果肉分析用試料とした。2組の果実分析用試料のうち、1組の全量をミキサーで均一化した（残りの1組は添加剤が必要なアラニカルブ分析用試料とした）。2組の果肉分析用試料は、果肉と果皮に分けた。その1組の全量をミキサーで均一化した（残りの1組は添加剤が必要なアラニカルブ分析用試料とした）。

量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比（%）を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した果肉試料又は果実試料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、40°C以下の水浴中で減圧濃縮し、アセトンを留去した。

6.1.3. 精製

6.1.3.1. C₁₈ミニカラム精製

C₁₈ミニカラムにメタノール5 mL及び水5 mLを流下し前処理した。濃縮にメタノール／水（50:50, v/v）混液5 mLを添加し、前処理したC₁₈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、メタノール10 mLを流下し、溶出液を分取した。

6.1.3.2. グラファイトカーボンミニカラム精製

グラファイトカーボンミニカラムにメタノール5 mLを流下し前処理した。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た。さらにメタノール5 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／トルエン（75:25, v/v）混液20 mLを流下し、溶出液を取り、40°C以下の水浴中で減圧濃縮し、最後は窒素気流下で溶媒を留去した。

6.1.3.3. 蛍光誘導体化

残留物にトルエン1 mL、トリエチルアミン0.05 mL及びトリフルオロ酢酸無水物0.1 mLを添加後、密栓して恒温振とう機（設定温度40°C）で30分間振とうし、レピメクチンA3及びレピメクチンA4を蛍光誘導化した。放冷後、40°C以下の水浴中で減圧濃縮し、最後は窒素気流下で溶媒を留去した。

6.1.4. 定量

残留物をアセトニトリル2 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を前記条件の高速液体クロマトグラフに注入してレピメクチンA3及びレピメクチンA4の各ピーク面積の含量を求め，検量線よりレピメクチンの重量を求め，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)
0.1	2	2	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)
0.05	2	2	10	0.005

*果肉，果実はいずれも同じ値

6.3. 回収率

分析法確認のため、高知試料の果肉無処理試料*及び宮崎試料の果実無処理試料**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24年度 農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業の試料を使用

**平成24年度 生産資材安全確保推進事業の試料を使用

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	5	83, 81,	81, 72	81,	80	5.4
高知	0.25	81, 75,	79, 72	76,	77	4.6
高知	0.01	85, 81,	82, 78	81,	81	3.1

6.3.2. 果実の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
宮崎	5	94, 89,	91, 87	90,	90	2.9
宮崎	0.25	87, 81,	86, 77	82,	83	4.9
宮崎	0.01	93, 84,	90, 81	87,	87	5.5

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、2012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)
2013/9/ 6	茨城	70	<0.01
2013/9/10	高知	73	<0.01
2013/9/ 4	宮崎	90	<0.01
2013/9/17	宮崎	86	<0.01

7.1.2.果実

分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
2013/9/ 6	茨城	74	<0.01
2013/9/10	高知	81	<0.01
2013/9/ 4	宮崎	86	<0.01
2013/9/17	宮崎	84	<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、0.1 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. 果肉

試料	マトリックス効果 (%)
茨城	103
高知	108
宮崎	103

8.2. 果実

試料	マトリックス効果 (%)
茨城	103
高知	104
宮崎	103

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料にレピメクチンを添加し、 -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

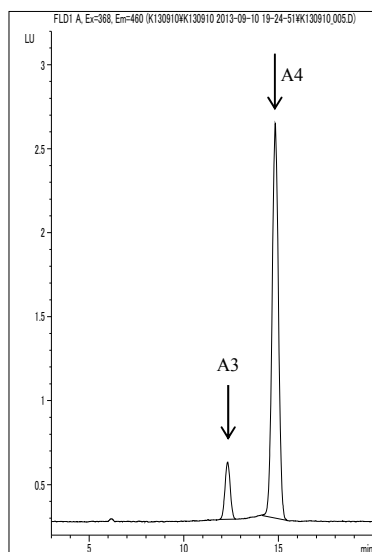
添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	56 (2013/7/23-9/17)	82,	80	81
0.5	高知	42 (2013/8/6-9/17)	86,	79	82
0.5	宮崎	71 (2013/7/8-9/17)	73,	70	72

9.2. 果実の保存安定性試験結果

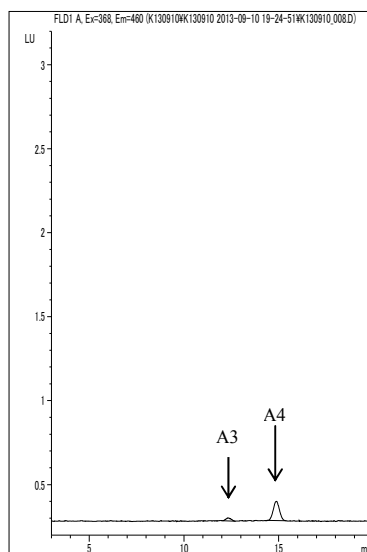
添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	56 (2013/7/23-9/17)	78,	78	78
0.5	高知	42 (2013/8/6-9/17)	81,	79	80
0.5	宮崎	71 (2013/7/8-9/17)	82,	76	79

付図-1. 果肉のクロマトグラム (代表例)

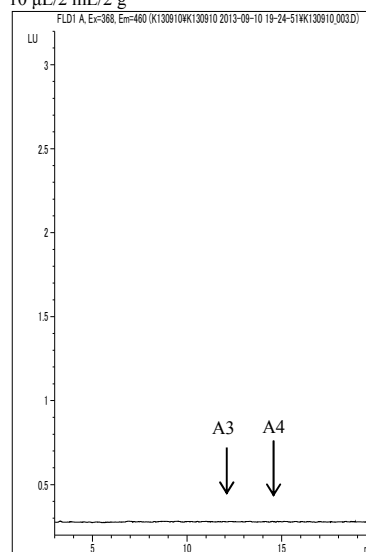
標準品 2 ng



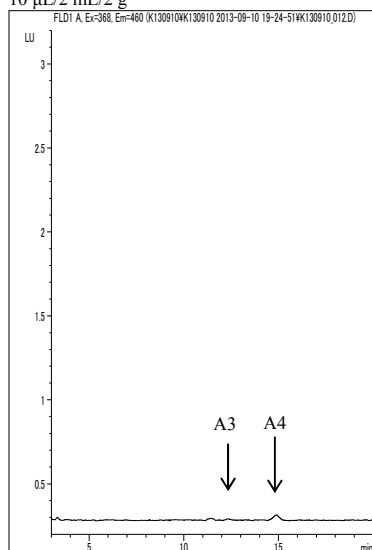
標準品 0.1 ng



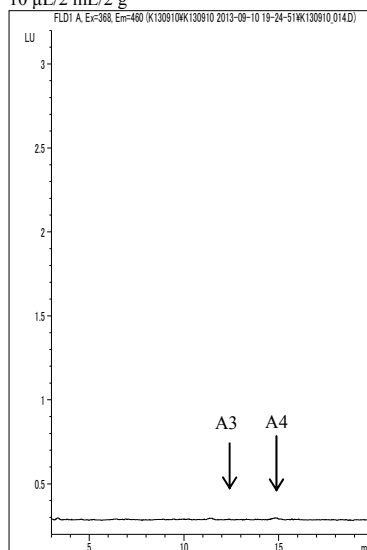
宮崎 無処理
10 μ L/2 mL/2 g



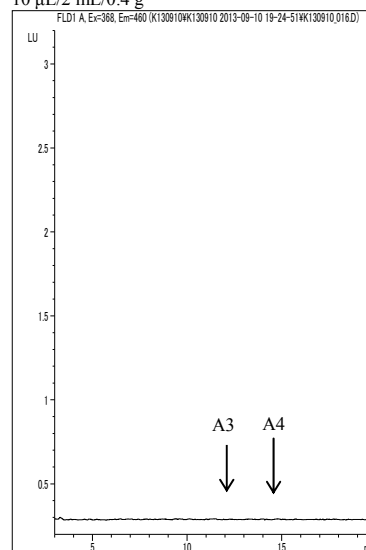
宮崎 4回処理 1日後
10 μ L/2 mL/2 g



宮崎 4回処理 3日後
10 μ L/2 mL/2 g

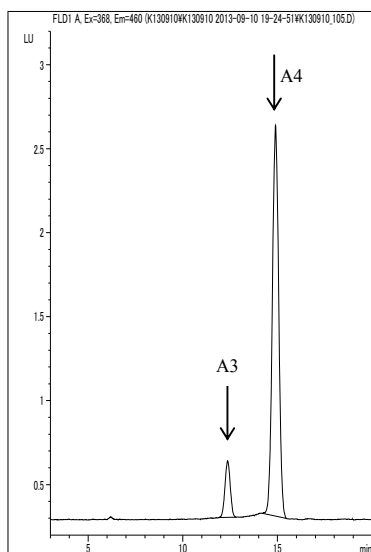


宮崎 4回処理 7日後
10 μ L/2 mL/0.4 g

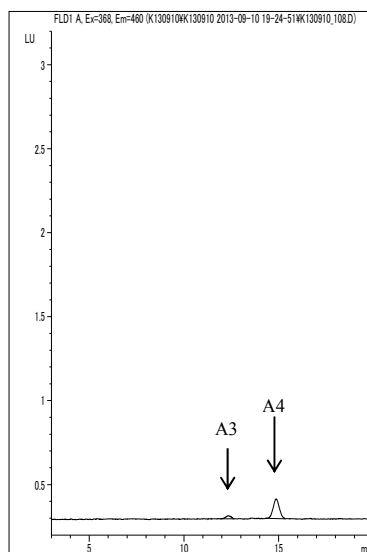


付図-2. 果実のクロマトグラム (代表例)

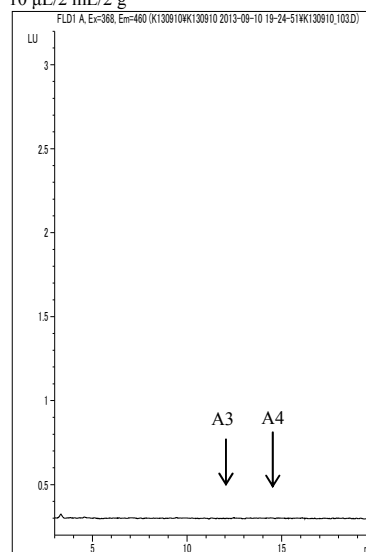
標準品 2 ng



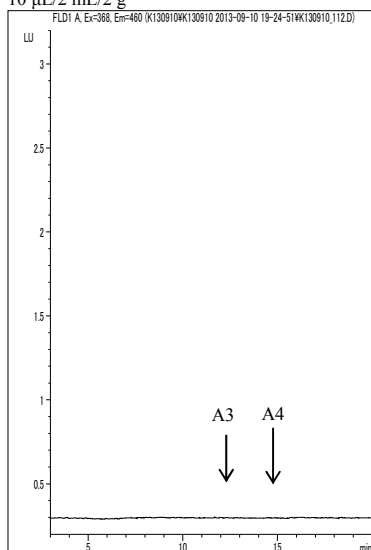
標準品 0.1 ng



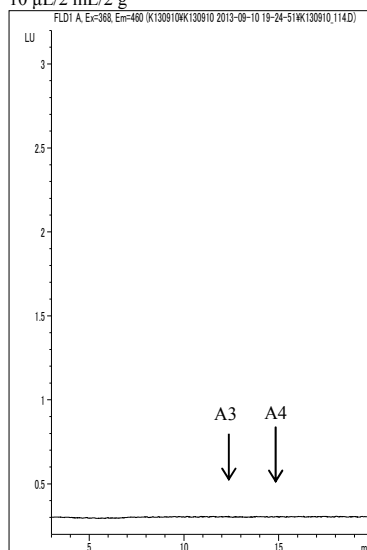
宮崎 無処理
10 μ L/2 mL/2 g



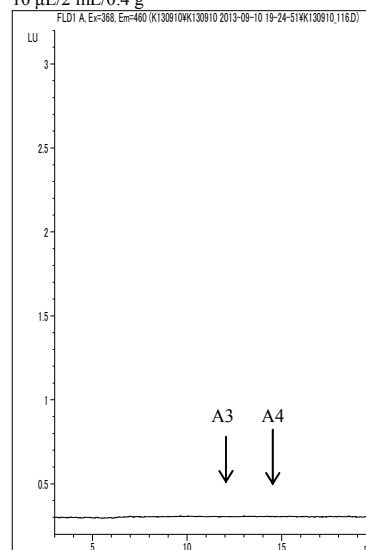
宮崎 4回処理 1日後
10 μ L/2 mL/2 g



宮崎 4回処理 3日後
10 μ L/2 mL/2 g



宮崎 4回処理 7日後
10 μ L/2 mL/0.4 g



農薬登録における作物のグループ化・残留分析詳細⑤
アラニカルブ

1. 分析対象物質

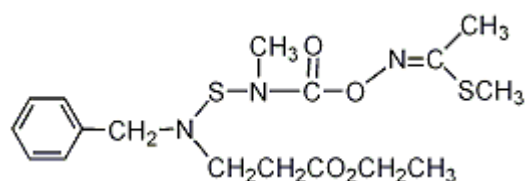
アラニカルブ

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

分子式： $C_{17}H_{25}N_3O_4S_2$

分子量： 399.5

構造式：



性 状： 薄黄色結晶

融 点： 46.6～47.0℃

蒸気圧： <0.0047 mPa (20℃)

分配係数： $\log P_{ow} = 3.57 \pm 0.06$

溶解性： 水 27.7 mg/L (20℃)

トルエン，ジクロロメタン，メタノール，アセトン，酢酸エチル；
95%以上溶解

安定性： 100℃まで安定；54℃，30日間で0.2～1.0%程度分解

中性及び弱塩基性条件下で安定，酸性及び強塩基性条件下で不安定，
光分解半減期；6時間（ガラス板上で太陽光照射）

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

2. 標準品及び試薬

アラニカルブ標準品：純度 99.9% (和光純薬工業製)

アセトニトリル, 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)

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

リン酸二水素カリウム：試薬特級 (和光純薬工業製)

炭酸水素ナトリウム：試薬特級 (和光純薬工業製)

水酸化ナトリウム：試薬特級 (和光純薬工業製)

0.2 mol/L リン酸緩衝液 (pH=8)：第 1 液 250 mL に第 2 液 231 mL を混和し、水を加えて 1000 mL としたもの

(第 1 液；リン酸二水素カリウム 13.61 g を水に溶かし、500 mL としたもの)

(第 2 液；水酸化ナトリウム 4.0 g を水に溶かし、500 mL としたもの (用事調製))

酢酸アンモニウム：試薬特級 (和光純薬工業製)

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：ソルトン・ヨーロッパ ラッセルホブス 3901JP

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. 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：5 mmol/L 酢酸アンモニウム／アセトニトリル

65:35 (2 min)－(5 min)－5:95 (1 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：約 6.1 min

4.2. 質量分析計

イオン化法：	エレクトロスプレー イオン化法 (ESI)
	正モード
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：	50 V
コリジョン電圧：	5 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：	プリカーサーイオン m/z 400.0
	プロダクトイオン m/z 238.1

5. 検量線の作成

アラニカルブの標準品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。この標準原液をアセトニトリルで希釈して0.000005, 0.00001, 0.00005, 0.0001及び0.0002 mg/Lの標準溶液を調製した。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、データ処理装置を用いてアラニカルブ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

受領した試料の重量を量った後、各々を縦に8分割し、それぞれの対角の2つを取り合わせた (4組作製)。その2組を果実分析用試料とし、残りの2組を果肉分析用試料とした。2組の果実分析用試料のうち、1組をさらに2分割したのから対角の2つを取り合わせ、細切した。細切試料500 gに対して0.2 mol/Lリン酸緩衝液200 mL及び飽和炭酸水素ナトリウム溶液50 mLを加えてミキサーで均一化した。

2組の果肉分析用試料は、果肉と果皮に分けた。その1組をさらに2分割したのから対角の2つを取り合わせ、細切した。細切試料500 gに対して0.2 mol/Lリン酸緩衝液200 mL及び飽和炭酸水素ナトリウム50 mLを加えてミキサーで均一化した。

6.1.2. 抽出

均一化した果肉試料又は果実試料30 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、その0.5 mL (試料0.05 g相当量) を分取した。

6.1.3. 定量

分取した抽出液にアセトニトリルを加えて50 mLに定容し、必要に応じてアセトニトリルで希釈した。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、検量線よりアラニカルブの重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値(LOQ)及び検出限界値(LOD) *

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μ L)	定量限界 (ppm)
0.00005	0.05	50	5	0.01
最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μ L)	検出限界 (ppm)
0.000025	0.05	50	5	0.005

*果肉、果実はいずれも同じ値

6.3. 回収率

分析法確認のため、高知試料の果肉無処理試料*及び宮崎試料の果実無処理試料**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24年度 農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業の試料を使用

**平成24年度 生産資材安全確保推進事業の試料を使用

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	5	99, 94,	96, 92	94,	95	2.8
高知	0.25	100, 94,	98, 93	98,	97	3.1
高知	0.01	116, 100,	109, 96	101,	104	7.7

6.3.2. 果実の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
宮崎	5	91, 90,	91, 89	90,	90	0.9
宮崎	0.25	94, 88,	93, 86	91,	90	3.7
宮崎	0.01	98, 90,	94, 83	94,	92	6.2

7. 精度管理

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

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

クォリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

また、2012年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)
2013/7/24	茨城	97	<0.01
2013/7/26	茨城	101	<0.01
2013/7/30	茨城	99	<0.01
2013/8/ 7	高知	97	<0.01
2013/8/ 9	高知	99	<0.01
2013/8/13	高知	99	<0.01
2013/7/ 8	宮崎	101	<0.01
2013/7/10	宮崎	105	<0.01
2013/7/15	宮崎	102	<0.01

7.1.2.果実

分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
2013/7/24	茨城	94	<0.01
2013/7/26	茨城	100	<0.01
2013/7/30	茨城	97	<0.01
2013/8/ 7	高知	94	<0.01
2013/8/ 9	高知	97	<0.01
2013/8/13	高知	99	<0.01
2013/7/ 8	宮崎	98	<0.01
2013/7/10	宮崎	95	<0.01
2013/7/15	宮崎	92	<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°C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、0.0001 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. 果肉

試料	マトリックス効果 (%)
茨城	103
高知	103
宮崎	113

8.2. 果実

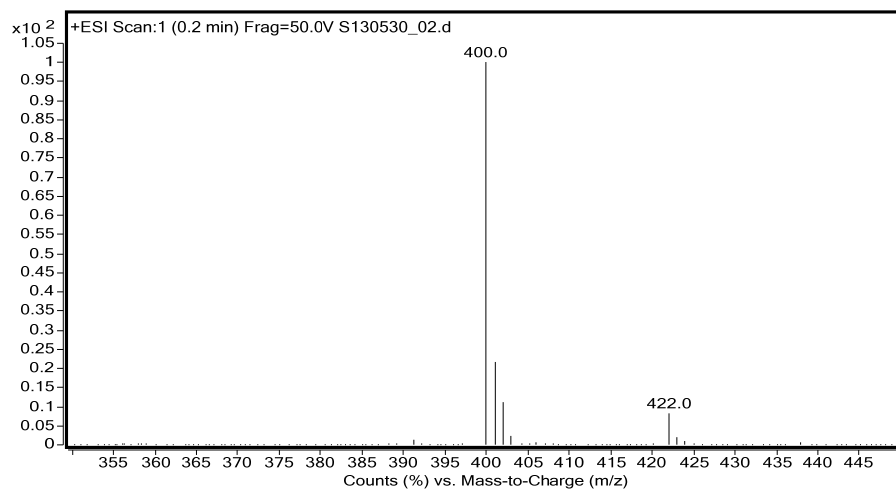
試料	マトリックス効果 (%)
茨城	101
高知	99
宮崎	101

9. 保存安定性試験

試料到着後、直ちに分析を実施したため、保存安定性試験を実施しなかった。

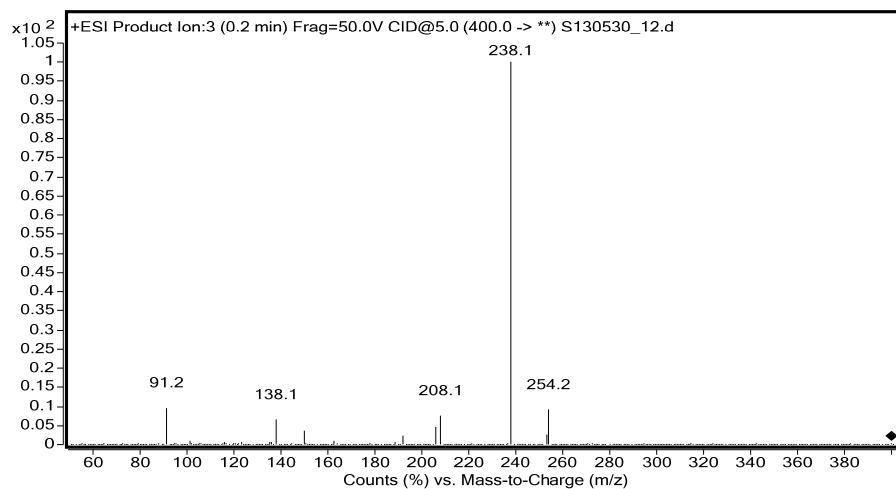
付図-1. マススペクトル

アラニカルブのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)

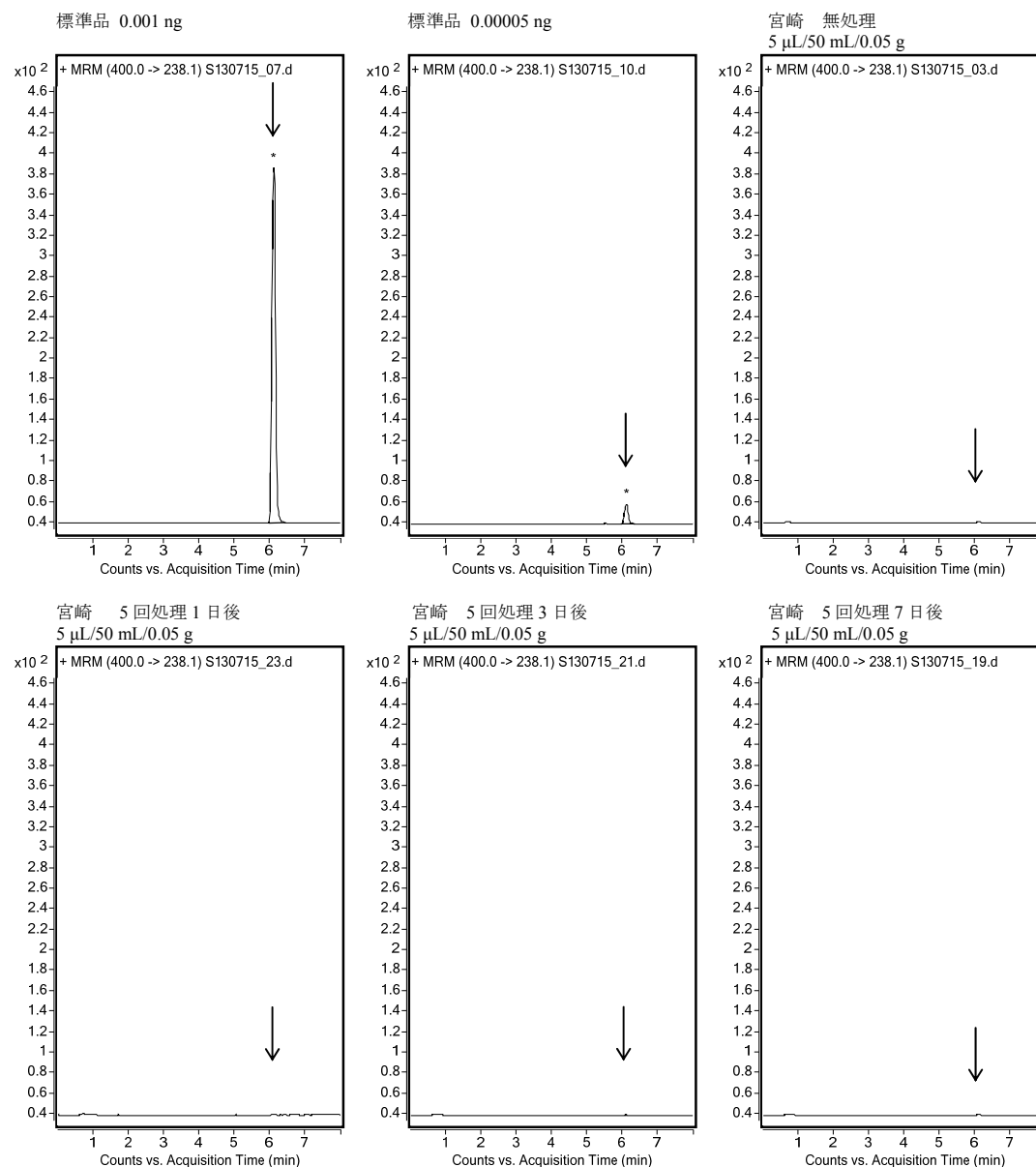


アラニカルブのプロダクトスキンスペクトルの一例

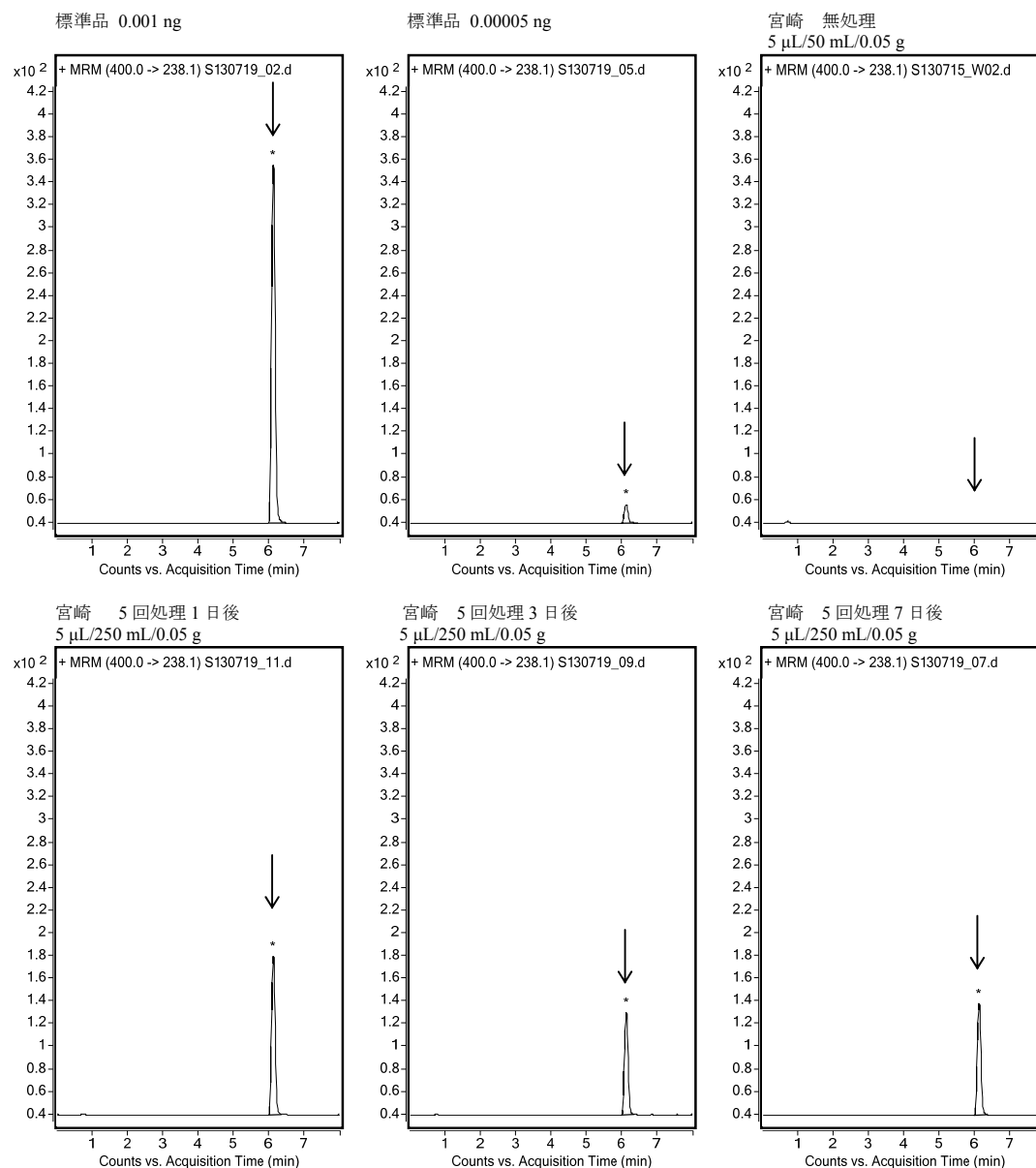
(プリカーサーイオン ; $m/z=400.0$, 正モード)



付図-2. 果肉のクロマトグラム (代表例)



付図-3. 果実のクロマトグラム (代表例)



農薬登録における作物のグループ化・残留分析詳細⑥
クレソキシムメチル

1. 分析対象物質

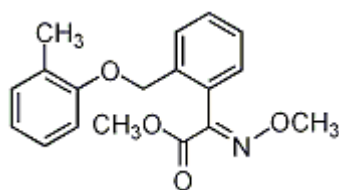
クレソキシムメチル

化学名： methyl (*E*)-methoxyimino[2-(*o*-tolylloxymethyl)phenyl]acetate

分子式： $C_{18}H_{19}NO_4$

分子量： 313.4

構造式：



性 状： 白色結晶

融 点： 101.6～102.5°C

蒸気圧： 2.3×10^{-3} mPa (20°C)

分配係数： $\log P_{OW} = 3.4$ (pH=7, 25°C)

溶解性： 水 2 mg/L (20°C)

ヘプタン 1.72, メタノール 14.9, アセトン 217, 酢酸エチル 123,
ジクロロメタン 939 (以上 g/L, 20°C)

安定性： 加水分解半減期；34日 (pH=7), 7時間 (pH=9),
pH=5で比較的安定

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

2. 標準品及び試薬

クレソキシムメチル標準品：純度 99.9% (和光純薬工業製)

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

メタノール：LC-MS 用 (和光純薬工業製)

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

ギ酸アンモニウム：試薬特級 (和光純薬工業製)

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

3. 装置及び機器

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 R-45 及びロボクーブ BLIXER-5Plus
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. 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／5 mmol/L ギ酸アンモニウム 60:40 (1 min)－(4 min)－90:10－(2 min)－95:5 (1 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：	約 4.7 min

4.2. 質量分析計

イオン化法：	エレクトロスプレー イオン化法 (ESI) 正モード
乾燥ガス温度：	300°C
乾燥ガス流量：	6 L/min
ネブライザー圧力：	60 psi
シースガス温度：	250°C
シースガス流量：	12 L/min
イオン導入電圧：	5000 V
フラグメンター電圧：	50 V
コリジョン電圧：	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：	プリカーサーイオン m/z 331.0 プロダクトイオン m/z 116.0

5. 検量線の作成

クレソキシムメチルの標準品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。この標準原液をメタノール／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の標準溶液を調製した。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、データ処理装置を用いてクレソキシムメチルのピーク面積を測定し、横軸に重量 (ng), 縦軸にピーク面積をとって検量線を作成した。

6. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料の重量を量った後、各々を縦に8分割し、それぞれの対角の2つを取り合わせた（4組作製）。その2組を果実分析用試料とし、残りの2組を果肉分析用試料とした。2組の果実分析用試料のうち、1組の全量をミキサーで均一化した（残りの1組は添加剤が必要なアラニカルブ分析用試料とした）。2組の果肉分析用試料は、果肉と果皮に分けた。その1組の全量をミキサーで均一化した（残りの1組は添加剤が必要なアラニカルブ分析用試料とした）。

量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比（%）を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した果肉試料又は果実試料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。

6.1.3. 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。前項の抽出液に水5 mLを加えて混和した後、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。さらにアセトン／水（60:40, v/v）混液5 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吸引乾燥した後、アセトニトリル／トルエン（75:25, 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

残留物をメタノール／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 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，検量線よりクレソキシムメチルの重量を求め，試料中の残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値(LOQ)及び検出限界値(LOD)*

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μ L)	定量限界 (ppm)
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 (μ L)	検出限界 (ppm)
0.0005	0.2	10	5	0.005

*果肉，果実はいずれも同じ値

6.3. 回収率

分析法確認のため、高知試料の果肉無処理試料*及び宮崎試料の果実無処理試料**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24年度 農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業の試料を使用

**平成24年度 生産資材安全確保推進事業の試料を使用

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	5	99, 98,	99, 97	98,	98	0.9
高知	0.25	96, 91,	94, 90	94,	93	2.6
高知	0.01	104, 101,	103, 99	101,	102	1.9

6.3.2. 果実の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
宮崎	5	99, 98,	99, 96	99,	98	1.3
宮崎	0.25	100, 96,	99, 96	98,	98	1.8
宮崎	0.01	100, 92,	95, 90	93,	94	4.1

7. 精度管理

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

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

クォリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

また、2012年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)
2013/9/19	茨城	95	<0.01
2013/9/20	高知	98	<0.01
2013/9/18	宮崎	102	<0.01
2013/10/2	宮崎	101	<0.01

7.1.2.果実

分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
2013/9/19	茨城	94	<0.01
2013/9/20	高知	102	<0.01
2013/9/18	宮崎	102	<0.01
2013/10/2	宮崎	104	<0.01

8. マトリックス効果の確認

マトリックス標準溶液は、各圃場の無処理試料の最終溶液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. 果肉

試料	マトリックス効果 (%)
茨城	101
高知	102
宮崎	104

8.2. 果実

試料	マトリックス効果 (%)
茨城	103
高知	105
宮崎	102

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料にクレソキシムメチルを添加し、 -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

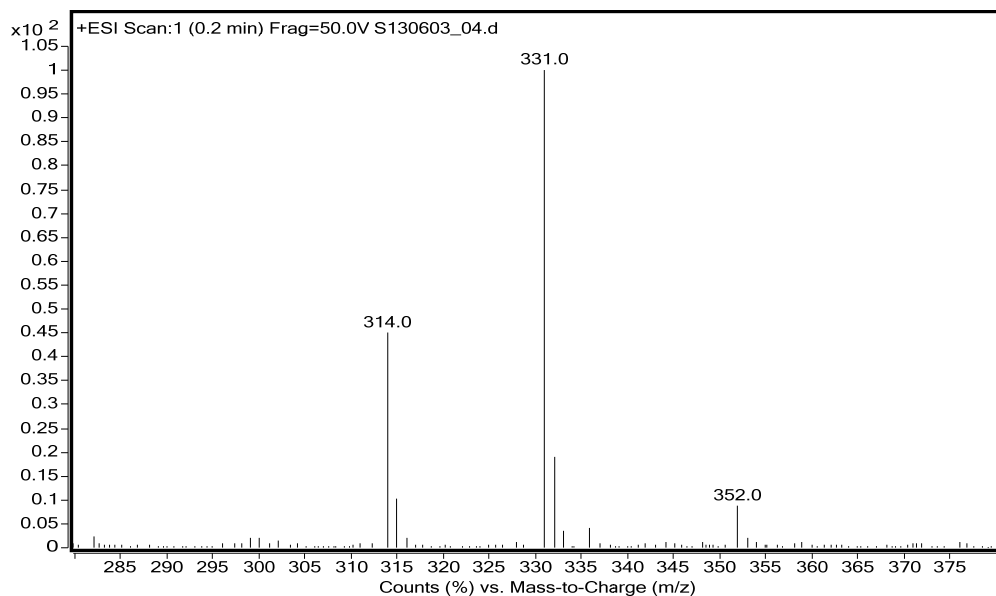
添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	71 (2013/7/23-10/2)	92,	89	90
0.5	高知	57 (2013/8/6-10/2)	87,	85	86
0.5	宮崎	86 (2013/7/8-10/2)	88,	83	86

9.2. 果実の保存安定性試験結果

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	71 (2013/7/23-10/2)	85,	84	84
0.5	高知	57 (2013/8/6-10/2)	87,	84	86
0.5	宮崎	86 (2013/7/8-10/2)	85,	82	84

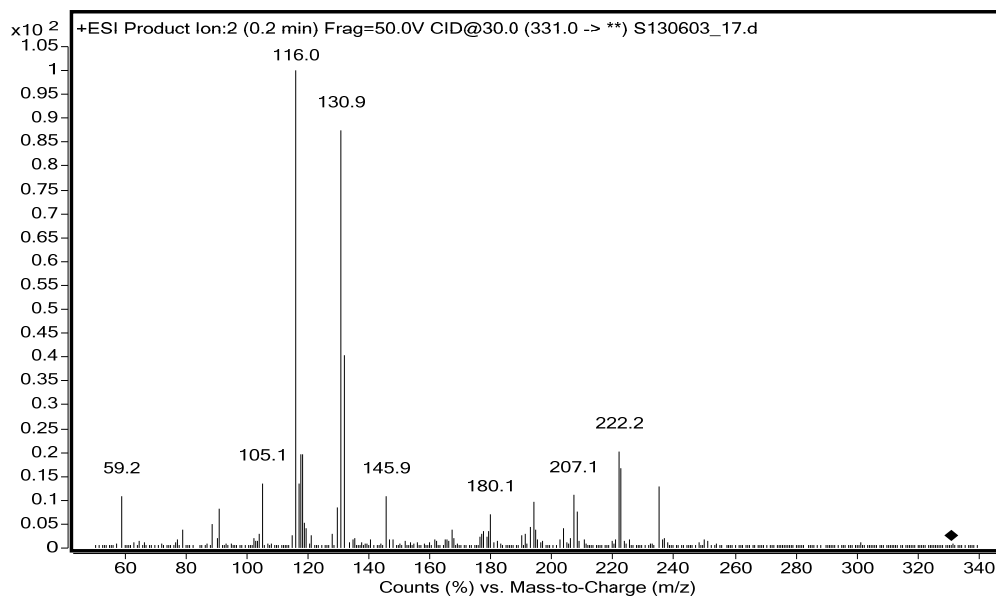
付図-1. マススペクトル

クレソキシムメチルのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)

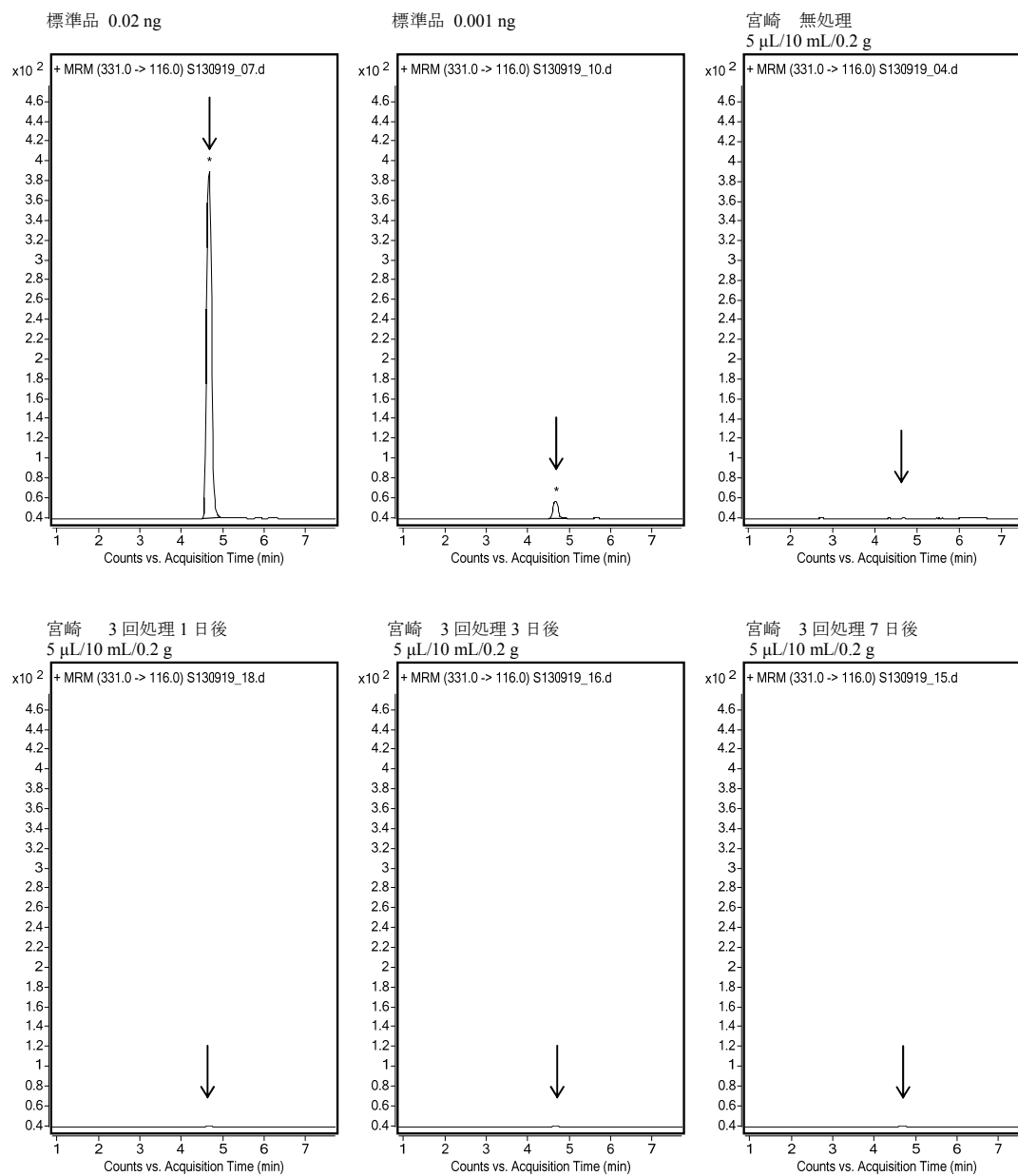


クレソキシムメチルのプロダクトスキャンスペクトルの一例

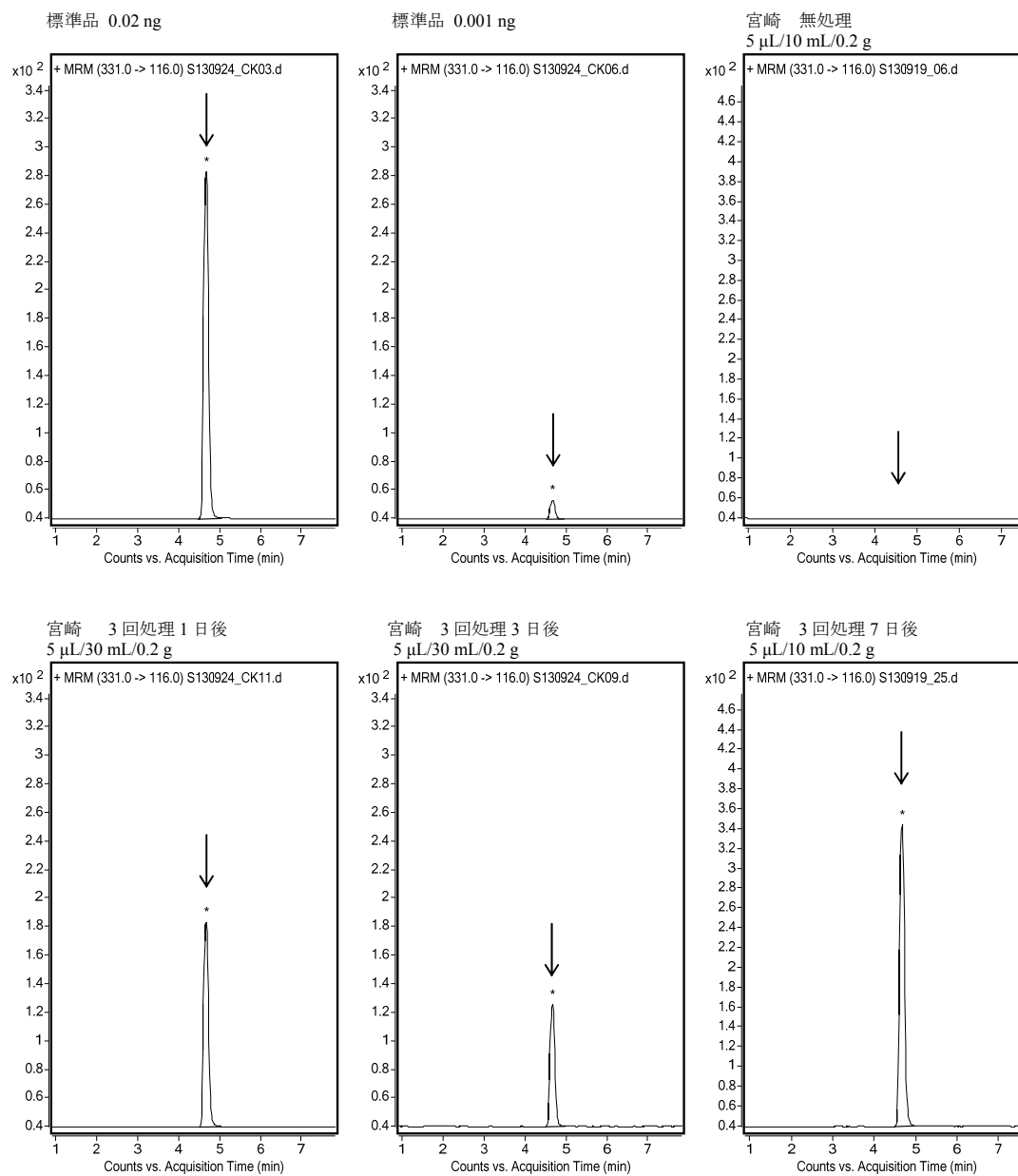
(プリカーサーイオン ; m/z=331.0, 正モード)



付図-2. 果肉のクロマトグラム (代表例)



付図-3. 果実のクロマトグラム (代表例)



農薬登録における作物のグループ化・残留分析詳細⑦
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	—	1.69	1.74	16.9	10.8	93	7	2.0
	A	1	1.69		8.46		93	7	1.9
	A	3	1.76		8.78		93	7	2.0
	A	7	1.81		9.04		94	6	1.5
							平均 93:7		平均 1.9
高知	0	—	1.48	1.40	14.8	9.89	89	11	2.1
	A	1	1.38		8.26		90	10	2.0
	A	3	1.35		8.12		90	10	2.0
	A	7	1.40		8.38		90	10	1.8
							平均 90:10		平均 2.0
宮崎	0	—	1.75	1.96	21.0	14.4	89	11	2.0
	A	1	2.02		12.1		90	10	2.0
	A	3	1.98		11.9		93	7	2.4
	A	7	2.10		12.6		92	8	2.0
							平均 91:9		平均 2.1
3 ほ場の総平均重量					3 ほ場の総重量の平均				
1.70 kg/個					11.7 kg				

A：シハロトリンは1回処理

クレソキシムメチルは3回処理

イプロジオン，エトフェンプロックス，レピメクチンは4回処理

アラニカルブは5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

農薬登録における作物のグループ化・残留分析詳細①

シエノピラフェン

1. 分析対象物質

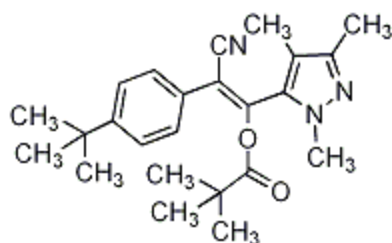
シエノピラフェン

化学名： (E)-2-(4-*tert*-butylphenyl)-2-cyano-1-(1,3,4-trimethylpyrazol-5-yl)vinyl
2,2-dimethylpropionate

分子式： $C_{24}H_{31}N_3O_2$

分子量： 393.5

構造式：



性 状： 白色結晶固体

融 点： 106.7～108.2℃

蒸気圧： 5.2×10^{-4} mPa (25℃)

分配係数： $\log P_{OW} = 5.6$

溶解性： 水 0.30 mg/L (20℃)

安定性： 54℃で14日間安定

加水分解半減期；0.9日 (pH=9, 25℃)

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

2. 標準品及び試薬

シエノピラフェン標準品：純度 99.8% (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)

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

ギ酸：高速液体クロマトグラフィー用 (和光純薬工業製)

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

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

3. 装置及び機器

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 R-45 及びロボクーブ BLIXER-5Plus
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. 高速液体クロマトグラフ

カラム：	SunFire C18, 3.5 μm (ウォータース製) 内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3.5 μm
溶離液：	アセトニトリル／水／2%ぎ酸 (75:20:5, 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：	約 11.2 min

4.2. 質量分析計

イオン化法：	エレクトロスプレー イオン化法 (ESI) 正モード
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：	40 V
コリジョン電圧：	25 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 394.0 プロダクトイオン m/z 309.9

5. 検量線の作成

シエノピラフェンの標準品10.0 mgを50 mLのメスフラスコに精秤し、アセトニトリルに溶解して200 mg/L標準原液を調製した。この標準原液をアセトニトリル／水（75:25, 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。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、データ処理装置を用いてシエノピラフェ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

受領した試料の重量を量った後、無処理試料は各々を縦に8分割し、それぞれの対角の2つを取り合わせた（4組作製）。その2組を果実分析用試料とし、残りの2組を果肉分析用試料とした。2組の果実分析用試料のうち、1組の全量をミキサーで均一化した（残りの1組は添加剤が必要なアラニカルブ分析用試料とした）。2組の果肉分析用試料は、果肉と果皮に分けた。その1組の全量をミキサーで均一化した（残りの1組は添加剤が必要なアラニカルブ分析用試料とした）。

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

量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比（%）を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した果肉試料又は果実試料20 gを三角フラスコにはかりとり、アセトニトリル／水（80:20, 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2 mL（試料0.2 g相当量）を分取した。

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

C₁₈ミニカラムにアセトニトリル5 mL及び水5 mLを順次流下し前処理した。前項の抽出液に水10 mLを加えて混和した後、前処理したC₁₈ミニカラムに流下した。さらにアセトニトリル／水（60:40, v/v）混液10 mLを流下し、これらの流出液を捨てた。C₁₈ミニカラムの下にアセトニトリル／水（80:20, v/v）混液5 mLで前処理したグラファイトカーボンミニカラムを連結し、アセトニトリル／水（80:20, v/v）混液15 mLをこの連結カラムに流下して溶出液を分取した。分取した溶出液を40°C以下の水浴中で減圧濃縮し、最後は窒素気流下で溶媒を留去した。

6.1.4. 定量

残留物をアセトニトリル／水（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 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，検量線よりシエノピラフェンの重量を求め，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 (μ L)	定量限界 (ppm)
0.005	0.2	4	10	0.01

最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μ L)	検出限界 (ppm)
0.0025	0.2	4	10	0.005

*果肉，果実はいずれも同じ値

6.3. 回収率

分析法確認のため、高知試料の果肉無処理試料*及び宮崎試料の果実無処理試料**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24年度 農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業の試料を使用

**平成24年度 生産資材安全確保推進事業の試料を使用

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	5	98, 95,	98, 94	96,	96	1.9
高知	0.25	95, 93,	94, 88	94,	93	3.0
高知	0.01	105, 101,	104, 100	103,	103	2.0

6.3.2. 果実の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
宮崎	5	95, 90,	94, 89	92,	92	2.8
宮崎	0.25	93, 92,	93, 91	92,	92	0.9
宮崎	0.01	96, 93,	95, 90	94,	94	2.4

7. 精度管理

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

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

クォリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

また、2012年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)
2013/8/ 5	茨城	92	<0.01
2013/8/14	茨城	85	<0.01
2013/8/22	高知	84	<0.01
2013/8/26	高知	80	<0.01
2013/7/19	宮崎	79	<0.01
2013/7/25	宮崎	95	<0.01

7.1.2.果実

分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
2013/8/ 5	茨城	88	<0.01
2013/8/14	茨城	85	<0.01
2013/8/22	高知	88	<0.01
2013/8/26	高知	76	<0.01
2013/7/19	宮崎	93	<0.01
2013/7/25	宮崎	92	<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. 果肉

試料	マトリックス効果 (%)
茨城	107
高知	119
宮崎	105

8.2. 果実

試料	マトリックス効果 (%)
茨城	112
高知	111
宮崎	116

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料にシエノピラフェンを添加し、 -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

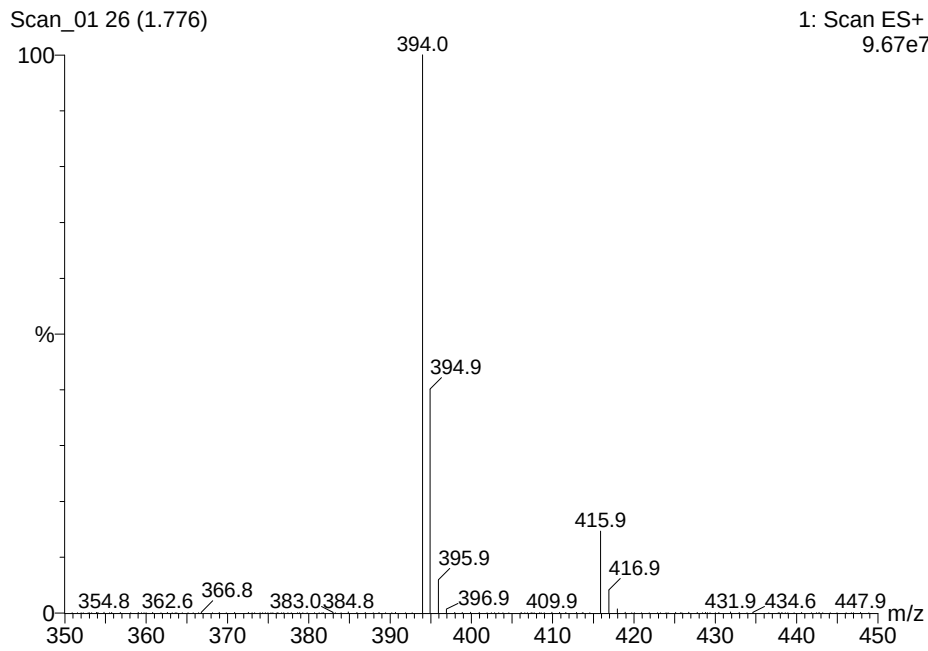
添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	22 (2013/7/23-8/14)	88,	81	84
0.5	高知	20 (2013/8/6-26)	77,	76	76
0.5	宮崎	17 (2013/7/8-25)	84,	83	84

9.2.果実の保存安定性試験結果

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	22 (2013/7/23-8/14)	85,	82	84
0.5	高知	20 (2013/8/6-26)	80,	75	78
0.5	宮崎	17 (2013/7/8-25)	88,	80	84

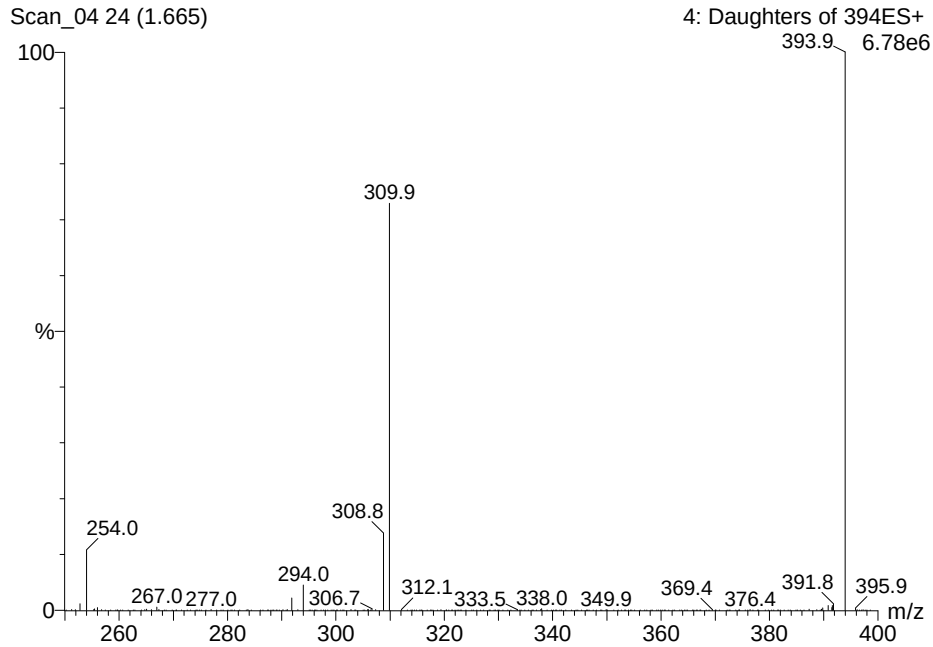
付図-1. マススペクトル

シエノピラフェンのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)



シエノピラ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 ; $m/z=394.0$, 正モード)

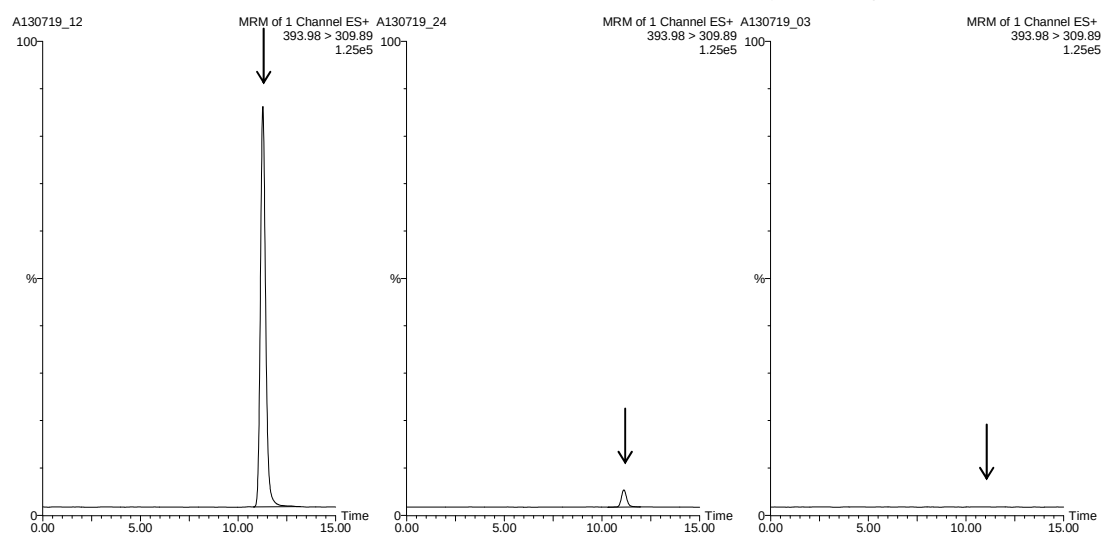


付図-2. 果肉のクロマトグラム (代表例)

標準品 0.1 ng

標準品 0.005 ng

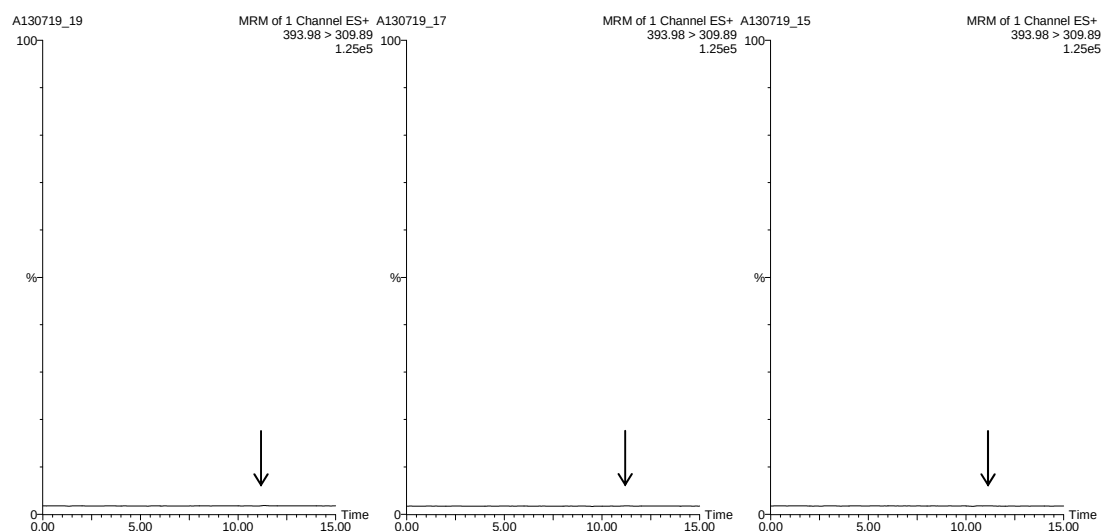
宮崎 無処理
10 μ L/4 mL/0.2 g



宮崎 1 回処理 1 日後
10 μ L/4 mL/0.2 g

宮崎 1 回処理 3 日後
10 μ L/4 mL/0.2 g

宮崎 1 回処理 7 日後
10 μ L/4 mL/0.2 g

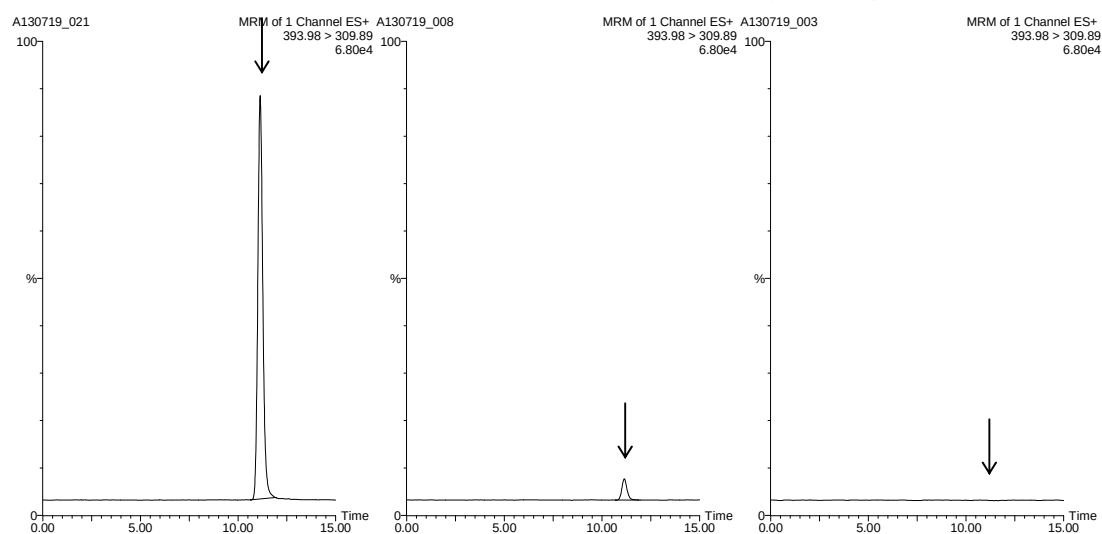


付図-3. 果実のクロマトグラム（代表例）

標準品 0.1 ng

標準品 0.005 ng

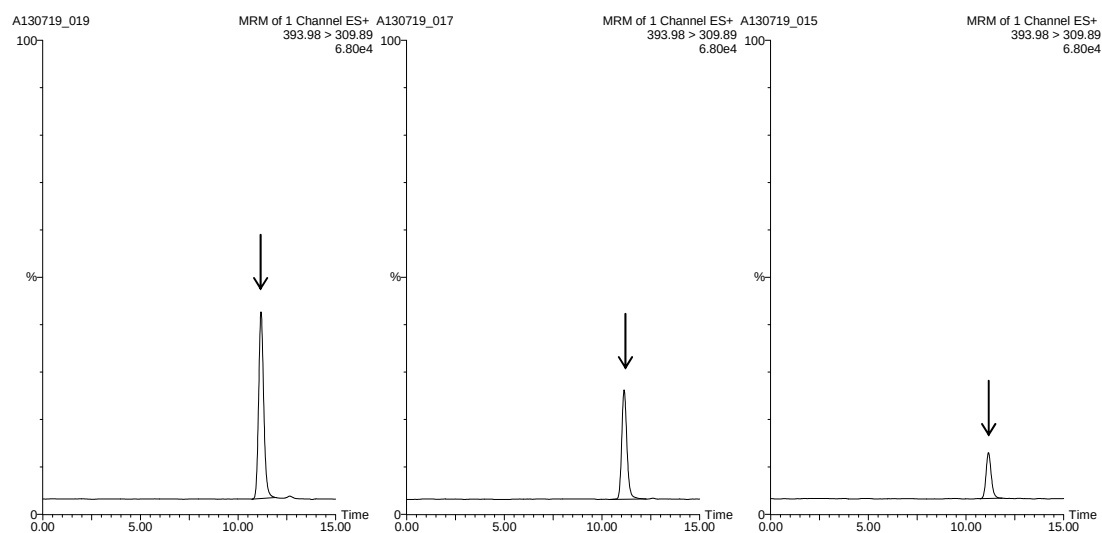
宮崎 無処理
10 μ L/4 mL/0.2 g



宮崎 1 回処理 1 日後
10 μ L/4 mL/0.2 g

宮崎 1 回処理 3 日後
10 μ L/4 mL/0.2 g

宮崎 1 回処理 7 日後
10 μ L/4 mL/0.2 g



農薬登録における作物のグループ化・残留分析詳細②
チアクロプリド

1. 分析対象物質

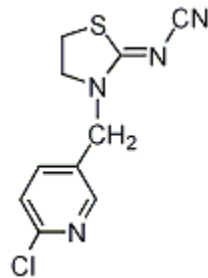
チアクロプリド

化学名： (Z)-3-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-1,3-thiazolidin-2-ylidenecyanamide

分子式： $C_{10}H_9ClN_4S$

分子量： 252.7

構造式：



性 状： 淡黄色結晶粉末

融 点： 136°C

蒸気圧： 3×10^{-7} mPa (20°C)

分配係数： $\log P_{ow} = 0.74$ (水), 0.73 (pH=4, 7), 0.74 (pH=9)

溶解性： 水 185 mg/L (20°C)

ヘキサン <0.1, キシレン 0.30, ジクロロメタン 160,
オクタノール 1.4, プロパノール 3.0, アセトン 64,
酢酸エチル 9.4, ポリエチレングリコール 42, アセトニトリル 52,
DMSO 150 (以上 g/L, 20°C)

安定性： 加水分解に対して安定 (pH=5~9, 25°C)

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

2. 標準品及び試薬

チアクロプリド標準品：純度 98.0% (Dr. Ehrenstorfer 製)

アセトニトリル, メタノール：残留農薬試験用 (和光純薬工業製)

メタノール：LC-MS 用 (和光純薬工業製)

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

ぎ酸：高速液体クロマトグラフィー用 (和光純薬工業製)

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

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 R-45 及びロボクーブ BLIXER-5Plus
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. 高速液体クロマトグラフ

カラム：	SunFire C18, 3.5 μm (ウォータース製) 内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3.5 μm
溶離液：	メタノール／水／2%ぎ酸 (70:25:5, 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：	約 2.5 min

4.2. 質量分析計

イオン化法：	エレクトロスプレー イオン化法 (ESI) 正モード
コーンガス流量：	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：	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 253.0 プロダクトイオン m/z 125.9

5. 検量線の作成

チアクロプリドの標準品10.2 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。この標準原液をメタノール／水 (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。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、データ処理装置を用いてチアクロプリ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

受領した試料の重量を量った後、無処理試料は各々を縦に8分割し、それぞれの対角の2つを取り合わせた (4組作製)。その2組を果実分析用試料とし、残りの2組を果肉分析用試料とした。2組の果実分析用試料のうち、1組の全量をミキサーで均一化した (残りの1組は添加剤が必要なアラニカルブ分析用試料とした)。2組の果肉分析用試料は、果肉と果皮に分けた。その1組の全量をミキサーで均一化した (残りの1組は添加剤が必要なアラニカルブ分析用試料とした)。

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

量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比 (%) を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した果肉試料又は果実試料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。分取した抽出液に水10 mLを添加後、40°C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. 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。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 (50:50, v/v) 混液10 mLを流下し、溶出液を取り、40°C以下の水浴中で減圧濃縮し、最後は窒素気流下で溶媒を留去した。

6.1.4. 定量

残留物をメタノール／水（50:50, 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 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，検量線よりチアクロプリドの重量を求め，試料中の残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値(LOQ)及び検出限界値(LOD) *

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μ L)	定量限界 (ppm)
0.005	0.2	4	10	0.01

最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μ L)	検出限界 (ppm)
0.0025	0.2	4	10	0.005

*果肉，果実はいずれも同じ値

6.3. 回収率

分析法確認のため、高知試料の果肉無処理試料*及び宮崎試料の果実無処理試料**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24年度 農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業の試料を使用

**平成24年度 生産資材安全確保推進事業の試料を使用

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	5	112, 106,	110, 105	108,	108	2.7
高知	0.25	103, 100,	101, 96	100,	100	2.5
高知	0.01	100, 91,	95, 81	93,	92	7.6

6.3.2. 果実の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
宮崎	5	100, 98,	99, 97	98,	98	1.2
宮崎	0.25	95, 91,	95, 91	94,	93	2.2
宮崎	0.01	91, 86,	89, 83	87,	87	3.5

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、2012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)
2013/8/12	茨城	89	<0.01
2013/8/20	茨城	92	<0.01
2013/8/28	高知	90	<0.01
2013/9/ 4	高知	96	<0.01
2013/7/24	宮崎	96	<0.01
2013/7/31	宮崎	90	<0.01

7.1.2.果実

分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
2013/8/12	茨城	93	<0.01
2013/8/20	茨城	91	<0.01
2013/8/28	高知	90	<0.01
2013/9/ 4	高知	99	<0.01
2013/7/24	宮崎	91	<0.01
2013/7/31	宮崎	88	<0.01

8. マトリックス効果の確認

マトリックス標準溶液は、各圃場の無処理試料の最終溶液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. 果肉

試料	マトリックス効果 (%)
茨城	91
高知	99
宮崎	99

8.2. 果実

試料	マトリックス効果 (%)
茨城	100
高知	96
宮崎	95

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料にチアクロプリドを添加し、 -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

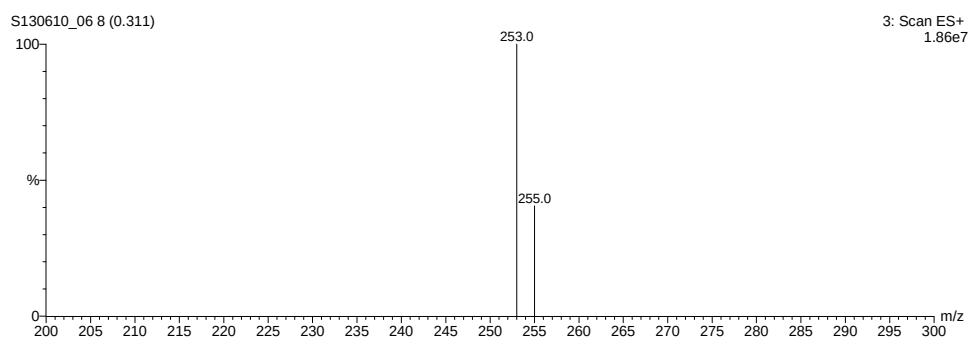
添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	28 (2013/7/23-8/20)	101,	97	99
0.5	高知	29 (2013/8/6-9/4)	95,	94	94
0.5	宮崎	23 (2013/7/8-31)	90,	89	90

9.2.果実の保存安定性試験結果

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	28 (2013/7/23-8/20)	97,	93	95
0.5	高知	29 (2013/8/6-9/4)	94,	94	94
0.5	宮崎	23 (2013/7/8-31)	93,	90	92

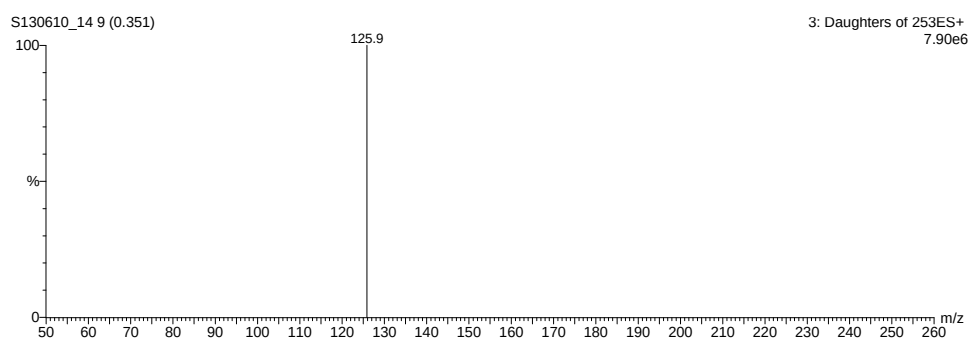
付図-1. マススペクトル

チアクロプリドのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)



チアクロプリ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=253.0, 正モード)

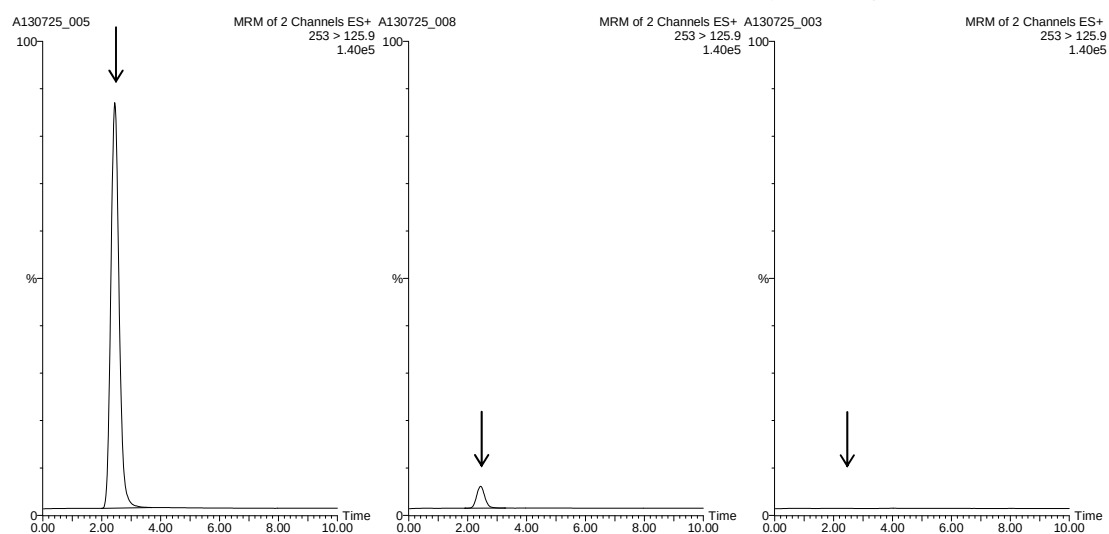


付図-2. 果肉のクロマトグラム (代表例)

標準品 0.1 ng

標準品 0.005 ng

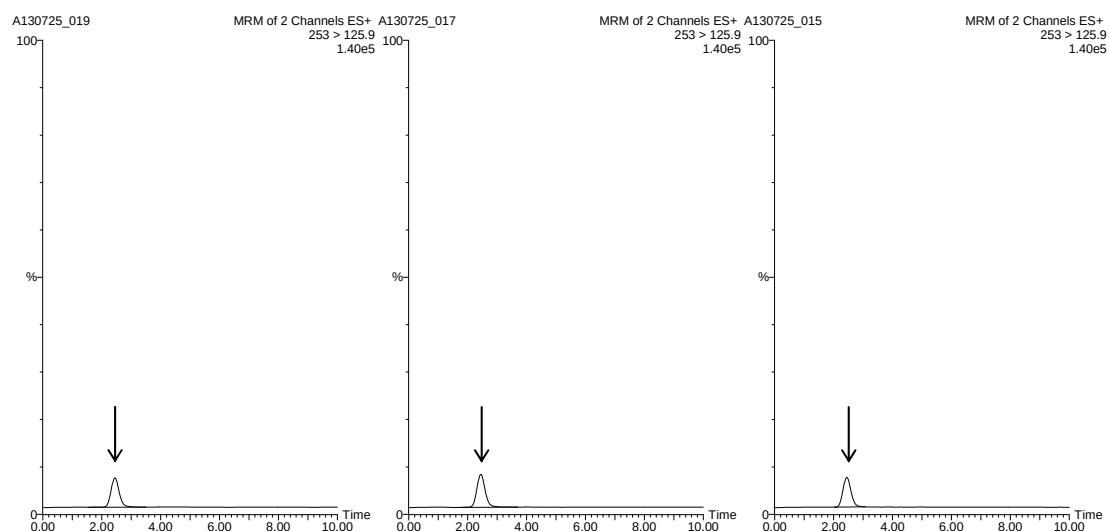
宮崎 無処理
10 μ L/4 mL/0.2 g



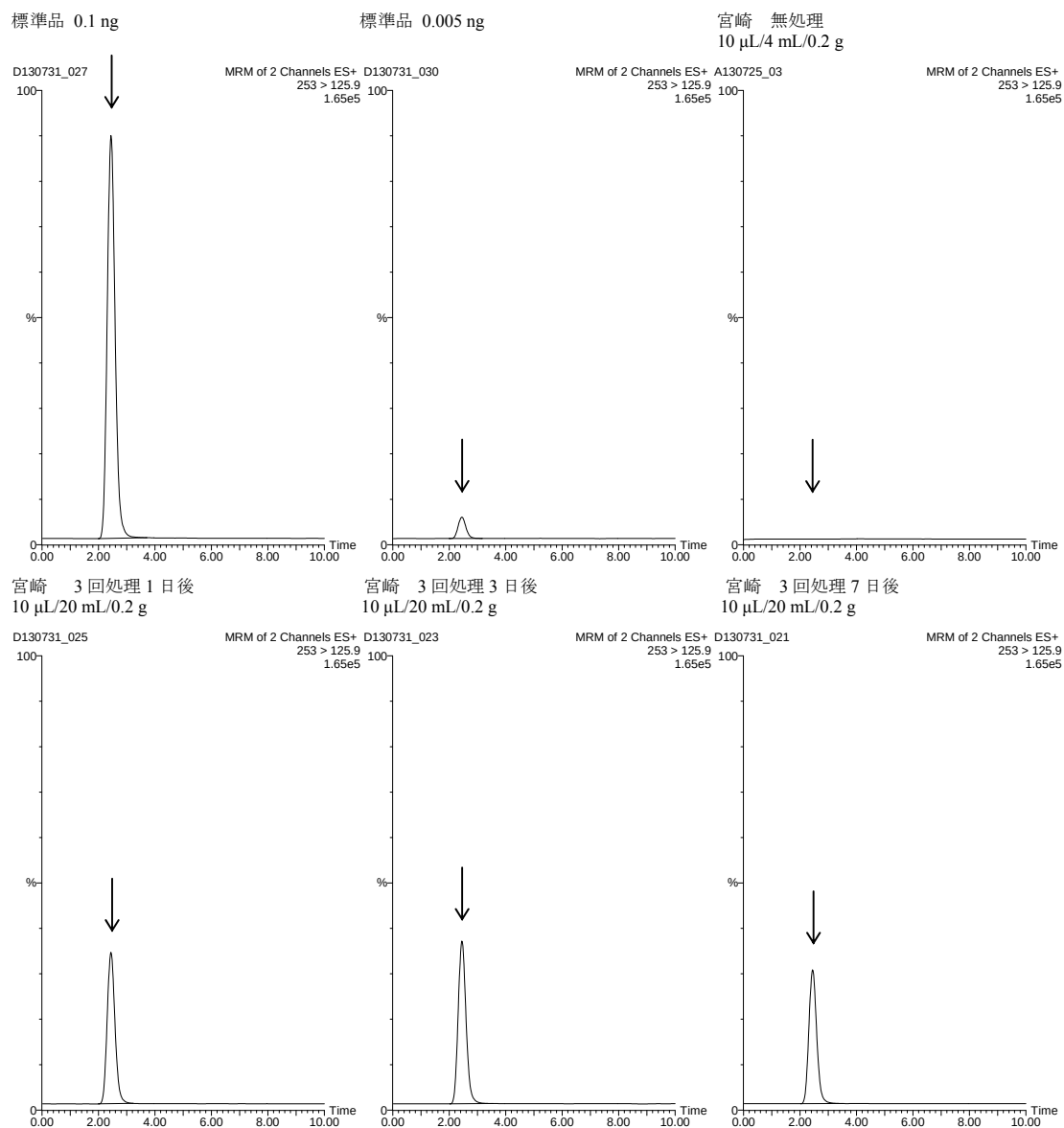
宮崎 3 回処理 1 日後
10 μ L/4 mL/0.2 g

宮崎 3 回処理 3 日後
10 μ L/4 mL/0.2 g

宮崎 3 回処理 7 日後
10 μ L/4 mL/0.2 g



付図-3. 果実のクロマトグラム (代表例)



農薬登録における作物のグループ化・残留分析詳細③
トリホリン

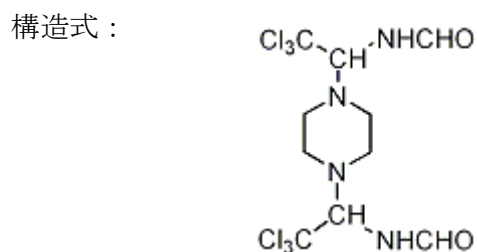
1. 分析対象物質

トリホリン

化学名： *N,N'*-{piperazine-1,4-diylbis[(trichloromethyl)methylene]} diformamide

分子式： $C_{10}H_{14}Cl_6N_4O_2$

分子量： 435.0



性 状： 白色結晶

蒸気圧： 8×10^{-1} mPa (25°C)

分配係数： $\log P_{OW} = 2.2$ (20°C)

溶解性： 水 12.5 mg/L (pH=7~9, 20°C)
DMF 330, DMSO 476, *N*-メチルピロリドン 476, アセトン 33,
ジクロロメタン 24, メタノール 47 (以上 g/L)
テトラヒドロフラン；可溶
ジオキサン及びシクロヘキサノン；僅かに可溶
ベンゼン, 石油エーテル及びシクロヘキサン；不溶

安定性： 148.6°Cまで安定

加水分解半減期；約2.6~3.1日 (pH=5~9)

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

2. 標準品及び試薬

トリホリン標準品：純度 100%（和光純薬工業製）

アセトニトリル，アセトン，メタノール：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

ギ酸：高速液体クロマトグラフィー用（和光純薬工業製）

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

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 R-45
及びロボクーブ BLIXER-5Plus

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. 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 µm

溶離液：0.1%ギ酸／0.1%ギ酸含有アセトニトリル
70:30 (2 min)－(6 min)－10:90

流速：0.3 mL/min

カラム温度：40°C

試料注入量：5 µL

保持時間：約 5.3 min

4.2. 質量分析計

イオン化法：	エレクトロスプレー イオン化法 (ESI)
	正モード
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：	5000 V
フラグメンター電圧：	100 V
コリジョン電圧：	10 V
	(コリジョンガス; N ₂)
イオン検出法：	MRM
モニタリングイオン：	プリカーサーイオン m/z 435.0
	プロダクトイオン m/z 389.7

5. 検量線の作成

トリホリンの標準品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。この標準原液をアセトニトリル／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の標準溶液を調製した。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、データ処理装置を用いてトリホ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

受領した試料の重量を量った後、無処理試料は各々を縦に8分割し、それぞれの対角の2つを取り合わせた（4組作製）。その2組を果実分析用試料とし、残りの2組を果肉分析用試料とした。2組の果実分析用試料のうち、1組の全量をミキサーで均一化した（残りの1組は添加剤が必要なアラニカルブ分析用試料とした）。2組の果肉分析用試料は、果肉と果皮に分けた。その1組の全量をミキサーで均一化した（残りの1組は添加剤が必要なアラニカルブ分析用試料とした）。

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

量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比（%）を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した果肉試料又は果実試料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1 mL（試料0.1 g相当量）を分取した。

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。前項の抽出液に水5 mLを加えて混和した後、前処理したC₁₈ミニカラムに流下した。さらに水／アセトニトリル（75:25, v/v）混液5 mLを流下し、これらの流出液を捨てた。C₁₈ミニカラムを吸引乾燥した後、水／アセトニトリル（50:50, v/v）混液10 mLを流下し、溶出液を分取した。

6.1.4. 定量

溶出液をアセトニトリル／水（50:50, v/v）混液で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、検量線よりトリホリンの重量を求め、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)*

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (µL)	定量限界 (ppm)
0.0005	0.1	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)
0.00025	0.1	10	5	0.005

*果肉、果実はいずれも同じ値

6.3. 回収率

分析法確認のため、高知試料の果肉無処理試料*及び宮崎試料の果実処理3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24年度 農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業の試料を使用

**平成24年度 生産資材安全確保推進事業の試料を使用

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	5	97, 95,	97, 93	95,	95	1.8
高知	0.25	95, 92,	94, 90	94,	93	2.2
高知	0.01	106, 99,	105, 96	103,	102	4.1

6.3.2. 果実の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
宮崎	5	97, 92,	95, 92	95,	94	2.3
宮崎	0.25	96, 89,	95, 88	92,	92	3.8
宮崎	0.01	94, 90,	91, 90	91,	91	1.8

7. 精度管理

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

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

クォリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

また、2012年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)
2013/8/13	茨城	95	<0.01
2013/8/21	高知	97	<0.01
2013/7/25	宮崎	101	<0.01
2013/8/26	宮崎	81	<0.01

7.1.2.果実

分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
2013/8/13	茨城	93	<0.01
2013/8/21	高知	71	<0.01
2013/7/25	宮崎	97	<0.01
2013/8/26	宮崎	98	<0.01

8. マトリックス効果の確認

マトリックス標準溶液は、各圃場の無処理試料の最終溶液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. 果肉

試料	マトリックス効果 (%)
茨城	100
高知	104
宮崎	104

8.2. 果実

試料	マトリックス効果 (%)
茨城	102
高知	100
宮崎	104

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料にトリホリンを添加し、 -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

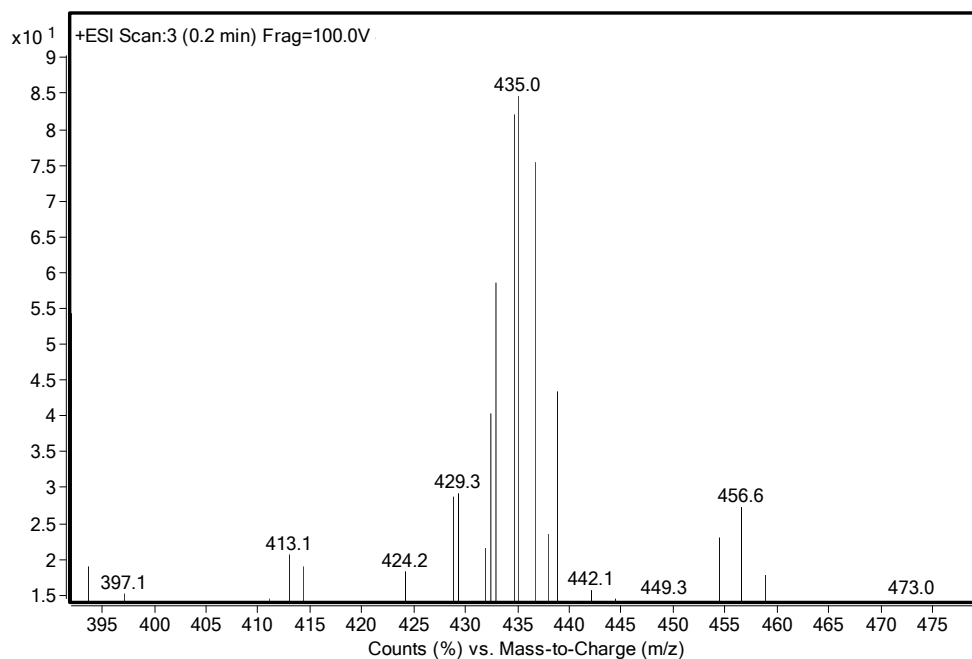
添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	34 (2013/7/23-8/26)	95,	92	94
0.5	高知	20 (2013/8/6-26)	95,	94	94
0.5	宮崎	49 (2013/7/8-8/26)	91,	88	90

9.2. 果実の保存安定性試験結果

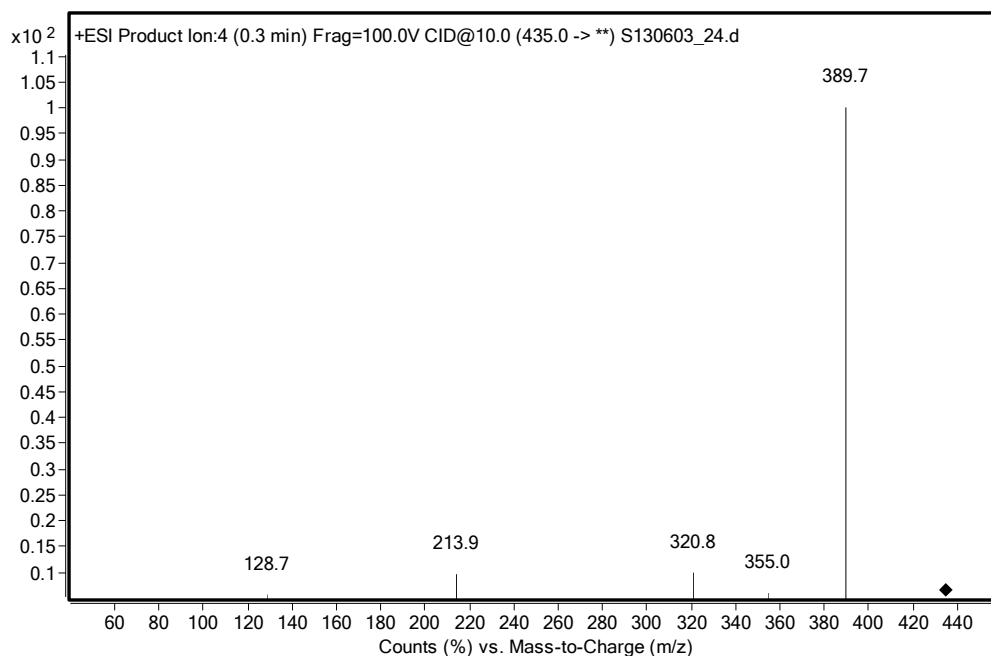
添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	34 (2013/7/23-8/26)	91,	88	90
0.5	高知	20 (2013/8/6-26)	96,	93	94
0.5	宮崎	49 (2013/7/8-8/26)	93,	90	92

付図-1. マススペクトル

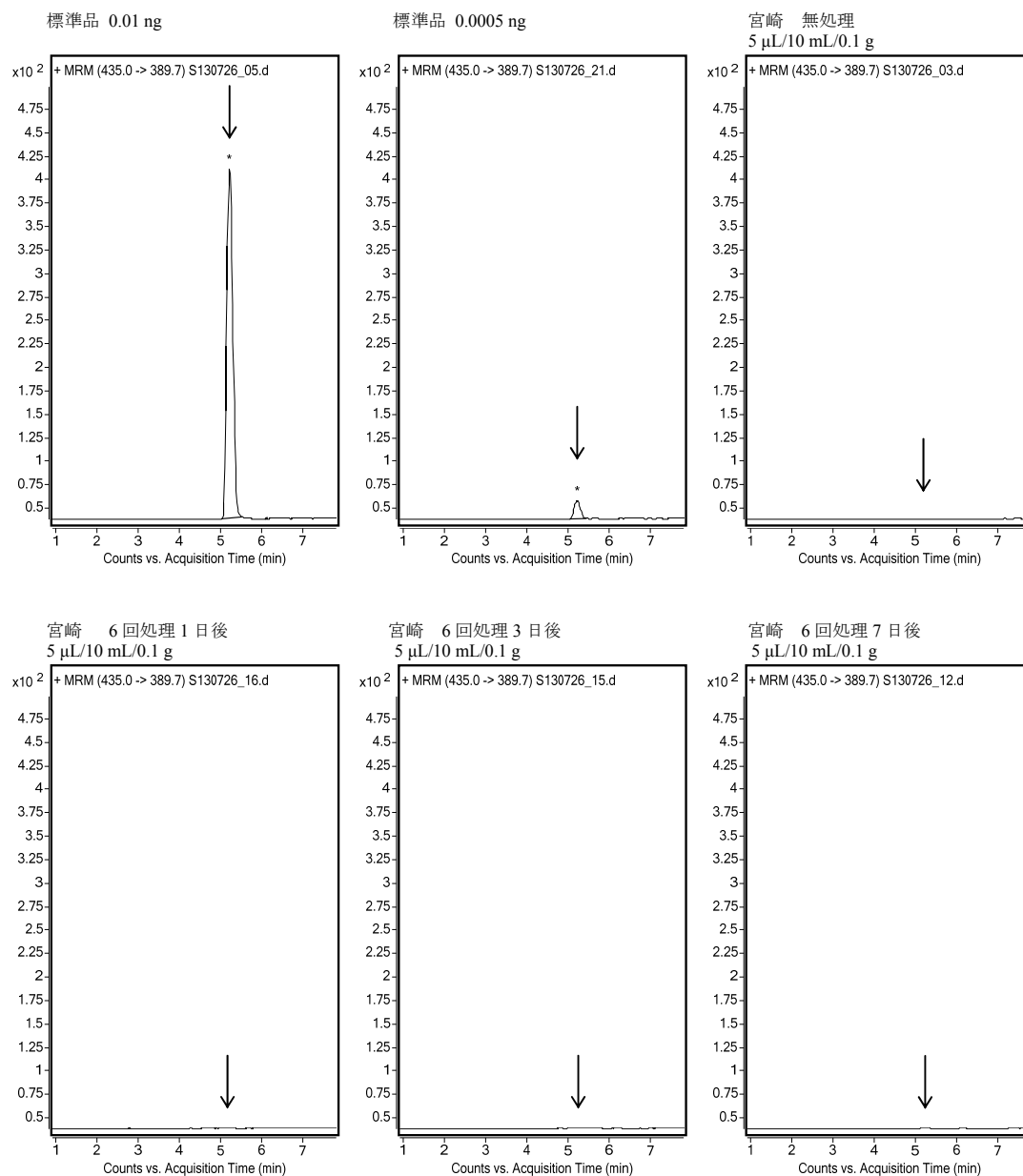
トリホリンのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)



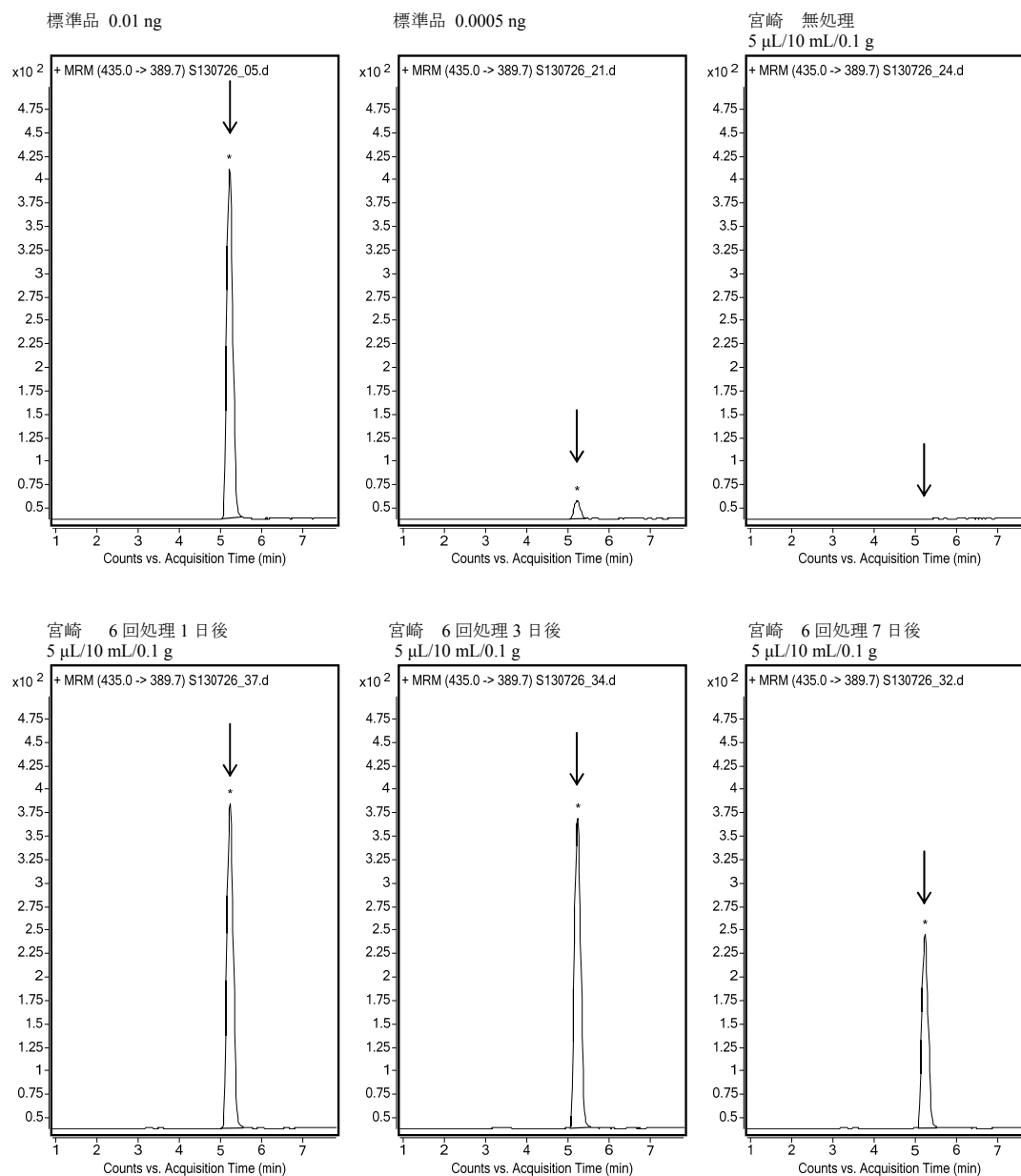
トリホリンのプロダクトスキャンスペクトルの一例

(プリカーサーイオン ; $m/z=435.0$, 正モード)

付図-2. 果肉のクロマトグラム（代表例）



付図-3. 果実のクロマトグラム（代表例）

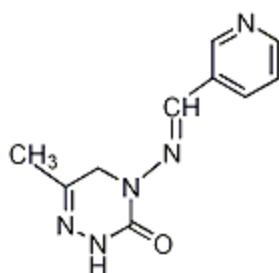


農薬登録における作物のグループ化・残留分析詳細④
ピメトロジン

1. 分析対象物質

ピメトロジン

化学名： (E)-4,5-dihydro-6-methyl-4-(3-pyridylmethyleamino)-1,2,4-triazin-3(2H)-one
分子式： $C_{10}H_{11}N_5O$
分子量： 217.2
構造式：



性 状： 白色結晶固体
融 点： 217°C
蒸気圧： $<4 \times 10^{-3}$ mPa (25°C)
分配係数： $\log P_{OW} = -0.18$
溶解性： 水 0.29 g/L (pH=6.5, 25°C)
エタノール 2.4, ヘキサン <0.001 , トルエン 0.034,
ジクロロメタン 1.2, オクタノール 0.45, アセトン 0.94,
酢酸エチル 0.26 (以上 g/L, 25°C)
安定性： 空気中で安定
加水分解半減期；5～12日 (pH=5), 616～800日 (pH=7),
510～1212日 (pH=9, 25°C)

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

2. 標準品及び試薬

ピメトロジン標準品：純度 100% (和光純薬工業製)

アセトニトリル, トルエン, メタノール

: 残留農薬試験用 (和光純薬工業製)

メタノール：LC-MS 用 (和光純薬工業製)

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

酢酸アンモニウム：試薬特級 (和光純薬工業製)

炭酸カリウム：試薬特級 (和光純薬工業製)

グラファイトカーボンミニカラム：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 R-45

及びロボクーブ BLIXER-5Plus

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. 高速液体クロマトグラフ

カラム：L-column ODS (化学物質評価研究機構製)

内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 5 μ m

溶離液：5 mmol/L 酢酸アンモニウム/メタノール (v/v)

90:10(2 min)－(8 min)－40:60 (5 min)

流速：0.2 mL/min

カラム温度：40°C

試料注入量：10 μ L

保持時間：約 11.9 min

4.2. 質量分析計

イオン化法：	エレクトロスプレー イオン化法 (ESI)
	正モード
コーンガス流量：	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：	40 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 218.1
	プロダクトイオン m/z 104.9

5. 検量線の作成

ピメトロジンの標準品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。この標準原液を水／メタノール（80:20, v/v）混液で希釈して0.0005, 0.001, 0.005, 0.01及び0.02 mg/Lの標準溶液を調製した。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、データ処理装置を用いてピメトロ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. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料の重量を量った後、無処理試料は各々を縦に8分割し、それぞれの対角の2つを取り合わせた（4組作製）。その2組を果実分析用試料とし、残りの2組を果肉分析用試料とした。2組の果実分析用試料のうち、1組の全量をミキサーで均一化した（残りの1組は添加剤が必要なアラニカルブ分析用試料とした）。2組の果肉分析用試料は、果肉と果皮に分けた。その1組の全量をミキサーで均一化した（残りの1組は添加剤が必要なアラニカルブ分析用試料とした）。

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

量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比（%）を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した果肉試料又は果実試料20 gを三角フラスコにはかりとり、0.5 mol/L炭酸カリウム溶液5 mL及びメタノール100 mLを加えて30分間振とう抽出した。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣をメタノール50 mLで洗い、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4 mL（試料0.4 g相当量）を分取した。

6.1.3. グラファイトカーボンミニカラム精製

グラファイトカーボンミニカラムにメタノール5 mLを流下し前処理した。分取した抽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た。さらにメタノール5 mL及びアセトニトリル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／トルエン（75:25, 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。

6.1.4. 定量

残留物を水／メタノール（80:20, 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、検量線よりピメトロジンの重量を求め、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)
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)
0.005	0.4	4	10	0.005

*果肉、果実はいずれも同じ値

6.3. 回収率

分析法確認のため、高知試料の果肉無処理試料*及び宮崎試料の果実無処理試料**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24年度 農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業の試料を使用

**平成24年度 生産資材安全確保推進事業の試料を使用

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	5	97, 96,	97, 89	96,	95	3.6
高知	0.25	101, 99,	101, 97	99,	99	1.7
高知	0.01	100, 89,	99, 87	94,	94	6.2

6.3.2. 果実の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
宮崎	5	90, 88,	89, 87	89,	89	1.3
宮崎	0.25	93, 91,	93, 90	92,	92	1.4
宮崎	0.01	104, 94,	99, 93	98,	98	4.5

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、2012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)
2013/8/ 2	茨城	105	<0.01
2013/8/13	茨城	111	<0.01
2013/8/20	高知	118	<0.01
2013/8/21	高知	103	<0.01
2013/7/18	宮崎	116	<0.01
2013/7/22	宮崎	103	<0.01

7.1.2.果実

分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
2013/8/ 2	茨城	117	<0.01
2013/8/13	茨城	119	<0.01
2013/8/20	高知	118	<0.01
2013/8/21	高知	118	<0.01
2013/7/18	宮崎	116	<0.01
2013/7/22	宮崎	119	<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°C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. 果肉

試料	マトリックス効果 (%)
茨城	107
高知	118
宮崎	119

8.2. 果実

試料	マトリックス効果 (%)
茨城	113
高知	118
宮崎	119

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料にピメトロジンを添加し、 -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

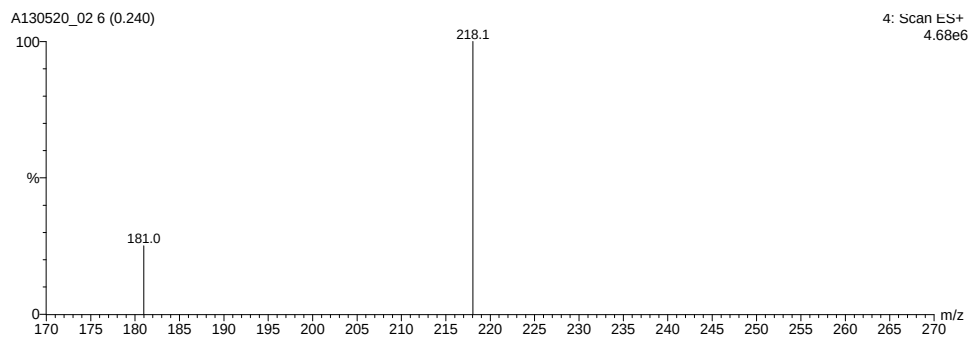
添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	21 (2013/7/23-8/13)	93,	93	93
0.5	高知	15 (2013/8/6-21)	93,	93	93
0.5	宮崎	14 (2013/7/8-22)	95,	90	92

9.2. 果実の保存安定性試験結果

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	21 (2013/7/23-8/13)	95,	94	94
0.5	高知	15 (2013/8/6-21)	94,	93	94
0.5	宮崎	14 (2013/7/8-22)	93,	92	92

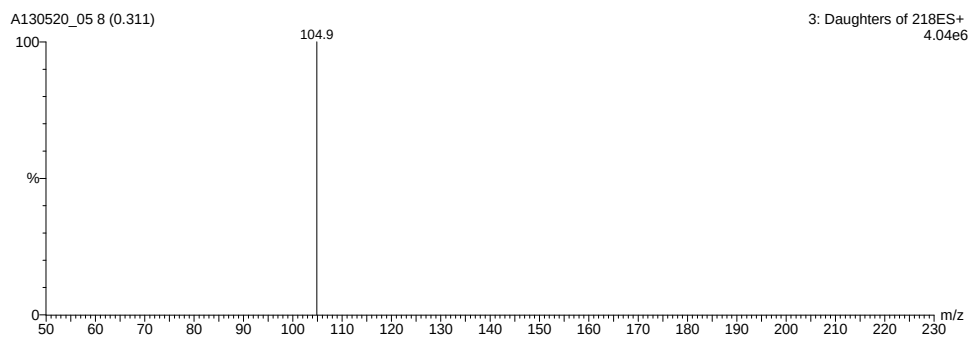
付図-1. マススペクトル

ピメトロジンのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)

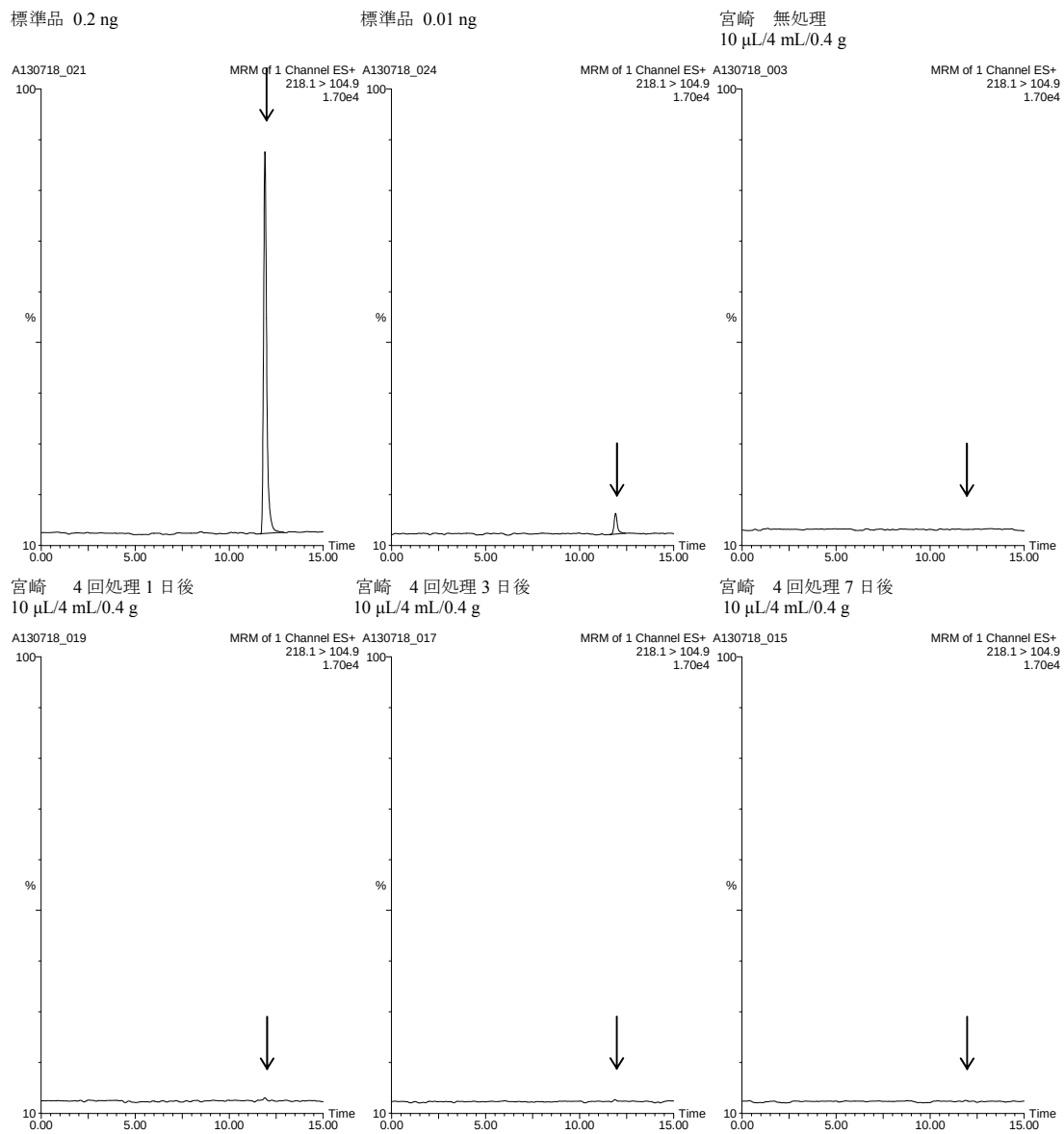


ピメトロジンのプロダクトスキャンスペクトルの一例

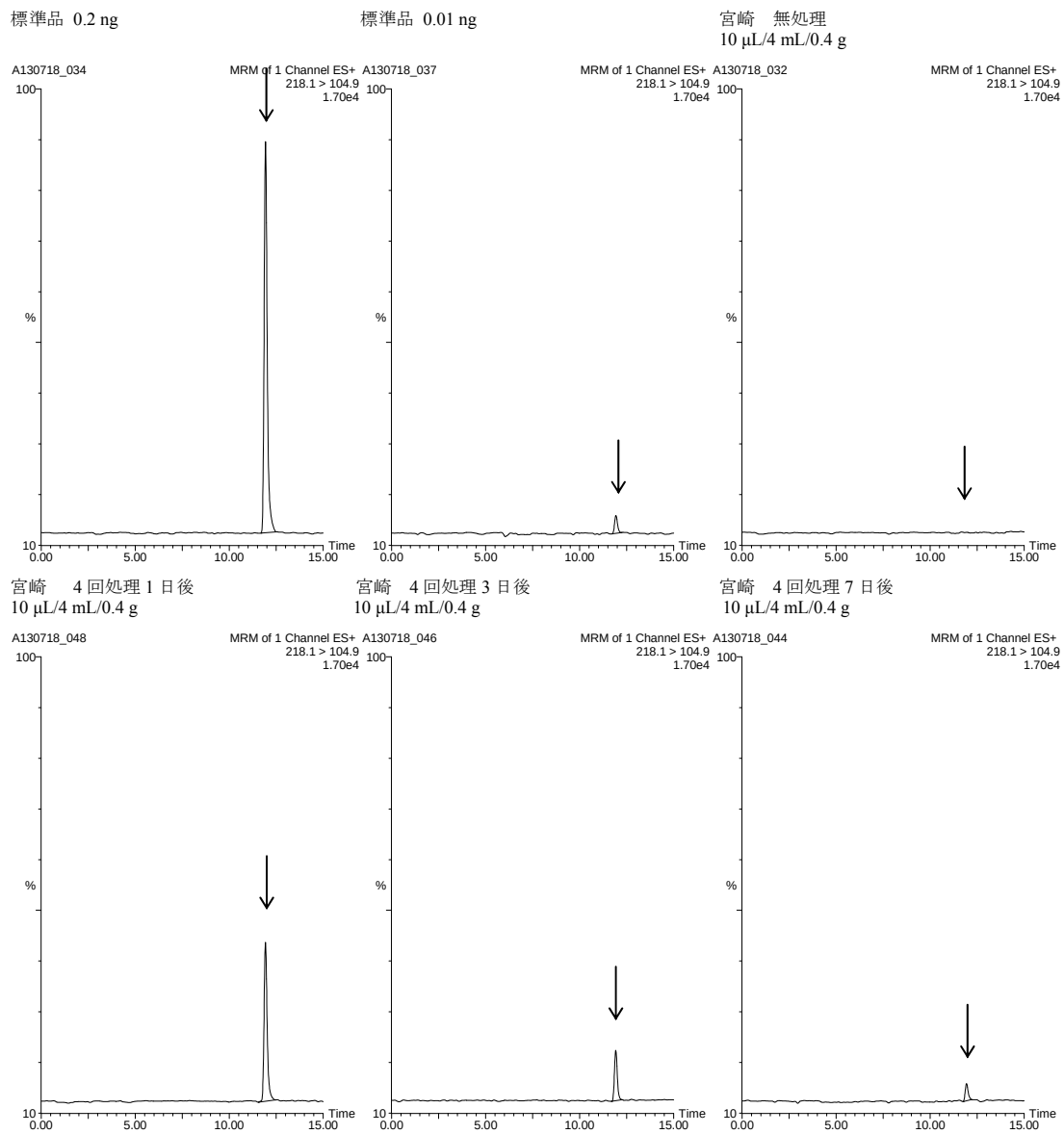
(プリカーサーイオン ; $m/z=218.1$, 正モード)



付図-2. 果肉のクロマトグラム (代表例)



付図-3. 果実のクロマトグラム (代表例)

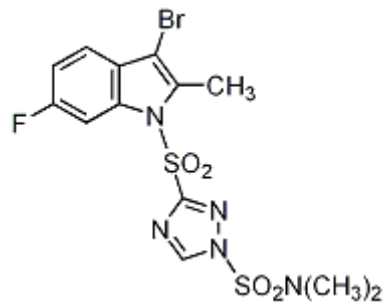


農薬登録における作物のグループ化・残留分析詳細⑤
アミスルブロム

1. 分析対象物質

アミスルブロム

化学名： 3-(3-bromo-6-fluoro-2-methylindol-1-ylsulfonyl)-*N,N*-dimethyl-1*H*-1,2,4-triazole-1-sulfonamide
 分子式： $C_{13}H_{13}BrFN_5O_4S_2$
 分子量： 466.3
 構造式：



性 状： 白色粉末
 融 点： 128.6～130.0℃
 蒸気圧： 1.8×10^{-5} mPa (25℃)
 分配係数： $\log P_{ow} = 4.4$
 溶解性： 水 0.11 mg/L (20℃, pH=6.9)
 安定性： 加水分解半減期；5日 (pH=9, 25℃)
 出 典： The e-Pesticide Manual 15th Edition. ver. 5.0

2. 標準品及び試薬

アミスルブロム標準品：純度 99.6% (関東化学製)

アセトニトリル, 酢酸エチル, トルエン, ヘキサン, メタノール
 : 残留農薬試験用 (和光純薬工業製)

メタノール：LC-MS 用 (和光純薬工業製)

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

酢酸：高速液体クロマトグラフィー用 (和光純薬工業製)

C_{18} ミニカラム：InertSep C18-C, 1 g/6 mL (ジーエルサイエンス製)

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

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)

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 R-45 及びロボクーブ BLIXER-5Plus
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. 高速液体クロマトグラフ

カラム：	SunFire C18, 3.5 μm (ウォータース製) 内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3.5 μm
溶離液：	メタノール／水／2%酢酸 (80:15:5, v/v/v)
流速：	0.2 mL/min
カラム温度：	40°C
試料注入量：	5 μL
保持時間：	約 7.3 min

4.2. 質量分析計

イオン化法：	エレクトロスプレー イオン化法 (ESI) 正モード
コーンガス流量：	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：	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 467.7 プロダクトイオン m/z 228.8

5. 検量線の作成

アミスルブロムの標準品10.0 mg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。この標準原液をメタノール／水（50:50, v/v）混液で希釈して0.0025, 0.005, 0.025, 0.05及び0.1 mg/Lの標準溶液を調製した。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、データ処理装置を用いてアミスルブロム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

受領した試料の重量を量った後、無処理試料は各々を縦に8分割し、それぞれの対角の2つを取り合わせた（4組作製）。その2組を果実分析用試料とし、残りの2組を果肉分析用試料とした。2組の果実分析用試料のうち、1組の全量をミキサーで均一化した（残りの1組は添加剤が必要なアラニカルブ分析用試料とした）。2組の果肉分析用試料は、果肉と果皮に分けた。その1組の全量をミキサーで均一化した（残りの1組は添加剤が必要なアラニカルブ分析用試料とした）。

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

量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比（%）を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した果肉試料又は果実試料20 gを三角フラスコにはかりとり、アセトニトリル／水（80:20, 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）を分取した。分取した抽出液に水10 mLを添加後、40°C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. 精製

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

C₁₈ミニカラムにアセトニトリル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。さらにアセトニトリル／水（50:50, v/v）混液10 mLを流下し、これらの流出液を捨てた。C₁₈ミニカラムの下にアセトニトリル5 mL及び水5 mLを順次流下し前処理したグラファイトカーボンミニカラムを連結し、アセトニトリル／水（70:30, v/v）混液10 mLをこの連結カラムに流下し、流出液を捨てた。C₁₈ミニカラムを

取り除き、グラファイトカーボンミニカラムにアセトニトリル10 mLを流下し、流出液を捨てた。次に、アセトニトリル／トルエン（75:25, v/v）混液30 mLを流下し、溶出液を取り、40°C以下の水浴中で減圧濃縮し、最後は窒素気流下で溶媒を留去した。

6.1.3.2. フロリジルミニカラムによる精製

フロリジルミニカラムにヘキサン／酢酸エチル（95:5, v/v）混液5 mLを流下し前処理した。前項の残留物を同混液5 mLに溶解してフロリジルミニカラムに移して流下した。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／酢酸エチル（80:20, v/v）混液10 mLを流下し、溶出液を取り、40°C以下の水浴中で減圧濃縮し、最後は窒素気流下で溶媒を留去した。

6.1.4. 定量

残留物をメタノール／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 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、検量線よりアミスルブロムの重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値(LOQ)及び検出限界値(LOD)*

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (µL)	定量限界 (ppm)
0.025	1	2	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)
0.0125	1	2	5	0.005

* 果肉，果実はいずれも同じ値

6.3. 回収率

分析法確認のため、高知試料の果肉無処理試料*及び宮崎試料の果実無処理試料**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24年度 農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業の試料を使用

**平成24年度 生産資材安全確保推進事業の試料を使用

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	5	99, 96,	98, 93	96,	96	2.4
高知	0.25	102, 98,	100, 98	100,	100	1.7
高知	0.01	90, 84,	89, 83	86,	86	3.5

6.3.2. 果実の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
宮崎	5	100, 97,	99, 97	99,	98	1.4
宮崎	0.25	99, 97,	98, 97	98,	98	0.9
宮崎	0.01	83, 77,	81, 77	78,	79	3.4

7. 精度管理

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

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

クォリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

また、2012年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)
2013/8/ 5	茨城	107	<0.01
2013/8/14	茨城	95	<0.01
2013/8/22	高知	101	<0.01
2013/8/26	高知	106	<0.01
2013/7/19	宮崎	98	<0.01
2013/7/25	宮崎	101	<0.01

7.1.2.果実

分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
2013/8/ 5	茨城	91	<0.01
2013/8/14	茨城	94	<0.01
2013/8/22	高知	91	<0.01
2013/8/26	高知	113	<0.01
2013/7/19	宮崎	89	<0.01
2013/7/25	宮崎	100	<0.01

8. マトリックス効果の確認

マトリックス標準溶液は、各圃場の無処理試料の最終溶液1 mLをナス型フラスコに分取し、40°C以下の水浴中で減圧濃縮し、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. 果肉

試料	マトリックス効果 (%)
茨城	105
高知	102
宮崎	100

8.2. 果実

試料	マトリックス効果 (%)
茨城	105
高知	92
宮崎	94

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料にアミスルブロムを添加し、 -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

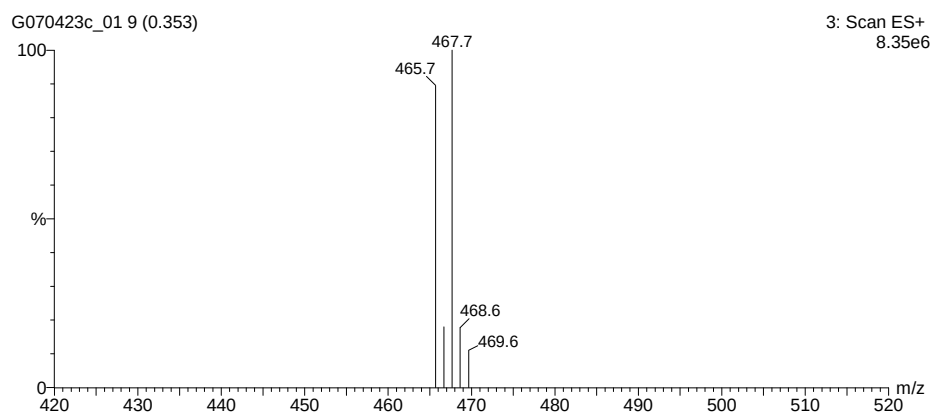
添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	22 (2013/7/23-8/14)	95,	92	94
0.5	高知	20 (2013/8/6-26)	108,	103	106
0.5	宮崎	17 (2013/7/8-25)	96,	96	96

9.2.果実の保存安定性試験結果

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	22 (2013/7/23-8/14)	96,	95	96
0.5	高知	20 (2013/8/6-26)	104,	101	102
0.5	宮崎	17 (2013/7/8-25)	97,	96	96

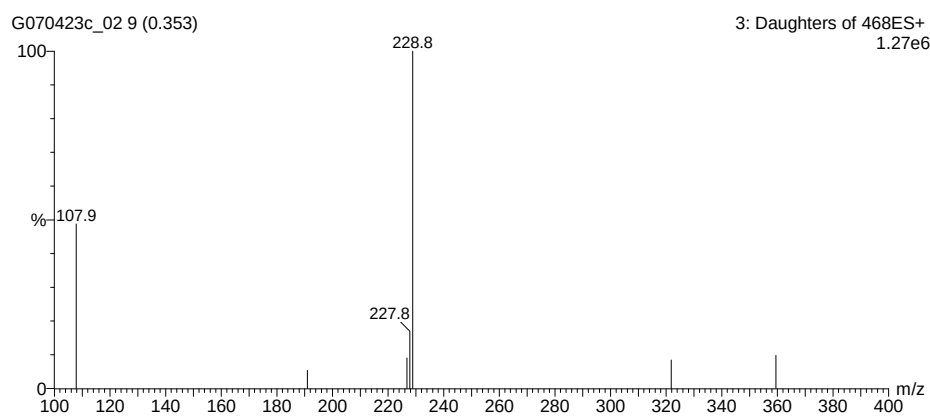
付図-1. マススペクトル

アミスルブロムのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)



アミスルブロム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 ; $m/z=467.7$, 正モード)

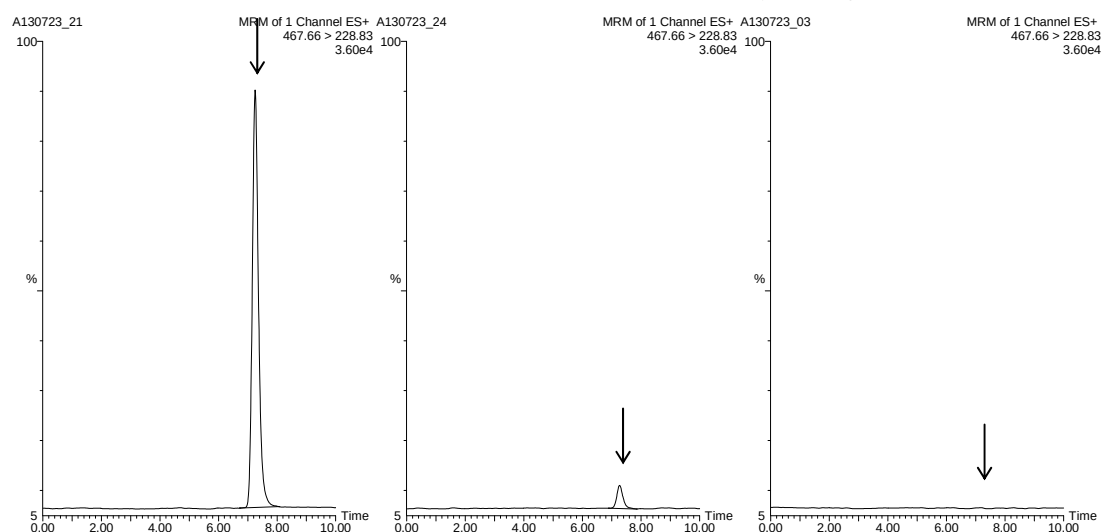


付図-2. 果肉のクロマトグラム (代表例)

標準品 0.5 ng

標準品 0.025 ng

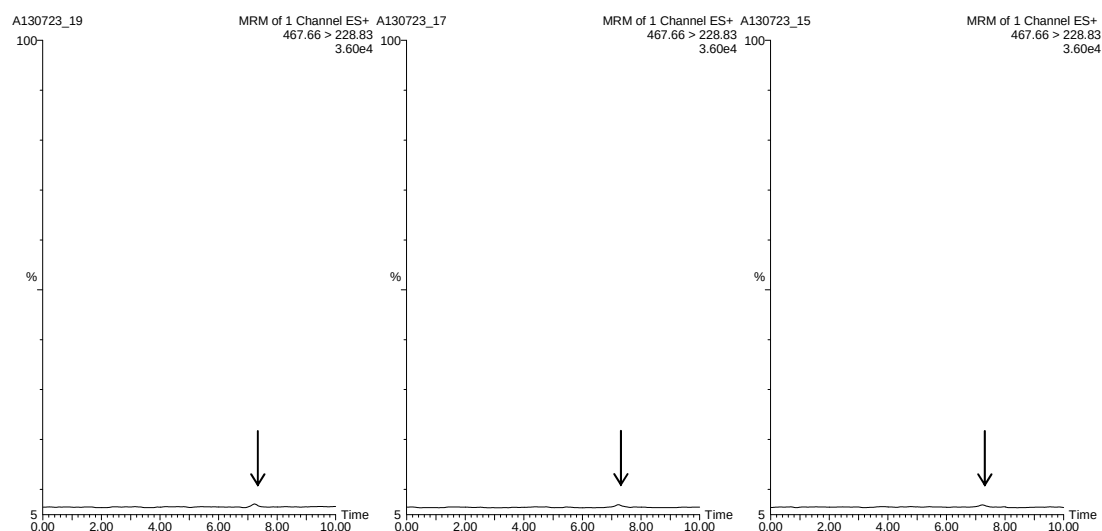
宮崎 無処理
5 μ L/2 mL/1 g



宮崎 4回処理 1日後
5 μ L/2 mL/1 g

宮崎 4回処理 3日後
5 μ L/2 mL/1 g

宮崎 4回処理 7日後
5 μ L/2 mL/1 g

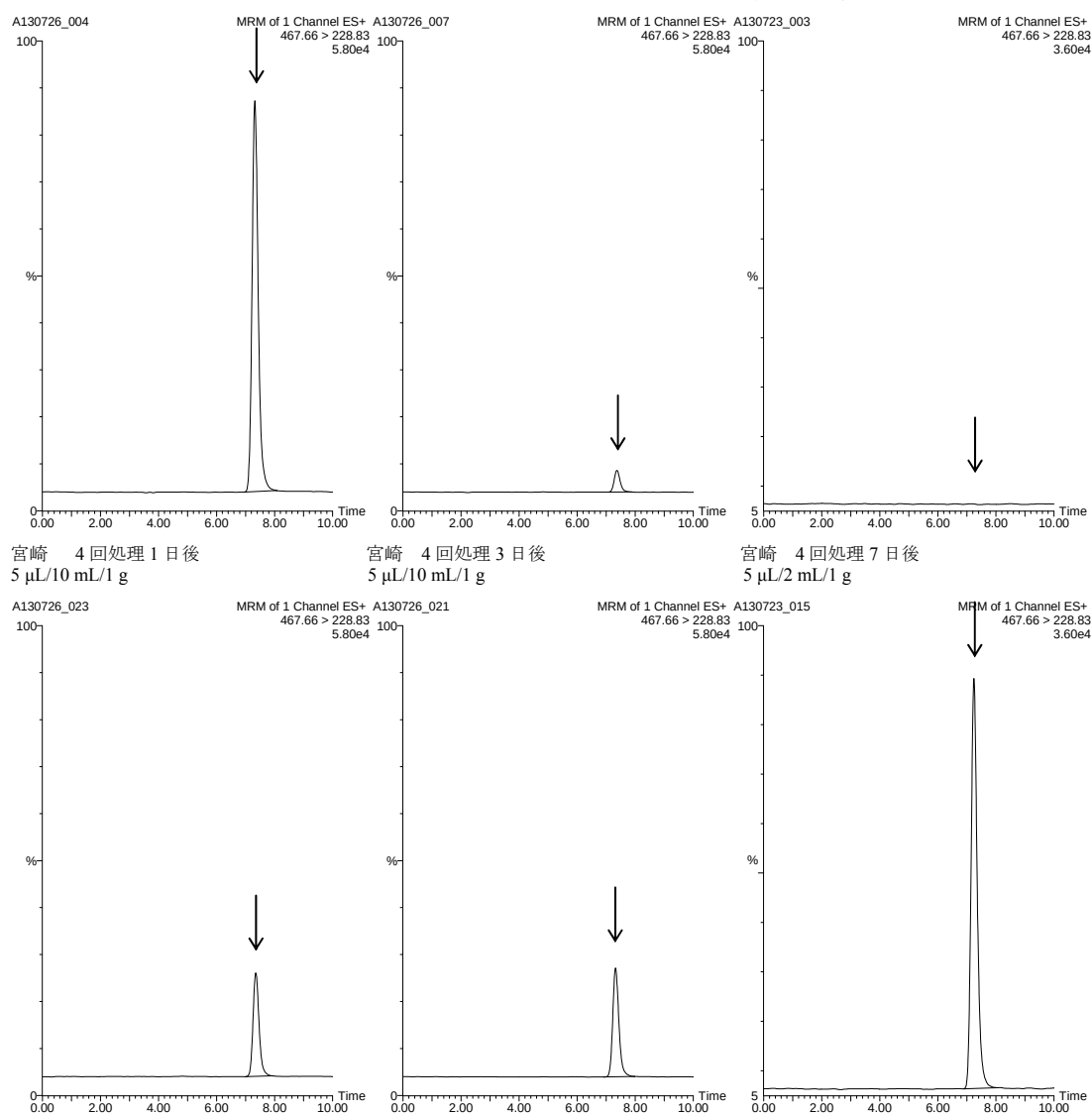


付図-3. 果実のクロマトグラム (代表例)

標準品 0.5 ng

標準品 0.025 ng

宮崎 無処理
5 μ L/2 mL/1 g



農薬登録における作物のグループ化・残留分析詳細⑥
フルベンジアミド

1. 分析対象物質

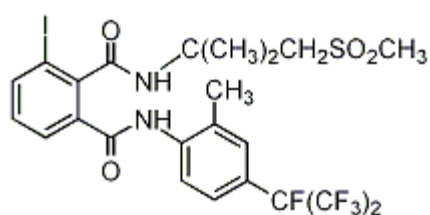
フルベンジアミド

化学名： 3-iodo-*N'*-(2-mesyl-1,1-dimethylethyl)-*N*-{4-[1,2,2,2-tetrafluoro-1-(trifluoromethyl)ethyl]-*o*-tolyl}phthalamide

分子式： $C_{23}H_{22}F_7IN_2O_4S$

分子量： 682.4

構造式：



性 状： 白色結晶粉末

融 点： 217.5～220.7℃

蒸気圧： $< 1 \times 10^{-1}$ mPa (25℃)

分配係数： $\log P_{ow} = 4.2$ (25℃)

溶解性： 水 29.9 µg/L (20℃)

キシレン 0.488, ヘプタン 0.000835, メタノール 26.0,
1,2-ジクロロエタン 8.12, アセトン 102, 酢酸エチル 29.4 (以上 g/L)

安定性： 酸性及び塩基性 (pH=4～9) で安定

水中光分解半減期；5.5日 (蒸留水, 25℃)

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

2. 標準品及び試薬

フルベンジアミド標準品：純度 99.7% (和光純薬工業製)

アセトニトリル, 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

酢酸：高速液体クロマトグラフィー用 (和光純薬工業製)

PH ミニカラム：InertSep PH, 1 g/6 mL (ジュ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 R-45 及びロボクーブ BLIXER-5Plus
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. 高速液体クロマトグラフ

カラム：	SunFire C18, 3.5 μm (ウォータース製) 内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3.5 μm
溶離液：	アセトニトリル／水／2%酢酸 (65:10:25, v/v/v)
流速：	0.2 mL/min
カラム温度：	40°C
試料注入量：	5 μL
保持時間：	約 6.1 min

4.2. 質量分析計

イオン化法：	エレクトロスプレー イオン化法 (ESI) 負モード
コーンガス流量：	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：	2.5 kV
コーン電圧：	30 V
コリジョン電圧：	30 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 681.0 プロダクトイオン m/z 253.9

5. 検量線の作成

フルベンジアミドの標準品10.0 mg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。この標準原液をアセトニトリル／水(50:50, v/v)混液で希釈して0.0005, 0.001, 0.005, 0.01及び0.02 mg/Lの標準溶液を調製した。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、データ処理装置を用いてフルベンジア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

受領した試料の重量を量った後、無処理試料は各々を縦に8分割し、それぞれの対角の2つを取り合わせた (4組作製)。その2組を果実分析用試料とし、残りの2組を果肉分析用試料とした。2組の果実分析用試料のうち、1組の全量をミキサーで均一化した (残りの1組は添加剤が必要なアラニカルブ分析用試料とした)。2組の果肉分析用試料は、果肉と果皮に分けた。その1組の全量をミキサーで均一化した (残りの1組は添加剤が必要なアラニカルブ分析用試料とした)。

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

量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比 (%) を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した果肉試料又は果実試料20 gを三角フラスコにはかりとり、アセトニトリル／水 (80:20, 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4 mL (試料0.4 g相当量) を分取した。分取した抽出液を40°C以下の水浴中で減圧濃縮し、最後は窒素気流下で溶媒を留去した。

6.1.3. PHミニカラムによる精製

PH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。前項の残留物をメタノール1 mLに溶解し、水4 mLを添加して混和した後、前処理したPHミニカラムに流下した。さらにメタノール／水 (60:40, v/v) 混液5 mLを流下し、これらの流出液を捨てた。PHミニカラムを吸引乾燥した後、メタノール／水 (80:20, v/v) 混液5 mLを流下し、溶出液を取り、40°C以下の水浴中で減圧濃縮し、最後は窒素気流下で溶媒を留去した。

6.1.4. 定量

残留物をアセトニトリル／水（50:50, 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，検量線よりフルベンジアミドの重量を求め，試料中の残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値(LOQ)及び検出限界値(LOD)*

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μ L)	定量限界 (ppm)
0.005	0.4	4	5	0.01

最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μ L)	検出限界 (ppm)
0.0025	0.4	4	5	0.005

*果肉，果実はいずれも同じ値

6.3. 回収率

分析法確認のため、高知試料の果肉無処理試料*及び宮崎試料の果実無処理試料**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24年度 農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業の試料を使用

**平成24年度 生産資材安全確保推進事業の試料を使用

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	5	92, 91,	91, 87	91,	90	2.2
高知	0.25	90, 85,	88, 81	88,	86	4.1
高知	0.01	95, 86,	90, 86	90,	89	4.2

6.3.2. 果実の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
宮崎	5	100, 95,	99, 95	96,	97	2.4
宮崎	0.25	103, 100,	101, 94	100,	100	3.4
宮崎	0.01	95, 91,	94, 90	92,	92	2.3

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0.1 ppm添加試料（クォリティーコントロール試料）を分析した。

クォリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

また、2012年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)
2013/8/ 5	茨城	113	<0.01
2013/8/14	茨城	95	<0.01
2013/8/22	高知	79	<0.01
2013/8/26	高知	107	<0.01
2013/7/19	宮崎	83	<0.01
2013/7/25	宮崎	109	<0.01

7.1.2.果実

分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
2013/8/ 5	茨城	89	<0.01
2013/8/14	茨城	87	<0.01
2013/8/22	高知	111	<0.01
2013/8/26	高知	104	<0.01
2013/7/19	宮崎	101	<0.01
2013/7/25	宮崎	91	<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. 果肉

試料	マトリックス効果 (%)
茨城	99
高知	85
宮崎	83

8.2. 果実

試料	マトリックス効果 (%)
茨城	110
高知	114
宮崎	112

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料にフルベンジアミドを添加し、－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

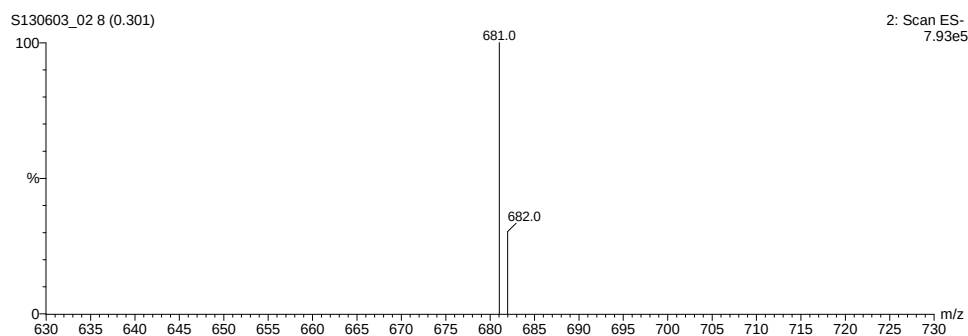
添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	22 (2013/7/23-8/14)	105,	93	99
0.5	高知	20 (2013/8/6-26)	89,	80	84
0.5	宮崎	17 (2013/7/8-25)	93,	88	90

9.2.果実の保存安定性試験結果

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	22 (2013/7/23-8/14)	97,	96	96
0.5	高知	20 (2013/8/6-26)	80,	75	78
0.5	宮崎	17 (2013/7/8-25)	99,	98	98

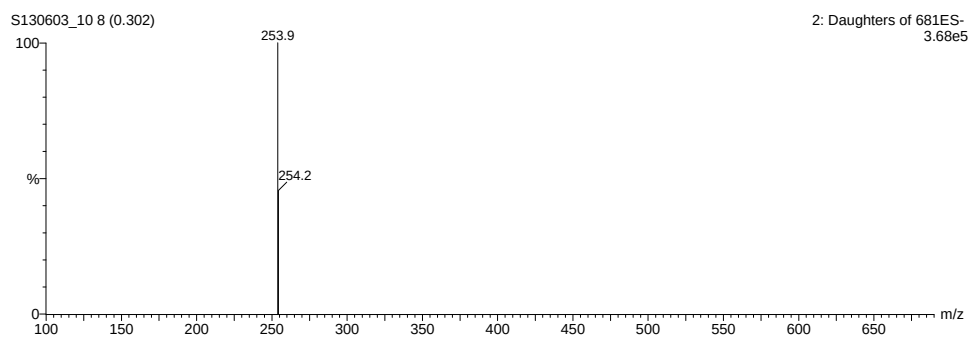
付図-1. マススペクトル

フルベンジアミドのマススペクトル (一次イオン) の一例 (負モード)



フルベンジアミ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 =681.0, 負モード)

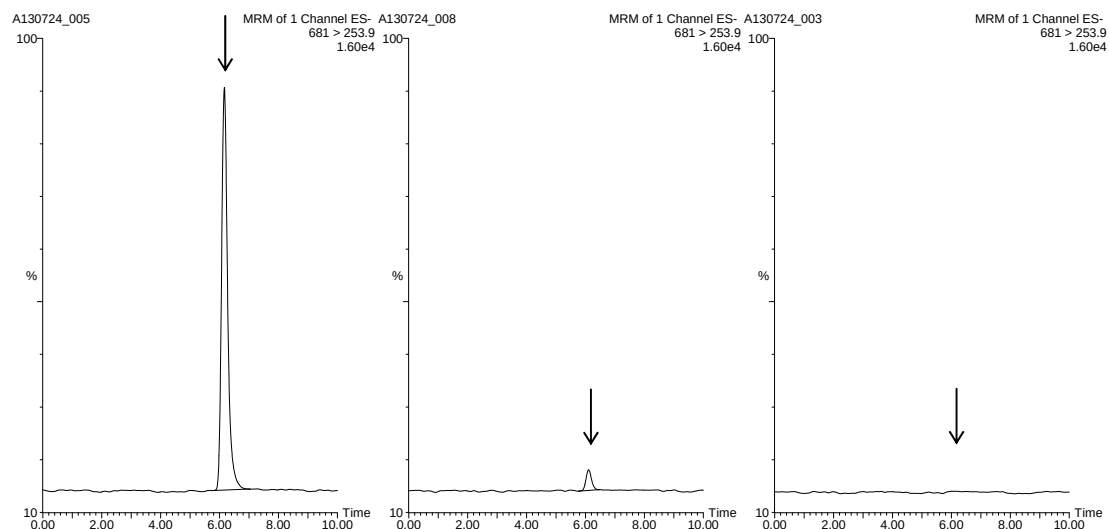


付図-2. 果肉のクロマトグラム（代表例）

標準品 0.1 ng

標準品 0.005 ng

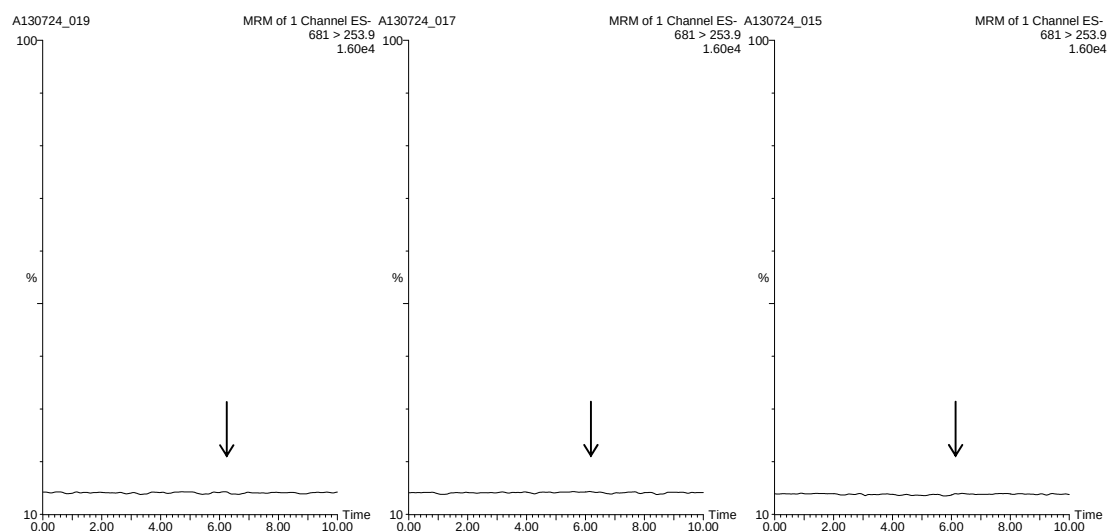
宮崎 無処理
5 μ L/4 mL/0.4 g



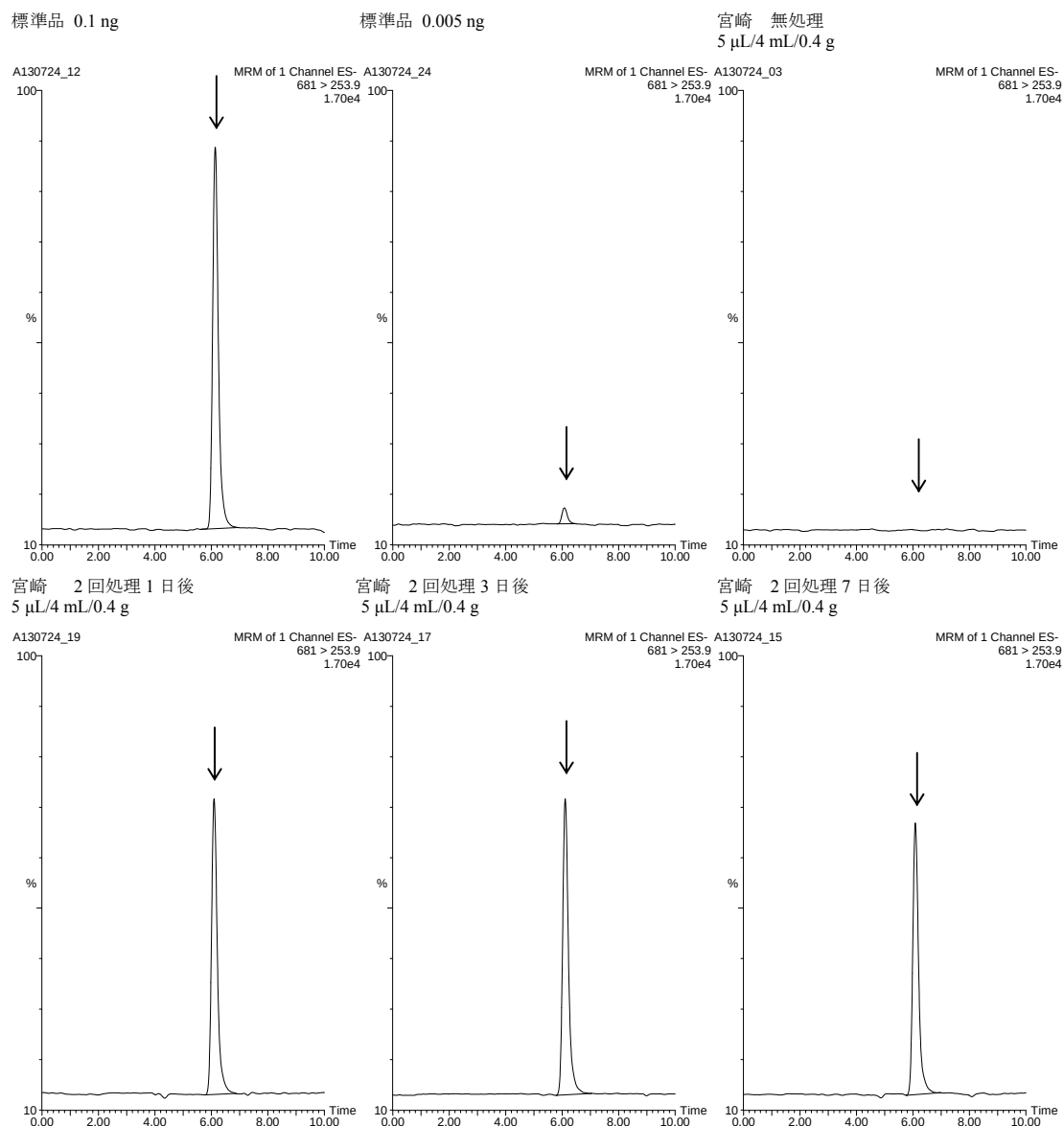
宮崎 2回処理 1日後
5 μ L/4 mL/0.4 g

宮崎 2回処理 3日後
5 μ L/4 mL/0.4 g

宮崎 2回処理 7日後
5 μ L/4 mL/0.4 g



付図-3. 果実のクロマトグラム（代表例）



農薬登録における作物のグループ化・残留分析詳細⑦

ベンチアバリカルブイソプロピル

1. 分析対象物質

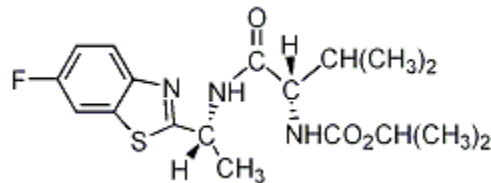
ベンチアバリカルブイソプロピル

化学名 : isopropyl [(S)-1-{[(R)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)ethyl]carbamoyl}-2-methylpropyl]carbamate

分子式 : $C_{18}H_{24}FN_3O_3S$

分子量 : 381.5

構造式 :



性 状 : 白色粉末

融 点 : 153.1°C, 169.5°C (結晶多型)

蒸気圧 : $< 3.0 \times 10^{-1}$ mPa (25°C)

分配係数 : $\log P_{ow} = 2.3 \sim 2.9$ (pH=5~9, 20~25°C)

溶解性 : 水 13.14, 10.96 (pH=5), 12.76 (pH=9) (以上 mg/L, 20°C)
メタノール 41.7, ヘプタン 2.15×10^{-2} , キシレン 0.501,
アセトン 25.4, ジクロロエタン 11.5, 酢酸エチル 19.4 (以上 g/L, 20°C)

安定性 : 加水分解半減期 ; 1年以上 (pH=4, 7, 9, 25°C)

光分解半減期 ; 301日 (自然水), 131日 (蒸留水)

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

2. 標準品及び試薬

ベンチアバリカルブイソプロピル標準品：純度 99.5%（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）

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

酢酸アンモニウム：試薬特級（和光純薬工業製）

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 R-45
及びロボクーブ BLIXER-5Plus

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. 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：5 mmol/L 酢酸アンモニウム／アセトニトリル

65:35 (2 min)－(4 min)－10:90

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：約 5.1 min

4.2. 質量分析計

イオン化法：	エレクトロスプレー イオン化法 (ESI)
	正モード
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：	50 V
コリジョン電圧：	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：	プリカーサーイオン m/z 382.0
	プロダクトイオン m/z 180.0

5. 検量線の作成

ベンチアバリカルブイソプロピルの標準品10.1 mg (10.0 mg相当) を50 mLのメスフラスコに精秤し、メタノールに溶解して200 mg/L標準原液を調製した。この標準原液をアセトニトリル／水(50:50, v/v) 混液で希釈して0.000005, 0.00001, 0.00005, 0.0001及び0.0002 mg/Lの標準溶液を調製した。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、データ処理装置を用いてベンチアバリカルブイソプロピルのピーク面積を測定し、横軸に重量 (ng)、縦軸にピーク面積をとって検量線を作成した。

6. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料の重量を量った後、無処理試料は各々を縦に8分割し、それぞれの対角の2つを取り合わせた（4組作製）。その2組を果実分析用試料とし、残りの2組を果肉分析用試料とした。2組の果実分析用試料のうち、1組の全量をミキサーで均一化した（残りの1組は添加剤が必要なアラニカルブ分析用試料とした）。2組の果肉分析用試料は、果肉と果皮に分けた。その1組の全量をミキサーで均一化した（残りの1組は添加剤が必要なアラニカルブ分析用試料とした）。

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

量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比（%）を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した果肉試料又は果実試料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0.5 mL（試料0.05 g相当量）を分取した。

6.1.3. 定量

分取した抽出液にアセトニトリル／水（50:50, v/v）混液を加えて50 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 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、検量線よりベンチアバリカルブイソプロピルの重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値(LOQ)及び検出限界値(LOD)*

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μ L)	定量限界 (ppm)
0.00005	0.05	50	5	0.01
最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μ L)	検出限界 (ppm)
0.000025	0.05	50	5	0.005

*果肉、果実はいずれも同じ値

6.3. 回収率

分析法確認のため、高知試料の果肉無処理試料*及び宮崎試料の果実処理3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24年度 農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業の試料を使用

**平成24年度 生産資材安全確保推進事業の試料を使用

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	5	96, 95,	95, 92	95,	95	1.6
高知	0.25	96, 93,	95, 93	94,	94	1.4
高知	0.01	96, 93,	95, 88	93,	93	3.3

6.3.2. 果実の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
宮崎	5	95, 93,	95, 92	94,	94	1.4
宮崎	0.25	93, 91,	92, 90	91,	91	1.3
宮崎	0.01	95, 92,	94, 90	93,	93	2.1

7. 精度管理

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

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

クォリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

また、2012年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)
2013/8/13	茨城	94	<0.01
2013/8/21	高知	99	<0.01
2013/7/25	宮崎	100	<0.01
2013/10/2	宮崎	97	<0.01

7.1.2.果実

分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
2013/8/13	茨城	91	<0.01
2013/8/21	高知	99	<0.01
2013/7/25	宮崎	97	<0.01
2013/10/2	宮崎	96	<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、0.0001 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. 果肉

試料	マトリックス効果 (%)
茨城	99
高知	103
宮崎	105

8.2. 果実

試料	マトリックス効果 (%)
茨城	100
高知	104
宮崎	100

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料にベンチアバリカルブイソプロピルを添加し、 -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

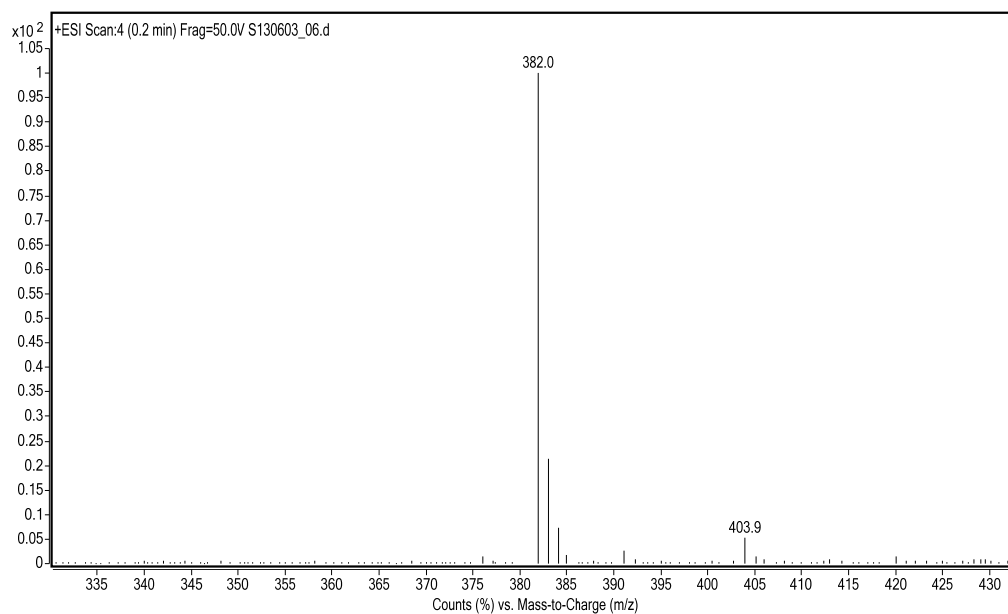
添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	71 (2013/7/23-10/2)	94,	91	92
0.5	高知	57 (2013/8/6-10/2)	92,	90	91
0.5	宮崎	86 (2013/7/8-10/2)	92,	91	92

9.2.果実の保存安定性試験結果

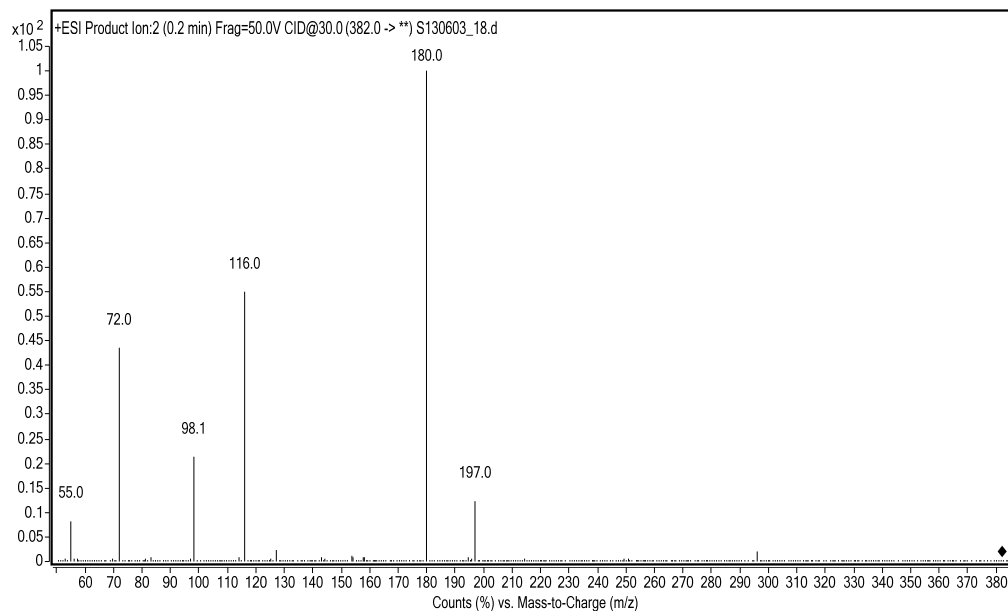
添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	71 (2013/7/23-10/2)	87,	85	86
0.5	高知	57 (2013/8/6-10/2)	93,	92	92
0.5	宮崎	86 (2013/7/8-10/2)	89,	89	89

付図-1. マススペクトル

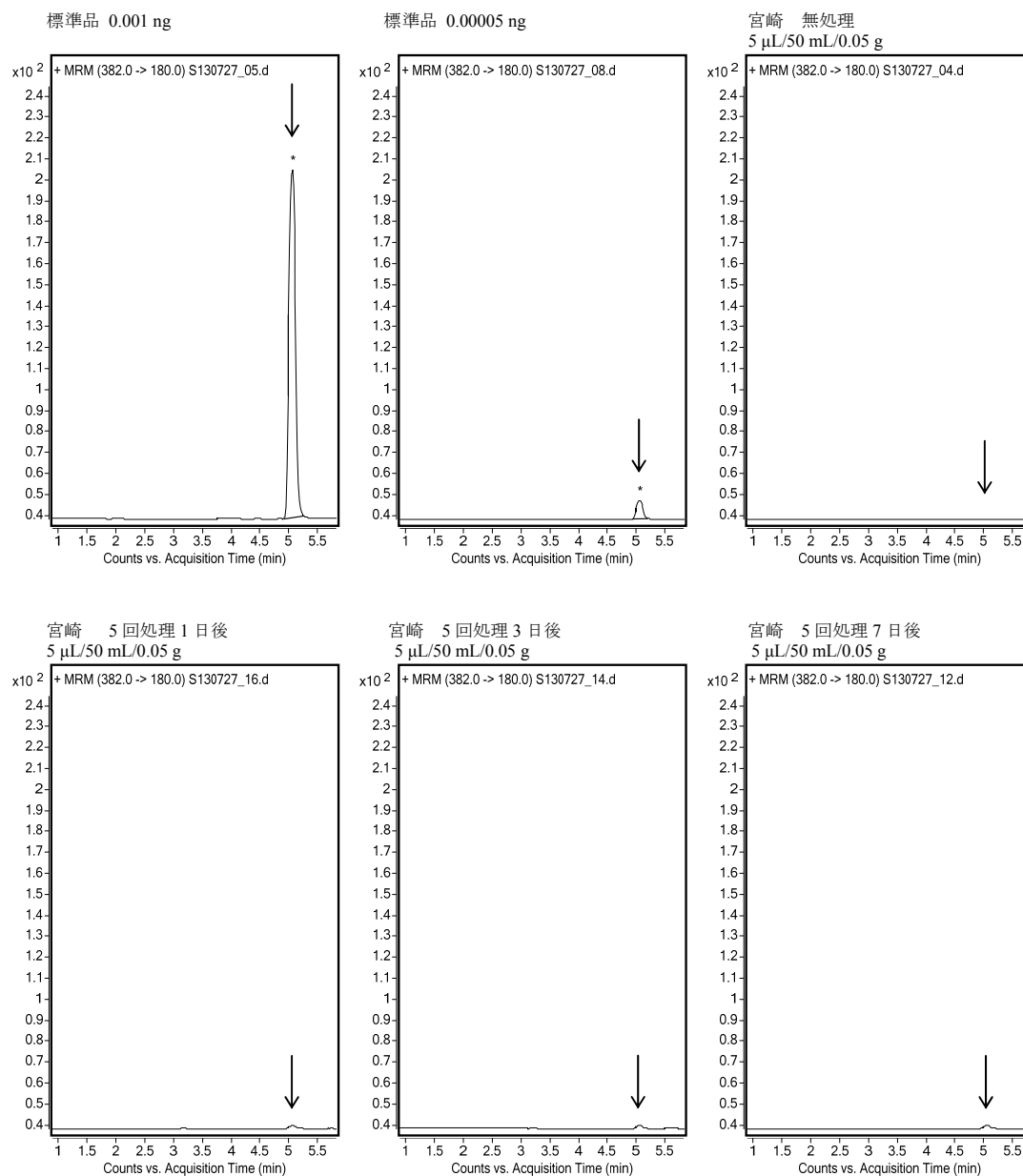
ベンチアバリカルブのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)



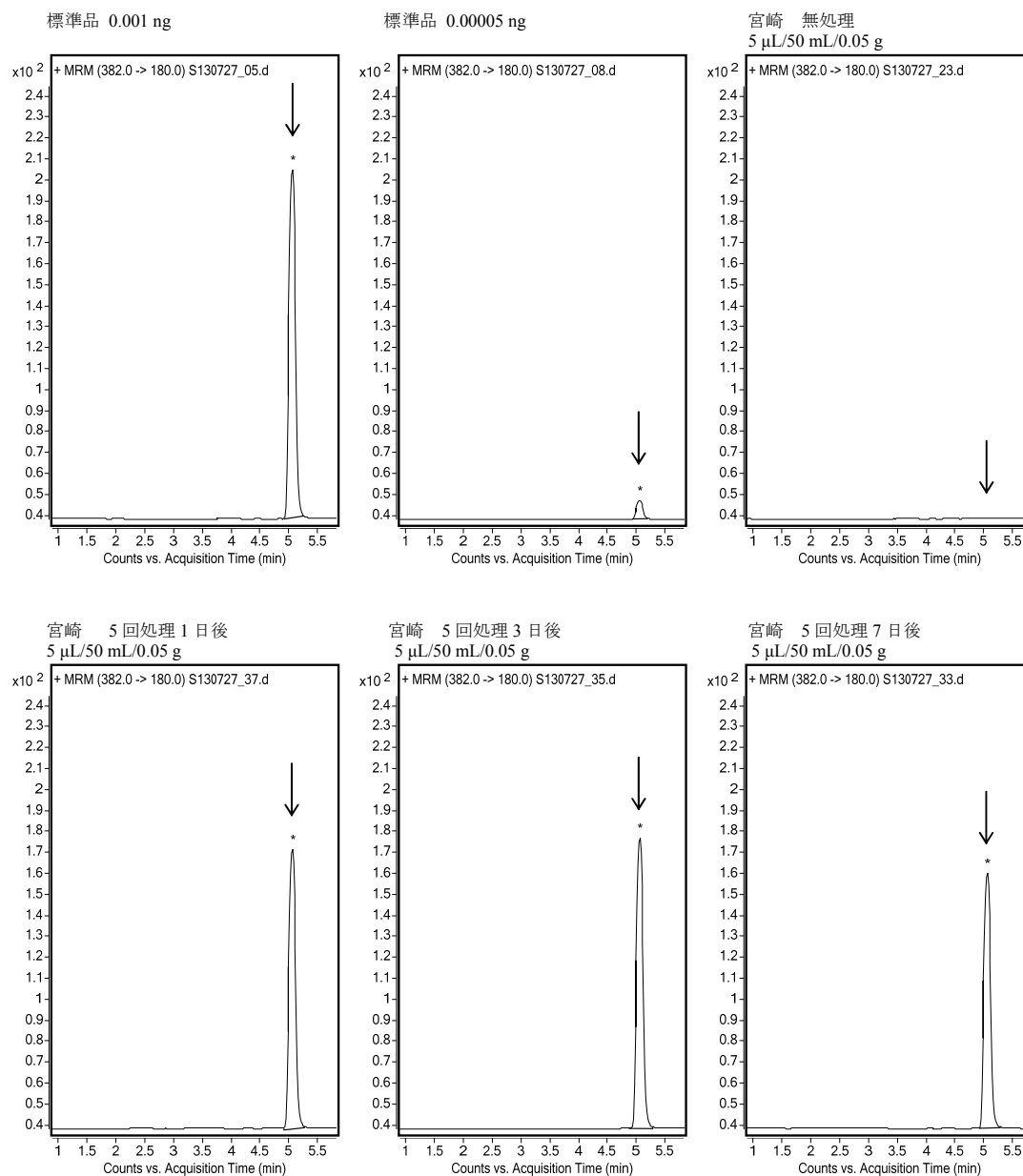
ベンチアバリカルブイソプロピルのプロダクトスキャンスペクトルの一例
(プリカーサーイオン ; $m/z=382.0$, 正モード)



付図-2. 果肉のクロマトグラム (代表例)



付図-3. 果実のクロマトグラム (代表例)



農薬登録における作物のグループ化・残留分析詳細⑧
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	—	1.69	1.71	16.9	10.6	93	7	2.0
	B	1	1.70		8.50		92	8	2.0
	B	3	1.68		8.38		91	9	2.0
	B	7	1.75		8.74		93	7	2.1
							平均 92:8		平均 2.0
高知	0	—	1.48	1.40	14.8	9.84	89	11	2.1
	B	1	1.38		8.26		90	10	2.1
	B	3	1.34		8.02		91	9	2.1
	B	7	1.38		8.26		91	9	1.6
							平均 90:10		平均 2.0
宮崎	0	—	1.75	1.89	21.0	13.9	89	11	2.0
	B	1	1.85		11.1		91	9	2.1
	B	3	1.97		11.8		89	11	2.2
	B	7	1.97		11.8		91	9	2.1
							平均 90:10		平均 2.1
3 ほ場の総平均重量					3 ほ場の総重量の平均				
1.67 kg/個					11.4 kg				

B：シエノピラフェンは1回処理

フルベンジアミドは2回処理

チアクロプリドは3回処理

ピメトロジン，アミスルブロムは4回処理

ベンチアバリカルブイソプロピルは5回処理

トリホリンは6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

農薬登録における作物のグループ化・残留分析詳細①
フルフェノクスロン

1. 分析対象物質

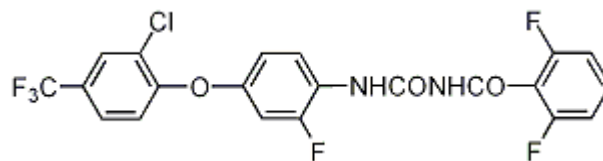
フルフェノクスロン

化学名： 1-[4-(2-chloro- α, α, α -trifluoro-*p*-tolylloxy)-2-fluorophenyl]-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea

分子式： $C_{21}H_{11}ClF_6N_2O_3$

分子量： 488.8

構造式：



性 状： 白色結晶固体

融 点： 169～172℃

蒸気圧： 6.52×10^{-9} mPa (20℃)

分配係数： $\log P_{ow} = 4.0$ (pH=7)

溶解性： 水 0.0186 (pH=4), 0.00152 (pH=7), 0.00373 (pH=9) (以上 mg/L, 25℃)
キシレン 6, ヘキサン 0.11, シクロヘキサン 95, ジクロロメタン 18.8,
メタノール 3.5, アセトン 73.8 (以上 g/L, 25℃)

安定性： 190℃まで安定

水中光分解半減期；11日

加水分解半減期；112日 (pH=5), 104日 (pH=7), 36.7日 (pH=9),
2.7日 (pH=12),

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

2. 標準品及び試薬

フルフェノクスロン標準品：純度 98.5% (Dr. Ehrenstorfer 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)

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

酢酸アンモニウム：試薬特級 (和光純薬工業製)

陰イオン交換ミニカラム：InertSep SAX, 500 mg/6 mL (ジールサイエンス製)

陽イオン交換ミニカラム：Bond Elute 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 R-45 及びロボクーブ BLIXER-5Plus
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. 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 µm
溶離液：	5 mmol/L 酢酸アンモニウム／アセトニトリル 65:35 (2 min)－(4 min)－10:90－(2 min)－5:95
流速：	0.3 mL/min
カラム温度：	40°C
試料注入量：	5 µL
保持時間：	約 6.9 min

4.2. 質量分析計

イオン化法：	エレクトロスプレー イオン化法 (ESI)
	正モード
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：	5000 V
フラグメンター電圧：	50 V
コリジョン電圧：	20 V
	(コリジョンガス; N ₂)
イオン検出法：	MRM
モニタリングイオン：	プリカーサーイオン m/z 488.9
	プロダクトイオン m/z 157.9

5. 検量線の作成

フルフェノクスロンの標準品10.2 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。この標準原液をアセトニトリル／水（50:50, v/v）混液で希釈して0.000025, 0.00005, 0.00025, 0.0005及び0.001 mg/Lの標準溶液を調製した。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、データ処理装置を用いてフルフェノクスロンのピーク面積を測定し、横軸に重量（ng）、縦軸にピーク面積をとって検量線を作成した。

6. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料の重量を量った後、無処理試料は各々を縦に8分割し、それぞれの対角の2つを取り合わせた（4組作製）。その2組を果実分析用試料とし、残りの2組を果肉分析用試料とした。2組の果実分析用試料のうち、1組の全量をミキサーで均一化した（残りの1組は添加剤が必要なアラニカルブ分析用試料とした）。2組の果肉分析用試料は、果肉と果皮に分けた。その1組の全量をミキサーで均一化した（残りの1組は添加剤が必要なアラニカルブ分析用試料とした）。

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

量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比（%）を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した果肉試料又は果実試料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0.5 mL（試料0.05 g相当量）を分取し、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. 陰イオン交換ミニカラム及び陽イオン交換ミニカラムの連結カラムによる精製

陰イオン交換ミニカラム及び陽イオン交換ミニカラムにアセトニトリル5 mLを流下し前処理した。陰イオン交換ミニカラムを陽イオン交換ミニカラムの下に連結し、前項の残留物をアセトニトリル5 mLに溶解して連結カラムに移して流下した。さらにアセトニトリル15 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、検量線よりフルフェノクスロンの重量を求め、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)
0.00025	0.05	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)
0.000125	0.05	10	5	0.005

*果肉、果実はいずれも同じ値

6.3. 回収率

分析法確認のため、高知試料の果肉無処理試料*及び宮崎試料の果実無処理試料**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24年度 農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業の試料を使用

**平成24年度 生産資材安全確保推進事業の試料を使用

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	5	89, 81,	87, 79	86,	84	5.0
高知	0.25	87, 82,	85, 80	85,	84	3.3
高知	0.01	88, 82,	84, 77	83,	83	4.8

6.3.2. 果実の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
宮崎	5	100, 98,	99, 91	99,	97	3.8
宮崎	0.25	95, 90,	95, 88	93,	92	3.4
宮崎	0.01	97, 90,	96, 84	92,	92	5.7

7. 精度管理

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

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

クォリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

また、2012年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/ 8/19	茨城	89	<0.01
2013/ 9/ 9	高知	82	<0.01
2013/ 8/ 1	宮崎	88	<0.01
2013/10/ 2	宮崎	86	<0.01

7.1.2.果実

分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
2013/ 8/19	茨城	79	<0.01
2013/ 9/ 9	高知	80	<0.01
2013/ 8/ 1	宮崎	93	<0.01
2013/10/ 2	宮崎	89	<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、0.0005 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. 果肉

試料	マトリックス効果 (%)
茨城	95
高知	101
宮崎	105

8.2. 果実

試料	マトリックス効果 (%)
茨城	93
高知	93
宮崎	99

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料にフルフェノクスロンを添加し、 -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

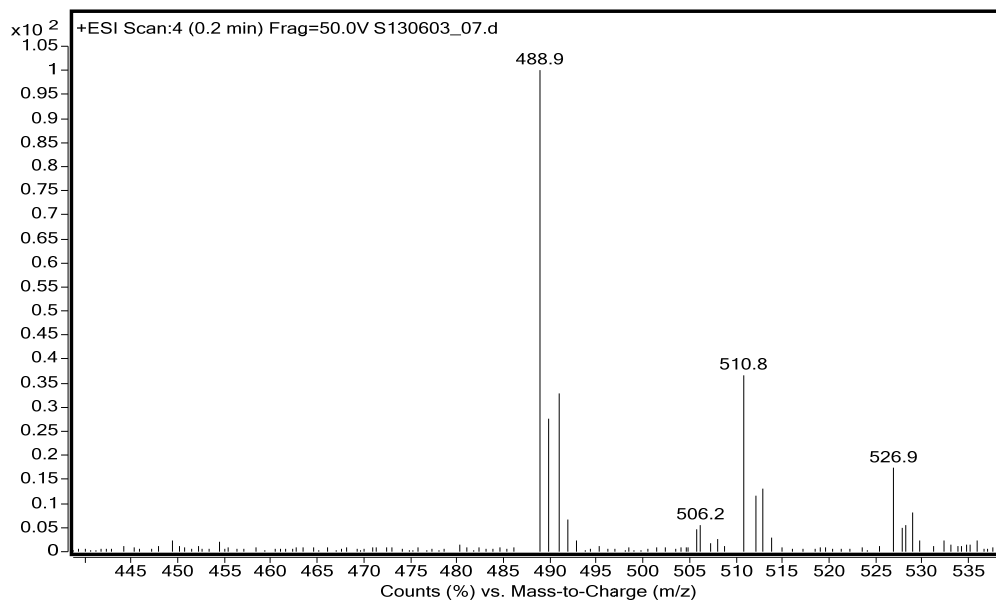
添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	71 (2013/7/23-10/2)	89,	82	86
0.5	高知	57 (2013/8/6-10/2)	95,	95	95
0.5	宮崎	86 (2013/7/8-10/2)	73,	70	72

9.2. 果実の保存安定性試験結果

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	71 (2013/7/23-10/2)	89,	86	88
0.5	高知	57 (2013/8/6-10/2)	101,	87	94
0.5	宮崎	86 (2013/7/8-10/2)	95,	77	86

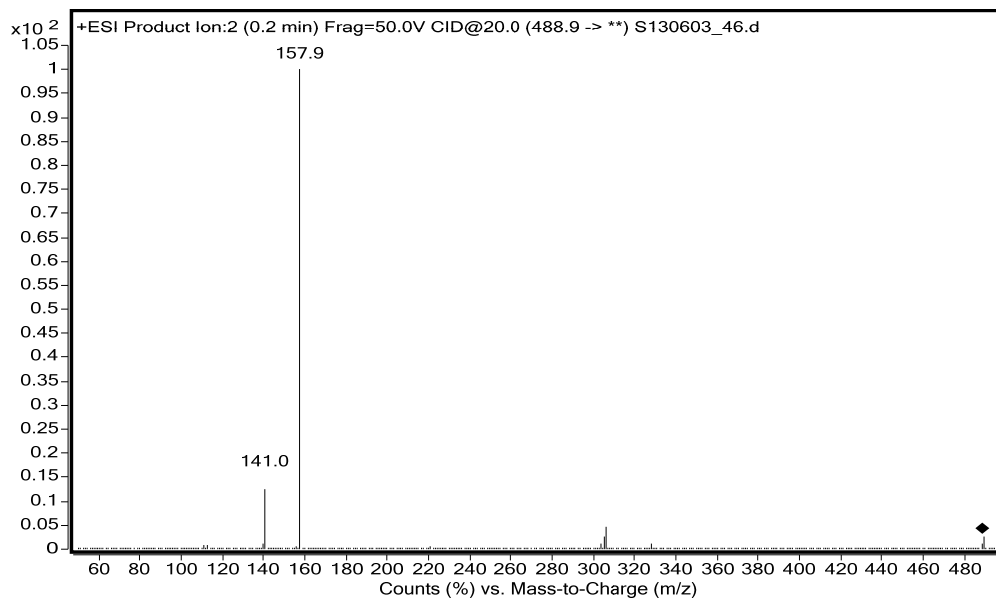
付図-1. マススペクトル

フルフェノクスロンのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)

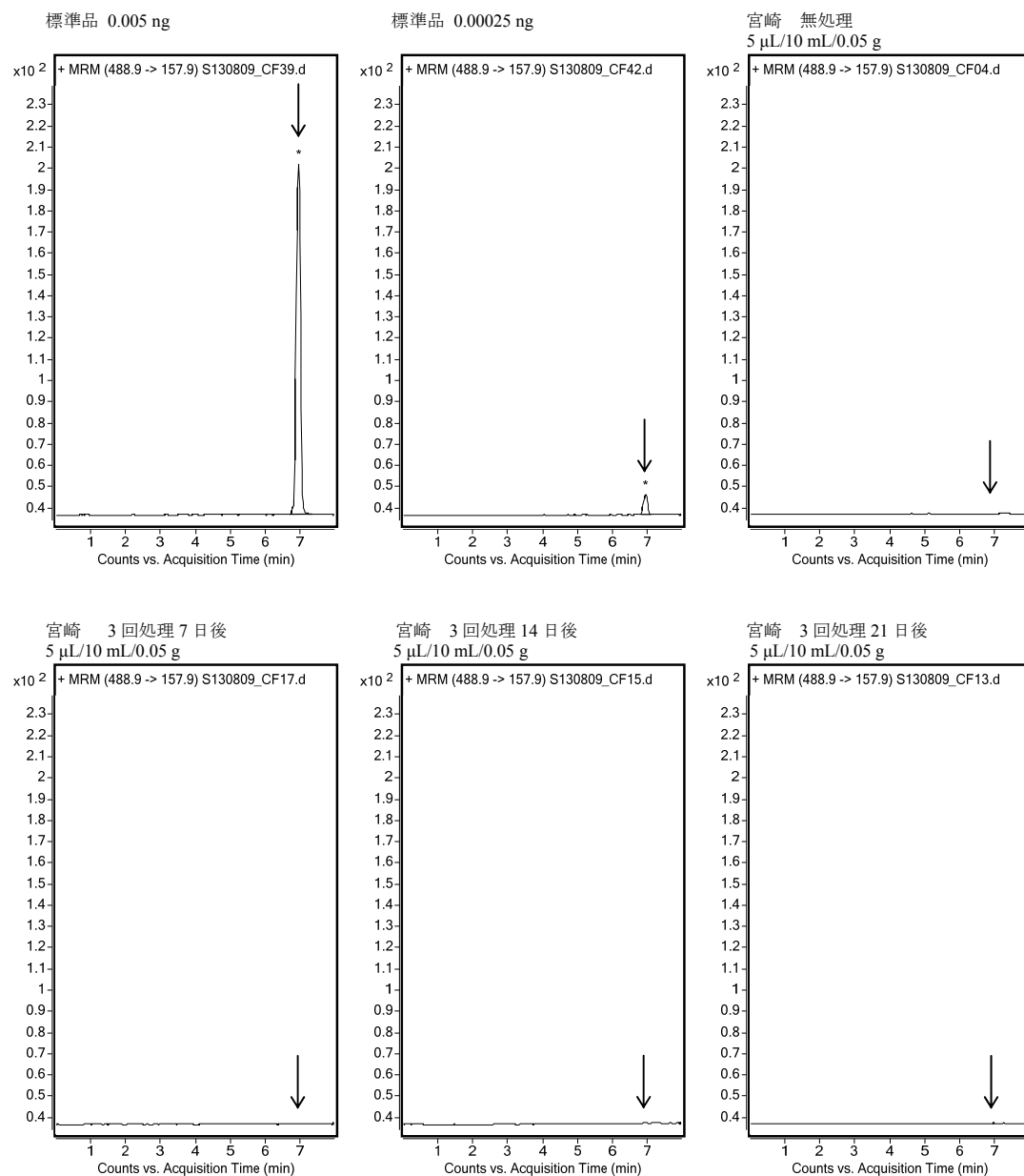


フルフェノクスロンのプロダクトスキャンスペクトルの一例

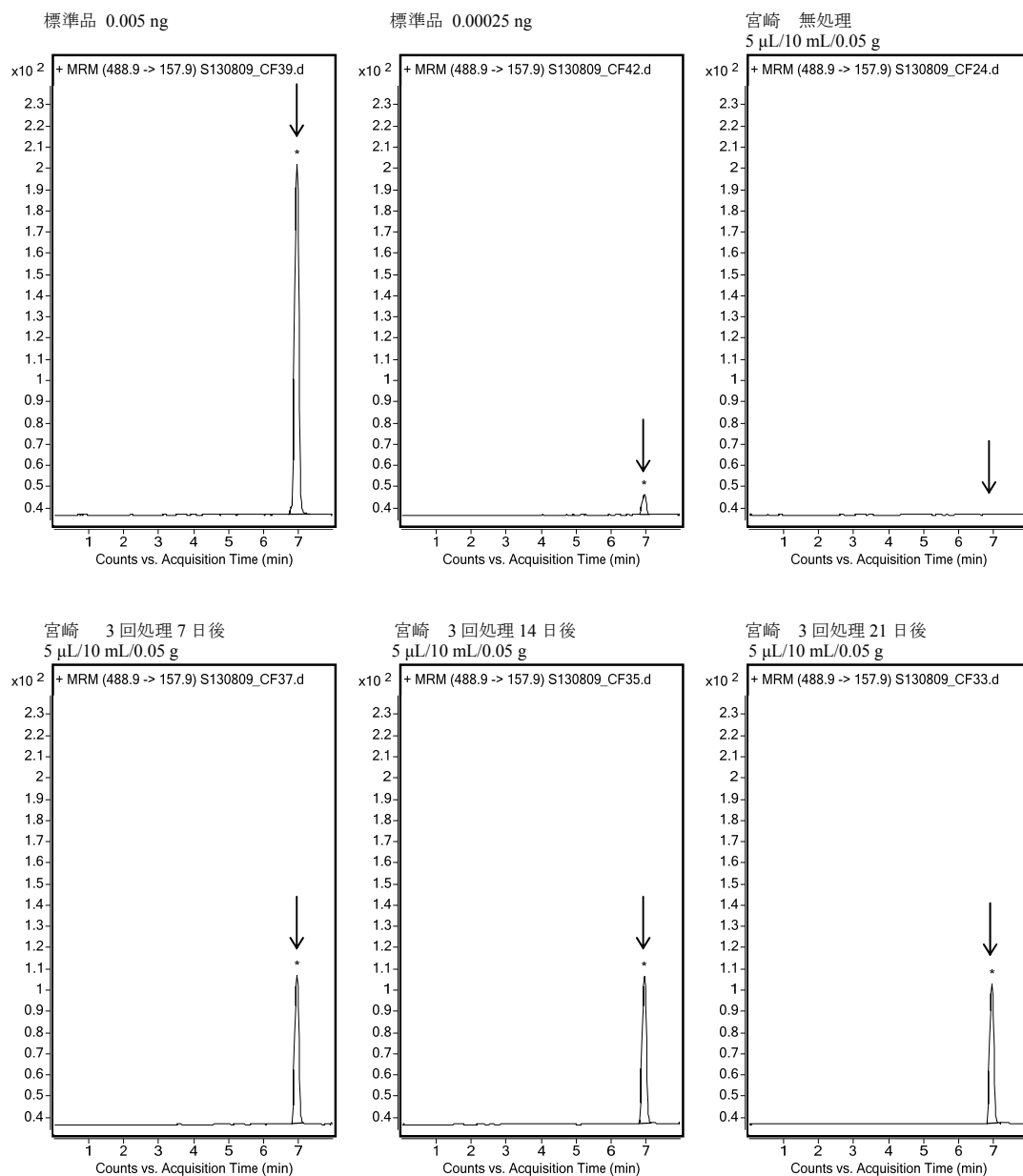
(プリカーサーイオン ; $m/z=488.9$, 正モード)



付図-2. 果肉のクロマトグラム (代表例)



付図-3. 果実のクロマトグラム (代表例)



農薬登録における作物のグループ化・残留分析詳細②
シメコナゾール

1. 分析対象物質

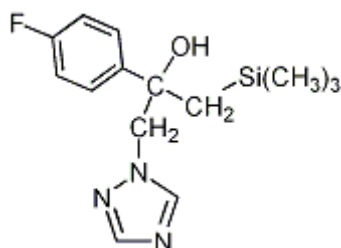
シメコナゾール

化学名： (RS)-2-(4-fluorophenyl)-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)-3-(trimethylsilyl)propan-2-ol

分子式： $C_{14}H_{20}FN_3OSi$

分子量： 293.4

構造式：



性 状： 白色結晶

融 点： 118.5～120.5°C

蒸気圧： 5.4×10^{-2} mPa (25°C)

分配係数： $\log P_{ow} = 3.2$

溶解性： 水 57.5 mg/L (20°C)

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

2. 標準品及び試薬

シメコナゾール標準品：純度 99.2% (和光純薬工業製)

アセトニトリル，メタノール：残留農薬試験用 (和光純薬工業製)

メタノール：LC-MS 用 (和光純薬工業製)

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

ギ酸：高速液体クロマトグラフィー用 (和光純薬工業製)

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

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 R-45 及びロボクーブ BLIXER-5Plus
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. 高速液体クロマトグラフ

カラム：	SunFire C18, 3.5 μm (ウォータース製) 内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3.5 μm
溶離液：	メタノール／水／2%ぎ酸 (70:25:5, 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：	約 7.8 min

4.2. 質量分析計

イオン化法：	エレクトロスプレー イオン化法 (ESI) 正モード
コーンガス流量：	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：	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 294.1 プロダクトイオン m/z 69.8

5. 検量線の作成

シメコナゾールの標準品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。この標準原液をメタノール／水 (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。この溶液の10 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メコナゾールのピーク面積を測定し、横軸に重量 (ng), 縦軸にピーク面積をとって検量線を作成した。

6. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料の重量を量った後、無処理試料は各々を縦に8分割し、それぞれの対角の2つを取り合わせた (4組作製)。その2組を果実分析用試料とし、残りの2組を果肉分析用試料とした。2組の果実分析用試料のうち、1組の全量をミキサーで均一化した (残りの1組は添加剤が必要なアラニカルブ分析用試料とした)。2組の果肉分析用試料は、果肉と果皮に分けた。その1組の全量をミキサーで均一化した (残りの1組は添加剤が必要なアラニカルブ分析用試料とした)。

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

量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比 (%) を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した果肉試料又は果実試料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。分取した抽出液に水10 mLを添加後、40°C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. 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。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 (50:50, v/v) 混液10 mLを流下し、溶出液を取り、40°C以下の水浴中で減圧濃縮し、最後は窒素気流下で溶媒を留去した。

6.1.4. 定量

残留物をメタノール／水（50:50, 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 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，検量線よりチアクロプリドの重量を求め，試料中の残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値(LOQ)及び検出限界値(LOD)*

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μ L)	定量限界 (ppm)
0.005	0.2	4	10	0.01

最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μ L)	検出限界 (ppm)
0.0025	0.2	4	10	0.005

*果肉，果実はいずれも同じ値

6.3. 回収率

分析法確認のため、高知試料の果肉無処理試料*及び宮崎試料の果実無処理試料**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24年度 農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業の試料を使用

**平成24年度 生産資材安全確保推進事業の試料を使用

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	5	93, 78,	92, 74	83,	84	10.0
高知	0.25	91, 87,	89, 83	89,	88	3.4
高知	0.01	82, 75,	80, 73	78,	78	4.7

6.3.2. 果実の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
宮崎	5	84, 80,	83, 80	83,	82	2.3
宮崎	0.25	92, 86,	91, 85	88,	88	3.5
宮崎	0.01	89, 87,	89, 86	88,	88	1.5

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、2012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)
2013/8/16	茨城	86	<0.01
2013/8/20	茨城	85	<0.01
2013/9/ 3	高知	81	<0.01
2013/9/ 4	高知	84	<0.01
2013/7/29	宮崎	100	<0.01
2013/7/31	宮崎	93	<0.01

7.1.2.果実

分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
2013/8/16	茨城	95	<0.01
2013/8/20	茨城	92	<0.01
2013/9/ 3	高知	72	<0.01
2013/9/ 4	高知	86	<0.01
2013/7/29	宮崎	102	<0.01
2013/7/31	宮崎	93	<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. 果肉

試料	マトリックス効果 (%)
茨城	99
高知	107
宮崎	107

8.2. 果実

試料	マトリックス効果 (%)
茨城	100
高知	105
宮崎	110

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料にシメコナゾールを添加し、 -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

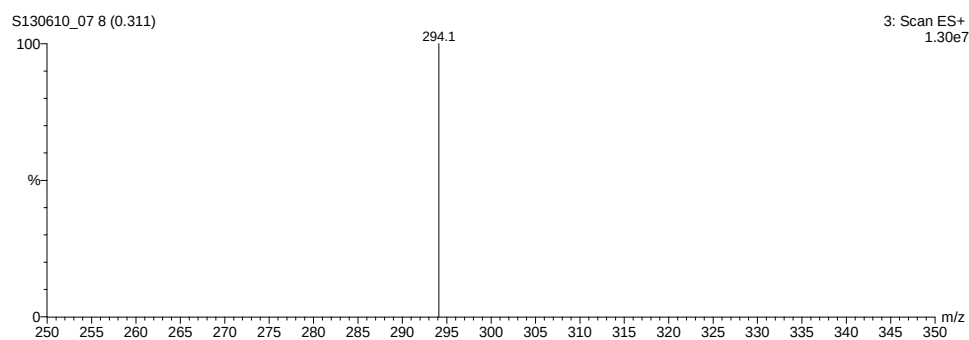
添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	28 (2013/7/23-8/20)	91,	91	91
0.5	高知	29 (2013/8/6-9/4)	84,	80	82
0.5	宮崎	23 (2013/7/8-31)	86,	84	85

9.2. 果実の保存安定性試験結果

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	28 (2013/7/23-8/20)	87,	86	86
0.5	高知	29 (2013/8/6-9/4)	75,	74	74
0.5	宮崎	23 (2013/7/8-31)	88,	87	88

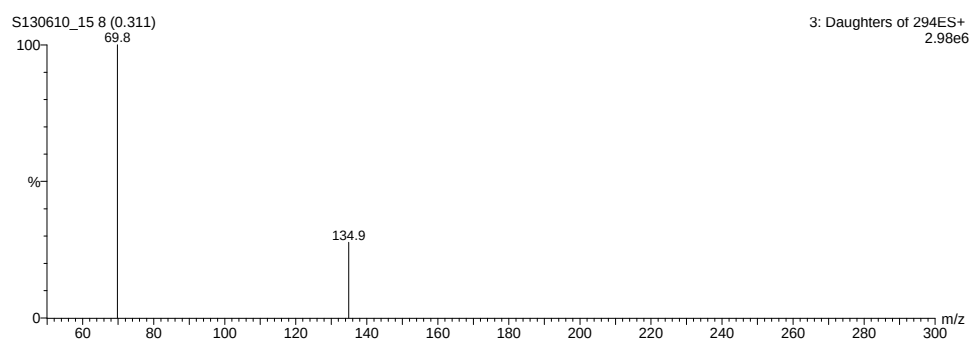
付図-1. マススペクトル

シメ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)

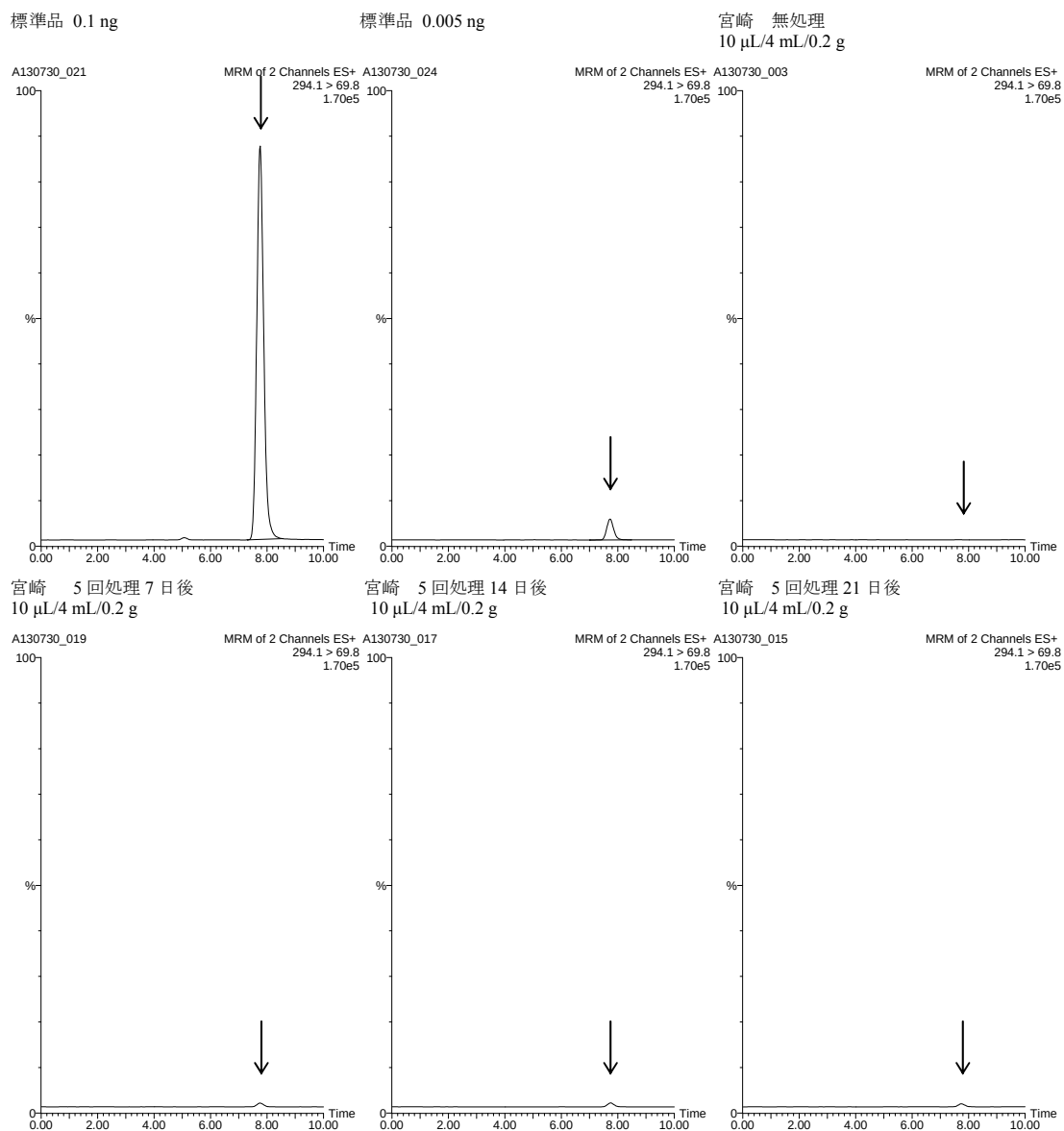


シメコナゾールのプロダクトスキャンスペクトルの一例

(プリカーサーイオン ; $m/z=294.1$, 正モード)



付図-2. 果肉のクロマトグラム (代表例)

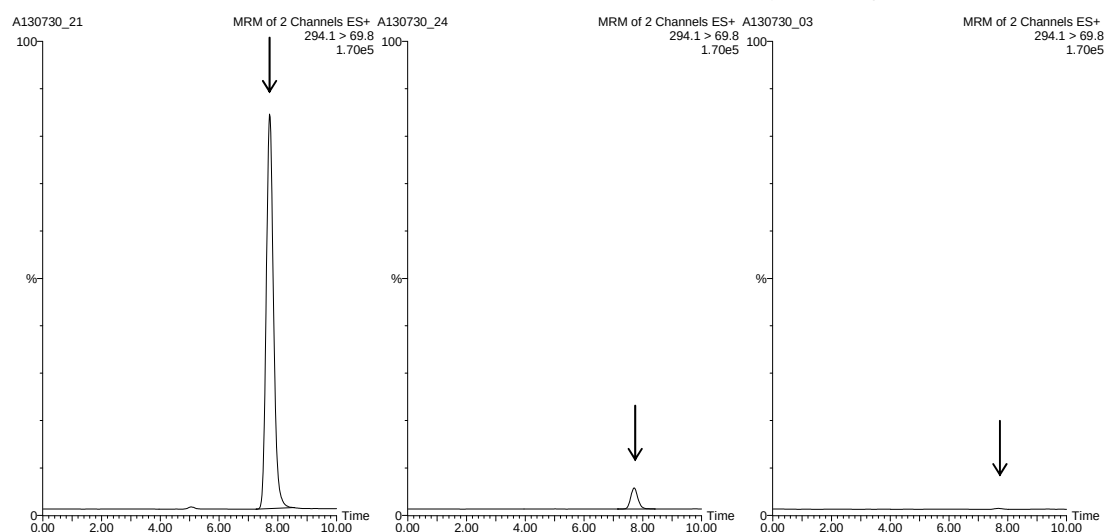


付図-3. 果実のクロマトグラム (代表例)

標準品 0.1 ng

標準品 0.005 ng

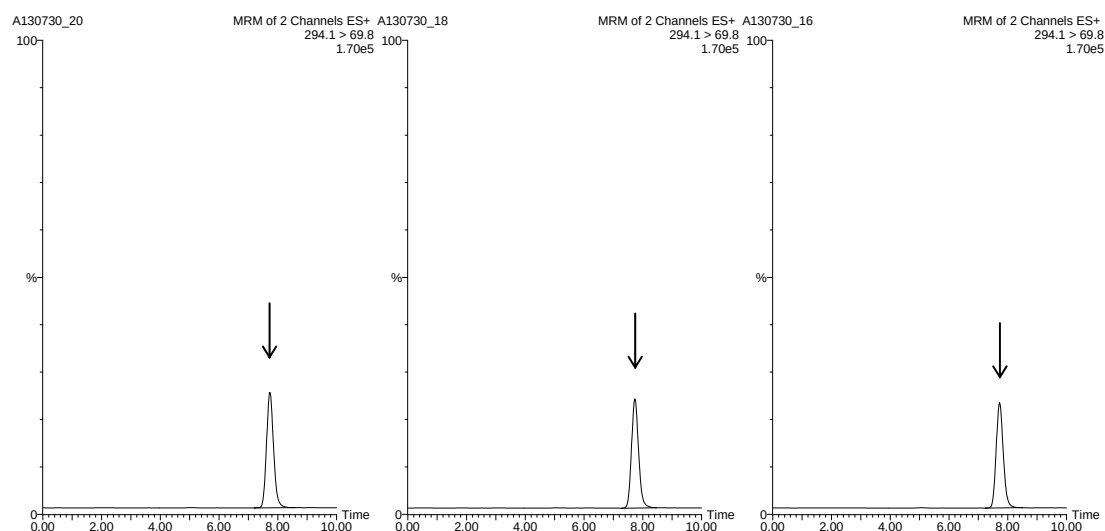
宮崎 無処理
10 μ L/4 mL/0.2 g



宮崎 5 回処理 7 日後
10 μ L/4 mL/0.2 g

宮崎 5 回処理 14 日後
10 μ L/4 mL/0.2 g

宮崎 5 回処理 21 日後
10 μ L/4 mL/0.2 g



農薬登録における作物のグループ化・残留分析詳細③
クロルフルアズロン

1. 分析対象物質

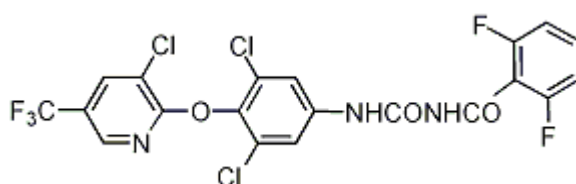
クロルフルアズロン

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

分子式： $C_{20}H_9Cl_3F_5N_3O_3$

分子量： 540.7

構造式：



性 状： 白色結晶

融 点： 221.2～223.9°C

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

分配係数： $\log P_{OW} = 5.9$

溶解性： 水 0.012 mg/L (20°C)

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

安定性： 熱, 光, 加水分解に対して安定

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

2. 標準品及び試薬

クロルフルアズロン標準品：純度 99.0% (Dr. Ehrenstorfer 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)

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

酢酸アンモニウム：試薬特級 (和光純薬工業製)

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)

陽イオン交換ミニカラム：Bond Elute 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 R-45 及びロボクーブ BLIXER-5Plus
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. 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 µm
溶離液：	5 mmol/L 酢酸アンモニウム／アセトニトリル 65:35 (2 min)－(4 min)－10:90－(2 min)－5:95
流速：	0.3 mL/min
カラム温度：	40°C
試料注入量：	5 µL
保持時間：	約 7.1 min

4.2. 質量分析計

イオン化法：	エレクトロスプレー イオン化法 (ESI) 負モード
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：	50 V
コリジョン電圧：	2 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：	プリカーサーイオン m/z 539.9 プロダクトイオン m/z 519.9

5. 検量線の作成

クロルフルアズロンの標準品10.1 mg (10.0 mg相当) を50 mLのメスフラスコに精秤し、メタノールに溶解して200 mg/L標準原液を調製した。この標準原液をアセトニトリル/水 (50:50, v/v) 混液で希釈して0.000025, 0.00005, 0.00025, 0.0005及び0.001 mg/Lの標準溶液を調製した。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、データ処理装置を用いてクロルフルアズロンのピーク面積を測定し、横軸に重量 (ng), 縦軸にピーク面積をとって検量線を作成した。

6. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料の重量を量った後、無処理試料は各々を縦に8分割し、それぞれの対角の2つを取り合わせた (4組作製)。その2組を果実分析用試料とし、残りの2組を果肉分析用試料とした。2組の果実分析用試料のうち、1組の全量をミキサーで均一化した (残りの1組は添加剤が必要なアラニカルブ分析用試料とした)。2組の果肉分析用試料は、果肉と果皮に分けた。その1組の全量をミキサーで均一化した (残りの1組は添加剤が必要なアラニカルブ分析用試料とした)。

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

量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比 (%) を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した果肉試料又は果実試料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0.5 mL (試料0.05 g相当量) を分取し、40°C以下の水浴中で減圧濃縮し、最後は窒素気流下で溶媒を留去した。

6.1.3. 陰イオン交換ミニカラム及び陽イオン交換ミニカラムの連結カラムによる精製

陰イオン交換ミニカラム及び陽イオン交換ミニカラムにアセトニトリル5 mLを流下し前処理した。陰イオン交換ミニカラムを陽イオン交換ミニカラムの下に連結し、前項の残留物をアセトニトリル5 mLに溶解して連結カラムに移して流下した。さらにアセトニトリル15 mLを流下し、全溶出液を取り、40°C以下の水浴中で減圧濃縮し、最後は窒素気流下で溶媒を留去した。

6.1.4. 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 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，検量線よりクロルフルアズロンの重量を求め，試料中の残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値(LOQ)及び検出限界値(LOD)*

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μ L)	定量限界 (ppm)
0.00025	0.05	10	5	0.01

最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μ L)	検出限界 (ppm)
0.000125	0.05	10	5	0.005

*果肉，果実はいずれも同じ値

6.3. 回収率

分析法確認のため、高知試料の果肉無処理試料*及び宮崎試料の果実無処理試料**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24年度 農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業の試料を使用

**平成24年度 生産資材安全確保推進事業の試料を使用

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	5	94, 86,	92, 85	92,	90	4.5
高知	0.25	94, 88,	90, 80	88,	88	5.8
高知	0.01	93, 74,	89, 71,	86,	83	11.6

6.3.2. 果実の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
宮崎	5	105, 92,	98, 89	98,	96	6.4
宮崎	0.25	94, 93,	94, 92	93,	93	0.9
宮崎	0.01	106, 93,	102, 90	98,	98	6.6

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、2012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/ 8/19	茨城	84	<0.01
2013/ 9/ 9	高知	73	<0.01
2013/ 8/ 1	宮崎	84	<0.01
2013/10/ 2	宮崎	83	<0.01

7.1.2.果実

分析日	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
2013/ 8/19	茨城	77	<0.01
2013/ 9/ 9	高知	78	<0.01
2013/ 8/ 1	宮崎	83	<0.01
2013/10/ 2	宮崎	80	<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°C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、0.0005 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. 果肉

試料	マトリックス効果 (%)
茨城	100
高知	104
宮崎	107

8.2. 果実

試料	マトリックス効果 (%)
茨城	100
高知	92
宮崎	115

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料にクロルフルアズロンを添加し、 -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

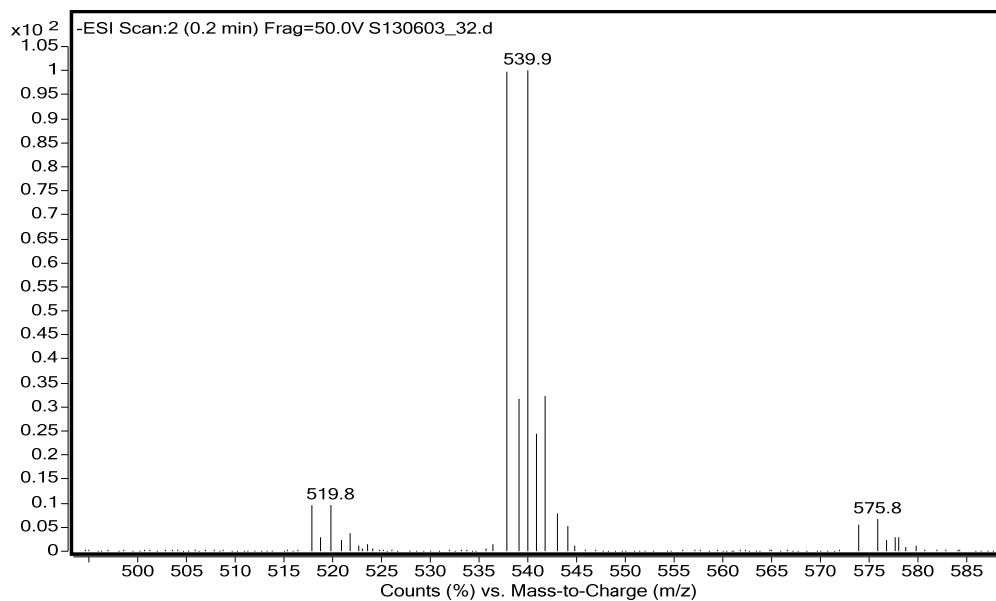
添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	71 (2013/7/23-10/2)	78,	76	77
0.5	高知	57 (2013/8/6-10/2)	87,	73	80
0.5	宮崎	86 (2013/7/8-10/2)	70,	70	70

9.2. 果実の保存安定性試験結果

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	茨城	71 (2013/7/23-10/2)	82,	80	81
0.5	高知	57 (2013/8/6-10/2)	93,	81	87
0.5	宮崎	86 (2013/7/8-10/2)	83,	74	78

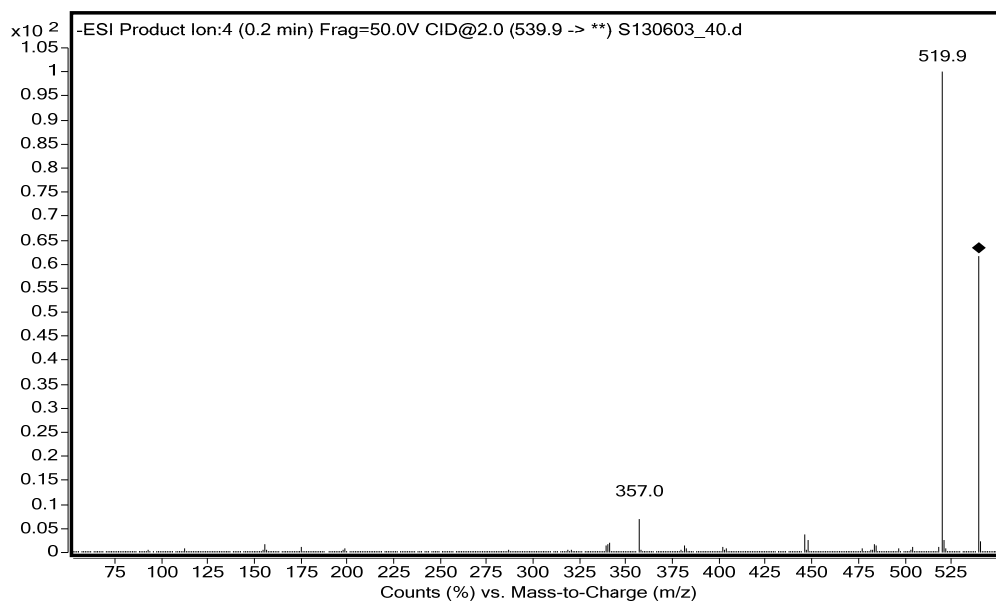
付図-1. マススペクトル

クロルフルアズロンのマススペクトル (一次イオン) の一例 (負モード)

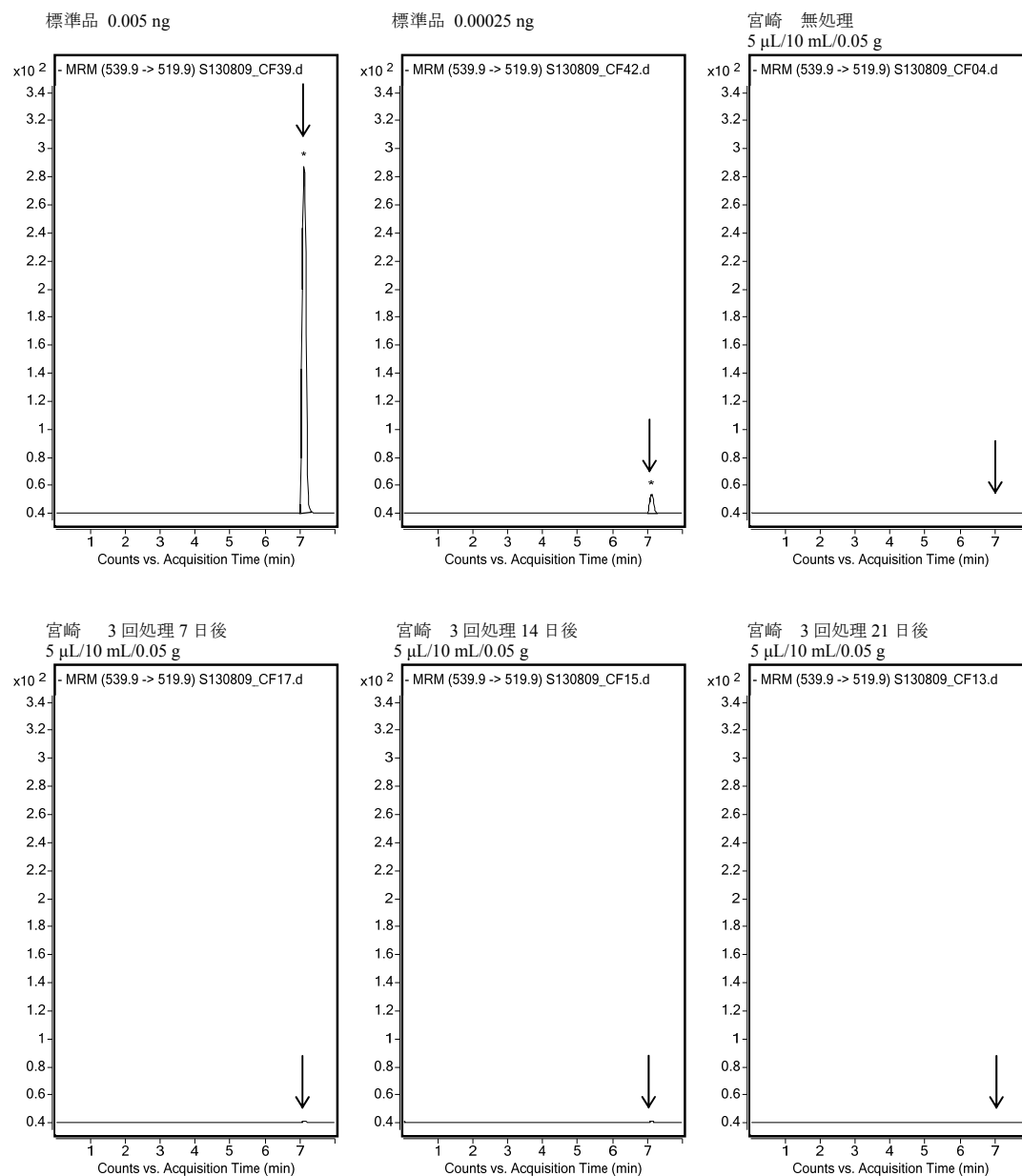


クロルフルアズロンのプロダクトスキャンスペクトルの一例

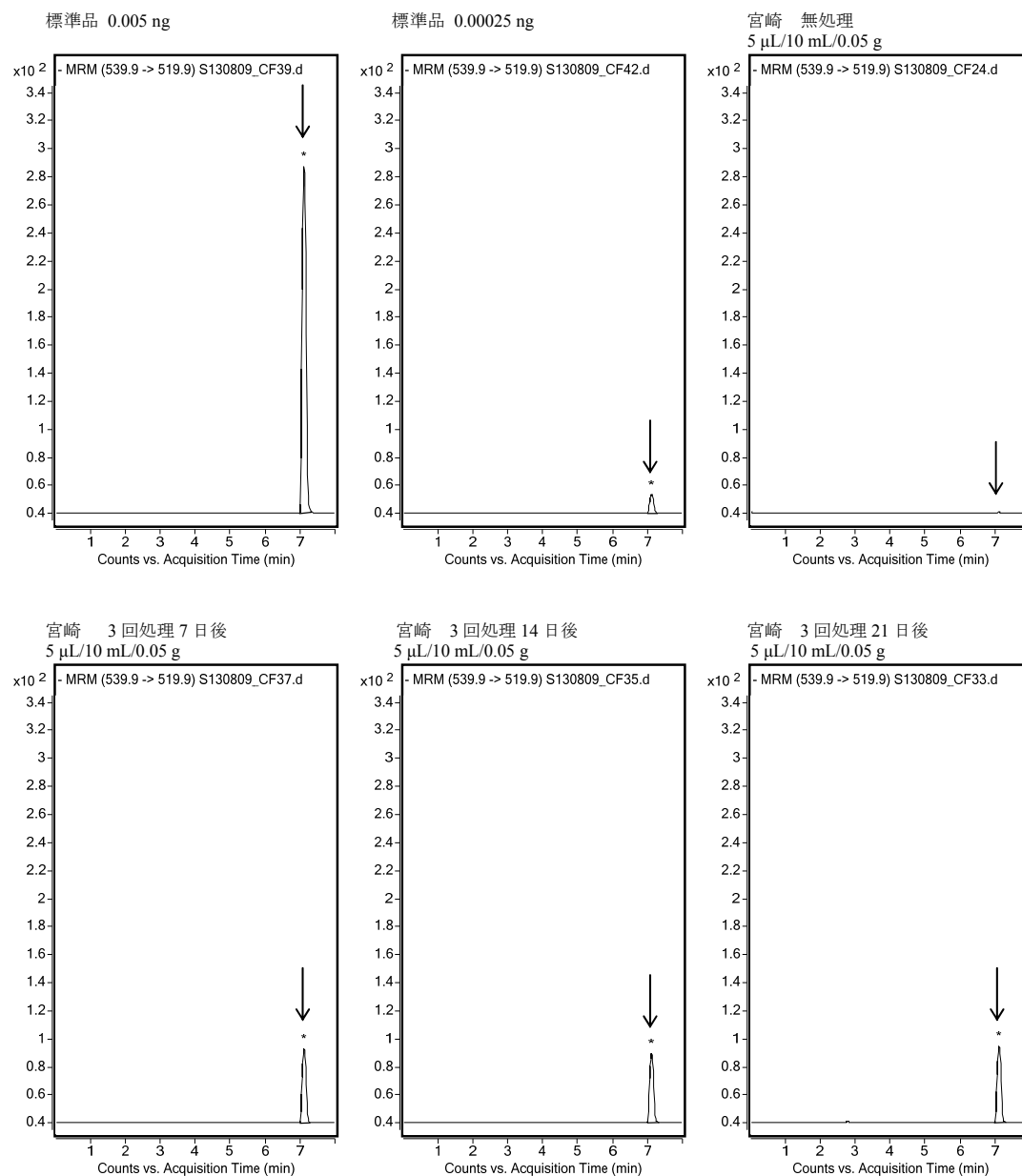
(プリカーサーイオン ; m/z=539.9, 負モード)



付図-2. 果肉のクロマトグラム (代表例)



付図-3. 果実のクロマトグラム (代表例)



農薬登録における作物のグループ化・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	—	1.69	1.76	16.9	10.9	93	7	2.0
	CD	7	1.74		8.72		93	7	2.0
	CD	14	1.77		8.84		93	7	1.7
	CD	21	1.84		9.20		94	6	1.8
							平均 93:7		平均 1.9
高知	0	—	1.48	1.49	14.8	10.4	89	11	2.1
	CD	7	1.49		8.92		90	10	2.1
	CD	14	1.49		8.92		88	12	1.9
	CD	21	1.49		8.94		90	10	2.3
							平均 89:11		平均 2.1
宮崎	0	—	1.75	1.93	21.0	14.2	89	11	2.0
	CD	7	1.90		11.4		89	11	2.1
	CD	14	2.07		12.4		92	8	1.8
	CD	21	1.98		11.9		92	8	1.9
							平均 91:9		平均 2.0
3 ほ場の総平均重量				3 ほ場の総重量の平均					
1.73 kg/個				11.8 kg					

CD：フルフェノクスロン，クロルフルアズロンは3回処理

シメコナゾールは5回処理

2.作物写真

2.1.茨城



茨城 無処理



茨城 処理7日後



茨城 処理14日後



茨城 処理21日後

2.2.高知



高知 無処理



高知 処理7日後



高知 処理14日後



高知 処理21日後

2.3.宮崎



宮崎 無処理



宮崎 処理7日後



宮崎 処理14日後



宮崎 処理21日後