

資料 2-1

登録作物のグループ化・残留分析詳細①
ピメトロジン

1. 分析対象物質

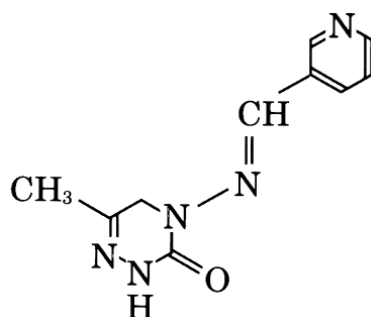
ピメトロジン

化学名： (E)-4,5-dihydro-6-methyl-4-(3-pyridylmethyleamino)-
1,2,4-triazin-3(2H)-one

分子量： 217.2

分子式： $C_{10}H_{11}N_5O$

構造式：



性 状： 無色結晶

融 点： 217℃

蒸気圧： $<4 \times 10^{-3}$ mPa (25℃)

分配係数： $\log P_{OW} = -0.18$

溶解性： 水 0.29 g/L (pH6.5, 25℃)
メタノール 2.25, ヘキサン <0.001 (以上 g/L, 20℃)

安定性： 空気中で安定
加水分解性半減期 5-12 日 (pH5), 616-800 日 (pH7),
510-1212 日 (pH9, 25℃)

出 典： The Pesticide Manual (14th Edition)

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)

メタノール : HPLC 用 (和光純薬工業製)

ヘキサン : 試薬特級 (和光純薬工業製)

酢酸エチル : 試薬特級 (和光純薬工業製)

エタノール : HPLC 用 (関東化学製)

炭酸カリウム : 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)

多孔性ケイソウ土カラム : InertSep K-solute 10mL
(ジーエルサイエンス製)
シリカゲルミニカラム : InertSep Slim-J SI 1000 mg
(ジーエルサイエンス製)

3. 装置及び機器

化学天秤 : 島津製作所製 AUW220
上皿天秤 : メトラー・トレド製 PB8001-S/FACT
上皿天秤 : エー・アンド・ディ製 FX 1200i
ミキサー : ワーリング製 CB-15T
フードプロセッサー : クイジナート製 DLC-NXJ2PS
高速液体クロマトグラフ : 島津製作所製 LC-10AD
データ処理装置 : EZChrom Elite

4. 高速液体クロマトグラフの操作条件

4.1. 液体クロマトグラフ・質量分析計

4.1.1. 高速液体クロマトグラフ

検出器 : 紫外分光光度計
波長 : 298nm
カラム : Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス製)
内径 4.6mm, 長さ 250mm, 粒径 5.0 μ m
溶離液 : アセトニトリル/50m mol/L 酢酸アンモニウム溶液 (20:80v/v)
流量 : 1.0mL/min.
カラム温度 : 40℃
試料注入量 : 40 μ m
保持時間 : 約 16.7~16.9min.

5. 検量線の作成

ピメトロジン標準品 20.0 mg を精秤し、100mL 容メスフラスコに移した。メタノールを加えて溶解して 200 mg/L の標準原液を調製した。この原液をメタノール/水 (20:80 v/v) 混液で希釈して 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 mg/L の標準溶液を調製した。この 40 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ピメトロジンのピーク高さを測定し、横軸に重量 (ng)、縦軸にピーク高さをもって検量線を作成した。

6. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料は重量を量り、つるを除去した。各々を縦に 8 分割し、対角の 2 つを取り合わせた後、果肉と果皮の境目に沿って包丁を入れ果肉と果皮にわけた。各々の重量を測定した後、果肉はミキサーで果皮はフードプロセッサーで均一化した。各々の試料は密封容器に入れて -20°C 以下で凍結保存した。また、量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比 (%) を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した試料 20 g を分液ロートにはかりとり、0.5 mol/L 炭酸カリウム溶液 5 mL 及びメタノール/水 (90:10v/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、残渣をメタノール/水 (90:10v/v) 混液 50 mL で 2 回洗浄し、同様にろ過した。ろ液を合わせメタノール/水 (90:10v/v) 混液で 250 mL に定容した。

6.1.3. 多孔性ケイソウ土カラムによる精製

前項の定容液から 50mL (試料 4g 相当量) 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、メタノールを留去した。濃縮液に 0.5 mol/L 炭酸カリウム溶液 5 mL を加え、多孔性ケイソウ土カラムに流下し、15 分間放置後、ヘキサン 80mL を流下し、流出液を捨てた。次に酢酸エチル 120mL を流下し、溶出液を取った。溶出液を 40°C 以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。残留物は直ちにエタノール/ヘキサン (20:80v/v) 混液 5 mL で溶解した。

6.1.4. シリカゲルミニカラムクロマトグラフィーによる精製

シリカゲルミニカラムにエタノール/ヘキサン (20:80v/v) 混液 10mL を注入し流下して前処理した。前項の溶解液をシリカゲルミニカラムに流下した後、エタノール/ヘキサン (20:80v/v) 混液 10 mL を流下し、これらの流出液を捨てた。次にエタノール/ヘキサン (50:50v/v) 混液 30 mL を流下し、溶出液を取った。

6.1.5. 定量

前項の溶出液を 40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮後，通風で乾固した。残留物は直ちにメタノール/水（20:80v/v）混液を用いて 4 mL に定容し、測定溶液とした。

測定溶液の 40μL を前記条件の高速液体クロマトグラフに注入し，ピーク高さを求め，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)
<u>果肉</u>					
	0.4	4	4	40	0.01
<u>果皮</u>					
	0.4	4	4	40	0.01
	最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)
<u>果肉</u>					
	0.2	4	4	40	0.005
<u>果皮</u>					
	0.2	4	4	40	0.005

6.3. 回収率

分析法確認のため、日植防高知の果肉及び果皮の無処理試料を用いて、0.01ppm（定量限界相当）、0.25ppm 及び 5ppm 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。

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>ピメトロジン</u>								
日植防高知	5	95	94	92	91	90	92	2.3
日植防高知	0.25	97	96	93	92	86	93	4.6
日植防高知	0.01	108	108	105	103	103	105	2.4

6.3.2 果皮の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
<u>ピメトロジン</u>								
日植防高知	5	93	92	91	88	86	90	3.2
日植防高知	0.25	94	91	90	89	89	91	2.3
日植防高知	0.01	88	84	82	78	76	82	5.8

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（クオリティーコントロール試料）を分析した。

クオリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

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

7.1. クオリティーコントロール試料分析結果

7.1.1. 果肉

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>ピメトロジン</u>	2012/12/30	日植防茨城	88	<0.01
	2012/12/30	日植防高知	88	<0.01
	2012/12/30	日植防宮崎	86	<0.01

7.1.2. 果皮

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>ピメトロジン</u>	2013/1/4	日植防茨城	87	<0.01
	2013/1/4	日植防高知	93	<0.01
	2013/1/4	日植防宮崎	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液量 1mL 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 の検量線溶液 1mL で溶解して調製した。マトリック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>ピメトロジン</u>	日植防茨城	105
	日植防高知	102
	日植防宮崎	103

8.2. 果皮

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>ピメトロジン</u>	日植防茨城	107
	日植防高知	105
	日植防宮崎	108

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料に化合物を添加し、 -20°C 以下で凍結保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を評価した。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	日植防茨城	179 (12/7/5 - 12/12/31)	83	83	83
	日植防高知	179 (12/7/4 - 12/12/30)	84	80	82
	日植防宮崎	197 (12/6/16 - 12/12/30)	82	81	82

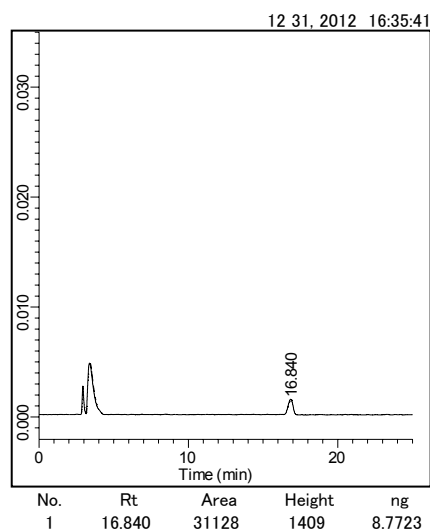
9.2. 果皮の保存安定性試験結果

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	184 (12/7/5 - 13/1/5)	77	75	76
	日植防高知	184 (12/7/4 - 13/1/4)	76	72	74
	日植防宮崎	202 (12/6/16 - 13/1/4)	78	76	77

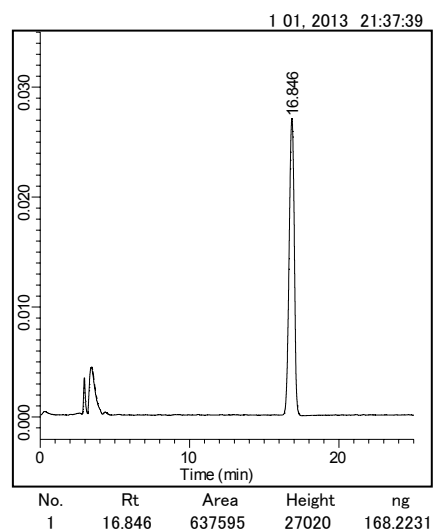
付図-1. 果肉のクロマトグラム (代表例)

付図-1-1. ピメトロジンのクロマトグラム

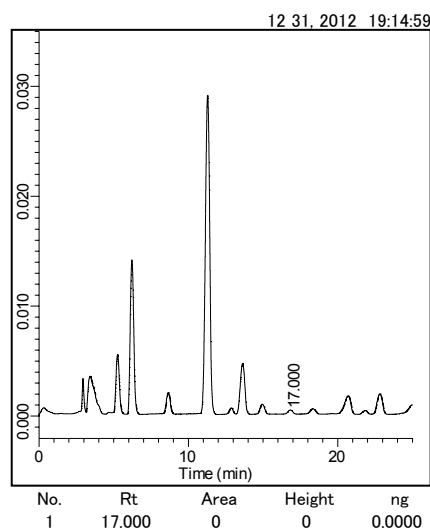
標準品 0.4ng



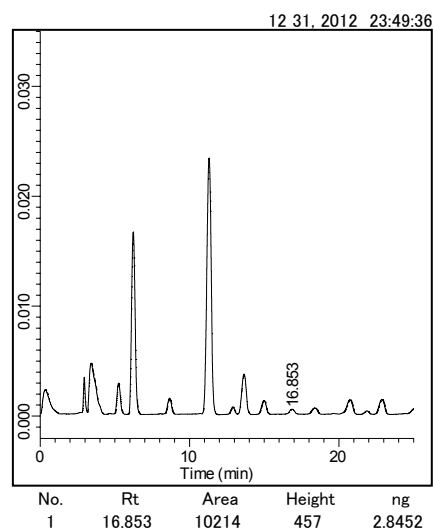
標準品 8.0ng



日植防茨城 無処理
4mL/40μL/4g

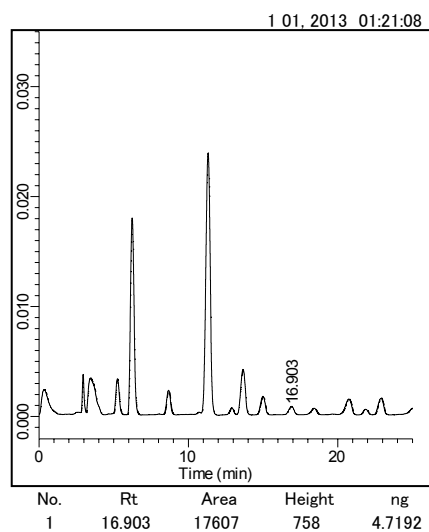


日植防茨城 4回処理 1日後
4mL/40μL/4g

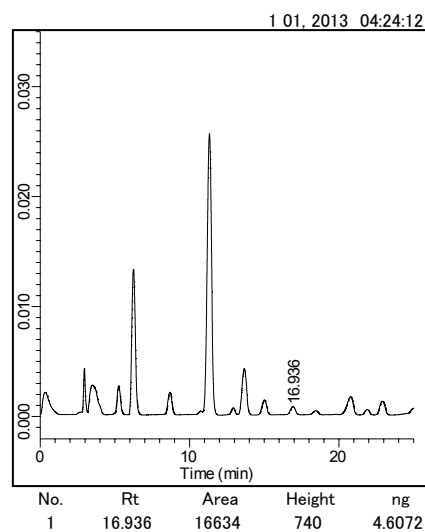


付図-1-1. ピメトロジンのクロマトグラム

日植防茨城 4 回処理 3 日後
4mL/40 μ L/4g

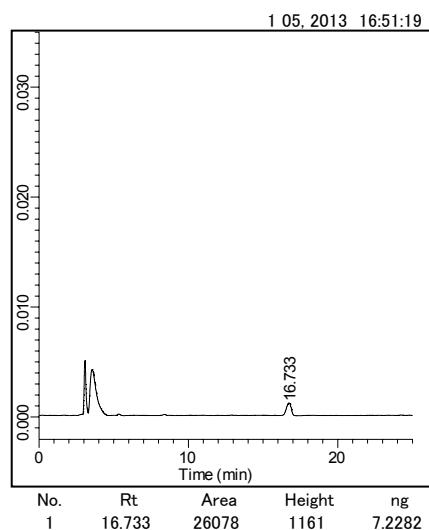


日植防茨城 4 回処理 7 日後
4mL/40 μ L/4g

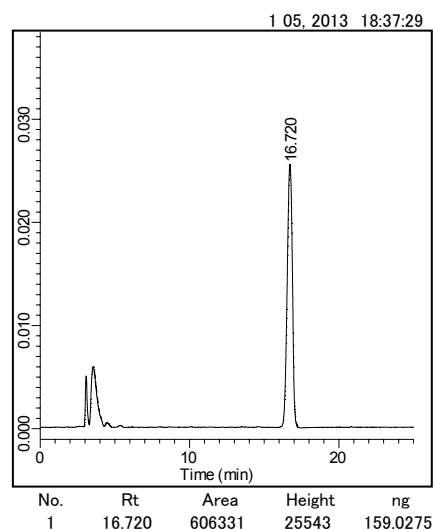


付図-2. 果皮のクロマトグラム (代表例)
付図-2-1. ピメトロジンのクロマトグラム

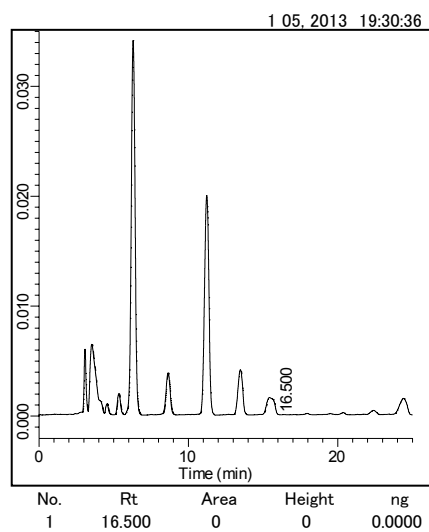
標準品 0.4ng



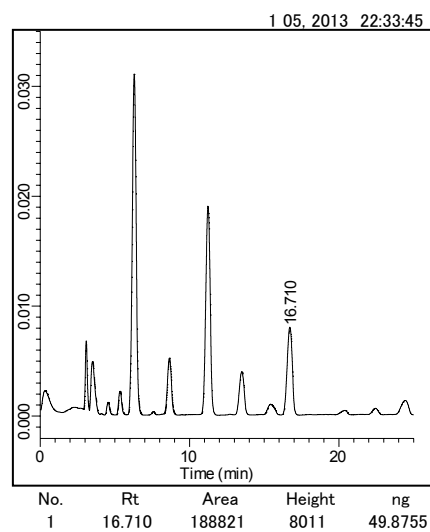
標準品 8.0ng



日植防茨城 無処理
4mL/40μL/4g

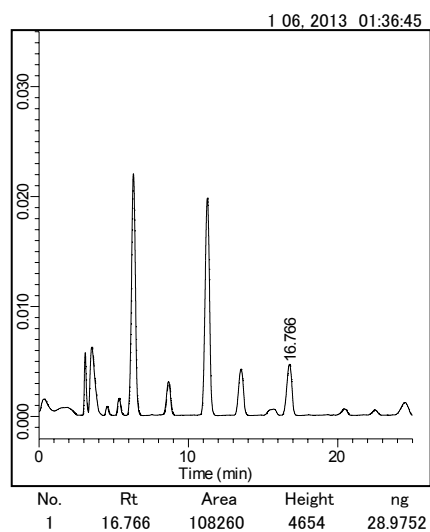


日植防茨城 4回処理 1日後
4mL/40μL/4g

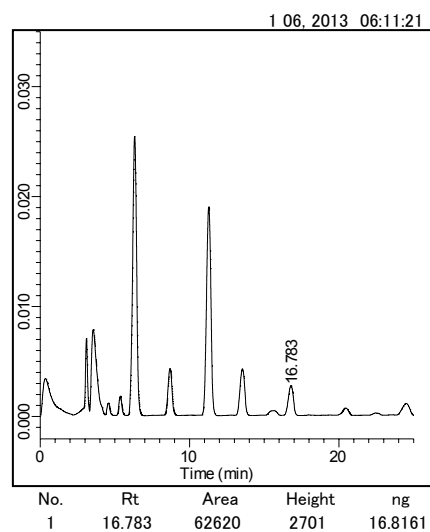


付図-2-1. ピメトロジンのクロマトグラム

日植防茨城 4 回処理 3 日後
4mL/40 μ L/4g



日植防茨城 4 回処理 7 日後
4mL/40 μ L/4g



登録作物のグループ化・残留分析詳細②

シモキサニル

1. 分析対象物質

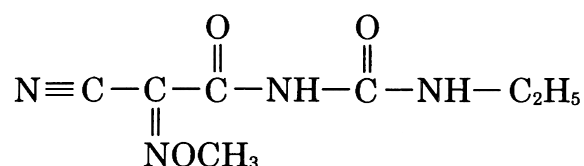
シモキサニル

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

分子量： 198.2

分子式： $C_7H_{10}N_4O_3$

構造式：



性 状： 無色，無臭結晶

融 点： 160-161℃

蒸気圧： 0.15 mPa (20℃)

分配係数： $\log P_{OW} = 0.59$ (pH5), 0.67 (pH7)

溶解性： 水 890 mg/kg (pH5, 20℃)

ヘキサン 0.037, トルエン 5.29, アセトニトリル 57,

酢酸エチル 28, n-オクタノール 1.43, メタノール 22.9,

アセトン 62.4, ジクロロメタン 133.0 (以上 g/L, 20℃)

安定性： 加水分解性半減期 148 日(pH5), 34 時間(pH7), 31 分間(pH9)

水中光分解性半減期 1.8 日(pH5)

出 典： The Pesticide Manual, (14th Edition).

2. 標準品及び試薬

シモキサニル標準品 : 純度 99.9% (和光純薬工業製)

アセトニトリル : HPLC 用 (関東化学製)

アセトン : 残留農薬試験用 (和光純薬工業製)

ヘキサン : 試薬特級 (和光純薬工業製)

酢酸エチル : 試薬特級 (和光純薬工業製)

塩化ナトリウム : 試薬特級 (和光純薬工業製)

無水硫酸ナトリウム : 試薬特級 (和光純薬工業製)

リン酸 : 試薬特級 (和光純薬工業製)

酢酸 : 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 : Supelclean ENVI-Carb 500mg/6mL (SUPELCO 製)

シリカゲルミニカラム : InertSep Slim-J SI 1000 mg (ジーエルサイエンス製)

3. 装置及び機器

化学天秤：	島津製作所製 AUW220
上皿天秤：	メトラー・トレド製 PB8001-S/FACT
上皿天秤：	エー・アンド・ディ製 FX 1200i
ミキサー：	ワーリング製 CB-15T
フードプロセッサー	クイジナート製 DLC-NXJ2PS
液体クロマトグラフ・質量分析計システム (LC-MS)：	
	ヒューレット・パッカー製 HP-1100
データ処理装置：	ヒューレット・パッカー製 Chem Station

4. 液体クロマトグラフ・質量分析計の操作条件

4.1. 液体クロマトグラフ・質量分析計

4.1.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム：	Inertsil ODS-3 (ジエールサイエンス製), 内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 4 μ m
溶離液：	0.2% 酢酸溶液 / アセトニトリル (65:35v/v) -8min.
流速：	0.2 mL/min
カラム温度：	40℃
試料注入量：	2 μ L
保持時間：	約 3.5～3.6 min

4.1.2 質量分析計

イオン化法：	API-ES Negative モード
乾燥ガス温度：	350℃
乾燥ガス流量：	10 L/min
ネブライザー圧力：	35 psi
フラグメンター電圧：	30 v
キャピラリー電圧：	3000 v
採取イオン：	SIM m/z 197.0 (580 m 秒)

5. 検量線の作成

シモキサニル標準品 20.0 mg (純度換算相当量) を精秤し, 100mL 容メスフラスコに移した。アセトニトリルを加えて溶解して 200 mg/L の標準原液を調製した。この原液を水/アセトニトリル/酢酸 (75:25:0.2 v/v/v) 混液で希釈して 0.005, 0.01, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 mg/L の標準溶液を調製した。この 2 μ L を前記条件の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入し, データ処理装置を用いてシモキサニルのピーク高さを測定し, 横軸に重量 (ng), 縦軸にピーク高さをもって検量線を作成した。

6. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料は重量を量り、つるを除去した。各々を縦に 8 分割し、対角の 2 つを取り合わせた後、果肉と果皮の境目に沿って包丁を入れ果肉と果皮にわけた。各々の重量を測定した後、果肉及び果皮のそれぞれの重量 1kg に対して 500g の 5%リン酸溶液を加え、果肉はミキサーで果皮はフードプロセッサーで均一化した。各々の試料は密封容器に入れて -20℃以下で凍結保存した。また、量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比 (%) を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した試料 30 g (試料 20 g 相当量) を分液ロートにはかりとり、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 2 回洗浄し、同様にろ過した。ろ液を合わせアセトンで 250 mL に定容した。

6.1.3. 転溶

前項の定容液から 50mL (試料 4g 相当量) 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、アセトンを留去した。濃縮液を少量の水で分液ロートに移し、10%塩化ナトリウム溶液 100mL 及び酢酸エチル/ヘキサン (50:50v/v) 混液 80mL を加え 5 分間振とうした。静置分離後、酢酸エチル/ヘキサン (50:50v/v) 混液層は無水硫酸ナトリウムをのせたらろ紙 (No.5A) を通過させ、脱水した。さらに酢酸エチル/ヘキサン (50:50v/v) 混液 80mL を加え、前記操作をくり返した後、酢酸エチル/ヘキサン (50:50v/v) 混液層を合わせ 40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮後、窒素気流下で乾固した。残留物は直ちにアセトン/ヘキサン (5:95v/v) 混液 5 mL で溶解した。

6.1.4. グラファイトカーボン及びシリカゲルミニカラムクロマトグラフィーによる精製

グラファイトカーボンミニカラム及びシリカゲルミニカラムにヘキサン 10mL を注入し流下して前処理した。前項の溶解液をグラファイトカーボンミニカラムの下部にシリカゲルミニカラムを連結したカラムに流下した後、アセトン/ヘキサン (5:95v/v) 混液を 20 mL を流下し、これらの溶出液を捨てた。次にグラファイトカーボンミニカラムを外し、シリカゲルミニカラムにアセトン/ヘキサン (20:80v/v) 混液 30 mL を流下し、溶出液を取った。

6.1.5. 定量

前項の溶出液を 40℃以下の水浴中で 2mL まで減圧濃縮後、窒素気流下で乾固した。残留物は直ちに水/アセトニトリル/酢酸 (75:25:0.2v/v/v) 混液を用いて 4 mL に定容し、測定溶液とした。

測定溶液の 2 μ L を前記条件の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入し、ピーク高さを求め、検量線よりシモキサニルの重量を求め、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 (μL)	定量限界 (ppm)
<u>果肉</u>	0.02	4	4	2	0.01
<u>果皮</u>	0.02	4	4	2	0.01
	最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)
<u>果肉</u>	0.01	4	4	2	0.005
<u>果皮</u>	0.01	4	4	2	0.005

6.3. 回収率

分析法確認のため、日植防宮崎の果肉及び果皮の無処理試料を用いて、0.01ppm（定量限界相当）、0.25ppm 及び 5ppm 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。

6.3.1. 果肉の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
<u>シモキサニル</u>								
日植防宮崎	5	93	93	93	92	90	92	1.4
日植防宮崎	0.25	97	97	96	94	92	95	2.3
日植防宮崎	0.01	93	91	82	82	77	85	7.9

6.3.2. 果皮の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
<u>シモキサニル</u>								
日植防宮崎	5	96	94	93	93	92	94	1.6
日植防宮崎	0.25	98	98	97	97	97	97	0.6
日植防宮崎	0.01	109	102	99	89	83	96	10.8

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（クオリティーコントロール試料）を分析した。

クオリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

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

7.1. クオリティーコントロール試料分析結果

7.1.1. 果肉

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>シモキサニル</u>	2012/10/16	日植防茨城	90	<0.01
	2012/10/17	日植防高知	98	<0.01
	2012/10/18	日植防宮崎	92	<0.01

7.1.2. 果皮

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>シモキサニル</u>	2012/10/16	日植防茨城	97	<0.01
	2012/10/17	日植防高知	93	<0.01
	2012/10/18	日植防宮崎	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、各圃場の無処理区試料の最終液量 1mL 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、0.10mg/L の検量線溶液 1mL に溶解して調製した。マトリック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>シモキサニル</u>	日植防茨城	100
	日植防高知	103
	日植防宮崎	96

8.2. 果皮

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>シモキサニル</u>	日植防茨城	101
	日植防高知	102
	日植防宮崎	100

9. 保存安定性試験

均一化した無処理試料に化合物を添加し、 -20°C 以下で凍結保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を評価した。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

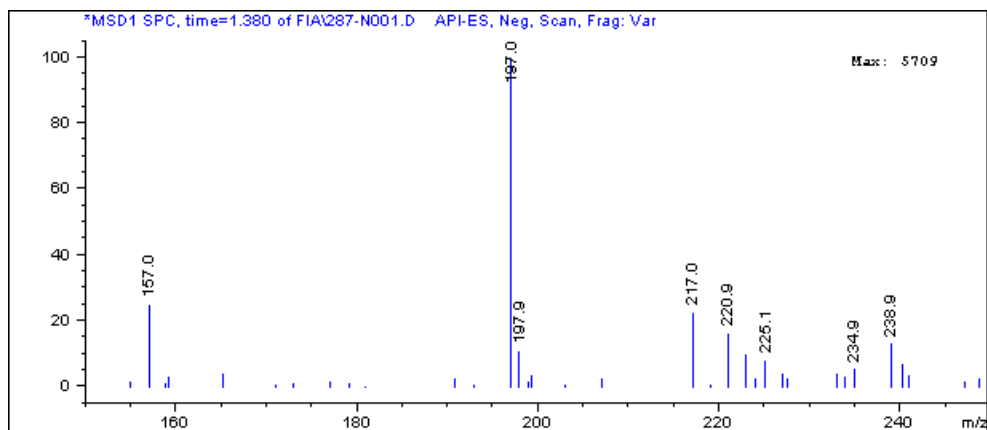
添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城 104	(12/7/5 - 12/10/17)	92	90
	日植防高知 105	(12/7/4 - 12/10/17)	98	93
	日植防宮崎 124	(12/6/16 - 12/10/18)	98	95

9.2. 果皮の保存安定性試験結果

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城 104	(12/7/5 - 12/10/17)	95	95
	日植防高知 105	(12/7/4 - 12/10/17)	92	91
	日植防宮崎 124	(12/6/16 - 12/10/18)	95	94

付図-1. マススペクトル

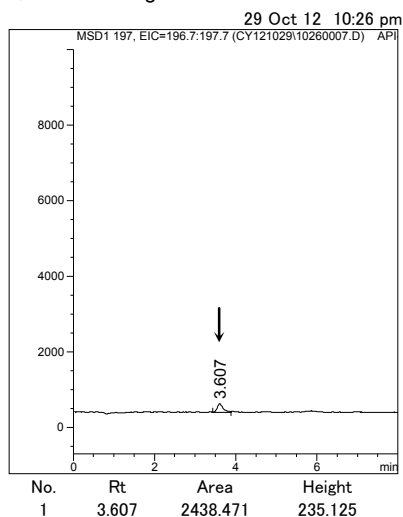
付図-1-1. シモキサニルのマススペクトル



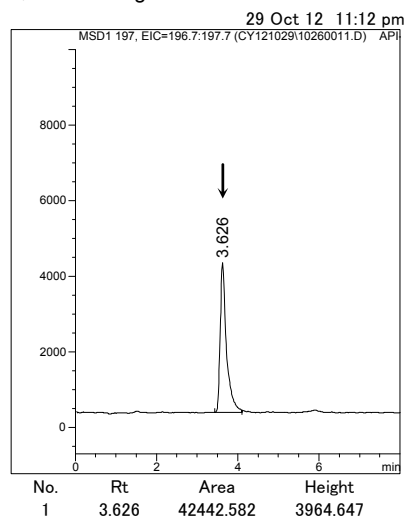
付図-2. 果肉のクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. シモキサニルのクロマトグラム

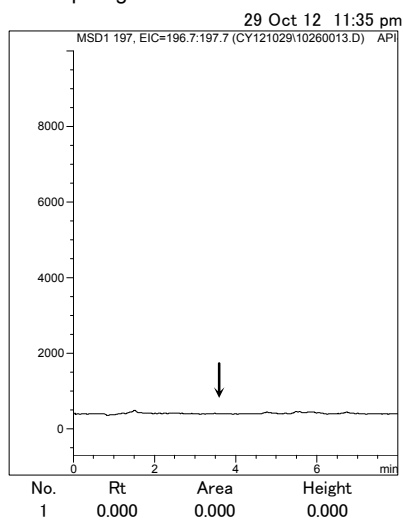
標準品 0.02ng



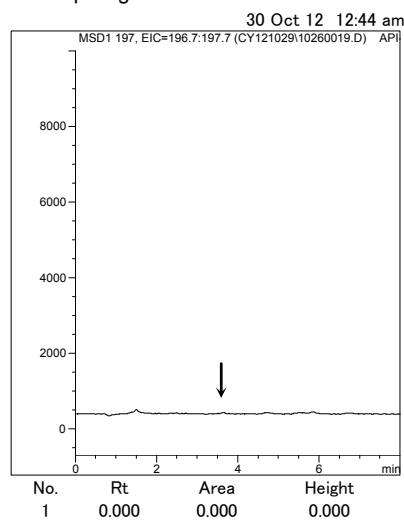
標準品 0.4ng



日植防茨城 無処理
4mL/2 μ L/4g

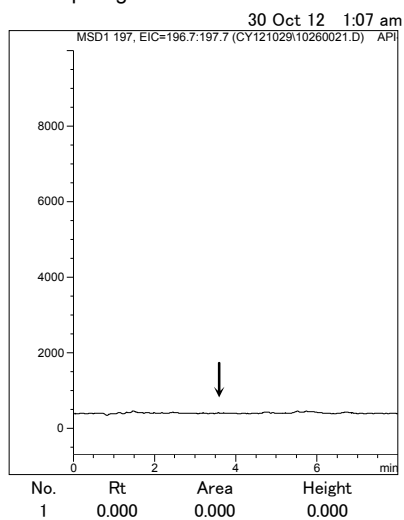


日植防茨城 3回処理 1日後
4mL/2 μ L/4g

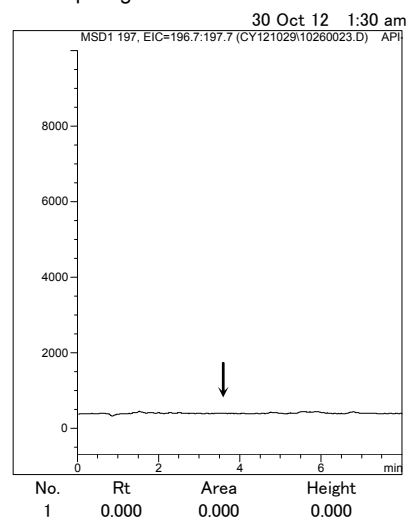


付図-2-1. シモキサニルのクロマトグラム

日植防茨城 3 回処理 3 日後
4mL/2 μ L/4g



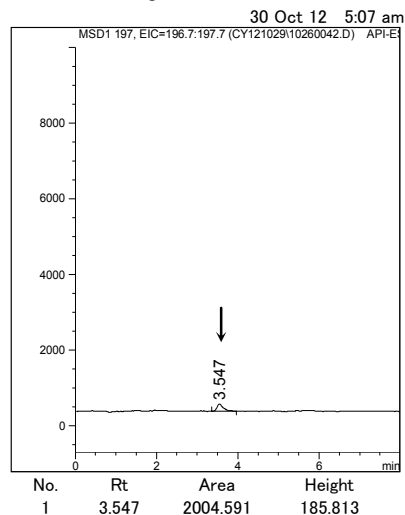
日植防茨城 3 回処理 7 日後
4mL/2 μ L/4g



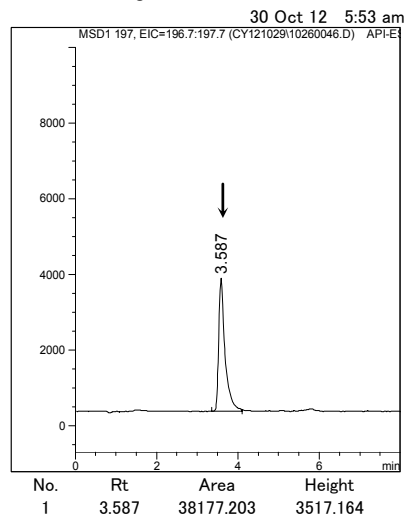
付図-3. 果皮のクロマトグラム (代表例)

付図-3-1. シモキサニルのクロマトグラム

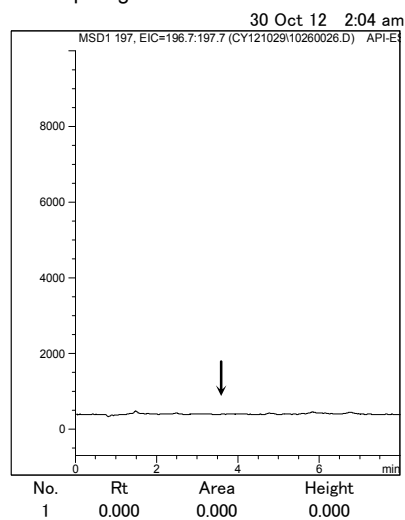
標準品 0.02ng



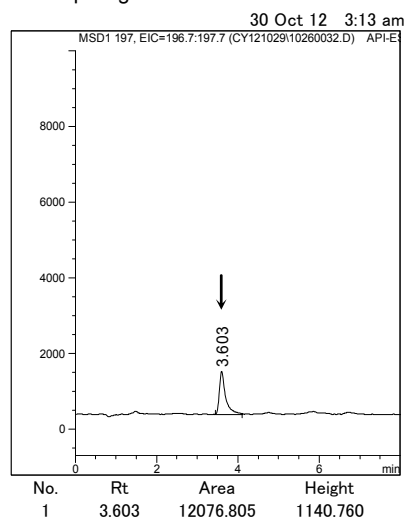
標準品 0.4ng



日植防茨城 無処理
4mL/2 μ L/4g

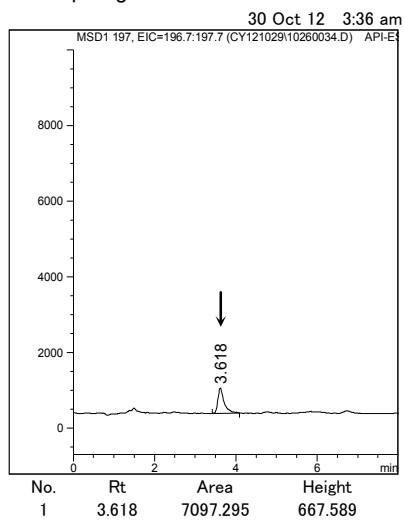


日植防茨城 3回処理 1日後
4mL/2 μ L/4g

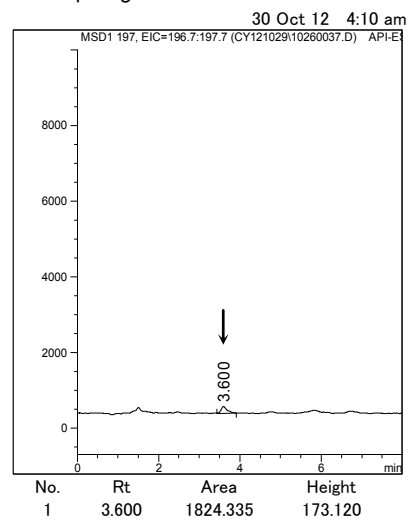


付図-3-1. シモキサニルのクロマトグラム

日植防茨城 3 回処理 3 日後
4mL/2 μ L/4g



日植防茨城 3 回処理 7 日後
4mL/2 μ L/4g

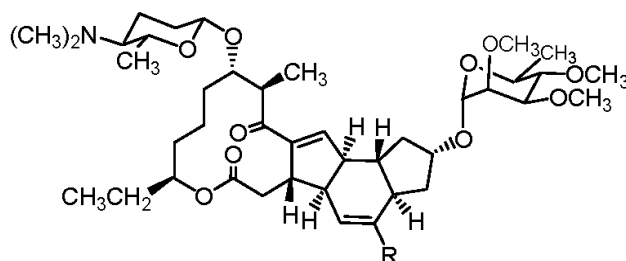


登録作物のグループ化・残留分析詳細③ スピノサド、ボスカリド

1. 分析対象物質

スピノサド

化学名： スピノシン A (50-95%) とスピノシン D (50-5%) の混合物
スピノシン A
(2*R*,3*aS*,5*aR*,5*bS*,9*S*,13*S*,14*R*,16*aS*,16*bR*)-2-
(6-deoxy-2,3,4-tri-*O*-methyl- α -L-mannopyranosyloxy)-13-
(4-dimethylamino-2,3,4,6-tetradeoxy- β -D-erythro-pyranosyloxy)-9-ethyl-
2,3,3*a*,5*a*,5*b*,6,7,9,10,11,12,13,14,15,16*a*,16*b*-hexadecahydro-
14-methyl-1*H*-8-oxacyclododeca[*b*]as-indacene-7,15-dione
スピノシン D
(2*S*,3*aR*,5*aS*,5*bS*,9*S*,13*S*,14*R*,16*aS*,16*bR*)-2-
(6-deoxy-2,3,4-tri-*O*-methyl- α -L-mannopyranosyloxy)-13-
(4-dimethylamino-2,3,4,6-tetradeoxy- β -D-erythro-pyranosyloxy)-9-ethyl-
2,3,3*a*,5*a*,5*b*,6,7,9,10,11,12,13,14,15,16*a*,16*b*-hexadecahydro-4,
14-dimethyl-1*H*-8-oxacyclododeca[*b*] as-indacene-7,15-dione
分子量： 732.0 (スピノシン A), 746.0 (スピノシン D)
分子式： C₄₁H₆₅NO₁₀ (スピノシン A), C₄₂H₆₇NO₁₀ (スピノシン D)
構造式：



spinosyn A, R = H-

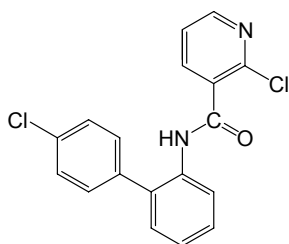
spinosyn D, R = CH₃-

性 状： 灰白色結晶
融 点： 84-99.5°C (スピノシン A), 161.5-170°C (スピノシン D)
蒸気圧： 3.0×10⁻⁵ mPa (25°C) (スピノシン A)
2.0×10⁻⁵ mPa (25°C) (スピノシン D)
分配係数： log P_{OW} = 2.8 (pH5), 4.0(pH7), 5.2(pH9) (スピノシン A)
log P_{OW} = 3.2 (pH5), 4.5(pH7), 5.2(pH9) (スピノシン D)
溶解性： スピノシン A： 水 89 ppm (蒸留水, 20°C),
アセトン 16.8, アセトニトリル 13.4, ジクロロメタン 52.5,
ヘキサン 0.448, メタノール 19.0, n-オクタノール 0.926,

トルエン 45.7 (以上、g/L、20℃)
 スピノシン D : 水 0.5 ppm (蒸留水、20℃),
 アセトン 1.01, アセトニトリル 0.225, ジクロロメタン 44.8,
 ヘキサン 0.743, メタノール 0.252, n-オクタノール 0.127,
 トルエン 15.2 (以上 g/L、20℃)
 安定性 : 加水分解性 (pH5, pH7) 安定
 加水分解性半減期(pH9) 200 日(スピノシン A)、259 日(スピノシン D)
 水中光分解性半減期(pH7) 0.93 日(スピノシン A)
 0.82 日(スピノシン D)
 出典 : The Pesticide Manual (14th Edition)

ボスカリド

化学名 : 2-chloro-N-(4'-chlorobiphenyl-2-yl)nicotinamide
 分子量 : 343.2
 分子式 : $C_{18}H_{12}Cl_2N_2O$
 構造式 :



性状 : 白色無臭結晶
 融点 : 142.8-143.8℃
 蒸気圧 : 7.2×10^{-4} mPa (20℃)
 分配係数 : $\log Pow = 2.96$
 溶解性 : 水 4.6 mg/L (20℃)
 n-ヘプタン <10, メタノール 40~50, アセトン 160~200
 (以上 g/L、20℃)
 出典 : The Pesticide Manual (14th Edition).

2. 標準品及び試薬

スピノシン A 標準品 : 純度 94.3% (林純薬工業製)
 スピノシン D 標準品 : 純度 96.9% (林純薬工業製)
 ボスカリド標準品 : 純度 99.8% (和光純薬工業製)
 アセトニトリル : HPLC 用 (関東化学製)
 ヘキサン : 試薬特級 (和光純薬工業製)
 トルエン : 残留農薬試験用 (和光純薬工業製)
 塩化ナトリウム : 試薬特級 (和光純薬工業製)
 リン酸水素二カリウム : 試薬特級 (和光純薬工業製)

リン酸二水素カリウム : 試薬特級 (和光純薬工業製)
 塩酸 : 試薬特級 (和光純薬工業製)
 水酸化ナトリウム : 試薬特級 (和光純薬工業製)
 ぎ酸 : 試薬特級 (和光純薬工業製)
 GC/SAX/PSA ミニカラム : InertSep GC/SAX/PSA (500mg/500mg/500mg)
 (ジーエルサイエンス製)

3. 装置及び機器

化学天秤 : 島津製作所製 AUW220
 上皿天秤 : メトラー・トレド製 PB8001-S/FACT
 上皿天秤 : エー・アンド・ディ製 FX 1200i
 ミキサー : ワーリング製 CB-15T
 フードプロセッサー : クイジナート製 DLC-NXJ2PS
 液体クロマトグラフ : 質量分析計システム (LC-MS/MS) :
 Waters 社製 Alliance 2695
 Waters 社製 Quattro Premier XE
 データ処理装置 : Waters 社製 Mass Lynx

4. 液体クロマトグラフ・質量分析計の操作条件

4.1. 液体クロマトグラフ・質量分析計

4.1.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム : Atlantis dC18 (Waters 製),
 内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 5 μ m
 溶離液 : 0.1%ギ酸溶液/アセトニトリル (40:60v/v) – (15min.)
 流速 : 0.2 mL/min
 カラム温度 : 40℃
 試料注入量 : 2 μ L
 保持時間 : 約 3.0~3.4min (スピノシン A)
 約 3.7~4.1min (スピノシン D)
 約 5.7~5.8min (ボスカリド)

4.1.2. 質量分析計

イオン化法 : エレクトロスプレー(ESI)、正イオン化モード
 キャピラリー電圧 : 3.5kV
 コーンガス流量 : 窒素 50L/hr
 デソルベーションガス流量 : 窒素 800L/hr (400℃)
 コリジョンガス流量 : アルゴン 0.2mL/min
 イオンソース温度 : 80℃
 採取イオン : Q1Mass m/z 732.3 , Q3Mass m/z 142.1 (スピノシン A)

Q1Mass m/z 746.5 , Q3Mass m/z 142.1 (スピノシン D)

Q1Mass m/z 343.0 , Q3Mass m/z 140.0 (ボスカリド)

5. 検量線の作成

スピノシン A、スピノシン D 及びボスカリド標準品 20.0 mg (各純度換算相当量) を精秤し、それぞれ 100mL 容メスフラスコに移した。アセトニトリルを加えて溶解して 200 mg/L の標準原液を調製した。各原液をアセトニトリルで希釈してスピノシン A 及びスピノシン D 0.005, 0.01, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 mg/L、ボスカリド 0.01, 0.02, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mg/L の混合標準溶液を調製した。この 4 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スピノシン A、スピノシン D 及びボスカリドのピーク高さを測定し、横軸に重量 (ng)、縦軸にピーク高さをとって各検量線を作成した。

6. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料は重量を量り、つるを除去した。各々を縦に 8 分割し、対角の 2 つを取り合わせた後、果肉と果皮の境目に沿って包丁を入れ果肉と果皮にわけた。各々の重量を測定した後、果肉はミキサーで果皮はフードプロセッサーで均一化した。各々の試料は密封容器に入れて -20℃ 以下で凍結保存した。また、量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比 (%) を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した試料 20 g を分液ロートにはかりとり、アセトニトリル/水 (80:20v/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、残渣をアセトニトリル/水 (80:20v/v) 混液 50 mL で 2 回洗浄し、同様にろ過した。ろ液を合わせアセトニトリル/水 (80:20v/v) 混液で 250 mL に定容した。

6.1.3. 転溶

前項の定容液から 100mL (試料 8g 相当量) を分液ロートに分取し、塩化ナトリウム 15g、リン酸緩衝溶液*15mL 及びヘキサン 20mL を加え 5 分間振とうした。静置分離後、アセトニトリル層を分取し、40℃ 以下の水浴中で約 2mL で減圧濃縮後、通風で乾固した。残留物は直ちにトルエン/アセトニトリル (25:75v/v) 混液 5mL で溶解した。

*リン酸二水素カリウム 61 g とリン酸水素二カリウム 105 g に水 900mL を加え溶解後、1mol/L 塩酸又は 1mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH7.0 に調整し、水を加えて 1L とした。

6.1.4. GC/SAX/PSA ミニカラムクロマトグラフィーによる精製

GC/SAX/PSA ミニカラムにトルエン/アセトニトリル (25:75v/v) 混液 10mL を注入し流下して前処理した。前項の溶解液を GC/SAX/PSA ミニカラムに流下した後、トルエン/アセトニトリル (25:75v/v) 混液 30 mL を流下し、その全溶出液を取った。

6.1.5. 定量

前項の溶出液を 40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。残留物は直ちにアセトニトリルを用いて 4 mL に定容し、測定溶液とした。測定溶液は必要に応じてアセトニトリルで希釈した。

測定溶液の 4 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、ピーク高さを求め、検量線よりスピノシン A、スピノシン D 及びボスカリドの重量を求め、試料中の各残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値 (LOQ) 及び検出限界値 (LOD)**6.2.1. スピノシン A, スピノシン D**

	定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	定量限界 (ppm)
<u>果肉</u>	0.04	8	4	4	0.005
<u>果皮</u>	0.04	8	4	4	0.005
	最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)
<u>果肉</u>	0.02	8	4	4	0.003
<u>果皮</u>	0.02	8	4	4	0.003

*スピノシン A, スピノシン D はいずれも同じ値

6.2.2. ボスカリド

	定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	定量限界 (ppm)
<u>果肉</u>	0.08	8	4	4	0.01
<u>果皮</u>	0.08	8	4	4	0.01
	最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)
<u>果肉</u>	0.04	8	4	4	0.005
<u>果皮</u>	0.04	8	4	4	0.005

6.3. 回収率

分析法確認のため、日植防高知の果肉及び果皮の無処理試料を用いて、スピノシン A 及びスピノシン D 0.005ppm (定量限界相当), ボスカリド 0.01ppm (定量限界相当), 0.25ppm 及び 5ppm 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 (<0.005ppm 又は <0.01 ppm) であった。回収試験結果を表に示す。

6.3.1 果肉の回収率

試料	添加濃度 (ppm)		回収率 (%)			平均回収率 (%)		RSDr
スピノシンA								
日植防茨城	5	108	101	99	88	87	97	9.2
日植防茨城	0.25	110	109	108	107	104	108	2.1
日植防茨城	0.005	106	106	102	101	97	102	3.7
スピノシンD								
日植防茨城	5	107	100	99	88	87	96	8.9
日植防茨城	0.25	109	109	109	108	104	108	2.0
日植防茨城	0.005	105	104	102	100	98	102	2.8
ボスカリド								
日植防茨城	5	88	87	86	85	85	86	1.5
日植防茨城	0.25	93	92	90	90	88	91	2.1
日植防茨城	0.01	108	106	106	105	100	105	2.9

6.3.2. 果皮の回収率

試料	添加濃度 (ppm)		回収率 (%)				平均回収率 (%)	RSDr
スピノシンA								
日植防茨城	5	85	82	79	75	71	78	7.1
日植防茨城	0.25	91	89	87	84	84	87	3.5
日植防茨城	0.005	86	81	75	72	72	77	8.0
スピノシンD								
日植防茨城	5	82	80	78	75	70	77	6.1
日植防茨城	0.25	88	87	85	83	82	85	3.0
日植防茨城	0.005	84	77	72	70	69	74	8.4
ボスカリド								
日植防茨城	5	86	85	84	83	83	84	1.6
日植防茨城	0.25	88	87	87	87	85	87	1.3
日植防茨城	0.01	105	102	96	95	88	97	6.8

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 0.05ppm（スピノシン A、スピノシン D）、0.1ppm（ボスカリド）添加試料（クォリティーコントロール試料）を分析した。

クォリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

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

7.1. クォリティーコントロール試料分析結果

7.1.1. 果肉

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>スピノシンA</u>	2012/12/25	日植防茨城	96	<0.005
	2012/12/25	日植防高知	94	<0.005
	2012/12/25	日植防宮崎	106	<0.005
<u>スピノシンD</u>	2012/12/25	日植防茨城	98	<0.005
	2012/12/25	日植防高知	99	<0.005
	2012/12/25	日植防宮崎	109	<0.005
<u>ボスカリド</u>	2012/12/25	日植防茨城	100	<0.01
	2012/12/25	日植防高知	94	<0.01
	2012/12/25	日植防宮崎	96	<0.01

7.1.2. 果皮

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>スピノシンA</u>	2012/12/29	日植防茨城	95	<0.005
	2012/12/29	日植防高知	94	<0.005
	2012/12/29	日植防宮崎	90	<0.005
<u>スピノシンD</u>	2012/12/29	日植防茨城	96	<0.005
	2012/12/29	日植防高知	93	<0.005
	2012/12/29	日植防宮崎	88	<0.005
<u>ボスカリド</u>	2012/12/29	日植防茨城	99	<0.01
	2012/12/29	日植防高知	102	<0.01
	2012/12/29	日植防宮崎	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液量 1mL 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、スピノシン A 及びスピノシン D 各 0.1mg/L、ボスカリド 0.2mg/L の検量線溶液 1mL 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>スピノシンA</u>	日植防茨城	95
	日植防高知	97
	日植防宮崎	91
<u>スピノシンD</u>	日植防茨城	96
	日植防高知	98
	日植防宮崎	92
<u>ボスカリド</u>	日植防茨城	98
	日植防高知	102
	日植防宮崎	100

8.2. 果皮

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>スピノシンA</u>	日植防茨城	99
	日植防高知	96
	日植防宮崎	80
<u>スピノシンD</u>	日植防茨城	100
	日植防高知	98
	日植防宮崎	81
<u>ボスカリド</u>	日植防茨城	102
	日植防高知	106
	日植防宮崎	101

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料に各化合物を添加し、 -20°C 以下で凍結保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を評価した。保存安定性試験の結果を表に示す。

9.1. 果肉の保存安定性試験結果

9.1.1. スピノシン A

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城 174	(12/7/5 - 12/12/26)	97	95
	日植防高知 175	(12/7/4 - 12/12/26)	85	85
	日植防宮崎 193	(12/6/16 - 12/12/26)	81	78

9.1.2. スピノシン D

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城 174	(12/7/5 - 12/12/26)	106	105
	日植防高知 175	(12/7/4 - 12/12/26)	91	90
	日植防宮崎 193	(12/6/16 - 12/12/26)	88	84

9.1.3. ボスカリド

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城 174	(12/7/5 - 12/12/26)	95	94
	日植防高知 175	(12/7/4 - 12/12/26)	90	89
	日植防宮崎 193	(12/6/16 - 12/12/26)	91	88

9.2. 果皮の保存安定性試験結果

9.2.1. スピノシン A

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)	
0.5	日植防茨城	177 (12/7/5 - 12/12/29)	82	79	80
	日植防高知	178 (12/7/4 - 12/12/29)	91	91	91
	日植防宮崎	196 (12/6/16 - 12/12/29)	103	103	103

9.2.2. スピノシン D

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)	
0.5	日植防茨城	178 (12/7/5 - 12/12/30)	82	80	81
	日植防高知	179 (12/7/4 - 12/12/30)	94	94	94
	日植防宮崎	197 (12/6/16 - 12/12/30)	110	110	110

9.2.3. ボスカリド

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)	
0.5	日植防茨城	178 (12/7/5 - 12/12/30)	92	92	92
	日植防高知	179 (12/7/4 - 12/12/30)	94	94	94
	日植防宮崎	197 (12/6/16 - 12/12/30)	95	91	93

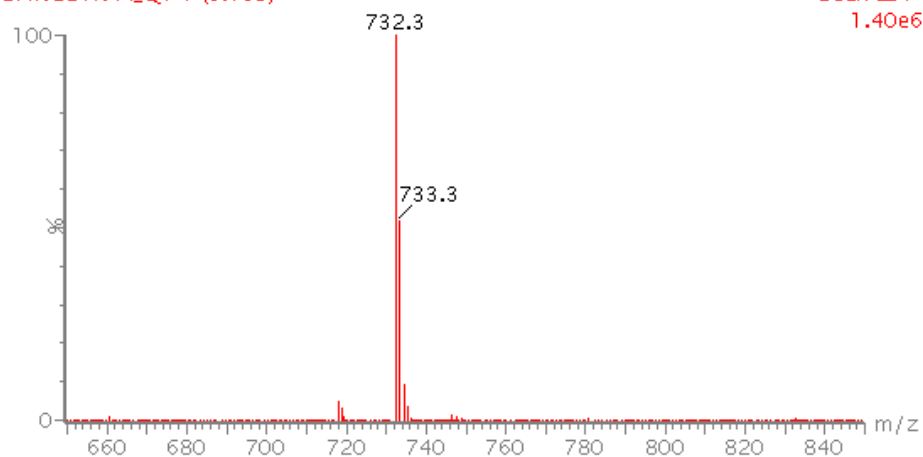
付図-1. マススペクトル

付図-1-1. スピノシン A のマススペクトル

Capillary3.5/cone25

SPINOSYN A_Q1 1 (0.105)

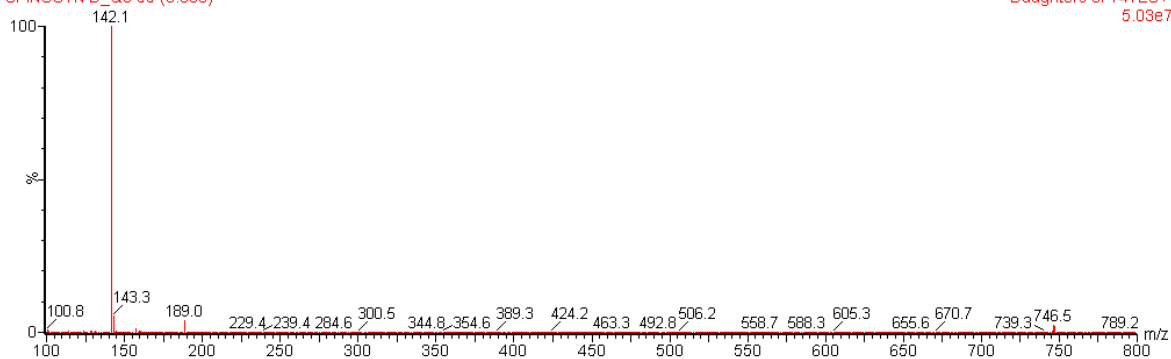
Scan ES+
1.40e6



Cone35 Collision 30

SPINOSYN D_Q3 55 (0.380)

Daughters of 747ES+
5.03e7

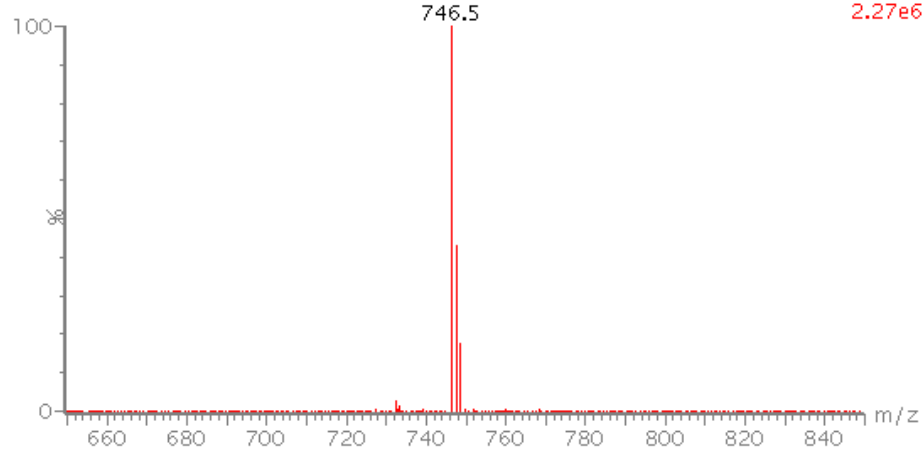


付図-1-2. スピノシン D のマススペクトル

Capillary3.5/cone35

SPINOSYN D_Q1 1 (0.105)

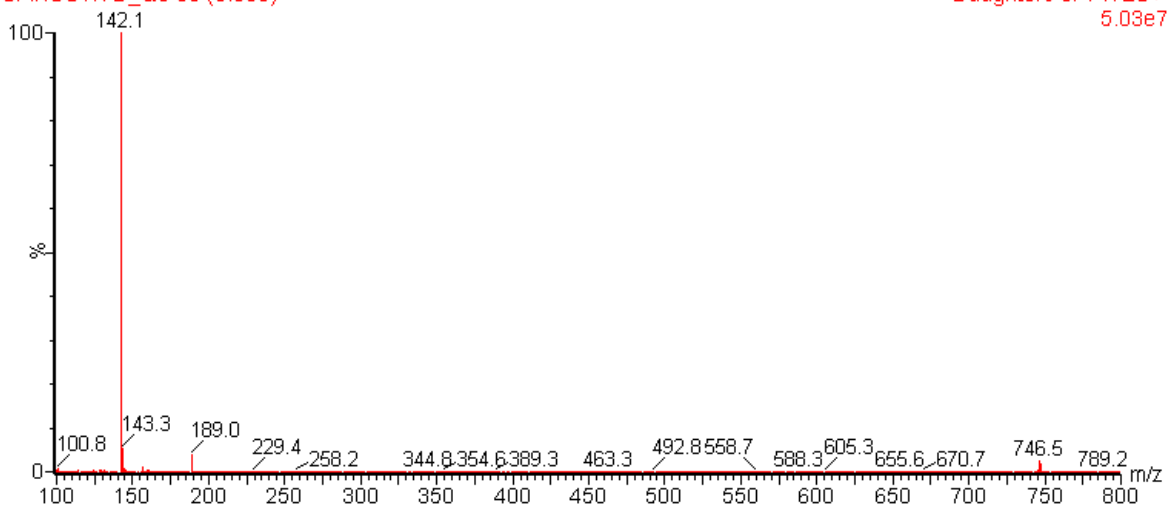
Scan ES+
2.27e6



Cone35 Collision 30

SPINOSYN D_Q3 55 (0.380)

Daughters of 747ES+
5.03e7

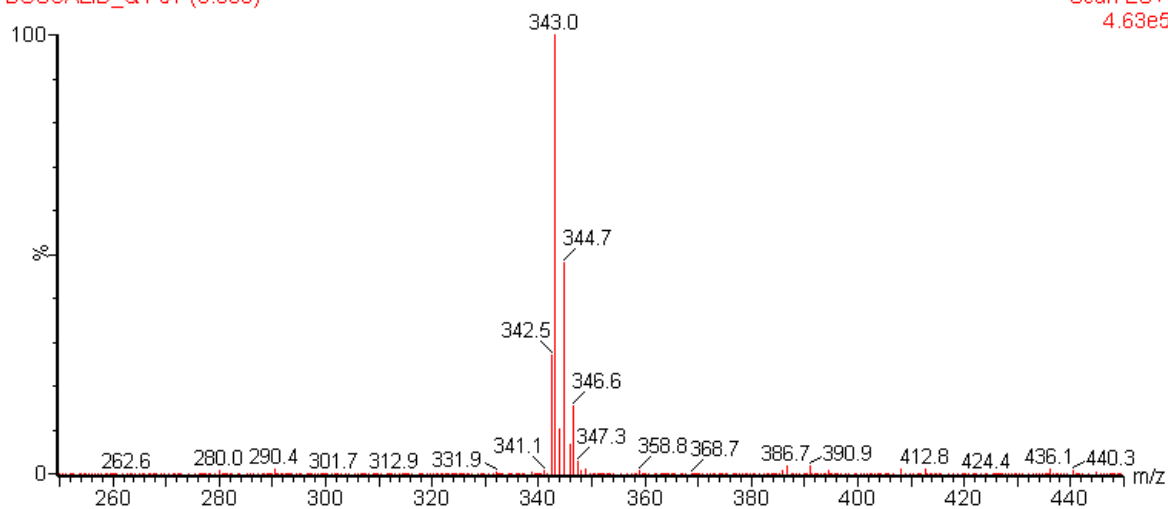


付図-1-3. ボスカリドのマススペクトル

Capillary3.5/cone30

BOSCALID_Q1 57 (0.388)

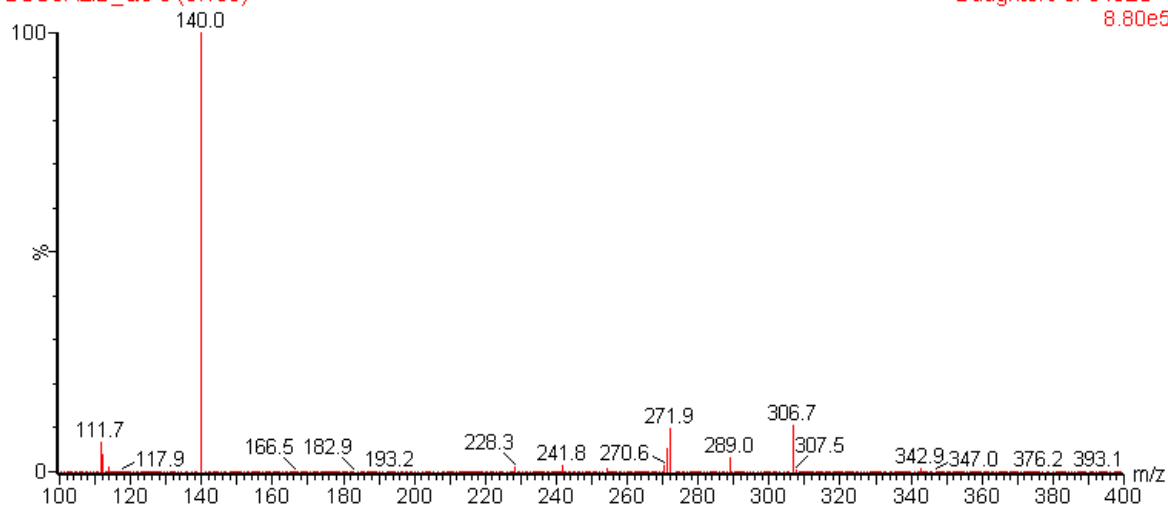
Scan ES+
4.63e5



Cone30,Collision25

BOSCALID_Q3 6 (0.130)

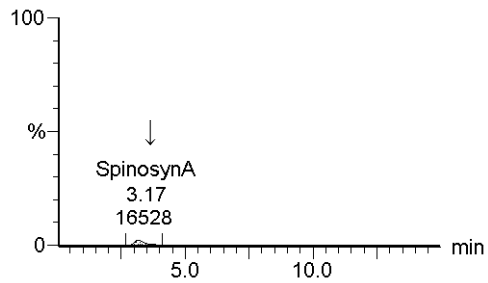
Daughters of 343ES+
8.80e5



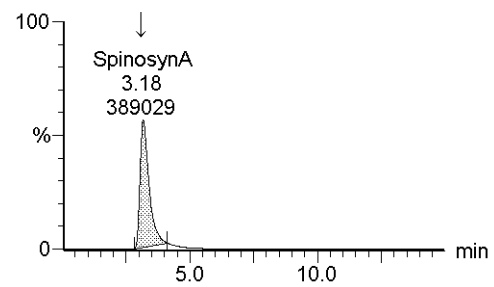
付図-2. 果肉のクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. スピノシン A のクロマトグラム

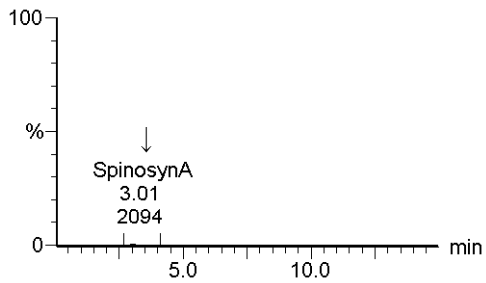
標準品 0.04ng



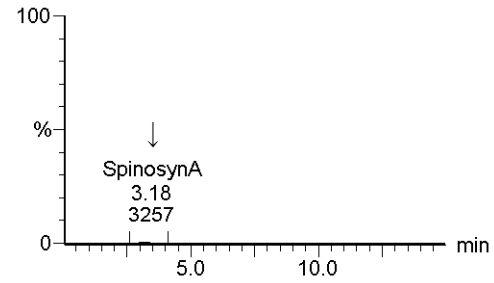
標準品 0.8ng



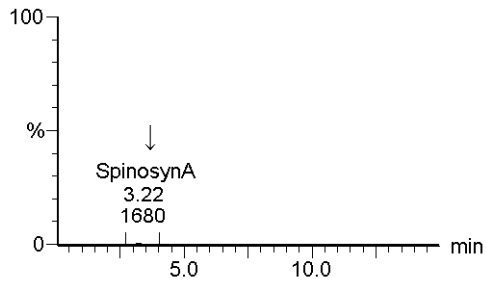
日植防茨城 無処理
4mL/4μL/8g



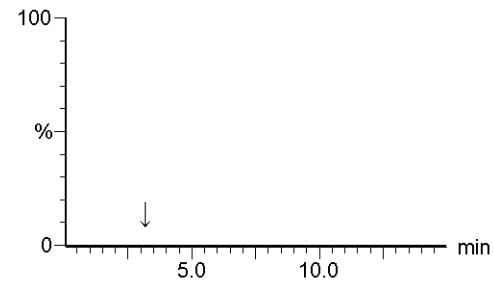
日植防茨城 2回処理 1日後
4mL/4μL/8g



日植防茨城 2回処理 3日後
4mL/4μL/8g

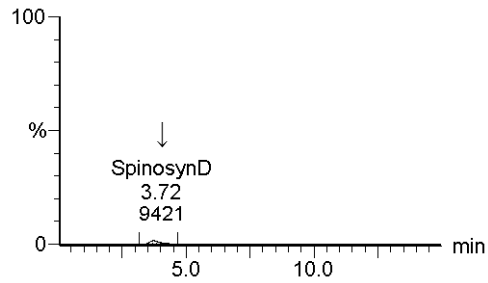


日植防茨城 2回処理 7日後
4mL/4μL/8g

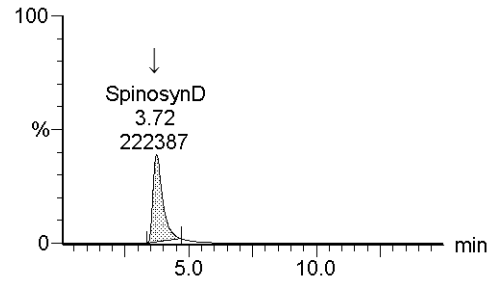


付図-2-2. スピノシン D のクロマトグラム

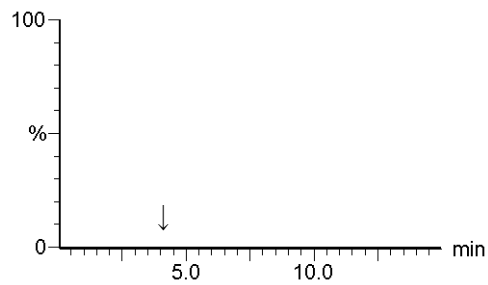
標準品 0.04ng



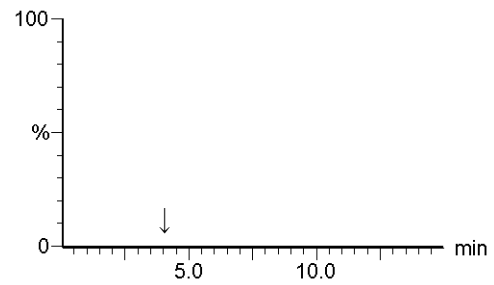
標準品 0.8ng



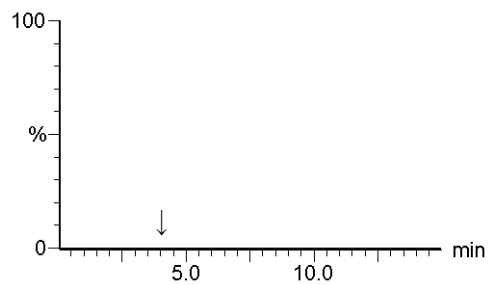
日植防茨城 無処理
4mL/4 μ L/8g



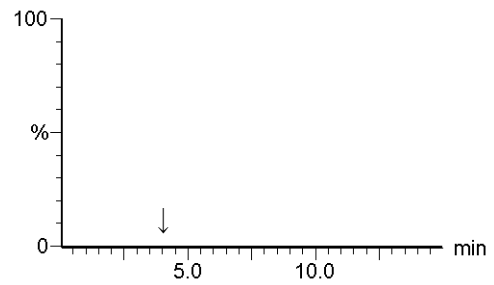
日植防茨城 2回処理 1日後
4mL/4 μ L/8g



日植防茨城 2回処理 3日後
4mL/4 μ L/8g

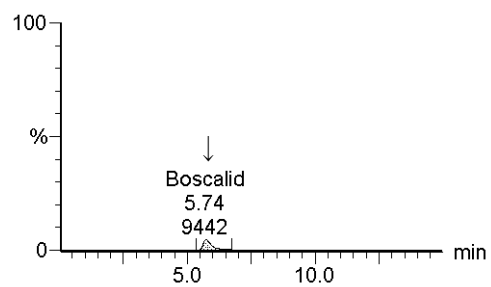


日植防茨城 2回処理 7日後
4mL/4 μ L/8g

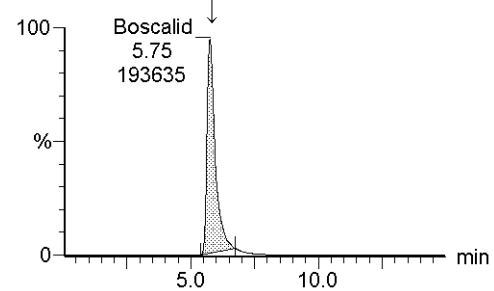


付図-2-3. ボスカリドのクロマトグラム

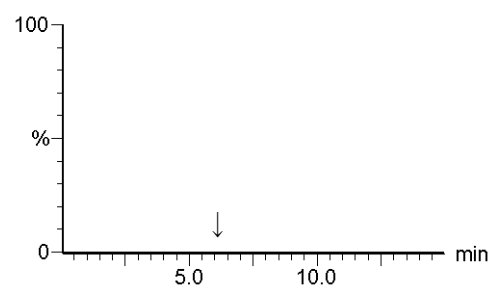
標準品 0.08ng



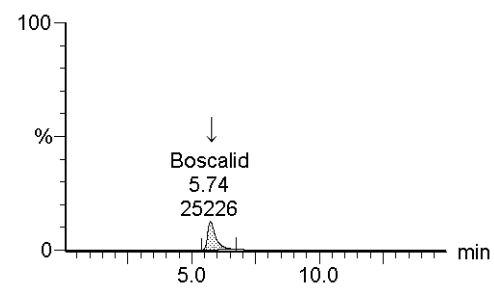
標準品 1.6ng



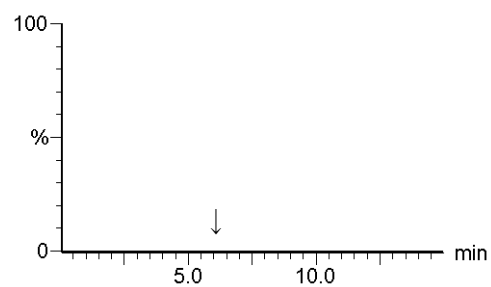
日植防茨城 無処理
4mL/4μL/8g



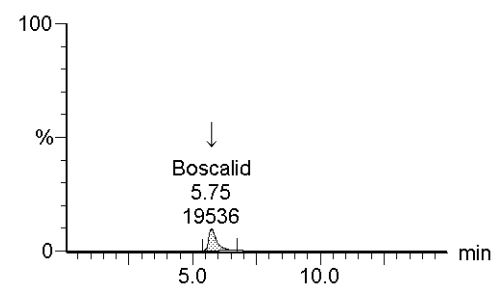
日植防茨城 3回処理 1日後
4mL/4μL/8g



日植防茨城 3回処理 3日後
4mL/4μL/8g



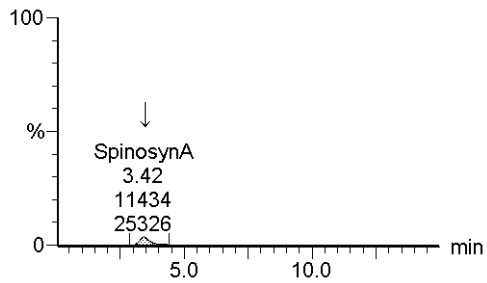
日植防茨城 3回処理 7日後
4mL/4μL/8g



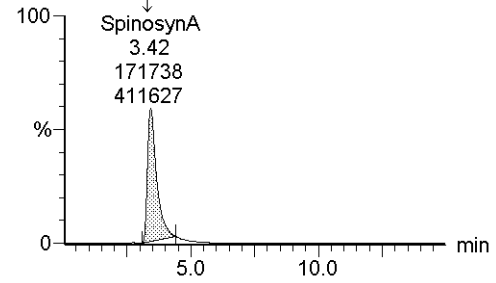
付図-3. 果皮のクロマトグラム (代表例)

付図-3-1. スピノシン A のクロマトグラム

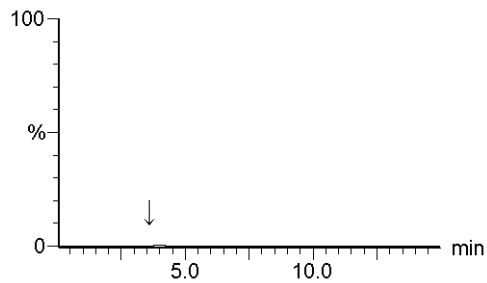
標準品 0.04ng



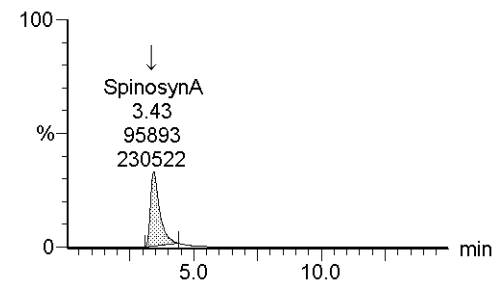
標準品 0.8ng



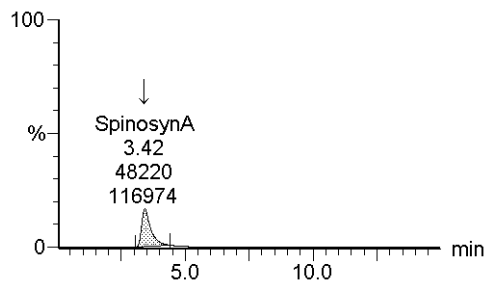
日植防茨城 無処理
4mL/4μL/8g



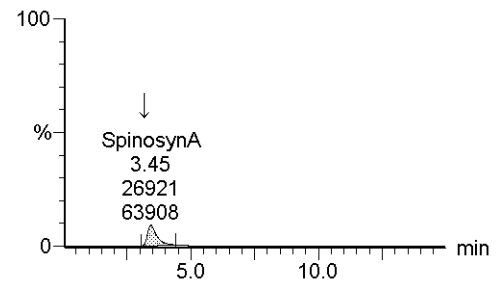
日植防茨城 2回処理 1日後
4mL/4μL/8g



日植防茨城 2回処理 3日後
4mL/4μL/8g

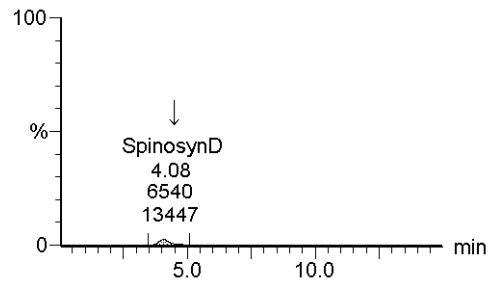


日植防茨城 2回処理 7日後
4mL/4μL/8g

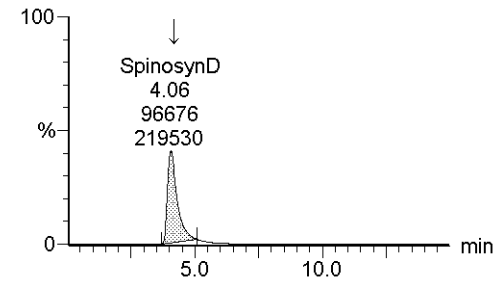


付図-3-2. スピノシン D のクロマトグラム

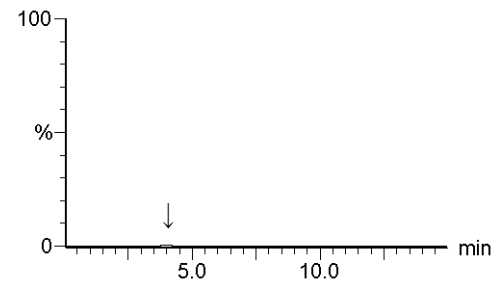
標準品 0.04ng



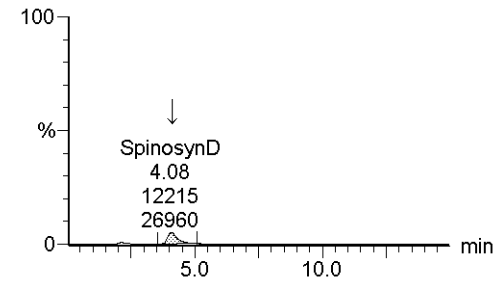
標準品 0.8ng



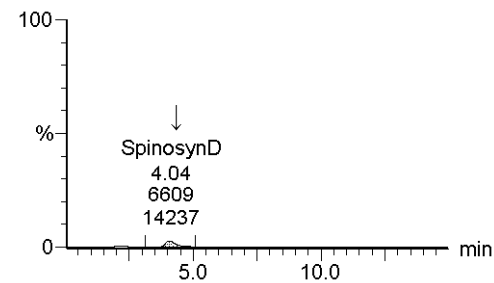
日植防茨城 無処理
4mL/4μL/8g



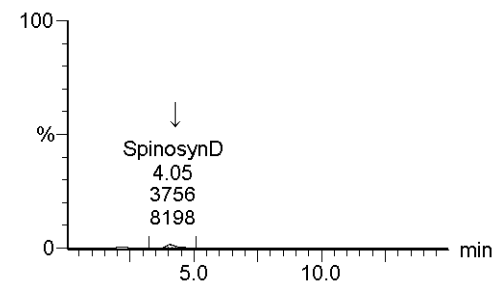
日植防茨城 2 回処理 1 日後
4mL/4μL/8g



日植防茨城 2 回処理 3 日後
4mL/4μL/8g

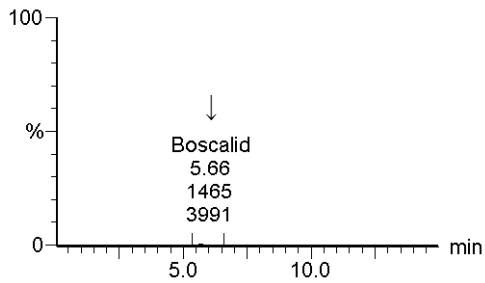


日植防茨城 2 回処理 7 日後
4mL/4μL/8g

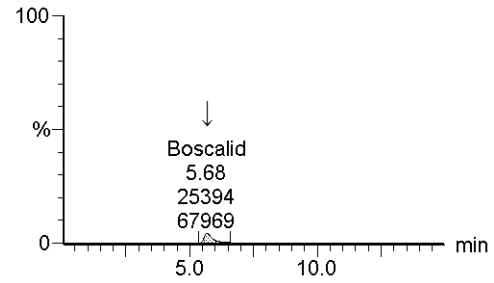


付図-3-3. ボスカリドのクロマトグラム

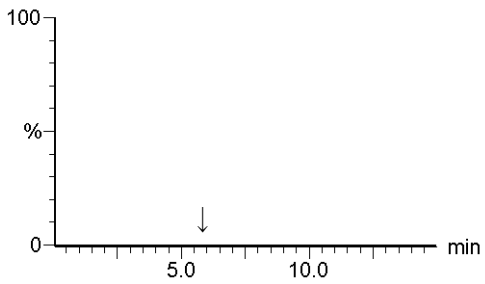
標準品 0.08ng



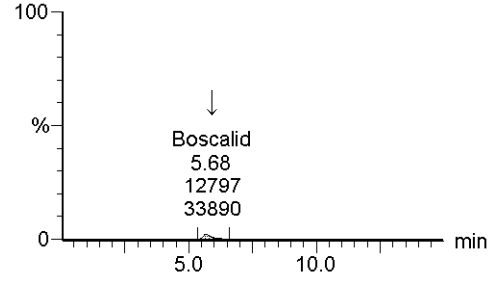
標準品 1.6ng



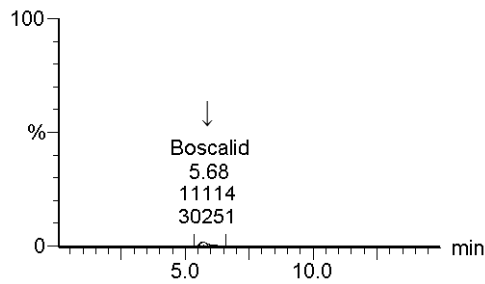
日植防茨城 無処理
4mL/4μL/8g



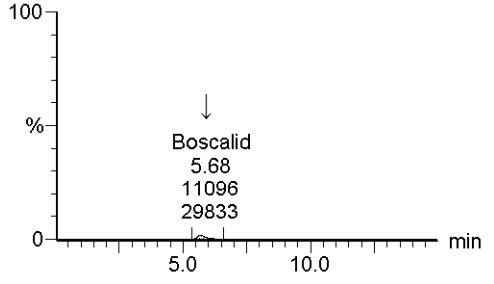
日植防茨城 3回処理 1日後
160mL/4μL/8g



日植防茨城 3回処理 3日後
160mL/4μL/8g



日植防茨城 3回処理 7日後
160mL/4μL/8g



登録作物のグループ化・残留分析詳細④
シアゾファミド

1. 分析対象物質

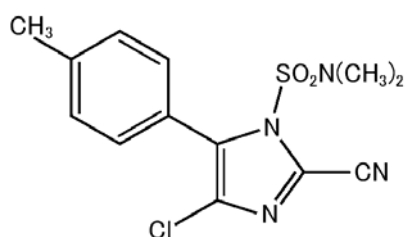
シアゾファミド

化学名： 4-chloro-2-cyano-*N,N*-dimethyl-5-*p*-tolylimidazole-1-sulfonamide

分子量： 324.8

分子式： $C_{13}H_{13}ClN_4O_2S$

構造式：



性 状： 淡黄色無臭粉末

融 点： 152.7℃

蒸気圧： $< 1.3 \times 10^{-2}$ mPa (35℃)

分配係数： $\log Pow = 3.2$ (25℃)

溶解性： 水 0.121 (pH5), 0.107 (pH7), 0.109 (pH9) (以上 ppm, 20℃)
アセトン 41.9, トルエン 5.3, ジクロロメタン 101.8, ヘキサン 0.03,
エタノール 1.54, 酢酸エチル 15.63, オクタノール 0.25,
アセトニトリル 29.4, イソプロパノール 0.39 (以上 g/L, 20℃)

安定性： 水中での半減期 24.6 日 (pH4), 27.2 日 (pH5), 24.8 日 (pH7)

出 典： The Pesticide Manual (14th Edition)

2. 標準品及び試薬

シアゾファミド標準品	: 純度 99 % (Dr.Ehrenstorfer GmbH 製)
アセトニトリル	: HPLC 用 (関東化学製)
メタノール	: HPLC 用 (和光純薬工業製)
ヘキサン	: 試薬特級 (和光純薬工業製)
ジエチルエーテル	: 残留農薬試験用 (和光純薬工業製)
塩化ナトリウム	: 試薬特級 (和光純薬工業製)
無水硫酸ナトリウム	: 試薬特級 (和光純薬工業製)
シリカゲルミニカラム	: InertSep Slim-J SI 1000 mg (ジーエルサイエンス製)

3. 装置及び機器

化学天秤：	島津製作所製 AUW220
上皿天秤：	メトラー・トレド製 PB8001-S/FACT

上皿天秤： エー・アンド・ディ製 FX 1200i
ミキサー： ワーリング製 CB-15T
フードプロセッサー： クイジナート製 DLC-NXJ2PS
高速液体クロマトグラフ： ヒューレット・パッカード製 HP-1100
データ処理装置： ヒューレット・パッカード製 Chem Station

4. 高速液体クロマトグラフの操作条件

検出器： 可変波長検出器
波長： 280 nm
カラム： L-column2 C6-phenyl (CERI 製),
内径 4.6 mm, 長さ 250 mm, 粒径 5 μ m
溶離液： アセトニトリル / メタノール (50:50v/v) 混液 / 水 (v/v)
65:35 - (20 min) – 90:10 (10 min) – 65:35 - (10 min)
流速： 1.0 mL/min
カラム温度： 40℃
試料注入量： 40 μ L
保持時間： 約 9.6～9.7 min

5. 検量線の作成

シアゾファミド標準品 20.0 mg (純度換算相当量) を精秤し, 100mL 容メスフラスコに移した。アセトンを加えて溶解して 200 mg/L の標準原液を調製した。この原液をアセトニトリル/水 (50:50v/v) 混液で希釈して 0.005, 0.01, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 mg/L の標準溶液を調製した。この 40 μ L を前記条件の高速液体クロマトグラフにそれぞれ注入し, データ処理装置を用いてシアゾファミドのピーク高さを測定し, 横軸に重量 (ng), 縦軸にピーク高さをもって検量線を作成した。

6. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料は重量を量り, つるを除去した。各々を縦に 8 分割し, 対角の 2 つを取り合わせた後, 果肉と果皮の境目に沿って包丁を入れ果肉と果皮にわけた。各々の重量を測定した後, 果肉はミキサーで果皮はフードプロセッサーで均一化した。各々の試料は密封容器に入れて -20℃ 以下で凍結保存した。また, 量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比 (%) を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した試料 20 g を分液ロートにはかりとり、アセトニトリル/水 (90:10v/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、残渣をアセトニトリル/水 (90:10v/v) 混液 50 mL で 2 回洗浄し、同様にろ過した。ろ液を合わせ、アセトニトリル/水 (90:10v/v) 混液で 250 mL に定容した。

6.1.3. 転溶

前項の定容液から 50mL (試料 4g 相当量) をナス型フラスコに分取し、40℃以下の水浴中で約 25mL まで減圧濃縮した。濃縮液を少量の水で分液ロートに移し、10%塩化ナトリウム溶液 100mL 及びヘキサン 80mL を加え 5 分間振とうした。静置分離後、ヘキサン層は無水硫酸ナトリウムをのせたるろ紙 (No.5A) を通過させ、脱水した。さらにヘキサン 80 mL を加え、前記操作をくり返した後、ヘキサン層を合わせ 40℃以下の水浴中で約 5mL まで減圧濃縮した。

6.1.4. シリカゲルミニカラムクロマトグラフィーによる精製

シリカゲルミニカラムにヘキサン 10mL を注入し流下して前処理した。前項の濃縮液をシリカゲルミニカラムに流下した後、ヘキサン 10mL 及びジエチルエーテル/ヘキサン (20:80v/v) 混液 15 mL を流下し、これらの溶出液を捨てた。次にジエチルエーテル/ヘキサン (30:70v/v) 混液 30 mL を流下し、溶出液を取った。

6.1.5. 定量

前項の溶出液を 40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。残留物は直ちにアセトニトリル/水 (50:50v/v) 混液を用いて 4 mL に定容し、測定溶液とした。測定溶液は必要に応じてアセトニトリル/水 (50:50v/v) 混液で希釈した。

測定溶液の 40μL を前記条件の高速液体クロマトグラフに注入し、ピーク高さを求め、検量線よりシアゾファミドの重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値 (LOQ) 及び検出限界値 (LOD)

	定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	定量限界 (ppm)
<u>果肉</u>	0.4	4	4	40	0.01
<u>果皮</u>	0.4	4	4	40	0.01
	最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)
<u>果肉</u>	0.2	4	4	40	0.005
<u>果皮</u>	0.2	4	4	40	0.005

6.3. 回収率

分析法確認のため、日植防高知の果肉及び果皮の無処理試料を用いて、0.01ppm（定量限界相当）、0.25ppm 及び 5ppm 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。

6.3.1. 果肉の回収率

試料	添加濃度 (ppm)		回収率 (%)			平均回収率 (%)		RSDr
<u>シアゾファミド</u>								
日植防高知	5	100	99	97	97	96	98	1.7
日植防高知	0.25	101	99	99	99	98	99	1.1
日植防高知	0.01	102	100	98	98	96	99	2.3

6.3.2. 果皮の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
<u>シアゾファミド</u>								
日植防高知	5	96	95	95	94	93	95	1.2
日植防高知	0.25	100	99	98	97	96	98	1.6
日植防高知	0.01	99	96	95	93	88	94	4.3

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（クオリティーコントロール試料）を分析した。

クオリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

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

7.1. クオリティーコントロール試料分析結果

7.1.1. 果肉

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>シアゾファミド</u>	2012/12/26	日植防茨城	98	<0.01
	2012/12/26	日植防高知	100	<0.01
	2012/12/27	日植防宮崎	102	<0.01

7.1.2. 果皮

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>シアゾファミド</u>	2012/12/27	日植防茨城	98	<0.01
	2012/12/29	日植防高知	104	<0.01
	2012/12/29	日植防宮崎	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、各圃場の無処理区試料の最終液量 1mL 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、0.1mg/L の検量線溶液 1mL に溶解して調製した。マトリック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>シアゾファミド</u>	日植防茨城	100
	日植防高知	100
	日植防宮崎	102

8.2. 果皮

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>シアゾファミド</u>	日植防茨城	99
	日植防高知	101
	日植防宮崎	100

9. 保存安定性試験

均一化した無処理試料に化合物を添加し、 -20°C 以下で凍結保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を評価した。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	日植防茨城	175 (12/7/5 - 12/12/27)	91	91
	日植防高知	175 (12/7/4 - 12/12/26)	91	91
	日植防宮崎	194 (12/6/16 - 12/12/27)	92	92

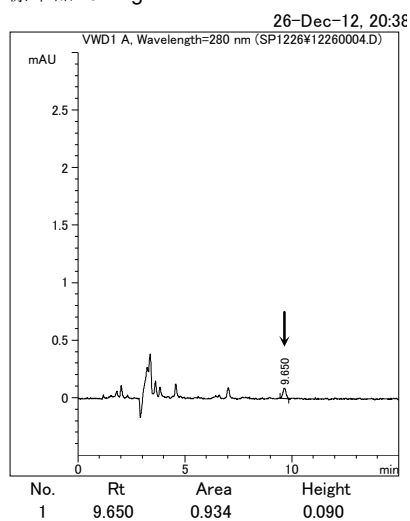
9.2. 果皮の保存安定性試験結果

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	176 (12/7/5 - 12/12/28)	89	89
	日植防高知	178 (12/7/4 - 12/12/29)	90	89
	日植防宮崎	196 (12/6/16 - 12/12/29)	86	86

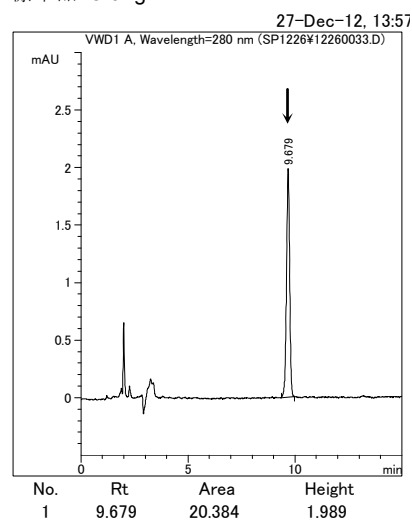
付図-1. 果肉のクロマトグラム (代表例)

付図-1-1. シアゾファミドのクロマトグラム

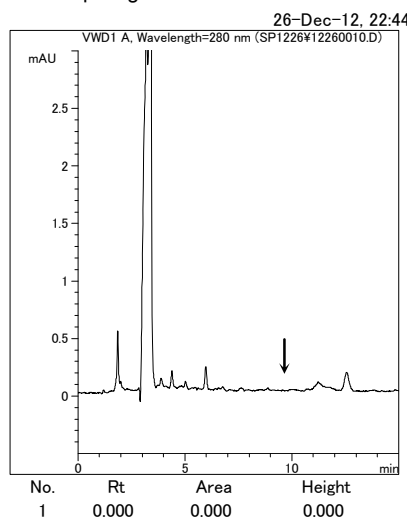
標準品 0.4ng



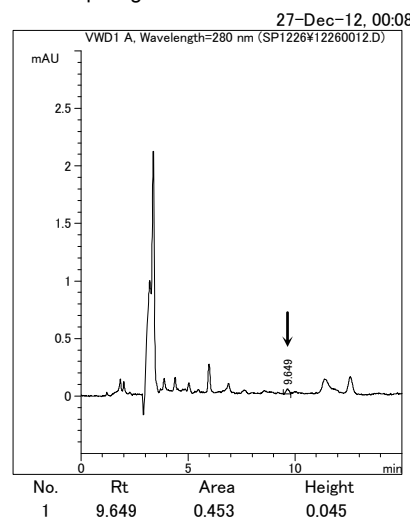
標準品 8.0ng



日植防茨城 無処理
4mL/40μL/4g

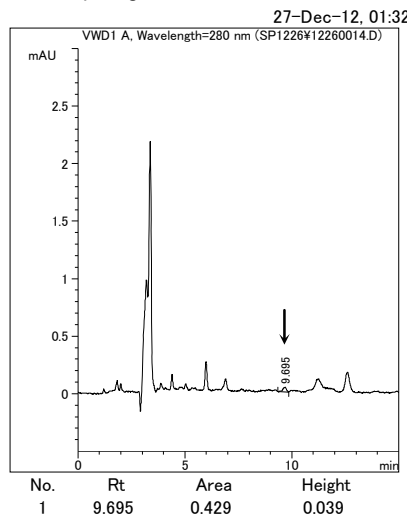


日植防茨城 4 回処理 1 日後
4mL/40μL/4g

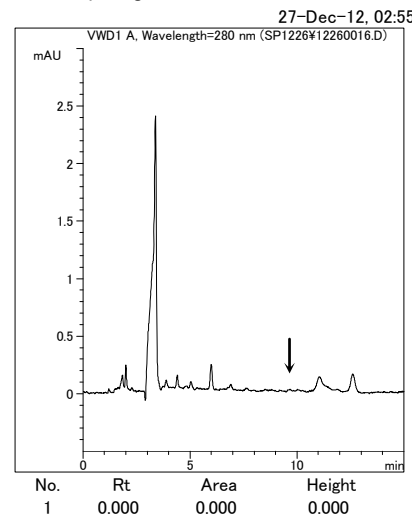


付図-1-1. シアゾファミドのクロマトグラム

日植防茨城 4 回処理 3 日後
4mL/40 μ L/4g



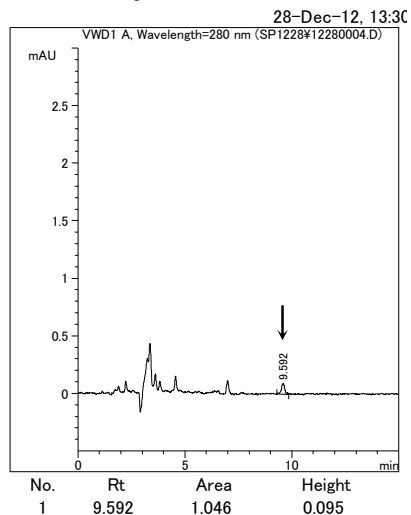
日植防茨城 4 回処理 7 日後
4mL/40 μ L/4g



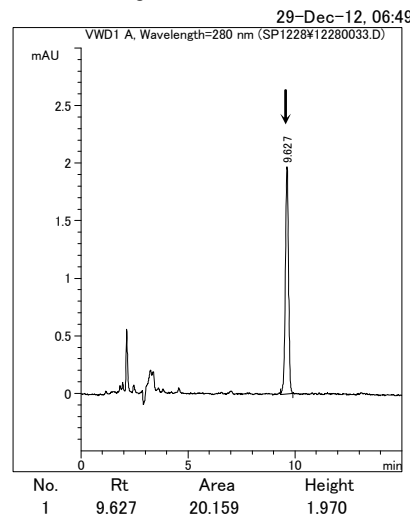
付図-2. 果皮のクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. シアゾファミドのクロマトグラム

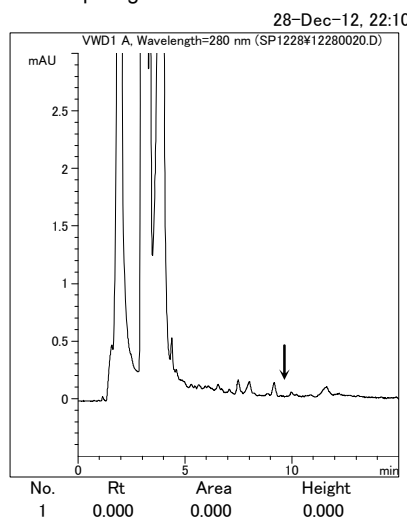
標準品 0.4ng



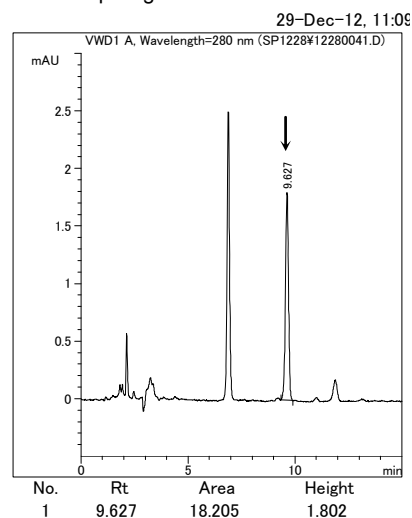
標準品 8.0ng



日植防茨城 無処理
4mL/40μL/4g

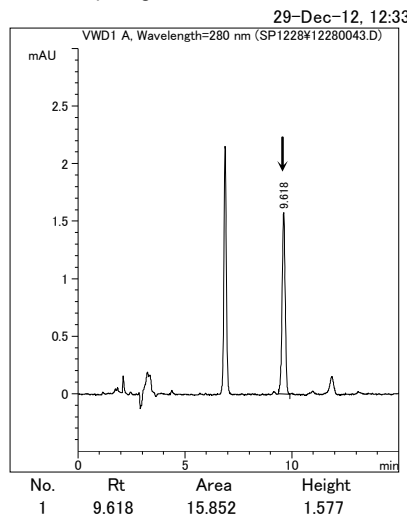


日植防茨城 4回処理 1日後
24mL/40μL/4g

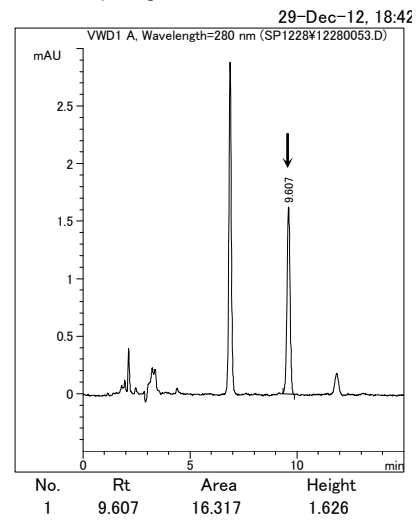


付図-2-1. シアゾファミドのクロマトグラム

日植防茨城 4 回処理 3 日後
24mL/40 μ L/4g



日植防茨城 4 回処理 7 日後
20mL/40 μ L/4g



10. 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(%)	
	回数	日数	(kg/個)	(kg/個)	(kg)	(kg)	果肉	果皮
茨城	0	—	1.95	1.95	19.5	12.2	80	20
	A	1	1.92		9.61		81	19
	A	3	1.92		9.58		78	22
	A	7	2.02		10.1		80	20
							平均 80:20	
高知	0	—	1.02	1.11	12.2	8.18	78	22
	A	1	1.20		7.20		79	21
	A	3	1.11		6.68		80	20
	A	7	1.10		6.62		80	20
							平均 79:21	
宮崎	0	—	1.71	1.89	20.5	13.4	81	19
	A	1	1.89		9.47		83	17
	A	3	1.75		10.5		83	17
	A	7	2.20		13.2		81	19
							平均 82:18	
3ほ場の総平均重量					3ほ場の総重量の平均			
1.65 kg/個					11.3 kg			

A:ピメトロジン, シアゾファミドは4回処理
シモキサニル, ボスカリドは3回処理
スピノサドは2回処理

11. 作物写真の一例



茨城 無処理区



茨城 処理 1 日後



茨城 処理 3 日後



茨城 処理 7 日後

資料 2-2

登録作物のグループ化・残留分析詳細①
クレソキシムメチル, クロルフェナピル

1. 分析対象物質

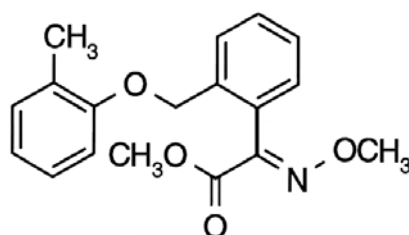
クレソキシムメチル

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

分子量 : 313.4

分子式 : $C_{18}H_{19}NO_4$

構造式 :



性 状 : 白色微芳香結晶

融 点 : 101.6-102.5℃

蒸気圧 : 2.3×10^{-3} mPa (20℃)

分配係数 : log Pow = 3.4 (pH7, 25℃)

溶解性 : 水 2mg/L (20℃)

n-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℃)

安定性 : 加水分解性半減期 34 日 (pH7), 7 時間 (pH9); pH5 で比較的安定

出 典 : The Pesticide Manual (14th Edition)

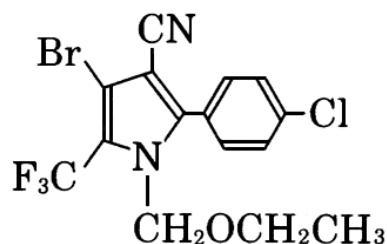
クロルフェナピル

化学名 : 4-bromo-2-(4-chlorophenyl)-1-ethoxymethyl-5-trifluoromethylpyrrole-3-carbonitrile

分子量 : 407.6

分子式 : $C_{15}H_{11}BrClF_3N_2O$

構造式 :



性 状 : 白色固体
融 点 : 101-102℃
蒸気圧 : $<1.2 \times 10^{-2}$ mPa (20℃)
分配係数 : $\log Pow = 4.83$
溶解性 : 水に難溶性, アセトン, ジエチルエーテル, ジメチルスルホキシド,
テトラヒドロフラン, アセトニトリル, アルコール類には可溶
安定性 : 空気中の半減期 0.88 日, 水中半減期 4.8-7.5 日
加水分解性 安定 (pH4, 7, 9)
出 典 : The Pesticide Manual (14th Edition)

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)
クロルフェナピル標準品 : 純度 99.8 % (和光純薬工業製)
アセトニトリル : HPLC 用 (関東化学製)
ヘキサン : 試薬特級 (和光純薬工業製)
ジエチルエーテル : 残留農薬試験用 (和光純薬工業製)
アセトン : 残留農薬試験用 (和光純薬工業製)
塩化ナトリウム : 試薬特級 (和光純薬工業製)
無水硫酸ナトリウム : 試薬特級 (和光純薬工業製)
NH₂ ミニカラム : InertSep Slim-J NH₂ (1000 mg)
(ジーエルサイエンス製)

3. 装置及び機器

化学天秤 : 島津製作所製 AUW220
上皿天秤 : メトラー・トレド製 PB8001-S/FACT
上皿天秤 : エー・アンド・ディ製 FX 1200i
ミキサー : ワーリング製 CB-15T
フードプロセッサー : クイジナート製 DLC-NXJ2PS
ガスクロマトグラフ : アジレント・テクノロジー製 7890A
データ処理装置 : アジレント・テクノロジー製 Chem Station

4. ガスクロマトグラフの操作条件

検出器：	NPD
カラム：	DB-5 (J&W 製) 内径 0.53 mm, 長さ 30 m, 膜厚 1.5 μ m
温度：	温度 240 $^{\circ}$ C (18 分) 検出器 300 $^{\circ}$ C 注入口 280 $^{\circ}$ C
ガス流速：	水素 3 mL/min, 空気 60 mL/min キャリアガス He 7.0 mL/min
試料注入量：	4 μ L
保持時間：	約 3.2 min (クレソキシムメチル) 約 3.5 min (クロルフェナピル)

5. 検量線の作成

クレソキシムメチル及びクロルフェナピルの標準品 20.0 mg (各純度換算相当量) を精秤し、それぞれ 100mL 容メスフラスコに移した。アセトンを加えて溶解して 200 mg/L の標準原液を調製した。各原液を等量ずつ混合し、アセトンで希釈して 0.01, 0.02, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mg/L の混合標準溶液を調製した。この 4 μ L を前記条件のガスクロマトグラフに注入し、データ処理装置を用いてクレソキシムメチル及びクロルフェナピルのピーク高さを測定し、横軸に重量 (ng), 縦軸にピーク高さをとって各検量線を作成した。

6. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料は重量を量り、つるを除去した。各々を縦に 8 分割し、対角の 2 つを取り合わせた後、果肉と果皮の境目に沿って包丁を入れ果肉と果皮にわけた。各々の重量を測定した後、果肉はミキサーで果皮はフードプロセッサーで均一化した。各々の試料は密封容器に入れて -20°C 以下で凍結保存した。また、量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比 (%) を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した試料 20 g を分液ロートにはかりとり、アセトニトリル/水 (80:20v/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、残渣をアセトニトリル/水 (80:20v/v) 混液 50 mL で 2 回洗浄し、同様にろ過した。ろ液を合わせアセトニトリル/水 (80:20v/v) 混液で 250 mL に定容した。

6.1.3. 転溶

前項の定容液から 100mL (試料 8g 相当量) 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、アセトニトリルを留去した。濃縮液を少量の水で分液ロートに移し、10%塩化ナトリウム溶液 80mL 及びヘキサン 80mL を加え 5 分間振とうした。静置分離後、ヘキサン層は無水硫酸ナトリウムをのせたろ紙 (No.5A) を通過させ、脱水した。さらにヘキサン 80 mL を加え、前記操作をくり返した後、ヘキサン層を合わせ 40℃以下の水浴中で約 5mL まで減圧濃縮した。

6.1.4. NH₂ ミニカラムクロマトグラフィーによる精製

NH₂ ミニカラムにヘキサン 10mL を注入し流下して前処理した。前項の濃縮液を NH₂ ミニカラムに流下した後、ヘキサン 20 mL を流下し、これらの流出液を捨てた。次にジエチルエーテル/ヘキサン (20:80v/v) 混液 30 mL を流下し、流出液を取った。

6.1.5. 定量

前項の溶出液を 40℃以下の水浴中で約 1mL まで減圧濃縮し、アセトンを用いて 4 mL に定容し、測定溶液とした。測定溶液は必要に応じてアセトンで希釈した。

測定溶液の 4 µL を前記条件のガスクロマトグラフに注入し、ピーク高さを求め、検量線よりクレソキシムメチル及びクロルフェナピルの重量を求め、試料中の各残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値 (LOQ) 及び検出限界値 (LOD)

	定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (µL)	定量限界 (ppm)
<u>果肉</u>					
	0.08	8	4	4	0.01
<u>果皮</u>					
	0.08	8	4	4	0.01
	最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (µL)	検出限界 (ppm)
<u>果肉</u>					
	0.04	8	4	4	0.005
<u>果皮</u>					
	0.04	8	4	4	0.005

*クレソキシムメチル, クロルフェナピルはいずれも同じ値

6.3. 回収率

分析法確認のため、日植防高知の果肉及び果皮の無処理試料を用いて、0.01ppm（定量限界相当）、0.25ppm 及び 5ppm 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。

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
クレソキシムメチル								
日植防高知	5	93	90	88	87	86	89	3.1
日植防高知	0.25	96	94	92	91	83	91	5.5
日植防高知	0.01	94	92	87	85	79	87	6.8
クロルフェナピル								
日植防高知	5	101	99	97	95	94	97	3.0
日植防高知	0.25	104	98	96	92	85	95	7.4
日植防高知	0.01	95	95	94	91	87	92	3.7

6.3.2. 果皮の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
クレソキシムメチル								
日植防高知	5	95	94	92	90	86	91	3.9
日植防高知	0.25	92	87	87	84	84	87	3.8
日植防高知	0.01	95	93	88	80	79	87	8.4
クロルフェナピル								
日植防高知	5	93	93	90	87	82	89	5.2
日植防高知	0.25	104	98	94	93	90	96	5.6
日植防高知	0.01	94	91	86	86	78	87	7.0

7. 精度管理

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

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

クオリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

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

7.1. クオリティーコントロール試料分析結果

7.1.1. 果肉

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>クレソキシムメチル</u>	2012/11/14	日植防茨城	101	<0.01
	2012/11/14	日植防高知	99	<0.01
	2012/11/19	日植防宮崎	91	<0.01
<u>クロルフェナピル</u>	2012/11/14	日植防茨城	99	<0.01
	2012/11/14	日植防高知	101	<0.01
	2012/11/19	日植防宮崎	96	<0.01

7.1.2. 果皮

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>クレソキシムメチル</u>	2012/11/19	日植防茨城	94	<0.01
	2012/11/21	日植防高知	98	<0.01
	2012/11/21	日植防宮崎	99	<0.01
<u>クロルフェナピル</u>	2012/11/19	日植防茨城	98	<0.01
	2012/11/21	日植防高知	100	<0.01
	2012/11/21	日植防宮崎	102	<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液量 1mL 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, 0.2mg/L の検量線溶液 1mL で溶解して調製した。マトリック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>クレソキシムメチル</u>	日植防茨城	100
	日植防高知	102
	日植防宮崎	103
<u>クロルフェナピル</u>	日植防茨城	103
	日植防高知	102
	日植防宮崎	103

8.2. 果皮

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>クレソキシムメチル</u>	日植防茨城	100
	日植防高知	103
	日植防宮崎	100
<u>クロルフェナピル</u>	日植防茨城	100
	日植防高知	102
	日植防宮崎	101

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料に各化合物を添加し、 -20°C 以下で凍結保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を評価した。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. クレシキシムメチル**

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城 133	(12/7/4 - 12/11/14)	99	98
0.5	日植防高知 133	(12/7/4 - 12/11/14)	100	95
0.5	日植防宮崎 156	(12/6/16 - 12/11/19)	91	91

9.1.2. クロルフェナピル

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城 133	(12/7/4 - 12/11/14)	109	108
0.5	日植防高知 133	(12/7/4 - 12/11/14)	108	101
0.5	日植防宮崎 156	(12/6/16 - 12/11/19)	99	91

9.2. 果皮の保存安定性試験結果

9.2.1. クレソキシムメチル

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城 138	(12/7/4 - 12/11/19)	99	91
0.5	日植防高知 140	(12/7/4 - 12/11/21)	93	93
0.5	日植防宮崎 158	(12/6/16 - 12/11/21)	89	88

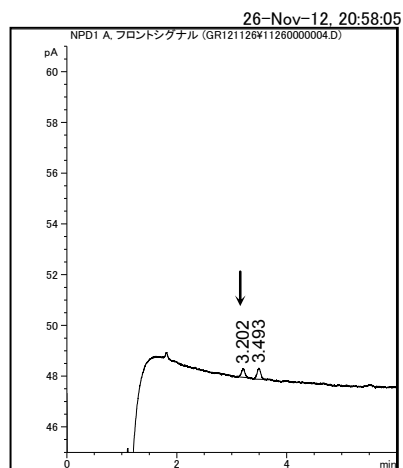
9.2.2. クロルフェナピル

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城 138	(12/7/4 - 12/11/19)	102	102
0.5	日植防高知 140	(12/7/4 - 12/11/21)	107	101
0.5	日植防宮崎 158	(12/6/16 - 12/11/21)	109	102

付図-1. 果肉のクロマトグラム (代表例)

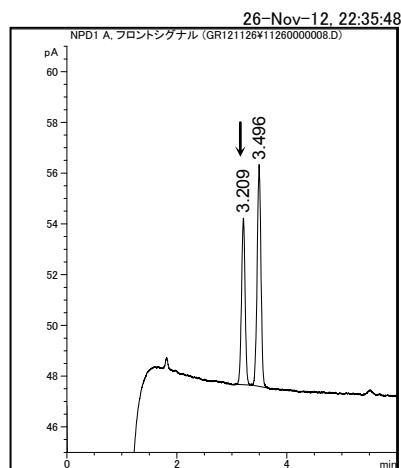
付図-1-1. クレソキシムメチルのクロマトグラム

標準品 0.08ng



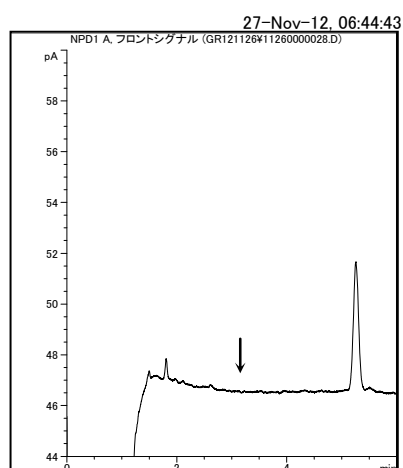
No.	Rt	Area	Height
1	3.202	1.477	0.321
2	3.493	1.995	0.425

標準品 1.6ng



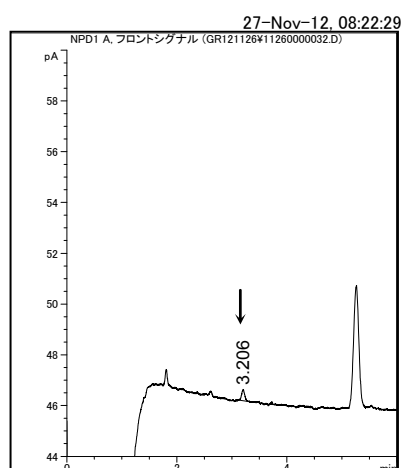
No.	Rt	Area	Height
1	3.209	29.946	6.566
2	3.496	42.031	8.725

日植防高知 無処理
4mL/4μL/8g



No.	Rt	Area	Height
1	0.000	0.000	0.000
2	0.000	0.000	0.000

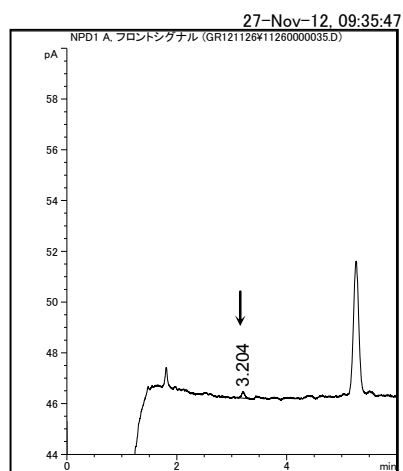
日植防高知 3回処理 1日後
4mL/4μL/8g



No.	Rt	Area	Height
1	3.206	1.720	0.436
2	0.000	0.000	0.000

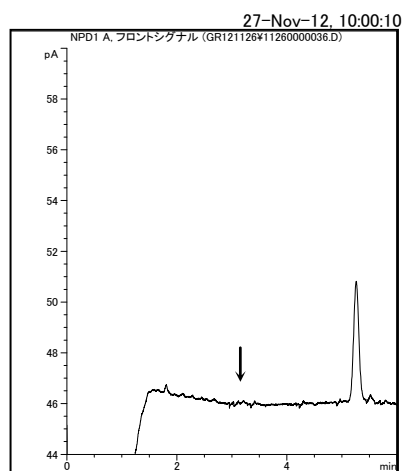
付図-1-1. クレソキシムメチルのクロマトグラム

日植防高知 3 回処理 3 日後
4mL/4 μ L/8g



No.	Rt	Area	Height
1	3.204	1.010	0.247
2	0.000	0.000	0.000

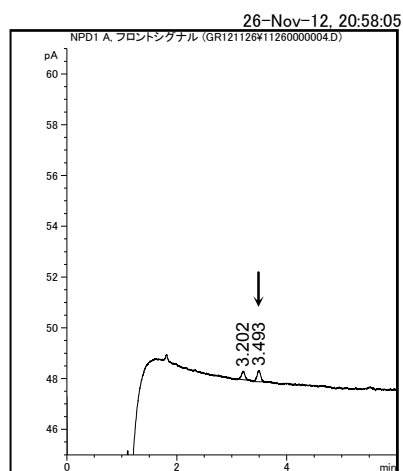
日植防高知 3 回処理 7 日後
4mL/4 μ L/8g



No.	Rt	Area	Height
1	0.000	0.000	0.000
2	0.000	0.000	0.000

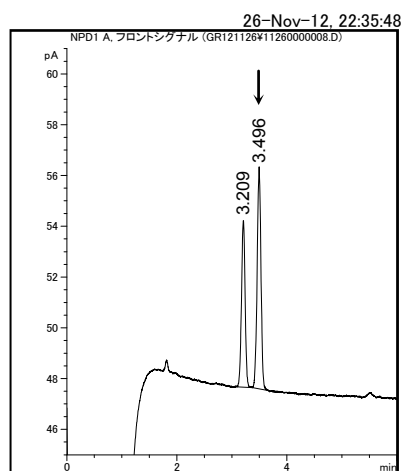
付図-1-2. クロルフェナピルのクロマトグラム

標準品 0.08ng



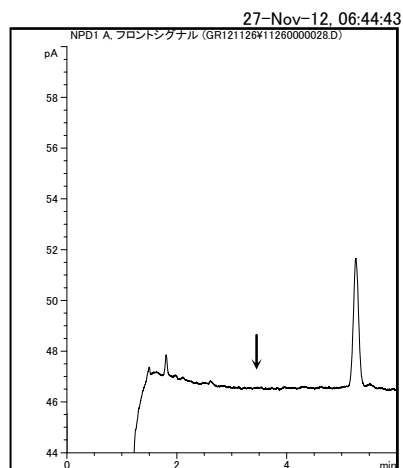
No.	Rt	Area	Height
1	3.202	1.477	0.321
2	3.493	1.995	0.425

標準品 1.6ng



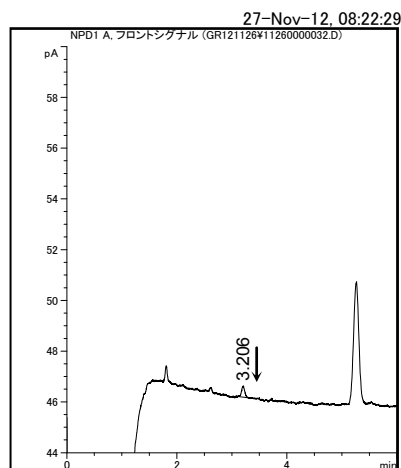
No.	Rt	Area	Height
1	3.209	29.946	6.566
2	3.496	42.031	8.725

日植防高知 無処理
4mL/4μL/8g



No.	Rt	Area	Height
1	0.000	0.000	0.000
2	0.000	0.000	0.000

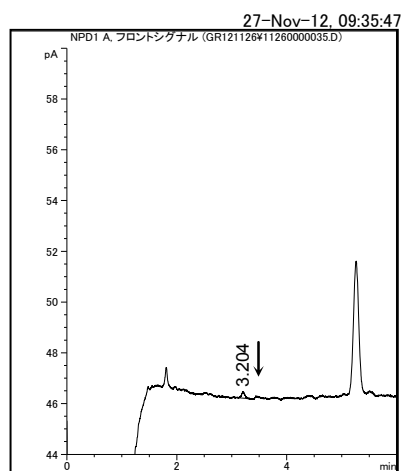
日植防高知 2 回処理 1 日後
4mL/4μL/8g



No.	Rt	Area	Height
1	3.206	1.720	0.436
2	0.000	0.000	0.000

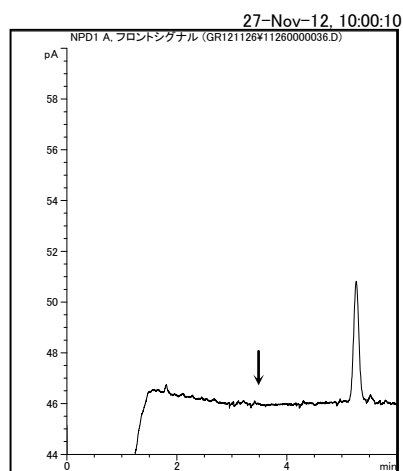
付図-1-2. クロルフェナピルのクロマトグラム

日植防高知 2 回処理 3 日後
4mL/4 μ L/8g



No.	Rt	Area	Height
1	3.204	1.010	0.247
2	0.000	0.000	0.000

日植防高知 2 回処理 7 日後
4mL/4 μ L/8g

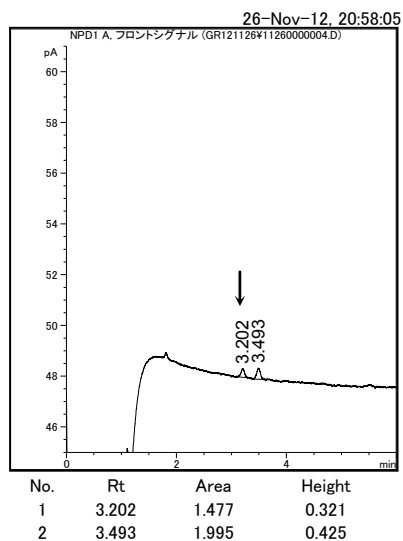


No.	Rt	Area	Height
1	0.000	0.000	0.000
2	0.000	0.000	0.000

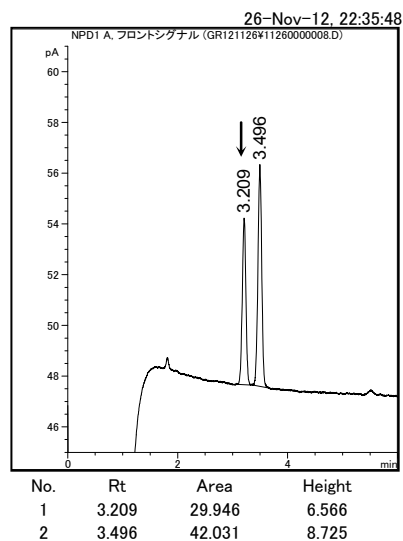
付図-2. 果皮のクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. クレソキシムメチルのクロマトグラム

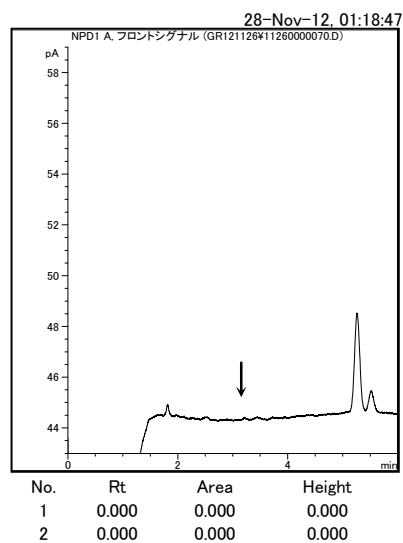
標準品 0.08ng



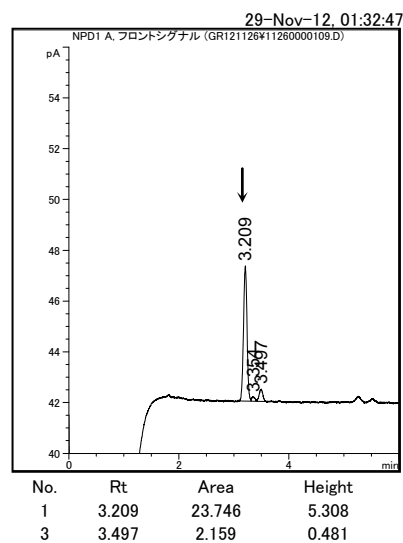
標準品 1.6ng



日植防高知 無処理
4mL/4μL/8g

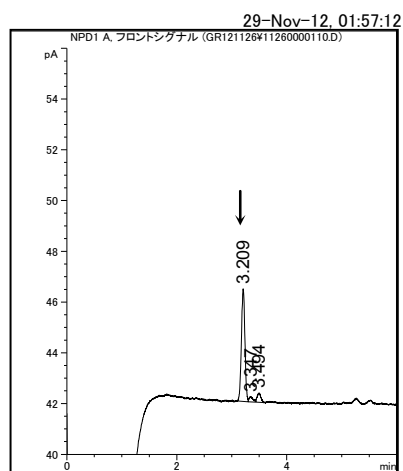


日植防高知 3回処理 1日後
80mL/4μL/8g

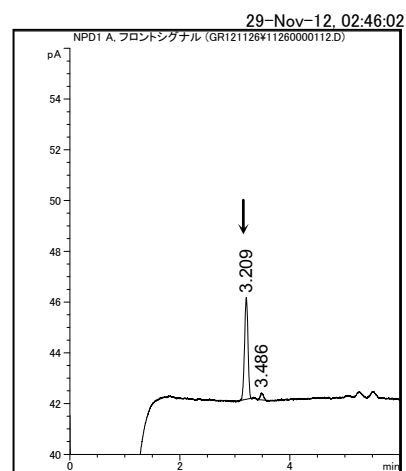


付図-2-1. クレソキシムメチルのクロマトグラム

日植防高知 3 回処理 3 日後
80mL/4 μ L/8g

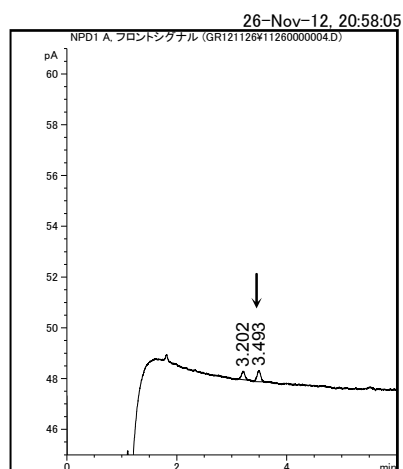


日植防高知 3 回処理 7 日後
80mL/4 μ L/8g



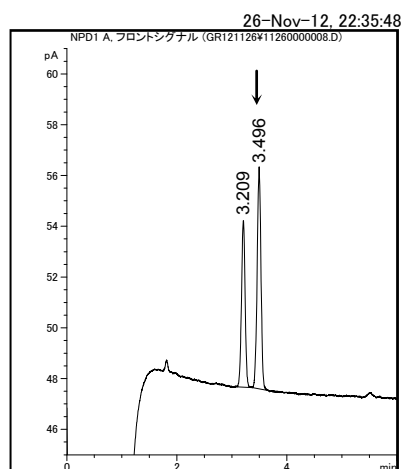
付図-2-2. クロルフェナピルのクロマトグラム

標準品 0.08ng



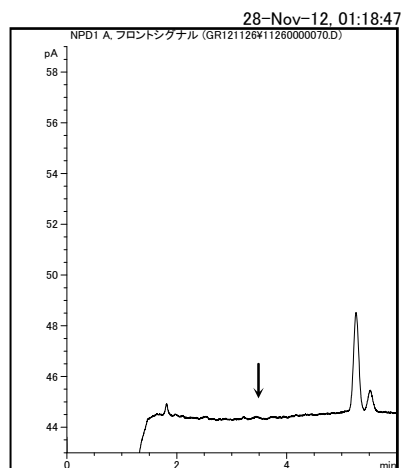
No.	Rt	Area	Height
1	3.202	1.477	0.321
2	3.493	1.995	0.425

標準品 1.6ng



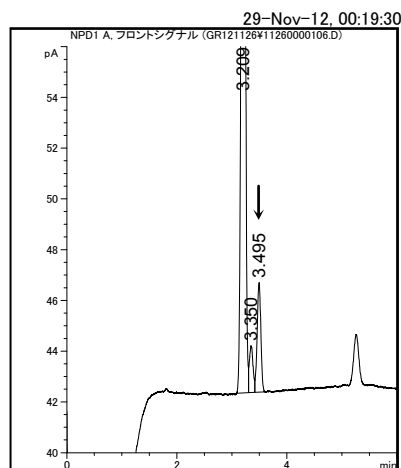
No.	Rt	Area	Height
1	3.209	29.946	6.566
2	3.496	42.031	8.725

日植防高知 無処理
4mL/4μL/8g



No.	Rt	Area	Height
1	0.000	0.000	0.000
2	0.000	0.000	0.000

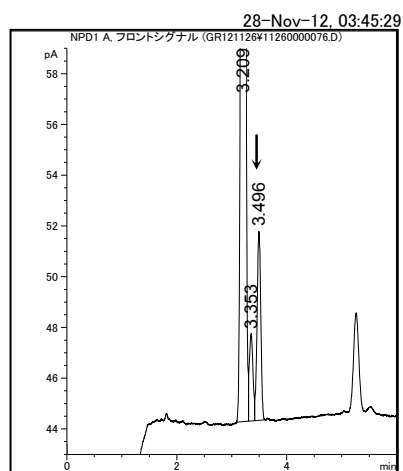
日植防高知 2 回処理 1 日後
8mL/4μL/8g



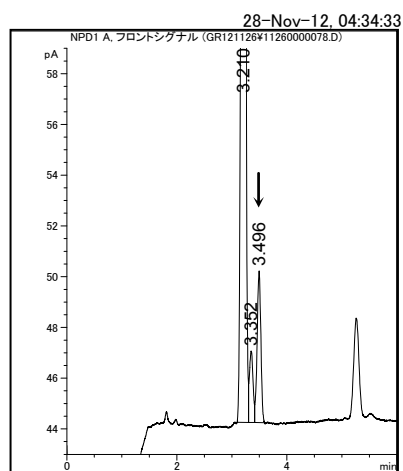
No.	Rt	Area	Height
1	3.209	223.222	51.082
3	3.495	20.236	4.308

付図-2-2. クロルフェナピルのクロマトグラム

日植防高知 2 回処理 3 日後
4mL/4 μ L/8g



日植防高知 2 回処理 7 日後
4mL/4 μ L/8g

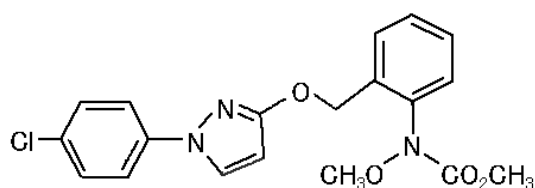


登録作物のグループ化・残留分析詳細②
ピラクロストロビン, ファモキサドン, シフルフェナミド

1. 分析対象物質

ピラクロストロビン

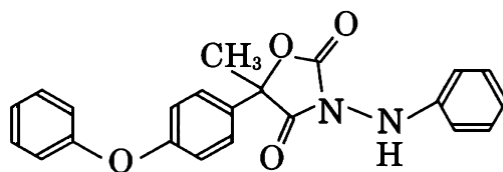
化学名 : methyl *N*-{2-[1-(4-chlorophenyl)-1*H*-pyrazol-3-yloxymethyl]phenyl}
(*N*-methoxy)carbamate
分子量 : 387.8
分子式 : C₁₉H₁₈ClN₃O₄
構造式 :



性 状 : 白色又は明灰黄色結晶性固体
融 点 : 63.7-65.2℃
蒸気圧 : 2.6×10^{-5} mPa (20℃)
分配係数 : log Pow = 3.99 (20℃)
溶解性 : 水 1.9mg/L (20℃)
n-ヘプタン 3.7, イソプロパノール 30.0, オクタノール 24.2,
オリーブオイル 28.0, メタノール 100.8,
アセトン, 酢酸エチル, アセトニトリル, ジクロロメタン, トルエン >500
(以上 g/L, 20℃)
安定性 : 30 日以上安定 (pH5-7, 25℃), 水中光分解性半減期 1.7 日
出 典 : The Pesticide Manual (14th Edition)

ファモキサドン

化学名 : 3-anilino-5-methyl-5-(4-phenoxyphenyl)-1,3-oxazolidine-2,4-dione
分子量 : 374.4
分子式 : C₂₂H₁₈N₂O₄
構造式 :

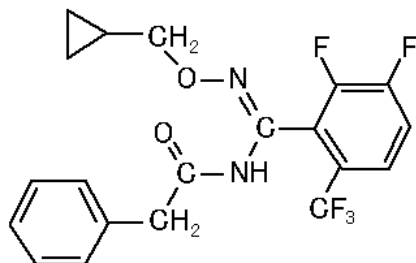


すいか 処理区 B (ピラクロストロビン, ファモキサドン, シフルフェナミド)

性 状 : 淡黄色粉末
融 点 : 141.3-142.3℃
蒸気圧 : 6.4×10^{-4} mPa (20℃)
分配係数 : $\log Pow = 4.65$ (pH7)
溶解性 : 水 52 (非緩衝液, pH7.8-8.9), 243 (pH5), 111 (pH7),
38 (pH9) (以上 $\mu\text{g/L}$, 20℃)
アセトン 274, トルエン 13.3, ジクロロメタン 239, ヘキサン 0.048,
メタノール 10, 酢酸エチル 125.0, n-オクタノール 1.78,
アセトニトリル 125 (以上 g/L , 20℃)
安定性 : 固体の状態で暗所 (25℃で安定)
水中で光なし 半減期 41 日(pH5), 2 日(pH7), 0.0646 日(pH9) (25℃)
水中で光あり 半減期 4.6 日(pH5, 25℃)
出 典 : The Pesticide Manual (14th Edition)

シフルフェナミド

化学名 : (Z)-N-[α -(cyclopropylmethoxyimino)-2,3-difluoro-6-(trifluoromethyl)benzyl]-2-phenylacetamide
分子量 : 412.4
分子式 : $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{F}_5\text{N}_2\text{O}_2$
構造式 :



性 状 : 白色固体微芳香
融 点 : 61.5-62.5℃
蒸気圧 : 3.54×10^{-2} mPa (20℃)
分配係数 : $\log Pow = 4.70$ (pH6.75, 20℃)
溶解性 : 水 5.20×10^{-4} g/L (pH6.5, 20℃)
ジクロロメタン 902, アセトン 920, キシレン 658, アセトニトリル 943,
メタノール 653, エタノール 500, 酢酸エチル 808, n-ヘキサン 18.6
n-ヘプタン 15.7 (以上 g/L , 20℃)
安定性 : pH5-7 で安定, pH9 で半減期 288 日, 水中光分解半減期 594 日
出 典 : The Pesticide Manual (14th Edition)

2. 標準品及び試薬

ピラクロストロビン標準品	: 純度 97% (Dr.Ehrenstorfer GmbH 製)
ファモキサドン標準品	: 純度 99.6% (関東化学製)
シフルフェナミド標準品	: 純度 99.7% (和光純薬工業製)
アセトニトリル	: HPLC 用 (関東化学製)
メタノール	: HPLC 用 (和光純薬工業製)
ヘキサン	: 試薬特級 (和光純薬工業製)
トルエン	: 残留農薬試験用 (和光純薬工業製)
塩化ナトリウム	: 試薬特級 (和光純薬工業製)
リン酸水素二カリウム	: 試薬特級 (和光純薬工業製)
リン酸二水素カリウム	: 試薬特級 (和光純薬工業製)
酢酸アンモニウム	: 試薬特級 (和光純薬工業製)
塩酸	: 試薬特級 (和光純薬工業製)
水酸化ナトリウム	: 試薬特級 (和光純薬工業製)
GC/SAX/PSA ミニカラム	: InertSep GC/SAX/PSA (500mg/500mg/500mg) (ジーエルサイエンス製)

3. 装置及び機器

化学天秤:	島津製作所製 AUW220
上皿天秤:	メトラー・トレド製 PB8001-S/FACT
上皿天秤:	エー・アンド・ディ製 FX 1200i
ミキサー:	ワーリング製 CB-15T
フードプロセッサー	クイジナート製 DLC-NXJ2PS
液体クロマトグラフ・質量分析計システム (LC-MS):	アジレント・テクノロジー製 HP-1100 ①
液体クロマトグラフ・質量分析計システム (LC-MS/MS):	Waters 社製 Alliance 2695 Waters 社製 Quattro Premier XE ②
データ処理装置:	アジレント・テクノロジー製 Chem Station ① Waters 社製 Mass Lynx ②

4. 液体クロマトグラフ・質量分析計の操作条件

4.1. 液体クロマトグラフ・質量分析計 ① ファモキサドン

4.1.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム:	Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス製), 内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒径 4 μ m
溶離液:	10mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 / メタノール(15:85v/v)
流速:	0.2 mL/min

カラム温度 : 40°C
試料注入量 : 4 µL
保持時間 : 約 2.8 min

4.1.2. 質量分析計

イオン化法 : API-ES Negative モード
乾燥ガス温度 : 350°C
乾燥ガス流量 : 12 L/min
ネプライザー圧力 : 35 psi
フラグメンター電圧 : 80 v
キャピラリー電圧 : 3500 v
採取イオン : SIM m/z 373.1 (289 m 秒)

4.2. 液体クロマトグラフ・質量分析計 ② ピラクロストロビン, シフルフェナミド

4.2.1 高速液体クロマトグラフ

カラム : Atlantis dC18 (Waters 製),
内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 5 µm
溶離液 : 5mmol/L 酢酸アンモニウム溶液/アセトニトリル(30:70v/v)
流速 : 0.2 mL/min
カラム温度 : 40°C
試料注入量 : 2 µL
保持時間 : 約 5.7~5.8min (ピラクロストロビン)
約 6.3~6.5min (シフルフェナミド)

4.2.2. 質量分析計

イオン化法 : エレクトロスプレー(ESI), 正イオン化モード
キャピラリー電圧 : 3.5kV
コーンガス流量 : 窒素 50L/hr
デソルベーションガス流量 : 窒素 800L/hr (400°C)
コリジョンガス流量 : アルゴン 0.2mL/min
イオンソース温度 : 80°C
採取イオン : Q1Mass m/z 387.7 , Q3Mass m/z 194.1 (ピラクロストロビン)
Q1Mass m/z 413.1 , Q3Mass m/z 295.1 (シフルフェナミド)
コーン電圧 : 18 V (ピラクロストロビン)
25 V (シフルフェナミド)
コリジョン電圧 : 13 eV (ピラクロストロビン)
16 eV (シフルフェナミド)

5. 検量線の作成

ピラクロストロビン, ファモキサドン及びシフルフェナミドの標準品 20.0 mg (各純度換算相当量) を精秤し, それぞれ 100mL 容メスフラスコに移した。アセトニトリルを加えて溶解して 200 mg/L の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 (50:50v/v) 混液で希釈して 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 mg/L の混合標準溶液を調製した。ファモキサドンは混合標準溶液の 4 μ L を, ピラクロストロビン及びシフルフェナミドは 2 μ L を前記条件の液体クロマトグラフ・質量分析計にそれぞれ注入し, データ処理装置を用いてピラクロストロビン, ファモキサドン及びシフルフェナミドのピーク高さを測定し, 横軸に重量 (ng), 縦軸にピーク高さをとって各検量線を作成した。

6. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料は重量を量り, つるを除去した。各々を縦に 8 分割し, 対角の 2 つを取り合わせた後, 果肉と果皮の境目に沿って包丁を入れ果肉と果皮にわけた。各々の重量を測定した後, 果肉はミキサーで果皮はフードプロセッサーで均一化した。各々の試料は密封容器に入れて -20°C 以下で凍結保存した。また, 量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比 (%) を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した試料 20 g を分液ロートにはかりとり, アセトニトリル/水 (80:20v/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, 残渣をアセトニトリル/水 (80:20v/v) 混液 50 mL で 2 回洗浄し, 同様にろ過した。ろ液を合わせアセトニトリル/水 (80:20v/v) 混液で 250 mL に定容した。

6.1.3. 転溶

前項の定容液から 50mL (試料 4g 相当量) を分液ロートに分取し, 塩化ナトリウム 10g, リン酸緩衝溶液*15mL 及びヘキサン 20mL を加え, 5 分間振とうした。静置分離後, アセトニトリル層を分取し, 40°C 以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮後, 通風で乾固した。残留物は直ちにトルエン/アセトニトリル (25:75v/v) 混液 5mL で溶解した。

*リン酸二水素カリウム 61 g とリン酸水素二カリウム 105 g に水 900mL を加え溶解後, 1mol/L 塩酸又は 1mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH7.0 に調整し, 水を加えて 1L とした。

6.1.4. GC/SAX/PSA ミニカラムクロマトグラフィーによる精製

GC/SAX/PSA ミニカラムにトルエン/アセトニトリル (25:75v/v) 混液 10 mL を注入し流下して前処理した。前項の溶解液を GC/SAX/PSA ミニカラムに流下した後, トルエン/アセトニトリル (25:75v/v) 混液 30 mL を流下し, その全溶出液を取った。

すいか 処理区 B (ピラクロストロビン, ファモキサドン, シフルフェナミド)

6.1.5. 定量

前項の溶出液を 40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮後, 通風で乾固した。残留物は直ちにアセトニトリルを用いて 4 mL に定容し, 測定溶液とした。測定溶液は必要に応じてアセトニトリルで希釈した。

ファモキサドン 4 μ L, ピラクロストロビン及びシフルフェナミド 2 μ L を前記条件の液体クロマトグラフ・質量分析計にそれぞれ注入し, ピーク高さを求め, 検量線よりファモキサドン, ピラクロストロビン及びシフルフェナミドの重量を求め, 試料中の各残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値 (LOQ) 及び検出限界値 (LOD)**6.2.1. ファモキサドン**

	定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	定量限界 (ppm)
<u>果肉</u>	0.04	4	4	4	0.01
<u>果皮</u>	0.04	4	4	4	0.01

	最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)
<u>果肉</u>	0.02	4	4	4	0.005
<u>果皮</u>	0.02	4	4	4	0.005

6.2.2. ピラクロストロビン, シフルフェナミド

	定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	定量限界 (ppm)
<u>果肉</u>	0.02	4	4	2	0.01
<u>果皮</u>	0.02	4	4	2	0.01

	最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)
<u>果肉</u>	0.01	4	4	2	0.005
<u>果皮</u>	0.01	4	4	2	0.005

*ピラクロストロビン, シフルフェナミドはいずれも同じ値

6.3. 回収率

分析法確認のため、日植防高知の果肉及び果皮の無処理試料を用いて、0.01ppm（定量限界相当）、0.25ppm 及び 5ppm 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。

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
ピラクロストロビン								
日植防高知	5	95	94	94	93	93	94	0.9
日植防高知	0.25	101	96	95	93	92	95	3.7
日植防高知	0.01	100	96	95	94	93	96	2.8
ファモキサドン								
日植防高知	5	99	93	92	91	85	92	5.4
日植防高知	0.25	100	94	90	89	87	92	5.6
日植防高知	0.01	94	93	92	86	84	90	5.0
シフルフェナミド								
日植防高知	5	98	97	95	95	95	96	1.5
日植防高知	0.25	99	95	95	87	84	92	6.8
日植防高知	0.01	87	87	87	82	78	84	4.9

6.3.2. 果皮の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
ピラクロストロビン								
日植防高知	5	93	92	91	89	88	91	2.3
日植防高知	0.25	96	93	92	91	90	92	2.5
日植防高知	0.01	107	105	105	103	95	103	4.6
ファモキサドン								
日植防高知	5	101	98	96	92	92	96	4.1
日植防高知	0.25	91	90	86	85	83	87	3.9
日植防高知	0.01	100	94	93	90	90	93	4.4
シフルフェナミド								
日植防高知	5	95	92	91	81	76	87	9.3
日植防高知	0.25	94	91	89	88	84	89	4.2
日植防高知	0.01	90	84	81	81	81	83	4.7

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（クオリティーコントロール試料）を分析した。

クオリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

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

7.1. クオリティーコントロール試料分析結果

7.1.1. 果肉

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>ピラクロストロビン</u>	2012/11/14	日植防茨城	100	<0.01
	2012/11/14	日植防高知	96	<0.01
	2012/11/19	日植防宮崎	95	<0.01
<u>ファモキサドン</u>	2012/11/14	日植防茨城	94	<0.01
	2012/11/14	日植防高知	96	<0.01
	2012/11/19	日植防宮崎	98	<0.01
<u>シフルフェナミド</u>	2012/11/14	日植防茨城	102	<0.01
	2012/11/14	日植防高知	92	<0.01
	2012/11/19	日植防宮崎	100	<0.01

すいか 処理区 B (ピラクロストロビン, ファモキサドン, シフルフェナミド)

7.1.2. 果皮

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
<u>ピラクロストロビン</u>	2012/11/19	日植防茨城	112	<0.01
	2012/11/21	日植防高知	119	<0.01
	2012/11/21	日植防宮崎	110	<0.01
<u>ファモキサドン</u>	2012/11/19	日植防茨城	92	<0.01
	2012/11/21	日植防高知	86	<0.01
	2012/11/21	日植防宮崎	86	<0.01
<u>シフルフェナミド</u>	2012/11/19	日植防茨城	101	<0.01
	2012/11/21	日植防高知	112	<0.01
	2012/11/21	日植防宮崎	112	<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液量 1mL 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 の検量線溶液 1mL で溶解して調製した。マトリック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>ピラクロストロビン</u>	日植防茨城	97
	日植防高知	100
	日植防宮崎	104
<u>ファモキサドン</u>	日植防茨城	104
	日植防高知	101
	日植防宮崎	101
<u>シフルフェナミド</u>	日植防茨城	94
	日植防高知	90
	日植防宮崎	94

8.2. 果皮

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>ピラクロストロビン</u>	日植防茨城	99
	日植防高知	99
	日植防宮崎	99
<u>ファモキサドン</u>	日植防茨城	98
	日植防高知	101
	日植防宮崎	95
<u>シフルフェナミド</u>	日植防茨城	95
	日植防高知	102
	日植防宮崎	87

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料に各化合物を添加し, -20°C 以下で凍結保存した。一定期間保存した後, 同様に分析して回収率を求め, 保存中の安定性を評価した。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. ピラクロストロビン

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城 133	(12/7/4 - 12/11/14)	92	90
0.5	日植防高知 133	(12/7/4 - 12/11/14)	95	91
0.5	日植防宮崎 156	(12/6/16 - 12/11/19)	97	92

9.1.2. ファモキサドン

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城 133	(12/7/4 - 12/11/14)	91	90
0.5	日植防高知 133	(12/7/4 - 12/11/14)	91	88
0.5	日植防宮崎 156	(12/6/16 - 12/11/19)	93	91

9.1.3. シフルフェナミド

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城 133	(12/7/4 - 12/11/14)	93	87
0.5	日植防高知 133	(12/7/4 - 12/11/14)	93	89
0.5	日植防宮崎 156	(12/6/16 - 12/11/19)	94	88

9.2. 果皮の保存安定性試験結果

9.2.1. ピラクロストロビン

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城 138	(12/7/4 - 12/11/19)	110	103
0.5	日植防高知 140	(12/7/4 - 12/11/21)	108	107
0.5	日植防宮崎 158	(12/6/16 - 12/11/21)	108	101

9.2.2. ファモキサドン

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城 138	(12/7/4 - 12/11/19)	107	102
0.5	日植防高知 140	(12/7/4 - 12/11/21)	99	95
0.5	日植防宮崎 158	(12/6/16 - 12/11/21)	90	82

9.2.3. シフルフェナミド

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城 138	(12/7/4 - 12/11/19)	109	104
0.5	日植防高知 140	(12/7/4 - 12/11/21)	105	102
0.5	日植防宮崎 158	(12/6/16 - 12/11/21)	102	101

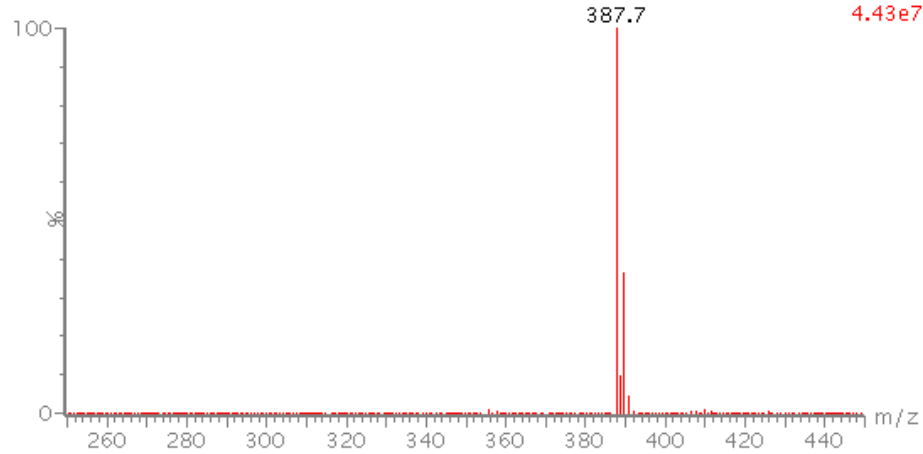
付図-1. マススペクトル

付図-1-1. ピラクロストロビンのマススペクトル

Capillary3.5/cone20

PYRACLOSTROBINE_Q1 1 (0.106)

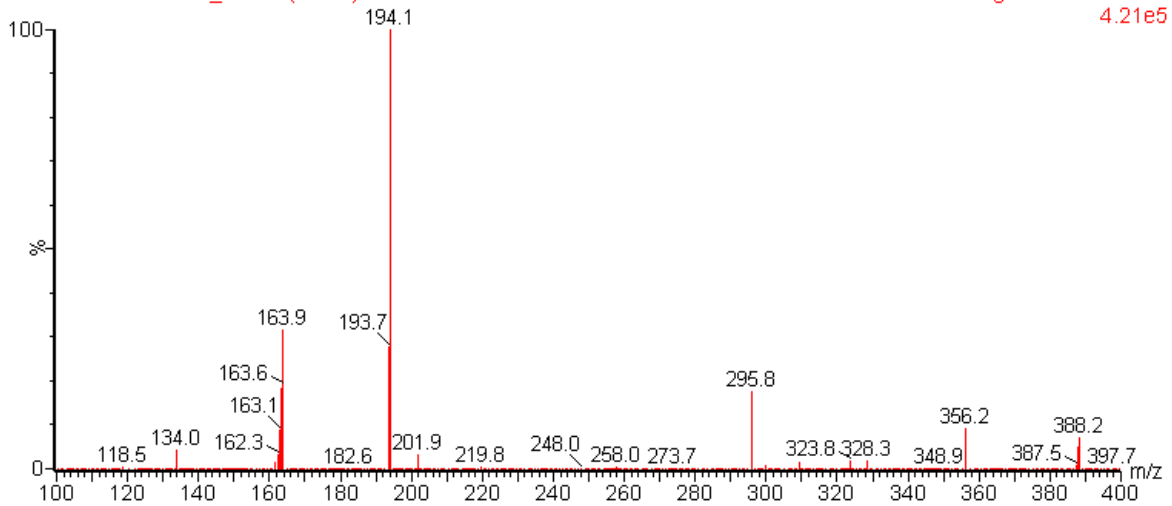
Scan ES+
4.43e7



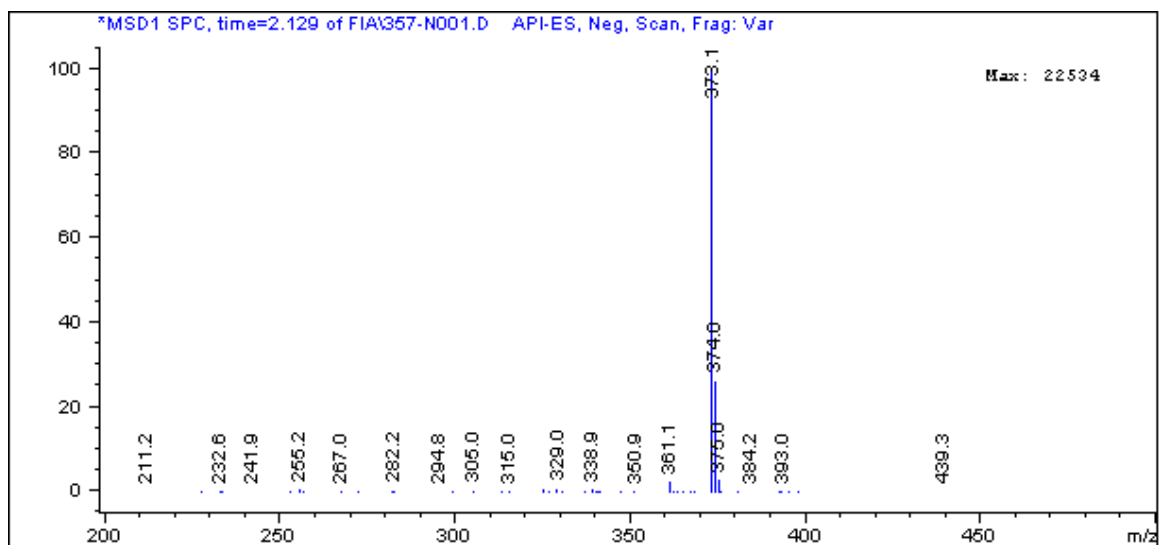
Cone18 Collision 13

PYRACLOSTROBINE_Q3 36 (0.281)

Daughters of 388ES+
4.21e5



付図-1-2. ファモキサドンのマススペクトル

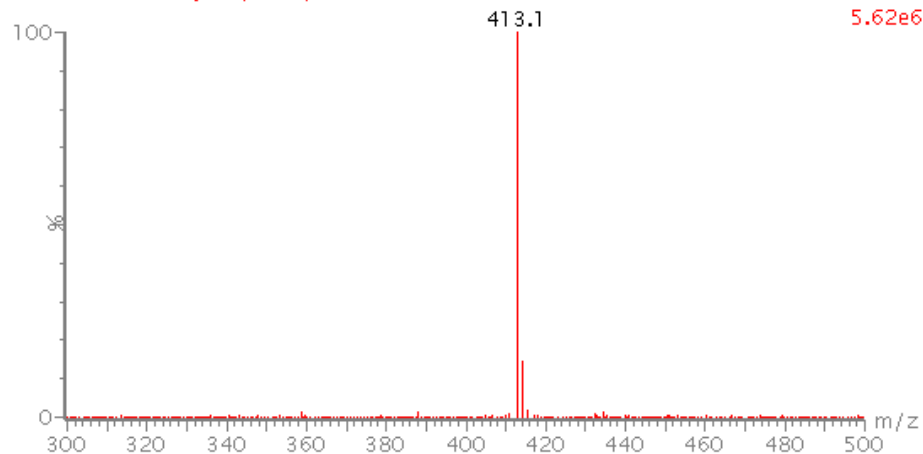


付図-1-3. シフルファナミドのマススペクトル

Capillary3.5/cone25

CYFLUFENAMID_Q1 1 (0.105)

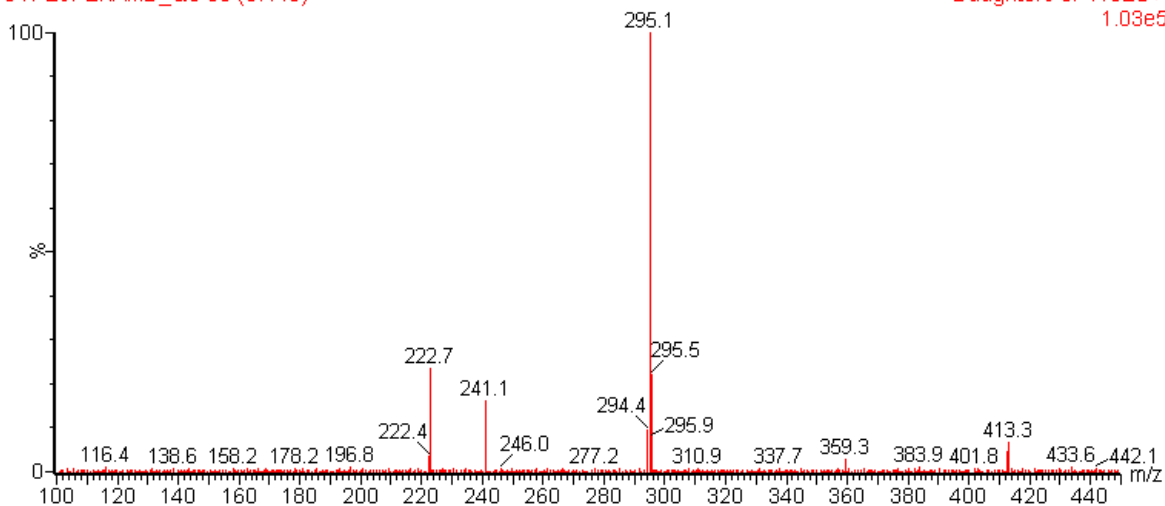
MS2 ES+
5.62e6



Cone25 Collision 16

CYFLUFENAMID_Q3 68 (0.443)

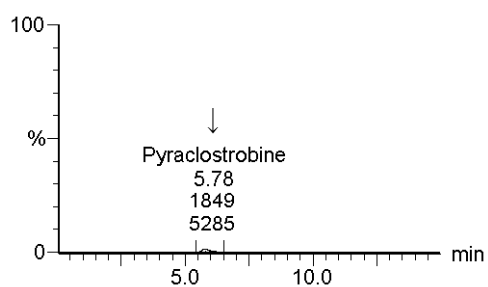
Daughters of 413ES+
1.03e5



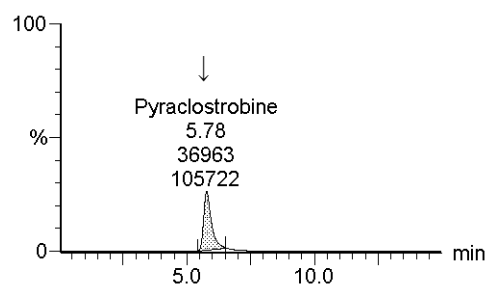
付図-2. 果肉のクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. ピラクロストロビンのクロマトグラム

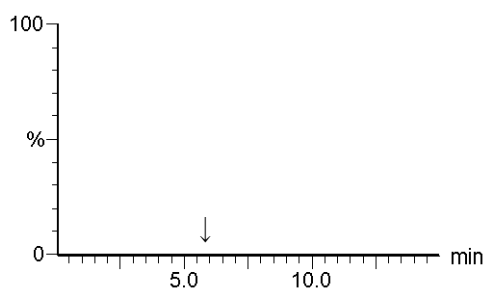
標準品 0.02ng



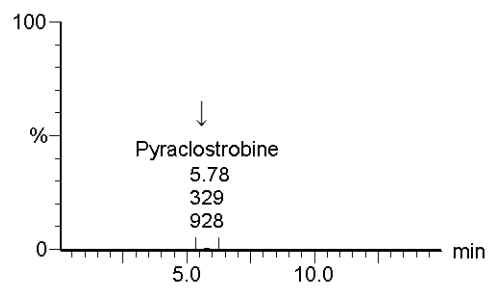
標準品 0.4ng



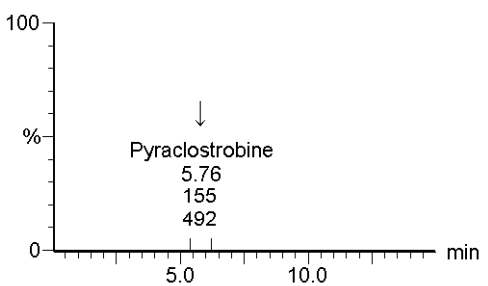
日植防高知 無処理
4mL/2 μ L/4g



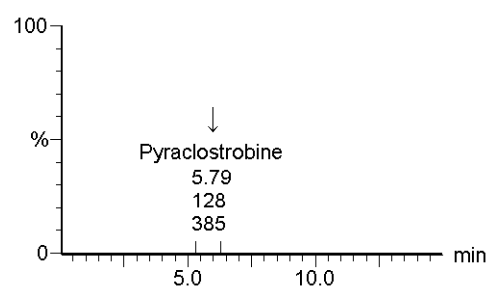
日植防高知 3回処理 1日後
4mL/2 μ L/4g



日植防高知 3回処理 3日後
4mL/2 μ L/4g

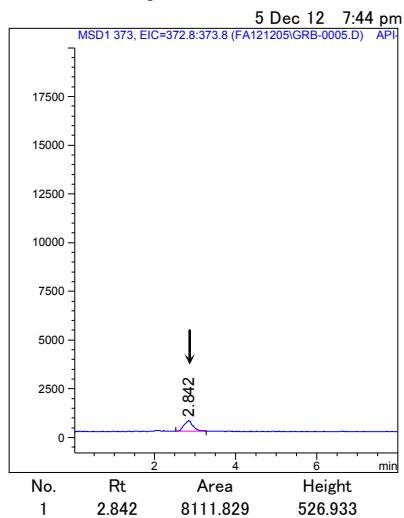


日植防高知 3回処理 7日後
4mL/2 μ L/4g

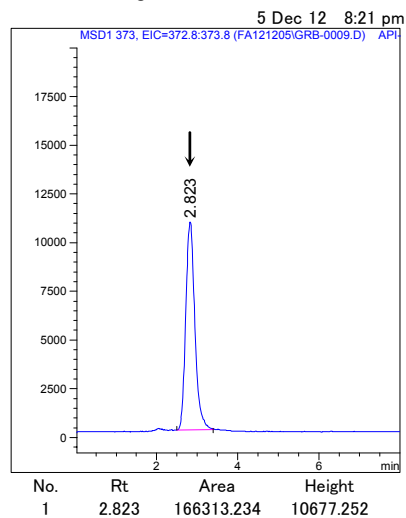


付図-2-2. ファモキサドンのクロマトグラム

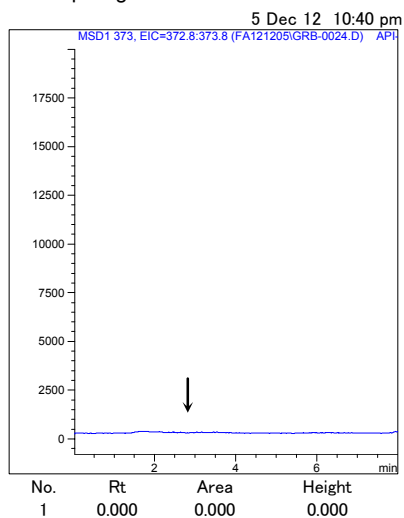
標準品 0.04ng



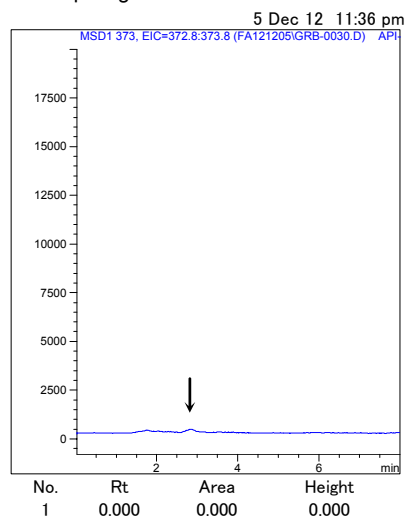
標準品 0.8 ng



日植防高知 無処理
4mL/4μL/4g



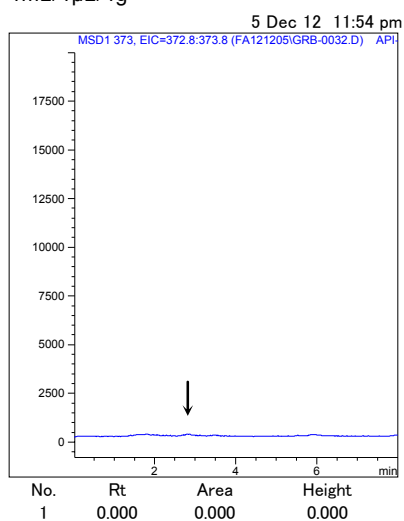
日植防高知 3回処理 1日後
4mL/4μL/4g



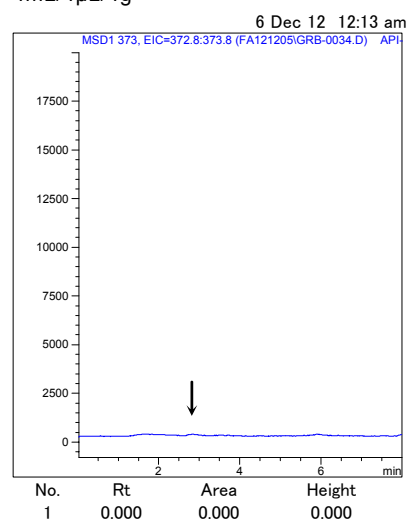
すいか 処理区 B (ピラクロストロビン, ファモキサドン, シフルフェナミド)

付図-2-2. ファモキサドンのクロマトグラム

日植防高知 3 回処理 3 日後
4mL/4 μ L/4g

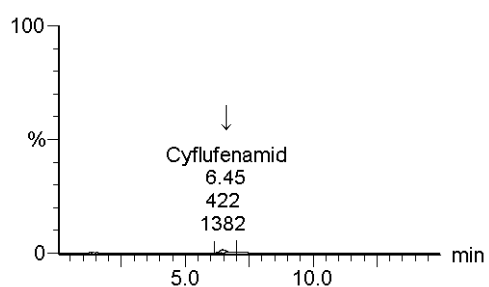


日植防高知 3 回処理 7 日後
4mL/4 μ L/4g

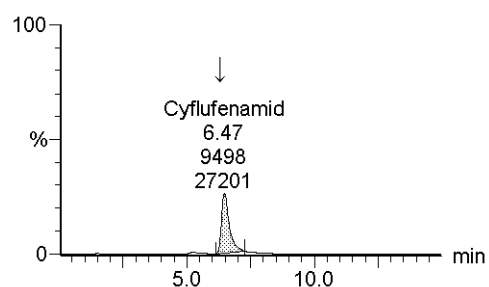


付図-2-3. シフルフェナミドのクロマトグラム

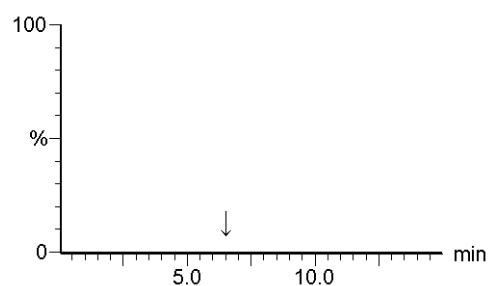
標準品 0.02ng



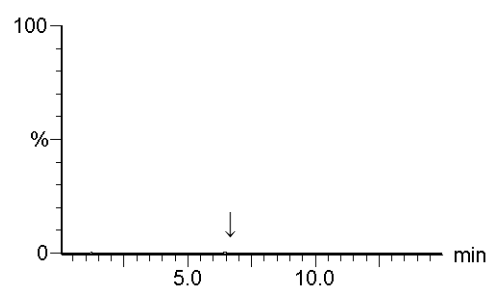
標準品 0.4ng



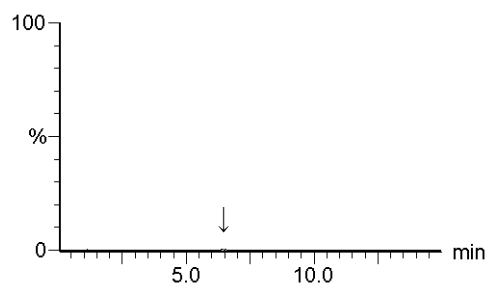
日植防高知 無処理
4mL/2 μ L/4g



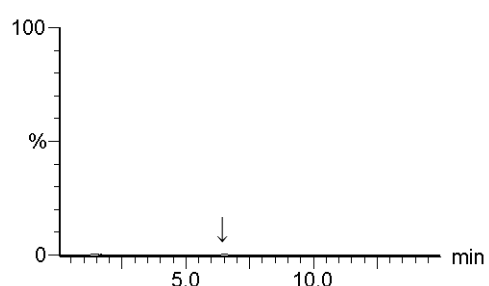
日植防高知 2回処理 1日後
4mL/2 μ L/4g



日植防高知 2回処理 3日後
4mL/2 μ L/4g



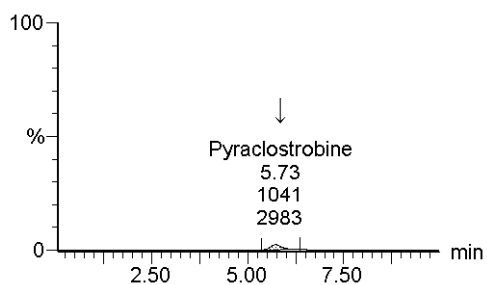
日植防高知 2回処理 7日後
4mL/2 μ L/4g



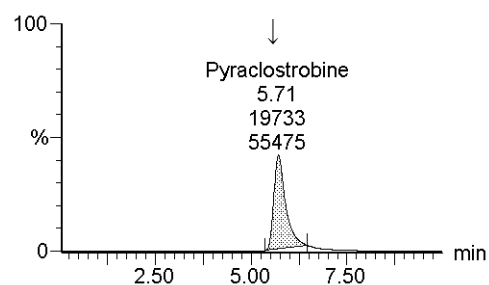
付図-3. 果皮のクロマトグラム (代表例)

付図-3-1. ピラクロストロビンのクロマトグラム

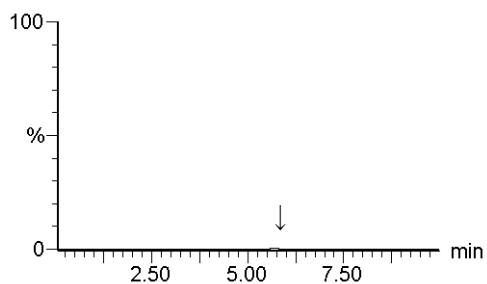
標準品 0.02ng



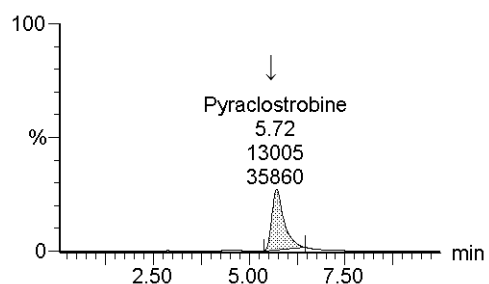
標準品 0.4ng



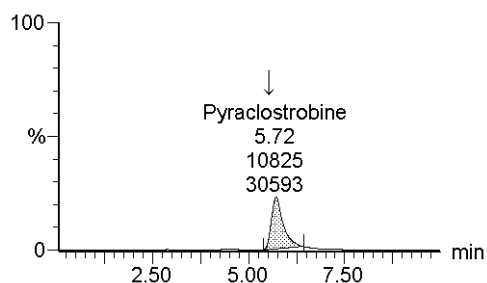
日植防高知 無処理
4mL/2μL/4g



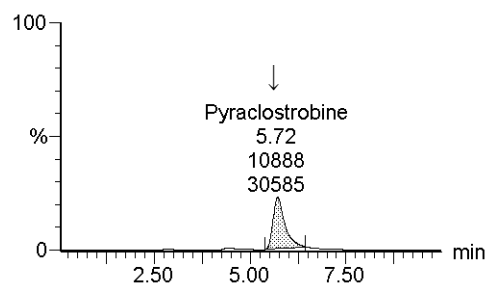
日植防高知 3回処理 1日後
16mL/2μL/4g



日植防高知 3回処理 3日後
16mL/2μL/4g

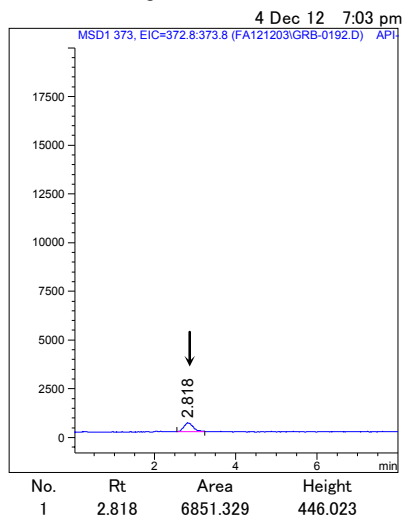


日植防高知 3回処理 7日後
12mL/2μL/4g

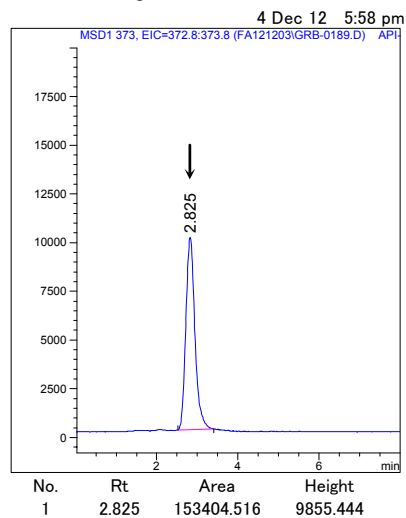


付図-3-2. ファモキサドンのクロマトグラム

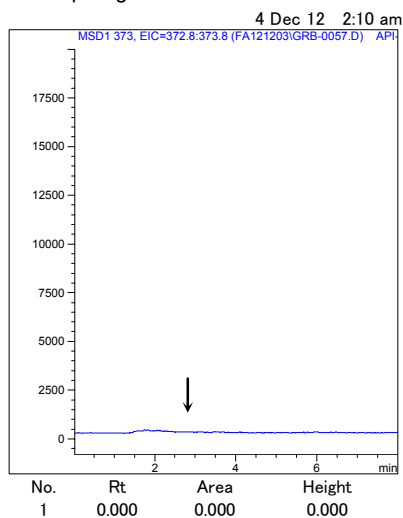
標準品 0.04ng



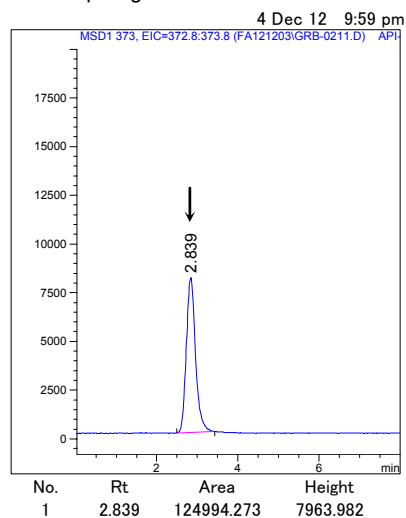
標準品 0.8ng



日植防高知 無処理
4mL/4μL/4g



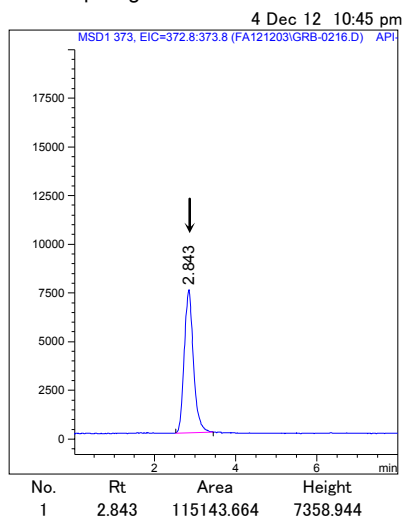
日植防高知 3回処理 1日後
32mL/4μL/4g



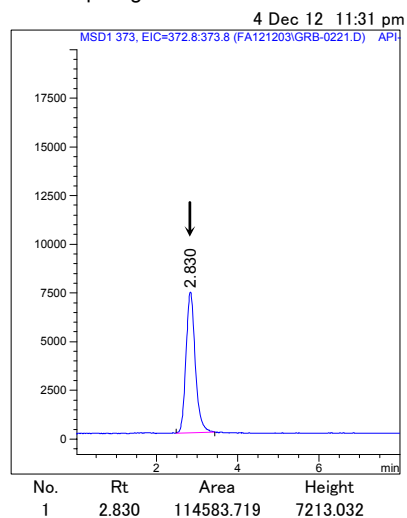
すいか 処理区 B (ピラクロストロビン, ファモキサドン, シフルフェナミド)

付図-3-2. ファモキサドンのクロマトグラム

日植防高知 3 回処理 3 日後
32mL/4 μ L/4g

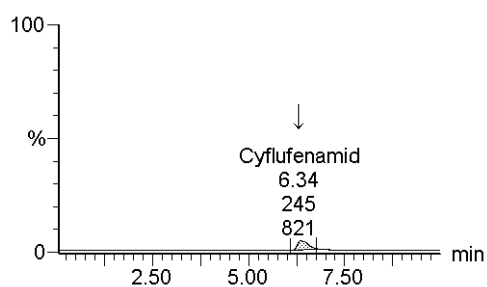


日植防高知 3 回処理 7 日後
32mL/4 μ L/4g

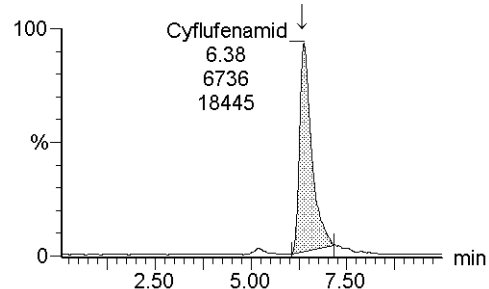


付図-3-3. シフルフェナミドのクロマトグラム

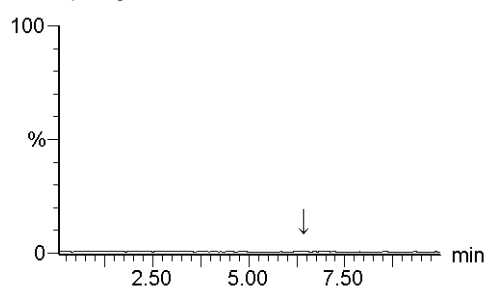
標準品 0.02ng



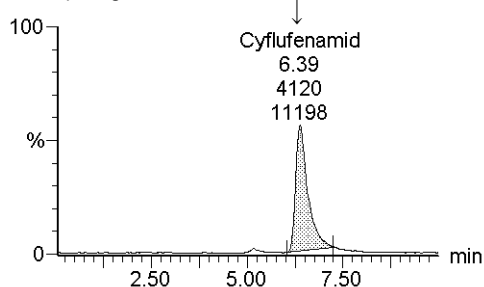
標準品 0.4ng



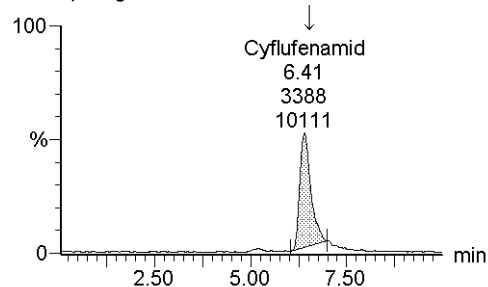
日植防高知 無処理
4mL/2μL/4g



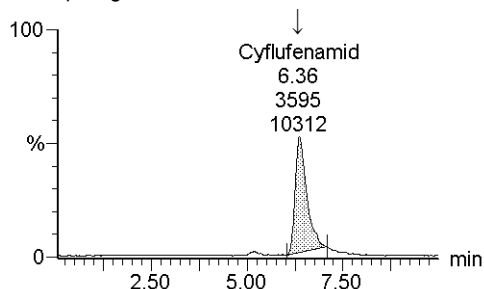
日植防高知 2回処理 1日後
4mL/2μL/4g



日植防高知 2回処理 3日後
4mL/2μL/4g



日植防高知 2回処理 7日後
4mL/2μL/4g



10. 試料重量等

試料	処理 回数	経過 日数	平均重量 (kg/個)	総平均重量 (kg/個)	総重量 (kg)	総重量の平均 (kg)	重量比(%)	
							果肉	果皮
茨城	0	—	1.95	1.95	19.5	12.2	80	20
	B	1	1.99		9.96		80	20
	B	3	1.91		9.56		80	20
	B	7	1.96		9.82		80	20
							平均 80:20	
高知	0	—	1.02	1.07	12.2	7.92	78	22
	B	1	1.09		6.57		80	20
	B	3	1.05		6.29		79	21
	B	7	1.11		6.64		80	20
							平均 79:21	
宮崎	0	—	1.71	1.90	20.5	14.0	81	19
	B	1	1.97		11.8		82	18
	B	3	1.89		11.3		84	16
	B	7	2.03		12.2		82	18
							平均 82:18	
3ほ場の総平均重量					3ほ場の総重量の平均			
1.64 kg/個					11.4 kg			

B: クレソキシムメチル, ピラクロストロビン, ファモキサドンは3回処理
シフルフェナミド, クロルフェナピル2回処理

11. 作物写真の一例



高知 無処理区



高知 処理 1 日後



高知 処理 3 日後



高知 処理 7 日後

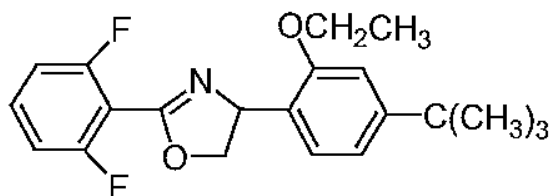
資料 2-3

登録作物のグループ化・残留分析詳細①
エトキサゾール

1. 分析対象物質

エトキサゾール

化学名： (RS)-5-*tert*-butyl-2-[2-(2,6-difluorophenyl)-4,5-dihydro-1,3-oxazol-4-yl]
phenetole
分子量： 359.4
分子式： $C_{21}H_{23}F_2NO_2$
構造式：



性 状： 白色結晶性粉末
融 点： 101-102℃
蒸気圧： 7.0×10^{-3} mPa (25℃)
分配係数： $\log Pow = 5.59$ (25℃)
溶解性： 水 75.4 (μg/L, 20℃)
アセトン 300, メタノール 90, エタノール 90, シクロヘキサノン 500,
テトラヒドロフラン 750, アセトニトリル 80, 酢酸エチル 250, キシレ
ン 250, n-ヘキサン 13, n-ヘプタン 13 (以上 g/L, 20℃)
安定性： 30 日間 (50℃) 分解しない, アルカリ性で安定
出 典： The Pesticide Manual (14th Edition)

2. 標準品及び試薬

エトキサゾール標準品 : 純度 99.8% (和光純薬工業製)
アセトン : 残留農薬試験用 (和光純薬工業製)
ヘキサン : 試薬特級 (和光純薬工業製)
ジエチルエーテル : 残留農薬試験用 (和光純薬工業製)
酢酸ナトリウム : 試薬特級 (和光純薬工業製)
塩化ナトリウム : 試薬特級 (和光純薬工業製)
無水硫酸ナトリウム : 試薬特級 (和光純薬工業製)
シリカゲルミニカラム : InertSep Slim-J SI 1000 mg
(ジーエルサイエンス製)

3. 装置及び機器

化学天秤：	島津製作所製 AUW220
上皿天秤：	メトラー・トレド製 PB8001-S/FACT
上皿天秤：	エー・アンド・ディ製 FX 1200i
ミキサー：	ワーリング製 CB-15T
フードプロセッサー	クイジナート製 DLC-NXJ2PS
ガスクロマトグラフ：	アジレント・テクノロジー製 7890A
データ処理装置：	アジレント・テクノロジー製 Chem Station

4. ガスクロマトグラフの操作条件

検出器：	NPD
カラム：	Rtx-200 (Restec 社製) 内径 0.53 mm, 長さ 15 m, 膜厚 1.5 μ m
温度：	温度 240 $^{\circ}$ C (12 分) 検出器 300 $^{\circ}$ C 注入口 280 $^{\circ}$ C
ガス流速：	水素 3 mL/min, 空気 60 mL/min キャリアガス He 6.0 mL/min
試料注入量：	4 μ L
保持時間：	約 2.7 min

5. 検量線の作成

エトキサゾール標準品 20.0 mg (純度換算相当量) を精秤し, 100mL 容メスフラスコに移した。アセトンを加えて溶解して 200 mg/L の標準原液を調製した。この原液をアセトンで希釈して 0.01, 0.02, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40 mg/L の標準溶液を調製した。この 4 μ L を前記条件のガスクロマトグラフに注入し, データ処理装置を用いてエトキサゾールのピーク高さを測定し, 横軸に重量 (ng), 縦軸にピーク高さをもって検量線を作成した。

6. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料は重量を量り, つるを除去した。各々を縦に 8 分割し, 対角の 2 つを取り合わせた後, 果肉と果皮の境目に沿って包丁を入れ果肉と果皮にわけた。各々の重量を測定した後, 果肉はミキサーで果皮はフードプロセッサーで均一化した。各々の試料は密封容器に入れて -20° C 以下で凍結保存した。また, 量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比 (%) を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した試料 20 g を分液ロートにはかりとり、10 %酢酸ナトリウム溶液 20 mL 及びアセトン/水 (90:10v/v) 混液 80 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/水 (90:10v/v) 混液 50 mL で 2 回洗浄し、同様にろ過した。ろ液を合わせアセトン/水 (90:10v/v) 混液で 250 mL に定容した。

6.1.3. 転溶

前項の定容液から 100 mL (試料 8g 相当量) 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、アセトンを留去した。濃縮液を少量の水で分液ロートに移し、10%塩化ナトリウム溶液 100mL 及びヘキサン 60 mL を加え 5 分間振とうした。静置分離後、ヘキサン層は無水硫酸ナトリウムをのせたろ紙 (No.5A) を通過させ、脱水した。さらにヘキサン 60 mL を加え、前記操作をくり返した後、ヘキサン層を合わせ 40℃以下の水浴中で約 5mL まで減圧濃縮した。

6.1.4. シリカゲルミニカラムクロマトグラフィーによる精製

シリカゲルミニカラムにヘキサン 10mL を注入し流下して前処理した。前項の濃縮液をシリカゲルミニカラムに流下した後、ヘキサン 10 mL 及びジエチルエーテル/ヘキサン (5:95v/v) 混液 10 mL を流下し、これらの流出液を捨てた。次にジエチルエーテル/ヘキサン (20:80v/v) 混液 20 mL を流下し、溶出液を取った。

6.1.5. 定量

前項の溶出液を 40℃以下の水浴中で約 1 mL まで減圧濃縮後、アセトンを用いて 4 mL に定容し、測定溶液とした。測定溶液は必要に応じてアセトンで希釈した。

測定溶液の 4μL を前記条件のガスクロマトグラフに注入し、ピーク高さを求め、検量線よりエトキサゾールの重量を求め、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 (μL)	定量限界 (ppm)
<u>果肉</u>	0.08	8	4	4	0.01
<u>果皮</u>	0.08	8	4	4	0.01
	最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)
<u>果肉</u>	0.04	8	4	4	0.005
<u>果皮</u>	0.04	8	4	4	0.005

6.3. 回収率

分析法確認のため、日植防高知の果肉及び果皮の無処理試料を用いて、0.01ppm（定量限界相当）、0.25ppm 及び 5ppm 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。

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>エトキサゾール</u>								
日植防高知	5	96	95	94	87	85	91	5.5
日植防高知	0.25	85	85	84	83	82	84	1.6
日植防高知	0.01	97	86	82	76	74	83	11.0

6.3.2. 果皮の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
<u>エトキサゾール</u>								
日植防高知	5	87	86	84	84	82	85	2.3
日植防高知	0.25	91	90	88	87	86	88	2.4
日植防高知	0.01	95	90	85	83	82	87	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（クオリティーコントロール試料）を分析した。

クオリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

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

7.1. クオリティーコントロール試料分析結果

7.1.1. 果肉

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
エトキサゾール	2012/12/19	日植防茨城	94	<0.01
	2012/12/19	日植防高知	91	<0.01
	2012/12/20	日植防宮崎	93	<0.01

7.1.2. 果皮

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
エトキサゾール	2012/12/20	日植防茨城	85	<0.01
	2012/12/21	日植防高知	98	<0.01
	2012/12/21	日植防宮崎	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液量 1mL をナス型フラスコに分取し、窒素気流下で溶媒を留去した後、0.2 mg/L の検量線溶液 1mL に溶解して調製した。マトリック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>エトキサゾール</u>	日植防茨城	105
	日植防高知	103
	日植防宮崎	106

8.2. 果皮

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>エトキサゾール</u>	日植防茨城	108
	日植防高知	105
	日植防宮崎	107

9. 保存安定性試験

均一化した無処理試料に化合物を添加し、 -20°C 以下で凍結保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を評価した。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	日植防茨城	168 (12/7/4 - 12/12/19)	105	104
	日植防高知	168 (12/7/4 - 12/12/19)	109	105
	日植防宮崎	187 (12/6/16 - 12/12/20)	96	95

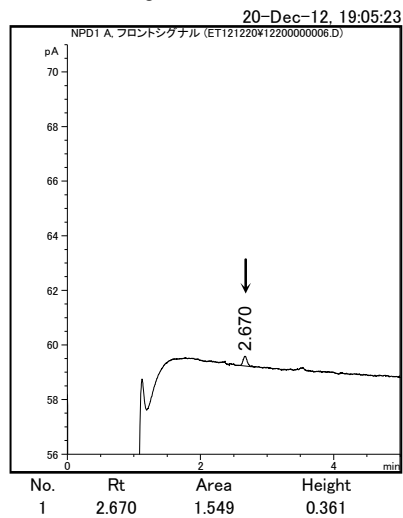
9.2. 果皮の保存安定性試験結果

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	169 (12/7/4 - 12/12/20)	91	90
	日植防高知	170 (12/7/4 - 12/12/21)	106	104
	日植防宮崎	188 (12/6/16 - 12/12/21)	105	104

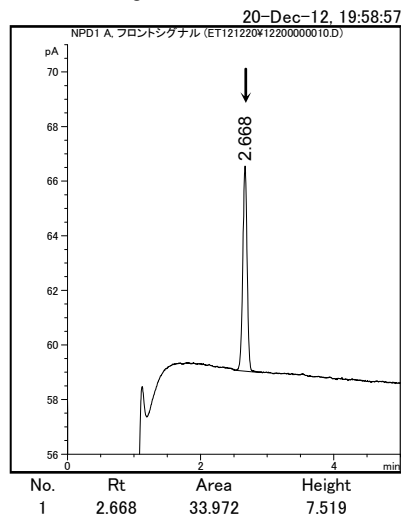
付図-1. 果肉のクロマトグラム (代表例)

付図-1-1. エトキサゾールのクロマトグラム

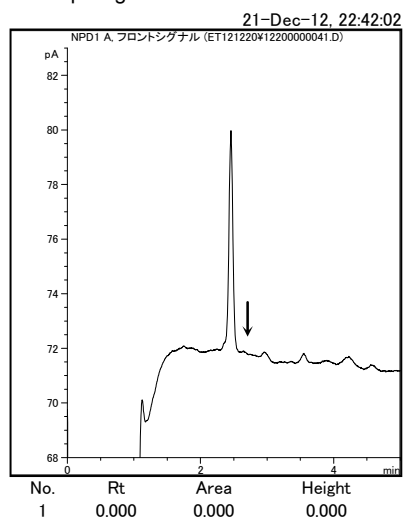
標準品 0.08ng



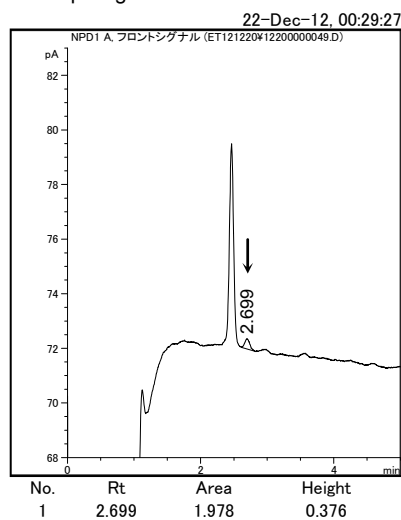
標準品 1.6ng



日植防宮崎 無処理
4mL/4μL/8g

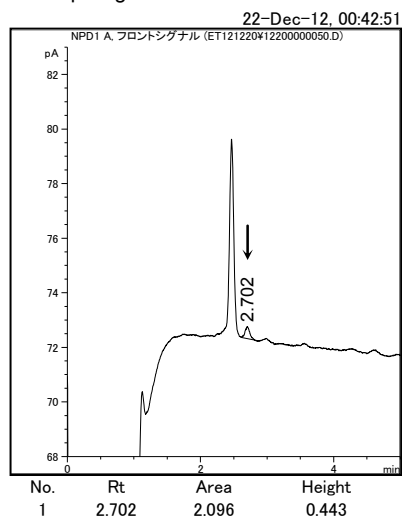


日植防宮崎 2回処理 1日後
4mL/4μL/8g

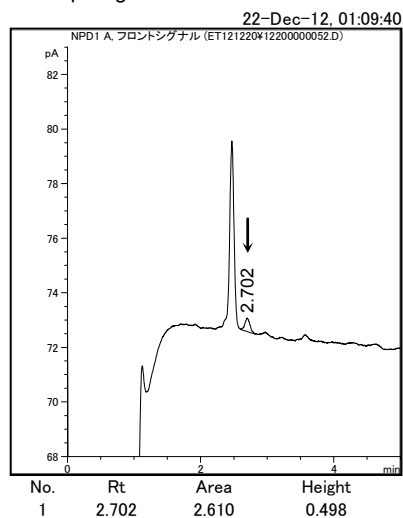


付図-1-1. エトキサゾールのクロマトグラム

日植防宮崎 2 回処理 3 日後
4mL/4 μ L/8g



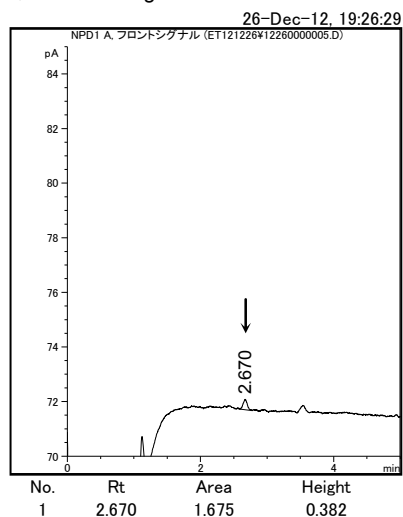
日植防宮崎 2 回処理 7 日後
4mL/4 μ L/8g



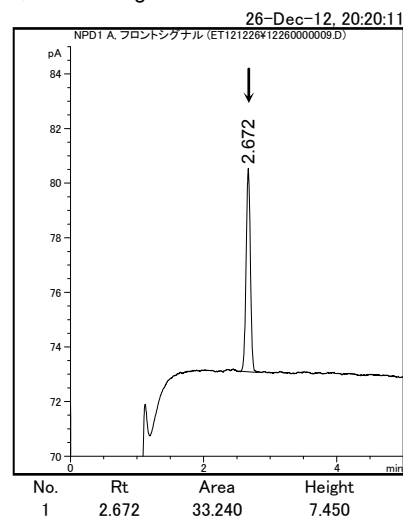
付図-2. 果皮のクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. エトキサゾールのクロマトグラム

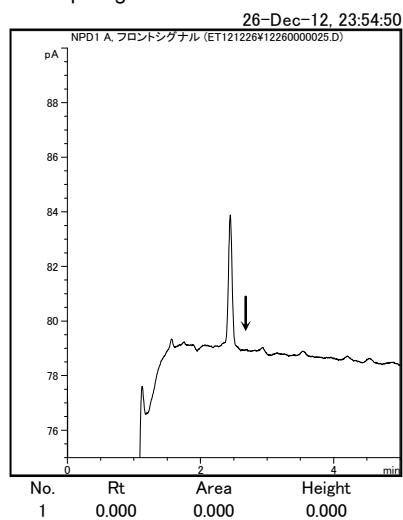
標準品 0.08ng



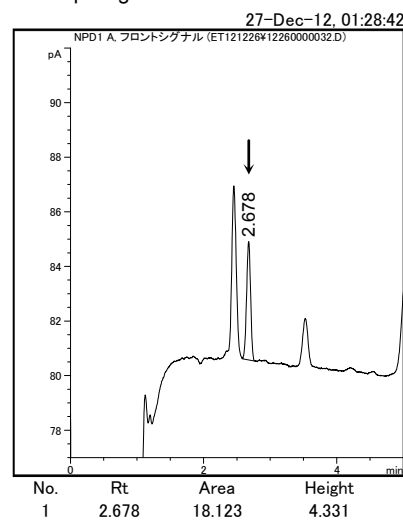
標準品 1.6ng



日植防宮崎 無処理
4mL/4μL/8g

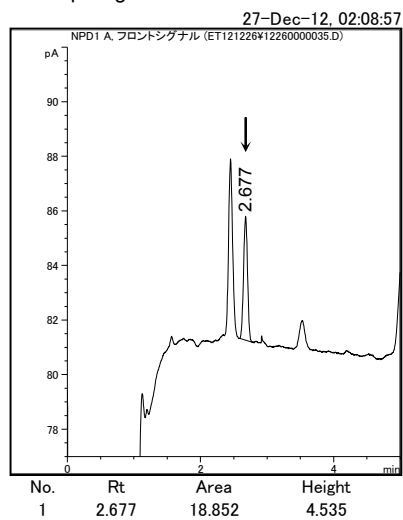


日植防宮崎 2回処理 1日後
4mL/4μL/8g

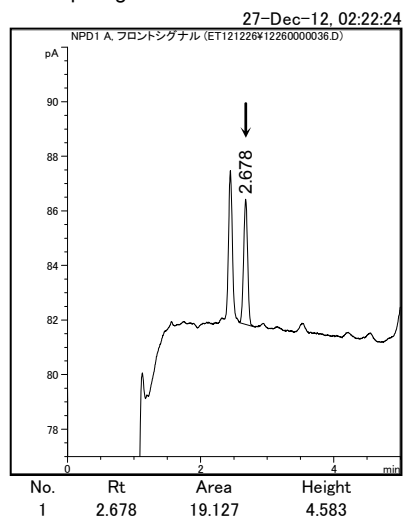


付図-2-1. エトキサゾールのクロマトグラム

日植防宮崎 2 回処理 3 日後
4mL/4 μ L/8g



日植防宮崎 2 回処理 7 日後
4mL/4 μ L/8g



登録作物のグループ化・残留分析詳細②
アクリナトリン, フェンプロパトリン

1. 分析対象物質

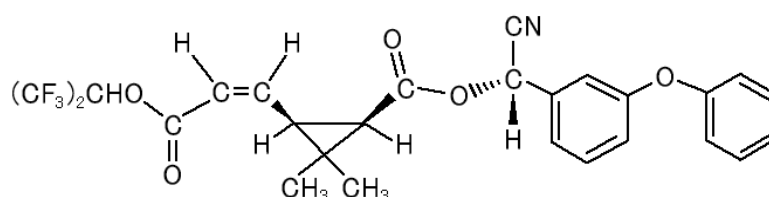
アクリナトリン

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

分子量 : 541.4

分子式 : $C_{26}H_{21}F_6NO_5$

構造式 :



性 状 : 白色粉末

融 点 : 81.5°C

蒸気圧 : 4.4×10^{-5} mPa (20°C)

分配係数 : log Pow = 5.6 (25°C)

溶解性 : 水 ≤ 0.02 (mg/L, 25°C)

アセトン, クロロホルム, ジクロロメタン, 酢酸エチル,
ジメチルホルムアミド >500

ジイソプロピルエーテル 170, エタノール 40, ヘキサン 10,
n-オクタノール 10 (以上 g/L, 25°C)

安定性 : 酸性で安定だが, pH7 以上で加水分解と異性体化する

半減期 1 年以上 (pH5, 50°C), 30 日 (pH7, 30°C), 1.6 日 (pH9, 37°C)

出 典 : The Pesticide Manual (14th Edition)

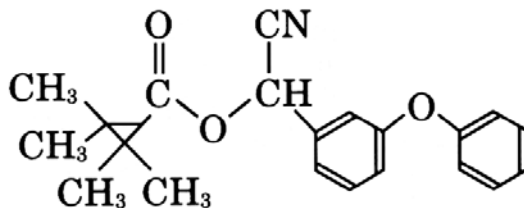
フェンプロパトリン

化学名 : (RS)- α -cyano-3-phenoxybenzyl 2,2,3,3-tetramethylcyclopropanecarboxylate

分子量 : 349.4

分子式 : $C_{22}H_{23}NO_3$

構造式 :



性 状 : 黄褐色固体

融 点 : 45-50 °C

蒸気圧 : 0.730 mPa (20°C)

分配係数 : log Pow = 6 (20°C)

溶解性 : 水 14.1 (μ g/L, 25°C)

キシレン 1000, シクロヘキサノン 1000, メタノール 337 (以上 g/kg, 25°C)

安定性 : アルカリ溶液中で分解

出 典 : The Pesticide Manual (14th Edition)

2. 標準品及び試薬

アクリナトリン標準品 : 純度 98.5% (和光純薬工業製)

フェンプロパトリン標準品 : 純度 99.9% (和光純薬工業製)

アセトン : 残留農薬試験用 (和光純薬工業製)

ヘキサン : 試薬特級 (和光純薬工業製)

ジエチルエーテル : 残留農薬試験用 (和光純薬工業製)

塩化ナトリウム : 試薬特級 (和光純薬工業製)

無水硫酸ナトリウム : 試薬特級 (和光純薬工業製)

シリカゲルミニカラム : InertSep Slim-J SI 1000 mg
(ジーエルサイエンス製)

3. 装置及び機器

化学天秤 : 島津製作所製 AUW220

上皿天秤 : メトラー・トレド製 PB8001-S/FACT

上皿天秤 : エー・アンド・ディ製 FX 1200i

ミキサー : ワーリング製 CB-15T

フードプロセッサー : クイジナート製 DLC-NXJ2PS

ガスクロマトグラフ : アジレント・テクノロジー製 7890A
データ処理装置 : アジレント・テクノロジー製 Chem Station

4. ガスクロマトグラフの操作条件

4.1. ガスクロマトグラフ (アクリナトリン)

検出器 : μ -ECD
カラム : Rtx-200 (Restec 社製)
内径 0.53 mm, 長さ 15 m, 膜厚 1.5 μ m
温度 : 温度 240 °C (24 分)
検出器 320 °C
注入口 260 °C
ガス流速 : キャリアガス He 8.0 mL/min
メイクアップガス N₂ 60 mL/min
試料注入量 : 1 μ L
保持時間 : 約 4.1 min

4.2. ガスクロマトグラフ (フェンプロパトリン)

検出器 : NPD
カラム : Rtx-200 (Restec 社製)
内径 0.53 mm, 長さ 15 m, 膜厚 1.5 μ m
温度 : 温度 240 °C (12 分)
検出器 300 °C
注入口 280 °C
ガス流速 : 水素 3 mL/min, 空気 60 mL/min
キャリアガス He 5.8 mL/min
試料注入量 : 4 μ L
保持時間 : 約 3.0~3.1 min

5. 検量線の作成

アクリナトリン及びフェンプロパトリンの標準品 20.0 mg (各純度換算相当量) を精秤し, それぞれ 100mL 容メスフラスコに移した。アセトンを加えて溶解して 200 mg/L の標準原液を調製した。アクリナトリンは原液をアセトンで希釈して 0.0025, 0.005, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1 mg/L, フェンプロパトリンは原液をアセトンで希釈して 0.01, 0.02, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mg/L の標準溶液を調製した。この標準溶液をアクリナトリンは 1 μ L, フェンプロパトリンは 4 μ L を前記条件のガスクロマトグラフにそれぞれ注入し, データ処理装置を用いてアクリナトリン及びフェンプロパトリンのピーク高さを測定し, 横軸に重量 (ng), 縦軸にピーク高さをとって各検量線を作成した。

6. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料は重量を量り、つるを除去した。各々を縦に 8 分割し、対角の 2 つを取り合わせた後、果肉と果皮の境目に沿って包丁を入れ果肉と果皮にわけた。各々の重量を測定した後、果肉はミキサーで果皮はフードプロセッサーで均一化した。各々の試料は密封容器に入れて -20°C 以下で凍結保存した。また、量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比 (%) を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した試料 20 g を分液ロートにはかりとり、アセトン/水 (80:20v/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、残渣をアセトン/水 (80:20v/v) 混液 50 mL で 2 回洗浄し、同様にろ過した。ろ液を合わせアセトン/水 (80:20v/v) 混液で 250 mL に定容した。

6.1.3. 転溶

前項の定容液から 100mL (試料 8g 相当量) 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、アセトンを留去した。濃縮液を少量の水で分液ロートに移し、10%塩化ナトリウム溶液 100mL 及びヘキサン 80 mL を加え 5 分間振とうした。静置分離後、ヘキサン層は無水硫酸ナトリウムをのせたろ紙 (No.5A) を通過させ、脱水した。さらにヘキサン 80mL を加え、前記操作をくり返した後、ヘキサン層を合わせ 40°C 以下の水浴中で約 5 mL まで減圧濃縮した。

6.1.4. シリカゲルミニカラムクロマトグラフィーによる精製

シリカゲルミニカラムにヘキサン 10mL を注入し流下して前処理した。前項の濃縮液をシリカゲルミニカラムに流下した後、ヘキサン 20 mL を流下し、これらの流出液を捨てた。次にジエチルエーテル/ヘキサン (10:90v/v) 混液 30 mL を流下し、溶出液を取った。

6.1.5. 定量

6.1.5.1. フェンプロパトリンの定量

前項の溶出液を 40°C 以下の水浴中で約 1mL まで減圧濃縮後、アセトンを用いて 4 mL に定容し測定溶液とした。測定溶液は必要に応じてアセトンで希釈した。

測定溶液の 4 μL を前記条件のガスクロマトグラフに注入し、ピーク高さを求め、検量線よりフェンプロパトリンの重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

6.1.5.2. アクリナトリンの定量

前記フェンプロパトリンの定容液から 1 mL 分取し、アセトンを用いて 4 mL に定容し測定溶液とした。

測定溶液の 1 μL を前記条件のガスクロマトグラフに注入し、ピーク高さを求め、検量線よりアクリナトリンの重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値 (LOQ) 及び検出限界値 (LOD)

6.2.1. アクリナトリン

	定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	定量限界 (ppm)
<u>果肉</u>	0.005	8	16	1	0.01
<u>果皮</u>	0.005	8	16	1	0.01
	最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)
<u>果肉</u>	0.0025	8	16	1	0.005
<u>果皮</u>	0.0025	8	16	1	0.005

6.2.2. フェンプロパトリン

	定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	定量限界 (ppm)
<u>果肉</u>	0.08	8	4	4	0.01
<u>果皮</u>	0.08	8	4	4	0.01
	最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)
<u>果肉</u>	0.04	8	4	4	0.005
<u>果皮</u>	0.04	8	4	4	0.005

6.3. 回収率

分析法確認のため、日植防茨城の果肉及び果皮の無処理試料を用いて、0.01ppm（定量限界相当）、0.25ppm 及び 5ppm 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。

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
アクリナトリン								
日植防茨城	5	90	89	89	89	89	89	0.5
日植防茨城	0.25	83	83	82	80	80	82	1.8
日植防茨城	0.01	86	84	84	83	80	83	2.6
フェンプロパトリン								
日植防茨城	5	112	110	110	108	104	109	2.8
日植防茨城	0.25	101	99	99	98	98	99	1.2
日植防茨城	0.01	84	83	80	79	78	81	3.2

6.3.2. 果皮の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
<u>アクリナトリン</u>								
日植防茨城	5	81	81	77	76	72	77	4.9
日植防茨城	0.25	81	79	79	76	75	78	3.1
日植防茨城	0.01	89	86	85	82	80	84	4.2
<u>フェンプロバトリン</u>								
日植防茨城	5	112	111	107	107	102	108	3.7
日植防茨城	0.25	112	108	107	103	103	107	3.5
日植防茨城	0.01	112	111	111	106	96	107	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（クオリティーコントロール試料）を分析した。

クオリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

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

7.1. クオリティーコントロール試料分析結果

7.1.1. 果肉

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
アクリナトリン	2013/1/11	日植防茨城	84	<0.01
	2013/1/11	日植防高知	89	<0.01
	2013/1/11	日植防宮崎	72	<0.01
フェンプロパトリン	2013/1/11	日植防茨城	88	<0.01
	2013/1/11	日植防高知	93	<0.01
	2013/1/11	日植防宮崎	94	<0.01

7.1.2. 果皮

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
アクリナトリン	2013/1/15	日植防茨城	88	<0.01
	2013/1/15	日植防高知	84	<0.01
	2013/1/15	日植防宮崎	88	<0.01
フェンプロパトリン	2013/1/15	日植防茨城	104	<0.01
	2013/1/15	日植防高知	104	<0.01
	2013/1/15	日植防宮崎	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液量 1mL をナス型フラスコに分取し, 窒素気流下で溶媒を留去した後, アクリナトリン 0.05mg/L およびフェンプロパトリン 0.2mg/L の検量線溶液 1mL 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>アクリナトリン</u>	日植防茨城	97
	日植防高知	92
	日植防宮崎	94
<u>フェンプロパトリン</u>	日植防茨城	97
	日植防高知	92
	日植防宮崎	94

8.2. 果皮

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>アクリナトリン</u>	日植防茨城	95
	日植防高知	92
	日植防宮崎	87
<u>フェンプロパトリン</u>	日植防茨城	100
	日植防高知	104
	日植防宮崎	105

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料に各化合物を添加し、 -20°C 以下で凍結保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を評価した。保存安定性試験の結果を表に示す。

9.1. 果肉の保存安定性試験結果

9.1.1. アクリナトリン

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	191 (12/7/4 - 13/1/11)	83	78
	日植防高知	191 (12/7/4 - 13/1/11)	89	86
	日植防宮崎	209 (12/6/16 - 13/1/11)	85	76

9.1.2. フェンプロパトリン

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	191 (12/7/4 - 13/1/11)	106	105
	日植防高知	191 (12/7/4 - 13/1/11)	101	95
	日植防宮崎	209 (12/6/16 - 13/1/11)	90	88

9.2. 果皮の保存安定性試験結果

9.2.1. アクリナトリン

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	195 (12/7/4 - 13/1/15)	86	83
	日植防高知	195 (12/7/4 - 13/1/15)	81	74
	日植防宮崎	213 (12/6/16 - 13/1/15)	97	89

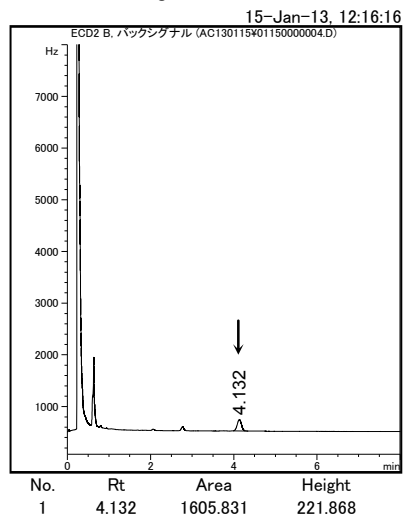
9.2.2. フェンプロパトリン

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	195 (12/7/4 - 13/1/15)	102	95
	日植防高知	195 (12/7/4 - 13/1/15)	98	95
	日植防宮崎	213 (12/6/16 - 13/1/15)	97	94

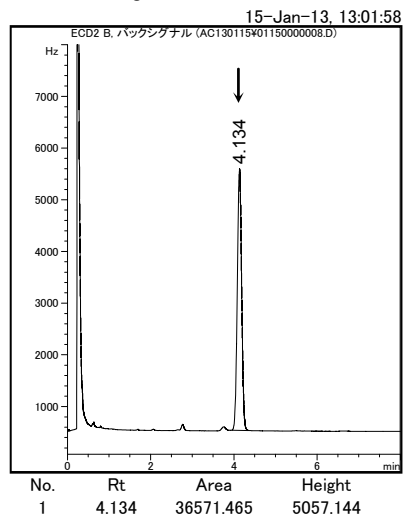
付図-1. 果肉のクロマトグラム (代表例)

付図-1-1. アクリナトリンのクロマトグラム

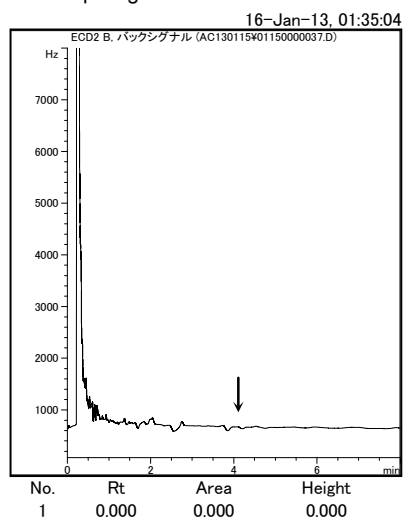
標準品 0.005ng



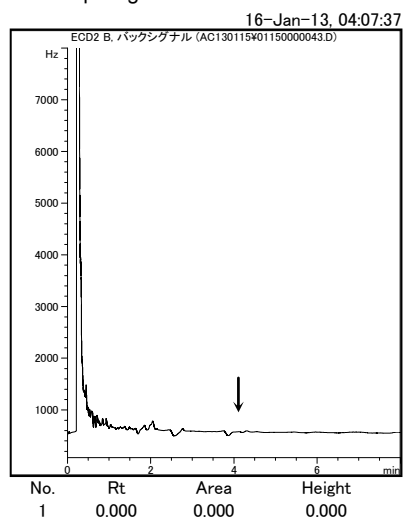
標準品 0.1ng



日植防宮崎 無処理
16mL/1μL/8g

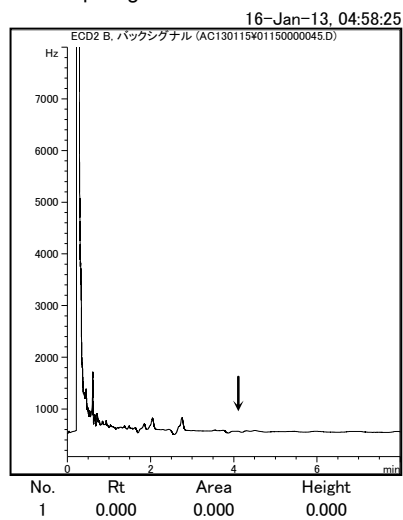


日植防宮崎 5回処理 1日後
16mL/1μL/8g

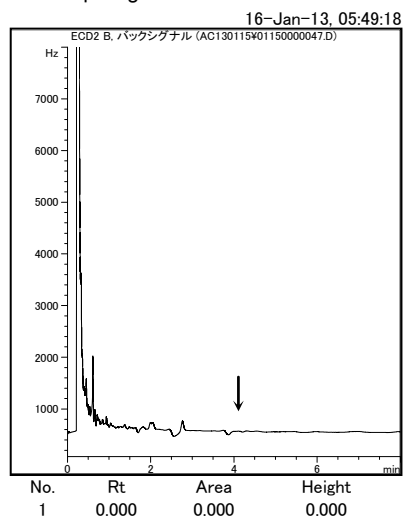


付図-1-1. アクリナトリンのクロマトグラム

日植防宮崎 5 回処理 3 日後
16mL/1 μ L/8g

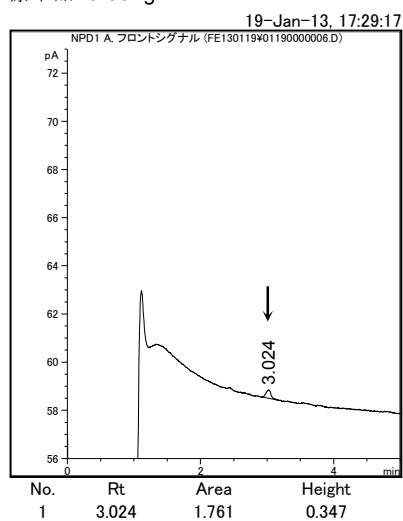


日植防宮崎 5 回処理 7 日後
16mL/1 μ L/8g

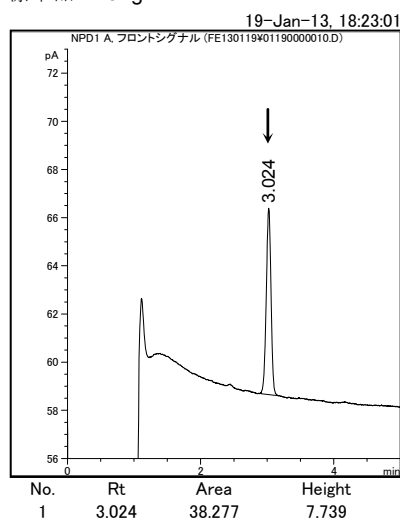


付図-1-2. フェンプロパトリンのクロマトグラム

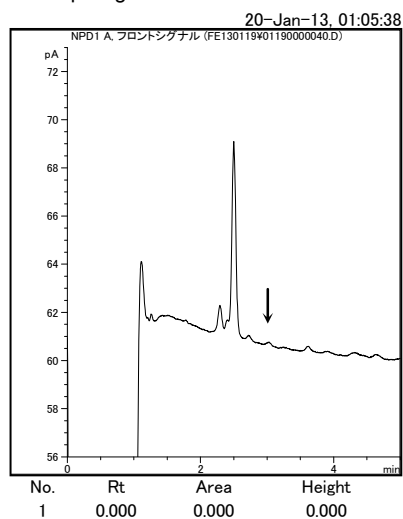
標準品 0.08ng



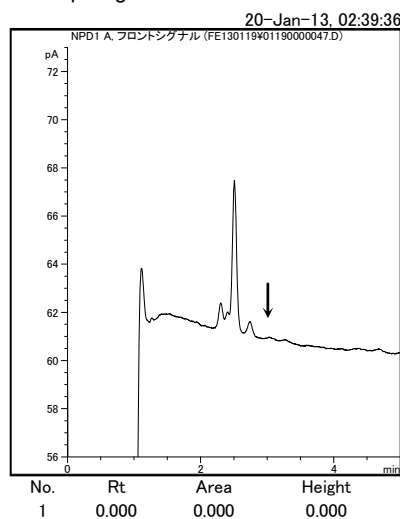
標準品 1.6ng



日植防宮崎 無処理
4mL/4μL/8g

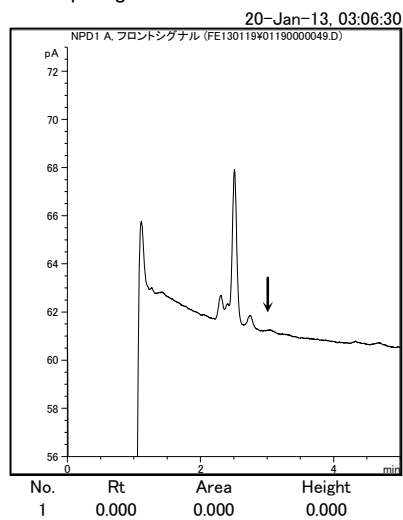


日植防宮崎 4 回処理 1 日後
4mL/4μL/8g

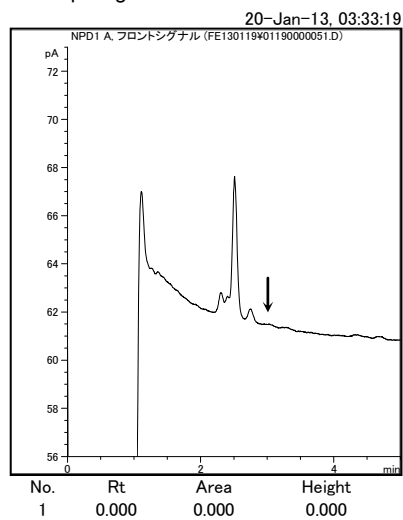


付図-1-2. フェンプロパトリンのクロマトグラム

日植防宮崎 4 回処理 3 日後
4mL/4 μ L/8g



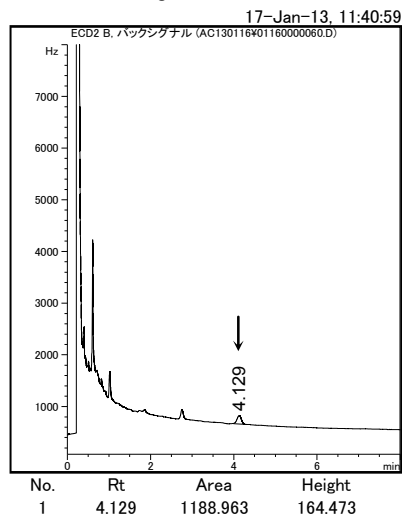
日植防宮崎 4 回処理 7 日後
4mL/4 μ L/8g



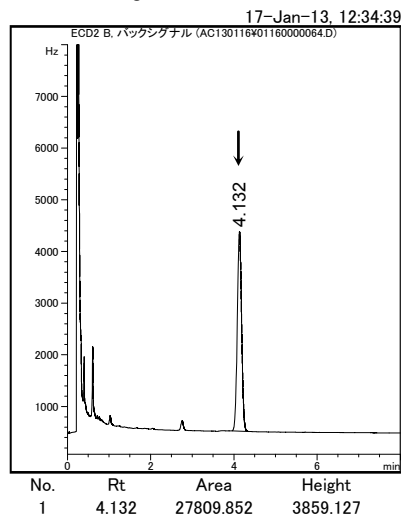
付図-2. 果皮のクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. アクリナトリンのクロマトグラム

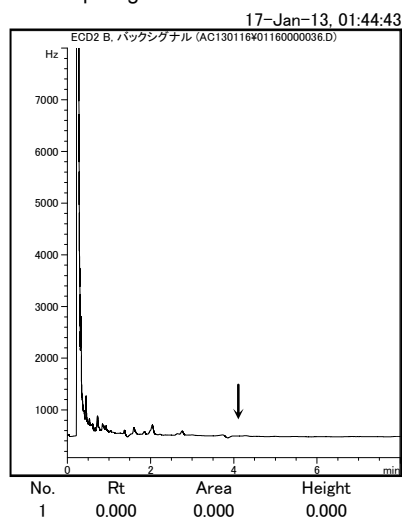
標準品 0.005ng



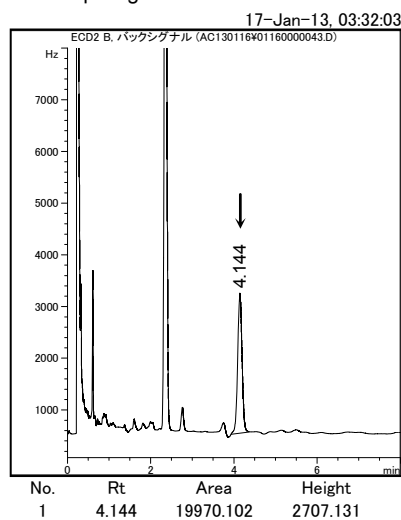
標準品 0.1ng



日植防宮崎 無処理
16mL/1μL/8g

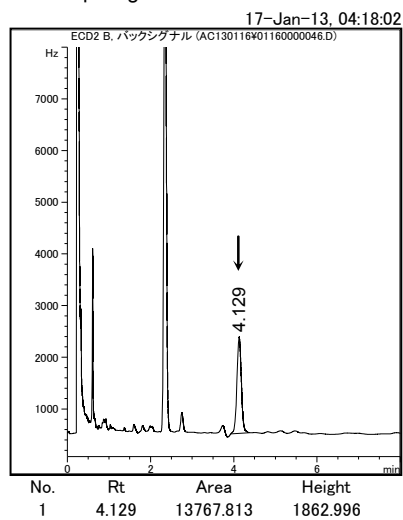


日植防宮崎 5回処理 1日後
16mL/1μL/8g

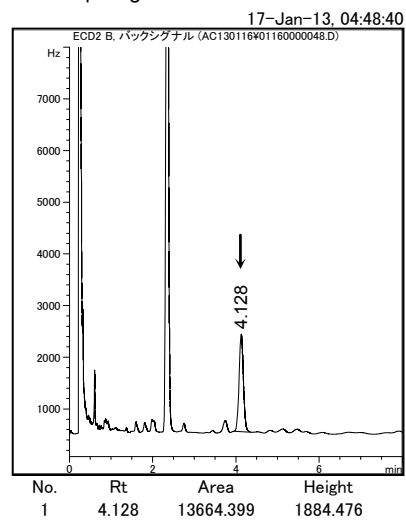


付図-2-1. アクリナトリンのクロマトグラム

日植防宮崎 5 回処理 3 日後
16mL/1 μ L/8g

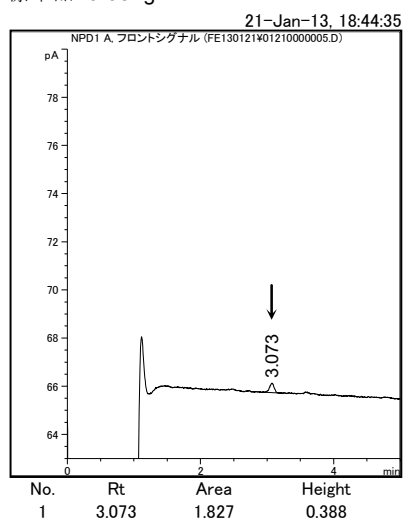


日植防宮崎 5 回処理 7 日後
16mL/1 μ L/8g

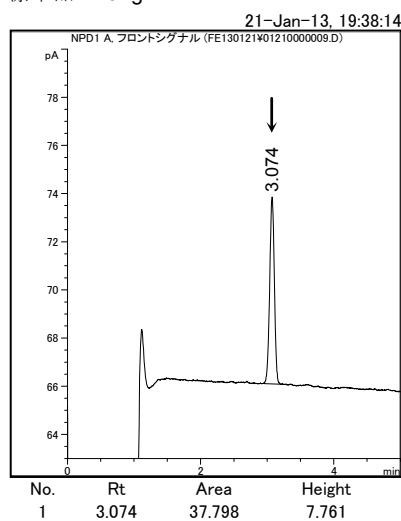


付図-2-2. フェンプロパトリンのクロマトグラム

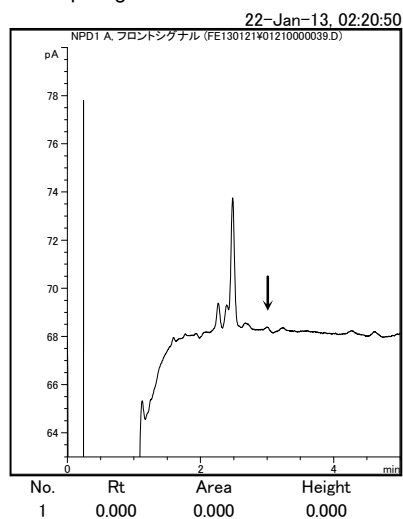
標準品 0.08ng



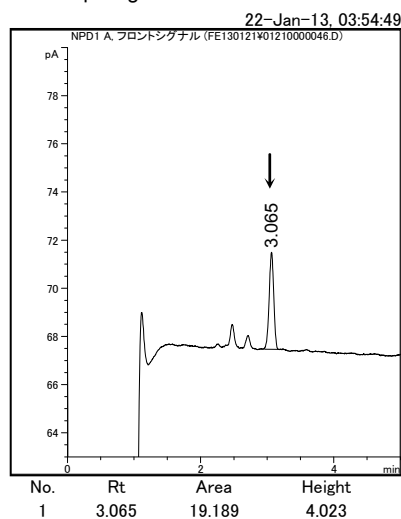
標準品 1.6ng



日植防宮崎 無処理
4mL/4μL/8g

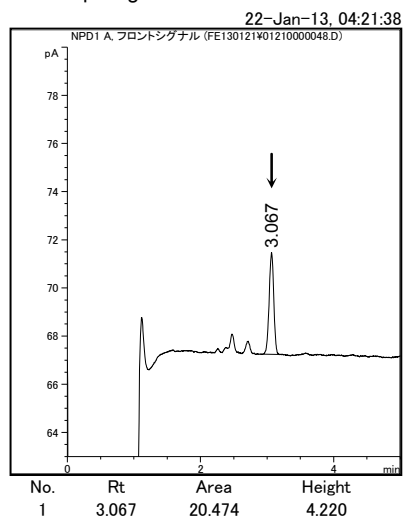


日植防宮崎 4 回処理 1 日後
32mL/4μL/8g

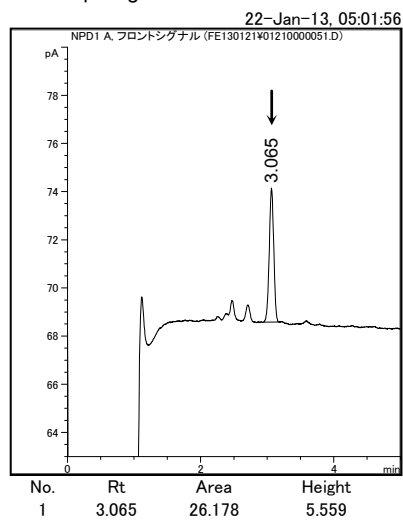


付図-2-2. フェンプロパトリンのクロマトグラム

日植防宮崎 4 回処理 3 日後
24mL/4 μ L/8g



日植防宮崎 4 回処理 7 日後
24mL/4 μ L/8g



登録作物のグループ化・残留分析詳細③
シエノピラフェン

1. 分析対象物質

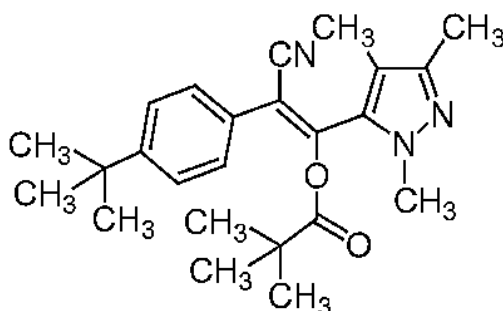
シエノピラフェン

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

分子量： 393.5

分子式： $C_{24}H_{31}N_3O_2$

構造式：



性 状： 淡白色結晶性固体

融 点： 106.7-108.2 °C

蒸気圧： 5.2×10^{-4} mPa (25°C)

分配係数： log Pow = 5.6

溶解性： 水 0.30 (mg/L, 20°C)

安定性： 54°Cで 14 日間安定
加水分解半減期 0.9 日 (pH9, 25°C)

出 典： The Pesticide Manual (15th Edition)

2. 標準品及び試薬

シエノピラフェン標準品 : 純度 99 % (関東化学製)
アセトニトリル : HPLC 用 (関東化学製)
ヘキサン : 試薬特級 (和光純薬工業製)
酢酸エチル : 試薬特級 (和光純薬工業製)
硫酸アンモニウム : 試薬特級 (和光純薬工業製)
リン酸 : 試薬特級 (和光純薬工業製)
多孔性ケイソウ土カラム : InertSep K-solute 10mL
(ジーエルサイエンス製)
シリカゲルミニカラム : InertSep Slim-J SI 1000 mg
(ジーエルサイエンス製)

3. 装置及び機器

化学天秤：	島津製作所製 AUW220
上皿天秤：	メトラー・トレド製 PB8001-S/FACT
上皿天秤：	エー・アンド・ディ製 FX 1200i
ミキサー：	ワーリング製 CB-15T
フードプロセッサー	クイジナート製 DLC-NXJ2PS
高速液体クロマトグラフ：	島津製作所製 LC-10AD
データ処理装置：	EZChrom Elite

4. 高速液体クロマトグラフの操作条件

検出器：	紫外分光光度計
波長：	290nm
カラム：	Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス製) 内径 4.6mm, 長さ 250mm, 粒径 5 μ m
溶離液：	アセトニトリル/水/リン酸 (75:25:0.1v/v)
流量：	1.0mL/min.
カラム温度：	40℃
試料注入量：	40 μ m
保持時間：	約 17.7～17.8min.

5. 検量線の作成

シエノピラフェン標準品 20.0 mg (純度換算相当量) を精秤し, 100mL 容メスフラスコに移した。アセトニトリルを加えて溶解して 200 mg/L の標準原液を調製した。この原液を 0.1mol/L リン酸/アセトニトリル (50:50 v/v) 混液で希釈し, 0.005, 0.01, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 mg/L の標準溶液を調製した。この 40 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シエノピラフェンのピーク高さを測定し, 横軸に重量 (ng), 縦軸にピーク高さをもって検量線を作成した。

6. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料は重量を量り, つるを除去した。各々を縦に 8 分割し, 対角の 2 つを取り合わせた後, 果肉と果皮の境目に沿って包丁を入れ果肉と果皮にわけた。各々の重量を測定した後, 果肉はミキサーで果皮はフードプロセッサーで均一化した。各々の試料は密封容器に入れて -20℃ 以下で凍結保存した。また, 量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比 (%) を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した試料 20 g を分液ロートにはかりとり、0.1 mol/L リン酸/アセトニトリル (10:90v/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 0.1 mol/L リン酸/アセトニトリル (10:90v/v) 混液 50 mL で 2 回洗浄し、同様にろ過した。ろ液を合わせ 0.1mol/L リン酸/アセトニトリル (10:90v/v) 混液で 250 mL に定容した。

6.1.3. 多孔性ケイソウ土カラムによる精製

前項の定容液から 50mL (試料 4g 相当量) 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、アセトニトリルを留去した。濃縮液に少量の水と硫酸アンモニウム 2 g を加え溶解し、多孔性ケイソウ土カラムに流下した後、15 分間放置し、酢酸エチル/ヘキサン (10:90v/v) 混液 120mL を流下し、溶出液を取った。溶出液を 40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。残留物は直ちにヘキサン 5 mL で溶解した。

6.1.4. シリカゲルミニカラムクロマトグラフィーによる精製

シリカゲルミニカラムにヘキサン 10mL を注入し流下して前処理した。前項の溶解液をシリカゲルミニカラムに流下した後、酢酸エチル/ヘキサン (5:95v/v) 混液 20 mL を流下し、これらの流出液を捨てた。次に酢酸エチル/ヘキサン (20:80v/v) 20 mL を流下し、溶出液を取った。

6.1.5. 定量

前項の溶出液を 40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。残留物は直ちに 0.1 mol/L リン酸/アセトニトリル (50:50v/v) 混液を用いて 4 mL に定容し、測定溶液とした。測定溶液は必要に応じて 0.1 mol/L リン酸/アセトニトリル (50:50v/v) 混液で希釈した。

測定溶液の 40μL を前記条件の高速液体クロマトグラフに注入し、ピーク高さを求め、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 (μL)	定量限界 (ppm)
<u>果肉</u>					
	0.4	4	4	40	0.01
<u>果皮</u>					
	0.4	4	4	40	0.01
	最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)
<u>果肉</u>					
	0.2	4	4	40	0.005
<u>果皮</u>					
	0.2	4	4	40	0.005

6.3. 回収率

分析法確認のため、日植防高知の果肉及び果皮の無処理試料を用いて、0.01ppm（定量限界相当）、0.25ppm 及び 5ppm 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。

6.3.1. 果肉の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
<u>シエノピラフェン</u>								
日植防高知	5	86	86	84	82	82	84	2.4
日植防高知	0.25	87	85	83	82	71	82	7.6
日植防高知	0.01	99	73	72	72	71	77	15.7

6.3.2. 果皮の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
<u>シエノピラフェン</u>								
日植防高知	5	95	93	92	91	91	92	1.8
日植防高知	0.25	84	84	76	74	72	78	7.3
日植防高知	0.01	105	99	91	83	82	92	10.9

7. 精度管理

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

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

クオリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

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

7.1. クオリティーコントロール試料分析結果

7.1.1. 果肉

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
シエノピラフェン	2013/1/7	日植防茨城	88	<0.01
	2013/1/7	日植防高知	86	<0.01
	2013/1/7	日植防宮崎	85	<0.01

7.1.2. 果皮

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
シエノピラフェン	2013/1/9	日植防茨城	84	<0.01
	2013/1/9	日植防高知	87	<0.01
	2013/1/9	日植防宮崎	86	<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液量 1mL をナス型フラスコに分取し、窒素気流下で溶媒を留去した後、0.1mg/L の検量線溶液 1mL に溶解して調製した。マトリック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>シエノピラフェン</u>	日植防茨城	98
	日植防高知	92
	日植防宮崎	95

8.2. 果皮

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>シエノピラフェン</u>	日植防茨城	94
	日植防高知	92
	日植防宮崎	93

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料に化合物を添加し、 -20°C 以下で凍結保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を評価した。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	日植防茨城	187 (12/7/4 - 13/1/7)	83	81
	日植防高知	187 (12/7/4 - 13/1/7)	86	86
	日植防宮崎	205 (12/6/16 - 13/1/7)	74	71

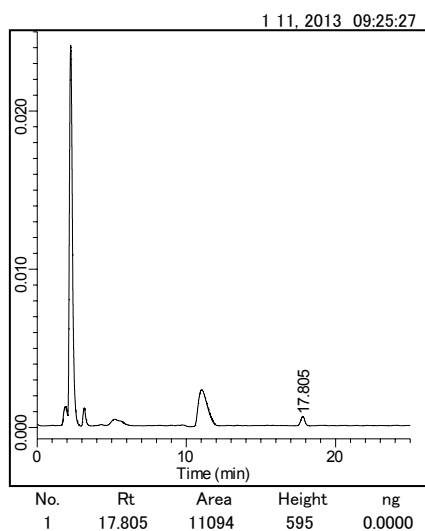
9.2. 果皮の保存安定性試験結果

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城	189 (12/7/4 - 13/1/9)	77	77
	日植防高知	189 (12/7/4 - 13/1/9)	75	74
	日植防宮崎	207 (12/6/16 - 13/1/9)	84	80

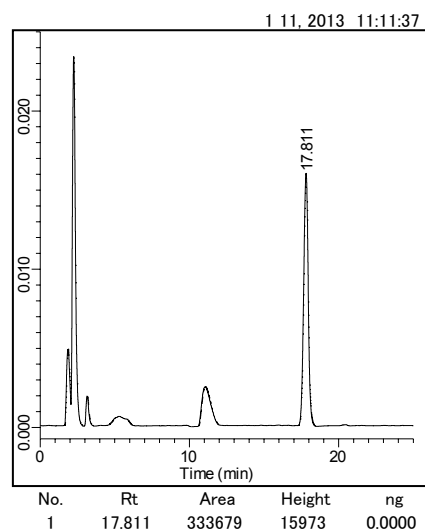
付図-1. 果肉のクロマトグラム (代表例)

付図-1-1. シエノピラフェンのクロマトグラム

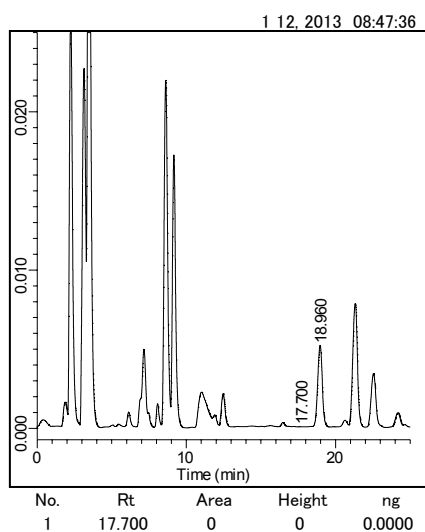
標準品 0.4ng



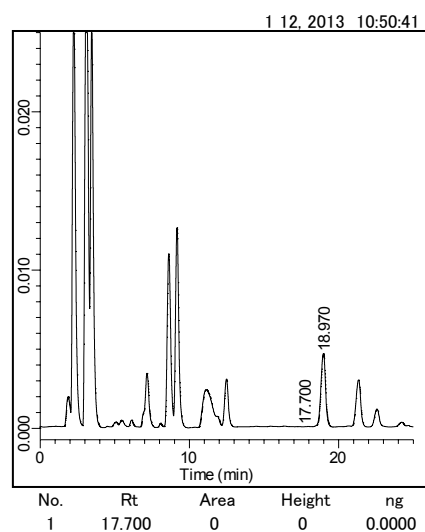
標準品 8.0ng



日植防宮崎 無処理
4mL/40μL/4g

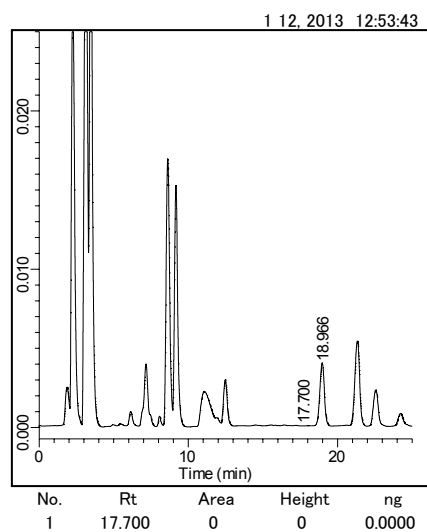


日植防宮崎 1回処理 1日後
4mL/40μL/4g

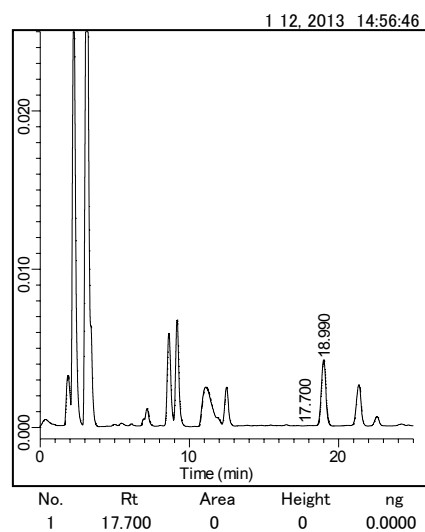


付図-1-1. シエノピラフェンのクロマトグラム

日植防宮崎 1回処理 3日後
4mL/40 μ L/4g



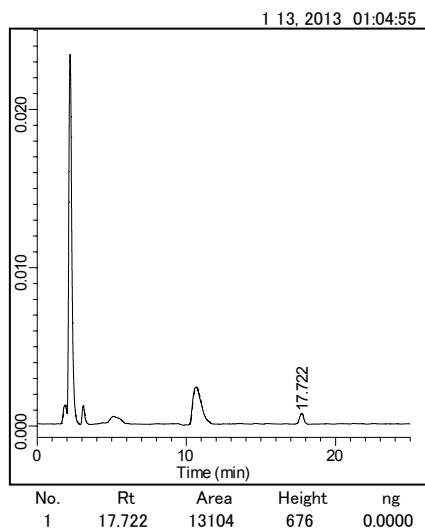
日植防宮崎 1回処理 7日後
4mL/40 μ L/4g



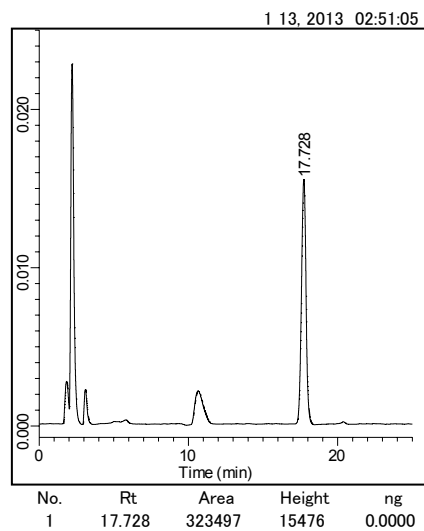
付図-2. 果皮のクロマトグラム (代表例)

付図-2-2. シエノピラフェンのクロマトグラム

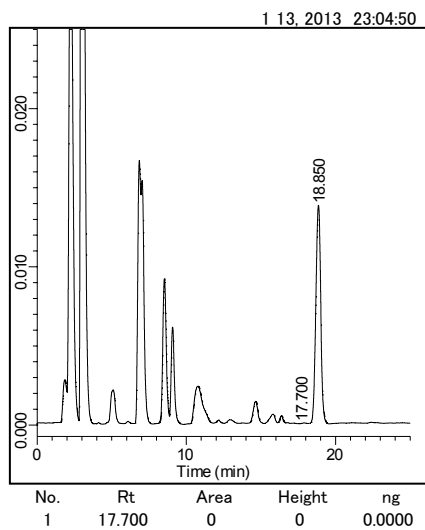
標準品 0.4ng



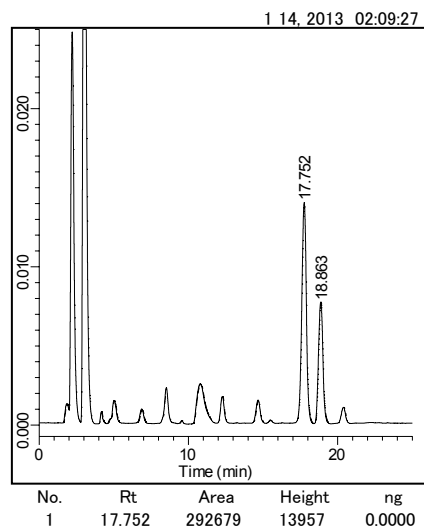
標準品 8.0ng



日植防宮崎 無処理
4mL/40μL/4g

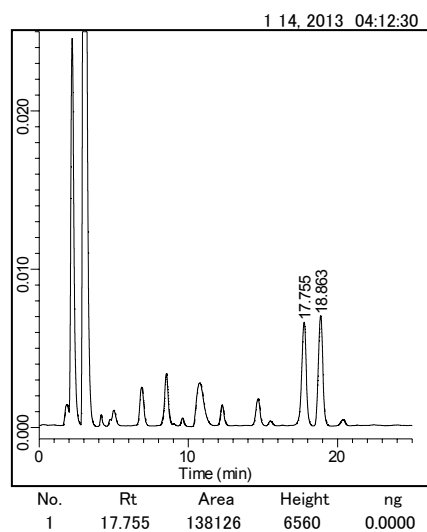


日植防宮崎 1回処理 1日後
4mL/40μL/4g

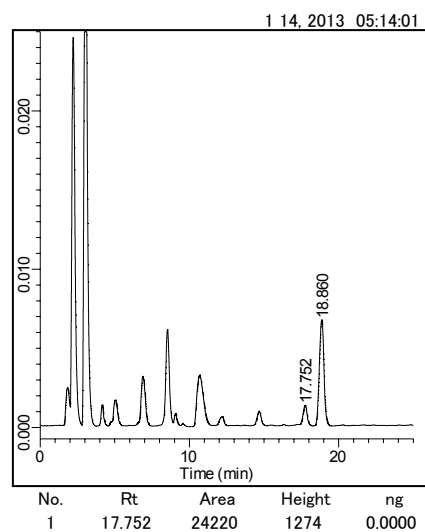


付図-2-2. シエノピラフェンのクロマトグラム

日植防宮崎 1回処理 3日後
4mL/40 μ L/4g



日植防宮崎 1回処理 7日後
4mL/40 μ L/4g



登録作物のグループ化・残留分析詳細④
シフルメトフェン

1. 分析対象物質

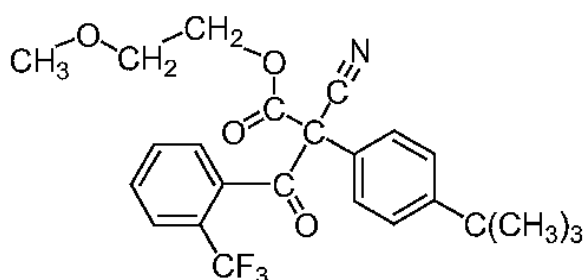
シフルメトフェン

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

分子量 : 447.5

分子式 : $C_{24}H_{24}F_3NO_4$

構造式 :



性 状 : 白色無臭固体

融 点 : 77.9-81.9 °C

蒸気圧 : $< 5.9 \times 10^{-3}$ mPa (25°C)

分配係数 : $\log Pow = 4.3$

溶解性 : 水 0.0281 (mg/L, pH7, 25°C)

n-ヘキサン 5.23, メタノール 99.9,

アセトン, ジクロロメタン, 酢酸エチル, トルエン >500 (以上 g/L, 20°C)

安定性 : 弱酸性媒体中では安定, 塩基性媒体中では不安定

水中半減期 9 日 (pH4, 25°C), 5 時間 (pH7, 25°C), 12 分 (pH9, 25°C)

出 典 : The Pesticide Manual (15th Edition)

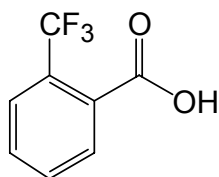
代謝物 B-1

化学名 : α,α,α -trifluoro-o-toluic acid

分子量 : 190.1

分子式 : $C_8H_5F_3O_2$

構造式 :



性 状： 白色固体（粉末）
融 点： 109-113 °C
出 典： 製造元提供資料

2. 標準品及び試薬

シフルメトフェン標準品 : 純度 99.4% (林純薬工業製)
代謝物 B-1 標準品 : 純度 100% (和光純薬工業製)
アセトニトリル : HPLC 用 (関東化学製)
メタノール : HPLC 用 (和光純薬工業製)
ヘキサン : 試薬特級 (和光純薬工業製)
酢酸エチル : 試薬特級 (和光純薬工業製)
トルエン : 残留農薬試験用 (和光純薬工業製)
ジエチレングリコール : 試薬特級 (和光純薬工業製)
塩酸 : 試薬特級 (和光純薬工業製)
ギ酸 : 試薬特級 (和光純薬工業製)
液相分離ろ紙 : Whatman 1PS 110mm (GE ヘルスケア社製)
オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム :
InertSep C18 1g/6mL (ジーエルサイエンス製)
シリカゲルミニカラム : InertSep Slim-J SI 1000 mg (ジーエルサイエンス製)
トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム :
InertSep Slim-J SAX 1000 mg (ジーエルサイエンス製)
ベンゼンスルホンプロピルシリル化シリカゲルミニカラム :
BOND ELUT-JR SCX 100mg (アジレント製)

3. 装置及び機器

化学天秤 : 島津製作所製 AUW220
上皿天秤 : メトラー・トレド製 PB8001-S/FACT
上皿天秤 : エー・アンド・ディ製 FX 1200i
ミキサー : ワーリング製 CB-15T
フードプロセッサー : クイジナート製 DLC-NXJ2PS
液体クロマトグラフ・質量分析計システム (LC-MS) :
アジレント・テクノロジー製 HP-1100
液体クロマトグラフ・質量分析計システム (LC-MS/MS) :
島津製作所製 LC-20AD
アプライドバイオシステムズ製 API3200 QTRAP
データ処理装置 : アジレント・テクノロジー製 Chem Station
アプライドバイオシステムズ製 Analyst

4. 液体クロマトグラフ・質量分析計の操作条件**4.1. 液体クロマトグラフ・質量分析計 (シフルメトフェン)****4.1.1. 高速液体クロマトグラフ**

カラム：	Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス製)、 内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒径 4 μ m
溶離液：	0.1%ギ酸溶液/アセトニトリル (30:70v/v)
流速：	0.2 mL/min
カラム温度：	40℃
試料注入量：	1 μ L
保持時間：	約 7.5~7.6min

4.1.2. 質量分析計

イオン化法：	API-ES Positive モード
乾燥ガス温度：	350℃
乾燥ガス流量：	10L/min.
ネブライザー圧力：	35psi
フラグメンター電圧：	100v
キャピラリー電圧：	4000v
採取イオン：	SIM m/z 465.2

4.2. 液体クロマトグラフ・質量分析計 (代謝物 B-1)**4.2.1. 高速液体クロマトグラフ**

カラム：	Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス製)、 内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒径 4 μ m
溶離液：	0.1%ギ酸溶液/アセトニトリル (60:40v/v)
流速：	0.2 mL/min
カラム温度：	40℃
試料注入量：	1 μ L
保持時間：	約 5.0~5.3min

4.2.2. 質量分析計

イオン化法：	Turbo スプレー 負イオン化モード
採取イオン：	Q1 Mass m/z 189.0、Q3 Mass m/z 145.0
ガス流量：	Curtain Gas 10psi
	Ion Source Gas1 (ネブライザーガス) 50psi
	Ion Source Gas2 (ターボガス) 50psi (600℃)
	Collision Gas 4
電圧：	IonSpray Voltage -4500V
	Declustering Potential -25V
	Entrance Potential -8.5V
	Collision Cell Entrance Potential -10V
	Collision Energy -20V
	Collision Cell Exit Potential -10V

5. 検量線の作成

シフルメトフェン標準品 20.0mg (純度換算相当量) 及び代謝物 B-1 標準品 20.0mg を精秤し、それぞれ 100mL 容メスフラスコに移した。アセトニトリルを加えて溶解して 200 mg/L の標準原液を調製した。この原液をアセトニトリル/水 (40:60v/v) 混液で希釈し、シフルメトフェン及び代謝物 B-1 0.002, 0.004, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 mg/L 標準溶液を各々調製した。この 1 μ L を前記条件の液体クロマトグラフ・質量分析計にそれぞれ注入し、データ処理装置を用いてシフルメトフェン及び代謝物 B-1 のピーク高さを測定し、横軸に重量 (ng)、縦軸にピーク高さをとって各検量線を作成した。

6. 分析法

6.1. 分析操作

6.1.1. 試料の前処理

受領した試料は重量を量り、つるを除去した。各々を縦に 8 分割し、対角の 2 つを取り合わせた後、果肉と果皮の境目に沿って包丁を入れ果肉と果皮にわけ、各々の重量を測定した後、果肉はミキサーで果皮はフードプロセッサーで均一化した。各々の試料は密封容器に入れて -20°C 以下で凍結保存した。また、量った果肉重量と果皮重量を用いて果肉果皮重量比 (%) を算出した。

6.1.2. 抽出

均一化した試料 20 g を分液ロートにはかりとり、アセトニトリル/水 (90:10v/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、残渣をアセトニトリル/水 (90:10v/v) 混液 50 mL で 2 回洗浄し、同様にろ過した。ろ液を合わせアセトニトリル/水 (90:10v/v) 混液で 250 mL に定容した。

6.1.3. C18 ミニカラムによる精製 (シフルメトフェン及び代謝物 B-1 の分画)

前項の定容液から 20mL (試料 1.6 g 相当量) 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、アセトニトリルを留去後、水 20mL を加えた。C18 ミニカラム (アセトニトリル 5mL 及び水 5mL を注入し流下して前処理) に流下した後、アセトニトリル/水 (20:80v/v) 混液 20mL を流下し、これらを代謝物 B-1 の溶出液とした。次にアセトニトリル 20mL を流下し、シフルメトフェンを溶出した。

6.1.4. シフルメトフェン

6.1.4.1. シリカゲルミニカラムによる精製

前項のシフルメトフェンの溶出液を 40°C 以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。残留物は直ちにヘキサン 5 mL で溶解し、シリカゲルミニカラム (ヘキサン 5 mL を注入し流下して前処理) に流下した後、ヘキサン 20 mL を流下し、これらの流出液を捨てた。次に酢酸エチル/ヘキサン (20:80v/v) 混液 30 mL を流下し、溶出液を取った。

6.1.4.2. 定量

前項の溶出液を 40°C 以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。残留物

は直ちにアセトニトリル/水 (40:60v/v) 混液を用いて 4mL に定容し、測定溶液とした。測定溶液は必要に応じてアセトニトリル/水 (40:60v/v) 混液で希釈した。

測定溶液の 1 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、ピーク高さを求め、検量線よりシフルメトフェンの重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

6.1.5. 代謝物 B-1

6.1.5.1. 転溶

6.1.3.項の代謝物 B-1 溶出液に塩酸 4mL を加えてマントルヒーター (印加電圧 60V) で 1 時間加水分解した。放冷後、反応液は少量の水で分液ロートに移し、酢酸エチル/ヘキサン (20:80v/v) 混液 50 mL を加え 5 分間振とうした。静置分離後、溶媒層は液層分離ろ紙を通過させ、脱水した。さらに酢酸エチル/ヘキサン (20:80v/v) 混液 50mL を加え、前記操作をくり返した後、ジエチレングリコール/アセトニトリル (2:98v/v) 混液 0.5 mL を加え、40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮後、窒素気流下で乾固した。残留物は直ちにトルエン/アセトニトリル (25:75v/v) 混液 5mL で溶解した。

6.1.5.2. SCX ミニカラム及び SAX ミニカラムによる精製

前項の溶解液を SCX ミニカラムの下部に SAX ミニカラムを連結したカラム (各々メタノール 5 mL 及びトルエン/アセトニトリル (25:75v/v) 混液 10mL を注入し流下して前処理) に流下した後、トルエン/アセトニトリル (25:75v/v) 混液 20 mL を流下し、これらの溶出液を捨てた。次に SCX ミニカラムを外し、ギ酸/メタノール (1:99v/v) 混液 20 mL を流下し、その溶出液を取った。

6.1.5.3. 定量

前項の溶出液にジエチレングリコール/アセトニトリル (2:98v/v) 混液 0.5 mL を加え、40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮後、窒素気流下で乾固した。残留物は直ちにアセトニトリル/水 (40:60v/v) 混液を用いて 4 mL に定容し、測定溶液とした。測定溶液は必要に応じてアセトニトリル/水 (40:60v/v) 混液で希釈した。

測定溶液の 1 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、ピーク高さを求め、検量線より代謝物 B-1 の重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

6.2. 定量限界値 (LOQ) 及び検出限界値 (LOD)

6.2.1. シフルメトフェン

	定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	定量限界 (ppm)
<u>果肉</u>	0.004	1.6	4	1	0.01
<u>果皮</u>	0.004	1.6	4	1	0.01

	最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)
<u>果肉</u>	0.002	1.6	4	1	0.005
<u>果皮</u>	0.002	1.6	4	1	0.005

6.2.2. 代謝物 B-1

	定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	定量限界 (ppm)
<u>果肉</u>	0.004	1.6	4	1	0.01
<u>果皮</u>	0.004	1.6	4	1	0.01

	最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (ppm)
<u>果肉</u>	0.002	1.6	4	1	0.005
<u>果皮</u>	0.002	1.6	4	1	0.005

6.3. 回収率

分析法確認のため、日植防茨城の果肉及び果皮の無処理試料を用いて、0.01ppm（定量限界相当）、0.25ppm 及び 5ppm 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。

6.3.1. 果肉の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
シフルメトフェン								
日植防茨城	5	91	90	89	85	85	88	3.2
日植防茨城	0.25	98	94	92	89	89	92	4.1
日植防茨城	0.01	105	99	96	95	89	97	6.0
代謝物B-1								
日植防茨城	5	97	96	95	93	91	94	2.6
日植防茨城	0.25	94	93	92	92	91	92	1.2
日植防茨城	0.01	101	96	89	82	80	90	10.0

6.3.2. 果皮の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
シフルメトフェン								
日植防茨城	5	97	96	94	94	91	94	2.4
日植防茨城	0.25	102	101	101	99	98	100	1.6
日植防茨城	0.01	110	108	105	104	98	105	4.4
代謝物B-1								
日植防茨城	5	101	101	100	98	97	99	1.8
日植防茨城	0.25	102	99	95	95	95	97	3.3
日植防茨城	0.01	103	97	92	89	87	94	6.9

7. 精度管理

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

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

クオリティーコントロール試料分析結果を表に示す。

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

7.1. クオリティーコントロール試料分析結果

7.1.1. 果肉

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
シフルメトフェン	2013/1/21	日植防茨城	90	<0.01
	2013/1/23	日植防高知	90	<0.01
	2013/1/24	日植防宮崎	92	<0.01
代謝物B-1	2013/1/21	日植防茨城	86	<0.01
	2013/1/23	日植防高知	86	<0.01
	2013/1/24	日植防宮崎	91	<0.01

7.1.2. 果皮

分析成分	分析日	使用した圃場	平均回収率 (%)	無処理区の 分析値(ppm)
シフルメトフェン	2013/1/25	日植防茨城	98	<0.01
	2013/1/29	日植防高知	102	<0.01
	2013/1/31	日植防宮崎	97	<0.01
代謝物B-1	2013/1/25	日植防茨城	88	<0.01
	2013/1/29	日植防高知	90	<0.01
	2013/1/31	日植防宮崎	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、各圃場の無処理区試料の最終液量 1mL 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、0.04mg/L の検量線溶液 1mL に溶解して調製した。マトリック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>シフルメトフェン</u>	日植防茨城	102
	日植防高知	98
	日植防宮崎	98
<u>代謝物B-1</u>	日植防茨城	103
	日植防高知	104
	日植防宮崎	104

8.2. 果皮

成分名	試料	マトリックス効果 (%)
<u>シフルメトフェン</u>	日植防茨城	107
	日植防高知	102
	日植防宮崎	107
<u>代謝物B-1</u>	日植防茨城	101
	日植防高知	103
	日植防宮崎	99

9. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料に各化合物を添加し、 -20°C 以下で凍結保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を評価した。保存安定性試験の結果を表に示す。

9.1. 果肉の保存安定性試験結果**9.1.1. シフルメトフェン**

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城 201	(12/7/4 - 13/1/21)	106	103
	日植防高知 203	(12/7/4 - 13/1/23)	89	87
	日植防宮崎 222	(12/6/16 - 13/1/24)	105	102

9.1.2. 代謝物 B-1

添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城 201	(12/7/4 - 13/1/21)	103	96
	日植防高知 203	(12/7/4 - 13/1/23)	98	92
	日植防宮崎 222	(12/6/16 - 13/1/24)	94	94

9.2. 果皮の保存安定性試験結果**9.2.1. シフルメトフェン**

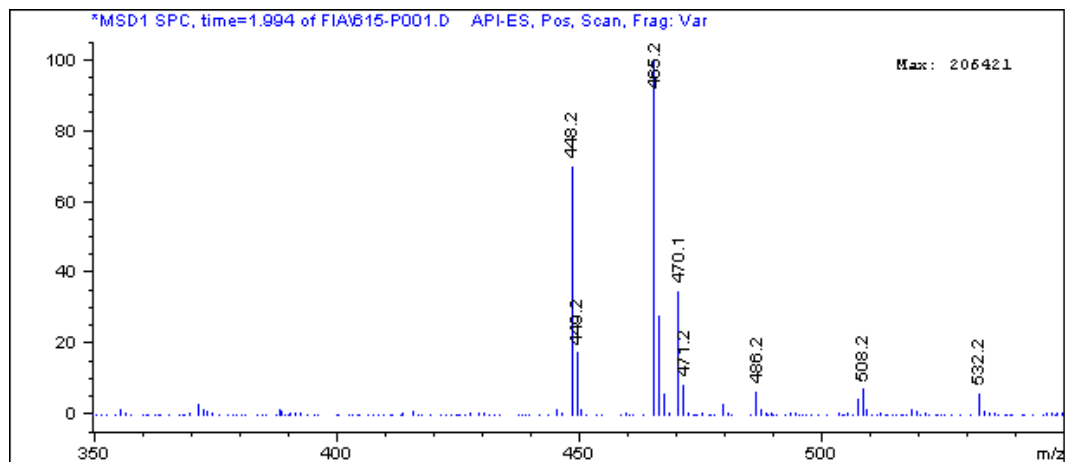
添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城 205	(12/7/4 - 13/1/25)	98	93
	日植防高知 209	(12/7/4 - 13/1/29)	104	102
	日植防宮崎 229	(12/6/16 - 13/1/31)	92	86

9.2.2. 代謝物 B-1

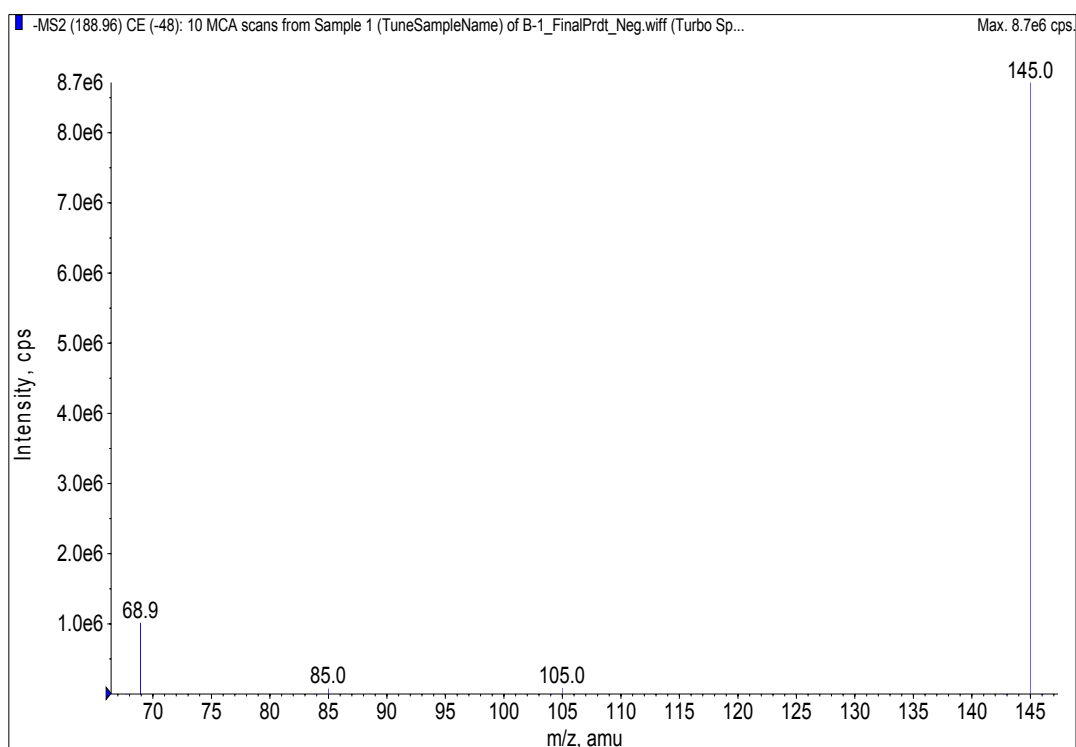
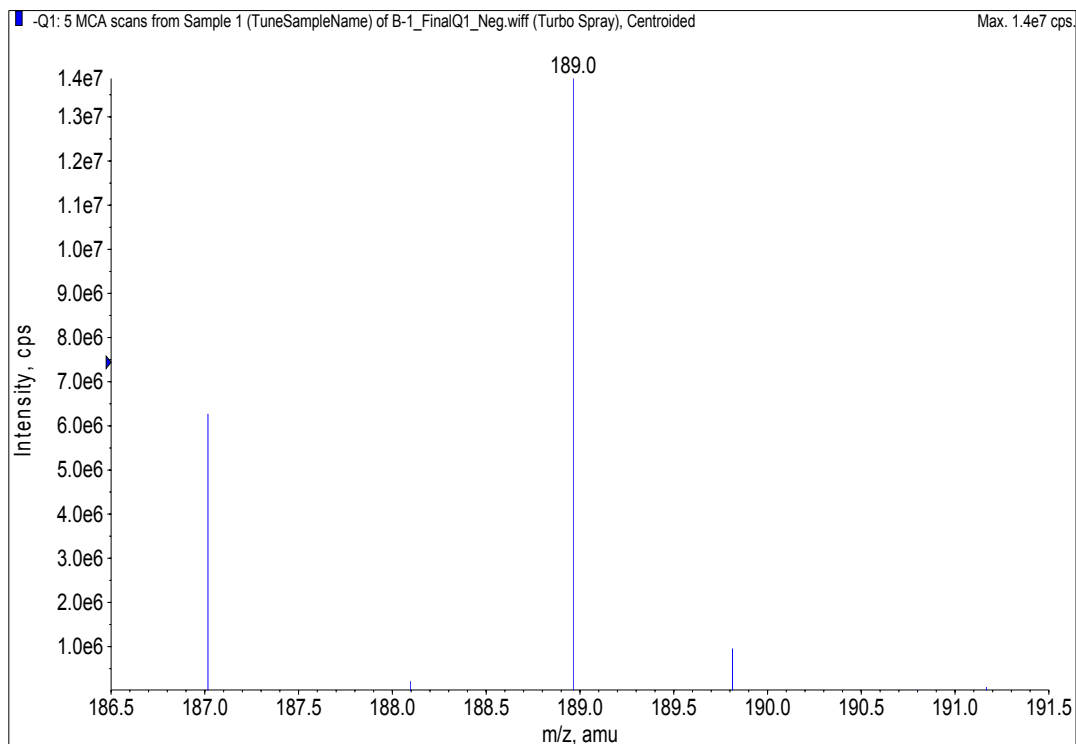
添加濃度 (ppm)	圃場名	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.5	日植防茨城 205	(12/7/4 - 13/1/25)	92	89
	日植防高知 209	(12/7/4 - 13/1/29)	88	87
	日植防宮崎 229	(12/6/16 - 13/1/31)	90	90

付図-1. マススペクトル

付図-1-1. シフルメトフェンのマススペクトル



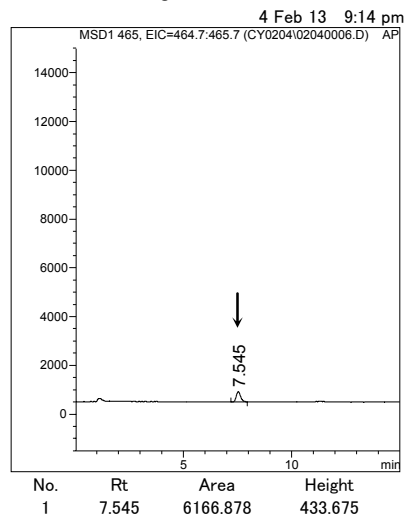
付図-1-2. 代謝物 B-1 のマススペクトル



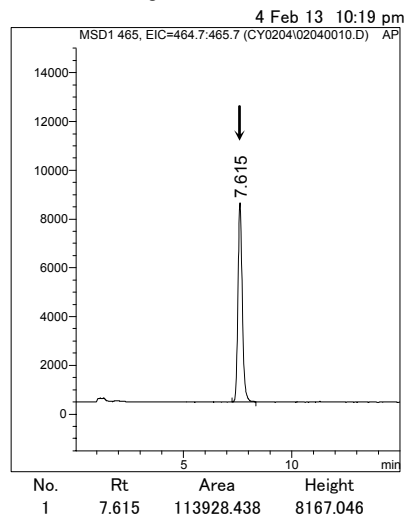
付図-2. 果肉のクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. シフルメトフェンのクロマトグラム

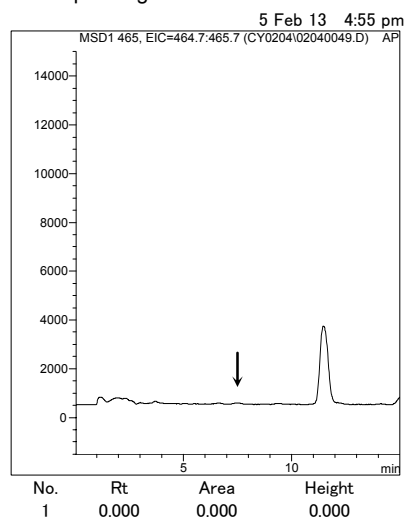
標準品 0.004ng



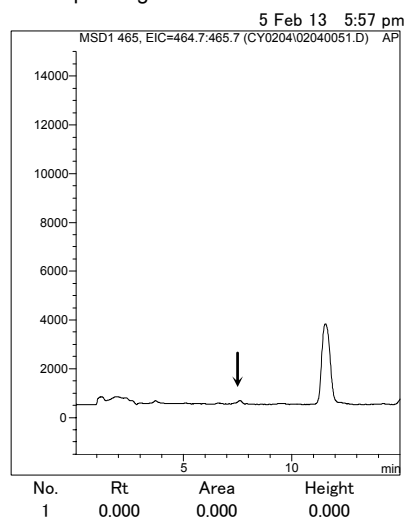
標準品 0.08ng



日植防宮崎 無処理
4mL/1μL/1.6g

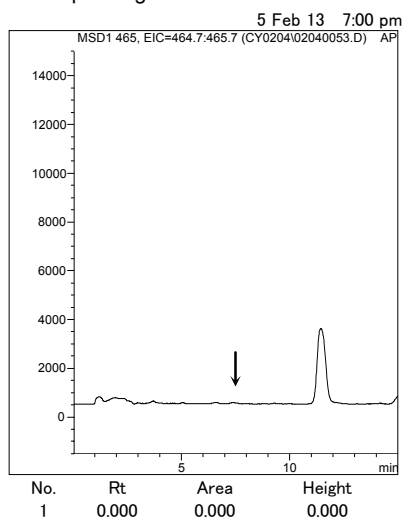


日植防宮崎 2回処理 1日後
4mL/1μL/1.6g

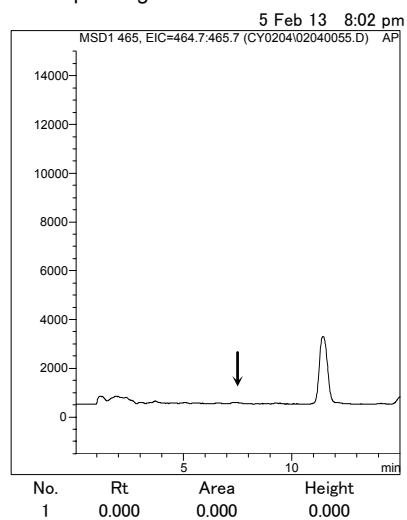


付図-2-1. シフルメトフェンのクロマトグラム

日植防宮崎 2 回処理 3 日後
4mL/1 μ L/1.6g

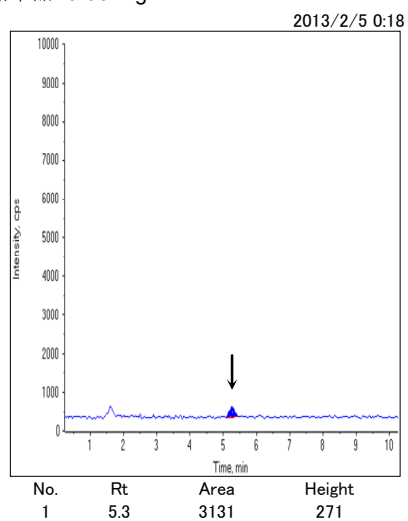


日植防宮崎 2 回処理 7 日後
4mL/1 μ L/1.6g

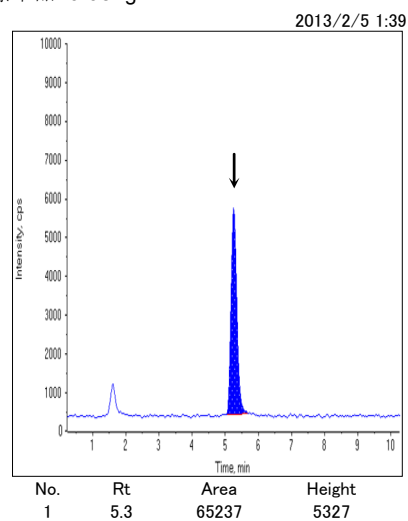


付図-2-2. 代謝物 B-1 のクロマトグラム

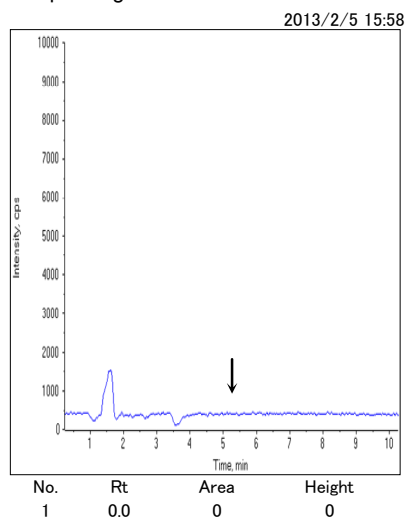
標準品 0.004ng



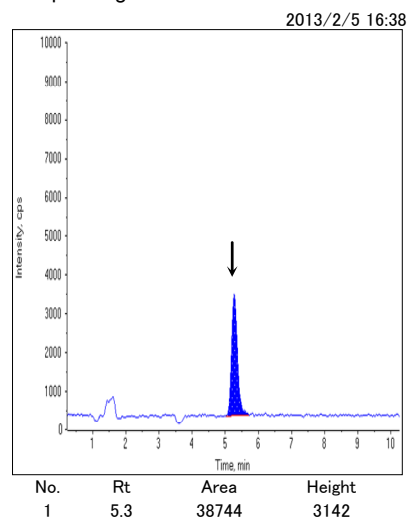
標準品 0.08ng



日植防宮崎 無処理
4mL/1 μ L/1.6g

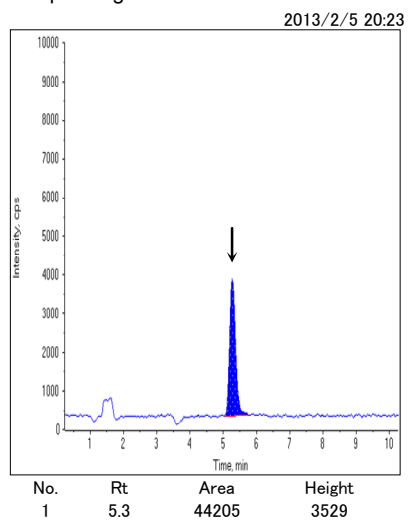


日植防宮崎 2 回処理 1 日後
4mL/1 μ L/1.6g

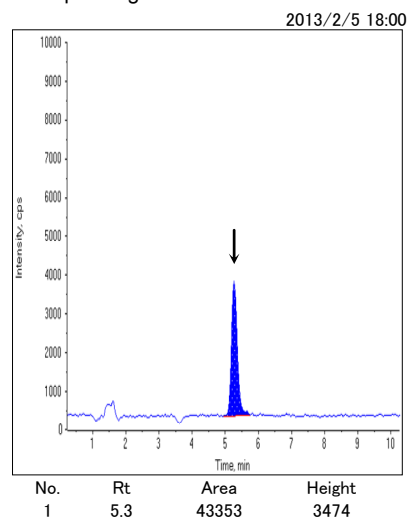


付図-2-2. 代謝物 B-1 のクロマトグラム

日植防宮崎 2 回処理 3 日後
8mL/1 μ L/1.6g



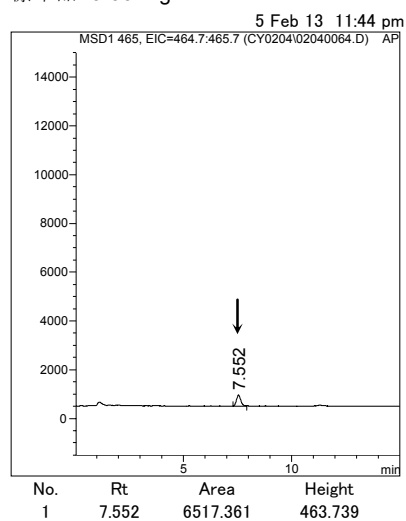
日植防宮崎 2 回処理 7 日後
12mL/1 μ L/1.6g



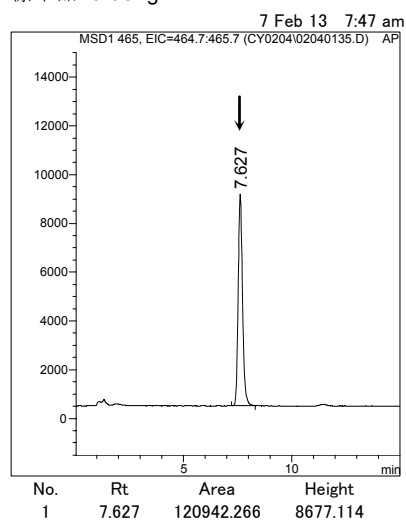
付図-3. 果皮のクロマトグラム (代表例)

付図-3-1. シフルメトフェンのクロマトグラム

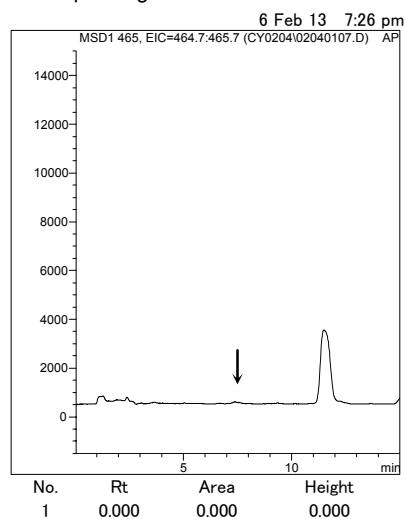
標準品 0.004ng



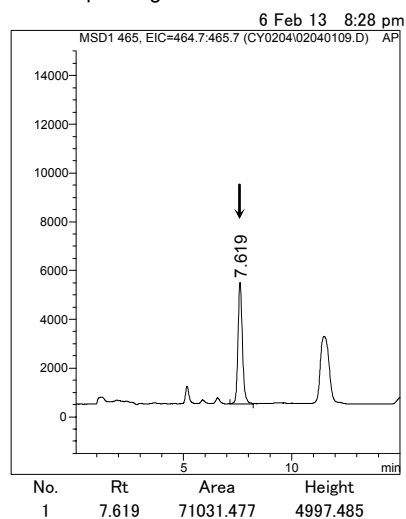
標準品 0.08ng



日植防宮崎 無処理
4mL/1μL/1.6g

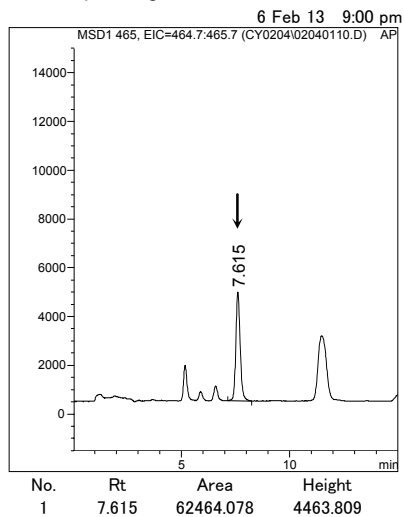


日植防宮崎 2回処理 1日後
12mL/1μL/1.6g

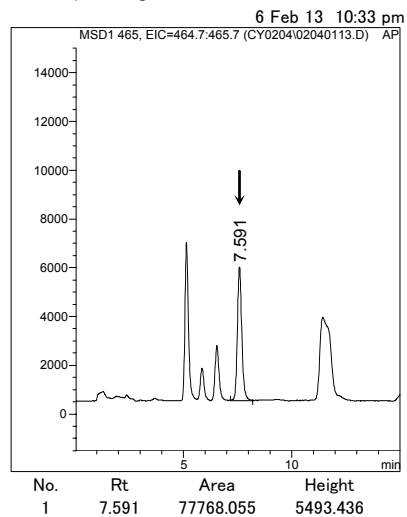


付図-3-1. シフルメトフェンのクロマトグラム

日植防宮崎 2 回処理 3 日後
12mL/1 μ L/1.6g

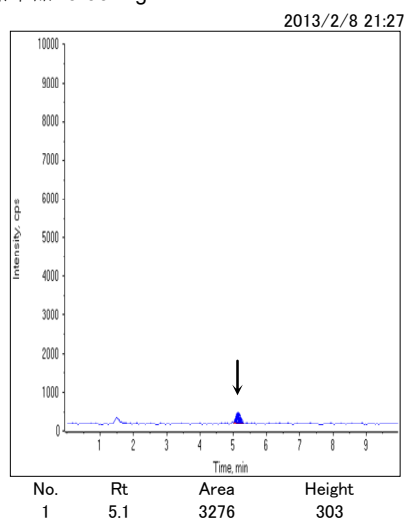


日植防宮崎 2 回処理 7 日後
4mL/1 μ L/1.6g

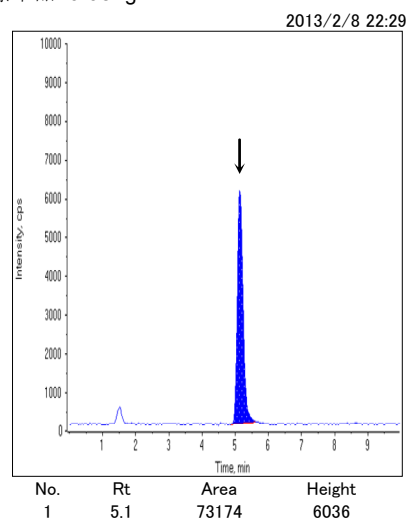


付図-3-2. 代謝物 B-1 のクロマトグラム

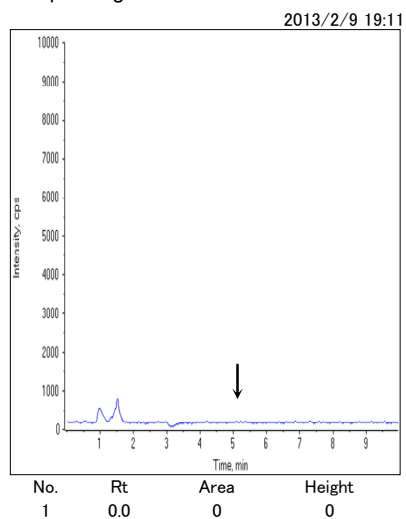
標準品 0.004ng



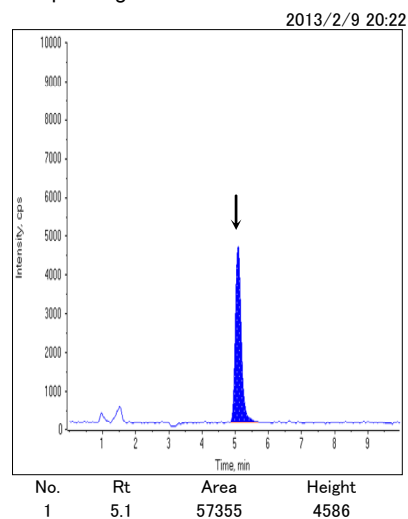
標準品 0.08ng



日植防宮崎 無処理
4mL/1 μ L/1.6g

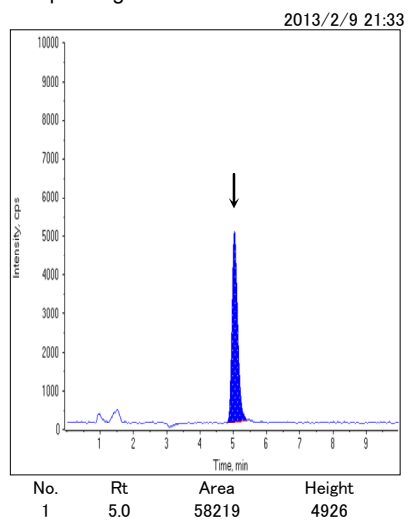


日植防宮崎 2回処理 1日後
4mL/1 μ L/1.6g

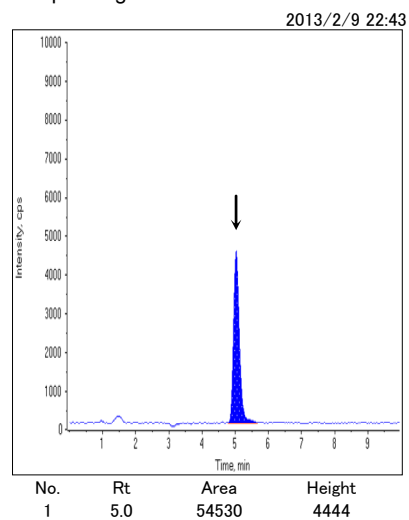


付図-3-2.代謝物 B-1 のクロマトグラム

日植防宮崎 2 回処理 3 日後
4mL/1 μ L/1.6g



日植防宮崎 2 回処理 7 日後
8mL/1 μ L/1.6g



10. 試料重量等

試料	処理 回数	経過 日数	平均重量 (kg/個)	総平均重量 (kg/個)	総重量 (kg)	総重量の平均 (kg)	重量比(%) 果肉 果皮	
茨城	0	—	1.95	1.98	19.5	12.4	80	20
	C	1	2.02		10.1		78	22
	C	3	1.93		9.64		82	18
	C	7	2.04		10.2		81	19
	平均 80:20							
高知	0	—	1.02	1.16	12.2	8.44	78	22
	C	1	1.22		7.31		78	22
	C	3	1.19		7.14		79	21
	C	7	1.19		7.13		80	20
	平均 79:21							
宮崎	0	—	1.71	1.96	20.5	13.4	81	19
	C	1	2.06		10.3		82	18
	C	3	1.67		8.36		84	16
	C	7	2.42		14.5		83	17
	平均 82:18							
3圃場の平均			3ほ場の総平均重量 1.70 kg/個		3ほ場の総重量の平均 11.4 kg			

C: エトキサゾール, シフルメトフェンは2回処理

アクリナトリンは5回処理

シエノピラフェンは1回処理

フェンプロパトリンは4回処理

11. 作物写真の一例



宮崎 無処理区



宮崎 処理 1 日後



宮崎 処理 3 日後



宮崎 処理 7 日後