

農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業

(①すいか、メロン)

残留分析詳細(メロン試料)：カスガマイシン

1. 分析対象物質

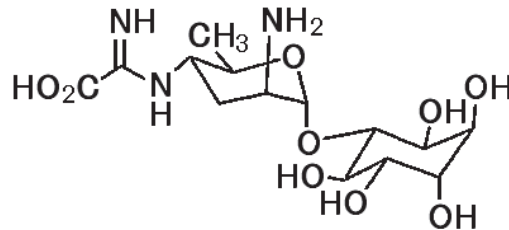
カスガマイシン

化学名： 1_L-1,3,4/2,5,6-1-deoxy-2,3,4,5,6-pentahydroxycyclohexyl 2-amino
-2,3,4,6-tetra-deoxy-4-(α -iminoglycino)- α -D-arabino-hexopyranoside

分子式： C₁₄H₂₅N₃O₉

分子量： 379.4

構造式：



性 状： 無色の針状結晶

融 点： 202-204℃ (分解)

蒸気圧： <0.0013 mPa (25℃)

分配係数： log K_{OW} <1.96 (pH 5)

溶解性： 水 2.07×10⁵ (pH 5), 2.28×10⁵ (pH 7), 4.38×10⁵ (pH 9)
(以上 mg/L, 20-25℃)

アセトン <0.001, メタノール 0.00276, キシレン <0.001
(以上 g/L, 20-25℃)

安定性： 室温で非常に安定
弱酸に対して安定, 強酸及びアルカリに対して不安定

出 典： The Pesticide Manual 17th Edition.

2. 標準品及び試薬

カスガマイシンー塩酸塩標準品：純度 99.0%（Dr.Ehrenstorfer 製）
 アンモニア水，酢酸，ギ酸：特級（関東化学製）
 メタノール：高速液体クロマトグラフ用（和光純薬工業製）
 アセトニトリル：高速液体クロマトグラフィー用（関東化学製）
 水：PRA-0015-0V0／Analytic で精製した水（オルガノ製）
 HLB ミニカラム：Oasis HLB 3cc, 60mg（Waters 製）
 SCX ミニカラム：Bond Elut SCX 500 mg/3 mL（アジレント・テクノロジー製）

3. 装置及び機器

化学天秤：AUW220（島津製作所製）
 上皿天秤：PB8001-S/FACT（メトラー・トレド製）
 上皿天秤：MS6001S/02（メトラー・トレド製）
 上皿天秤：EK-1200G（エー・アンド・デイ製）
 ミキサー：CB-15T（ワーリング製）
 液体クロマトグラフ・質量分析計（LC-MS/MS）：
 LCMS-8050 トリプル四重極型（島津製作所製）
 データ処理装置：LabSolutions（島津製作所製）

4. 液体クロマトグラフ・質量分析計の操作条件

4.1. 液体クロマトグラフの操作条件

カラム：Inertsil Amide（ジーエルサイエンス製）
 内径 2.1 mm，長さ 10 cm，粒径 3 μ m
 温度：カラムオーブン 40℃
 サンプルクーラ 15℃
 移動相：

時間(min)	アセトニトリル(vol%)	0.1%ギ酸溶液(vol%)
0.00 - 9.99	90	10
10.00-20.00	10	90
20.01-30.00	90	10

流量：0.2 mL/min
 注入量：1 μ L
 保持時間：約 8.5 min

4.2. 質量分析計の操作条件

イオン化法：	エレクトロスプレーイオン化法（ESI）
	正モード
ネブライザーガス流量：	3.0 L/min
ヒーティングガス流量：	10.0 L/min
ドライイングガス流量：	10.0 L/min
CID ガス圧力：	270 kPa
インターフェイス電圧：	4.0 kV
インターフェイス温度：	300℃
DL 温度：	250℃
ヒートブロック温度：	400℃
Q1 PreBias：	-11.0 V
コリジョン電圧：	-21.0 V
Q3 PreBias：	-24.0 V
イオン検出法：	MRM
採取イオン：	プリカーサーイオン； m/z 380.40
	プロダクトイオン； m/z 112.20

5. 検量線の作成

カスガマイシン一塩酸塩標準品20.0 mg（カスガマイシン換算相当量）を100 mL容メスフラスコに精秤し、メタノールに溶解して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（50：50，v/v）混液で希釈して10 mg/Lの標準溶液を調製した。さらにこの標準溶液を同混液で希釈して0.0025，0.005，0.025，0.05，0.075及び0.1 mg/Lの標準溶液を調製した。この溶液を前記条件の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入し、データ処理装置を用いてカスガマイシンのピーク面積を測定し、横軸に重量（ng），縦軸にピーク面積をとって検量線を作成した。

6. 分析操作

6.1. 試料の前処理

試料は写真撮影及び重量測定を実施した後、各々を縦に8分割し、対角の2つを取り合わせた（4組作製）。その2組を果実分析用試料とし、残りの2組を果肉分析用試料とした。果肉分析用試料は果肉と果皮に分け、果皮の厚さを測定した。又、果実、果肉及び果皮の各部位の全重量を測定した。

無処理区は、2組の果実分析用試料を細切した後、よく混ぜ合わせ、その一部を添加剤が必要な有機銅分析用試料として取り分けた後、残りの果実分析用試料をミキサーで均一化してカスガマイシン分析用を含む調製試料を作製した。果肉分析用試料についても果実

分析用試料と同様に各調製試料を作製した。

処理区は、2組の果実分析用試料を細切り、ミキサーで均一化してカスガマイシン分析用を含む調製試料を作製した。果肉分析用試料についても果実分析用試料と同様に各調製試料を作製した。

各調製試料は2組以上作製し、密封して冷凍保存（-20℃以下）した。分析時にその1組を取り、分析に供した。

6.2. 抽出

均一化した試料20 gをはかりとり、水／酢酸（100：0.1，v/v）混液100 mLを加え、30分間振とうした。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣を同混液30 mLで2回洗い、同様にろ過した。ろ液を合わせ、同混液で200 mL定容とし、その10 mL（試料1 g相当量）を分取した。

6.3. HLBミニカラム及びSCXミニカラムによる精製

HLBミニカラム及びSCXミニカラムにメタノール5 mL，水5 mL，水／酢酸（100：0.1，v/v）混液5 mLを順次各々のカラムに流下し前処理した。HLBミニカラムを上側，SCXミニカラムを下側に連結し，抽出液を連結したミニカラムに移して流下した後，水10 mLを流下し，流出液は捨てた。上側のHLBミニカラムを除去した後，SCXミニカラムにメタノール／アンモニア水（100：1，v/v）混液30 mLを流下し，溶出液を取り，40℃以下の水浴中で減圧濃縮し，通風で乾固した。

6.4. 定量

残留物を適量のアセトニトリル／水（50：50，v/v）混液に溶解した。この溶液を前記条件の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入してピーク面積を求め，検量線よりカスガマイシンの重量を求め，試料中のカスガマイシンの残留濃度を算出した。

7. 定量限界値(LOQ)及び検出限界値(LOD)

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	定量限界 (mg/kg)
0.005	1	2	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 (mg/kg)
0.0025	1	2	1	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、市販試料*を用いて、0.01 mg/kg (定量限界相当)、0.25 mg/kg及び5 mg/kg添加濃度における回収試験を各5連分析で実施した。尚、無添加試料は2連分析し、全て定量限界未満であった。回収率の算出結果を示す。

* 東京都板橋区の小売店で2016年7月5日に購入した静岡県産のメロン (27.2 kg/12個)

8.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
市販品	5	100, 95,	100, 95	100,	98	2.8
市販品	0.25	103, 98,	100, 98	98,	99	2.2
市販品	0.01	103, 85,	100, 83	90,	92	9.7

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
市販品	5	101, 95,	100, 93	98,	97	3.5
市販品	0.25	102, 98,	102, 95	101,	100	3.0
市販品	0.01	103, 90,	99, 85	96,	95	7.5

9. 精度管理

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

管理基準：20検体を超えるごとに、各1検体の無処理試料及び0.1 mg/kg添加試料（内部精度管理試料）を分析した。その結果、下表に示すように問題は認められなかった。

又、2015年7月実施の食品衛生精度管理比較調査（一般財団法人食品薬品安全センター）におけるZスコアは全て $Z < 2$ であった。

9.1. 果肉

分析日*	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値 (mg/kg)
2016/12/17	茨城	81	< 0.01
2016/12/17	高知	84	< 0.01
2016/12/18	宮崎	72	< 0.01
2017/ 1/ 4	茨城	103	< 0.01
2017/ 1/ 4	高知	85	< 0.01
2017/ 1/ 4	宮崎	103	< 0.01

回収試料の添加濃度：0.1 mg/kg

* 抽出日を記載

9.2.果実

分析日*	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値 (mg/kg)
2016/12/18	茨城	114	<0.01
2016/12/19	高知	89	<0.01
2016/12/19	宮崎	99	<0.01
2017/ 1/ 4	茨城	111	<0.01
2017/ 1/ 4	高知	85	<0.01
2017/ 1/ 4	宮崎	96	<0.01

回収試料の添加濃度：0.1 mg/kg

* 抽出日を記載

10. 保存安定性確認

均一化した各無処理試料にカスガマイシン一塩酸塩を添加し、冷凍暗所（－20℃以下）に凍結保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を確認した。保存安定性の結果を示す。

10.1. 果肉

圃場名	添加濃度* (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	0.5	138 (2016/8/19-2017/1/4)	93,	86	90
高知	0.5	98 (2016/9/28-2017/1/4)	84,	81	82
宮崎	0.5	149 (2016/8/8-2017/1/4)	82,	81	82

* カスガマイシンとしての添加濃度

10.2. 果実

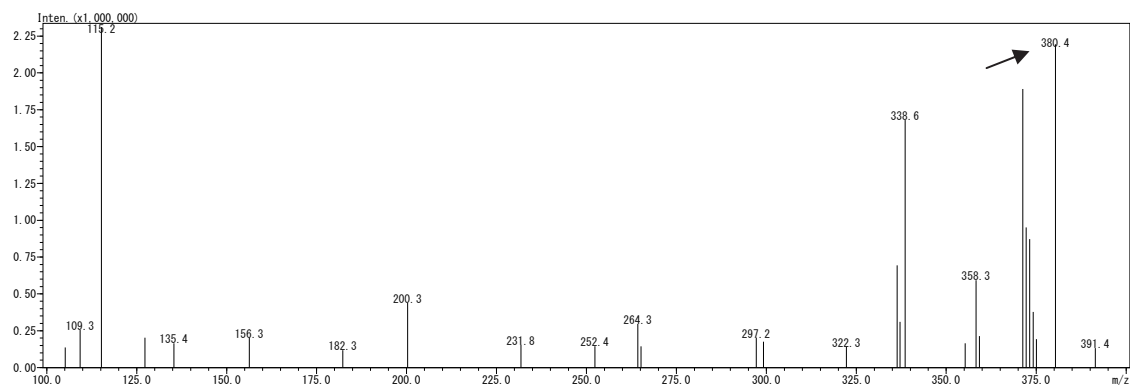
圃場名	添加濃度* (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	0.5	138 (2016/8/19-2017/1/4)	93,	88	90
高知	0.5	98 (2016/9/28-2017/1/4)	85,	79	82
宮崎	0.5	149 (2016/8/8-2017/1/4)	87,	84	86

* カスガマイシンとしての添加濃度

付図-1. マススペクトル

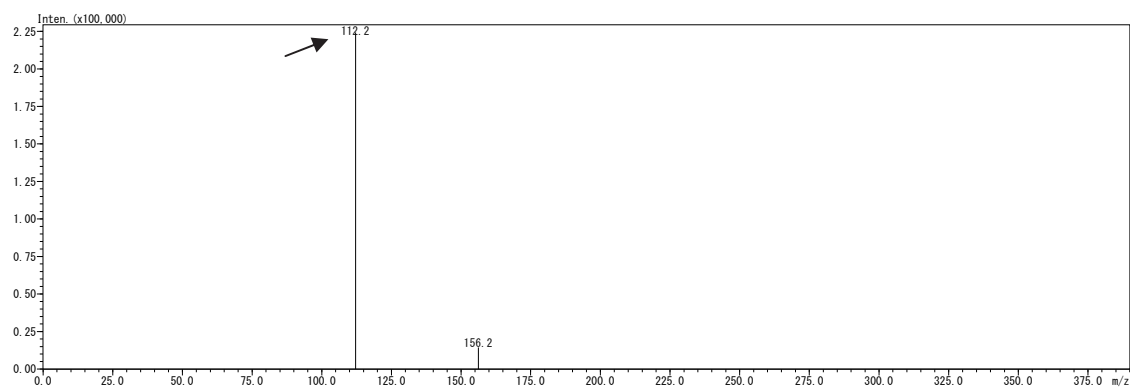
カスガマイシンのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)

(プリカーサーイオン $m/z=380.4$, 正モード)



カスガマイシンのプロダクトスキャンスペクトルの一例

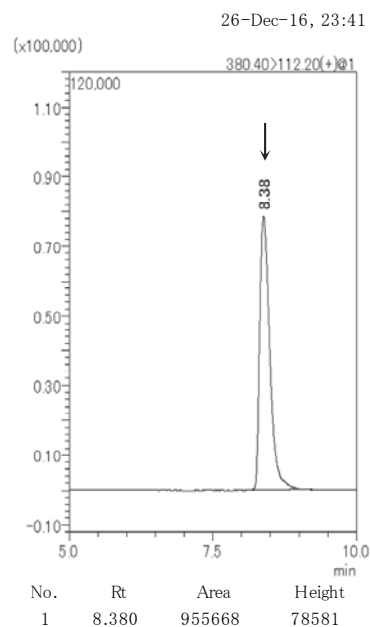
(プロダクトイオン $m/z=112.2$, 正モード)



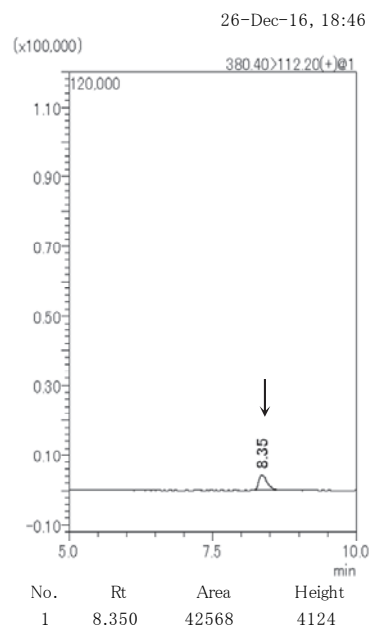
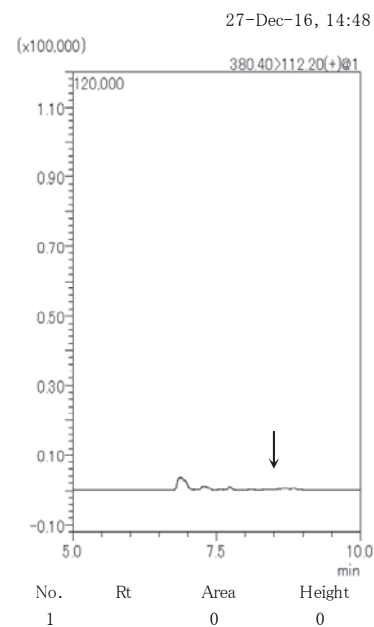
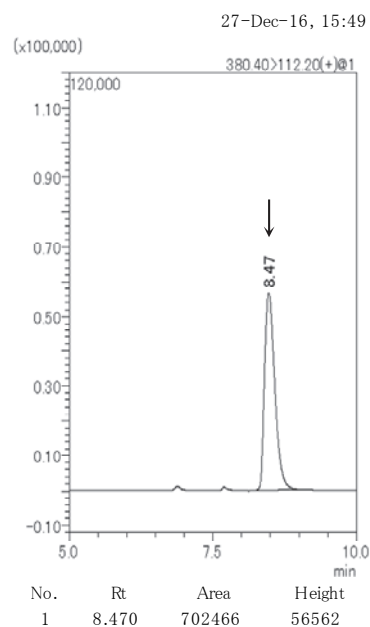
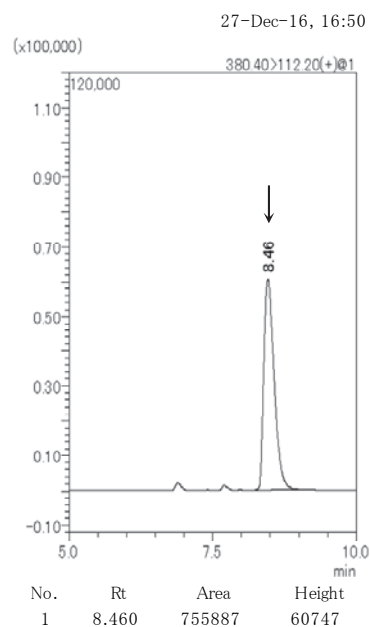
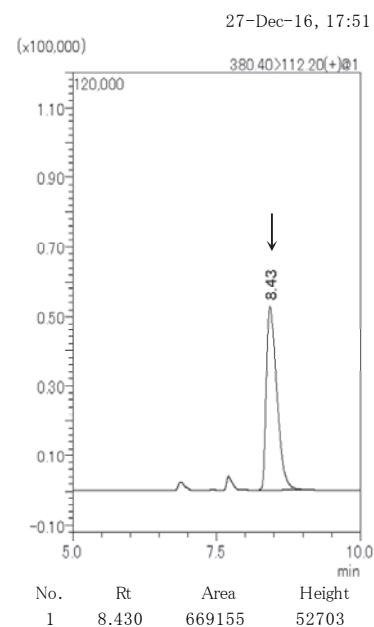
付図-2. カスガマイシンのクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. 果肉

標準品 0.1 ng

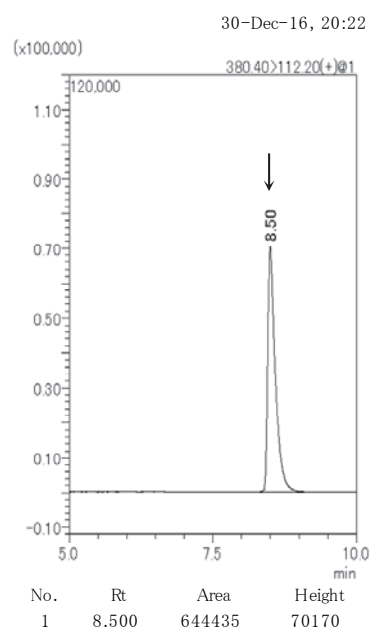


標準品 0.005 ng

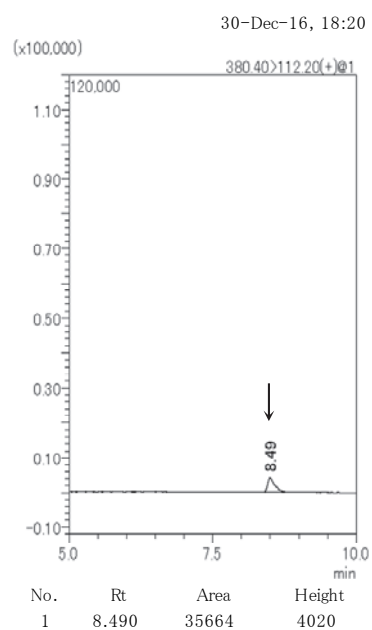
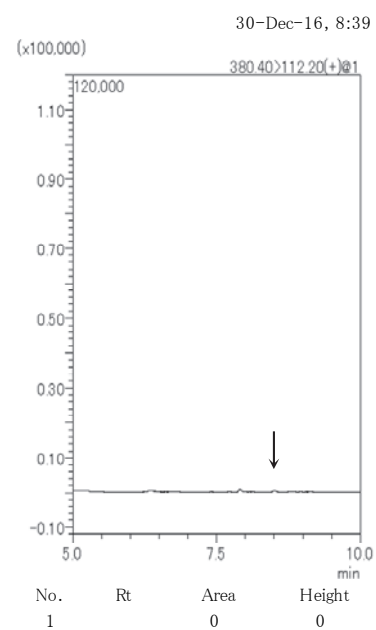
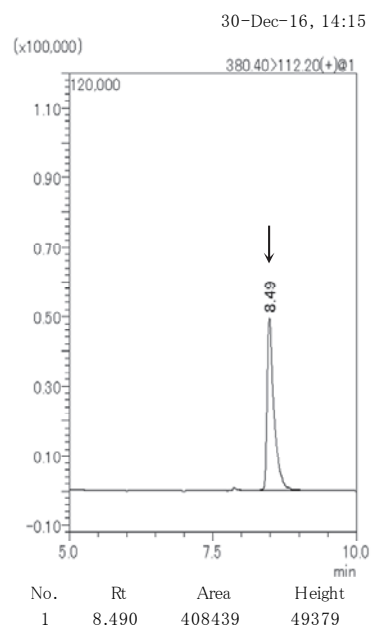
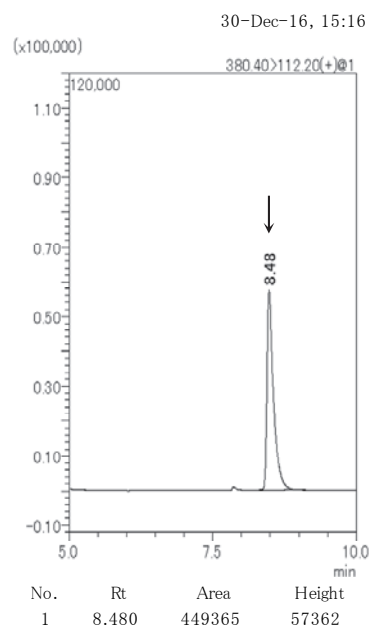
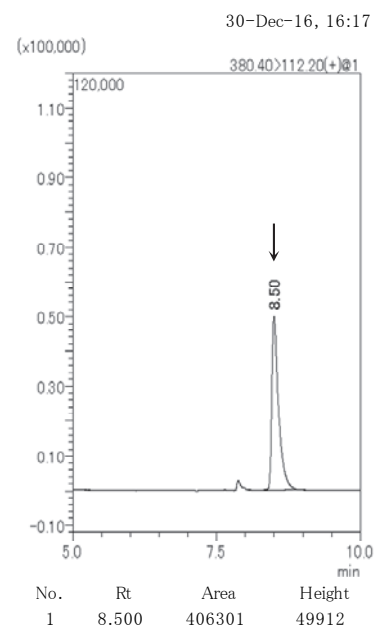
宮崎 無処理
1 μ L/2 mL/1 g宮崎 5回処理 3日後
1 μ L/6 mL/1 g宮崎 5回処理 7日後
1 μ L/6 mL/1 g宮崎 5回処理 14日後
1 μ L/6 mL/1 g

付図-2-2. 果実

標準品 0.1 ng



標準品 0.005 ng

宮崎 無処理
1 μ L/2 mL/1 g宮崎 5回処理 3日後
1 μ L/12 mL/1 g宮崎 5回処理 7日後
1 μ L/12 mL/1 g宮崎 5回処理 14日後
1 μ L/10 mL/1 g

残留分析詳細(メロン試料)：イミダクロプリド

1. 分析対象物質

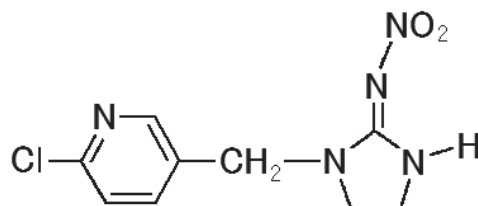
イミダクロプリド

化学名： (E)-1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine

分子式： $C_9H_{10}ClN_5O_2$

分子量： 255.7

構造式：



性 状： 弱い特異臭のある無色の結晶

融 点： 144℃

蒸気圧； 4×10^{-7} mPa (20℃), 9×10^{-7} (25℃)

溶解性： 水 610.0 mg/L (20-25℃)

ジクロロメタン 67, n-ヘキサン <0.1, 2-プロパノール 2.3,
トルエン 0.69 (以上 g/L, 20-25℃)

安定性： 加水分解に対して安定 (pH 5-11)

出 典： The Pesticide Manual 17th Edition.

2. 標準品及び試薬

イミダクロプリド標準品：純度 99.1% (和光純薬工業製)

アセトニトリル, ヘキサン, ギ酸, リン酸二水素カリウム,

リン酸水素二カリウム, 塩化ナトリウム：特級 (和光純薬工業製)

アセトン, ヘキサン, トルエン：残留農薬試験用 (和光純薬工業製)

アセトニトリル：高速液体クロマトグラフィー用 (関東化学製)

水：PRA-0015-0V0 / Analytic で精製した水 (オルガノ製)

GC / SAX / PSA ミニカラム：InertSep GC / SAX / PSA 500 mg / 500 mg / 500 mg / 12 mL
(ジーエルサイエンス製)

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：AUW220 (島津製作所製)

上皿天秤：PB8001-S / FACT (メトラー・トレド製)

上皿天秤：MS6001S / 02 (メトラー・トレド製)

上皿天秤：FX-1200i (エー・アンド・デイ製)

ミキサー：CB-15T (ワーリング製)

液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC-MS)：1100SL (アジレント・テクノロジー製)

データ処理装置：ChemStation (アジレント・テクノロジー製)

4. 液体クロマトグラフ・質量分析計の操作条件

4.1. 液体クロマトグラフの操作条件

カラム：	Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス製) 内径 2.1 mm, 長さ 10 cm, 粒径 4 μm
移動相：	0.1 %ギ酸溶液 / アセトニトリル (70 : 30, v/v)
流量：	0.2 mL/min
温度：	カラムオーブン 40℃
注入量：	2 μL
保持時間：	約 3.8 min

4.2. 質量分析計の操作条件

イオン化法：	エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) 正モード
ネブライザーガス圧力：	35 psi
ドライイングガス流量：	12 L/min
ドライイングガス温度：	350℃

フラグメンター電圧： 60 V
キャピラリー電圧： 4000 V
イオン検出法： SIM
採取イオン： m/z 256.1

5. 検量線の作成

イミダクロプリド標準品20.0 mg（純度換算相当量）を100 mL容メスフラスコに精秤し、アセトニトリルに溶解して200 mg/L標準原液を調製した。この原液を水／アセトニトリル（75：25，v/v）混液で希釈して10 mg/L標準溶液を調製し、さらにこの標準溶液を同混液で希釈して0.005，0.01，0.05，0.1，0.15及び0.2 mg/Lの標準溶液を調製した。この溶液を前記条件の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入し、データ処理装置を用いてイミダクロプ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もって検量線を作成した。

6. 分析操作

6.1. 試料の前処理

試料は写真撮影及び重量測定を実施した後、各々を縦に8分割し、対角の2つを取り合わせた（4組作製）。その2組を果実分析用試料とし、残りの2組を果肉分析用試料とした。果肉分析用試料は果肉と果皮に分け、果皮の厚さを測定した。又、果実、果肉及び果皮の各部位の全重量を測定した。

無処理区は、2組の果実分析用試料を細切した後、よく混ぜ合わせ、その一部を添加剤が必要な有機銅分析用試料として取り分けた後、残りの果実分析用試料をミキサーで均一化してイミダクロプリド分析用を含む調製試料を作製した。果肉分析用試料についても果実分析用試料と同様に各調製試料を作製した。

処理区は、2組の果実分析用試料を細切し、ミキサーで均一化してイミダクロプリド分析用を含む調製試料を作製した。果肉分析用試料についても果実分析用試料と同様に各調製試料を作製した。

各調製試料は2組以上作製し、密封して冷凍保存（-20℃以下）した。分析時にその1組を取り、分析に供した。

6.2. 抽出

均一化した試料20 gをはかりとり、アセトニトリル100 mLを加え、30分間振とうした。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣をアセトニトリル30 mLで2回洗い、同様にろ過した。ろ液を合わせ、アセトニトリルで200 mL定容とした。

6.3. ヘキサン洗浄及び塩析分離

定容液から40 mL（試料4 g相当量）を分液ロートに分取し、塩化ナトリウム10 g，リン酸緩衝溶液*15 mL及びヘキサン30 mLを加え5分間振とうした。静置分離後、アセトニトリ

ル層をナス型フラスコに移して40℃以下の水浴中で約2 mLまで減圧濃縮し、通風で乾固した。

* 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を水1 Lに溶解した。

6.4. GC/SAX/PSAミニカラムによる精製

GC/SAX/PSAミニカラムにアセトニトリル/トルエン (75 : 25, v/v) 混液10 mLを流下して前処理した。残留物を同混液5 mLで溶解してGC/SAX/PSAミニカラムに移して流下した後、同混液10 mLを流下した。全ての溶出液を取り合わせ、40℃以下の水浴中で約2 mLまで減圧濃縮し、通風で乾固した。

6.5. NH₂ミニカラムによる精製

NH₂ミニカラムにヘキサン/アセトン (90 : 10, v/v) 混液10 mLを流下して前処理した。残留物を同混液5 mLに溶解してNH₂ミニカラムに移して流下した後、同混液10 mLを流下し、流出液は捨てた。次にヘキサン/アセトン (70 : 30, v/v) 混液20 mLを流下し、溶出液を取り、40℃以下の水浴中で約2 mLまで減圧濃縮し、通風で乾固した。

6.6. 定量

残留物を適量の水/アセトニトリル (75 : 25, v/v) 混液に溶解した。この溶液を前記条件の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入してピーク高さを求め、検量線よりイミダクロプリドの重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

7. 定量限界値(LOQ)及び検出限界値(LOD)

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	定量限界 (mg/kg)
0.02	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 (mg/kg)
0.01	4	4	2	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、市販試料*を用いて、0.01 mg/kg（定量限界相当）、0.25 mg/kg及び5 mg/kg添加濃度における回収試験を各5連分析で実施した。尚、無添加試料は2連分析し、全て定量限界未満であった。回収率の算出結果を示す。

* 東京都板橋区の小売店で2016年7月5日に購入した静岡県産のメロン（27.2 kg/12個）

8.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
市販品	5	91, 89,	89, 84	89,	88	3.0
市販品	0.25	99, 91,	95, 90	94,	94	3.8
市販品	0.01	104, 102,	104, 99	103,	102	2.0

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
市販品	5	94, 84,	88, 84	88,	88	4.7
市販品	0.25	92, 84,	89, 81	88,	87	5.0
市販品	0.01	103, 96,	98, 93	98,	98	3.7

9. 精度管理

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

管理基準：20検体を超えるごとに、各1検体の無処理試料及び0.1 mg/kg添加試料（内部精度管理試料）を分析した。その結果、下表に示すように問題は認められなかった。

又、2015年7月実施の食品衛生精度管理比較調査（一般財団法人食品薬品安全センター）におけるZスコアは全てZ<2であった。

9.1. 果肉

分析日*	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値 (mg/kg)
2016/ 9/10	茨城	87	<0.01
2016/ 9/10	宮崎	86	<0.01
2016/10/12	茨城	91	<0.01
2016/10/12	高知	91	<0.01
2016/10/12	宮崎	95	<0.01

回収試料の添加濃度：0.1 mg/kg

* 抽出日を記載

9.2. 果実

分析日*	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値 (mg/kg)
2016/ 9/10	茨城	82	<0.01
2016/ 9/10	宮崎	92	<0.01
2016/10/12	茨城	79	<0.01
2016/10/12	高知	94	<0.01
2016/10/12	宮崎	85	<0.01

回収試料の添加濃度：0.1 mg/kg

* 抽出日を記載

10. 保存安定性確認

均一化した各無処理試料にイミダクロプリドを添加し、冷凍暗所（－20℃以下）に凍結保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を確認した。保存安定性の結果を示す。

10.1. 果肉

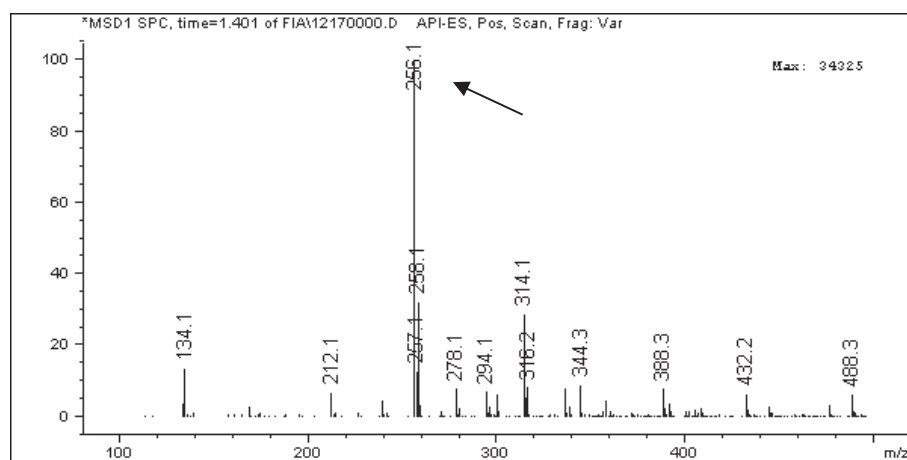
圃場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	0.5	54 (2016/8/19-10/12)	85,	83	84
高知	0.5	14 (2016/9/28-10/12)	90,	85	88
宮崎	0.5	67 (2016/8/6-10/12)	83,	83	83

10.2. 果実

圃場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	0.5	54 (2016/8/19-10/12)	85,	83	84
高知	0.5	14 (2016/9/28-10/12)	85,	78	82
宮崎	0.5	67 (2016/8/6-10/12)	96,	95	96

付図-1. マススペクトル

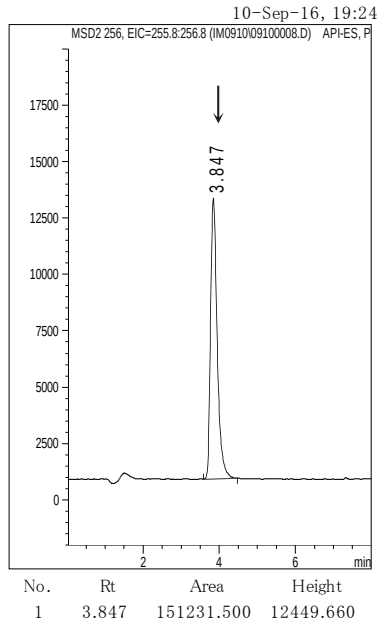
イミダクロプリドのマススペクトルの一例 (正モード)



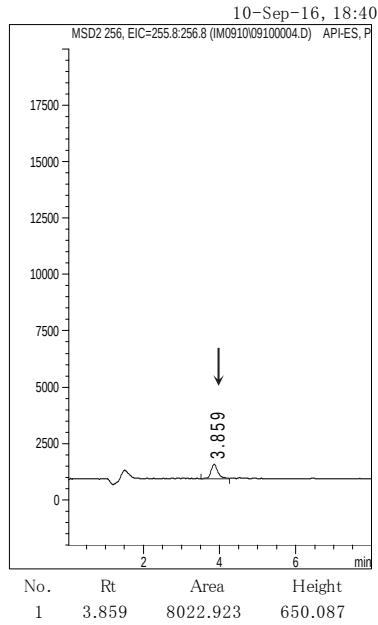
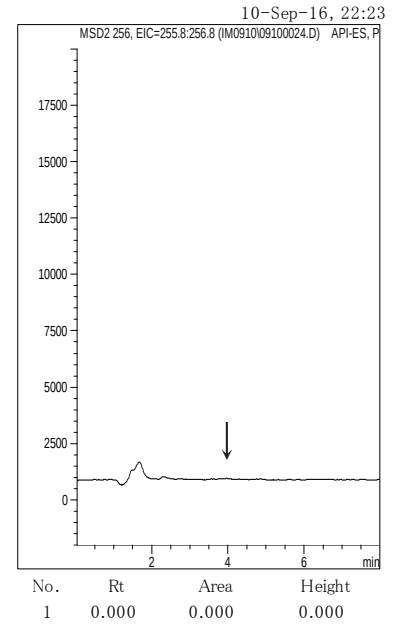
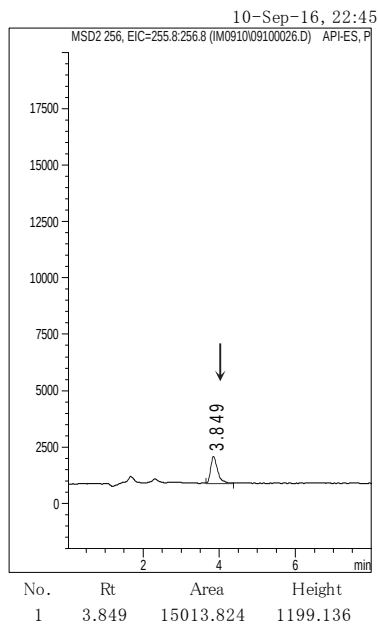
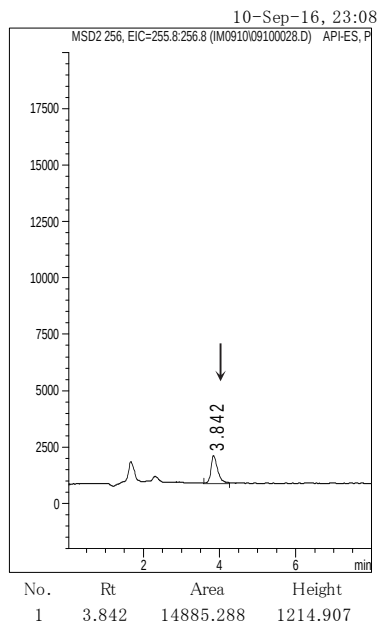
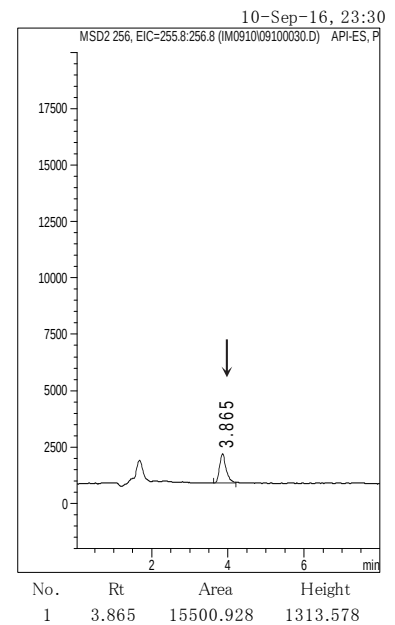
付図-2. イミダクロプリドのクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. 果肉

標準品 0.4 ng



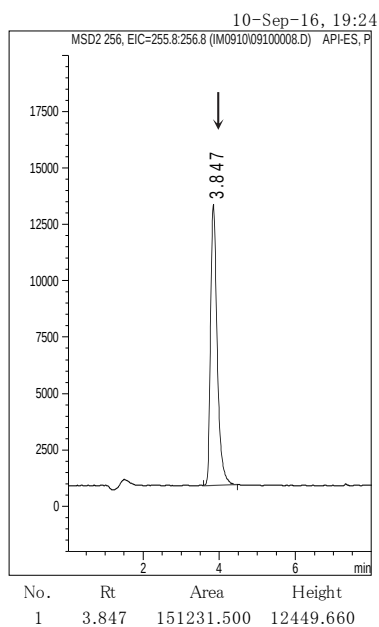
標準品 0.02 ng

宮崎 無処理
2 μ L/4 mL/4 g宮崎 3回処理 3日後
2 μ L/4 mL/4 g宮崎 3回処理 7日後
2 μ L/4 mL/4 g宮崎 3回処理 14日後
2 μ L/4 mL/4 g

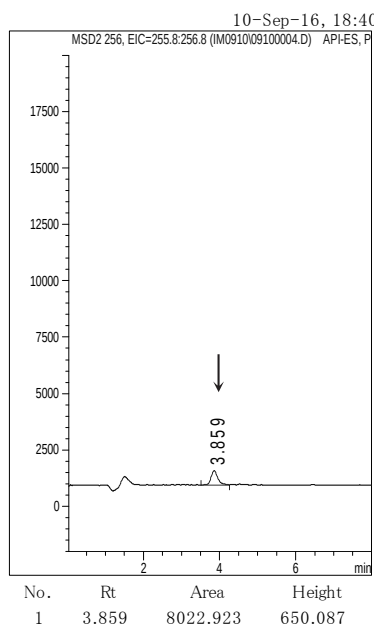
メロン 処理区C (イミダクロプリド)

付図-2-2. 果実

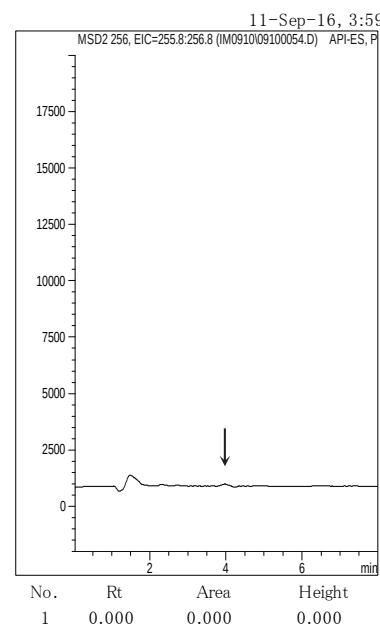
標準品 0.4 ng



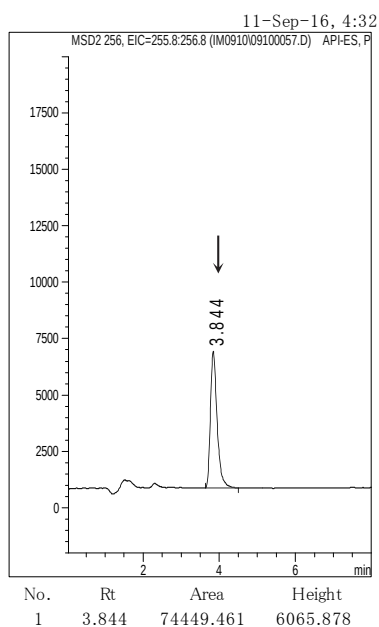
標準品 0.02 ng



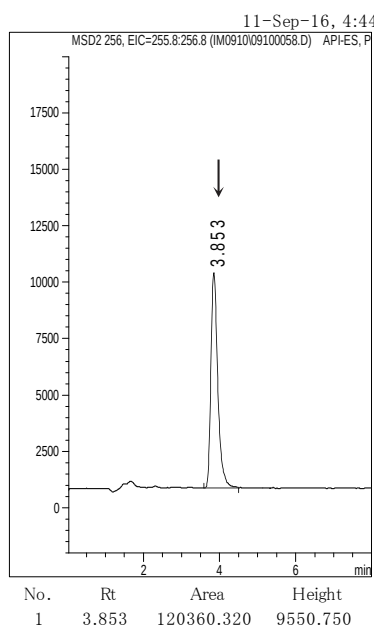
宮崎 無処理
2 μ L/4 mL/4 g



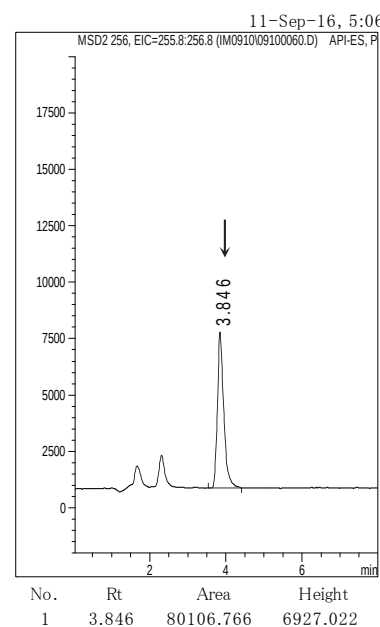
宮崎 3回処理 3日後
2 μ L/8 mL/4 g



宮崎 3回処理 7日後
2 μ L/4 mL/4 g



宮崎 3回処理 14日後
2 μ L/4 mL/4 g



残留分析詳細(メロン試料)：試料重量，作物写真

1. 試料重量等

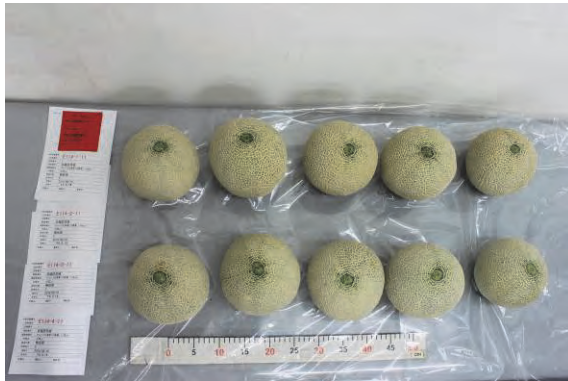
試料	処理	経過	平均重量	総平均重量	総重量	総重量の平均	重量比(%)		果皮の厚さ
	回数	日数	(kg/個)	(kg/個)	(kg)	(kg)	果肉	果皮	(mm)
茨城	0	—	1.71	1.82	17.1	11.2	85	15	2.0
	C	3	1.72		8.60		86	14	1.8
	C	7	1.90		9.49		86	14	1.7
	C	14	1.95		9.73		84	16	1.5
								平均 85:15	平均 1.8
高知	0	—	1.71	1.75	20.5	13.1	85	15	1.4
	C	3	1.85		11.1		85	15	1.3
	C	7	1.73		10.4		85	15	1.7
	C	14	1.72		10.3		86	14	1.4
								平均 85:15	平均 1.5
宮崎	0	—	2.00	1.85	20.0	13.1	84	16	1.7
	C	3	1.77		10.6		83	17	1.7
	C	7	1.80		10.8		84	16	2.0
	C	14	1.82		10.9		84	16	2.0
								平均 84:16	平均 1.9
3 ほ場の総平均重量					3 ほ場の総重量の平均				
1.81 kg/個					12.5 kg				

C：カスガマイシンは5回処理

イミダクロプリドは3回処理

2. 作物写真

2.1. 茨城



茨城 無処理



茨城 処理 3 日後



茨城 処理 7 日後



茨城 処理 14 日後

2.2. 高知



高知 無処理



高知 処理 3 日後



高知 処理 7 日後



高知 処理 14 日後

2.3. 宮崎



宮崎 無処理



宮崎 処理 3 日後



宮崎 処理 7 日後



宮崎 処理 14 日後

農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業

(①すいか、メロン)

残留分析詳細(メロン試料)：有機銅

1. 分析対象物質

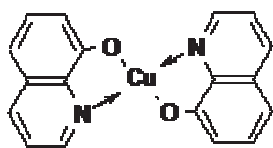
有機銅

化学名： bis(quinolin-8-olato-O,N)copper(II); cupric 8-quinolinoxide

分子式： $C_{18}H_{12}CuN_2O_2$

分子量： 351.8

構造式：



性 状： オリーブ色の粉末

融 点： $>270^{\circ}\text{C}$ (分解)蒸気圧： $4.6 \times 10^{-5} \text{ mPa}$ (25°C)分配係数： $\log K_{OW} = 2.46$ 溶解性： 水 1.04 mg/L ($20-25^{\circ}\text{C}$)

アセトン 0.0276, ジクロロメタン 0.410, エタノール 0.150,

酢酸エチル 0.0286, ヘキサン 0.00017, トルエン 0.0459

(以上 g/L, $20-25^{\circ}\text{C}$)

安定性： 酸性からアルカリ溶媒中で安定 (pH 5-9)

出 典： The Pesticide Manual 17th Edition.

2. 標準品及び試薬

有機銅 (オキシ銅) 標準品 : 純度 100% (和光純薬工業製)
 アセトン, 酢酸エチル, ギ酸, エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム,
 塩化ナトリウム, 塩酸 : 特級 (和光純薬工業製)
 メタノール : 高速液体クロマトグラフ用 (和光純薬工業製)
 水 : PRA-0015-0V0 / Analytic で精製した水 (オルガノ製)
 液相分離ろ紙 : ワットマン 1PS 110 mm (GE ヘルスケア製)

3. 装置及び機器

化学天秤 : AUW220 (島津製作所製)
 上皿天秤 : PB8001-S/FACT (メトラー・トレド製)
 上皿天秤 : MS6001S/02 (メトラー・トレド製)
 上皿天秤 : EK-1200G (エー・アンド・デイ製)
 ミキサー : CB-15T (ワーリング製)
 液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC-MS/MS) :
 LCMS-8050 トリプル四重極型 (島津製作所製)
 データ処理装置 : LabSolutions (島津製作所製)

4. 液体クロマトグラフ・質量分析計の操作条件

4.1. 液体クロマトグラフの操作条件

カラム :	InertSustain C18 (ジエールサイエンス製) 内径 2.1 mm, 長さ 15 cm, 粒径 3 µm
温度 :	カラムオーブン 40℃ サンプルクーラ 15℃
移動相 :	0.2 %ギ酸溶液 / 0.2 %ギ酸含有メタノール溶液 (85:15, v/v)
流量 :	0.2 mL/min
注入量 :	1 µL
保持時間 :	約 4.3 min

4.2. 質量分析計の操作条件

イオン化法 :	エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) 正モード
ネブライザーガス流量 :	3.0 L/min
ヒーティングガス流量 :	10.0 L/min
ドラインガス流量 :	10.0 L/min

CID ガス圧力：	270 kPa
インターフェイス電圧：	4.0 kV
インターフェイス温度：	300℃
DL 温度：	250℃
ヒートブロック温度：	400℃
Q1 PreBias：	-16.0 V
コリジョン電圧：	-30.0 V
Q3 PreBias：	-11.0 V
イオン検出法：	MRM
採取イオン：	プリカーサーイオン； m/z 146.10 プロダクトイオン； m/z 101.10

5. 検量線の作成

有機銅標準品20.0 mgを100 mL容メスフラスコに精秤し、メタノールに溶解して200 mg/L標準原液を調製した。この原液をメタノールで希釈して10 mg/L標準溶液を調製し、さらにこの標準溶液をメタノールで希釈して0.001, 0.002, 0.01, 0.02, 0.03及び0.04 mg/Lの標準溶液を調製した。この溶液を前記条件の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入し、データ処理装置を用いて有機銅のピーク高さを測定し、横軸に重量 (ng)，縦軸にピーク高さをもって検量線を作成した。

6. 分析操作

6.1. 試料の前処理

試料は写真撮影及び重量測定を実施した後、各々を縦に8分割し、対角の2つを取り合わせた（4組作製）。その2組を果実分析用試料とし、残りの2組を果肉分析用試料とした。果肉分析用試料は果肉と果皮に分け、果皮の厚さを測定した。又、果実、果肉及び果皮の各部位の全重量を測定した。

無処理区は、2組の果実分析用試料を細切した後、よく混ぜ合わせ、その一部を取り分けて有機銅分析用試料とし、6 mol/L塩酸溶液を試料100に対し4の重量比で加え、ミキサーで均一化し、調製試料を作製した。果肉分析用試料についても果実分析用試料と同様に調製試料を作製した。

処理区は、2組の果実分析用試料を細切し、その全量を有機銅分析用試料とし、6 mol/L塩酸溶液を試料100に対し4の重量比で加え、ミキサーで均一化し、調製試料を作製した。果肉分析用試料についても果実分析用試料と同様に調製試料を作製した。

各調製試料は2組以上作製し、密封して冷凍保存（-20℃以下）した。分析時にその1組を取り、分析に供した。

6.2. 抽出

均一化した試料20.8 g（試料20 g相当量）をはかりとり、アセトン100 mLを加え、30分間振とうした。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣をアセトン30 mLで2回洗い、同様にろ過した。ろ液を合わせ、アセトンで200 mL定容とした。

6.3. 酢酸エチル転溶

定容液から10 mL（試料1 g相当量）を分液ロートに分取し、10%塩化ナトリウム水溶液100 mL、0.5 mol/Lエチレンジアミン四酢酸四ナトリウム水溶液5 mL及び酢酸エチル80 mLを加え5分間振とうした。静置分離後、酢酸エチル層は液相分離ろ紙を通過させ脱水した。水層には酢酸エチル80 mLを加えて前記操作を繰り返した後、酢酸エチル層を合わせた。酢酸エチル層は40℃以下の水浴中で約2 mLまで減圧濃縮し、通風で乾固した。

6.4. 定量

残留物を適量のメタノールに溶解した。この溶液を前記条件の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入してピーク高さを求め、検量線より有機銅の重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

7. 定量限界値(LOQ)及び検出限界値(LOD)

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	定量限界 (mg/kg)
0.002	1	5	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 (mg/kg)
0.001	1	5	1	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、市販試料*を用いて、0.01 mg/kg（定量限界相当）、0.25 mg/kg、5 mg/kg 及び20 mg/kg（果実）添加濃度における回収試験を各5連分析で実施した。尚、無添加試料は2連分析し、全て定量限界未満であった。回収率の算出結果を示す。

* 東京都板橋区の小売店で2016年7月5日に購入した静岡県産のメロン（27.2 kg/12個）

8.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
市販品	5	74, 72,	74, 70	73,	73	2.3
市販品	0.25	87, 80,	82, 77	82,	82	4.4
市販品	0.01	90, 83,	87, 70	86,	83	9.4

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
市販品	20	82, 78,	80, 77	80,	79	2.5
市販品	5	97, 88,	95, 83	93,	91	6.2
市販品	0.25	88, 83,	85, 83	84,	85	2.4
市販品	0.01	99, 82,	93, 81	88,	89	8.5

9. 精度管理

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

管理基準：20検体を超えるごとに、各1検体の無処理試料及び0.1 mg/kg添加試料（内部精度管理試料）を分析した。その結果、下表に示すように問題は認められなかった。

又、2015年7月実施の食品衛生精度管理比較調査（一般財団法人食品薬品安全センター）におけるZスコアは全てZ<2であった。

9.1. 果肉

分析日*	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値 (mg/kg)
2016/11/ 2	茨城	92	<0.01
2016/11/ 2	高知	90	<0.01
2016/11/ 4	宮崎	96	<0.01
2016/11/19	茨城	87	<0.01
2016/11/19	高知	86	<0.01
2016/11/19	宮崎	89	<0.01

回収試料の添加濃度：0.1 mg/kg

* 抽出日を記載

9.2. 果実

分析日*	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値 (mg/kg)
2016/11/ 9	茨城	95	<0.01
2016/11/ 9	高知	93	<0.01
2016/11/ 9	宮崎	105	<0.01
2016/11/19	茨城	91	<0.01
2016/11/19	高知	87	<0.01
2016/11/19	宮崎	91	<0.01

回収試料の添加濃度：0.1 mg/kg

* 抽出日を記載

10. 保存安定性確認

均一化した各無処理試料に有機銅を添加し、冷凍暗所（－20℃以下）に凍結保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を確認した。保存安定性の結果を示す。

10.1. 果肉

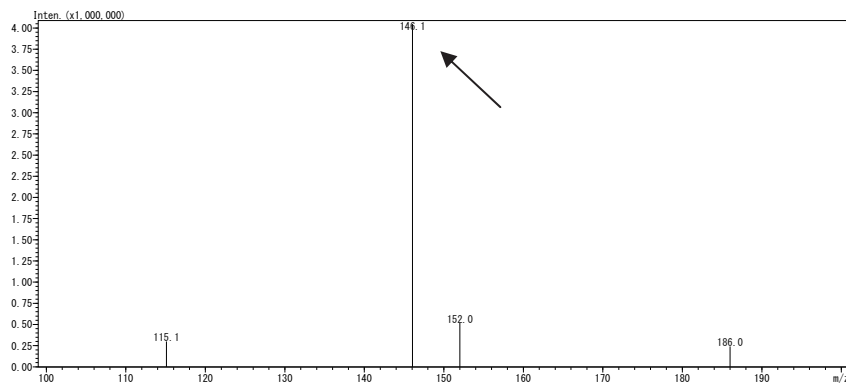
圃場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	0.5	92 (2016/8/19-11/19)	82,	80	81
高知	0.5	52 (2016/9/28-11/19)	85,	81	83
宮崎	0.5	103 (2016/8/8-11/19)	83,	79	81

10.2. 果実

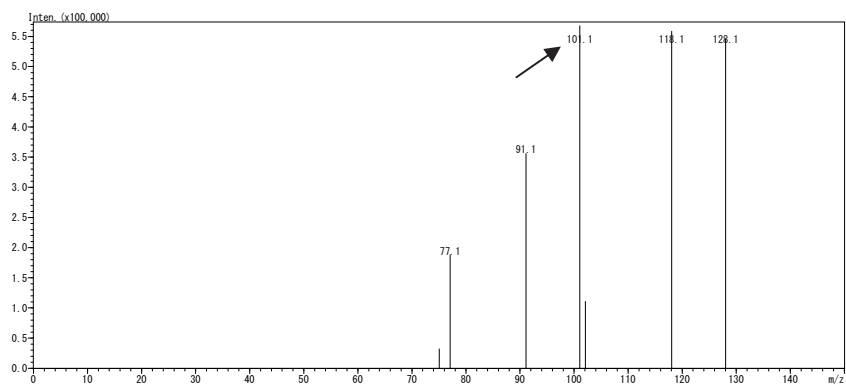
圃場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	0.5	92 (2016/8/19-11/19)	80,	79	80
高知	0.5	52 (2016/9/28-11/19)	85,	82	84
宮崎	0.5	103 (2016/8/8-11/19)	82,	82	82

付図-1. マススペクトル

有機銅のマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)

(プリカーサーイオン $m/z=146.1$, 正モード)

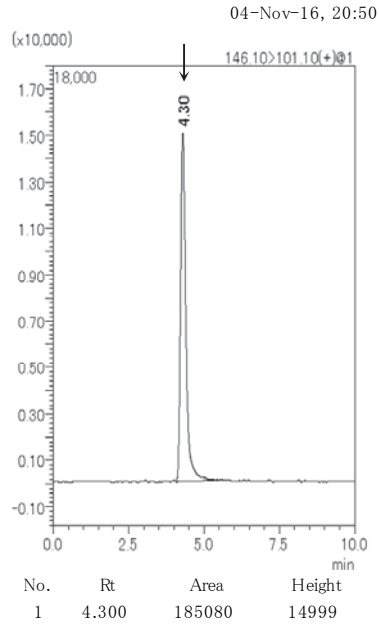
有機銅のプロダクトスキャンスペクトルの一例

(プロダクトイオン $m/z=101.1$, 正モード)

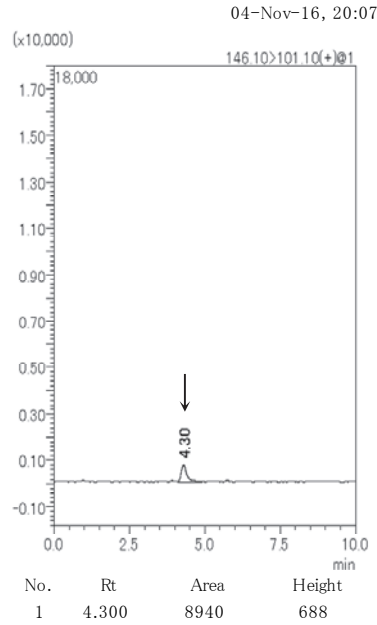
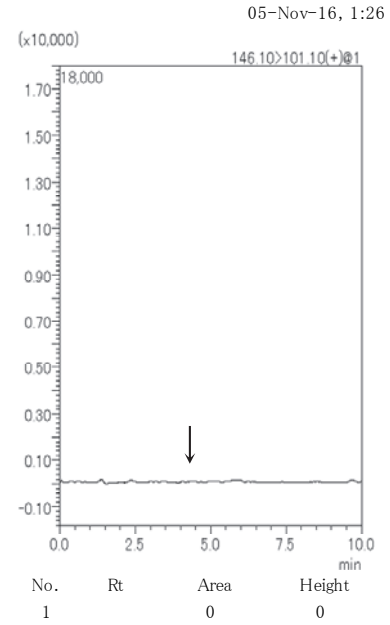
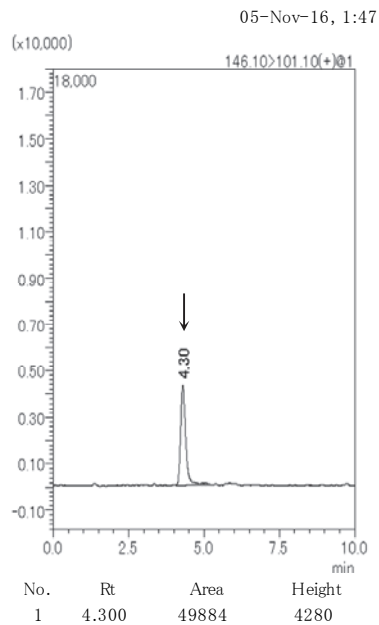
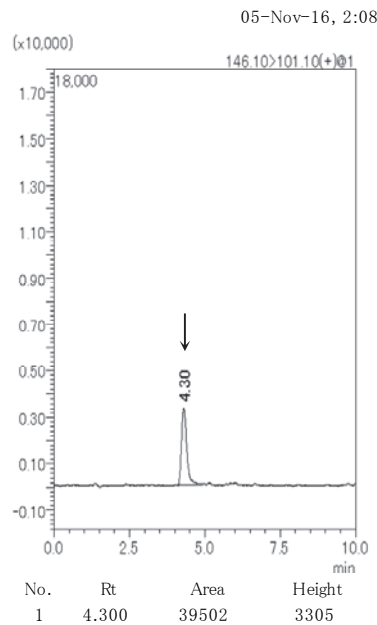
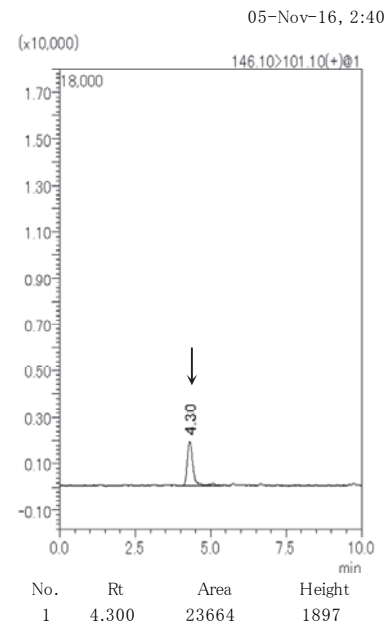
付図-2. 有機銅のクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. 果肉

標準品 0.04 ng

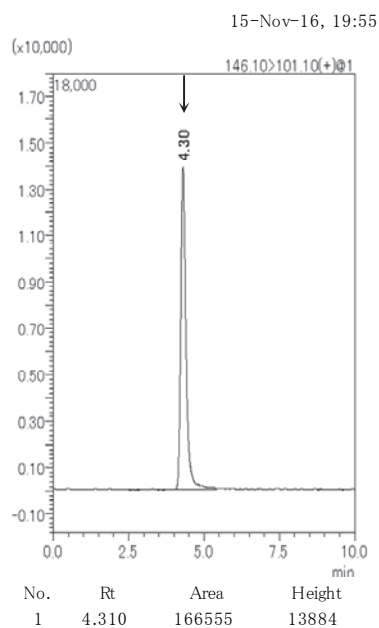


標準品 0.002 ng

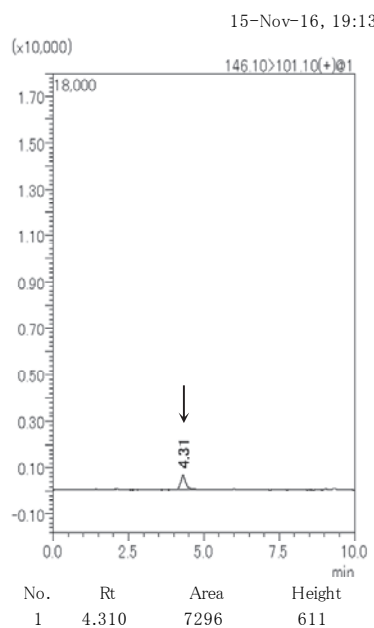
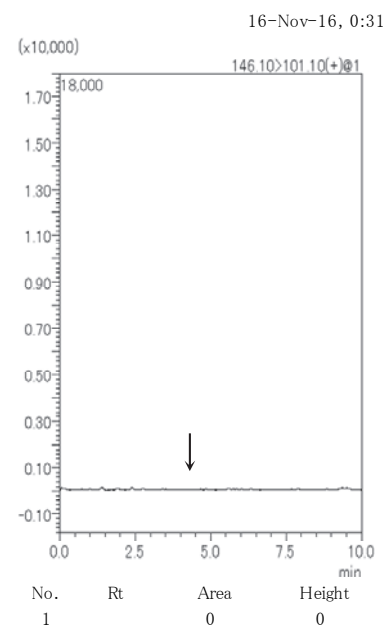
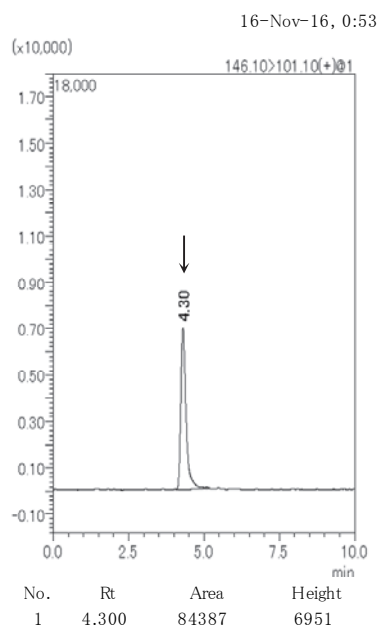
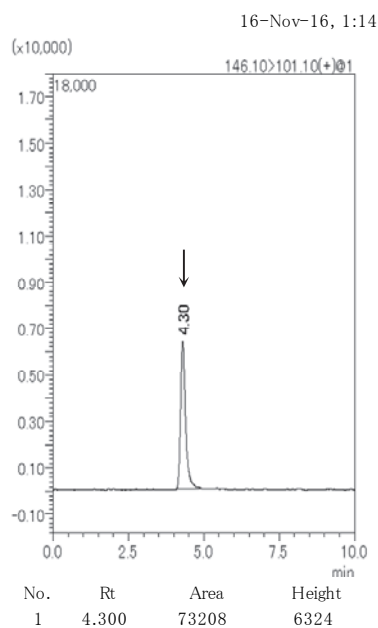
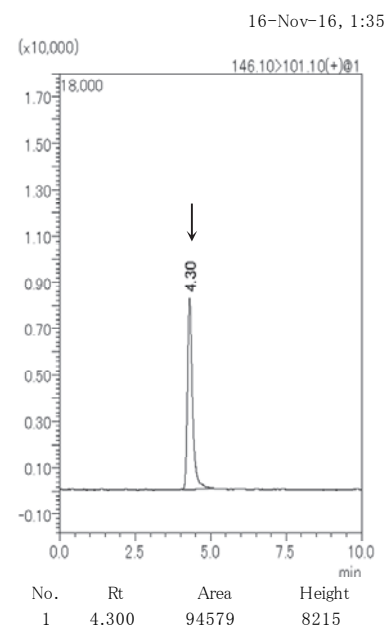
宮崎 無処理
1 µL/5 mL/1 g宮崎 5回処理 10日後
1 µL/5 mL/1 g宮崎 5回処理 13日後
1 µL/5 mL/1 g宮崎 5回処理 17日後
1 µL/5 mL/1 g

付図-2-2. 果実

標準品 0.04 ng



標準品 0.002 ng

宮崎 無処理
1 µL/5 mL/1 g宮崎 5回処理 10日後
1 µL/300 mL/1 g宮崎 5回処理 13日後
1 µL/300 mL/1 g宮崎 5回処理 17日後
1 µL/300 mL/1 g

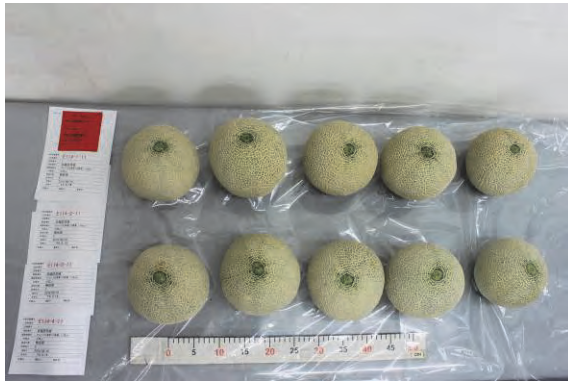
残留分析詳細(メロン試料): 試料重量, 作物写真

1. 試料重量等

試料	処理	経過	平均重量	総平均重量	総重量	総重量の平均	重量比(%)		果皮の厚さ
	回数	日数	(kg/個)	(kg/個)	(kg)	(kg)	果肉	果皮	(mm)
茨城	0	—	1.71	1.70	17.1	10.6	85	15	2.0
	5	10	1.59		7.97		84	16	1.6
	5	13	1.67		8.34		85	15	1.6
	5	17	1.82		9.08		83	17	1.4
							平均 84:16		平均 1.7
高知	0	—	1.71	1.72	20.5	12.9	85	15	1.4
	5	10	1.72		10.3		84	16	1.6
	5	13	1.73		10.4		85	15	1.5
	5	17	1.72		10.3		85	15	1.4
							平均 85:15		平均 1.5
宮崎	0	—	2.00	1.71	20.0	12.2	84	16	1.7
	5	10	1.54		9.21		81	19	1.5
	5	13	1.64		9.86		84	16	1.5
	5	17	1.64		9.81		86	14	1.3
							平均 84:16		平均 1.5
3 ほ場の総平均重量				3 ほ場の総重量の平均					
1.71 kg/個				11.9 kg					

2. 作物写真

2.1. 茨城



茨城 無処理



茨城 処理 10 日後



茨城 処理 13 日後



茨城 処理 17 日後

2.2. 高知



高知 無処理



高知 処理 10 日後



高知 処理 13 日後



高知 処理 17 日後

2.3. 宮崎



宮崎 無処理



宮崎 処理 10 日後



宮崎 処理 13 日後



宮崎 処理 17 日後