

平成 26 年度農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業
残留分析詳細③ ピリダベン

1. 分析対象物質

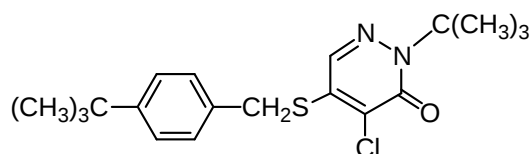
ピリダベン

化学名： 2-*tert*-butyl-5-(4-*tert*-butylbenzylthio)-4-chloropyridazin-3(2*H*)-one

分子式： $C_{19}H_{25}ClN_2OS$

分子量： 364.9

構造式：



性 状： 無色結晶

融 点： 111-112 °C

蒸気圧： < 0.01 mPa (25°C)

分配係数： $\log P_{OW} = 6.37$ (23±1°C, 蒸留水)

溶解性： 水 0.012 mg/L (24°C)

アセトン 460, エタノール 57, ヘキサン 10, ベンゼン 110, キシレン 390, シクロヘキサン 320, *n*-オクタノール 63 (以上 g/L, 20°C)

安定性： 50°Cで 90 日間安定, 光には不安定

暗所で 30 日間加水分解に対して安定 (pH5,7 と 9, 25°C)

出 典： The Pesticide Manual (16th Edition)

2. 標準品及び試薬

ピリダベン標準溶液：純度 99.9% (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)

アセトニトリル：高速液体クロマトグラフ用 (和光純薬工業製)

アセトン, ヘキサン, 酢酸エチル, 塩化ナトリウム, 無水硫酸ナトリウム, ギ酸
：試薬特級 (和光純薬工業製)

GC/SAX/PSA 3 層ミニカラム：InertSep GC/SAX/PSA, 500mg/500mg/500mg/12mL
(ジューエルサイエンス製)

フロジリルミニカラム：Bond Elut JR-FL, 1000mg (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：メトラー・トレド製 MS6001S/02

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

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
データ処理装置 : アジレント・テクノロジー製 Chem Station

4. 液体クロマトグラフ・質量分析計の操作条件

4.1. 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 μm
溶離液 : 0.1%ギ酸溶液/アセトニトリル (15:85, v/v)
流速 : 0.2 mL/min.
カラム温度 : 40 $^{\circ}\text{C}$
試料注入量 : 1 μL
保持時間 : 約 4.7 min.

4.2. 質量分析計

イオン化法 : エレクトロスプレー(ESI), 正イオンモード
乾燥ガス温度 : 350 $^{\circ}\text{C}$
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 : 100 V
キャピラリー電圧 : 3000 V
採取イオン : SIM m/z 365.2

5. 検量線の作成

ピリダベン標準品 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。この原液をアセトニトリルで希釈して 10 mg/L の標準溶液を調製した。さらにこの溶液をアセトニトリルで希釈して 0.001, 0.002, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 mg/L の標準溶液を調製した。この 1 μL を前記条件の液体クロマトグラフ 質量分析計に注入し, データ処理装置を用いてピリダベ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. 分析操作

6.1. 試料の前処理

試料は各々を縦に 4 分割し, 対角の 2 つを取り合わせた。その 1 組を果実分析用試料とし, 残りの 1 組を果肉分析用試料とした。果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。

各分析用試料をミキサーで均一化し, 調製試料を 4 組作製した。各調製試料は, それぞれ密封して冷凍保存 (-20°C 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 を分液ロートに量りとり, 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 30 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 200 mL に定容した。

6.3. 酢酸エチル転溶

前項の定容液から 100 mL (試料 10g 相当量) を分取し、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、アセトンを留去した。濃縮液に 10%塩化ナトリウム溶液 80 mL 及び酢酸エチル 80 mL を加えて 5 分間振とうした。静置分離後、酢酸エチル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。水層には酢酸エチル 80 mL を加え、前記操作をくり返した後、酢酸エチル層を取り合わせた。酢酸エチル層は、40℃以下の水浴中で約 5 mL まで減圧濃縮した後、酢酸エチルで 20 mL に定容した。この定容液から 4 mL (試料 2g 相当量) を分取し、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、酢酸エチルを留去した。残留物はトルエン/アセトニトリル (25:75, v/v) 混液 5 mL で溶解した。

6.4. GC/SAX/PSA 3 層ミニカラムによる精製

GC/SAX/PSA 3 層ミニカラムにトルエン/アセトニトリル (25:75, v/v) 混液 20 mL を流下し前処理した。前項の溶解液を 3 層ミニカラムに移して流下した。さらに同混液 20 mL を流下し、全溶出液を取り、40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮し、通風で乾固した後、ヘキサン 5mL に溶解した。

6.5. フロリジルミニカラムによる精製

フロリジルミニカラムにヘキサン 10mL を流下して前処理した。前項の溶解液をフロリジルミニカラムに移して流下した後、ヘキサン 10mL を流下し、これらの流出液を捨てた。次に、アセトン/ヘキサン (10:90, 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 2mL まで減圧濃縮後、通風で乾固させた。

6.6. 定量

残留物を適量のアセトニトリルに溶解した。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測定し、検量線よりピリダベンの重量を求め、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	2	10	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	2	10	1	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、宮崎試料の果肉無処理試料*及び果実無処理試料*を用いて、定量限界相当 (0.01mg/kg)、0.25mg/kg 及び 5mg/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、無処理試料は 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。

*平成 25 年度 農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業の試料を使用

8.1 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
<u>ピリダベン</u>								
宮崎	5	107	106	104	102	100	104	2.8
宮崎	0.25	103	102	101	100	99	101	1.6
宮崎	0.01	100	99	90	89	88	93	6.2

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)		回収率 (%)				平均回収率 (%)	RSDr
<u>ピリダベン</u>								
宮崎	5	105	101	100	99	98	101	2.7
宮崎	0.25	99	97	95	93	93	95	2.7
宮崎	0.01	103	96	94	92	91	95	5.0

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 0.1mg/kg 添加試料（クオリティーコントロール試料）を分析した。その結果、下表に示すように問題は認められなかった。

また、2013 年 10 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)
2014/11/28	茨城	90	<0.01
2014/12/20	高知	95	<0.01
2014/12/12	宮崎	85	<0.01
2015/1/6	宮崎	85	<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)
2014/11/28	茨城	90	<0.01
2014/12/20	高知	92	<0.01
2014/12/12	宮崎	91	<0.01
2015/1/6	宮崎	87	<0.01

回収試料の添加濃度：0.1 mg/kg

*抽出日を記載

10. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料にピリダベンを添加し、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

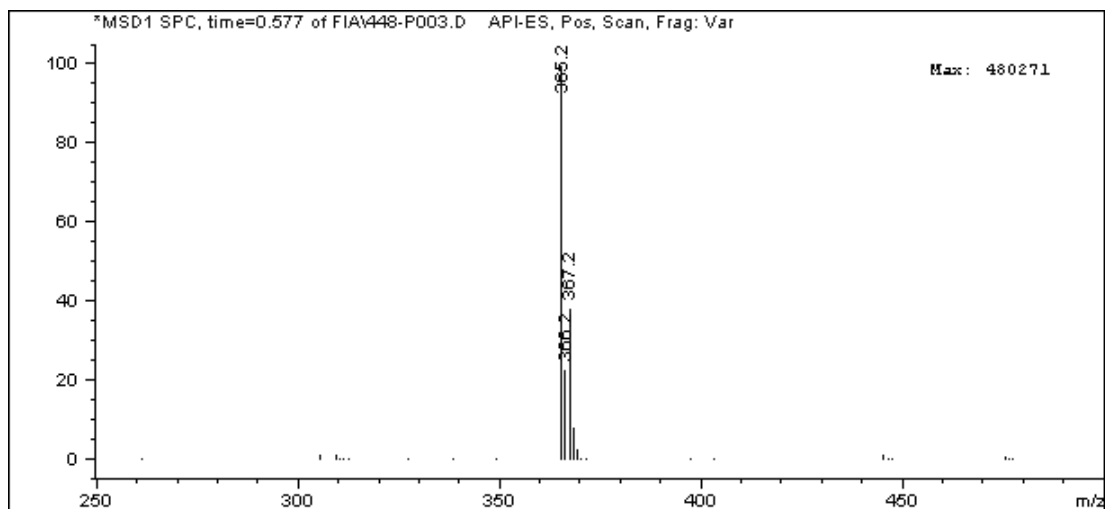
圃場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
茨城	0.5	174 (14/7/16 - 15/1/6)	86	82
高知	0.5	39 (14/11/28 - 15/1/6)	89	87
宮崎	0.5	48 (14/11/19 - 15/1/6)	94	93

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	174 (14/7/16 - 15/1/6)	88	84
高知	0.5	39 (14/11/28 - 15/1/6)	93	91
宮崎	0.5	48 (14/11/19 - 15/1/6)	93	92

付図-1. マススペクトル

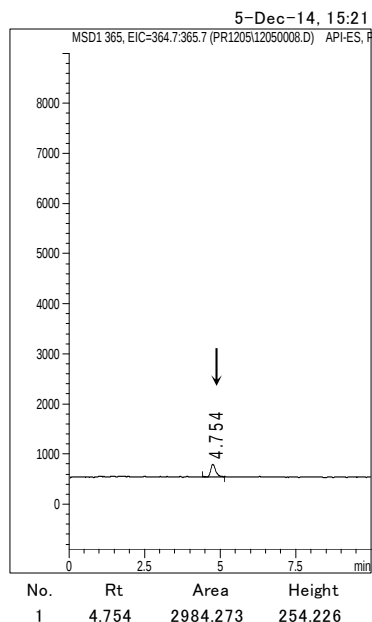
ピリダベンマススペクトルの一例 (正イオンモード)



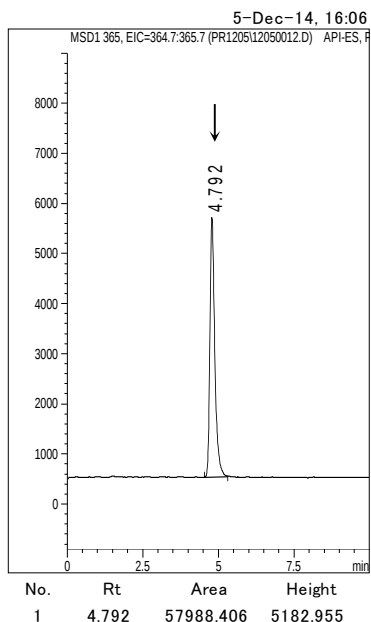
付図-2. ピリダベンのロマトグラム (代表例)

付図-2-1. 果肉

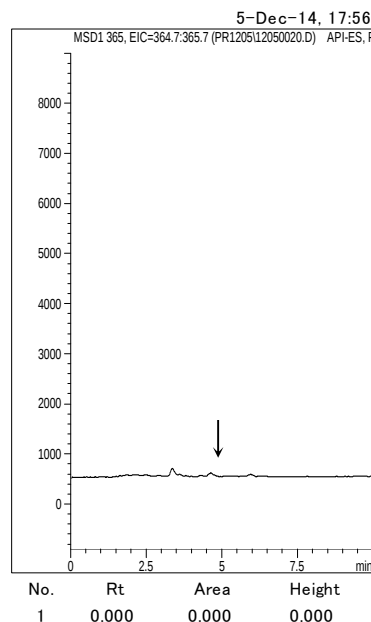
標準品 0.002ng



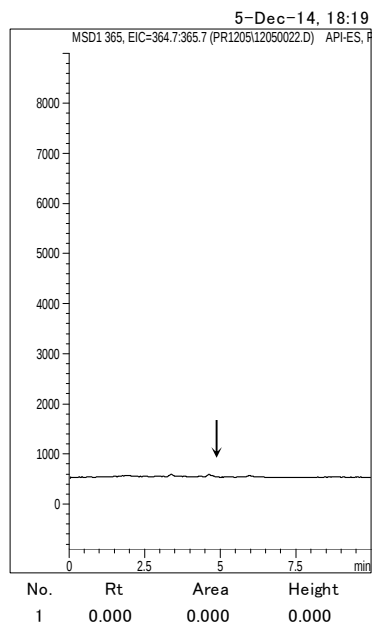
標準品 0.04ng



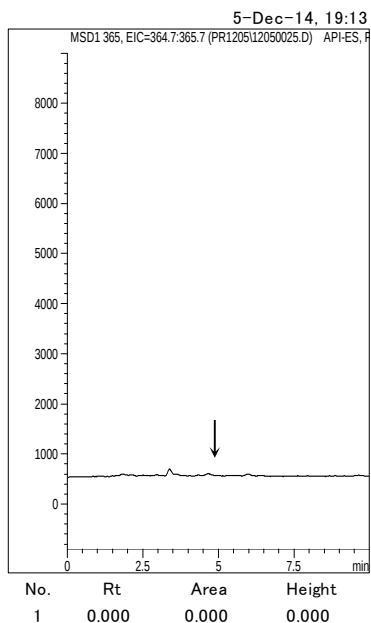
茨城 無処理
10mL/1μL/2g



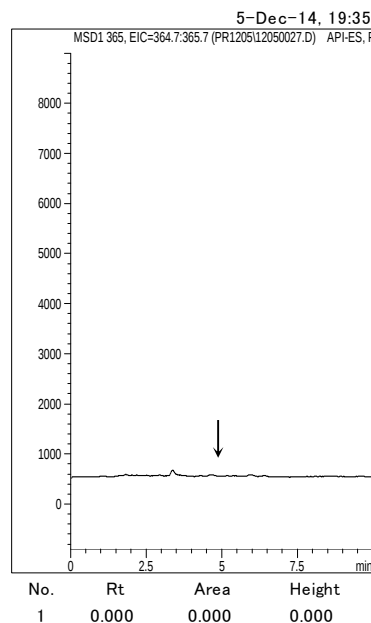
茨城 2回処理 3日後
10mL/1μL/2g



茨城 2回処理 7日後
10mL/1μL/2g

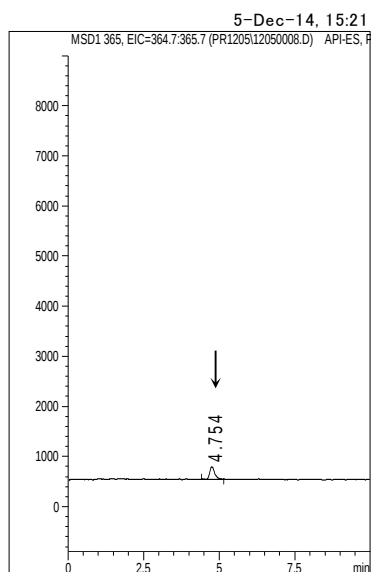


茨城 2回処理 14日後
10mL/1μL/2g



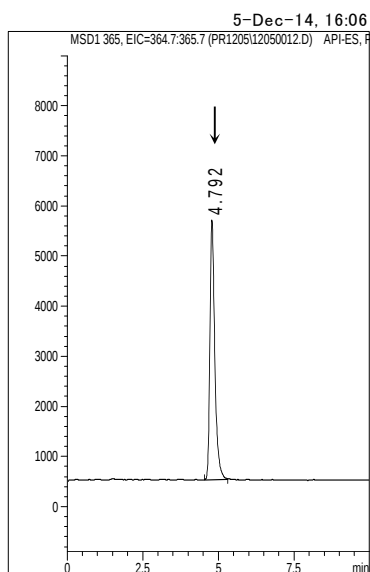
付図-2-2. 果実

標準品 0.002ng

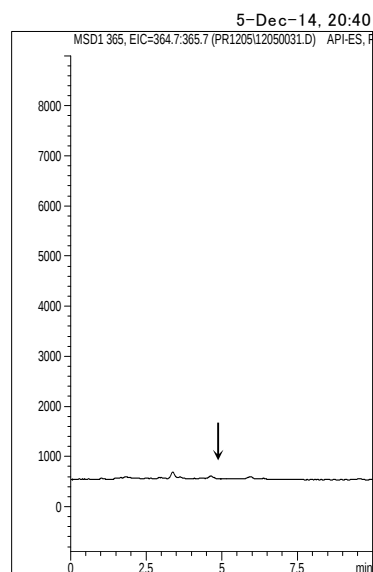


No.	Rt	Area	Height
1	4.754	2984.273	254.226

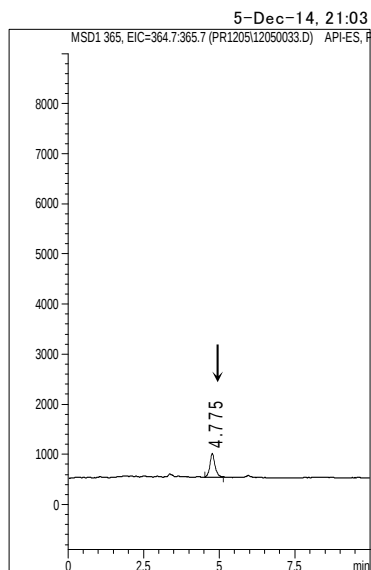
標準品 0.04ng



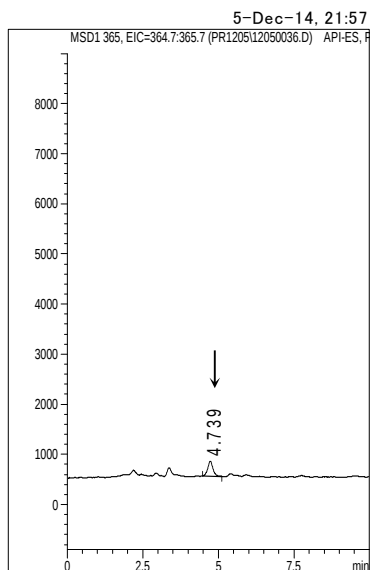
No.	Rt	Area	Height
1	4.792	57988.406	5182.955

茨城 無処理
10mL/1μL/2g

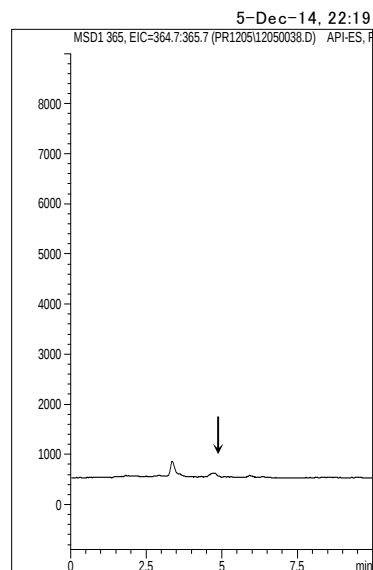
No.	Rt	Area	Height
1	0.000	0.000	0.000

茨城 2 回処理 3 日後
10mL/1μL/2g

No.	Rt	Area	Height
1	4.775	5604.954	479.608

茨城 2 回処理 7 日後
10mL/1μL/2g

No.	Rt	Area	Height
1	4.739	3668.958	299.782

茨城 2 回処理 14 日後
10mL/1μL/2g

No.	Rt	Area	Height
1	0.000	0.000	0.000

平成 26 年度農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業
 残留分析詳細④ 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	O	—	1.73	1.90	20.7	12.5	87	13	4.2
	D	3	1.67		8.34		89	11	3.4
	D	7	1.99		9.93		86	14	4.5
	D	14	2.20		11.0		88	12	4.2
							平均 88:12		平均 4.1
高知	O	—	1.77	1.83	10.6	11.0	83	17	5.2
	H	3	1.82		10.9		84	16	4.8
	H	7	1.88		11.3		83	17	5.2
	H	14	1.85		11.1		82	18	5.2
							平均 83:17		平均 5.1
宮崎	O	—	1.42	1.48	25.6	13.1	84	16	4.4
	D	3	1.40		8.40		85	15	4.0
	D	7	1.42		8.49		84	16	4.4
	D	14	1.66		9.97		84	16	4.9
							平均 84:16		平均 4.4
3ほ場の総平均重量					3ほ場の総重量の平均				
1.74 kg/個					12.2 kg				

D,H:アセタミプリド, エトフェンプロックは3回処理
 ピリダベンは2回処理

注) 高知試料は秋作の試料で分析を実施した。

2. 作物写真の一例

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

資料 2 - 5

平成 26 年度農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業
残留分析詳細① テトラジホン

1. 分析対象物質

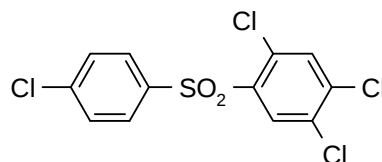
テトラジホン

化学名： 4-chlorophenyl 2,4,5-trichlorophenyl sulfone;
2,4,4',5-tetrachlorodiphenyl sulfone

分子式： $C_{12}H_6Cl_4O_2S$

分子量： 356.0

構造式：



性 状： 無色結晶

融 点： 146 °C

蒸気圧： 9.4×10^{-7} mPa (25°C)

分配係数： $\log Pow = 4.61$

溶解性： 水 0.078 mg/L (20°C)

アセトン 67.3, メタノール 3.46, 酢酸エチル 67.3, ヘキサン 1.52,
ジクロロメタン 297, キシレン 105 (以上 g/L, 20°C)

安定性： 強酸及び強アルカリのいずれにも極めて安定

熱及び光に安定

強い酸化剤に耐性

出 典： The Pesticide Manual (16th Edition)

2. 標準品及び試薬

テトラジホン標準品：純度 99.9% (和光純薬工業製)

トルエン, ヘキサン：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用 (和光純薬工業製)

アセトン, ヘキサン, 酢酸エチル, 塩化ナトリウム, 無水硫酸ナトリウム
：試薬特級 (和光純薬工業製)

陽イオン交換ミニカラム：Bond Elut JR-SCX, 1000mg (アジレント製)

GC/NH₂/SI 3 層ミニカラム：InertSep GC/NH₂/SI, 500mg/400mg/600mg/12mL

(ジールサイエンス製)

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：メトラー・トレド製 MS6001S/02

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

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：μ-ECD

カラム：Rtx-5 Amine (Restek 製),
内径 0.53 mm, 長さ 30 m, 膜厚 1.0 μm

温度：温度 250 °C

検出器 320 °C

注入口 280 °C

ガス流速：キャリアガス He 7.0 mL/min.
メイクアップガス N₂ 60 mL/min.

試料注入量：1 μL

保持時間：約 6.7 min.

5. 検量線の作成

テトラジホン標準品 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。ヘキサンを加えて溶解して 200 mg/L の標準原液を調製した。この原液をヘキサンで希釈して 10 mg/L の標準溶液を調製した。さらにこの溶液をヘキサンで希釈して 0.001, 0.002, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 mg/L の標準溶液を調製した。この 1 μL 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テトラジホ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. 分析操作

6.1. 試料の前処理

試料は各々を縦に 4 分割し, 対角の 2 つを取り合わせた。その 1 組を果実分析用試料とし, 残りの 1 組を果肉分析用試料とした。果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。

各分析用試料をミキサーで均一化し, 調製試料を 4 組作製した。各調製試料は, それぞれ密封して冷凍保存 (−20°C 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 を分液ロートに量りとり, 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 30 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 200 mL に定容した。

6.3. ヘキサン転溶

前項の定容液から 100 mL (試料 10g 相当量) を分取し、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、アセトンを留去した。濃縮液に 10%塩化ナトリウム溶液 80 mL 及びヘキサン 80 mL を加えて 5 分間振とうした。静置分離後、ヘキサンは無水硫酸ナトリウムをのせたる紙 (No.5A) を通過させ、脱水した。水層にはヘキサン 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 5 mL まで減圧濃縮後、ヘキサンで 20mL に定容した。

6.4. 陽イオン交換ミニカラムによる精製

陽イオン交換ミニカラムに酢酸エチル 10 mL を流下して前処理した。前項の定容液から 4 mL (試料 2g 相当量) を分取し、40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮した後、通風で乾固した。残留物を酢酸エチル 5 mL に溶解し、陽イオン交換ミニカラムに移して流下した。さらに酢酸エチル 20 mL を流下し、全溶出液を取り、40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮し、通風で乾固した後、トルエン/アセトニトリル (25:75, v/v) 混液 5mL に溶解した。

6.5. GC/NH₂/SI 3 層ミニカラムによる精製

GC/NH₂/SI 3 層ミニカラムにトルエン/アセトニトリル (25:75, v/v) 混液 20mL を流下して前処理した。前項の溶解液を 3 層ミニカラムに移して流下した。さらに同混液 20mL を流下し、全溶出液を取り、40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮し、通風で乾固した。

6.6. 定量

残留物を適量のヘキサンに溶解した。この溶液を前記条件のガスクロマトグラフに注入してピーク高さを測定し、検量線よりテトラジホンの重量を求め、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	2	10	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	2	10	1	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、宮崎試料の果肉無処理試料*及び果実無処理試料*を用いて、定量限界相当 (0.01mg/kg), 0.25mg/kg 及び 5mg/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、無処理試料は 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。

*平成 25 年度 農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業の試料を使用

8.1 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)		回収率 (%)				平均回収率 (%)	RSDr
<u>テトラジホン</u>								
宮崎	5	95	95	94	94	93	94	0.9
宮崎	0.25	98	97	96	95	92	96	2.4
宮崎	0.01	89	88	88	87	84	87	2.2

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
テトラジホン								
宮崎	5	98	96	96	95	92	95	2.3
宮崎	0.25	93	93	93	93	92	93	0.5
宮崎	0.01	90	89	88	86	85	88	2.4

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 0.1mg/kg 添加試料（クオリティーコントロール試料）を分析した。その結果、下表に示すように問題は認められなかった。

また、2013 年 10 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)
2014/11/28	茨城	100	<0.01
2014/12/3	高知	98	<0.01
2014/12/12	宮崎	91	<0.01
2015/1/6	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)
2014/11/28	茨城	97	<0.01
2014/12/3	高知	100	<0.01
2014/12/12	宮崎	93	<0.01
2015/1/6	宮崎	89	<0.01

回収試料の添加濃度：0.1 mg/kg

*抽出日を記載

10. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料にテトラジホンを添加し、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	174 (14/7/16 - 15/1/6)	84	78	81
高知	0.5	193 (14/6/27 - 15/1/6)	85	83	84
宮崎	0.5	48 (14/11/19 - 15/1/6)	88	87	88

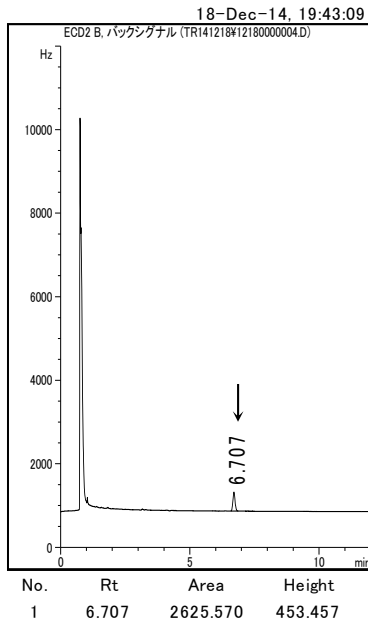
10.2. 果実

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	174 (14/7/16 - 15/1/6)	83	82	82
高知	0.5	193 (14/6/27 - 15/1/6)	85	83	84
宮崎	0.5	48 (14/11/19 - 15/1/6)	90	87	88

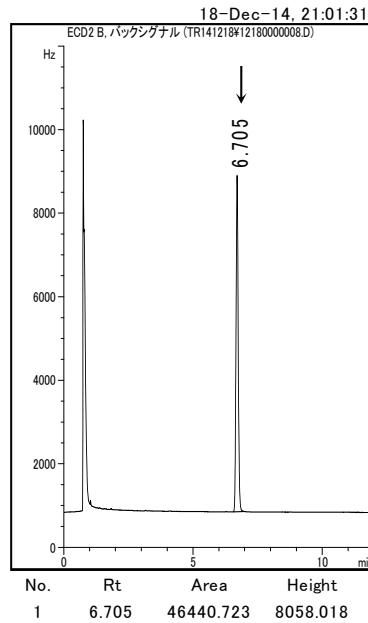
付図-1. テトラジホンのクロマトグラム (代表例)

付図-1-1. 果肉

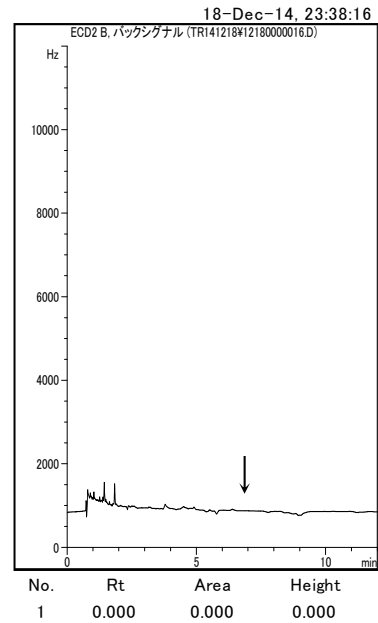
標準品 0.002ng



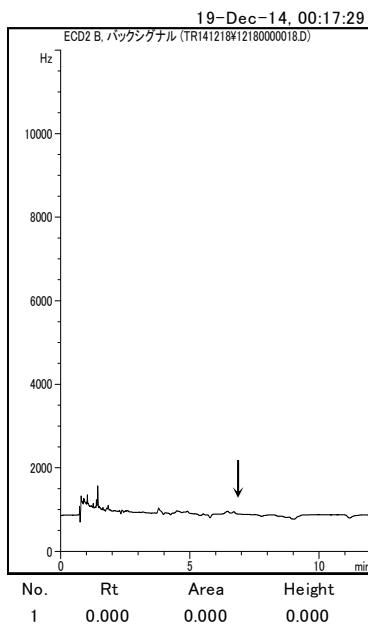
標準品 0.04ng



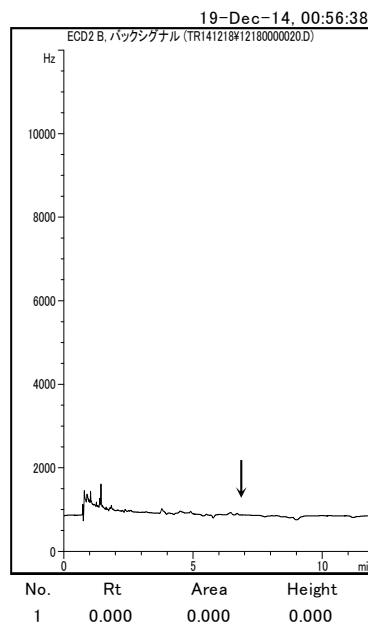
宮崎 無処理
10mL/1μL/2g



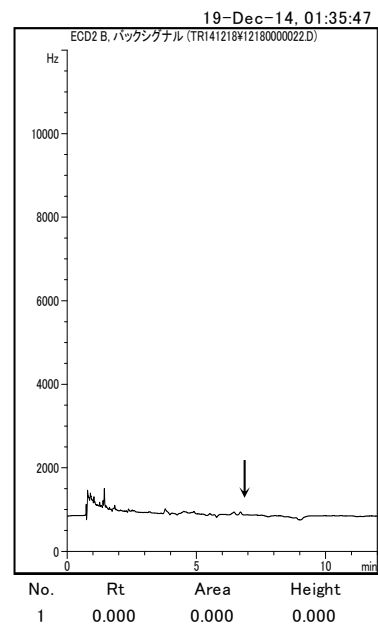
宮崎 2回処理 7日後
10mL/1μL/2g



宮崎 2回処理 14日後
10mL/1μL/2g



宮崎 2回処理 21日後
10mL/1μL/2g

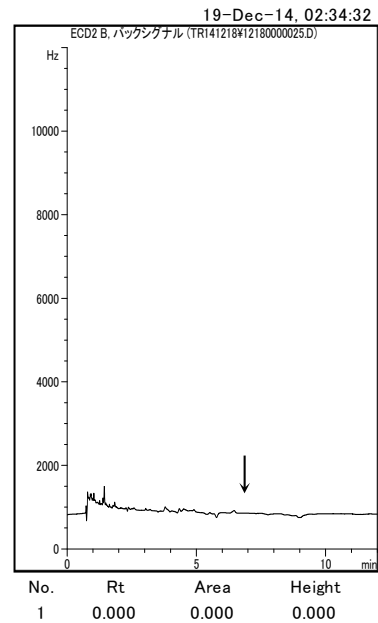
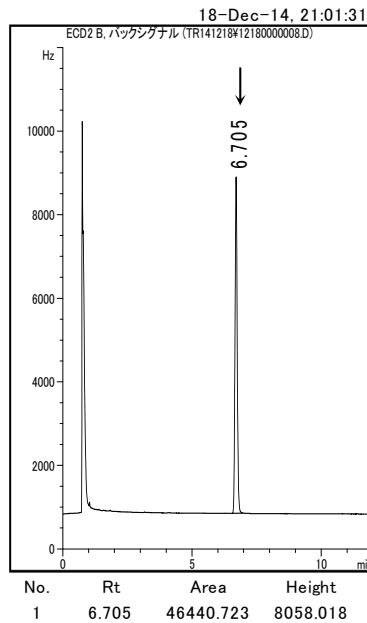
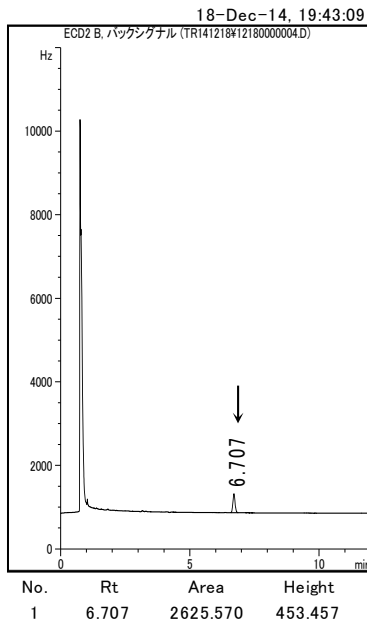


付図-1-2. 果実

標準品 0.002ng

標準品 0.04ng

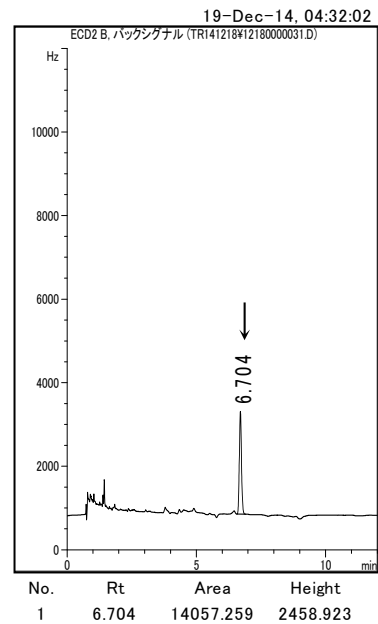
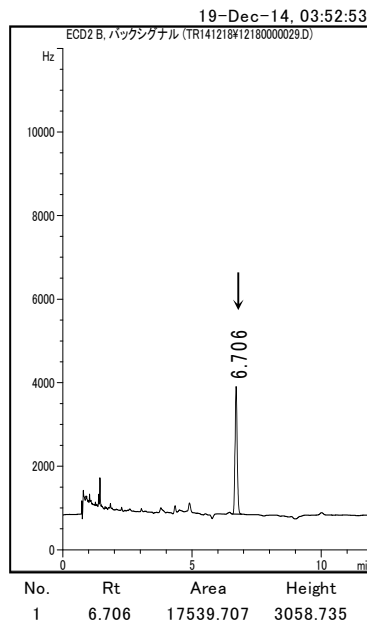
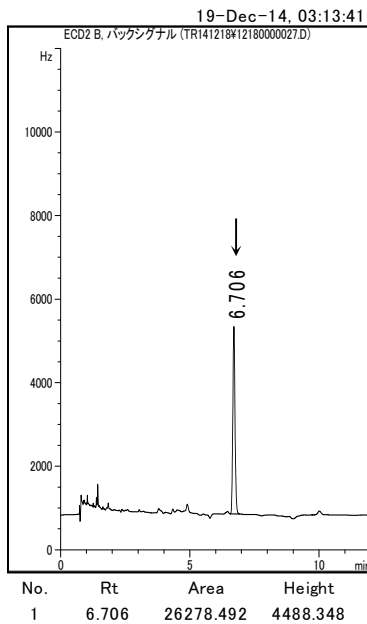
宮崎 無処理
10mL/1 μ L/2g



宮崎 2回処理 7日後
10mL/1 μ L/2g

宮崎 2回処理 14日後
10mL/1 μ L/2g

宮崎 2回処理 21日後
10mL/1 μ L/2g



平成 26 年度農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業
残留分析詳細② ニテンピラム

1. 分析対象物質

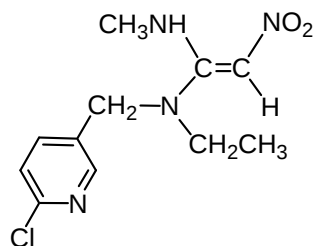
ニテンピラム

化学名： (E)-N-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-ethyl-N'-methyl-2-nitrovinylidenediamine

分子式： $C_{11}H_{15}ClN_4O_2$

分子量： 270.7

構造式：



性 状： 淡黄色の結晶

融 点： 82.0 °C

蒸気圧： 1.1×10^{-6} mPa (20°C)

分配係数： $\log P_{ow} = -0.66$ (25°C, pH 不明)

溶解性： 水 590 g/L 以上 (pH7, 20°C)

ジクロロメタン及びメタノール 1000 以上,

クロロホルム 700, アセトン 290, 酢酸エチル 34.7, トルエン 10.6

キシレン 4.5, ヘキサン 0.00470 (以上 g/L, 20°C)

安定性： 150°Cで安定

pH 3,5,7 で加水分解に対して安定

半減期 69 h (pH 9, 25°C)

出 典： The Pesticide Manual (16th Edition)

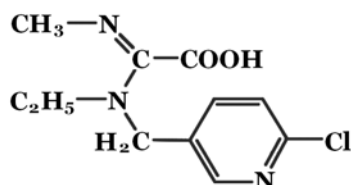
CPMA

化学名： 2-[N-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-ethyl]-amino-2-methyliminoacetic acid

分子式： $C_{11}H_{14}ClN_3O_2$

分子量： 255.70

構造式：



性 状： 白色～褐色，結晶性粉末

出 典： 和光純薬工業(株) 標準品検査成績書及び安全データシートより抜粋

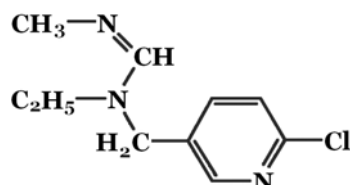
CPMF

化学名： *N*-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-*N*-ethyl-*N'*-methylformamidine

分子式： $C_{10}H_{14}ClN_3$

分子量： 211.69

構造式：



性 状： わずかにうすい黄色～褐色，澄明～ほとんど澄明の液体

出 典： 和光純薬工業(株) 標準品検査成績書及び安全データシートより抜粋

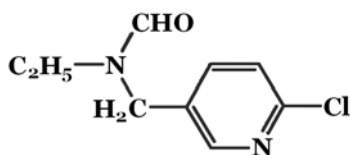
CPF

化学名： *N*-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-*N*-ethylformamide

分子量： 198.65

分子式： $C_9H_{11}ClN_2O$

構造式：



性 状： 無色～黄色，澄明の液体

出 典： 和光純薬工業(株) 標準品検査成績書及び安全データシートより抜粋

2. 標準品及び試薬

ニテンピラム標準品：純度 99.9% (関東化学製)

CPMA 標準品：純度 98.0% (和光純薬工業製)

CPMF 標準品：純度 96.0% (和光純薬工業製)

CPF 標準品：純度 99.4% (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)

アセトニトリル，メタノール：高速液体クロマトグラフ用 (和光純薬工業製)

アセトン，ヘキサン，酢酸エチル，酢酸アンモニウム，ジエチレングリコール，
トリエチルアミン，ギ酸：試薬特級 (和光純薬工業製)

陽イオン交換ミニカラム：InertSep SCX, 1g/6mL (ジーエルサイエンス製)

多孔性ケイソウ土カラム：InertSep K-solute, 20mL (ジーエルサイエンス製)

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

弱塩基性陰イオン交換ミニカラム：Bond Elut JR-NH2, 1000mg (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：メトラー・トレド製 MS6001S/02

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

定温乾燥器：東京理化工機製・WFO-450ND

<ニテンピラム>

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

データ処理装置：アジレント・テクノロジー製 Chem Station

<CPF>

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 6120

データ処理装置：アジレント・テクノロジー製 Open LAB

4. 測定機器の測定条件

4.1. 液体クロマトグラフ・質量分析計の測定条件 (ニテンピラム)

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 (90:10, v/v)
流速：0.2 mL/min.
カラム温度：40 $^{\circ}$ C
試料注入量：1 μ L
保持時間：約 4.2 min.

4.1.2. 質量分析計

イオン化法：エレクトロスプレー(ESI), 正イオンモード
乾燥ガス温度：350 $^{\circ}$ C
乾燥ガス流量：10 L/min.
ネプライザー圧力：35 psi
フラグメンター電圧：60 V
キャピラリー電圧：4000 V
採取イオン：SIM m/z 271.0

4.2. 液体クロマトグラフ・質量分析計の測定条件 (CPF)

4.2.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム：Inertsil ph-3 (ジーエルサイエンス製),
内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3 μ m
溶離液：0.1%ギ酸溶液/アセトニトリル (75:25, v/v)
流速：0.2 mL/min.
カラム温度：40 $^{\circ}$ C

試料注入量： 4 μ L
 保持時間： 約 6.7 min.

4.2.2. 質量分析計

イオン化法： エレクトロスプレー(ESI), 正イオンモード
 乾燥ガス温度： 350 $^{\circ}$ 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： 120 V
 キャピラリー電圧： 3000 V
 採取イオン： SIM m/z 199.0

5. 検量線の作成

5.1. ニテンピラム

ニテンピラム標準品 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。この原液をアセトニトリルで希釈して 10 mg/L の標準溶液を調製した。さらにこの溶液をアセトニトリル/水 (10:90, v/v) 混液で希釈して 0.0025, 0.005, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1 mg/L の標準溶液を調製した。この 1 μ L を前記条件の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入し, データ処理装置を用いてニテンピラム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。

5.2. CPF

CPF 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 (20:80, v/v) 混液で希釈して 10 mg/L の標準溶液を調製した。さらにこの溶液をアセトニトリル/水 (20:80, v/v) 混液で希釈して 0.001, 0.002, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 mg/L の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 CPF 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. 試料の前処理

試料は各々を縦に 4 分割し, 対角の 2 つを取り合わせた。その 1 組を果実分析用試料とし, 残りの 1 組を果肉分析用試料とした。果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。

各分析用試料をミキサーで均一化し, 調製試料を 4 組作製した。各調製試料は, それぞれ密封して冷凍保存 (-20° C 以下) した。分析時にその 1 組を取り, 分析に供した。

6.2. ニテンピラム

6.2.1. 抽出

均一化した試料 20 g を分液ロートに量りとり, 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 30 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 200 mL に定容した。

6.2.2. 酢酸エチル/ヘキサン洗浄

前項の定容液から 50 mL (試料 5g 相当量) を分取し、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、アセトンを留去した。濃縮液に水 50mL 及び酢酸エチル/ヘキサン (50:50, v/v) 混液 30 mL を加え 1 分間振とうし、静置分離後、水層を分取した。再び水層に酢酸エチル/ヘキサン (50:50, v/v) 混液 30 mL を加え同様の操作をくり返した。

6.2.3. 陽イオン交換ミニカラムによる精製

陽イオン交換ミニカラムにメタノール 5 mL 及び水 10mL を流下し前処理をした。前項の水層を陽イオン交換ミニカラムに移して流下した後、アセトン 5mL 及びメタノール 20 mL を流下してこれらの流出液を捨てた。次に 1 %酢酸アンモニウム含有メタノール溶液 10mL を流下し、溶出液を取り、40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮し、通風で乾固した。

6.2.4. 定量

残留物を適量のアセトニトリル/水 (10:90, 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測定し、検量線よりニテンピラムの重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

6.3. CPF

6.3.1. 抽出

均一化した試料 20 g を分液ロートに量りとり、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 30 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 200 mL に定容した。

6.3.2. 誘導体化 (CPMA から CPMF へ変換)

前項の定容液から 25 mL (試料 2.5g 相当量) をナス型フラスコに分取し、密栓して 70℃の定温乾燥器中で 90 分間加温した。放冷後、40℃以下の水浴中で約 5mL まで減圧濃縮した。

6.3.2. 誘導体化 (CPMF から CPF へ変換)

前項の濃縮液にトリエチルアミン 1 mL を加え、密栓して 50℃の定温乾燥器中で 30 分間加温した。

6.3.3. 多孔性ケイソウ土カラムによる精製

放冷後、前項の反応液を多孔性ケイソウ土カラムに移し入れ、10 分間放置後、ジエチルエーテル 100 mL を流下し、溶出液を取った。溶出液に 2%ジエチレングリコール含有アセトン溶液 0.1mL を加えた後、40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮し、通風で乾固した。残留物はアセトン 5mL に溶解した。

6.3.4. グラファイトカーボンミニカラムによる精製

グラファイトカーボンミニカラムにアセトン 10 mL を流下し前処理した。前項の溶解液をグラファイトカーボンミニカラムに移して流下した後、さらにアセトン 10mL を流下し、全溶出液を取った。溶出液に 2%ジエチレングリコール含有アセトン溶液 0.1mL を加えた後、40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮し、通風で乾固した。残留物はアセトン/ヘキサン (5 : 95, v/v) 混液 5mL に溶解した。

6.3.5. NH₂ ミニカラムによる精製

NH₂ ミニカラムにヘキサン 10 mL を流下し前処理した。前項の溶解液を NH₂ ミニカラムに移して流下した後、アセトン/ヘキサン (5 : 95, v/v) 混液 10mL を流下し、これらの流出液を捨てた。次にアセトン/ヘキサン (10 : 90, v/v) 混液 20mL を流下し、溶出液を取り、2%ジエチレングリコール含有アセトン溶液 0.1mL を加えた後、40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮し、通風で乾固した。

6.3.6. 定量

残留物を適量のアセトニトリル/水 (20:80, 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測定し、検量線より CPF の重量を求め、換算係数*1.36 を乗じ、試料中のニテンピラム換算の CPMA 及び CPMF の含量としての残留濃度を算出した。

* 換算係数 (ニテンピラム分子量 270.7 / CPF 分子量 198.7)

7. 定量限界値 (LOQ) 及び検出限界値 (LOD)**7.1. ニテンピラム**

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	5	4	1	0.004
最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (mg/kg)
0.0025	5	4	1	0.002

7.2. CPF

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)
0.008	2.5	4	4	0.004
最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (mg/kg)
0.004	2.5	4	4	0.002

8. 回収率

分析法確認のため、宮崎試料の果肉無処理試料*及び果実無処理試料*を用いて、定量限界相当（ニテンピラム 0.004 mg/kg, CPMA 0.005 mg/kg, CPMF 0.004 mg/kg）、（ニテンピラム 0.25 mg/kg, CPMA 0.3 mg/kg, CPMF 0.25 mg/kg）及び（ニテンピラム 5 mg/kg, CPMA 6 mg/kg, CPMF 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、無処理試料は 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。

*平成 25 年度 農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業の試料を使用

8.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
ニテンピラム								
宮崎	5	96	94	93	92	87	92	3.7
宮崎	0.25	107	104	102	102	97	102	3.6
宮崎	0.004	107	106	104	104	103	105	1.6
CPMA								
宮崎	6	80	80	80	80	80	80	0.0
宮崎	0.3	79	79	77	77	74	77	2.7
宮崎	0.005	98	97	96	96	86	95	5.1
CPMF								
宮崎	5	85	83	83	83	81	83	1.7
宮崎	0.25	81	80	77	77	75	78	3.1
宮崎	0.004	103	97	85	80	73	88	14.0

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
ニテンピラム								
宮崎	5	99	97	97	96	92	96	2.7
宮崎	0.25	105	104	103	100	100	102	2.3
宮崎	0.004	120	107	107	103	102	108	6.7
CPMA								
宮崎	6	88	87	87	86	85	87	1.3
宮崎	0.3	84	83	76	76	76	79	5.2
宮崎	0.005	97	97	95	95	89	95	3.5
CPMF								
宮崎	5	89	89	87	86	85	87	2.1
宮崎	0.25	82	81	81	81	80	81	0.9
宮崎	0.004	112	108	106	103	101	106	4.1

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ニテンピラム 0.04 mg/kg, CPMA 0.05mg/kg, CPMF 0.04mg/kg 添加試料（クオリティーコントロール試料）を分析した。その結果、下表に示すように問題は認められなかった。

また、2013 年 10 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)
<u>ニテンピラム</u>			
2014/12/26	茨城	72	<0.004
2015/1/6	茨城	84	<0.004
2014/12/27	高知	74	<0.004
2015/1/6	高知	88	<0.004
2014/12/27	宮崎	76	<0.004
<u>CPMA</u>			
2014/12/26	茨城	73	<0.004
2014/12/27	高知	71	<0.004
2015/1/7	高知	74	<0.004
2014/12/27	宮崎	73	<0.004
<u>CPMF</u>			
2014/12/26	茨城	70	<0.004
2014/12/27	高知	75	<0.004
2015/1/7	高知	81	<0.004
2014/12/27	宮崎	76	<0.004

回収試料の添加濃度：ニテンピラム 0.04 mg/kg, CPMA 0.05mg/kg, CPMF 0.04mg/kg

*抽出日を記載

（CPMA 及び CPMF の無処理区の分析値は CPF としての値）

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)
<u>ニテンピラム</u>			
2014/12/26	茨城	73	<0.004
2015/1/6	茨城	81	<0.004
2014/12/27	高知	73	<0.004
2015/1/6	高知	86	<0.004
2014/12/27	宮崎	79	<0.004
<u>CPMA</u>			
2014/12/26	茨城	77	<0.004
2014/12/27	高知	75	<0.004
2015/1/7	高知	82	<0.004
2014/12/27	宮崎	73	<0.004
<u>CPMF</u>			
2014/12/26	茨城	82	<0.004
2014/12/27	高知	81	<0.004
2015/1/7	高知	85	<0.004
2014/12/27	宮崎	75	<0.004

回収試料の添加濃度：ニテンピラム 0.04 mg/kg, CPMA 0.05mg/kg, CPMF 0.04mg/kg

*抽出日を記載

(CPMA 及び CPMF の無処理区の分析値は CPF としての値)

10. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料にニテンピラム, CPMA 及び CPMF を各々添加し, 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。保存安定性試験の結果を示す。

10.1. 果肉

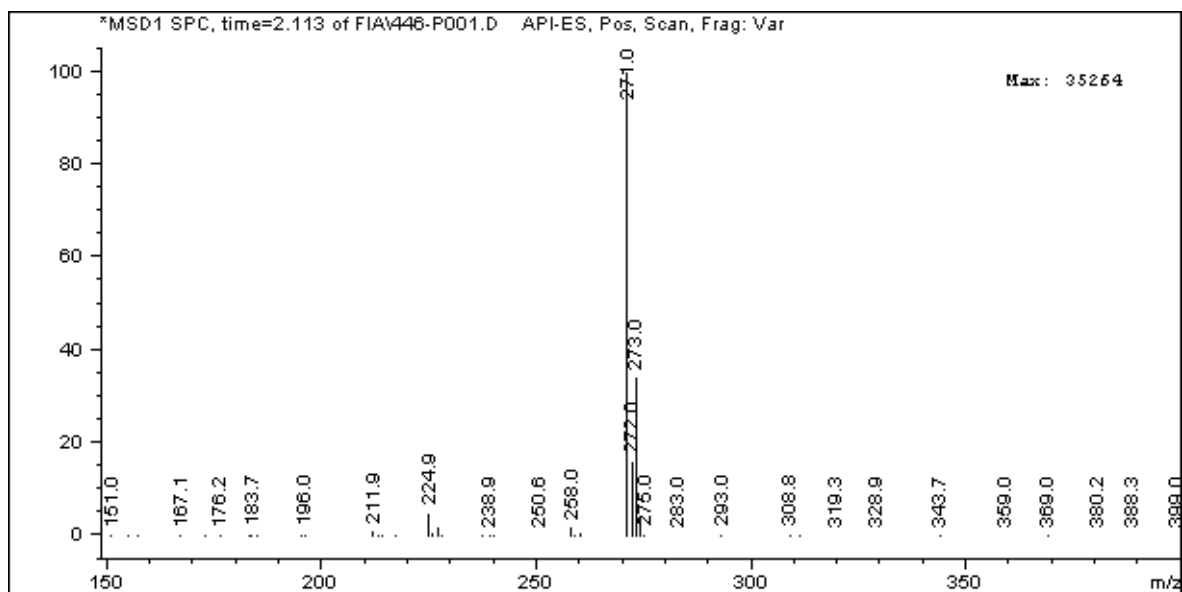
	圃場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
ニテンピラム	茨城	0.5	174 (14/7/16 - 15/1/6)	80	78
	高知	0.5	193 (14/6/27 - 15/1/6)	90	85
	宮崎	0.5	48 (14/11/19 - 15/1/6)	96	92
CPMA	茨城	0.5	175 (14/7/16 - 15/1/7)	75	75
	高知	0.5	194 (14/6/27 - 15/1/7)	76	73
	宮崎	0.5	49 (14/11/19 - 15/1/7)	72	71
CPMF	茨城	0.5	175 (14/7/16 - 15/1/7)	82	81
	高知	0.5	194 (14/6/27 - 15/1/7)	72	71
	宮崎	0.5	49 (14/11/19 - 15/1/7)	74	71

10.2. 果実

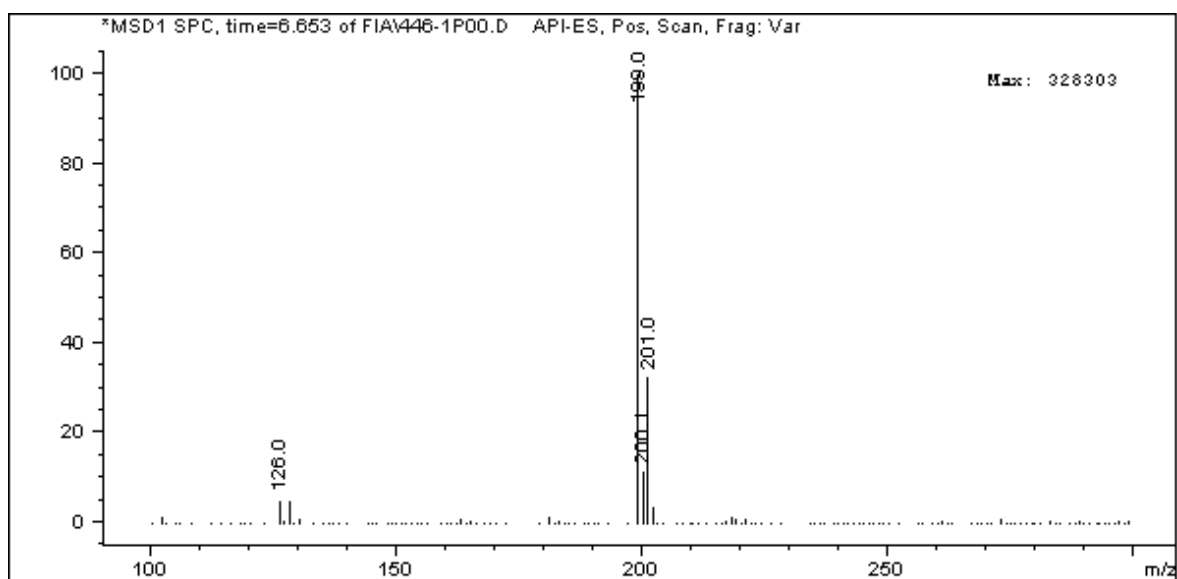
	圃場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
ニテンピラム	茨城	0.5	174 (14/7/16 - 15/1/6)	77	75
	高知	0.5	193 (14/6/27 - 15/1/6)	73	72
	宮崎	0.5	48 (14/11/19 - 15/1/6)	90	84
CPMA	茨城	0.5	175 (14/7/16 - 15/1/7)	80	77
	高知	0.5	194 (14/6/27 - 15/1/7)	78	72
	宮崎	0.5	49 (14/11/19 - 15/1/7)	72	71
CPMF	茨城	0.5	175 (14/7/16 - 15/1/7)	82	77
	高知	0.5	194 (14/6/27 - 15/1/7)	71	70
	宮崎	0.5	49 (14/11/19 - 15/1/7)	80	76

付図-1. マススペクトル

ニテンピラムのマススペクトルの一例 (正イオンモード)



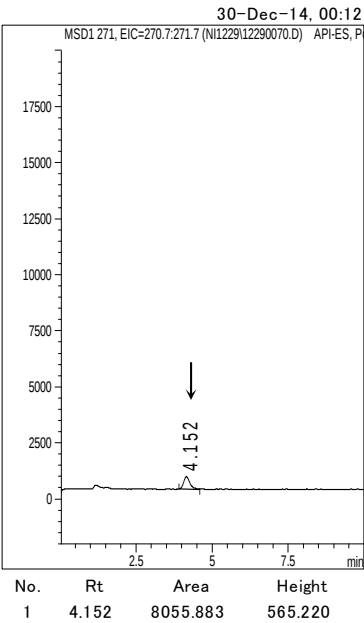
CPF のマススペクトルの一例 (正イオンモード)



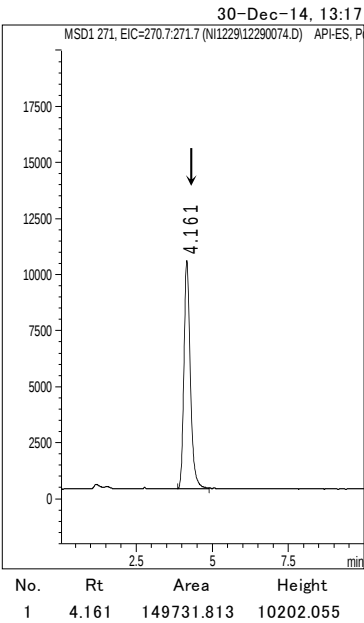
付図-2. ニテンピラムのクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. 果肉

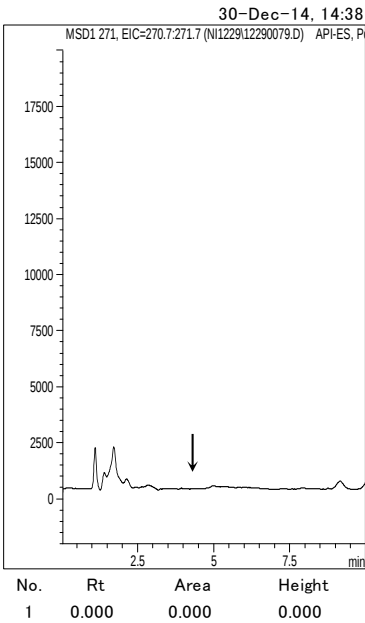
標準品 0.005ng



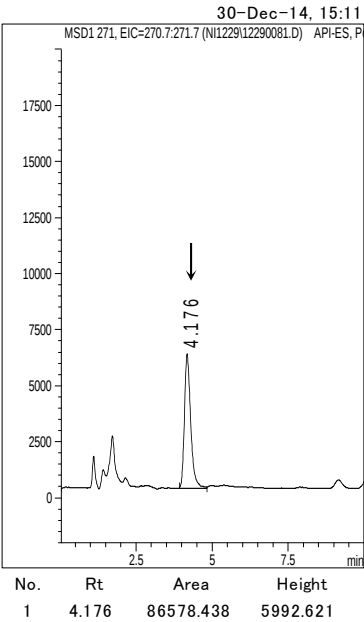
標準品 0.1ng



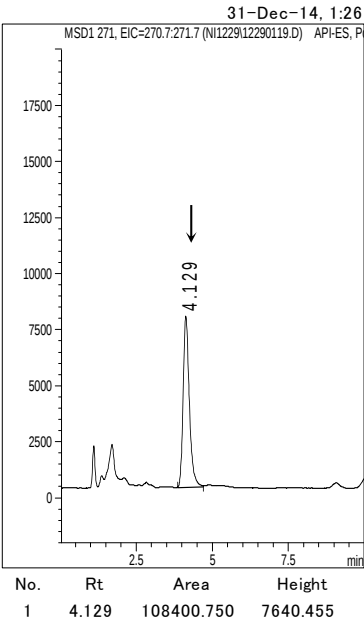
宮崎 無処理
4mL/1μL/5g



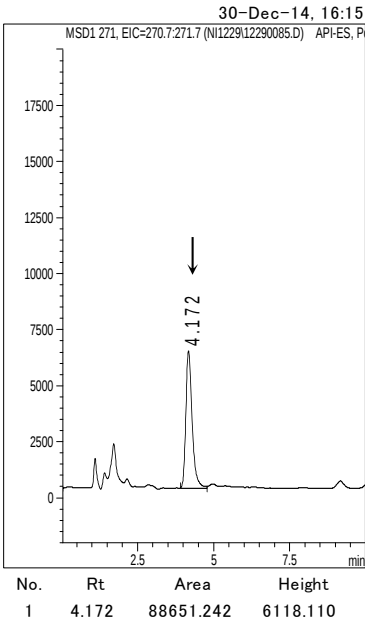
宮崎 3 回処理 7 日後
4mL/1μL/5g



宮崎 3 回処理 14 日後
4mL/1μL/5g

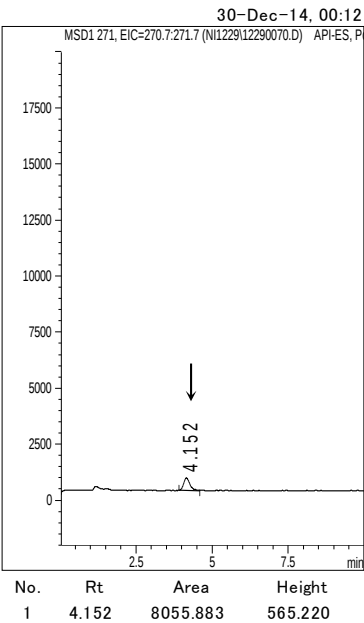


宮崎 3 回処理 21 日後
4mL/1μL/5g

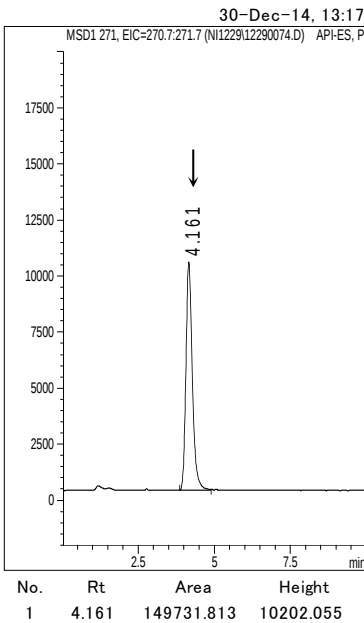


付図-2.2.果実

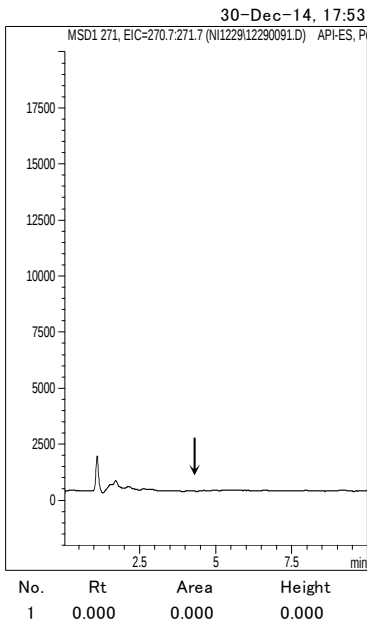
標準品 0.005ng



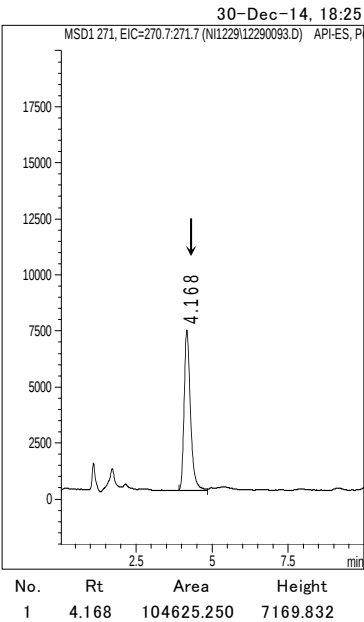
標準品 0.1ng



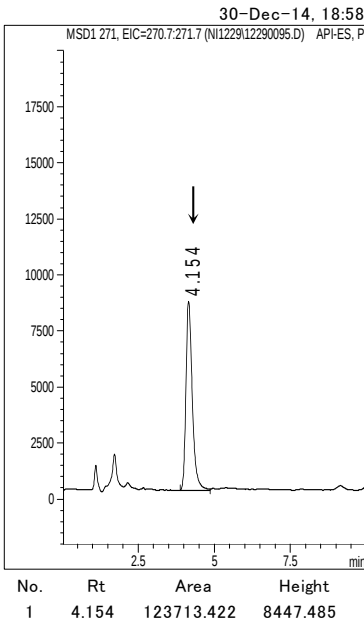
宮崎 無処理
4mL/1μL/5g



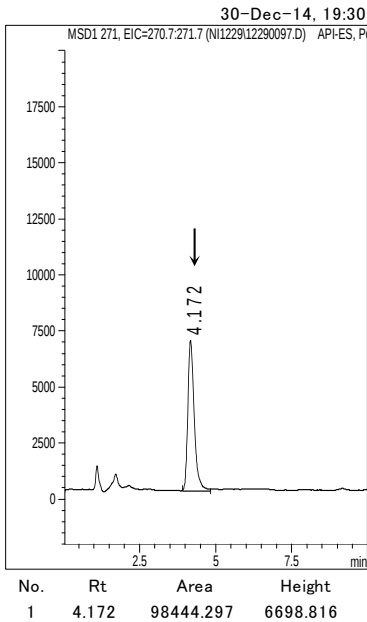
宮崎 3回処理 7日後
4mL/1μL/5g



宮崎 3回処理 14日後
4mL/1μL/5g



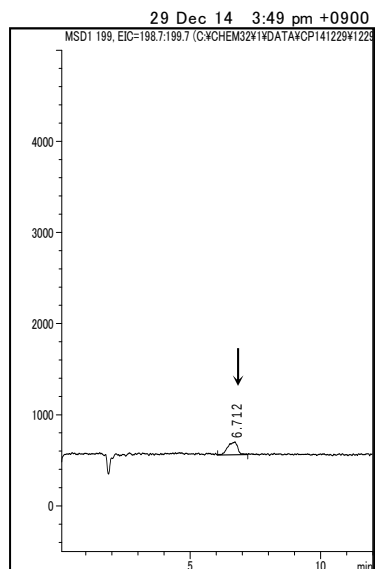
宮崎 3回処理 21日後
4mL/1μL/5g



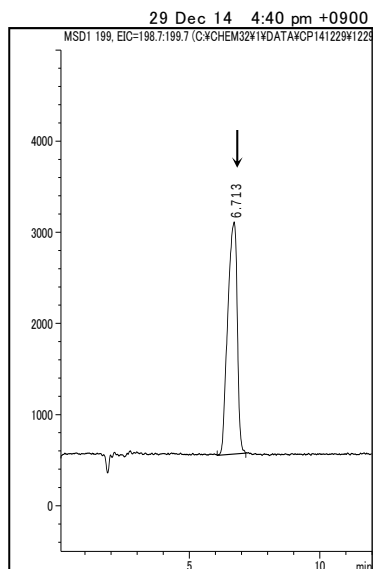
付図-3. CPF のクロマトグラム (代表例)

付図-3-1. 果肉

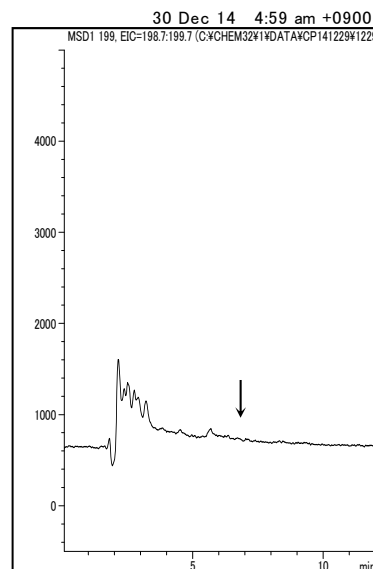
標準品 0.008ng



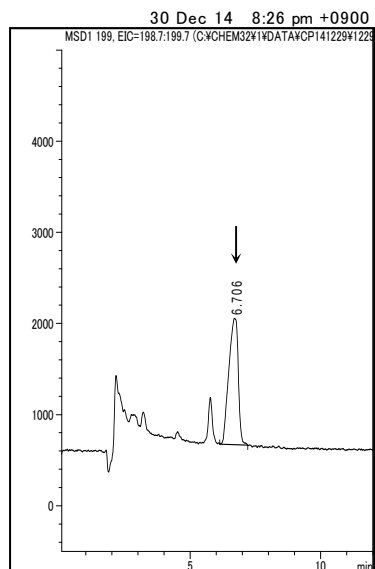
標準品 0.16ng



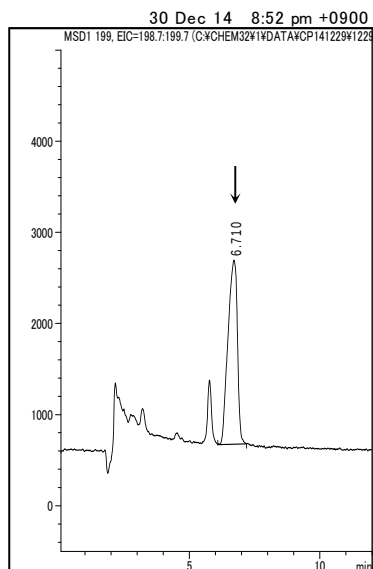
宮崎 無処理
4mL/4μL/2.5g



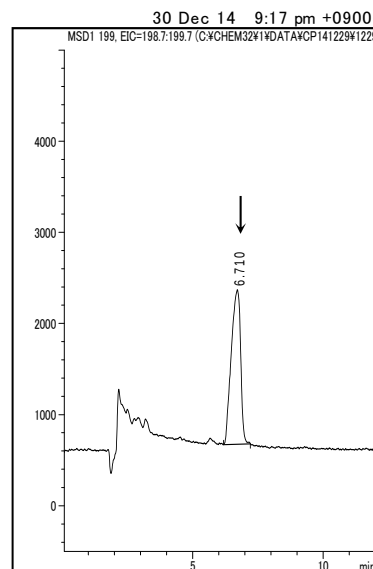
宮崎 3 回処理 7 日後
8mL/4μL/2.5g



宮崎 3 回処理 14 日後
8mL/4μL/2.5g



宮崎 3 回処理 21 日後
8mL/4μL/2.5g

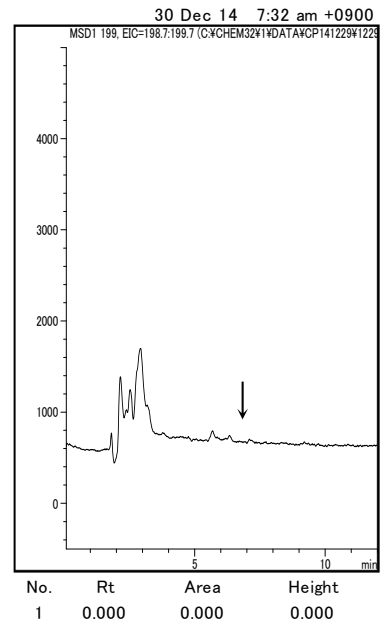
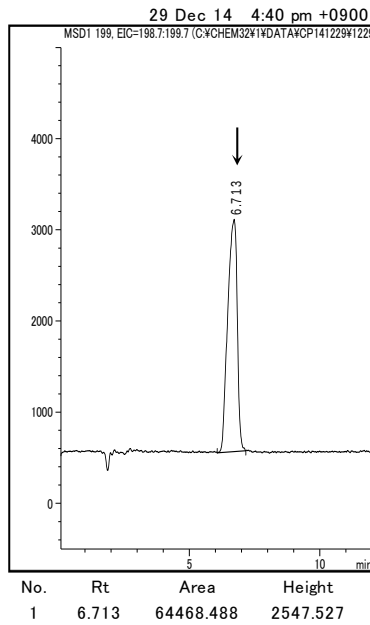
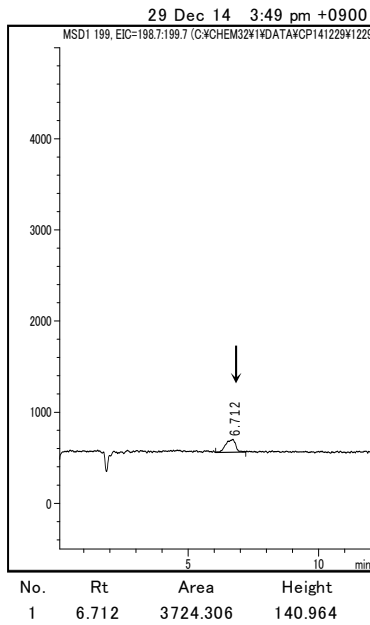


付図-3-2. 果実

標準品 0.008ng

標準品 0.16ng

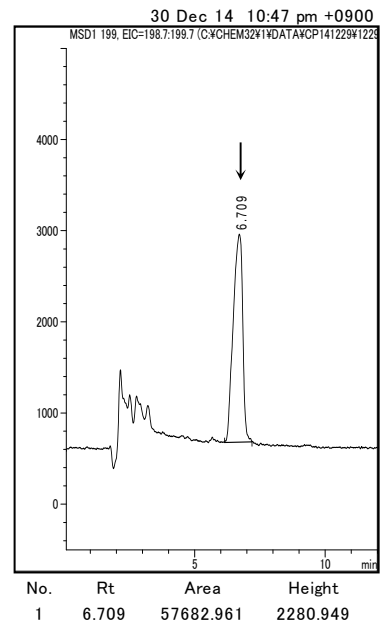
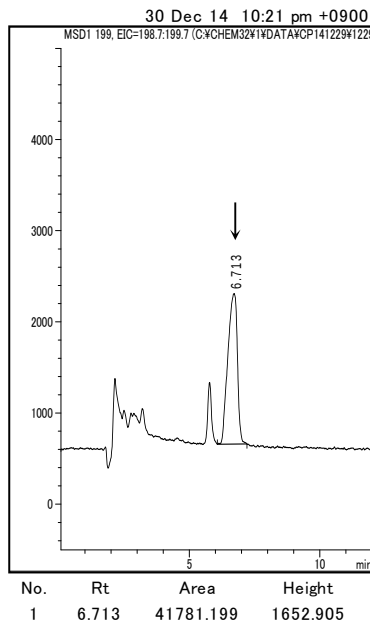
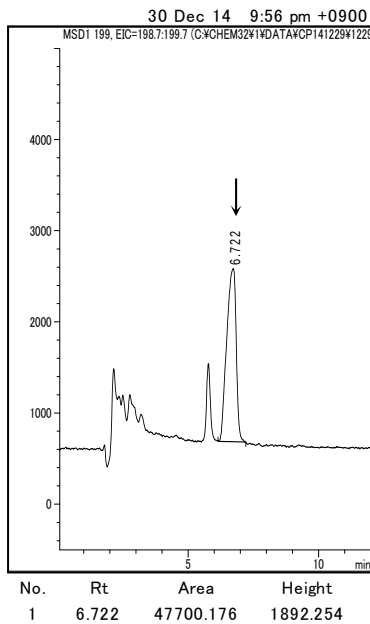
宮崎 無処理
4mL/4 μ L/2.5g



宮崎 3回処理 7日後
8mL/4 μ L/2.5g

宮崎 3回処理 14日後
12mL/4 μ L/2.5g

宮崎 3回処理 21日後
8mL/4 μ L/2.5g



平成 26 年度農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業
 残留分析詳細③ 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	—	1.73	1.95	20.7	12.8	87	13	4.2
	D・E	7	1.99		9.93		86	14	4.5
	D・E	14	2.20		11.0		88	12	4.2
	D・E	21	1.88		9.38		89	11	3.7
							平均 88:12		平均 4.2
高知	0	—	1.75	1.79	26.3	13.3	85	15	4.5
	D・E	7	1.75		8.76		88	12	3.3
	D・E	14	1.76		8.79		88	12	3.8
	D・E	21	1.89		9.45		86	14	3.2
							平均 87:13		平均 3.7
宮崎	0	—	1.42	1.51	25.6	13.3	84	16	4.4
	D・E	7	1.42		8.49		84	16	4.4
	D・E	14	1.66		9.97		84	16	4.9
	D・E	21	1.54		9.26		84	16	5.0
							平均 84:16		平均 4.7
3ほ場の総平均重量					3ほ場の総重量の平均				
1.75 kg/個					13.1 kg				

D・E: テトラジホンは2回処理

ニテンピラムは3回処理

2. 作物写真

2.1. 茨城



茨城 無処理



茨城 処理 7 日後



茨城 処理 14 日後



茨城 処理 21 後

2.2. 高知



高知 無処理



高知 処理 7 日後



高知 処理 14 日後



高知 処理 21 日後

2.3 宮崎



宮崎 無処理



宮崎 処理 7 日後



宮崎 処理 14 日後



宮崎 処理 21 日後

資料 2 - 6

平成 26 年度農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業
残留分析詳細① トリフルミゾール

1. 分析対象物質

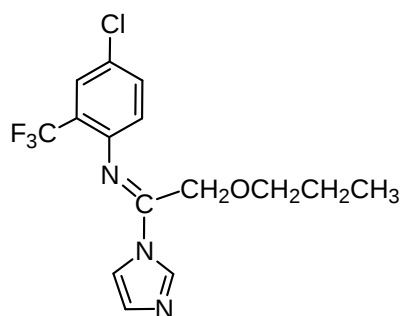
トリフルミゾール

化学名 : (E)-4-chloro- α,α,α -trifluoro-N-(1-imidazol-1-yl-2-propoxyethylidene)-o-toluidine

分子式 : $C_{15}H_{15}ClF_3N_3O$

分子量 : 345.7

構造式 :



性 状 : 無色結晶

融 点 : 62.4 °C

蒸気圧 : 0.191 mPa (25°C)

分配係数 : $\log P_{ow} = 5.06$ (pH6.5), 5.10 (pH7), 5.12 (pH8)

溶解性 : 水 0.0102 g/L (pH7, 20°C)

クロロホルム 2220, ヘキサン 17.6, キシレン 639, アセトン 1440,
メタノール 496 (以上 g/L, 20°C)

安定性 : 強アルカリ性及び酸性媒体中で不安定

水中光分解性半減期 : 29h

出 典 : The Pesticide Manual (16th Edition)

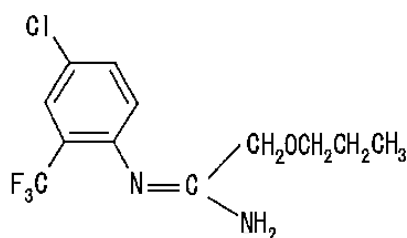
トリフルミゾール代謝物

化学名 : (E)-4-chloro- α,α,α -trifluoro-N-(1-amino-2-propoxyethylidene)-o-toluidine

分子量 : 294.70

分子式 : $C_{12}H_{14}ClF_3N_2O$

構造式 :



性 状： ほとんど白色の結晶性粉末
出 典： 関東化学 (株)の標準品成績証明書より抜粋

2. 標準品及び試薬

トリフルミゾール標準品：純度 99.6% (関東化学製)
トリフルミゾール代謝物標準品：純度 100% (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)
メタノール、アセトン、ヘキサン、硫酸アンモニウム、リン酸二水素カリウム、
リン酸水素二ナトリウム：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, 20mL (ジエールサイエンス製)
グラファイトカーボンミニカラム：SUPELCO Supelclean ENVI-Carb, 500mg/6mL
(シグマ・アルドリッチ製)
NH₂ ミニカラム：InertSep Slim-J NH₂, 1000mg (ジエールサイエンス製)

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：メトラー・トレド製 MS6001S/02
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
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. 液体クロマトグラフ・質量分析計の操作条件

4.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム： Inertsil ODS-3 (ジエールサイエンス製),
内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒径 4 μm
溶離液： 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液/メタノール (25:75, v/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 7.8 min. (トリフルミゾール)
約 3.8 min. (トリフルミゾール代謝物)

4.2. 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：	40 V (トリフルミゾール) 80 V (トリフルミゾール代謝物)
キャピラリー電圧：	3000 V
採取イオン：	SIM m/z 346.1 (トリフルミゾール) SIM m/z 295.1 (トリフルミゾール代謝物)

5. 検量線の作成

トリフルミゾール標準品 20.0 mg (純度換算相当量) 及びトリフルミゾール代謝物標準品 20.0mg を精秤し、各々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。この原液を等量ずつ混合し、メタノールで希釈して 10 mg/L の混合標準溶液を調製した、さらにこの溶液をメタノールで希釈して 0.0025, 0.005, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1 mg/L の混合標準溶液を調製した。この 2 µL を前記条件の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入し、データ処理装置を用いてトリフルミゾール及びトリフルミゾール代謝物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. 分析操作

6.1. 試料の前処理

試料は各々を縦に 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。

2 組の果実分析用試料のうち 1 組の全量をミキサーで均一化した。果肉分析用試料についても果実と同様に調製試料を作製した。各調製試料は 2 組作製し、それぞれ密封して冷凍保存 (−20°C 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 を分液ロートに量りとり、リン酸緩衝溶液*20mL 及びメタノール 100 mL を加えて 30 分間振とう抽出した。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣をメタノール 30 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で 200 mL に定容した。定容液から 50 mL (試料 5g 相当量) を分取し、40°C 以下の水浴中で減圧濃縮し、メタノールを留去した。

*0.5 mol/L リン酸二水素カリウム溶液 55.4 mL と 0.5 mol/L リン酸水素二ナトリウム溶液 48.2mL を合わせて水を加えて 1 L とした。

6.3. 多孔性ケイソウ土カラムによるヘキサン転溶

前項の濃縮液に硫酸アンモニウム 1g を加え、硫酸アンモニウムを溶解した後、多孔性ケイソウ土カラムに移して流下し、10 分間静置した。次にヘキサン 150mL を流下し、溶出液を取り、40℃以下の水浴中で約 2 mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。残留物はアセトン 5 mL に溶解した。

6.4. グラファイトカーボンミニカラムによる精製

グラファイトカーボンミニカラムにアセトン 10 mL を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に移して流下した後、さらにアセトン 15 mL を流下し、全溶出液を取り、40℃以下の水浴中で約 2 mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。残留物はヘキサン 5mL に溶解した。

6.5. NH₂ ミニカラムによる精製

NH₂ ミニカラムにヘキサン 10mL を流下して前処理した。前項の溶解液を NH₂ ミニカラムに移して流下し、さらにヘキサン 20mL を流下し、これらの流出液を捨てた。次にアセトン/ヘキサン（10:90, v/v）混液 25 mL を流下し、溶出液を取り、40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。

6.6. 定量

残留物を適量のメタノールに溶解し、必要に応じてメタノールで希釈した。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、検量線よりトリフルミゾール及びトリフルミゾール代謝物の重量を求め、試料中の各残留濃度を算出した。

7. 定量限界値（LOQ）及び検出限界値（LOD）

トリフルミゾール，トリフルミゾール代謝物

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)
0.01	5	4	2	0.004
最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (mg/kg)
0.005	5	4	2	0.002

8. 回収率

分析法確認のため、宮崎試料の果肉無処理試料*及び果実無処理試料*を用いて、定量限界相当 (0.004mg/kg), 0.25mg/kg 及び 5mg/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、無処理試料は 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。

*平成 25 年度 農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業の試料を使用

8.1 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
トリフルミゾール								
宮崎	5	95	92	92	91	90	92	2.0
宮崎	0.25	92	91	90	89	89	90	1.4
宮崎	0.004	92	87	85	78	72	83	9.5
トリフルミゾール代謝物								
宮崎	5	97	95	92	89	86	92	4.8
宮崎	0.25	93	92	89	88	86	90	3.2
宮崎	0.004	117	103	91	86	79	95	15.8

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
<u>トリフルミゾール</u>								
宮崎	5	83	83	81	81	78	81	2.5
宮崎	0.25	76	75	74	74	72	74	2.0
宮崎	0.004	100	98	91	83	82	91	9.1
<u>トリフルミゾール代謝物</u>								
宮崎	5	94	94	88	86	85	89	4.9
宮崎	0.25	97	96	96	91	89	94	3.8
宮崎	0.004	103	99	96	96	93	97	3.9

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トリフルミゾール 0.04 mg/kg, トリフルミゾール代謝物 0.04 mg/L 添加試料（クオリティーコントロール試料）を分析した。その結果、下表に示すように問題は認められなかった。

また、2013 年 10 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

分析成分	分析日*	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(mg/kg)
<u>トリフルミゾール</u>				
	2014/10/2	茨城	94	<0.004
	2014/10/10	茨城	92	<0.004
	2014/10/6	高知	89	<0.004
	2014/10/10	高知	79	<0.004
	2014/12/12	宮崎	75	<0.004
	2014/12/17	宮崎	97	<0.004
<u>トリフルミゾール 代謝物</u>				
	2014/10/2	茨城	87	<0.004
	2014/10/10	茨城	81	<0.004
	2014/10/6	高知	81	<0.004
	2014/10/10	高知	72	<0.004
	2014/12/12	宮崎	83	<0.004
	2014/12/17	宮崎	74	<0.004

回収試料の添加濃度：0.04 mg/kg

*抽出日を記載

9.2. 果実

分析成分	分析日*	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値(mg/kg)
<u>トリフルミゾール</u>				
	2014/10/2	茨城	86	<0.004
	2014/10/10	茨城	82	<0.004
	2014/10/6	高知	91	<0.004
	2014/10/10	高知	84	<0.004
	2014/12/12	宮崎	75	<0.004
	2014/12/17	宮崎	110	<0.004
<u>トリフルミゾール 代謝物</u>				
	2014/10/2	茨城	89	<0.004
	2014/10/10	茨城	71	<0.004
	2014/10/6	高知	93	<0.004
	2014/10/10	高知	74	<0.004
	2014/12/12	宮崎	96	<0.004
	2014/12/17	宮崎	87	<0.004

回収試料の添加濃度：0.04 mg/kg

*抽出日を記載

10. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料にトリフルミゾール及びトリフルミゾール代謝物を添加し、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、保存中の安定性を評価した。保存安定性の結果を示す。

10.1. 果肉

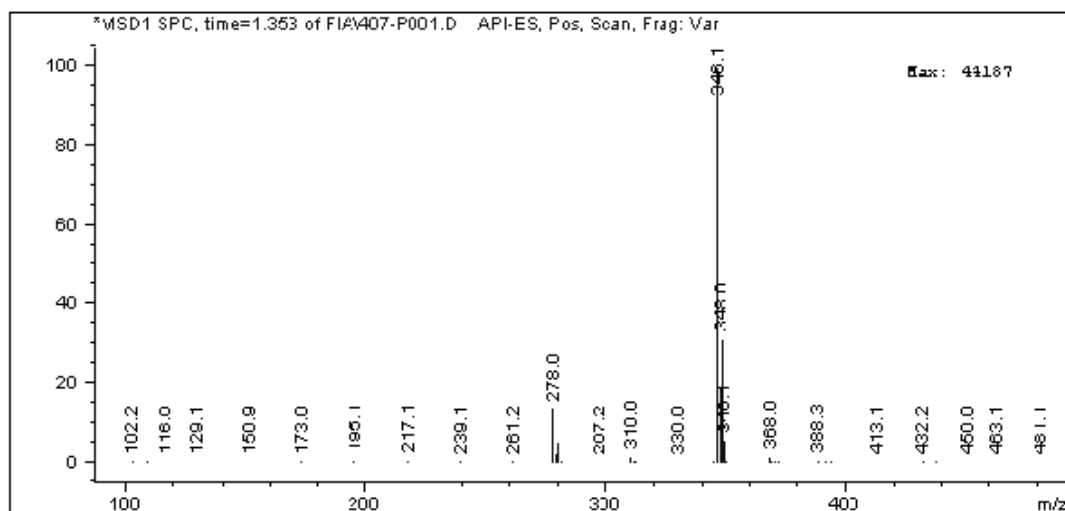
圃場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
トリフルミゾール				
茨城	0.5	86 (14/7/16 - 14/10/10)	81	75
高知	0.5	105 (14/6/27 - 14/10/10)	80	73
宮崎	0.5	28 (14/11/19 - 14/12/17)	90	80
トリフルミゾール代謝物				
茨城	0.5	86 (14/7/16 - 14/10/10)	86	77
高知	0.5	105 (14/6/27 - 14/10/10)	76	73
宮崎	0.5	28 (14/11/19 - 14/12/17)	84	83

10.2. 果実

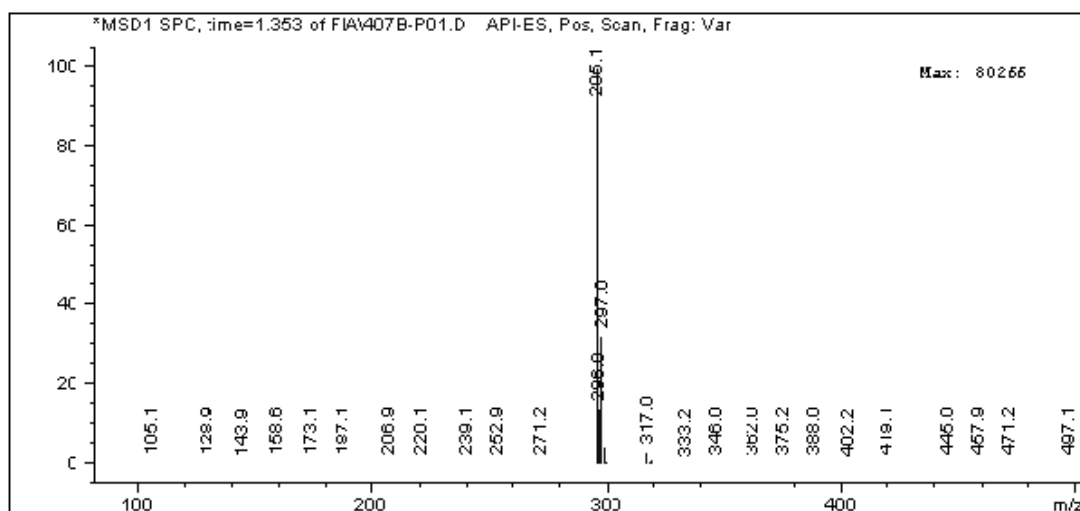
圃場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
トリフルミゾール代謝物				
茨城	0.5	86 (14/7/16 - 14/10/10)	86	77
高知	0.5	105 (14/6/27 - 14/10/10)	76	73
宮崎	0.5	28 (14/11/19 - 14/12/17)	84	83
トリフルミゾール代謝物				
茨城	0.5	86 (14/7/16 - 14/10/10)	71	71
高知	0.5	105 (14/6/27 - 14/10/10)	75	74
宮崎	0.5	28 (14/11/19 - 14/12/17)	82	71

付図-1. マススペクトル

トリフルミゾールのマススペクトルの一例 (正イオンモード)



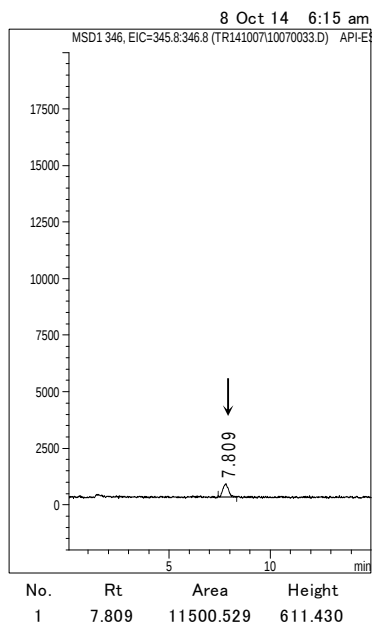
トリフルミゾール代謝物のマススペクトルの一例 (正イオンモード)



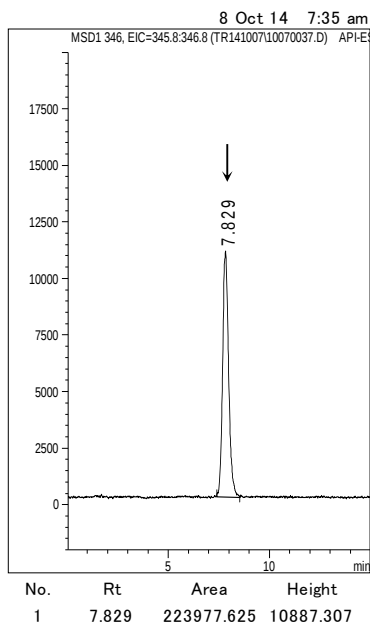
付図-2. トリフルミゾールのクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. 果肉

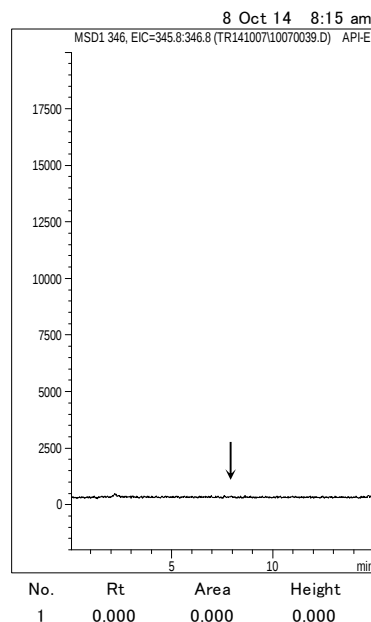
標準品 0.01ng



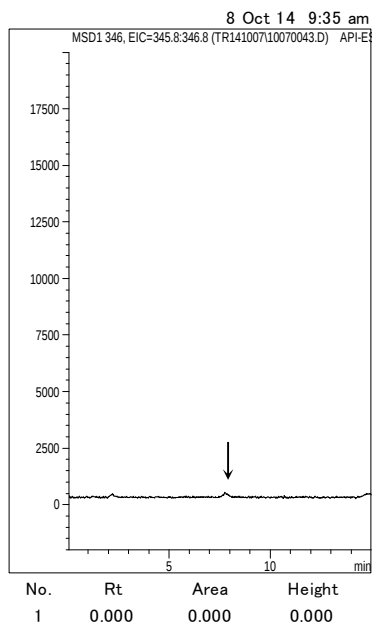
標準品 0.2ng



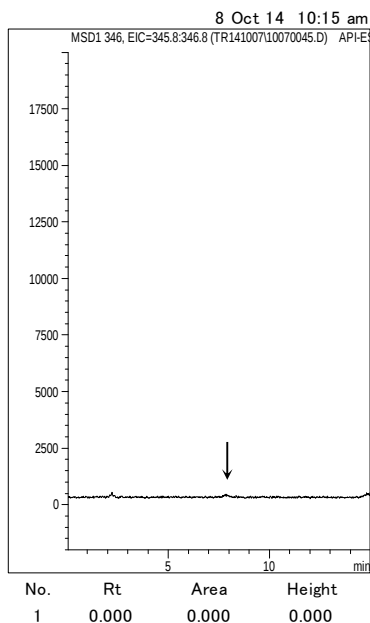
高知 無処理
4mL/2μL/5g



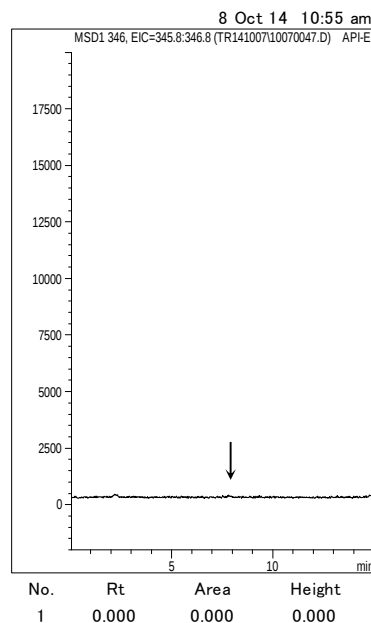
高知 5回処理 1日後
4mL/2μL/5g



高知 5回処理 3日後
4mL/2μL/5g

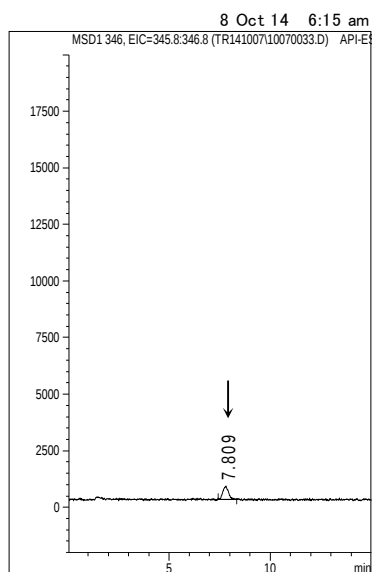


高知 5回処理 7日後
4mL/2μL/5g



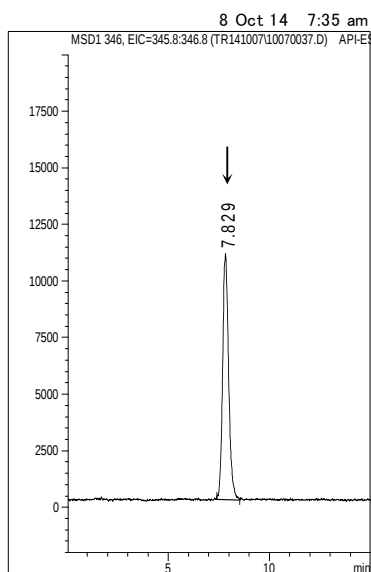
付図-2-2. 果実

標準品 0.01ng

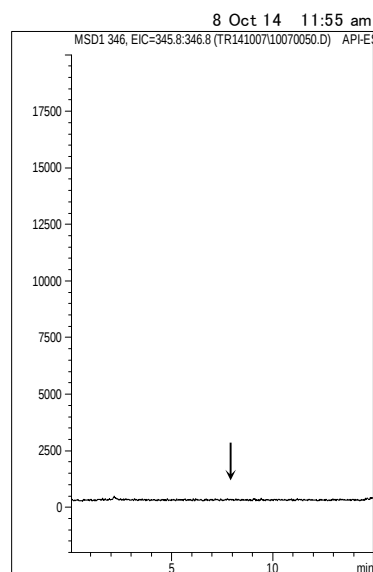


No.	Rt	Area	Height
1	7.809	11500.529	611.430

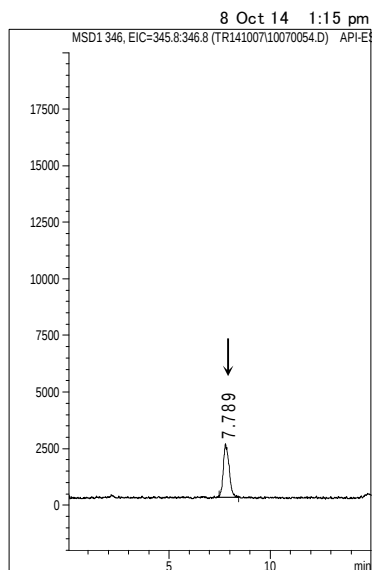
標準品 0.2ng



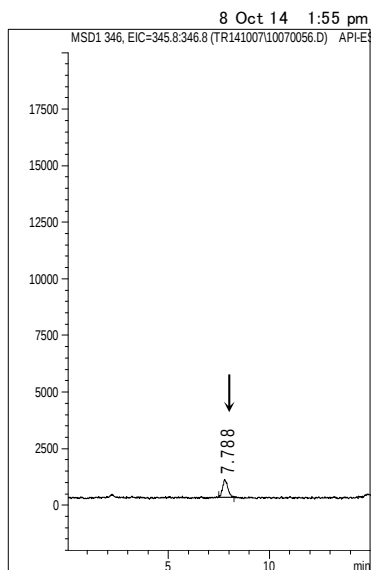
No.	Rt	Area	Height
1	7.829	223977.625	10887.307

高知 無処理
4mL/2μL/5g

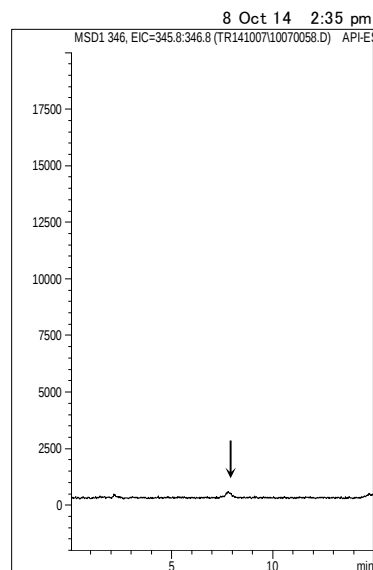
No.	Rt	Area	Height
1	0.000	0.000	0.000

高知 5回処理 1日後
4mL/2μL/5g

No.	Rt	Area	Height
1	7.789	47363.910	2371.559

高知 5回処理 3日後
4mL/2μL/5g

No.	Rt	Area	Height
1	7.788	14657.155	804.426

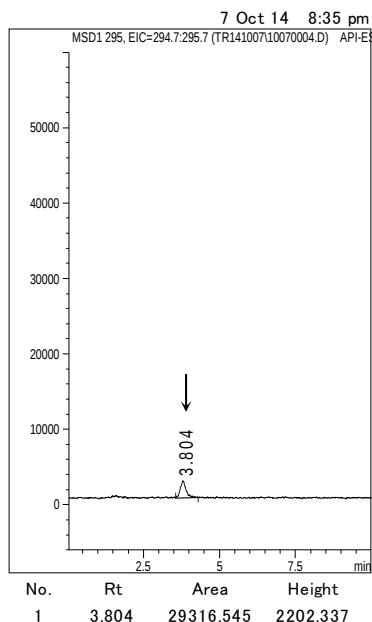
高知 5回処理 7日後
4mL/2μL/5g

No.	Rt	Area	Height
1	0.000	0.000	0.000

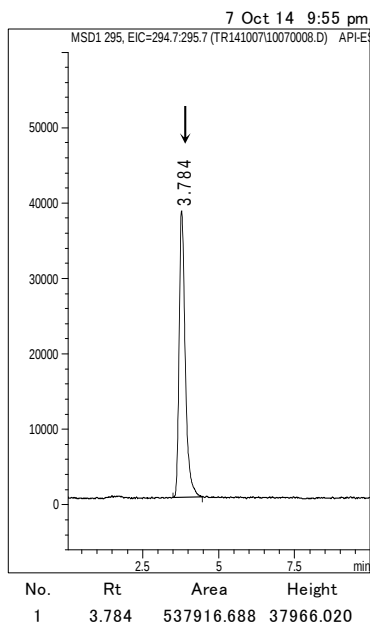
付図-3. トリフルミゾール代謝物のクロマトグラム (代表例)

付図-3-1. 果肉

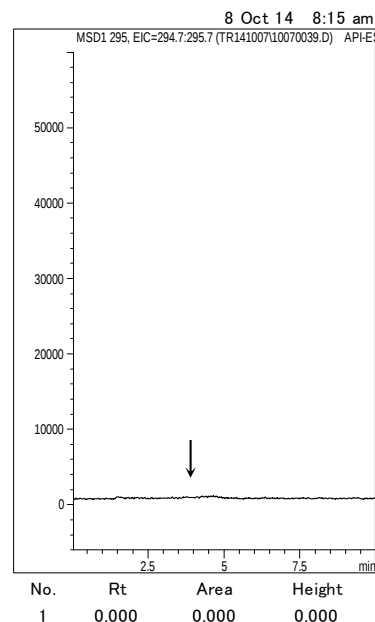
標準品 0.01ng



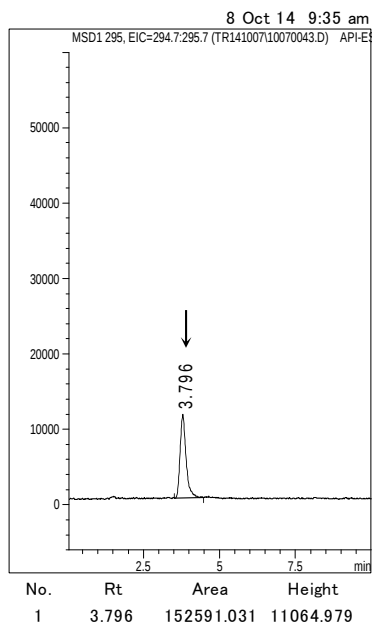
標準品 0.2ng



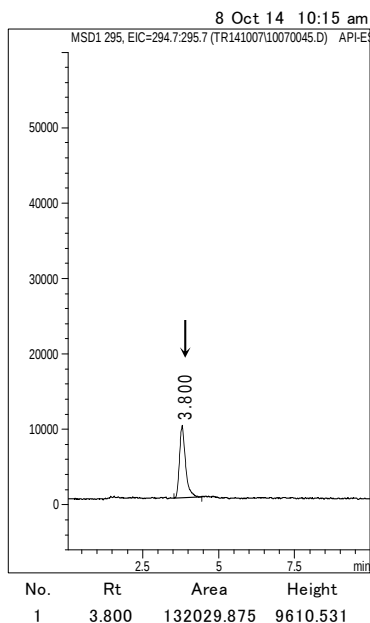
高知 無処理
4mL/2μL/5g



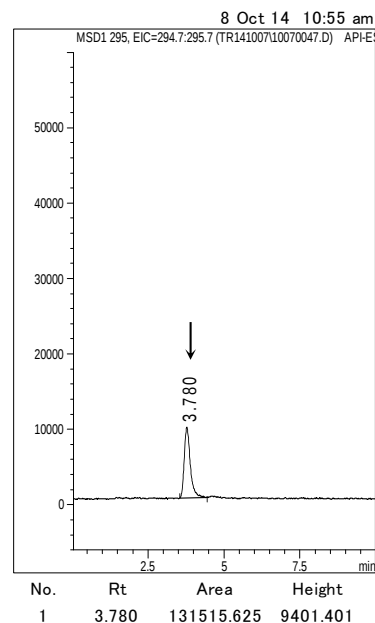
高知 5 回処理 1 日後
4mL/2μL/5g



高知 5 回処理 3 日後
4mL/2μL/5g

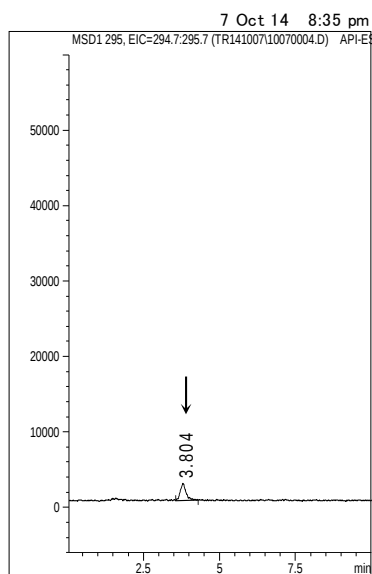


高知 5 回処理 7 日後
4mL/2μL/5g



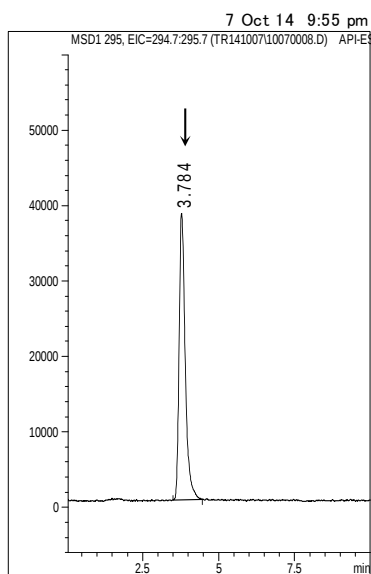
付図-3-2. 果実

標準品 0.01ng

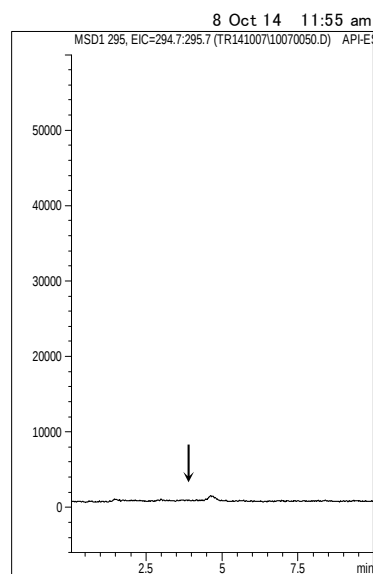


No.	Rt	Area	Height
1	3.804	29316.545	2202.337

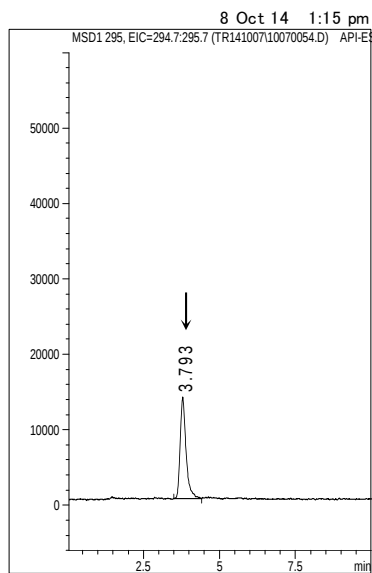
標準品 0.2ng



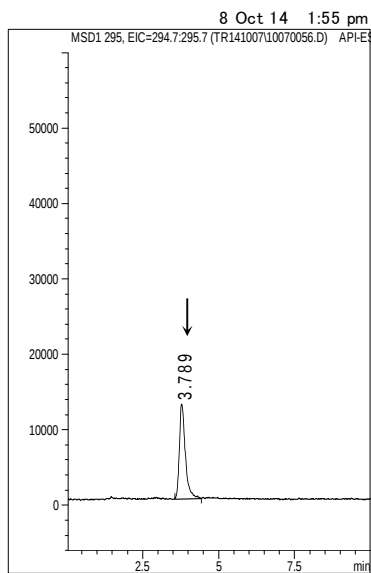
No.	Rt	Area	Height
1	3.784	537916.688	37966.020

高知 無処理
4mL/2μL/5g

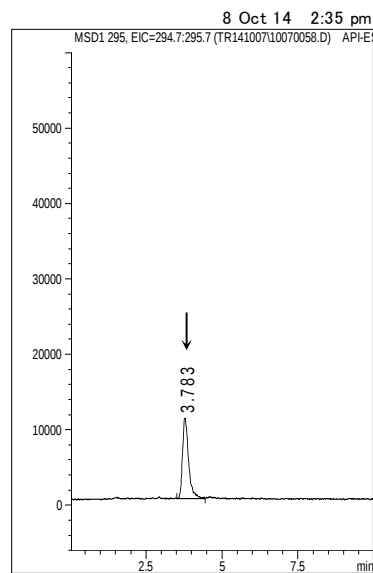
No.	Rt	Area	Height
1	0.000	0.000	0.000

高知 5回処理 1日後
4mL/2μL/5g

No.	Rt	Area	Height
1	3.793	183623.484	13504.613

高知 5回処理 3日後
4mL/2μL/5g

No.	Rt	Area	Height
1	3.789	173002.328	12446.401

高知 5回処理 7日後
4mL/2μL/5g

No.	Rt	Area	Height
1	3.783	148374.859	10648.313

平成 26 年度農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業
 残留分析詳細② ベノミル (カルベンダジム)

1. 分析対象物質

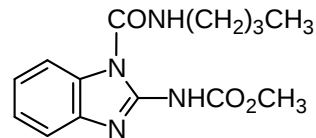
ベノミル

化学名 : methyl 1-(butylcarbamoyl)benzimidazol-2-ylcarbamate

分子量 : 290.3

分子式 : $C_{14}H_{18}N_4O_3$

構造式 :



性 状 : 無色結晶

融 点 : 140 °C

蒸気圧 : $< 5.0 \times 10^{-3}$ mPa (25°C)

分配係数 : log Pow = 1.37

溶解性 : 水 3.6 (pH5), 2.9 (pH7), 1.9 (pH9) (以上 mg/L, 室温)
 クロロホルム 94, アセトン 18, キシレン 10, エタノール 4,
 ヘプタン 0.4 (以上 g/kg, 25°C)

安定性 : 加水分解性半減期 : 3.5h (pH5), 1.5h (pH7), <1h (pH9)

出 典 : The Pesticide Manual (16th Edition)

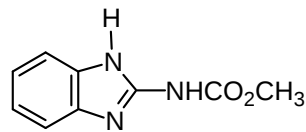
カルベンダジム (MBC)

化学名 : methyl benzimidazol-2-ylcarbamate

分子量 : 191.2

分子式 : $C_9H_9N_3O_2$

構造式 :



性 状 : 結晶性粉末

融 点 : 302-307 °C

蒸気圧 : 0.09 mPa (20°C) ; 0.15 mPa (25°C) ; 1.3 mPa (50°C) ;
 別の試験 < 0.0001 mPa (20°C)

分配係数 : log Pow = 1.38 (pH5), 1.51 (pH7), 1.49 (pH9)

溶解性 : 水 29 mg/L (pH4), 8 mg/L (pH7), 7 mg/L (pH8) (24°C)
 DMF 5, アセトン 0.3, エタノール 0.3, クロロホルム 0.1,
 酢酸エチル 0.135, ジクロロメタン 0.068, ベンゼン 0.036,

シクロヘキサン <0.01, ジエチルエーテル <0.01, ヘキサン 0.0005
(以上 g/L, 24℃)

安定性： 融点で分解 50℃以下で少なくとも2年間は安定
アルカリ性溶液中で緩やかに分解 (22℃)
半減期 >350 日 (pH5, pH7), 124 日 (pH9)
水溶性塩を形成する酸で安定

出典： The Pesticide Manual (16th Edition)

2. 標準品及び試薬

ベノミル標準品：純度 98.0 % (Dr.Ehrenstorfer GmbH)

カルベンダジム標準品：99.0 % (Dr.Ehrenstorfer GmbH)

メタノール：高速液体クロマトグラフ用 (和光純薬工業製)

メタノール, アセトン, ヘキサン, 酢酸エチル, ギ酸, 塩化ナトリウム, 塩酸,
無水硫酸ナトリウム, リン酸二水素カリウム, リン酸水素二ナトリウム
：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, 1000mg (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

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. 高速液体クロマトグラフ

カラム： Unison UK-C18 (インタクト製),
内径 2.0 mm, 長さ 75 mm, 粒径 3µm
溶離液： 0.1 %ギ酸溶液/メタノール (80:20, v/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 3.6 min.

4.2. 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： 45 psi
フラグメンター電圧： 70 V

キャピラリー電圧： 4000 V
採取イオン： SIM m/z 192.1

5. 検量線の作成

カルベンダジム標準品 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。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で希釈して 10 mg/L の標準溶液を調製した。さらにこの溶液をメタノール/水 (50 : 50, v/v) 混液で希釈して 0.0025, 0.005, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1 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カルベンダジム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. 試料の前処理

試料は各々を縦に 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。

2 組の果実分析用試料のうち 1 組の全量をミキサーで均一化した。果肉分析用試料についても果実と同様に調製試料を作製した。各調製試料は 2 組作製し、それぞれ密封して冷凍保存 (-20°C 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 を分液ロートに量りとり、メタノール 100 mL を加えて 30 分間振とう抽出した。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣をメタノール 30 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で 200 mL に定容した。

6.3. ヘキサン洗浄

前項の定容液から 50 mL (試料 5g 相当量) を分取し、 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 1 mol/L 塩酸 5mL、水 50mL 及びヘキサン 40 mL を加えて 5 分間振とうした。静置分離後、ヘキサン層を捨てた後、さらに水層にヘキサン 40 mL を加え、前記操作をくり返した。

6.4. 酢酸エチル/ヘキサン転溶

水層にリン酸緩衝溶液*5mL を加え、1mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加えて pH6.5～pH7.0 に調整した。調整液は少量の水を用いて分液ロートに移し、塩化ナトリウム 10g を加え溶解後、酢酸エチル/ヘキサン (50:50, v/v) 混液 80mL を加え 5 分間振とうした。静置分離後、有機溶媒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。さらに同混液 80 mL を加え、前記操作をくり返した。全有機溶媒層を合わせ、 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。残留物はヘキサン 5 mL に溶解した。

*0.1 mol/L リン酸二水素カリウム溶液 277 mL と 0.1 mol/L リン酸水素二ナトリウム溶液 241mL を合わせて水を加えて 1 L とした。

6.5. シリカゲルミニカラムによる精製

シリカゲルミニカラムにヘキサン 10 mL を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移して流下した後、アセトン/ヘキサン (10:90, v/v) 混液 20 mL を流下し、これらの流出液を捨てた。次にアセトン/ヘキサン (40:60, v/v) 混液 30 mL を流下し、溶出液を取り、40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。

6.6. 定量

残留物を適量のメタノール/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高さを求め、検量線よりカルベンダジムの重量を求め、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)	換算係数	定量限界 (mg/kg)
0.01	5	6	2	1.52	0.01

最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	換算係数	検出限界 (mg/kg)
0.005	5	6	2	1.52	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、宮崎試料の果肉無処理試料*及び果実無処理試料*を用いて、定量限界相当（ベノミル 0.01 mg/kg, カルベンダジム 0.006 mg/kg）、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、無処理試料は 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。

*平成 25 年度 農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業の試料を使用

8.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
<u>ベノミル</u>								
宮崎	5	93	87	85	83	83	86	4.8
宮崎	0.25	92	91	90	89	89	90	1.4
宮崎	0.01	104	104	100	99	94	100	4.1
<u>カルベンダジム</u>								
宮崎	5	92	92	91	89	87	90	2.4
宮崎	0.25	96	95	92	92	90	93	2.6
宮崎	0.006	112	111	103	102	101	106	5.0

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
<u>ベノミル</u>								
宮崎	5	82	80	80	77	75	79	3.5
宮崎	0.25	93	91	90	88	87	90	2.7
宮崎	0.01	104	98	94	90	89	95	6.5
<u>カルベンダジム</u>								
宮崎	5	86	84	83	82	78	83	3.6
宮崎	0.25	95	94	94	92	90	93	2.2
宮崎	0.006	112	99	97	92	89	98	9.1

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ベノミル 0.1 mg/kg、カルベンダジム 0.06mg/kg 添加試料（クオリティーコントロール試料）を分析した。

その結果、下表に示すように問題は認められなかった。

また、2013 年 10 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)
<u>ベノミル</u>			
2014/8/7	茨城	85	<0.01
2014/8/18	茨城	70	<0.01
2014/8/12	高知	72	<0.01
2014/8/18	高知	77	<0.01
2014/12/11	宮崎	71	<0.01
2014/12/16	宮崎	85	<0.01
<u>カルベンダジム</u>			
2014/8/7	茨城	87	<0.006
2014/8/18	茨城	74	<0.006
2014/8/12	高知	74	<0.006
2014/8/18	高知	83	<0.006
2014/12/11	宮崎	87	<0.006
2014/12/16	宮崎	92	<0.006

回収試料の添加濃度：ベノミル 0.1 mg/kg

カルベンダジム 0.06 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)
<u>ベノミル</u>				
	2014/8/7	茨城	93	<0.01
	2014/8/18	茨城	80	<0.01
	2014/8/12	高知	71	<0.01
	2014/8/18	高知	78	<0.01
	2014/12/11	宮崎	76	<0.01
	2014/12/16	宮崎	84	<0.01
<u>カルベンダジム</u>				
	2014/8/7	茨城	88	<0.006
	2014/8/18	茨城	81	<0.006
	2014/8/12	高知	72	<0.006
	2014/8/18	高知	81	<0.006
	2014/12/11	宮崎	72	<0.006
	2014/12/16	宮崎	91	<0.006

回収試料の添加濃度：ベノミル 0.1 mg/kg

カルベンダジム 0.06 mg/kg

*抽出日を記載

10. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料にベノミル及びカルベンダジムを添加し、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

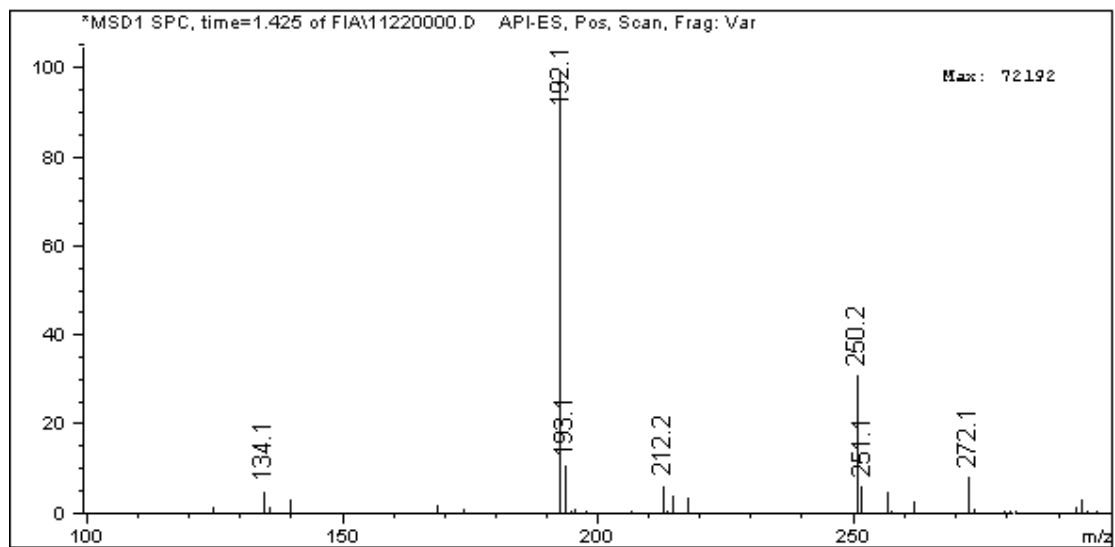
	圃場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
ベノミル	茨城	0.5	33 (14/7/16 – 14/8/18)	80	73
	高知	0.5	52 (14/6/27 – 14/8/18)	82	81
	宮崎	0.5	27 (14/11/19 – 14/12/16)	81	80
カルベンダジム	茨城	0.5	33 (14/7/16 – 14/8/18)	77	71
	高知	0.5	52 (14/6/27 – 14/8/18)	83	78
	宮崎	0.5	27 (14/11/19 – 14/12/16)	94	89

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 (%)
ベノミル	茨城	0.5	33 (14/7/16 – 14/8/18)	76	73
	高知	0.5	52 (14/6/27 – 14/8/18)	79	77
	宮崎	0.5	27 (14/11/19 – 14/12/16)	94	91
カルベンダジム	茨城	0.5	33 (14/7/16 – 14/8/18)	73	73
	高知	0.5	52 (14/6/27 – 14/8/18)	82	74
	宮崎	0.5	27 (14/11/19 – 14/12/16)	92	91

付図-1. マススペクトル

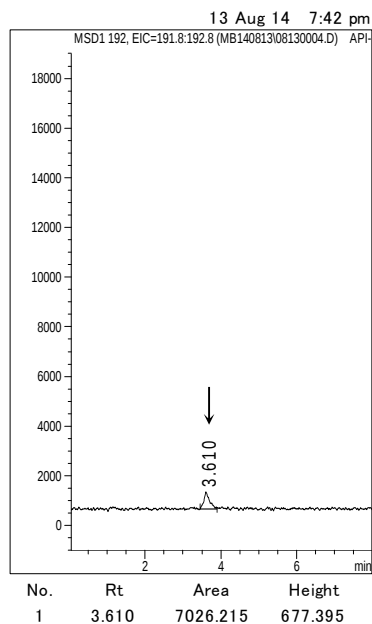
カルベンダジムのスペクトルの一例 (正イオンモード)



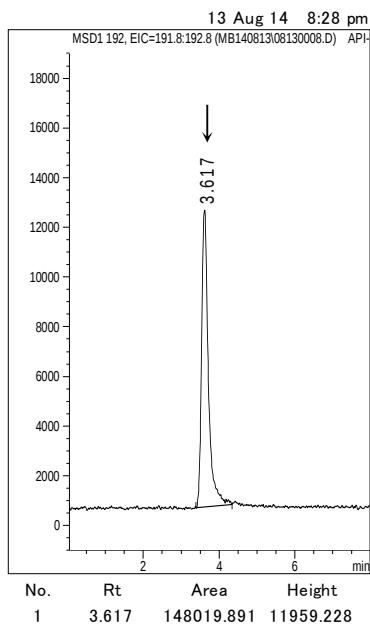
付図-2. カルベンダジムのクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. 果肉

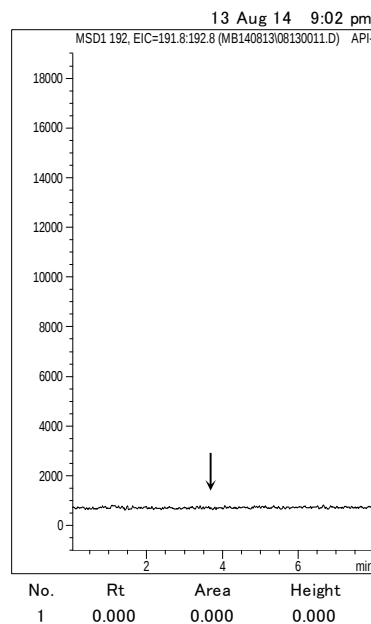
標準品 0.01ng



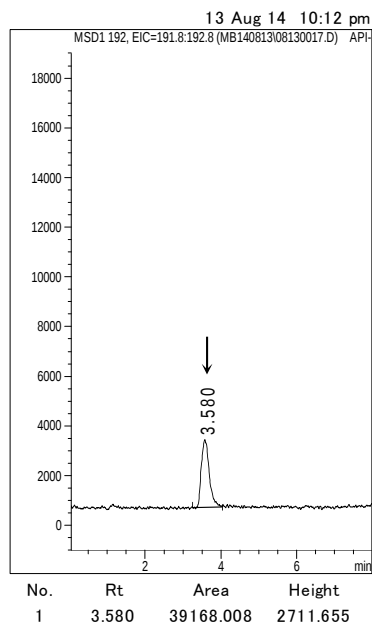
標準品 0.2ng



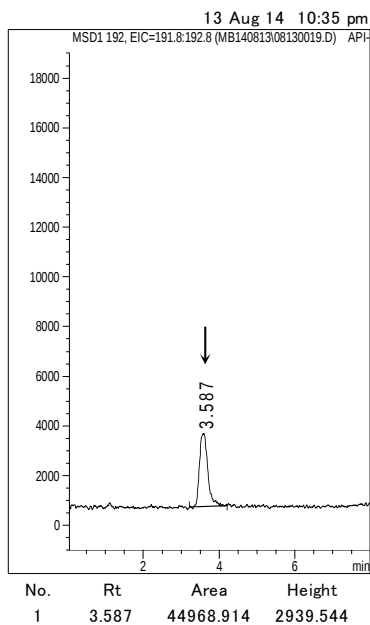
高知 無処理
6mL/2μL/5g



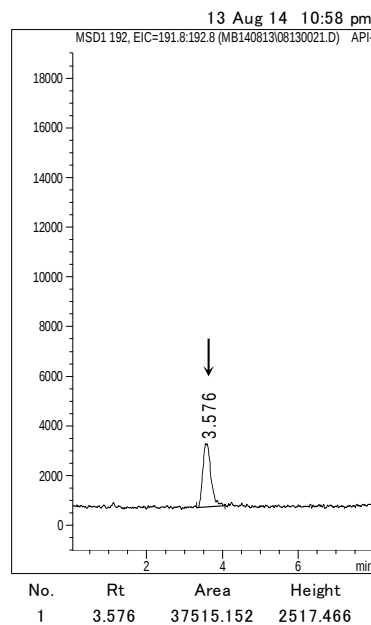
高知 5 回処理 1 日後
6mL/2μL/5g



高知 5 回処理 3 日後
6mL/2μL/5g

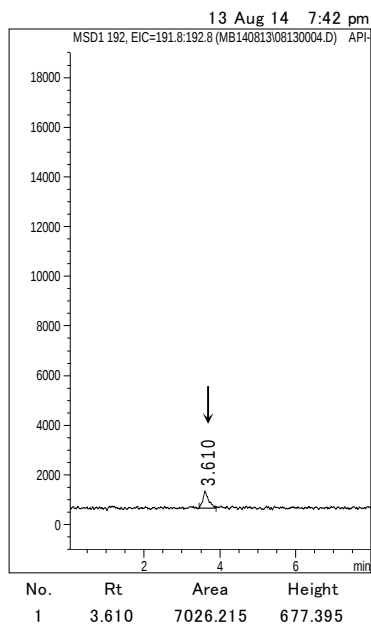


高知 5 回処理 7 日後
6mL/2μL/5g

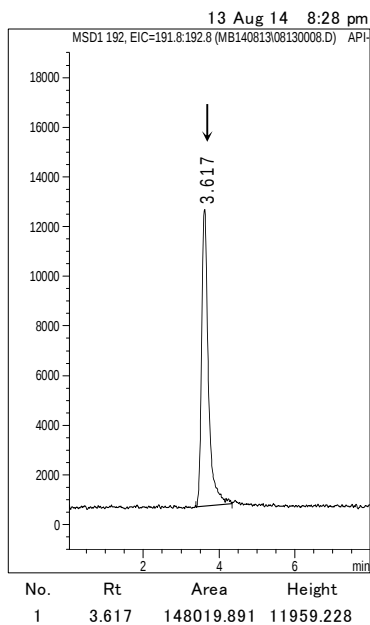


付図-2-2.果実

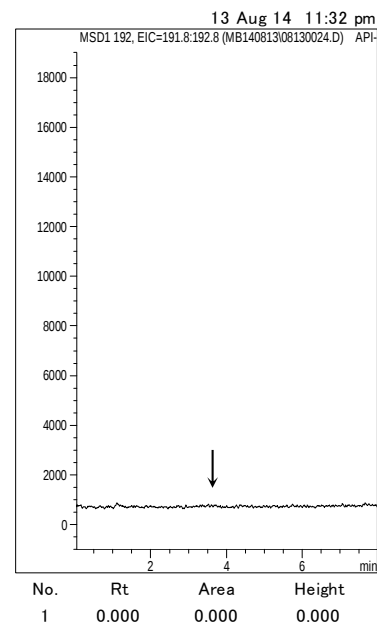
標準品 0.01ng



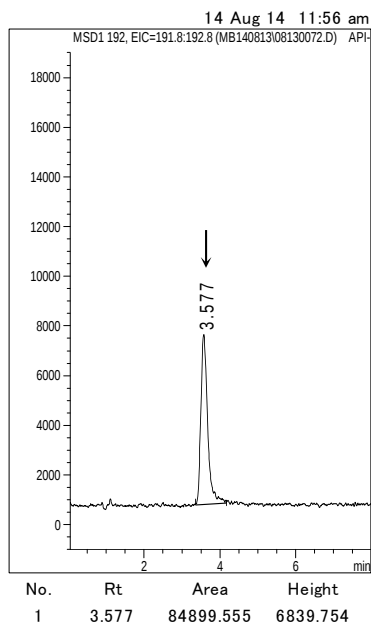
標準品 0.2ng



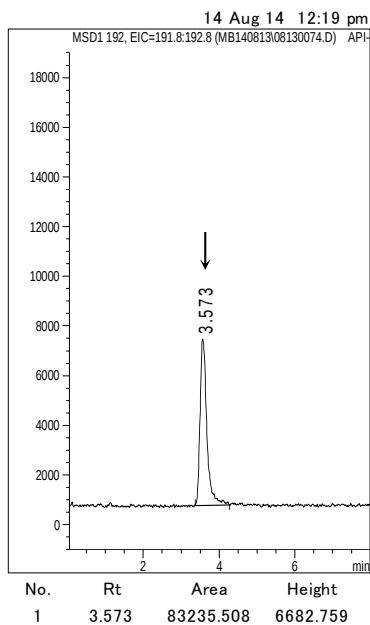
高知 無処理
6mL/2μL/5g



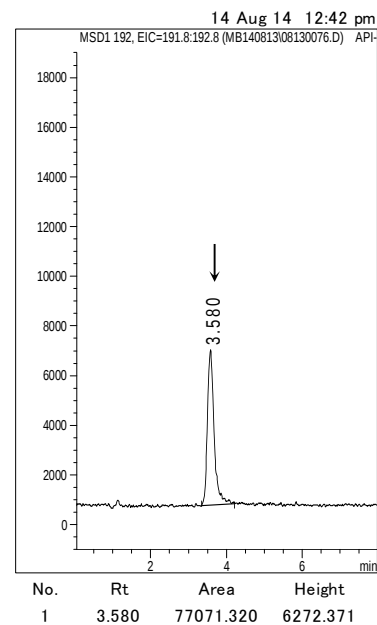
高知 5 回処理 1 日後
24mL/2μL/5g



高知 5 回処理 3 日後
24mL/2μL/5g



高知 5 回処理 7 日後
24mL/2μL/5g

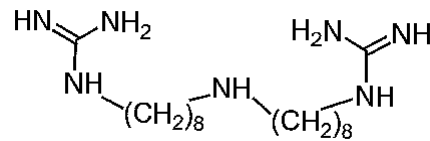


平成 26 年度農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業
残留分析詳細③ イミノクタジンアルベシル酸塩

1. 分析対象物質

イミノクタジン

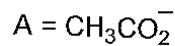
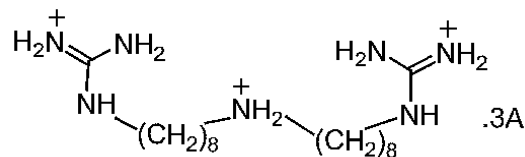
化学名： 1,1' -iminodi(octamethylene)diguanidine; bis(8-guanidino-octyl)amine
分子量： 355.6
分子式： $C_{18}H_{41}N_7$
構造式：



出 典： The Pesticide Manual (16th Edition)

イミノクタジン三酢酸塩

化学名： 1,1' -iminodi(octamethylene)diguanidinium triacetate
分子量： 535.7
分子式： $C_{24}H_{53}N_7O_6$
構造式：



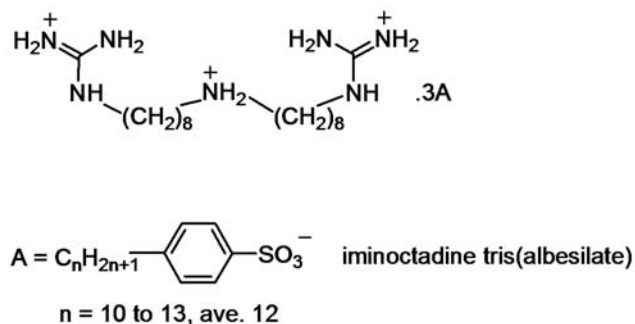
性 状： 白色粉末
融 点： 140.3-145.6 °C
蒸気圧： < 0.4 mPa (23°C)
分配係数： log Pow =< 2 (20°C)
溶解性： 水 550 g/L
 エタノール 66, メタノール 356 (以上 g/L, 20°C)
安定性： 234°Cまで安定
出 典： The Pesticide Manual (16th Edition)

イミノクタジンアルベシル酸塩

化学名： 1,1' -iminodi(octamethylene)diguanidinium tris(alkylbenzenesulfonate)
分子量： 1335 (平均)
分子式： $C_{72}H_{131}N_7O_9S_3$ (平均)

すいか 処理区 F (イミノクタジンアルベシル酸塩)

構造式：



性 状： 白色粉末
融 点： 92-96 °C
蒸気圧： < 1.6 × 10⁻¹ mPa (60°C)
分配係数： log Pow = 1.14 (25°C)
溶解性： 水 6mg/L, (20°C)
メタノール 616, エタノール 412, アセトン 0.15 (以上 g/L)
アセトニトリル, ジクロロメタン, n-ヘキサン, キシレン
二硫化炭素及び酢酸に不溶 (20°C)
安定性： 328°Cまで安定
室温でアルカリ又は酸性の水溶性媒体中で安定
出 典： The Pesticide Manual (16th Edition)

2. 標準品及び試薬

イミノクタジン三酢酸塩標準品：純度 99.6 % (和光純薬工業)
アセトニトリル：高速液体クロマトグラフ用 (和光純薬工業製)
クロロホルム, メタノール, リン酸二水素カリウム, 水酸化ナトリウム,
過塩素酸ナトリウム, 塩化ナトリウム, 塩酸, グアニジン塩酸塩
：試薬特級 (和光純薬工業製)
ヘプタフルオロ酪酸 (IPC-PFFA-4)：LC-MS 用イオンペアー試薬, 以下 IPC と略す
(東京化成工業製)
陽イオン交換ミニカラム：BOND ELUT CBA, 1g/6mL (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
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. 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：	5 mmol/L IPC 溶液/アセトニトリル (65:35, v/v)
流速：	0.2 mL/min.
カラム温度：	40 $^{\circ}$ C
試料注入量：	2 μ L
保持時間：	約 4.2 min.

4.2. 質量分析計

イオン化法：	エレクトロスプレー(ESI), 正イオンモード
乾燥ガス温度：	350 $^{\circ}$ C
乾燥ガス流量：	10 L/min.
ネプライザー圧力：	35 psi
フラグメンター電圧：	140 V
キャピラリー電圧：	4000 V
採取イオン：	SIM m/z 178.8

5. 検量線の作成

イミノクタジン三酢酸塩標準品をイミノクタジンとして 20 mg (純度換算相当量) 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で希釈して 10mg/L の標準溶液を調製した。さらにこの溶液をアセトニトリル/5 mmol/L IPC 溶液 (50:50, v/v) 混液で希釈して 0.0025, 0.005, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1 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イミノクタ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. 試料の前処理

試料は各々を縦に 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。

2 組の果実分析用試料のうち 1 組の全量を細切した。細切試料の一部を取り, 採取量の 25%の重量比でグアニジン塩酸塩を加え, ミキサーで均一化したものを分析用試料とした。果肉分析用試料についても果実と同様に調製試料を作製した。各調製試料は 2 組作製し, それぞれ密封して冷凍保存 (-20° C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 25 g (試料 20 g 相当量) を分液ロートに量りとり, 2 mol/L 水酸化ナトリウム含有メタノール溶液 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 2 mol/L 水酸化ナトリウム含有メタノール溶液 30 mL で 2 回洗浄し, 同様にろ過した。2 mol/L 水酸化ナトリウム含有メタノール溶液で 200 mL に

定容し、その 20 mL（試料 2 g 相当量）を分取した。

6.3. クロロホルム転溶

分取した抽出液に 10%塩化ナトリウム溶液 20 mL 及びクロロホルム 20 mL を加え 5 分間振とうした。静置分離後、有機溶媒層を分取し、水層にはクロロホルム 20 mL を加え、前記操作をくり返した。有機溶媒層を合わせ、40℃以下の水浴中で約 2 mL まで減圧濃縮後、窒素気流下で溶媒を留去した。残留物をリン酸緩衝液*5 mL に溶解した。

*リン酸二水素カリウム 2.713 g を水に溶解して 1 L とした後、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加え、pH メーターで pH6 に調整した。

6.4. 陽イオン交換ミニカラムによる精製

陽イオン交換ミニカラムにメタノール 5 mL、水 5 mL 及びリン酸緩衝液 5 mL を順次流下し前処理した。前項の溶解液を陽イオン交換ミニカラムに流下した後、リン酸緩衝液 5 mL 及びメタノール 10 mL を流下し、これらの流出液を捨てた。次に、100 mmol/L 塩酸含有メタノール溶液 15 mL を流下し、溶出液を取り、40℃以下の水浴中で約 2mL まで減圧濃縮後、窒素気流下で溶媒を留去した。

6.5. 定量

残留物を適量の 0.1 mol/L 過塩素酸ナトリウム溶液/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、検量線よりイミノクタジンの重量を求め、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)
0.01	2	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)
0.005	2	4	2	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、宮崎試料の果肉無処理試料*及び果実無処理試料*を用いて、定量限界相当 (0.01 mg/kg)、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、無処理試料は 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。

*平成 25 年度 農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業の試料を使用

8.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
<u>イミノクタジン</u>								
宮崎	5	80	77	73	73	70	75	5.2
宮崎	0.25	79	79	78	78	77	78	1.1
宮崎	0.01	84	83	81	78	75	80	4.6

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)					平均回収率 (%)	RSDr
<u>イミノクタジン</u>								
宮崎	5	82	78	75	74	70	76	5.9
宮崎	0.25	77	77	76	76	76	76	0.7
宮崎	0.01	87	83	82	82	80	83	3.1

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 0.1mg/kg 添加試料（クオリティーコントロール試料）を分析した。その結果、下表に示すように問題は認められなかった。

また、2013 年 10 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)
2014/12/25	茨城	74	<0.01
2015/1/8	茨城	72	<0.01
2014/12/25	高知	79	<0.01
2015/1/8	高知	72	<0.01
2014/12/25	宮崎	78	<0.01
2015/1/8	宮崎	73	<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)
2014/12/28	茨城	75	<0.01
2015/1/8	茨城	72	<0.01
2014/12/28	高知	74	<0.01
2015/1/8	高知	73	<0.01
2014/12/28	宮崎	77	<0.01
2015/1/8	宮崎	72	<0.01

回収試料の添加濃度：0.1 mg/kg

*抽出日を記載

10. 保存安定性試験

均一化した各無処理試料にイミノクタジン三酢酸塩を添加し、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。保存安定性試験の結果を示す。

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	176 (14/7/16 - 15/1/8)	72	70
高知	0.5	195 (14/6/27 - 15/1/8)	79	78
宮崎	0.5	50 (14/11/19 - 15/1/8)	80	78

* イミノクタジンとして 0.5 mg/kg 相当

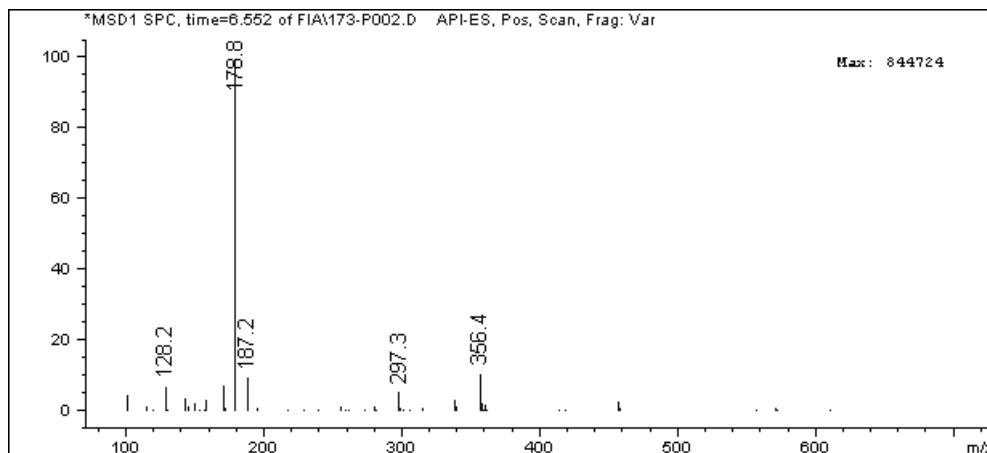
10.2. 果実

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	176 (14/7/16 - 15/1/8)	80	74
高知	0.5	195 (14/6/27 - 15/1/8)	80	80
宮崎	0.5	50 (14/11/19 - 15/1/8)	78	76

* イミノクタジンとして 0.5 mg/kg 相当

付図-1. マススペクトル

イミノクタジンのマススペクトル一例 (正イオンモード)

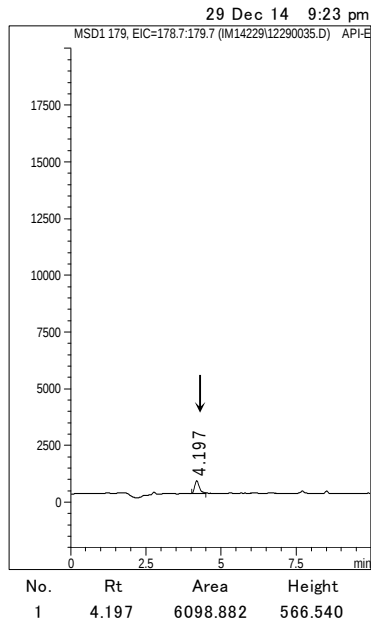


すいか 処理区 F (イミノクタジンアルベシル酸塩)

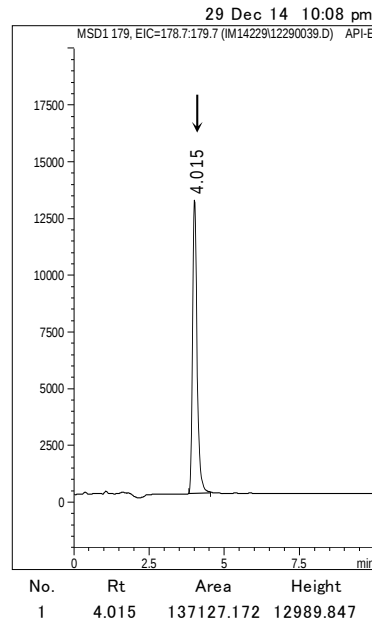
付図-2. イミノクタジンのクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. 果肉

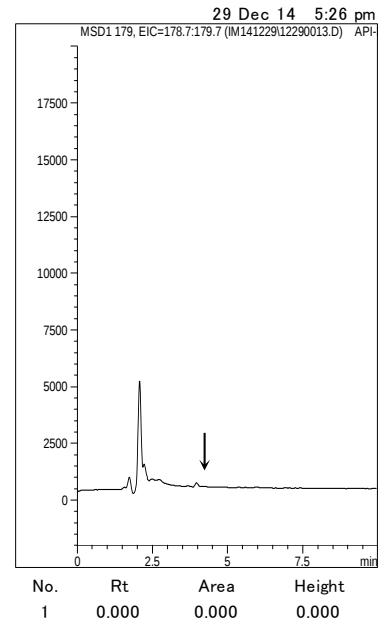
標準品 0.01ng



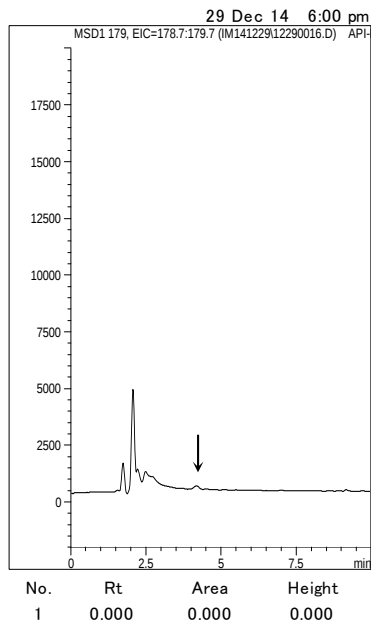
標準品 0.2ng



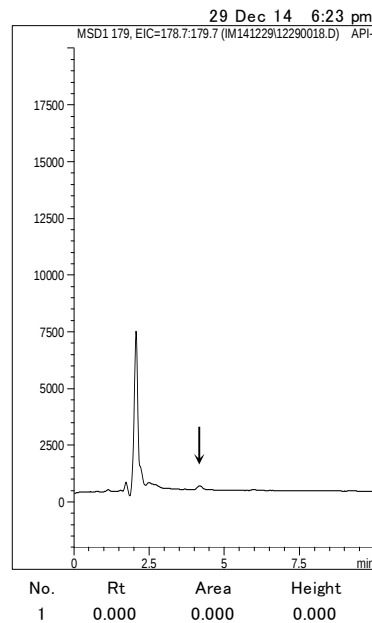
茨城 無処理
4mL/2μL/2g



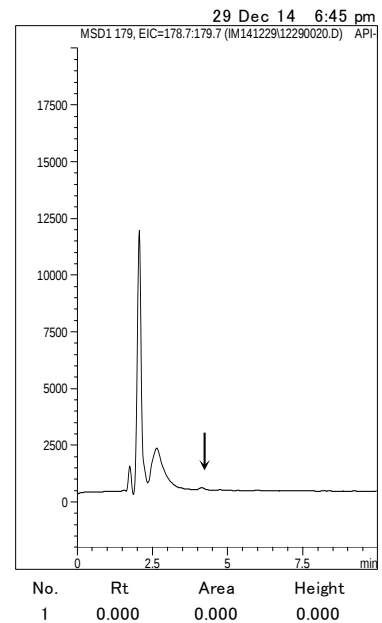
茨城 4 回処理 1 日後
4mL/2μL/2g



茨城 4 回処理 3 日後
4mL/2μL/2g



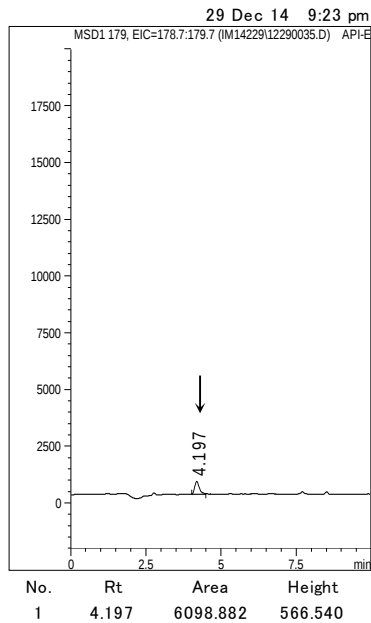
茨城 4 回処理 7 日後
4mL/2μL/2g



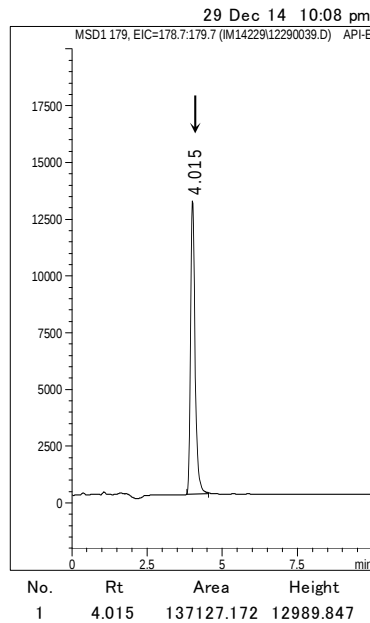
すいか 処理区 F (イミノクタジンアルベシル酸塩)

付図-2-2.果実

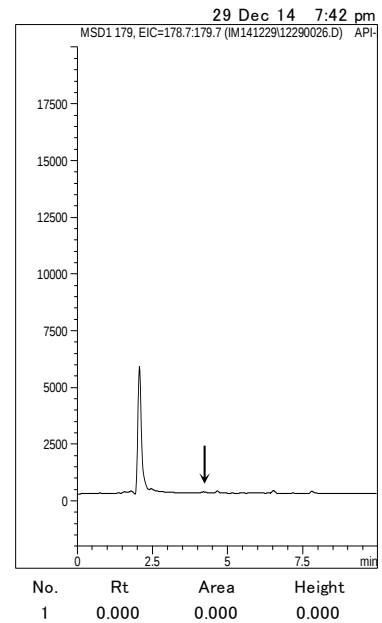
標準品 0.01ng



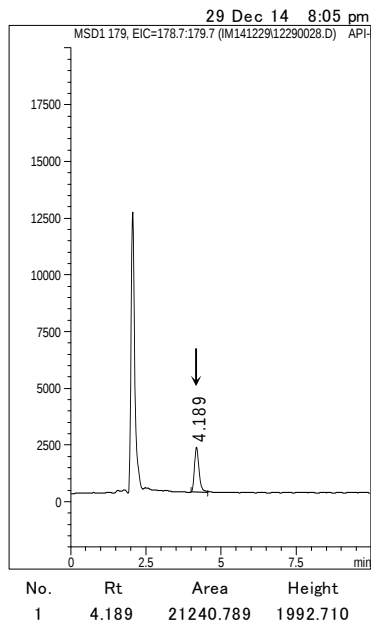
標準品 0.2ng



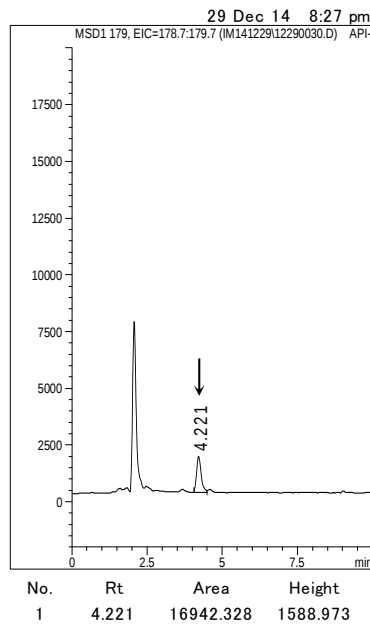
茨城 無処理
4mL/2μL/2g



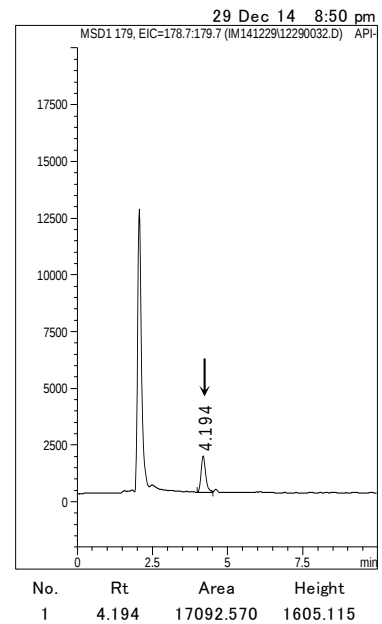
茨城 4 回処理 1 日後
4mL/2μL/2g



茨城 4 回処理 3 日後
4mL/2μL/2g



茨城 4 回処理 7 日後
4mL/2μL/2g



平成 26 年度農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業
 残留分析詳細③ 試料重量, 作物写真

1. 試料重量等

試料	処理 回数	経過 日数	平均重量 (kg/個)	総平均重量 (kg/個)	総重量 (kg)	総重量の平均 (kg)	重量比(%)		果皮の厚さ (mm)
茨城	0	—	1.73	1.66	20.7	11.3	87	13	4.2
	F	1	1.51		7.57		89	11	4.1
	F	3	1.64		8.21		88	12	4.2
	F	7	1.77		8.86		88	12	3.7
平均 88:12									平均 4.1
高知	0	—	1.75	2.12	26.3	15.0	85	15	4.5
	F	1	2.16		10.8		86	14	4.5
	F	3	2.30		11.5		87	13	4.8
	F	7	2.28		11.4		88	12	4.4
平均 87:13									平均 4.6
宮崎	0	—	1.42	1.46	25.6	13.0	84	16	4.4
	F	1	1.41		8.47		85	15	4.6
	F	3	1.51		9.03		82	18	5.3
	F	7	1.48		8.86		82	18	5.0
平均 83:17									平均 4.8
3ほ場の総平均重量					3ほ場の総重量の平均				
1.75 kg/個					13.1 kg				

F:トリフルミゾール, ペノミルは5回処理
 イミノクタジンアルベシル酸塩は4回処理

2. 作物写真の一例

2.1. 茨城



茨城 無処理



茨城 処理 1 日後



茨城 処理 3 日後



茨城 処理 7 日後

2.2. 高知



高知 無処理



高知 処理 1 日後



高知 処理 3 日後



高知 処理 7 日後

2.3 宮崎



宮崎 無処理



宮崎 処理 1 日後



宮崎 処理 3 日後



宮崎 処理 7 日後