

残留分析詳細(メロン試料)：ポリオキシシン複合体

1. 分析対象物質

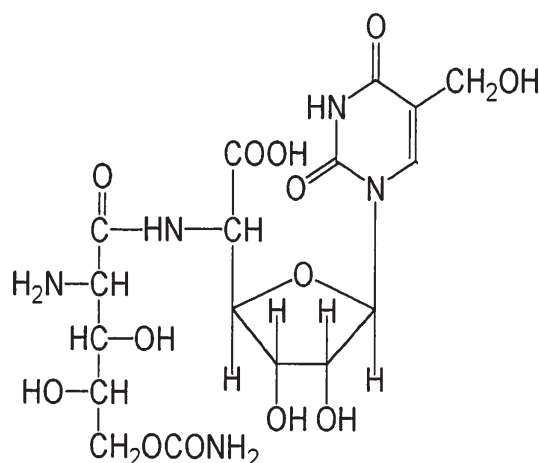
ポリオキシシンB

化 学 名: 5-(2-amino-5-*O*-carbamoyl-2-deoxy-L-xylonamido)-1,5-dideoxy-1-(1,2,3,4-tetrahydro-5-hydroxymethyl-2,4-dioxypyrimidin-1-yl)- β -D-allofuranuronic acid

分 子 式: $C_{17}H_{25}N_5O_{13}$

分 子 量: 507.4

構 造 式:



性 状: 類白色粉末

融 点: $> 188^{\circ}\text{C}$ (分解)

蒸 気 圧: $< 1.33 \times 10^{-5} \text{ mPa}$ (20,30,と 40°C)

分配係数: $\log P_{\text{OW}} = -1.21$

溶 解 性: 水 $>1 \text{ kg/l}$ (20°C)、アセトン 13.5、メタノール 2250、トルエン、ジクロロメタン、酢酸エチル <0.65 (以上 mg/l , 20°C)

安 定 性: pH 1からpH 8で安定

出 典: The e-Pesticide Manual 14th Edition.

2. 標準品、試薬及び材料

ポリオキシンB標準品	: 常用標準 1540AmBu/mg (農林水産省農薬検査所)
塩酸	: 試薬特級 (関東化学)
水酸化ナトリウム	: 試薬特級 (関東化学)
クエン酸二ナトリウム	: 試薬特級 (関東化学)
硝酸ナトリウム	: 試薬特級 (関東化学)
リン酸一カリウム	: 試薬特級 (関東化学)
塩化カリウム	: 試薬特級 (関東化学)
硫酸マグネシウム	: 試薬特級 (関東化学)
硫酸第一鉄	: 試薬特級 (関東化学)
メタノール	: 試薬特級 (関東化学)
エタノール	: 試薬特級 (関東化学)
アセトン	: 試薬特級 (関東化学)
アニリン	: 試薬特級 (関東化学)
し ょ 糖	: 試薬特級 (関東化学)
乾 杏	: 甘味料等、無添加品 (東洋ナッツ食品)
ガラス繊維 濾紙	: ϕ 47mm (アドバンテック)
セルロース 濾紙	: ϕ 110mm (No.2)
石英ガラスウール	: 6~10 μ m
ダウエックス50W-X4	: 100~200メッシュ (ダウケミカル)
粒状活性炭	: カラムクロマト用 (和光純薬)
セルロース	: カラムクロマト用 (メルク)

3. 器具及び装置

万能振盪機	: 東京理化工機製	MMS
pHメーター	: 堀場製作所製	D-51
ロータリーエバポレーター	: 東京理化工機製	N-1000
ガラスカラム	: ϕ 15×H300mm	
無 菌 箱	: イスズ製作所製	BO-12S
インキュベーター	: 三洋電機製	MR252
殺菌灯ランプ	: 東芝製	GL15
ノ ギ ス	: ミットヨ	CD-15
ホモジナイザー	: 日本精機製	AM-1
ペトリ皿	: ϕ 90mm	
ステンレス製円筒	: ϕ 8mm×H10mm	

4. 試料の受領

各圃場の果肉及び果実の均一化試料は、株式会社化学分析コンサルタントが調製した。調製試料の一部を冷凍便で受領し、分析時まで冷凍保存した。

5. 分析操作

5.1. 抽出

均一化した試料50 gをはかりとり、メタノール150 mLを加え、15分間攪拌した。抽出物をブフナーロートで吸引ろ過し、残渣に80%メタノール水溶液200 mLを加え、10分間攪拌し、吸引ろ過した。ろ液を合わせ、約50 mLになるまで浴温40℃以下で減圧濃縮した。

濃縮液を希塩酸でpH2.0に調整し、冷蔵庫に一夜放置した後、生じた沈殿物を自然ろ過によって除去して試料濃縮液とした。

5.2. 精製

5.2.1. イオン交換樹脂による精製

水で膨潤させたイオン交換樹脂（ダウエックス50W-X4）20 mLをガラスカラムに充填し、1/5Mクエン酸・リン酸二ナトリウム緩衝液60 mL及び水60 mLを順次流下してカラムを調製した。これに試料濃縮液を流下した後、水60 mL、50%アセトン水溶液1000 mL、水60 mLを順次流下し、これらの流出液を捨てた。次に3/10N塩酸200 mLを流下し、溶出させた。

5.2.2. 活性炭による精製

煮沸、デカントして微粒子を除いたクロマト用活性炭0.8 gをガラスカラムに充填し、2%アニリン水溶液100 mL、水100 mLを順次流下してカラムを調製した。前項の溶出液をpH6.0に調整した後、活性炭カラムに流下し、順次水50 mL、5%エタノール水溶液100 mLを流下し、これらの流出液を捨てた。次にpH3.0に調整した40%アセトン水溶液200 mLを流下し、溶出液を取り、浴温40℃以下で減圧濃縮（乾固）し、80%エタノール水溶液10 mLに溶解した。

5.2.3. セルロースによる精製

カラムクロマト用セルロース4.0 gに80%エタノール水溶液約50 mLを加え、ガラスカラムに充填し、80%エタノール水溶液20 mLを流下してカラムを調製した。これに前項の80%エタノール水溶液10 mLを通し、80%エタノール水溶液15 mLを流下し、流出液を捨てた。次にpH3.0に調整した50%アセトン水溶液150 mLを流下し、溶出液を取り、浴温40℃以下で減圧濃縮（乾固）した。この残渣に1/15Mリン酸緩衝液（pH6.0）を正確に10 mL加えて溶解し、最終試料溶液とした。

5.3. 検定

日本抗生物質医薬品基準（日抗基）の一般試験法に記載されている標準曲線法に準じて実施した。常用標準希釈液は等比的に以下の4段階の希釈とし中心常用標準希釈液は0.5AmBu/mlとした。

- ① 常用標準希釈液 2.0 AmBu/ml
- ② 常用標準希釈液 1.0 AmBu/ml
- ③ 常用標準希釈液 0.5 AmBu/ml
- ④ 常用標準希釈液 0.25 AmBu/ml

検定に使用する第1、第3の円筒には常用標準希釈液0.5AmBu/mlを、残りの2個の円筒には常用標準希釈液及び最終試料溶液をそれぞれ満たした。予めプログラム運転中※の恒温器に収めて31℃に到達してから38～40時間培養した。培養後、各々の阻止円の直径を0.1mmまで正確に測った。

※:恒温器のプログラム運転

第1段階: 4℃で 6時間(試験液を満たした後、約5時間冷却)

第2段階: 31℃で 40時間

各濃度(0.25,1.0,2.0 AmBu/ml)の常用標準希釈液の阻止円直径を、中心濃度の阻止円直径で補正した。縦軸に阻止円直径、横軸に濃度(片対数)をとって標準曲線を作成した。試料液の阻止円直径についても中心濃度の阻止円直径で補正し、作成した標準曲線をもとにポリオキシンBの残留濃度を算出した。

6. 定量限界値(LOQ)及び検出限界値(LOD)

定量限界濃度 (AmBu/ml)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	定量限界 (mg/kg)
0.5	50	10	0.1

最小検出濃度 (AmBu/ml)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	検出限界 (mg/kg)
0.25	50	10	0.05

7. 回収率

分析法確認のため、市販品のメロンを用いて、0.1 mg/kg (定量限界相当) 及び1 mg/kgの添加濃度における回収試験を各15連で実施した。回収試験は実試料分析と併行分析し、精度管理としても併用した。添加回収試験に用いた無添加試料(市販品)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。

7.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)	平均回収率 (%)	RSD (%)
市販品 ^a	0.1	84,85,85,85,84	86	4
市販品 ^b	0.1	89,89,90,90,91		
市販品 ^c	0.1	78,84,85,85,86		
市販品 ^a	1	89,89,88,87,87	89	6
市販品 ^b	1	96,96,97,95,96		
市販品 ^c	1	82,83,86,86,85		

^a 茨城の実試料分析時に併行分析して回収率を求めた。

^b 高知の実試料分析時に併行分析して回収率を求めた。

^c 宮崎の実試料分析時に併行分析して回収率を求めた。

7.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)	平均回収率 (%)	RSD (%)
市販品 ^a	0.1	91,91,91,90,92	87	4
市販品 ^b	0.1	86,84,86,85,84		
市販品 ^c	0.1	87,87,86,81,83		
市販品 ^a	1	96,94,94,96,93	88	6
市販品 ^b	1	87,84,87,88,83		
市販品 ^c	1	83,84,86,82,85		

^a 茨城の実試料分析時に併行分析して回収率を求めた。

^b 高知の実試料分析時に併行分析して回収率を求めた。

^c 宮崎の実試料分析時に併行分析して回収率を求めた。

8. 精度管理

7項の添加回収試験を精度管理と併用した。前述の通り良好な結果が得られ、問題は認められなかった。

9. 保存安定性の確認

均一化した各無処理区試料に1 mg/kgとなるようにポリオキシンBを添加し、冷凍保存（-20℃以下）した。一定期間保存した後、実試料と併行して分析を実施し、保存中の安定性を確認した。保存安定性の結果を次に示す。

9.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	1	84 (2016/9/1-11/24)	84	84	84
高知	1	63 (2016/10/6-12/8)	98	98	98
宮崎	1	73 (2016/8/16-10/28)	79	78	78

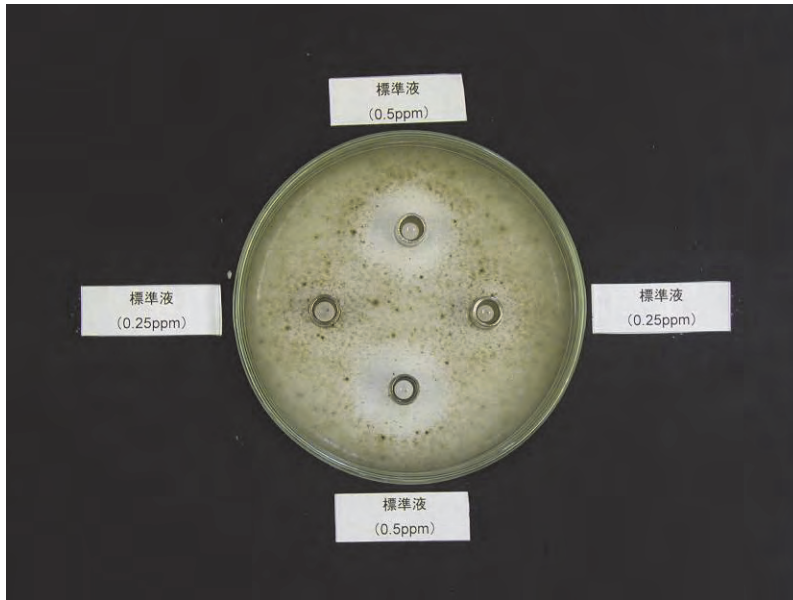
9.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	1	91 (2016/9/1-12/1)	84	84	84
高知	1	70 (2016/10/6-12/15)	89	89	89
宮崎	1	73 (2016/8/16-10/28)	87	84	86

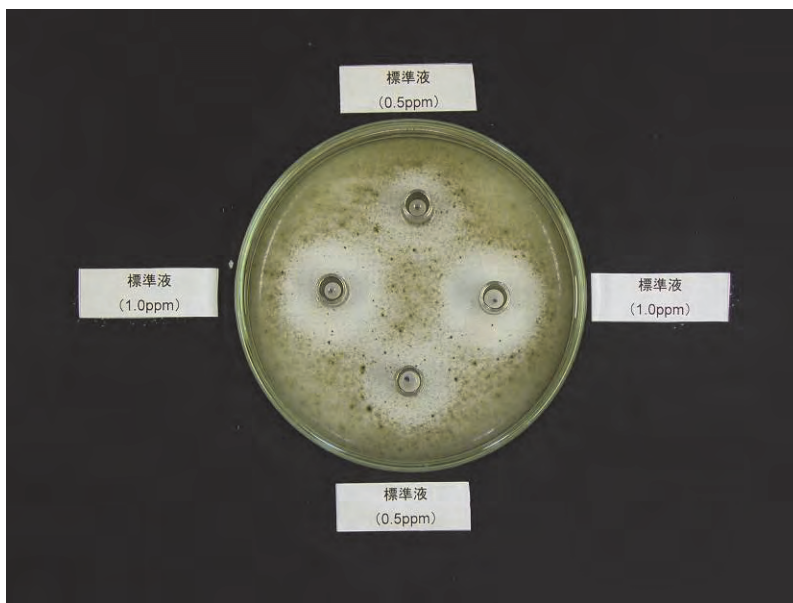
付図-1. 検定写真(代表例)

付図-1-1. 果肉

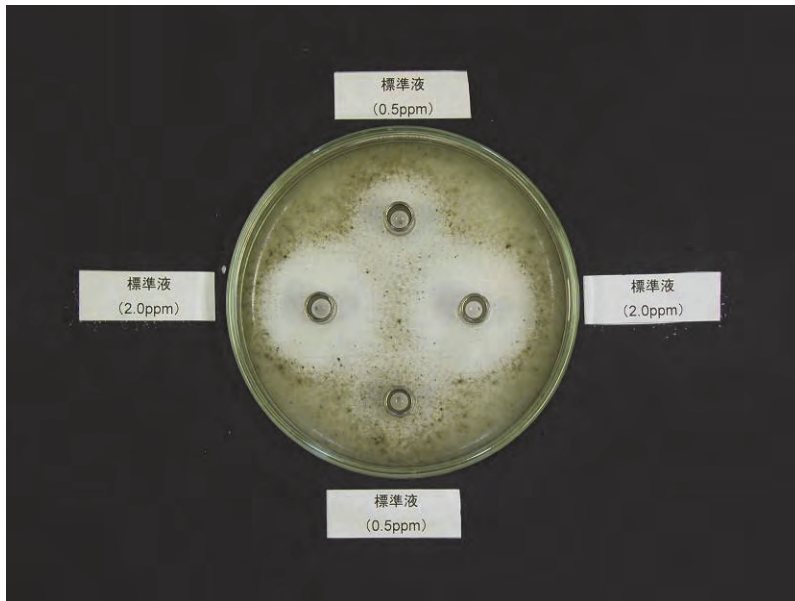
STD-0.25 AmBu/ml



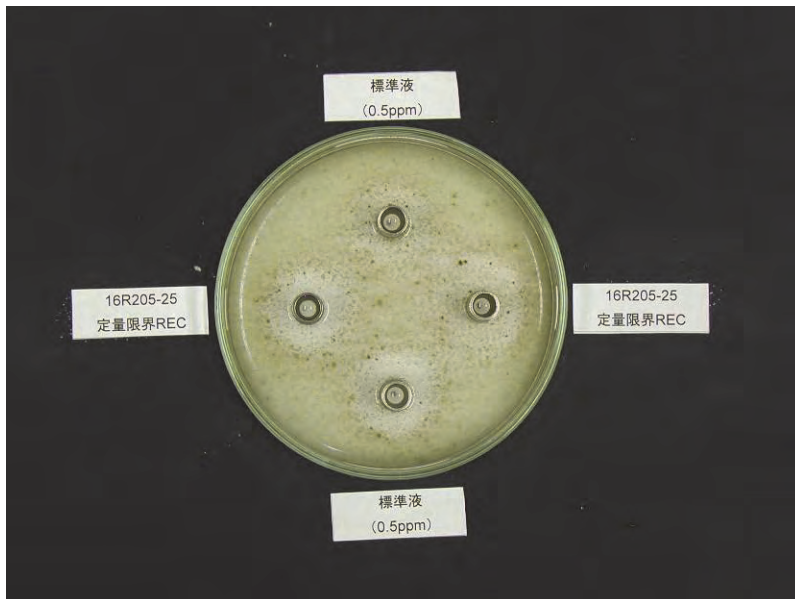
STD-1.0 AmBu/ml



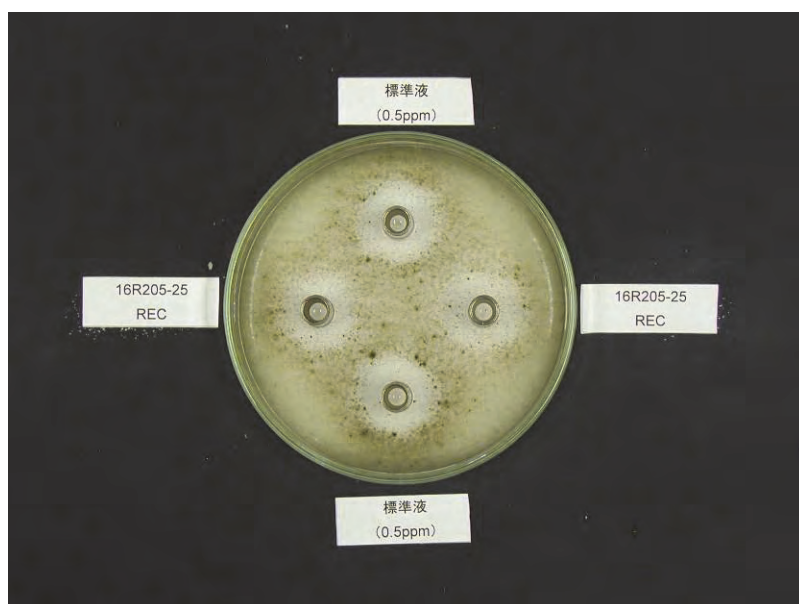
STD-2.0 AmBu/ml



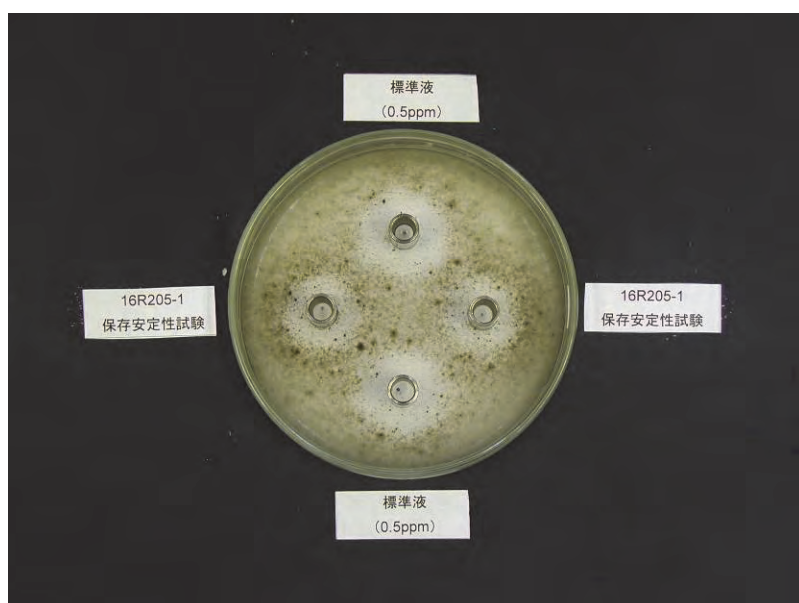
添加回収試験:0.1 mg/kg 添加(定量限界濃度)



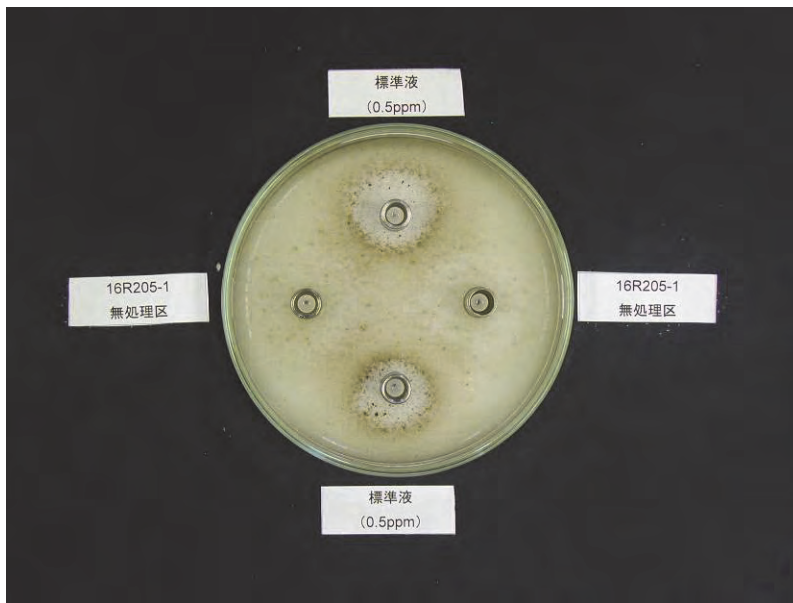
添加回収試験: 1 mg/kg 添加 (定量限界の 10 倍量)



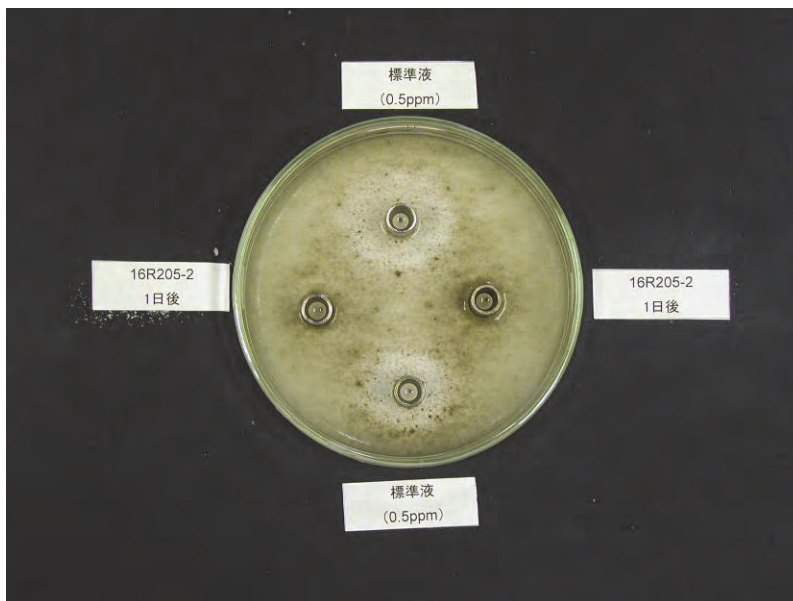
宮崎 保存安定性試験: 1 mg/kg 添加



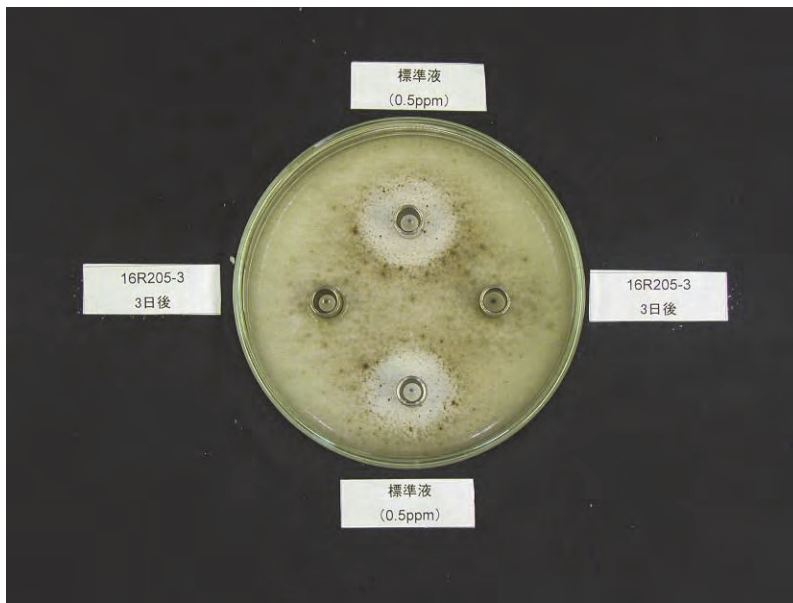
宮崎 無処理区(E)



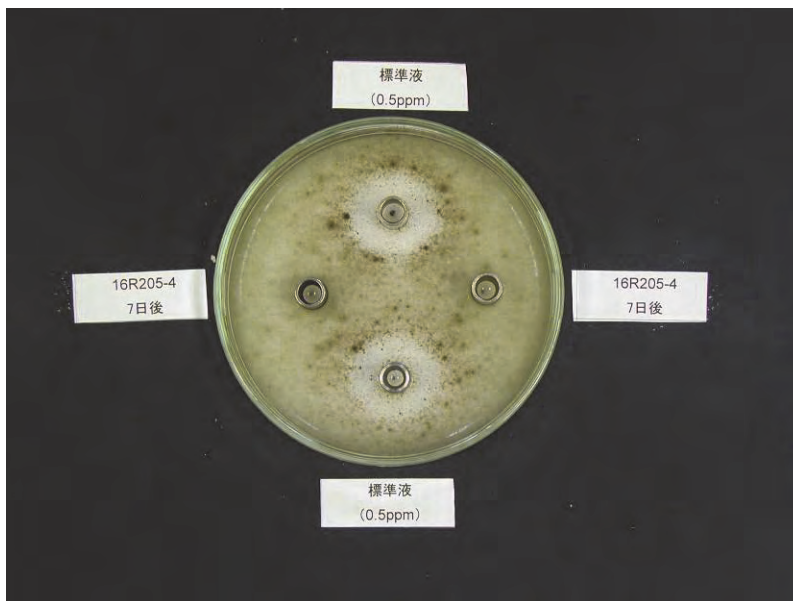
宮崎 処理1日後(B-1)



宮崎 処理3日後 (B-2)

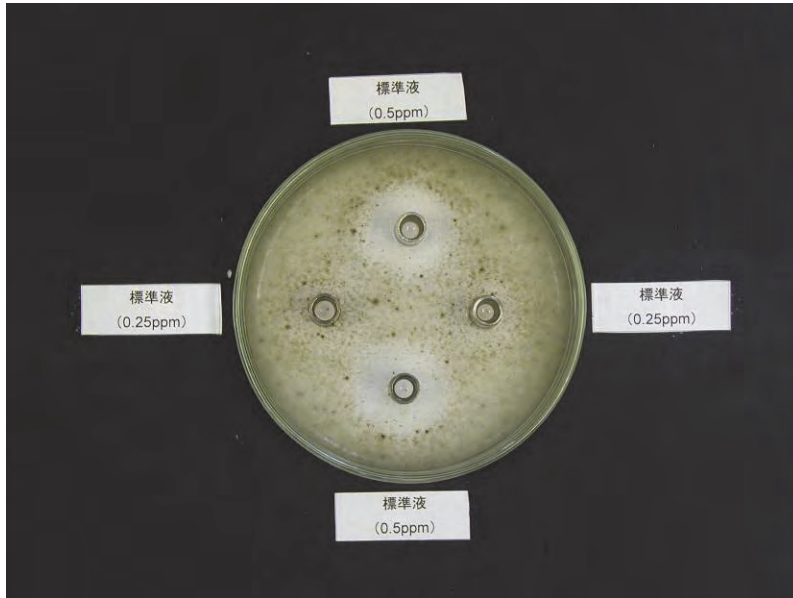


宮崎 処理7日後 (B-3)

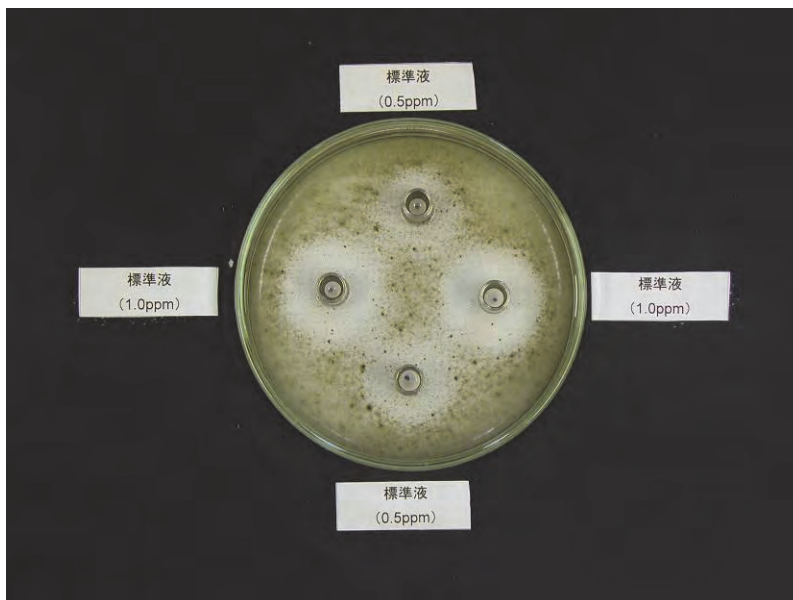


付図-1-2.果実

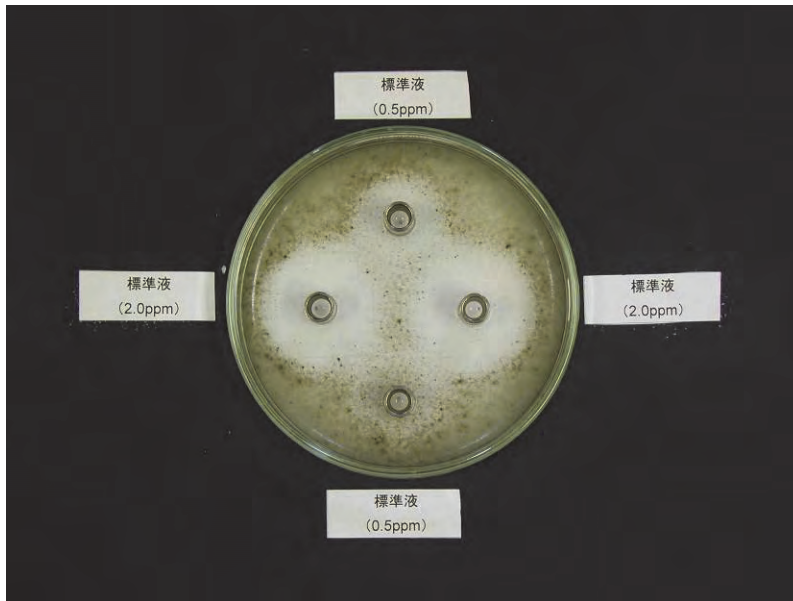
STD-0.25 AmBu/ml



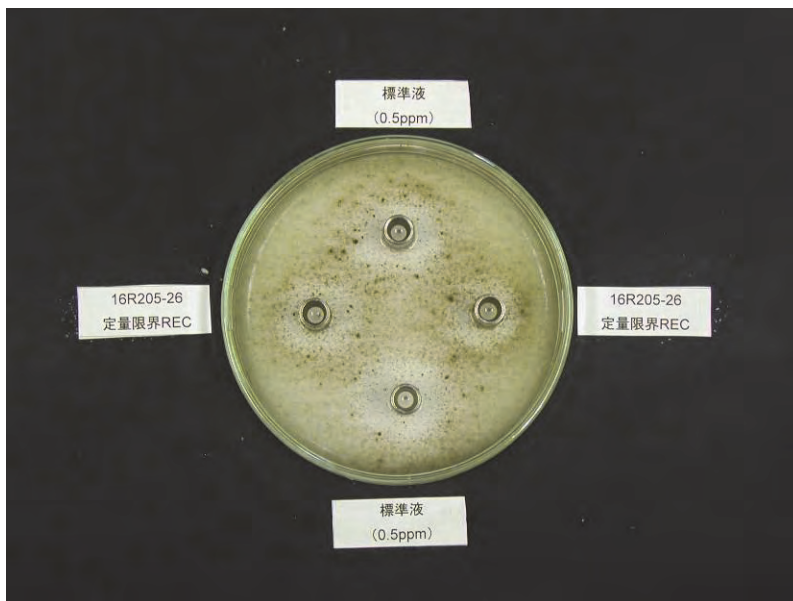
STD-1.0 AmBu/ml



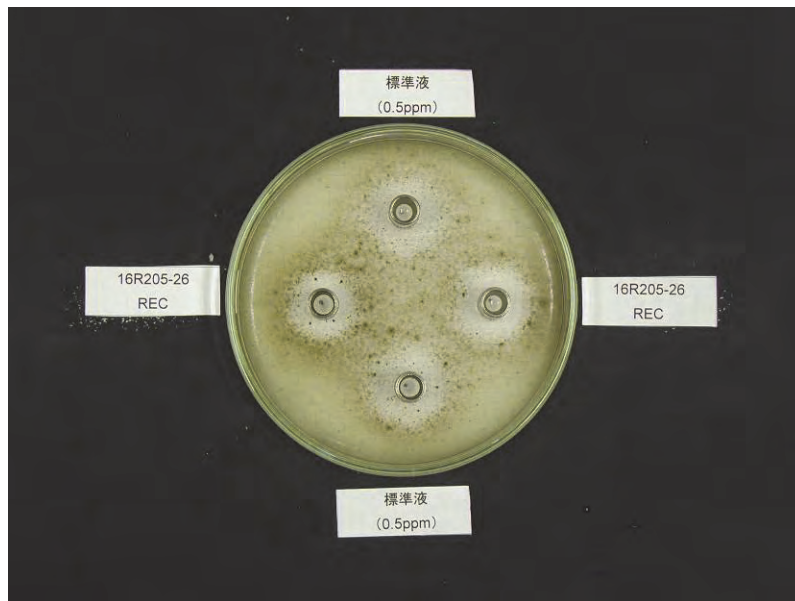
STD-2.0 AmBu/ml



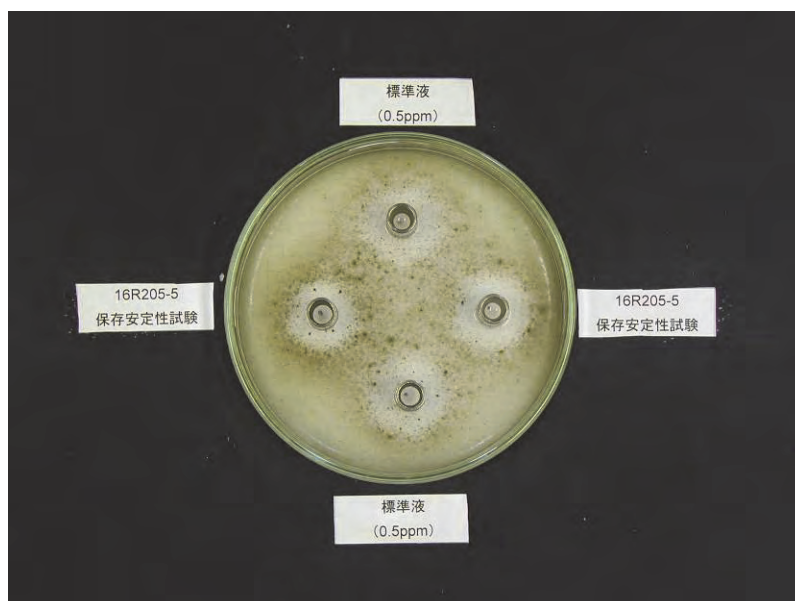
添加回収試験:0.1 mg/kg 添加(定量限界濃度)



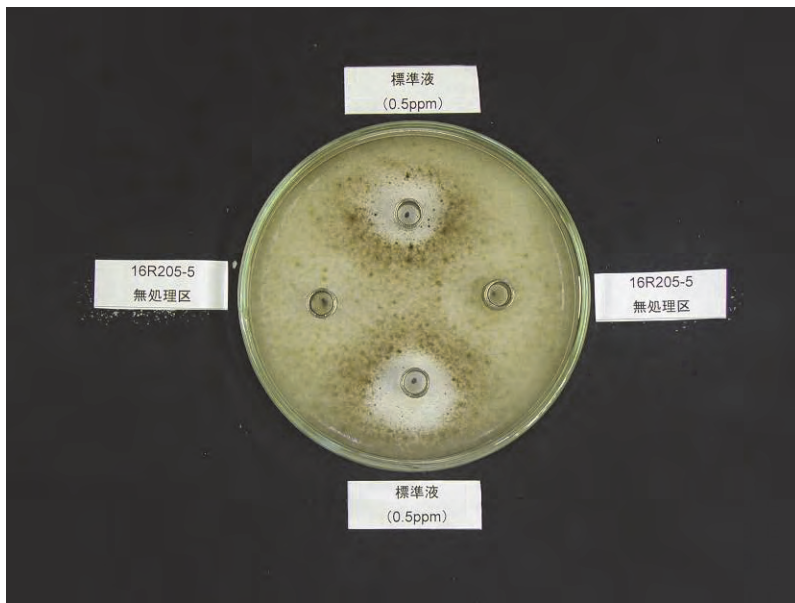
添加回収試験: 1 mg/kg 添加 (定量限界の 10 倍量)



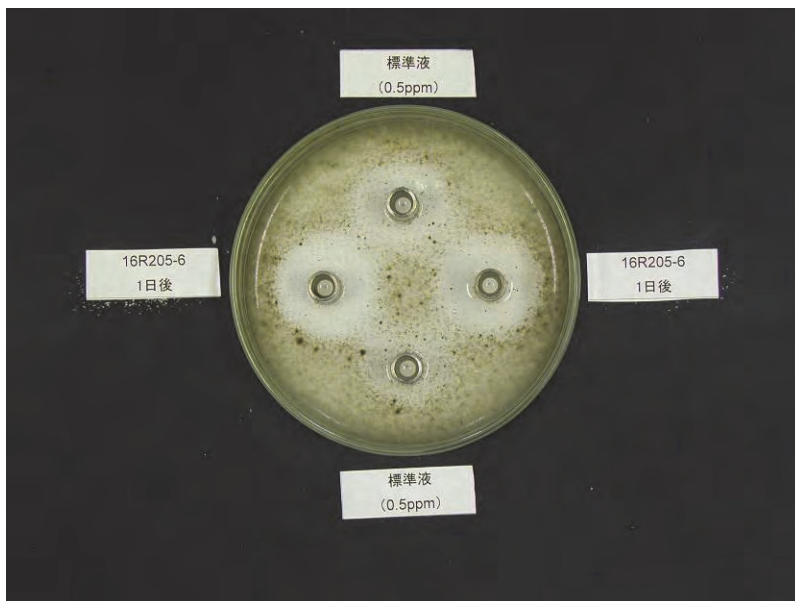
宮崎 保存安定性試験: 1 mg/kg 添加



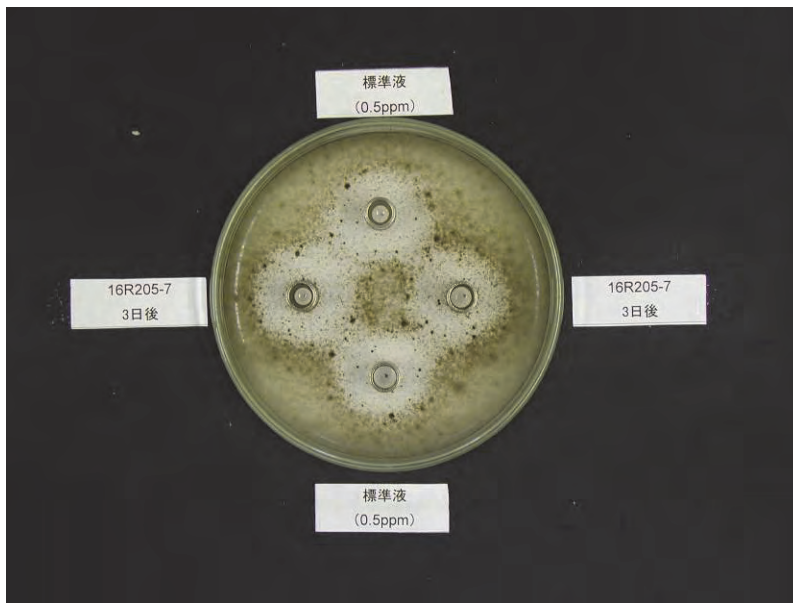
宮崎 無処理区(E)



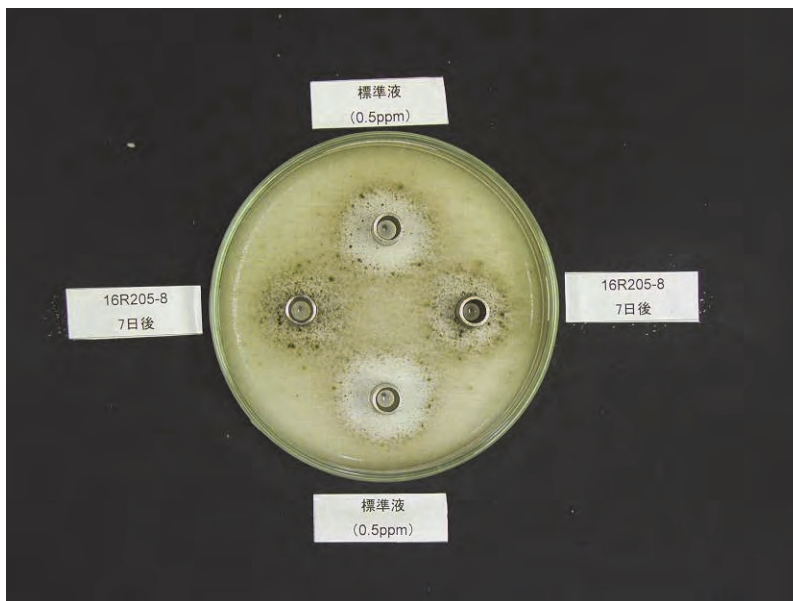
宮崎 処理3日後(B-1)



宮崎 処理3日後 (B-2)



宮崎 処理7日後 (B-3)



残留分析詳細(メロン試料)：シフルフェナミド

1. 分析対象物質

シフルフェナミド

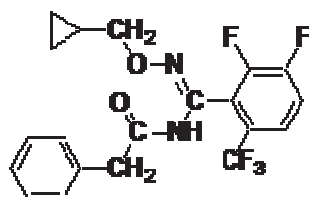
化学名： (Z)-N-[α-(cyclopropylmethoxyimino)-2,3-difluoro-

6-(trifluoromethyl)benzyl]-2-phenylacetamide

分子式： $C_{20}H_{17}F_5N_2O_2$

分子量： 412.4

構造式：



性 状： 白色固体，わずかな芳香

融 点： 61.5-62.5℃

沸 点： 256.8℃ (760 mmHg)

蒸気圧： 0.0354 mPa (20℃)

分配係数： $\log K_{OW} = 4.7$ (pH 6.75)

溶解性： 水 0.52 mg/L (pH 6.5, 20-25℃)

アセトン 920, アセトニトリル 943, ジクロロメタン 902,

エタノール 500, 酢酸エチル 808, *n*-ヘプタン 15.7,

n-ヘキサン 18.6, メタノール 653, キシレン 658 (以上 g/L, 20-25℃)

安定性： pH 4-7で安定

半減期 288日 (pH 9)

水中光分解性半減期 594日

出 典： The Pesticide Manual 17th Edition.

2. 標準品及び試薬

シフルフェナミド標準品：純度 99.8% (和光純薬工業製)

メタノール，ヘキサン，塩化ナトリウム，無水硫酸ナトリウム，酢酸アンモニウム
：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)

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)

GC / SAX / PSA ミニカラム：InertSep GC / SAX / PSA 500mg / 500mg / 500mg / 12mL
(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/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 ODS-3 (ジーエルサイエンス製)
内径 2.1 mm，長さ 10 cm，粒径 4 μ m

温度：カラムオーブン 40℃
サンプルクーラ 15℃

移動相：メタノール / 5 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液
(70 : 30, v/v)

流量：0.2 mL/min

注入量：1 μ L

保持時間：約 9.9 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：	-13.0 V
コリジョン電圧：	-16.0 V
Q3 PreBias：	-15.0 V
イオン検出法：	MRM
採取イオン：	プリカーサーイオン； m/z 414.20
	プロダクトイオン； m/z 296.10

5. 検量線の作成

シフルフェナミド標準品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。この原液をアセトニトリル／水（50：50，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シフルフェナミ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シフルフェナミ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、メタノール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、残渣をメタノール30 mLで2回洗い、同様にろ過した。ろ液を合わせ、メタノールで200 mL定容とし、その40 mL（試料4 g相当量）を取り、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、メタノールを留去した。

6.3. ヘキサン転溶

濃縮液を10%塩化ナトリウム溶液80 mLを用いて分液ロートに移し、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。水層にはヘキサン80 mLを加えて前記操作を繰り返した後、ヘキサン層を取り合わせた。ヘキサン層は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. 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30 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. 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高さを求め、検量線よりシフルフェナミドの重量を求め、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)
0.01	4	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 (mg/kg)
0.005	4	4	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	97, 94,	95, 93	94,	95	1.6
市販品	0.25	110, 102,	107, 102	106,	105	3.3
市販品	0.01	111, 105,	110, 100	110,	107	4.4

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
市販品	5	101, 92,	94, 90	93,	94	4.5
市販品	0.25	106, 99,	102, 97	99,	101	3.5
市販品	0.01	116, 108,	113, 105	109,	110	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)
2016/10/ 3	茨城	89	<0.01
2016/10/ 3	宮崎	91	<0.01
2016/10/13	高知	102	<0.01
2016/10/20	茨城	81	<0.01
2016/10/20	高知	91	<0.01
2016/10/20	宮崎	96	<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)
2016/10/ 3	茨城	95	<0.01
2016/10/ 3	宮崎	102	<0.01
2016/10/13	高知	103	<0.01
2016/10/20	茨城	95	<0.01
2016/10/20	高知	94	<0.01
2016/10/20	宮崎	94	<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シフルフェナミドを添加し、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	62 (2016/8/19-10/20)	95,	94	94
高知	0.5	22 (2016/9/28-10/20)	91,	91	91
宮崎	0.5	73 (2016/8/8-10/20)	95,	91	93

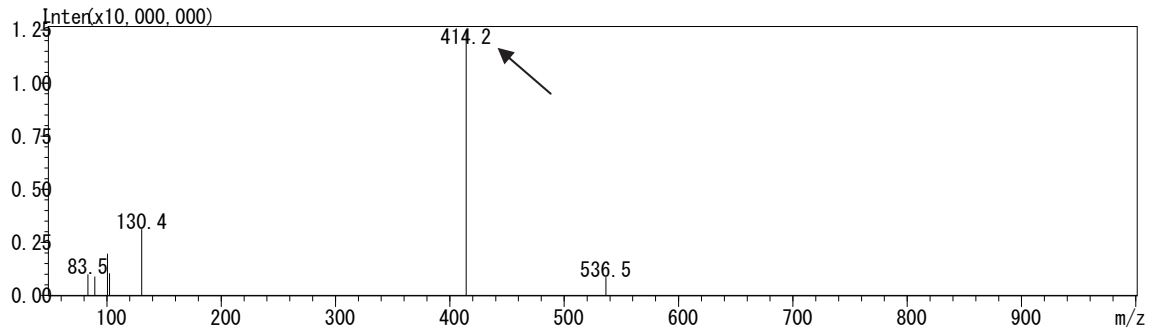
10.2. 果実

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	62 (2016/8/19-10/20)	91,	89	90
高知	0.5	22 (2016/9/28-10/20)	94,	90	92
宮崎	0.5	73 (2016/8/8-10/20)	96,	92	94

付図-1. マススペクトル

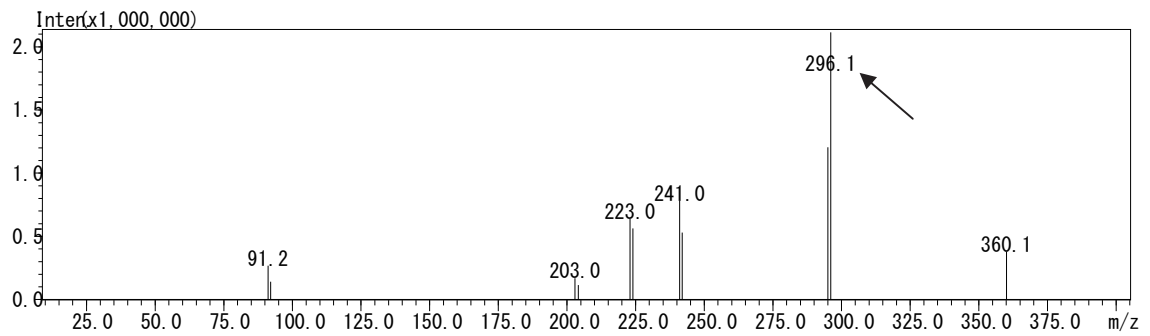
シフルフェナミドのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)

(プリカーサーイオン $m/z=414.2$, 正モード)



シフルフェナミドのプロダクトスキャンスペクトルの一例

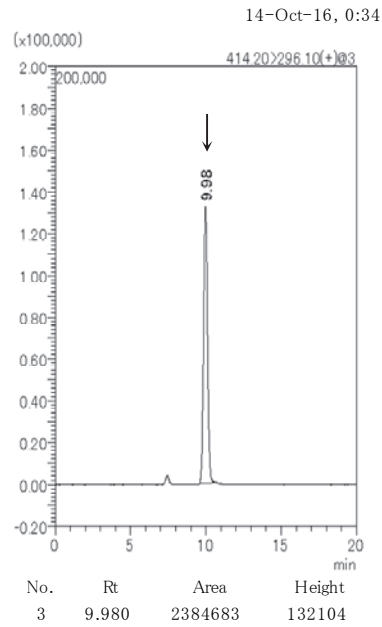
(プロダクトイオン $m/z=296.1$, 正モード)



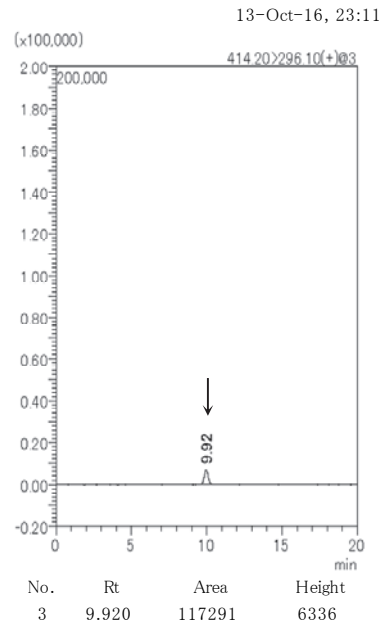
付図-2. シフルフェナミドのクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. 果肉

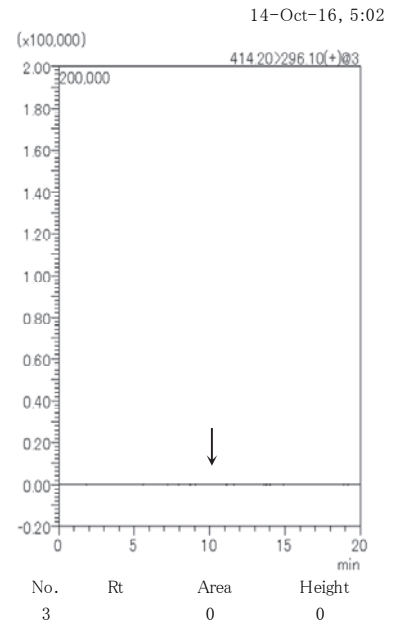
標準品 0.2 ng



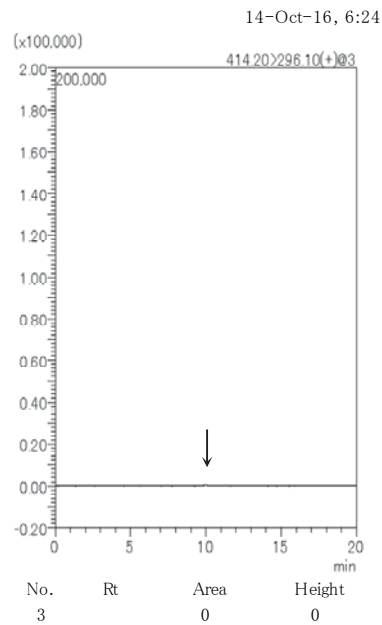
標準品 0.01 ng



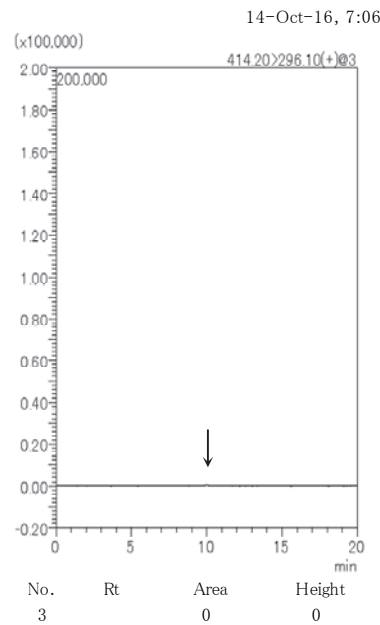
宮崎 無処理
1 µL/4 mL/4 g



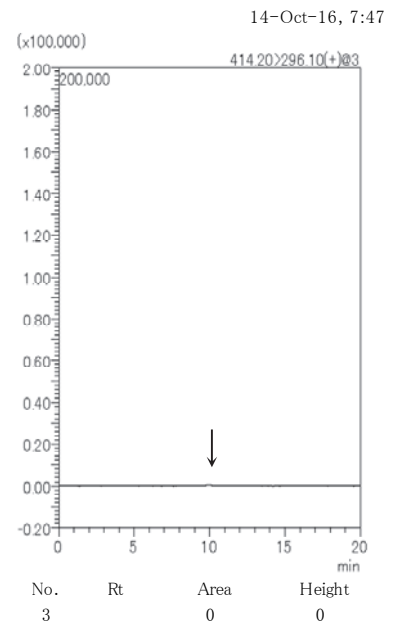
宮崎 2回処理 1日後
1 µL/4 mL/4 g



宮崎 2回処理 3日後
1 µL/4 mL/4 g

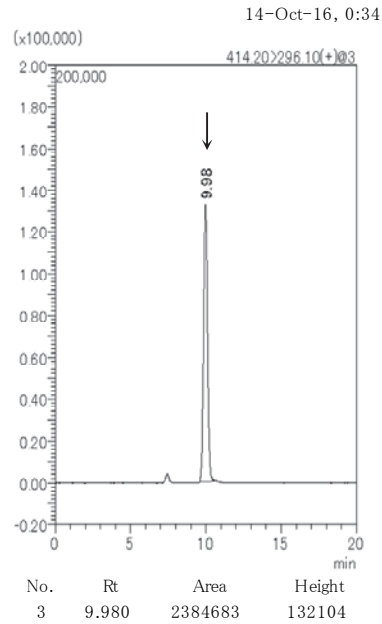


宮崎 2回処理 7日後
1 µL/4 mL/4 g

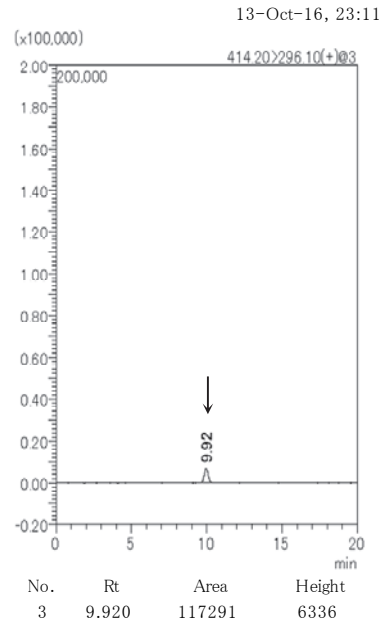
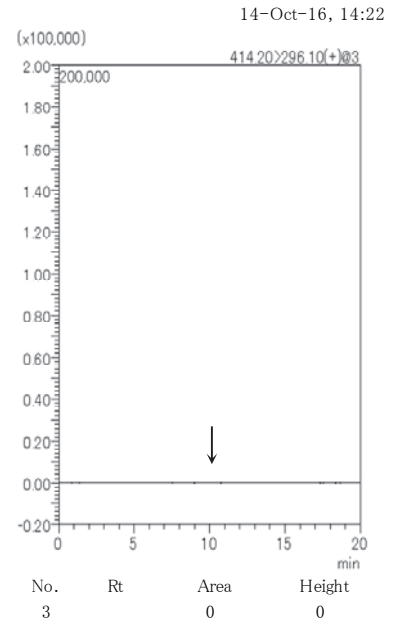
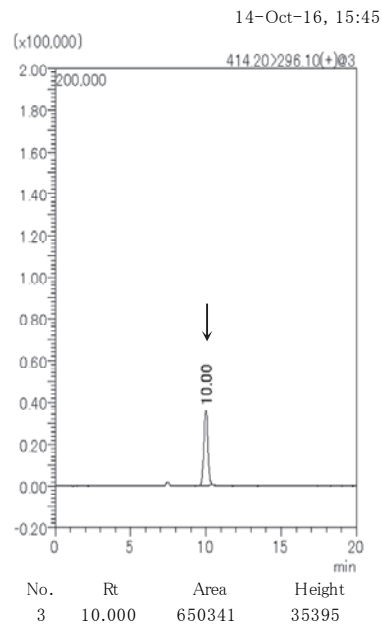
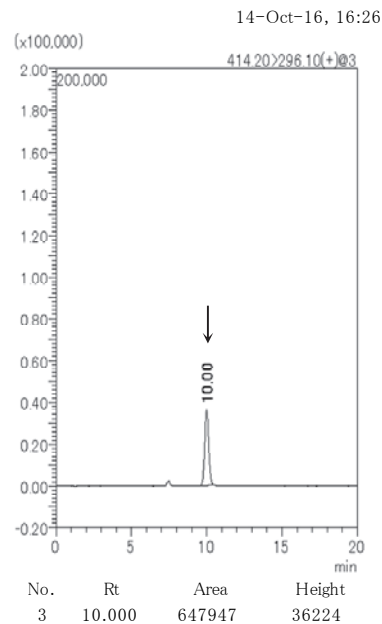
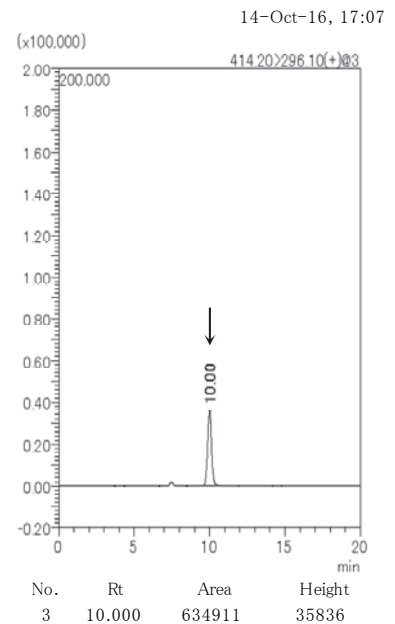


付図-2-2. 果実

標準品 0.2 ng



標準品 0.01 ng

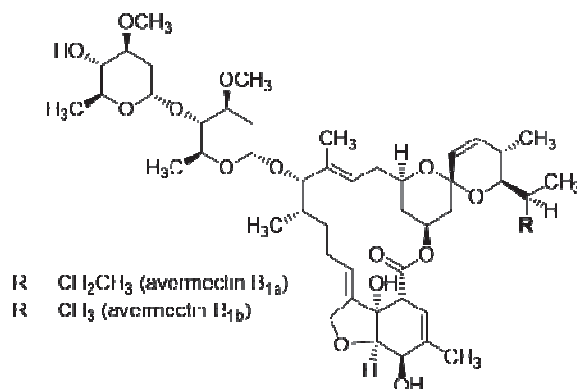
宮崎 無処理
1 μ L/4 mL/4 g宮崎 2回処理 1日後
1 μ L/4 mL/4 g宮崎 2回処理 3日後
1 μ L/4 mL/4 g宮崎 2回処理 7日後
1 μ L/4 mL/4 g

残留分析詳細(メロン試料) : アバメクチン

1. 分析対象物質

アバメクチン

構造式 :



性 状 : 無色から淡黄色の結晶

融 点 : 161.8-169.4℃ (分解)

蒸気圧 : <0.0037 mPa (25℃)

分配係数 : log K_{OW} = 4.4 (pH 7.2)

溶解性 : 水 1.21 mg/L (20-25℃)

アセトン 72, ジクロロメタン 470, 酢酸エチル 160, ヘキサン 0.11,
メタノール 13, オクタノール 83, トルエン 23 (以上 g/L, 20-25℃)

安定性 : 25℃, pH 5~9の水溶液中で加水分解に対して安定

強酸性及び強アルカリに対して不安定

紫外線照射で8,9-Z異性体に変異し, その後不明な分解生成物を生成

アベルメクチンB_{1a}

化学名 : (10*E*,14*E*,16*E*)-(1*R*,4*S*,5′*S*,6*S*,6′*R*,8*R*,12*S*,13*S*,20*R*,21*R*,24*S*)-
6′-[(*S*)-sec-butyl]-21,24-dihydroxy-5′,11,13,22-tetramethyl-2-oxo-3,7,19-
trioxatetracyclo[15.6.1.^{14,8}.0^{20,24}]pentacosa-10,14,16,22-tetraene-6-spiro-
2′-(5′,6′-dihydro-2′*H*-pyran)-12-yl 2,6-dideoxy-4-*O*-
(2,6-dideoxy-3-*O*-methyl-α-*L*-arabino-hexopyranosyl)-3-*O*-methyl-α-
L-arabino-hexopyranoside

分子式 : C₄₈H₇₂O₁₄

分子量 : 873.1

アベルメクチンB_{1b}

化学名： (10*E*,14*E*,16*E*)-(1*R*,4*S*,5′*S*,6*S*,6′*R*,8*R*,12*S*,13*S*,20*R*,21*R*,24*S*)-
21,24-dihydroxy-6′-isopropyl-5′,11,13,22-tetramethyl-2-oxo-
3,7,19-trioxatetracyclo[15.6.1.^{14,8}.0^{20,24}]pentacosa-10,14,16,22-
tetraene-6-spiro-2′-(5′,6′-dihydro-2′*H*-pyran)-12-yl 2,6-dideoxy-4-
O-(2,6-dideoxy-3-O-methyl-α-*L*-arabino-hexopyranosyl)-3-O-
methyl-α-*L*-arabino-hexopyranoside

分子式： C₄₇H₇₀O₁₄

分子量： 859.1

出 典： The Pesticide Manual 17th Edition.

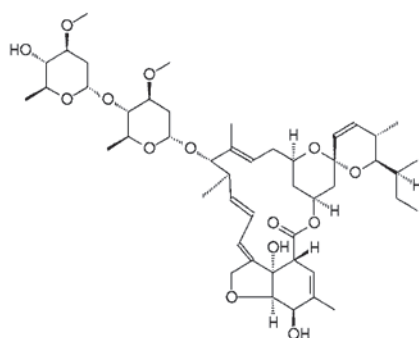
8,9-*Z*-アベルメクチンB_{1a}

化学名： (10*E*,14*E*,16*E*,22*Z*)-(1*R*,4*S*,5′*S*,6*S*,6′*R*,8*R*,12*S*,13*S*,20*R*,21*R*,24*S*)-6′-
[(*S*)-sec-butyl]-21,24-dihydroxy-5′,11,13,22-tetramethyl-
2-oxo-3,7,19-trioxatetracyclo[15.6.1.^{14,8}.0^{20,24}]
pentacosa-10,14,16,22-tetraene-6-spiro-2′-
(5′,6′-dihydro-2′*H*-pyran)-12-yl-2,6-dideoxy-
4-O-(2,6-dideoxy-3-O-methyl-α-*L*-arabino-hexopyranosyl)-
3-O-methyl-α-*L*-arabino-hexopyranoside

分子式： C₄₈H₇₂O₁₄

分子量： 873.1

構造式：



性 状： 白色の結晶性粉末

分配係数： log P_{OW} = 5.463 ± 0.858

溶解性： メタノールに可溶

安定性： 光により変質する恐れ

出 典： 和光純薬工業株式会社 安全データシート
林純薬工業株式会社 安全データシート

2. 標準品及び試薬

アバメクチン標準品：純度 98.7% (シグマアルドリッチ製)

(アベルメクチン B_{1a} 97.286%, アベルメクチン B_{1b} 1.442%の混合品)

8,9-Z-アベルメクチン B_{1a} 標準品：純度 98.7% (和光純薬工業製)

メタノール, アセトニトリル, ヘキサン, 塩化ナトリウム, リン酸二水素カリウム,
リン酸水素二カリウム：特級 (和光純薬工業製)

トルエン：残留農薬試験用 (関東化学製)

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 500mg / 500mg / 500mg / 12mL

(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：ML1502E / 02 (メトラー・トレド製)

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 ODS-4 (ジーエルサイエンス製) 内径 2.1 mm, 長さ 10 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：	アセトニトリル / 20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (85 : 15, v/v)
流量：	0.2 mL/min
注入量：	10 μL
保持時間：	約 3.8 min (アベルメクチン B _{1a}) 約 3.2 min (アベルメクチン B _{1b}) 約 4.4 min (8,9-Z-アベルメクチン B _{1a})

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)
負モード

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°C

DL 温度： 250°C

ヒートブロック温度： 400°C

イオン検出法： MRM

<アベルメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-アベルメクチン B_{1a}>

Q1 PreBias： 24.0 V

コリジョン電圧： 28.0 V

Q3 PreBias： 26.0 V

採取イオン： プリカーサーイオン； m/z 871.50

プロダクトイオン； m/z 565.35

<アベルメクチン B_{1b}>

Q1 PreBias： 20.0 V

コリジョン電圧： 25.0 V

Q3 PreBias： 28.0 V

採取イオン： プリカーサーイオン； m/z 857.50

プロダクトイオン； m/z 551.30

5. 検量線の作成

アバメクチン（アベルメクチンB_{1a}及びアベルメクチンB_{1b}の混合標準品）及び8,9-Z-アベルメクチンB_{1a}の標準品20.0 mg（純度換算相当量）を各々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の標準原液を調製した。この原液を等量ずつ混合し、アセトニトリルで希釈して10 mg/Lの混合標準溶液を調製した。さらにこの混合標準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及び0.04 mg/Lの混合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アバメクチン（アベルメクチンB_{1a}及びアベルメクチンB_{1b}の含量値）はそれぞれのピーク面積を測定し、横軸に重量 (ng)、縦軸に各ピーク面積の和をとって検量線を作成した。8,9-Z-アベルメクチンB_{1a}は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アバメクチ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し、ミキサーで均一化してアバメクチ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、メタノール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、残渣をメタノール30 mLで2回洗い、同様にろ過した。ろ液を合わせ、メタノールで200 mL定容とし、その20 mL（試料2 g相当量）を取り、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、メタノールを留去した。

6.3. ヘキサン洗浄及び塩析分離

濃縮液に塩化ナトリウム10 g及びリン酸緩衝溶液15 mL*を加え分液ロートに移し、アセトニトリル40 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分取し、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、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に溶解してGC/SAX/PSAミニカラムに移して流下した後、同混液20 mLを流下した。全ての溶出液を取り合わせ、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、通風で乾固した。

6.5. 定量

濃縮液を適量のアセトニトリルで定容した。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た。アバメクチン（アベルメクチン B_{1a} 及びアベルメクチン B_{1b} ）はそれぞれのピーク面積を測定し、その和を求め、検量線よりアバメクチン（アベルメクチン B_{1a} 及びアベルメクチン B_{1b} の含量値）の重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

8,9-Z-アベルメクチンB_{1a}はピーク面積を求め、検量線より8,9-Z-アベルメクチンB_{1a}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)

アバメクチン, 8,9-Z-アベルメクチンB_{1a}

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	2	5	10	0.005

最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (mg/kg)
0.01	2	5	10	0.003

8. 回収率

分析法確認のため、市販試料*を用いて、0.005 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 (%)
<u>アバメクチン</u>						
市販品	5	92, 85,	92, 85	89,	89	3.9
市販品	0.25	94, 90,	93, 82	91,	90	5.3
市販品	0.005	117, 99,	112, 90	101,	104	10.3
<u>8,9-Z-アベルメクチンB_{1a}</u>						
市販品	5	90, 81,	89, 79	89,	86	6.0
市販品	0.25	96, 92,	95, 85	95,	93	4.8
市販品	0.005	111, 96,	105, 96	102,	102	6.2

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
<u>アバメクチン</u>						
市販品	5	96, 90,	95, 87	91,	92	4.0
市販品	0.25	96, 93,	95, 91	93,	94	2.1
市販品	0.005	103, 97,	99, 96	98,	99	2.7
<u>8,9-Z-アベルメクチンB_{1a}</u>						
市販品	5	97, 86,	97, 84	94,	92	6.7
市販品	0.25	96, 94,	96, 93	95,	95	1.4
市販品	0.005	103, 99,	102, 95	100,	100	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0.05 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

成分名	分析日*	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値 (mg/kg)
<u>アバメクチン</u>	2016/ 9/27	茨城	100	<0.005
	2016/ 9/27	宮崎	100	<0.005
	2016/10/12	高知	90	<0.005
	2016/10/24	茨城	89	<0.005
	2016/10/24	高知	90	<0.005
	2016/10/24	宮崎	104	<0.005
<u>8,9-Z-アバメクチンB_{1a}</u>	2016/ 9/27	茨城	98	<0.005
	2016/ 9/27	宮崎	98	<0.005
	2016/10/12	高知	97	<0.005
	2016/10/24	茨城	93	<0.005
	2016/10/24	高知	90	<0.005
	2016/10/24	宮崎	96	<0.005

回収試料の添加濃度：0.05 mg/kg

* 抽出日を記載

9.2. 果実

成分名	分析日*	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値 (mg/kg)
<u>アバメクチン</u>	2016/ 9/27	茨城	97	<0.005
	2016/ 9/27	宮崎	101	<0.005
	2016/10/12	高知	95	<0.005
	2016/10/24	茨城	104	<0.005
	2016/10/24	高知	98	<0.005
	2016/10/24	宮崎	109	<0.005
<u>8,9-Z-アベルメクチンB_{1a}</u>	2016/ 9/27	茨城	98	<0.005
	2016/ 9/27	宮崎	96	<0.005
	2016/10/12	高知	98	<0.005
	2016/10/24	茨城	98	<0.005
	2016/10/24	高知	96	<0.005
	2016/10/24	宮崎	101	<0.005

回収試料の添加濃度：0.05 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アバメクチン（アベルメクチンB_{1a}及びアベルメクチンB_{1b}）及び8,9-Z-アベルメクチンB_{1a}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 (%)
<u>アバメクチン</u>					
茨城	0.5	66 (2016/8/19-10/24)	92,	89	90
高知	0.5	26 (2016/9/28-10/24)	91,	89	90
宮崎	0.5	79 (2016/8/6-10/24)	92,	90	91
<u>8,9-Z-アベルメクチンB_{1a}</u>					
茨城	0.5	66 (2016/8/19-10/24)	87,	86	86
高知	0.5	26 (2016/9/28-10/24)	87,	85	86
宮崎	0.5	79 (2016/8/6-10/24)	86,	86	86

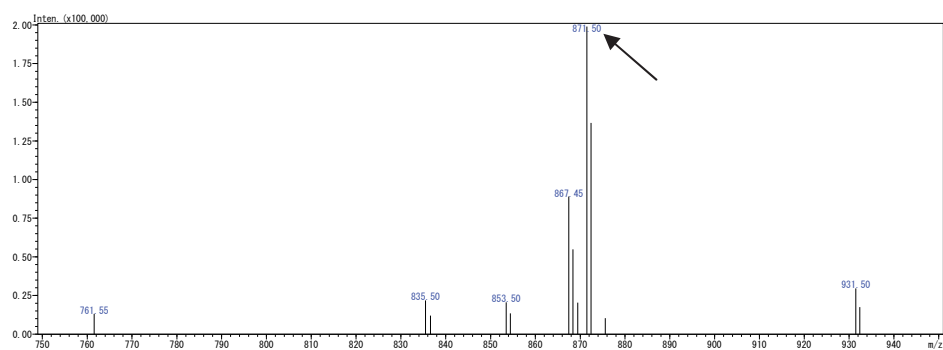
10.2. 果実

圃場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
<u>アバメクチン</u>					
茨城	0.5	66 (2016/8/19-10/24)	98,	95	96
高知	0.5	26 (2016/9/28-10/24)	99,	94	96
宮崎	0.5	79 (2016/8/6-10/24)	105,	96	100
<u>8,9-Z-アベルメクチンB_{1a}</u>					
茨城	0.5	66 (2016/8/19-10/24)	90,	89	90
高知	0.5	26 (2016/9/28-10/24)	96,	92	94
宮崎	0.5	79 (2016/8/6-10/24)	91,	90	90

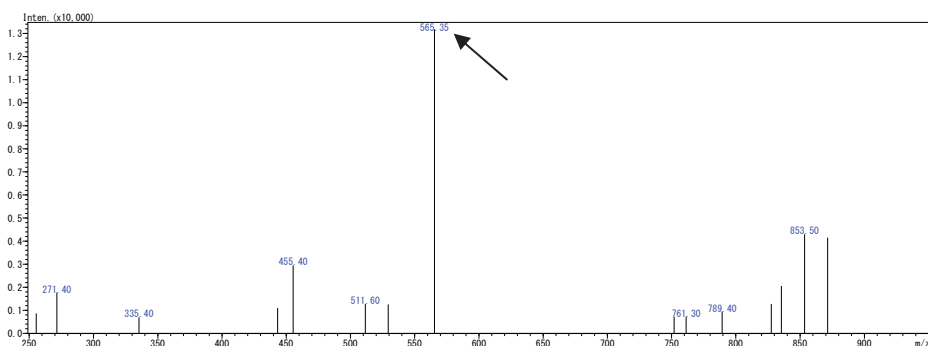
付図-1. マススペクトル

アベルメクチンB_{1a}のマススペクトル (一次イオン) の一例

(プリカーサーイオン $m/z=871.50$, 負モード)

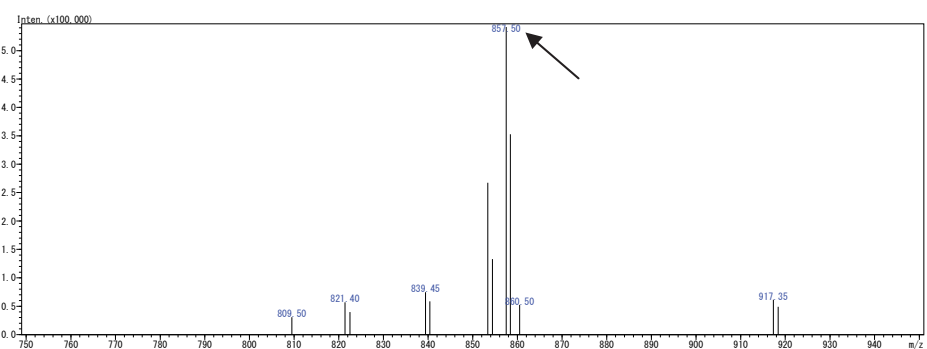


(プロダクトイオン $m/z=565.35$, 負モード)

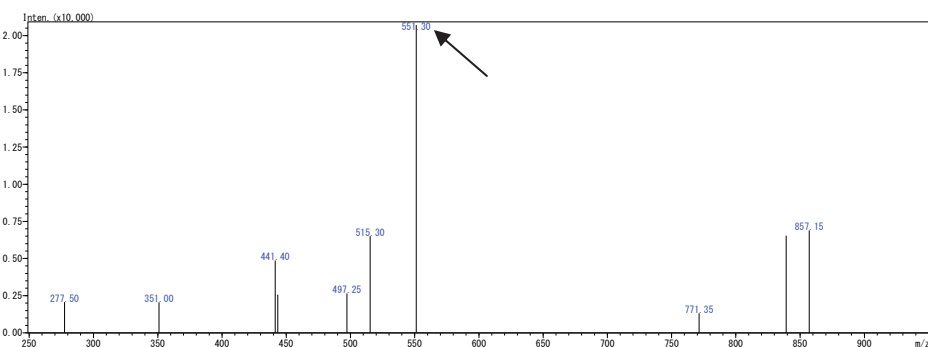


アベルメクチンB_{1b}のマススペクトル (一次イオン) の一例

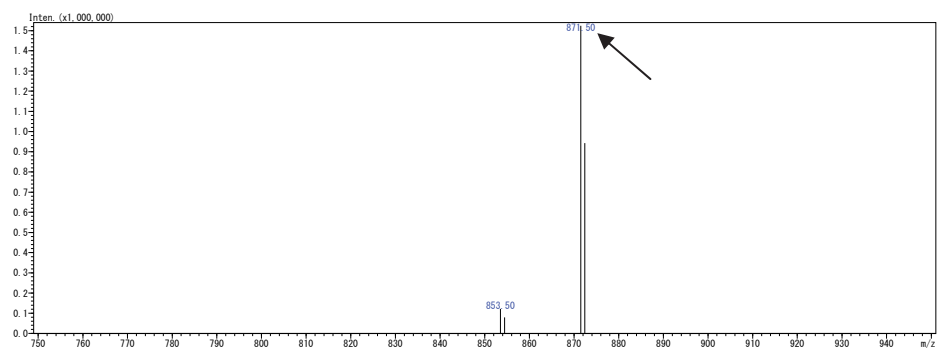
(プリカーサーイオン $m/z=857.50$, 負モード)



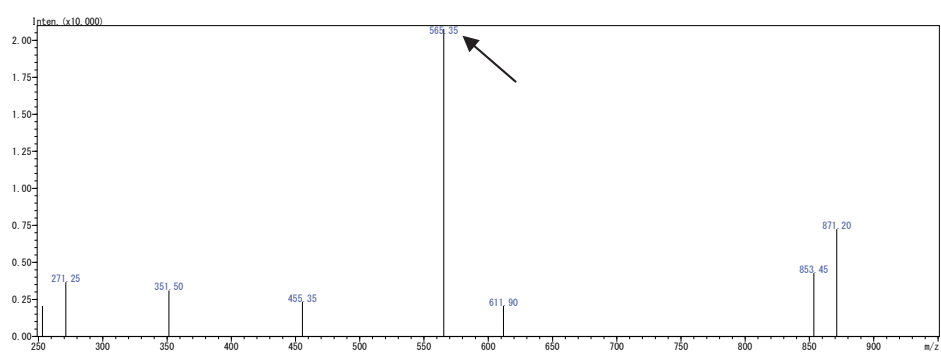
(プロダクトイオン $m/z=551.30$, 負モード)



8,9-Z-アベルメクチンB_{1a}のマススペクトル (一次イオン) の一例
(プリカーサーイオン $m/z=871.50$, 負モード)



(プロダクトイオン $m/z=565.35$, 負モード)

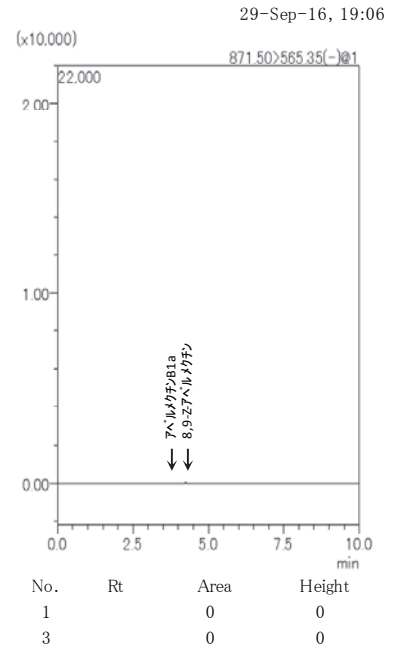
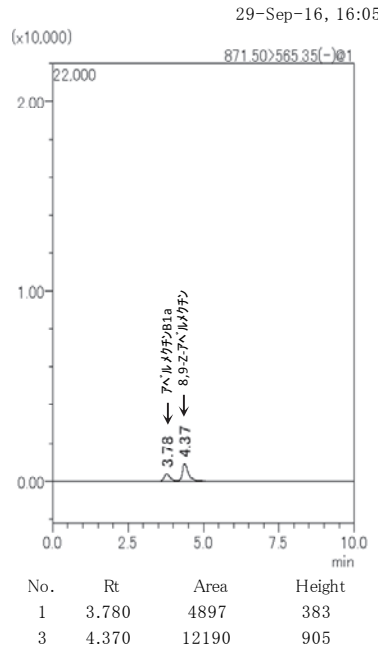
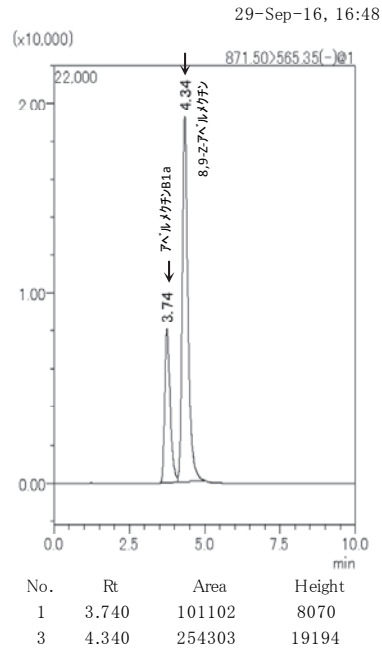
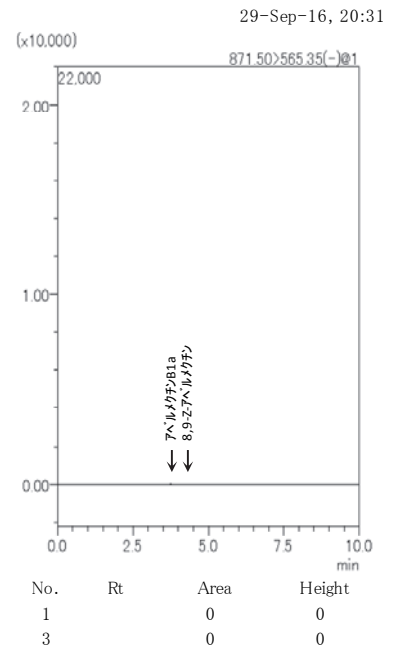
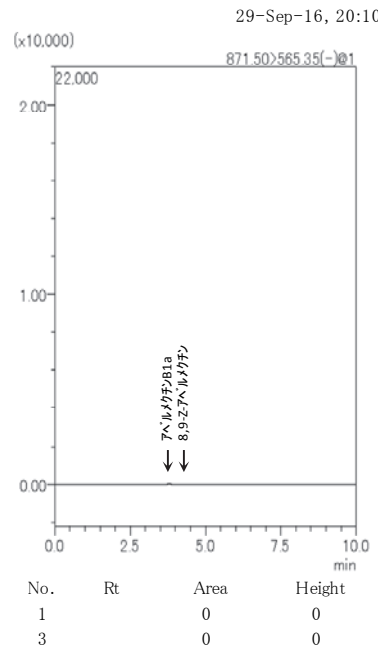
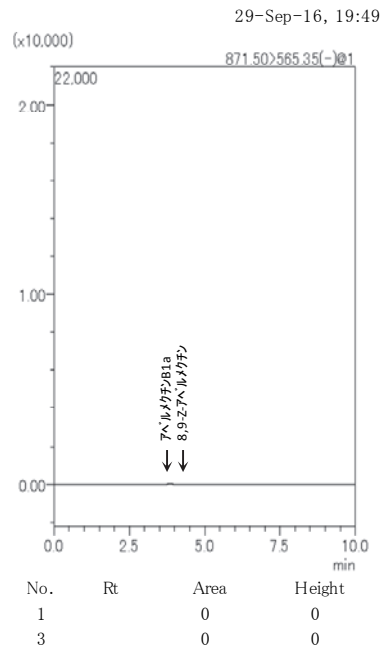


付図-2. アベルメクチン B_{1a} 及び8,9-Z-アベルメクチン B_{1a} のクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. 果肉

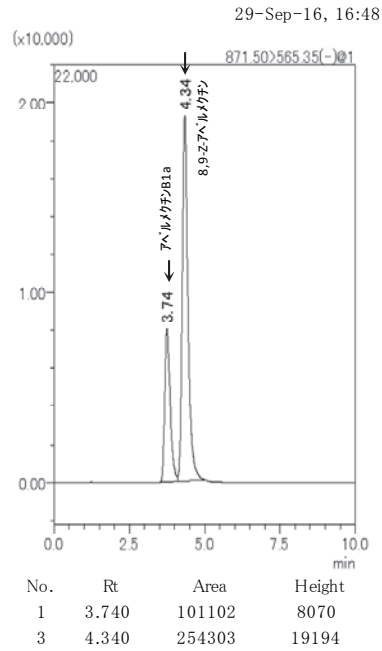
標準品 0.4 ng

標準品 0.02 ng

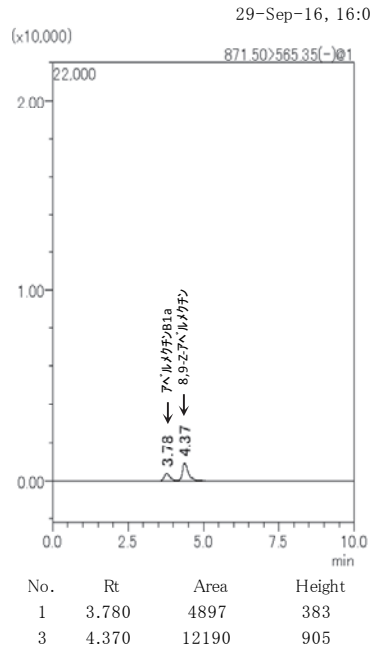
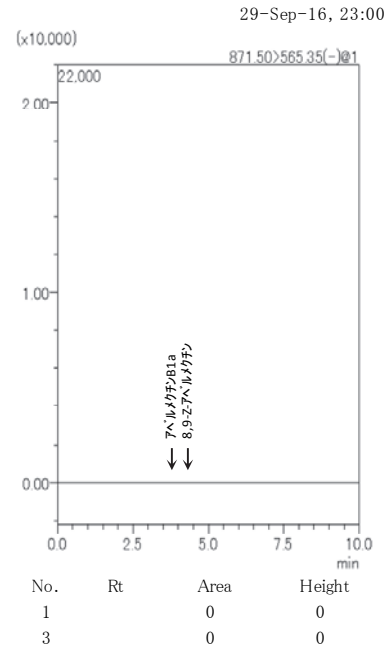
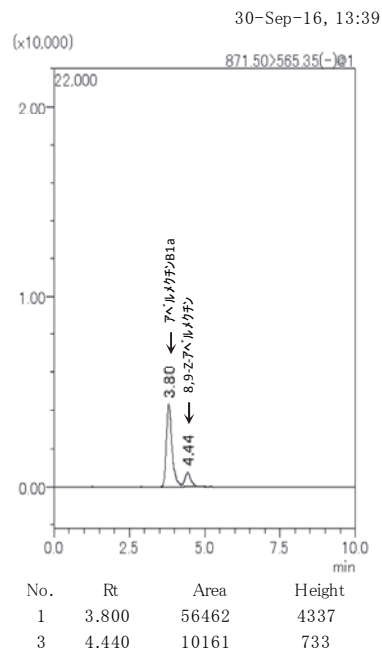
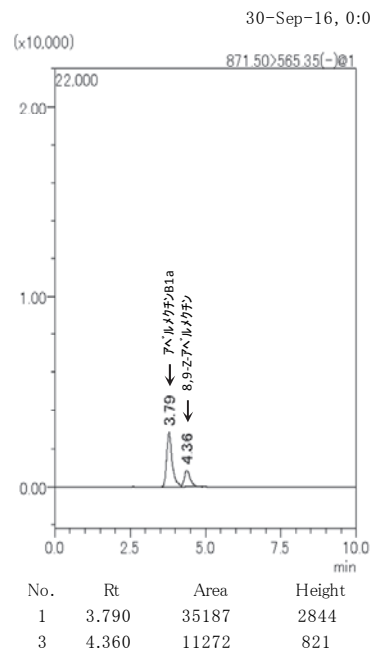
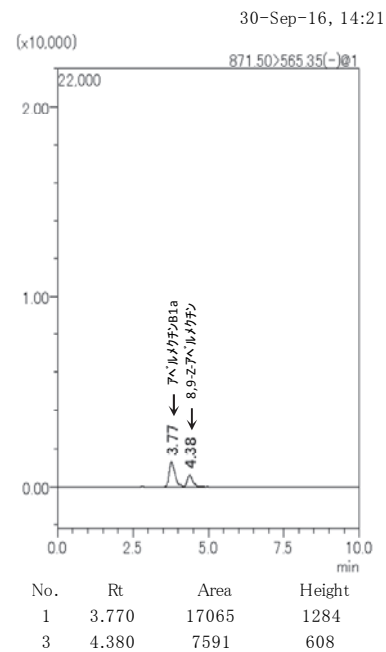
宮崎 無処理
10 μ L/5 mL/2 g宮崎 3回処理 1日後
10 μ L/5 mL/2 g宮崎 3回処理 3日後
10 μ L/5 mL/2 g宮崎 3回処理 7日後
10 μ L/5 mL/2 g

付図-2-2. 果実

標準品 0.4 ng

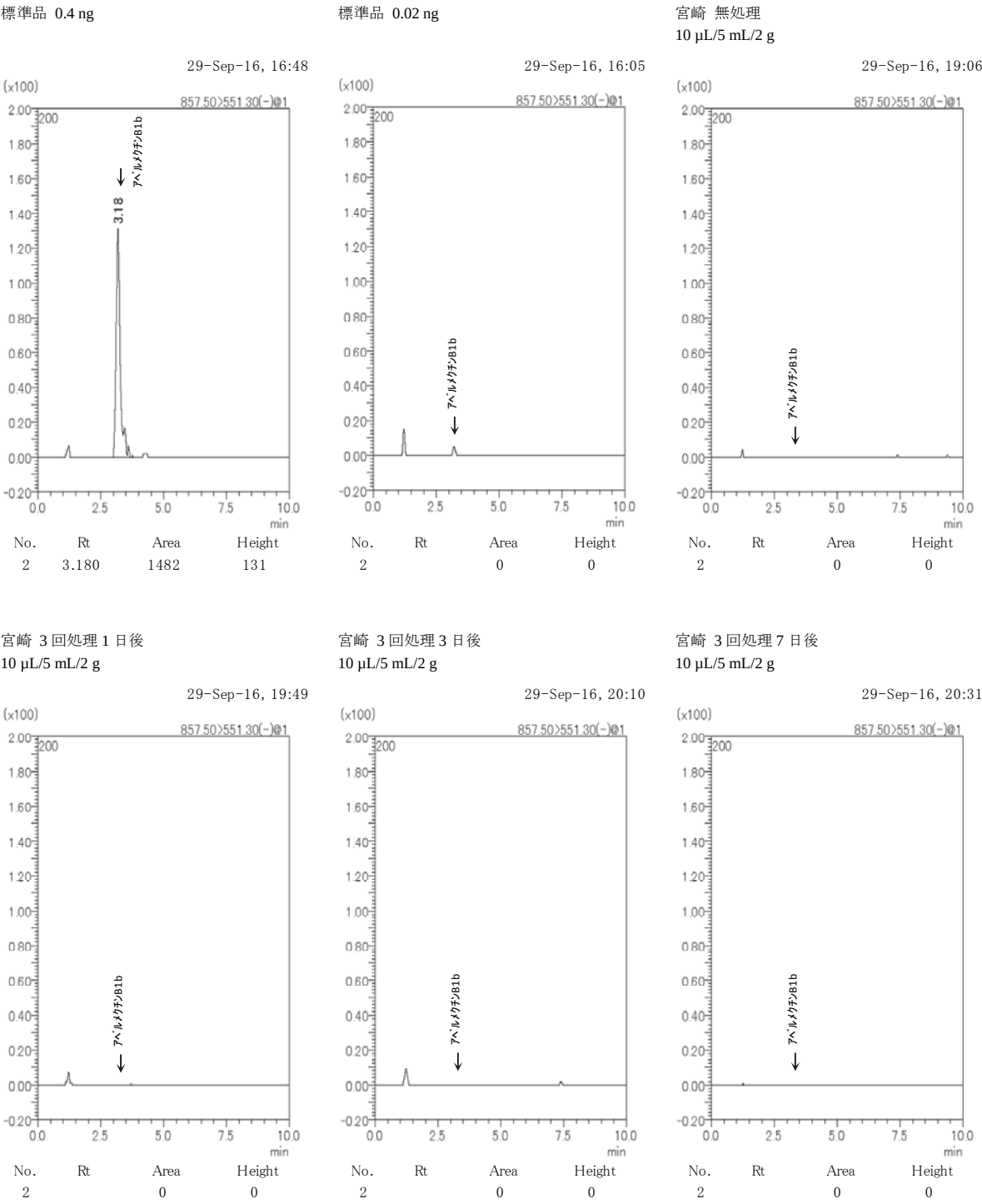


標準品 0.02 ng

宮崎 無処理
10 µL/5 mL/2 g宮崎 3回処理 1日後
10 µL/5 mL/2 g宮崎 3回処理 3日後
10 µL/5 mL/2 g宮崎 3回処理 7日後
10 µL/5 mL/2 g

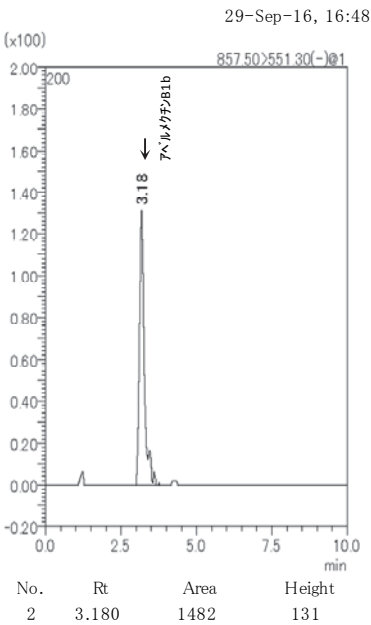
付図-3. アベルメクチンB_{1b}のクロマトグラム (代表例)

付図-3-1. 果肉

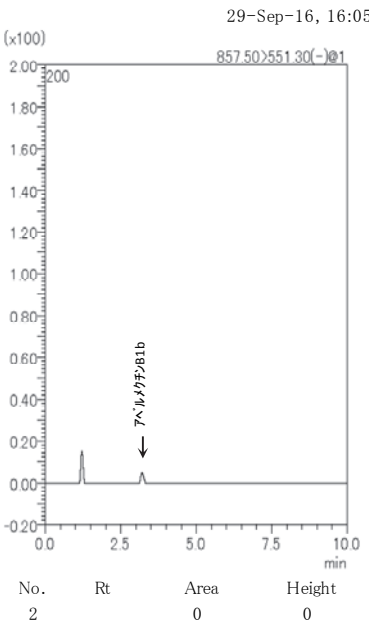


付図-3-2. 果実

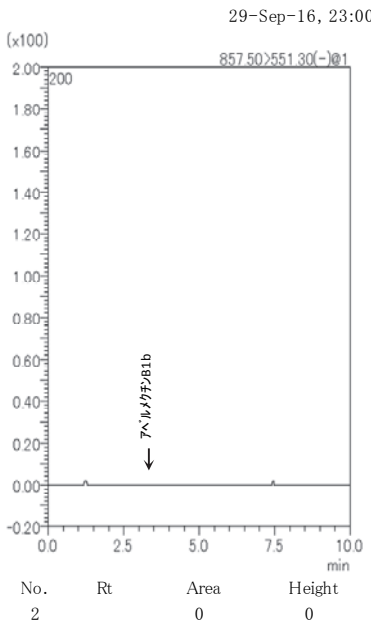
標準品 0.4 ng



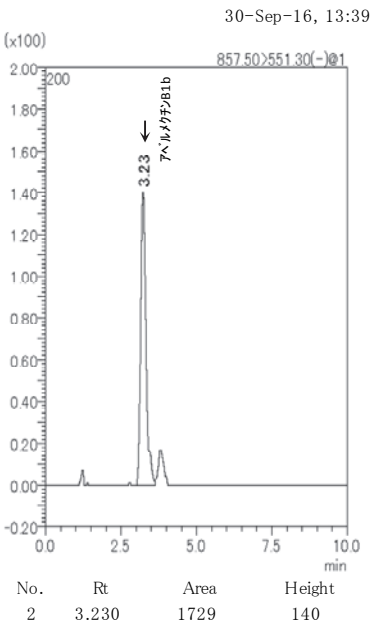
標準品 0.02 ng



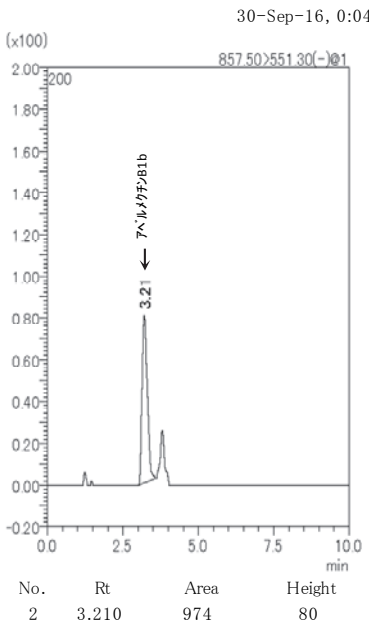
宮崎 無処理
10 μ L/5 mL/2 g



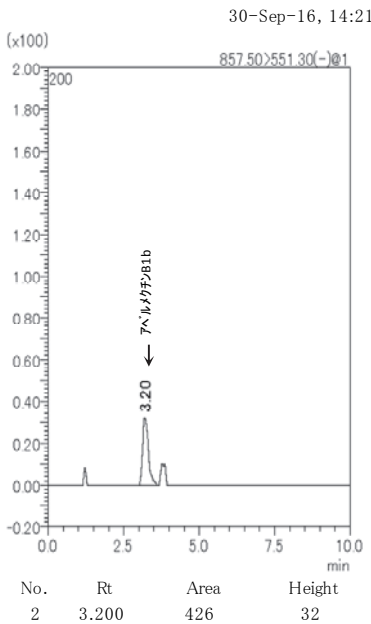
宮崎 3回処理 1日後
10 μ L/5 mL/2 g



宮崎 3回処理 3日後
10 μ L/5 mL/2 g



宮崎 3回処理 7日後
10 μ L/5 mL/2 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	1.76	17.1	10.9	85	15	2.0
	B	1	1.69		8.46		85	15	1.6
	B	3	1.75		8.73		85	15	1.6
	B	7	1.88		9.39		85	15	1.7
							平均 85:15		平均 1.7
高知	0	—	1.71	1.75	20.5	13.1	85	15	1.4
	B	1	1.73		10.4		84	16	1.3
	B	3	1.80		10.8		85	15	1.3
	B	7	1.75		10.5		83	17	1.7
							平均 84:16		平均 1.4
宮崎	0	—	2.00	1.79	20.0	12.7	84	16	1.7
	B	1	1.77		10.6		82	18	1.8
	B	3	1.61		9.68		81	19	2.1
	B	7	1.77		10.6		86	14	1.1
							平均 83:17		平均 1.7
3 ほ場の総平均重量					3 ほ場の総重量の平均				
1.77 kg/個					12.2 kg				

B：マラソンは3回処理

ミルベメクチンは2回処理

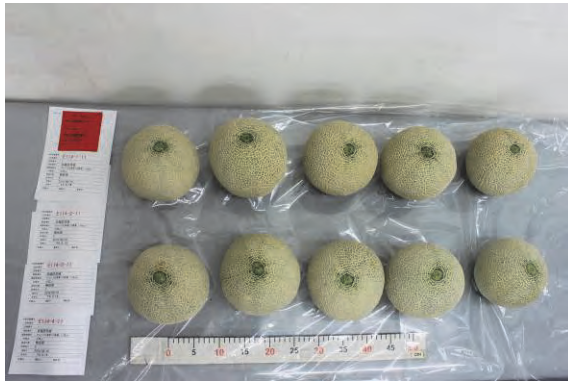
ポリオキシシン複合体は5回処理

シフルフェナミドは2回処理

アバメクチンは3回処理

2. 作物写真

2.1. 茨城



茨城 無処理



茨城 処理 1 日後



茨城 処理 3 日後



茨城 処理 7 日後

2.2. 高知



高知 無処理



高知 処理 1 日後



高知 処理 3 日後



高知 処理 7 日後

2.3. 宮崎



宮崎 無処理



宮崎 処理 1 日後



宮崎 処理 3 日後



宮崎 処理 7 日後