

資料 2-3

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② (メロン)
残留分析詳細① ピリダベン

1. 分析対象物質

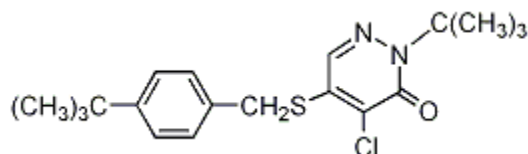
ピリダベン

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： 90日間50°Cで安定, 光に対して不安定,
暗所で30日間, 加水分解に対して安定 (pH5, 7, 9, 25°C)

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

2. 標準品及び試薬

ピリダベン標準品：純度 100% (和光純薬工業製)

アセトン, トルエン, メタノール：残留農薬試験用 (和光純薬工業製)

メタノール：残留農薬試験用 (和光純薬工業製)

水：PURELAB Flex System で精製した水

(Veolia Water Solutions&Technologies, France)

酢酸アンモニウム：試薬特級 (和光純薬工業製)

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

3. 装置及び機器

ミキサー： ロボクーブ BLIXER-5Plus, ロボクーブ R-23 (エフ・エム・アイ製)

液体クロマトグラフ・質量分析計システム (LC-MS/MS)：

島津製作所 Nexera X2 System

サイエックス Triple Quad 4500

データ処理装置： サイエックス Analyst

4. 液体クロマトグラフ・質量分析計の操作条件

4.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム： ZORBAX Eclipse Plus C18 (アジレント・テクノロジー製)

内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒径 1.8 μ m

溶離液： メタノール／5 mmol/L 酢酸アンモニウム

70:30 (5 min)－(2 min)－95:5 (2.9 min)

流速： 0.3 mL/min

カラム温度： 40°C

試料注入量： 2 μ L

保持時間： 約 8.6 min

4.2. 質量分析計

イオン化法： エレクトロスプレー イオン化法 (ESI)

正モード

イオン化温度： 700°C

イオンスプレー電圧： 5500 V

Declustering Potential： 81 V

Collision Energy： 33 V

Collision Cell Exit Potential： 12 V

イオン検出法： MRM

モニタリングイオン： プリカーサーイオン m/z 365.1

プロダクトイオン m/z 309.0

5. 検量線の作成

ピリダベン標準品 10.0 mg を 50 mL 容メスフラスコに精秤し、アセトンに溶解して 200 mg/L 標準原液を調製した。この原液をアセトンで希釈して 2 mg/L 標準溶液を調製し、さらメタノール／水 (70:30, v/v) 混液で希釈して 0.1 mg/L 標準溶液を調製した。この溶液を同混液で希釈して 0.00025, 0.0005, 0.0025, 0.005 及び 0.01 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液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 組をミキサーで均一化して調製試料を作製した。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 組以上作製し、それぞれ密封して冷凍保存 (−20℃ 以下) した。分析時にその 1 組を取り、分析に供した。

6.2. 抽出

均一化した試料 20 g をはかりとり、アセトン 100 mL を加え、30 分間振とうした。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣をアセトン 50 mL で洗い、同様にろ過した。ろ液を合わせ、アセトンで 200 mL に定容した後、その 2.5 mL (試料 0.25 g 相当量) を分取した。

6.3. グラファイトカーボンミニカラムによる精製

グラファイトカーボンミニカラムにメタノール及び水を順次 5 mL ずつ流下し、前処理した。前項で分取した抽出液に水 2.5 mL を添加して混和した後、グラファイトカーボンミニカラムに移して流下した。さらにメタノール/水 (90:10, v/v) 混液 5 mL を流下し、これらの流出液を捨てた。次に、メタノール/トルエン (75:25, v/v) 混液 10 mL を流下し、溶出液を取り、40℃ 以下の水浴中で減圧濃縮し、最後は窒素気流下で溶媒を留去した。

6.4. 定量

残留物を適量のメタノール/水 (70:30, v/v) 混液に溶解した。この溶液を前記条件の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入してピーク面積を求め、検量線より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)
0.001	0.25	5	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)
0.0005	0.25	5	2	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、高知の無処理試料*を用いて、0.01 mg/kg (定量限界相当), 0.25 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。

* H25 農薬登録に係る調理加工試験導入に関する調査事業 無処理試料を均一化したもの

8.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSD (%)
高知	5	104, 100,	103, 99	101,	101	2
高知	0.25	95, 92,	95, 89	93,	93	3
高知	0.01	76, 71,	75, 70	72,	73	4

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSD (%)
高知	5	107, 101,	102, 99	102,	102	3
高知	0.25	104, 98,	103, 95	102,	100	4
高知	0.01	103, 93,	102, 85	96,	96	8

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6月実施のFAPAS 技能試験 (Fera Science Ltd.) におけるZスコアは全てZ<2であった。

9.1. 果肉

分析日*	使用したほ場	回収率 (%)	無処理区の分析値 (mg/kg)
2015/8/28	宮崎	93	<0.01
2015/11/9	高知	87	<0.01
2015/11/10	茨城	77	<0.01
2015/11/24	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*	使用したほ場	回収率 (%)	無処理区の分析値 (mg/kg)
2015/8/28	宮崎	95	<0.01
2015/11/9	高知	82	<0.01
2015/11/10	茨城	95	<0.01
2015/11/24	宮崎	91	<0.01

回収試料の添加濃度：0.1 mg/kg

*抽出日を記載

10. 保存安定性確認

均一化した各無処理試料にピリダベンを添加し、冷凍暗所 (−20℃ 以下) に保存した。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

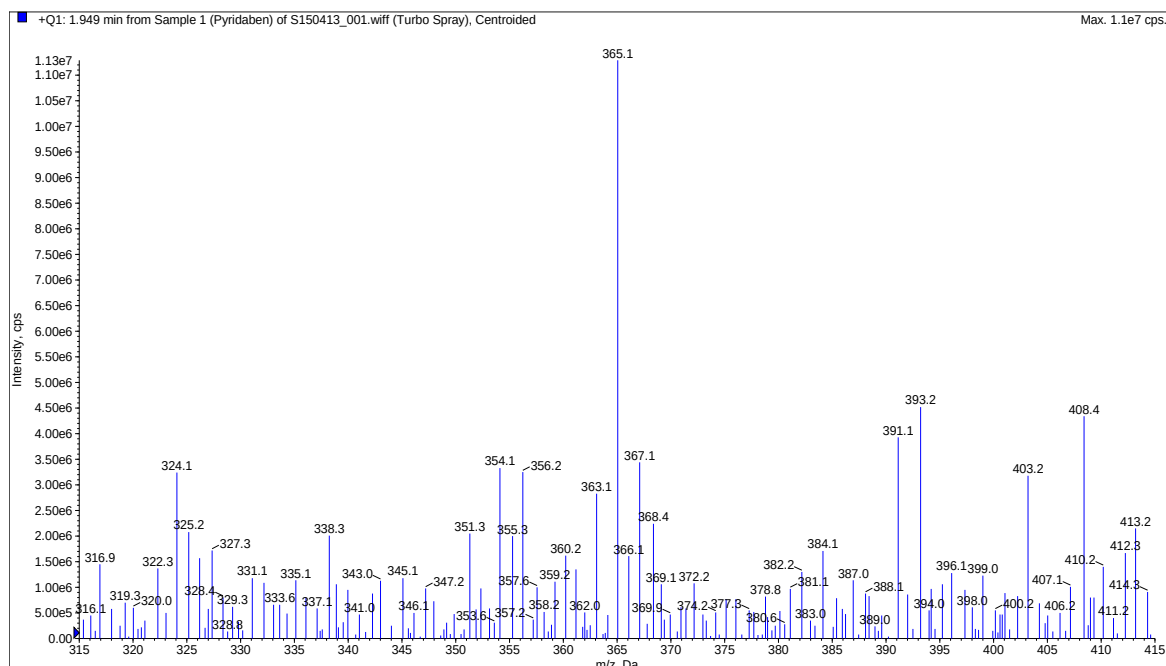
ほ場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	0.5	27 (2015/10/28-11/24)	93,	92	92
高知	0.5	41 (2015/10/14-11/24)	88,	88	88
宮崎	0.5	116 (2015/7/31-11/24)	93,	90	92

10.2. 果実

ほ場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	0.5	27 (2015/10/28-11/24)	100,	96	98
高知	0.5	41 (2015/10/14-11/24)	91,	89	90
宮崎	0.5	116 (2015/7/31-11/24)	92,	90	91

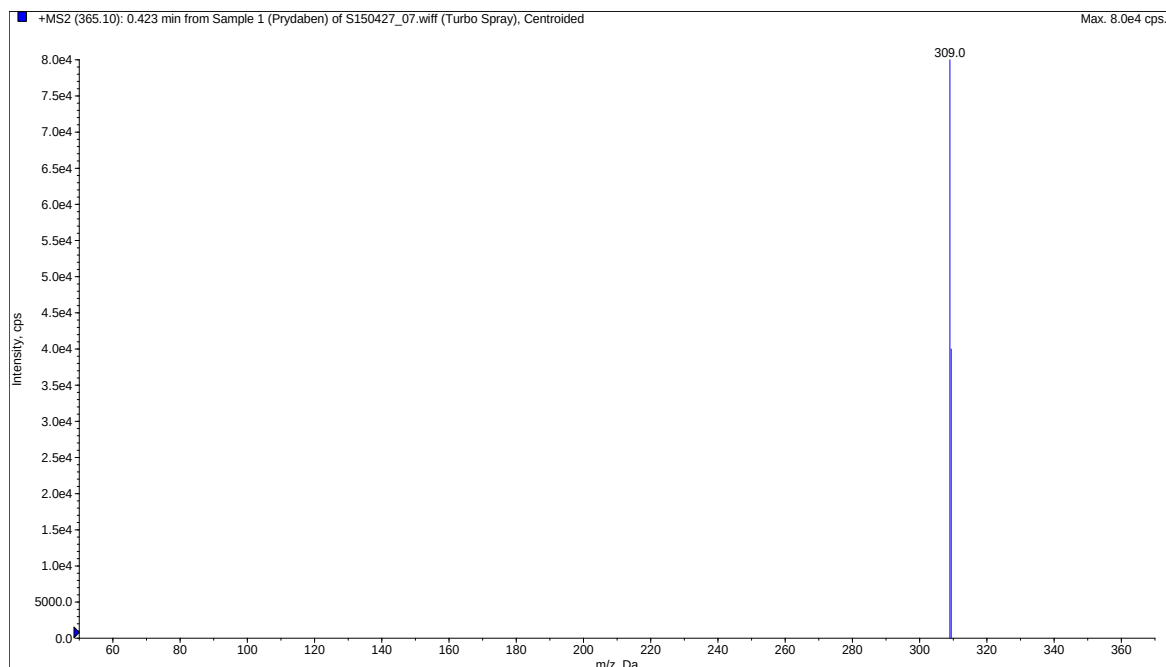
付図-1. ピリダベンのマスペクトル

ピリダベンのマスペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)



ピリダベンのプロダクトスキャンスペクトルの一例

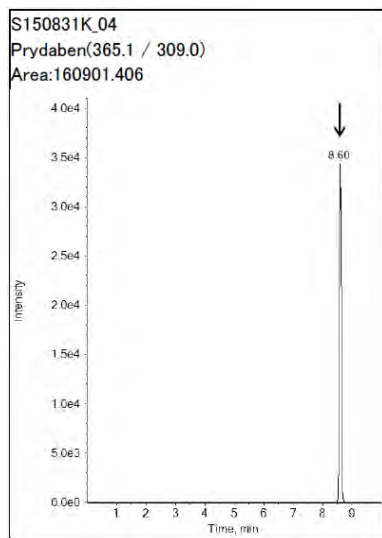
(プリカーサーイオン ; $m/z=365.1$, 正モード)



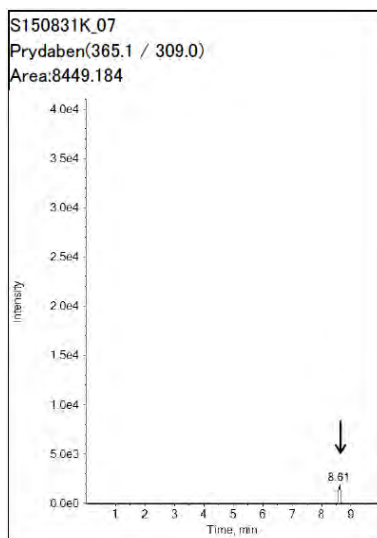
付図-2. ピリダベンのクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. 果肉

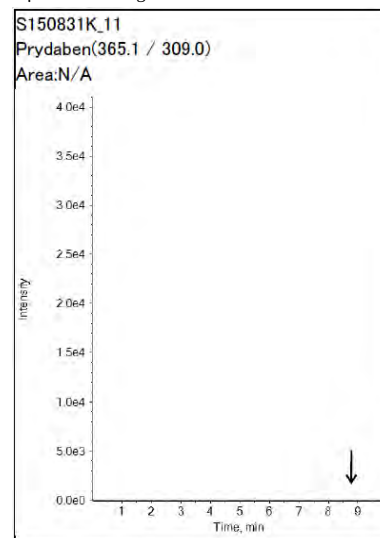
標準品 0.02 ng



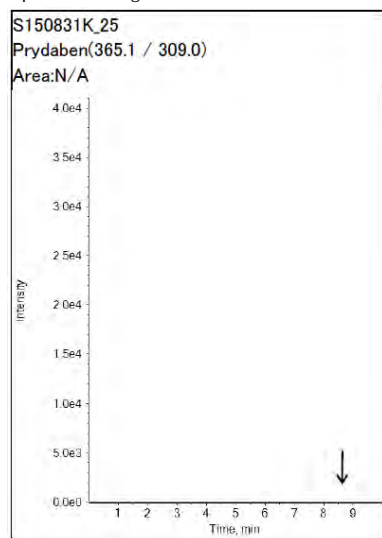
標準品 0.001 ng



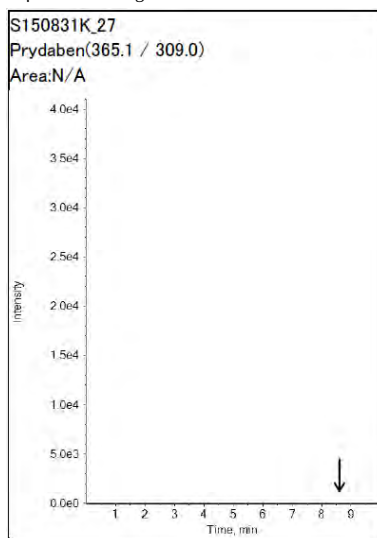
宮崎 無処理
2 μ L/5 mL/0.25 g



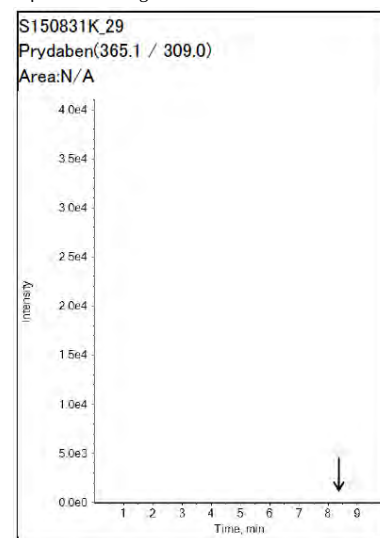
宮崎 2 回処理 3 日後
2 μ L/5 mL/0.25 g



宮崎 2 回処理 7 日後
2 μ L/5 mL/0.25 g



宮崎 2 回処理 14 日後
2 μ L/5 mL/0.25 g

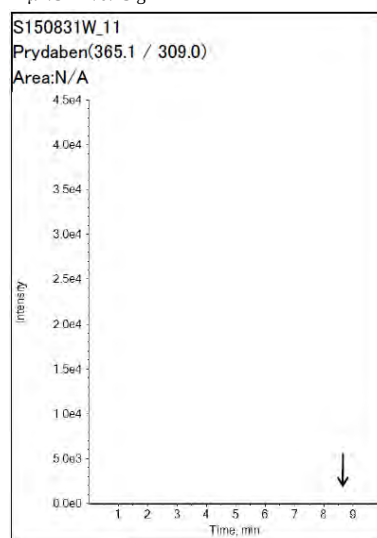
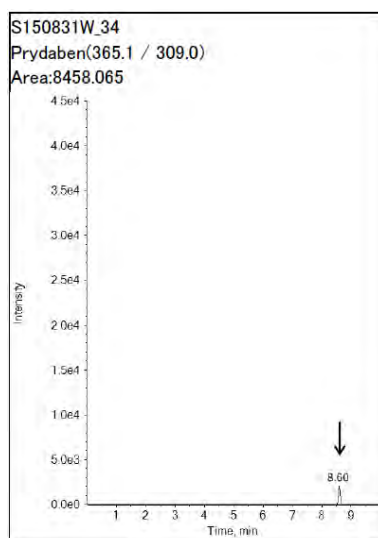
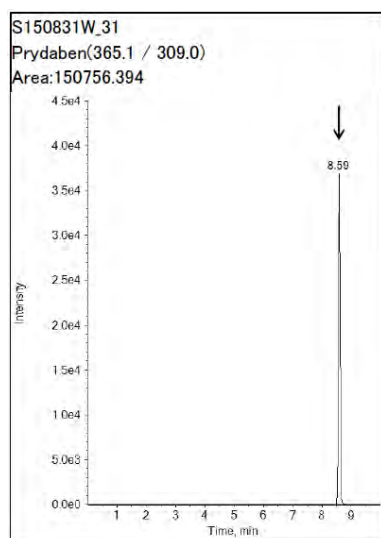


付図-2-2. 果実

標準品 0.02 ng

標準品 0.001 ng

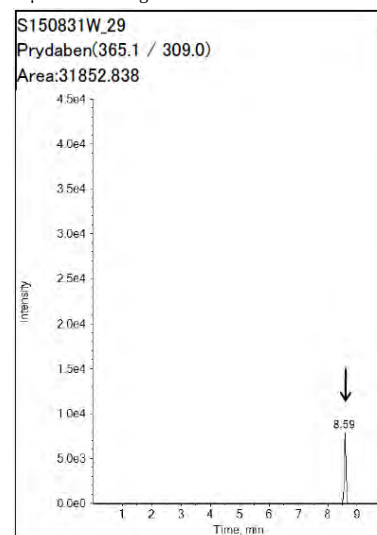
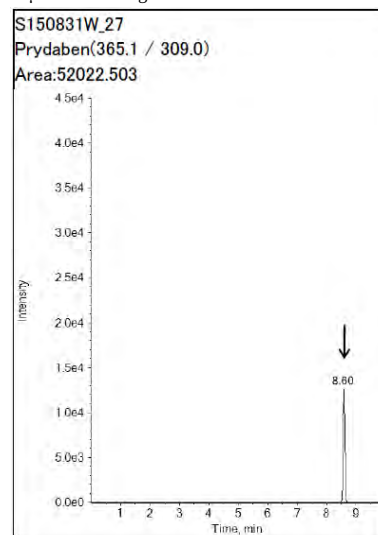
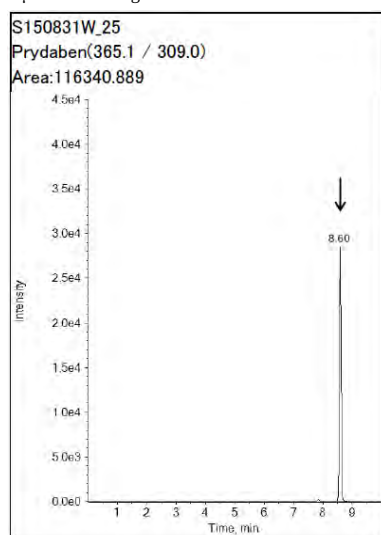
宮崎 無処理
2 μ L/5 mL/0.25 g



宮崎 2 回処理 3 日後
2 μ L/5 mL/0.25 g

宮崎 2 回処理 7 日後
2 μ L/5 mL/0.25 g

宮崎 2 回処理 14 日後
2 μ L/5 mL/0.25 g



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② (メロン)
残留分析詳細② TPN

1. 分析対象物質

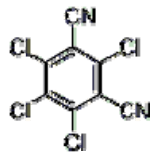
TPN

化学名 : tetrachloroisophthalonitrile

分子式 : $C_6Cl_4N_2$

分子量 : 265.9

構造式 :



性 状 : 無色結晶

融 点 : 252.1°C

蒸気圧 : 0.076 mPa (25°C)

分配係数 : $\log P_{OW} = 2.92$ (25°C)

溶解性 : 水 0.81 mg/L (25°C)

アセトン 20.9, 1,2-ジクロロエタン 22.4, 酢酸エチル 13.8,
n-ヘプタン 0.2, メタノール 1.7, キシレン 74.4 (以上g/L)

安定性 : 室温で安定, 水溶液中や結晶状態において紫外線照射に対して安定,
酸性溶液中や弱アルカリ溶液中で安定 (pH>9で徐々に加水分解)

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

2. 標準品及び試薬

TPN 標準品 : 純度 99.9% (和光純薬工業製)

アセトニトリル, アセトン, トルエン, ヘキサン : 残留農薬試験用 (和光純薬工業製)

水 : PURELAB Flex System で精製した水

(Veolia Water Solutions&Technologies, France)

リン酸 : 試薬特級 (和光純薬工業製)

グラファイトカーボン/NH₂ 積層ミニカラム :

Supelclean ENVI-Carb/LC-NH₂, 500 mg/500 mg/6 mL (シグマアルドリッチ製)

3. 装置及び機器

ミキサー： ロボクーブ BLIXER-5Plus, ロボクーブ R-23 (エフ・エム・アイ製)
 ガスクロマトグラフ (ECD)： 7890A GC System (アジレント・テクノロジー製)
 データ処理装置： OpenLAB CDS ChemStation Edition (アジレント・テクノロジー製)

4. ガスクロマトグラフ (ECD) の操作条件

カラム： Rtx-1 (Restek 製)
 内径 0.53 mm, 長さ 30 m, 膜厚 1.0 μ m
 温度： カラム 210°C (1 min)－10/min－270°C (1 min)－ 10°C /min－
 280°C (3 min)
 注入口 280°C, 検出器 300°C
 ガス流量： キャリアー (He) 6 mL/min
 メイクアップガス (N₂) 54 mL/min
 注入量： 2 μ L
 保持時間： 約 3.0 min

5. 検量線の作成

TPN 標準品 10.0 mg を 50 mL 容メスフラスコに精秤し、アセトンに溶解して 200 mg/L 標準原液を調製した。この原液をアセトンで希釈して 10 mg/L 標準溶液を調製し、さらにこの標準溶液をヘキサンで希釈して 0.2 mg/L 標準溶液を調製した。この溶液をヘキサンで希釈して 0.0002, 0.0004, 0.002, 0.004 及び 0.008 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液を前記条件のガスクロマトグラフに注入し、データ処理装置を用いて TPN のピーク面積を測定し、横軸に重量 (ng), 縦軸にピーク面積をとって検量線を作成した。

6. 分析操作

6.1. 試料の前処理

試料は各々を縦に 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 組を適切な大きさに細切した。細切試料 1 kg に対して 10% リン酸溶液 500 g を加えてミキサーで均一化し、調製試料を作製した。果肉分析用試料についても果実と同様に調製試料を作製した。各調製試料は 2 組以上作製し、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 30 g (試料 20 g 相当量) をはかりとり、アセトン 100 mL を加え、30 分間振とうした。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣をアセトン 50 mL で洗

い、同様にろ過した。ろ液を合わせ、アセトンで 200 mL 定容とし、その 2 mL (試料 0.2 g 相当量) を分取した。

6.3. グラファイトカーボン／NH₂積層ミニカラムによる精製

グラファイトカーボン／NH₂ 積層ミニカラムにアセトニトリル 5 mL を流下し前処理した。分取した抽出液を積層ミニカラムに流下した。さらにアセトニトリル 5 mL を流下し、これらの流出液を捨てた。次に、アセトニトリル／トルエン (75:25, v/v) 混液 20 mL を流下し、溶出液を取り、40℃ 以下の水浴中で減圧濃縮し、最後は窒素気流下で溶媒を留去した。

6.4. 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面積を求め、検量線より TPN 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)
0.0008	0.2	5	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)
0.0004	0.2	5	2	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、高知の無処理試料*を用いて、0.01 mg/kg (定量限界相当), 0.25 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。

* H25 農薬登録に係る調理加工試験導入に関する調査事業 無処理試料を均一化したもの

8.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSD (%)
高知	5	93, 87,	92, 86	87,	89	4
高知	0.25	91, 87,	90, 87	88,	89	2
高知	0.01	106, 103,	106, 103,	105,	105	1

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSD (%)
高知	5	96, 86,	92, 85	89,	90	5
高知	0.25	94, 89,	90, 88	90,	90	3
高知	0.01	108, 107,	108, 104,	108,	107	2

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6月実施のFAPAS 技能試験 (Fera Science Ltd.) におけるZスコアは全てZ<2であった。

9.1. 果肉

分析日*	使用したほ場	回収率 (%)	無処理区の分析値 (mg/kg)
2015/9/2	宮崎	83	<0.01
2015/11/2	高知	70	<0.01
2015/11/27	茨城	79	<0.01
2015/12/14	茨城	99	<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*	使用したほ場	回収率 (%)	無処理区の分析値 (mg/kg)
2015/9/2	宮崎	89	<0.01
2015/11/2	高知	84	<0.01
2015/11/27	茨城	88	<0.01
2015/12/14	茨城	103	<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 TPN を添加し、冷凍暗所 (−20℃ 以下) に保存した。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

ほ場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	0.5	47 (2015/10/28-12/14)	89,	87	88
高知	0.5	61 (2015/10/14-12/14)	95,	90	92
宮崎	0.5	136 (2015/7/31-12/14)	94,	91	92

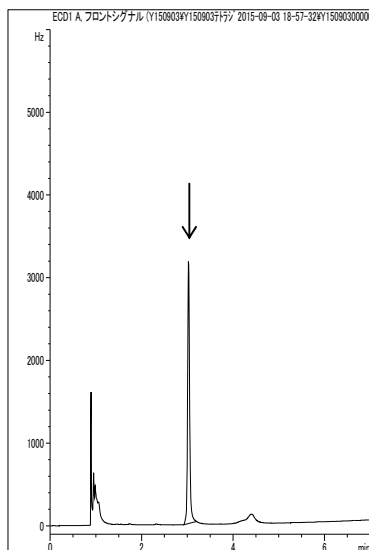
10.2. 果実

ほ場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	0.5	47 (2015/10/28-12/14)	97,	86	92
高知	0.5	61 (2015/10/14-12/14)	99,	96	98
宮崎	0.5	136 (2015/7/31-12/14)	77,	72	74

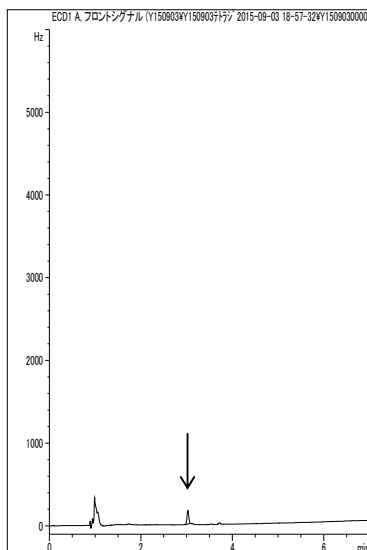
付図-1. TPNのクロマトグラム (代表例)

付図-1-1. 果肉

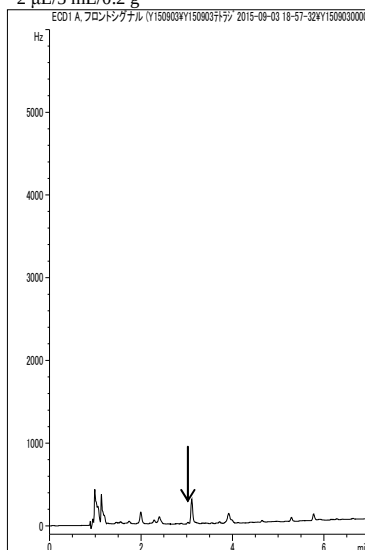
標準品 0.016 ng



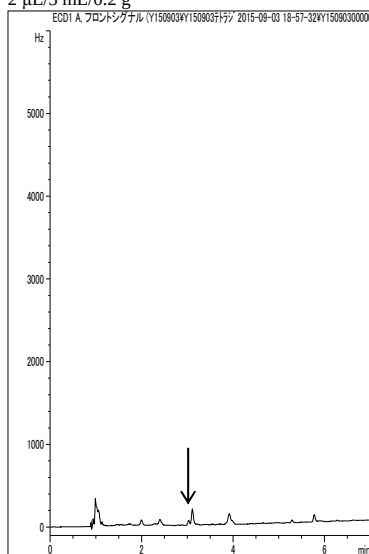
標準品 0.0008 ng



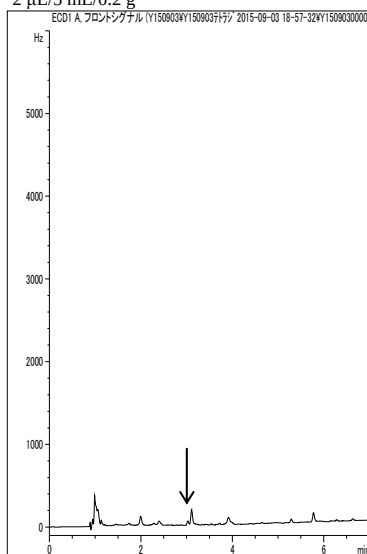
宮崎 無処理
2 μ L/5 mL/0.2 g



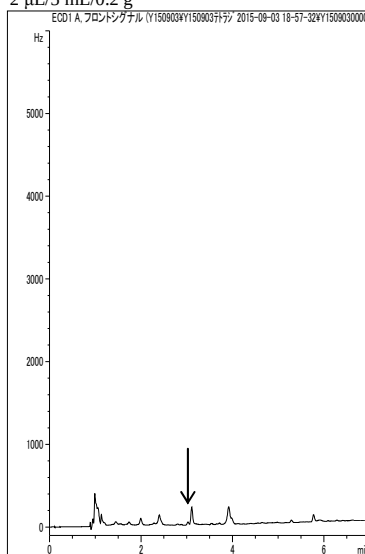
宮崎 5 回処理 3 日後
2 μ L/5 mL/0.2 g



宮崎 5 回処理 7 日後
2 μ L/5 mL/0.2 g

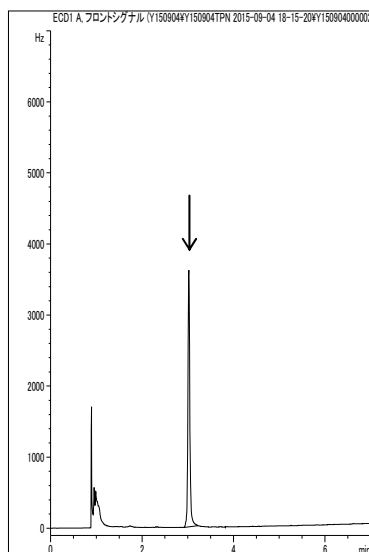


宮崎 5 回処理 14 日後
2 μ L/5 mL/0.2 g

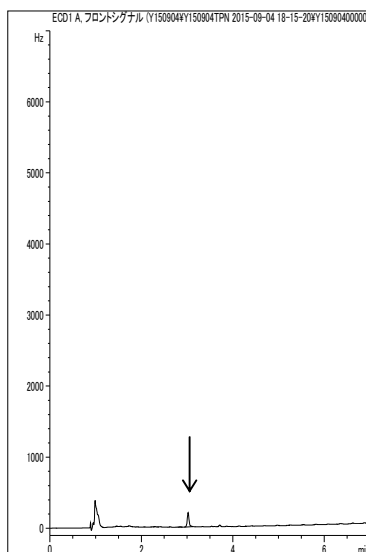


付図-1-2. 果実

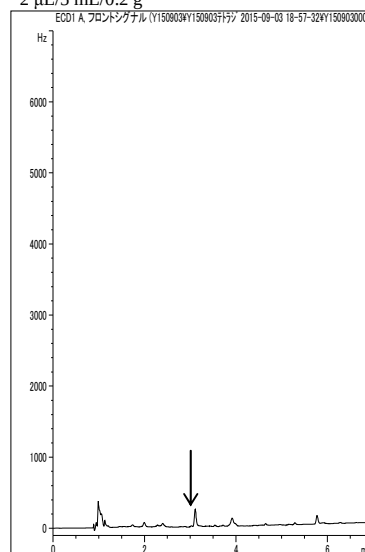
標準品 0.016 ng



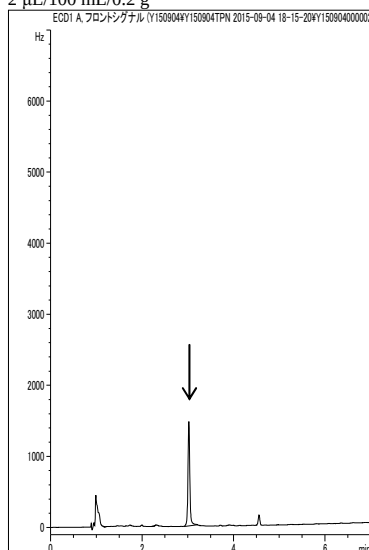
標準品 0.0008 ng



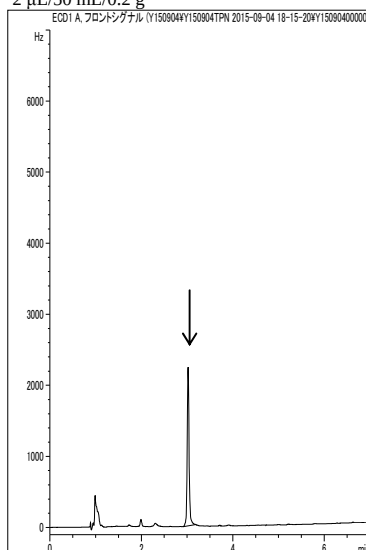
宮崎 無処理
2 μ L/5 mL/0.2 g



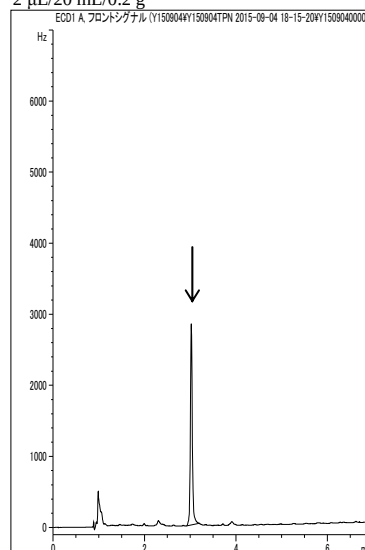
宮崎 5 回処理 3 日後
2 μ L/100 mL/0.2 g



宮崎 5 回処理 7 日後
2 μ L/50 mL/0.2 g



宮崎 5 回処理 14 日後
2 μ L/20 mL/0.2 g



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② (メロン)
残留分析詳細③ キノキサリン系

1. 分析対象物質

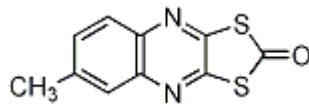
キノキサリン系

化学名 : S,S-(6-methylquinoxaline-2,3-diyl) dithiocarbonate

分子式 : $C_{10}H_6N_2OS_2$

分子量 : 234.3

構造式 :



性 状 : 黄色結晶

融 点 : 170°C

蒸気圧 : 0.026 mPa (20°C)

分配係数 : $\log P_{OW} = 3.78$ (20°C)

溶解性 : 水 1 mg/L (20°C)

トルエン 25, ジクロロメタン 40, ヘキサン 1.8,

イソプロパノール 0.9, シクロヘキサノン 18, DMF 10 (以上g/L, 20°C)

安定性 : 通常の条件下で比較的安定

アルカリ溶液中では加水分解

加水分解半減期 (22°C) ; 10日 (pH4), 80時間 (pH7), 225分 (pH9)

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

2. 標準品及び試薬

キノキサリン系標準品 : 純度 99.5% (和光純薬工業製)

アセトニトリル, アセトン, 酢酸エチル, 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 : LC/MS 用 (和光純薬工業製)

水 : PURELAB Flex System で精製した水

(Veolia Water Solutions&Technologies, France)

ギ酸 : 高速液体クロマトグラフィー用 (関東化学製)

リン酸 : 試薬特級 (和光純薬工業製)

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

シリカゲルミニカラム : Sep-Pak シリカカートリッジ, プラス (ウォーターズ製)

3. 装置及び機器

ミキサー： ロボクーブ BLIXER-5Plus, ロボクーブ R-23 (エフ・エム・アイ製)

液体クロマトグラフ・質量分析計システム (LC-MS/MS)：

1290 HPLC 6460 Triple Quad LC/MS (アジレント・テクノロジー製)

データ処理装置： MassHunter (アジレント・テクノロジー製)

4. 液体クロマトグラフ・質量分析計の操作条件

4.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム： ZORBAX Eclipse Plus C18 (アジレント・テクノロジー製)
 内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒径 1.8 µm
 溶離液： アセトニトリル／0.1%ギ酸
 60:40—(5 min)—95:5 (2 min)
 流速： 0.2 mL/min
 カラム温度： 40°C
 試料注入量： 5 µL
 保持時間： 約 4.6 min

4.2. 質量分析計

イオン化法： エレクトロスプレー イオン化法 (ESI)
 正モード
 乾燥ガス温度： 300°C
 乾燥ガス流量： 5 L/min
 ネブライザー圧力： 45 psi
 シースガス温度： 400°C
 シースガス流量： 11 L/min
 イオン導入電圧： 3500 V
 フラグメンター電圧： 100 V
 コリジョン電圧： 15 V (コリジョンガス; N₂)
 イオン検出法： MRM
 モニタリングイオン： プリカーサーイオン m/z 235.0
 プロダクトイオン m/z 207.2

5. 検量線の作成

キノキサリン系標準品 10.1 mg を 50 mL 容メスフラスコに精秤し、アセトンに溶解して 200 mg/L 標準原液を調製した。この原液をアセトンで希釈して 10 mg/L 標準溶液を調製し、さらにこの標準溶液をアセトンで希釈して 0.2 mg/L 標準溶液を調製した。この溶液をアセ

トニトリル／水 (50:50, v/v) 混液で希釈して 0.0001, 0.0002, 0.001, 0.002 及び 0.004 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液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キノキサリン系のピーク面積を測定し、横軸に重量 (ng)、縦軸にピーク面積をとって検量線を作成した。

6. 分析操作

6.1. 試料の前処理

試料は各々を縦に 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 組を適切な大きさに細切した。細切試料 1 kg に対して 10% リン酸溶液 500 g を加えてミキサーで均一化し、調製試料を作製した。果肉分析用試料についても果実と同様に調製試料を作製した。各調製試料は 2 組以上作製し、それぞれ密封して冷凍保存 (−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 30 g (試料 20 g 相当量) をはかりとり、アセトン 100 mL を加え、30 分間振とうした。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣をアセトン 50 mL で洗い、同様にろ過した。ろ液を合わせ、アセトンで 200 mL に定容した後、その 2 mL (試料 0.2 g 相当量) を分取した。

6.3. 精製

6.3.1. 多孔性ケイソウ土カラムによる精製

分取した抽出液に水 15 mL を添加後、注射針を装着した多孔性ケイソウ土カラムに流下した。5 分間放置後、ヘキサン 20 mL で容器内を洗って多孔性ケイソウ土カラムに移して流下した。さらにヘキサン 40 mL で同様の操作を繰り返し、全溶出液を取り、40℃ 以下の水浴中で減圧濃縮し、最後は窒素気流下で溶媒を留去した。

6.3.2. 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、前処理した。残留物をヘキサン 5 mL に溶解し、シリカゲルミニカラムに移して流下した。さらにヘキサン 5 mL を流下し、これらの流出液を捨てた。次に、ヘキサン／酢酸エチル (98:2, v/v) 混液 10 mL を流下し、溶出液を取り、40℃ 以下の水浴中で減圧濃縮し、最後は窒素気流下で溶媒を留去した。

6.4. 定量

残留物を適量のアセトニトリル／水 (50:50, v/v) 混液に溶解した。この溶液を前記条件の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入してピーク面積を求め、検量線よりキノキサリン系の重量を求め、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)
0.001	0.2	10	5	0.01

最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (mg/kg)
0.0005	0.2	10	5	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、高知の無処理試料*を用いて、0.01 mg/kg (定量限界相当), 0.25 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。

* H25 農薬登録に係る調理加工試験導入に関する調査事業 無処理試料を均一化したもの

8.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSD (%)
高知	5	95, 94,	94, 93	94,	94	1
高知	0.25	98, 97,	98, 97	97,	97	1
高知	0.01	95, 93,	95, 92	94,	94	1

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSD (%)
高知	5	97, 96,	97, 96	96,	96	1
高知	0.25	98, 97,	98, 97	97,	97	1
高知	0.01	98, 98,	98, 97	98,	98	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0.1 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6月実施のFAPAS 技能試験 (Fera Science Ltd.) におけるZスコアは全てZ<2であった。

9.1. 果肉

分析日*	使用したほ場	回収率 (%)	無処理区の分析値 (mg/kg)
2015/9/2	宮崎	91	<0.01
2015/11/4	高知	106	<0.01
2015/11/27	茨城	104	<0.01
2015/12/14	茨城	103	<0.01

回収試料の添加濃度：0.1 mg/kg

*抽出日を記載

9.2. 果実

分析日*	使用したほ場	回収率 (%)	無処理区の分析値 (mg/kg)
2015/9/2	宮崎	94	<0.01
2015/11/4	高知	108	<0.01
2015/11/27	茨城	105	<0.01
2015/12/14	茨城	100	<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キノキサリン系を添加し、冷凍暗所（－20℃ 以下）に保存した。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

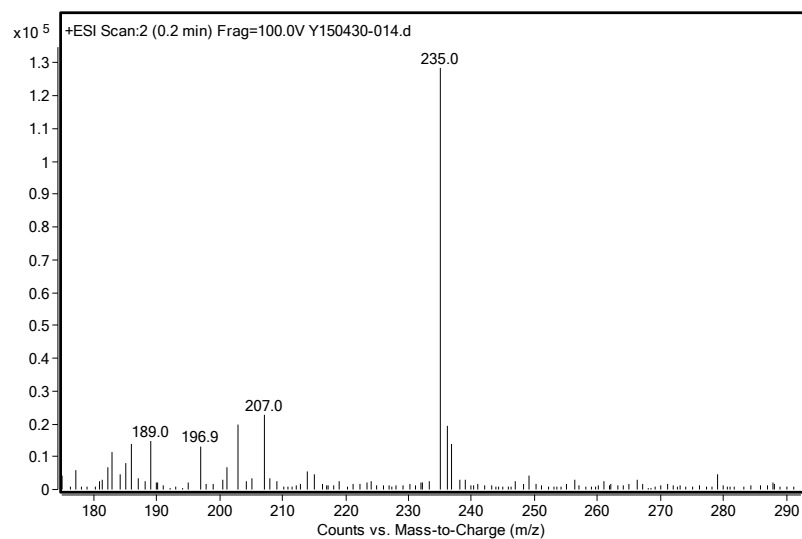
ほ場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	0.5	47 (2015/10/28-12/14)	104,	103	104
高知	0.5	61 (2015/10/14-12/14)	103,	103	103
宮崎	0.5	136 (2015/7/31-12/14)	98,	97	98

10.2.果実

ほ場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	0.5	47 (2015/10/28-12/14)	104,	104	104
高知	0.5	61 (2015/10/14-12/14)	104,	103	104
宮崎	0.5	136 (2015/7/31-12/14)	98,	97	98

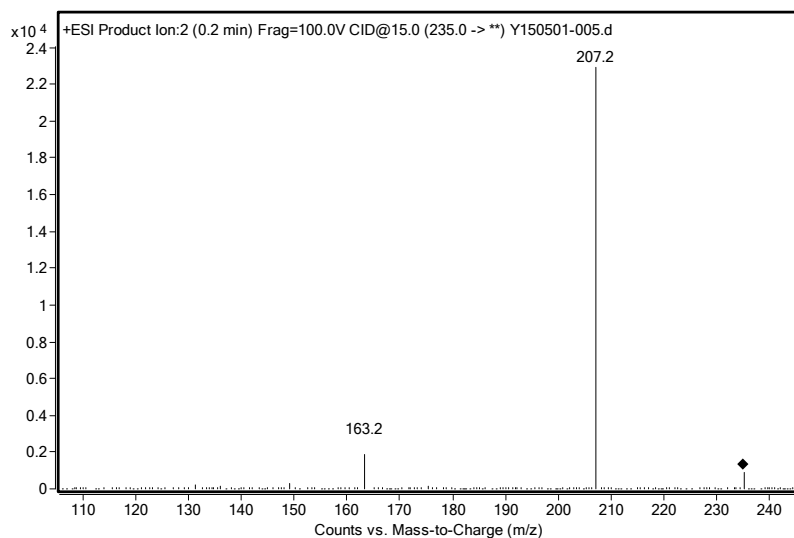
付図-1. キノキサリン系のマスペクトル

キノキサリン系のマスペクトル（一次イオン）の一例（正モード）



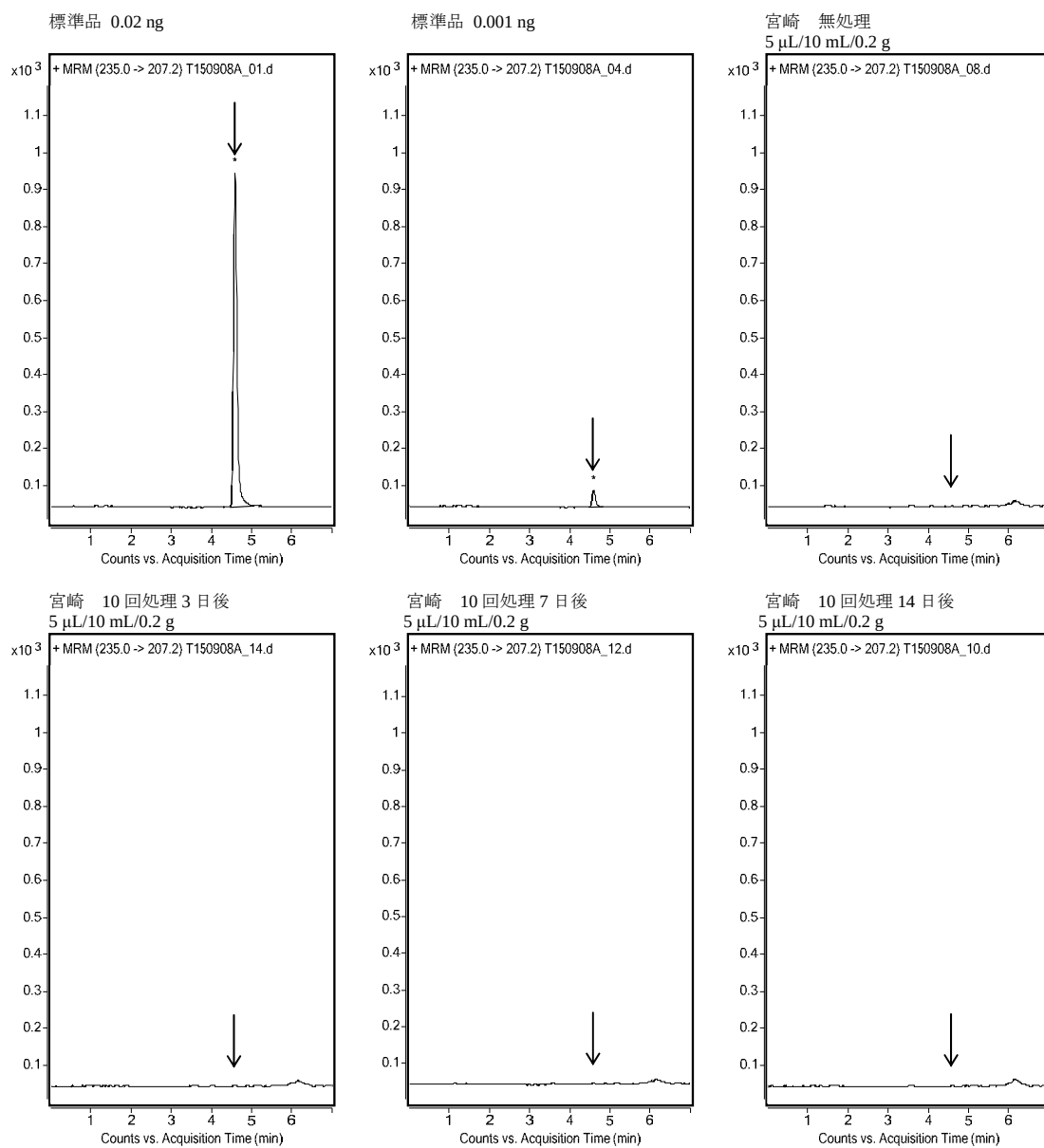
キノキサリン系のプロダクトスキャンスペクトルの一例

（プリカーサーイオン； $m/z=235.0$ ，正モード）

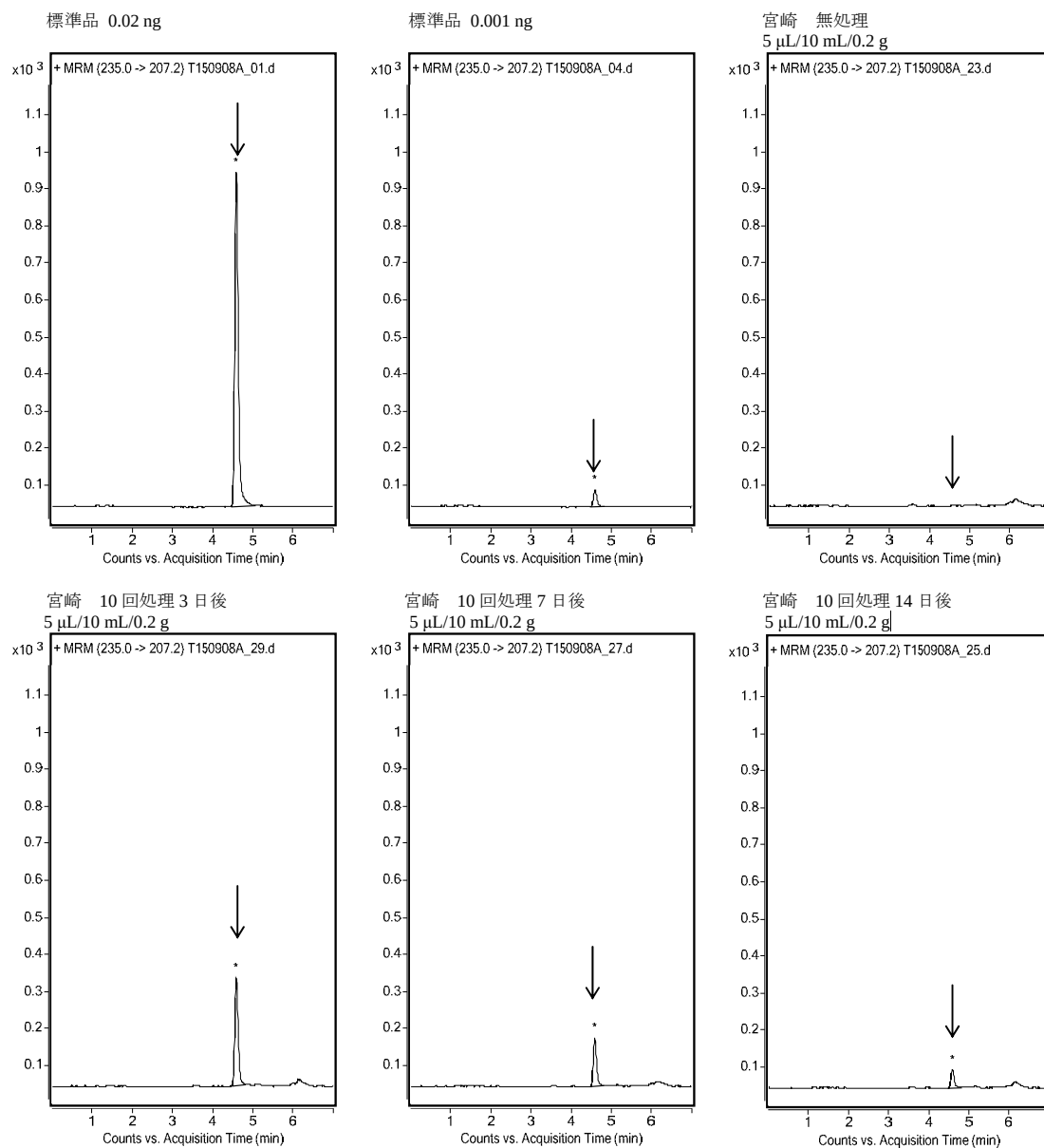


付図-2. キノキサリン系のクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. 果肉



付図-2-2. 果実



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②（メロン）
 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	送付量	送付量の平均	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	—	1.46	1.35	14.6	8.54	89	11	2.1
	C	3	1.27		6.34		89	11	2.2
	C	7	1.28		6.38		88	12	2.1
	C	14	1.37		6.85		89	11	2.1
								平均 89:11	平均 2.1
高知	0	—	1.36	1.42	13.6	9.89	91	9	2.0
	C	3	1.44		8.62		90	10	2.1
	C	7	1.45		8.68		90	10	2.1
	C	14	1.44		8.65		88	12	2.2
								平均 90:10	平均 2.1
宮崎	0	—	1.38	1.31	24.8	12.0	89	11	1.9
	C	3	1.17		6.99		91	9	2.0
	C	7	1.34		8.03		90	10	2.1
	C	14	1.33		8.00		90	10	2.0
								平均 90:10	平均 2.0
3 ほ場の総平均重量									
1.36 kg/個									

C：ピリダベンは 2 回処理

TPN は 5 回処理

キノキサリン系は 10 回処理

2.作物写真

2.1.茨城



茨城 無処理



茨城 処理3日後



茨城 処理7日後



茨城 処理14日後

2.2.高知



高知 無処理



高知 処理3日後



高知 処理7日後



高知 処理14日後

2.3.宮崎



宮崎 無処理



宮崎 処理3日後



宮崎 処理7日後



宮崎 処理14日後

資料 2-4

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② (メロン)
残留分析詳細① テトラジホン

1. 分析対象物質

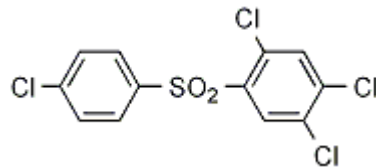
テトラジホン

化学名： 4-chlorophenyl 2,4,5-trichlorophenyl sulfone

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： $\log P_{OW} = 4.61$

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： 非常に安定 (強酸, 強アルカリに対して安定),

熱や紫外線照射に対して安定,

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

2. 標準品及び試薬

テトラジホン標準品：純度 99.9% (和光純薬工業製)

アセトン, 酢酸エチル, ヘキサン：残留農薬試験用 (和光純薬工業製)

水：PURELAB Flex System で精製した水

(Veolia Water Solutions&Technologies, France)

多孔性ケイソウ土カラム：InertSep K-Solute, 5 mL 容 (ジーエルサイエンス製)

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

3. 装置及び機器

ミキサー： ロボクーブ BLIXER-5Plus, ロボクーブ R-23 (エフ・エム・アイ製)
 ガスクロマトグラフ (ECD)： 7890A GC System (アジレント・テクノロジー製)
 データ処理装置： OpenLAB CDS ChemStation Edition (アジレント・テクノロジー製)

4. ガスクロマトグラフ (ECD) の操作条件

カラム： Rtx-1 (Restek 製)
 内径 0.53 mm, 長さ 30 m, 膜厚 1.0 μ m
 温度： カラム 240°C (10 min)－30°C /min－280°C (1 min)
 注入口 280°C, 検出器 300°C
 ガス流量： キャリヤー (He) 6 mL/min
 メイクアップガス (N₂) 54 mL/min
 注入量： 2 μ L
 保持時間： 約 8.3 min

5. 検量線の作成

テトラジホン標準品 10.0 mg を 50 mL 容メスフラスコに精秤し、アセトンに溶解して 200 mg/L 標準原液を調製した。この原液をヘキサンで希釈して 10 mg/L 標準溶液を調製し、さらにこの標準溶液をヘキサンで希釈して 2 mg/L 標準溶液を調製した。この溶液をヘキサンで希釈して 0.0005, 0.001, 0.005, 0.01 及び 0.02 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液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 組をミキサーで均一化して調製試料を作製した。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 組以上作製し、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 をはかりとり、アセトン 100 mL を加え、30 分間振とうした。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣をアセトン 50 mL で洗い、同様にろ過した。ろ液を合わせ、アセトンで 200 mL に定容した後、その 5 mL (試料 0.5 g 相当量) を分取し、

水 5 mL を添加して 40°C 以下の水浴中で減圧濃縮し、アセトンを留去した。

6.3. 多孔性ケイソウ土カラム及びグラファイトカーボンミニカラムの

連結カラムによる精製

グラファイトカーボンミニカラムに酢酸エチル 5 mL を流下し前処理した。多孔性ケイソウ土カラムの下にグラファイトカーボンミニカラムを連結し、前項の濃縮液を多孔性ケイソウ土カラムに流下した。5 分放置後、酢酸エチル 40 mL で容器内を洗って多孔性ケイソウ土カラムに移して流下し、全溶出液を取り、40°C 以下の水浴中で減圧濃縮し、最後は窒素気流下で溶媒を留去した。

6.4. 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面積を求め、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 (μ L)	定量限界 (mg/kg)
0.002	0.5	5	2	0.01

最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μ L)	検出限界 (mg/kg)
0.001	0.5	5	2	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、高知の無処理試料*を用いて、0.01 mg/kg (定量限界相当), 0.25 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。

* H25 農薬登録に係る調理加工試験導入に関する調査事業 無処理試料を均一化したもの

8.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSD (%)
高知	5	85, 80,	83, 77	82,	81	4
高知	0.25	92, 88,	88, 85	88,	88	3
高知	0.01	84, 76,	84, 72	83,	80	7

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSD (%)
高知	5	84, 82,	83, 77	83,	82	3
高知	0.25	94, 88,	91, 87	89,	90	3
高知	0.01	84, 80,	82, 76	82,	81	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0.1 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6月実施のFAPAS 技能試験（Fera Science Ltd.）におけるZスコアは全てZ<2であった。

9.1. 果肉

分析日*	使用したほ場	回収率 (%)	無処理区の分析値 (mg/kg)
2015/8/28	宮崎	91	<0.01
2015/10/19	宮崎	91	<0.01
2015/11/9	高知	96	<0.01
2015/11/10	茨城	103	<0.01
2015/12/2	茨城	80	<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*	使用したほ場	回収率 (%)	無処理区の分析値 (mg/kg)
2015/8/28	宮崎	87	<0.01
2015/10/19	宮崎	97	<0.01
2015/11/9	高知	98	<0.01
2015/11/10	茨城	96	<0.01
2015/12/2	茨城	83	<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テトラジホンを添加し、冷凍暗所 (−20℃ 以下) に保存した。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

ほ場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	0.5	35 (2015/10/28-12/2)	90,	85	88
高知	0.5	49 (2015/10/14-12/2)	89,	85	87
宮崎	0.5	80 (2015/7/31-10/19)	81,	76	78

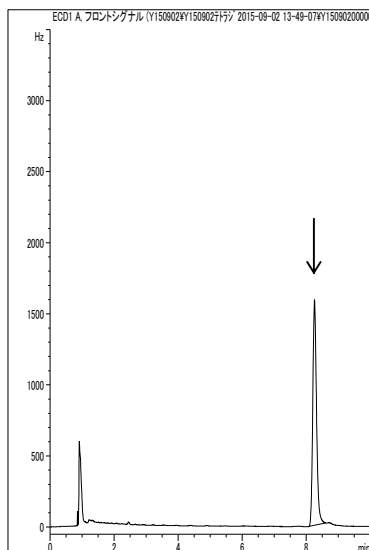
10.2. 果実

ほ場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	0.5	35 (2015/10/28-12/2)	85,	85	85
高知	0.5	49 (2015/10/14-12/2)	86,	81	84
宮崎	0.5	80 (2015/7/31-10/19)	86,	85	86

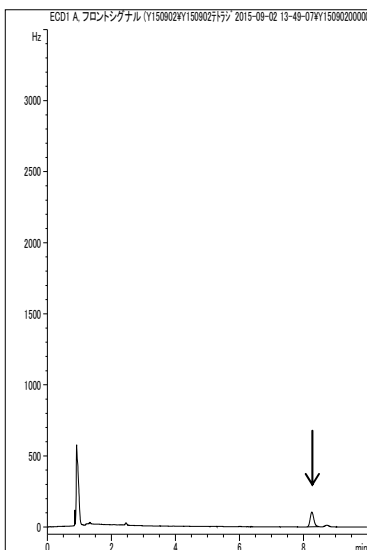
付図-1. テトラジホンのクロマトグラム (代表例)

付図-1-1. 果肉

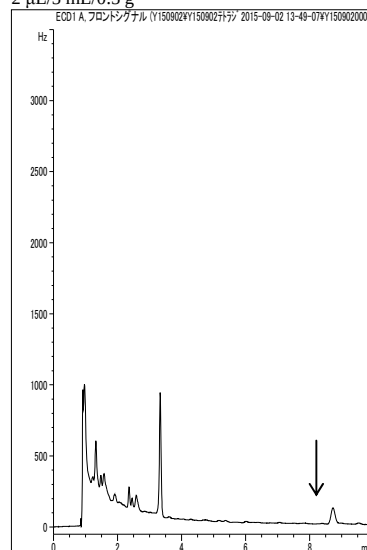
標準品 0.04 ng



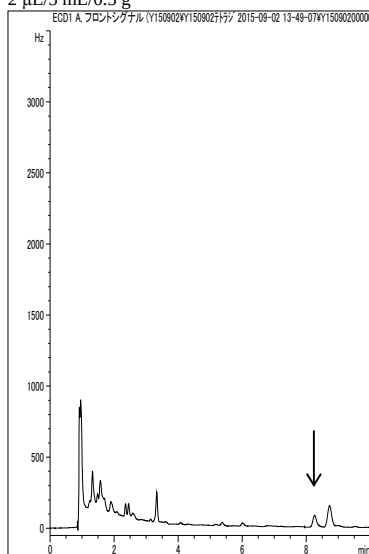
標準品 0.002 ng



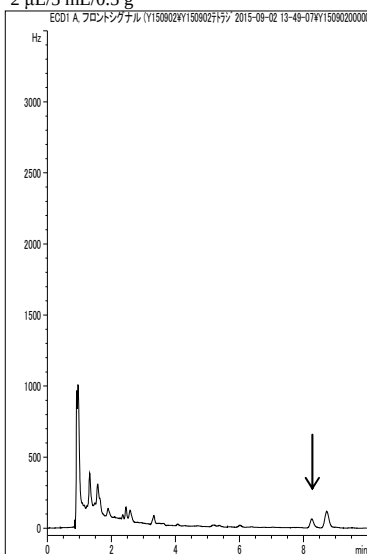
宮崎 無処理
2 μ L/5 mL/0.5 g



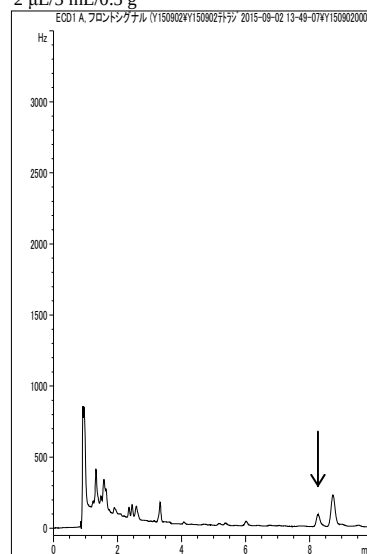
宮崎 2 回処理 7 日後
2 μ L/5 mL/0.5 g



宮崎 2 回処理 14 日後
2 μ L/5 mL/0.5 g

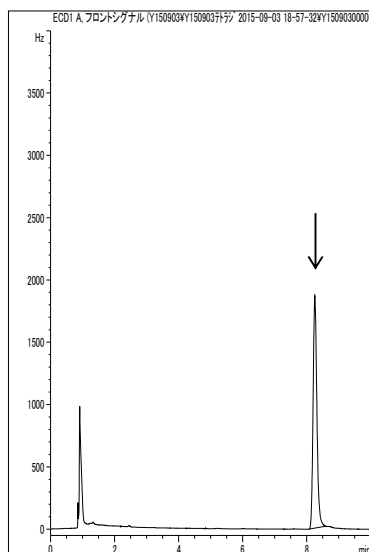


宮崎 2 回処理 21 日後
2 μ L/5 mL/0.5 g

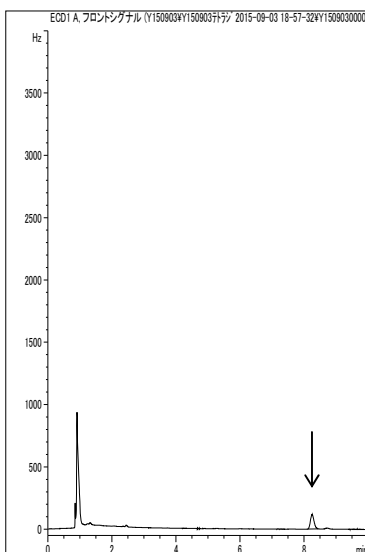


付図-1-2. 果実

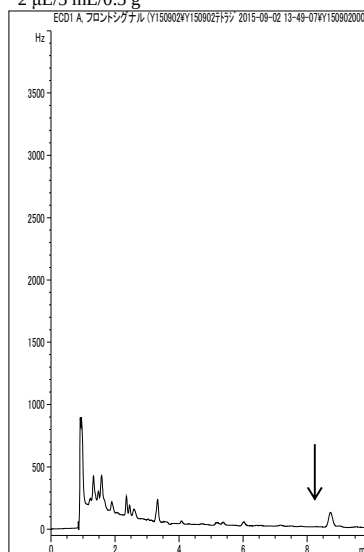
標準品 0.04 ng



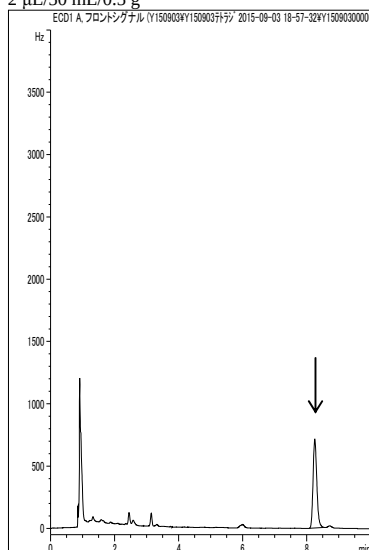
標準品 0.002 ng



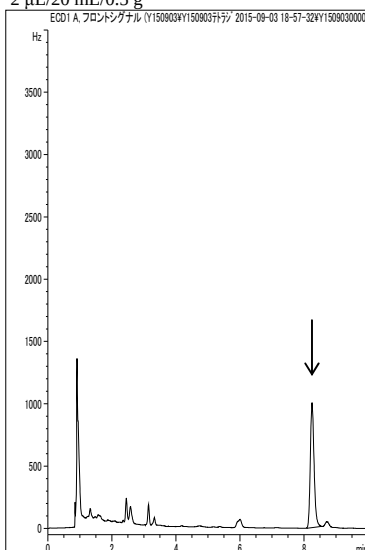
宮崎 無処理
2 μ L/5 mL/0.5 g



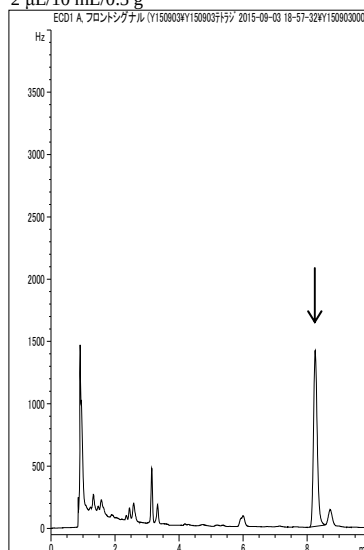
宮崎 2回処理 7日後
2 μ L/50 mL/0.5 g



宮崎 2回処理 14日後
2 μ L/20 mL/0.5 g



宮崎 2回処理 21日後
2 μ L/10 mL/0.5 g



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②（メロン）
残留分析詳細② ダイアジノン

1. 分析対象物質

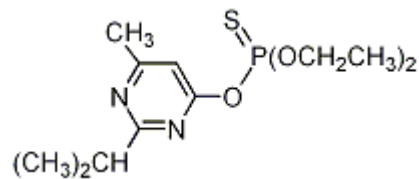
ダイアジノン

化学名： O, O-diethyl O-2-isopropyl-6-methylpyrimidin-4-yl phosphorothioate

分子式： $C_{12}H_{21}N_2O_3PS$

分子量： 304.3

構造式：



性 状： 無色液体

融 点： 83～84°C

蒸気圧： 1.2×10^1 mPa (25°C)

分配係数： $\log P_{OW} = 3.30$

溶解性： 水 60 mg/L (20°C)

有機溶媒に易溶

安定性： 中性溶液中で安定，

アルカリ溶液中では緩やかに加水分解

酸性溶液中では非常に速やかに加水分解

加水分解半減期 (20°C)；11.77時間 (pH3.1), 185日 (pH7.4), 6日 (pH10.4)

120°C以上で分解

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

2. 標準品及び試薬

ダイアジノン標準品：純度 99.8% (和光純薬工業製)

アセトニトリル，アセトン：残留農薬試験用 (和光純薬工業製)

アセトニトリル：LC/MS 用 (和光純薬工業製)

水：PURELAB Flex System で精製した水

(Veolia Water Solutions&Technologies, France)

ギ酸：高速液体クロマトグラフィー用 (関東化学株式会社製)

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

メンブレンフィルター：Millex-LG 0.20 μm (ミリポア製)

3. 装置及び機器

ミキサー： ロボクーブ BLIXER-5Plus, ロボクーブ R-23 (エフ・エム・アイ製)

液体クロマトグラフ・質量分析計システム (LC-MS/MS)：

1290 HPLC 6460 Triple Quad LC/MS (アジレント・テクノロジー製)

データ処理装置： MassHunter (アジレント・テクノロジー製)

4. 液体クロマトグラフ・質量分析計の操作条件

4.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム： ZORBAX Eclipse Plus C18 (アジレント・テクノロジー製)
 内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒径 1.8 μ m
 溶離液： アセトニトリル／0.1%ギ酸
 60:40—(5 min)—95:5 (2 min)
 流速： 0.2 mL/min
 カラム温度： 40°C
 試料注入量： 5 μ L
 保持時間： 約 4.3 min

4.2. 質量分析計

イオン化法： エレクトロスプレー イオン化法 (ESI)
 正モード
 乾燥ガス温度： 300°C
 乾燥ガス流量： 5 L/min
 ネブライザー圧力： 45 psi
 シースガス温度： 400°C
 シースガス流量： 11 L/min
 イオン導入電圧： 3500 V
 フラグメンター電圧： 100 V
 コリジョン電圧： 20 V (コリジョンガス; N₂)
 イオン検出法： MRM
 モニタリングイオン： プリカーサーイオン m/z 305.0
 プロダクトイオン m/z 169.2

5. 検量線の作成

ダイアジノン標準品 10.0 mg を 50 mL 容メスフラスコに精秤し、アセトンに溶解して 200 mg/L 標準原液を調製した。この原液をアセトンで希釈して 10 mg/L 標準溶液を調製し、さらにアセトンで希釈して 0.2 mg/L 標準溶液を調製した。この 0.2 mg/L 標準溶液を

アセトニトリル／水 (50:50, v/v) 混液で希釈して 0.04 mg/L 標準溶液を調製し、さらに同混液で希釈して 0.00002, 0.00004, 0.0002, 0.0004 及び 0.0008 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ダイアジノンのピーク面積を測定し、横軸に重量 (ng)、縦軸にピーク面積をとって検量線を作成した。

6. 分析操作

6.1. 試料の前処理

試料は各々を縦に 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 組をミキサーで均一化して調製試料を作製した。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 組以上作製し、それぞれ密封して冷凍保存 (−20℃ 以下) した。分析時にその 1 組を取り、分析に供した。

6.2. 抽出

均一化した試料 20 g をはかりとり、アセトン 100 mL を加え、30 分間振とうした。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣をアセトン 50 mL で洗い、同様にろ過した。ろ液を合わせ、アセトンで 200 mL に定容した。

6.3. C₁₈ミニカラムによる精製

C₁₈ミニカラムにアセトニトリル及び水を順次 5 mL ずつ流下し、前処理した。前項の抽出液 2 mL (試料 0.2 g 相当量) を分取し、水 5 mL を添加して混和した後、C₁₈ミニカラムに移して流下した。さらにアセトニトリル／水 (50:50, v/v) 混液 5 mL を流下し、これらの流出液を捨てた。C₁₈ミニカラムを吸引乾燥した後、アセトニトリル 10 mL を流下し、溶出液を取り、40℃ 以下の水浴中で減圧濃縮し、最後は窒素気流下で溶媒を留去した。

6.4. 定量

残留物を適量のアセトニトリル／水 (50:50, v/v) 混液に溶解した。この溶液を前記条件の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入してピーク面積を求め、検量線よりダイアジノンの重量を求め、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)
0.0002	0.2	50	5	0.01

最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μL)	検出限界 (mg/kg)
0.0001	0.2	50	5	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、高知の無処理試料*を用いて、0.01 mg/kg (定量限界相当), 0.25 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。

* H25 農薬登録に係る調理加工試験導入に関する調査事業 無処理試料を均一化したもの

8.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSD (%)
高知	5	100, 95,	97, 94	96,	96	2
高知	0.25	96, 94,	95, 93	94,	94	1
高知	0.01	98, 97,	98, 97	98,	98	1

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSD (%)
高知	5	95, 93,	93, 92	93,	93	1
高知	0.25	96, 94,	96, 93	94,	95	1
高知	0.01	98, 97,	98, 97	98,	98	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0.1 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6月実施のFAPAS 技能試験（Fera Science Ltd.）におけるZスコアは全てZ<2であった。

9.1.果肉

分析日*	使用したほ場	回収率 (%)	無処理区の分析値 (mg/kg)
2015/ 8/28	宮崎	97	<0.01
2015/10/19	宮崎	98	<0.01
2015/11/ 9	高知	98	<0.01
2015/11/10	茨城	92	<0.01
2015/12/2	茨城	97	<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*	使用したほ場	回収率 (%)	無処理区の分析値 (mg/kg)
2015/ 8/28	宮崎	93	<0.01
2015/10/19	宮崎	96	<0.01
2015/11/ 9	高知	97	<0.01
2015/11/10	茨城	85	<0.01
2015/12/2	茨城	93	<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ダイアジノンを添加し、冷凍暗所（－20℃以下）に保存した。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

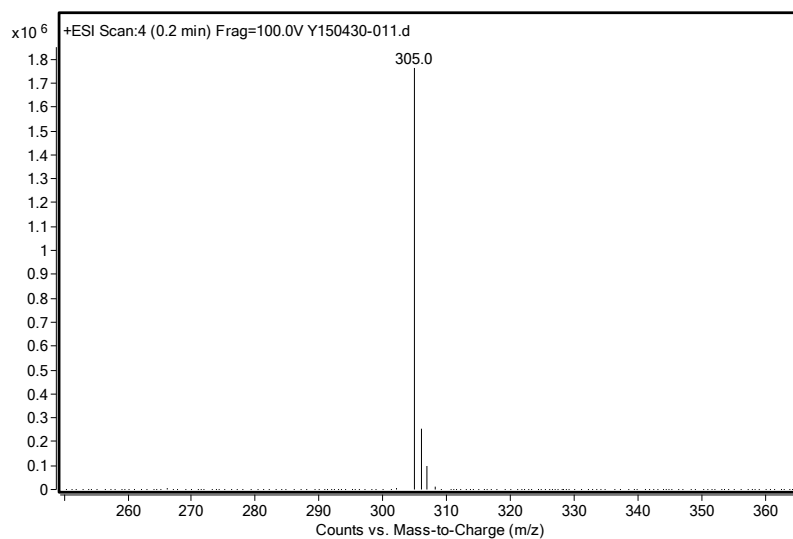
ほ場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	0.5	35 (2015/10/28-12/2)	97,	95	96
高知	0.5	49 (2015/10/14-12/2)	90,	87	88
宮崎	0.5	80 (2015/7/31-10/19)	87,	81	84

10.2. 果実

ほ場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	0.5	35 (2015/10/28-12/2)	93,	92	92
高知	0.5	49 (2015/10/14-12/2)	87,	86	86
宮崎	0.5	80 (2015/7/31-10/19)	87,	86	86

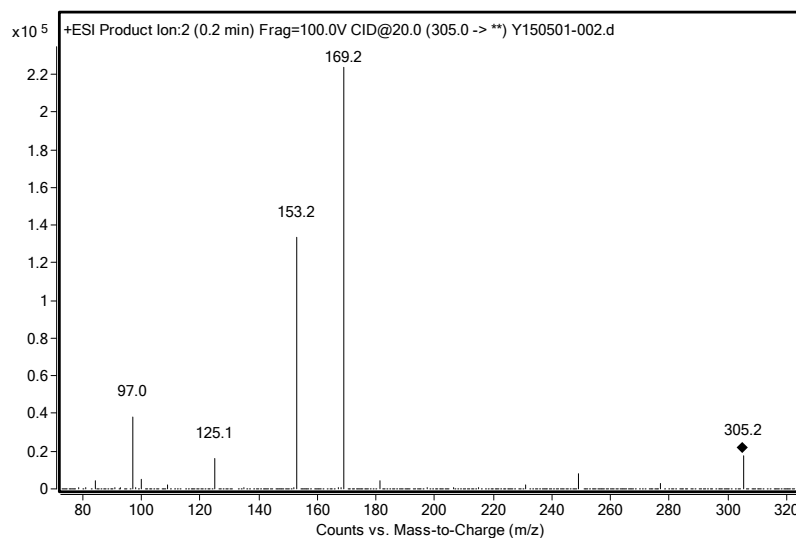
付図-1. マススペクトル

ダイアジノンのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)



ダイアジノンのプロダクトスキャンスペクトルの一例

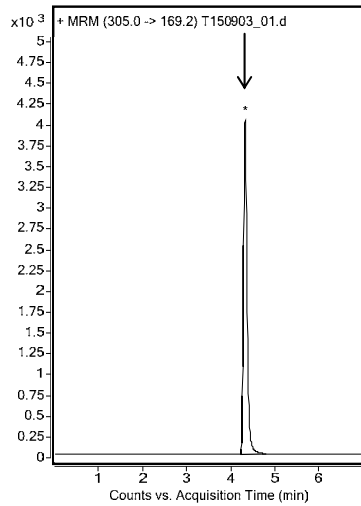
(プリカーサーイオン ; $m/z=305.0$, 正モード)



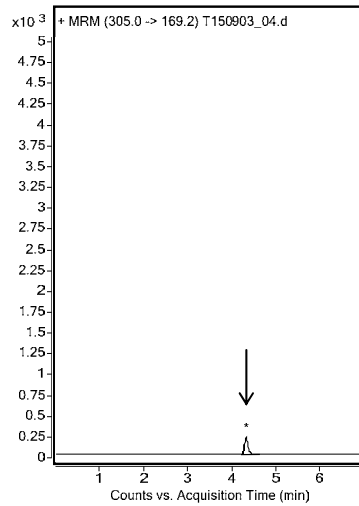
付図-2. ダイアジノンのクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. 果肉

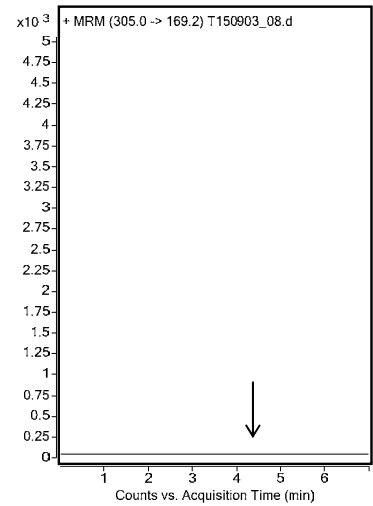
標準品 0.004 ng



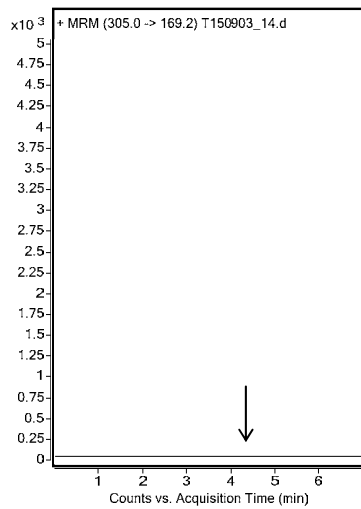
標準品 0.0002 ng



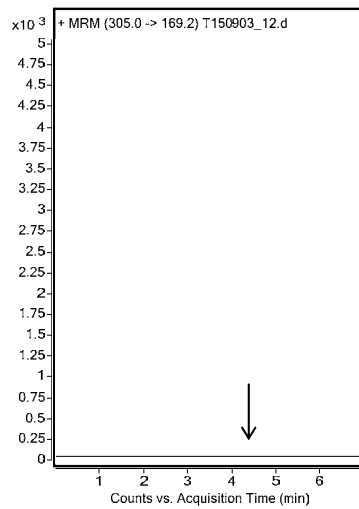
宮崎 無処理
5 μ L/50 mL/0.2 g



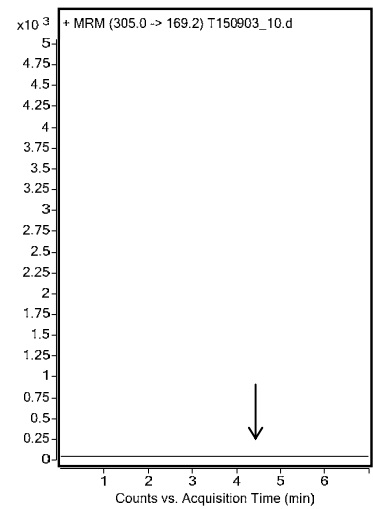
宮崎 4 回処理 7 日後
5 μ L/50 mL/0.2 g



宮崎 4 回処理 14 日後
5 μ L/50 mL/0.2 g

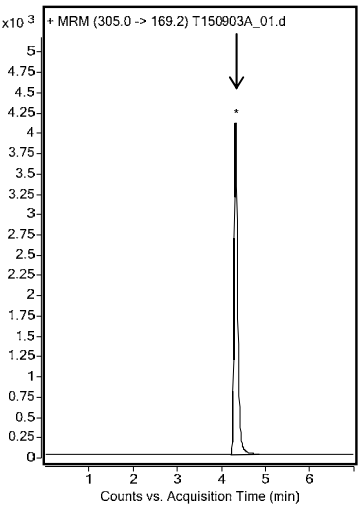


宮崎 4 回処理 21 日後
5 μ L/50 mL/0.2 g

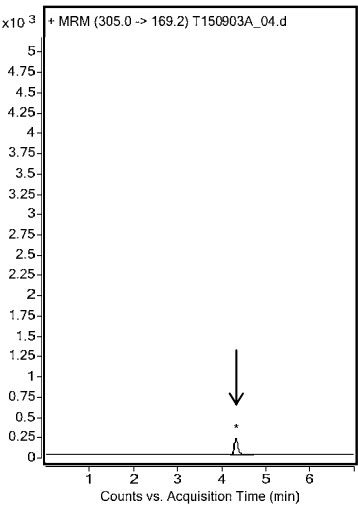


付図-2-2. 果実

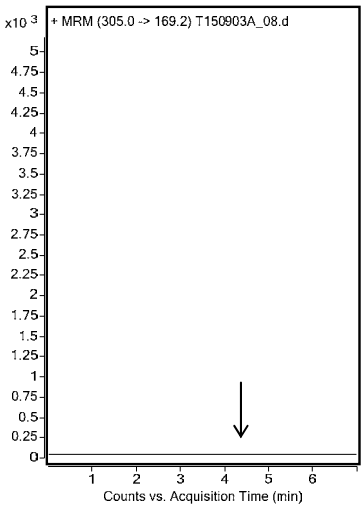
標準品 0.004 ng



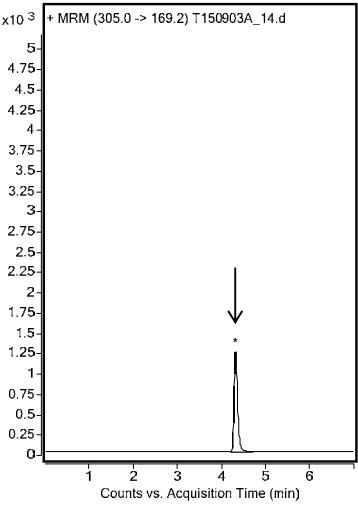
標準品 0.0002 ng



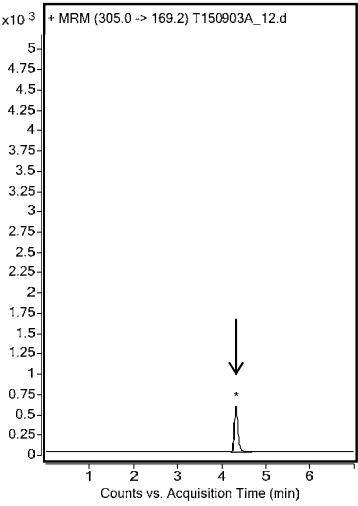
宮崎 無処理
5 μ L/50 mL/0.2 g



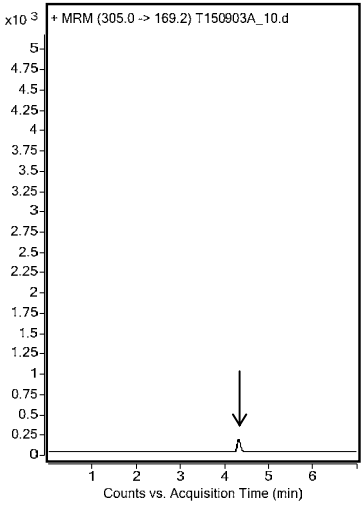
宮崎 4 回処理 7 日後
5 μ L/50 mL/0.2 g



宮崎 4 回処理 14 日後
5 μ L/50 mL/0.2 g



宮崎 4 回処理 21 日後
5 μ L/50 mL/0.2 g



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② (メロン)
残留分析詳細③ キャプタン

1. 分析対象物質

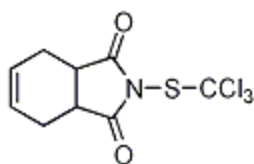
キャプタン

化学名： N-(trichloromethylthio)cyclohex-4-ene-1,2-dicarboximide

分子式： $C_9H_8Cl_3NO_2S$

分子量： 300.6

構造式：



性 状： 無色結晶

融 点： 178°C

蒸気圧： <1.3 mPa (25°C)

分配係数： $\log P_{OW} = 2.8$ (25°C)

溶解性： 水 3.3 mg/L (25°C)

キシレン 20, クロロホルム 70, アセトン 21, シクロヘキサン 23,
ジオキサン 47, ベンゼン 21, トルエン 6.9, イソプロパノール 1.7,
エタノール 2.9, ジエチルエーテル 2.5 (以上g/kg, 26°C)

安定性： 中性溶液中で緩やかに加水分解,
アルカリ溶液中では速やかに加水分解
加水分解半減期(20°C) ; 32.4時間(pH5), 8.3時間(pH7), 2分未満(pH10)

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

2. 標準品及び試薬

キャプタン標準品：純度 99.2% (和光純薬工業製)

アセトニトリル, アセトン, トルエン, ヘキサン：残留農薬試験用 (和光純薬工業製)

水：PURELAB Flex System で精製した水

(Veolia Water Solutions&Technologies, France)

リン酸：試薬特級 (和光純薬工業製)

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

グラファイトカーボンミニカラム：Supelclean ENVI-Carb, 500 mg/6 mL

(シグマアルドリッチ製)

3. 装置及び機器

ミキサー： ロボクーブ BLIXER-5Plus, ロボクーブ R-23 (エフ・エム・アイ製)
 ガスクロマトグラフ (ECD)： 7890A GC System (アジレント・テクノロジー製)
 データ処理装置： OpenLAB CDS ChemStation Edition (アジレント・テクノロジー製)

4. ガスクロマトグラフ (ECD) の操作条件

カラム： Rtx-1 (Restek 製)
 内径 0.53 mm, 長さ 30 m, 膜厚 1.0 μ m
 温度： カラム 220°C (1 min)－5°C /min－250°C (3 min)
 注入口 280°C, 検出器 300°C
 ガス流量： キャリヤー (He) 6 mL/min
 メイクアップガス (N₂) 54 mL/min
 注入量： 2 μ L
 保持時間： 約 4.2 min

5. 検量線の作成

キャプタン標準品 10.1 mg を 50 mL 容メスフラスコに精秤し、アセトンに溶解して 200 mg/L 標準原液を調製した。この原液をアセトンで希釈して 10 mg/L 標準溶液を調製し、さらにこの標準溶液をヘキサンで希釈して 2 mg/L 標準溶液を調製した。この溶液をヘキサンで希釈して 0.0005, 0.001, 0.005, 0.01 及び 0.02 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液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キャプタンのピーク面積を測定し、横軸に重量 (ng), 縦軸にピーク面積をとって検量線を作成した。

6. 分析操作

6.1. 試料の前処理

試料は各々を縦に 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 組を適切な大きさに細切した。細切試料 1 kg に対して 10% リン酸溶液 500 g を加えてミキサーで均一化し、調製試料を作製した。果肉分析用試料についても果実と同様に調製試料を作製した。各調製試料は 2 組以上作製し、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 30 g (試料 20 g 相当量) をはかりとり、アセトン 100 mL を加え、30 分間振とうした。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣をアセトン 50 mL で洗い、同様にろ過した。ろ液を合わせ、アセトンで 200 mL に定容した後、その 2.5 mL (試料

0.25 g 相当量) を分取し、水 5 mL を添加して 40℃ 以下の水浴中で減圧濃縮し、アセトン
を留去した。

6.3. 精製

6.3.1. 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アセトニトリル及び水を順次 5 mL ずつ流下し、前処理した。
前項の濃縮液を陽イオン交換ミニカラムに移して流下した。さらに水／アセトニトリル
(80:20, v/v) 混液 5 mL を流下し、これらの流出液を捨てた。次に、水／アセトニトリル
(60:40, v/v) 混液 5 mL を流下し、溶出液を分取した。

6.3.2. 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トルエン及びアセトンを順次 5 mL ずつ流下し、前
処理した。前項の溶出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。さらに水
／アセトン (60:40, v/v) 混液 5 mL を流下し、これらの流出液を捨てた。グラファイトカー
ボンミニカラムを吸引乾燥した後、アセトン 5 mL 及びアセトン／トルエン (70:30, v/v) 混
液 5 mL を順次流下し、全溶出液を取り、40℃ 以下の水浴中で減圧濃縮し、最後は窒素気
流下で溶媒を留去した。

6.4. 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
してピーク面積を求め、検量線よりキャプタンの重量を求め、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	0.25	2.5	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)
0.001	0.25	2.5	2	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、高知の無処理試料*を用いて、0.01 mg/kg (定量限界相当), 0.25 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。果実についてはさらに 10 mg/kg 添加濃度における回収試験を本事業の茨城試料を用いて 5 連分析で実施した。回収率の算出結果を示す。

* H25 農薬登録に係る調理加工試験導入に関する調査事業 無処理試料を均一化したもの

8.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSD (%)
高知	5	76, 70,	75, 70	71,	72	4
高知	0.25	88, 83,	83, 76	83,	83	5
高知	0.01	106, 101,	104, 98	102,	102	3

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSD (%)
茨城	10	83, 79,	81, 78	81,	80	2
高知	5	79, 71,	74, 71	72,	73	5
高知	0.25	78, 73,	75, 71	74,	74	4
高知	0.01	110, 100,	102, 96	101,	102	5

9. 精度管理

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

管理基準：20検体を超えるごとに、各1検体の無処理試料及び0.1 mg/kg 添加試料（内部精度管理試料）を分析した。その結果、下表に示すように問題は認められなかった。又、2015年6月実施のFAPAS 技能試験（Fera Science Ltd.）におけるZスコアは全てZ<2であった。

9.1. 果肉

分析日*	使用したほ場	回収率 (%)	無処理区の分析値 (mg/kg)
2015/9/24	宮崎	107	<0.01
2015/10/28	高知	76	<0.01
2015/11/12	茨城	110	<0.01
2015/12/14	茨城	119	<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*	使用したほ場	回収率 (%)	無処理区の分析値 (mg/kg)
2015/9/24	宮崎	107	<0.01
2015/10/28	高知	96	<0.01
2015/11/12	茨城	104	<0.01
2015/12/14	茨城	97	<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キャプタンを添加し、冷凍暗所（－20℃ 以下）に保存した。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

ほ場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	0.5	47 (2015/10/28-12/14)	105,	95	100
高知	0.5	61 (2015/10/14-12/14)	104,	86	95
宮崎	0.5	136 (2015/7/31-12/14)	88,	83	86

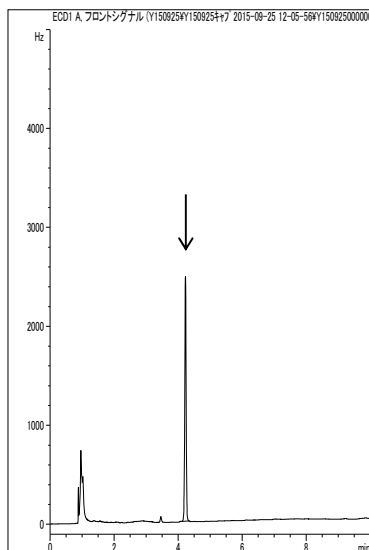
10.2. 果実

ほ場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	0.5	47 (2015/10/28-12/14)	99,	88	94
高知	0.5	61 (2015/10/14-12/14)	103,	93	98
宮崎	0.5	136 (2015/7/31-12/14)	90,	89	90

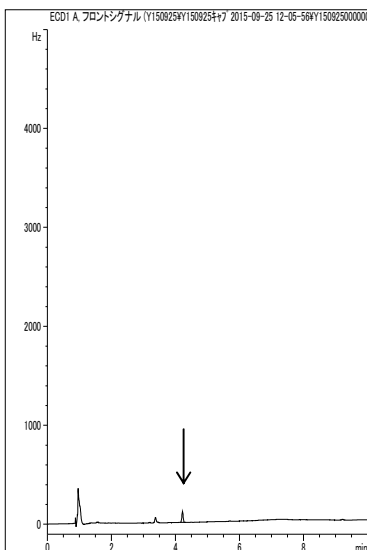
付図-1. キャプタンのクロマトグラム (代表例)

付図-1-1. 果肉

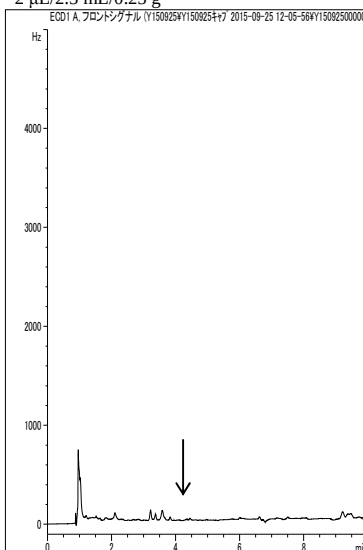
標準品 0.04 ng



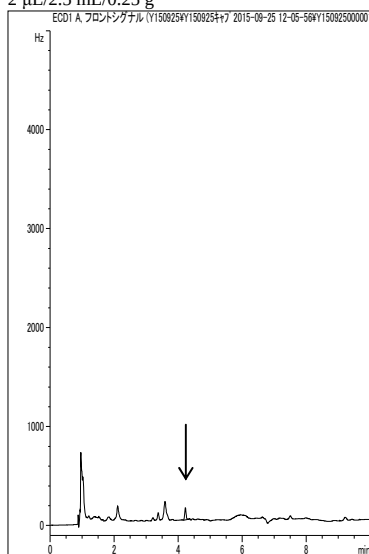
標準品 0.002 ng



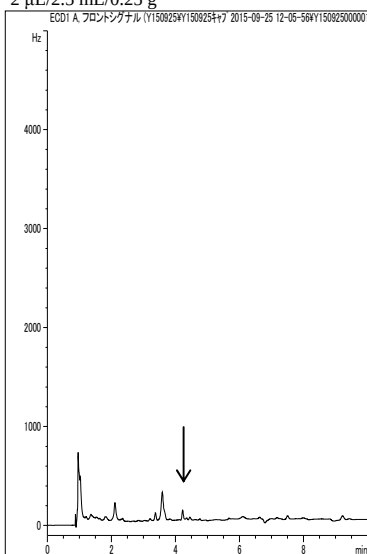
宮崎 無処理
2 μ L/2.5 mL/0.25 g



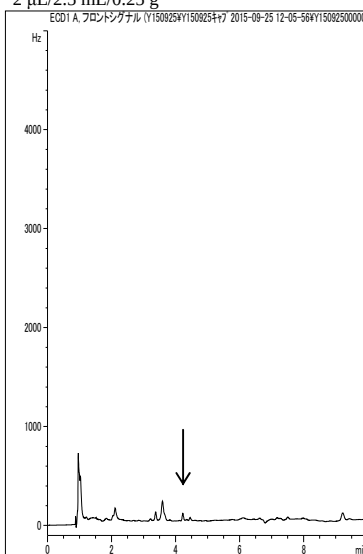
宮崎 5 回処理 7 日後
2 μ L/2.5 mL/0.25 g



宮崎 5 回処理 14 日後
2 μ L/2.5 mL/0.25 g

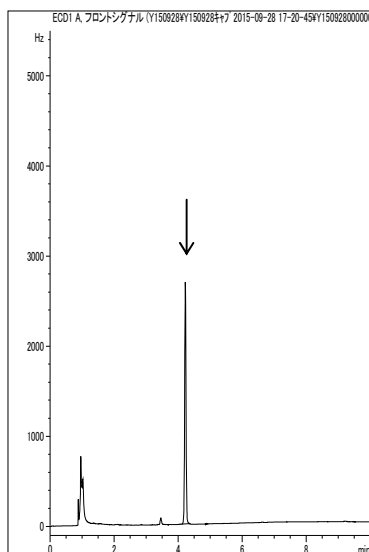


宮崎 5 回処理 21 日後
2 μ L/2.5 mL/0.25 g

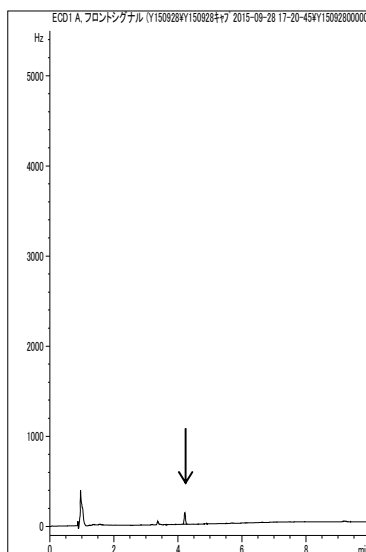


付図-1-2. 果実

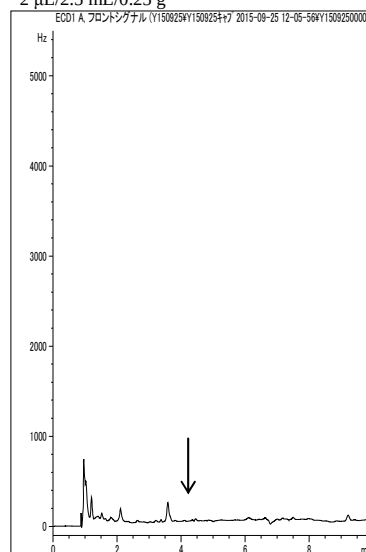
標準品 0.04 ng



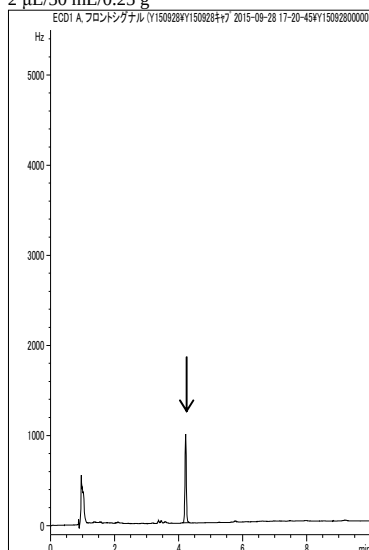
標準品 0.002 ng



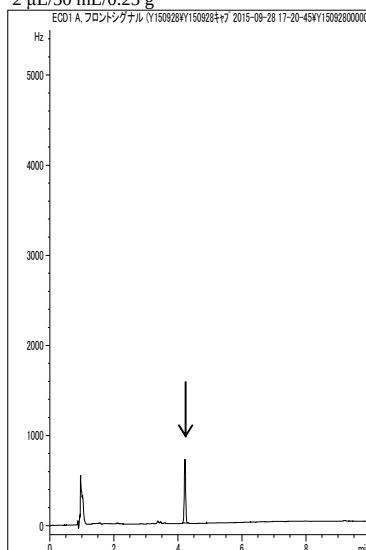
宮崎 無処理
2 μ L/2.5 mL/0.25 g



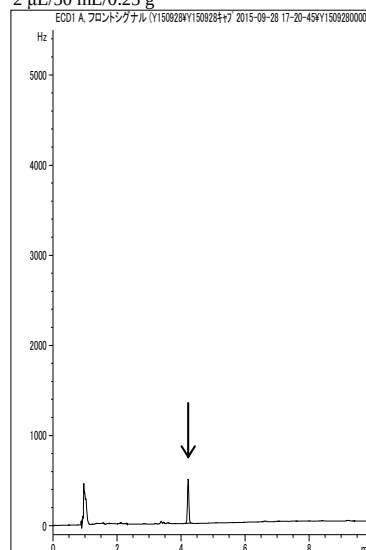
宮崎 5 回処理 7 日後
2 μ L/50 mL/0.25 g



宮崎 5 回処理 14 日後
2 μ L/50 mL/0.25 g



宮崎 5 回処理 21 日後
2 μ L/50 mL/0.25 g



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②（メロン）
 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	送付量	送付量の平均	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	—	1.46	1.36	14.6	8.60	89	11	2.1
	DE	7	1.22		6.08		89	11	2.2
	DE	14	1.38		6.89		89	11	2.1
	DE	21	1.36		6.81		87	13	2.2
							平均 89:11		平均 2.2
高知	0	—	1.36	1.44	13.6	10.0	91	9	2.0
	DE	7	1.46		8.76		90	10	2.2
	DE	14	1.47		8.83		88	12	2.2
	DE	21	1.48		8.90		90	10	2.1
							平均 90:10		平均 2.1
宮崎	0	—	1.38	1.56	24.8	13.5	89	11	1.9
	DE	7	1.54		9.22		91	9	2.1
	DE	14	1.66		9.97		91	9	1.9
	DE	21	1.67		10.0		89	11	1.9
							平均 90:10		平均 2.0
3 ほ場の総平均重量									
1.45 kg/個									

DE：テトラジホンは 2 回処理

ダイアジノンは 4 回処理

キャプタンは 5 回処理

2.作物写真

2.1. 茨城



茨城 無処理



茨城 処理7日後



茨城 処理14日後



茨城 処理21日後

2.2. 高知



高知 無処理



高知 処理7日後



高知 処理14日後



高知 処理21日後

2.3. 宮崎



宮崎 無処理



宮崎 処理7日後



宮崎 処理14日後



宮崎 処理21日後