

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

(①すいか、メロン)

残留分析詳細(すいか試料) : TPN (クロロタロニル)

1. 分析対象物質

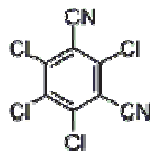
TPN

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)

ガラス繊維ろ紙 : GFP (桐山製作所製)

グラファイトカーボン/ NH_2 積層ミニカラム :Supelclean ENVI-Carb/LC- NH_2 , 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 (エフ・エム・アイ製)
 ガスクロマトグラフ (GC-ECD)： 7890A (Agilent製)
 データ処理装置： OpenLAB CDS ChemStation Edition (Agilent 製)

4. ガスクロマトグラフの操作条件

4.1. 果肉分析

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 180°C(1 min)－10°C/min－260°C (1 min)－20°C /min－
 280°C (2 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) 30 mL/min
 注入量： 2 μ L
 保持時間： 約 4.8 min

4.2. 果実分析

カラム： Rtx-35 (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°C/min－260°C (1 min)－20°C /min－
 280°C (2 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 5.0 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、さらにこの溶液をヘキサンで希釈して0.1 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, 0.0008, 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。細切試料に10%リン酸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。抽出物をガラス繊維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/ NH_2 積層ミニカラムによる精製

グラファイトカーボン/ NH_2 積層ミニカラムにアセトニトリルを5 mL流下し前処理した。分取した抽出液をミニカラムに流下した。さらにアセトニトリル5 mLで容器内を洗浄後、ミニカラムに移して流下し、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°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、茨城及び宮崎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、無処理試料は各ほ場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。

8.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSD (%)
茨城	5	96,	90,		94	4
宮崎		99,	93,	93		
茨城	0.25	102,	99,		99	2
宮崎		101,	99,	96		
茨城	0.01	98,	89,		93	4
宮崎		95,	92,	91		

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSD (%)
茨城	5	92,	88,		92	4
宮崎		97,	92,	90		
茨城	0.25	97,	93,		93	2
宮崎		93,	92,	92		
茨城	0.01	103,	101,		103	3
宮崎		108,	103,	98		

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、2016年8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)
2016/9/28	宮崎	83	<0.01
11/17	高知	87	<0.01
11/28	高知	86	<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)
2016/9/28	宮崎	98	<0.01
11/17	高知	101	<0.01
11/28	高知	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	111 (2016/8/9-11/28)	92,	90	91
高知	0.5	54 (2016/10/5-11/28)	88,	84	86
宮崎	0.5	129 (2016/7/22-11/28)	97,	94	96

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	111 (2016/8/9-11/28)	99,	95	97
高知	0.5	54 (2016/10/5-11/28)	99,	97	98
宮崎	0.5	129 (2016/7/22-11/28)	98,	94	96

付図-1 クロマトグラム (代表例)

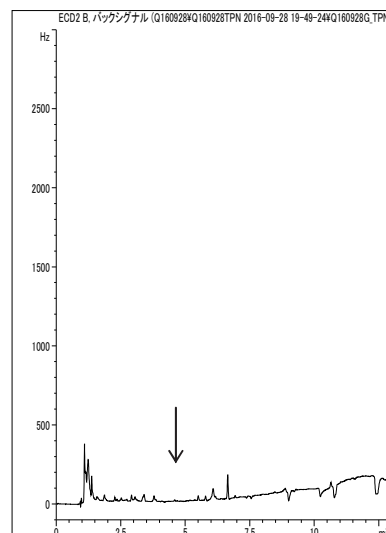
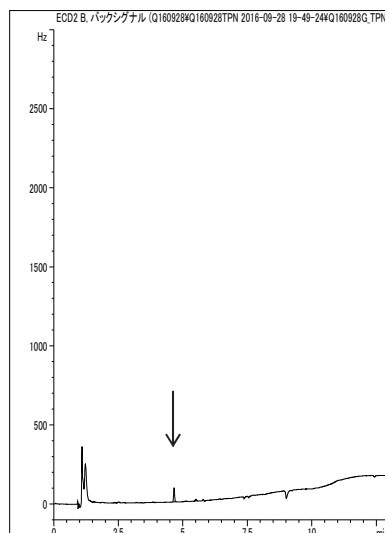
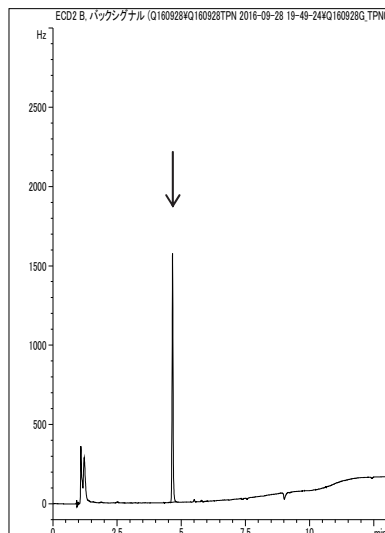
付図-1-1. 果肉

標準品 0.016 ng

標準品 0.0008 ng

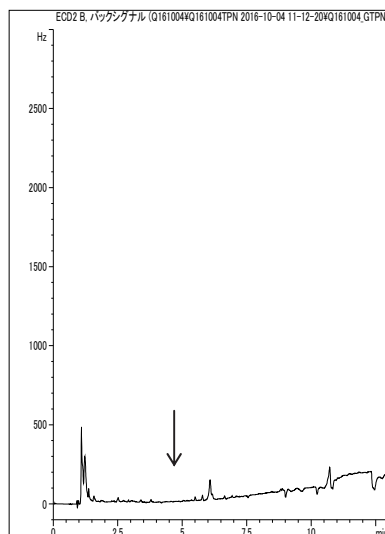
茨城 無処理

2 μ L/5 mL/0.2 g



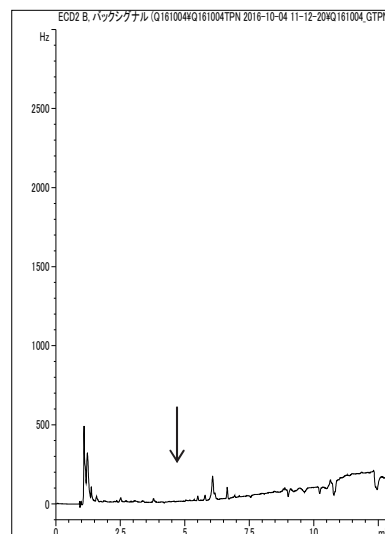
茨城 5回処理 3日後

2 μ L/5 mL/0.2 g



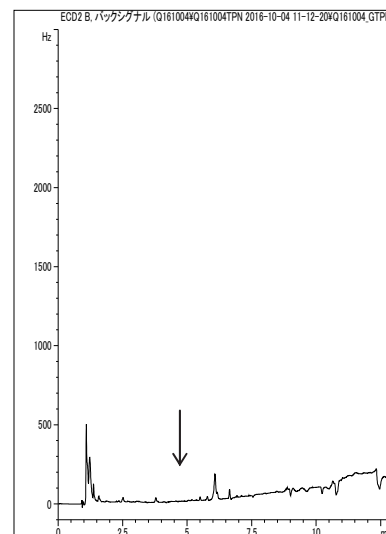
茨城 5回処理 7日後

2 μ L/5 mL/0.2 g



茨城 5回処理 14日後

2 μ L/5 mL/0.2 g



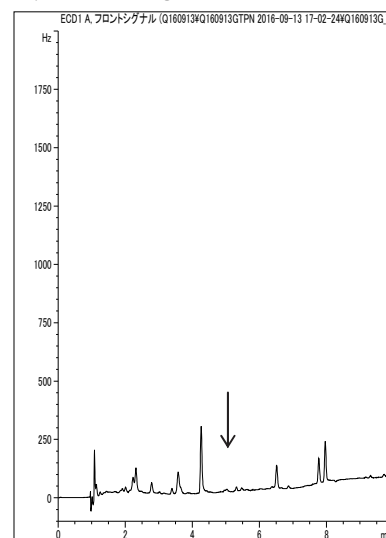
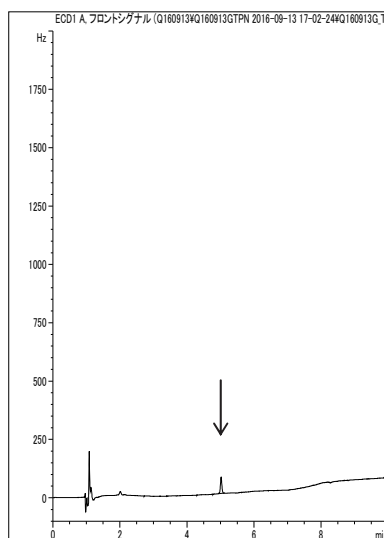
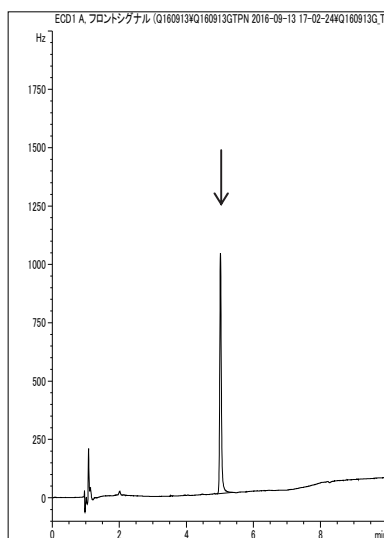
付図-1-2. 果実

標準品 0.016 ng

標準品 0.0008 ng

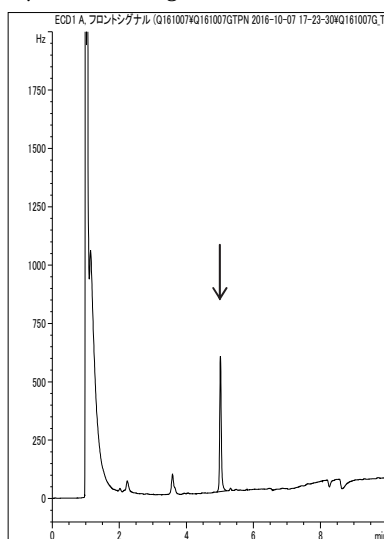
茨城 無処理

2 μ L/5 mL/0.2 g



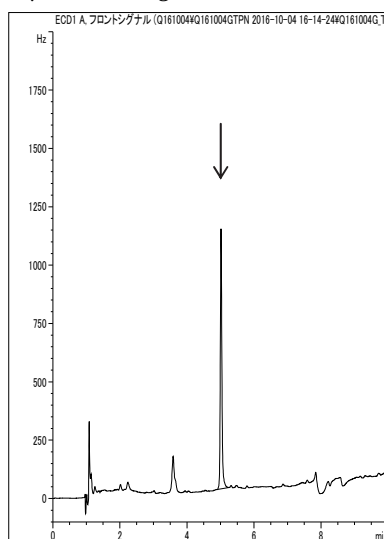
茨城 5回処理 3日後

2 μ L/25 mL/0.2 g



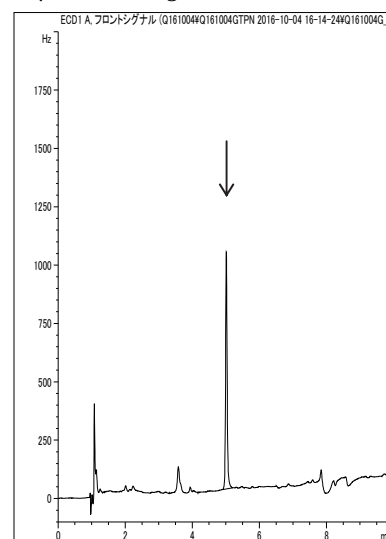
茨城 5回処理 7日後

2 μ L/5 mL/0.2 g



茨城 5回処理 14日後

2 μ L/5 mL/0.2 g



残留分析詳細(すいか試料)：キノキサリン系

1. 分析対象物質

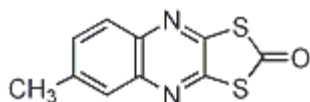
キノメチオナート

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

キノメチオナート標準品：純度 99.5% (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)

リン酸：試薬特級 (和光純薬工業製)

ガラス繊維ろ紙：GFP (桐山製作所製)

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 (Waters 製)

3. 装置及び機器

ミキサー：ロボクーブ BLIXER-5Plus (エフ・エム・アイ製)

超音波洗浄機：FU-30C, UT-305 (シャープ製)

ガスクロマトグラフ (GC-ECD)：7890A (Agilent製)

データ処理装置：OpenLAB CDS ChemStation Edition（Agilent 製）

4. ガスクロマトグラフの操作条件

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(0.5 min)－10°C/min－260°C (1.5 min)－
 20°C /min－280°C (2 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 3.7 min

5. 検量線の作成

キノメチオナート標準品10.1 mg（純度補正10.0 mg相当）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1 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, 0.002, 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ノメチオナート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。細切試料に10%リン酸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。抽出物をガラス繊維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2.5 mL（試料0.25 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17 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80 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、超音波処理した後、シリカゲルミニカラムに移して流下した。同様の操作を繰り返し、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、検量線よりキノメチオナートの重量を求め、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、茨城及び宮崎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、無処理試料は各ほ場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。

8.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSD (%)
茨城	5	108,	107,	98	103	5
宮崎		106,	98,			
茨城	0.25	106,	104,	105	109	5
宮崎		114,	114,			
茨城	0.01	104,	98,	98	100	3
宮崎		101,	98,			

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSD (%)
茨城	5	105,	103,	102	103	1
宮崎		103,	102,			
茨城	0.25	106,	100,	98	101	3
宮崎		103,	100,			
茨城	0.01	107,	106,	107	107	1
宮崎		109,	108,			

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、2016年8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)
2016/9/28	宮崎	107	<0.01
11/21	高知	87	<0.01
11/28	高知	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)
2016/9/28	宮崎	111	<0.01
11/21	高知	101	<0.01
11/28	高知	99	<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メチオナートを添加し、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	111 (2016/8/9-11/28)	96,	95	96
高知	0.5	54 (2016/10/5-11/28)	90,	87	88
宮崎	0.5	129 (2016/7/22-11/28)	94,	94	94

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	111 (2016/8/9-11/28)	95,	93	94
高知	0.5	54 (2016/10/5-11/28)	92,	90	91
宮崎	0.5	129 (2016/7/22-11/28)	93,	93	93

付図-1.クロマトグラム（代表例）

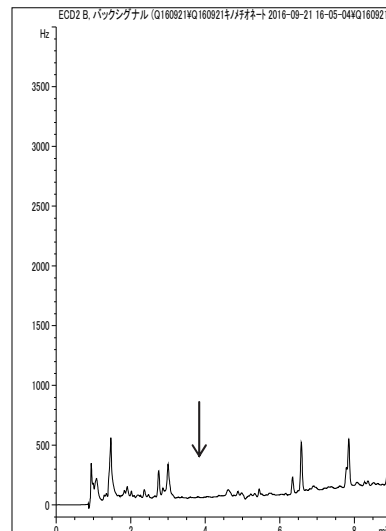
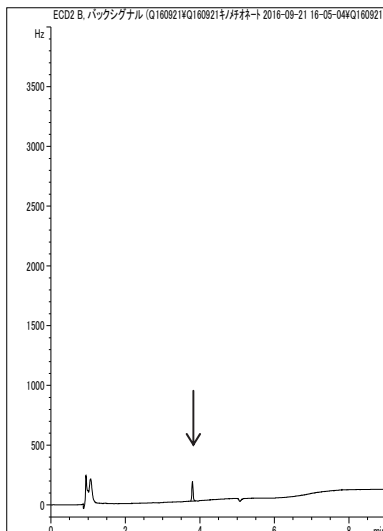
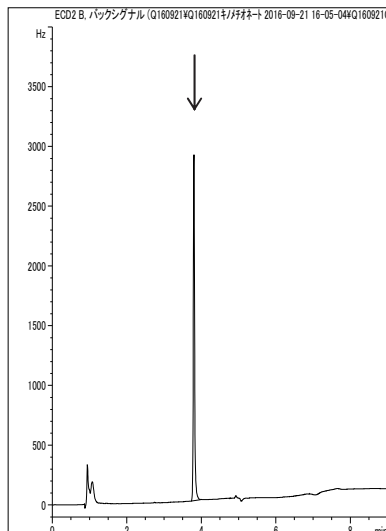
付図-1-1. 果肉

標準品 0.04 ng

標準品 0.002 ng

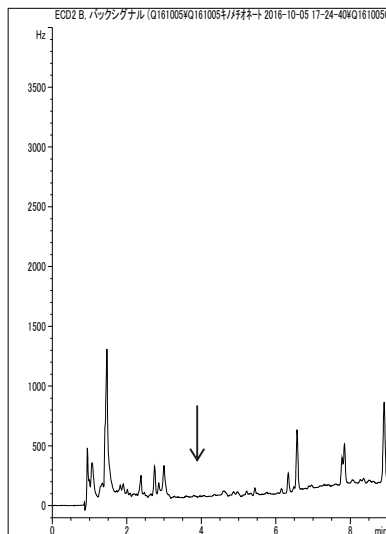
茨城 無処理

2 μ L/2.5 mL/0.25 g



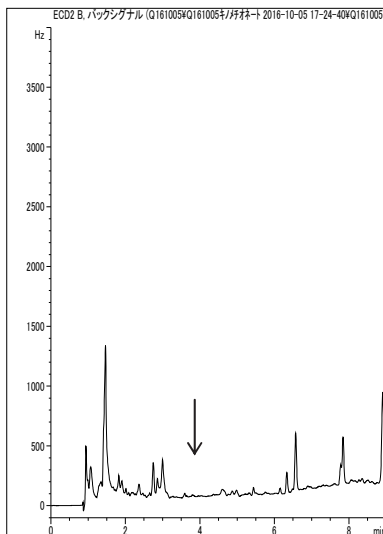
茨城 5回処理 3日後

2 μ L/2.5 mL/0.25 g



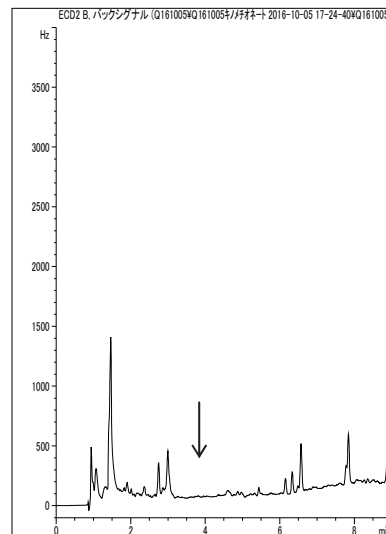
茨城 5回処理 7日後

2 μ L/2.5 mL/0.25 g



茨城 5回処理 14日後

2 μ L/2.5 mL/0.25 g



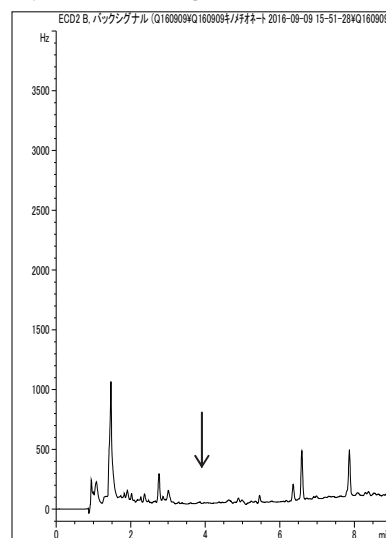
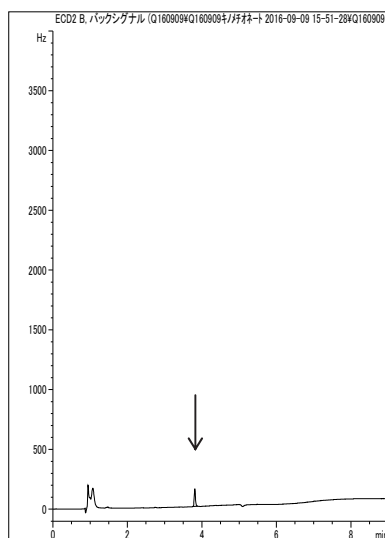
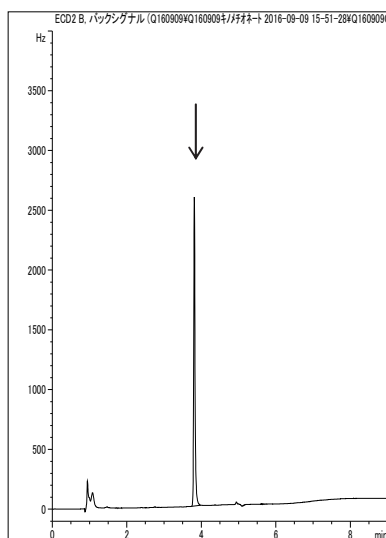
付図-1-2. 果実

標準品 0.04 ng

標準品 0.002 ng

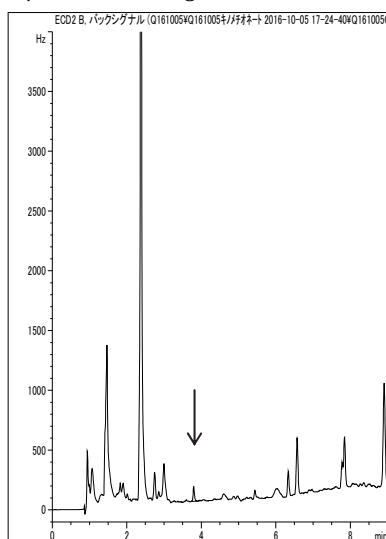
茨城 無処理

2 μ L/2.5 mL/0.25 g



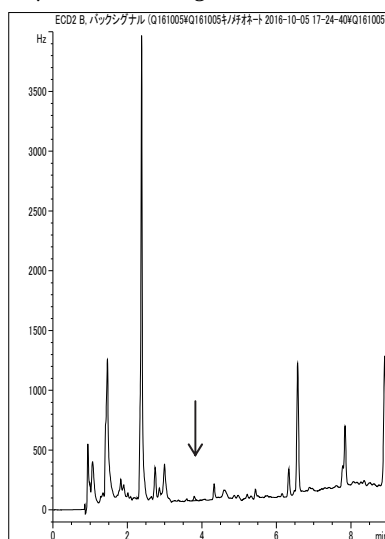
茨城 5回処理 3日後

2 μ L/2.5 mL/0.25 g



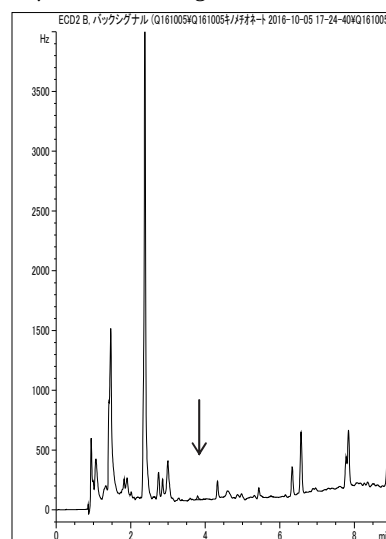
茨城 5回処理 7日後

2 μ L/2.5 mL/0.25 g



茨城 5回処理 14日後

2 μ L/2.5 mL/0.25 g



残留分析詳細(すいか試料)：フルバリネート

1. 分析対象物質

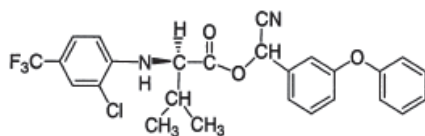
フルバリネート

化学名： (RS)- α -cyano-3-phenoxybenzyl N-(2-chloro- α,α,α -trifluoro-*p*-tolyl)-DL-valinate

分子式： $C_{26}H_{22}ClF_3N_2O_3$

分子量： 502.9

構造式：



性 状： 黄色粘性液体

沸 点： $>450^{\circ}C$

蒸気圧： <0.013 mPa ($25^{\circ}C$)

分配係数： $\log P_{OW} > 3.8$

溶解性： 水 <0.005 mg/kg,
アルコール類，芳香族炭化水素類，ジクロロメタン，
ジエチルエーテルに可溶

安定性： 加水分解半減期 ($25^{\circ}C$)；30日 (pH 3, pH 6), 1～2時間 (pH 9)
($42^{\circ}C$)；35日 (pH 3), 8日 (pH 6), 1日 (pH 9)

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

2. 標準品及び試薬

フルバリネート標準品：純度 97.2% (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：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：試薬特級 (和光純薬工業製)

酢酸アンモニウム：試薬特級 (和光純薬工業製)

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, 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)：

ACQUITY UPLC I-Class (Waters 製)

Xevo TQ-S (Waters 製)

データ処理装置： MassLynx 4.1 (Waters 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： ACQUITY UPLC HSS C18 (Waters 製)
 内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒径 1.8 μ m
 溶離液： A : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール
 B : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム
 A:B = 60:40 (1 min)－(3.5 min)－98:2 (1.5 min)
 流速： 0.3 mL/min
 カラム温度： 40°C
 注入量： 2 μ L
 保持時間： 約 5.2 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
 コーンガス流量： 150 L/h (N₂)
 脱溶媒ガス流量： 1000 L/h (N₂)
 脱溶媒ガス温度： 500°C
 ソースブロック温度： 150°C
 キャピラリー電圧： 3.0 kV
 コーン電圧： 20 V
 コリジョン電圧： 30 V
 (コリジョンガス; Ar)
 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 502.9
 プロダクトイオン m/z 181.0

5. 検量線の作成

フルバリネート標準品10.3 mg (純度補正10.0 mg相当) 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、さらにこの溶液をメタノールで希釈して0.2 mg/L標準溶液を調製した。この溶液をメタノールで希釈して0.0005, 0.001, 0.002, 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フルバリネート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定容とし、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。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流下した。さらにメタノール/水 (70:30, v/v) 混液 5 mLで容器内を洗浄後、グラファイトカーボンミニカラムに移して流下し、これらの流出液を捨てた。次に3%ギ酸含有メタノール5 mL, メタノール/トルエン (75:25, v/v) 混液 20 mLを順次流下し、これらの溶出液を分取した。溶出液は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

残留物を適量のメタノールに溶解した。この溶液を前記条件の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入してピーク面積を求め、検量線よりフルバリネートの重量を求め、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の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	113, 105,	106, 100	105,	106	4
高知	0.25	100, 94,	100, 93	97,	97	3
高知	0.01	92, 83,	87, 80	84,	85	5

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSD (%)
高知	5	110, 106,	107, 96	107,	105	5
高知	0.25	95, 92,	93, 85	92,	91	4
高知	0.01	95, 84,	92, 80	85,	87	7

9. 精度管理

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

管理基準：20検体を超えるごとに、各1検体の無処理試料及び0.1 mg/kg添加試料（内部精度管理試料）を分析した。その結果、下表に示すように問題は認められなかった。又、2016年8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)
2016/8/18	宮崎	87	<0.01
9/15	茨城	102	<0.01
11/10	高知	104	<0.01
12/13	高知	91	<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)
2016/8/18	宮崎	75	<0.01
9/15	茨城	90	<0.01
11/10	高知	111	<0.01
12/13	高知	88	<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フルバリネートを添加し、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

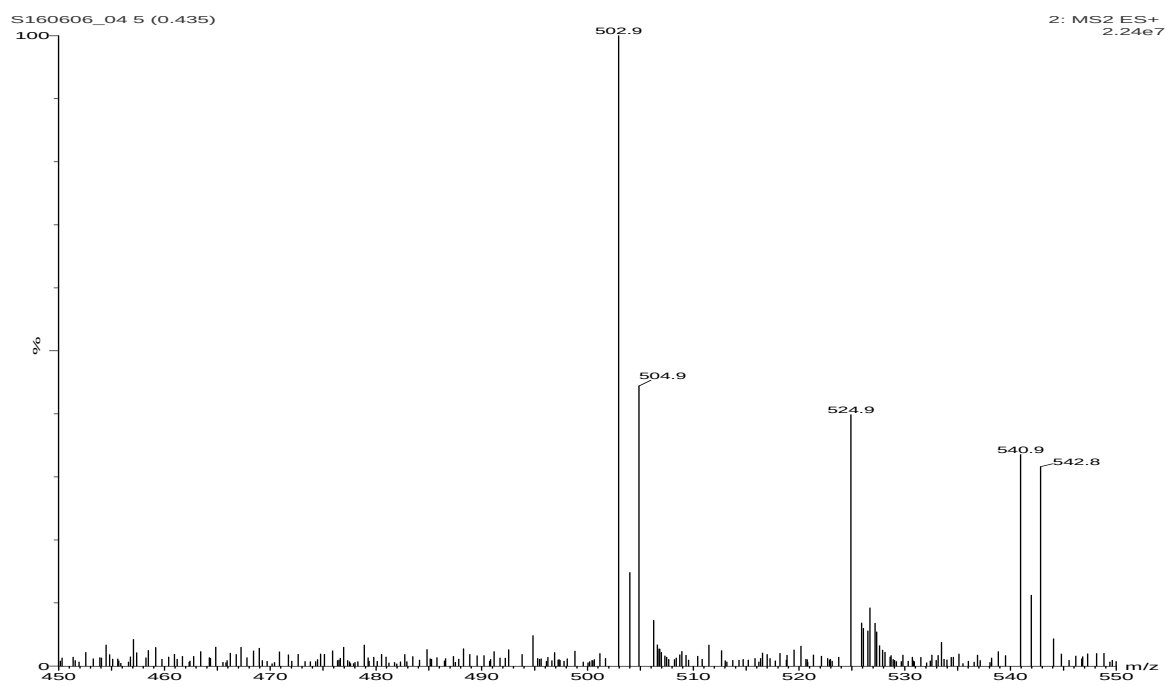
ほ場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	0.5	126 (2016/8/9-12/13)	114,	113	114
高知	0.5	69 (2016/10/5-12/13)	116,	115	116
宮崎	0.5	144 (2016/7/22-12/13)	118,	117	118

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	126 (2016/8/9-12/13)	117,	116	116
高知	0.5	69 (2016/10/5-12/13)	117,	113	115
宮崎	0.5	144 (2016/7/22-12/13)	116,	111	114

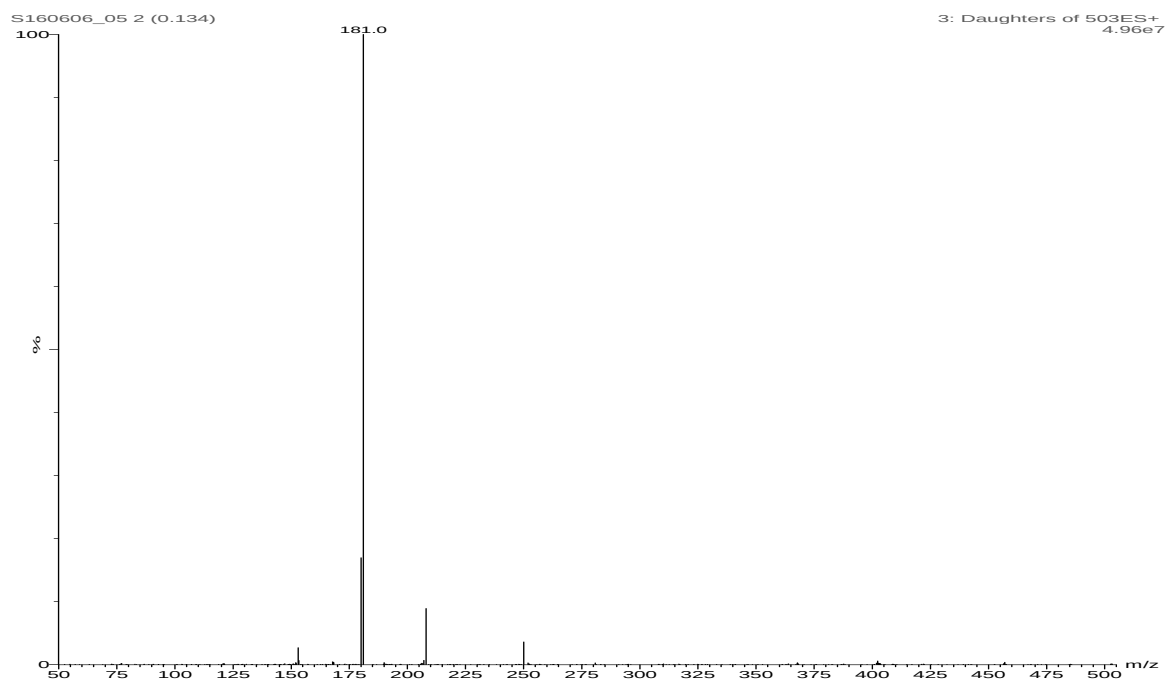
付図-1. マススペクトル

マススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)



プロダクトスキャンスペクトルの一例

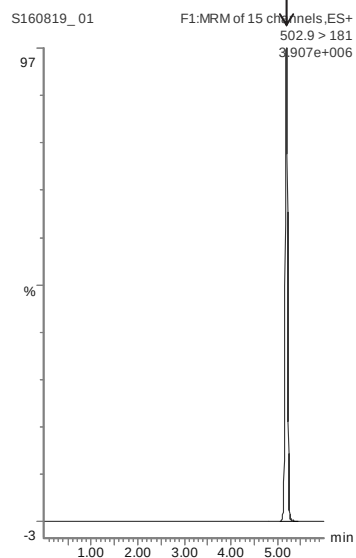
(プリカーサーイオン ; $m/z=502.9$, 正モード)



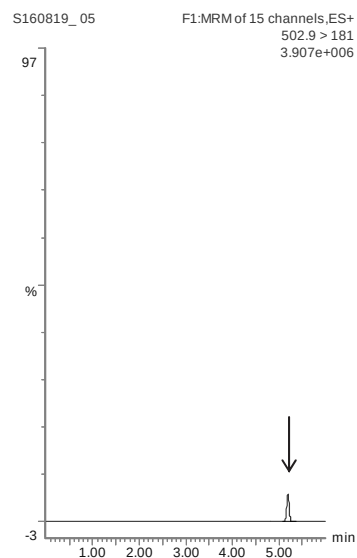
付図-2. クロマトグラム (代表例)

付図-2-1. 果肉

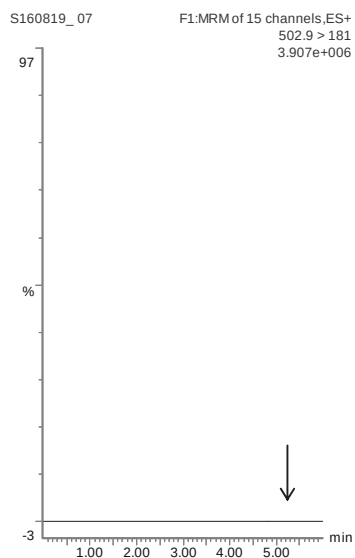
標準品 0.04 ng



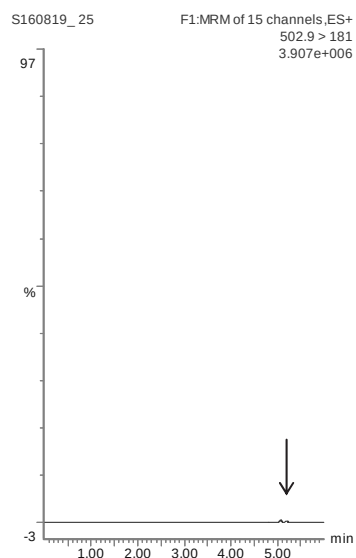
標準品 0.002 ng



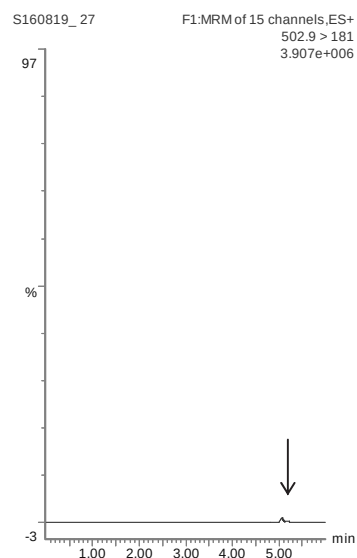
宮崎 無処理
2 μ L/2.5 mL/0.25 g



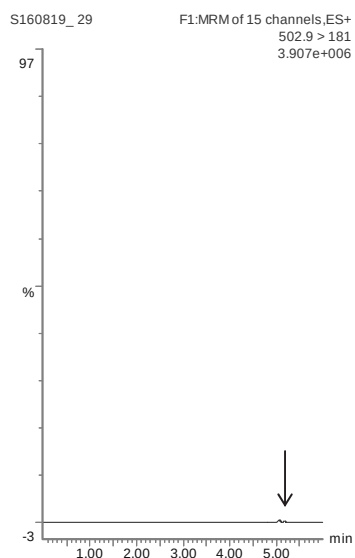
宮崎 2 回処理 3 日後
2 μ L/2.5 mL/0.25 g



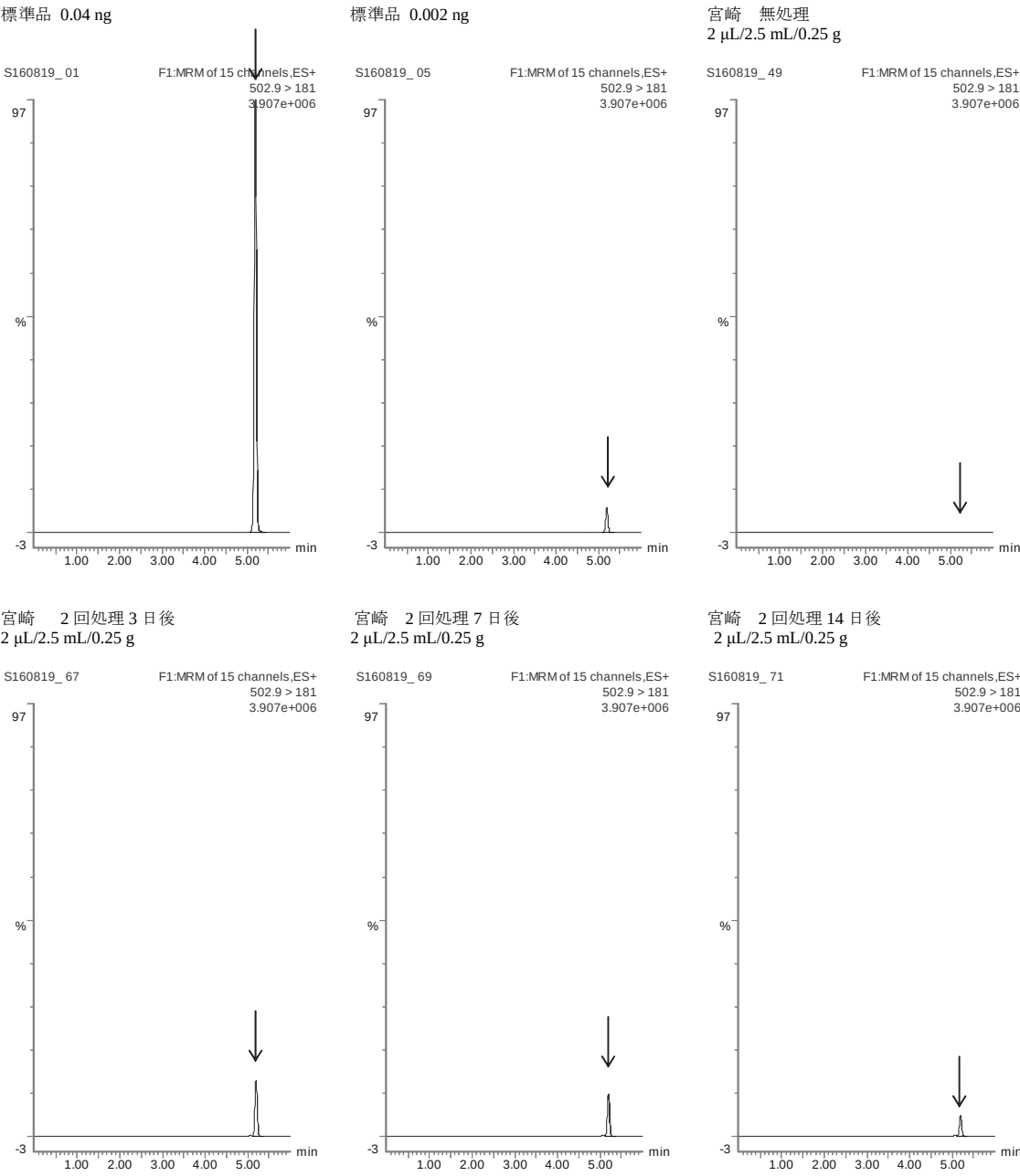
宮崎 2 回処理 7 日後
2 μ L/2.5 mL/0.25 g



宮崎 2 回処理 14 日後
2 μ L/2.5 mL/0.25 g



付図-2-2. 果実



残留分析詳細(すいか試料)：ポリオキシン複合体

1. 分析対象物質

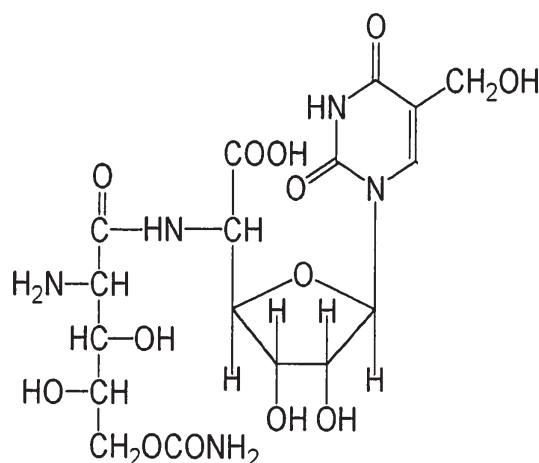
ポリオキシンB

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)
しよ糖	: 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、一般財団法人残留農薬研究所が調製した。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、市販品のすいかを用いて、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10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	79,77,73,73,71	79	7
市販品 ^b	0.1	86,84,83,83,83		
市販品 ^a	1	81,80,80,77,76	82	5
市販品 ^b	1	86,86,86,85,84		

^a 茨城及び宮崎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。

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	80,80,80,80,77	81	2
市販品 ^b	0.1	83,83,82,81,81		
市販品 ^a	1	83,80,80,78,78	84	5
市販品 ^b	1	89,89,88,87,86		

^a 茨城及び宮崎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。

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	69 (2016/8/16-10/24)	77	79	78
高知	1	23 (2016/10/19-11/11)	87	86	86
宮崎	1	89 (2016/7/27-10/24)	81	80	80

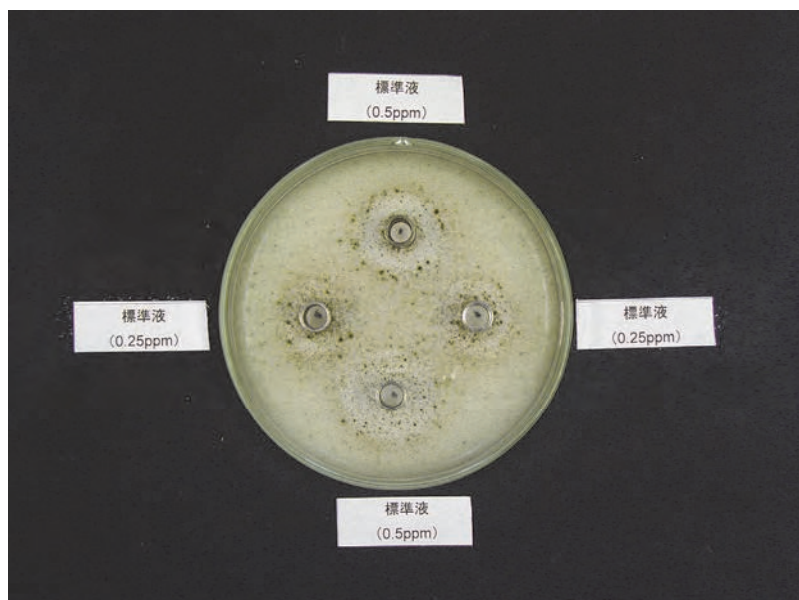
9.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	1	69 (2016/8/16-10/24)	77	74	76
高知	1	23 (2016/10/19-11/11)	82	83	82
宮崎	1	89 (2016/7/27-10/24)	80	81	80

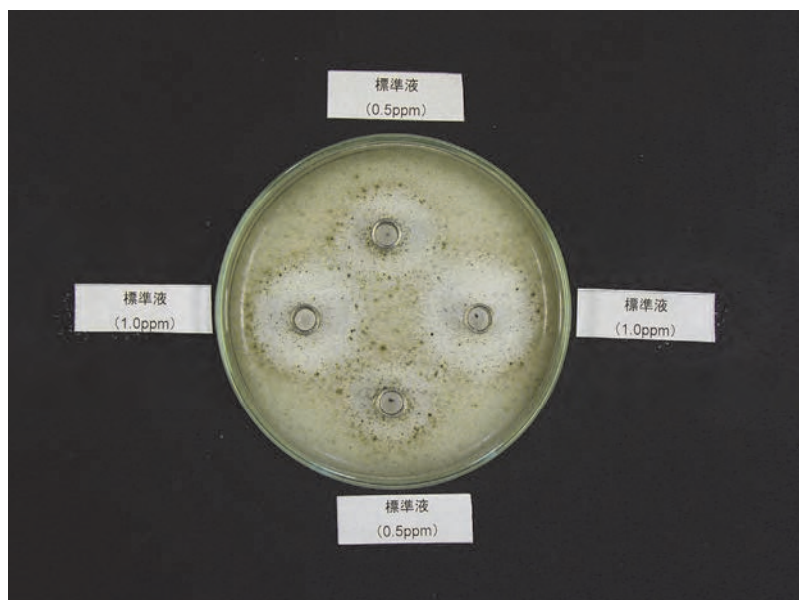
付図-1. 検定写真(代表例)

付図-1-1. 果肉

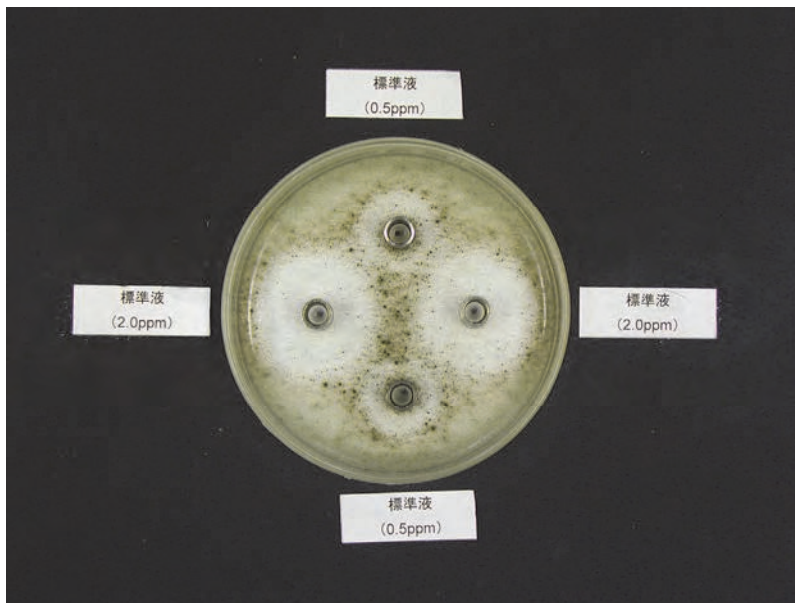
STD-0.25 AmBu/ml



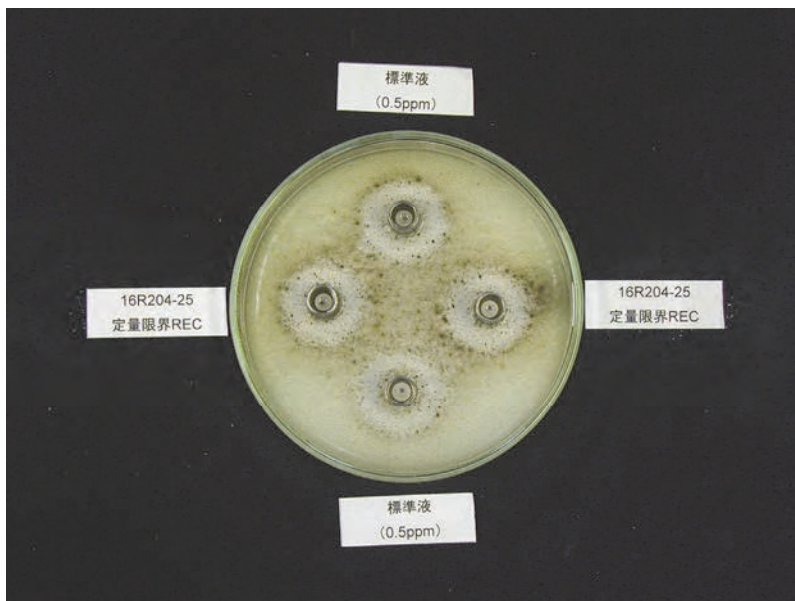
STD-1.0 AmBu/ml



STD-2.0 AmBu/ml

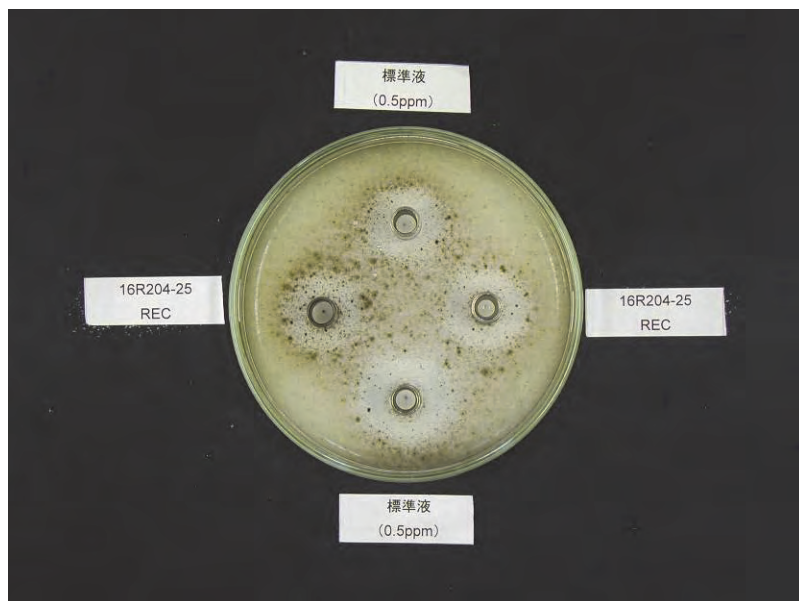


添加回収試験: 0.1 mg/kg 添加 (定量限界濃度)

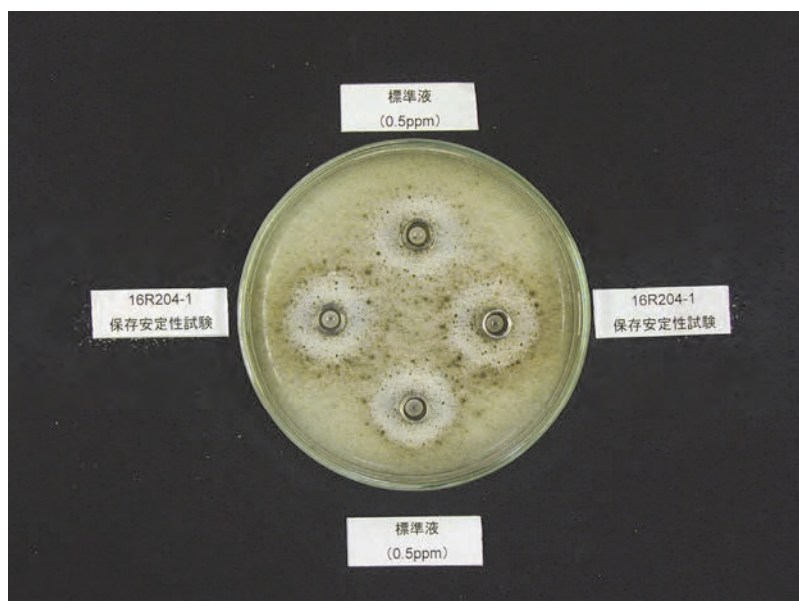


処理区D (ポリオキシン複合体)

添加回収試験: 1 mg/kg 添加 (定量限界の 10 倍量)

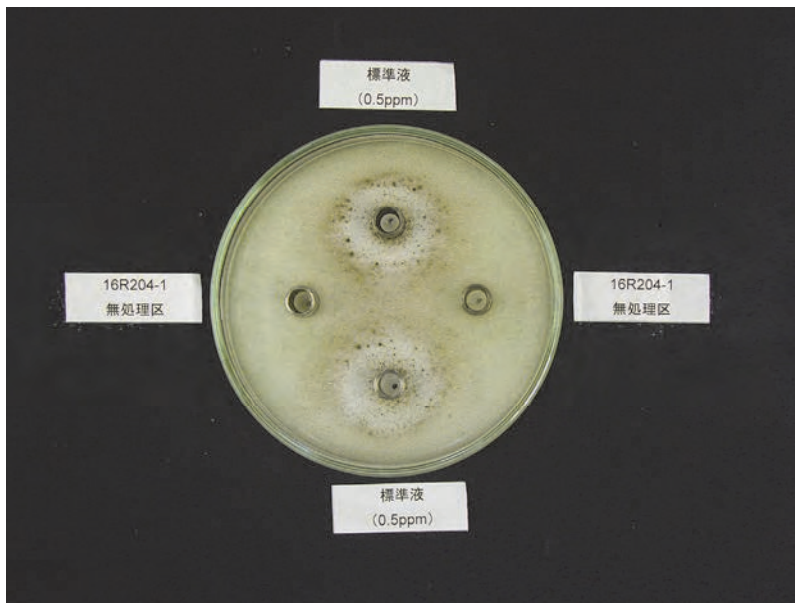


保存安定性試験: 1 mg/kg 添加

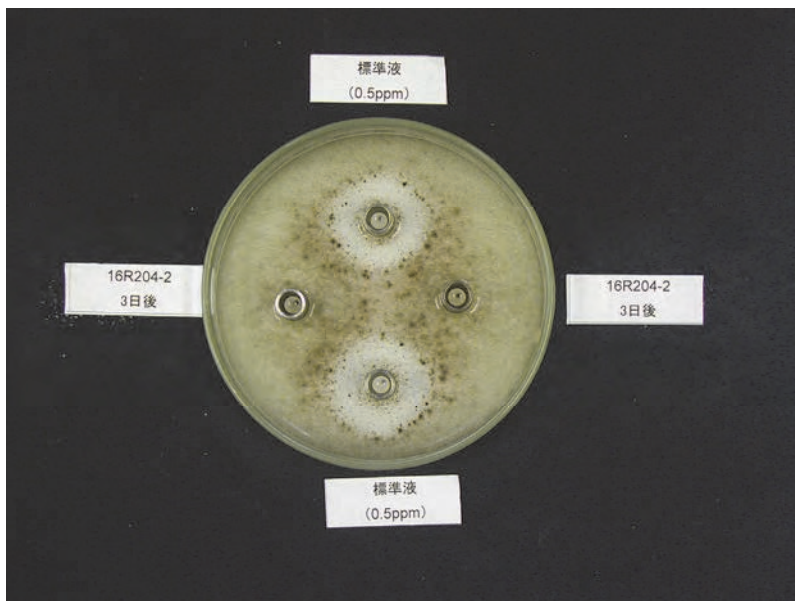


処理区D (ポリオキシン複合体)

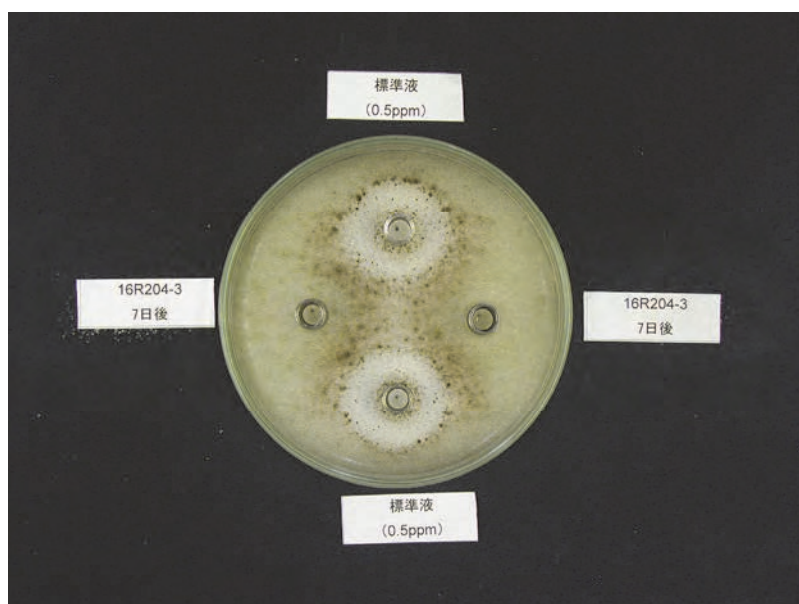
宮崎 無処理区(BL)



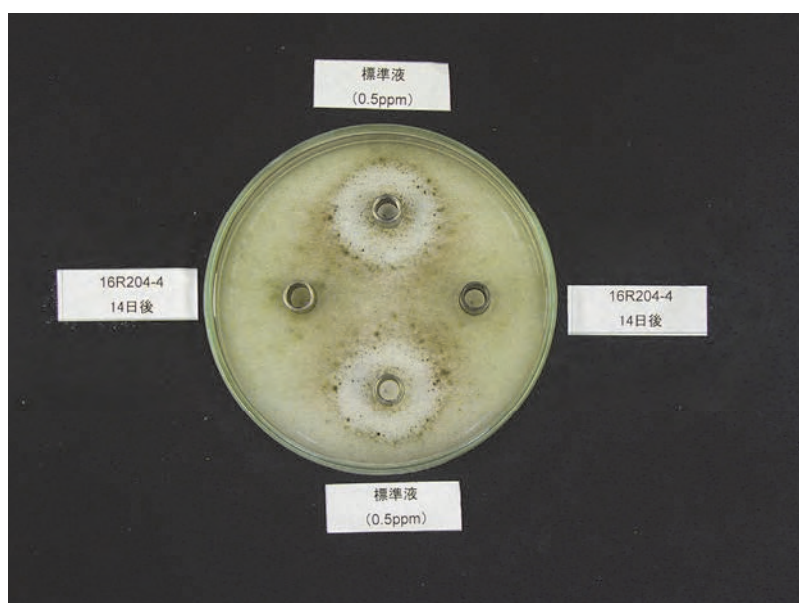
宮崎 5回処理3日後 (D-1)



宮崎 5回処理7日後 (D-2)

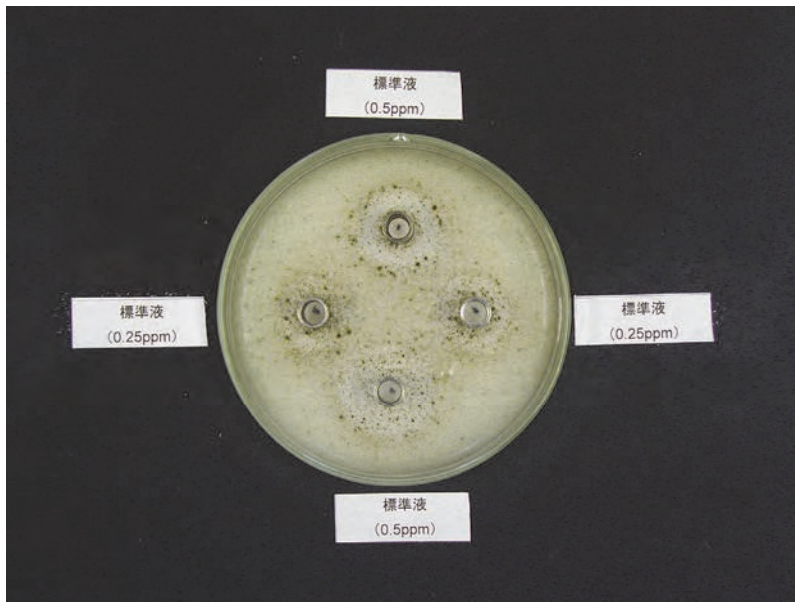


宮崎 5回処理14日後 (D-3)

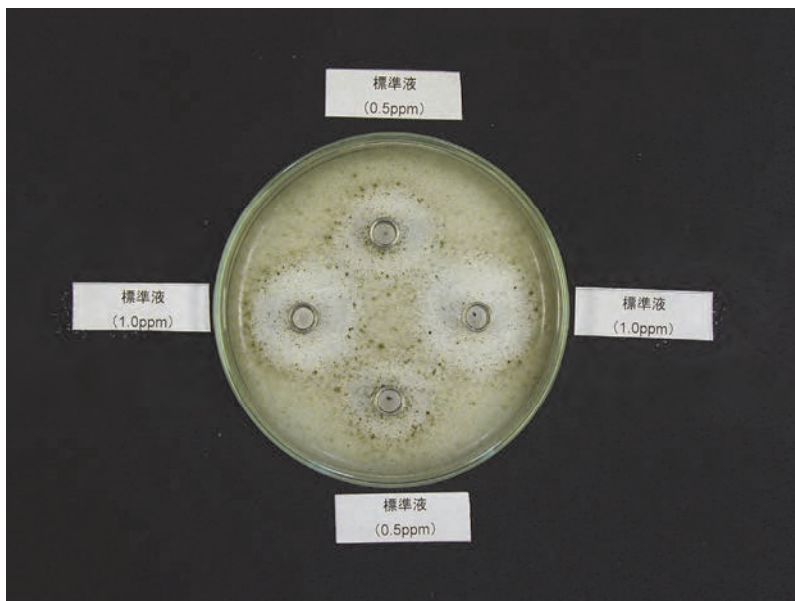


付図-1-2.果実

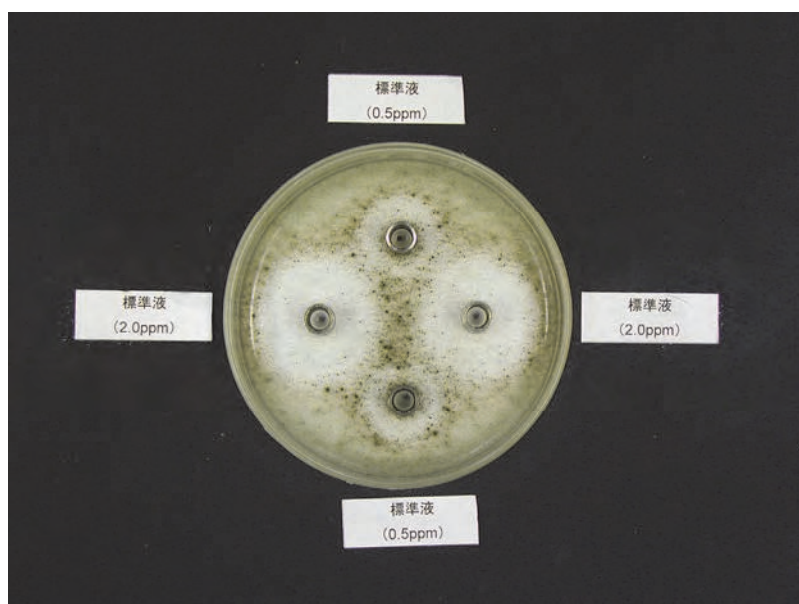
STD-0.25 AmBu/ml



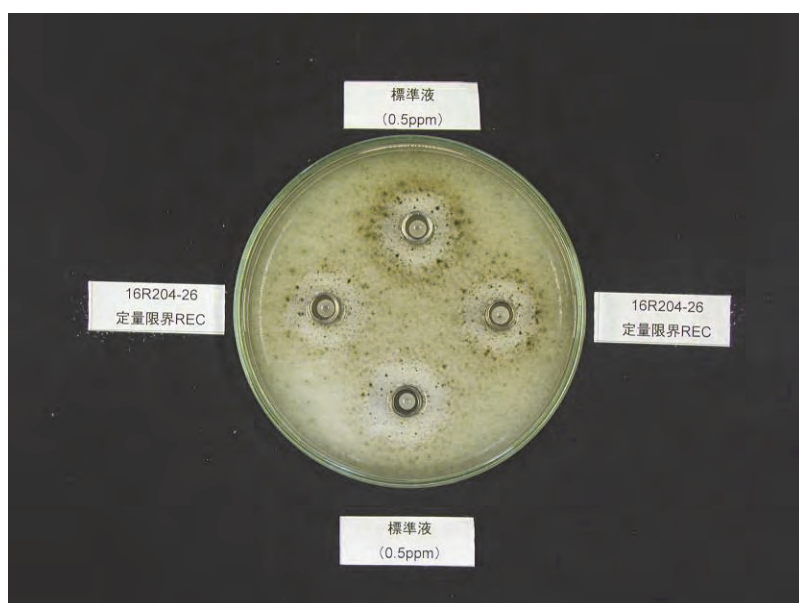
STD-1.0 AmBu/ml



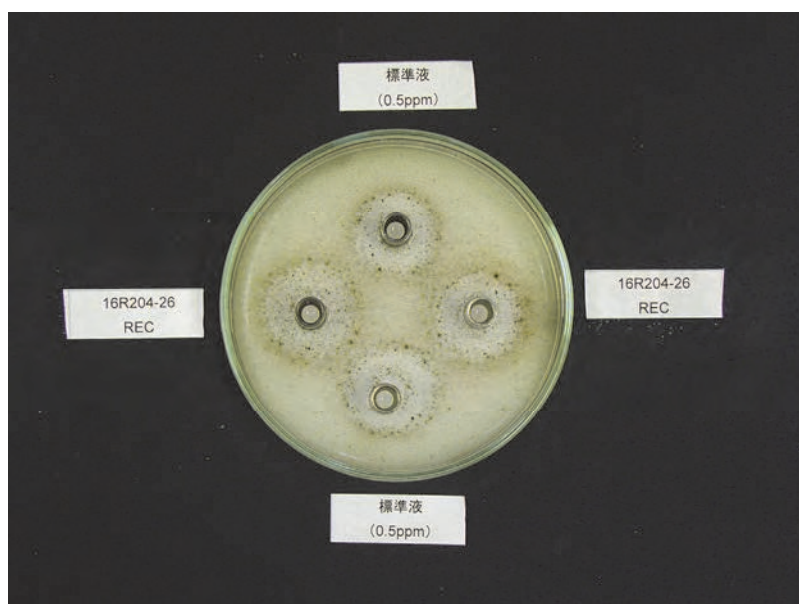
STD-2.0 AmBu/ml



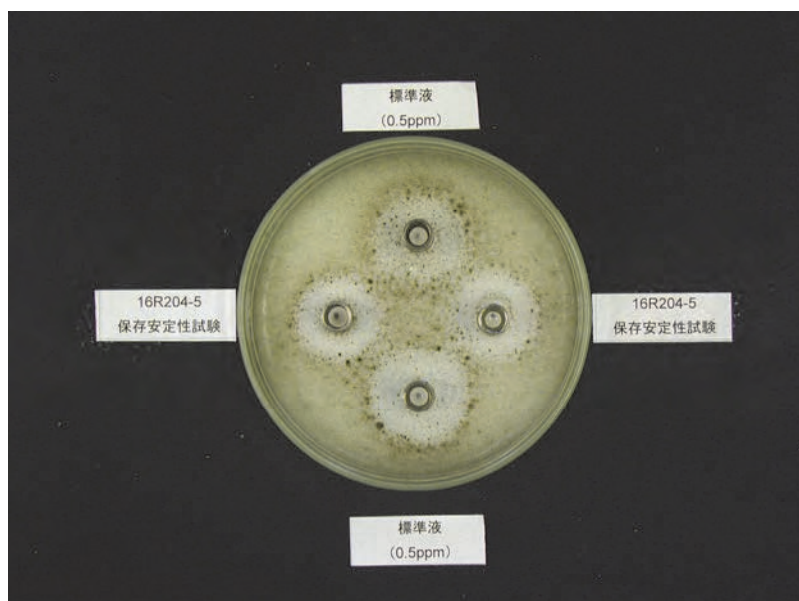
添加回収試験:0.1 mg/kg 添加(定量限界濃度)



添加回収試験: 1 mg/kg 添加 (定量限界の 10 倍量)

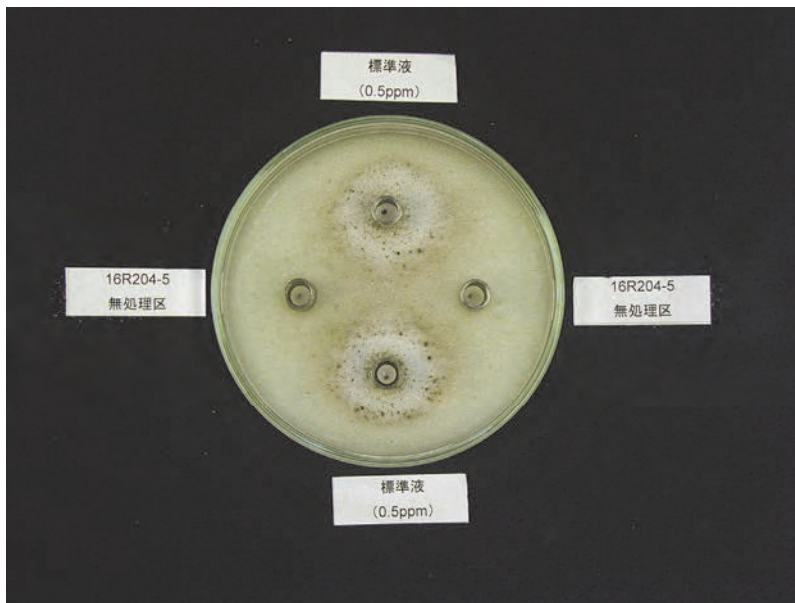


保存安定性試験: 1 mg/kg 添加

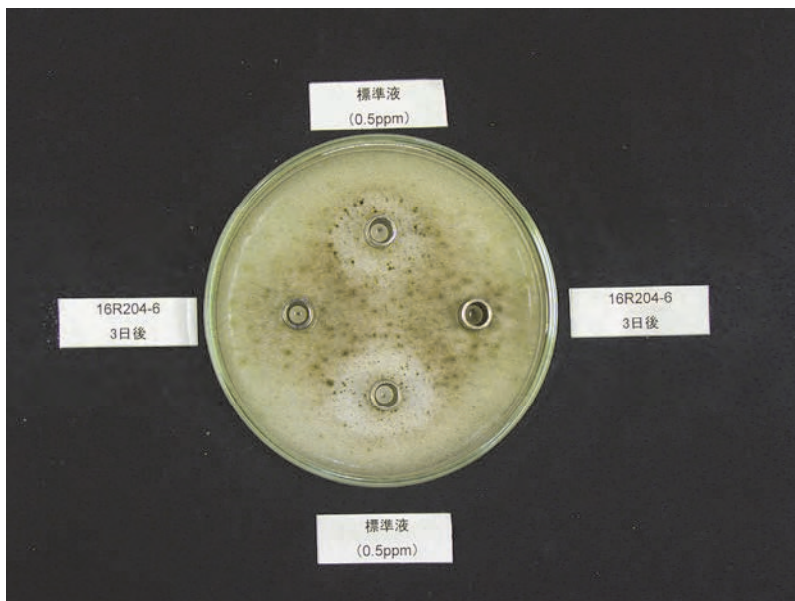


処理区D (ポリオキシン複合体)

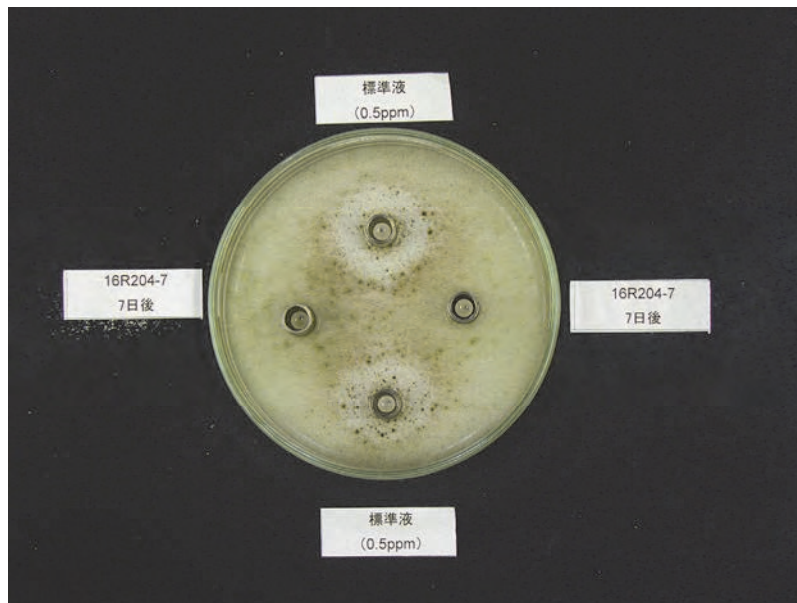
宮崎 無処理区(BL)



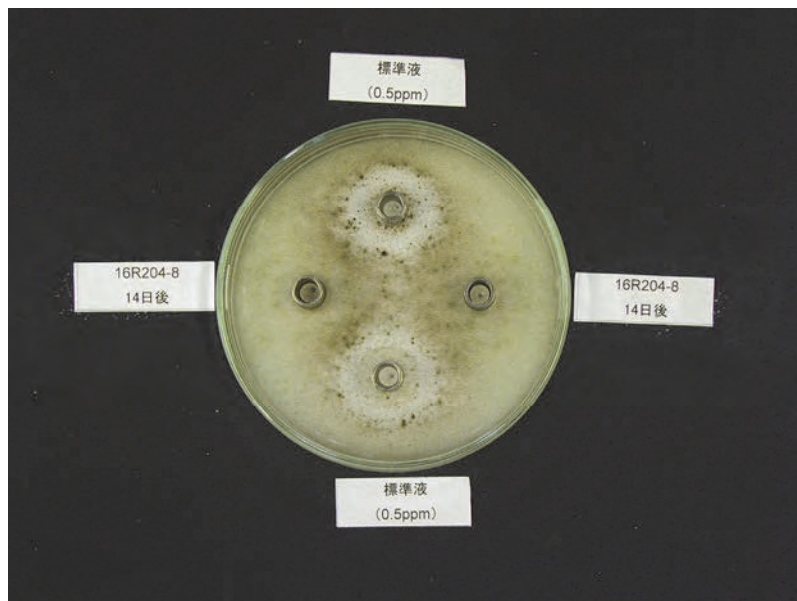
宮崎 5回処理3日後(D-1)



宮崎 5回処理7日後 (D-2)



宮崎 5回処理14日後 (D-3)



残留分析詳細(すいか試料) : 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	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	—	1.68	1.82	30.3	15.5	74	26	6.9
	D	3	1.49		8.91		74	26	4.4
	D	7	1.90		9.52		77	23	4.7
	D	14	2.22		13.3		78	22	4.3
							平均 76:24		平均 5.1
高知	0	—	1.34	2.23	24.2	15.5	77	23	5.9
	D	3	2.48		12.4		81	19	2.3
	D	7	2.46		12.3		82	18	3.9
	D	14	2.64		13.2		83	17	4.2
							平均 81:19		平均 4.1
宮崎	0	—	1.67	1.44	25.0	12.9	72	28	5.2
	D	3	1.45		8.70		71	29	4.4
	D	7	1.42		8.49		75	25	4.4
	D	14	1.20		9.60		77	23	3.9
							平均 74:26		平均 4.5
3 ほ場の総平均重量									
1.83 kg/個									

D : TPNは5回処理

キノキサリン系は5回処理

フルバリネートは2回処理

ポリオキシシン複合体は5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