

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、1 mol/L塩酸 5 mL及びアセトン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50 mL(試料5 g相当量)を取り、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、アセトンを留去した。

6.3. 酸加水分解

濃縮液に水を加え約10 gとした後、3 mol/L塩酸 5 mLを加えて密栓をし、80℃の乾熱恒温器に入れ、18時間放置し、1-ナフタレン酢酸抱合体を1-ナフタレン酢酸に加水分解した。

6.4. PLS-2ミニカラムによる精製

PLS-2ミニカラムにメタノール及び1 mol/L 塩酸を順次5 mLずつ流下し前処理した。反応液を前処理したPLS-2ミニカラムに流下した。さらにメタノール/水(50:50,v/v)混液5 mLを容器内に入れ、超音波をかけた後、PLS-2ミニカラムに流下し、これらの流出液を捨てた。次に、メタノール/酢酸(100:1,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、メタノールを留去した。

6.5. 多孔性ケイソウ土カラムによる精製

濃縮液に水を加え約5 gに調整した後、多孔性ケイソウ土カラムに流下した。5分間放置後、酢酸エチル/ヘキサン(50:50,v/v)混液50 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、溶出液を分取した。溶出液を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。

6.6. 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/アセトン/酢酸(95:5:1,v/v/v)混液5 mLを流下し前処理した。残留物を同混液5 mLに溶解してシリカゲルミニカラムに移して流下し、同様の操作を3回繰り返した。次に、ヘキサン/アセトン/酢酸(85:15:1,v/v/v)混液5 mLを流下し、全ての溶出液を合わせ取り、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。

6.7. 定量

残留物を適量のメタノール/水/酢酸 (500:500:2,v/v/v) 混液に溶解し、HPLC用ディスクフィルターに通した。この溶液を前記条件の高速液体クロマトグラフに注入してピーク高さを求め、検量線より1-ナフタレン酢酸の重量を求め、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)
0.4	5	2.5	20	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)
0.2	5	2.5	20	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、宮崎試料及び茨城試料の無処理試料*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。

*本事業の無処理試料

8.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
茨城	5	84, 79,	83, 75,	82,	81	4.5
茨城	0.25	89, 83,	86, 77,	84,	84	5.3
茨城	0.01	110, 90,	100, 90	100,	98	8.5

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
宮崎	5	86, 82,	85, 76	82,	82	4.8
宮崎	0.25	87, 74,	77, 72	76,	77	7.5
宮崎	0.01	100, 80,	90, 80	90,	88	9.5

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

又、2013年10月実施の食品衛生精度管理比較調査（一般財団法人食品薬品安全センター）におけるZスコアは全てZ<2であった。

9.1. 果肉

分析日*	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値 (mg/kg)
2014/11/5	宮崎	75	<0.01
2014/11/6	茨城	71	<0.01
2014/11/10	高知	70	<0.01
2014/11/17	宮崎	77	<0.01
2014/11/27	茨城	76	<0.01
2014/12/10	高知	74	<0.01

回収試料の添加濃度：0.1 mg/kg

*抽出日を記載

9.2.果実

分析日*	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値 (mg/kg)
2014/11/11	宮崎	72	<0.01
2014/11/12	茨城	70	<0.01
2014/11/13	高知	72	<0.01
2014/11/17	宮崎	77	<0.01
2014/11/27	茨城	82	<0.01
2014/12/10	高知	77	<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1-ナフタレン酢酸を添加し、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	1.0	127(2014/7/23-11/27)	79, 77	78
高知	1.0	128 (2014/8/4-12/10)	75, 72	74
宮崎	1.0	135(2014/7/5-11/17)	75, 74	74

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	1.0	127(2014/7/23-11/27)	80, 76	78
高知	1.0	128 (2014/8/4-12/10)	75, 74	74
宮崎	1.0	135(2014/7/5-11/17)	80, 79	80

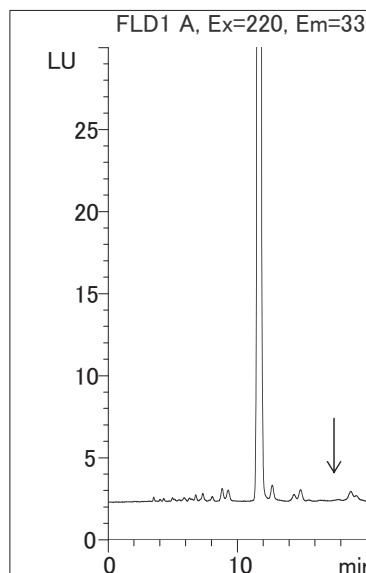
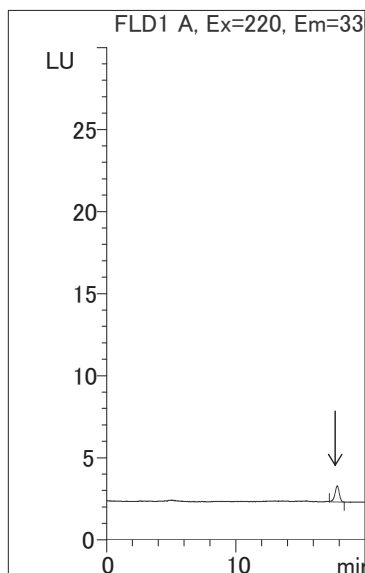
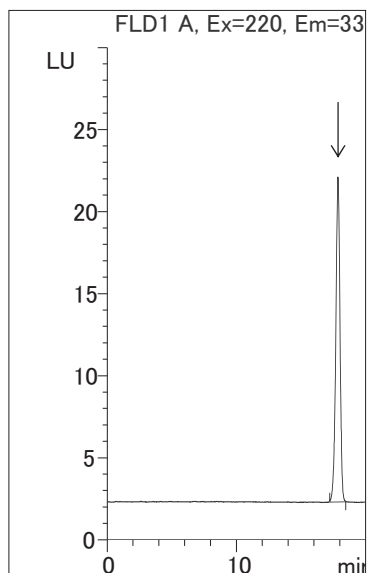
付図-1. 1-ナフタレン酢酸のクロマトグラム (代表例)

付図-1-1. 果肉

標準品 8.0 ng

標準品 0.4 ng

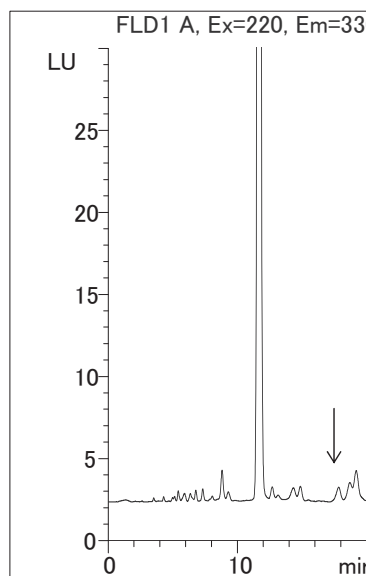
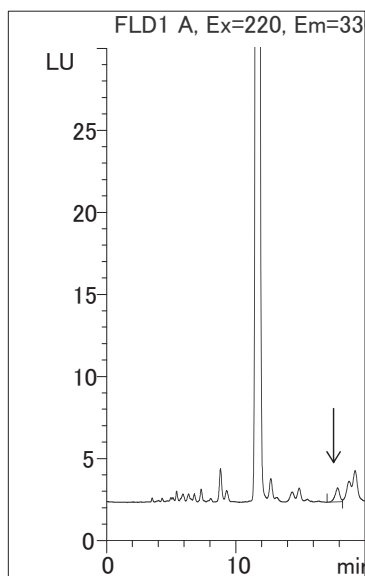
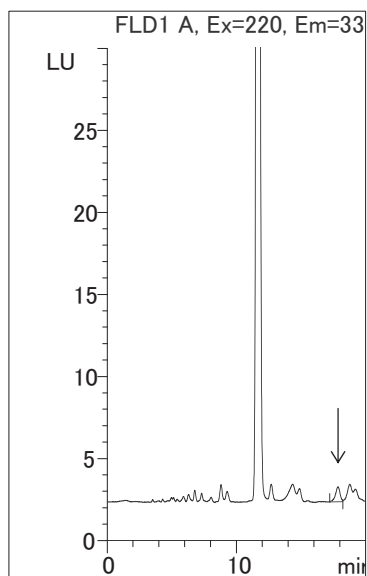
宮崎 無処理
20 μ L/2.5 mL/5 g



宮崎 2回処理 3日後
20 μ L/2.5 mL/5 g

宮崎 2回処理 7日後
20 μ L/2.5 mL/5 g

宮崎 2回処理 14日後
20 μ L/2.5 mL/5 g

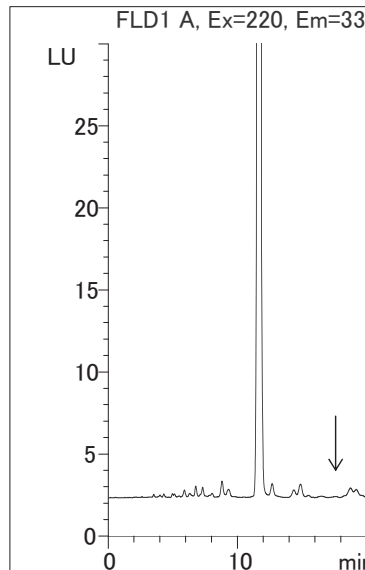
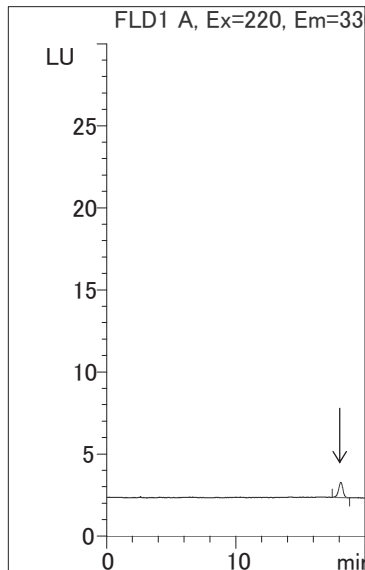
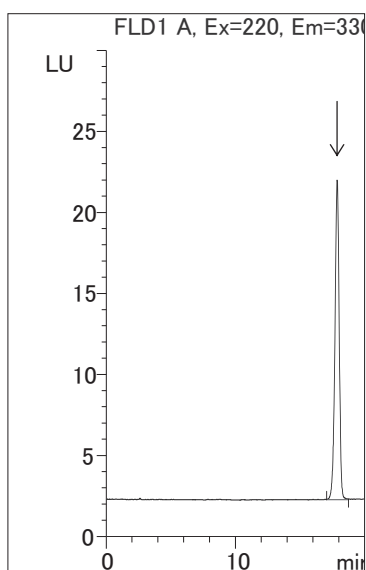


付図-1-2. 果実

標準品 8.0 ng

標準品 0.4 ng

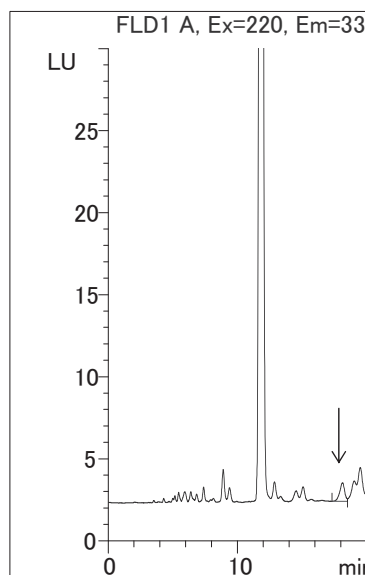
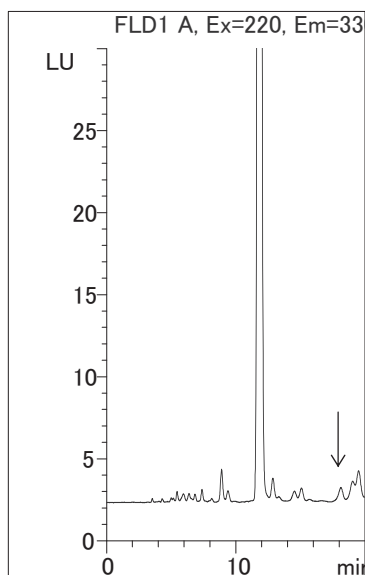
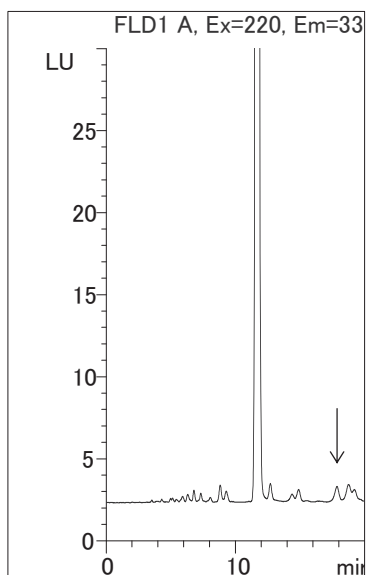
宮崎 無処理
20 μ L/2.5 mL/5 g



宮崎 2回処理 3日後
20 μ L/2.5 mL/5 g

宮崎 2回処理 7日後
20 μ L/2.5 mL/5 g

宮崎 2回処理 14日後
20 μ L/2.5 mL/5 g



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

1. 分析対象物質

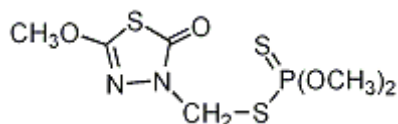
DMTP

化学名： S-2,3-dihydro-5-methoxy-2-oxo-1,3,4-thiadiazol-3-ylmethyl *O,O*-dimethyl phosphorodithioate

分子式： $C_6H_{11}N_2O_4PS_3$

分子量： 302.3

構造式：



性状： 無色結晶

融点： 39～40℃

蒸気圧： 2.5×10^{-1} mPa (20℃)

分配係数： $\log P_{ow} = 2.2$

溶解性： 水 200 mg/L (25℃)

エタノール 150, アセトン 670, トルエン 720,
 ヘキサン 11, *n*-オクタノール 14 (以上 g/L, 20℃)

安定性： 中性及び弱酸性では加水分解に対し比較的安定

強酸性及びアルカリ性で速やかに加水分解

加水分解による半減期30分 (pH=13, 25℃)

出典： The Pesticide Manual 15th Edition.

2. 標準品及び試薬

- DMTP 標準品：純度 98.5% (Dr.Ehrenstorfer 製)
 アセトン, 酢酸エチル, ヘキサン：残留農薬試験用 (関東化学製)
 メタノール：LC-MS 用 (関東化学製)
 水：ピュアライト PAR-0015-0V1(オカノ製)及びピュアリック Z II(オカノ製)
 で精製した水
 多孔性ケイソウ土カラム：InertSep K-solute 5 mL (ジーエルサイエンス製)
 GC/PSA/SI 3層ミニカラム：InertSep GC/PSA/SI 500 mg/500 mg/500 mg/20 mL
 (ジーエルサイエンス製)
 塩化ナトリウム：特級 (関東化学製)

3. 装置及び機器

- ミキサー：クイジナート DLC-NXJ2PS (クイジナート・アメリカ製)
 液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC-MS/MS)：
 Agilent 6410 Triple Quad LC/MS (アジレント製)
 データ処理装置：MassHunter (アジレント製)

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：Atlantis T3 (Waters 製)
 内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3 μ m
 溶離液：メタノール/4 mmol/L 酢酸アンモニウム含有 0.1%ギ酸
 (70:30,v/v)
 流量：0.2 mL/min
 カラム温度：40°C
 注入量：2 μ L
 保持時間：約 5.1 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
 乾燥ガス温度：300°C
 乾燥ガス流量：10 L/min
 ネブライザー圧力：30 psi
 イオン導入電圧：3000 V
 フラグメンター電圧：50 V

コリジョン電圧： 10 V (コリジョンガス; N₂)
イオン検出法： MRM 法
モニタリングイオン： プリカーサーイオン; m/z 302.9
プロダクトイオン; m/z 144.9

5. 検量線の作成

DMTP標準品20.3 mgを20 mL容メスフラスコに精秤し、アセトンに溶解して1000 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20 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, 0.01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DMTP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定容とし、その2 mL (試料0.2 g相当量) を取り、40℃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による精製

濃縮液に5%塩化ナトリウム溶液を加え約5 gに調整した後、多孔性ケイソウ土カラムに流下した。5分間放置後、酢酸エチル/ヘキサン (50:50,v/v) 混液30 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、溶出液を分取した。溶出液を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. GC/PSA/SIミニカラムによる精製

GC/PSA/SIミニカラムにヘキサン/アセトン (95:5,v/v) 混液5 mLを流下し前処理した。残留物を同混液10 mLに溶解してGC/PSA/SIミニカラムに移して流下した。次にヘキサン/アセトン (70:30,v/v) 混液10 mLを流下し、全ての溶出液を合わせ取り、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。

6.5. 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DMTP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	0.2	2	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	0.2	2	2	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、宮崎試料及び茨城試料の無処理試料*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。

*本事業の無処理試料

8.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
茨城	5	90, 85,	90, 83,	88,	87	3.6
茨城	0.25	92, 89,	89, 86,	89,	89	2.4
茨城	0.01	110, 100,	100, 100,	100,	102	4.4

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
宮崎	5	90, 88,	90, 84,	89,	88	2.8
宮崎	0.25	93, 87,	92, 87,	87,	89	3.4
宮崎	0.01	100, 100,	100, 100,	100,	100	0.0

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

又、2013年10月実施の食品衛生精度管理比較調査（一般財団法人食品薬品安全センター）におけるZスコアは全てZ<2であった。

9.1. 果肉

分析日*	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値 (mg/kg)
2014/10/16	宮崎	87	<0.01
2014/10/17	茨城	91	<0.01
2014/10/20	高知	92	<0.01
2014/11/10	宮崎	98	<0.01
2014/11/12	茨城	96	<0.01
2014/11/13	高知	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)
2014/10/22	宮崎	94	<0.01
2014/10/23	茨城	91	<0.01
2014/10/24	高知	93	<0.01
2014/11/10	宮崎	98	<0.01
2014/11/12	茨城	93	<0.01
2014/11/13	高知	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DMTP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

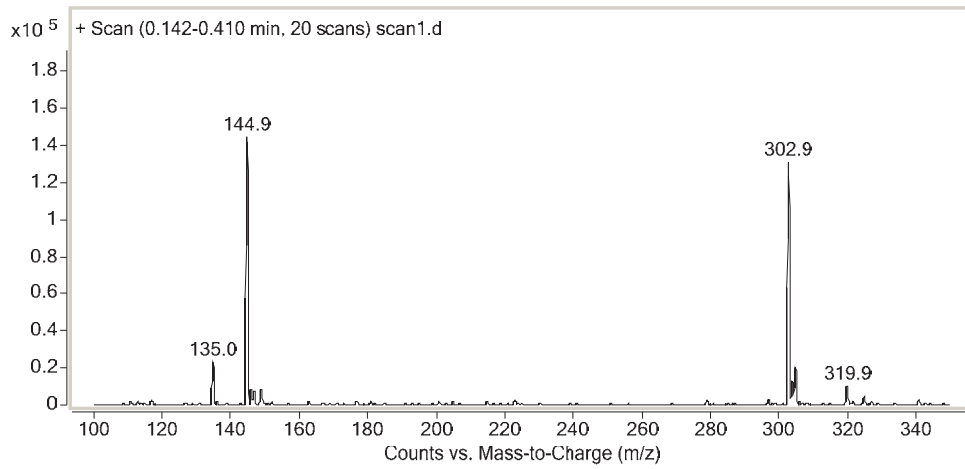
圃場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	1.0	112 (2014/7/23-11/12)	87,	83	85
高知	1.0	101 (2014/8/4-11/13)	91,	85	88
宮崎	1.0	128 (2014/7/5-11/10)	86,	82	84

10.2. 果実

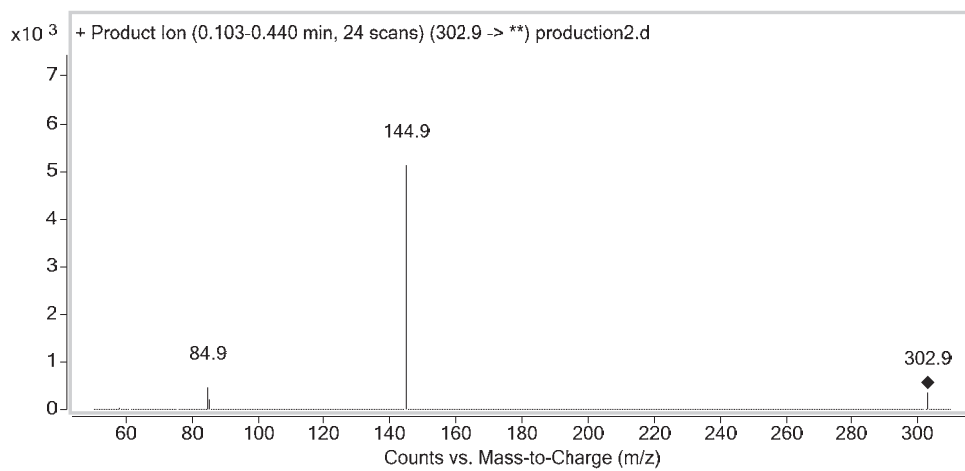
圃場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	1.0	112 (2014/7/23-11/12)	87,	83	85
高知	1.0	101 (2014/8/4-11/13)	89,	87	88
宮崎	1.0	128 (2014/7/5-11/10)	88,	86	87

付図-1. マススペクトル

DMTPのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)



DMTP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 $m/z=302.9$, 正モード)

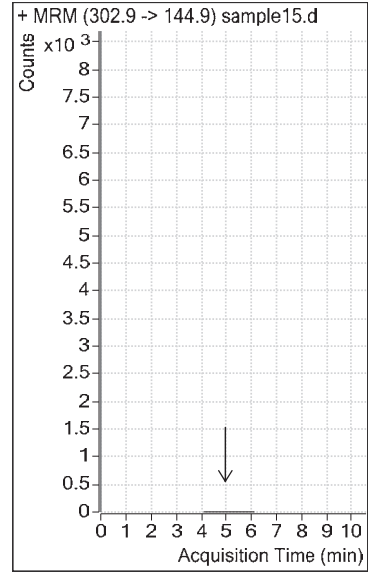
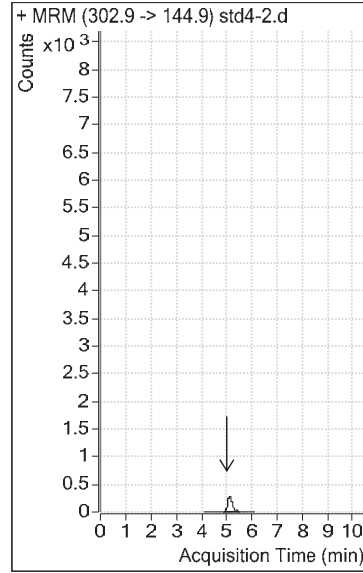
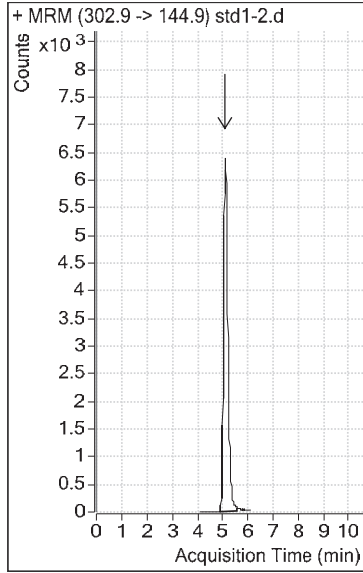
付図-2. DMTPのクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. 果肉

標準品 0.04 ng

標準品 0.002 ng

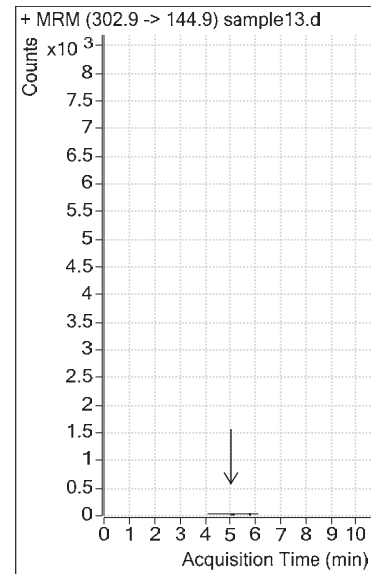
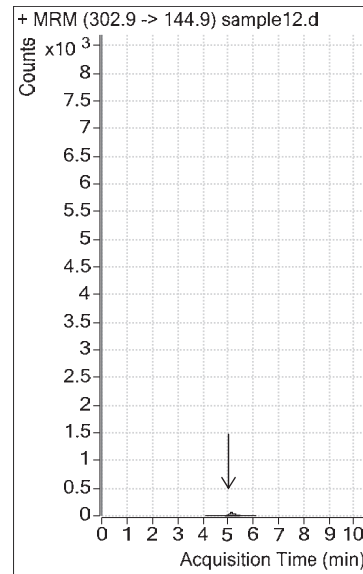
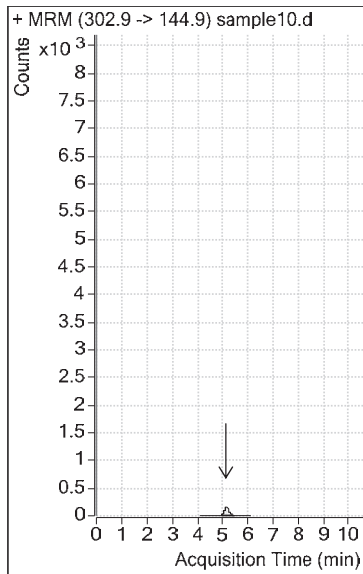
宮崎 無処理
2 μ L/2 mL/0.2 g



宮崎 2 回処 3 日後
2 μ L/2 mL/0.2 g

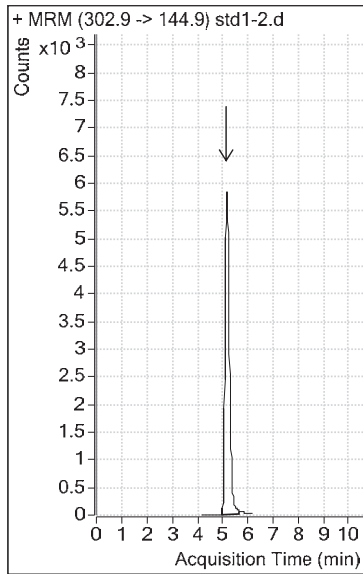
宮崎 2 回処理 7 日後
2 μ L/2 mL/0.2 g

宮崎 2 回処理 14 日後
2 μ L/2 mL/0.2 g

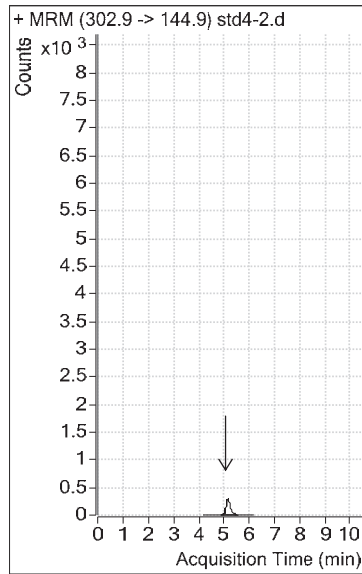
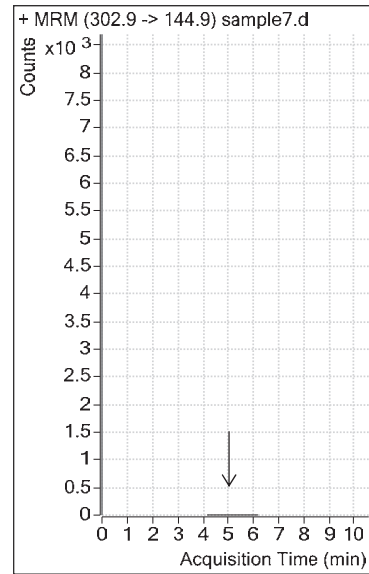
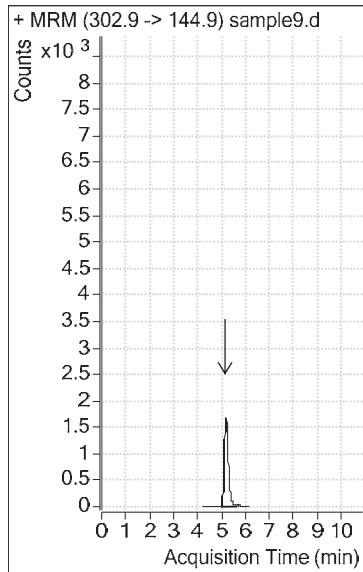
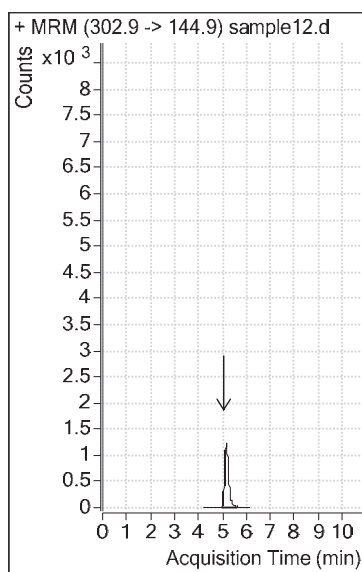
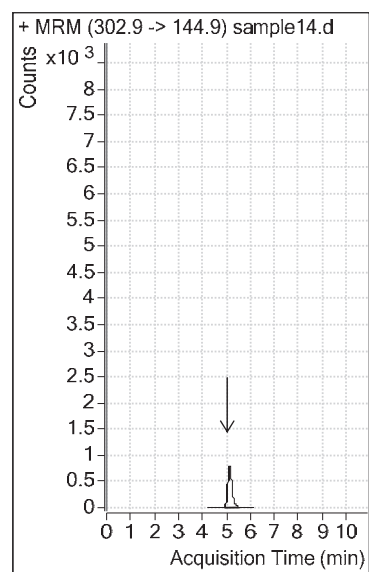


付図-2-2. 果実

標準品 0.2 ng



標準品 0.01 ng

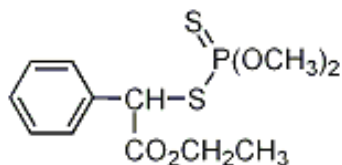
宮崎 無処理
2 μ L/2 mL/0.2 g宮崎 2回処理3日後
2 μ L/10 mL/0.2 g宮崎 2回処理7日後
2 μ L/10 mL/0.2 g宮崎 2回処理14日後
2 μ L/10 mL/0.2 g

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

1. 分析対象物質

PAP

化学名： *S*- α -ethoxycarbonylbenzly *O,O*-dimethyl phosphorodithioate
 分子式： $C_{12}H_{17}O_4PS_2$
 分子量： 320.4
 構造式：



性状： 無色結晶
 融点： 17～18℃
 蒸気圧： 5.3 mPa (40℃)
 分配係数： $\log P_{ow} = 3.69$
 溶解性： 水 10 mg/L (25℃)
 メタノール，エタノール，アセトン，ヘキサン，キシレン，ベンゼン，
 クロロホルム，ジクロロメタン，二硫化炭素，テトラヒドロフラン
 に易溶
n-ヘキサン 116，ケロシン 340 (以上 g/L, 25℃)
 安定性： 180℃で分解。
 中性水溶液及び酸性水溶液中では安定。
 アルカリ性水溶液中で分解。

出典：The Pesticide Manual 15th Edition.

2. 標準品及び試薬

- PAP 標準品：純度 99.5% (シグマアルドリッチ製)
 アセトン, 酢酸エチル, ヘキサン：残留農薬試験用 (関東化学製)
 メタノール：LC-MS 用 (関東化学製)
 水：ピュアライトPAR-0015-0V1(オカノ製)及びピュアリックZII(オカノ製)
 で精製した水
 多孔性ケイソウ土カラム：InertSep K-solute 5 mL (ジーエルサイエンス製)
 GC/PSA/SI 3 層ミニカラム：InertSep GC/PSA/SI 500 mg/500 mg/500 mg/20 mL
 (ジーエルサイエンス製)
 塩化ナトリウム：特級 (関東化学製)

3. 装置及び機器

- ミキサー：クイジナートDLC-NXJ2PS (クイジナート・アメリカ製)
 液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC-MS/MS)：
 Agilent 6410 Triple Quad LC/MS (アジレント製)
 データ処理装置：MassHunter (アジレント製)

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：Atlantis T3 (Waters 製)
 内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3 μm
 溶離液：メタノール/4 mmol/L 酢酸アンモニウム含有 0.1%ギ酸
 (70:30,v/v)
 流量：0.2 mL/min
 カラム温度：40°C
 注入量：2 μL
 保持時間：約 5.1 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
 乾燥ガス温度：300°C
 乾燥ガス流量：10 L/min
 ネブライザー圧力：30 psi
 イオン導入電圧：3000 V
 フラグメンター電圧：100 V

コリジョン電圧：	10 V (コリジョンガス; N ₂)
イオン検出法：	MRM 法
モニタリングイオン：	プリカーサーイオン； m/z 320.9 プロダクトイオン； m/z 247.0

5. 検量線の作成

PAP標準品20.1 mgを20 mL容メスフラスコに精秤し、アセトンに溶解して1000 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20 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, 0.01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PAP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定容とし、その2 mL (試料0.2 g相当量) を取り、40℃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による精製

濃縮液に5%塩化ナトリウム溶液を加え約5 gに調整した後、多孔性ケイソウ土カラムに流下した。5分間放置後、酢酸エチル/ヘキサン (50:50,v/v) 混液30 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、溶出液を分取した。溶出液を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. GC/PSA/SIミニカラムによる精製

GC/PSA/SIミニカラムにヘキサン/アセトン (95:5,v/v) 混液5 mLを流下し前処理した。残留物を同混液10 mLに溶解してGC/PSA/SIミニカラムに移して流下した。次にヘキサン/アセトン (70:30,v/v) 混液10 mLを流下し、全ての溶出液を合わせ取り、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。

6.5. 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PAP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	0.2	2	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	0.2	2	2	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、宮崎試料及び茨城試料の無処理試料*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**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。

*本事業の無処理試料

8.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
茨城	5	91, 89,	90, 89,	89,	90	1.0
茨城	0.25	94, 88,	90, 87,	88,	89	3.1
茨城	0.01	110, 100,	100, 100,	100,	102	4.4

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
宮崎	5	91, 88,	90, 88,	90,	89	1.5
宮崎	0.25	93, 89,	92, 88,	89,	90	2.4
宮崎	0.01	100, 100,	100, 100,	100,	100	0.0

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

又、2013年10月実施の食品衛生精度管理比較調査（一般財団法人食品薬品安全センター）におけるZスコアは全てZ<2であった。

9.1. 果肉

分析日*	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区 の 分析値 (mg/kg)
2014/10/16	宮崎	83	<0.01
2014/10/17	茨城	92	<0.01
2014/10/20	高知	92	<0.01
2014/11/10	宮崎	96	<0.01
2014/11/12	茨城	97	<0.01
2014/11/13	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*	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区 の 分析値 (mg/kg)
2014/10/22	宮崎	93	<0.01
2014/10/23	茨城	95	<0.01
2014/10/24	高知	91	<0.01
2014/11/10	宮崎	92	<0.01
2014/11/12	茨城	98	<0.01
2014/11/13	高知	95	<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**PAP**を添加し、冷凍暗所（ -20°C 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

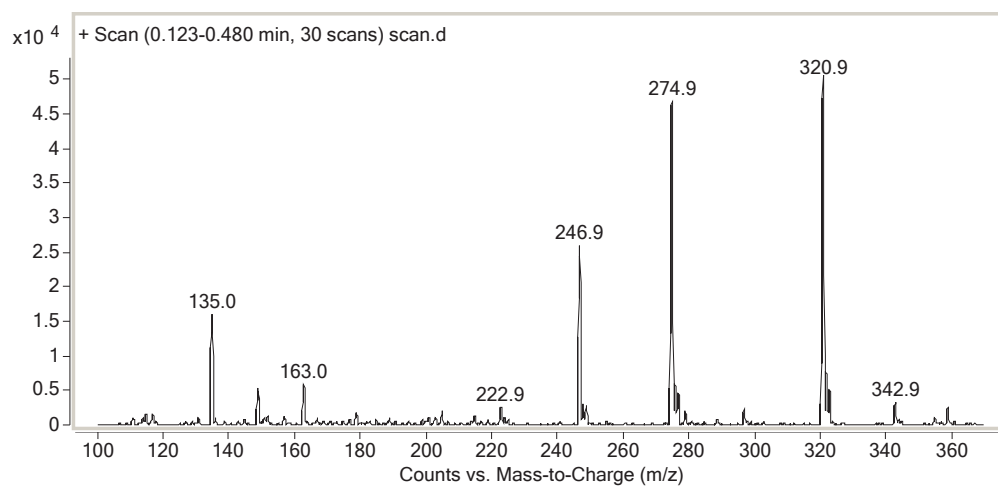
圃場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	1.0	112 (2014/7/23-11/12)	83,	79	81
高知	1.0	101 (2014/8/4-11/13)	82,	75	78
宮崎	1.0	128 (2014/7/5-11/10)	77,	75	76

10.2. 果実

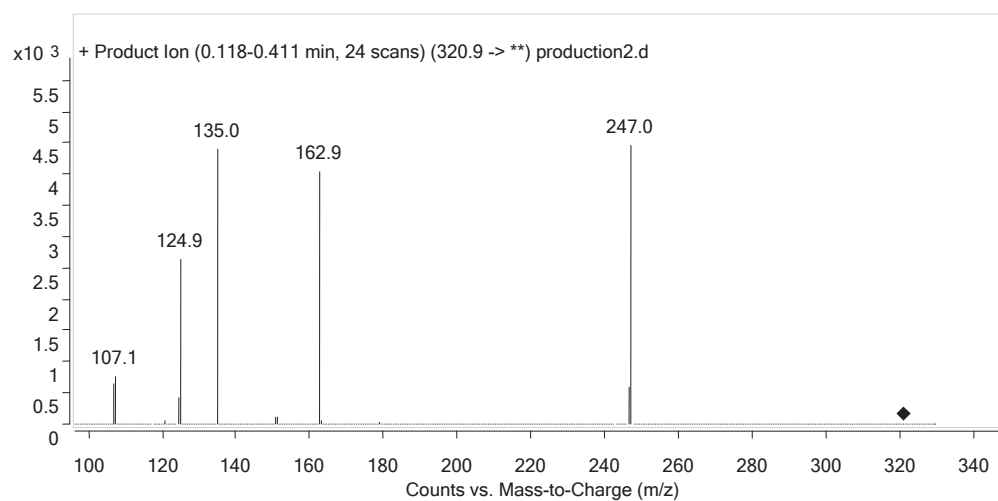
圃場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	1.0	112 (2014/7/23-11/12)	80,	79	80
高知	1.0	101 (2014/8/4-11/13)	86,	82	84
宮崎	1.0	128 (2014/7/5-11/10)	84,	81	82

付図-1. マススペクトル

PAPのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)



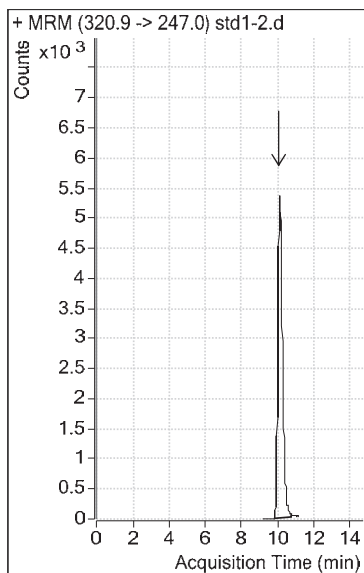
PAPのプロダクトスキャンスペクトルの一例

(プリカーサーイオン $m/z=320.9$, 正モード)

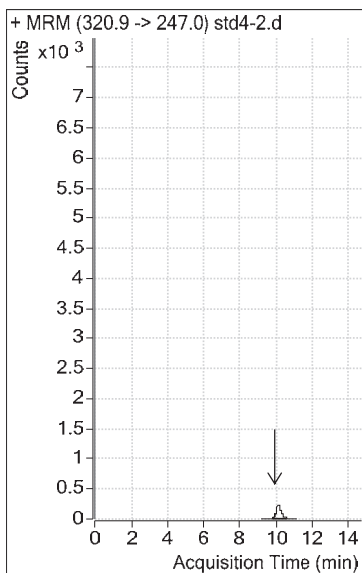
付図-2. PAPのクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. 果肉

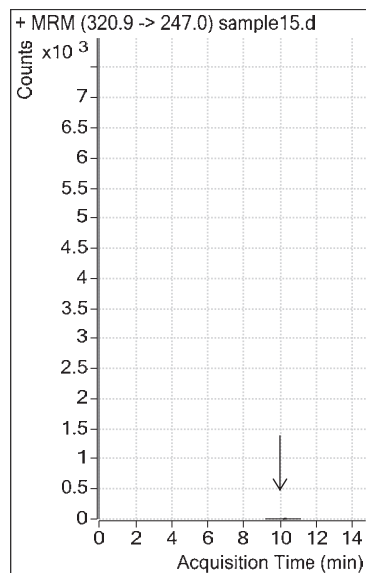
標準品 0.04 ng



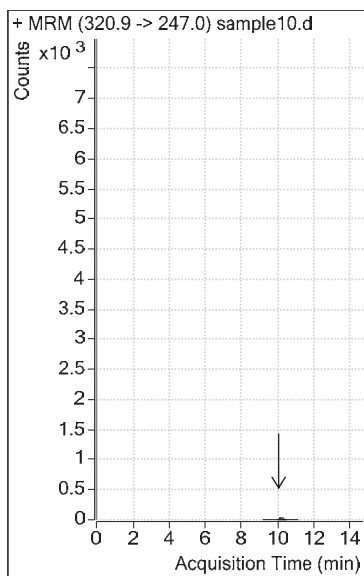
標準品 0.002 ng



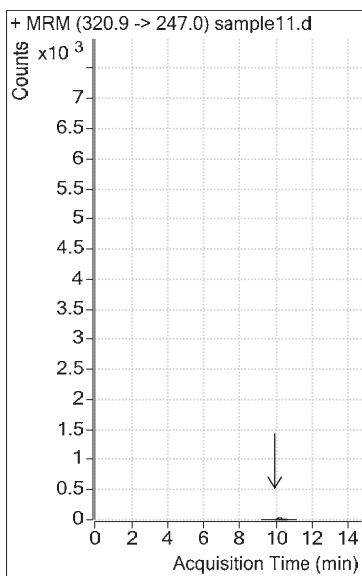
宮崎 無処理
2 μL/2 mL/0.2 g



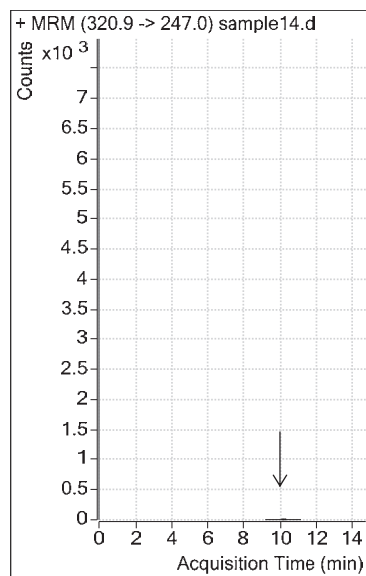
宮崎 4回処理 3日後
2 μL/2 mL/0.2 g



宮崎 4回処理 7日後
2 μL/2 mL/0.2 g



宮崎 4回処理 14日後
2 μL/2 mL/0.2 g

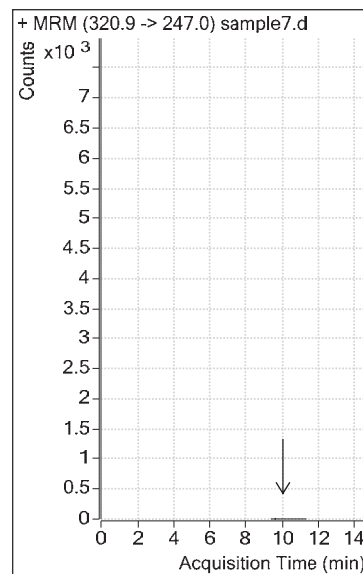
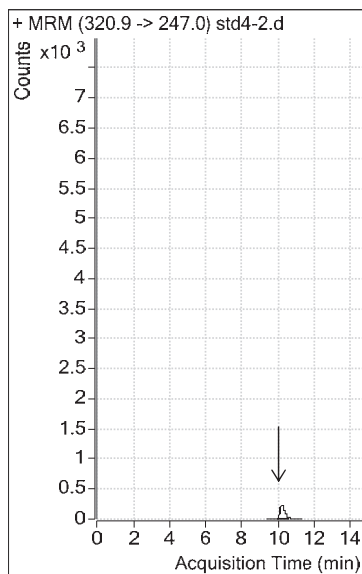
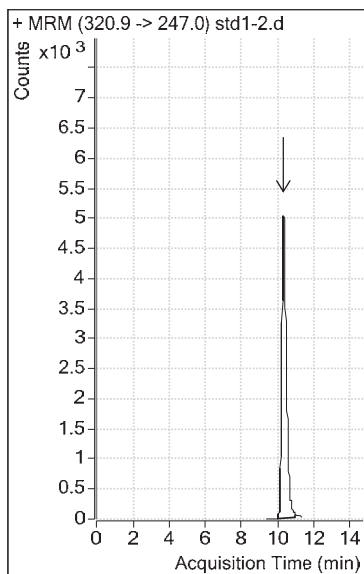


付図-2-2. 果実

標準品 0.04 ng

標準品 0.002 ng

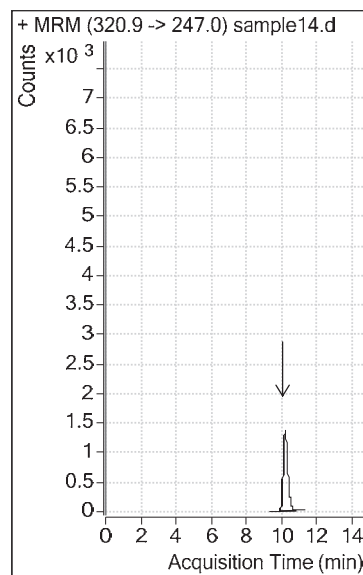
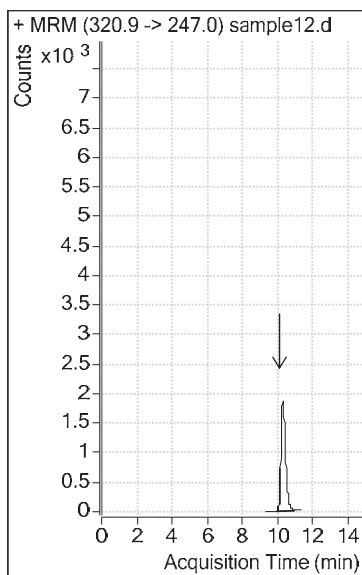
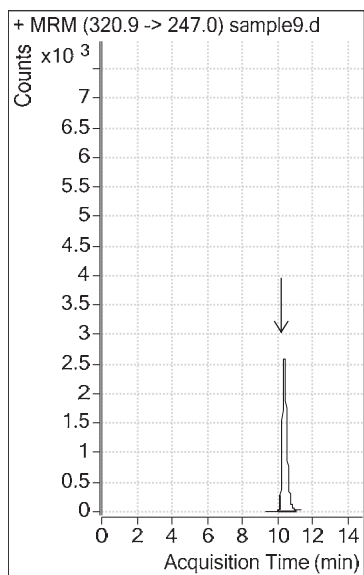
宮崎 無処理
2 μ L/2 mL/0.2 g



宮崎 4 回処理 3 日後
2 μ L/10 mL/0.2 g

宮崎 4 回処理 7 日後
2 μ L/10 mL/0.2 g

宮崎 4 回処理 14 日後
2 μ L/10 mL/0.2 g

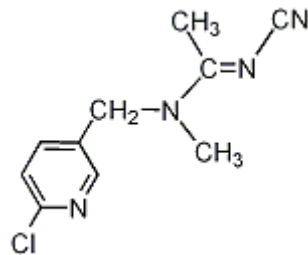


平成26年度農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業
残留分析詳細④ アセタミプリド

1. 分析対象物質

アセタミプリド

化学名： (E)-N¹-(6-chloro-3-pyridyl)methyl]-N²-cyano-N¹-methylacetamide
分子式： C₁₀H₁₁ClN₄
分子量： 222.7
構造式：



性状： 白色結晶

融点： 98.9℃

蒸気圧： 1×10^{-3} mPa (25℃)

分配係数： $\log P_{ow} = 0.80$ (25℃)

溶解性： 水 4250 mg/L (25℃)

アセトン，メタノール，エタノール，ジクロロメタン，クロロホルム
アセトニトリル，テトラヒドロフランに可溶

安定性： pH4, 5, 7の緩衝液中で安定
pH9及び45℃で徐々に分解
太陽光に安定

出典： The Pesticide Manual 15th Edition.

2. 標準品及び試薬

- アセタミプリド標準品：純度 100.0% (関東化学製)
アセトン, 酢酸エチル, ヘキサン：残留農薬試験用 (関東化学製)
メタノール：LC-MS 用 (関東化学製)
水：ピュアライトPAR-0015-0V1(わか)ノ製)及びピュアリックZII(わか)ノ製)
で精製した水
多孔性ケイソウ土カラム：InertSep K-solute 5 mL (ジーエルサイエンス製)
GC/PSA/SI 3 層ミニカラム：InertSep GC/PSA/SI 500 mg/500 mg/500 mg/20 mL
(ジーエルサイエンス製)
塩化ナトリウム：特級 (関東化学製)

3. 装置及び機器

- ミキサー：クイジナートDLC-NXJ2PS (クイジナート・アメリカ製)
液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC-MS/MS)：
Agilent 6410 Triple Quad LC/MS (アジレント製)
データ処理装置：MassHunter(アジレント製)

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：Atlantis T3 (Waters 製)
内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3 μm
溶離液：メタノール/4 mmol/L 酢酸アンモニウム含有 0.1%ギ酸
(70:30,v/v)
流量：0.2 mL/min
カラム温度：40°C
注入量：2 μL
保持時間：約 5.1 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
乾燥ガス温度：300°C
乾燥ガス流量：10 L/min
ネブライザー圧力：30 psi
イオン導入電圧：3000 V
フラグメンター電圧：100 V

コリジョン電圧：	20V (コリジョンガス; N ₂)
イオン検出法：	MRM 法
モニタリングイオン：	プリカーサーイオン; m/z 222.7 プロダクトイオン; m/z 126.0

5. 検量線の作成

アセタミプリド標準品20.0 mgを20 mL容メスフラスコに精秤し、アセトンに溶解して1000 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20 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, 0.01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アセタミプリド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定容とし、その2 mL (試料0.2 g相当量) を取り、40℃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による精製

濃縮液に5%塩化ナトリウム溶液を加え約5 gに調整した後、多孔性ケイソウ土カラムに流下した。5分間放置後、酢酸エチル/ヘキサン (50:50,v/v) 混液30 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、溶出液を分取した。溶出液を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. GC/PSA/SIミニカラムによる精製

GC/PSA/SIミニカラムにヘキサン/アセトン (95:5,v/v) 混液5 mLを流下し前処理した。残留物を同混液10 mLに溶解してGC/PSA/SIミニカラムに移して流下した。次にヘキサン/アセトン (70:30,v/v) 混液10 mLを流下し、全ての流出液を捨てた。次に、ヘキサン/アセトン (50:50,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。

6.5. 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、検量線よりアセタミプリドの重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

7. 定量限界値(LOQ)及び検出限界値(LOD)

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μ L)	定量限界 (mg/kg)
0.002	0.2	2	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	0.2	2	2	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、宮崎試料及び茨城試料の無処理試料*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。

*本事業の無処理試料

8.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
茨城	5	94, 91,	92, 91,	91,	92	1.4
茨城	0.25	93, 87,	90, 78,	88,	87	6.5
茨城	0.01	110, 100,	100, 100,	100,	102	4.4

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
宮崎	5	96, 91,	93, 91,	91,	92	2.4
宮崎	0.25	95, 92,	93, 90,	92,	92	2.0
宮崎	0.01	100, 100,	100, 100,	100,	100	0.0

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

又、2013年10月実施の食品衛生精度管理比較調査（一般財団法人食品薬品安全センター）におけるZスコアは全てZ<2であった。

9.1. 果肉

分析日*	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区 の 分析値 (mg/kg)
2014/10/16	宮崎	90	<0.01
2014/10/17	茨城	94	<0.01
2014/10/20	高知	91	<0.01
2014/11/10	宮崎	84	<0.01
2014/11/12	茨城	93	<0.01
2014/11/13	高知	94	<0.01

回収試料の添加濃度：0.1 mg/kg

*抽出日を記載

9.2. 果実

分析日*	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区 の 分析値 (mg/kg)
2014/10/22	宮崎	95	<0.01
2014/10/23	茨城	90	<0.01
2014/10/24	高知	94	<0.01
2014/11/10	宮崎	89	<0.01
2014/11/12	茨城	93	<0.01
2014/11/13	高知	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アセタミプリドを添加し、冷凍暗所（-20℃以下）に凍結保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を確認した。保存安定性の結果を示す。

10.1. 果肉

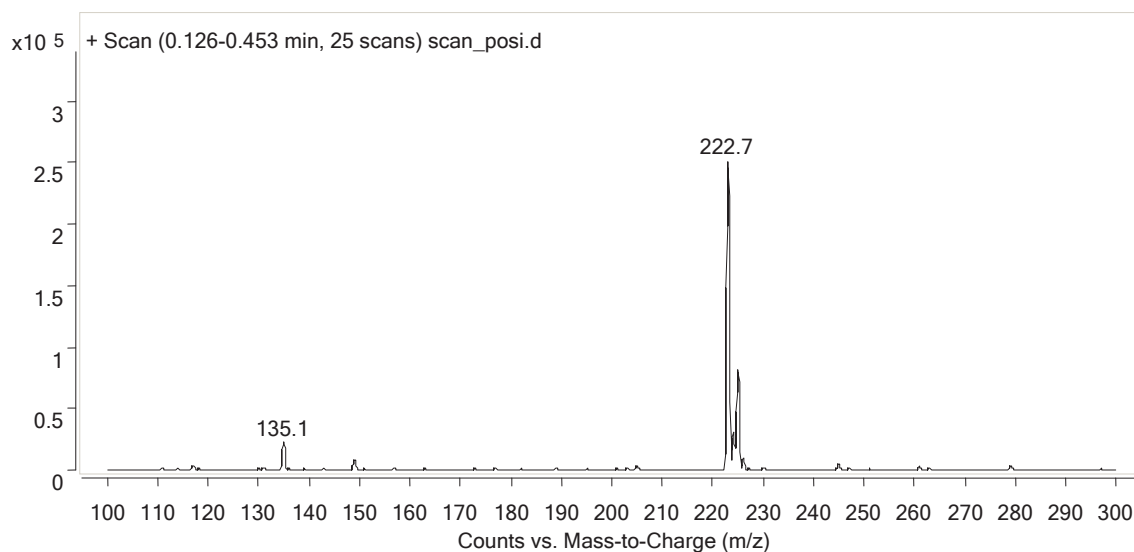
圃場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	1.0	112 (2014/7/23-11/12)	86,	85	86
高知	1.0	101 (2014/8/4-11/13)	89,	85	87
宮崎	1.0	128 (2014/7/5-11/10)	86,	82	84

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	1.0	112 (2014/7/23-11/12)	88,	84	86
高知	1.0	101 (2014/8/4-11/13)	87,	84	86
宮崎	1.0	128 (2014/7/5-11/10)	83,	80	82

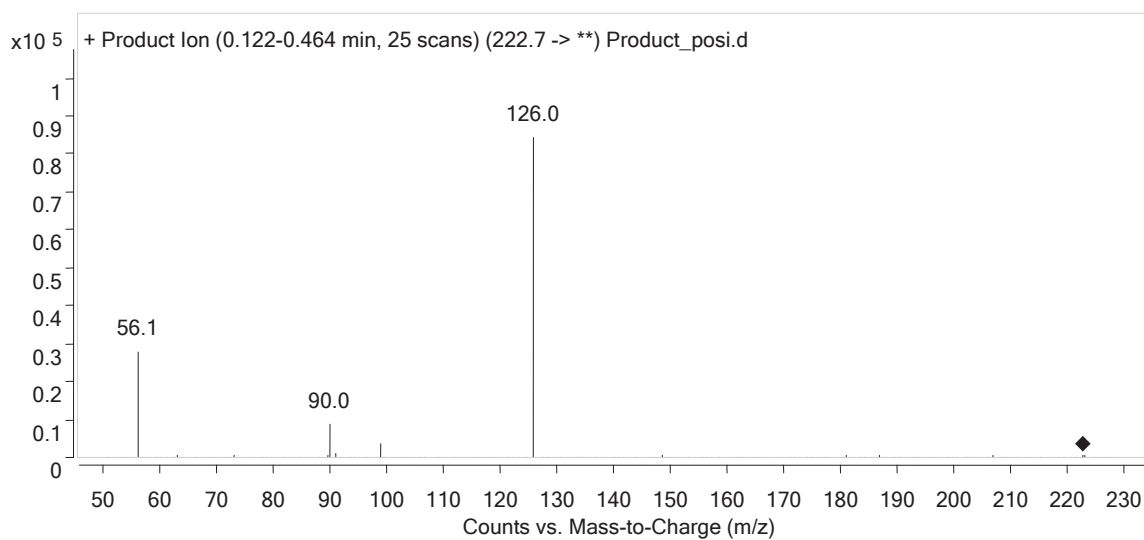
付図-1. マススペクトル

アセタミプリドのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)



アセタミプリドのプロダクトスキャンスペクトルの一例

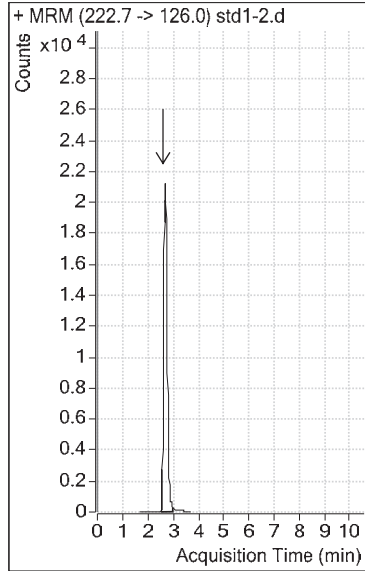
(プリカーサーイオン $m/z=222.7$, 正モード)



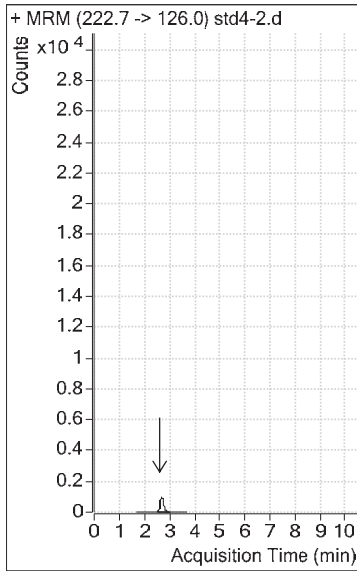
付図-2. アセタミプリドのクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. 果肉

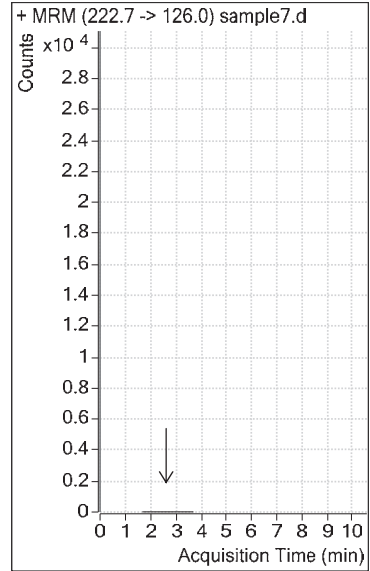
標準品 0.04 ng



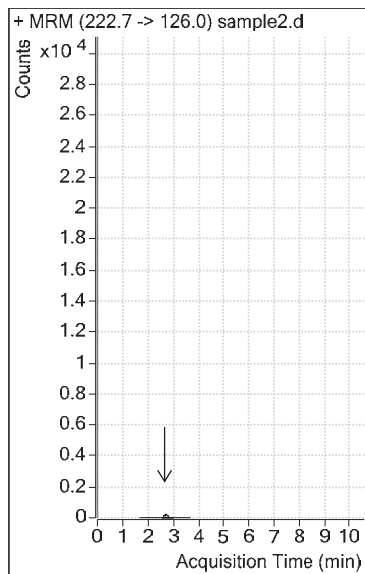
標準品 0.002 ng



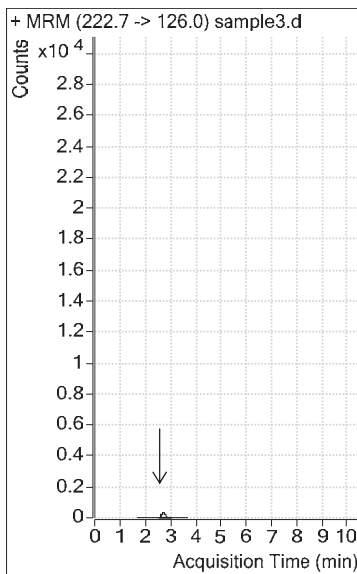
宮崎 無処理
2 μL/2 mL/0.2 g



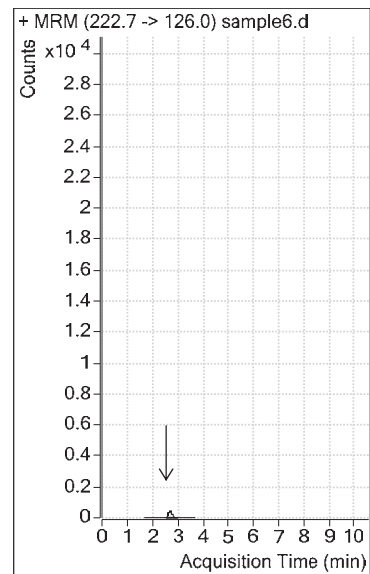
宮崎 3回処理 3日後
2 μL/2 mL/0.2 g



宮崎 3回処理 7日後
2 μL/2 mL/0.2 g



宮崎 3回処理 14日後
2 μL/2 mL/0.2 g



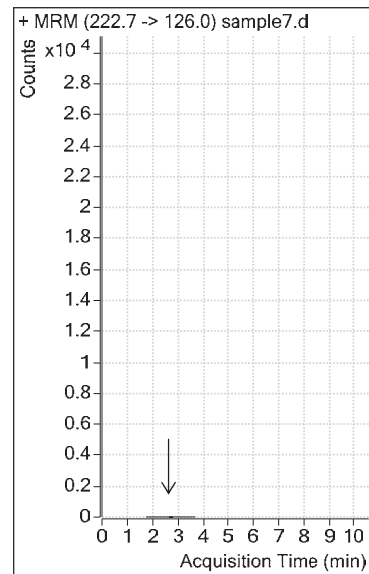
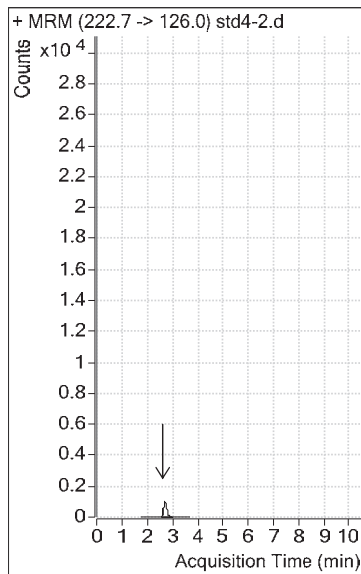
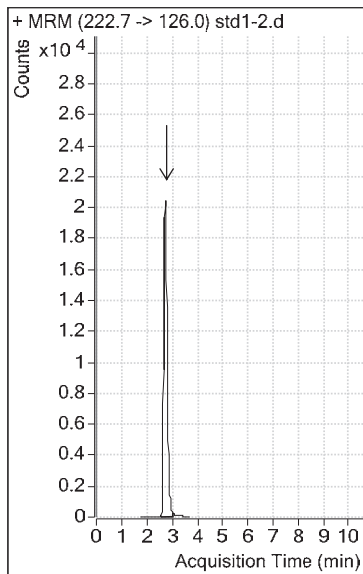
付図-2-2. 果実

標準品 0.04 ng

標準品 0.002 ng

宮崎 無処理

2 μ L/2 mL/0.2 g



宮崎 3回処理3日後

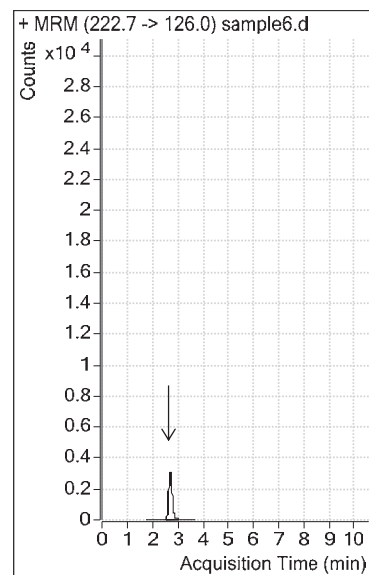
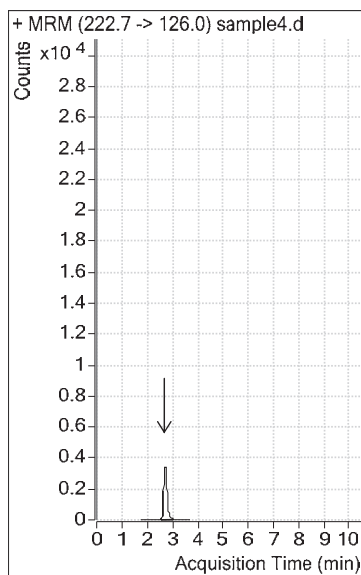
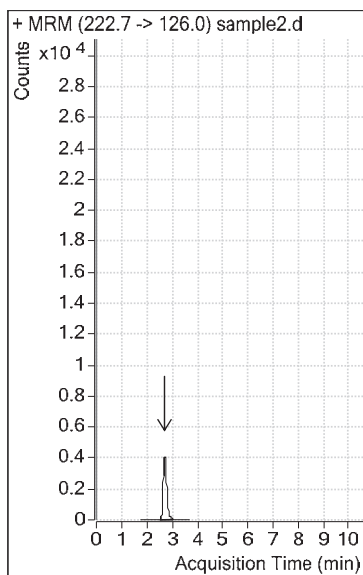
2 μ L/2 mL/0.2 g

宮崎 3回処理7日後

2 μ L/2 mL/0.2 g

宮崎 3回処理14日後

2 μ L/2 mL/0.2 g



平成26年度農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業
 残留分析詳細⑤ 試料重量, 作物写真

1. 試料重量等

試料	処理回数	経過日数	平均重量	総平均重量	総重量	総重量の平均	重量比(%)		果皮の厚さ
			(kg/個)	(kg/個)	(kg)	(kg)	果肉	果皮	(mm)
茨城	0	—	1.86	2.11	22.3	13.800	94	16	1.2
	D	3	2.16		10.8		95	15	1.3
	D	7	2.22		11.1		94	16	1.3
	D	14	2.18		10.9		95	15	1.1
							平均 95:6		平均 1.2
高知	0	—	1.41	1.54	14.1	9.44	93	7	1.3
	D	3	1.59		7.94		93	7	1.4
	D	7	1.56		7.82		92	8	1.3
	D	14	1.58		7.90		91	9	1.3
							平均 92:8		平均 1.3
宮崎	0	—	2.29	2.18	34.3	18.200	85	15	1.8
	D	3	2.22		13.3		86	14	1.9
	D	7	2.07		12.4		92	8	2.0
	D	14	2.13		12.8		94	16	1.8
							平均 89:11		平均 1.9
3ほ場の総平均重量					3ほ場の総重量の平均				
1.94 kg/個					13.8 kg				

D : 1-ナフタレン酢酸ナトリウム及びDMTPは2回処理

アセタミプリドは3回処理

PAPは4回処理

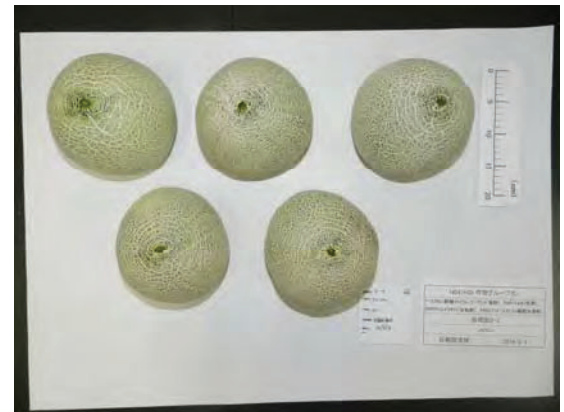
2.作物写真

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

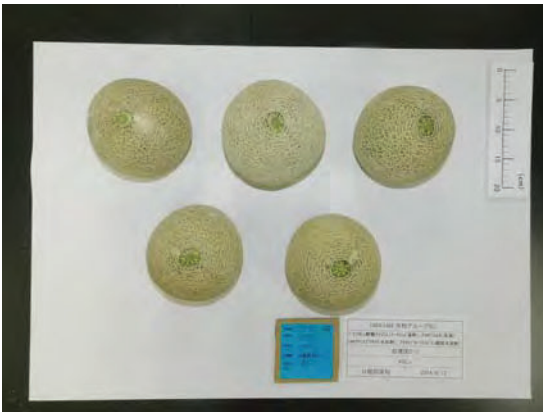
2.2.高知



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

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

1. 分析対象物質

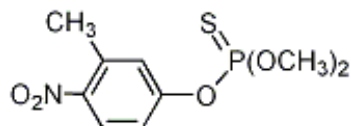
MEP

化学名： *O,O* -dimethyl *O*-4-nitro-*m*-tolyl phosphorothioate

分子式： $C_9H_{12}NO_5PS$

分子量： 277.2

構造式：



性状： 黄色または茶褐色の液体

融点： 0.3°C

蒸気圧： 18 mPa (20°C)

分配係数： $\log P_{ow} = 3.43$ (20°C)

溶解性： 水 14.0 mg/L (30°C)

有機溶媒易溶

ヘキサン 24, イソプロパノール 138 (共に g/L, 20°C)

安定性： 通常保存条件下で比較的安定

加水分解による半減期 (22°C)

108.8日 (pH=4), 84.3日 (pH=7), 75日 (pH=9)

出典： The Pesticide Manual 15th Edition

2. 標準品及び試薬

MEP 標準品：純度 98.0% (Dr.Ehrenstorfer 製)

アセトニトリル, アセトン, ヘキサン：残留農薬試験用 (関東化学製)

水：ピュアライト PRA-0015-0V1 (オカノ製) 及びピュリック ZII (オカノ製) で精製した水

C₁₈ ミニカラム：BondElut C₁₈ 1 g/6 mL (アジレント製)

陰イオン交換ミニカラム：BondElut Jr.PSA 500 mg (アジレント製)

フロリジルミニカラム：Sep-pak フロリジルカートリッジ, プラス (waters 製)

3. 装置及び機器

ミキサー：クイジナート DLC-NXJ2PS (クイジナート・アメリカ製)

ガスクロマトグラフ (GC FPD-P)：HP6890 GC System, FPD P フィルター
(アジレント製)

データ処理装置：ChemStation (アジレント製)

4. ガスクロマトグラフの操作条件

カラム： RESTEK-5 (RESTEK 製)
内径 0.53 mm, 長さ 15 m, 膜厚 1.5 μm

温度： カラム 100°C – 25°C/min – 220°C (2 min),
注入口 200°C, 検出器 250°C

ガス流量： 水素 75 mL/min, 空気 100 mL/min

注入量： 2 μL

保持時間： 約 5.4 min

5. 検量線の作成

MEP標準品20.4 mgを20 mL容メスフラスコに精秤し, アセトンに溶解して1000 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20 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0.025, 0.05, 0.1, 0.5及び1.0 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分析計に注入し, データ処理装置を用いてMEP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, 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MEP分析用試料とし, 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定容とした。その100 mL（試料10 g相当量）を分取し、40℃以下の水浴中で減圧濃縮しアセトンを留去した。

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。濃縮液を前処理したC₁₈ミニカラムに流下した後、水5 mLで容器内を洗って流下した。さらにアセトニトリル/水（60:40, 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1分間吸引乾燥した後、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. PSA/フロリジル連結ミニカラムによる精製

PSA/フロリジル連結ミニカラムにヘキサン/アセトン（85:15, v/v）混液5 mLを流下し前処理した。残留物をヘキサン/アセトン（85:15, v/v）混液10 mLに溶解し、前処理したPSA/フロリジル連結ミニカラムに移した。さらに同混液10 mLで容器内を洗って流下した。全ての溶出液を合わせ取り、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。

6.5. 定量

残留物を適量のアセトンに溶解した。この溶液を前記条件のガスクロマトグラフに注入してピーク高さを求め、検量線よりMEP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)
0.1	10	2	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)
0.05	10	2	2	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、茨城試料及び宮崎試料の無処理試料*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。

*本事業の無処理試料

8.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
茨城	5	96, 90,	92, 89,	91,	92	2.9
茨城	0.25	97, 89,	95, 79	94,	91	7.9
茨城	0.01	120, 110,	120, 110,	120,	116	4.7

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
宮崎	5	96, 94,	95, 94	94,	95	0.9
宮崎	0.25	93, 84,	90, 83	88,	88	4.7
宮崎	0.01	120, 100,	110, 100,	110,	108	7.7

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

又、2013年10月実施の食品衛生精度管理比較調査（一般財団法人食品薬品安全センター）におけるZスコアは全てZ<2であった。

9.1. 果肉

分析日*	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値 (mg/kg)
2014/10/30	宮崎	103	<0.01
2014/11/5	茨城	108	<0.01
2014/12/17	高知	111	<0.01
2014/12/19	宮崎	120	<0.01
2014/12/22	茨城	111	<0.01
2014/12/25	高知	109	<0.01

回収試料の添加濃度：0.1 mg/kg

*抽出日を記載

9.2. 果実

分析日*	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区の 分析値 (mg/kg)
2014/11/6	茨城	110	<0.01
2014/11/7	宮崎	120	<0.01
2014/12/18	高知	120	<0.01
2014/12/19	宮崎	119	<0.01
2014/12/22	茨城	109	<0.01
2014/12/25	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**MEP**を添加し、冷凍暗所（ -20°C 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	1.0	153 (2014/ 7/22-12/22)	80,	75	78
高知	1.0	15 (2014/12/10-12/25)	85,	85	85
宮崎	1.0	162 (2014/ 7/10-12/19)	86,	78	82

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	1.0	153 (2014/ 7/22-12/22)	83,	80	82
高知	1.0	15 (2014/12/10-12/25)	84,	82	83
宮崎	1.0	162 (2014/ 7/10-12/19)	88,	87	88

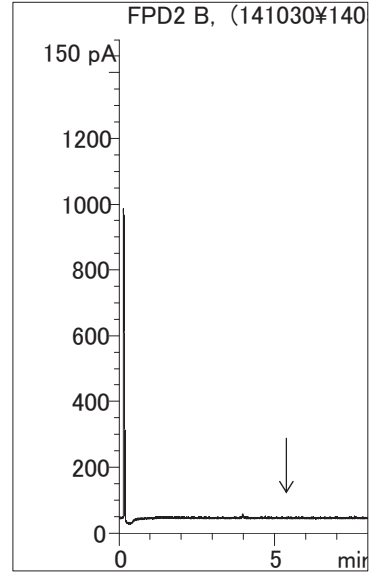
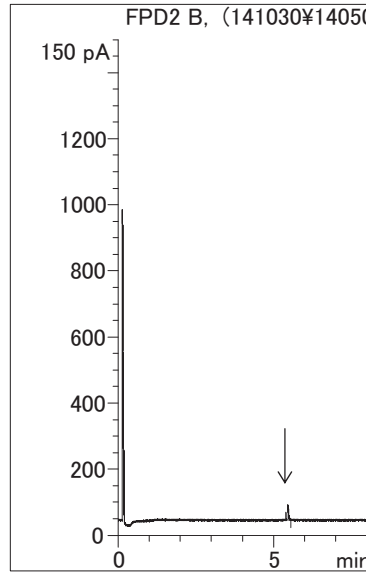
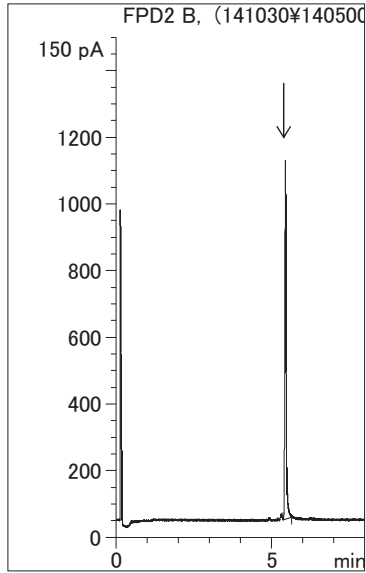
付図-1. MEPのクロマトグラム (代表例)

付図-1-1. 果肉

標準品 2.0 ng

標準品 0.1 ng

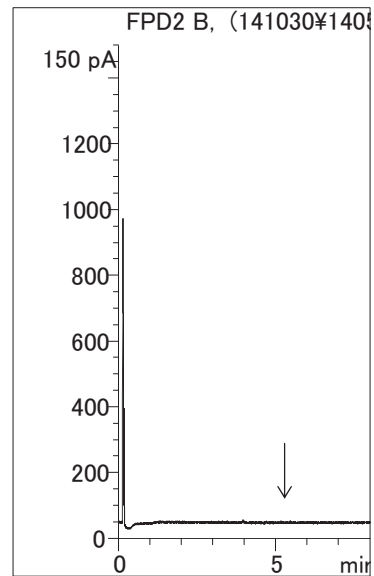
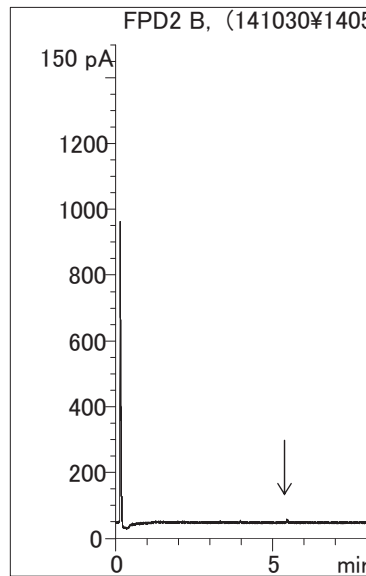
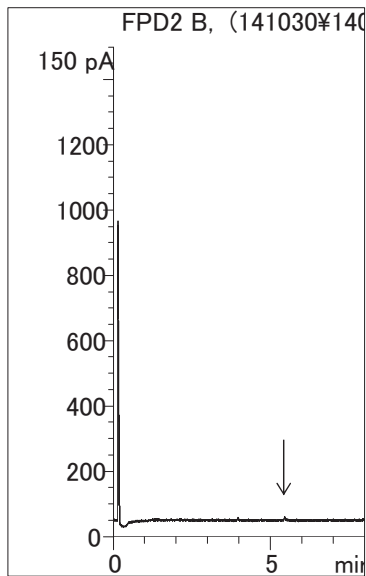
宮崎 無処理
2 μ L/2 mL/10 g



宮崎 5回処理1日後
2 μ L/2 mL/10 g

宮崎 5回処理3日後
2 μ L/2 mL/10 g

宮崎 5回処理7日後
2 μ L/2 mL/10 g

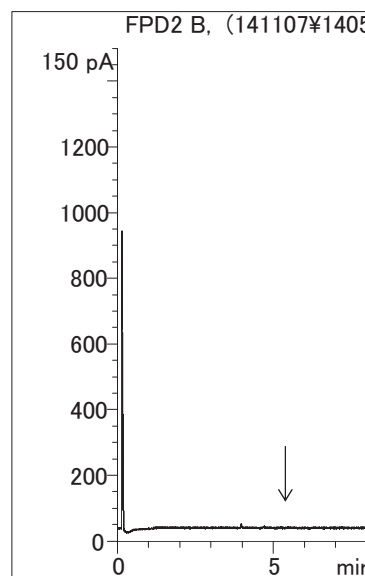
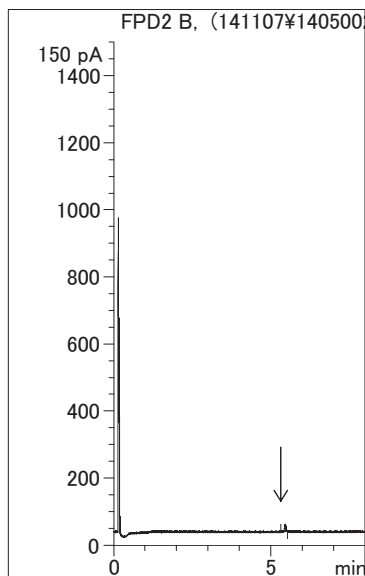
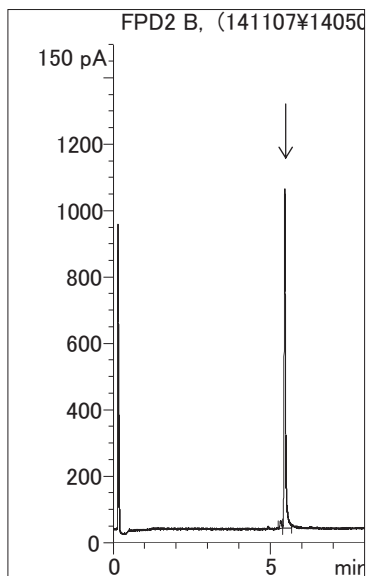


付図-1-2. 果実

標準品 2.0 ng

標準品 0.1 ng

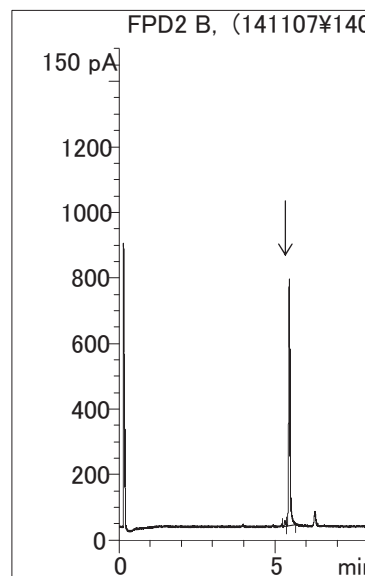
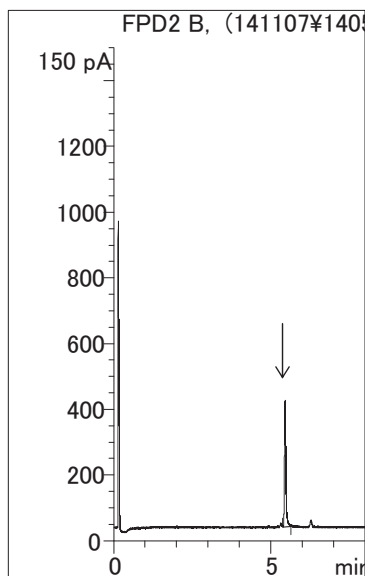
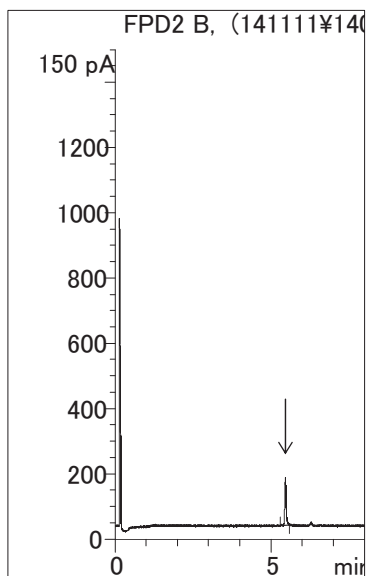
宮崎 無処理
2 μ L/2 mL/10 g



宮崎 5 回処理 1 日後
2 μ L/20 mL/10 g

宮崎 5 回処理 3 日後
2 μ L/10 mL/10 g

宮崎 5 回処理 7 日後
2 μ L/4 mL/10 g



平成26年度農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業
残留分析詳細② クロチアニジン

1. 分析対象物質

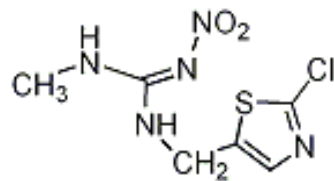
クロチアニジン

化学名： (E)-1-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-3-methyl-2-nitroguanidine

分子式： $C_6H_8ClN_5O_2S$

分子量： 249.7

構造式：



性状： 無色粉末，無臭

融点： 176.8℃

蒸気圧： 3.8×10^{-8} mPa (20℃)

分配係数： $\log P_{ow} = 0.7$ (25℃)

溶解性： 水 0.304 g/L (pH=4, 20℃), 0.340 g/L (pH=10, 20℃)

ヘプタン < 0.00104, キシレン 0.0128, ジクロロメタン 1.32,
メタノール 6.26, オクタノール 0.938, アセトン 15.2, 酢酸エチル 2.03
(以上 g/L, 25℃)

安定性： pH=5及びpH=7において安定 (50℃)

加水分解の半減期 1401日 (pH=9, 20℃)

水中光分解の半減期 3.3時間 (pH=7, 25℃)

出典： The Pesticide Manual 15th Edition

2. 標準品及び試薬

クロチアニジン標準品：純度 99.5% (Dr.Ehrenstorfer 製)

アセトニトリル, アセトン：残留農薬試験用 (関東化学製)

メタノール：LC-MS 用 (関東化学製)

水：ピュアライト PRA-0015-0V1 (オカノ製) 及びピュアリック Z II (オカノ製) で精製した水

C₁₈ ミニカラム：BondElut C₁₈ 1 g/6mL (アジレント製)

3. 装置及び機器

ミキサー：クイジナート DLC-NXJ2 (クイジナート・アメリカ製)

液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC-MS/MS)：

Agilent 6410 Triple Quad LC/MS (アジレント製)

データ処理装置：MassHunter (アジレント製)

4. 測定機器の操作条件

4.1. 液体クロマトグラフの操作条件

カラム：Atlantis T3 (waters 製)

内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3 μm

溶離液：メタノール/4 mmol/L 酢酸アンモニウム含有 0.1%ギ酸
(85:15,v/v)

流量：0.2 mL/min

カラム温度：40°C

注入量：2 μL

保持時間：約 2.4 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

乾燥ガス温度：300°C

乾燥ガス流量：10 L/min

ネブライザー圧力：30 psi

イオン導入電圧：3000 V

フラグメンター電圧：100 V

コリジョン電圧：10 V (コリジョンガス; N₂)

イオン検出法：MRM 法

モニタリングイオン：プリカーサーイオン ; m/z 249.7

プロダクトイオン ; m/z 169.0

5. 検量線の作成

クロチアニジン標準品20.1 mgを20 mL容メスフラスコに精秤し、アセトンに溶解して1000 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20 mg/L標準溶液を調製し、さらにこの標準溶液をメタノールで希釈して0.0005, 0.001, 0.002, 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クロチアニジ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組をクロチアニジン分析用試料とし、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定容とした。その100 mL (試料10 g相当量) を取り、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、アセトンを留去した。

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。濃縮液を前処理したC₁₈ミニカラムに流下した後、水5 mLで容器内を洗って流下し、こられる流出液を捨てた。次に、アセトニトリル/水 (60:40, v/v) 混液5 mLを流下し、溶出液を取り、アセトニトリルで10 mL定容とした。その0.2 mL (試料0.2 g相当量) を分取し、アセトニトリルを加え、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、検量線よりクロチアニジンの重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

7. 定量限界値(LOQ)及び検出限界値(LOD)

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μ L)	定量限界 (mg/kg)
0.002	0.2	2	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	0.2	2	2	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、茨城試料及び宮崎試料の無処理試料*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。

*本事業の無処理試料

8.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
茨城	5	94, 91,	94, 90,	92,	92	1.9
茨城	0.25	96, 90,	93, 90,	93,	92	2.7
茨城	0.01	100, 100,	100, 90,	100,	98	4.6

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
宮崎	5	103, 99,	101, 94,	99,	99	3.4
宮崎	0.25	109, 104,	108, 102,	104	105	2.8
宮崎	0.01	120, 110,	110, 100	110,	110	6.4

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

又、2013年10月実施の食品衛生精度管理比較調査（一般財団法人食品薬品安全センター）におけるZスコアは全てZ<2であった。

9.1. 果肉

分析日*	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区 の 分析値 (mg/kg)
2014/10/30	宮崎	99	<0.01
2014/11/5	茨城	79	<0.01
2014/12/17	高知	90	<0.01
2014/12/19	宮崎	71	<0.01
2014/12/22	茨城	79	<0.01
2014/12/25	高知	74	<0.01

回収試料の添加濃度：0.1 mg/kg

*抽出日を記載

9.2. 果実

分析日*	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区 の 分析値 (mg/kg)
2014/11/6	茨城	82	<0.01
2014/11/7	宮崎	79	<0.01
2014/12/18	高知	80	<0.01
2014/12/19	宮崎	72	<0.01
2014/12/22	茨城	71	<0.01
2014/12/25	高知	70	<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クロチアニジンを添加し、冷凍暗所（-20℃以下）に凍結保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を確認した。保存安定性の結果を示す。

10.1. 果肉

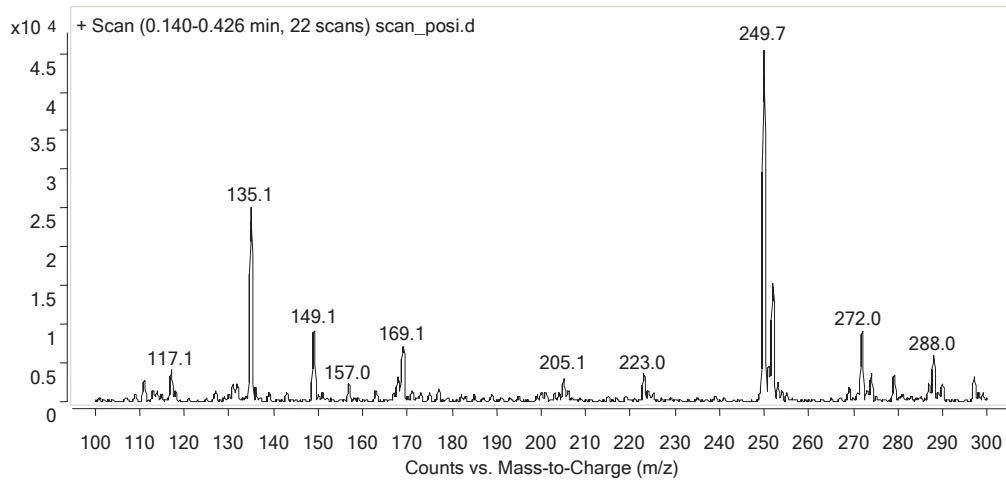
圃場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	1.0	153 (2014/ 7/22-12/22)	101,	100	100
高知	1.0	15 (2014/12/10-12/25)	95,	93	94
宮崎	1.0	162 (2014/ 7/10-12/19)	84,	79	82

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	1.0	153 (2014/ 7/22-12/22)	100,	97	98
高知	1.0	15 (2014/12/10-12/25)	100,	98	99
宮崎	1.0	162 (2014/ 7/10-12/19)	84,	79	82

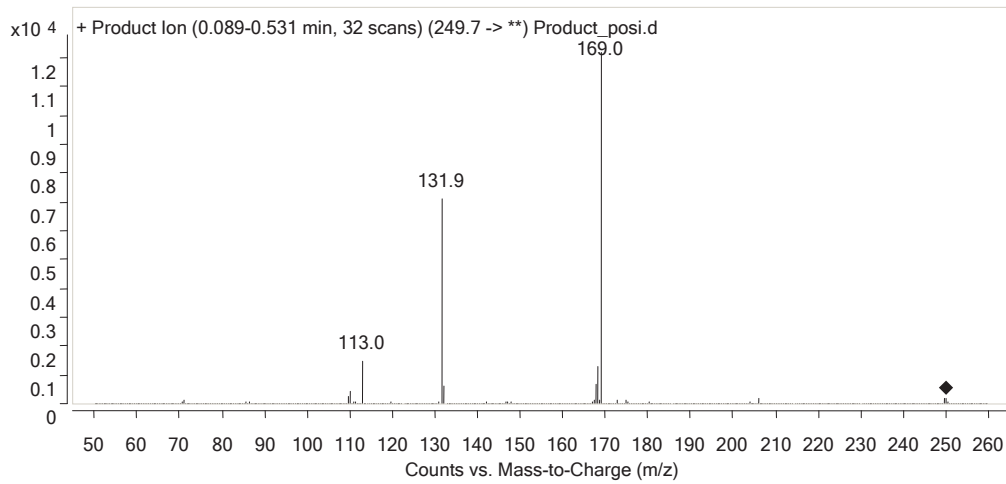
付図-1. マススペクトル

クロチアニジンのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)



クロチアニジンのプロダクトスキャンスペクトルの一例

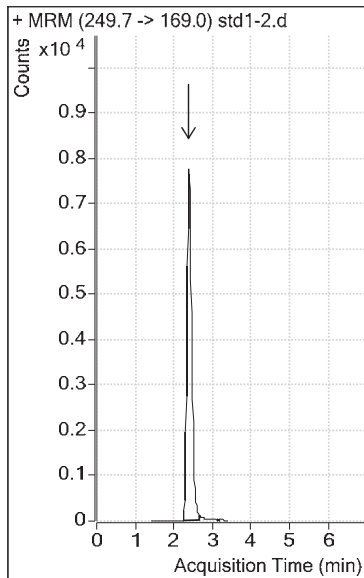
(プリカーサーイオン m/z=249.7, 正モード)



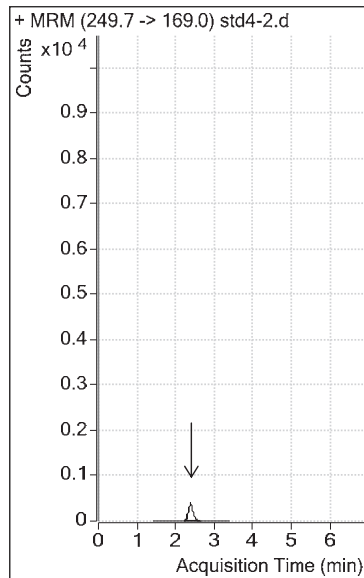
付図-2. クロチアニジンのクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. 果肉

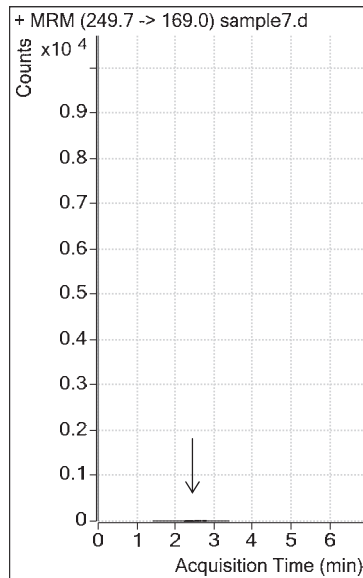
標準品 0.04 ng



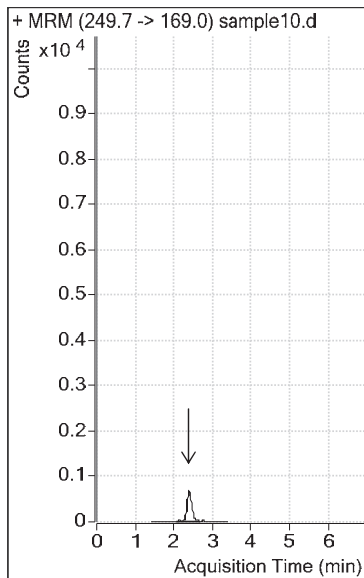
標準品 0.002 ng



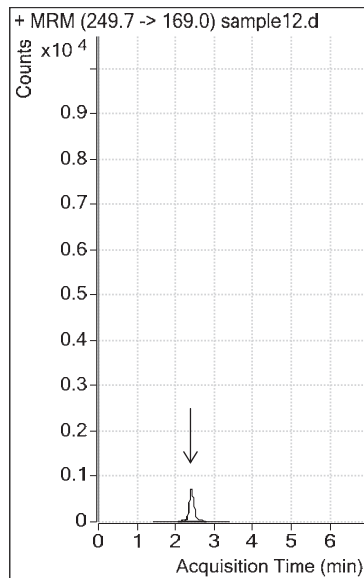
宮崎 無処理
2 μL/2 mL/0.2 g



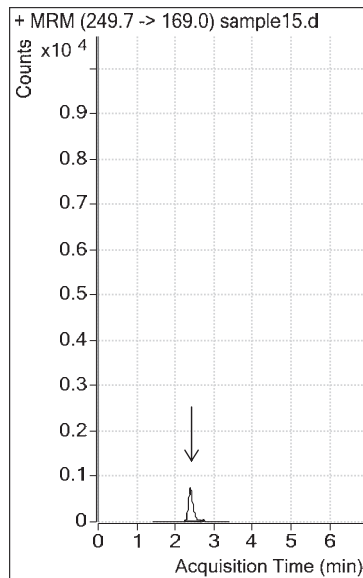
宮崎 3回処理1日後
2 μL/2 mL/0.2 g



宮崎 3回処理3日後
2 μL/2 mL/0.2 g



宮崎 3回処理7日後
2 μL/2 mL/0.2 g

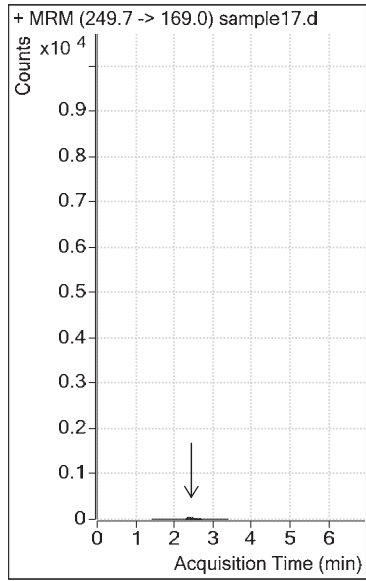
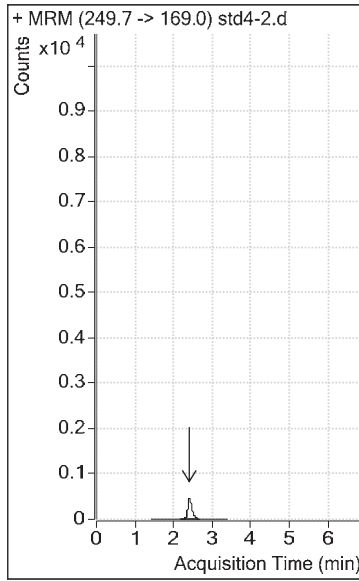
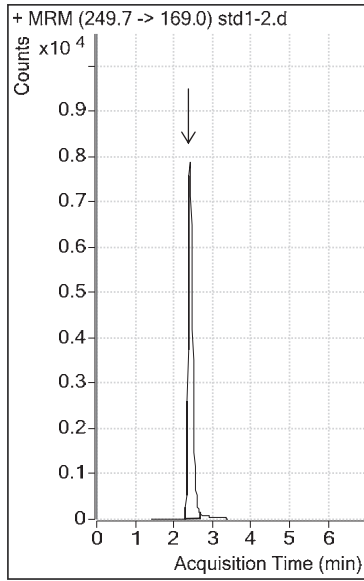


付図-2-2. 果実

標準品 0.04 ng

標準品 0.002 ng

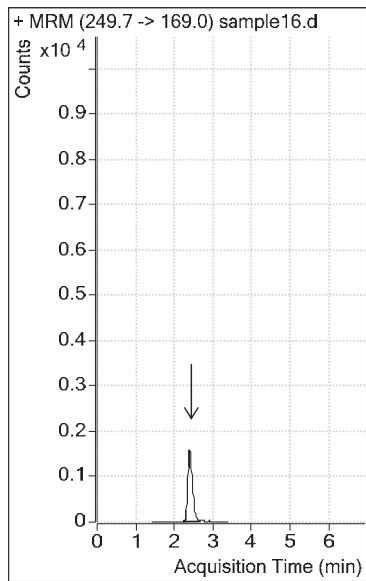
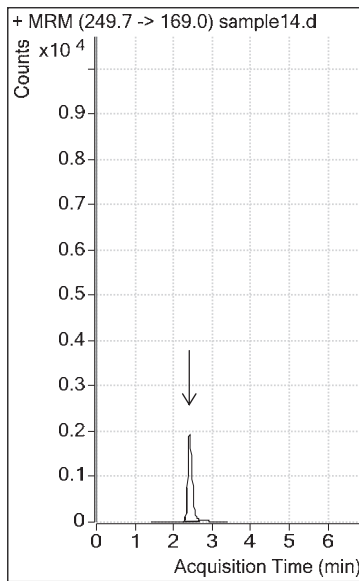
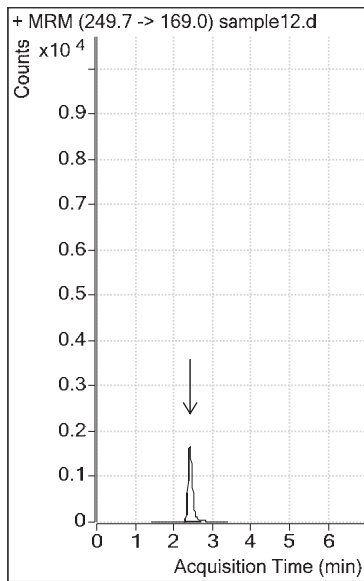
宮崎 無処理
2 μ L/2 mL/0.2 g



宮崎 3回処理1日後
2 μ L/4 mL/0.2 g

宮崎 3回処理3日後
2 μ L/4 mL/0.2 g

宮崎 3回処理7日後
2 μ L/4 mL/0.2 g



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

1. 分析対象物質

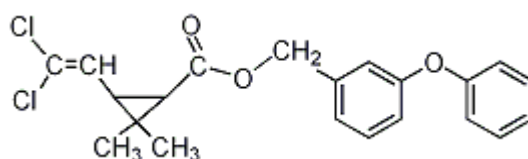
ペルメトリン

化学名： 3-phenoxybenzyl(1*RS*,3*RS*;1*RS*,3*SR*)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate

分子式： $C_{21}H_{20}Cl_2O_3$

分子量： 391.3

構造式：



性状： 茶褐色液体

融点： 34°C-35°C ; *cis*体 63-65°C, *trans*体 44-47°C

蒸気圧： *cis*体 2.9×10^{-3} mPa, *trans*体 9.2×10^{-4} Pa

分配係数： $\log P_{ow} = 6.1$ (20°C)

溶解性： 水; 6×10^{-3} mg/L (pH=7, 20°C)

*cis*体 0.20 mg/L (pH不定, 25°C) , *trans*体 0.13 mg/L (pH不定, 25°C)

キシレン 1000, ヘキサン 1000, メタノール 258

(以上 g/kg, 25°C)

安定性： 熱に安定 (50°Cで2年以上安定)

アルカリ溶液中より酸性溶液中で安定

pH9での半減期50日, pH5及びpH7において安定 (25°C)

出典： The Pesticide Manual 15th Edition

2. 標準品及び試薬

- cis*-ペルメトリン標準品：純度 99.8% (和光純薬工業製)
trans-ペルメトリン標準品：純度 99.0% (Dr.Ehrenstorfer 製)
 アセトニトリル, アセトン, ヘキサン：残留農薬試験用 (関東化学製)
 メタノール：LC-MS 用 (関東化学製)
 水：ピュアライト PRA-0015-0V1 (オルガノ製) 及びピュリック ZII (オルガノ製) で精製した水
 C₁₈ ミニカラム：BondElut C₁₈ 1 g/6 mL (アジレント製)
 陰イオン交換ミニカラム：BondElut Jr.PSA 500 mg (アジレント製)
 フロリジルミニカラム：Sep-pak フロリジルカートリッジ, プラス (Waters 製)

3. 装置及び機器

- ミキサー：クイジナート **DLC-NXJ2** (クイジナート・アメリカ製)
 液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC-MS/MS)：
Agilent 6410 Triple Quad LC/MS (アジレント製)
 データ処理装置：MassHunter (アジレント製)

4. 測定機器の操作条件

4.1. 液体クロマトグラフの操作条件

- カラム： **Atlantis T3** (Waters 製)
 内径 2.1mm, 長さ 150 mm, 粒径 3 μm
 溶離液： メタノール/4 mmol/L 酢酸アンモニウム含有 0.1%ギ酸
 (85:15,v/v)
 流量： **0.2 mL/min**
 カラム温度： **40°C**
 注入量： **2 μL**
 保持時間： *cis* 体 約 13.8min, *trans* 体 約 11.7min

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
 乾燥ガス温度： **300°C**
 乾燥ガス流量： **10 L/min**
 ネブライザー圧力： **30 psi**
 イオン導入電圧： **3000 V**
 フラグメンター電圧： *cis* 体 **100 V**, *trans* 体 **100 V**
 コリジョン電圧： *cis* 体 **10 V**, *trans* 体 **10 V** (コリジョンガス; N₂)

イオン検出法：	MRM 法		
モニタリングイオン：	<i>cis</i> 体	プリカーサーイオン	m/z 408.0
		プロダクトイオン	m/z 183.1
	<i>trans</i> 体	プリカーサーイオン	m/z 408.0
		プロダクトイオン	m/z 183.0

5. 検量線の作成

cis-ペルメトリンは標準品 10.0 mg を 20 mL 容メスフラスコに精秤し、アセトンに溶解して 500 mg/L 標準原液を調製した。*trans*-ペルメトリンは標準品 5.05 mg を 10 mL 容メスフラスコに精秤し、アセトンに溶解して 500 mg/L 標準原液を調製した。各原液から等量を取り合わせ、アセトンで希釈して 20 mg/L 混合標準溶液を調製し、さらにこの混合標準溶液をメタノールで希釈し 0.0005, 0.001, 0.002, 0.01 及び 0.02 mg/L の混合溶液を調製した。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 *cis* 及び *trans*-ペルメトリンのピーク面積を測定し、横軸に重量、縦軸に 2 本のピーク面積の合計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組をペルメトリン分析用試料とし、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定容とし、その100 mL（試料10 g相当量）を分取し、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、アセトンを留去した。

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。濃縮液を前処理したC₁₈ミニカラムに流下した後、水5 mLで容器内を洗って流下した。さらにアセトニトリル/水（60:40, 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1分間吸引乾燥した後、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.PSA／フロリジル連結ミニカラムによる精製

PSA／フロリジル連結ミニカラムにヘキサン／アセトン（85:15, v/v）混液5 mLを流下し前処理した。残留物を同混液10 mLで溶解し，前処理したPSA／フロリジル連結ミニカラムに移した。さらに同混液10 mLで容器内を洗って流下した。全ての溶出液を合わせ取り，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。

6.5. 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，検量線よりペルメトリンの重量を求め，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	10	100	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	10	100	2	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、茨城試料及び宮崎試料の無処理試料*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。

*本事業の無処理試料

8.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
茨城	5	101, 98,	100, 95,	100,	99	2.4
茨城	0.25	98, 93,	97, 92	94,	95	2.7
茨城	0.01	110, 100,	110, 100,	110,	106	5.2

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
宮崎	5	104, 100,	101, 99,	100,	101	1.9
宮崎	0.25	101, 95,	99, 94	98,	97	3.0
宮崎	0.01	110, 100,	110, 100,	110,	106	5.2

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

又、2013年10月実施の食品衛生精度管理比較調査（一般財団法人食品薬品安全センター）におけるZスコアは全てZ<2であった。

9.1. 果肉

分析日*	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区 の 分析値 (mg/kg)
2014/10/30	宮崎	103	<0.01
2014/11/5	茨城	97	<0.01
2014/12/17	高知	119	<0.01
2014/12/19	宮崎	119	<0.01
2014/12/22	茨城	109	<0.01
2014/12/25	高知	112	<0.01

回収試料の添加濃度：0.1 mg/kg（混合）

*抽出日を記載

9.2. 果実

分析日*	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区 の 分析値 (mg/kg)
2014/11/6	茨城	98	<0.01
2014/11/7	宮崎	106	<0.01
2014/12/18	高知	106	<0.01
2014/12/19	宮崎	112	<0.01
2014/12/22	茨城	109	<0.01
2014/12/25	高知	106	<0.01

回収試料の添加濃度：0.1 mg/kg（混合）

*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ペルメトリンを添加し、冷凍暗所（-20℃以下）に凍結保存した。一定期間保存した後、同様に分析して回収率を求め、保存中の安定性を確認した。保存安定性の結果を示す。

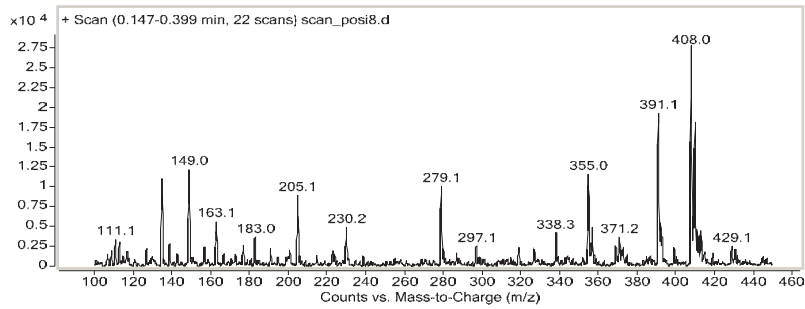
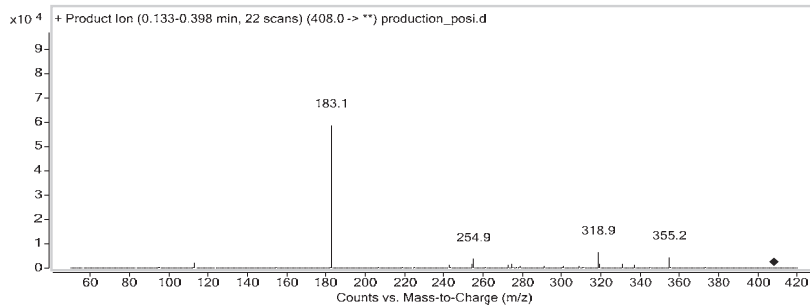
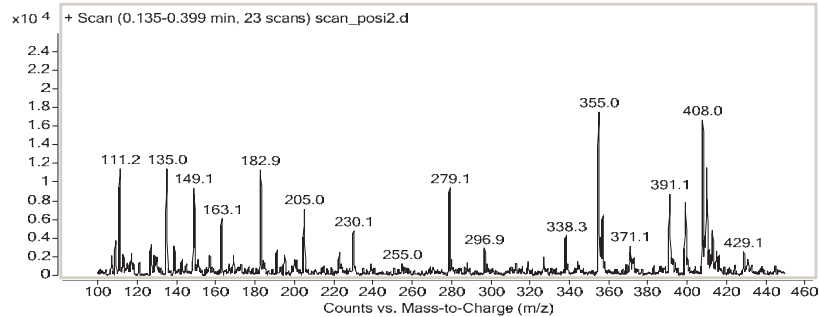
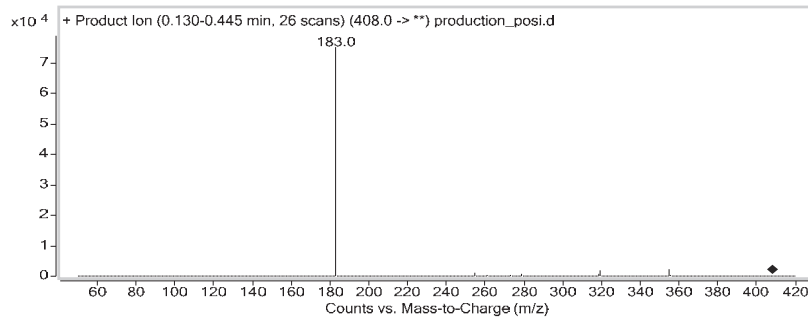
10.1. 果肉

圃場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)		平均回収率 (%)
茨城	1.0	153 (2014/ 7/22-12/22)	92,	91	92
高知	1.0	15 (2014/12/10-12/25)	99,	97	98
宮崎	1.0	162 (2014/ 7/10-12/19)	100,	96	98

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	1.0	153 (2014/ 7/22-12/22)	93,	90	92
高知	1.0	15 (2014/12/10-12/25)	98,	95	96
宮崎	1.0	162 (2014/ 7/10-12/19)	94,	93	94

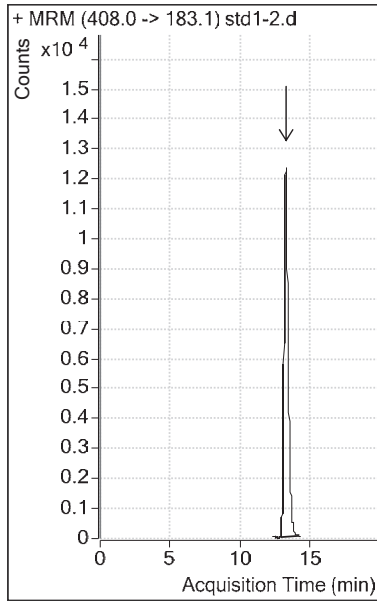
付図-1. マススペクトル

cis-ペルメトリンのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)*cis*-ペルメトリンのプロダクトスキンスペクトルの一例
(プリカーサーイオン m/z=408.0, 正モード)*trans*-ペルメトリンのマススペクトル (一次イオン) の一例 (正モード)*trans*-ペルメトリンのプロダクトスキンスペクトルの一例
(プリカーサーイオン m/z=408.0, 正モード)

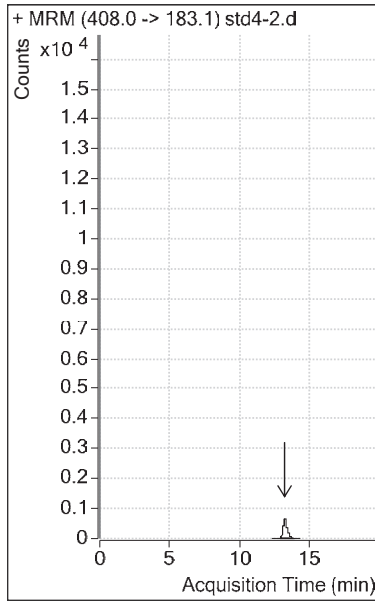
付図-2.cis-ペルメトリンのクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. 果肉

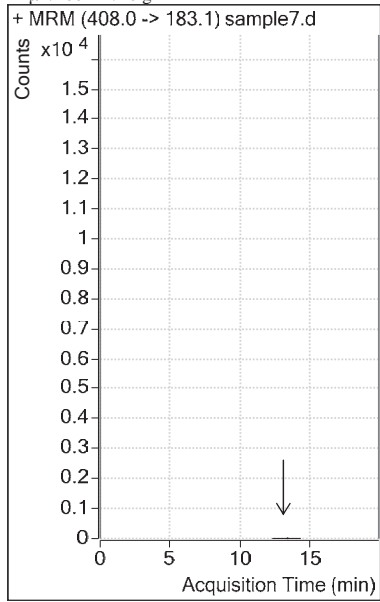
標準品 0.04 ng



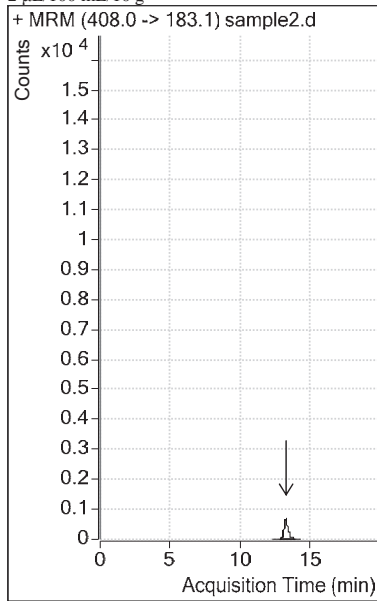
標準品 0.002 ng



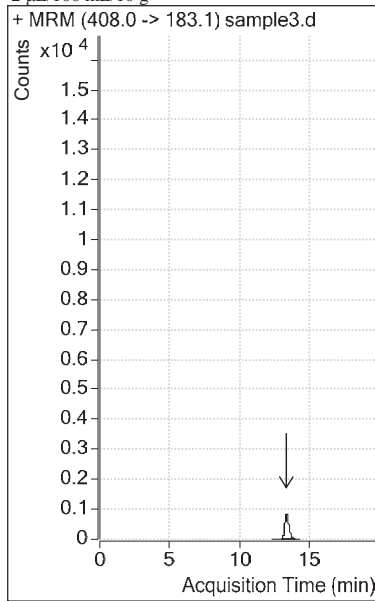
宮崎 無処理
2 μL/100 mL/10 g



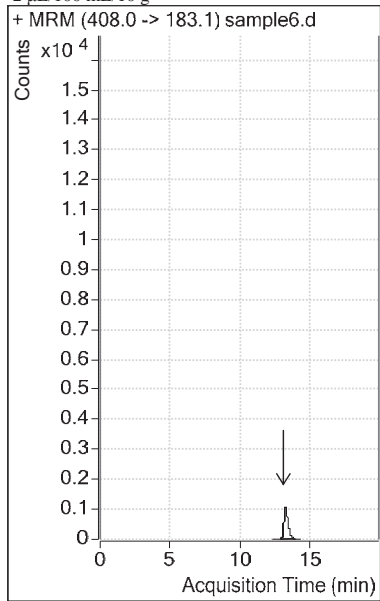
宮崎 5 回処理 1 日後
2 μL/100 mL/10 g



宮崎 5 回処理 3 日後
2 μL/100 mL/10 g



宮崎 5 回処理 7 日後
2 μL/100 mL/10 g

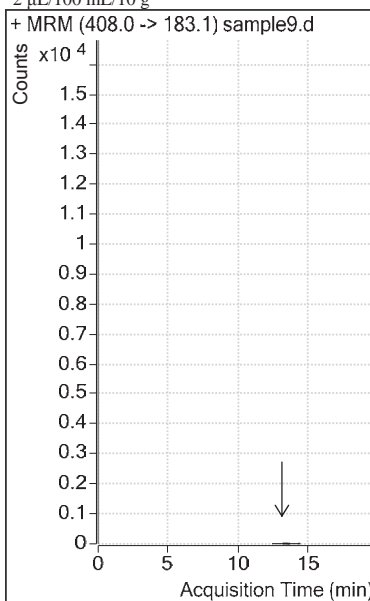
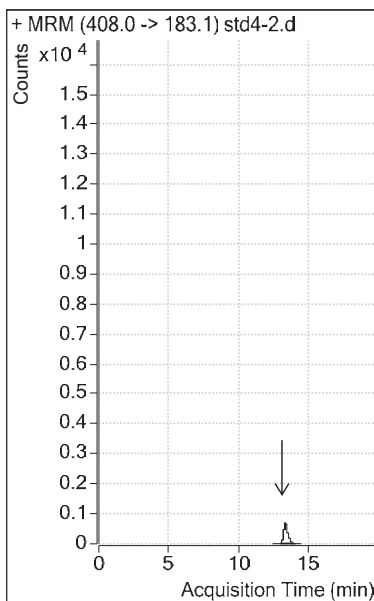
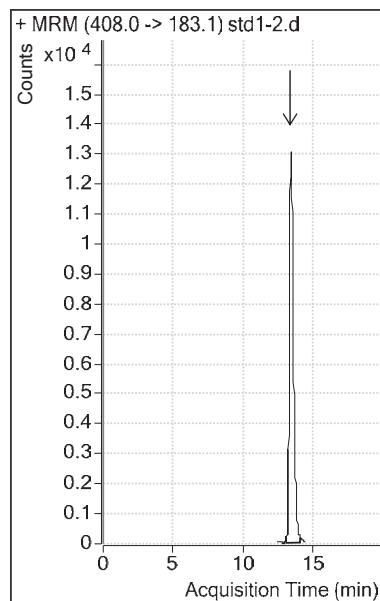


付図-2-2. 果実

標準品 0.04 ng

標準品 0.002 ng

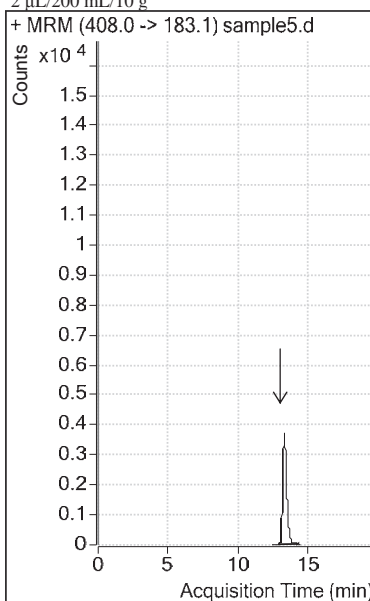
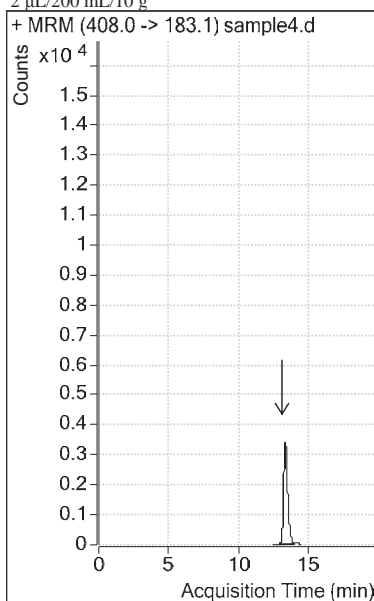
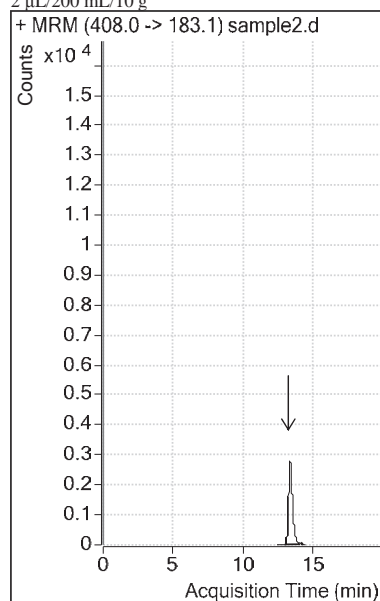
宮崎 無処理
2 μ L/100 mL/10 g



宮崎 5回処理1日後
2 μ L/200 mL/10 g

宮崎 5回処理3日後
2 μ L/200 mL/10 g

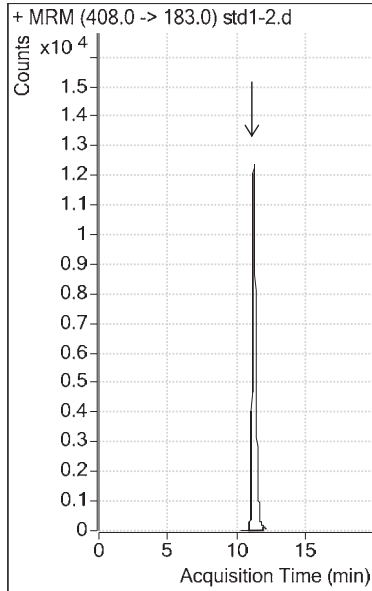
宮崎 5回処理7日後
2 μ L/200 mL/10 g



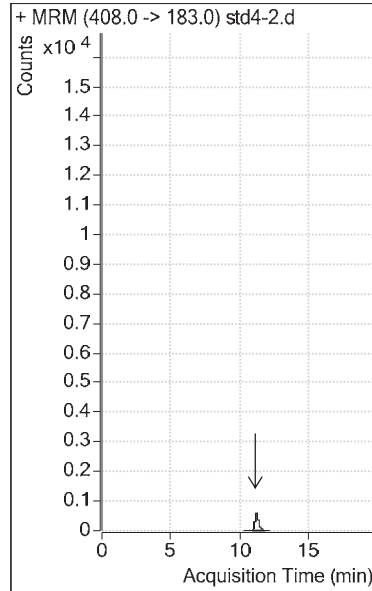
付図-3.trans-ペルメトリンのクロマトグラム (代表例)

付図-3-1. 果肉

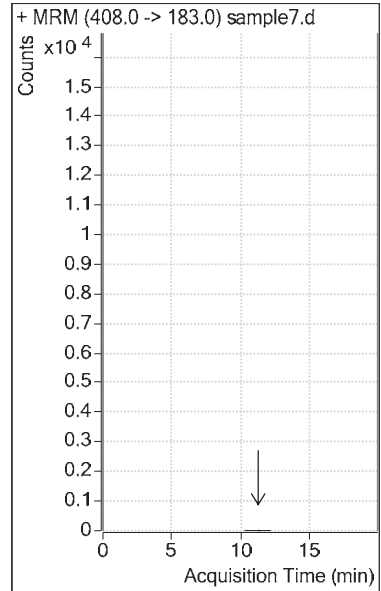
標準品 0.04 ng



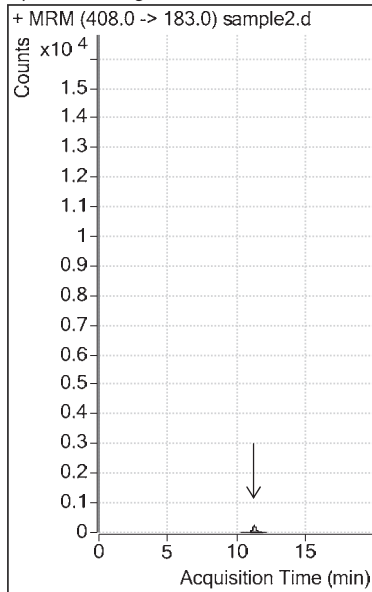
標準品 0.002 ng



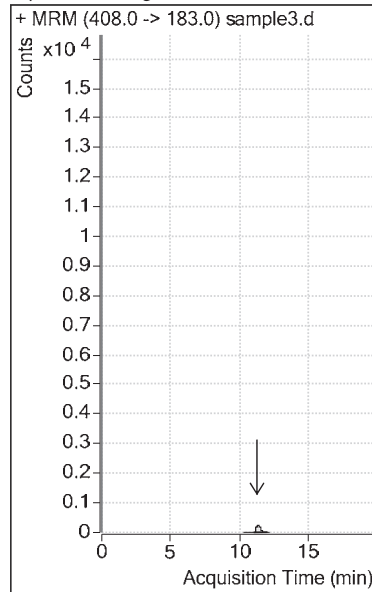
宮崎 無処理
2 μL/100 mL/10 g



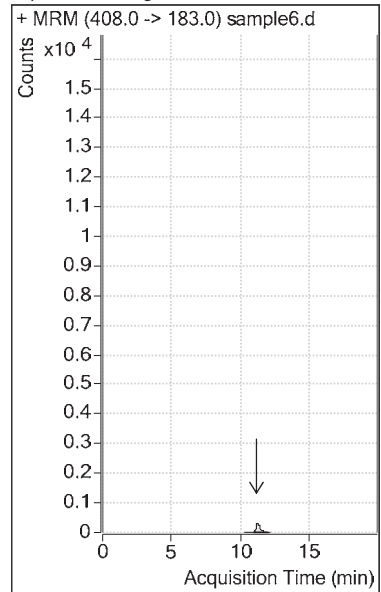
宮崎 5回処理1日後
2 μL/100 mL/10 g



宮崎 5回処理3日後
2 μL/100 mL/10 g

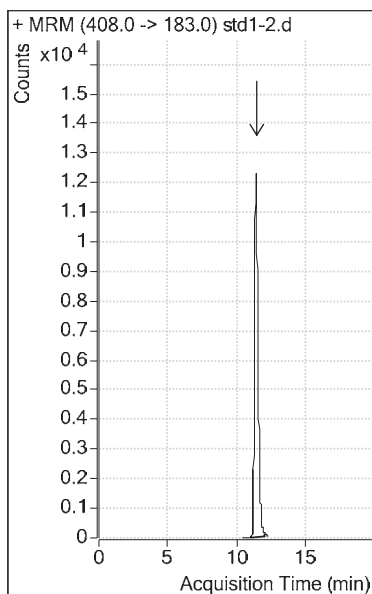


宮崎 5回処理7日後
2 μL/100 mL/10 g

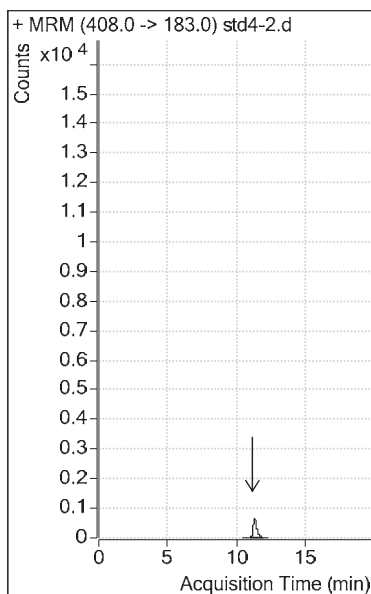


付図-3-2. 果実

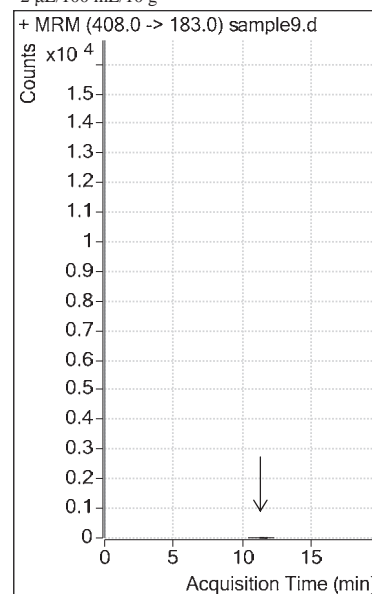
標準品 0.04 ng



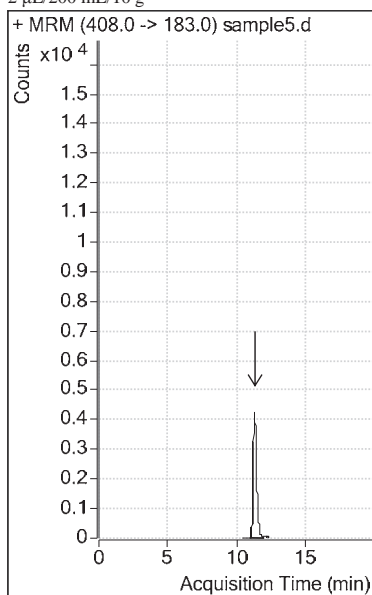
標準品 0.002 ng



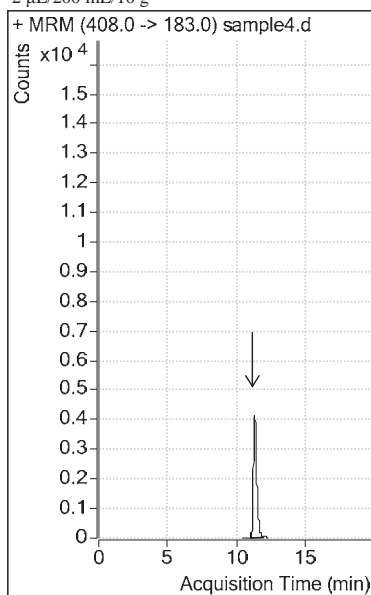
宮崎 無処理
2 μL/100 mL/10 g



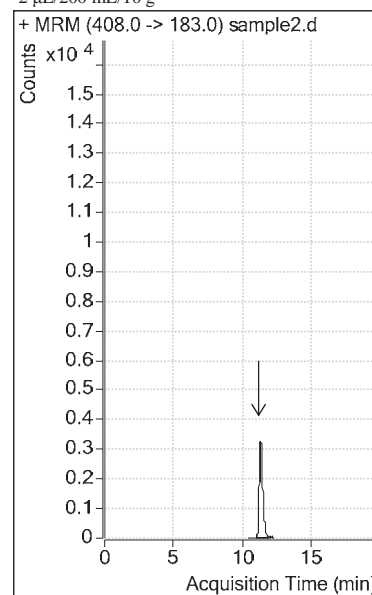
宮崎 5回処理 1日後
2 μL/200 mL/10 g



宮崎 5回処理 3日後
2 μL/200 mL/10 g



宮崎 5回処理 7日後
2 μL/200 mL/10 g

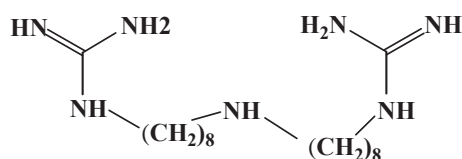


平成26年度農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業
 残留分析詳細④ イミノクタジン

1. 分析対象物質

イミノクタジン

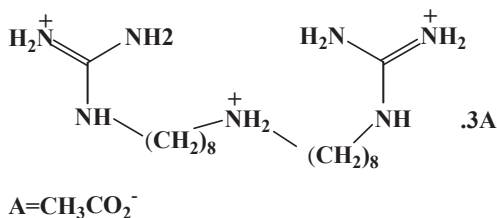
化学名： 1,1 -iminodi(octamethylene)diguanidine
 分子式： $C_{18}H_{41}N_7$
 分子量： 355.6
 構造式：



出典：The Pesticide Manual 15th Edition.

イミノクタジン三酢酸塩

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



性状： 無色結晶
 融点： 143.0～144.2℃
 蒸気圧： < 0.4 mPa (23℃)
 分配係数： log P_{OW} = -2.33 (pH=7)
 溶解性： 水 764 g/L (20℃)
 エタノール 117, メタノール 777 (以上 g/L, 20℃)

出典：The Pesticide Manual 15th Edition.

2. 標準品及び試薬

イミノクタジン三酢酸塩標準品：純度 99.1% (和光純薬製)

アセトニトリル, クロロホルム, メタノール：残留農薬試験用 (関東化学製)

アセトニトリル：LC-MS 用 (関東化学製)

水：ピュアライトPAR-0015-0V1(わか)製及びピュアリックZII(わか)製

で精製した水

陽イオン交換ミニカラム：InertSep CBA 500 mg/6 mL (ジーエルサイエンス製)

イオンペア試薬：IPC-PFFA-4 (LC-MS 用),

以下 IPC と略す (東京化成工業製)

グアニジン塩酸塩：特級 (和光純薬製)

水酸化ナトリウム：特級 (関東化学製)

塩酸：有害金属測定用 (関東化学製)

硫酸：特級 (関東化学製)

塩化ナトリウム：特級 (関東化学製)

リン酸二水素カリウム：特級 (関東化学製)

リン酸緩衝液：リン酸二水素カリウム 2.713 g を水に溶解した後,

0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加え, pH メーターで

pH=6 に調製したもの。

3. 装置及び機器

ミキサー：クイジナートDLC-NXJ2PS (クイジナート・アメリカ製)

pHメーター：F-22 (堀場製作所)

液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC-MS)：Agilent 1100 LC/MSD (アジレント製)

データ処理装置：ChemStation (アジレント製)

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-SP (ジーエルサイエンス製)

内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3 μm

溶離液：5 mmol/L IPC/アセトニトリル

75:25,v/v (10min) - 55:45,v/v (3 min)

流量：0.2 mL/min

カラム温度：40°C

注入量：2 μL

保持時間：約 12.1min

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
乾燥ガス温度：	350°C
乾燥ガス流量：	12 L/min
ネブライザー圧力：	50 psi
イオン導入電圧：	3000 V
フラグメンター電圧：	250 V
イオン検出法：	SIM 法
モニタリングイオン：	m/z 356.3

5. 検量線の作成

イミノクタジン三酢酸塩標準品30.5 mg (イミノクタジンとして20.0 mg相当) を20 mL容メスフラスコに精秤し、メタノールに溶解して1000 mg/L標準原液を調製した。この原液をメタノールで希釈して20 mg/L標準溶液を調製した。この溶液を5 mmol/L IPC/アセトニトリル (55:45,v/v) 混液で希釈して0.0025, 0.005, 0.01, 0.05及び0.1 mg/Lの標準溶液を調製した。この溶液を前記条件の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入し、データ処理装置を用いてイミノクタジンのピーク高さを測定し、横軸に重量 (ng), 縦軸にピーク高さを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組をイミノクタジン分析用試料とし、細切した。細切試料2.00 kgに対してグアニジン塩酸塩500 gを添加してミキサーで均一化した。果肉分析用試料についても果実と同様に調製試料を作製した。各調製試料は2組以上作製し、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25 g (試料20 g相当量) をはかりとり、2 mol/L水酸化ナトリウム含有メタノール溶液150 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50 mLで洗い、同様にろ過した。

6.3. クロロホルム転溶

抽出液に10%塩化ナトリウム溶液100 mL及びクロロホルム150 mLを分液漏斗に入れ、振とう機を用いて5分間激しく振とうした。暫時放置後、クロロホルム層を分取し、水層には

クロロホルム 75 mLを加え同様の振とう及び分取の操作を繰り返し、クロロホルム層を取り合わせた。

6.4. 硫酸転溶

全クロロホルム層を分液漏斗に入れ、水30 mL及び1 mol/L 硫酸 2 mLを加え振とう機を用いて5分間激しく振とうした。暫時放置後、水層を分取し、クロロホルム層には水20 mL及び1 mol/L 硫酸 0.5 mLを加え同様の振とう及び分取の操作を繰り返し、全水層を合わせた。

6.5. CBAミニカラムによる精製

CBAミニカラムにメタノール、水及びリン酸緩衝液を順次5 mLずつ流下し前処理した。水層にリン酸緩衝液5 mLを加え、12 mol/L塩酸溶液、1 mol/L塩酸溶液及び0.1 mol/L塩酸溶液を用いてpH6に調製した後、リン酸緩衝液を用いて100 mLに定容し、その10 mL (試料2 g相当量)を取り、CBAミニカラムに移して流下した。さらに、メタノール及び2 mmol/L塩酸含有メタノールを順次10 mLずつ流下し、これらの流出液を捨てた。次に、50 mmol/L塩酸含有メタノール 15 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。

6.6. 定量

残留物を適量の5 mmol/L IPC/アセトニトリル (55:45,v/v) 混液に溶解した。この溶液を前記条件の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入してピーク高さを求め、検量線よりイミノクタジンの重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

7. 定量限界値(LOQ)及び検出限界値(LOD)

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

最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μ L)	検出限界 (mg/kg)
0.005	2	4	2	0.005

8. 回収率

分析法確認のため、宮崎試料及び茨城試料の無処理試料*を用いて、0.01mg/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。

*本事業の無処理試料

8.1. 果肉

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
茨城	5	103, 95,	98, 90,	96,	96	4.9
茨城	0.25	106, 102,	105, 97,	102,	102	3.4
茨城	0.01	120, 100,	120, 90,	100,	106	12.7

8.2. 果実

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)			平均回収率 (%)	RSDr (%)
宮崎	5	103, 93,	94, 92,	93,	95	4.7
宮崎	0.25	111, 93,	98, 93,	94,	98	7.8
宮崎	0.01	120, 90,	90, 80,	90,	94	16.1

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

又、2013年10月実施の食品衛生精度管理比較調査（一般財団法人食品薬品安全センター）におけるZスコアは全てZ<2であった。

9.1. 果肉

分析日*	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区 の 分析値 (mg/kg)
2014/12/16	宮崎	85	<0.01
2014/12/19	茨城	88	<0.01
2014/12/23	高知	96	<0.01
2014/12/24	宮崎	102	<0.01
2014/12/25	茨城	94	<0.01
2014/12/26	高知	94	<0.01

回収試料の添加濃度：0.1 mg/kg

*抽出日を記載

9.2. 果実

分析日*	使用した圃場	回収率 (%)	無処理区 の 分析値 (mg/kg)
2014/12/17	宮崎	96	<0.01
2014/12/18	茨城	93	<0.01
2014/12/22	高知	91	<0.01
2014/12/24	宮崎	97	<0.01
2014/12/25	茨城	106	<0.01
2014/12/26	高知	80	<0.01

回収試料の添加濃度：0.1 mg/kg

*抽出日を記載

10. 保存安定性確認

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

10.1. 果肉

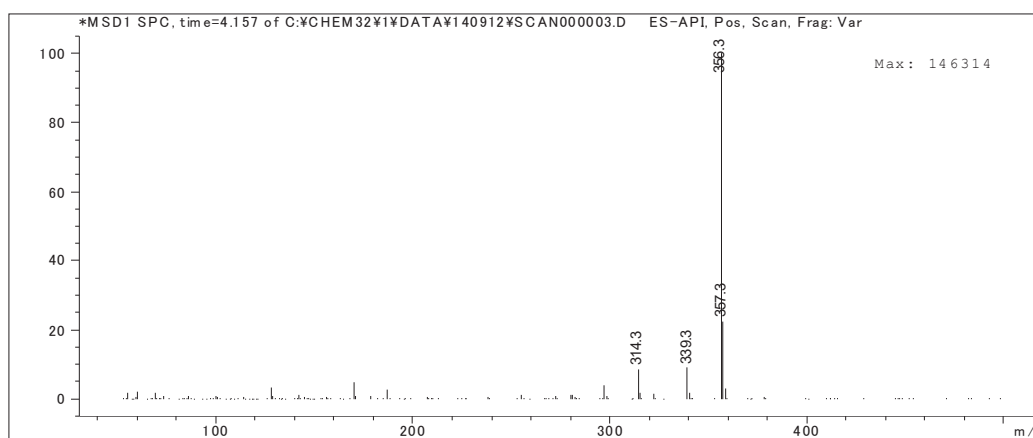
圃場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
茨城	1.0	156 (2014/7/22-12/25)	97, 93	95
高知	1.0	16 (2014/12/10-12/26)	101, 100	100
宮崎	1.0	167 (2014/7/10-12/24)	104, 103	104

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	1.0	156 (2014/7/22-12/25)	93, 89	91
高知	1.0	16 (2014/12/10-12/26)	99, 99	99
宮崎	1.0	167 (2014/7/10-12/24)	105, 105	105

付図-1. マススペクトル

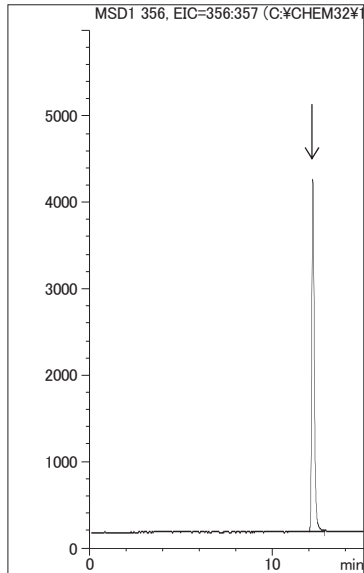
イミノクタジンのマススペクトルの一例 (正モード)



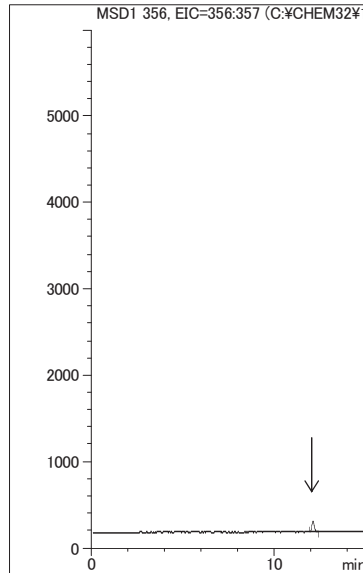
付図-2. イミノクタジンのクロマトグラム (代表例)

付図-2-1. 果肉

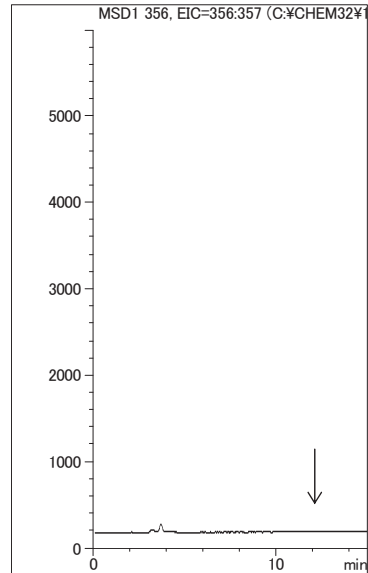
標準品 0.2 ng



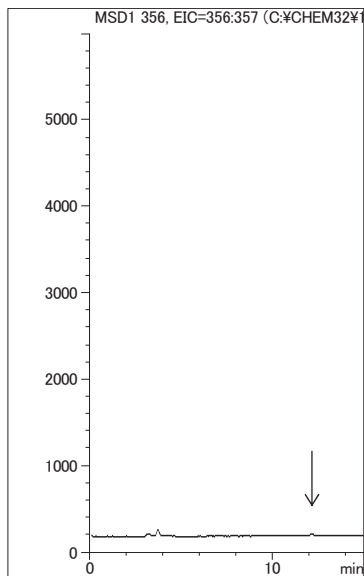
標準品 0.01 ng



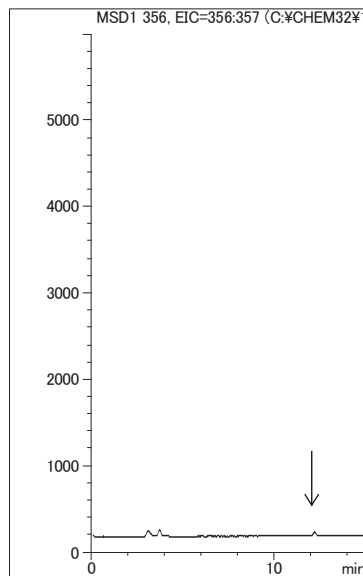
宮崎 無処理
2 μ L/4 mL/2 g



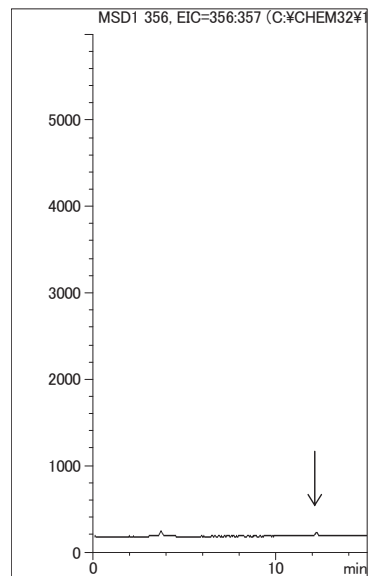
宮崎 5回処理 1日後
2 μ L/4 mL/2 g



宮崎 5回処理 3日後
2 μ L/4 mL/2 g

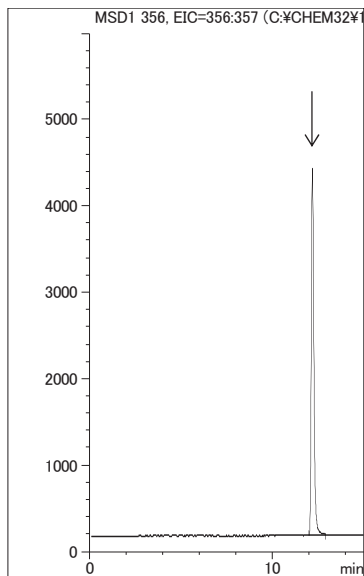


宮崎 5回処理 7日後
2 μ L/4 mL/2 g

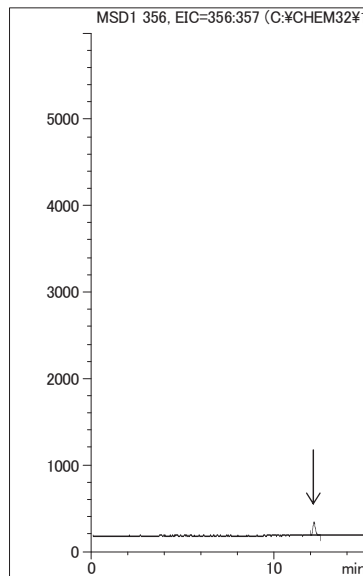


付図-2-2. 果実

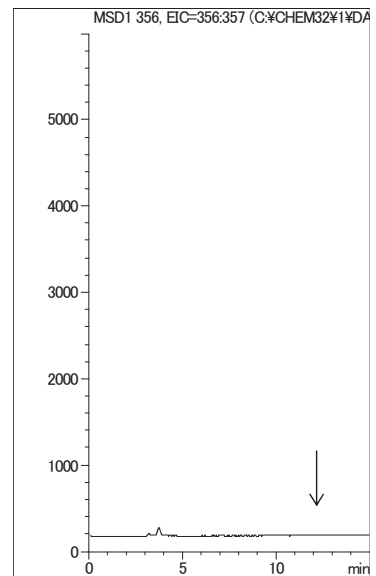
標準品 0.2 ng



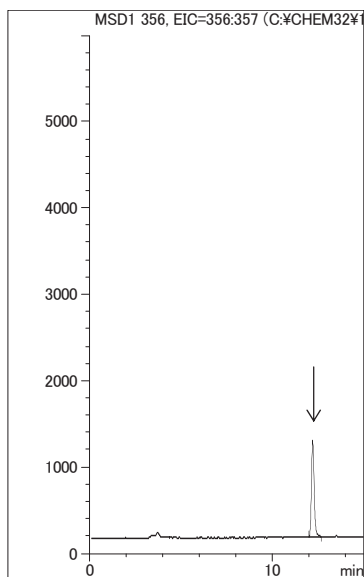
標準品 0.01 ng



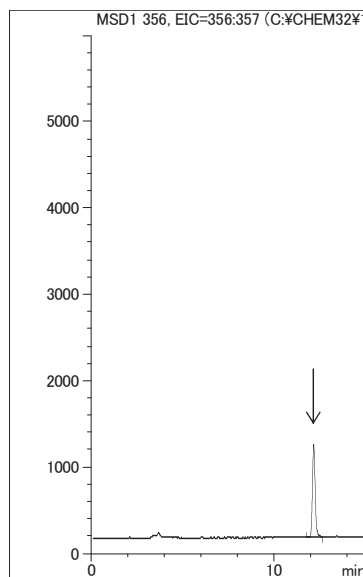
宮崎 無処理
2 μL/4 mL/2 g



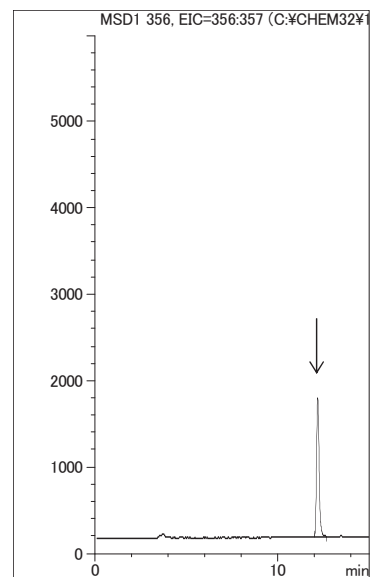
宮崎 3回処理7日後
2 μL/4 mL/2 g



宮崎 3回処理14日後
2 μL/4 mL/2 g



宮崎 3回処理21日後
2 μL/4 mL/2 g



平成26年度農薬登録における作物のグループ化の検討のための試験委託事業
作残留分析詳細⑤試料重量, 作物写真

1. 試料重量等

試料	処理 回数	経過 日数	平均重量 (kg/個)	総平均重量 (kg/個)	総重量 (kg)	総重量の平均 (kg)	重量比(%)		果皮の厚さ (mm)
							果肉	果皮	
茨城	0	—	1.86	2.01	22.3	13.3	94	6	1.2
	E	1	1.93		9.66		94	6	1.3
	E	3	2.04		10.2		94	6	1.3
	E	7	2.20		11.0		93	7	1.4
							<u>平均 94:6</u>		<u>平均 1.3</u>
高知	0	—	1.38	1.45	8.25	8.67	90	10	1.2
	E	1	1.42		8.52		92	8	1.3
	E	3	1.48		8.86		92	8	1.3
	E	7	1.51		9.05		91	9	1.4
							<u>平均 91:9</u>		<u>平均 1.3</u>
宮崎	0	—	2.29	2.24	34.3	18.6	85	15	1.8
	E	1	2.10		12.6		92	8	1.3
	E	3	2.25		13.5		93	7	1.8
	E	7	2.33		14.0		93	17	1.2
							<u>平均 91:9</u>		<u>平均 1.5</u>
3ほ場の総平均重量					3ほ場の総重量の平均				
1.90 kg/個					13.5				

E : クロチアニジンは3回処理

イミノクタジン, ペルメトリン及びMEPは5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

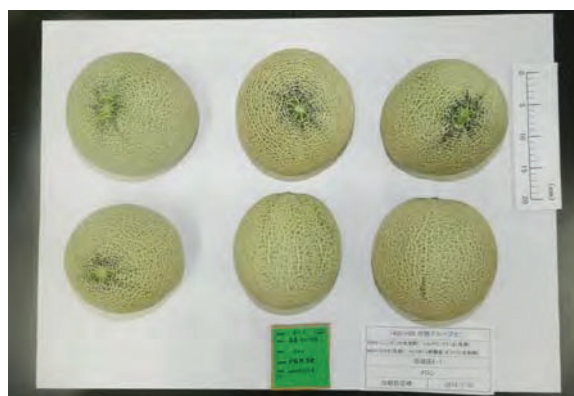


高知 処理3日後



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