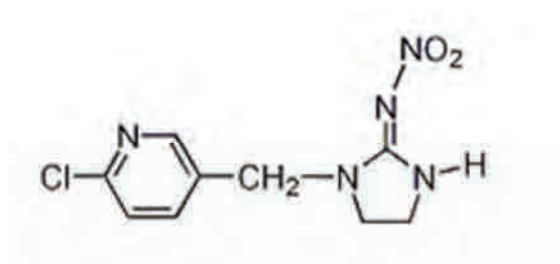


3. 分析方法の詳細

①イミダクロプリド

1. 分析対象物質

化学構造式：



化学名：(E)-1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine

化学式：C₉H₁₀ClN₅O₂

分子量：255.7

性状：無色結晶，弱い特異臭

融点：144 °C

蒸気圧：4×10⁻⁷ mPa (20 °C)， 9×10⁻⁷ mPa (25 °C)

オクタノール／水分配係数：log POW = 0.57 (21°C)

溶解性：水 0.61g/L (20°C)，ジクロロメタン 67 g/L，2-プロパノール 2.3 g/L，
トルエン 0.69 g/L (以上 20 °C)，ヘキサン <0.1g/L

安定性：pH 5～11 で加水分解に対して安定

出典：The Pesticide Manual 15th Edition

2. 標準品及び試薬

イミダクロプリド標準品：純度 99.5% (富士フイルム和光純薬工業株式会社製)
有効期限 2021 年 1 月

アセトン，ヘキサン，酢酸エチル：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)

その他の試薬：特級

水：ピュアライト PRA-0015-0V1 (オルガノ製) 及びピューリック ZII (オルガノ製) で精製したもの

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

シリカゲルミニカラム：Sep-Pak® Plus Silica Cartridges (Waters 製)

3. 装置及び機器

ミキサー：DLC-NXJ2（クイジナート製）

IFM-700G（岩谷産業株式会社製）

GM200（Retsgh 製）

ウルトラタックス：T25（IKA 製）

g グラフ／タンデム型質量分析計(LC-MS/MS)：6410 Triple Quand LC/MS

(Agilent Technologies 製)

データ処理ソフトウェア：Mass Hunter（Agilent Technologies 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：Inertsil ODS-SP（ジーエルサイエンス製）

内径 2.1mm, 長さ 150mm, 粒径 3 μ m

溶離液：A 液 4mM 酢酸アンモニウム及び 1%ギ酸含有水溶液

B 液 メタノール

送液条件：A 液：B 液 (v:v)

40：60（0～5 分）→15：85（5-12 分）→ 40：60（12-22 分）

流量：0.2mL/min

カラム温度：40℃

注入量：2 μ L

保持時間：約 2.8min

4.2 質量分析計の操作条件

イオン検出法：MRM 法

イオン化モード：エレクトロスプレーイオン化法（ESI），正モード

フラグメント電圧：100V

コリジョン電圧：10V

ガス温度：300℃

乾燥ガス：10.0mL/分

モニタリングイオン：プリカーサーイオン m/z 255.8

プロダクトイオン m/z 174.9

5. 検量線の作成

イミダクロプリド標準品 20.1mg を 20mL 容メスフラスコに精秤し、アセトニトリルで溶解して 1000mg/L 標準原液を調製した。この原液をアセトニトリルで希釈して 20mg/L 標準溶液を調製し、さらにこの標準溶液を分取し窒素気流下で乾固させた後にメタノールで希釈して 0.00025, 0.0005, 0.001, 0.005, 及び 0.01mg/L 標準溶液を調製した。この溶液を前記条件の LC-MS/MS に注入し、データ処理装置を用いてイミダクロ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り、Microsoft Excel を用いて検量線を作成した。

6. 分析操作

6.1 試料の前処理

受領・計量後，ズッキーニはへたを除去し，きゅうりは花卉が付着していた場合は取り除いた。福島植，奈良植，和歌山植の試料は直ちに磨砕均一化し，日植防茨城，日植防高知，日植防宮崎の試料は-20℃設定の冷凍庫内に有姿保存し，分析直前に半解凍の状態にしてミキサーを用いて磨砕均一化を行った。なお，試験2ではウルトラタックスもしくはミキサーから供試する試料の量に応じて，磨砕均一化が可能な機器を選択した。磨砕均一化には受領した試料全量を供試した。

6.2 抽出

均一化した試料から 20.0g を三角フラスコにはかりとり，アセトン 100mL を加え，振とう機を用いて 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 50mL で洗い，同様にろ過した。ろ液を合わせ，アセトンで 200mL に定容した。この 100mL（試料 10g 相当）をとり，40℃以下水浴中で約 17g まで減圧濃縮し，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

濃縮液に塩化ナトリウム 5g を加え混合した後，多孔性ケイソウ土カラムに移し 5 分間放置した。酢酸エチル 50mL で容器内を洗いこみ，多孔性ケイソウ土カラムに流下し，次いで酢酸エチル 150mL で容器内を洗いこみ，全流出液を合わせとり溶出液とした。この溶出液に 1%ジエチレングリコール含有アセトン溶液 1mL を添加し，40℃以下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 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アセトン 5mL 及びヘキサン 10mL を順次流下し前処理を行った。残留物を酢酸エチル/ヘキサン（50:50，v:v）5mL で溶解しシリカゲルミニカラムに流下した。流下後に同様の操作を行った。次に酢酸エチル 10mL をシリカゲルミニカラムに流下した。さらに，アセトン/酢酸エチル(50:50，v:v)20mL をシリカゲルミニカラムに流下した。これらの全流出液を合わせとり溶出液とした。この溶出液に 1%ジエチレングリコール含有アセトン溶液 1mL を添加し，40℃以下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で溶解した。この溶液を前記条件の LC-MS/MS に注入してピーク面積を求めた。また，検量線よりイミダクロプリドの重量を求め，試料中の残留濃度を解析用のエクセルファイルを用いて算出した。

7. 定量限界値及び検出限界値

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)
0.001	10	200	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)
0.0005	10	200	2	0.005

8. 妥当性確認

残留分析法の妥当性確認のため、「検量線の直線性」、「選択性」及び「回収率及び併行再現性」を確認した。

検量線の直線性は相関係数の 2 乗 (r^2) で評価し、常に r^2 が 0.9950 以上であった。また、選択性は無処理区試料及び超純水を用い、イミダクロプリドの保持時間にピークが無いことを確認した。福島植の各無処理試料を用いて、定量限界相当 (0.01mg/kg) 及び 1.0mg/kg 添加濃度における 5 連の繰り返し分析を実施した。また、実試料において 1.0mg/kg を超過した試料があったため、追加で 10.0mg/kg 添加濃度における 5 連の繰り返し分析を実施した。繰り返し分析の回収率と併行相対標準偏差(RSDr)の結果を以下に示した。

これらより採用した分析方法が妥当であることを確認した。

○評価基準

・ 検量線

相関係数の 2 乗が 0.9950 以上であること。

・ 回収率及び RSDr の評価基準

濃度 (ppm)	回収率の平均 (%)	RSDr (%)
0.001 超～0.01 以下	60 - 120	30 以下
0.01 超～0.1 以下	70 - 120	20 以下
0.1 超～1.0 以下	70 - 110	15 以下
1.0 超	70 - 110	10 以下

試料	添加濃度 (mg / kg)	回収率(%)					平均 回収率(%)	RSDr (%)
福島植 きゅうり	10.0	92	96	92	97	97	95	2.7
	1.0	94	95	90	95	95	94	2.3
	0.01	80	90	70	80	80	80	8.9
試料	添加濃度 (mg / kg)	回収率(%)					平均 回収率(%)	RSDr (%)
福島植 ズッキーニ	1.0	102	103	100	101	101	101	1.1
	0.01	80	70	80	70	80	76	7.2

9. 試料分析結果（試験 1）

無処理区を含む各試験の結果を表 9.1 及び表 9.2 に示した。分析は各々 2 連で行い、各分析値の差を「R」で示した。また、各 2 連の併行相対標準偏差（RSDr）を算出し、その値が下表で示した評価基準を満たすことを確認した。

○評価基準

濃度 (ppm)	RSDr (%)
0.001 超～0.01 以下	30 以下
0.01 超～0.1 以下	20 以下
0.1 超～1.0 以下	15 以下
1.0 超	10 以下

9.1 きゅうり

試料調製 圃場	処理後 経過日数	分析値① (mg / kg)	分析値② (mg / kg)	R	平均値 (mg / kg)	RSDr (%)
福島植	無処理区	<0.01	<0.01	—	<0.01	—
	最終散布1日後	0.10	0.09	0.01	0.10	8.9
	同7日後	0.03	0.03	0.00	0.03	0.0
	同14日後	<0.01	<0.01	—	<0.01	—
日植防 茨城	無処理区	<0.01	<0.01	—	<0.01	—
	最終散布1日後	0.08	0.08	0.00	0.08	0.0
	同7日後	0.03	0.03	0.00	0.03	0.0
	同14日後	0.01	0.01	0.00	0.01	0.0
奈良植	無処理区	<0.01	<0.01	—	<0.01	—
	最終散布1日後	0.09	0.08	0.01	0.08	11.1
	同7日後	0.02	0.02	0.00	0.02	0.0
	同14日後	<0.01	<0.01	—	<0.01	—
和歌山植	無処理区	<0.01	<0.01	—	<0.01	—
	最終散布1日後	0.07	0.07	0.00	0.07	0.0
	同7日後	0.02	0.02	0.00	0.02	0.0
	同14日後	<0.01	<0.01	—	<0.01	—
日植防 高知	無処理区	<0.01	<0.01	—	<0.01	—
	最終散布1日後	0.11	0.12	0.01	0.12	7.4
	同7日後	0.02	0.02	0.00	0.02	0.0
	同14日後	<0.01	<0.01	—	<0.01	—
日植防 宮崎	無処理区	<0.01	<0.01	—	<0.01	—
	最終散布1日後	0.10	0.11	0.01	0.10	8.9
	同7日後	0.03	0.03	0.00	0.03	0.0
	同14日後	0.01	0.01	0.00	0.01	0.0

9.2 ブッキーニ

試料調製 圃場	処理後 経過日数	分析値① (mg / kg)	分析値② (mg / kg)	R	平均値 (mg / kg)	RSDr (%)
福島植	無処理	<0.01	<0.01	—	<0.01	—
	最終散布1日後	0.08	0.07	0.01	0.08	11.1
	同7日後	0.01	0.01	0.00	0.01	0.0
	同14日後	<0.01	<0.01	—	<0.01	—
日植防 茨城	無処理	<0.01	<0.01	—	<0.01	—
	最終散布1日後	0.09	0.09	0.00	0.09	0.0
	同7日後	0.02	0.02	0.00	0.02	0.0
	同14日後	0.01	0.01	0.00	0.01	0.0
奈良植	無処理	<0.01	<0.01	—	<0.01	—
	最終散布1日後	0.10	0.10	0.00	0.10	0.0
	同7日後	0.01	0.01	0.00	0.01	0.0
	同14日後	<0.01	<0.01	—	<0.01	—
日植防 高知 (場内圃場)	無処理	<0.01	<0.01	—	<0.01	—
	最終散布1日後	0.08	0.09	0.01	0.08	11.1
	同7日後	0.01	0.01	0.00	0.01	0.0
	同14日後	<0.01	<0.01	—	<0.01	—
日植防 高知 (現地圃場)	無処理	<0.01	<0.01	—	<0.01	—
	最終散布1日後	0.09	0.09	0.00	0.09	0.0
	同7日後	<0.01	<0.01	—	<0.01	—
	同14日後	<0.01	<0.01	—	<0.01	—
日植防宮崎	無処理	<0.01	<0.01	—	<0.01	—
	最終散布1日後	0.08	0.09	0.01	0.08	11.1
	同7日後	<0.01	<0.01	—	<0.01	—
	同14日後	<0.01	<0.01	—	<0.01	—

10. 試料分析結果（試験 2）

無処理区を含む各試験の結果を表 10.1 及び表 10.2 に示した。分析は各々 2 連で行い、各分析値の差を「R」で示した。また、各 2 連の併行相対標準偏差（RSDr）を算出し、その値が「9.試料分析結果（試験 1）」で示した評価基準を満たすことを確認した。

10.1 きゅうり

試験区	処理条件	処理後 経過日数	分析値① (mg / kg)	分析値② (mg / kg)	R	平均値 (mg / kg)	RSDr (%)
処理区1	定植時粒剤処理 ＋ 生育期2回散布 (果実1回)	第2回処理当日	3.66	－ ※	－	3.66	－
		処理3日後	0.10	－ ※	－	0.10	－
		同5日後	0.03	－ ※	－	0.03	－
		同7日後	0.04	－ ※	－	0.04	－
		同10日後	0.01	－ ※	－	0.01	－
		同14日後	<0.01	<0.01	－	<0.01	－
処理区2	定植時粒剤処理 ＋ 生育期2回散布 (果実2回)	第2回処理当日	0.77	－ ※	－	0.77	－
		処理3日後	0.32	－ ※	－	0.32	－
		同7日後	0.03	0.03	0.00	0.03	0.0
		同10日後	<0.01	<0.01	－	<0.01	－
無処理区	－	－	<0.01	<0.01	－	<0.01	－

※試料が小さかったため、1 反復（試料全量）で試験を実施した区

10.2 ブッキーニ

試験区	処理条件	処理後 経過日数	分析値① (mg / kg)	分析値② (mg / kg)	R	平均値 (mg / kg)	RSDr (%)
処理区1	定植時粒剤処理 ＋ 生育期2回散布 (果実1回)	第2回処理当日	0.70	－ ※	－	0.70	－
		処理3日後	0.06	－ ※	－	0.06	－
		同5日後	0.02	－ ※	－	0.02	－
		同7日後	0.01	－ ※	－	0.01	－
		同10日後	<0.01	<0.01	－	<0.01	－
		同14日後	<0.01	<0.01	－	<0.01	－
処理区2	定植時粒剤処理 ＋ 生育期2回散布 (果実2回)	第2回処理当日	0.27	－ ※	－	0.27	－
		処理3日後	0.08	0.09	0.01	0.08	11.1
		同7日後	0.02	0.02	0.00	0.02	0.0
		同10日後(未熟)	<0.01	<0.01	－	<0.01	－
		同10日後(規格)	<0.01	<0.01	－	<0.01	－
無処理区	－	－	<0.01	<0.01	－	<0.01	－

※試料が小さかったため、1 反復（試料全量）で試験を実施した区

11. 精度管理

内部精度管理として、各圃場の実試料分析と保存安定性試験を行うごとに、各 1 検体の無処理試料及びイミダクロプリド 0.1mg/kg 添加試料を併行分析した。回収率が 70%から 120%の間に含まれる、かつ無処理区試料からイミダクロプリドの保持時間に検出限界相当量の 30%に相当する面積値のピークが無い場合、分析の信頼性が確保されたと判断した。その結果、問題は認められなかった。

また、2018 年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。

精度管理結果（試験 1）

分析日※	試料調製圃場 (分析試料)	回収率 (%)	無処理区の分析値 (mg / kg)
2019/10/15	福島植(きゅうり)	81	<0.01
2019/10/23	福島植(ズッキーニ)	71	<0.01
2019/10/24	和歌山植(きゅうり)	73	<0.01
2019/10/25	奈良植(きゅうり)	71	<0.01
2019/10/28	奈良植(ズッキーニ)	88	<0.01
2019/10/29	福島植(きゅうり)	77	<0.01
2019/10/29	福島植(ズッキーニ)	70	<0.01
2019/10/29	和歌山植(きゅうり)	77	<0.01
2019/10/30	福島植(ズッキーニ)	70	<0.01
2019/10/31	奈良植(きゅうり)	75	<0.01
2019/10/31	奈良植(ズッキーニ)	75	<0.01
2019/11/5	奈良植(きゅうり)	70	<0.01
2019/11/5	奈良植(ズッキーニ)	71	<0.01
2019/11/8	日植防高知現地(ズッキーニ)	73	<0.01
2019/11/11	日植防高知現地(ズッキーニ)	73	<0.01
2019/11/14	日植防茨城(きゅうり)	72	<0.01
2019/11/15	日植防茨城(きゅうり)	79	<0.01
2019/11/18	日植防茨城(ズッキーニ)	73	<0.01
2019/11/20	日植防茨城(ズッキーニ)	73	<0.01
2019/11/21	日植防高知(きゅうり)	76	<0.01
2019/11/25	日植防高知(きゅうり)	75	<0.01
2019/11/27	日植防高知場内(ズッキーニ)	76	<0.01
2019/11/28	日植防高知場内(ズッキーニ)	73	<0.01
2019/12/2	日植防宮崎(ズッキーニ)	82	<0.01
2019/12/4	日植防宮崎(ズッキーニ)	84	<0.01
2019/12/5	日植防宮崎(きゅうり)	79	<0.01
2019/12/6	日植防宮崎(きゅうり)	70	<0.01

※分析日：抽出日

精度管理結果（試験 2）

分析日※	試料調製圃場 (分析試料)	回収率 (%)	無処理区の分析値 (mg / kg)
2019/12/9	日植防茨城(きゅうり)	76	<0.01
2019/12/11	日植防茨城(ズッキーニ)	74	<0.01
2019/12/13	日植防茨城(きゅうり)	71	<0.01
2020/1/10	日植防茨城(ズッキーニ)	82	<0.01
2020/1/14	日植防茨城(ズッキーニ)	86	<0.01
2020/1/15	日植防茨城(きゅうり)	81	<0.01
2020/1/16	日植防茨城(きゅうり)	80	<0.01

※分析日：抽出日

12. 保存安定性確認

均一化した無処理試料にイミダクロプリドを添加し、日植防茨城、日植防高知、日植防宮崎の試料は冷凍暗所（－20℃に設定）に凍結保存した。また、福島植、奈良植、和歌山植の無処理区試料は抽出操作後にイミダクロプリドを添加し、抽出液を冷蔵暗所（5℃に設定）に冷蔵保存した。一定期間保存した後に実試料分析と同様に分析して回収率を求め、回収率が70%以上得られた場合、安定であったと判断した。その結果、保存期間中の安定性に問題は認められなかった。

・きゅうり

圃場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	実試料 最長保管 日数	回収率 (%)		平均 回収率 (%)
福島植	1	52	45	94	102	98
日植防茨城	1	37	36	85	85	85
奈良植	1	47	42	94	102	98
和歌山植	1	52	45	94	102	98
日植防高知	1	19	15	78	81	80
日植防宮崎	1	20	19	86	84	85

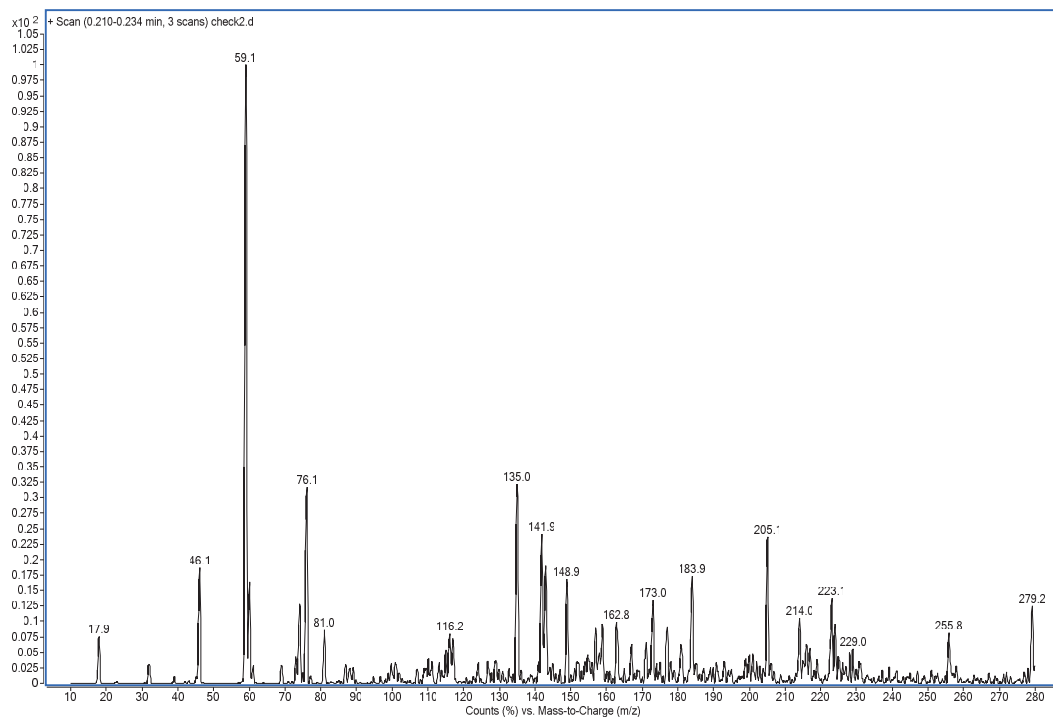
・ズッキーニ

圃場名	添加濃度 (mg/kg)	保存期間 (日)	実試料 最長保管 日数	回収率 (%)		平均 回収率 (%)
福島植	1	52	46	89	96	92
日植防茨城	1	42	40	90	100	95
奈良植	1	47	42	89	96	92
日植防高知(場内)	1	22	21	92	92	92
日植防高知(現地)	1	37	34	88	81	84
日植防宮崎	1	34	32	81	90	86

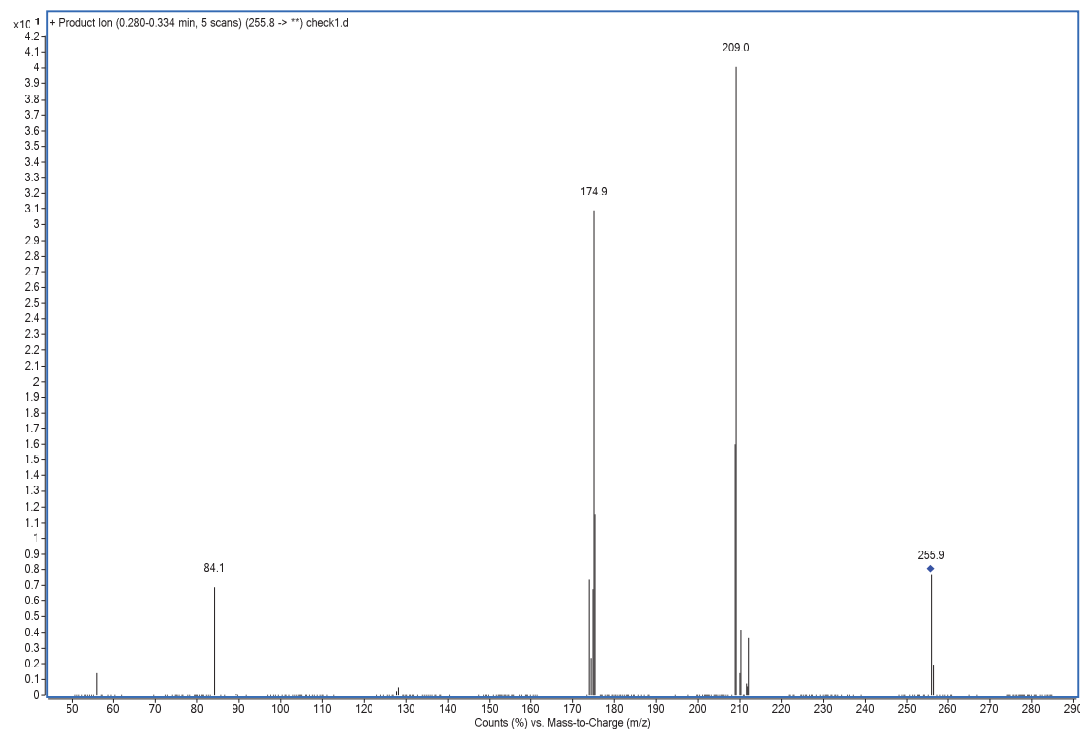
付図－1. イミダクロプリドのクロマトグラム

・マススペクトル

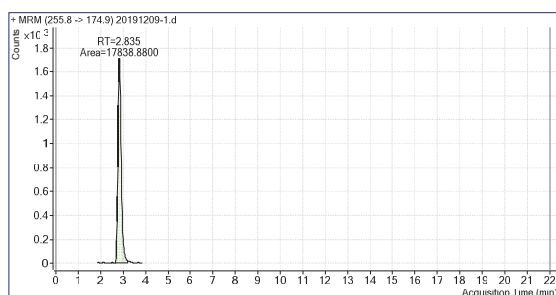
プリカーサーイオン： m/z 255.8



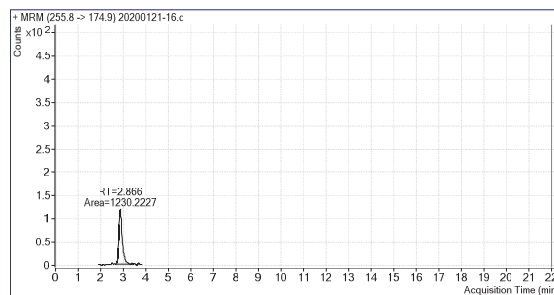
プロダクトイオン： m/z 174.9



・検量線の代表例

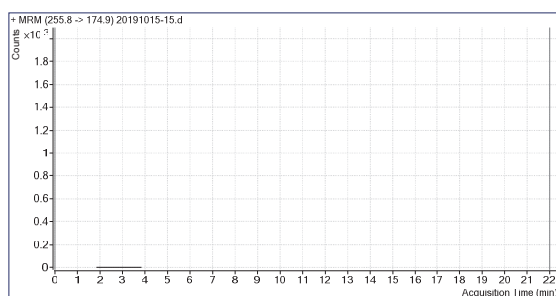


STD/0.02ng

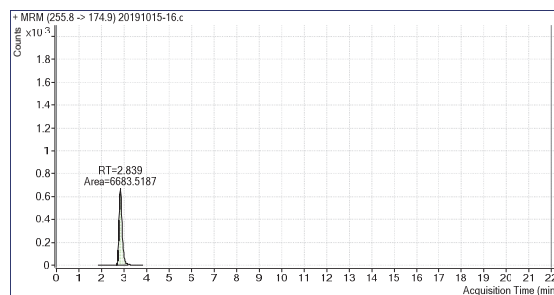


STD/0.001ng

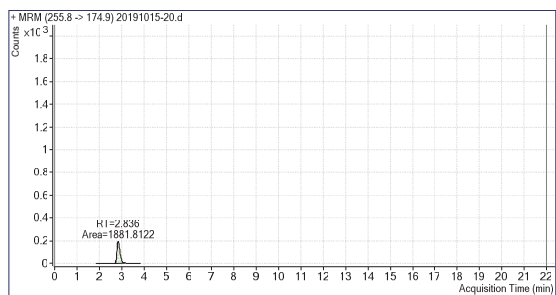
・試験 1 福島植（きゅうり）



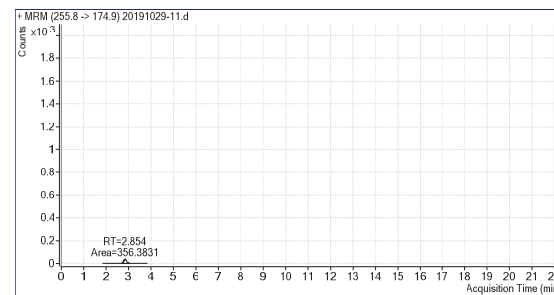
無処理区



処理 1 日後

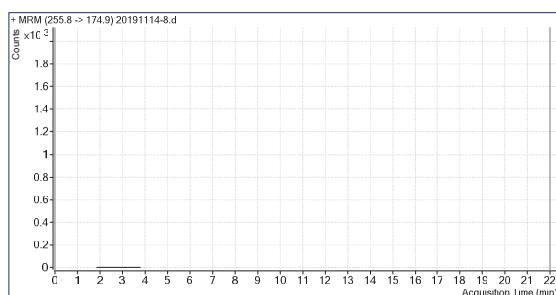


処理 7 日後

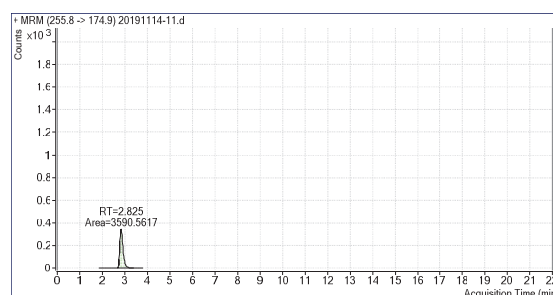


処理 14 日後

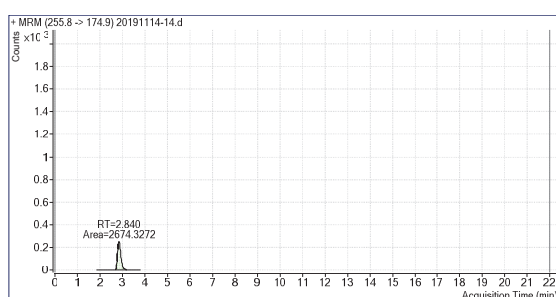
・試験 1 日植防茨城（きゅうり）



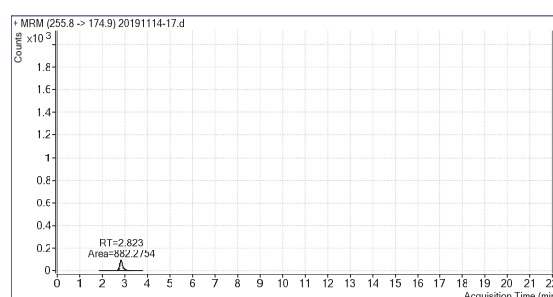
無処理区



処理 1 日後

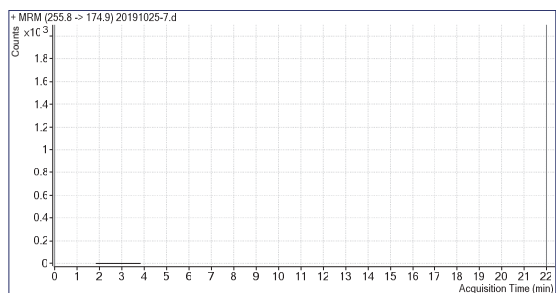


処理 7 日後

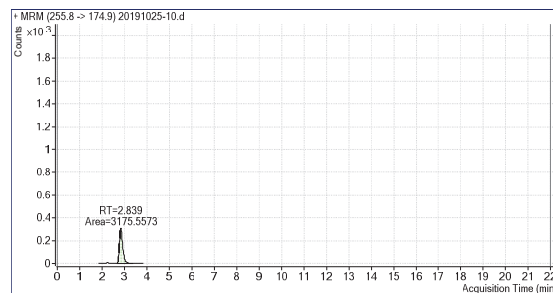


処理 14 日後

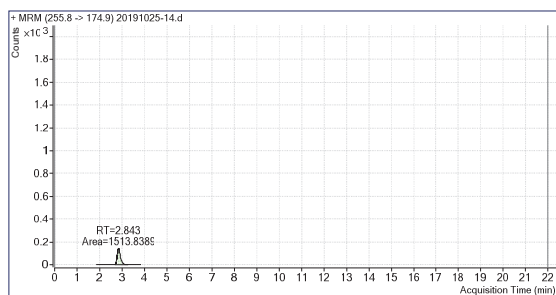
・試験 1 奈良植（きゅうり）



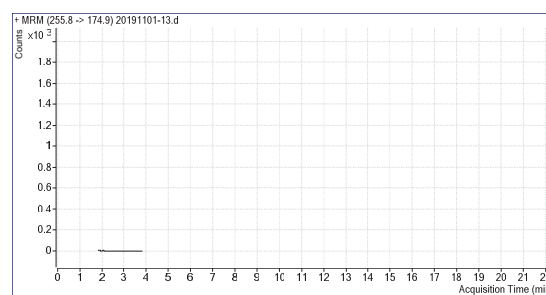
無処理区



処理 1 日後

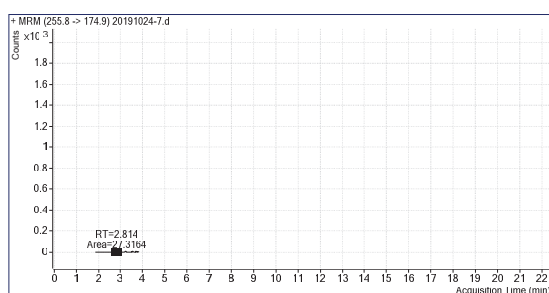


処理 7 日後

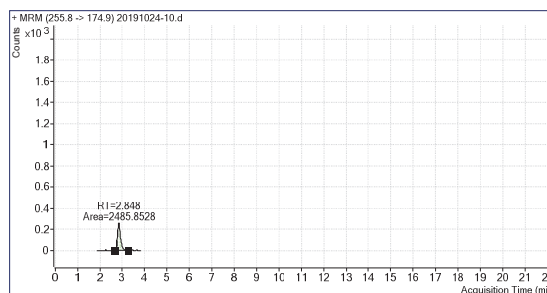


処理 14 日後

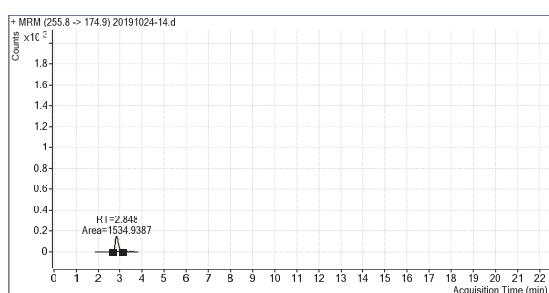
・試験 1 和歌山植（きゅうり）



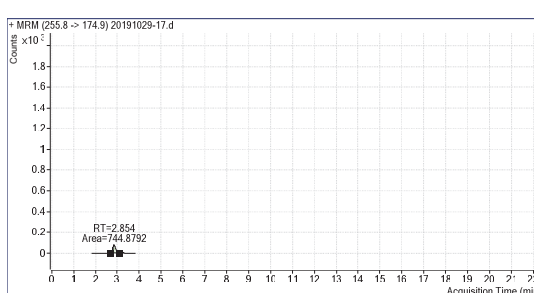
無処理区



処理 1 日後

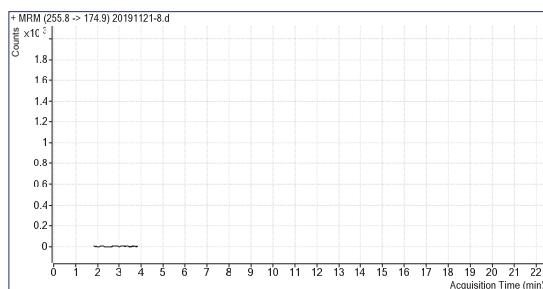


処理 7 日後

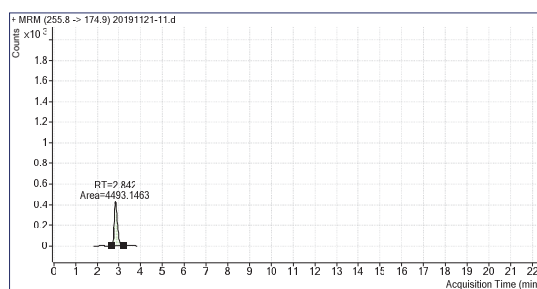


処理 14 日後

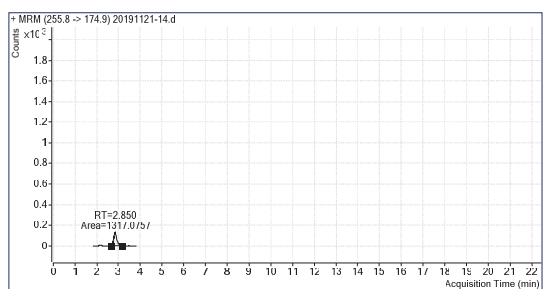
・試験 1 日植防高知（きゅうり）



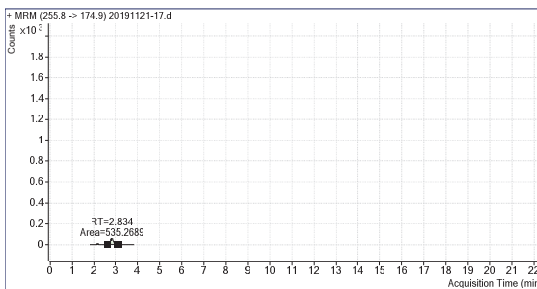
無処理区



処理 1 日後

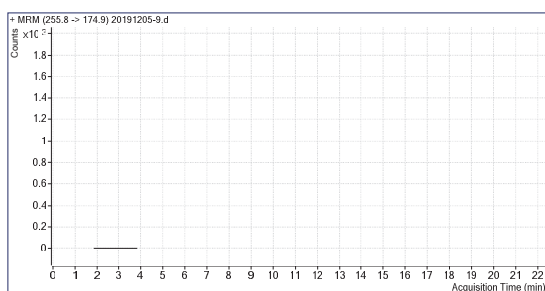


処理 7 日後

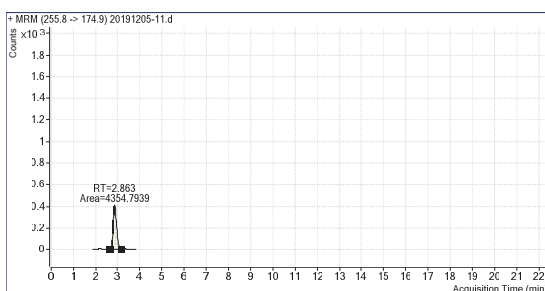


処理 14 日後

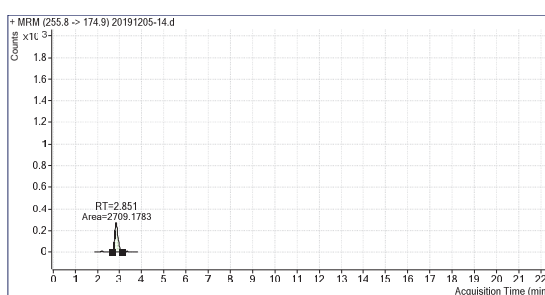
・試験 1 日植防宮崎（きゅうり）



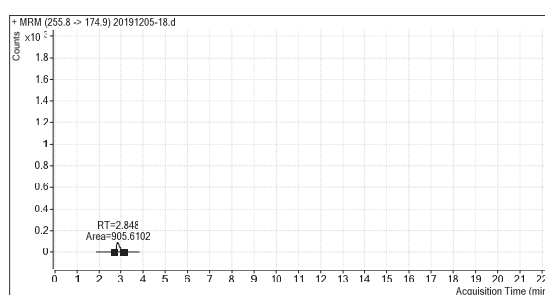
無処理区



処理 1 日後

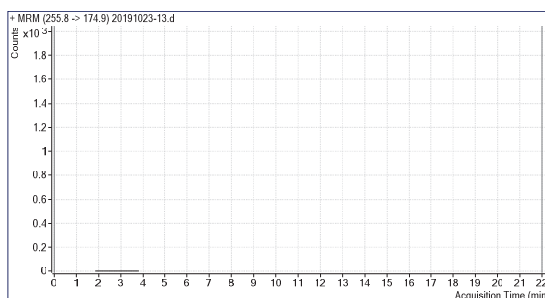


処理 7 日後

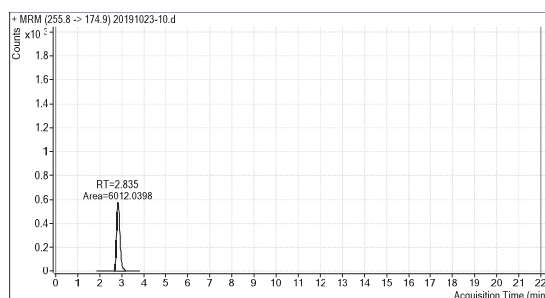


処理 14 日後

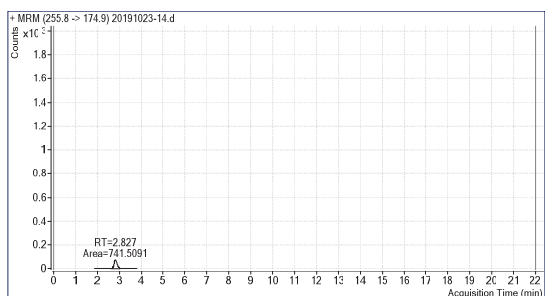
・試験 1 ブッキーニ（福島植）



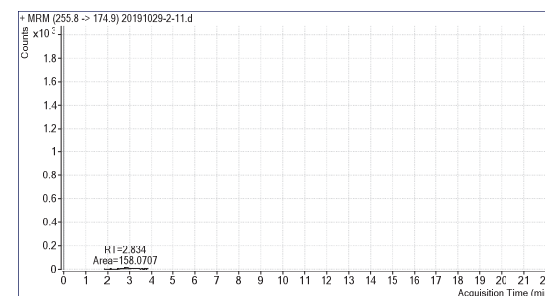
無処理区



処理 1 日後

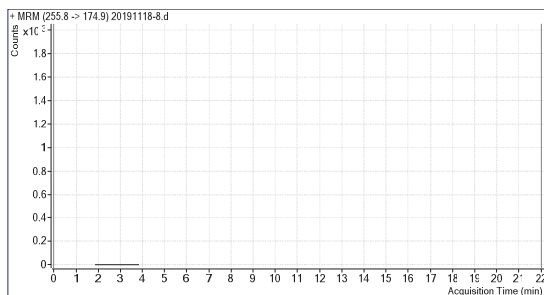


処理 7 日後

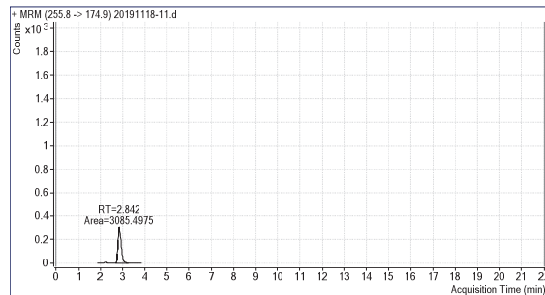


処理 14 日後

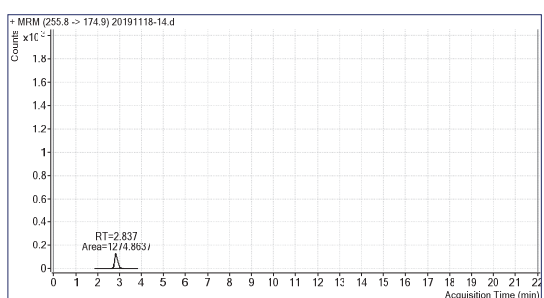
・試験 1 日植防茨城（ズッキーニ）



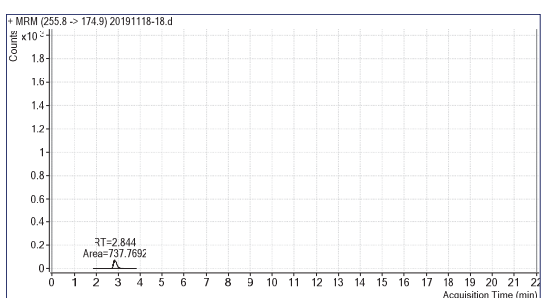
無処理区



処理 1 日後

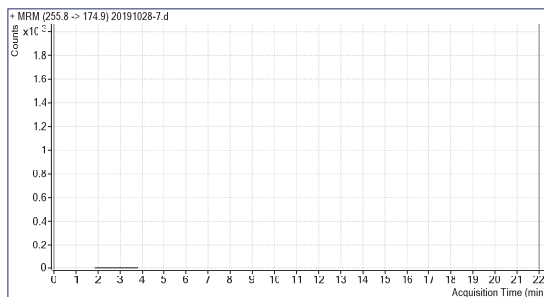


処理 7 日後

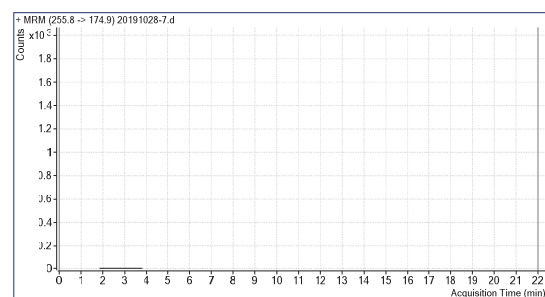


処理 14 日後

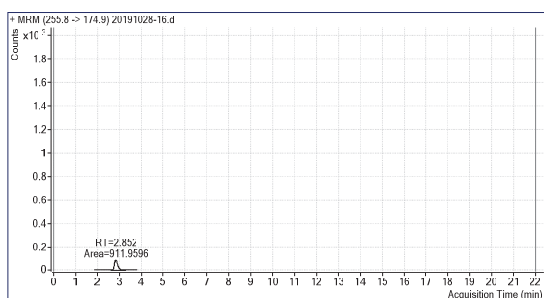
・試験 1 奈良植（ズッキーニ）



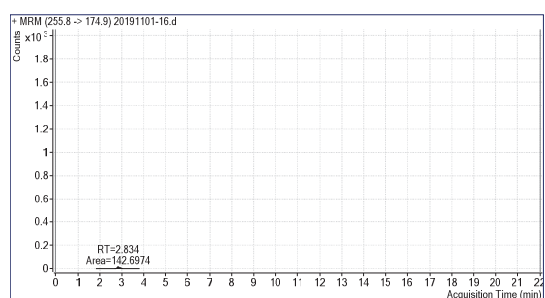
無処理区



処理 1 日後

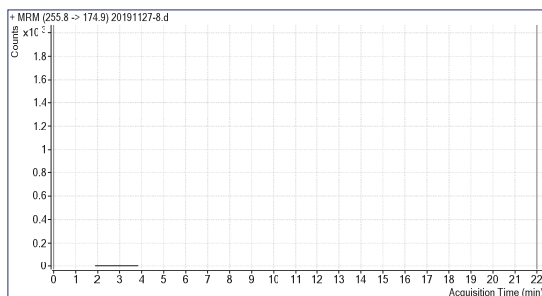


処理 7 日後

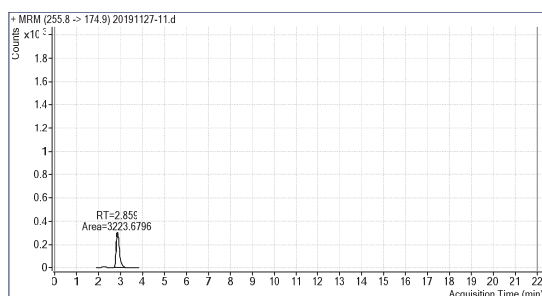


処理 14 日後

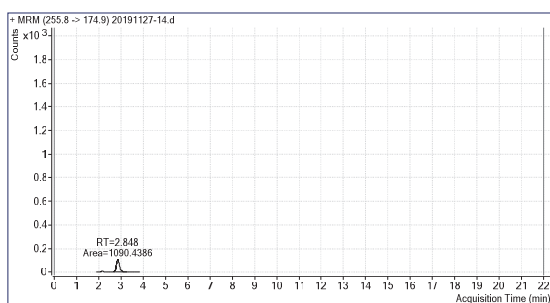
・試験 1 日植防高知，場内（ズッキーニ）



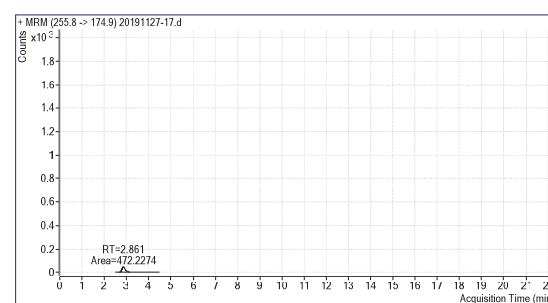
無処理区



処理 1 日後

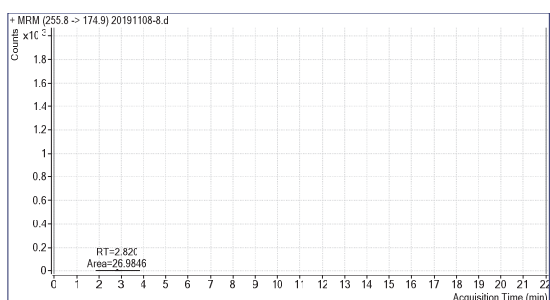


処理 7 日後

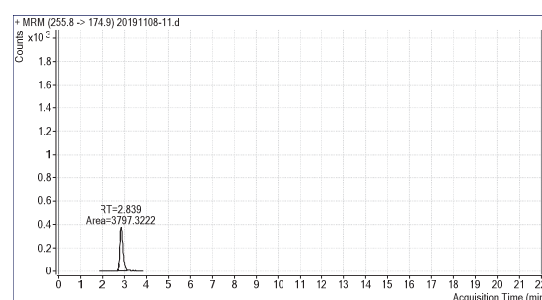


処理 14 日後

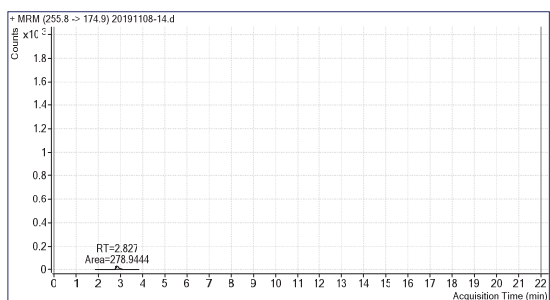
・試験 1 日植防高知，現地（ズッキーニ）



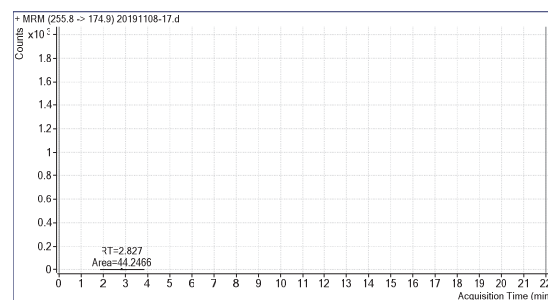
無処理区



処理 1 日後

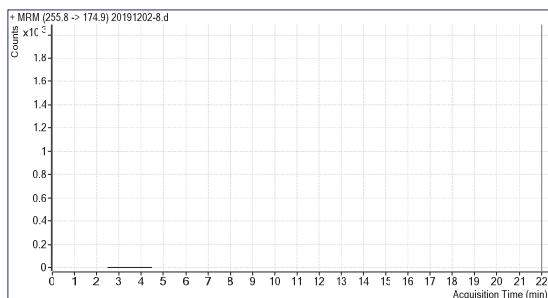


処理 7 日後

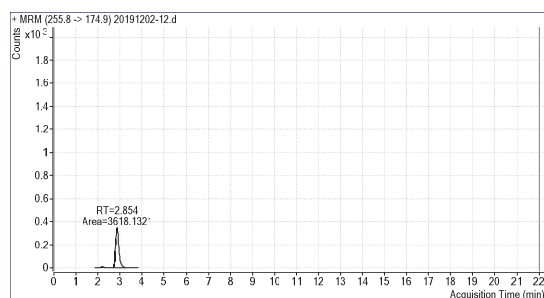


処理 14 日後

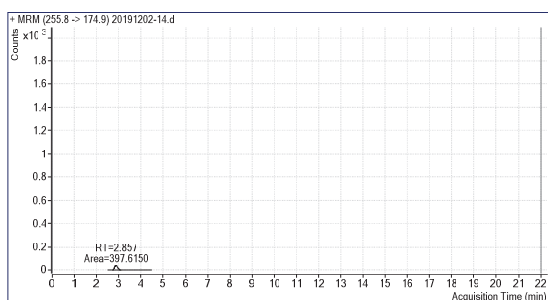
・試験 1 日植防宮崎（ズッキーニ）



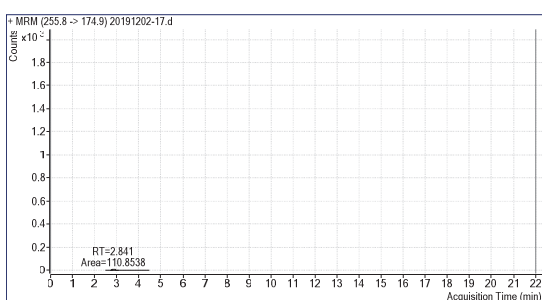
無処理区



処理 1 日後

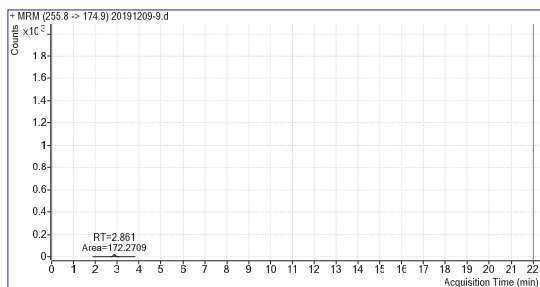


処理 7 日後

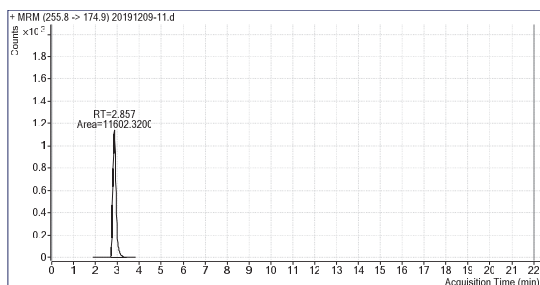


処理 14 日後

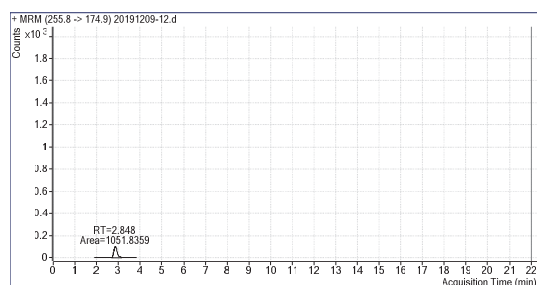
・試験 2 きゅうり



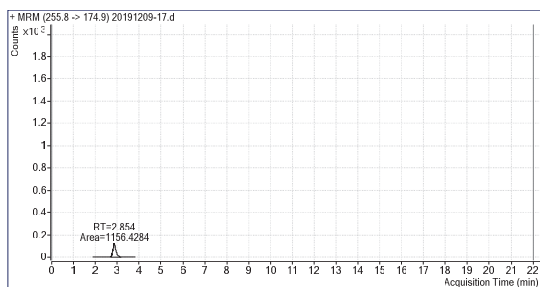
無処理区



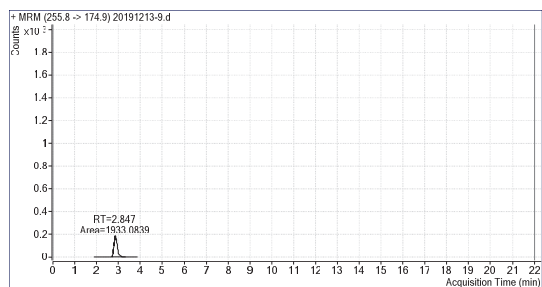
処理区 1 1 日後



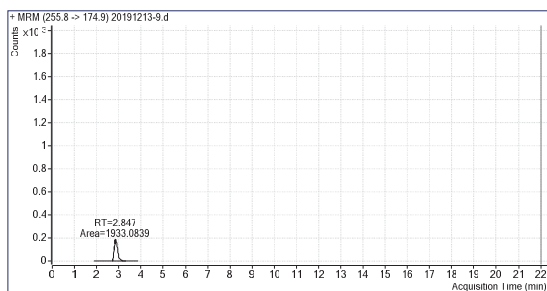
処理区 1 3 日後



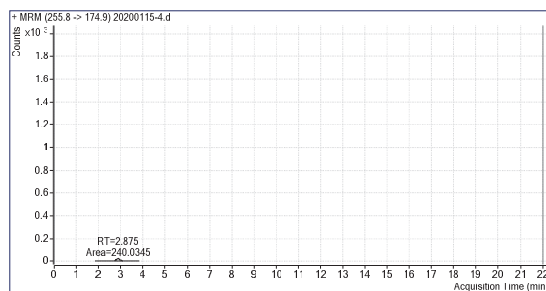
処理区 1 5 日後



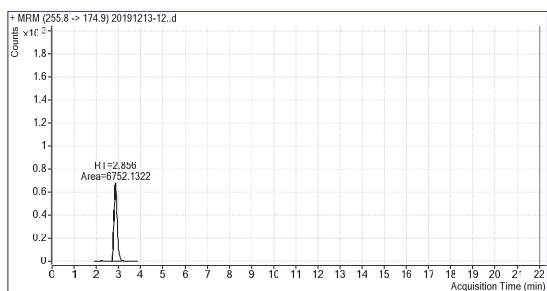
処理区 1 7 日後



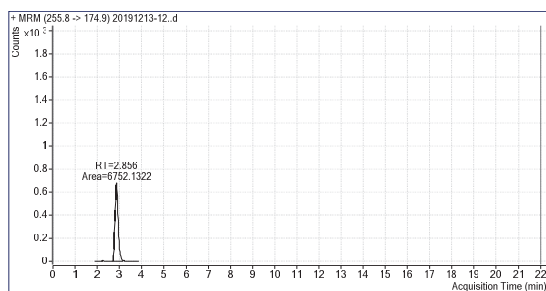
処理区 1 10 日後



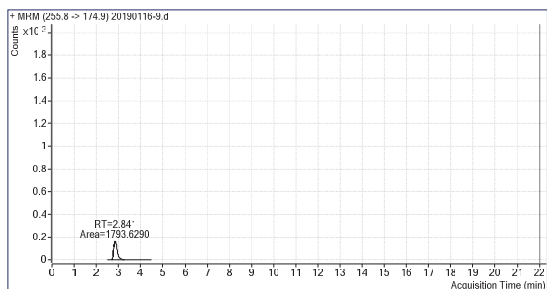
処理区 1 14 日後



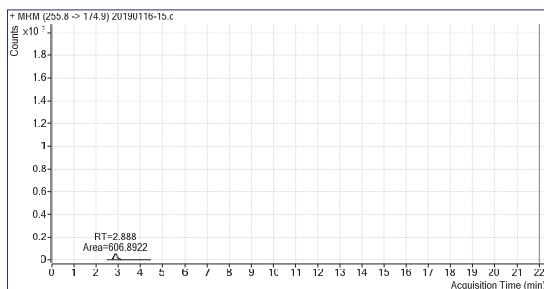
処理区 2 1 日後



処理区 2 3 日後

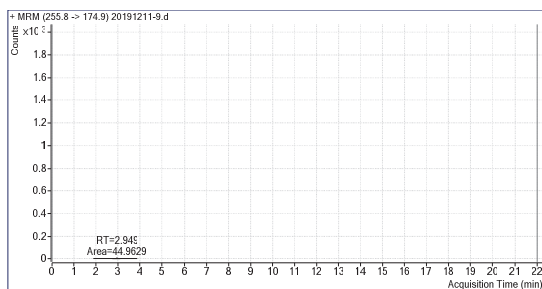


処理区 2 7 日後

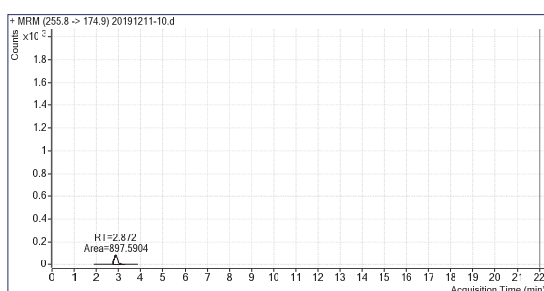


処理区 2 10 日後

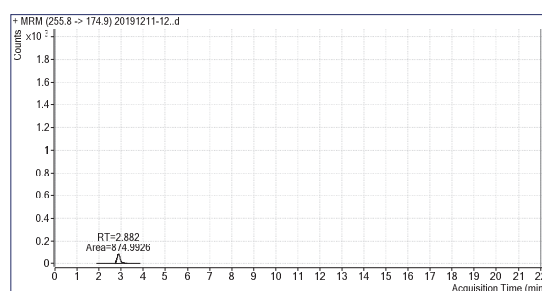
・試験 2 ブッキーニ



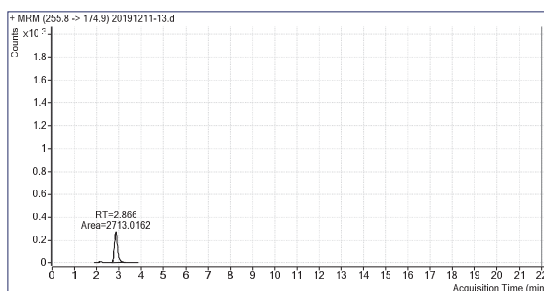
無処理区



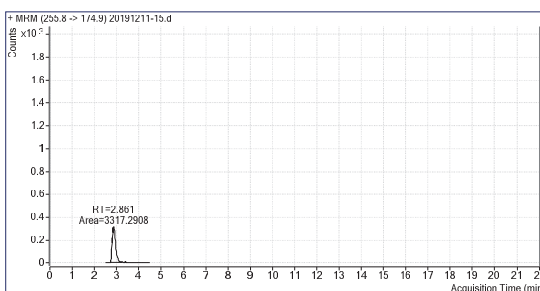
処理区 1 1日後



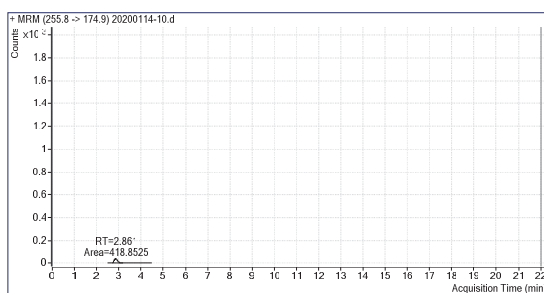
処理区 1 3日後



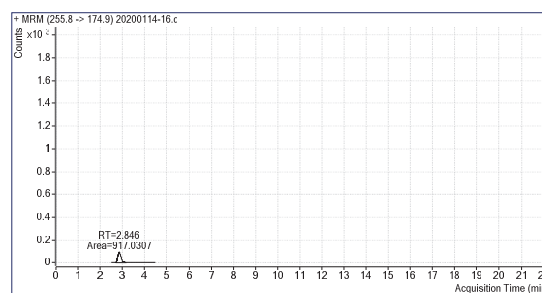
処理区 1 5日後



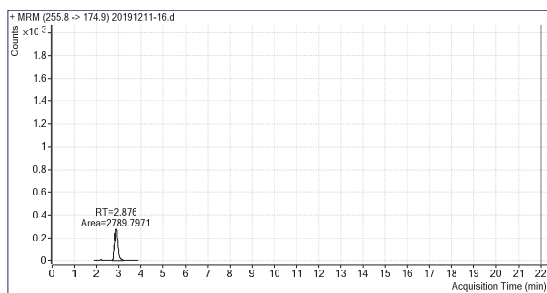
処理区 1 7日後



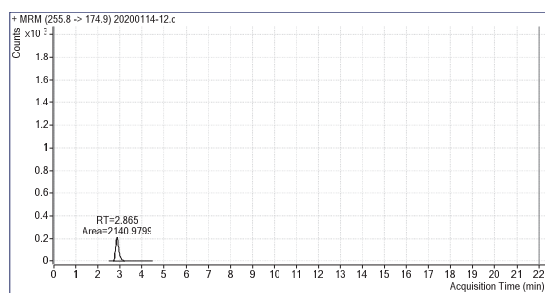
処理区 1 10日後



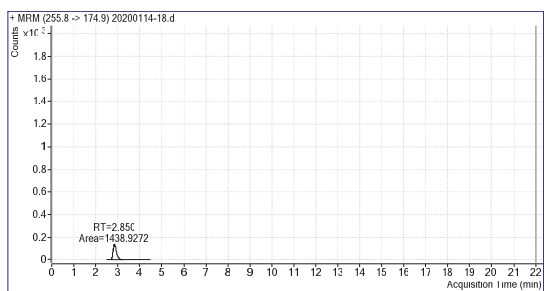
処理区 1 14日後



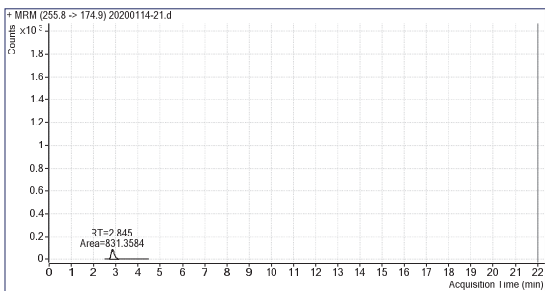
処理区 2 1 日後



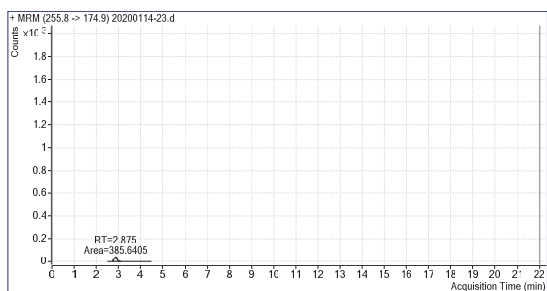
処理区 2 3 日後



処理区 2 7 日後



処理区 2 10 日後 (小型)



処理区 2 10 日後 (大型)