

第2節 多成分系統的分析法

1 有機塩素系及び酸アミド系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法

(1) 分析対象化合物

A グループ α -BHC、 β -BHC、 γ -BHC、 δ -BHC、*o,p'*-DDD、*p,p'*-DDD、*o,p'*-DDE、*p,p'*-DDE、*o,p'*-DDT、*p,p'*-DDT、アルドリン、 α -エンドスルファン、エンドリン、オキシクロルデン、*cis*-クロルデン、*trans*-クロルデン、ディルドリン、ニトロフェン、*cis*-ノナクロール、*trans*-ノナクロール、ヘキサクロロベンゼン、ヘプタクロール、ヘプタクロールエポキシド及びメトキシクロール (24 成分)

B グループ アラクロール、 β -エンドスルファン、エンドスルファンスルフェート、クロルベンジレート、ジクロラン、ブタクロール、プレチラクロール及びメトラクロール (8 成分)

(2) 分析法

A 試薬の調製

A グループ農薬混合標準液 α -BHC [C₆H₆Cl₆]、 β -BHC [C₆H₆Cl₆]、 γ -BHC [C₆H₆Cl₆]、 δ -BHC [C₆H₆Cl₆]、*o,p'*-DDD [C₁₄H₁₀Cl₄]、*p,p'*-DDD [C₁₄H₁₀Cl₄]、*o,p'*-DDE [C₁₄H₈Cl₄]、*p,p'*-DDE [C₁₄H₈Cl₄]、*o,p'*-DDT [C₁₄H₉Cl₅]、*p,p'*-DDT [C₁₄H₉Cl₅]、アルドリン [C₁₂H₈Cl₆]、 α -エンドスルファン [C₉H₆Cl₆O₃S]、エンドリン [C₁₂H₈Cl₆O]、オキシクロルデン [C₁₀H₄Cl₈O]、*cis*-クロルデン [C₁₀H₆Cl₈]、*trans*-クロルデン [C₁₀H₆Cl₈]、ディルドリン [C₁₂H₈Cl₆O]、ニトロフェン [C₁₂H₇Cl₂NO₃]、*cis*-ノナクロール [C₁₀H₅Cl₉]、*trans*-ノナクロール [C₁₀H₅Cl₉]、ヘキサクロロベンゼン [C₆Cl₆]、ヘプタクロール [C₁₀H₅Cl₇]、ヘプタクロールエポキシド [C₁₀H₅Cl₇O]、メトキシクロール [C₁₆H₁₅Cl₃O₂] 各 20 mg を正確に量ってそれぞれ 100 mL の全量フラスコに入れ、アセトン 20 mL を加えて溶かす。更に各全量フラスコの標線まで 2,2,4-トリメチルペンタンを加えて各 A グループ農薬標準原液を調製する (これらの液各 1 mL は、各農薬としてそれぞれ 0.2 mg を含有する。)

使用に際して、各標準原液の一定量を混合し、2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) で正確に希釈し、1 mL 中に各 A グループ農薬としてそれぞれ 0.01~0.2 μ g を含有する数点の A グループ農薬混合標準液を調製する。

B グループ農薬混合標準液 アラクロール [C₁₄H₂₀ClNO₂]、 β -エンドスルファン [C₉H₆Cl₆O₃S]、エンドスルファンスルフェート [C₉H₆Cl₆O₄S]、クロルベンジレート [C₁₆H₁₄Cl₂O₃]、ジクロラン [C₆H₄Cl₂N₂O₂]、ブタクロール [C₁₇H₂₆ClNO₂]、プレチラクロール [C₁₇H₂₆ClNO₂] 及びメトラクロール [C₁₅H₂₂ClNO₂] 各 20 mg を正確に量ってそれぞれ 100 mL の全量フラスコに入れ、アセトン 20 mL を加えて溶かす。更に各全量フラスコの標線まで 2,2,4-トリメチルペンタンを加えて各 B グループ農薬標準原液を調製する (これらの液各 1 mL は、各農薬としてそれぞれ 0.2 mg を含有する。)

使用に際して、各標準原液の一定量を混合し、2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) で正確に希釈し、1 mL 中に各 B グループ農薬としてそれぞれ 0.01~0.2 μ g を含有する数点の B グループ農薬混合標準液を調製する。

B 定 量

抽出 試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水 (3+1) 20 mL を加えて潤し、10 分間静置後、更にアセトニトリル 100 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出する。300 mL のなす形フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した後、先の三角フラスコ及び残さを順次アセトニトリル 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過する。ろ液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮し、塩化ナトリウム飽和溶液 20 mL を加え、カラム処理 I に供する試料溶液とする。

カラム処理 I 試料溶液を多孔性ケイソウ土カラム (20 mL 保持用) に入れ、5 分間静置する。300 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン 20 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次カラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下し、定量する各農薬を溶出させる。更にヘキサン 60 mL をカラムに加えて同様に溶出させ、溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。シクロヘキサン-アセトン (4+1) 10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、メンブランフィルター (孔径 0.5 µm 以下) でろ過し、ゲル浸透クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

ゲル浸透クロマトグラフィー 試料溶液 5.0 mL をゲル浸透クロマトグラフに注入し、定量する各農薬が溶出する画分を 100 mL のなす形フラスコに分取し、40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

ヘキサン 2 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理 II に供する試料溶液とする。

ゲル浸透クロマトグラフィー 例

カラム：スチレンジビニルベンゼン共重合体カラム (内径 20 mm、長さ 300 mm、粒径 15 µm)

ガードカラム：スチレンジビニルベンゼン共重合体カラム (内径 20 mm、長さ 100 mm、粒径 15 µm)

溶離液：シクロヘキサン-アセトン (4+1)

流量：5 mL/min

分取画分：70~120 mL

カラム処理 II 合成ケイ酸マグネシウムミニカラム (910 mg) をヘキサン 5 mL で洗浄する。

50 mL のなす形フラスコ A をミニカラムの下に置き、試料溶液をミニカラムに入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン 2 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下させる。ヘキサノージェチルエーテル (9+1) 15 mL をミニカラムに加えて A グループ農薬を溶出させる。

次に、50 mL のなす形フラスコ B をミニカラムの下に置き換え、ヘキサン-アセトン (19+1) 15 mL をミニカラムに加えて B グループ農薬を溶出させる。

各溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) 2 mL ずつを正確に加えてそれぞれの残留物を溶かし、ガスクロマトグラフィーに供する試料溶液 A 及び B とする。

ガスクロマトグラフィー 試料溶液 A、各 A グループ農薬混合標準液、試料溶液 B、各 B グループ農薬混合標準液各 1 µL をガスクロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：電子捕獲検出器
 カ ラ ム：溶融石英製キャピラリーカラム (14 %シアノプロピルフェニル-86 %ジメチルポリシロキサンコーティング、内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 µm)

キャリアーガス：He (1.5 mL/min)

メイクアップガス：N₂ (60 mL/min)

試料導入法：スプリットレス (60 s)

試料導入部温度：250 °C

カラム槽温度：初期温度 60 °C (1 min 保持) →昇温 20 °C/min→180 °C →昇温 2 °C/min→260 °C→昇温 5 °C/min→275 °C (1 min 保持)

検出器温度：280 °C

計 算 得られたクロマトグラムから各ピーク高さを求めて検量線を作成し、試料中の各農薬量を算出する。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

(A グループ)

添加成分名	試料の種類	添加濃度 (µg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
α-BHC	鶏用配合飼料	10~100	3	82.7~97.7	5.7
	豚用配合飼料	10~100	3	78.3~87.7	7.5
	アルファルファ	10~100	3	77.0~92.0	6.0
β-BHC	鶏用配合飼料	10~100	3	87.7~96.3	7.5
	豚用配合飼料	10~100	3	87.7~100.0	6.1
	アルファルファ	10~100	3	85.0~96.0	3.5
γ-BHC	鶏用配合飼料	10~100	3	85.3~102.3	5.5
	豚用配合飼料	10~100	3	79.0~94.7	8.3
	アルファルファ	10~100	3	85.7~94.7	6.5

(A グループ) [続き]

添加成分名	試料の種類	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
δ -BHC	鶏用配合飼料	10~100	3	83.3~100.3	2.5
	豚用配合飼料	10~100	3	79.0~96.0	12.6
	アルファルファ	10~100	3	80.0~91.3	3.3
<i>o,p'</i> -DDD	鶏用配合飼料	10~100	3	90.0~94.0	3.1
	豚用配合飼料	10~100	3	85.0~97.7	6.2
	アルファルファ	10~100	3	85.3~105.7	8.2
<i>p,p'</i> -DDD	鶏用配合飼料	10~100	3	91.0~94.7	1.3
	豚用配合飼料	10~100	3	87.3~98.7	7.4
	アルファルファ	10~100	3	82.7~105.0	4.0
<i>o,p'</i> -DDE	鶏用配合飼料	10~100	3	91.3~102.3	6.4
	豚用配合飼料	10~100	3	86.0~97.3	6.3
	アルファルファ	10~100	3	87.3~101.3	1.7
<i>p,p'</i> -DDE	鶏用配合飼料	10~100	3	92.3~100.3	3.0
	豚用配合飼料	10~100	3	86.7~96.7	7.6
	アルファルファ	10~100	3	93.3~104.3	2.0
<i>o,p'</i> -DDT	鶏用配合飼料	10~100	3	93.7~99.0	4.0
	豚用配合飼料	10~100	3	92.0~96.0	9.5
	アルファルファ	10~100	3	97.7~104.3	3.1
<i>p,p'</i> -DDT	鶏用配合飼料	10~100	3	86.7~105.3	6.2
	豚用配合飼料	10~100	3	90.0~94.0	6.3
	アルファルファ	10~100	3	90.7~105.0	2.5
アルドリソ	鶏用配合飼料	10~100	3	86.7~108.3	3.6
	豚用配合飼料	10~100	3	84.7~92.3	6.0
	アルファルファ	10~100	3	85.3~97.3	4.6
α -エンドスルファン	鶏用配合飼料	10~100	3	87.7~97.0	9.6
	豚用配合飼料	10~100	3	81.0~93.7	5.6
	アルファルファ	10~100	3	93.7~96.3	8.0
エンドリン	鶏用配合飼料	10~100	3	91.3~106.7	8.5
	豚用配合飼料	10~100	3	91.7~96.7	7.5
	アルファルファ	10~100	3	92.7~97.0	2.2
オキシクロルデン	鶏用配合飼料	10~100	3	90.7~93.0	4.4
	豚用配合飼料	10~100	3	87.3~92.7	9.3
	アルファルファ	10~100	3	84.0~97.3	3.6
<i>cis</i> -クロルデン	鶏用配合飼料	10~100	3	96.0~103.3	5.1
	豚用配合飼料	10~100	3	89.7~95.0	6.4
	アルファルファ	10~100	3	94.7~103.7	8.3
<i>trans</i> -クロルデン	鶏用配合飼料	10~100	3	94.0~105.3	3.0
	豚用配合飼料	10~100	3	91.0~92.3	7.7
	アルファルファ	10~100	3	95.3~108.7	4.4

(A グループ) [続き]

添加成分名	試料の種類	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
ディルドリン	鶏用配合飼料	10~100	3	88.0~92.7	5.0
	豚用配合飼料	10~100	3	86.0~93.0	4.2
	アルファルファ	10~100	3	84.3~92.7	3.9
ニトロフェン	肉用牛肥育用配合飼料	10~100	3	95.9~100.2	10.7
	乳用牛飼育用配合飼料	10~100	3	110.3~113.0	13.8
	ライ麦	10~100	3	97.3~104.0	10.7
	アルファルファ	10~100	3	98.6~102.1	3.8
<i>cis</i> -ノナクロール	鶏用配合飼料	10~100	3	90.0~96.7	2.2
	豚用配合飼料	10~100	3	87.3~94.0	6.6
	アルファルファ	10~100	3	89.7~97.3	1.6
<i>trans</i> -ノナクロール	鶏用配合飼料	10~100	3	91.0~98.7	4.1
	豚用配合飼料	10~100	3	88.7~94.7	4.4
	アルファルファ	10~100	3	95.3~108.3	4.5
ヘキサクロロベンゼン	鶏用配合飼料	10~100	3	80.7~88.0	7.3
	豚用配合飼料	10~100	3	80.3~84.0	9.1
	アルファルファ	10~100	3	78.7~81.7	5.1
ヘプタクロル	鶏用配合飼料	10~100	3	90.7~106.0	3.4
	豚用配合飼料	10~100	3	86.0~101.7	3.9
	アルファルファ	10~100	3	92.7~105.3	8.2
ヘプタクロルエポキシド	鶏用配合飼料	10~100	3	86.7~94.3	2.7
	豚用配合飼料	10~100	3	84.7~94.3	6.0
	アルファルファ	10~100	3	85.7~95.3	2.4
メトキシクロール	鶏用配合飼料	50~500	3	87.3~105.7	8.0
	豚用配合飼料	50~500	3	92.3~101.3	6.0
	アルファルファ	50~500	3	98.7~104.7	2.3

(B グループ)

添加成分名	試料の種類	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
アラクロール	鶏用配合飼料	50~500	3	94.3~105.7	5.1
	豚用配合飼料	50~500	3	94.3~99.0	5.3
	アルファルファ	50~500	3	97.7~103.0	3.4
β -エンドスルファン	鶏用配合飼料	10~100	3	91.3~100.7	5.0
	豚用配合飼料	10~100	3	85.7~98.7	10.2
	アルファルファ	10~100	3	92.3~98.7	3.5
エンドスルファンスルフェート	鶏用配合飼料	10~100	3	89.7~91.0	6.7
	豚用配合飼料	10~100	3	84.0~92.3	9.3
	アルファルファ	10~100	3	80.7~107.3	5.0

(B グループ) [続き]

添加成分名	試料の種類	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
クロルベンジレート	鶏用配合飼料	50~500	3	78.7~87.7	4.6
	豚用配合飼料	50~500	3	77.0~86.7	6.0
	アルファルファ	50~500	3	78.3~93.7	6.0
ジクロラン	鶏用配合飼料	10~100	3	94.7~98.7	7.4
	豚用配合飼料	10~100	3	94.7~97.3	6.8
	アルファルファ	10~100	3	96.3~100.0	2.1
ブタクロール	鶏用配合飼料	50~500	3	92.3~101.0	6.9
	豚用配合飼料	50~500	3	89.7~96.7	8.7
	アルファルファ	50~500	3	88.7~102.0	2.8
プレチラクロール	鶏用配合飼料	50~500	3	93.3~102.3	7.9
	豚用配合飼料	50~500	3	89.3~98.3	4.5
	アルファルファ	50~500	3	93.3~100.0	3.1
メトラクロール	鶏用配合飼料	50~500	3	94.7~105.7	6.3
	豚用配合飼料	50~500	3	90.0~100.7	5.6
	アルファルファ	50~500	3	88.0~104.0	3.0

・共同試験

(A グループ)

成分名	試料の種類	試験室 数	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
α -BHC	鶏用配合飼料	4	20	84.2	10.0	7.8	0.36
β -BHC	鶏用配合飼料	4	20	99.0	11.2	11.5	0.52
γ -BHC	鶏用配合飼料	4	20	89.3	9.0	8.9	0.41
δ -BHC	鶏用配合飼料	4	20	92.7	9.0	9.0	0.41
<i>o,p'</i> -DDD	鶏用配合飼料	4	20	94.6	8.2	8.4	0.38
<i>p,p'</i> -DDD	鶏用配合飼料	4	20	91.1	8.1	8.7	0.40
<i>o,p'</i> -DDE	鶏用配合飼料	4	20	94.8	8.0	17.1	0.78
<i>p,p'</i> -DDE	鶏用配合飼料	4	20	92.4	8.9	9.3	0.42
<i>o,p'</i> -DDT	鶏用配合飼料	4	20	93.3	8.0	8.5	0.39
<i>p,p'</i> -DDT	鶏用配合飼料	4	20	93.5	7.6	8.0	0.36
アルドリソ	鶏用配合飼料	4	20	90.9	7.9	13.2	0.60
α -エンドスルファン	鶏用配合飼料	4	20	95.8	7.6	7.9	0.36
エンドリン	鶏用配合飼料	4	20	102.0	9.0	17.0	0.77
オキシクロルデン	鶏用配合飼料	4	20	88.1	9.0	9.5	0.43
<i>cis</i> -クロルデン	鶏用配合飼料	4	20	98.8	7.7	7.0	0.32
<i>trans</i> -クロルデン	鶏用配合飼料	4	20	101.2	7.3	7.6	0.35
ディルドリン	鶏用配合飼料	4	20	86.0	11.8	15.3	0.70
ニトロフェン	乳用牛飼育用配合飼料	6	100	85.5	2.4	14.4	0.65
	ライ麦		100	94.4	6.3	8.3	0.38
<i>cis</i> -ノナクロール	鶏用配合飼料	4	20	92.3	8.2	6.6	0.30
<i>trans</i> -ノナクロール	鶏用配合飼料	4	20	100.0	7.1	5.9	0.27
ヘキサクロロベンゼン	鶏用配合飼料	4	20	78.0	13.6	12.3	0.56
ヘブタクロール	鶏用配合飼料	4	20	90.3	8.5	11.6	0.53
ヘブタクロールエポキシド	鶏用配合飼料	4	20	90.6	8.3	6.3	0.29
メトキシクロール	鶏用配合飼料	4	100	97.3	7.2	7.8	0.35

(B グループ)

成分名	試料の種類	試験室数	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD_r (%)	室間再現精度 RSD_R (%)	HorRat
アラクロール	鶏用配合飼料	4	100	95.5	6.0	9.1	0.41
β -エンドスルファン	鶏用配合飼料	4	20	98.5	4.3	13.0	0.59
エンドスルファンスルフェート	鶏用配合飼料	4	20	100.0	6.0	16.6	0.75
クロルベンジレート	鶏用配合飼料	4	100	89.1	8.2	25.6	1.16
ジクロラン	鶏用配合飼料	4	20	93.1	12.6	14.0	0.64
ブタクロール	鶏用配合飼料	4	100	94.7	5.3	11.8	0.54
プレチクロール	鶏用配合飼料	4	100	99.7	8.0	13.6	0.62
メトラクロール	鶏用配合飼料	4	100	98.0	5.0	13.1	0.59

・ 定量下限

メトキシクロール、アラクロール、クロルベンジレート、ブタクロール、プレチクロール及びメトラクロール：試料中 各 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$

その他の農薬：試料中 各 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$

2 有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法 (その 1)

(1) 分析対象化合物

- A グループ農薬 EPN、イプロベンホス、エチオン、エディフェンホス、エトリムホス、カルボフェノチオン、クロルフェンビンホス (*E* 体)、クロルフェンビンホス (*Z* 体)、ダイアジノン、テルブホス、トルクロホスメチル、ピリミホスメチル、フェニトロチオン、フェンチオン、フェントエート、プロチオホス、ホサロン、ホスメット、ホレート、マラチオン及びメチダチオン (21 成分)
- B グループ農薬 エトプロホス、キナルホス、クロルピリホス、クロルピリホスメチル、パラチオン、パラチオンメチル及びメカルバム (7 成分)
- C グループ農薬 アセフェート、イソフェンホス、イソフェンホスオキソン、ジクロルボス、ジメトエート、フェンスルホチオン及びモノクロトホス (7 成分)

(2) 分析法

A 試薬の調製

- A グループ農薬混合標準液 EPN [$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{NO}_4\text{PS}$]、イプロベンホス [$\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{O}_3\text{PS}$]、エチオン [$\text{C}_9\text{H}_{22}\text{O}_4\text{P}_2\text{S}_4$]、エディフェンホス [$\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{O}_2\text{PS}_2$]、エトリムホス [$\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4\text{PS}$]、カルボフェノチオン [$\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{ClO}_2\text{PS}_3$]、クロルフェンビンホス (*E* 体) [$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{Cl}_3\text{O}_4\text{P}$]、クロルフェンビンホス (*Z* 体) [$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{Cl}_3\text{O}_4\text{P}$]、ダイアジノン [$\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3\text{PS}$]、テルブホス [$\text{C}_9\text{H}_{21}\text{O}_2\text{PS}_3$]、トルクロホスメチル [$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{O}_3\text{PS}$]、ピリミホスメチル [$\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_3\text{PS}$]、フェニトロチオン [$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{NO}_5\text{PS}$]、フェンチオン [$\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{O}_3\text{PS}_2$]、フェントエート [$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{O}_4\text{PS}_2$]、プロチオホス [$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{O}_2\text{PS}_2$]、ホサロン [$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{ClNO}_4\text{PS}_2$]、ホスメット [$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{NO}_4\text{PS}_2$]、ホレート [$\text{C}_7\text{H}_{17}\text{O}_2\text{PS}_3$]、マラチオン [$\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{O}_6\text{PS}_2$] 及びメチダチオン [$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_4\text{PS}_3$] 各 20 mg を正確に量ってそれぞれ 100 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトン 20 mL を加えて溶かし、更に各全量フラスコの標線まで 2,2,4-トリメチルペンタンを加えて各 A グループ農薬標準原液を調製する (これらの液各 1 mL は、各 A グループ農薬と

してそれぞれ 0.2 mg を含有する。)

使用に際して、各標準原液の一定量を混合し、2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) で正確に希釈し、1 mL 中に各 A グループ農薬として 0.1~2 µg を含有する数点の A グループ農薬混合標準液を調製する。

B・C グループ農薬混合標準液 アセフェート [C₄H₁₀NO₃PS]、イソフェンホス [C₁₅H₂₄NO₄PS]、イソフェンホスオキソン [C₁₅H₂₄NO₅P]、エトプロホス [C₈H₁₉O₂PS₂]、キナルホス [C₁₂H₁₅N₂O₃PS]、クロルピリホス [C₉H₁₁Cl₃NO₃PS]、クロルピリホスメチル [C₇H₇Cl₃NO₃PS]、ジクロルボス [C₄H₇Cl₂O₄P]、ジメトエート [C₅H₁₂NO₃PS₂]、パラチオン [C₁₀H₁₄NO₅PS]、パラチオンメチル [C₈H₁₀NO₅PS]、フェンスルホチオン [C₁₁H₁₇O₄PS₂]、メカルバム [C₁₀H₂₀NO₅PS₂] 及びモノクロトホス [C₇H₁₄NO₅P] 各 20 mg を正確に量ってそれぞれ 100 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトン 20 mL を加えて溶かし、更に各全量フラスコの標線まで 2,2,4-トリメチルペンタンを加えて各 B グループ農薬及び C グループ農薬標準原液を調製する (これらの液各 1 mL は、各 B グループ農薬又は C グループ農薬としてそれぞれ 0.2 mg を含有する。)

使用に際して、各標準原液の一定量を混合し、2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) で正確に希釈し、1 mL 中に各 B グループ農薬及び C グループ農薬として 0.1~2 µg を含有する数点の B・C グループ農薬混合標準液を調製する。

B 定 量

抽出 分析試料 5 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 5 mL を加え、30 分間静置後、更にアセトニトリル 50 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出する。300 mL のなす形フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した後、先の三角フラスコ及び残さを順次アセトニトリル 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過する。ろ液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

シクロヘキサン-アセトン (7+3) 10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、10 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離する。上澄み液をメンブランフィルター (孔径 5 µm 以下) でろ過し、A 及び B グループ農薬を定量する場合にはゲル浸透クロマトグラフィー (A・B) に、C グループ農薬を定量する場合にはゲル浸透クロマトグラフィー (C) にそれぞれ供する試料溶液とする。

ゲル浸透クロマトグラフィー (A・B) 試料溶液 5.0 mL をゲル浸透クロマトグラフに注入し、定量する各 A グループ及び B グループ農薬が溶出する画分を 200 mL のなす形フラスコに分取し、アセトン-ジエチレングリコール (100+1) 1 滴を加え、40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) 5 mL を正確に加えて残留物を溶かし、カラム処理 (A・B) に供する試料溶液とする。

ゲル浸透クロマトグラフ条件 例

カ ラ ム：スチレンジビニルベンゼン共重合体カラム (内径 20 mm、長さ 300 mm、粒径 15 µm)

溶 離 液：シクロヘキサン-アセトン (7+3)

流 速：5 mL/min

流 出 画 分：50~90 mL

カラム処理 (A・B) 試料溶液を合成ケイ酸マグネシウムミニカラム (500 mg)^{注1}に入れ、初めの流出液 1 mL を捨て、その後の流出液 1~2 mL をガスクロマトグラフィー (A) 及びガスクロマトグラフィー (B・C) にそれぞれ供する試料溶液とする。

ゲル浸透クロマトグラフィー (C) 試料溶液 5.0 mL をゲル浸透クロマトグラフに注入し、定量する各 C グループ農薬が溶出する画分を 200 mL なす形フラスコに分取し、40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

アセトン 5 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理 (C) に供する試料溶液とする。

ゲル浸透クロマトグラフ条件 例

カ ラ ム：スチレンジビニルベンゼン共重合体カラム (内径 20 mm、長さ 300 mm、粒径 15 µm)

溶 離 液：シクロヘキサン-アセトン (7+3)

流 速：5 mL/min

流 出 画 分：45~90 mL

カラム処理 (C) 活性炭ミニカラム (400 mg)^{注2}をアセトン 5 mL で洗浄する。

100 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、試料溶液をミニカラムに入れ、定量する各 C グループ農薬を流出させる。試料溶液の入っていたなす形フラスコをアセトン 5 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加えて同様に流出させる。更にアセトン 10 mL をミニカラムに加えて同様に流出させ、流出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) 5 mL を正確に加えて残留物を溶かし、ガスクロマトグラフィー (B・C) に供する試料溶液とする。

ガスクロマトグラフィー (A) 試料溶液及び各 A グループ農薬混合標準液各 1 µL をガスクロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：炎光光度検出器 (リン検出用フィルター)

カ ラ ム：熔融石英製キャピラリーカラム (5%ジフェニル-95%ジメチルポリシロキサンコーティング、内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 µm)

キャリアーガス：He (1.5 mL/min)

メイクアップガス：N₂ (30 mL/min)

水 素：75 mL/min

乾 燥 空 気：100 mL/min

試 料 導 入 法：スプリットレス (60 s)

試料導入部温度：240 °C

カラム槽温度：初期温度 60 °C (1 min 保持) →昇温 20 °C/min→170 °C、
昇温 2 °C/min→260 °C

検出器温度：270 °C

ガスクロマトグラフィー (B・C グループ) 試料溶液及び各 B・C グループ農
薬混合標準液各 1 µL をガスクロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検出器：炎光光度検出器 (リン検出用フィルター)

カラム：溶融石英製キャピラリーカラム (50 %トリフルオロプロ
ピルメチル-50 %ジメチルポリシロキサンコーティ
ング、内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 µm)

キャリアーガス：He (1.5 mL/min)

メイクアップガス：N₂ (30 mL/min)

水素：75 mL/min

乾燥空気：100 mL/min

試料導入法：スプリットレス (60 s)

試料導入部温度：210 °C

カラム槽温度：初期温度 60 °C (1 min 保持) →昇温 20 °C/min→150 °C
→昇温 2 °C/min→210 °C→昇温 5 °C/min→235 °C (7.5
min 保持)

検出器温度：240 °C

計算 得られたクロマトグラムから各ピーク高さ又は面積を求めて検量線
を作成し、試料中の各農薬量^{注3}を算出する。

注 1 AccuBOND[®] Florisil (リザーバー容量 3 mL、Agilent Technologies 製) 又は
これと同等のもの

2 Sep-Pak Plus AC-1 Cartridge (Waters 製) に適当な容量のリザーバーを接続
したもの又はこれと同等のもの

3 本法では、試料中にナレド [C₄H₇Br₂Cl₂O₄P] が含まれている場合には、ナレ
ドがジクロロボスに変換され、試料中のジクロロボス量に含まれる可能性があ
る。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

(A グループ)

添加成分名	試料の種類	添加濃度 (µg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
EPN	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	98.3~105.0	9.1
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	99.7~104.7	7.2
	アルファアルファ	200~2,000	3	85.3~97.7	7.4

(A グループ) [続き]

添加成分名	試料の種類	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
イプロベンホス	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	87.7~99.3	10.2
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	93.0~101.3	11.2
	アルファアルファ	200~2,000	3	86.0~94.0	7.3
エディフェンホス	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	101.3~113.7	3.1
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	100.3~114.0	6.1
	アルファアルファ	200~2,000	3	94.7~101.0	6.9
エチオン	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	84.0~97.0	6.2
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	90.3~96.7	8.4
	アルファアルファ	200~2,000	3	73.0~90.7	9.9
エトリムホス	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	95.3~101.7	5.0
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	99.7~105.0	4.4
	アルファアルファ	200~2,000	3	88.3~96.3	7.3
カルボフェノチオン	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	98.7~106.0	5.0
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	97.3~104.7	9.8
	アルファアルファ	200~2,000	3	93.3~97.0	10.0
クロルフェンビンホス (E体)	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	89.3~97.3	10.4
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	91.0~95.7	9.4
	アルファアルファ	200~2,000	3	79.0~93.7	9.1
クロルフェンビンホス (Z体)	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	92.3~98.0	4.9
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	95.3~103.3	5.3
	アルファアルファ	200~2,000	3	81.3~96.0	6.1
ダイアジノン	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	77.3~82.7	6.2
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	81.7~83.7	4.6
	アルファアルファ	200~2,000	3	74.3~83.7	13.3
テルブホス	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	77.3~87.3	10.0
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	80.0~87.0	10.0
	アルファアルファ	200~2,000	3	72.7~80.0	14.4
トルクロホスメチル	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	94.3~104.3	10.6
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	97.3~102.7	6.8
	アルファアルファ	200~2,000	3	89.3~99.0	8.1
ピリミホスメチル	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	98.0~101.0	6.9
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	94.0~107.0	8.9
	アルファアルファ	200~2,000	3	86.3~93.7	5.4
フェニトロチオン	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	97.0~109.7	6.4
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	99.0~110.3	6.9
	アルファアルファ	200~2,000	3	97.0~98.0	5.8
フェンチオン	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	91.0~94.7	11.5
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	84.0~93.0	8.2
	アルファアルファ	200~2,000	3	84.0~89.3	7.3

(A グループ) [続き]

添加成分名	試料の種類	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
フェントエート	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	95.0~102.7	4.9
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	97.0~102.7	4.7
	アルファアルファ	200~2,000	3	85.0~98.0	5.4
プロチオホス	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	96.0~104.0	3.8
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	98.7~102.7	6.2
	アルファアルファ	200~2,000	3	86.0~97.3	5.2
ホサロン	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	94.7~112.3	6.6
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	99.7~110.3	3.2
	アルファアルファ	200~2,000	3	91.3~97.3	5.9
ホスメット	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	97.7~112.3	2.6
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	100.7~106.7	8.7
	アルファアルファ	200~2,000	3	90.7~98.0	13.7
ホレート	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	87.7~88.3	8.3
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	86.3~88.7	8.5
	アルファアルファ	200~2,000	3	85.0~88.7	7.2
マラチオン	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	95.3~110.3	6.7
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	99.3~110.3	6.0
	アルファアルファ	200~2,000	3	91.3~99.7	7.1
メチダチオン	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	103.3~107.3	8.6
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	101.7~104.0	7.7
	アルファアルファ	200~2,000	3	92.7~104.3	3.3

(B グループ)

添加成分名	試料の種類	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
エトプロホス	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	104.0~112.0	11.1
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	101.7~106.0	7.4
	アルファアルファ	200~2,000	3	95.7~98.3	7.8
キナルホス	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	104.0~111.7	12.2
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	100.7~110.3	7.4
	アルファアルファ	200~2,000	3	98.0~102.0	8.1
クロルピリホス	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	102.7~108.0	11.2
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	99.7~104.7	7.4
	アルファアルファ	200~2,000	3	93.3~103.0	8.9
クロルピリホスメチル	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	106.3~107.7	11.2
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	99.7~111.7	9.6
	アルファアルファ	200~2,000	3	93.0~100.3	9.4
パラチオン	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	104.0~106.0	11.8
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	96.7~104.0	9.6
	アルファアルファ	200~2,000	3	95.7~99.7	8.5

(B グループ) [続き]

添加成分名	試料の種類	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
パラチオンメチル	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	103.7~107.7	7.6
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	96.3~105.3	10.7
	アルファルファ	200~2,000	3	91.0~94.7	14.4
メカルバム	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	106.7~112.7	12.1
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	100.7~107.7	7.4
	アルファルファ	200~2,000	3	93.7~100.0	14.5

(C グループ)

添加成分名	試料の種類	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
アセフェート	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	97.0~112.3	10.7
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	75.3~108.7	68.3
	アルファルファ	200~2,000	3	90.0~103.0	8.6
イソフェンホス	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	101.7~108.0	2.0
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	98.3~111.7	7.8
	アルファルファ	200~2,000	3	89.3~92.0	5.0
イソフェンホスオキソン	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	108.0~110.7	5.8
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	107.7~110.0	7.5
	アルファルファ	200~2,000	3	95.0~101.7	8.2
ジクロロボス	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	100.7~107.3	10.9
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	104.0~111.7	3.5
	アルファルファ	200~2,000	3	86.7~92.3	4.7
ジメトエート	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	105.7~110.7	12.5
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	98.0~110.7	5.4
	アルファルファ	200~2,000	3	90.0~98.3	10.9
フェンスルホチオン	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	110.3~113.3	3.7
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	105.0~113.0	11.2
	アルファルファ	200~2,000	3	94.0~101.3	8.8
モノクロトホス	成鶏飼育用配合飼料	200~2,000	3	102.7~109.0	12.9
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	200~2,000	3	102.0~111.7	5.3
	アルファルファ	200~2,000	3	86.0~95.3	10.9

・共同試験

(A グループ)

成分名	試料の種類	試験室 数	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
EPN	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	100.7	8.2	14.1	0.88
イプロベンホス	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	107.7	6.7	23.9	1.51
エディフェンホス	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	117.5	9.1	24.4	1.56
エチオン	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	100.1	6.8	19.4	1.21
エトリムホス	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	100.8	7.5	7.3	0.46
カルボフェノチオン	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	104.4	7.5	14.7	0.92
クロルフェンビンホス (E体)	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	100.1	7.7	13.4	0.84
クロルフェンビンホス (Z体)	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	102.2	7.1	8.3	0.52

(A グループ) [続き]

成分名	試料の種類	試験室数	添加濃度 (µg/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
ダイアジノン	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	94.0	7.4	23.5	1.45
テルブホス	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	92.7	9.3	17.0	1.05
トルクロホスメチル	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	100.5	6.4	10.2	0.64
ピリミホスメチル	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	98.5	5.4	7.1	0.44
フェニトロチオン	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	100.0	5.4	7.1	0.44
フェンチオン	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	82.9	8.4	9.7	0.59
フェントエート	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	98.1	6.7	7.8	0.48
プロチオホス	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	102.4	6.9	14.3	0.90
ホサロン	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	106.1	7.9	23.9	1.51
ホスメット	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	99.5	9.4	14.6	0.91
ホレート	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	84.7	10.2	11.6	0.71
マラチオン	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	102.8	6.6	7.2	0.45
メチダチオン	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	105.4	6.9	14.1	0.89

(B グループ)

成分名	試料の種類	試験室数	添加濃度 (µg/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
エトプロホス	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	102.3	5.9	5.6	0.35
キナルホス	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	103.8	4.7	9.5	0.60
クロルピリホス	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	105.9	5.4	4.3	0.27
クロルピリホスメチル	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	106.8	5.2	5.0	0.31
パラチオン	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	104.3	5.5	5.7	0.36
パラチオンメチル	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	101.7	6.0	8.6	0.54
メカルバム	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	95.6	6.5	24.9	1.54

(C グループ)

成分名	試料の種類	試験室数	添加濃度 (µg/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
アセフェート	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	129.3	5.8	22.4	1.46
イソフェンホス	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	98.5	7.0	10.7	0.67
イソフェンホスオキソン	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	112.5	3.2	4.7	0.30
ジクロルボス	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	87.1	6.8	20.5	1.26
ジメトエート	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	105.7	2.5	8.6	0.54
フェンスルホチオン	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	96.1	4.8	31.3	1.94
モノクロトホス	ほ乳期子豚育成用配合飼料	3	1,000	114.3	4.4	5.5	0.35

- ・ 定量下限 試料中 各 20 µg/kg

3 有機リン系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法 (その2)

(1) 分析対象化合物

A グループ EPN、ダイアジノン、パラチオン、フェニトロチオン、フェンチオン、フェントエート、ホサロン及びマラチオン (8成分)

B グループ ジクロルボス (1成分)

(2) 分析法

A 試薬の調製

1) 農薬混合標準液 EPN [C₁₄H₁₄NO₄PS]、ジクロルボス [C₄H₇Cl₂O₄P]、ダイアジノン [C₁₂H₂₁N₂O₃PS]、パラチオン [C₁₀H₁₄NO₅PS]、フェニトロチオン

〔 $C_9H_{12}NO_5PS$ 〕、フェンチオン〔 $C_{10}H_{15}O_3PS_2$ 〕、フェントエート〔 $C_{12}H_{17}O_4PS_2$ 〕、ホサロン〔 $C_{12}H_{15}ClNO_4PS_2$ 〕及びマラチオン〔 $C_{10}H_{19}O_6PS_2$ 〕各 20 mg を正確に量ってそれぞれ 100 mL の全量フラスコに入れ、アセトン 20 mL を加えて溶かし、更に各全量フラスコの標線まで 2,2,4-トリメチルペンタンを加えて各農薬標準原液を調製する（この液 1 mL は、各農薬として 0.2 mg を含有する。）。

使用に際して、各農薬標準原液の一定量を混合し、2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン（4+1）で正確に希釈し、1 mL 中に各農薬としてそれぞれ 0.1~2 µg を含有する数点の農薬混合標準液を調製する。

- 2) ケイ酸マグネシウム 合成ケイ酸マグネシウム（粒径 149~250 µm（100~60 メッシュ））を 130 °C で 16 時間乾燥する。
- 3) L-システイン塩酸塩溶液 L-システイン塩酸塩一水和物 4.2 g を水に溶かして 250 mL とする。
- 4) 活性炭混合物 活性炭^{注1} 10 g 及びセルロース^{注2} 90 g を混合する。

B 定 量

抽 出 分析試料 10.0~20.0 g を量って 300 mL の分液漏斗に入れ、L-システイン塩酸塩溶液 30 mL を加えて潤し、30 分間静置後、更にアセトン 70 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出する。200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗^{注2}の下に置き、抽出液をろ紙（5 種 B）で吸引ろ過した後、先の分液漏斗及び残さを順次アセトン-水（7+3）50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過する。更に全量フラスコの標線までアセトン-水（7+3）を加え、精製に供する試料溶液とする。

精 製 試料溶液 100 mL をあらかじめ塩化ナトリウム溶液（5 w/v%）250 mL 及びジクロロメタン 50 mL を入れた 500 mL の分液漏斗に加え、5 分間振り混ぜた後静置し、ジクロロメタン層（下層）を三角フラスコに入れる。残留液にジクロロメタン 50 mL を加え、穏やかに振り混ぜた後静置し、ジクロロメタン層を先の三角フラスコに合わせる。ジクロロメタン層を適量の硫酸ナトリウム（無水）で脱水し、300 mL のなす形フラスコに分液ろ紙でろ過した後、試料溶液の入っていた三角フラスコ及びろ紙を順次少量のジクロロメタンで洗浄し、洗液を先のろ紙を通してろ液を合わせる。ろ液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

残留物をヘキサン 30 mL で 200 mL の分液漏斗に移し、更にアセトニトリル-水（100+1）30 mL を加え、5 分間振り混ぜた後静置し、アセトニトリル層（下層）を 300 mL のなす形フラスコに入れる。残留液にアセトニトリル-水（100+1）30 mL を加え、同様に操作する。アセトニトリル層を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

ヘキサン-アセトン（19+1）5 mL を加えて残留物を溶かし、A グループ農薬を定量する場合にはカラム処理（A）に、ジクロロボスを定量する場合にはカラム処理（B）にそれぞれ供する試料溶液とする。

カラム処理（A） 硫酸ナトリウム（無水）2 g、ケイ酸マグネシウム 5 g 及び硫酸ナトリウム（無水）2 g をそれぞれヘキサン-アセトン（19+1）に懸濁させて

カラム管（内径 15 mm）に順次流し込み、液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流出させ、カラムを調製する。

300 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、試料溶液をカラムに入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン-アセトン（19+1）5 mL で 5 回洗浄し、洗液を順次カラムに加える。液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流下して定量する各 A グループ農薬を流出させ、更にヘキサン-アセトン（19+1）70 mL をカラムに加えて同様に流出させる。流出液にアセトン-ジエチレングリコール（99+1）2~3 滴を加え、40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン（4+1）5 mL を正確に加えて残留物を溶かし、ガスクロマトグラフィーに供する試料溶液 A とする。

カラム処理（B） 硫酸ナトリウム（無水）2 g、活性炭混合物 5 g 及び硫酸ナトリウム（無水）2 g をそれぞれアセトンに懸濁させてカラム管（内径 15 mm）に順次流し込み、液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流出させ、カラムを調製する。

300 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、試料溶液をカラムに入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコをアセトン 5 mL で 5 回洗浄し、洗液を順次カラムに加える。液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流下してジクロロボスを流出させた後、更にアセトン 20 mL をカラムに加えて同様に流出させる。アセトン-ジエチレングリコール（99+1）2~3 滴を流出液に加え、流出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン（4+1）5 mL を正確に加えて残留物を溶かし、ガスクロマトグラフィーに供する試料溶液 B とする。

ガスクロマトグラフィー 試料溶液 A 及び B 並びに各農薬混合標準液各 1 µL をガスクロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：炎光光度検出器（リン検出用フィルター）

カ ラ ム：溶融石英製キャピラリーカラム（5%ジフェニル-95%ジメチルポリシロキサンコーティング、内径 0.32 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 µm）

キャリアーガス：He（1.5 mL/min）

メイクアップガス：N₂（30 mL/min）

水 素：75 mL/min

乾 燥 空 気：100 mL/min

試 料 導 入 法：スプリットレス（60 s）

試料導入部温度：230 °C

カ ラ ム 槽 温 度：初期温度 60 °C（1 min 保持）→昇温 10 °C/min→170 °C

（21 min 保持）→昇温 20 °C/min→240 °C（12 min 保持）

検 出 器 温 度：250 °C

計 算 得られたクロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中の各農薬量^{注3}を算出する。

注 1 カラムクロマトグラフ用活性炭素（和光純薬工業製）又はこれと同等のもの

2 微結晶カラムクロマトグラフ用セルロース（Merck 製）又はこれと同等のもの

3 本法では、試料中にナレド〔C₄H₇Br₂Cl₂O₄P〕が含まれている場合には、ナレドがジクロロボスに変換され、試料中のジクロロボス量に含まれる可能性がある。

(参考) 分析法バリデーション

・ 添加回収率及び繰返し精度

(A グループ)

添加成分名	試料の種類	添加濃度 (µg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
EPN	成鶏飼育用配合飼料	100~500	3	99.0~106.5	8.3
	ハイキューブ	100~500	3	95.6~96.8	11.3
ダイアジノン	成鶏飼育用配合飼料	100~500	3	88.5~91.1	5.4
	ハイキューブ	100~500	3	86.7~90.2	10.4
パラチオン	成鶏飼育用配合飼料	100~500	3	94.3~97.6	3.2
	ハイキューブ	100~500	3	92.5~93.5	10.5
フェントロチオン	成鶏飼育用配合飼料	100~500	3	103.9~108.2	10.6
	ハイキューブ	100~500	3	94.7~95.3	5.3
フェンチオン	成鶏飼育用配合飼料	100~500	3	94.6~96.6	4.9
	ハイキューブ	100~500	3	83.8~88.4	14.3
フェントエート	成鶏飼育用配合飼料	100~500	3	93.5~98.8	9.1
	ハイキューブ	100~500	3	92.0~94.7	5.9
ホサロン	成鶏飼育用配合飼料	50~1,000	3	96.2~101.7	13.2
	肉豚肥育用配合飼料	50~1,000	3	100.2~102.0	3.9
	ハイキューブ	50~1,000	3	92.6~100.4	10.1
マラチオン	成鶏飼育用配合飼料	100~500	3	101.7~114.9	14.7
	ハイキューブ	100~500	3	94.8~96.1	4.2

(B グループ)

添加成分名	試料の種類	添加濃度 (µg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
ジクロロボス	成鶏飼育用配合飼料	100~500	3	94.8~98.8	13.6
	ハイキューブ	100~500	3	89.4~90.4	8.3

・共同試験

(A グループ)

成分名	試料の種類	試験室数	添加濃度 (µg/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
EPN	ほ乳期子豚育成用配合飼料	7	500	96.2	4.9	8.3	0.47
ダイアジノン	ほ乳期子豚育成用配合飼料	7	500	90.8	7.4	8.3	0.46
パラチオン	ほ乳期子豚育成用配合飼料	7	500	94.4	3.3	4.6	0.26
フェントロチオン	ほ乳期子豚育成用配合飼料	7	500	98.4	5.5	9.6	0.54
フェンチオン	ほ乳期子豚育成用配合飼料	7	500	94.7	5.6	5.7	0.32
フェントエート	ほ乳期子豚育成用配合飼料	7	500	95.7	4.9	6.0	0.34
ホサロン	ほ乳期子豚育成用配合飼料	7	250	99.4	4.1	9.0	0.45
マラチオン	ほ乳期子豚育成用配合飼料	7	500	101.9	4.3	8.4	0.48

(B グループ)

成分名	試料の種類	試験室数	添加濃度 (µg/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
ジクロルボス	ほ乳期子豚育成用配合飼料	7	500	100.7	6.4	12.3	0.69

4 ピレスロイド系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法

(1) 分析対象化合物

A グループ テフルトリン、ビフェントリン及びペルメトリン (3 成分)

B グループ シハロトリン、シフルトリン、シペルメトリン、デルタメトリン、フェンバレレート、フェンプロパトリン、フルシトリネート及びフルバリネート (8 成分)

C グループ アレスリン及びテトラメトリン (2 成分)

(2) 分析法

A 試薬の調製

1) A グループ農薬混合標準液 テフルトリン [C₁₇H₁₄ClF₇O₂]、ビフェントリン [C₂₃H₂₂ClF₃O₂] 及びペルメトリン [C₂₁H₂₀Cl₂O₃] 各 20 mg を正確に量ってそれぞれ 100 mL の全量フラスコに入れ、アセトン 20 mL を加えて溶かし、更に各全量フラスコの標線まで 2,2,4-トリメチルペンタンを加えてペルメトリン標準原液を調製する (これらの液各 1 mL は、各 A グループ農薬としてそれぞれ 0.2 mg を含有する。)

使用に際して、各標準原液の一定量を混合し、2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) で正確に希釈し、1 mL 中に各 A グループ農薬としてそれぞれ 0.1~2 µg (テフルトリンについては、0.01~0.2µg) を含有する数点の A グループ農薬混合標準液を調製する。

2) B グループ農薬混合標準液 シハロトリン [C₂₃H₁₉ClF₃NO₃]、シフルトリン [C₂₂H₁₈Cl₂FNO₃]、シペルメトリン [C₂₂H₁₉Cl₂NO₃]、デルタメトリン [C₂₂H₁₉Br₂NO₃]、フェンバレレート [C₂₅H₂₂ClNO₃]、フェンプロパトリン [C₂₂H₂₃NO₃]、フルシトリネート [C₂₆H₂₃F₂NO₄] 及びフルバリネート [C₂₆H₂₂ClF₃N₂O₃] 各 20 mg を正確に量ってそれぞれ 100 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトン 20 mL を加えて溶かし、更に各全量フラスコの標線まで 2,2,4-トリメチルペンタンを加えて各 B グループ農薬標準原液を調製する (これ

らの液各 1 mL は、各 B グループ農薬としてそれぞれ 0.2 mg を含有する。)

使用に際して、各標準原液の一定量を混合し、2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) で正確に希釈し、1 mL 中に各 B グループ農薬としてそれぞれ 0.1~2 µg を含有する数点の B グループ農薬混合標準液を調製する。

- 3) C グループ農薬混合標準液 アレスリン [C₁₉H₂₆O₃] 及びテトラメトリン [C₁₉H₂₅NO₄] 各 20 mg を正確に量ってそれぞれ 100 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトン 20 mL を加えて溶かし、更に各全量フラスコの標線まで 2,2,4-トリメチルペンタンを加えて各 C グループ農薬標準原液を調製する (これらの液各 1 mL は、各 C グループ農薬としてそれぞれ 0.2 mg を含有する。)

使用に際して、各標準原液の一定量を混合し、2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) で正確に希釈し、1 mL 中に各 C グループ農薬としてそれぞれ 0.1~2 µg を含有する数点の C グループ農薬混合標準液を調製する。

B 定 量

抽 出 分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水 (3+1) 20 mL を加えて潤し、15 分間静置後、更にアセトニトリル 100 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出する。300 mL のなす形フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した後、先の三角フラスコ及び残さを順次アセトニトリル 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過する。ろ液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮し、塩化ナトリウム飽和溶液 20 mL を加え、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 試料溶液を多孔性ケイソウ土カラム (20 mL 保持用) に入れ、5 分間静置する。300 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン 20 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次カラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下して定量する各農薬を溶出させる。更にヘキサン 60 mL をカラムに加えて同様に溶出させ、溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

シクロヘキサン-アセトン (4+1) 10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、メンブランフィルター (孔径 0.5 µm 以下) でろ過し、ゲル浸透クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

ゲル浸透クロマトグラフィー 試料溶液 5.0 mL をゲル浸透クロマトグラフに注入し、定量する各農薬が溶出する画分を 100 mL のなす形フラスコに分取し、40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

ヘキサン 5 mL を正確に加えて残留物を溶かし、カラム処理 (A) 及びカラム処理 (B・C) にそれぞれ供する試料溶液とする。

ゲル浸透クロマトグラフィー 例

カ ラ ム : スチレンジビニルベンゼン共重合体カラム (内径 20 mm、長さ 300 mm、粒径 15 µm)

ガードカラム : スチレンジビニルベンゼン共重合体カラム (内径 20 mm、長さ 100 mm、粒径 15 µm)

溶 離 液：シクロヘキサン-アセトン (4+1)

流 速：5 mL/min

分 取 画 分：60~85 mL

カラム処理 (A) 合成ケイ酸マグネシウムミニカラム (910 mg) をヘキサン 5 mL で洗浄する。

試料溶液 2 mL を正確にミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させ、更にヘキサン 15 mL をミニカラムに加え、同様に流出させる。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、ヘキサン-ジエチルエーテル (19+1) 15 mL をミニカラムに加えて定量する各 A グループ農薬を溶出させる。溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、ガスクロマトグラフィーに供する試料溶液 A とする。

カラム処理 (B・C) 合成ケイ酸マグネシウムミニカラム (910 mg) をヘキサン 5 mL で洗浄する。

試料溶液 2 mL を正確にミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させ、更にヘキサン 15 mL をミニカラムに加え、同様に流出させる。50 mL のなす形フラスコ B をミニカラムの下に置き、ヘキサン-ジエチルエーテル (4+1) 15 mL をミニカラムに加え、定量する各 B グループ農薬を溶出させる。50 mL のなす形フラスコ C をミニカラムの下に置き換え、ヘキサン-アセトン (19+1) 15 mL をミニカラムに加えて定量する各 C グループ農薬を溶出させる。各溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) 2 mL ずつを正確に加えてそれぞれの残留物を溶かし、ガスクロマトグラフィーに供する試料溶液 B 及び C とする。

ガスクロマトグラフィー 試料溶液 A、B 及び C 並びに各 A グループ農薬、B グループ農薬及び C グループ農薬混合標準液各 1 µL をガスクロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：電子捕獲検出器

カ ラ ム：溶融石英製キャピラリーカラム (50%トリフルオロプロピルメチル-50%ジメチルポリシロキサンコーティング、内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 µm)

キャリアーガス：He (1.5 mL/min)

メイクアップガス：N₂ (60 mL/min)

試 料 導 入 法：スプリットレス (60 s)

試料導入部温度：250 °C

カ ラ ム 槽 温 度：初期温度 80 °C (1 min 保持) →昇温 20 °C/min→200 °C
→昇温 2 °C/min→290 °C (10 min 保持)

検出器温度：300℃

計算 得られたクロマトグラムからピーク高さを求めて検量線を作成し、試料中の各農薬量^{注1}を算出する。

注1 本法では、試料中にトラロメトリンが含まれている場合には、トラロメトリンがデルタメトリンに変換され、試料中のデルタメトリン量に含まれる可能性がある。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

(A グループ)

添加成分名	試料の種類	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
テフルトリン	鶏用配合飼料	10~100	3	92.0~103.0	5.6
	豚用配合飼料	10~100	3	96.0~103.0	8.1
	チモシー	10~100	3	90.7~108.0	5.5
ビフェントリン	鶏用配合飼料	100~1,000	3	82.0~98.0	5.7
	豚用配合飼料	100~1,000	3	94.0~102.3	9.8
	チモシー	100~1,000	3	90.0~95.3	2.3
ペルメトリン	鶏用配合飼料	100~1,000	3	86.7~95.0	6.4
	豚用配合飼料	100~1,000	3	98.3~103.7	3.1
	チモシー	100~1,000	3	89.0~101.0	2.6

(B グループ)

添加成分名	試料の種類	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
シハロトリン	鶏用配合飼料	100~1,000	3	92.3~102.3	9.1
	豚用配合飼料	100~1,000	3	101.3~113.7	6.9
	チモシー	100~1,000	3	98.0~102.0	4.4
シフルトリン	鶏用配合飼料	100~1,000	3	100.3~113.7	5.7
	豚用配合飼料	100~1,000	3	98.0~111.7	4.4
	チモシー	100~1,000	3	92.7~99.3	6.1
シペルメトリン	鶏用配合飼料	100~1,000	3	94.0~107.3	7.4
	豚用配合飼料	100~1,000	3	98.0~114.0	6.4
	チモシー	100~1,000	3	96.3~102.3	5.6
デルタメトリン	鶏用配合飼料	100~1,000	3	107.0~115.3	12.6
	豚用配合飼料	100~1,000	3	108.0~114.0	7.6
	チモシー	100~1,000	3	96.3~108.3	2.8
フェンバレレート	鶏用配合飼料	100~1,000	3	100.7~106.3	6.2
	豚用配合飼料	100~1,000	3	101.3~111.7	9.0
	チモシー	100~1,000	3	92.7~105.7	5.2
フェンプロパトリン	鶏用配合飼料	100~1,000	3	97.3~105.0	7.6
	豚用配合飼料	100~1,000	3	96.3~109.3	3.6
	チモシー	100~1,000	3	99.3~104.7	5.2

(B グループ) [続き]

添加成分名	試料の種類	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
フルシトリネート	鶏用配合飼料	100~1,000	3	97.3~112.3	6.3
	豚用配合飼料	100~1,000	3	97.7~115.7	7.0
	チモシー	100~1,000	3	100.3~103.3	4.0
フルバリネート	鶏用配合飼料	100~1,000	3	108.3~117.3	6.3
	豚用配合飼料	100~1,000	3	105.3~118.7	7.2
	チモシー	100~1,000	3	100.3~109.0	3.2

(C グループ)

添加成分名	試料の種類	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
アレスリン	鶏用配合飼料	100~1,000	3	93.0~105.3	2.6
	豚用配合飼料	100~1,000	3	101.0~110.3	5.5
	チモシー	100~1,000	3	91.7~103.7	2.0
テトラメトリン	鶏用配合飼料	100~1,000	3	97.3~106.0	5.7
	豚用配合飼料	100~1,000	3	91.3~102.7	2.1
	チモシー	100~1,000	3	96.0~100.7	4.8

・ 共同試験

(A グループ)

成分名	試料の種類	試験室 数	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _f (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
テフルトリン	鶏用配合飼料	5	25	86.4	5.8	15.8	0.72
ピフェントリン	鶏用配合飼料	5	250	93.0	3.3	21.1	1.06
ペルメトリン	鶏用配合飼料	5	250	93.1	5.1	24.7	1.24

(B グループ)

成分名	試料の種類	試験室 数	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _f (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
シハロトリン	鶏用配合飼料	5	250	93.7	3.8	9.9	0.50
シフルトリン	鶏用配合飼料	5	250	93.8	4.1	17.9	0.90
シベルメトリン	鶏用配合飼料	5	250	93.8	3.4	12.9	0.65
デルタメトリン	鶏用配合飼料	5	250	92.8	4.6	15.8	0.79
フェンバレレート	鶏用配合飼料	5	250	94.6	3.8	18.5	0.93
フェンプロバトリン	鶏用配合飼料	5	250	92.3	3.2	15.0	0.75
フルシトリネート	鶏用配合飼料	5	250	95.3	3.9	15.9	0.80
フルバリネート	鶏用配合飼料	5	250	96.7	5.7	19.1	0.96

(C グループ)

成分名	試料の種類	試験室 数	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _f (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
アレスリン	鶏用配合飼料	5	250	99.8	9.7	13.3	0.68
テトラメトリン	鶏用配合飼料	5	250	102.5	5.8	18.5	0.94

・ 定量下限

テフルトリン：試料中 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、その他の農薬：試料中 各 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$

・ 検出下限

テフルトリン：試料中 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、その他の農薬：試料中 各 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$

5 アラクロール、アレスリン、クロルプロファミン、ジクロラン及びメトキシクロールのガスクロマトグラフによる系統的分析法

(1) 分析対象化合物

- A グループ アラクロール、アレスリン及びジクロラン (3 成分)
B グループ メトキシクロール (1 成分)
C グループ クロルプロファミン (1 成分)

(2) 分析法

A 試薬の調製

- 1) 農薬混合標準液 アラクロール [$C_{14}H_{20}ClNO_2$]、アレスリン [$C_{19}H_{26}O_3$]、ジクロラン [$C_6H_4Cl_2N_2O_2$] 及びメトキシクロール [$C_{16}H_{15}Cl_3O_2$] 各 20 mg を正確に量ってそれぞれ 100 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトン 20 mL を加えて溶かし、更に各全量フラスコの標線まで 2,2,4-トリメチルペンタンを加えて各農薬標準原液を調製する (これらの液 1 mL は、各農薬としてそれぞれ 0.2 mg を含有する。)

使用に際して、各標準原液の一定量を混合し、2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) で正確に希釈し、1 mL 中に各農薬としてそれぞれ 0.025~0.75 μ g を含有する数点の農薬混合標準液を調製する。

- 2) クロルプロファミン標準液 クロルプロファミン [$C_{10}H_{12}ClNO_2$] 20 mg を正確に量って 100 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトン 20 mL を加えて溶かし、更に標線まで 2,2,4-トリメチルペンタンを加えてクロルプロファミン標準原液を調製する (この液 1 mL は、クロルプロファミンとして 0.2 mg を含有する。)

使用に際して、標準原液の一定量を 2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) で正確に希釈し、1 mL 中にクロルプロファミン 0.1~3 μ g を含有する数点のクロルプロファミン標準液を調製する。

- 3) ケイ酸マグネシウム 合成ケイ酸マグネシウム (粒径 149~250 μ m (100~60 メッシュ)) を 130 $^{\circ}$ C で 16 時間乾燥する。

B 定 量

抽出 分析試料 10.0~20.0 g を量って 300 mL の分液漏斗に入れ、水 30 mL を加えて潤し、30 分間静置後、更にアセトン 70 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出する。200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した後、先の分液漏斗及び残さを順次アセトン-水 (7+3) 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過する。アセトン-水 (7+3) を全量フラスコの標線まで加え、精製に供する試料溶液とする。

精製 試料溶液 50 mL をあらかじめ塩化ナトリウム溶液 (5 w/v%) 100 mL 及びヘキサン 100 mL を入れた 300 mL の分液漏斗 A に加え、5 分間激しく振り混ぜた後静置し、水層 (下層) を 300 mL の分液漏斗 B に入れ、ヘキサン層 (上層) を三角フラスコに入れる。分液漏斗 B にヘキサン 50 mL を加え、穏やかに振り混ぜた後静置し、ヘキサン層を先の三角フラスコに合わせる。ヘキサン層を適量の硫酸ナトリウム (無水) で脱水し、300 mL のなす形フラスコに分液ろ紙でろ過した後、先の三角フラスコ及びろ紙を順次少量のヘキサンので洗浄し、洗液

を先のろ紙を通してろ液を合わせる。ろ液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

残留物をヘキサン 30 mL で 200 mL の分液漏斗に移し、アセトニトリル-水 (100+1) 30 mL を加え、5 分間激しく振り混ぜた後静置し、アセトニトリル層 (下層) を 300 mL のなす形フラスコに入れる。残留液にアセトニトリル-水 (100+1) 30 mL を加え、同様に 2 回操作し、各アセトニトリル層を先のなす形フラスコに合わせる。アセトニトリル層を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

ヘキサノージエチルエーテル (19+1) 5 mL を残留物に加えて溶かし、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 ケイ酸マグネシウム 5 g、硫酸ナトリウム (無水) 2 g をそれぞれヘキサンに懸濁させてカラム管 (内径 15 mm) に順次流し込み、液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流出させ、カラムを調製する。

300 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、試料溶液をカラムに入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサノージエチルエーテル (19+1) 5 mL で 3 回洗浄し、洗液を順次カラムに加える。液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流下してメトキシクロールを流出させる。更にヘキサノージエチルエーテル (19+1) 80 mL をカラムに加えて同様に流出させる。

次に、200 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き換え、ヘキサノーアセトン (19+1) 50 mL をカラムに加えて、定量する各 A グループ農薬及びクロルプロファムを溶出させる。

先の流出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、ガスクロマトグラフィー (B) に供する試料溶液 B とする。

先の溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、ガスクロマトグラフィー (A) 及びガスクロマトグラフィー (C) に供する試料溶液 AC とする。

ガスクロマトグラフィー (A) 試料溶液 AC 及び各農薬混合標準液各 2 µL をガスクロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：電子捕獲検出器
カ ラ ム：溶融石英製キャピラリーカラム (14 %シアノプロピルフェニル-86 %ジメチルポリシロキサンコーティング、内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 µm)
キャリアーガス：He (1.5 mL/min、初期流量)
メイクアップガス：N₂ (60 mL/min)
試料導入法：スプリットレス (60 s)
試料導入部温度：250 °C

カラム槽温度：初期温度 80 °C (2 min 保持) →昇温 30 °C/min→140 °C
→昇温 3 °C/min→220 °C

検出器温度：300 °C

ガスクロマトグラフィー (B) 試料溶液及び各農薬混合標準液各 2 µL をガスクロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検出器：電子捕獲検出器

カラム：溶融石英製キャピラリーカラム (14 %シアノプロピルフェニル-86 %ジメチルポリシロキサンコーティング、内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 µm)

キャリアーガス：He (1.5 mL/min)

メイクアップガス：N₂ (60 mL/min)

試料導入法：スプリットレス (60 s)

試料導入部温度：250 °C

カラム槽温度：初期温度 80 °C (2 min 保持) →昇温 30 °C/min→140 °C
→昇温 3 °C/min→220 °C (15 min 保持) →昇温 2 °C/min
→250 °C

検出器温度：300 °C

ガスクロマトグラフィー (C) 試料溶液及び各クロルプロファミン標準液各 2 µL をガスクロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検出器：アルカリ熱イオン化検出器

カラム：溶融石英製キャピラリーカラム (100 %ジメチルポリシロキサンコーティング、内径 0.32 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 µm)

キャリアーガス：He (1.5 mL/min)

メイクアップガス：He (30 mL/min)

水素：4 mL/min

乾燥空気：100 mL/min

試料導入法：スプリットレス (60 s)

試料導入部温度：250 °C

カラム槽温度：初期温度 80 °C (2 min 保持) →昇温 30 °C/min→140 °C
→昇温 3 °C/min→180 °C

検出器温度：280 °C

計算 得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中の各農薬量を算出する。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

(A グループ)

添加成分名	試料の種類	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
アラクロール	とうもろこし	10~100	3	103.3~109.2	9.7
	マイロ	10~100	3	102.2~109.2	10.3
	成鶏用配合飼料	10~100	3	103.2~107.0	14.1
アレスリン	とうもろこし	20~200	3	102.5~110.0	6.0
	マイロ	20~200	3	104.0~110.0	3.6
	成鶏用配合飼料	20~200	3	99.3~108.7	8.1
ジクロラン	とうもろこし	20~200	3	95.3~98.7	11.2
	マイロ	20~200	3	96.8~104.0	12.4
	成鶏用配合飼料	20~200	3	94.8~102.3	10.0

(B グループ)

添加成分名	試料の種類	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
メトキシクロール	とうもろこし	20~200	3	99.0~111.7	10.5
	マイロ	20~200	3	113.0~114.0	7.6
	成鶏用配合飼料	20~200	3	103.9~117.7	13.1

(C グループ)

添加成分名	試料の種類	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
クロルプロファム	とうもろこし	40~400	3	88.3~97.7	12.8
	マイロ	40~400	3	93.5~109.4	15.6
	成鶏用配合飼料	40~400	3	88.8~103.9	9.0

・共同試験

(A グループ)

成分名	試料の種類	試験室 数	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
アラクロール	成鶏用配合飼料	5	100	101	3.5	10.9	0.50
アレスリン	成鶏用配合飼料	5	100	93	3.1	12.2	0.56
ジクロラン	成鶏用配合飼料	5	100	102	4.2	12.0	0.55

(B グループ)

成分名	試料の種類	試験室 数	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
メトキシクロール	成鶏用配合飼料	5	100	106	4.6	10.7	0.49

(C グループ)

成分名	試料の種類	試験室 数	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
クロルプロファム	成鶏用配合飼料	5	200	94	7.0	13.1	0.64

・定量下限

クロルプロファム：試料中 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$

その他の農薬：試料中 各 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$

6 含リンアミノ酸系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法

(1) 分析対象化合物^{注1}

- A グループ グリホサート及び3-メチルホスフィニコプロピオン酸（2成分）
B グループ グルホシネート（1成分）

(2) 分析法

A 試薬の調製

- 1) 農薬混合標準原液 グリホサート〔C₃H₈NO₅P〕、グルホシネート〔C₅H₁₅N₂O₄P〕及び3-メチルホスフィニコプロピオン酸〔C₄H₉O₄P〕各0.1 gを正確に量ってそれぞれ100 mLの全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に各全量フラスコの標線まで水を加える（これらの液各1 mLは、グリホサート、グルホシネート及び3-メチルホスフィニコプロピオン酸としてそれぞれ1 mgを含有する）。更にこれらの液の一定量を混合し、水で正確に希釈し、1 mL中にグリホサート、グルホシネート及び3-メチルホスフィニコプロピオン酸としてそれぞれ100 µgを含むグリホサート標準原液を調製する。
- 2) 強塩基性陰イオン交換樹脂（酢酸型） 強塩基性イオン交換樹脂^{注2} 100 gを量って、500 mLの三角フラスコに入れ、水300 mLを加えてかき混ぜ、上澄み液を捨てる。更にこの操作を2回繰り返した後、水300 mLを加え、気泡を除去して樹脂を膨潤させ、上澄み液を捨てる。次にこの樹脂に水酸化ナトリウム溶液（1 mol/L）200 mLを加えてかき混ぜ、上澄み液を捨てる。この操作を2回繰り返した後、水酸化ナトリウム溶液（1 mol/L）200 mLを加えて一夜静置し、上澄み液を捨てる。次にこの樹脂に水300 mLを加えてかき混ぜ、上澄み液を捨てる。上澄み液のpHが9以下になるまでこの操作を繰り返した後、酢酸（1+9）200 mLを加えてかき混ぜ、上澄み液を捨てる。更にこの操作を2回繰り返した後、酢酸（1+9）200 mLを加えて一夜静置し、同溶液中に保存する。

B 定 量

抽 出 分析試料10.0 gを量って300 mLの共栓三角フラスコに入れ、水200 mLを加え、30分間振り混ぜて抽出する。抽出液を50 mLの共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×gで10分間遠心分離し、上澄み液をカラム処理Iに供する試料溶液とする。

カラム処理 I 強塩基性陰イオン交換樹脂（酢酸型）をカラム管（内径10 mm）に7 cmの高さまで流し込み、酢酸（1+9）5 mLを加えて、液面が充てん剤の上端から3 mmの高さに達するまで流出させる。更にこの操作を繰り返してカラムを調製する。

試料溶液25 mLを正確にカラムに入れ、液面が充てん剤の上端から3 mmの高さに達するまで流出^{注3}させた後、水10 mLを加え、同様に流出させる。

200 mLのなす形フラスコをカラムの下に置き、酢酸（1+1）100 mLをカラムに入れ、液面が充てん剤の上端から3 mmの高さに達するまで流下してグリホサート、グルホシネート及び3-メチルホスフィニコプロピオン酸を溶出^{注3}させ、溶出液を誘導体化反応に供する試料溶液とする。

誘導体化反応 試料溶液を50 °C以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮^{注4}

した後、窒素ガスを送って乾固する。酢酸 1 mL 及びオルト酢酸トリメチル 4 mL を正確に加えて残留物を溶かし^{注5}、この容器を密栓して 100 °C で 2 時間加熱^{注6}した後放冷し、50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

酢酸エチル 5 mL を正確に加えて残留物を溶かし^{注5}、この液を 10 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、650×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液をカラム処理 II に供する試料溶液とする。

カラム処理 II アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (360 mg) の下にシリカゲルミニカラム (690 mg) (A) を連結し、酢酸エチル 10 mL で洗浄する。

試料溶液 4 mL をミニカラムに正確に入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。酢酸エチル 10 mL をミニカラムに加え、同様に 2 回操作する。

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムをはずし、50 mL のなす形フラスコをシリカゲルミニカラム (A) の下に置く。アセトン-水 (19+1) 10 mL をシリカゲルミニカラム (A) に加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下してグリホサート誘導体及び 3-メチルホスフィニコプロピオン酸誘導体を溶出させる。溶出液を 50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

酢酸エチル 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし^{注5}、プラスチック製^{注7}の遠心沈殿管 (容量 1.5 mL) に入れ、5,000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液をガスクロマトグラフィーに供する試料溶液 (A) とする。

また、先のアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムは、カラム処理 III に供する。

カラム処理 III カラム処理 II で使用したアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムの下にあらかじめ酢酸エチル 10 mL で洗浄したシリカゲルミニカラム (690 mg) (B) を連結する。

アセトン 10 mL をミニカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下してグルホシネート誘導体をシリカゲルミニカラム (B) に移行させる。

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムをはずし、アセトン 10 mL をシリカゲルミニカラム (B) に加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させ、シリカゲルミニカラム (B) を洗浄する。50 mL のなす形フラスコをシリカゲルミニカラム (B) の下に置き、アセトン-水 (19+1) 10 mL をミニカラムに加えてグルホシネート誘導体を溶出させる。溶出液を 50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

酢酸エチル 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし^{注5}、この液をプラスチック製^{注7}の遠心沈殿管 (容量 1.5 mL) に入れ、5,000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液をガスクロマトグラフィーに供する試料溶液 (B) とする。

標準原液の誘導体化 農薬混合標準原液 200 µL を 200 mL のなす形フラスコに入れ、窒素ガスを送って乾固する。酢酸 1 mL 及びオルト酢酸トリメチル 4 mL を正確に加えて残留物を溶かし、なす形フラスコを密栓して 100 °C で 2 時間加熱^{注6}した後放冷する。この液を 50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧

濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

酢酸エチルを加えて残留物を溶かし、更に同溶媒で正確に希釈し、1 mL 中にグリホサート、グルホシネート及び 3-メチルホスフィニコプロピオン酸としてそれぞれ 0.05~2 µg 相当量を含む数点の標準液を調製する。

ガスクロマトグラフィー 試料溶液及び各標準液各 2 µL をガスクロマトグラフに注入^{注8}し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：炎光光度検出器（リン検出用フィルター）
カ ラ ム：熔融石英製キャピラリーカラム（ポリエチレングリコール（平均分子量 15,000）ジエポキシド結合型、内径 0.32 mm、長さ 15 m、膜厚 0.25 µm）

キャリアーガス：He（8.4 mL/min）

メイクアップガス：N₂（30 mL/min）

水 素：75 mL/min

乾 燥 空 気：100 mL/min

試 料 導 入 法：スプリットレス（60 s）

試料導入部温度：250 °C

カ ラ ム 槽 温 度：100 °C（1 min 保持）→昇温 20 °C/min→250 °C（5 min 保持）

検 出 器 温 度：275 °C

計 算 得られたクロマトグラムからグリホサート誘導体のピーク高さを求めて検量線を作成し、試料中のグリホサート量を算出する。

同様に、グルホシネート誘導体及び 3-メチルホスフィニコプロピオン酸誘導体のピーク高さを求めてそれぞれの検量線を作成し、グルホシネート及び 3-メチルホスフィニコプロピオン酸のそれぞれの量を算出し、次式により試料中のグルホシネート量を算出する。

試料中のグルホシネート量（µg/kg） = $A + B \times 1.3$

A：検量線から求めたグルホシネートの濃度（µg/kg）

B：検量線から求めた 3-メチルホスフィニコプロピオン酸の濃度（µg/kg）

注 1 本法では、試料中に N-アセチルグルホシネートが含まれている場合には、N-アセチルグルホシネートがグルホシネート誘導体に変換され、試料中のグルホシネート量に含まれる可能性がある。

2 ムロマック 1×2 CI 型（粒径 100~50 メッシュ）（ムロマチテクノス製）又はこれと同等のもの

3 流速は 3~5 mL/min とする。

4 最初は突沸しやすいので穏やかに減圧し、徐々に強く減圧する。

5 必要に応じて超音波処理し、十分に拡散させる。

6 乾燥器等に入れる。乾燥器を用いる場合は、十分に庫内及び実験室内を換気すること。

7 酢酸エチルに耐薬品性のあるもの

8 試料導入部にはグラスウールを詰めていないシラン処理済みのインサートを使用する。

(参考) 分析法バリデーション

・ 添加回収率及び繰返し精度

(A グループ)

添加成分名	試料の種類	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
グリホサート	とうもろこし	100~1,000	3	85.0~91.7	10.6
	大豆油かす	100~1,000	3	85.6~97.6	12.4
	成鶏飼育用配合飼料	100~1,000	3	86.9~106.6	4.2
	肉豚飼育用配合飼料	100~1,000	3	93.1~94.6	10.4
3-メチルホスフィ ニコプロピオン酸	とうもろこし	100~1,000	3	91.0~93.9	3.0
	大豆油かす	100~1,000	3	96.9~99.8	3.3
	成鶏飼育用配合飼料	100~1,000	3	95.6~99.6	8.5
	肉豚飼育用配合飼料	100~1,000	3	92.2~97.7	5.2

(B グループ)

添加成分名	試料の種類	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
グルホシネート	とうもろこし	100~1,000	3	85.8~90.4	12.4
	大豆油かす	100~1,000	3	80.8~81.9	4.5
	成鶏飼育用配合飼料	100~1,000	3	92.1~103.8	3.2
	肉豚飼育用配合飼料	100~1,000	3	93.5~100.3	4.5

・ 共同試験

(A グループ)

成分名	試料の種類	試験 室数	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加回収率 (%) (測定値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$))	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
グリホサート	マイロ	6	汚染	(977)	8.5	11.0	0.69
	肉豚肥育用配合飼料	6	500	94.2	9.2	10.4	0.58
3-メチルホス フィニコ プロピオン酸	肉豚肥育用配合飼料	6	500	99.7	6.4	10.5	0.59

(B グループ)

成分名	試料の種類	試験室 数	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
グルホシネート	肉豚肥育用配合飼料	6	500	103.0	7.4	14.0	0.79

・ 定量下限 試料中 各 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$