2　カーバメート系農薬の液体クロマトグラフによる同時分析法（その 1）

(1)　分析対象化合物　　XMC、アルジカルブ（アルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホン[注1]を含む。）、イソプロカルブ、カルバリル、カルボフラン、キシリルカルブ、フェノブカルブ、プロポキスル、ベンダイオカルブ及びメトルカルブ（12 成分）

(2)　分析法

A　　試薬の調製

農薬混合標準液　　XMC〔$C_{10}H_{13}NO_2$〕、アルジカルブ〔$C_7H_{14}N_2O_2S$〕、アルジカルブスルホキシド〔$C_7H_{14}N_2O_3S$〕、アルジカルブスルホン〔$C_7H_{14}N_2O_4S$〕、イソプロカルブ〔$C_{11}H_{15}NO_2$〕、カルバリル〔$C_{12}H_{11}NO_2$〕、カルボフラン〔$C_{12}H_{15}NO_3$〕、キシリルカルブ〔$C_{10}H_{13}NO_2$〕、フェノブカルブ〔$C_{12}H_{17}NO_2$〕、プロポキスル〔$C_{11}H_{15}NO_3$〕、ベンダイオカルブ〔$C_{11}H_{13}NO_4$〕及びメトルカルブ〔$C_9H_{11}NO_2$〕各 20 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、それぞれ 100 mL の全量フラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、更に各全量フラスコの標線までアセトニトリルを加えて各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、各標準原液の一部を混合し、アセトニトリルで正確に希釈し、1 mL 中に各農薬として 0.1~3 μg を含有する数点の農薬混合標準液を調製する。

B　　定　　量

抽　　出　　分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 15 mL を加えて潤し、30 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 40 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過する。

ろ液を 40 °C 以下の水浴で約 15 mL まで減圧濃縮し、塩化ナトリウム 5 g（4.5~5.4 g）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）[注2]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酢酸エチル 10 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。更に酢酸エチル 120 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（7+3）10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、10 mL の遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 分間遠心分離した後、メンブランフィルター（孔径 0.5 μm 以下）でろ過し、カラム処理 II に供する試料溶液とする。

カラム処理 II　　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 200 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。

酢酸エチルーメタノール（99+1）5 mL を正確に加えて残留物を溶かし、カラム処理 III 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：シクロヘキサンーアセトン（7+3）

流　　速：5 mL/min

分 取 画 分：65~115 mL

カラム処理 III　　アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム（360 mg）[注3]の下にグラファイトカーボンミニカラム（250 mg）[注4]を連結し、酢酸エチルーメタノール（99+1）10 mL で洗浄する。

50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、試料溶液 2 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圧注[注5]して定量する各農薬を流出させる。更に酢酸エチルーメタノール（99+1）20 mL をミニカラムに加え、圧注[注5]して同様に流出させる。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。

アセトニトリル 1 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、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー　　試料溶液及び各農薬混合標準液各 20 μL を液体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：蛍光検出器（励起波長：340 nm、蛍光波長：445 nm）

カ　ラ　ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 3.9 mm、長さ 150 mm、粒径 4 μm）[注6]

溶　離　液：水ーメタノール（22+3）→0.1 min→水ーテトラヒドロフラン（9+1）→29.9 min→水ーテトラヒドロフラン（7+3）→10 min→水ーメタノール（22+3）

反応液[注7]：I 液（加水分解液）　水酸化ナトリウム 1.0 g（0.95~1.04 g）を水に溶かして 500 mL とする。

II 液（蛍光化試薬）　*o*-フタルアルデヒド 0.05 g（0.045~0.054 g）をメタノール 5 mL で溶かし、更にホウ酸ナトリウム溶液（四ホウ酸ナトリウム十水和物 19.1 g（19.05~19.14 g）を水に溶かして 1 L とする。）を加えて 500 mL とした後、2-メルカプトエタノール 50 μL を加えて混合する（使用時に調製する。）。

流　　速：溶離液　1.0 mL/min、反応液　各 0.3 mL/min

温　　度：カラム槽　40 °C、反応槽　80 °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。

なお、試料中のアルジカルブ量は、算出したアルジカルブ、アルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホンのそれぞれの量から次式により算出する。

試料中のアルジカルブ（μg/kg）$=(A+B\times 0.922+C\times 0.856)\times 25$

A ：検量線から求めたアルジカルブの質量（ng）

B ：検量線から求めたアルジカルブスルホキシドの質量（ng）

C ：検量線から求めたアルジカルブスルホンの質量（ng）

注 1　アルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホンは、アルジカルブの酸化代謝体である。

2　Chem Elut（Agilent Technologies 製）又はこれと同等のもの

3　Sep-Pak Plus C_{18} Cartridge（Waters 製）に適当な容量のリザーバーを連結したもの又はこれと同等のもの

4　Supelclean ENVI-Carb（リザーバー容量 6 mL、Sigma-Aldrich 製）又はこれと同等のもの

5　流速は 1~2 mL/min とする。

6　Carbamate Analysis（Waters 製）又はこれと同等のもの

7　反応液 I をカラムから溶出した溶離液に合わせて反応槽内の反応コイル内で加水分解させ、この溶液を室温まで冷却し、更に反応液 II を合わせて蛍光化した後、直ちに蛍光検出器に送る。

反応コイルは RXN 1000 Coil（内径 0.5 mm、長さ約 5 m、反応容量 1 mL、テフロン製、Waters 製（販売終了））又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
XMC	大すう育成用配合飼料	0.2	3	97.3	10
		0.5	3	94.7	13
		1	3	103	2.2
	乳用牛飼育用配合飼料	0.2	3	102	1.5
		0.5	3	101	4.0
		1	3	97.7	4.7
	オーツヘイ	0.2	3	93.3	2.7
		0.5	3	93.7	1.2
		1	3	90.3	13
アルジカルブ	大すう育成用配合飼料	0.2	3	90.0	14
		0.5	3	87.0	12
		1	3	96.0	1.0
	乳用牛飼育用配合飼料	0.2	3	90.0	4.8
		0.5	3	91.0	5.7
		1	3	92.7	2.7
	オーツヘイ	0.2	3	46.0	7.8
		0.5	3	53.0	21
		1	3	63.0	28
アルジカルブスルホキシド	大すう育成用配合飼料	0.2	3	79.3	21
		0.5	3	74.3	17
		1	3	74.0	5.4
	乳用牛飼育用配合飼料	0.2	3	74.0	8.9
		0.5	3	70.7	13
		1	3	68.7	16
	オーツヘイ	0.2	3	91.0	9.8
		0.5	3	84.7	20
		1	3	78.7	12
アルジカルブスルホン	大すう育成用配合飼料	0.2	3	78.7	9.0
		0.5	3	86.0	14
		1	3	84.7	4.9
	乳用牛飼育用配合飼料	0.2	3	82.0	6.8
		0.5	3	81.0	14
		1	3	79.3	13
	オーツヘイ	0.2	3	85.0	10
		0.5	3	88.3	12
		1	3	79.0	16
イソプロカルブ	大すう育成用配合飼料	0.2	3	96.7	13
		0.5	3	97.3	15
		1	3	103	4.8
	乳用牛飼育用配合飼料	0.2	3	105	0.5
		0.5	3	101	3.5
		1	3	101	3.2
	オーツヘイ	0.2	3	96.3	1.6
		0.5	3	84.7	15
		1	3	88.0	10
カルバリル	大すう育成用配合飼料	0.2	3	102	8.5
		0.5	3	95.3	13
		1	3	103	1.5
	乳用牛飼育用配合飼料	0.2	3	105	1.6
		0.5	3	99.3	0.6
		1	3	97.7	0.6
	オーツヘイ	0.2	3	99.3	2.3
		0.5	3	96.0	2.1
		1	3	87.0	9.4

・添加回収率及び繰返し精度〔続き〕

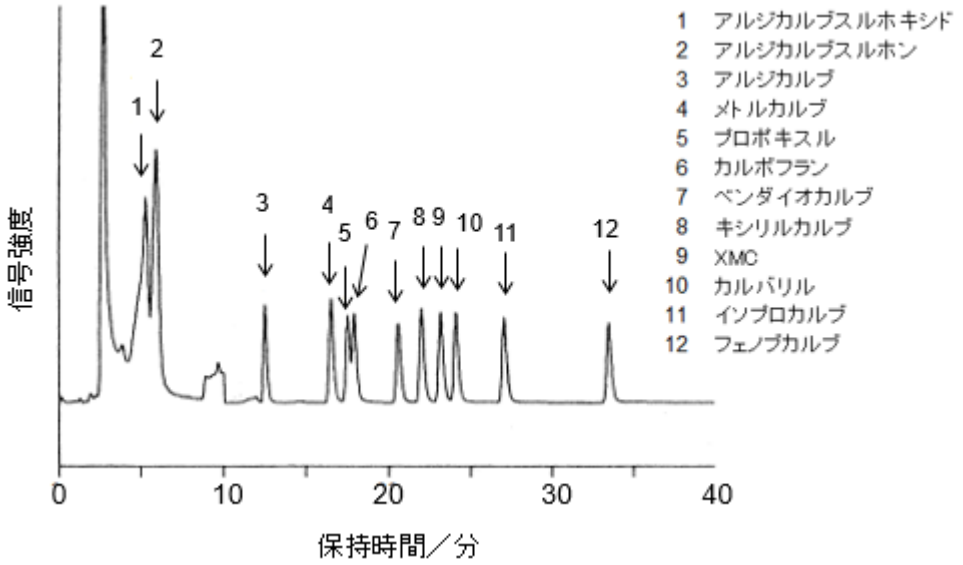
添加成分名	試料の種類	添加濃度（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
カルボフラン	大すう育成用配合飼料	0.2	3	98.0	14
		0.5	3	97.7	13
		1	3	105	1.9
	乳用牛飼育用配合飼料	0.2	3	104	2.0
		0.5	3	93.0	2.8
		1	3	98.7	2.3
	オーツヘイ	0.2	3	90.0	6.7
		0.5	3	90.7	5.6
		1	3	88.7	10
キシリルカルブ	大すう育成用配合飼料	0.2	3	94.7	8.2
		0.5	3	107	4.4
		1	3	103	1.7
	乳用牛飼育用配合飼料	0.2	3	101	4.7
		0.5	3	102	5.6
		1	3	102	3.5
	オーツヘイ	0.2	3	90.0	4.0
		0.5	3	93.7	2.7
		1	3	88.7	8.0
フェノブカルブ	大すう育成用配合飼料	0.2	3	96.0	9.5
		0.5	3	91.7	12
		1	3	102	2.6
	乳用牛飼育用配合飼料	0.2	3	102	3.0
		0.5	3	103	1.9
		1	3	99.0	2.0
	オーツヘイ	0.2	3	91.7	7.3
		0.5	3	87.0	3.4
		1	3	87.0	11
プロポキスル	大すう育成用配合飼料	0.2	3	93.3	14
		0.5	3	96.0	13
		1	3	102	3.9
	乳用牛飼育用配合飼料	0.2	3	100	11
		0.5	3	101	1.1
		1	3	101	2.6
	オーツヘイ	0.2	3	84.0	5.2
		0.5	3	91.3	1.7
		1	3	86.7	8.7
ベンダイオカルブ	大すう育成用配合飼料	0.2	3	99.3	8.7
		0.5	3	101	14
		1	3	104	0.6
	乳用牛飼育用配合飼料	0.2	3	101	5.2
		0.5	3	103	3.0
		1	3	98.3	0.6
	オーツヘイ	0.2	3	93.7	6.9
		0.5	3	95.0	3.6
		1	3	87.0	9.1
メトルカルブ	大すう育成用配合飼料	0.2	3	87.3	16
		0.5	3	95.0	13
		1	3	100	3.6
	乳用牛飼育用配合飼料	0.2	3	100	6.1
		0.5	3	97.7	5.1
		1	3	98.0	3.7
	オーツヘイ	0.2	3	90.3	6.1
		0.5	3	91.0	2.2
		1	3	86.7	9.8

・共同試験

成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（mg/kg）	添加回収率（%）	室内繰返し精度 RSD_r（%）	室間再現精度 RSD_R（%）	HorRat
XMC	成鶏用配合飼料	3	0	0.5	106	1.9	3.0	0.17
	アルファルファ	3	0	0.5	98.4	5.9	5.9	0.33
アルジカルブ	成鶏用配合飼料	3	0	0.5	108	2.2	15	0.84
	アルファルファ	3	0	0.5	66.2	16	31	1.6
アルジカルブスルホキシド	成鶏用配合飼料	3	0	0.5	102	2.0	15	0.84
	アルファルファ	3	0	0.5	107	21	22	1.3
アルジカルブスルホン	成鶏用配合飼料	3	0	0.5	106	8.3	11	0.63
	アルファルファ	3	0	0.5	90.4	3.6	13	0.71
イソプロカルブ	成鶏用配合飼料	3	0	0.5	105	2.1	3.6	0.21
	アルファルファ	3	0	0.5	97.3	3.1	8.3	0.46
カルバリル	成鶏用配合飼料	3	0	0.5	106	1.7	2.9	0.16
	アルファルファ	3	0	0.5	97.3	3.1	6.6	0.37
カルボフラン	成鶏用配合飼料	3	0	0.5	108	0.6	1.4	0.08
	アルファルファ	3	0	0.5	97.8	5.9	7.0	0.39
キシリルカルブ	成鶏用配合飼料	3	0	0.5	105	1.4	3.2	0.18
	アルファルファ	3	0	0.5	96.7	5.4	5.7	0.32
フェノブカルブ	成鶏用配合飼料	3	0	0.5	105	1.8	3.5	0.20
	アルファルファ	3	0	0.5	96.2	4.4	6.2	0.35
プロポキスル	成鶏用配合飼料	3	0	0.5	106	1.8	2.6	0.15
	アルファルファ	3	0	0.5	100	3.3	8.4	0.47
ベンダイオカルブ	成鶏用配合飼料	3	0	0.5	106	1.5	2.8	0.16
	アルファルファ	3	0	0.5	96.0	3.9	6.4	0.36
メトルカルブ	成鶏用配合飼料	3	0	0.5	104	2.1	2.9	0.16
	アルファルファ	3	0	0.5	96.0	3.9	5.8	0.33

・定量下限（単一試験室による確認）　XMC、アルジカルブ、イソプロカルブ、カルバリル及びカルボフラン：試料中　各 0.025 mg/kg、キシリルカルブ、フェノブカルブ、プロポキスル、ベンダイオカルブ及びメトルカルブ：試料中　各 0.01 mg/kg

（参考）クロマトグラム例



添加試料（大すう飼育用配合飼料に各農薬として 0.5 mg/kg 相当量添加））のクロマトグラム

3　カーバメート系農薬の液体クロマトグラフによる同時分析法（その 2）

(1)　分析対象化合物　　エチオフェンカルブ（エチオフェンカルブスルホキシド及びエチオフェンカルブスルホン[注1]を含む。）、ベンダイオカルブ及びメチオカルブ（メチオカルブスルホキシド及びメチオカルブスルホン[注2]を含む。）（3 成分）

(2)　分析法

A　　試薬の調製

1)　エチオフェンカルブスルホン標準原液　　エチオフェンカルブスルホン〔$C_{11}H_{15}NO_4S$〕10 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の全量フラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、更に標線までアセトニトリルを加えてエチオフェンカルブスルホン標準原液を調製する（この液 1 mL は、エチオフェンカルブスルホンとして 0.2 mg を含有する。）。

2)　ベンダイオカルブ標準原液　　ベンダイオカルブ〔$C_{11}H_{13}NO_4$〕10 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の全量フラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、更に標線までアセトニトリルを加えてベンダイオカルブ標準原液を調製する（この液 1 mL は、ベンダイオカルブとして 0.2 mg を含有する。）。

3)　メチオカルブスルホン標準原液　　メチオカルブスルホン〔$C_{11}H_{15}NO_4S$〕10 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の全量フラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、更に標線までアセトニトリルを加えてメチオカルブスルホン標準原液を調製する（この液 1 mL は、メチオカルブスルホンとして 0.2 mg を含有する。）。

4)　農薬混合標準液　　使用に際して、エチオフェンカルブスルホン、ベンダイオカルブ及びメチオカルブスルホン各標準原液の一部を混合し、アセトニトリルで正確に希釈し、1 mL 中にエチオフェンカルブスルホン、ベンダイオカルブ及びメチオカルブスルホンとしてそれぞれ 0.1~3 μg を含有する数点の農薬混合標準液を調製する。

B　　定　　量

抽　　出　　分析試料 5.0 g を 0.001 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 15 mL を加えて潤し、30 分間静置後、更にアセトニトリル 80 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 以下の水浴で約 15 mL まで減圧濃縮し、塩化ナトリウム 5 g（4.5~5.4 g）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）[注3]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酢酸エチル 10 mL ずつで 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に達するまで流下してエチオフェンカルブ及びその酸化代謝体、ベンダイオカルブ並びにメチオカルブ及びその酸化代謝体を溶出させる。更に酢酸エチル 70 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－酢酸エチル（1+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 5.0 μm）でろ過し、カラム処理 II に供する試料溶液とする。

カラム処理 II　試料溶液 5.0 mL をゲル浸透クロマトグラフに注入し、エチオフェンカルブ及びその酸化代謝体、ベンダイオカルブ並びにメチオカルブ及びその酸化代謝体が溶出する画分[注4]を 200 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。

アセトン 2 mL を加えて残留物を溶かし、酸化処理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（粒径 37.5~75 μm（400~200 メッシュ））[注5]充てんカラム（充てん量 60 g、内径 30 mm）[注6]

溶　離　液：シクロヘキサン－酢酸エチル（1+1）

流　　速：5 mL/min

酸化処理　試料溶液に硫酸マグネシウム七水和物溶液（20 w/v%）3 mL 及び過マンガン酸カリウム溶液（1.6 w/v%）15 mL を加えた後 30 分間静置し、更に塩化ナトリウム約 3 g を加える。この液をあらかじめアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム（360 mg）を接続した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ミニカラムの下に置き、試料溶液の入っていたなす形フラスコを酢酸エチル 10 mL ずつで 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に達するまで流下してエチオフェンカルブスルホン、ベンダイオカルブ及びメチオカルブスルホンを溶出させる。更に酢酸エチル 70 mL を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。

アセトニトリル 1 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、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー　試料溶液及び各農薬混合標準液各 20 μL を液体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：蛍光検出器（励起波長：340 nm、蛍光波長：445 nm）

カ　ラ　ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm）[注7]

溶　離　液：水－メタノール（41+9）→30 min→（3+7）→3 min→（1+9）

反　応　液[注8]：I 液（加水分解液）　水酸化ナトリウム 1.0 g（0.95~1.04 g）を水に溶かして 500 mL とする。

II 液（蛍光化試薬）　*o*-フタルアルデヒド 0.05 g（0.045~0.054 g）をメタノール 5 mL で溶かし、更にホウ酸ナトリウム溶液（四ホウ酸ナトリウム十水和物 19.1 g（19.05~19.14 g）を水に溶かして 1 L とする。）を加えて 500 mL とした後、2-メルカプトエタノール 50 μL を加えて混合する（使用時に調製する。）。

流　　速：溶離液　1.0 mL/min、反応液　各 0.3 mL/min

温　　度：カラム槽　40 °C、反応槽　80~90 °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、次式によりエチオフェンカルブ〔$C_{11}H_{15}NO_2S$〕量、ベンダイオカルブ量及びメチオカルブ〔$C_{11}H_{15}NO_2S$〕量を算出する。

試料中のエチオフェンカルブ（μg/kg）$=E \times 20 \times 0.876$

E ：検量線から求めたエチオフェンカルブスルホンの質量（ng）

試料中のベンダイオカルブ（μg/kg）$=B \times 20 \times 1$

B ：検量線から求めたベンダイオカルブの質量（ng）

試料中のメチオカルブ（μg/kg）$=M \times 20 \times 0.876$

M ：検量線から求めたメチオカルブスルホンの質量（ng）

注 1　エチオフェンカルブスルホキシド及びエチオフェンカルブスルホンは、エチオフェンカルブの酸化代謝体である。

2　メチオカルブスルホキシド及びメチオカルブスルホンは、メチオカルブの酸化代謝体である。

3　Chem Elut（Agilent Technologies 製）又はこれと同等のもの

4　調製したカラムのエチオフェンカルブ及びその酸化代謝体、ベンダイオカルブ並びにメチオカルブ及びその酸化代謝体の溶出画分を確認して分取する。

5　Bio-Beads S-X3（Bio Rad 製）又はこれと同等のもの

6　充てん剤 60 g（59.5~60.5 g）をシクロヘキサン－酢酸エチル（1+1）で一夜膨潤させた後、カラム管に充てんする。（充てん剤の高さ約 360 mm）

7　STR ODS-II（信和化工製（販売終了））又はこれと同等のもの

8　カラムから溶出した溶離液に反応液 I を合わせて反応槽内の反応コイル内で加水分解させ、この溶液を室温まで冷却し反応液 II を合わせて蛍光化した後、直ちに蛍光検出器に送る。

反応コイルは RXN 1000 Coil（内径約 0.5 mm、長さ約 5 m、反応容量 1 mL、テフロン製、Waters 製（販売終了））又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

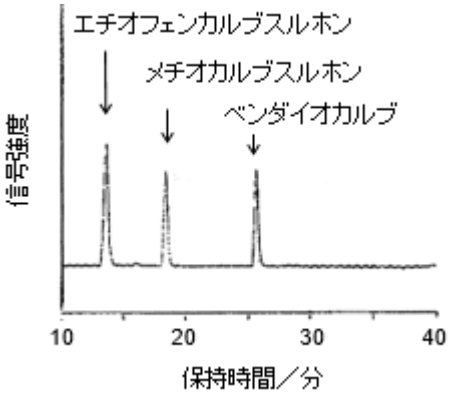
添加成分名	試料の種類	添加濃度（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
エチオフェンカルブ	成鶏飼育用配合飼料	0.1	3	86.3	4.7
		0.5	3	90.0	3.3
		1	3	84.7	4.1
	とうもろこし	0.1	3	90.3	3.4
		0.5	3	87.7	0.7
		1	3	87.3	0.7
	アルファルファミール	0.1	3	82.3	6.7
		0.5	3	84.0	1.2
		1	3	81.7	3.5
ベンダイオカルブ	成鶏飼育用配合飼料	0.1	3	97.0	5.4
		0.5	3	100	5.7
		1	3	98.0	2.7
	とうもろこし	0.1	3	98.7	5.2
		0.5	3	96.7	2.6
		1	3	101	1.5
	アルファルファミール	0.1	3	96.7	2.4
		0.5	3	95.3	8.9
		1	3	96.7	4.2
メチオカルブ	成鶏飼育用配合飼料	0.1	3	77.7	9.0
		0.5	3	84.7	1.4
		1	3	79.3	5.8
	とうもろこし	0.1	3	75.7	2.0
		0.5	3	81.7	1.4
		1	3	79.7	0.7
	アルファルファミール	0.1	3	84.7	1.8
		0.5	3	90.7	3.9
		1	3	86.3	10

・共同試験

成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（mg/kg）	添加回収率（%）	室内繰返し精度 RSD_r（%）	室間再現精度 RSD_R（%）	HorRat
エチオフェンカルブ	成鶏飼育用配合飼料	3	0	0.25	73.7	2.5	15	0.71
	オーツヘイ	3	0	0.25	60.8	3.5	14	0.67
ベンダイオカルブ	成鶏用配合飼料	3	0	0.25	97.0	3.8	4.9	0.25
	オーツヘイ	3	0	0.25	92.4	2.1	5.2	0.26
メチオカルブ	成鶏用配合飼料	3	0	0.25	86.6	6.8	12	0.59
	オーツヘイ	3	0	0.25	83.4	3.0	8.1	0.40

・定量下限（単一試験室による確認）　　試料中　各 0.02 mg/kg

（参考）クロマトグラム例



標準液（各農薬として 20 ng 注入）のクロマトグラム

4　カーバメート系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法

(1)　分析対象化合物　　XMC、イソプロカルブ、カルバリル、キシリルカルブ、フェノブカルブ、プロポキスル及びメトルカルブ（7 成分）

(2)　分析法

A　試薬の調製

1)　農薬混合標準液　　XMC〔$C_{10}H_{13}NO_2$〕、イソプロカルブ〔$C_{11}H_{15}NO_2$〕、カルバリル〔$C_{12}H_{11}NO_2$〕、キシリルカルブ〔$C_{10}H_{13}NO_2$〕、フェノブカルブ〔$C_{12}H_{17}NO_2$〕、プロポキスル〔$C_{11}H_{15}NO_3$〕及びメトルカルブ〔$C_9H_{11}NO_2$〕各 20 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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、各標準原液の一部を混合し、2,2,4-トリメチルペンタンーアセトン（4+1）で正確に希釈し、1 mL 中に各農薬として 0.5~4 μg を含有する数点の農薬混合標準液を調製する。

2)　凝固液　　塩化アンモニウム 2.0 g（1.95~2.04 g）を水 400 mL に溶かし、リン酸 4 mL を加えて調製する。

3)　過マンガン酸カリウム・リン酸液　　過マンガン酸カリウム 2.5 g（2.45~2.54 g）をリン酸（1+400）1 L に溶かす。

4)　硝酸銀コーティングアルミナ　　130 °C で一昼夜乾燥したカラムクロマトグラフ用中性アルミナ（粒径 63~200 μm（230~70 メッシュ））[注1]に 5 v/w%相当量の硝酸銀溶液（50 w/v%）を加えて振り混ぜる。

5)　ケイ酸マグネシウム　　130 °C で一昼夜乾燥した合成ケイ酸マグネシウム（粒径 149~250 μm（100~60 メッシュ））[注2]に 5 v/w%相当量の水を加えて振り混ぜる。

6)　ケイソウ土　　ケイソウ土[注3]を温水及びメタノールで洗浄した後、風乾する。

B　定　　量

抽　　出　　分析試料 20 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、500 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。500 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、先の分液漏斗及び残さを順次アセトン 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過する。ろ液を 40 °C 以下の水浴で約 40 mL まで減圧濃縮し、精製に供する試料溶液とする。

精　　製　　試料溶液をあらかじめ塩化ナトリウム溶液（5 w/v%）100 mL 及びジクロロメタン 50 mL を入れた 300 mL の分液漏斗 A に加え、3 分間激しく振り混ぜた後静置し、ジクロロメタン層（下層）を 300 mL のなす形フラスコに入れる。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なす形フラスコに合わせる。ジクロロメタン層を 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。

アセトン 20 mL を加えて残留物を溶かし、ケイソウ土約 2 g、凝固液 80 mL 及

び過マンガン酸カリウム・リン酸液 20 mL を加え、軽く振り混ぜた後 5 分間静置し、上澄み液を 300 mL の分液漏斗 B にろ紙（5 種 A）でろ過する。先のなす形フラスコにアセトン 10 mL を加えて軽く振り混ぜ、凝固液 40 mL を加え、同様に操作する。更に、先のなす形フラスコ及びろ紙を順次少量の凝固液－アセトン（4+1）で洗浄し、洗液を先のろ紙を通して分液漏斗 B に合わせる。分液漏斗 B にジクロロメタン 50 mL を加え、3 分間激しく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。分液漏斗 B にジクロロメタン 50 mL を加え、同様に 2 回操作し、各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、500 mL のなす形フラスコにろ紙（5 種 A）でろ過し、先の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。

ヘキサン－アセトン（9+1）5 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理　硫酸ナトリウム（無水）3 g（2.7~3.3 g）、ケイ酸マグネシウム 2 g（1.8~2.2 g）、硫酸ナトリウム（無水）3 g（2.7~3.3 g）、硝酸銀コーティングアルミナ 2 g（1.8~2.2 g）、及び硫酸ナトリウム（無水）3 g（2.7~3.3 g）をそれぞれヘキサン－アセトン（9+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。

500 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（9+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農薬を流出させた後、更にヘキサン－アセトン（9+1）200 mL をカラムに加えて同様に流出させる。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とする。

ガスクロマトグラフィー　試料溶液及び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：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（50 %ジフェニル－50 %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）[注4]
キャリヤーガス：He（4 mL/min）
メイクアップガス：He（26 mL/min）
燃　料　ガ　ス：H_2（4 mL/min）
助　燃　ガ　ス：乾燥空気（100 mL/min）
試 料 導 入 法：クールオンカラム

試料導入部温度：280 °C

カラム槽温度：50 °C（1 min 保持）→昇温 20 °C/min→180 °C（5 min 保持）→昇温 2 °C/min→190 °C（2 min 保持）→昇温 15 °C/min→230 °C

検出器温度：300 °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、試料中の各農薬量を算出する。

注 1　Aluminiumoxid 90 Aktiv neutral Art. 1077（Merck 製）又はこれと同等のもの

2　フロリジル（Floridin 製）又はこれと同等のもの

3　Hyflo Supercel（Celite Corporation 製）又はこれと同等のもの

4　DB-17（Agilent Technologies 製）又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

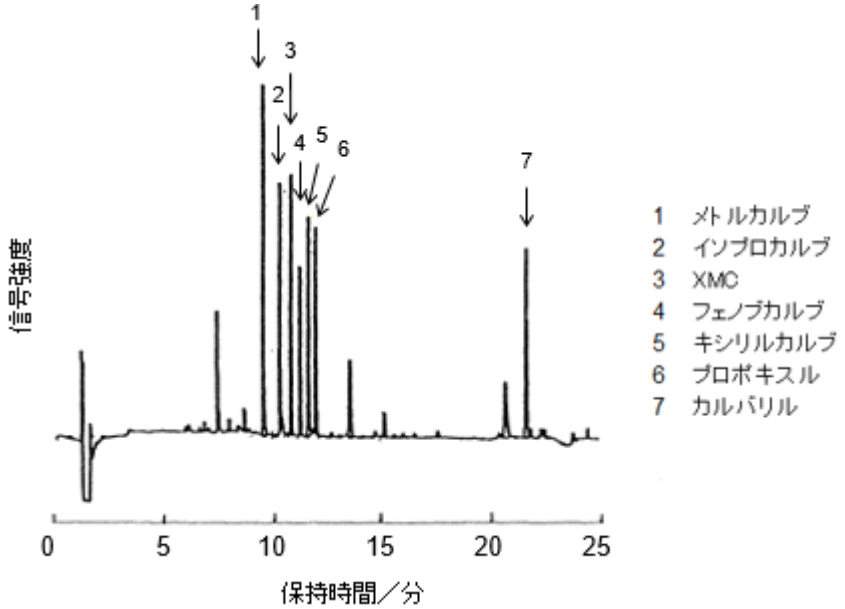
添加成分名	試料の種類	添加濃度（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
XMC	配合飼料	0.1	3	101	11
		0.25	3	92.7	3.3
		0.5	3	100	3.0
イソプロカルブ	配合飼料	0.1	3	105	11
		0.25	3	103	2.8
		0.5	3	101	2.6
カルバリル	配合飼料	0.1	3	101	4.7
		0.25	3	96.3	9.6
		0.5	3	99.3	9.6
キシリルカルブ	配合飼料	0.1	3	101	10
		0.25	3	93.7	13
		0.5	3	104	3.4
フェノブカルブ	配合飼料	0.1	3	85.0	5.1
		0.25	3	83.3	5.0
		0.5	3	81.3	1.4
プロポキスル	配合飼料	0.1	3	102	8.5
		0.25	3	99.0	6.1
		0.5	3	107	2.3
メチオカルブ	配合飼料	0.1	3	105	6.7
		0.25	3	99.0	1.7
		0.5	3	107	6.5

・共同試験

成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（mg/kg）	添加回収率（%）	室内繰返し精度 RSD_r（%）	室間再現精度 RSD_R（%）	HorRat
XMC	とうもろこし	5	0	0.25	99.3	8.0	11	0.54
イソプロカルブ	とうもろこし	5	0	0.25	93.9	6.6	11	0.57
カルバリル	とうもろこし	5	0	0.25	97.0	14	14	0.69
キシリルカルブ	とうもろこし	5	0	0.25	99.1	7.3	9.2	0.47
フェノブカルブ	とうもろこし	5	0	0.25	88.7	6.9	12	0.59
プロポキスル	とうもろこし	5	0	0.25	101	6.5	8.4	0.43
メトルカルブ	とうもろこし	5	0	0.25	97.3	7.6	12	0.61

・定量下限（単一試験室による確認）　　試料中　各 0.05 mg/kg

（参考）クロマトグラム例



添加試料（配合飼料に各農薬として 0.1 mg/kg 相当量添加）のクロマトグラム

5　含リンアミノ酸系農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法

(1)　分析対象化合物　　グリホサート[注1]（*N*-アセチルグリホサート[注2]を含む。）、グルホシネート（*N*-アセチルグルホシネート[注3]を含む。）及び 3-メチルホスフィニコプロピオン酸（3 成分）

(2)　適用範囲　　穀類、大豆油かす、稲わら及び稲発酵粗飼料

(3)　分析法

A　　試薬の調製

1)　グリホサート標準原液　　グリホサート〔$C_3H_8NO_5P$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、25 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えてグリホサート標準原液を調製する（この液 1 mL は、グリホサートとして 1 mg を含有する。）。

2)　グルホシネート標準原液　　グルホシネート〔$C_5H_{15}N_2O_4P$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、25 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えてグルホシネート標準原液を調製する（この液 1 mL は、グルホシネートとして 1 mg を含有する。）。

3)　3-メチルホスフィニコプロピオン酸標準原液　　3-メチルホスフィニコプロピオン酸〔$C_4H_9O_4P$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、25 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えて 3-メチルホスフィニコプロピオン酸標準原液を調製する（この液 1 mL は、3-メチルホスフィニコプロピオン酸として 1 mg を含有する。）。

4)　農薬混合標準液　　使用に際して、グリホサート標準原液、グルホシネート標準原液及び 3-メチルホスフィニコプロピオン酸標準原液の一部を混合し、更に水で正確に希釈し、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 を含有する農薬混合標準原液を調製する。

B　定　　量

抽　　出　　分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、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、上澄み液の一部を水で正確に 2.5 倍に希釈し、カラム処理 I に供する試料溶液とする。また、試料が大豆及び大豆油かすである場合は、上澄み液の一部をアセトンで正確に 2.5 倍に希釈した後、15 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500×g で 5 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 [注4]　　ジビニルベンゼン－*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（500 mg）[注5] の下にスルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン－*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（225 mg）[注6] を連結し、メタノール 6 mL 及び水 12 mL で順次洗浄する。200 mL のなす形フラスコ[注7] をミニカラムの下に置き、試料溶液 1 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。更に水 18 mL をミニカラムに加え、同様に流出させ、誘導体化に供する試料溶液とする。

誘導体化　　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 を加えて残留物を溶かし[注8]、この容器を密栓して 100 °C で 2 時間加熱[注9] 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 4 mL を正確に加えて残留物を溶かし[注8]、カラム処理 II に供する試料溶液とする。

カラム処理 II [注4]　　アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム（360 mg）[注10] の下にシリカゲルミニカラム（690 mg）[注11] を連結し、酢酸エチル 10 mL で洗浄する。試料溶液 2 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。更に酢酸エチル 18 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、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。次に、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－水（19+1）10 mL をシリカゲルミニカラムに加えてグリホサート誘導体、3-メチルホスフィニコプロピオン酸誘導体及び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。0.01 v/v%ギ酸溶液 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし[注8]、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とする。

標準液の誘導体化　　農薬混合標準原液 1 mL を 200 mL のなす形フラスコに正確に入れ、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 1 mL 及びオルト酢酸トリメチル 4 mL を加えて残留物を溶かし[注8]、この容

器を密栓して 100 °C で 2 時間加熱[注9]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。0.01 v/v%ギ酸溶液 10 mL を正確に加えて残留物を溶かし[注8]、更に 0.01 v/v%ギ酸溶液で正確に希釈し、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 0.3~300 ng 相当量を含有する数点の標準液を調製する。

液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定　試料溶液及び各標準液各 5 μL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、選択反応検出クロマトグラムを得る。

測定条件　例

（液体クロマトグラフ部）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm）[注12]

溶離液：0.01 v/v%ギ酸溶液－アセトニトリル（93+7）（12 min 保持）→ 3 min →（5+95）（10 min 保持）

流速：0.2 mL/min

カラム槽温度：40 °C

（タンデム型質量分析計部[注13]）

検出器：四重極型質量分析計

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化（ESI）法（正イオンモード）

イオン源温度：120 °C

デソルベーションガス：N_2（800 L/h、400 °C）

キャピラリー電圧：3 kV

コーンガス：N_2（50 L/h）

コーン電圧：下表のとおり

コリジョンガス：Ar（0.2 mL/min）

コリジョンエネルギー：下表のとおり

モニターイオン：下表のとおり

表　各物質の測定条件

測定対象物質	プリカーサーイオン（*m*/*z*）	プロダクトイオン 定量用（*m*/*z*）	プロダクトイオン 確認用（*m*/*z*）	コーン電圧（V）	コリジョンエネルギー（eV）
グリホサート誘導体	254	102	152	22	17
グルホシネート誘導体	252	210	150	26	14
3-メチルホスフィニコプロピオン酸誘導体	181	149	93	21	14

計　算　得られた選択反応検出クロマトグラムからグリホサート誘導体、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面積を求めて検量線を作成し、試料中のグリホサート（*N*-アセチルグリホサートを含む。）量、グルホシネート（*N*-アセチルグルホシネートを含む。）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求めた後、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（mg/kg）$= A + B \times 1.3$

A ：検量線から求めた試料中のグルホシネート（*N*-アセチルグルホシネートを含む）の濃度（mg/kg）

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

注 1　本法では、試料中のグリホサート、グリホサートアンモニウム塩、グリホサートイソプロピルアミン塩、グリホサートトリメシウム塩及びグリホサートナトリウム塩をグリホサート誘導体に誘導体化し、グリホサートとして定量する。

2　グリホサート及び *N*-アセチルグリホサートの誘導体は同一であることから、*N*-アセチルグリホサートはグリホサートとの合量として定量する。

3　グルホシネート及び *N*-アセチルグルホシネートの誘導体は同一であることから、*N*-アセチルグルホシネートはグルホシネートとの合量として定量する。

4　流速は 2~3 mL/min 程度とする。必要に応じて吸引マニホールドを使用する。

5　Oasis HLB（Waters 製、リザーバー容量 6 mL）又はこれと同等のもの

6　Oasis Plus MCX（Waters 製）又はこれと同等のもの

7　50 mL のなす形フラスコを用いる場合には、同様に操作した後、流出液を少量の水で 200 mL のなす形フラスコに移し、誘導体化に供する試料溶液とする。

8　必要に応じて超音波処理し、十分に拡散させる。

9　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。

10　Sep-Pak Plus NH_2 Cartridge（Waters 製）に適当な容量のリザーバーを連結したもの又はこれと同等のもの

11　Sep-Pak Plus Silica Cartridge（Waters 製）に適当な容量のリザーバーを連結したもの又はこれと同等のもの

12　ZORBAX Eclipse XDB-C18（Agilent Technologies 製）又はこれと同等のもの

13　ACQUITY TQD（Waters 製）による条件例

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r (%)
グリホサート	えん麦	30	5	94.8	2.0
	大麦	0.04	3	117	17
		20	3	82.8	6.5
		30	5	90.8	1.6
	きな粉	0.04	5	85.6	18
		20	5	82.3	4.1
	小麦	0.5	3	85.0	7.0
		5	3	86.4	6.1
		30	5	98.2	0.6
	大豆	0.04	5	115	12
		20	5	109	4.1
	とうもろこし	0.1	3	85.4	13
		1	3	80.1	7.6
		5	5	81.3	3.0
	マイロ	30	5	85.6	1.7
	ライ麦	30	5	77.5	4.7
	大豆油かす	0.04	5	95.7	13
		20	5	104	4.6
	稲わら	0.04	3	100	14
		0.2	3	97.3	4.2
	稲発酵粗飼料	0.04	3	83.0	7.2
		0.2	3	88.6	8.8
N-アセチル グリホサート	えん麦	0.04	5	104	11
		20	5	107	6.1
	大麦	0.04	5	101	4.7
		20	5	111	5.3
	きな粉	0.04	5	89.0	6.9
		20	5	84.5	5.4
	大豆	0.04	5	110	15
		20	5	92.6	4.9
	とうもろこし	0.04	5	102	7.1
		1	5	118	6.8
		5	5	96.0	7.0
	大豆油かす	0.04	5	93.9	11
		20	5	104	4.4
	稲わら	0.04	5	104	10
		0.2	5	114	5.0
	稲発酵粗飼料	0.02	5	105	10
		0.04	5	101	14
		0.2	5	107	9.3
グルホシネート	大麦	0.05	3	88.0	14
		0.5	3	100	6.5
	きな粉	0.05	5	102	12
		2	5	80.9	11
	小麦	0.1	3	102	16
		0.2	3	93.1	6.2
	大豆	0.05	5	102	12
		2	5	111	9.4
	とうもろこし	0.05	3	103	14
		0.1	3	112	2.6
	大豆油かす	0.05	5	84.8	3.7
		2	5	111	8.2
	稲わら	0.05	3	103	16
		0.5	3	94.2	5.4
	稲発酵粗飼料	0.05	3	92.7	11
		0.5	3	84.6	2.2

・添加回収率及び繰返し精度〔続き〕

添加成分名	試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r (%)
3-メチル ホスフィニコ プロピオン酸	大麦	0.05	3	81.2	17
		0.5	3	89.9	5.3
	きな粉	0.05	5	94.4	10
		2	5	90.0	3.7
	小麦	0.05	3	98.0	7.2
		0.2	3	80.0	8.9
	大豆	0.05	5	107	3.7
		2	5	111	3.1
	とうもろこし	0.05	3	108	5.5
		0.1	3	85.7	7.0
	大豆油かす	0.05	5	79.1	11
		2	5	113	6.0
	稲わら	0.05	3	117	3.3
		0.5	3	92.4	7.2
	稲発酵粗飼料	0.05	3	91.1	4.1
		0.5	3	76.9	10
N-アセチル グルホシネート	大麦	0.05	3	101	19
		0.5	3	89.0	7.0
	きな粉	0.05	5	107	17
		2	5	88.4	8.1
	小麦	0.05	3	74.1	11
		0.2	3	82.2	7.4
	大豆	0.05	5	92.1	9.0
		2	5	111	5.7
	とうもろこし	0.05	3	85.4	11
		0.1	3	88.0	5.3
	大豆油かす	0.05	5	86.0	18
		2	5	117	3.3
	稲わら	0.05	3	84.4	16
		0.5	3	82.4	13
	稲発酵粗飼料	0.05	3	82.3	10
		0.5	3	73.0	8.3

・共同試験

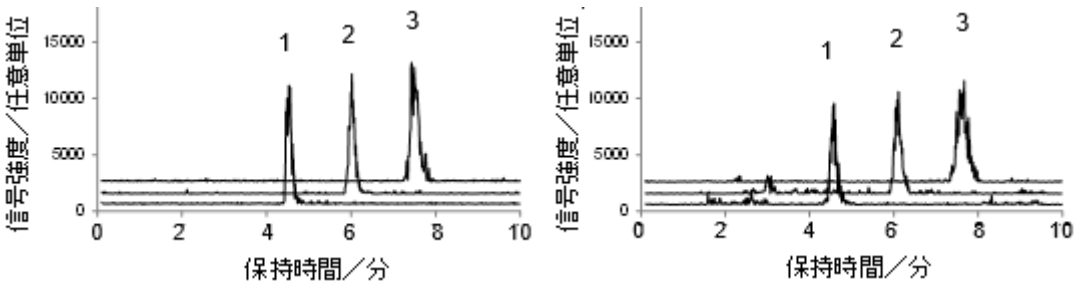
成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (mg/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD_r (%)	室間再現精度 RSD_R (%)	HorRat
グリホサート	大麦	10	0	20	75.4	10	22	2.0
	きな粉	8	0	5	94.4	11	15	1.2
	大豆1	8	0	0.2	91.6	13	16	0.76
	大豆2	8	0	20	84.9	8.7	15	1.4
	とうもろこし	9	1	1	79.7	5.1	20	1.2
	大豆油かす1	8	0	1	98.3	13	17	1.1
	大豆油かす2	8	0	12	92.3	11	14	1.3
	大豆油かす3	8	0	24	92.1	9.0	16	1.6
	稲わら	10	0	0.2	88.7	18	32	1.6
	稲発酵粗飼料	10	0	0.2	81.7	12	23	1.1
グルホシネート	大麦	10	0	0.5	99.3	11	15	0.84
	きな粉	8	0	0.5	105	11	17	0.97
	大豆1	8	0	0.1	94.3	13	23	1.0
	大豆2	8	0	2	94.7	11	16	1.1
	とうもろこし	10	0	0.1	98.3	8.1	21	0.96
	大豆油かす1	8	0	0.2	101	12	16	0.77
	大豆油かす2	8	0	1.5	103	10	15	1.0
	大豆油かす3	8	0	2.5	102	6.8	18	1.3
	稲わら	10	0	0.5	96.8	6.5	17	0.93
	稲発酵粗飼料	10	0	0.5	89.1	8.0	15	0.85
3-メチルホスフィニコプロピオン酸	大麦	9	1	0.5	91.1	10	14	0.77
	きな粉	8	0	0.5	106	20	26	1.5
	大豆1	8	0	0.1	116	15	25	1.1
	大豆2	8	0	2	102	8.2	19	1.3
	とうもろこし	7	3	0.1	90.5	13	33	1.5
	大豆油かす1	8	0	0.2	106	8.2	26	1.3
	大豆油かす2	8	0	1.5	117	6.2	16	1.1
	大豆油かす3	8	0	2.5	112	7.4	22	1.6
	稲わら	9	1	0.5	91.1	6.3	13	0.71
	稲発酵粗飼料	9	1	0.5	86.2	5.7	17	0.93

・定量下限（単一試験室による確認）　グリホサート及び *N*-アセチルグリホサート：試料（稲発酵粗飼料は風乾物。以下本項において同じ。）中　各 0.04 mg/kg、その他：試料中　各 0.05 mg/kg

・検出下限（単一試験室による確認）　グリホサート及び *N*-アセチルグリホサート：試料中　各 0.01 mg/kg、その他：試料中　各 0.02 mg/kg

（参考）クロマトグラム例

A　　B



標準液及び添加試料のクロマトグラム

（矢印は 1：グルホシネート誘導体、2：3-メチルホスフィニコプロピオン酸、3：グリホサート誘導体を示す。）

A：標準液（各農薬として 1 ng/mL）

B：添加試料（大豆油かすにグリホサートとして 0.04 mg/kg、その他農薬として各 0.05 mg/kg 相当量添加）

6　トリアゾール系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法

(1)　分析対象化合物　　トリアジメノール、トリアジメホン及びプロピコナゾール（3 成分）

(2)　分析法

A　　試薬の調製

1)　トリアジメノール標準原液　　トリアジメノール〔$C_{14}H_{18}ClN_3O_2$〕20 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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、更に標線まで 2,2,4-トリメチルペンタンを加えて標準原液を調製する（この溶液 1 mL はトリアジメノールとして 0.2 mg を含有する。）。

2)　トリアジメホン標準原液　　トリアジメホン〔$C_{14}H_{16}ClN_3O_2$〕20 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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、更に標線まで 2,2,4-トリメチルペンタンを加えて標準原液を調製する（この溶液 1 mL はトリアジメホンとして 0.2 mg を含有する。）。

3)　プロピコナゾール標準原液　　プロピコナゾール〔$C_{15}H_{17}Cl_2N_3O_2$〕20 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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、更に標線まで 2,2,4-トリメチルペンタンを加えて標準原液を調製する（この溶液 1 mL はプロピコナゾールとして 0.2 mg を含有する。）。

4)　農薬混合標準液　　使用に際して、トリアジメノール、トリアジメホン及びプロピコナゾール各標準原液の一部を混合し、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 0.05~2 μg を含有する数点の農薬混合標準液を調製する。

B　定　　量

抽　　出　　分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、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、10 分間静置後、更にアセトニトリル 100 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出する。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）[注1]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－酢酸エチル（9+1）20 mL ずつで 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－酢酸エチル（9+1）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、カラム処理 II に供する試料溶液とする。

カラム処理 II　　試料溶液 5.0 mL をゲル浸透クロマトグラフに注入し、定量する各農薬が流出する画分を 200 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－アセトン（29+1）2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、カラム処理 III 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　　速：5 mL/min

流 出 画 分：70~100 mL

カラム処理 III　　合成ケイ酸マグネシウムミニカラム（910 mg）[注2]をヘキサン－アセトン（29+1）5 mL で洗浄する。

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－アセトン（29+1）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出させる。

100 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、ヘキサン－アセトン（17+3）25 mL をミニカラムに加えて定量する各農薬を溶出させる。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。

ヘキサン－アセトン（49+1）2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、カラム処理 IV に供する試料溶液とする。

カラム処理 IV　シリカゲルミニカラム（690mg）[注3] をヘキサン－アセトン（49+1）10 mL で洗浄する。

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－アセトン（49+1）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出させる。

100 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、ヘキサン－アセトン（17+3）20 mL をミニカラムに加えて定量する各農薬を溶出させる。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）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とする。

ガスクロマトグラフィー　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：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（5 %ジフェニル－95 %ジメチルポリシロキサン、内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 µm）[注4]
キャリヤーガス：He（1.5 mL/min）
メイクアップガス：He（30 mL/min）
燃料ガス：H_2（4 mL/min）
助燃ガス：乾燥空気（140 mL/min）
試料導入法：スプリットレス（60 s）
試料導入部温度：270 °C
カラム槽温度：60 °C（2 min 保持）→昇温 30 °C/min→200 °C→昇温 10 °C/min→280 °C（40 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トリアジメノール及びプロピコナゾールはそれぞれ 2 つのピーク高さの和を、トリアジメホンは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。

注 1　Chem Elut（Agilent Technologies 製）又はこれと同等のもの
2　Sep-Pak Plus Florisil Cartridge（Waters 製）に適当な容量のリザーバーを連結したもの又はこれと同等のもの
3　Sep-Pak Plus Silica Cartridge（Waters 製）に適当な容量のリザーバーを連結したもの又はこれと同等のもの
4　DB-5（Agilent Technologies 製）に適当な容量のリザーバーを連結したもの又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

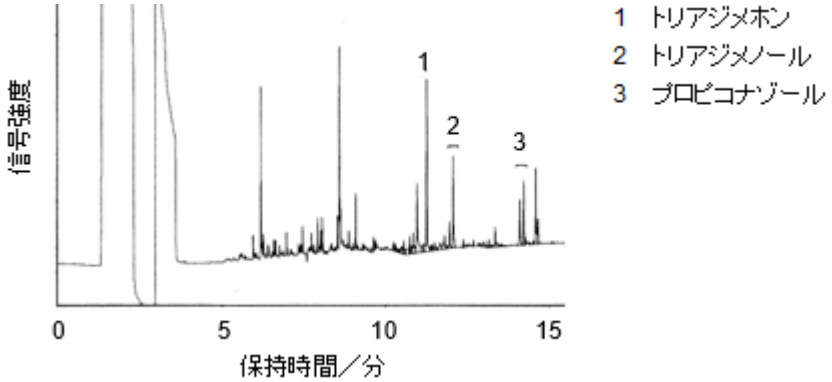
添加成分名	試料の種類	添加濃度（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
トリアジメノール	成鶏飼育用配合飼料	0.1	3	93.8	5.1
		0.5	3	96.6	5.2
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	0.1	3	95.6	4.5
		0.5	3	88.4	11
	とうもろこし	0.1	3	105	0.9
		0.5	3	97.0	1.1
	アルファルファ	0.1	3	82.7	4.0
		0.5	3	86.3	4.5
トリアジメホン	成鶏飼育用配合飼料	0.1	3	99.6	3.7
		0.5	3	103	2.4
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	0.1	3	101	3.3
		0.5	3	104	4.5
	とうもろこし	0.1	3	101	2.7
		0.5	3	104	1.9
	アルファルファ	0.1	3	98.1	2.9
		0.5	3	102	5.4
プロピコナゾール	成鶏飼育用配合飼料	0.1	3	99.4	8.7
		0.5	3	103	3.8
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	0.1	3	95.3	3.3
		0.5	3	101	3.3
	とうもろこし	0.1	3	104	1.4
		0.5	3	98.7	3.7
	アルファルファ	0.1	3	96.4	0.8
		0.5	3	96.5	4.5

・共同試験

成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（mg/kg）	添加回収率（%）	室内繰返し精度 RSD_r（%）	室間再現精度 RSD_R（%）	HorRat
トリアジメノール	成鶏飼育用配合飼料	6	0	0.1	97.8	4.0	7.8	0.36
トリアジメホン	成鶏飼育用配合飼料	6	0	0.1	94.9	5.4	7.3	0.33
プロピコナゾール	成鶏飼育用配合飼料	6	0	0.1	96.4	3.2	6.9	0.31

・定量下限（単一試験室による確認）　　試料中　各 0.05 mg/kg

（参考）クロマトグラム例



添加試料（配合飼料に各農薬として 0.1 mg/kg 相当量添加）のクロマトグラム

7　有機塩素系農薬のガスクロマトグラフによる同時分析法

(1)　分析対象化合物　　*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、エンドリン、ディルドリ

ン、ヘプタクロル及びヘプタクロルエポキシド（15 成分）

(2)　分析法

A　試薬の調製

1)　農薬混合標準液　α-BHC〔$C_6H_6Cl_6$〕、β-BHC〔$C_6H_6Cl_6$〕、γ-BHC〔$C_6H_6Cl_6$〕、δ-BHC〔$C_6H_6Cl_6$〕、*o,p′*-DDD〔$C_{14}H_{10}Cl_4$〕、*p,p′*-DDD〔$C_{14}H_{10}Cl_4$〕、*o,p′*-DDE〔$C_{14}H_8Cl_4$〕、*p,p′*-DDE〔$C_{14}H_8Cl_4$〕、*o,p′*-DDT〔$C_{14}H_9Cl_5$〕、*p,p′*-DDT〔$C_{14}H_9Cl_5$〕、アルドリン〔$C_{12}H_8Cl_6$〕、エンドリン〔$C_{12}H_8Cl_6O$〕、ディルドリン〔$C_{12}H_8Cl_6O$〕、ヘプタクロル〔$C_{10}H_5Cl_7$〕及びヘプタクロルエポキシド〔$C_{10}H_5Cl_7O$〕各 20 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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、各標準原液の一部を混合し、2,2,4-トリメチルペンタンーアセトン（4+1）で正確に希釈し、1 mL 中に各農薬としてそれぞれ 0.05~0.2 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））[注1]を 130 °C で 5 時間乾燥する。

B　定　量

抽　出　分析試料 10~50 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、500 mL の分液漏斗に入れ、アセトニトリルー水（13+7）300 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出し、ビーカーをブフナー漏斗の下に置き、ろ紙（5 種 B）で吸引ろ過して抽出液とする。

精　製　抽出液 150 mL をあらかじめ塩化ナトリウム溶液（5 w/v%）600 mL 及びヘキサン 100 mL を入れた 1 L の分液漏斗 A に加え、5 分間激しく振り混ぜた後静置する。水層（下層）を 1 L の分液漏斗 B に入れ、ヘキサン 50 mL を加えて穏やかに振り混ぜた後静置する。水層を捨て、ヘキサン層（上層）を分液漏斗 A に合わせ、更に分液漏斗 A に水 100 mL を加えて穏やかに振り混ぜた後静置し、水層を 500 mL の分液漏斗 C に入れる。分液漏斗 A に水 100 mL を加え、同様に操作し、水層を分液漏斗 C に合わせ、ヘキサン層を 500 mL の三角フラスコに入れる。分液漏斗 C にヘキサン 100 mL を加え、穏やかに振り混ぜた後静置し、水層を捨て、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、500 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 以下の水浴で約 5 mL まで減圧濃縮し、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 9 g（8.5~9.5 g）及び硫酸ナトリウム（無水）3 g（2.7~3.3 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、ヘキサン 40 mL を加え、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少量のヘキサンで洗浄し、洗液をカラムに加える。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農薬を流出させる。更にヘキサン－ジエチルエーテル（17+3）150 mL を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、更に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）3 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とする。

ガスクロマトグラフィー　試料溶液及び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：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 0.32 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm）[注2]

キャリヤーガス：He（1.5 mL/min）

メイクアップガス：N_2（60 mL/min）

試料導入法：クールオンカラム

試料導入部温度：250 °C

カラム槽温度：60 °C（1 min 保持）→昇温 20 °C/min→180 °C（1 min 保持）→昇温 2 °C/min→220 °C（1 min 保持）→昇温 1 °C/min→250 °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。

注 1　フロリジル（Floridin 製）又はこれと同等のもの

2　DB-1701（Agilent Technologies 製）又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
α-BHC	配合飼料	0.01	3	85.8	10
		0.05	3	88.8	7.9
		0.1	3	81.7	8.4
	とうもろこし	0.01	3	94.7	20
		0.05	3	96.1	19
		0.1	3	93.3	8.7
β-BHC	配合飼料	0.01	3	103	12
		0.05	3	104	3.2
		0.1	3	106	3.2
	とうもろこし	0.01	3	109	8.3
		0.05	3	105	13
		0.1	3	113	5.2

・添加回収率及び繰返し精度〔続き〕

添加成分名	試料の種類	添加濃度（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
γ-BHC	配合飼料	0.01	3	81.1	12
		0.05	3	90.9	3.0
		0.1	3	92.5	3.7
	とうもろこし	0.01	3	106	11
		0.05	3	104	13
		0.1	3	97.0	14
δ-BHC	配合飼料	0.01	3	92.6	6.6
		0.05	3	93.4	5.3
		0.1	3	103	3.8
	とうもろこし	0.01	3	111	5.1
		0.05	3	116	7.4
		0.1	3	118	6.0
o,p'-DDD	配合飼料	0.01	3	109	5.3
		0.05	3	102	3.6
		0.1	3	103	7.5
	とうもろこし	0.01	3	117	3.8
		0.05	3	116	3.8
		0.1	3	116	6.6
p,p'-DDD	配合飼料	0.01	3	107	4.4
		0.05	3	102	5.3
		0.1	3	101	6.3
	とうもろこし	0.01	3	104	13
		0.05	3	118	1.7
		0.1	3	109	16
o,p'-DDE	配合飼料	0.01	3	94.1	7.4
		0.05	3	88.9	4.4
		0.1	3	93.1	8.9
	とうもろこし	0.01	3	102	8.5
		0.05	3	100	5.2
		0.1	3	104	9.6
p,p'-DDE	配合飼料	0.01	3	77.9	9.0
		0.05	3	81.7	2.4
		0.1	3	86.1	7.9
	とうもろこし	0.01	3	87.9	9.3
		0.05	3	97.2	9.1
		0.1	3	92.8	12
o,p'-DDT	配合飼料	0.01	3	85.9	3.5
		0.05	3	85.8	0.3
		0.1	3	87.9	6.4
	とうもろこし	0.01	3	91.7	10
		0.05	3	97.3	8.3
		0.1	3	96.9	15
p,p'-DDT	配合飼料	0.01	3	90.1	7.3
		0.05	3	86.6	2.3
		0.1	3	89.8	6.4
	とうもろこし	0.01	3	90.9	6.4
		0.05	3	94.8	4.7
		0.1	3	99.8	25
アルドリン	配合飼料	0.01	3	74.2	4.2
		0.05	3	74.0	3.2
		0.1	3	73.7	3.3
	とうもろこし	0.01	3	79.6	4.6
		0.05	3	81.6	13
		0.1	3	84.4	15

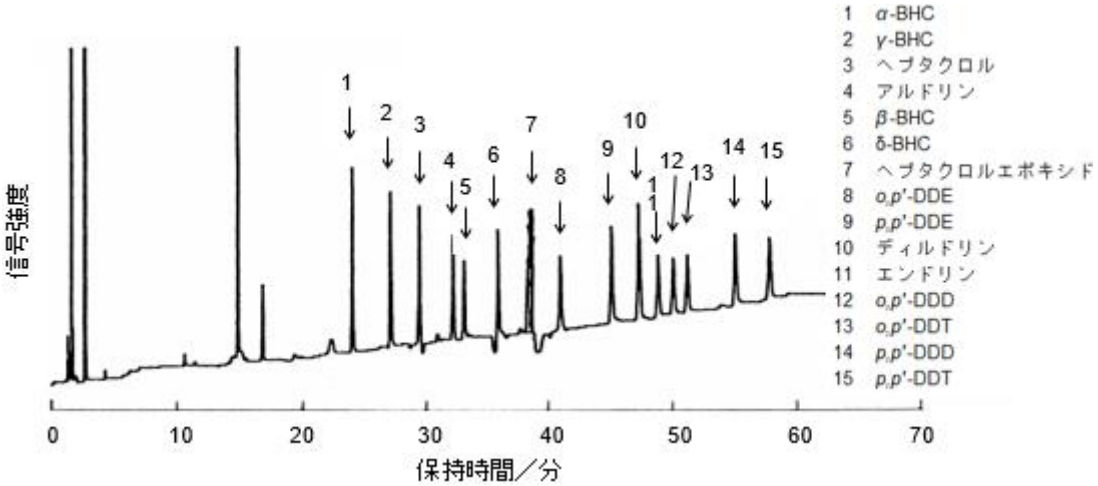
・添加回収率及び繰返し精度〔続き〕

添加成分名	試料の種類	添加濃度（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
エンドリン	配合飼料	0.01	3	100	8.0
		0.05	3	98.0	4.9
		0.1	3	104	5.2
	とうもろこし	0.01	3	85.7	15
		0.05	3	81.1	4.4
		0.1	3	87.8	7.1
ディルドリン	配合飼料	0.01	3	101	3.6
		0.05	3	99.4	4.1
		0.1	3	106	4.9
	とうもろこし	0.01	3	106	8.0
		0.05	3	109	6.9
		0.1	3	106	9.0
ヘプタクロル	配合飼料	0.01	3	82.5	17
		0.05	3	84.2	2.2
		0.1	3	83.3	4.4
	とうもろこし	0.01	3	80.5	11
		0.05	3	86.5	10
		0.1	3	86.6	9.0
ヘプタクロルエポキシド	配合飼料	0.01	3	85.9	7.0
		0.05	3	81.8	6.8
		0.1	3	89.5	1.8
	とうもろこし	0.01	3	83.3	8.9
		0.05	3	94.0	2.9
		0.1	3	99.3	6.2

・共同試験

成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（mg/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	成鶏用配合飼料	3	0	0.06	94.1	2.8	6.9	0.31
β-BHC	成鶏用配合飼料	3	0	0.06	105	4.7	8.2	0.37
γ-BHC	成鶏用配合飼料	3	0	0.06	98.0	4.9	4.9	0.22
δ-BHC	成鶏用配合飼料	3	0	0.06	99.8	8.0	8.0	0.36
o,p'-DDD	成鶏用配合飼料	3	0	0.06	89.1	4.8	6.9	0.31
p,p'-DDD	成鶏用配合飼料	3	0	0.06	88.7	4.7	9.4	0.43
o,p'-DDE	成鶏用配合飼料	3	0	0.06	80.4	4.8	4.8	0.22
p,p'-DDE	成鶏用配合飼料	3	0	0.06	73.3	6.2	11	0.48
o,p'-DDT	成鶏用配合飼料	3	0	0.06	74.4	5.9	6.7	0.31
p,p'-DDT	成鶏用配合飼料	3	0	0.06	81.7	5.2	8.9	0.41
アルドリン	成鶏用配合飼料	2	0	0.06	77.5	10	13	0.58
エンドリン	成鶏用配合飼料	3	0	0.06	89.8	5.9	14	0.64
ディルドリン	成鶏用配合飼料	3	0	0.06	93.7	5.9	12	0.53
ヘプタクロル	成鶏用配合飼料	3	0	0.06	80.8	6.3	11	0.48
ヘプタクロルエポキシド	成鶏用配合飼料	3	0	0.06	91.1	4.8	9.7	0.44

（参考）クロマトグラム例



添加試料（とうもろこしに各農薬として 0.01 mg/kg 相当量添加））のクロマトグラム

8　2,4-ジクロロフェノキシ酢酸及び 2,4,5-T のガスクロマトグラフによる同時分析法

(1)　分析対象化合物　　2,4-ジクロロフェノキシ酢酸及び 2,4,5-T（2 成分）

(2)　分析法[注1]

A　試薬の調製

1)　2,4-ジクロロフェノキシ酢酸標準原液　　2,4-ジクロロフェノキシ酢酸〔$C_8H_6Cl_2O_3$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線までアセトンを加えて 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸標準原液を調製する（この液 1 mL は、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸として 0.5 mg を含有する。）。

2)　2,4,5-T 標準原液　　2,4,5-T〔$C_8H_5Cl_3O_3$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線までアセトンを加えて 2,4,5-T 標準原液を調製する（この液 1 mL は、2,4,5-T として 0.5 mg を含有する。）。

3)　メチルエステル化農薬混合標準液　　使用に際して、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸及び 2,4,5-T 各標準原液各 1 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、窒素ガスを送って乾固した後、メタノール 1 mL 及びトリメチルシリルジアゾメタン液 0.5 mL を加え 30 分間静置する。この反応液に窒素ガスを送って乾固した後、ヘキサンを加えて残留物を溶かし、更にヘキサンで正確に希釈し、1 mL 中に 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸及び 2,4,5-T としてそれぞれ 0.002~0.1 μg 相当量を含有する数点のメチルエステル化農薬混合標準液を調製する。

4)　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））[注2]を 130 °C で 16 時間乾燥し、放冷後、1 v/w%相当量の水を加えて振り混ぜる。

B　定　　量

抽　　出　　分析試料 20 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓付き三角フラスコに入れ、水 30 mL 及び塩酸（1 mol/L）5 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、更に先の三角フラスコ及び残さを順次アセトン 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を加え、精製に供する試料溶液とする。

精　　製　　試料溶液 10 mL を 100 mL のなす形フラスコに正確に入れ、約 5 mL まで減圧濃縮した後、水酸化ナトリウム溶液（2 mol/L）5 mL を加え、30 分間静置する。これを塩化ナトリウム溶液（10 w/v%）50 mL 及び塩酸（2 mol/L）50 mL で 300 mL の分液漏斗 A に移し、ジエチルエーテル－ヘキサン（2+1）50 mL を加え、5 分間振り混ぜた後静置する。水層（下層）を 300 mL の分液漏斗 B に入れ、ジエチルエーテル－ヘキサン層（上層）を 200 mL の三角フラスコに入れる。分液漏斗 B にジエチルエーテル－ヘキサン（2+1）50 mL を加え、5 分間振り混ぜた後静置し、ジエチルエーテル－ヘキサン層を先の三角フラスコに合わせる。ジエチルエーテル－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する。先の三角フラスコ及びろ紙を順次少量のジエチルエーテル－ヘキサン（2+1）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。

残留物をジエチルエーテル 50 mL で 200 mL の分液漏斗 C に移し、炭酸水素ナトリウム溶液（4 w/v%）25 mL を加え、5 分間振り混ぜた後静置し、水層（下層）を 200 mL の分液漏斗 D に入れる。分液漏斗 C に炭酸水素ナトリウム溶液（4 w/v%）25 mL を加え、同様に操作し、水層を分液漏斗 D に合わせる。分液漏斗 D に塩酸（1+5）20 mL を加え、炭酸ガスの発生が収まった後、更にジエチルエーテル 50 mL を加え、5 分間振り混ぜた後静置する。水層を 200 mL の分液漏斗 E に入れ、ジエチルエーテル層（上層）を 200 mL の三角フラスコに入れる。分液漏斗 E にジエチルエーテル 50 mL を加え、同様に操作し、ジエチルエーテル層を 200 mL の三角フラスコに合わせる。ジエチルエーテル層を適量の硫酸ナトリウム（無水）で脱水し、200 mL のなす形フラスコに分液ろ紙でろ過する。先の三角フラスコ及びろ紙を順次少量のジエチルエーテルで洗浄し、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。

メチルエステル化　　残留物にメタノール 1 mL 及びトリメチルシリルジアゾメタン液 0.5 mL を加えた後 30 分間静置し、窒素ガスを送って乾固する。

ヘキサン 5 mL を加えて残留物を溶かし、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（4.5~5.5 g）及び硫酸ナトリウム（無水）2 g（1.8~2.2 g）をそれぞれヘキサンに懸濁させてカラム管（内径 10 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。

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 5 mL で洗浄して洗液をカラムに加え、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。ヘキサン－ジエチルエーテル（19+1）50 mL をカラムに加え、同様に流出させる。300 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、ヘキサン－ジエチルエーテル（4+1）100 mL をカラムに加えて 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸メチル及び 2,4,5-T メチルを溶出させる。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。

ヘキサン 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とする。

ガスクロマトグラフィー　試料溶液及び各メチルエステル化農薬混合標準液各 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）[注3]

キャリヤーガス：He（1 mL/min）

メイクアップガス：N_2（60 mL/min）

試料導入法：スプリットレス（60 s）

試料導入部温度：280 °C

カラム槽温度：80 °C（2 min 保持）→昇温 10 °C/min→280 °C（5 min 保持）

検出器温度：300 °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 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸量及び 2,4,5-T 量を算出する。

注 1　使用する水は、蒸留水 1 L をヘキサン 200 mL で振り混ぜ洗浄したもの

2　フロリジル（Floridin 製）又はこれと同等のもの

3　Rtx-200（Restek 製）又はこれと同等のもの

（参考）分析法バリデーション

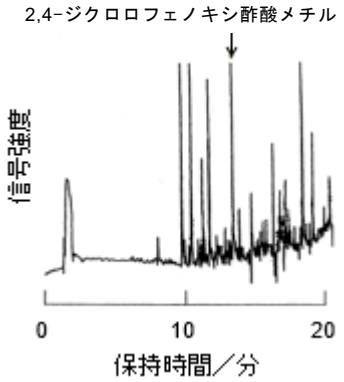
・添加回収率及び繰返し精度

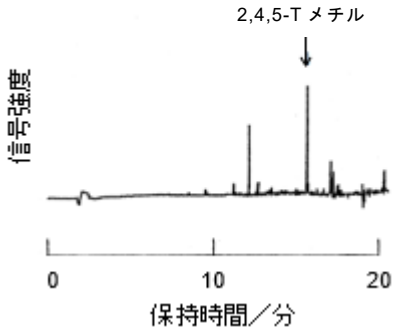
添加成分名	試料の種類	添加濃度（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
2,4-ジクロロフェノキシ酢酸	ブロイラー肥育後期用配合飼料	0.05	3	76.7	6.7
		0.25	3	88.3	17
		0.5	3	89.3	13
	肉豚肥育用配合飼料	0.05	3	73.7	2.1
		0.25	3	95.3	14
		0.5	3	82.0	15
	イタリアンライグラス	0.05	3	105	15
		0.25	3	94.7	9.6
		0.5	3	86.7	11
2,4,5-T	ブロイラー肥育後期用配合飼料	0.05	3	73.0	6.3
		0.25	3	72.7	3.5
		0.5	3	73.7	18
	肉豚肥育用配合飼料	0.05	3	82.7	21
		0.25	3	72.7	18
		0.5	3	73.3	21
	イタリアンライグラス	0.05	3	67.3	11
		0.25	3	73.7	8.7
		0.5	3	76.3	18

・共同試験

成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（mg/kg）	添加回収率（%）	室内繰返し精度 RSD_r（%）	室間再現精度 RSD_R（%）	HorRat
2,4-ジクロロフェノキシ酢酸	中すう育成用配合飼料	6	0	0.25	81.4	5.2	8.5	0.42
2,4,5-T	中すう育成用配合飼料	6	0	0.25	89.4	5.6	11	0.54

（参考）クロマトグラム例





添加試料（配合飼料に 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸及び 2,4,5-T として 0.25 mg/kg 相当量添加）のクロマトグラム

9　EPTC 及び二臭化エチレンのガスクロマトグラフ質量分析計による同時分析法

(1)　分析対象化合物　　EPTC 及び二臭化エチレン（2 成分）

(2)　分析法

A　　試薬の調製

1)　EPTC 標準原液　　EPTC〔$C_9H_{19}NOS$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数

値を記録し、50 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線までアセトンを加える（この液 1 mL は、EPTC として 0.5 mg を含有する。）。

2) 二臭化エチレン標準原液　二臭化エチレン〔$C_2H_4Br_2$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線までアセトンを加える（この液 1 mL は、二臭化エチレンとして 0.5 mg を含有する。）。

3) 農薬混合標準液　EPTC 及び二臭化エチレン標準原液の一部を混合した後、ヘキサンで正確に希釈し、1 mL 中に EPTC 及び二臭化エチレンとしてそれぞれ 0.001~0.5 µg を含有する数点の農薬混合標準液を調製する。

B　定　量

抽　出　試料 20 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、1 L 容のディーン・スターク用蒸留フラスコに入れ、水 400 mL を加え、更にヘキサン 20 mL を正確に加えた後、シリコン油約 0.2 mL を加える。この蒸留フラスコをディーン・スターク蒸留装置[注1]にとり付け、マントルヒーターで加熱し、沸騰を始めてから 60 分間加熱還流した後放冷する。蒸留トラップ内の水を捨て、ヘキサン層を分液ろ紙でろ過しガスクロマトグラフ質量分析計による測定に供する試料溶液とする。

ガスクロマトグラフ質量分析計による測定　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質量分析計に注入し、選択イオン検出クロマトグラムを得る。

測定条件　例

（ガスクロマトグラフ部）

カラム：溶融石英製キャピラリーカラム（6 %シアノプロピルフェニル－94 %ジメチルポリシロキサン化学結合型、内径 0.32 mm、長さ 30 m、膜厚 1.8 µm）[注2]

キャリヤーガス：He（3.6 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：50 °C→昇温 10 °C/min →180 °C→昇温 30 °C/min→250 °C（10 min 保持）

（質量分析計部[注3]）

検出器：四重極型質量分析計

インターフェース温度：250 °C

イオン源温度：200 °C

イオン化法：電子イオン化（EI）法

イオン化電圧：70 eV

モニターイオン：定量イオン *m/z* 189（EPTC）、109（二臭化エチレン）、確認イオン *m/z* 128（EPTC）、107（二臭化エチレン）

計　算　得られた選択イオン検出クロマトグラムからピーク面積又は高さを求

めて検量線を作成し、試料中の EPTC 量及び二臭化エチレン量を算出する。

注 1　ヘキサンが揮散しないよう、冷却水温度は 5 °C 以下とする。

2　DB-624（Agilent Technologies 製）又はこれと同等のもの

3　GCMS-QP2010（島津製作所製）による測定条件例

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
EPTC	鶏用配合飼料	0.025	3	91.9	8.2
		0.2	3	88.1	11
	牛用配合飼料	0.01	3	98.3	6.1
		0.025	3	88.5	11
		0.2	3	94.9	6.5
	とうもろこし	0.025	3	95.5	3.6
		0.2	3	93.5	8.0
	ライ麦	0.025	3	93.1	3.0
		0.2	3	95.5	6.4
二臭化エチレン	鶏用配合飼料	0.005	3	98.7	1.2
		0.2	3	96.2	3.5
	牛用配合飼料	0.005	3	101	4.1
		0.2	3	101	1.8
	とうもろこし	0.005	3	103	6.3
		0.2	3	99.3	1.7
	ライ麦	0.002	3	96.7	3.0
		0.005	3	99.3	3.1
		0.2	3	98.2	1.3

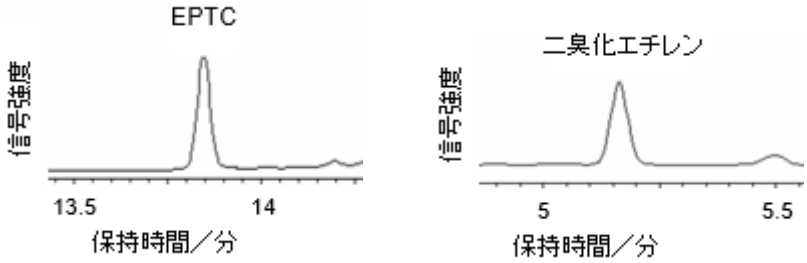
・共同試験

成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（mg/kg）	添加回収率（%）	室内繰返し精度 RSD_r（%）	室間再現精度 RSD_R（%）	HorRat
EPTC	肉用牛肥育用配合飼料	8	0	0.04	113	1.9	6.9	0.31
	とうもろこし	8	0	0.04	109	6.1	7.7	0.35
二臭化エチレン	肉用牛肥育用配合飼料	8	0	0.01	106	3.9	11	0.51
	とうもろこし	8	0	0.01	106	5.8	14	0.61

・定量下限（単一試験室による確認）　EPTC：試料中　0.01 mg/kg、二臭化エチレン：試料中　0.002 mg/kg

・検出下限（単一試験室による確認）　EPTC：試料中　0.003 mg/kg、二臭化エチレン：試料中　0.0007 mg/kg

（参考）クロマトグラム例



添加試料（とうもろこしに EPTC として 0.25 mg/kg、
二臭化エチレンとして 0.01 mg/kg 相当量添加）のクロマトグラム

10　アジンホスメチル及びプロフェノホスのガスクロマトグラフによる同時分析法

(1)　分析対象化合物　　アジンホスメチル及びプロフェノホス（2 成分）

(2)　分析法

A　試薬の調製

1)　アジンホスメチル標準原液　　アジンホスメチル〔$C_{10}H_{12}N_3O_3PS_2$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線までアセトンを加えてアジンホスメチル標準原液を調製する（この液 1 mL は、アジンホスメチルとして 0.5 mg を含有する。）。

2)　プロフェノホス標準原液　　プロフェノホス〔$C_{11}H_{15}BrClO_3PS$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線までアセトンを加えてプロフェノホス標準原液を調製する（この液 1 mL は、プロフェノホスとして 0.5 mg を含有する。）。

3)　農薬混合標準液　　使用に際して、アジンホスメチル及びプロフェノホス各標準原液の一部を混合し、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 中にアジンホスメチル及びプロフェノホスとしてそれぞれ 0.02~1 μg を含有する数点の農薬混合標準液を調製する。

B　定　　量

抽　　出　　分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 10 mL を加えて潤し 30 分間静置した後、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（綿実は 20 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、3,000×*g* で 5 分間遠心分離した後、上澄み液をメンブランフィルター（孔径 0.45 μm）でろ過し、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 5.0 mL をゲル浸透クロマトグラフに注入し、アジンホスメチル及びプロフェノホスが溶出する画分を 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（7+3）

流　　速：5 mL/min

分 取 画 分：70 mL~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）[注1]をヘキサン 5 mL で洗浄する。試料溶液をカラムに加え、試料溶液の入っていた 100 mL のなす形フラスコをヘキサン 2 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次カラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。

50 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、ヘキサン－アセトン（17+3）15 mL を加えてアジンホスメチル及びプロフェノホスを溶出させる。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）1 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とする。

ガスクロマトグラフィー　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[注2]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（35 %トリフルオロプロピル－65 %ジメチルポリシロキサン化学結合型、内径 0.25 mm、長さ 15 m、膜厚 0.25 µm）[注3]

キャリヤーガス：He（2.0 mL/min）

メイクアップガス：He（30 mL/min）

燃　料　ガ　ス：H_2（75 mL/min）

助　燃　ガ　ス：乾燥空気（100 mL/min）

試 料 導 入 法：スプリットレス（45 s）

試料導入部温度：250 °C

カ ラ ム 槽 温 度：70 °C（1 min 保持）→20 °C/min→250 °C（4 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、試料中のアジンホスメチル量及びプロフェノホス量を算出する。

注 1　Sep-Pak Plus Florisil Cartridge（Waters 製）に適当な容量のリザーバーを連結したもの又はこれと同等ものもの

2　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。

3　Rtx-200（Restek 製）又はこれと同等ものもの

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
アジンホスメチル	成鶏飼育用配合飼料	0.05	3	104	3.3
		3	3	104	2.4
	乳用牛飼育用配合飼料	0.01	3	90.9	13
		0.05	3	76.3	12
		3	3	78.7	4.3
	小麦	0.05	3	111	2.0
		3	3	86.4	1.7
	綿実	0.02	3	110	3.9
		0.05	3	117	3.3
		3.0	3	112	4.6
	ライグラスストロー	0.01	3	108	12
		0.05	3	88.7	8.8
		10	3	78.3	4.2
プロフェノホス	成鶏飼育用配合飼料	0.05	3	110	0.7
		3	3	92.9	10
	乳用牛飼育用配合飼料	0.01	3	112	1.4
		0.05	3	105	7.7
		3	3	96.6	3.5
	小麦	0.05	3	110	2.8
		3	3	98.5	1.0
	綿実	0.02	3	109	3.7
		0.05	3	120	0.8
		3.0	3	114	4.5
	ライグラスストロー	0.01	3	105	8.3
		0.05	3	99.4	3.7
		10	3	88.0	3.4

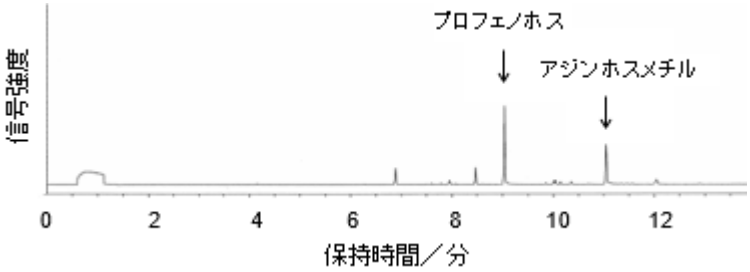
・共同試験

成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（mg/kg）	添加回収率（%）	室内繰返し精度 RSD_r（%）	室間再現精度 RSD_R（%）	HorRat
アジンホスメチル	乳用牛飼育用配合飼料	8	0	0.1	88.0	7.2	9.7	0.44
	アルファルファ	8	0	0.1	99.3	4.1	12	0.54
プロフェノホス	乳用牛飼育用配合飼料	8	0	0.1	92.4	7.0	14	0.65
	アルファルファ	8	0	0.1	96.6	6.8	12	0.56

・定量下限（単一試験室による確認）　飼料（綿実を除く）中　各 0.01 mg/kg、綿実中　各 0.02 mg/kg

・検出下限（単一試験室による確認）　飼料（綿実を除く）中　各 0.002 mg/kg、綿実中　各 0.003 mg/kg

（参考）クロマトグラム例



添加試料（乳用牛飼育用配合飼料に各農薬として 0.05 mg/kg 相当量添加）のクロマトグラム

11　アセフェート及びメタミドホスの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法

(1)　分析対象化合物　　アセフェート及びメタミドホス（2 成分）

(2)　適用範囲　　飼料

(3)　分析法

A　試薬の調製

1)　アセフェート標準原液　　アセフェート〔$C_4H_{10}NO_3PS$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線までアセトンを加えてアセフェート標準原液を調製する（この液 1 mL は、アセフェートとして 0.5 mg を含有する。）。

2)　メタミドホス標準原液　　メタミドホス〔$C_2H_8NO_2PS$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線までアセトンを加えてメタミドホス標準原液を調製する（この液 1 mL は、メタミドホスとして 0.5 mg を含有する。）。

3)　農薬混合標準液　　使用に際して、各標準原液の一部を混合し、アセトンで正確に希釈し、1 mL 中にアセフェート及びメタミドホスとしてそれぞれ 20 µg を含有する農薬混合標準原液を調製する。この標準原液 1 mL を正確にとり、窒素ガスを送って乾固した後、水で正確に希釈し、1 mL 中にアセフェート及びメタミドホスとしてそれぞれ 2.5~250 ng を含有する数点の農薬混合標準液を調製する。

B　定　　量

抽　　出　　分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、300 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 20 mL（乾牧草は 30 mL）を加え、30 分間静置後、更にアセトン 100 mL（乾牧草は 120 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、先の三角フラスコ及び残さを順次アセトン 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を加える。この液 8 mL（乾牧草（稲わらを除く。）は、更にアセトンで正確に 10 倍希釈した後、その液 8 mL）を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮し、塩化ナトリウム約 1 g 及び水 3 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（5 mL 保持用）[注1] に入れた後、10 分間静置する。試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン 10 mL ずつで 4 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出させる。

多孔性ケイソウ土カラムの下にあらかじめ酢酸エチル 5 mL で洗浄したグラファイトカーボンミニカラム（500 mg）[注2] を連結し、200 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置く。試料溶液の入っていたなす形フラスコを酢酸エチル 10 mL ずつで 2 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させてアセフェート及びメタミドホスを溶出させる。更に酢酸エチル 40 mL をカラムに加え、同様に溶出させる。溶出液を 40 °C 以下の水浴で約 1 mL

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（7+3）5 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。

カラム処理 II　シリカゲルミニカラム（690 mg）[注3]をヘキサン－アセトン（7+3）5 mL で洗浄する。試料溶液をミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。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（7+3）2.5 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、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－アセトン（1+1）20 mL をミニカラムに加えてアセフェート及びメタミドホスを溶出させる。溶出液を 40 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。水 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定　試料溶液及び各農薬混合標準液各 2 µL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、選択反応検出クロマトグラムを得る。

測定条件　例

（液体クロマトグラフ部）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒径 5 µm）[注4]

溶離液：2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液－メタノール（19+1）

流速：0.2 mL/min

カラム槽温度：40 °C

（タンデム型質量分析計部[注5]）

検出器：四重極型質量分析計

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化（ESI）法（正イオンモード）

イオン源温度：120 °C

デソルベーションガス：N_2（800 L/h、350 °C）

キャピラリー電圧：0.5 kV

コーンガス：N_2（50 L/h）

コーン電圧：下表のとおり

コリジョンガス：Ar（0.20 mL/min）

コリジョンエネルギー：下表のとおり

モニターイオン：下表のとおり

表　各物質の測定条件

測定対象物質	プリカーサーイオン（m/z）	プロダクトイオン 定量用（m/z）	プロダクトイオン 確認用（m/z）	コーン電圧（V）	コリジョンエネルギー（eV）
アセフェート	184	143	－	20	5
		－	49		20
メタミドホス	142	94	－	30	15
		－	125		

計　　算　　得られた選択反応検出クロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中のアセフェート量及びメタミドホス量を算出する。

注 1　Chem Elut（Agilent Technologies 製）又はこれと同等のもの

2　Supelclean ENVI-Carb（Sigma-Aldrich 製）又はこれと同等のもの

3　Sep-Pak Plus Silica Cartridge（Waters 製）に適当な容量のリザーバーを連結したもの又はこれと同等のもの

4　TSKgel ODS-100V（東ソー製）又はこれと同等のもの

5　Quattro Premier（Waters 製）による条件例

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
アセフェート	成鶏飼育用配合飼料	0.01	3	78.4	1.7
		0.5	3	70.3	6.1
	乳用牛飼育用配合飼料	0.01	3	83.4	3.4
		0.5	3	83.5	5.1
	小麦	0.01	3	78.0	8.9
		0.1	3	83.0	10
	とうもろこし	0.01	3	77.1	8.1
		0.5	3	80.5	4.1
	アルファルファヘイ	0.1	3	73.4	8.8
		3	3	79.1	2.3
	稲わら	0.01	3	79.0	3.6
		0.1	3	86.9	2.4
メタミドホス	成鶏飼育用配合飼料	0.01	3	90.3	7.0
		0.1	3	83.3	7.7
	乳用牛飼育用配合飼料	0.01	3	79.6	12
		0.1	3	87.6	5.8
	小麦	0.01	3	75.8	2.1
		0.02	3	84.3	12
		0.1	3	90.2	2.0
	とうもろこし	0.01	3	81.9	9.5
		0.1	3	82.3	5.2
	アルファルファヘイ	0.1	3	89.0	13
		3	3	73.1	5.8
	稲わら	0.01	3	85.7	13
		0.1	3	72.5	15

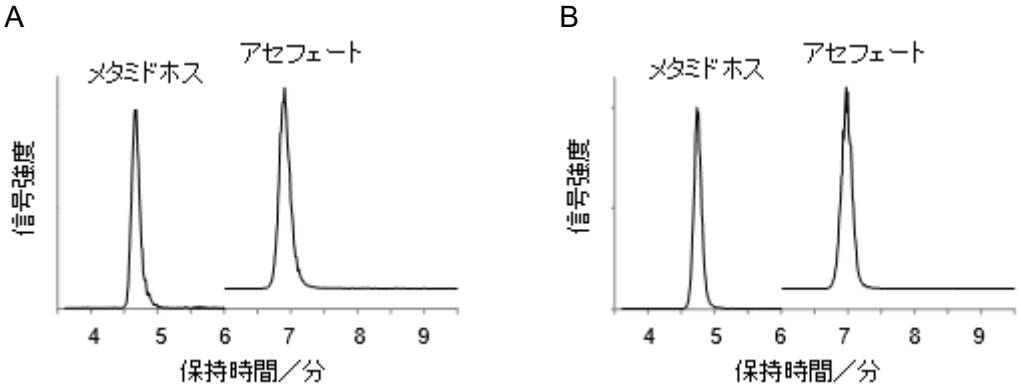
・共同試験

成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（mg/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	乳用牛飼育用配合飼料	10	0	0.1	81.9	1.7	11	0.48
	とうもろこし	10	0	0.5	82.7	4.8	8.4	0.46
	アルファルファヘイ	10	0	3	74.9	3.5	15	1.0
メタミドホス	乳用牛飼育用配合飼料	9	1	0.1	81.9	8.4	15	0.70
	とうもろこし	10	0	0.01	81.5	2.0	15	0.67
	アルファルファヘイ	10	0	0.1	100	4.5	18	0.83

・定量下限（単一試験室による確認）　試料中　各 0.01 mg/kg（乾牧草（稲わらを除く。）中　各 0.1 mg/kg）

・検出下限（単一試験室による確認）　試料中　各 0.003 mg/kg（乾牧草（稲わらを除く。）中　各 0.03 mg/kg）

（参考）クロマトグラム例



標準液及び添加試料のクロマトグラム

A：標準液（各農薬として 0.1 μg/mL）

B：添加試料（成鶏飼育用配合飼料にアセフェートとして 0.5 mg/kg、メタミドホスとして 0.1 mg/kg 相当量添加）

12　アゾキシストロビンその他の農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法

(1)　分析対象化合物　　アゾキシストロビン、イソプロカルブ、ジクロシメット、ピリミカーブ、プロポキスル、メタラキシル及びメトルカルブ（7 成分）

(2)　適用範囲　　稲わら、稲発酵粗飼料及び籾米

(3)　分析法

A　　試薬の調製

農薬混合標準液　　アゾキシストロビン〔$C_{22}H_{17}N_3O_5$〕、イソプロカルブ〔$C_{11}H_{15}NO_2$〕、ジクロシメット〔$C_{15}H_{18}Cl_2N_2O$〕、ピリミカーブ〔$C_{11}H_{18}N_4O_2$〕、プロポキスル〔$C_{11}H_{15}NO_3$〕、メタラキシル〔$C_{15}H_{21}NO_4$〕及びメトルカルブ〔$C_9H_{11}NO_2$〕各 25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、それぞれ 50 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線までアセトンを加えて各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 0.5 mg を含有する。）。

各農薬標準原液の一部を混合し、アセトンで正確に希釈し、1 mL 中に各農薬

としてそれぞれ 10 μg を含有する農薬混合標準原液を調製する。

使用に際して、農薬混合標準原液の一部を、アセトニトリル－水（3+2）で正確に希釈し、1 mL 中に各農薬としてそれぞれ 0.25~20 ng を含有する数点の農薬混合標準液を調製する。

B　定　　量

抽　　出　　分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、300 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 30 mL（籾米は 20 mL）を加え、30 分間静置後、更にアセトン 120 mL（籾米は 100 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、先の三角フラスコ及び残さを順次アセトン 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を加える。この液をアセトンで正確に 10 倍希釈した後、希釈試料溶液 2 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、水 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[注1]　　オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）[注2]をアセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL で順次洗浄する。試料溶液をミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。更に試料溶液の入っていたなす形フラスコを水－アセトニトリル（9+1）5 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に流出させる。10 mL の全量フラスコをミニカラムの下に置き、アセトニトリル－水（3+2）10 mL をミニカラムに加え、各農薬を溶出させる[注3]。更に全量フラスコの標線までアセトニトリル－水（3+2）を加え、この液 5 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C 以下の水浴で約 2 mL まで減圧濃縮し、カラム処理 II に供する試料溶液とする。

カラム処理 II[注1]　　試料溶液に水 2 mL を加え、これを多孔性ケイソウ土カラム（5 mL 保持用）[注4]に入れ、10 分間静置する。100 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酢酸エチル 5 mL ずつで 4 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各農薬を溶出させる。更に酢酸エチル 10 mL をカラムに加えて同様に溶出させ、溶出液を 40 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮し、窒素ガスを送って乾固する。アセトニトリル－トルエン（3+1）5 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理 III に供する試料溶液とする。

カラム処理 III[注1]　　グラファイトカーボン／アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム（500 mg/500 mg）[注5]をアセトニトリル－トルエン（3+1）10 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、液面が充てん剤の上端に達するまで流下して各農薬を流出させる。試料溶液の入っていたなす形フラスコをアセトニトリル－トルエン（3+1）5 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に流出させる。流出液を 40 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮し、窒素ガスを送って乾固する。アセトニトリル－水（3+2）1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、5,000×*g* で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とする。また、試料が稲わらである場合は、更に試料溶液の

一部をアセトニトリル－水（3+2）で正確に10倍希釈し、アゾキシストロビン及びジクロシメットの定量に用いる。

液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定　　試料溶液及び各農薬混合標準液各 5 μL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、選択反応検出クロマトグラムを得る。

測定条件　例

（液体クロマトグラフ部）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm）[注6]

溶離液：2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液－アセトニトリル（4+1）→15 min→（1+9）（5 min 保持）

流速：0.2 mL/min

カラム槽温度：40 °C

（タンデム型質量分析計部[注7]）

検出器：四重極型質量分析計

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化（ESI）法（正イオンモード）

イオン源温度：120 °C

デソルベーション温度：350 °C

キャピラリー電圧：3.5 kV

コーン電圧：下表のとおり

コリジョンエネルギー：下表のとおり

モニターイオン：下表のとおり

表　各物質の測定条件

測定対象物質	プリカーサーイオン（m/z）	プロダクトイオン 定量用（m/z）	プロダクトイオン 確認用（m/z）	コーン電圧（V）	コリジョンエネルギー（eV）
アゾキシストロビン	404	372	—	20	15
		—	344	20	25
イソプロカルブ	194	95	—	30	15
		—	137	30	10
ジクロシメット	313	173	—	35	23
		—	137	35	47
ピリミカーブ	239	182	—	35	15
		—	72	35	20
プロポキスル	210	111	—	25	15
		—	93	25	25
メタラキシル	280	220	—	30	15
		—	192	30	20
メトルカルブ	166	109	—	11	15
		—	94	11	43

計　　算　　得られた選択反応検出クロマトグラムからピーク面積又は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。

注 1　流速は 1 mL/min 程度とする。必要に応じて吸引マニホールドを使用する。

2　InertSep Slim-J C18-B（ジーエルサイエンス製）又はこれと同等のもの

3　全量フラスコの標線を超えるおそれがあるときは、溶出液が標線に達した時点で溶出は終了させる。

4　Chem Elut（Agilent Technologies 製）又はこれと同等のもの

5　Supelclean ENVI-Carb/LC-NH_2（Sigma-Aldrich 製）又はこれと同等のもの

6　Inertsil ODS-SP（ジーエルサイエンス製）又はこれと同等のもの

7　Quattro Premier XE （Waters 製）による条件例

（参考）分析法バリデーション

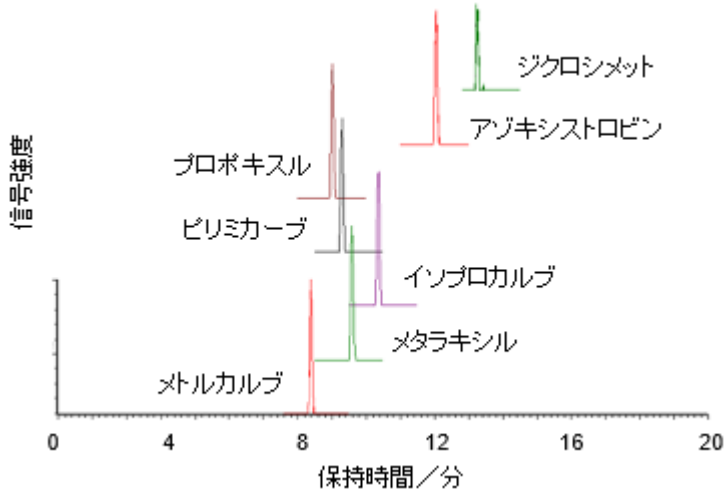
・添加回収率、繰返し精度、定量下限及び検出下限（単一試験室による確認）

添加成分名	試料の種類	添加濃度（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）	定量下限（mg/kg）	検出下限（mg/kg）
アゾキシストロビン	稲わら	1	3	106	1.7	1.0	0.3
		5	3	89.1	2.1		
	稲発酵粗飼料	0.1	3	104	18	0.1	0.03
		1	3	81.4	11		
	籾米	0.1	3	119	14		
		2	3	97.2	3.4		
イソプロカルブ	稲わら	0.1	3	93.6	8.8	0.1	0.03
		1	3	81.0	6.3		
	稲発酵粗飼料	0.1	3	105	6.3		
		1	3	83.5	5.4		
	籾米	0.1	3	107	6.8		
		1	3	87.2	5.4		
ジクロシメット	稲わら	1	3	101	11	1.0	0.3
		15	3	94.8	6.8		
	稲発酵粗飼料	0.1	3	90.7	7.5	0.1	0.03
		1	3	82.1	8.6		
	籾米	0.1	3	91.0	9.1		
		1	3	102	16		
ピリミカーブ	稲わら	0.1	3	90.5	2.4	0.1	0.03
		1	3	88.8	4.0		
	稲発酵粗飼料	0.1	3	110	2.7		
		1	3	88.5	8.8		
	籾米	0.1	3	113	5.0		
		1	3	96.7	1.3		
プロポキスル	稲わら	0.1	3	85.4	4.5	0.1	0.03
		1	3	82.3	3.1		
	稲発酵粗飼料	0.1	3	110	15		
		1	3	93.0	6.9		
	籾米	0.1	3	114	10		
		1	3	96.7	1.3		
メタラキシル	稲わら	0.04	3	90.7	3.6	0.04	0.01
		1	3	91.3	3.9		
	稲発酵粗飼料	0.04	3	114	1.7		
		1	3	81.8	8.1		
	籾米	0.04	3	103	6.8		
		1	3	101	5.4		
メトルカルブ	稲わら	0.4	3	85.6	2.1	0.4	0.1
		1	3	76.2	19		
	稲発酵粗飼料	0.4	3	95.2	11		
		1	3	89.2	11		
	籾米	0.4	3	94.9	6.4		
		1	3	82.0	17		

・共同試験

成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（mg/kg）	添加回収率（%）	室内繰返し精度 RSD_r（%）	室間再現精度 RSD_R（%）	HorRat
アゾキシストロビン	稲わら	9	0	5	79.5	8.0	11	0.90
	籾米	9	0	2	84.3	8.8	8.8	0.61
イソプロカルブ	稲わら	9	0	1	83.5	7.3	15	0.94
	籾米	9	0	1	83.3	3.9	14	0.90
ジクロシメット	稲わら	9	0	15	84.0	6.3	10	0.97
	籾米	8	1	1	85.0	8.0	9.5	0.59
ピリミカーブ	稲わら	9	0	1	97.0	4.6	12	0.76
	籾米	9	0	1	102	5.0	6.3	0.39
プロポキスル	稲わら	9	0	1	86.3	6.6	13	0.80
	籾米	9	0	1	85.1	5.9	10	0.65
メタラキシル	稲わら	7	2	1	94.2	3.4	5.3	0.33
	籾米	9	0	1	99.5	3.5	7.7	0.48
メトルカルブ	稲わら	7	2	1	78.8	7.8	7.8	0.47
	籾米	9	0	1	74.5	5.7	12	0.76

（参考）クロマトグラム例



標準液（各農薬として 5 ng/mL）のクロマトグラム

13　アトラジン及びシマジンのガスクロマトグラフによる同時分析法

(1)　分析対象化合物　　アトラジン及びシマジン（2 成分）

(2)　分析法

A　　試薬の調製

1)　アトラジン標準原液　　アトラジン〔$C_8H_{14}ClN_5$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線までアセトンを加えてアトラジン標準原液を調製する（この液 1 mL は、アトラジンとして 0.5 mg を含有する。）。

2)　シマジン標準原液　　シマジン〔$C_7H_{12}ClN_5$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線までアセトンを加えてシマジン標準原液を調製する（これらの液 1 mL は、シマジンとして 0.5 mg を含有する。）。

3)　農薬混合標準液　　使用に際して、アトラジン及びシマジン各標準原液の一部

を混合し、2,2,4-トリメチルペンタンーアセトン（4+1）で正確に希釈して、1 mL 中にアトラジン及びシマジンとしてそれぞれ 0.01~1 μg を含有する数点の農薬混合標準液を調製する。

B　定　　量

抽　　出　　分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 15 mL を加え、30 分間静置後、更にアセトン 100 mL を加え、60 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ン 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過する。ろ液を 40 °C 以下の水浴で約 15 mL まで減圧濃縮し、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）[注1]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 10 mL ずつで 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に達するまで流下してアトラジン及びシマジンを溶出させる。更にヘキサン 120 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。

シクロヘキサンーアセトン（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、カラム処理 II に供する試料溶液とする。

カラム処理 II　　試料溶液 5.0 mL をゲル浸透クロマトグラフに注入し、アトラジン及びシマジンが溶出する画分を 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。

ヘキサンーアセトン（49+1）5 mL を正確に加えて残留物を溶かし、カラム処理 III 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：シクロヘキサンーアセトン（4+1）

流　　速：5 mL/min

分 取 画 分：75~110 mL

カラム処理 III　　合成ケイ酸マグネシウムミニカラム（910 mg）[注2]をヘキサン 5 mL で洗浄する。

試料溶液 2 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た後、ヘキサンーアセトン（49+1）8 mL をミニカラムに加え、同様に流出させる。

50 mL のなし形フラスコをミニカラムの下に置き、ヘキサンーアセトン（9+1）

15 mL をミニカラムに加えてアトラジン及びシマジンを溶出させる。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とする。

ガスクロマトグラフィー　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：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（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）[注3]

キャリヤーガス：He（1.6 mL/min）

メイクアップガス：He（30 mL/min）

燃料ガス：H_2（3 mL/min）

助燃ガス：乾燥空気（90 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：60 °C（2 min 保持）→昇温 20 °C/min→170 °C→昇温 2 °C/min→200 °C→昇温 20 °C/min→280 °C（10 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ピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のアトラジン量及びシマジン量を算出する。

注 1　Chem Elut（Agilent Technologies 製）又はこれと同等ものもの

2　Sep-Pak Plus Florisil Cartridge（Waters 製）に適当な容量のリザーバーを連結したもの又はこれと同等ものもの

3　Rtx-200（Restek 製）又はこれと同等ものもの

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

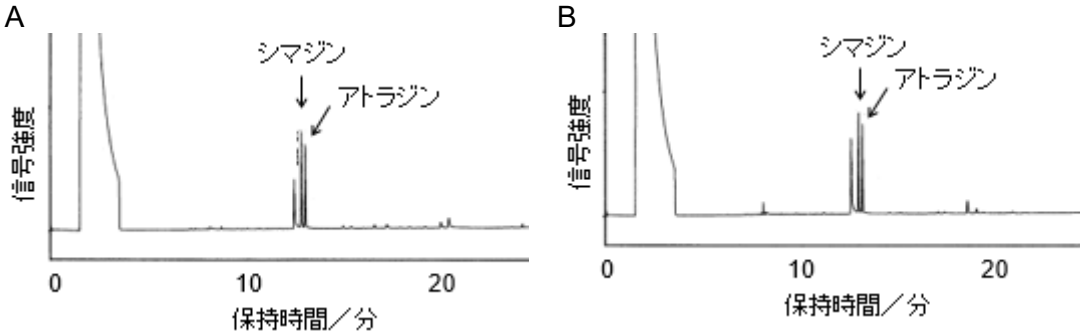
添加成分名	試料の種類	添加濃度（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
アトラジン	幼すう育成用配合飼料	0.05	3	98.9	5.5
		0.25	3	91.4	8.7
	肉豚肥育用配合飼料	0.05	3	102	4.0
		0.25	3	96.4	5.6
	とうもろこし	0.05	3	101	2.4
		0.25	3	98.9	0.6
	オーツヘイ	0.05	3	91.8	8.8
		0.25	3	90.5	8.6
シマジン	幼すう育成用配合飼料	0.05	3	102	5.4
		0.25	3	93.1	10
	肉豚肥育用配合飼料	0.05	3	106	5.7
		0.25	3	97.4	6.7
	とうもろこし	0.05	3	97.5	3.0
		0.25	3	96.7	1.6
	オーツヘイ	0.05	3	92.0	7.8
		0.25	3	90.4	11

・共同試験

成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（mg/kg）	添加回収率（%）	室内繰返し精度 RSD_r（%）	室間再現精度 RSD_R（%）	HorRat
アトラジン	肉用牛肥育用配合飼料	6	0	0.1	95.5	2.9	9.4	0.43
	マイロ	6	0	0.1	92.7	1.4	11	0.48
シマジン	肉用牛肥育用配合飼料	6	0	0.1	99.6	3.9	8.1	0.37
	マイロ	6	0	0.1	101	3.4	6.7	0.30

・定量下限（単一試験室による確認）　　試料中　各 0.02 mg/kg

（参考）クロマトグラム例



標準液及び添加試料のクロマトグラム

A：標準液（各農薬として 0.5 ng 注入）

B：添加試料（幼すう育成用配合飼料に各農薬として 0.25 mg/kg 相当量添加）

14　アメトリン、シアナジン及びプロメトリンの液体クロマトグラフ質量分析計による同時分析法

(1)　分析対象化合物　　アメトリン、シアナジン及びプロメトリン（3 成分）

(2)　分析法

A　　試薬の調製

1)　アメトリン標準原液　　アメトリン〔$C_9H_{17}N_5S$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量

り、その数値を記録し、50 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線までアセトンを加えてアメトリン標準原液を調製する（この液 1 mL は、アメトリンとして 0.5 mg を含有する。）。

2) シアナジン標準原液　　シアナジン〔$C_9H_{13}ClN_6$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線までアセトンを加えてシアナジン標準原液を調製する（この液 1 mL は、シアナジンとして 0.5 mg を含有する。）。

3) プロメトリン標準原液　　プロメトリン〔$C_{10}H_{19}N_5S$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線までアセトンを加えてプロメトリン標準原液を調製する（この液 1 mL は、プロメトリンとして 0.5 mg を含有する。）。

4) 農薬混合標準液　　使用に際して、アメトリン標準原液、シアナジン標準原液及びプロメトリン標準原液の一部を混合し、アセトニトリルで正確に希釈し、1 mL 中に各農薬としてそれぞれ 0.5~100 ng を含有する数点の農薬混合標準液を調製する。

B　定　　量

抽　　出　　分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 20 mL（乾牧草は 30 mL）を加えた後 30 分間静置する。更にアセトン 100 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）で吸引ろ過する。先の三角フラスコ及び残さを順次アセトン 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を加える。

この液 10 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C 以下の水浴で約 2 mL まで減圧濃縮し、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）[注1]に入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコを水 5 mL で洗浄し、洗液をカラムに加えた後、5 分間静置する。200 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酢酸エチル－ヘキサン（17+3）10 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させて各農薬を溶出させる。更に酢酸エチル－ヘキサン（17+3）50 mL をカラムに加えて同様に溶出させる。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。

乾牧草以外の飼料を分析する場合には、ヘキサン 30 mL を加えて残留物を溶かし、液液分配に供する試料溶液とする。乾牧草を分析する場合には、ヘキサン 5 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。

液液分配　　試料溶液を 100 mL の分液漏斗に入れ、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、洗液を試料溶液に合わせる。更に分液漏斗にヘキサン飽和アセトニトリル 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 200 mL のなす形フラスコに入れる。分液漏斗にヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え、同様に操作し、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。ヘキサン 5 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。

カラム処理 II　グラファイトカーボン／アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム（500 mg/500 mg）[注2] を酢酸エチル 5 mL 及びヘキサン 10 mL で洗浄する。

試料溶液をミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流下させる。試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン 5 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、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、先のなす形フラスコをヘキサン－酢酸エチル（1+1）5 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加えて同様に流下し、各農薬を溶出させる。更にヘキサン－酢酸エチル（1+1）10 mL をミニカラムに加え、同様に溶出させる。

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。ヘキサン 3 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理 III に供する試料溶液とする。

カラム処理 III　合成ケイ酸マグネシウムミニカラム（910 mg）[注3] をヘキサン 5 mL で洗浄する。

試料溶液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させる。試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン 3 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、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、先のなす形フラスコをヘキサン－アセトン（17+3）5 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加えて同様に流下し、各農薬を溶出させる。更にヘキサン－アセトン（17+3）10 mL をミニカラムに加え、同様に溶出させる。

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。アセトニトリル 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、5,000×*g* で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフ質量分析計による測定に供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフ質量分析計による測定　試料溶液及び各農薬混合標準液各 4 µL を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、選択イオン検出クロマトグラムを得る。

測定条件　例

（液体クロマトグラフ部）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 5 µm）[注4]

溶離液：0.01 %ギ酸溶液－アセトニトリル（3+1）（5 min 保持）→2 min→（2+3）（3 min 保持）→2 min→（1+9）（8 min 保持）

流　　速：0.2 mL/min
カラム槽温度：40 °C
（質量分析計部[注5]）
検　　出　　器：四重極型質量分析計
イオン化法：エレクトロスプレーイオン化（ESI）法（正イオンモード）
フラグメンター電圧：120 V
ネブライザーガス：N_2（340 kPa）
乾燥ガス：N_2（10 L/min、350 °C）
キャピラリー電圧：4,000 V
モニターイオン：*m/z* 228（アメトリン）、241（シアナジン）、242（プロメトリン）

計　　算　　得られた選択イオン検出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、試料中のアメトリン量、シアナジン量及びプロメトリン量を算出する。

注 1　Chem Elut（Agilent Technologies 製）又はこれと同等のもの
2　Supelclean ENVI-Carb/LC-NH_2（Sigma-Aldrich 製）又はこれと同等のもの
3　Sep-Pak Plus Florisil Cartridge（Waters 製）に適当な容量のリザーバーを連結したもの又はこれと同等のもの
4　Inertsil ODS-SP（ジーエルサイエンス製）又はこれと同等のもの
5　Agilent 1100 Series MSD SL（Agilent Technologies 製）による条件例

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
アメトリン	ブロイラー肥育後期用配合飼料	0.002	3	82.9	1.8
		0.01	3	81.1	4.7
		0.1	3	93.5	0.8
	スーダングラス	0.002	3	77.2	4.4
		0.01	3	80.4	5.9
		0.1	3	80.6	0.5
シアナジン	ブロイラー肥育後期用配合飼料	0.002	3	89.5	9.4
		0.01	3	95.7	2.9
		0.1	3	93.6	0.7
	スーダングラス	0.002	3	79.2	4.4
		0.01	3	74.7	5.4
		0.1	3	85.7	2.4
プロメトリン	ブロイラー肥育後期用配合飼料	0.002	3	94.5	6.6
		0.01	3	85.5	2.9
		0.1	3	87.3	1.2
	スーダングラス	0.002	3	87.2	3.1
		0.01	3	73.8	4.0
		0.1	3	77.1	1.0

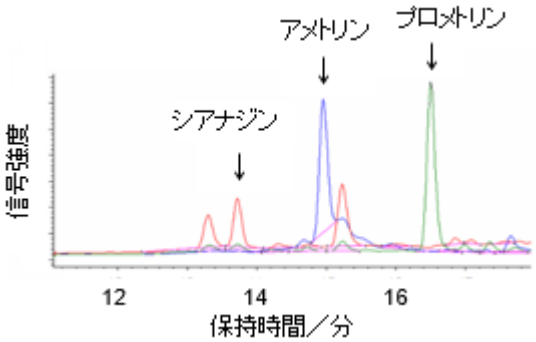
・共同試験

成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（mg/kg）	添加回収率（%）	室内繰返し精度 RSD_r（%）	室間再現精度 RSD_R（%）	HorRat
アメトリン	ブロイラー肥育前期用配合飼料	9	0	0.01	98.4	4.3	6.2	0.28
	スーダングラス	9	0	0.01	92.2	4.2	15	0.66
シアナジン	ブロイラー肥育前期用配合飼料	9	0	0.01	98.9	6.6	9.4	0.43
	スーダングラス	9	0	0.01	94.4	4.1	17	0.76
プロメトリン	ブロイラー肥育前期用配合飼料	9	0	0.01	93.6	2.7	6.1	0.28
	スーダングラス	9	0	0.01	89.6	3.2	11	0.52

・定量下限（単一試験室による確認）　試料中　各 0.002 mg/kg

・検出下限（単一試験室による確認）　試料中　各 0.0007 mg/kg

（参考）クロマトグラム例



添加試料（ブロイラー肥育前期用配合飼料に各農薬として 0.01 mg/kg 相当量添加）のクロマトグラム

15　アルジカルブ及びその代謝物の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法

(1)　分析対象化合物　　アルジカルブ、アルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホン[注1]（3 成分）

(2)　適用範囲　　穀類及び乾牧草

(3)　分析法

A　　試薬の調製

1)　アルジカルブ標準原液　　アルジカルブ〔$C_7H_{14}N_2O_2S$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線までアセトンを加えてアルジカルブ標準原液を調製する（この液 1 mL は、アルジカルブとして 0.5 mg を含有する。）。

2)　アルジカルブスルホキシド標準原液　　アルジカルブスルホキシド〔$C_7H_{14}N_2O_3S$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線までアセトンを加えてアルジカルブスルホキシド標準原液を調製する（この液 1 mL は、アルジカルブスルホキシドとして 0.5 mg を含有する。）

3)　アルジカルブスルホン標準原液　　アルジカルブスルホン〔$C_7H_{14}N_2O_4S$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線までアセトンを加えてアルジカルブスルホン標準原液を調製する（この液 1 mL は、アルジカルブスルホンとして 0.5 mg を含

有する。）。

4) 農薬混合標準液　　使用に際して、アルジカルブ標準原液、アルジカルブスルホキシド標準原液及びアルジカルブスルホン標準原液の一部を混合し、メタノールで正確に希釈し、1 mL 中に各農薬としてそれぞれ 0.0002~0.1 µg を含有する数点の農薬混合標準液を調製する。

B　定　　量

抽　　出　　分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、300 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 20 mL（乾牧草は 30 mL）を加え、30 分間静置後、更にアセトン 100 mL（乾牧草は 120 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、先の三角フラスコ及び残さを順次アセトン 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を加える。この液 4 mL（乾牧草は、更にアセトンで正確に 10 倍希釈した後、その液 4 mL）を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮し、カラム処理 I に供する試料溶液とする。

カラム処理 I　　試料溶液に塩化ナトリウム約 1 g 及び水 2 mL を加え、これを多孔性ケイソウ土カラム（5 mL 保持用）[注2] に入れ、10 分間静置する。200 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酢酸エチル 5 mL ずつで 2 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各農薬を溶出させる。更に酢酸エチル 80 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。

アセトニトリル 5 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。

カラム処理 II　　グラファイトカーボン／アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム（500 mg/500 mg）[注3] をアセトニトリル 10 mL で洗浄する。

50 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、液面が充てん剤の上端に達するまで流下して各農薬を流出させる。次に、試料溶液の入っていたなす形フラスコをアセトニトリル 5 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に流出させる。更に、アセトニトリル 5 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。

メタノール 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、5,000×*g* で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定　　試料溶液及び各農薬混合標準液各 2 µL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、選択反応検出クロマトグラムを得る。

測定条件　例

（液体クロマトグラフ部）

カ　ラ　ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm）[注4]

溶　離　液：2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液－メタノール（17+3）（2 min 保持）→ 10 min →（1+9）（3 min 保持）

流　速：0.2 mL/min

カラム槽温度：40 °C

（タンデム型質量分析計部[注5]）

検　出　器：四重極型質量分析計

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化（ESI）法（正イオンモード）

イオン源温度：150 °C

デソルベーション温度：250 °C

キャピラリー電圧：0.8 kV

コーン電圧：下表のとおり

コリジョンエネルギー：下表のとおり

モニターイオン：下表のとおり

表　各物質の測定条件

測定対象物質	プリカーサーイオン（*m*/*z*）	プロダクトイオン 定量用（*m*/*z*）	プロダクトイオン 確認用（*m*/*z*）	コーン電圧（V）	コリジョンエネルギー（eV）
アルジカルブ	208	116	—	10	6
		—	89		18
アルジカルブスルホキシド	207	132	—	20	6
		—	89		12
アルジカルブスルホン	223	86	—	25	8
		—	148		16

計　算　得られた選択反応検出クロマトグラムからアルジカルブスルホンのピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中のアルジカルブスルホン量を算出する。

同様に、アルジカルブ及びアルジカルブスルホキシドのピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料溶液中のアルジカルブ及びアルジカルブスルホキシドのそれぞれの量を求めた後、次式により試料中のアルジカルブ量を算出する。

試料中のアルジカルブ量（mg/kg）＝（$A + B \times 0.922$）× 5[注6]

A：検量線から求めた試料溶液中のアルジカルブの濃度（μg / mL）

B：検量線から求めた試料溶液中のアルジカルブスルホキシドの濃度（μg/mL）

注 1　アルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホンはアルジカルブの酸化代謝体である。

2　InertSep K-solute 5 mL（ジーエルサイエンス製）又はこれと同等のもの

3　InertSep GC/NH_2（ジーエルサイエンス製）又はこれと同等のもの

4　ZORBAX Eclipse XDB-C18（Agilent Technologies 製）又はこれと同等のもの

5　ACQUITY TQD（Waters 製）による条件例

6　乾牧草にあっては 50 を乗じる。

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

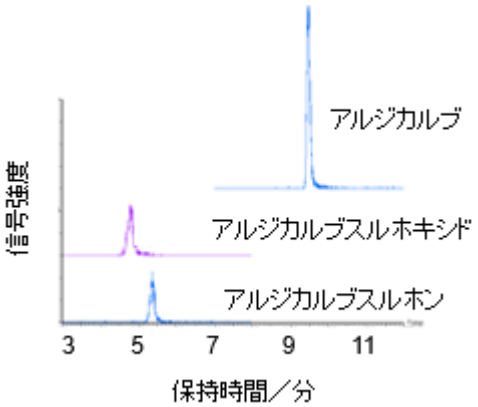
添加成分名	試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r (%)
アルジカルブ	小麦	0.002	3	90.5	4.8
		0.005	3	97.3	4.5
		0.01	3	93.7	1.6
		0.02	3	81.7	3.7
	とうもろこし	0.002	3	104	6.0
		0.005	3	83.9	8.8
		0.01	3	101	5.9
		0.05	3	81.3	8.3
	スーダングラスヘイ	0.02	3	88.3	16
		0.05	3	118	13
		1	3	104	4.5
アルジカルブスルホキシド	小麦	0.002	3	88.2	17
		0.005	3	96.2	5.0
		0.01	3	97.4	4.1
		0.02	3	93.7	2.2
	とうもろこし	0.002	3	95.8	7.8
		0.005	3	105	3.5
		0.01	3	97.2	6.8
		0.05	3	95.9	1.6
	スーダングラスヘイ	0.02	3	82.0	6.5
		0.05	3	89.5	7.7
		1	3	91.1	1.6
アルジカルブスルホン	小麦	0.002	3	101	19
		0.005	3	96.5	3.5
		0.01	3	88.5	6.0
		0.02	3	98.7	4.7
	とうもろこし	0.002	3	84.5	4.5
		0.005	3	96.7	12
		0.01	3	93.6	6.0
		0.05	3	99.6	1.4
	スーダングラスヘイ	0.02	3	91.2	2.2
		0.05	3	84.7	12
		1	3	95.6	2.4

・共同試験

成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (mg/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD_r (%)	室間再現精度 RSD_R (%)	HorRat
アルジカルブ	小麦	8	0	0.01	90.9	9.2	14	0.63
	とうもろこし	8	0	0.02	103	5.5	11	0.50
	スーダングラスヘイ	8	0	0.1	105	5.7	8.2	0.37
アルジカルブスルホキシド	小麦	8	0	0.01	97.9	3.4	5.0	0.23
	とうもろこし	8	0	0.02	96.0	7.5	8.4	0.38
	スーダングラスヘイ	8	0	0.1	93.0	4.1	6.5	0.30
アルジカルブスルホン	小麦	8	0	0.01	98.2	6.5	7.5	0.34
	とうもろこし	8	0	0.02	102	4.4	7.2	0.33
	スーダングラスヘイ	8	0	0.1	93.6	8.8	11	0.50

・定量下限（単一試験室による確認）　　試料中　各 0.002 mg/kg（乾牧草中　各 0.02 mg/kg）
・検出下限（単一試験室による確認）　　試料中　各 0.0006 mg/kg（乾牧草中　各 0.006 mg/kg）

（参考）クロマトグラム例



標準液（各農薬として 4 ng/mL）のクロマトグラム

16　イマザピック及びイマザピルの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法

(1)　分析対象化合物　　イマザピック及びイマザピル（2 成分）

(2)　適用範囲　　飼料

(3)　分析法

A　　試薬の調製

1)　イマザピック標準原液　　イマザピック〔$C_{14}H_{17}N_3O_3$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線までアセトンを加えてイマザピック標準原液を調製する（この液 1 mL は、イマザピックとして 0.5 mg を含有する。）。

2)　イマザピル標準原液　　イマザピル〔$C_{13}H_{15}N_3O_3$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線までアセトンを加えてイマザピル標準原液を調製する（この液 1 mL は、イマザピルとして 0.5 mg を含有する。）。

3)　農薬混合標準液　　各標準原液の一部を混合し、アセトンで正確に希釈し、1 mL 中にイマザピック及びイマザピルとしてそれぞれ 20 µg を含有する農薬混合標準原液を調製する。

使用に際して、農薬混合標準原液の一部を 0.1 v/v%ギ酸溶液－メタノール（7+3）で正確に希釈し、1 mL 中にイマザピック及びイマザピルとしてそれぞれ 0.2~2000 ng を含有する数点の農薬混合標準液を調製する。

B　　定　　量

抽　　出　　分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、300 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 20 mL（乾牧草は 30 mL）を加え、30 分間静置後、更に塩酸（0.02 mol/L）－メタノール（2+3）100 mL（乾牧草は 120 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、抽出液をあらかじめケイソウ土を 1 cm の厚さに敷いたろ紙（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塩酸（0.02 mol/L）－メタノール（2+3）60 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塩酸（0.02 mol/L）－メタノール（2+3）を加える。この液 2 mL（乾牧草は、更に塩酸（0.02 mol/L）－メタノール（2+3）で正確に 10 倍希釈した後、その液 2 mL）を 20 mL 以上の試験管等のガラス容器に正確に入れ、塩酸（0.01 mol/L）18 mL を加えて、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理[注1]　オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（1 g）[注2]をメタノール 10 mL 及び塩酸（10 mmol/L）10 mL で順次洗浄する。試料溶液をミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。先のミニカラムの下にあらかじめメタノール 10 mL 及び塩酸（10 mmol/L）10 mL で順次洗浄したベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）[注3]を連結する。試料溶液の入っていたガラス容器を塩酸（10 mmol/L）－メタノール（1+1）5 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に流出させる。

次に、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムをはずし、メタノール 5 mL をベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲルミニカラムに加え、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、メタノール－アンモニア水（99+1）10 mL をミニカラムに加え、イマザピック及びイマザピルを溶出させる。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。0.1 v/v%ギ酸溶液－メタノール（7+3）1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定　試料溶液及び各農薬混合標準液各 4 µL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、選択反応検出クロマトグラムを得る。

測定条件　例

（液体クロマトグラフ部）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 4 µm）[注4]

溶離液：0.1 v/v%ギ酸溶液－メタノール（4+1）→10 min→（1+9）（5 min 保持）

流速：0.2 mL/min

カラム槽温度：40 °C

（タンデム型質量分析計部[注5]）

検出器：四重極型質量分析計

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化（ESI）法（正イオンモード）

イオン源温度：150 °C

デソルベーションガス：N_2（650 L/h、500 °C）
キャピラリー電圧：1 kV
コーンガス：N_2（50 L/h）
コーン電圧：下表のとおり
コリジョンガス：Ar（0.20 mL/min）
コリジョンエネルギー：下表のとおり
モニターイオン：下表のとおり

表　各物質の測定条件

測定対象物質	プリカーサーイオン（*m*/*z*）	プロダクトイオン 定量用（*m*/*z*）	プロダクトイオン 確認用（*m*/*z*）	コーン電圧（V）	コリジョンエネルギー（eV）
イマザピック	276	231	—	35	20
		—	163		25
イマザピル	262	217	—	35	25
		—	69		30

計　　算　　得られた選択反応検出クロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中のイマザピック量及びイマザピル量を算出する。

注 1　流速は 1~2 mL/min とする。必要に応じて吸引マニホールドを使用する。

2　InertSep C18-C（ジーエルサイエンス製）に適当な容量のリザーバーを連結したもの又はこれと同等のもの

3　Bond Elut SCX（Agilent Technologies 製）に必要に応じて適当な容量のリザーバーを連結したもの又はこれと同等のもの

4　Inertsil ODS-3（ジーエルサイエンス製）又はこれと同等のもの

5　ACQUITY TQD（Waters 製）による条件例

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
イマザピック	牛用配合飼料	0.005	3	93.2	2.4
		0.01	3	96.0	6.5
	小麦	0.005	3	82.7	3.5
		0.01	3	87.8	2.3
		0.05	3	100	2.4
	大豆	0.005	3	89.5	4.4
		0.05	3	96.3	3.3
		0.5	3	96.2	0.4
	とうもろこし	0.005	3	87.7	1.7
		0.01	3	97.7	5.0
	大豆油かす	0.005	3	89.9	5.1
		0.05	3	106	2.1
		0.5	3	102	1.2
	スーダングラスヘイ	0.05	3	91.7	7.0
		0.5	3	99.4	1.5
		3	3	92.9	0.9
イマザピル	牛用配合飼料	0.005	3	87.9	6.7
		0.01	3	93.4	3.8
		0.05	3	84.9	0.8
	小麦	0.005	3	88.9	4.9
		0.01	3	98.5	3.5
		0.05	3	105	2.2
	大豆	0.005	3	90.1	6.5
		0.05	3	102	1.4
		5	3	94.0	0.7
	とうもろこし	0.005	3	95.2	6.2
		0.010	3	100	4.9
		0.05	3	85.4	0.7
	大豆油かす	0.005	3	87.1	4.1
		0.05	3	107	2.1
		7.0	3	98.5	1.4
	スーダングラスヘイ	0.05	3	100	5.1
		0.5	3	109	2.3
		30	3	92.5	0.4

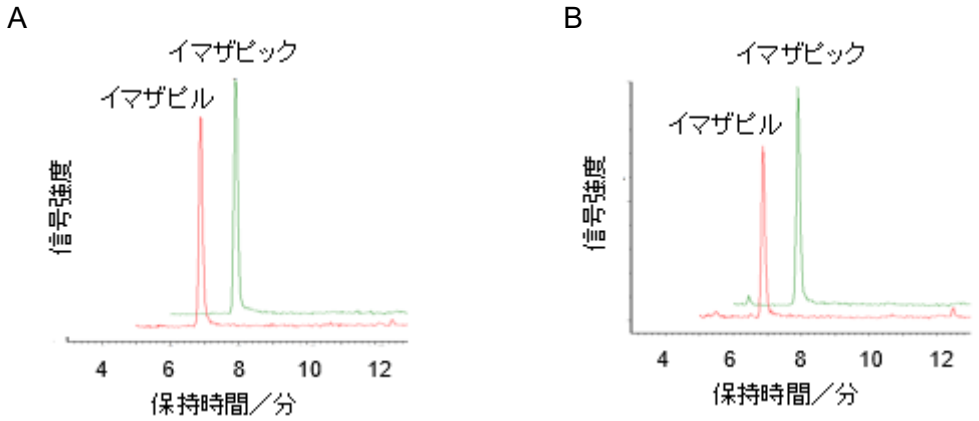
・共同試験

成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（mg/kg）	添加回収率（%）	室内繰返し精度 RSD_r（%）	室間再現精度 RSD_R（%）	HorRat
イマザピック	牛用配合飼料	9	0	0.01	87.6	9.3	11	0.50
	小麦	9	0	0.05	81.4	8.6	13	0.61
	とうもろこし	9	0	0.01	89.0	10	14	0.64
	大豆油かす	9	0	0.5	98.2	3.6	6.8	0.37
	スーダングラスヘイ	9	0	3	84.4	6.7	9.1	0.65
イマザピル	牛用配合飼料	9	0	0.05	76.6	7.6	19	0.85
	小麦	9	0	0.05	78.8	13	20	0.90
	とうもろこし	9	0	0.05	83.7	8.6	19	0.85
	大豆油かす	8	1	7	89.4	2.2	6.2	0.51
	スーダングラスヘイ	9	0	30	91.0	3.8	4.8	0.49

・定量下限（単一試験室による確認）　試料中　各 0.005 mg/kg（乾牧草中　各 0.05 mg/kg）

・検出下限（単一試験室による確認）　試料中　各 0.002 mg/kg（乾牧草中　各 0.02 mg/kg）

（参考）クロマトグラム例



標準液及び添加試料のクロマトグラム

A：標準液（各農薬として 5 ng/mL）

B：添加試料（小麦に各農薬として 0.05 mg/kg 相当量添加）

17　イミダクロプリド、クロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサムの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法

(1)　分析対象化合物　　イミダクロプリド、クロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサム（4 成分）

(2)　適用範囲　　稲わら、稲発酵粗飼料及び籾米

(3)　分析法

A　　試薬の調製

1) イミダクロプリド標準原液　イミダクロプリド〔$C_9H_{10}ClN_5O_2$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線までメタノールを加えてイミダクロプリド標準原液を調製する（この液 1 mL は、イミダクロプリドとして 0.5 mg を含有する。）。

2)　クロチアニジン標準原液　　クロチアニジン〔$C_6H_8ClN_5O_2S$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線までアセトンを加えてクロチアニジン標準原液を調製する（この液 1 mL は、クロチアニジンとして 0.5 mg を含有する。）。

3)　ジノテフラン標準原液　　ジノテフラン〔$C_7H_{14}N_4O_3$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線までメタノールを加えてジノテフラン標準原液を調製する（この液 1 mL は、ジノテフランとして 0.5 mg を含有する。）。

4)　チアメトキサム標準原液　　チアメトキサム〔$C_8H_{10}ClN_5O_3S$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線までアセトンを加えてチアメトキサム標準原液を調製する（この液 1 mL は、チアメトキサムとして 0.5 mg を含有する。）。

5)　農薬混合標準液　　使用に際して、イミダクロプリド標準原液、クロチアニジン標準原液、ジノテフラン標準原液及びチアメトキサム標準原液の一部を混合し、水－メタノール（9+1）で正確に希釈し、1 mL 中に各農薬としてそれぞれ

0.25~100 ng を含有する数点の農薬混合標準液を調製する。

B　定　　量

抽　　出　　分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、300 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 30 mL（籾米は 20 mL）を加え、30 分間静置後、更にアセトン 120 mL（籾米は 100 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、先の三角フラスコ及び残さを順次アセトン 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を加える。この液 20 mL を 100 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C 以下の水浴で約 2 mL まで減圧濃縮し、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（5 mL 保持用）[注1]に入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコを水 2 mL で洗浄し、洗液をカラムに加えた後、10 分間静置する。先のなす形フラスコをヘキサン 25 mL ずつで 2 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出させる。200 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、先のなす形フラスコを酢酸エチル 20 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次カラムに加え、各農薬を溶出させる。

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。アセトニトリル 5 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。

カラム処理 II　　グラファイトカーボン／アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム（500 mg/500 mg）[注2]をアセトニトリル 10 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、液面が充てん剤の上端に達するまで流下し、各農薬を流出させる。更に、試料溶液の入っていたなす形フラスコをアセトニトリル 10 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に流出させる。

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。水－メタノール（9+1）20 mL を正確に加えて残留物を溶かし、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定　　試料溶液及び各農薬混合標準液各 5 µL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、選択反応検出クロマトグラムを得る。

測定条件　例

（液体クロマトグラフ部）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 5 µm）[注3]

溶離液：5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液－アセトニトリル（9+1）→15 min→アセトニトリル（2 min 保持）

流速：0.2 mL/min

カラム槽温度：40 °C

（タンデム型質量分析計部[注4]）

検　　出　　器：四重極型質量分析計

イ　オ　ン　化　法：エレクトロスプレーイオン化（ESI）法（正イオンモード）

イ　オ　ン　源　温　度：120 °C

デソルベーションガス：N_2（800 L/h、500 °C）

キ ャ ピ ラ リ ー 電 圧：0.5 kV

コ　ー　ン　ガ　ス：N_2（50 L/h）

コ　ー　ン　電　圧：下表のとおり

コ リ ジ ョ ン ガ ス：Ar（0.25 mL/min）

コリジョンエネルギー：下表のとおり

モ ニ タ ー イ オ ン：下表のとおり

表　各物質の測定条件

測定対象物質	プリカーサーイオン（*m/z*）	プロダクトイオン 定量用（*m/z*）	プロダクトイオン 確認用（*m/z*）	コーン電圧（V）	コリジョンエネルギー（eV）
イミダクロプリド	256	175	－	25	20
		－	209	25	15
クロチアニジン	250	132	－	15	15
		－	169	15	15
ジノテフラン	203	129	－	15	10
		－	157	15	10
チアメトキサム	292	211	－	20	15
		－	132	20	15

計　　算　　得られた選択反応検出クロマトグラムからピーク面積又は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。

注 1　Chem Elut（Agilent Technologies 製）又はこれと同等のもの

2　InertSep GC/NH_2（ジーエルサイエンス製）又はこれと同等のもの

3　ZORBAX Eclipse XDB-C18（Agilent Technologies 製）又はこれと同等のもの

4　ACQUITY TQD（Waters 製）による条件例

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r (%)
イミダクロプリド	稲わら 1	0.01	5	83.1	5.9
		10	5	90.3	1.8
	稲発酵粗飼料	0.004	5	90.6	8.0
		3.1	5	91.5	2.0
	籾米	0.01	5	97.7	9.0
		1	5	93.0	2.3
クロチアニジン	稲わら 2	0.01	3	77.5	7.3
		0.02	3	81.6	3.7
		0.2	3	91.0	3.5
		2	3	99.5	2.4
		5	3	88.0	3.6
	稲わら 3	0.2	3	91.4	2.6
		2	3	86.5	0.7
		5	3	90.0	3.7
	稲発酵粗飼料	0.09	3	98.0	3.1
		0.9	3	101	2.7
		2.2	3	83.1	2.7
	籾米	0.01	3	80.2	16
		0.02	3	93.0	2.3
		0.2	3	91.6	7.0
		2	3	94.0	1.9
		5	3	87.5	4.5
ジノテフラン	稲わら 2	0.01	3	82.8	4.8
		0.02	3	89.1	5.4
		0.2	3	95.2	9.1
		2	3	99.0	2.8
		5	3	87.0	4.9
	稲わら 3	0.2	3	106	8.9
		2	3	85.0	1.4
		5	3	88.0	4.8
	稲発酵粗飼料	0.09	3	96.0	3.3
		0.9	3	100	2.2
		2.2	3	84.0	6.6
	籾米	0.01	3	76.9	13
		0.02	3	86.8	2.1
		0.2	3	81.5	3.4
		2	3	85.7	2.7
		5	3	89.0	5.7
チアメトキサム	稲わら 2	0.01	3	96.1	4.6
		0.02	3	79.8	5.9
		0.2	3	102	6.5
		2	3	105	8.0
		5	3	95.0	3.0
	稲わら 3	0.2	3	92.0	8.2
		2	3	96.8	2.3
		5	3	93.0	2.0
	稲発酵粗飼料	0.09	3	87.9	8.7
		0.9	3	101	2.7
		2.2	3	96.0	2.7
	籾米	0.01	3	95.6	6.5
		0.02	3	89.0	2.1
		0.2	3	98.8	5.7
		2	3	95.7	1.4
		5	3	91.0	2.1

・共同試験

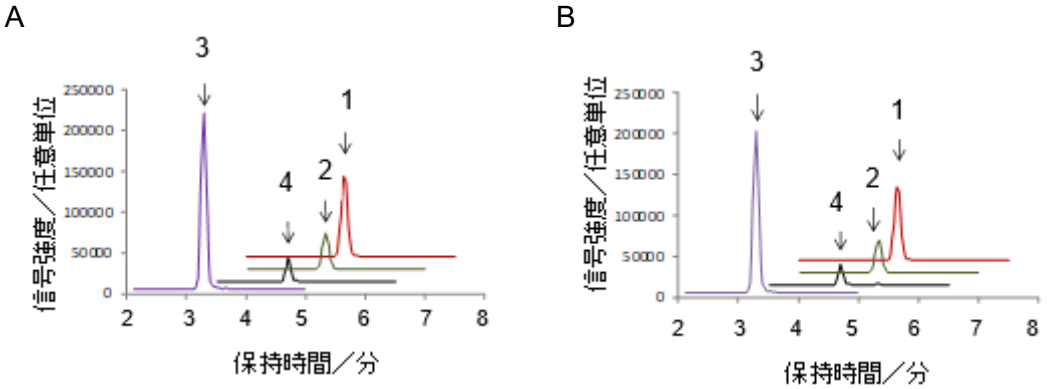
成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（mg/kg）	添加回収率（%）	室内繰返し精度 RSD_r（%）	室間再現精度 RSD_R（%）	HorRat
クロチアニジン	稲わら	9	0	0.2	90.4	8.3	14	0.68
	稲発酵粗飼料	8	1	5注	94.5	4.2	5.9	0.46
	籾米	8	1	3	92.3	1.8	4.4	0.32
ジノテフラン	稲わら	8	1	0.2	89.3	3.4	15	0.71
	稲発酵粗飼料	8	1	5注	94.4	4.0	6.7	0.53
	籾米	8	1	3	92.3	3.5	8.9	0.65
チアメトキサム	稲わら	9	0	0.2	92.1	9.5	11	0.52
	稲発酵粗飼料	9	0	5注	98.6	3.8	9.0	0.72
	籾米	9	0	3	93.7	3.5	5.8	0.43

注　分析試料（風乾物）に対する添加濃度

・定量下限（単一試験室による確認）　試料（稲発酵粗飼料は風乾物。以下本項において同じ。）中　各 0.01 mg/kg

・検出下限（単一試験室による確認）　イミダクロプリド：試料中　0.004 mg/kg、その他の農薬：試料中　各 0.003 mg/kg

（参考）クロマトグラム例



標準液及び添加試料のクロマトグラム

（矢印は 1：イミダクロプリド、2：クロチアニジン、3：ジノテフラン、4：チアメトキサムを示す。）

A：標準液（チアメトキサムとして 10 ng/mL、その他農薬として各 50 ng/mL）

B：添加試料（稲わらに各農薬としてチアメトキサムとして 10 mg/kg、その他農薬として各 0.2 mg/kg 相当量添加）

18　エスプロカルブその他の農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法

(1)　分析対象化合物　エスプロカルブ、カフェンストロール、ピラゾキシフェン、ピラゾリネート及びブプロフェジン（5 成分）

(2)　適用範囲　稲わら、稲発酵粗飼料及び籾米

(3)　分析法

A　試薬の調製

農薬混合標準液　エスプロカルブ〔$C_{15}H_{23}NOS$〕、カフェンストロール〔$C_{16}H_{22}N_4O_3S$〕、ピラゾキシフェン〔$C_{20}H_{16}Cl_2N_2O_3$〕、ピラゾリネート

〔$C_{19}H_{16}Cl_2N_2O_4S$〕及びブプロフェジン〔$C_{16}H_{23}N_3OS$〕各 25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、それぞれ 50 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線までアセトンを加えて各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 0.5 mg を含有する。）。

各農薬標準原液各 1 mL を 50 mL の全量フラスコに正確に入れ、更に標線までアセトンを加えて 1 mL 中に各農薬としてそれぞれ 10 μg を含有する農薬混合標準原液を調製する。

使用に際して、農薬混合標準原液の一部をアセトニトリル－水（4+1）で正確に希釈し、1 mL 中に各農薬としてそれぞれ 0.05~10 ng を含有する数点の農薬混合標準液を調製する。

B　定　　量

抽　　出　　分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、300 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 30 mL（籾米は 20 mL）を加え、30 分間静置後、更にアセトン 120 mL（籾米は 100 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、先の三角フラスコ及び残さを順次アセトン 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を加える。この液 2 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、水 20 mL を加えて、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理[注1]　　オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）[注2]をアセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL で順次洗浄する。試料溶液をミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。更に試料溶液の入っていたなす形フラスコを水－アセトニトリル（3+2）5 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に流出させる。10 mL の全量フラスコをミニカラムの下に置き、アセトニトリル－水（4+1）9 mL をミニカラムに加え、各農薬を溶出させる[注3]。更に全量フラスコの標線までアセトニトリル－水（4+1）を加え、その液の一部を 5,000×*g* で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とする[注4]。

液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定　　試料溶液及び各農薬混合標準液各 5 μL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、選択反応検出クロマトグラムを得る。

測定条件　例

（液体クロマトグラフ部）

カ　　ラ　　ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm）[注5]

溶　　離　　液：2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液－アセトニトリル（4+1）→15 min→（1+9）（5 min 保持）

流　　速：0.2 mL/min

カ ラ ム 槽 温 度：40 °C

（タンデム型質量分析計部[注6]）

検　　出　　器：四重極型質量分析計

イ　オ　ン　化　法：エレクトロスプレーイオン化（ESI）法（正イオンモード）

イ　オ　ン　源　温　度：120 °C

デソルベーションガス：N_2（650 L/h、350 °C）

キャピラリー電圧：3.5 kV

コ　ー　ン　ガ　ス：N_2（50 L/h）

コ　ー　ン　電　圧：下表のとおり

コリジョンガス：Ar（0.25 mL/min）

コリジョンエネルギー：下表のとおり

モニターイオン：下表のとおり

表　各物質の測定条件

測定対象物質	プリカーサーイオン（*m/z*）	プロダクトイオン 定量用（*m/z*）	プロダクトイオン 確認用（*m/z*）	コーン電圧（V）	コリジョンエネルギー（eV）
エスプロカルブ	266	91	—	35	25
		—	71		20
カフェンストロール	351	100	—	20	16
		—	72		36
ピラゾキシフェン	403	91	—	45	35
		—	105		23
ピラゾリネート	439	91	—	45	37
		—	173		19
ブプロフェジン	306	201	—	35	14
		—	116		18

計　　算　　得られた選択反応検出クロマトグラムからピーク面積又は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。

注 1　流速は 1~2 mL/min 程度とする。必要に応じて吸引マニホールドを使用する。

2　InertSep Slim-J C18-B（ジーエルサイエンス製）に適当な容量のリザーバーを連結したもの又はこれと同等のもの

3　流速が維持できない場合は、必要に応じて二連球等により圧注する。

4　試料中のブプロフェジン含量が多い場合には、最終試料溶液をアセトニトリル－水（4+1）で希釈してから液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する。

5　ZORBAX Eclipse XDB-C18（Agilent Technologies 製）又はこれと同等のもの

6　ACQUITY TQD（Waters 製）による条件例

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
エスプロカルブ	稲わら	0.01	3	93.6	5.2
		0.2	3	94.9	3.1
	稲発酵粗飼料	0.01	3	98.1	2.4
		0.2	3	103	2.1
	籾米	0.01	3	96.6	3.3
		0.02	3	98.0	4.2
カフェンストロール	稲わら	0.01	3	97.0	4.7
		0.2	3	98.0	4.4
	稲発酵粗飼料	0.01	3	104	1.3
		0.2	3	103	1.9
	籾米	0.01	3	94.2	6.2
		0.02	3	88.5	7.9
ピラゾキシフェン	稲わら	0.01	3	88.3	5.9
		0.2	3	92.6	3.1
	稲発酵粗飼料	0.01	3	97.6	2.0
		0.2	3	106	1.2
	籾米	0.01	3	86.5	1.3
		0.1	3	86.2	5.0
ピラゾリネート	稲わら	0.01	3	97.5	1.8
		0.2	3	93.7	3.6
	稲発酵粗飼料	0.01	3	92.0	7.1
		0.2	3	90.3	6.3
	籾米	0.01	3	96.7	3.2
		0.1	3	98.8	5.3
ブプロフェジン	稲わら	0.01	3	90.0	7.1
		25	3	99.3	5.2
	稲発酵粗飼料	0.01	3	95.0	1.7
		15	3	85.6	3.6
	籾米	0.01	3	101	3.5
		10	3	99.9	2.4

・共同試験

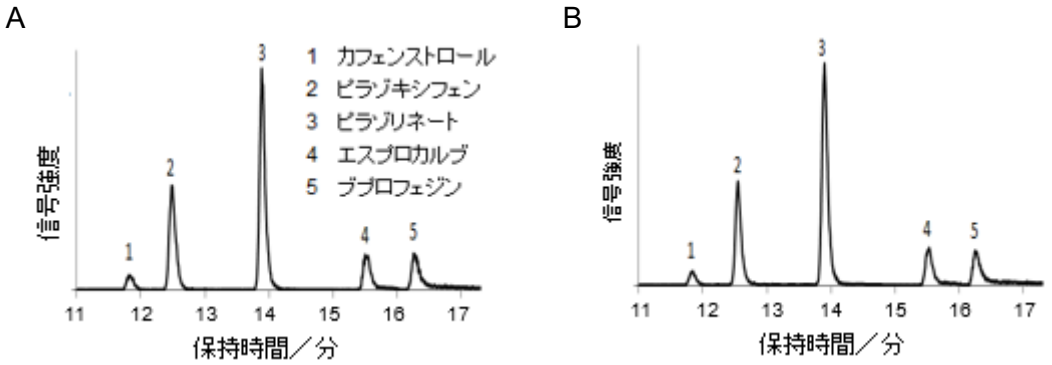
成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（mg/kg）	添加回収率（%）	室内繰返し精度 RSD_r（%）	室間再現精度 RSD_R（%）	HorRat
エスプロカルブ	稲わら	9	0	0.2	89.3	4.6	10	0.49
	稲発酵粗飼料	9	0	0.2	88.4	3.3	7.3	0.35
	籾米	9	0	0.02	94.0	5.9	7.1	0.32
カフェンストロール	稲わら	9	0	0.2	96.1	2.5	9.4	0.46
	稲発酵粗飼料	9	0	0.2	95.8	3.0	7.7	0.38
	籾米	9	0	0.02	97.0	7.1	9.6	0.44
ピラゾキシフェン	稲わら	9	0	0.2	88.3	4.0	13	0.65
	稲発酵粗飼料	9	0	0.2	89.3	3.8	8.9	0.43
	籾米	9	0	0.1	94.2	3.8	8.7	0.40
ピラゾリネート	稲わら	9	0	0.2	94.1	1.8	15	0.71
	稲発酵粗飼料	9	0	0.2	91.0	5.2	13	0.65
	籾米	9	0	0.1	99.3	4.5	8.8	0.40
ブプロフェジン	稲わら	9	0	25	90.5	2.7	10	1.1
	稲発酵粗飼料	9	0	15	92.4	2.9	11	1.0
	籾米	9	0	10	97.6	4.4	7.7	0.68

・定量下限（単一試験室による確認）　試料（稲発酵粗飼料は風乾物）中　各 0.01 mg/kg

・検出下限（単一試験室による確認）　試料（稲発酵粗飼料は風乾物）中　各

0.003 mg/kg

（参考）クロマトグラム例



標準液及び添加試料のクロマトグラム

A：標準液（ピラゾキシフェン及びピラゾリネートとして 1 ng/mL、その他農薬として各 0.2 ng/mL）

B：添加試料（籾米にカフェンストロール及びエスプロカルブとして 0.02 mg/kg、ピラゾキシフェン及びピラゾリネートとして 0.1 mg/kg、ブプロフェジンとして 10 mg/kg （試料溶液を 500 倍希釈）相当量添加）

19　エチプロールその他の農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法

(1)　分析対象化合物　エチプロール、カルプロパミド、クロマフェノジド、クロラントラニリプロール、チフルザミド、ピロキロン（6 成分）

(2)　適用範囲　稲わら、稲発酵粗飼料及び籾米

(3)　分析法

A　試薬の調製

農薬混合標準液　エチプロール〔$C_{13}H_9Cl_2F_3N_4OS$〕、カルプロパミド〔$C_{15}H_{18}Cl_3NO$〕、クロマフェノジド〔$C_{24}H_{30}N_2O_3$〕、クロラントラニリプロール〔$C_{18}H_{14}BrCl_2N_5O_2$〕、チフルザミド〔$C_{13}H_6Br_2F_6N_2O_2S$〕及びピロキロン〔$C_{11}H_{11}NO$〕各 50 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、それぞれ 100 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線までアセトンを加えて各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 0.5 mg を含有する。）。

各農薬標準原液各 2 mL を 100 mL の全量フラスコに入れて混合し、更に標線までアセトンを加えて 1 mL 中に各農薬としてそれぞれ 10 μg を含有する農薬混合標準原液を調製する。

使用に際して、農薬混合標準原液の一部をアセトニトリル－水（3+2）で正確に希釈し、1 mL 中に各農薬として 0.5~50 ng を含有する数点の農薬混合標準液を調製する。

B　定　　量

抽　　出　分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、300 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 30 mL（籾米は 20 mL）を加えて、30 分間静置後、

更にアセトン 120 mL（籾米は 100 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、先の三角フラスコ及び残さを順次アセトン 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を加える。この液 2 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、水 20 mL を加えて、カラム処理 I に供する試料溶液とする。

カラム処理 I [注1]　オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）[注2] をアセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL で順次洗浄する。試料溶液をミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流下させる。更に試料溶液の入っていたなす形フラスコを水－アセトニトリル（9+1）5 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に流出させる。10 mL の全量フラスコをミニカラムの下に置き、アセトニトリル－水（3+2）9 mL をミニカラムに加え、各農薬を溶出させる。更に全量フラスコの標線までアセトニトリル－水（3+2）を加える。この液 5 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C 以下の水浴で約 2 mL まで減圧濃縮した後、水 2 mL を加えてカラム処理 II に供する試料溶液とする。

カラム処理 II [注1]　試料溶液を多孔性ケイソウ土カラム（5 mL 保持用）[注3] に入れ、10 分間静置する。100 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酢酸エチル 5 mL ずつで 4 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各農薬を溶出させる。更に酢酸エチル 10 mL をカラムに加えて同様に溶出させ、溶出液を 40 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮し、窒素ガスを送って乾固する。アセトニトリル－トルエン（3+1）5 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理 III に供する試料溶液とする。

カラム処理 III [注1]　グラファイトカーボン／アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム（500 mg/500 mg）[注4] をアセトニトリル－トルエン（3+1）10 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、液面が充てん剤の上端に達するまで流下して各農薬を流出させる。試料溶液の入っていたなす形フラスコをアセトニトリル－トルエン（3+1）5 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に流出させる。更にアセトニトリル－トルエン（3+1）5 mL をミニカラムに加えて同様に流出させる。流出液を 40 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮し、窒素ガスを送って乾固する。アセトニトリル－水（3+2）1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、5,000×*g* で 5 分間遠心分離し、上澄み液の一部をアセトニトリル－水（3+2）で正確に 10 倍希釈して液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とする。また、試料が稲わらである場合は、先の遠心分離した後の上澄み液をクロラントラニリプロールの定量に用いるための液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定　試料溶液及び各農薬混合標準液各 5 μL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、選択反応検出クロマトグラムを得る。

測定条件　例

（液体クロマトグラフ部）

カ　ラ　ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm）[注5]

溶　離　液：2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液－アセトニトリル（4+1）→15 min→（1+9）（5 min 保持）

流　速：0.2 mL/min

カラム槽温度：40 °C

（タンデム型質量分析計部[注6]）

検　出　器：四重極型質量分析計

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化（ESI）法

イオン源温度：120 °C

デソルベーションガス：N_2（600 L/h、450 °C）

キャピラリー電圧：正イオン 2.0 kV、負イオン 1.0 kV

コーンガス：N_2（50 L/h）

コーン電圧：下表のとおり

コリジョンエネルギー：下表のとおり

モニターイオン：下表のとおり

表　各物質の測定条件

測定対象物質	測定モード	プリカーサーイオン（m/z）	プロダクトイオン 定量用（m/z）	プロダクトイオン 確認用（m/z）	コーン電圧（V）	コリジョンエネルギー（eV）
エチプロール	−	395	330	−	20	15
			−	250	20	25
カルプロパミド	＋	334	139	−	30	20
			−	103	30	40
クロマフェノジド	＋	395	175	−	15	15
			−	91	15	50
クロラントラニリプロール	＋	482	284	−	25	15
			−	112	25	50
チフルザミド	−	527	125	−	25	45
			−	166	25	30
ピロキロン	＋	174	132	−	45	20
			−	117	45	25

計　算　得られた選択反応検出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、試料中の各農薬量を算出する。

注1　流速は1 mL/min程度とする。必要に応じて吸引マニホールドを使用する。

2　InertSep Slim-J C18-B（ジーエルサイエンス製）又はこれと同等のもの

3　Chem Elut（Agilent Technologies 製）又はこれと同等のもの

4　Supelclean ENVI-Carb/LC-NH_2（Sigma-Aldrich 製）又はこれと同等のもの

5　Inertsil ODS-SP（ジーエルサイエンス製）又はこれと同等のもの

6　Quattro Premier XE （Waters 製）による条件例

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
エチプロール	稲わら	0.1	3	83.5	16
		3	3	90.4	5.0
	稲発酵粗飼料	0.044	3	88.8	12
		1.3	3	86.5	2.2
	籾米	0.1	3	86.7	10
		1	3	94.6	4.3
カルプロパミド	稲わら	0.1	3	100	12
		3	3	83.3	3.7
	稲発酵粗飼料	0.044	3	105	3.5
		0.89	3	89.9	4.3
	籾米	0.1	3	102	9.2
		1	3	91.8	6.6
クロマフェノジド	稲わら	0.1	3	105	11
		5	3	85.9	1.5
	稲発酵粗飼料	0.044	3	99.9	2.8
		1.3	3	97.4	2.7
	籾米	0.1	3	101	1.6
		3	3	92.7	1.1
クロラントラニリプロール	稲わら	0.01	3	96.8	10
		0.1	3	95.5	2.8
	稲発酵粗飼料	0.044	3	98.3	4.2
		1.3	3	93.5	5.6
	籾米	0.1	3	103	10
		1	3	103	2.9
チフルザミド	稲わら	0.1	3	87.8	20
		1	3	85.2	6.7
	稲発酵粗飼料	0.044	3	98.2	3.6
		1.3	3	119	6.6
	籾米	0.1	3	90.8	11
		1	3	92.3	4.6
ピロキロン	稲わら	0.1	3	103	9.9
		3	3	79.4	13
	稲発酵粗飼料	0.044	3	103	3.8
		0.89	3	97.4	3.7
	籾米	0.1	3	102	5.5
		1	3	88.7	12

・共同試験

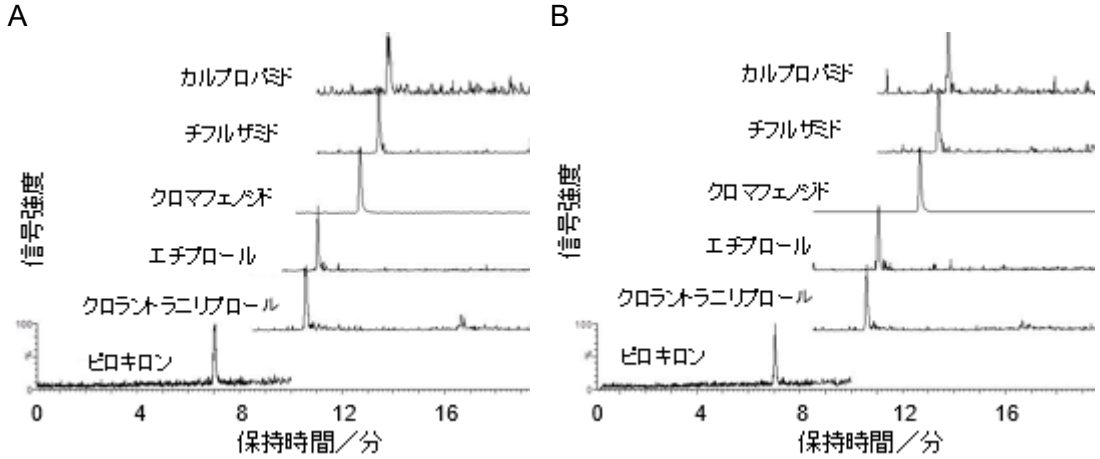
成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（mg/kg）	添加回収率（%）	室内繰返し精度 RSD_r（%）	室間再現精度 RSD_R（%）	HorRat
エチプロール	稲わら	8	0	1	92.5	5.0	6.0	0.37
	籾米	8	0	1	98.5	4.8	8.0	0.50
カルプロパミド	稲わら	8	0	1	91.7	3.5	4.6	0.28
	籾米	8	0	1	97.0	4.0	4.3	0.27
クロマフェノジド	稲わら	8	0	1	94.8	8.1	8.1	0.50
	籾米	8	0	1	101	1.9	4.3	0.27
クロラントラニリプロール	稲わら	8	0	0.1	75.8	11	25	1.2
	籾米	8	0	1	95.6	7.3	9.4	0.58
チフルザミド	稲わら	8	0	1	92.6	5.4	6.4	0.40
	籾米	8	0	1	99.2	3.5	5.1	0.32
ピロキロン	稲わら	8	0	1	90.8	4.4	6.3	0.39
	籾米	8	0	1	94.2	3.8	5.8	0.36

・定量下限（単一試験室による確認）　　クロラントラニリプロール：試料（稲

発酵粗飼料は風乾物。以下本項において同じ。）中　0.1 mg/kg（稲わら 0.01 mg/kg）、その他の農薬：試料中　各 0.1 mg/kg

・検出下限（単一試験室による確認）　　クロラントラニリプロール：試料中 0.03 mg/kg（稲わら 0.003 mg/kg）、その他の農薬：試料中　各 0.03 mg/kg

（参考）クロマトグラム例



標準液及び添加試料のクロマトグラム

A：標準液（各農薬として 0.5 ng/mL）

B：添加試料（稲わらに各農薬として 0.1 mg/kg 相当量添加）

20　オキサジクロメホンその他の農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法

(1)　分析対象化合物　　オキサジクロメホン、ジメタメトリン及びピリブチカルブ（3 成分）

(2)　適用範囲　　稲わら、稲発酵粗飼料及び籾米

(3)　分析法

A　　試薬の調製

1)　オキサジクロメホン標準原液　　オキサジクロメホン〔$C_{20}H_{19}Cl_2NO_2$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線までアセトンを加えてオキサジクロメホン標準原液を調製する（この液 1 mL は、オキサジクロメホンとして 0.5 mg を含有する。）

2)　ジメタメトリン標準原液　　ジメタメトリン〔$C_{11}H_{21}N_5S$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線までアセトンを加えてジメタメトリン標準原液を調製する（この液 1 mL は、ジメタメトリンとして 0.5 mg を含有する。）。

3)　ピリブチカルブ標準原液　　ピリブチカルブ〔$C_{18}H_{22}N_2O_2S$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線までアセトンを加えてピリブチカルブ標準原液を調製する（この液 1 mL は、ピリブチカルブとして 0.5 mg を含有する。）。

4)　農薬混合標準液　　使用に際して、オキサジクロメホン標準原液、ジメタメト

リン標準原液及びピリブチカルブ標準原液の一部を混合し、アセトニトリル－水（4+1）で正確に希釈し、1 mL 中にオキサジクロメホン、ジメタメトリン及びピリブチカルブとしてそれぞれ 0.1~10 ng を含有する数点の農薬混合標準液を調製する。

B　定　　量

抽　　出　　分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、300 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 30 mL（籾米は 20 mL）を加え、30 分間静置後、更にアセトン 120 mL（籾米は 100 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、先の三角フラスコ及び残さを順次アセトン 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を加える。この液 2 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、水 20 mL を加えて、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理[注1]　　オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）[注2]をアセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL で順次洗浄する。試料溶液をミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。更に試料溶液の入っていたなす形フラスコを水－アセトニトリル（3+2）5 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に流出させる。10 mL の全量フラスコをミニカラムの下に置き、アセトニトリル－水（4+1）9 mL をミニカラムに加え、各農薬を溶出させる[注3]。更に全量フラスコの標線までアセトニトリル－水（4+1）を加え、その液の一部を 5,000×*g* で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定　　試料溶液及び各農薬混合標準液各 5 μL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、選択反応検出クロマトグラムを得る。

測定条件　例

（液体クロマトグラフ部）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm）[注4]

溶離液：2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液－アセトニトリル（4+1）→15 min→（1+9）（5 min 保持）

流速：0.2 mL/min

カラム槽温度：40 °C

（タンデム型質量分析計部[注5]）

検出器：四重極型質量分析計

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化（ESI）法（正イオンモード）

イオン源温度：120 °C

デソルベーションガス：N_2（650 L/h、350 °C）

キャピラリー電圧：3.5 kV

コ　ー　ン　ガ　ス：N_2（50 L/h）
コ　ー　ン　電　圧：下表のとおり
コリジョンエネルギー：下表のとおり
モ ニ タ ー イ オ ン：下表のとおり

表　各物質の測定条件

測定対象物質	プリカーサーイオン（*m/z*）	プロダクトイオン 定量用（*m/z*）	プロダクトイオン 確認用（*m/z*）	コーン電圧（V）	コリジョンエネルギー（eV）
オキサジクロメホン	376	190	―	21	23
		―	162	21	43
ジメタメトリン	256	186	―	31	27
		―	69	31	63
ピリブチカルブ	331	181	―	16	23
		―	109	16	39

計　　算　　得られた選択反応検出クロマトグラムからピーク面積又は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得る。

注 1　流速は 1~2 mL/min とする。必要に応じて吸引マニホールドを使用する。

2　InertSep Slim-J C18-B（ジーエルサイエンス製）に適当な容量のリザーバーを連結したもの又はこれと同等のもの

3　流速が維持できない場合は、必要に応じて二連球等により圧注する。

4　ZORBAX Eclipse XDB-C18（Agilent Technologies 製）又はこれと同等のもの

5　ACQUITY TQD（Waters 製）による条件例

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度（mg/kg）	繰返し	平均回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
オキサジクロメホン	稲わら	0.01	3	95.5	3.1
		0.3	3	99.0	2.5
	稲発酵粗飼料	0.01	3	100	4.5
		0.1	3	94.2	2.6
	籾米	0.01	3	91.7	4.9
		0.1	3	99.5	7.1
ジメタメトリン	稲わら	0.01	3	91.0	3.5
		0.2	3	92.8	3.4
	稲発酵粗飼料	0.01	3	105	4.7
		0.1	3	90.8	1.8
	籾米	0.01	3	88.3	2.2
		0.1	3	98.6	0.6
ピリブチカルブ	稲わら	0.01	3	93.1	1.1
		0.1	3	84.1	3.9
	稲発酵粗飼料	0.01	3	95.5	3.6
		0.1	3	90.3	5.3
	籾米	0.01	3	104	4.9
		0.1	3	91.2	7.8

・共同試験

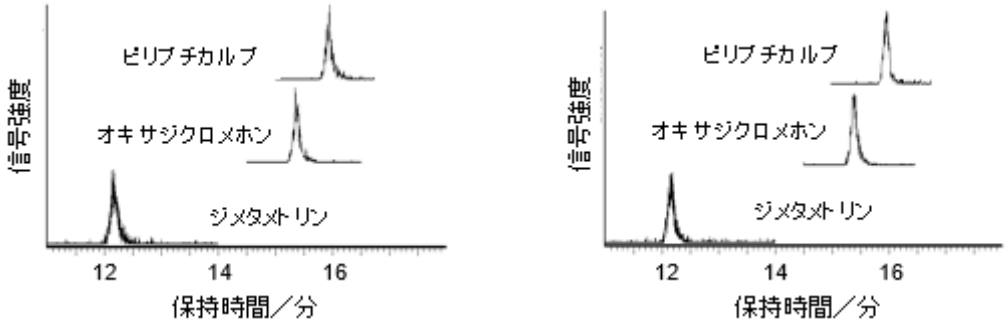
成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（mg/kg）	添加回収率（%）	室内繰返し精度 RSD_r（%）	室間再現精度 RSD_R（%）	HorRat
オキサジクロメホン	稲わら	8	0	0.1	94.6	4.1	4.1	0.19
	稲発酵粗飼料	8	0	0.04	94.1	7.4	7.4	0.33
	籾米	8	0	0.05	96.8	3.1	3.3	0.15
ジメタメトリン	稲わら	8	0	0.1	94.1	2.1	3.2	0.15
	稲発酵粗飼料	8	0	0.04	95.3	3.8	4.0	0.18
	籾米	8	0	0.05	96.4	2.3	3.2	0.14
ピリブチカルブ	稲わら	8	0	0.1	81.4	5.0	5.2	0.23
	稲発酵粗飼料	8	0	0.04	83.1	6.6	7.0	0.32
	籾米	8	0	0.05	88.0	6.1	6.5	0.30

・定量下限（単一試験室による確認）　試料（稲発酵粗飼料は風乾物）中　各 0.01 mg/kg

・検出下限（単一試験室による確認）　試料（稲発酵粗飼料は風乾物）中　各 0.003 mg/kg

（参考）クロマトグラム例

A　　B



標準液及び添加試料のクロマトグラム

A：標準液（各農薬として 1 ng/mL）

B：添加試料（籾米に各農薬として 0.1 mg/kg 相当量添加）

21　オリサストロビンその他の農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法

(1)　分析対象化合物　　オリサストロビン、オリサストロビン 5*Z* 異性体、クミルロン、シメコナゾール、シメトリン、ダイムロン、テニルクロール、パクロブトラゾール、ピリミノバックメチル（*E* 体）、ピリミノバックメチル（*Z* 体）、フェノキサニル、ペンシクロン、ベンゾフェナップ及びメプロニル（14 成分）

(2)　適用範囲　　稲わら、稲発酵粗飼料及び籾米

(3)　分析法

A　　試薬の調製

農薬混合標準液　　オリサストロビン〔$C_{18}H_{25}N_5O_5$〕、オリサストロビン 5*Z* 異性体〔$C_{18}H_{25}N_5O_5$〕、クミルロン〔$C_{17}H_{19}ClN_2O$〕、シメコナゾール〔$C_{14}H_{20}FN_3OSi$〕、シメトリン〔$C_8H_{15}N_5S$〕、ダイムロン〔$C_{17}H_{20}N_2O$〕、テニルクロール〔$C_{16}H_{18}ClNO_2S$〕、パクロブトラゾール〔$C_{15}H_{20}ClN_3O$〕、ピリミノバックメチル（*E* 体）〔$C_{17}H_{19}N_3O_6$〕、ピリミノバックメチル（*Z* 体）

〔$C_{17}H_{19}N_3O_6$〕、フェノキサニル〔$C_{15}H_{18}Cl_2N_2O_2$〕、ペンシクロン〔$C_{19}H_{21}ClN_2O$〕、ベンゾフェナップ〔$C_{22}H_{20}Cl_2N_2O_3$〕及びメプロニル〔$C_{17}H_{19}NO_2$〕各 25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、それぞれ 50 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線までアセトンを加えて各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 0.5 mg を含有する。）。

各農薬標準原液の一部を混合し、アセトンで正確に希釈し、1 mL 中に各農薬としてそれぞれ 10 μg を含有する農薬混合標準原液を調製する。

使用に際して、農薬混合標準原液の一部を、アセトニトリル－水（3+2）で正確に希釈し、1 mL 中に各農薬としてそれぞれ 0.1~5 ng を含有する数点の農薬混合標準液を調製する。

また、パクロブトラゾールは、上記農薬混合標準液に加えて、別途 1 mL 中にパクロブトラゾールとして 0.05~5 ng を含有する数点のパクロブトラゾール標準液を調製する。

B　定　　量

抽　　出　　分析試料 10 g を 0.01 g の桁まで量り、その数値を記録し、200 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 30 mL（籾米は 20 mL）を加え、30 分間静置後、更にアセトン 120 mL（籾米は 100 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、先の三角フラスコ及び残さを順次アセトン 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を加える。この液をアセトンで正確に 10 倍希釈した後、希釈試料溶液 2 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、水 20 mL を加えて、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理[注1]　　オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）[注2]をアセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL で順次洗浄する。試料溶液をミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。更に試料溶液の入っていたなす形フラスコを水－アセトニトリル（9+1）5 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に流出させる。10 mL の全量フラスコをミニカラムの下に置き、アセトニトリル－水（3+2）10 mL をミニカラムに加え、各農薬を溶出させる[注3]。更に全量フラスコの標線までアセトニトリル－水（3+2）を加え、その液の一部を 5,000×*g* で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定　　試料溶液及び各農薬混合標準液各 5 μL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、選択反応検出クロマトグラムを得る。

測定条件　例

（液体クロマトグラフ部）

カ　　ラ　　ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm）[注4]

溶　　離　　液：2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液－アセトニトリル（4+1）→15 min→（1+9）（5 min 保持）
流　　速：0.2 mL/min
カラム槽温度：40 °C
（タンデム型質量分析計部[注5]）
検　　出　　器：四重極型質量分析計
イオン化法：エレクトロスプレーイオン化（ESI）法（正イオンモード）
イオン源温度：120 °C
デソルベーション温度：350 °C
キャピラリー電圧：1.0 kV
コーン電圧：下表のとおり
コリジョンエネルギー：下表のとおり
モニターイオン：下表のとおり

表　各物質の測定条件

測定対象物質	プリカーサーイオン（*m*/*z*）	プロダクトイオン 定量用（*m*/*z*）	プロダクトイオン 確認用（*m*/*z*）	コーン電圧（V）	コリジョンエネルギー（eV）
オリサストロビン	392	205	－	31	16
		－	116	31	29
オリサストロビン5Z異性体	392	205	－	31	16
		－	116	31	29
クミルロン	303	185	－	30	12
		－	125	30	36
シメコナゾール	294	70	－	36	18
		－	73	36	40
シメトリン	214	68	－	44	32
		－	124	44	18
ダイムロン	269	151	－	24	14
		－	91	24	36
テニルクロール	324	127	－	18	20
		－	53	18	60
パクロブトラゾール	294	70	－	36	18
		－	125	36	42
ピリミノバックメチル（*E*体）	362	330	－	28	12
		－	284	28	32
ピリミノバックメチル（*Z*体）	362	330	－	28	14
		－	75	28	110
フェノキサニル	329	302	－	32	12
		－	86	32	24
ペンシクロン	329	125	－	36	24
		－	89	36	60
ベンゾフェナップ	431	105	－	48	30
		－	119	48	20
メプロニル	270	119	－	34	22
		－	91	34	44

計　　算　　得られた選択反応検出クロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中の各農薬量（オリサストロビン及びピリミノバックメチルを除く）を算出する。

試料中のオリサストロビンは得られたクロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中のオリサストロビン量及びオリサストロビン5*Z*異性体量を算出し、その合量をオリサストロビン量とする。

同様に、試料中のピリミノバックメチルは得られたクロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中のピリミノバックメチル（*E* 体）量及びピリミノバックメチル（*Z* 体）量を算出し、その合量をピリミノバックメチル量とする。

注 1　流速は 1 mL/min 程度とする。必要に応じて吸引マニホールドを使用する。

2　InertSep Slim-J C18-B（ジーエルサイエンス製）又はこれと同等のもの

3　全量フラスコの標線を越えるおそれがあるときは、溶出液が標線に達した時点で溶出は終了させる。また、流速が維持できない場合は、必要に応じて二連球等により圧注する。

4　ZORBAX Eclipse XDB-C18（Agilent Technologies 製）又はこれと同等のもの

5　ACQUITY TQD（Waters 製）による条件例

（参考）分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r (%)
オリサストロビン	稲わら	0.1	3	81.1	3.5
		1	3	90.3	0.8
		5	3	92.3	1.2
	稲発酵粗飼料	0.1	3	92.4	0.8
		0.5	3	96.0	1.9
		1	3	98.4	2.8
	籾米	0.1	3	101	2.8
		0.5	3	94.0	4.4
		1	3	99.8	2.5
オリサストロビン（5*Z*異性体）	稲わら	0.1	3	86.5	5.6
		1	3	92.2	5.7
		5	3	91.5	0.5
	稲発酵粗飼料	0.1	3	73.8	12
		0.5	3	99.7	5
		1	3	98.6	2.4
	籾米	0.1	3	94.5	16
		0.5	3	96.2	1.7
		1	3	100	0.5
クミルロン	稲わら	0.1	3	84.2	14
		1	3	93.9	1.7
		2	3	99.0	2.3
	稲発酵粗飼料	0.1	3	86.9	14
		0.5	3	92.2	2.3
		1	3	100	2.8
	籾米	0.1	3	91.3	0.8
		0.5	3	93.9	4.7
		1	3	105	4.3

・添加回収率及び繰返し精度〔続き〕

添加成分名	試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r(%)
シメコナゾール	稲わら	0.1	3	83.5	7.3
		0.5	3	90.1	0.7
		1	3	86.0	1.0
	稲発酵粗飼料	0.1	3	85.2	3.2
		0.5	3	93.7	6.5
		1	3	95.8	2.1
	籾米	0.1	3	93.1	0.5
		0.5	3	98.1	3.7
		1	3	98.6	1.9
シメトリン	稲わら	0.1	3	86.4	4.7
		0.5	3	89.1	4.7
		1	3	92.4	2.0
	稲発酵粗飼料	0.1	3	100	4.8
		0.5	3	96.1	3.0
		1	3	94.1	2.5
	籾米	0.1	3	84.7	7.0
		0.5	3	94.0	5.7
		1	3	96.8	3.9
ダイムロン	稲わら	0.1	3	83.9	5.5
		0.5	3	90.5	3.9
		1	3	94.4	1.6
	稲発酵粗飼料	0.1	3	97.8	13
		0.5	3	95.8	4.0
		1	3	99.2	2.3
	籾米	0.1	3	99.7	3.3
		0.5	3	96.8	8.6
		1	3	101	3.8
テニルクロール	稲わら	0.1	3	106	4.3
		0.5	3	91.3	4.6
		1	3	90.1	1.6
	稲発酵粗飼料	0.1	3	109	5.6
		0.5	3	94.8	5.6
		1	3	93.4	6.5
	籾米	0.1	3	92.3	9.3
		0.5	3	100	6.3
		1	3	94.1	1.9
パクロブトラゾール	稲わら	0.05	3	97.9	16
		0.5	3	87.6	4.1
		1	3	90.5	4.7
	稲発酵粗飼料	0.05	3	105	2.6
		0.5	3	94.8	3.7
		1	3	98.4	1.2
	籾米	0.05	3	105	3.5
		0.5	3	93.8	4.4
		1	3	96.7	0.6
ピリミノバックメチル（*E*体）	稲わら	0.1	3	87.8	13
		0.5	3	91.0	2.0
		1	3	90.8	1.5
	稲発酵粗飼料	0.1	3	101	8.8
		0.5	3	99.3	1.1
		1	3	99.5	1.3
	籾米	0.1	3	98.0	8.7
		0.5	3	100	3.0
		1	3	101	1.7

・添加回収率及び繰返し精度〔続き〕

添加成分名	試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD_r(%)
ピリミノバックメチル（Z体）	稲わら	0.1	3	96.8	2.0
		0.5	3	88.8	8.2
		1	3	93.8	2.9
	稲発酵粗飼料	0.1	3	90.8	10
		0.5	3	93.2	11
		1	3	98.7	2.4
	籾米	0.1	3	95.2	3.8
		0.5	3	98.6	5.4
		1	3	97.6	2.6
フェノキサニル	稲わら	0.1	3	109	14
		1	3	92.4	4.2
		30	3	94.3	1.9
	稲発酵粗飼料	0.1	3	109	7.2
		1	3	95.0	3.2
		3.0	3	104	1.9
	籾米	0.1	3	91.8	9.6
		1	3	98.3	3.2
		10	3	110	1.3
ペンシクロン	稲わら	0.1	3	98.0	7.1
		1	3	85.2	3.8
		30	3	89.2	11
	稲発酵粗飼料	0.1	3	97.3	2.2
		0.5	3	90.9	2.7
		1	3	82.8	2.8
	籾米	0.1	3	83.5	9.3
		1	3	90.7	1.4
		10	3	107	0.3
ベンゾフェナップ	稲わら	0.1	3	92.5	3.7
		0.5	3	89.1	4.9
		1	3	88.5	1.0
	稲発酵粗飼料	0.1	3	95.0	4.2
		0.5	3	93.8	4.3
		1	3	88.4	7.6
	籾米	0.1	3	96.2	7.7
		0.5	3	93.5	5.9
		1	3	99.1	2.7
メプロニル	稲わら	0.1	3	88.4	9.0
		1	3	95.0	1.5
		25	3	98.3	2.0
	稲発酵粗飼料	0.1	3	85.4	7.7
		0.5	3	95.0	6.7
		1	3	99.3	2.8
	籾米	0.1	3	92.8	2.4
		1	3	98.3	3.4
		7	3	108	3.8

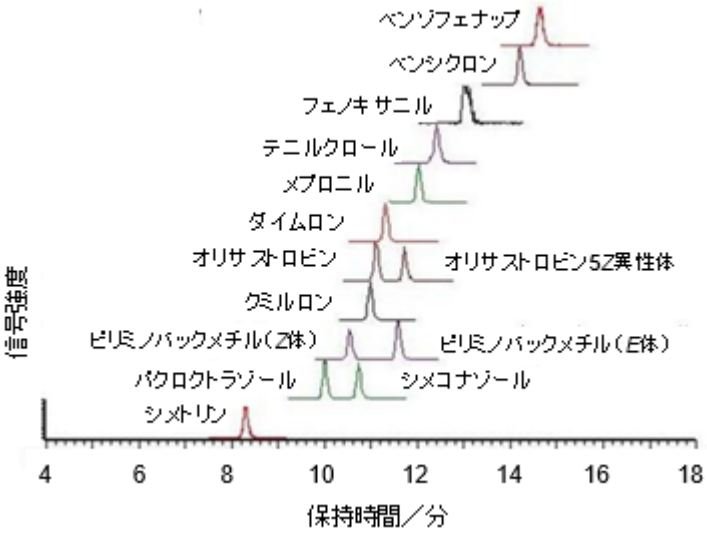
・共同試験

成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（mg/kg）	添加回収率（%）	室内繰返し精度 RSD_r（%）	室間再現精度 RSD_R（%）	HorRat
オリサストロビン	稲わら	8	2	2	93.4	3.3	4.6	0.32
	籾米	10	0	2	96.4	3.6	5.8	0.40
オリサストロビン5Z異性体	稲わら	8	2	2	94.1	3.0	3.9	0.27
	籾米	10	0	2	96.8	4.0	6.6	0.45
クミルロン	稲わら	8	2	2	94.1	6.1	6.1	0.42
	籾米	10	0	2	95.6	3.9	5.6	0.39
シメコナゾール	稲わら	8	2	2	89.7	3.9	5.0	0.34
	籾米	10	0	2	93.5	4.1	6.7	0.46
シメトリン	稲わら	9	1	2	93.7	4.0	6.4	0.44
	籾米	9	1	2	93.1	1.5	8.4	0.57
ダイムロン	稲わら	8	2	2	94.0	2.1	4.7	0.32
	籾米	10	0	2	96.3	2.1	6.8	0.47
テニルクロール	稲わら	10	0	2	97.8	3.6	9.3	0.64
	籾米	10	0	2	97.7	3.0	4.9	0.34
パクロブトラゾール	稲わら	8	2	2	91.1	1.8	3.6	0.25
	籾米	10	0	2	93.7	2.4	4.2	0.29
ピリミノバックメチル（*E*体）	稲わら	8	2	2	93.8	3.4	4.7	0.32
	籾米	10	0	2	96.1	2.9	5.1	0.35
ピリミノバックメチル（Z体）	稲わら	8	2	2	94.3	3.0	5.8	0.40
	籾米	10	0	2	95.7	3.1	6.9	0.47
フェノキサニル	稲わら	9	1	2	89.9	3.3	7.2	0.49
	籾米	10	0	2	93.8	3.8	7.9	0.54
ペンシクロン	稲わら	9	1	2	94.6	2.4	5.7	0.39
	籾米	10	0	2	96.1	1.8	6.4	0.44
ベンゾフェナップ	稲わら	9	1	2	92.6	3.1	4.8	0.33
	籾米	10	0	2	93.5	2.4	6.7	0.46
メプロニル	稲わら	9	1	2	96.4	3.6	5.3	0.36
	籾米	10	0	2	96.5	3.5	4.9	0.34

・定量下限（単一試験室による確認）　パクロブトラゾール：試料中　0.05 mg/kg、その他の農薬：試料中　各 0.1 mg/kg

・検出下限（単一試験室による確認）　パクロブトラゾール：試料中　0.02 mg/kg、その他の農薬：試料中　各 0.03 mg/kg

（参考）クロマトグラム例



標準液（各農薬として 2 ng/mL）のクロマトグラム