

2 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 [C₆H₆Cl₆]、 β -BHC [C₆H₆Cl₆]、 γ -BHC [C₆H₆Cl₆]、 δ -BHC [C₆H₆Cl₆]、 o,p' -DDD [C₁₄H₁₀Cl₄]、 p,p' -DDD [C₁₄H₁₀Cl₄]、 o,p' -DDE [C₁₄H₈Cl₄]、 p,p' -DDE [C₁₄H₈Cl₄]、 o,p' -DDT [C₁₄H₉Cl₅]、 p,p' -DDT [C₁₄H₉Cl₅]、アルドリン [C₁₂H₈Cl₆]、エンドリン [C₁₂H₈Cl₆O]、ディルドリン [C₁₂H₈Cl₆O]、ヘプタクロル [C₁₀H₅Cl₇] 及びヘプタクロルエポキシド [C₁₀H₅Cl₇O] 各 20 mg を正確に量ってそれぞれ 100 mL の全量フラスコに入れ、アセトン 20 mL を加えて溶かす。更に各全量フラスコの標線まで 2,2,4-トリメチルペンタンを加えて各農薬標準原液を調製する (これらの液各 1 mL は、各農薬としてそれぞれ 0.2 mg を含有する。)

使用に際して、各標準原液の一定量を混合し、2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) で正確に希釈し、1 mL 中に各農薬としてそれぞれ 0.05~0.2 μ g 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 μ m (100~60 メッシュ)) を 130 °C で 5 時間乾燥する。

B 定 量

抽 出 分析試料 10.0~50.0 g を量って 500 mL の分液漏斗に入れ、アセトニトリル-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の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 及び硫酸ナトリウム (無水) 3 g をそれぞれヘキサンの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。更にヘキサノジエチルエーテル (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)

キャリアーガス：He (1.5 mL/min)

メイクアップガス：N₂ (60 mL/min)

試料導入法：クールオンカラム

試料導入部温度：250 °C

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

(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 (µg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
α-BHC	とうもろこし	10~100	3	93.3~96.1	19.8
	配合飼料	10~100	3	81.7~88.8	10.1
β-BHC	とうもろこし	10~100	3	104.5~112.8	13.1
	配合飼料	10~100	3	103.4~106.1	11.7
γ-BHC	とうもろこし	10~100	3	97.0~105.7	14.1
	配合飼料	10~100	3	81.1~92.5	11.6
δ-BHC	とうもろこし	10~100	3	110.6~118.1	7.4
	配合飼料	10~100	3	92.6~103.1	6.6

・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 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
<i>o,p'</i> -DDD	とうもろこし	10~100	3	115.9~117.4	6.6
	配合飼料	10~100	3	101.6~109.1	7.5
<i>p,p'</i> -DDD	とうもろこし	10~100	3	90.9~99.8	24.8
	配合飼料	10~100	3	86.6~90.1	7.3
<i>o,p'</i> -DDE	とうもろこし	10~100	3	100.1~104.2	9.6
	配合飼料	10~100	3	88.9~94.1	8.9
<i>p,p'</i> -DDE	とうもろこし	10~100	3	87.9~97.2	12.1
	配合飼料	10~100	3	77.9~86.1	9.0
<i>o,p'</i> -DDT	とうもろこし	10~100	3	91.7~97.3	14.5
	配合飼料	10~100	3	85.8~87.9	6.4
<i>p,p'</i> -DDT	とうもろこし	10~100	3	103.5~117.8	16.4
	配合飼料	10~100	3	101.4~107.5	6.3
アルドリン	とうもろこし	10~100	3	79.6~84.4	14.9
	配合飼料	10~100	3	73.7~74.2	4.2
エンドリン	とうもろこし	10~100	3	81.1~87.8	15.5
	配合飼料	10~100	3	98.0~103.9	8.0
ディルドリン	とうもろこし	10~100	3	105.6~109.4	9.0
	配合飼料	10~100	3	99.4~105.8	4.9
ヘプタクロル	とうもろこし	10~100	3	80.5~86.6	11.4
	配合飼料	10~100	3	82.5~84.2	16.8
ヘプタクロルエポキシド	とうもろこし	10~100	3	83.3~99.3	8.9
	配合飼料	10~100	3	81.8~89.5	7.0

・共同試験

成分名	試料の種類	試験室 数	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _f (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
α -BHC	成鶏用配合飼料	3	50	94.1	2.8	8.2	0.37
β -BHC	成鶏用配合飼料	3	50	104.6	4.7	9.4	0.43
γ -BHC	成鶏用配合飼料	3	50	98.0	4.9	3.6	0.16
δ -BHC	成鶏用配合飼料	3	50	99.8	8.0	5.7	0.26
<i>o,p'</i> -DDD	成鶏用配合飼料	3	50	89.1	4.8	7.7	0.35
<i>p,p'</i> -DDD	成鶏用配合飼料	3	50	88.7	4.7	11.0	0.50
<i>o,p'</i> -DDE	成鶏用配合飼料	3	50	80.4	4.8	4.4	0.20
<i>p,p'</i> -DDE	成鶏用配合飼料	3	50	73.3	6.2	12.2	0.56
<i>o,p'</i> -DDT	成鶏用配合飼料	3	50	74.4	5.9	7.1	0.32
<i>p,p'</i> -DDT	成鶏用配合飼料	2	50	81.7	5.2	10.3	0.47
アルドリン	成鶏用配合飼料	3	50	77.5	10.2	13.8	0.63
エンドリン	成鶏用配合飼料	3	50	89.8	5.9	16.9	0.77
ディルドリン	成鶏用配合飼料	3	50	93.7	5.9	13.6	0.62
ヘプタクロル	成鶏用配合飼料	2	50	80.8	6.3	12.2	0.55
ヘプタクロルエポキシド	成鶏用配合飼料	3	50	91.1	4.8	11.4	0.52

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 [C₁₀H₁₃NO₂]、アルジカルブ [C₇H₁₄N₂O₂S]、アルジカルブスルホキシド [C₇H₁₄N₂O₃S]、アルジカルブスルホン [C₇H₁₄N₂O₄S]、イソプロカルブ [C₁₁H₁₅NO₂]、カルバリル [C₁₂H₁₁NO₂]、カルボフラン [C₁₂H₁₅NO₃]、キシリルカルブ [C₁₀H₁₃NO₂]、フェノブカルブ [C₁₂H₁₇NO₂]、プロポキスル [C₁₁H₁₅NO₃]、ベンダイオカルブ [C₁₁H₁₃NO₄]及びメトルカルブ [C₉H₁₁NO₂] 各 20 mg を正確に量ってそれぞれ 100 mL の全量フラスコに入れ、アセト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同溶媒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、各標準原液の一定量を混合し、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 10.0 g を量って 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 を加え、カラム処理 I に供する試料溶液とする。

カラム処理 I 試料溶液を多孔性ケイソウ土カラム（20 mL 保持用）に入れ、5 分間静置する。

300 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、試料溶液の入っていたなす形フラスコを酢酸エチル 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。

シクロヘキサノンアセトン（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、ゲル浸透クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

ゲル浸透クロマトグラフィー 試料溶液 5.0 mL をゲル浸透クロマトグラフに注入し、定量する各農薬が溶出する画分を 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 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：65~115 mL

カラム処理 II アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (360 mg) の下にグラファイトカーボンミニカラム (250 mg) ^{注2} 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3}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3}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4}

溶離液：水-メタノール (22+3) →0.1 min→水-テトラヒドロフラン (9+1) →29.9 min→水-テトラヒドロフラン (7+3) →10 min→水-メタノール (22+3)

反応液^{注5}：I 液 (加水分解液) 水酸化ナトリウム 1 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 50 mg 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 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。

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

A : 検量線から求めたアルジカルブの重量 (ng)

B : 検量線から求めたアルジカルブスルホキシドの重量 (ng)

C : 検量線から求めたアルジカルブスルホンの重量 (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 Supelclean ENVI-Carb (リザーバー容量 6 mL、Supelco 製) 又はこれと同等のもの

3 流速は 1~2 mL/min とする。

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

5 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) 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 ($\mu\text{g/kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
XMC	大すう育成用配合飼料	200~1,000	3	94.7~103.3	13.0
	乳用牛飼育用配合飼料	200~1,000	3	97.7~102.3	4.7
	オーツヘイ	200~1,000	3	90.3~93.7	13.2
アルジカルブ	大すう育成用配合飼料	200~1,000	3	87.0~96.0	13.5
	乳用牛飼育用配合飼料	200~1,000	3	90.0~92.7	5.7
	オーツヘイ	200~1,000	3	46.0~63.0	28.2
アルジカルブスルホキシド	大すう育成用配合飼料	200~1,000	3	74.0~79.3	21.1
	乳用牛飼育用配合飼料	200~1,000	3	68.7~74.0	15.6
	オーツヘイ	200~1,000	3	78.7~91.0	20.1
アルジカルブスルホン	大すう育成用配合飼料	200~1,000	3	78.7~86.0	14.1
	乳用牛飼育用配合飼料	200~1,000	3	79.3~82.0	14.2
	オーツヘイ	200~1,000	3	79.0~88.3	15.9
イソプロカルブ	大すう育成用配合飼料	200~1,000	3	96.7~103.3	15.0
	乳用牛飼育用配合飼料	200~1,000	3	100.7~105.3	3.5
	オーツヘイ	200~1,000	3	84.7~96.3	15.0
カルバリル	大すう育成用配合飼料	200~1,000	3	95.3~102.7	12.5
	乳用牛飼育用配合飼料	200~1,000	3	97.7~105.0	1.6
	オーツヘイ	200~1,000	3	87.0~99.3	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 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
カルボフラン	大すう育成用配合飼料	200~1,000	3	97.7~105.0	14.5
	乳用牛飼育用配合飼料	200~1,000	3	93.0~103.7	2.8
	オーツヘイ	200~1,000	3	88.7~90.7	10.4
キシリルカルブ	大すう育成用配合飼料	200~1,000	3	94.7~107.3	8.2
	乳用牛飼育用配合飼料	200~1,000	3	101.3~102.3	5.6
	オーツヘイ	200~1,000	3	88.7~93.7	8.0
フェノブカルブ	大すう育成用配合飼料	200~1,000	3	91.7~102.0	12.4
	乳用牛飼育用配合飼料	200~1,000	3	99.0~103.0	3.0
	オーツヘイ	200~1,000	3	87.0~91.7	11.1
プロポキスル	大すう育成用配合飼料	200~1,000	3	93.3~102.3	13.8
	乳用牛飼育用配合飼料	200~1,000	3	100.3~101.3	10.7
	オーツヘイ	200~1,000	3	84.0~91.3	8.7
ベンダイオカルブ	大すう育成用配合飼料	200~1,000	3	99.3~104.3	13.7
	乳用牛飼育用配合飼料	200~1,000	3	98.3~103.3	5.2
	オーツヘイ	200~1,000	3	87.0~95.0	9.1
メトルカルブ	大すう育成用配合飼料	200~1,000	3	87.3~100.0	16.0
	乳用牛飼育用配合飼料	200~1,000	3	97.7~100.0	6.1
	オーツヘイ	200~1,000	3	86.7~91.0	9.8

・共同試験

成分名	試料の種類	試験室 数	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
XMC	成鶏用配合飼料	3	500	106.2	1.9	3.4	0.19
	アルファルファ	3	500	98.4	5.9	5.4	0.30
アルジカルブ	成鶏用配合飼料	3	500	108.2	2.2	17.9	1.02
	アルファルファ	3	500	66.2	15.5	36.4	1.93
アルジカルブ スルホキシド	成鶏用配合飼料	3	500	102.0	2.0	18.1	1.02
	アルファルファ	3	500	107.3	21.2	22.9	1.30
アルジカルブ スルホン	成鶏用配合飼料	3	500	105.6	8.3	12.4	0.70
	アルファルファ	3	500	90.4	3.6	15.4	0.86
イソプロカルブ	成鶏用配合飼料	3	500	104.7	2.1	4.2	0.24
	アルファルファ	3	500	97.3	3.1	9.9	0.56
カルバリル	成鶏用配合飼料	3	500	106.4	1.7	3.3	0.19
	アルファルファ	3	500	97.3	3.1	7.8	0.44
カルボフラン	成鶏用配合飼料	3	500	107.6	0.6	1.6	0.09
	アルファルファ	3	500	97.8	5.9	7.5	0.42
キシリルカルブ	成鶏用配合飼料	3	500	105.1	1.4	3.8	0.22
	アルファルファ	3	500	96.7	5.4	5.9	0.33
フェノブカルブ	成鶏用配合飼料	3	500	105.3	1.8	4.1	0.23
	アルファルファ	3	500	96.2	4.4	7.0	0.39
プロポキスル	成鶏用配合飼料	3	500	106.4	1.8	3.0	0.17
	アルファルファ	3	500	100.0	3.3	10.1	0.57
ベンダイオカルブ	成鶏用配合飼料	3	500	106.2	1.5	3.3	0.19
	アルファルファ	3	500	96.0	3.9	7.3	0.41
メトルカルブ	成鶏用配合飼料	3	500	104.0	2.1	3.2	0.18
	アルファルファ	3	500	96.0	3.9	6.6	0.37

・定量下限

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 25 µg/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 10 µg/kg

4 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 [C₁₁H₁₅NO₄S] 10 mg を正確に量って 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、更に標線まで同溶媒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 [C₁₁H₁₃NO₄] 10 mg を正確に量って 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、更に標線まで同溶媒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 [C₁₁H₁₅NO₄S] 10 mg を正確に量って 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、更に標線まで同溶媒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定量を混合し、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 g を正確に量って 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 を加え、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理 試料溶液を多孔性ケイソウ土カラム（20 mL 保持用）に入れ、5 分間静置する。300 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、試料溶液の入って

いたなす形フラスコを酢酸エチル 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、ゲル浸透クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

ゲル浸透クロマトグラフィー 試料溶液 5.0 mL をゲル浸透クロマトグラフに注入し、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3}を 200 mL のなす形フラスコに fractions 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4} 充てんカラム (充てん量 60 g、内径 30 mm)^{注5}

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 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 μ m）^{注6}

溶離液：水-メタノール（41+9）→30 min→（3+7）→3 min→（1+9）

反応液^{注7}：I液（加水分解液） 水酸化ナトリウム 1 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 50 mg 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 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 μ L 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〔C₁₁H₁₅NO₂S〕量、ベンダイオカルブ量及びメチオカルブ〔C₁₁H₁₅NO₂S〕量を算出する。

試料中のエチオフェンカルブ（ μ g/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重量（ng）

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

B ：検量線から求めたベンダイオカルブの重量（ng）

試料中のメチオカルブ（ μ g/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重量（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 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。

4 Bio-Beads S-X3 Beads（Bio Rad 製）又はこれと同等のもの

5 充てん剤 60 g をシクロヘキササン-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）

6 STR ODS-II（信和化工製）又はこれと同等のもの

7 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）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 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
エチオフェンカルブ	成鶏飼育用配合飼料	100~1,000	3	87.3~90.3	3.4
	とうもろこし	100~1,000	3	84.7~90.0	4.7
	アルファルファミール	100~1,000	3	81.7~84.0	6.7
ベンダイオカルブ	成鶏飼育用配合飼料	100~1,000	3	96.7~101.3	5.2
	とうもろこし	100~1,000	3	97.0~100.3	5.7
	アルファルファミール	100~1,000	3	95.3~96.7	8.9
メチオカルブ	成鶏飼育用配合飼料	100~1,000	3	75.7~81.7	2.0
	とうもろこし	100~1,000	3	77.7~84.7	9.0
	アルファルファミール	100~1,000	3	84.7~90.7	10.4

・共同試験

成分名	試料の種類	試験室 数	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
エチオフェンカルブ	成鶏飼育用配合飼料	3	250	73.7	2.5	17.9	0.87
	オーツヘイ	3	250	60.8	3.5	17.3	0.81
ベンダイオカルブ	成鶏飼育用配合飼料	3	250	97.0	3.8	5.3	0.27
	オーツヘイ	3	250	92.4	2.1	6.2	0.31
メチオカルブ	成鶏飼育用配合飼料	3	250	86.6	6.8	13.7	0.68
	オーツヘイ	3	250	83.4	3.0	9.7	0.48

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

5 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 [$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_2$]、イソプロカルブ [$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_2$]、カルバリル [$\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_2$]、キシリルカルブ [$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_2$]、フェノブカルブ [$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NO}_2$]、プロポキスル [$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_3$]及びメトルカルブ [$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$]各 20 mg を正確に量ってそれぞれ 100 mL の全量フラスコに入れ、アセトン 20 mL を加えて溶かし、更に各全量フラスコの標線まで 2,2,4-トリメチルペンタンを加えて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、各標準原液の一定量を混合し、2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) で正確に希釈し、1 mL 中に各農薬として 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 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 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））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2}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 20.0 g を量って 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、ケイ酸マグネシウム 2 g、硫酸ナトリウム（無水）3 g、硝酸銀コーティングアルミナ 2 g 及び硫酸ナトリウム（無水）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)

キャリアーガス：He (4 mL/min)

メイクアップガス：He (26 mL/min)

水 素：4 mL/min

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：初期温度 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 Hyflo Supercel (Celite Corporation 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 (µg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
XMC	配合飼料	100~500	3	92.7~100.7	11.2
イソプロカルブ	配合飼料	100~500	3	101.0~105.3	10.5
カルバリル	配合飼料	100~500	3	96.3~100.7	9.6
キシリルカルブ	配合飼料	100~500	3	93.7~103.7	12.9
フェノブカルブ	配合飼料	100~500	3	81.3~85.0	5.1
プロポキスル	配合飼料	100~500	3	99.0~107.3	8.5
メトルカルブ	配合飼料	100~500	3	99.0~107.0	6.7

・共同試験

成分名	試料の種類	試験室数	添加濃度 (µg/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
XMC	とうもろこし	5	250	99.3	8.0	11.7	0.59
インプロカルブ	とうもろこし	5	250	93.9	6.6	13.2	0.66
カルバリル	とうもろこし	5	250	97.0	13.6	13.4	0.68
キシリルカルブ	とうもろこし	5	250	99.1	7.3	10.1	0.51
フェノブカルブ	とうもろこし	5	250	88.7	6.9	13.7	0.68
プロボキスル	とうもろこし	5	250	100.6	6.5	9.2	0.47
メトルカルブ	とうもろこし	5	250	97.3	7.6	13.9	0.70

・定量下限 試料中 各 50 µg/kg

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 [C₁₄H₁₈ClN₃O₂] 20 mg を正確に量って 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 [C₁₄H₁₆ClN₃O₂] 20 mg を正確に量って 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 [C₁₅H₁₇Cl₂N₃O₂] 20 mg を正確に量って 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定量を混合し、2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) で正確に希釈し、1 mL 中に各農薬としてそれぞれ 0.05~2 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 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水 (3+1) 20 mL を加え、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) 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。更に同溶媒 60 mL をカラムに加えて同様に溶出させ、溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

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

ゲル浸透クロマトグラフィー 試料溶液 5.0 mL をゲル浸透クロマトグラフに注入し、定量する各農薬が流出する画分を 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 II に供する試料溶液とする。

ゲル浸透クロマトグラフィー 例

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

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

溶離液：シクロヘキサン-アセトン (4+1)

流速：5 mL/min

流出画分：70~100 mL

カラム処理 II 合成ケイ酸マグネシウムミニカラム (910 mg) をヘキサン-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同溶媒 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 III に供する試料溶液とする。

カラム処理 III シリカゲルミニカラム (690mg) 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同溶媒 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)

キャリアーガス：He (1.5 mL/min)

メイクアップガス：He (30 mL/min)

水 素：4 mL/min

乾 燥 空 気：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：初期温度 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。

(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 (µg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
トリアジメノール	成鶏飼育用配合飼料	100~500	3	93.8~96.6	5.2
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	100~500	3	88.4~95.6	10.6
	アルファルファ	100~500	3	82.7~86.3	4.5
	とうもろこし	100~500	3	97.0~104.8	1.1
トリアジメホン	成鶏飼育用配合飼料	100~500	3	99.6~102.9	3.7
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	100~500	3	101.4~104.0	4.5
	アルファルファ	100~500	3	98.1~101.6	5.4
	とうもろこし	100~500	3	100.7~103.5	2.7
プロピコナゾール	成鶏飼育用配合飼料	100~500	3	99.4~102.8	8.7
	ほ乳期子豚育成用配合飼料	100~500	3	95.3~101.4	3.3
	アルファルファ	100~500	3	96.4~96.5	4.5
	とうもろこし	100~500	3	98.7~104.4	3.7

・共同試験

成分名	試料の種類	試験室数	添加濃度 (µg/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
トリアジメノール	成鶏飼育用配合飼料	6	100	98.7	4.0	9.2	0.42
トリアジメホン	成鶏飼育用配合飼料	6	100	94.9	5.4	8.1	0.37
プロピコナゾール	成鶏飼育用配合飼料	6	100	96.4	3.2	8.1	0.37

・定量下限 試料中 各 50 µg/kg

7 2,4-D 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-D 及び 2,4,5-T (2 成分)
- (2) 分析法^{注1}

A 試薬の調製

- 1) 2,4-D 標準原液 2,4-D [C₈H₆Cl₂O₃] 25 mg を正確に量って 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、更に標線まで同溶媒を加えて 2,4-D 標準原液を調製する (この液 1 mL は、2,4-D として 0.5 mg を含有する。)
- 2) 2,4,5-T 標準原液 2,4,5-T [C₈H₅Cl₃O₃] 25 mg を正確に量って 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、更に標線まで同溶媒を加えて 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-D 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、更にヘキサンの正確に希釈し、1 mL 中に 2,4-D 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)) 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 20.0 g を量って 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 及び硫酸ナトリウム（無水）2 g をそれぞれヘキサンに懸濁させてカラム管（内径 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-D メチルエステル及び 2,4,5-T メチルエステルを溶出させる。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）

キャリアーガス：He（1 mL/min）

メイクアップガス：N₂（60 mL/min）

試料導入法：スプリットレス（60 s）

試料導入部温度：280 °C

カラム槽温度：初期温度 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-D 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（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 (μg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
2,4-D	肉豚肥育用配合飼料	50~500	3	73.7~95.3	15.3
	ブイラー肥育後期用配合飼料	50~500	3	76.7~89.3	17.2
	イタリアンライグラス	50~500	3	86.7~105.0	15.0
2,4,5-T	肉豚肥育用配合飼料	50~500	3	72.7~82.7	21.4
	ブイラー肥育後期用配合飼料	50~500	3	72.7~73.7	17.7
	イタリアンライグラス	50~500	3	67.3~76.3	18.1

・共同試験

成分名	試料の種類	試験室 数	添加濃度 (μg/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
2,4-D	中さう育成用配合飼料	6	250	81.4	5.2	9.8	0.48
2,4,5-T	中さう育成用配合飼料	6	250	89.4	5.6	12.5	0.63

8 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 [C₉H₁₉NOS] 25 mg を正確に量って 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、更に標線まで同溶媒を加える（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 [C₂H₄Br₂] 25 mg を正確に量って 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、更に標線まで同溶媒を加える（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定量を混合した後、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 20.0 g を量って 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}に取り付け、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

カラム 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同型、内径 0.32 mm、長さ 30 m、膜厚 1.8 µm）

キャリアーガス：He（3.6 mL/min、初期流量）

試料導入法：スプリットレス（60 s）

試料導入部温度：250 °C

カラム槽温度：初期温度 50 °C→昇温 10 °C/min →180 °C→昇温 30 °C/min→250 °C（10 min 保持）

インターフェース温度：250 °C

検出器：四重極型質量分析計^{注2}

イオン源温度：200 °C

イオン化法：電子衝撃イオン化（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 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 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し	平均回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
EPTC	鶏用配合飼料	25~200	3	88.1~91.9	11
	牛用配合飼料	10~200	3	88.5~98.3	11
	とうもろこし	25~200	3	93.5~95.5	8.0
	ライ麦	25~200	3	93.1~95.5	6.4
二臭化エチレン	鶏用配合飼料	5~200	3	96.2~98.7	3.5
	牛用配合飼料	5~200	3	101.2~101.3	4.1
	とうもろこし	5~200	3	99.3~102.7	6.3
	ライ麦	2~200	3	96.7~99.3	3.3

・共同試験

成分名	試料の種類	試験室 数	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
EPTC	とうもろこし	8	40	109	6.1	7.7	0.35
	肉用牛肥育用配合飼料	8	40	113	1.9	6.9	0.31
二臭化エチレン	とうもろこし	8	10	106	5.8	14	0.61
	肉用牛肥育用配合飼料	8	10	106	3.9	11	0.51

- ・定量下限 EPTC 試料中 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、二臭化エチレン 試料中 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$
- ・検出下限 EPTC 試料中 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、二臭化エチレン 試料中 0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$

9 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 [$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_3\text{PS}_2$] 25 mg を正確に量って 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 [$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{BrClO}_3\text{PS}$] 25 mg を正確に量って 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定量を混合し、2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) で正確に希釈し、1 mL 中に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 10.0 g を量って 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、ゲル浸透クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

ゲル浸透クロマトグラフィー 試料溶液 5.0 mL をゲル浸透クロマトグラフに注入し、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 合成ケイ酸マグネシウムミニカラム（910 mg）をヘキサン 5 mL で洗浄する。試料溶液をカラムに加え、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1}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）

キャリアーガス：He（2.0 mL/min、初期流量）

メイクアップガス：He（30 mL/min）

水 素：75 mL/min
 乾燥空気：100 mL/min
 試料導入法：スプリットレス（45 s）
 試料導入部温度：250 °C
 カラム槽温度：初期温度 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 試料導入部にはグラスウールを詰めていないシラン処理済みのインサートを使用する。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し	平均回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
アジンホスメチル	乳用牛飼育用配合飼料	10~3,000	3	76.3~90.9	13
	成鶏飼育用配合飼料	50~3,000	3	103.6~103.8	3.3
	小麦	50~3,000	3	86.4~111.3	2.0
	綿実	20~3,000	3	110.2~116.5	4.6
	ライグラスストロー	10~10,000	3	78.3~108.1	12
プロフェノホス	乳用牛飼育用配合飼料	10~3,000	3	96.6~111.5	7.7
	成鶏飼育用配合飼料	50~3,000	3	92.9~109.7	10
	小麦	50~3,000	3	98.5~110.3	2.8
	綿実	20~3,000	3	108.9~119.5	4.5
	ライグラスストロー	10~10,000	3	88.0~105.3	8.3

・共同試験

成分名	試料の種類	試験室 数	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
アジンホスメチル	アルファルファ	8	100	99.3	4.1	12	0.54
	乳用牛飼育用配合飼料	8	100	88.0	7.2	9.7	0.44
プロフェノホス	アルファルファ	8	100	96.6	6.8	12	0.56
	乳用牛飼育用配合飼料	8	100	92.4	7.0	14	0.65

- ・定量下限 飼料（綿実を除く。）中 アジンホスメチル及びプロフェノホス 各 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、綿実中 アジンホスメチル及びプロフェノホス 各 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$
- ・検出下限 飼料（綿実を除く。）中 アジンホスメチル及びプロフェノホス 各 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、綿実中 アジンホスメチル及びプロフェノホス 各 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$

10 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 を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒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 を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒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定量を混合し、2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) で正確に希釈して、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 μ g 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 10.0 g を量って 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) 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-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 μ m 以下) でろ過し、ゲル浸透クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

ゲル浸透クロマトグラフィー 試料溶液 5.0 mL をゲル浸透クロマトグラフに注入し、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-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 II に供する試料溶液とする。

ゲル浸透クロマトグラフィー 例

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

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

溶離液：シクロヘキサン-アセトン（4+1）

流速：5 mL/min

分取画分：75~110 mL

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

試料溶液 2.0 mL 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た後、ヘキサン-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-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 $^{\circ}\text{C}$ 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 ）

キャリアーガス：He（1.6 mL/min）

メイクアップガス：He（30 mL/min）

水素：3 mL/min

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 $^{\circ}\text{C}$

カラム槽温度：初期温度 60 $^{\circ}\text{C}$ （2 min 保持） \rightarrow 昇温 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ \rightarrow 170 $^{\circ}\text{C}$
 \rightarrow 昇温 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ \rightarrow 200 $^{\circ}\text{C}$ \rightarrow 昇温 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ \rightarrow 280 $^{\circ}\text{C}$ （10 min 保持）

検出器温度：280 $^{\circ}\text{C}$

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を算出する。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
アトラジン	幼すう育成用配合飼料	50~250	3	91.4~98.9	8.7
	肉豚飼育用配合飼料	50~250	3	96.4~101.7	5.6
	とうもろこし	50~250	3	98.9~101.3	2.4
	オーツヘイ	50~250	3	90.5~91.8	8.8
シマジン	幼すう育成用配合飼料	50~250	3	93.1~101.9	10.0
	肉豚飼育用配合飼料	50~250	3	97.4~105.9	6.7
	とうもろこし	50~250	3	96.7~97.5	3.0
	オーツヘイ	50~250	3	90.4~92.0	10.6

・共同試験

成分名	試料の種類	試験室 数	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
アトラジン	肉用牛肥育用配合飼料	6	100	95.5	2.9	9.4	0.43
	マイロ		100	92.7	1.4	10.6	0.48
シマジン	肉用牛肥育用配合飼料	6	100	99.6	3.9	8.1	0.37
	マイロ		100	101.4	3.4	6.7	0.30

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

11 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 [$\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_5\text{S}$] 25 mg を正確に量って 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 [$\text{C}_9\text{H}_{13}\text{ClN}_6$] 25 mg を正確に量って 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 [$\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{S}$] 25 mg を正確に量って 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定量を混合し、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 10.0 g を量って 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）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自然流下させて各農薬を溶出させる。更に同溶媒 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1}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自然流下させる。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自然流下し、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) 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自然流下させる。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

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 ²
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
検	出	器 : 四重極型質量分析計注 ³
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 ENVI-Carb/LC-NH₂ (Supelco 製) 又はこれと同等のもの

2 Inertsil ODS-SP (ジーエルサイエンス製、本測定条件によるアメトリン、

シアナジン及びプロメトリンの保持時間はそれぞれ約 15 分、約 14 分及び約 17 分) 又はこれと同等のもの

3 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 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し	平均回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
アメトリン	ブイラー肥育前期用配合飼料	2~100	3	89.5~95.7	9.4
	スーダングラス	2~100	3	74.7~85.7	5.4
シアナジン	ブイラー肥育前期用配合飼料	2~100	3	81.1~93.5	4.7
	スーダングラス	2~100	3	77.2~80.6	5.9
プロメトリン	ブイラー肥育前期用配合飼料	2~100	3	85.8~94.5	6.6
	スーダングラス	2~100	3	73.8~87.2	4.0

・共同試験

成分名	試料の種類	試験室 数	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
アメトリン	ブイラー肥育 前期用配合飼料	9	10.0	98.4	4.3	6.2	0.28
	スーダングラス	9	10.0	92.2	4.2	15	0.66
シアナジン	ブイラー肥育 前期用配合飼料	9	10.0	98.9	6.6	9.4	0.43
	スーダングラス	9	10.0	94.4	4.1	17	0.76
プロメトリン	ブイラー肥育 前期用配合飼料	9	10.0	93.6	2.7	6.1	0.28
	スーダングラス	9	10.0	89.6	3.2	11	0.52

- ・定量下限 アメトリン、シアナジン及びプロメトリン：試料中 各 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$
- ・検出下限 アメトリン、シアナジン及びプロメトリン：試料中 各 0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$

12 クロルピリホスメチル及びピリミホスメチル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 クロルピリホスメチル及びピリミホスメチル (2 成分)
- (2) 分析法

A 試薬の調製

- 1) クロルピリホスメチル標準原液 クロルピリホスメチル [$\text{C}_7\text{H}_7\text{Cl}_3\text{NO}_3\text{PS}$] 20 mg を正確に量って 100 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトン 20 mL を加えて溶かし、更に標線まで 2,2,4-トリメチルペンタンを加えてクロルピリホスメチル標準原液を調製する (この液 1 mL は、クロルピリホスメチルとして 0.2 mg を含有する。)
- 2) ピリミホスメチル標準原液 ピリミホスメチル [$\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_3\text{PS}$] 20 mg を正確に量って 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ピリミホスメチル標準原液を調製する (この液 1 mL は、ピリミホスメチルとして 0.2 mg を含有する。)
- 3) 農薬混合標準液 使用に際して、クロルピリホスメチル及びピリミホスメチル各標準原液の一定量を混合し、2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) で

正確に希釈し、1 mL 中にクロルピリホスメチル及びピリミホスメチルとしてそれぞれ 0.1~4 µg を含有する数点の農薬混合標準液を調製する。

- 4) シリカゲル 開封後シリカゲル（粒径 63~200 µm (230~70 メッシュ)）^{注1} をデシケーター中で保存する。
- 5) 凝固液 塩化アンモニウム 1 g を水 1 L に溶かし、リン酸 2 mL を加える。
- 6) ケイソウ土 ケイソウ土^{注2} 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 10.0~20.0 g を量って 500 mL の分液漏斗に入れ、水 60 mL を加えて潤し、30 分間静置後、更にアセトン 140 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出する。トールビーカーをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をろ紙（5 種 B）で吸引ろ過した後、先の分液漏斗及び残さを順次アセトン-水（7+3）100 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過し、ろ液を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%）400 mL 及びジクロロメタン 100 mL を入れた 1 L の分液漏斗に加え、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）を三角フラスコに入れる。残留液にジクロロメタン 100 mL を加え、穏やかに振り混ぜた後静置し、ジクロロメタン層を先の三角フラスコに合わせる。ジクロロメタン層を適量の硫酸ナトリウム（無水）で脱水し、500 mL のなす形フラスコにガラス繊維ろ紙^{注3}でろ過した後、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。

アセトン 30 mL を加えて残留物を溶かし、ケイソウ土 0.5 g 及び凝固液 40 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 A にガラス繊維ろ紙^{注3}でろ過する。先のなす形フラスコにアセトン 30 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ガラス繊維ろ紙を順次少量の凝固液-アセトン（4+3）で洗浄し、洗液を先のガラス繊維ろ紙を通して分液漏斗 A に合わせる。分液漏斗 A にヘキサン 50 mL を加え、3 分間激しく振り混ぜた後静置し、水層（下層）を 300 mL の分液漏斗 B に入れ、ヘキサン層（上層）を三角フラスコに入れる。分液漏斗 B にヘキサン 50 mL を加え、同様に操作し、ヘキサン層を先の三角フラスコに合わせる。ヘキサン層を適量の硫酸ナトリウム（無水）で脱水し、300 mL のなす形フラスコにガラス繊維ろ紙^{注3}でろ過する。先の三角フラスコ及びガラス繊維ろ紙を順次少量のヘキサンので洗浄し、洗液を先のガラス繊維ろ紙を通してろ液を合わせ、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-ジエチルエーテル（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）5 g、シリカゲル 5 g 及び硫酸ナトリウム（無水）5 g をそれぞれヘキサン-ジエチルエーテル（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。

200 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、試料溶液をカラムに入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサノージェチルエーテル (9+1) 5 mL で4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クロルピリホスメチル及びピリミホスメチルを流出させた後、更にヘキサノージェチルエーテル (9+1) 75 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 (100%ジメチルポリシロキサンコーティング、内径 0.32 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 µm)

キャリアーガス：He (4 mL/min)

メイクアップガス：He (26 mL/min)

水 素：4 mL/min

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：200 °C

カ ラ ム 槽 温 度：50 °C (1 min 保持) →昇温 20 °C/min→180 °C (1 min 保持) →昇温 3 °C/min→200 °C

検 出 器 温 度：240 °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、試料中のクロルピリホスメチル量及びピリミホスメチル量を算出する。

注 1 Silica Gel 60 (Merck 製) 又はこれと同等のもの

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

3 GA-100 (東洋濾紙製) 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 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
クロルピリホスメチル	ブローラー肥育後期用配合飼料	250~500	3	92.1~94.4	3.7
	肉豚肥育用配合飼料	250~500	3	88.1~94.1	6.6
	肉用牛肥育用配合飼料	250~500	3	87.1~100.9	4.0
ピリミホスメチル	ブローラー肥育後期用配合飼料	250~500	3	97.0~99.6	2.3
	肉豚肥育用配合飼料	250~500	3	102.7~106.8	5.8
	肉用牛肥育用配合飼料	250~500	3	100.0~104.6	3.7

・共同試験

成分名	試料の種類	試験室 数	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
クロルピリホスメチル	ブローラー肥育後期用配合飼料	6	250	89.8	3.5	4.2	0.21
ピリミホスメチル	ブローラー肥育後期用配合飼料	6	250	101.6	4.4	7.9	0.40

13 酸化フェンブタズ及びシヘキサチ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 酸化フェンブタズ及びシヘキサチン (2成分)

(2) 分析法

A 試薬の調製

1) 酸化フェンブタズ及びシヘキサチン混合標準原液 酸化フェンブタズ $[\text{C}_{60}\text{H}_{78}\text{OSn}_2]$ 及びシヘキサチン $[\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{OSn}]$ 各 20 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ、酢酸エチル-酢酸 (99+1) を加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えて酸化フェンブタズ及びシヘキサチン混合標準原液を調製する (この液 1 mL は、酸化フェンブタズ及びシヘキサチンとしてそれぞれ 0.2 mg を含有する。)

2) ケイ酸マグネシウム 合成ケイ酸マグネシウム (粒径 149~250 μm (100~60メッシュ)) を 130 °C で 16 時間乾燥する。

B 定 量

抽 出 分析試料 10.0 g を 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、アセトン-酢酸 (99+1) 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) に入れ、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ヘキサン 10 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液をカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下し、酸化フェンブタズ及びシヘキサチンを溶出させる。更にヘキサン 40 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。

ヘキサン 5 mL を正確に加えて残留物を溶かし、エチル化反応に供する試料溶液とする。

エチル化反応 試料溶液 1 mL を 50 mL の試験管に正確に入れ、エチルマグネシウムブロミド液 1 mL を加えた後 20 分間静置し、酸化フェンブタズ及びシヘキサチンをエチル化する。これに硫酸^{注1} (0.5 mol/L) 10 mL を少量ずつ加え、過剰のエチルマグネシウムブロミドを分解し、更に水 10 mL 及びヘキサン 5 mL を加えて振り混ぜた後静置する。ヘキサン層（上層）をパスツールピペットで 50 mL の三角フラスコに入れる。先の試験管にヘキサン 5 mL を加えて同様に操作し、ヘキサン層を先の三角フラスコに合わせる。ヘキサン層を適量の硫酸ナトリウム（無水）で脱水し、100 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 ケイ酸マグネシウム 10 g をヘキサンに懸濁させてカラム管（内径 15 mm）に流し込み、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。

200 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 5 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から 3 mm の高さに達するまで流下させる。

ヘキサノージエチルエーテル (99+1) 70 mL をカラムに加えてエチル化した酸化フェンブタズ及びシヘキサチンを溶出させ、溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

ヘキサン 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。

標準液のエチル化 酸化フェンブタズ及びシヘキサチン混合標準原液 1 mL を 50 mL の試験管に正確に入れ、エチル化反応の項と同一条件で操作し、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 10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、この液の一定量をヘキサンで正確に希釈し、1 mL 中に酸化フェンブタズ及びシヘキサチンとしてそれぞれ 0.01~2 µg 相当量を含む数点の混合標準液を調製する。

ガスクロマトグラフィー 試料溶液及び各混合標準液 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：炎光光度検出器（スズ検出用フィルター）

カラム：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0.32 mm、長さ30 m、膜厚0.5 μm）

キャリアーガス：He（2 mL/min）

メイクアップガス：N₂（30 mL/min）

水素：80 mL/min

乾燥空気：100 mL/min

試料導入法：スプリットレス（60 s）

試料導入部温度：250 °C

カラム槽温度：初期温度150 °C（1 min 保持）→昇温10 °C/min→280 °C（5 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面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中の酸化フェンブタスズ量及びシヘキサチン量を算出する。

注1 有害金属測定用試薬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 (μg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
酸化フェンブタスズ	ブレイラー肥育後期用配合飼料	100~1,000	3	84.8~93.6	14.2
	子豚育成用配合飼料	100~1,000	3	80.0~89.0	17.6
	アルファルファヘイ	100~1,000	3	84.4~96.0	8.6
シヘキサチン	ブレイラー肥育後期用配合飼料	100~1,000	3	84.6~90.6	5.2
	子豚育成用配合飼料	100~1,000	3	87.1~92.7	8.3
	アルファルファヘイ	100~1,000	3	85.7~89.6	8.8

- ・共同試験

成分名	試料の種類	試験室 数	添加濃度 (μg/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
酸化フェンブタスズ	成鶏飼育用配合飼料	7	500	95.3	5.2	9.5	0.53
シヘキサチン	成鶏飼育用配合飼料	7	500	78.7	5.6	17.1	0.93

- ・定量下限 試料中 各 20 μg/kg

14 シアナジン及びマイクロブタニル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 シアナジン及びマイクロブタニル（2成分）
- (2) 分析法

A 試薬の調製

- 1) シアナジン標準原液 シアナジン [C₉H₁₃ClN₆] 50 mg を正確に量って 100 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒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。）。
- 2) マイクロブタニル標準原液 マイクロブタニル [C₁₅H₁₇ClN₄] 50 mg を正確に量

って 100 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてミクロブタニル標準原液を調製する（この液 1 mL はミクロブタニルとして 0.5 mg を含有する。）。

- 3) 農薬混合標準液 使用に際して、シアナジン及びミクロブタニル各標準原液の一定量を混合し、希釈溶媒で正確に希釈して、1 mL 中にシアナジン及びミクロブタニルとしてそれぞれ 0.02~1.0 µg を含有する数点の農薬混合標準液を調製する。
- 4) 希釈溶媒 0.1 v/v%ポリエチレングリコール含有アセトン

B 定 量

抽出 分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 15 mL を加えて潤し、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、塩化ナトリウム 5 g 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 試料溶液を多孔性ケイソウ土カラム（20 mL 保持用）に入れ、5 分間静置する。300 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン-酢酸エチル（4+1）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シアナジン及びミクロブタニルを溶出させ、更にヘキサン-酢酸エチル（4+1）70 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。

シクロヘキサン-アセトン（4+1）20 mL を正確に加えて残留物を溶かし、メンブランフィルター（孔径 0.5 µm 以下）でろ過し、ゲル浸透クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

ゲル浸透クロマトグラフィー 試料溶液 5.0 mL をゲル浸透クロマトグラフに注入し、シアナジン及びミクロブタニルが溶出する画分を 100 mL のなす形フラスコに分取し、40 °C 以下の水浴でほぼ乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

ヘキサン-アセトン（19+1）5 mL を正確に加えて残留物を溶かし、カラム処理 II に供する試料溶液とする。

ゲル浸透クロマトグラフィー 例

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

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

溶離液：シクロヘキサン-アセトン（4+1）

流速：5 mL/min

分取画分：80~120 mL

カラム処理 II 合成ケイ酸マグネシウムミニカラム（910 mg）をヘキサン-アセ

トン (19+1) 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、試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン-アセトン (19+1) 5 mL 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 のなす型フラスコをミニカラムの下に置き、ヘキサン-アセトン (7+3) 20 mL をミニカラムに加えてシアナジン及びミクロブタニルを溶出させる。溶出液を 40 °C 以下の水浴でほぼ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、クロマトグラフを得る。

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コーティング、内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 µm)

キャリアーガス：He (2.5 mL/min)

メイクアップガス：He (30 mL/min)

水 素：3 mL/min

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：初期温度 70 °C (2 min 保持) →昇温 30 °C/min→230 °C
→昇温 2.5 °C/min→245 °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面積を求めて検量線を作成し、試料中のシアナジン量及びミクロブタニル量を算出する。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度 (µg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
シアナジン	鶏用配合飼料	50~500	3	98.8~108.5	9.6
	牛用配合飼料	50~500	3	114.4~121.6	5.4
	とうもろこし	50~500	3	96.1~104.0	4.9
	大麦	50~500	3	104.7~106.3	3.6
ミクロブタニル	鶏用配合飼料	50~500	3	88.7~92.8	4.5
	豚用配合飼料	50~500	3	99.4~100.3	7.2
	とうもろこし	50~500	3	85.0~91.0	4.8
	大麦	50~500	3	89.7~92.6	4.7

・共同試験

成分名	試料の種類	試験室数	添加濃度 (µg/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
シアナジン	プロイラー肥育 前期用配合飼料	7	200	93.4	5.0	13.9	0.68
	とうもろこし	7	200	94.1	6.9	7.9	0.38
マイクロブタニル	プロイラー肥育 前期用配合飼料	7	200	89.1	5.3	10.0	0.48
	とうもろこし	7	200	91.1	5.2	14.9	0.72

・定量下限 試料中 シアナジン 10 µg/kg、マイクロブタニル 20 µg/kg

15 ジコホール及びトリフルラリ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 ジコホール及びトリフルラリン (2成分)

(2) 分析法

A 試薬の調製

- 1) ジコホール標準原液 ジコホール [C₁₄H₉Cl₅O] 50 mg を正確に量って 100 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトン 20 mL を加えて溶かし、更に標線まで 2,2,4-トリメチルペンタンを加えてジコホール標準原液を調製する (この液 1 mL は、ジコホールとして 0.5 mg を含有する。)
- 2) トリフルラリン標準原液 トリフルラリン [C₁₃H₁₆F₃N₃O₄] 50 mg を正確に量って 100 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトン 20 mL を加えて溶かし、更に標線まで 2,2,4-トリメチルペンタンを加えてトリフルラリン標準原液を調製する (この液 1 mL は、トリフルラリンとして 0.5 mg を含有する。)
- 3) 農薬混合標準液 使用に際して、ジコホール及びトリフルラリン各標準原液の一定量を混合し、2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) で正確に希釈して、1 mL 中にジコホール及びトリフルラリンとしてそれぞれ 0.01~1.0 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 10.0 g を量って 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 80 mL を加え、60 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、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%) 200 mL 及びヘキサン 100 mL を入れた 500 mL の分液漏斗 A に加え、5 分間振り混ぜた後静置する。水層 (下層) を 500 mL の分液漏斗 B に入れ、ヘキサン層 (上層) を 300 mL の三角フラスコに入れる。分液漏斗 B にヘキサン 50 mL を加え、5 分間振り混ぜた後静置し、ヘキサン層を先の三角フラスコに合わせる。ヘキサン層を適量の硫酸ナトリウム (無水) で脱水し、300 mL のなす形フラスコにろ紙 (5 種 B) でろ過した後、先の三角フラスコ及びろ紙を順次少量のヘキサンので洗浄し、洗液を先のろ紙を通してろ液を合わせる。ろ液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

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

ゲル浸透クロマトグラフィー 試料溶液 5.0 mL をゲル浸透クロマトグラフに注入し、ジコホール及びトリフルラリンが溶出する画分を 100 mL のなす形フラスコに分取し、40 $^{\circ}\text{C}$ 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

ヘキサン 5 mL を正確に加えて残留物を溶かし、カラム処理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

分取画分：60~110 mL

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

100 mL のなす型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る。液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた後、ヘキサノージェチルエーテル (99+1) 30 mL をミニカラムに加えてジコホール及びトリフルラリンを溶出させる。溶出液を 40 $^{\circ}\text{C}$ 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：電子捕獲型検出器

カラム：熔融石英製キャピラリーカラム (50%ジフェニルー50%ジメチルポリシロキサンコーティング、内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm)

キャリアーガス：He (2.5 mL/min)

メイクアップガス：N₂ (60 mL/min)

試料導入法：スプリットレス (60 s)

試料導入部温度：200 $^{\circ}\text{C}$

検出部温度：300 $^{\circ}\text{C}$

カラム槽温度：初期温度 70 $^{\circ}\text{C}$ (2 min 保持) \rightarrow 昇温 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ \rightarrow 280 $^{\circ}\text{C}$ (10 min 保持)

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、試料中のジコホール量及びトリフルラリン量を算出する。

(参考) 分析法バリデーション

- ・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
ジコホール	鶏用配合飼料	100~500	3	88.5~94.8	10.9
	豚用配合飼料	100~500	3	89.8~98.9	3.8
	アルファルファ	100~500	3	89.0~94.3	8.2
	チモシー	100~500	3	85.7~90.4	10.8
トリフルラリン	鶏用配合飼料	100~500	3	90.7~95.4	10.0
	豚用配合飼料	100~500	3	91.9~106.5	5.2
	アルファルファ	100~500	3	91.6~101.0	8.8
	チモシー	100~500	3	87.6~90.1	8.7

- ・共同試験

成分名	試料の種類	試験室 数	添加濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
ジコホール	肉豚肥育用配合飼料	5	200	88.2	5.6	14.2	0.68
	マイロ	5	200	89.9	6.5	17.5	0.84
トリフルラリン	肉豚肥育用配合飼料	5	200	98.6	5.5	9.0	0.44
	マイロ	5	200	99.7	5.9	11.8	0.58

- ・定量下限 試料中 ジコホール及びトリフルラリン 各 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$

16 テブコナゾール及びフェナリモル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 テブコナゾール及びフェナリモル (2成分)
- (2) 分析法

A 試薬の調製

- 1) テブコナゾール標準原液 テブコナゾール [$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{ClN}_3\text{O}$] 25 mg を正確に量って 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、更に標線まで同溶媒を加えてテブコナゾール標準原液を調製する (この液 1 mL はテブコナゾールとして 0.5 mg を含有する。)
- 2) フェナリモル標準原液 フェナリモル [$\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}$] 25 mg を正確に量って 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、更に標線まで同溶媒を加えてフェナリモル標準原液を調製する (この液 1 mL はフェナリモルとして 0.5 mg を含有する。)
- 3) 農薬混合標準液 使用に際して、テブコナゾール及びフェナリモル各標準原液の一定量を混合し、希釈溶媒で正確に希釈して、1 mL 中にテブコナゾール及びフェナリモルとしてそれぞれ 0.01~1.0 μg を含有する数点の農薬混合標準液を調製する。
- 4) 希釈溶媒 ポリエチレングリコール (平均分子量 400) 50 μL を 2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) 100 mL に加えて希釈溶媒を調製する。

B 定 量

抽出 分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水 (3+1) 20 mL を加えた後 10 分間静置し、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 のなす型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、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 試料溶液を多孔性ケイソウ土カラム (20 mL 保持用) に入れ、5 分間静置する。300 mL のなす型フラスコをカラムの下に置き、試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン 20 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次カラムに加える。液面が充てん剤の上端に達するまで流下してテブコナゾール及びフェナリモルを溶出させ、更にヘキサン 60 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。シクロヘキサン-アセトン (4+1) 10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、メンブランフィルター (孔径 0.5 µm 以下) でろ過し、ゲル浸透クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

ゲル浸透クロマトグラフィー 試料溶液 5.0 mL をゲル浸透クロマトグラフに注入し、テブコナゾール及びフェナリモルが溶出する画分を 100 mL のなす形フラスコに分取し、40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

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

ゲル浸透クロマトグラフィー 例

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

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

溶離液：シクロヘキサン-アセトン (4+1)

流速：5 mL/min

分取画分：70~125 mL

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

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 2 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。更にヘキサン-アセトン (19+1) 10 mL をミニカラムに加え、同様に流出させる。50 mL のなす型フラスコをミニカラムの下に置き、ヘキサン-アセトン (7+3) 20 mL をミニカラムに加えてテブコナゾール及びフェナリモルを溶出させる。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。

希釈溶媒 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 μ L 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

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

キャリアーガス：He（1.0 mL/min、初期流量）

試料導入法：スプリットレス（60 s）

試料導入部温度：250 $^{\circ}$ C

カラム槽温度：初期温度 70 $^{\circ}$ C（2 min 保持）、昇温 20 $^{\circ}$ C/min、280 $^{\circ}$ C（10 min 保持）

検出器：四重極型質量分析計^{注1}

インターフェース温度：280 $^{\circ}$ C

イオン源温度：200 $^{\circ}$ C

イオン化法：電子衝撃イオン化（EI）法

イオン化電圧：70 eV

モニターイオン： m/z 250（テブコナゾール）、330（フェナリモル）

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を求めて検量線を作成し、試料中のテブコナゾール量^{注2}及びフェナリモル量を算出する。

注1 GCMS-QP2010（島津製作所製）による条件例

2 試料中のテブコナゾール量が 5 mg/kg を超える場合は、本法では回収率が低下する可能性があるので、第1節 106.3 による試験を行う。

（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 (μ g/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
テブコナゾール	ブロイラー肥育 後期用配合飼料	50~500	3	86.6~91.9	9.8
	若令牛育成用配合飼料	50~500	3	99.5~101.0	11.1
	とうもろこし	50~500	3	90.1~91.9	10.8
	ライグラス	50~500	3	85.4~87.1	4.7
フェナリモル	ブロイラー肥育 後期用配合飼料	50~500	3	95.3~98.6	9.0
	若令牛育成用配合飼料	50~500	3	100.1~102.2	5.1
	とうもろこし	50~500	3	96.9~101.2	4.6
	ライグラス	50~500	3	97.6~97.9	3.6

・共同試験

成分名	試料の種類	試験室数	添加濃度 (µg/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
テブコナゾール	ブロイラー肥育後期用配合飼料	5	200	89.1	2.1	9.3	0.45
	大麦	5	200	91.0	6.3	11.6	0.56
フェナリモル	ブロイラー肥育後期用配合飼料	5	200	92.7	5.4	6.0	0.29
	大麦	5	200	90.9	7.3	10.2	0.49

- ・ 定量下限 テブコナゾール：試料中 5 µg/kg、フェナリモル：試料中 10 µg/kg
- ・ 定量上限 テブコナゾール 試料中 5 mg/kg

17 フェンバレレート及びペルメトリ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 フェンバレレート及びペルメトリン
- (2) 分析法

A 試薬の調製

- 1) フェンバレレート標準原液 フェンバレレート [C₂₅H₂₂ClNO₃] 10 mg を正確に量って 100 mL の褐色全量フラスコに入れ、ヘキサンを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてフェンバレレート標準原液を調製する（この液 1 mL は、フェンバレレートとして 0.1 mg を含有する。）。
- 2) ペルメトリン標準原液 ペルメトリン [C₂₁H₂₀Cl₂O₃] 10 mg を正確に量って 100 mL の褐色全量フラスコに入れ、ヘキサンを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてペルメトリン標準原液を調製する（この液 1 mL は、ペルメトリンとして 0.1 mg を含有する。）。
- 3) 農薬混合標準液 使用に際して、フェンバレレート及びペルメトリン各標準原液の一定量を混合し、ヘキサンで正確に希釈し、1 mL 中にフェンバレレート及びペルメトリンとしてそれぞれ 0.05~1 µg を含有する数点の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））を 130 °C で 5 時間乾燥する。

B 定 量

抽 出 分析試料 5~10 g を正確に量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、アセトニトリル-水（7+3）100 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、先の三角フラスコ及び残さを順次アセトニトリル-水（7+3）10 mL で 2 回洗浄し、同様に吸引ろ過する。ろ液を 50 °C 以下の水浴で約 30 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（10 w/v%）100 mL 及びジクロロメタン 30 mL を入れた 300 mL の分液漏斗に加える。試料溶液の入っていたなす形フラスコをジクロロメタン 10 mL で 2 回洗浄し、洗液を分液漏斗に合わせ、5 分間振り混ぜた後静置し、ジクロロメタン層（下層）を三角フラスコに入れる。分液漏斗にジクロロメタン 50 mL を加え、同様に操作し、ジクロロメ

タン層を先の三角フラスコに合わせる。ジクロロメタン層を適量の硫酸ナトリウム（無水）で脱水し、300 mL のなす形フラスコに分液ろ紙でろ過した後、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 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。

ヘキサン 10 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理 I に供する試料溶液とする。

カラム処理 I ケイ酸マグネシウム 10 g 及び硫酸ナトリウム（無水）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、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、液面が充てん剤の上端から 3 mm 高さに達するまで流出させ、更にヘキサン 90 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、ヘキサノジエチルエーテル（7+3）100 mL をカラムに加えてフェンバレレート及びペルメトリンを溶出させる。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。

アセトニトリル 5 mL を加えて残留物を溶かし、更に水 5 mL を加え、カラム処理 II に供する試料溶液とする。

カラム処理 II オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（360 mg）を水 10 mL で洗浄する。

試料溶液をメンブランフィルター（孔径 0.5 µm 以下）でろ過し、ミニカラムに入れる。試料溶液の入っていたなす形フラスコ及びメンブランフィルターを少量のアセトニトリル-水（1+1）で洗浄し、洗液を先のメンブランフィルターを通してミニカラムに加え、圧注^{注1}して流出させる。アセトニトリル-水（1+1）10 mL をミニカラムに加え、同様に流出させてミニカラムを洗浄する。100 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、アセトニトリル 15 mL をミニカラムに加え、圧注^{注1}してフェンバレレート及びペルメトリンを溶出させる。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。

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

キャリアーガス：He（1.5 mL/min）

メイクアップガス：N₂（60 mL/min）

試料導入法：スプリットレス（60 s）

試料導入部温度：260 °C

カラム槽温度：初期温度 80 °C（1 min 保持）→昇温 30 °C/min→250 °C
（5 min 保持）→昇温 1 °C/min→280 °C

検出器温度：300 °C

計算 得られたクロマトグラムからそれぞれ 2 個ずつのピーク面積の和又は高さの和を求めて検量線を作成し、試料中のフェンバレレート量及びペルメトリン量を算出する。

注 1 流速は 1~2 mL/min とする。

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度 (µg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
フェンバレレート	とうもろこし	50~500	3	88.4~105.5	12.5
	アルファルファ	50~500	3	91.2~118.9	7.9
	成鶏飼育用配合飼料	50~500	3	91.7~105.9	9.6
ペルメトリン	とうもろこし	50~500	3	86.2~100.9	10.2
	アルファルファ	50~500	3	95.3~113.9	6.0
	成鶏飼育用配合飼料	50~500	3	89.1~100.1	16.6

・共同試験

成分名	試料の種類	試験 室数	添加濃度 (µg/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
フェンバレレート	ブイラー後期用配合飼料	6	250	95.3	8.1	11.1	0.56
ペルメトリン	ブイラー後期用配合飼料	6	250	97.0	6.8	8.3	0.42

・定量下限 試料中 各 50 µg/kg

18 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、稲発酵粗飼料及び粃米

(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 [C₉H₁₀ClN₅O₂] 25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒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 [C₆H₈ClN₅O₂S] 25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒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〔C₇H₁₄N₄O₃〕25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒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〔C₈H₁₀ClN₅O₃S〕25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒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定量を混合し、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 10.0 g を量って 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。さらに、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})

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：N₂（800 L/h、500 °C）

キャピラリー電圧：0.5 kV

コーンガス：N₂（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 各農薬のモニターイオン条件

測定対象物質	プリカーサーイオン (<i>m/z</i>)	プロダクトイオン		コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
		定量用 (<i>m/z</i>)	確認用 (<i>m/z</i>)		
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、5 mL（Agilent Technologies 製）又はこれと同等のもの

2 InertSep GC/NH₂（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、本測定条件によるイミダクロプリド、クロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサムの保持時間はそれぞれ約 5.7、5.3、3.3 及び 4.7 分）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
	粃米	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
	粃米	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
	粃米	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	

・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 (%)	
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	
		粃米	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 (%)	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
	粃米	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
	粃米	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
	粃米	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 試料中（稲発酵粗飼料は風乾物中） 各 0.01 mg/kg
- ・検出下限 イミダクロプリド：試料中（稲発酵粗飼料は風乾物中） 0.004 mg/kg、その他の農薬：試料中（稲発酵粗飼料は風乾物中） 各 0.003 mg/kg

19 カルバリルその他の農薬の液体クロマトグラフト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 カルバリル、カルボフラン、チアクロプリド、テブフェノジド、フェノブカルブ、フラメトピル、フルジオキシニル及びメトキシフェノジド（8成分）
- (2) 適用範囲 稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米
- (3) 分析法

A 試薬の調製

農薬混合標準液 カルバリル [C₁₂H₁₁NO₂]、カルボフラン [C₁₂H₁₅NO₃]、チアクロプリド [C₁₀H₉ClN₄S]、テブフェノジド [C₂₂H₂₈N₂O₂]、フェノブカルブ

〔 $C_{12}H_{17}NO_2$ 〕、フラメトピル〔 $C_{17}H_{20}ClN_3O_2$ 〕、フルジオキシニル〔 $C_{12}H_6F_2N_2O_2$ 〕及びメトキシフェノジド〔 $C_{22}H_{28}N_2O_3$ 〕各 25 mg を正確に量ってそれぞれ 50 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒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（フルジオキシニルは 10 mL）を 100 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農薬混合標準原液を調製する（この液 1 mL は、各農薬としてそれぞれ 10 μ g（フルジオキシニルは 50 μ g）を含有する。）。

使用に際して、農薬混合標準原液の一定量を、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 0.1~2 ng（フルジオキシニルは 0.5~10 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 10.0 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 30 mL（粃米は 20 mL）を加え、30 分間静置後、更にアセトン 120 mL（粃米は 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同溶媒を加え、その液の一定量を 5,000 \times 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 μ L 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 μ m） ^{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℃

(タンデム型質量分析計部^{注5)})

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℃

デソルベーション温度：350℃

キャピラリー電圧：正イオン 3.5 kV、負イオン 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 各農薬のモニターイオン条件

農薬名	測定モード	プリカーサーイオン (<i>m/z</i>)	プロダクトイオン (<i>m/z</i>)	確認イオン (<i>m/z</i>)	コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
チアクロプリド	+	253	126	-	36	20
			-	90	36	36
テブフェノジド	+	353	133	-	18	20
			-	105	18	42
フラメトピル	+	334	157	-	36	32
			-	290	36	16
フルジオキソニル	-	247	180	-	48	28
			-	126	48	28
メトキシフェノジド	+	369	149	-	18	18
			-	133	18	28
カルバリル	+	202	145	-	24	11
			-	127	24	25
カルボフラン	+	222	165	-	32	11
			-	123	32	23
フェノブカルブ	+	208	95	-	28	13
			-	77	28	35

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 (ジュ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 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 (%)
チアクロプリド	稲わら	1.0	3	88.0	1.7
		0.2	3	89.9	2.9
		0.1	3	107	11
	稲発酵粗飼料	1.0	3	94.2	0.4
		0.2	3	89.3	3.4
		0.1	3	99.1	6.9
	粳米	1.0	3	91.7	2.6
		0.2	3	89.5	4.0
		0.1	3	97.0	11
テブフェノジド	稲わら	1.0	3	89.2	1.0
		0.2	3	92.7	2.6
		0.1	3	102	12
	稲発酵粗飼料	1.0	3	94.2	1.9
		0.2	3	92.7	3.7
		0.1	3	97.3	1.6
	粳米	1.0	3	92.9	2.8
		0.2	3	88.8	2.4
		0.1	3	93.0	7.3
フラメトピル	稲わら	1.0	3	87.0	4.1
		0.2	3	104	9.8
		0.1	3	103	12
	稲発酵粗飼料	1.0	3	93.8	3.7
		0.2	3	103	11
		0.1	3	104	12
	粳米	1.0	3	93.7	3.0
		0.2	3	87.8	7.4
		0.1	3	111	5.7
フルジオキシニル	稲わら	0.1	3	92.9	2.6
		0.05	3	104	7.6
	稲発酵粗飼料	0.1	3	92.0	1.7
		0.05	3	99.3	6.8
	粳米	0.1	3	95.9	2.7
		0.05	3	98.9	1.7
メトキシフェノジド	稲わら	1.0	3	91.6	3.7
		0.2	3	92.5	6.3
		0.1	3	95.3	6.7
	稲発酵粗飼料	1.0	3	92.9	1.1
		0.2	3	77.1	7.7
		0.1	3	96.7	9.6
	粳米	1.0	3	93.2	0.4
		0.2	3	90.7	5.1
		0.1	3	89.8	0.7

・ 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 (%)
カルバリル	稲わら	1.0	3	96.0	4.0
		0.2	3	101	0.8
		0.1	3	103	6.7
	稲発酵粗飼料	1.0	3	99.4	1.6
		0.2	3	97.7	8.2
		0.1	3	115	11
	粳米	1.0	3	99.0	0.7
		0.2	3	90.1	6.2
		0.1	3	106	9.3
カルボフラン	稲わら	1.0	3	89.0	2.5
		0.2	3	101	8.6
		0.1	3	89.4	11
	稲発酵粗飼料	1.0	3	96.7	1.8
		0.2	3	96.6	3.0
		0.1	3	92.1	16
	粳米	1.0	3	96.3	7.1
		0.2	3	82.5	9.1
		0.1	3	94.4	8.0
フェノブカルブ	稲わら	1.0	3	86.1	1.7
		0.2	3	103	6.4
		0.1	3	99.1	9.3
	稲発酵粗飼料	1.0	3	94.3	6.9
		0.2	3	96.3	6.9
		0.1	3	101	2.8
	粳米	1.0	3	94.4	3.6
		0.2	3	91.4	7.9
		0.1	3	92.3	13

・ 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 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
チアクロプリド	稲わら	12	0	1.0	99.0	4.5	8.6	0.53
	粳米	11	1	1.0	103	2.8	5.2	0.33
テブフェノジド	稲わら	11	1	1.0	95.2	5.1	4.7	0.29
	粳米	12	0	1.0	102	5.1	6.1	0.39
フラメトピル	稲わら	12	0	1.0	98.2	7.6	7.9	0.50
	粳米	12	0	1.0	100	4.5	9.5	0.60
フルジ	稲わら	12	0	0.1	100	9.8	12	0.55
オキシニル	粳米	12	0	0.1	107	3.8	12	0.53
メトキシ	稲わら	12	0	1.0	97.3	5.0	7.8	0.49
フェノジド	粳米	12	0	1.0	103	5.0	5.9	0.37
カルバリル	稲わら	12	0	1.0	97.6	4.4	7.7	0.48
	粳米	12	0	1.0	101	4.3	11	0.69
カルボフラン	稲わら	12	0	1.0	99.2	4.6	6.1	0.38
	粳米	12	0	1.0	102	3.8	7.8	0.49
フェノブカルブ	稲わら	12	0	1.0	99.3	5.5	10	0.65
	粳米	11	1	1.0	105	5.0	6.2	0.39

- ・ 定量下限 フルジオキシニル：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 フルジオキシニル：試料中 0.02 mg/kg、その他の農薬：試料中各 0.03 mg/kg

20 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、稲発酵粗飼料及び粃米
- (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〔C₂₂H₁₇N₃O₅〕、イソプロカルブ〔C₁₁H₁₅NO₂〕、ジクロシメット〔C₁₅H₁₈C₁₂N₂O〕、ピリミカーブ〔C₁₁H₁₈N₄O₂〕、プロポキスル〔C₁₁H₁₅NO₃〕、メタラキシル〔C₁₅H₂₁NO₄〕及びメトルカルブ〔C₉H₁₁NO₂〕各 25 mg を正確に量ってそれぞれ 50 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒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定量を混合し、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定量を、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 10.0 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 30 mL（粃米は 20 mL）を加え、30 分間静置後、更にアセトン 120 mL（粃米は 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同溶媒を加え、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。更に同溶媒 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、更に試料溶液の一定量をアセトニトリル-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})

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 各農薬のモニターイオン条件

農薬名	ブリーカーサー	プロダクト	確認	コーン	コリジョン
	イオン (<i>m/z</i>)	イオン (<i>m/z</i>)	イオン (<i>m/z</i>)	電圧 (V)	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 ENVI-Carb/LC-NH₂ (Supelco 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

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	5.0	3	89.1	2.1	1.0	0.3
		1.0	3	106	1.7		
	稲発酵粗飼料	1.0	3	81.4	11	0.1	0.03
		0.1	3	104	18		
		2.0	3	97.2	3.4		
		0.1	3	119	14		
イソプロカルブ	稲わら	1.0	3	81.0	6.3	0.1	0.03
		0.1	3	93.6	8.8		
	稲発酵粗飼料	1.0	3	83.5	5.4	0.1	0.03
		0.1	3	105	6.3		
		1.0	3	87.2	5.4		
		0.1	3	107	6.8		

・添加回収率、繰返し精度、定量下限及び検出下限〔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 (%)	定量下限 (mg/kg)	検出下限 (mg/kg)
ジクロシメット	稲わら	15	3	94.8	6.8	1.0	0.3
		1.0	3	101	11		
	稲発酵粗飼料	1.0	3	82.1	8.6	0.1	0.03
		0.1	3	90.7	7.5		
		1.0	3	102	16		
		0.1	3	91.0	9.1		
ピリミカーブ	稲わら	1.0	3	88.8	4.0	0.1	0.03
		0.1	3	90.5	2.4		
	稲発酵粗飼料	1.0	3	88.5	8.8	0.1	0.03
		0.1	3	110	2.7		
		1.0	3	96.7	1.3		
		0.1	3	113	5.0		
プロボキスル	稲わら	1.0	3	82.3	3.1	0.1	0.03
		0.1	3	85.4	4.5		
	稲発酵粗飼料	1.0	3	93.0	6.9	0.1	0.03
		0.1	3	110	15		
		1.0	3	96.7	1.3		
		0.1	3	114	10		
メタラキシル	稲わら	1.0	3	91.3	3.9	0.04	0.01
		0.04	3	90.7	3.6		
	稲発酵粗飼料	1.0	3	81.8	8.1	0.04	0.01
		0.04	3	114	1.7		
		1.0	3	101	5.4		
		0.04	3	103	6.8		
メトルカルブ	稲わら	1.0	3	76.2	19	0.4	0.1
		0.4	3	85.6	2.1		
	稲発酵粗飼料	1.0	3	89.2	11	0.4	0.1
		0.4	3	95.2	11		
		1.0	3	82.0	17		
		0.4	3	94.9	6.4		

・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 (%)	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	5.0	79.5	8.0	11	0.90
	籾米	9	0	2.0	84.3	8.8	8.8	0.61
イソプロカルブ	稲わら	9	0	1.0	83.5	7.3	15	0.94
	籾米	9	0	1.0	83.3	3.9	14	0.90
ジクロシメット	稲わら	9	0	15.0	84.0	6.3	10	0.97
	籾米	8	1	1.0	85.0	8.0	9.5	0.59
ピリミカーブ	稲わら	9	0	1.0	97.0	4.6	12	0.76
	籾米	9	0	1.0	102	5.0	6.3	0.39
プロボキスル	稲わら	9	0	1.0	86.3	6.6	13	0.80
	籾米	9	0	1.0	85.1	5.9	10	0.65
メタラキシル	稲わら	7	2	1.0	94.2	3.4	5.3	0.33
	籾米	9	0	1.0	99.5	3.5	7.7	0.48
メトルカルブ	稲わら	7	2	1.0	78.8	7.8	6.6	0.41
	籾米	9	0	1.0	74.5	5.7	12	0.76

21 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〔C₇H₁₄N₂O₂S〕25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒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〔C₇H₁₄N₂O₃S〕25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒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〔C₇H₁₄N₂O₄S〕25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒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定量を混合し、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 10.0 g を量って 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 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。更に同溶媒 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})

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 各物質のモニターイオン条件

農薬名	プリカーサー イオン (<i>m/z</i>)	プロダクト イオン (<i>m/z</i>)	確認 イオン (<i>m/z</i>)	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。

$$\text{試料中のアルジカルブ量 (mg/kg)} = (A + B \times 0.922) \times 5^{\text{注6}}$$

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/NH₂ (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、本測定条件によるアルジカルブ、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保持時間はそれぞれ約 9.4、4.7 及び 5.3 分) 又はこれと同等のもの

5 ACQUITY TQD (Waters 製) による条件例

6 乾牧草にあつては 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	とうもろこし	0.05	3	81.3	8.3	
		0.01	3	101	5.9	
		0.005	3	83.9	8.8	
		0.002	3	104	6.0	
	小麦	0.02	3	81.7	3.7	
		0.01	3	93.7	1.6	
		0.005	3	97.3	4.5	
		0.002	3	90.5	4.8	
	スーダングラス 乾草	1	3	104	4.5	
		0.05	3	118	13	
	アルジカルブ スルホキシド	とうもろこし	0.05	3	95.9	1.6
			0.01	3	97.2	6.8
0.005			3	105	3.5	
0.002			3	95.8	7.8	
小麦		0.02	3	93.7	2.2	
		0.01	3	97.4	4.1	
		0.005	3	96.2	5.0	
		0.002	3	88.2	17	
スーダングラス 乾草		1	3	91.1	1.6	
		0.05	3	89.5	7.7	
			0.02	3	82.0	6.5

・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 (%)
アルジカルブ スルホン	とうもろこし	0.05	3	99.6	1.4
		0.01	3	93.6	6.0
		0.005	3	96.7	12
		0.002	3	84.5	4.5
	小麦	0.02	3	98.7	4.7
		0.01	3	88.5	6.0
		0.005	3	96.5	3.5
		0.002	3	101	19
スーダングラス 乾草	スーダングラス 乾草	1	3	95.6	2.4
		0.05	3	84.7	12
		0.02	3	91.2	2.2

・共同試験

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

- ・ 定量下限 試料中 各 0.002 mg/kg (乾牧草各 0.02 mg/kg)
- ・ 検出下限 試料中 各 0.0006 mg/kg (乾牧草各 0.006 mg/kg)

22 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 5Z 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 [C₁₈H₂₅N₅O₅]、オリサストロビン 5Z 異性体 [C₁₈H₂₅N₅O₅]、クミルロン [C₁₇H₁₉ClN₂O]、シメコナゾール [C₁₄H₂₀FN₃OSi]、シメトリン [C₈H₁₅N₅S]、ダイムロン [C₁₇H₂₀N₂O]、テニルクロール [C₁₆H₁₈ClNO₂S]、パクロブトラゾール [C₁₅H₂₀ClN₃O]、ピリミノバックメチル (E 体) [C₁₇H₁₉N₃O₆]、ピリミノバックメチル (Z 体) [C₁₇H₁₉N₃O₆]、フェノキサニル [C₁₅H₁₈Cl₂N₂O₂]、ペンシクロン [C₁₉H₂₁ClN₂O]、ベンゾフェナップ [C₂₂H₂₀Cl₂N₂O₃] 及びメプロニル

[C₁₇H₁₉NO₂] 各 25 mg を正確に量ってそれぞれ 50 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒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定量を混合し、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定量を、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 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 30 mL（粳米は 20 mL）を加え、30 分間静置後、更にアセトン 120 mL（粳米は 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同溶媒を加え、その液の一定量を 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)})

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 各物質のモニターイオン条件

農薬成分名	プリカーサー イオン (<i>m/z</i>)	プロダクト イオン (<i>m/z</i>)	確認 イオン (<i>m/z</i>)	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 5Z 異性体量を算出し、その含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、その含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
		1.0	3	90.3	0.8
		5.0	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
		1.0	3	98.4	2.8
	粳米	0.1	3	101	2.8
		0.5	3	94.0	4.4
		1.0	3	99.8	2.5
オリサストロビン 5Z異性体	稲わら	0.1	3	86.5	5.6
		1.0	3	92.2	5.7
		5.0	3	91.5	0.5
	稲発酵粗飼料	0.1	3	73.8	12
		0.5	3	99.7	4.9
		1.0	3	98.6	2.4
	粳米	0.1	3	94.5	16
		0.5	3	96.2	1.7
		1.0	3	100	0.5
クミルロン	稲わら	0.1	3	84.2	14
		1.0	3	93.9	1.7
		2.0	3	99.0	2.3
	稲発酵粗飼料	0.1	3	86.9	14
		0.5	3	92.2	2.3
		1.0	3	100	2.8
	粳米	0.1	3	91.3	0.8
		0.5	3	93.9	4.7
		1.0	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
		1.0	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
		1.0	3	95.8	2.1
	粳米	0.1	3	93.1	0.5
		0.5	3	98.1	3.7
		1.0	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
		1.0	3	92.4	2.0
	稲発酵粗飼料	0.1	3	100	4.8
		0.5	3	96.1	3.0
		1.0	3	94.1	2.5
	粳米	0.1	3	84.7	7.0
		0.5	3	94.0	5.7
		1.0	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
		1.0	3	94.4	1.6
	稲発酵粗飼料	0.1	3	97.8	13
		0.5	3	95.8	4.0
		1.0	3	99.2	2.3
	粳米	0.1	3	99.7	3.3
		0.5	3	96.8	8.6
		1.0	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
		1.0	3	90.1	1.6
	稲発酵粗飼料	0.1	3	109	5.6
		0.5	3	94.8	5.6
		1.0	3	93.4	6.5
	粳米	0.1	3	92.3	9.3
		0.5	3	100	6.3
		1.0	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
		1.0	3	90.5	4.7
	稲発酵粗飼料	0.05	3	105	2.6
		0.5	3	94.8	3.7
		1.0	3	98.4	1.2
	粳米	0.05	3	105	3.5
		0.5	3	93.8	4.4
		1.0	3	96.7	0.6

・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 (E体)	稲わら	0.1	3	87.8	13
		0.5	3	91.0	2.0
		1.0	3	90.8	1.5
	稲発酵粗飼料	0.1	3	101	8.8
		0.5	3	99.3	1.1
		1.0	3	99.5	1.3
	粳米	0.1	3	98.0	8.7
		0.5	3	100	3.0
		1.0	3	101	1.7
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
		1.0	3	93.8	2.9
	稲発酵粗飼料	0.1	3	90.8	10
		0.5	3	93.2	11
		1.0	3	98.7	2.4
	粳米	0.1	3	95.2	3.8
		0.5	3	98.6	5.4
		1.0	3	97.6	2.6
フェノキサニル	稲わら	0.1	3	109	14
		1.0	3	92.4	4.2
		30	3	94.3	1.9
	稲発酵粗飼料	0.1	3	109	7.2
		1.0	3	95.0	3.2
		3.0	3	104	1.9
	粳米	0.1	3	91.8	9.6
		1.0	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
		1.0	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
		1.0	3	82.8	2.8
	粳米	0.1	3	83.5	9.3
		1.0	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
		1.0	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
		1.0	3	88.4	7.6
	粳米	0.1	3	96.2	7.7
		0.5	3	93.5	5.9
		1.0	3	99.1	2.7

・ 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 (%)
メプロニル	稲わら	0.1	3	88.4	9.0
		1.0	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
		1.0	3	99.3	2.8
	粳米	0.1	3	92.8	2.4
		1.0	3	98.3	3.4
		7.0	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 (%)	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
	粳米	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
	粳米	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	5.9	0.41
	粳米	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
	粳米	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
	粳米	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
	粳米	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
	粳米	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
	粳米	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
	粳米	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
	粳米	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
	粳米	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
	粳米	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
	粳米	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
	粳米	10	0	2	96.5	3.5	4.9	0.34

・ 定量下限 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 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