22　カルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブ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　　カルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブ（3 成分）

(2)　適用範囲　　飼料

(3)　分析法

A　　試薬の調製

1)　カルバリル標準原液　　カルバリル〔$C_{12}H_{11}NO_2$〕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カルバリル標準原液を調製する（この液 1 mL は、カルバリルとして 0.5 mg を含有する。）。

2)　カルボフラン標準原液　　カルボフラン〔$C_{12}H_{15}NO_3$〕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カルボフラン標準原液を調製する（この液 1 mL は、カルボフランとして 0.5 mg を含有する。）。

3)　フェノブカルブ標準原液　　フェノブカルブ〔$C_{12}H_{17}NO_2$〕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フェノブカルブ標準原液を調製する（この液 1 mL は、フェノブカルブとして 0.5 mg を含有する。）。

4)　農薬混合標準液　　カルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブ標準原液の一部を混合し、アセトンで正確に希釈し、1 mL 中にカルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブとしてそれぞれ 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 中にカルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブとしてそれぞれ 0.04~600 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 2 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 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。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、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3]

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（650 L/h、350 °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（0.25 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）
カルバリル	202	145	－	22	12
		－	127	22	28
カルボフラン	222	165	－	24	12
		－	123	24	23
フェノブカルブ	208	95	－	24	16
		－	77	24	36

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）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（%）
カルバリル	肉用牛肥育用配合飼料	0.01	5	89.6	7.2
		0.1	5	96.9	2.5
	小麦	0.01	5	92.6	8.8
		2	5	92.9	4.0
	とうもろこし	0.01	5	96.0	10
		0.1	5	96.2	4.5
	マイロ	0.01	5	90.6	7.2
		10	5	96.4	1.1
	オーツヘイ	0.1	5	86.6	6.6
		250	5	103	1.1
カルボフラン	肉用牛肥育用配合飼料	0.01	5	93.2	6.6
		0.05	5	95.8	3.7
	小麦	0.01	5	95.1	6.5
		0.2	5	91.3	1.9
	とうもろこし	0.01	5	105	7.4
		0.05	5	94.0	1.2
	マイロ	0.01	5	97.8	4.3
		0.1	5	93.4	6.9
	オーツヘイ	0.1	5	92.8	5.0
		13	5	95.7	2.1
フェノブカルブ	肉用牛肥育用配合飼料	0.01	5	89.4	6.8
		0.3	5	95.0	1.3
	小麦	0.01	5	85.5	11
		0.3	5	91.8	2.7
	とうもろこし	0.01	5	92.9	7.3
		0.3	5	94.3	3.1
	マイロ	0.01	5	86.8	7.3
		0.3	5	95.6	2.2
	オーツヘイ	0.1	5	95.3	5.5
		10	5	99.1	2.6

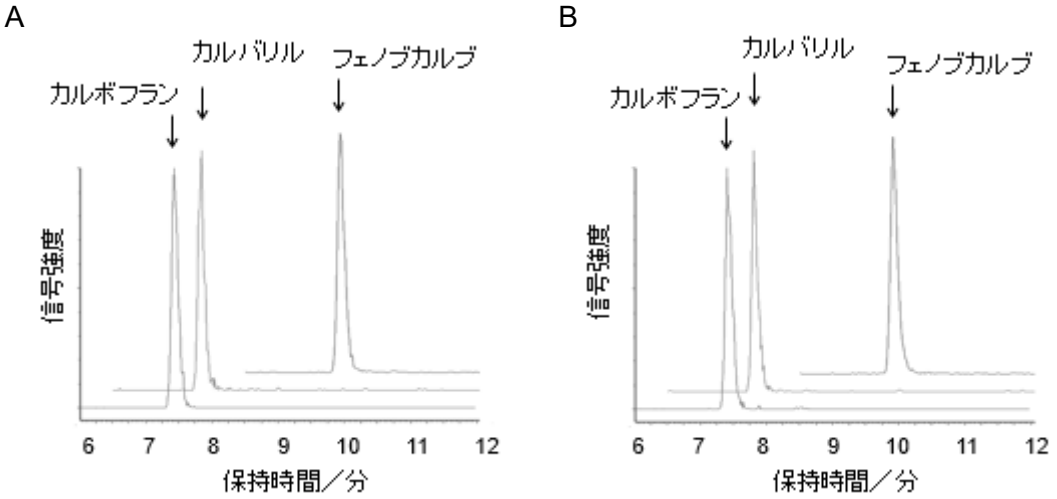
・共同試験

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
カルバリル	肉用牛肥育用配合飼料	11	0	0.1	99.4	7.2	15	0.68
	小麦	11	0	2	95.4	5.9	9.4	0.46
	とうもろこし	11	0	0.1	99.1	4.6	16	0.74
	マイロ	10	1	10	97.9	2.6	6.5	0.58
	オーツヘイ	11	0	10	94.9	5.3	11	0.96
カルボフラン	肉用牛肥育用配合飼料	11	0	0.1	96.5	3.1	7.5	0.34
	小麦	11	0	0.2	94.2	5.6	7.0	0.34
	とうもろこし	11	0	0.05	96.8	3.4	9.9	0.45
	マイロ	11	0	0.1	98.7	2.3	5.2	0.24
	オーツヘイ	11	0	10	94.0	2.2	6.1	0.54
フェノブカルブ	肉用牛肥育用配合飼料	11	0	0.3	94.9	4.7	5.6	0.29
	小麦	11	0	0.3	92.5	6.0	7.2	0.37
	とうもろこし	11	0	0.3	96.3	3.4	8.3	0.43
	マイロ	11	0	0.3	97.8	3.2	6.7	0.35
	オーツヘイ	11	0	10	95.4	2.8	7.0	0.61

・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（カルバリルとして 1 ng/mL、カルボフランとして 0.5 ng/mL、フェノブカルブとして 0.3 ng/mL）

B：添加試料（肉用牛肥育用配合飼料にカルバリルとして 0.1 mg/kg、カルボフランとして 0.05 mg/kg、フェノブカルブとして 0.3 mg/kg 相当量添加）

23　カルバリ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　　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、フルジオキソニル及びメトキシフェノジド

（8 成分）

(2)　適用範囲　　稲わら、稲発酵粗飼料及び籾米

(3)　分析法

A　試薬の調製

農薬混合標準液　　カルバリル〔$C_{12}H_{11}NO_2$〕、カルボフラン〔$C_{12}H_{15}NO_3$〕、チアクロプリド〔$C_{10}H_9ClN_4S$〕、テブフェノジド〔$C_{22}H_{28}N_2O_2$〕、フェノブカルブ〔$C_{12}H_{17}NO_2$〕、フラメトピル〔$C_{17}H_{20}ClN_3O_2$〕、フルジオキソニル〔$C_{12}H_6F_2N_2O_2$〕及びメトキシフェノジド〔$C_{22}H_{28}N_2O_3$〕各 25 mg を 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 2 mL（フルジオキソニルは 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 µg（フルジオキソニルは 50 µg）を含有する。）。

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 0.1~2 ng（フルジオキソニルは 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 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

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：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　各物質の測定条件

農薬名	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）
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
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
フェノブカルブ	+	208	95	－	28	13
			－	77	28	35
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

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　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（%）
カルバリル	稲わら	0.1	3	103	6.7
		0.2	3	101	0.8
		1	3	96.0	4.0
	稲発酵粗飼料	0.1	3	115	11
		0.2	3	97.7	8.2
		1	3	99.4	1.6
	籾米	0.1	3	106	9.3
		0.2	3	90.1	6.2
		1	3	99.0	0.7
カルボフラン	稲わら	0.1	3	89.4	11
		0.2	3	101	8.6
		1	3	89.0	2.5
	稲発酵粗飼料	0.1	3	92.1	16
		0.2	3	96.6	3.0
		1	3	96.7	1.8
	籾米	0.1	3	94.4	8.0
		0.2	3	82.5	9.1
		1	3	96.3	7.1
チアクロプリド	稲わら	0.1	3	107	11
		0.2	3	89.9	2.9
		1	3	88.0	1.7
	稲発酵粗飼料	0.1	3	99.1	6.9
		0.2	3	89.3	3.4
		1.0	3	94.2	0.4
	籾米	0.1	3	97.0	11
		0.2	3	89.5	4.0
		1	3	91.7	2.6
テブフェノジド	稲わら	0.1	3	102	12
		0.2	3	92.7	2.6
		1	3	89.2	1.0
	稲発酵粗飼料	0.1	3	97.3	1.6
		0.2	3	92.7	3.7
		1	3	94.2	1.9
	籾米	0.1	3	93.0	7.3
		0.2	3	88.8	2.4
		1	3	92.9	2.8
フェノブカルブ	稲わら	0.1	3	99.1	9.3
		0.2	3	103	6.4
		1	3	86.1	1.7
	稲発酵粗飼料	0.1	3	101	2.8
		0.2	3	96.3	6.9
		1	3	94.3	6.9
	籾米	0.1	3	92.3	13
		0.2	3	91.4	7.9
		1	3	94.4	3.6

・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 (%)
フラメトピル	稲わら	0.1	3	103	12
		0.2	3	104	9.8
		1	3	87.0	4.1
	稲発酵粗飼料	0.1	3	104	12
		0.2	3	103	11
		1	3	93.8	3.7
	籾米	0.1	3	111	5.7
		0.2	3	87.8	7.4
		1	3	93.7	3.0
フルジオキソニル	稲わら	0.05	3	104	7.6
		0.1	3	92.9	2.6
	稲発酵粗飼料	0.05	3	99.3	6.8
		0.1	3	92.0	1.7
	籾米	0.05	3	98.9	1.7
		0.1	3	95.9	2.7
メトキシフェノジド	稲わら	0.1	3	95.3	6.7
		0.2	3	92.5	6.3
		1	3	91.6	3.7
	稲発酵粗飼料	0.1	3	96.7	9.6
		0.2	3	77.1	7.7
		1	3	92.9	1.1
	籾米	0.1	3	89.8	0.7
		0.2	3	90.7	5.1
		1	3	93.2	0.4

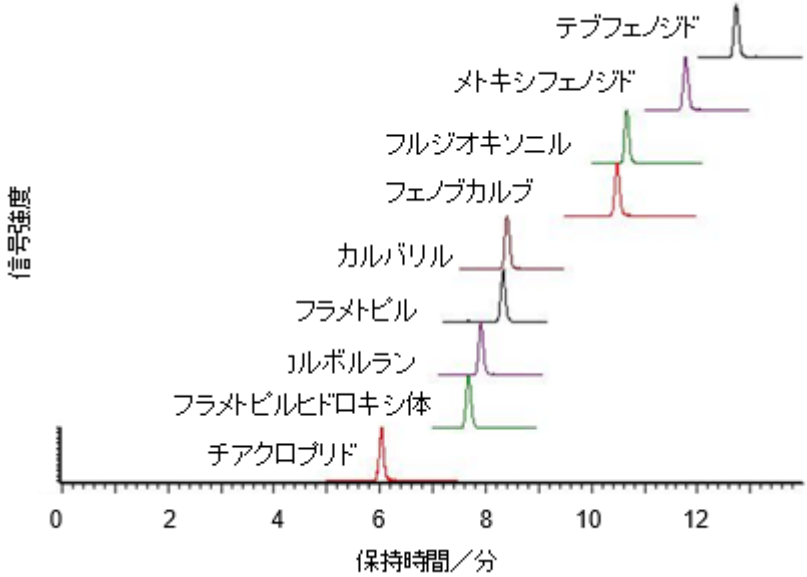
・共同試験

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
カルバリル	稲わら	12	0	1	97.6	4.4	7.7	0.48
	籾米	12	0	1	101	4.3	11	0.69
カルボフラン	稲わら	12	0	1	99.2	4.6	6.1	0.38
	籾米	12	0	1	102	3.8	7.8	0.49
チアクロプリド	稲わら	12	0	1	99.0	4.5	8.6	0.53
	籾米	11	1	1	103	2.8	5.2	0.33
テブフェノジド	稲わら	11	1	1	95.2	5.1	5.1	0.32
	籾米	12	0	1	102	5.1	6.1	0.39
フェノブカルブ	稲わら	12	0	1	99.3	5.5	10	0.65
	籾米	11	1	1	105	5.0	6.2	0.39
フラメトピル	稲わら	12	0	1	98.2	7.6	7.9	0.50
	籾米	12	0	1	100	4.5	9.5	0.60
フルジオキソニル	稲わら	12	0	0.1	100	9.8	12	0.55
	籾米	12	0	0.1	107	3.8	12	0.53
メトキシフェノジド	稲わら	12	0	1	97.3	5.0	7.8	0.49
	籾米	12	0	1	103	5.0	5.9	0.37

・定量下限（単一試験室による確認）　フルジオキソニル：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（単一試験室による確認）　フルジオキソニル：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（フルジオキソニルとして 10 ng/mL、その他農薬として 2 ng/mL）のクロマトグラム

24　グルホシネート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　　グルホシネート（*N*-アセチルグルホシネート[注1]を含む。）及び 3-メチルホスフィニコプロピオン酸（2 成分）

(2)　適用範囲　　穀類（小麦を除く。）、乾牧草及び稲わら

(3)　分析法

A　試薬の調製

1)　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。）。

2)　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。）。

3)　農薬混合標準原液　　使用に際して、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 を加えて、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、上澄み液を誘導体化に供する試料溶液とする。

誘導体化　試料溶液 2 mL（稲わらを除く乾牧草では、更に水で正確に 10 倍希釈した後、その液 2 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2]、この容器を密栓して 100 °C で 2 時間加熱[注3]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2]、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理[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5]の下にシリカゲルミニカラム（690 mg）[注6]を連結し、酢酸エチル 10 mL で洗浄する。

試料溶液 2 mL を連結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カラムの下に置き、アセトン 10 mL 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て 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 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2]、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2]、この容器を密栓して 100 °C で 2 時間加熱[注3]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。

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2]、更に 0.01 v/v%ギ酸溶液で正確に希釈し、1 mL 中にグルホシネート及び 3-メチルホスフィニコプロピオン酸としてそれぞれ 1~300 ng 相当量を含有する数点の検量線作成用標準液を調製する。

液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定　試料溶液及び各検量線作成用標準液各 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7]

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8]）

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それぞれ検量線を作成し、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　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。

2　必要に応じて超音波処理し、十分に拡散させる。

3　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。

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　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

6　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

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

8　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（%）
グルホシネート	大麦	0.5	3	77.3	7.8
		5	3	95.5	4.9
	とうもろこし	0.05	3	84.5	5.5
		0.1	3	99.3	19
	アルファルファヘイ	0.5	3	111	18
		1.5	3	87.9	10
		15	3	90.1	13
	稲わら	0.05	3	84.8	7.1
		0.5	3	76.8	5.0
3-メチルホスフィニコプロピオン酸	大麦	0.5	3	71.6	10
		5	3	87.1	8.3
	とうもろこし	0.05	3	79.9	0.9
		0.1	3	72.3	9.6
	アルファルファヘイ	0.5	3	93.4	4.5
		1.5	3	78.4	10
		15	3	78.6	3.2
	稲わら	0.05	3	90.8	8.8
		0.5	3	74.2	3.1
N-アセチルグルホシネート	大麦	0.5	3	99.0	5.7
		5	3	115	14
	とうもろこし	0.05	3	116	1.6
		0.1	3	87.7	19
	アルファルファヘイ	0.5	3	110	6.7
		1.5	3	97.5	4.5
		15	3	93.5	8.3
	稲わら	0.05	3	111	11
		0.5	3	94.9	2.3

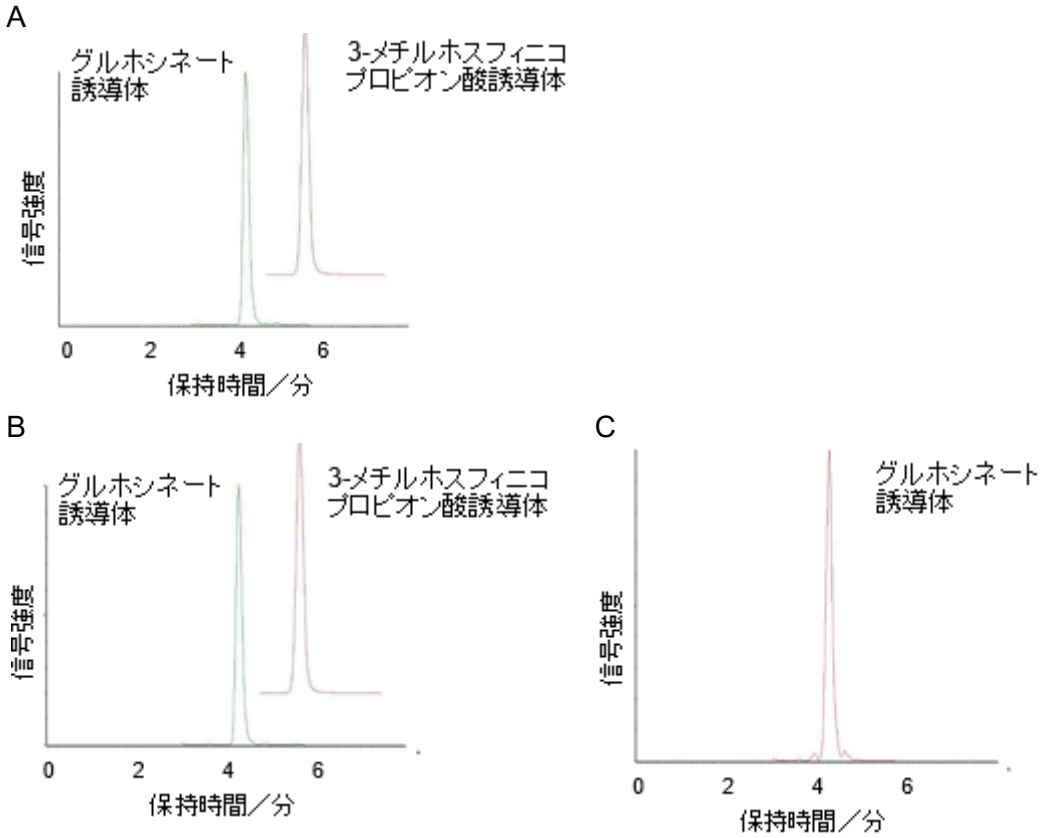
・共同試験

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
N-アセチルグルホシネート	大麦	8	0	5	110	3.1	10	0.77
	アルファルファヘイ	8	0	15	107	4.4	12	1.1
グルホシネート	大麦	8	0	5	101	6.7	8.2	0.66
	アルファルファヘイ	8	0	15	100	5.1	14	1.3
3-メチルホスフィニコプロピオン酸	大麦	8	0	5	91.4	8.1	12	0.97
	アルファルファヘイ	8	0	15	92.8	10	13	1.2

・定量下限（単一試験室による確認）　試料中　各 0.05 mg/kg（乾牧草各 0.5 mg/kg）

・検出下限（単一試験室による確認）　試料中　各 0.02 mg/kg（乾牧草各 0.2 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（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各 100 ng/mL）

B：添加試料（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各 5 mg/kg 相当量添加）

C：添加試料（大麦に *N*-アセチルグルホシネートとして 5 mg/kg 相当量添加）

25　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〔$C_7H_7Cl_3NO_3PS$〕20 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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〔$C_{11}H_{20}N_3O_3PS$〕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 1.0 g（0.95~1.04 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 10~20 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 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（0.45~0.54 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（4.5~5.5 g）、シリカゲル 5 g（4.5~5.5 g）及び硫酸ナトリウム（無水）5 g（4.5~5.5 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ン－ジエチルエーテル（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、更にヘキサン－ジエチルエーテル（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）[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：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

4　DB-1（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

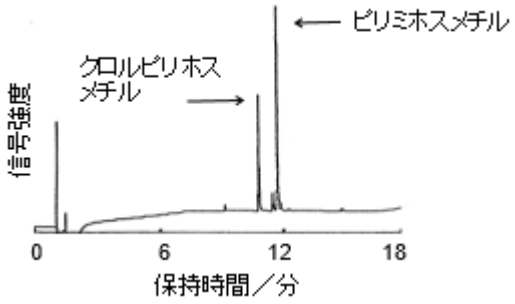
・添加回収率及び繰返し精度

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（%）
クロルピリホスメチル	ブロイラー肥育後期用配合飼料	0.25	3	92.1	3.7
		0.5	3	94.4	3.2
	肉豚肥育用配合飼料	0.25	3	94.1	4.4
		0.5	3	88.1	6.6
	肉用牛肥育用配合飼料	0.25	3	101	4.0
		0.5	3	87.1	2.0
ピリミホスメチル	ブロイラー肥育後期用配合飼料	0.25	3	97.0	0.7
		0.5	3	99.6	2.3
	肉豚肥育用配合飼料	0.25	3	107	2.4
		0.5	3	103	5.8
	肉用牛肥育用配合飼料	0.25	3	105	3.3
		0.5	3	100	3.7

・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
クロルピリホスメチル	ブロイラー肥育後期用配合飼料	6	0	0.25	89.8	3.5	4.0	0.20
ピリミホスメチル	ブロイラー肥育後期用配合飼料	6	0	0.25	102	4.4	6.9	0.35

（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 0.25 mg/kg 相当量添加）のクロマトグラム

26　酸化フェンブタス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　　酸化フェンブタスズ及びシヘキサチン（2 成分）

(2)　分析法

A　試薬の調製

1)　酸化フェンブタスズ及びシヘキサチン混合標準原液　　酸化フェンブタスズ〔$C_{60}H_{78}OSn_2$〕及びシヘキサチン〔$C_{18}H_{34}OSn$〕各 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、酢酸エチル－酢酸（99+1）を加えて溶かし、更に標線まで酢酸エチル－酢酸（99+1）を加えて酸化フェンブタス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、酸化フェンブタス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））[注1]を 130 °C で 16 時間乾燥する。

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、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）[注2]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、酸化フェンブタス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、酸化フェンブタスズ及びシヘキサチンをエチル化する。これに硫酸[注3]（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（9.5~10.5 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。

ヘキサン－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ス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　酸化フェンブタス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、この液の一部をヘキサンで正確に希釈し、1 mL 中に酸化フェンブタスズ及びシヘキサチンとしてそれぞれ 0.01~2 μg 相当量を含有する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）注 4
キャリヤーガス：He（2 mL/min）
メイクアップガス：N_2（30 mL/min）
燃料ガス：H_2（80 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（60 s）
試料導入部温度：250 °C
カラム槽温度：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　フロリジル（Floridin 製）又はこれと同等のもの
2　Chem Elut（Agilent Technologies 製）又はこれと同等のもの

3　有害金属測定用試薬又はこれと同等のもの

4　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

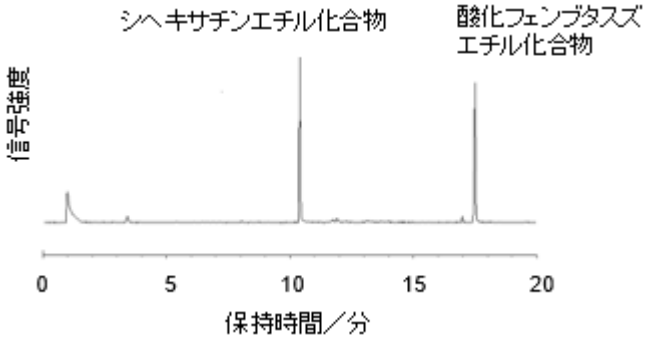
添加成分名	試料の種類	添加濃度（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
酸化フェンブタスズ	ブロイラー肥育後期用配合飼料	0.1	3	84.8	6.2
		0.5	3	87.8	14
		1	3	93.6	0.3
	子豚育成用配合飼料	0.1	3	80.0	16
		0.5	3	87.4	18
		1	3	89.0	12
	アルファルファヘイ	0.1	3	90.1	8.6
		0.5	3	96.0	3.3
		1	3	84.4	6.3
シヘキサチン	ブロイラー肥育後期用配合飼料	0.1	3	84.6	1.7
		0.5	3	87.1	4.8
		1	3	90.6	5.2
	子豚育成用配合飼料	0.1	3	92.7	8.3
		0.5	3	87.1	3.9
		1	3	87.2	5.8
	アルファルファヘイ	0.1	3	89.6	6.2
		0.5	3	85.7	3.3
		1	3	88.1	8.8

・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
酸化フェンブタスズ	成鶏飼育用配合飼料	7	0	0.5	95.3	5.2	8.3	0.47
シヘキサチン	成鶏飼育用配合飼料	7	0	0.5	78.7	5.6	14	0.78

・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



添加試料（子豚育成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

27　シアナジン及びミ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　　シアナジン及びミクロブタニル（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〔$C_9H_{13}ClN_6$〕50 mg を 0.01 mg の桁まで量

り、その数値を記録し、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。）。

2) ミクロブタニル標準原液　　ミクロブタニル〔$C_{15}H_{17}ClN_4$〕50 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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、更に標線までアセトン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部を混合し、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 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（4.5~5.4 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）[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（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、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、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 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
分 取 画 分：80~120 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（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）[注3]
キャリヤーガス：He（2.5 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：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。

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　DB-5（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（%）
シアナジン	鶏用配合飼料	0.05	3	109	4.4
		0.5	3	98.8	9.6
	牛用配合飼料	0.05	3	122	4.5
		0.5	3	114	5.4
	大麦	0.05	3	104	4.9
		0.5	3	96.1	1.2
	とうもろこし	0.05	3	106	3.6
		0.5	3	105	1.5
ミクロブタニル	鶏用配合飼料	0.05	3	92.8	4.5
		0.5	3	88.7	2.6
	牛用配合飼料	0.05	3	99.4	7.2
		0.5	3	100	5.2
	大麦	0.05	3	91.0	4.8
		0.5	3	85.0	1.2
	とうもろこし	0.05	3	92.6	4.7
		0.5	3	89.7	2.3

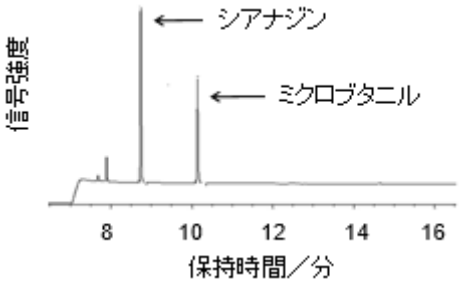
・共同試験

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
シアナジン	ブロイラー肥育前期用配合飼料	7	0	0.2	93.4	5.0	14	0.68
	とうもろこし	7	0	0.2	94.1	6.9	7.9	0.38
ミクロブタニル	ブロイラー肥育前期用配合飼料	7	0	0.2	89.1	5.3	10	0.48
	とうもろこし	7	0	0.2	91.1	5.2	15	0.72

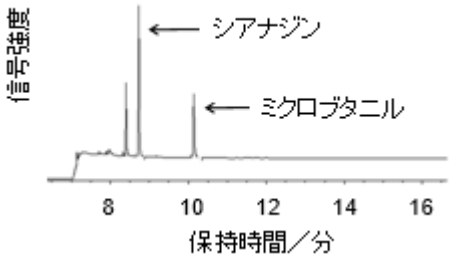
・定量下限（単一試験室による確認）　シアナジン:：試料中　0.01 mg/kg、ミクロブタニル：試料中　0.02 mg/kg

（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

A：標準液（各農薬として 2 ng 注入）

B：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 0.5 mg/kg 相当量添加）

28　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〔$C_{14}H_9Cl_5O$〕50 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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〔$C_{13}H_{16}F_3N_3O_4$〕50 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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 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 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、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、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 °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 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：60~110 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）[注1] 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、ヘキサン－ジエチルエーテル（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 °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 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm）[注2]

キャリヤーガス：He（2.5 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：200 °C

検 出 部 温 度：300 °C

カ ラ ム 槽 温 度：70 °C（2 min 保持）→昇温 20 °C/min→280 °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。

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のもの

2　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

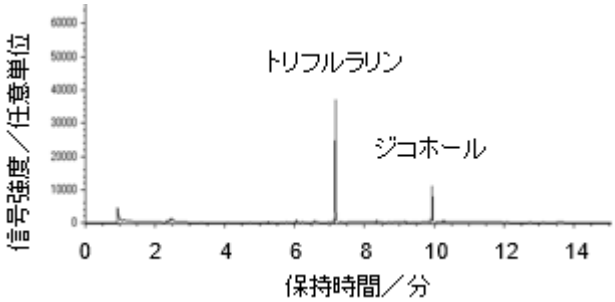
添加成分名	試料の種類	添加濃度（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
ジコホール	鶏用配合飼料	0.1	3	94.8	11
		0.5	3	88.5	4.4
	豚用配合飼料	0.1	3	98.9	2.0
		0.5	3	89.8	3.8
	アルファルファ	0.1	3	94.3	8.2
		0.5	3	89.0	3.6
	チモシー	0.1	3	90.4	11
		0.5	3	85.7	1.9
トリフルラリン	鶏用配合飼料	0.1	3	95.4	10
		0.5	3	90.7	4.4
	豚用配合飼料	0.1	3	107	4.7
		0.5	3	91.9	5.2
	アルファルファ	0.1	3	101	8.8
		0.5	3	91.6	1.7
	チモシー	0.1	3	90.1	8.7
		0.5	3	87.6	2.0

・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
ジコホール	肉豚肥育用配合飼料	5	0	0.2	88.2	5.6	10	0.49
	マイロ	5	0	0.2	89.9	6.5	13	0.60
トリフルラリン	肉豚肥育用配合飼料	5	0	0.2	98.6	5.5	6.6	0.32
	マイロ	5	0	0.2	99.7	5.9	8.5	0.42

・定量下限（単一試験室による確認）　　試料中　各 0.01 mg/kg

（参考）クロマトグラム例



添加試料（ブロイラー肥育後期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

29　シハロホップブチル及びベンフレセート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　　シハロホップブチル及びベンフレセート（2 成分）

(2)　適用範囲　　稲発酵粗飼料

(3)　分析法

A　　試薬の調製

1)　シハロホップブチル標準原液　　シハロホップブチル〔$C_{20}H_{20}FNO_4$〕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ハロホップブチル標準原液を調製する（この液 1 mL は、シハロホップブチルとして 0.5 mg を含有する。）。

2) ベンフレセート標準原液　　ベンフレセート〔$C_{12}H_{16}O_4S$〕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ベンフレセート標準原液を調製する（この液 1 mL は、ベンフレセートとして 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、アセトンを加えて、1 mL 中にシハロホップブチル及びベンフレセートとしてそれぞれ 50 µg を含有する農薬混合標準原液を調製する。この標準原液を水－メタノール（1+1）で正確に希釈し、1 mL 中にシハロホップブチル及びベンフレセートとしてそれぞれ 1~200 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 を加え、30 分間静置後、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 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 0.5 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 4 mL で洗浄し、洗液をカラムに加えた後、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ヘキサン 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シハロホップブチル及びベンフレセートを溶出させる。更にヘキサン 90 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。酢酸エチル 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。

カラム処理 II [注2]　　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]を酢酸エチル 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シハロホップブチル及びベンフレセートを流出させる。試料溶液の入っていたなす形フラスコを酢酸エチル 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。更に酢酸エチル 4 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（1+1）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 10 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 3 μm）[注4]

溶離液：0.1 v/v%ギ酸溶液－0.1 v/v%ギ酸メタノール溶液（4+6）（1 min 保持）→ 12 min →（1+99）（15 min 保持）

流速：0.1 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：大気圧化学イオン化（APCI）法（正イオンモード）

ネブライザーガス：空気（4.4 L/min）

乾燥ガス：N_2（20 L/min）

インターフェース温度：350 °C

ヒートブロック温度：300 °C

DL 温度：300 °C

コリジョンガス：Ar（230 kPa）

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*）	コリジョンエネルギー（eV）
シハロホップブチル	358	256	－	11
		－	120	28
ベンフレセート	257	163	－	11
		－	121	22

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、試料中のシハロホップブチル量及びベンフレセート量を算出する。

注 1　InertSep K-solute（ジーエルサイエンス製）又はこれと同等のもの

2　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。

3　Supelclean ENVI-Carb/LC-NH_2（Sigma-Aldrich 製）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 LCMS-8040（島津製作所製）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 (%)
シハロホップブチル	稲発酵粗飼料1	0.009	5	93.2	7.7
		0.1	5	87.0	11
	稲発酵粗飼料2	0.009	5	85.3	14
		0.1	5	91.0	5.4
ベンフレセート	稲発酵粗飼料1	0.009	5	86.0	6.4
		0.2	5	89.0	11
	稲発酵粗飼料2	0.009	5	91.1	12
		0.2	5	101	2.7

・共同試験

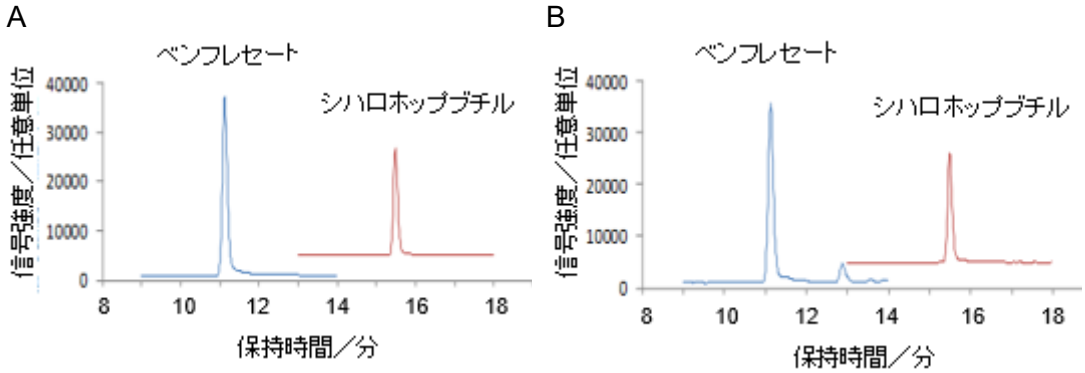
成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度注 (mg/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD_r (%)	室間再現精度 RSD_R (%)	HorRat
シハロホップブチル	稲発酵粗飼料 1	11	0	0.045	97.0	4.8	32	1.5
	稲発酵粗飼料 2	11	0	0.225	92.7	2.7	22	1.1
ベンフレセート	稲発酵粗飼料 1	11	0	0.045	94.7	3.7	10	0.45
	稲発酵粗飼料 2	11	0	0.45	96.1	2.6	8.1	0.45

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（風乾物）中　各 0.02 mg/kg

・検出下限（単一試験室による確認）　シハロホップブチル：試料（風乾物）中 0.0005 mg/kg、ベンフレセート：試料（風乾物）中　0.006 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（シハロホップブチルとして 50 ng/mL、ベンフレセートとして 100 ng/mL）

B：添加試料（稲発酵粗飼料にシハロホップブチルとして 0.2 mg/kg、ベンフレセートとして 0.4 mg/kg 相当量添加）

30　シハロホップブチル及びベンフレセート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　　シハロホップブチル及びベンフレセート（2 成分）

(2) 適用範囲　稲わら及び籾米

(3) 分析法

A　試薬の調製

1) シハロホップブチル標準原液　シハロホップブチル〔$C_{20}H_{20}FNO_4$〕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ハロホップブチル標準原液を調製する（この液 1 mL は、シハロホップブチルとして 0.5 mg を含有する。）。

2) ベンフレセート標準原液　ベンフレセート〔$C_{12}H_{16}O_4S$〕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ベンフレセート標準原液を調製する（この液 1 mL は、ベンフレセートとして 0.5 mg を含有する。）。

3) 農薬混合標準液　使用に際して、シハロホップブチル標準原液及びベンフレセート標準原液の一部を混合し、希釈溶媒で正確に希釈し、1 mL 中にシハロホップブチル及びベンフレセートとしてそれぞれ 0.005~0.5 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 をアセトン 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 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（稲わらは 30 mL）を加え、30 分間静置後、更にアセトン 100 mL（稲わらは 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 40 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 4 mL（稲わらは約 6 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、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ヘキサン 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。更にヘキサン 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－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、シハロホップブチル及びベンフレセートが溶出する画分を 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。ヘキサン 2 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。

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：60~115 mL

カラム処理 III[注2]　エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）[注3]の下に合成ケイ酸マグネシウムミニカラム（910 mg）[注4]を連結し、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 8 mL で洗浄し、洗液をミニカラムに加え、同様に流出させる。更にヘキサン－アセトン（99+1）10 mL で試料溶液の入っていたなす形フラスコを洗浄し、洗液をミニカラムに加え、同様に流出させる。

次に、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムをはずし、50 mL のなす形フラスコを合成ケイ酸マグネシウムミニカラムの下に置き、ヘキサン－アセトン（19+1）20 mL を合成ケイ酸マグネシウムミニカラムに加えて、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。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 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（溶融石英ガードカラム（内径 0.25 mm、長さ 10 m）付き））[注5]

キャリヤーガス：He（1.0 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：80 °C（1 min 保持）→昇温 20 °C/min→280 °C（10 min 保持）

（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：電子イオン化（EI）法

インターフェース温度：280 °C

イ　オ　ン　源　温　度：230 °C

イ　オ　ン　化　電　圧：70 eV

モ　ニ　タ　ー　イ　オ　ン：定量イオン *m/z* 357（シハロホップブチル）、256（ベンフレセート）、確認イオン *m/z* 256（シハロホップブチル）、163（ベンフレセート）

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又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のシハロホップブチル量及びベンフレセート量を算出する。

注 1　InertSep K-solute（ジーエルサイエンス製）又はこれと同等のもの

2　流速は 1~2mL/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。

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

4　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

5　DB-5ms DG（Agilent Technologies 製）又はこれと同等のもの

6　Agilent 5975C inert XL MSD（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 (%)
シハロホップブチル	稲わら	0.02	3	109	4.6
		0.3	3	93.5	10
		2	3	77.4	10
	籾米	0.02	3	80.6	5.8
		0.2	3	89.9	18
		2	3	74.2	13
ベンフレセート	稲わら	0.02	3	119	1.7
		0.3	3	102	4.9
		2	3	99.5	4.6
	籾米	0.01	3	102	1.7
		0.02	3	116	4.1
		0.2	3	113	4.1
		2	3	92.6	4.2

・共同試験

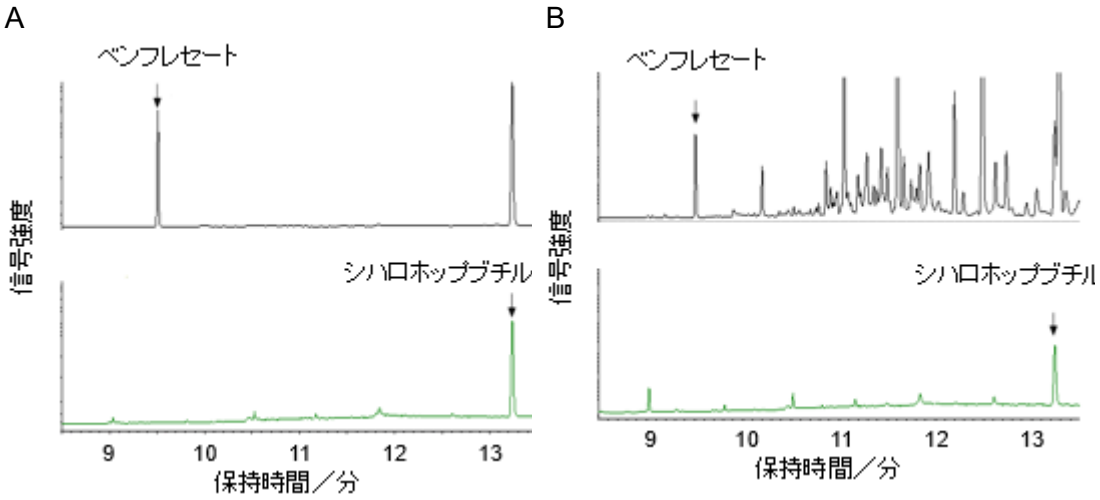
成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度（mg/kg）	添加回収率（%）	室内繰返し精度 RSD_r（%）	室間再現精度 RSD_R（%）	HorRat
シハロホップブチル	稲わら	9	0	2	77.9	9.4	27	1.8
	籾米	9	0	0.2	80.2	8.2	29	1.4
ベンフレセート	稲わら	9	0	0.3	96.3	5.5	15	0.80
	籾米	9	0	0.03	103	6.8	21	0.96

・定量下限（単一試験室による確認）　シハロホップブチル：試料中　0.02 mg/kg、ベンフレセート：稲わら中　0.02 mg/kg、籾米中　0.01 mg/kg

・検出下限（単一試験室による確認）　シハロホップブチル：試料中　0.002

mg/kg、ベンフレセート：試料中　0.0003 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 20 ng/mL）

B：添加試料（稲わらに各農薬として 0.02 mg/kg 相当量添加）

31　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〔$C_{16}H_{22}ClN_3O$〕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〔$C_{17}H_{12}Cl_2N_2O$〕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部を混合し、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 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）[注1]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、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、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 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

分 取 画 分：70~125 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 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（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）[注3]

キャリヤーガス：He（1.0 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：70 °C（2 min 保持）→昇温 20 °C/min→280 °C（10 min 保持）

（質量分析計部[注4]）

検出器：四重極型質量分析計

インターフェース温度：280 °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：*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5]及びフェナリモル量を算出する。

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　HP-5ms（Agilent Technologies 製）又はこれと同等のもの

4　GCMS-QP2010（島津製作所製）による条件例

5　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 141.3 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（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
テブコナゾール	ブロイラー肥育後期用配合飼料	0.05	3	86.6	4.7
		0.5	3	91.9	9.8
	若令牛育成用配合飼料	0.05	3	101	11
		0.5	3	99.5	6.0
	とうもろこし	0.05	3	90.1	9.6
		0.5	3	91.9	11
	ライグラス	0.05	3	87.1	4.7
		0.5	3	85.4	4.2
フェナリモル	ブロイラー肥育後期用配合飼料	0.05	3	95.3	4.2
		0.5	3	98.6	9.0
	若令牛育成用配合飼料	0.05	3	100	1.0
		0.5	3	102	5.1
	とうもろこし	0.05	3	96.9	1.2
		0.5	3	101	4.6
	ライグラス	0.05	3	97.9	2.3
		0.5	3	97.6	3.6

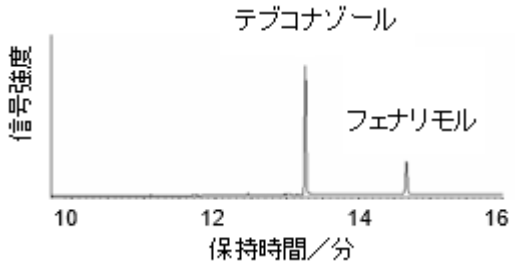
・共同試験

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
テブコナゾール	ブロイラー肥育後期用配合飼料	5	0	0.2	89.1	2.1	9.3	0.45
	大麦	5	0	0.2	91.0	6.3	12	0.56
フェナリモル	ブロイラー肥育後期用配合飼料	5	0	0.2	92.7	5.4	6.0	0.29
	大麦	5	0	0.2	90.9	7.3	10	0.49

・定量下限（単一試験室による確認）　テブコナゾール：試料中　0.005 mg/kg、フェナリモル：試料中　0.01 mg/kg

・定量上限（単一試験室による確認）　テブコナゾール：試料中　5 mg/kg

（参考）クロマトグラム例



標準液（各農薬として 2 ng 注入）のクロマトグラム

32　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〔$C_{25}H_{22}ClNO_3$〕10 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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、更に標線までヘキサン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〔$C_{21}H_{20}Cl_2O_3$〕10 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、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、更に標線までヘキサン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部を混合し、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））[注1]を 130 °C で 5 時間乾燥する。

B　定　量

抽　出　分析試料 5~10 g を有効数字 4 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（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（9.5~10.5 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、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、ヘキサン－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）[注2] 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3] 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。50 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3] 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）[注4]

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：スプリットレス（60 s）

試料導入部温度：260 °C

カラム槽温度：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　フロリジル（Floridin 製）又はこれと同等のもの

2　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

3　流速は 1~2 mL/min とする。

4　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

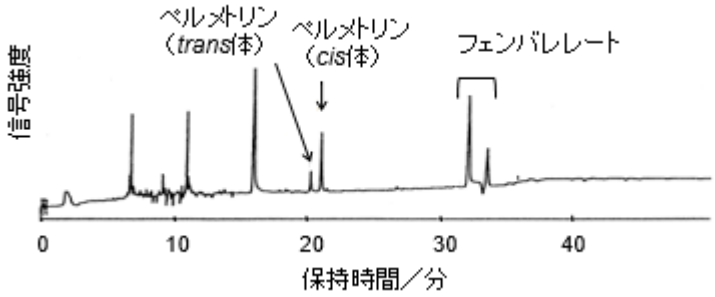
添加成分名	試料の種類	添加濃度（mg/kg）	繰返し	添加回収率（%）	繰返し精度 RSD_r（%）
フェンバレレート	成鶏飼育用配合飼料	0.05	3	106	8.7
		0.1	3	99.7	6.6
		0.25	3	106	9.6
		0.5	3	91.7	3.6
	とうもろこし	0.05	3	106	13
		0.1	3	105	6.9
		0.25	3	97.2	11
		0.5	3	88.4	5.1
	アルファルファ	0.05	3	119	2.0
		0.1	3	96.6	7.9
		0.25	3	105	5.2
		0.5	3	91.2	2.8
ペルメトリン	成鶏飼育用配合飼料	0.05	3	100	17
		0.1	3	95.8	3.5
		0.25	3	100	8.2
		0.5	3	89.1	3.4
	とうもろこし	0.05	3	101	9.9
		0.1	3	95.4	1.7
		0.25	3	95.6	10
		0.5	3	86.2	2.7
	アルファルファ	0.05	3	114	3.1
		0.1	3	105	6.0
		0.25	3	108	1.2
		0.5	3	95.3	1.7

・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
フェンバレレート	ブロイラー後期用配合飼料	6	0	0.25	95.3	8.1	10	0.51
ペルメトリン	ブロイラー後期用配合飼料	6	0	0.25	97.0	6.8	7.8	0.40

・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 0.25 mg/kg 相当量添加）のクロマトグラム

33　ベンスルフロンメチ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　　アジムスルフロン、イマゾスルフロン、エトキシスルフロン、シクロスルファムロン、ハロスルフロンメチル、フルセトスルフロン及びベンスルフロンメチル（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　　アジムスルフロン〔$C_{13}H_{16}N_{10}O_5S$〕、イマゾスルフロン〔$C_{14}H_{13}ClN_6O_5S$〕、エトキシスルフロン〔$C_{15}H_{18}N_4O_7S$〕、シクロスルファムロン〔$C_{17}H_{19}N_5O_6S$〕、ハロスルフロンメチル〔$C_{13}H_{15}ClN_6O_7S$〕、フルセトスルフロン〔$C_{18}H_{22}FN_5O_8S$〕及びベンスルフロンメチル〔$C_{16}H_{18}N_4O_7S$〕各 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各農薬標準原液を調製する（これらの液 1 mL は、各農薬として 0.5 mg を含有する。）。

各農薬標準原液各 1 mL を 25 mL の全量フラスコに正確に入れて混合し、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 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アセトニトリル－水（1+1）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、300 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 30 mL を加え、30 分間静置後、更にアセトン 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 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　　試料溶液に 0.1 mol/L 塩酸 2.5 mL を加え軽く振り混ぜた後、多孔性ケイソウ土カラム（5 mL 保持用）[注1]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ヘキサン－酢酸エチル（3+1）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た後、更にヘキサン－酢酸エチル（3+1）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－水－ギ酸（50+50+1）10 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ミニカラム（500 mg）[注2]をアセトニトリ

ル 5 mL 及び 1 v/v%ギ酸溶液 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[注3]。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－ギ酸（99+1）5 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液をミニカラムに加え、同様に流出させる[注3]。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－トルエン－ギ酸（75+25+1）30 mL をミニカラムに加えて各農薬を溶出させる[注3]。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－水（1+1）5 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 0.20 µm 以下）でろ過し、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。また、試料が稲わら及び稲発酵粗飼料である場合は、更に試料溶液の一定量をアセトニトリル－水（1+1）で正確に 5 倍希釈したものも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し、アジムスルフロン、イマゾスルフロン、エトキシスルフロン、ハロスルフロンメチル及びフルセトスルフロンの定量に用いる。

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 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 2.0 mm、長さ 150 mm、粒径 5 µm）[注4]

溶離液：2 mol/L 酢酸アンモニウム溶液－メタノール（9+1）→ 5 min →（1+1）（15 min 保持）→（1+9）（15 min 保持）→ 5 min →（9+1）（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、400 °C）

キャピラリー電圧：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)
アジムスルフロン	425	182	−	25	15
		−	156	25	36
イマゾスルフロン	413	153	−	22	10
		−	258	22	23
エトキシスルフロン	399	261	−	27	14
		−	218	27	24
シクロスルファムロン	422	261	−	25	16
		−	218	25	27
ハロスルフロンメチル	435	182	−	27	20
		−	83	27	52
フルセトスルフロン	488	156	−	32	17
		−	273	32	23
ベンスルフロンメチル	411	149	−	28	21
		−	91	28	58

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

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

3　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。

4　Mightysil RP-18 GP（関東化学製）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（%）
アジムスルフロン	稲わら	0.04	5	87.2	5.7
		0.5	5	96.0	7.0
	稲発酵粗飼料	0.02	5	84.1	3.7
		0.2	5	94.4	8.4
	籾米	0.01	5	77.4	2.0
		0.2	5	84.7	4.0
イマゾスルフロン	稲わら	0.04	5	78.8	15
		0.5	5	82.5	5.8
	稲発酵粗飼料	0.02	5	75.3	2.8
		0.2	5	75.2	7.3
	籾米	0.01	5	71.8	7.2
		0.2	5	74.5	9.0
エトキシスルフロン	稲わら	0.04	5	77.5	4.7
		0.5	5	90.0	2.5
	稲発酵粗飼料	0.02	5	70.7	1.4
		0.2	5	76.9	3.8
	籾米	0.01	5	85.3	8.8
		0.2	5	91.2	3.9
シクロスルファムロン	稲わら	0.04	5	89.7	3.4
		0.5	5	109	2.0
	稲発酵粗飼料	0.02	5	116	1.4
		0.2	5	118	1.7
	籾米	0.01	5	88.8	7.1
		0.2	5	99.5	1.4
ハロスルフロンメチル	稲わら	0.04	5	82.8	7.7
		0.5	5	80.6	5.1
	稲発酵粗飼料	0.02	5	71.4	5.0
		0.2	5	75.4	8.9
	籾米	0.01	5	77.2	4.2
		0.2	5	87.9	11
フルセトスルフロン	稲わら	0.04	5	85.7	5.8
		0.5	5	84.9	5.4
	稲発酵粗飼料	0.02	5	72.6	6.4
		0.2	5	75.8	6.0
	籾米	0.01	5	87.4	18
		0.2	5	85.1	6.9
ベンスルフロンメチル	稲わら	0.04	5	91.7	1.9
		0.5	5	116	3.2
	稲発酵粗飼料	0.02	5	120	1.4
		0.2	5	119	1.5
	籾米	0.01	5	91.9	5.3
		0.2	5	95.9	1.4

・共同試験

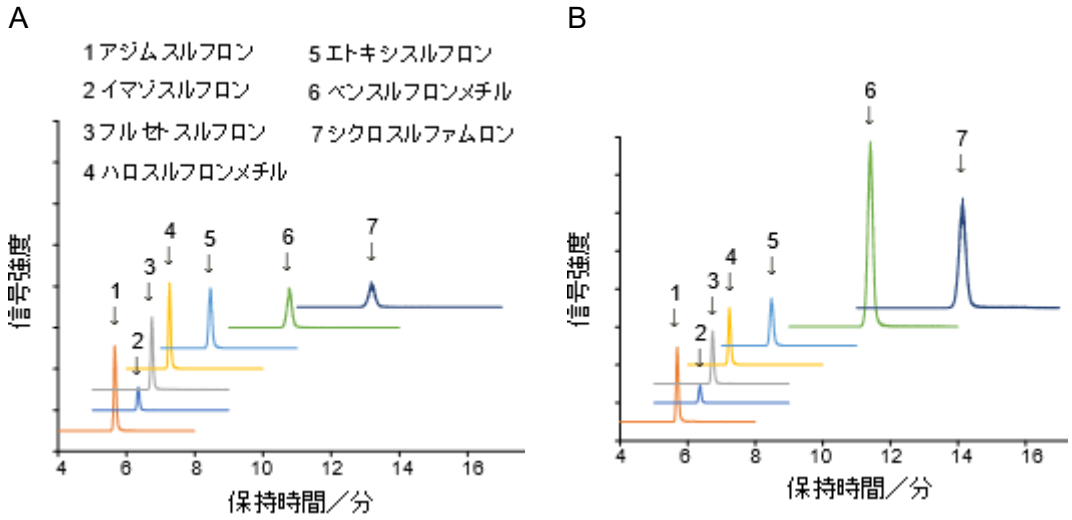
成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (mg/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD_r (%)	室間再現精度 RSD_R (%)	HorRat
アジムスルフロン	稲わら 1	10	0	0.08	79.0	4.4	11	0.52
	稲わら 2	9	1	0.2	84.1	6.0	8.7	0.41
	稲発酵粗飼料 1	10	0	0.1注	81.7	5.5	8.4	0.38
	稲発酵粗飼料 2	10	0	0.4注	85.9	5.5	7.4	0.39
	籾米1	10	0	0.04	78.8	6.7	10	0.46
	籾米2	10	0	0.5	85.2	8.5	9.4	0.52
イマゾスルフロン	稲わら 1	10	0	0.08	75.7	6.6	11	0.51
	稲わら 2	9	1	0.2	77.3	8.5	9.3	0.44
	稲発酵粗飼料 1	10	0	0.1注	77.7	8.8	11	0.51
	稲発酵粗飼料 2	10	0	0.4注	82.3	7.8	8.6	0.45
	籾米1	10	0	0.04	77.8	7.5	14	0.62
	籾米2	10	0	0.5	78.0	7.7	12	0.65
エトキシスルフロン	稲わら 1	10	0	0.08	75.1	4.1	17	0.79
	稲わら 2	9	1	0.2	82.2	6.4	15	0.70
	稲発酵粗飼料 1	10	0	0.1注	76.0	6.4	16	0.72
	稲発酵粗飼料 2	9	1	0.4注	87.1	2.5	12	0.65
	籾米1	10	0	0.04	78.8	7.0	19	0.88
	籾米2	9	1	0.5	84.4	3.0	9.4	0.52
シクロスルファムロン	稲わら 1	10	0	0.02	85.2	4.0	15	0.68
	稲わら 2	9	1	0.1	86.3	5.6	13	0.59
	稲発酵粗飼料 1	10	0	0.06注	84.9	3.9	14	0.63
	稲発酵粗飼料 2	10	0	0.4注	87.5	5.6	15	0.81
	籾米1	10	0	0.04	89.7	5.0	13	0.58
	籾米2	10	0	0.5	91.6	4.2	12	0.66
ハロスルフロンメチル	稲わら 1	10	0	0.08	69.7	4.5	16	0.73
	稲わら 2	9	1	0.2	75.5	5.7	14	0.66
	稲発酵粗飼料 1	9	1	0.1注	72.0	3.3	13	0.60
	稲発酵粗飼料 2	10	0	0.4注	82.0	5.4	13	0.69
	籾米1	10	0	0.04	63.4	5.5	19	0.86
	籾米2	9	1	0.5	79.2	4.6	10	0.54
フルセトスルフロン	稲わら 1	10	0	0.08	73.8	4.4	14	0.63
	稲わら 2	9	1	0.2	81.6	6.1	8.9	0.42
	稲発酵粗飼料 1	9	1	0.1注	78.0	2.8	11	0.52
	稲発酵粗飼料 2	10	0	0.4注	87.2	5.0	7.9	0.42
	籾米1	10	0	0.04	81.2	6.7	16	0.71
	籾米2	10	0	0.5	86.1	5.9	11	0.60
ベンスルフロンメチル	稲わら 1	10	0	0.02	91.2	3.4	11	0.51
	稲わら 2	9	1	0.1	90.9	5.2	10	0.47
	稲発酵粗飼料 1	8	2	0.06注	93.9	2.1	4.5	0.21
	稲発酵粗飼料 2	10	0	0.4注	93.4	5.3	11	0.58
	籾米1	10	0	0.04	94.9	5.0	11	0.51
	籾米2	10	0	0.5	97.3	2.7	11	0.59

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）　　ベンスルフロンメチル及びシクロスルファムロン：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、その他：稲わら及び稲発酵粗飼料中　各 0.04 mg/kg、籾米中　0.01 mg/kg

・検出下限（単一試験室による確認）　　ベンスルフロンメチル及びシクロスルファムロン：試料中　各 0.003 mg/kg、その他：稲わら及び稲発酵粗飼料中　各 0.006 mg/kg、籾米中　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（各農薬として 10 ng/mL）

B：添加試料（稲わらに各農薬として 0.5 mg/kg 相当量添加）

34　ジクワット及びパラコート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　　ジクワット及びパラコート（2 成分）

(2)　適用範囲　　配合飼料及び穀類

(3)　分析法[注1]

A　　試薬の調製

1)　ジクワット標準原液　　ジクワット〔$C_{12}H_{12}N_2Br_2$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL のポリプロピレン製全量フラスコに入れ、塩酸（0.01 mol/L）を加えて溶かし、更に標線まで塩酸（0.01 mol/L）を加えてジクワット標準原液を調製する（この液 1 mL は、ジクワットして 0.5 mg を含有する。）。

2)　パラコート標準原液　　パラコート〔$C_{12}H_{14}N_2Cl_2$〕25 mg を 0.01 mg の桁まで量り、その数値を記録し、50 mL のポリプロピレン製全量フラスコに入れ、塩酸（0.01 mol/L）を加えて溶かし、更に標線まで塩酸（0.01 mol/L）を加えてパラコート標準原液を調製する（この液 1 mL は、パラコートとして 0.5 mg を含有する。）。

3)　混合標準液　　ジクワット標準原液及びパラコート標準原液各 1 mL を 25 mL のポリプロピレン製全量フラスコに正確に入れて混合し、更に標線まで塩酸（0.01 mol/L）を加えて混合標準原液を調製する（この液 1 mL は、ジクワット及びパラコートとしてそれぞれ 20 μg を含有する。）。

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 のなす形フラスコに入れ、水 60 mL 及び硫酸 30 mL を加え、空冷管を付け 120 °C

の油浴で60分間加熱還流して抽出する。200 mLの全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き、放冷後の抽出液をろ紙（5種B）で吸引ろ過した後、先のなす形フラスコ及び残さを順次水100 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水を加える。この液2 mLをポリプロピレン製ビーカーに正確に入れ、水30 mLを加え、水酸化ナトリウム溶液（12 mol/L）でpH 5.5~6.5に調整した後、50 mL程度となるように水を加え、カラム処理Iに供する試料溶液とする。

カラム処理I[注2]　4級アンモニウム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[注3]及び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[注4]をそれぞれメタノール5 mL及び水5 mLで順次洗浄する。4級アンモニウム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を連結し、試料溶液を連結ミニカラムに入れ、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ポリプロピレン製ビーカーを水5 mLずつで2回洗浄し、洗液を順次連結ミニカラムに加え、同様に流出させる。4級アンモニウム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をはずし、10 mLポリプロピレン製全量フラスコを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の下に置き、塩化アンモニウム溶液（25 w/v%）9 mLを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に加え、ジクワット及びパラコートを溶出させる。更に標線まで塩化アンモニウム溶液（25 w/v%）を加え、酸化処理に供する試料溶液とする。

酸化処理　試料溶液2 mLをあらかじめ水酸化ナトリウム溶液（12 mol/L）10 mL及びフェリシアン化カリウム溶液（1 w/v%）1 mLを入れ混合したポリプロピレン製ビーカーに正確に加えて均一になるよう振り混ぜ、カラム処理IIに供する試料溶液とする。

カラム処理II[注2]　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を[注5]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。試料溶液の入っていたポリプロピレン製ビーカーを水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。50 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5 mLをミニカラムに加えてジクワット及びパラコートを溶出させる。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。水－メタノール（4+1）1 mL（麦類を除く穀類は2 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0.45 µm以下）を用いてろ過し、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。

標準液の酸化処理及びカラム処理II　混合標準原液1 mLを20 mLのポリプロピレン製全量フラスコに正確に入れ、更に標線まで塩酸（0.01 mol/L）を加えて酸化用混合標準液を調製する（この液1 mLは、ジクワット及びパラコートとして

それぞれ 1 μg を含有する。）。塩化アンモニウム溶液（25 w/v%）2 mL に酸化用混合標準液 0.1 mL を正確に加えたものを、あらかじめ水酸化ナトリウム溶液（12 mol/L）10 mL 及びフェリシアン化カリウム溶液（1 w/v%）1 mL を入れ混合したポリプロピレン製ビーカーに加える。以下、試料溶液の場合と同様に酸化処理及びカラム処理 II を行い、水－メタノール（4+1）で正確に希釈し、1 mL 中にジクワット及びパラコートとして 0.1~20 ng 相当量の間の数点を含有する混合標準液を調製する。

液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定　試料溶液及び混合標準液各 10 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6]

溶離液：0.1 v/v%ギ酸溶液－メタノール（4+1）→ 10 min →（3+7）（2 min 保持）→ 5 min →（4+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）

ネブライザーガス：空気（3 L/min）

乾燥ガス：N_2（15 L/min）

ヒートブロック温度：500 °C

DL 温度：100 °C

コリジョンガス：Ar（230 kPa）

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*)	コリジョンエネルギー (eV)
ジクワット酸化体	215	171	－	25
		－	153	35
パラコート酸化体	217	174	－	31
		－	104	53

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、試料中のジクワット及びパラコート量を算出する。

注 1　ジクワット及びパラコートはガラス器具に強く吸着するため、使用後のガ

ラス器具を硝酸（1+10）等に一晩漬け置いた後、流水で濯ぎ、更に流水により水を入れ替えながら水に 1 時間程度漬け置いた後、流水で濯ぐことによってガラス器具への残留を防ぐことができる。

2　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。

3　Oasis MAX（充てん剤量 500 mg、リザーバー容量 6 mL、Waters 製）又はこれと同等のもの

4　Oasis MCX（充てん剤量 500 mg、リザーバー容量 6 mL、Waters 製）又はこれと同等のもの

5　Oasis HLB（充てん剤量 60 mg、リザーバー容量 20 mL、Waters 製）又はこれと同等のもの

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

7　LCMS-8040（島津製作所製）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（%）
ジクワット	成鶏飼育用配合飼料	0.02	6	106	17
		0.15	6	94.7	4.4
	とうもろこし	0.02	5	79.4	4.4
		0.1	5	87.4	4.5
	ライ麦	0.01	6	81.8	12
		0.06	6	81.3	6.2
パラコート	成鶏飼育用配合飼料	0.02	6	88.5	9.7
		0.15	6	92.3	4.1
	とうもろこし	0.02	5	74.7	15
		0.2	5	88.4	6.8
	ライ麦	0.01	6	85.5	17
		0.1	6	90.1	5.2

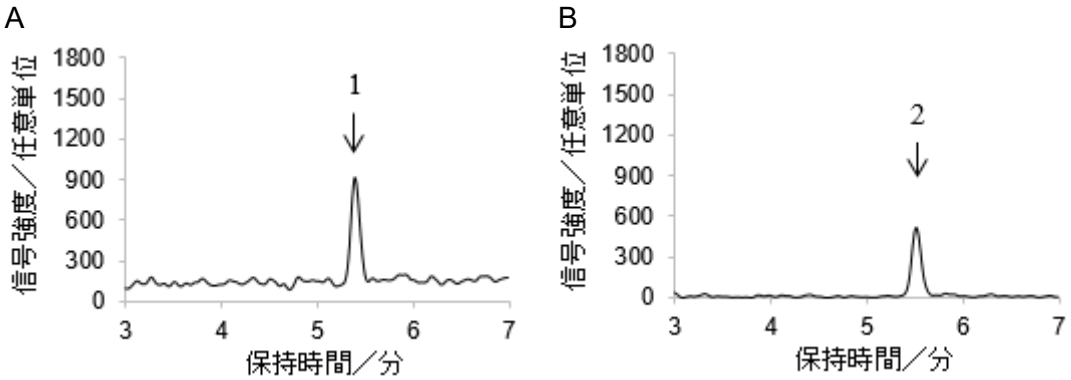
・共同試験

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
ジクワット	成鶏飼育用配合飼料	10	0	0.3	77.4	13	30	1.5
	とうもろこし	10	0	0.05	83.2	12	24	1.1
	ライ麦	8	2	0.01	88.3	4.3	18	0.80
パラコート	成鶏飼育用配合飼料	8	2	0.2	73.9	4.0	8.8	0.41
	とうもろこし	9	1	0.1	77.1	5.3	21	0.97
	ライ麦	9	1	0.01	83.4	9.4	23	1.0

・定量下限（共同試験による確認）　試料（麦類を除く）中　各 0.02 mg/kg、麦類中　0.01 mg/kg

・検出下限（単一試験室による確認）　試料（麦類を除く）中　各 0.006 mg/kg、麦類中　0.003 mg/kg

（参考）クロマトグラム例



標準液のクロマトグラム

A：ジクワット標準液（ジクワットとして 0.2 ng/mL）

B：パラコート標準液（パラコートとして 0.2 ng/mL）

35　チオファネート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[注1]

(1)　分析対象化合物　　カルベンダジム[注2]（カルベンダジム、チオファネートメチル及びベノミル）及びチオファネート（2 成分）

(2)　適用範囲　　配合飼料、穀類、乾牧草、稲わら、稲発酵粗飼料及び籾米

(3)　分析法

A　　試薬の調製

1)　カルベンダジム標準液　　カルベンダジム〔$C_9H_9N_3O_2$〕10 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、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カルベンダジム標準原液を調製する（この液 1 mL は、カルベンダジムとして 0.1 mg を含有する。）。

　使用に際して、標準原液の一部をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にカルベンダジムとして 0.1~20 ng を含有する数点のカルベンダジム標準液を調製する。

2)　チオファネート標準原液　　チオファネート〔$C_{14}H_{18}N_4O_4S_2$〕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チオファネート標準原液を調製する（この液 1 mL は、チオファネートとして 0.5 mg を含有する。）。

　使用に際して、標準原液の一部をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にチオファネートとして 0.4 μg を含有するチオファネート標準液を調製し、閉環反応に供する。

3)　チオファネートメチル標準原液（分析試料にチオファネートメチルの残留が疑われる場合に使用する）　　チオファネートメチル〔$C_{12}H_{14}N_4O_4S_2$〕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チオファネートメチル標準原液を調製する（この液 1 mL は、チオファネートメチルとして 0.5 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にチオファネートメチルとして 0.4 µg を含有するチオファネートメチル標準液を調製し、閉環反応に供する。

4) ベノミル標準原液（分析試料にベノミルの残留が疑われる場合に使用する）
ベノミル〔$C_{12}H_{18}N_4O_3$〕10 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、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ベノミル標準原液を調製する（この液 1 mL は、ベノミルとして 0.1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一部をメタノールで正確に希釈し、1 mL 中にベノミルとして 0.4 µg を含有するベノミル標準液を調製し、閉環反応に供する。

B　定　　量[注3]

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、L-アスコルビン酸ナトリウム約 1 g、水 20 mL（乾牧草、稲わら及び稲発酵粗飼料は 30 mL）を加え、30 分間静置後、更にメタノール 100 mL（乾牧草、稲わら及び稲発酵粗飼料は 120 mL）を加え、30 分間振り混ぜて抽出する[注4]。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メタノール 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メタノールを加え（乾牧草、稲わら、稲発酵粗飼料及び籾米は、この液 2 mL を 20 mL の全量フラスコに正確に入れ、標線までメタノールを加えた液を）、閉環反応に供する試料溶液とする。

閉環反応[注5]　　試料溶液 1 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、これに酢酸（1+1）10 mL、酢酸銅（II）一水和物約 0.2 g 及び沸騰石数個を加え、空冷管を接続した後、120 °C の油浴上で 30 分間加熱する。放冷後、1 mol/L 塩酸 10 mL を空冷管の上部から加えて管壁を洗浄し、試料溶液に合わせる。試料溶液を 100 mL のトールビーカーに移し、先のなす形フラスコ及び残さを 1 mol/L 塩酸 20 mL で洗浄し、洗液を試料溶液に合わせる。1 mol/L 又は 10 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で試料溶液を pH 6.8~6.9 に調整し、全量を 100 mL の全量フラスコに移し、更に全量フラスコの標線まで水を加え、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 10 mL を多孔性ケイソウ土カラム（20 mL 保持用）[注6]に負荷し、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、酢酸エチル 100 mL を加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下し、EBC 及びカルベンダジムを溶出させた後、圧注して全量を溶出させる。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。メタノール 2 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 0.45 µm 以下）でろ過し、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。

標準液の閉環反応及びカラム処理　　チオファネート標準液、チオファネートメチル標準液又はベノミル標準液 1 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れる。

以下、試料溶液の場合と同様に閉環反応及びカラム処理を行い、メタノールで正確に希釈し、1 mL 中にチオファネート又はチオファネートメチル若しくはベノミルとして 0.2~20 ng 相当量の間の数点を含有する標準液[注7]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8]

溶離液：2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液－メタノール（3+2）（5 min 保持）→ 5 min →（5+95）（5 min 保持））→ 0.1 min →（3+2）（8 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9]）

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）

ネブライザーガス：N_2（3 L/min）

乾燥ガス：N_2（10 L/min）

ヒーティングガス：空気（10 L/min）

インターフェイス温度：350 °C

ヒートブロック温度：500 °C

DL 温度：120 °C

コリジョンガス：Ar（230 kPa）

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*)	コリジョンエネルギー (eV)
EBC	206	160	-	15
		-	134	30
カルベンダジム	192	160	-	16
		-	132	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 EBC 及びカルベンダジム量を算出[注10]し、EBC 量に 1.806 を乗じてチオファネート量に換算する。

注 1　分析試料にカルベンダジム、チオファネートメチル及びベノミルのうち複

数の残留が疑われる場合、カルベンダジム標準液を用いてチオファネートメチル及びベノミルを定量することも可能だが、定量値が低くなる場合があるため、必要に応じて妥当性を確認すること。

2　本法では、試料中のチオファネートメチル及びベノミルをカルベンダジムに変換し、試料中のカルベンダジム、カルベンダジムに換算したチオファネートメチル及びカルベンダジムに換算したベノミルの総和として定量する。

3　分析過程で各成分の消失が生じやすいため、抽出からカラム処理までの操作は 1 日で終了させる。

4　この際抽出されたベノミルは、カルベンダジムに変換される。

5　チオファネートはエチルベンズイミダゾール-2-イルカルバメート（EBC）に、チオファネートメチルはカルベンダジムに変換される。

6　Chem Elut（20 mL 保持用）（Agilent Technologies 製）又はこれと同等のもの

7　各チオファネート標準液の濃度（ng/mL）× 0.5540、各チオファネートメチル標準液の濃度（ng/mL）× 0.5584、各ベノミル標準液の濃度（ng/mL）× 0.6585 が変換後の EBC 又はカルベンダジムの濃度（各成分が全て変換された場合の理論値）となる。

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

9　LCMS-8045（島津製作所製）による条件例

10　チオファネートメチル及びベノミルはカルベンダジムに変換されるため、カルベンダジムとして定量し、カルベンダジム量に、1.791 を乗じてチオファネートメチル量に、1.519 を乗じてベノミル量に換算する。なお、EBC 量をカルベンダジム量へ換算する場合、0.9316 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（チオファネートメチル標準液、ベノミル標準液又は

チオファネート標準液を閉環反応して得られたカルベンダジム又は EBC で定量）

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（%）
チオファネートメチル	成鶏飼育用配合飼料	0.2	5	105	3.4
		1.5	5	106	1.0
	大麦	0.2	5	110	3.4
		1.2	5	111	3.1
	とうもろこし	0.2	5	95.6	7.6
		1.5	5	92.8	4.2
	チモシーヘイ	3	5	89.9	2.5
		20	5	88.8	3.7
	稲わら	1	5	91.4	4.5
		40	5	89.9	1.5
	稲発酵粗飼料	1.8	5	99.8	4.8
		11.1	5	96.4	5.1
	籾米	1	5	99.7	10
		10	5	94.5	1.1
ベノミル	成鶏飼育用配合飼料	0.1	5	101	5.4
		1.5	5	92.1	1.4
	大麦	0.1	5	95.2	4.0
		1	5	93.4	2.3
	とうもろこし	0.2	5	90.0	4.8
		1.5	5	94.1	3.5
	チモシーヘイ	3	5	84.5	2.2
		20	5	79.3	2.8
	稲わら	6	5	97.8	2.8
		40	5	85.1	5.0
	稲発酵粗飼料	1.3	5	103	3.3
		8.9	5	92.2	3.2
	籾米	1	5	94.7	3.2
		10	5	98.0	11
チオファネート	成鶏飼育用配合飼料	0.2	5	82.5	6.6
		1.5	5	98.2	1.6
	大麦	0.2	5	109	4.0
		1.2	5	110	4.7
	とうもろこし	0.2	5	92.5	2.5
		1.5	5	89.3	0.9
	チモシーヘイ	3	5	83.9	1.5
		20	5	90.7	2.5
	稲わら	1	5	81.3	4.3
		40	5	94.0	4.0
	稲発酵粗飼料	1.8	5	93.1	3.2
		11.1	5	96.6	5.4
	籾米	1	5	112	9.0
		10	5	94.2	1.3

・添加回収率及び繰返し精度（カルベンダジム標準液で定量）

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 (%)
カルベンダジム	成鶏飼育用配合飼料	0.1	5	93.4	3.7
		1	5	94.0	6.8
	大麦	0.1	5	96.5	14
		1	5	91.4	3.6
	とうもろこし	0.1	5	87.4	3.3
		1	5	85.7	1.4
	チモシーヘイ	2	5	73.7	3.9
		10	5	75.7	4.3
	稲わら	4	5	87.3	5.3
		20	5	82.8	1.1
	稲発酵粗飼料	0.9	5	100	3.7
		6.7	5	84.4	4.6
	籾米	1	5	87.5	11
		5	5	81.0	1.9
チオファネートメチル	成鶏飼育用配合飼料	0.2	5	84.8	3.0
		1.5	5	78.6	1.0
	大麦	0.2	5	71.8	3.4
		1.2	5	72.3	3.1
	とうもろこし	0.2	5	78.4	7.8
		1.5	5	76.2	4.2
	チモシーヘイ	3	5	70.6	2.5
		20	5	79.4	3.7
	稲わら	1	5	77.2	4.5
		40	5	81.8	1.5
	稲発酵粗飼料	1.8	5	79.0	5.1
		11.1	5	84.6	5.4
	籾米	1	5	86.8	9.2
		10	5	76.8	1.1
ベノミル	成鶏飼育用配合飼料	0.1	5	85.6	5.9
		1.5	5	78.5	1.4
	大麦	0.1	5	90.3	3.5
		1	5	87.5	2.5
	とうもろこし	0.2	5	73.2	4.4
		1.5	5	70.5	3.4
	チモシーヘイ	3	5	72.9	2.3
		20	5	76.9	3.0
	稲わら	6	5	82.5	2.9
		40	5	79.4	5.0
	稲発酵粗飼料	1.3	5	86.7	3.3
		8.9	5	81.8	3.3
	籾米	1	5	95.3	2.6
		10	5	94.2	11

・共同試験

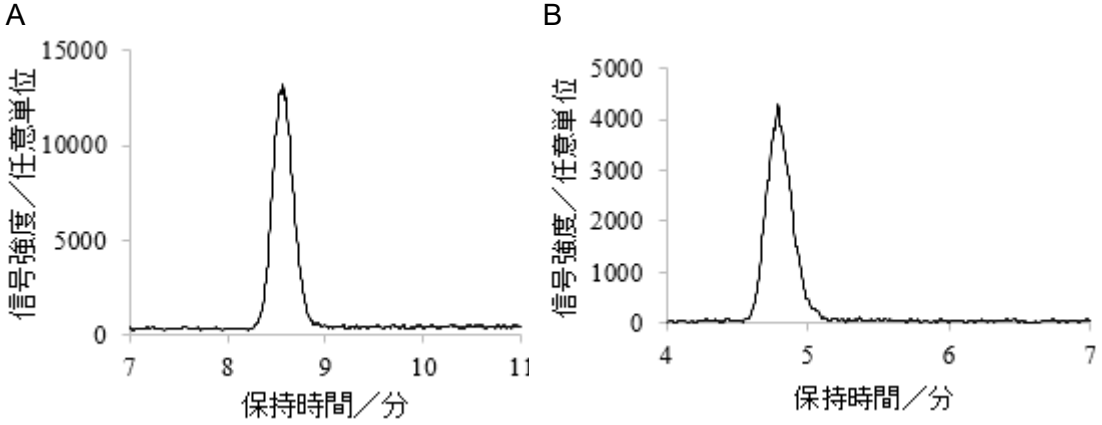
成分名	試料の種類	有効試験室数	棄却試験室数	添加濃度 (mg/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD_r (%)	室間再現精度 RSD_R (%)	HorRat
チオファネート	採卵鶏用配合飼料	10	0	0.2	92.9	5.4	17	0.81
	とうもろこし	10	0	0.2	94.0	7.0	19	0.94
	チモシーヘイ	10	0	12	87.1	6.9	13	1.2
	稲わら	9	1	50	98.3	4.0	12	1.3
	稲発酵粗飼料	10	0	20[注]	95.8	13	14	1.4
	籾米	10	0	6	87.1	7.5	15	1.2
チオファネートメチル	採卵鶏用配合飼料	9	1	0.2	102	5.1	9.2	0.45
	チモシーヘイ	10	0	10	92.6	6.5	11	1.2
	籾米	9	1	4	95.3	8.9	16	1.2
ベノミル	とうもろこし	10	0	0.2	100	7.5	21	1.0
	稲わら	8	2	45	68.6	2.8	3.9	0.41
	稲発酵粗飼料	9	1	15[注]	89.2	3.5	5.1	0.47

注　分析試料（風乾物）に対する添加濃度

・定量下限（共同試験による確認）　　カルベンダジム：配合飼料及び穀物中各 0.1 mg/kg、乾牧草及び稲発酵粗飼料（風乾物。以下本項において同じ。）中各 2 mg/kg、稲わら中　4 mg/kg、籾米中　1 mg/kg、チオファネート：配合飼料及び穀物中　各 0.2 mg/kg、乾牧草中　3 mg/kg、稲わら及び籾米中　各 1 mg/kg、稲発酵粗飼料中　4 mg/kg

・検出下限（単一試験室による確認）　　カルベンダジム：配合飼料及び穀物中各 0.03 mg/kg、乾牧草及び稲発酵粗飼料中　各 0.6 mg/kg、稲わら中　1.2 mg/kg、籾米中　0.3 mg/kg、チオファネート：配合飼料及び穀物中　各 0.06 mg/kg、乾牧草中　0.9 mg/kg、稲わら及び籾米中　各 0.3 mg/kg、稲発酵粗飼料中　1.2 mg/kg

（参考）クロマトグラム例



標準液のクロマトグラム

A：チオファネート標準液（EBC として 0.89 ng/mL、チオファネートとして 1.6 ng/mL）

B：カルベンダジム標準液（カルベンダジムとして 1 ng/mL）