

23 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 を正確に量って 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 を正確に量って 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定量を混合し、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 μ g 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 10.0 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 200 mL を加えて、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 \times 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 $^{\circ}$ 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}、密栓して 100 $^{\circ}$ C で 2 時間加熱^{注3}した後放冷し、50 $^{\circ}$ 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) の下にシリカゲルミニカラム (690 mg) 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}、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}、更に同溶媒で正確に希釈し、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 1.0~300 ng 相当量を含む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5}

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6})

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 : 400 °C

キャピラリー電圧 : 3 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)
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。

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

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含量として定量する。

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 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies 製、本測定条件による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保持時間はそれぞれ約4分及び6分) 又はこれと同等のもの

6 ACQUITY TQD (Waters 製) による条件例

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
グルホシネート	大麦	5	3	95.5	4.9
		0.5	3	77.3	7.8
	とうもろこし	0.1	3	99.3	19
		0.05	3	84.5	5.5
アルファルファ乾草	15	3	90.1	13	
		3	87.9	10	
		3	111	18	
稲わら	0.5	3	76.8	5.0	
		3	84.8	7.1	

・添加回収率及び繰返し精度〔続き〕

添加成分名	試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
3-メチル ホスフィニコ プロピオン酸	大麦	5	3	87.1	8.3
		0.5	3	71.6	10
	とうもろこし	0.1	3	72.3	9.6
		0.05	3	79.9	0.9
		アルファルファ乾草	15	3	78.6
	稲わら	1.5	3	78.4	10
		0.5	3	93.4	4.5
		0.5	3	74.2	3.1
0.05		3	90.8	8.8	
N-アセチルグ ルホシネート	大麦	5	3	115	14
		0.5	3	99.0	5.7
	とうもろこし	0.1	3	87.7	19
		0.05	3	116	1.6
		アルファルファ乾草	15	3	93.5
	稲わら	1.5	3	97.5	4.5
		0.5	3	110	6.7
		0.5	3	94.9	2.3
		0.05	3	111	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 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
グルホシネート	大麦	8	0	5	101	6.7	8.2	0.66
	アルファルファ乾草	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
	アルファルファ乾草	8	0	15	92.8	10	13	1.2
N-アセチルグ ルホシネート	大麦	8	0	5	110	3.1	10	0.77
	アルファルファ乾草	8	0	15	107	4.4	12	1.1

- ・ 定量下限 試料中 各 0.05 mg/kg (乾牧草各 0.5 mg/kg)
- ・ 検出下限 試料中 各 0.02 mg/kg (乾牧草各 0.2 mg/kg)

24 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 [C₂₀H₂₀FNO₄] 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 [C₁₂H₁₆O₄S] 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定量を混合し、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 10.0 g を量って 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、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 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：60~115 mL

カラム処理 II ^{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) 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外し、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 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 : 熔融石英キャピラリーカラム (5%ジフェニルー 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 (熔融石英ガードカラム (内径 0.25 mm、長さ 10 m) 付き))

キャリアーガス : 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) \rightarrow 昇温 20 °C/min \rightarrow 280 °C (10 min 保持)

検出器 : 四重極型質量分析計^{注4}

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

イオン化法 : 電子衝撃イオン化 (EI) 法

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 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 (µg/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	2,000	3	77.4	10
		300	3	93.5	10
		20	3	109	4.6
	粳米	2,000	3	74.2	13
		200	3	89.9	18
		20	3	80.6	5.8
ベンフレセート	稲わら	2,000	3	99.5	4.6
		300	3	102	4.9
		20	3	119	1.7
	粳米	2,000	3	92.6	4.2
		200	3	113	4.1
		20	3	116	4.1
		10	3	102	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 (µg/kg)	添加回収率 (%)	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	2000	77.9	9.4	27	1.8
	粳米	9	0	200	80.2	8.2	29	1.4
ベンフレセート	稲わら	9	0	300	96.3	5.5	15	0.80
	粳米	9	0	30	103	6.8	21	0.96

・ 定量下限 シハロホップブチル 試料中 20 µg/kg、ベンフレセート 稲わら：試料中 20 µg/kg、粳米：試料中 10 µg/kg

・ 検出下限 シハロホップブチル 試料中 2 µg/kg、ベンフレセート 試料中 0.3 µg/kg

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

- (1) 分析対象化合物 エチプロール、カルプロパミド、クロマフェノジド、クロラントラニリプロール、チフルザミド、ピロキロン (6成分)
- (2) 適用範囲 稲わら、稲発酵粗飼料及び粳米
- (3) 分析法

A 試薬の調製

農薬混合標準液 エチプロール [C₁₃H₉Cl₂F₃N₄OS]、カルプロパミド [C₁₅H₁₈Cl₃NO]、クロマフェノジド [C₂₄H₃₀N₂O₃]、クロラントラニリプロール [C₁₈H₁₄BrCl₂N₅O₂]、チフルザミド [C₁₃H₆Br₂F₆N₂O₂S] 及びピロキロン [C₁₁H₁₁NO] 各 50 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 を 100 mL の全量フラスコに入れて混合し、更に標線までアセトンを加えて 1 mL 中に各農薬としてそれぞれ 10 µg を含有する農薬混合標準原液を調製する。

使用に際して、農薬混合標準原液の一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 0.0005~0.05 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 30 mL (粃米は 20 mL) を加えて、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 2 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、水 20 mL を加えて、カラム処理 I に供する試料溶液とする。

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

カラム処理 II ^{注1} 試料溶液を多孔性ケイソウ土カラム (5 mL 保持用) ^{注3} に入れ、10 分間静置する。100 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、試料溶液の入っていたなす形フラスコを酢酸エチル 5 mL ずつで 4 回洗浄し、洗液を順次カラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下して各農薬を溶出させる。更に同溶媒 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4} をアセトニトリル-トルエン (3+1) 10 mL で洗浄する。100 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、試料溶液をミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流下して各農薬を流出させる。試料溶液の入っていたなす形フラスコをアセトニトリル-トルエン (3+1) 5 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に流出させる。更にアセトニトリル-トルエン (3+1) 5 mL をミニカラムに加えて同様に流出させる。流出液を 40 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮し、窒素ガスを送って乾固する。アセトニトリル-水 (3+2) 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、

5,000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液の一定量を同溶媒で正確に 10 倍希釈して液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とする。また、試料が稲わらである場合は、先の遠心分離した後の上澄み液をクロラントラニリプロールの定量に用いるための液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とする。

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

測定条件 例

(液体クロマトグラフ部)

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

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

流速 : 0.2 mL/min

カラム槽温度 : 40 °C

(タンデム型質量分析計部^{注6})

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 : 450 °C

キャピラリー電圧 : 正イオン 2.0 kV、負イオン 1.0 kV

コーン電圧 : 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 モニターイオン条件

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

計算 得られた選択反応検出クロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中の各農薬量を算出する。

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

- 2 InertSep Slim-J C18-B (ジーエルサイエンス製) 又はこれと同等のもの
- 3 Chem Elut (Agilent Technologies 製) 又はこれと同等のもの
- 4 ENVI-Carb/LC-NH₂ (Supelco 製) 又はこれと同等のもの
- 5 Inertsil ODS-SP (ジーエルサイエンス製) 又はこれと同等のもの
- 6 Quattro Premier XE (Waters 製) による条件例

(参考) 分析法バリデーション

- ・ 添加回収率及び繰返し精度

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

- ・ 共同試験

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

- ・ 定量下限 クロラントラニリプロール：試料（稲発酵粗飼料は風乾物）中 0.1 mg/kg（稲わら 0.01 mg/kg）、その他の農薬：試料（稲発酵粗飼料は風乾物）中 各 0.1 mg/kg
- ・ 検出下限 クロラントラニリプロール：試料（稲発酵粗飼料は風乾物）中 0.03 mg/kg（稲わら 0.003 mg/kg）、その他の農薬：試料（稲発酵粗飼料は風乾物）中 各 0.03 mg/kg

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

- (1) 分析対象化合物 オキサジクロメホン、ジメタメトリン及びピリブチカルブ（3成分）
- (2) 適用範囲 稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米
- (3) 分析法

A 試薬の調製

- 1) オキサジクロメホン標準原液 オキサジクロメホン〔 $C_{20}H_{19}Cl_2NO_2$ 〕 25 mg を正確に量って 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オキサジクロメホン標準原液を調製する（この液 1 mL は、オキサジクロメホンとして 0.5 mg を含有する。）
- 2) ジメタメトリン標準原液 ジメタメトリン〔 $C_{11}H_{21}N_5S$ 〕 25 mg を正確に量って 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ジメタメトリン標準原液を調製する（この液 1 mL は、ジメタメトリンとして 0.5 mg を含有する。）
- 3) ピリブチカルブ標準原液 ピリブチカルブ〔 $C_{18}H_{22}N_2O_2S$ 〕 25 mg を正確に量って 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ピリブチカルブ標準原液を調製する（この液 1 mL は、ピリブチカルブとして 0.5 mg を含有する。）
- 4) 農薬混合標準液 使用に際して、オキサジクロメホン標準原液、ジメタメトリン標準原液及びピリブチカルブ標準原液の一定量を混合し、アセトニトリル水（4+1）で正確に希釈し、1 mL 中にオキサジクロメホン、ジメタメトリン及びピリブチカルブとしてそれぞれ 0.1~10 ng を含有する数点の農薬混合標準液を調製する。

B 定 量

抽出 分析試料 10.0 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 2 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、水 20 mL を加えて、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理^{注1} オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）^{注2}をア

セトニトリル 5 mL 及び水 5 mL で順次洗浄する。試料溶液をミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。更に試料溶液の入っていたなす形フラスコを水-アセトニトリル (3+2) 5 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に流出させる。10 mL の全量フラスコをミニカラムの下に置き、アセトニトリル-水 (4+1) 9 mL をミニカラムに加え、各農薬を溶出させる^{注3}。更に全量フラスコの標線まで同溶媒を加え、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 : 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 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 (<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)
オキサジクロメホン	376	190	162	21	23
				21	43
ジメタメトリン	256	186	69	31	27
				31	63
ピリブチカルブ	331	181	109	16	23
				16	39

計算 得られた選択反応検出クロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中の各農薬量を算出する得る。

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

2 InertSep Slim-J C18-B (ジーエルサイエンス製) に適当な容量のリザーバ

ーを連結したもの又はこれと同等のもの

3 流速が維持できない場合は、必要に応じて二連球等により圧注する。

4 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies 製、本測定条件によるオキサジクロメホン、ジメタメトリン及びピリプチカルブの保持時間はそれぞれ約 15.4、12.2 及び 16.0 分) 又はこれと同等のもの

5 ACQUITY TQD (Waters 製) による条件例

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

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

・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
オキサジクロメホン	稲わら	8	0	0.1	94.6	4.1	4.1	0.19
	稲発酵粗飼料	8	0	0.04	94.1	7.4	7.4	0.33
	粳米	8	0	0.05	96.8	3.1	3.3	0.15
ジメタメトリン	稲わら	8	0	0.1	94.1	2.1	3.2	0.15
	稲発酵粗飼料	8	0	0.04	95.3	3.8	4.0	0.18
	粳米	8	0	0.05	96.4	2.3	3.2	0.14
ピリプチカルブ	稲わら	8	0	0.1	81.4	5.0	5.2	0.23
	稲発酵粗飼料	8	0	0.04	83.1	6.6	7.0	0.32
	粳米	8	0	0.05	88.0	6.1	6.5	0.30

・定量下限 試料 (稲発酵粗飼料は風乾物) 中各 0.01 mg/kg

・検出下限 試料 (稲発酵粗飼料は風乾物) 中各 0.003 mg/kg

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

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

(2) 適用範囲 穀類、大豆油かす、稲わら及び稲発酵粗飼料

(3) 分析法

A 試薬の調製

- 1) グリホサート標準原液 グリホサート [$C_3H_8NO_5P$] 25 mg を正確に量って 25 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えてグリホサート標準原液を調製する（この液 1 mL は、グリホサートとして 1 mg を含有する。）。
- 2) グルホシネート標準原液 グルホシネート [$C_5H_{15}N_2O_4P$] 25 mg を正確に量って 25 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えてグルホシネート標準原液を調製する（この液 1 mL は、グルホシネートとして 1 mg を含有する。）。
- 3) 3-メチルホスフィニコプロピオン酸標準原液 3-メチルホスフィニコプロピオン酸 [$C_4H_9O_4P$] 25 mg を正確に量って 25 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えて 3-メチルホスフィニコプロピオン酸標準原液を調製する（この液 1 mL は、3-メチルホスフィニコプロピオン酸として 1 mg を含有する。）。
- 4) 農薬混合標準液 使用に際して、グリホサート標準原液、グルホシネート標準原液及び 3-メチルホスフィニコプロピオン酸標準原液の一定量を混合し、更に水で正確に希釈し、1 mL 中にグリホサート、グルホシネート及び 3-メチルホスフィニコプロピオン酸としてそれぞれ 100 μ g 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 10.0 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 200 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出する。抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ、1,500 \times g で 10 分間遠心分離し、上澄み液の一定量を水で正確に 2.5 倍に希釈し、カラム処理 I に供する試料溶液とする。また、試料が大豆及び大豆油かすである場合は、上澄み液の一定量をアセトンで正確に 2.5 倍に希釈した後、15 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,500 \times g で 5 分間遠心分離し、上澄み液をカラム処理 I に供する試料溶液とする。

カラム処理 I ^{注4} ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (500 mg) ^{注5} の下にスルホン酸修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (225 mg) ^{注6} を連結し、メタノール 6 mL 及び水 12 mL で順次洗浄する。200 mL のなす形フラスコ^{注7} をミニカラムの下に置き、試料溶液 1 mL をミニカラムに正確に入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。更に水 18 mL をミニカラムに加え、同様に流出させ、誘導体化に供する試料溶液とする。

誘導体化 試料溶液を 50 $^{\circ}$ C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。酢酸 1 mL 及びオルト酢酸トリメチル 4 mL を加えて残留物を溶かし^{注8}、この容器を密栓して 100 $^{\circ}$ C で 2 時間加熱^{注9} した後放冷し、50 $^{\circ}$ C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾

固する。酢酸エチル 4 mL を正確に加えて残留物を溶かし^{注8}、カラム処理 II に供する試料溶液とする。

カラム処理 II ^{注4} アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (360 mg) の下にシリカゲルミニカラム (690 mg) を連結し、酢酸エチル 10 mL で洗浄する。試料溶液 2 mL をミニカラムに正確に入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。更に酢酸エチル 18 mL をミニカラムに加え、同様に流出させる。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、アセトン 10 mL をミニカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下してグリホサート誘導体及び 3-メチルホスフィニコプロピオン酸誘導体を溶出させる。次に、アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムをはずし、アセトン-水 (19+1) 10 mL をシリカゲルミニカラムに加えてグリホサート誘導体、3-メチルホスフィニコプロピオン酸誘導体及びグルホシネート誘導体を溶出させる。溶出液を 50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。0.01 v/v% ギ酸溶液 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし^{注8}、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とする。

標準液の誘導体化 農薬混合標準原液 1 mL を 200 mL のなす形フラスコに正確に入れ、50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

酢酸 1 mL 及びオルト酢酸トリメチル 4 mL を加えて残留物を溶かし^{注8}、なす形フラスコを密栓して 100 °C で 2 時間加熱^{注9}した後放冷する。この液を 50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。0.01 v/v% ギ酸溶液 10 mL を正確に加えて残留物を溶かし^{注8}、更に同溶媒で正確に希釈し、1 mL 中にグリホサート、グルホシネート及び 3-メチルホスフィニコプロピオン酸としてそれぞれ 0.3~300 ng 相当量を含有する数点の標準液を調製する。

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

測定条件 例

(液体クロマトグラフ部)

カラム : オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 5 µm) ^{注10}

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11})

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：400 °C
 キャピラリー電圧：3 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 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 (<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)
グリホサート誘導体	254	102	152	22	17
グルホシネート誘導体	252	210	150	26	14
3-メチルホスフィニコプロピオン酸誘導体	181	149	93	21	14

計算 得られた選択反応検出クロマトグラムからグリホサート誘導体、グルホシネート誘導体及び 3-メチルホスフィニコプロピオン酸誘導体のピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中のグリホサート (*N*-アセチルグリホサートを含む。) 量、グルホシネート (*N*-アセチルグルホシネートを含む。) 及び 3-メチルホスフィニコプロピオン酸のそれぞれの量を求めた後、次式により試料中のグルホシネート量を算出する。

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

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

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

- 注 1 本法では、試料中のグリホサート、グリホサートアンモニウム塩、グリホサートイソプロピルアミン塩、グリホサートトリメシウム塩及びグリホサートナトリウム塩をグリホサート誘導体に誘導体化し、グリホサートとして定量する。
- 2 グリホサート及び *N*-アセチルグリホサートの誘導体は同一であることから、*N*-アセチルグリホサートはグリホサートとの含量として定量する。
- 3 グルホシネート及び *N*-アセチルグルホシネートの誘導体は同一であることから、*N*-アセチルグルホシネートはグルホシネートとの含量として定量する。
- 4 流速は 2~3 mL/min 程度とする。必要に応じて吸引マニホールドを使用する。
- 5 Oasis HLB (Waters 製、リザーバー容量 6 mL) 又はこれと同等のもの
- 6 Oasis Plus MCX (Waters 製) 又はこれと同等のもの
- 7 50 mL のなす形フラスコを用いる場合には、同様に操作した後、流出液を少量の水で 200 mL のなす形フラスコに移し、誘導体化に供する試料溶液とする。
- 8 必要に応じて超音波処理し、十分に拡散させる。

9 乾燥器等に入れる。乾燥器を用いる場合は十分に庫内及び実験室内を換気すること。

10 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies 製、本測定条件によるグリホサート誘導体の保持時間は約 7.2 分、グルホシネート誘導体の保持時間は約 4.4 分、3-メチルホスフィニコプロピオン酸誘導体の保持時間は約 5.8 分) 又はこれと同等のもの

11 ACQUITY TQD (Waters 製) による条件例

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
グリホサート	大麦	0.04	3	117	17
		20	3	82.8	6.5
	きな粉	0.04	5	85.6	18
		20	5	82.3	4.1
	小麦	0.5	3	85.0	7.0
		5	3	86.4	6.1
	大豆	0.04	5	115	12
		20	5	109	4.1
	とうもろこし	0.1	3	85.4	13
		1	3	80.1	7.6
	大豆油かす	0.04	5	95.7	13
		20	5	104	4.6
	稲わら	0.04	3	100	14
		0.2	3	97.3	4.2
	稲発酵粗飼料	0.04	3	83.0	7.2
		0.2	3	88.6	8.8
N-アセチル グリホサート	えん麦	0.04	5	104	11
		20	5	107	6.1
	大麦	0.04	5	101	4.7
		20	5	111	5.3
	きな粉	0.04	5	89.0	6.9
		20	5	84.5	5.4
	大豆	0.04	5	110	15
		20	5	92.6	4.9
	とうもろこし	0.04	5	102	7.1
		1	5	118	6.8
		5	5	96.0	7.0
	大豆油かす	0.04	5	93.9	11
		20	5	104	4.4
	稲わら	0.04	5	104	10
		0.2	5	114	5.0
	稲発酵粗飼料	0.02	5	105	10
0.04		5	101	14	
0.2		5	107	9.3	

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	0.05	3	88.0	14
		0.5	3	100	6.5
	きな粉	0.05	5	102	12
		2	5	80.9	11
	小麦	0.05	5	102	16
		0.2	5	93.1	6.2
	大豆	0.05	5	102	12
		2	5	111	9.4
	とうもろこし	0.05	3	103	14
		0.1	3	112	2.6
	大豆油かす	0.05	5	84.8	3.7
		2	5	111	8.2
	稲わら	0.05	3	103	16
		0.5	3	94.2	5.4
	稲発酵粗飼料	0.05	3	92.7	11
0.5		3	84.6	2.2	
3-メチル ホスフィニコ プロピオン酸	大麦	0.05	3	81.2	17
		0.5	3	89.9	5.3
	きな粉	0.05	5	94.4	10
		2	5	90.0	3.7
	小麦	0.05	3	98.0	7.2
		0.2	3	80.0	8.9
	大豆	0.05	5	107	3.7
		2	5	111	3.1
	とうもろこし	0.05	3	108	5.5
		0.1	3	85.7	7.0
	大豆油かす	0.05	5	79.1	11
		2	5	113	6.0
	稲わら	0.05	3	117	3.3
		0.5	3	92.4	7.2
	稲発酵粗飼料	0.05	3	91.1	4.1
0.5		3	76.9	10	
N-アセチル グルホシネート	大麦	0.05	3	101	19
		0.5	3	89.0	7.0
	きな粉	0.05	5	107	17
		2	5	88.4	8.1
	小麦	0.05	3	74.1	11
		0.2	3	82.2	7.4
	大豆	0.05	5	92.1	9.0
		2	5	111	5.7
	とうもろこし	0.05	3	85.4	11
		0.1	3	88.0	5.3
	大豆油かす	0.05	5	86.0	18
		2	5	117	3.3
	稲わら	0.05	3	84.4	16
		0.5	3	82.4	13
	稲発酵粗飼料	0.05	3	82.3	10
0.5		3	73.0	8.3	

・共同試験

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

- ・ 定量下限 グリホサート及び *N*-アセチルグリホサート：試料（稲発酵粗飼料は風乾物）中 各 0.04 mg/kg、その他：試料（稲発酵粗飼料は風乾物）中 各 0.05 mg/kg
- ・ 検出下限 グリホサート及び *N*-アセチルグリホサート：試料（稲発酵粗飼料は風乾物）中 各 0.01 mg/kg、その他：試料（稲発酵粗飼料は風乾物）中 各 0.02 mg/kg

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

- (1) 分析対象化合物 アセフェート及びメタミドホス（2成分）
- (2) 適用範囲 飼料
- (3) 分析法

A 試薬の調製

- 1) アセフェート標準原液 アセフェート [C₄H₁₀NO₃PS] 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セフェート標準原液を調製する（この液 1 mL は、アセフェートとして 0.5 mg を含有する。）。
- 2) メタミドホス標準原液 メタミドホス [C₂H₈NO₂PS] 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

加えてメタミドホス標準原液を調製する（この液 1 mL は、メタミドホスとして 0.5 mg を含有する。）。

- 3) 農薬混合標準液 使用に際して、各標準原液の一定量を混合し、アセトンで正確に希釈し、1 mL 中にアセフェート及びメタミドホスとしてそれぞれ 20 µg を含有する農薬混合標準原液を調製する。この標準原液 1 mL を正確にとり、窒素ガスを送って乾固した後、水で正確に希釈し、1 mL 中にアセフェート及びメタミドホスとしてそれぞれ 2.5~250 ng を含有する数点の農薬混合標準液を調製する。

B 定 量

抽出 分析試料 10.0 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 8 mL（乾牧草（稲わらを除く。））は、更にアセトンで正確に 10 倍希釈した後、その液 8 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮し、塩化ナトリウム 1 g 及び水 3 mL を加え、カラム処理 I に供する試料溶液とする。

カラム処理 I 試料溶液を多孔性ケイソウ土カラム（5 mL 保持用）^{注1}に入れた後、10 分間静置する。試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン 10 mL ずつで 4 回洗浄し、洗液を順次カラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。

多孔性ケイソウ土カラムの下にあらかじめ酢酸エチル 5 mL で洗浄したグラファイトカーボンミニカラム（500 mg）^{注2}を連結し、200 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置く。試料溶液の入っていたなす形フラスコを酢酸エチル 10 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次カラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下させてアセフェート及びメタミドホスを溶出させる。更に酢酸エチル 40 mL をカラムに加え、同様に溶出させる。溶出液を 40 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。ヘキサン-アセトン（7+3）5 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理 II に供する試料溶液とする。

カラム処理 II シリカゲルミニカラム（690 mg）をヘキサン-アセトン（7+3）5 mL で洗浄する。試料溶液をミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン-アセトン（7+3）2.5 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に流出させる。

50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、ヘキサン-アセトン（1+1）20 mL をミニカラムに加えてアセフェート及びメタミドホスを溶出させる。溶出液を 40 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。水 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とする。

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

測定条件 例

(液体クロマトグラフ部)

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm ）^{注3}

溶離液：2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液－メタノール（19+1）

流速：0.2 mL/min

カラム槽温度：40 °C

(タンデム型質量分析計部^{注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、350 °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（0.20 mL/min）

コリジョンエネルギー：下表のとおり

モニターイオン：下表のとおり

表 各物質の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>)		
アセフェート	184	143	—	20	5
		—	49		20
メタミドホス	142	94	—	30	15
		—	125		

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

注 1 Chem Elut 5 mL（Agilent Technologies 製）又はこれと同等のもの

2 ENVI-Carb（Supelco 製）又はこれと同等のもの

3 TSKgel ODS-100V（東ソー製、本測定条件によるアセフェート及びメタミドホスの保持時間はそれぞれ約 7.2 分及び 4.8 分）又はこれと同等のもの

4 Quattro Premier（Waters 製）による条件例

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

添加成分名	試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)
アセフェート	成鶏飼育用配合飼料	0.01	3	78.4	1.7
		0.5	3	70.3	6.1
	乳用牛飼育用配合飼料	0.01	3	83.4	3.4
		0.5	3	83.5	5.1
	小麦	0.01	3	78.0	8.9
		0.1	3	83.0	9.9
	とうもろこし	0.01	3	77.1	8.1
		0.5	3	80.5	4.1
	稲わら	0.01	3	79.0	3.6
		0.1	3	86.9	2.4
	アルファルファ乾草	0.1	3	73.4	8.8
		3	3	79.1	2.3
メタミドホス	成鶏飼育用配合飼料	0.01	3	90.3	7.0
		0.1	3	83.3	7.7
	乳用牛飼育用配合飼料	0.01	3	79.6	12
		0.1	3	87.6	5.8
	小麦	0.01	3	75.8	2.1
		0.02	3	84.3	12
	とうもろこし	0.1	3	90.2	2.0
		0.01	3	81.9	9.5
	稲わら	0.1	3	82.3	5.2
		0.01	3	85.7	13
	アルファルファ乾草	0.1	3	72.5	15
		3	3	89.0	13
		3	73.1	5.8	

・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
アセフェート	乳用牛飼育用配合飼料	10	0	0.1	81.9	1.7	11	0.48
	とうもろこし	10	0	0.5	82.7	4.8	8.4	0.46
	アルファルファ乾草	10	0	3	74.9	3.5	15	1.0
メタミドホス	乳用牛飼育用配合飼料	9	1	0.1	81.9	8.4	15	0.70
	とうもろこし	10	0	0.01	81.5	2.0	15	0.67
	アルファルファ乾草	10	0	0.1	100	4.5	18	0.83

・ 定量下限 試料中 各 0.01 mg/kg (乾牧草 (稲わらを除く。)) 中 各 0.1 mg/kg)

・ 検出下限 試料中 各 0.003 mg/kg (乾牧草 (稲わらを除く。)) 中 各 0.03 mg/kg)