

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

- (1) 分析対象化合物 イマザピック及びイマザピル (2成分)
- (2) 適用範囲 飼料
- (3) 分析法

A 試薬の調製

- 1) イマザピック標準原液 イマザピック [$C_{14}H_{17}N_3O_3$] 25 mg を正確に量って 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イマザピック標準原液を調製する (この液 1 mL は、イマザピックとして 0.5 mg を含有する。)
- 2) イマザピル標準原液 イマザピル [$C_{13}H_{15}N_3O_3$] 25 mg を正確に量って 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イマザピル標準原液を調製する (この液 1 mL は、イマザピルとして 0.5 mg を含有する。)
- 3) 農薬混合標準液 各標準原液の一定量を混合し、アセトンで正確に希釈し、1 mL 中にイマザピック及びイマザピルとしてそれぞれ 20 μg を含有する農薬混合標準原液を調製する。

使用に際して、農薬混合標準原液の一定量を 0.1 v/v%ギ酸溶液-メタノール (7+3) で正確に希釈し、1 mL 中にイマザピック及びイマザピルとしてそれぞれ 0.0002~2 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 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 20 mL (乾牧草は 30 mL) を加え、30 分間静置後、更に塩酸 (0.02 mol/L) -メタノール (2+3) 100 mL (乾牧草は 120 mL) を加え、30 分間振り混ぜて抽出する。200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をあらかじめケイソウ土を 1 cm の厚さに敷いたろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した後、先の三角フラスコ及び残さを順次塩酸 (0.02 mol/L) -メタノール (2+3) 60 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過する。更に全量フラスコの標線まで塩酸 (0.02 mol/L) -メタノール (2+3) を加える。この液 2 mL (乾牧草は、更に塩酸 (0.02 mol/L) -メタノール (2+3) で正確に 10 倍希釈した後、その液 2 mL) を 20 mL 以上の試験管等のガラス容器に正確に入れ、塩酸 (0.01 mol/L) 18 mL を加えて、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理^{注1} オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (1 g)^{注2} をメタノール 10 mL 及び塩酸 (0.01 mol/L) 10 mL で順次洗浄する。試料溶液をミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。先のミニカラムの下にあらかじめメタノール 10 mL 及び塩酸 (0.01 mol/L) 10 mL で順次洗浄したベンゼンスルホンプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg)^{注3} を連結する。試料溶液の入っていたガラス容器を塩酸 (0.01 mol/L) -メタノール (1+1) 5 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に流出させる。

次に、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを外し、メタノール 5 mL をベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲルミニカラムに加え、同様に流出させる。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、メタノール-アンモニア水 (99+1) 10 mL をミニカラムに加え、イマザピック及びイマザピルを溶出させる。溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。0.1 v/v%ギ酸溶液-メタノール (7+3) 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とする。

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

測定条件 例

(液体クロマトグラフ部)

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

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

流速 : 0.2 mL/min

カラム槽温度 : 40 °C

(タンデム型質量分析計部^{注5})

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

イオン源温度 : 150 °C

デソルベーションガス : N₂ (650 L/h、500 °C)

キャピラリー電圧 : 1 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>)		
イマザピック	276	231	—	35	20
		—	163		25
イマザピル	262	217	—	35	25
		—	69		30

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

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

- 2 InertSep C18-C (ジューエルサイエンス製) に適当な容量のリザーバーを連結したもの又はこれと同等のもの
- 3 Bond Elut SCX (Agilent Technologies 製) に必要に応じて適当な容量のリザーバーを連結したもの又はこれと同等のもの
- 4 Inertsil ODS-3 (ジューエルサイエンス製、本測定条件によるイマザピック及びイマザピルの保持時間はそれぞれ約 7.5 分及び 6.5 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	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)	
イマザピック	牛用配合飼料	0.005	3	93.2	2.4	
		0.01	3	96.0	6.5	
	小麦	0.005	3	82.7	3.5	
		0.01	3	87.8	2.3	
		0.05	3	100	2.4	
	大豆	0.005	3	89.5	4.4	
		0.05	3	96.3	3.3	
		0.5	3	96.2	0.4	
	とうもろこし	大豆油かす	0.005	3	87.7	1.7
			0.01	3	97.7	5.0
		大豆油かす	0.005	3	89.9	5.1
			0.05	3	106	2.1
			0.5	3	102	1.2
		スーダングラス乾草	0.05	3	91.7	7.0
	0.5		3	99.4	1.5	
3	3		92.9	0.9		
イマザピル	牛用配合飼料	0.005	3	87.9	6.7	
		0.01	3	93.4	3.8	
		0.05	3	84.9	0.8	
	小麦	0.005	3	88.9	4.9	
		0.01	3	98.5	3.5	
		0.05	3	105	2.2	
	大豆	0.005	3	90.1	6.5	
		0.05	3	102	1.4	
		5	3	94.0	0.7	
	とうもろこし	大豆油かす	0.005	3	95.2	6.2
			0.01	3	100	4.9
			0.05	3	85.4	0.7
		大豆油かす	0.005	3	87.1	4.1
			0.05	3	107	2.1
			7	3	98.5	1.4
スーダングラス乾草	0.05	3	100	5.1		
	0.5	3	109	2.3		
	30	3	92.5	0.4		

・共同試験

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

- ・ 定量下限 試料中 各 0.005 mg/kg (乾牧草中 各 0.05 mg/kg)
- ・ 検出下限 試料中 各 0.002 mg/kg (乾牧草中 各 0.02 mg/kg)

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

- (1) 分析対象化合物 エスプロカルブ、カフェンストロール、ピラゾキシフェン、ピラゾリネート及びブプロフェジン (5成分)
- (2) 適用範囲 稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米
- (3) 分析法

A 試薬の調製

農薬混合標準液 エスプロカルブ〔C₁₅H₂₃NOS〕、カフェンストロール〔C₁₆H₂₂N₄O₃S〕、ピラゾキシフェン〔C₂₀H₁₆Cl₂N₂O₃〕、ピラゾリネート〔C₁₉H₁₆Cl₂N₂O₄S〕及びブプロフェジン〔C₁₆H₂₃N₃OS〕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 1 mL を 50 mL の全量フラスコに正確に入れ、更に標線までアセトンを加えて 1 mL 中に各農薬としてそれぞれ 10 µg を含有する農薬混合標準原液を調製する。

使用に際して、農薬混合標準原液の一定量をアセトニトリル-水 (4+1) で正確に希釈し、1 mL 中に各農薬としてそれぞれ 0.05~10 ng を含有する数点の農薬混合標準液を調製する。

B 定 量

抽出 分析試料 10.0 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^{注4}。

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

測定条件 例

(液体クロマトグラフ部)

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

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

流速 : 0.2 mL/min

カラム槽温度 : 40 °C

(タンデム型質量分析計部^{注6})

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 (650 L/h、350 °C)

キャピラリー電圧 : 3.5 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>)		
エスプロカルブ	266	91	—	35	25
		—	71		20
カフェンストロール	351	100	—	20	16
		—	72		36
ピラゾキシフェン	403	91	—	45	35
		—	105		23
ピラゾリネート	439	91	—	45	37
		—	173		19
ブプロフェジン	306	201	—	35	14
		—	116		18

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

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

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

3 流速が維持できない場合は、必要に応じて二連球等により圧注する。

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

5 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies 製、本測定条件によるエスプロカルブ、カフェンストロール、ピラゾキシフェン、ピラゾリネート及びブプロフェジンの保持時間はそれぞれ約 15.7 分、11.9 分、12.6 分、14.0 分及び 16.3 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 (%)
エスプロカルブ	稲わら	0.01	3	93.6	5.2
		0.2	3	94.9	3.1
	稲発酵粗飼料	0.01	3	98.1	2.4
		0.2	3	103	2.1
	粳米	0.01	3	96.6	3.3
		0.02	3	98.0	4.2
カフェンストロール	稲わら	0.01	3	97.0	4.7
		0.2	3	98.0	4.4
	稲発酵粗飼料	0.01	3	104	1.3
		0.2	3	103	1.9
	粳米	0.01	3	94.2	6.2
		0.02	3	88.5	7.9

・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 (%)
ピラゾキシフェン	稲わら	0.01	3	88.3	5.9
		0.2	3	92.6	3.1
	稲発酵粗飼料	0.01	3	97.6	2.0
		0.2	3	106	1.2
	粳米	0.01	3	86.5	1.3
		0.1	3	86.2	5.0
ピラゾリネート	稲わら	0.01	3	97.5	1.8
		0.2	3	93.7	3.6
	稲発酵粗飼料	0.01	3	92.0	7.1
		0.2	3	90.3	6.3
	粳米	0.01	3	96.7	3.2
		0.1	3	98.8	5.3
ブプロフェジン	稲わら	0.01	3	90.0	7.1
		25	3	99.3	5.2
	稲発酵粗飼料	0.01	3	95.0	1.7
		15	3	85.6	3.6
	粳米	0.01	3	101	3.5
		10	3	99.9	2.4

・共同試験

成分名	試料の種類	有効試験 室数	棄却試験 室数	添加濃度 (mg/kg)	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
エスプロカルブ	稲わら	9	0	0.2	89.3	4.6	10	0.49
	稲発酵粗飼料	9	0	0.2	88.4	3.3	7.3	0.35
	粳米	9	0	0.02	94.0	8.0	7.1	0.32
カフェンスト ロール	稲わら	9	0	0.2	96.1	2.5	9.4	0.46
	稲発酵粗飼料	9	0	0.2	95.8	3.0	7.7	0.38
	粳米	9	0	0.02	97.0	7.1	9.6	0.44
ピラゾキシフェ ン	稲わら	9	0	0.2	88.3	4.0	13	0.65
	稲発酵粗飼料	9	0	0.2	89.3	3.8	8.9	0.43
	粳米	9	0	0.1	94.2	3.8	8.7	0.40
ピラゾリネート	稲わら	9	0	0.2	94.1	1.8	15	0.71
	稲発酵粗飼料	9	0	0.2	91.0	5.2	13	0.65
	粳米	9	0	0.1	99.3	4.5	8.8	0.40
ブプロフェジン	稲わら	9	0	25	90.5	2.7	10	1.1
	稲発酵粗飼料	9	0	15	92.4	2.9	11	1.0
	粳米	9	0	10	97.6	4.4	7.7	0.68

- ・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

31 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レート（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 [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、各標準原液の一定量を混合し、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 10.0 g を量って 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) \rightarrow 12 min \rightarrow (1+99) (15 min 保持)

流速 : 0.1 mL/min

カラム槽温度 : 40 $^{\circ}\text{C}$

(タンデム型質量分析計部^{注5})

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

ヒートブロック温度 : 300 $^{\circ}\text{C}$

D L 温度 : 300 $^{\circ}\text{C}$

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 各物質のモニターイオン条件

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		コリジョン エネルギー (eV)
		定量用 (m/z)	確認用 (m/z)	
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 5 mL (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 ENVI-Carb/LC-NH₂ (500 mg/500 mg) (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、本測定条件によるシハロホップブチル及びベンフレセートの保持時間はそれぞれ約 15.5 及び 11.1 分) 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 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 (%)	繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
シハロホッ プチル	稲発酵粗飼料1	11	0	0.225	92.7	2.7	22	1.1
	稲発酵粗飼料2	11	0	0.045	97.0	4.8	32	1.5
ベンフレ セート	稲発酵粗飼料1	11	0	0.45	96.1	2.6	8.1	0.45
	稲発酵粗飼料2	11	0	0.045	94.7	3.7	10	0.45

注 分析試料（風乾物）に対する添加濃度

- ・定量下限 試料（風乾物）中 各 0.02 mg/kg
- ・検出下限 試料（風乾物）中 シハロホップチル 0.0005 mg/kg、ベンフレセート 0.006 mg/kg

32 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 [C₁₂H₁₁NO₂] 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 [C₁₂H₁₅NO₃] 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 [C₁₂H₁₇NO₂] 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

一定量を混合し、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定量をアセトニトリル-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 10.0 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 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})

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 (650 L/h、350 °C)

キャピラリー電圧：1 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>)		
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、本測定条件によるカルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブの保持時間は約 7.9、7.5 及び 10.0 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 (%)
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
	オーツ乾草	0.1	5	86.6	6.6
		250	5	103	1.1

・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 (%)	
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	
	オーツ乾草	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	
オーツ乾草		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 (%)	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
	オーツ乾草	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
	オーツ乾草	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
	オーツ乾草	11	0	10	95.4	2.8	7.0	0.61

- ・定量下限 試料中 各 0.01 mg/kg (乾牧草中 各 0.1 mg/kg)
- ・検出下限 試料中 各 0.003 mg/kg (乾牧草中 各 0.03 mg/kg)