8.3.2 残留農薬多成分分析（その 2）

8.3.2.a ガスクロマトグラフ法

（1） **分析対象化合物**　*β*-HCH（*β*-BHC）、*γ*-HCH（*γ*-BHC）、*o,p'*-DDD、*p,p'*-DDD、*o,p'*-DDE、*p,p'*-DDE、*o,p'*-DDT、*p,p'*-DDT、アルドリン、エンドリン、ディルドリン、*trans*-クロルデン、*cis*-クロルデン、*trans*-ノナクロル、*cis*-ノナクロル、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド及びヘキサクロロベンゼン

（2） **概要**

この試験法は堆肥及びその原料となる藁に適用する。この試験法の分類は Type D であり、その記号は 8.3.2.a-2017 又は AG-C-2.a-1 とする。

肥料又は原料中の各農薬をアセトニトリル及び水で抽出し、多孔性けいそう土カラム、ゲル浸透クロマトグラフ及び合成けい酸マグネシウムカートリッジカラムを用いて精製後、電子捕獲検出器付きガスクロマトグラフを用いて測定し、分析試料中の分析対象化合物を求める。なお、この試験法の性能は**備考 8** に示す。

（3） **試薬等**　試薬及び水は、次による。

a） **水**：JIS K 0557 に規定する A3 の水。

b） **アセトニトリル**：JIS K 8039 に規定する残留農薬・PCB 試験用（濃縮 300 以上）又は同等の品質の試薬。

c） **ヘキサン**：JIS K 8825 に規定する（濃縮 300 以上）又は同等の品質の試薬。

d） **塩化ナトリウム**：残留農薬・PCB 試験用又は同等の品質の試薬。

e） **シクロヘキサン**：残留農薬・PCB 試験用（濃縮 300 以上）又は同等の品質の試薬。

f） **アセトン**：JIS K 8040 に規定する残留農薬・PCB 試験用（濃縮 300 以上）又は同等の品質の試薬。

g） **ジエチルエーテル**：JIS K 8357 に規定する残留農薬・PCB 試験用（濃縮 300 以上）又は同等の品質の試薬。

h） **2,2,4-トリメチルペンタン**：高速液体クロマトグラフ用又は同等の品質の試薬。

i） **各農薬標準液（200 μg/mL）**(1)：*β*-HCH（*β*-BHC）[$C_6H_6Cl_6$](2)、*γ*-HCH（*γ*-BHC）[$C_6H_6Cl_6$](2)、*o,p'*-DDD [$C_{14}H_{10}Cl_4$](2)、*p,p'*-DDD [$C_{14}H_{10}Cl_4$](2)、*o,p'*-DDE [$C_{14}H_8Cl_4$](2)、*p,p'*-DDE [$C_{14}H_8Cl_4$](2)、*o,p'*-DDT [$C_{14}H_9Cl_5$](2)、*p,p'*-DDT [$C_{14}H_9Cl_5$](2)、アルドリン [$C_{12}H_8Cl_6$](2)、エンドリン [$C_{12}H_8Cl_6O$](2)、ディルドリン [$C_{12}H_8Cl_6O$](2)、*trans*-クロルデン [$C_{10}H_8Cl_6$](2)、*cis*-クロルデン [$C_{10}H_8Cl_6$](2)、*trans*-ノナクロル [$C_{10}H_5Cl_9$](2)、*cis*-ノナクロル [$C_{10}H_5Cl_9$](2)、ヘプタクロル [$C_{10}H_5Cl_7$](2)、ヘプタクロルエポキシド [$C_{10}H_5Cl_7O$](2)及びヘキサクロロベンゼン [C_6Cl_6](2)約 0.02 g をそれぞれひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。アセトン 20 mL で溶かし、それぞれ 100 mL 全量フラスコに移し入れ、標線まで 2,2,4-トリメチルペンタンを加える。

j） **混合標準液（1 μg/mL）**(1)：各農薬標準液 1 mL を 200 mL 全量フラスコに移し入れ、標線まで 2,2,4-トリメチルペンタン－アセトン（4+1）を加える。

k） **検量線用混合標準液（0.02 μg/mL～0.2 μg/mL）**(1)：使用時に混合標準液（1 μg/mL）の 1 mL～10 mL を 50 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線まで 2,2,4-トリメチルペンタン－アセトン（4+1）を加える。

l） **検量線用混合標準液（0.005 μg/mL～0.02 μg/mL）**(1)：使用時に混合標準液（0.1 μg/mL）の 2.5 mL～10 mL を 50 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線まで 2,2,4-トリメチルペンタン－アセトン（4+1）を加える。

注（1） 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

（2） 標準試薬が市販されている。

備考 1. 各農薬の標準試薬は富士フイルム和光純薬、関東化学及び林純薬工業等より販売されている。

(4) **器具及び装置** 器具及び装置は、次のとおりとする。

a) **ガスクロマトグラフ(GC)**: JIS K 0114 に規定する GC で次の要件を満たすもの。

1) **試料導入部**: スプリットレス方式が可能なもの。

2) **キャピラリーカラム**: 内径 0.25 mm、長さ 30 m の溶融シリカ製の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を 0.25 μm 厚さでキャピラリーカラム内表面へ化学結合したもの。

3) **検出器**: 電子捕獲検出器(ECD)

b) **ゲル浸透クロマトグラフ(GPC)**: JIS K 0135 に規定する分取液体クロマトグラフで次の要件を満たすもの。なお、検出器は必要としない。

1) **試料導入部**: 試料溶液を 5 mL を注入できるもの。

2) **カラム**: 内径 20 mm、長さ 300 mm のステンレス鋼のカラム管にスチレンジビニルベンゼン共重合対系ハードゲルを充てんしたもの。

3) **ガードカラム**: 内径 20 mm、長さ 100 mm のステンレス鋼のカラム管にスチレンジビニルベンゼン共重合対系ハードゲルを充てんしたもの。

4) **分画部**: 農薬成分が溶出する画分を設定できるフラクションコレクター

c) **振り混ぜ機**

d) **濃縮器**: 40 °C まで調節できるエバポレーター

e) **ろ過器**: 減圧ろ過用漏斗(適合ろ紙径 60 mm)。

f) **多孔性けいそう土カートリッジカラム**: 多孔性けいそう土を充てんしたもの(保持容量 20 mL)。

g) **合成けい酸マグネシウムカートリッジカラム**: 合成けい酸マグネシウム 910 mg を充てんしたもの。

h) **メンブレンフィルター**: PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5 μm 以下)。

備考 2. GC 用カラムは DB-1701、Rtx-1701、SPB-1701 等の名称で市販されている。分析対象化合物を完全に分離できることが確認されたカラムを使用すること。

備考 3. GPC は、物質の分子の大きさにより GPC 用カラムの充てん剤でふるい分けられ分離した測定対象物質の画分をフラクションコレクターで収集する分取液体クロマトグラフである。GPC 用カラムは Shodex CLNpak EV-2000 AC 等の名称で市販されている。また、GPC 用ガードカラムは Shodex CLNpak EV-G AC 等の名称で市販されている。

備考 4. 減圧ろ過用漏斗は桐山漏斗 SB-60、桐山漏斗 SU-60 等の名称で市販されている。

備考 5. 多孔性けいそう土カートリッジは Chem Elut(20 mL)等の名称で市販されている。

備考 6. 合成けい酸マグネシウムは Sep-Pak Florisil Plus Long Cartridge(910 mg)等の名称で市販されている。

備考 7. メンブレンフィルターは HLC-DISK 25 溶媒系(孔径 0.45 μm)、DISMIC 25JP050、Millex FH(直径 25 mm、孔径 0.45 μm)等の名称で市販されている。

(5) **試験操作**

(5.1) **抽出** 抽出は、次のとおり行う。

a) 分析試料 5 g を 1 mg の桁まではかりとり、200 mL 共栓三角フラスコに入れる。

b） アセトニトリル－水（3+1）20 mL を加えて潤す。

c） 10 分間放置後、更にアセトニトリル 100 mL を加え、30 分間振り混ぜる。

d） 300 mL なす形フラスコをろ過器の下に置き、抽出液をろ紙（5 種 B）で減圧ろ過する。

e） 先の三角フラスコ及び残留物を順次アセトニトリル 50 mL で洗浄し、同様に減圧ろ過し、**d**）のろ液と合わせて抽出液とする。

（**5.2**） **クリーンアップ（1）** クリーンアップ（1）は、次のとおり行う。

a） 抽出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮する。

b） 塩化ナトリウム飽和溶液 20 mL を加え、多孔性けいそう土カートリッジカラムに入れ、約 5 分間放置させる。

c） 300 mL なすフラスコを同カートリッジカラムの下に置き、容器をヘキサン約 20 mL で 3 回洗浄し、順次同カートリッジカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで溶出させる。

d） 更にヘキサン約 60 mL を同カートリッジカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで溶出させる。

e） 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し(3)、シクロヘキサン－アセトン（4+1）10 mL を加えて残留物を溶かす。

f） メンブレンフィルター（孔径 0.5 μm 以下）でろ過する。

注（**3**） 乾固させすぎると農薬が揮散するおそれがある。

（**5.3**） **クリーンアップ（2）** クリーンアップ（2）は、次のとおり行う。

a） （**5.2**）**e**）のろ液 5.0 mL をゲル浸透クロマトグラフに注入し、**b**）の操作条件により定量する各農薬が溶出する画分を 100 mL なす形フラスコに分取する。

b） **ゲル浸透クロマトグラフの操作条件**： ゲル浸透クロマトグラフの操作条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

1） **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）

2） **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）

3） **溶離液**： シクロヘキサン－アセトン（4+1）

4） **流量**： 5 mL/min

5） **分取画分**： 70 mL～120 mL

c） 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し(3)、ヘキサン 2 mL を加えて残留物を溶かす。

（**5.4**） **クリーンアップ（3）** クリーンアップ（3）は、次のとおり行う。

a） 合成けい酸マグネシウムカートリッジカラム（910 mg）をヘキサン約 5 mL で洗浄する。

b） 50 mL なすフラスコを同カートリッジカラムの下に置き、（**5.3**）**c**）の溶液を同カートリッジカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。

c） 容器をヘキサン約 2 mL で 2 回洗浄し、洗液を順次同カートリッジに加え流出させる。

d） 更に、ヘキサン－ジエチルエーテル（9+1）15 mL を同カートリッジに加えて各測定対象物質を溶出させる。

e） 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し(3)、2,2,4-トリメチルペンタン－アセトン（4+1）1 mL(4)を加えて残留物を溶かし、試料溶液とする。

注（**4**） 試料溶液中の各農薬濃度が検量線の上限を超えるおそれのある場合は、試料溶液の一定量を2,2,4-トリメチルペンタン－アセトン（4+1）で希釈する。

（**5.5**） **測定** 測定は、JIS K 0114 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用するガスクロマトグラフの操作方法による。

a） **ガスクロマトグラフの測定条件** ガスクロマトグラフの測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

1） **試料導入方法**： スプリットレス注入法（1 min）

2） **試料導入部温度**： 250 °C

3） **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をキャピラリーカラム内表面へ化学結合した溶融シリカ製のキャピラリーカラム（内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm）

4） **カラム槽温度**： 60 °C（1 min）→（20 °C/min）→180 °C→（2 °C/min）→260 °C→（5 °C/min）→275 °C（1 min）

5） **キャリヤーガス**： ヘリウム、 **流量**： 1.5 mL/min

6） **付加ガス**： 窒素、 **流量**： 60 mL/min

7） **検出器**： 電子捕獲検出器（ECD）

8） **検出器温度**： 280 °C

b） **検量線の作成**

1） 各検量線用混合標準液 1 μL を GC に注入し、クロマトグラムを記録し、ピーク面積又は高さを求める。

2） 各検量線用混合標準液の濃度とピーク面積又は高さとの検量線を作成する。検量線の作成は、試料の測定時に行う。

c） **試料の測定**

1） 試料溶液を 1 μL を **b**）**1**）と同様に操作する。

2） ピーク面積又は高さから検量線より測定対象物質量を求め、分析試料中の測定対象物質を算出する。

備考 8. 堆肥中の分析対象化合物の回収試験の結果は、20 μg/kg 及び 50 μg/kg の添加レベルで平均回収率が 82.1 %～118.1 %及び 62.5 %～120.2 %であった。

精度の評価のため、堆肥を用いた日を変えての分析結果について、一元配置分散分析を用いて解析し、併行精度及び中間精度を算出した結果を表 1 に示す。なお、同時に検討した *α*-HCH（*α*-BHC）、*δ*-HCH（*δ*-BHC）、オキシクロルデンは満足する回収率が得られなかったので分析対象化合物から外した。

なお、この試験法の各農薬の定量下限は 20 μg/kg 以下である。

表1　残留農薬多成分分析の日を変えた試験成績の解析結果

農薬名	日数[1)]	平均値[2)]	併行精度		中間精度	
	T	(μg/kg)	s_r[3)] (μg/kg)	RSD_r[4)] (%)	$s_{I(T)}$[5)] (μg/kg)	$RSD_{I(T)}$[6)] (%)
β-BHC	5	15.7	1.3	8.3	2.0	12.8
γ-BHC	5	14.7	1.3	8.6	1.6	10.9
ヘキサクロロベンゼン	5	15.3	1.4	9.3	2.5	16.0
ヘプタクロル	5	16.9	1.1	6.7	2.4	14.3
アルドリン	5	12.8	1.0	7.8	3.4	26.4
ヘプタクロルエポキシド(1)	5	17.8	2.0	11.1	1.6	9.0
ヘプタクロルエポキシド(2)	5	17.9	1.8	10.1	1.8	10.0
trans-クロルデン	5	17.6	1.7	9.9	1.9	10.8
cis-クロルデン	5	17.8	1.3	7.2	2.0	11.3
trans-ノナクロル	5	15.9	1.3	8.3	1.5	9.6
cis-ノナクロル	5	16.7	1.5	8.8	2.1	12.4
ディルドリン	5	16.6	1.4	8.5	2.0	11.9
エンドリン	5	17.8	1.4	7.9	1.7	9.5
o,*p*'-DDE	5	18.7	2.7	14.4	2.7	14.6
p,*p*'-DDE	5	16.8	1.6	9.8	1.8	10.9
o,*p*'-DDD	5	16.9	1.2	7.3	1.3	7.8
p,*p*'-DDD	5	16.3	1.7	10.7	1.8	10.9
o,*p*'-DDT	5	17.9	1.4	7.8	2.2	12.0
p,*p*'-DDT	5	16.6	1.4	8.1	2.2	13.0

1) 2点併行分析を実施した日数
2) 平均値 (n= 日数(T)×併行数(2))
3) 併行標準偏差
4) 併行相対標準偏差
5) 中間標準偏差
6) 中間相対標準偏差

参考文献

1) 野崎友春: ガスクロマトグラフ(質量分析計)(GC(-MS))法による堆肥等中の塩素系農薬の測定, 肥料研究報告, **10**, 41~60 (2017)

(6) 塩素系農薬一斉試験法フローシート 肥料中の塩素系農薬の一斉試験法のフローシートを次に示す。

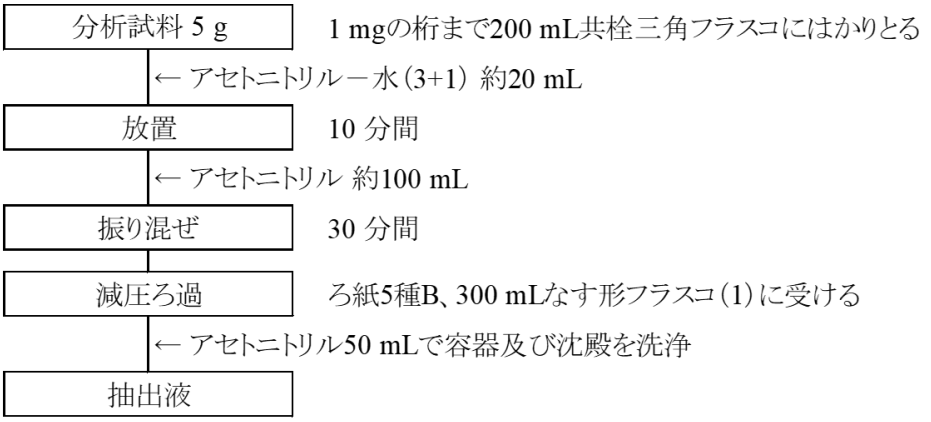


図1　肥料中の残留農薬多成分分析（その2：塩素系農薬の一斉試験法）フローシート（抽出操作）

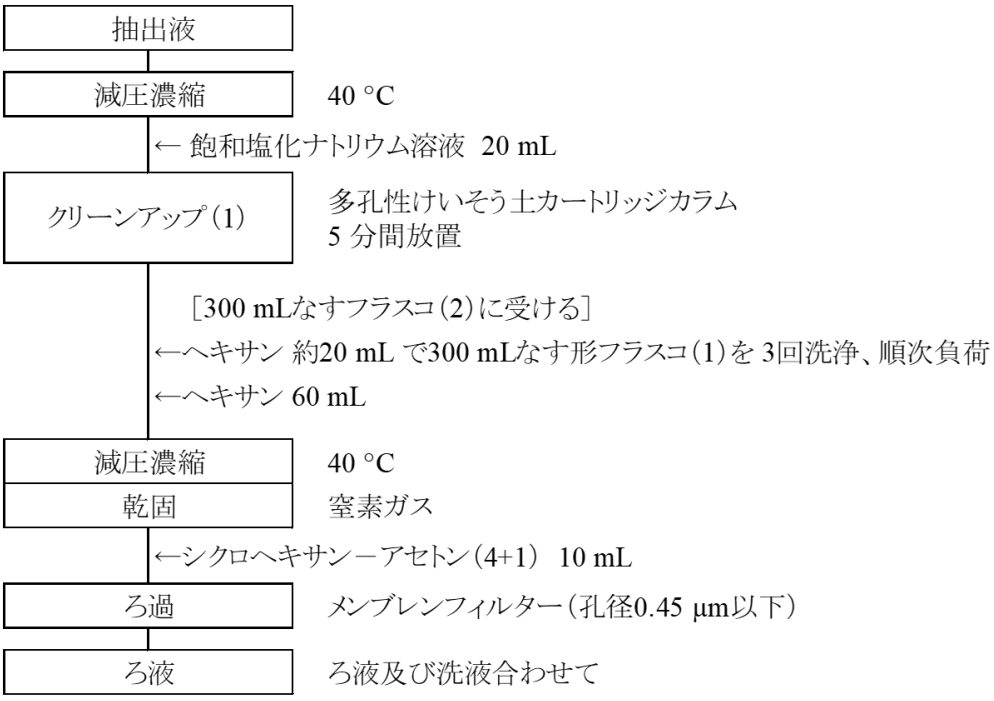


図2　肥料中の残留農薬多成分分析（その2：塩素系農薬の一斉試験法）フローシート（クリーンアップ（1）操作）

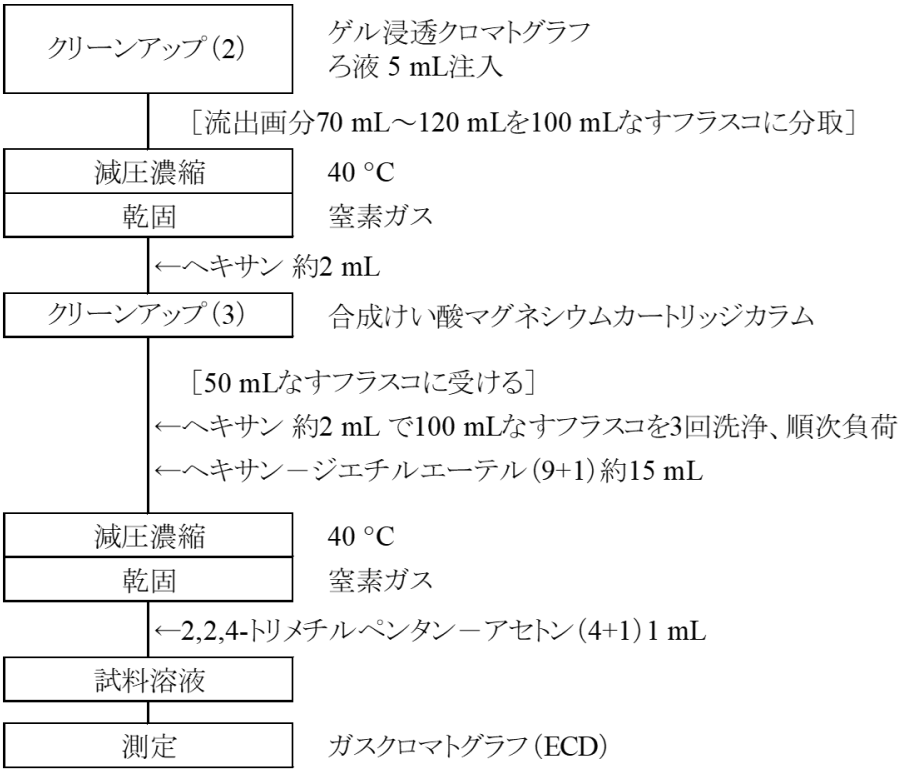


図3　肥料中の残留農薬多成分分析（その2：塩素系農薬の一斉試験法）フローシート（クリーンアップ（2）、クリーンアップ（3）及び測定操作）