

8.3 残留農薬(多成分)

8.3.1 残留農薬多成分分析(その1)

8.3.1.a 高速液体クロマトグラフタンデム質量分析法

(1) **分析対象化合物** アバメクチン: アバメクチン B1a、イベルメクチン: 22, 23-ジヒドロアベルメクチン B1a(別名イベルメクチン B1a)、エプリノメクチン: エプリノメクチン B1a、ロテノン: ロテノン、ピペロニルブトキシド: ピペロニルブトキシド、ピレトリン: ピレトリンI及びピレトリンII

(2) 概要

この試験法は液状の家庭園芸用複合肥料及び液状複合肥料に適用する。この試験法の分類は Type B であり、その記号は 8.3.1.a-2017 又は AG-C-1.a-1 とする。

肥料中の各農薬をアセトニトリル及び水にて溶解・抽出し、二種類のクリーンアップカートリッジを用いて精製後、高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計(LC-MS/MS)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3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) **メタノール**: JIS K 8891 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- d) **メタノール**: 高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計の溶離液に使用するメタノールは LC/MS 用又は同等の品質の試薬。
- e) **酢酸エチル**: JIS K 8361 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- f) **トルエン**: JIS K 8680 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- g) **ギ酸アンモニウム**: 特級(純度 95 % (質量分率) 以上)又は同等の品質の試薬。
- h) **ギ酸アンモニウム溶液(0.1 mol/L)**⁽¹⁾: ギ酸アンモニウム 6.306 g を水 1000 mL に加える。
- i) **ギ酸アンモニウム溶液(0.1 mmol/L)**⁽¹⁾: ギ酸アンモニウム溶液(0.1 mol/L) 1 mL を水 1000 mL に加える。
- j) **ギ酸**: JIS K 8264 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- k) **ギ酸溶液(0.1 v/v%)**⁽¹⁾: ギ酸 1 mL を水 1000 mL に加える。
- l) **ギ酸アセトニトリル溶液(0.1 v/v%)**⁽¹⁾: ギ酸 1 mL をアセトニトリル 1000 mL に加える。
- m) **各農薬標準液(100 µg/mL)**⁽¹⁾: アバメクチン[C₄₈H₇₂O₁₄]⁽²⁾、イベルメクチン[C₄₈H₇₄O₁₄]⁽²⁾、エプリノメクチン[C₅₀H₇₅NO₁₄]⁽²⁾、ロテノン[C₂₃H₂₂O₆]⁽²⁾、ピペロニルブトキシド[C₁₉H₃₀O₅]⁽²⁾及びピレトリンI:C₂₁H₂₈O₃及びピレトリンII:C₂₂H₂₈O₅⁽²⁾約 0.01 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。少量のメタノールで溶かし、100 mL 全量フラスコに移し入れ、標線まで同溶媒を加える(ただし、ピレトリンに関してはピレトリンI・IIの含量として 100 µg/mL を含有する。)
- n) **混合標準液(10 µg/mL)**: 各農薬標準液 10 mL を 100 mL 全量フラスコに移し入れ、標線までメタノールを加える。
- o) **混合標準液(1000 ng/mL)**: 混合標準液(10 µg/mL) 10 mL を 100 mL 全量フラスコに移し入れ、標線までメタノールを加える。
- p) **検量線用混合標準液(50 ng/mL~500 ng/mL)**: 使用時に混合標準液(1000 ng/mL)の 2.5 mL~25 mL を 50 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線までメタノールを加える。

q) **検量線用混合標準液(5 ng/mL~50 ng/mL)**: 使用時に混合標準液(100 ng/mL)の2.5 mL~25 mLを50 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線までメタノールを加える。

- 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) **高速液体クロマトグラフ質量分析計**: JIS K 0136 に規定する高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計で次の要件を満たすもの。

1) **高速液体クロマトグラフ**:

- ① カラム槽: カラム槽温度を30℃~45℃で調節できるもの。
 ② カラム: 内径2 mm~3 mm、長さ50 mm~150 mm、粒径1.6 μm~3.0 μmのステンレス鋼のカラム管にオクタデシル基を化学結合したシリカゲルを充てんしたもの。質量分析計仕様のもの⁽³⁾。

2) **質量分析計**:

- ① イオン化法: エレクトロスプレーイオン化(ESI)法
 ② イオン検出方式: 選択反応検出法

b) **超音波発生器**: 超音波洗浄器を用いることができる。

c) **濃縮器**: 40℃まで調節できるエバポレーター

d) **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5 mL)⁽⁴⁾

e) **グラファイトカーボン-NH₂ 積層カートリッジカラム**: グラファイトカーボン500 mg及びアミノプロピルシリル化シリカゲル500 mgを6 mL注射筒に積層したもの⁽⁵⁾

注(3) ACQUITY UPLC HSS C18等の名称で市販されている。

(4) Chem Elut (5 mL)等の名称で市販されている。

(5) Envi-carb/LC-NH₂ (500 mg/500 mg、6 mL)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5.00 mL⁽⁶⁾を、10 mL 全量フラスコに入れる。

b) アセトニトリル3 mLを同全量フラスコに加え、標線まで水を加えてよく振り混ぜる。

c) 超音波発生器を用いて5分間超音波処理をし⁽⁷⁾、抽出液とする。

注(6) 試料の比重を量り測定終了後、分析試料中の対象物質濃度を算出する。

(7) 超音波処理の結果、溶液の体積が膨張することがあるので注意する。膨張の際にはしばらく常温にて放置するとよい。

備考 2. 比重(密度)の測定は10 mL 全量フラスコを電子天秤に乗せ、ゼロ合わせを行い、分析試料5.00 mLを当該フラスコに入れ、秤量値を読み取り算出することができる。

(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 5 mL を、多孔性けいそう土カートリッジカラムに入れ、約 5 分間保持させる。
- b) 100 mL なすフラスコを同カートリッジカラムの下に置き、酢酸エチル約 5 mL を 4 回、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⁽⁸⁾。
- 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⁽⁹⁾、アセトニトリル-トルエン(3+1) 2 mL を加えて残留物を溶かす。

注(8) 試験導入前には溶出確認をすること。

(9) 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) グラファイトカーボン-NH₂ 積層カートリッジカラムを予めアセトニトリル-トルエン(3+1)約 10 mL で洗浄する。
- b) 100 mL なすフラスコを同カートリッジカラムの下に置き、(5.2)c) の溶解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) 容器をアセトニトリル-トルエン(3+1)約 5 mL で 5 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) 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し⁽¹⁰⁾、メタノール 5 mL⁽¹¹⁾を加えて残留物を溶かす。溶解液の一定量を正確にとり、メタノールで正確に 5 倍に希釈し、当該溶液を試料溶液とする。

注(10) 乾固させすぎると農薬が揮散するおそれがある。

(11) 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メタノールで希釈する。

(5.4) 測定 測定は、JIS K 0136 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する高速液体クロマトグラフ質量分析計の操作方法による。

a) 高速液体クロマトグラフ質量分析計の測定条件 高速液体クロマトグラフ質量分析計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) 高速液体クロマトグラフ:

- ① カラム: オクタデシル基を化学結合したシリカゲルカラム(内径 2 mm~3 mm、長さ 50 mm~150 mm、粒径 1.6 μm~3.0 μm)
- ② 流量: 0.2 mL/min~0.5 mL/min
- ③ 溶離液: A: ぎ酸アンモニウム溶液(0.1 mmol/L) - ぎ酸溶液(0.1 v/v%) [1+1]
B: ぎ酸アセトニトリル溶液(0.1 v/v%)
- ④ グラジエント: 0 min (50 %B) → 15 min (95 %B) → 20 min (98%B) → 30 min (50 %B)
- ⑤ カラム恒温槽: 40 °C
- ⑥ 注入量: 5 μL

2) 質量分析計:

- ① イオン化法: エレクトロスプレーイオン化(ESI)法

- ② モード: ポジティブ
 ③ モニターイオン: 表1のとおり

表1 各農薬のモニターイオン

農薬名	質量イオン比 (m/z)		
	プレカーサーイオン	プロダクトイオン (定量用)	プロダクトイオン (確認用)
アバメクチンB1a	891	305	567
イベルメクチンB1a	893	307	551
エプリノメクチンB1a	915	186	298
ロテノン	395	213	192
ピペロニルブトキシド	356	177	147
ピレトリンI	329	161	133
ピレトリンII	373	161	133

b) 検量線の作成

- 1) 各検量線用混合標準液 5 μL を高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計に注入し、測定対象物質の定量用イオン (m/z) 及び確認用イオン (m/z) のクロマトグラムを記録する。
- 2) 測定対象物質の定量用イオン (m/z) と確認用イオン (m/z) のピーク面積比又は高さ比を算出する。
- 3) 各検量線用混合標準液の測定対象物質濃度と定量用イオン (m/z) の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 5 μL を **b) 2) ~ 3)** と同様に操作する⁽¹²⁾。
- 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。

注(12) 試料溶液の定量用イオン (m/z) と確認用イオン (m/z) のピーク面積比又は高さ比が、標準液のピーク面積比又は高さ比に対して $\pm 30\%$ 程度の範囲内であることを確認する。なお、ピーク面積比又は高さ比は濃度によって異なることがある。

(5.5) 計算

次の式によって分析試料中の各農薬濃度を算出する。

$$\text{分析試料中の各農薬濃度 } (\mu\text{g/kg}) = (A \times B \times 10) / C$$

A: 検量線から求めた最終試料溶液中の各測定対象物質濃度 (ng/mL)

B: 検量線上限を超えたために最終試料溶液をさらに希釈した場合の希釈倍率

C: 分析試料における比重(密度) (g/mL)

備考 3. 液状の家庭園芸用複合肥料(3種類)、液状複合肥料(2種類)の回収試験の結果は、4000 $\mu\text{g/kg}$

及び 400 µg/kg(ただし、ピレトリンに関してはピレトリンI・IIの含量として 4000 µg/kg 及び 400 µg/kg)の添加レベルで平均回収率が 77.0 %~104.5 %及び 85.6 %~107.9 %であった。

また、試験法の妥当性確認のための共同試験の成績及び解析結果を表 2 に示す。

なお、この試験法の各農薬の定量下限は 10 µg/kg 程度と推定された。

表2 残留農薬多成分分析試験法の妥当性確認のための共同試験成績の解析結果

農薬名	試料名	試験 室数 ¹⁾	平均値 ²⁾ (µg/kg)	添加量 (µg/kg)	回収率 (%)	RSD _r ³⁾ (%)	RSD _R ⁴⁾ (%)
アバメクチン Bla	家庭園芸用複合肥料1	8(0)	286.8	333.3	86.1	13.3	14.4
	家庭園芸用複合肥料2	8(0)	358.9	416.7	86.1	13.4	14.8
	家庭園芸用複合肥料3	8(0)	425.8	500.0	85.2	8.6	11.6
	液状複合肥料1	8(0)	288.6	333.3	86.6	7.1	8.5
	液状複合肥料2	8(0)	405.5	500.0	81.1	7.1	7.2
イベルメクチン Bla	家庭園芸用複合肥料1	8(0)	298.9	333.3	89.7	14.9	15.0
	家庭園芸用複合肥料2	8(0)	382.5	416.7	91.8	14.1	19.3
	家庭園芸用複合肥料3	8(0)	431.1	500.0	86.2	9.8	10.9
	液状複合肥料1	8(0)	298.8	333.3	89.6	10.1	12.8
	液状複合肥料2	8(0)	405.2	500.0	81.0	3.8	5.8
エプリノメクチン Bla	家庭園芸用複合肥料1	8(0)	293.5	333.3	88.1	7.0	10.4
	家庭園芸用複合肥料2	8(0)	361.9	416.7	86.9	9.2	14.3
	家庭園芸用複合肥料3	8(0)	425.3	500.0	85.1	7.0	10.0
	液状複合肥料1	8(0)	277.3	333.3	83.2	9.0	12.0
	液状複合肥料2	8(0)	398.2	500.0	79.6	7.5	11.6
ロテノン	家庭園芸用複合肥料1	8(0)	276.8	333.3	83.1	5.7	7.8
	家庭園芸用複合肥料2	8(0)	353.5	416.7	84.8	9.8	12.5
	家庭園芸用複合肥料3	8(0)	426.6	500.0	85.3	6.6	8.5
	液状複合肥料1	8(0)	263.5	333.3	79.1	11.0	12.3
	液状複合肥料2	8(0)	385.2	500.0	77.0	5.7	12.1

1) 有効試験室数(外れ値を報告した試験室数)

2) 平均値(n =有効試験室数×試料数(2))

3) 併行相対標準偏差

4) 室間再現相対標準偏差

表2 (続き)

農薬名	試料名	試験 室数 ¹⁾	平均値 ²⁾ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回収率 (%)	RSD_r ³⁾ (%)	RSD_R ⁴⁾ (%)
ピペロニル ブトキシド	家庭園芸用複合肥料1	8(0)	318.2	333.3	95.5	8.1	13.2
	家庭園芸用複合肥料2	8(0)	395.6	416.7	94.9	8.4	13.6
	家庭園芸用複合肥料3	8(0)	450.3	500.0	90.1	4.6	9.3
	液状複合肥料1	8(0)	299.7	333.3	89.9	7.4	11.0
	液状複合肥料2	8(0)	435.8	500.0	87.2	5.8	7.4
ピレトリン I	家庭園芸用複合肥料1	8(0)	160.7	186.0	86.4	9.3	11.9
	家庭園芸用複合肥料2	8(0)	202.2	232.5	87.0	12.6	12.8
	家庭園芸用複合肥料3	8(0)	228.6	279.0	81.9	5.4	8.8
	液状複合肥料1	8(0)	158.2	186.0	85.1	6.8	10.4
	液状複合肥料2	8(0)	223.1	279.0	80.0	8.5	9.1
ピレトリン II	家庭園芸用複合肥料1	8(0)	131.1	147.3	89.0	6.5	9.7
	家庭園芸用複合肥料2	8(0)	163.2	184.2	88.6	10.8	13.6
	家庭園芸用複合肥料3	8(0)	182.0	221.0	82.4	5.4	8.9
	液状複合肥料1	8(0)	126.2	147.3	85.7	7.8	11.4
	液状複合肥料2	8(0)	180.2	221.0	81.5	6.3	8.3

1) 有効試験室数(外れ値を報告した試験室数)

3) 併行相対標準偏差

2) 平均値(n =有効試験室数 \times 試料数(2))

4) 室間再現相対標準偏差

参考文献

- 八木寿治, 山西正将, 白井裕治: 液体クロマトグラフトンデム型質量分析計(LC/MS/MS)による液状肥料中の農薬の同時測定, 肥料研究報告, **4**, 36~48 (2011)
- 八木寿治, 山西正将, 白井裕治, 柴田政人: 液体クロマトグラフトンデム型質量分析計(LC-MS/MS)による液状肥料中の6種農薬の同時測定 -共同試験成績-, 肥料研究報告, **5**, 48~59 (2012)

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

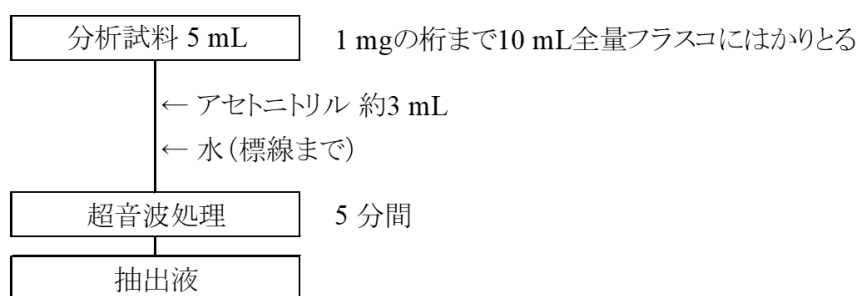


図1 肥料中の残留農薬多成分分析(その1:6種農薬の一斉試験法)フローシート(抽出操作)

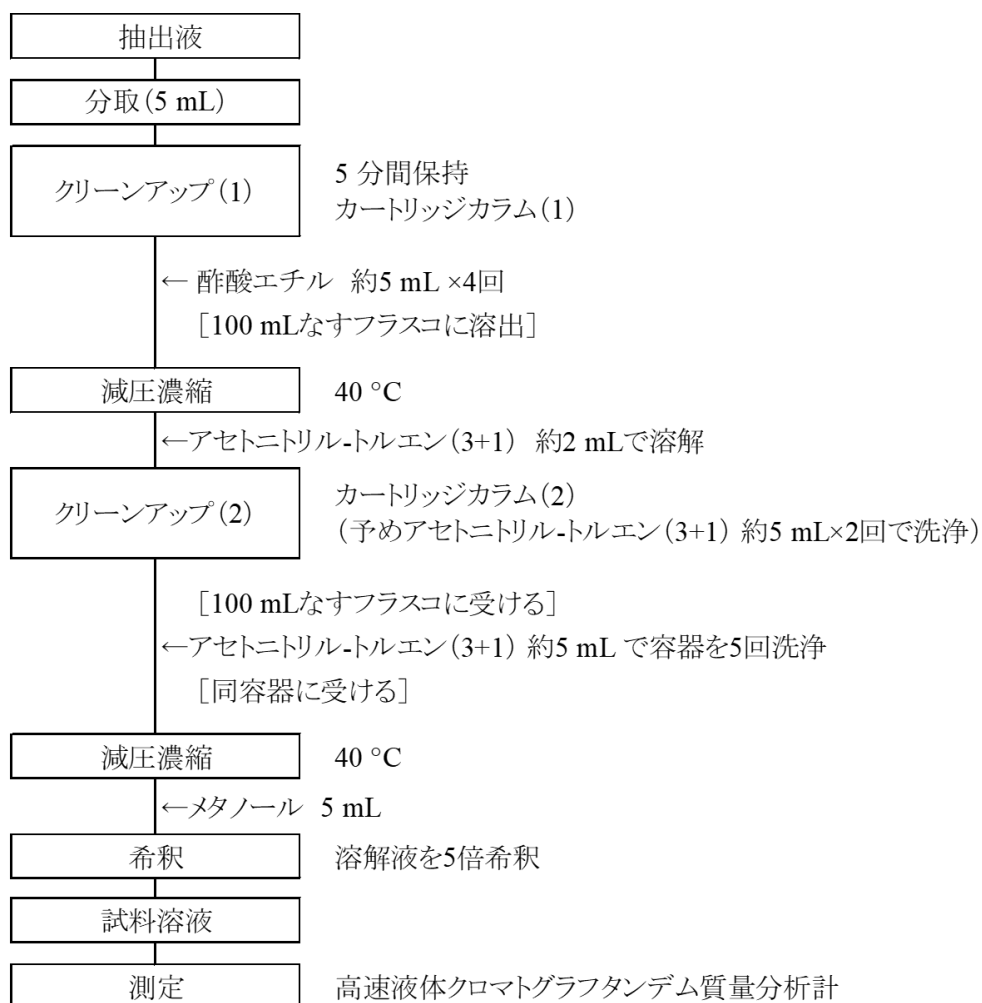
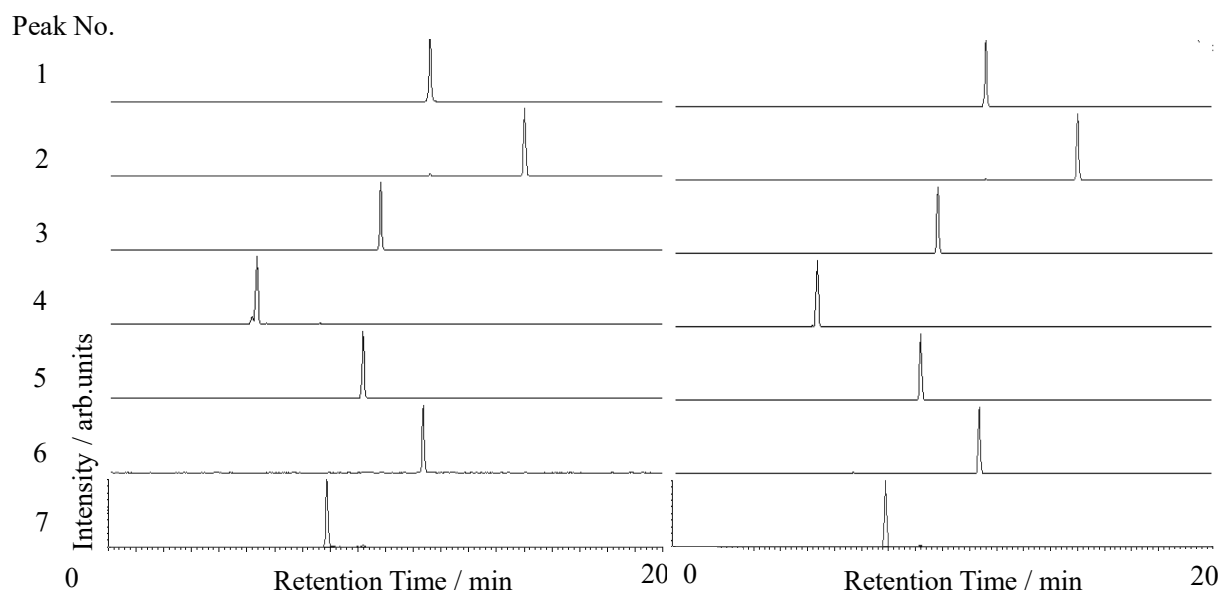


図2 肥料中の残留農薬多成分分析(その1:6種農薬の一斉試験法)フローシート
(クリーンアップ(1)、クリーンアップ(2)及び測定操作)

参考 検量線用混合標準液及び試料溶液(液状の家庭園芸用複合肥料)の選択反応検出クロマトグラム例を次に示す。



Peak No.1: アバメクチン B1a
 No.2: イベルメクチン B1a
 No.3: エプリノメクチン B1a
 No.4: ロテノン
 No.5: ピペロニルブトキシド
 No.6: ピレトリンI
 No.7: ピレトリンII

1) 混合標準液

2) 試料溶液

参考図 各農薬の選択反応検出クロマトグラム

- 1) 混合標準液(各農薬として 2500 pg 相当量)
(ピレトリンに関してはピレトリンI・IIの含量として 2500 pg 相当量)
- 2) 試料溶液(液状の家庭園芸用複合肥料、試料中 400 μg/kg 相当量添加)
(ピレトリンに関してはピレトリンI・IIの含量として 400 μg/kg 相当量)

LC-MS/MS の測定条件

カラム: ACQUITY UPLC HSS C18(内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒径 1.8 μm)

流量: 0.2 mL/min

キャピラリー電圧: 3.0 kV

イオン源温度: 120 °C

デソルベーション温度: 400 °C

コーン電圧: 表 1 のとおり

コリジョンエネルギー：参考表のとおり

その他の条件は(5.4) a) LC-MS/MS の測定条件の例示及び参考表のとおり

参考表 質量分析計のパラメーター

農薬名	質量イオン比 (m/z)			コリジョン エネルギー (eV)
	プレカーサー イオン	プロダクトイオン (定量用)	プロダクトイオン (確認用)	
アバメクチンB1a	891	305	567	20
イベルメクチンB1a	893	307	551	25
エプリノメクチンB1a	915	186	298	20
ロテノン	395	213	192	35
ピペロニルブトキシド	356	177	147	20
ピレトリン I	329	161	133	20
ピレトリン II	373	161	133	20

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、アルドリノ、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糞に適用する。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 $\mu\text{g}/\text{mL}$)**⁽¹⁾: β -HCH(β -BHC) [$\text{C}_6\text{H}_6\text{Cl}_6$]⁽²⁾、 γ -HCH(γ -BHC) [$\text{C}_6\text{H}_6\text{Cl}_6$]⁽²⁾、*o,p'*-DDD [$\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{Cl}_4$]⁽²⁾、*p,p'*-DDD [$\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{Cl}_4$]⁽²⁾、*o,p'*-DDE [$\text{C}_{14}\text{H}_8\text{Cl}_4$]⁽²⁾、*p,p'*-DDE [$\text{C}_{14}\text{H}_8\text{Cl}_4$]⁽²⁾、*o,p'*-DDT [$\text{C}_{14}\text{H}_9\text{Cl}_5$]⁽²⁾、*p,p'*-DDT [$\text{C}_{14}\text{H}_9\text{Cl}_5$]⁽²⁾、アルドリノ [$\text{C}_{12}\text{H}_8\text{Cl}_6$]⁽²⁾、エンドリン [$\text{C}_{12}\text{H}_8\text{Cl}_6\text{O}$]⁽²⁾、ディルドリン [$\text{C}_{12}\text{H}_8\text{Cl}_6\text{O}$]⁽²⁾、*trans*-クロルデン [$\text{C}_{10}\text{H}_8\text{Cl}_6$]⁽²⁾、*cis*-クロルデン [$\text{C}_{10}\text{H}_8\text{Cl}_6$]⁽²⁾、*trans*-ノナクロル [$\text{C}_{10}\text{H}_5\text{Cl}_9$]⁽²⁾、*cis*-ノナクロル [$\text{C}_{10}\text{H}_5\text{Cl}_9$]⁽²⁾、ヘプタクロル [$\text{C}_{10}\text{H}_5\text{Cl}_7$]⁽²⁾、ヘプタクロルエポキシド [$\text{C}_{10}\text{H}_5\text{Cl}_7\text{O}$]⁽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 $\mu\text{g}/\text{mL}$)**⁽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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)**⁽¹⁾: 使用時に混合標準液(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$)**⁽¹⁾: 使用時に混合標準液(0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)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 の熔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℃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℃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⁽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℃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⁽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、ヘキサノージェチルエーテル(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℃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⁽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) **キャリアーガス**: 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、中間精度及び併行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⁾ <i>T</i>	平均値 ²⁾ ($\mu\text{g/kg}$)	併行精度		中間精度	
			s_r ³⁾ ($\mu\text{g/kg}$)	RSD_r ⁴⁾ (%)	$s_{I(T)}$ ⁵⁾ ($\mu\text{g/kg}$)	$RSD_{I(T)}$ 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
<i>trans</i> -クロルデン	5	17.6	1.7	9.9	1.9	10.8
<i>cis</i> -クロルデン	5	17.8	1.3	7.2	2.0	11.3
<i>trans</i> -ノナクロル	5	15.9	1.3	8.3	1.5	9.6
<i>cis</i> -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
<i>o,p'</i> -DDE	5	18.7	2.7	14.4	2.7	14.6
<i>p,p'</i> -DDE	5	16.8	1.6	9.8	1.8	10.9
<i>o,p'</i> -DDD	5	16.9	1.2	7.3	1.3	7.8
<i>p,p'</i> -DDD	5	16.3	1.7	10.7	1.8	10.9
<i>o,p'</i> -DDT	5	17.9	1.4	7.8	2.2	12.0
<i>p,p'</i> -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(日数(*T*) \times 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。

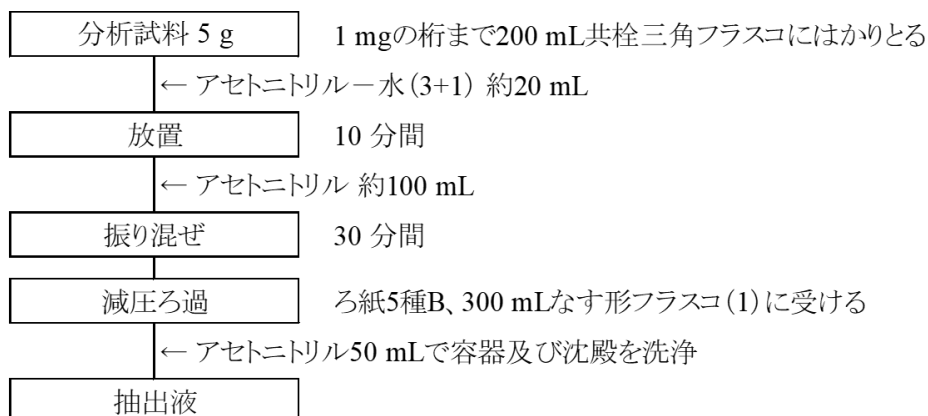


図1 肥料中の残留農薬多成分分析(その2:塩素系農薬の一斉試験法)フローシート
(抽出操作)

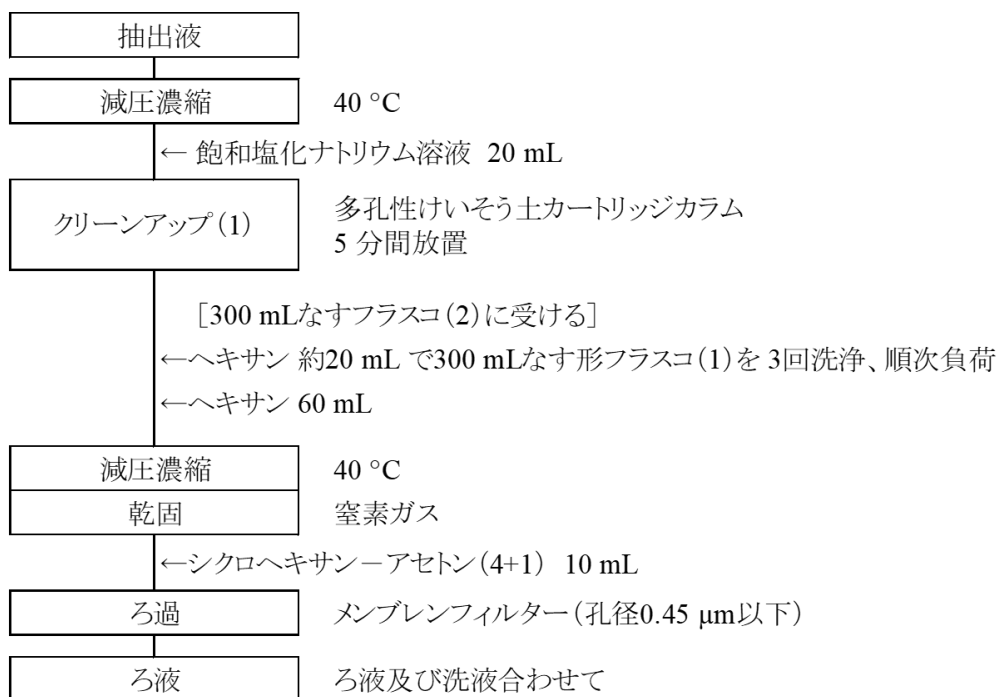


図2 肥料中の残留農薬多成分分析(その2:塩素系農薬の一斉試験法)フローシート
(クリーンアップ(1)操作)

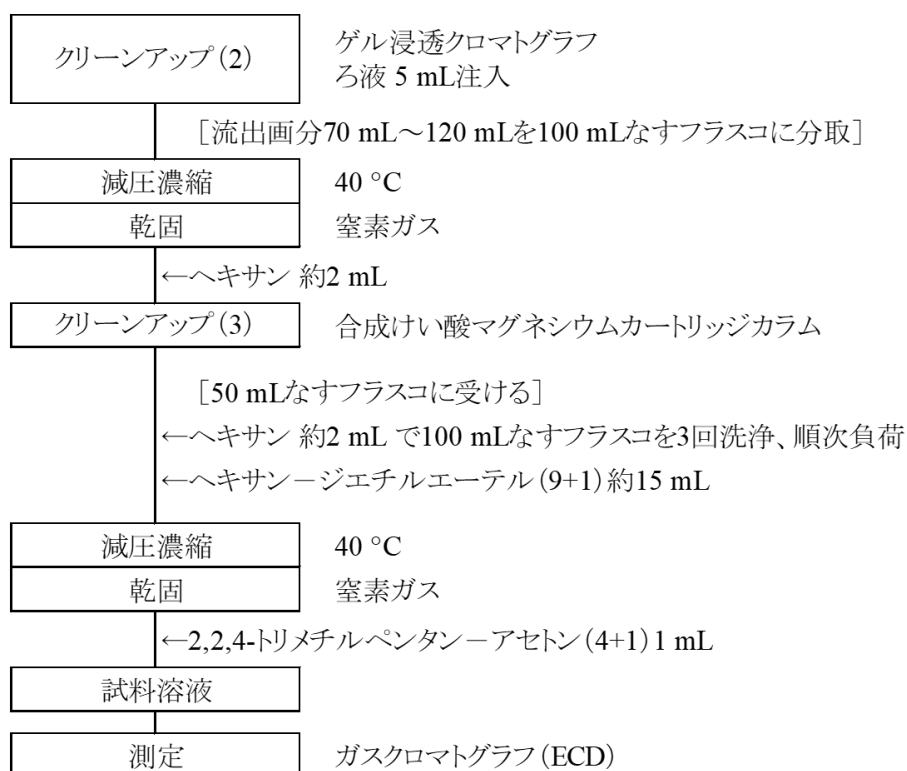


図3 肥料中の残留農薬多成分分析(その2:塩素系農薬の一斉試験法)フローシート
(クリーンアップ(2)、クリーンアップ(3)及び測定操作)