

第 3 章 個別試験法

(追加：2，2-DPA試験法、Sec-ブチルアミン試験法、アルベンダゾール、オキシベンダゾール、チアベンダゾール、フルベンダゾール及びメベンダゾール試験法、アンプロリウム及びデコキネート試験法、イソウロン、ジウロン、テブチウロン、トリフルムロン、フルオメツロン及びリニューロン試験法、エテホン試験法、オキスポコナゾールフマル酸塩試験法、オルメトプリム、ジアベリジン、トリメトプリム及びピリメタミン試験法、クロジナホッププロパルギル試験法、ジクロベニル試験法、ジチアノン試験法、ジチオピル及びチアゾピル試験法、スルファキノキサリン、スルファジアジン、スルファジミジン、スルファジメトキシシ、スルファメトキサゾール、スルファメトキシピリダジン、スルファメラジン、スルファモノメトキシシ及びスルフイソゾール試験法、チアジニル試験法、トリクロロ酢酸ナトリウム塩試験法、トリブロムサラン及びビチオノール試験法、ニコチン試験法、ピリチオバックナトリウム塩試験法、フルカルバゾンナトリウム塩試験法、リン化水素試験法)

2,2-DPA試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

2,2-DPA（別名：ダラポン、2,2-ジクロロプロピオン酸）
ダラポンナトリウム塩

2. 装置

電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフ（GC-ECD）
ガスクロマトグラフ・質量分析計（GC/MS）

3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の2に示すものを用いる。

2,2-DPA標準品 本品は2,2-DPA 99%以上を含む。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出、精製

試料10.0 gを量り採り、塩化ナトリウム飽和2%ホウ酸ナトリウム溶液70 mLを加えて30分間振とうした後、ガラス繊維ろ紙を用いて吸引ろ過する。ろ紙上の残留物に同溶液30 mLを加え、上記と同様に操作した後、ろ液を合わせる。これにエーテル100 mLを加えて5分間激しく振とうした後、静置し、エーテル層は捨てる。水層に6 mol/L塩酸を加えてpH1.0に調整した後、エーテル50 mLずつで2回振とう抽出する。得られた抽出液を合わせ、1%炭酸水素ナトリウム溶液30 mLずつで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、かくはんしながら、6 mol/L塩酸を加えてpH1.0に調整した後、エーテル40 mLずつで2回抽出する。抽出液を合わせ、液相分離ろ紙を用いてろ過し、30℃以下で約2 mLまで減圧濃縮した後、窒素ガス気流中で溶媒を除去する。

2) エステル化

残留物にブタノール1 mL及び硫酸3滴を加え、還流冷却管を取り付けて、沸騰水浴上で30分間加熱還流する。冷却後、冷却管の内壁を少量の水で洗い、冷却管をはずし、反応液を*n*-ヘキサン10 mLずつで2回抽出する。抽出液を液相分離ろ紙を用いてろ過し、*n*-ヘキサンを加えて正確に25 mLとしたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

2,2-DPA標準品の20 mg/Lアセトン溶液を調製し、この1 mLを採り、室温下、窒素ガス気流中で溶媒を除去した後、4の2) エステル化と同様の操作を行う。この溶液を*n*-ヘキサンで希釈し、2,2-DPAの0.02～1 mg/L溶液を数点調製し、それぞれ2 μL

をGCに注入し、ピーク高法又はピーク面積法により検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液 2 μ L を GC に注入し、5 の検量線で 2,2-DPA の含量を求める。

7. 確認試験

GC/MSにより確認する。

8. 測定条件

GC

検出器：ECD

カラム：50%フェニルメチルシリコン、内径0.25 mm、長さ25m、膜厚0.1 μ m

カラム温度：40°C

注入口温度：250°C

検出器温度：250～300°C

キャリアーガス：ヘリウム

保持時間の目安：5分

9. 定量限界

0.05 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

2,2-DPAを試料から塩化ナトリウム飽和2%ホウ酸ナトリウム溶液で抽出し、抽出液をエーテルで洗浄した後、酸性（pH 1）に調整し、エーテルで抽出する。エーテル抽出液から2,2-DPAを1%炭酸水素ナトリウム溶液で抽出する。抽出液を酸性（pH 1）に調整した後、エーテルで再抽出する。溶媒を除去した後、ブタノール及び硫酸を加え、30分間加熱還流する。反応液から2,2-DPAのエステル化体を*n*-ヘキサンで抽出し、GC-ECDで測定し、GC/MSで確認する方法である。

2) 注意点

- ① 2,2-DPAは濃縮操作で損失するため、浴温を低く設定し、溶媒除去は窒素ガス気流中で行う。キーパーを使用してもよい。
- ② 2,2-DPAのエステル化生成物は揮発性が高く、濃縮による損失が大きいため、濃縮を行わずそのまま定容して試験溶液とする。
- ③ LC/MSの適用も考えられる。この場合はエステル化操作を省き、1) 抽出の最終

残留物を0.1%酢酸 8 mLに溶解する。

LC/MS操作条件

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径 5 μ m） 内径2.0 mm、長さ150 mm

移動相：1 %ギ酸及びメタノール（4 : 1）混液

流量：0.2 mL/分

カラム温度：40℃

イオン化モード：ESI(+)

主なイオン（ m/z ）：141

保持時間の目安：7 分

11. 参考文献

- 1) Cotterill, E.G., Determination of residues of dalapon in soil by gas chromatography of the 1-butyl ester, J.Chromatogr., 106, 409~411, 1975
- 2) Zweig, G. & Sherma, J. ed., Analytical Method for Pesticides, Plant Growth Regulators, and Food Additives. vol.VI p.621-624, Academic Press (1972)

12. 類型

C

Sec-ブチルアミン試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

Sec-ブチルアミン（別名：2-アミノブタン）

2. 装置

蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-FL）

液体クロマトグラフ・質量分析計（LC/MS）

水蒸気蒸留装置

3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の2に示すものを用いる。

フルオレスカミン HPLC用ラベル試薬フルオレスカミン

0.4 mol/Lホウ酸緩衝液（pH10.25）

Sec-ブチルアミン標準品 本品は Sec-ブチルアミン99%以上を含む。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料25.0 gを蒸留フラスコに量り採り、1 mol/L塩化カルシウム溶液75 mL、水50 mL、消泡剤5～10滴、及び酸化マグネシウム10 gを水50 mLに懸濁させたものを加え、次いで、水50 mLで蒸留フラスコの内壁を洗い込み、水蒸気蒸留装置に取りつける。あらかじめ0.15 mol/L硫酸10 mLを入れた受器に、留出液80 mLが溜まるまで水蒸気蒸留を行う。この留出液に0.3 mol/L水酸化ナトリウム溶液を加えてpH 7に調整し、水を加えて100 mLとする。

2) 蛍光誘導体化

上記の溶液0.50 mL（試料0.125 g相当）を採り、0.4 mol/Lホウ酸緩衝液（pH10.25）0.20 mL及び0.1%フルオレスカミン含有アセトニトリル0.25 mLを加えて混合し、2～3分間放置したものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

Sec-ブチルアミン標準品の0.025～5 mg/L水溶液を数点調製し、それぞれ0.50 mLを採り、4の2）と同様に蛍光誘導体化の操作を行う。その20 μ LをHPLCに注入し、ピーク高法又はピーク面積法により検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液20 μ LをHPLCに注入し、5の検量線でSec-ブチルアミンの含量を求める。

7. 確認試験

LC/MSにより確認する。

8. 測定条件

HPLC

検出器：FL（励起波長382 nm、蛍光波長487.5 nm）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径5 μ m）、内径6 mm、長さ250 mm

移動相：0.08 mol/L トリス緩衝液（pH8.0）及びメタノール（48：52）混液

9. 定量限界

0.1 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

Sec-ブチルアミンを試料から水蒸気蒸留法で抽出し、フルオレスカミンで蛍光誘導体化した後、HPLC-FLで測定し、LC/MSで確認する方法である。

2) 注意点

① 別法として、ジニトロフェニル誘導体化し、GC-ECDで定量し、GC/MSで確認する方法がある。詳細は類型に示した文献2)を参照のこと。

11. 参考文献

- 1) Hunter, K. & Lindsay, D., High-pressure liquid chromatographic determination of sec-butylamine residues in potatoes, Pestic. Sci. 12, 319-324, 1981
- 2) Day, E. W. & Koons, J. R., 2-Aminobutane, Analytical Methods Pesticide, Plant Growth Regulators, and Food Additives vol VIII, 251-261, 1976, Academic Press

12. 類型

D（誘導体化、HPLC測定については、1) Hunter, K. & Lindsay, D., High-pressure liquid chromatographic determination of sec-butylamine residues in potatoes, Pestic. Sci. 12, 319-324, 1981, 水蒸気蒸留法については、2) Day, E. W. & Koons, J. R., 2-Aminobutane, Analytical Methods Pesticide, Plant Growth Regulators, and Food Additives vol VIII, 251-261, 1976, Academic Press)

アルベンダゾール、オキシベンダゾール、チアベンダゾール、フルベンダゾール及びメベンダゾール試験法（畜水産物）

1. 分析対象化合物

オキシベンダゾール

チアベンダゾール

5-ヒドロキシチアベンダゾール（チアベンダゾールの代謝物）

フルベンダゾール

5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン（アルベンダゾールの代謝物）

メベンダゾール

2. 装置

紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-UV）又は多波長検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-DAD）

3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の2に示すものを用いる。

アセトニトリル 液体クロマトグラフ用に製造したものを用いる。

テトラヒドロフラン 液体クロマトグラフ用に製造したものを用いる。

水 液体クロマトグラフ用に製造したものを用いる。

メタノール 液体クロマトグラフ用に製造したものを用いる。

炭酸塩緩衝液 0.1 mol/L 炭酸水素ナトリウム溶液 900 mL に 0.1 mol/L 炭酸ナトリウム溶液 100 mL を混合する（pH9.1）。

オキシベンダゾール標準品 本品はオキシベンダゾール 98.0%以上を含み、融点は 230～231℃である。

チアベンダゾール標準品 本品はチアベンダゾール 99.0%以上を含み、融点は 304～305℃である。

5-ヒドロキシチアベンダゾール標準品 本品は 5-ヒドロキシチアベンダゾール 98.0%以上を含み、融点は 283～286℃である。

メベンダゾール標準品 本品はメベンダゾール 98.0%以上を含み、融点は 289℃である。

フルベンダゾール標準品 本品はフルベンダゾール 99.0%以上を含み、融点は 260℃である。

5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン標準品 本品は 5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン 99.0%以上を含み、融点は 222～224℃である。

フルベンダゾール標準品 本品はフルベンダゾール 99.9%以上を含み、融点は 260℃である。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料 5.0 g を量り採り、アセトニトリル 20 mL 及び *n*-ヘキサン 20 mL を加えてホモ

ジナイズした後、毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離する。アセトニトリル層及び *n*-ヘキサン層を分液ロートに移し、アセトニトリル層を採る。これに *n*-プロパノール 10 mL を加えて、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に炭酸塩緩衝液 3 mL を加えて溶かす。

2) 精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) にメタノール 5 mL、水 5 mL 及び炭酸緩衝液 2 mL を順次注入し、流出液は捨てる。このカラムに 1) で得られた溶液を注入した後、水 5 mL を注入し、流出液は捨てる。3 分間吸引乾燥した後、このカラムにメタノール 2 mL を注入し、溶出液を試験溶液とする。

5. 検量線の作成

オキシベンダゾール、チアベンダゾール、5-ヒドロキシチアベンダゾール、5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン及びメベンダゾール各標準品について、0.05～10 mg/L のアセトニトリル溶液を数点調製する。

フルベンダゾール標準品について、0.025～10 mg/L のアセトニトリル溶液を数点調製する。

それぞれ HPLC に注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液を HPLC に注入し、5 の検量線でオキシベンダゾール、チアベンダゾール、5-ヒドロキシチアベンダゾール、フルベンダゾール、5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン及びメベンダゾールの含量を求める。

7. 確認試験

LC/MS 又は LC/MS/MS により確認する。

8. 測定条件

1) チアベンダゾール、5-ヒドロキシチアベンダゾール及び 5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミンの試験を行う場合

HPLC

検出器：UV 又は DAD (波長 チアベンダゾール及び 5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン 295 nm、5-ヒドロキシチアベンダゾール 313 nm 付近の極大波長)

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径 2.0～6.0 mm、長さ 100～250 mm、粒子径 2～5 μm

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル及び 0.05 mol/L 酢酸アンモニウム (1 : 4) 混液

保持時間の目安：3～8 分

2) オキシベンダゾール、フルベンダゾール及びメベンダゾールの試験を行う場合

HPLC

検出器：UV 又は DAD（波長 オキシベンダゾール 295 nm、フルベンダゾール及びメベンダゾール 313 nm 付近の極大波長）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径 2.0～6.0 mm、長さ 100～250 mm、粒子径 2～5 μm

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル及び 0.05 mol/L 酢酸アンモニウム（2：3）混液

保持時間の目安：4～7 分

9. 定量限界

オキシベンダゾール 0.03 mg/kg

チアベンダゾール 0.02 mg/kg

5-ヒドロキシチアベンダゾール 0.02 mg/kg

フルベンダゾール 0.01 mg/kg

5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン 0.03 mg/kg

メベンダゾール 0.02 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

ベンズイミダゾール化合物を試料からアセトニトリルで抽出し、アセトニトリル／ヘキサン分配により脱脂した後、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製し HPLC-UV 又は HPLC-DAD により測定する方法である。

11. 参考文献

竹葉、他：食品衛生学雑誌、第 44 巻、第 5 号、246～252 頁、2003 年（「HPLC による畜産食品中のベンズイミダゾール系寄生虫駆除剤の分析」）。

12. 類型

D

アンプロリウム及びデコキネート試験法（畜水産物）

1. 分析対象化合物

アンプロリウム

デコキネート

2. 装置

紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-UV）又は多波長検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-DAD）又は蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-FL）

3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の2に示すものを用いる。

アセトニトリル 液体クロマトグラフ用に製造したものを用いる。

水 液体クロマトグラフ用に製造したものを用いる。

メタノール 液体クロマトグラフ用に製造したものを用いる。

アンプロリウム標準品 本品はアンプロリウム 99.8%以上を含み、融点は 248～249℃（分解）である。

デコキネート標準品 本品はデコキネート 99.4%以上を含み、融点は 242～245℃である。

4. 試験溶液調製法

試料 10.0 g を量り採り、アセトニトリル 50 mL を加えてホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離する。アセトニトリル層を分液ロートに採り、残留物にアセトニトリル 20 mL を加えて激しく振り混ぜた後、上記と同様に遠心分離し、得られたアセトニトリル層を先の分液ロート中に合わせる。これに *n*-ヘキサン 70 mL を加えて激しく振り混ぜた後、*n*-ヘキサン層を捨て、アセトニトリル層に *n*-プロパノール 10 mL を加えて、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にメタノール 2.0 mL を加えて溶解した後、孔径 0.45 μm のメンブランフィルターでろ過して、これを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

アンプロリウム標準品について、0.01～10.0 mg/L のメタノール溶液を数点調製する。

デコキネート標準品について、0.05～10.0 mg/L のクロロホルム溶液を数点調製する。

それぞれ HPLC に注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液を HPLC に注入し、5 の検量線でアンプロリウム及びデコキネートの含量を

求める。

7. 確認試験

LC/MS 又は LC/MS/MS により確認する。

8. 測定条件

1) アンプロリウムの試験を行う場合

検出器：UV 又は DAD（波長 254 nm 付近の極大波長）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径 2.0～6.0 mm、長さ 100～250 mm、
粒子径 2～5 μm

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル及び 0.01 mol/L ヘプタンスルホン酸含有 0.025%リン酸（1 :
4）混液

保持時間の目安：10 分

2) デコキネートの試験を行う場合

HPLC

検出器：FL（励起波長 326 nm、蛍光波長 384 nm）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径 2.0～6.0 mm、長さ 100～250 mm、
粒子径 2～5 μm

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル及び 0.025%リン酸（3 : 1）混液

保持時間の目安：10 分

9. 定量限界

アンプロリウム 0.01 mg/kg

デコキネート 0.03 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

アンプロリウム及びデコキネートを試料からアセトニトリルで抽出し、アセトニトリル／ヘキサン分配により脱脂した後、それぞれ HPLC-UV 又は HPLC-DAD 及び HPLC-FL により測定する方法である。

11. 参考文献

なし

12. 類型

C

エテホン試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

エテホン

2. 装置

アルカリ熱イオン化検出器付きガスクロマトグラフ（GC-FTD）、高感度窒素・リン検出器付きガスクロマトグラフ（GC-NPD）又は炎光光度型検出器付きガスクロマトグラフ（GC-FPD(P)）及びガスクロマトグラフ・質量分析計（GC/MS）

3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の2に示すものを用いる。

トリメチルシリルジアゾメタン溶液 トリメチルシリルジアゾメタンを約 10%含む
n-ヘキサン溶液

エテホン標準品 本品はエテホン 99%以上を含み、融点は 74～75℃である。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

穀類、豆類、種実類、茶及びホップの場合は、試料 20.0 g に塩酸 1 mL、酢酸エチル 100 mL、硫酸マグネシウム 20 g 及び無水硫酸ナトリウム 10 g を加え 30 分間振とうした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物に酢酸エチル 50 mL を加え、上記と同様に振とう及びろ過を行う。得られたろ液を合わせ、酢酸エチルを加えて正確に 200 mL とする。この溶液の 20 mL を採り、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。

果実、野菜及びハーブの場合は、検体 1 kg を精密に量り、塩酸 50 mL を加え、細切均一化した後、検体 20.0 g に相当する量を量り採る。これに酢酸エチル 100 mL、硫酸マグネシウム 20 g 及び無水硫酸ナトリウム 60 g を加え 10 分間振とうした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物に酢酸エチル 50 mL を加え、上記と同様に振とう及びろ過を行う。得られたろ液を合わせ、酢酸エチルを加えて正確に 200 mL とする。この溶液の 20 mL を採り、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。

この残留物に *n*-ヘキサン 30 mL を加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL ずつで2回振とう抽出する。抽出液を 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン及び酢酸（99：1）混液 1 mL を加えて溶かす。

2) メチル化

1) で得られた溶液に、トリメチルシリルジアゾメタン溶液 1 mL を加え、室温で 30 分間放置した後、アセトン及びジエチレングリコール（99：1）混液 1 mL を加え、40℃

以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物を酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（１：１）混液 5 mL に溶かす。

3) 精製

シリカゲルミニカラム（690 mg）に酢酸エチル 5 mL 及び *n*-ヘキサン 5 mL を順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに 2) で得られた溶液を注入し、流出液は捨てる。さらに、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（１：１）混液 5 mL を注入し、流出液は捨てる。次いで、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（４：１）混液 10 mL を注入し、溶出液にアセトン及びジエチレングリコール（99：１）混液 1 mL を加え、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトンに溶かし、正確に 4 mL としたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

エテホン標準品の 100 mg/L アセトン溶液を調製し、その 1 mL を採り、窒素ガスを送って溶媒を除去した後、残留物をアセトン及びジエチレングリコール（99：１）混液 1 mL に溶かし、4. 2) メチル化と同様に操作する。得られた残留物をアセトンに溶解し 50 mL とする。これをアセトンで希釈してエテホンの 0.01～0.2 mg/L 溶液を調製する。それぞれ 2 μL を GC に注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液 2 μL を GC に注入し、5 の検量線でエテホンの含量を求める。

7. 確認試験

GC/MS により確認する。

8. 測定条件

GC

検出器：FTD、NPD 又は FPD(P)

カラム：５％フェニルメチルシリコン、内径 0.2～0.7 mm、長さ 10～30m、膜厚 0.1～1.5 μm

カラム温度：50℃（２分）－2～20℃／分－280℃

注入口温度：200～270℃

検出器温度：280～300℃

キャリアーガス：窒素ガス又はヘリウム

保持時間の目安：３分（内径 0.53 mm、長さ 15 m のメチルシリコンカラム、カラム温度 150℃で操作した場合）

9. 定量限界

0.02 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

穀類、豆類等の場合は塩酸酸性下で、果実、野菜等の場合は塩酸を加えてホモジナイズした試料に脱水剤を加えて、エテホンを酢酸エチルで抽出する。アセトニトリル/ヘキサン分配で精製し、トリメチルシリルジアゾメタンでメチル化した後、GC-FTD、GC-NPD 又は GC-FPD(P)で測定し、GC/MS で確認する方法である。

2) 注意点

- ① エテホンは pH 4 以上では不安定であるため、塩酸を加えて pH 3 以下で操作する。
- ② 一律基準レベルの分析を行う場合は、濃縮倍率を上げるなどの工夫が必要である。

11. 参考文献

- 1) 上路雅子ら、2002 年度版「残留農薬分析法」203 頁、ソフトサイエンス社
- 2) 農薬残留分析研究班編集 「最新 農薬の残留分析法」p.254-255、中央法規出版 (1995)

12. 類型

A (環境省告示第 20 号「エテホン試験法」昭和 61 年 4 月 14 日及び同 83 号「エテホン試験法」平成 14 年 12 月 24 日)

オキシポコナゾールフマル酸塩試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

オキシポコナゾールフマル酸塩

2. 装置

紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-UV）

液体クロマトグラフ・質量分析計（LC/MS）

3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の2に示すものを用いる。

0.2 mol/L リン酸緩衝液 0.2 mol/L リン酸水素二ナトリウム溶液に 0.2 mol/L リン酸二水素カリウム溶液を加えて pH7.5 に調整したもの

オキシポコナゾールフマル酸塩標準品 本品はオキシポコナゾールフマル酸塩 99% 以上を含み、融点は 124℃である。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料 20.0 g に 0.2 mol/L リン酸緩衝液（みかん以外のかんきつ類の場合は、0.1 mol/L リン酸水素二ナトリウム溶液）10 mL 及びアセトン 100 mL を加え、30 分間振とうした後、ガラス繊維ろ紙を用いて吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン 50 mL を加え、上記と同様に操作する。ろ液を合わせて 40℃以下で 30 mL に濃縮する。

2) 精製

① オクタデシルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（1,000 mg）にメタノール 5 mL 及び水 5 mL を順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに1)で得られた溶液を注入し、流出液は捨てる。さらに、水及びメタノール（1：1）混液 5 mL を注入し、流出液は捨てる。次いで、メタノール 10 mL を注入し、溶出液を 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。残留物をアセトン及び *n*-ヘキサン（1：19）混液 10 mL（みかん以外のかんきつ類の場合は正確に 10 mL）に溶かす。

② シリカゲルカラムクロマトグラフィー

シリカゲルミニカラム（690 mg）に *n*-ヘキサン 5 mL を注入し、流出液は捨てる。このカラムに①で得られた溶液（みかん以外のかんきつ類の場合は、その 1 mL）を注入し、アセトン及び *n*-ヘキサン（1：9）混液 15 mL を注入し、流出液は捨てる。次

いで、アセトン及び *n*-ヘキサン（１：４）混液 25 mL を注入し、溶出液を 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。残留物をアセトン及び *n*-ヘキサン（１：９）混液 5 mL に溶かす。

③ 合成ケイ酸マグネシウムカラムクロマトグラフィー

合成ケイ酸マグネシウムミニカラム（910 mg）に *n*-ヘキサン 5 mL を注入し、流出液は捨てる。このカラムに②で得られた溶液を注入し、流出液は捨てる。さらに、アセトン及び *n*-ヘキサン（１：９）混液 10 mL を注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトン及び *n*-ヘキサン（１：１）混液 20 mL を注入し、溶出液を 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。残留物をメタノールに溶かし正確に 2 mL としたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

オキスポコナゾールフマル酸塩標準品の 0.1～2 mg/L メタノール溶液を数点調製し、それぞれ 20 μL を HPLC に注入してピーク高法又はピーク面積法により検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液 20 μL を HPLC に注入し、5 の検量線でオキスポコナゾールフマル酸塩の含量を求める。

7. 確認試験

LC/MS により確認する。

8. 操作条件

HPLC

検出器：UV（波長 220 nm）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル、内径 2～6 mm、長さ 150～300 mm

カラム温度：40℃

移動相：水及びメタノール（７：13）

保持時間の目安：15 分

9. 定量限界

0.01 mg/kg（みかん以外のかんきつ類の場合は 0.1 mg/kg）

10. 留意事項

1) 試験法の概要

オキシポコナゾールフマル酸塩を試料からリン酸緩衝液添加アセトンで抽出し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム、シリカゲルミニカラム及び合成ケイ酸マグネシウムミニカラムで精製する。HPLC-UV で測定し、LC/MS で確認する方法である。

2) 注意点

- ① 本法は果実類を対象とした環境省の告示試験法に基づく。ただし、同試験法では代謝物も分析対象としているため、一部修正した。

11. 参考文献

- 1) 上路雅子ら、「2002 年版残留農薬分析法」、393 頁、ソフトサイエンス社

12. 類型

A (環境省告示第 32 号「オキシポコナゾールフマル酸塩試験法」平成 12 年 4 月 28 日)

オルメトプリム、ジアベリジン、トリメトプリム及びピリメタミン試験法 (畜水産物)

1. 分析対象化合物

オルメトプリム
ジアベリジン
トリメトプリム
ピリメタミン

2. 装置

紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ (HPLC-UV) 又は多波長検出器付き高速液体クロマトグラフ (HPLC-DAD)

3. 試薬、試液

次に示すものの以外は、総則の2に示すものを用いる。

アセトニトリル 液体クロマトグラフ用に製造したものを用いる。

水 液体クロマトグラフ用に製造したものを用いる。

メタノール 液体クロマトグラフ用に製造したものを用いる。

オルメトプリム標準品 本品はオルメトプリム 99.2%以上含み、融点は 231～235℃である。

ジアベリジン標準品 本品はジアベリジン 98.0%以上を含み、融点は 231～236℃である。

トリメトプリム標準品 本品はトリメトプリム 99.9%以上を含み、融点は 199～203℃である。

ピリメタミン標準品 本品はピリメタミン 99.9%以上含み、融点は 233～234℃である。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料 10.0 g を量り採り、アセトニトリル 50 mL を加えてホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離する。アセトニトリル層を分液ロートに採り、残留物にアセトニトリル 20 mL を加えて激しく振り混ぜた後、上記と同様に遠心分離し、得られたアセトニトリル層を先の分液ロート中に合わせる。これに *n*-ヘキサン 70 mL を加えて激しく振り混ぜた後、*n*-ヘキサン層を捨て、アセトニトリル層に *n*-プロパノール 10 mL を加えて、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にクロロホルム 10 mL を加えて溶解する。

2) 精製

① 筋肉及び乳の場合

シリカゲルミニカラム (1,000 mg) にクロロホルム 10 mL を注入し、流出液は捨てる。このカラムに、1) で得られた溶液を注入した後、クロロホルム 10 mL を注入し、流出液は捨てる。このカラムにクロロホルム及びメタノール (4 : 1) 混液 10 mL を注入し、溶出液を 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にメタノール 2.0 mL を加えて溶解し、これを試験溶液とする。

② 肝臓及び魚類の場合

シリカゲルミニカラム (1,000 mg) にクロロホルム 10 mL を注入し、流出液は捨てる。このカラムに 1) で得られた溶液を注入した後、クロロホルム 10 mL、クロロホルム及びメタノール (19 : 1) 混液 10 mL を順次注入し、流出液は捨てる。このカラムにクロロホルム及びメタノール (9 : 1) 混液 10 mL を注入し、溶出液を 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にメタノール 2.0 mL を加えて溶解し、これを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

オルメトプリム、ジアベリジン及びトリメトプリム各標準品について、0.05～10 mg/L のメタノール溶液を数点調製する。

ピリメタミン標準品について、0.05～10 mg/L アセトニトリル溶液を数点調製する。それぞれ HPLC に注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液を HPLC に注入し、5 の検量線でオルメトプリム、ジアベリジン、トリメトプリム及びピリメタミンの含量を求める。

7. 確認試験

LC/MS 又は LC/MS/MS により確認する。

8. 測定条件

HPLC

検出器 : UV 又は DAD (波長 230 nm 付近の極大波長)

カラム : オクタデシルシリル化シリカゲル 内径 2.0～6.0 mm、長さ 100～250 mm、
粒子径 2～5 μ m

カラム温度 : 40℃

移動相 :

ジアベリジン、トリメトプリム及びオルメトプリム アセトニトリル及び 0.025%
リン酸溶液 (7 : 93) 混液

ピリメタミン アセトニトリル及び 0.025%リン酸溶液 (17 : 83) 混液

保持時間の目安 : ジアベリジン 9 分、トリメトプリム 12 分、オルメトプリム 18 分、
ピリメタミン 11 分

9. 定量限界

オルメトプリム 0.02 mg/kg

ジアベリジン 0.02 mg/kg

トリメトプリム 0.02 mg/kg

ピリメタミン 0.02 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

オルメトプリム、ジアベリジン、トリメトプリム及びピリメタミンを試料からアセトニトリルで抽出し、アセトニトリル／ヘキサン分配により脱脂した後、シリカゲルミニカラムで精製して、それぞれ HPLC-UV 又は HPLC-DAD により測定する方法である。

11. 参考文献

なし

12. 類型

C

クロジナホッププロパルギル試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

クロジナホッププロパルギル

2. 装置

紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-UV）

液体クロマトグラフ・質量分析計（LC/MS）

3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の2に示すものを用いる。

クロジナホッププロパルギル標準品 本品はクロジナホッププロパルギル99%以上を含む。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料25.0 g にアセトニトリル100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトニトリル50 mLを加え、同様にろ過し、ろ液を合わせ、アセトニトリルを加えて250 mLとする。この10 mLを採り、*n*-ヘキサン3 mLずつで2回振とう洗浄する。アセトニトリル層を40℃以下で5 mLに濃縮し、水を加えて20 mLとする。

2) 精製

① オクタデシルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）にメタノール2 mL、アセトニトリル及び水（1：3）混液2 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに1) で得られた溶液を注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトン2 mLを注入し、流出液に水を加えて16 mLとし、さらに飽和塩化ナトリウム溶液4 mLを加える。これをエーテル及び*n*-ヘキサン（1：9）混液3 mLずつで3回振とう抽出する。

② シリカゲルミニカラムクロマトグラフィー

シリカゲルミニカラム（690 mg）に①で得られた溶液を注入し、さらにエーテル及び*n*-ヘキサン（1：9）混液9 mLを注入し、全溶出液を採り、40℃以下で溶媒を除去する。残留物をテトラヒドロフラン及び*n*-ヘキサン（1：9）混液に溶解し正確に2 mLとしたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

クロジナホッププロパルギル標準品の0.01～0.2 mg/Lテトラヒドロフラン及び*n*-ヘキサン（1：9）混液溶液を数点調製し、それぞれ100 μLをHPLCに注入し、ピーク高法又はピーク面積法により検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液100 μ LをHPLCに注入し、5の検量線でクロジナホッププロパルギルの含量を求める。

7. 確認試験

LC/MSにより確認する。

8. 測定条件

HPLC

検出器：UV（波長226 nm）

カラム：アミノプロピルシリル化シリカゲル（粒径5 μ m）内径4.6 mm、長さ250 mm

移動相：テトラヒドロフラン及び*n*-ヘキサン（1：9）混液

保持時間の目安：8分

9. 定量限界

0.02 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

クロジナホッププロパルギルを試料からアセトニトリルで抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂した後、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製し、エーテル及び*n*-ヘキサン混液に転溶する。さらに、シリカゲルミニカラムで精製した後、HPLC-UVで測定し、LC/MSで確認する方法である。

2) 注意点

- ① 本法は小麦を対象とした試験法である。引用文献のHPLC測定条件を変更した。
- ② クロジナホッププロパルギルは酸性条件下では比較的安定であるが、塩基性条件下では急速に分解し、酸体となる（pH 9での半減期約2時間）。
- ③ 妨害ピークが出現する場合は、類型に示した引用文献の方法（カラムスイッチング方式）を行うとよい。
- ④ 作物によっては、参考文献に示す一斉試験法も適用可能である。

11. 参考文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法」LC/MSによる農薬等の一斉試験法 I（農産物）

12. 類型

D (Altenburger, E., Determination of residues of parent compounds by liquid chromatography (HPLC) wheat, Novartis Crop Protection社報告, http://www.epa.gov/oppbead1/methods/rammethods/1999_088M.tif)

ジクロベニル試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

ジクロベニル

2. 装置

電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフ（GC-ECD）

ガスクロマトグラフ・質量分析計（GC/MS）

3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の2に示すものを用いる。

5%含水合成ケイ酸マグネシウム カラムクロマトグラフィー用に製造した合成ケイ酸マグネシウム（粒径 150～250 μm ）を 130℃で 12 時間以上加熱した後、デシケーター中で放冷する。これに対して水 5%を加える。

ジクロベニル標準品 本品はジクロベニル 97%以上を含み、融点は 143～146℃である。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料 20.0 g（穀類の場合は、試料 20.0 g に水 40 mL を加え、2 時間放置する）にアセトン 100 mL を加えて 30 分間振とうした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン 50 mL を加えて振とうし、上記と同様にろ過を行う。ろ液を合わせ、40℃以下で約 50 mL に濃縮する。これに 5%塩化ナトリウム溶液 100 mL を加え、*n*-ヘキサン 100 mL 及び 50 mL で 2 回振とう抽出する。抽出液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液に 2%ジエチレングリコール・アセトン溶液 0.5 mL を加えて 35℃以下で約 5 mL まで濃縮する。

2) 精製

クロマトグラフ管（内径 15 mm）に 5%含水合成ケイ酸マグネシウム 5 g を *n*-ヘキサンに懸濁させて充てんし、無水硫酸ナトリウム約 5 g を積層する。このカラムに 1) で得られた溶液を注入し、次いで、エーテル及び *n*-ヘキサン（1 : 19）混液 50 mL を注入する。溶出液に 2%ジエチレングリコール・アセトン溶液 0.5 mL を加えて 35℃以下で約 1 mL まで濃縮し、窒素ガスを用いて乾固する。残留物を *n*-ヘキサンに溶解し、正確に 10 mL としたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

ジクロベニル標準品をアセトンに溶解し、*n*-ヘキサンで希釈して、0.01～0.2 mg/L の標準溶液を調製する。この溶液の 2 μ L を GC に注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液 2 μ L を GC に注入し、5 の検量線でジクロベニルの含量を求める。

7. 確認試験

GC/MSにより確認する。

8. 測定条件

GC

検出器：ECD

カラム：50%フェニルーメチルシリコン 内径 0.2～0.7 mm、長さ 10～30m、膜厚 0.1～1.5 μ m

カラム温度：50℃(2分)－2～20℃/分－280℃

注入口温度：200～270℃

検出器温度：280～300℃

9. 定量限界

0.01 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

ジクロベニルを試料からアセトンで抽出し、ヘキサンに転溶した後、合成ケイ酸マグネシウムカラムで精製する。GC-ECD で測定し、GC/MS で確認する方法である。

2) 注意点

- ① ジクロベニルは蒸気圧が高いので濃縮時に揮散しやすく、GC/MS による一斉試験法では 30～60%の回収率しか得られない。濃縮時にはキーパーとしてジエチレンジクロベニルを加え、乾固させないように充分注意する。

11. 参考文献

なし

12. 類型

D（農薬残留分析法研究班編 最新「農薬の残留分析法」、193-195 頁、中央法規出版、1995 年、GC 操作条件は環境省告示の水質汚濁に係わる登録保留基準値の試験法から引用）

ジチアノン試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

ジチアノン

2. 装置

紫外分光光度型検出付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-UV）

液体クロマトグラフ・質量分析計（LC/MS）

3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の2に示すものを用いる。

凝固液 塩化アンモウム 2 g を水 400 mL に溶解した後、リン酸 4 mL を加えたもの。

ジチアノン標準品 本品はジチアノン 99%以上を含み、融点は 216℃である。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

果実、野菜及びハーブの場合は、検体約 1 kg を精密に量り、4 mol/L 塩酸 100 mL を加えて細切均一化した後、検体 20.0 g に相当する量を量り採る。ホップの場合は、試料 5.00 g に 0.5 mol/L 塩酸 20 mL を加え、2 時間放置する。

これにアセトン 100 mL を加え、30 分間振とうする。吸引ろ過後、ろ紙上の残留物にアセトン 50 mL を加え、上記と同様に操作する。ろ液を合わせ、アセトンを加えて 200 mL とする。

上記の溶液 50 mL を採り、凝固液 50 mL 及びケイソウ土 2 g を加え、5 分間放置した後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物をアセトン及び凝固液（1 : 1）混液 50 mL で洗い、全ろ液を合わせる。これに 5% 塩化ナトリウム溶液 100 mL を加え、*n*-ヘキサン 100 mL ずつで 2 回振とう抽出する。抽出液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液に酢酸 0.5 mL を加え 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に *n*-ヘキサン 5 mL を加えて溶かす。

2) 精製

シリカゲルミニカラム（690 mg）に *n*-ヘキサン 5 mL を注入し、流出液は捨てる。このカラムに 1) で得られた溶液を注入し、流出液は捨てる。*n*-ヘキサン 15 mL をカラムに注入し、流出液は捨てる。さらに、アセトン及び *n*-ヘキサン（1 : 49）混液 10 mL をカラムに注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトン及び *n*-ヘキサン（1 : 9）混液 10 mL を注入する。溶出液に酢酸 0.5 mL を加え、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物を酢酸及びメタノール（1 : 19）混液に溶解し、正確に 2 mL としたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

ジチアノン標準品をジクロロメタンに溶解し、200 mg/L 溶液を調製する。これを酢酸及びメタノール（1：19）混液で希釈して、0.05～1 mg/L の溶液を調製する。その 20 μ L を HPLC に注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液 20 μ L を HPLC に注入し、5 の検量線でジチアノンの含量を求める。

7. 確認試験

LC/MS により確認する。

8. 測定条件

HPLC

検出器：UV（波長 255 nm）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径 5 μ m） 内径 2～6 mm、長さ 150～300 mm

カラム温度：40℃

移動相：酢酸、水及びメタノール（1：35：65）混液

保持時間の目安：7～12 分

9. 定量限界

0.02 mg/kg（ホップの場合は 0.08 mg/kg）

10. 留意事項

1) 試験法の概要

ジチアノンを、塩酸を加えて均一化した試料からアセトンで抽出し、凝固液処理した後、*n*-ヘキサンに転溶する。シリカゲルミニカラムで精製した後、HPLC-UV で測定し、LC/MS で確認する方法である。

2) 注意点

- ① 本法は環境省告示ジチアノン試験法の「大根の葉の場合」の方法を準用した方法である。

11. 参考文献

なし

12. 類型

A（環境省告示第 60 号 ジチアノン試験法 平成 15 年 4 月 10 日改訂）

ジチオピル及びチアゾピル試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

農薬等の成分である物質

ジチオピル

チアゾピル

分析対象化合物

ジチオピル

チアゾピル

2. 装置

電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフ（GC-ECD）

ガスクロマトグラフ・質量分析計（GC/MS）

ディーン・スターク蒸留装置

3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の2に示すものを用いる。

ジチオピル標準品 本品はジチオピル 99%以上を含み、融点は 65～67℃である。

チアゾピル標準品 本品はチアゾピル 99%以上を含み、融点は 77～79℃である。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料 5.00 g をディーン・スターク蒸留装置の丸底フラスコに量り採り、水 350 mL、塩酸 2 mL、*n*-ヘキサン 20 mL 及び消泡剤 1 mL を加え、120 分間加熱還流する。終了後、トラップ内の水及び *n*-ヘキサンを分液ロートに採り、再び丸底フラスコに *n*-ヘキサン 20 mL を加え、60 分間加熱還流する。終了後、トラップ内の水及び *n*-ヘキサンを先の分液ロート中に合わせる。これに塩化ナトリウム 10 g を加えて振とうし、*n*-ヘキサン層を採る。水層に *n*-ヘキサン 20 mL を加えて振とうし、*n*-ヘキサン層を採り、先の *n*-ヘキサン層と合わせる。これに無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を 40℃以下で 5 mL に濃縮する。

2) 精製

クロマトグラフ管（内径 15 mm）にカラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウム 5 g を *n*-ヘキサンに懸濁させて充てんし、無水硫酸ナトリウム約 5 g を積層する。このカラムに 1) で得られた溶液を注入し、流出液は捨てる。さらに、*n*-ヘキサン 50 mL を注入し、流出液は捨てる。次いで、エーテル及び *n*-ヘキサン（1：4）混液 100 mL を注入し、溶出液を 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。残留物を *n*-ヘキサンに溶解し、正確に 5 mL としたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

ジチオピル及びチアゾピル標準品をアセトンに溶解して標準原液を作製し、これを n へキサンで希釈して、0.01~0.1 mg/L の混合標準溶液を数点調製する。それぞれ 2 μ L を GC に注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液 2 μ L を GC に注入し、5 の検量線でジチオピル及びチアゾピルの含量を求める。

7. 確認試験

GC/MS により確認する。

8. 測定条件

1) GC

検出器：ECD

カラム：メチルシリコン 内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m

カラム温度：50°C (1 分) - 25°C/分 - 175°C - 10°C/分 - 300°C

注入口温度：230°C

検出器温度：300°C

キャリアーガス：ヘリウム

注入量：2 μ L

保持時間の目安：ジチオピル 13 分

2) GC/MS

カラム：5 %フェニルーメチルシリコン 内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m

カラム温度：50°C (1 分) - 25°C/分 - 125°C - 10°C/分 - 300°C (7 分)

注入口温度：230°C

インターフェイス温度：300°C

キャリアーガス：ヘリウム

注入量：2 μ L

保持時間の目安：ジチオピル 14 分

9. 定量限界

ジチオピル 0.01 mg/kg

チアゾピル 0.01 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

ジチオピル及びチアゾピルを試料からディーン・スターク蒸留装置を用いて抽出する。合成ケイ酸マグネシウムカラムで精製した後、GC-ECD で定量し、GC/MS で確認する方法である。

11. 参考文献

今月の農業編集室編「改定 4 版登録農薬保留基準ハンドブック」p.363-365、化学工業日報社（2003）

12. 類型

C

スルファキノキサリン、スルファジアジン、スルファジミジン、スルファジメトキシシ、スルファメトキサゾール、スルファメトキシピリダジン、スルファメラジン、スルファモノメトキシシ及びスルフィソゾール試験法（畜水産物）

1. 分析対象化合物

スルファキノキサリン
スルファジアジン
スルファジミジン
スルファジメトキシシ
スルファメトキサゾール
スルファメトキシピリダジン
スルファメラジン
スルファモノメトキシシ
スルフィソゾール

2. 装置

紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-UV）又は多波長検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-DAD）

3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の2に示すものを用いる。

アセトニトリル 液体クロマトグラフ用に製造したものを用いる。

水 液体クロマトグラフ用に製造したものを用いる。

メタノール 液体クロマトグラフ用に製造したものを用いる。

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） 内径 12～13 mm のポリエチレン製のカラム管にエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル 500 mg を充填したもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。
スルファキノキサリンナトリウム標準品 本品はスルファキノキサリン 99.0%以上を含み、融点は 247～248℃である。

スルファジアジン標準品 本品はスルファジアジン 99.0%以上を含み、融点は 252～256℃である。

スルファジミジン標準品 本品はスルファジミジン 99.0%以上を含み、融点は 197～200℃である。

スルファジメトキシシ標準品 本品はスルファジメトキシシ 99.0%以上を含み、融点は 193～203℃である。

スルファメトキサゾール標準品 本品はスルファメトキサゾール 99.0%以上を含み、融点は 166～172℃である。

スルファメトキシピリダジン標準品 本品はスルファメトキシピリダジン 99.0%以上を含み、180～183℃である。

スルファメラジン標準品 本品はスルファメラジン 99.0%以上を含み、融点は 234～238℃である。

スルファモノメトキシシ標準品 本品はスルファモノメトキシシ 99.0%以上を含み、

融点は 204～206℃である。

スルフィソゾール標準品 本品はスルフィソゾール 98.0%以上を含み、融点は 141～142℃である。

4. 試験溶液調製法

1) 抽出

試料 5.00 g を量り採り、無水硫酸ナトリウム 10 g 及び酢酸エチル 20 mL を加えて 1 分間ホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離し、酢酸エチル層を採る。残留物を酢酸エチル 20 mL ずつで 2 回上記と同様に操作し、得られた酢酸エチル層を合わせる。適量の無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら 15 分間放置した後、綿栓ろ過する。これを 40℃以下で約 5 mL に濃縮し、*n*-ヘキサン 7 mL を加える。

2) 精製

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) に、*n*-ヘキサン 5 mL を注入し、流出液は捨てる。このカラムに 1) で得られた溶液を毎分 5 mL で注入した後、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液 3 mL、*n*-ヘキサン 3 mL を注入し、流出液は捨てる。カラム内の *n*-ヘキサンを加圧又は減圧により除去した後、カラムに 20%アセトニトリル-0.05 mol/L ギ酸アンモニウムを 5 mL 注入し、溶出液を試験溶液とする。

5. 検量線の作成

スルファキノキサリン、スルファジアジン、スルファジミジン、スルファジメトキシン、スルファメトキサゾール、スルファメトキシピリダジン、スルファメラジン、スルファモノメトキシン及びスルフィソゾール標準品について、0.005～1.0 mg/L の 20%アセトニトリル-0.05 mol/L ギ酸アンモニウム溶液を数点調製する。それぞれ HPLC に注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液を HPLC に注入し、5 の検量線でスルファキノキサリン、スルファジアジン、スルファジミジン、スルファジメトキシン、スルファメトキサゾール、スルファメトキシピリダジン、スルファメラジン、スルファモノメトキシン及びスルフィソゾールの含量を求める。

7. 確認試験

LC/MS 又は LC/MS/MS により確認する。

8. 測定条件

HPLC

検出器 : UV 又は DAD (波長 272 nm)

カラム : オクタデシルシリル化シリカゲル 内径 2.0～6.0 mm、長さ 100～250 mm、
粒子径 2～5 μm

カラム温度：30℃

移動相：メタノール、アセトニトリル及び 0.05 mol/L ギ酸（2：3；15）混液

保持時間の目安：30～40 分（スルファキノキサリン）

9. 定量限界

0.01 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

スルファキノキサリン、スルファジアジン、スルファジミジン、スルファジメトキシ
ン、スルファメトキサゾール、スルファメトキシピリダジン、スルファメラジン、スル
ファモノメトキシン及びスルフィソゾールを試料から酢酸エチルで抽出し、エチレンジ
アミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製した後、
HPLC-UV 又は HPLC-DAD により測定する方法である。

2) 注意点

- ① 抽出液を濃縮乾固後、酢酸エチル及び *n*-ヘキサンを混ぜると、サルファ剤の
再溶解が不十分な場合があるので、抽出液の濃縮時には乾固させないようにすること。
- ② *n*-ヘキサンでミニカラムを洗浄した後に、ミニカラム中に残存している *n*-ヘキサン
を完全に留去しないと、試験溶液中に *n*-ヘキサンが混入して、測定結果に影響を及ぼ
すことがある。

11. 参考文献

Y. Ito et al., *J. Chromatogr. A*, **898**, 95-102 (2000)

12. 類型

D

チアジニル試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

チアジニル

2. 装置

紫外分光光度型検出器付き液体クロマトグラフ（HPLC-UV）

液体クロマトグラフ・質量分析計（LC/MS）

3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の2に示すものを用いる。

チアジニル標準品 本品はチアジニル 95%以上を含み、融点は 112.2℃である。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料 10.0 g を量り採り、0.1 mol/L 塩酸 20 mL を加えて2時間放置する。これにアセトニトリル 80 mL を加え、30 分間振とうした後、ガラス繊維ろ紙を用いて吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトニトリル及び水（9：1）混液 60 mL を加え、同様の振とう及びろ過の操作を繰り返す。ろ液を合わせ、40℃以下で 15 mL に濃縮する。

多孔性ケイソウ土カラム（20 mL 保持用）に上記の濃縮液を注入し、10 分間放置した後、*n*-ヘキサン 120 mL を注入する。溶出液を 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に水及びメタノール（4：1）混液 5 mL を加えて溶かす。

2) 精製

① オクタデシルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（1,000 mg）にメタノール 5 mL 及び水 5 mL を順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに1)で得られた溶液を注入し、さらに、水及びメタノール（2：3）混液 10 mL を注入し、流出液は捨てる。次いで、水及びメタノール（1：4）混液 10 mL を注入し、溶出液を 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に *n*-ヘキサン 5 mL を加えて溶かす。

② シリカゲルカラムクロマトグラフィー

シリカゲルミニカラム（690 mg）に *n*-ヘキサン 5 mL を注入し、流出液は捨てる。このカラムに①で得られた溶液を注入し、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（1：9）混液 10 mL を注入し、流出液は捨てる。次いで、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（1：4）混液 15 mL を注入し、溶出液を 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に *n*-ヘ

キサン 5 mL を加えて溶かす。

③ 合成ケイ酸マグネシウムカラムクロマトグラフィー

合成ケイ酸マグネシウムミニカラム (910 mg) に *n*-ヘキサン 5 mL を注入し、流出液は捨てる。このカラムに②で得られた溶液を注入し、さらに *n*-ヘキサン 5 mL を注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 9) 混液 10 mL を注入し、溶出液を 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液を加えて溶かし、正確に 2 mL としたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

チアジニル標準品の 500 mg/L アセトニトリル溶液を調製し、この溶液をアセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液で希釈して 0.05~1 mg/L 溶液を数点調製し、それぞれ 40 µL ずつを HPLC に注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液 40 µL を HPLC に注入し、5 の検量線でチアジニルの含量を求める。

7. 確認試験

LC/MS により確認する。

8. 操作条件

HPLC

検出器 : UV (波長 275 nm)

カラム : オクタデシルシリル化シリカゲル、内径 2~6 mm、長さ 150~300 mm

カラム温度 : 40℃

移動相 : アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液

保持時間の目安 : 10~15 分

9. 定量限界

0.01 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

チアジニルを試料から塩酸酸性下でアセトニトリルで抽出し、多孔性ケイソウ土カラム中で *n*-ヘキサンに転溶する。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム、シリカゲルミニカラム及び合成ケイ酸マグネシウムミニカラムによる精製の後、HPLC-UV で

測定し、LC/MS で確認する方法である。

2) 注意点

- ① 本法は環境省告示試験法に基づく米を対象とした試験法である。同試験法は代謝物も対象とした試験法であるため、酸性条件で抽出を行っている。

11. 参考文献

なし

12. 類型

A（環境省告示第 60 号「チアジニル試験法」平成 15 年 4 月 10 日）

トリクロロ酢酸ナトリウム塩試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

トリクロロ酢酸ナトリウム塩

2. 装置

ガスクロマトグラフ・質量分析計（GC/MS）

3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の2に示すものを用いる。

ジアゾメタン溶液 ジアゾメタン生成装置を用い、*N*-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン0.2 gに精製水0.5 mL及び20%水酸化ナトリウム溶液0.6 mLを加え、発生したジアゾメタンを氷冷した*tert*-ブチルメチルエーテル3 mLに捕集し、この*tert*-ブチルメチルエーテル層をジアゾメタン溶液とする。

トリクロロ酢酸ナトリウム塩標準品 本品はトリクロロ酢酸ナトリウム塩99%以上を含む。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料10.0 gに水70 mLを加えて30分間振とうし、ガラス繊維ろ紙を用いて吸引ろ過する。ろ紙上の残留物に水30 mLを加え、上記と同様に振とう及びろ過を行う。

得られたろ液を合わせ、9 mol/L硫酸を加えてpH0.5以下に調整した後、塩化ナトリウム20 gを加え、*tert*-ブチルメチルエーテル50 mLずつで2回抽出する。抽出液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、30℃以下で濃縮し、*tert*-ブチルメチルエーテルを加えて正確に20 mLとする。

2) メチル化

抽出溶液2 mLを採り、ジアゾメタン溶液1 mLを加えて密栓し、60分間静置したものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

トリクロロ酢酸ナトリウム塩標準品の0.005～0.5 mg/L *tert*-ブチルメチルエーテル溶液を数点調製し、それぞれについて4. 2) メチル化と同様に操作する。それぞれ4 μLをGC/MSに注入し、ピーク高法又はピーク面積法により検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液 4 μ L を GC/MS に注入し、5 の検量線でトリクロロ酢酸ナトリウム塩の含量を求める。

7. 確認試験

GC/MSにより確認する。

8. 測定条件

GC/MS

カラム：メチルシリコン 内径0.25 mm, 長さ25 m, 膜厚0.1 μ m

カラム温度：50°C (12分)－10°C/分－150°C (2分)

注入口温度：200°C

主なイオン(m/z)：119, 117

9. 定量限界

0.05 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

トリクロロ酢酸ナトリウム塩を試料から水で抽出し、*tert*-ブチルメチルエーテルに転溶した後、ジアゾメタンでメチル化し、GC/MSで測定及び確認する方法である。

2) 注意点

- ① 本法は水道法水質基準のクロロ酢酸、ジクロロ酢酸及びトリクロロ酢酸のGC/MSによる一斉分析法に、大麦及び「その他の穀類」試料からの抽出操作を追加した方法である。
- ② トリクロロ酢酸は濃縮操作で損失があるため、浴温を低く設定し、乾固させない。
- ③ メチル化操作においてジアゾメタン量が不足する場合は、適宜増量し、検量線溶液の作成操作時も同様にジアゾメタンを増量する。
- ④ トリクロロ酢酸のメチル化生成物は揮発性が高く、濃縮による損失が大きいため、濃縮を行わずそのまま試験溶液とする。
- ⑤ トリクロロ酢酸ナトリウム塩の標準原液は冷凍保存し、希釈標準溶液は用時調製する。

12. 参考文献

なし

13. 類型

D（厚生労働省告示第261号「水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法 別表第17に定める方法」平成15年7月22日）

トリブロムサラン及びビチオノール試験法（畜水産物）

1. 分析対象化合物

トリブロムサラン

ビチオノール

2. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計（LC/MS/MS）

3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の2に示すものを用いる。

アセトニトリル 液体クロマトグラフ用に製造したものを用いる。

水 液体クロマトグラフ用に製造したものを用いる。

トリブロムサラン標準品 本品はトリブロムサラン 98.0%以上を含み、融点は 227～228℃である。

ビチオノール標準品 本品はビチオノール 98.0%以上を含み、融点は 184～187℃である。

4. 試験溶液調製法

1) 乳の場合

試料 5.0 g を量り採り、アセトニトリル 20 mL 及びアセトニトリル飽和 *n*-ヘキサン 20 mL を加えてホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で5分間遠心分離する。アセトニトリル層及び *n*-ヘキサン層を綿栓ろ過して分液ロートに移し、アセトニトリル層を採る。これに *n*-プロパノール 10 mL を加え 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトニトリル 1 mL を加えて溶解した後、孔径 0.2 μm のメンブランフィルターでろ過して、これを試験溶液とする。

2) 筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及びその他の食用部分の場合

試料 5.0 g を量り採り、1 mol/L 塩酸 10 mL 及び酢酸エチル 50 mL を加えてホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で5分間遠心分離し、酢酸エチル層をすり合わせ減圧濃縮器中に採る。残留物に酢酸エチル 20 mL を加えて5分間激しく振り混ぜた後、上記と同様に遠心分離し、得られた酢酸エチル層をその減圧濃縮器中に合わせ、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトニトリル 20 mL 及びアセトニトリル飽和 *n*-ヘキサン 20 mL を加え5分間激しく振り混ぜた後、アセトニトリル層を 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトニトリル 1.0 mL を加えて溶解した後、孔径 0.2 μm のメンブランフィルターでろ過して、これを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

トリブロムサラン標準品について、0.006～0.1 mg/L のアセトニトリル溶液を数点調製する。

ビチオノール標準品について、0.002～0.1 mg/L のアセトニトリル溶液を数点調製する。それぞれ LC/MS/MS に注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液を LC/MS/MS に注入し、5 の検量線でトリブロムサラン及びビチオノールの含量を求める。

7. 確認試験

LC/MS/MS により確認する。

8. 測定条件

LC/MS/MS

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径 2.0～6.0 mm、長さ 50～250 mm、
粒子径 2～5 μm

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル、水及びギ酸（500：500：1）混液

主なイオン(m/z)：ESI(-) トリブロムサラン 251/448、ビチオノール 161/335

保持時間の目安：7～10 分

9. 定量限界

トリブロムサラン 0.005 mg/kg

ビチオノール 0.002 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

トリブロムサラン及びビチオノールを乳の場合はアセトニトリルで、その他の場合は酢酸エチルで抽出し、アセトニトリル／ヘキサン分配により脱脂した後、それぞれ LC/MS/MS で測定する方法である。

2) 注意点

試験溶液を LC/MS/MS に注入した際に、ピーク高さ又はピーク面積の増強又は抑制が認められる場合には、以下の操作に準じて定量を行うこと。

試験溶液Ⅰ：4 で得られた試験溶液 0.1 mL に、基準値相当濃度の標準品のアセトニトリル溶液 0.1 mL を加える。

試験溶液Ⅱ：4 で得られた試験溶液 0.1 mL に、基準値の 2 倍相当濃度の標準品のアセトニトリル溶液 0.1 mL を加える。

本試験法において検体 5.0 g から試験溶液 1.0 mL が得られるので、基準値相当濃度の標準品のアセトニトリル溶液は、次の通り計算する。

$$\text{基準値相当濃度 (mg/L)} = \text{基準値 (ppm)} \times 5.0 (\text{g}) \div 1.0 (\text{mL})$$

試験溶液 I 及び II をそれぞれ HPLC に注入し、ピーク高さ又はピーク面積を求め、次式により含量を計算する。

$$\text{含量 (ppm)} = \text{基準値 (ppm)} \times (2a - b) \div (b - a)$$

a : 試験溶液 I のピーク高さ又はピーク面積

b : 試験溶液 II のピーク高さ又はピーク面積

含量が基準値の 2 倍を超える場合は、試験溶液をアセトニトリルで希釈して、基準値相当濃度以上、基準値の 2 倍相当濃度以下となるように調製した後、試験溶液 I 及び II を調製し、上記と同様に操作して求めた含量に希釈倍率 を乗じて、希釈前の含量を求める。

11. 参考文献

なし

12. 類型

C

ニコチン試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

ニコチン

2. 装置

ガスクロマトグラフ・質量分析計（GC/MS）

3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の2に示すものを用いる。

酢酸ブチル 酢酸ブチル（特級）

ニコチン標準品 本品はニコチン99%以上を含む。

[$^2\text{H}_3$]メチルニコチン標準品 本品は[$^2\text{H}_3$]メチルニコチン98%以上を含む。

4. 試験溶液の調製

試料3～5 gを正確に量り採り、内標準物質として[$^2\text{H}_3$]メチルニコチン82 ngを添加し、よく混和する。これに、アンモニア水1 mLを加えて、pH12に調整し、トルエン3 mLを加え、15時間振とう抽出する。4,200回転で遠心分離し、トルエン層2 mLを採る。これに0.05 mol/L塩酸1 mLを加え、1分間激しく混合し、水層0.7～0.8 mLを採り、これに5 mol/L水酸化ナトリウム溶液3滴及びトルエン0.5 mLを加え、1分間激しく混合する。トルエン層を採り、これを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

ニコチン標準品及び[$^2\text{H}_3$]メチルニコチンを0.01%トリエチルアミン含有酢酸ブチルに溶解し、それぞれ100 mg/L溶液を調製する。これらの溶液を混合し、0.01%トリエチルアミン含有酢酸エチルで希釈して、ニコチン 12～240 ng/mL（[$^2\text{H}_3$]メチルニコチン各 82 ng/mL含有）溶液を数点調製する。標準原液は暗所に冷凍保存し、使用の直前に希釈する。それぞれ2 μL をGC/MSに注入し、ニコチンと[$^2\text{H}_3$]メチルニコチンのピーク高比又はピーク面積比を求め、検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液2 μL をGC/MSに注入し、5の検量線でニコチンの含量を求める。

7. 確認試験

GC/MSにより確認する。

8. 測定条件

GC/MS

カラム：5%フェニルーメチルシリコン、内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm

カラム温度：70°C（1分）－25°C/分－280°C（3分）

注入口温度：235℃

検出器温度：280℃

イオン化モード(電圧)：EI (70 eV)

主なイオン(m/z)：ニコチン 162、133、84、 $[^2\text{H}_3]$ メチルニコチン 165、136、87

保持時間の目安：6分（ニコチン及び $[^2\text{H}_3]$ メチルニコチンの保持時間はほぼ同じ）

9. 定量限界

0.01 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

内標準物質として $[^2\text{H}_3]$ メチルニコチンを添加した試料から、塩基性条件下でニコチンをトルエンで抽出し、酸性条件下で水に転溶する。再度塩基性条件下でトルエンに転溶し、GC/MSで測定及び確認する方法である。

2) 注意点

- ① 遠心分離を行ってもトルエン層が分離しにくい場合は、塩化ナトリウムを少量加えて混ぜ、再度遠心分離する。
- ② 夾雑物が少ない試料では、遠心分離後の液々分配による精製を省略することができる。
- ③ 液々分配において、水層の分離が悪い場合は、遠心分離を行うとよい。
- ④ 不活性化処理したライナーに、不活性化処理したガラスウールを詰めて使用する。
ライナーを交換した後は、120 ng/mLのニコチンと82 ng/mLの内標準を含む標準溶液を10～15回注入することにより装置を安定化させる必要がある。
- ⑤ 環境中のニコチンによる試薬や装置の汚染の可能性があるので、事前に確認する必要がある。

11. 参考文献

なし

12. 類型

D (Siegmund, B., et.al., Development of a simple sample preparation technique for gas chromatographic-mass spectrometric determination of nicotine in edible nightshades (Solanaceae), Journal of Chromatography A, 840, 249-260, 1999)

ピリチオバックナトリウム塩試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

ピリチオバックナトリウム塩

2. 装置

カラムスイッチングシステム及び紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-UV（カラムスイッチング））

液体クロマトグラフ・質量分析計（LC/MS）又は液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC/MS/MS）

3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の2に示すものを用いる。

0.03 mol/L リン酸緩衝液（pH3.0） リン酸二水素カリウム 7.21 g、アジ化ナトリウム 0.2 g 及びリン酸 0.40 mL に水を加えて 2,000 mL とし、リン酸又は 50%水酸化ナトリウム溶液を加えて pH3.00 に調整する。

水（pH2.4） 水にリン酸を加えて pH2.40（±0.05）に調整する。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（2,000 mg） 内径 12～13 mm のポリエチレン製のカラム管に、オクタデシルシリル化シリカゲル 2,000 mg を充てんしたもの又はこれと同等の分離性能を有するものを用いる。

トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム（5,000 mg） 内径 19 mm のポリエチレン製のカラム管に、トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル 5,000 mg を充てんしたもの又はこれと同等の分離性能を有するものを用いる。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料 5.00 g にアセトニトリル及び 0.01 mol/L 炭酸アンモニウム溶液（2：1）混液 100 mL を加え、ホモジナイズした後、3,000 回転で 15 分間遠心分離する。

上澄液 60 mL を採り、これにジクロロメタン 50 mL を加え、振とうした後、ジクロロメタン層は捨てる。水層に塩化ナトリウム 0.05 g 及びジクロロメタン 50 mL を加え、振とうした後、ジクロロメタン層は捨てる。

2) 精製

① トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム（5,000 mg）にメタノール

20 mL、水 20 mL 及び 0.01 mol/L 炭酸アンモニウム溶液 20 mL を順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに 1) で得られた水層を注入した後、0.01 mol/L 炭酸アンモニウム溶液 5 mL を注入し、各流出液は捨てる。

② オクタデシルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (2,000 mg) にメタノール 5 mL 及び水 10 mL を順次注入し、各流出液は捨てる。次いで 1 mol/L クエン酸カリウム溶液及びメタノール (3 : 1) 混液 20 mL を注入し、カラムの上に同混液約 10 mL が残るまで流出させ、流出液は捨てる。このカラムを、①のミニカラムの下に連結し、①のミニカラムに 1 mol/L クエン酸カリウム溶液及びメタノール (3 : 1) 混液 20 mL を注入し、流出液を捨て、更に 10 分間通気して脱水する。

①のミニカラムを捨て、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムに水 10 mL、水 (pH2.4) 10 mL 及び 30%メタノール含有水 (pH2.4) 10 mL を順次注入し、各流出液を捨て、更に 15 分間通気して脱水する。次いで、メタノール 10 mL を注入し、溶出液を 50°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトニトリル及び 0.03 mol/L リン酸緩衝液 (28 : 72) 混液 0.5 mL に溶解したものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

ピリチオバックナトリウム塩標準品をメタノールに溶解して標準原液を調製し、アセトニトリル及び 0.03 mol/L リン酸緩衝液 (28 : 72) 混液で希釈して、0.03~0.8 mg/L の標準溶液を数点調製し、それぞれ 100 μ L を HPLC に注入し、ピーク高法又はピーク面積法により検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液 100 μ L を HPLC 又は LC/MS (LC/MS/MS) に注入し、5 の検量線でピリチオバックナトリウム塩の含量を求める。

7. 確認試験

LC/MS (LC/MS/MS) により確認する。

8. 測定条件

HPLC (カラムスイッチング方式)

検出器 : UV (波長 254 nm)

カラム① : シアノプロピルシリル化シリカゲル (粒径 5 μ m) 内径 4.0 mm、長さ 150 mm

カラム② : オクタデシルシリル化シリカゲル (粒径 5 μ m)、内径 4.6 mm、長さ 250 mm

カラム温度：40℃

移動相：

A：アセトニトリル、B：0.03 mol/L リン酸緩衝液（pH3.0）、C：水

カラム①とカラム②を離した状態で、試験溶液を注入後、A28%、B72%、流速 1 mL/分で操作し、ピリチオバックナトリウム塩の保持時間直前（注入から 8～10 分後）にカラム①とカラム②をつなぎ、ピリチオバックナトリウム塩をカラム①からカラム②に移す。

ピリチオバックナトリウム塩がカラム②に移動した後、カラム①とカラム②を切り離し、カラム①を A75%、C25%、流速 2 mL/分で 5 分間洗浄する。次いで、A43%、B57%、流速 2 mL/分で 10 分間調整した後、同移動相、流速 1 mL/分で 1 分間調整する。

再びカラム①とカラム②をつなぎ、A43%、B57%、流速 1 mL/分で操作し、ピリチオバックナトリウム塩を溶出させる。

次いで、両カラムを A75%、C25%、流速 1 mL/分で 15 分間洗浄した後、A43%、B57%、流速 1 mL/分で調整する。

カラム①とカラム②を離し、カラム①を A28%、B72%、流速 2 mL/分で 5 分間調整した後、流速 1 mL/分で 1 分間調整する。

注入量：100 μ L

保持時間の目安：37 分

LC/MS/MS

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径 5 μ m） 内径 4.6 mm、長さ 150 mm

カラム温度：30℃

移動相：A 液及び B 液について下の表の濃度勾配で送液する。

A 液：1 % 酢酸

B 液：アセトニトリル

時間(分)	A 液(%)	B 液(%)
0	85	15
1	85	15
17	40	60
18	10	90
25	10	90
35	終了	

流量：1.0 mL/分

イオン化モード：APCI

主なイオン(m/z)：正イオンモード 親イオン327、子イオン309

注入量：100 μ L

保持時間の目安：15分

9. 定量限界

0.01 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

試料からピリチオバックナトリウム塩をアセトニトリル及び 0.01 mol/L 炭酸アンモニウム溶液（2：1）混液で抽出し、ジクロロメタンで洗浄した後、トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム及びオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製し、カラムスイッチングシステム付き HPLC-UV 又は LC/MS（LC/MS/MS）で測定し、LC/MS（LC/MS/MS）で確認する方法である。

2) 注意点

- ① 本法は DuPont 社が開発した、綿実を対象とした試験法である。Sumpter, S.R.らの方法ではカラムスイッチングシステム付き HPLC で測定している。LC/MS/MS の条件は、Bramble, F.Q.らの報告を引用した。
- ② 0.03 mol/L リン酸緩衝液（pH3.0）は毎日使用前に 0.45 μ m のフィルターでろ過する
- ③ 試験溶液の調製時は、アセトニトリル及び 0.03 mol/L リン酸緩衝液（28：72）混液に溶解する前の状態で冷蔵保存可能である。

11. 参考文献

- 1) Bramble, F.Q.ら, Analytical method for the determination of pyriithiobac sodium in cotton gin trash using ASE extraction and LC/MS/MS analysis, DuPont 社報告、
http://www.epa.gov/oppbead1/methods/rammethods/2001_035M.tif

12. 類型

D (Sumpter,S.R.ら, Improved analytical enforcement method for the determination of KIH-2031(DPX-PE350) residues in cottonseed using column-switching liquid chromatography、 DuPont 社報告、
http://www.epa.gov/oppbead1/methods/rammethods/1994_001M.tif)

フルカルバゾンナトリウム塩試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

フルカルバゾンナトリウム塩

2. 装置

液体クロマトグラフ・質量分析計（LC/MS）

高速溶媒抽出（ASE）装置

3. 試薬、試液

次に示すものの以外は、総則の2に示すものを用いる。

フルカルバゾンナトリウム塩標準品 本品はフルカルバゾンナトリウム塩99%以上を含む。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料1.00 gにケイソウ土4 gを混合し、これをASE装置の22 mL容抽出管（あらかじめろ紙とケイソウ土0.5 gを入れておく）に入れ、抽出溶媒として 0.05 mol/Lアンモニア水を用いてASE装置で抽出する。抽出条件は、温度70℃、圧力1,500 psi、サイクル回数3回、各5分間（フラッシュ容量60%）、パージ時間150秒とする。抽出物はケイソウ土0.2 gを入れた容器に集める。

2) 精製

抽出物に酢酸0.5 mLを加え、これをオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（1,000 mg）に注入し、流出液は捨てる。さらに、0.1%酢酸 5 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトニトリル及び0.1%酢酸（3：1）混液 5 mLを注入し、溶出液を採る。

これに 0.1%酢酸を加えて10 mLとし、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）に注入し、流出液は捨てる。さらに、0.1%酢酸 5 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、0.5 mol/Lアンモニア水 5 mLを注入し、溶出液を採る。これに測定の直前に酢酸 0.15 mLを加え、水を加えて正確に 6 mLとしたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

フルカルバゾンナトリウム塩標準品を一定濃度含む溶液を数点調製し、それぞれ200 μ LをLC/MSに注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液200 μ LをLC/MSに注入し、5の検量線でフルカルバゾンナトリウム塩の含量を求める。

7. 確認試験

LC/MSにより確認する。

8. 測定条件

LC/MS

カラム：オクチルシリル化シリカゲル（粒径 3.5 μ m）内径4.6 mm、長さ150 mm

移動相：0.1%ギ酸及びメタノール混液（68：32）から（35：65）までの濃度勾配を10分間で行い、さらに（5：95）までの濃度勾配を0.5分間で行い、そのまま3分間保持する。

主なイオン(m/z)：395、381、負イオンモード

9. 定量限界

0.01 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

フルカルバゾンナトリウム塩を試料からASE装置（抽出溶媒は 0.05 mol/Lアンモニア水）を用いて抽出し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、LC/MSで測定及び確認する方法である。

2) 注意点

- ① 本法は小麦を対象とした試験法である。類型に示した文献は、安定同位体を用いた内部標準法を採用しており、タンデム型質量分析計（LC/MS/MS）で測定する方法である。また、代謝物（*N*-脱メチルフルカルバゾン）も対象とした分析法である。
- ② フルカルバゾンナトリウム塩は、中性～塩基性溶液中では安定であるが、酸性溶液中では不安定である。溶解度は、水：44 g/L，アセトニトリル：6.4 g/Lである。

11. 参考文献

なし

12. 類型

D (Lee, P.W. *et.al.* ed., Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals Volume 1, p489-497, John Wiley & Sons Ltd. (2003))

リン化水素試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

リン化水素

リン化亜鉛

リン化アルミニウム

リン化マグネシウム

2. 装置

分光光度計

分解吸収装置 図に示すものを用いる。

3. 試薬、試液

吸収液 水で冷却しながら飽和するまで水に臭素を溶かしたもの

硫酸ヒドラジン 硫酸ヒドラジン（特級）

4. 試験溶液の調製

試料 200 g を分解吸収装置のフラスコに量り採り、水 2 L を加える。別に同装置の第一吸収管及び第二吸収管に、それぞれ吸収液 100 mL を入れ、外部を氷水で冷却しておく。送気孔から窒素を 200 mL/分の流速で 30 分間通した後、フラスコを加熱しながら同様の通気の操作を 2 時間行う。第一吸収管及び第二吸収管の吸収液を少量の水で 500 mL のビーカーに洗い入れ、ホットプレートを用いて 10 mL に濃縮し、ガラスフィルターを用いてろ過する。使用したビーカーを少量の水で洗い、その洗液でガラスフィルター上の残留物を洗い、洗液をろ液に合わせ、更に、5 mol/L 硫酸 5 mL、2.5%モリブデン酸アンモニウム溶液 5 mL 及び 0.15%硫酸ヒドラジン溶液 2 mL を加えた上、水を加えて正確に 50 mL としたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

110℃で 4 時間加熱したリン酸一カリウム 0.4394 g を水に溶かして 1 L とし、その 10 mL を採り、水で 1 L に希釈する。その 1、2、3、4 及び 5 mL を採り、それぞれに 5 mol/L 硫酸 5 mL、2.5%モリブデン酸アンモニウム溶液 5 mL 及び 0.15%硫酸ヒドラジン溶液 2 mL を加えた上、水を加えて正確に 50 mL とする。これらを 100 mL の容器に移し、密栓して沸騰水浴中で 10 分間加熱する。冷後それぞれの溶液を、1 cm のセルに採り、5 mol/L 硫酸、2.5%モリブデン酸アンモニウム溶液、0.15%硫酸ヒドラジン溶液及び水（5 : 5 : 2 : 38）混液を対照として分光光度計により波長 820 nm における吸光度を測定し、縦軸に吸光度、横軸にリンの重量をとってリンの検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液を 100 mL の容器に移し、密栓して沸騰水浴中で 10 分間加熱する。冷後、溶液を 1 cm のセルに採り、5 mol/L 硫酸、2.5% モリブデン酸アンモニウム溶液、0.15% 硫酸ヒドラジン溶液及び水（5 : 5 : 2 : 38）混液を対照として分光光度計により波長 820 nm における吸光度を測定し、5 の検量線により、リンの重量を求める。別に分解吸収装置を用い、試料をフラスコ中に加えないで 4 と同様の操作を行って得た溶液について、試験溶液と同様の操作を行ってリンの重量を求め、この値を試験溶液について得られたリンの重量の値から減じて補正重量を求める。これに係数 1.097 を乗じてリン化水素の重量に換算し、これに基づき、試料中のリン化水素の濃度を算出する。

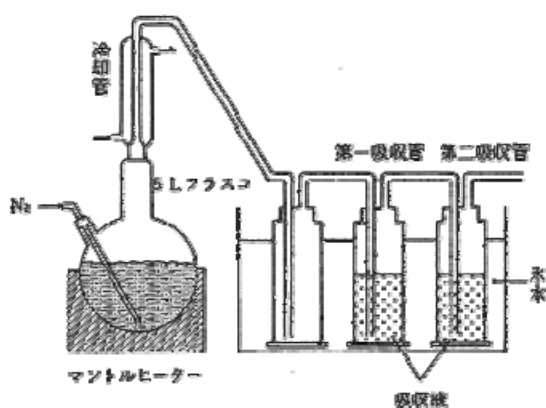


図 分解吸収装置の一例

7. 定量限界

0.01 mg/kg

8. 留意事項

1) 試験法の概要

試料を加熱し、リン化水素を蒸発させて飽和臭素水で捕集、酸化し、リン酸とする。リン酸イオンをモリブデン酸と反応させ、さらに還元して生成するモリブデンプルーを吸光度法で測定する。

2) 注意点

- ① リン酸一カリウム 0.4394 g を水に溶かして 1 L とし、その 10 mL を採り、水で 1 L に希釈した溶液は、リンとして 1 mg/L の溶液である。

9. 類型

A（環境省告示第 55 号「リン化アルミニウム試験法」昭和 53 年 9 月 22 日）