

## クマホス試験法

### 1. 装置

アルカリ熱イオン化検出器、炎光光度型検出器（リン用干渉フィルター、波長526nm）又は高感度窒素・リン検出器付きガスクロマトグラフ及びガスクロマトグラフ・質量分析計を用いる。

### 2. 試薬・試液

次に示すもの以外は、第2 添加物の部C 試薬・試液等の項に示すものを用いる。

アセトニトリル 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

アセトン 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

塩化ナトリウム 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

カラムクロマトグラフィー用シリカゲル（粒径63～200  $\mu\text{m}$ ） カラムクロマトグラフィー用に製造したシリカゲル（粒径63～200  $\mu\text{m}$ ）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。

ケイソウ土 化学分析用ケイソウ土を用いる。

酢酸エチル 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

多孔性ケイソウ土カラム（20ml保持用） 内径20～30mmのポリエチレン製のカラム管に、20mlを保持することができる量のカラムクロマトグラフィー用に製造した顆粒状多孔性ケイソウ土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。

トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル／エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム（500mg／500mg） 内径12～13mmのポリエチレン製のカラム管に、上層にトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルを、下層にエチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルを各500mg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。

n-ヘキサン 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

水 蒸留水、精製水、純水等の化学分析に適したものを用いる。当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含む場合には、n-ヘキサン等の溶媒で洗浄したものを用いる。

無水硫酸ナトリウム 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

### 3. 標準品

クマホス 本品はクマホス98%以上を含む。

### 4. 試験溶液の調製

#### a 抽出法

##### ① 穀類、豆類及び種実類の場合

検体を425  $\mu\text{m}$ の標準網ふるいを通して粉砕した後、その10.0gを量り採り、水

20mlを加えて、30分間放置する。

これにアセトン100mlを加え、3分間細砕した後、ケイソウ土を1cmの厚さに敷いたろ紙を用いてすり合わせ減圧濃縮器中に吸引ろ過する。ろ紙上の残留物を採り、アセトン50mlを加え、3分間細砕した後、上記と同様に操作して、ろ液をその減圧濃縮器中に合わせ、40℃以下でアセトンを除去する。

これをあらかじめ飽和塩化ナトリウム溶液100mlを入れた300mlの分液漏斗に移す。酢酸エチル及びn-ヘキサンの混液(1:4)100mlを用いて上記の減圧濃縮器のナス型フラスコを洗い、洗液を上記の分液漏斗に合わせる。振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、静置し、酢酸エチル及びn-ヘキサンの層を300mlの三角フラスコに移す。水層に酢酸エチル及びn-ヘキサンの混液(1:4)50mlを加え、上記と同様に操作して、酢酸エチル及びn-ヘキサンの層を上記の三角フラスコに合わせる。これに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、すり合わせ減圧濃縮器中にろ過する。次いでn-ヘキサン20mlを用いて三角フラスコを洗い、その洗液でろ紙上の残留物を洗う操作を2回繰り返す。両洗液をその減圧濃縮器中に合わせ、40℃以下で酢酸エチル及びn-ヘキサンを除去する。

この残留物にn-ヘキサン30mlを加え、100mlの分液漏斗に移す。これにn-ヘキサン飽和アセトニトリル30mlを加え、振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、静置し、アセトニトリル層をすり合わせ減圧濃縮器中に移す。n-ヘキサン層にn-ヘキサン飽和アセトニトリル30mlを加え、上記と同様の操作を2回繰り返し、アセトニトリル層をその減圧濃縮器中に合わせ、40℃以下でアセトニトリルを除去する。この残留物にアセトン及びn-ヘキサンの混液(1:1)5mlを加えて溶かす。

## ② 果実、野菜、茶及びホップの場合

果実及び野菜の場合は、検体約1kgを精密に量り、必要に応じ適量の水を量って加え、細切均一化した後、検体20.0gに相当する量を量り採る。

茶の場合は、検体5.00gを量り採り、水20mlを加え、30分間放置する。

ホップの場合は、検体を粉碎した後、5.00gを量り採り、水20mlを加え、30分間放置する。

これにアセトン100mlを加え、3分間細砕した後、ケイソウ土を1cmの厚さに敷いたろ紙を用いてすり合わせ減圧濃縮器中に吸引ろ過する。ろ紙上の残留物を採り、アセトン50mlを加え、3分間細砕した後、上記と同様に操作して、ろ液をその減圧濃縮器に合わせ、40℃以下でアセトンを除去する。

これをあらかじめ飽和塩化ナトリウム溶液100mlを入れた300mlの分液漏斗に移す。酢酸エチル及びn-ヘキサンの混液(1:4)100mlを用いて上記の減圧濃縮器のナス型フラスコを洗い、洗液を上記の分液漏斗に合わせる。振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、静置し、酢酸エチル及びn-ヘキサンの層を300mlの三角フラスコに

移す。水層に酢酸エチル及びn-ヘキサンの混液（1：4）50mlを加え、上記と同様に操作して、酢酸エチル及びn-ヘキサンの層を上記の三角フラスコに合わせる。これに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、すり合わせ減圧濃縮器中にろ過する。次いでn-ヘキサン20mlを用いて三角フラスコを洗い、その洗液でろ紙上の残留物を洗う操作を2回繰り返す。両洗液をその減圧濃縮器中に合わせ、40℃以下で酢酸エチル及びn-ヘキサンを除去する。この残留物にアセトン及びn-ヘキサンの混液（1：1）5mlを加えて溶かす。

③ 筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓並びに魚介類の場合

筋肉、肝臓及び腎臓並びに魚介類の場合は試料20.0g、脂肪の場合は試料5.00gを量り採る。

これに0.1mol/l塩酸20mlを加え、細砕した後、アセトン及びn-ヘキサンの混液（1：2）100mlを加え、更に細砕した後、毎分3,000回転で5分間遠心分離し、有機層を採る。残留物にn-ヘキサン50mlを加え、細砕した後、毎分3,000回転で5分間遠心分離する。得られた有機層を合わせ、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℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をn-ヘキサンに溶かし、正確に20mlとする。

④ 乳、卵及びはちみつの場合

試料10.0gを量り採り、これに0.1mol/l塩酸10mlを加え、細砕した後、アセトン及びn-ヘキサンの混液（1：2）100mlを加え、更に細砕した後、毎分3,000回転で5分間遠心分離し、有機層を採る。残留物にn-ヘキサン50mlを加え、細砕した後、毎分3,000回転で5分間遠心分離する。得られた有機層を合わせ、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℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。乳及び卵の場合は、この残留物をn-ヘキサンに溶かし、正確に10mlとする。はちみつの場合は、この残留物をアセトン及びn-ヘキサンの混液（1：9）に溶かし、正確に5mlとする。

b 精製法

① 穀類、豆類、種実類、果実、野菜、茶及びホップの場合

内径15mm、長さ300mmのクロマトグラフ管にカラムクロマトグラフィー用シリカゲル（粒径63~200 $\mu$ m）5gをアセトン及びn-ヘキサンの混液（1：1）に懸濁したものの、次いでその上に無水硫酸ナトリウム約5gを入れ、カラムの上端に少量のアセトン及びn-ヘキサンの混液（1：1）が残る程度までアセトン及びn-ヘキサンの混液（1：1）を流出させる。このカラムにa 抽出法で得られた溶液を注入した後、アセトン及びn-ヘキサンの混液（1：1）100mlを注入し、溶出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、40℃以下でアセトン及びn-ヘキサンを除去する。この残留物にアセトンを加えて溶かし、正確に5mlとして、これを試験溶液とする。

② 筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓、魚介類、乳並びに卵の場合

イ 多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィー

多孔性ケイソウ土カラム（20ml保持用）に a 抽出法で得られた溶液から、筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓並びに魚介類の場合は正確に10mlを採り、乳及び卵の場合は全量を注入する。このカラムを10分間放置し、更に10分間吸引して大部分の溶媒を除去した後、n-ヘキサン飽和アセトニトリル90mlを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトン及びn-ヘキサンの混液（1：9）に溶かし、正確に5mlとする。

ロ トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル／エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層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／エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム（500mg／500mg）にアセトン及びn-ヘキサンの混液（1：9）10mlを注入し、流出液は捨てる。このカラムにイで得られた溶液から正確に2mlを採って注入し、更にアセトン及びn-ヘキサンの混液（1：9）10mlを注入して、全溶出液を採り、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトン及びn-ヘキサンの混液（1：9）に溶かし、正確に4ml（脂肪の場合は1ml）としたものを試験溶液とする。

③ はちみつの場合

トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル／エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム（500mg／500mg）にアセトン及びn-ヘキサンの混液（1：9）10mlを注入し、流出液は捨てる。このカラムに a 抽出法で得られた溶液から正確に2mlを採って注入し、更にアセトン及びn-ヘキサンの混液（1：9）10mlを注入して、全溶出液を採り、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトン及びn-ヘキサンの混液（1：9）に溶かし、正確に4mlとしたものを試験溶液とする。

5. 操作法

a 検量線の作成

① 穀物、豆類、種実類、果実、野菜、茶及びホップの場合

クマホス標準品のアセトン溶液を数点調製し、それぞれアルカリ熱イオン化検出器、炎光光度型検出器（リン用干渉フィルター、波長526nm）又は高感度窒素・リン検出器付きガスクロマトグラフに注入し、ピーク高法又はピーク面積法により検量線を作成する。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合、試料中0.01mg/kgに相当する試験溶液中濃度は、穀類、豆類及び種実類にあつては0.02mg/l、果実及び野菜にあつては0.04mg/l、茶及びホップにあつては0.01mg/lである。

② 筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓、魚介類、乳、卵並びにはちみつの場合

クマホス標準品のアセトン及びn-ヘキサンの混液（1：9）の溶液を数点調製し、それぞれアルカリ熱イオン化検出器、炎光光度型検出器（リン用干渉フィルター、波長526nm）又は高感度窒素・リン検出器付きガスクロマトグラフに注入し、ピーク高法又はピーク面積法により検量線を作成する。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合、試料中0.01mg/kgに相当する試験溶液中濃度は0.01mg/lである。

b 定量試験

試験溶液をアルカリ熱イオン化検出器、炎光光度型検出器（リン用干渉フィルター、波長526nm）又は高感度窒素・リン検出器付きガスクロマトグラフに注入し、a 検量線の作成によりクマホスの定量を行う。

c 確認試験

ガスクロマトグラフ・質量分析計により確認する。

d 測定条件

① 定量試験用

測定条件1（アルカリ熱イオン化検出器、炎光光度型検出器（リン用干渉フィルター、波長526nm）又は高感度窒素・リン検出器付きガスクロマトグラフ）

カラム：内径0.53mm、長さ10～30mのケイ酸ガラス製の細管に、ガスクロマトグラフィー用メチルシリコンを1.5μmの厚さでコーティングしたものを用いる。

カラム温度：80℃で1分間保持し、その後毎分8℃で昇温する。250℃に到達後5分間保持する。

試験溶液注入口温度：230℃に保持する。

検出器：280℃で操作する。

ガス流量：キャリアーガスとしてヘリウムを用いる。流速を至適条件に調整する。空気及び水素の流量を至適条件に調整する。

測定条件2（アルカリ熱イオン化検出器、炎光光度型検出器（リン用干渉フィルター、波長526nm）又は高感度窒素・リン検出器付きガスクロマトグラフ）

カラム：内径0.32mm、長さ10～30mのケイ酸ガラス製の細管に、ガスクロマトグラフィー用50%トリフルオロプロピルメチルシリコンを0.25μmの厚さでコーティングしたものを用いる。

カラム温度：70℃で1分間保持し、その後毎分25℃で昇温する。125℃に到達後は、毎分10℃で昇温し、235℃に到達後12分間保持する。

試験溶液注入口温度：230℃に保持する。

検出器：280℃で操作する。

ガス流量：キャリアーガスとしてヘリウムを用いる。流速を至適条件に調整する。空気及び水素の流量を至適条件に調整する。

測定条件3（炎光光度型検出器（リン用干渉フィルター、波長526nm）付きガスクロマ

トグラフ)

カラム：内径0.32mm、長さ30mのケイ酸ガラス製の細管に、ガスクロマトグラフィー用35%トリフルオロプロピルメチルシリコンを0.5 $\mu$ mの厚さでコーティングしたものをを用いる。

カラム温度：60℃で1分間保持し、その後毎分25℃で昇温する。210℃に到達後は、毎分10℃で昇温し、280℃に到達後10分間保持する。

試験溶液注入口温度：250℃に保持する。

検出器：280℃で操作する。

ガス流量：キャリアガスとしてヘリウムを用いる。流速を至適条件に調整する。空気及び水素の流量を至適条件に調整する。

注入量：2 $\mu$ l

保持時間の目安：18分

## ② 確認試験用

測定条件（ガスクロマトグラフ・質量分析計）

カラム：内径0.25mm、長さ30mのケイ酸ガラス製の細管に、ガスクロマトグラフィー用5%フェニルメチルシリコンを0.25 $\mu$ mの厚さでコーティングしたものをを用いる。

カラム温度：60℃で1分間保持し、その後毎分25℃で昇温する。210℃に到達後は、毎分10℃で昇温し、300℃に到達後8分間保持する。

試験溶液注入口温度：250℃に保持する。

ガス流量：キャリアガスとしてヘリウムを用いる。流速を至適条件に調整する。

イオン化モード（イオン化エネルギー）：EI（70eV）

主なイオン（m/z）：364、362及び226

注入量：2 $\mu$ l

保持時間の目安：15分