

※本報告書は、試験法開発における検討結果をまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。
なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意ください。

平成 20 年度

残留農薬等個別試験法開発
カルベンダジム他 3 物質 一式

カルベンダジム、チオフアネート、チオフアネートメチル及びベノミル試験法の検討結果

[緒言]

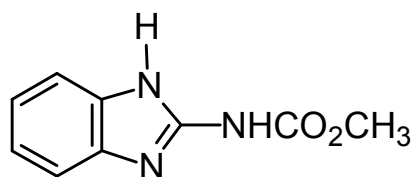
1. 目的及び試験法の検討方針

カルベンダジム (MBC)、チオフアネート、チオフアネートメチル及びベノミルはカーバマート系農薬に大別される殺菌剤である。既存のカルベンダジム、チオフアネート、チオフアネートメチル及びベノミルの通知試験法は、チオフアネートメチル及びベノミルをMBCに、チオフアネートをエチル2-ベンズイミダゾールカルバマート (EBC) に変換して、同時に分析試験を行う方法であるが、転溶操作中の分解や閉環反応における回収率が低いなどの問題点がある。試験法の作成に際して、通知試験法及び飼料分析基準[カルベンダジム (カルベンダジム、チオフアネートメチル及びベノミル)]を参考に各種精製操作及び閉環反応を検討した。測定機器にLC-MS/MSを用いて感度及び選択性をあげることで、試料溶液の分取率を下げ、分析閉環反応前の転溶を省略することで、良好な結果が得られた。また、通知試験法では、検量線は閉環反応を行ったカルベンダジム及びチオフアネートを用いて作成しているが、本方法では、未反応のカルベンダジム及びEBCを用いて検討を行った。

2. 構造式等

カルベンダジム (MBC)

構造式：



化学式：C₉H₉N₃O₂

分子量：191.19

溶解性：水 29(pH4), 8(pH7), 7(pH8) (以上 mg/L, 24 °C)

ジメチルホルムアミド 5, アセトン 0.3, エタノール 0.3, クロロホルム 0.1,
酢酸エチル 0.135, ジクロロメタン 0.068, ベンゼン 0.036, シクロヘキサン <0.01,
ジエチルエーテル <0.01, ヘキサン 0.0005 (以上 g/L, 24 °C)

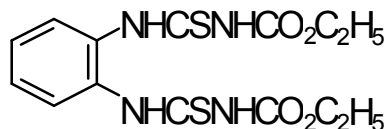
1-オクタノール／水分配係数：log P_{OW}=1.38(pH5), 1.51(pH7), 1.49(pH9)

安定性：アルカリ性下で徐々に分解, 半減期>350日(pH 5及びpH7), 124日(pH 9) (以上 22 °C)

(出典：The e-Pesticide Manual 13th ed., ver.3.2)

チオフアネート

構造式：



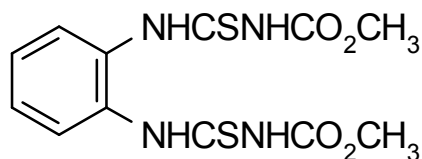
化学式：C₁₄H₁₈N₄O₄S₂

分子量：370.45

溶解性：水に難溶, 多くの有機溶媒に少量溶解

チオファネートメチル

構造式：



化学式： $C_{12}H_{14}N_4O_4S_2$

分子量：342.39

溶解性：水に可溶(23 °C), アセトン 58.1, シクロヘキサン 43, メタノール 29.2, クロロホルム 26.2, アセトニトリル 24.4, 酢酸エチル 11.9 (以上 g/kg, 23 °C)

1-オクタノール／水分配係数： $\log P_{OW}=1.50$

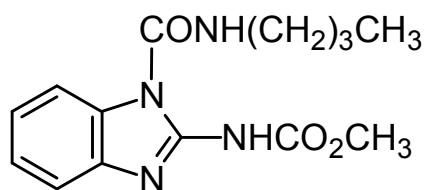
安定性：室温中性で安定，大気中及び光に安定，室温酸性でやや安定，アルカリ性で不安定

半減期24.5時間(pH9, 22°C)

(出典：The e-Pesticide Manual 13th ed., ver.3.2)

ベノミル

構造式：



化学式： $C_{14}H_{18}N_4O_3$

分子量：290.32

溶解性：水 3.6(pH 5), 2.9(pH 7), 1.9(pH 9) (以上 µg/L, 室温)

クロロホルム 94, ジメチルホルムアミド 53, アセトン 18, キシレン 10, エタノール 4, ヘプタン 0.4 (以上 g/kg, 25 °C)

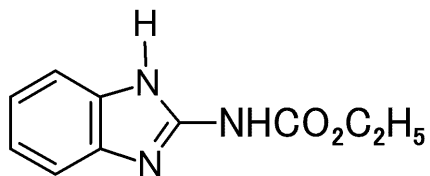
1-オクタノール／水分配係数： $\log P_{OW}=1.37$

安定性：加水分解半減期3.5時間(pH5), 1.5時間(pH7), <1時間(pH9) (以上 25 °C)

(出典：The e-Pesticide Manual 13th ed., ver.3.2)

エチル2-ベンズイミダゾールカルバマート (EBC)

構造式：



化学式： $C_{10}H_{11}N_3O_2$

分子量：205.21

溶解性等の情報なし。構造式がMBCに類似している点やカラムの溶出条件から、極性についてはMBCに近い (MBCより若干低め) 物性と推測される。

3. 基準値

農産物：0.08 ppm（さとうきび）～10 ppm（茶）

畜水産物：0.07 ppm（牛の脂肪）～0.3 ppm（乳）

カルベンダジム、ベノミルをカルベンダジム含量に換算したもの、チオファネートをカルベンダジム含量に換算したものと及びチオファネートメチルをカルベンダジム含量に換算したものの総和をいう。

4. 分析対象化合物

カルベンダジム

チオファネート

チオファネートメチル

ベノミル

EBC

5. 試験法の分析操作

概要：メタノール抽出後、試料溶液を分取して加熱還流（閉環反応）を行う。その後、*n*-ヘキサン洗浄、酢酸エチル抽出し、カルベンダジム及びEBCについてLC-MS/MSで測定する。

〔実験方法〕

1. 試料

1) 購入先

うなぎは愛知県の業者にて、その他の試料については都内のスーパーにて購入した。

2) 試料の採取方法

- ①玄米は425 μm の標準網ふるいを通して均一化した。
- ②大豆は425 μm の標準網ふるいを通して均一化した。
- ③コーヒード豆は425 μm の標準網ふるいを通して均一化した。
- ④ほうれんそうはひげ根及び変質葉を除き、細切均一化した。
- ⑤キャベツは外側変質葉及びしんを除き、細切均一化した。
- ⑥ばれいしょは泥を水で軽く洗い落とし、細切均一化した。
- ⑦オレンジは細切均一化した。
- ⑧りんごは花おち、しん及び果梗の基部を除き、細切均一化した。
- ⑨茶（直接抽出法用）は425 μm の標準網ふるいを通して均一化した。
- ⑩なすはへたを除き、細切均一化した。
- ⑪牛の筋肉は脂肪層を除き、細切均一化した。
- ⑫牛の脂肪は筋肉部を除き、細切均一化した。
- ⑬牛の肝臓は、全体を細切均一化した。
- ⑭さけは可食部（皮を含む）を細切均一化した。
- ⑮うなぎは、活鰻を使用し、頭部を除いた可食部（内臓、骨及び皮を含む）を細切均一化した。
- ⑯しじみは、貝殻を除き細切均一化した。
- ⑰牛乳は全体をよく混合して均一化した。

- ⑱鶏卵は、殻を除き卵白と卵黄を合わせてよく混合し均一化した。
- ⑲はちみつは百花蜜を使用し、加温（40℃以下）してから、よく混合して均一化した。
- ⑳鶏の筋肉は脂肪層を除き、細切均一化した。

2. 試薬・試液

1) 標準品

標準品	純度 (%)	融点	メーカー
カルベンダジム	99.9	302～307	和光純薬工業株式会社
チオファネート	99.9	187.6	和光純薬工業株式会社
チオファネートメチル	99.9	171.9	和光純薬工業株式会社
ベノミル	98	-	Dr. Ehrenstorfer GmbH 社
EBC	99.9	-	林純薬工業株式会社

測定には、カルベンダジム標準品及びEBC標準品のメタノール混合標準溶液を調製し使用した。

2) 試薬

次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

L-アスコルビン酸ナトリウム（特級、関東化学株式会社）

酢酸銅（Ⅱ）一水和物（特級、小宗化学株式会社）

ケイソウ土：セライト545（関東化学株式会社）

3) 標準溶液の調製方法

①標準溶液の調製方法

標準原液：カルベンダジム、チオファネート、チオファネートメチル、ベノミル及びEBCの標準品それぞれ25 mgを精秤し、メタノールで溶解して各500 mg/L溶液を調製した。

検量線用混合標準溶液：カルベンダジム及びEBC標準原液をメタノールで混合希釈し、各0.000125～0.02 mg/Lの濃度の溶液を調製した。

添加用混合標準溶液：各標準原液5 mLを採り、メタノールで25 mLに定容（カルベンダジムとEBC、チオファネートとチオファネートメチルの組み合わせで混合、ベノミルは単独で調製）して100 mg/L標準溶液をそれぞれ調製し、この溶液をメタノールで希釈し、0.1、1、5及び20 mg/Lの濃度の溶液を調製した。

3. 装置

装置	型式	会社
MS装置	API 3200 Q TRAP	AB SCIEX 社
LC装置	Agilent 1200	Agilent Technologies 社

4. 測定条件

LC条件																					
カラム	Mightysil RP-18 GP サイズ：内径2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径5 μm 会社：関東化学株式会社																				
移動相流速（mL/min）	0.20																				
注入量（μL）	2																				
カラム温度（℃）	40																				
移動相	A液：2 mmol/L酢酸アンモニウム溶液 B液：メタノール																				
グラジエント条件	<table><tr><th>時間（分）</th><th>A液（%）</th><th>B液（%）</th></tr><tr><td>0.0</td><td>60</td><td>40</td></tr><tr><td>5.0</td><td>60</td><td>40</td></tr><tr><td>10.0</td><td>5</td><td>95</td></tr><tr><td>15.0</td><td>5</td><td>95</td></tr><tr><td>15.1</td><td>60</td><td>40</td></tr></table>			時間（分）	A液（%）	B液（%）	0.0	60	40	5.0	60	40	10.0	5	95	15.0	5	95	15.1	60	40
時間（分）	A液（%）	B液（%）																			
0.0	60	40																			
5.0	60	40																			
10.0	5	95																			
15.0	5	95																			
15.1	60	40																			
MS条件																					
測定モード	MS/MS、選択反応モニタリング																				
イオン化モード	ESI（+）																				
キャピラリー電圧（V）	5000																				
脱溶媒温度（℃）	400																				
コーンガス	窒素、50 L/hr																				
脱溶媒ガス	窒素、80 L/hr																				
コリジョンガス	窒素																				
定量イオン（m/z）	カルベンダジム：+192.1→160.0 [コーン電圧：21.0（V）、コリジョンエネルギー：23.0（eV）] EBC：+206.2→160.0 [コーン電圧：21.0（V）、コリジョンエネルギー：23.0（eV）]																				
定性イオン（m/z）	カルベンダジム：+192.1→132.1 [コーン電圧：21.0（V）、コリジョンエネルギー：41.0（eV）] EBC：+206.2→134.0 [コーン電圧：21.0（V）、コリジョンエネルギー：31.0（eV）]																				
保持時間（min）	カルベンダジム：6.8 EBC：11.4																				

5. 定量

ピーク面積から絶対検量線法により、0.00025 ngから0.04 ngの濃度範囲でカルベンダジム及びEBCについて検量線を作成し、カルベンダジム及びEBCの含量を求める。EBCの含量に係数0.9317を掛けてカルベンダジムに換算したものとカルベンダジム含量の和を分析値とする。

6. 試験溶液の調製

1) 試験操作

①抽出

穀類、豆類及び種実類の場合は、試料10 g[抹茶、ホップ及び茶（直接抽出法）は5 g]を200 mL遠心管に採り、水20 mLを加えて30分間放置した。果実及び野菜の場合は試料20 g、筋肉、脂肪、内臓、魚介類及び乳の場合は試料10 g（はちみつの場合は水10 mLを加える。）を200 mL遠心管に採り、L-アスコルビン酸ナトリウム1 gを加えた。これにメタノール100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過し、200 mL容メスフラスコに採取した。（果実の場合はセライトを使用した。）ろ紙上の残留物にメタノール50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせて、メタノールで正確に200 mLとした。抹茶以外の茶（熱湯浸出法）の場合は、試料9.00 gに100℃の水540 mLを加え、室温で5分間放置した後ろ過し、3 mLを10 mL容メスフラスコに採取し、メタノールで正確に10 mLとした。

②閉環反応

①で得られた溶液1 mL（抹茶以外の茶の場合は2 mL）を200 mLナスフラスコに採り、50%酢酸10 mL、酢酸銅（Ⅱ）一水和物0.2 g及び沸石を加え、還流冷却器を取り付けて、120℃で30分間加熱還流した後、放冷し、200 mL分液漏斗に移した。これに塩化ナトリウム5 g及び1 mol/L塩酸30 mLを加え、*n*-ヘキサン20 mLずつで2回振とう洗浄した。水層に10 mol/L水酸化ナトリウム溶液を加え（約10 mL）、正確にpH 6.8から6.9に調整し、酢酸エチル50 mLずつで2回振とう抽出した。抽出液を200 mL三角フラスコに採り、無水硫酸ナトリウムを加えて時々振り混ぜながら15分間放置した。200 mLナスフラスコにろ過した後、ろ液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物をメタノールに溶解し、正確に2 mL（果実及び野菜の場合は4 mL、抹茶、ホップ及び茶（直接抽出法）の場合は1 mL）としたものを試験溶液とした。

③添加回収試験

カルベンダジム標準品、チオファネート標準品、チオファネートメチル標準品、ベノミル標準品及びEBC標準品の100 mg/Lメタノール標準溶液を各々調製し、添加量が1 mL程度となるように適宜希釈して、添加を行った。

2) 分析法フローチャート

秤 取

- | 穀類、豆類及び種実類：試料10.0 g
- | 果実、野菜及びハーブ：試料20.0 g
- | 茶（直接抽出法の場合）：試料5.00 g
- | 茶（熱湯浸出法の場合）：試料9.00 g
- | 畜水産物：試料10.0 g

↓

メタノール抽出

- | ①穀類、豆類及び種実類の場合
 - | L - アスコルビン酸ナトリウム1 g及び水20 mLを加え30分間放置後、メタノール100 mLを加え、
 - | ホモジナイズ、抽出後・ろ過
 - | 残留物をメタノール50 mLで同様に抽出・ろ過
 - | ろ液を合わせ、メタノールで正確に200 mLとする
 - | ②果実及び野菜の場合
 - | L - アスコルビン酸ナトリウム1 g及びメタノール100 mLを加え、
 - | ホモジナイズ、抽出後・ろ過
 - | 残留物をメタノール50 mLで同様に抽出・ろ過
 - | ろ液を合わせ、メタノールで正確に200 mLとする
 - | ③筋肉、脂肪、肝臓、腎臓、魚介類、乳、卵の場合
 - | L - アスコルビン酸ナトリウム1 g及びメタノール100 mLを加え、
 - | ホモジナイズ、抽出後・ろ過
 - | 残留物をメタノール50 mLで同様に抽出・ろ過
 - | ろ液を合わせ、メタノールで正確に200 mLとする
 - | ④はちみつの場合
 - | L - アスコルビン酸ナトリウム1 g、水10 mL及びメタノール100 mLを加え、
 - | ホモジナイズ、抽出後・ろ過
 - | 残留物をメタノール50 mLで同様に抽出・ろ過
 - | ろ液を合わせ、メタノールで正確に200 mLとする
 - | ⑤茶（直接抽出法）の場合
 - | L - アスコルビン酸ナトリウム1 g及び水20 mLを加え30分間放置後、メタノール100 mLを加え、
 - | ホモジナイズ、抽出後・ろ過
 - | 残留物をメタノール50 mLで同様に抽出・ろ過
 - | ろ液を合わせ、メタノールで正確に200 mLとする
- ↓ 試料溶液1 mLを分取し、メタノールで正確に10 mLとする

※

※

- | ⑥茶（熱湯浸出法）の場合
- | 100℃の水540 mLを加え、室温で5分間放置した後、ろ過
- | 冷後、ろ液3 mLを採り、メタノールで正確に10 mLとする

↓

閉環反応

- | 試料溶液1 mL（茶は2 mL）に50%酢酸10 mL、酢酸銅（Ⅱ）一水和物0.2 g及び沸石を加え、
- | 120℃で30分間加熱還流
- | 放冷後、塩化ナトリウム5 g、1 mol/L塩酸30 mL及び*n*-ヘキサン20 mLを加え、5分間振とう洗浄
- | 水層に*n*-ヘキサン20 mLを加え、5分間振とう洗浄
- | 水層に10 mol/L水酸化ナトリウム溶液を加え、pH 6.8から6.9に調整
- | 酢酸エチル50 mLを加え、5分間振とう抽出
- | 水層に酢酸エチル50 mLを加え、5分間振とう抽出
- | 抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水ろ過、減圧濃縮、窒素乾固
- | メタノール2 mL（果実及び野菜の場合は4 mL、茶（直接抽出法）の場合は1 mL）に溶解

↓

LC-MS/MS定量・確認

2 µL注入

7. 定量限界

[残留基準値 0.01~10 ppm]

カルベンダジム（茶以外の場合）：0.01 mg/kg

[果実及び野菜以外の場合； $(2 \text{ mL}/0.05 \text{ g}^{*1}) \times (0.0005 \text{ ng}/2 \text{ µL})$ 、
果実及び野菜の場合； $(4 \text{ mL}/0.1 \text{ g}^{*2}) \times (0.0005 \text{ ng}/2 \text{ µL})$]

*1 $10.0 \text{ g} \times 1 \text{ mL}/200 \text{ mL}$

*2 $20.0 \text{ g} \times 1 \text{ mL}/200 \text{ mL}$

カルベンダジム（茶の場合）：0.05 mg/kg

[直接抽出法の場合； $(1 \text{ mL}/0.005 \text{ g}^{*3}) \times (0.0005 \text{ ng}/2 \text{ µL})$ 、
熱湯浸出法の場合； $(2 \text{ mL}/0.01 \text{ g}^{*4}) \times (0.0005 \text{ ng}/2 \text{ µL})$]

*3 $5.00 \text{ g} \times 1 \text{ mL}/200 \text{ mL} \times 2 \text{ mL}/10 \text{ mL}$

*4 $9.00 \text{ g} \times 3 \text{ mL}/540 \text{ mL} \times 2 \text{ mL}/10 \text{ mL}$

EBC（茶以外の場合）：0.01 mg/kg（カルベンダジムとして）

[果実及び野菜以外の場合； $(2 \text{ mL}/0.05 \text{ g}^{*1}) \times (0.0005 \text{ ng}/2 \text{ µL}) \times 0.9317$ 、
果実及び野菜の場合； $(4 \text{ mL}/0.1 \text{ g}^{*2}) \times (0.0005 \text{ ng}/2 \text{ µL}) \times 0.9317$]

EBC（茶の場合）：0.05 mg/kg

[直接抽出法の場合； $(1 \text{ mL}/0.005 \text{ g}^{*3}) \times (0.0005 \text{ ng}/2 \text{ µL}) \times 0.9317$ 、
熱湯浸出法の場合； $(2 \text{ mL}/0.01 \text{ g}^{*4}) \times (0.0005 \text{ ng}/2 \text{ µL}) \times 0.9317$]

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS)

1) MS/MSスペクトル (図1-1、図2-1)

カルベンダジムはESI (+) でプリカーサーイオン $m/z=192.1$ からプロダクトイオン $m/z=160.0$ (定量用) 及び $m/z=132.1$ (確認用) が確認された。

EBCはESI (+) でプリカーサーイオン $m/z=206.2$ からプロダクトイオン $m/z=160.0$ (定量用) 及び $m/z=134.0$ (確認用) が確認された。

2) 測定条件

機種 : 1200 Series [Agilent Technologies]

検出器 : API-3200QTRAP [AB SCIEX]

カラム : Mightysil RP-18 GP 内径2.0 mm、長さ150 mm、粒子径5 μm [関東化学株式会社]

カラム温度 : 40°C

移動相 : 2 mmol/L酢酸アンモニウム溶液及びメタノールの混液 (3 : 2) で5分間保持し、(3 : 2) から (1 : 19) までの濃度勾配を5分間で行った後、(1 : 19) で5分間保持する。

移動相流量 : 0.2 mL/分

イオン化モード : ESI (+)

イオン化温度 : 400°C

イオン化電圧 : 5,000 V

主なイオン (m/z) :

カルベンダジム ; プリカーサーイオン192、プロダクトイオン160 (定量)

プリカーサーイオン192、プロダクトイオン132 (確認)

EBC : プリカーサーイオン206、プロダクトイオン160 (定量)

プリカーサーイオン206、プロダクトイオン134 (確認)

注入量 : 2 μL

保持時間の目安 : カルベンダジム 7分、EBC 11分

定量限界相当の検出量 : 0.0005 ng (0.00025 mg/L $\times$ 2 μL) のピークのS/N比は、カルベンダジムの確認イオン ($m/z = 192 \rightarrow 132$) が定量イオン ($m/z = 192 \rightarrow 160$) の5分の1程度、EBCの確認イオン ($m/z = 206 \rightarrow 134$) が定量イオン ($m/z = 206 \rightarrow 160$) の2倍程度で、ともに10以上であった。

なお、EBCは確認イオンの方が定量イオンと比べ感度が良いが、選択性のより良い、 $m/z = 206 \rightarrow 160$ を定量用とした。

3) 検量線の直線性

以下の6段階濃度に調製した標準溶液を注入し、作成した検量線を図1-2、2-2に示した。この濃度範囲で良好な直線性を確認した。

カルベンダジム及びEBC : 0.000125 mg/L (0.00025 ng) から0.02 mg/L (0.04 ng)

4) 標準溶液の検出感度 (図1-3、2-3)

定量限界相当の検出量：0.0005 ng (0.00025 mg/L×2 μL) のピークのS/N比は、カルベンダジム及びEBCでともに10以上であった。

2. 試験溶液調製法の検討結果

1) チオファネート及びチオファネートメチルの直接定量についての検討

チオファネート及びチオファネートメチルについてそれぞれの化合物を閉環反応せずに直接定量することが可能か検証するため、下記①から⑤の精製を検討した。その結果、精製中の分解が疑われる場合やジクロロメタンを使用する必要があるなどの問題があったため、閉環反応と同時に分析する方法をとることとした。

①酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) への転溶

既存の通知試験法を参考として検討を行った。

チオファネート及びチオファネートメチル各1 μgに10%塩化ナトリウム溶液100 mL及び1 mol/L水酸化ナトリウム溶液5 mLを加え、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) の混液100 mL及び50 mLで2回振とう抽出を行い、結果をTable 1に示した。Table 1より、チオファネートはほぼEBCに変換していた。チオファネートメチルはそのものの回収率は0%で、一部カルベンダジムへの変換がみられたが、チオファネートメチルとカルベンダジムの合計の収支から6割以上が分解していると予想された。

Table 1 酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) の混液への転溶 (%)

	酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 1)			合計
	100 mL (1回目)	50 mL (2回目)	50 mL (3回目)	
チオファネート	0 (94)	0 (13)	0 (0)	107
チオファネートメチル	0 (36)	0 (0)	0 (0)	36

添加量：1 μg

カッコ内はチオファネートメチルから変換したカルベンダジムをチオファネートメチルに換算し数値化したもの及びチオファネートから変換したEBCをチオファネートに換算し数値化したもの。

②ジクロロメタンへの転溶

飼料分析基準を参考として検討を行った。

チオファネート及びチオファネートメチル各1 μgに10%塩化ナトリウム溶液150 mL及びL-アスコルビン酸ナトリウム3 gを加え、0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液でpH 6.7から7.1に調整した。ジクロロメタン100 mL及び50 mLで3回振とう抽出を行い、結果をTable 2に示した。Table 2より、チオファネート及びチオファネートメチルは、200 mLで完全にジクロロメタンに移行していた。しかしジクロロメタンの使用を避けるため、本転溶法は採用しなかった。

Table 2 ジクロロメタンへの転溶 (%)

	ジクロロメタン			合計
	100 mL (1回目)	100 mL (2回目)	50 mL (3回目)	
チオファネート	82 (7)	16 (0)	0 (0)	105
チオファネートメチル	82 (6)	17 (0)	0 (0)	105

添加量：1 μg

カッコ内はチオフアネートメチルから変換したカルベンダジムをチオフアネートメチルに換算し
数値化したもの及びチオフアネートから変換したEBCをチオフアネートに換算し数値化したもの。

③オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (1,000 mg) からの溶出状況をTable 3に示した。Table 3より、チオフアネートは良好な結果が得られたが、チオフアネートメチルは一部カルベンダジムへの変換がみられ、チオフアネートメチルとカルベンダジムの合計の収支から20%以上の分解が予想された。

Table 3 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの溶出状況 (%)

	水及びメタノールの混液					合計
	(8 : 2)	(7 : 3)	(5 : 5)	(2 : 8)	(2 : 8)	
	10 mL	10 mL	10 mL	0-10 mL	10-20 mL	
チオフアネート	0	0	0	125	0	125
チオフアネートメチル	0 (0)	0 (0)	65 (20)	0 (0)	0 (0)	85

Bond-Elut C18 (充てん量 1,000 mg, Agilent製)

添加量 : 1 µg

カッコ内はチオフアネートメチルから変換したカルベンダジムをチオフアネートメチルに換算し
数値化したもの。

④グラファイトカーボンミニカラムによる精製

グラファイトカーボンミニカラム (250 mg) からの溶出状況をTable 4に示した。Table 4より、チオフアネートメチル及びチオフアネートについて、本体の十分な回収率は得られず変換または分解が予想された。

Table 4 グラファイトカーボンミニカラムの溶出状況 (%)

	アセトン	トルエン及びアセトニトリルの混液		合計
	-	(1 : 3)	(1 : 3)	
	10 mL	0-10 mL	10-20 mL	
チオフアネート	0	59	0	59
チオフアネートメチル	50 (16)	8 (13)	0 (0)	87

Envi-carb (充てん量 250 mg, SUPELCO製)

添加量 : 1 µg

カッコ内はチオフアネートメチルから変換したカルベンダジムをチオフアネートメチルに換算し
数値化したもの。

⑤シリカゲルミニカラムによる精製

シリカゲルミニカラム(690 mg)からの溶出状況をTable 5に示した。Table 5より、チオフアネート及びチオフアネートメチルとともにカルベンダジム及びEBCへの変換がみられ、チオフアネートメチルではカルベンダジムとの合計の収支から4割程度の分解が予想された。

Table 5 シリカゲルミニカラムの溶出状況 (%)

	酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサンの混液			合計
	(3 : 7)	(5 : 5)	(5 : 5)	
	10 mL	0-30 mL	30-40 mL	
チオファネート	16 (78)	0 (45)	0 (0)	139
チオファネートメチル	0 (0)	13 (49)	0 (0)	62

Sep-Pak Plus Silica (充てん量 690 mg, Waters製)

添加量 : 1 µg

カッコ内はチオファネートメチルから変換したカルベンダジムをチオファネートメチルに換算し
数値化したもの及びチオファネートから変換したEBCをチオファネートに換算し数値化したもの。

2) 閉環反応条件の検討

通知試験法の閉環反応条件について再確認を行い、その結果を以下に示した。

①反応時間

チオファネート及びチオファネートメチル各1 µgにメタノール2 mL、50%酢酸10 mL、酢酸銅 (II) 一水和物0.2 g及び沸石を加え、還流冷却器を取り付けて120℃で各時間加熱還流した。放冷後、塩化ナトリウム5 g及び1 mol/L塩酸30 mLを加え、10 mol/L水酸化ナトリウム溶液でpH 6.8から6.9に調整した。これに酢酸エチル50 mLずつで2回振とう抽出を行い、結果をTable 6に示した。Table 6より、チオファネート及びチオファネートメチルは、30分間でもっとも良い閉環率となった。

Table 6 閉環反応時間の違いによる閉環率比 (%)

反応時間	チオファネート	チオファネートメチル
15分	98	99
30分	100	100
60分	86	90
120分	86	90
180分	74	77

添加量 : 1 µg

反応時間30分の値を100%とした。

②反応温度

チオファネート及びチオファネートメチル各1 µgにメタノール2 mL、50%酢酸10 mL、酢酸銅 (II) 一水和物0.2 g及び沸石を加え、還流冷却器を取り付けて各温度で30分間加熱還流した。放冷後、塩化ナトリウム5 g及び1 mol/L塩酸30 mLを加え、10 mol/L水酸化ナトリウム溶液でpH 6.8から6.9に調整した。これに酢酸エチル50 mLずつで2回振とう抽出を行い、結果をTable 7に示した。Table 7より、チオファネート及びチオファネートメチルは、120℃でもっとも良い閉環率となった。

Table 7 閉環反応温度の違いによる閉環率比 (%)

反応温度	チオファネート	チオファネートメチル
60℃	46	58
80℃	56	64
100℃	88	92
120℃	100	100
140℃	98	97

添加量：1 μg

反応温度120℃の値を100%とした。

③酢酸濃度

チオファネート及びチオファネートメチル各1 μg にメタノール2 mL、各割合の酢酸及び水の混液10 mL、酢酸銅（Ⅱ）一水和物0.2 g及び沸石を加え、還流冷却器を取り付けて120℃で30分間加熱還流した。放冷後、塩化ナトリウム5 g及び1 mol/L塩酸30 mLを加え、10 mol/L水酸化ナトリウム溶液でpH 6.8から6.9に調整した。これに酢酸エチル50 mLずつで2回振とう抽出を行い、結果をTable 8に示した。Table 8より、チオファネート及びチオファネートメチルは、大きな差はないものの、酢酸及び水（1：1）混液でもっとも良い閉環率となった。

Table 8 酢酸濃度の違いによる閉環率比 (%)

酢酸及び水の混液	チオファネート	チオファネートメチル
1：9	92	90
1：3	98	96
1：1	100	100
3：1	101	97

添加量：1 μg

酢酸及び水（1：1）混液の値を100%とした。

④酢酸銅（Ⅱ）一水和物の添加量

チオファネート及びチオファネートメチル各1 μg にメタノール2 mL、50%酢酸10 mL、各量の酢酸銅（Ⅱ）一水和物及び沸石を加え、還流冷却器を取り付けて120℃で30分間加熱還流した。放冷後、塩化ナトリウム5 g及び1 mol/L塩酸30 mLを加え、10 mol/L水酸化ナトリウム溶液でpH 6.8から6.9に調整した。これに酢酸エチル50 mLずつで2回振とう抽出を行い、結果をTable 9に示した。Table 9より、チオファネート及びチオファネートメチルは、酢酸銅（Ⅱ）一水和物0.1 gから0.4 gの間ではほぼ同様の閉環率となった。しかし0.4 gでは加熱還流により容器への焦げ付きがみられたため、操作性が良くチオファネート及びチオファネートメチルとともに閉環率のよい0.2 gで反応を行うこととした。

Table 9 酢酸銅（Ⅱ）一水和物添加量の違いによる閉環率比 (%)

酢酸銅（Ⅱ）一水和物	チオファネート	チオファネートメチル
0.1 g	102	95
0.2 g	100	100
0.3 g	102	98

0.4 g	103	101
-------	-----	-----

添加量：1 µg

酢酸銅（Ⅱ）一水和物0.2 gの値を100%とした。

3) 閉環反応後の洗浄及び抽出の検討

通知試験法では加熱還流後、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：1）混液で洗浄及び抽出を行っているが、操作の簡便化を図るために飼料分析基準を参考にして*n*-ヘキサン洗浄及び酢酸エチルによる抽出の検討を行い、その結果を以下に示した。また通知試験法で抹茶及びホップの場合に行って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精製について再確認を行い、その結果も以下に示した。

①*n*-ヘキサン洗浄

カルベンダジム及びEBC各1 µgに1 mol/L塩酸50 mL及び塩化ナトリウム5 gを加え、*n*-ヘキサン20 mLで2回振とう洗浄を行い、結果をTable 10に示した。Table 10より、カルベンダジム及びEBCの*n*-ヘキサンへの移行は確認されなかったので、20 mLを2回で洗浄することとした。

Table 10 *n*-ヘキサンによる洗浄時の移行率 (%)

	<i>n</i> -ヘキサン層		水層	合計
	0-20 mL	20-40 mL	50 mL	
カルベンダジム	0	0	95	95
EBC	0	0	94	94

添加量：1 µg

②酢酸エチル転溶

カルベンダジム及びEBC各1 µgに水50 mL及び塩化ナトリウム5 gを加え、0.1 mol/L水酸化ナトリウムでpH 6.8から6.9に調整後、酢酸エチル50 mLで3回振とう抽出を行い、結果をTable 11に示した。Table 11より、カルベンダジム及びEBCは100 mLで完全に酢酸エチルに移行したので、50 mLを2回で抽出することとした。

Table 11 酢酸エチルへの転溶 (%)

	酢酸エチル			合計
	0-50 mL	50-100 mL	100-150 mL	
カルベンダジム	75	23	0	98
EBC	76	22	0	98

添加量：1 µg

③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による精製

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）からの溶出状況をTable 12及び13に示した。Table 12より、カルベンダジム及びEBCはアセトン及び*n*-ヘキサン（3：7）20 mLでほぼ溶出することが確認されたが、Table 13より、試料共存下では溶出にずれが確認されたため、試験では省略することとした。

Table 12 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の溶出状況 (%)

	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン の混液				合計
	(3 : 17)	(3 : 7)	(3 : 7)	(3 : 7)	
	10 mL	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	
カルベンダジム	0	91	7	0	98
EBC	0	96	0	0	96

Bond Elut PSA (充てん量 500 mg, Agilent製)

添加量 : 1 µg

Table 13 試料共存下でのエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムの溶出状況 (%)

	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン の混液			合計
	(3 : 17)	(3 : 7)	(3 : 7)	
	10 mL	0-20 mL	20-30 mL	
カルベンダジム	0	65	11	76
EBC	0	75	7	82

Bond Elut PSA (充てん量 500 mg, Agilent製)

試料 : 大豆使用

添加量 : 1 µg

4) 閉環反応操作の検討

①平均回収率

既存の通知試験法での閉環反応の回収率はカルベンダジムが約73%、チオファネートメチルが約60%となっている。そこで、2) 及び3) で検討した閉環反応の操作について試行数3で回収試験を実施し、結果をTable 14に示した。Table 14より、本試験法の回収率はカルベンダジムが平均90%、チオファネートメチルが平均79%と、既存の試験法と比べて回収率が向上した。さらにチオファネートの回収率は平均81%、EBCは83%であった。

Table 14 閉環反応操作の回収率 (%)

	試行数			合計
	1	2	3	
カルベンダジム	90	91	90	90
チオファネートメチル	78	80	78	79
チオファネート	87	81	74	81
EBC	85	79	84	83

添加量 : 1 µg

②各濃度における回収率

供試量0.01 µgから20 µgでの閉環反応の回収率をTable 15に示した。Table 15より、供試量0.01 µgから20 µgの間でばらつきなく良好な回収が得られることが確認された。

Table 15 各濃度での閉環反応操作の回収率 (%)

	供試量 (μg)			
	0.01	0.1	1	20
カルベンダジム	91	88	89	88
チオファネートメチル	80	76	82	73
チオファネート	79	76	78	76
EBC	86	88	87	84

5) 抽出後試料溶液の分取量の検討

本試験法では抽出後の試料溶液をそのまま閉環反応することから、閉環反応操作に供する試料溶液の分取量による反応率を調べ、Table 16及び17に示した。Table 16より、玄米を用いた試料溶液1 mLを反応したときにチオファネート及びチオファネートメチルの回収率が標準品のみを閉環反応させた場合と同程度であった。またTable 17より、茶葉及び浸出液ではそれぞれの試料溶液を10倍希釈後、2 mLを反応に用いたときにチオファネート及びチオファネートメチルの回収率が標準品のみを閉環反応させた場合と同程度であった。よって、閉環反応に用いる試料溶液は1 mLとし、茶葉及び浸出液では10倍希釈後の試料溶液を2 mLとした。

Table 16 試料溶液の分取量による反応率 (%)

分取量 (mL)	反応率 (%)	
	チオファネート	チオファネートメチル
4	48	32
2	40	39
1	80	79

試料：玄米

Table 17 試料溶液の分取量による反応率 (%)

試料	分取量	反応率 (%)	
		チオファネート	チオファネートメチル
茶葉	1 mL	36	105
	10倍希釈後2 mL	81	86
浸出液	1 mL	48	71
	10倍希釈後2 mL	73	107

6) 抽出溶媒の検討

畜水産物についても農産物に合わせ、メタノールを抽出溶媒とした。メタノールでも低極性試料から、カルベンダジム、チオファネート、チオファネートメチル及びベノミルが十分に抽出されることを確認するため、牛の脂肪を用いて検証した。牛の脂肪を100℃のオーブンで溶かし、溶けた脂肪について冷やし固めた後、10 g採取して約50℃の湯せんで再度溶解したところに、カルベンダジム、チオファネート、チオファネートメチル及びベノミルを添加した。添加後、2時間冷蔵庫で冷やし固めたも

のについて、メタノールで抽出を行った。回収試験の結果をTable 18に示した。脂肪をメタノールでホモジナイズ抽出した場合、十分に分散しており、本検討の回収率も問題なかったことから、脂肪についても抽出溶媒は農産物同様、メタノールで問題ないと判断した。

Table 18 脂肪からの抽出確認試験の回収率

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)				
		カルベンダジム	チオファネート	チオファネート メチル	ベノミル	EBC
牛の脂肪	0.07	102	89	87	106	96

3. 添加回収試験

農産物は玄米、大豆、ばれいしょ、キャベツ、ほうれんそう、オレンジ、りんご及び茶の8品目になす及びコーヒー豆を加えた10品目を試料とした。畜水産物は牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、乳、鶏卵、さけ、うなぎ、しじみ及びはちみつの9品目に鶏の筋肉を加えた10品目を試料とした。カルベンダジム、チオファネート、チオファネートメチル、ベノミル及びEBCの回収試験の結果をTable 19から23に、クロマトグラムを図1-4及び図2-4に示した。なお、添加試料の調製方法は次の通り調製した。また、添加はカルベンダジムとEBC、チオファネートとチオファネートメチル、ベノミル単独の組み合わせでそれぞれ試験を実施した。

- ①玄米及び大豆（添加濃度：0.5 ppm相当）：試料10.0 gに添加用標準溶液5 mg/Lを1 mL添加し、よく混合した後、30分間放置した。
- ②ばれいしょ（添加濃度：0.6 ppm相当）：試料20.0 gにL - アスコルビン酸ナトリウム1 gを加え、添加用標準溶液20 mg/Lを0.6 mL添加し、よく混合した後、30分間放置した。
- ③キャベツ、なす、ほうれんそう、オレンジ及びりんご（添加濃度：3 ppm相当）：試料20.0 gにL - アスコルビン酸ナトリウム1 gを加え、添加用標準溶液100 mg/Lを0.6 mL添加し、よく混合した後、30分間放置した。
- ④茶（直接抽出法用 添加濃度：10 ppm相当）：試料5.00 gに添加用標準溶液100 mg/Lを0.5 mL添加し、よく混合した後、30分間放置した。
- ⑤茶（熱湯浸出法用 添加濃度：10 ppm相当）：試料9.00 gに100℃の水540 mLを加え、室温で5分間放置した後、ろ過、放冷後、ろ液3 mLを採り、添加用標準溶液1 mg/Lを0.5 mL添加し、よく混合した後、30分間放置した。
- ⑥コーヒー豆（添加濃度：0.1 ppm相当）：試料10.0 gに添加用標準溶液1 mg/Lを1 mL添加し、よく混合した後、30分間放置した。
- ⑦牛の筋肉（添加濃度：0.1 ppm相当）：試料10.0 gにL - アスコルビン酸ナトリウム1 gを加え、添加用標準溶液1 mg/Lを1 mL添加し、よく混合した後、30分間放置した。
- ⑧牛の脂肪（添加濃度：0.07 ppm相当）：試料10.0 gにL - アスコルビン酸ナトリウム1 gを加え、添加用標準溶液1 mg/Lを0.7 mL添加し、よく混合した後、30分間放置した。
- ⑨牛の肝臓（添加濃度：0.4 ppm相当）：試料10.0 gにL - アスコルビン酸ナトリウム1 gを加え、添加用標準溶液5 mg/Lを0.8 mL添加し、よく混合した後、30分間放置した。
- ⑩乳（添加濃度：0.3 ppm相当）：試料10.0 gにL - アスコルビン酸ナトリウム1 gを加え、添加用標準溶液5 mg/Lを0.6 mL添加し、よく混合した後、30分間放置した。

- ⑪鶏の筋肉及び卵（添加濃度：0.09 ppm相当）：試料10.0 gにL - アスコルビン酸ナトリウム1 gを加え、添加用標準溶液1 mg/Lを0.9 mL添加し、よく混合した後、30分間放置した。
- ⑫さけ、うなぎ及びしじみ（添加濃度：0.01 ppm相当）：試料10.0 gにL - アスコルビン酸ナトリウム1 gを加え、添加用標準溶液0.1 mg/Lを1 mL添加し、よく混合した後、30分間放置した。
- ⑬はちみつ（添加濃度：0.01 ppm相当）：試料10.0 gに添加用標準溶液0.1 mg/Lを1 mL添加し、よく混合した後、30分間放置した。

Table 19 カルベンダジム添加回収試験結果

試料	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)
			1	2	3	4	5		
米（玄米）	1	0.5	89	91	93	90	91	91	1.5
大豆	1	0.5	77	80	84	87	85	82	5.0
ばれいしょ	0.6	0.6	75	94	91	94	90	89	8.8
キャベツ	3	3	82	89	90	89	86	87	3.7
なす	3	3	80	98	97	96	94	93	8.0
ほうれんそう	3	3	95	90	92	84	79	88	7.4
オレンジ	3	3	85	77	77	78	78	79	4.1
りんご	3	3	79	93	85	91	94	88	7.2
茶	10	10	88	106	102	104	101	100	6.9
茶（熱湯浸出法）	10	10	98	106	94	101	107	101	5.6
コーヒー豆	0.1	0.1	94	90	95	89	92	92	2.6
牛の筋肉	0.1	0.1	89	91	86	85	91	88	2.9
牛の脂肪	0.07	0.07	111	108	106	87	110	104	9.3
牛の肝臓	0.4	0.4	100	82	96	101	92	94	8.2
乳	0.3	0.3	85	91	88	87	96	89	4.8
鶏の筋肉	0.09	0.09	89	97	94	96	95	94	3.5
鶏の卵	0.09	0.09	87	98	103	95	103	97	7.1
さけ	0.01	0.01	96	89	98	102	99	97	5.0
うなぎ	0.01	0.01	96	97	93	112	89	98	9.0
しじみ	0.01	0.01	101	93	102	102	90	97	5.9
はちみつ	0.01	0.01	74	106	81	102	74	87	17.8

Table 20 チオファネート添加回収試験結果

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)
		1	2	3	4	5		
米 (玄米)	0.5	74	83	81	79	79	79	4.3
大豆	0.5	81	78	81	85	85	82	3.6
ばれいしょ	0.6	96	81	96	99	90	92	7.9
キャベツ	3	97	96	95	91	89	94	3.8
なす	3	82	81	85	85	76	82	4.4
ほうれんそう	3	86	86	82	81	89	85	4.1
オレンジ	3	80	89	86	85	89	86	4.0
りんご	3	75	80	82	74	83	79	5.1
茶	10	95	97	96	91	97	95	2.4
茶 (熱湯浸出法)	10	83	85	80	85	92	85	5.0
コーヒー豆	0.1	71	75	79	80	78	77	4.4
牛の筋肉	0.1	90	89	85	91	92	90	3.0
牛の脂肪	0.07	97	115	103	101	104	104	6.5
牛の肝臓	0.4	89	92	96	100	92	94	4.5
乳	0.3	81	88	86	95	89	88	5.8
鶏の筋肉	0.09	78	81	71	72	81	76	6.3
鶏の卵	0.09	87	98	104	101	85	95	8.9
さけ	0.01	95	96	98	103	97	98	3.3
うなぎ	0.01	95	107	106	112	102	105	6.0
しじみ	0.01	89	90	98	89	90	91	4.1
はちみつ	0.01	87	91	83	86	83	86	3.8

Table 21 チオファネートメチル添加回収試験結果

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)
		1	2	3	4	5		
米 (玄米)	0.5	82	89	87	89	89	87	3.4
大豆	0.5	78	79	80	81	85	81	3.3
ばれいしょ	0.6	91	80	92	90	89	89	6.0
キャベツ	3	87	87	85	85	100	89	7.2
なす	3	85	74	80	83	91	83	7.8
ほうれんそう	3	81	85	80	86	88	84	4.1
オレンジ	3	88	84	88	77	88	85	5.5
りんご	3	75	79	82	80	81	79	3.5
茶	10	97	95	94	100	96	96	2.4
茶 (熱湯浸出法)	10	89	87	89	90	93	89	2.6
コーヒー豆	0.1	77	75	76	74	79	76	2.7
牛の筋肉	0.1	85	88	83	83	86	85	2.6
牛の脂肪	0.07	86	107	88	97	100	96	9.0
牛の肝臓	0.4	82	100	95	96	91	93	7.6
乳	0.3	82	85	88	86	87	86	2.5
鶏の筋肉	0.09	72	65	76	76	79	74	7.2
鶏の卵	0.09	83	103	98	104	91	96	9.2
さけ	0.01	94	102	103	103	99	100	4.0
うなぎ	0.01	106	110	104	111	102	107	3.6
しじみ	0.01	101	96	100	100	98	99	2.1
はちみつ	0.01	90	93	94	100	97	95	4.0

Table 22 ベノミル添加回収試験結果

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)
		1	2	3	4	5		
米 (玄米)	0.5	87	91	85	81	80	85	5.5
大豆	0.5	75	82	83	80	89	82	6.3
ばれいしょ	0.6	74	77	76	78	74	76	2.1
キャベツ	3	93	93	91	90	90	92	1.7
なす	3	76	95	80	89	82	84	8.9
ほうれんそう	3	97	98	94	97	90	95	3.3
オレンジ	3	77	81	79	78	80	79	1.8
りんご	3	91	93	78	92	92	89	7.3
茶	10	94	94	95	97	90	94	3.0
茶 (熱湯浸出法)	10	83	90	93	86	82	87	5.4
コーヒー豆	0.1	83	75	82	70	76	77	6.6
牛の筋肉	0.1	83	87	87	85	84	85	2.0
牛の脂肪	0.07	92	107	104	108	104	103	6.1
牛の肝臓	0.4	97	95	94	96	89	94	3.4
乳	0.3	99	92	90	91	99	94	4.7
鶏の筋肉	0.09	89	96	100	92	93	94	4.5
鶏の卵	0.09	82	101	99	105	106	99	9.6
さけ	0.01	96	99	96	94	99	97	2.1
うなぎ	0.01	101	96	95	99	105	99	4.2
しじみ	0.01	98	103	99	96	96	98	3.2
はちみつ	0.01	101	103	75	72	80	86	16.9

Table 23 EBC添加回収試験結果

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)
		1	2	3	4	5		
米 (玄米)	0.5	79	76	75	80	80	78	2.8
大豆	0.5	73	76	82	87	83	80	7.0
ばれいしょ	0.6	75	91	90	87	89	87	7.5
キャベツ	3	80	89	88	88	86	86	4.1
なす	3	89	84	91	92	92	90	4.0
ほうれんそう	3	84	92	93	84	74	85	8.8
オレンジ	3	84	82	79	77	73	79	5.5
りんご	3	74	90	92	94	88	88	9.2
茶	10	90	106	100	103	100	100	6.0
茶 (熱湯浸出法)	10	86	77	85	80	69	80	8.8
コーヒー豆	0.1	86	79	75	75	79	79	5.5
牛の筋肉	0.1	89	86	80	82	83	84	4.2
牛の脂肪	0.07	108	109	106	93	107	105	6.1
牛の肝臓	0.4	88	73	87	87	85	84	7.2
乳	0.3	82	87	88	86	95	87	5.2
鶏の筋肉	0.09	82	95	94	86	93	90	6.2
鶏の卵	0.09	78	93	90	92	95	90	7.8
さけ	0.01	90	91	94	96	89	92	2.9
うなぎ	0.01	97	89	91	97	99	94	4.7
しじみ	0.01	93	90	95	93	89	92	2.8
はちみつ	0.01	82	83	82	83	84	82	1.1

今回検討した農産物及び畜水産物における本分析法の真度 (%) は、カルベンダジム : 79~104、チオファネート : 76~105、チオファネートメチル : 74~107、ベノミル : 76~103、EBC : 78~105、また併行精度 (RSD%) はカルベンダジム : 1.5~17.8、チオファネート : 2.4~8.9、チオファネートメチル : 2.1~9.2、ベノミル : 1.7~16.9、EBC : 1.1~9.2で良好であった。

4. 無添加試料の妨害状況

農産物10品目及び畜水産物10品目のいずれのブランク試料においても、妨害ピークは認められなかった。

5. 試料マトリックスの測定値への影響

試料由来の夾雑物によるイオン化抑制等の影響を把握するために、試料溶液からカルベンダジム及びEBCが添加回収試験と同濃度の添加試料溶液を調製し、標準品のみの標準溶液と比較した結果をTable 24に示した。21品目について、マトリックスによる顕著な影響は認められなかった。

Table 24 カルベンダジム及びEBCのマトリックスによる測定への影響

試料	カルベンダジム	EBC
米（玄米）	113.0	108.5
大豆	112.8	114.3
ばれいしょ	113.9	112.8
キャベツ	100.0	92.8
なす	101.6	96.2
ほうれんそう	98.0	100.7
オレンジ	102.0	108.1
りんご	99.0	101.4
茶	99.0	100.9
茶（熱湯浸出法）	99.2	95.3
コーヒー豆	96.8	99.3
牛の筋肉	103.9	101.2
牛の脂肪	94.7	86.6
牛の肝臓	103.6	103.5
乳	96.3	86.8
鶏の筋肉	100.8	97.6
鶏の卵	112.2	109.6
さけ	103.5	103.9
うなぎ	101.0	97.1
しじみ	97.6	94.0
はちみつ	99.8	90.7

数値：（添加試料溶液のレスポンス／標準溶液のレスポンス）×100

測定イオン：カルベンダジム $m/z = 192 \rightarrow 160$ 、EBC $m/z = 206 \rightarrow 160$

6. L - アスコルビン酸ナトリウムの添加

試料調製中における分解損失を調べるため、L - アスコルビン酸ナトリウムの有無による回収率を調査し、結果をTable 25に示した。Table 25より、L - アスコルビン酸ナトリウムの有無で回収率に大きな差はなかった。

Table 25 L - アスコルビン酸ナトリウムの有無による回収率の比較

試料	チオファネートメチル	チオファネート
ばれいしょ	98.5	101.2
キャベツ	120.7	112.5
なす	117.1	109.9
ほうれんそう	124.1	117.0
オレンジ	117.9	109.9
りんご	118.4	108.7

数値（％）：（無添加調製試料回収率／L - アスコルビン酸ナトリウム添加調製試料回収率）×100

[結論]

カルベンダジム、チオファネート、チオファネートメチル及びベノミルについて個別試験法を検討した。メタノールで抽出し、抽出液をそのまま閉環反応させた後、酢酸エチルに転溶し、LC-MS/MSで定量、確認する方法を提案する。

この試験法を玄米、大豆、ばれいしょ、ほうれんそう、オレンジ、キャベツ、なす、りんご、コーヒー豆及び茶の農産物10品目と、牛の筋肉、牛の肝臓、乳、鶏の筋肉、鶏の卵、さけ、うなぎ、しじみ及びはちみつの畜水産物10品目の試料に適用した場合、真度はカルベンダジム79～104%、チオファネート76～105%、チオファネートメチル74～107%、ベノミル76～103%、EBC78～105%であり、定量限界は茶でそれぞれ0.05 mg/kg、その他の食品でそれぞれ0.01 mg/kgが可能であることが確認された。

[参考文献]

1. 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 カルベンダジム、チオファネート、チオファネートメチル及びベノミルの個別試験法(厚生労働省)
2. 飼料分析基準 カルベンダジム（カルベンダジム、チオファネートメチル及びベノミル）平成20年4月1日・19消安第14729号 農林水産省消費・安全局長通知

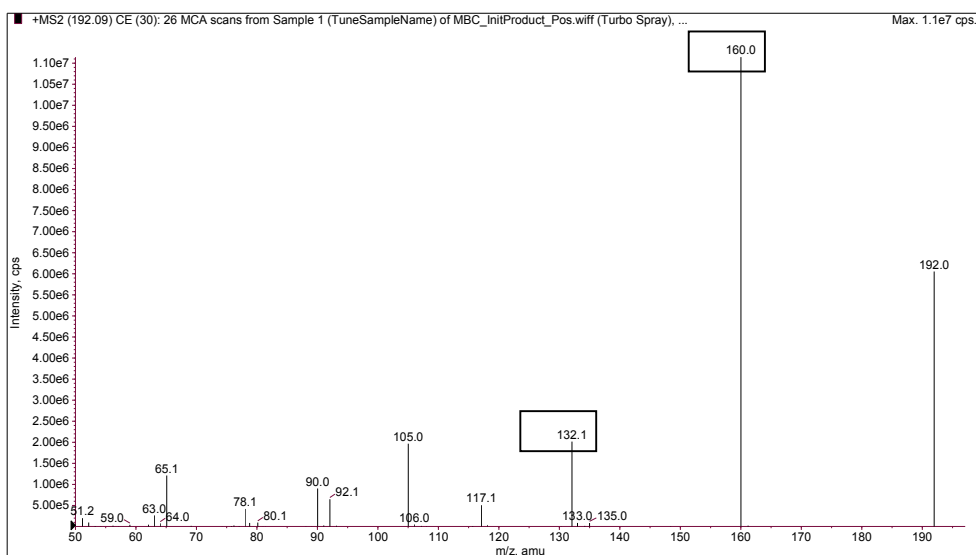
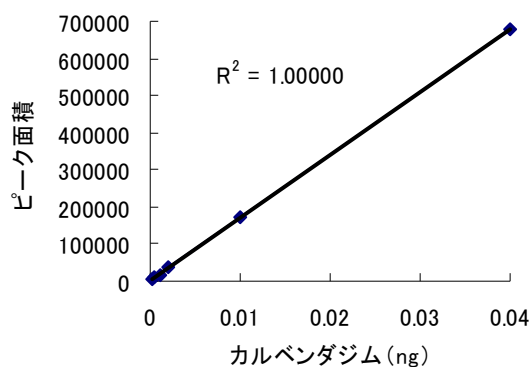


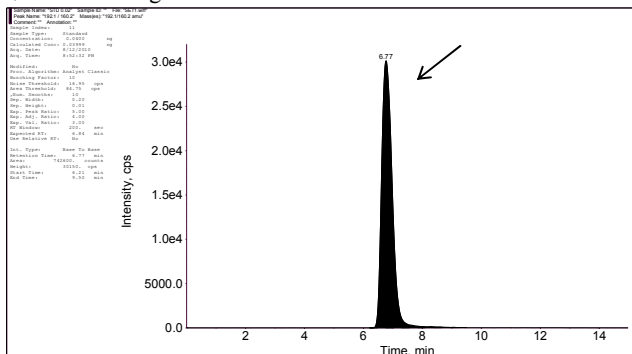
図1-1 カルベンダジム ($m/z = 192$) 由来のプロダクトイオンスキャン



データ処理装置設定条件の一例
 機種（メーカー）：Analyst（AB SCIEX製）
 ピークの定量方法：ピーク面積法
 検量線の種類：最小二乗法
 検量線基準ピークの重量：0.00025 ng～0.04 ng
 検量線傾き (a) : $a = 1.695851E+07$
 検量線切片 (b) : $b = 1309.54015$

図1-2 カルベンダジムの検量線の一例 ($m/z = 192 \rightarrow 160$)

標準品 0.04 ng



標準品 0.0005 ng (定量限界相当量)

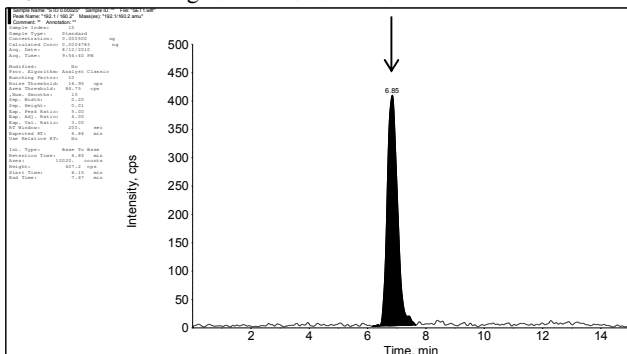
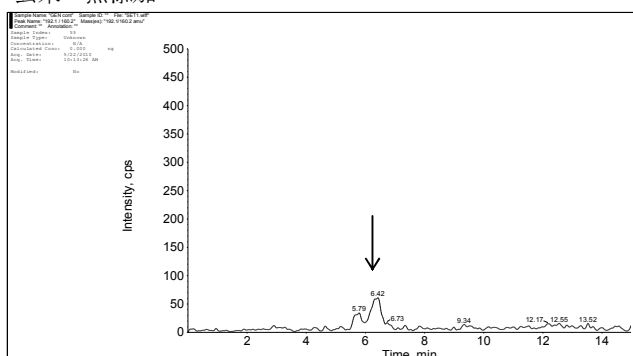
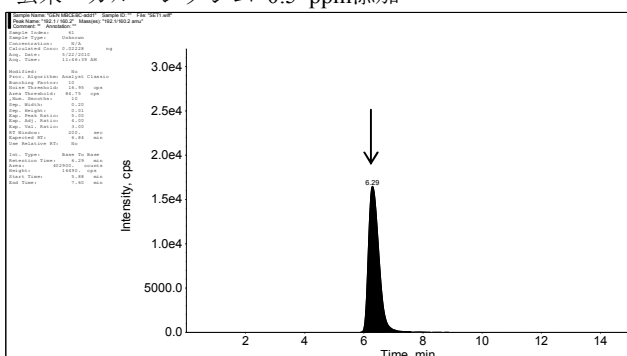


図1-3 カルベンダジム標準溶液のクロマトグラム一例 ($m/z = 192 \rightarrow 160$)

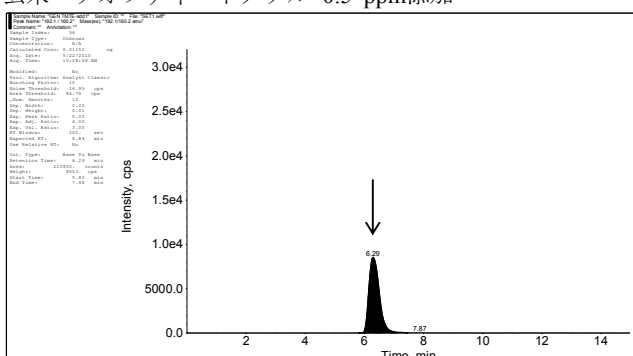
玄米 無添加



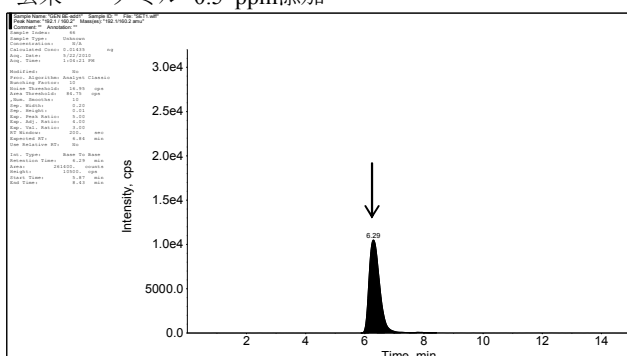
玄米 カルベンダジム 0.5 ppm添加



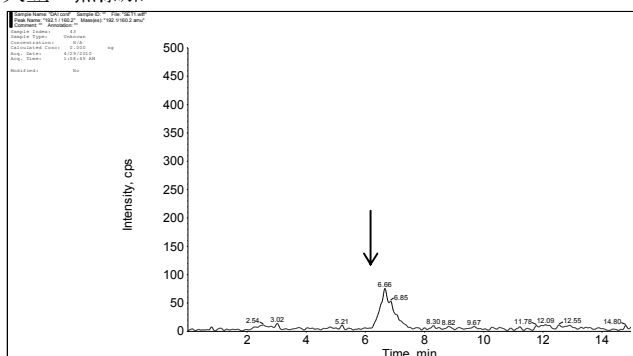
玄米 チオファネートメチル 0.5 ppm添加



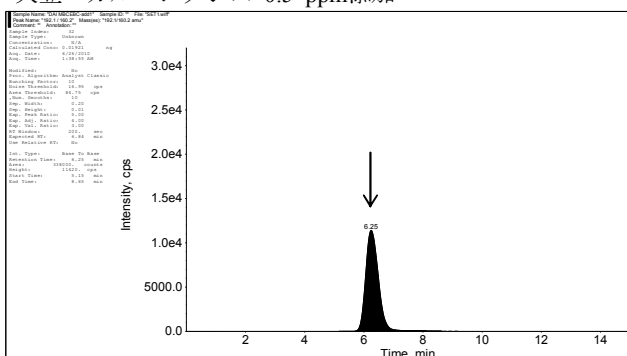
玄米 ベノミル 0.5 ppm添加



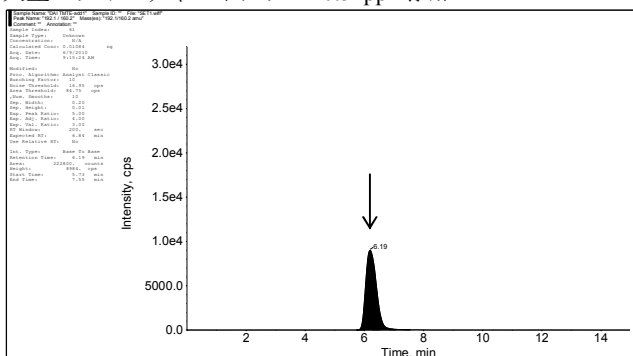
大豆 無添加



大豆 カルベンダジム 0.5 ppm添加



大豆 チオファネートメチル 0.5 ppm添加



大豆 ベノミル 0.5 ppm添加

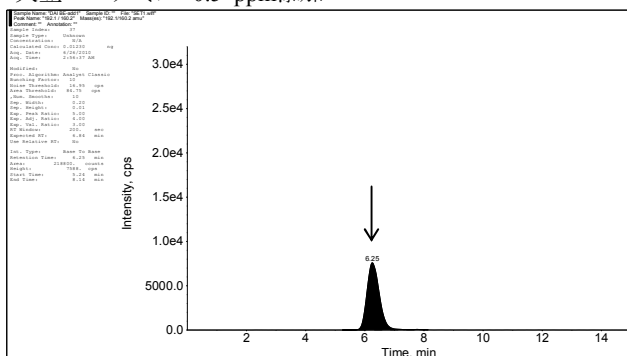
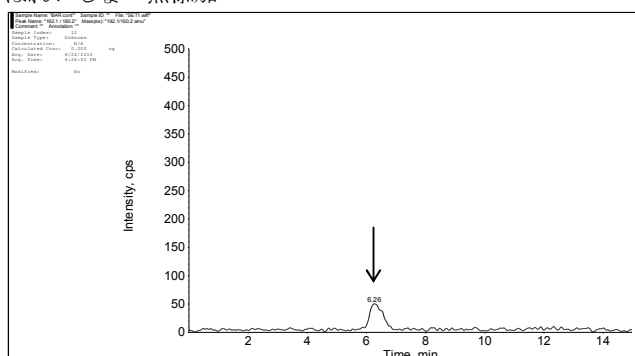
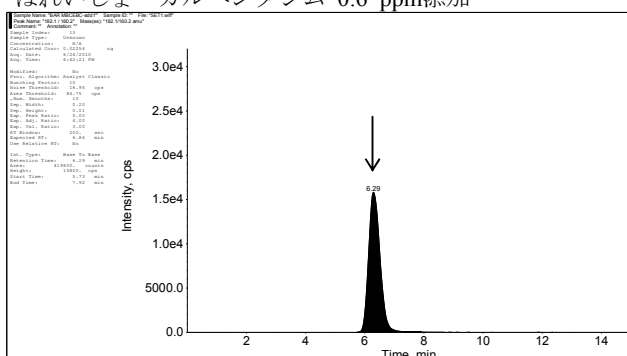


図1-4-1 試料のカルベンダジムクロマトグラム ($m/z = 192 \rightarrow 160$)

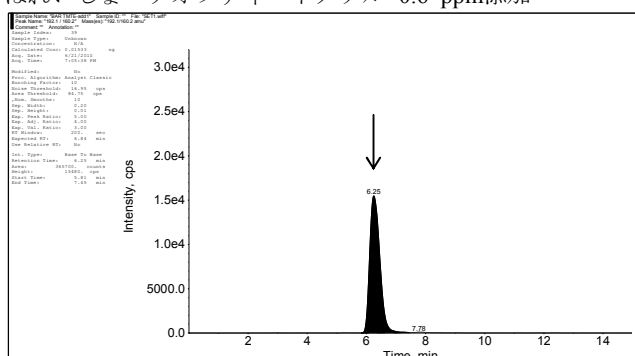
ばれいしょ 無添加



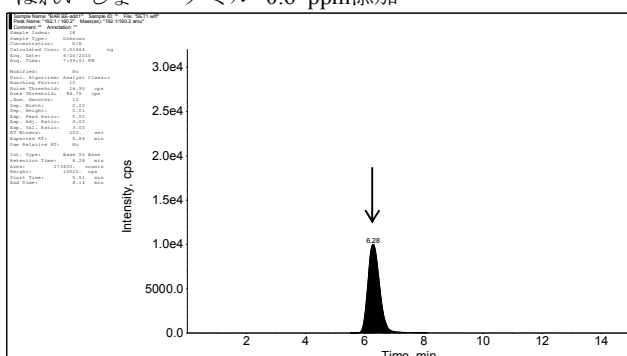
ばれいしょ カルベンダジム 0.6 ppm添加



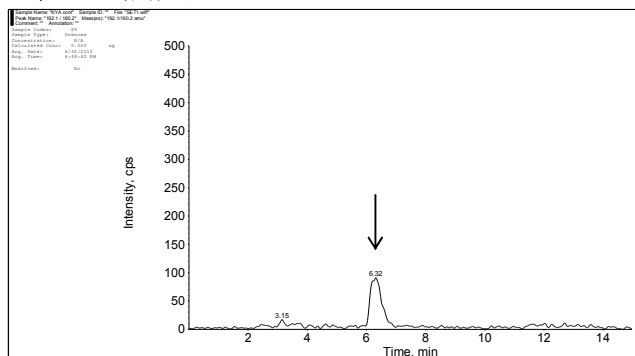
ばれいしょ チオファネートメチル 0.6 ppm添加



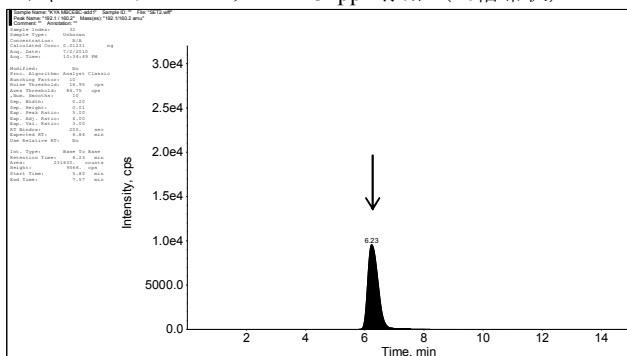
ばれいしょ ベノミル 0.6 ppm添加



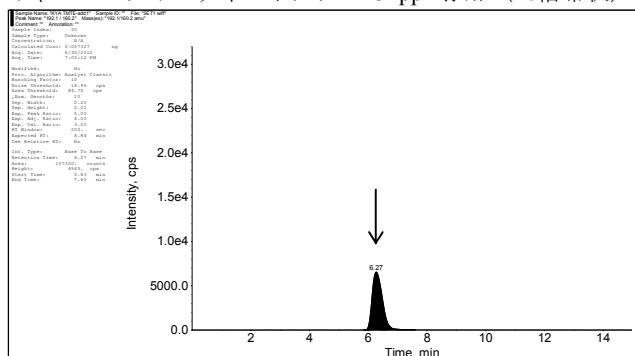
キャベツ 無添加



キャベツ カルベンダジム 3 ppm添加 (10倍希釈)



キャベツ チオファネートメチル 3 ppm添加 (10倍希釈)



キャベツ ベノミル 3 ppm添加 (10倍希釈)

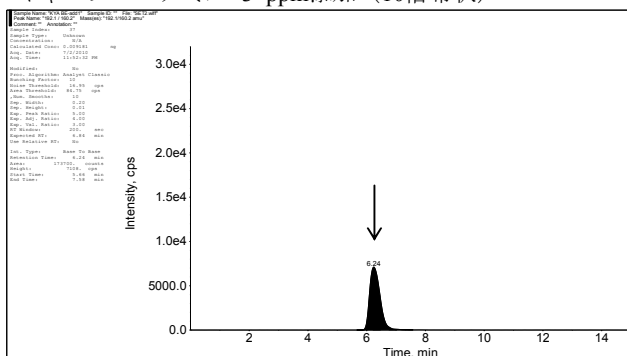
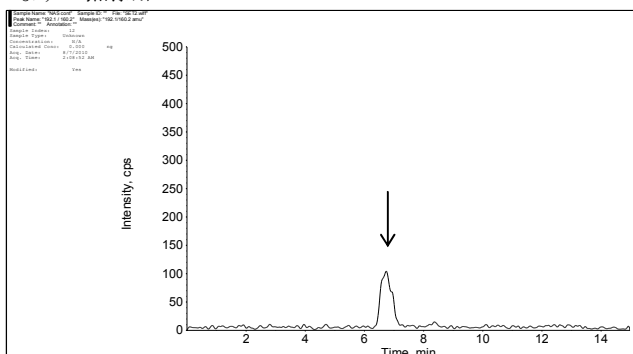
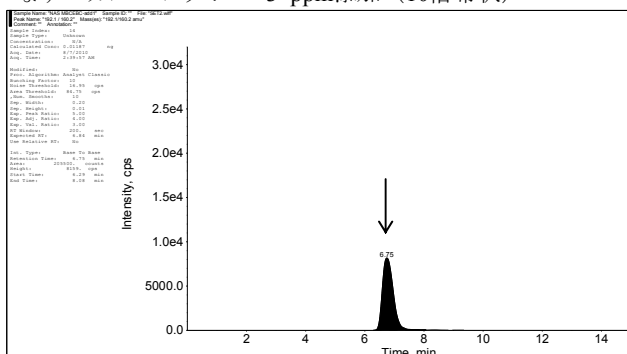


図1-4-2 試料のカルベンダジムクロマトグラム ($m/z = 192 \rightarrow 160$)

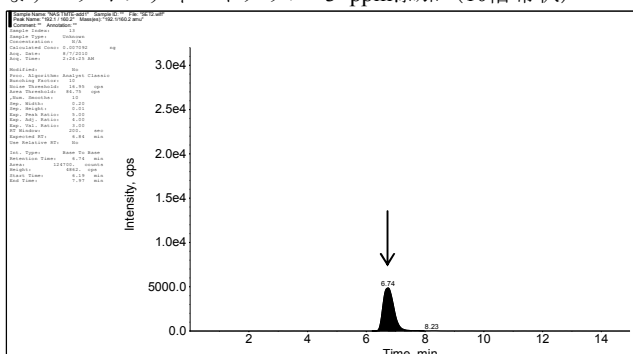
なす 無添加



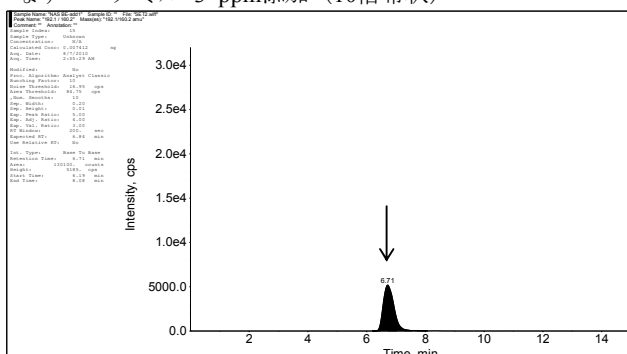
なす カルベンダジム 3 ppm添加 (10倍希釈)



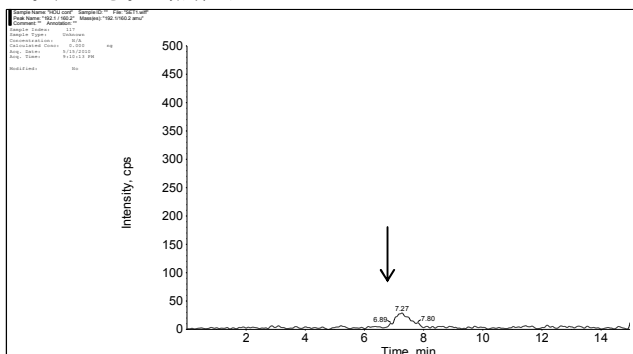
なす チオファネートメチル 3 ppm添加 (10倍希釈)



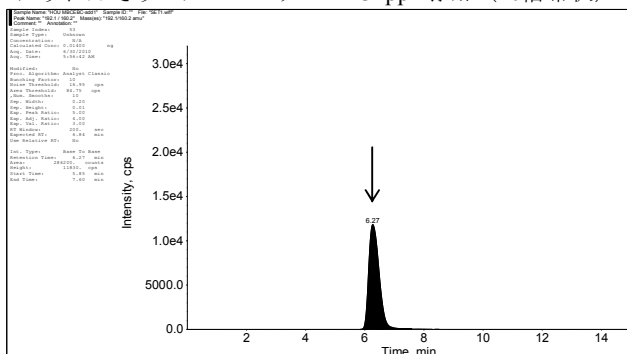
なす ベノミル 3 ppm添加 (10倍希釈)



ほうれんそう 無添加

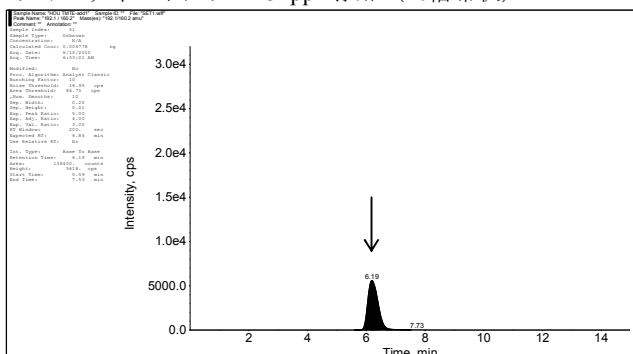


ほうれんそう カルベンダジム 3 ppm添加 (10倍希釈)



ほうれんそう

チオファネートメチル 3 ppm添加 (10倍希釈)



ほうれんそう ベノミル 3 ppm添加 (10倍希釈)

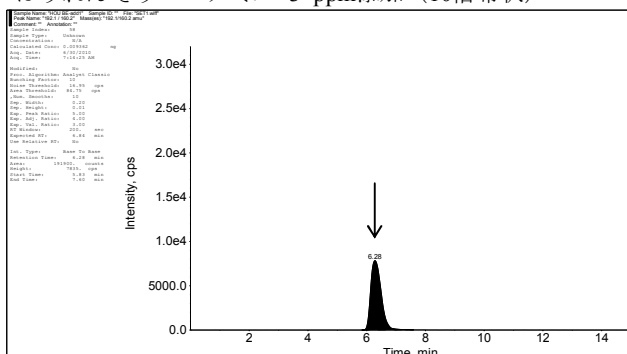
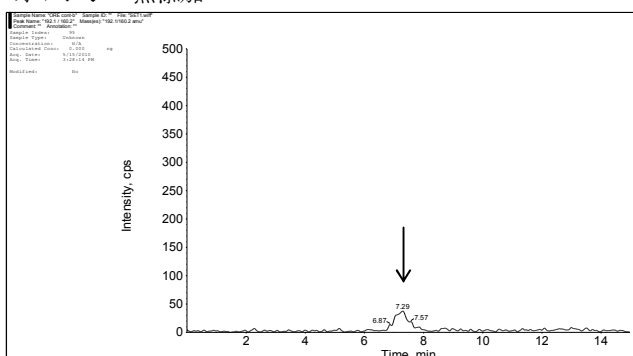
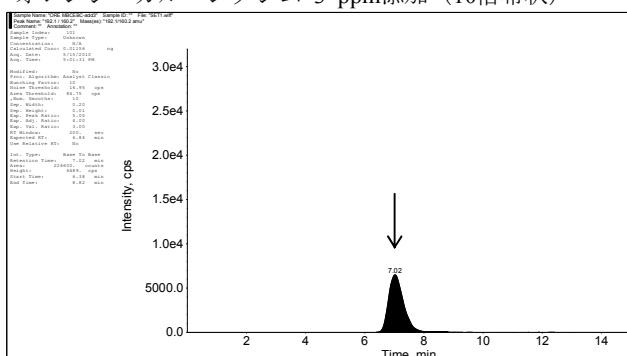


図1-4-3 試料のカルベンダジムクロマトグラム ($m/z = 192 \rightarrow 160$)

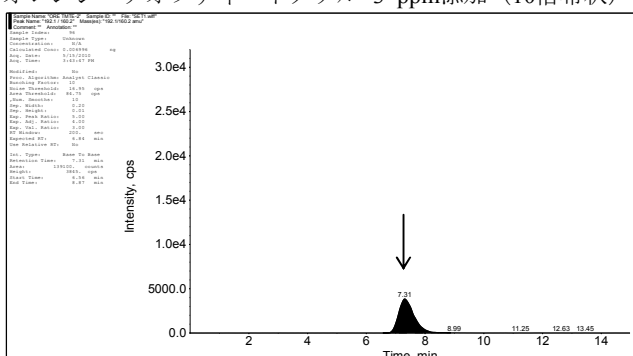
オレンジ 無添加



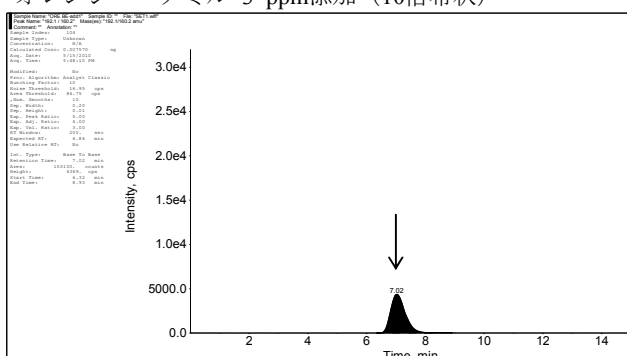
オレンジ カルベンダジム 3 ppm添加 (10倍希釈)



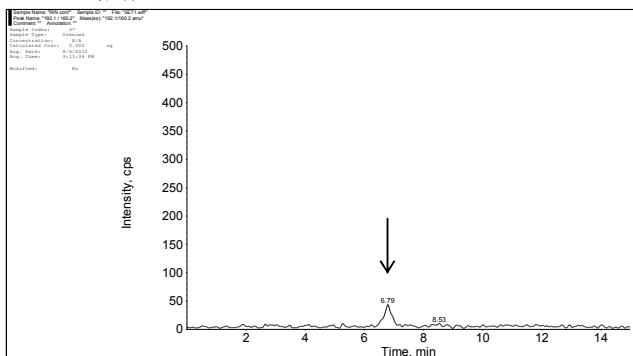
オレンジ チオファネートメチル 3 ppm添加 (10倍希釈)



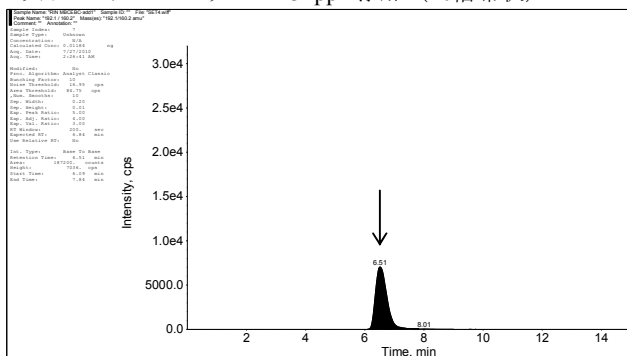
オレンジ ベノミル 3 ppm添加 (10倍希釈)



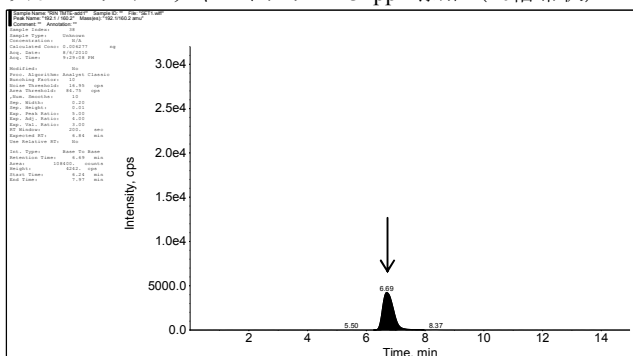
りんご 無添加



りんご カルベンダジム 3 ppm添加 (10倍希釈)



りんご チオファネートメチル 3 ppm添加 (10倍希釈)



りんご ベノミル 3 ppm添加 (10倍希釈)

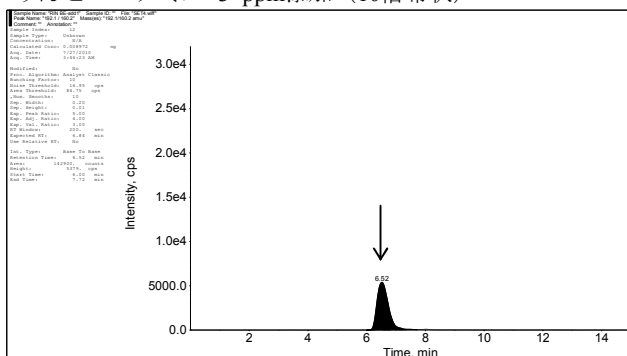
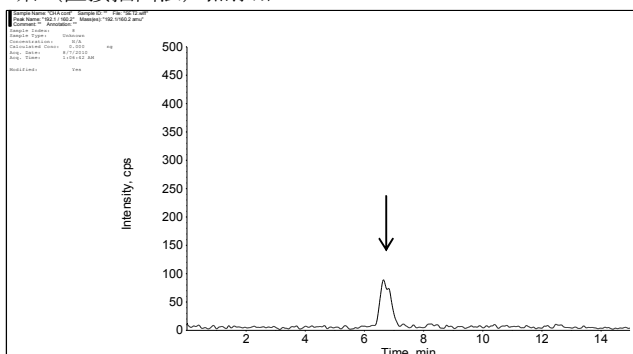
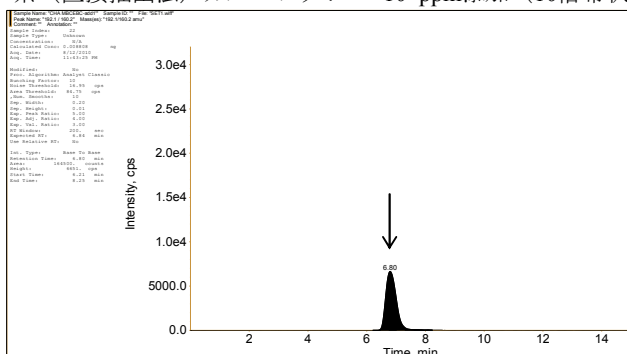


図1-4-4 試料のカルベンダジムクロマトグラム ($m/z = 192 \rightarrow 160$)

茶（直接抽出法）無添加

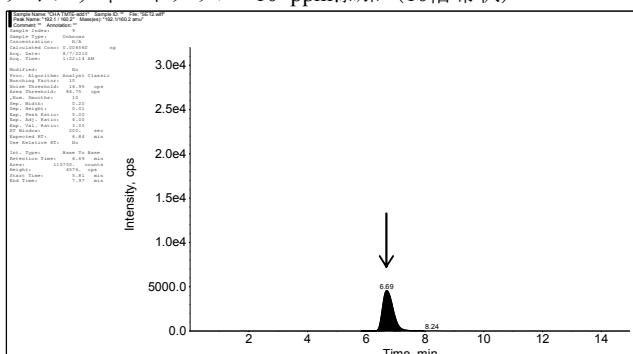


茶（直接抽出法）カルベンダジム 10 ppm添加（10倍希釈）

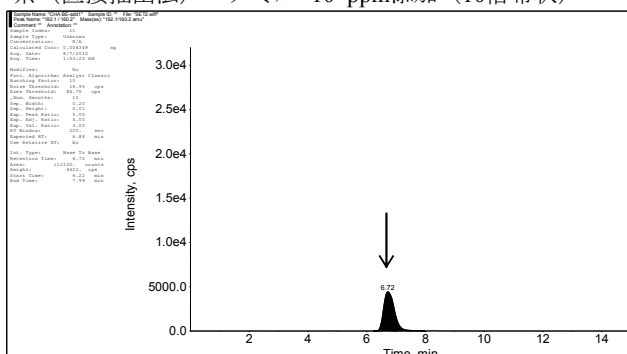


茶（直接抽出法）

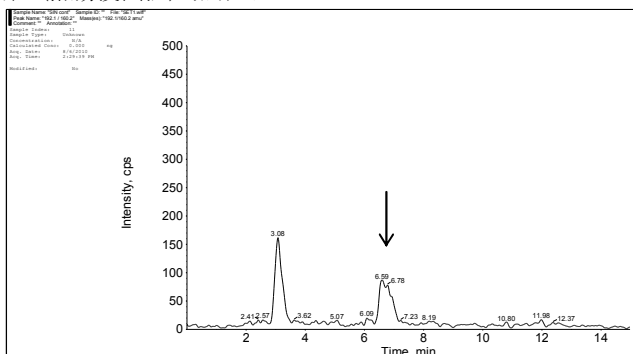
チオファネートメチル 10 ppm添加（10倍希釈）



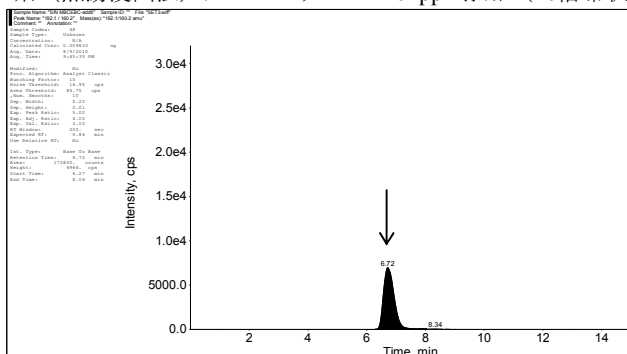
茶（直接抽出法）ベノミル 10 ppm添加（10倍希釈）



茶（熱湯浸出法）無添加

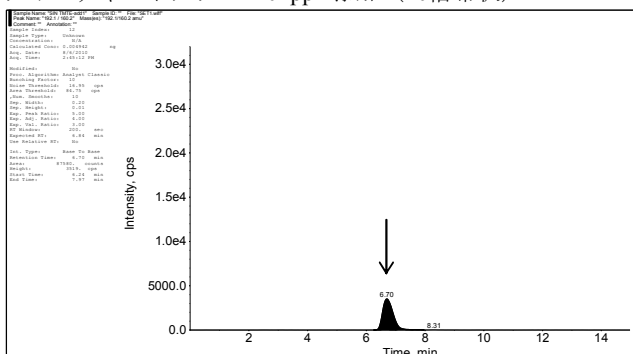


茶（熱湯浸出法）カルベンダジム 10 ppm添加（10倍希釈）



茶（熱湯浸出法）

チオファネートメチル 10 ppm添加（10倍希釈）



茶（熱湯浸出法）ベノミル 10 ppm添加（10倍希釈）

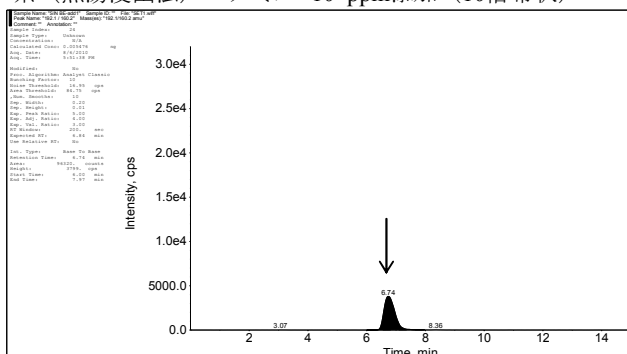
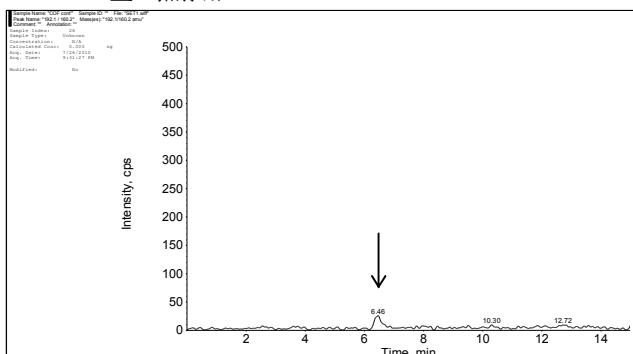
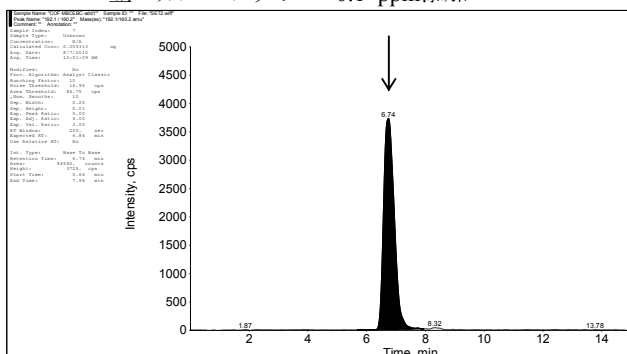


図1-4-5 試料のカルベンダジムクロマトグラム ($m/z = 192 \rightarrow 160$)

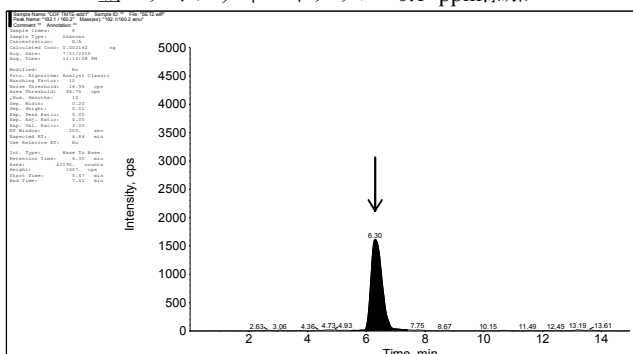
コーヒー豆 無添加



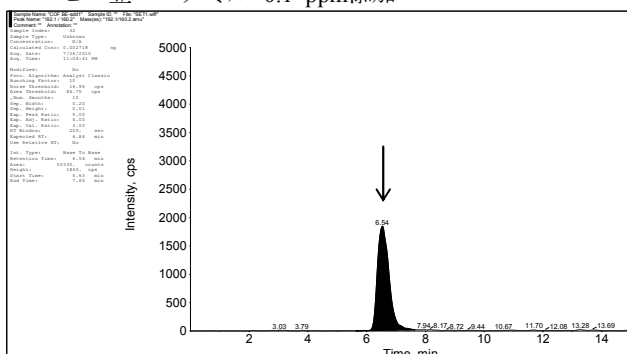
コーヒー豆 カルベンダジム 0.1 ppm添加



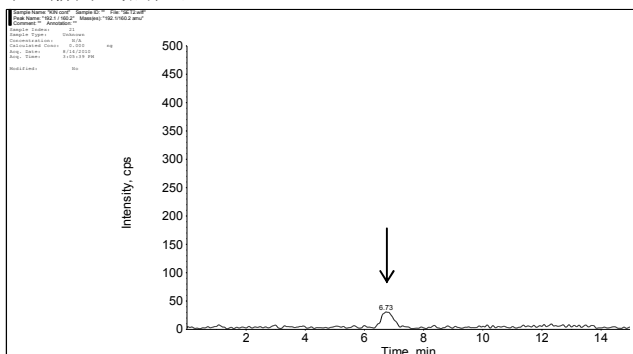
コーヒー豆 チオファネートメチル 0.1 ppm添加



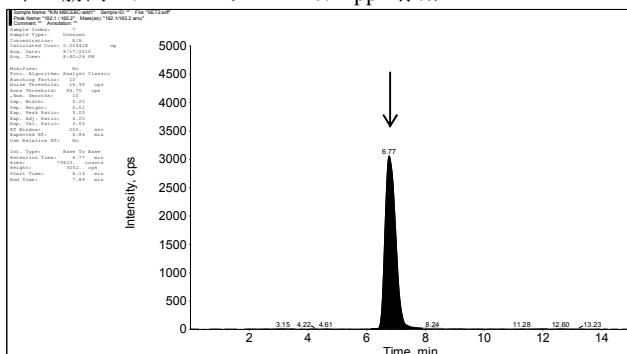
コーヒー豆 ベノミル 0.1 ppm添加



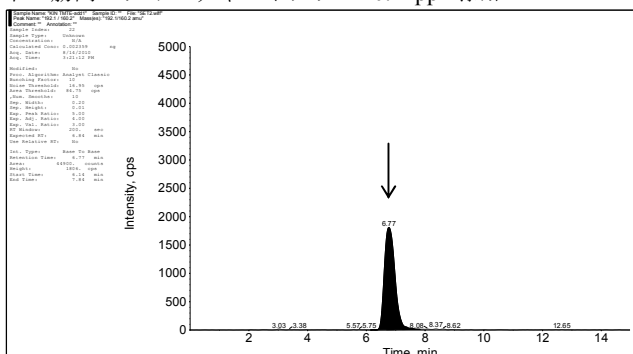
牛の筋肉 無添加



牛の筋肉 カルベンダジム 0.1 ppm添加



牛の筋肉 チオファネートメチル 0.1 ppm添加



牛の筋肉 ベノミル 0.1 ppm添加

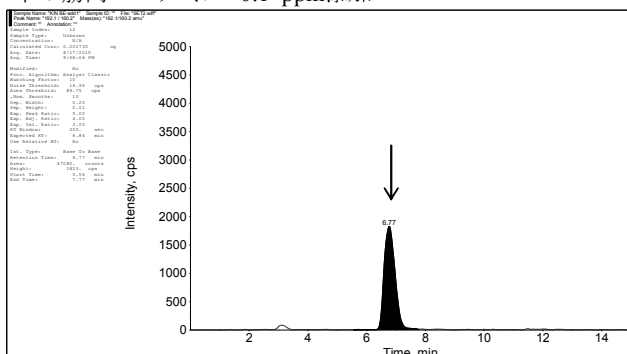
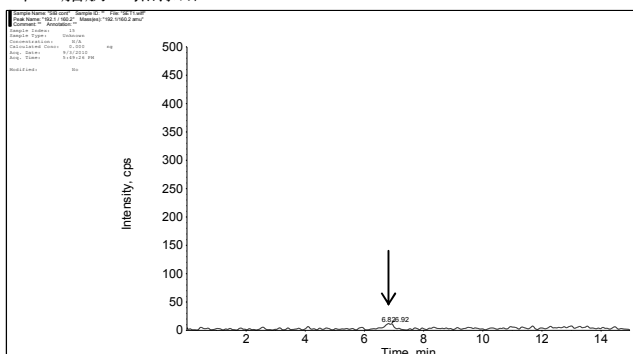
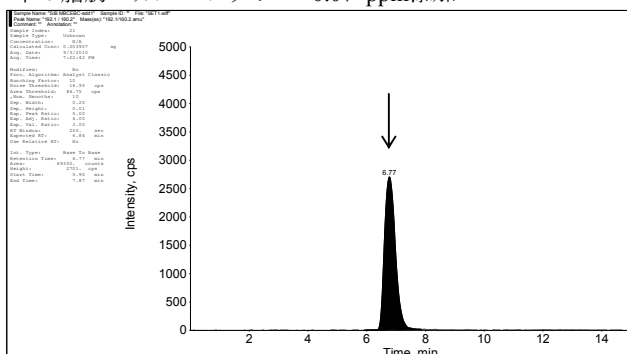


図1-4-6 試料のカルベンダジムクロマトグラム ($m/z = 192 \rightarrow 160$)

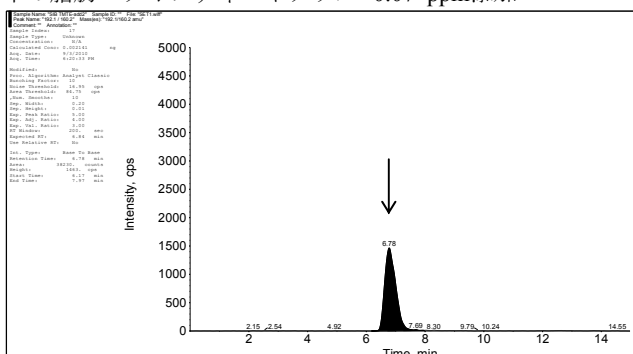
牛の脂肪 無添加



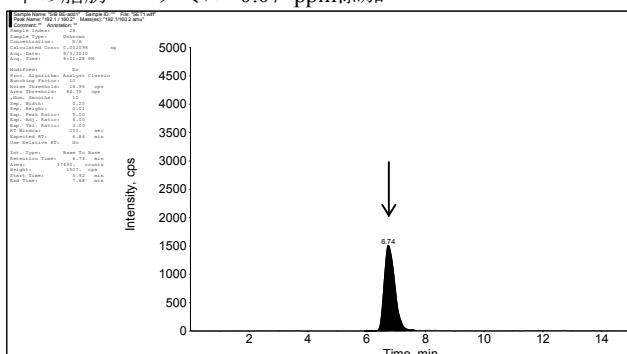
牛の脂肪 カルベンダジム 0.07 ppm添加



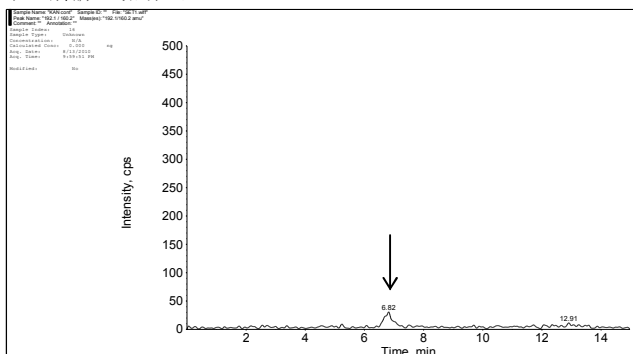
牛の脂肪 チオファネートメチル 0.07 ppm添加



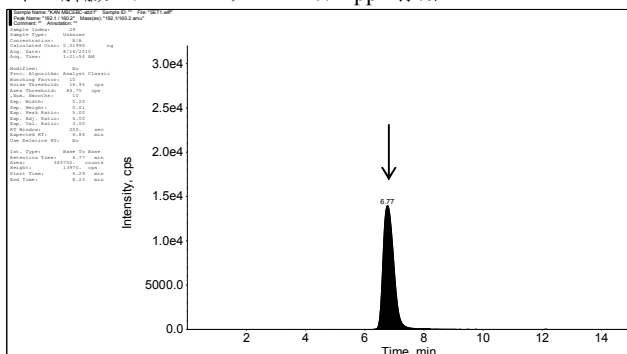
牛の脂肪 ベノミル 0.07 ppm添加



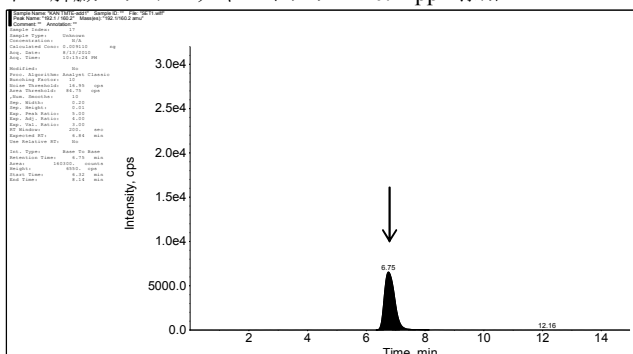
牛の肝臓 無添加



牛の肝臓 カルベンダジム 0.4 ppm添加



牛の肝臓 チオファネートメチル 0.4 ppm添加



牛の肝臓 ベノミル 0.4 ppm添加

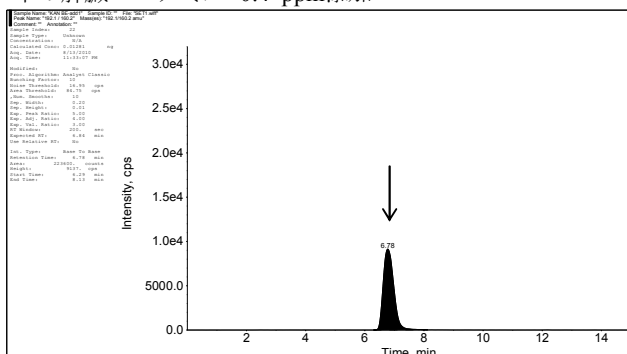
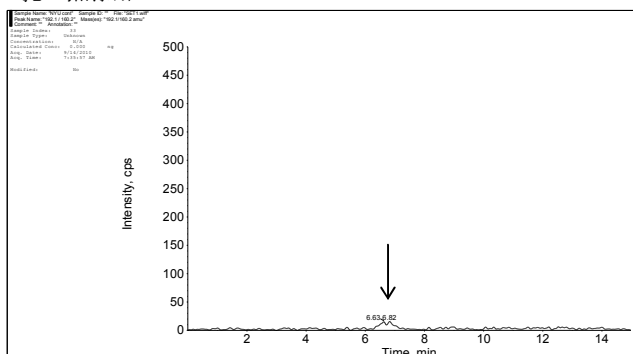
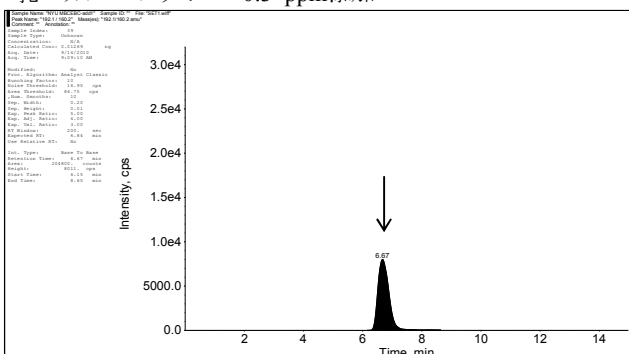


図1-4-7 試料のカルベンダジムクロマトグラム ($m/z = 192 \rightarrow 160$)

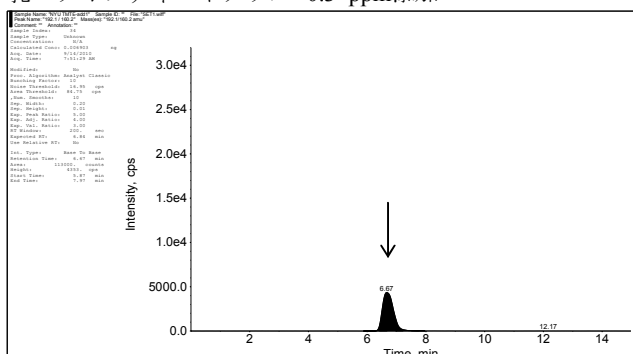
乳 無添加



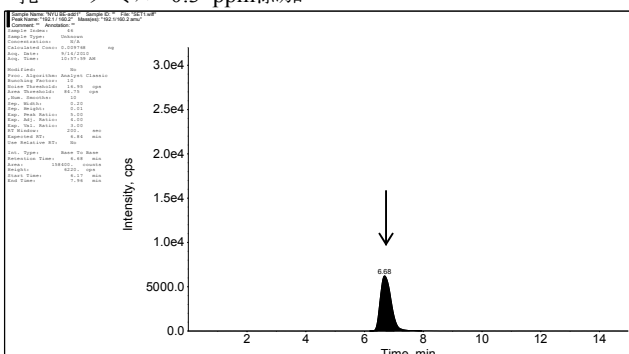
乳 カルベンダジム 0.3 ppm添加



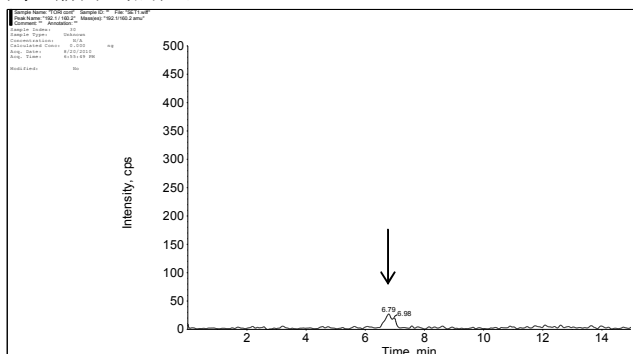
乳 チオファネートメチル 0.3 ppm添加



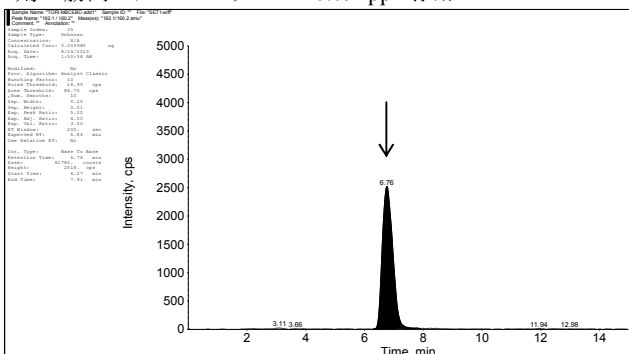
乳 ベノミル 0.3 ppm添加



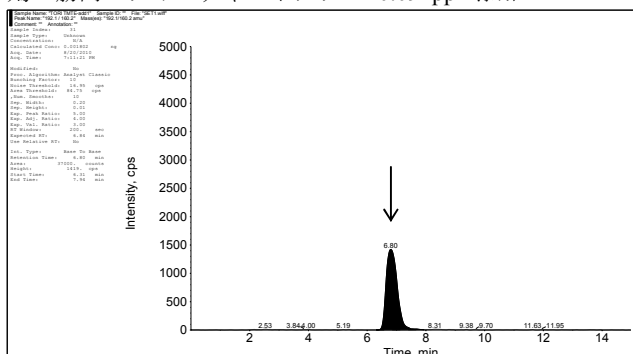
鶏の筋肉 無添加



鶏の筋肉 カルベンダジム 0.09 ppm添加



鶏の筋肉 チオファネートメチル 0.09 ppm添加



鶏の筋肉 ベノミル 0.09 ppm添加

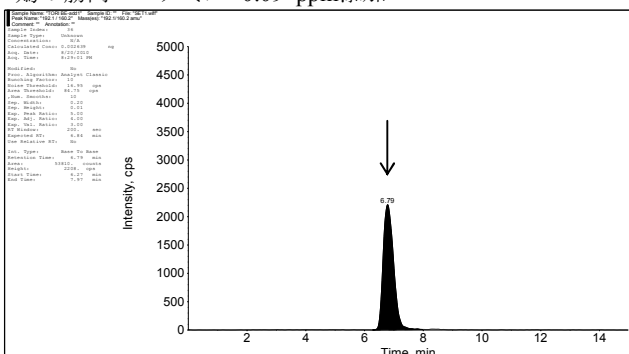


図1-4-8 試料のカルベンダジムクロマトグラム ($m/z = 192 \rightarrow 160$)

Data Name: "502_1_100_2_F" Sample ID: "502_1_100_2_F" File Name: "502_1_100_2_F" Scan Range: "502_1_100_2_F" Min/Max: "502_1_100_2_F" Units: "cps" Date: "2012-12-12" Time: "12:12:12" User: "jg" Version: "1.0" Author: "jg" Date: "2012-12-12" Time: "12:12:12" User: "jg" Version: "1.0" Author: "jg"

Intensity, cps

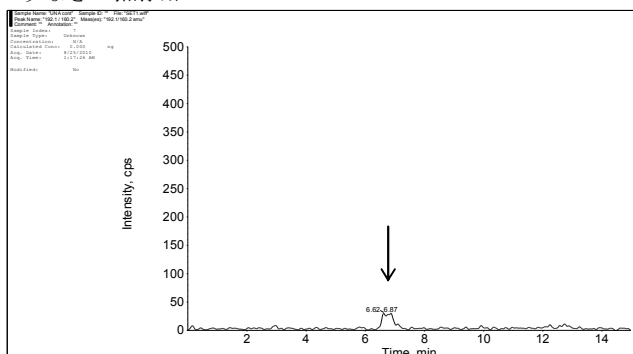
Time, min

6.72 7.30 12.52 12.72 13.49

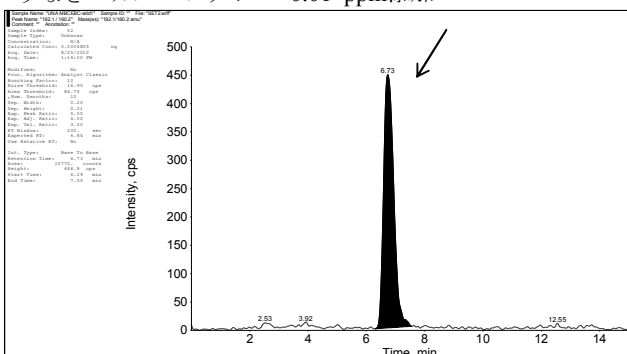
1
 2
 3
 4
 5
 6
 7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26
 27
 28
 29
 30
 31
 32
 33
 34
 35
 36
 37
 38
 39
 40
 41
 42
 43
 44
 45
 46
 47
 48
 49
 50
 51
 52
 53
 54
 55
 56
 57
 58
 59
 60
 61
 62
 63
 64
 65
 66
 67
 68
 69
 70
 71
 72
 73
 74
 75
 76
 77
 78
 79
 80
 81
 82
 83
 84
 85
 86
 87
 88
 89
 90
 91
 92
 93
 94
 95
 96
 97
 98
 99
 100
 101
 102
 103
 104
 105
 106
 107
 108
 109
 110
 111
 112
 113
 114
 115
 116
 117
 118
 119
 120
 121
 122
 123
 124
 125
 126
 127
 128
 129
 130
 131
 132
 133
 134
 135
 136
 137
 138
 139
 140
 141
 142
 143
 144
 145
 146
 147
 148
 149
 150
 151
 152
 153
 154
 155
 156
 157
 158
 159
 160
 161
 162
 163
 164
 165
 166
 167
 168
 169
 170
 171
 172
 173
 174
 175
 176
 177
 178
 179
 180
 181
 182
 183
 184
 185
 186
 187
 188
 189
 190
 191
 192
 193
 194
 195
 196
 197
 198
 199
 200
 201
 202
 203
 204
 205
 206
 207
 208
 209
 210
 211
 212
 213
 214
 215
 216
 217
 218
 219
 220
 221
 222
 223
 224
 225
 226
 227
 228
 229
 230
 231
 232
 233
 234
 235
 236
 237
 238
 239
 240
 241
 242
 243
 244
 245
 246
 247
 248
 249
 250
 251
 252
 253
 254
 255
 256
 257
 258
 259
 260
 261
 262
 263
 264
 265
 266
 267
 268
 269
 270
 271
 272
 273
 274
 275
 276
 277
 278
 279
 280
 281
 282
 283
 284
 285
 286
 287
 288
 289
 290
 291
 292
 293
 294
 295
 296
 297
 298
 299
 300
 301
 302
 303
 304
 305
 306
 307
 308
 309
 310
 311
 312
 313
 314
 315
 316
 317
 318
 319
 320
 321
 322
 323
 324
 325
 326
 327
 328
 329
 330
 331
 332
 333
 334
 335
 336
 337
 338
 339
 340
 341
 342
 343
 344
 345
 346
 347
 348
 349
 350
 351
 352
 353
 354
 355
 356
 357
 358
 359
 360
 361
 362
 363
 364
 365
 366
 367
 368
 369
 370
 371
 372
 373
 374
 375
 376
 377
 378
 379
 380
 381
 382
 383
 384
 385
 386
 387
 388
 389
 390
 391
 392
 393
 394
 395
 396
 397
 398
 399
 400
 401
 402
 403
 404
 405
 406
 407
 408
 409
 410
 411
 412
 413
 414
 415
 416
 417
 418
 419
 420
 421
 422
 423
 424
 425
 426
 427
 428
 429
 430
 431
 432
 433
 434
 435
 436
 437
 438
 439
 440
 441
 442
 443
 444
 445
 446
 447
 448
 449
 450
 451
 452
 453
 454
 455
 456
 457
 458
 459
 460
 461
 462
 463
 464
 465
 466
 467
 468
 469
 470
 471
 472
 473
 474
 475
 476
 477
 478
 479
 480
 481
 482
 483
 484
 485
 486
 487
 488
 489
 490
 491
 492
 493
 494
 495
 496
 497
 498
 499
 500
 501
 502
 503
 504
 505
 506
 507
 508
 509
 510
 511
 512
 513
 514
 515
 516
 517
 518
 519
 520
 521
 522

[illegible][illegible][illegible][illegible][illegible][illegible]

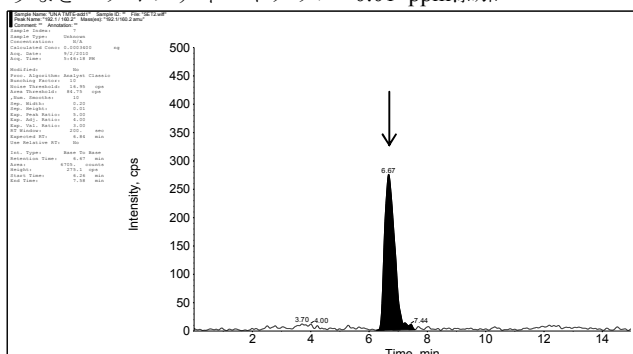
うなぎ 無添加



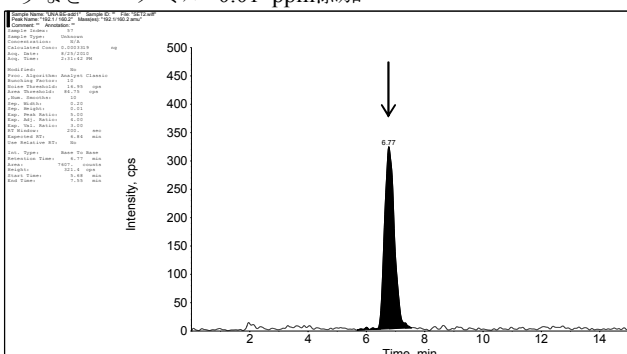
うなぎ カルベンダジム 0.01 ppm添加



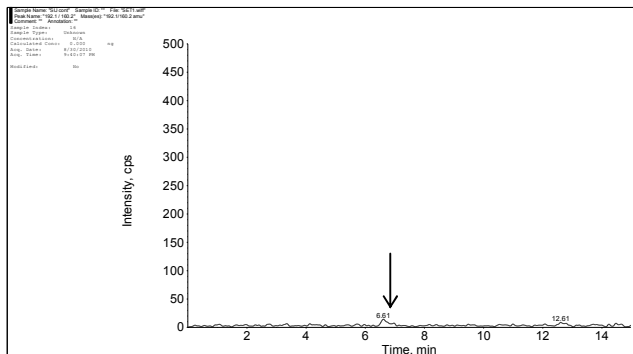
うなぎ チオファネートメチル 0.01 ppm添加



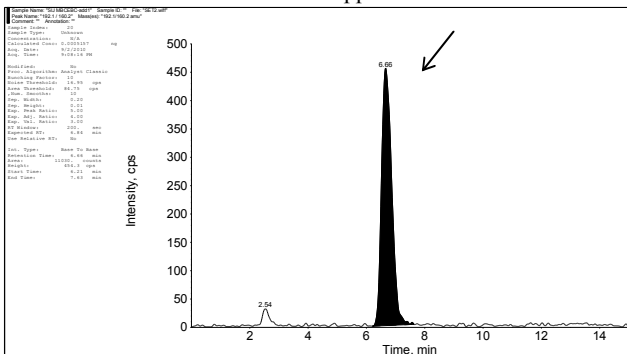
うなぎ ベノミル 0.01 ppm添加



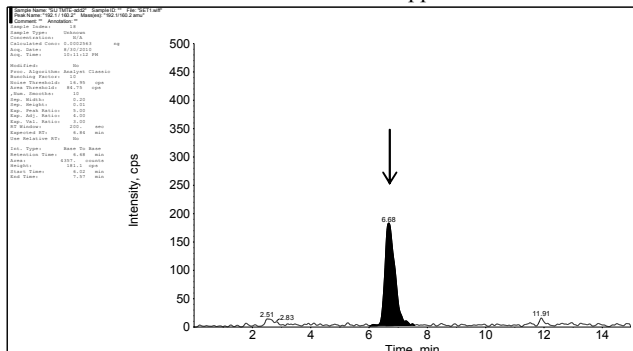
しじみ 無添加



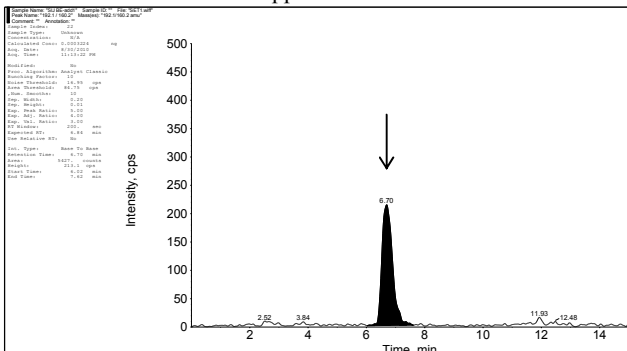
しじみ カルベンダジム 0.01 ppm添加



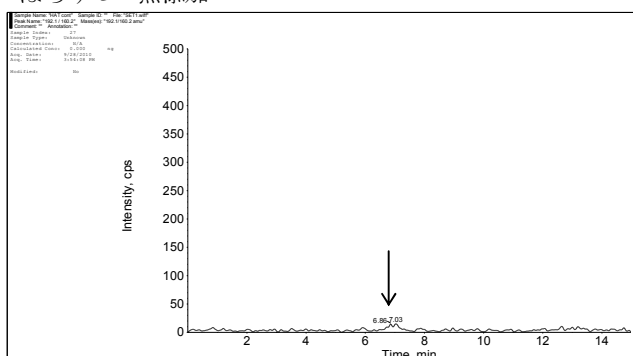
しじみ チオファネートメチル 0.01 ppm添加



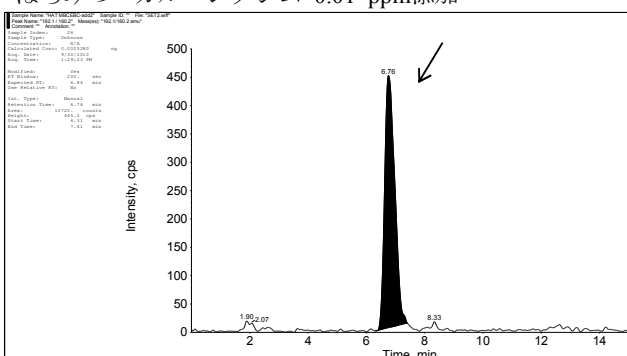
しじみ ベノミル 0.01 ppm添加

図1-4-10 試料のカルベンダジムクロマトグラム ($m/z = 192 \rightarrow 160$)

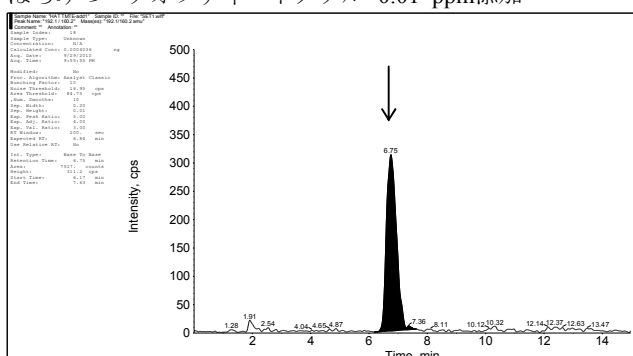
はちみつ 無添加



はちみつ カルベンダジム 0.01 ppm添加



はちみつ チオファネートメチル 0.01 ppm添加



はちみつ ベノミル 0.01 ppm添加

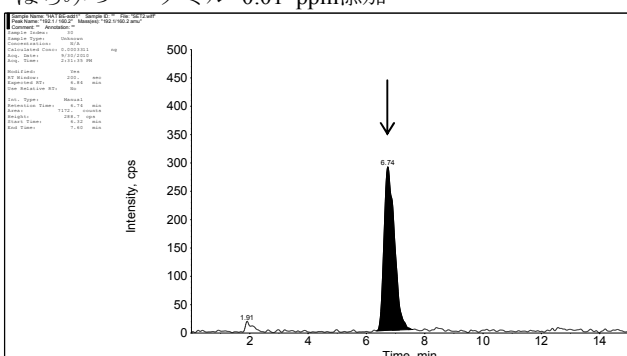


図1-4-11 試料のカルベンダジムクロマトグラム ($m/z = 192 \rightarrow 160$)

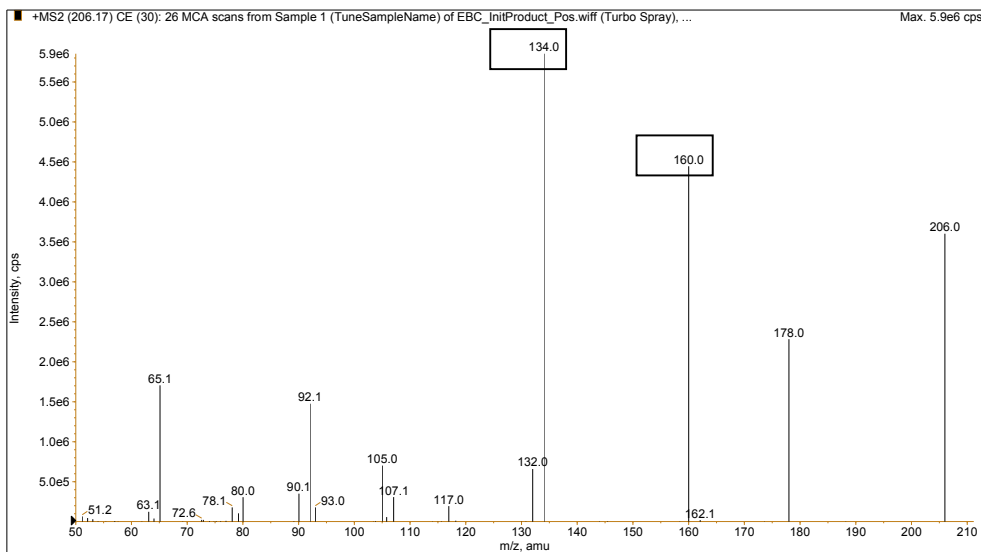
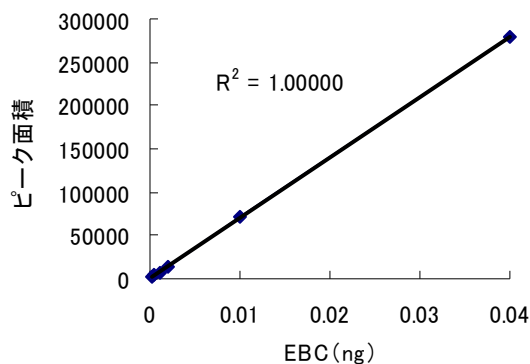


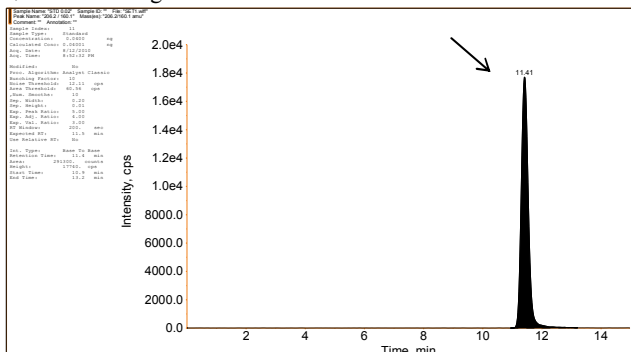
図2-1 EBC ($m/z = 206$) 由来のプロダクトイオンスキャン



データ処理装置設定条件の一例
 機種（メーカー）：Analyst（AB SCIEX製）
 ピークの定量方法：ピーク面積法
 検量線の種類：最小二乗法
 検量線基準ピークの重量：0.00025 ng～0.02 ng
 検量線傾き (a) : $a = 6.983198E+06$
 検量線切片 (b) : $b = 770.01647$

図2-2 EBCの検量線の一例 ($m/z = 206 \rightarrow 160$)

標準品 0.04 ng



標準品 0.0005 ng (定量限界相当量)

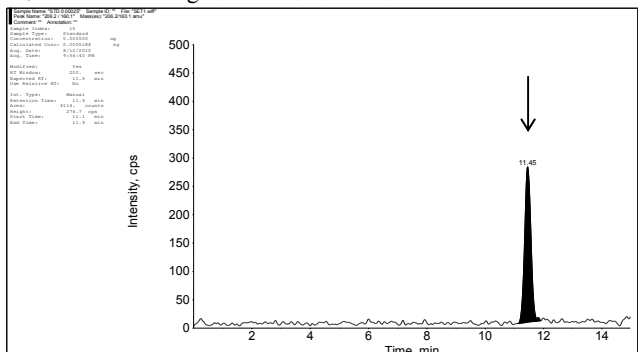
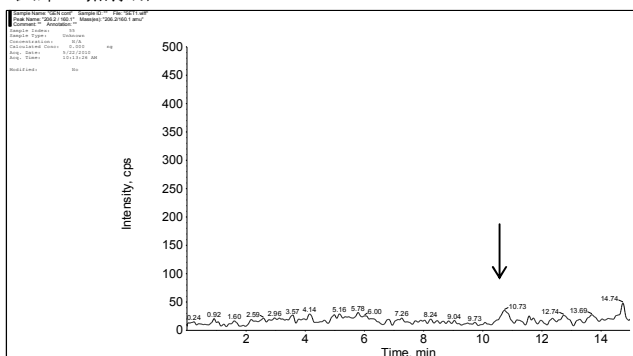
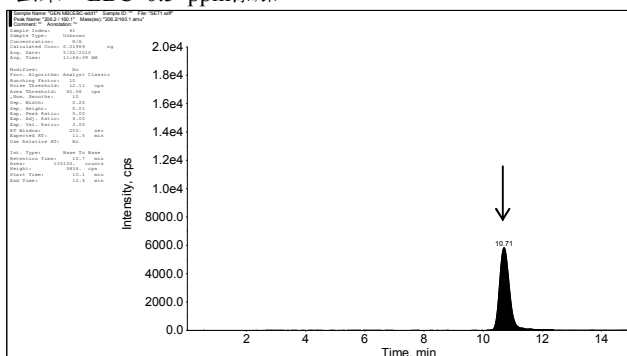


図2-3 EBC標準溶液のクロマトグラム一例 ($m/z = 206 \rightarrow 160$)

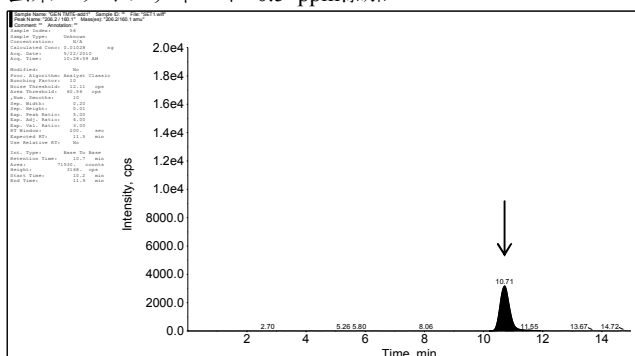
玄米 無添加



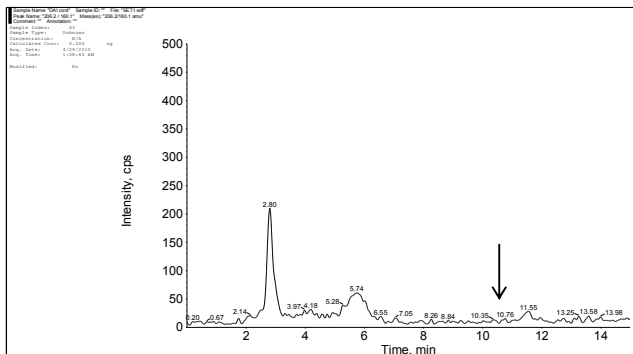
玄米 EBC 0.5 ppm添加



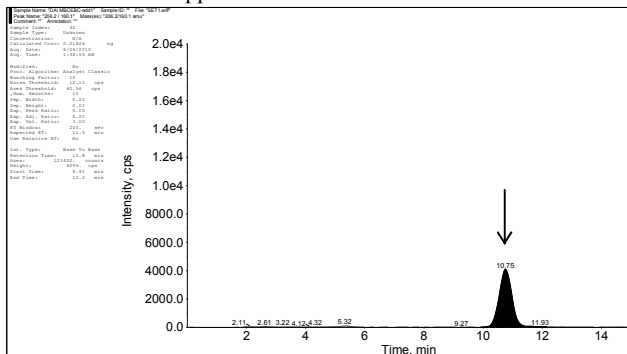
玄米 チオファネート 0.5 ppm添加



大豆 無添加



大豆 EBC 0.5 ppm添加



大豆 チオファネート 0.5 ppm添加

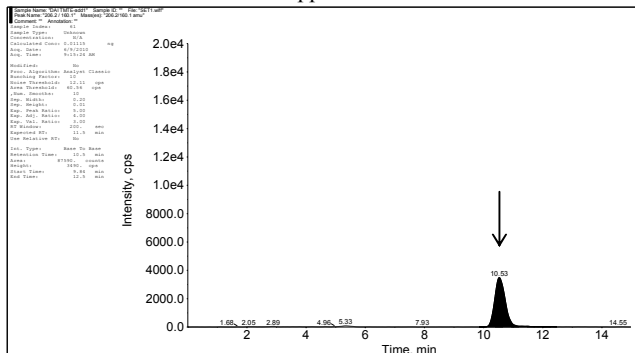
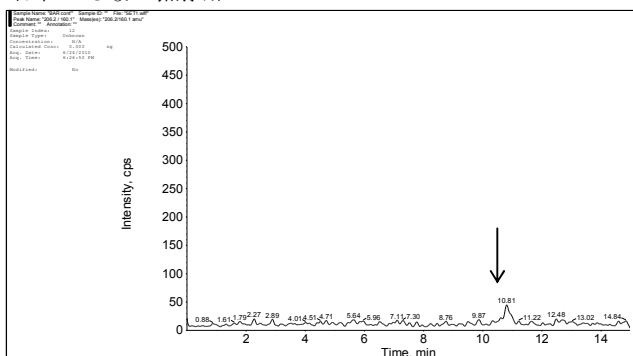
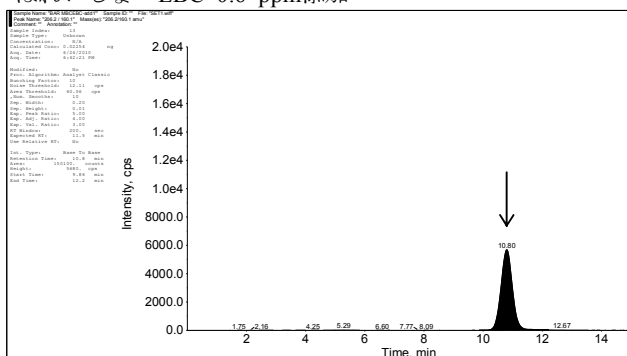


図2-4-1 試料のEBCクロマトグラム ($m/z = 206 \rightarrow 160$)

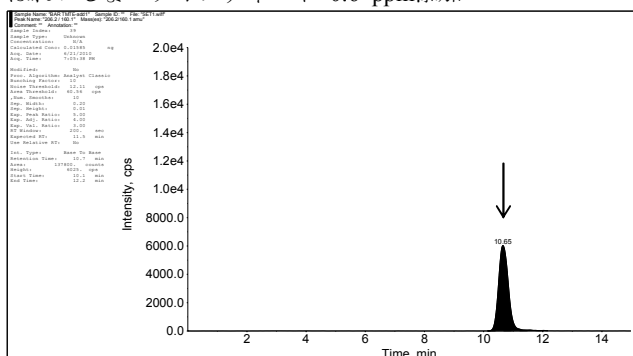
ばれいしょ 無添加



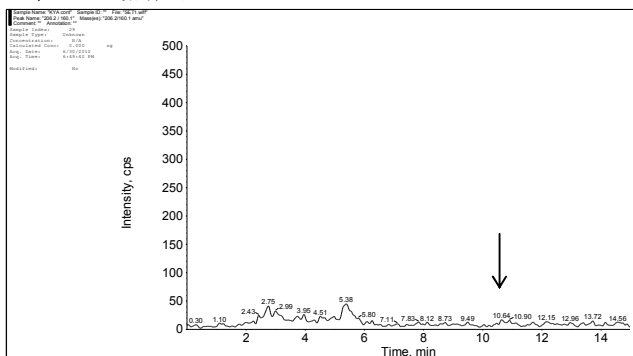
ばれいしょ EBC 0.6 ppm添加



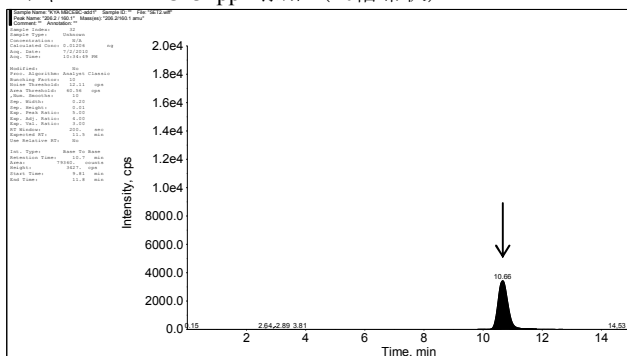
ばれいしょ チオファネート 0.6 ppm添加



キャベツ 無添加



キャベツ EBC 3 ppm添加 (10倍希釈)



キャベツ チオファネート 3 ppm添加 (10倍希釈)

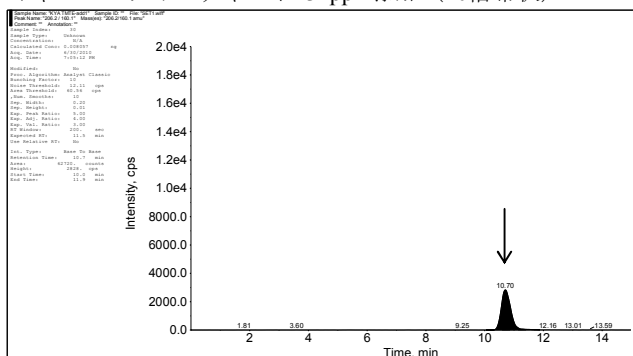
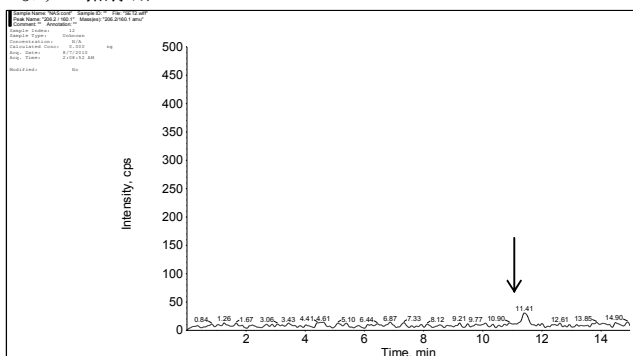
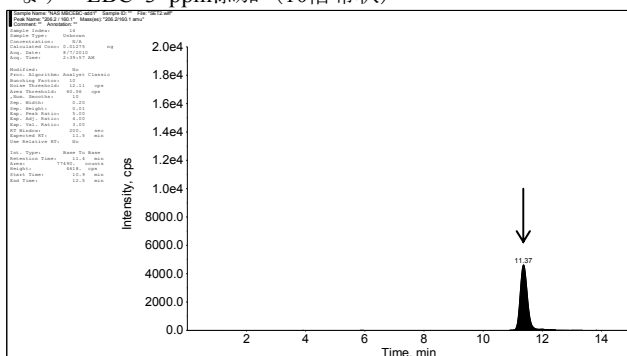


図2-4-2 試料のEBCクロマトグラム ($m/z = 206 \rightarrow 160$)

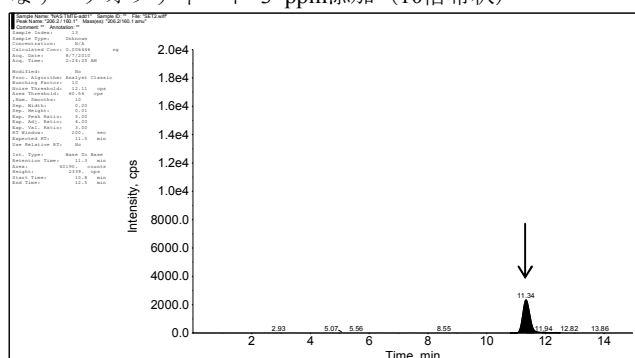
なす 無添加



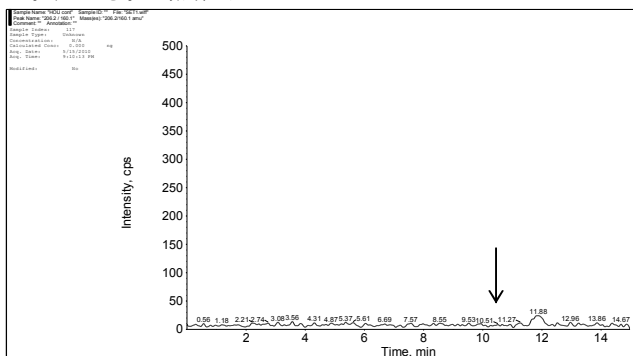
なす EBC 3 ppm添加 (10倍希釈)



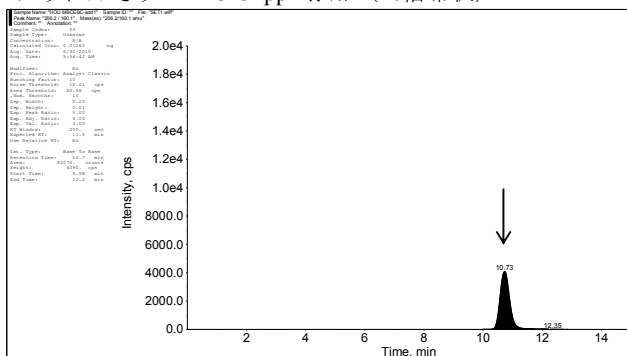
なす チオファネート 3 ppm添加 (10倍希釈)



ほうれんそう 無添加



ほうれんそう EBC 3 ppm添加 (10倍希釈)



ほうれんそう チオファネート 3 ppm添加 (10倍希釈)

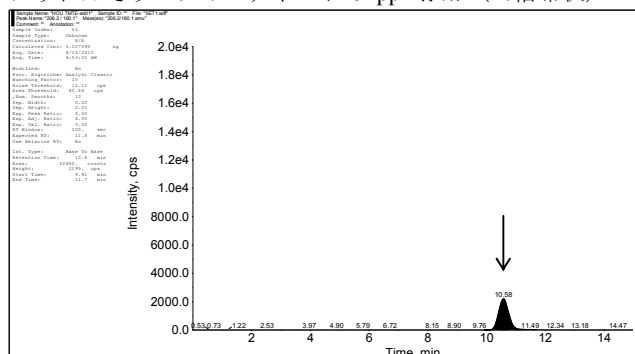
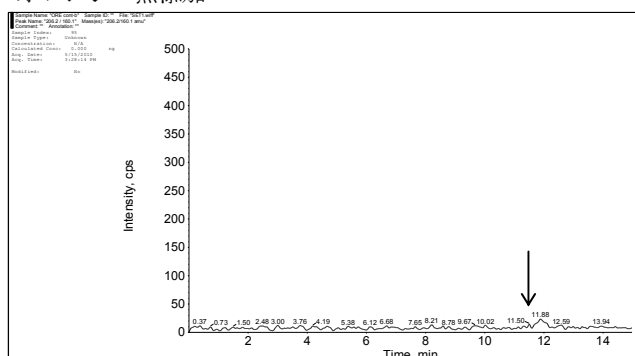
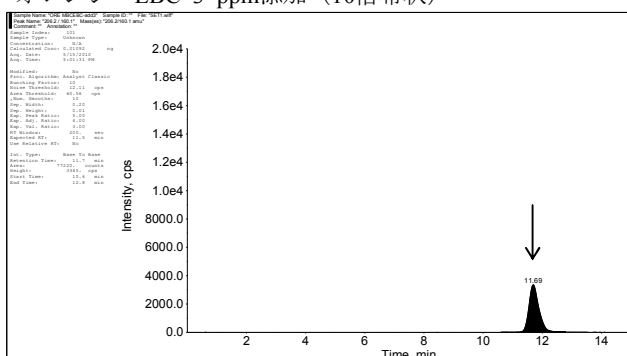


図2-4-3 試料のEBCクロマトグラム ($m/z = 206 \rightarrow 160$)

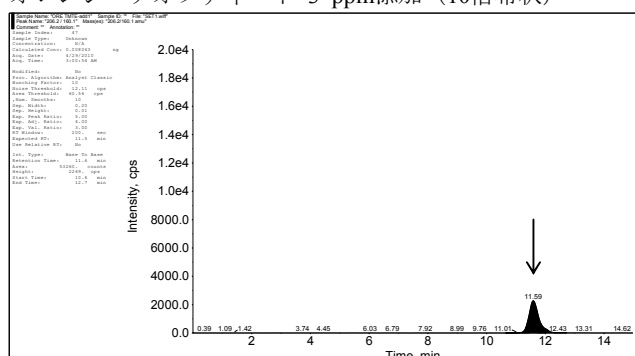
オレンジ 無添加



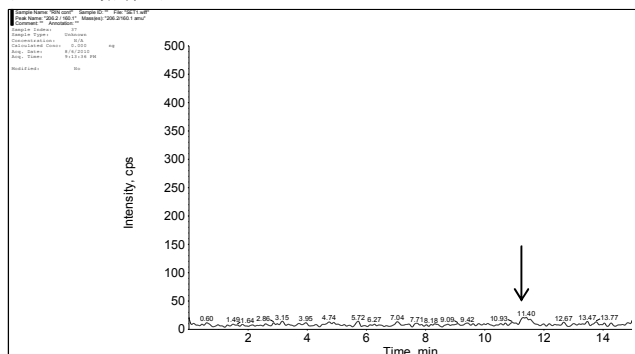
オレンジ EBC 3 ppm添加 (10倍希釈)



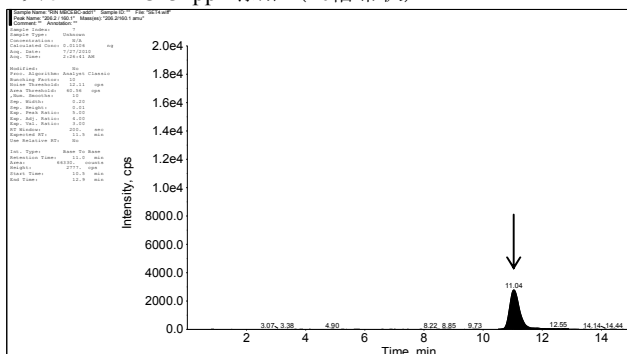
オレンジ チオファネート 3 ppm添加 (10倍希釈)



りんご 無添加



りんご EBC 3 ppm添加 (10倍希釈)



りんご チオファネート 3 ppm添加 (10倍希釈)

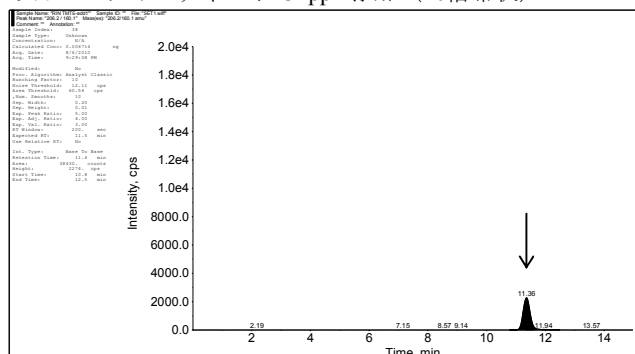
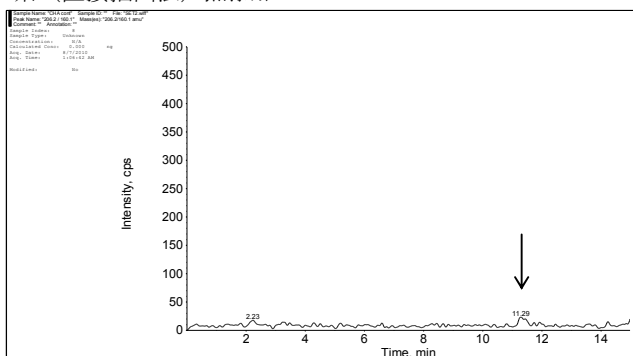
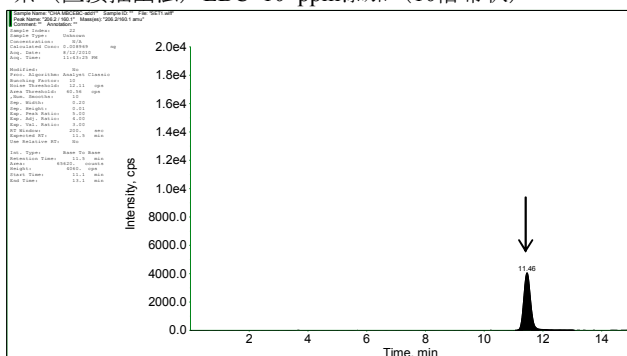


図2-4-4 試料のEBCクロマトグラム ($m/z = 206 \rightarrow 160$)

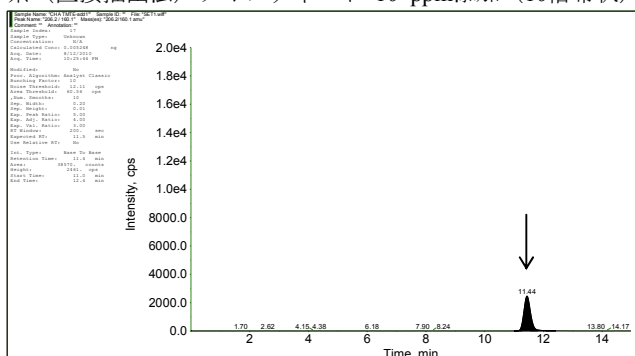
茶（直接抽出法）無添加



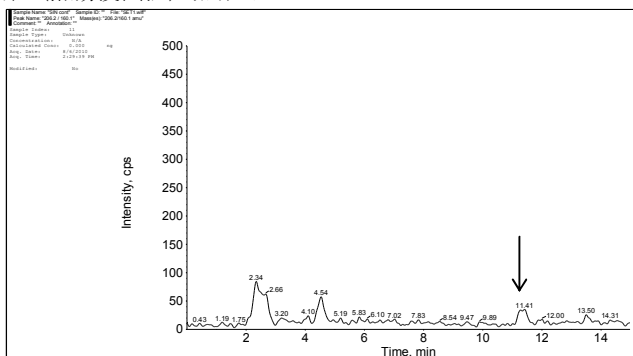
茶（直接抽出法）EBC 10 ppm添加（10倍希釈）



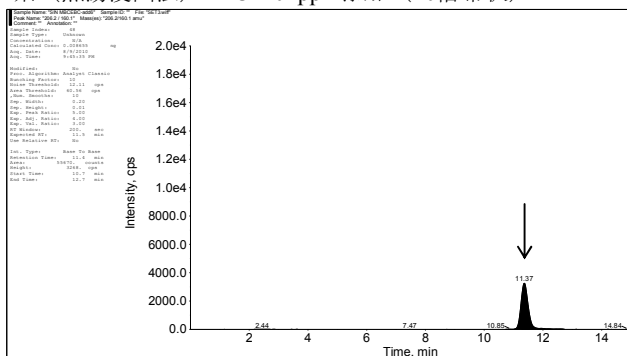
茶（直接抽出法）チオファネート 10 ppm添加（10倍希釈）



茶（熱湯浸出法）無添加



茶（熱湯浸出法）EBC 10 ppm添加（10倍希釈）



茶（熱湯浸出法）チオファネート 10 ppm添加（10倍希釈）

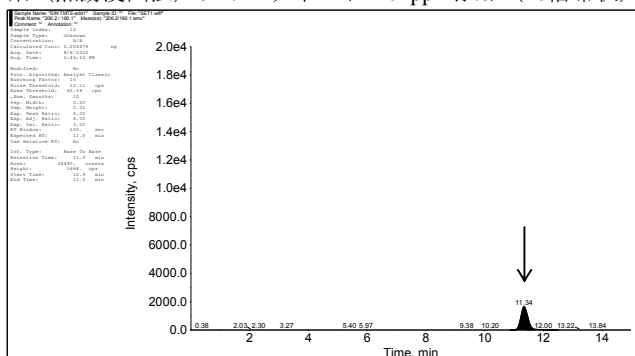
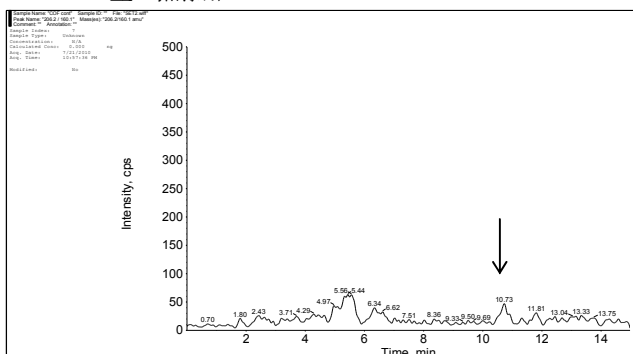
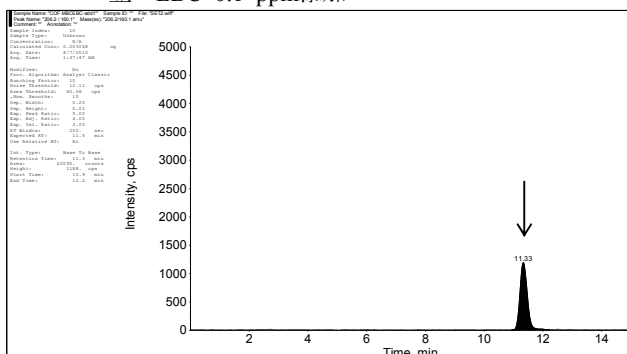


図2-4-5 試料のEBCクロマトグラム ($m/z = 206 \rightarrow 160$)

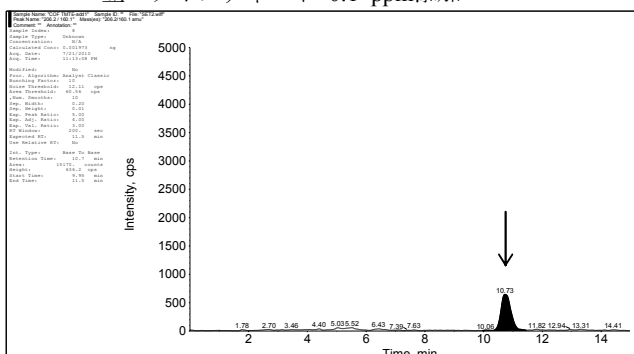
コーヒー豆 無添加



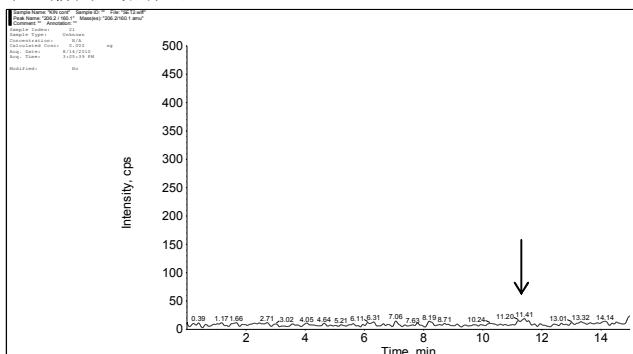
コーヒー豆 EBC 0.1 ppm添加



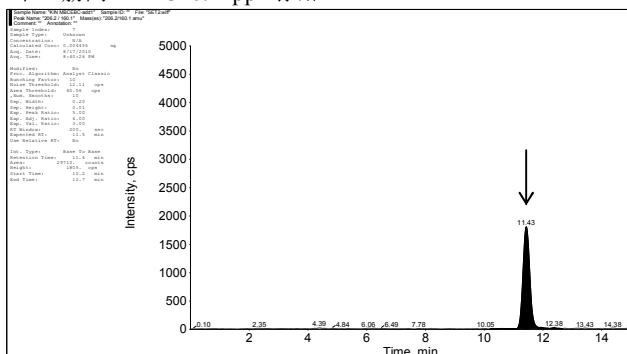
コーヒー豆 チオファネート 0.1 ppm添加



牛の筋肉 無添加



牛の筋肉 EBC 0.1 ppm添加



牛の筋肉 チオファネート 0.1 ppm添加

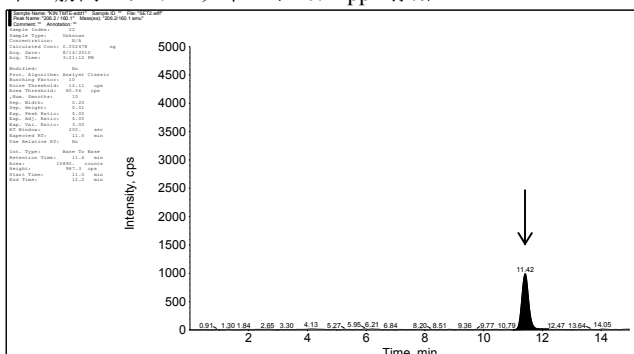
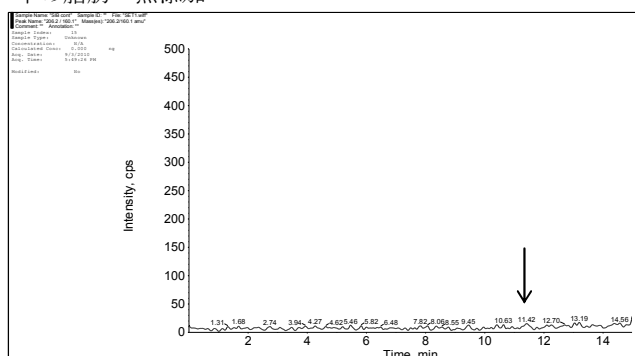
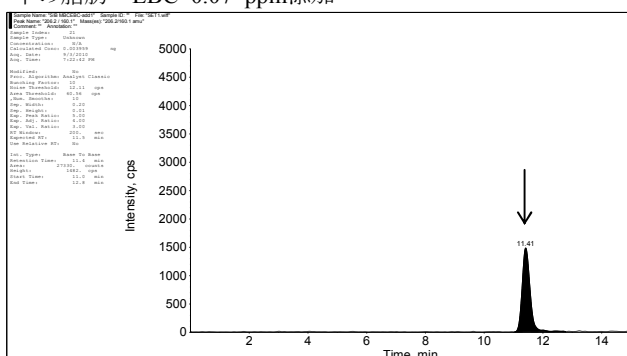


図2-4-6 試料のEBCクロマトグラム ($m/z = 206 \rightarrow 160$)

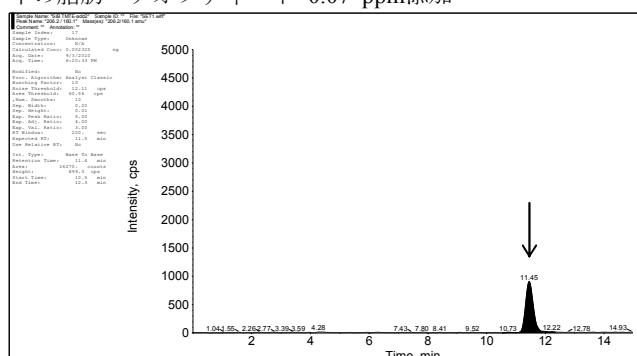
牛の脂肪 無添加



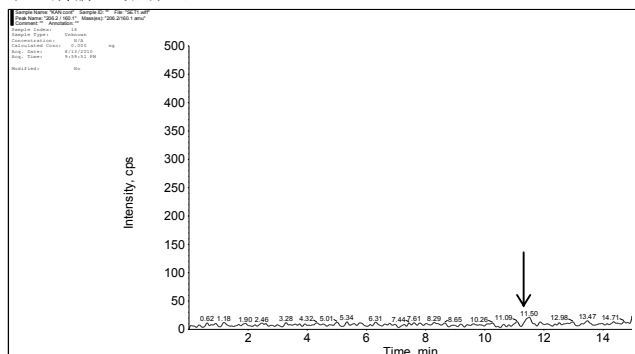
牛の脂肪 EBC 0.07 ppm添加



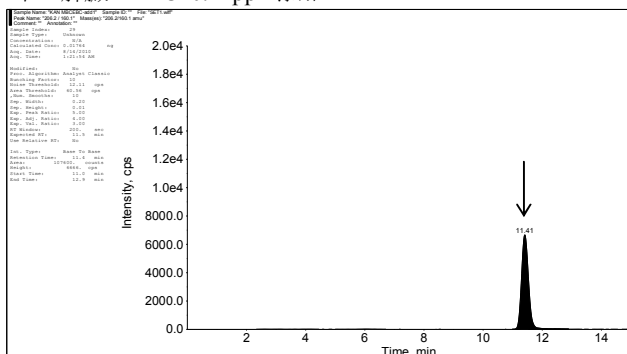
牛の脂肪 チオファネート 0.07 ppm添加



牛の肝臓 無添加



牛の肝臓 EBC 0.4 ppm添加



牛の肝臓 チオファネート 0.4 ppm添加

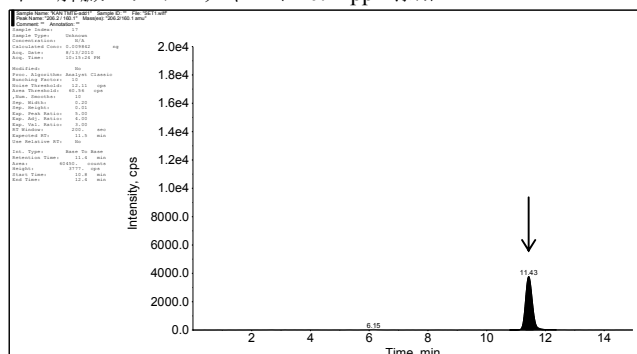
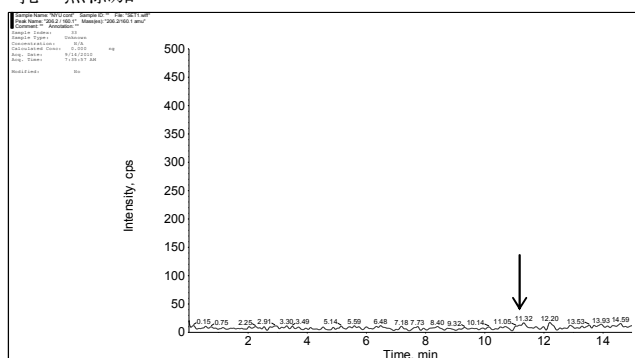
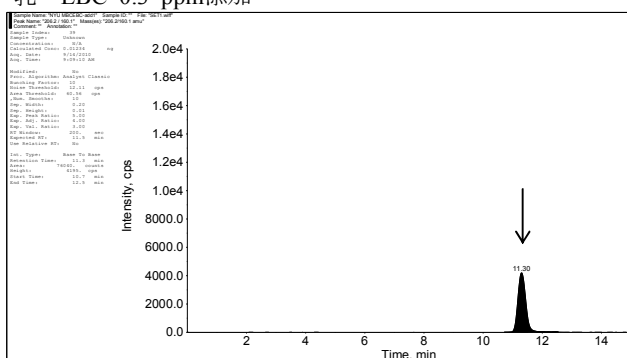


図2-4-7 試料のEBCクロマトグラム ($m/z = 206 \rightarrow 160$)

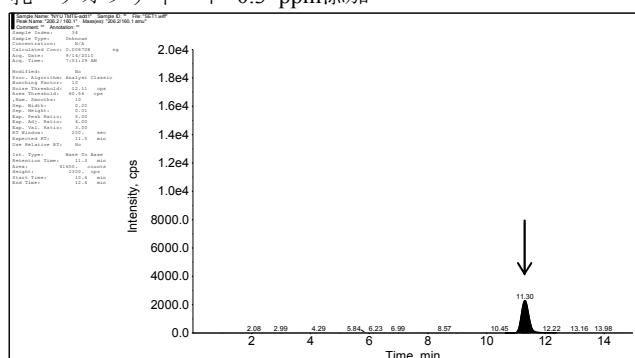
乳 無添加



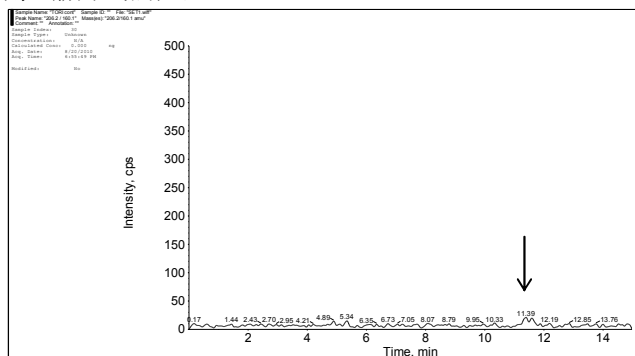
乳 EBC 0.3 ppm添加



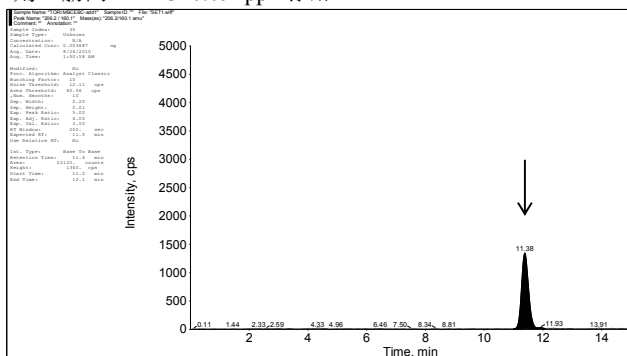
乳 チオファネート 0.3 ppm添加



鶏の筋肉 無添加



鶏の筋肉 EBC 0.09 ppm添加



鶏の筋肉 チオファネート 0.09 ppm添加

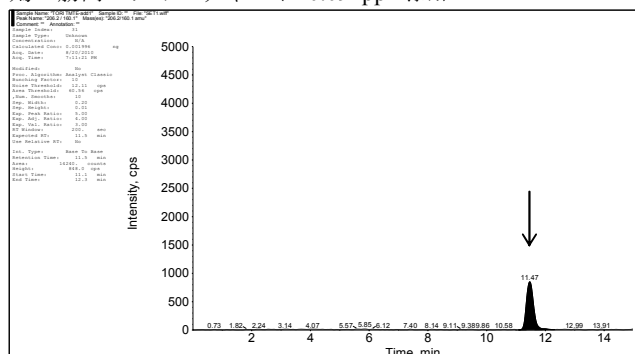
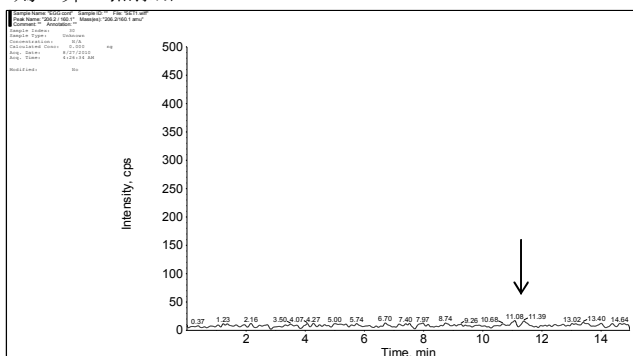
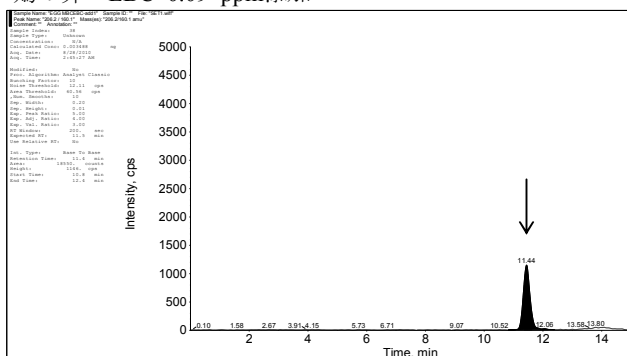


図2-4-8 試料のEBCクロマトグラム ($m/z = 206 \rightarrow 160$)

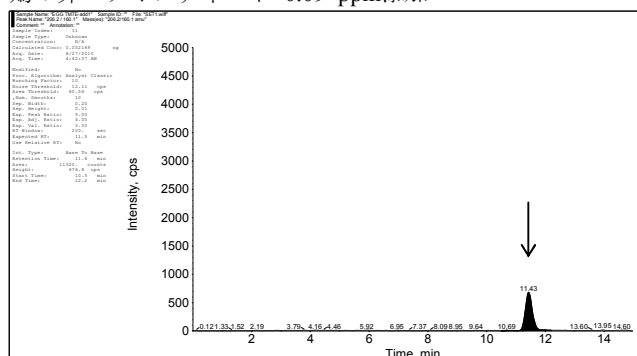
鶏の卵 無添加



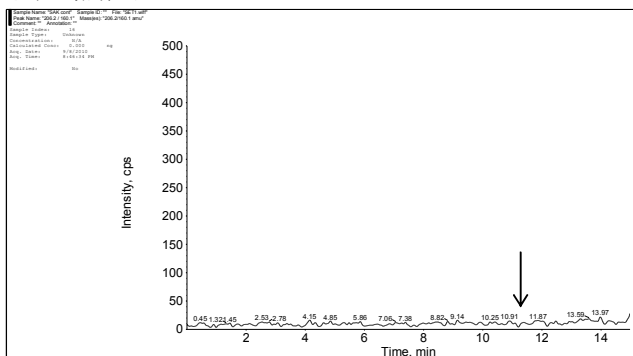
鶏の卵 EBC 0.09 ppm添加



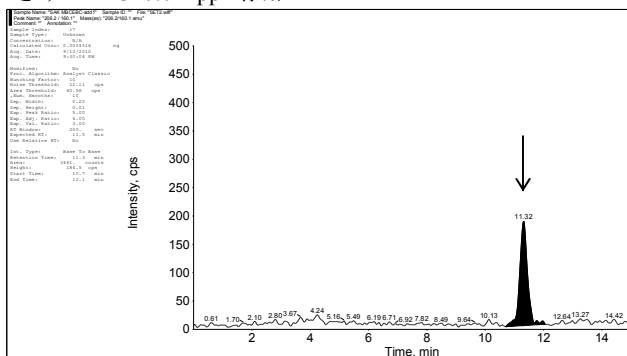
鶏の卵 チオファネート 0.09 ppm添加



さけ 無添加



さけ EBC 0.01 ppm添加



さけ チオファネート 0.01 ppm添加

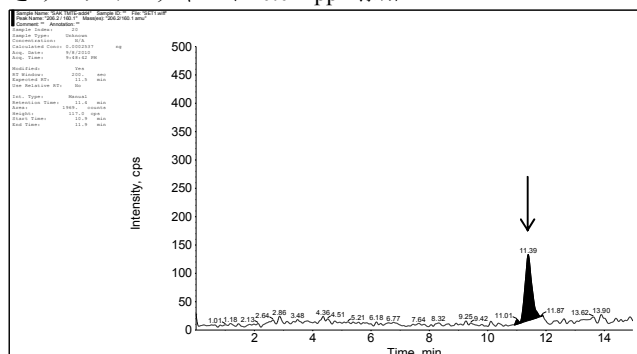
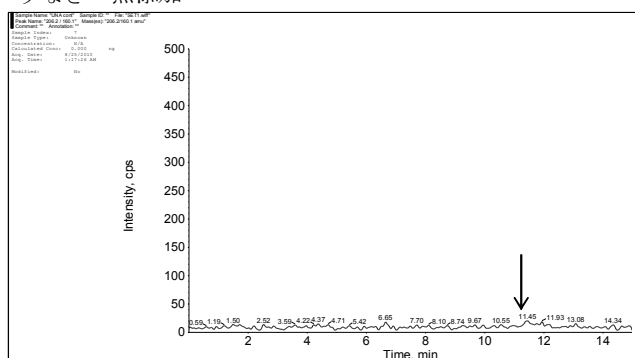
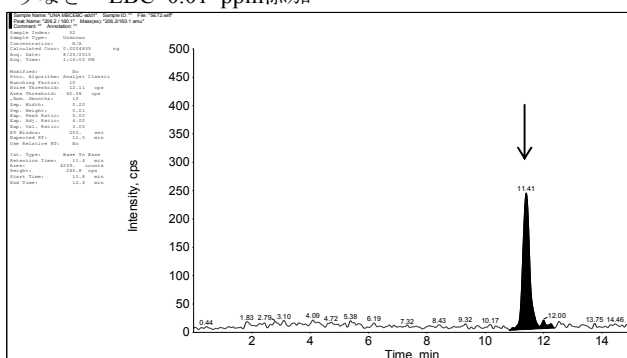


図2-4-9 試料のEBCクロマトグラム ($m/z = 206 \rightarrow 160$)

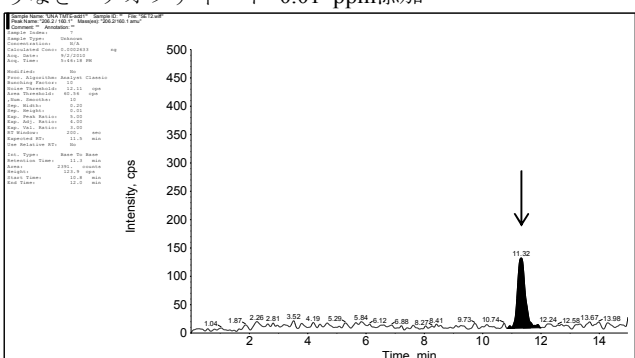
うなぎ 無添加



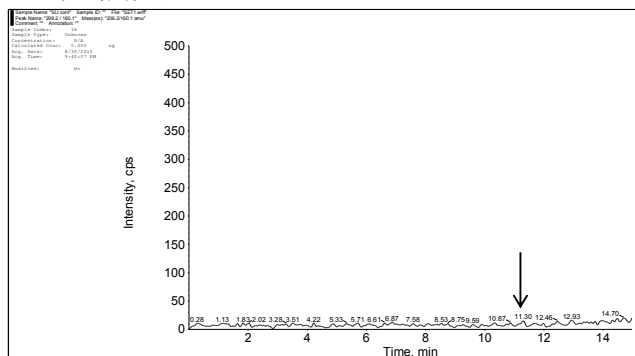
うなぎ EBC 0.01 ppm添加



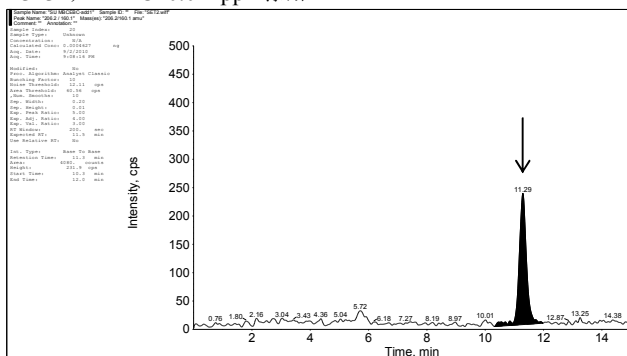
うなぎ チオファネート 0.01 ppm添加



しじみ 無添加



しじみ EBC 0.01 ppm添加



しじみ チオファネート 0.01 ppm添加

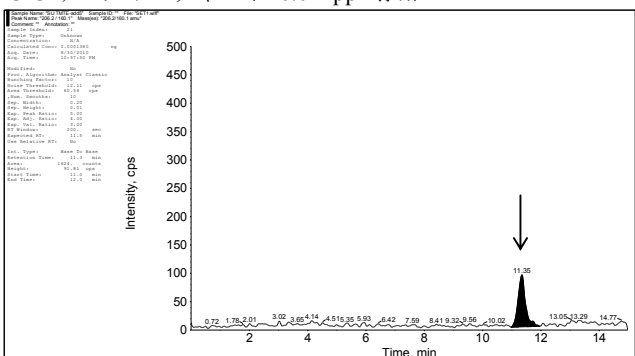
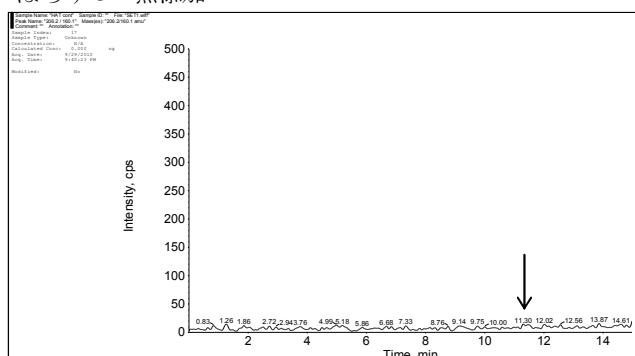
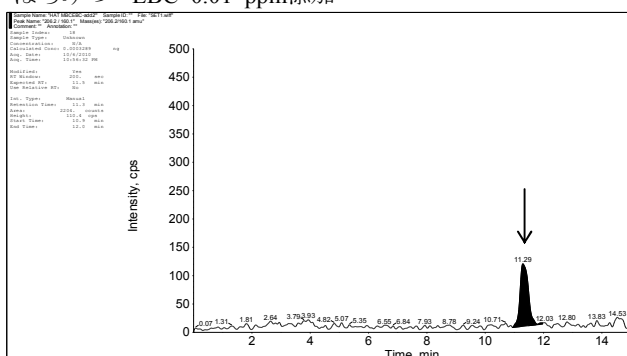


図2-4-10 試料のEBCクロマトグラム ($m/z = 206 \rightarrow 160$)

はちみつ 無添加



はちみつ EBC 0.01 ppm添加



はちみつ チオファネート 0.01 ppm添加

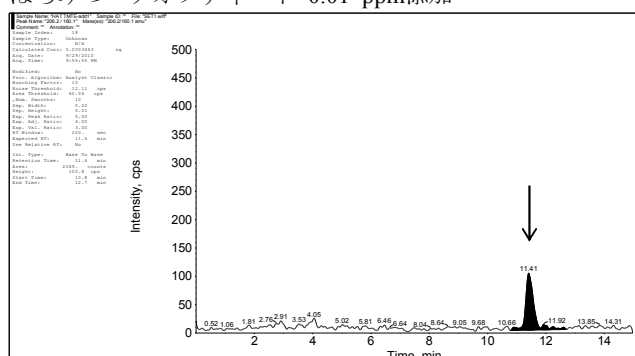


図2-4-11 試料のEBCクロマトグラム ($m/z = 206 \rightarrow 160$)