

※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 22 年度

食品に残留する農薬等の成分である物質(イソ
チアニル及びプロスルホカルブ)の試験法開発
事業

イソチアニル及びプロスルホカルブ試験法（農産物）の検討結果

[緒言]

1. 目的及び試験法の検討方針等

イソチアニル及びプロスルホカルブの農産物中の分析法の開発を行った。

イソチアニルは、ドイツバイエル社（現 バイエルクロップサイエンス AG）により開発されたイソチアゾール系殺菌剤であり、稲いもち病に防除効果を示す。本剤は、病原菌に対する直接抗菌作用はなく、植物自身が持ついもち病菌に対する防御機能を活性化する薬剤（プラントアクチベータ）である。

プロスルホカルブはストウファー社（ゼネカ社を経て、現在シンジェンタ社）によって 1980 年代後半に開発されたチオカーバメート系除草剤である。作用機構として超長鎖脂肪酸の生合成阻害作用により、生体膜変性を誘起し、細胞分裂に影響を与えて植物を枯死させると考えられている。海外ではスイス、ベルギー等のヨーロッパ 21 カ国において麦類用除草剤として新規登録または再登録が進められている。

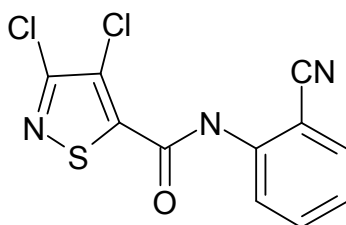
本試験法においては、通知一斉試験法「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I（農産物）」の適用も試みたが、イソチアニルのグラファイトカーボンミニカラムからの溶出操作において吸着が観察され良好な結果が得られなかったことから、新たに個別試験法を開発した。

本試験方法はメタフルミゾン試験法（農産物）と併行して検討を行っており、転溶溶媒が異なる点以外は前処理方法は同一の方法となっている。本試験方法では転溶溶媒に *n*-ヘキサンを使用するが、メタフルミゾン試験法と同様に *n*-ヘキサン及び酢酸エチル（4：1）を用いて試験を行うことも可能である。

2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

分析対象化合物： イソチアニル（Isotianil）

構造式：



分子式： $C_{11}H_5Cl_2N_3OS$

分子量： 298.15

化学名： IUPAC 名

3,4-ジクロロ-2'-シアノ-1,2-チアゾール-5-カルボキサニリド

3,4-dichloro-2'-cyano-1,2-thiazole-5-carboxanilide

CAS 名 (224049-04-1)

3,4-ジクロロ-N-(2-シアノフェニル)-5-イソチアゾールカルボキサミド

3,4-dichloro-N-(2-cyanophenyl)-5-isothiazolecarboxamide

外観： 白色粉末、わずかな芳香臭（室温）

融点： 193.7-195.1℃

蒸気圧： 2.36×10^{-7} Pa (25℃)

溶解性： 水：0.50 mg/L (20℃、純水 pH 7.0)

n-ヘキサン：0.0594 g/L (20℃)

トルエン：6.87 g/L (20℃)

ジクロロメタン：16.6 g/L (20℃)
アセトン：4.96 g/L (20℃)
メタノール：0.775 g/L (20℃)
酢酸エチル：3.62 g/L (20℃)

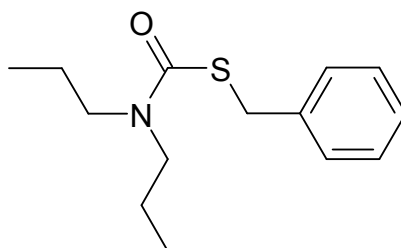
オクタノール/水分配係数：log Pow = 2.96 (25±1℃、pH 7.2)

[出典：イソチアニル農薬抄録

<http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/isotianil/index.htm>]

分析対象化合物：プロスルホカルブ (Prosulfocarb)

構造式：



分子式：C₁₄H₂₁NOS

分子量：251.39

化学名：IUPAC 名

S-ベンジル ジプロピルチオカルバマート

S-benzyl dipropylthiocarbamate

CAS 名 (52888-80-9)

S-(フェニルメチル) ジプロピルカルバモチオアート

S-(phenylmethyl) dipropylcarbamothioate

外観：淡黄色液体(色調、形状:20.5±0.5℃)、硫黄臭 (臭気:23.0±0.5℃)

融点：<-20℃

蒸気圧：7.9×10⁻⁴ Pa (20℃)

溶解性：水：13.0 mg/L (20.0±0.5℃)

キシレン、1,2-ジクロロエタン、酢酸エチル、メタノール、アセトン、*n*-オクタノール、*n*-ヘプタン：

5～95%(w/w)の範囲において任意の割合で完全に溶解する (20.0±0.5℃)

オクタノール/水分配係数：log Pow = 4.48 (30℃)

[出典：プロスルホカルブ農薬抄録

<http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/prosulfocarb/index.htm>]

3. 基準値

イソチアニル及びプロスルホカルブの基準値を表 1 に示す。

表 1 イソチアニル及びプロスルホカルブの基準値

物質名	食品名	基準値 (ppm)
イソチアニル	米 (玄米)	0.3
プロスルホカルブ	小麦	0.05
	大麦	0.05
	ライ麦	0.05
	とうもろこし	0.05
	その他の穀類	0.05
	えんどう	0.05
	そら豆	0.05
	ばれいしょ	0.05
	たまねぎ	0.1
	ねぎ (リーキを含む)	0.05
	その他のゆり科野菜	0.05
	にんじん	1
	セロリ	2
	その他のせり科野菜	0.1
	未成熟えんどう	0.05
	ひまわりの種子	0.05
	その他のスパイス	0.5

[実験方法]

1. 試料

玄米、大豆、落花生、ばれいしょ、きゃべつ、ほうれんそう、オレンジ、りんご、茶及びコリアンダー（コエンドロ）の種子は埼玉県内の小売店で購入した。また、試料の採取方法を以下に記載した。

(1) 玄米、大豆、茶及びコリアンダー（コエンドロ）の種子

試料を粉砕機を用いて 425 μ m の標準網ふるいを通して均一化した。

(2) ばれいしょ、きゃべつ、ほうれんそう、オレンジ及びりんご

試料を細切した後ミキサーを用いて磨砕均一化した。

(3) 落花生

冷凍庫 (-18℃) で冷却した試料をミキサーを用いて粉砕し、2 mm のふるいを通し均一化した。

2. 試薬・試液

(1) 試薬

イソチアニル標準品：純度 99.4% (FLUKA 製)

プロスルホカルブ標準品：純度 98.0%、融点-20℃以下 (Dr.Ehrenstorfer 製)

アセトン、*n*-ヘキサン：残留農薬試験用 (関東化学 (株) 製)

アセトニトリル、メタノール、超純水：LCMS 用 (和光純薬工業 (株) 製)

ケイソウ土：セライト 545 (和光純薬工業 (株) 製)

合成ケイ酸マグネシウムミニカラム：Sep-Pak Plus Florisil (910 mg 、Waters 製)

その他の試薬：特級 (和光純薬工業 (株))

(2) 試液

アセトン及び *n*-ヘキサン（1：4）混液： アセトン 100 mL に *n*-ヘキサン 400 mL を加えて混和した。

(3) 標準溶液

イソチアニル標準品 20 mg をアセトニトリルに溶解して 20 mL に定容したもの、及びプロスルホカルブ標準品 20 mg をアセトニトリルに溶解して 20 mL に定容したものを 1000 mg/L 標準原液とした。この標準原液をメタノールを用いて適宜希釈し、検量線作成用の 0.0005～0.15 mg/L 標準溶液を調製した。

なお、その他の添加試料や検討に用いた標準溶液についても、この標準原液をメタノールを用いて適宜希釈し、それぞれ設定濃度の標準溶液を調製した。各試料への添加溶液を表 2 に示す。

表 2 各試料への添加溶液

試料	物質名	基準値 (ppm)	試料量 (g)	添加溶液濃度 (μg/mL)	添加量 (mL)
玄米	イソチアニル	0.3	10.0	3.000	1.0
大豆	イソチアニル	0.01（一律）	10.0	0.200	0.5
落花生	イソチアニル	0.01（一律）	10.0	0.200	0.5
ばれいしょ	イソチアニル	0.01（一律）	20.0	0.200	1.0
キャベツ	イソチアニル	0.01（一律）	20.0	0.200	1.0
ほうれんそう	イソチアニル	0.01（一律）	20.0	0.200	1.0
オレンジ	イソチアニル	0.01（一律）	20.0	0.200	1.0
りんご	イソチアニル	0.01（一律）	20.0	0.200	1.0
茶	イソチアニル	0.01（一律）	5.00	0.100	0.5
コリアンダー （コエンドロ） の種子	イソチアニル	0.01（一律）	10.0	0.200	0.5
玄米	プロスルホカルブ	0.01（一律）	10.0	0.200	0.5
大豆	プロスルホカルブ	0.01（一律）	10.0	0.200	0.5
落花生	プロスルホカルブ	0.01（一律）	10.0	0.200	0.5
ばれいしょ	プロスルホカルブ	0.05	20.0	1.000	1.0
キャベツ	プロスルホカルブ	0.01（一律）	20.0	0.200	1.0
ほうれんそう	プロスルホカルブ	0.01（一律）	20.0	0.200	1.0
オレンジ	プロスルホカルブ	0.01（一律）	20.0	0.200	1.0
りんご	プロスルホカルブ	0.01（一律）	20.0	0.200	1.0
茶	プロスルホカルブ	0.01（一律）	5.00	0.100	0.5
コリアンダー （コエンドロ） の種子	プロスルホカルブ	0.5	10.0	10.000	0.5

3. 装置

装 置	型 式	製造元
MS 装置	API4000	AB SCIEX 社
LC 装置	Prominence UFLC XR	(株)島津製作所
ホモジナイザー	マルチディスパーサー PB95	(株)エスエムテ

4. 測定条件

LC 条件			
	L-column2 ODS		
カラム	サイズ：内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm (一財)化学物質評価研究機構製		
移動相流速 (mL/min)	0.20		
注入量 (μL)	5		
カラム温度 (°C)	40		
移動相	A 液：0.1vol%ギ酸 B 液：アセトニトリル		
グラジエント条件			
	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
	0.0	50	50
	15.0	0	100
	25.0	0	100
	26.0	50	50
	36.0	50	50

MS 条件	
測定モード	選択反応モニタリング (SRM)
イオン化モード	エレクトロスプレーイオン化法 イソチアニル：ネガティブモード (ESI-) プロスルホカルブ：ポジティブモード (ESI+)
Collision Gas	窒素 5 (単位なし)
Curtain Gas	窒素 30 psi
Ion Source Gas1	50 psi
Ion Source Gas2	80 psi
IonSpray Voltage	イソチアニル：4500 V プロスルホカルブ：5500 V
IonSpray Source 温度	600°C
Declustering Potencial	イソチアニル：45 V プロスルホカルブ：70 V
定量イオン (m/z)	イソチアニル：296→152 (コリジョンエネルギー20 eV) プロスルホカルブ：252→91 (コリジョンエネルギー40 eV)
定性イオン (m/z)	イソチアニル：298→154 (コリジョンエネルギー20 eV) プロスルホカルブ：252→128 (コリジョンエネルギー20 eV)
保持時間 (min)	イソチアニル：7.6 プロスルホカルブ：12.5

グラジエント条件の洗浄時間は、試験法開発時には多検体の試料を連続して測定するため、測定再現性を維持するために十分な 10 分間に設定した。実際に本試験法を適用するにあたっては、事前に測定再現性への影響がないことを確認した上で、洗浄時間を短縮することも可能である。

5. 定量

イソチアニル標準品の 0.0005~0.003 mg/L 及び 0.015~0.09 mg/L 溶液 (メタノール)、プロスルホカルブ標準品の 0.0005~0.003 mg/L、0.0025~0.015 mg/L 及び 0.025~0.15 mg/L 溶液 (メタノール) を数点調製し、それぞれ 5 µL を LC-MS/MS に注入し、ピーク面積法で検量線を作成した。こ

の検量線を用い、絶対検量線法でイソチアニル及びプロスルホカルブの含量を求めた。

6. 試験溶液の調製

(1) 抽出

穀類、豆類及び種実類の場合は試料を 425 μm の標準網ふるいを通して粉砕した後、その 10.0 g を量り採り、水 20 mL を加え、30 分間放置した。果実、野菜及び茶の場合は試料を粉砕した後、果実及び野菜は 20.0 g を量り採り、茶はその 5.00 g を量り採り水 20 mL を加え、30 分間放置した。

これにアセトン 100 mL を加え、3 分間ホモジナイズした後、ケイソウ土を 1 cm の厚さに敷いたろ紙（直径 60 mm、No.5B、桐山製）を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物に、アセトン 50 mL を加え 3 分間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、アセトンを加えて正確に 200 mL とした。穀類、豆類及び種実類の場合は抽出液 20 mL、果実及び野菜の場合は抽出液 10 mL、茶の場合は抽出液 40 mL を採り、40℃以下で約 5 mL に濃縮した。これに 10 w/v% 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 回振とう抽出した。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、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。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 3 回振とう抽出した。抽出液を合わせ、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物にアセトン及び *n*-ヘキサン（1：4）混液 2 mL を加えて溶かした。

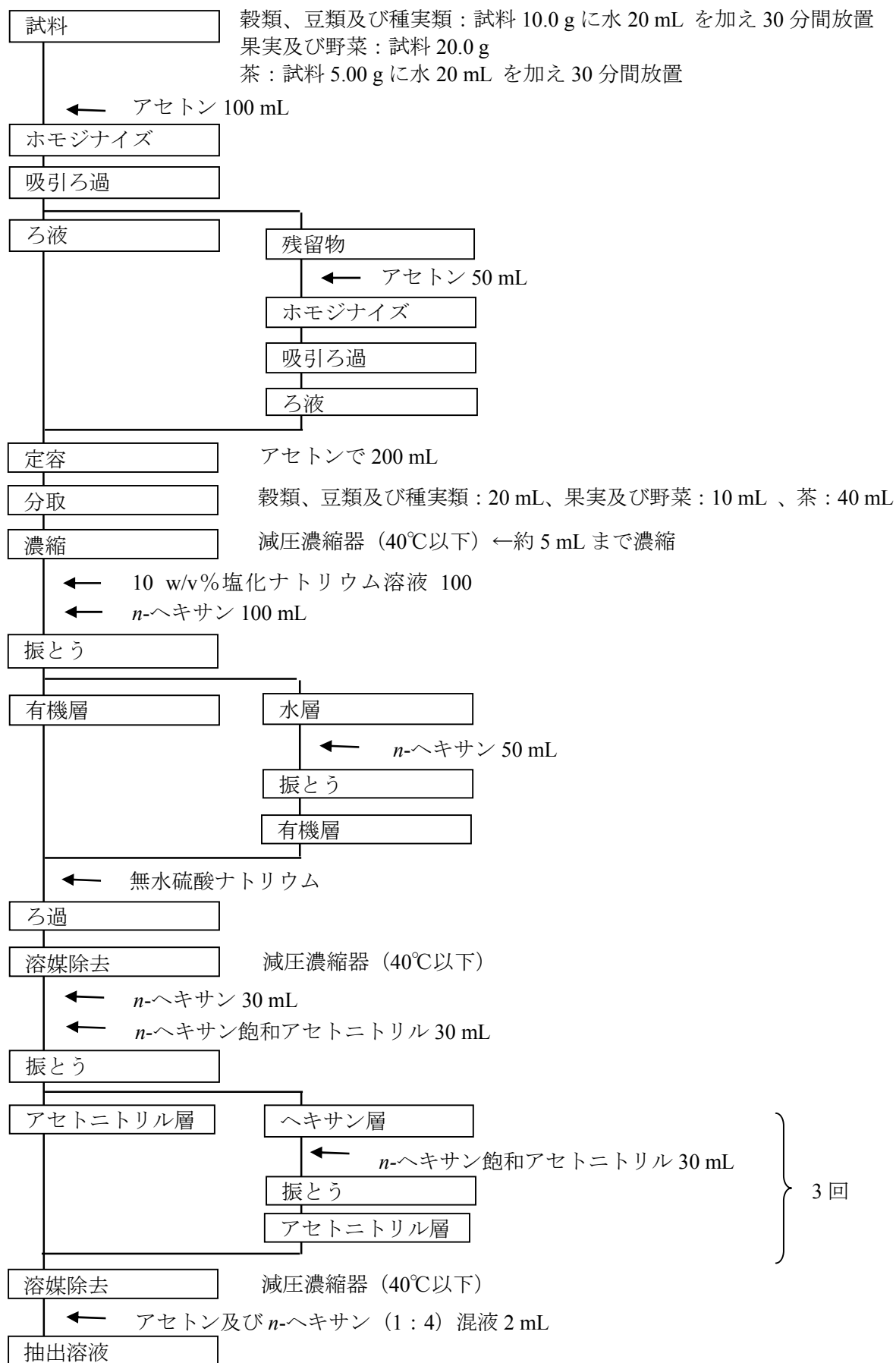


図1 抽出フローチャート（穀類、豆類及び種実類の場合）

(2) 精製

合成ケイ酸マグネシウムミニカラム (Sep-Pak Plus Florisil 910 mg) にアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 4) 混液 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに(1)抽出で得られた抽出溶液を注入し、さらにアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 4) 混液 15 mL を注入して全溶出液を採り、40℃以下で濃縮して溶媒を除去した。残留物にメタノールを正確に 5 mL 加えて溶かし、これを試験溶液とした。

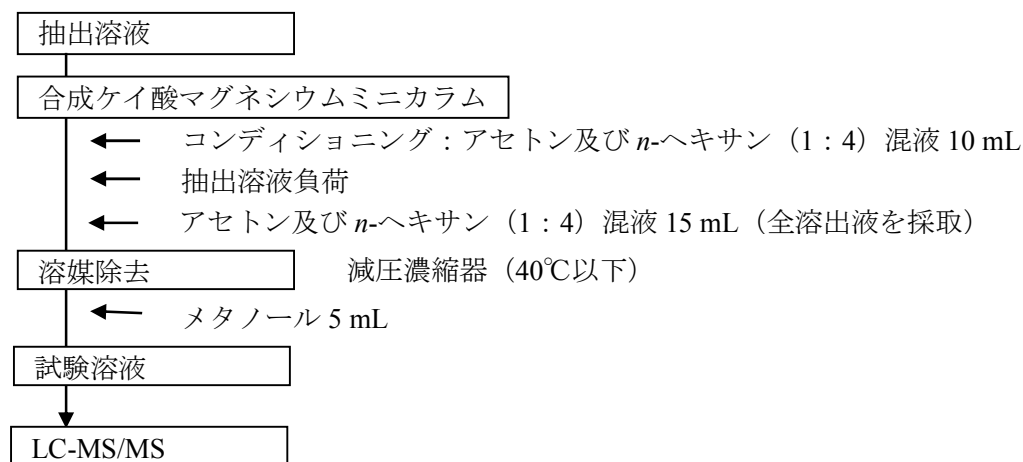


図 2 精製フローチャート

7. マトリックス添加標準溶液の調製

添加回収試験における回収率が 100%と仮定した場合に基準値相当濃度となるよう、標準溶液をブランク試料の試験溶液（マトリックス添加標準溶液）及び溶媒（溶媒標準溶液）で調製し、溶媒標準溶液に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積の比を求めて、試料マトリックスの測定への影響について検討した。各標準溶液の詳細を以下に示す。

溶媒標準溶液 : イソチアニルの標準溶液 0.06 mg/L (メタノール溶液)
イソチアニル及びプロスルホカルブの標準溶液 0.002 mg/L (メタノール溶液)
プロスルホカルブの標準溶液 0.01 mg/L 及び 0.1 mg/L (メタノール溶液)

マトリックス添加標準溶液 : 各ブランク試料の試験溶液 1 mL を 40℃以下で濃縮乾固した後、上記の溶媒標準溶液を 1 mL 添加して溶解した溶液

なお、定量限界の推定においても、定量限界相当の 1/5 濃度マトリックス添加標準溶液を同様にして調製した。各標準溶液の詳細を以下に示す。

溶媒標準溶液 : イソチアニル及びプロスルホカルブの標準溶液 0.0004 mg/L (メタノール溶液)

マトリックス添加標準溶液 : 各ブランク試料の試験溶液 1 mL を 40℃以下で濃縮乾固した後、上記の溶媒標準溶液を 1 mL 添加して溶解した溶液

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

(1) MS 条件の検討

イソチアニルは ESI (－) モードでイオンが検出され、ESI (+) モードではピークが観察されなかった。プロスルホカルブは ESI (+) モードでイオン化された。各々の最適な条件を検討するために、アセトニトリル及び 0.1 vol% 酢酸溶液 (v/v) の混液 (1 : 1) を移動相としてイソチアニル及びプロスルホカルブの Declustering Potential (DP) 及び Collision energy (CE) について検討した。

イソチアニル ESI (－) モード測定時のマススペクトルを図 3 に、プロスルホカルブの ESI (+) モード測定時のマススペクトルを図 4 に示した。その結果から、イソチアニル DP=45 V とした時 m/z 296 のイオン強度が最大となったため、イソチアニルの脱プロトン分子 (m/z 296 [M-H]⁻) をプリカーサーイオンとした。プロスルホカルブは DP=70 V とした時 m/z 252 のイオン強度が最大となったため、プロスルホカルブのプロトン付加分子 (m/z 252 [M+H]⁺) をプリカーサーイオンとした。

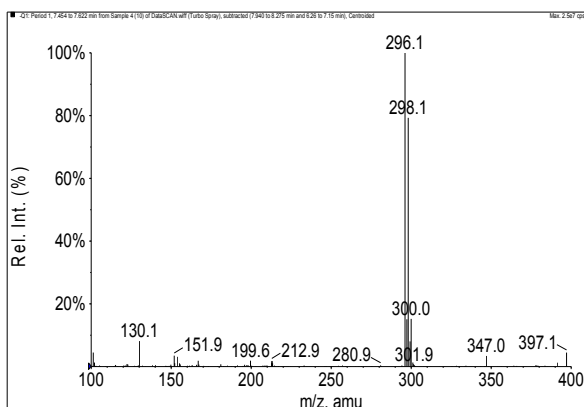


図 3 イソチアニルのマススペクトル
スキャン範囲：100～600 amu
測定条件：ESI (－)、DP=45 V
(DP : Declustering Potential)
イソチアニル：1 mg/L

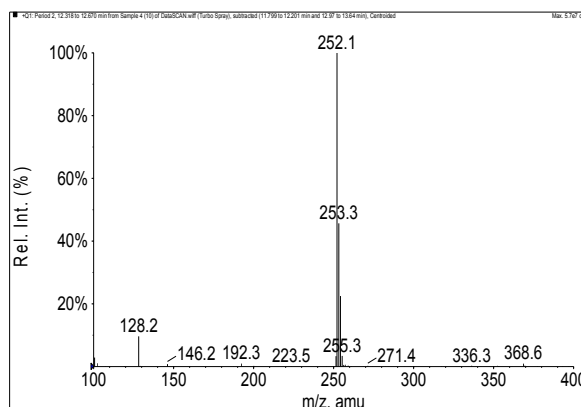


図 4 プロスルホカルブのマススペクトル
スキャン範囲：100～600 amu
測定条件：ESI (+), DP=70 V
(DP : Declustering Potential)
プロスルホカルブ：1 mg/L

イソチアニル：ESI (－) モード測定時の m/z 296 をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図 5 に示した。イソチアニルは CE=20 eV とした時プロダクトイオンイオン m/z 152 のイオン強度が最大となったため、 m/z 296 をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンである m/z 152 を定量用イオンとした。 m/z 296 をプリカーサーイオンとした場合に他に適切な強度のプロダクトイオンが観察されなかったため、 m/z 298 をプリカーサーイオンとしてそのプロダクトイオンを定性イオンとした。この時のプロダクトイオンスペクトルを図 6 に示した。 m/z 298 をプリカーサーイオンとした場合、プロダクトイオンイオン m/z 154 が CE=20 eV の時にイオン強度が最大となったためこれを定性用イオンとした。

プロスルホカルブ：ESI (+) モード測定時の m/z 252 をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図 7～8 に示した。プロスルホカルブは CE=40 eV とした時プロダクトイオンイオン m/z 91 のイオン強度が最大となり、次いで CE=20 eV とした時プロダクトイオン m/z 128 のイオン強度が大きかったため、 m/z 252 をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンである m/z 91 を定量用イオンに、また m/z 128 を定性用イオンとした。

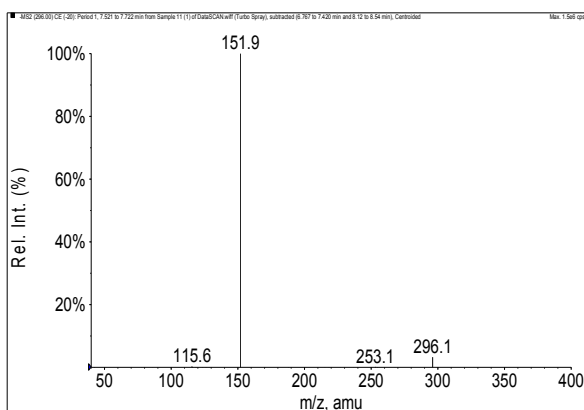


図5 イソチアニルのプロダクトイオンスペクトル(定量用)

プリカーサーイオン： m/z 296

測定条件：ESI（－），DP=45 V，CE=20 eV
(DP：Declustering Potential CE：Collision energy)

イソチアニル：1 mg/L

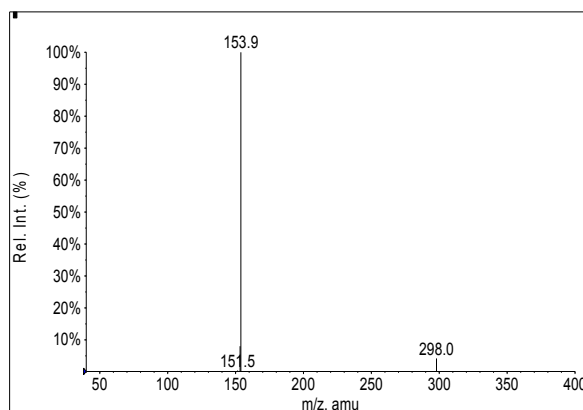


図6 イソチアニルのプロダクトイオンスペクトル(定性用)

プリカーサーイオン： m/z 298

測定条件：ESI（－），DP=45 V，CE=20 eV
(DP：Declustering Potential CE：Collision energy)

イソチアニル：1 mg/L

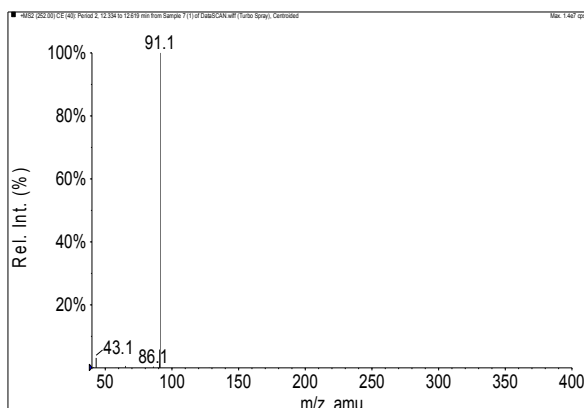


図7 プロスルホカルブのプロダクトイオンスペクトル(定量用)

プリカーサーイオン： m/z 252

測定条件：ESI（＋），DP=70 V，CE=40 eV
(DP：Declustering Potential CE：Collision energy)

プロスルホカルブ：1 mg/L

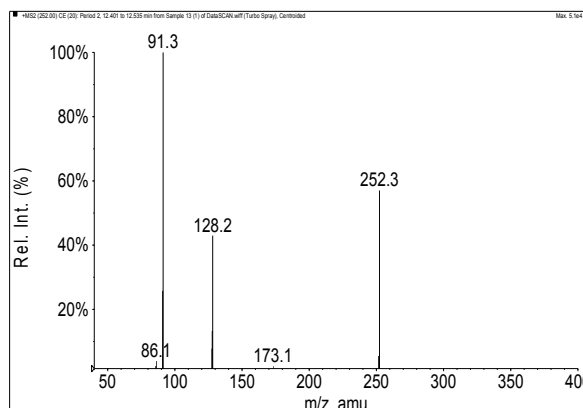


図8 プロスルホカルブのプロダクトイオンスペクトル(定性用)

プリカーサーイオン： m/z 252

測定条件：ESI（＋），DP=70 V，CE=20 eV
(DP：Declustering Potential CE：Collision energy)

プロスルホカルブ：1 mg/L

(2) LC 条件

分析カラムについては、ODS カラム（L-column2 ODS サイズ：内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μ m（一財）化学物質評価研究機構製）を用い、移動相をアセトニトリル及び 0.1 vol% ギ酸とし、アセトニトリル及び 0.1 vol% ギ酸の混液（50：50）から（100：0）までの濃度勾配を 15 分間で実施する条件で測定したところ、イソチアニルは 7 分付近、プロスルホカルブは 12 分付近にピークが認められた。溶媒標準溶液（0.0004 mg/L）を 7 回注入する繰り返し測定において、面積値及び保持時間の再現性が得られたので、この測定条件を用いることとした。標準溶液（0.0004 mg/L）の 7 回繰り返し測定の結果を表 3 に示す。

試験法開発時は、アセトニトリル及び 0.1 vol% ギ酸の混液（50：50）から（100：0）までのグラジエント条件で測定を行ったが、機種によっては有機溶媒移動相の濃度を 99% までとする（あ

るいは推奨している）場合があるため、通知（案）ではアセトニトリル及び 0.1vol%ギ酸の混液（50：50）から（99：1）のラジエント条件とした。今回開発した試験では、移動相に塩を添加していないため、アセトニトリル濃度 100%としても塩の析出によりカラムが劣化する可能性は殆どない。また、C18 系のカラムではアセトニトリル 100%で洗浄及び保管することが推奨されることがある。

表 3 標準溶液の 7 回繰り返し測定の結果

物質名	イソチアニル：0.0004 mg/L		プロスルホカルブ：0.0004 mg/L	
	面積値	保持時間	面積値	保持時間
測定結果 1	1380	7.57	17532	12.48
測定結果 2	1424	7.58	17612	12.48
測定結果 3	1416	7.57	17987	12.47
測定結果 4	1484	7.56	17140	12.48
測定結果 5	1502	7.56	17791	12.48
測定結果 6	1438	7.57	17306	12.47
測定結果 7	1429	7.57	17876	12.48
平均値	1439	7.57	17606	12.48
標準偏差	41	0.01	307	0.005
変動係数(%)	2.9	0.1	2	0.04

(3)検量線

図 9～13 にイソチアニル及びプロスルホカルブの検量線の例を示した。イソチアニルは 0.0005～0.003 mg/L 及び 0.015～0.09 mg/L の各濃度範囲で、またプロスルホカルブは 0.0005～0.003 mg/L、0.0025～0.015 mg/L 及び 0.025～0.15 mg/L の各濃度範囲で、それぞれ作成した検量線の決定係数 (R^2) はいずれも 0.995 以上の良好な直線性を示した。

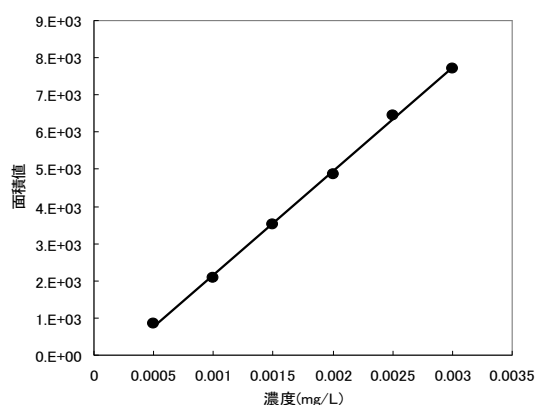


図 9 イソチアニル検量線の例
濃度範囲：0.0005～0.003 mg/L
 $y=2790057x+64$ $R^2=0.999$

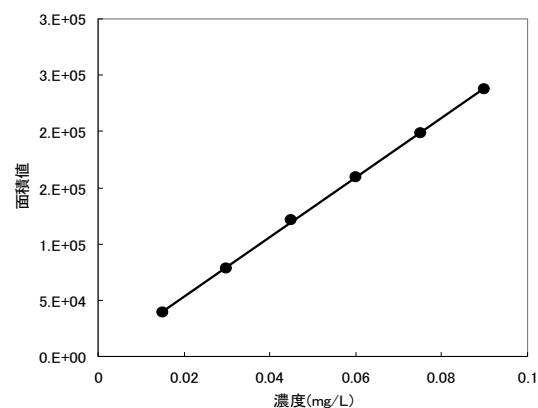


図 10 イソチアニル検量線の例
濃度範囲：0.015～0.09 mg/L
 $y=2646514x-41$ $R^2=1.000$

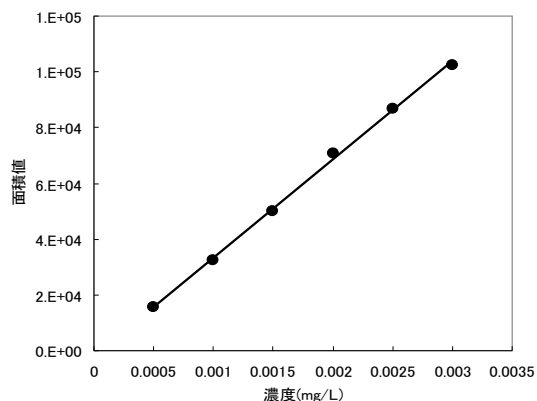


図 11 プロスルホカルブ検量線の例
濃度範囲：0.0005～0.003 mg/L
 $y=35239257x+1935$ $R^2=0.999$

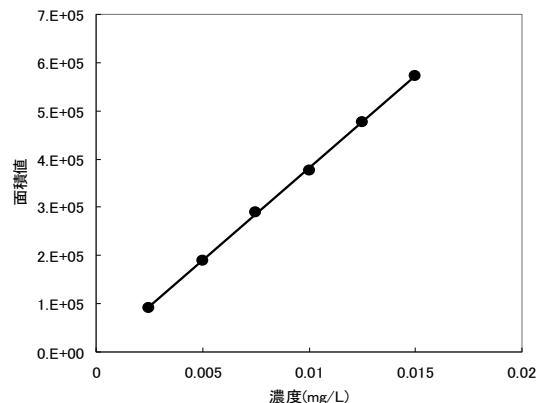


図 12 プロスルホカルブ検量線の例
濃度範囲：0.0025～0.015 mg/L
 $y=38303714x+2744$ $R^2=1.000$

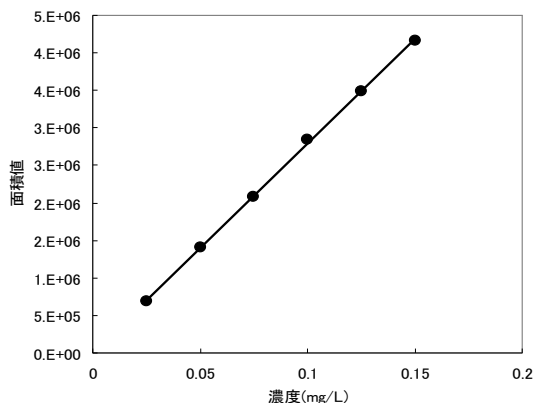


図 13 プロスルホカルブ検量線の例
濃度範囲：0.025～0.15 mg/L
 $y=26257565x-20599$ $R^2=1.000$

(4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

計算式：【[試験用液量(mL)／試験溶液中の試料量(g)]×
[分析対象化合物の定量限界相当量(ng)／注入量(μL)]]
穀類・豆类・種実類、野菜、果実、茶：0.01 mg/kg = [5 (mL)／1 (g)]×[0.01 (ng)／5 (μL)]

2. 試験溶液調製法の検討

(1) 抽出方法の検討

大豆を試料としてアセトンによる抽出の検討を行った。検討の操作手順は次の通りとした。

試料を粉碎均一化した後、その 10.0 g を量り採り、メタノールで調製した標準溶液 (5 mg/L) をホールピペットを用いて 0.4 mL 添加し、よく混合して 30 分放置した。これに水を 20 mL 加えてよく混合して 30 分放置し、これにアセトン 100 mL を加え、3 分間ホモジナイズした後、ケイソウ土を敷いたろ紙 (No.5B) を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物を採り、新たにアセトン 50 mL を加え、3 分間ホモジナイズした後、吸引ろ過し、アセトンを用いて 200 mL に定容した。抽出溶液を 1 mL 分取し、40℃以下で濃縮して溶媒を除去後、残留物をメタノールに溶かし 1 mL

としたものを試験溶液とした。結果を表 4 に示す。

マトリックス補正が無い場合の大豆からの回収率は、イソチアニルは 89.1%、プロスルホカルブは 73.7%であった。マトリックス補正によりイソチアニルは 100.4%、プロスルホカルブは 98.2%の十分な回収が得られたため、抽出溶媒はアセトンとし、ケイソウ土を用いた吸引ろ過を採用することとした。

表 4 アセトン抽出の検討結果 (n=2)

物質名	マトリックス 影響 (%) *1	回収率 (%)			
		マトリックス 補正有*2	マトリックス 補正有-平均	マトリックス 補正無	マトリックス 補正無-平均
イソチアニル	88.8	102.3	100.4	90.8	89.1
		98.4		87.4	
プロスルホカルブ	75.0	99.1	98.2	74.3	73.7
		97.3		73.0	

*1 マトリックス影響：マトリックス添加標準溶液の面積値を溶媒標準溶液の面積値で除した値に 100 を乗じて算出した。

*2 マトリックス添加標準溶液を基準として算出。

(2) 転溶溶媒の検討

10%塩化ナトリウム水溶液 100 mL にメタノールで調製した標準溶液 0.01 mg/L を 1 mL 添加し、*n*-ヘキサン又は酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 4) 混液 100 mL 及び 50 mL で転溶した結果を表 5 に示す。抽出液は 40℃以下で濃縮して溶媒を除去後、残留物をメタノールに溶かし 1 mL とし、LC-MS/MS で測定した。

イソチアニル及びプロスルホカルブはいずれの溶媒もで 95%以上が回収されが、試料マトリックスの抽出がより少ないと考えられるため、転溶溶媒には *n*-ヘキサンを選択した。

表 5 転溶溶媒の検討結果

転溶溶媒	物質名	回収率 (%)	回収率-平均 (%)
<i>n</i> -ヘキサン	イソチアニル	104.1	102.2
		100.2	
	プロスルホカルブ	97.6	97.0
		96.4	
酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 4) 混液	イソチアニル	106.6	106.1
		105.5	
	プロスルホカルブ	102.9	101.0
		99.1	

転溶操作における 1 段階目 (溶媒量 100 mL) と 2 段階目 (溶媒量 50 mL) における各々の回収率について表 6 に示す。いずれの溶媒を使用した場合も、イソチアニル及びプロスルホカルブは 1 段階目の抽出で 97%以上が回収された。この結果から転溶操作は 2 段階で十分であることが確認された。

表 6 転溶操作の各段階における回収率

転溶溶媒	物質名	溶媒量 (mL)	回収率 (%)		
			個別	平均	合計
<i>n</i> -ヘキサン	イソチアニル	100	105.4	101.2	101.2
			97.0		
		50	0.0	0.0	
			0.0		
	プロスルホカルブ	100	99.5	100.1	100.1
			100.7		
		50	0.0	0.0	
			0.0		
酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 4) 混液	イソチアニル	100	100.1	100.3	100.3
			100.4		
		50	0.0	0.0	
			0.0		
	プロスルホカルブ	100	99.9	101.7	101.7
			103.5		
		50	0.0	0.0	
			0.0		

上記の『(1)抽出方法の検討』の結果に従い、大豆試料をアセトンで抽出した粗抽出液を用いて、転溶操作の確認を行った。大豆試料の粗抽出液はその 20 mL を採り、アセトンで調製した標準溶液 0.01 mg/L を 1 mL 添加した後、40℃以下で約 5 mL に濃縮し、これを 10 w/v%塩化ナトリウム水溶液 100 mL に加え、*n*-ヘキサンまたは酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 4) 混液による転溶を行った。得られた抽出液は 40℃以下で濃縮して溶媒を除去後、残留物をメタノールに溶かし 5 mL とし、LC-MS/MS で測定した。検討結果を表 7 に示す。イソチアニルにおいて若干のマトリックス影響が認められたが、プロスルホカルブは殆ど影響が認められなかった。転溶溶媒の違いによるマトリックス影響及び回収率の差は殆ど認められなかったため、いずれの転溶溶媒も使用可能である。

表 7 大豆試料を用いた転溶操作の確認結果

転溶溶媒	物質名	マトリックス影響 (%) *1	回収率 (%)			
			マトリックス補正有 ^{*2}	マトリックス補正有-平均	マトリックス補正無	マトリックス補正無-平均
<i>n</i> -ヘキサン	イソチアニル	94.1	100.9	100.7	94.9	94.8
			100.5		94.6	
	プロスルホカルブ	99.6	99.3	99.7	100.0	99.8
			100.0		99.5	
酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 4) 混液	イソチアニル	93.7	97.8	99.0	91.6	92.8
			100.2		93.9	
	プロスルホカルブ	99.2	97.3	98.0	96.5	97.2
			98.7		97.9	

*1 マトリックス影響：マトリックス添加標準溶液の面積値を溶媒標準溶液の面積値で除した値に 100 を乗じて算出した。

*2 マトリックス添加標準溶液を基準として算出。

(3) アセトニトリル/ヘキサン分配の検討

アセトニトリル/ヘキサン分配による脱脂を検討した。アセトンで調製した 0.01 mg/L 標準溶液の 1 mL をナス型フラスコに採り、窒素気流下で穏やかに溶媒を除去した後 *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 で 3 回抽出を行った。各段階の抽出液を取り 40℃以下で濃縮して溶媒を除去後、残留物をメタノールに溶かし 1 mL とし、LC-MS/MS で測定した。各抽出段階におけるイソチアニル及びプロスルホカルブの回収率を表 8 に示す。

イソチアニルはアセトニトリル/ヘキサン分配 1 回目で約 97%が回収され、2 回目で約 4%が回収され、2 回の操作でほぼ 100%の回収が得られた。プロスルホカルブは分配 1 回目で約 75%、2 回目で 20%、3 回目で 5%と完全に回収するには 3 回の分配操作を行う必要があったため、*n*-ヘキサン 30 mL に対して *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL で 3 回抽出する方法を採用した。

試験法の添加回収試験実施時には、オレンジ試料においてプロスルホカルブのピークの直前に妨害ピークが検出されたため、アセトニトリル/ヘキサン分配を行ったところ、定量下限 0.01 mg/kg レベルでのプロスルホカルブ定量への影響が殆どない程度に妨害ピークが縮小した。脱脂操作がオレンジ試料のバックグラウンドに与える影響については「4. その他の試験法検討に関連する事項 (1) 脱脂操作について」に後述する。

表 8 アセトニトリル/ヘキサン分配の検討結果

物質名	抽出回数	回収率（％）		
		個別	平均	合計
イソチアニル	1 回	95.8	96.7	101.0
		97.6		
	2 回	4.5	4.3	
		4.0		
	3 回	0.0	0.0	
		0.0		
プロスルホカルブ	1 回	74.3	75.0	99.9
		75.7		
	2 回	21.2	20.3	
		19.3		
	3 回	5.0	4.7	
		4.3		

上記の『(1)抽出方法の検討』及び『(2) 転溶溶媒の検討』に従って処理した大豆試料を用いて、アセトニトリル/ヘキサン分配の確認を行った。大豆試料の粗抽出液 20 mL を採り 40℃以下で約 5 mL に濃縮し、*n*-ヘキサンまたは酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 4) 混液で転溶操作後の抽出液にアセトンで調製した標準溶液 0.01 mg/L を 1 mL 加え、40℃以下で濃縮して溶媒を除去後にアセトニトリル/ヘキサン分配を 3 回行った。得られたアセトニトリル溶液を 40℃以下で濃縮して溶媒を除去後、残留物をメタノールに溶かし 5 mL とし、LC-MS/MS で測定した。検討結果を表 9 に示す。大豆試料を用いたアセトニトリル/ヘキサン分配の確認において、イソチアニル及びプロスルホカルブで 90%以上の回収率が得られたため、転溶操作後にアセトニトリル/ヘキサン分配を 3 回行うこととした。また、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 4) 混液による転溶操作後にアセトニトリル/ヘキサン分配を行った場合でも良好な回収率が得られており、メタフルミゾン試験法と同様の転溶操作をイソチアニル及びプロスルホカルブの試験でも適用できることを確認した。

表 9 大豆試料を用いたアセトニトリル/ヘキサン分配の確認

転溶操作に 用いた溶媒	物質名	マトリック ス影響 (%) *1	回収率 (%)			
			マトリック ス補正有*2	マトリックス 補正有-平均	マトリック ス補正無	マトリックス 補正無-平均
<i>n</i> -ヘキサン	イソチア ニル	94.5	98.6 98.4	98.5	93.2 93.0	93.1
	プロスル ホカルブ	93.3	96.9 100.1	98.5	90.4 93.3	91.9
酢酸エチル 及び <i>n</i> -ヘキ サン (1 : 4) 混液	イソチア ニル	92.8	99.7 101.1	100.4	92.5 93.8	93.2
	プロスル ホカルブ	95.6	103.3 102.2	102.7	98.8 97.6	98.2

(4) 精製方法の検討

①Sep-Pak Plus Florisil ミニカラム (910 mg)

Sep-Pak Plus Florisil ミニカラムを *n*-ヘキサン 10 mL でコンディショニングした後、ヘキサンで調製した標準溶液 0.01 mg/L を 1 mL 添加し、割合の異なる *n*-ヘキサン及びアセトン混液を 10 mL 流し、各溶出画分を測定した検討結果を表 10 に示す。画分は 40℃以下で濃縮して溶媒を除去後、残留物をメタノールに溶かし 1 mL とし、LC-MS/MS で測定した。

イソチアニル及びプロスルホカルブは *n*-ヘキサンの画分から溶出が始まり、アセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 9) 混液の画分で約 100%が回収されたが、アセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 4) 混液の画分でも微量のイソチアニル及びプロスルホカルブが確認された。

表 10 Sep-Pak Plus Florisil ミニカラム (910 mg) の溶出画分測定結果

物質名	溶出液	回収率 (%)	回収率 累計 (%)
イソチアニル	<i>n</i> -ヘキサン 10 mL	42.0	42.0
	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 9) 混液 10 mL	55.9	97.9
	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 4) 混液 10 mL	0.3	98.2
	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (3 : 7) 混液 10 mL	0.0	98.2
	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (2 : 3) 混液 10 mL	0.0	98.2
	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 1) 混液 10 mL	0.0	98.2
プロスルホカルブ	<i>n</i> -ヘキサン 10 mL	83.2	83.2
	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 9) 混液 10 mL	19.3	102.5
	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 4) 混液 10 mL	0.3	102.8
	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (3 : 7) 混液 10 mL	0.0	102.8
	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (2 : 3) 混液 10 mL	0.0	102.8
	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 1) 混液 10 mL	0.0	102.8

Florisil ミニカラムの精製の精製に使用する溶出液について更なる検討を行った。Sep-Pak Plus Florisil ミニカラムはアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 9) 混液あるいはアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 4) 混液 10 mL でコンディショニングした後、各溶出液で調製した標準溶液 0.005 mg/L を 2 mL 添加し、各溶出液を 5 mL ずつ計 25 mL まで流し、各溶出画分を測定した。画分は 40℃以下で濃縮して溶媒を除去後、残留物をメタノールに溶かし 5 mL とし、LC-MS/MS で測定した。また、試料マトリックスの有無によって溶出挙動に差が無いことを確認するため、同様の操作を大豆

試料について行った。大豆試料は上記『(1)抽出方法の検討』、『(2) 転溶溶媒の検討』（転溶溶媒は *n*-ヘキサンを使用）及び『(3) 脱脂方法の検討』の結果に従い処理を行い、得られたアセトニトリル溶液にアセトンで調製した標準溶液 0.01 mg/L を 1 mL 加え、40℃以下で濃縮して溶媒を除去後、残留物をアセトン及び *n*-ヘキサン（1：4）混液に溶かし 2 mL として、同様の精製操作を行った。検討結果を表 11 に示す。

Sep-Pak Plus Florisil ミニカラムからイソチアニル及びプロスルホカルブはアセトン及び *n*-ヘキサン（1：9）混液及びアセトン及び *n*-ヘキサン（1：4）混液のうちいずれの溶媒を使用しても溶出可能であった。また、また、溶出に必要な溶媒量は、試料マトリックスの有無に関わらずアセトン及び *n*-ヘキサン（1：9）混液が 15 mL、アセトン及び *n*-ヘキサン（1：4）混液が 10 mL であった。溶出を確実にを行うため、使用する溶媒はアセトン及び *n*-ヘキサン（1：4）混液とし、溶媒量は 15 mL とした。

表 11 Sep-Pak Plus Florisil ミニカラムからの溶出挙動

物質名	試料マトリックス	溶出液の種類	溶出液量 (mL)	回収率 (%)	回収率累計 (%)
イソチアニル	なし	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 9) 混液	0-5	66.5	66.5
			6-10	22.8	89.3
			11-15	6.6	95.9
			16-20	0.0	95.9
			21-25	0.0	95.9
		アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 4) 混液	0-5	40.9	40.9
			6-10	66.1	107.0
			11-15	0.0	107.0
			16-20	0.0	107.0
			21-25	0.0	107.0
	大豆	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 9) 混液	0-5	50.5	50.5
			6-10	24.6	75.1
			11-15	17.1	92.2
			16-20	0.0	92.2
			21-25	0.0	92.2
		アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 4) 混液	0-5	84.5	84.5
			6-10	17.9	102.0
			11-15	0.0	102.0
			16-20	0.0	102.0
			21-25	0.0	102.0
プロスルホカルブ	なし	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 9) 混液	0-5	44.0	44.0
			6-10	38.8	82.8
			11-15	16.4	99.2
			16-20	0.0	99.2
			21-25	0.0	99.2
		アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 4) 混液	0-5	78.0	78.0
			6-10	24.3	102.3
	大豆		11-15	0.0	102.3
			16-20	0.0	102.3
			21-25	0.0	102.3
		アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 9) 混液	0-5	45.7	45.7
			6-10	40.2	85.9
			11-15	16.4	102.3
			16-20	0.0	102.3
			21-25	0.0	102.3
	大豆	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 4) 混液	0-5	82.1	82.1
			6-10	19.1	101.2
			11-15	0.0	101.2
			16-20	0.0	101.2
			21-25	0.0	101.2

(5)着色について

茶葉等の色素を多量に含む試料では最終溶液には着色が観察された。大豆や米、りんご等色素の少ない試料では無色に近い最終溶液が得られた。

試料に含まれる色素は、転溶操作及びアセトニトリル/ヘキサン分配でもその一部が除去されたが、Sep-Pak Plus Florisil ミニカラムを用いた精製操作による色素の除去効果が高いことが目視により確認された。

3. 添加回収試験

玄米、大豆、落花生、ばれいしょ、きゃべつ、ほうれんそう、オレンジ、りんご、茶及びコリアンダー（コエンドロ）の種子の 10 食品を試料に用いて、実験方法の 7.試験溶液の調製に従って添加回収試験を実施した。

玄米、大豆、落花生及びコリアンダー（コエンドロ）の種子はその 10.0 g を量り採り、添加後の濃度が各試料における基準値と同じ濃度になるように調製した標準溶液を、表 2 に従ってホールピペットを用いて添加し、よく混合して 30 分放置したものを添加回収試験の試料とした。ばれいしょ、きゃべつ、ほうれんそう、オレンジ及びりんごはその 20.0 g を量り採り、添加後の濃度が各試料における基準値と同じ濃度になるように調製した標準溶液を、表 2 に従ってホールピペットを用いて添加し、よく混合して 30 分放置したものを添加回収試験の試料とした。茶はその 5.00 g を量り採り、添加後の濃度が各試料における基準値と同じ濃度になるように調製した標準溶液を、表 2 に従ってホールピペットを用いて添加し、よく混合して 30 分放置したものを添加回収試験の試料とした。

添加回収試験における各食品のブランク試料、添加回収試料及び回収率 100%相当の溶媒標準溶液の代表的なクロマトグラムを図 14～33 に示した。また、各食品のブランク試料のスキャン測定による代表的な全イオン電流クロマトグラムを図 37 及び 38 に示した。

(1) 選択性

選択性の検討結果を表 12 に示した。茶のブランク試料においてプロスルホカルブと同一の保持時間にピークが検出され（図 32）、定性イオンも標準溶液と同じ面積比で検出されたことから、検出された物質はプロスルホカルブであると考えられたが、定量限界 0.01 ppm に対して十分に小さく 妨害ピークの許容範囲に適合しており、測定上の影響はなかった。オレンジにおいてはプロスルホカルブの手前に夾雑ピークが観察されたが（図 30）、定量限界 0.01 ppm に対して十分に小さいため、測定上の影響は少ないものと考えられた。他の試料についてもプロスルホカルブのピーク位置に微小なピークが検出されたが妨害ピークの許容範囲の判定基準に適合していた。

表 12 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)		妨害ピークの許容範囲			ピーク面積				選択性の評価 ¹⁾	備考
							評価対象濃度 (ppm)		判定基準	面積又は高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 ⁴⁾ (b)	面積比 (a)/(b)		
1	イソチアニル	玄米	0.01	0.3	0.3	*	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	152635	0.000	○	定量限界<基準値
2	イソチアニル	大豆	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	6458	0.000	○	定量限界=基準値
3	イソチアニル	落花生	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	6029	0.000	○	定量限界=基準値
4	イソチアニル	ばれいしょ	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	5401	0.000	○	定量限界=基準値
5	イソチアニル	きやべつ	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	6386	0.000	○	定量限界=基準値
6	イソチアニル	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	6170	0.000	○	定量限界=基準値
7	イソチアニル	オレンジ	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	5198	0.000	○	定量限界=基準値
8	イソチアニル	りんご	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	5438	0.000	○	定量限界=基準値
9	イソチアニル	茶	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	4922	0.000	○	定量限界=基準値
10	イソチアニル	コリアンダー (コエンドロ)の 種子	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	5122	0.000	○	定量限界=基準値
11	プロスルホカルブ	玄米	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	69776	0.000	○	定量限界=基準値
12	プロスルホカルブ	大豆	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	198	67167	0.003	○	定量限界=基準値
13	プロスルホカルブ	落花生	0.01	0.01	0.01		基準値	0.01	< 0.333	面積	0	69122	0.000	○	定量限界=基準値
14	プロスルホカルブ	ばれいしょ	0.01	0.05	0.05	*	定量限界	0.05	< 0.100	面積	0	448972	0.000	○	定量限界<基準値
15	プロスルホカルブ	きやべつ	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	66617	0.000	○	定量限界=基準値
16	プロスルホカルブ	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	67848	0.000	○	定量限界=基準値
17	プロスルホカルブ	オレンジ	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	67146	0.000	○	定量限界=基準値
18	プロスルホカルブ	りんご	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	396	96464	0.004	○	定量限界=基準値
19	プロスルホカルブ	茶	0.01	0.01	0.01		基準値	0.01	< 0.333	面積	2585	112725	0.023	○	定量限界=基準値
20	プロスルホカルブ	コリアンダー (コエンドロ)の 種子	0.01	0.5	0.5	*	定量限界	0.5	< 0.100	面積	0	2822137	0.000	○	定量限界<基準値

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準 (0.01 ppm) を用いた。

2 添加濃度と評価対象濃度が異なる場合 (定量限界と基準値との関係が『定量限界<基準値<定量限界×3』となる場合) には、『』が表示される。『*』が表示された分析対象化合物は、添加濃度と評価対象濃度が異なるため、別途、定量限界濃度相当のマトリックス添加標準溶液を調製して評価した。

*3 ブランク試料及び標準溶液の順に測定した。

*4 試料中の濃度が「評価対象濃度 (基準値濃度又は定量限界濃度)」相当になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)を用いた。

*5 面積比が、妨害ピークの許容範囲の判定基準に適合する場合には「○」、適合しない場合には「×」を記載した。

(2) 真度、精度及び定量限界

真度及び併行精度の検討結果を表 13 に示した。イソチアニルの真度は 94～101%、併行精度は 1～4% であり、プロスルホカルブの真度は 91～100%、併行精度は 2～5% であった。検討に使用した 10 食品においてイソチアニル及びプロスルホカルブは良好な回収率を得られた。

添加濃度と定量限界濃度が異なる試料において、定量限界の推定を行った結果を表 14 に示した。また、定量限界の推定における代表的なクロマトグラムを図 34～36 に示した。玄米におけるイソチアニルの S/N 比は 38、ばれいしょ及びコリアンダー種子におけるプロスルホカルブの S/N 比は各々 619 及び 428 であり、定量限界の 1/5 濃度においても 10 以上の S/N 比を得ることができた。

表 13 真度及び併行精度の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 ¹⁾ (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界 の評価 ²⁾	検量線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	備考
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			
1	イソチアニル	玄米	0.01	0.3	0.3	*	2650317	-492	1.000	96	96	98	95	96	96	1	定量限界<基準値
2	イソチアニル	大豆	0.01	0.01	0.01		3121953	-281	1.000	96	96	103	99	95	98	3	定量限界=基準値
3	イソチアニル	落花生	0.01	0.01	0.01		3235977	-205	0.999	97	97	96	95	97	96	1	定量限界=基準値
4	イソチアニル	ばれいしょ	0.01	0.01	0.01		2228860	232	0.999	95	96	98	98	101	97	3	定量限界=基準値
5	イソチアニル	きゃべつ	0.01	0.01	0.01		2552442	-143	0.998	97	102	101	98	103	100	3	定量限界=基準値
6	イソチアニル	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01		2199047	150	1.000	102	100	104	102	95	101	4	定量限界=基準値
7	イソチアニル	オレンジ	0.01	0.01	0.01		2624372	-225	0.999	101	96	97	96	94	97	3	定量限界=基準値
8	イソチアニル	りんご	0.01	0.01	0.01		2504093	-26	0.999	99	98	102	94	100	99	3	定量限界=基準値
9	イソチアニル	茶	0.01	0.01	0.01		2599200	-246	0.999	98	95	89	95	94	94	3	定量限界=基準値
10	イソチアニル	コリアンダー(コエンドロ)の種子	0.01	0.01	0.01		2572419	-101	0.999	101	99	100	100	98	100	1	定量限界=基準値
11	プロスルホカルブ	玄米	0.01	0.01	0.01		36140581	-4932	0.999	99	97	102	95	96	98	3	定量限界=基準値
12	プロスルホカルブ	大豆	0.01	0.01	0.01		37647233	-828	0.999	96	95	96	99	94	96	2	定量限界=基準値
13	プロスルホカルブ	落花生	0.01	0.01	0.01		33507116	1755	0.996	96	101	102	102	101	100	2	定量限界=基準値
14	プロスルホカルブ	ばれいしょ	0.01	0.05	0.05	*	38303714	-2744	1.000	102	99	96	96	95	97	3	定量限界<基準値
15	プロスルホカルブ	きゃべつ	0.01	0.01	0.01		40699953	-301	1.000	94	99	99	97	99	98	2	定量限界=基準値
16	プロスルホカルブ	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01		38237023	1025	0.999	103	103	99	100	97	100	3	定量限界=基準値
17	プロスルホカルブ	オレンジ	0.01	0.01	0.01		32503651	1545	0.999	99	97	98	95	96	97	2	定量限界=基準値
18	プロスルホカルブ	りんご	0.01	0.01	0.01		42048535	-146	0.998	97	96	98	97	100	98	2	定量限界=基準値
19	プロスルホカルブ	茶	0.01	0.01	0.01		66994400	10212	0.999	93	85	96	93	90	91	5	定量限界=基準値
20	プロスルホカルブ	コリアンダー(コエンドロ)の種子	0.01	0.5	0.5	*	26257565	20599	1.000	96	94	90	86	88	91	5	定量限界<基準値

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準 (0.01 ppm) を用いた。

2 添加濃度が定量限界濃度と異なる場合には『』を表示した。その場合には、別途、定量限界の推定を行った。

表 14 定量限界の推定

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 ¹⁾ (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界 の評価 ²⁾	標準溶液 濃度 (mg/L) ³⁾	ピーク面積 ⁴⁾							S/N 比		平均値		備考	
								面積又は 高さの別	ブランク ⁵⁾	マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液							
										n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	n=1	n=2			
1	イソチアニル	玄米	0.01	0.3	0.3	*	0.0004	面積	0	1466	1412	1439	1456	1451	1454	40	37	99	38	定量限界<基準値
2	プロスルホカルブ	ばれいしょ	0.01	0.05	0.05	*	0.0004	面積	0	17508	17401	17455	16775	18465	17620	649	589	99	619	定量限界<基準値
3	プロスルホカルブ	コリアンダー(コエンドロ)の種子	0.01	0.5	0.5	*	0.0004	面積	0	16863	15933	16398	17968	17887	17928	405	452	91	428	定量限界<基準値

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準 (0.01 ppm) を用いた。

2 添加濃度が定量限界濃度と異なる場合には『』を表示した。

*3 試料中の濃度が定量限界相当濃度の 1/5 となるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成した。

*4 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に測定した。

*5 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いた。

*6 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積の比を求めた。

(3) 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について検討した結果を表 15 に示した。添加回収試験における回収率 100%相当濃度になるように調製したマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求めた。イソチアニルの面積比は 0.95～1.01、プロスルホカルブの面積比は 0.92～1.02 であり、検討に使用した 10 食品に関してはマトリックスの測定への影響は少ないものと考えられた。

添加回収試験における真度を表 15 で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表 16 に示した。イソチアニルの補正真度は 96～102%、プロスルホカルブの補正真度は 96～102%であり、検討に使用した 10 食品においては補正前と補正後とで真度の大きな変動は見られなかった。

表 15 試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 ¹⁾ (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界 の評価 ²⁾	標準溶液 濃度 (mg/L) ³⁾	ピーク面積 ⁴⁾									平均値	備考
								面積又は 高さの別	ブランク ⁵⁾	マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液			面積比 (%) ⁶⁾		
										n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均			
1	イソチアニル	玄米	0.01	0.3	0.3	*	0.06	面積	0	152635	153495	153065	160015	160081	160048	0.96	定量限界<基準値	
2	イソチアニル	大豆	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	0	6458	6595	6527	6557	6545	6551	1.00	定量限界=基準値	
3	イソチアニル	落花生	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	0	6029	6276	6153	6474	6165	6320	0.97	定量限界=基準値	
4	イソチアニル	ばれいしょ	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	0	5401	4806	5104	5404	5295	5350	0.95	定量限界=基準値	
5	イソチアニル	きゃべつ	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	0	6386	6013	6200	6044	6180	6112	1.01	定量限界=基準値	
6	イソチアニル	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	0	6170	6297	6234	6042	6258	6150	1.01	定量限界=基準値	
7	イソチアニル	オレンジ	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	0	5198	5023	5111	5210	5226	5218	0.98	定量限界=基準値	
8	イソチアニル	りんご	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	0	5438	5064	5251	5165	5335	5250	1.00	定量限界=基準値	
9	イソチアニル	茶	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	0	4874	4986	4930	4990	5107	5049	0.98	定量限界=基準値	
10	イソチアニル	コリアンダー(コエンドロ)の種子	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	0	5122	5338	5230	5448	5121	5285	0.99	定量限界=基準値	
11	プロスルホカルブ	玄米	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	0	69776	68395	69086	70110	69885	69998	0.99	定量限界=基準値	
12	プロスルホカルブ	大豆	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	198	66969	67703	67336	68472	68200	68336	0.99	定量限界=基準値	
13	プロスルホカルブ	落花生	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	0	69122	69410	69266	69295	69554	69425	1.00	定量限界=基準値	
14	プロスルホカルブ	ばれいしょ	0.01	0.05	0.05	*	0.01	面積	0	448972	438393	443683	452414	421653	437034	1.02	定量限界<基準値	
15	プロスルホカルブ	きゃべつ	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	0	66617	67668	67143	69280	69706	69493	0.97	定量限界=基準値	
16	プロスルホカルブ	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	0	67848	67321	67585	69011	68575	68793	0.98	定量限界=基準値	
17	プロスルホカルブ	オレンジ	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	0	67146	67963	67555	68799	68352	68576	0.99	定量限界=基準値	
18	プロスルホカルブ	りんご	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	396	96068	90134	93101	95650	92586	94118	0.99	定量限界=基準値	
19	プロスルホカルブ	茶	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	2585	139777	141007	140392	152935	152332	152634	0.92	定量限界=基準値	
20	プロスルホカルブ	コリアンダー(コエンドロ)の種子	0.01	0.5	0.5	*	0.1	面積	0	2822137	2782515	2802326	3044918	2926965	2985942	0.94	定量限界<基準値	

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準 (0.01 ppm) を用いた。

2 添加濃度が定量限界濃度と異なる場合には『』を表示した。

*3 試料中の濃度が定量限界相当濃度となるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液 (マトリックス添加標準溶液) 及び溶媒で調製した標準溶液 (溶媒標準溶液) を作成した。

*4 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に測定した。

*5 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いた。

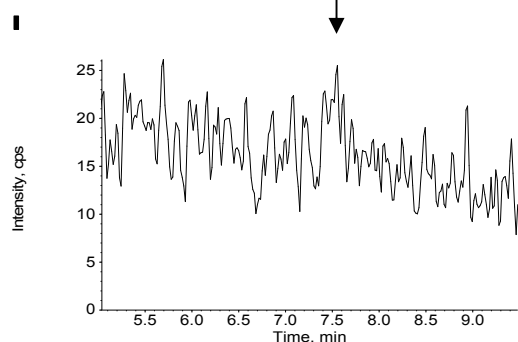
*6 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積の比を求めた。

表 16 補正真度

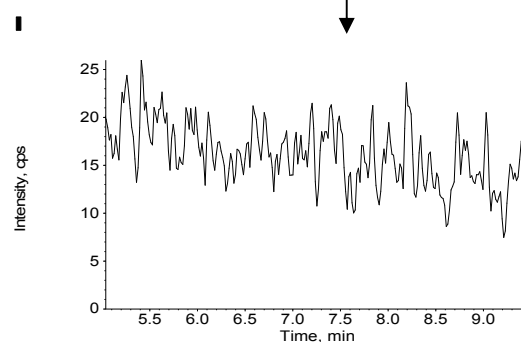
分析対象化合物	食品名	真度(%)	ピーク面積比	補正真度(%)
イソチアニル	玄米	96	0.96	101
イソチアニル	大豆	98	1.00	98
イソチアニル	落花生	96	0.97	99
イソチアニル	ばれいしょ	97	0.95	102
イソチアニル	きゃべつ	100	1.01	99
イソチアニル	ほうれんそう	101	1.01	99
イソチアニル	オレンジ	97	0.98	99
イソチアニル	りんご	99	1.00	99
イソチアニル	茶	94	0.98	96
イソチアニル	コリアンダー（コエンドロ）の種子	100	0.99	101
プロスルホカルブ	玄米	98	0.99	99
プロスルホカルブ	大豆	96	0.99	98
プロスルホカルブ	落花生	100	1.00	100
プロスルホカルブ	ばれいしょ	97	1.02	96
プロスルホカルブ	きゃべつ	98	0.97	101
プロスルホカルブ	ほうれんそう	100	0.98	102
プロスルホカルブ	オレンジ	97	0.99	99
プロスルホカルブ	りんご	98	0.99	99
プロスルホカルブ	茶	91	0.92	99
プロスルホカルブ	コリアンダー（コエンドロ）の種子	91	0.94	97

①添加回収試験における代表的なクロマトグラム

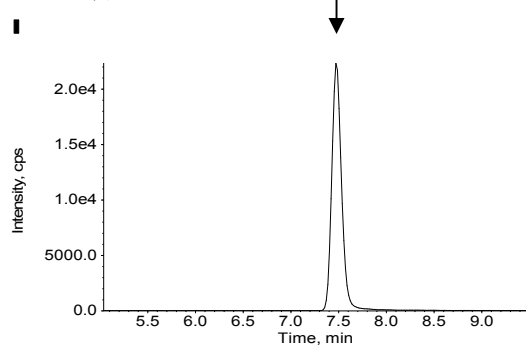
ブランク試料



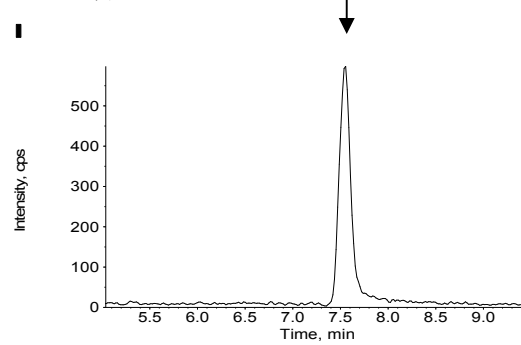
ブランク試料



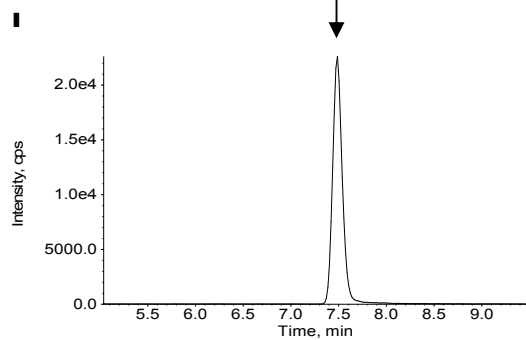
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

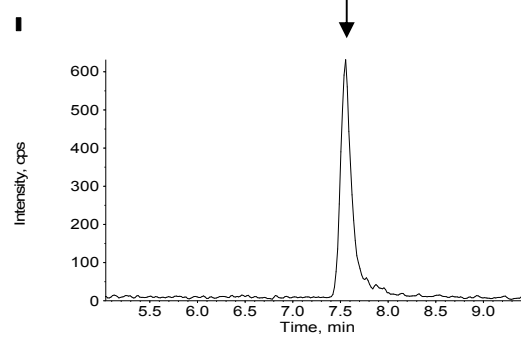
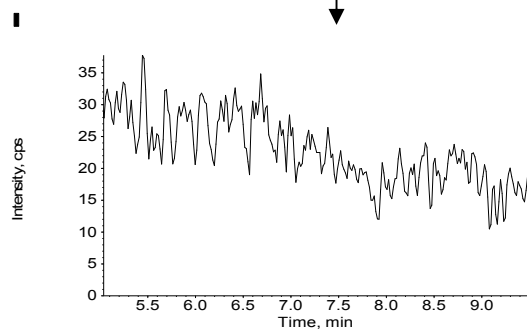


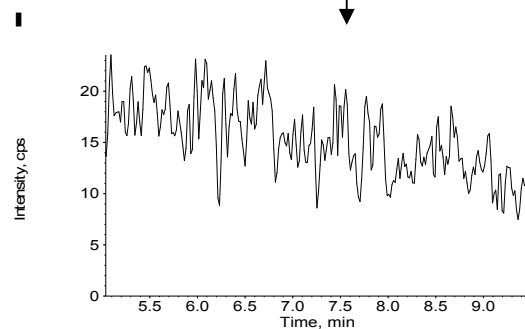
図 14 イソチアニルの SRM クロマトグラム
($m/z=296 \rightarrow 152$)
試料中 0.3 ppm 相当 (玄米)

図 15 イソチアニルの SRM クロマトグラム
($m/z=296 \rightarrow 152$)
試料中 0.01 ppm 相当 (大豆)

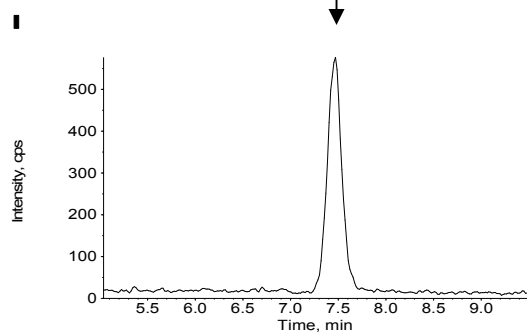
ブランク試料



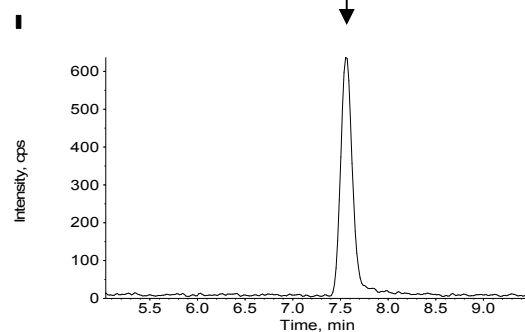
ブランク試料



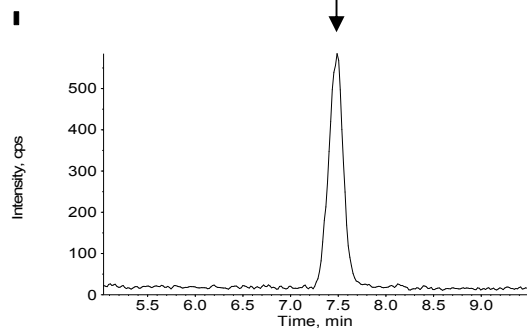
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

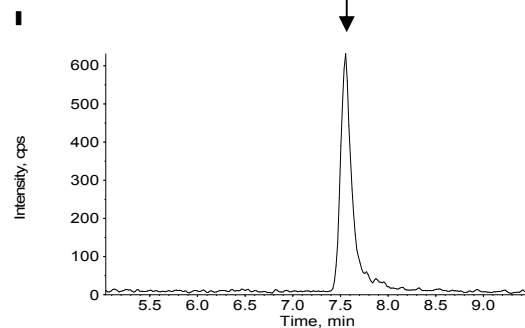
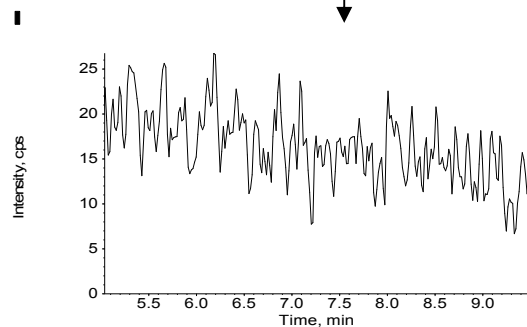


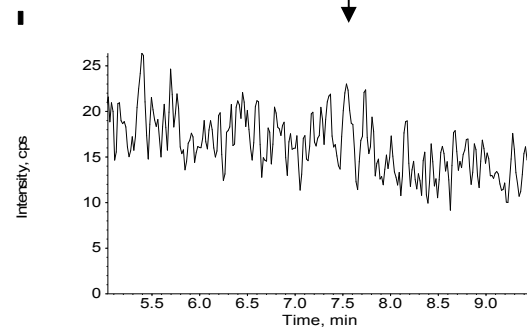
図 16 イソチアニルの SRM クロマトグラム
($m/z=296 \rightarrow 152$)
試料中 0.01 ppm 相当 (落花生)

図 17 イソチアニルの SRM クロマトグラム
($m/z=296 \rightarrow 152$)
試料中 0.01 ppm 相当 (ばれいしょ)

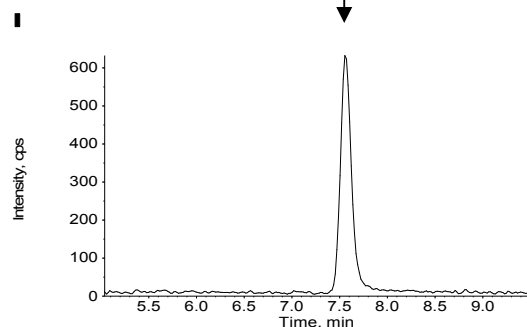
ブランク試料



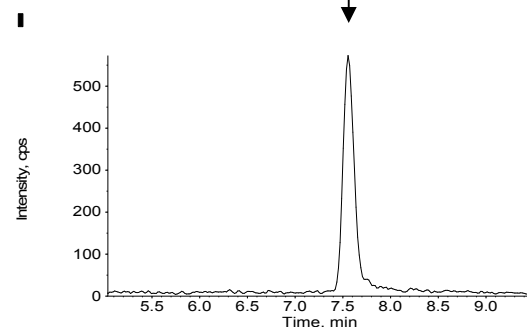
ブランク試料



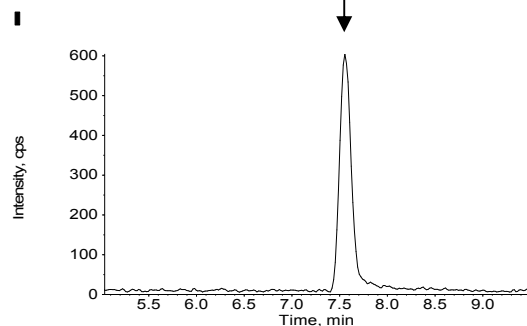
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

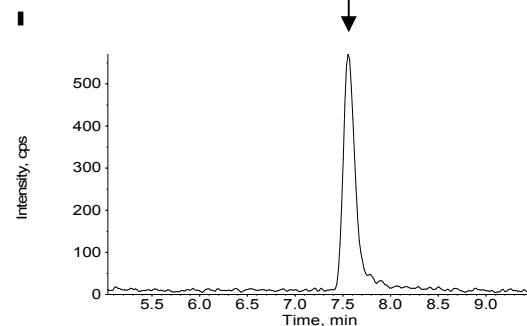
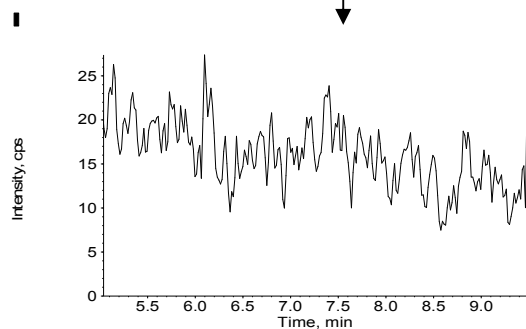


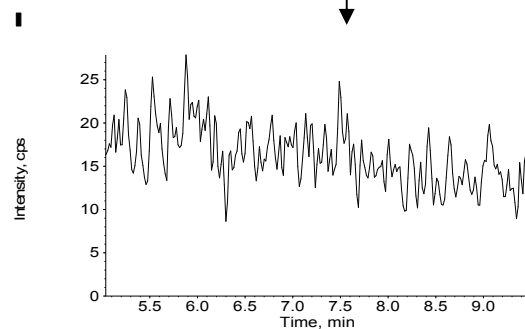
図 18 イソチアニルの SRM クロマトグラム
($m/z=296 \rightarrow 152$)
試料中 0.01 ppm 相当 (きやべつ)

図 19 イソチアニルの SRM クロマトグラム
($m/z=296 \rightarrow 152$)
試料中 0.01 ppm 相当 (ほうれんそう)

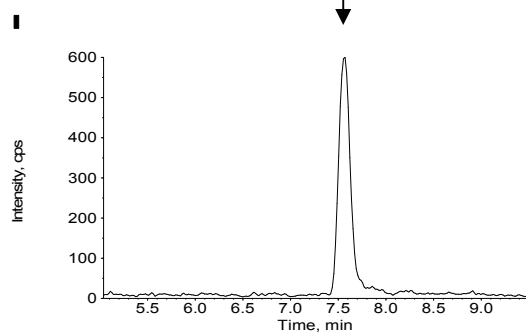
ブランク試料



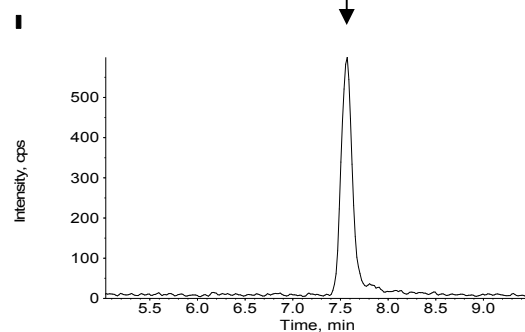
ブランク試料



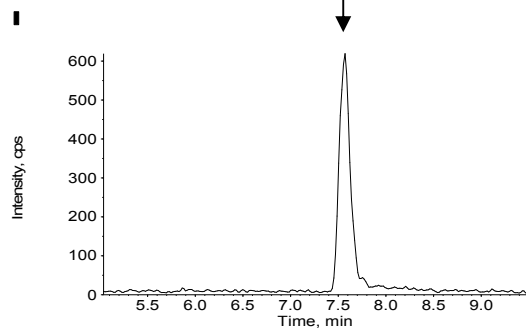
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

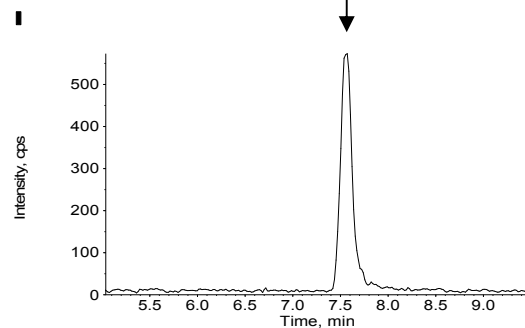
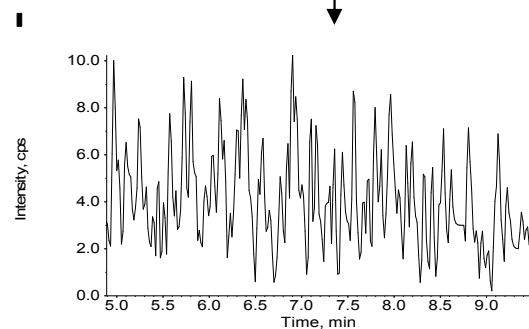


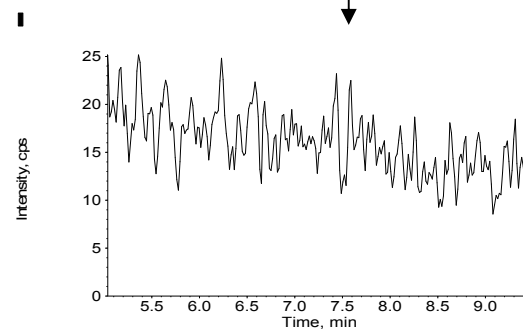
図 20 イソチアニルの SRM クロマトグラム
($m/z=296 \rightarrow 152$)
試料中 0.01 ppm 相当 (オレンジ)

図 21 イソチアニルの SRM クロマトグラム
($m/z=296 \rightarrow 152$)
試料中 0.01 ppm 相当 (りんご)

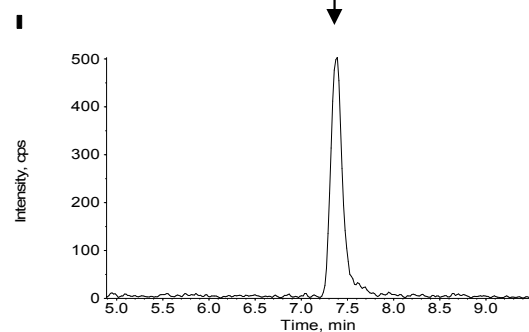
ブランク試料



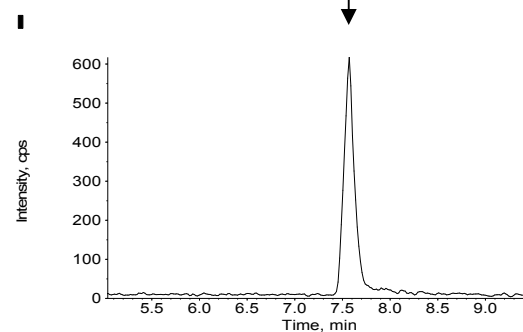
ブランク試料



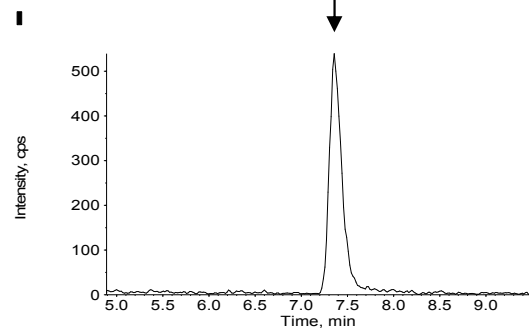
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

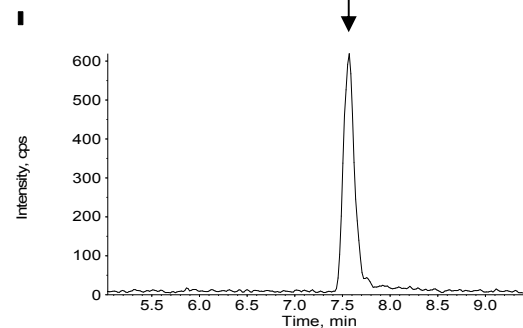
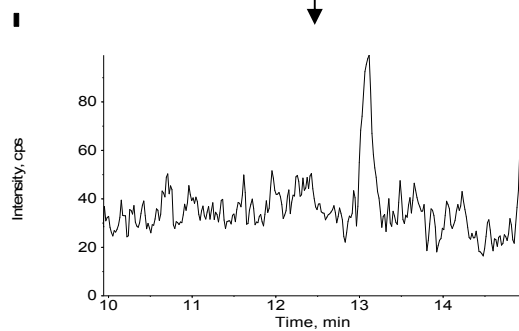


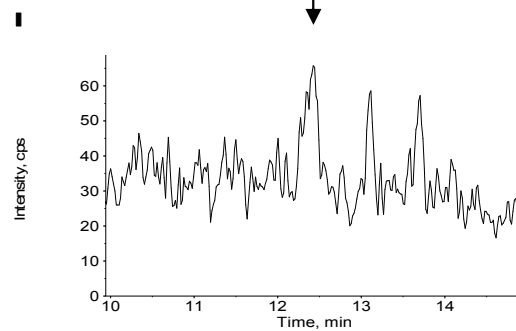
図 22 イソチアニルの SRM クロマトグラム
($m/z=296 \rightarrow 152$)
試料中 0.01 ppm 相当 (茶)

図 23 イソチアニルの SRM クロマトグラム
($m/z=296 \rightarrow 152$)
試料中 0.01 ppm 相当 (コリアンダー (コエンドロ) の種子)

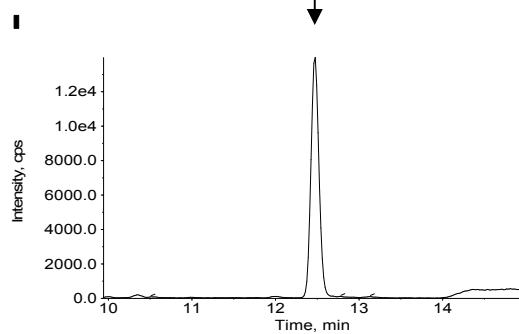
ブランク試料



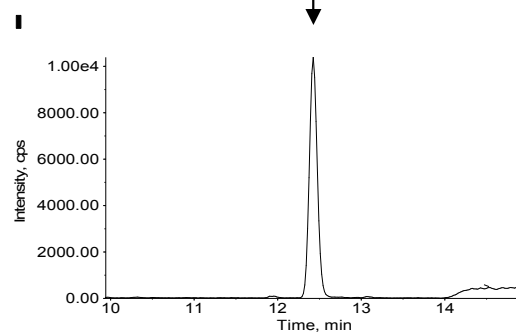
ブランク試料



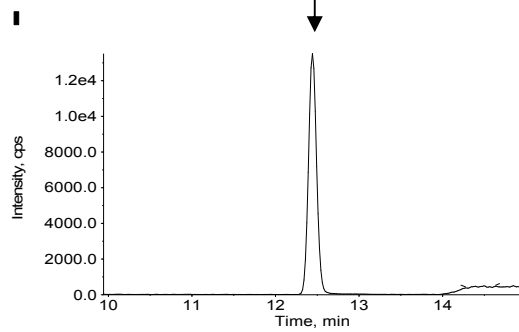
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

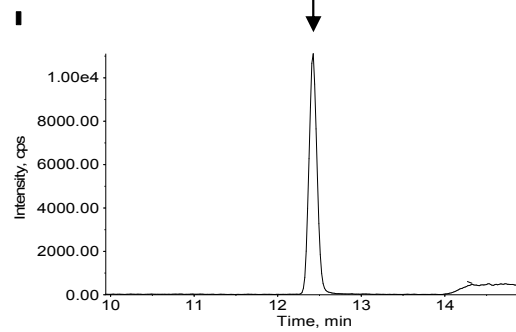
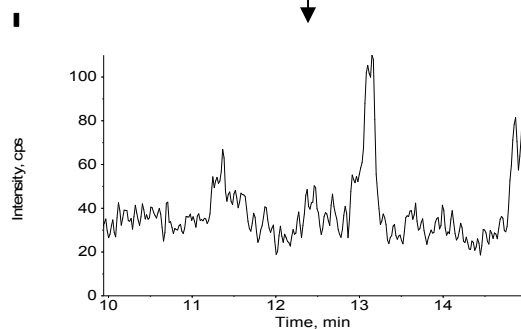


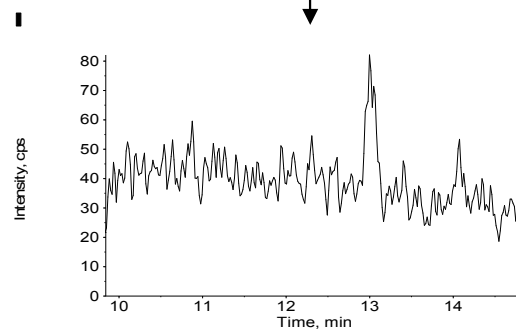
図 24 プロスルホカルブの SRM クロマトグラム
($m/z=252 \rightarrow 91$)
試料中 0.01 ppm 相当 (玄米)

図 25 プロスルホカルブの SRM クロマトグラム
($m/z=252 \rightarrow 91$)
試料中 0.01 ppm 相当 (大豆)

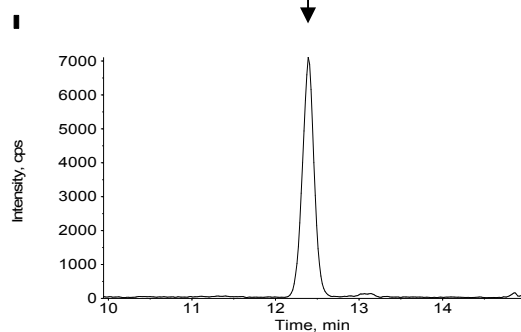
ブランク試料



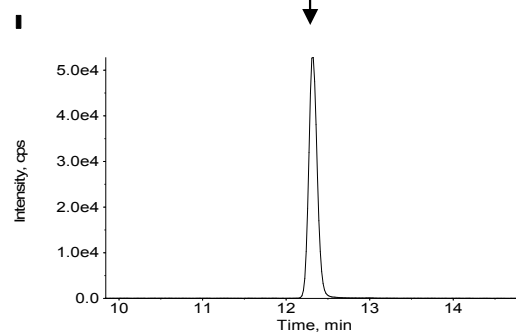
ブランク試料



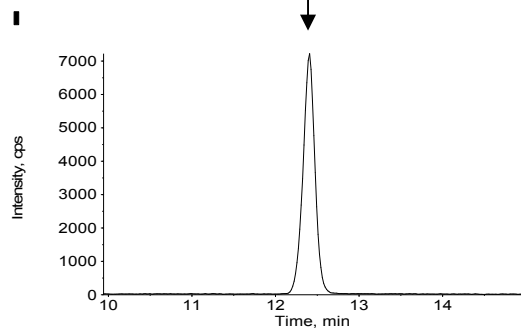
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

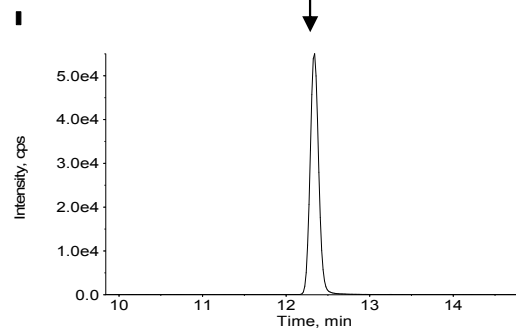
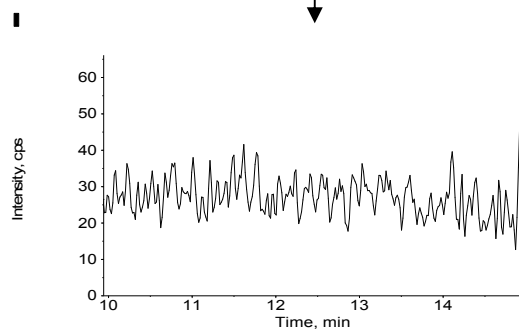


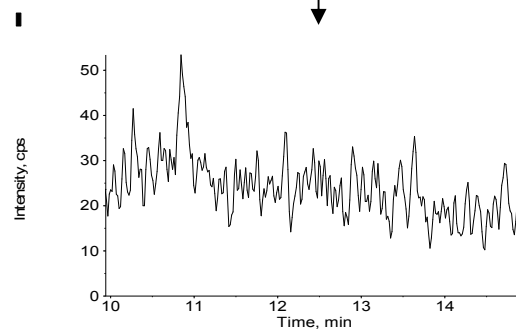
図 26 プロスルホカルブの SRM クロマトグラム
($m/z=252 \rightarrow 91$)
試料中 0.01 ppm 相当 (落花生)

図 27 プロスルホカルブの SRM クロマトグラム
($m/z=252 \rightarrow 91$)
試料中 0.05 ppm 相当 (ばれいしょ)

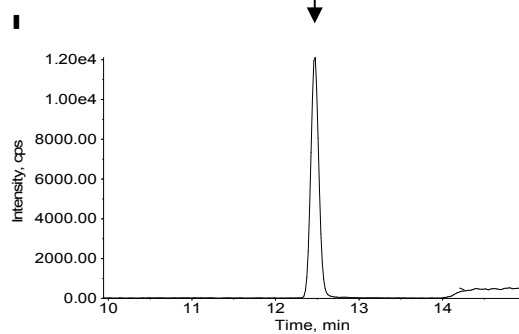
ブランク試料



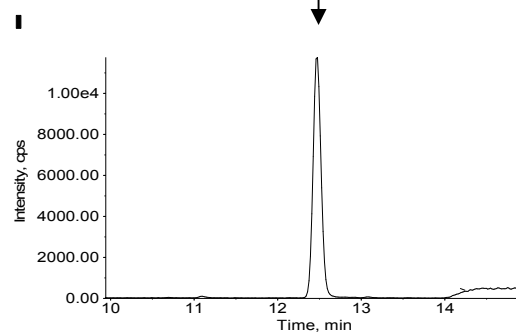
ブランク試料



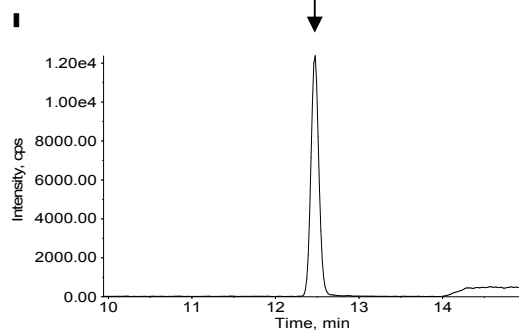
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

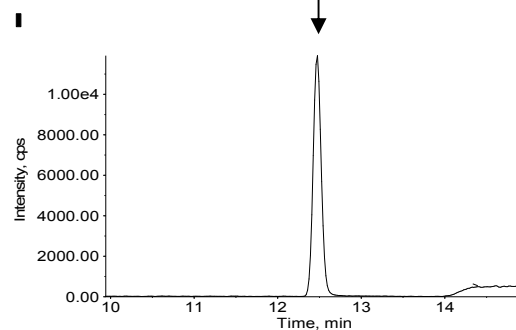
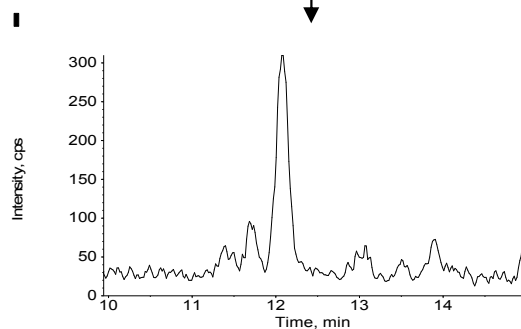


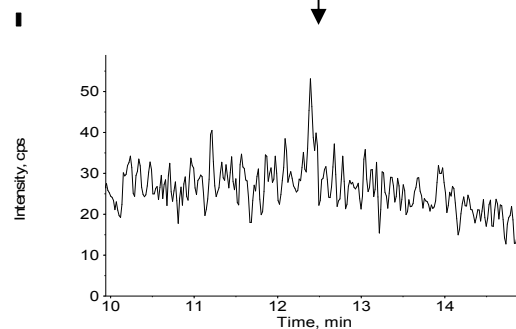
図 28 プロスルホカルブの SRM クロマトグラム
($m/z=252 \rightarrow 91$)
試料中 0.01 ppm 相当 (きゃべつ)

図 29 プロスルホカルブの SRM クロマトグラム
($m/z=252 \rightarrow 91$)
試料中 0.01 ppm 相当 (ほうれんそう)

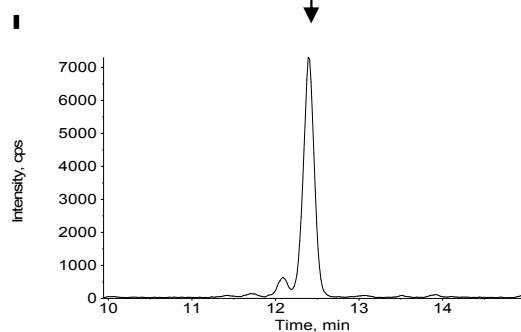
ブランク試料



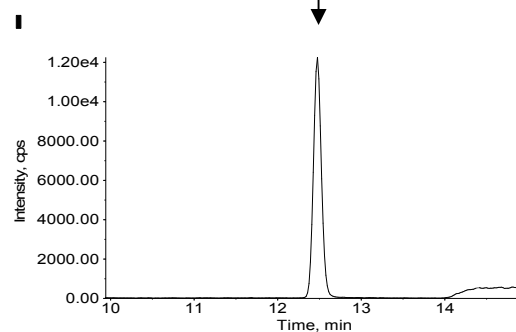
ブランク試料



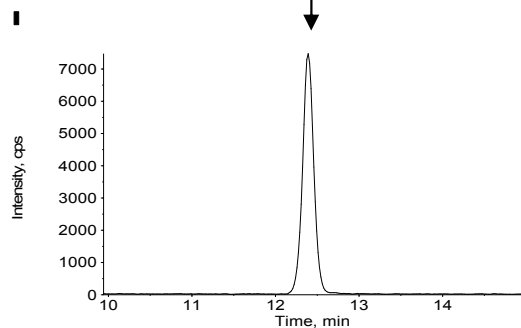
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

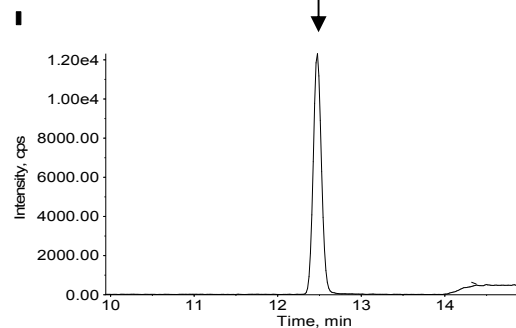
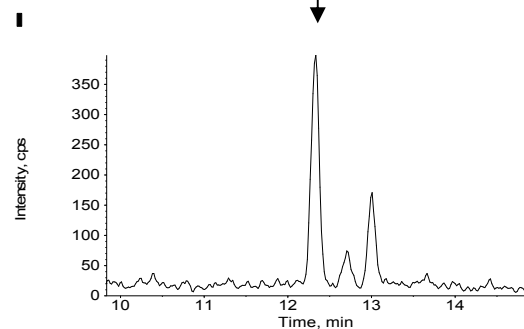


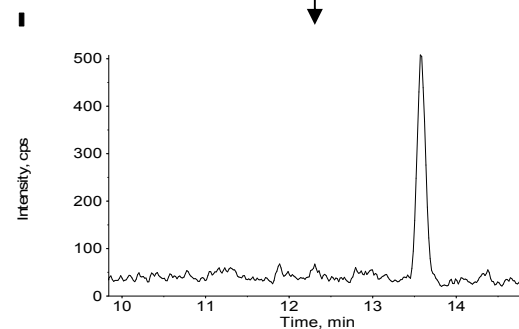
図 30 プロスルホカルブの SRM クロマトグラム
($m/z=252 \rightarrow 91$)
試料中 0.01 ppm 相当 (オレンジ)

図 31 プロスルホカルブの SRM クロマトグラム
($m/z=252 \rightarrow 91$)
試料中 0.01 ppm 相当 (りんご)

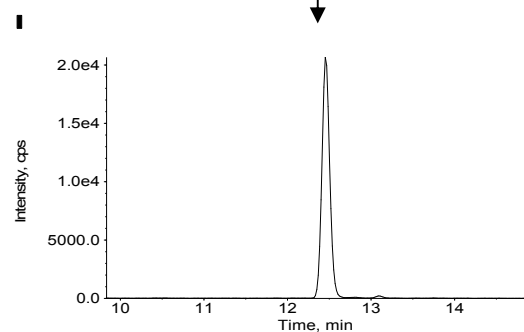
ブランク試料



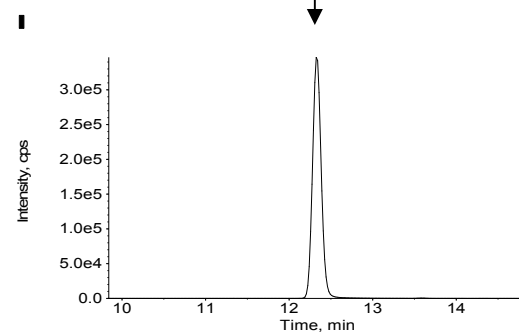
ブランク試料



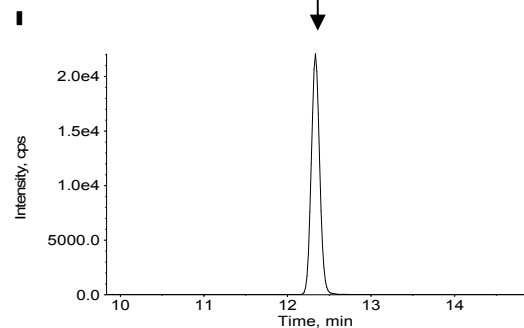
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

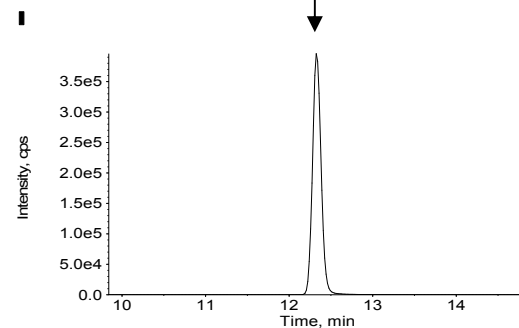
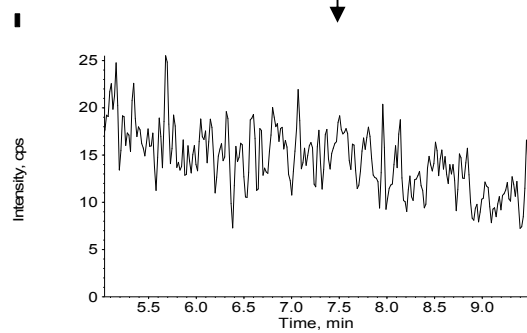


図 32 プロスルホカルブの SRM クロマトグラム
($m/z=252 \rightarrow 91$)
試料中 0.01 ppm 相当 (茶)

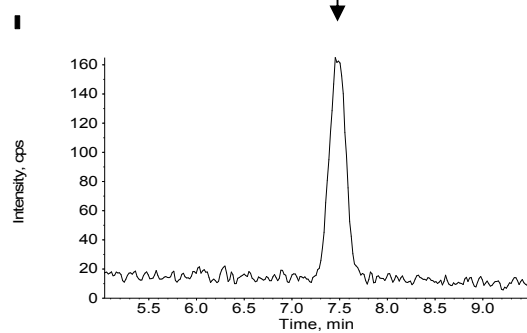
図 33 プロスルホカルブの SRM クロマトグラム
($m/z=252 \rightarrow 91$)
試料中 0.5 ppm 相当 (コリアンダー (コエンドロ) の種子)

②定量下限の推定における代表的なクロマトグラム(定量限界相当濃度)

ブランク試料



添加試料



標準溶液

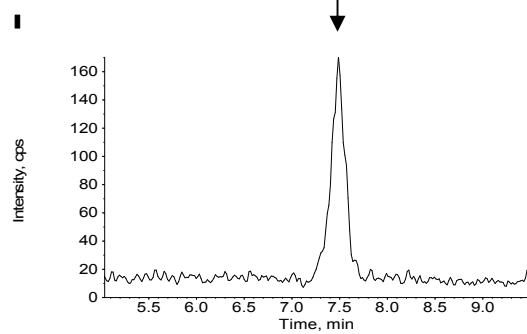
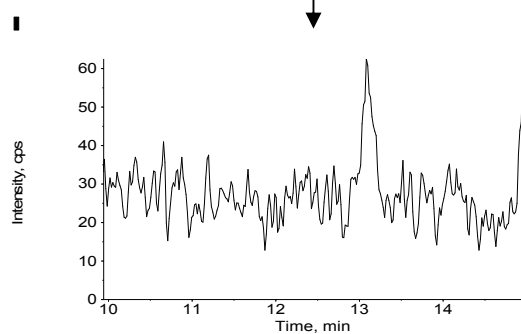
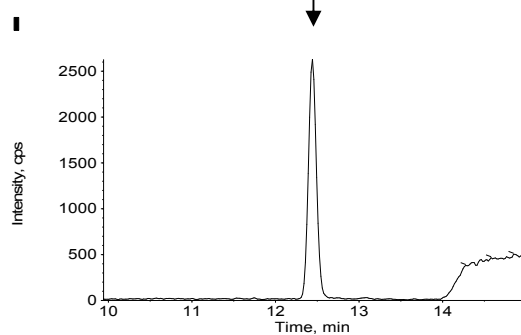


図 34 イソチアニルの SRM クロマトグラム
($m/z=296 \rightarrow 152$)
試料中 0.002 ppm 相当 (玄米)

ブランク試料



添加試料



標準溶液

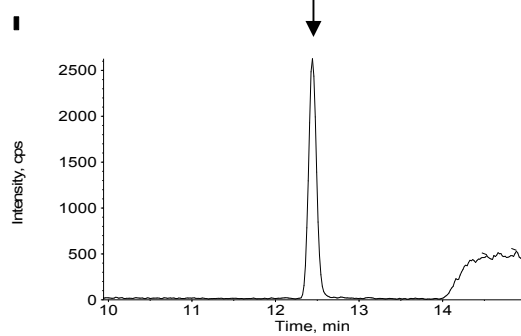
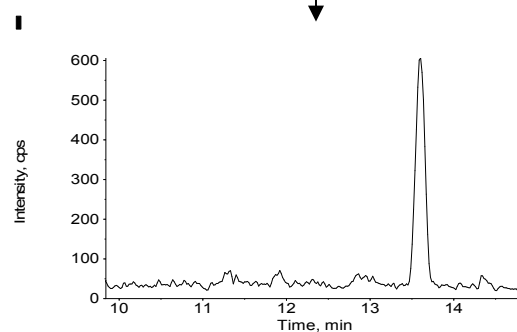
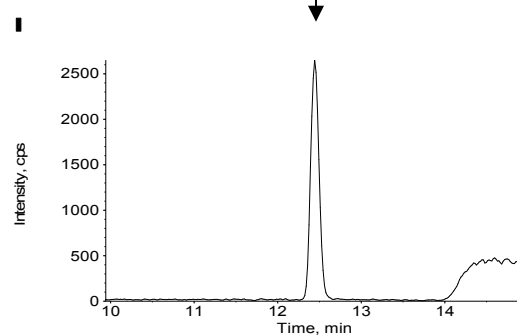


図 35 プロスルホカルブの SRM クロマト
グラム
($m/z=252 \rightarrow 91$)
試料中 0.002 ppm 相当 (ばれいしょ)

ブランク試料



添加試料



標準溶液

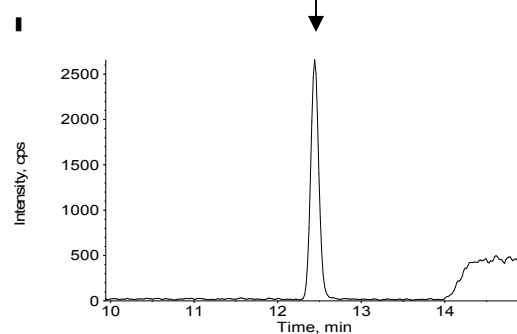


図 36 プロスルホカルブの SRM クロマト
グラム
($m/z=252 \rightarrow 91$)
試料中 0.002 ppm 相当 (コリアンダー (コエ
ンドロ) の種子)

③ ブランク試料の代表的な全イオン電流クロマトグラム

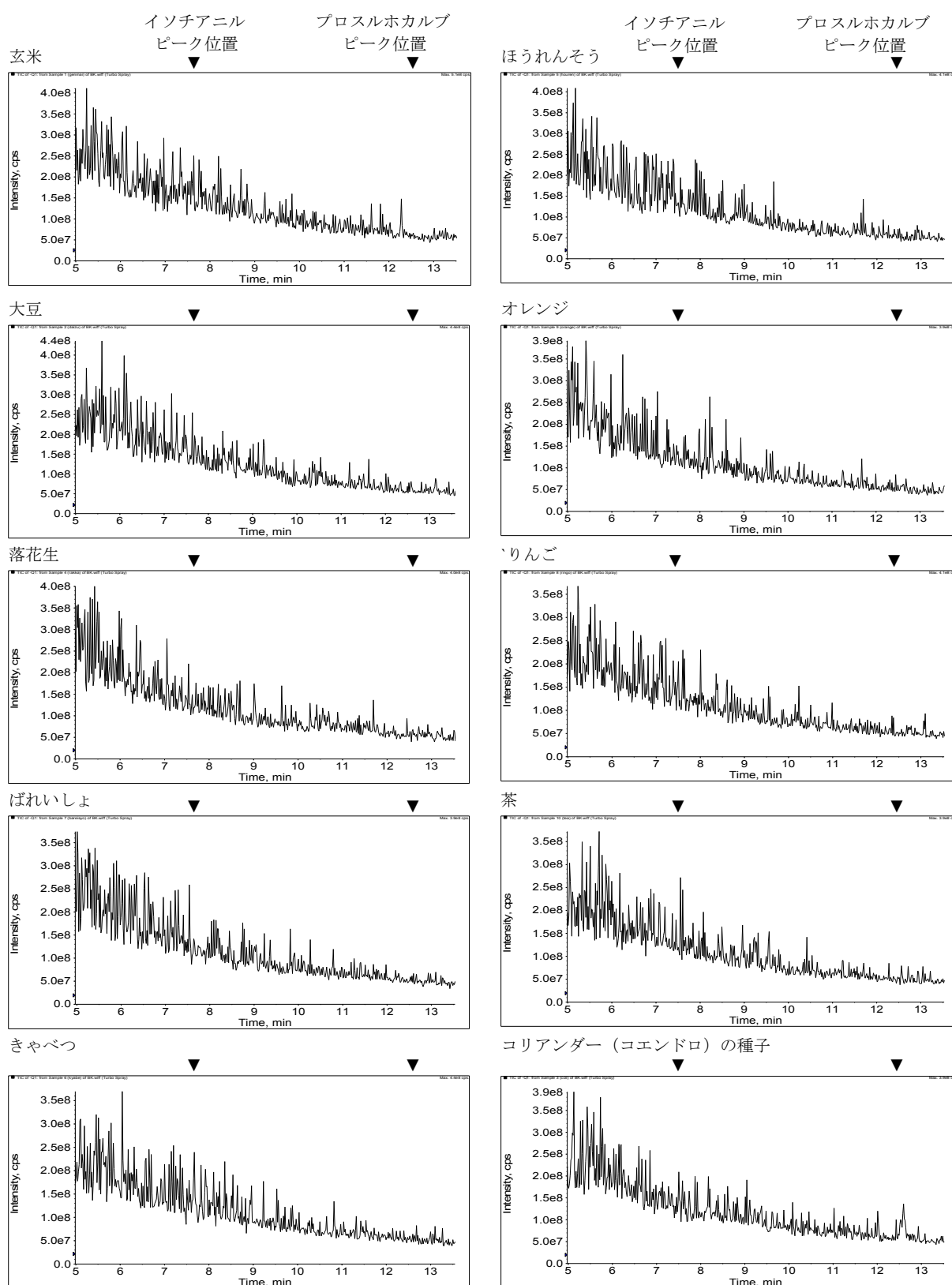


図 37 ブランク試料の全イオン電流クロマトグラム(ESI-)
(スキャン範囲：100～1000 amu)

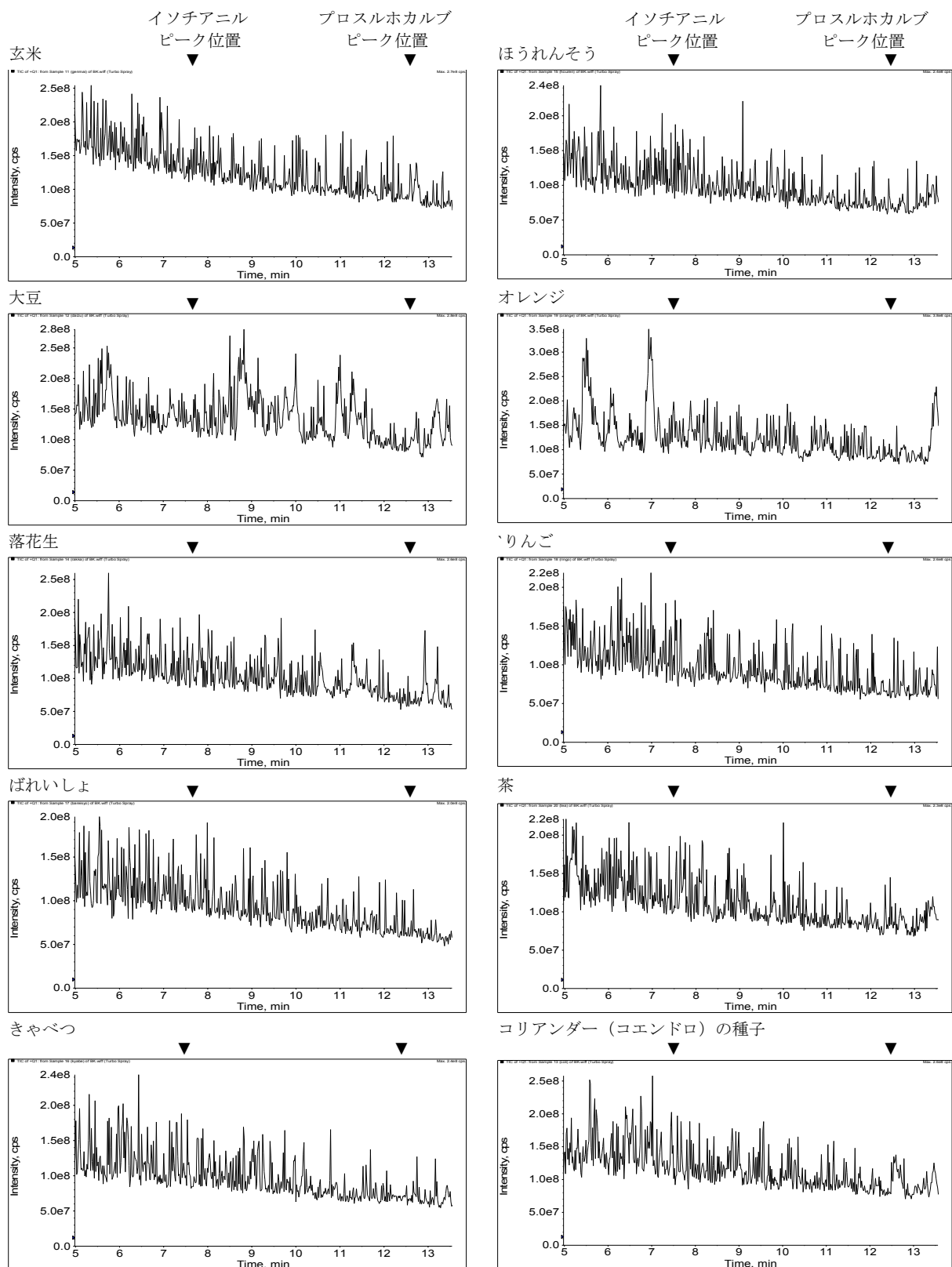


図 38 ブランク試料の全イオン電流クロマトグラム(ESI+)
(スキャン範囲：100～1000 amu)

4. その他の試験法検討に関連する事項

(1) アセトニトリル/ヘキサン分配について

チオカルバメート系農薬の通知試験法⁵⁾で試料の種類に関係なくアセトニトリル/ヘキサン分配を適用していた（油脂をほとんど含まない試料では省略可能）ことから、穀類、豆類及び種実類以外の試料へのアセトニトリル/ヘキサン分配の適用を検討した。図 39～44 にオレンジで検討した例を記載した。プロスルホカルブのピークの手前に溶出してくる隣接ピークが半減し、確認イオンの方ではバックグラウンドが下がりノイズ低減が観察された。添加回収試験を行った 10 食品においてオレンジ以外では妨害ピークは確認されなかったが、茶試料において着色が低下する等の効果もあり試験法開発時には全ての試料においてアセトニトリル/ヘキサン分配を適用した。しかし、全ての試料においてアセトニトリル/ヘキサン分配を行うと操作が煩雑になるため、脂肪分を含まない試料では妨害ピーク等の試験への影響がなければ必ずしも行う必要はない旨留意事項に記載した。

アセトニトリル/ヘキサン分配無

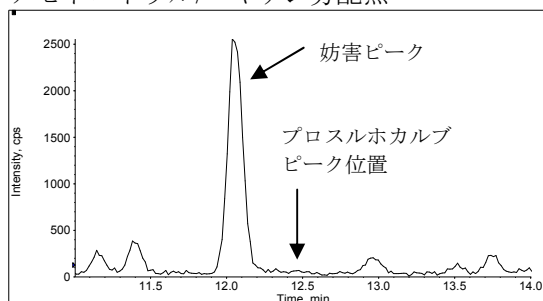


図 39 プロスルホカルブの SRM クロマトグラム ($m/z=252 \rightarrow 91$)
無添加試料 (オレンジ)

アセトニトリル/ヘキサン分配有

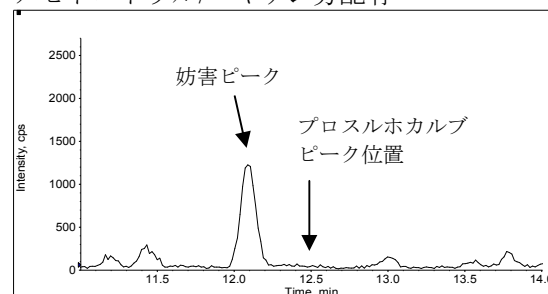


図 40 プロスルホカルブの SRM クロマトグラム ($m/z=252 \rightarrow 91$)
無添加試料 (オレンジ)

アセトニトリル/ヘキサン分配無

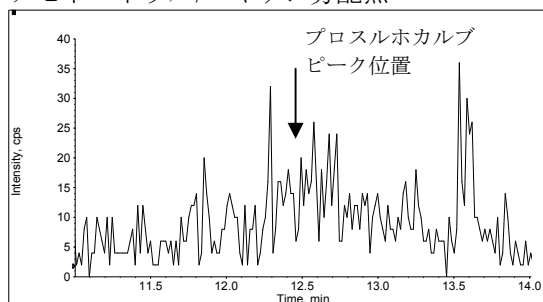


図 41 プロスルホカルブの SRM クロマトグラム ($m/z=252 \rightarrow 128$)
無添加試料 (オレンジ)

アセトニトリル/ヘキサン分配有

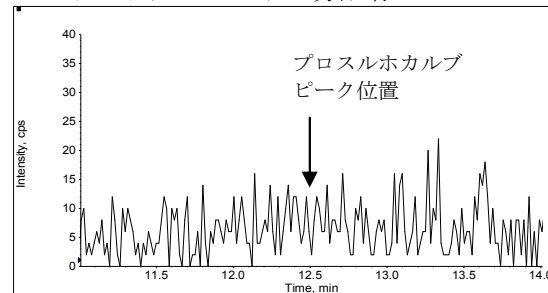


図 42 プロスルホカルブの SRM クロマトグラム ($m/z=252 \rightarrow 128$)
無添加試料 (オレンジ)

(2) グラファイトカーボンミニカラムによる精製の検討

Envi-carb (250 mg/6 mL) ミニカラムをアセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液でコンディショニングした後、アセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液で調製した標準溶液 0.01 mg/L を 1 mL 添加し、さらにアセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液を 10 mL ずつ 50 mL まで流し、各溶出画分を測定した検討結果を表 17 に示す。画分は 40℃以下で濃縮して溶媒を除去後、残留物をメタノールに溶かし 1 mL とし、LC-MS/MS で測定した。

プロスルホカルブは Envi-carb (250 mg/6 mL) からアセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液を 20 mL でほぼ 100%の回収率を得られた。イソチアニルは Envi-carb (250 mg/6 mL) から徐々に溶出する傾向にあり、アセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液を 50 mL 流しても回収率の累計は 60%であった。Envi-carb (250 mg/6 mL) からのイソチアニルの溶出が遅く、多量のアセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液が必要なことが予測されるため、グラファイトカーボンミニカラムを使用した更なる精製操作は行わないこととした。

表 17 グラファイトカーボンミニカラムの検討結果

物質名	溶出液量 (mL)	回収率 (%)	回収率累計 (%)
イソチアニル	0-10	0.0	0.0
	11-20	10.8	10.8
	21-30	22.1	32.9
	31-40	12.4	45.3
	41-50	14.7	60.0
プロスルホカルブ	0-10	95.4	95.4
	11-20	9.1	104.5
	21-30	0.0	104.5
	31-40	0.0	104.5
	41-50	0.0	104.5

5. 考察

グラファイトカーボンミニカラムによる精製を検討するに当たっては、通知法「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)」³⁾ の精製法を参考にして、溶出液にアセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液を使用した。この結果、イソチアニルの溶出にはアセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液が 50 mL 以上必要であり、あまり効率的ではなかったため、本試験法においては通知法の適用とグラファイトカーボンミニカラムによる精製は行わなかった。

イソチアニルについては通知法のチフルザミドの試験法⁴⁾を参考にして、合成ケイ酸マグネシウムミニカラムによる精製法の検討を行った。この結果イソチアニル及びプロスルホカルブの両物質について良好な回収率を得られたが、試料によってはプロスルホカルブのバックグラウンドが若干高くなるが、このため、通知法のチオカーバメート系農薬の試験法⁴⁾を参考にして、アセトニトリル/ヘキサン分配による脱脂操作を全ての試料に適用し、バックグラウンドの低減を図った。

添加回収試験の最も低い添加濃度が 0.01 mg/kg であったため、70~120%の回収を確保できる最低濃度として、イソチアニル及びプロスルホカルブの定量下限を 0.01 mg/kg に設定した。

開発した方法を用いて、玄米等 10 食品の添加回収試験を行った結果、本試験法は野菜類、果実類、茶、穀類・豆類・種実類等の農産物に適用可能であると判断された。

[結論]

農産物中のイソチアニル及びプロスルホカルブ試験法として、イソチアニル及びプロスルホカルブを試料からアセトンで抽出し、*n*-ヘキサンに転溶後、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂し、合成ケイ酸マグネシウムミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認する方法を開発した。開発した試験法を玄米、大豆、落花生、ばれいしょ、きゃべつ、ほうれんそう、オレンジ、りんご、茶及びコリアンダー (コエンドロ) の種子の 10 食品に適用した結果、イソチアニルでは真度 94~101%、併行精度 1~4%、プロスルホカルブでは真度は 91~100%、併行精度 2~5%の良好な結果が得られた。また、定量限界として、0.01 mg/kg を設定可能であることが確認された。

[参考文献]

- 1) イソチアニル農薬抄録
<http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/isotianil/index.htm>
- 2) プロスルホカルブ農薬抄録
<http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/prosulfocarb/index.htm>
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 食安発第 0124004 号「LC/MS による農薬等の一斉試験法Ⅰ（農産物）」（平成 17 年 1 月 24 日）
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 食安発第 0124004 号「カフェンストロール、ジフェノコナゾール、シプロコナゾール、シメトリン、チフルザミド、テトラコナゾール、テブコナゾール、トリアジメノール、フルジオキシニル、プロピコナゾール、ヘキサコナゾール及びペンコナゾール試験法（農産物）」（平成 17 年 1 月 24 日）