

ジチオカルバメート試験法（農産物及び畜水産物）

1. 分析対象化合物

ジネブ
ジラム
チラム
ニッケルビス（ジチオカーバメート）
フェルバム
プロピネブ
ポリカーバメート
マンコゼブ
マンネブ

2. 適用食品

農産物
畜水産物

3. 装置

ガスクロマトグラフ・質量分析計（GC-MS）

4. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

システイン-エチレンジアミン四酢酸溶液（以下「システイン-EDTA溶液」という。） L-システイン塩酸塩一水和物50 g及びエチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物50 gを約500 mLの水に溶かし、12 mol/L水酸化ナトリウム溶液でpH 9.6～10.0に調整した後、水を加えて1,000 mLとする（用時調製）。

メチル化溶液 *n*-ヘキサン792 mL及びアセトン108 mLの混液にヨウ化メチル6 mLを加える。

硫酸水素テトラブチルアンモニウム溶液 硫酸水素テトラブチルアンモニウム27.2 gを水に溶解し200 mLとする。

ジラム標準品 本品はジラム 96%以上を含む。

プロピネブ標準品 本品はプロピネブ 75%以上を含む。

マンネブ標準品 本品はマンネブ 75%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 穀類、豆類、種実類及び畜水産物の場合

試料 10.0 g（しじみなどの一個体が小さいものは、試料を正確に量り、重量比で等量のシステイン-EDTA 溶液を加え磨砕均一化した後、試料 10.0 g に相当する量を量り採る。）にシステイン-EDTA 溶液 100 mL（しじみなどの場合は 90 mL）及びジクロロメタ

ン 50 mL を加え、ホモジナイズした後、毎分 2,500 回転で 5 分間遠心分離を行う。システイン-EDTA 層を採った後、残留物にシステイン-EDTA 溶液 50 mL を加えてホモジナイズし、上記と同様に遠心分離を行い、システイン-EDTA 層を合わせる。これに硫酸水素テトラブチルアンモニウム溶液 10 mL を加え、6 mol/L 塩酸で pH 7.5~7.7 に調整し、水を加えて正確に 200 mL とする。

② 果実及び野菜の場合

試料約 1 kg を精密に量り、システイン-EDTA 溶液 1 kg を加え、ホモジナイズした後、試料 20.0 g に相当する量を量り採る。

これにシステイン-EDTA 溶液 80 mL 及びジクロロメタン 50 mL を加え、ホモジナイズした後、毎分 2,500 回転で 5 分間遠心分離を行う。システイン-EDTA 層を採った後、残留物にシステイン-EDTA 溶液 50 mL を加えてホモジナイズし、上記と同様に遠心分離を行い、システイン-EDTA 層を合わせる。これに硫酸水素テトラブチルアンモニウム溶液 10 mL を加え、6 mol/L 塩酸で pH 7.5~7.7 に調整し、水を加えて正確に 200 mL とする。

③ 茶の場合

試料 5.00 g にシステイン-EDTA 溶液 100 mL 及びジクロロメタン 50 mL を加え、ホモジナイズした後、毎分 2,500 回転で 5 分間遠心分離を行う。システイン-EDTA 層を採った後、残留物にシステイン-EDTA 溶液 50 mL を加えてホモジナイズし、上記と同様に遠心分離を行い、システイン-EDTA 層を合わせる。これにシステイン-EDTA 溶液を加えて正確に 200 mL とする。この溶液を正確に 40 mL 分取し、システイン-EDTA 溶液 110 mL 及び硫酸水素テトラブチルアンモニウム溶液 10 mL を加え、6 mol/L 塩酸で pH 7.5~7.7 に調整し、水を加えて正確に 200 mL とする。

2) メチル化

1) で得られた溶液を正確に 20 mL 分取し、塩化ナトリウム 4 g を加え溶解する。この溶液を多孔性ケイソウ土カラム (20 mL 保持用) に注入し 10 分間放置した後、カラム先端にコックを開放した状態で付け、メチル化溶液 60 mL をカラムに注入する。コック先端より液滴が落ち始めたら 1 mL/分の流速となるようにコックを調節し流下する。アセトン及びジエチレングリコール (99:1) 混液 0.5 mL を加え、40°C以下で約 2 mL に濃縮し、この溶液にアセトン 5 mL を加える。

3) 精製

中性アルミナミニカラム (1,710 mg) にアセトン 5 mL を注入し、流出液は捨てる。このカラムに 2) で得られた溶液を注入した後、アセトン 20 mL を注入し、溶出液にアセトン及びジエチレングリコール (99:1) 混液 0.5 mL を加え、40°C以下で約 2 mL に濃縮し、更に窒素を吹き付けて溶媒を除去する。この残留物をアセトンに溶解し、穀類、豆類、種実類及び畜水産物の場合は正確に 2 mL、果実及び野菜の場合は正確に 4 mL、茶の場合は正確に 2 mL としたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

ジラム、プロピネブ及びマンネブ標準品各 5 mg (二硫化炭素として) を正確に量り採り、それぞれシステイン-EDTA 溶液に溶解して正確に 50 mL としたものを標準原液 (100 mg/L) とする。システイン-EDTA 溶液 150 mL に各標準原液 1 mL 及び硫酸水素テトラブチルアンモニウム溶液 10 mL を加え、6 mol/L 塩酸で pH 7.5~7.7 に調整し、水を加えて正確に 200 mL とする。この溶液を正確に 20 mL 分取し、5. 2) と同様に操作して得られた溶液をアセトンで希釈し、各農薬の混合溶液 (アセトン) を数点調製する。それぞれ GC-MS に注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。

ジメチルジチオカルバミン酸メチル (以下「DMDC」という。) に変換して測定するジラム、チラム、ニッケルビス (ジチオカーバメート) 及びフェルバムは、ジラムを標準品として定量する。エチレンビスジチオカルバミン酸ジメチル (以下「EBDC」という。) に変換して測定するジネブ、マンコゼブ及びマンネブは、マンネブを標準品として定量する。プロピレンビスジチオカルバミン酸ジメチル (以下「PBDC」という。) に変換して測定するプロピネブはプロピネブを標準品として定量する。DMDCとEBDCに変換して測定するポリカーバメートは、それぞれジラム及びマンネブを標準品として定量する。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合、茶以外では試料中0.01 mg/kg (二硫化炭素として) に相当する試験溶液中濃度は0.005 mg/L (二硫化炭素として) であり、茶では試料中0.1 mg/kg (二硫化炭素として) に相当する試験溶液中濃度は0.005 mg/L (二硫化炭素として) である。

7. 定量

試験溶液を GC-MS に注入し、6. の検量線でそれぞれ二硫化炭素としての含量を求める。

8. 確認試験

GC-MS により確認する。

9. 測定条件

(例)

1) 定量用

カラム : 50%フェニル-メチルシリコン 内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m

カラム温度 : 70°C (2分) -20°C/分-280°C

注入口温度 : 240°C

キャリアーガス : ヘリウム

イオン化モード (イオン化エネルギー) : EI (70 eV)

主なイオン (*m/z*) : DMDC 135、88

PBDC 158

EBDC 144

注入量 : 2 μ L

保持時間の目安 : DMDC 8分

PBDC 9分

EBDC 9分

2) 確認用

① DMDC又はEBDCの場合

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

カラム温度：60 $^{\circ}\text{C}$ (2分) -20 $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ -120 $^{\circ}\text{C}$ -10 $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ -160 $^{\circ}\text{C}$ -20 $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ -280 $^{\circ}\text{C}$

注入口温度：240 $^{\circ}\text{C}$

キャリアーガス：ヘリウム

イオン化モード (イオン化エネルギー) : EI (70 eV)

主なイオン (m/z) : DMDC 135、88

EBDC 144

注入量：2 μL

保持時間の目安：DMDC 8分

EBDC 9分

② PBDCの場合

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

カラム温度：60 $^{\circ}\text{C}$ (3分) -20 $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ -120 $^{\circ}\text{C}$ -10 $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ -160 $^{\circ}\text{C}$ -20 $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ -280 $^{\circ}\text{C}$

注入口温度：240 $^{\circ}\text{C}$

キャリアーガス：ヘリウム

イオン化モード (イオン化エネルギー) : EI (70 eV)

主なイオン (m/z) : PBDC 158

注入量：2 μL

保持時間の目安：PBDC 11分

10. 定量限界

ジネブ、ジラム、チラム、ニッケルビス (ジチオカーバメート)、フェルバム、プロピネブ、ポリカーバメート、マンコゼブ及びマンネブ

二硫化炭素として各 0.01 mg/kg (茶の場合は各 0.1 mg/kg)

11. 留意事項

1) 試験法の概要

ジチオカルバメートを試料からジクロロメタン存在下でシステイン-EDTA 溶液で抽出する。抽出液を多孔性ケイソウ土カラムに負荷し、カラムにメチル化溶液を流下して、カラム内で各分析対象化合物を DMDC、EBDC 又は PBDC に変換した後、GC-MS で定量及び確認する方法である。なお、ジラム、プロピネブ及びマンネブ標準品の混合溶液について試験溶液と同様にメチル化を行ったもので検量線を作成して定量し、その総和を試料中の二硫化炭素の含量として求めこれを分析値とする。なお、各分析対象化合物と測定対象化合物の関係を下表に示した。

分析対象化合物	測定対象化合物
ジラム	DMDC
チラム	
ニッケルビス (ジチオカーバメート)	
フェルバム	

ジネブ	EBDC
マンコゼブ	
マンネブ	
プロピネブ	PBDC
ポリカーバメート	DMDC及びEBDC

2) 注意点

- ① システイン-EDTA 溶液のみの抽出では、畜水産物の固体試料において抽出溶媒と試料が十分に混和されない可能性があるため、ジクロロメタンを同時に加えて抽出及び洗浄を行うこととした。
- ② ジメチルジチオカルバメート系農薬に類似する化合物がゴム加硫促進剤として使用されているため、試料調製や分析操作中に混入する可能性があり、注意が必要である。
- ③ DMDC、EBDC 及び PBDC の GC-MS 測定で、試験法開発時に使用したイオンを以下に示す。
 定量イオン (m/z) : DMDC 88、EBDC 144、PBDC 158
 定性イオン (m/z) : DMDC 135
- ④ メチラムについては、本試験法により、メチル化 (EBDC への変換) ができないため分析できない。ただし、本法により試験を行い、各食品のジチオカルバメートの基準値を超える場合には、食品衛生法における規格基準に適合しないと判断して差し支えない。
- ⑤ 試験法開発時には、プロピネブ標準品及びマンネブ標準品は高純度の標準品が入手できなかったため、4. 試薬、試液ではそれぞれ「プロピネブ標準品 本品はプロピネブ 75%以上を含む。」及び「マンネブ標準品 本品はマンネブ 75%以上を含む。」とされたが、入手可能な場合には純度 95%以上の標準品を試験に用いることが望ましい。
- ⑥ 試験法開発時に検討した食品
 農産物: 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、かぼちゃ、カカオ豆及び茶
 畜水産物: 牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳、鶏卵、さけ、うなぎ、しじみ、えび及びはちみつ

12. 参考文献

木船信行ら、食品衛生学雑誌、36、p.244-251 (1995)

13. 類型

C