

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試験法 (農産物及び畜水産物)

1. 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

2. 適用食品

農産物
畜水産物

3. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計 (LC-MS/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。

L-アスコルビン酸ナトリウム L-アスコルビン酸ナトリウム (特級)

カルベンダジム標準品 本品はカルベンダジム98%以上を含む。

チオファネート標準品 本品はチオファネート98%以上を含む。

チオファネートメチル標準品 本品はチオファネートメチル99%以上を含む。

ベノミル標準品 本品はベノミル97%以上を含む。

エチル2-ベンズイミダゾールカルバマート (以下「EBC」という。) 標準品 本品はEBC98%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 穀類、豆類、種実類及びホップの場合

試料10.0 g (ホップは5.00 g) にL-アスコルビン酸ナトリウム1 g及び水20 mLを加え、30分間放置する。これにメタノール100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。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、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせて、メタノールで正確に200 mLとする。

② 果実及び野菜の場合

試料を正確に量り、重量比で1/20量のL-アスコルビン酸ナトリウムを加え、磨砕均一化した後、試料20.0 gに相当する量を量り採り、メタノール100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にメタノール50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせて、メタノールで正確に200 mLとする。

③ 抹茶の場合

試料5.00 gにL-アスコルビン酸ナトリウム1 g及び水20 mLを加え、30分間放置する。これにメタノール100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。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、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせて、メタノールで正確に200 mLとする。この溶液から正確に1 mLを分取し、メタノールで正確に10 mLとする。

④ 抹茶以外の茶の場合

試料9.00 gに100°Cの水540 mLを加え、室温で5分間放置した後、ろ過する。冷後、ろ液3 mLを採り、メタノールで正確に10 mLとする。

⑤ 筋肉、脂肪、肝臓、腎臓、乳、卵及び魚介類の場合

試料10.0 gにL-アスコルビン酸ナトリウム1 gを加える。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1/20量のL-アスコルビン酸ナトリウムを加え、磨砕均一化した後、試料10.0 gに相当する量を量り採る。

これにメタノール100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。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、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせて、メタノールで正確に200 mLとする。

⑥ はちみつの場合

試料10.0 gに水10 mLを加える。これに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、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。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、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせて、メタノールで正確に200 mLとする。

2) 閉環反応

1) で得られた溶液を正確に1 mL (抹茶及び抹茶以外の茶の場合は正確に2 mL) 分取し、酢酸及び水 (1 : 1) 混液10 mL、酢酸銅 (II) 1水和物0.2 g及び沸騰石を加え、還流冷却器を取り付けて、120°Cで30分間加熱還流した後、放冷する。

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回振とう洗浄する。水層に10 mol/L水酸化ナトリウム溶液 (約10 mL) を加え、pH 6.8から6.9に調整する。酢酸エチル50 mLずつで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。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、ホップ及び抹茶の場合は1 mL) としたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

カルベンダジム標準品及びEBC標準品をそれぞれメタノールに溶解して500 mg/Lとし、標準原液とする。各標準原液を適宜混合してメタノールで希釈した溶液を数点調製し、それぞ

れLC-MS/MSに注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合、試料中0.01 mg/kg (カルベンダジムとして) に相当する試験溶液中濃度は0.00025 mg/Lである。ただし、茶については、本法に従って試験溶液を調製した場合、試料中0.05 mg/kg (カルベンダジムとして) に相当する試験溶液中濃度は0.00025 mg/Lである。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線でカルベンダジム及びEBCの含量を求める。EBCを含むカルベンダジムの含量を求める場合には、次式により求める。

カルベンダジム (EBCを含む) の含量 (ppm) = $A + B \times 0.9317$

A : カルベンダジムの含量 (ppm)

B : EBCの含量 (ppm)

8. 確認試験

LC-MS/MSにより確認する。

9. 測定条件

(例)

カラム : オクタデシルシリル化シリカゲル 内径2.0 mm、長さ150 mm、粒子径5 µm

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。

イオン化モード : ESI (+)

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、132

EBC : プリカーサーイオン206、プロダクトイオン160、134

注入量 : 2 µL

保持時間の目安 : カルベンダジム 7分

EBC 11分

10. 定量限界

0.01 mg/kg (カルベンダジムとして)

ただし、茶については0.05 mg/kg (カルベンダジムとして)

11. 留意事項

1) 試験法の概要

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試料からメタノールで抽出する。この間にベノミルはカルベンダジムに変化する。次いで、酢酸及び酢酸銅溶液中で加熱還流 (閉環反応) し、チオファネートメチルをカルベンダジムに、チオ

ファネートをEBCに変換する。カルベンダジム及びEBCを酸性下で*n*-ヘキサンで洗浄した後、中性下で酢酸エチルで抽出し、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。なお、カルベンダジム及びEBCのそれぞれについて定量を行い、EBCを含むカルベンダジムの含量を求める場合には、EBCの含量に換算係数を乗じてカルベンダジムの含量に換算し、これらの和を分析値とする。分析値は、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、チオフアネート（EBCを含む）をカルベンダジム含量に換算したものと及びチオフア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として求められる。

2) 注意点

- ① 本試験法では、閉環反応前に存在するEBCも合わせて定量されるため、EBCの含量は、閉環反応によりチオフアネートから生成したEBCと閉環反応前に存在するEBCとの和として求められる。
- ② L-アスコルビン酸ナトリウムは分析操作中の酸化分解防止のため添加する。
- ③ 閉環反応における温度制御は、油浴あるいはアルミ製ヒートブロック等を用いて行うことが可能である。
- ④ 閉環反応後のpH調整以降の操作は、回収率の低下が考えられるため短時間で行うことが望ましい。
- ⑤ LC-MS/MS測定で、試験法開発時に使用したイオンを以下に示す。

カルベンダジム

定量イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン 192、プロダクトイオン 160

定性イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン 192、プロダクトイオン 132

EBC

定量イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン 206、プロダクトイオン 160

定性イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン 206、プロダクトイオン 134

- 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、
なす、コーヒー豆及び茶

畜水産物：牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳、鶏の筋肉・卵、さけ、うなぎ、しじみ及び
はちみつ

12. 参考文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 食安発第0315001号「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（農産物）」（平成18年3月15日）
- 2) 農林水産省消費・安全局長通知 19消安第14729号「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）」（平成20年4月1日）

13. 類型

C