

アルジカルブ及びアルドキシカルブ、エチオフエンカルブ、オキサミル、カルバリル、ピリミカーブ、フェノブカルブ並びにベンダイオカルブ試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

農薬等の成分である物質	分析対象化合物
アルジカルブ及びアルドキシカルブ	アルジカルブ、アルジカルブスルホキシド、アルジカルブスルホン
エチオフエンカルブ	エチオフエンカルブ
オキサミル	オキサミル
カルバリル	カルバリル
ピリミカーブ	ピリミカーブ
フェノブカルブ	フェノブカルブ
ベンダイオカルブ	ベンダイオカルブ

2. 装置

ポストカラム反応蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-FL（ポストカラム））
液体クロマトグラフ・質量分析計（LC-MS）

3. 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。

発蛍光液 *o*-フタルアルデヒド10 mg及び2-メルカプトエタノール5 µLに0.05 mol/Lホウ酸ナトリウム溶液を加えて100 mLとする。

リン酸緩衝液 水約800 mLに水酸化ナトリウム1.75 g及びリン酸一ナトリウム11.7 gを加えて溶かした後、水を加え1,000 mLとする。

4. 標準品

アルジカルブ 本品はアルジカルブ99%以上を含む。

融点 本品の融点は98～100℃である。

アルジカルブスルホキシド 本品はアルジカルブスルホキシド96%以上を含む。

融点 本品の融点は100～104℃である。

アルジカルブスルホン 本品はアルジカルブスルホン98%以上を含む。

融点 本品の融点は132～142℃である。

エチオフエンカルブ 本品はエチオフエンカルブ99%以上を含む。

融点 本品の融点は33～34℃である。

オキサミル 本品はオキサミル99%以上を含む。

融点 本品の融点は100～102℃である。

カルバリル 本品はカルバリル99%以上を含む。

融点 本品の融点は138～140℃である。

ピリミカーブ 本品はピリミカーブ99%以上を含む。

融点 本品の融点は90～91℃である。

フェノブカルブ 本品はフェノブカルブ98%以上を含む。

融点 本品の融点は32℃である。

ベンダイオカルブ 本品はベンダイオカルブ99%以上を含む。

融点 本品の融点は129～130℃である。

5. 試験溶液の調製

a 抽出法

[1] 穀類、豆類、果実、野菜、種実類、抹茶及びホップの場合

穀類、豆類及び種実類の場合は、試料20.0 gを量り採り、水100 mLを加え、2時間放置する。

果実及び野菜の場合は、試料20.0 gに相当する量を量り採る。

抹茶及びホップの場合は、試料20.0 gを量り採る。

これにアセトン200 mLを加え、3分間細砕した後、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いてすり合わせ減圧濃縮器中に吸引ろ過する。ろ紙上の残留物を採り、アセトン100 mLを加え、上記と同様に操作して、ろ液をその減圧濃縮器中に合わせ、40℃以下で約20 mLに濃縮する。

これをあらかじめ5%塩化ナトリウム溶液200 mL及びジクロロメタン（特級）100 mLを入れた500 mLの分液漏斗に移し、振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、静置し、ジクロロメタン層を500 mLの三角フラスコに移す。水層にジクロロメタン（特級）100 mLを加え、上記と同様に操作して、ジクロロメタン層を上記の三角フラスコに合わせる。これに適量の無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら15分間放置した後、すり合わせ減圧濃縮器中にろ過する。次いでジクロロメタン（特級）50 mLを用いて三角フラスコを洗い、その洗液でろ紙上の残留物を洗う操作を3回繰り返す。これらの洗液をその減圧濃縮器中に合わせ、40℃以下で約1 mLに濃縮し、更に室温で空気を通じて乾固する。

この残留物に*n*-ヘキサン25 mL及び*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加えて溶かし、これを100 mLの分液漏斗に移す。振とう機を用いて10分間激しく振り混ぜた後、静置し、アセトニトリル層を200 mLの分液漏斗に移す。*n*-ヘキサン層に*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加え、上記と同様の操作を2回繰り返す。アセトニトリル層を

上記の分液漏斗に合わせる。これにアセトニトリル飽和*n*-ヘキサン50 mLを加え、振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、静置し、アセトニトリル層をすり合わせ減圧濃縮器中に移し、40℃以下で約1 mLに濃縮し、更に室温で空気を通じて乾固する。この残留物にメタノールを加えて溶かし、正確に2 mLとする。

[2] 抹茶以外の茶の場合

試料9.00 gを100℃の水540 mLに浸し、室温で5分間放置した後、ろ過し、冷後ろ液360 mLを500 mLの三角フラスコに移す。これに飽和酢酸鉛溶液4 mLを加え、10秒間振り混ぜた後、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過し、ろ液を1,000 mLの分液漏斗に移す。次いでアセトン50 mLを用いて三角フラスコを洗い、その洗液でろ紙上の残留物を洗い、洗液を上記の分液漏斗に合わせる。これにエーテル100 mL及び塩化ナトリウム100 gを加え、振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、静置し、エーテル層を300 mLの三角フラスコに移す。水層にエーテル100 mLを加え、上記と同様に操作して、エーテル層を上記の三角フラスコに合わせる。これに適量の無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら15分間放置した後、すり合わせ減圧濃縮器中にろ過する。次いでエーテル30 mLを用いて三角フラスコを洗い、その洗液でろ紙上の残留物を洗う操作を3回繰り返す。これらの洗液をその減圧濃縮器中に合わせ、40℃以下で約1 mLに濃縮し、更に室温で空気を通じて乾固する。この残留物にメタノールを加えて溶かし、正確に2 mLとする。

b 精製法

a 抽出法で得られた溶液0.3 mLを量り採り、これを希塩酸3 mLに加え、緩やかに振り混ぜた後、孔径0.45 μmのメンブランフィルターを用いてろ過し、これを試験溶液とする。

6. 操作法

a 定性試験

[1] アルジカルブ、アルジカルブスルホキシド、アルジカルブスルホン、エチオフェンカルブ、オキサミル、カルバリル、フェノブカルブ及びベンダイオカルブの試験法を行う場合

次の操作条件で試験を行う。試験結果は標準品と一致しなければならない。

操作条件

カラム オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径5 μm）、内径3.9 mm、長さ150 mm

カラム温度 40℃

検出器 励起波長339 nm、蛍光波長445 nm

移動相 A テトラヒドロフラン B 水 C メタノール アルジカルブが約12分で流出する流速に調整する。

濃度勾配 水及びメタノールの混液 (22 : 3) を0.1分間送液した後、A : B (1 : 9) から (3 : 7) までの濃度勾配を19.9分間行う。次にテトラヒドロフラン及び水の混液 (3 : 7) を10分間送液した後、水及びメタノールの混液 (22 : 3) を10分間送液する。

加水分解反応槽 移動相に対し、0.05 mol/L水酸化ナトリウム溶液を注入する。注入量を一定に保つ。

加水分解反応槽温度 80℃

蛍光反応槽 移動相に対し、発蛍光液を注入する。注入量を一定に保つ。

[2] ピリミカーブの試験を行う場合

次の操作条件で試験を行う。試験溶液は5. 試験溶液の調製の a 抽出法で得られた溶液を用い、試験結果は標準品と一致しなければならない。

操作条件

カラム オクタデシルシリル化シリカゲル (粒径5 μm)、内径4.0~4.6 mm、長さ250 mm

検出器 励起波長312 nm、蛍光波長382 nm

移動相 水、メタノール及びリン酸緩衝液 (1 : 7 : 2) 混液を用いる。ピリミカーブが 約5分で流出する流速に調整する。

b 定量試験

a 定性試験と同様の操作条件で得られた試験結果に基づき、ピーク高法又はピーク面積法により定量を行う。

ただし、アルジカルブ及びアルドキシカルブにあつては、定性試験と同様の操作条件で得られた試験結果に基づき、アルジカルブ、アルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホンのそれぞれについてピーク高法又はピーク面積法により定量を行い、アルジカルブ、アルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホンの含量を求め、次式により、アルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホンを含むアルジカルブの含量を求める。

アルジカルブ (アルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホンを含む。) の含量

$$(\text{ppm}) = A + B \times 0.9224 + C \times 0.8560$$

A : アルジカルブの含量 (ppm)

B : アルジカルブスルホキシドの含量 (ppm)

C : アルジカルブスルホンの含量 (ppm)

c 確認試験

次の操作条件で液体クロマトグラフィー・質量分析を行う。試験溶液は5. 試験溶液の調製の a 抽出法で得られた溶液を用い、試験結果は標準品と一致しなければならない。また、必要に応じ、ピーク高法又はピーク面積法により定量を行う。

操作条件

カラム オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径3～5 μm）、内径2.0～4.6 mm、長さ75～150 mm

カラム温度 50℃

移動相 A 水及びメタノール（9：1）混液、B 水及びメタノール（1：9）混液

濃度勾配 A：B（9：1）を0.1分間送液した後、A：B（9：1）から（1：3）までの濃度勾配を24.9分間行う。次にA：B（1：3）から（0：1）までの濃度勾配を5分間おこなった後、A：B（9：1）を5分間送液する。

イオン化モード ESI（+）

主なイオン (*m/z*) アルジカルブ 213、116

アルジカルブスルホキシド 207、132

アルジカルブスルホン 223

エチオフェンカルブ 226

オキサミル 237

カルバリル 202、145

ピリミカーブ 239

フェノブカルブ 208

ベンダイオカルブ 224

7. 定量限界

アルジカルブ 0.005 mg/kg

アルジカルブスルホキシド 0.005 mg/kg

アルジカルブスルホン 0.005 mg/kg

エチオフェンカルブ 0.005 mg/kg

オキサミル 0.005 mg/kg

カルバリル 0.01mg/kg

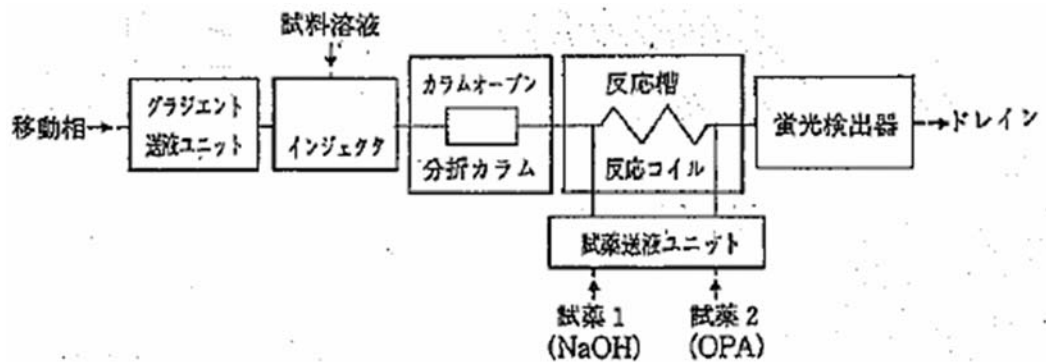
ピリミカーブ 0.005 mg/kg

フェノブカルブ 0.01 mg/kg

ベンダイオカルブ 0.005 mg/kg

8. 留意事項

1) ポストカラム蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ装置の構成は下図の通りであること。



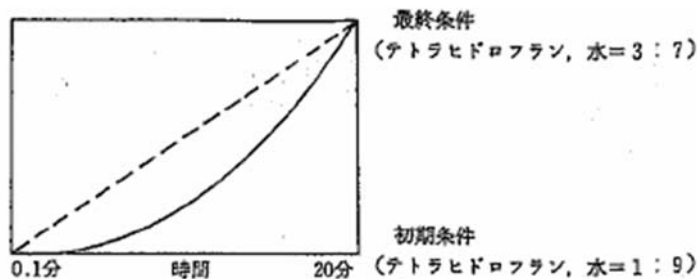
2) かんきつ類の果肉等酸性の強い検体を対象としてピリミカーブを同時に抽出するとき、炭酸水素ナトリウム約5gを加えることにより抽出率が向上できること。

3) アセトニトリル/ヘキサン分配は、油脂等をほとんど含まない試料では省略することができる。

4) メンブランフィルターは、種類によって測定対象物質が吸着されることがあるので、回収できることを確認して使用する。

5) 操作条件は、機種、カラムの種類等により異なる。アルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホンは溶出が早いことから、オキサミルや他の成分と誤認しないよう留意する。

6) 6. 操作法の a 定性試験の濃度勾配は、下図の曲線を参考にする。



7) 6. 操作法の c 確認試験におけるアルジカルブの主なイオンのうち m/z 213は $[M+Na]^+$ である。

8) 妨害成分の多い試料では、グラファイトカーボンミニカラム (250 mg)、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) 及びトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) による精製を加えるとよい。

操作概要：グラファイトカーボンミニカラム (250 mg)、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) 及びトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) それぞれにアセトン30 mL、*n*-ヘキサン 20 mLを注入し、流出液を捨て、上からグラファイトカーボンミニカラム (250 mg)、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) 及びトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) の順に連結する。試料抽出液の0.5 mLを採り、窒素気流下でメタノ

ールを除去し、アセトン及び*n*-ヘキサンの混液（1：4）0.5 mLに溶解して、先の連結カラムに注入する。アセトン及び*n*-ヘキサンの混液（1：4）20 mLを注入し、0.5 mL/分の速さで流出させ、溶出液を採る。次いで、グラファイトカーボンミニカラム（250 mg）及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）をはずし、トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）にアセトン及び*n*-ヘキサンの混液（3：7）10 mLを注入し、溶出液を合わせ、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0.5 mLに溶解する。

9) 測定機器及び食品の種類によっては、5. 試験溶液の調製の a 抽出法で得られた溶液を、必要に応じて8) に示したミニカラム精製を行った後、LC/MSにより直接分析し、定量することも可能であるが、食品由来の成分の影響をうける場合があるので、予め適用可能であることを確認してから採用する必要がある。

10) アルジカルブスルホンは、アルドキシカルブと同一の化合物である。

9. 参考文献

永山ら、食品衛生学雑誌、35、470（1994）

小林ら、食品衛生学雑誌、43、133（2002）

10. 類型

C