

## アルジカルブ、アルジカルブスルホキシド、アルドキシカルブ、エチオフェンカルブ、オキサミル、カルバリル、ピリミカーブ、フェノブカルブ及びベンダイオカルブ試験法

### 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	アルジカルブ
<u>アルジカルブスルホキシド</u>	<u>アルジカルブスルホキシド</u>
<u>アルドキシカルブ</u>	<u>アルジカルブスルホン</u>
エチオフェンカルブ	エチオフェンカルブ
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 0.05mol/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°C 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°C 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°C である。

エチオフェンカルブ 本品はエチオフェンカルブ 99%以上 を含む。

融点 本品の融点は 33~34°C 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°C 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°C 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°C 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°C

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°C

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。

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°C

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 (+)

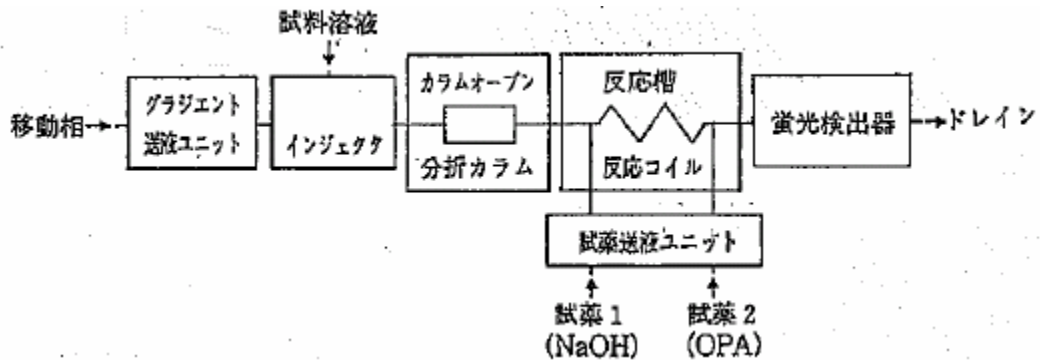
主なイオン ( <i>m/z</i> )	<u>アルジカルブ 213、116</u>
	<u>アルジカルブスルホキシド 207、132</u>
	<u>アルジカルブスルホン 223</u>
	<u>エチオフェンカルブ 226</u>
	<u>オキサミル 237</u>
	<u>カルバリル 202、145</u>
	<u>ピリミカーブ 239</u>
	<u>フェノブカルブ 208</u>

7. 定量限界

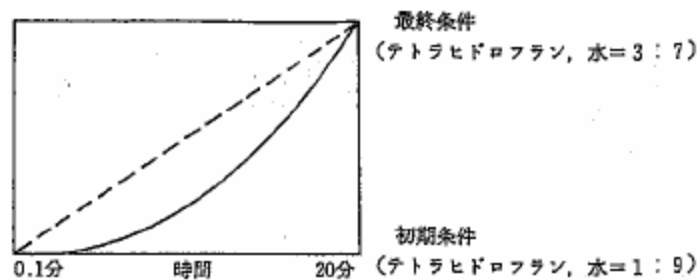
- アルジカルブ 0.005 mg/kg
- アルジカルブスルホキシド 0.005 mg/kg
- アルジカルブスルホン 0.005 mg/kg
- エチオフェンカルブ 0.005 mg/kg
- オキサミル 0.005 mg/kg
- カルバリル 0.01mg/kg
- ピリミカーブ 0.005 mg/kg
- フェノブカルブ 0.01 mg/kg
- ベンダイオカルブ 0.005 mg/kg

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は、炭酸水素ナトリウム約5 g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℃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。

## 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