

5 飼料中のカルベンダジム, チオファネート, チオファネートメチル及びベノミルの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法

堀米 明日香^{*1}, 野崎 友春^{*2}

Determination of Carbendazim, Thiophanate, Thiophanate-methyl and Benomyl in Feed by LC-MS

Asuka HORIGOME^{*1} and Tomoharu NOZAKI^{*2}

(^{*1} I.A.A. Fertilizer and Feed Inspection Services, Headquarters
(Now the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan),

^{*2} Food and Agricultural Materials Inspection Center (I.A.A.),
Fertilizer and Feed Inspection Department)

An analytical method to determine carbendazim, benomyl and thiophanate-methyl in feed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) was developed. Benomyl and thiophanate-methyl are transformed to carbendazim during analytical procedure and carbendazim, benomyl and thiophanate-methyl are determined as total quantity of carbendazim. Thiophanate in feed was also transformed to ethyl-2-benzimidazole carbamate (EBC) and could be detected in this method.

A spike test resulted in the mean recovery of carbendazim, benomyl, thiophanate-methyl and thiophanate of 94.6~98.3%, 101.4~105.8%, 82.1~84.4% and 57.9~64.2%, respectively.

A collaborative study was conducted with corn spiked with thiophanate-methyl and thiophanate at 1.3 mg/kg respectively, and with timothy spiked with thiophanate-methyl and thiophanate at 20 mg/kg respectively. For corn, the mean recovery of thiophanate-methyl was 87.8%, and the repeatability and reproducibility as the relative standard deviation (RSD_r and RSD_R) were 3.2% and 15% respectively, and the mean recovery of thiophanate was 53.5%. For timothy, these values of thiophanate-methyl were 83.1%, 4.6% and 19% respectively, and those of thiophanate were 41.6%, 4.3% and 26% respectively.

Key words: カルベンダジム carbendazim ; ベノミル benomyl ; チオファネート thiophanate ; チオファネートメチル thiophanate-methyl ; 高速液体クロマトグラフ質量分析計 liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS) ; 飼料 feed ; 共同試験 collaborative study

1 緒 言

ベノミルはデュポン社が開発した浸透性殺菌剤で、菌核病、灰色かび病、フザリウム病害などに対して効果がある。チオファネートメチルは日本曹達が開発した殺菌剤で灰色かび病、菌核病、褐斑病、炭そ病、青かび病、緑かび病などに効果がある。カルベンダジムはベノミル及びチオファネートメチルの代謝分解物であり、日本では1999年に農薬登録が失効している。また、チオファネー

^{*1} 独立行政法人肥飼料検査所本部, 現 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課

^{*2} (独) 農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

ト（チオファネートエチル）は子のう菌，不完全菌などに効果があるが，現在日本での登録はされていない。

平成 18 年 5 月 29 日付けで飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和 51 年農林省令第 35 号）の一部が改正され，これらの農薬については，カルベンダジム，ベノミルをカルベンダジムに換算したもの，チオファネートをカルベンダジムに換算したもの及びチオファネートメチルをカルベンダジムに換算したもの，の総和として基準値が定められた。

本法の検討に先立ち，（財）日本食品分析センターが検討した液体クロマトグラフ質量分析計によるチオファネートメチル，カルベンダジム及びベノミルの残留分析法¹⁾（以下「センター法」）に基づき，最も回収が困難なチオファネートメチルについて共同試験を行った。しかしその結果，必要十分な回収率が得られなかったことから，厚生労働省の分析法²⁾を参考に標準液について次の 2 点について追加検討した。

（1）標準液も閉環反応に供すること

（2）チオファネートメチルの測定にはチオファネートメチル標準液を使用すること

試料の定量操作についてはセンター法をそのまま踏襲した。また，センター法では分析対象となっていないチオファネートについても，省令中の基準値に含まれているため，同一操作でのチオファネートの添加回収試験及び共同試験を行い，本法でチオファネートの定量が可能かあわせて検討した。

なお，本法では操作中に，チオファネートメチル及びベノミルはカルベンダジムに変換されるため，カルベンダジム，チオファネートメチル及びベノミルの三成分をカルベンダジムとして LC-MS で定量した。チオファネートは操作中にエチル-2-ベンゾイミダゾールカルバマート（以下「EBC」）に変換されるため EBC として定量し，厚生労働省の分析法と同様に EBC 量に係数 0.52 を乗じてカルベンダジム量に換算した。

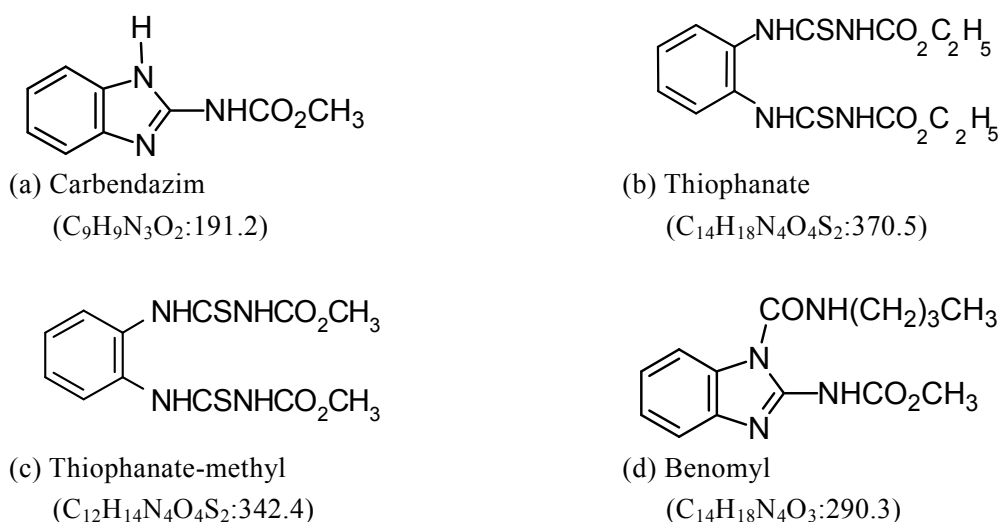


Fig. 1 Structure of carbendazim, thiophanate-ethyl, thiophanate-methyl and benomyl

2 分析方法

2.1 試料

市販の飼料原料（とうもろこし）及び乾牧草（チモシー）をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎し、供試試料とした。

2.2 試薬

1) カルベンダジム標準液

カルベンダジム [$C_9H_9N_3O_2$] (Dr. Ehrenstorfer 製, 純度 99.0%) 10 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ, メタノールを加えて溶かし, 更に標線までメタノールを加えてカルベンダジム標準原液を調製した (この液 1 mL は, カルベンダジムとして 0.1 mg を含有する.) .

使用に際して, この原液の一定量をメタノールで正確に希釈し, 1 mL 中に 20 μ g を含有するカルベンダジム標準液を調製した。

2) チオファネートメチル標準液

チオファネートメチル [$C_{12}H_{14}N_4O_4S_2$] (和光純薬工業製, 純度 99.9%) 10 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ, メタノールを加えて溶かし, 更に標線までメタノールを加えてチオファネートメチル標準原液を調製した (この液 1 mL は, チオファネートメチルとして 0.1 mg を含有する.) .

使用に際して, この原液の一定量をメタノールで正確に希釈し, 1 mL 中に 20 μ g を含有するチオファネートメチル標準液を調製した。

3) チオファネート標準液

チオファネート [$C_{14}H_{18}N_4O_4S_2$] (Dr. Ehrenstorfer 製, 純度 99.0%) 10 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ, メタノールを加えて溶かし, 更に標線までメタノールを加えてチオファネート標準原液を調製した (この液 1 mL は, チオファネートとして 0.1 mg を含有する.) .

使用に際して, この原液の一定量をメタノールで正確に希釈し, 1 mL 中に 20 μ g を含有するチオファネート標準液を調製した。

4) ベノミル [$C_{14}H_{18}N_4O_3$] 標準品

Dr. Ehrenstorfer 製, 純度 97.5% のものを用いた。

5) メタノール, ジクロロメタン, ヘキサン, 酢酸エチル及び硫酸ナトリウム (無水) は残留農薬分析用試薬を用いた。特記している以外の試薬については特級を用いた。

2.3 装置及び器具

1) 液体クロマトグラフ質量分析計: Agilent Technologies 製 1100 Series

2) 振とう機: タイテック製 レシプロシェーカー SR-2W

3) エバポレーター: BÜCHI 製 R-200

4) 高速遠心分離機: 久保田商事製 KM-15200

5) ミニカラム: Varian 製 Bond Elut Jr. PSA

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ, L-アスコルビン酸 0.4 g 及び水 15 mL (乾牧草は 30 mL) を加え, 30 分間放置した後, メタノール 100 mL (乾牧草は 120 mL) を加え, 30 分間振り混ぜて抽出した。300 mL のトールビーカーをブフナー漏斗の下に置き, 抽出液をろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した後, 先の三角フラスコ及び残さをメタノール 50 mL で

洗浄し、洗液をろ液に合わせた。ろ液を 200 mL の全量フラスコに入れ、更に全量フラスコの標線までメタノールを加えて液液分配 I に供する試料溶液とした。

2) 液液分配 I

試料溶液 10 mL (乾牧草にあつては試料溶液 20 mL) を正確に 500 mL の分液漏斗 A に入れ、L-アスコルビン酸 3 g、塩化ナトリウム溶液 (10 w/v%) 150 mL 及びヘキサン 100 mL を加え、5 分間振り混ぜた後静置した。

水層 (下層) を 200 mL のトールビーカーに入れ、水酸化ナトリウム溶液 (4 mol/L 及び 0.4 mol/L) を用いて pH を 6.7~7.1 に調整した。

pH 調整後の水層を 500 mL の分液漏斗 B に移し、ジクロロメタン 100 mL を加え、5 分間振り混ぜた後静置し、ジクロロメタン層 (下層) を 300 mL の共栓三角フラスコに入れた。分液漏斗 B にジクロロメタン 100 mL を加え、5 分間振り混ぜた後静置し、ジクロロメタン層を先の三角フラスコに合わせた。ジクロロメタン層に適量の硫酸ナトリウム (無水) を加えて脱水し、300 mL のなす形フラスコにろ紙 (5 種 B) でろ過した後、先の三角フラスコを少量のジクロロメタンで洗浄し、洗液をろ液に合わせた。

ろ液に酢酸 0.5 mL を加え、40°C 以下の水浴上で約 0.5 mL まで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。メタノール 2 mL を加えて残留物を溶かし、閉環反応に供する試料溶液とした。

3) 閉環反応

試料溶液に酢酸 (1+1) 10 mL、酢酸銅 0.2 g 及び沸石 2~3 個を加え、なす形フラスコに還流冷却器を接続した後、120°C の油浴上で 30 分間加熱した。放冷後、塩酸 (1 mol/L) 10 mL を還流冷却器の上部から加えて管壁を洗浄し、試料溶液に合わせ、液液分配 II に供する試料溶液とした。

4) 液液分配 II

試料溶液を 100 mL の分液漏斗 C に移し、試料溶液の入っていたなす形フラスコを塩酸 (1 mol/L) 20 mL で洗浄し、洗液を試料溶液に合わせた。更に塩化ナトリウム 5 g 及びヘキサン 20 mL を加え、5 分間振り混ぜた後静置し、水層 (下層) を 100 mL の分液漏斗 D に移した。

分液漏斗 D にヘキサン 20 mL を加え、5 分間振り混ぜた後静置した。水層を 100 mL のトールビーカーに入れ、水酸化ナトリウム溶液 (10 mol/L 及び 1 mol/L) を用いて pH を 6.8~6.9 に調整した後、300 mL の分液漏斗 E に移した。

分液漏斗 E に酢酸エチル 50 mL を加え、5 分間振り混ぜた後静置し、水層 (下層) を 300 mL の分液漏斗 F に入れ、酢酸エチル層 (上層) を 200 mL の三角フラスコに入れた。分液漏斗 F に酢酸エチル 50 mL を加え、5 分間振り混ぜた後静置し、水層を捨てた。酢酸エチル層を先の三角フラスコに合わせ、適量の硫酸ナトリウム (無水) で脱水し、200 mL のなす形フラスコにろ紙 (5 種 B) でろ過した。

ろ液を 40°C 以下の水浴上で約 1 mL まで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。酢酸エチル-メタノール (19+1) 5 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理に供する試料溶液とした。

5) カラム処理

ミニカラムを注射筒に連結し、酢酸エチル 5 mL で洗浄した。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、試料溶液を注射筒に入れ、液面がカラムの上端に達するまで流出させた。

試料溶液の入っていたなす形フラスコを酢酸エチル-メタノール (19+1) 5 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、液面がカラムの上端に達するまで流出させた。更に酢酸エチル-メタノール (19+1) 10 mL をミニカラムに加えて、カルベンダジム及び EBC を同様に溶出させた。(この時点までに、チオファネートメチル及びベノミルはカルベンダジムに、チオファネートは EBC に変換されている。)

溶出液を 40°C 以下の水浴上で約 1 mL まで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。水-メタノール (1+1) 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、5,000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフ質量分析に供する試料溶液とした。

6) 標準液の閉環反応

カルベンダジム標準液又はチオファネートメチル標準液 1 mL を 200 mL なす形フラスコに正確に入れ閉環反応に供する標準液とした。更に、今回チオファネートについても同一操作での測定が可能か検討するため、チオファネート標準液 1 mL を正確に加え、同時に閉環反応に供した。

閉環反応後、試料と同様に液液分配 II 及びミニカラムから溶出させ、減圧濃縮、乾固したのち水-メタノール (1+1) 20 mL を正確に加えて溶解した。この液の一定量を水-メタノール (1+1) で正確に希釈し、1 mL 中にカルベンダジム又はチオファネートメチル及びチオファネートとして各々 5 ng, 10 ng, 20 ng, 50 ng, 100 ng 及び 200 ng 相当量を含む各標準液を調製し、5,000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフ質量分析計による測定に供する標準液とした。

7) 液体クロマトグラフ質量分析計による測定

試料溶液、各標準液各 2 µL を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、Table 1 の測定条件に従い選択イオン検出 (以下「SIM」) クロマトグラムを得た。

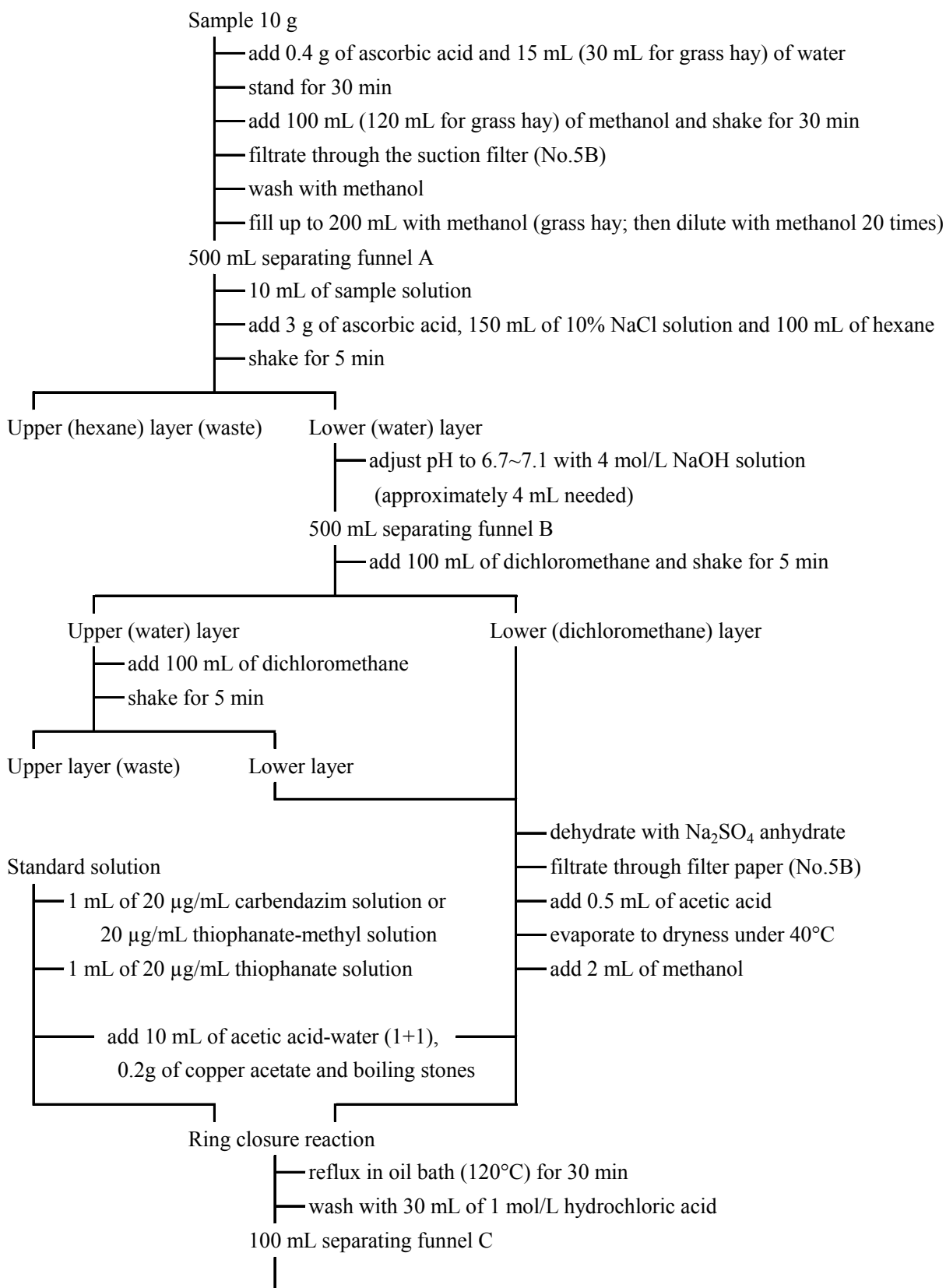
Table 1 Operating conditions for LC-MS

Column	Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d.×150 mm, 3.5 µm)
Mobile phase	A: 2 mmol/L Ammonium acetate solution B: Methanol B(%) 25%→15 min→60%→0.1 min→90%(7 min)→0.1 min→25%(8 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temp.	40°C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Fragmentor	100 V
Nebulizer	N ₂ (50 psi)
Drying gas	N ₂ (10 L/min, 350°C)
Capillary voltage	4,000 V
Monitor ion	<i>m/z</i> 192 (Carbendazim), 206 (EBC)

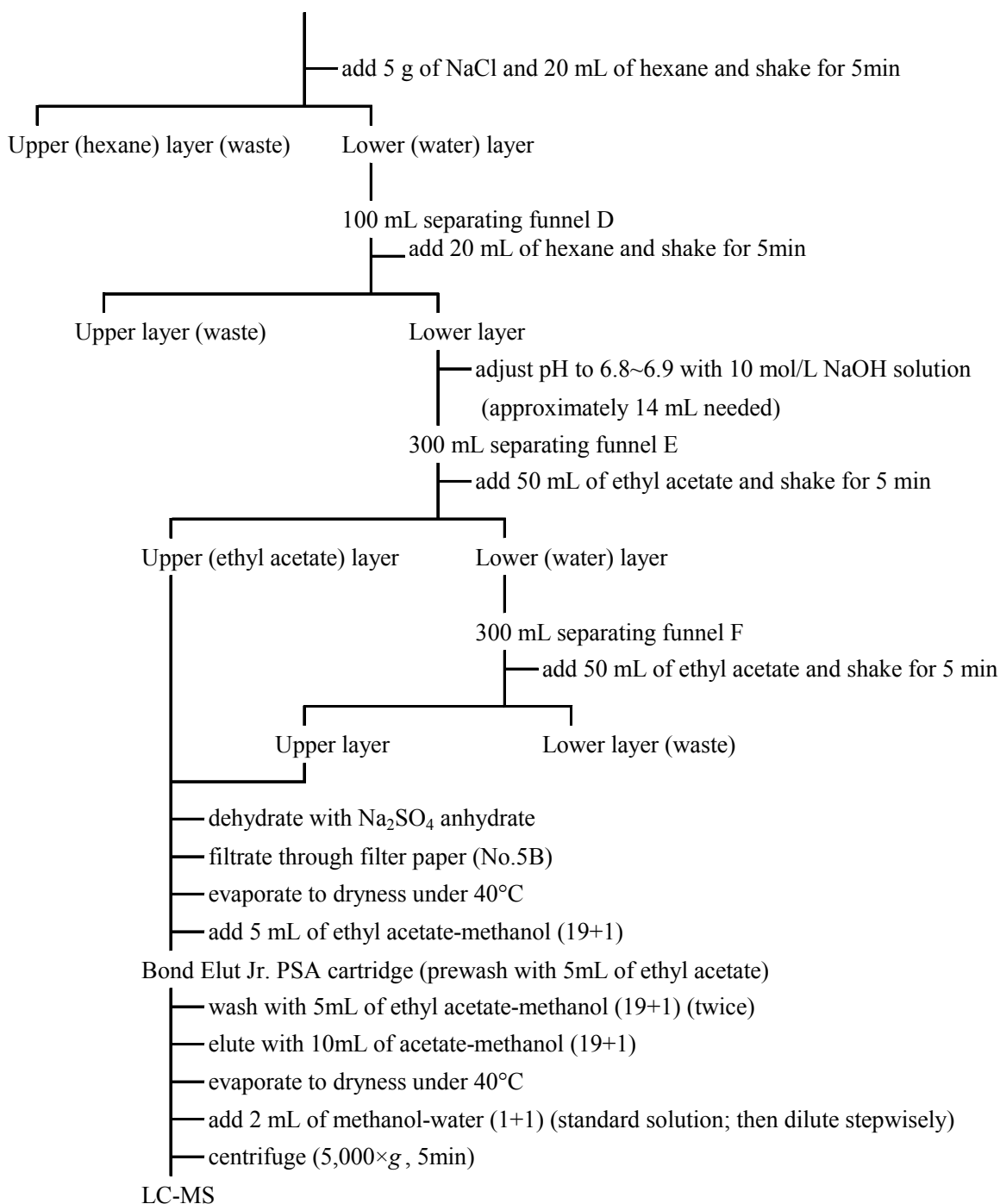
8) 計算

得られた選択イオン検出クロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中のカルベンダジム量 (チオファネートメチル及びベノミルをカルベンダジムに変換したものを含む。) 及び EBC 量 (チオファネートを EBC に変換したものを) を算出した。なお、カルベンダ

ジムとしての含量を求める際には、EBC 量に係数 0.52 を乗じてカルベンダジム量へ換算した。
なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



(To be continued to next page.)



Scheme 1 Analytical procedure for carbendazim, benomyl, thiophanate and thiophanate-methyl

3 結果及び考察

3.1 標準液の操作について

本法では閉環反応における回収率が低いことが知られており，厚生労働省の分析法²⁾によれば閉環反応（その後の転溶操作も含む）における回収率が，カルベンダジムでは約 73%，チオファネートメチルでは約 60%である．そのため，厚生労働省の分析法では標準液も閉環反応とその後の転溶操作を試料溶液と同様に行うこととしている．

厚生労働省の分析法とセンター法では用いる溶媒などに若干違いがあるため，センター法において閉環反応後の操作での回収率を確認した．閉環反応のみに供した標準液を 100%として，そ

の後の操作での回収率を比較したところ、Table2 のとおり閉環反応後の操作で回収率が 76%程度まで下がることがわかったので、標準液についても閉環反応以降、試料溶液と同様の操作を行うこととした。

Table 2 Recovery after each procedure

Procedure	Carbendazim	EBC
ring closure reaction	100%	100%
ring closure reaction and washing with hexane	96%	100%
ring closure reaction, washing with hexane and ethyl acetate extraction	83%	84%
ring closure reaction, washing with hexane, ethyl acetate extraction and PSA cartridge	76%	76%

3.2 チオファネートメチル標準液の使用について

本法では、チオファネートメチル及びベノミルは分析操作中にカルベンダジムに変換されるため、カルベンダジム、チオファネートメチル及びベノミルの三成分をカルベンダジムとして定量する。そのため、センター法では上記三成分の測定にはカルベンダジム標準液を希釈して検量線を作成することとなっている。

しかし、(財)日本食品分析センターの検討¹⁾において、閉環反応でのチオファネートメチルからカルベンダジムへの反応率は 80%程度であることがわかっている。また、厚生労働省の分析法においても、チオファネートメチルは閉環反応の回収率が特に低いので、チオファネートメチルを定量する場合はチオファネートメチル標準液を閉環反応に供し、生成したカルベンダジムを標準液として用いることとなっている。以上のことから、本法においても、チオファネートメチルを定量する場合にはチオファネートメチル標準品を閉環反応に供し、生成したカルベンダジムを標準液とするべきと考えられた。

なお、ベノミルについては(財)日本食品分析センターの検討の中で、ベノミルの添加回収試験(ベノミルを添加しカルベンダジム標準液を用いて検量線を引くセンター法で実施)の結果は平均回収率 93%で、カルベンダジムの添加回収試験の平均回収率 93%と同等であった。このことから、ベノミルからカルベンダジムへの変換はほぼ 100%行われていると考えられ、ベノミルを定量する際にはカルベンダジムの標準品を用いて問題ないと考えられる。

以上のことから、厚生労働省の分析法と同様に、カルベンダジム及びベノミルを定量する場合はカルベンダジム標準液を用い、チオファネートメチルを定量する場合にはチオファネートメチル標準液を閉環反応に供し、生成したカルベンダジムを標準液として用いるべきと考えられた。

よって、本法を用いる時には、農薬の使用状況からカルベンダジム及びベノミルの残留が考えられる場合はカルベンダジム標準液を用い、チオファネートメチルの残留が考えられる場合にはチオファネートメチル標準液を用いることとした。

また、チオファネートについては、閉環反応により EBC に変換されるため、チオファネート標準液を閉環反応に供し、生成した EBC を標準液として用いることとした。

3.3 検量線の作成

カルベンダジム標準液又はチオファネートメチル標準液及びチオファネート標準液 1 mL を試

料と同様に閉環反応，液液分配 II 及びミニカラムの操作を行った．ミニカラムから溶出後，減圧濃縮，乾固したのち水-メタノール (1+1) 20 mL を正確に加えて溶解した．さらに水-メタノール (1+1) で希釈し，1 mL 中にカルベンダジム又はチオファネートメチル及びチオファネートとしてそれぞれ 5, 10, 20, 50, 100, 200 ng 相当量を含む標準液を作成した．各 2 µL を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し得られたクロマトグラムのピーク面積から検量線を作成した．その結果いずれの検量線とも 5~200 ng 相当量の範囲で直線性を示した．

3.4 妨害物質の検討

(財) 日本食品分析センターの検討の中で，飼料 13 種について定量を妨害するピークが検出されないことが確認されている．試料の定量操作はセンター法から変更がないことから，確認は省略した．

3.5 添加回収試験

とうもろこしにカルベンダジムとして 0.70 mg/kg，乾牧草 (チモシー) にカルベンダジムとして 10 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて回収率及び分析精度を検討した．その結果，Table 3 のとおり平均回収率 94.6~98.3%，繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 6.8%以下であった．

Table 3 Spike test of carbendazim

Spiked level (mg/kg)	(%)	
	Corn	Timothy
0.70	94.6 ^{a)} (6.8) ^{b)}	---
10	---	98.3 ^{a)} (0.75) ^{b)}

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation (RSD)

更に，とうもろこしにベノミルとして 1.0 mg/kg，チモシーにベノミルとして 15 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて回収率及び分析精度を検討した．その結果，Table 4 のとおり平均回収率 101.4~105.8%，繰返し精度は RSD として 5.0%以下であった．

Table 4 Spike test of benomyl

Spiked level (mg/kg)	(%)	
	Corn	Timothy
1.0	101.4 ^{a)} (3.2) ^{b)}	---
15	---	105.8 ^{a)} (5.0) ^{b)}

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation (RSD)

更に，とうもろこしにチオファネートメチルとして 0.70 mg/kg 及びチモシーに 10 mg/kg を添加した試料を用いて回収率及び分析精度を検討した．その結果，Table 5 のとおり平均回収率 82.1~84.4%，繰返し精度は RSD として 9.5%以下であった．

また，チオファネートについても，チオファネートメチルの添加回収試験と同時にチオファネ

ートとして 0.70 mg/kg 及びチモシーに 10 mg/kg を添加した試料を用いて回収率及び分析精度を検討した。その結果、Table 6 のとおり平均回収率 57.9~64.2%で、定量法の確立に十分な回収率が得られなかった。なお、繰返し精度は RSD として 8.1%以下であった。

なお、添加回収試験で得られたクロマトグラムの一例を Fig.2 に示した。

Table 5 Spike test of thiophanate-methyl

Spiked level (mg/kg)	(%)	
	Corn	Timothy
0.70	84.4 ^{a)} (9.5) ^{b)}	---
10	---	82.1 ^{c)} (6.1) ^{b)}

a) Mean recovery ($n=5$)

b) Relative standard deviation (RSD)

c) Mean recovery ($n=3$)

Table 6 Spike test of thiophanate-ethyl

Spiked level (mg/kg)	(%)	
	Corn	Timothy
0.70	57.9 ^{a)} (4.4) ^{b)}	---
10	---	64.2 ^{c)} (8.1) ^{b)}

a) Mean recovery ($n=5$)

b) Relative standard deviation (RSD)

c) Mean recovery ($n=3$)

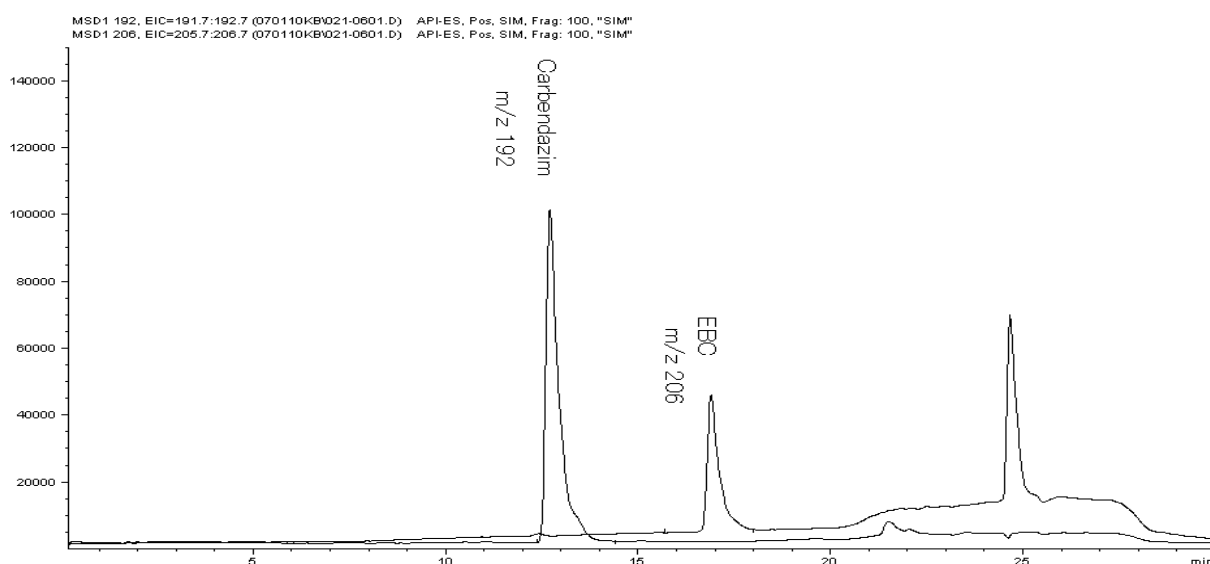


Fig.2 SIM chromatogram of carbenrazim (m/z 192) and EBC (m/z 206)

LC/MS conditions are shown in Table 1.

3.6 定量下限及び検出下限

本法の定量下限を確認するために、とうもろこしにカルベンダジム、ベノミル及びチオファネートメチルそれぞれを添加し、本法に従って分析を3回実施し、得られたピークのSN比からそれぞれの定量下限及び検出下限を求めた。チオファネートについては、添加回収試験で十分な回収率が得られなかったため、定量下限及び検出下限は求めなかった。

とうもろこしにカルベンダジムとして 50 µg/kg 及び 100 µg/kg 相当量を添加した試料を用いて本法に従って分析を3回実施した結果、SN比が10となる濃度は 50 µg/kg であり、カルベンダジムの定量下限は 50 µg/kg と考えられた。添加量 50 µg/kg における平均回収率は Table 7 のとおり 115.0%，繰返し精度は RSD として 12%であった。また、カルベンダジムの検出限界は SN比が3となる濃度から 15 µg/kg と見積もられた。

Table 7 Spike test of carbendazim to define the limit of quantification

(%)	
Spiked level (µg/kg)	Corn
50	115.0 ^{a)} (12) ^{b)}
100	104.6 ^{a)} (3.6) ^{b)}

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation (RSD)

同様にベノミルの定量下限は、SN比が10となる濃度からベノミルとしての添加濃度が 60 µg/kg であり、添加量 60 µg/kg における平均回収率は Table 8 のとおり 113.3%，繰返し精度は RSD として 12%であった。また、ベノミルの検出限界は SN比が3となる濃度から 18 µg/kg と見積もられた。

Table 8 Spike test of benomyl to define the limit of quantification

(%)	
Spiked level (µg/kg)	Corn
60	113.3 ^{a)} (12) ^{b)}

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation (RSD)

同様にチオファネートメチルの定量下限は、SN比が10となる濃度から、チオファネートメチルとしての添加濃度が 40 µg/kg であり、添加量 40 µg/kg における平均回収率は Table 9 のとおり 72.4%，繰返し精度は RSD として 3.2%であった。また、チオファネートメチルの検出限界は SN比が3となる濃度から 12 µg/kg と見積もられた。

Table 9 Spike test of thiophanate-methyl to define the limit of quantification

(%)	
Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Corn
40	72.4 ^{a)} (3.2) ^{b)}
80	72.3 ^{a)} (0.86) ^{b)}

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation (RSD)

3.6 チオファネートメチル及びチオファネートの共同試験

本法の再現精度を確認するため、カルベンダジム、チオファネートメチル及びベノミルの中で、十分な回収率を得るのがもっとも困難と思われるチオファネートメチルについて共同試験を行った。

また、参考までにチオファネートについても同時に試験を実施した。

チオファネートメチル及びチオファネートとしてそれぞれ 1.3 mg/kg 相当量を添加したとうもろこし並びにチオファネートメチル及びチオファネートとしてそれぞれ 20 mg/kg 相当量を添加した乾牧草（チモシー）を用いて、株式会社島津製作所京都カスタマサポートセンター，社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター，財団法人日本食品分析センター多摩研究所，全国酪農業協同組合連合会分析センター，独立行政法人肥飼料検査所（現（独）農林水産消費安全技術センター）本部及び同仙台事務所（現 同仙台センター）の 7 試験室において、本法に従って共同試験を実施した。

チオファネートメチルの結果は Table 10 のとおりであり，とうもろこしでは平均回収率は 87.8%，室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD_f 及び RSD_R) として 3.2% 及び 15% であり，HorRat は 0.95 であった。また，チモシーでは平均回収率は 83.1%，室内繰返し精度及び室間再現精度は RSD_f 及び RSD_R として 4.6% 及び 19% であり，HorRat は 1.8 であった。

チオファネートの結果は Table 11 のとおりであり，とうもろこしでは平均回収率は 53.5%，室内繰返し精度及び室間再現精度は RSD_f 及び RSD_R として 4.6% 及び 14% であり，HorRat は 0.85 であった。また，チモシーでは平均回収率は 41.6%，室内繰返し精度及び室間再現精度は RSD_f 及び RSD_R として 4.3% 及び 26% であり，HorRat は 2.2 であった。乾牧草の HorRat が 2.0 を超えているが，これは添加が高濃度のため HorRat を求める際の分母の予想室間再現精度 PRSD_R（Horwitz 式から求める）が小さくなったことも寄与していると考えられた。

なお，参考のため，各試験室で使用した液体クロマトグラフ質量分析計の機種等を Table 12 に示した。

Table 10 Collaborative study of thiophanate-methyl

Laboratory	Sample (mg/kg)			
	Corn		Timothy	
1	0.923	0.911	13.2	13.7
2	2.58 ^{f)}	2.68 ^{f)}	39.4 ^{e)}	46.8 ^{e)}
3	1.20	1.21	18.1	16.5
4	1.03	1.05	17.9	17.1
5	1.37	1.45	21.5	21.9
6	1.20	1.18	12.8	14.6
7	1.04	1.13	16.3	15.8
Spiked level (mg/kg)	1.30		20.0	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	1.14		16.6	
Recovery (%)	87.8		83.1	
RSD _r ^{b)} (%)	3.2		4.6	
RSD _R ^{c)} (%)	15		19	
PRSD _R ^{d)} (%)	16		10	
HorRat	0.95		1.8	

a) $n=12$ (excluding Laboratory 2)

b) Repeatability relative standard deviation within same laboratory

c) Reproducibility relative standard deviation

d) Predicted reproducibility relative standard deviation calculated by the modified Horwitz equation

e) Removed by Cochran test

f) Removed by single Grubbs test

Table 11 Collaborative study of thiophanate-ethyl

Laboratory	Sample (mg/kg)			
	Corn		Timothy	
	1	0.629	0.634	8.64
2	1.31 ^{f)}	1.42 ^{f)}	18.2 ^{e)}	2.07 ^{e)}
3	0.810	0.840	10.9	10.8
4	0.586	0.623	8.48	7.97
5	0.220	0.782	9.12	8.40
6	0.592	0.600	4.00	4.64
7	0.728	0.806	9.35	8.79
Spiked level (mg/kg)	1.30		20.0	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.696		8.32	
Recovery (%)	53.5		41.6	
RSD _r ^{b)} (%)	4.6		4.3	
RSD _R ^{c)} (%)	14		26	
PRSD _R ^{d)} (%)	17		12	
HorRat	0.85		2.2	

a) $n=12$ (excluding Laboratory 2)

b) Repeatability relative standard deviation within same laboratory

c) Reproducibility relative standard deviation

d) Predicted reproducibility relative standard deviation calculated by the modified Horwitz equation

e) Removed by Cochran test

f) Removed by single Grubbs test

Table 12 Instruments used in the collaborative study

Lab No.	LC-MS	Column
		(i.d.×length, particle size)
1	LC: Shimadzu LC-20AD	GL Sciences Inertsil ODS-3
	MS: Shimadzu LCMS-2010EV	(2.1 mm×150 mm)
2	Agilent LC/MS/MS 6410	Agilent ZORBAX XDB-C18
		(4.6mm×50 mm, 1.8 μm)
3	LC: Agilent 1100 series	Agilent ZORBAX XDB-C18
	MS: Agilent G1946D	(2.1 mm×150 mm, 3.5 μm)
4	Shimadzu LCMS-2010EV	Agilent ZORBAX XDB-C18
		(2.0 mm×150 mm, 5 μm)
5	Waters Quattro micro API Mass Analyzer	Agilent ZORBAX XDB-C18
		(2.1 mm×150 mm, 3.5 μm)
6	Shimadzu LCMS-2010EV	Phenomenex Gemini 5u C18 110A
		(2.0 mm×150 mm, 5 μm)
7	LC: Waters alliance 2695	GL Sciences Inertsil ODS-3
	MS: Waters Micromass Quattro micro	(2.1 mm×150 mm, 5 μm)

4 まとめ

(財) 日本食品分析センターが検討したチオファネートメチル、カルベンダジム及びベノミルの液体クロマトグラフ質量分析計による残留分析法をもとに、飼料中のカルベンダジム、チオファネート、チオファネートメチル及びベノミルの定量法を検討したところ次の結果を得た。

- 1) 標準液については、閉環反応以降、試料液と同様の操作を行うべきと考えられた。また、チオファネートメチルを定量する場合はチオファネートメチル標準液を用いるべきと考えられた。
- 2) 閉環反応以降の操作を試料液と同様に行った標準液について、ピーク面積を用いて検量線を作成したところカルベンダジム、チオファネートメチル及びチオファネートとも 5~200ng の範囲で直線性を示した。
- 3) カルベンダジムをとうもろこしに 0.70 mg/kg , 乾牧草 (チモシー) に 10 mg/kg 添加し、添加回収試験を実施した結果、平均回収率は 96.5%、繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 6.8% 以下の成績が得られた。
- 4) ベノミルをとうもろこしに 1.0 mg/kg, チモシーに 15 mg/kg 添加し、添加回収試験を実施した結果、平均回収率は 103.6%、繰返し精度は RSD として 5.0%以下の成績が得られた。
- 5) チオファネートメチルをとうもろこしに 0.70 mg/kg, チモシーに 10 mg/kg 添加し、添加回収試験を実施した結果、平均回収率は 83.3%、繰返し精度は RSD として 9.5%以下の成績が得られた。
- 6) 定量下限は試料中で、カルベンダジムとして 50 µg/kg, またはベノミルとして 60 µg/kg 及びチオファネートメチルとして 40 µg/kg 相当量と考えられた。
- 7) チオファネートメチルとしてとうもろこしに 1.3 mg/kg, 及びチモシーに 20 mg/kg 相当量を添加した試料を用いた共同試験の結果、平均回収率 85.5%、室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD_f 及び RSD_R) として 4.6%以下及び 19%以下であった。
- 8) 同一操作での定量が可能か検討したチオファネートについては、その回収率が 70%未満であり、定量法の確立には至らなかった。

謝 辞

共同試験に参加して頂いた株式会社島津製作所、社団法人日本科学飼料協会、財団法人日本食品分析センター及び全国酪農業協同組合連合会の試験室の各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 日本食品分析センター:平成 17 年度 飼料の有害物質等残留基準設定等委託事業 (分析法の開発) 飼料中の有害物質等の分析法の開発 (2006).
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知:“食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法”,平成 17 年 1 月 24 日,食安発第 0124001 号 (2005).