

エトフメセート試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

エトフメセート

代謝物M2【2,3-ジヒドロ-3,3-ジメチル-2-オキソ-ベンゾフラン-5-イル メタンスルホナート】

熱酸処理で代謝物M2に変換される代謝物（代謝物M3【2-(2-ヒドロキシ-5-メタンスルホニルオキシフェニル)-2-メチルプロピオン酸】及び代謝物M3抱合体を含む。）

2. 適用食品

野菜

3. 装置

ガスクロマトグラフ・タンデム型質量分析計（GC-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。

エトフメセート標準品 本品はエトフメセート98%以上を含む。

代謝物M2標準品 本品は代謝物M2 98%以上を含む。

代謝物M3ナトリウム塩標準品 本品は代謝物M3ナトリウム塩95%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料20.0 gにアセトン及び水（4：1）混液100 mLを加え、ホモジナイズした後、毎分3,000回転で5分間遠心分離し、上澄液を採る。残留物にアセトン及び水（4：1）混液50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離する。得られた上澄液を合わせ、アセトンを加えて正確に200 mLとする。遠心分離後の残留物は4) ①加水分解で使用する。

2) 水酸化ナトリウム溶液/*n*-ヘキサン分配

1) で得られた抽出液から正確に2 mLを分取し、40℃以下で0.5 mL以下まで濃縮する。これに0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液5 mL及び*n*-ヘキサン5 mLを加えて振とうする。*n*-ヘキサン層を採り、水層に*n*-ヘキサン5 mLを加えて振とうする。得られた*n*-ヘキサン層を合わせ、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：9）混液1 mLを加えて溶かす。分配後の水層は4) ①加水分解で使用する。

3) エトフメセート試験溶液

シリカゲルミニカラム (1,000 mg) に酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 9) 混液10 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、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 9) 混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (3 : 17) 混液10 mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトン及び*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液に溶かし、正確に4 mLとしたものを試験溶液とする。

4) 代謝物M2及び熱酸処理で代謝物M2に変換される代謝物 (代謝物M3及び代謝物M3抱合体を含む。) 試験溶液

① 加水分解

1) で得られた残留物を正確に量り、直ちにその1/100に相当する量を量り採る。これに2) で得られた水層を合わせた後、塩酸5 mLを加え、密栓して80°Cで2.5時間加熱する。放冷後、水10 mLを加え、ジエチルエーテル20 mLで3回振とう抽出する。抽出液を合わせ、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。

② 代謝物M2への変換

①で得られた残留物に無水酢酸0.5 mLを加え、80°Cで15分間加熱する。放冷後、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 9) 混液5 mLを加える。

③ シリカゲルカラムクロマトグラフィー

シリカゲルミニカラム (1,000 mg) に酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 9) 混液10 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、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 9) 混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 4) 混液20 mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトン及び*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液に溶かし、正確に4 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

エトフメセート標準品及び代謝物M2標準品を用いてそれぞれ標準原液を調製する。各標準原液を適宜混合してアセトン及び*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液で希釈した溶液を数点調製し、それぞれGC-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 (代謝物M2及び代謝物M3はエトフメセート換算) に相当する試験溶液中濃度は0.0005 mg/L (代謝物M2及び代謝物M3はエトフメセート換算) である。

7. 定量

試験溶液をGC-MS/MSに注入し、6. の検量線でエトフメセート及び代謝物M2*の各含量を求める。代謝物M2*を含むエトフメセートの含量を求める場合には、次式により求める。

エトフメセート（代謝物M2*を含む。）の含量（ppm） $=A+B\times 1.117$

A：エトフメセートの含量（ppm）

B：代謝物M2*の含量（ppm）

* 熱酸処理で代謝物M2に変換される代謝物（代謝物M3及び代謝物M3抱合体を含む。）を含む。

8. 確認試験

GC-MS/MSにより確認する。

9. 測定条件

（例）

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：50 $^{\circ}\text{C}$ （1分） $-25^{\circ}\text{C}/\text{分}$ -220°C $-5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ -240°C $-30^{\circ}\text{C}/\text{分}$ -310°C （5分）

注入口温度：260 $^{\circ}\text{C}$

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 ）：

エトフメセート：プリカーサーイオン 286、プロダクトイオン 207、161

代謝物M2：プリカーサーイオン 256、プロダクトイオン 177、149

注入量：2 μL

保持時間の目安：エトフメセート：10分

代謝物M2：10分

10. 定量限界

エトフメセート：0.01 mg/kg

代謝物M2：0.01 mg/kg（エトフメセート換算）

代謝物M3：0.01 mg/kg（エトフメセート換算）

11. 留意事項

1) 試験法の概要

エトフメセート及びその代謝物〔代謝物M2及び熱酸処理で代謝物M2に変換される

代謝物（代謝物M3及び代謝物M3抱合体を含む。）] を試料からアセトン及び水（4：1）混液で抽出し、水酸化ナトリウム溶液/ヘキサン分配により、エトフメセートを n -ヘキサン層に、代謝物を水層に分配する。エトフメセートについては、 n -ヘキサン層をシリカゲルミニカラムで精製した後、GC-MS/MSで定量及び確認する。代謝物については、分配後の水層及び抽出時の残留物に塩酸を加えて加熱し、代謝物M3抱合体を代謝物M3に加水分解（この段階で代謝物M3の一部が代謝物M2に変換される）した後、ジエチルエーテルに転溶する。次いで無水酢酸で代謝物M3を代謝物M2に変換し、シリカゲルミニカラムで精製した後、代謝物M2をGC-MS/MSで定量及び確認する方法である。なお、エトフメセート及び代謝物M2 [熱酸処理で代謝物M2に変換される代謝物（代謝物M3及び代謝物M3抱合体を含む。）を含む。] のそれぞれについて定量を行い、代謝物を含むエトフメセートの含量を求める場合には、代謝物M2の含量に換算係数を乗じてエトフメセートの含量に変換し、これらの和を分析値とする。

2) 注意点

- ① 抽出の際、遠心分離した後に浮遊物が認められる場合は、上澄液をろ紙を用いてろ過するとよい。
- ② 抽出後の残留物を量り採る際、残留物に含まれる溶媒の影響で重量が変動する場合は、窒素気流により溶媒を除去するとよい。
- ③ 加水分解操作により、代謝物M2と代謝物M3の平衡混合物となる。そのため、無水酢酸により、未変換の代謝物M3を代謝物M2に変換する。
- ④ 代謝物M3ナトリウム塩標準品を用いて添加回収試験を実施し、代謝物M2への変換が十分に行われていることを確認すること。なお、代謝物M3ナトリウム塩からエトフメセートへの換算係数は0.9665である。
- ⑤ 加水分解後のジエチルエーテルでの転溶の際にエマルジョンが生成した場合は、エマルジョンを残してジエチルエーテル層を採り、残ったエマルジョン及び水層について2回目以降の操作を行うとよい。
- ⑥ 測定の際に、マトリックスの影響やテーリングが認められた場合は、試験溶液及び検量線作成用の標準溶液にポリエチレングリコール300を加えるとよい。以下に方法を示す。

試験溶液：5. 3) 又は5. 4) の③で得られた試験溶液から正確に1 mLを分取し、0.1 w/v%ポリエチレングリコール300含有アセトン及び n -ヘキサン（1：1）混液を正確に100 μ L加える。

検量線作成用の標準溶液：6. で得られた検量線作成用の標準溶液から正確に1 mLを分取し、0.1 w/v%ポリエチレングリコール300含有アセトン及び n -ヘキサン（1：1）混液を正確に100 μ L加える。

⑦ エトフメセート及び代謝物M2のGC-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。

・エトフメセート

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 286、プロダクトイオン 207

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 286、プロダクトイオン 161

・代謝物M2

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 256、プロダクトイオン 149

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 256、プロダクトイオン 177

⑧ 試験法開発時に検討した食品：たまねぎ、てんさい、にんにく

12. 参考文献

Ethofumesate: Magnitude of the residue on onion (dry bulb), Appendix 4 Analytical summary report, Bayer Cropscience, 2004.

13. 類型

C