

※本報告書は、試験法開発における検討結果を取りまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意下さい。

食品に残留する農薬等の成分である物質の 試験法開発事業報告書

エトフメセート試験法（農産物）

エトフメセート試験法（農産物）の検討結果

〔緒言〕

1. 背景・目的

エトフメセート（図 1）はベンゾフラン環を有する除草剤であり、光合成及び呼吸を阻害することによって細胞分裂を抑制し、殺草効果を示すものと考えられている。エトフメセートの主な代謝物としては、図 1 に示した代謝物 M1、代謝物 M2 及び代謝物 M3 がある。エトフメセートの残留基準値は、エトフメセート、代謝物 M2 をエトフメセートに換算したものと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。）をエトフメセートに換算したものの和として設定されているが、公示試験法は示されていない。そこで本研究では、農産物中のエトフメセート試験法を開発することを目的とした。

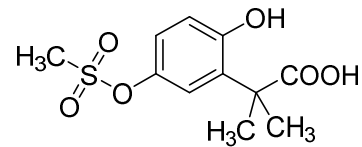
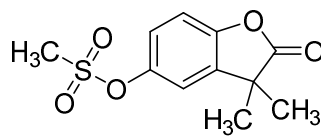
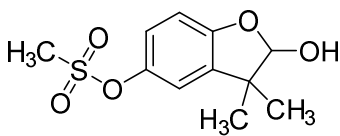
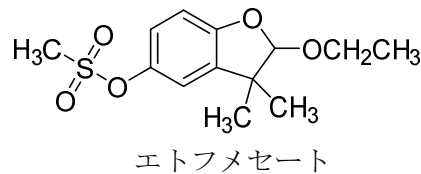


図 1 エトフメセート及びその代謝物

2. 基準値

エトフメセートとは、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】をエトフメセートに換算したものと及び熱酸処理で代謝物 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。）をエトフメセートに換算したものの和とする。〔生食発 0223 第 1 号 (H29.2.23) 〕

食品名	基準値 (ppm)
たまねぎ	0.3
てんさい	0.3
にんにく	0.3
その他の野菜	5

3. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

分析対象化合物： エトフメセート (Ethofumesate)

構造式： 図 1 に示す

分子式： $C_{13}H_{18}O_5S$

分子量： 286.34

化学名： (2RS)-2-Ethoxy-3,3-dimethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl methanesulfonate

CAS 番号： 26225-79-6

外観： 白色粉末

溶解性： 水 50 mg/L (25°C)、アセトン、ジクロロメタン、DMSO、酢酸エチル >600、トルエン、*p*-キシレン 300~600、メタノール 120~150、エタノール 60~75、イソプロパノール 25~30、*n*-ヘキサン 4.67 (g/L, 25°C) ^{a)}

融点： 70~72°C ^{a)}

蒸気圧： $1.2 \times 10^{-4} \sim 6.5 \times 10^{-4}$ Pa (25°C) ^{a)}

1-オクタノール/水分配係数 ($\log P_{ow}$)： 2.7 (pH 6.5~7.6, 25°C) ^{a)}

安定性： pH7~9 の水溶液中で安定。pH5 DT₅₀ 940 日 ^{a)}

分析対象化合物： 代謝物 M2

構造式： 図 1 に示す

分子式： $C_{11}H_{12}O_5S$

分子量： 256.27

化学名： 3,3-Dimethyl-2-oxo-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl methanesulfonate

CAS 番号： 26244-33-7

外観： 白色粉末

沸点 (計算値)： $396.9 \pm 42.0^\circ\text{C}$ (101,325 Pa) ^{b)}

1-オクタノール/水分配係数 ($\log P_{ow}$, 計算値)： 1.724 ± 0.269 (25°C) ^{b)}

蒸気圧 (計算値)： 2.2×10^{-4} Pa (25 °C) ^{b)}

分析対象化合物： 代謝物 M3

構造式： 図 1 に示す

化学名： 2-{2-Hydroxy-5-[(methylsulfonyl)oxy]phenyl}-2-methylpropanoic acid

CAS 番号： 572912-13-1

分子式： $C_{11}H_{14}O_6S$

分子量： 274.29

沸点 (計算値)： $477.9 \pm 45.0^\circ\text{C}$ (101,325 Pa) ^{b)}

1-オクタノール/水分配係数 ($\log P_{ow}$, 計算値)： 1.490 ± 0.302 (25°C) ^{b)}

蒸気圧 (計算値)： 8.13×10^{-8} Pa (25 °C) ^{b)}

解離定数 (計算値)： 4.08 ± 0.14 (25°C) ^{b)}

^{a)} The Pesticide Manual sixteenth Edition, BCPC

^{b)} SciFinder (Calculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02)

4. 申請企業の残留分析法¹⁾

本検討で参考にした申請企業の残留分析法を以下に示す。

(1) 試験溶液の調製方法

秤 取

↓ 試料 (試料量不明)

ソックスレー抽出

↓ アセトン 200 mL を加え、一晚還流

ヘキサン転溶

↓ 放冷後、水 150 mL 及びアセトン 10 mL でナスフラスコに移す

残留物 (①) は熱酸処理へ

↓ アセトンを除去

↓ 3 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 2 mL を加え、塩基性に調整

↓ *n*-ヘキサン 100 mL で 3 回転溶

↓ *n*-ヘキサン層を無水硫酸ナトリウムで脱水

水層 (②) は熱酸処理へ

↓ *n*-ヘキサン層の溶媒を除去

↓ 残留物を *n*-ヘキサン 3 mL に溶解③

シリカゲルミニカラム (500 mg) 精製

↓ *n*-ヘキサンでコンディショニング

↓ ③を負荷。*n*-ヘキサン 3 mL で 2 回洗浄

↓ *n*-ヘキサン/ジクロロメタン (3 : 2) 5 mL で洗浄

↓ *n*-ヘキサン/ジクロロメタン (1 : 9) 10 mL で溶出

↓ 溶媒を除去

↓ 残留物をトルエン 2 mL に溶解

GC-FPD(S)測定 ⇒ エトフメセートを測定

熱酸処理

↓ ①及び②を合わせる

↓ 塩酸 150 mL を加え、80°C で 2.5 時間加熱

↓ 吸引ろ過 (セライト及びガラス繊維ろ紙を使用)。水 25 mL で容器を洗浄し、吸引ろ過

↓ 放冷

定容

↓ 水を加えて 400 mL に定容

転溶

↓ 200 mL を採り、ジエチルエーテル 150 mL で 3 回転溶し、ジエチルエーテル層を合わせる

水洗浄

↓ 水 50 mL で 2 回洗浄

↓ ジエチルエーテル層を無水硫酸ナトリウムで脱水

↓ 溶媒を除去

代謝物 M1 のアセチル化

↓ ジエチルエーテル 5 mL に溶解し、ガラス容器に移す。ジエチルエーテル 5 mL でナスフラスコを 2 回洗浄し、合わせる

↓ 溶媒を除去

↓ トルエン 500 μ L、無水酢酸 200 μ L、ピリジン 50 μ L を加え、90°C で 15 分間加熱

↓ 溶媒を除去

↓ 残留物を *n*-ヘキサン/ジクロロメタン (1 : 1) 2.5 mL に溶解④

シリカゲルカラムクロマトグラフィー (5 g)

↓ ④を負荷。*n*-ヘキサン/ジクロロメタン (1 : 1) 2.5 mL で洗浄

↓ *n*-ヘキサン/ジクロロメタン (1 : 1) 40 mL で洗浄

↓ *n*-ヘキサン/酢酸エチル (1 : 1) 10 mL で洗浄

↓ *n*-ヘキサン/酢酸エチル (1 : 1) 10 mL で溶出

↓ 溶媒を除去

↓ 残留物をトルエン 2 mL に溶解

GC-FPD(S)測定 ⇒代謝物 M2、代謝物 M1 (代謝物 M1 抱合体を含む) のアセチル化体を測定

スキーム 1. 申請企業の試験溶液調製方法の概要

(2) 測定条件

装置	型式	会社
GC-FPD(S)	記載無し	Perkin Elmer
GC 条件		
カラム	DB-1 (内径 0.53 mm、長さ 15 m、膜厚 3 μ m : J&W 製)	
キャリアーガス	ヘリウム	
ガス流量	5 mL/min	
温度	165°C (1 min) —7.5°C/min—235°C (4 min)	
注入口温度	200°C	
検出器温度	320°C	
注入量	3 μ L	
保持時間	エトフメセート 8.8 min、代謝物 M1 のアセチル化体 10.2 min、代謝物 M2 7.8 min	

[実験方法]

1. 試料

たまねぎ及びにんにくは、東京都内の小売店で購入した。てんさいは北海道の農家より入手した。各試料の調製方法を以下に記載した。

たまねぎ及びにんにく： 外皮及びひげ根を除去し、磨砕装置を用いて細切均一化した。

てんさい： 泥を水で軽く洗い落とし、磨砕装置を用いて細切均一化した。

2. 試薬・試液

(1) 標準品

エトフメセート標準品：純度 98.8% (富士フィルム和光純薬製)

代謝物 M2 標準品：純度 99.7% (Sigma-Aldrich 製)

代謝物 M3 ナトリウム塩標準品：純度 98.1% (分子式：C₁₁H₁₃NaO₆S、分子量：296.27、外観：白色粉末) (林純薬工業製)

(2) 試薬等

アセトン、酢酸エチル、ジエチルエーテル、トルエン、*n*-ヘキサン： 残留農薬試験用 (関東化学製)

蒸留水、アセトニトリル、メタノール： LC-MS 用 (関東化学製)

水 (試験溶液調製用)： 超高純度蒸留水精製装置で精製したもの

ピリジン： 特級 (富士フィルム和光純薬製)

塩酸、ギ酸、酢酸アンモニウム、無水酢酸： 特級 (富士フィルム和光純薬製)

酢酸： 精密分析用 (富士フィルム和光純薬製)

6 mol/L 塩酸、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液： 容量分析用 (富士フィルム和光純薬製)

ポリエチレングリコール： ポリエチレングリコール 300 (PEG300) (富士フィルム和光純薬製)

シリカゲルミニカラム： Inertsep SI (1 g/6 mL、ジーエルサイエンス製)

ろ紙： 定量ろ紙、No.5A (アドバンテック製)

遠心管： 15 mL 容遠心管 (ポリプロピレン (PP) 製)、50 mL 容遠心管 (PP 製) (AGC テクノグラフィクス製)

熱酸処理用容器： DigiTUBEs (50 mL 容、PP 製) (SCP Science 製)

GC-MS/MS 用分析カラム： DB-5ms DuraGuard (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm : Agilent Technologies 製)

LC-MS/MS 用分析カラム： InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm : ジーエルサイエンス製)、Inertsil ODS-4 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm : ジーエルサイエンス製)、L-column ODS (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm : 化学物質評価研究機構製)、Atlantis T3 (内径 3.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm : Waters 製)

(3) 試液

① 標準原液

エトフメセート及び代謝物 M2 標準原液：各標準品 10 mg を精秤し、アセトニトリルに溶解して 1 mg/mL の濃度の溶液を調製した。

代謝物 M3 標準原液：代謝物 M3 ナトリウム塩標準品 10 mg を精秤し、メタノールに溶解して 1 mg/mL (代謝物 M3 として) の濃度の溶液を調製した。

② 添加用標準溶液 (定量限界濃度 0.01 ppm)

エトフメセート、代謝物 M2 及び代謝物 M3 の各標準原液をアセトン（代謝物 M3 はメタノール）で希釈し、エトフメセートとして 0.2 µg/mL（エトフメセート 0.2 µg/mL；代謝物 M2 0.179 µg/mL；代謝物 M3 0.192 µg/mL）の濃度の溶液を調製した。

③ 添加用標準溶液（基準値濃度 0.3 ppm）

エトフメセート、代謝物 M2 及び代謝物 M3 の各標準原液をアセトン（代謝物 M3 はメタノール）で希釈し、エトフメセートとして 6 µg/mL（エトフメセート 6 µg/mL；代謝物 M2 5.37 µg/mL；代謝物 M3 5.75 µg/mL）の濃度の溶液を調製した。

なお、エトフメセートとしての濃度への換算は、以下の換算係数（各化合物の分子量をエトフメセートの分子量で除した値）を用いて行った。

	換算係数
代謝物 M2	0.8950
代謝物 M3	0.9579

④ 0.1 w/v%PEG300・アセトン/*n*-ヘキサン（1：1）溶液： PEG300 100 mg をアセトン/*n*-ヘキサン（1：1）に溶解し、100 mL に定容した。

3. 装置等

磨砕装置： Grindomix GM200（Verder Scientific 製）

ホモジナイザー： Polytron PT 10-35 GT（Kinematica 社製）

振とう機： SR-2 DW（タイテック製）

遠心分離機： テーブルトップ多本架遠心機 8100（久保田商事製）

ヒートブロック： MetaPREP AT-1（ジーエルサイエンス製）

アルミブロック恒温槽： Dry Thermo Bath MG-2000（東京理化工械製）

蒸留水精製装置： 超高純度蒸留水精製装置 NZJ-2DSYW（藤原製作所製）

ロータリーエバポレーター： N-1000/NVC-2100/DPE-1300/CCA-1111/SB-1000（東京理化工械製）

LC-MS/MS

装置	型式	会社
LC	Acquity UPLC I-Class	Waters
MS	Triple Quad 5500	Sciex
データ処理	Analyst 1.6.2	Sciex

GC-MS/MS

装置	型式	会社
GC	Trace 1310	ThermoFisher Scientific
MS	TSQ 8000	ThermoFisher Scientific
オートサンプラー	TriPlus RSH	ThermoFisher Scientific
データ処理	Xcalibur 2.2	ThermoFisher Scientific

4. 測定条件

(1) LC-MS/MS 測定条件

LC 条件																
カラム	InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm : ジーエルサイエンス製)															
移動相流速	0.2 mL/min															
注入量	3 μL															
カラム温度	40°C															
移動相	A 液 : 1 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液 B 液 : 1 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液															
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>15.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>15.1</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> </tbody> </table>	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	80	20	10.0	5	95	15.0	5	95	15.1	80	20
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)														
0.0	80	20														
10.0	5	95														
15.0	5	95														
15.1	80	20														
保持時間	エトフメセート 10.0 min、代謝物 M2 8.0 min、代謝物 M3 5.3 min															
MS 条件																
測定モード	選択反応モニタリング (SRM)															
イオン化モード	エトフメセート : ESI (+)、代謝物 M2 及び代謝物 M3 : ESI (-)															
イオンスプレー電圧	エトフメセート : 5500 V、代謝物 M2 及び代謝物 M3 : -4500 V															
ヒーター温度	450°C															
エントランス電位	10 V															
カーテングス	N ₂ , 10 psi															
ネブライザーガス	N ₂ , 40 psi															
ターボガス	N ₂ , 80 psi															
コリジョンガス	N ₂ , 7 (任意単位)															
測定イオン																
		イオン (<i>m/z</i>)	デクラスタリング電位 (V)	コリジョンエネルギー (eV)	コリジョンセルイグジット電位 (V)											
エトフメセート	定量イオン	287.1→121.1	120	20	10											
	定性イオン	304.1→121.1	50	30	10											
代謝物 M2	定量イオン	255.1→177.0	90	20	15											
	定性イオン	177.1→149.0	130	20	10											
代謝物 M3	定量イオン	273.1→149.1	80	20	16											
	定性イオン	273.1→194.0	80	20	16											

(2) GC-MS/MS 測定条件

GC 条件																			
カラム	DB-5ms DuraGuard (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm、ガード長さ 10 m : Agilent Technologies 製)																		
カラム温度	50°C (1 min) →25°C/min→220°C→5°C/min→240°C→30°C/min→310°C (5 min)																		
注入口温度	260°C																		
ライナー	Ultra inert inlet liner (シングルテーパー付、ウール入り : Agilent Technologies 製)																		
トランスファーライン温度	290°C																		
イオン源温度	290°C																		
イオン化モード	EI																		
イオン化電圧	70 eV																		
キャリアーガス	ヘリウム																		
キャリアーガス流量	1 mL/min (定流量)																		
注入方式	スプリットレス (高圧注入、200 kPa、1 min)																		
注入量	2 μL																		
コリジョンガス	アルゴン																		
測定モード	SRM																		
保持時間	エトフメセート 10.1 min、代謝物 M2 9.6 min																		
測定イオン																			
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th></th> <th>イオン (m/z)</th> <th>コリジョンエネルギー (eV)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">エトフメセート</td> <td>定量イオン</td> <td>286.1→207.2</td> <td>8</td> </tr> <tr> <td>定性イオン</td> <td>286.1→161.1</td> <td>17</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">代謝物 M2</td> <td>定量イオン</td> <td>256.1→149.1</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>定性イオン</td> <td>256.1→177.1</td> <td>8</td> </tr> </tbody> </table>			イオン (m/z)	コリジョンエネルギー (eV)	エトフメセート	定量イオン	286.1→207.2	8	定性イオン	286.1→161.1	17	代謝物 M2	定量イオン	256.1→149.1	15	定性イオン	256.1→177.1	8
		イオン (m/z)	コリジョンエネルギー (eV)																
エトフメセート	定量イオン	286.1→207.2	8																
	定性イオン	286.1→161.1	17																
代謝物 M2	定量イオン	256.1→149.1	15																
	定性イオン	256.1→177.1	8																

5. 定量

エトフメセート及び代謝物M2の添加用標準溶液をアセトン/*n*-ヘキサン (1 : 1) で希釈し、定量限界濃度での添加回収試験においては0.125、0.25、0.375、0.5、0.625及び0.75 ng/mL、基準値濃度での添加回収試験においては3.75、7.5、11.25、15、18.75及び22.5 ng/mL濃度の溶液を調製した。PEG300を添加する場合は、各溶液1 mLを採り、0.1 w/v%PEG300・アセトン/*n*-ヘキサン (1 : 1) 溶液100 μLを添加した。これらの溶液2 μLをGC-MS/MSに注入し、それぞれ得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。なお、検量線作成用の標準溶液は、エトフメセートとしての濃度で調製した。試験溶液2 μLをGC-MS/MSに注入し、検量線から絶対検量線法によりエトフメセートの含量を算出した。

6. 添加試料の調製

(1) 定量限界濃度 (添加濃度 0.01 mg/kg)

試料 20.0 g に、0.2 μg/mL (エトフメセートとして) 添加用標準溶液 1 mL を添加して混合後、30 分間放置した。

(2) 基準値濃度 (添加濃度 0.3 mg/kg)

試料 20.0 g に、6 µg/mL (エトフメセートとして) 添加用標準溶液 1 mL を添加して混合後、30 分間放置した。

7. 試験溶液の調製

(1) 抽出

試料 20.0 g を予め重量を量ったガラス遠心管に量り採った。これにアセトン/水 (4 : 1) 100 mL を加えてホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、上澄液を採った。残留物にアセトン/水 (4 : 1) 50 mL を加えてホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、上澄液を採った。なお、てんさいにおいては、遠心分離後の上澄液に少量の浮遊物が認められたため、2 回目の遠心分離後の上澄液をろ紙を用いて自然ろ過した。得られた上澄液を合わせ、アセトンを加えて 200 mL に定容した。残留物は、重量を正確に量り、直ちにその 1/100 量 (試料 0.2 g 相当) を熱酸処理用容器に量り採った。

(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 (試料 0.2 g 相当) をナスフラスコに分取し、40°C 以下で 0.5 mL 以下まで減圧濃縮した。これを PP 製遠心管 (15 mL 容) に移した。ナスフラスコを 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 で洗い、洗液を遠心管に合わせた。これを 5 分間振とう後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離した。*n*-ヘキサン層を採り、水層に *n*-ヘキサン 5 mL を加えて 5 分間振とう後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離した。得られた *n*-ヘキサン層を合わせ、40°C 以下で約 1 mL まで減圧濃縮後、窒素気流により溶媒を除去し、残留物を酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1 : 9) 1 mL に溶解した。なお、分配後の水層は (4) ① 加水分解で使用した。

(3) エトフメセートの分析

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 g) に酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1 : 9) 10 mL を注入し、流出液は捨てた。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/*n*-ヘキサン (1 : 9) 10 mL を注入し、流出液は捨てた。次いで、酢酸エチル/*n*-ヘキサン (3 : 17) 10 mL を注入し、溶出液を 40°C 以下で約 1 mL まで減圧濃縮後、窒素気流により溶媒を除去した。この残留物をアセトン/*n*-ヘキサン (1 : 1) 4 mL に溶解したものをエトフメセートの試験溶液とした。なお、PEG300 を添加する場合は、試験溶液 1 mL を採り、0.1 w/v% PEG300・アセトン/*n*-ヘキサン (1 : 1) 溶液 100 µL を添加した。

(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。) の分析

① 加水分解

(1) の熱酸処理用容器 (50 mL 容) に (2) で得られた水層を合わせた。遠心管を塩酸 5 mL で洗い、洗液を合わせた。これを密栓して 80°C で 2.5 時間加熱した (30 分毎に容器を穏やかに 5 秒間程度振とうした)。放冷後、反応液を遠心管 (50 mL 容) に移した。熱酸処理用容器を水 10 mL 及びジエチルエーテル 20 mL で洗い、洗液を遠心管に合わせた。これを 5 分間振とう後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離した。ジエチルエーテル層を採った後、ジエチルエーテル 20 mL でさらに 2 回振とう抽出した。抽出液をナスフラスコに合わせ、40°C 以下で約 0.5 mL まで減圧濃縮し、ガラス試験管に移した。ジエチルエーテル 2 mL でナスフラスコを洗い、洗液を試験管に合わせ、40°C 以下で窒素気流により溶媒を除去した。

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 を加えて溶解後、密栓して 80°C で 15 分間加熱した。放冷後、酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1 : 9) 5 mL を加えて混合した。

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 g) に酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1 : 9) 10 mLを注入し、流出液は捨てた。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/*n*-ヘキサン (1 : 9) 10 mLを注入し、流出液は捨てた。次いで、酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1 : 4) 20 mLを注入し、溶出液を40°C以下で約1 mLまで減圧濃縮後、窒素気流により溶媒を除去した。この残留物をアセトン/*n*-ヘキサン (1 : 1) 4 mLに溶解したものを試験溶液とした。なお、PEG300を添加する場合は、試験溶液1 mLを採り、0.1 w/v%PEG300・アセトン/*n*-ヘキサン (1 : 1) 溶液100 μ Lを添加した。

8. マトリックス添加標準溶液の調製

ブランク試験溶液 200 μ Lを採り、窒素気流下、溶媒を除去後、添加回収試験における回収率 100%相当濃度の溶媒標準溶液 200 μ Lを加えて溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。PEG300を添加する場合は、この溶液に 0.1 w/v%PEG300・アセトン/*n*-ヘキサン (1 : 1) 溶液 20 μ Lを加えて混合した。

[分析法フローチャート]

秤 取

- ↓ 遠心管の重量を量る
- ↓ 試料 20.0 g を量り採る

抽出

- ↓ アセトン/水 (4 : 1) 100 mL を加え、ホモジナイズ
- ↓ 遠心分離 (毎分 3000 回転、5 分間) 後、上澄液を採る
- ↓ アセトン/水 (4 : 1) 50 mL を加え、ホモジナイズ
- ↓ 遠心分離 (毎分 3000 回転、5 分間) 後、上澄液を採り、先の上澄液と合わせる
- ↓ 残留物量を量り、1/100 量 (試料 0.2 g 相当) を熱酸処理用容器に移す (①)

定容

- ↓ 上澄液をアセトンで 200 mL に定容 (②)

水酸化ナトリウム溶液/ヘキサン分配

- ↓ ②を 2 mL (試料 0.2 g 相当) 採り、アセトンを除去
- ↓ 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、振とう
- ↓ 遠心分離 (毎分 3000 回転、5 分間)。 *n*-ヘキサン層を採る
- ↓ 水層に *n*-ヘキサン 5 mL を加え、振とう
- ↓ 遠心分離 (毎分 3000 回転、5 分間)。 *n*-ヘキサン層を採る。水層を①と合わせる (③)

<エトフメセートの分析>

シリカゲルミニカラム (1 g) 精製

- ↓ *n*-ヘキサン層の溶媒を除去。酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1 : 9) 1 mL に溶解
- ↓ 酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1 : 9) 10 mL でコンディショニング
- ↓ 負荷。酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1 : 9) 10 mL で洗浄
- ↓ 酢酸エチル/*n*-ヘキサン (3 : 17) 10 mL で溶出
- ↓ 溶媒を除去。アセトン/*n*-ヘキサン (1 : 1) 4 mL に溶解
- ↓ (PEG300 を添加する場合) 試験溶液 1 mL を採り、0.1 w/v%PEG300・アセトン/*n*-ヘキサン (1 : 1) 溶液 100 μ L を添加

GC-MS/MS 測定

<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。）の分析>

熱酸処理

↓ ③に塩酸 5 mL を加え、80°Cで 2.5 時間加熱

転溶

↓ 放冷後、水 10 mL 及びジエチルエーテル 20 mL を加え、振とう

↓ 遠心分離（毎分 3000 回転、5 分間）。有機層を採る

↓ ジエチルエーテル 20 mL を加え、振とう

↓ 遠心分離（毎分 3000 回転、5 分間）。有機層を採る

↓ ジエチルエーテル 20 mL を加え、振とう

↓ 遠心分離（毎分 3000 回転、5 分間）。有機層を採る

↓ 有機層を合わせ、溶媒を除去

代謝物 M2 への変換

↓ 無水酢酸 0.5 mL を加え、80°Cで 15 分間加熱

↓ 放冷後、酢酸エチル/*n*-ヘキサン（1：9）5 mL を加える（④）

シリカゲルミニカラム（1 g）精製

↓ 酢酸エチル/*n*-ヘキサン（1：9）10 mL でコンディショニング

↓ ④を負荷。酢酸エチル/*n*-ヘキサン（1：9）10 mL で洗浄

↓ 酢酸エチル/*n*-ヘキサン（1：4）20 mL で溶出

↓ 溶媒を除去。アセトン/*n*-ヘキサン（1：1）4 mL に溶解

↓ （PEG300 を添加する場合）試験溶液 1 mL を採り、0.1 w/v%PEG300・アセトン/*n*-ヘキサン（1：1）溶液 100 μ L を添加

GC-MS/MS 測定

スキーム 2. 確立した試験溶液調製方法の概要

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

(1) LC-MS/MS 測定条件

まず、LC-MS/MS を用いた測定を検討した。

①MS条件

a. エトフメセート

ESI (+) 及びESI (-) モードでスキャン測定を行ったところ、ESI (-) モードでは脱プロトン分子等のエトフメセート由来のイオンは検出されなかった。一方、ESI (+) モードではプロトン付加分子 (m/z 287.1、 $[M+H]^+$) 及びアンモニウム付加分子 (m/z 304.1、 $[M+NH_4]^+$) が強く観測された (図2)。これらをプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行ったところ、いずれもプロダクトイオンとして m/z 121.1 及び 161.0 等が観測された (図3-1 及び 3-2)。後述する LC 条件で測定を行い、 S/N が高かった m/z 287.1 \rightarrow 121.1 を定量イオン、 m/z 304.1 \rightarrow 121.1 を定性イオンとすることとした。

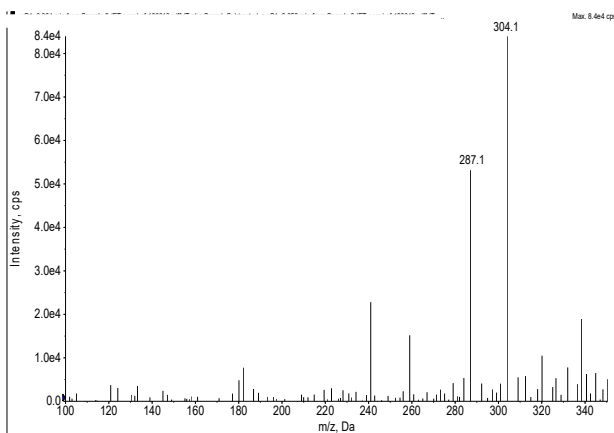


図2 エトフメセートのマススペクトル

スキャン範囲： m/z 100~350、測定条件：ESI (+)、デクラスタリング電位 120 V

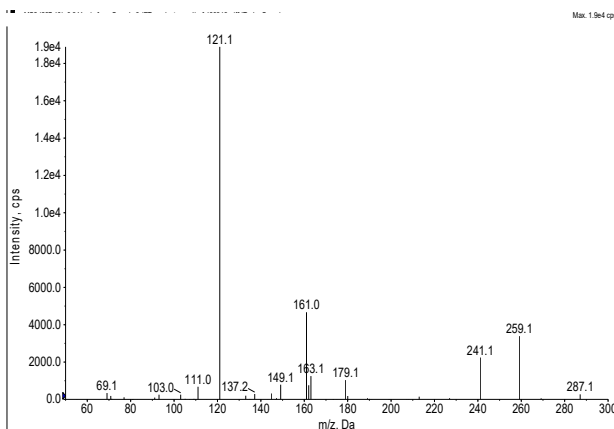


図3-1 エトフメセートのプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン： m/z 287.1、スキャン範囲： m/z 50~300、測定条件：ESI (+)、デクラスタリング電位120 V、コリジョンエネルギー 20 eV

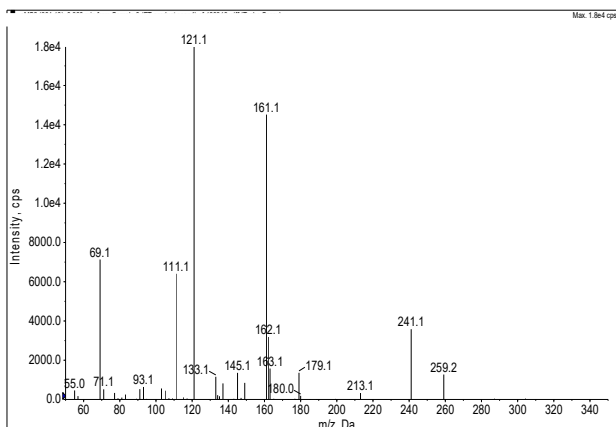


図3-2 エト酢酸のプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン： m/z 304.1、スキャン範囲： m/z 50～350、測定条件：ESI（+）、
デクラスタリング電位50 V、コリジョンエネルギー 30 eV

b. 代謝物M2

ESI（+）及びESI（-）モードでスキャン測定を行ったところ、ESI（+）モードではプロトン付加分子等の代謝物M2由来のイオンは検出されなかった。一方、ESI（-）モードでは脱プロトン分子（ m/z 255.1、 $[M-H]^-$ ）及びそのフラグメントイオン m/z 177.1が強く観測された（図4）。脱プロトン分子（ m/z 255.1、 $[M-H]^-$ ）をプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行ったところ、プロダクトイオンとして m/z 177.0及び149.0等が観測された（図5-1）。フラグメントイオン m/z 177.1をプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行ったところ、プロダクトイオンとして m/z 149.0等が観測された（図5-2）。後述するLC条件で測定を行い、 S/N が高かった m/z 255.1→177.0を定量、 m/z 177.1→149.0を定性イオンとすることとした。

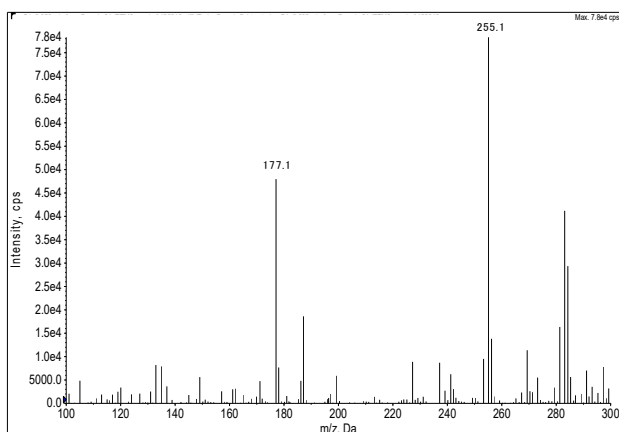


図4 代謝物M2のマススペクトル

スキャン範囲： m/z 100～300、測定条件：ESI（-）、デクラスタリング電位-90 V

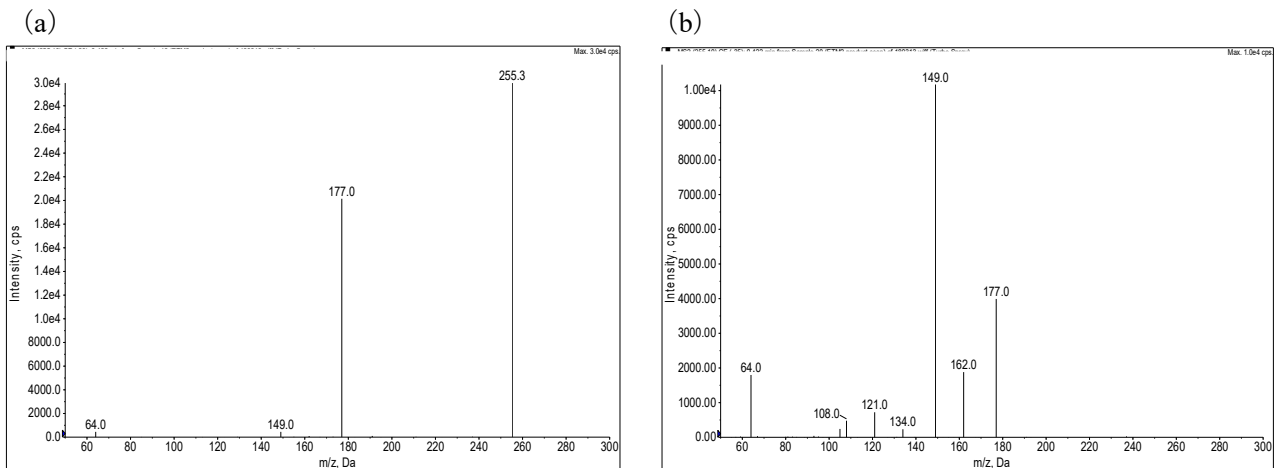


図5-1 代謝物M2のプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン： m/z 255.1、スキャン範囲： m/z 50～300、測定条件：ESI（－）、
 デクラスタリング電位-90 V、コリジョンエネルギー (a) -20 eV、(b) -35 eV

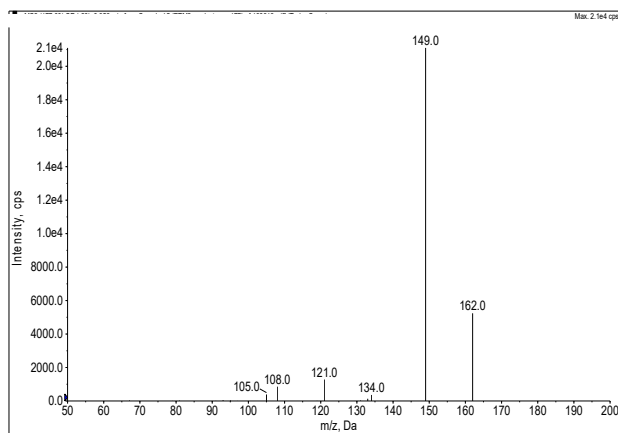


図5-2 代謝物M2のプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン： m/z 177.1、スキャン範囲： m/z 50～200、測定条件：ESI（－）、
 デクラスタリング電位-130 V、コリジョンエネルギー -20 eV

c. 代謝物M3

ESI（＋）及びESI（－）モードでスキャン測定を行ったところ、ESI（＋）モードではプロトン付加分子等の代謝物M3由来のイオンは検出されなかった。一方、ESI（－）モードでは脱プロトン分子（ m/z 273.1、 $[M-H]^-$ ）が強く観測された（図6）。これをプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行ったところ、プロダクトイオンとして m/z 194.0、150.1、149.1及び79.0等が観測された（図7）。後述するLC条件で測定を行い、 S/N が高かった m/z 273.1→149.1を定量イオン、 m/z 273.1→194.0を定性イオンとすることとした。

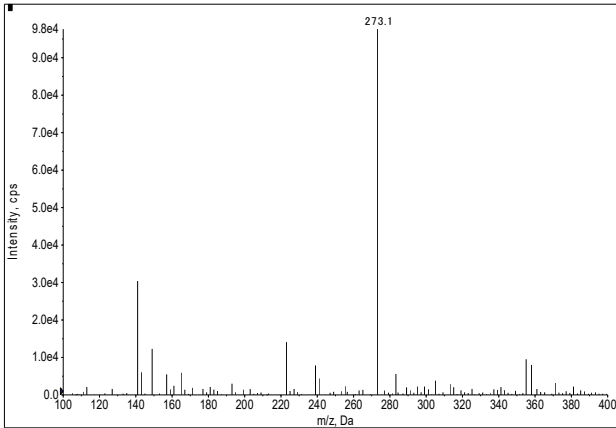


図6 代謝物M3のマススペクトル

スキャン範囲： m/z 100～400、測定条件：ESI（-）、デクラスタリング電位：-80 V

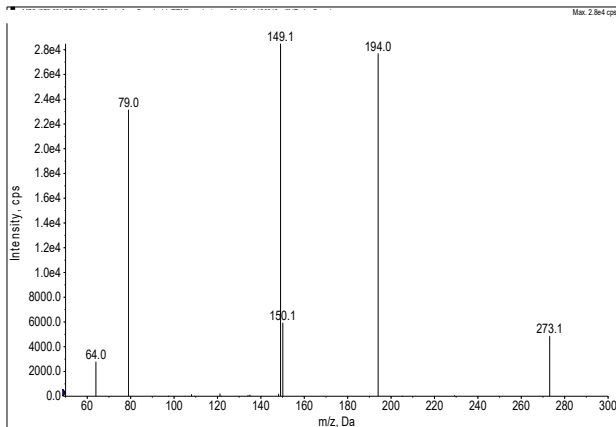


図7 代謝物M3のプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン： m/z 273.1、スキャン範囲： m/z 50～300、測定条件：ESI（-）、デクラスタリング電位：-80 V、コリジョンエネルギー：-20 eV

②LC条件

a. 移動相及び分析カラム

まず、ODS カラム（InertSustain C18、ジーエルサイエンス製）を用いて移動相条件を検討した。移動相の有機溶媒としてメタノール及びアセトニトリルを比較したところ、エトフメセート、代謝物 M2 及び代謝物 M3 のいずれもメタノールの方が高いピーク強度が得られた。3 化合物の中で特に感度が低かった代謝物 M2 を用いて移動相の添加剤（酢酸、ギ酸及び酢酸アンモニウム）を検討したところ、酢酸アンモニウムを用いた場合に最も高いピーク強度が得られた。酢酸アンモニウムの濃度（1、2.5、5 及び 10 mmol/L）を検討した結果、1 mmol/L で最も高いピーク強度が得られた。これらの結果から、移動相には 1 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及び 1 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液を用いることとした。

次に、4 種類の ODS カラム [InertSustain C18、Inertsil ODS-4（ジーエルサイエンス製）、L-column ODS（化学物質評価研究機構製）及び Atlantis T3（Waters 製）] を用いてピーク形状やピーク強度を比較した。なお、注入溶媒にはメタノールを用いた。その結果、代謝物 M3 はいずれのカラムを用いた場合もテーリングしたが、エトフメセート及び代謝物 M2 は良好なピーク形状が得られた。感度の低い代謝物 M2 は、InertSustain C18 を用いた場合に最も高い S/N が得られた。

以上の結果から、分析カラムとして InertSustain C18、移動相として 1 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及び 1 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液を用いて測定を行うこととした。

b. 注入溶媒（試験溶液の調製溶媒）

メタノールを注入溶媒（試験溶液の調製溶媒）として用いて、a で最適化した移動相条件で測定を行った。その結果、エトフメセートや代謝物 M2 は良好なピーク形状が得られたが、代謝物 M3 ではテーリングが見られた。注入溶媒にギ酸を添加したところ、ピーク形状が改善したため、注入溶媒としてメタノール/ギ酸（100：1）、（1000：1）及び（10000：1）を検討した。その結果、メタノール/ギ酸（100：1）及び（1000：1）で良好なピーク形状が得られた。メタノール/ギ酸（100：1）及び（1000：1）では、エトフメセート、代謝物 M2 及び代謝物 M3 のいずれの化合物もピーク形状や感度に大きな違いは見られなかったことから、メタノール/ギ酸（1000：1）を注入溶媒として用いることとした。

エトフメセート、代謝物 M2 及び代謝物 M3 標準溶液のクロマトグラムを図 8 に示した。

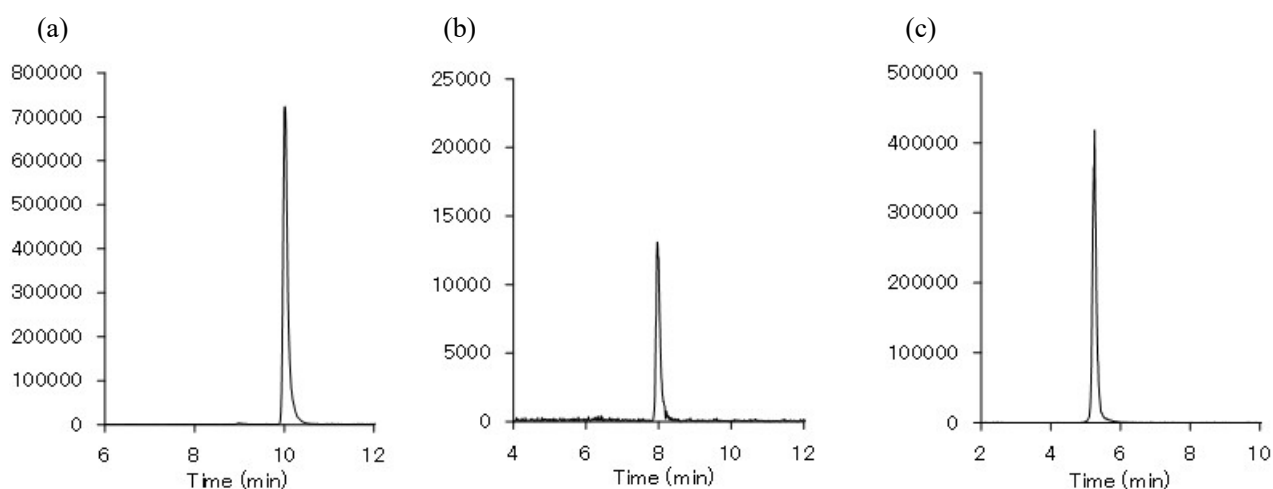


図 8 エトフメセート、代謝物 M2 及び代謝物 M3 標準溶液（エトフメセートとして 10 ng/mL）のクロマトグラム

(a) エトフメセート、(b) 代謝物 M2、(c) 代謝物 M3

(2) GC-MS/MS 測定条件

LC-MS/MS測定では代謝物M2が低感度であったため、GC-MS/MSを用いた測定を検討した。分析カラムとして一般的な微極性カラム（5%ジフェニル/95%ジメチルポリシロキサン）であるDB-5ms（Agilent Technologies製）を用いて測定条件の検討を行った。

a. エトフメセート

スキャン測定を行ったところ、分子イオン (M^+ 、 m/z 286.1) 及びそのフラグメントイオン (m/z 207.1 等) が観測された (図 9)。分子イオン m/z 286.1 をプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行ったところ、プロダクトイオンとして m/z 207.2 や 161.1 等が観測された (図 10-1)。フラグメントイオン m/z 207.1 をプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行ったところ、プロダクトイオンとして m/z 161.1 や 179.1 等が観測された (図 10-2)。SRM 測定を行った結果、高い S/N が得られた m/z 286.1→207.2 を定量イオン、 m/z 286.1→161.1 を定性イオンとすることとした。

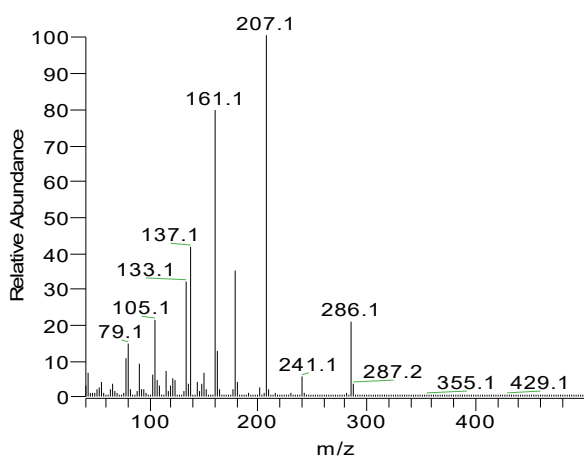
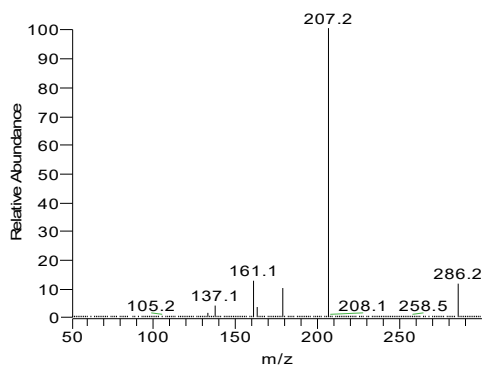


図9 エトフメセートのマススペクトル

スキャン範囲：m/z 40~500

(a)



(b)

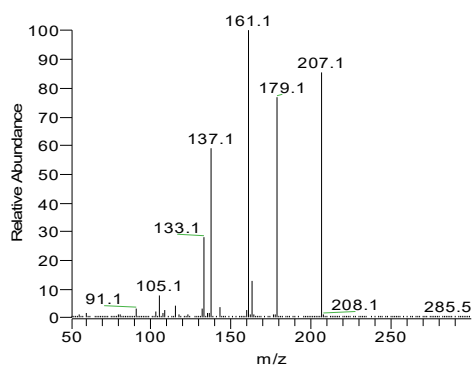


図10-1 エトフメセートのプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン：m/z 286.1、スキャン範囲：m/z 50~300、コリジョンエネルギー：(a) 8 eV、(b) 17 eV

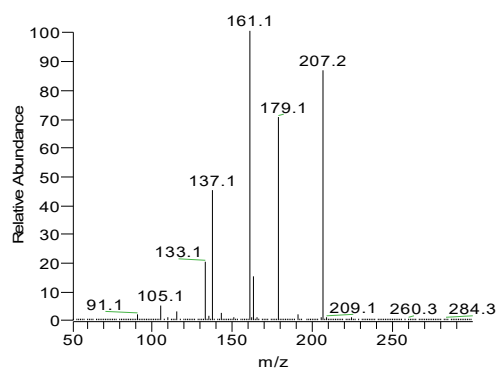


図10-2 エトフメセートのプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン：m/z 207.1、スキャン範囲：m/z 50~300、コリジョンエネルギー：6 eV

b. 代謝物M2

スキャン測定を行ったところ、分子イオン (M^+ 、 m/z 256.1) 及びそのフラグメントイオン (m/z 149.1 や 177.1 等) が観測された (図 11)。分子イオン m/z 256.1 をプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行ったところ、プロダクトイオンとして m/z 149.1 や 177.1 等が観測された (図 12-1)。フラグメントイオン m/z 177.1 をプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行ったところ、プロダクトイオンとして m/z 149.1 等が観測された (図 12-2)。SRM 測定を行った結果、高い S/N が得られた m/z 256.1 \rightarrow 149.1 を定量イオン、 m/z 256.1 \rightarrow 177.1 を定性イオンとすることとした。

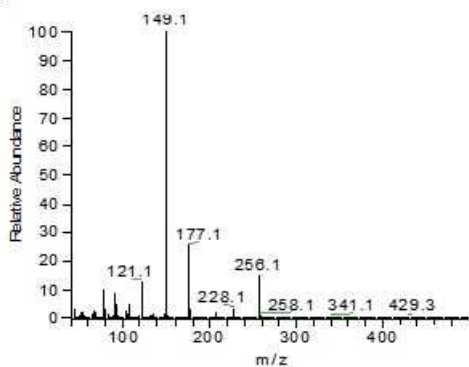


図11 代謝物M2のマススペクトル

スキャン範囲： m/z 40~500

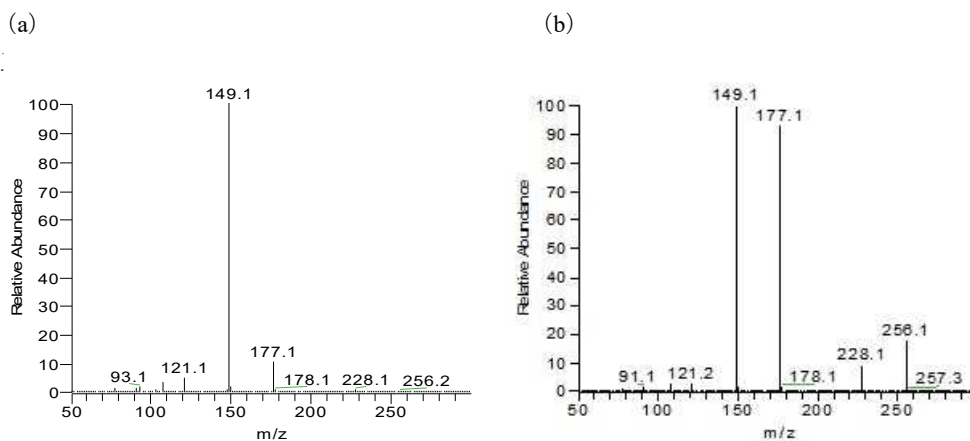


図12-1 代謝物M2のプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン： m/z 256.1、スキャン範囲： m/z 50~300、コリジョンエネルギー：(a) 15 eV、(b) 8 eV

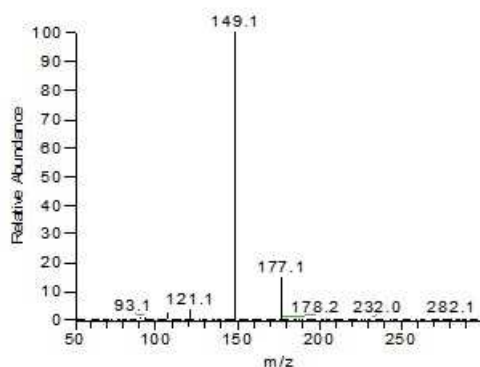


図12-2 代謝物M2のプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン： m/z 177.1、スキャン範囲： m/z 50~300、コリジョンエネルギー：6 eV

c. 代謝物M3

代謝物M3標準溶液をスキャン測定したところ、代謝物M3のピークは観測されず、代謝物M2のピークが観測された。代謝物M3は注入口において代謝物M2へ変換したものと考えられた。GC-MS/MS測定における代謝物M3標準溶液（エトフメセートとして10 ng/mL）から代謝物M2への変換率は44%（n=3）であった。

エトフメセート及び代謝物 M2 標準溶液のクロマトグラムを図 13、検量線を図 14 及び図 15 に示した。LC-MS/MS よりも GC-MS/MS を用いた方が代謝物 M2 を高感度に測定することができたため、GC-MS/MS を用いた試験法を開発することとした。なお、GC-MS/MS では代謝物 M3 を直接測定することができないため、検討の際は LC-MS/MS での測定も行うこととした。

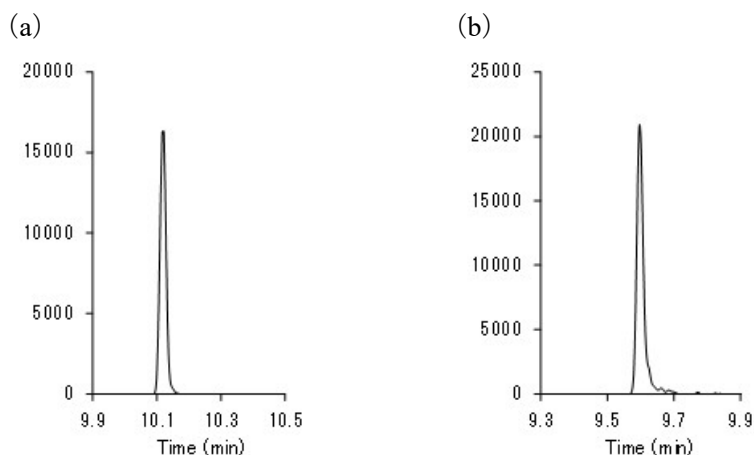


図 13 エトフメセート及び代謝物 M2 標準溶液（0.5 ng/mL）のクロマトグラム
(a) エトフメセート、 (b) 代謝物 M2

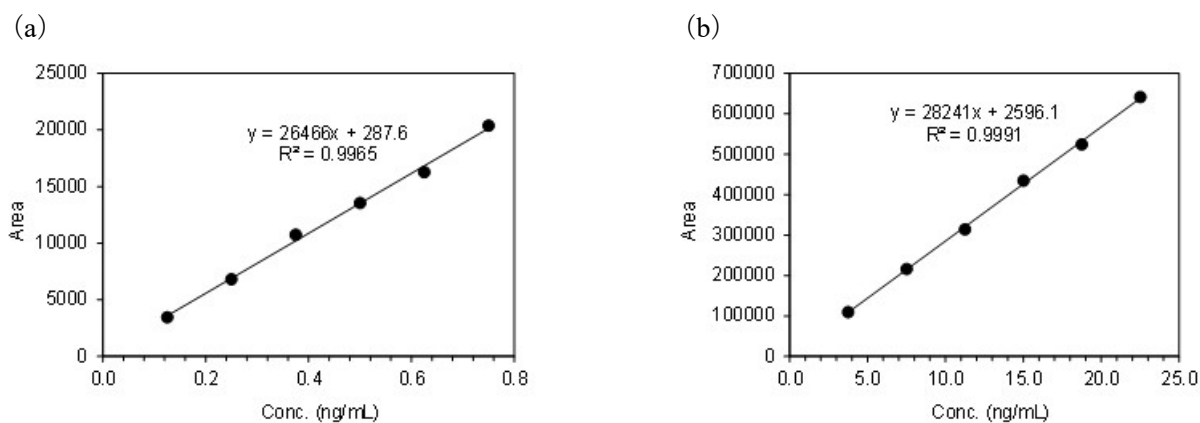


図 14 エトフメセートの検量線の例
(a) 0.125~0.75 ng/mL、 (b) 3.75~22.5 ng/mL

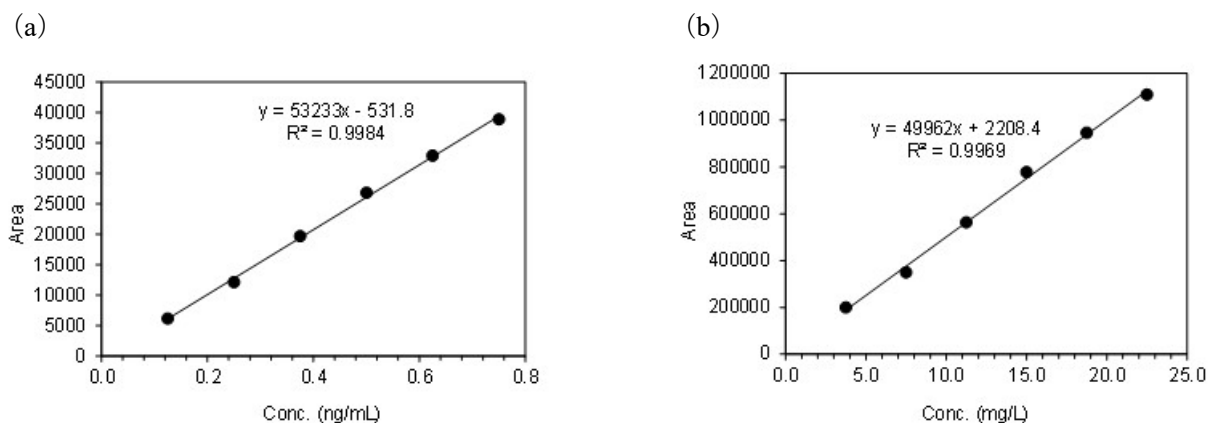


図 15 代謝物 M2 の検量線の例

(a) 0.125~0.75 ng/mL、 (b) 3.75~22.5 mg/L (エトフメセートとして)

2. 試験溶液の調製方法の検討

(1) 抽出

抽出溶媒としてアセトニトリル、アセトン及びメタノールを用いて、基準値が設定されているたまねぎ、てんさい及びにんにくをホモジナイズした。その結果、にんにくではいずれの溶媒を用いても試料が粘土状となってシャフトに付着し、ホモジナイズ操作が困難であった。含水溶媒では操作性が改善したため、抽出溶媒のアセトン及び水の比率を検討した。その結果、アセトン/水 (4 : 1) ではいずれの食品についても操作上の問題はなかったため、アセトン/水 (4 : 1) を抽出溶媒として用いることとした。

エトフメセート代謝物の一部は有機溶媒では抽出されず、抽出後の残留物に残ると考えられている。²⁾ そのため申請企業の方法¹⁾では、アセトン抽出液を水酸化ナトリウム溶液/ヘキサン分配して得られた水層と、アセトン抽出後の残留物を合わせて熱酸処理を行う方法を採用している (スキーム 1)。本試験でも水層とアセトン抽出後の残留物を合わせて熱酸処理することとした。しかしながら、申請企業の方法のように、抽出後の残留物を全量、熱酸処理するためには大量の塩酸が必要となる。このため、本試験法では残留物の一部を分取して熱酸処理することとした。このとき、抽出後の残留物は抽出溶媒を含んでいるため、溶媒の揮発により重量が変動する可能性がある。そこで、残留物を窒素吹き付けした場合としない場合での放置時間による重量変化について検討した。その結果、いずれの場合も、残留物の重量は時間とともに徐々に減少したが、5 分間での重量の減少率は 1% 未満であった (図 16-1 及び図 16-2)。窒素吹き付けした場合としない場合では、にんにくを除き、減少率に大きな違いは認められなかった。この結果から、残留物の重量を量った後、直ちに熱酸処理に必要な量を量り採れば、溶媒の揮発による影響は無視できるものと考えられた。

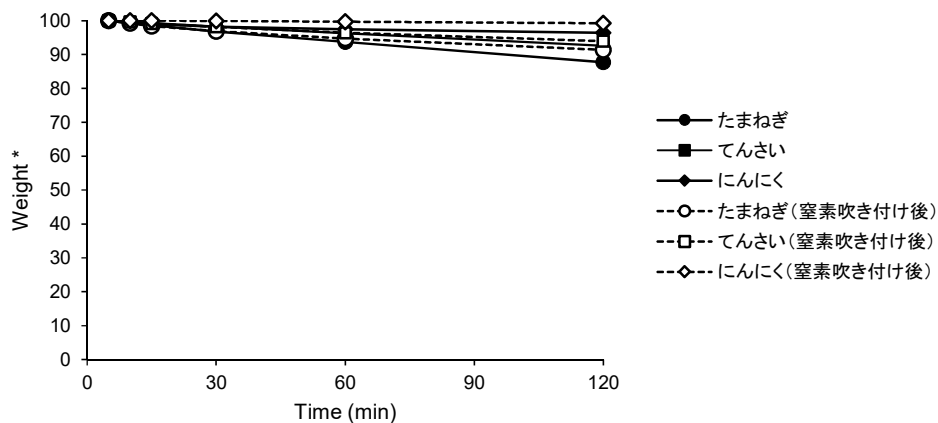


図 16-1 抽出後の残留物の放置時間による重量変化 (5~120 分後)

*5 分後の重量を 100 とした

各食品 n=2

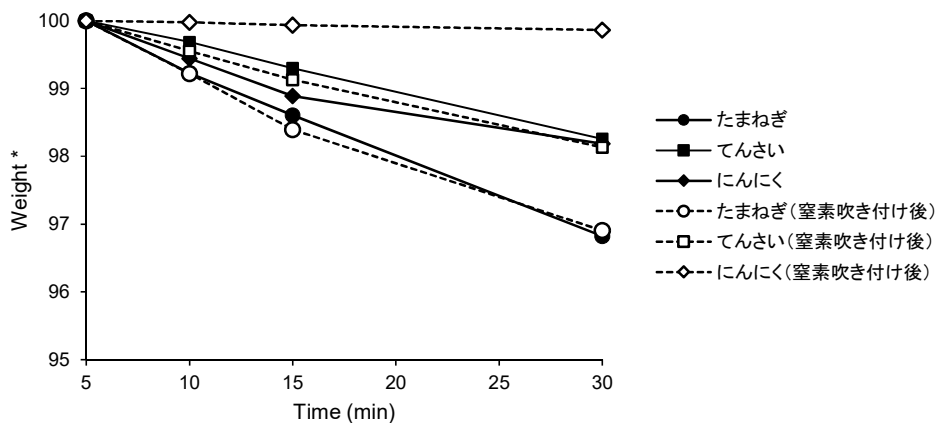


図 16-2 抽出後の残留物の放置時間による重量変化 (5~30 分後)

*5 分後の重量を 100 とした

各食品 n=2

(2) 転溶

①酸性条件

申請企業の方法¹⁾では、塩酸酸性条件下加熱(熱酸処理)し、エトフメセートの代謝物を代謝物 M2 へ変換する方法を採用している。そこで反応後の溶液から有機溶媒で転溶することによって、エトフメセート、代謝物 M2 及び代謝物 M3 を抽出することができるか検討を行った。

a. エトフメセート

転溶溶媒として酢酸エチル及びn-ヘキサンを検討した。熱酸処理後の反応液を水で2倍希釈した後、転溶することを想定し、3 mol/L塩酸からの転溶の回収率を求めた。その結果、酸性条件下ではいずれの溶媒でも低回収率となり、代謝物M2や代謝物M3への変換も認められなかった(表1)。中性または塩基性(pH 14)条件では、酢酸エチルで転溶することにより良好な回収率が得られた(表2 (a)(b))。しかしながら、6 mol/L塩酸に溶解した後、水酸化ナトリウム溶液を用いて中性(pH 7)または塩基性(pH 14)に調整し、酢酸エチルで転溶したところ、いずれも回収率が2%以下となり、代謝物M2や代謝物M3への変換も認められなかった(表2 (c)(d))。これらの結果から、強酸性条件ではエトフメセートは分解するものと考えられた。このため、熱酸処理を行う前にエトフメセートを分離することとした。

表 1 酸性条件下 (3 mol/L 塩酸) での転溶におけるエトフメセートの回収率 (%)

	転溶溶媒	1 回目	2 回目	3 回目	合計
エトフメセート	酢酸エチル	4	0	0	4
	<i>n</i> -ヘキサン	2	0	0	2

操作方法：標準溶液 (1 µg/mL) を 100 µL 採り、溶媒を除去後、3 mol/L 塩酸 40 mL に溶解し、各転溶溶媒 40 mL で 3 回転溶した。

表 2 中性または塩基性条件下での酢酸エチル転溶におけるエトフメセートの回収率 (%)

	転溶溶媒	水層	1 回目	2 回目	3 回目	合計
エトフメセート	酢酸エチル	(a) 中性 (pH 7)	100	5	0	105
		(b) 塩基性 (pH 14)	95	4	0	99
		(c) 6 mol/L 塩酸に溶解後、中性 (pH 7) に調整	1	0	0	1
		(d) 6 mol/L 塩酸に溶解後、塩基性 (pH 14) に調整	2	0	0	2

操作方法：標準溶液 (1 µg/mL) を 100 µL 採り、溶媒を除去した後、(a) 水 40 mL に溶解、(b) 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 40 mL に溶解、(c) 6 mol/L 塩酸 20 mL に溶解して 1 分間振とうした後、8 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH 7 に調整、(d) 6 mol/L 塩酸 20 mL に溶解して 1 分間振とうした後、8 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH 14 に調整した。これを酢酸エチル 40 mL で 3 回転溶した。

b. 代謝物 M2 及び代謝物 M3

転溶溶媒として酢酸エチル、酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1 : 1)、*n*-ヘキサン及びジエチルエーテルを検討した。その結果、代謝物 M2 から代謝物 M3 または代謝物 M3 から代謝物 M2 への変換が見られたものの、代謝物 M2 及び代謝物 M3 の合計の回収率は *n*-ヘキサンを除き、良好であった (表 3)。しかしながら、酢酸エチルまたは酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1 : 1) を用いた場合は、転溶操作中に酢酸が生成し、溶媒の除去が困難であった。このため、ジエチルエーテルで 3 回転溶することとした。

表 3 酸性条件下 (3 mol/L 塩酸) での転溶における代謝物 M2 及び代謝物 M3 の回収率 (%)

添加	転溶溶媒	定量	1 回目	2 回目	3 回目	合計	合計 (代謝物 M2+ 代謝物 M3)
代謝物 M2	酢酸エチル	M2	93	2	0	95	102
		M3	7	0	0	7	
	酢酸エチル/ <i>n</i> -ヘキサン (1 : 1)	M2	91	3	0	94	103
		M3	6	2	1	9	
	<i>n</i> -ヘキサン	M2	41	20	10	71	72
		M3	0	1	0	1	
ジエチルエーテル	M2	98	4	0	102	102	
	M3	0	0	0	0		
代謝物 M3	酢酸エチル	M2	42	0	0	42	89
		M3	46	1	0	47	
	酢酸エチル/ <i>n</i> -ヘキサン (1 : 1)	M2	25	7	2	34	97
		M3	47	13	3	63	
	<i>n</i> -ヘキサン	M2	25	21	13	59	59
		M3	0	0	0	0	
ジエチルエーテル	M2	11	2	1	14	101	
	M3	70	15	2	87		

操作方法：各標準溶液 (1 µg/mL) を 100 µL 採り、溶媒を除去後、3 mol/L 塩酸 40 mL に溶解し、各転溶溶媒 40 mL で 3 回転溶した。

②中性及び塩基性条件

エトフメセートは強酸性条件では分解するため、熱酸処理を行う前にエトフメセートのみを分離する必要がある。そこで、中性または塩基性条件下、酢酸エチルまたは *n*-ヘキサンで液-液分配することによって、エトフメセートを代謝物 M2 や代謝物 M3 (代謝物 M3 抱合体を含む) と分離することができるか検討を行った。中性条件での結果を表 4、塩基性条件での結果を表 5-1 及び表 5-2 に示した。中性条件では、いずれの溶媒を用いた場合もエトフメセート及び代謝物 M2 が有機層へ移行し、エトフメセートを分離することはできなかった。塩基性条件下 (0.001~1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液) においても、酢酸エチルを転溶溶媒として用いた場合はいずれの化合物も有機層への移行が見られ、エトフメセートを分離することはできなかった。これに対し、*n*-ヘキサンを用いた場合は、エトフメセートのみに有機層へ移行し、エトフメセートを代謝物 M2 及び代謝物 M3 と分離することができた。これらの結果から、マトリックス共存下での pH の変動を考慮し、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液及び *n*-ヘキサンを用いて液々分配することとし、*n*-ヘキサン層はエトフメセート、水層は代謝物 M2 及び代謝物 M3 (代謝物 M3 抱合体を含む) の分析を行った。なお、マトリックス共存下での水層の pH はたまねぎ、てんさい、にんにくのいずれの食品も約 13 であった。

表4 中性条件下での転溶におけるエトフメセート、代謝物M2及び代謝物M3の回収率 (%)

	転溶溶媒	1回目	2回目	3回目	合計
エトフメセート	酢酸エチル	100	5	0	105
	<i>n</i> -ヘキサン	98	4	0	102
代謝物 M2	酢酸エチル	98	2	0	100
	<i>n</i> -ヘキサン	61	26	9	96
代謝物 M3	酢酸エチル	97	8	1	106
	<i>n</i> -ヘキサン	0	0	0	0

操作方法：各標準溶液 (1 µg/mL) を 100 µL 採り、溶媒を除去後、水 40 mL に溶解し、各転溶溶媒 40 mL で 3 回転溶した。

表5-1 塩基性条件下での転溶におけるエトフメセートの回収率 (%)

	転溶溶媒	水層	1回目	2回目	3回目	合計
エトフメセート	酢酸エチル	1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 (pH 14)	95	4	0	99
	<i>n</i> -ヘキサン	1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 (pH 14)	95	1	0	96
	<i>n</i> -ヘキサン	0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 (pH 13)	91	3	0	94
	<i>n</i> -ヘキサン	0.001 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 (pH 11)	95	3	0	98

操作方法：エトフメセート標準溶液 (1 µg/mL) を 100 µL 採り、溶媒を除去後、水酸化ナトリウム溶液 40 mL に溶解し、各転溶溶媒 40 mL で 3 回転溶した。

表5-2 塩基性条件下での転溶における代謝物M2及び代謝物M3の回収率 (%)

	転溶溶媒	水層	定量	1回目	2回目	3回目	合計	合計 (代謝物 M2 +代謝物 M3)
代謝物 M2	酢酸エチル	1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 (pH 14)	M2	4	0	0	4	22
			M3	6	7	5	18	
	<i>n</i> -ヘキサン	1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 (pH 14)	M2	0	0	0	0	0
			M3	0	0	0	0	
	<i>n</i> -ヘキサン	0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 (pH 13)	M2	0	0	0	0	0
			M3	0	0	0	0	
<i>n</i> -ヘキサン	0.001 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 (pH 11)	M2	0	0	0	0	0	
		M3	0	0	0	0		
代謝物 M3	酢酸エチル	1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 (pH 14)	M2	0	0	0	0	16
			M3	5	6	5	16	
	<i>n</i> -ヘキサン	1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 (pH 14)	M2	0	0	0	0	0
			M3	0	0	0	0	
	<i>n</i> -ヘキサン	0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 (pH 13)	M2	0	0	0	0	0
			M3	0	0	0	0	
<i>n</i> -ヘキサン	0.001 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 (pH 11)	M2	0	0	0	0	0	
		M3	0	0	0	0		

操作方法：各標準溶液 (1 µg/mL) を 100 µL 採り、溶媒を除去後、水酸化ナトリウム溶液 40 mL に溶解し、各転溶溶媒 40 mL で 3 回転溶した。

(3) 代謝物 M3 (及び代謝物 M3 抱合体) から代謝物 M2 への変換

① 熱酸処理

a. 標準品の反応

熱酸処理を行うことにより、代謝物 M3 抱合体が代謝物 M3 へ加水分解されるとともに代謝物 M3 が代謝物 M2 へ変換されるものと考えられている。²⁾ そこで、申請企業の方法¹⁾と同様に、代謝物 M3 に 6 mol/L 塩酸を加え、80°C で加熱し、代謝物 M2 及び代謝物 M3 の回収率を求めた。その結果、0.5 時間以上加熱することにより、8 割以上が代謝物 M2 へ変換したが、16 時間加熱を行っても未変換の代謝物 M3 が 1~2 割程度認められた (図 17 (a))。代謝物 M2 に 6 mol/L 塩酸を加え、同様に 80°C で加熱したところ、加熱時間によらず 1~2 割程度が代謝物 M3 へ変換した (図 17 (b))。また、代謝物 M3 または代謝物 M2 を 6 mol/L 塩酸中 100°C で加熱した場合も、80°C で加熱した場合と同様に代謝物 M3 が 1~2 割程度認められた (図 18)。これらの結果から、代謝物 M3 または代謝物 M2 を 6 mol/L 塩酸中 80~100°C で加熱すると代謝物 M2 及び代謝物 M3 の平衡混合物となり、完全に代謝物 M2 へ変換することはできないものと考えられた。

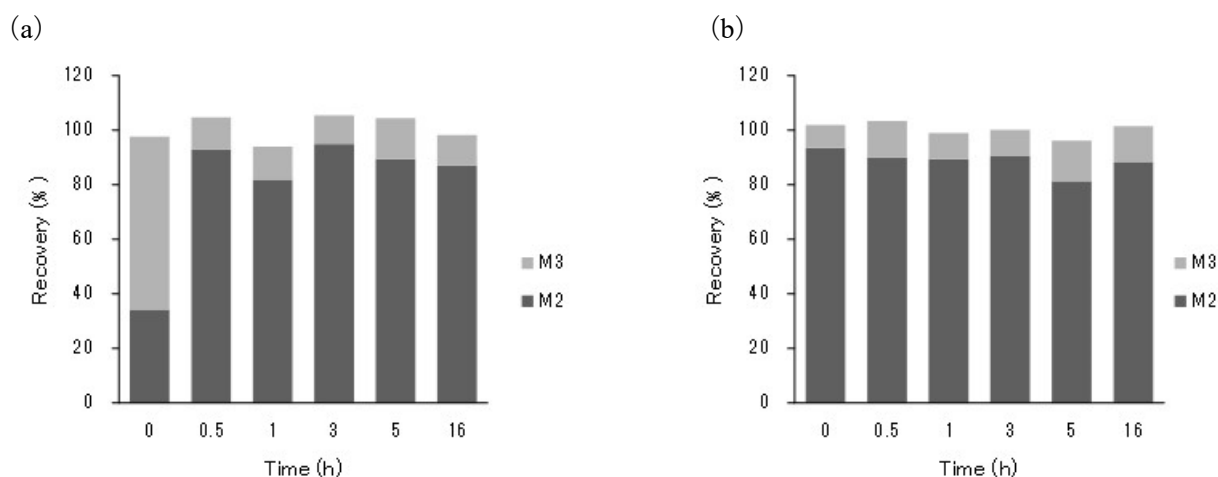


図17 熱酸処理（6 mol/L塩酸、80°C）における代謝物M2及び代謝物M3の回収率（%）

(a) 代謝物 M3、 (b) 代謝物 M2

操作方法： 各化合物の標準溶液（エトフメセートとして 1 µg/mL）を 100 µL 採り、溶媒を除去後、6 mol/L 塩酸 15 mL を加えて、80°C で加熱（0、0.5、1、3、5 及び 16 時間）した。これに水 15 mL を加えた後、ジエチルエーテル 30 mL で 3 回抽出し、溶媒を除去後、メタノール/ギ酸（1000 : 1）に溶解して LC-MS/MS で測定した。

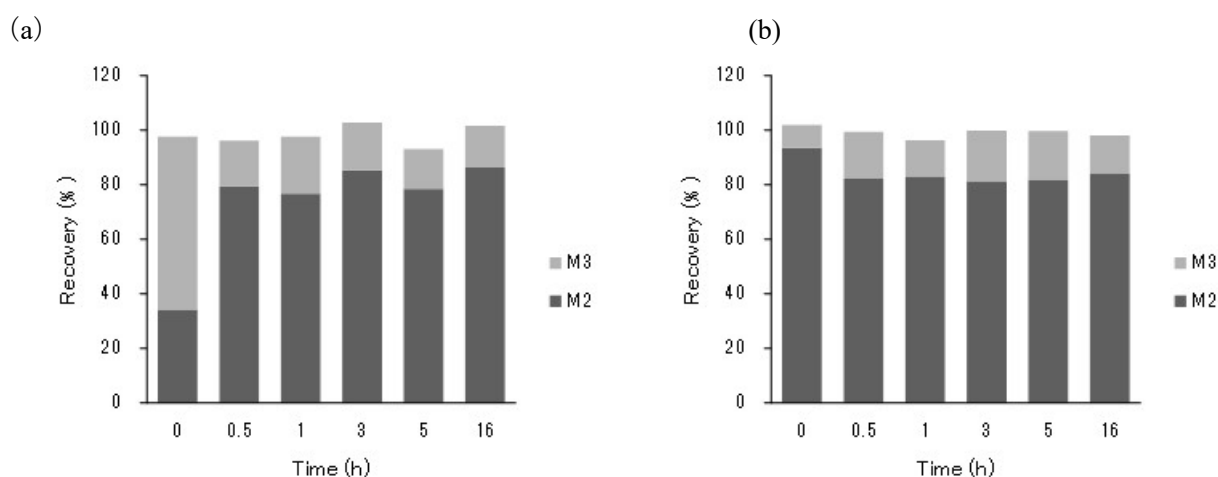


図18 熱酸処理（6 mol/L塩酸、100°C）における代謝物M2及び代謝物M3の回収率（%）

(a) 代謝物 M3、 (b) 代謝物 M2

操作方法： 各化合物の標準溶液（エトフメセートとして 1 µg/mL）を 100 µL 採り、溶媒を除去後、6 mol/L 塩酸 15 mL を加えて、100°C で加熱（0、0.5、1、3、5 及び 16 時間）した。これに水 15 mL を加えた後、ジエチルエーテル 30 mL で 3 回抽出し、溶媒を除去後、メタノール/ギ酸（1000 : 1）に溶解して LC-MS/MS で測定した。

b. マトリックス共存下での反応

マトリックス共存下においても熱酸処理することによって代謝物 M2 及び代謝物 M3 の平衡混合物になるか検討を行った。にんにくをスキーム 2 に従って抽出及び液々分配し、得られた水層及び抽出後の残留物を合わせた。これに代謝物 M2 または代謝物 M3 を添加（0.1 µg）後、塩酸を加えて（溶液中の塩酸濃度は約 6 mol/L）80°C で 2.5 時間加熱した。反応液をジエチルエーテル転溶した後、後述するミニカラム精製〔(4) ②及び (4) ③〕し、代謝物 M2 は GC-MS/MS、代謝物 M3 は LC-MS/MS で測定した。その結果、標準品を反応させた場合と同様に、代謝物 M2 及び代謝物 M3 のいずれを反応させた場合も代謝物 M3 が 2 割程度認められた（図 19）。これらの結果から、マトリックス共存下で熱酸処理した場

合も代謝物 M2 及び代謝物 M3 の平衡混合物となり、完全に代謝物 M2 へ変換することはできないものと考えられた。

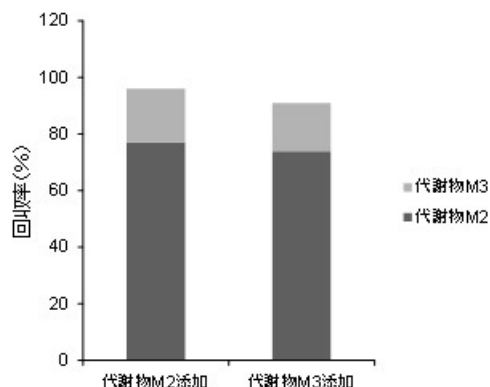


図19 マトリックス共存下での熱酸処理（80℃、2.5時間）における代謝物M2及び代謝物M3の回収率
試料：にんにく

② 無水酢酸を用いた変換

申請企業の方法¹⁾では、熱酸処理後に代謝物M1をアセチル化する方法を採用している（スキーム1）。この反応条件下、代謝物M3が代謝物M2へ変換するか検討を行った。申請企業のアセチル化の方法¹⁾と同様に、代謝物M3（0.1 µg）をトルエン（0.5 mL）及びピリジン（0.05 mL）に溶解し、無水酢酸（0.2 mL）を加えて90℃で15分間加熱した。得られた溶液の溶媒及び無水酢酸を除去後、アセトニトリルに溶解してLC-MS/MSで測定した。その結果、代謝物M2に変換し、代謝物M3のピークは検出されなかった（表6（a））。反応溶媒としてジエチルエーテル（1 mL）を用いて、室温で60分間、無水酢酸（0.4 mL）と反応させた場合も、代謝物M2へ変換し、未変換の代謝物M3は認められなかった（表6（b））。そこで、酢酸やギ酸を用いた場合においても、無水酢酸と同様に代謝物M3から代謝物M2へ変換するか検討した。代謝物M3（0.1 µg）をジエチルエーテル（1 mL）に溶解後、酢酸またはギ酸（0.4 mL）を加え、室温で60分間反応させた後、溶媒及び酸を除去し、アセトニトリルに溶解してLC-MS/MSで測定した。その結果、酢酸では3%、ギ酸では11%が代謝物M2へ変換したものの、大部分は未変換の代謝物M3であった（表6（c）、（d））。これらの結果から、無水酢酸存在下では、代謝物M3は代謝物M2へ変換しやすいものと考えられた。この代謝物M3から代謝物M2への変換反応は、図20のように進行したものと推測された。なお、（a）～（d）のいずれも、反応後の濃縮操作中に変換した可能性も考えられた。

表6 無水酢酸、酢酸及びギ酸を用いた代謝物M3から代謝物M2への変換反応における回収率

	酸	溶媒	反応温度	時間 (分)	回収率 (%)		
					代謝物 M2	代謝物 M3	合計
(a)	無水酢酸 0.2 mL	トルエン 0.5 mL、ピリジン 0.05 mL	90℃	15	97	0	97
(b)	無水酢酸 0.4 mL	ジエチルエーテル 1 mL	室温	60	102	0	102
(c)	酢酸 0.4 mL	ジエチルエーテル 1 mL	室温	60	3	108	111
(d)	ギ酸 0.4 mL	ジエチルエーテル 1 mL	室温	60	11	77	88

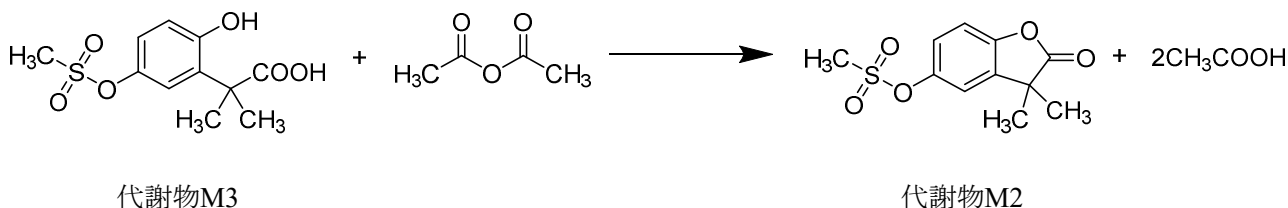


図20 無水酢酸を用いた代謝物M3から代謝物M2への変換

そこで、無水酢酸を用いた代謝物M3から代謝物M2への変換反応条件を最適化することとした。

a. 反応溶媒

反応溶媒としてアセトニトリル、アセトン及びジエチルエーテルを用いた場合と溶媒を加えずに反応させた場合を比較した。代謝物M3 (0.1 μg) を各溶媒 (1 mL) に溶解後、無水酢酸 (0.5 mL) を加え、室温で60分間放置した。無水酢酸の濃縮操作中に反応が進行する可能性が考えられたため、溶媒のみを除去 (無水酢酸の沸点は140°C) 後、そのまま (無水酢酸も一緒に) 後述するミニカラム精製 [(4) ②] を行い、LC-MS/MSで測定して代謝物M2の回収率を求めた。その結果、溶媒を加えなかった場合で最も高い回収率が得られた (図21)。反応溶媒としてジエチルエーテルを用いた場合においても、やや低回収率となったことから、前述 (表6) のように溶媒とともに無水酢酸を濃縮・乾固すると濃縮操作に変換するものと考えられた。これらの結果から、溶媒を加えずに無水酢酸のみで反応することとした。なお、無水酢酸の量が多いと、シリカゲルミニカラムにおいて代謝物M2が保持されなくなるため、無水酢酸0.5 mLを反応に用いることとした。

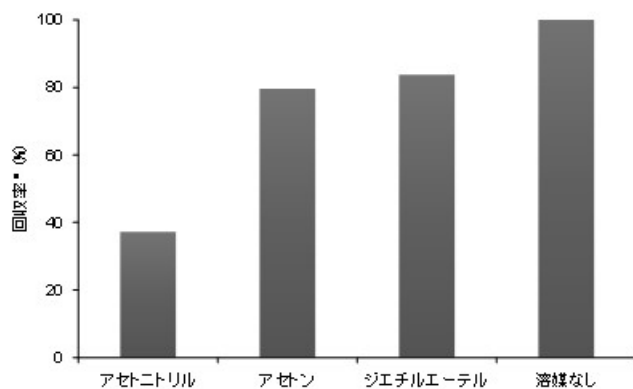


図21 無水酢酸を用いた代謝物M3から代謝物M2への変換反応における反応溶媒の影響

*代謝物 M2 の回収率

b. 反応時間

代謝物M3 (0.1 μg) に無水酢酸 (0.5 mL) を加え、室温で1、5、10、30及び60分間反応し、後述するミニカラム精製 [(4) ②] を行い、LC-MS/MSで測定して代謝物M2の回収率を求めた。その結果、反応1分で良好な回収率が得られ、代謝物M3は無水酢酸を加えた直後に代謝物M2へ変換するものと考えられた (表7)。

表7 無水酢酸を用いた代謝物M3から代謝物M2への変換反応における反応時間と代謝物M2の回収率

反応時間 (分)	回収率 (%)
1	101
5	100
10	105
30	100
60	103

c. マトリックス共存下での代謝物M3から代謝物M2への変換

マトリックス共存下においても標準品と同様に、無水酢酸を用いることによって代謝物M3から代謝物M2へ変換するか検討を行った。にんにくを用いてスキーム2に従い、抽出、熱酸処理及び転溶を行い、得られた残留物に代謝物M3 (0.1 µg) を添加後、無水酢酸 (0.5 mL) を加えて室温で反応させた。これを後述するミニカラム精製 [(4) ②及び (4) ③] を行った後、代謝物M2はGC-MS/MS、代謝物M3はLC-MS/MSで測定した。その結果、マトリックス共存下では、標準品を用いた場合と比較して反応の進行が遅く、室温では60分間反応させても代謝物M2の回収率が49%となった(図22)。そこで、マトリックス共存下で反応温度及び反応時間を検討した。その結果、80°Cで10分以上加熱することにより、代謝物M3は代謝物M2へ変換し、未変換の代謝物M3は認められなかった(図22)。これらの結果から、ジエチルエーテル転溶後の残留物に無水酢酸を加えて80°Cで15分間加熱し、代謝物M3を代謝物M2へ変換することとした。

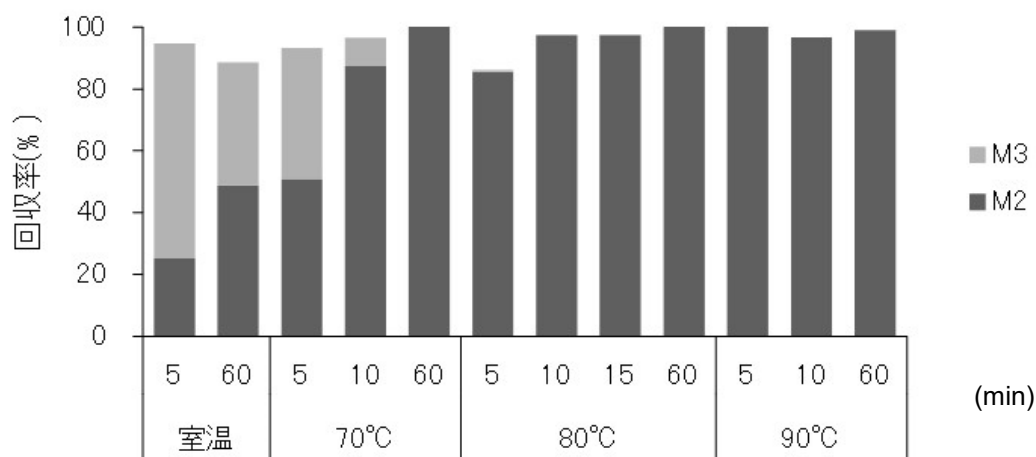


図22 マトリックス共存下での無水酢酸を用いた代謝物M3から代謝物M2への変換

試料：にんにく

代謝物 M3 0.1 µg

(4) ミニカラム精製

シリカゲルミニカラム [Inertsep SI (1 g/6 mL)] を用いた精製を検討した。

①エトフメセート

エトフメセート (0.1 µg) を酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1 : 9) 1 mLに溶解してミニカラムに負荷したところ、酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1 : 9) 10 mLでは溶出せず、酢酸エチル/*n*-ヘキサン (3 : 17) 8 mLで溶出した(表8)。このため、酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1 : 9) 10 mLで洗浄後、酢酸エチル/*n*-ヘキサン (3 : 17) 10 mLで溶出することとした。

表8 エトフメセートのシリカゲルミニカラムからの回収率 (%)

負荷液	酢酸エチル/ <i>n</i> -ヘキサン (1:9)	酢酸エチル/ <i>n</i> -ヘキサン (3:17)					合計
	10 mL	0-2 mL	2-4 mL	4-6 mL	6-8 mL	8-10 mL	
0	0	9	62	21	3	0	95

エトフメセート 0.1 µg

②代謝物 M2

無水酢酸を用いた代謝物M3から代謝物M2への変換反応を行った後、反応液（無水酢酸0.5 mL）をそのままシリカゲルミニカラムで精製する方法を検討した。代謝物M2 (0.1 µg) を無水酢酸 (0.5 mL) に溶解後、酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1:9) 5 mLを加えて混合し、ミニカラムに負荷したところ、酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1:9) 10 mLでは溶出せず、酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1:4) 15 mLで溶出した (表9)。この結果から、酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1:9) 10 mLで洗浄した後、酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1:4) 20 mLで溶出することとした。なお、無水酢酸は酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1:9) での洗浄画分に溶出した。

表9 代謝物M2のシリカゲルミニカラムからの回収率 (%)

負荷液	酢酸エチル/ <i>n</i> -ヘキサン (1:9)		酢酸エチル/ <i>n</i> -ヘキサン (1:4)					合計
	0-5 mL	5-10 mL	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	15-20 mL	20-25 mL	
0	0	0	6	59	33	0	0	98

代謝物 M2 0.1 µg

マトリックス共存下での熱酸処理における代謝物M2の回収率を求める際の精製方法を検討した。代謝物M2を酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1:4) 2 mLに溶解してミニカラムに負荷したところ、酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1:4) 5 mLでは溶出せず、酢酸エチル/*n*-ヘキサン (3:7) 8 mLで溶出した (表10)。このため、酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1:4) 5 mLで洗浄後、酢酸エチル/*n*-ヘキサン (3:7) 10 mLで溶出することとした。

表10 代謝物M2のシリカゲルミニカラムからの回収率 (%)

負荷液	酢酸エチル/ <i>n</i> -ヘキサン (1:4)	酢酸エチル/ <i>n</i> -ヘキサン (3:7)					合計
	5 mL	0-2 mL	2-4 mL	4-6 mL	6-8 mL	8-10 mL	
0	0	0	44	57	2	0	103

代謝物 M2 0.1 µg

③代謝物 M3

マトリックス共存下での熱酸処理における代謝物M3の回収率を求める際の精製方法を検討した。代謝物M3 (0.1 µg) を酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1:4) 2 mLに溶解してミニカラムに負荷したところ、酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1:4) 5 mL、酢酸エチル/*n*-ヘキサン (3:7) 10 mL、酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1:1) 10 mLでは溶出せず、酢酸エチル/*n*-ヘキサン/ギ酸(100:100:1) 20 mLで溶出した (表11)。このため、酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1:4) 5 mL、酢酸エチル/*n*-ヘキサン (3:7) 10 mL、酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1:1) 10 mLで洗浄した後、酢酸エチル/*n*-ヘキサン/ギ酸(100:100:1) 20 mLで溶出することとした。

表11 代謝物M3のシリカゲルミニカラムからの回収率 (%)

負荷液	酢酸エチル / <i>n</i> -ヘキサン (1:4)	酢酸エチル / <i>n</i> -ヘキサン (3:7)	酢酸エチル / <i>n</i> -ヘキサン (1:1)	酢酸エチル/ <i>n</i> -ヘキサン/ギ酸(100:100:1)					合計
	5 mL	10 mL	10 mL	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	15-20 mL	20-25 mL	
0	0	0	0	0	48	44	4	0	96

代謝物 M3 0.1 µg

マトリックス共存下での無水酢酸を用いた変換反応において、代謝物M3の回収率を求める際の精製方法を検討した。標準品では、代謝物M3に無水酢酸を加えると直ちに代謝物M2へ変換してしまうため、マトリックス（にんにく）共存下で検討した。その結果、酢酸エチル/*n*-ヘキサン（1：9）10 mLでは溶出せず、酢酸エチル/*n*-ヘキサン（1：4）20 mLで変換した代謝物M2、酢酸エチル/*n*-ヘキサン/ギ酸(100:100:1) 15 mLで未変換の代謝物M3が溶出した（表12）。この結果から、酢酸エチル/*n*-ヘキサン（1：9）10 mLで洗浄した後、酢酸エチル/*n*-ヘキサン（1：4）20 mLで代謝物M2を溶出し、酢酸エチル/*n*-ヘキサン/ギ酸(100:100:1) 20 mLで代謝物M3を溶出することとした。なお、無水酢酸は酢酸エチル/*n*-ヘキサン（1：9）での洗浄画分に溶出した。

表12 マトリックス共存下での代謝物M3のシリカゲルミニカラムからの回収率 (%)

定量	負荷液	酢酸エチル / <i>n</i> -ヘキサン (1:9)		酢酸エチル / <i>n</i> -ヘキサン (1:4)	酢酸エチル/ <i>n</i> -ヘキサン/ギ酸 (100:100:1)					合計	合計 (代謝物 M2 + 代謝物 M3)
		0-5 mL	5-10 mL	20 mL	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	15-20 mL	20-25 mL		
代謝物 M2	0	0	0	23	0	0	0	0	0	23	93
代謝物 M3	0	0	0	0	0	67	3	0	0	70	

代謝物 M3 0.1 µg

試料：にんにく

(5) ピーク形状及び試料マトリックスの測定への影響

確立した方法（スキーム2）を用いてマトリックス添加標準溶液（0.5 ng/mL、試料0.01 ppm相当）を調製し、溶媒標準溶液及びマトリックス添加標準溶液を交互に繰り返し測定した。その結果、エトフメセート、代謝物M2のいずれも、溶媒標準溶液のピークのテーリング（図23-1及び図23-2）やマトリックスによる影響（表13）が認められた。GC-MS/MS測定におけるピーク形状やマトリックスの影響の改善には疑似マトリックスの添加が有効であることが知られている。そこで、疑似マトリックスとしてポリエチレングリコール（PEG）300を用いた測定を検討した。溶媒標準溶液及びマトリックス添加標準溶液各1 mL採り、PEG300・アセトン/*n*-ヘキサン（1：1）溶液（0.05、0.1、0.2 w/v%）100 µLを加えて、ピーク形状及びマトリックスの影響を比較した。その結果、PEG300を添加することによって、エトフメセート及び代謝物M2のいずれも、溶媒標準溶液のピーク形状が改善し（図23-1及び図23-2）、マトリックスの影響も若干小さくなった（表13）。添加するPEG300溶液の濃度（0.05、0.1、0.2 w/v%）によるピーク形状やマトリックスの影響の大きな違いは認められなかった。高濃度のPEG300溶液を注入すると装置が汚染する可能性があるため、溶媒標準溶液及び試験溶液1 mLに、0.1 w/v%PEG300・アセトン/*n*-ヘキサン（1：1）溶液を100 µL加えて測定することとした。

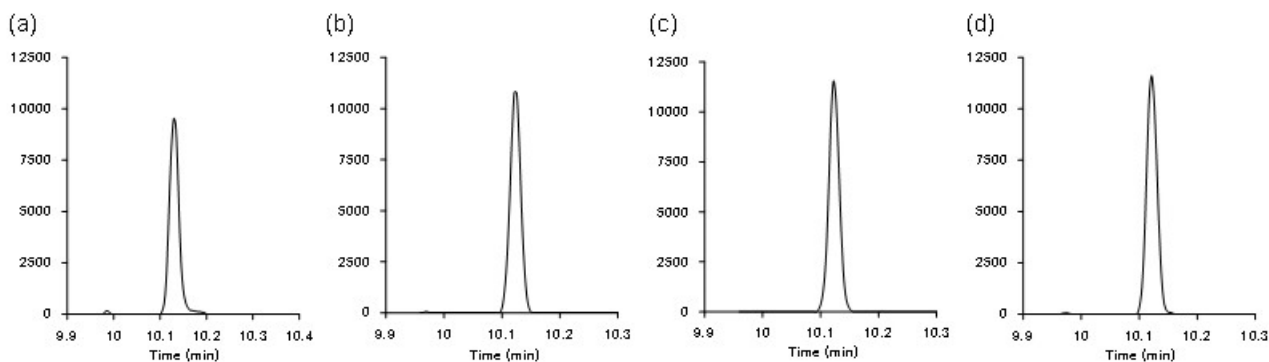


図23-1 エトフメセート標準溶液 (0.5 ng/mL) のクロマトグラム

添加したPEG300溶液の濃度 (a) 0、(b) 0.05 w/v%、(c) 0.1 w/v%、(d) 0.2 w/v%

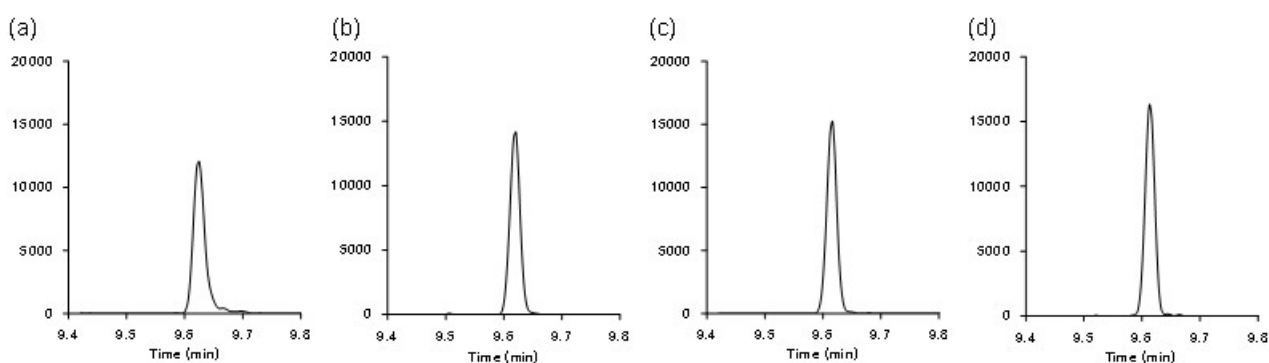


図23-2 代謝物M2標準溶液 (0.5 ng/mL) のクロマトグラム

添加したPEG300溶液の濃度 (a) 0、(b) 0.05 w/v%、(c) 0.1 w/v%、(d) 0.2 w/v%

表13 試料マトリックスの測定への影響*

添加した PEG300 溶液の濃度 (w/v%)	エトフメセート	代謝物 M2
0	1.21	1.26
0.05	1.18	1.17
0.1	1.13	1.17
0.2	1.11	1.18

* 溶媒標準溶液に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積比

濃度 : 0.5 ng/mL (0.01 ppm相当)

試料 : にんにく

3. 添加回収試験

農産物3食品 (たまねぎ、てんさい及びにんにく) を用いて、試料に定量限界 (0.01 ppm) 及び基準値濃度 (0.3 ppm) のエトフメセート、代謝物M2及び代謝物M3を添加し、実験方法の『7. 試験溶液の調製』に従い、5併行の添加回収試験を実施した。なお、代謝物M2及び代謝物M3は相互に変換するため、代謝物M3のみ別に添加回収試験を行った。添加回収試験における各食品のブランク試料、添加試料及び回収率100%相当の溶媒標準溶液の代表的なクロマトグラムを図24~29に示した。また、各食品のブランク試料の代表的なトータルイオンカレント (TIC) クロマトグラムを図30に示した。

(1) 選択性

いずれの食品においても、定量を妨害するピークは検出されず、選択性は良好であった（表14-1及び表14-2）。

表14-1 選択性の評価（PEG300未添加）

分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 ^{*1} (ppm)	妨害ピークの許容範囲の評価			ピーク面積(高さ) ^{*2}							選択性の評価 ^{*4}	
					評価濃度 (ppm)	評価基準	面積又は高さの別	ブランク			マトリックス添加標準溶液 ^{*3}			面積(高さ)比(a)/(b)		
								n=1	n=2	平均(a)	n=1	n=2	平均(b)			
エトフメセート	たまねぎ	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	390916	391195	391056	0.000	○
	てんさい	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	456586	495712	476149	0.000	○
	にんにく	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	746160	806120	776140	0.000	○
	たまねぎ	0.01	0.3	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	26769	28062	27416	0.000	○
	てんさい	0.01	0.3	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	39972	45797	42884	0.000	○
	にんにく	0.01	0.3	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	58423	59342	58883	0.000	○
代謝物M2	たまねぎ	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	349249	368380	358815	0.000	○
	てんさい	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	349249	368380	358815	0.000	○
	にんにく	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	847993	907052	877523	0.000	○
	たまねぎ	0.01	0.3	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	26587	26225	26406	0.000	○
	てんさい	0.01	0.3	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	27450	26500	26975	0.000	○
	にんにく	0.01	0.3	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	28751	29274	29013	0.000	○
代謝物M3	たまねぎ	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	609539	602528	606033	0.000	○
	てんさい	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	612183	616583	614383	0.000	○
	にんにく	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	778681	784380	781530	0.000	○
	たまねぎ	0.01	0.3	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	21836	21176	21506	0.000	○
	てんさい	0.01	0.3	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	31511	30622	31067	0.000	○
	にんにく	0.01	0.3	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	36689	37478	37084	0.000	○

*1 エトフメセートとしての濃度
 *2 ブランク試料、標準溶液の順に注入して測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)
 *3 試料中の濃度が「評価濃度」相当になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)を用いる。
 ブランク試料に妨害ピークが観察されなかった場合には、標準溶液のピーク面積(高さ)は求めなくても良い。
 *4 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の評価基準に適合する場合には「○」、適合しない場合には「×」を記載する。

表14-2 選択性の評価（PEG300添加）

分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 ^{*1} (ppm)	妨害ピークの許容範囲の評価			ピーク面積(高さ) ^{*2}							選択性の評価 ^{*4}	
					評価濃度 (ppm)	評価基準	面積又は高さの別	ブランク			マトリックス添加標準溶液 ^{*3}			面積(高さ)比(a)/(b)		
								n=1	n=2	平均(a)	n=1	n=2	平均(b)			
エトフメセート	たまねぎ	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	401367	375468	388417	0.000	○
	てんさい	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	402693	378517	390605	0.000	○
	にんにく	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	835885	847131	841508	0.000	○
	たまねぎ	0.01	0.3	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	24362	24459	24411	0.000	○
	てんさい	0.01	0.3	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	47597	47907	47752	0.000	○
	にんにく	0.01	0.3	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	53975	54556	54265	0.000	○
代謝物M2	たまねぎ	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	378351	378206	378279	0.000	○
	てんさい	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	378351	358206	368279	0.000	○
	にんにく	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	847993	907052	877523	0.000	○
	たまねぎ	0.01	0.3	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	18981	19144	19063	0.000	○
	てんさい	0.01	0.3	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	33752	34451	34101	0.000	○
	にんにく	0.01	0.3	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	50	25	20880	22153	21516	0.001	○
代謝物M3	たまねぎ	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	522478	571975	547226	0.000	○
	てんさい	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	577982	570740	574361	0.000	○
	にんにく	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	689497	692275	690886	0.000	○
	たまねぎ	0.01	0.3	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	16649	18094	17371	0.000	○
	てんさい	0.01	0.3	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	25699	25562	25631	0.000	○
	にんにく	0.01	0.3	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	32328	30441	31384	0.000	○

*1 エトフメセートとしての濃度
 *2 ブランク試料、標準溶液の順に注入して測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)
 *3 試料中の濃度が「評価濃度」相当になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)を用いる。
 ブランク試料に妨害ピークが観察されなかった場合には、標準溶液のピーク面積(高さ)は求めなくても良い。
 *4 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の評価基準に適合する場合には「○」、適合しない場合には「×」を記載する。

(2) 真度及び併行精度

真度及び併行精度を表15-1及び表15-2に示した。PEG300を添加せずに測定した場合のエトフメセート、代謝物M2及び代謝物M3の真度はそれぞれ94~103%、98~113%及び94~111%であり、併行精度はそれぞれ1.8~3.9%、1.6~4.9%及び3.1~5.7%であった。また、PEG300を添加して測定した場合のエトフメセート、代謝物M2及び代謝物M3の真度はそれぞれ92~104%、94~106%及び93~101%であり、併行精度はそれぞれ2.5~5.5%、2.8~4.5%及び2.8~7.6%であった。いずれの場合も良好な結果が得られ、妥当性評価ガイドラインの真度及び精度の目標値を満たした。また、定量限界濃度の添加試料から得られたピー

クのS/Nは、PEG300を添加せずに測定した場合は305~669、PEG300を添加して測定した場合は369~857となり、S/N \geq 10が得られた（表16-1及び表16-2）。

表15-1 真度及び精度（PEG300未添加）

分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 ^{*1} (ppm)	検量線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)
					傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5		
エトフメセート	たまねぎ	0.01	0.3	0.3	24300	7809	0.9995	99	99	102	101	97	100	2.3
	てんさい	0.01	0.3	0.3	28241	2596	0.9991	97	93	98	96	94	96	1.9
	にんにく	0.01	0.3	0.3	53014	-26487	0.9989	102	99	101	102	98	101	1.8
	たまねぎ	0.01	0.3	0.01	38652	-213	0.9969	101	101	101	104	109	103	3.5
	てんさい	0.01	0.3	0.01	70249	-311	0.9933	89	97	92	98	95	94	3.9
代謝物M2	にんにく	0.01	0.3	0.01	100207	624	0.9972	98	101	104	99	102	101	2.5
	たまねぎ	0.01	0.3	0.3	20736	-10503	0.9947	106	108	108	109	116	109	3.4
	てんさい	0.01	0.3	0.3	20054	-9921	0.9958	109	112	112	113	117	113	2.6
	にんにく	0.01	0.3	0.3	54394	-19111	0.9941	103	105	95	99	104	101	4.2
	たまねぎ	0.01	0.3	0.01	45374	-774	0.9988	102	106	102	101	103	103	1.9
代謝物M3	てんさい	0.01	0.3	0.01	46547	-2034	0.9933	101	101	94	93	103	98	4.9
	にんにく	0.01	0.3	0.01	53005	-265	0.9967	100	104	101	102	101	102	1.6
	たまねぎ	0.01	0.3	0.3	35335	5130	0.9953	93	102	96	89	92	94	5.2
	てんさい	0.01	0.3	0.3	34819	11440	0.9942	97	101	98	91	93	96	4.3
	にんにく	0.01	0.3	0.3	48514	17542	0.9941	101	103	96	97	96	98	3.2
代謝物M3	たまねぎ	0.01	0.3	0.01	34557	-185	0.9982	108	107	105	97	97	103	5.2
	てんさい	0.01	0.3	0.01	53623	963	0.9931	94	104	105	109	99	102	5.7
	にんにく	0.01	0.3	0.01	59756	-1532	0.9918	105	113	112	110	114	111	3.1

*1 エトフメセートとしての濃度

表15-2 真度及び精度（PEG300添加）

分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 ^{*1} (ppm)	検量線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)
					傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5		
エトフメセート	たまねぎ	0.01	0.3	0.3	24307	-1602	0.9993	93	90	95	96	90	93	3.0
	てんさい	0.01	0.3	0.3	23502	-4782	0.9989	95	94	97	100	96	96	2.5
	にんにく	0.01	0.3	0.3	44494	52559	0.9980	109	105	107	102	96	104	4.8
	たまねぎ	0.01	0.3	0.01	40280	1769	0.9975	106	102	98	108	95	102	5.5
	てんさい	0.01	0.3	0.01	100010	-2987	0.9991	86	93	95	94	93	92	4.0
代謝物M2	にんにく	0.01	0.3	0.01	105319	-1210	0.9938	99	101	97	94	100	98	2.7
	たまねぎ	0.01	0.3	0.3	20926	-6734	0.9991	102	104	112	109	102	106	4.3
	てんさい	0.01	0.3	0.3	20910	-6643	0.9991	102	105	112	110	102	106	4.3
	にんにく	0.01	0.3	0.3	51262	-3394	0.9979	98	100	103	98	109	102	4.5
	たまねぎ	0.01	0.3	0.01	40797	225	0.9984	94	103	97	95	94	97	4.0
代謝物M3	てんさい	0.01	0.3	0.01	68613	-985	0.9958	100	98	95	93	94	96	2.8
	にんにく	0.01	0.3	0.01	50355	-1454	0.9953	89	93	94	96	96	94	2.9
	たまねぎ	0.01	0.3	0.3	33340	201	0.9982	90	95	97	93	94	94	2.8
	てんさい	0.01	0.3	0.3	34145	13654	0.9994	90	97	94	92	92	93	3.0
	にんにく	0.01	0.3	0.3	43293	36669	0.9974	99	108	93	95	88	97	7.6
代謝物M3	たまねぎ	0.01	0.3	0.01	35453	-415	0.9981	94	90	103	98	101	97	5.6
	てんさい	0.01	0.3	0.01	52148	857	0.9966	97	97	100	104	106	101	4.3
	にんにく	0.01	0.3	0.01	60707	-2704	0.9976	96	90	103	98	99	97	5.3

*1 エトフメセートとしての濃度

表16-1 定量限界濃度の添加試料から得られたピークのS/N (PEG300未添加)

分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 ^{*1} (ppm)	定量限界 の評価 ^{*2}	S/N ^{*3}		
						Max.	Min.	平均値
エトフメセート	たまねぎ	0.01	0.3	0.01	S/N	454	884	669
	てんさい	0.01	0.3	0.01	S/N	665	284	475
	にんにく	0.01	0.3	0.01	S/N	285	326	305
代謝物M2	たまねぎ	0.01	0.3	0.01	S/N	555	643	599
	てんさい	0.01	0.3	0.01	S/N	126	555	341
	にんにく	0.01	0.3	0.01	S/N	616	642	629
代謝物M3	たまねぎ	0.01	0.3	0.01	S/N	713	562	637
	てんさい	0.01	0.3	0.01	S/N	666	581	624
	にんにく	0.01	0.3	0.01	S/N	388	541	465

*1 エトフメセートとしての濃度

*2 S/Nを求める必要がある場合には『S/N』と表示される。

*3 得られた回収率の中で最大値を与えるピーク(Max.)及び最小値を与えるピーク(Min.)のそれぞれのS/Nを求める

表16-2 定量限界濃度の添加試料から得られたピークのS/N (PEG300添加)

分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 ^{*1} (ppm)	定量限界 の評価 ^{*2}	S/N ^{*3}		
						Max.	Min.	平均値
エトフメセート	たまねぎ	0.01	0.3	0.01	S/N	686	200	443
	てんさい	0.01	0.3	0.01	S/N	772	768	770
	にんにく	0.01	0.3	0.01	S/N	359	592	476
代謝物M2	たまねぎ	0.01	0.3	0.01	S/N	576	292	434
	てんさい	0.01	0.3	0.01	S/N	736	978	857
	にんにく	0.01	0.3	0.01	S/N	447	403	425
代謝物M3	たまねぎ	0.01	0.3	0.01	S/N	316	607	462
	てんさい	0.01	0.3	0.01	S/N	262	482	372
	にんにく	0.01	0.3	0.01	S/N	287	452	369

*1 エトフメセートとしての濃度

*2 S/Nを求める必要がある場合には『S/N』と表示される。

*3 得られた回収率の中で最大値を与えるピーク(Max.)及び最小値を与えるピーク(Min.)のそれぞれのS/Nを求める。

(3) 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響を表 17-1 及び表 17-2 に示した。添加回収試験における回収率 100% 相当濃度の溶媒標準溶液に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積比を求めた。その結果、PEG300 を添加せずに測定した場合のエトフメセート、代謝物 M2 及び代謝物 M3 のピーク面積比はそれぞれ 1.03~1.17、1.08~1.18 及び 1.03~1.18 であった。また、PEG300 を添加して測定した場合のエトフメセート、代謝物 M2 及び代謝物 M3 のピーク面積比はそれぞれ 1.01~1.14、0.97~1.11 及び 1.01~1.09 となり、PEG300 の有無によらず、大きな影響は認められなかった。PEG300 を添加せずに測定した場合は、溶媒標準溶液でテーリングが認められたが、PEG300 を添加して測定した場合は良好なピーク形状が得られた。

表17-1 試料マトリックスの測定への影響 (PEG300未添加)

分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 ^{*1} (ppm)	標準溶液 濃度 ^{*2} (mg/L)	ピーク面積(高さ) ^{*3}								
						面積又は 高さの別	ブランク ^{*4}	マトリックス添加標準溶液 ^{*5}			溶媒標準溶液			ピーク面積 (高さ)比 ^{*6}
								n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
エトフメセート	たまねぎ	0.01	0.3	0.3	0.015	面積	0	390916	391195	391056	365825	367402	366613	1.07
	てんさい	0.01	0.3	0.3	0.015	面積	0	456586	495712	476149	421518	444894	433206	1.10
	にんにく	0.01	0.3	0.3	0.015	面積	0	746160	806120	776140	762333	681403	721868	1.08
	たまねぎ	0.01	0.3	0.01	0.0005	面積	0	26769	28062	27416	22714	24327	23521	1.17
	てんさい	0.01	0.3	0.01	0.0005	面積	0	39972	45797	42884	40342	42718	41530	1.03
	にんにく	0.01	0.3	0.01	0.0005	面積	0	58423	59342	58883	51679	51882	51780	1.14
代謝物M2	たまねぎ	0.01	0.3	0.3	0.015	面積	0	349249	368380	358815	317419	318081	317750	1.13
	てんさい	0.01	0.3	0.3	0.015	面積	0	349249	368380	358815	338402	304838	321620	1.12
	にんにく	0.01	0.3	0.3	0.015	面積	0	847993	907052	877523	816181	811747	813964	1.08
	たまねぎ	0.01	0.3	0.01	0.0005	面積	0	26587	26225	26406	22396	22268	22332	1.18
	てんさい	0.01	0.3	0.01	0.0005	面積	0	27450	26500	26975	23742	24746	24244	1.11
	にんにく	0.01	0.3	0.01	0.0005	面積	0	28751	29274	29013	27158	26359	26759	1.08
代謝物M3	たまねぎ	0.01	0.3	0.3	0.015	面積	0	609539	602528	606033	573868	594567	584217	1.04
	てんさい	0.01	0.3	0.3	0.015	面積	0	612183	616583	614383	578761	548736	563749	1.09
	にんにく	0.01	0.3	0.3	0.015	面積	0	778681	784380	781530	765788	749986	757887	1.03
	たまねぎ	0.01	0.3	0.01	0.0005	面積	0	21836	21176	21506	19389	17986	18688	1.15
	てんさい	0.01	0.3	0.01	0.0005	面積	0	31511	30622	31067	28984	28714	28849	1.08
	にんにく	0.01	0.3	0.01	0.0005	面積	0	36689	37478	37084	31229	31734	31481	1.18

*1 エトフメセートとしての濃度

*2 添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。

*3 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

*4 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

*5 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

*6 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

表17-2 試料マトリックスの測定への影響 (PEG300添加)

分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 ^{*1} (ppm)	標準溶液 濃度 ^{*2} (mg/L)	ピーク面積(高さ) ^{*3}								
						面積又は 高さの別	ブランク ^{*4}	マトリックス添加標準溶液 ^{*5}			溶媒標準溶液			ピーク面積 (高さ)比 ^{*6}
								n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
エトフメセート	たまねぎ	0.01	0.3	0.3	0.015	面積	0	401367	375468	388417	365766	367402	366584	1.06
	てんさい	0.01	0.3	0.3	0.015	面積	0	402693	378517	390605	360748	348884	354816	1.10
	にんにく	0.01	0.3	0.3	0.015	面積	0	835885	847131	841508	700695	811747	756221	1.11
	たまねぎ	0.01	0.3	0.01	0.0005	面積	0	24362	24459	24411	20788	22050	21419	1.14
	てんさい	0.01	0.3	0.01	0.0005	面積	0	47597	47907	47752	47319	46969	47144	1.01
	にんにく	0.01	0.3	0.01	0.0005	面積	0	53975	54556	54265	50488	49623	50055	1.08
代謝物M2	たまねぎ	0.01	0.3	0.3	0.015	面積	0	378351	378206	378279	347356	345205	346281	1.09
	てんさい	0.01	0.3	0.3	0.015	面積	0	378351	358206	368279	327356	337773	332565	1.11
	にんにく	0.01	0.3	0.3	0.015	面積	0	847993	907052	877523	780230	816181	798206	1.10
	たまねぎ	0.01	0.3	0.01	0.0005	面積	0	18981	19144	19063	18058	18604	18331	1.04
	てんさい	0.01	0.3	0.01	0.0005	面積	0	33752	34451	34101	35844	34461	35153	0.97
	にんにく	0.01	0.3	0.01	0.0005	面積	0	20880	22153	21516	18165	21534	19850	1.08
代謝物M3	たまねぎ	0.01	0.3	0.3	0.015	面積	0	522478	571975	547226	496286	513307	504797	1.08
	てんさい	0.01	0.3	0.3	0.015	面積	0	577982	570740	574361	534018	521572	527795	1.09
	にんにく	0.01	0.3	0.3	0.015	面積	0	689497	692275	690886	664847	641848	653348	1.06
	たまねぎ	0.01	0.3	0.01	0.0005	面積	0	16649	18094	17371	16750	17738	17244	1.01
	てんさい	0.01	0.3	0.01	0.0005	面積	0	25699	25562	25631	25941	24407	25174	1.02
	にんにく	0.01	0.3	0.01	0.0005	面積	0	32328	30441	31384	28627	28942	28784	1.09

*1 エトフメセートとしての濃度

*2 添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。

*3 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

*4 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

*5 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

*6 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

エトフメセート

代謝物 M2

代謝物 M3

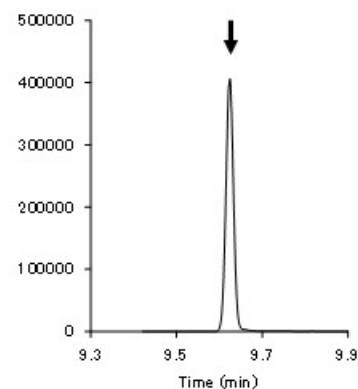
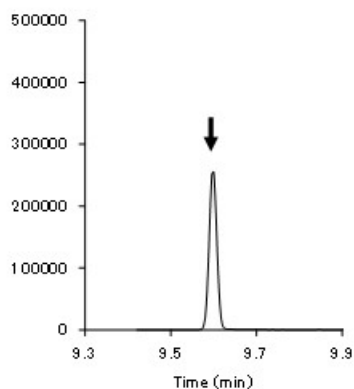
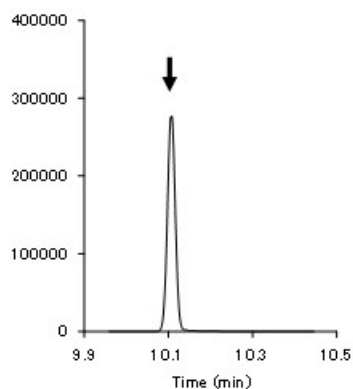
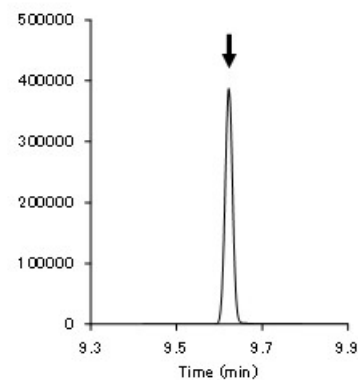
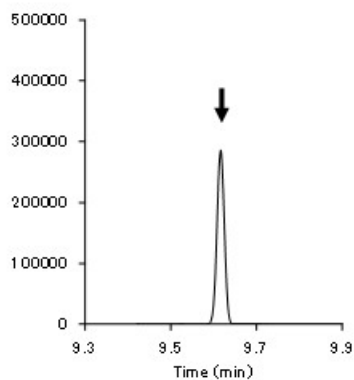
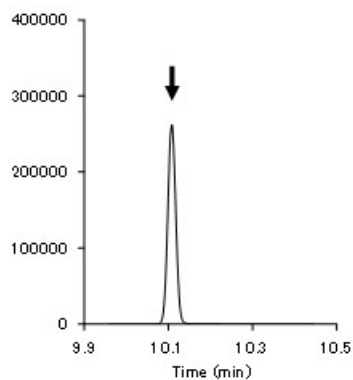
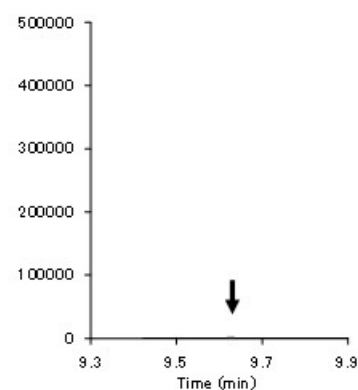
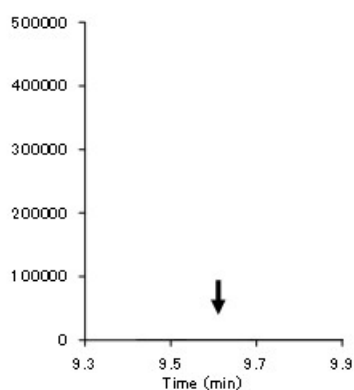
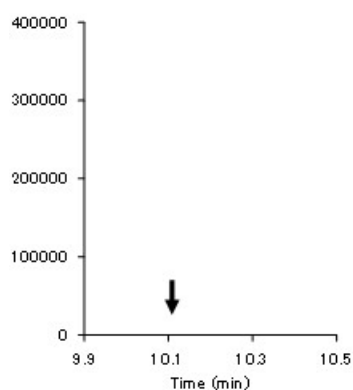


図 24-1 基準値濃度 (0.3 ppm) での添加回収試験 (たまねぎ、PEG300 未添加) における代表的なクロマトグラム

上 : ブランク試料、中 : 添加試料、下 : 回収率 100% 相当の標準溶液 (15 ng/mL)

エトフメセート

代謝物 M2

代謝物 M3

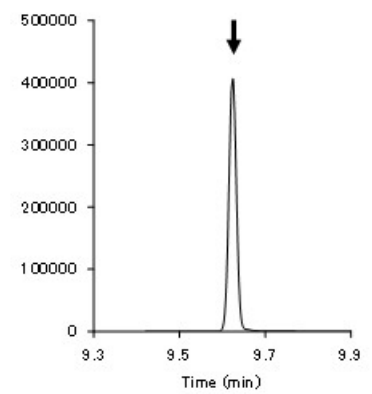
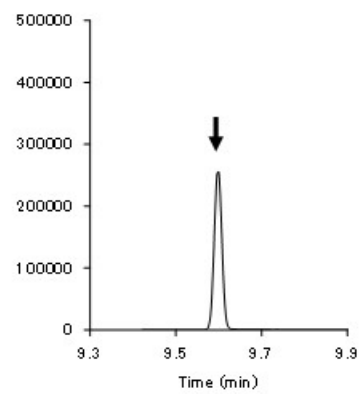
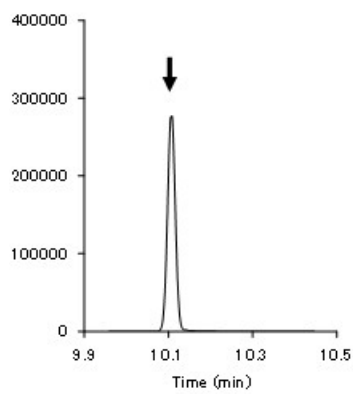
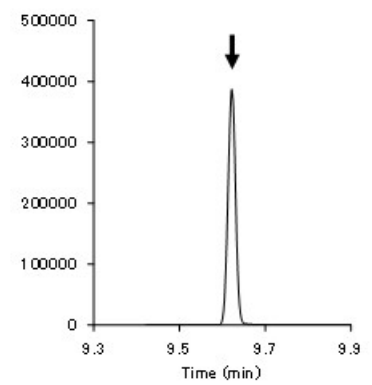
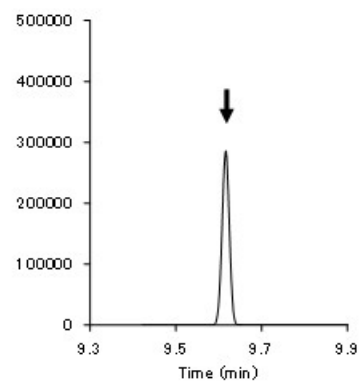
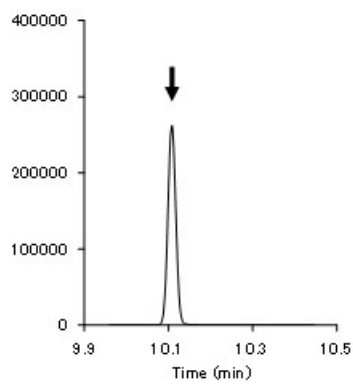
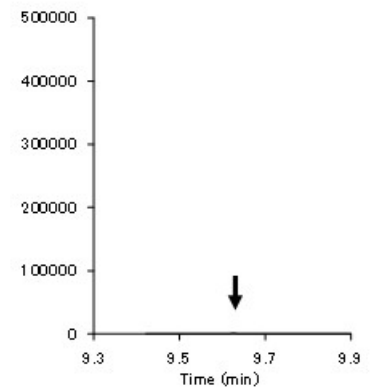
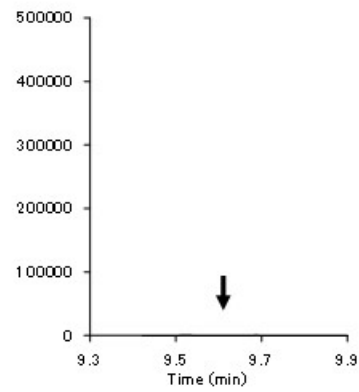
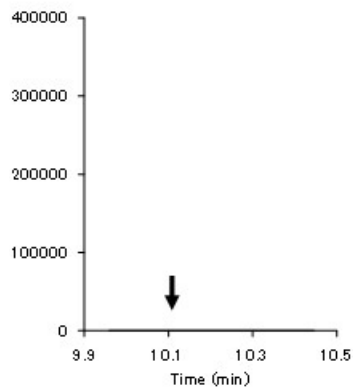
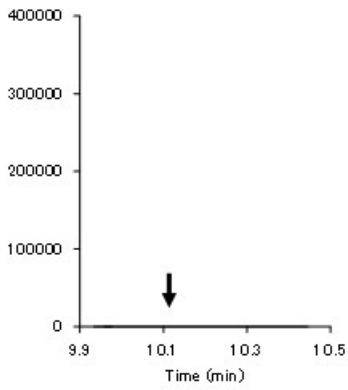


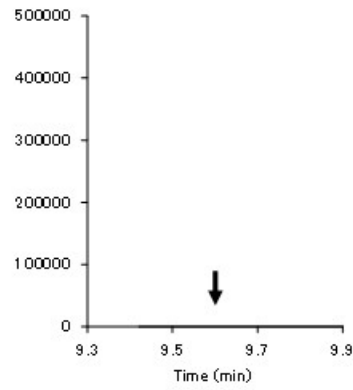
図 24-2 基準値濃度 (0.3 ppm) での添加回収試験 (たまねぎ、PEG300 添加) における代表的なクロマトグラム

上 : ブランク試料、中 : 添加試料、下 : 回収率 100% 相当の標準溶液 (15 ng/mL)

エトフメセート



代謝物 M2



代謝物 M3

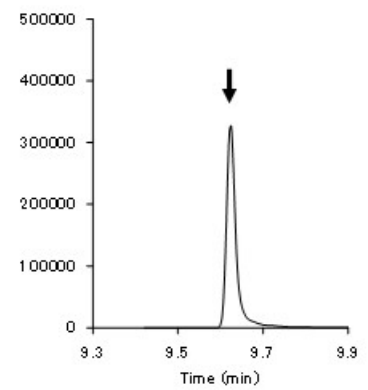
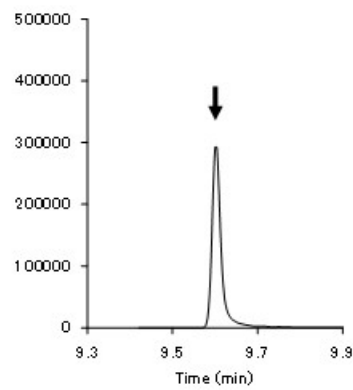
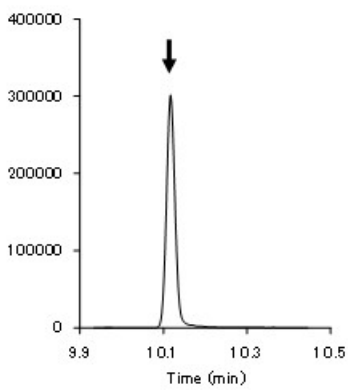
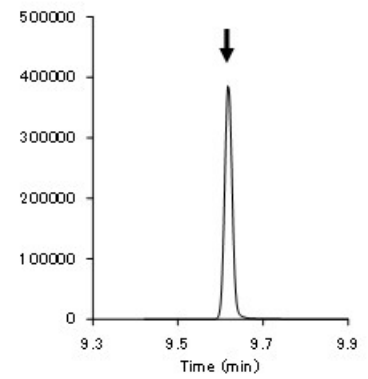
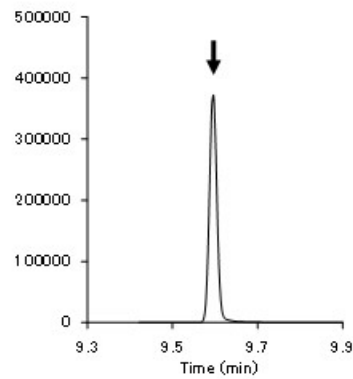
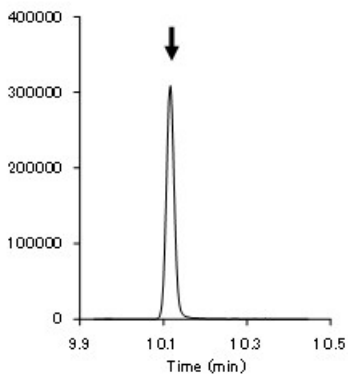
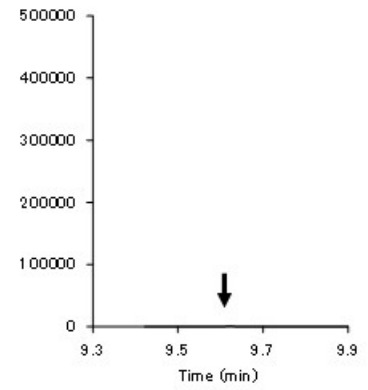


図 25-1 基準値濃度 (0.3 ppm) での添加回収試験 (てんさい、PEG300 未添加) における代表的なクロマトグラム
上 : ブランク試料、中 : 添加試料、下 : 回収率 100% 相当の標準溶液 (15 ng/mL)

エトフメセート

代謝物 M2

代謝物 M3

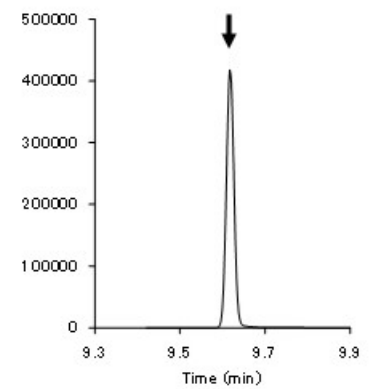
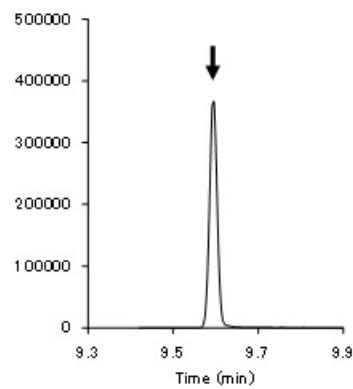
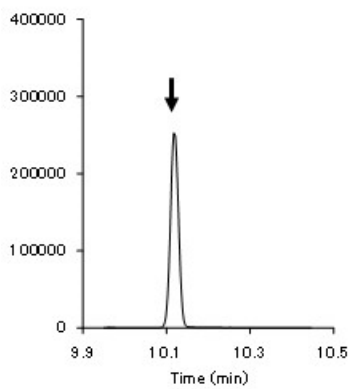
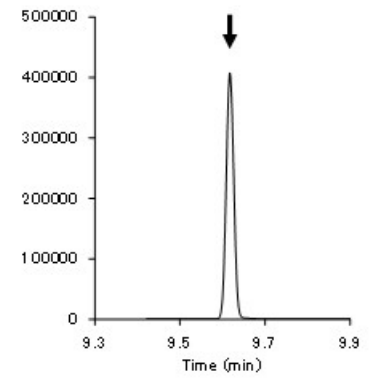
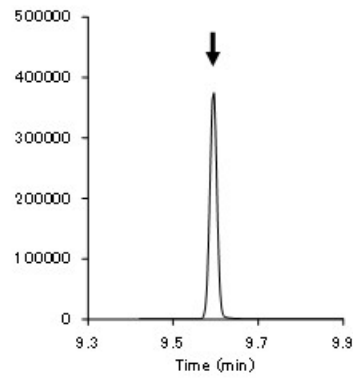
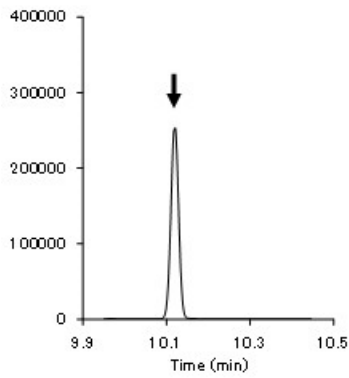
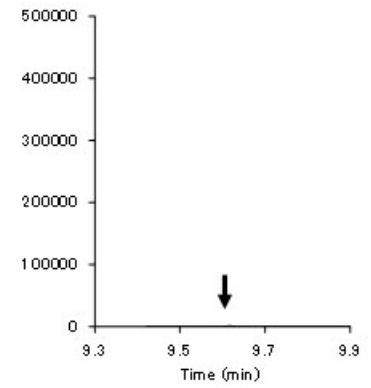
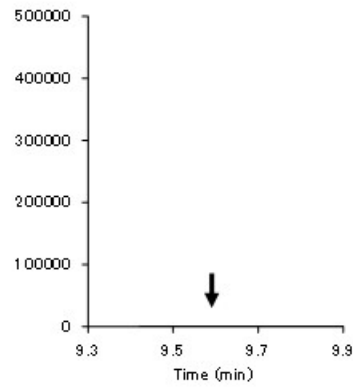
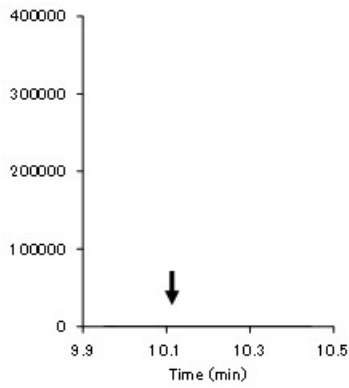


図 25-2 基準値濃度 (0.3 ppm) での添加回収試験 (てんさい、PEG300 添加) における代表的なクロマトグラム

上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100% 相当の標準溶液 (15 ng/mL)

エトフメセート

代謝物 M2

代謝物 M3

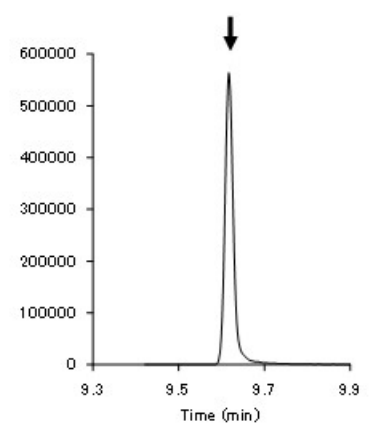
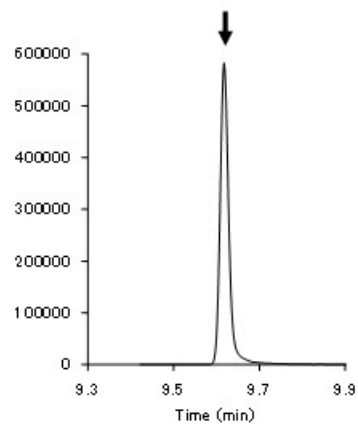
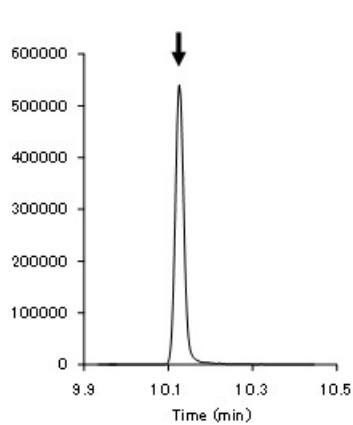
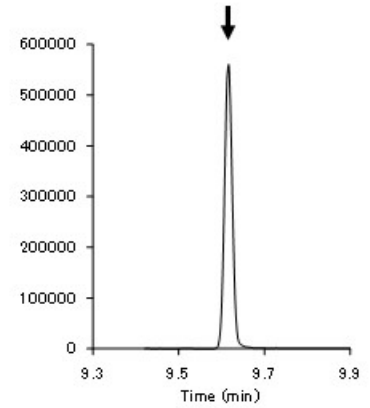
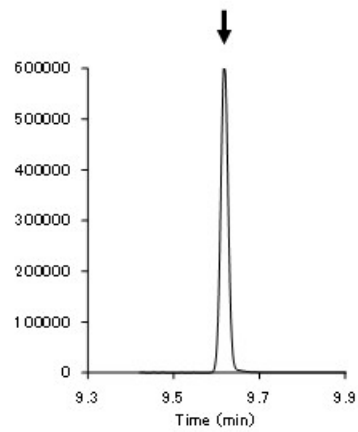
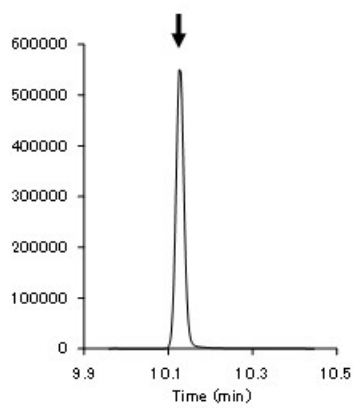
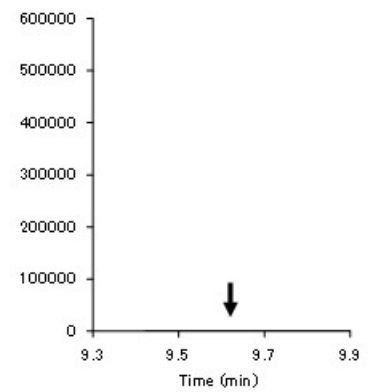
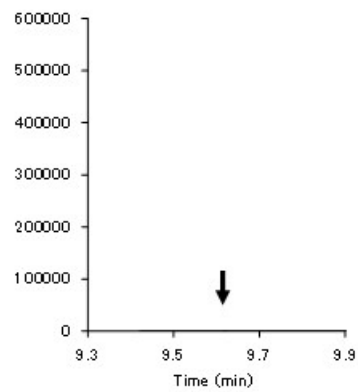
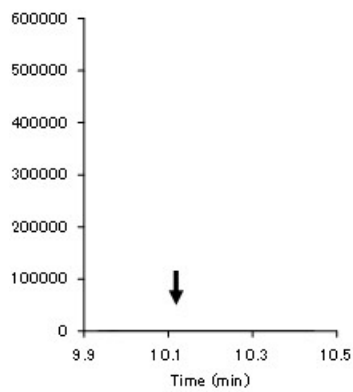


図 26-1 基準値濃度 (0.3 ppm) での添加回収試験 (にんにく、PEG300 未添加) における代表的なクロマトグラム

上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の標準溶液 (15 ng/mL)

エトフメセート

代謝物 M2

代謝物 M3

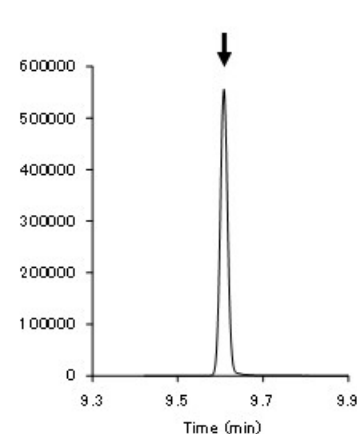
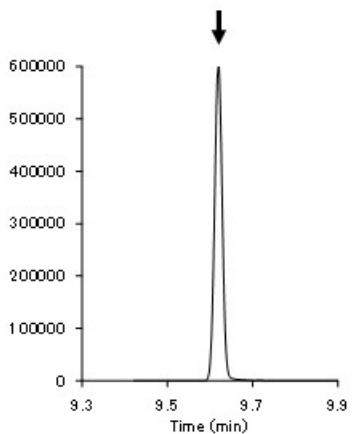
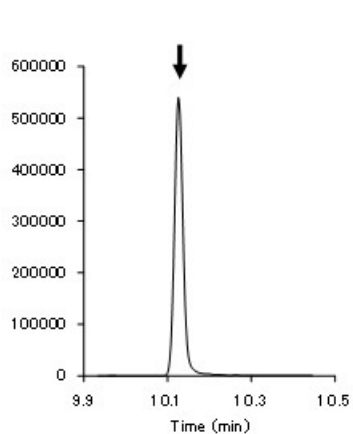
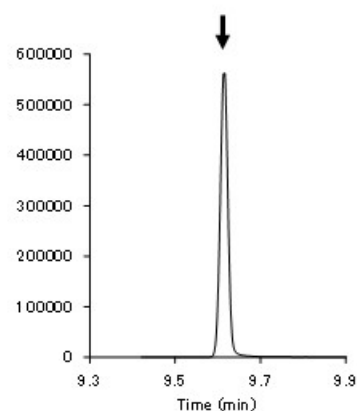
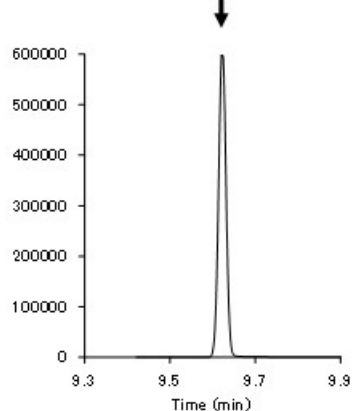
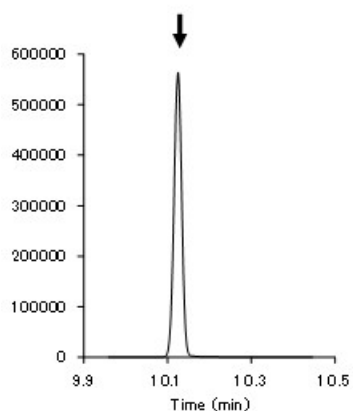
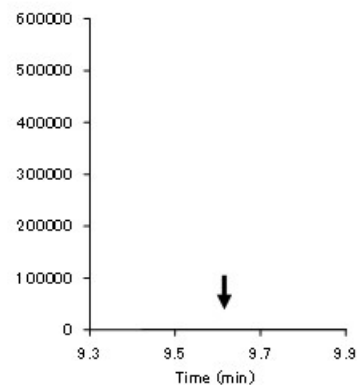
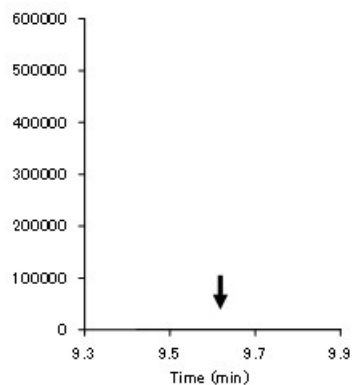
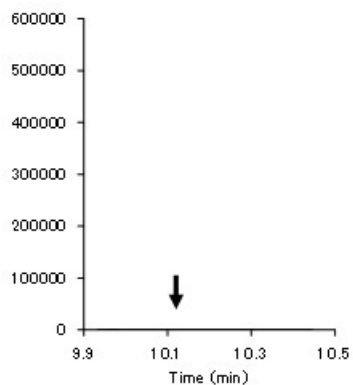
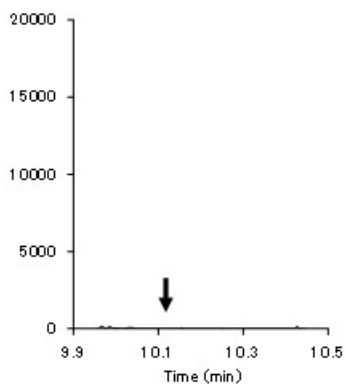


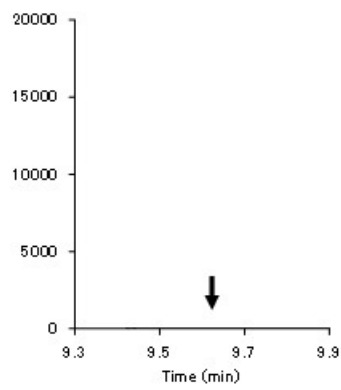
図 26-2 基準値濃度 (0.3 ppm) での添加回収試験 (にんにく、PEG300 添加) における代表的なクロマトグラム

上 : ブランク試料、中 : 添加試料、下 : 回収率 100% 相当の標準溶液 (15 ng/mL)

エトフメセート



代謝物 M2



代謝物 M3

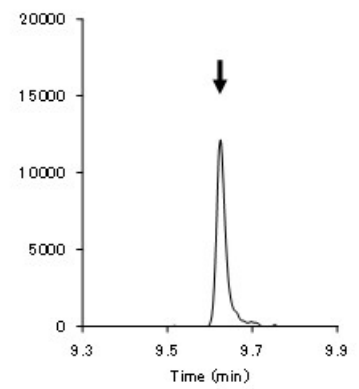
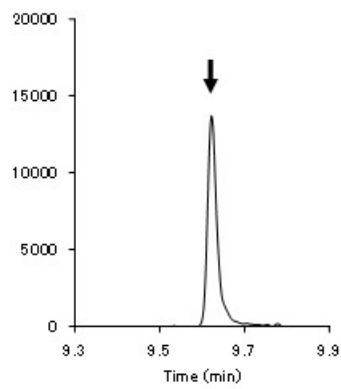
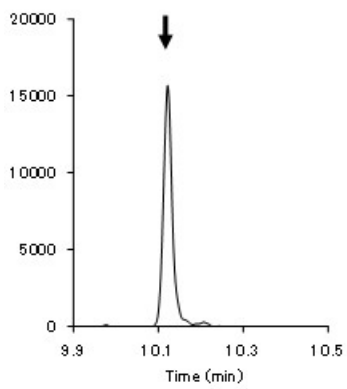
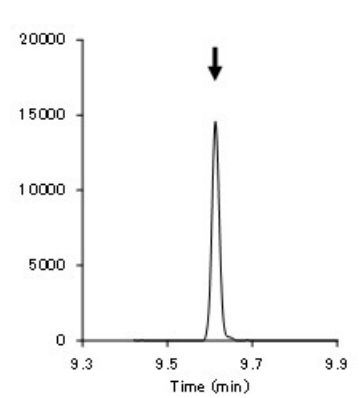
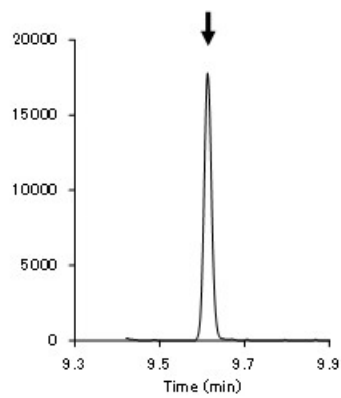
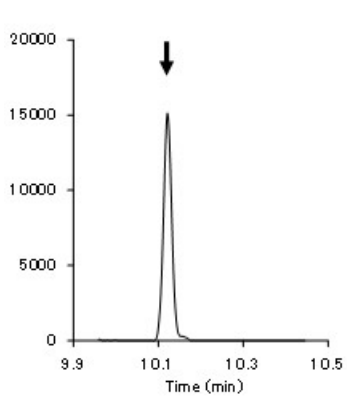
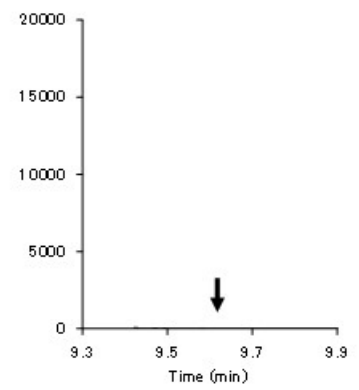
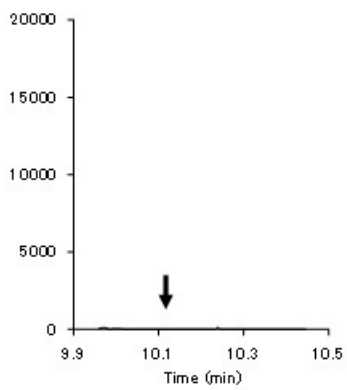


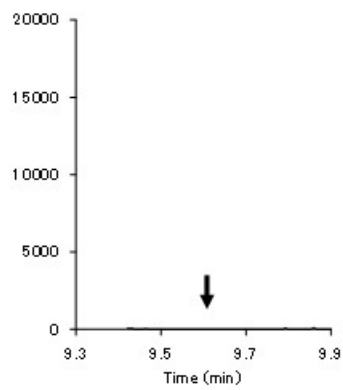
図 27-1 定量限界濃度 (0.01 ppm) での添加回収試験 (たまねぎ、PEG300 未添加) における代表的なクロマトグラム

上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の標準溶液 (0.5 ng/mL)

エトフメセート



代謝物 M2



代謝物 M3

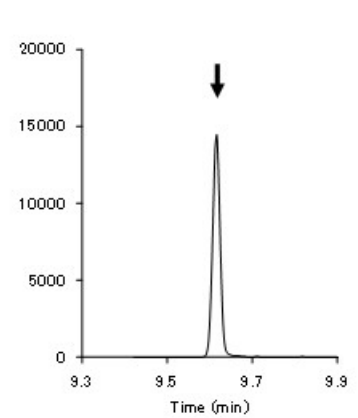
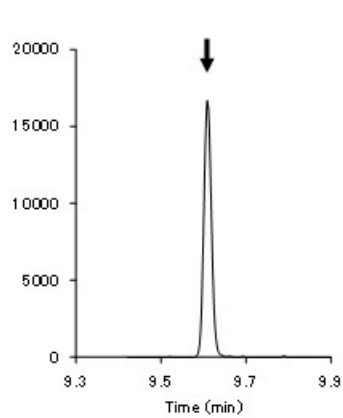
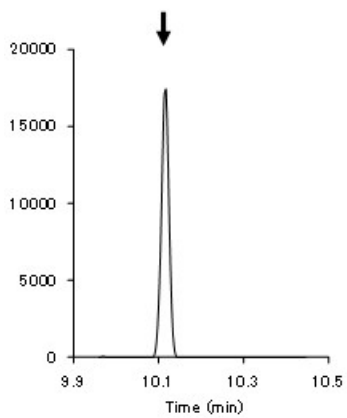
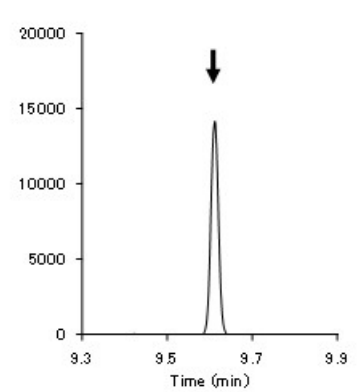
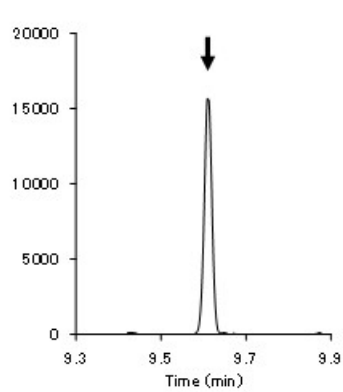
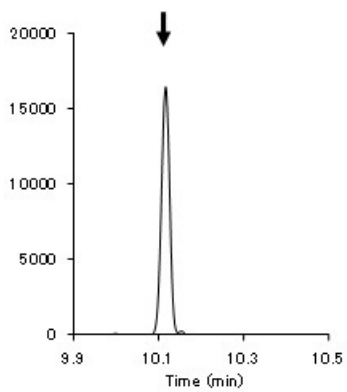
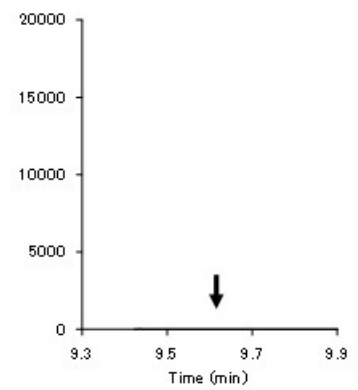


図 27-2 定量限界濃度 (0.01 ppm) での添加回収試験 (たまねぎ、PEG300 添加) における代表的なクロマトグラム

上 : ブランク試料、中 : 添加試料、下 : 回収率 100% 相当の標準溶液 (0.5 ng/mL)

エトフメセート

代謝物 M2

代謝物 M3

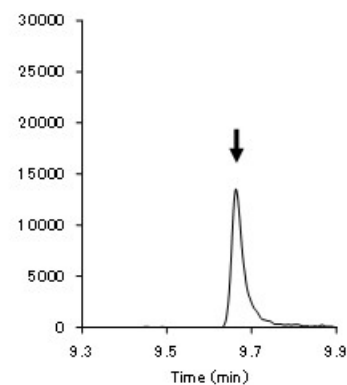
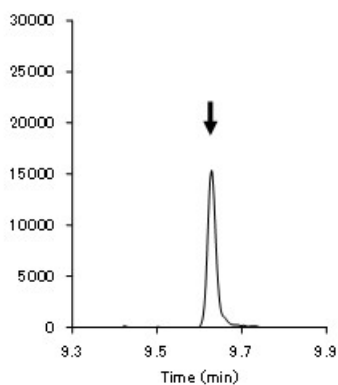
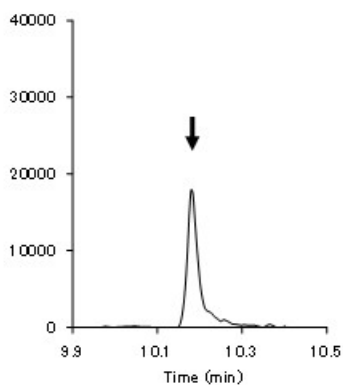
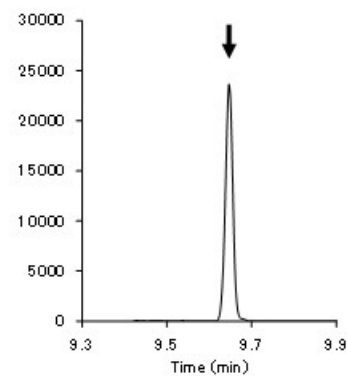
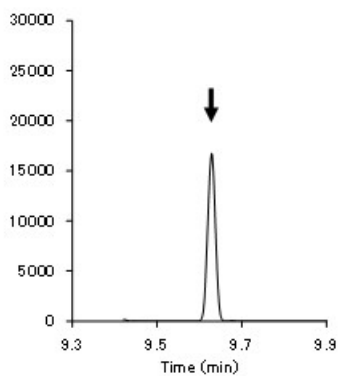
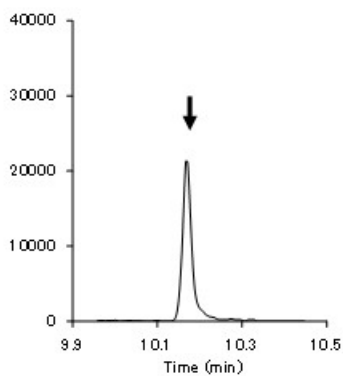
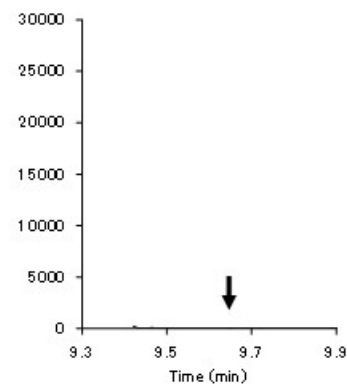
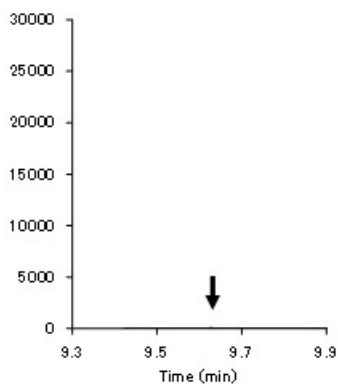
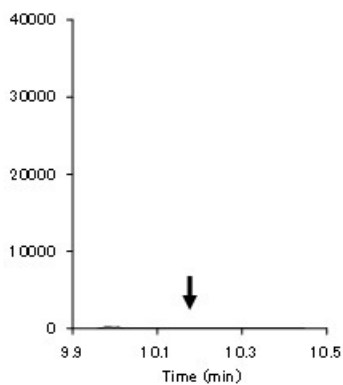


図 28-1 定量限界濃度 (0.01 ppm) での添加回収試験 (てんさい、PEG300 未添加) における代表的なクロマトグラム

上 : ブランク試料、中 : 添加試料、下 : 回収率 100% 相当の標準溶液 (0.5 ng/mL)

エトフメセート

代謝物 M2

代謝物 M3

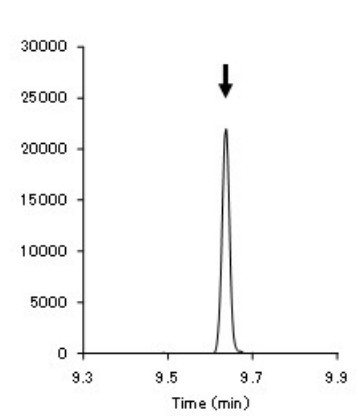
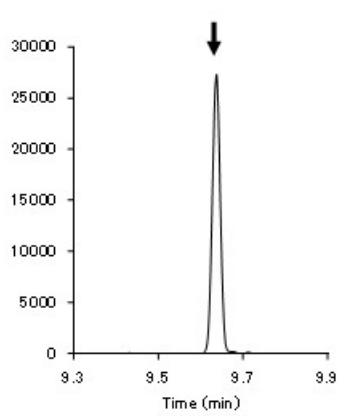
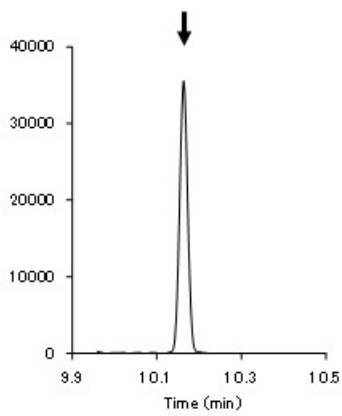
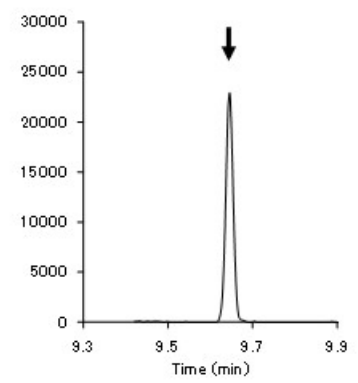
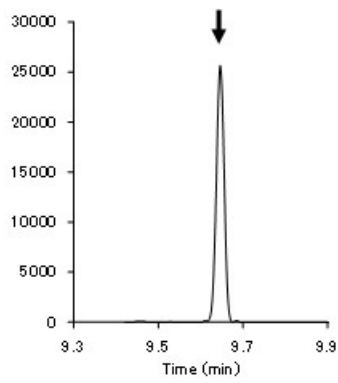
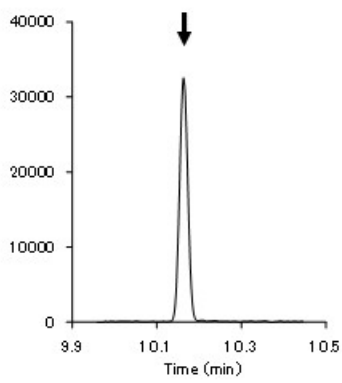
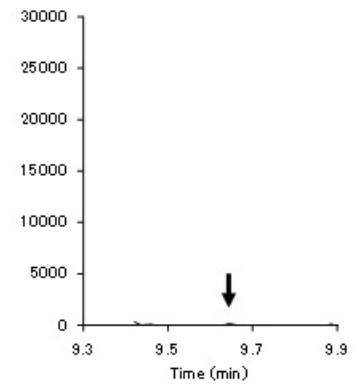
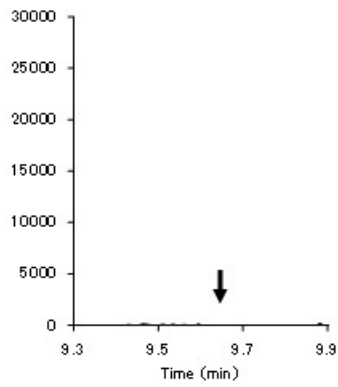
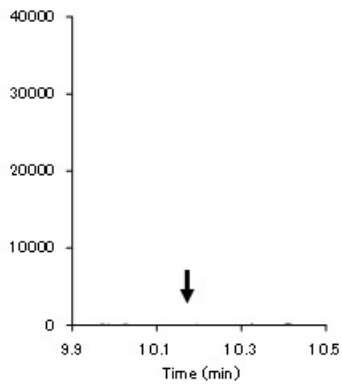
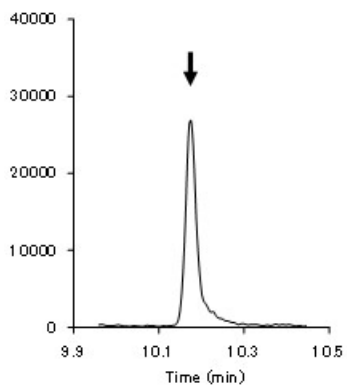
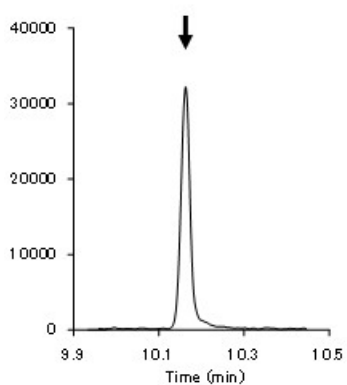
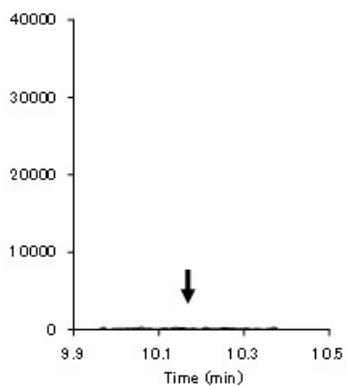


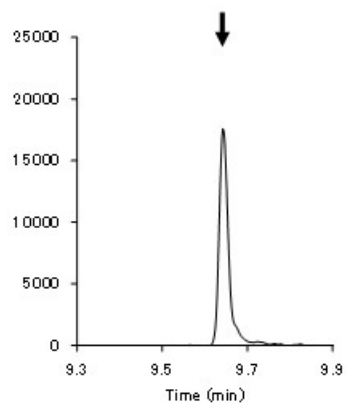
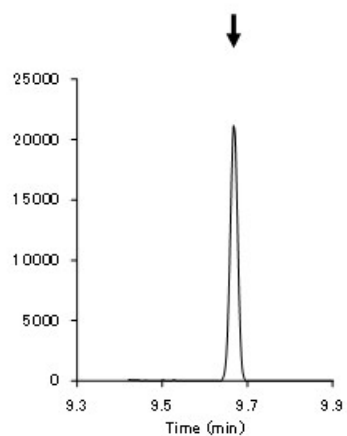
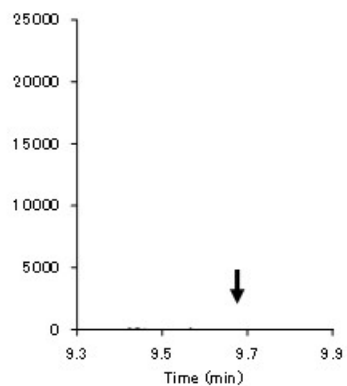
図 28-2 定量限界濃度 (0.01 ppm) での添加回収試験 (てんさい、PEG300 添加) における代表的なクロマトグラム

上 : ブランク試料、中 : 添加試料、下 : 回収率 100% 相当の標準溶液 (0.5 ng/mL)

エトフメセート



代謝物 M2



代謝物 M3

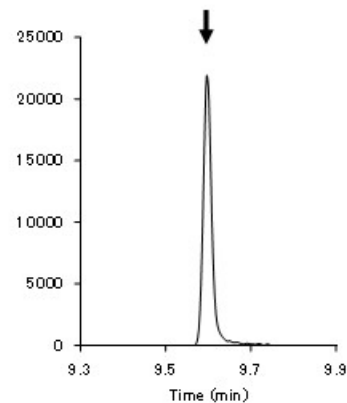
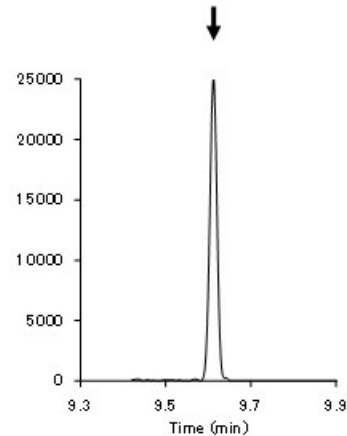
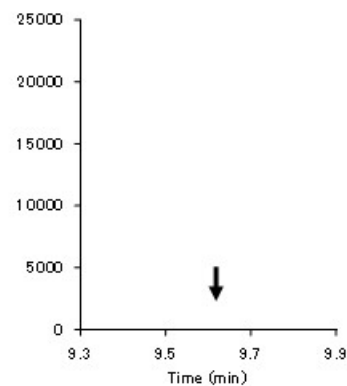
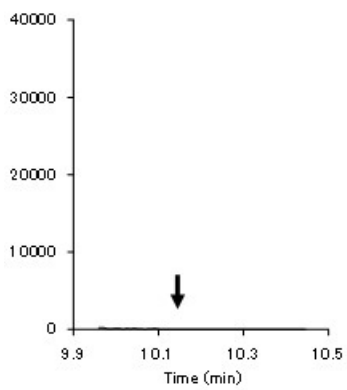


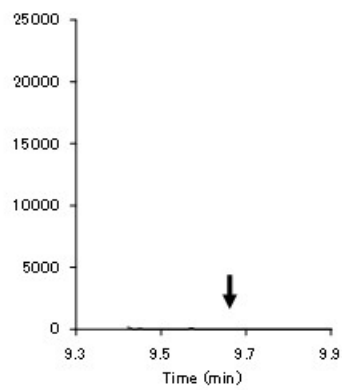
図 29-1 定量限界濃度 (0.01 ppm) での添加回収試験 (にんにく、PEG300 未添加) における代表的なクロマトグラム

上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100% 相当の標準溶液 (0.5 ng/mL)

エトフメセート



代謝物 M2



代謝物 M3

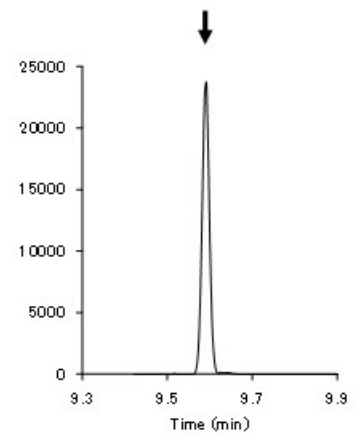
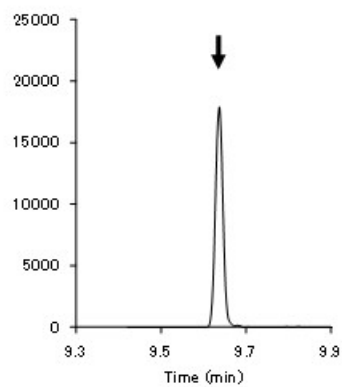
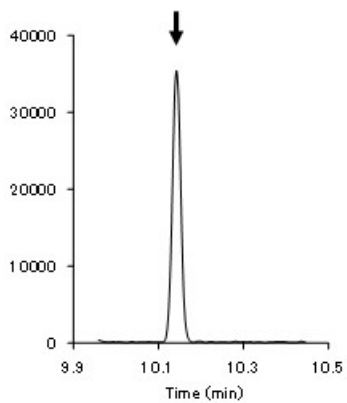
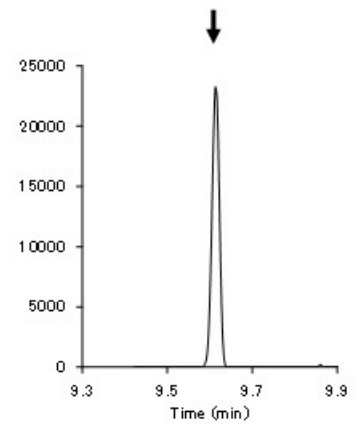
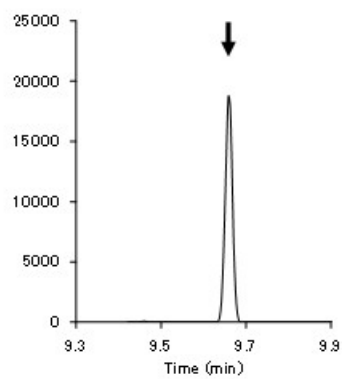
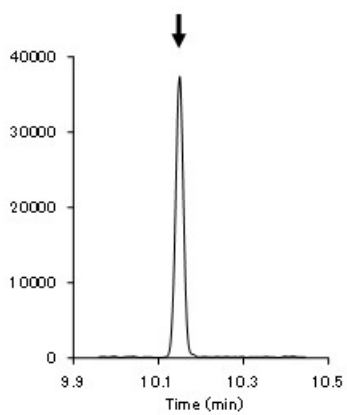
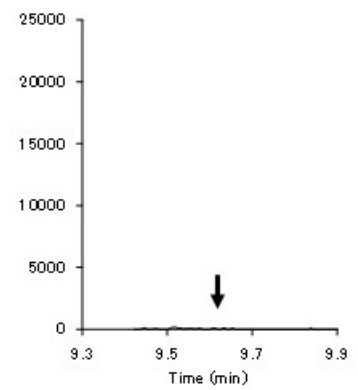
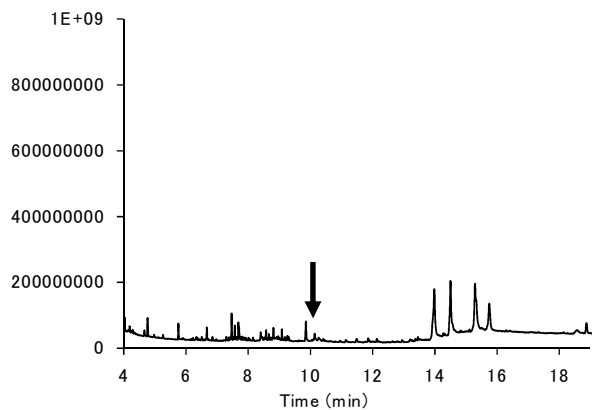


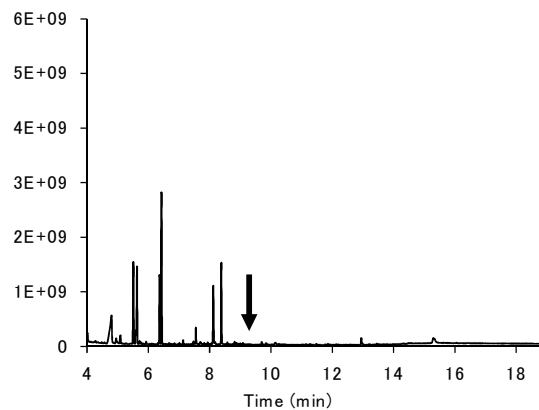
図 29-2 定量限界濃度 (0.01 ppm) での添加回収試験 (にんにく、PEG300 添加) における代表的なクロマトグラム

上 : ブランク試料、中 : 添加試料、下 : 回収率 100% 相当の標準溶液 (0.5 ng/mL)

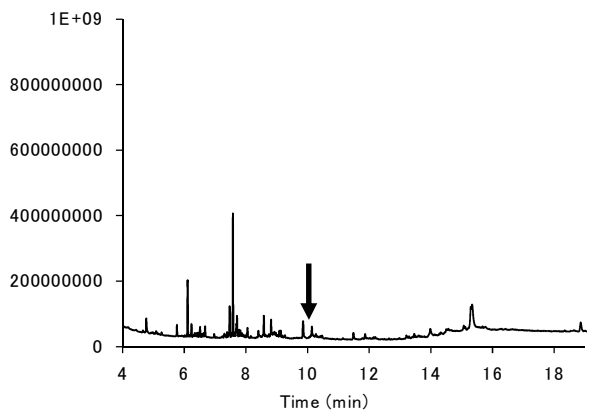
①たまねぎ
エトフメセート



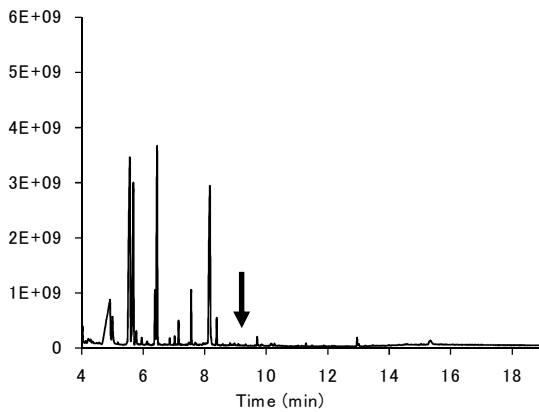
代謝物 M2



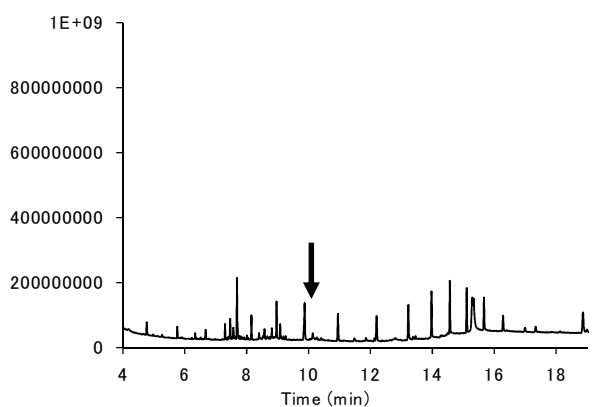
②てんさい
エトフメセート



代謝物 M2



③にんにく
エトフメセート



代謝物 M2

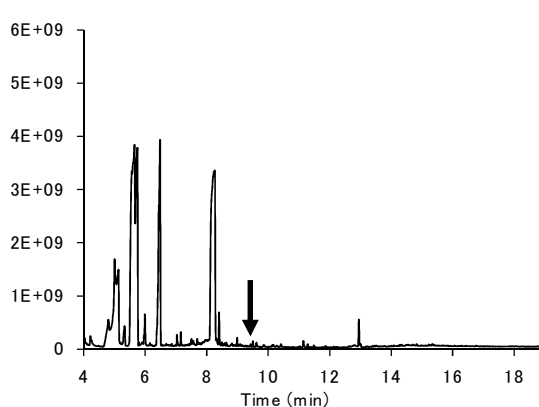
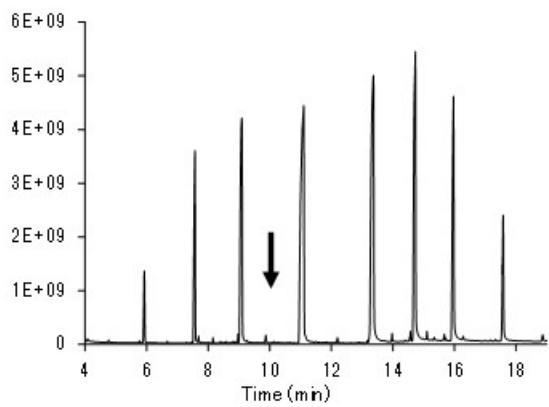
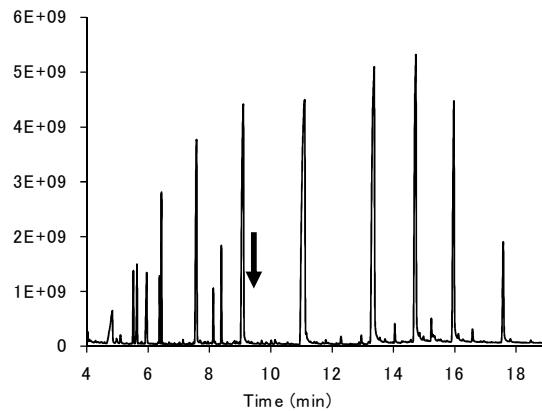


図 30-1 ブランク試料の代表的なトータルイオンカレント (TIC) クロマトグラム
スキャン範囲 : m/z 40~500

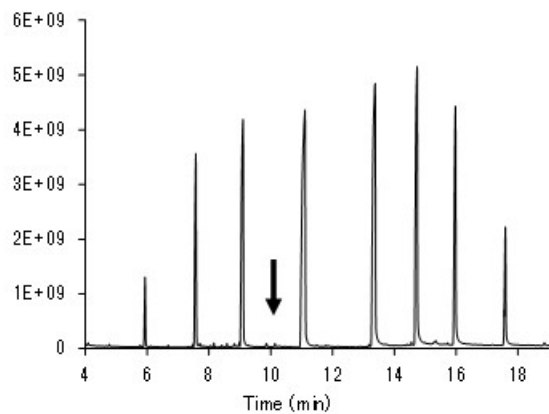
①たまねぎ
エトフメセート



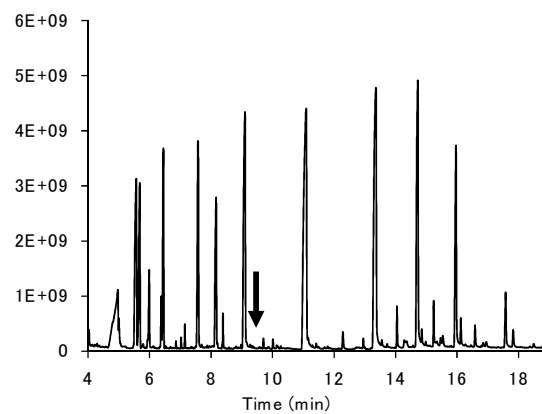
代謝物 M2



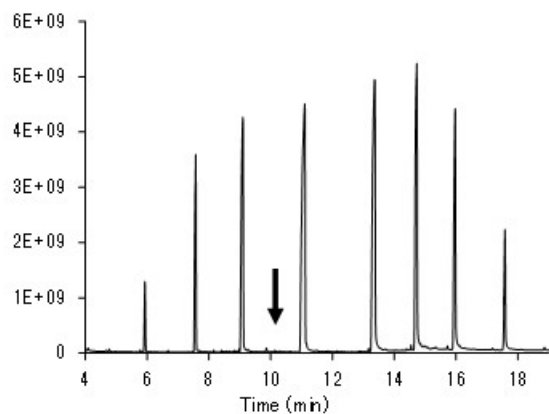
②てんさい
エトフメセート



代謝物 M2



③にんにく
エトフメセート



代謝物 M2

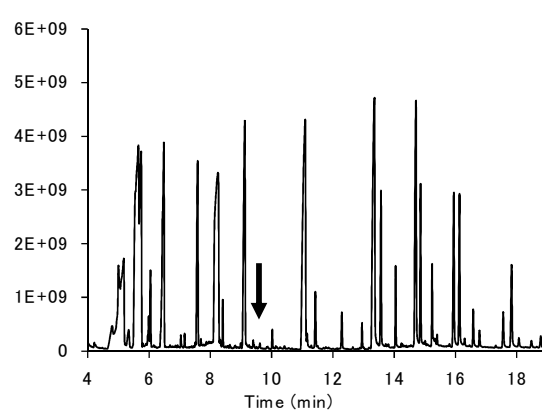


図 30-2 ブランク試料の代表的なトータルイオンカレント (TIC) クロマトグラム (PEG あり)
スキャン範囲 : m/z 40~500

【結論】

農産物中のエトフメセート試験法を開発した。本試験法では、エトフメセート及びその代謝物を試料からアセトン/水（4：1）混液で抽出し、水酸化ナトリウム溶液/ヘキサン分配を行って、分析対象化合物を *n*-ヘキサン層（エトフメセート）と水層（代謝物 M2、代謝物 M3 及びその抱合体）に分離する。エトフメセートは、*n*-ヘキサン層をシリカゲルカラムで精製し、GC-MS/MS で定量及び確認する。一方、代謝物 M2、代謝物 M3 及びその抱合体は、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 に加水分解する。これをジエチルエーテルに転溶し、無水酢酸で代謝物 M3 を代謝物 M2 に変換して、シリカゲルカラムで精製した後、GC-MS/MS で定量及び確認する方法である。本試験法を用いてたまねぎ、てんさい及びにんにくを対象に、エトフメセート、代謝物 M2 及び代謝物 M3 について定量限界及び基準値濃度で添加回収試験を行った。PEG300 を添加せずに測定した場合は溶媒標準溶液でテーリングが認められたが、PEG300 を添加して測定した場合は良好なピーク形状が得られた。しかしながら、PEG300 を添加せずに測定した場合は真度 94～113%、併行精度 1.6～5.7%、PEG300 を添加して測定した場合は真度 92～106%、併行精度 2.5～7.6%といずれの場合も良好な結果が得られた。また、いずれも定量を妨害するピークは認められず、選択性は良好であった。以上の結果から、PEG300 の有無によらず、本試験法はエトフメセート及びその代謝物を精確に分析することが可能と考えられた。定量限界として 0.01 mg/kg を設定可能であることが確認された。

【参考文献】

- 1) Ethofumesate: Magnitude of the residue on onion (dry bulb), Appendix 4 Analytical summary report, Bayer Cropscience, 2004.
- 2) 農薬抄録エトフメセート（除草剤）、バイエルクロップサイエンス株式会社、平成 21 年 4 月 28 日（平成 23 年 11 月 15 日改訂）