

シフルメトフェン試験法（農産物）

1．分析対象化合物

シフルメトフェン

α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸（以下、代謝物 という。）

代謝物配糖体

2．装置

液体クロマトグラフ・質量分析計（LC/MS）

3．試薬、試液

次に示すものの以外は、総則の3に示すものを用いる。

シフルメトフェン標準品 本品はシフルメトフェン96 %以上を含み、融点は77～82 °Cである。

代謝物標準品 本品は α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸99 %以上を含み、融点は109～113 °Cである。

4．試験溶液の調製

1) 抽出

果実及び野菜の場合は試料20.0 gを量り採る。茶の場合は試料5.00 gに水20 mLを加え、30分間放置する。

これにアセトニトリル及び水（9：1）混液100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物に、アセトニトリル及び水（9：1）混液50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液にアセトニトリルを加えて正確に200 mLとし、この20 mL（茶の場合は10 mL）を採り、40 °C以下で約5 mLまで濃縮する。これに水95 mLを加え、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：9）混液50 mLずつで2回振とう抽出する。抽出液を液相分離ろ紙でろ過する。

残りの水層を採り、これに塩酸4 mLを加え、還流冷却器を取り付けて、1時間加熱還流した後、放冷する。これを酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：9）混液50 mLずつで2回振とう抽出し、抽出液を液相分離ろ紙でろ過する。

各抽出液を合わせ、これに2 %ジエチレングリコール含有アセトン溶液0.5 mLを加え、40 °C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン及びメタノール（2：3）混液5 mLを加えて溶かす。

2) 精製

（1）果実及び野菜の場合

グラファイトカーボンミニカラム（500 mg）にアセトン及びメタノール（2：3）混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに1)で得られた溶液を注入し、さらに、アセトン及びメタノール（2：3）混液15 mLを注入し、全溶出液を採り、これに2 %ジエチレングリコール含有アセトン溶液0.5 mLを加え、40 °C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトニトリル及び水（2：3）混液に溶解し、正確に2 mLとしたものを試験溶液とす

る。

(2) 茶の場合

1) で得られた溶液を、(1) 果実及び野菜の場合と同様に、グラファイトカーボンカラムクロマトグラフィーによる精製に供し、得られた残留物に酢酸エチル 5 mL を加えて溶かす。

トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (1,000 mg) に酢酸エチル 10 mL を注入し、流出液は捨てる。このカラムに上記の溶液を注入し、さらに、酢酸エチル 10 mL を注入し、溶出液を採る (溶出液)。次いで、アセトン 10 mL 及びメタノール 10 mL を順次注入し、各流出液は捨てる。アンモニア水及びメタノール (1 : 99) 混液 15 mL を注入し、溶出液 () を採り、これに 2 % ジエチレングリコール含有アセトン溶液 0.5 mL を加える。各溶出液を 40 以下で濃縮し、溶媒を除去する。溶出液 () 及び溶出液 () の残留物をアセトニトリル及び水 (2 : 3) 混液に溶解し、各々正確に 1 mL としたものを、それぞれシフルメトフェン及び代謝物の試験溶液とする。

5. 検量線の作成

シフルメトフェン標準品及び代謝物標準品の各 0.01 ~ 0.2 mg/L を含むアセトニトリル及び水 (2 : 3) 混液の混合標準溶液を数点調製し、それぞれ 5 µL を LC/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。

6. 定量

試験溶液 5 µL を LC/MS に注入し、5 の検量線でシフルメトフェン及び代謝物の含量を求め、次式により代謝物及び代謝物配糖体を含むシフルメトフェンの含量を求める。

シフルメトフェン (代謝物及び代謝物配糖体含む) の含量 (ppm) = $A + B \times 2.35$

A : シフルメトフェンの含量 (ppm)

B : 代謝物 (配糖体を含む) の含量 (ppm)

7. 確認試験

LC/MS により確認する。

8. 測定条件

カラム : オクタデシルシリル化シリカゲル 内径 2 mm、長さ 150 mm、粒径 5 µm

移動相 : アセトニトリル及び 0.002 mol/L 酢酸アンモニウム含有 0.1 % ギ酸溶液の混液 (2 : 3) から (19 : 1) までの濃度勾配を 10 分間で行い、(19 : 1) で 10 分間保持する。

イオン化モード : シフルメトフェン ESI (+)、代謝物 ESI (-)

主なイオン (m/z) : シフルメトフェン 465、代謝物 189

保持時間の目安 : シフルメトフェン 15 分、代謝物 6 分

9. 定量限界

各化合物 0.01 mg/kg

茶の場合は、各化合物 0.04 mg/kg

10．留意事項

1) 試験法の概要

シフルメトフェン、代謝物及び代謝物配糖体を試料からアセトニトリル及び水（9：1）混液で抽出し、シフルメトフェンは酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：9）混液に転溶する。水層に存在する代謝物及びその配糖体は、塩酸酸性下で加熱還流し、配糖体を加水分解した後、同様に酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：9）混液に転溶する。転溶液を合わせ、グラファイトカーボンミニカラムで精製し、茶の場合はさらにトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、LC/MSで測定及び確認する方法である。シフルメトフェン及び代謝物（配糖体を含む）のそれぞれについて定量を行い、代謝物についてはその含量に換算係数を乗じてシフルメトフェンの含量に変換し、これらの和を分析値とする。

2) 注意点

本試験法は、脂肪含量が低い農産物（多くの果実、野菜及び茶等）に適用できる。なお、脂肪含量が高い農産物（アボカド等の果実、穀類、豆類及び種実類等）の試験法については現在検討中である。

代謝物配糖体は、塩酸酸性下で加熱還流することにより、代謝物に分解される。本試験法では、これを酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：9）混液で抽出する。

茶の分析では、トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製を追加しなければ、特にシフルメトフェンの回収が不良となる。

茶以外の農産物で、精製が不足する場合は、茶の追加精製方法、もしくは合成ケイ酸マグネシウムミニカラム（910 mg）による精製を追加するとよい。後者の操作概要を以下に示す。グラファイトカーボンミニカラム精製後の残留物をアセトン及び*n*-ヘキサン（1：19）混液 5 mL に溶解し、これを合成ケイ酸マグネシウムミニカラム（同混液 5 mL で洗浄したもの）に負荷した後、同混液 5 mL で洗浄し、アセトン及び*n*-ヘキサン（3：7）混液 10 mL でシフルメトフェンを溶出する。次いで、アセトン 10 mL で洗浄後、アセトン、酢酸及び酢酸エチル（30：1：70）混液 20 mL で代謝物を溶出する。

試験法では、転溶液の脱水に液相分離紙を使用しているが、無水硫酸ナトリウムによる方法を用いてもよい。

11．参考文献

なし

12．類型

C