

スピロメシフェン試験法（畜水産物）

1. 分析対象化合物

スピロメシフェン

4-ヒドロキシ-3-メシチル-1-オキサスピロ[4.4]ノナ-3-エン-2-オン（以下、「代謝物M1」という。）

4-ヒドロキシ-3-(4-ヒドロキシメチル-2,6-ジメチル-フェニル)-1-オキサスピロ[4.4]ノナ-3-エン-2-オン（以下、「代謝物M2」という。抱合体を含む。）

2. 適用食品

畜水産物

3. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-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。

スピロメシフェン標準品 本品はスピロメシフェン 98%以上を含む。

代謝物M1標準品 本品は代謝物M1 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。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料を正確に量り、重量比で3/10量のエタノール、ギ酸及び水（9：2：9）混液を加え磨砕均一化した後、試料10.0 g（脂肪の場合は5.00 g）に相当する量を量り採る。アセトニトリル、ギ酸及び水（80：1：20）混液100 mL並びに*n*-ヘキサン20 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、アセトニトリル及び水混液層を採る。*n*-ヘキサン層及び残留物にアセトニトリル、ギ酸及び水（80：1：20）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し、得られたアセトニトリル及び水混液層を合わせ、アセトニトリル、ギ酸及び水（80：1：20）混液で正確に200 mLとする。この溶液から正確に5 mL（脂肪は10 mL）を分取し、40℃以下で約1 mLに濃縮する。これに0.1 vol%ギ酸0.1 mL及び10 w/v%塩化ナトリウム溶液40 mLを加え、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：19）混液50 mLずつで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、スピロメシフェン及び代謝物M1画分（画分Ⅰ）とする。残りの水層を採り、代謝物M2及び代謝物M2抱合体画分（画分Ⅱ）とする。画分Ⅰに無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、40℃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0.01 vol%ギ酸（1：1）混液に溶かし、正確に10 mLとしたものをスピロメシフェン及び代謝物M1の試験溶液とする。

2) 加水分解（畜産物のみ）

1) で得られた画分Ⅱに水を加えて正確に50 mLとする。この溶液から正確に10 mLを分取し、塩酸6 mLを加え、密栓して90℃の油浴中で3時間加熱し代謝物M2

抱合体を加水分解する。放冷後、10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：1）混液100 mL及び50 mLで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトニトリル及び酢酸（99：1）混液10 mLを加えて溶かす。

3) 精製

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル（500 mg）にアセトニトリル及び酢酸（99：1）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流出液を捨てる。次いでアセトニトリル及び酢酸（19：1）20 mLを注入し溶出液を40℃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0.1 vol%ギ酸（1：1）混液に溶かし、正確に2 mLとしたものを代謝物M2の試験溶液とする。

6. 検量線の作成

スピロメシフェン標準品、代謝物M1標準品及び代謝物M2標準品をそれぞれアセトニトリルに溶かして標準原液とする。各標準原液を適宜混合してアセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸（1：1）混液で希釈した溶液を数点調製し、それぞれLC-MS/MSに注入し、ピーク高法又は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（スピロメシフェン換算）に相当する試験溶液中濃度は各化合物とも0.00025 mg/L（スピロメシフェン換算）である。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線でスピロメシフェン、代謝物M1及び代謝物M2の各含量を求める。代謝物M1及び代謝物M2を含むスピロメシフェンの含量を求める場合には、次式により求める。

$$\begin{aligned} & \text{スピロメシフェン（代謝物M1及び代謝物M2を含む。）の含量（ppm）} \\ & = A + B \times 1.360 + C \times 1.285 \end{aligned}$$

A：スピロメシフェンの含量（ppm）

B：代謝物M1の含量（ppm）

C：代謝物M2の含量（ppm）

8. 確認試験

LC-MS/MSにより確認する。

9. 測定条件

(例)

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径2.1 mm、長さ150 mm、粒子径5 μm

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸混液（1：4）から（9：1）までの濃度勾配を10分間で行い（9：1）で6分間保持する。

イオン化モード：ESI（+）

主なイオン（ m/z ）

スピロメシフェン：プリカーサーイオン 273、プロダクトイオン 255、187

代謝物M1：プリカーサーイオン 273、プロダクトイオン 255、187

代謝物M2：プリカーサーイオン 289、プロダクトイオン 271、241

注入量：10 μ L

保持時間の目安

スピロメシフェン：15分

代謝物M1：11分

代謝物M2：9分

10. 定量限界

各化合物0.01 mg/kg（スピロメシフェン換算）

11. 留意事項

1) 試験法の概要

スピロメシフェン、代謝物M1及び代謝物M2（抱合体を含む。）をエタノール、ギ酸及び水（9：2：9）混液で磨砕均一化した試料から n -ヘキサン存在下アセトニトリル、ギ酸及び水（80：1：20）混液で抽出する。酢酸エチル及び n -ヘキサン（1：19）混液を用いた液液分配によりスピロメシフェン及び代謝物M1を有機層に、代謝物M2及びその抱合体を水層に分画する。有機層についてはそのまま、水層については代謝物M2の抱合体を塩酸で加水分解して代謝物M2とし、酢酸エチル及び n -ヘキサン（1：1）混液で抽出した後、エチレンジアミン- N -プロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。

なお、スピロメシフェン、代謝物M1及び代謝物M2（抱合体を含む）のそれぞれについて定量を行い、代謝物M1及び代謝物M2（抱合体を含む）を含むスピロメシフェンの含量を求める場合には、代謝物M1及び代謝物M2の含量に換算係数を乗じてスピロメシフェンの含量に変換し、これらの和を分析値とする。ただし、分析値を求める際には、各食品の規制対象化合物に留意すること。

2) 注意点

- ① 調製時及び試験操作時のスピロメシフェンの分解を防ぐためにエタノール、ギ酸及び水混液を加えて調製を行い、以降の試験操作もギ酸酸性下で行う必要がある。
- ② スピロメシフェン、代謝物M1及び代謝物M2のLC-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。

スピロメシフェン

定量イオン（ m/z ）：プリカーサーイオン 273、プロダクトイオン 187

定性イオン（ m/z ）：プリカーサーイオン 273、プロダクトイオン 255

代謝物M1

定量イオン（ m/z ）：プリカーサーイオン 273、プロダクトイオン 187

定性イオン（ m/z ）：プリカーサーイオン 273、プロダクトイオン 255

代謝物M2

定量イオン（ m/z ）：プリカーサーイオン 289、プロダクトイオン241

定性イオン（ m/z ）：プリカーサーイオン 289、プロダクトイオン271

- ③ 試験法開発に検討した食品：牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳、鶏の筋肉・卵、はちみつ、うなぎ、さけ及びしじみ

12. 参考文献
なし

13. 類型
C