

スピロテトラマト試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

スピロテトラマト

シス-3-(2,5-ジメチルフェニル)-4-ヒドロキシ-8-メトキシ-1-アザスピロ[4.5]デカ-3-エン-2-オン（以下、「代謝物 M1」という。）

2. 適用食品

農産物

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。

スピロテトラマト標準品 本品はスピロテトラマト 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。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 穀類、豆類及び種実類の場合

試料 10.0 g に 2 vol%ギ酸 20 mL を加え、30 分間放置する。これにアセトン 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ン 50 mL を加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせて、アセトンを加えて正確に 200 mL とする。この溶液から正確に 2 mL を分取し、0.02 vol%ギ酸 20 mL を加える。

② 果実及び野菜の場合

試料を正確に量り、重量比で 3/10 量の 5 vol%ギ酸を加え磨砕均一化した後、試料 20.0 g に相当する量を量り採る。アセトン 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ン 50 mL を加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせて、アセトンを加えて正確に 200 mL とする。この溶液から正確に 2 mL を分取し、0.02 vol%ギ酸 20 mL を加える。

③ 茶の場合

試料 5.00 g に 2 vol%ギ酸 20 mL を加え、30 分間放置する。これにアセトン 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ン 50 mL を加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせて、アセトンを加えて正確に 200 mL とする。この溶液から正確に 4 mL を分取し、40°C 以下で約 1 mL まで濃縮し、アセトン 1 mL を加えて混合した後、0.02 vol% ギ酸 20 mL を加える。

2) 精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (1,000 mg) に、0.02 vol% ギ酸・メタノール溶液及び 0.02 vol% ギ酸各 5 mL を順次注入し、各流出液は捨てる。グラファイトカーボンミニカラム (250 mg) に、0.02 vol% ギ酸・メタノール溶液 5 mL を注入し、流出液は捨てる。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムに 1) で得られた溶液を注入した後、更に 0.02 vol% ギ酸及びメタノール (7:3) 混液 10 mL を注入し、流出液は捨てる。次いで、このカラムの下部にグラファイトカーボンミニカラムを接続し、0.02 vol% ギ酸・メタノール溶液 15 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ニトリル及び 0.02 vol% ギ酸 (1:1) 混液に溶かし、正確に 2 mL (果実及び野菜の場合は 4 mL) としたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

スピロテトラマト標準品及び代謝物 M1 標準品をそれぞれアセトンに溶解して標準原液を調製する。各標準原液を適宜混合してアセトニトリル及び 0.02 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 に相当する試験溶液中濃度は各化合物とも 0.0005 mg/L (代謝物 M1 はスピロテトラマト換算) である。

7. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、6 の検量線でスピロテトラマト及び代謝物 M1 の含量を求める。

代謝物 M1 を含むスピロテトラマトの含量を求める場合には、次式により求める。

スピロテトラマト (代謝物 M1 を含む) の含量 (ppm) = $A + B \times 1.239$

A : スピロテトラマトの含量 (ppm)

B : 代謝物 M1 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 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μ m

カラム温度：40°C

移動相：アセトニトリル及び 0.02 vol%ギ酸 (7 : 13) 混液で 1 分間保持した後、(19 : 1) までの濃度勾配を 10 分間で行い、(19 : 1) で 3 分間保持する。

イオン化モード：ESI (+)

主なイオン (m/z):

スピロテトラマト プリカーサーイオン 374

プロダクトイオン 302、216

代謝物 M1 プリカーサーイオン 302

プロダクトイオン 270、216

注入量：5 μ L

保持時間の目安：スピロテトラマト 11 分

代謝物 M1 8 分

10. 定量限界

各化合物 0.01 mg/kg (代謝物 M1 はスピロテトラマト換算)

11. 留意事項

1) 試験法の概要

スピロテトラマト及び代謝物 M1 を試料からギ酸酸性下でアセトン抽出し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びグラファイトカーボンミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認する方法である。なお、スピロテトラマト及び代謝物 M1 のそれぞれについて定量を行い、代謝物 M1 を含むスピロテトラマト含量を求める場合には、代謝物 M1 の含量に換 算係数を乗じてスピロテトラマトの含量に変換し、これらの和を分析値とする。

2) 留意事項

① スピロテトラマトは大豆等試料によっては分解されるため、酸性条件下で抽出を行う必要がある。

② 代謝物 M1 は濃縮操作により損失することがあるため、注意が必要である。

③ スピロテトラマト及び代謝物 M1 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。

スピロテトラマト

定量イオン (m/z): プリカーサーイオン 374
プロダクトイオン 216

定性イオン (m/z): プリカーサーイオン 374
プロダクトイオン 302

代謝物 M1

定量イオン (m/z): プリカーサーイオン 302
プロダクトイオン 216

定性イオン (m/z): プリカーサーイオン 302
プロダクトイオン 270

④ 試験法開発時に検討した食品：玄米、大豆、らっかせい、ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、なす、オレンジ、りんご及び茶

12. 参考文献

なし

13. 類型

C