

スピロメシフェン試験法（農産物）

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、エノール体という。）

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%以上を含み、融点は 96～101℃である。

エノール体標準品 本品はエノール体 99%以上を含み、融点は256～258℃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。穀類及び豆類の場合は試料10.0 g、茶の場合は試料5.00 gにそれぞれ水20 mLを加え、2時間放置する。

これにアセトニトリル、ギ酸及び水（80：1：20）混液100 mLを加え、ホモジナイズした後、抽出液をろ紙とガラス繊維ろ紙を敷いたロートで吸引ろ過する。ろ紙上の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、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトニトリル、ギ酸及び水（80：1：20）混液を加えて正確に200 mLとする。この50 mL（穀類及び豆類の場合は 20 mL、茶の場合は40 mL）を採り、40℃以下で約10 mL（穀類及び豆類の場合は約4 mL、茶の場合は約8 mL）まで濃縮する。濃縮液に水を加えて50 mLとし、これにギ酸0.1 mLを加え、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：19）混液50 mLで2回振とう抽出する。抽出液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、ろ液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に*n*-ヘキサン10 mLを加えて溶かす。

2) 精製

(1) 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（500 mg）に*n*-ヘキサン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た後、容器を酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：19）混液10 mLで洗い、洗液をカラムに注入し、流出液は捨てる。次に酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：19）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 : 19) 混液15 mLを注入し、溶出液 (I : スピロメシフェン画分) を採る。さらにギ酸、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (0.1 : 25 : 75) 混液10 mLを注入し、溶出液 (II : エノール体画分) を採る。溶出液 (I) 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0.01%ギ酸溶液 (1 : 1) 混液に溶解し、果実及び野菜の場合は正確に10 mL、穀類、豆類及び茶の場合は正確に2 mLとしたものをスピロメシフェンの試験溶液とする。

(2) グラファイトカーボンカラムクロマトグラフィー

グラファイトカーボンミニカラム (500 mg) にギ酸、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (0.1 : 25 : 75) 混液5 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに (1) で得られた溶出液 (II) を注入する。次に、ギ酸、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (0.1 : 25 : 75) 混液5 mL及びアセトニトリル及びギ酸 (99 : 1) 混液10 mLを順次注入し、全溶出液を合わせ、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%ギ酸溶液 (1 : 1) 混液に溶解し、果実及び野菜の場合は正確に10 mL、穀類、豆類及び茶の場合は正確に2 mLとしたものをエノール体の試験溶液とする。

5. 検量線の作成

スピロメシフェン標準品の0.005~0.1mg/L及びエノール体標準品の0.0025~0.05 mg/Lを含むアセトニトリル及び0.01%ギ酸溶液 (1 : 1) 混液の混合標準溶液を数点調製する。それぞれ2 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2 µLをLC/MSに注入し、5の検量線でスピロメシフェン及びエノール体の含量を求める。次式により、エノール体を含むスピロメシフェンの含量を求める。

スピロメシフェン (エノール体を含む。) の含量 (ppm) = A + B × 1.36

A : スピロメシフェンの含量 (ppm)

B : エノール体の含量 (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 2.1 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0.01%ギ酸溶液の混液 (3 : 7) から (4 : 1) までの濃度勾配を15分間で行い、さらに (9 : 1) までの濃度勾配を7分間で行う。

イオン化モード : スピロメシフェン ESI (+) 、エノール体 ESI (-)

主なイオン (m/z) : スピロメシフェン 273、エノール体 271

保持時間の目安 : スピロメシフェン 20分

エノール体 11分

9. 定量限界

各化合物 0.01mg/kg (エノール体はスピロメシフェン換算)

10. 留意事項

1) 試験法の概要

スピロメシフェン及びエノール体を試料からアセトニトリル、ギ酸及び水 (80 : 1 : 20) 混液で抽出し、酢酸エチル及び n -ヘキサン (1 : 19) 混液に転溶した後、シリカゲルミニカラムでスピロメシフェンとエノール体に分画し、エノール体はさらにグラファイトカーボン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。なお、スピロメシフェン及びエノール体のそれぞれについて定量を行い、エノール体についてはそ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。

2) 注意点

(1) スピロメシフェンからエノール体への変換を抑えるためにギ酸酸性下にて抽出を行う。

(2) 抽出液のろ過の際には、ろ紙の上にガラス繊維ろ紙を積層することにより、目詰りを防止し、ろ過を容易にする。

(3) 葉緑素の少ない試料では、エノール体をエチレンジアミントリ酢酸- N -プロピルシリル化シリカゲルミニカラム (1000 mg) で精製しても良い。

操作概要を以下に示す。予めメタノール5 mL、次いで水5 mLで洗浄したエチレンジアミントリ酢酸- N -プロピルシリル化シリカゲルミニカラム (1000 mg) に、シリカゲルミニカラムで精製した溶出液 (II) を注入し、流出液は捨てる。このカラムに、ギ酸、酢酸エチル及び n -ヘキサン (0.1 : 25 : 75) 混液5 mLを注入し、流出液を捨てる。次に、メタノール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ニトリル及び0.01%ギ酸溶液 (1 : 1) 混液に溶解し、果実及び野菜の場合は正確に10 mL、穀類、豆類及び茶の場合は正確に2 mLとしたものをエノール体の試験溶液とする。

11. 参考文献

なし

12. 類型

C