

## スピロジクロフェン試験法（畜産物）

### 1. 分析対象化合物

スピロジクロフェン

3-(2,4-ジクロロフェニル)-4-ヒドロキシ-1-オキサスピロ[4.5]デカ-3-エン-2-オン（以下「代謝物M1」という。）

### 2. 適用食品

畜産物

### 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。

スピロジクロフェン標準品 本品はスピロジクロフェン95%以上を含む。

代謝物M1標準品 本品は代謝物M1 95%以上を含む。

### 5. 試験溶液の調製

#### 1) 抽出

試料10.0 gにアセトン50 mL及びギ酸0.1 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25 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、アセトンを加えて正確に100 mLとする。この溶液から正確に10 mLを分取し、40°C以下で約1 mLに濃縮する。これに10 w/v%塩化ナトリウム溶液10 mLを加え、酢酸エチル10 mLずつで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、ろ液を40°C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、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル10 mLずつで3回振とう抽出する。抽出液を合わせ、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に0.1 vol%ギ酸及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液（7：3）混液10 mLを加えて溶かす。

#### 2) 精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）に、アセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸各10 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに1) で得られた溶液を注入した後、0.1 vol%ギ酸及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液（7：3）混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、0.1 vol%ギ酸及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液（1：4）混液10 mLを注入し、溶出液に0.1 vol%ギ酸及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液（1：4）混液を加えて正確に10 mLとしたものを試験溶液とする。

### 6. 検量線の作成

スピロジクロフェン標準品及び代謝物M1標準品をそれぞれアセトンに溶かして標準原液とする。各

標準原液を適宜混合して0.1 vol%ギ酸及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液（1：4）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0.001 mg/L（代謝物M1はスピロジクロフェン換算）である。

## 7. 定量

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

スピロジクロフェン（代謝物M1を含む。）の含量（ppm） =  $A + B \times 1.313$

A：スピロジクロフェンの含量（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2.1 mm、長さ100 mm、粒子径3 µm

カラム温度：40 °C

移動相：2 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液及び2 mmol/Lギ酸アンモニウム・メタノール溶液（1：1）混液で5分間保持した後、（1：4）で8分間保持する。

イオン化モード：ESI（+）

主なイオン（*m/z*）

スピロジクロフェン：プリカーサーイオン 411、プロダクトイオン 313

プリカーサーイオン 413、プロダクトイオン 315

代謝物M1：プリカーサーイオン 313、プロダクトイオン 213

プリカーサーイオン 315、プロダクトイオン 215

注入量：5 µL

保持時間の目安

スピロジクロフェン：13分

代謝物M1：3分

## 10. 定量限界

各化合物0.01 mg/kg（代謝物M1はスピロジクロフェン換算）

## 11. 留意事項

### 1) 試験法の概要

スピロジクロフェン及び代謝物M1を試料からギ酸酸性下アセトンで抽出し、酢酸エチルに転溶した後、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂する。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製

した後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。なお、スピロジクロフェン及び代謝物M1のそれぞれについて定量を行い、代謝物M1を含むスピロジクロフェン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ジクロフェンの含量に換算し、これらの和を分析値とする。

## 2) 注意点

- ① スピロジクロフェンから代謝物M1への変換を抑えるためにギ酸酸性下にて抽出を行う。
- ② 酢酸エチル転溶の際、エマルジョンが生成した場合は、毎分3,000回転で5分間遠心分離を行うと良い。
- ③ スピロジクロフェン及び代謝物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。

スピロジクロフェン

定量イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 411、プロダクトイオン 313

定性イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 413、プロダクトイオン 315

代謝物M1

定量イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 313、プロダクトイオン 213

定性イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 315、プロダクトイオン 215

- ④ 試験法開発時に検討した食品：牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳

## 12. 参考文献

なし

## 13. 類型

C