

※本報告書は、試験法開発における検討結果を取りまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意下さい。

食品に残留する農薬等の成分である物質の 試験法開発事業報告書

スピロジクロフェン試験法（畜産物）

スピロジクロフェン試験法（畜産物）の検討結果

【緒言】

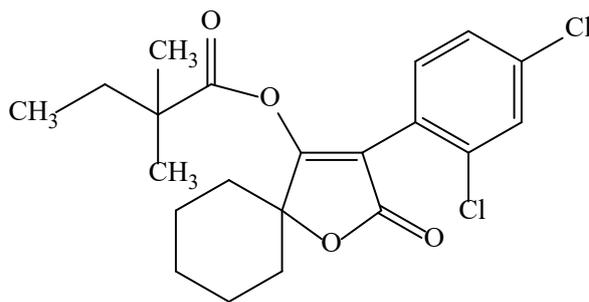
1. 目的及び試験法の検討方針等

スピロジクロフェンは、バイエルクロップサイエンス社が開発した環状ケトエノールに属するテトロノ酸誘導体で、植物寄生性ハダニに広範囲な活性を有する新規の構造を有する殺ダニ剤である。その作用機序は、脂質生合成に関与するアセチル CoA カルボキシラーゼを阻害することにより殺ダニ活性を示すものと考えられている。畜産物中の残留基準値は、スピロジクロフェン及び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（代謝物 M1）に対して設定されている。平成27年度に新規 LC/MS 一斉試験法（畜水産物）：愛知県法の妥当性評価試験において、その適用について検討されたが、スピロジクロフェン及び代謝物 M1 ともに適用不可であり、現在までのところ、通知試験法は示されていない。そこで、本検討では、LC-MS/MS を用いた畜産物を対象としたスピロジクロフェンの個別試験法の開発を行うことを目的とした。

2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

1) 分析対象化合物：スピロジクロフェン

構造式：



分子式：C₂₁H₂₄Cl₂O₄

CAS No. : 148477-71-8

分子量：411.32

化学名：3-(2, 4-Dichlorophenyl)-2-oxo-1-oxaspiro[4. 5]dec-3-en-4-yl 2, 2-dimethylbutyrate (IUPAC 名)

外観：白色粉末・無臭

融点：94.8℃

沸点：>375℃（熱分解により測定できず）

蒸気圧：2.8×10⁻⁷ Pa (20℃)

6.5×10⁻⁷ Pa (25℃)

溶解度：水：0.05 mg/L (20℃)、*n*-ヘプタン：20 g/L (20℃)、キシレン：>250 g/L (20℃)、ジクロロメタン：>250 g/L (20℃)、2-プロパノール：47 g/L (20℃)、1-オクタノール：44 g/L (20℃)、ポリエチレングリコール：24 g/L (20℃)、アセトン：>250 g/L (20℃)、酢酸エチル：>250 g/L (20℃)、アセトニトリル：>250 g/L (20℃)、ジメチルスルホキシド：75 g/L (20℃)

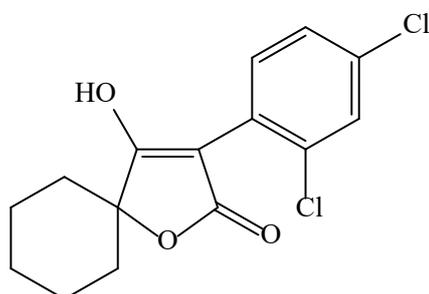
オクタノール/水分配係数：log Pow 5.83

解離定数 (pKa)：pH 4 以上の水溶液中で不安定なため測定不能

[出典：農薬抄録 一般名：スピロジクロフェン]

1) 分析対象化合物：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 (代謝物 M1)

構造式：



分子式：C₁₅H₁₄Cl₂O₃

CAS No.：148476-22-6

分子量：313.18

化学名：3-(2,4-Dichlorophenyl)-4-hydroxy-1-oxaspiro[4.5]dec-3-en-2-one (IUPAC 名)

外観：白色、結晶性粉末～粉末

融点/凝固点：255°C(分解)

溶解度：エタノール、アセトン：溶ける。

水：ほとんど溶けない。

[出典：富士フイルム和光純薬 安全データシート (スピロジクロフェン代謝産物 M1 標準品)]

3. 基準値

[食安発 0702 第 1 号 (平成 25 年 7 月 2 日)]

畜産物にあつてはスピロジクロフェン及び代謝物 M1 をスピロジクロフェンに換算したものの和をいう。

トマト	0.5
ピーマン	0.2
なす	2
その他のなす科野菜	5
きゅうり (ガーキンを含む)	0.1
みかん	0.05
なつみかんの果実全体	2
レモン	2
オレンジ (ネーブルオレンジを含む)	2
グレープフルーツ	2
ライム	2
その他のかんきつ類果実	2
りんご	2
日本なし	0.8
西洋なし	0.8
マルメロ	0.8
びわ	0.5
ネクタリン	2
あんず (アプリコットを含む)	2

すもも（プルーンを含む）	2
うめ	2
おうとう（チェリーを含む）	3
いちご	2
その他のベリー類果実	1
ぶどう	2
かき	1
パパイヤ	1
アボカド	1
マンゴー	1
その他の果実	5
ぎんなん	0.05
くり	0.1
ペカン	0.1
アーモンド	0.1
くるみ	0.1
その他のナッツ類	0.1
茶	20
コーヒー豆	0.03
ホップ	40
その他のスパイス	5
牛の筋肉	0.02
豚の筋肉	0.02
その他の陸棲哺乳類に属する動物の筋肉	0.02
牛の脂肪	0.02
豚の脂肪	0.02
その他の陸棲哺乳類に属する動物の脂肪	0.02
牛の肝臓	0.1
豚の肝臓	0.1
その他の陸棲哺乳類に属する動物の肝臓	0.1
牛の腎臓	0.1
豚の腎臓	0.1
その他の陸棲哺乳類に属する動物の腎臓	0.1
牛の食用部分	0.1
豚の食用部分	0.1
その他の陸棲哺乳類に属する動物の食用部分	0.1
乳	0.01

【実験方法】

1. 試料

試料は埼玉県内で市販されていた1) 牛の筋肉、2) 牛の脂肪、3) 牛の肝臓、4) 牛乳を用いた。

各食品の試料採取の方法を以下に示した。

- 1) 牛の筋肉：可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した。
- 2) 牛の脂肪：可能な限り筋肉層を除き、細切均一化した。
- 3) 牛の肝臓：全体を細切均一化した。
- 4) 牛乳：よく混合して均一化した。

2. 試薬

スピロジクロフェン：純度 99.0 % (富士フィルム和光純薬社製)
代謝物 M1：純度 99.6% (富士フィルム和光純薬社製)
メタノール：HPLC 用 (関東化学社製)
蒸留水：HPLC 用 (関東化学社製)
アセトン：残留農薬試験・PCB 試験用 (関東化学社製)
酢酸エチル：残留農薬試験・PCB 試験用 (富士フィルム和光純薬社製)
n-ヘキサン：残留農薬試験・PCB 試験用 (関東化学社製)
アセトニトリル：HPLC 用 (関東化学社製)
ギ酸：特級 (富士フィルム和光純薬社製)
ギ酸アンモニウム：特級 (富士フィルム和光純薬社製)
ケイソウ土：ハイフロスーパーセル (富士フィルム和光純薬社製)
塩化ナトリウム：特級 (富士フィルム和光純薬社製)
オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム： InertSep C18 (500 mg /6 mL、GL サイエンス社製)

標準原液：スピロジクロフェン標準品及び代謝物 M1 標準品各 20 mg を精秤し、アセトンで溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。

検量線用標準溶液：スピロジクロフェン及び代謝物 M1 標準原液を 0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (1 : 4) 混液で適宜希釈し、スピロジクロフェンは 0.00025~0.02 µg/mL 濃度範囲の、代謝物 M1 は 0.00025~0.02 µg/mL (スピロジクロフェン換算) 濃度範囲の標準溶液を調製した。

添加用標準溶液：標準原液をアセトンで希釈し、スピロジクロフェンは 0.1 mg/L、0.2 mg/L 及び 1 mg/L 溶液を、代謝物 M1 は 0.1 mg/L、0.2 mg/L 及び 1 mg/L (スピロジクロフェン換算) 溶液を調製した。

なお、本検討において、スピロジクロフェン及び代謝物 M1 の標準品の安定性については、アセトンで調製した標準原液は-25℃以下で 6 ヶ月は安定であった。

3. 装置

粉碎機：FP-25 (Cuisinart 社製)
ホモジナイザー：ヒスコトロン (マイクロテック・ニチオン社製)
遠心分離器：テーブルトップ遠心機 4000 (KUBOTA 社製)

LC-MS/MS

装置	型式	会社
MS	Xevo TQS	Waters
LC	ACQUITY UPLC	Waters
データ処理	MassLynx Ver.4.1	Waters

4. 測定条件

LC-MS/MS

LC 条件					
カラム	InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、 粒子径 3 μm : GL サイエンス社製)				
移動相流速 (mL/min)	0.3				
注入量 (μL)	5				
カラム温度 ($^{\circ}\text{C}$)	40				
移動相	A 液 : 蒸留水 B 液 : メタノール C 液 : 100 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液				
グラジエント条件	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	C 液 (%)	
	0.0	48	50	2	
	5.0	48	50	2	
	5.1	18	80	2	
	13.0	18	80	2	
	13.1	48	50	2	
	18.0	48	50	2	
MS 条件					
測定モード	選択反応モニタリング (SRM)				
イオン化モード	ESI (+)				
キャピラリ電圧 (kV)	3.0				
ソース温度 ($^{\circ}\text{C}$)	150				
脱溶媒温度 ($^{\circ}\text{C}$)	500				
コーンガス	窒素、150 L/hr				
脱溶媒ガス	窒素、1000 L/hr				
コリジョンガス	アルゴン				
スピロジクロフェン	定量イオン (m/z)	MS/MS: +411.0 \rightarrow +312.9 [コーン電圧 : 30 (V)、コリジョンエネルギー : 10 (eV)]			
	定性イオン (m/z)	MS/MS: +412.9 \rightarrow +314.8 [コーン電圧 : 30 (V)、コリジョンエネルギー : 10 (eV)]			
代謝物 M1	定量イオン (m/z)	MS/MS: +312.9 \rightarrow +212.9 [コーン電圧 : 30 (V)、コリジョンエネルギー : 25 (eV)]			
	定性イオン (m/z)	MS/MS: +314.9 \rightarrow +214.9 [コーン電圧 : 30 (V)、コリジョンエネルギー : 25 (eV)]			
保持時間 (min)	スピロジクロフェン 12.9 代謝物 M1 3.0				

5. 定量

スピロジクロフェン及び代謝物 M1 標準原液を 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、スピロジクロフェンは 0.00025~0.02 µg/mL 濃度範囲の、代謝物 M1 は 0.00019~0.01523 µg/mL 濃度範囲の数点の標準溶液を調製した。この溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入して、それぞれ得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりスピロジクロフェン及び代謝物 M1 の含量を算出した。

6. 添加試料の調製

- 1) 牛の筋肉 (添加濃度 : 0.02 ppm または 0.01 ppm) : 試料 10.0 g に添加用標準溶液 (スピロジクロフェンに換算して 0.2 mg/L または 0.1 mg/L) 1 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。
- 2) 牛の脂肪 (添加濃度 : 0.02 ppm または 0.01 ppm) : 試料 10.0 g に添加用標準溶液 (スピロジクロフェンに換算して 0.2 mg/L または 0.1 mg/L) 1 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。
- 3) 牛の肝臓 (添加濃度 : 0.1 ppm または 0.01 ppm) : 試料 10.0 g に添加用標準溶液 (スピロジクロフェンに換算して 1 mg/L または 0.1 mg/L) 1 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。
- 4) 牛乳 (添加濃度 : 0.01 ppm) : 試料 10.0 g に添加用標準溶液 (スピロジクロフェンに換算して 0.1 mg/L) 1 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

7. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料 10.0 g を遠沈管に量り採った。これにアセトン 50 mL 及びギ酸 0.1 mL を加えてホモジナイズした後、ケイソウ土を約 1 cm の厚さに敷いたろ紙 (直径 60 mm、No. 5B、桐山製作所製) を用いて吸引ろ過した。残留物にアセトン 25 mL を加えて同様に操作し、得られたろ液を合わせ、アセトンを加えて正確に 100 mL とした。この溶液から正確に 10 mL を分取し、40°C 以下で約 1 mL まで濃縮した。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 回振とう抽出した。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°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。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 回振とう抽出した。抽出液を合わせ、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。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 を加えて溶かした。

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 10 mL 及び 0.1 vol%ギ酸 10 mL を順次注入し、流出液は捨てた。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、流出液は捨てた。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した。

8. マトリックス添加標準溶液の調製

各検討対象食品の添加回収試験における回収率 100%相当濃度の 10 倍濃度に相当する標準液 0.2 mL を量り採り、40 °C 以下で濃縮し、溶媒を除去した後、ブランク試験溶液 2 mL を加えて溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。

《分析法フローチャート》

秤 取

↓ 牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳：10.0 g

アセトン抽出

↓ アセトン 50 mL 及びギ酸 0.1 mL を加えてホモジナイズ

↓ 吸引ろ過

↓ 残留物にアセトン 25 mL を加えてホモジナイズ

↓ 吸引ろ過

↓ ろ液を合わせてアセトンで 100 mL に定容

↓ 抽出液 10 mL の溶媒を採り、約 1 mL まで濃縮

酢酸エチル転溶

↓ 10 w/v%塩化ナトリウム溶液及び酢酸エチル各 10 mL

↓ 振とう 5 分間

↓ 酢酸エチル層を採取

↓ 水層に酢酸エチル 10 mL を加えて、同様に操作

↓ 酢酸エチル層を脱水、減圧濃縮し、窒素気流下で溶媒除去

アセトニトリル/ヘキサン分配

↓ *n*-ヘキサン 10 mL 及び *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 10 mL

↓ 振とう 5 分間

↓ アセトニトリル層を採取

↓ *n*-ヘキサン層に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 10 mL を加えて、同様に操作 (2 回)

↓ アセトニトリル層を減圧濃縮し、窒素気流下で溶媒除去

↓ 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 に溶解・・・①

InertSep C18 (500 mg/6 mL)

↓ アセトニトリル 10 mL 及び 0.1 vol%ギ酸 10 mL でコンディショニング

↓ ①を注入 (流出液は捨てる)

↓ 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 で洗浄

↓ 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 で溶出

↓ 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 とする

試験溶液

↓

LC-MS/MS

【結果及び考察】

1. 測定条件の検討

1) MS 及び LC 条件の検討

① MS 条件

スキャン測定においては、スピロジクロフェンは ESI の (+) モードのみ測定が可能であった。一方、代謝物 M1 は ESI の (+) モード及び (-) モード両方のモードで測定が可能であったが、その感度を比較すると (+) モードの方が良好であったことから (+) モードを採用した。ESI の (+) モード測定におけるスピロジクロフェン及び代謝物 M1 のマススペクトルを図 1 及び図 2 に示した。ESI の (+) モードではスピロジクロフェンは、プロトン付加分子の $[M+H]^+$ の m/z 411.0 及び塩素原子同位体由来のイオン m/z 412.9 が感度良く検出された。また m/z 312.9 および 314.8 も感度よく検出されたが、コーン電圧を下げて同イオンは検出され、この傾向は変わらなかった。一方、代謝物 M1 は、プロトン付加分子の $[M+H]^+$ の m/z 312.9 及び塩素原子同位体由来のイオン m/z 314.9 が感度よく検出された。

Selected Reaction Monitoring (SRM) モード測定条件について検討した。スピロジクロフェンでは、 m/z 411.0 をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンのうち、イオン強度の最も強い m/z 312.9 を定量用イオンに採用しようと検討したところ、 m/z 312.9 をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンである、 m/z 156.9 のイオン強度がより強かった。一方、LC 条件を変更して測定した場合には、いずれの測定イオンにおいても同等のイオン強度が得られた。使用する LC 条件によって異なる結果が得られた原因としては、質量分析におけるスピロジクロフェンのイオン化等に及ぼす試料マトリックス成分の影響が考えられた。測定イオンに依らず同等の結果が得られる条件、すなわち、分子イオンをプリカーサーイオンとした測定イオン、フラグメントイオンをプリカーサーイオンとした測定イオン、どちらの測定イオンを用いた場合であっても同等のイオン強度が得られる LC 条件や試験溶液調製法を採用することが重要であると考えられた。その結果、スピロジクロフェンでは、プロトン付加分子の $[M+H]^+$ をプリカーサーイオンとして、衝突誘起解離によって得られる m/z 411.0→312.9 を定量イオン (図 3)、 m/z 412.9→314.8 を定性イオン (図 4) とした。代謝物 M1 では、 m/z 312.9 をプリカーサーイオンとした場合には m/z 212.9 の強度が最も高く、次に m/z 184.7、3 番目に m/z 158.8 の強度が高かった。また、 m/z 314.9 をプリカーサーイオンとした場合には m/z 214.9、 m/z 186.7、ならびに m/z 160.7 が同様に感度良く検出された。これらのイオンから最も感度が良いことから m/z 312.9→212.9 を定量イオンに、塩素原子同位体から得られる m/z 314.9→ m/z 214.9 を定性イオンに採用した (図 5 及び図 6)。

② LC 条件

シリカベースの逆相系カラムについて、ピーク形状や MS 検出の感度が良好なカラムを検討した。L-column ODS ((一般財団法人) 化学物質評価研究機構製)、Cadenza CD-C18 (Imtakt 社製)、Atlantis T3 及び XBridge C18 (Waters 社製)、Inertsil ODS-3 及び InertSustain C18 (GL サイエンス社製) の内径 2~2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 3~3.5 μm のカラムについて検討したところ、スピロジクロフェン及び代謝物 M1 の S/N が比較的良好で (表 1)、ピーク形状、分離及び再現性についても良好な結果が得られた InertSustain C18 を採用した。

移動相への添加剤について、ギ酸、酢酸、酢酸アンモニウム及びギ酸アンモニウムを比較したところ、ギ酸アンモニウムの添加においてピーク形状が良好であったため、ギ酸アンモニウムを採用し、かつ、その至適濃度は 2 mmol/L であった (表 2)。移動相の有機溶媒についてメタノール (表 3) とアセトニトリル (表 4) を比較したところ、溶媒標準溶液では感度に顕著な差は認められなかったが、マトリックス添加標準溶液では移動相にアセトニトリルを用いると肝臓試料 (代謝物 M1 のピーク面積比 0.80) 及び脂肪試料 (スピロジクロフェンのピーク面積比 1.31) においてマトリックスによるイオン化抑制及び増強効果が認められた。一方、メタノールを移動相に使用した場合は、

マトリックスによる顕著なイオン化増強効果は観察されなかったことから、メタノールを採用した。

また、グラジエント法を実施した場合、牛の筋肉及び肝臓において、スピロジクロフェンで良好な回収率が得られず、測定の際の試料マトリックスによるイオン化抑制が原因と推察された(表 5)。そこで、種々の LC 条件について検討した結果、ステップワイズ法を用いた LC 条件を使用することで回収率の改善が確認された(表 6)。

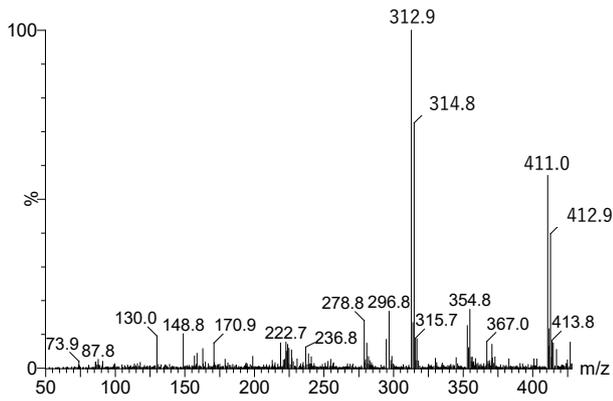


図1 スピロジクロフェンのマススペクトル
 スキャン範囲：50~430 amu
 測定条件：ESI(+), CV=30 V
 (CV: corn voltage)

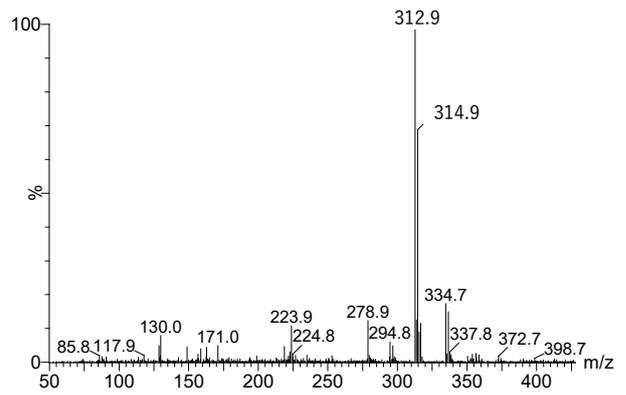


図2 代謝物 M1 のマススペクトル
 スキャン範囲：50~330 amu
 測定条件：ESI(+), CV=30 V
 (CV: corn voltage)

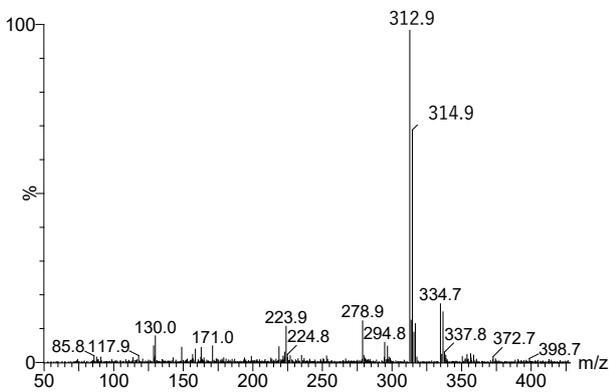


図3 スピロジクロフェンのプロダクトイオン
 スペクトル (定量用)
 プリカーサーイオン：m/z 411.0
 測定条件：ESI(+), CV=30 V, CE=10eV
 (CV: corn voltage, CE: collision energy)

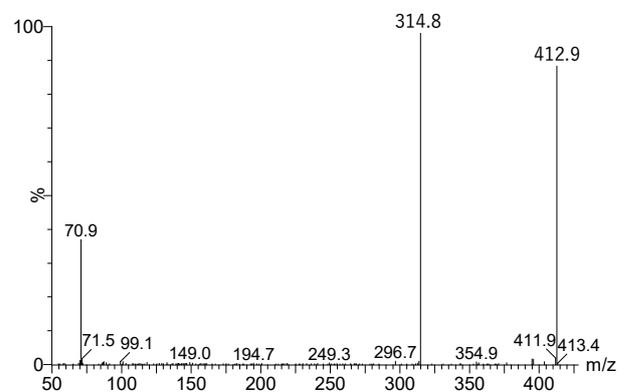


図4 スピロジクロフェンのプロダクトイオン
 スペクトル (定性用)
 プリカーサーイオン：m/z 412.9
 測定条件：ESI(+), CV=30 V, CE=10 eV
 (CV: corn voltage, CE: collision energy)

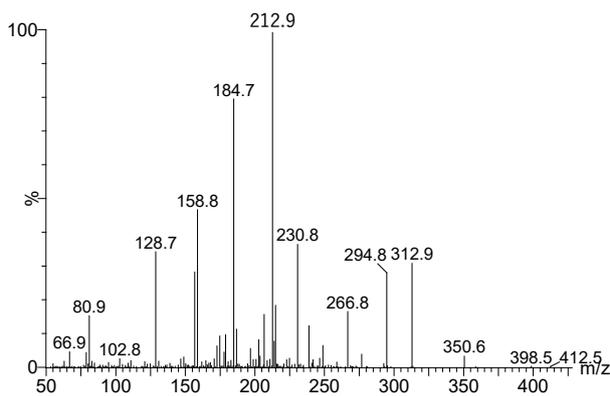


図5 代謝物 M1 のプロダクトイオンスペクトル(定
 量用)
 プリカーサーイオン：m/z 312.9
 測定条件：ESI(+), CV=30 V, CE=25 eV
 (CV: corn voltage, CE: collision energy)

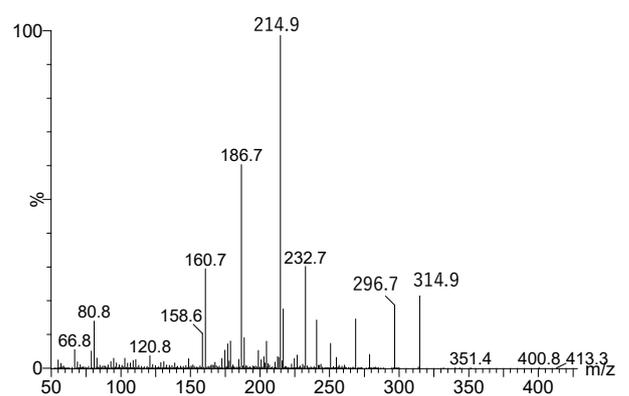


図6 代謝物 M1 のプロダクトイオンスペクトル(定
 性用)
 プリカーサーイオン：m/z 314.9
 測定条件：ESI(+), CV=30 V, CE=25 eV
 (CV: corn voltage, CE: collision energy)

表1 分析カラムの検討

分析カラム	代謝物 M1	スピロジクロフェン
	<i>S/N</i>	<i>S/N</i>
Cadenza CD-C18 3 μm, 2.0×100 mm	11375	1415
XBridge C18 3.5 μm, 2.1×100 mm	11561	2707
Atlantis T3 3 μm, 2.1×100 mm	12645	1886
L-column ODS 3 μm, 2.1×100 mm	11089	2384
InertSustain C18 3 μm, 2.1×100 mm	21548	3281
Inertsil ODS-3 3 μm, 2.1×100 mm	16883	2207

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（9：1）混液で0.5 分間保持した後、（1：9）までの濃度勾配を5.5 分間で行い、（1：9）で6 分間保持。
測定サンプル：20 ppb スピロジクロフェンまたは20 ppb スピロジクロフェン代謝産物 M1 標準溶液（0.1 vol%ギ酸及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液（1：4）混液にて希釈）

表2 添加剤の比較

添加剤	濃度	スピロジクロフェン	代謝物M1
		<i>S/N</i>	<i>S/N</i>
ギ酸	0.1 vol%	91	62
酢酸	0.1 vol%	7312	7825
ギ酸アンモニウム	2 mmol/L	16426	14683
酢酸アンモニウム	2 mmol/L	8378	6731

各濃度の添加剤を加えた水及び各濃度の添加剤を加えたメタノール溶液（9：1）混液で0.5 分間保持した後、（1：9）までの濃度勾配を5.5 分間で行い、（1：9）で6 分間保持。

表3 試料マトリックスの測定への影響（移動相にメタノールを使用）

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 ^{*1} (mg/L)	面積又は 高さの別	ブラン ク ^{*3}	ピーク面積（高さ） ^{*2}						備考	
									マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液				ピーク面積 （高さ）比 ^{*5}
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
スピロジクロフェン	牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	0.002	面積	0	78654	76294	77474	86374	88123	87249	0.89		
		0.01	0.02	0.01	0.001	面積	0	40887	36080	38484	42107	43701	42904	0.90		
		0.01	0.02	0.02	0.002	面積	0	93650	90743	92197	89984	86075	88030	1.05		
		0.01	0.02	0.01	0.001	面積	0	46016	46332	46174	42691	43361	43026	1.07		
		0.01	0.1	0.1	0.01	面積	0	368747	389034	378891	421954	423064	422509	0.90		
		0.01	0.1	0.01	0.001	面積	0	38785	41301	40043	44504	42583	43544	0.92		
		0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	41218	42028	41623	44979	46272	45626	0.91		
		0.01	0.02	0.02	0.002	面積	0	202339	198086	200213	201893	208133	205013	0.98		
		0.01	0.02	0.01	0.001	面積	0	98412	100729	99571	107821	106498	107160	0.93		
代謝物M1	牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	0.002	面積	0	198872	199878	199375	197594	207232	202413	0.98		
		0.01	0.02	0.01	0.001	面積	0	100923	96533	98728	101552	99447	100500	0.98		
		0.01	0.1	0.1	0.01	面積	0	871241	906724	888983	1035297	1052890	1044094	0.85		
		0.01	0.1	0.01	0.001	面積	0	85238	91897	88568	100711	98207	99459	0.89		
		0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	103906	102010	102958	104396	105558	104977	0.98		

*1 添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液（マトリックス添加標準溶液）及び溶媒で調製した標準溶液（溶媒標準溶液）を作成する。

*2 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。（必要に応じて起爆注入を行う。）

*3 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

*4 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

*5 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積（又は高さ）の比を求める。

表 4 試料マトリックスの測定への影響 (移動相にアセトニトリルを使用)

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 ^{*1} (mg/L)	面積又は高さの別	ブランク ^{*3}	ピーク面積 (高さ) ^{*2}						備考	
									マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液				ピーク面積 (高さ) 比 ^{*5}
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
スピロジクロフェン	牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	0.002	面積	0	166609	187205	176907	152455	184119	168287	1.05		
		0.01	0.02	0.01	0.001	面積	0	82711	84156	83433	72852	80262	76557	1.09		
		0.01	0.02	0.02	0.002	面積	0	236423	223037	229730	189128	194076	191602	1.20		
		0.01	0.02	0.01	0.001	面積	0	122657	117059	119858	92700	90348	91524	1.31		
		0.01	0.1	0.1	0.01	面積	0	950757	907744	929250	929608	881258	905433	1.03		
		0.01	0.1	0.01	0.001	面積	0	100321	99841	100081	97532	102893	100212	1.00		
代謝物M1	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	94620	103950	99285	84543	93405	88974	1.12		
		0.01	0.02	0.02	0.002	面積	0	130682	136221	133452	140106	139092	139599	0.96		
		0.01	0.02	0.01	0.001	面積	0	69086	69729	69408	69565	66855	68210	1.02		
		0.01	0.02	0.02	0.002	面積	0	140199	135680	137939	136080	136425	136253	1.01		
		0.01	0.02	0.01	0.001	面積	0	71184	73958	72571	68459	68298	68378	1.06		
		0.01	0.1	0.1	0.01	面積	0	562070	550899	556485	658214	685000	671607	0.83		
牛の脂肪	牛の脂肪	0.01	0.1	0.01	0.001	面積	0	55754	57520	56637	72391	69463	70927	0.80		
		0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	72880	69908	71394	74220	69925	72072	0.99		

*1 添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液 (マトリックス添加標準溶液) 及び溶媒で調製した標準溶液 (溶媒標準溶液) を作成する。
 *2 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)
 *3 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。
 *4 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。
 *5 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積 (又は高さ) の比を求める。

表 5 グラジエント法におけるスピロジクロフェン及び代謝物 M1 の回収率 (%)

測定イオン	牛の筋肉				牛の肝臓				
	day 1		day 2		day 1		day 2		
	回収率 (%)	面積比							
スピロジクロフェン	411>313	38	0.51	66	0.71	63	0.52	27	0.44
	413>315	39	0.51	63	0.67	63	0.53	26	0.42
	313>213	50	0.66	77	0.80	67	0.61	42	0.64
	315>215	49	0.65	75	0.80	67	0.60	42	0.64
代謝物M1	313>213	82	1.00	-	-	80	0.98	-	-
	315>215	82	1.00	-	-	79	0.98	-	-

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 (9 : 1) 混液で

0.5 分間保持した後、(1 : 9) までの濃度勾配を 5.5 分間で行い、(1 : 9) で 6 分間保持する。

面積比 : マトリックス添加標準溶液のピーク面積値/溶媒標準溶液のピーク面積値

- : 未実施

表 6 ステップワイズ法におけるスピロジクロフェン及び代謝物 M1 の回収率 (%)

測定イオン	牛の筋肉				牛の肝臓				
	day 1		day 2		day 1		day 2		
	回収率 (%)	面積比							
スピロジクロフェン	411>313	73	0.85	85	0.89	78	0.91	68	0.89
	413>315	72	0.85	85	0.89	78	0.89	69	0.90
	313>213	74	0.88	85	0.89	75	0.90	70	0.92
	315>215	76	0.88	83	0.90	75	0.90	68	0.91
代謝物M1	313>213	-	1.02	-	-	-	1.01	-	-
	315>215	-	1.02	-	-	-	1.01	-	-

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。

面積比 : マトリックス添加標準溶液のピーク面積値/溶媒標準溶液のピーク面積値

- : 未実施

2) 検量線

各定量用イオンのピーク面積値を用いて、絶対検量線を作成した。図 7~9 にスピロジクロフェン (定量イオン測定) の検量線の例を示した。0.25~2.0 ng/mL、0.5~4.0 ng/mL 及び 2.5~20.0 ng/mL の各濃度範囲で、それぞれ作成した検量線の相関係数は、0.9990~0.9998 の良好な直線性を示した。図 10~12 に代謝物 M1 (定量イオン測定) の検量線の例を示した。0.25~2.0 ng/mL、0.5~4.0 ng/mL 及び 2.5~20.0 ng/mL (スピロジクロフェン換算) の各濃度範囲で、それぞれ作成した検量線の相関係数は、0.9993~0.9998 の良好な直線性を示した。

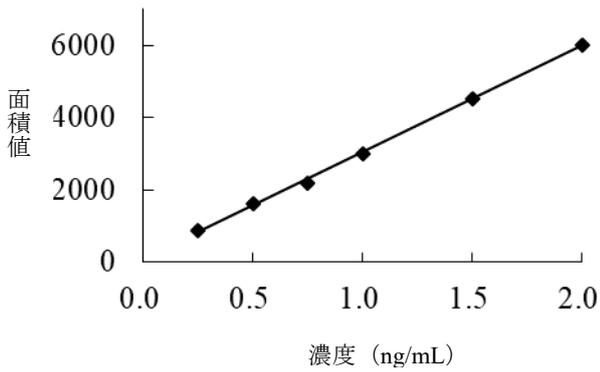


図7 スピロジクロフェンの検量線例
濃度範囲：0.25~2.0 ng/mL
 $y=2910x+122$ $r=0.9990$

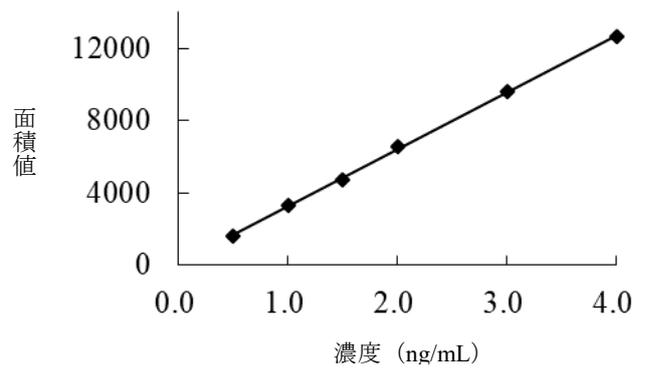


図8 スピロジクロフェンの検量線例
濃度範囲：0.5~4.0 ng/mL
 $y=3188x+24$ $r=0.9995$

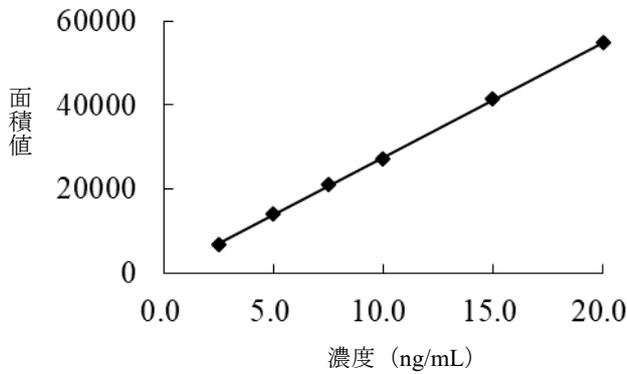


図9 スピロジクロフェンの検量線例
濃度範囲：2.5~20.0 ng/mL
 $y=2735x+310$ $r=0.9998$

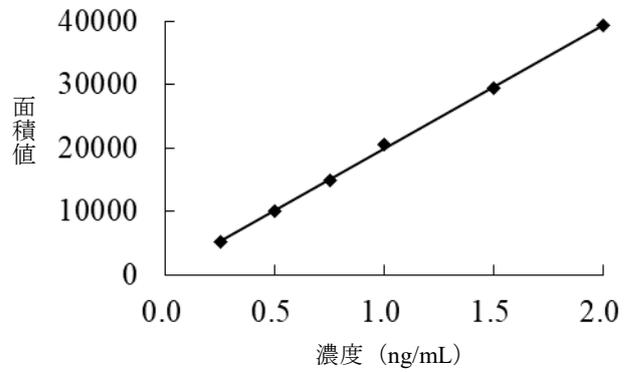


図10 代謝物 M1 の検量線例
濃度範囲：0.25~2.0 ng/mL
(スピロジクロフェン換算)
 $y=19607x+344$ $r=0.9997$

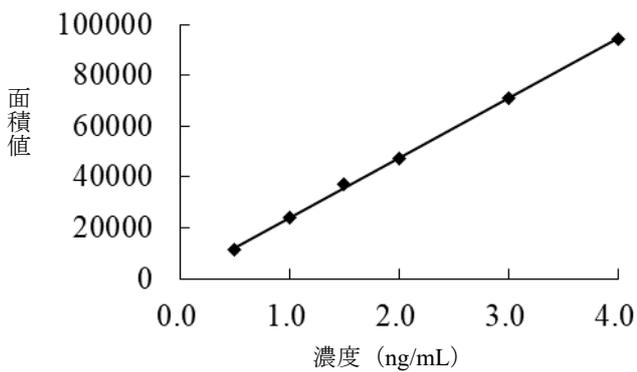


図11 代謝物 M1 の検量線例
濃度範囲：0.5~4.0 ng/mL
(スピロジクロフェン換算)
 $y=23913x-126$ $r=0.9993$

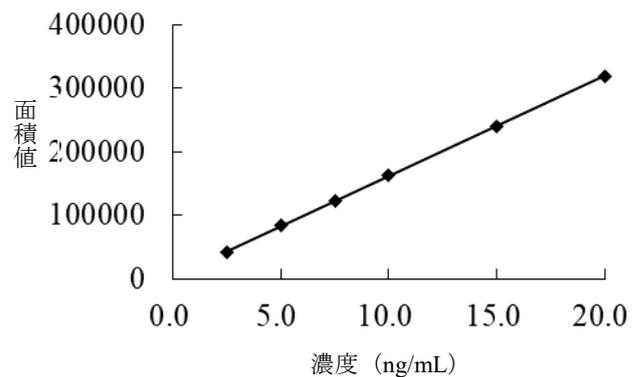


図12 代謝物 M1 の検量線例
濃度範囲：2.5~20.0 ng/mL
(スピロジクロフェン換算)
 $y=15897x+2871$ $r=0.9998$

2. 試験溶液調製法の検討

開発メーカーより提供された分析法は、試料から 0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (1:4) 混液で抽出後、HLB カラムで精製し、LC-MS/MS を用いて定量する方法であった。また、農薬・動物用医薬品部会報告での分析法は、試料から 0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (1:4) 混液で抽出後、C18 カラムで精製し、LC-MS/MS を用いて定量する方法であった。これらの方法を参考として検討を行うこととした。

1) 抽出溶媒の検討

開発メーカーより提供された分析法¹⁾や農薬・動物用医薬品部会報告での分析法²⁾では、畜産物を対象としたスピロジクロフェン分析法の抽出溶媒として、0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (1:4) 混液が用いられている。スピロジクロフェンは、pH4 以上の水溶液中で不安定であり加水分解を受け、その半減期は、pH4: 63.6 日、pH7: 30.8 日、pH9: 1.9 日 (25°C) である³⁾。

抽出溶媒にギ酸を添加する理由は、ギ酸を添加し酸性条件下にすることでスピロジクロフェンから、その代謝物である代謝物 M1 への変換を抑えていると考えられる。しかしながら、残留農薬等試験法検討実施要領では、畜水産物の固形試料の場合は、物理化学的性質等から脂肪とともに抽出することが困難でない限り、原則として農薬等を脂肪とともに抽出する方法を検討することとなっている。そこで、抽出溶媒には、脂質と分析対象としているスピロジクロフェン及び代謝物 M1 を同時に抽出できる溶媒として、残留農薬分析で広く採用されているアセトンを用いて、アセトン抽出時のギ酸の添加量により回収率に影響を及ぼすか否かについて検討した。

牛の筋肉試料を用いてアセトン抽出時にギ酸 0~0.2 mL を添加し、各抽出条件でのスピロジクロフェン及び代謝物 M1 の回収率を比較した (表 7)。その結果、抽出溶媒にアセトンを用いることでスピロジクロフェン及び代謝物 M1 ともに良好な回収率が認められた。また、アセトン抽出時にギ酸を添加することで代謝物 M1 の回収率が若干改善されたが、ギ酸添加量による回収率の差異はみられなかった。さらに、2 回目のアセトン抽出時にギ酸を添加しなくても、同等の回収率が認められたことからアセトン抽出 1 回目のみギ酸を添加することとした。

以上の結果より、抽出溶媒にはアセトンを採用し、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開発メーカーより提供された分析法¹⁾や農薬・動物用医薬品部会報告での分析法²⁾で採用されているギ酸濃度であるギ酸 0.1 mL を添加することとした。なお、アセトン抽出操作については、残留農薬等試験法検討実施要領に従って、50 mL 及び 25 mL で 2 回抽出する方法とした。

表 7 アセトン抽出時のギ酸添加によるスピロジクロフェン及び代謝物 M1 の回収率 (%)

	ギ酸			
	0 mL	0.05 mL	0.1 mL	0.2 mL
スピロジクロフェン	99	101	100	98
代謝物M1	93	96	98	99

(0.1 mg/kg 相当添加、 $n = 2$)

[実験方法] 7. 試験溶液の調製に従って調製した。

牛の筋肉試料 10.0 g に添加用標準溶液 (スピロジクロフェンに換算して 1 mg/L) 1 mL を添加した。

アセトン 50 mL 抽出時にギ酸を 0~0.2 mL 添加した。

2) 有機溶媒への転溶

n-ヘキサンまたは酢酸エチルを転溶溶媒として有機溶媒転溶時の転溶溶媒によるスピロジクロフェン及び代謝物 M1 の回収率について牛の筋肉試料を用いて検討した (表 8)。なお、各有機溶媒での転溶操作については 3 回実施し、その回収率を比較した。その結果、酢酸エチルを転溶溶媒に用いることでス

スピロジクロフェン及び代謝物 M1 とともに概ね 100%回収されていた。また、LC-MS/MS 測定では感度が高く、抽出液のすべてを用いる必要がないため、アセトン抽出液の一部 (10 mL) を用いることとした。

表 8 有機溶媒転溶におけるスピロジクロフェン及び代謝物 M1 の回収率 (%)

	<i>n</i> -ヘキサン	酢酸エチル
スピロジクロフェン	89	97
代謝物M1	90	98

(0.1 mg/kg 相当添加、*n* = 2)

[実験方法] 7. 試験溶液の調製に従って調製した。

アセトン抽出液の溶媒を除去した後に添加用標準溶液 (スピロジクロフェンに換算して 1 mg/L) 0.1 mL を添加した。転溶溶媒は *n*-ヘキサン 10 mL または酢酸エチル 10 mL を用いた。

酢酸エチル転溶時の転溶回数におけるスピロジクロフェン及び代謝物 M1 の回収率について牛の筋肉試料を用いて検討した (表 9)。その結果、1 回の酢酸エチル転溶操作でスピロジクロフェン及び代謝物 M1 は有機層にはほぼ 100%回収され、転溶操作 2 回目以降からは回収されなかった。酢酸エチル転溶 1 回で良好な回収率が得られたが、多くの食品マトリックス存在下においても対応可能であることを考慮して、酢酸エチルの転溶回数は 2 回とした。

表 9 酢酸エチル転溶時の転溶回数におけるスピロジクロフェン及び代謝物 M1 の回収率 (%)

	酢酸エチル転溶			
	1回目	2回目	3回目	計
スピロジクロフェン	99	0	0	99
代謝物M1	97	0	0	97

(0.1 mg/kg 相当添加、*n* = 2)

[実験方法] 7. 試験溶液の調製に従って調製した。

アセトン抽出液の溶媒を除去した後に添加用標準溶液 (スピロジクロフェンに換算して 1 mg/L) 0.1 mL を添加した。酢酸エチル 10 mL 転溶回数 (1~3 回目) における回収率を比較した。

塩化ナトリウム濃度 (w/v%) におけるスピロジクロフェン及び代謝物 M1 の回収率について牛の筋肉試料を用いて検討した (表 10)。その結果、スピロジクロフェン及び代謝物 M1 とともに、塩化ナトリウムの添加により回収率の若干の改善が認められたが、塩化ナトリウムの濃度による回収率の差異はなく、何れの試験溶液も無色透明であった。そこで、塩化ナトリウム濃度は、残留農薬等試験法検討実施要領において例示されている 10 w/v%塩化ナトリウムを採用した。

表 10 塩化ナトリウム濃度 (w/v%) におけるスピロジクロフェン及び代謝物 M1 の回収率 (%)

	塩化ナトリウム溶液 (w/v%)				
	0	5	10	20	飽和 at 20°C
スピロジクロフェン	96	100	99	100	101
代謝物M1	92	97	98	98	98

(0.1 mg/kg 相当添加、*n* = 2)

[実験方法] 7. 試験溶液の調製に従って調製した。

アセトン抽出液の溶媒を除去した後に添加用標準溶液 (スピロジクロフェンに換算して 1 mg/L) 0.1 mL を添加した。

0~20 w/v%塩化ナトリウム溶液、または 20°C における飽和塩化ナトリウム溶液 10 mL を用いて、酢酸エチル 10mL で 2 回転溶したときの回収率を比較した。

3) 脱脂方法の検討

脱脂方法としてアセトニトリル/ヘキサン分配について検討した。牛の筋肉試料及び牛の脂肪試料を用いてアセトニトリル/ヘキサン分配の分配操作を検討した（表 11 及び表 12）。その結果、牛の筋肉試料同様に、牛の脂肪試料でも、代謝物 M1 は、アセトニトリル/ヘキサン分配を 2 回操作することで、ほぼ 100%回収されていた。一方、log Pow 5.83 と脂溶性の高いスピロジクロフェンについても、牛の筋肉試料同様に、牛の脂肪試料でも、アセトニトリル/ヘキサン分配を 3 回操作することで、ほぼ 100%回収されていた。以上の結果より、アセトニトリル/ヘキサン分配を 3 回操作することとした。

表 11 牛の筋肉におけるアセトニトリル/ヘキサン分配によるスピロジクロフェン及び代謝物 M1 の回収率 (%)

牛の筋肉	アセトニトリル/ヘキサン分配				
	1回目	2回目	3回目	4回目	計
スピロジクロフェン	86	13	1	0	100
スピロジクロフェン代謝物M1	99	0	0	0	99

(0.1 mg/kg 相当添加、n = 2)

[実験方法] 7. 試験溶液の調製に従って調製した。

酢酸エチル層を除去した後に添加用標準溶液（スピロジクロフェンに換算して 1 mg/L）0.1 mL を添加した。アセトニトリル 10 mL/ヘキサン 10 mL 分配回数（1~4 回目）における回収率を比較した。

表 12 牛の脂肪におけるアセトニトリル/ヘキサン分配によるスピロジクロフェン及び代謝物 M1 の回収率 (%)

牛の脂肪	アセトニトリル/ヘキサン分配				
	1回目	2回目	3回目	4回目	計
スピロジクロフェン	79	17	3	0	99
代謝物M1	97	2	0	0	99

(0.1 mg/kg 相当添加、n = 2)

[実験方法] 7. 試験溶液の調製に従って調製した。

酢酸エチル層を除去した後に添加用標準溶液（スピロジクロフェンに換算して 1 mg/L）0.1 mL を添加した。アセトニトリル 10 mL/ヘキサン 10 mL 分配回数（1~4 回目）における回収率を比較した。

4) ミニカラム精製

開発メーカーより提供された畜産物を対象とした分析法では Oasis HLB ミニカラムによる精製¹⁾が、農薬・動物用医薬品部会報告の畜産物への推定残留量の分析法では C18 ミニカラムによる精製²⁾が用いられていることから、牛の筋肉試料及び牛の脂肪試料を用いて、InertSep C18（500 mg/6 mL、GL サイエンス社製）及び Oasis HLB（150 mg/6 cc、Waters 社製）からのスピロジクロフェン及び代謝物 M1 の回収率を検討した（表 13）。その結果、C18 ミニカラム、Oasis HLB ミニカラムともに、良好な回収率が認められた。いずれも無色透明な試験溶液が得られたが、より汎用性が高く、安価な C18 ミニカラムを採用した。

表 13 InertSep C18 及び Oasis HLB からのスピロジクロフェン及び代謝物 M1 の回収率 (%)

	回収率 (%)			
	スピロジクロフェン		代謝物M1	
	InertSep C18	Oasis HLB	InertSep C18	Oasis HLB
牛の筋肉	99	95	98	94
牛の脂肪	95	94	96	98

0.1 mg/kg 相当添加、n = 2

[実験方法] 7. 試験溶液の調製に従って調製した。

ミニカラム負荷液に添加用標準溶液 (スピロジクロフェンに換算して 1 mg/L) 0.1 mL を添加した。

InertSep C18 及び Oasis HLB からの回収率を比較した。

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 で溶出させた。

標準溶液を用いて、InertSep C18 (500 mg/6 mL) からのスピロジクロフェン及び代謝物 M1 の溶出パターンを調査し、その結果を表 14 及び表 15 に示す。なお、本検討では、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各組成比率の水及びアセトニトリル混液に 0.1vol%ギ酸を含有して検討を行った。その結果、スピロジクロフェンは 0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (5 : 5) 混液では全く溶出されないが、0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (3 : 7) 混液以上のアセトニトリル混合比率では 10 mL で溶出させることにより、概ね 100%回収された。一方、代謝物 M1 は 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 20 mL までは全く溶出されないが、0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (5 : 5) 混液以上のアセトニトリル混合比率では 10 mL で溶出させることにより、概ね 100%回収された。

表 14 InertSep C18 (500 mg/6 mL)からのスピロジクロフェンの溶出率 (%)

溶出液 (mL)	0.1 vol%ギ酸及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液の比率							
	7:3	6:4	5:5	4:6	3:7	2:8	1:9	0:10
0-10	0	0	0	0	99	97	101	100
10-20	0	0	0	89	0	0	0	0
20-30	0	0	0	1	0	0	0	0
30-40	0	0	0	0	0	0	0	0
40-50 *	98	95	91	0	0	0	0	0
合計	98	95	91	90	99	97	101	100

*0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル10 mLで溶出させた。

表 15 InertSep C18 (500 mg/6 mL)からの代謝物 M1 の溶出率 (%)

溶出液 (mL)	0.1 vol%ギ酸及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液の比率							
	7:3	6:4	5:5	4:6	3:7	2:8	1:9	0:10
0-10	0	0	97	96	95	97	93	101
10-20	0	92	1	1	1	0	1	0
20-30	24	8	0	0	0	0	0	0
30-40	44	0	0	0	0	0	0	0
40-50 *	32	0	0	0	0	0	0	0
合計	100	100	98	97	96	97	94	101

*0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル10 mLで溶出させた。

次に、試料マトリックス存在下でも同様の溶出パターンを示すか確認するため、牛の筋肉試料を用いて、InertSep C18 (500 mg/6 mL) からのスピロジクロフェン及び代謝物 M1 の溶出パターンを調査し、その結果を表 16 及び表 17 に示す。スピロジクロフェンは 0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (5 : 5) 混液では全く溶出されないが、0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (2 : 8) 混液以上のアセトニトリル混合比率では 10 mL で溶出させることにより、100%回収された。一方、代謝物 M1 は 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 20 mL までは全く溶出されないが、0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (5 : 5) 混液以上のアセトニトリル混合比率では 10 mL で溶出させることにより、概ね 100%回収された。以上の結果より、C18 ミニカラムによる精製方法は、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 で負荷し、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 で洗浄し、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 で溶出することとした。

表 16 牛の筋肉試料での InertSep C18 (500 mg/6 mL)からのスピロジクロフェンの溶出率 (%)

溶出液 (mL)	0.1 vol%ギ酸及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液の比率							
	7:3	6:4	5:5	4:6	3:7	2:8	1:9	0:10
0-10	0	0	0	0	96	98	99	103
10-20	0	0	0	92	4	0	0	0
20-30	0	0	0	8	0	0	0	0
30-40	0	0	1	0	0	0	0	0
40-50 *	101	101	100	0	0	0	0	0
合計	101	101	100	100	100	98	99	103

(0.1 mg/kg 相当添加、 $n = 1$)

*0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル 10 mL で溶出させた。

[実験方法] 7. 試験溶液の調製に従って調製した。

InertSep C18 負荷液に添加用標準溶液を添加した。

0.1 vol%ギ酸を含有した各組成比率の水及びアセトニトリル混液で溶出させた。

表 17 牛の筋肉試料での InertSep C18 (500 mg/6 mL)からの代謝物 M1 の溶出率 (%)

溶出液 (mL)	0.1 vol%ギ酸及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液の比率							
	7:3	6:4	5:5	4:6	3:7	2:8	1:9	0:10
0-10	0	0	95	96	102	96	97	96
10-20	0	47	1	1	0	0	0	0
20-30	17	54	0	0	0	0	0	0
30-40	30	0	0	0	0	0	0	0
40-50 *	54	0	0	0	0	0	0	0
合計	101	101	96	97	102	96	97	96

(0.1 mg/kg 相当添加、 $n = 1$)

*0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル 10 mL で溶出させた。

[実験方法] 7. 試験溶液の調製に従って調製した。

InertSep C18 負荷液に添加用標準溶液を添加した。

0.1 vol%ギ酸を含有した各組成比率の水及びアセトニトリル混液で溶出させた。

標準溶液及び牛の筋肉試料を用いて C18 ミニカラムからのスピロジクロフェン及び代謝物 M1 の溶出状況について、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各組成比率の水及びアセトニトリル混液に 0.1 vol%ギ酸を添加して検討を行ったが (表 12~15)、溶出液の水及びアセトニトリ

ル (1 : 4) 混液に添加するギ酸濃度におけるスピロジクロフェン及び代謝物 M1 の回収率について牛の筋肉試料を用いて検討した (表 18)。その結果、水及びアセトニトリル (1 : 4) 混液にギ酸を添加した場合、検討したギ酸濃度すべてにおいて水及びアセトニトリル (1 : 4) 混液 10 mL で 100% 溶出されていた。また、ギ酸の添加濃度に関しては、検討した 0.05~0.5 vol% ギ酸の範囲でほとんど回収率に差異は認められなかった。さらに、0~0.5 vol% ギ酸を含有した水及びアセトニトリル (1 : 4) 混液 10 mL で溶出させた各 C18 ミニカラムを 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル 10 mL で追加溶出させたところ、水及びアセトニトリル (1 : 4) 混液 10 mL で溶出させた C18 ミニカラムから代謝物 M1 が 24% 回収されただけで、それ以外の条件では溶出は認められなかった。以上の結果より、負荷液には 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、洗浄液には 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、溶出液には 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 を採用した。

表 18 水及びアセトニトリル (1 : 4) 混液中のギ酸濃度におけるスピロジクロフェン及び代謝物 M1 の C18 ミニカラムからの回収率 (%)

	水及びアセトニトリル(1:4)混液10 mL中のギ酸濃度における回収率(%)				
	0 vol%	0.05 vol%	0.1 vol%	0.2 vol%	0.5 vol%
スピロジクロフェン	98 (0)*	98 (0)	99 (0)	96 (0)	98 (0)
代謝物M1	72 (24)	96 (0)	97 (0)	95 (0)	96 (0)

(0.1 mg/kg 相当添加、n = 2)

*()は、0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル 10 mL で追加溶出させた。

[実験方法] 7. 試験溶液の調製に従って調製した。

InertSep C18 負荷液に添加用標準溶液を添加した。

0~0.5 vol% ギ酸を含有した水及びアセトニトリル (1 : 4) 混液 10 mL で溶出させた。

5) その他の食品への適用

牛の筋肉試料 (0.1 mg/kg 相当添加) を用いて検討した本分析法が、検討を実施するその他の食品においても適用可能であるか、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛乳を用いて回収率及びマトリックスの影響について確認を行った (表 19)。その結果、各検討試料から調製した試験溶液は、ほとんど無色であり、何れの試料においても概ね良好な回収率が得られた。また、マトリックスの測定への影響については、マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比は 0.97~1.05 の範囲であり、検討した何れの試料においても、顕著なイオン化抑制及び増強効果は観察されず、許容できる範囲であると考えられた。さらに、マトリックスの違いにより 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 の溶出では十分に回収されない可能性も考えられたため、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 で溶出させた後、再度、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 で追加溶出させることによりスピロジクロフェン及び代謝物 M1 が C18 ミニカラムから溶出されるか否かについて確認した。その結果、何れの試料においても最初の 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 の溶出でスピロジクロフェン及び代謝物 M1 は回収され、追加の 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 中にはスピロジクロフェン及び代謝物 M1 は溶出されていないことが確認された。

表 19 添加回収試験及びマトリックスの測定への影響

	スピロジクロフェン		代謝物M1	
	回収率(%)	Peak area ratio (Mt/St)	回収率(%)	Peak area ratio (Mt/St)
牛の筋肉	91	1.01	93	0.97
牛の脂肪	99	1.05	99	1.02
牛の肝臓	91	0.98	88	0.97
牛乳	100	1.04	98	1.00

(0.1 mg/kg 相当添加、n = 2)

[実験方法] 7. 試験溶液の調製に従って調製した。

Peak area ratio : マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積の比

3. 添加回収試験

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛乳の 4 食品を試料に用いて、実験方法の 7. 試験溶液の調製に従って添加回収試験（基準値濃度または定量限界濃度の 2 濃度）を実施した。なお、スピロジクロフェンもしくは代謝物 M1 を個別に添加し、添加回収試験を実施した。添加回収試験における回収率 100% 相当の溶媒標準溶液、各食品のブランク試料及び添加試料の代表的なクロマトグラムを図 13~図 26 に示した。また、各食品のスキャン測定による代表的なトータルイオンクロマトグラムを図 27 に示した。特に、測定を妨害するような顕著なピークは認められなかった。

1) 選択性

選択性の検討結果を表 20 に示した。検討した何れの試料においても、ブランク試料にスピロジクロフェン及び代謝物 M1 の定量を妨害するピークは認められなかった。

表 20 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	妨害ピークの許容範囲の評価		ピーク面積 (高さ) *1						選択性の評価*3	備考		
					評価濃度 (ppm)	評価基準	面積又は高さの別	ブランク			マトリックス添加標準溶液*2				面積 (高さ) 比 (a)/(b)	
								n=1	n=2	平均 (a)	n=1	n=2				平均 (b)
スピロジクロフェン	牛の筋肉	0.01	0.02	定量限界	0.01	< 0.333	面積	7	8	8	1785	1794	1790	0.004	○	
		0.01	0.02	定量限界	0.01	< 0.333	面積	31	82	57	1721	1539	1630	0.036	○	
		0.01	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	2	110	56	18097	16140	17119	0.003	○	
		0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	71	36	54	1707	1745	1726	0.032	○	
代謝物M1	牛の筋肉	0.01	0.02	定量限界	0.01	< 0.333	面積	52	29	41	15679	16057	15868	0.003	○	
		0.01	0.02	定量限界	0.01	< 0.333	面積	25	2	14	15054	15369	15212	0.001	○	
		0.01	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	28	30	29	160511	167123	163817	0.000	○	
		0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	31	17	24	14530	14319	14425	0.002	○	

*1 ブランク試料、標準溶液の順に注入して測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

*2 試料中の濃度が「評価濃度」相当になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)を用いる。ブランク試料に妨害ピークが観察されなかった場合には、標準溶液のピーク面積(高さ)は求めなくても良い。

*3 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の評価基準に適合する場合には「○」、適合しない場合には「×」を記載する。

2) 真度及び精度

真度及び併行精度の検討結果を表 21 に示した。残留基準値濃度 (0.01~0.1 ppm) での 5 併行の添加回収試験における真度は、スピロジクロフェンが 84.2~100.4%、代謝物 M1 が 82.9~99.7% であった。また、併行精度の相対標準偏差は、スピロジクロフェンが 1.6~3.1%、代謝物 M1 が 2.7~7.1% であった。回収率及び併行精度は、厚生労働省から通知されている「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」(平成 19 年 11 月 15 日、平成 22 年 12 月 24 日改正) で示されている目標値を満足するものであった。さらに、本測定法における定量限界濃度を一律基準値濃度 (0.01 mg/kg) として評価した。そこで、牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓の 3 試料について、定量限界濃度を添加し、5 併行の添加回収試験を行った。真度は、スピロジクロフェンが 86.5~101.8%、代謝物 M1 が 83.9~94.5% であった。また、併行精度の相対標準偏差はスピロジクロフェンが 3.7~6.6%、代謝物 M1 が 2.2~9.8% で

あった。これら試料を含めて検討した4種類の畜産物で、定量限界濃度の添加回収試験において良好な結果が認められた。さらに、定量限界濃度での添加回収試験のクロマトグラムより算出したS/Nの平均値はスピロジクロフェンが99.2~384.2、代謝物M1が162.9~196.7であり、検討した何れの試料においてもS/N \geq 10を満たしていた(表22)。

表21 真度、精度及び定量限界の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 ^{*1}	検量線			回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N ²			備考
							傾き	切片	r ²	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値	
スピロジクロフェン	牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	—	2978	131	0.9988	100.6	96.9	96.4	93.9	94.1	96.4	2.8				#DIV/0!	
		0.01	0.02	0.01	S/N	3068	16	0.9981	99.1	103.9	98.9	107.5	99.5	101.8	3.7	152.6	101.2	126.9		
		0.01	0.02	0.02	—	3188	24	0.9991	97.5	99.9	105.7	98.9	99.9	100.4	3.1				#DIV/0!	
		0.01	0.02	0.01	S/N	3577	145	0.9981	90.6	101.3	102.4	107.2	107.0	101.7	6.6	615.8	152.6	384.2		
		0.01	0.1	0.1	—	2735	310	0.9997	84.4	82.8	85.8	82.9	85.0	84.2	1.6				#DIV/0!	
		0.01	0.1	0.01	S/N	2910	122	0.9980	94.4	83.6	85.0	85.0	84.7	86.5	5.1	152.6	45.8	99.2		
代謝物M1	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	S/N	3325	-104	0.9980	99.2	96.5	94.8	95.0	100.5	97.2	2.6	152.6	152.6	152.6		
		0.01	0.02	0.02	—	25751	603	0.9981	94.0	93.8	89.4	89.2	89.4	91.2	2.7				#DIV/0!	
		0.01	0.02	0.01	S/N	23138	-570	0.9989	92.5	103.5	104.4	83.4	88.7	94.5	9.8	204.1	121.8	162.9		
		0.01	0.02	0.02	—	31318	-157	0.9987	83.3	86.2	75.1	79.7	90.3	82.9	7.1				#DIV/0!	
		0.01	0.02	0.01	S/N	21469	-12	0.9993	77.3	80.1	90.6	89.4	81.9	83.9	7.0	152.6	204.1	178.4		
		0.01	0.1	0.1	—	20875	2874	0.9997	97.2	105.4	97.9	101.7	96.5	99.7	3.8				#DIV/0!	
牛の脂肪	0.01	0.1	0.01	S/N	32838	-182	0.9992	87.4	83.8	85.4	83.1	83.0	84.5	2.2	86.5	307.0	196.7			
	0.01	0.01	0.01	S/N	25799	344	0.9994	82.9	80.9	89.5	83.1	79.4	83.2	4.6	152.6	204.1	178.4			

*1 S/Nを求める必要がある場合には「S/N」と表示される。

*2 得られた回収率の中で最大値を与えるピーク (Max.) 及び最小値を与えるピーク (Min.) のそれぞれのS/Nを求める。

表22 定量限界濃度でのS/N

No.	分析対象化合物	食品名	定量イオン (m/z)	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	Max.					Min.					S/N			備考		
							ピークの最大値 (Dimax)	ノイズ			ピークの最大値 (Dimax)	ピークの高さ (S)	ノイズ幅 (N)	ピークの最大値 (Dimax)	ノイズ			Max.	Min.		平均値	
								最大値 (E1)	最小値 (E2)	中央値 (C)					最大値 (E1)	最小値 (E2)	中央値 (C)					最大値 (E1)
スピロジクロフェン	牛の筋肉	313	0.01	0.02	0.01	247	4	0	2	246.2	244.2	1.6	247	6	0	3	245.8	242.8	2.4	152.6	101.2	126.9
		313	0.01	0.02	0.01	247	4	0	1	246.8	246.3	0.4	247	4	0	2	246.2	244.2	1.6	615.8	152.6	384.2
		313	0.01	0.1	0.01	247	4	0	2	246.2	244.2	1.6	247	13	0	7	244.4	237.9	5.2	152.6	45.8	99.2
		313	0.01	0.01	0.01	247	4	0	2	246.2	244.2	1.6	247	4	0	2	246.2	244.2	1.6	152.6	152.6	152.6
		213	0.01	0.02	0.01	247	3	0	2	246.4	244.9	1.2	247	5	0	3	246.0	243.5	2.0	204.1	121.8	162.9
		213	0.01	0.02	0.01	247	4	0	2	246.2	244.2	1.6	247	3	0	2	246.4	244.9	1.2	152.6	615.8	384.2
代謝物M1	牛の筋肉	213	0.01	0.1	0.01	247	7	0	4	245.6	242.1	2.8	247	2	0	1	246.6	245.6	0.8	86.5	307.0	196.7
		213	0.01	0.02	0.01	247	4	0	2	246.2	244.2	1.6	247	3	0	2	246.4	244.9	1.2	152.6	204.1	178.4
		213	0.01	0.1	0.01	247	7	0	4	245.6	242.1	2.8	247	2	0	1	246.6	245.6	0.8	86.5	307.0	196.7
		213	0.01	0.01	0.01	247	4	0	2	246.2	244.2	1.6	247	3	0	2	246.4	244.9	1.2	152.6	204.1	178.4

* ベースラインにはノイズの中央値 (C) を用いることが望ましいが、それが困難な場合にはノイズの最大値 (E1) と最小値 (E2) の平均値 [(E1+E2)/2] を用いても良い。

3) 試料マトリックスの測定値への影響

添加回収試験 (基準値濃度または定量限界濃度の2濃度) における回収率100%相当濃度になるように調製したマトリックス添加標準溶液と溶媒標準溶液を交互に2回測定し、そのピーク面積比から試料マトリックスの測定への影響を評価した。ピーク面積比はスピロジクロフェン及び代謝物M1において、それぞれ0.94~1.05及び0.98~1.05の範囲であり、検討した何れの試料においても、顕著なイオン化抑制及び増強効果は観察されず、許容できる範囲であると考えられた(表23)。

表23 試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 ^{*1} (mg/L)	ピーク面積 (高さ) ^{*2}									備考
							面積又は高さの別	ブランク ^{*3}	マトリックス添加標準溶液 ^{*4}			溶媒標準溶液			ピーク面積 (高さ) 比 ^{*5}	
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
スピロジクロフェン	牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	0.002	0	4964	4443	4704	4815	4664	4740	0.99			
		0.01	0.02	0.01	0.001	面積	0	1785	1794	1695	1806	1751	1.02			
		0.01	0.02	0.02	0.002	面積	0	3713	3646	3680	3806	3527	1.00			
		0.01	0.02	0.01	0.001	面積	0	1721	1539	1630	1713	1646	0.97			
		0.01	0.1	0.1	0.01	面積	0	18097	16140	17119	18296	18028	18162	0.94		
		0.01	0.1	0.01	0.001	面積	0	1857	1825	1841	1745	1877	1811	1.02		
代謝物M1	牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	0.002	面積	0	33466	33401	33434	31989	31910	1.05			
		0.01	0.02	0.01	0.001	面積	0	15679	16057	15868	15346	15241	1.04			
		0.01	0.02	0.02	0.002	面積	0	31328	30907	31118	32070	31433	0.98			
		0.01	0.02	0.01	0.001	面積	0	15054	15369	15212	14830	15223	1.01			
		0.01	0.1	0.1	0.01	面積	0	160511	167123	163817	165736	163502	1.00			
		0.01	0.1	0.01	0.001	面積	0	14360	14703	14532	13852	14698	1.02			
牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	14530	14319	14425	13953	13838	1.04				

*1 添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液 (マトリックス添加標準溶液) 及び溶媒で調製した標準溶液 (溶媒標準溶液) を作成する。

*2 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

*3 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

*4 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

*5 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積 (又は高さ) の比を求める。

4) 分析操作中の変換について

分析操作中にスピロジクロフェンから代謝物M1への変換が懸念されることから、国立医薬品食品衛生研究所において、スピロジクロフェンから代謝物M1への変換について検討を実施した。スピロジクロフェンの添加回収試験において、ブランク試験溶液、マトリックス添加標準溶液及び添加回収試験溶

液の測定で検出された代謝物 M1 のピーク面積値を表 24 に示した。表 24 の通り、各食品のブランク試験溶液において代謝物 M1 のピークが検出されたことから、マトリックス添加標準溶液及び添加回収試験溶液を含め、夾雑物等に起因する影響が推察された。

マトリックス添加標準溶液における代謝物 M1 のピーク面積値はブランク試験溶液のピーク面積値よりも大きく、添加したスピロジクロフェン標準溶液中においても僅かではあるが代謝物 M1 への変換が生じていることが示唆された。

牛の筋肉及び肝臓試料の添加回収試験溶液における代謝物 M1 のピーク面積値は、それぞれの試料のマトリックス添加標準溶液のピーク面積値よりも大きく、分析操作中の代謝物 M1 への変換が示唆された。以下の式により、分析操作中に生じるスピロジクロフェンから代謝物 M1 への変換の割合 (%) を概算した。

変換の割合 (%) = {(添加回収試験溶液の代謝物 M1 のピーク面積) - (マトリックス添加標準溶液の代謝物 M1 のピーク面積)} / (添加したスピロジクロフェンの回収率 100%に相当する濃度の代謝物 M1 標準溶液のピーク面積)

表 24 の通り、算出された割合 (%) は牛の筋肉で 1%~2%程度 (表 24-1)、牛の肝臓で 1%程度 (表 24-2) であった。

また、牛の脂肪においては、マトリックス添加標準溶液と添加回収試験溶液の代謝物 M1 のピーク面積値が同程度であったことから、分析操作中の変換はほとんど生じないことが示唆された (表 24-3)。

以上の結果から、試料によっては分析操作中にスピロジクロフェンから代謝物 M1 への変換が生じる場合があるものの、変換の割合は僅かであり、スピロジクロフェンもしくは代謝物 M1 それぞれの定量に及ぼす影響は小さいと考えられた。

表 24-1 スピロジクロフェンの添加回収試験で検出された代謝物 M1 のピーク面積 (牛の筋肉)

	LC条件①				LC条件②			
	313>213		315>215		313>213		315>215	
	面積	変換(%) ²						
代謝物M1標準溶液 ¹	93976.2	-	59596.4	-	69084.9	-	43603.5	-
ブランク試験溶液	1319.3	-	798.3	-	125.3	-	95.1	-
マトリックス添加標準溶液	2307.6	-	1514.0	-	942.5	-	544.9	-
添加回収試験溶液①	3317.7	1.1	2025.9	0.9	1615.1	1.0	1011.6	1.1
添加回収試験溶液②	3192.0	0.9	2033.9	0.9	1463.5	0.8	935.8	0.9
添加回収試験溶液③	3977.7	1.8	2509.6	1.7	2001.8	1.5	1354.5	1.9
添加回収試験溶液④	4488.2	2.3	2822.4	2.2	2406.1	2.1	1543.8	2.3
添加回収試験溶液⑤	3909.9	1.7	2404.7	1.5	1968.3	1.5	1264.2	1.6

*1: スピロジクロフェンとして 2 ng/mL

*2: {(添加回収試験溶液のピーク面積) - (マトリックス添加標準溶液のピーク面積)} / (代謝物 M1 標準溶液のピーク面積) × 100

表 24-2 スピロジクロフェンの添加回収試験で検出された代謝物 M1 のピーク面積 (牛の肝臓)

	LC条件①				LC条件②			
	313>213		315>215		313>213		315>215	
	面積	変換(%) ²						
代謝物M1標準溶液 ¹	584286.6	-	371511.8	-	443422.0	-	281243.9	-
ブランク試験溶液	1143.9	-	702.7	-	39.1	-	5.9	-
マトリックス添加標準溶液	1568.6	-	935.1	-	216.4	-	148.8	-
添加回収試験溶液①	7480.0	1.0	4705.8	1.0	4839.8	1.0	3029.4	1.0
添加回収試験溶液②	7595.3	1.0	4925.3	1.1	5087.9	1.1	3144.9	1.1
添加回収試験溶液③	7655.9	1.0	4748.6	1.0	5045.1	1.1	3119.6	1.1
添加回収試験溶液④	7122.5	1.0	4375.7	0.9	4362.2	0.9	2796.8	0.9
添加回収試験溶液⑤	7992.4	1.1	5067.8	1.1	5238.3	1.1	3355.3	1.1

*1: スピロジクロフェンとして 10 ng/mL

*2: {(添加回収試験溶液のピーク面積) - (マトリックス添加標準溶液のピーク面積)} / (代謝物 M1 標準溶液のピーク面積) × 100

表 24-3 スピロジクロフェンの添加回収試験で検出された代謝物 M1 のピーク面積 (牛の脂肪)

	LC条件①				LC条件②			
	313>213		315>215		313>213		315>215	
	面積	変換(%) ⁻²	面積	変換(%) ⁻²	面積	変換(%) ⁻²	面積	変換(%) ⁻²
代謝物M1標準溶液 ¹	103594.3	-	65941.2	-	77540.1	-	49492.0	-
ブランク試験溶液	1162.9	-	728.8	-	35.4	-	34.1	-
マトリックス添加標準溶液	1600.5	-	986.1	-	305.7	-	168.2	-
添加回収試験溶液①	1425.6	-	882.2	-	256.5	-	127.8	-
添加回収試験溶液②	1379.3	-	896.0	-	176.6	-	142.2	-
添加回収試験溶液③	1271.5	-	800.9	-	178.8	-	122.9	-
添加回収試験溶液④	1488.8	-	906.2	-	184.5	-	131.7	-
添加回収試験溶液⑤	1455.6	-	870.0	-	259.9	-	151.4	-

*1 : スピロジクロフェンとして 2 ng/mL

*2 : $\{(\text{添加回収試験溶液のピーク面積}) - (\text{マトリックス添加標準溶液のピーク面積})\} / (\text{代謝物 M1 標準溶液のピーク面積}) \times 100$

LC 条件①2 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 (9 : 1) で 0.5 分間保持した後、(1 : 9) までの濃度勾配を 5.5 分間で行い、(1 : 9) で 6 分間保持する。

LC 条件②2 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) で 5 分間保持した後、(1 : 4) で 8 分間保持する。

4. まとめ

検討した何れの試料においても、ブランク試料のクロマトグラムに定量を妨害するピークは認められなかった。スピロジクロフェンの真度 84.2~101.8%、併行精度 1.6~6.6%及び代謝物 M1 の真度 82.9~99.7%、併行精度 2.2~9.8%は目標値に適合する結果であった。マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比は 0.94~1.05 であり、本法では明らかなマトリックス効果は認められなかった。定量限界濃度 (0.01 mg/kg) での添加回収試験の S/N は、検討した何れの試料においても S/N ≥ 10 を満たした。

【結論】

畜産物中スピロジクロフェン試験法として、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、酢酸エチル及び 10 w/v%塩化ナトリウム溶液を加え有機溶媒転溶後、アセトニトリル/ヘキサン分配により脱脂し、オクタデシ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を開発した。開発した試験法を牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛乳の畜産物 4 食品に適用した結果、良好な結果が認められたため、本法は畜産物の残留分析法として適用可能であることが考えられた。

【参考文献】

- 1) 企業提供資料
- 2) 農薬・動物用医薬品部会報告
- 3) スピロジクロフェン農薬抄録

【クロマトグラム報告】

① 添加回収試験（基準値添加）における代表的なクロマトグラム

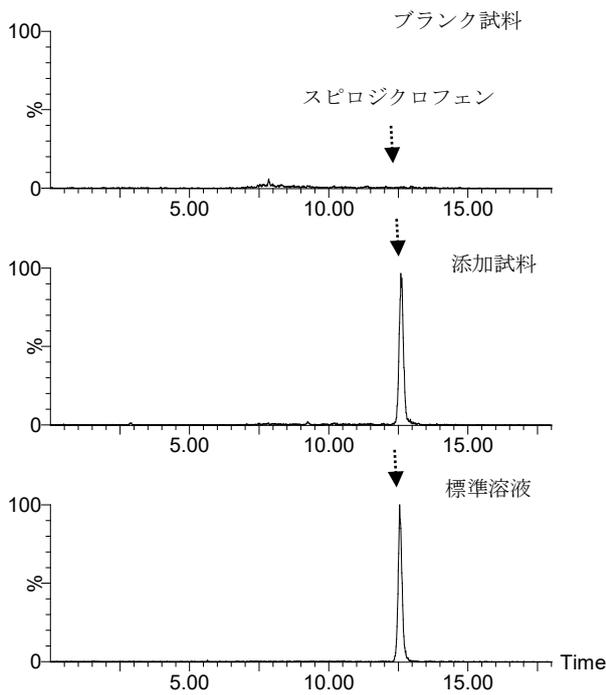


図 13 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
(m/z 411.0→312.9)
添加濃度：0.02 ppm

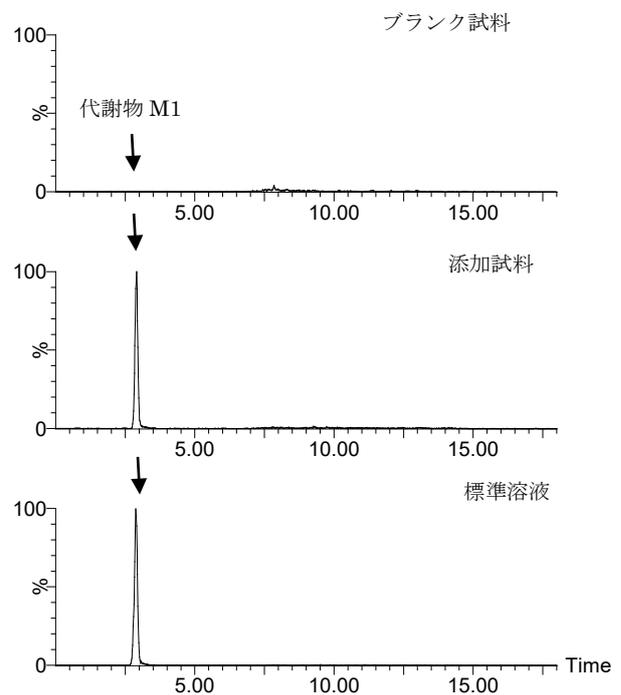


図 14 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
(m/z 312.9→212.9)
添加濃度：0.02 ppm

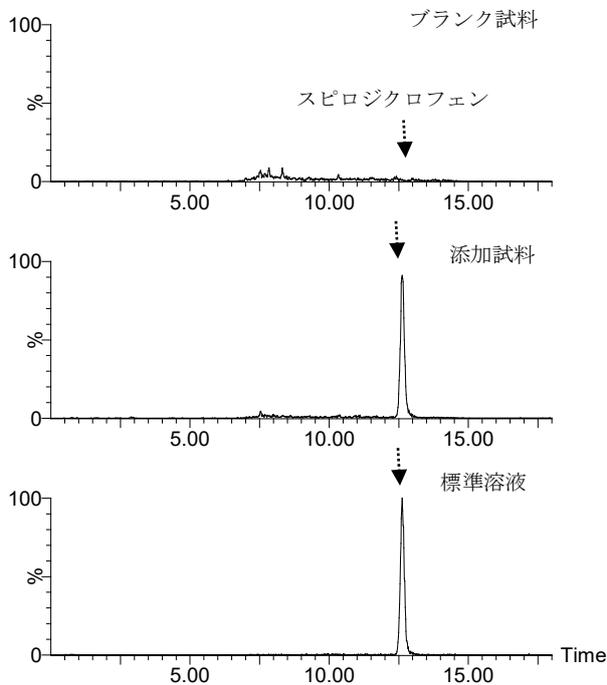


図 15 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
(m/z 411.0→312.9)
添加濃度：0.02 ppm

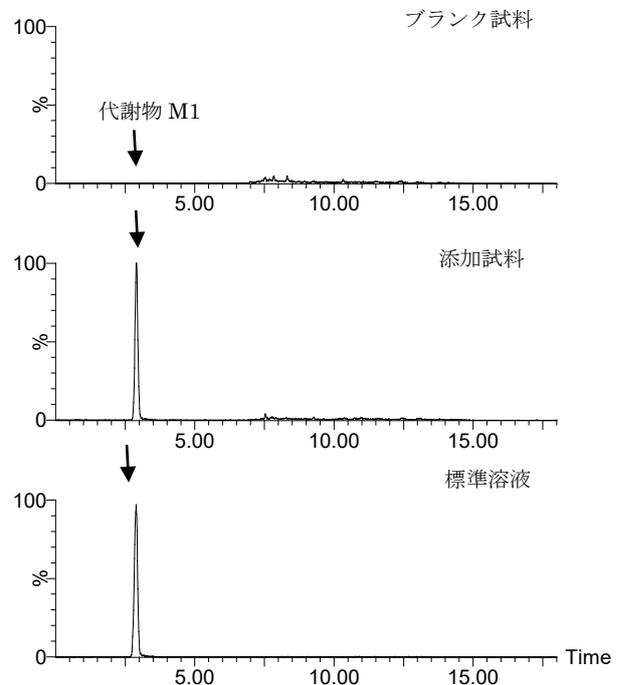


図 16 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
(m/z 312.9→212.9)
添加濃度：0.02 ppm

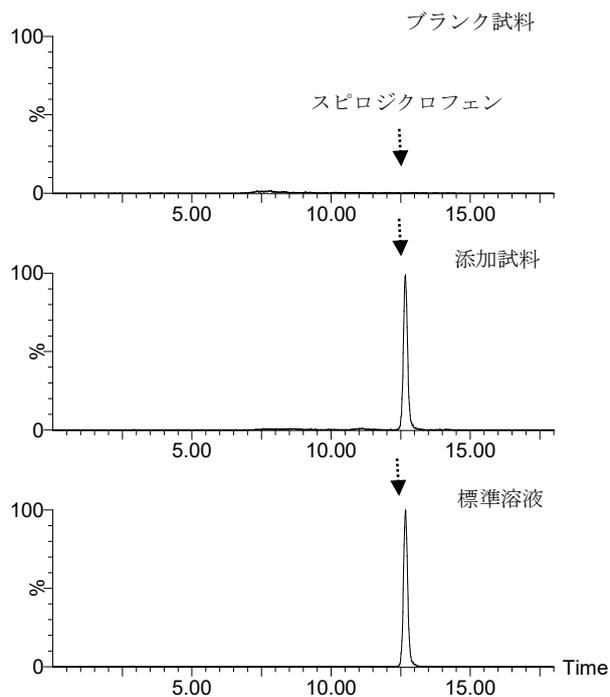


図 17 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
(m/z 411.0→312.9)
添加濃度 : 0.1 ppm

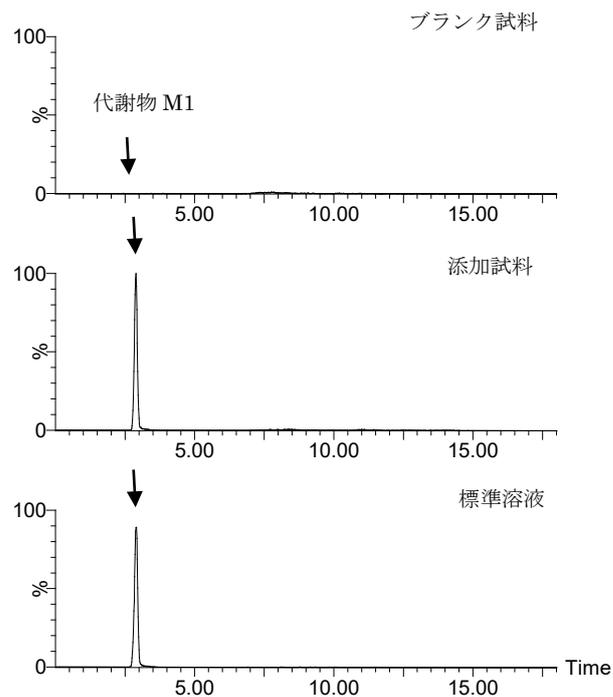


図 18 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
(m/z 312.9→212.9)
添加濃度 : 0.1 ppm

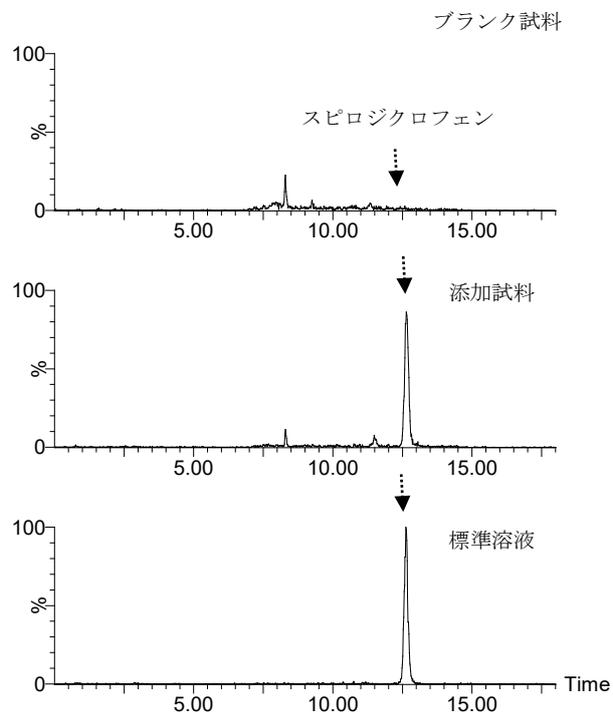


図 19 牛乳の SRM クロマトグラム
(m/z 411.0→312.9)
添加濃度 : 0.01 ppm

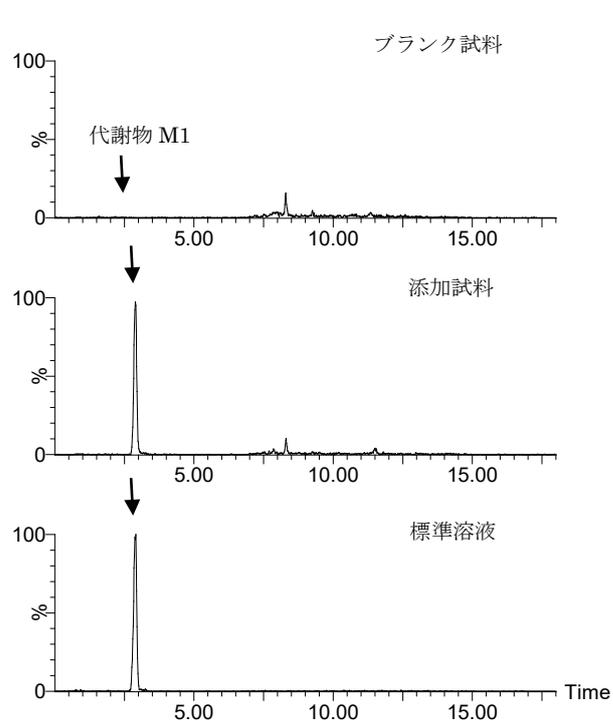


図 20 牛乳の SRM クロマトグラム
(m/z 312.9→212.9)
添加濃度 : 0.01 ppm

② 添加回収試験（定量限界値添加）における代表的なクロマトグラム

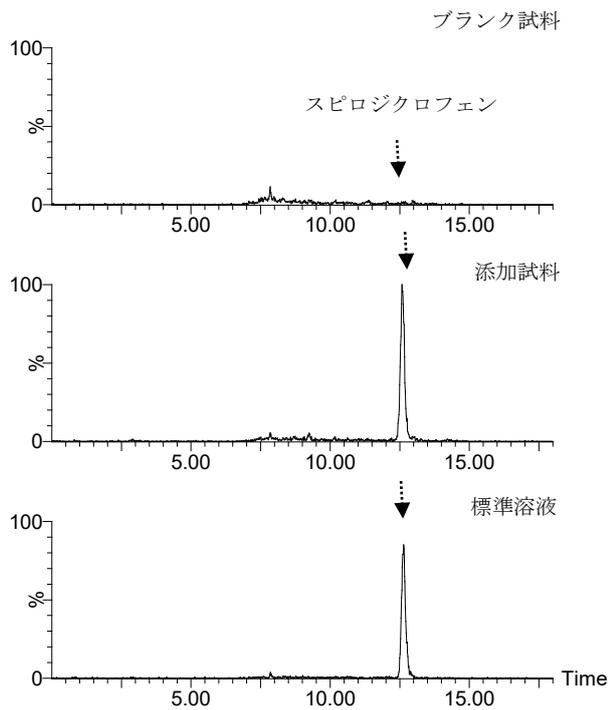


図 21 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
(m/z 411.0→312.9)
添加濃度：0.01 ppm

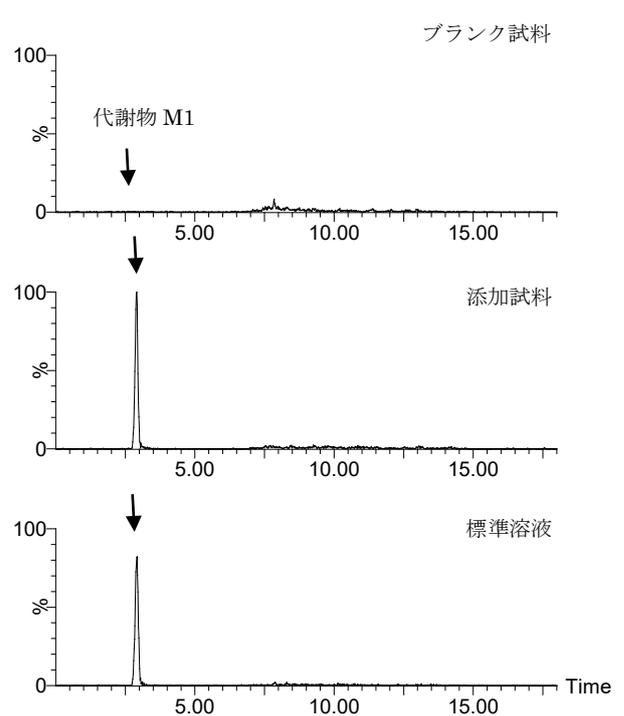


図 22 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
(m/z 312.9→212.9)
添加濃度：0.01 ppm

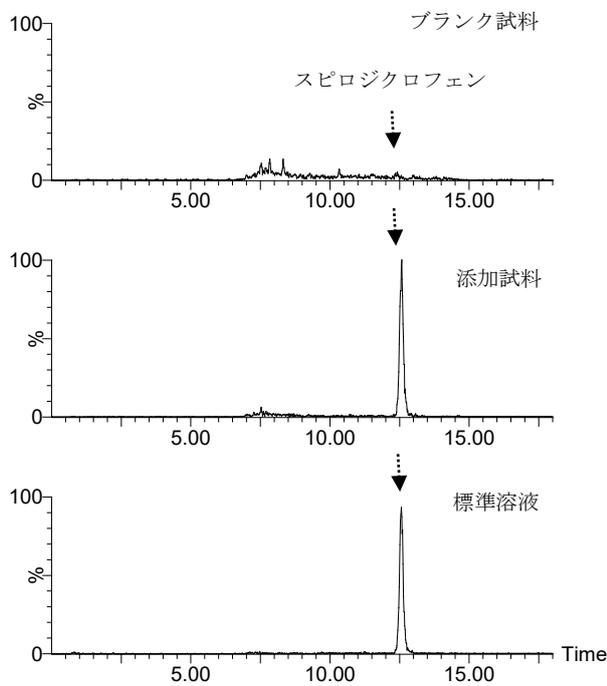


図 23 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
(m/z 411.0→312.9)
添加濃度：0.01 ppm

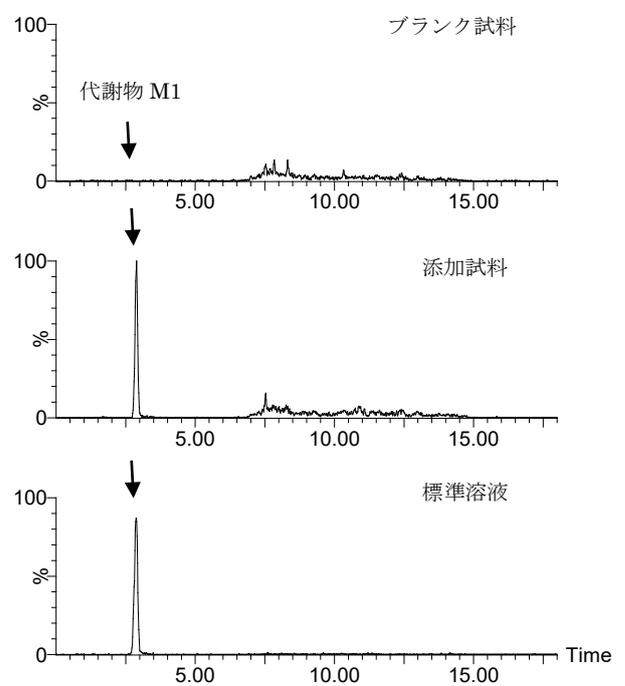


図 24 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
(m/z 312.9→212.9)
添加濃度：0.01 ppm

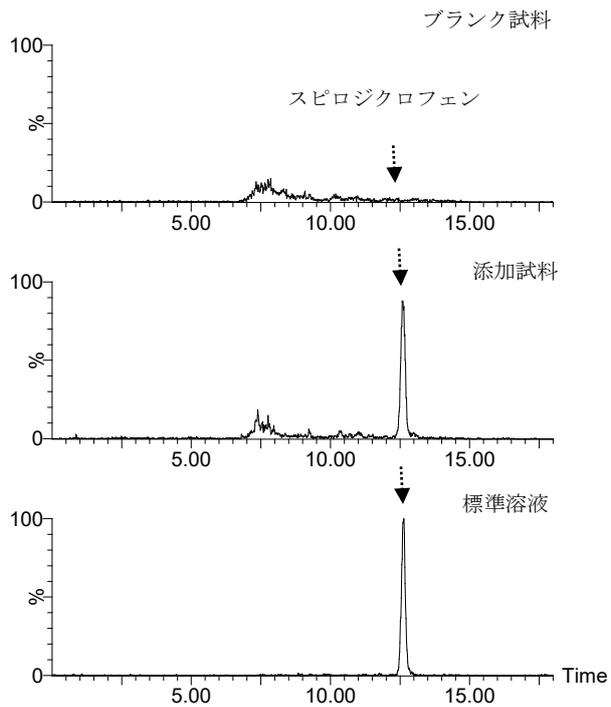


図 25 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
(m/z 411.0→312.9)
添加濃度 : 0.01 ppm

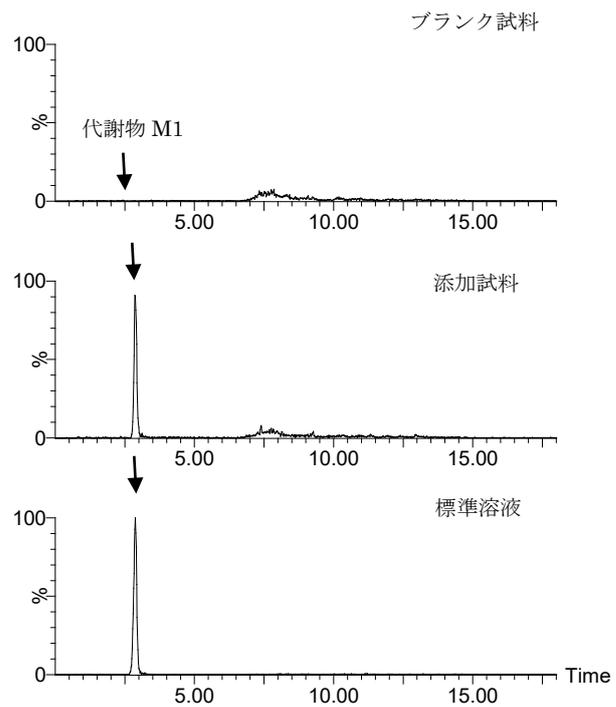


図 26 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
(m/z 312.9→212.9)
添加濃度 : 0.01 ppm

③ ブランク試料の代表的なトータルイオンクロマトグラム

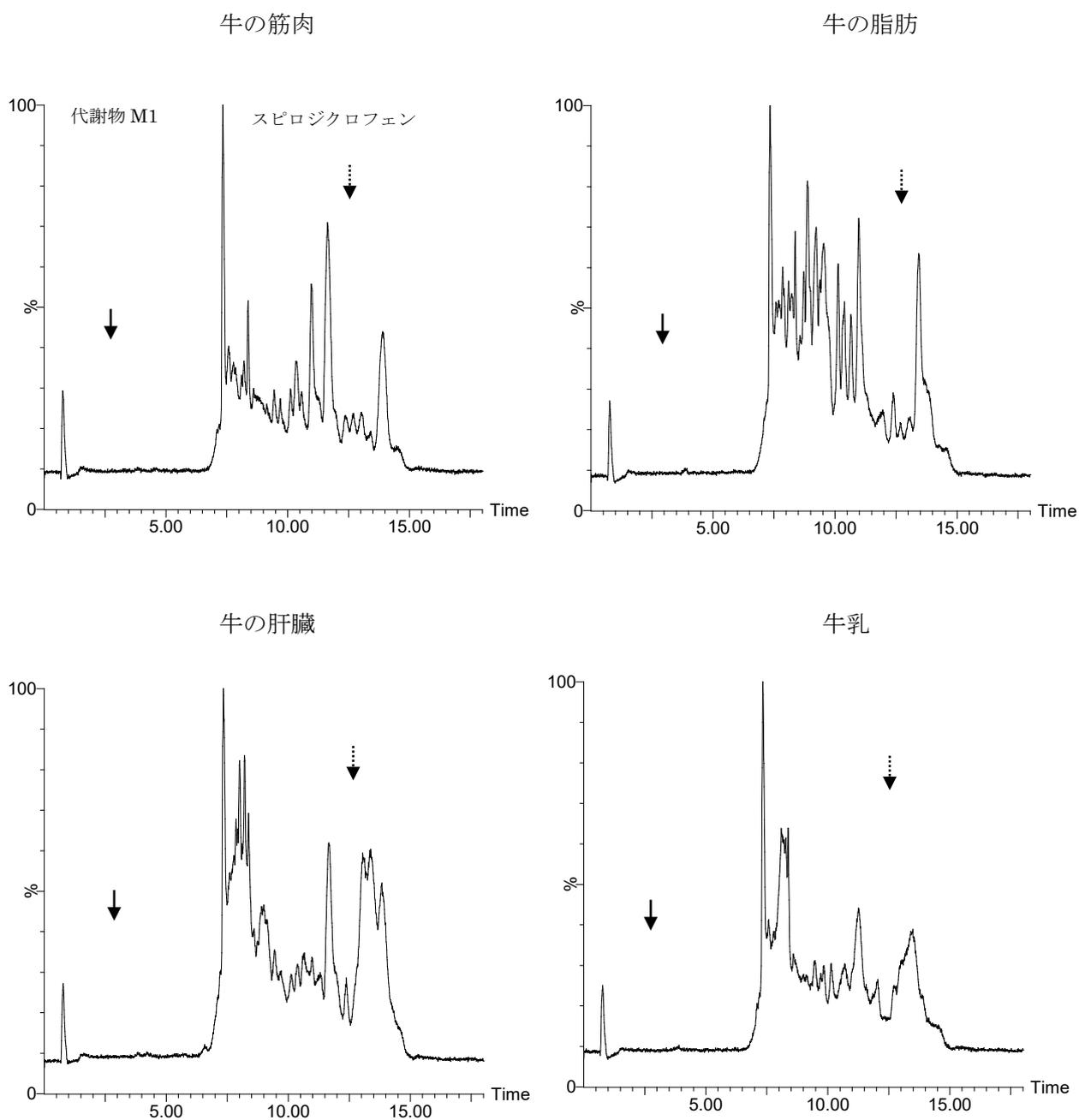


図 27 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム
スキャン範囲：50~550 amu
測定条件：ESI(+)、CV=30 V (CV: corn voltage)