

## スピロテトラマト試験法（畜水産物）

### 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

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。

ギ酸・エタノール試液 ギ酸50 mLにエタノール及び水（1：1）混液を加えて1,000 mLとする。

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 筋肉、肝臓、鶏卵及び魚介類の場合

試料を正確に量り、重量比で3/10量のギ酸・エタノール試液を加え磨砕均一化した後、試料10.0 gに相当する量を量り採る。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、アセトンで正確に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 脂肪の場合

試料を正確に量り、重量比で3/10量のギ酸・エタノール試液を加え磨砕均一化した後、試料5.00 gに相当する量を量り採る。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、アセトンで正確に200 mLとする。この溶液から正確に4 mLを分取し、40℃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。

##### ③ 牛乳の場合

試料10.0 gに2 vol%ギ酸20 mLを加え混合する。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、アセトンで正確に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。

##### ④ はちみつの場合

試料10.0 gに2 vol%ギ酸20 mLを加え溶解する。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2 vol%ギ酸10 mL及びアセトン50 mL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、アセトンで正確に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) 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、さらに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0.02 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、5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 µm

カラム温度 : 40°C

移動相 : アセトニトリル及び0.02 vol%ギ酸混液 (7 : 13) 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 µL

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) 注意点

- 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：牛の筋肉・脂肪・肝臓、豚の筋肉、牛乳、鶏卵、はちみつ、さけ、うなぎ及びしじみ、

## 12. 参考文献

なし

## 13. 類型

C