

※本報告書は、試験法開発における検討結果を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ください。

スピロメシフェン試験法の検討結果

1. 目的及び試験法の検討方針

スピロメシフェンは1994年に[]社により開発された環状ケトエノール系の殺虫剤であり、脂質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幼虫、殺卵活性等を示すものと考えられている。

「薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会 農薬・動物用医薬品部会報告について」に記載されている規制対象物質及び残留基準値案を踏まえ、試験法の開発を行った。なお、食安発0519第1号（平成22年5月19日）では、『スピロメシフェンとは、農産物及び魚介類にあつてはスピロメシフェン及び代謝物M1〔4-ヒドロキシ-3-メチル-1-オキサスピロ〔4.4〕ノナ-3-エン-2-オン〕をスピロメシフェンに換算したものの和をいい、畜産物にあつては、スピロメシフェン、代謝物M1をスピロメシフェンに換算したものの、代謝物M2〔4-ヒドロキシ-3-(4-ヒドロキシメチル-2,6-ジメチル-フェニル)-1-オキサスピロ〔4.4〕ノナ-3-エン-2-オン〕をスピロメシフェンに換算したものと及び代謝物M2の抱合体をスピロメシフェンに換算したものの和をいうこと。』とされている。食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法におけるスピロメシフェンの個別試験法が示されているが、畜水産物については代謝物M2及びその抱合体が測定対象に含まれていない。以上を考慮し、「薬事食品衛生審議会 食品衛生分科会報告書」に記載されている規制対象物質及び残留基準値案を踏まえ、代謝物M2及びその抱合体を測定対象に含む試験法の開発を行った。

1) 規制対象物質

スピロメシフェン

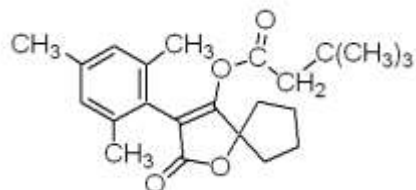
4-ヒドロキシ-3-メチル-1-オキサスピロ〔4.4〕ノナ-3-エン-2-オン（以下、「代謝物M1」という。）

4-ヒドロキシ-3-(4-ヒドロキシメチル-2,6-ジメチル-フェニル)-1-オキサスピロ〔4.4〕ノナ-3-エン-2-オン（以下、「代謝物M2」という。抱合体含む。）

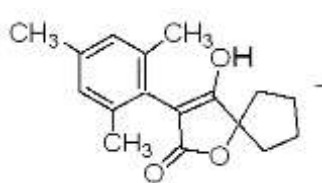
2. 分析対象化合物の構造式、物理化学的性質及び基準値等に関する情報

1) 構造式及び物理化学的性質

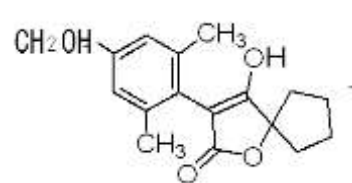
スピロメシフェン



代謝物M1



代謝物M2



スピロメシフェン

化学式：C₂₃H₃₀O₄

分子量：370.48

化学名（IUPAC）：3-mesityl-2-oxo-1-oxaspiro[4.4]non-3-en-4-yl 3, 3-dimethylbutyrate

外 観：無色結晶、強い特異臭

密 度：1.13 g/cm³ (20℃)

融 点：結晶型1；98.7℃、結晶型2；96.7℃

沸 点：>350℃

蒸気圧： 7×10^{-6} Pa (20℃)、 1×10^{-5} Pa (25℃)

溶解性：水 0.13 mg/L (20 °C)

n-ヘプタン 23、キシレン >250、ジクロロメタン >250、2-プロパノール 115、
1-オクタノール 60、ポリエチレングリコール 22、アセトン>250、酢酸エチル >250、
アセトニトリル>250、ジメチルスルホキシド 55 (以上 g/L、20 °C)

オクタノール/水分配係数：log Pow=4.55

安定性：250℃まで安定

加水分解半減期：53.3日 (pH4)、24.8日 (pH7)、4.3日 (pH9) (以上 25℃)

(出典：農薬抄録)

代謝物M1

化学式：C₁₇H₂₀O₃

分子量：272.34

化学名 (IUPAC)：4-hydroxy-3-mesityl-1-oxaspiro[4.4]non-3-en-2-one

蒸気圧： 7.2×10^{-7} Pa (20℃)、 1.5×10^{-6} Pa (25℃)

溶解性：水 0.019 (pH4)、18 (pH7)、1800 (pH9) (以上 g/L)

オクタノール/水分配係数：log Pow=3.1 (pH4)、0.2 (pH7)、-1.8 (pH9)

加水分解性：pH4、pH7、pH9で安定 (25℃)

(出典：農薬抄録)

代謝物M2

化学式：C₁₇H₂₀O₄

分子量：288.34

化学名：4-hydroxy-3-(4-hydroxymethyl-2, 6-dimethylphenyl) -1-oxaspiro[4.4]non-3-en-2-one

外 観：白色結晶

(出典：██████████提供資料)

2) 基準値

牛の筋肉 0.02 ppm

牛の脂肪 0.1 ppm

牛の肝臓、牛の腎臓、牛の食用部分 0.2 ppm

乳 0.01 ppm

魚介類 0.06 ppm

[実験方法]

1. 試料

1) 購入先

うなぎは愛知県の業者から、しじみは都内の市場から、その他の試料については都内のスーパーにて購入した。

2) 試料の採取方法

①牛の筋肉は脂肪層を可能な限り除いた後、試料100 gを正確に量り、エタノール、ギ酸及び水 (9:2:9)

混液30 gを加え、磨砕均一化した。

②牛の脂肪は筋肉部を可能な限り除いた後、試料100 gを正確に量り、エタノール、ギ酸及び水（9：2：9）混液30 gを加え、磨砕均一化した。

③牛の肝臓は試料100 gを正確に量り、エタノール、ギ酸及び水（9：2：9）混液30 gを加え、磨砕均一化した。

④鶏の筋肉は脂肪層を可能な限り除いた後、試料100 gを正確に量り、エタノール、ギ酸及び水（9：2：9）混液混液30 gを加え、磨砕均一化した。

⑤牛乳は試料100 gを正確に量り、エタノール、ギ酸及び水（9：2：9）混液30 gを加え、均一化した。

⑥鶏卵は、殻を除き卵白と卵黄を合わせてよく混合した後、試料100 gを正確に量り、エタノール、ギ酸及び水（9：2：9）混液30 gを加え、磨砕均一化した。

⑦はちみつはそば蜜を使用し、加温（40℃以下）した後、試料100 gを正確に量り、エタノール、ギ酸及び水（9：2：9）混液30 gを加え、均一化した。

⑧うなぎは活鰻を使用し、頭部を除いた可食部（内臓、骨及び皮を含む）試料100 gを正確に量り、エタノール、ギ酸及び水（9：2：9）混液30 gを加え、磨砕均一化した。

⑨さけは可食部（皮を含む）試料100 gを正確に量り、エタノール、ギ酸及び水（9：2：9）混液30 gを加え、磨砕均一化した。

⑩しじみは、貝殻を除いた後、約5分間水切りを行った試料100 gを正確に量り、エタノール、ギ酸及び水（9：2：9）混液30 gを加え、磨砕均一化した。

2. 試薬・試液

1) 標準品

スピロメシフェン標準品：純度99.8 %（和光純薬工業製）

代謝物M1標準品：純度98.9 %（和光純薬工業製）

代謝物M2標準品：純度99.0 %（XXXXXXXXXX社提供品）

2) 試薬

アセトニトリル、エタノール、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン：残留農薬試験用（関東化学製）

無水硫酸ナトリウム：PCB分析用（関東化学製）

アセトニトリル：高速液体クロマトグラフ用（関東化学製）

塩化ナトリウム、ギ酸及び酢酸：特級（関東化学製）

塩酸：試薬特級（小宗化学製）

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム：InertSep Slim-J PSA

（充てん量500 mg、ジーエルサイエンス製）

3) 標準溶液、試液の調製方法

①標準溶液の調製方法

標準原液：スピロメシフェン標準品20 mgを精秤し、アセトニトリルに溶解して100 mLに定容し、200 mg/L溶液を調製した。

代謝物M1標準品18.4 mgを精秤し、アセトニトリルに溶解して50 mLに定容し、スピロメシフェン濃度として500 mg/L溶液を調製した。

代謝物M2標準品19.5 mgをを精秤し、アセトニトリルに溶かしてスピロメシフェン濃度として500 mg/L溶液を調製した。

検量線用混合標準溶液：スピロメシフェン標準原液、代謝物M1標準原液及び代謝物M2標準原液をアセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸（1：1）混液で希釈し、スピロメシフェン、代謝物M1及び代謝物M2 0.000125～0.0075 mg/Lの濃度の混合標準溶液を調製した。

添加用標準溶液：スピロメシフェン標準原液、代謝物M1標準原液及び代謝物M2標準原液をアセトニトリルで希釈して各0.2、0.4、1.2、2及び4 mg/Lの濃度の混合標準溶液を調製した。

②試液の調製方法

0.1 vol%ギ酸

ギ酸1 mLに水を加えて1000 mLとした。

アセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸（1：1）混液

アセトニトリル500 mL及び0.1 vol%ギ酸500 mLを混合した。

エタノール、ギ酸及び水（9：2：9）混液

エタノール45 mL、ギ酸10 mL及び水45 mLを混合した。

アセトニトリル、ギ酸及び水（80：1：20）混液

アセトニトリル1600 mL、ギ酸20 mL及び水400 mLを混合した。

10 w/v%塩化ナトリウム溶液

塩化ナトリウム100 gに水を加えて溶解し、1000 mLとした。

酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：19）混液

酢酸エチル50 mL及び*n*-ヘキサン950 mLを混合した。

酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：1）混液

酢酸エチル500 mL及び*n*-ヘキサン500 mLを混合した。

アセトニトリル及び酢酸（99：1）混液

アセトニトリル495 mL及び酢酸5 mLを混合した。

アセトニトリル及び酢酸（19：1）混液

アセトニトリル475 mL及び酢酸25 mLを混合した。

3. 装置

ホモジナイザー：ウルトラタラックスT-25ベーシック（イカ・ジャパン製）

ロータリーエバポレーター：R-200（柴田科学製）等

LC-MS/MS

	型式	会社
MS 装置	API-3200Q トラップ	AB SCIEX
LC 装置	Agilent1200	Agilent Technologies
解析ソフト	Analyst	AB SCIEX

4. 測定条件

LC 条件																					
カラム	Inertsil ODS-4 サイズ：内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm 会社：ジーエルサイエンス株式会社																				
移動相流速 (mL/min)	0.2																				
注入量 (μL)	10																				
カラム温度 (°C)	40																				
移動相	A液：0.1 vol%ギ酸 B液：アセトニトリル																				
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A液(%)</th> <th>B液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>16.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>16.1</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>21.0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> </tbody> </table>			時間(分)	A液(%)	B液(%)	0.0	80	20	10.0	10	90	16.0	10	90	16.1	80	20	21.0	80	20
時間(分)	A液(%)	B液(%)																			
0.0	80	20																			
10.0	10	90																			
16.0	10	90																			
16.1	80	20																			
21.0	80	20																			
MS 条件																					
測定モード	MS/MS、SRM (選択反応モニタリング)																				
イオン化モード	ESI (+)																				
キャピラリ電圧 (V)	5500																				
脱溶媒温度 (°C)	700																				
脱溶媒ガス	窒素 40 psi																				
コリジョンガス	窒素																				
定量イオン (m/z)	スピロメシフェン： +273→187[コーン電圧：41(V)、コリジョンエネルギー：21(eV)] 代謝物 M1： +273→187[コーン電圧：41(V)、コリジョンエネルギー：21(eV)] 代謝物 M2： +289→241[コーン電圧：41(V)、コリジョンエネルギー：21(eV)]																				
定性イオン (m/z)	スピロメシフェン： +273→255[コーン電圧：41(V)、コリジョンエネルギー：21(eV)] 代謝物 M1： +273→255[コーン電圧：41(V)、コリジョンエネルギー：21(eV)] 代謝物 M2： +289→271[コーン電圧：41(V)、コリジョンエネルギー：21(eV)]																				
保持時間 (min)	スピロメシフェン：15.5 代謝物M1：11.5 代謝物M2：9.1																				

5. 定量

[実験方法] 2. 3) ①に従い調製した混合標準溶液10 μLをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積から絶対検量線法で検量線を作成した。試験溶液10 μLをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積と作成した検量線からスピロメシフェン、代謝物M1及び代謝物M2の量を算出した。

6. 添加試料の調製

2. 3) で調製した添加用混合標準溶液を使用した。

鶏の筋肉、鶏卵、牛乳及びはちみつ（添加濃度：0.01 ppm相当）：1. 2) の試料10.0 gに相当する量を量り採り、添加用混合標準溶液0.2 mg/Lを0.5 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

牛の筋肉（添加濃度：0.02 ppm相当）：1. 2) の試料10.0 gに相当する量を量り採り、添加用混合標準溶液0.4 mg/Lを0.5 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

うなぎ、さけ及びしじみ（添加濃度：0.06 ppm相当）：1. 2) の試料10.0 gに相当する量を量り採り、添加用混合標準溶液1.2 mg/Lを0.5 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

牛の脂肪（添加濃度：0.1 ppm相当）：1. 2) の試料5.00 gに相当する量を量り採り、添加用混合標準溶液2 mg/Lを0.25 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

牛の肝臓（添加濃度：0.2 ppm相当）：1. 2) の試料10.0 gに相当する量を量り採り、添加用混合標準溶液4 mg/Lを0.5 mL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

スピロメシフェン、代謝物M1及び代謝物M2（抱合体を含む。）をエタノール、ギ酸及び水（9：2：9）混液で磨砕均一化した試料から*n*-ヘキサン存在下アセトニトリル、ギ酸及び水（80：1：20）混液で抽出する。酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：19）混液を用いた液液分配によりスピロメシフェン及び代謝物M1を有機層に、代謝物M2及びその抱合体を水層に分画する。有機層についてはそのまま、水層については代謝物M2の抱合体を塩酸で加水分解して代謝物M2とし、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：1）混液で抽出した後、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認した。

1) 抽出

1. 2) の試料10.0 g（脂肪の場合は5.00 g）に相当する量を200 mL遠心管に量り採り、アセトニトリル、ギ酸及び水（80：1：20）混液100 mL並びに*n*-ヘキサン20 mLを加え、ホモジナイズした後、毎分3000回転で5分間遠心分離を行った。アセトニトリル、ギ酸及び水（80：1：20）混液層を採り、*n*-ヘキサン層及び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た後、上記と同様に遠心分離し、得られたアセトニトリル、ギ酸及び水（80：1：20）混液層を合わせて、アセトニトリル、ギ酸及び水（80：1：20）混液で正確に200 mLとした。この溶液から正確に5 mL（脂肪の場合は10 mL）を分取し100 mL遠心管に採り、ロータリーエバポレーターを用いて40℃以下で約1 mLまで濃縮した。

2) 液液分配

1) で得られた液を10 w/v%塩化ナトリウム溶液40 mL及びギ酸0.1 mLを用いて200 mL分液漏斗に移し、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：19）混液50 mLずつで2回振とう抽出した。酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：19）混液層をスピロメシフェン及び代謝物M1画分、水層を代謝物M2及びその抱合体画分として分画した。酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：19）混液層は300 mL三角フラスコに採り、無水硫酸ナトリウムを加えて時々振り混ぜながら15分間放置した。200 mLなす形フラスコにろ過した後、ロータリーエバポレーターを用いて40℃以下で約1 mLに濃縮し、更に窒素を吹き付けて溶媒を除去した。この残留物をアセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸（1：1）混液に溶かし、正確に10 mLとしたものをスピロメシフェン及び代謝物M1の試験溶液とした。

3) 代謝物M2の抱合体の加水分解 (畜産物のみ)

2) で得られた水層を水で正確に50 mLとした。この溶液から正確に10 mLを分取し100 mL遠心管に採り、塩酸6 mLを加えた後、密栓して90°Cに設定したオイルバス内で3時間放置した。室温まで放冷した後10 w/v%塩化ナトリウム100 mLを用いて300 mL分液漏斗に移し、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液100 mL及び50 mLで2回振とう抽出した。抽出液を300 mL三角フラスコに採り、無水硫酸ナトリウムを加えて時々振り混ぜながら15分間放置した。200 mLなす形フラスコにろ過した後、ロータリーエバポレーターを用いて40°C以下で約1 mLに濃縮し、更に窒素を吹き付けて溶媒を除去した。この残留物をアセトニトリル及び酢酸 (99 : 1) 混液10 mLに溶かした。

4) 精製

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep Slim-J PSA (500 mg)] にアセトニトリル及び酢酸 (99 : 1) 混液10 mLを注入し、流出液は捨てた。エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムに3) で得られた液を注入し、流出液は捨てた。次いで、アセトニトリル及び酢酸 (19 : 1) 混液20 mLを注入し、溶出液を50 mL遠心管に採り、ロータリーエバポレーターを用いて40°C以下で約1 mLに濃縮し、更に窒素を吹き付けて溶媒を除去した。この残留物をアセトニトリル及び0.1 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した。

[分析法フローチャート]

秤 取

- | 試料100 gにエタノール、ギ酸及び水 (9 : 2 : 9) 混液30 gを加え、
- ↓ 磨砕均一化後、試料10.0 g相当 (脂肪 : 5.00 g相当) を量り採る

ギ酸酸性下含水アセトニトリル抽出並びに*n*-ヘキサン洗浄

- | アセトニトリル、ギ酸及び水 (80 : 1 : 20) 混液100 mL、
- | *n*-ヘキサン20 mLを加え、ホモジナイズ
- | 遠心分離 (3000回転/分、5分)
- | アセトニトリル層を採る
- | 残留物及び*n*-ヘキサンにアセトニトリル、ギ酸及び水 (80 : 1 : 20) 混液50 mLを加え、
- | ホモジナイズ
- | 遠心分離 (3000回転/分、5分)
- | アセトニトリル、ギ酸及び水 (80 : 1 : 20) 混液層を合わせ、同混液で正確に200 mLとする
- | 脂肪以外 : 抽出液5 mL分取
- | 脂肪 : 抽出液10 mL分取
- ↓ 約1 mLまで濃縮

液液分配による分画

- | ギ酸0.1 mL、10 w/v%塩化ナトリウム溶液40 mL
- | 酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液50 mLを加え、5分間振とう
- | 有機層を採る
- | 水層に酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液50 mLを加え、5分間振とう
- | 酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液層を合わせ脱水する
- | 酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液層→スピロメシフェン及び代謝物M1画分
- ↓ 水層→代謝物M2及びその抱合体画分

スピロメシフェン及び代謝物M1画分

濃縮（溶媒除去）

↓ 減圧濃縮、窒素乾固

↓ 残留物をアセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸（1：1）混液10 mLに溶解

試験溶液

↓

LC-MS/MS定量

10 µL注入

代謝物M2及びその抱合体画分

加水分解

↓ 水を加えて正確に50 mLとする

↓ 10 mL分取

↓ 濃塩酸6 mL、密栓して90°Cで3時間放置

酢酸エチル-ヘキサン転溶

↓ 10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mL

↓ 酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：1）混液100 mLを加え、5分間振とう

↓ 酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：1）混液層を採る

↓ 水層に酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：1）混液50 mLを加え、5分間振とう

↓ 酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：1）混液層を合わせ脱水する

濃縮（溶媒除去）

↓ 減圧濃縮、窒素乾固

↓ 残留物をアセトニトリル及び酢酸（99：1）混液10 mLに溶解

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム

↓ アセトニトリル及び酢酸（99：1）混液10 mLでコンディショニング

↓ 全量注入

↓ アセトニトリル及び酢酸（19：1）混液20 mLで溶出

濃縮（溶媒除去）

↓ 減圧濃縮、窒素乾固

↓ 残留物をアセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸（1：1）混液2 mLに溶解

試験溶液

↓

LC-MS/MS定量

10 µL注入

8. マトリックス添加標準溶液の調製

1) スピロメシフェン及び代謝物 M1 の試験溶液について

① 定量限界相当濃度（定量限界の推定用）

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、うなぎ、さけ及びしじみはブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、0.00025 mg/Lの標準溶液0.5 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。

② 添加回収試験における回収率100%相当濃度（試料マトリックスの測定への影響用）

鶏の筋肉、鶏卵、牛乳及びはちみつは、ブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、0.00025 mg/Lの標準溶液0.5 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。

牛の筋肉は、ブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、0.0005 mg/Lの標準溶液0.5 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。

うなぎ、さけ及びじみは、ブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、0.0015 mg/Lの標準溶液0.5 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。

牛の脂肪はブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、0.0025 mg/Lの標準溶液0.5 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。

牛の肝臓はブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、0.005 mg/Lの標準溶液0.5 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。

2) 代謝物 M2 の試験溶液について

① 定量限界相当濃度（定量限界の推定用）

牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓はブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、0.00025 mg/Lの標準溶液0.5 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。

② 添加回収試験における回収率100%相当濃度（試料マトリックスの測定への影響用）

鶏の筋肉、鶏卵、牛乳及びはちみつは、ブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、0.00025 mg/Lの標準溶液0.5 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。

牛の筋肉は、ブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、0.0005 mg/Lの標準溶液0.5 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。

牛の脂肪はブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、0.0025 mg/Lの標準溶液0.5 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。

牛の肝臓はブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、0.005 mg/Lの標準溶液0.5 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

1) MS条件の検討

スピロメシフェンはESI (+) モードでの測定が可能であった。スピロメシフェンのESI (+) モード測定時のマススペクトルを図1に示した。スピロメシフェンの分子量は370.48であるが、プロトン付加分子 (m/z 371 [M+H]⁺) は十分なピーク強度が得られず、ナトリウム付加分子 (m/z 393 [M+Na]⁺) などが不規則に発生し、いずれのイオンも注入の再現性が悪かった。一方、現通知試験法でも採用されている m/z 273 では十分なピーク強度が得られ、定量性にも優れていたため、 m/z 273 をプリカーサーイオンとした。 m/z 273 をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図2に示した。強度としては m/z 273 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 255 が一番強く、次いで m/z 187 が続いたが、 m/z 255 はしばしばベースラインの崩れが見られたため、より選択性の高い m/z 187 を定量用イオン、 m/z 255 を定性用イオンとした。

代謝物M1はESI (+) モードでの測定が可能であった。代謝物M1のESI (+) モード測定時のマススペクトルを図3に示した。その結果から、基準ピークとして273が得られたので、代謝物M1のプロトン付加分子 (m/z 273 [M+H]⁺) をプリカーサーイオンとした。 m/z 273 をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図4に示した。強度としては m/z 273 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 255 が一番強く、次いで m/z 187 が続いたが、 m/z 255 はしばしばベースラインの崩れが見られたため、より選択性の高い m/z 187 を定量用イオンに、また m/z 255 を定性用イオンとした。なお、スピロメシフェン及び代謝物M1はプリカーサーイオン、プロダクトイオン共に同じ設定のイオンを用いることとなった。

代謝物M2はESI (+) モードでの測定が可能であった。代謝物M2のESI (+) モード測定時のマススペクトルを図5に示した。その結果から、基準ピークとして289が得られたので、代謝物M2のプロトン付加分子 (m/z 289 $[M+H]^+$) をプリカーサーイオンとした。 m/z 289をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図6に示した。強度としては m/z 289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 271が一番強く、次いで m/z 241が続いたが、 m/z 271はしばしばベースラインの崩れが見られたため、より選択性の高い m/z 241を定量用イオンに、また m/z 271を定性用イオンとした。

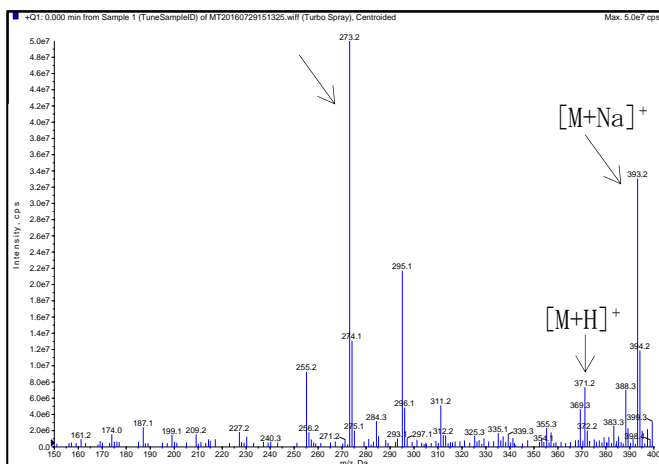


図1 スピロメシフェンのマススペクトル

スキャン範囲： m/z 150~400

測定条件：ESI (+)、CV=41

(CV：コーン電圧)

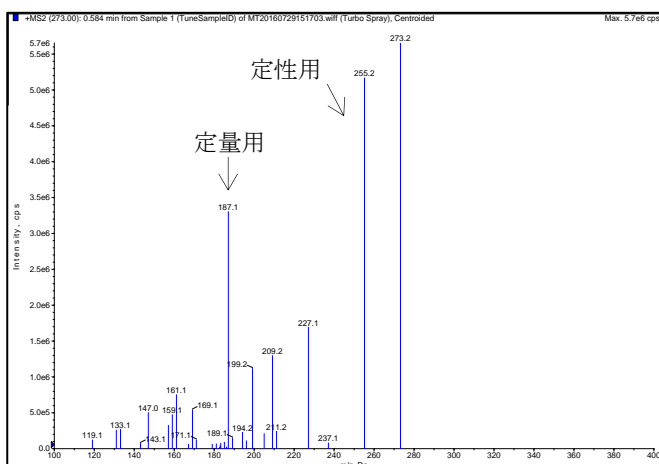


図2 スピロメシフェンのプリカーサーイオン m/z 273 のプロダクトイオンスペクトル (定量及び定性)

スキャン範囲： m/z 100~400

測定条件：ESI (+)、CV=41、CE=21

(CV：コーン電圧、CE：コリジョンエネルギー)

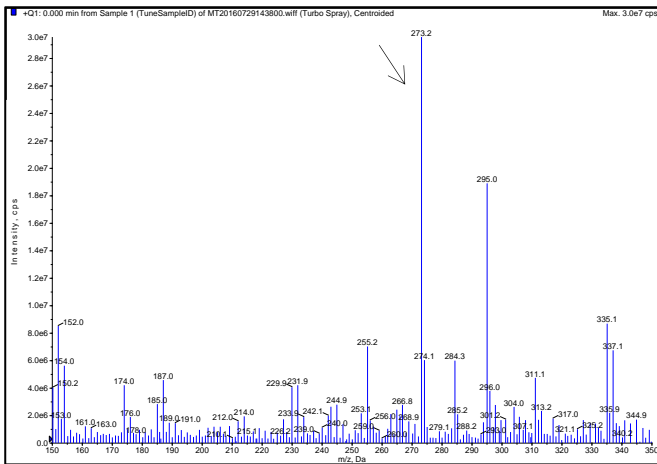


図3 代謝物 M1 のマススペクトル
 スキャン範囲： m/z 150～350
 測定条件：ESI (+)、CV=41
 (CV：コロン電圧)

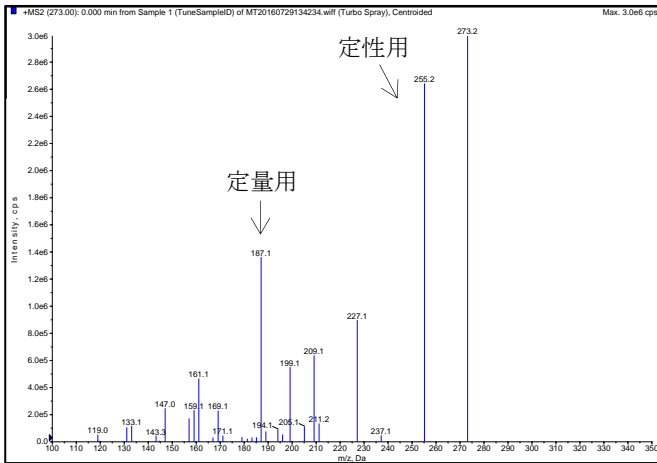


図4 代謝物 M1 のプリカーサーイオン m/z 273 のプロダクトイオンスペクトル (定量及び定性)
 スキャン範囲： m/z 100～350
 測定条件：ESI (+)、CV=41、CE=21
 (CV：コロン電圧、CE：コリジョンエネルギー)

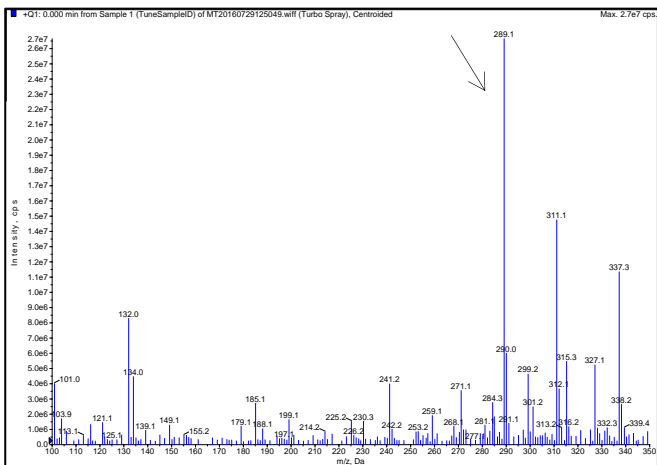


図5 代謝物 M2 のマススペクトル
 スキャン範囲： m/z 100～350
 測定条件：ESI (+)、CV=41
 (CV：コロン電圧)

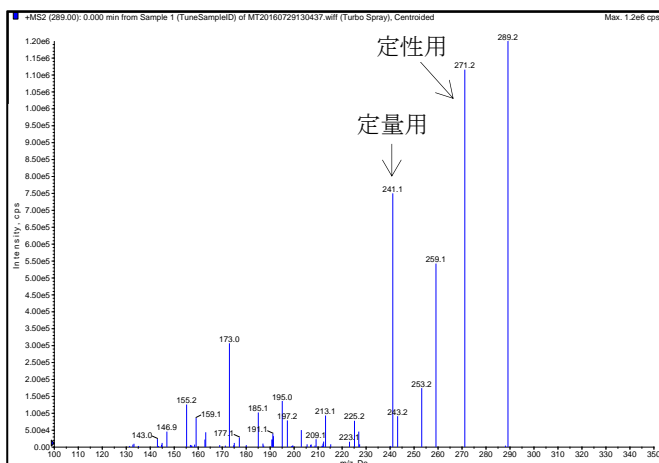


図6 代謝物M2のプリカーサーイオン m/z 289のプロダクトイオンスペクトル（定量及び定性）
 スキャン範囲： m/z 100～350

測定条件：ESI（+）、CV=41、CE=21

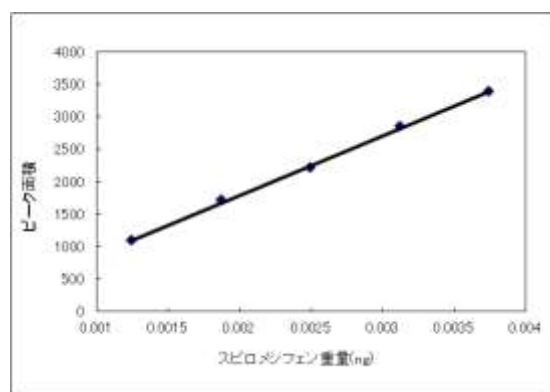
（CV：コーン電圧、CE：コリジョンエネルギー）

2) LC 条件の検討

分離カラムについて、Inertsil ODS-4（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μ m）を、移動相について、アセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸を用いて検討を行ったところ、ピーク形状、分離、再現性及び感度のいずれも良好な結果が得られたので、カラムはInertsil ODS-4を、移動相はアセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸を用い、アセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸（1：4）から（9：1）までの濃度勾配を10分間で行い、（9：1）で6分間保持することとした。

3) 検量線

図7にスピロメシフェン、代謝物M1及び代謝物M2の検量線の例を示した。0.000125 mg/L（0.00125 ng）～0.000375 mg/L（0.00375 ng）、0.000125 mg/L（0.00125 ng）～0.00075 mg/L（0.0075 ng）、0.000375 mg/L（0.00375 ng）～0.00225 mg/L（0.0225 ng）、0.000625 mg/L（0.00625 ng）～0.00375 mg/L（0.0375 ng）及び0.00125 mg/L（0.0125 ng）～0.0075 mg/L（0.075 ng）の濃度範囲で作成した検量線の決定係数は0.993以上であり良好な直線性を示した。



データ処理装置設定条件の一例

データ処理ソフト（メーカー）：Analyst

（AB SCIEX製）

ピークの定量方法：ピーク面積法

検量線の種類：最小二乗法

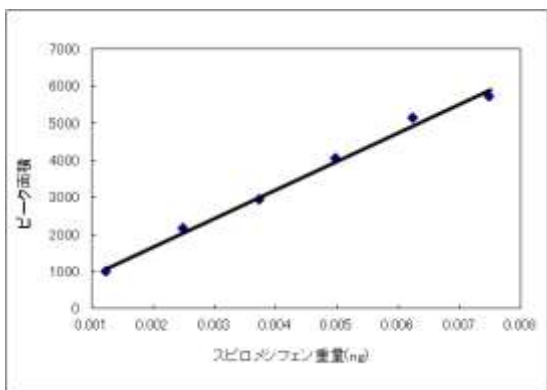
検量線基準ピークの重量：0.00125 ng～0.00375 ng

傾き（a）：a=914000

切片（b）：b=-34

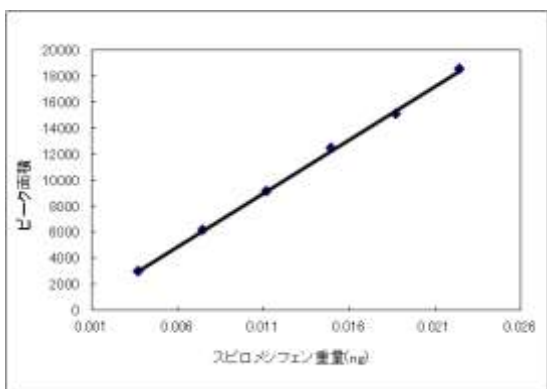
R^2 ：0.9990

図7-1 スピロメシフェン検量線例（ m/z +273→187）



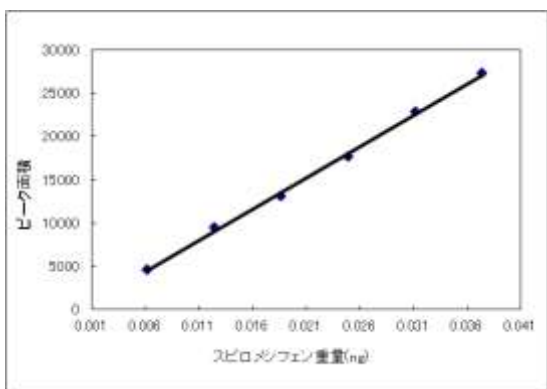
データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフト（メーカー）：Analyst
 （AB SCIEX製）
 ピークの定量方法：ピーク面積法
 検量線の種類：最小二乗法
 検量線基準ピークの重量：0.00125 ng～0.0075 ng
 傾き (a)：a=767000
 切片 (b)：b=133
 R^2 ：0.9938

図 7-2 スピロメシフェン検量線例 (m/z +273→187)



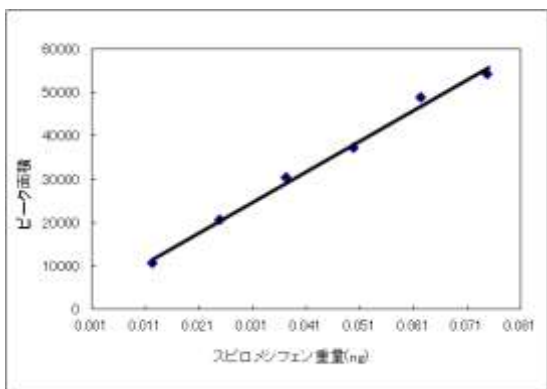
データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフト（メーカー）：Analyst
 （AB SCIEX製）
 ピークの定量方法：ピーク面積法
 検量線の種類：最小二乗法
 検量線基準ピークの重量：0.00375 ng～0.0225 ng
 傾き (a)：a=821000
 切片 (b)：b=-39
 R^2 ：0.9992

図 7-3 スピロメシフェン検量線例 (m/z +273→187)



データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフト（メーカー）：Analyst
 （AB SCIEX製）
 ピークの定量方法：ピーク面積法
 検量線の種類：最小二乗法
 検量線基準ピークの重量：0.00625 ng～0.0375 ng
 傾き (a)：a=722000
 切片 (b)：b=38
 R^2 ：0.9980

図 7-4 スピロメシフェン検量線例 (m/z +273→187)



データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフト（メーカー）：Analyst
 （AB SCIEX製）
 ピークの定量方法：ピーク面積法
 検量線の種類：最小二乗法
 検量線基準ピークの重量：0.0125 ng～0.075 ng
 傾き (a)：a=708000
 切片 (b)：b=2660
 R^2 ：0.9934

図 7-5 スピロメシフェン検量線例 (m/z +273→187)

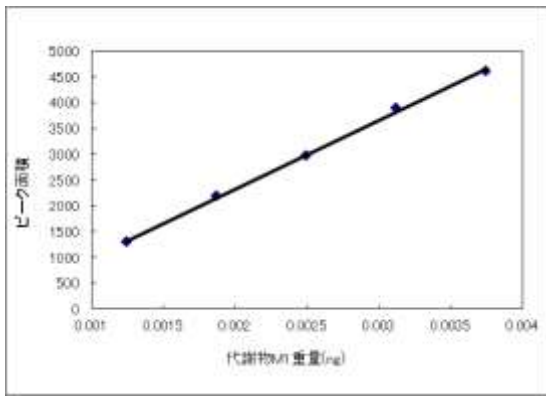


図 7-6 代謝物 M1 検量線例 (m/z +273→187)

データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフト (メーカー) : Analyst
 (AB SCIEX製)
 ピークの定量方法 : ピーク面積法
 検量線の種類 : 最小二乗法
 検量線基準ピークの重量 : 0.00125 ng~0.00375 ng
 傾き (a) : a=1190000
 切片 (b) : b=424
 R^2 : 0.9996

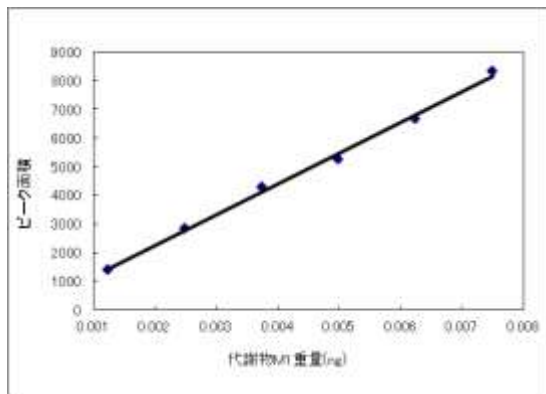


図 7-7 代謝物 M1 検量線例 (m/z +273→187)

データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフト (メーカー) : Analyst
 (AB SCIEX製)
 ピークの定量方法 : ピーク面積法
 検量線の種類 : 最小二乗法
 検量線基準ピークの重量 : 0.00125 ng~0.0075 ng
 傾き (a) : a=1070000
 切片 (b) : b=90
 R^2 : 0.9960

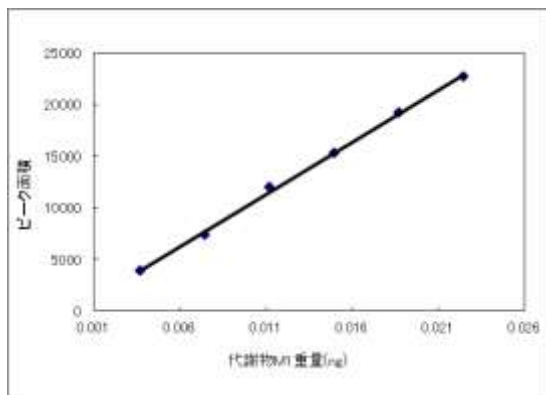


図 7-8 代謝物 M1 検量線例 (m/z +273→187)

データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフト (メーカー) : Analyst
 (AB SCIEX製)
 ピークの定量方法 : ピーク面積法
 検量線の種類 : 最小二乗法
 検量線基準ピークの重量 : 0.00375 ng~0.0225 ng
 傾き (a) : a=950000
 切片 (b) : b=-238
 R^2 : 0.9982

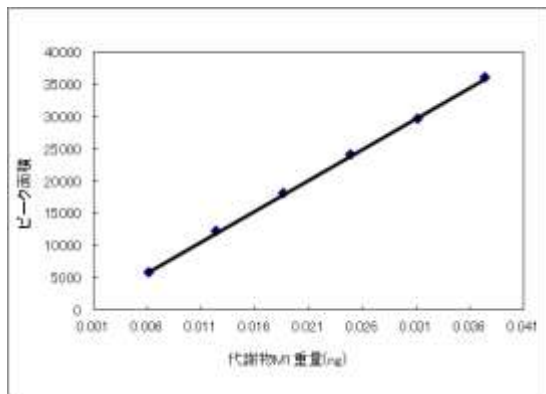


図 7-9 代謝物 M1 検量線例 (m/z +273→187)

データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフト (メーカー) : Analyst
 (AB SCIEX製)
 ピークの定量方法 : ピーク面積法
 検量線の種類 : 最小二乗法
 検量線基準ピークの重量 : 0.00625 ng~0.0375 ng
 傾き (a) : a=958000
 切片 (b) : b=-29
 R^2 : 0.9996

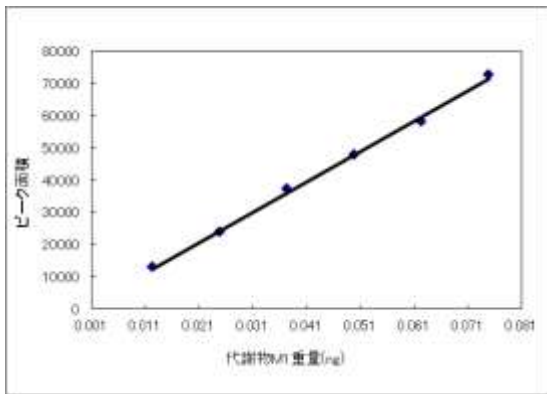


図 7-10 代謝物 M1 検量線例 ($m/z + 273 \rightarrow 187$)

データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフト (メーカー) : Analyst
 (AB SCIEX製)
 ピークの定量方法 : ピーク面積法
 検量線の種類 : 最小二乗法
 検量線基準ピークの重量 : 0.0125 ng~0.075 ng
 傾き (a) : a=942000
 切片 (b) : b=850
 $R^2 : 0.9978$

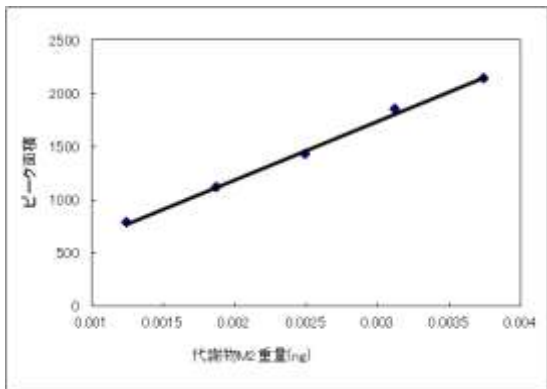


図 7-11 代謝物 M2 検量線例 ($m/z + 289 \rightarrow 241$)

データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフト (メーカー) : Analyst
 (AB SCIEX製)
 ピークの定量方法 : ピーク面積法
 検量線の種類 : 最小二乗法
 検量線基準ピークの重量 : 0.00125 ng~0.00375 ng
 傾き (a) : a=550000
 切片 (b) : b=91
 $R^2 : 0.9972$

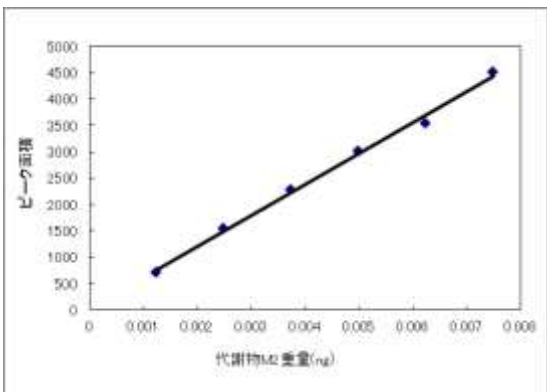


図 7-12 代謝物 M2 検量線例 ($m/z + 289 \rightarrow 241$)

データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフト (メーカー) : Analyst
 (AB SCIEX製)
 ピークの定量方法 : ピーク面積法
 検量線の種類 : 最小二乗法
 検量線基準ピークの重量 : 0.00125 ng~0.0075 ng
 傾き (a) : a=588000
 切片 (b) : b=24
 $R^2 : 0.9958$

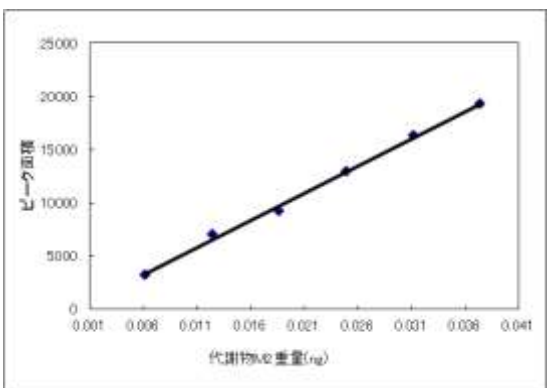
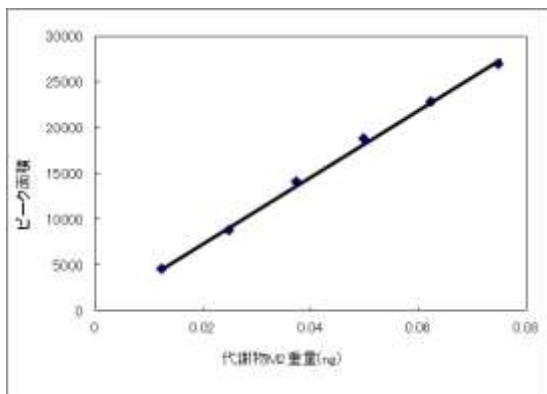


図 7-13 代謝物 M2 検量線例 ($m/z + 289 \rightarrow 241$)

データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフト (メーカー) : Analyst
 (AB SCIEX製)
 ピークの定量方法 : ピーク面積法
 検量線の種類 : 最小二乗法
 検量線基準ピークの重量 : 0.00625 ng~0.0375 ng
 傾き (a) : a=513000
 切片 (b) : b=134
 $R^2 : 0.9972$



データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフト (メーカー) : Analyst
 (AB SCIEX製)
 ピークの定量方法 : ピーク面積法
 検量線の種類 : 最小二乗法
 検量線基準ピークの重量 : 0.0125 ng~0.075 ng
 傾き (a) : a=363000
 切片 (b) : b=75
 $R^2 : 0.9982$

図 7-14 代謝物 M2 検量線例 ($m/z +289 \rightarrow 241$)

4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

$$0.01 \text{ mg/kg} [(10 \text{ mL}/0.25 \text{ g}^{*1}) \times (0.0025 \text{ ng}/10 \text{ } \mu\text{L})]$$

*¹ 5.00 g \times 10 mL/200 mL (脂肪の場合)

10.0 g \times 5 mL/200 mL (脂肪以外の場合)

2. 試験溶液調製法の検討

1) 試料調製について

牛の肝臓試料にスピロメシフェン1 μg を添加し30分間放置後、抽出以降の操作を [分析法フローチャート] に従って試験したところ、スピロメシフェンの添加回収率が70%を下回り、スピロメシフェンが放置時間中に分解していることが推測された。なお、代謝物M1及び代謝物M2については分解は認められなかった。現通知試験法では試験操作中にスピロメシフェンの分解を防ぐため、ギ酸を加えて抽出を行っているため、試料調製についてもギ酸を添加して分解を防ぐ方法を検討した。

調製に用いる溶媒は脂肪組織との混和性を考慮して、エタノール及び水 (1 : 1) 混液とし、牛の肝臓試料を用いて加えるギ酸濃度について検討した。牛の肝臓試料10 gに対して各濃度のギ酸含有 {エタノール及び水 (1 : 1) } 混液を3 g加え、牛の肝臓試料にスピロメシフェン1 μg を添加し30分間放置後、アセトニトリル、ギ酸及び水 (80 : 1 : 20) 混液100 mL並びにn-ヘキサン20 mLを加えて抽出を行った回収率を表1に示した。ギ酸の濃度が5 vol%以上で良好な回収率が得られたため、エタノール及び水 (1 : 1) 混液中のギ酸濃度は10 vol%、即ちエタノール、ギ酸及び水 (9 : 2 : 9) 混液を、試料調製用の添加溶液として用いることとした。

表1 各濃度のギ酸含有 {エタノール及び水 (1 : 1) } 混液を加え添加回収試験を行った結果 (%)
 エタノール及び水 (1 : 1) 混液中のギ酸濃度 (vol%)

	0		1		2		4		5		10	
	n=1	n=2	n=1	n=2	n=1	n=2	n=1	n=2	n=1	n=2	n=1	n=2
スピロメシフェン	65	62	85	84	87	83	95	88	102	96	108	96
平均	64		85		85		92		99		102	

添加量 : 1 μg 、牛の肝臓試料10 g相当供試

マトリックス標準溶液の面積値を100%として算出

2) 抽出方法の検討

本検討時では代謝物M2の抱合体の入手が不可能であり、代謝物M2の抱合体の抽出効率についての検証が不可能であったため、スピロメシフェン、代謝物M1、代謝物M2及び代謝物M2の抱合体を同時抽出する方法について文献調査を行った。スピロメシフェン及び代謝物の抽出を行っている文献について、

その抽出溶媒を表2に示した。

表2 各文献で使用している抽出溶媒

	対象食品 試料採取量	抽出溶媒	対象成分
社 提供資料	畜水産物 2 g	アセトニトリル及び水 (4 : 1) 40 mL (ASE セル内加圧加温抽出)	スピロメシフェン 代謝物 M1 代謝物 M2 代謝物 M2 の抱合体
薬事・食品 衛生審議会資料	農産物 20 g	アセトニトリル、ギ酸及び水 (80 : 1 : 20) 100 mL	スピロメシフェン 代謝物 M1 代謝物 M2 代謝物 M2 の抱合体
現行の通知試験法	畜水産物 5 g	アセトニトリル、ギ酸及び水 (80 : 1 : 20) 100 mL + <i>n</i> -ヘキサン 10 mL	スピロメシフェン 代謝物 M1
現行の通知試験法	農産物 20 g	アセトニトリル、ギ酸及び水 (80 : 1 : 20) 100 mL	スピロメシフェン 代謝物 M1

①加圧、加温抽出の必要性について

社提供資料では高速溶媒抽出 (ASE) セル内でアセトニトリル及び水 (4 : 1) 混液を加え、70℃で加圧抽出を行っている。しかし、ASEセルを用いて加圧抽出を行う方法は残留分析法として一般的ではない。薬事・食品衛生審議会資料では、農産物に関してアセトニトリル、ギ酸及び水 (80 : 1 : 20) 混液を用いて加圧、加温を行わずにスピロメシフェン、代謝物M1、代謝物M2及び代謝物M2の抱合体の抽出を行っている。また、社提供資料では肝臓及び腎臓においてアセトニトリルで振とう抽出した後アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液で振とう抽出したところ、いずれもスピロメシフェン及びその代謝物に由来する物質97%以上が抽出できたと報告がある。以上の資料から、代謝物M2の抱合体は抽出時に加熱・加圧を行わなくても十分に抽出可能であると判断した。

②抽出溶媒の組成の検討

社提供資料ではアセトニトリル及び水 (4 : 1) 混液で抽出を行っているが、この方法で牛の肝臓試料におけるスピロメシフェンの添加回収率は70%を下回っている。1) の結果より、低回収の原因はスピロメシフェンの分解であると推測される。試料調製時及び試験操作時のスピロメシフェンの分解を抑えるため、抽出溶媒にもギ酸を十分量加え、アセトニトリル、ギ酸及び水 (80 : 1 : 20) 混液とした。

③抽出時の*n*-ヘキサン洗浄の検討

現行の通知試験法 (畜水産物) では脂肪との混和性を考慮し、アセトニトリル、ギ酸及び水 (80 : 1 : 20) 混液並びに*n*-ヘキサンを用いて抽出を行っている。社提供資料では代謝物M2の抱合体は代謝物M2よりも水溶性が高いことが報告されているため、スピロメシフェン、代謝物M1及び代謝物M2がいずれもアセトニトリル、ギ酸及び水 (80 : 1 : 20) 混液層に抽出できていれば代謝物M2の抱合体もアセトニトリル、ギ酸及び水 (80 : 1 : 20) 混液層に抽出できていると推測される。そこで、融解脂肪を用いて抽出溶媒の検討を行った。以下に検討内容のフローを示した。

[分析法フローチャート]

秤 取

- | 牛の脂肪：試料5.00 g
- | 約50℃に加熱して融解後、スピロメシフェン、代謝物M1及び代謝物M2各0.5 µg添加
- ↓ 放冷して再度凝固させる

ギ酸酸性下含水アセトニトリル抽出並びに*n*-ヘキサン洗浄

- | a) アセトニトリル、ギ酸及び水（80：1：20）混液100 mL+*n*-ヘキサン20 mL
- | b) アセトニトリル、ギ酸及び水（80：1：20）混液100 mL+*n*-ヘキサン50 mL
- | c) アセトニトリル、ギ酸及び水（80：1：20）混液100 mL+*n*-ヘキサン100 mL
- | ホモジナイズ抽出
- | 遠心分離（3000回転/分、5分）
- | アセトニトリル、ギ酸及び水（80：1：20）混液層を採る
- | 残留物及び*n*-ヘキサン層にアセトニトリル、ギ酸及び水（80：1：20）50 mLを加え、
- | ホモジナイズ
- | 遠心分離（3000回転/分、5分）
- ↓ アセトニトリル、ギ酸及び水（80：1：20）層を合わせ、同混液で正確に200 mLとする

LC-MS/MS測定

フローチャートに従って添加回収試験を行った結果を表3に示した。*n*-ヘキサン20 mLを加えて抽出を行ったものでは3成分とも良好な回収率が得られた。しかし、*n*-ヘキサンの量を50 mL、100 mLと増加させるにつれ、スピロメシフェンの回収率が下がることが確認された。スピロメシフェンは3成分の中で最も低極性の物質のため、*n*-ヘキサン量を増やすとアセトニトリル、ギ酸及び水（80：1：20）混液への分配率が下がると推測された。

表3 上記フローチャートに従って添加回収試験を行った結果 (%)

	<i>n</i> -ヘキサンの量 (mL)		
	20	50	100
スピロメシフェン	96, 106 平均 101	87, 87 平均 87	64, 58 平均 61
代謝物 M1	108, 102 平均 105	97, 105 平均 101	102, 101 平均 102
代謝物 M2	100, 104 平均 102	101, 98 平均 100	98, 104 平均 101

添加量：各0.5 µg

牛の脂肪5 g共存下

各試行2で実施

マトリックス標準溶液中の各成分の面積値を100%として算出

①～③の検討結果から、抽出方法としてはアセトニトリル、ギ酸及び水（80：1：20）混液100 mLに*n*-ヘキサン20 mLを加え抽出を行った後アセトニトリル、ギ酸及び水（80：1：20）混液層を採り、残留物及び*n*-ヘキサン層にアセトニトリル、ギ酸及び水（80：1：20）混液50 mLを加えて抽出する方法を採用することとした。

3) 分画操作の検討

メーカー提供資料では代謝物 M1 にも抱合体が存在することが報告されているが、代謝物 M1 の抱合体は規制対象に含まれていない。したがって、加水分解処理を行う前に代謝物 M1 及び代謝物 M1 の抱合体を分画する必要がある。以下に、①液液分配②オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる分画が可能か検討を行った。

①液液分配による分画の検討

薬事・食品衛生審議会資料では、農産物に関して水50 mLにギ酸0.1 mLを加え、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液で液液分配し、水層に代謝物M2及びその抱合体、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液層にスピロメシフェン及び代謝物M1を分画している。代謝物M1の抱合体は代謝物M2よりも水溶性が高いため、水層に分画されていると考えられる。本検討でも同様の方法で分画できるか検討した。この条件で試料共存下で液液分配操作を行った際、牛の肝臓試料においてエマルジョンを形成した。水を10 w/v%塩化ナトリウム溶液に変更したところ、エマルジョンが改善されたため、水ではなく10 w/v%塩化ナトリウム溶液を用いて検討を行った。スピロメシフェン、代謝物M1及び代謝物M2各0.01 µgを10 w/v%塩化ナトリウム溶液40 mLに添加し、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3回振とう抽出を行った結果を表4に示した。

スピロメシフェン及び代謝物M1は2回の抽出で酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液に抽出され、代謝物M2は抽出されなかったため、液液分配による分画が可能であった。

表4 酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液への抽出率 (%)

	50 mL	50 mL	50 mL	合計
	(1回目)	(2回目)	(3回目)	
スピロメシフェン	88	8	0	96
代謝物 M1	78	16	0	94
代謝物 M2	0	0	0	0

添加量：各0.01 µg

ギ酸0.1 mL添加

次に、液液分配時の酢酸エチルの比率について検証した。スピロメシフェン、代謝物M1及び代謝物M2各0.01 µgを10 w/v%塩化ナトリウム溶液40 mLに添加し、ギ酸0.1 mLを加え、*n*-ヘキサン50 mLで3回振とう抽出を行った結果を表5に示した。*n*-ヘキサンのみでは代謝物M1が*n*-ヘキサン層に一部しか抽出されなかった。また、酢酸エチルの比率を上げて酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 9) 混液50 mLで3回振とう抽出を行った結果を表6に示した。酢酸エチル濃度を上げると代謝物M2の一部が酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 9) 混液層に抽出されてしまい、分画できなかった。

表5 *n*-ヘキサンへの抽出率 (%)

	50 mL	50 mL	50 mL	合計
	(1回目)	(2回目)	(3回目)	
スピロメシフェン	84	8	0	92
代謝物 M1	0	20	13	33
代謝物 M2	0	0	0	0

添加量：各0.01 µg

ギ酸0.1 mL添加

表 6 酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 9) 混液への抽出率 (%)

	50 mL	50 mL	50 mL	合計
	(1 回目)	(2 回目)	(3 回目)	
スピロメシフェン	97	2	0	99
代謝物 M1	92	2	0	94
代謝物 M2	5	17	14	36

添加量 : 各0.01 µg

ギ酸0.1 mL添加

次に、ギ酸添加が必要かどうか、ギ酸を加えずに液液分配の検討を行った。スピロメシフェン、代謝物M1及び代謝物M2各0.01 µgを10 w/v%塩化ナトリウム溶液40 mLに添加し、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液50 mLで3回振とう抽出を行った結果を表7に示した。ギ酸を加えない場合 (pH5~7程度)、代謝物M1が酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液層に十分に抽出されなかった。

表 7 ギ酸を加えない場合の酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 19) 混液への抽出率 (%)

	50 mL	50 mL	50 mL	合計
	(1 回目)	(2 回目)	(3 回目)	
スピロメシフェン	88	10	0	98
代謝物 M1	3	34	26	63
代謝物 M2	0	0	0	0

添加量 : 各0.01 µg

以上の結果から、液液分配操作は10 w/v%塩化ナトリウム溶液40 mLにギ酸0.1 mL加え (pH2程度)、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液50 mLで2回振とう抽出することとした。

②オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる分画について

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる分画が可能か検討した。InertSep C18 (充てん量1,000 mg) 及びBond Elut C18 (充てん量1,000 mg) を用いて溶出の比較を行った。それぞれアセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸各5 mLで予備洗浄した後、スピロメシフェン、代謝物M1及び代謝物M2各0.025 µgを添加し、アセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸の混液でカラムに順次負荷、溶出したときの溶出状況を表8に示した。InertSep C18を用いた場合、Bond Elut C18を用いた場合よりも代謝物M1及び代謝物M2の回収率が低下した。Bond Elut C18を用いた場合良好な回収率が得られたが、試料共存で溶出を行った際に溶出ずれが生じ、分画できなかつたため不採用とした。

表 8 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況 (%)

		アセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸									合計
		1:9	1:4	3:7	2:3	1:1	3:2	7:3	4:1	9:1	
InertSep C18	溶出量 (mL)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	スピロメシフェン	0	0	0	0	0	0	28	66	0	94
	代謝物M1	0	0	0	21	45	0	0	0	0	66
	代謝物M2	0	0	83	0	0	0	0	0	0	83
Bond Elut C18	溶出量 (mL)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	スピロメシフェン	0	0	0	0	0	0	3	91	0	94
	代謝物M1	0	0	0	0	109	0	0	0	0	109
	代謝物M2	0	0	87	16	0	0	0	0	0	103

InertSep C18、充てん量1,000 mg、ジーエルサイエンス製

Bond Elut C18、充てん量1,000 mg、Agilent Technologies製

添加量：各0.025 µg

4) 代謝物 M2 の抱合体の加水分解法について

社提供資料では、水5 mLに濃塩酸3 mLを加えて密栓し、90 °Cに設定したヒートブロック内で3時間加熱し加水分解を行っている。本試験では、ヒートブロックよりさらに熱が伝導しやすいオイルバスを用い、同様の方法を採用した。すなわち、水10 mLに濃塩酸6 mLを加えて密栓し、90 °Cに設定したオイルバス内で3時間加熱し加水分解を行うこととした。

5) 精製法について

①酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液による転溶について

加水分解処理を行った後の代謝物M2の精製として、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液による精製を検討した。加水分解操作終了時には塩酸酸性下でpH<1となっているため、同程度の濃度の塩酸を加えて検討を行った。代謝物M2 0.01 µgを10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLに添加し、塩酸1 mLを加え、pH<1とした後酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液100 mL、50 mL及び50 mLで3回振とう抽出を行った結果を表9に示した。代謝物M2は2回の抽出で酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液に抽出されたため、加水分解後の溶液に10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液100 mL及び50 mLで2回抽出することとした。

表9 酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) への抽出率 (%)

	100 mL	50 mL	50 mL	
	(1回目)	(2回目)	(3回目)	
代謝物 M2	91	6	0	97

添加量：0.01 µg

②エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製

代謝物M2の精製法として、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製を検討した。代謝物M2 0.025 µgを各組成のアセトニトリル及び酢酸混液並びにアセトニトリル及びギ酸混液に添加し、あらかじめ各溶出溶媒5 mLで予備洗浄したエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムに負荷、溶出した結果を表10に示した。代謝物M2はアセトニトリル及び酢酸 (99 : 1) 混液30 mLでは溶出せず、アセトニトリル及び酢酸 (19 : 1) 20 mLで溶出された。アセトニトリル及びギ酸混液を用いても溶出は可能であった。

表10 エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況① (%)

溶出溶媒		溶出量 (mL)			合計
		0-10	10-20	20-30	
代謝物 M2	アセトニトリル及び酢酸の混液	(99 : 1)	0	0	0
		(49 : 1)	0	37	50
		(19 : 1)	54	43	0
	アセトニトリル及びギ酸の混液	(99 : 1)	60	23	0
		(49 : 1)	83	11	0
		(19 : 1)	85	6	0

InertSep Slim-J PSA、充てん量500 mg、ジーエルサイエンス製

代謝物M2添加量：0.025 µg

表10の結果から、アセトニトリル及び酢酸（99：1）混液で洗浄した後溶出が可能か検討した。カラムをアセトニトリル及び酢酸（99：1）混液5 mLで予備洗浄した後代謝物M2 0.025 µgをアセトニトリル及び酢酸（99：1）混液10 mLで負荷し、アセトニトリル及び酢酸（19：1）30 mLで溶出した結果を表11に示した。代謝物M2はアセトニトリル及び酢酸（99：1）混液10 mLでは溶出せず、アセトニトリル及び酢酸（19：1）20 mLで溶出されたため、アセトニトリル及び酢酸（99：1）混液10 mLで負荷、洗浄し、アセトニトリル及び酢酸（19：1）20 mLで溶出することとした。

表 11 エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況②（%）

	アセトニトリル及び 酢酸の混液 (99 : 1)		アセトニトリル及び 酢酸の混液 (19 : 1)		合計
	10 mL	0-20 mL	20-30 mL		
	代謝物M2	0	100	0	

InertSep Slim-J PSA、充てん量500 mg、ジーエルサイエンス製
代謝物M2添加量：0.025 µg

③グラファイトカーボンミニカラムによる精製

グラファイトカーボンミニカラムによる精製を検討した。カラムをアセトニトリル5 mLで予備洗浄した後スピロメシフェン、代謝物M1及び代謝物M2各0.025 µgを添加し、アセトニトリルで負荷、溶出したときの溶出状況を表12に示した。スピロメシフェン、代謝物M1及び代謝物M2はいずれもグラファイトカーボンミニカラムからアセトニトリル20 mLで溶出できた。しかし、グラファイトカーボンミニカラムによる精製を省略してもいずれの成分も良好な結果が得られたため不採用とした。

表 12 グラファイトカーボンミニカラムからの溶出率（%）

溶出量	アセトニトリル			合計
	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	
スピロメシフェン	81	9	0	90
代謝物 M1	90	9	0	99
代謝物 M2	97	8	0	105

Supelclean Envi-carb（充てん量250 mg、シグマアルドリッチ製）
添加量：各0.025 µg

3. 添加回収試験

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏の筋肉、鶏卵、牛乳、はちみつ、うなぎ、さけ及びしじみの10食品を用いて、[実験方法] 7. 試験溶液の調製に従って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8及び10に示した。また、各食品のブランク試料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12及び13に示した。

1) 選択性

選択性の結果を表13に示した。検討した何れの試料においてもスピロメシフェン、代謝物M1及び代謝物M2の定量を妨害するようなピークは認められず、選択性は良好であった。

表13 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 ¹ (ppm)	添加濃度 ² (ppm)	妨害ピークの許容範囲		ピーク面積(高さ) ³				選択性の評価 ⁵	備考	
						評価対象濃度 (ppm)	判定基準	面積又は高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 ⁴ (b)	面積(高さ)比 (a)/(b)			
1	スピロメシフェン	牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	*	定量限界 0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.1		基準値 0.1	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛の肝臓	0.01	0.2	0.2		基準値 0.2	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01		定量限界 0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01		定量限界 0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛乳	0.01	0.01	0.01		定量限界 0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01		定量限界 0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		うなぎ	0.01	0.06	0.06		基準値 0.06	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		さけ	0.01	0.06	0.06		基準値 0.06	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		しじみ	0.01	0.06	0.06		基準値 0.06	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
2	代謝物M1	牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	*	定量限界 0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.1		基準値 0.1	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛の肝臓	0.01	0.2	0.2		基準値 0.2	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01		定量限界 0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01		定量限界 0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛乳	0.01	0.01	0.01		定量限界 0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01		定量限界 0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		うなぎ	0.01	0.06	0.06		基準値 0.06	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		さけ	0.01	0.06	0.06		基準値 0.06	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		しじみ	0.01	0.06	0.06		基準値 0.06	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
3	代謝物M2	牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	*	定量限界 0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.1		基準値 0.1	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛の肝臓	0.01	0.2	0.2		基準値 0.2	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01		定量限界 0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01		定量限界 0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛乳	0.01	0.01	0.01		定量限界 0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01		定量限界 0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

2 添加濃度と評価対象濃度が異なる場合(定量限界と基準値との関係が、『定量限界<基準値<定量限界×3』となる場合)には、『』が表示される。『*』が表示された分析対象化合物は、添加濃度と評価対象濃度が異なるため、別途、定量限界濃度相当のマトリックス添加標準溶液を調製して評価する。

*3 ブランク試料及び標準溶液の順に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。)

*4 試料中の濃度が「評価対象濃度(基準値濃度又は定量限界濃度)」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。

*5 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の判定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、精度及び定量限界

真度及び併行精度の検討結果を表14に示した。スピロメシフェンの真度は82.1~101.3%、併行精度は1.9~5.6%であり、目標値を十分に満たした。代謝物M1の真度は87.2~102.7%、併行精度は1.3~8.9%であり、目標値を十分に満たした。代謝物M2の真度は81.8~99.5%、併行精度は2.6~7.4%であり、目標値を十分に満たした。スピロメシフェンのS/N比の平均値は87.1~102.7、代謝物M1のS/N比の平均値は66.2~125.4、代謝物M2のS/N比の平均値は48.5~70.4でありS/N≧10を十分に満たした。

添加濃度が定量限界濃度と異なる試料について、定量限界の推定を行った結果を表15に示した。また、定量限界の推定における代表的なクロマトグラムを図9及び11に示した。スピロメシフェンのS/N比の平均値は40.1~78.3、代謝物M1のS/N比の平均値は58.1~106.2、代謝物M2のS/N比の平均値は43.6~78.6でありS/N≧10を十分に満たした。

表14 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 ¹ (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 ²	検量線					回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N比 ³			備考
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	Max.	Min.			平均値			
1	スピロメシフェン	牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	*	767000	133	0.9938	96.4	97.3	104.1	107.8	99.8	101.1	4.7	/	/	/	#DIV/0!		
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.1	*	722000	38	0.9980	87.3	82.6	87.4	89.3	91.1	87.6	3.6	/	/	/	#DIV/0!		
		牛の肝臓	0.01	0.2	0.2	*	708000	2660	0.9934	81.1	79.7	80.7	83.7	85.1	82.1	2.8	/	/	/	#DIV/0!		
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01		2110000	526	0.9972	85.1	93.8	83.9	89.8	92.4	89.0	4.9	108.3	97.0	102.7			
		鶏卵	0.01	0.01	0.01		1180000	-207	0.9962	96.1	90.3	93.3	93.7	89.8	92.6	2.8	106.3	89.5	97.9			
		牛乳	0.01	0.01	0.01		914000	-34	0.9990	92.9	86.2	81.8	89.8	82.1	86.6	5.6	94.7	79.5	87.1			
		はちみつ	0.01	0.01	0.01		914000	-34	0.9990	99.7	97.3	90.7	97.5	96.1	96.3	3.5	93.6	85.8	89.7			
		うなぎ	0.01	0.06	0.06	*	821000	-39	0.9992	79.8	81.8	82.9	86.3	86.5	83.5	3.5	/	/	/	#DIV/0!		
		さけ	0.01	0.06	0.06	*	821000	-39	0.9992	84.3	91.2	91.4	89.1	94.5	90.1	4.2	/	/	/	#DIV/0!		
		しじみ	0.01	0.06	0.06	*	821000	-39	0.9992	88.8	91.5	87.5	89.4	91.5	89.7	1.9	/	/	/	#DIV/0!		
2	代謝物M1	牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	*	870000	99	0.9992	88.8	91.5	87.5	89.4	91.5	89.7	3.2	/	/	/	#DIV/0!		
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.1	*	958000	-29	0.9996	97.5	97.3	100.3	97.5	98.0	98.1	1.3	/	/	/	#DIV/0!		
		牛の肝臓	0.01	0.2	0.2	*	942000	850	0.9978	98.5	104.5	98.9	100.3	103.3	101.1	2.7	/	/	/	#DIV/0!		
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01		1190000	424	0.9996	90.6	98.6	81.6	79.2	90.8	88.2	8.9	70.4	62.0	66.2			
		鶏卵	0.01	0.01	0.01		1330000	-339	0.9984	91.5	95.0	99.1	98.3	102.4	97.3	4.3	130.0	118.8	124.4			
		牛乳	0.01	0.01	0.01		852000	189	0.9930	97.2	109.6	102.6	100.6	103.4	102.7	4.4	150.0	100.8	125.4			
		はちみつ	0.01	0.01	0.01		852000	189	0.9930	100.4	86.5	100.6	93.0	102.4	96.6	6.9	122.0	98.3	110.2			
		うなぎ	0.01	0.06	0.06	*	950000	-238	0.9982	98.9	89.8	101.3	98.6	95.9	96.9	4.6	/	/	/	#DIV/0!		
		さけ	0.01	0.06	0.06	*	950000	-238	0.9982	91.4	91.9	84.7	87.5	95.4	90.2	4.6	/	/	/	#DIV/0!		
		しじみ	0.01	0.06	0.06	*	950000	-238	0.9982	82.3	88.4	84.1	90.1	91.0	87.2	4.4	/	/	/	#DIV/0!		
3	代謝物M2	牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	*	588000	24	0.9958	82.2	73.2	84.8	82.3	86.3	81.8	6.2	/	/	/	#DIV/0!		
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.1	*	513000	134	0.9972	94.4	99.8	101.4	98.5	99.1	98.7	2.6	/	/	/	#DIV/0!		
		牛の肝臓	0.01	0.2	0.2	*	363000	75	0.9982	84.0	83.4	83.0	91.3	91.6	86.7	5.1	/	/	/	#DIV/0!		
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01		406000	76	0.9984	91.7	93.0	92.1	88.4	77.3	88.5	7.4	57.6	54.3	56.0			
		鶏卵	0.01	0.01	0.01		582000	65	0.9922	97.6	108.8	91.3	104.9	95.1	99.5	7.2	75.2	65.5	70.4			
		牛乳	0.01	0.01	0.01		495000	178	0.9914	96.8	85.1	94.5	91.2	82.1	89.9	6.9	75.8	51.0	63.4			
		はちみつ	0.01	0.01	0.01		550000	91	0.9972	80.1	75.3	83.1	84.4	86.1	81.8	5.2	48.9	48.0	48.5			

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。
 2 添加濃度が定量限界濃度と異なる場合には、『』が表示される。その場合には、S/N比の算出は不要であるが、別途、定量限界の推定を行う。
 *3 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(Mn.)のそれぞれのS/N比を求める。

表15 定量限界の推定

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 ¹ (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 ²	標準溶液濃度 ³ (mg/L)	ピーク面積(高さ) ⁴					S/N比		平均値		備考				
								面積又は高さの別	ブランク ⁵	マトリックス添加標準溶液	溶媒標準溶液	n=1	n=2	平均	n=1	n=2		平均	面積(高さ)比(%) ⁶	S/N比	
1	スピロメシフェン	牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	*	0.00025	面積	0	2321	2412	2366.5	2579	2664	2621.5	67.2	53.8	90.3	60.5		
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.1	*	0.00025	面積	0	1932	1977	1954.5	2052	2019	2035.5	56.7	56.7	96.0	56.7		
		牛の肝臓	0.01	0.2	0.2	*	0.00025	面積	0	1652	1536	1594.0	1742	1617	1679.5	55.8	54.5	94.9	55.2		
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01															#DIV/0!	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01																#DIV/0!
		牛乳	0.01	0.01	0.01																#DIV/0!
		はちみつ	0.01	0.01	0.01																#DIV/0!
		うなぎ	0.01	0.06	0.06	*	0.00025	面積	0	2174	2109	2141.5	1993	2297	2145.0	36.1	44.1	99.8	40.1		
		さけ	0.01	0.06	0.06	*	0.00025	面積	0	2273	2078	2175.5	2297	1820	2058.5	44.0	41.9	105.7	43.0		
		しじみ	0.01	0.06	0.06	*	0.00025	面積	0	2166	2143	2154.5	2160	2121	2140.5	82.0	74.5	100.7	78.3		
2	代謝物M1	牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	*	0.00025	面積	0	2545	2656	2600.5	2636	2397	2517.5	79.5	63.8	103.3	71.7		
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.1	*	0.00025	面積	0	2251	2675	2463.0	2463	2567	2515.0	91.7	87.5	97.9	89.6		
		牛の肝臓	0.01	0.2	0.2	*	0.00025	面積	0	2124	2018	2071.0	2118	2071	2094.5	99.5	106.0	98.9	102.8		
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01															#DIV/0!	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01															#DIV/0!	
		牛乳	0.01	0.01	0.01															#DIV/0!	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01															#DIV/0!	
		うなぎ	0.01	0.06	0.06	*	0.00025	面積	0	2386	2471	2428.5	2421	2397	2409.0	66.1	50.0	100.8	58.1		
		さけ	0.01	0.06	0.06	*	0.00025	面積	0	2295	2211	2253.0	2407	2151	2279.0	64.4	60.3	98.9	62.4		
		しじみ	0.01	0.06	0.06	*	0.00025	面積	0	2483	2487	2485.0	2494	2357	2425.5	107.5	104.8	102.5	106.2		
3	代謝物M2	牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	*	0.00025	面積	0	1438	1377	1407.5	1565	1446	1505.5	46.6	40.6	93.5	43.6		
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.1	*	0.00025	面積	0	1228	1324	1276.0	1403	1441	1422.0	78.3	78.9	89.7	78.6		
		牛の肝臓	0.01	0.2	0.2	*	0.00025	面積	0	1580	1528	1554.0	1512	1451	1481.5	76.3	69.5	104.9	72.9		
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01															#DIV/0!	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01															#DIV/0!	
		牛乳	0.01	0.01	0.01															#DIV/0!	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01															#DIV/0!	

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。
 2 定量限界の推定を行う対象(添加濃度と定量限界濃度と異なる場合)には、『』が表示される。
 *3 試料中の濃度が定量限界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。
 *4 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回以上測定する。(必要に応じて起爆注入を行う。)
 *5 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。
 *6 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。

3) 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について検討した結果を表16に示した。添加回収試験における回収率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の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求めた。スピロメシフェンの面積比は0.90~1.02、代謝物M1の面積比は0.94~1.05、代謝物M2の面積比は0.90~1.02であり、測定への影響は少ないものと考えられた。

添加回収試験における真度を表16で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表17に示した。補正真度はスピロメシフェン80.6~112.5%、代謝物M1 89.4~105.7%、代謝物M2 82.1~101.8%であり、試料マトリックスの測定への影響と真度との間に矛盾は見られなかった。

表 16 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 ¹ (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 ² (mg/L)	ピーク面積(高さ) ³									備考
							面積又は 高さの別	ブランク ⁴	マトリックス添加標準溶液 ⁵			溶媒標準溶液			ピーク面積 (高さ)比 ⁶	
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
1	スピロメシフェン	牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	0.0005	面積	0	4008	4167	4087.5	4523	4577	4550.0	0.90	
			0.01	0.1	0.1	0.0025	面積	0	17240	16920	17080.0	18100	17420	17760.0	0.96	
		牛の肝臓	0.01	0.2	0.2	0.005	面積	0	32410	33120	32765.0	31690	32670	32180.0	1.02	
			0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	2441	2401	2421.0	2565	2664	2614.5	0.93	
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	2483	2496	2489.5	2614	2648	2631.0	0.95	
			0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	1864	1967	1915.5	1809	1929	1869.0	1.02	
		牛乳	0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	2140	2030	2085.0	2104	2281	2192.5	0.95	
			0.01	0.06	0.06	0.015	面積	0	11170	10730	10950.0	11200	11920	11560.0	0.95	
		うなぎ	0.01	0.06	0.06	0.015	面積	0	12030	10510	11270.0	12340	11640	11990.0	0.94	
			0.01	0.06	0.06	0.015	面積	0	10500	11760	11130.0	12040	11150	11595.0	0.96	
		さけ	0.01	0.06	0.06	0.015	面積	0	5007	4866	4936.5	4640	4879	4759.5	1.04	
			0.01	0.1	0.1	0.0025	面積	0	23490	22530	23010.0	22200	21590	21895.0	1.05	
2	代謝物M1	牛の脂肪	0.01	0.2	0.2	0.005	面積	0	41700	40970	41335.0	43100	39550	41325.0	1.00	
			0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	2503	2471	2487.0	2709	2533	2621.0	0.95	
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	2671	2629	2650.0	2564	2561	2562.5	1.03	
			0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	2437	2618	2527.5	2546	2656	2601.0	0.97	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	2278	2280	2279.0	2262	2291	2276.5	1.00	
			0.01	0.06	0.06	0.015	面積	0	15120	15940	15530.0	15810	15510	15660.0	0.99	
		牛乳	0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	14410	13860	14135.0	14380	15150	14765.0	0.96	
			0.01	0.06	0.06	0.015	面積	0	14960	13870	14415.0	15460	15050	15255.0	0.94	
		うなぎ	0.01	0.06	0.06	0.015	面積	0	3124	3038	3081.0	3043	3146	3094.5	1.00	
			0.01	0.1	0.1	0.0025	面積	0	12890	13520	13205.0	12940	13300	13120.0	1.01	
		さけ	0.01	0.2	0.2	0.005	面積	0	21890	23370	22630.0	22290	22080	22185.0	1.02	
			0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	1333	1558	1445.5	1530	1455	1492.5	0.97	
3	代謝物M2	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	1637	1655	1646.0	1757	1610	1683.5	0.98	
			0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	1224	1403	1313.5	1306	1472	1389.0	0.95	
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	1097	1288	1192.5	1367	1286	1326.5	0.90	
			0.01	0.1	0.1	0.0025	面積	0	3124	3038	3081.0	3043	3146	3094.5	1.00	
		牛の肝臓	0.01	0.1	0.1	0.0025	面積	0	12890	13520	13205.0	12940	13300	13120.0	1.01	
			0.01	0.2	0.2	0.005	面積	0	21890	23370	22630.0	22290	22080	22185.0	1.02	
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	1333	1558	1445.5	1530	1455	1492.5	0.97	
			0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	1637	1655	1646.0	1757	1610	1683.5	0.98	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	1224	1403	1313.5	1306	1472	1389.0	0.95	
			0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	1097	1288	1192.5	1367	1286	1326.5	0.90	
		牛乳	0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	14410	13860	14135.0	14380	15150	14765.0	0.96	
			0.01	0.06	0.06	0.015	面積	0	14960	13870	14415.0	15460	15050	15255.0	0.94	
うなぎ	0.01	0.06	0.06	0.015	面積	0	15120	15940	15530.0	15810	15510	15660.0	0.99			
	0.01	0.06	0.06	0.015	面積	0	14410	13860	14135.0	14380	15150	14765.0	0.96			
さけ	0.01	0.06	0.06	0.015	面積	0	5007	4866	4936.5	4640	4879	4759.5	1.04			
	0.01	0.1	0.1	0.0025	面積	0	23490	22530	23010.0	22200	21590	21895.0	1.05			
しじみ	0.01	0.06	0.06	0.015	面積	0	14960	13870	14415.0	15460	15050	15255.0	0.94			
	0.01	0.06	0.06	0.015	面積	0	3124	3038	3081.0	3043	3146	3094.5	1.00			

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。
 *2 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。
 *3 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。)
 *4 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。
 *5 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。
 *6 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 17 補正真度

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 ¹ (ppm)	添加濃度 (ppm)	真度 (%)	ピーク面積 比 (%)	補正真度 (%)	備考	
1	スピロメシフェン	牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	101.1	0.90	112.5		
			0.01	0.1	0.1	87.6	0.96	91.0		
		牛の肝臓	0.01	0.2	0.2	82.1	1.02	80.6		
			0.01	0.01	0.01	89.0	0.93	96.1		
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01	92.6	0.95	97.9		
			0.01	0.01	0.01	86.6	1.02	84.4		
		牛乳	0.01	0.01	0.01	96.3	0.95	101.2		
			0.01	0.06	0.06	83.5	0.95	88.1		
		うなぎ	0.01	0.06	0.06	90.1	0.94	95.8		
			0.01	0.06	0.06	89.7	0.96	93.5		
		さけ	0.01	0.06	0.06	89.7	0.96	93.5		
			0.01	0.1	0.1	92.8	1.04	89.4		
2	代謝物M1	牛の脂肪	0.01	0.2	0.2	101.1	1.00	101.1		
			0.01	0.01	0.01	88.2	0.95	92.9		
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01	97.3	1.03	94.1		
			0.01	0.01	0.01	102.7	0.97	105.7		
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	96.6	1.00	96.5		
			0.01	0.06	0.06	96.9	0.99	97.7		
		牛乳	0.01	0.01	0.01	90.2	0.96	94.2		
			0.01	0.06	0.06	87.2	0.94	92.3		
		うなぎ	0.01	0.06	0.06	87.2	0.94	92.3		
			0.01	0.1	0.1	98.7	1.01	98.0		
		さけ	0.01	0.2	0.2	86.7	1.02	85.0		
			0.01	0.01	0.01	88.5	0.97	91.4		
鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01	99.5	0.98	101.8				
	0.01	0.01	0.01	89.9	0.95	95.1				
鶏卵	0.01	0.01	0.01	81.8	0.90	91.0				
	0.01	0.01	0.01	81.8	0.90	91.0				
牛乳	0.01	0.01	0.01	81.8	0.90	91.0				
	0.01	0.06	0.06	87.2	0.94	92.3				
うなぎ	0.01	0.06	0.06	90.2	0.96	94.2				
	0.01	0.06	0.06	89.7	0.96	93.5				
さけ	0.01	0.06	0.06	89.7	0.96	93.5				
	0.01	0.1	0.1	92.8	1.04	89.4				
しじみ	0.01	0.06	0.06	14960	13870	14415.0	15460	15050	15255.0	0.94

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

4. 考察

試料調製時のスピロメシフェンの分解を防止するために、エタノール、ギ酸及び水混液を加えて磨砕均一化を行ったところ良好な結果が得られた。代謝物M2の抱合体の標準品が入手できなかったため、抽出法はメーカー提供資料及び薬事・食品衛生審議会資料を参考にアセトニトリル、ギ酸及び水混液並びにn-ヘキサンを用いたところ、スピロメシフェン、代謝物M1及び代謝物M2のいずれも良好な回収率が得

られた。酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：19）混液を用いた液液分配によってスピロメシフェン及び代謝物M1を有機溶媒層に、代謝物M2を水層に分画することができた。代謝物M2の抱合体の加水分解法はメーカー提供資料の方法に倣い、塩酸を加えて3時間密栓加熱することとした。加水分解の溶液は酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：1）混液に抽出を行った後、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルによる精製を検討したところ、良好な結果が得られた。

開発した方法を用いて、牛の筋肉等10食品の添加回収試験を行った結果、選択性は良好で何れの試料においても妨害ピークは認められず、スピロメシフェンの真度は82.1～101.3%、併行精度は1.9～5.6%、代謝物M1の真度は87.2～102.7%、併行精度は1.3～8.9%、代謝物M2の真度は81.8～99.5%、併行精度は2.6～7.4%の良好な結果が得られたことから、本試験法は、陸棲哺乳類に属する動物の筋肉、脂肪及び肝臓並びに魚介類、鶏卵、はちみつ等の畜水産物に適応可能であると判断された。

[結論]

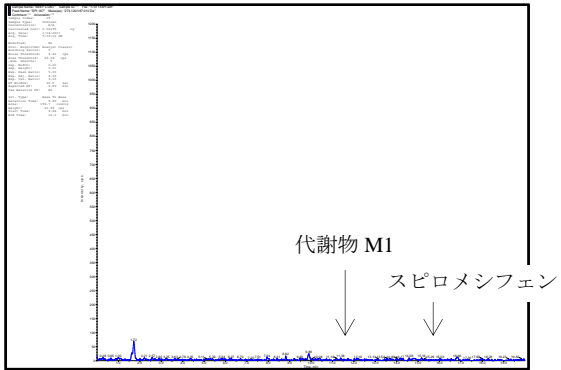
畜水産物中のスピロメシフェン、代謝物M1及び代謝物M2（抱合体を含む。）をエタノール、ギ酸及び水（9：2：9）混液で磨砕均一化した試料から*n*-ヘキサン存在下アセトニトリル、ギ酸及び水（80：1：20）混液で抽出する。酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：19）混液を用いた液液分配によりスピロメシフェン及び代謝物M1を有機層に、代謝物M2及びその抱合体を水層に分画する。有機層についてはそのまま、水層については代謝物M2の抱合体を塩酸で加水分解して代謝物M2とし、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：1）混液で抽出した後、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製し、LC-MS/MS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、鶏の筋肉、鶏卵、牛乳、はちみつ、うなぎ、さけ及びしじみに適用した結果、選択性は良好で何れの試料においても妨害ピークは認められず、スピロメシフェンの真度は82.1～101.3%、併行精度は1.9～5.6%、代謝物M1の真度は87.2～102.7%、併行精度は1.3～8.9%、代謝物M2の真度は81.8～99.5%、併行精度は2.6～7.4%、定量限界は0.01 mg/kgが可能であることが確認できた。

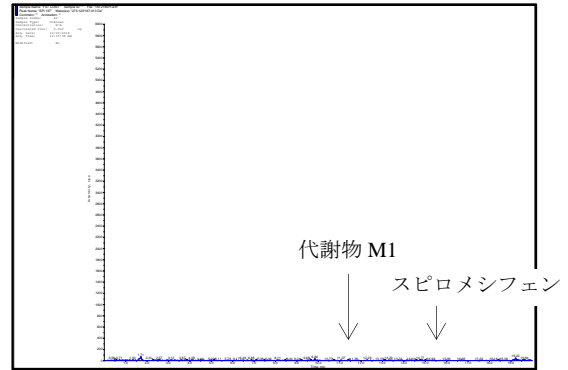
[参考文献]

- ・ ¹⁴C-BSN2060 METABOLISM IN THE LACTATING GOAT
- ・ Bayer CropScience Environmental Research 110878-1（以上 ██████████ 社提供資料）
- ・ 食品に残留する農薬等の試験法 スピロメシフェン試験法（畜水産物）
- ・ 薬事・食品衛生審議会資料

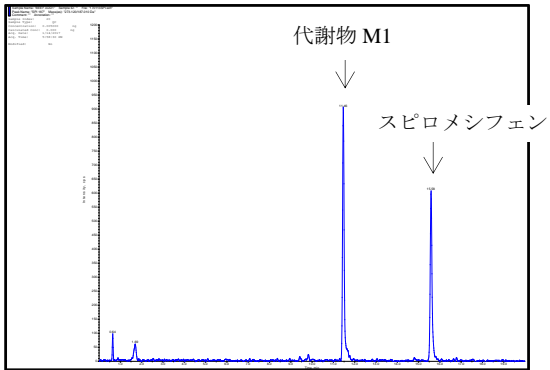
スピロメシフェン及び代謝物M1の添加回収試験におけるクロマトグラム
 ブランク



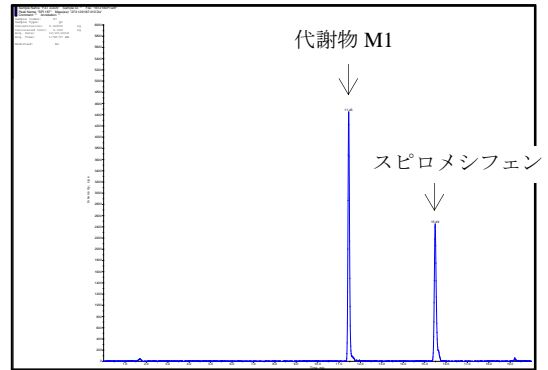
ブランク



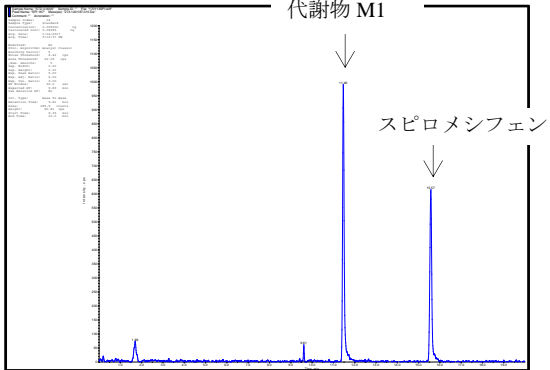
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

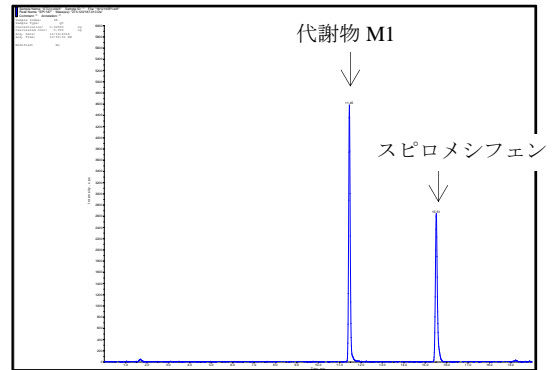
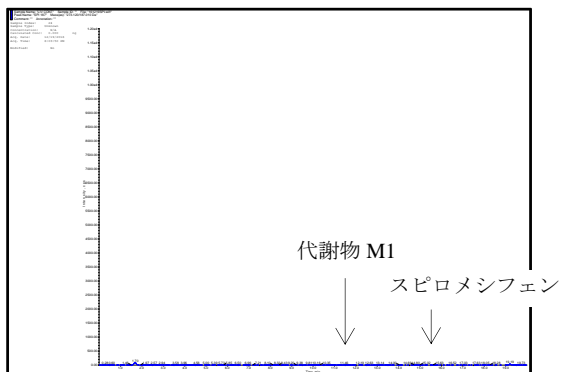


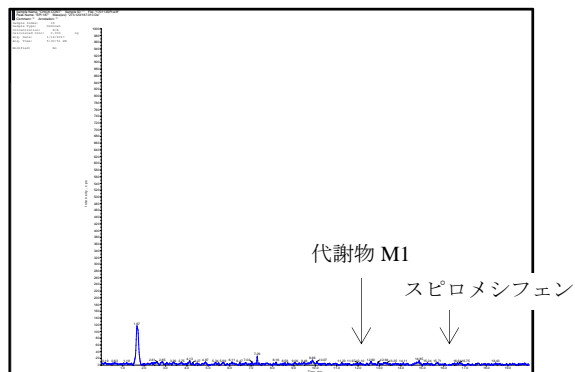
図 8-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
 スピロメシフェン及び代謝物 M1
 (m/z +273→187)
 添加濃度：0.02 ppm

図 8-2 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
 スピロメシフェン及び代謝物 M1
 (m/z +273→187)
 添加濃度：0.1 ppm

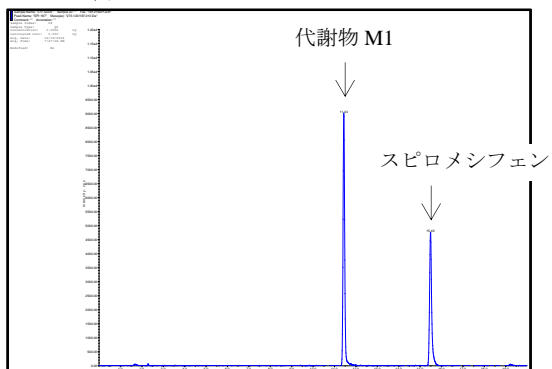
ブランク



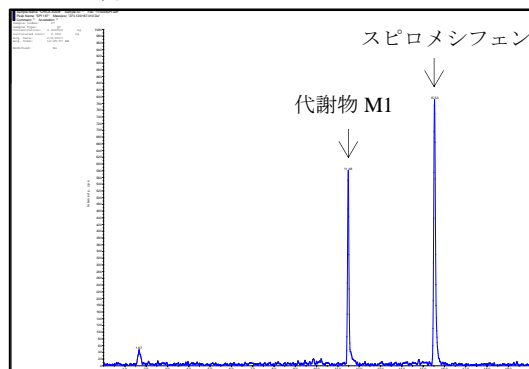
ブランク



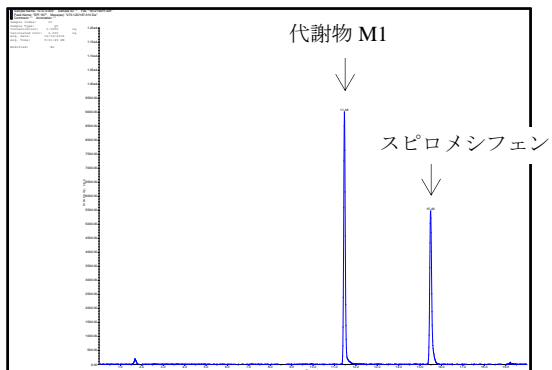
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

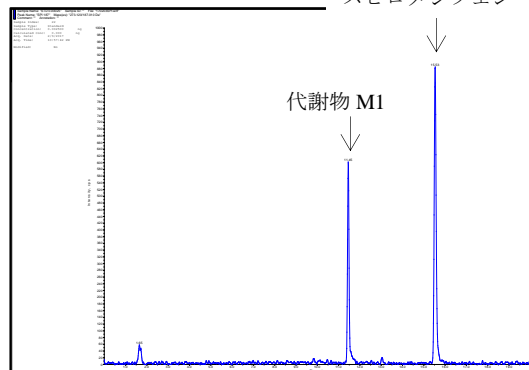


図 8-3 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
スピロメシフェン及び代謝物 M1

(m/z +273→187)

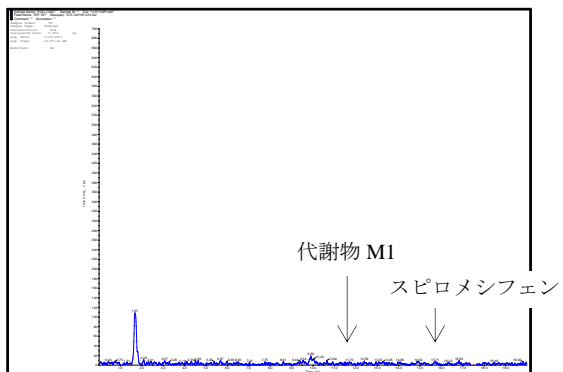
添加濃度 : 0.2 ppm

図 8-4 鶏の筋肉の SRM クロマトグラム
スピロメシフェン及び代謝物 M1

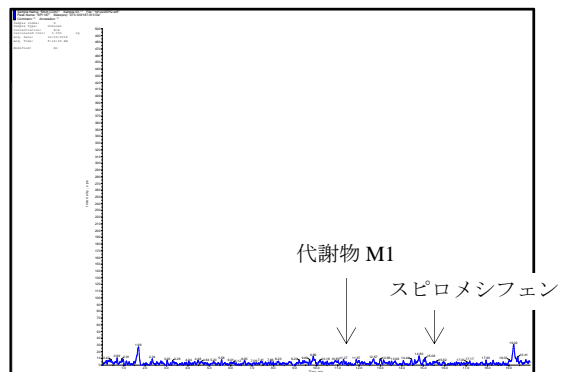
(m/z +273→187)

添加濃度 : 0.01 ppm

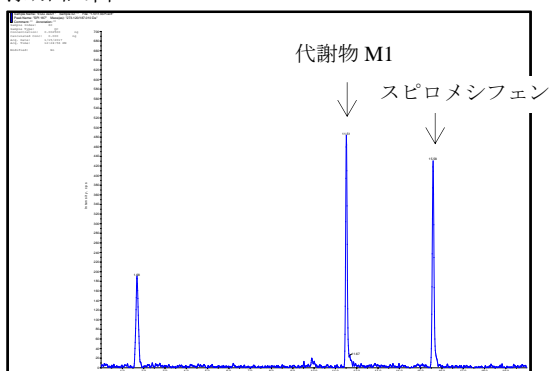
ブランク



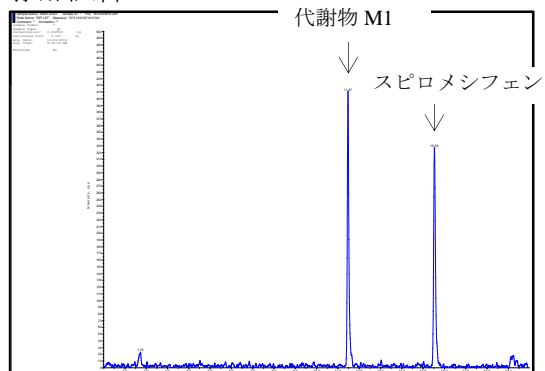
ブランク



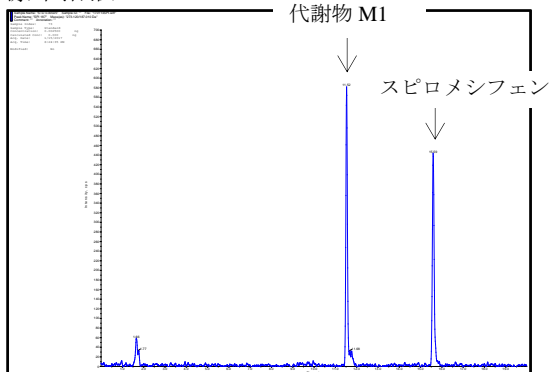
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

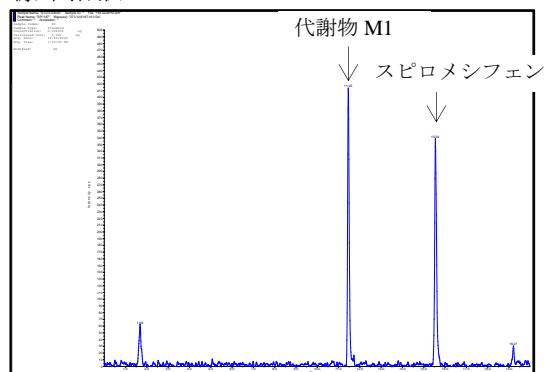


図 8-5 鶏卵の SRM クロマトグラム

スピロメシフェン及び代謝物 M1

(m/z +273→187)

添加濃度 : 0.01 ppm

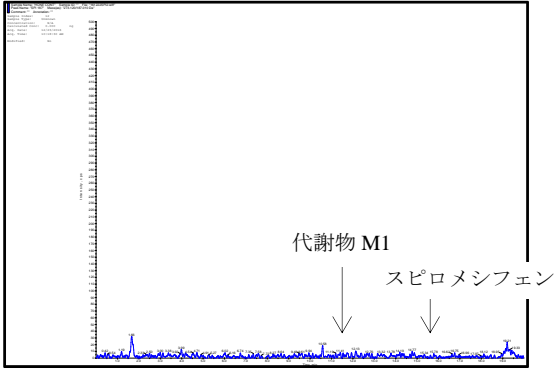
図 8-6 牛乳の SRM クロマトグラム

スピロメシフェン及び代謝物 M1

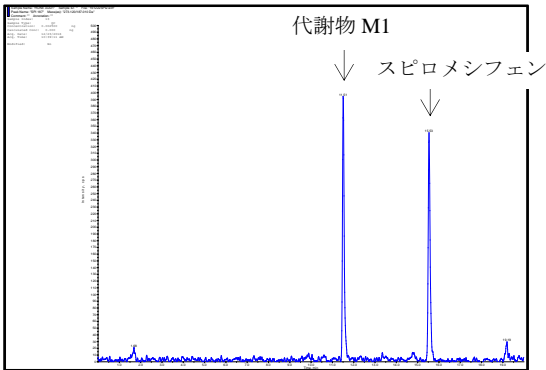
(m/z +273→187)

添加濃度 : 0.01 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

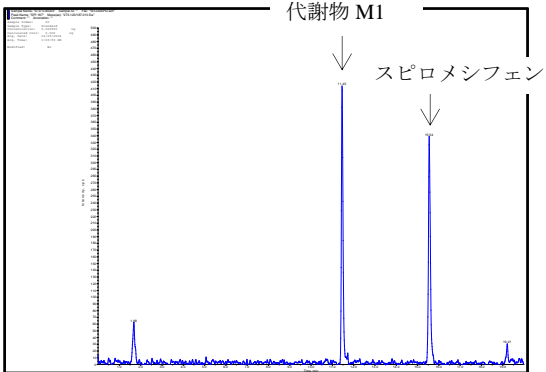
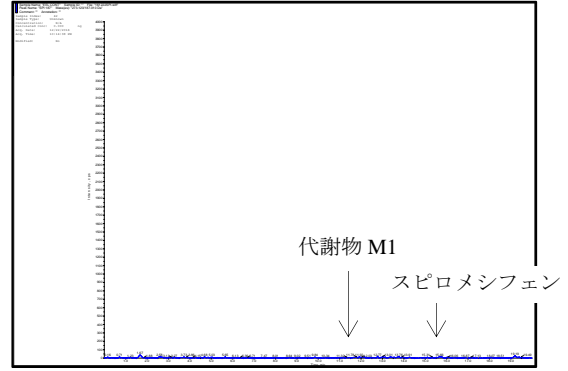


図 8-7 はちみつの SRM クロマトグラム
スピロメシフェン及び代謝物 M1

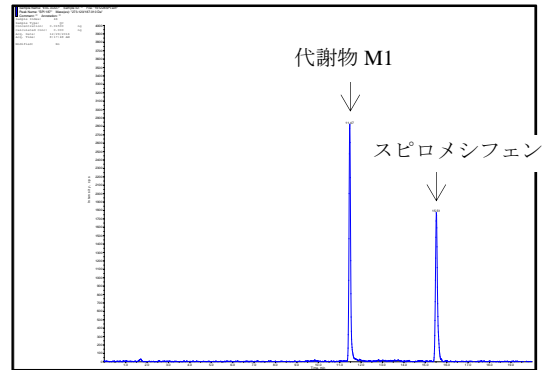
(m/z +273→187)

添加濃度 : 0.01 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

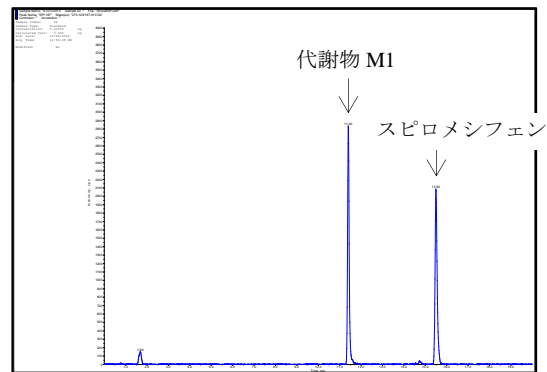
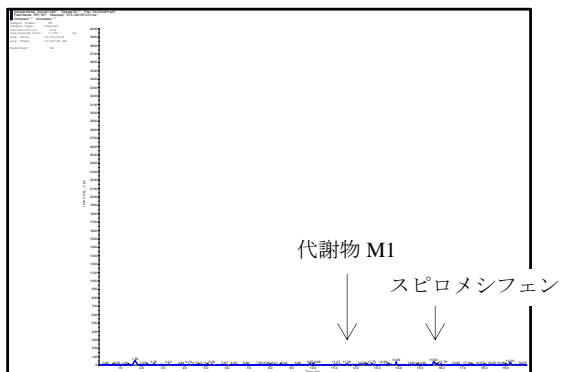


図 8-8 うなぎの SRM クロマトグラム
スピロメシフェン及び代謝物 M1

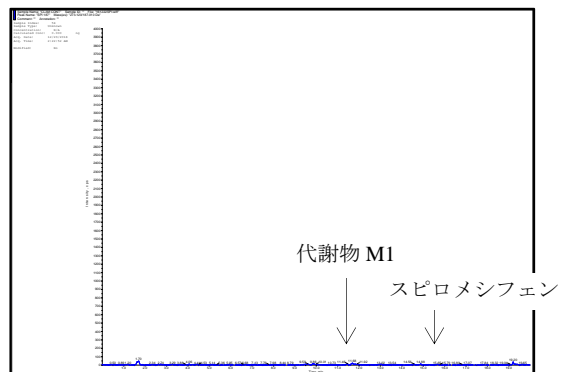
(m/z +273→187)

添加濃度 : 0.06 ppm

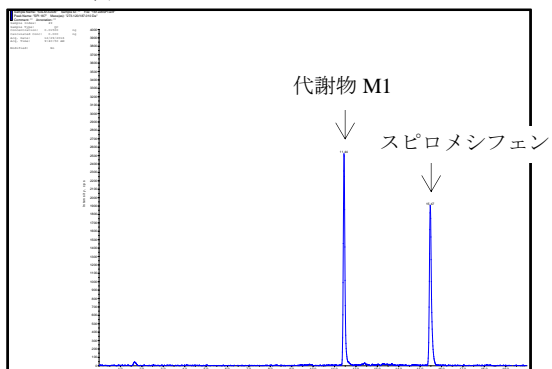
ブランク



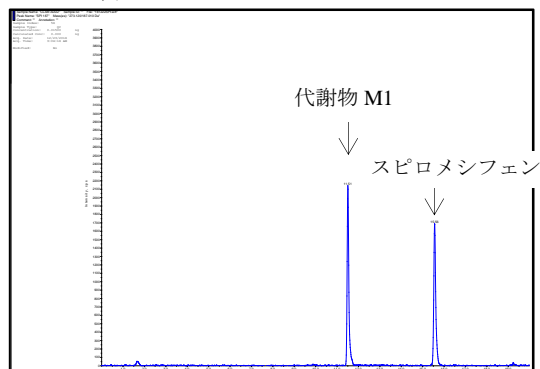
ブランク



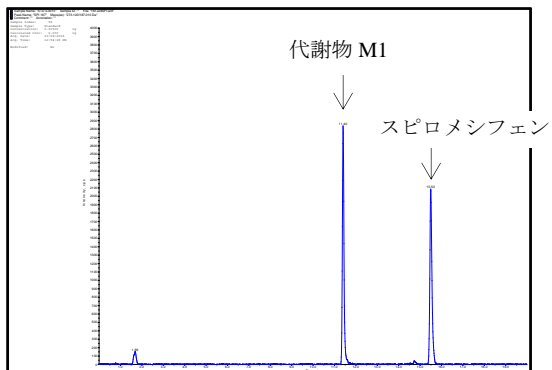
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

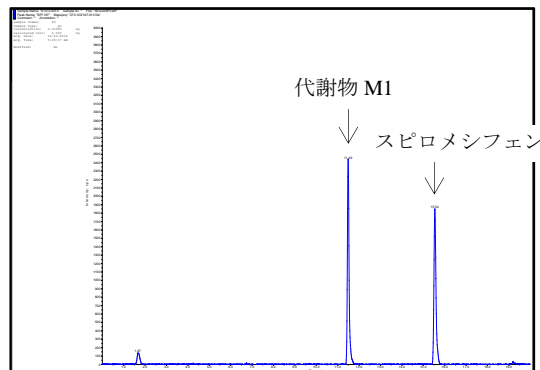


図 8-9 さけの SRM クロマトグラム

スピロメシフェン及び代謝物 M1

(m/z +273→187)

添加濃度 : 0.06 ppm

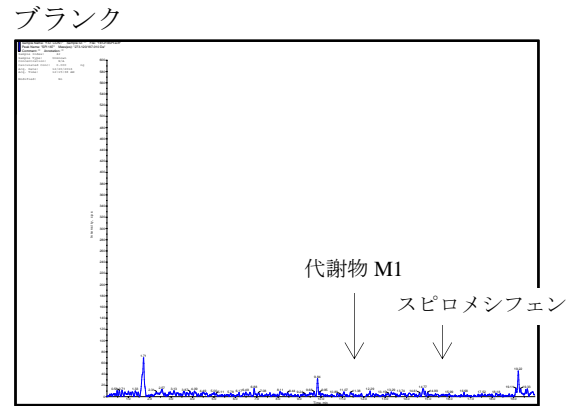
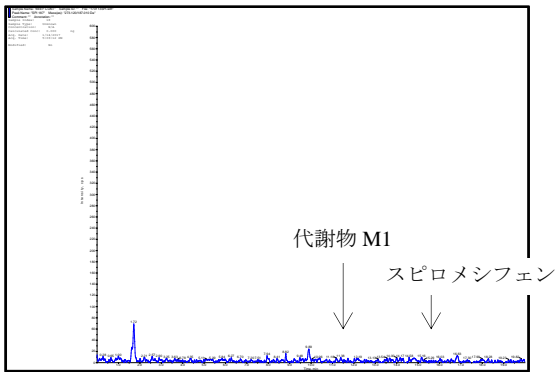
図 8-10 しじみの SRM クロマトグラム

スピロメシフェン及び代謝物 M1

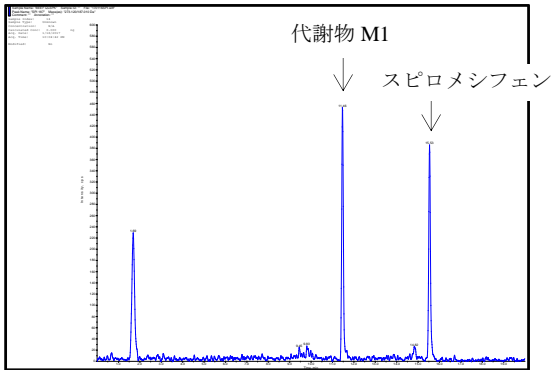
(m/z +273→187)

添加濃度 : 0.06 ppm

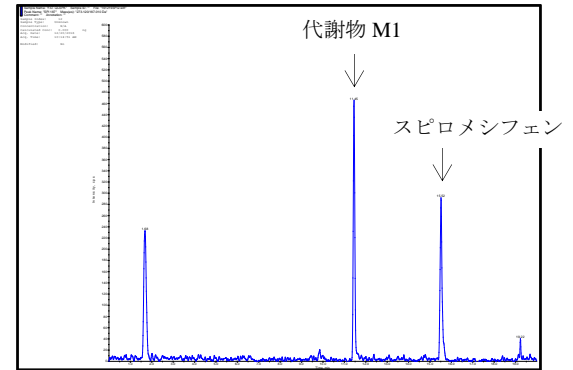
スピロメシフェン及び代謝物M1の定量限界の推定におけるクロマトグラム
 ブランク



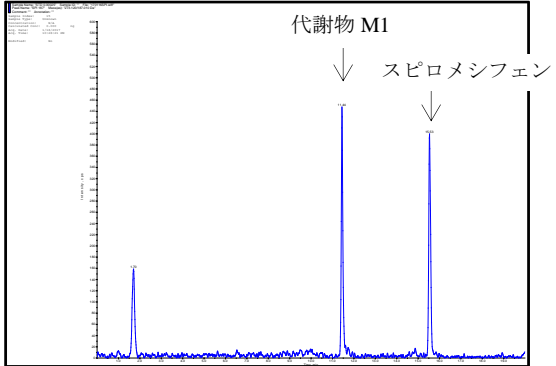
マトリックス添加標準溶液



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

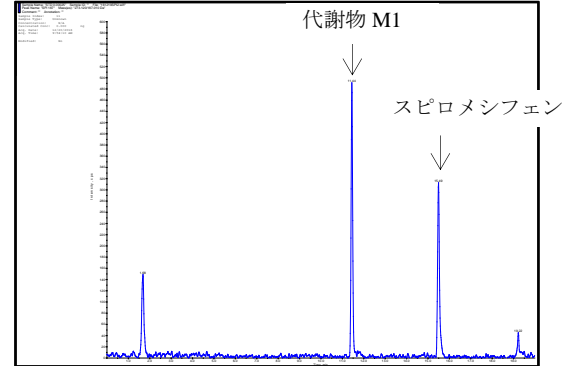
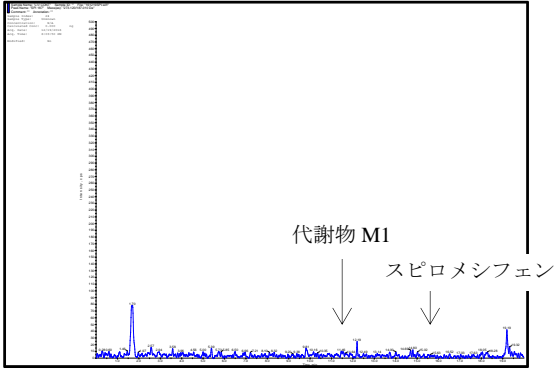


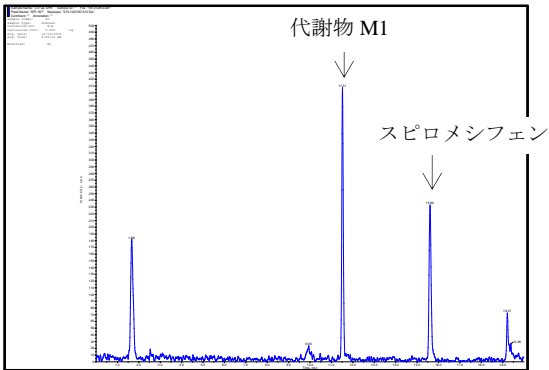
図 9-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
 スピロメシフェン及び代謝物 M1
 試料中 0.01 ppm 相当

図 9-2 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
 スピロメシフェン及び代謝物 M1
 試料中 0.01 ppm 相当

ブランク



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液

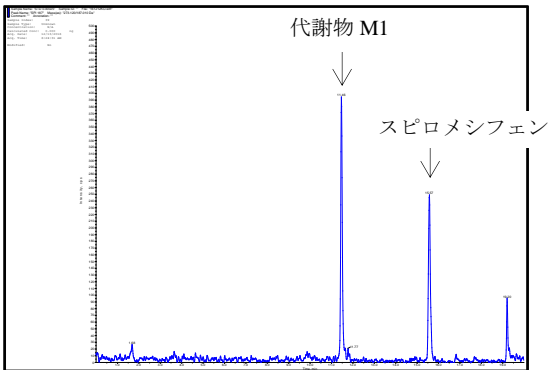
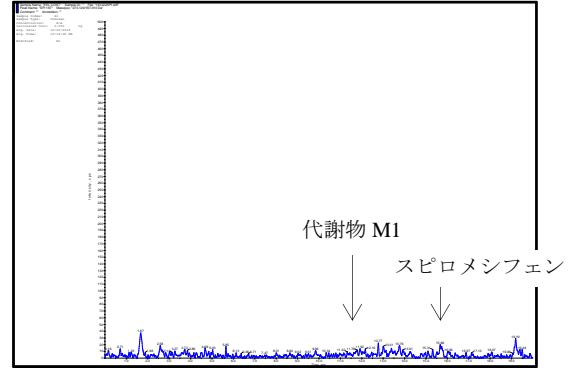
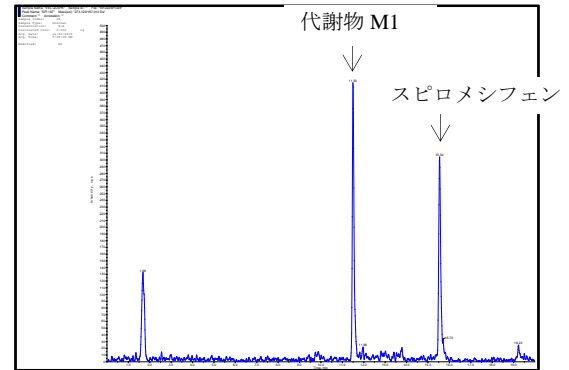


図 9-3 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
スピロメシフェン及び代謝物 M1
試料中 0.01 ppm 相当

ブランク



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液

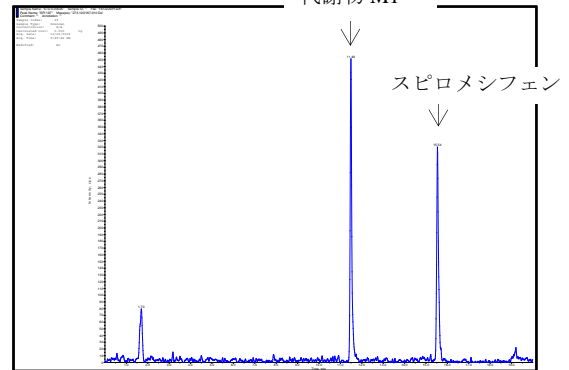
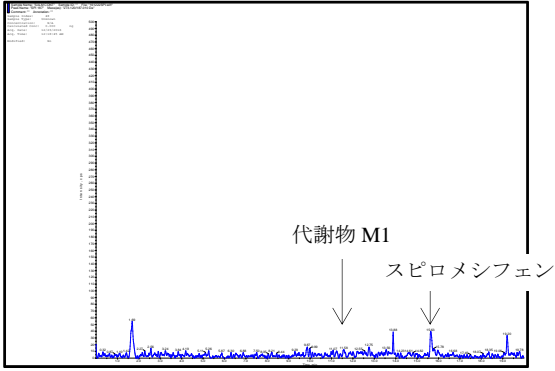
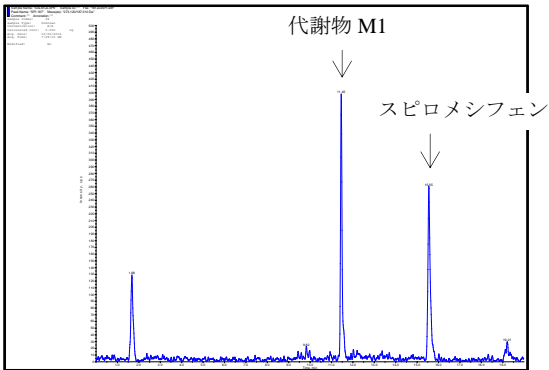


図 9-4 うなぎの SRM クロマトグラム
スピロメシフェン及び代謝物 M1
試料中 0.01 ppm 相当

ブランク



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液

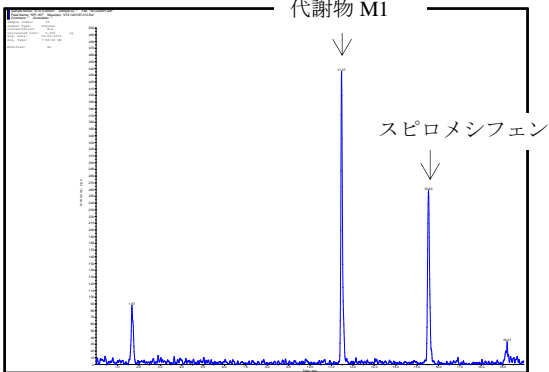
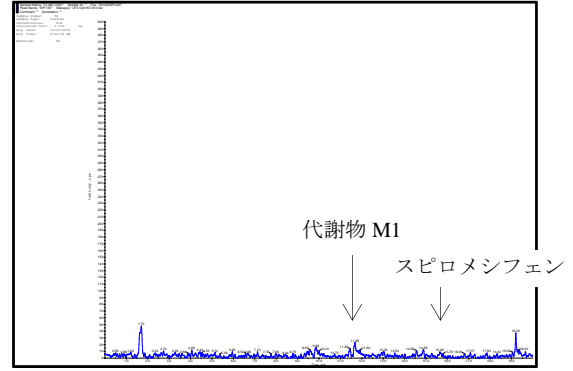
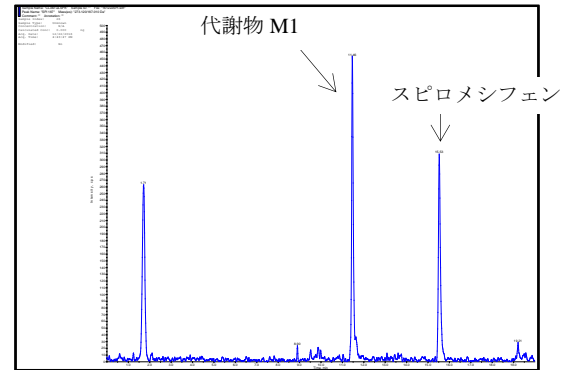


図 9-5 さけの SRM クロマトグラム
スピロメシフェン及び代謝物 M1
試料中 0.01 ppm 相当

ブランク



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液

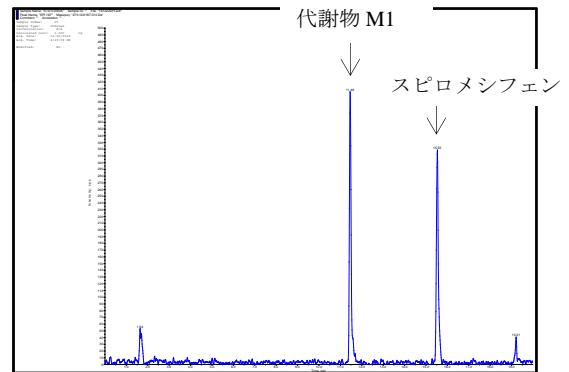
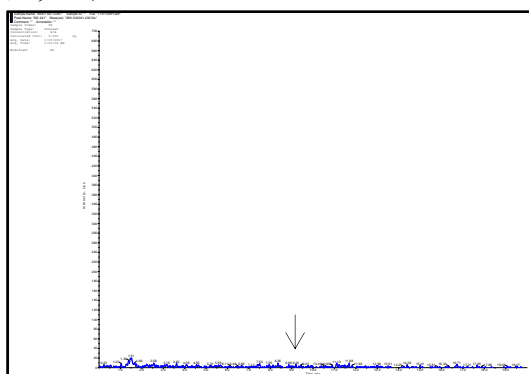
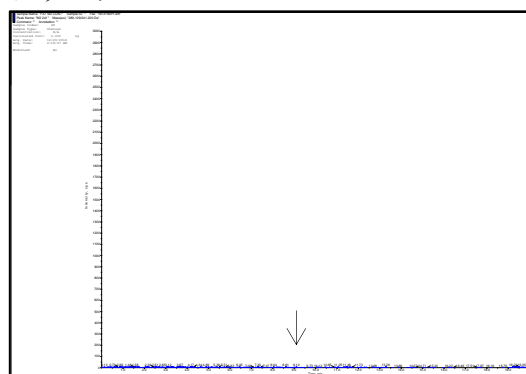


図 9-6 しじみの SRM クロマトグラム
スピロメシフェン及び代謝物 M1
試料中 0.01 ppm 相当

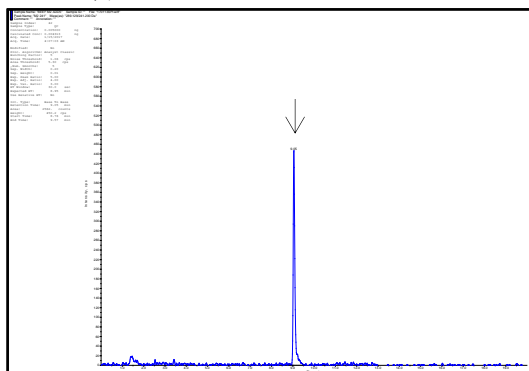
代謝物M2の添加回収試験におけるクロマトグラム
ブランク



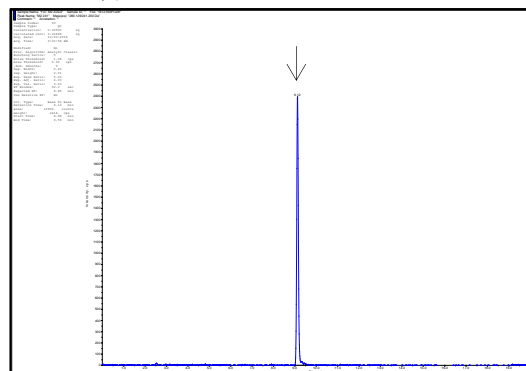
ブランク



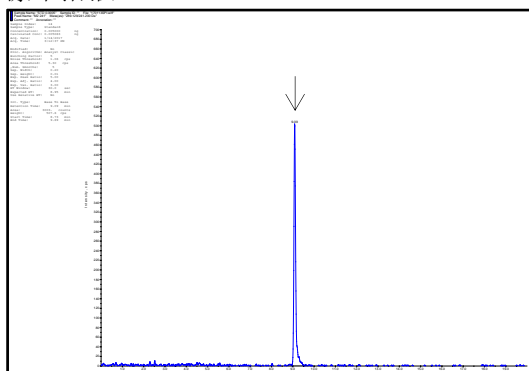
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

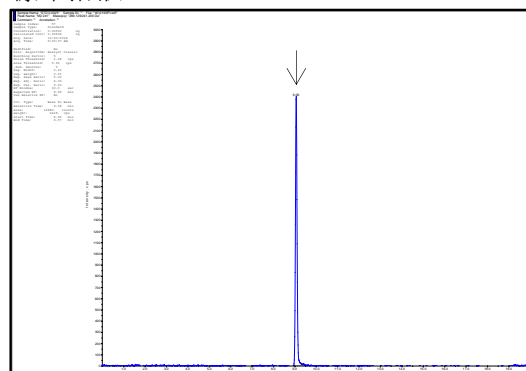
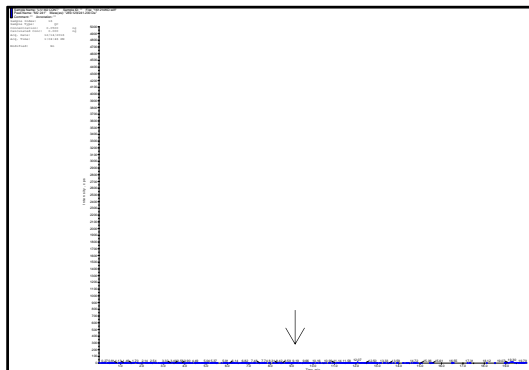


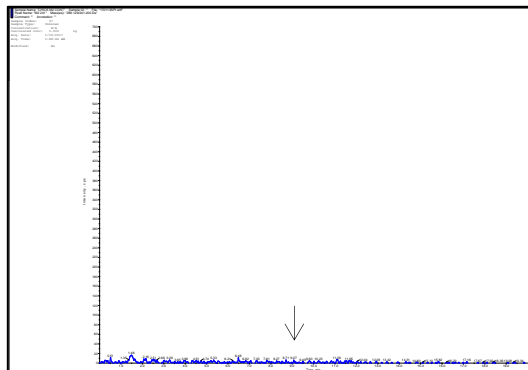
図 10-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
代謝物 M2 ($m/z +289 \rightarrow 241$)
添加濃度 : 0.02 ppm

図 10-2 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
代謝物 M2 ($m/z +289 \rightarrow 241$)
添加濃度 : 0.1 ppm

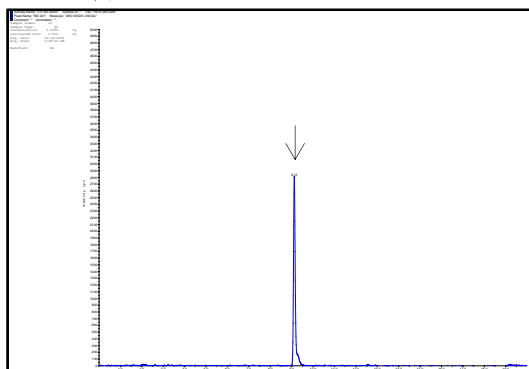
ブランク



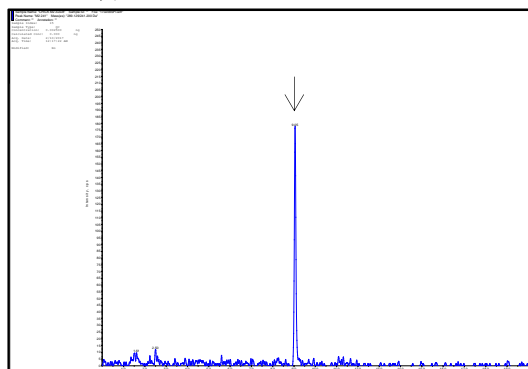
ブランク



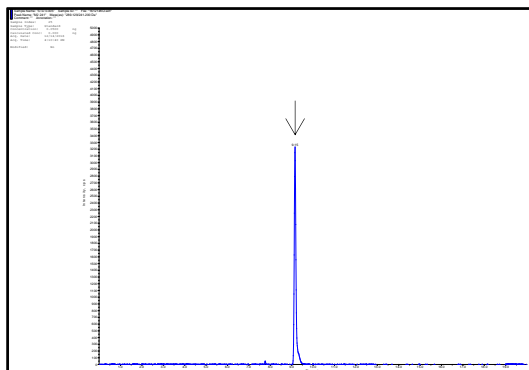
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

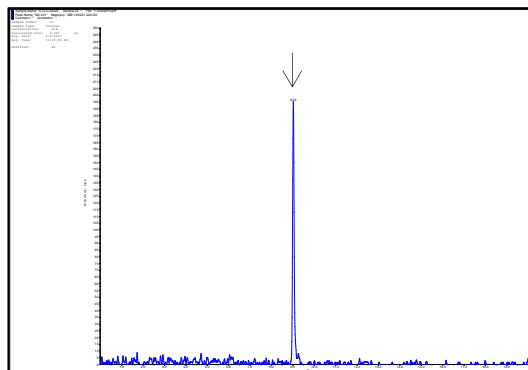
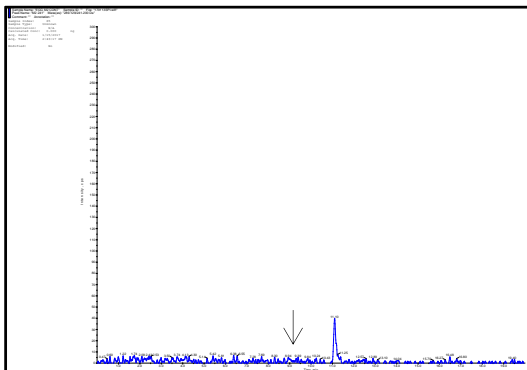


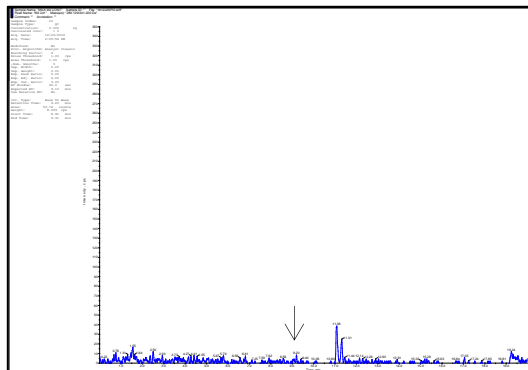
図 10-3 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
代謝物 M2 (m/z +289→241)
添加濃度 : 0.2 ppm

図 10-4 鶏の筋肉の SRM クロマトグラム
代謝物 M2 (m/z +289→241)
添加濃度 : 0.01 ppm

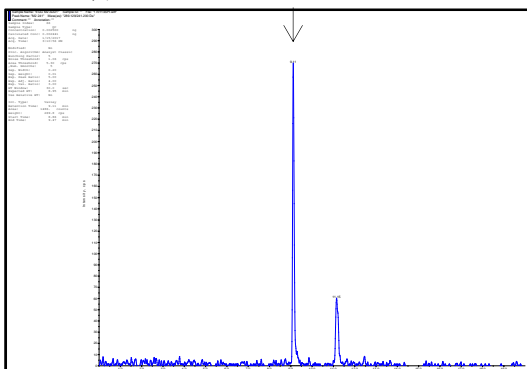
ブランク



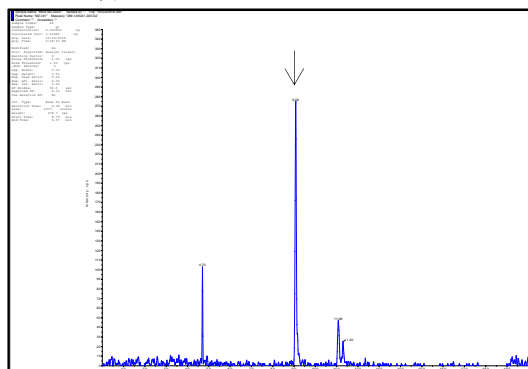
ブランク



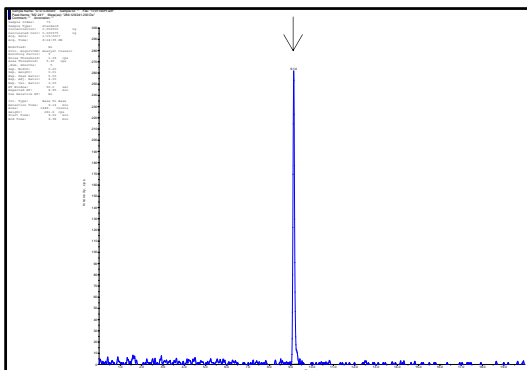
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

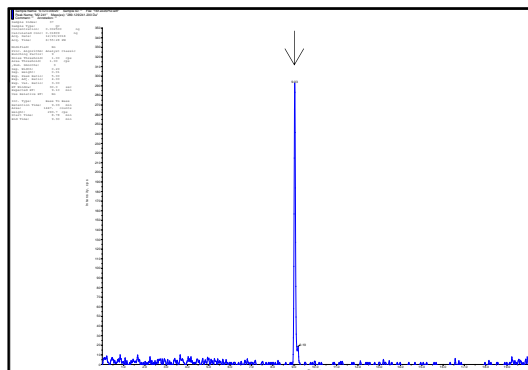
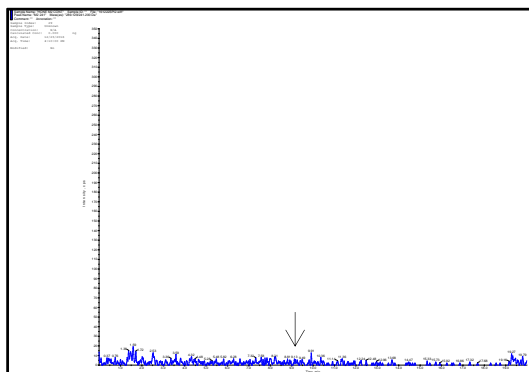


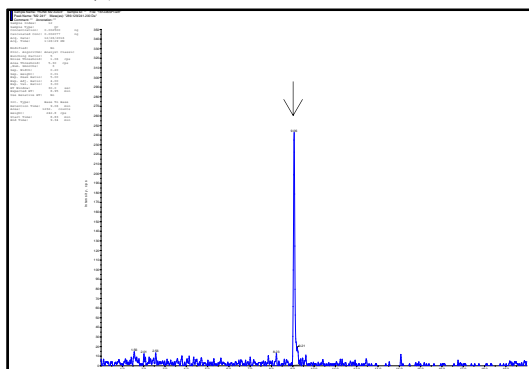
図 10-5 鶏卵の SRM クロマトグラム
代謝物 M2 (m/z +289→241)
添加濃度 : 0.01 ppm

図 10-6 牛乳の SRM クロマトグラム
代謝物 M2 (m/z +289→241)
添加濃度 : 0.01 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

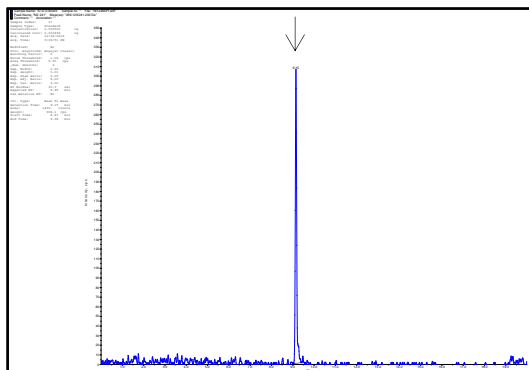
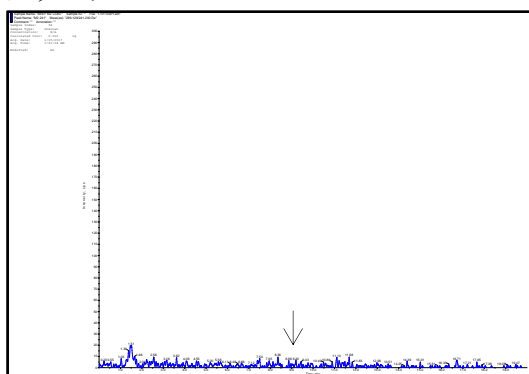
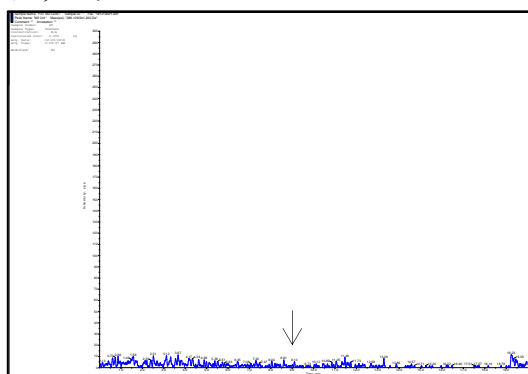


図 10-7 はちみつの SRM クロマトグラム
代謝物 M2 (m/z +289→241)
添加濃度 : 0.01 ppm

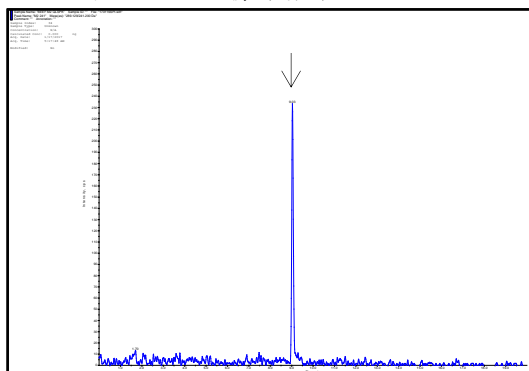
代謝物M2の定量限界の推定におけるクロマトグラム
 ブランク



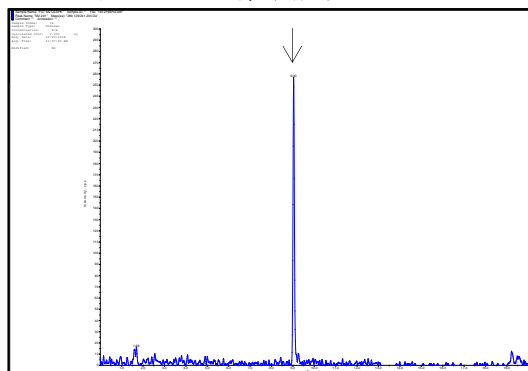
ブランク



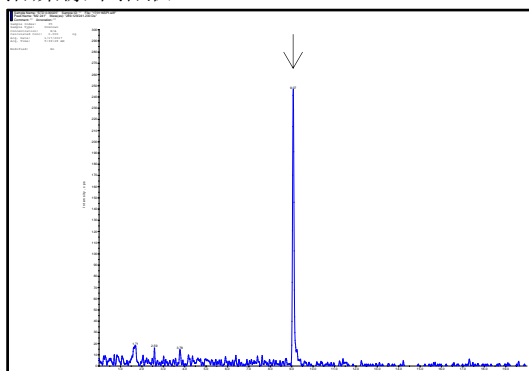
マトリックス添加標準溶液



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

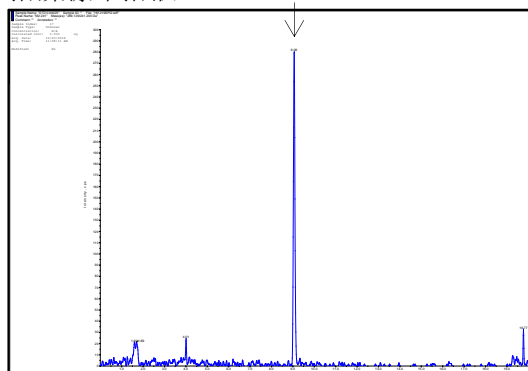
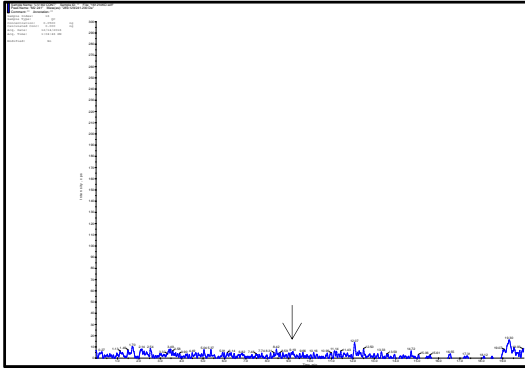


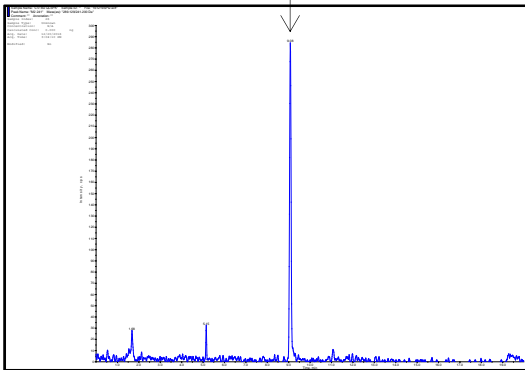
図 11-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
 代謝物 M2 ($m/z +289 \rightarrow 241$)
 試料中 0.01 ppm 相当

図 11-2 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
 代謝物 M2 ($m/z +289 \rightarrow 241$)
 試料中 0.01 ppm 相当

ブランク



マトリクス添加標準溶液



溶媒標準溶液

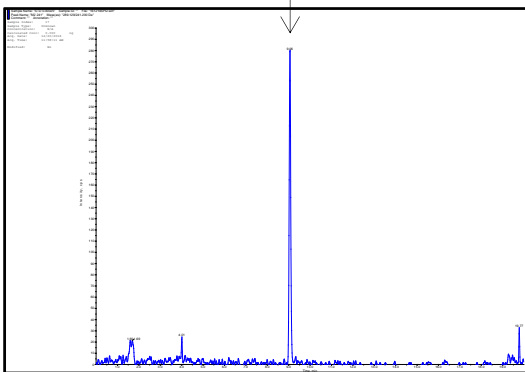
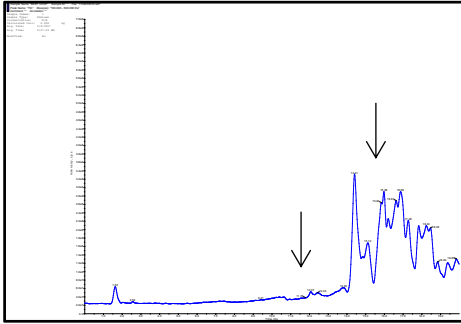
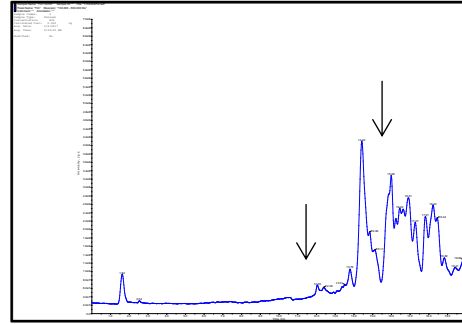


図 11-3 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
代謝物 M2 (m/z +289→241)
試料中 0.01 ppm 相当

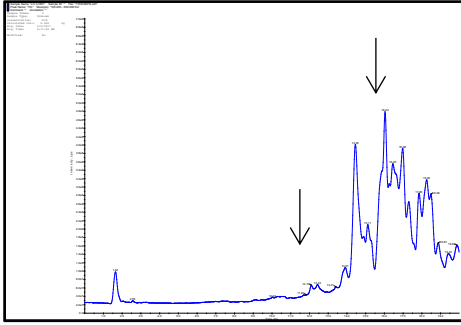
牛の筋肉



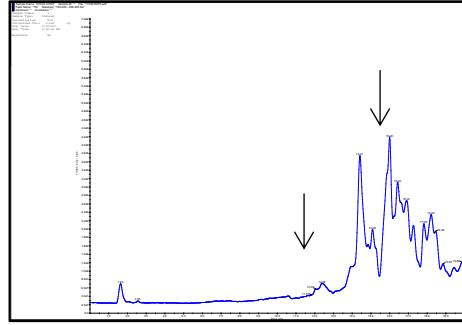
牛の脂肪



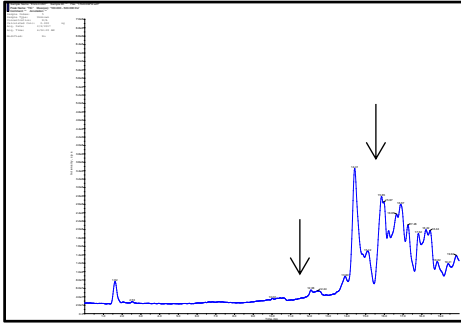
牛の肝臓



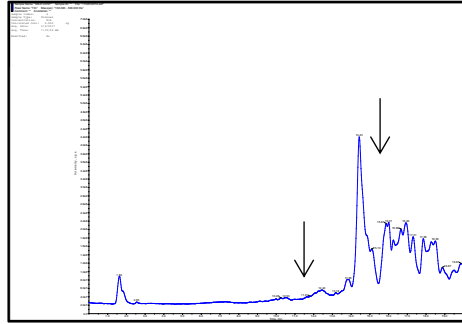
鶏の筋肉



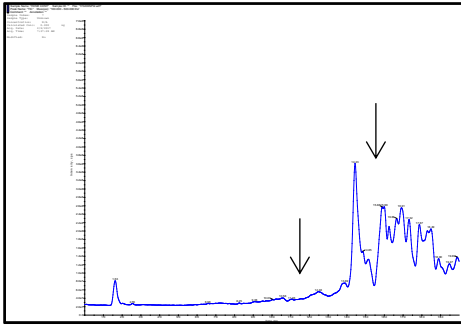
鶏卵



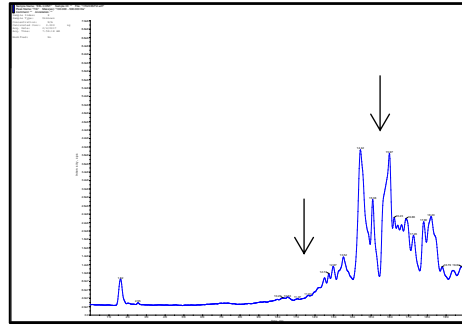
牛乳



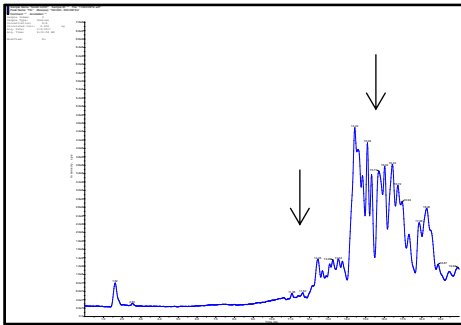
はちみつ



うなぎ



さけ



しじみ

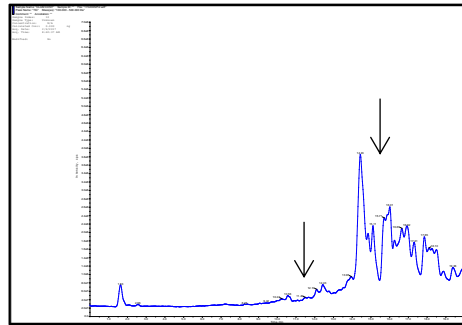
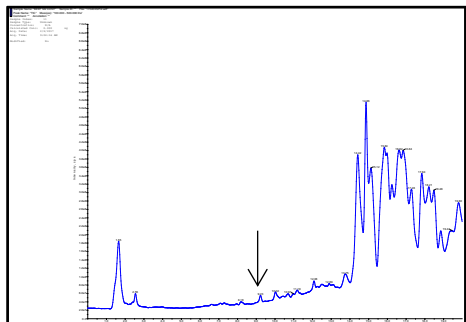
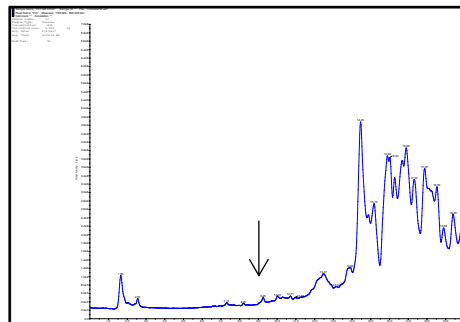


図 12 スピロメシフェン及び代謝物 M1 のブランク試料のトータルイオンクロマトグラム (スキャン範囲：100～500 m/z)

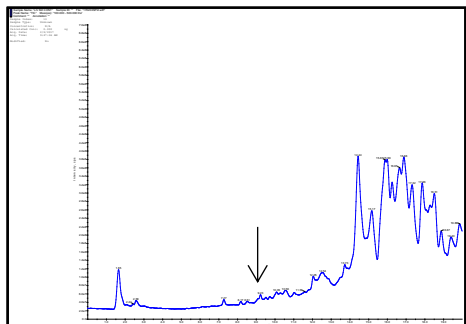
牛の筋肉



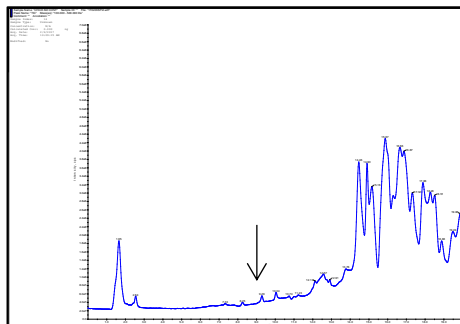
牛の脂肪



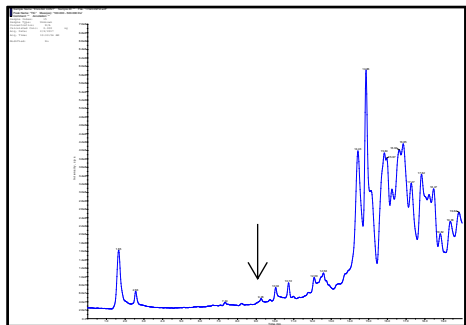
牛の肝臓



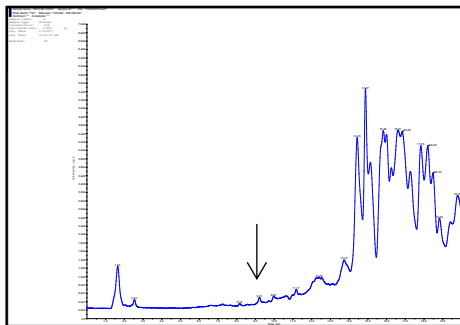
鶏の筋肉



鶏卵



牛乳



はちみつ

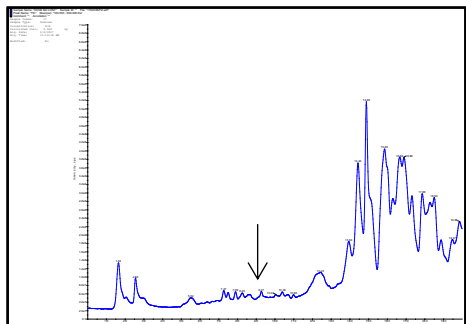


図 13 代謝物 M2 のブランク試料のトータルイオンクロマトグラム
(スキャン範囲：100～500 m/z)