

スピネトラム試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

スピネトラム-J
スピネトラム-L

2. 適用食品

農産物

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。

シクロヘキシルシリル化シリカゲルカラム（500 mg） 内径8～9 mmのポリエチレン製のカラム管に、シクロヘキシルシリル化シリカゲル500 mgを充填したもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

スピネトラム-J標準品 本品はスピネトラム-J 95%以上を含む。

スピネトラム-L標準品 本品はスピネトラム-L 90%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 穀類、豆類及び種実類の場合

試料10.0 gに水20 mLを加え、30分間放置する。これに1 vol%ギ酸2 mL及びアセトン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、アセトン2 mL及び水20 mLを加える。

② 果実及び野菜の場合

試料20.0 gに1 vol%ギ酸2 mL及びアセトン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1 mLを分取し、アセトン3 mL及び水20 mLを加える。

③ 茶の場合

試料5.00 gに水20 mLを加え、30分間放置する。これに1 vol%ギ酸2 mL及びアセトン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、水20 mLを加える。

2) 精製

シクロヘキ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5 mL及び水5 mLを順次注入し、流出液は捨てる。このカラムに1)で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル20 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトニトリル及びアンモニア水（49：1）混液10 mLを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトニトリル及び水（1：1）混液に溶解し、正確に4 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

スピネトラム-J標準品及びスピネトラム-L標準品をそれぞれアセトンに溶解して500 mg/Lとし標準原液とする。各標準原液を適宜混合してアセトニトリル及び水（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0.00025 mg/Lである。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線でスピネトラム-J及びスピネトラム-Lの含量を求める。

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2 mmol/L酢酸アンモニウム溶液（17：3）混液

イオン化モード：ESI (+)

主なイオン (*m/z*)

スピネトラム-J：プリカーサーイオン 749、プロダクトイオン 142、98

スピネトラム-L：プリカーサーイオン 761、プロダクトイオン 142、98

注入量：10 µL

保持時間の目安

スピネトラム-J：12分

スピネトラム-L：14分

10. 定量限界

スピネトラム-J：0.01 mg/kg

スピネトラム-L：0.01 mg/kg

11. 留意事項

1) 試験法の概要

スピネトラム-J及びスピネトラム-Lを試料からギ酸酸性下でアセトン抽出し、シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。なお、スピネトラムは、スピネトラム-J及びスピネトラム-Lのそれぞれについて定量を行い、両者の含量の和を分析値とする。

2) 注意点

① スピネトラム-J及びスピネトラム-L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。

スピネトラム-J

定量イオン (*m/z*)：プリカーサーイオン 749、プロダクトイオン 142

定性イオン (*m/z*)：プリカーサーイオン 749、プロダクトイオン 98

スピネトラム-L

定量イオン (*m/z*)：プリカーサーイオン 761、プロダクトイオン 142

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 761、プロダクトイオン 98

- ② スピネトラム-L標準品については、試験法開発時に入手可能であった標準品の純度規格が90%以上であったため、4. では「スピネトラム-L標準品 本品はスピネトラム-L 90%以上を含む。」とされたが、入手可能な場合には純度95%以上の標準品を試験に用いるのが望ましい。
- ③ 試験法開発時に検討した食品：玄米、大豆、らっかせい、ほうれんそう、キャベツ、ばいれしょ、オレンジ、りんご、メロン及び茶

12. 参考文献

なし

13. 類型

C