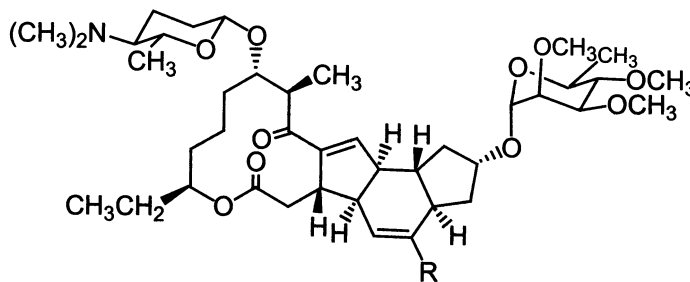


※ 本報告書は、試験法開発における検討結果をまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意ください。

## スピノサド試験法(畜水産物) の検討結果

## [緒言]

スピノサド(図-1)はダウ・ケミカル社が開発したマクロライド骨格を有する化合物で、土壌放線菌によって産生される物質(スピノシンA及びスピノシンD)を有効成分とする殺虫剤である。pHによって極性が大きく変化し、pH 7~9で極性が低くなり脂溶性が高まることから、中性~弱アルカリ性条件下でアセトン-ヘキサンを用いて畜水産物から脂肪とともに抽出し、脱脂・精製したのち、LC-MS又はLC-MS/MSで測定する分析法を検討した。



スピノシンA; R=H-  
スピノシンD; R=CH<sub>3</sub>-

図-1 スピノサドの構造式

### スピノシンAの性状

分子量: 731.98

分子式: C<sub>41</sub>H<sub>65</sub>NO<sub>10</sub>

外観: 淡灰白色結晶

融点: 84~99.5°C

蒸気圧: 0.00003 mPa (25°C)

log Pow: 2.8 (pH 5)、4.0 (pH 7)、5.0 (pH 9)

溶解性: 水 89 mg/L、ヘキサン 0.45 g/L、アセトン 17 g/L、メタノール 19 g/L、  
アセトニトリル 13 g/L (20°C、pHに依存)

安定性: 水中光分解(DT<sub>50</sub>, pH 7.0) 0.93日

(出典 The Pesticide Manual 15<sup>th</sup> ed., British Crop Production Council)

※ 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。

### スピノシンDの性状

分子量: 745.98

分子式:  $C_{42}H_{67}NO_{10}$

外観: 淡灰白色結晶

融点: 161.5~170°C

蒸気圧: 0.00002 mPa (25°C)

log Pow: 3.2 (pH 5)、4.5 (pH 7)、5.2 (pH 9)

溶解性: 水 0.5 mg/L、ヘキサン 0.7 g/L、アセトン 1 g/L、メタノール 0.25 g/L、  
アセトニトリル 0.26 g/L (20°C、pHに依存)

安定性: 水中光分解(DT<sub>50</sub>, pH 7.0) 0.82日

(出典 The Pesticide Manual 15<sup>th</sup> ed., British Crop Production Council)

## [実験方法]

### 1. 試料

市販の牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏の筋肉、さけ、うなぎ、えび、あさり、牛乳、鶏卵及びはちみつ(百花蜜)を用いた。

試料の採取方法

- 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: 可能な限り筋肉部を除き、細切均一化した。
- ③牛の肝臓: 全体を細切均一化した。
- ④鶏の筋肉: 可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した。
- ⑤さけ: 可食部(皮を含む)を細切均一化した。
- ⑥うなぎ: 活鰻を使用し、頭部を除いた可食部(内臓、骨及び皮を含む)を細切均一化した。
- ⑦えび: 外側の殻を除去し細切均一化した。
- ⑧あさり: 貝殻を除き細切均一化した。
- ⑨牛乳: 全体をよく混合して均一化した。
- ⑩鶏卵: 殻を除き卵白と卵黄を合わせてよく混合し均一化した。
- ⑪はちみつ: よく混合して均一化した。

### 2. 試薬、試液

試薬は、原則として和光純薬工業(株)の残留農薬試験用を用いた。

スピノシンA標準品(純度94.0%)及びスピノシンD標準品(純度98.1%)は、林純薬工業(株)の残留農薬試験用を用い、メタノールに溶解して1 mg/mL標準原液とし、メタノールで適宜希釈して検量線作成用の標準溶液とした。また、標準原液をアセトンで希釈し、添加回収試験用の標準溶液とした。

多孔性ケイソウ土カラム(20 mL保持用)は、Merck社製のEXtrelut NT20を用いた。

トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム(500 mg)及びエチレンジアミン-N-プロ

ピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) は、それぞれVarian社製のBond Elut-Jr SAX (500 mg) 及びBond Elut-Jr PSA (500 mg) を用い、Bond Elut-Jr PSA (500 mg) の手前にBond Elut-Jr SAX (500 mg) を連結した。

### 3. 装置および測定条件

#### 1) LC-MS

(株)島津製作所製LCMS-2010Aを用い、以下の測定条件に設定した。

カラム: (株)資生堂Capcell Pak C18 MG II (内径2 mm、長さ100 mm、粒子径3 µm)

カラム温度: 40 °C

移動相: 10 mmol/L酢酸アンモニウム水溶液－アセトニトリル(25 : 75) → Stop (20 min)

移動相流速: 0.25 mL/min

イオン化モード: ESI (+)

キャピラリー電圧: 4.5 kV

ヒートブロック温度: 200 °C

CDL温度: 250 °C

ネブライザーガス(窒素): 1.5 L/min

ドラインガス(窒素): 10 L/min

測定モード(インターバル): SIM(0.6 sec)

測定イオン( $m/z$ ): 732, 733, 142 (スピノシンA, 8 min)

746, 747, 142 (スピノシンD, 10 min)

#### 2) LC-MS/MS

(株)島津製作所製Prominence LC及びアプライドバイオシステムズ社製API4000MS/MSを用い、以下の測定条件に設定した。

カラム: (株)資生堂Capcell Pak C18 MG II (内径2 mm、長さ100 mm、粒子径3 µm)

カラム温度: 40 °C

移動相: 10 mmol/L酢酸アンモニウム水溶液－アセトニトリル(25 : 75) → Stop (20 min)

移動相流速: 0.25 mL/min

イオン化モード: ESI (+)

キャピラリー電圧: 5.5 kV

コーンガス(窒素): 50

ターボガス(窒素): 80

ターボガス温度: 600 °C

コリジョンガス(窒素): 4

測定モード: MRM

MRM条件等

成分名	測定イオン( $m/z$ )	DP	EP	CE	CXP
-----	----------------	----	----	----	-----

スピノシンA (8 min)	732→142(定量)	31	10	39	10
	732→98(定性)	31	10	97	8
スピノシンD (10 min)	746→142(定量)	101	10	29	12
	746→98(定性)	101	10	93	6

Dwell time: 100 msec

Pause time: 25 msec

#### 4. 試験溶液調製法

##### 1) 抽出

##### ① 筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及び魚介類の場合

筋肉、肝臓、腎臓及び魚介類は、試料を必要によりミンサーですじ切りし、フードカッターで細切均一化した20.0 gを350 mL容遠沈管に量り採った。脂肪は、試料をフードカッターで細切均一化した5.00 gを350 mL容遠沈管に量り採った。これに1mol/Lリン酸水素二カリウム水溶液20 mLを加えて30秒間ホモジナイズしたのち、アセトン-ヘキサン(1:2)100 mLを加えて2分間ホモジナイズ抽出した。毎分3,000回転で5分間遠心分離し、有機層を300 mL容三角フラスコ中に採った。残さは、ヘキサン50 mLを加えて1分間ホモジナイズ抽出したのち、同様に遠心分離し、有機層を上記の三角フラスコ中に合わせた。これに適量(20 g程度)の無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら15分間放置したのち、300 mL容ナスフラスコ中にろ過した。無水硫酸ナトリウムをアセトン-ヘキサン(1:2)20 mLで2回洗浄し、ろ液を合わせた。ろ液を40°C以下で約1 mLまで減圧濃縮し、わずかな窒素気流により溶媒を留去した。この残さをヘキサンに溶かし、正確に20 mLとしたものを試験原液とした。

##### ② 乳、卵及びはちみつの場合

必要によりフードカッターでかくはん均一化した10.0 gを350 mL容遠沈管に量り採った。これに1mol/Lリン酸水素二カリウム水溶液10 mLを加えて30秒間ホモジナイズしたのち、アセトン-ヘキサン(1:2)100 mLを加えて2分間ホモジナイズ抽出した。毎分3,000回転で5分間遠心分離し、有機層を300 mL容三角フラスコ中に採った。残さは、ヘキサン50 mLを加えて2分間ホモジナイズ抽出したのち、同様に遠心分離し、有機層を上記の三角フラスコ中に合わせた。これに適量(20 g程度)の無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら15分間放置したのち、300 mL容ナスフラスコ中にろ過した。無水硫酸ナトリウムをヘキサン20 mLで2回洗浄し、ろ液を合わせた。ろ液を40°C以下で約1 mLまで減圧濃縮し、わずかな窒素気流により溶媒を留去した。乳及び卵の場合は、この残さをヘキサンに溶かし、正確に10 mLとしたものを試験原液とした。はちみつの場合は、この残さをアセトン-ヘキサン(1:1)に溶かし、正確に10 mLとしたものを試験原液とした。

##### 2) 精製

##### ① 筋肉、脂肪、肝臓、腎臓、魚介類、乳及び卵の場合

試験原液10 mLを多孔性ケイソウ土カラム(20 mL保持用)に負荷し、10分間放置した。このケイソウ土カラムにヘキサン飽和アセトニトリル80 mLを注入し、溶出液を200 mL容ナスフラスコ中に採り、40°C以下で約1 mLまで減圧濃縮し、わずかな窒素気流により溶媒を留去した。この残さをアセトン-ヘキサン(1:1)に溶かし、正確に10 mLとした。

この溶液2 mLをあらかじめアセトン-ヘキサン(1:1)10 mLで洗浄しておいたSAX/PSA連結ミニカラム(500 mg/500 mg)に負荷して溶出液を採り、さらにアセトン-ヘキサン(1:1)10 mLで溶出した。溶出液を合わせて40°C以下で約1 mLまで減圧濃縮し、わずかな窒素気流により溶媒を留去した。この残さをメタノールに溶かし、正確に4 mL(脂肪の場合は1 mL)としたものを試験溶液(0.5 g試料/mL)とした。

## ②はちみつの場合

試験原液2 mLをあらかじめアセトン-ヘキサン(1:1)10 mLで洗浄しておいたSAX/PSA連結ミニカラム(500 mg/500 mg)に負荷して溶出液を採り、さらにアセトン-ヘキサン(1:1)10 mLで溶出した。溶出液を合わせて40°C以下で約1 mLまで減圧濃縮し、わずかな窒素気流により溶媒を留去した。この残さをメタノールに溶かし、正確に4 mLとしたものを試験溶液(0.5 g試料/mL)とした。

### 試料採取

筋肉, 肝臓, 腎臓, 魚介類 20.0 g

脂肪 5.00 g

乳, 卵, はちみつ 10.0 g

### アセトン-ヘキサン(1:2)抽出

筋肉, 肝臓, 腎臓, 魚介類, 脂肪は 1 mol/L リン酸水素二カリウム水溶液 20 mL 加え,  
乳, 卵, はちみつは 1 mol/L リン酸水素二カリウム水溶液 10 mL 加え,

30 秒間ホモジナイズ

アセトン-ヘキサン(1:2) 100 mL で 2 分間ホモジナイズ抽出

毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し, 有機層を採る

残さをヘキサン 50 mL で 1 分間ホモジナイズ抽出

毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し, 有機層を採る

有機層を合わせ, 無水硫酸ナトリウム適量を加えて脱水

無水硫酸ナトリウムをろ別

40°C以下で減圧濃縮

残さをヘキサンに溶解

(筋肉, 肝臓, 腎臓, 魚介類, 脂肪は 20 mL, 乳, 卵は 10 mL に定容)

はちみつの場合は残さをアセトン-ヘキサン(1:1)に溶解して 10 mL に定容

### 多孔性ケイソウ土カラム(20 mL 保持用)脱脂

【はちみつは, 本操作を省略】

ヘキサン溶液 10 mL を負荷

10 分間放置

ヘキサン飽和アセトニトリル 80 mL で溶出

溶出液を 40°C 以下で減圧濃縮 (約 1 mL まで)

緩やかに窒素を吹き付けて乾固

残さをアセトン-ヘキサン (1:1) に溶解して 10 mL に定容

SAX/PSA (500/500 mg) ミニカラム精製

カラムを予めアセトン-ヘキサン (1:1) 10 mL で洗淨

アセトン-ヘキサン (1:1) 溶液 2 mL を負荷

アセトン-ヘキサン (1:1) 10 mL で溶出

負荷液および溶出液を合わせ、40°C 以下で減圧濃縮 (約 1 mL まで)

緩やかに窒素を吹き付けて乾固

メタノールに溶解

(筋肉, 肝臓, 腎臓, 魚介類, 乳, 卵, はちみつは 4 mL, 脂肪は 1 mL に定容)

LC/MS(/MS) 0.5 g 試料/mL

試験法のフローチャート

## 5. 定量

スピノシンA標準品及びスピノシンD標準品の0.005、0.01、0.02、0.05、0.10及び0.20 mg/Lメタノール溶液を用時調製し、それぞれ5 µLをLC-MSに注入して、ピーク面積法で検量線を作成した。

試験溶液 (0.5 g 試料/mL) 5 µLをLC-MSに注入し、絶対検量線法を用いてスピノシンA及びスピノシンDの含量を求め、その和をスピノサドの含量とした。

### [結果及び考察]

#### 1. スピノサド試験法 (農産物) の適用性について

スピノサド試験法 (農産物) では、水-アセトニトリル (1:1) で抽出し、シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラム、次いでシリカゲルミニカラムで精製した後、HPLC-UVで測定する方法が採用されている。しかし、水-アセトニトリル (1:1) では、脂肪組織の溶解力が不足し、スピノシンA及びスピノシンDを効率よく分配しながら抽出することができないと考えられた。また、脂質成分の保持が弱いシクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製では、脱脂・精製が不十分な上に、試料によっては脂質成分の影響によってスピノシンA及びスピノシンDの一部が、試料負荷時及び洗淨時にカラムから溶出することが判明した。その上、HPLC-UVでは一律基準 (0.01 ppm) レベルを定量できないことが判明した。

#### 2. LC-MSによる農薬等の一斉試験法 (畜水産物) の適用性について

LC-MSによる農薬等の一斉試験法(畜水産物)(以下、一斉試験法)では、アセトン/ヘキサン抽出法及びゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)が採用されている。しかし、スピノシンA及びスピノシンDは、畜水産物の熟成あるいは鮮度低下などによって抽出時の液性が酸性となることで水溶性が大きく高まることから、スピノシンA及びスピノシンDの多くが残さ(水層)に残ることが判明した。また、スピノシンA及びスピノシンDは比較的大きな分子であり、GPCにおいて両成分の一部が脂質成分と重なって溶出することから、GPCによる脱脂・精製は不相当と判断した。

### 3. 新たな分析法の組み立てについて

前述したように、畜水産物によってはマトリックスの影響によってスピノシンA及びスピノシンDの抽出率が低下することから、中性～弱アルカリ性条件下でのアセトン/ヘキサン抽出法を検討することにした。

また、農産物の試験法では、原則としてアセトニトリル/ヘキサン分配による脱脂法が採用されている。しかし、畜水産物によっては多量に抽出される脂質成分を十分に除去できない上に、強固なエマルジョンが生成し、遠心分離を行っても十分に分離できないものも見受けられた。このため多孔性ケイソウ土カラムを用いて効率よく脱脂・精製する方法を検討することにした。

検討の結果、実験方法に示したようにスピノシンA及びスピノシンDを試料から1 mol/Lリン酸水素二カリウム水溶液及びアセトン-ヘキサン(1:2)で抽出→多孔性ケイソウ土カラムにより脱脂→SAX/PSAミニカラムにより精製→LC/MS(/MS)により測定する方法を採用した。

### 4. 試験溶液調製法の検討

#### 1) 抽出溶媒

一斉試験法に従って牛の筋肉からアセトン/ヘキサン法により抽出したところ、抽出率の低い試料があった(表-1)。

表-1 アセトン/ヘキサン法の抽出率(%)

項目	1回目:水20 mL, アセトン-ヘキサン(1:2)100 mL 2回目:ヘキサン50 mL
スピノシンA	79
スピノシンD	82

牛の筋肉20 gに標準品0.1 ppm添加

その残さ及び水層をろ過してアセトンの大部分を留去したのちpHを測定したところ、5.7であった。また、ろ液をメタノールで希釈してLC-MSで測定したところ、スピノシンA及びスピノシンDが20%程度残っていることが確認された。その原因として、熟成された牛肉等では乳酸、脂肪酸等が増加することによって抽出時の液性が酸性となり、スピノシンA及びスピノシンDの



水溶性が高まるものと考えられた。

抽出時に加える水20 mLのpHを1～12にしてアセトン/ヘキサン法により抽出したところ、酸性では抽出率が低く、中性～弱アルカリ条件下で抽出する必要があることが判明した(表-2及び表-3)。

表-2 pHの違いによるスピノシンAの抽出率(%)

項目	1回目:水20 mL, アセトン-ヘキサン(1:2) 100 mL	2回目:ヘキサン50 mL
pH 1	1	0
pH 4	48	20
pH 7	94	6
pH 9	95	5
pH 12	94	6

牛の筋肉20 gに標準品0.1 ppm添加

表-3 pHの違いによるスピノシンDの抽出率(%)

項目	1回目:水20 mL, アセトン-ヘキサン(1:2) 100 mL	2回目:ヘキサン50 mL
pH 1	1	0
pH 4	58	19
pH 7	95	6
pH 9	95	5
pH 12	94	6

牛の筋肉20 gに標準品0.1 ppm添加

そこで、この牛肉に①リン酸水素二カリウム水溶液(0.25、0.5及び1 mol/L)、②酢酸ナトリウム水溶液(0.25、0.5及び1 mol/L)、及び③トリメチルアミン水溶液(0.25、0.5及び1 mol/L)を20 mL加えてホモジナイズした後、同様にアセトン/ヘキサン法により抽出したところ、1 mol/Lリン酸水素二カリウム水溶液で最も良好な抽出率が得られた(表-4)。

表-4 水溶液の違いによるスピノシンA及びスピノシンDの抽出率(%)

項目	水層のpH	スピノシンA	スピノシンD
0.25 mol/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7.3	96	95
0.5 mol/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7.8	98	96
1 mol/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.1	102	100
0.25 mol/L CH <sub>3</sub> COONa	6.3	81	82
0.5 mol/L CH <sub>3</sub> COONa	6.4	88	90

1 mol/L CH <sub>3</sub> COONa	6.5	94	96
0.25 mol/L TMA	8.8	96	98
0.5 mol/L TMA	9.7	93	97
1 mol/L TMA	9.9	91	94

牛の筋肉20 gに標準品0.1 ppm添加

なお、水層のpHを測定したところ、酢酸ナトリウム水溶液は1 mol/Lを用いても液性は弱酸性を示した。また、トリメチルアミン水溶液ではケン化により脂肪酸やリン脂質が多量に生じたことから不相当と判断した。

また、一斉試験法では、液体試料に対してアセトニトリル抽出法が採用されている。しかし、①牛乳では抽出時に成分が遠沈管に強固に付着する、②ヘキサンに溶解しない成分が認められる、③多孔性ケイソウ土カラムやSAX/PSAミニカラムの溶出位置が大きく変わることがある。④LC-MSによる測定においてイオン化効率の変動が認められる(後述)など、マトリックスの影響を受けやすく、効率性や操作性等を考慮するとアセトン/ヘキサン抽出法の方が優れていると考えられた。

なお、牛乳、卵では試料10 gと半量にしても2回目のホモジナイズ抽出時にヘキサン層が固まるものがあった。そこで、2回目はホモジナイズしないでスパーテルでよくかき混ぜながら抽出することで、ヘキサン層の固化を防ぐことができた。

以上の結果から、畜水産物5~20 gに1 mol/Lリン酸水素二カリウム水溶液10~20 mLを加えてホモジナイズしたのち、アセトン-ヘキサン(1:2)100 mL、次いでヘキサン50 mLで抽出する方法を採用した。

## 2) 多孔性ケイソウ土カラムによる脱脂

上述したように多孔性ケイソウ土カラム(20 mL保持用)を用いて脱脂する方法を検討した。スピノシンA標準品及びスピノシンD標準品を牛脂及びさば油と共にヘキサンに溶かして10 mLとしたものをケイソウ土カラムに負荷して10分間放置したのち、このカラムにヘキサン飽和アセトニトリルを注入して溶出率を調査した。その結果を表-5及び表-6に示したように、スピノシンA及びスピノシンDは60 mLまでの画分に溶出し、牛脂の9割以上を除去できることが判明した。なお、さば油では8割程度の除去に留まったが、溶出した脂質成分の多くは比較的極性の高い脂肪酸と考えられた。

表-5 多孔性ケイソウ土カラムからの溶出率(%)

画分	スピノシンA		スピノシンD		牛脂	
	各画分	積算	各画分	積算	各画分	積算
0 - 10 mL	33.1	33.1	33.2	33.2	1.9	1.9
10 - 20 mL	25.0	58.1	24.2	57.4	1.5	3.4

20 - 30 mL	20.3	78.4	18.4	75.8	1.4	4.8
30 - 40 mL	13.4	91.8	14.7	90.5	1.2	6.0
40 - 50 mL	6.6	98.4	7.3	97.8	1.1	7.1
50 - 60 mL	1.4	99.8	1.8	99.6	1.0	8.1
60 - 70 mL	0.0	—	0.1	99.7	0.8	8.9
70 - 80 mL	0.0	—	0.0	—	0.7	9.6
80 - 90 mL	0.0	—	0.0	—	0.7	10.3

スピノシンA標準品及びスピノシンD標準品2 µg、及び牛脂2 g負荷

表-6 多孔性ケイソウ土カラムからの溶出率(%)

画分	スピノシンA		スピノシンD		さば油	
	各画分	積算	各画分	積算	各画分	積算
0 - 10 mL	40.1	40.1	37.5	37.5	4.3	4.3
10 - 20 mL	27.0	67.1	26.9	64.4	3.5	7.8
20 - 30 mL	18.8	85.9	19.9	84.3	2.7	10.5
30 - 40 mL	10.5	96.4	10.4	94.7	2.0	12.5
40 - 50 mL	2.7	99.1	4.6	99.3	1.5	14.0
50 - 60 mL	0.6	99.7	0.8	100.1	1.1	15.1
60 - 70 mL	0.0	—	0.0	—	0.9	16.0
70 - 80 mL	0.0	—	0.0	—	0.8	16.8
80 - 90 mL	0.0	—	0.0	—	0.8	17.6

スピノシンA標準品及びスピノシンD標準品2 µg、及びさば油2 g負荷

### 3) SAX/PSAミニカラムによる精製

多孔性ケイソウ土カラムによる脱脂後、試料をメタノールに溶解したところ不溶物が認められるものがあった。また、LC-MSではピーク割れを生じ、さけやえび等脂肪酸の多い試料では夾雑成分の影響によるイオン化抑制と考えられるピーク強度の低下が認められるものがあった。そこで、一斉試験法に準じて脂肪酸等を除去できるPSA(500 mg)ミニカラム、さらに強陰イオン交換型のSAXをPSA上部に連結したSAX/PSA(500 mg/500 mg)ミニカラムを用いて検討を進めた。その結果、SAX/PSAは、PSAに比べて弱酸性化合物である脂肪酸等の除去効果が高かったことから、SAX/PSAミニカラムによる精製を追加することにした。

上述の多孔性ケイソウ土カラムから溶出した牛脂成分及びさば油成分と共にスピノシンA標準品及びスピノシンD標準品をSAX/PSAミニカラムにアセトン-ヘキサン(1:1)2 mLで負荷し、アセトン-ヘキサン(1:1)で溶出したところ、スピノシンA及びスピノシンDは10 mLまでの画分に溶出した(表-7及び表-8)。

表-7 SAX/PSA(500 mg/500 mg)ミニカラムからの溶出率(%)

画分	スピノシンA		スピノシンD	
	各画分	積算	各画分	積算
0 - 2 mL	3.8	3.8	4.6	4.6
2 - 4 mL	70.1	73.9	72.8	77.4
4 - 6 mL	24.9	98.8	21.9	99.3
6 - 8 mL	0.3	99.1	0.8	101.1
8 - 10 mL	0.0	—	0.0	—
10 - 12 mL	0.0	—	0.0	—

スピノシンA標準品及びスピノシンD標準品0.2 µg、及び牛脂2 g相当を負荷

表-8 SAX/PSA (500 mg/500 mg)ミニカラムからの溶出率(%)

画分	スピノシンA		スピノシンD	
	各画分	積算	各画分	積算
0 - 2 mL	8.3	8.3	10.5	10.5
2 - 4 mL	82.0	90.3	85.3	95.8
4 - 6 mL	8.2	98.5	5.1	101.9
6 - 8 mL	0.3	98.8	0.0	—
8 - 10 mL	0.0	—	0.0	—
10 - 12 mL	0.0	—	0.0	—

スピノシンA標準品及びスピノシンD標準品0.2 µg、及びさば油2 g相当を負荷

## 5. 測定条件の検討

### 1) LC-MS (/MS)

スピノシンA及びスピノシンDは、中性～弱アルカリ性条件下で極性が極端に低くなりODS固定相への保持が強まることが判明したことから、酢酸アンモニウムを用いる移動相条件を検討した。一斉試験法にも採用されている一般的なLC-MS用のODSカラムであるWaters社製 Xterra MS C18 (内径2.1 mm、長さ100 mm、粒子径3.5 µm)を装着し、移動相条件を

A : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液

B : 5 mmol/L 酢酸アンモニウムメタノール

B% : 80 % 固定→Stop(20 min)

流速 : 0.25 mL/min

に設定して、標準品のメタノール溶液(1 µg/mL)を5 µL注入してスキャン測定したところ、若干ブロードぎみのピークが検出され、分離および感度が十分でないと考えられた(図-2)。また、カラム圧もかなり高くなることから(>15 MPa)、LC装置への負担も少なくないと考えられた。

そこで、カラム吸着が少なく、中性～弱アルカリ性条件下での使用に耐えるLC-MS用のODSカラムとして(株)資生堂製Capcell Pak C18 MG II (内径2.0 mm、長さ100 mm、粒子径

3  $\mu\text{m}$ )を装着し、移動相条件を

A : 10 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液

B : アセトニトリル

B% : 75 % 固定→Stop(20 min)

流速: 0.25 mL/min

に設定して、標準品のメタノール溶液(1  $\mu\text{g/mL}$ )を5  $\mu\text{L}$ 注入したところ、スピノシンA及びスピノシンDのいずれも良好なピークが得られた。また、アセトニトリルを用いたことにより、カラム圧は7 MPa程度と低くなり、分離の向上に加えて酢酸アンモニウムの濃度を低くしたことで感度も3倍程高くなった(図-3)。

MS及びMS/MS条件は、定法に従い実験方法に示した条件により最適化した(図-4～図-7)。

## 2) 検量線

LC-MS(SIM)により、スピノシンA及びスピノシンDいずれも0.005～0.5 mg/L (0.025～2.5 ng)の範囲で良好な直線性が認められた(図-8)。また、LC-MS/MS(MRM)により、スピノシンA及びスピノシンDいずれも0.001～0.5 mg/L (0.005～2.5 ng)の範囲で良好な直線性が認められた。

## 3) 定量限界

スピノシンA及びスピノシンDいずれも0.01 mg/kgであった。

## 6. 添加回収試験

本分析法により、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、さけ、うなぎ、えび、牛乳、鶏卵、鶏の筋肉、あさり及びびはちみつを用いて、スピノシンA及びスピノシンDそれぞれ0.01 ppm及び0.05 ppmでの添加回収試験を行い、その結果を表-9～表-19に示した(図-9及び図-10)。なお、本試験にはLC-MSを用いた。

表-9-1 牛の筋肉の添加回収試験結果(%)

項目	添加成分(濃度: 0.05 mg/kg)	
	スピノシンA	スピノシンD
ブランク	0.0	0.0
添加(1回目)	98.8	98.6
添加(2回目)	101.7	97.7
添加(3回目)	99.8	99.4
添加(4回目)	103.9	105.8
添加(5回目)	97.5	98.6
平均	100.3	100.0
変動係数	2.5	3.3

表-9-2 牛の筋肉の添加回収試験結果(%)

項目	添加成分(濃度: 0.01 mg/kg)	
	スピノシンA	スピノシンD
ブランク	0.0	0.0
添加(1回目)	90.0	87.0
添加(2回目)	90.2	89.8
添加(3回目)	92.6	87.2
添加(4回目)	81.6	83.0
添加(5回目)	87.8	79.8
平均	88.4	85.4
変動係数	4.7	4.6

表-10-1 牛の脂肪の添加回収試験結果(%)

項目	添加成分(濃度: 0.05 mg/kg)	
	スピノシンA	スピノシンD
ブランク	0.0	0.0
添加(1回目)	100.8	97.4
添加(2回目)	89.8	90.6
添加(3回目)	109.2	106.0
添加(4回目)	90.6	95.2
添加(5回目)	104.3	105.1
平均	98.9	98.8
変動係数	8.6	6.7

表-10-2 牛の脂肪の添加回収試験結果(%)

項目	添加成分(濃度: 0.01 mg/kg)	
	スピノシンA	スピノシンD
ブランク	0.0	0.0
添加(1回目)	90.4	98.2
添加(2回目)	87.8	91.4
添加(3回目)	92.6	94.2
添加(4回目)	96.0	86.2
添加(5回目)	82.6	84.4
平均	89.9	90.9
変動係数	5.6	6.2

表-11-1 牛の肝臓の添加回収試験結果(%)

項目	添加成分(濃度: 0.05 mg/kg)	
	スピノシンA	スピノシンD
ブランク	0.0	0.0
添加(1回目)	92.4	97.2
添加(2回目)	93.6	97.6
添加(3回目)	92.4	98.8
添加(4回目)	91.6	98.4
添加(5回目)	96.4	100.8
平均	93.3	98.6
変動係数	2.0	1.4

表-11-2 牛の肝臓の添加回収試験結果(%)

項目	添加成分(濃度: 0.01 mg/kg)	
	スピノシンA	スピノシンD
ブランク	0.0	0.0
添加(1回目)	80.0	82.2
添加(2回目)	85.6	83.2
添加(3回目)	84.4	87.0
添加(4回目)	86.4	72.8
添加(5回目)	76.4	75.4
平均	82.6	80.1
変動係数	5.1	7.3

表-12-1 さけの添加回収試験結果(%)

項目	添加成分(濃度: 0.05 mg/kg)	
	スピノシンA	スピノシンD
ブランク	0.0	0.0
添加(1回目)	100.6	102.2
添加(2回目)	96.8	99.0
添加(3回目)	99.2	96.7
添加(4回目)	94.1	96.8
添加(5回目)	101.9	102.3
平均	98.5	99.4
変動係数	3.1	2.8

表-12-2 さけの添加回収試験結果(%)

項目	添加成分(濃度: 0.01 mg/kg)	
	スピノシンA	スピノシンD
ブランク	0.0	0.0
添加(1回目)	92.2	98.6
添加(2回目)	87.8	96.2
添加(3回目)	87.6	93.2
添加(4回目)	93.8	91.0
添加(5回目)	82.0	89.8
平均	88.7	93.8
変動係数	5.2	3.9

表-13-1 うなぎの添加回収試験結果(%)

項目	添加成分(濃度: 0.05 mg/kg)	
	スピノシンA	スピノシンD
ブランク	0.0	0.0
添加(1回目)	96.8	103.6
添加(2回目)	100.8	98.0
添加(3回目)	96.4	99.2
添加(4回目)	96.8	104.8
添加(5回目)	96.8	100.4
平均	97.5	101.2
変動係数	1.9	2.9

表-13-2 うなぎの添加回収試験結果(%)

項目	添加成分(濃度: 0.01 mg/kg)	
	スピノシンA	スピノシンD
ブランク	0.0	0.0
添加(1回目)	87.4	80.4
添加(2回目)	82.0	83.8
添加(3回目)	83.0	88.4
添加(4回目)	79.6	76.2
添加(5回目)	77.8	83.8
平均	82.0	82.5
変動係数	4.5	5.5



表-14-1 えびの添加回収試験結果(%)

項目	添加成分(濃度: 0.05 mg/kg)	
	スピノシンA	スピノシンD
ブランク	0.0	0.0
添加(1回目)	97.1	95.6
添加(2回目)	84.2	91.6
添加(3回目)	97.9	97.9
添加(4回目)	92.1	90.8
添加(5回目)	94.8	97.9
平均	93.2	94.7
変動係数	5.9	3.6

表-14-2 えびの添加回収試験結果(%)

項目	添加成分(濃度: 0.01 mg/kg)	
	スピノシンA	スピノシンD
ブランク	0.0	0.0
添加(1回目)	91.0	85.2
添加(2回目)	92.2	90.8
添加(3回目)	95.6	91.0
添加(4回目)	87.4	92.0
添加(5回目)	90.0	85.8
平均	91.2	89.0
変動係数	3.3	3.6

表-15-1 牛乳の添加回収試験結果(%)

項目	添加成分(濃度: 0.05 mg/kg)	
	スピノシンA	スピノシンD
ブランク	0.0	0.0
添加(1回目)	95.6	104.1
添加(2回目)	99.2	98.8
添加(3回目)	99.4	101.7
添加(4回目)	100.6	98.3
添加(5回目)	97.2	94.5
平均	98.4	99.5
変動係数	2.0	3.7

表-15-2 牛乳の添加回収試験結果(%)

項目	添加成分(濃度: 0.01 mg/kg)	
	スピノシンA	スピノシンD
ブランク	0.0	0.0
添加(1回目)	83.0	86.6
添加(2回目)	85.0	79.6
添加(3回目)	83.6	81.6
添加(4回目)	85.2	77.8
添加(5回目)	89.2	86.6
平均	85.2	82.4
変動係数	2.8	4.9

表-16-1 鶏卵の添加回収試験結果(%)

項目	添加成分(濃度: 0.05 mg/kg)	
	スピノシンA	スピノシンD
ブランク	0.0	0.0
添加(1回目)	91.6	100.5
添加(2回目)	95.3	97.8
添加(3回目)	99.0	97.4
添加(4回目)	97.6	102.2
添加(5回目)	98.3	99.1
平均	96.4	99.4
変動係数	3.1	2.0

表-16-2 鶏卵の添加回収試験結果(%)

項目	添加成分(濃度: 0.01 mg/kg)	
	スピノシンA	スピノシンD
ブランク	0.0	0.0
添加(1回目)	85.0	86.2
添加(2回目)	87.4	89.8
添加(3回目)	84.8	88.4
添加(4回目)	82.4	86.4
添加(5回目)	91.4	86.6
平均	86.2	87.5
変動係数	3.9	1.8

表-17-1 鶏の筋肉の添加回収試験結果(%)

項目	添加成分(濃度: 0.05 mg/kg)	
	スピノシンA	スピノシンD
ブランク	0.0	0.0
添加(1回目)	103.5	98.7
添加(2回目)	103.4	99.5
添加(3回目)	107.8	93.8
添加(4回目)	102.4	97.5
添加(5回目)	103.4	97.3
平均	104.1	97.4
変動係数	2.1	2.3

表-17-2 鶏の筋肉の添加回収試験結果(%)

項目	添加成分(濃度: 0.01 mg/kg)	
	スピノシンA	スピノシンD
ブランク	0.0	0.0
添加(1回目)	80.2	93.2
添加(2回目)	85.4	85.8
添加(3回目)	89.8	88.6
添加(4回目)	82.2	89.0
添加(5回目)	87.0	76.2
平均	84.9	86.6
変動係数	4.5	7.4

表-18-1 あさりの添加回収試験結果(%)

項目	添加成分(濃度: 0.05 mg/kg)	
	スピノシンA	スピノシンD
ブランク	0.0	0.0
添加(1回目)	97.8	77.0
添加(2回目)	86.7	73.0
添加(3回目)	101.6	78.2
添加(4回目)	92.4	66.8
添加(5回目)	100.9	80.4
平均	95.9	75.1
変動係数	6.6	7.2

表-18-2 あさりの添加回収試験結果(%)

項目	添加成分(濃度: 0.01 mg/kg)	
	スピノシンA	スピノシンD
ブランク	0.0	0.0
添加(1回目)	90.8	78.4
添加(2回目)	98.0	77.4
添加(3回目)	97.4	79.8
添加(4回目)	90.2	74.0
添加(5回目)	92.0	70.8
平均	93.7	76.1
変動係数	4.0	4.8

表-19-1 はちみつの添加回収試験結果(%)

項目	添加成分(濃度: 0.05 mg/kg)	
	スピノシンA	スピノシンD
ブランク	0.0	0.0
添加(1回目)	92.0	96.8
添加(2回目)	92.4	92.4
添加(3回目)	81.2	98.4
添加(4回目)	84.4	100.8
添加(5回目)	92.0	95.6
平均	88.4	96.8
変動係数	5.9	3.2

表-19-2 はちみつの添加回収試験結果(%)

項目	添加成分(濃度: 0.01 mg/kg)	
	スピノシンA	スピノシンD
ブランク	0.0	0.0
添加(1回目)	87.6	79.4
添加(2回目)	93.2	85.8
添加(3回目)	76.6	89.6
添加(4回目)	77.8	85.6
添加(5回目)	89.8	75.0
平均	85.0	83.1
変動係数	8.7	7.0

0.05 ppm添加では、あさりのスピノシンDで回収率が75.1%とやや低かったのを除いて、良好な真度(スピノシンA:88.4~104.1%、スピノシンD:75.1~101.2%)および併行精度(スピノシンA:1.9~8.6%、スピノシンD:1.4~7.2%)が求められた。また、0.01 ppm添加でも同様に、あさりのスピノシンDで回収率が76.1%とやや低かったのを除いて、良好な真度(スピノシンA:82.0~93.7%、スピノシンD:76.1~93.8%)および併行精度(スピノシンA:2.8~8.7%、スピノシンD:1.8~7.4%)が求められた。

なお、牛乳及び鶏卵については、下記のようにアセトニトリル抽出法でも添加回収試験を行ったので、その結果を表-20~表-21に示した。

試料採取
乳, 卵 20.0 g
アセトニトリル抽出
1 mol/L リン酸水素二カリウム水溶液 20 mL 加えてホモジナイズ
アセトニトリル 100 mL で 2 分間ホモジナイズ抽出
毎分 2,500 回転で 3 分間遠心分離
上清を吸引ろ過
残さにアセトニトリル 50 mL 加えて 1 分間ホモジナイズ抽出
吸引ろ過
塩化ナトリウム10 g 加えて振とう後、静置
アセトニトリル層を分取
無水硫酸ナトリウム適量を加えて脱水
無水硫酸ナトリウムをろ別
40°C以下で減圧濃縮
多孔性ケイソウ土カラム(20 mL 保持用)脱脂
【以下同様】

表-20 牛乳の添加回収試験結果(%)

項目	添加成分(濃度: 0.05 mg/kg)	
	スピノシンA	スピノシンD
ブランク	0.0	0.0
添加(1回目)	73.2	78.1
添加(2回目)	67.0	61.9
添加(3回目)	60.3	62.3
添加(4回目)	64.3	72.6
添加(5回目)	70.2	66.6

平均	67.0	68.3
変動係数	7.5	10.2

表-21 鶏卵の添加回収試験結果(%)

項目	添加成分(濃度: 0.05 mg/kg)	
	スピノシンA	スピノシンD
ブランク	0.0	0.0
添加(1回目)	77.1	73.2
添加(2回目)	58.7	65.4
添加(3回目)	61.6	58.6
添加(4回目)	59.9	62.4
添加(5回目)	59.4	67.9
平均	63.3	65.5
変動係数	12.2	8.4

このように牛乳及び鶏卵では、回収率が63.3～68.3%と低かった。前述したようにアセトニトリル抽出法では、①牛乳では抽出時に成分が遠沈管に強固に付着する、②ヘキサンに溶解しない成分が認められる、③多孔性ケイソウ土カラムやSAX/PSAミニカラムの溶出位置が大きく変わることがある。④LC-MSによる測定においてイオン化阻害が認められる(後述)など、マトリックスの影響を受けやすく、効率性や操作性等を考慮するとアセトン/ヘキサン抽出法の方が優れていると考えられた。

## 7. 試料マトリックスの測定値に与える影響

ブランク試料溶液(0.5 g/mL)0.5 mLをバイアルに採り、窒素を吹き付けて乾固させたのち、残さに0.025 µg/mLの標準溶液0.5 mLを加えて溶解したマトリックス標準溶液と溶媒標準溶液でピーク面積値を比較したところ、表-22に示したようにあさりのスピノシンDで若干のピーク低下が認められた以外には、両者に大きな差は認められなかった。

なお、牛乳及び鶏卵gでは、前述のアセトニトリル抽出法によって得られた試料溶液でイオン化効率の変動が認められた(表-23)。

表-22 溶媒標準品とマトリックス標準品の比較

項目	マトリックス標準品/溶媒標準品(%)	
	スピノシンA	スピノシンD
牛の筋肉	98.1	100.5
牛の脂肪	99.5	101.2
牛の肝臓	104.5	98.0

さけ	100.3	99.4
うなぎ	101.7	101.8
えび	103.5	101.2
牛乳	98.4	99.4
鶏卵	104.6	102.1
鶏の筋肉	104.9	101.2
あさり	103.7	84.1
はちみつ	102.3	103.3

表-23 溶媒標準品とマトリックス標準品の比較(アセトニトリル抽出法)

項目	マトリックス標準品/溶媒標準品(%)	
	スピノシンA	スピノシンD
牛乳	139.7	111.0
鶏卵	89.2	94.5

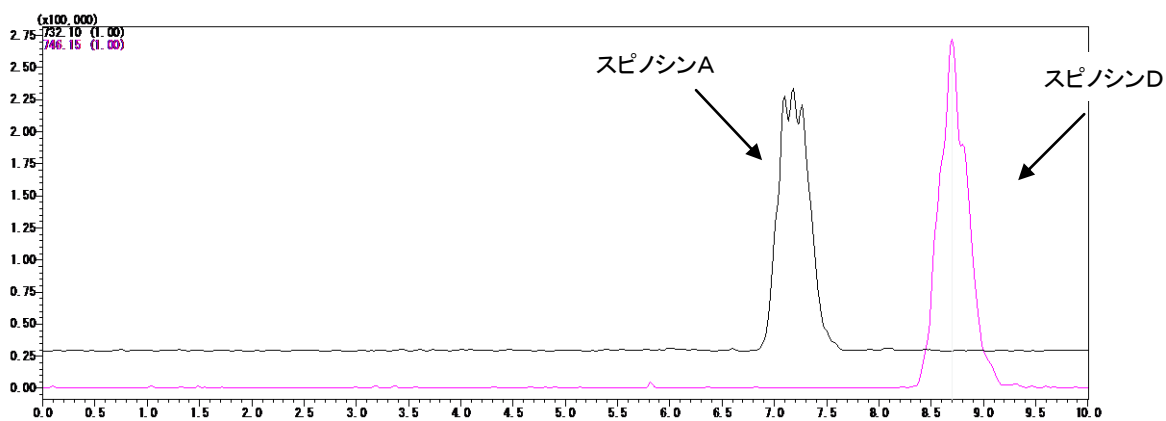
#### [結論]

スピノサド試験法(畜水産物)として、中性～弱アルカリ性条件下でアセトン/ヘキサンにより抽出、多孔性ケイソウ土カラムにより脱脂、SAX/PSAミニカラムにより精製したのち、LC/MS(/MS)により測定する方法を提案した。牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、さけ、うなぎ、えび、牛乳、鶏卵、鶏の筋肉、あさり及びはちみつの11品目に適用した場合の添加回収率および変動係数はおおむね良好であり、スピノサドの0.01 ppmでの定量分析が可能と判断された。

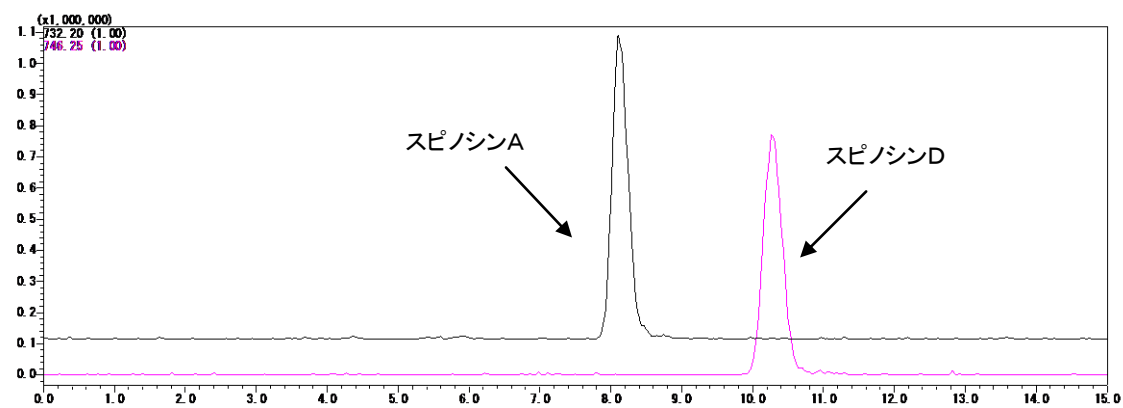
#### [参考文献]

なし

図一 標準品の LC-MS (Scan) クロマトグラム  
 Xterra MS C18 (粒径 3.5  $\mu\text{m}$ 、内径 2.1 mm、長さ 100 mm)  
 1  $\mu\text{g/mL}$  メタノール溶液を 5  $\mu\text{L}$  注入



図一 標準品の LC-MS (Scan) クロマトグラム  
 Capcell Pak C18 MG II (粒径 3  $\mu\text{m}$ 、内径 2 mm、長さ 100 mm)  
 1  $\mu\text{g/mL}$  メタノール溶液を 5  $\mu\text{L}$  注入

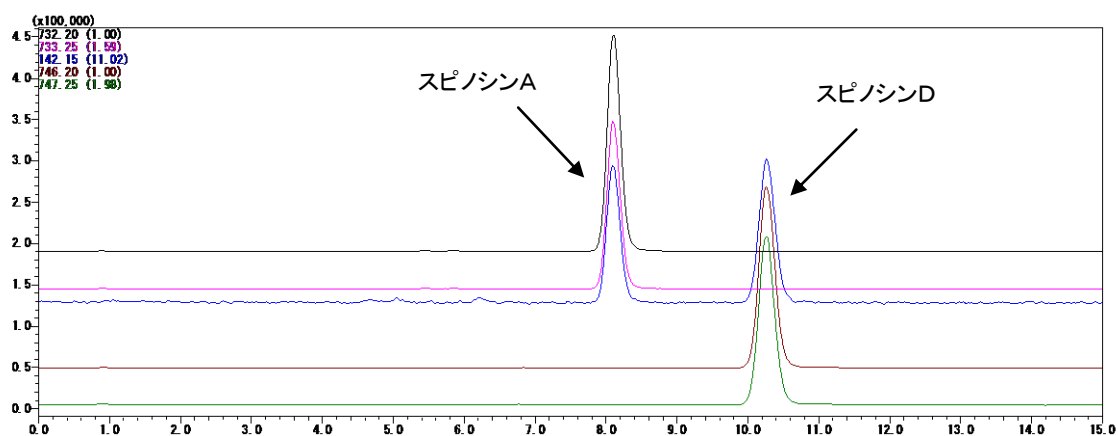




図ー 4 標準品の LC-MS (SIM) クロマトグラム

Capcell Pak C18 MG II (粒径 3  $\mu\text{m}$ 、内径 2 mm、長さ 100 mm)

0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  メタノール溶液を 5  $\mu\text{L}$  注入



図ー 5 標準品の LC-MS (Scan 100→850 m/z) スペクトル

Capcell Pak C18 MG II (粒径 3  $\mu\text{m}$ 、内径 2 mm、長さ 100 mm)

2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  メタノール溶液を 5  $\mu\text{L}$  注入

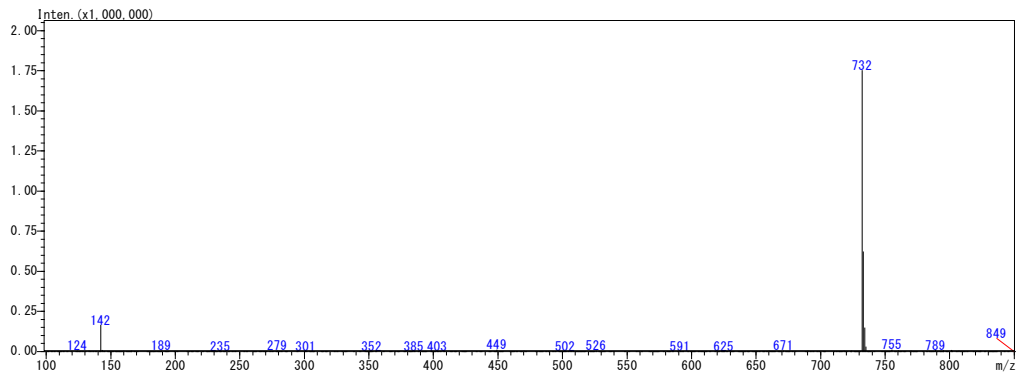
キャピラリー電圧 : 4.5 kV

CDL 電圧 : 25.0 V

Q-array DC 電圧 (コーン電圧に相当) : 50 V

Q-array RF 電圧 : 145 V

### スピノシンA



### スピノシンD

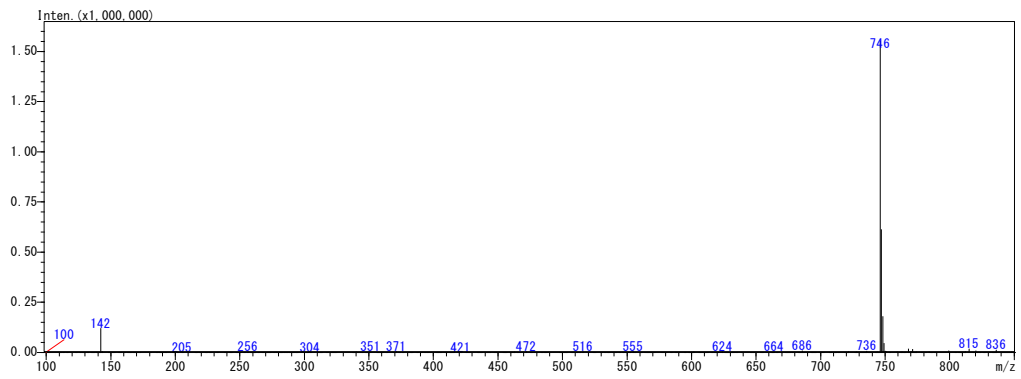


図-6 標準品の LC-MS/MS (MRM) クロマトグラム

Capcell Pak C18 MG II (粒径 3  $\mu\text{m}$ 、内径 2 mm、長さ 100 mm)

0.2  $\mu\text{g/mL}$  メタノール溶液を 5  $\mu\text{L}$  注入

TIC

スピノシンA  
↓

スピノシンD  
↓

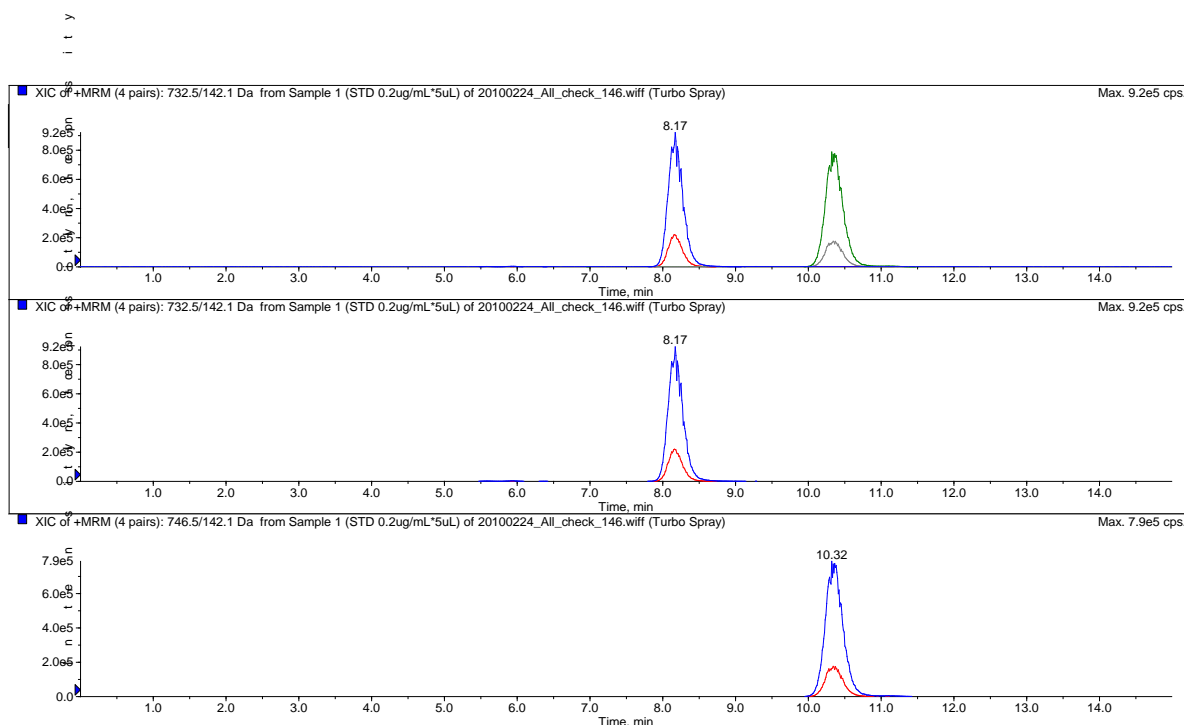


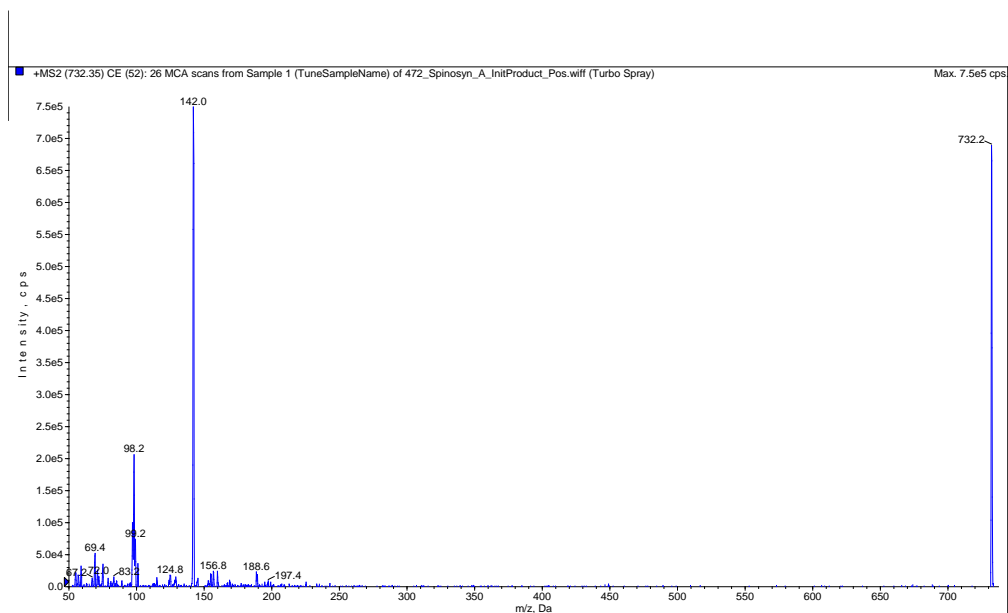
図-7 標準品の MS/MS スペクトル

0.01  $\mu\text{g/mL}$  メタノール溶液をインフュージョン注入

キャピラリー電圧: 5.5 kV

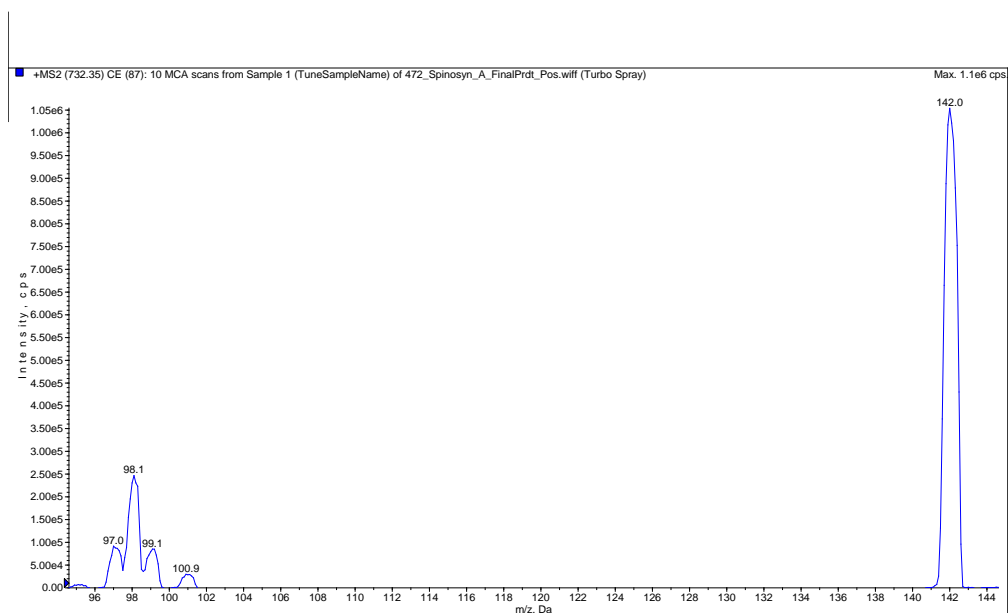
スピノシンA (初期)

DP電圧 (コーン電圧) : 60 V、コリジョンエネルギー: 0 V



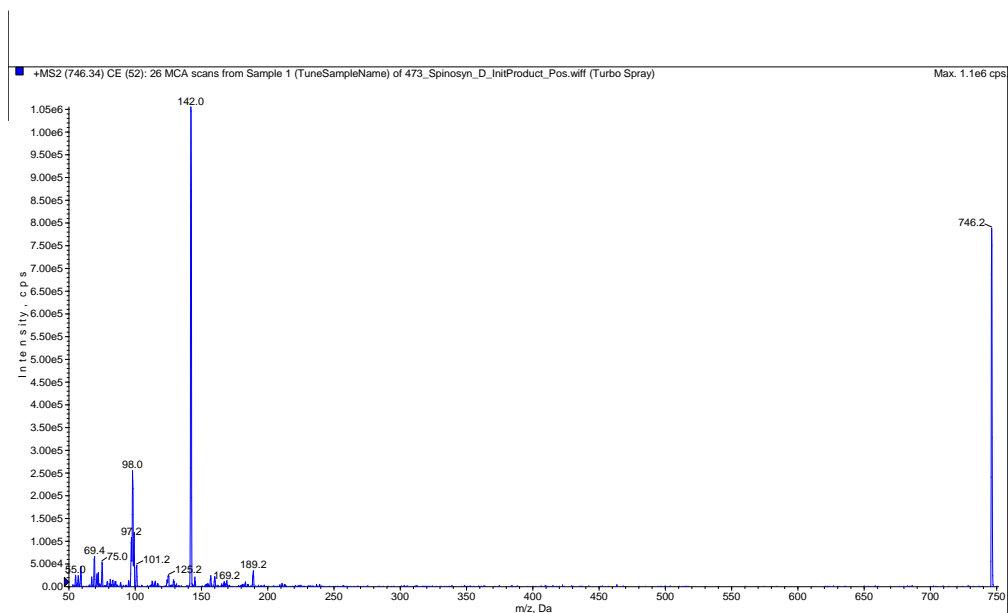
スピノシンA (最適化)

DP電圧 (コーン電圧) :31 V、コリジョンエネルギー:39 V



スピノシンD (初期)

DP電圧 (コーン電圧) :60 V、コリジョンエネルギー:0 V



スピノシンD (最適化)

DP 電圧 (コーン電圧) : 101 V、コリジョンエネルギー : 29 V

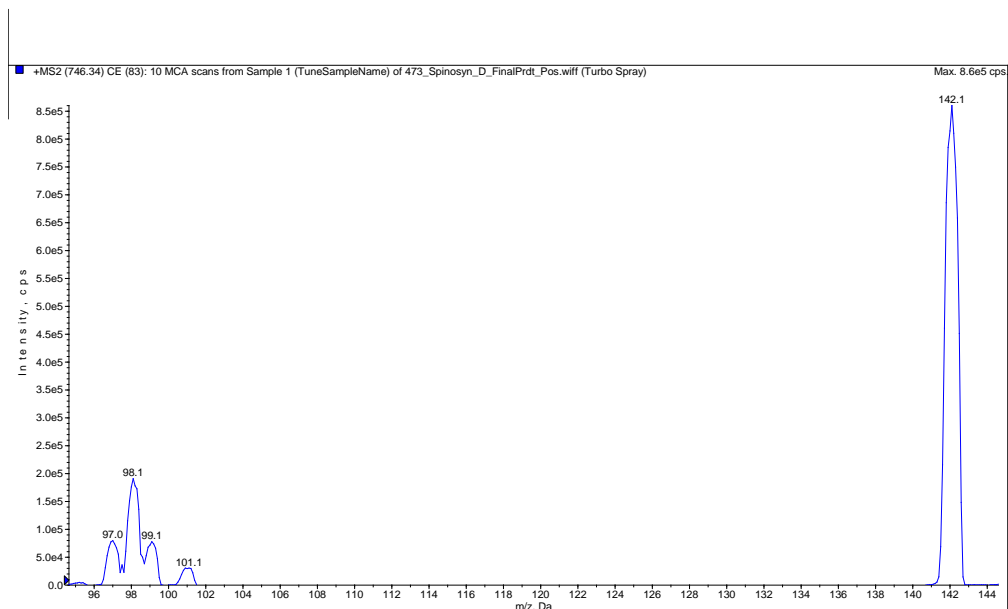


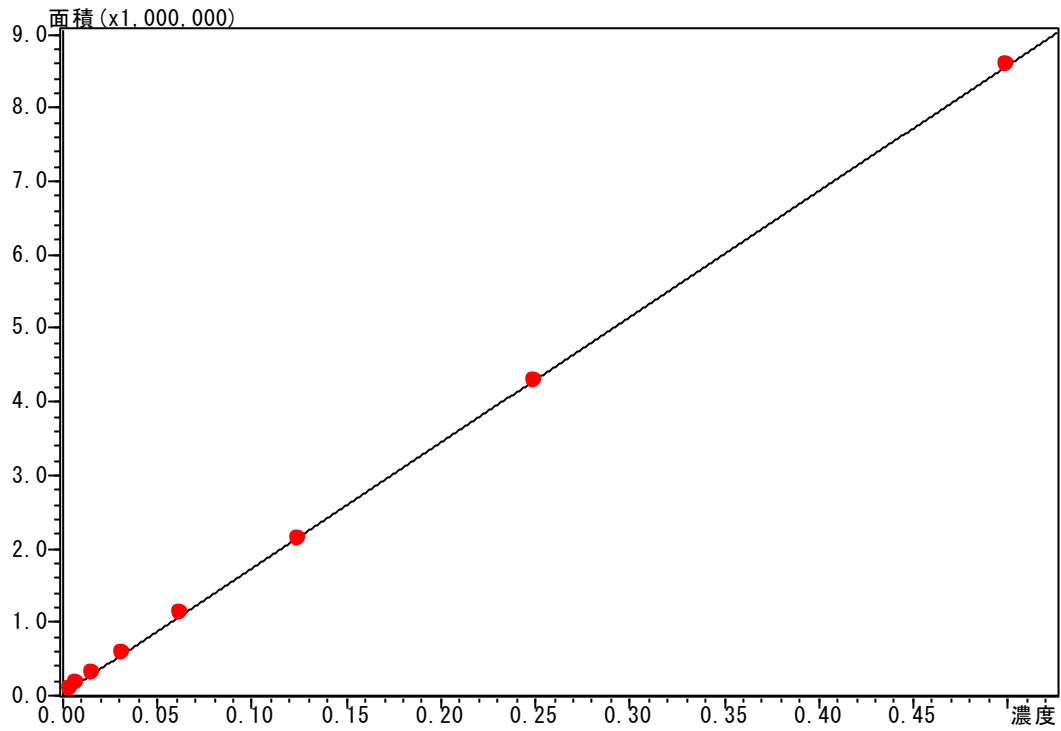
図-8 検量線

LC-MS (SIM)

Capcell Pak C18 MG II (粒径 3 μm、内径 2 mm、長さ 100 mm)

0.005~0.5 µg/mL メタノール溶液を 5 µL 注入

スピノシンA



$$Y = 17,108,390.0X + 23,788.99$$

$$R^2 = 0.9999324$$

$$R = 0.9999662$$

絶対検量線法

検量線:直線

原点:通さない

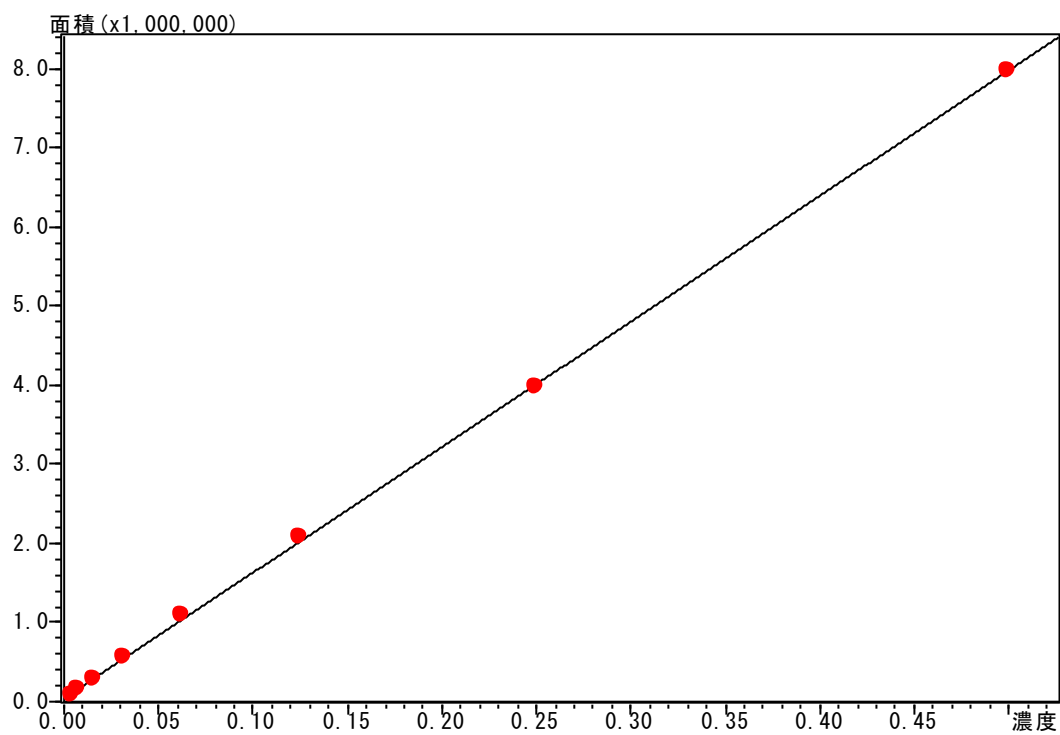
重み付け法:なし

平均 RF : 18,533,359.0

RF SD : 1,508,628

RF %RSD : 8.140073

スピノシンD



$$Y = 15,882,269.0X + 43,342.63$$

$$R^2 = 0.9998713$$

$$R = 0.9999357$$

絶対検量線法

検量線:直線

原点:通さない

重み付け法:なし

平均 RF : 17,186,027.0

RF SD : 921,702.9

RF %RSD : 5.363095

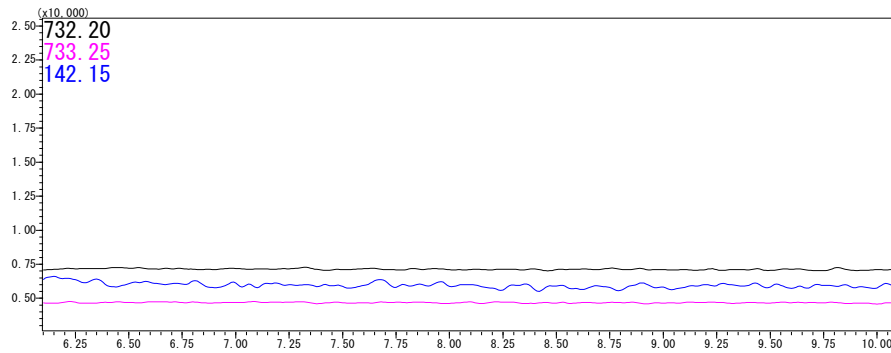
図-9 試料の LC-MS (SIM)クロマトグラム

Capcell Pak C18 MG II (粒径 3  $\mu\text{m}$ 、内径 2 mm、長さ 100 mm)

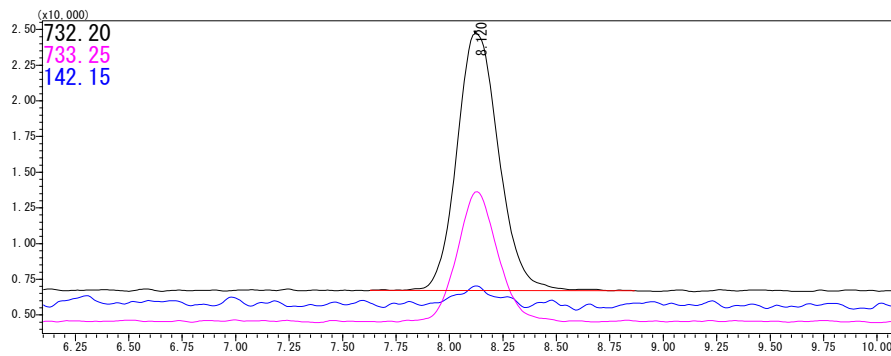
ブランク試料及び 0.05 ppm 添加試料

いずれも 0.5 g 試料/mL メタノール溶液を 5  $\mu\text{L}$  注入

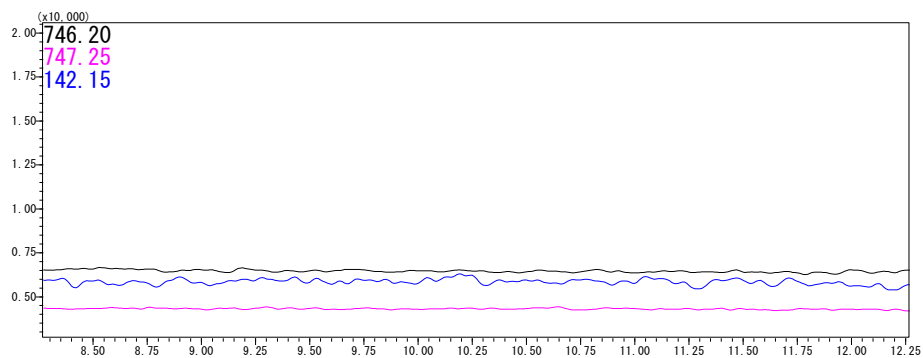
牛の筋肉 ブランク (スピノシンA)



牛の筋肉 0.05 ppm 添加 (スピノシンA)

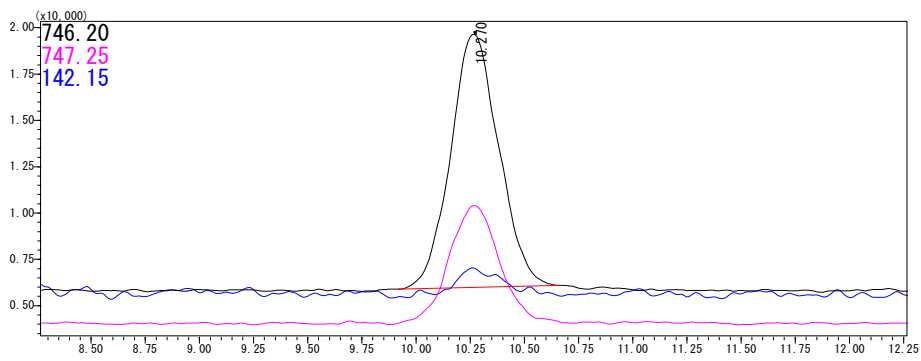


牛の筋肉 ブランク (スピノシンD)

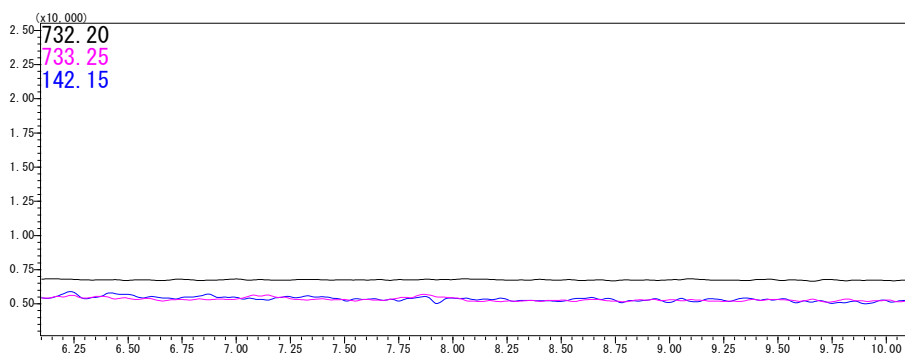


牛の筋肉 0.05 ppm 添加 (スピノシンD)

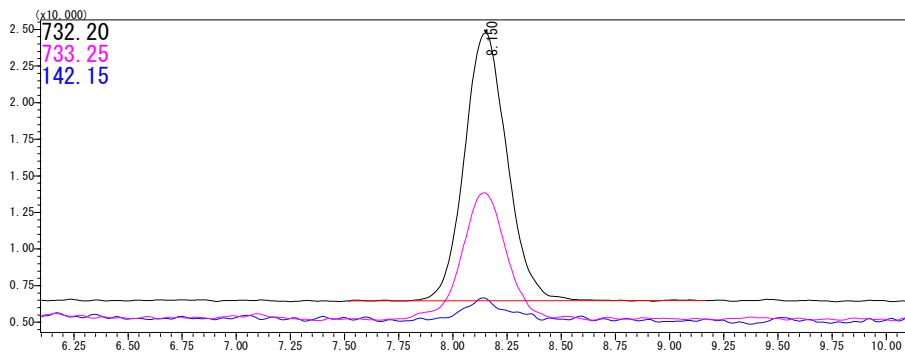




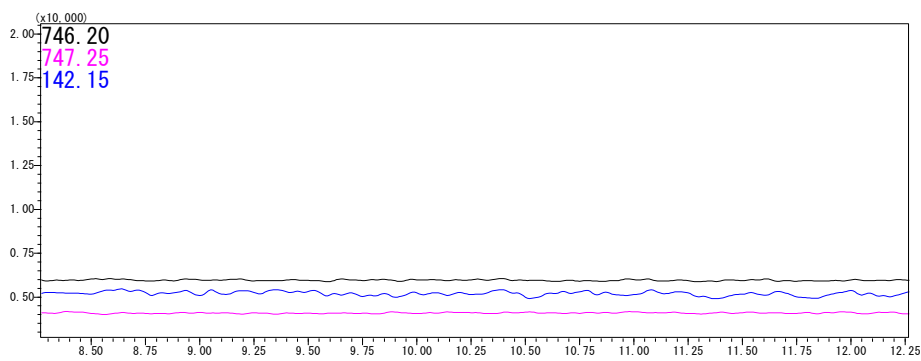
牛の脂肪 ブランク (スピノシンA)



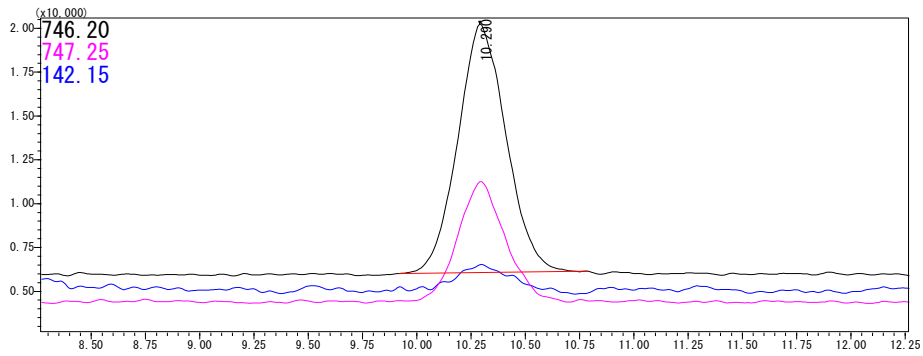
牛の脂肪 0.05 ppm 添加 (スピノシンA)



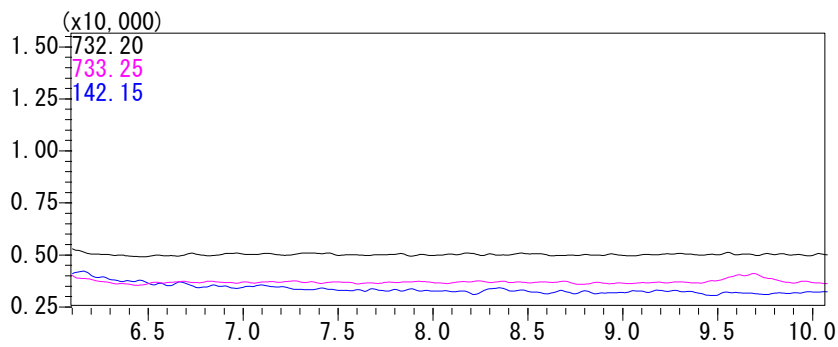
牛の脂肪 ブランク (スピノシンD)



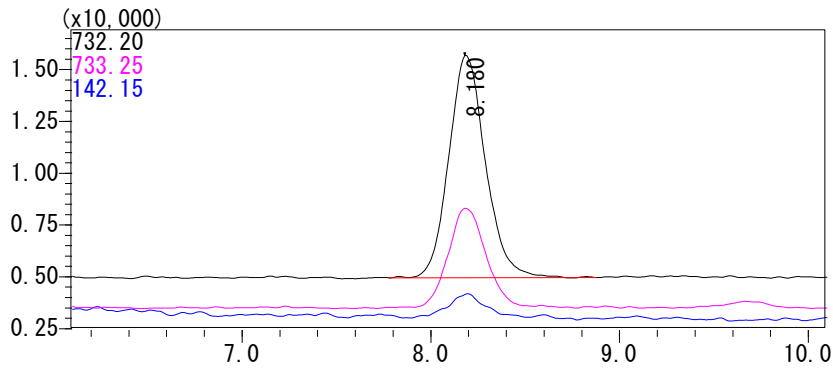
牛の脂肪 0.05 ppm 添加 (スピノシンD)



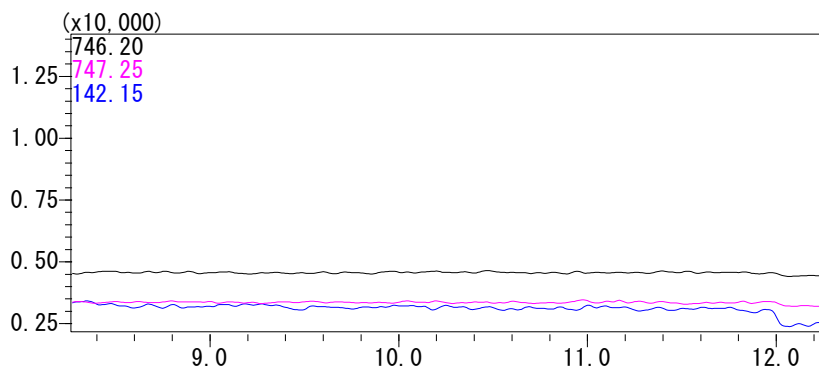
牛の肝臓 ブランク (スピノシンA)



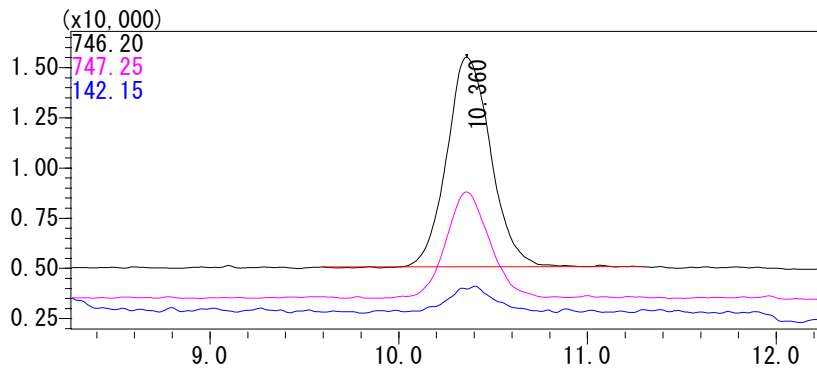
牛の肝臓 0.05 ppm 添加 (スピノシンA)



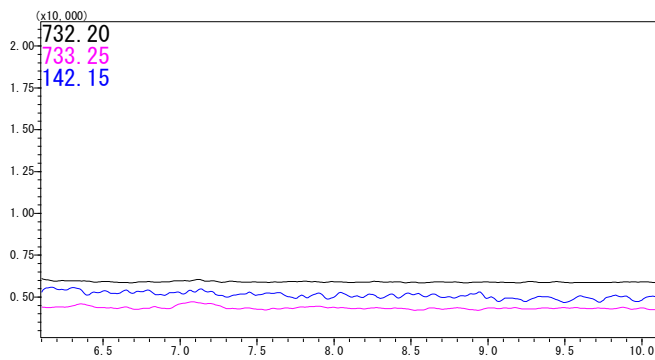
牛の肝臓 ブランク (スピノシンD)



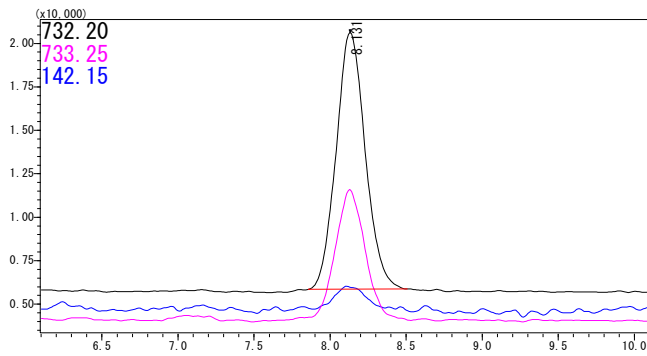
牛の肝臓 0.05 ppm 添加 (スピノシンD)



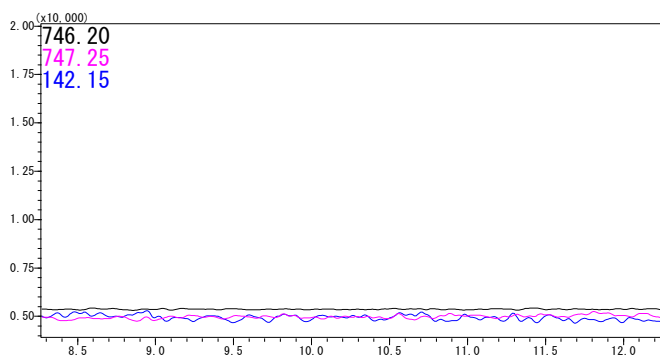
さけ ブランク (スピノシンA)



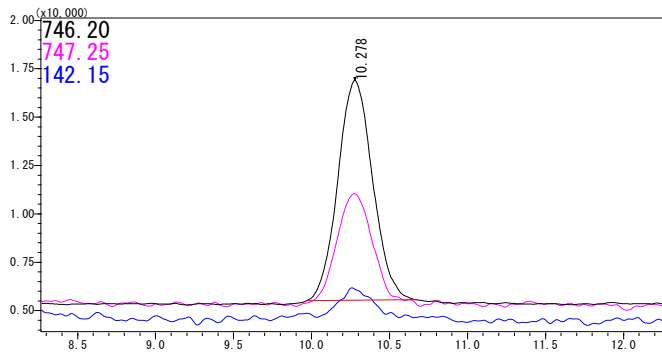
さけ 0.05 ppm 添加 (スピノシンA)



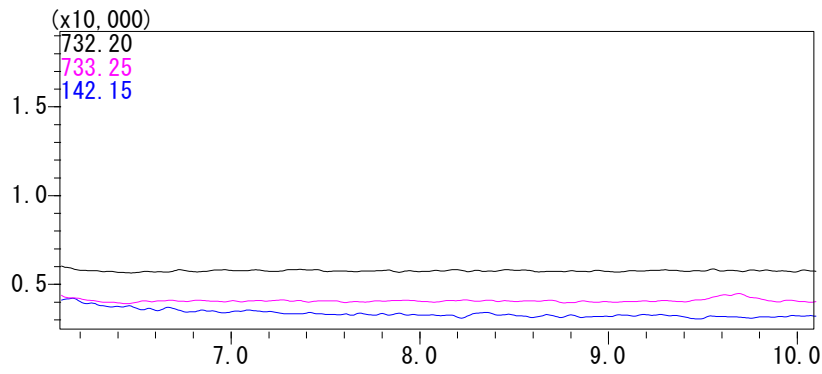
さけ ブランク (スピノシンD)



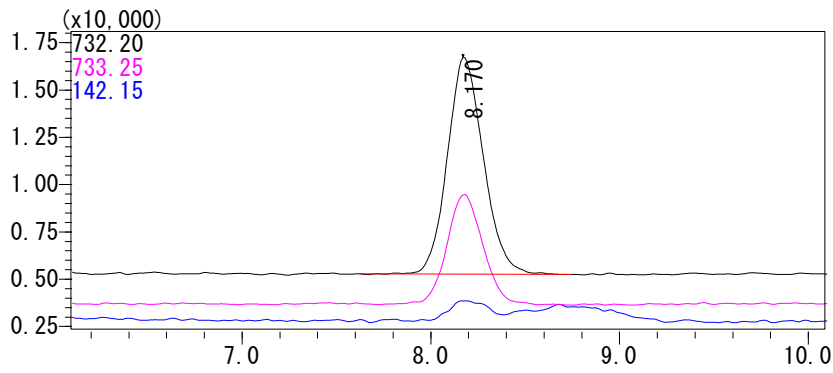
さけ 0.05 ppm 添加 (スピノシンD)



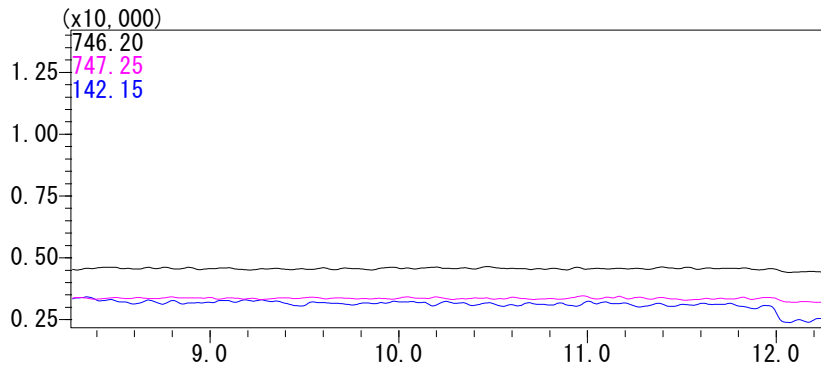
うなぎ ブランク (スピノシンA)



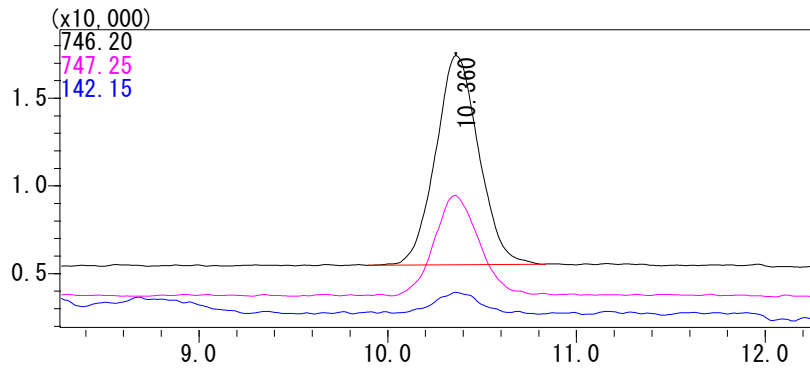
うなぎ 0.05 ppm 添加 (スピノシンA)



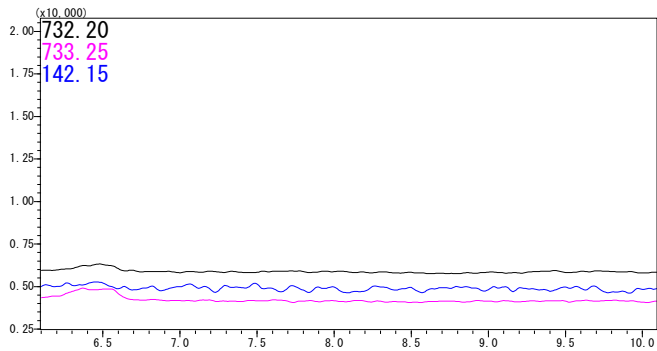
うなぎ ブランク (スピノシンD)



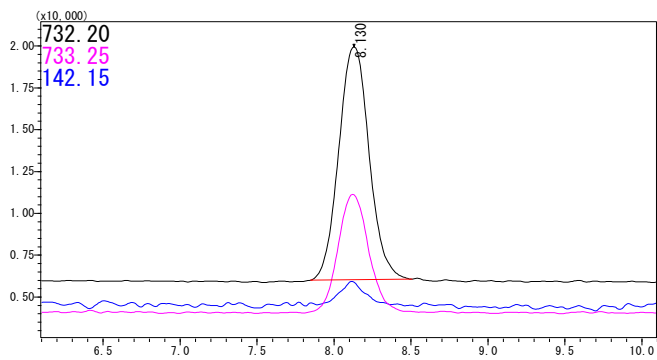
うなぎ 0.05 ppm 添加 (スピノシンD)



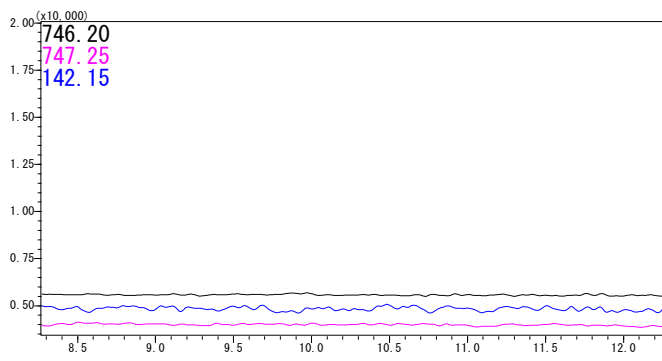
えび ブランク (スピノシンA)



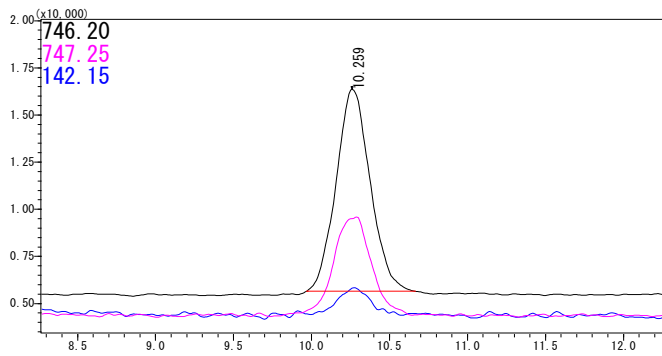
えび 0.05 ppm 添加 (スピノシンA)



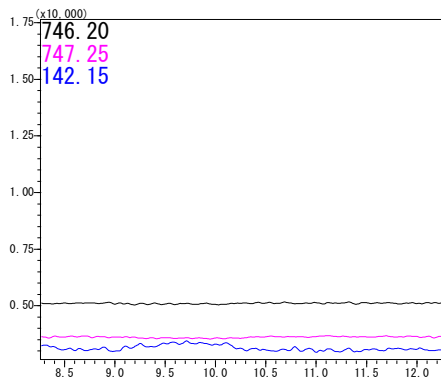
えび ブランク (スピノシンD)



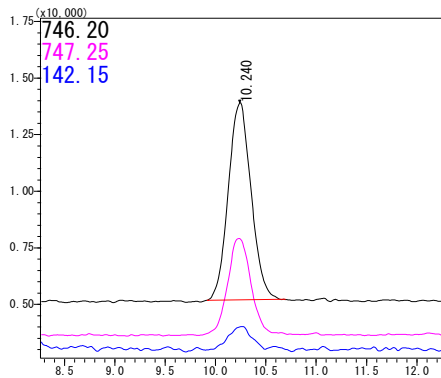
えび 0.05 ppm 添加 (スピノシンD)



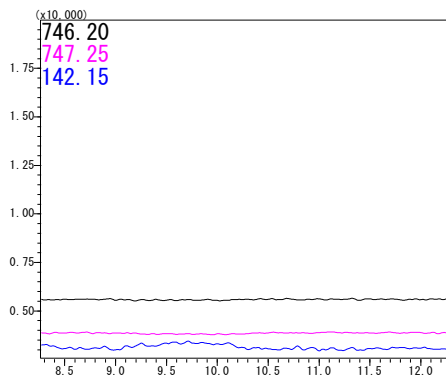
牛乳 ブランク (スピノシンA)



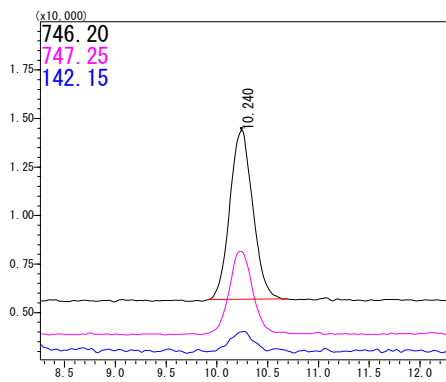
牛乳 0.05 ppm 添加 (スピノシンA)



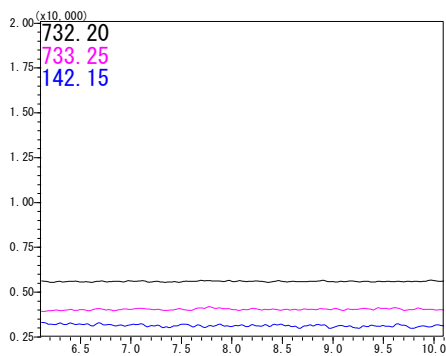
牛乳 ブランク (スピノシンD)



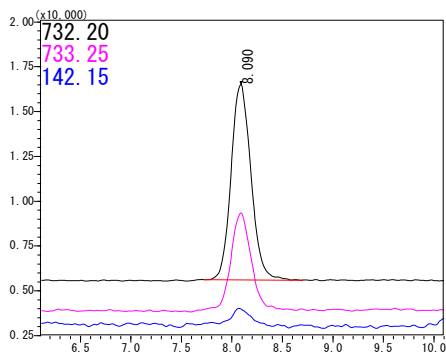
牛乳 0.05 ppm 添加 (スピノシンD)



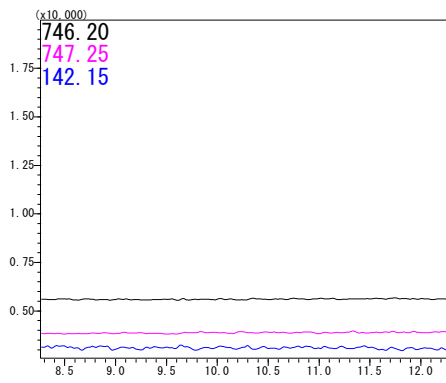
鶏卵 ブランク (スピノシンA)



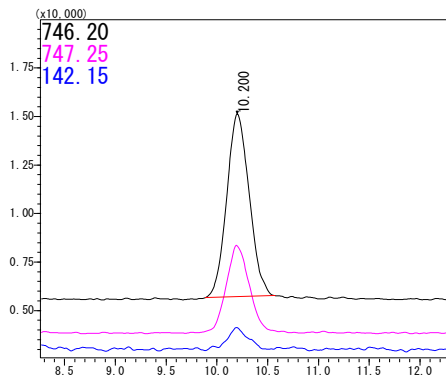
鶏卵 0.05 ppm 添加 (スピノシンA)



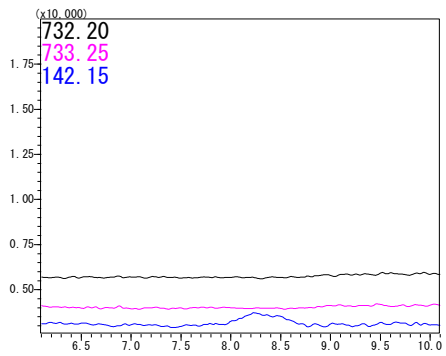
鶏卵 ブランク (スピノシンD)



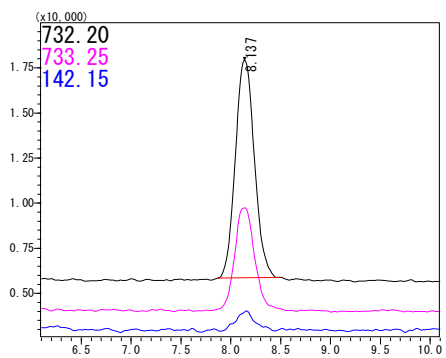
鶏卵 0.05 ppm 添加 (スピノシンD)



鶏の筋肉 ブランク (スピノシンA)

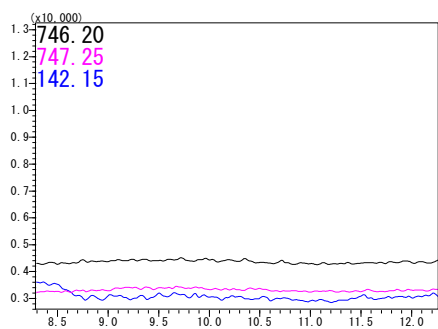


鶏の筋肉 0.05 ppm 添加 (スピノシンA)

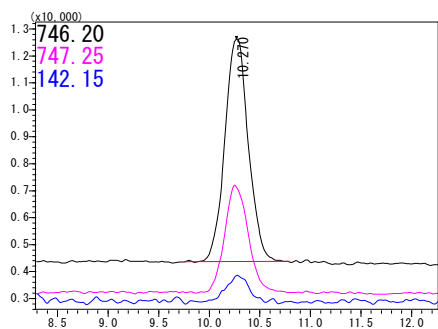


鶏の筋肉 ブランク (スピノシンD)

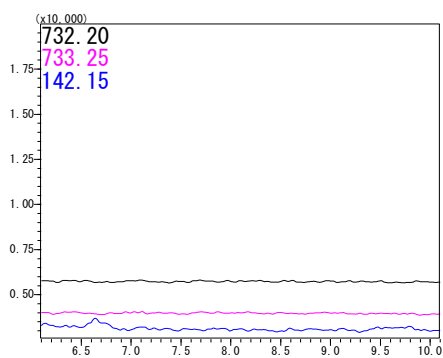




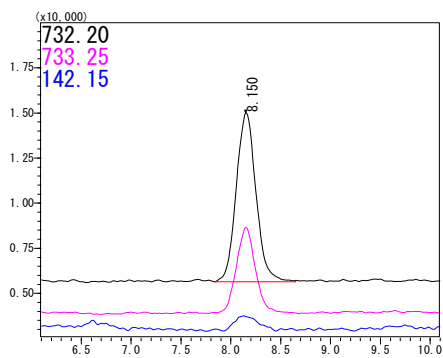
鶏の筋肉 0.05 ppm 添加 (スピノシンD)



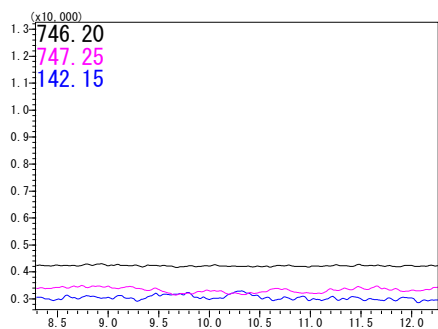
あさり ブランク (スピノシンA)



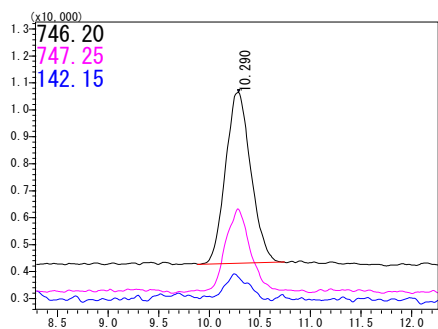
あさり 0.05 ppm 添加 (スピノシンA)



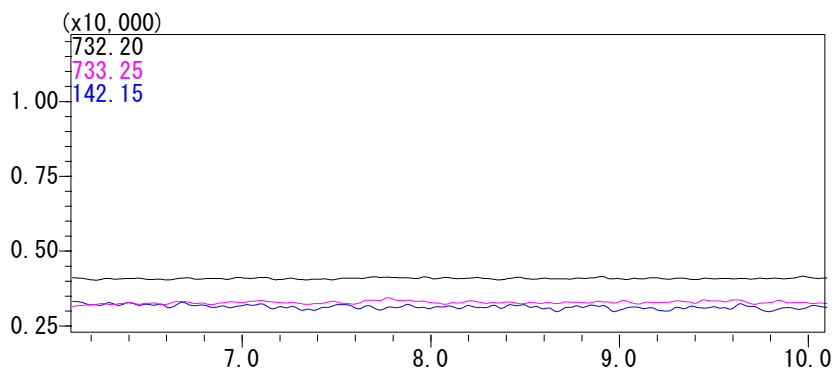
あさり ブランク (スピノシンD)



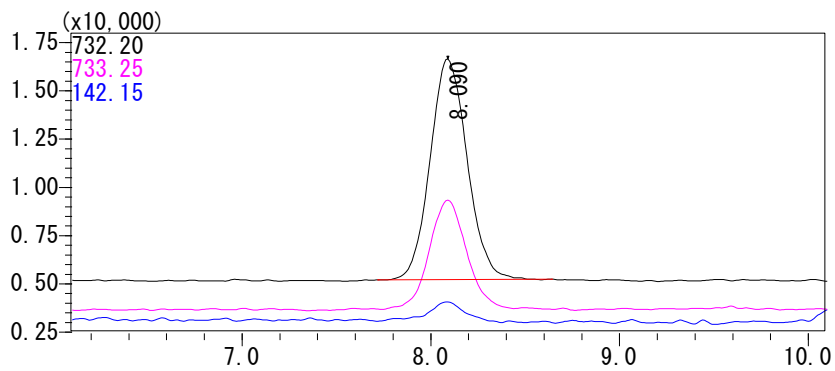
あさり 0.05 ppm 添加 (スピノシンD)



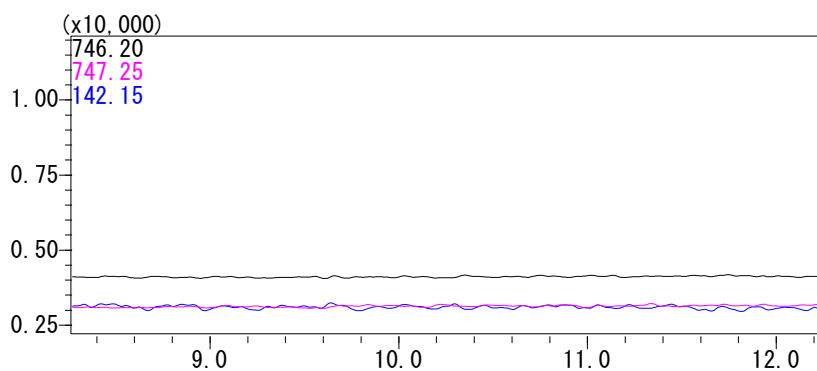
はちみつ ブランク (スピノシンA)



はちみつ 0.05 ppm 添加 (スピノシンA)



はちみつ ブランク (スピノシンD)



はちみつ 0.05 ppm 添加 (スピノシンD)

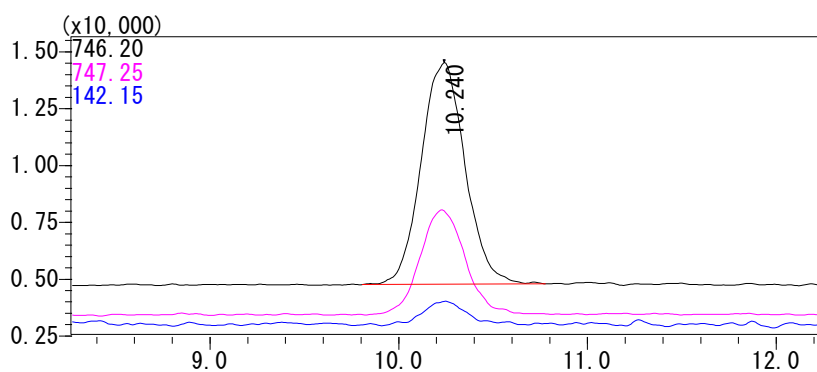


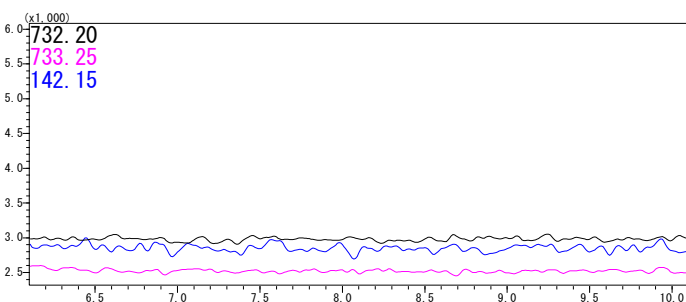
図-10 試料の LC-MS (SIM)クロマトグラム

Capcell Pak C18 MG II (粒径 3  $\mu\text{m}$ 、内径 2 mm、長さ 100 mm)

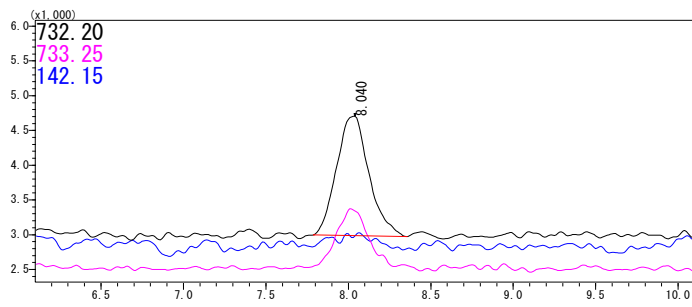
ブランク試料及び 0.01 ppm 添加試料

いずれも 0.5 g 試料/mL メタノール溶液を 5  $\mu\text{L}$  注入

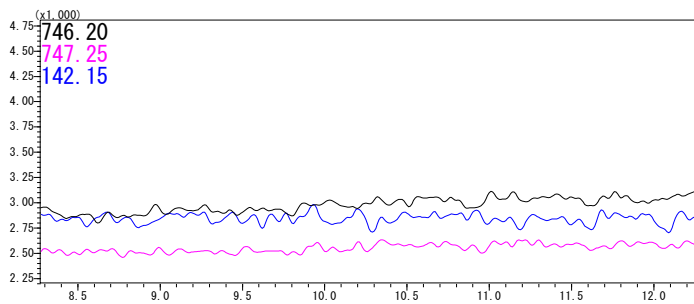
牛の筋肉 ブランク (スピノシンA)



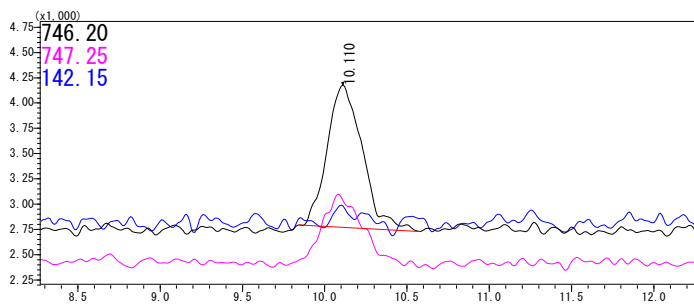
牛の筋肉 0.01 ppm 添加 (スピノシンA)



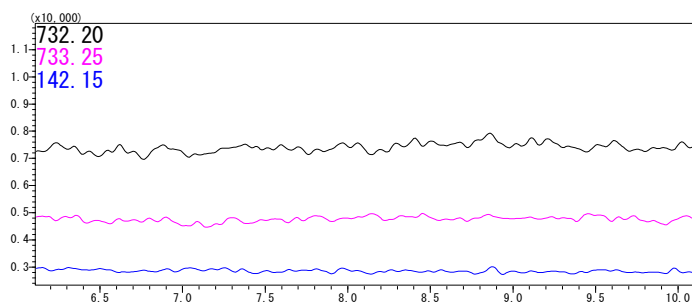
牛の筋肉 ブランク (スピノシンD)



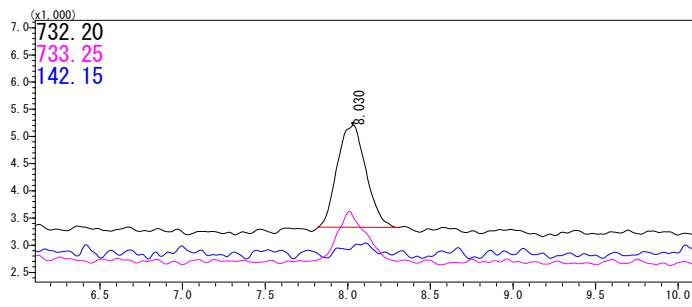
牛の筋肉 0.01 ppm 添加 (スピノシンD)



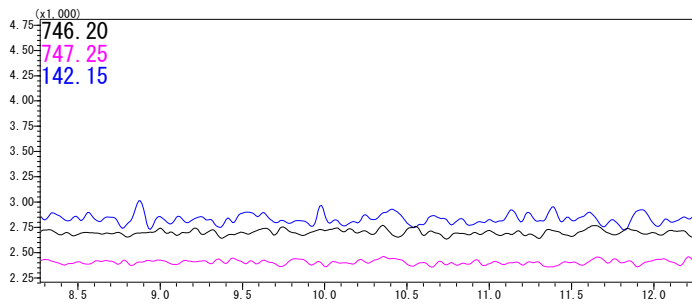
牛の脂肪 ブランク (スピノシンA)



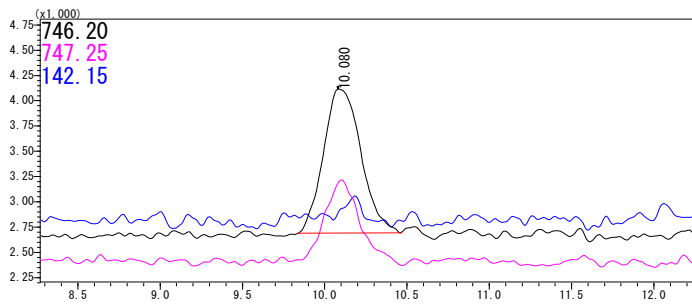
牛の脂肪 0.01 ppm 添加 (スピノシンA)



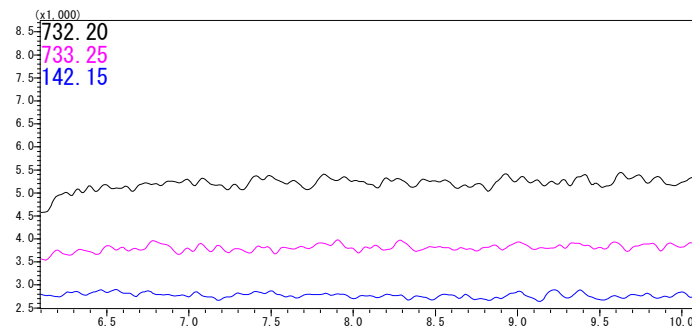
牛の脂肪 ブランク (スピノシンD)



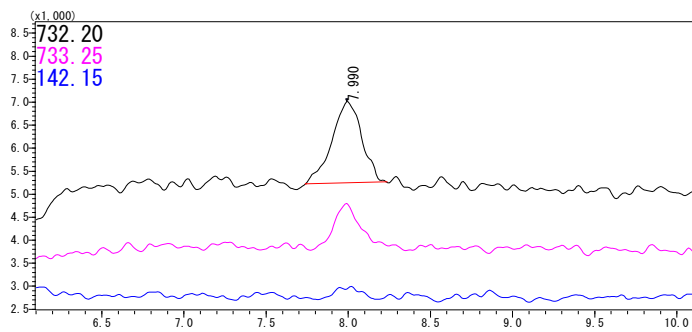
牛の脂肪 0.01 ppm 添加 (スピノシンD)



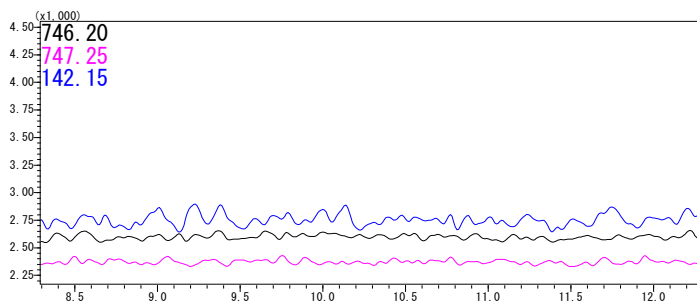
牛の肝臓 ブランク (スピノシンA)



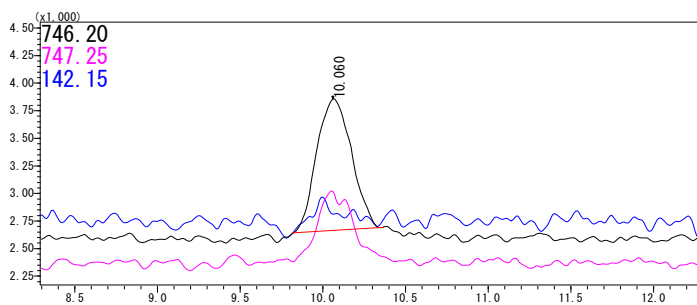
牛の肝臓 0.01 ppm 添加 (スピノシンA)



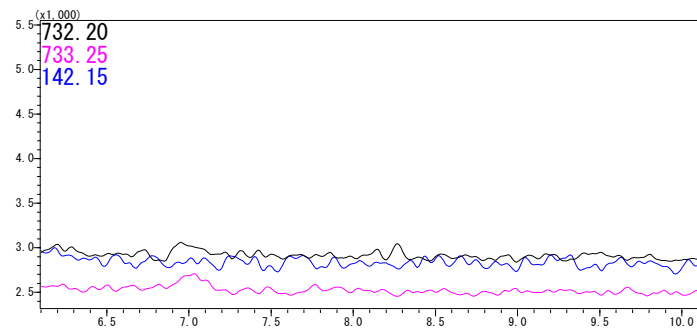
牛の肝臓 ブランク (スピノシンD)



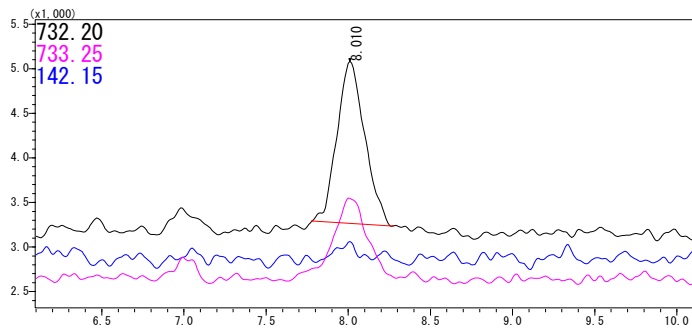
牛の肝臓 0.01 ppm 添加 (スピノシンD)



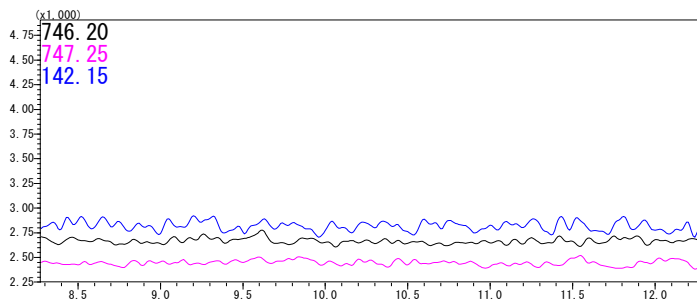
さけ ブランク (スピノシンA)



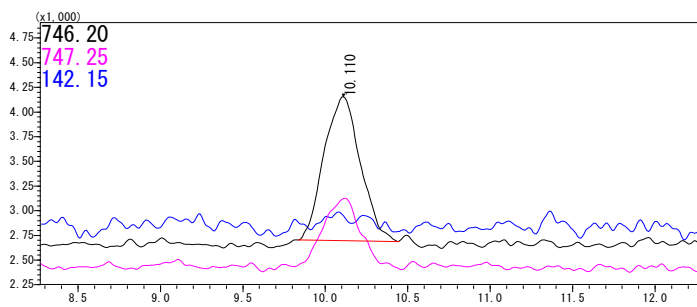
さけ 0.01 ppm 添加 (スピノシンA)



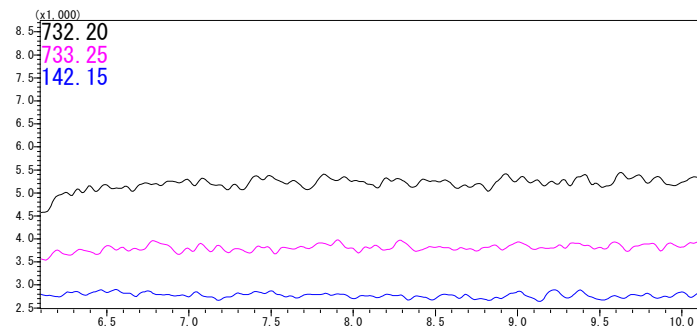
さけ ブランク (スピノシンD)



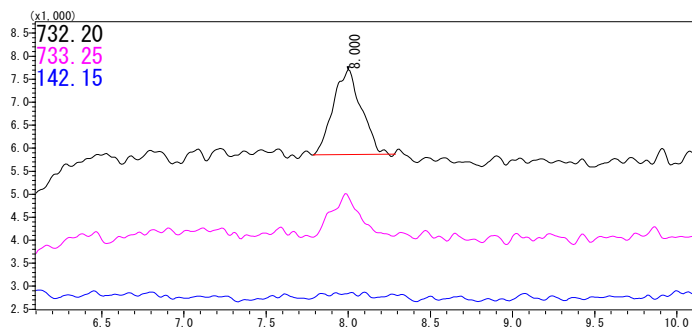
さけ 0.01 ppm 添加 (スピノシンD)



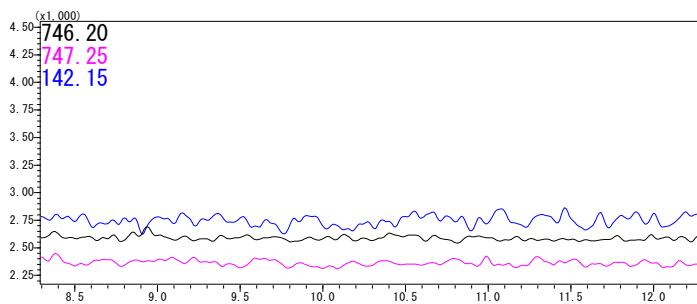
うなぎ ブランク (スピノシンA)



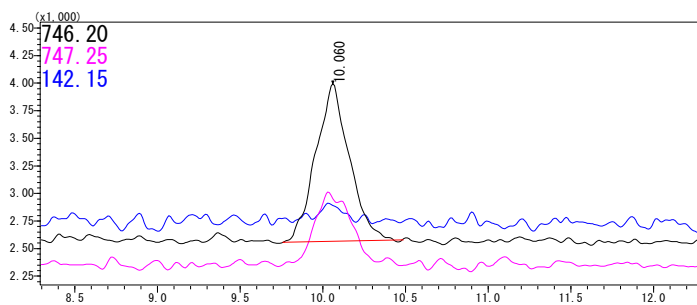
うなぎ 0.01 ppm 添加 (スピノシンA)



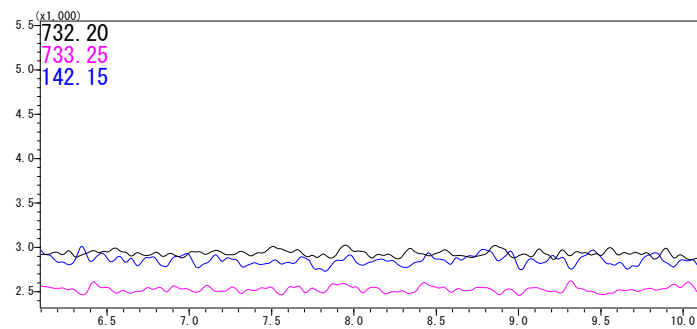
うなぎ ブランク (スピノシンD)



うなぎ 0.01 ppm 添加 (スピノシンD)

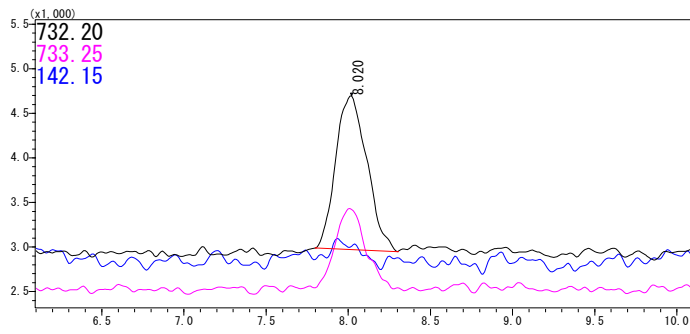


えび ブランク (スピノシンA)

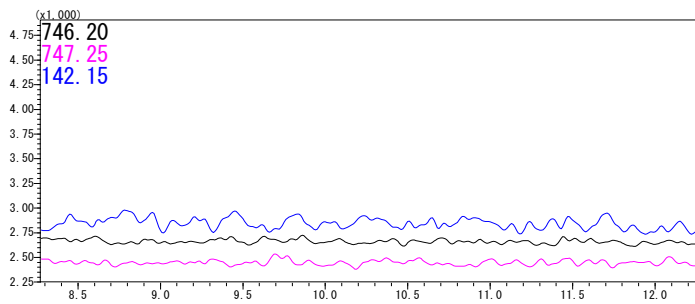


えび 0.01 ppm 添加 (スピノシンA)

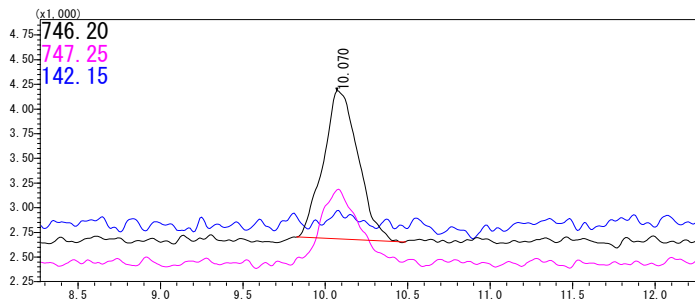




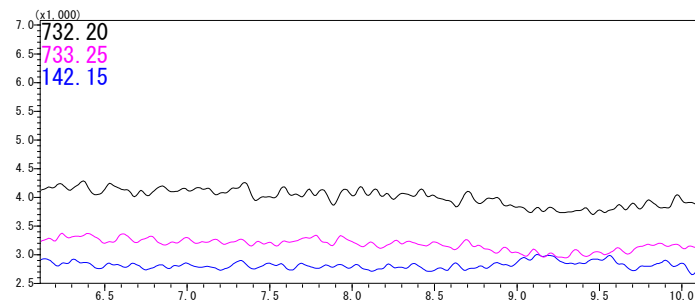
えび ブランク (スピノシンD)



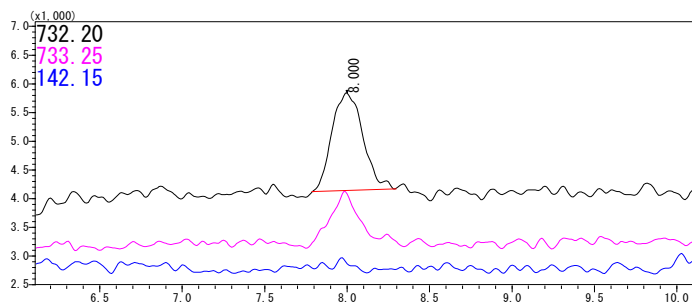
えび 0.01 ppm 添加 (スピノシンD)



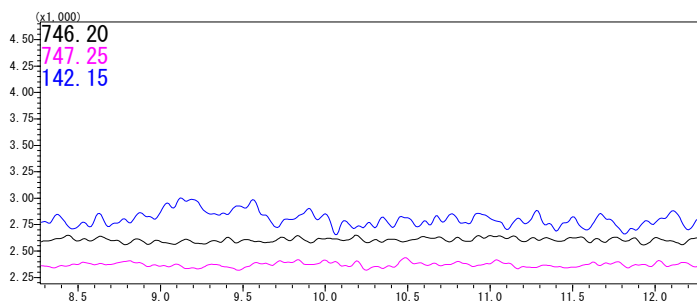
牛乳 ブランク (スピノシンA)



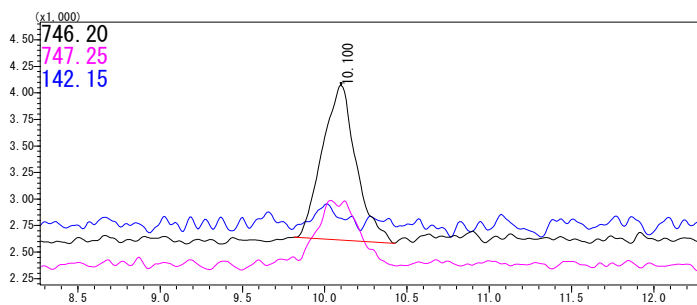
牛乳 0.01 ppm 添加 (スピノシンA)



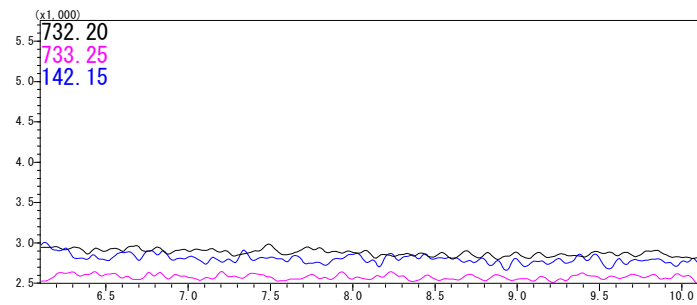
牛乳 ブランク (スピノシンD)



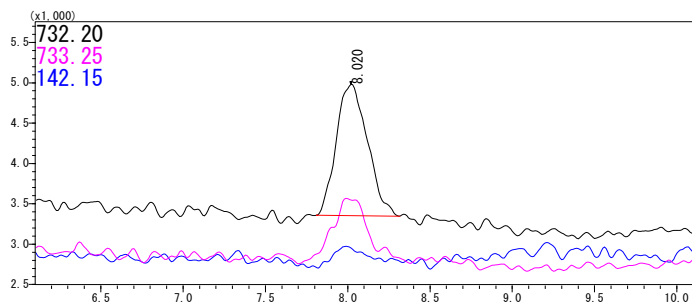
牛乳 0.01 ppm 添加 (スピノシンD)



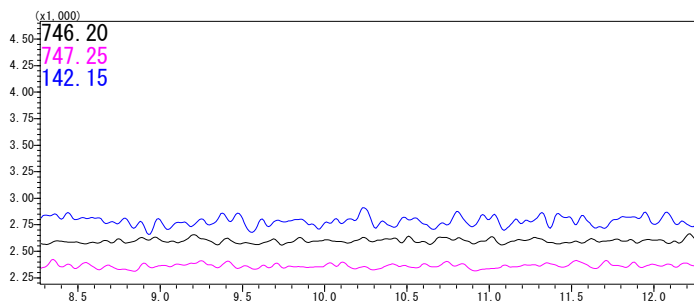
鶏卵 ブランク (スピノシンA)



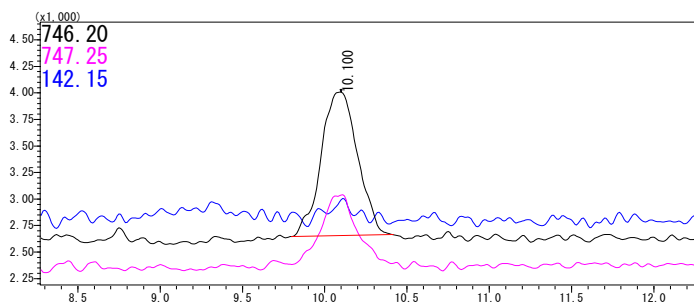
鶏卵 0.01 ppm 添加 (スピノシンA)



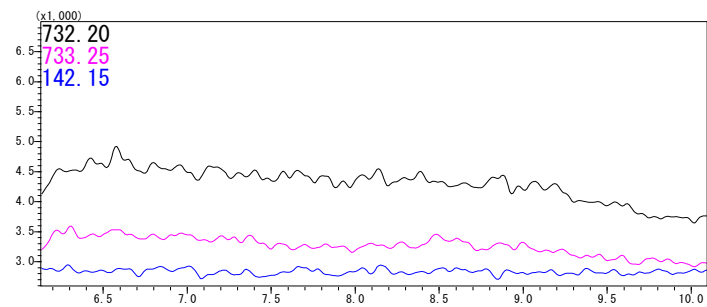
鶏卵 ブランク (スピノシンD)



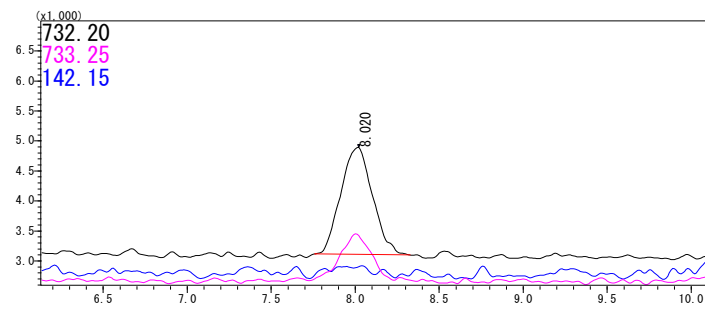
鶏卵 0.01 ppm 添加 (スピノシンD)



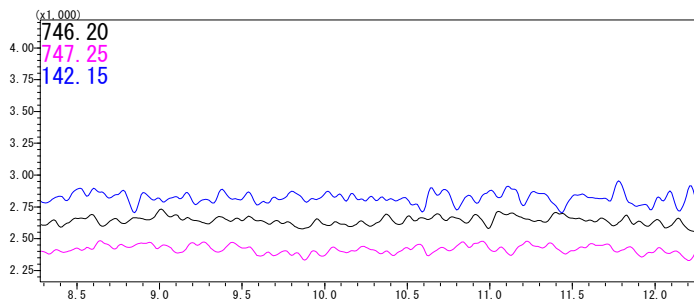
鶏の筋肉 ブランク (スピノシンA)



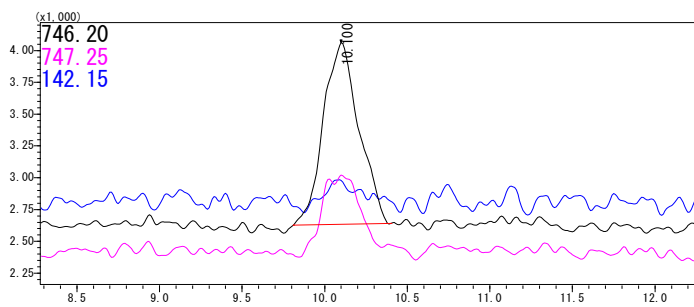
鶏の筋肉 0.01 ppm 添加 (スピノシンA)



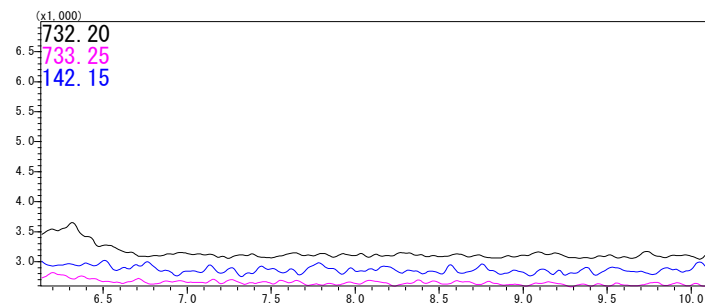
鶏の筋肉 ブランク (スピノシンD)



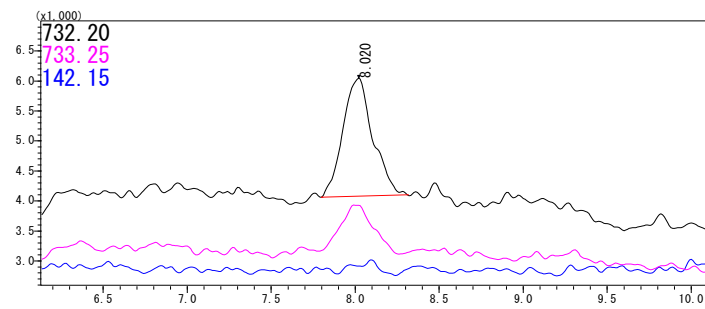
鶏の筋肉 0.01 ppm 添加 (スピノシンD)



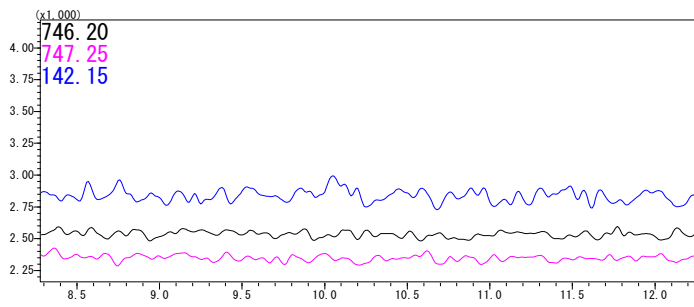
あさり ブランク (スピノシンA)



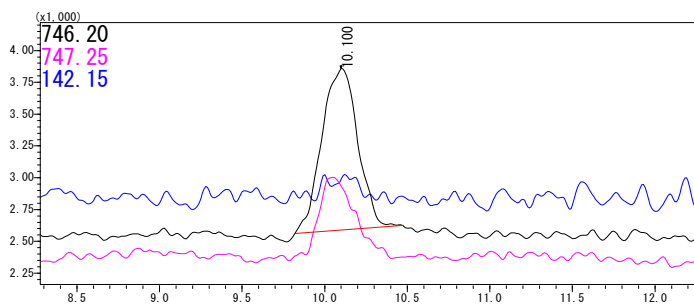
あさり 0.01 ppm 添加 (スピノシンA)



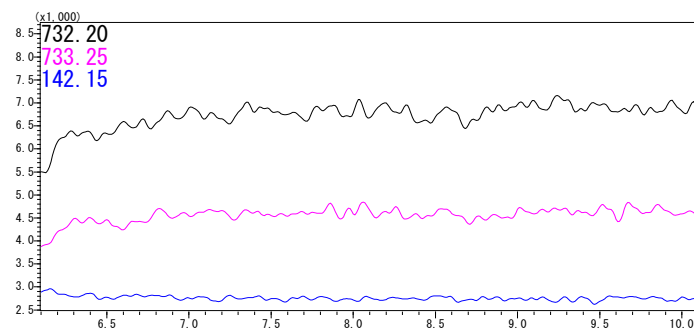
あさり ブランク (スピノシンD)



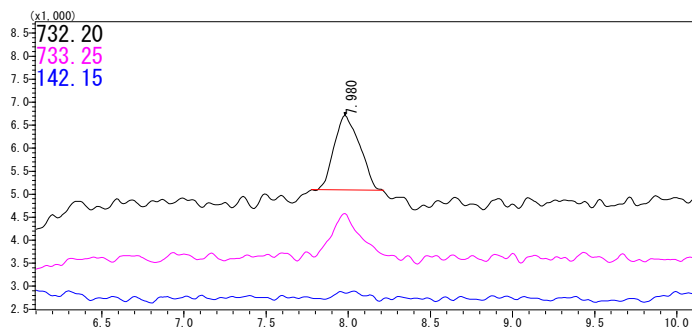
あさり 0.01 ppm 添加 (スピノシンD)



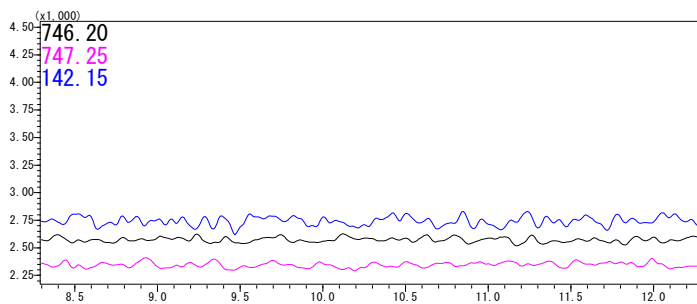
はちみつ ブランク (スピノシンA)



はちみつ 0.01 ppm 添加 (スピノシンA)



はちみつ ブランク (スピノシンD)



はちみつ 0.01 ppm 添加 (スピノシンD)

