

2 飼料中のスピノサドの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法

牧野 大作^{*1}, 山田 美帆^{*2}, 佐野 好弘^{*2}

Determination of Spinosad in Feeds by LC-MS

Daisaku MAKINO^{*1}, Miho YAMADA^{*2} and Yoshihiro SANNO^{*2}

(^{*1}Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center
(Now Fertilizer and Feed Inspection Department),

^{*2}Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center)

An analytical method for determination of spinosad in feeds using liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI-MS) was developed. After addition of 50 mL of water, the sample was left standing for 30 minutes. Spinosad was extracted with 50 mL of acetonitrile. The extract was filtered and topped up to 200 mL with acetonitrile-water (1:1). 10 mL of sample solution (10 mL of 10 times diluted sample solution for grass hay except rice straw) was purified by Mega bond Elut CH with 10 mL of acetonitrile-triethylamine (49:1). After the elute was evaporated to dryness, the residue was dissolved in 1 mL of acetonitrile-water (9:1) and subjected to LC-ESI-MS for determination of spinosyn A and D. Spinosad were determined as sum total quantity of spinosyn A and D. The LC separation was carried out on an ODS column (Inertsil ODS-3, 2.1 mm i.d.×150 mm, 5 μm (GL Sciences)) using acetonitrile-5 mmol/L ammonium acetate solution (9:1) as a mobile phase. The determination was performed in a selected ion monitoring (SIM) mode. A spike test was conducted with formula feed for layer, for growing cattle, corn, alfalfa hay and rice straw spiked with 0.10 and 0.010 mg/kg (1.0 and 0.10 mg/kg for alfalfa hay, 0.25 and 0.025 mg/kg for rice straw) of spinosyn A and D. The spike test resulted in recoveries ranging from 86.8 % to 106 % for spinosyn A and from 86.5 % to 100 % for spinosyn D, and in relative standard deviations (RSD) within 5.4 % and 6.5 % respectively. A collaborative study was conducted in eight laboratories using formula feed for layer, rice straw and corn spiked with spinosyn A and D at 0.10 mg/kg (0.25 mg/kg for rice straw). The mean recovery of spinosyn A in the formula feed for layer was 96.3 %, and the repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviation (RSD_r and RSD_R) and HorRat were 2.7 %, 11 % and 0.49 respectively. These values were 90.1 %, 1.8 %, 8.5 % and 0.43 for rice straw, 93.2 %, 4.5 %, 9.2 % and 0.42 for corn respectively. The mean recovery of spinosyn D in the formula feed for layer was 95.2 %, and the repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviation (RSD_r and RSD_R) and HorRat were 3.6 %, 12 % and 0.52 respectively. These values were 92.8 %, 2.8 %, 10 % and 0.52 for rice straw, 93.2 %, 3.7 %, 14 % and 0.62 for corn respectively.

Key words: 残留農薬 pesticide residue ; 殺虫剤 insecticide ; スピノサド spinosad ; スピノシン A spinosyn A ; スピノシン D spinosyn D ; 飼料 feed ; 乾牧草 grass hay ; 稲わら

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター, 現 同肥飼料安全検査部

^{*2} (独) 農林水産消費安全技術センター神戸センター

rice straw ; 液体クロマトグラフ質量分析計 liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS) ; エレクトロスプレーイオン化法 electrospray ionization (ESI) ; 共同試験 collaborative study

1 緒 言

スピノサドは 1985 年にダウ・エランコ社（現ダウ・アグロサイエンス社）が発見したスピノシン A 及び D からなる混合物を有効成分とするマクロライド系殺虫剤で、1999 年に国内で農薬登録されている。その作用機構は、ニコチン性アセチルコリン受容体を活性化することにより筋肉にけいれんを引き起こし、最終的に死に至らしめ¹⁾、抗菌活性はない。

わが国における飼料中のスピノサドの基準値²⁾は、稲わらで 0.5 ppm に設定されている。また、食品、添加物等の規格基準における残留農薬基準値は、とうもろこし、大麦等穀類で 0.02~1 ppm、綿実で 0.02 ppm 等となっており、諸外国の乾牧草の基準値は 5~30 ppm に設定されている。

定量法としては、国内では厚生労働省通知試験法³⁾があり、スピノシン A 及び D について個別に定量を行い、その和をスピノサドの定量値としている。この定量法を参考にして（財）日本食品分析センターが、「平成 18 年度飼料中の有害物質等残留基準を設定するための分析法開発及び家畜等への移行調査委託事業」において開発した方法⁴⁾（以下「分析センター法」という。）がある。筆者らは、この分析センター法を基に、飼料分析基準⁵⁾への適用の可否について検討したので報告する。

なお、スピノシン A 及び D の構造式を Fig. 1 に示した。

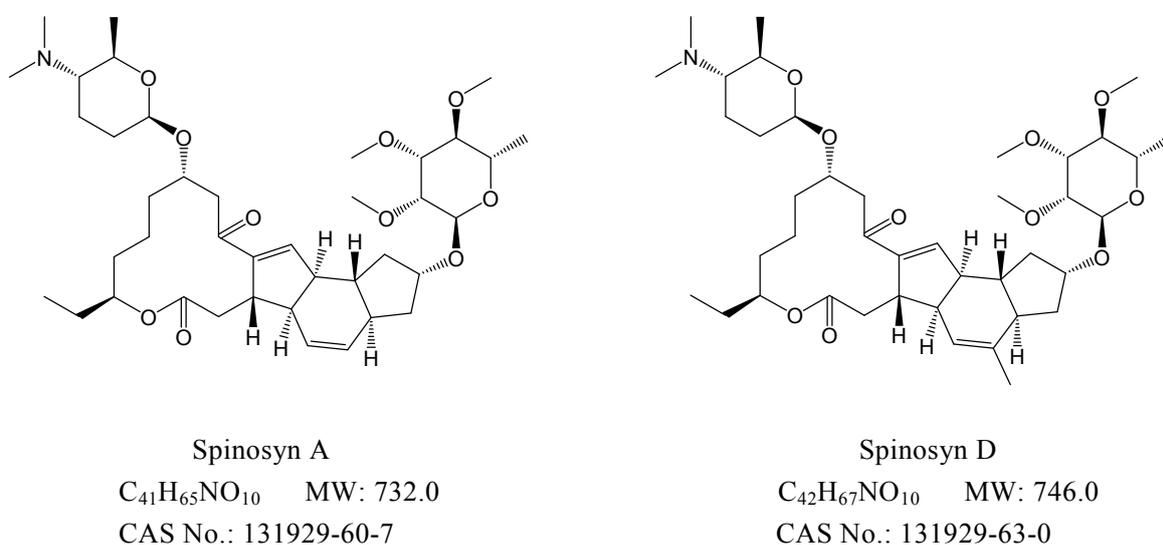


Fig. 1 Chemical structures of spinosyn A and D

2 実験方法

2.1 試 料

市販の配合飼料（成鶏飼育用及び若令牛育成用配合飼料）、とうもろこし、アルファルファ乾草及び稲わらをそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎して用いた。

なお、検討に用いた配合飼料の配合割合は、Table 1 のとおりである。

Table 1 Compositions of the formula feeds

| Formula feed types | Ingredient types | Proportion (%) | Ingredients |
|--------------------|--------------------|----------------|---|
| For layer | Grains | 59 | Corn |
| | Oil seed meal | 25 | Soybean meal, Rapeseed meal, Corn gluten meal |
| | Animal by-products | 1 | Fish meal |
| | Brans | 1 | Rice bran |
| | Others | 14 | Calcium carbonate, Calcium phosphate, Paprika extract, Feed additives |
| For growing cattle | Grains | 56 | Corn, Wheat flour |
| | Brans | 21 | Wheat bran |
| | Oil seed meal | 11 | Soybean meal |
| | Others | 12 | Calcium carbonate, Calcium phosphate, Alfalfa hay, Molasses, Salt, Feed additives |

2.2 試薬等

1) スピノシン A 標準原液

スピノシン A 標準品（林純薬工業製，純度 94.9 %）10 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ，アセトニトリルを加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えてスピノシン A 標準原液を調製した（この液 1 mL は，スピノシン A として 0.2 mg ($f = 0.949$) を含有する。）。

2) スピノシン D 標準原液

スピノシン D 標準品（林純薬工業製，純度 99.2 %）10 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ，アセトニトリルを加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えてスピノシン D 標準原液を調製した（この液 1 mL は，スピノシン D として 0.2 mg ($f = 0.992$) を含有する。）。

3) 混合標準液

使用に際して，スピノシン A 及び D 標準原液の一定量を混合した後，アセトニトリル-水 (9+1) で正確に希釈し，1 mL 中にスピノシン A 及び D として 0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5 及び 1 μg を含有する各標準液を調製した。

4) アセトニトリルは，残留農薬試験用及び液体クロマトグラフ用を用いた。その他，特記している以外の試薬は特級を用いた。

2.3 装置及び器具

1) 液体クロマトグラフ質量分析計：

LC 部：島津製作所製 Prominence

MS 部：島津製作所製 LCMS-2010EV

2) 振とう機：宮本理研工業製 理研式小型シェーカー MW-DR 型

3) ロータリーエバポレーター：東京理化学器械製 N-1N 型

4) 高速遠心分離器：日立製作所製 SCT15B

5) シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラム：Varian 製 Mega Bond Elut CH（充てん剤量 1 g）

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 10.0 g (稲わらは 5 g を正確に) を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 50 mL を加えて 30 分間静置後、更にアセトニトリル 50 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出した。200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した後、先の三角フラスコ及び残さを順次アセトニトリル-水 (1+1) 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過した。更に全量フラスコの標線までアセトニトリル-水 (1+1) を加え、カラム処理に供する試料溶液とした。

2) カラム処理

シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラムをアセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL で洗浄した。

試料溶液 10 mL (稲わらを除く乾牧草では、更にアセトニトリル-水 (1+1) で正確に 10 倍希釈した後、その液 10 mL) をミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流下させた。

更にアセトニトリル 10 mL を加えてミニカラムを洗浄した後、50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、アセトニトリル-トリエチルアミン (49+1) 10 mL をミニカラムに加えてスピノシン A 及び D を溶出させた。溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。

アセトニトリル-水 (9+1) 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、5,000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフ質量分析計による測定に供する試料溶液とした。

3) 液体クロマトグラフ質量分析計による測定

試料溶液及び各標準液各 5 µL を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、Table 2 の測定条件に従って選択イオン検出クロマトグラムを得た。

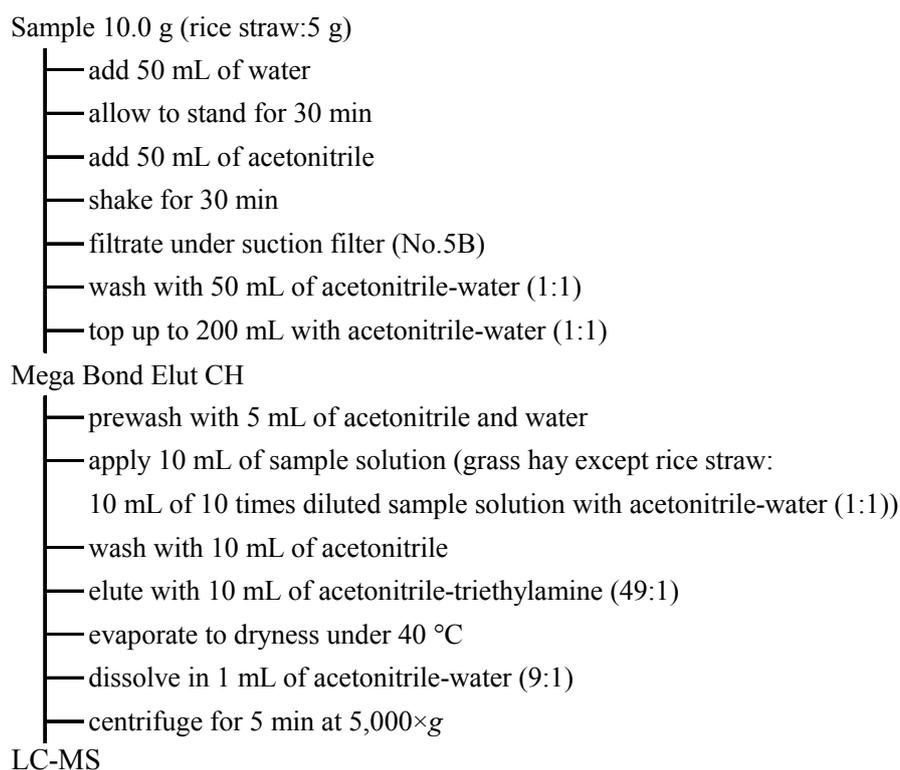
4) 計算

得られた選択イオン検出クロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中のスピノシン A 及び D 量を算出し、その含量をスピノサド量とした。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

Table 2 Operating conditions of LC-MS for analyzing spinosad

| | |
|------------------------|--|
| Column | GL Sciences Inertsil ODS-3 (2.1 mm i.d.×150 mm, 5 µm) |
| Mobile phase | Acetonitrile-5 mmol/L ammonium acetate solution (9:1) |
| Flow rate | 0.2 mL/min |
| Column temperature | 40 °C |
| Ionization | Electrospray ionization (ESI) |
| Mode | Positive |
| Nebulizer gas | N ₂ (1.5 L/min) |
| Heat block temperature | 200 °C |
| CDL temperature | 250 °C |
| Monitor ion | <i>m/z</i> 732 (spinosyn A), <i>m/z</i> 746 (spinosyn D) |



Scheme 1 Analytical procedure for spinosad in feeds

3 結果及び考察

3.1 質量分析計条件の検討

分析センター法⁴⁾ではスピノシン A 及び D のイオン化法としてエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法 (以下「ESI 法」という.) の正イオンモードが用いられていることから, 本法においても ESI 法を用いて検討を行った.

スピノシン A 及び D 各標準液について, 本法の測定条件によりスキャンモードで測定したところ, Fig. 2 に示したように, 各マススペクトルが得られた.

このマススペクトルにおいて基準ピークは, スピノシン A 及び D で m/z 732 及び 746 (プロトン付加分子 $[M+H]^+$) であった.

よって, これらをモニターイオンとして採用することにした.

また, 確認イオンとして使用できるようなフラグメントイオンは測定されなかった.

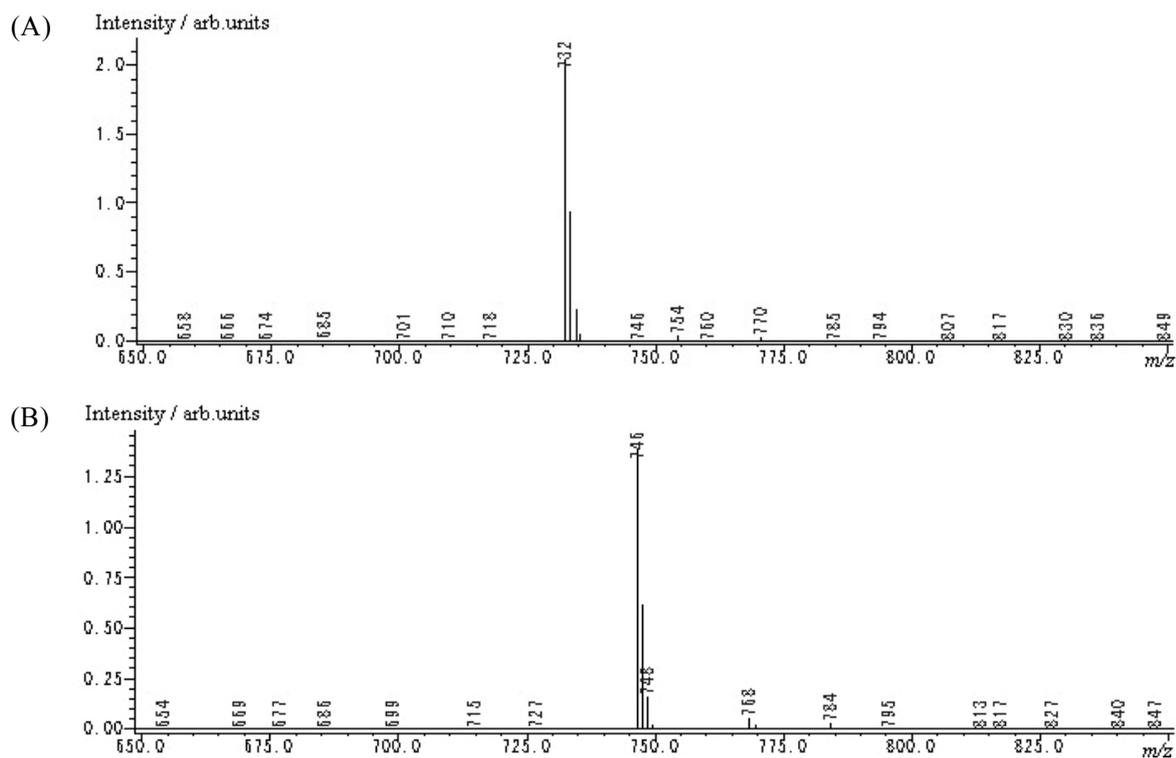


Fig. 2 Mass spectrum of standard solution

(A) Spinosyn A (B) Spinosyn D

3.2 液体クロマトグラフ条件の検討

スピノシン A 及び D 各標準液を液体クロマトグラフ質量分析計に注入することにより、液体クロマトグラフ条件の検討を行った。

分析センター法⁴⁾では、溶離液としてアセトニトリル-2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (9+1) を使用している。ここで、酢酸アンモニウム溶液の濃度について 2, 5 及び 10 mmol/L を検討したところ、酢酸アンモニウム溶液濃度が 2 mmol/L よりも 5 mmol/L 又は 10 mmol/L を用いた方が感度は良好であり、5 mmol/L と 10 mmol/L とでは特に感度に差異は無かった。このことから、酢酸アンモニウム濃度は 5 mmol/L で十分と考えられた。

これらのことから、溶離液としてアセトニトリル-5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (9+1) を採用した。

3.3 検量線の作成

2.2 の 3) に従って調製した標準液各 5 μ L を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、得られた選択イオン検出クロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成した。その結果、Fig. 3 及び 4 のとおり、検量線はスピノシン A 及び D として 1~1,000 ng/mL (注入量として 0.005~5 ng) の範囲で直線性を示した。

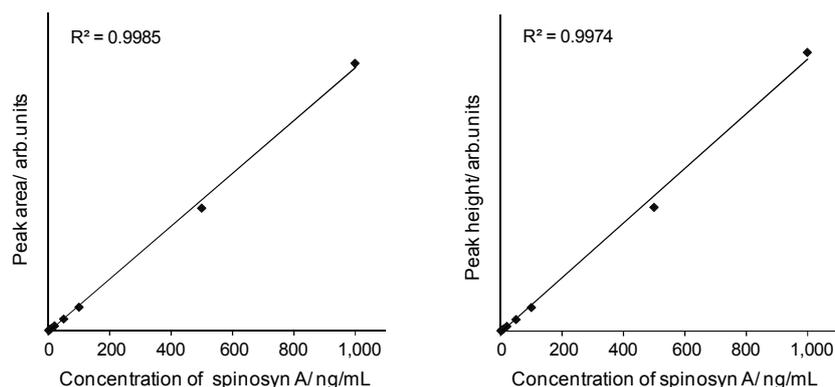


Fig. 3 Calibration curves of spinosyn A by peak area(left) and peak height(right)

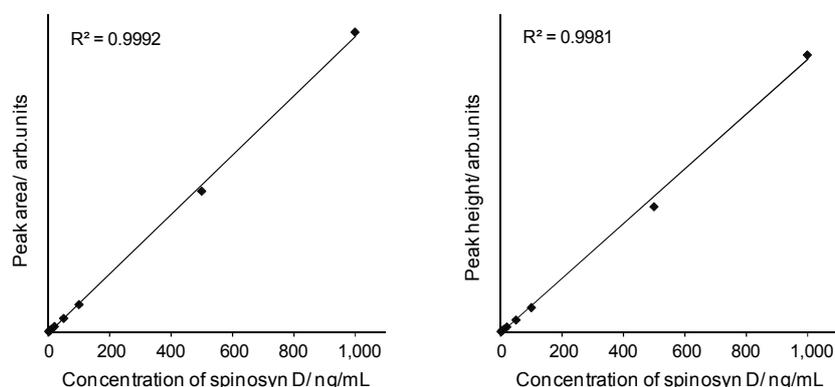


Fig. 4 Calibration curves of spinosyn D by peak area(left) and peak height(right)

3.4 シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラムの溶出画分の検討

スピノシン A 及び D について、シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出画分の検討を行った。

2.4 の 1)に従って成鶏飼育用配合飼料から抽出した抽出液 10 mL に対して、スピノシン A 及び D として 80 ng 相当量添加し、2.4 の 2)に従ってミニカラム処理を行った。

ミニカラムからの各溶出画分をそれぞれなす形フラスコに分取し、これらを減圧濃縮、乾固後、残留物をアセトニトリル-水 (9+1) に溶かしたものを液体クロマトグラフ質量分析計による測定に供試した。

その結果、Table 3 のとおり、スピノシン A 及び D は、アセトニトリル-トリエチルアミン (49+1) 0~10 mL に溶出し、それ以外の画分には溶出されなかった。以上の結果から、本法では分析センター法⁴⁾と同様にアセトニトリル-トリエチルアミン (49+1) 10 mL で溶出することとした。

Table 3 Elution pattern from mini column

| | Acetonitrile-water (1+1) | Acetonitrile 0~10 mL | Acetonitrile-triethylamine (49+1) | | Total |
|----------------------------|-----------------------------|-------------------------|--------------------------------------|--------|-------|
| | 0~10 mL | | 0~10 mL | ~15 mL | |
| Recovery of spinosyn A (%) | 0 | 0 | 98 | 0 | 98 |
| Recovery of spinosyn D (%) | 0 | 0 | 98 | 0 | 98 |

3.5 妨害物質の検討

市販の配合飼料（成鶏飼育用，ブロイラー肥育後期用，肉豚肥育用，若令牛育成用及び肉用牛肥育用），とうもろこし，大麦，大豆油かす及び乾牧草（スーダングラス乾草，アルファルファ乾草及び稲わら）を用い，本法により調製した試料溶液を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し，定量を妨げるピークの有無を確認したところ，妨害ピークは認められなかった。

なお，妨害物質の検討で得られた選択イオン検出クロマトグラムの一例を Fig. 5 に示した。

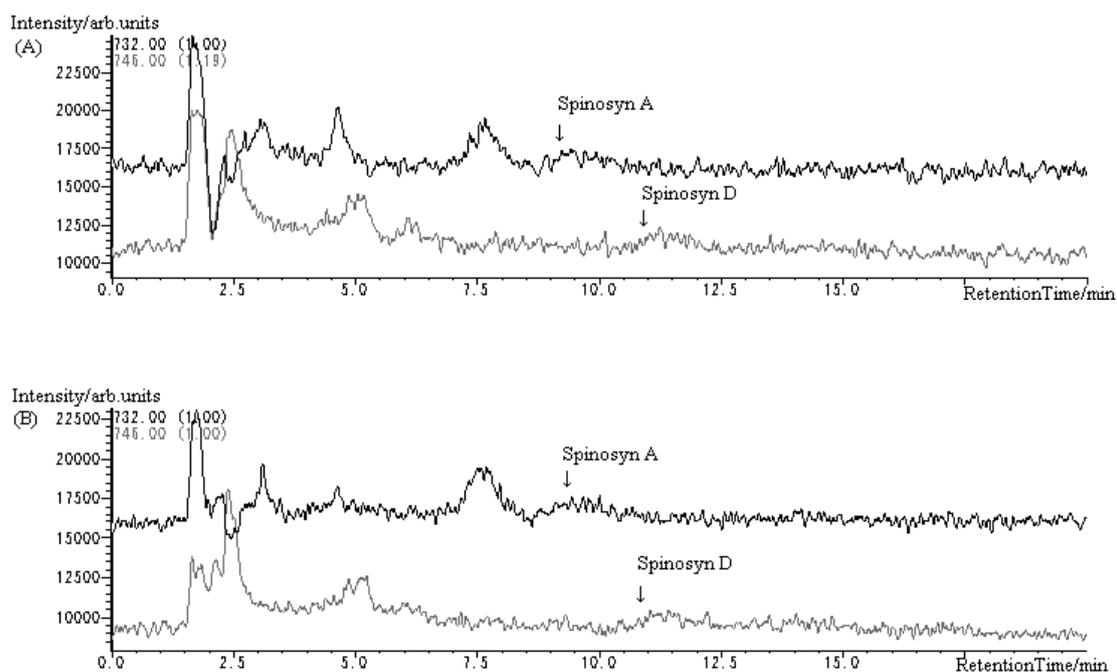


Fig. 5 SIM chromatograms of blank solutions

LC-MS conditions are shown in Table 2.

(A) Sample solution of corn (not spiked)

(B) Sample solution of alfalfa hay (not spiked)

(Arrows indicate the retention time of spinosyn A and D)

3.6 添加回収試験

2.1 で調製した成鶏飼育用配合飼料，若令牛育成用配合飼料及びとうもろこしにスピノシン A 及び D として 0.10 及び 0.010 mg/kg 相当量，アルファルファ乾草に 1.0 及び 0.10 mg/kg 相当量，稲わらに 0.25 及び 0.025 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて，本法により 3 点併行で定量し，回収率及び繰返し精度を検討した。

その結果は，Table 4 及び 5 のとおり，スピノシン A については平均回収率 86.8~106 %，その繰返し精度は，相対標準偏差（RSD）として 5.4 %以下，スピノシン D については平均回収率 86.5~100 %，その繰返し精度は，RSD として 6.5 %以下の成績が得られた。

なお，添加回収試験で得られた選択イオン検出クロマトグラムの一例を Fig. 6 に示した。

Table 4 Recoveries of spinosyn A from five kinds of feed

| Spiked level (mg/kg) | Feed types | | | | | | | | | |
|----------------------|----------------------------|-----------------------|---------------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|
| | Formula feed for layer | | Formula feed for growing cattle | | Corn | | Alfalfa hay | | Rice straw | |
| | Recovery ^{a)} (%) | RSD ^{b)} (%) | Recovery ^{a)} (%) | RSD ^{b)} (%) | Recovery ^{a)} (%) | RSD ^{b)} (%) | Recovery ^{a)} (%) | RSD ^{b)} (%) | Recovery ^{a)} (%) | RSD ^{b)} (%) |
| 1.0 | | | | | | | 91.6 | 1.0 | | |
| 0.25 | | | | | | | | | 98.2 | 2.6 |
| 0.10 | 106 | 1.6 | 93.4 | 2.4 | 95.8 | 1.2 | 96.8 | 4.2 | | |
| 0.025 | | | | | | | | | 86.8 | 0.9 |
| 0.010 | 91.7 | 5.4 | 92.9 | 0.3 | 101 | 2.2 | | | | |

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 5 Recoveries of spinosyn D from five kinds of feed

| Spiked level (mg/kg) | Feed types | | | | | | | | | |
|----------------------|----------------------------|-----------------------|---------------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|
| | Formula feed for layer | | Formula feed for growing cattle | | Corn | | Alfalfa hay | | Rice straw | |
| | Recovery ^{a)} (%) | RSD ^{b)} (%) | Recovery ^{a)} (%) | RSD ^{b)} (%) | Recovery ^{a)} (%) | RSD ^{b)} (%) | Recovery ^{a)} (%) | RSD ^{b)} (%) | Recovery ^{a)} (%) | RSD ^{b)} (%) |
| 1.0 | | | | | | | 89.2 | 1.6 | | |
| 0.25 | | | | | | | | | 100 | 2.0 |
| 0.10 | 99.6 | 4.3 | 94.7 | 2.9 | 98.0 | 1.7 | 91.9 | 6.5 | | |
| 0.025 | | | | | | | | | 86.5 | 4.0 |
| 0.010 | 90.1 | 2.4 | 95.2 | 4.8 | 98.9 | 1.4 | | | | |

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

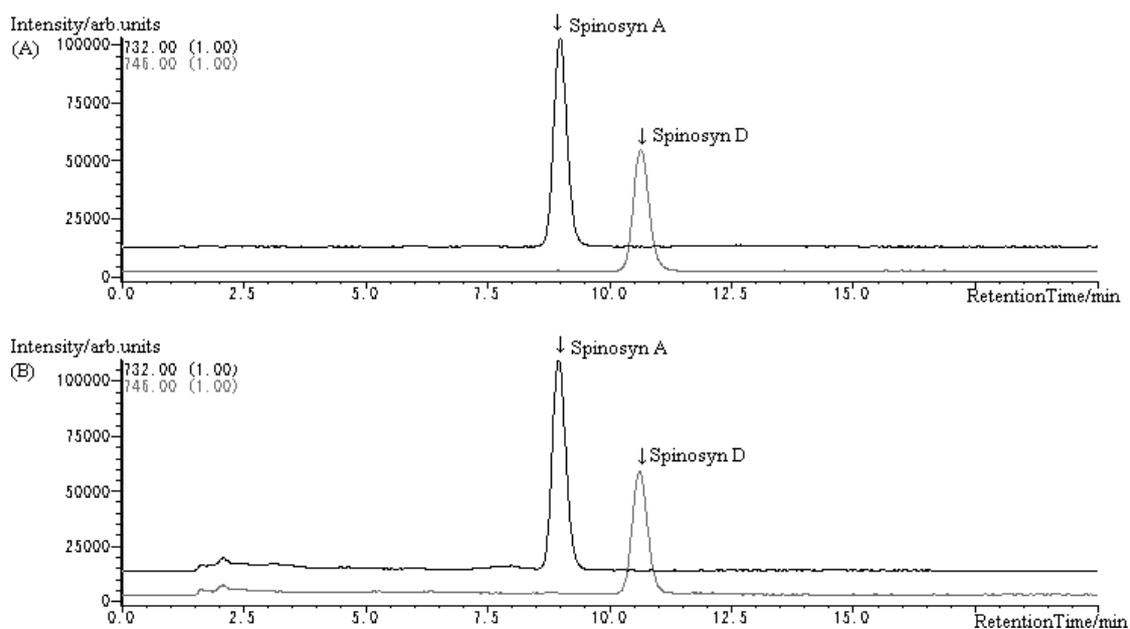


Fig. 6 SIM chromatograms of spinosyn A and D

LC-MS conditions are shown in Table 2.

(A) Standard solution of spinosyn A and D (The amount was each 0.25 ng.)

(B) Sample solution of formula feed for layer spiked at each 0.10 mg/kg

(Arrows indicate the peak of spinosyn A and D)

3.7 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するために、成鶏飼育用配合飼料、乾牧草（アルファルファ乾草）及び稲わらに、スピノシン A 及び D をそれぞれ添加し、添加回収試験により得られるピークの SN 比が 10 及び 3 となる濃度をそれぞれ求めた。

その結果、スピノシン A においては、得られたピークの SN 比が 10 以上となる濃度は 0.0025 mg/kg（乾牧草では 0.025 mg/kg、稲わらでは 0.0050 mg/kg）であった。また、スピノシン D においては、得られたピークの SN 比が 10 以上となる濃度は 0.0050 mg/kg（乾牧草では 0.050 mg/kg、稲わらでは 0.010 mg/kg）であった。

確認のため、スピノシン A として、成鶏飼育用配合飼料、乾牧草（アルファルファ乾草）及び稲わらに、それぞれ 0.0025、0.025 及び 0.0050 mg/kg 相当量を添加した試料について、本法により 3 点併行で定量を行った結果は Table 6 のとおりであり、成鶏飼育用配合飼料、乾牧草（アルファルファ乾草）及び稲わらにおいて、平均回収率は 95.2、102 及び 89.9 %、その繰返し精度は相対標準偏差（RSD）として 2.6、4.8 及び 1.4 %であった。

また、スピノシン D として、成鶏飼育用配合飼料、乾牧草（アルファルファ乾草）及び稲わらに、それぞれ 0.0050、0.050 及び 0.010 mg/kg 相当量を添加した試料について、本法により 3 点併行で定量を行った結果は Table 7 のとおりであり、成鶏飼育用配合飼料、乾牧草（アルファルファ乾草）及び稲わらにおいて、平均回収率は 88.7、90.8 及び 84.1 %、その繰返し精度は RSD として 4.4、6.1 及び 0.2 %であった。

以上の結果から、スピノシン A では、本法の定量下限は 0.0025 mg/kg（乾牧草では 0.025 mg/kg、稲わらでは 0.0050 mg/kg）であった。また、検出下限は SN 比が 3 となる濃度から 0.001

mg/kg (乾牧草では 0.008 mg/kg, 稲わらでは 0.002 mg/kg) であった。

また, スピノシン D では, 本法の定量下限は 0.0050 mg/kg (乾牧草では 0.050 mg/kg, 稲わらでは 0.010 mg/kg) であった。また, 検出下限は SN 比が 3 となる濃度から 0.002 mg/kg (乾牧草では 0.02 mg/kg, 稲わらでは 0.003 mg/kg) であった。

Table 6 Recoveries and limit of quantification of spinosyn A in feeds

| Spiked level (mg/kg) | Feed types | | | | | |
|----------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|
| | Formula feed for layer | | Alfalfa hay | | Rice straw | |
| | Recovery ^{a)} (%) | RSD ^{b)} (%) | Recovery ^{a)} (%) | RSD ^{b)} (%) | Recovery ^{a)} (%) | RSD ^{b)} (%) |
| 0.025 | | | 102 | 4.8 | | |
| 0.0050 | | | | | 89.9 | 1.4 |
| 0.0025 | 95.2 | 2.6 | | | | |

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 7 Recoveries and limit of quantification of spinosyn D in feeds

| Spiked level (mg/kg) | Feed types | | | | | |
|----------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|
| | Formula feed for layer | | Alfalfa hay | | Rice straw | |
| | Recovery ^{a)} (%) | RSD ^{b)} (%) | Recovery ^{a)} (%) | RSD ^{b)} (%) | Recovery ^{a)} (%) | RSD ^{b)} (%) |
| 0.050 | | | 90.8 | 6.1 | | |
| 0.010 | | | | | 84.1 | 0.2 |
| 0.0050 | 88.7 | 4.4 | | | | |

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.8 共同試験

本法の再現精度を調査するため, 成鶏飼育用配合飼料及びとうもろこしにスピノシン A 及びスピノシン D としてそれぞれ 0.10 mg/kg 相当量, 稲わらにスピノシン A 及びスピノシン D としてそれぞれ 0.25 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて, JA 東日本くみあい飼料株式会社品質安全部, 財団法人日本食品分析センター多摩研究所, 株式会社島津総合分析試験センター, 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部, 同仙台センター, 同名古屋センター, 同神戸センター及び同福岡センター (8 試験室) において, 本法に従って共同試験を実施した。

その結果, Table 8 のとおり, スピノシン A について, 成鶏飼育用配合飼料では, 平均回収率は 96.3 %, その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 (RSD_F 及び RSD_R) として 2.7 % 及び 11 % であり, HorRat は 0.49 であった。稲わらでは, 平均回収率は 90.1 %, その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_F 及び RSD_R として 1.8 % 及び 8.5 % であり, HorRat は 0.43 であった。とうもろこしでは, 平均回収率は 93.2 %, その室内繰返し精度及び室

間再現精度はそれぞれ RSD_r 及び RSD_R として 4.5 % 及び 9.2 % であり, HorRat は 0.42 であった.

また, Table 9 のとおり, スピノシン D について, 成鶏飼育用配合飼料では平均回収率は 95.2 %, その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 (RSD_r 及び RSD_R) として 3.6 % 及び 12 % であり, HorRat は 0.52 であった. 稲わらでは, 平均回収率は 92.8 %, その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_r 及び RSD_R として 2.8 % 及び 10 % であり, HorRat は 0.52 であった. とうもろこしでは, 平均回収率は 93.2 %, その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_r 及び RSD_R として 3.7 % 及び 14 % であり, HorRat は 0.62 であった.

なお, 参考のため, 各試験室で使用した液体クロマトグラフ質量分析計の機種等を Table 10 に示した.

Table 8 Collaborative study for spinosyn A

| Lab.No. | Formula feed for layer | | Rice straw | | Corn | |
|-------------------------------------|---------------------------|--------|------------|-------|---------|--------|
| | (mg/kg) | | (mg/kg) | | (mg/kg) | |
| 1 | 0.107 | 0.107 | 0.250 | 0.249 | 0.0956 | 0.0971 |
| 2 | 0.0971 | 0.0990 | 0.233 | 0.235 | 0.0971 | 0.0909 |
| 3 | 0.109 | 0.110 | 0.247 | 0.241 | 0.100 | 0.103 |
| 4 | 0.0923 | 0.0922 | 0.222 | 0.229 | 0.0918 | 0.0956 |
| 5 | 0.0905 | 0.0939 | 0.200 | 0.190 | 0.0817 | 0.0713 |
| 6 | 0.0754 | 0.0813 | 0.237 | 0.229 | 0.102 | 0.0984 |
| 7 | 0.106 | 0.100 | 0.206 | 0.202 | 0.0911 | 0.101 |
| 8 | 0.0875 | 0.0918 | 0.215 | 0.217 | 0.0880 | 0.0871 |
| Spiked level (mg/kg) | 0.10 | | 0.25 | | 0.10 | |
| Mean value ^{a)} (mg/kg) | 0.0963 | | 0.225 | | 0.0932 | |
| Recovery ^{a)} (%) | 96.3 | | 90.1 | | 93.2 | |
| RSD_r ^{b)} (%) | 2.7 | | 1.8 | | 4.5 | |
| RSD_R ^{c)} (%) | 11 | | 8.5 | | 9.2 | |
| PRSD _R ^{d)} (%) | 22 | | 20 | | 22 | |
| HorRat | 0.49 | | 0.43 | | 0.42 | |

a) $n=16$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

d) Predicted relative standard deviations of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 9 Collaborative study for spinosyn D

| Lab.No. | Formula feed | | Rice straw | | Corn | |
|-------------------------------------|----------------------|--------|------------|-------|---------|--------|
| | for layer (mg/kg) | | (mg/kg) | | (mg/kg) | |
| 1 | 0.103 | 0.101 | 0.256 | 0.252 | 0.100 | 0.0979 |
| 2 | 0.104 | 0.108 | 0.244 | 0.237 | 0.102 | 0.0970 |
| 3 | 0.109 | 0.110 | 0.246 | 0.247 | 0.101 | 0.103 |
| 4 | 0.0992 | 0.0958 | 0.230 | 0.229 | 0.0951 | 0.0956 |
| 5 | 0.0897 | 0.0934 | 0.194 | 0.190 | 0.0784 | 0.0751 |
| 6 | 0.0814 | 0.0922 | 0.251 | 0.274 | 0.115 | 0.103 |
| 7 | 0.0797 | 0.0745 | 0.220 | 0.216 | 0.0721 | 0.0745 |
| 8 | 0.0918 | 0.0909 | 0.217 | 0.210 | 0.0904 | 0.0912 |
| Spiked level (mg/kg) | 0.10 | | 0.25 | | 0.10 | |
| Mean value ^{a)} (mg/kg) | 0.0952 | | 0.232 | | 0.0932 | |
| Recovery ^{a)} (%) | 95.2 | | 92.8 | | 93.2 | |
| RSD _r ^{b)} (%) | 3.6 | | 2.8 | | 3.7 | |
| RSD _R ^{c)} (%) | 12 | | 10 | | 14 | |
| PRSD _R ^{d)} (%) | 22 | | 20 | | 22 | |
| HorRat | 0.52 | | 0.52 | | 0.62 | |

a) $n=16$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

d) Predicted relative standard deviations of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 10 Instruments used in the collaborative study

| Lab.No. | Instrument | LC column |
|---------|-------------------------|---|
| | | (i.d. × length, particle size) |
| 1 | SHIMADZU | GL Sciences Inertsil ODS-3 |
| | LCMS-2010EV | (2.1×150 mm, 5 μm) |
| 2 | Waters | Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 |
| | micromass Quattro Micro | (2.1×150 mm, 3.5 μm) |
| 3 | SHIMADZU | GL Sciences Inertsil ODS-3 |
| | LCMS-2010EV | (2.1×150 mm, 5 μm) |
| 4 | Waters | Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 |
| | ACQUITY TQ Detector | (2.1×150 mm, 5 μm) |
| 5 | SHIMADZU | GL Sciences Inertsil ODS-3 |
| | LCMS-2010EV | (2.1×150 mm, 5 μm) |
| 6 | SHIMADZU | GL Sciences Inertsil ODS-3 |
| | LCMS-2010EV | (2.1×150 mm, 5 μm) |
| 7 | SHIMADZU | SHIMADZU Shim-pack VP-ODS |
| | LCMS-2010EV | (2.0×150 mm, 5 μm) |
| 8 | Agilent Technologies | GL Sciences Inertsil ODS-3 |
| | G1946C | (2.1×150 mm, 5 μm) |

4 まとめ

飼料中のスピノサドについて、分析センター法を基に、液体クロマトグラフ質量分析計を用いた定量法の飼料分析基準への適用の可否について検討したところ、次の結果を得た。

- 1) イオン化法として、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法 (正イオンモード) , モニターイオンとして、スピノシン A 及び D についてそれぞれ m/z 732 及び 746 (すべてプロトン付加分子 $[M+H]^+$) を適用したところ良好な測定が可能であった。
- 2) 液体クロマトグラフ質量分析計の溶離液にアセトニトリル-5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (9+1) , カラムに Inertsil ODS-3 (内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 5 μm) を適用したところ良好な測定が可能であった。
- 3) 検量線はスピノシン A 及び D として 0.005~5 ng の範囲で直線性を示した。
- 4) シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出画分の検討を行ったところ、溶出溶媒の必要量は 10 mL であった。
- 5) 5 種類の配合飼料及び 6 種類の飼料原料について、本法に従ってクロマトグラムを作成したところ、スピノシン A 及び D の定量を妨げるピークは認められなかった。
- 6) 成鶏飼育用配合飼料, 若令牛育成用配合飼料, とうもろこし, アルファルファ乾草及び稲わらにスピノシン A 及び D として 0.10 及び 0.010 mg/kg 相当量 (アルファルファ乾草については 1.0 及び 0.10 mg/kg 相当量, 稲わらについては 0.25 及び 0.025 mg/kg 相当量) を添加し, 本法に従って添加回収試験を実施したところ, スピノシン A については平均回収率 86.8~106 %, その繰返し精度は, 相対標準偏差 (RSD) として 5.4 %以下, スピノシン D については平均回収率 86.5~100 %, その繰返し精度は, RSD として 6.5 %以下の成績が得られた。
- 7) 本法によるスピノシン A の定量下限は試料中で 0.0025 mg/kg (乾牧草では 0.025 mg/kg, 稲わらでは 0.0050 mg/kg) , 検出下限は 0.001 mg/kg (乾牧草では 0.008 mg/kg, 稲わらでは 0.002 mg/kg) であった。

また, スピノシン D の定量下限は試料中で 0.0050 mg/kg (乾牧草では 0.050 mg/kg, 稲わらでは 0.010 mg/kg) , 検出下限は 0.002 mg/kg (乾牧草では 0.02 mg/kg, 稲わらでは 0.003 mg/kg) であった。

- 8) 成鶏飼育用配合飼料及びとうもろこしにスピノシン A 及びスピノシン D としてそれぞれ 0.10 mg/kg 相当量, 稲わらにスピノシン A 及びスピノシン D としてそれぞれ 0.25 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて, 8 試験室において, 本法による共同試験を実施した。その結果, スピノシン A について, 成鶏飼育用配合飼料では, 平均回収率は 96.3 %, その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 (RSD_f 及び RSD_R) として 2.7 %及び 11 %であり, HorRat は 0.49 であった。稲わらでは, 平均回収率は 90.1 %, その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f 及び RSD_R として 1.8 %及び 8.5 %であり, HorRat は 0.43 であった。とうもろこしでは, 平均回収率は 93.2 %, その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f 及び RSD_R として 4.5 %及び 9.2 %であり, HorRat は 0.42 であった。スピノシン D について, 成鶏飼育用配合飼料では平均回収率は 95.2 %, その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 (RSD_f 及び RSD_R) として 3.6 %及び 12 %であり, HorRat は 0.52 であった。稲わらでは, 平均回収率は 92.8 %, その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f 及び RSD_R として 2.8 %及び 10 %であり, HorRat は 0.52 であった。とうもろこしでは, 平均回収率は 93.2 %, その室

内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_f 及び RSD_R として 3.7 %及び 14 %であり、HorRat は 0.62 であった。

謝 辞

共同試験に参加して頂いた JA 東日本くみあい飼料株式会社品質安全部，財団法人日本食品分析センター多摩研究所，株式会社島津総合分析試験センターの試験室の各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 食品安全委員会 第 54 回農薬専門調査会幹事会：スピノサド農薬評価書（案），平成 21 年 8 月 21 日 (2009).
- 2) 農林水産省畜産局長通知：“飼料の有害物質の指導基準の制定について”，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：“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ついて”，平成 17 年 1 月 24 日，食安発第 0124001 号 (2005).
- 4) 財団法人日本食品分析センター：平成 18 年度飼料中の有害物質等残留基準を設定するための分析法開発及び家畜等への移行調査委託事業 飼料中の有害物質等の分析法の開発，97 (2007).
- 5) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).