

2.3 模擬食材への原材料添加による添加回収および安定性試験

牛乳試料と同様に ELISA 法のみでなくウエスタンブロット法にも対応できるよう、SDS、メルカプトエタノールを含まない試料の作製を検討した。すなわち、あらかじめ作製したマッシュポテト基材に全卵の水溶液を混合して試料を作製した。卵タンパク質の添加量は 10 μ g/g (2-D Quant Kit の測定値から計算)とした。添加タンパク質量を基準にして求めた保存前の回収率は、モリナガ FASPEK 卵 測定キットで 69.4%、FASTKIT エライザ Ver. II 卵で 86.4%であった(表 7)。添加試料を-20 $^{\circ}$ Cで保存し、1、4、12 週後の測定値を保存前の測定値で除した回収率はいずれも 90%以上で、-20 $^{\circ}$ Cにおける安定性が、12 週まで確認された(図 8)。また、本試料について均一性試験は実施していないが、ELISA キットの各時点における測定値の RSD(n=4)が、いずれも 5%以内だったことから、ある程度均一性が確認できたものと考えられた。

2.4 ウエスタンブロッティングによる確認試験

2.3 の試料について-20 $^{\circ}$ Cで約 1 ヶ月保存後にウエスタンブロットによる確認試験を実施し、結果を図 9 に示した。試料のゲルへの重層量を変えて電気泳動し、卵白アルブミン抗体とオボムコイド抗体で検出した結果、全卵添加模擬食材の抽出液はいずれの抗体でも食材への添加量として 5 μ g/g に相当する重層量までバンドを確認できた。一方、模擬食材のみではバンドは検出されなかった。

また、別に自家製抽出液(卵)を卵タン

パク質として 10 μ g/g 添加したクッキーを作製し、-20 $^{\circ}$ Cで約 1 ヶ月保存後に ELISA 法用抽出液で抽出し、同様に確認試験を実施した。その結果、自家製抽出液(卵)添加クッキーでも 5 μ g/g に相当する添加量までバンドを確認でき、クッキーのみではバンドは検出されなかった。以上の結果からマッシュポテト基材に全卵を添加した食材は、ELISA 法のみでなくウエスタンブロット法にも使用でき、少なくとも-20 $^{\circ}$ Cで1ヶ月まで安定であると考えられた。また、自家製抽出液(卵)添加クッキーもウエスタンブロット法に使用できることが分かった。

E. 結論

1. 乳試料作製の検討

スキムミルク粉末(和光)、スキムミルク(雪印)および Whole Milk Powder から厚生労働省の通知法、標準品規格に従って抽出液を作製し、タンパク質を化学的方法と ELISA 法により測定するとともに、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を実施した。その結果、化学的方法、ELISA 法のいずれにおいても回収率が最も良く、電気泳動像から変性が少ないことが確認できたスキムミルク粉末(和光)を用いて自家製抽出液(乳)を作製することとした。

自家製抽出液(乳)の保存安定性を ELISA 法により検討した結果、-80 $^{\circ}$ C、12 週までの安定性が確認された。また、自家製抽出液(乳)を添加した食材についても同様に-20 $^{\circ}$ C、12 週までの安定性が確認できた。

ELISA 法のみでなくウエスタンブロット法にも対応できるよう、マッシュポテト基材にスキムミルク粉末(和光)の水溶液を混合して調製した試料においては、ELISA

法で-20℃、12週までの安定性が確認でき、ウエスタンブロット法では、カゼイン抗体、β-ラクトグロブリン抗体とも5μg/gまでバンドが検出できた。

以上の結果から、自家製抽出液（乳）を添加した試料およびマッシュポテト基材にスキムミルク粉末(和光)を添加した試料について、牛乳用精度管理試料として使用できる見通しがたったものとする。

2. 卵試料作製の検討

自家製抽出液（卵）を添加した試料について安定性を検討した結果、-20℃、14週までの保存安定性が確認できた。

ELISA法のみでなくウエスタンブロット法にも対応できるよう、マッシュポテト基材に全卵の水溶液を混合して調製した試料においては、ELISA法で-20℃、12週までの安定性が確認でき、ウエスタンブロット法では、卵白アルブミン抗体、オボムコイド抗体とも5μg/gまでバンドが検出できた。

以上の結果から、自家製抽出液（卵）を添加した試料および、マッシュポテト基材に全卵を添加した試料について、卵用精度管理試料として使用できる見通しがたったものとする。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

引用文献

1) Watanabe et.al. : Novel ELISA for the detection of raw and processed egg using extraction buffer containing a surfactant and a reducing agent,

J.Immunol. Methods 300, 115-123(2005)

2) Kristina M. Williams and Carmen D. Westphal : Determination of egg proteins in snack food and noodles,

AOAC Int.87(6), 1485-1497(2004)

謝辞

本研究に対しご助言頂いた国立医薬品食品衛生研究所、食品部第3室長、穂山浩先生に深謝致します。

表1 牛乳高濃度標準溶液添加食材の回収率

試料 ^a	牛乳タンパク質 モリナカ [®] FASPEK牛乳測定キット(カゼイン)				FASTKITエライザVer. II 牛乳		
	添加量 ^b (μ g/tube)	測定値 (μ g/tube)	回収率 (%)	RSD (%)	測定値 (μ g/tube)	回収率 (%)	RSD (%)
クッキー	0	0.0	-	-	0.0	-	-
	10.3	8.4	81.8	4.5	8.3	80.2	6.3
ハンペン	0	0.0	-	-	0.0	-	-
	10.3	6.9	67.0	1.7	5.0	48.1	7.8
肉そぼろ	0	0.0	-	-	0.0	-	-
	10.3	3.6	34.6	4.4	3.9	38.1	3.1
クラッカー	0	0.0	-	-	0.0	-	-
	10.3	8.9	86.2	1.1	7.6	74.1	3.3
ビスケット	0	1.2	-	-	1.2	-	-
	10.3	9.1	88.2	4.0	8.1	79.2	6.8
パイ	0	0.0	-	-	0.0	-	-
	10.3	8.2	80.0	3.4	8.3	80.8	13.3

添加量 10.3 は 3測定の平均、添加量 0 は 2測定の平均

a 食品サンプルはそれぞれ 1g を分取

b 高濃度標準溶液(乳標準品、二次希釈液)の表示量から計算

表2 スキムミルク粉末(和光)、スキムミルク(雪印)、Whole Milk Powderの標準品規格による抽出液のタンパク質量

試料	化学的方法による				免疫化学的方法によるタンパク質量				
	分取試料0.2g中のタンパク質量 ^b		モリナガFASPEK牛乳測定キット(カゼイン)		FASTKITエライザ ^g Ver. II牛乳				
	測定値(A) (mg/mL)	抽出率 ^c (%)	測定値(M) (mg/mL)	抽出率 ^d (%)	測定値(N) (mg/mL)	抽出率 ^f (%)	測定値(N) (mg/mL)	回収率 ^e (%)	
スキムミルク粉末(和光)	71.4	2.86	80.1	2.48	69.5	86.5	2.06	57.7	71.8
スキムミルク(雪印)	72.6	2.79	76.9	2.34	64.5	83.8	1.99	54.8	70.2
Whole Milk Powder	51.8	1.94	74.9	1.31	50.6	67.4	1.09	42.1	56.8

試料 0.2g に 0.5% SDS、2% Mercaptoethanol を含む PBS(pH7.4) 20mLを加え 1晩振盪して抽出

a : 添付文書(ケルダール法で測定された値)から算出

b : 2-D Quant Kit(アマシヤムバイオサイエンス)により測定

c : $(A) \times 20 / (K) \times 100$

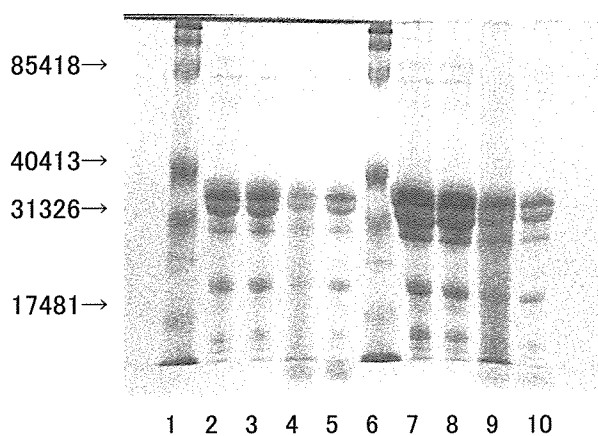
d : $(M) \times 20 / (K) \times 100$

e : $(M) \times 20 / (A) \times 100$

f : $(N) \times 20 / (K) \times 100$

g : $(N) \times 20 / (A) \times 100$

図1 スキムミルク粉末(和光)、スキムミルク(雪印)、Whole milk powder、牛乳の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動像



- 1、6 Molecular weight marker
- 2 スキムミルク粉末(和光)抽出液
- 3 スキムミルク(雪印)抽出液
- 4 Whole milk powder 抽出液
- 5 牛乳抽出液
- 7 スキムミルク粉末(和光)
- 8 スキムミルク(雪印)
- 9 Whole milk powder
- 10 牛乳

表3 自家製抽出液(乳)の回収率および-80°Cにおける安定性

試料	-80°Cでの 保存期間 (week)	牛乳 タンパク質量 ^a ($\mu\text{g/g}$)	モリナカFASPEK牛乳測定キット(カゼイン)			FASTKITエライザVer. II 牛乳		
			測定値 ($\mu\text{g/g}$)	回収率 ^b (%)	RSD (%)	測定値 ($\mu\text{g/g}$)	回収率 ^b (%)	RSD (%)
自家製 抽出液(乳)	保存前	10.9	9.3	85.1	2.0	6.2	57.0	14.5
	1	10.9	9.6	88.1	3.1	7.1	65.1	13.5
	4	10.9	8.8	80.8	1.3	6.2	57.0	9.3
	12	10.9	9.3	85.5	1.2	6.5	59.4	5.0

データは4測定の平均

a 2-D Quant Kit による測定値から計算

b 2-D Quant Kit による牛乳タンパク質量から計算した回収率(%)

図2 自家製抽出液(乳)の-80°Cにおける安定性

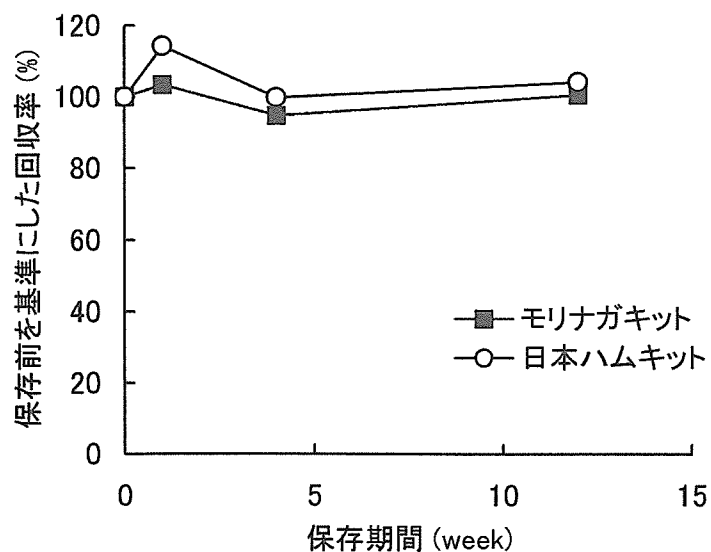


表4 自家製抽出液(乳)添加食材の回収率および-20℃における安定性

試料	-20℃での 保存期間 (week)	牛乳タンパク質 添加量 ^a ($\mu\text{g/g}$)	モリナガFASPEK牛乳測定キット(カゼイン)			FASTKITエライザVer. II 牛乳		
			測定値 ($\mu\text{g/g}$)	回収率 ^b (%)	RSD (%)	測定値 ($\mu\text{g/g}$)	回収率 ^b (%)	RSD (%)
自家製 抽出液(乳)	保存前	10.9	9.2	84.6	1.2	6.4	58.3	2.5
	1	10.9	8.9	81.2	4.7	7.0	64.3	5.0
添加クッキー	4	10.9	9.0	82.8	2.4	6.5	59.2	2.9
	12	10.9	9.6	87.7	2.0	7.3	66.8	7.9
クッキー	保存前	0.0	0.0	-	-	0.0	-	-
	12	0.0	0.0	-	-	0.0	-	-

添加量 0 は 2測定の平均、その他 は 4測定の平均、

a 自家製抽出液(乳)の2-D Quant Kit による測定値から計算

b 牛乳タンパク質添加量から計算した回収率(%)

図3 自家製抽出液(乳)添加食材の-20℃における安定性

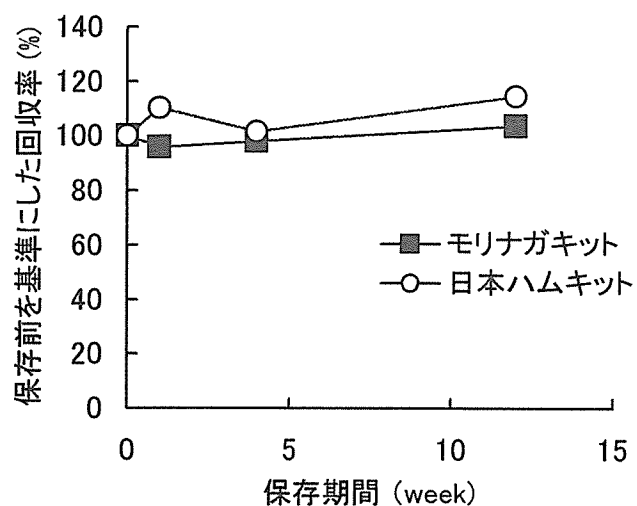


表5 スkimミルク粉末(和光)添加模擬食材についての回収率および-20℃における安定性

試料	-20℃での 保存期間 (week)	牛乳タンパク質 添加量 ^a (μg/g)	モリナガFASPEK牛乳測定キット(カゼイン)			FASTKITエライザVer. II 牛乳		
			測定値 (μg/g)	回収率 ^b (%)	RSD (%)	測定値 (μg/g)	回収率 ^b (%)	RSD (%)
添加液 ^c	保存前	12.3	9.5	77.2	3.7	7.1	58.0	6.6
	保存前	12.3	11.5	93.5	3.3	9.2	74.9	10.1
skimミルク粉末(和光) 添加模擬食材	1	12.3	10.6	86.3	2.4	8.4	68.7	11.2
	4	12.3	9.3	75.7	7.8	6.9	56.4	9.5
	12	12.3	10.4	84.3	1.4	8.0	65.2	5.4
模擬食材	保存前	0.0	0.0	-	-	0.0	-	-
	12	0.0	0.0	-	-	0.0	-	-

添加量 0 は 2測定の平均、その他 は 4測定の平均、

a 添加液の2-D Quant Kit による測定値から計算

b 牛乳タンパク質添加量から計算した回収率(%)

c skimミルク粉末(和光)水溶液

図4 skimミルク粉末(和光)添加模擬食材の-20℃における安定性

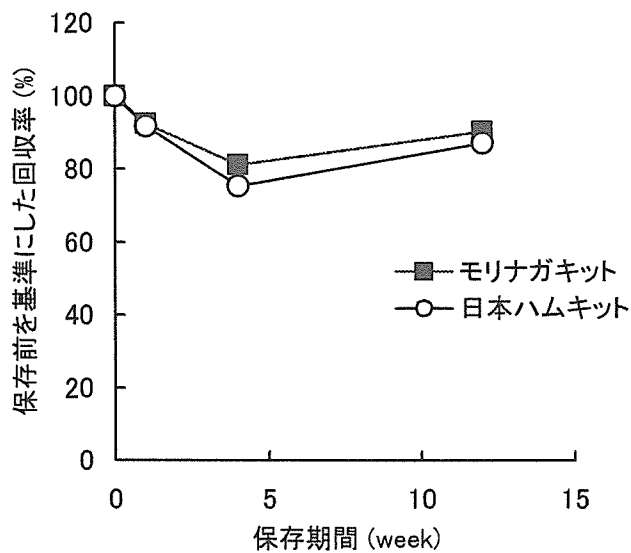


図5 牛乳試料のウエスタンブロット結果

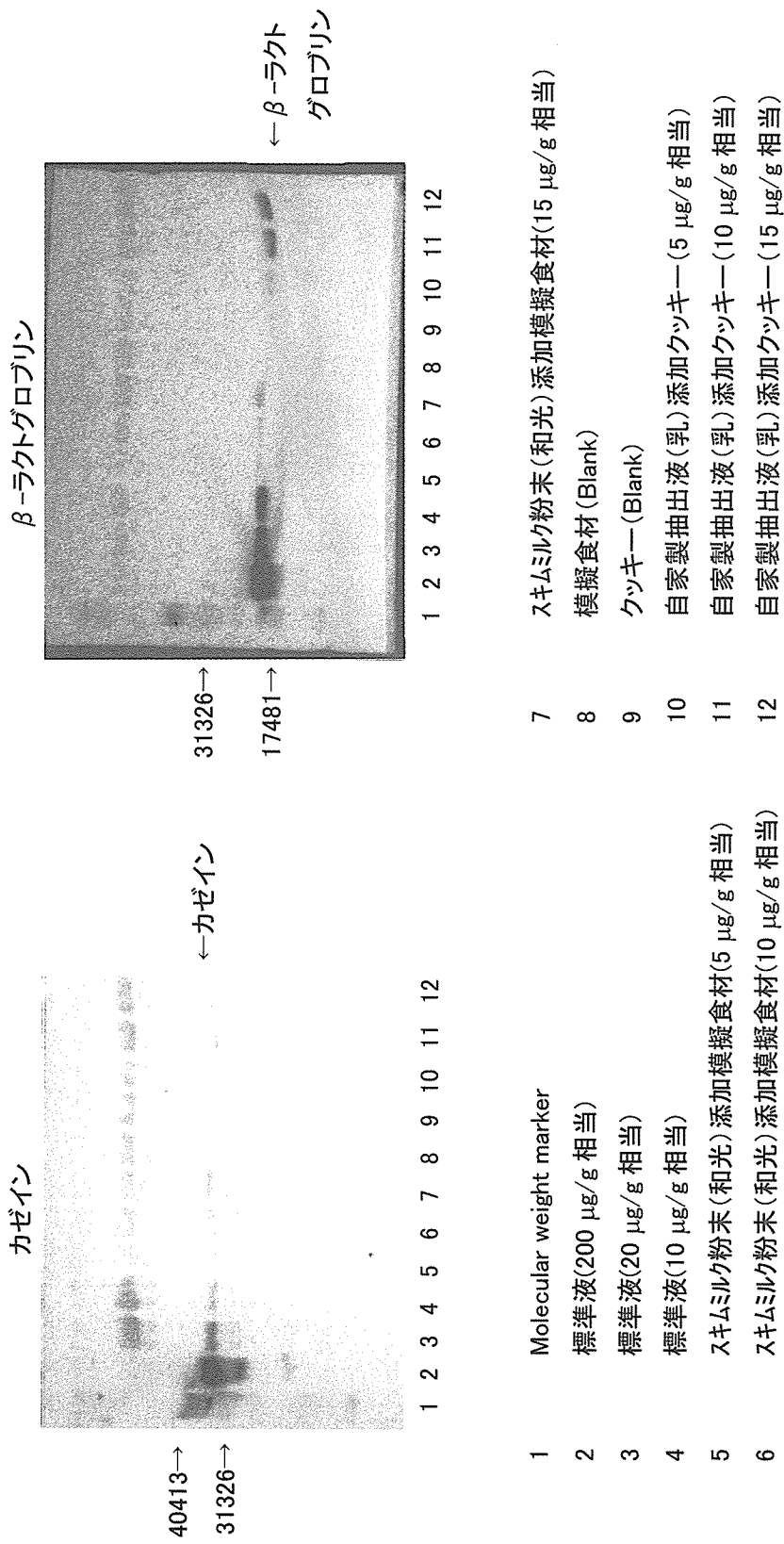
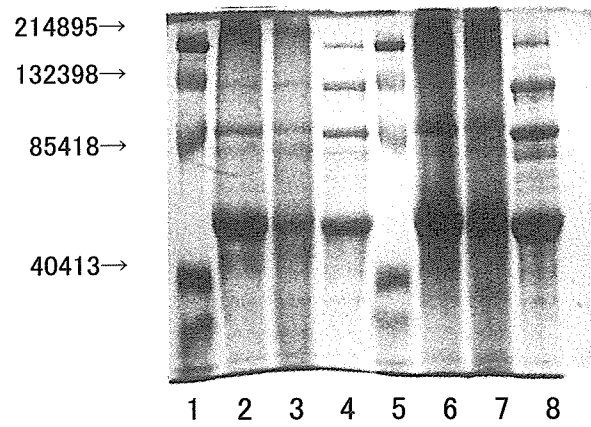


図 6 Egg solids、Whole egg powder、全卵の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動像



- 1、5 Molecular weight marker
- 2 Egg solids 抽出液
- 3 Whole egg powder 抽出液
- 4 全卵抽出液
- 6 Egg solids
- 7 Whole egg powder
- 8 全卵

表6 自家製抽出液(卵)添加食材の-20°Cにおける安定性

測定キット	添加食材	保存前				-20°C 4週間保存後				-20°C 14週間保存後			
		添加量 ^a (μg/tube)	測定値 (μg/tube)	回収率 ^b (%)	RSD (%)	測定値B (μg/tube)	回収率 ^b (%)	RSD (%)	測定値C (μg/tube)	回収率 ^b (%)	RSD (%)	測定値D (μg/tube)	回収率 ^b (%)
モリナガ FASPEK卵測定 キット	クリームサンド クッキー	0	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-
		5.0	4.4	88.3	1.3	4.7	94.5	1.8	4.3	85.7	2.1	4.3	85.7
		10.0	7.6	76.5	3.5	8.1	80.8	2.0	6.9	69.0	0.3	6.9	69.0
ハンバーグ		0	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-
		5.0	4.6	91.5	2.9	4.6	91.8	2.8	4.2	83.8	1.6	4.2	83.8
		10.0	7.7	77.1	1.7	7.7	77.4	2.0	6.9	68.9	2.3	6.9	68.9
FASTKITエライ ザVer. II 卵	クリームサンド クッキー	0	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-
		5.0	5.7	113.4	2.1	5.5	110.2	0.9	5.7	114.5	1.0	5.7	114.5
		10.0	9.8	97.6	1.7	9.9	99.3	0.8	10.0	100.1	1.1	10.0	100.1
ハンバーグ		0	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-
		5.0	4.9	97.2	1.3	4.5	90.5	1.8	4.5	90.2	3.8	4.5	90.2
		10.0	8.5	85.3	3.5	8.4	84.5	0.8	8.2	81.8	4.2	8.2	81.8

添加量 5.0 および 10.0 は 3測定 の平均、添加量 0 は 2測定 の平均

a 2-D Quant Kit による測定値から計算 b 卵タンパク質添加量から計算した回収率(%)

図7 自家製抽出液(卵)添加食材の安定性

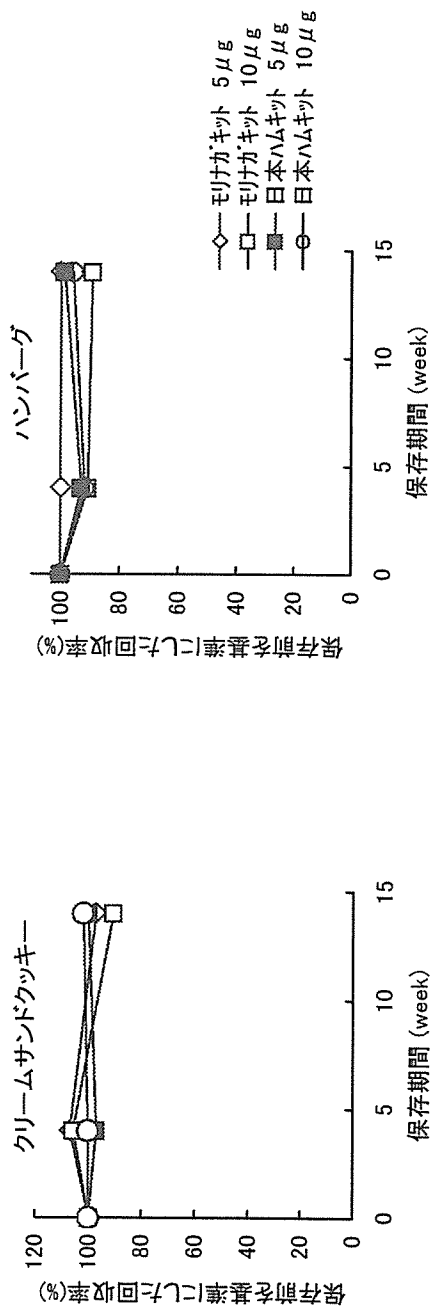


表7 全卵添加模擬食材の回収率および-20°Cにおける安定性

試料	-20°Cでの 保存期間	卵タンパク質	モリナガFASPEK卵測定キット			FASTKITエライザVer. II 卵		
		添加量 ^a ($\mu\text{g/g}$)	測定値 ($\mu\text{g/g}$)	回収率 ^b (%)	RSD (%)	測定値 ($\mu\text{g/g}$)	回収率 ^b (%)	RSD (%)
添加液 ^c	保存前	10	5.1	50.5	3.1	6.9	69.0	4.3
全卵添加 模擬食材	保存前	10	6.9	69.4	2.3	8.6	86.4	0.8
	1	10	6.4	64.3	4.6	8.1	81.0	2.6
	4	10	6.8	68.3	2.2	8.9	88.6	3.0
模擬食材	12	10	6.6	66.1	2.7	9.0	90.4	2.2
	保存前	0	0.0	-	-	0.0	-	-
	12	0	0.0	-	-	0.0	-	-

添加量 10.0 は 4測定 の平均、添加量 0 は 2測定 の平均

a 2-D Quant Kit による測定値から計算

b 卵タンパク質添加量から計算した回収率(%)

c 全卵水溶液

図8 全卵添加模擬食材の-20°Cにおける安定性

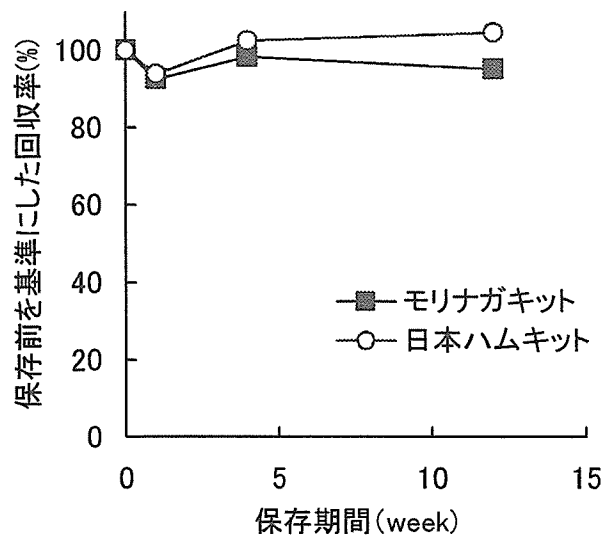
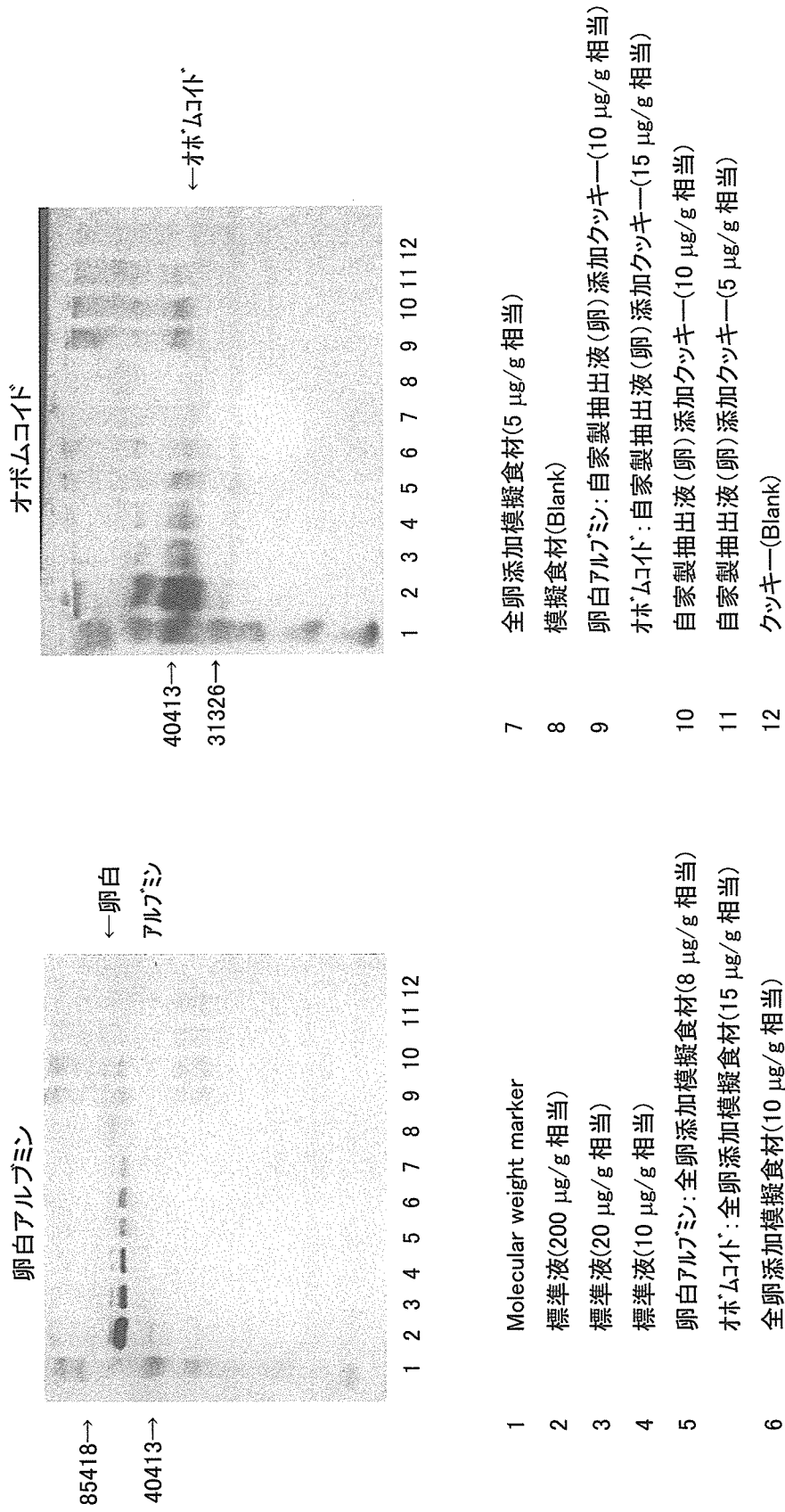


図 9 卵試料のウエスタンブロット結果



厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)

「検査機関の信頼性確保に関する研究」

平成 18 年度

研究成果に関する刊行物一覧表

研究成果の刊行に関する一覧

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
田中之雄： Eiji Ueno, Harumi Oshima, Hiroshi Matsumoto, Isao Saito, Hiroto Tamura	Determination of spinosad in vegetables and fruits by high-performance liquid chromatography with UV and mass spectrometric detection after gel permeation chromatography and solid-phase extraction cleanup on a 2-layered column	J. AOAC Int.	89 巻	1641-1649	2006
斎藤勲、上野英二、大 島晴美、松本浩、佐々 木久美子、米谷民雄	HPLC による食品中メトプレンの分析 法	食品衛生学雑誌	47 巻	173-177	2006
中澤裕之： M. Kawaguchi, R. Ito, N. Endo, N. Sakui, N. Okanouchi, K. Saito, N. Sato, H. Nakazawa	Stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for trace analysis of benzophenone and its derivatives in water sample	Analytica Chimica Acta	557 巻	272-277	2006
渡邊敬浩： 渡邊敬浩、笠間菊子、 菊地博之、鈴木達也、 時下祥子、坂田こずえ、 松木容彦、日野明寛、 穂山浩、米谷民雄	遺伝子組換えトウモロコシ (Mon810 系 統) の定量 PCR 法を対象とした外部精 度管理試験	食品衛生学雑誌	47 巻	15-27	2006
渡邊敬浩、時下祥子、 笠間菊子、鈴木達也、 大島赴夫、菊地博之、 日野明寛、穂山浩、米 谷民雄	遺伝子組換えトウモロコシ (GA21 なら びに MON810 系統) の定量 PCR 法を 対象とした外部精度管理試験	食品化学学会誌	13 巻	18-28	2006

渡邊敬浩、時下祥子、菊地博之、坂田こずえ、日野明寛、穂山浩、米谷民雄	定量 PCR 法による遺伝子組換えトウモロコシの定量分析に適用される 4 種の DNA 抽出法の比較検討	食品化学学会誌	13 巻	63-71	2006
------------------------------------	--	---------	------	-------	------

学会発表

発表者氏名	タイトル名	発表学会名	出版年
田中之雄： 住本建夫、織田肇、岩上正蔵、田中之雄、村田弘、起橋雅浩、高取聡、北川陽子、岡本葉、酒井洋、上野英二、田中敏嗣、宇野正清、宇治田正則、佐々木珠生、堤泰造、衛藤修一	農薬等のポジティブリスト化に伴う検査の精度管理に関する研究（第1報）	全国衛生化学技術協議会年会第43回（鳥取）	2006
高取聡、起橋雅浩、北川陽子、岡本葉、柿本幸子、村田弘、住本建夫、田中之雄	QuEChERS 報を活用した残留農薬分析法の検討	農薬残留分析研究会 29 回（大阪）	2006
Y. Ueda, M. Ito, N. Kojima, <u>Y. Tanaka</u> , T. Yamagami, Y. Ogawa, Y. Ono, S. Nakashima, S. Naka, K. Toubou, S. Nakamura, N. Sakui, Y. Takigawa, S. Harada, T. Ueda, Y. Kimura, D. Jinya, K. Kadokami	Easy and Intelligent Comprehensive Analysis by GC-MS coupled with Triple Database IV-Improvement of RRF Database for Reliable Screening Multi-Residues Pesticides Analysis in Foods	International Congress of Pesticide Chemistry (Kobe)	2006
M. Okihashi, Y. Kitagawa, H. Obana, <u>Y. Tanaka</u> , Y. Yamagishi, K. Sugitate, K. Saito, M. Kubota, M. Kanai, T. Ueda, S. Harada, Y. Kimura	Rapid Multiresidue Method for the Determination of Pesticide Residues in Food by GC/MS, GC/FPD and LC/MS/MS	EUROPEAN PESTICIDE RESIDUE WORKSHOP (Greece)	2006
M. Okihashi, Y. Kitagawa, H. Obana, <u>Y. Tanaka</u> , K. Sugitate, M. Kubota, M. Kanai, T. Ueda, S. Harada, Y. Kimura	Rapid-Multi-Class Screening Method for the Determination of 240 Pesticide Residues in Food by Gas Chromatography Mass Spectrometry and Flame Photometric Detection	29 th International Symposium on Capillary Chromatography (Italy)	2006
M. Okihashi, Y. Kitagawa, H. Obana, <u>Y. Tanaka</u> , Y. Yamagishi,	Multiresidue Method for the Determination of Pesticide Residues in Food by GC/MS,	11 th IUPAC International Congress of Pesticide	2006

K. Sugitate, K. Saito, M. Kubota, M. Kanai, T. Ueda, S. Harada, Y. Kimura	GC/FPD and LC/MS/MS	Chemistry (Kobe)	
上田泰人、伊藤光男、小島信彰、 <u>田中敏嗣</u> 、山上仰、中島晋也、瀧川義澄	GC/MS による農産物中の残留農薬一斉分析とトリプルデータベース相対定量法の比較 (II)	日本食品衛生学会第 91 回 (東京)	2006
上田泰人、伊藤光男、小島信彰、 <u>田中敏嗣</u> 、小川義謙、小野由紀子、山上仰、中島晋也、中村貞夫、佐久井徳広、瀧川義澄、中聡子、東房健一、陣矢大助、門上希和夫	GC/MS トリプルデータベースによる農産物中残留農薬一斉分析の検討	日本食品衛生学会第 92 回 (愛知)	2006
<u>E. Ueno</u> , I. Saito, Y. Kabashima, H. Oshima, H. Matsumoto	A reliable method with GPC and solid-phase extraction cleanup for monitoring pesticides in brown rice by GC/MS and LC/MS	6 th European Pesticide Residue Workshop (Greece)	2006
<u>E. Ueno</u> , Y. Kabashima, H. Oshima, H. Matsumoto	Reliable method for monitoring pesticide residues in foods by NCI mode GC/MS and dual column GC- μ ECD	11 th IUPAC International Congress of Pesticide Chemistry (Kobe)	2006
<u>上野英二</u> 、 <u>椛島由佳</u> 、大島晴美、大野勉	GC/MS 一斉分析データベースソフトウェアを用いた食品中残留農薬のモニタリング手法の検討	全国衛生化学技術協議会年会第 43 回 (鳥取)	2006
中澤裕之： 本田英博、川口研、岩崎雄介、伊藤里恵、斉藤貢一、 <u>中澤裕之</u>	液相マイクロ抽出法を用いた GC/MS による河川水中ベンゾフェノン類の測定	日本分析化学会第 55 年回 (大阪)	2006
本田英博、川口研、遠藤直幸、岩崎雄介、伊藤里恵、斉藤貢一、 <u>中澤裕之</u>	LC-MS/MS によるベンゾフェノン類の一斉分析法の検討	第 50 回日本薬学会関東支部大会 (新潟)	2006
渡邊敬浩： 井上雪乃、笠間菊子、大島赴夫、 <u>渡邊敬浩</u> 、 <u>穂山浩</u> 、米谷民雄	遺伝子組換え食品定量検査における調製試料混合率と定量値の差について	日本食品衛生学会第 92 回学術講演会 (愛知)	2006
<u>渡邊敬浩</u> 、時下祥子、菊地博之、大島赴夫、笠間菊子、鈴木達也、井上雪乃、日野明寛、 <u>穂山浩</u> 、米谷民雄	遺伝子組換えトウモロコシ (Bt11、GA21、および Mon810 系統) 定量検査法の外部精度管理について	第 43 回全国衛生化学技術協議会年会 (鳥取)	2006
町井研士： <u>K. Machii</u> , M. Kawasaki	Within-day variation in response of the mouse bioassay for diarrhetic shellfish	12 th International Conference on Harmful	2006

	poisoning toxin (okadaic acid)	Algae (Denmark)	
川崎勝、大島赴夫、山本茂貴、伊藤嘉典、 <u>町井研士</u>	食品衛生外部精度管理調査に於ける下痢性貝毒検査用試料作製に関する基礎的研究－オカダ酸の各種保存条件に於ける安定性について－	日本食品衛生学会第 90 回学術講演会（愛知）	2006

厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)

「検査機関の信頼性確保に関する研究」

平成 18 年度

研究成果に関する刊行物

論文

Determination of Spinosad in Vegetables and Fruits by High-Performance Liquid Chromatography with UV and Mass Spectrometric Detection After Gel Permeation Chromatography and Solid-Phase Extraction Cleanup on a 2-Layered Column

EIJI UENO, HARUMI OSHIMA, and HIROSHI MATSUMOTO

Aichi Prefectural Institute of Public Health, Tsuji-machi, Kita-ku, Nagoya, Aichi 462-8576, Japan

ISAO SAITO

Tokai COOP Federation, Food Safety and Quality Research Center, Sagamine, Yazako, Nagakute-cho, Aichi 480-1103, Japan

HIROTO TAMURA

Meijo University, Faculty of Agriculture, Department of Environmental Bioscience, Shiogamaguchi, Tempaku-ku, Nagoya, Aichi 468-8502, Japan

A simple and reliable method was developed for the determination of spinosyns A and D, the active ingredients of spinosad, in vegetables and fruits, by high-performance liquid chromatography with UV detection (HPLC-UV) and confirmation by mass spectrometry (MS); the method uses selected gel permeation chromatography (GPC) and a 2-layered column for solid-phase extraction system. An aliquot of the crude sample extract obtained by acetonitrile extraction is loaded into the GPC system. The fraction containing spinosyns A and D is selectively collected and loaded directly onto a 2-layered column consisting of graphitized carbon (upper layer) and cyclohexyl-bonded silica gel (lower layer). After the column is washed with the GPC mobile phase acetone-cyclohexane (3 + 7), the column is eluted with acetonitrile containing 2% triethylamine. The eluate is used for HPLC-UV/MS analysis. Average recoveries from fortified cabbage, green perilla, fig, and strawberry at analyte concentrations of 0.05 and 0.25 $\mu\text{g/g}$ were >85%, and the relative standard deviations were <9%. The detection limits for spinosyns A and D in green perilla were 0.005 $\mu\text{g/g}$ by UV detection and 0.001 $\mu\text{g/g}$ by MS detection.

Spinosad is an insecticide derived from the soil bacterium *Saccharopolyspora spinosa*. Its distinct mode of action is effective on a variety of insecticide-resistant strains of insects, and it has low mammalian toxicity and a favorable environmental profile (1). Spinosad has been registered in Japan for use on a variety of vegetables, fruits, and ornamental crops since 1999 (2, 3). Because spinosad is a mixture of the

active ingredients spinosyns A and D (Figure 1), vegetables and fruits should be analyzed for both ingredients during regulatory monitoring under the Japanese Food Sanitation Law (4). This law does not apply to the metabolites such as *n*-demethyl spinosyn D, spinosyn B, and spinosyn K, which are not harmful, judging from a comparison of the characteristics and severity of their toxicities with those of the parent ingredients (5).

In 2004, spinosyns A and D were detected in cabbage in Aichi Prefecture when a multiresidue method combining high-performance liquid chromatography (HPLC) with mass spectrometry (MS) and our reported sample preparation based on gel permeation chromatography (GPC) cleanup (6) was used. Because of their large molecular size, spinosyns A and D were eluted early in the GPC cleanup, and a considerable number of analytes were discarded with the large molecular matrixes such as lipids and pigments in the GPC procedure. Moreover, our current observations have revealed that, although HPLC-MS is suitable for the rapid semiquantitative screening of multiclass residues, the matrixes in the sample solution often cause suppression or promote the ionization of analytes during HPLC-MS analysis. Therefore, the sample must be reanalyzed by other selective-detection methods after adequate cleanup in order to have the precise quantitation needed for regulatory monitoring. Accordingly, the positive samples were reanalyzed by HPLC with UV detection (HPLC-UV) based on the Japanese official method (Figure 2; 7), with some necessary modifications such as replacement of dichloromethane with ethyl acetate because of environmental restrictions (8). The use of the Japanese official method has also been reported by other researchers (9, 10). Nevertheless, the method, which consists of acetonitrile extraction, liquid-liquid partitioning, and solid-phase extraction (SPE) on a cyclohexyl-bonded silica gel (CH) cartridge followed by a silica gel (silica) cartridge, involves labor-intensive procedures and strict requirements for the SPE conditions, because a low wavelength near 250 nm is needed

Received February 21, 2006. Accepted by AK May 15, 2006.
Corresponding author's e-mail: eiji_ueno@pref.aichi.lg.jp