

※ 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。

平成 21 年度

食品に残留する農薬等の成分である物質(カス  
ガマイシン)の試験法開発事業

## カスガマイシン試験法（農産物）の検討結果

### [ 緒言 ]

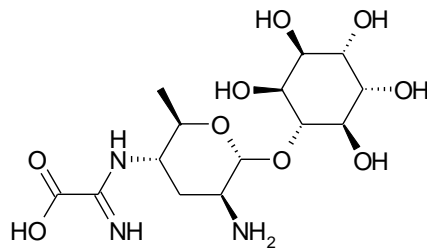
#### 1. 目的及び試験法の検討方針等

カスガマイシンは、1965年に農薬登録されてから40年近く使用されている農業用の抗生物質である。イネいもち病、葉鞘褐変病、苗立枯病、もみ枯れ細菌病、キウイフルーツや梅の潰瘍病、テンサイの褐斑病等に有効であり、化学的に安定で多くの種類の農薬と混合して使用することができる。<sup>1)</sup>

カスガマイシンは、ODSカラムへの保持が困難であり、アセトンやアセトニトリルによる抽出が困難であるため、通知一斉試験法「LC/MSによる農薬等の一斉試験法I（農産物）」の適用は試みず、新たに個別試験法を開発した。カスガマイシンは両性イオン化合物であるが、塩基性化合物として強陽イオン交換ミニカラムで前処理可能であり<sup>2)</sup>、高極性の塩基性物質であるメラミンの試験法<sup>3)</sup>を参考にして、親水性相互作用を利用したHILICカラムによる測定方法及び陽イオン交換ミニカラムによる精製法を検討した。

#### 2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

分析対象化合物： カスガマイシン (Kasugamycin)  
構造式：



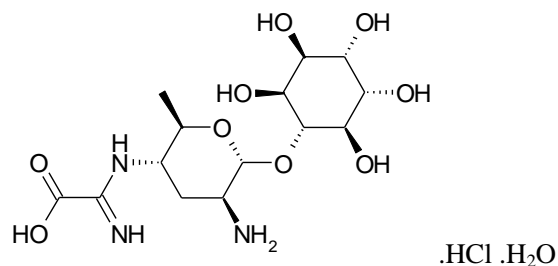
分子式： C<sub>14</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>  
分子量： 379.42  
化学名： IUPAC名  
2-アミノ-2-[(2*R*,3*S*,5*S*,6*R*)-5-アミノ-2-メチル-6-[(2*R*,3*S*,5*S*,6*S*)-2,3,4,5,6-ペンタヒドロキシシクロヘキシル]オキシオキサン-3-イル]イミノ酢酸  
2-amino-2-[(2*R*,3*S*,5*S*,6*R*)-5-amino-2-methyl-6-[(2*R*,3*S*,5*S*,6*R*)-2,3,4,5,6-pentahydroxycyclohexyl]oxyoxan-3-yl]iminoacetic acid  
CAS名 (6980-18-3)  
*D*-チロ-イノシトール, 3-*O*-[2-アミノ-4-[(カルボキシイミノメチル)アミノ]-2,3,4,6-テトラデオキシ- $\alpha$ -*D*-アラビノ-ヘキソピラノシル]-  
*D*-chiro-Inositol, 3-*O*-[2-amino-4-[(carboxyiminomethyl)amino]-2,3,4,6-tetrahydroxy- $\alpha$ -*D*-arabino-hexopyranosyl]-  
融点： 203°C  
蒸気圧： < 1.3×10<sup>-4</sup> mmHg at 25°C  
水溶解性： 1×10<sup>6</sup> mg/L at 25°C/混和性/ (計算値)  
オクタノール/水分配係数： Log K<sub>ow</sub> = -5.75 (計算値)

[ 出典：HSDB (Hazardous Substances Data Bank) <http://toxnet.nlm.nih.gov/> ]

本試験法開発で使用したカスガマイシン標準品は塩酸塩一水和物であるため、以下に塩酸塩一水和物の物理化学的性質を示す。

分析対象化合物： カスガマイシン塩酸塩一水和物 (Kasugamycin hydrochloride hydrate)

構造式：



分子式：

C<sub>14</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>10</sub>

分子量：

433.84

化学名：

IUPAC 名

2-アミノ-2-[(2R,3S,5S,6R)-5-アミノ-2-メチル  
-6-[(2R,3S,5S,6R)-2,3,4,5,6-ペンタヒドロキシシクロヘキシル]オ  
キシオキサン-3-イル]イミノ酢酸塩酸塩一水和物  
2-amino-2-[(2R,3S,5S,6R)-5-amino-2-methyl-6-[(2R,3S,5S,6R)-2,3,4,5  
,6-pentahydroxycyclohexyl]oxyoxan-3-yl]iminoacetic acid  
hydrochloride monohydrate

CAS 名 (200132-83-8)

*D*-チロ-イノシトール, 3-*O*-[2-アミノ-4-[(カルボキシイミノメチ  
ル)アミノ]-2,3,4,6-テトラデオキシ- $\alpha$ -*D*-アラビノ-ヘキソピラノ  
シル]-, 塩酸塩, 一水和物

*D*-chiro-Inositol, 3-*O*-[2-amino-4-[(carboxyiminomethyl)amino]-2,3,4,  
6- tetraideoxy- $\alpha$ -*D*-arabino-hexopyranosyl]-, hydrochloride, hydrate  
(1:1:1)

融点：

202~230°C<sup>1)</sup>

pH：

4.35 at 24.5°C (1% w/v 溶液)<sup>1)</sup>

密度：

0.43 g/mL at 24.5°C<sup>1)</sup>

蒸気圧：

< 0.013 mPa at 25°C<sup>1)</sup>

水溶解性：

水：pH5 20.7 g/100 mL；pH7 22.8 g/100 mL；pH9 43.8 g/100 mL<sup>1)</sup>

溶媒溶解性：

メタノール：0.744 g/100 mL<sup>1)</sup>

ヘキサン：<1×10<sup>-5</sup> g/100 mL<sup>1)</sup>

アセトニトリル：<1×10<sup>-5</sup> g/100 mL<sup>1)</sup>

ジクロロメタン：<1×10<sup>-5</sup> g/100 mL<sup>1)</sup>

pKa

pK<sub>a1</sub> = 3.23; pK<sub>a2</sub> = 7.73; pK<sub>a3</sub> = 11.0<sup>1)</sup>

オクタノール/水分配係数：Log K<sub>ow</sub> < 1.96 at 23°C pH5<sup>1)</sup>

[出典 1：EPA Pesticide Fact Sheet: Kasugamycin.]

### 3. 基準値

カスガマイシンの基準値を表 3-1 に示す。

表 3-1 カスガマイシンの基準値

食品名	基準値 (ppm)	
	最新の値*	試験法開発時
米 (玄米)	0.2	0.04
大豆	0.04	0.04
小豆類	0.2	0.04
えんどう	0.04	0.04
そら豆	0.04	0.04
らっかせい	---	0.04
その他の豆類	0.04	0.04
ばれいしょ	0.2	0.04
てんさい	0.2	0.05
だいこん類 (ラディッシュを含む) の根	0.2	0.04
だいこん類 (ラディッシュを含む) の葉	0.2	0.04
かぶ類の根	---	0.05
かぶ類の葉	---	0.05
クレソン	---	0.05
はくさい	0.2	0.04
キャベツ	0.2	0.04
芽キャベツ	0.2	0.05
きょうな	---	0.05
カリフラワー	---	0.05
ブロッコリー	0.2	0.04
その他のあぶらな科野菜	0.2	0.04
ごぼう	0.2	0.04
しゅんぎく	---	0.05
レタス (サラダ菜及びちしやを含む)	0.2	0.04
その他のきく科野菜	---	0.05
たまねぎ	0.2	0.04
ねぎ (リーキを含む)	0.2	0.04
にんにく	0.2	0.04
にんじん	0.2	0.04
セロリ	---	0.04
みつば	---	0.05
その他のせり科野菜	---	0.05
トマト	0.2	0.03
ピーマン	0.2	0.04
なす	0.1	---
その他のなす科野菜	0.2	0.05
きゅうり (ガーキンを含む)	0.2	0.05
かぼちゃ (スカッシュを含む)	---	0.05
すいか	0.2	0.05
メロン類果実	0.2	0.04
その他のうり科野菜	---	0.05
オクラ	0.2	0.05
しょうが	---	0.05

食品名	基準値 (ppm)	
	最新の値*	試験法開発時
未成熟えんどう	0.04	-----
未成熟いんげん	0.04	-----
えだまめ	0.04	-----
その他の野菜	0.04	0.05
みかん	0.2	0.05
なつみかんの果実全体	0.2	0.05
レモン	0.2	0.05
オレンジ (ネーブルオレンジを含む)	0.2	0.05
グレープフルーツ	0.2	0.05
ライム	0.2	0.05
その他のかんきつ類果実	0.2	0.05
りんご	0.2	-----
日本なし	0.2	0.04
西洋なし	0.2	0.04
マルメロ	0.2	-----
びわ	0.2	0.04
もも	0.2	0.04
うめ	0.2	0.04
キウイー	0.2	0.04
その他の果実	0.2	0.05
くるみ	0.04	-----
茶	0.2	0.04
その他のスパイス	0.2	0.05
その他のハーブ	---	0.05

\* 食安発 0326 第 1 号 (平成 27 年 3 月 26 日)

## 【実験方法】

### 1. 試料

玄米、大豆、らっかせい、ばれいしょ、キャベツ、ほうれんそう、オレンジ、りんご、茶及びコリアンダーの種子 (その他のスパイス) は埼玉県内の小売店で購入した。また、試料の採取方法を以下に記載した。

(1) 玄米、大豆、茶、コリアンダーの種子 (その他のスパイス)

冷凍庫 (-18℃) で冷却した試料をミキサーを用いて 425 μm の標準網ふるいを通して粉砕し均一化した。

(2) ばれいしょ、キャベツ、ほうれんそう、オレンジ、りんご

試料を細切した後ミキサーを用いて磨砕均一化した。

(3) らっかせい

冷凍庫 (-18℃) で冷却した試料を、ミキサーを用いて 2 mm のふるいを通して粉砕してよく均一化した。

### 2. 試薬・試液

(1) 試薬

カスガマイシン塩酸塩一水和物標準品：純度 99.9% (和光純薬工業 (株) 製)

アセトニトリル、超純水：LCMS 用 (和光純薬工業 (株) 製)

エタノール、メタノール：残留農薬試験用 300 倍濃縮（関東化学（株）製）  
 ケイソウ土ケイソウ：セライト 545（和光純薬工業（株）製）  
 アンモニア水：25%アンモニア水 特級（和光純薬工業（株）製）  
 ギ酸、酢酸：特級（和光純薬工業（株）製）  
 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（1000 mg）：InertSep C18（1 g/6 mL、ジーエルサイエンス(株)製）  
 強酸性陽イオン交換樹脂ミニカラム（500 mg）：OASIS MCX（500 mg/6 mL、日本ウォーターズ(株)製）

## (2) 試液

0.1 vol%ギ酸溶液：

ギ酸 1 mL に超純水を加え 1000 mL とした。

2 vol%酢酸（1：1）混液：

酢酸 10 mL に水を加え 500 mL とし、エタノール 500 mL と混合した。

アンモニア水及びメタノール（1：19）混液：

メタノール 950 mL 及びアンモニア水 50 mL を混合した。

## (3) 標準溶液

カスガマイシン塩酸塩一水和物標準品 23 mg（カスガマイシン 20 mg 相当）をガラス製メスフラスコ（20 mL）に採り、メタノールに溶解して 20 mL に定容したものを 1000 mg/L 標準原液とした。なお、標準原液は調製後速やかにポリプロピレン製の容器に移した。この標準原液をメタノールを用いて適宜希釈し、検量線作成用の 0.0005～0.015 mg/L 標準溶液を調製した。検討に用いた標準溶液については、標準原液をメタノールを用いて適宜希釈し、10 mg/L 及び 1 mg/L の検討用標準溶液を調製した。検量線作成用標準溶液及び検討用標準溶液の調製には、ガラス製のホールピペットとポリプロピレン製のメスフラスコを使用した。

## (4) 添加試料の調製方法

上記の標準原液をメタノールを用いて適宜希釈して、添加用標準溶液を調製し、試料に一定量添加して添加試料を調製した。各試料も使用した添加溶液の濃度と添加量を表 2-1 に示す。

表 2-1 各試料への添加溶液濃度と添加量

試料	物質名	基準値 (ppm)	試料量 (g)	添加溶液濃度 (µg/mL)	添加量 (mL)
玄米	カスガマイシン	0.04	10.0	0.800	0.5
大豆	カスガマイシン	0.04	10.0	0.800	0.5
らっかせい	カスガマイシン	0.04	10.0	0.800	0.5
ばれいしょ	カスガマイシン	0.04	20.0	0.800	1.0
キャベツ	カスガマイシン	0.04	20.0	0.800	1.0
ほうれんそう	カスガマイシン	0.01（一律）	20.0	0.200	1.0
オレンジ	カスガマイシン	0.05	20.0	1.000	1.0
りんご	カスガマイシン	0.01（一律）	20.0	0.200	1.0
茶	カスガマイシン	0.04	5.00	0.200	1.0
コリアンダーの 種子	カスガマイシン	0.05（その他の スパイス）	10.0	1.000	0.5

### 3. 装置

装置	型式	製造元
MS 装置	API4000	(株)エービー・サイエックス
LC 装置	Prominence UFLC XR	(株)島津製作所
ホモジナイザー ミキサー	マルチディスペルサー PB95 Blendtec 1-800	(株)エスエムテー Blendtec 社
減圧濃縮装置	ロータリーエバポレーターR-205	BÜCHI 社

### 4. 測定条件

#### LC 条件

ZIC-HILIC	
カラム	サイズ：内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 µm 会社：メルクミリポア製
移動相流速 (mL/min)	0.20
注入量 (µL)	5
カラム温度 (°C)	40
移動相	A 液：0.1vol% ギ酸溶液 B 液：アセトニトリル

#### グラジエント条件

時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
0.0	20	80
5.0	50	50
15.0	50	50
16.0	60	40
36.0	60	40
37.0	20	80
47.0	20	80

#### MS 条件

測定モード	選択反応モニタリング (SRM)
イオン化モード	エレクトロスプレーイオン化法、ポジティブモード (ESI+)
Collision Gas	窒素 5 (単位なし)
Curtain Gas	窒素 50 psi
Ion Source Gas1	80 psi
Ion Source Gas2	50 psi
IonSpray Voltage	5500 V
IonSpray Source 温度	500°C
Declustering Potencial	70 V
定量イオン (m/z)	380→112 (コリジョンエネルギー25 eV)
定性イオン (m/z)	380→200 (コリジョンエネルギー15 eV)
保持時間 (min)	11.4

### 5. 定量

カスガマイシン標準品の 0.0005~0.003 mg/L、0.001~0.006 mg/L、0.002~0.012 mg/L 溶液及び 0.0025~0.015 mg/L 溶液 (メタノール) を数点調製し、それぞれ 5 µL を LC-MS/MS に注入し、ピーク面積法で検量線を作成した。これらの検量線を用い、絶対検量線法でカスガマイシンの含量を求めた。

## 6. 試験溶液の調製

### (1) 抽出

#### ① 穀類、豆類、種実類、果実、野菜、茶及びその他のスパイスの場合

穀類、豆類、種実類及びその他のスパイスの場合は試料 10.0 g に水 20 mL を加え、30 分間放置した。果実及び野菜の場合は試料 20.0 g を量り採った。茶の場合は試料 5.00 g に水 20 mL を加え、30 分間放置した。

これに 2 vol% 酢酸 (1 : 1) 混液 100 mL を加え、3 分間ホモジナイズした後、ケイソウ土ケイソウ土を 1 cm の厚さに敷いたろ紙 (直径 60 mm、No.5B、桐山製作所製製作所製) を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物に 2 vol% 酢酸 (1 : 1) 混液 50 mL を加え、3 分間ホモジナイズした後、上記と同様に操作してろ過した。得られたろ液を合わせ、2 vol% 酢酸 (1 : 1) 混液を加えて正確に 200 mL とした。

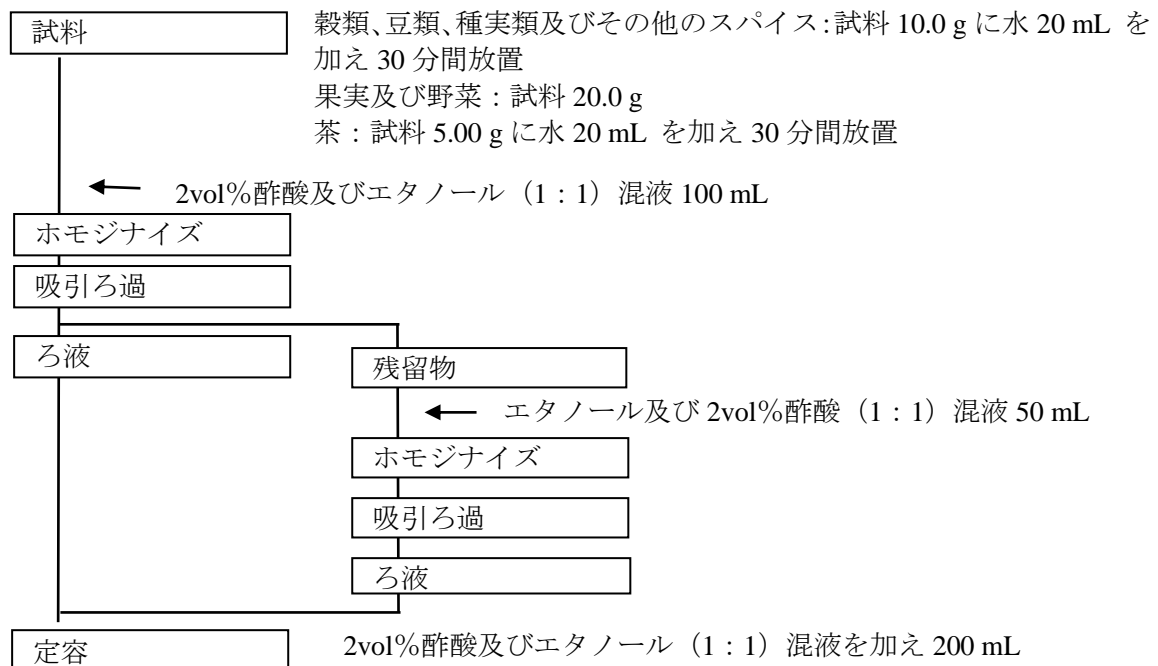


図 6-1 抽出フローチャート (穀類、豆類、種実類、果実、野菜、茶及びその他のスパイス)

### (2) 精製

#### ① オクタデシルシリル化シリカゲルクロマトグラフィー

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (1000 mg) (InertSep C18 1 g/6 mL) にメタノール及び水 10 mL を順次注入し、流出液は捨てた。このカラムに (1) で得られた溶液を 5 mL を注入し、さらに水 15 mL を注入し全溶出液を受け、水を加えて正確に 50 mL とした。

#### ② 強酸性陽イオン交換樹脂クロマトグラフィー

強酸性陽イオン交換樹脂ミニカラム (500 mg) (OASIS MCX 500 mg/6 mL) にメタノール及び水 10 mL を順次注入し、流出液は捨てた。このカラムに (2) ① で得られた溶液を、穀類、豆類、種実類、茶及びその他のスパイスの場合は 40 mL、果実及び野菜の場合は 20 mL を注入し、流出液は捨てた。さらに水及びメタノール 10 mL を順次注入し、流出液は捨てた。アンモニア水及びメタノール (1 : 19) 混液 15 mL を注入し溶出液を受け、40°C 以下で濃縮して溶媒を除去した。この残留物にメタノール 1 mL を正確に加えて溶かし、これを試験溶液とした。



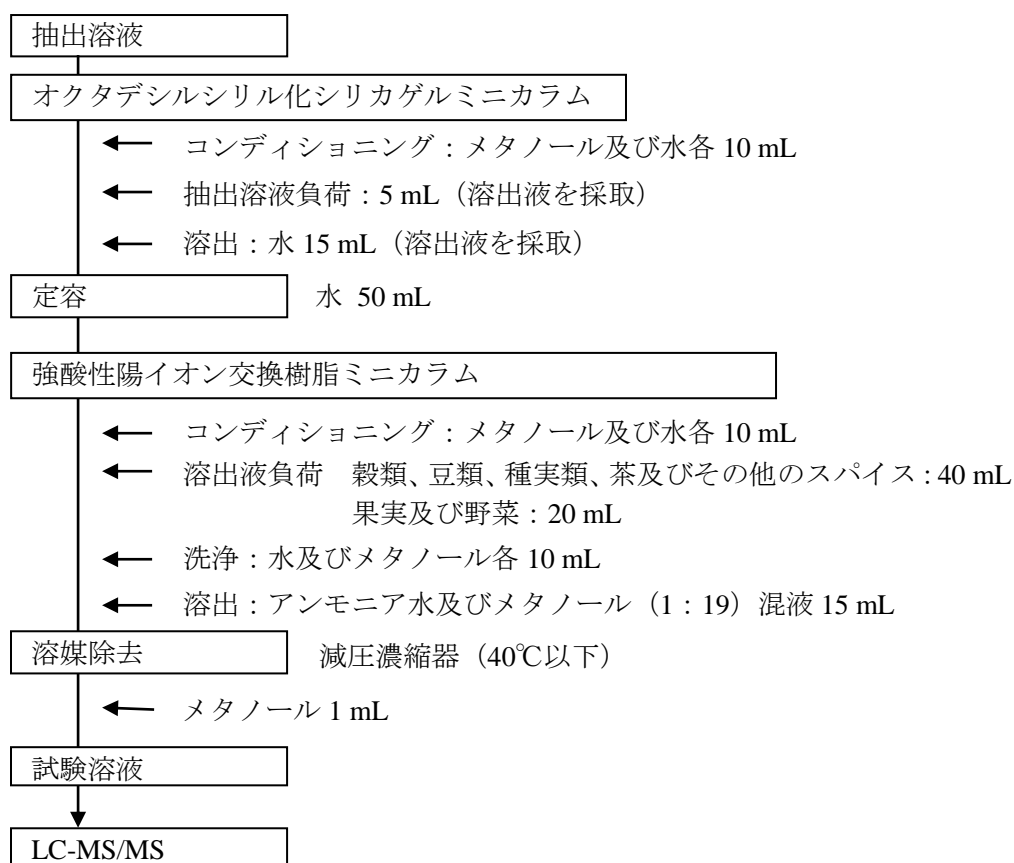


図 6-2 精製フローチャート

## 7. マトリックス添加標準溶液の調製

添加回収試験における回収率が 100%と仮定した場合に基準値相当濃度となるよう、標準溶液をブランク試料の試験溶液（マトリックス添加標準溶液）及び溶媒（溶媒標準溶液）で調製し、溶媒標準溶液に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積の比を求めて、試料マトリックスの測定への影響について検討した。各標準溶液の詳細を以下に示す。

溶媒標準溶液 : カスガマイシンの標準溶液 0.01 mg/L、0.008 mg/L、0.004 mg/L 及び 0.002 mg/L（メタノール溶液）

マトリックス添加標準溶液 : 各ブランク試料の試験溶液 1 mL を 40°C以下で窒素ガスを吹付けて濃縮乾固した後、上記の溶媒標準溶液を 1 mL 添加して溶解した溶液

なお、定量限界の推定においても、定量限界相当のマトリックス添加標準溶液を同様にして調製した。各標準溶液の詳細を以下に示す。

溶媒標準溶液 : カスガマイシンの標準溶液 0.001 mg/L（メタノール溶液）

マトリックス添加標準溶液 : 各ブランク試料の試験溶液 1 mL を 40°C以下で窒素ガスを吹付けて濃縮乾固した後、上記の溶媒標準溶液を 1 mL 添加して溶解した溶液

## [ 結果及び考察 ]

### 1. 測定条件の検討

#### (1) MS 条件の検討

カスガマイシンは ESI (+) モードでイオン化されたため、アセトニトリル及び 0.1 vol% ギ酸溶液の混液 (1 : 1) を移動相としてフローインジェクション測定を行い、Declustering Potential (DP) 及び Collision energy (CE) について最適条件を検討した。

カスガマイシン ESI (+) モード測定時のマススペクトルを図 1-1 に示した。カスガマイシンは DP=70 V とした時  $m/z$  380 のイオン強度が最大となったため、カスガマイシンのプロトン付加分子 ( $m/z$  380  $[M+H]^+$ ) をプリカーサーイオンとした。

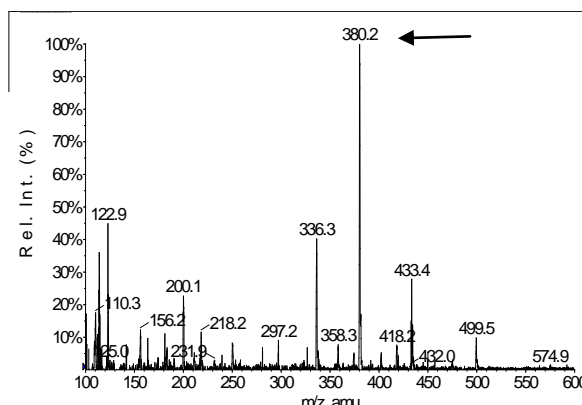


図 1-1 カスガマイシンのマススペクトル  
スキャン範囲 : 100~600 amu  
測定条件 : ESI (+)、DP=70 V  
(DP : Declustering Potential)  
カスガマイシン : 1 mg/L

カスガマイシン ESI (+) モード測定時の  $m/z$  380 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 1-2 及び 1-3 に示した。カスガマイシンは CE=25 eV とした時プロダクトイオンイオン  $m/z$  112 のイオン強度が最大となり、次いで CE=15 eV とした時プロダクトイオン  $m/z$  200 のイオン強度が大きかったため、 $m/z$  380 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  $m/z$  112 を定量用イオンに、また  $m/z$  200 を定性用イオンとした。

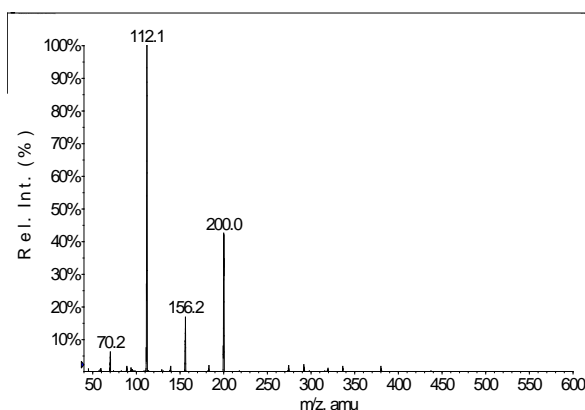


図 1-2 カスガマイシンのプロダクトイオンスペクトル(定量用)

プリカーサーイオン :  $m/z$  380

測定条件 : ESI (+), DP=70 V, CE=25 eV

(DP : Declustering Potential CE : Collision energy)

カスガマイシン : 1 mg/L

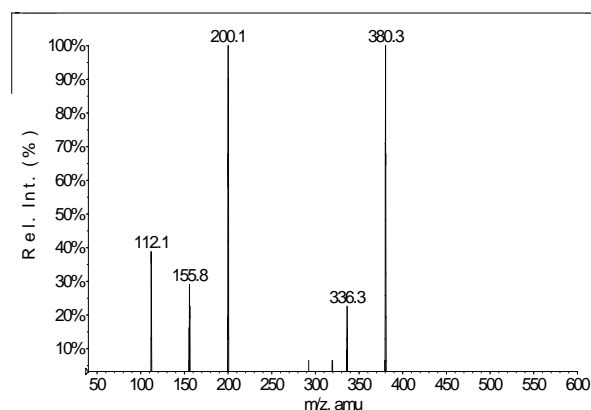


図 1-3 カスガマイシンのプロダクトイオンスペクトル(定性用)

プリカーサーイオン :  $m/z$  380

測定条件 : ESI (+), DP=70 V, CE=15 eV

(DP : Declustering Potential CE : Collision energy)

カスガマイシン : 1 mg/L

## (2) LC 条件

分析カラムについては、スルホベタイン基化学結合型シリカゲルカラム (ZIC-HILIC、サイズ : 内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5  $\mu$ m、メルクミリポア製) を用い、移動相をアセトニトリル及び 0.1 vol% ギ酸とし、アセトニトリル及び 0.1 vol% ギ酸溶液の混液 (4 : 1) から (1 : 1) までの濃度勾配を 5 分間で行い 10 分保持する条件でカスガマイシンは 11 分付近に溶出した。極性物質をカラムから完全に溶出させるため、15 分でアセトニトリル及び 0.1 vol% ギ酸溶液の混液 (1 : 1) から (2 : 3) までの濃度勾配を 1 分間で行い 20 分保持するステップを追加し、さらに初期条件に戻すためにアセトニトリル及び 0.1 vol% ギ酸溶液の混液 (2 : 3) から (4 : 1) までの濃度勾配を 1 分間で行い 10 分間保持する条件を設定した。溶媒標準溶液 (0.001 mg/L) を 7 回注入する繰り返し測定において、面積値及び保持時間の再現性が得られたので、この測定条件を用いることとした。標準溶液 (0.001 mg/L) の 7 回繰り返し測定の結果を表 1-1 に、クロマトグラムを図 1-4 及び 1-5 に示す。

表 1-1 標準溶液の 7 回繰り返し測定の結果

物質名	カスガマイシン : 0.001 mg/L	
	面積値	保持時間
測定結果 1	2400	11.1
測定結果 2	2463	11.1
測定結果 3	2592	11.1
測定結果 4	2518	11.0
測定結果 5	2396	11.0
測定結果 6	2431	11.1
測定結果 7	2466	11.1
平均値	2467	11.1
標準偏差	70	0.05
変動(%)	2.8	0.4

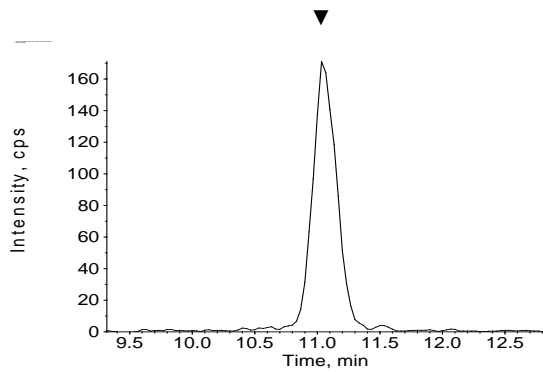


図 1-4 カスガマイシン溶媒標準溶液 0.001 mg/L の SRM クロマトグラム (定量イオン  $m/z=380 \rightarrow 112$ )

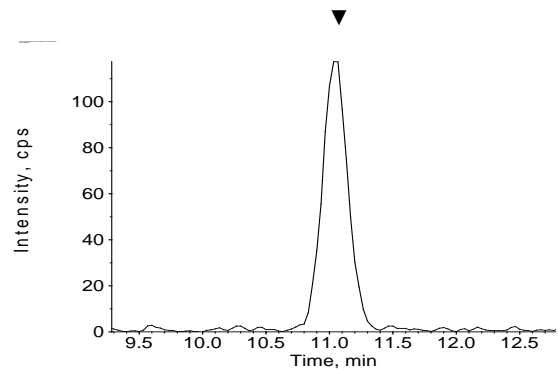


図 1-5 カスガマイシン溶媒標準溶液 0.001 mg/L の SRM クロマトグラム (定性イオン  $m/z=380 \rightarrow 200$ )

本試験の検討では、カスガマイシン溶出後にアセトニトリル及び 0.1 vol% ギ酸溶液の混液 (2 : 3) で 20 分間保持する洗浄工程を設定し測定を行った。多検体測定におけるカラムの劣化を考慮し、安全を見て洗浄時間を設定したが、この洗浄工程 20 分間は必須ではなく推奨される時間である。

多検体測定に対するカラムの耐久性を確認するために、洗浄時間を 20 分、10 分、5 分及び 0 分として、茶のマトリックス添加標準溶液 (カスガマイシンを 0.004 mg/L 含む) について各々 10 回繰り返し測定を行った。また、茶のマトリックス添加標準溶液の測定前及び 10 回繰り返し測定後に 1 回の頻度でマトリックスを含まないカスガマイシン標準溶液 (0.004 mg/L) の測定を行った。洗浄工程の時間は 20 分から 0 分へと段階的に短くし、連続して全ての測定を行った。茶のマトリックスは本試験の検討に用いた 10 試料の中でも比較的マトリックス影響が大きかったため、これらの測定結果によるマトリックス添加標準溶液及び標準溶液のピーク面積値の変動を図 1-6 に示す。

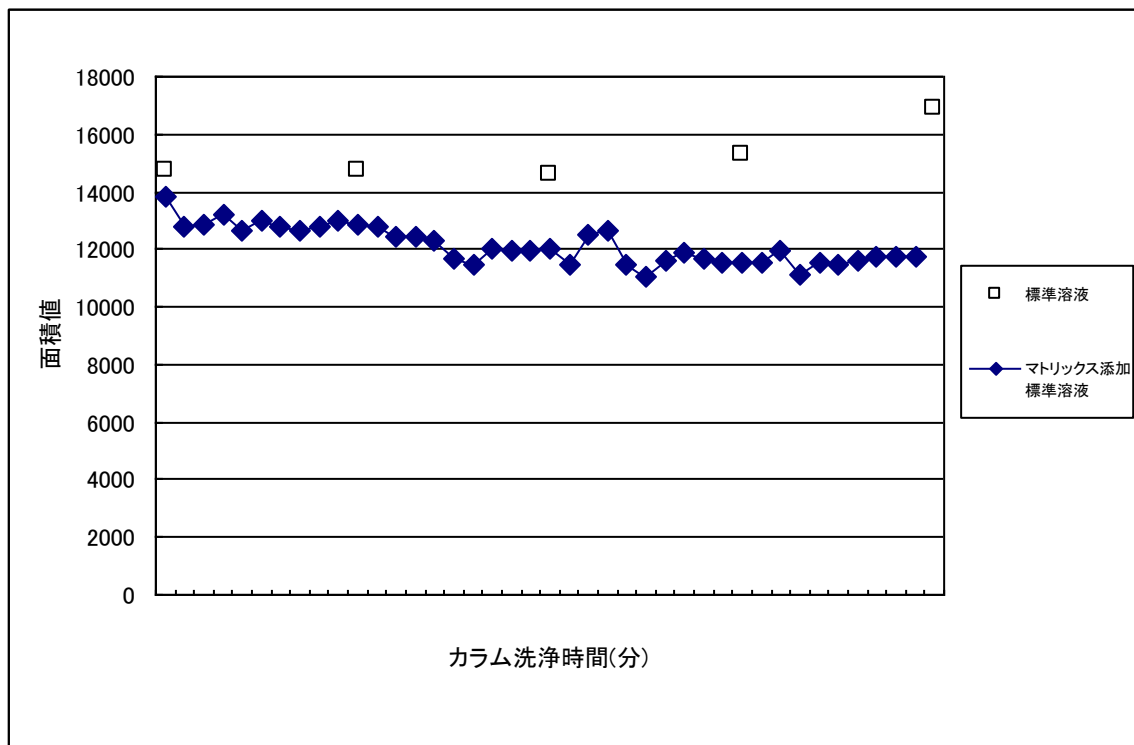


図 1-6 洗浄時間による面積値の変動

測定開始時から終了時までを比較すると、マトリックス添加標準溶液のピーク面積値は緩やか

な減少傾向は見られたが、洗浄時間の変化による変動は大きくはなかった。標準溶液の場合は洗浄時間 5 分まではピーク面積値はほぼ一定であり、洗浄時間を 0 分とした測定後の標準溶液のピーク面積値に増加が観察された。

本試験法ではスルホペタイン基化学結合型シリカゲルカラムの特性、試料マトリックスの影響及び多検体処理における再現性の低下を考慮して、20 分間の洗浄時間を採用したが、茶をマトリックスとした場合、洗浄時間を短縮しても連続測定における再現性への大きな影響は確認できなかった。このため本試験法を実際の検査に適用するにあたり、事前にマトリックス影響がないことが確認できれば、洗浄時間を短縮することも可能である。

参考として、カラム劣化によるピーク面積値の急激な減少等の現象が生じた場合の対処方法について以下に述べる。通常は、移動相をアセトニトリル及び 0.1vol%ギ酸溶液の混液 (10 : 90) として、カラム流量 0.1 mL/min で一晩流し続けることで感度は回復し、問題なく使用することが可能であった。また、カラムの製造元ではカラムの再生法として、カラムの出入り口を逆に接続し、各々カラム容積の 30 倍の体積の脱イオン水、0.5 mol/L 塩化ナトリウム水溶液、脱イオン水を順次低流量で流すという方法を推奨している。

### (3) 検量線

図 1-7~1-10 にカスガマイシンの検量線の例を示した。カスガマイシンは 0.0005~0.003 mg/L、0.001~0.006 mg/L、0.002~0.012 mg/L 及び 0.0025~0.015 mg/L の各濃度範囲で、それぞれ作成した検量線の相関係数はいずれも 0.995 以上の良好な直線性を示した。

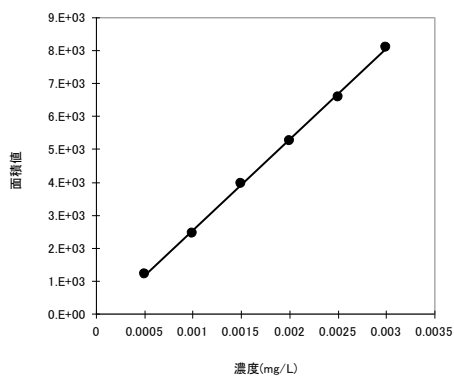


図 1-7 カスガマイシン検量線の例  
濃度範囲：0.0005~0.003 mg/L  
 $y=2752057x+220$   $r^2=0.999$

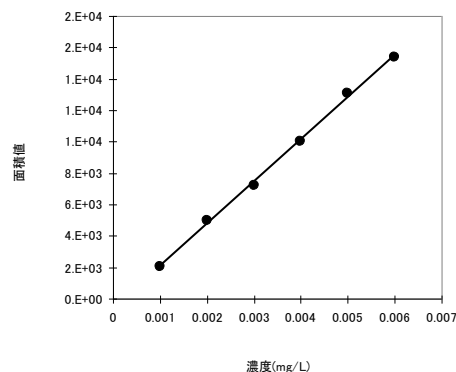


図 1-8 カスガマイシン検量線の例  
濃度範囲：0.001~0.006 mg/L  
 $y=2680114x+582$   $r^2=0.998$

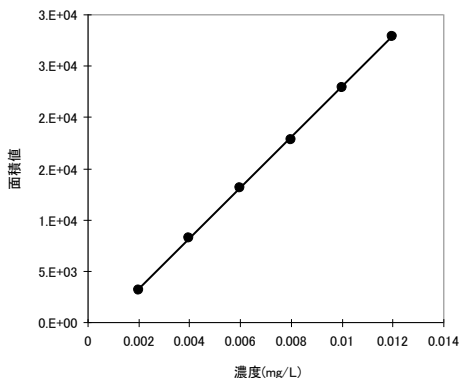


図 1-9 カスガマイシン検量線の例  
濃度範囲：0.002~0.012 mg/L  
 $y=2460557x+1719$   $r^2=1.000$

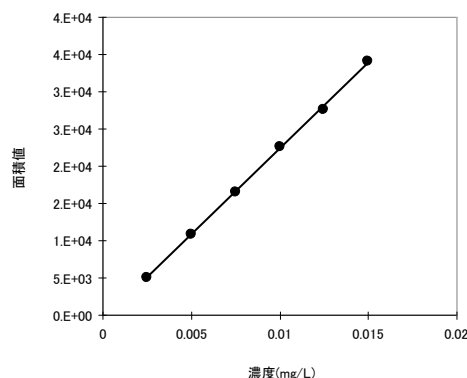


図 1-10 カスガマイシン検量線の例  
濃度範囲：0.0025~0.015 mg/L  
 $y=2308011x+789$   $r^2=0.999$

(4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

$$\text{計算式} : \left[ \frac{\text{試験用量(mL)}}{\text{試験溶液中の試料量(g)}} \times \frac{\text{分析対象化合物の定量限界相当量(ng)}}{\text{注入量(μL)}} \right]$$

$$\text{穀類・豆類・種実類・野菜・果実} : 0.01 \text{ mg/kg} = [1 \text{ (mL)} / 0.2 \text{ (g)}] \times [0.01 \text{ (ng)} / 5 \text{ (μL)}]$$

$$\text{茶} : 0.02 \text{ mg/kg} = [1 \text{ (mL)} / 0.1 \text{ (g)}] \times [0.01 \text{ (ng)} / 5 \text{ (μL)}]$$

2. 試験溶液調製法の検討

(1) 抽出方法の検討

大豆を試料として抽出溶媒の検討を行った。検討の操作手順は次の通りとした。

大豆試料の 10.0 g を量り採り、メタノールで調製した標準溶液 (0.8 mg/L) をホールピペットを用いて 0.5 mL 添加し、よく混合して 30 分放置した。水を 20 mL 加えて 30 分放置し、これに各抽出溶媒 100 mL をそれぞれ加え、3 分間ホモジナイズした後、ケイソウ土を敷いたろ紙 (No.5B) を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物を採り、新たに抽出溶媒 50 mL を加え、3 分間ホモジナイズした後、吸引ろ過し、各溶媒を用いて 200 mL に定容した。抽出溶液を 5 mL 分取し、あらかじめメタノール及び水各 10 mL で順次コンディショニングした InertSepC18 ミニカラム (1 g/6 mL) に注入し、溶出液を採った。さらに水 15 mL を注入し、全溶出液を採り、水を加えて 50 mL とした。あらかじめメタノール及び水各 10 mL で順次コンディショニングした OASIS MCX ミニカラム (500 mg/6 mL) に、この抽出液を全量注入し流出液は捨てた。水及びメタノール各 10 mL で順次洗浄し流出液を捨てた後、アンモニア水及びメタノール (1 : 19) 混液 15 mL を注入し、全溶出液を採った。40°C 以下で濃縮して溶媒を除去後、残留物をメタノールに溶かし 1 mL としたものを試験溶液とした。表 2-1 に抽出溶媒の検討結果を示す。

表 2-1 抽出溶媒検討結果 (n=2)

抽出溶媒	ピーク面積比 (%) *1	回収率 (%)			
		マトリックス補正有*2	マトリックス補正有-平均	マトリックス補正無	マトリックス補正無-平均
アセトン	95.6	0.0	0.0	0.0	0.0
		0.0		0.0	
アセトニトリル	92.1	0.0	0.0	0.0	0.0
		0.0		0.0	
メタノール	64.1	49.0	48.2	31.4	30.9
		47.3		30.3	
エタノール	92.7	10.6	11.1	9.8	10.3
		11.5		10.7	

\*1 ピーク面積比:マトリックス添加標準溶液の面積値を溶媒標準溶液の面積値で除した値に 100 を乗じて算出した。

\*2 マトリックス添加標準溶液を基準として算出。

アセトン及びアセトニトリルではカスガマイシンが回収されなかったため、メタノール及びエタノールを用いて更なる検討を行った。

カスガマイシンは水への溶解性が高いことから、メタノール及びエタノールに各々同量の 2 vol% 酢酸溶液を加え、2 vol% 酢酸及びメタノール (1 : 1) 混液及びエタノール 2 vol% 酢酸 (1 : 1) 混液を調製し、これを抽出溶媒として上記の条件と同様の操作を行った。検討結果を表 2-2 に示す。

表 2-2 抽出溶媒検討結果 (n=2)

抽出溶媒	ピーク面積比 (%) *1	回収率 (%)			
		マトリックス補正有*2	マトリックス補正有-平均	マトリックス補正無	マトリックス補正無-平均
2 vol%酢酸及びメタノール (1:1) 混液	83.5	99.7	99.8	83.2	83.3
		99.9		83.4	
2 vol%酢酸及びエタノール (1:1) 混液	97.9	100.0	101.7	97.9	99.6
		103.4		101.3	

\*1 ピーク面積比:マトリックス添加標準溶液の面積値を溶媒標準溶液の面積値で除した値に 100 を乗じて算出した。

\*2 マトリックス添加標準溶液を基準として算出。

2 vol%酢酸溶液との混液にすることでメタノール及びエタノールのいずれの溶媒でもカスガマイシンで良好な回収を得られた。エタノールを使用した方がマトリックス影響が低かったため、抽出溶媒は水 (1:1) 混液とし、さらに加える酢酸の量について検討を行った。

エタノールと 0~4 vol%の酢酸溶液との 1:1 混液を調製し検討を行った。検討の操作手順は次の通りとした。

大豆試料の 10.0 g を量り採り、メタノールで調製した標準溶液 (10 mg/L) をホールピペットを用いて 0.4 mL 添加し、よく混合して 30 分放置した。水を 20 mL 加えて 30 分放置し、これに各抽出溶媒 100 mL をそれぞれ加え、3 分間ホモジナイズした後、ケイソウ土を敷いたろ紙 (No.5B) を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物を採り、新たに抽出溶媒 50 mL を加え、3 分間ホモジナイズした後、吸引ろ過し、各溶媒を用いて 200 mL に定容した。抽出溶液を 1 mL 分取し、メタノールを加え 10 mL としたものを試験溶液とした。表 2-3 に酢酸添加量の検討結果を示す。

表 2-3 酢酸の添加量の検討結果 (n=2)

抽出溶媒	ピーク面積比 (%) *1	回収率 (%)			
		マトリックス補正有*2	マトリックス補正有-平均	マトリックス補正無	マトリックス補正無-平均
水及び (1:1) 混液	87.6	73.9	74.7	64.7	64.8
		75.6		64.8	
1 vol%酢酸 (1:1) 混液	87.6	96.2	96.9	84.3	84.9
		97.6		85.5	
2 vol%酢酸 (1:1) 混液	87.5	101.4	99.9	88.7	87.4
		98.3		86.0	
4 vol%酢酸及びエタノール (1:1) 混液	88.7	102.1	100.5	90.6	89.1
		98.8		87.6	

\*1 ピーク面積比:マトリックス添加標準溶液の面積値を溶媒標準溶液の面積値で除した値に 100 を乗じて算出した。

\*2 マトリックス添加標準溶液を基準として算出。

酢酸の添加によりカスガマイシンの回収率は向上した。1~4 vol%の酢酸溶液との混液において

回収率には殆ど差が無かったことから、検討した酢酸濃度の中間を選択し、抽出溶媒には 2 vol% 酢酸及び (1 : 1) 混液を使用することとした。

## ② オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製の検討

カスガマイシンは高極性のイオン性物質であるため、イオン交換による精製を検討することとしたが、抽出液をイオン交換カラムに直接負荷すると試料マトリックスによりカスガマイシンの保持が影響を受ける可能性が高い。カスガマイシンをイオン交換カラムに保持させるためには抽出液を水で希釈してイオン強度を下げるのが有効であるが、この際、希釈と抽出溶液に含まれる脂肪分や低極性物質の除去を同時に行うため、InertSep C18 ミニカラムを用いた精製の検討を行った。2 vol% 酢酸及びエタノール (1 : 1) 混液で抽出した大豆抽出液 5 mL にカスガマイシン標準溶液 (10 mg/L) を 0.5 mL 添加し、あらかじめメタノール及び水各 10 mL で順次コンディショニングした InertSep C18 (1 g/6 mL) に負荷し、溶出画分を採取した。引き続き水を注入して 5 mL ずつ溶出画分を採取した。これらの画分をメタノールで 10 mL に定容し、さらにメタノールで 10 倍に希釈したものについて分析を行った。この測定結果を表 2-4 に示す。

表 2-4 InertSep C18 (1 g/6 mL) の溶出画分の回収率 (n=1)

負荷液	溶出画分	回収率 (%)	回収率累計 (%)
標準添加した大豆抽出液 (2 vol% 酢酸 (1 : 1) 混液)	約 5 mL	81.6	81.6
水	0~5 mL	18.2	99.8
	6~10 mL	0.5	104.8
	11~15 mL	0.0	104.8
	16~20 mL	0.0	104.8

試料抽出液に続いて水を 10 mL 負荷した段階で添加したカスガマイシンはほぼ 100% 回収された。そこで、抽出溶液を負荷した後余裕を持たせてさらに水を 15 mL 負荷し、カスガマイシンを完全に溶出させることとした。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによって、野菜、果実及び茶に含まれる色素の一部も除去することが可能であるため、野菜、果実及び茶についてもオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製を適用することとした。

## ③ 強酸性陽イオン交換樹脂ミニカラムによる精製の検討

カスガマイシンを精製するために強酸性陽イオン交換樹脂ミニカラムによる検討を行った。

2 vol% 酢酸 (1 : 1) 混液で抽出した大豆抽出液 5 mL を、あらかじめメタノール及び水各 10 mL で順次コンディショニングした InertSep C18 (1 g/6 mL) に注入し、さらに水 15 mL を注入して全溶出液を受け、カスガマイシン標準溶液 (10 mg/L 水溶液) を 0.5 mL 添加し、水を加えて正確に 50 mL としたものを検討用の大豆試料液とした。

あらかじめメタノール及び水各 10 mL で順次コンディショニングした OASIS MCX ミニカラム (500 mg/6 mL) に、大豆試料液 40 mL、水及びメタノール各 10 mL を順次注入し、10 mL ずつ溶出画分を採取した。引き続きアンモニア水及びメタノール (1 : 19) 混液を注入し、5 mL ずつ溶出画分を採取した。大豆試料液 40 mL、水及びメタノールの溶出画分はメタノールで 10 倍に希釈したものを試料溶液とした。アンモニア水及びメタノール (1 : 19) 混液の溶出画分は、40℃以下で窒素ガスを吹付けて濃縮して溶媒を除去し、メタノールで 10 mL に定容し、さらにメタノールで 10 倍に希釈したものを試料溶液とした。溶出画分の測定結果を表 2-5 に示す。



表 2-5 OASIS MCX (500 mg/6 mL) の溶出画分の回収率 (n=1)

負荷液	溶出画分	回収率 (%)	回収率累計 (%)
大豆試料液	0~10 mL	0.0	0.0
	11~20 mL	0.0	0.0
	21~30 mL	0.0	0.0
	31~40 mL	0.0	0.0
水	10 mL	0.0	0.0
メタノール	10 mL	0.0	0.0
アンモニア水及び メタノール (1 : 19) 混液	0~5 mL	94.3	94.3
	6~10 mL	3.4	97.7
	11~15 mL	0.6	98.3
	16~20 mL	0.0	98.3
	21~25 mL	0.0	98.3

大豆試料液、洗浄用の水及びメタノールの負荷ではカスガマイシンは溶出されず、OASIS MCX ミニカラム (500 mg/6 mL) に保持された。抽出溶媒のアンモニア水及びメタノール (1 : 19) 混液を 15 mL 負荷した段階で添加したカスガマイシンはほぼ 100%回収されたため、抽出溶媒量は 15 mL とした。

### 3. 添加回収試験

玄米、大豆、らっかせい、ばれいしょ、キャベツ、ほうれんそう、オレンジ、りんご、茶及びコリアンダーの種子 (その他のスパイス) の 10 食品を試料とし、実験方法の 7.試験溶液の調製に従って添加回収試験を実施した。

検討に用いた 10 食品における真度は 91~100% (併行精度 2~5%) と良好な結果が得られ、測定妨害となるピークは検出されなかった。各食品のブランク試料のスキャン測定から、マトリックス中の夾雑ピークの多くが溶出し終えてからカスガマイシンの溶出が始まっており、夾雑ピークとの分離は良好であった。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は 89~100% であり、検討に用いた 10 食品におけるマトリックス影響は低かった。

添加回収試験における各食品のブランク試料、添加回収試料及び回収率 100% 相当の溶媒標準溶液の代表的なクロマトグラムを図 3-1~3-10 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全イオン電流クロマトグラム (TICC) を図 3-21 及び 3-22 に示した。

#### (1) 選択性

選択性の検討結果を表 3-1 に示した。全ての試料から妨害ピークは検出されなかった。

表 3-1 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 <sup>1)</sup> (ppm)	添加濃度 <sup>2)</sup> (ppm)	妨害ピークの許容範囲			ピーク面積 <sup>3)</sup>			選択性の評価 <sup>3)</sup>	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 <sup>4)</sup> (b)	面積比 (a)/(b)				
1	カスガマイシン	玄米	0.01	0.04	0.04	*	基準値	0.04	< 0.100	面積	0	24052	0.000	○	定量限界<基準値
2	カスガマイシン	大豆	0.01	0.04	0.04	*	基準値	0.04	< 0.100	面積	0	20856	0.000	○	定量限界<基準値
3	カスガマイシン	らっかせい	0.01	0.04	0.04	*	基準値	0.04	< 0.100	面積	0	19203	0.000	○	定量限界<基準値
4	カスガマイシン	ばれいしょ	0.01	0.04	0.04	*	基準値	0.04	< 0.100	面積	0	18578	0.000	○	定量限界<基準値
5	カスガマイシン	キャベツ	0.01	0.04	0.04	*	基準値	0.04	< 0.100	面積	0	20437	0.000	○	定量限界<基準値
6	カスガマイシン	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01	*	定量限界	0.005	< 0.333	面積	0	2338	0.000	○	定量限界=基準値
7	カスガマイシン	オレンジ	0.01	0.05	0.05	*	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	23352	0.000	○	定量限界<基準値
8	カスガマイシン	りんご	0.01	0.01	0.01	*	定量限界	0.005	< 0.333	面積	0	2912	0.000	○	定量限界=基準値
9	カスガマイシン	茶	0.01	0.04	0.04	*	基準値	0.04	< 0.100	面積	0	44229	0.010	○	定量限界<基準値
10	カスガマイシン	コリアンダーの種子	0.01	0.05	0.05	*	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	26392	0.000	○	定量限界<基準値

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

\*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した。

\*3 ブランク試料及び標準溶液の順に測定した。

\*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)を用いた。

\*5 面積比が、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「×」を記載した。

## (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 3-2 に示した。真度は 91~100%、併行精度は 2~5%であり、検討に使用した 10 食品において良好な回収率を得られた。

添加濃度と定量限界濃度は試料によって異なるため、定量限界の推定を行った結果を表 3-3 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 3-11~3-20 に示した。S/N 比の平均は 21~135 であり、試料によってはマトリックスの影響でベースラインが高くなり S/N 比が小さくなるものの、10 以上の感度を得ることができた。また、オレンジにおいてピーク後半に重なって溶出されるピークが存在したが、添加濃度及び定量限界濃度において定量の大きな妨げとはならなかった。

表 3-2 真度及び併行精度の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 <sup>1)</sup> (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 <sup>2)</sup>	検量線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N 比 平均値 <sup>3)</sup>	備考
							傾き	切片	r <sup>2</sup> 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5				
1	カスガマイシン	玄米	0.01	0.04	0.04	*	3477586	-926	0.999	97	97	98	97	91	96	3	-	定量限界<基準値
2	カスガマイシン	大豆	0.01	0.04	0.04	*	2797143	-2111	0.996	100	97	100	94	98	98	3	-	定量限界<基準値
3	カスガマイシン	らっかせい	0.01	0.04	0.04	*	2460557	-1719	1.000	94	99	97	98	97	97	2	-	定量限界<基準値
4	カスガマイシン	ばれいしょ	0.01	0.04	0.04	*	2672286	-1615	1.000	92	95	96	96	95	95	2	-	定量限界<基準値
5	カスガマイシン	キャベツ	0.01	0.04	0.04	*	2584100	-1094	0.998	95	98	99	100	93	97	3	-	定量限界<基準値
6	カスガマイシン	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01		2667200	-139	0.998	88	92	95	88	91	91	3	82	定量限界=基準値
7	カスガマイシン	オレンジ	0.01	0.05	0.05	*	2634229	-1583	0.997	95	98	96	90	100	96	4	-	定量限界<基準値
8	カスガマイシン	りんご	0.01	0.01	0.01		2787800	-303	0.999	94	101	102	101	102	100	4	261	定量限界=基準値
9	カスガマイシン	茶	0.01	0.04	0.04	*	2680114	-582	0.998	94	93	85	93	95	92	5	-	定量限界<基準値
10	カスガマイシン	コリアンダーの種子	0.01	0.05	0.05	*	2778080	-647	0.998	94	95	96	99	97	96	2	-	定量限界<基準値

- \*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準 (0.01 ppm) を用いた。
- \*2 添加濃度が定量限界濃度と異なる場合には『\*』を表示した。その場合には、別途、定量限界の推定を行った。
- \*3 添加濃度が定量限界濃度と同じ場合に S/N 比の平均値を示した。

表 3-3 定量限界の推定

No.	分析対象化合物	食品名	推定定量限界 (ppm)	基準値 <sup>1)</sup> (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 <sup>2)</sup>	標準溶液濃度 (mg/L) <sup>3)</sup>	ピーク面積 <sup>4)</sup>						S/N 比		平均値		備考		
								面積又は高さの別	ブランク <sup>5)</sup>	マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液			n=1	n=2		面積比 (%) <sup>6)</sup>	S/N 比
										n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均					
1	カスガマイシン	玄米	0.01	0.04	0.04	*	0.001	面積	0	2940	2876	2908	3123	2862	2993	117	107	97	112	定量限界<基準値
2	カスガマイシン	大豆	0.01	0.04	0.04	*	0.001	面積	0	2523	2644	2584	2506	2640	2573	167	104	100	135	定量限界<基準値
3	カスガマイシン	らっかせい	0.01	0.04	0.04	*	0.001	面積	0	2141	2544	2343	2528	2499	2514	78	72	93	75	定量限界<基準値
4	カスガマイシン	ばれいしょ	0.01	0.04	0.04	*	0.001	面積	0	2492	2460	2476	2515	2306	2411	74	107	103	90	定量限界<基準値
5	カスガマイシン	キャベツ	0.01	0.04	0.04	*	0.001	面積	0	2631	2409	2520	2502	2546	2524	45	40	100	42	定量限界<基準値
6	カスガマイシン	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01	*	0.001	面積	0	2338	2422	2380	2488	2571	2530	39	35	94	37	定量限界=基準値
7	カスガマイシン	オレンジ	0.01	0.05	0.05	*	0.001	面積	0	2161	2280	2221	2355	2434	2395	36	38	93	37	定量限界<基準値
8	カスガマイシン	りんご	0.01	0.01	0.01	*	0.001	面積	0	2912	2994	2953	2878	2937	2908	142	126	102	134	定量限界=基準値
9	カスガマイシン	茶	0.01	0.04	0.04	*	0.001	面積	0	2260	2073	2167	2073	2117	2095	20	21	103	21	定量限界<基準値
10	カスガマイシン	コリアンダーの種子	0.01	0.05	0.05	*	0.001	面積	0	2604	2898	2751	2782	2838	2810	66	73	98	69	定量限界<基準値

- \*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準 (0.01 ppm) を用いた。
- \*2 添加濃度が定量限界濃度と異なる場合には『\*』を表示した。
- \*3 試料中の濃度が定量限界相当濃度となるように、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) を作成した。茶のみ試料中 0.01 ppm 相当の標準溶液濃度であり、それ以外は全て試料中 0.005 ppm 相当の標準溶液濃度となっている。
- \*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測定した。
- \*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た。
- \*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の比を求めた。

(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 3-4 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。面積比は 89~100%であり、試料によってはマトリックスの測定へ

の影響が確認され、特に茶では89%と最も影響が大きかった。

添加回収試験における真度を表3-4で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表3-5に示した。補正真度は97~103%であり、補正によりほぼ100%の回収率を得られることを確認した。

表3-4 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 (ppm)	基準値 <sup>1)</sup> (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 <sup>2)</sup>	標準溶液濃度 (mg/L) <sup>3)</sup>	ピーク面積 <sup>4)</sup>									平均値	備考
								面積又は高さの別	ブランク <sup>5)</sup>	マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液			面積比 (%) <sup>6)</sup>		
										n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均			
1	カスガマイシン	玄米	0.01	0.04	0.04	*	0.008	面積	0	24052	24258	24155	25081	25128	25105	96	定量限界<基準値	
2	カスガマイシン	大豆	0.01	0.04	0.04	*	0.008	面積	0	20856	20588	20722	20929	20663	20796	100	定量限界<基準値	
3	カスガマイシン	らっかせい	0.01	0.04	0.04	*	0.008	面積	0	19203	18782	18993	20645	19615	20130	94	定量限界<基準値	
4	カスガマイシン	ばれいしょ	0.01	0.04	0.04	*	0.008	面積	0	18578	18242	18410	19962	19161	19562	94	定量限界<基準値	
5	カスガマイシン	キャベツ	0.01	0.04	0.04	*	0.008	面積	0	20437	20747	20592	20475	20737	20606	100	定量限界<基準値	
6	カスガマイシン	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01	*	0.002	面積	0	4985	4856	4921	5337	5232	5285	93	定量限界=基準値	
7	カスガマイシン	オレンジ	0.01	0.05	0.05	*	0.01	面積	0	23352	23016	23184	24536	23956	24246	96	定量限界<基準値	
8	カスガマイシン	りんご	0.01	0.01	0.01	*	0.002	面積	0	5372	5468	5420	5436	5612	5524	98	定量限界=基準値	
9	カスガマイシン	茶	0.01	0.04	0.04	*	0.004	面積	0	11134	12982	12058	12837	14219	13528	89	定量限界<基準値	
10	カスガマイシン	コリアンダーの種子	0.01	0.05	0.05	*	0.01	面積	0	26392	24170	25281	26103	27130	26617	95	定量限界<基準値	

- \*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準 (0.01 ppm) を用いた。
- \*2 添加濃度が定量限界濃度と異なる場合には『\*』を表示した。
- \*3 試料中の濃度が定量限界相当濃度となるように、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) を作成した。
- \*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測定した。
- \*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た。
- \*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の比を求めた。

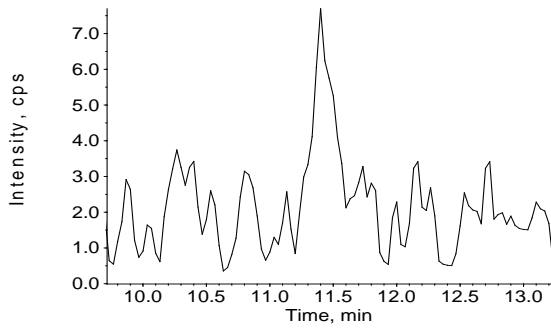
表3-5 補正真度

分析対象化合物	食品名	真度 (%)	ピーク面積比 (%)	補正真度 (%)
カスガマイシン	玄米	96	96	100
カスガマイシン	大豆	98	100	98
カスガマイシン	らっかせい	97	94	103
カスガマイシン	ばれいしょ	95	94	101
カスガマイシン	キャベツ	97	100	97
カスガマイシン	ほうれんそう	91	93	97
カスガマイシン	オレンジ	96	96	100
カスガマイシン	りんご	100	98	102
カスガマイシン	茶	93	89	103
カスガマイシン	コリアンダーの種子	96	95	101

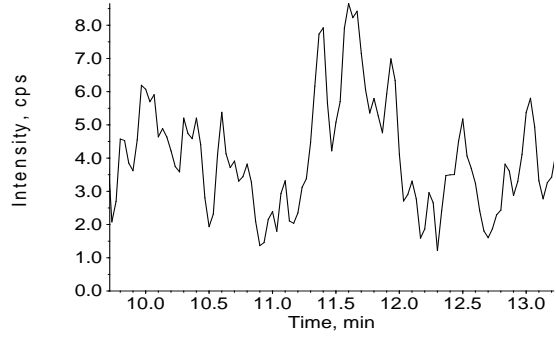
① 添加回収試験における代表的なクロマトグラム

ブランク試料

019 - 380.0 / 112.0 380.0112.0 amu - sample 2 of 27 from 01.wiff  
(peak not found)

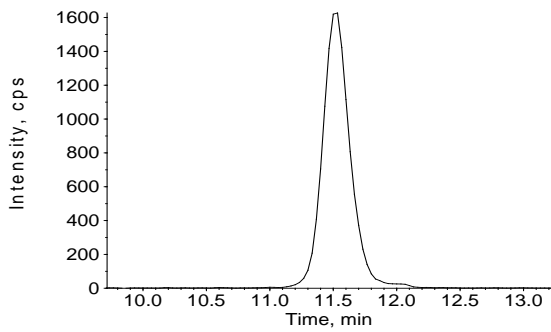


ブランク試料

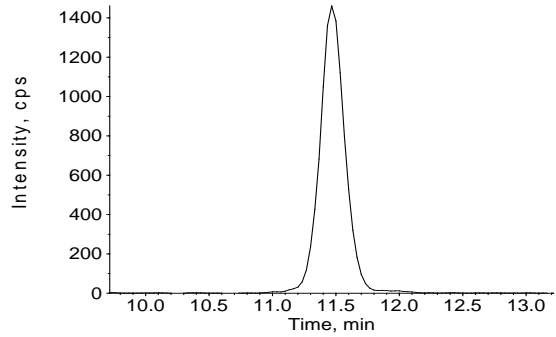


添加試料

019 - 380.0 / 112.0 380.0112.0 amu - sample 12 of 27 from 01.wiff  
(peak not found)

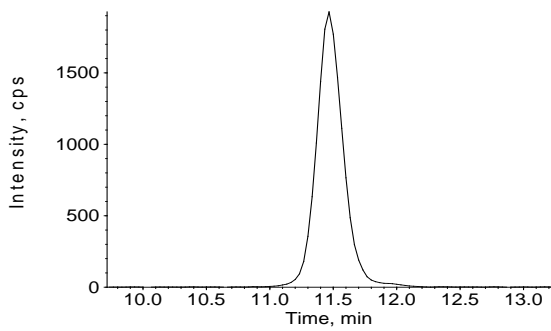


添加試料



標準溶液

8 - 380.0 / 112.0 380.0112.0 amu - sample 7 of 27 from 01.wiff  
(peak not found)



標準溶液

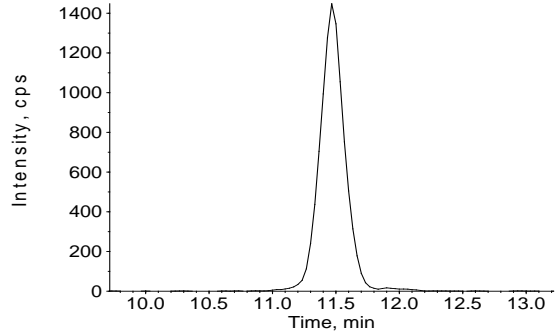
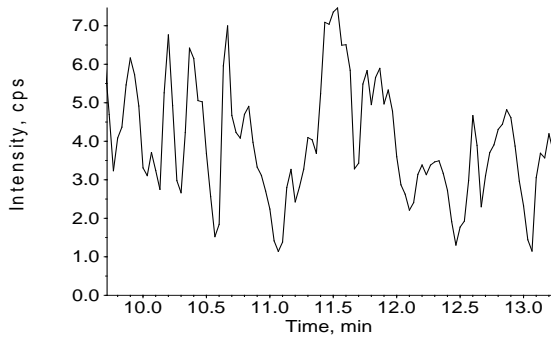


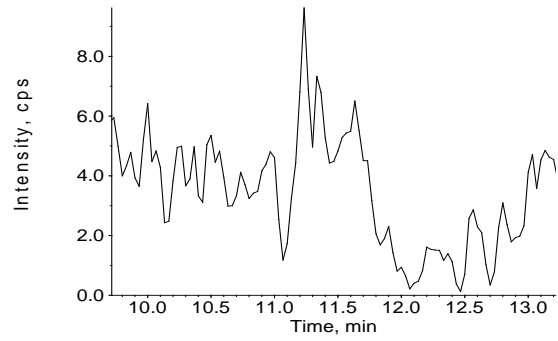
図 3-1 カスガマイシンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  380→112)  
試料中 0.04 ppm 相当 (玄米)

図 3-2 カスガマイシンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  380→112)  
試料中 0.04 ppm 相当 (大豆)

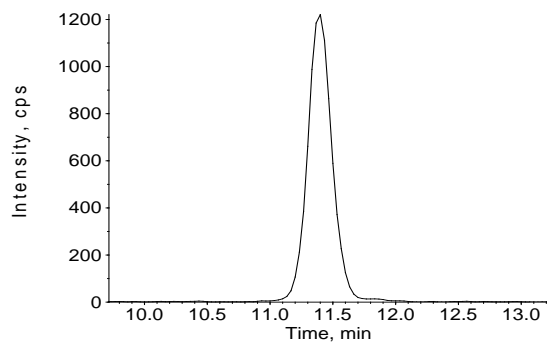
ブランク試料



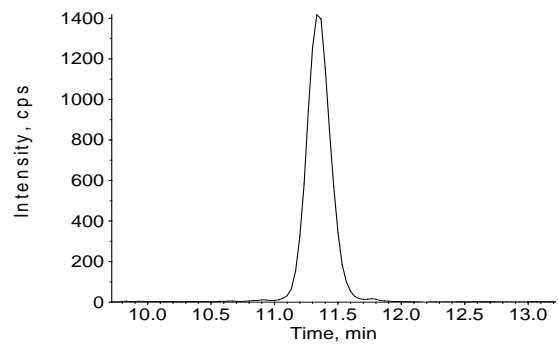
ブランク試料



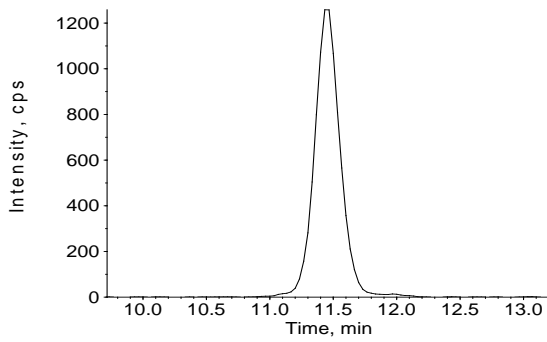
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

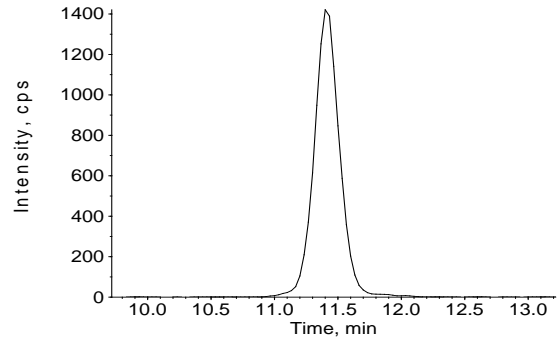
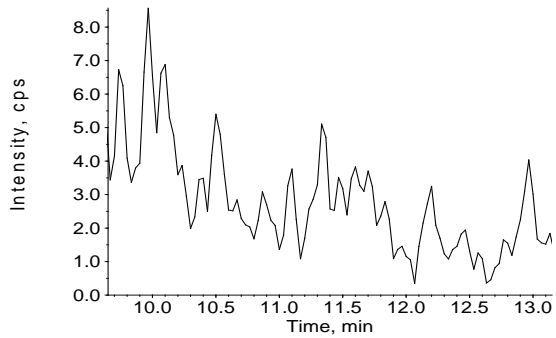


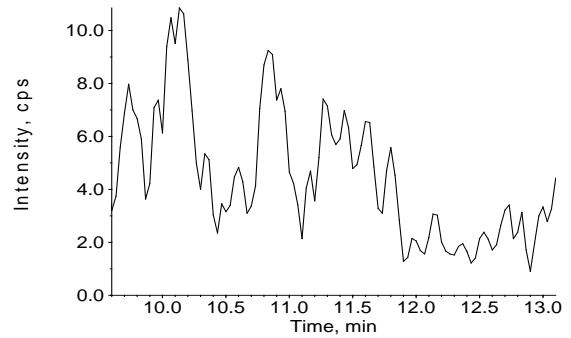
図 3-3 カスガマイシンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  380→112)  
試料中 0.04 ppm 相当 (らっかせい)

図 3-4 カスガマイシンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  380→112)  
試料中 0.04 ppm 相当 (ばれいしょ)

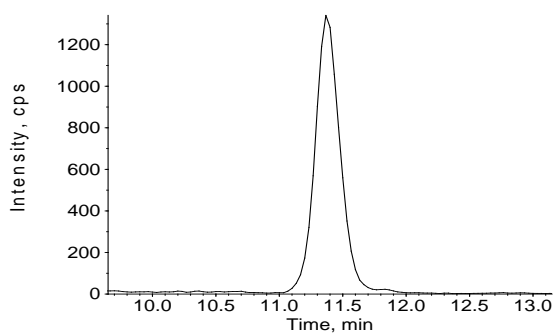
ブランク試料



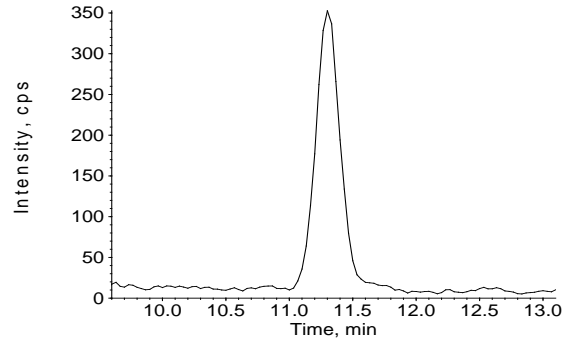
ブランク試料



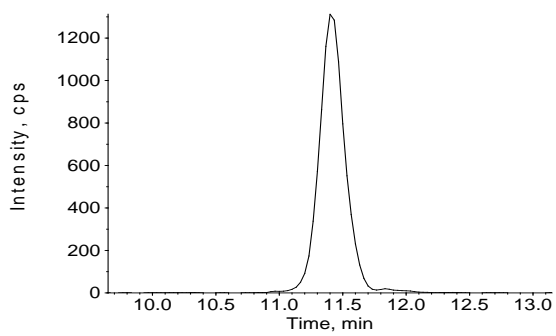
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

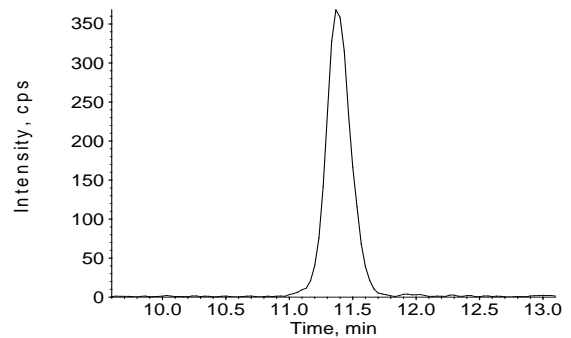
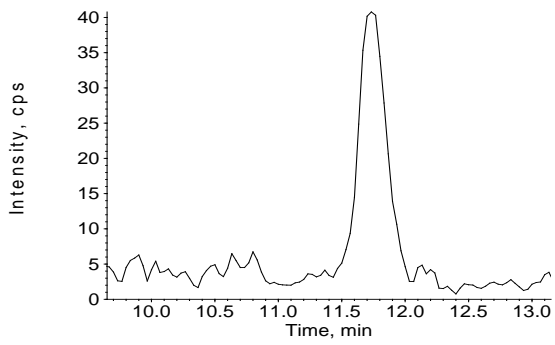


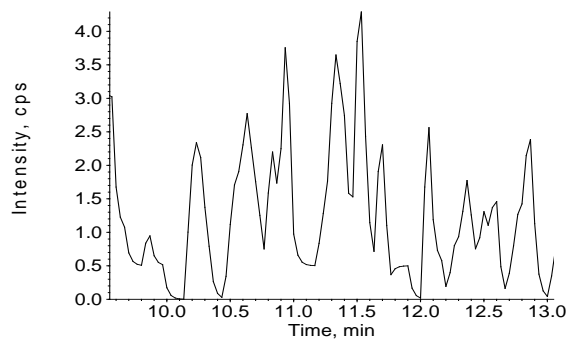
図 3-5 カスガマイシンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  380→112)  
試料中 0.04 ppm 相当 (キャベツ)

図 3-6 カスガマイシンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  380→112)  
試料中 0.01 ppm 相当 (ほうれんそう)

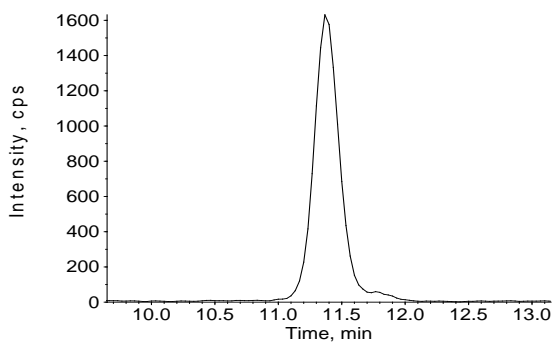
ブランク試料



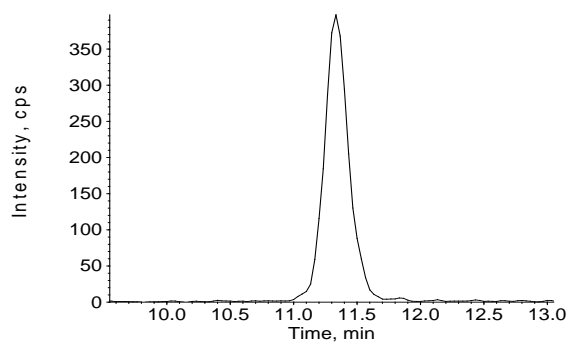
ブランク試料



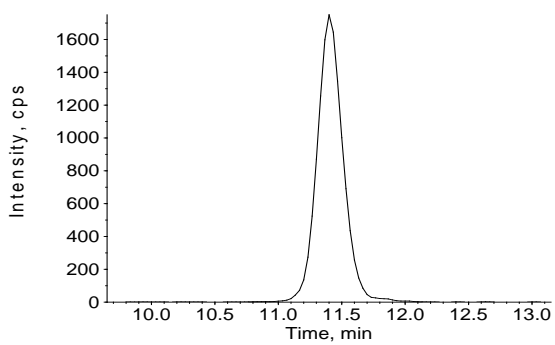
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

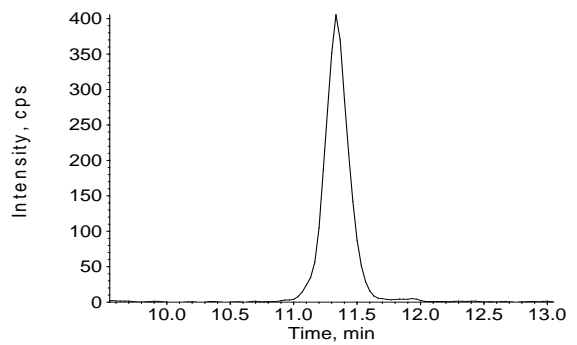
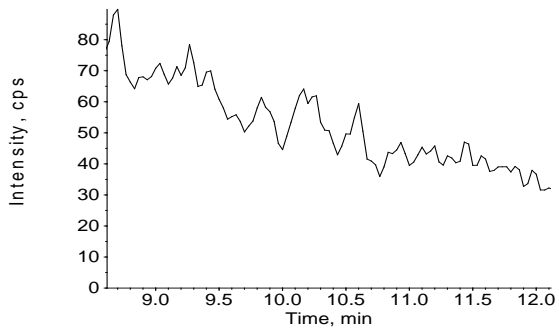


図 3-7 カスガマイシンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  380→112)  
試料中 0.05 ppm 相当 (オレンジ)

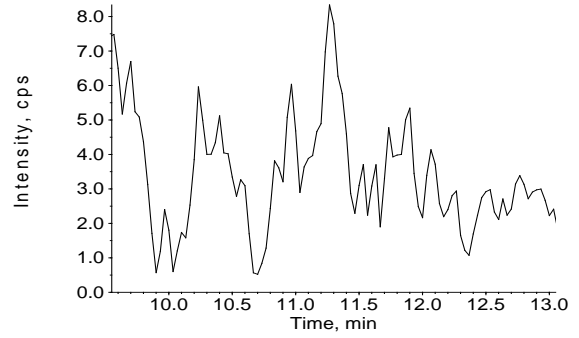
図 3-8 カスガマイシンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  380→112)  
試料中 0.01 ppm 相当 (りんご)



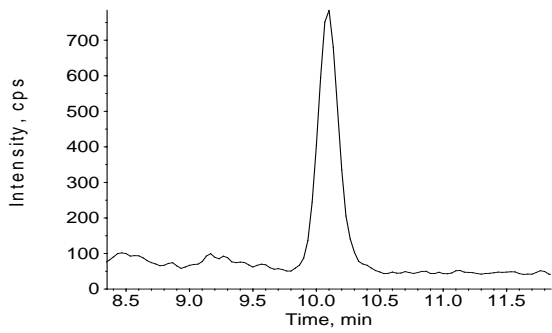
ブランク試料



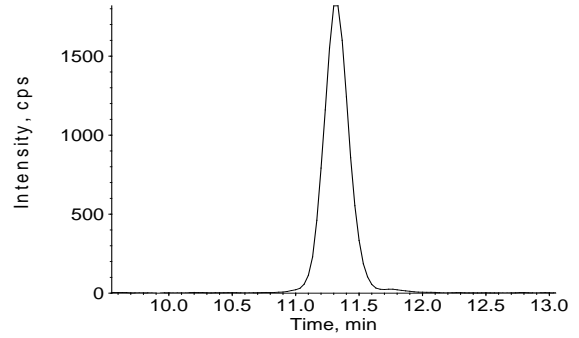
ブランク試料



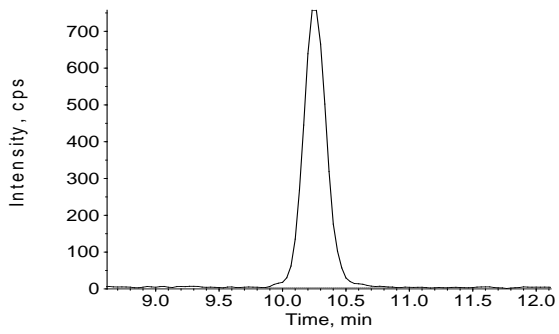
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

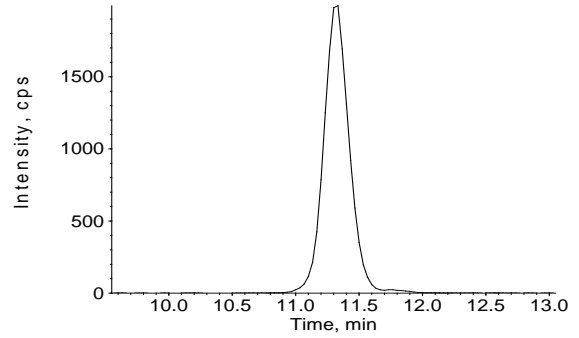
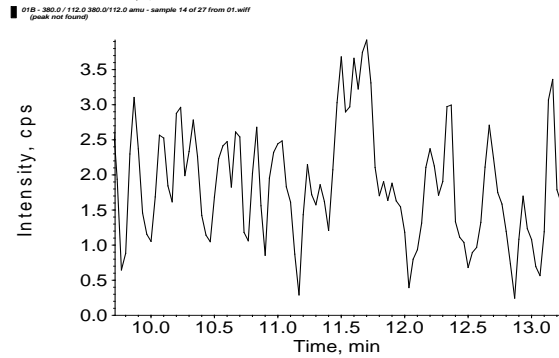


図 3-9 カスガマイシンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  380→112)  
試料中 0.04 ppm 相当 (茶)

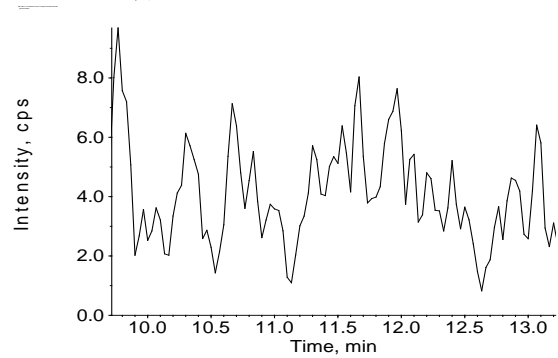
図 3-10 カスガマイシンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  380→112)  
試料中 0.05 ppm 相当 (コリアンダーの種子)

②定量下限の推定における代表的なクロマトグラム(定量限界相当濃度)

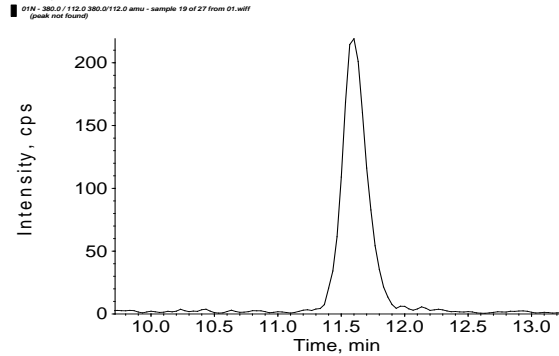
ブランク試料



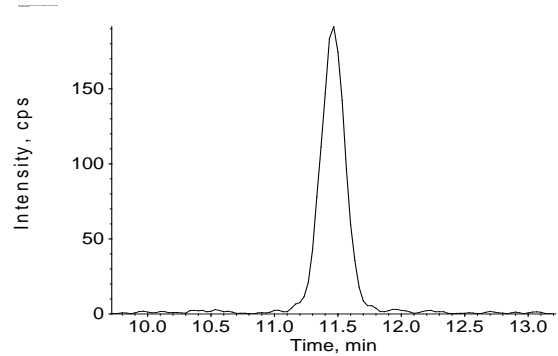
ブランク試料



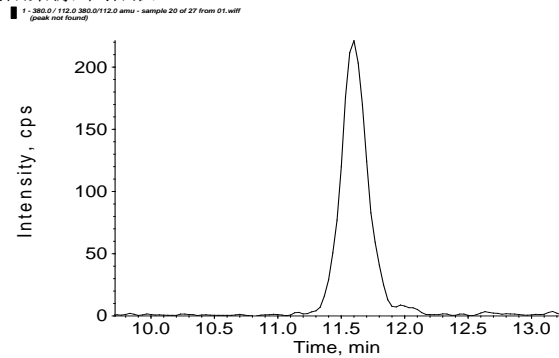
マトリックス  
添加標準溶液



マトリックス  
添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

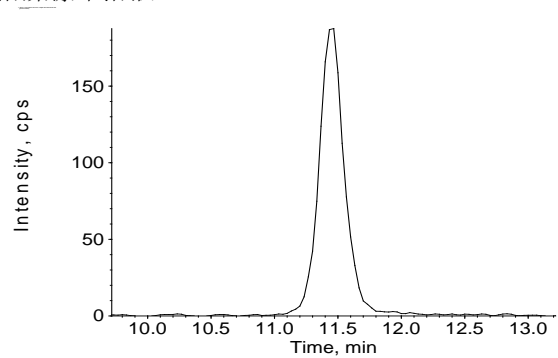
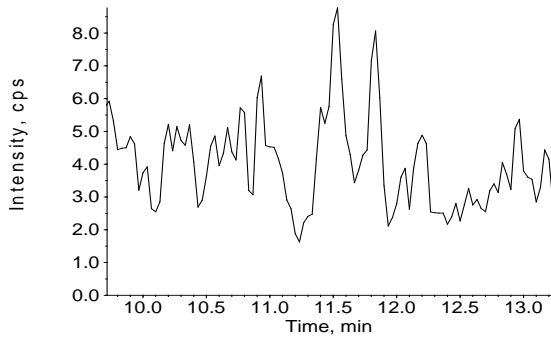


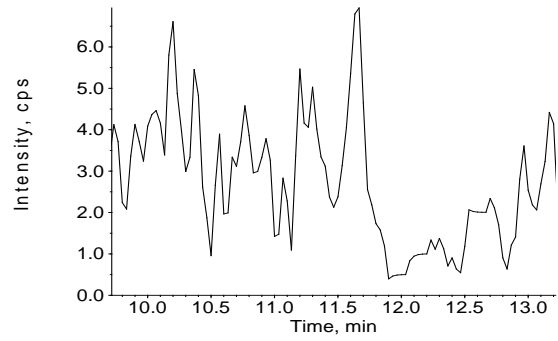
図 3-11 カスガマイシンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  380→112)  
試料中 0.005 ppm 相当 (玄米)

図 3-12 カスガマイシンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  380→112)  
試料中 0.005 ppm 相当 (大豆)

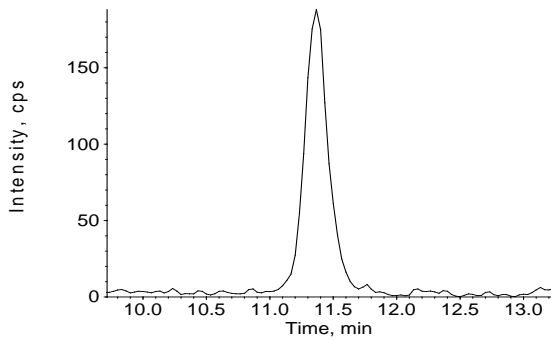
ブランク試料



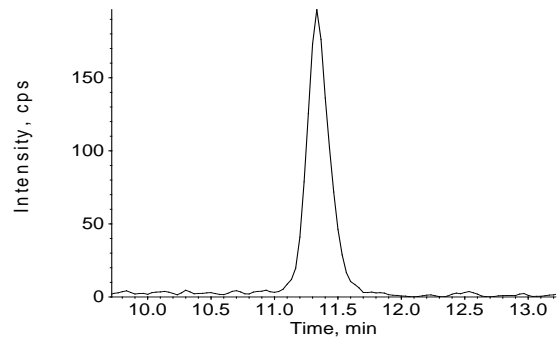
ブランク試料



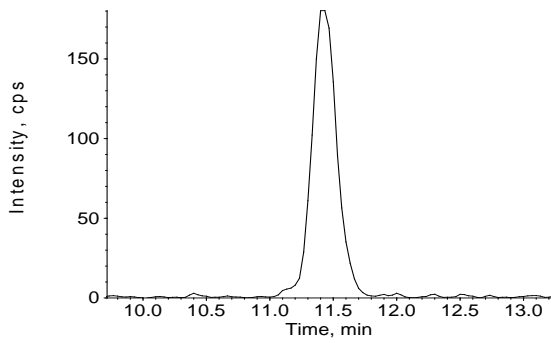
マトリックス  
添加標準溶液



マトリックス  
添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

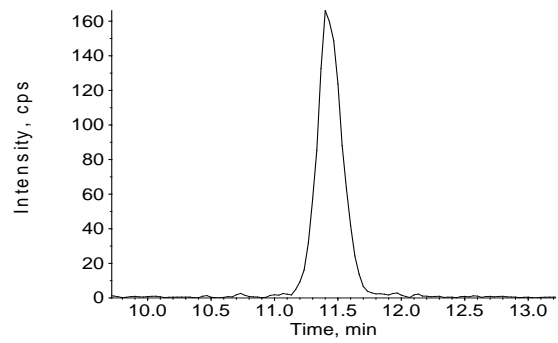
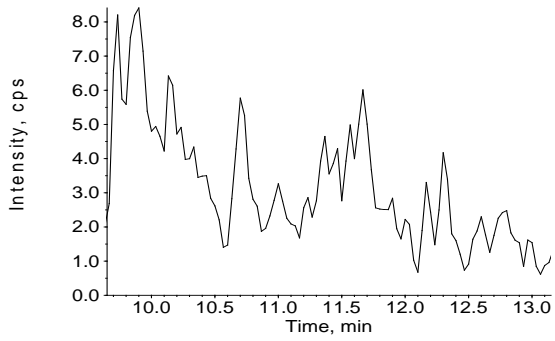


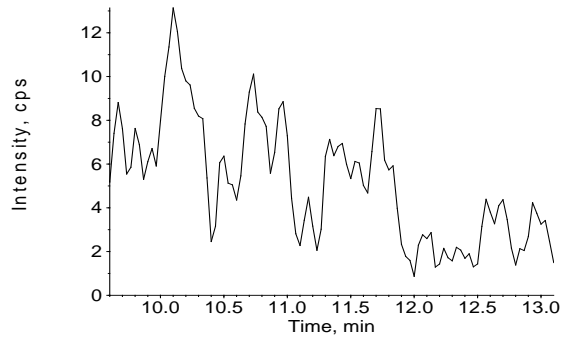
図 3-13 カスガマイシンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  380 $\rightarrow$ 112)  
試料中 0.005 ppm 相当 (らっかせい)

図 3-14 カスガマイシンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  380 $\rightarrow$ 112)  
試料中 0.005 ppm 相当 (ばれいしょ)

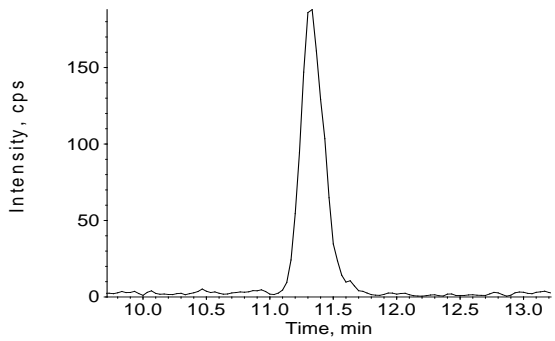
ブランク試料



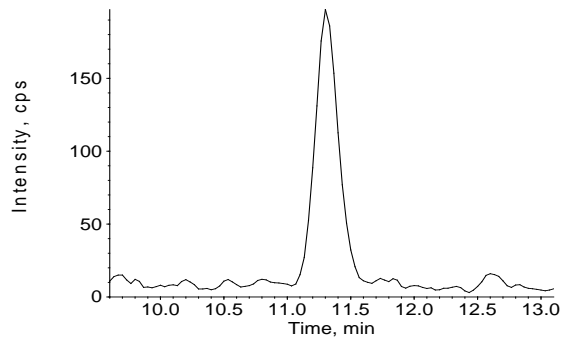
ブランク試料



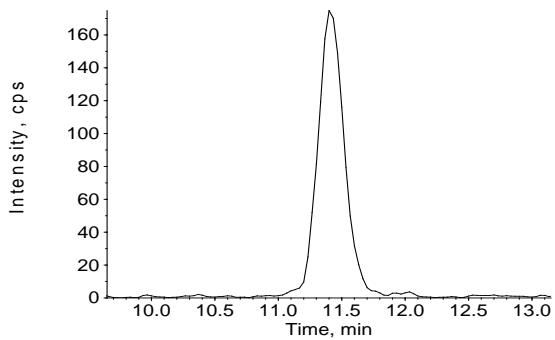
マトリックス  
添加標準溶液



マトリックス  
添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

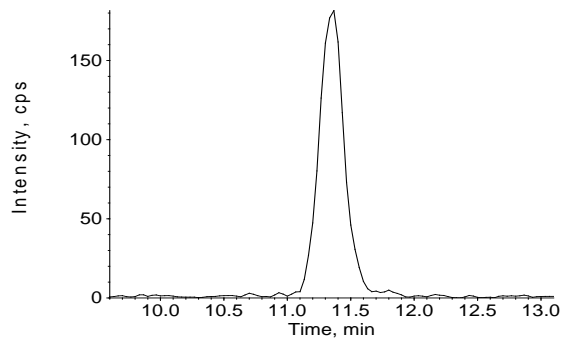
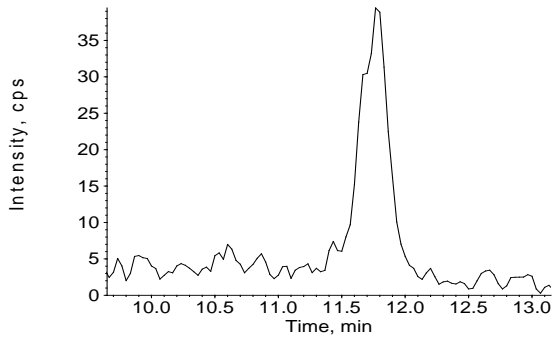


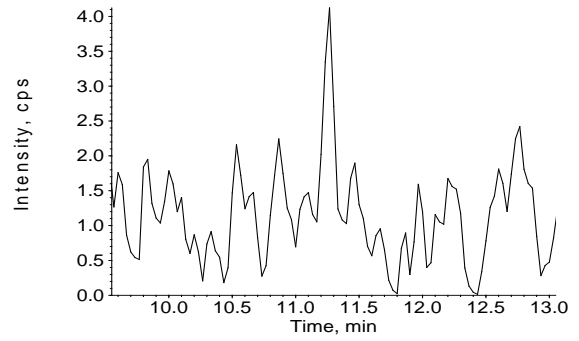
図 3-15 カスガマイシンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  380 $\rightarrow$ 112)  
試料中 0.005 ppm 相当 (キャベツ)

図 3-16 カスガマイシンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  380 $\rightarrow$ 112)  
試料中 0.005 ppm 相当 (ほうれんそう)

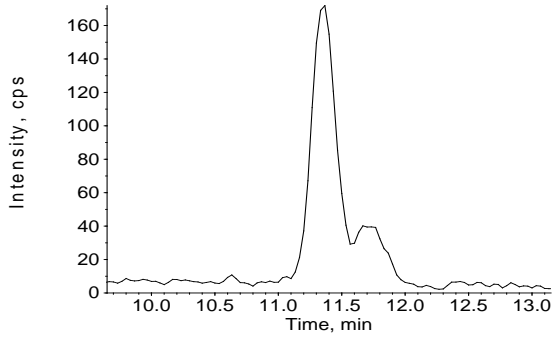
ブランク試料



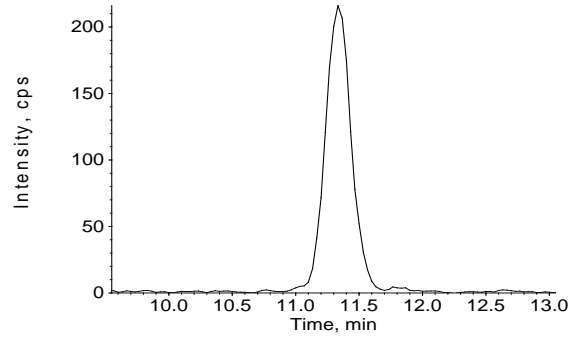
ブランク試料



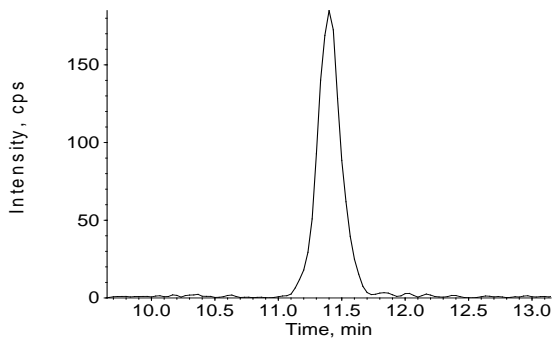
マトリックス  
添加標準溶液



マトリックス  
添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

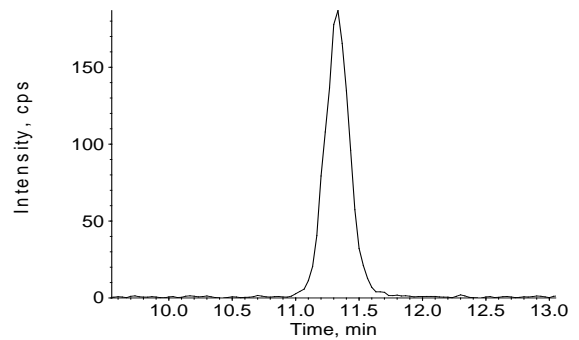
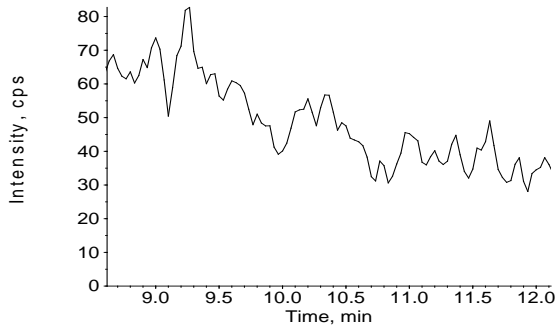


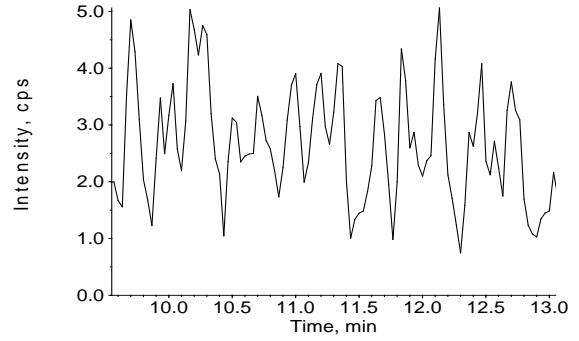
図 3-17 カスガマイシンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  380 $\rightarrow$ 112)  
試料中 0.005 ppm 相当 (オレンジ)

図 3-18 カスガマイシンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  380 $\rightarrow$ 112)  
試料中 0.005 ppm 相当 (りんご)

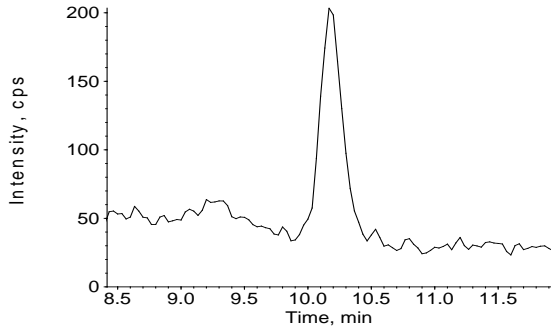
ブランク試料



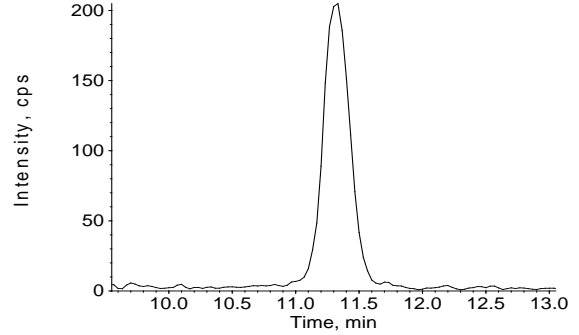
ブランク試料



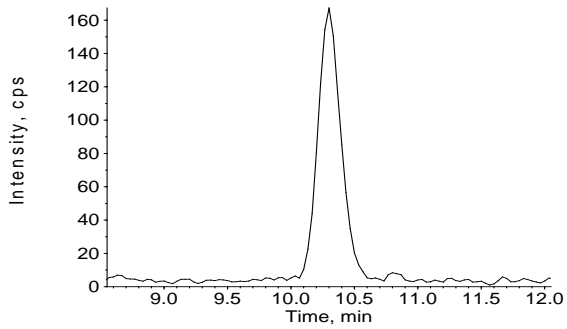
マトリックス  
添加標準溶液



マトリックス  
添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

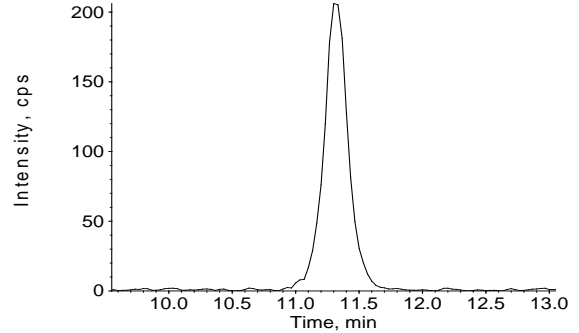


図 3-19 カスガマイシンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  380 $\rightarrow$ 112)  
試料中 0.01 ppm 相当 (茶)

図 3-20 カスガマイシンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  380 $\rightarrow$ 112)  
試料中 0.005 ppm 相当 (コリアンダー)

③ ブランク試料の代表的な全イオン電流クロマトグラム

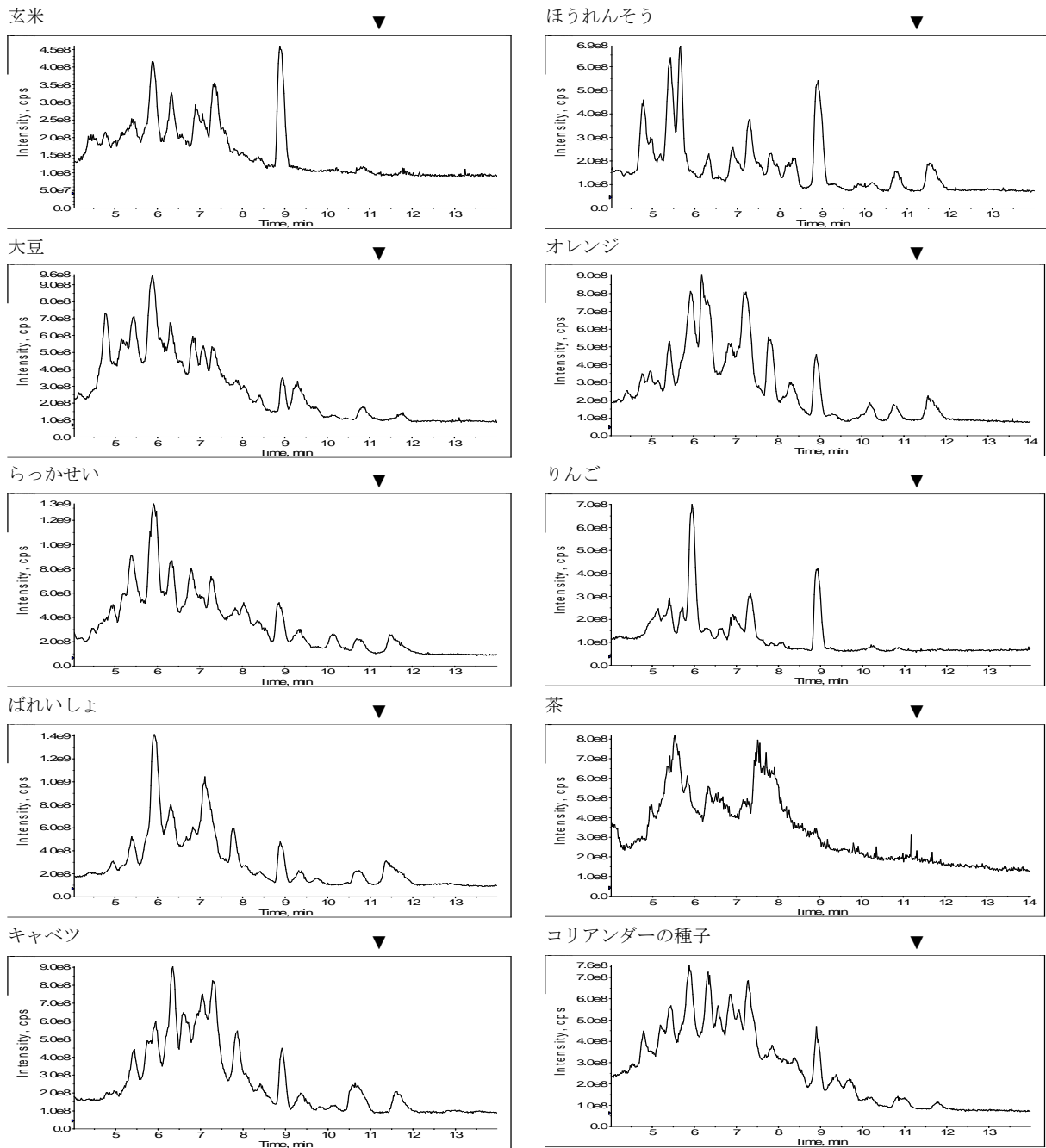
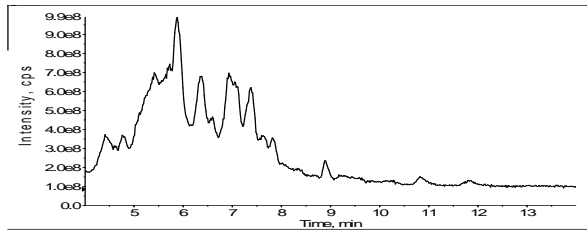
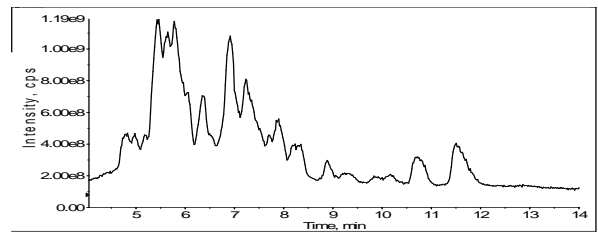


図 3-21 ブランク試料の全イオン電流クロマトグラム (TIC) (ESI-)  
(スキャン範囲 : 100~1000 amu ; コーン電圧 70 V)

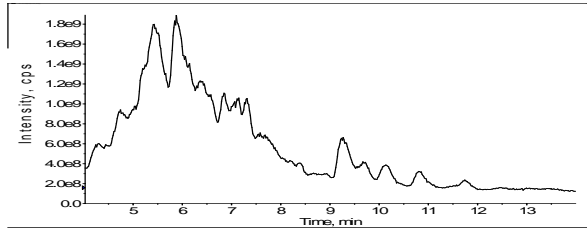
玄米



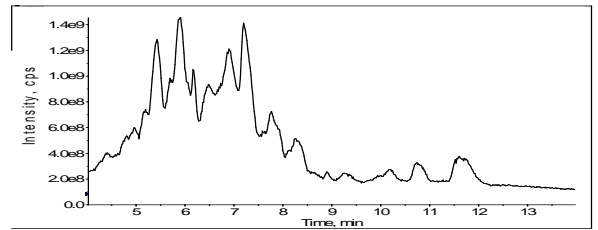
ほうれんそう



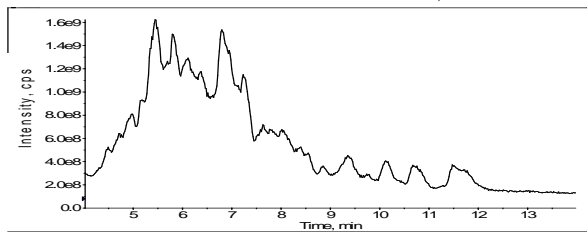
大豆



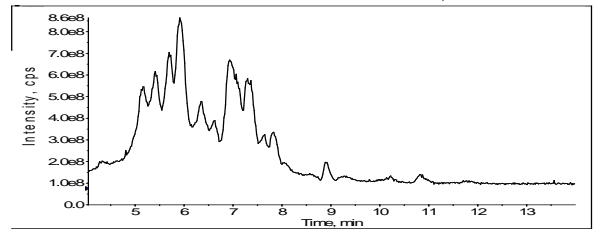
オレンジ



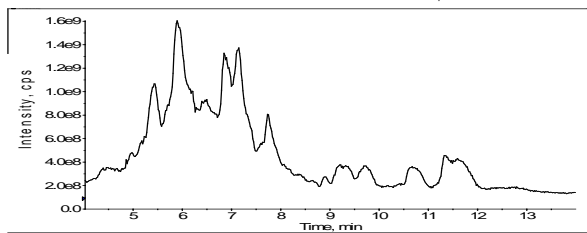
らっかせい



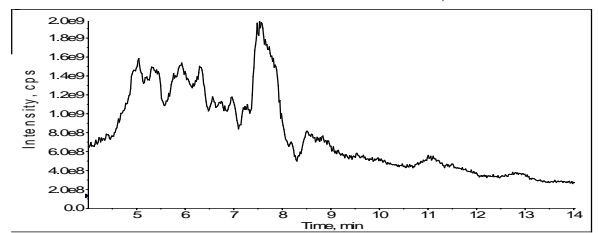
りんご



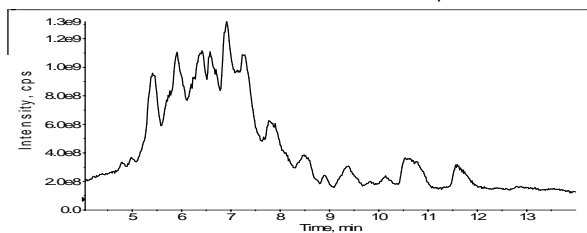
ばれいしょ



茶



キャベツ



コリアンダーの種子

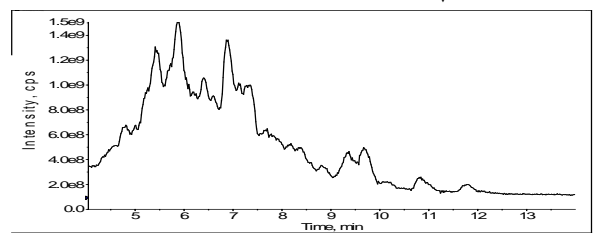


図 3-22 ブランク試料の全イオン電流クロマトグラム (TIC) (ESI+)  
(スキャン範囲 : 100~1000 amu ; コーン電圧 70 V)



#### 4. その他の試験法検討に関連する事項

##### (1) 逆相イオンペアクロマトグラフィーによる測定条件の検討

アミノグリコシド系抗生物質であるジヒドロストレプトマイシン及びストレプトマイシン試験法（農産物）<sup>2)</sup>を参考に、イオンペア試薬としてヘプタフルオロ酪酸を移動相に添加し、オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（L-column2 ODS：内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm、（一財）化学物質評価研究機構製）を用い測定する条件を検討し、標準溶液濃度で 0.001 ppm レベルの測定が可能であることを確認したが、イオンペア試薬が機器に及ぼす影響を考慮して本試験法では採用しなかった。

##### (2) 逆相マルチモードカラムによる測定条件の検討

逆相マルチモードカラム（Sherzo SM-C18：内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm、インタクト（株）製）による測定条件の検討を行い、標準溶液濃度で 0.001 ppm レベルの測定が可能であることを確認したが、販売元が 1 社のみの特種なカラムであるため、本試験法では採用しなかった。

##### (3) スルホベタイン基化学結合型シリカゲルカラム以外の HILIC カラムによる測定条件の検討

スルホベタイン基化学結合型シリカゲルカラム以外の HILIC カラムとして、ジオールカラム（Inertsil HILIC：内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 3 μm、ジーエルサイエンス（株）製）及び NH<sub>2</sub> カラム（TSK-GEL NH<sub>2</sub>-100：内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm、東ソー（株）製）による測定条件の検討も行った。ジオールカラムは堅牢性は高いが選択性が低いため、高極性のカスガマイシンが溶出する位置と他の高極性の塩類が溶出してくる位置が重なりマトリックス影響が大きくなるため本試験法には採用しなかった。NH<sub>2</sub> カラムは選択性は高いが、耐久性が低く注入回数の増加に従って感度やピーク形状等の再現性が下がる傾向にありメソッドの堅牢性を保つことが困難なため、本試験法では採用しなかった。

##### (4) 液-液抽出による溶媒転溶の検討

飽和食塩水にカスガマイシンを添加し、アセトニトリル、酢酸エチル、*n*-ヘキサン、ジエチルエーテル、トルエン及びジクロロメタンによる抽出を検討したが、カスガマイシンは回収されなかった。また、塩酸及び水酸化ナトリウムを 0.1 mol/L となるように添加した飽和食塩水で同様の操作を行ったがカスガマイシンは回収されなかった。水中のカスガマイシンを有機溶媒で液-液抽出することは困難であったため、本試験法では液-液抽出による溶媒転溶は採用しなかった。

##### (5) メタノール/*n*-ヘキサン分配による脱脂の検討

ヘキサン飽和メタノール 30 mL と同量のメタノール飽和 *n*-ヘキサンによる脱脂の検討を行った。*n*-ヘキサン飽和メタノール 30 mL に対して、メタノール飽和 *n*-ヘキサン 30 mL で 1~3 回の抽出を行いメタノール層を測定したところ、いずれもカスガマイシンはほぼ 100%メタノール層から回収された。本試験法ではオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる脱脂を採用したため、メタノール/*n*-ヘキサン分配は採用しなかった。

##### (6) メタノール及び 0.1 mol/L クエン酸緩衝液（7：3）混液による抽出法の検討

メタノール及び 0.1 mol/L クエン酸緩衝液（7：3）混液による抽出法を検討し、10 種類の食品からカスガマイシンが抽出可能であることを確認したが、クエン酸緩衝液の調製等操作が煩雑であるため、より簡便にするため酢酸の添加へ切り替えた。カスガマイシンを抽出するには pH が 5 以下であることが望ましかったが、塩酸等で pH を 1~2 にすると大豆試料のたんぱく質が凝固して吸引ろ過の妨げとなりやすいため、大豆たんぱく質の凝固が生じない pH4 前後での抽出が望ましくクエン酸緩衝液の使用を検討した。しかし、同 pH 域であれば酢酸でも同様

の効果を得られることから、メタノール及び0.1 mol/L クエン酸緩衝液（7：3）混液による抽出法は本試験法では採用しなかった。

(7) 強陽イオン交換ミニカラムによる精製法の検討

強陽イオン交換ミニカラム（HF BOND ELUT-SCX 2 g/12 mL）による精製法を検討したところ、抽出液を希釈せずに負荷してもカスガマイシンが保持された。しかし、抽出液を *n*-ヘキサン抽出でマトリックスを除去してから負荷するとカスガマイシンの保持の再現が失われるなど、溶出挙動の再現性を得ることが困難であった。また、HF BOND ELUT-SCX では抽出液を直接負荷してカスガマイシンを保持することが可能であっても、他社の強陽イオン交換ミニカラムで再現できない可能性があるため、本試験法では採用しなかった。

(8) 標準溶液の調製

カスガマイシンの検量線用の標準溶液調製にガラス製のメスフラスコを使用したところ、検量線の直線性が得られず、ポリプロピレン製のメスフラスコに変更したところ良好な直線性を得ることができた。このことから、カスガマイシンはガラス製容器内に長時間置くとガラス表面に吸着する可能性が考えられたため、メスフラスコ及び測定用バイアルにはポリプロピレン製の物を使用した。また、ガラス製のホールピペット及びナス型フラスコの使用は、短時間であれば問題ないが、使用後速やかにポリプロピレン製容器に移すことが推奨される。

(9) 茶試料の前処理条件の検討

茶試料の精製に用いる抽出液量の条件を変えて検討した結果を以下に示す。

茶試料の 5.00 g を量り採り、メタノールで調製した標準溶液（0.2 mg/L）をホールピペットを用いて 1 mL 添加し、よく混合して 30 分放置した。水を 20 mL 加えて 30 分放置し、これに 2 vol% 酢酸（1：1）混液 100 mL をそれぞれ加え、3 分間ホモジナイズした後、ケイソウ土を敷いたろ紙（No.5B）を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物を採り、新たに 2 vol% 酢酸（1：1）混液 50 mL を加え、3 分間ホモジナイズした後、吸引ろ過し、各溶媒を用いて 200 mL に定容した。この溶液を 10 mL 分取し、あらかじめメタノール及び水各 10 mL で順次コンディショニングした InertSepC18 ミニカラム（1 g/6 mL）に注入し、溶出液を採った。さらに水 15 mL を注入し、全溶出液を採り、水を加えて 100 mL とした。あらかじめメタノール及び水各 10 mL で順次コンディショニングした OASIS MCX ミニカラム（500 mg/6 mL）に、この抽出液を 80 mL 注入し流出液は捨てた。水及びメタノール各 10 mL で順次洗浄し流出液を捨てた後、アンモニア水及びメタノール（1：19）混液 15 mL を注入し、全溶出液を採った。40℃以下で濃縮して溶媒を除去後、残留物をメタノールに溶かし 1 mL としたものを試験溶液とした。

表 4-1 に検討結果を示す。

表 4-1 茶試料の精製検討の結果（n=5）

精製に用いた 試料液量 (mL)	ピーク面積 比 (%) *1	回収率 (%)					
		マトリックス補正有*2			マトリックス補正無		
		個別	平均	RSD (%)	個別	平均	RSD (%)
InertSepC18 : 10 mL OASIS MCX : 80 mL	72.7	95.0	98.5	6.2	69.1	71.6	6.2
		105.8			76.9		
		97.2			70.7		
		103.3			75.1		
		90.9			66.1		

\*1 ピーク面積比:マトリックス添加標準溶液の面積値を溶媒標準溶液の面積値で除した値に 100 を乗じて算出した。

\*2 マトリックス添加標準溶液を基準として算出。

精製に用いる試料液量を2倍にしたところ、マトリックス影響が72.7%と大きく、マトリックス補正後は100%近い回収率があったが、マトリックス補正無しでは回収率が70%を下回る試料もいくつかあったため、茶試料の精製方法には、InertSepC18 ミニカラムに5 mLを負荷し50 mLに定容後、OASIS MCX ミニカラムに40 mLを負荷し最終液量を1 mLとする方法を採用した。

## 5. 考察

カスガマイシンと同様に極性が高い塩基性物質であるメラミン試験法<sup>3)</sup>を参考にして、スルホベタイン基化学結合型シリカゲルカラムを用いて測定条件を検討した。メラミン試験法では水系の移動相の割合が最も高い状態で20分間維持する洗浄工程を設けていたため、実際にカラムの洗浄に必要な時間を検討したところ、少数の試料を測定する場合はカラムの洗浄工程は必要ないが、多検体の試料を測定する場合は10~20分程度のカラム洗浄工程を設定することで、マトリックスによる高極性物質の感度変動を防止できることが判明した。

大豆を試料とした検討において、カスガマイシンはアセトン及びアセトニトリルで直接抽出することは困難であったため、カスガマイシンの抽出が可能なメタノール及びエタノールと水を組み合わせ、酢酸酸性下での抽出を試みたところ、2 vol%酢酸(1:1)混液ではマトリックス影響も比較的少なく良好な回収率が得られたため、2 vol%酢酸(1:1)混液での抽出法を採用した。

イオン交換による精製には、通液性の良さ、充填剤が乾いても溶出挙動に影響がない堅牢さ、体積当りの交換容量の大きさ等を考慮し、OASIS MCX ミニカラムを使用した。精製前には脱脂と低極性物質の除去のためにInertSep C18 ミニカラムを使用した。

試料によってはカスガマイシンのピーク付近に夾雑ピークが認められるが、定量下限を0.01 ppmとした場合、検討に用いた10食品においてS/N10以上を確保することができた。

開発した方法を用いて、玄米等10食品の添加回収試験を行った結果、本試験法は穀類・豆類・種実類、野菜類、果実類、茶等の農産物に適用可能であると判断された。

### [ 結論 ]

農産物中のカスガマイシン試験法として、カスガマイシンを試料から2 vol%酢酸(1:1)混液で抽出し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及び強酸性陽イオン交換樹脂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。開発した試験法を玄米、大豆、らっかせい、ばれいしょ、キャベツ、ほうれんそう、オレンジ、りんご、茶及びコリアンダーの種子(その他のスパイス)の10食品に適用した結果、真度91~100%、併行精度は2~5%の良好な結果が得られた。また、定量限界として、0.01 ppmを設定可能であることが確認された。

### [ 参考文献 ]

- 1) Sheu C.ら, Analysis of antibiotic fungicide kasugamycin in irrigation water by high performance liquid chromatography. Journal of Environmental Science and Health Part B (2010) 45, 478-484HSDB (Hazardous Substances Data Bank)
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 食安発第0124001号「ジヒドロストレプトマイシン及びストレプトマイシン試験法(農産物)」(平成17年1月24日)
- 3) 農林水産省消費・安全局長通知 19消安第14729号「飼料分析基準(メラミン)」(平成20年4月1日)