

4) HILIC-MS/MS による農産物中ニテンピラム, CPMA 及び CPMF 分析法の検討

吉田 達雄 村川 弘

要 旨

ニテンピラムは国内使用量が多い農薬であり、残留農薬検査において重要な農薬成分であるが、ニテンピラム及びその代謝物である CPMA 及び CPMF は極性が非常に高く、分析法は煩雑な操作を必要とする。そこで、高極性化合物を分析可能な未修飾シリカ型 HILIC-MS/MS を用いることにより、ニテンピラム、CPMA 及び CPMF を簡易迅速に分析する方法を開発した。4 種類の農作物を用いて行った添加回収試験において、すべて良好な値が得られた。また、本分析法と厚生労働省通知試験法による分析値を比較した結果、同等の値を示し、本分析法は、有効な方法であることが明らかとなった。

キーワード：HILIC-MS/MS, ニテンピラム, CPMA, CPMF, 農作物

はじめに

農作物中の残留農薬においては、その代謝物にも強い活性を有するものがあり、代謝物も併せて分析を行う必要がある農薬成分が存在する。ニテンピラムは厚生労働省食品規格によりニテンピラムと2種の代謝物2-[N-(6-クロロ-3-ピリジルメチル)-N-エチル]アミノ-2-メチルイミノ酢酸（以下「CPMA」という。）及びN-(6-クロロ-3-ピリジルメチル)-N-エチル-N'-メチルホルムアミジン（以下「CPMF」という。）の含量で値を求めることとなっている¹⁾。厚生労働省通知試験法では、CPMA及びCPMFを、最終的にN-(6-クロロ-3-ピリジルメチル)-N-エチルホルムアミド（以下「CPF」という。）に変換して定量し、ニテンピラムに換算する分析法が示されている¹⁾。この分析法は、CPMAとCPMFを加水分解後、誘導体化して同一化合物として測定するため、各代謝物の残留量を把握できない欠点があり、さらに手法が煩雑で、試薬や精製カラムなど使用する器材も多く、大変複雑な分析法である。

CPMAとCPMFを個別に分析できない原因として、CPMAがアセトンや酢酸エチル中において、容易に

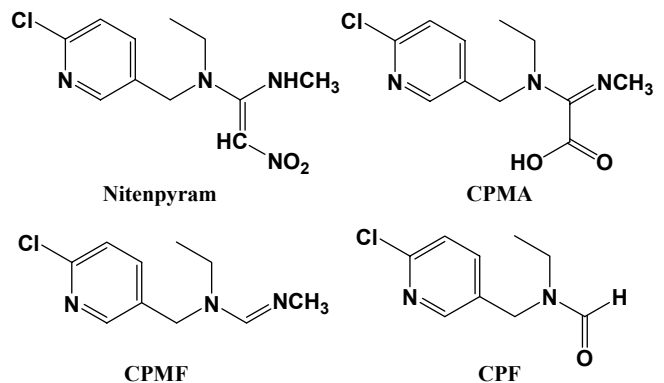


図1 Nitenpyram, CPMA, CPMF及びCPFの構造

CPMFに変換してしまうことが挙げられる²⁾。津村らによるとCPMA 10 µgを蒸留水20 ml及びアセトン150 mlで希釈してロータリーエバポレーターにて濃縮したところ、80.4%がCPMFに変化し、CPMAとして検出されたのは9.0%に過ぎず、CPMAとCPMFを分別定量するのは困難であるとしている³⁾。多くの分析法では、試料からの抽出に有機溶媒を用い、濃縮操作を伴うことから、CPMAの分析は困難である。さらに、CPMA分析を困難とする要因として、CPMAの極性が非常に高いため、農薬分析において一般的に用いられている逆相カラムを用いたLC測定では、良好なピーク形状が得られにくいことが挙げられる⁴⁾。従ってCPMAの分析には、有機溶媒含有率の低い抽出溶媒、濃縮操作を伴わない分析法及び高極性化合物を十分に保持するカラムが必要である。

一方、筆者らの研究室では、アセトニトリルと水の混合溶液を抽出溶媒として用いた抽出法により、様々な農薬成分や試料に対して、良好な抽出結果を得ている⁵⁾。この方法は、抽出溶媒に含水アセトニトリルを用いるため、有機溶媒の割合が低く、更に濃縮操作が不要である。また、高極性化合物を分離する方法として、親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) を用いる方法がある^{6~11)}。これは、順相クロマトグラフィーの一種であり、水と有機溶媒の混合溶液と、それより高極性の固定相を用いる分離モードである。順相クロマトグラフィーには非水溶性の有機溶媒を移動層に用いることが多く、親水性の化合物の中にはこの溶媒系に溶解せず、分析できないものもあったが、HILICは移動相が水系であり、高極性の化合物も溶解、分離が可能である。このHILICの特性を用いることにより、高極性化合物であるCPMAを保持し、良好なピーク形状が得られることが考えられる。

そこで今回、これらの知見をもとに、高極性化合物の保持に効果を示す HILIC を用いて、ニテンピラム、CPMA 及び CPMF を簡易迅速に分析する方法の開発を行った。検討方法は、まず、CPMA の変換を抑えるため、抽出溶媒に水を加え、溶媒の含水量に対するニテンピラム、CPMA 及び CPMF の抽出効率に与える影響を調べた。次に、抽出効率が良好であった含水抽出溶媒を用い、農産物を試料として標準品添加回収試験を行った。さらに、HILIC-MS/MS を用いて、ニテンピラム、CPMA 及び CPMF を含有する試料の分析を行った。同時に同じ試料を厚生労働省通知試験法に示されている方法¹⁾により分析し、実試料への適用性確認を行ったところ、良好な結果が得られたので報告する。

実験方法

1 試料の調製

ニテンピラム、CPMF 及び CPF (和光純薬工業製) についてはメタノール、CPMA (和光純薬工業製) については蒸留水を用いて溶解し、それぞれ標準原液 500 mg l⁻¹ を調製した。これらを適宜、メタノールにより希釈して標準溶液とした。

抽出溶媒中含水率の検討試験用試料は、ニテンピラム、CPMA 及び CPMF を含有する農作物 (アスパラガス) を用いた。添加回収試験用試料としては、ニテンピラム、CPMA 及び CPMF が不検出であることを確認した農作物 4 種類 (ピーマン、みかん、たまねぎ、玄米) を用いた。玄米以外の農作物については、それぞれフードカッターを用いて均一化、ホモジナイザーを用いて細切化した。玄米については、フードミルにより細切化を行った。これらに低濃度として 0.005 mg kg⁻¹、高濃度として 0.5 mg kg⁻¹ となるようにニテンピラム、CPMA 及び CPMF 標準品溶液をそれぞれ添加し、添加回収試験用試料とした。また、ニテンピラム、CPMA 及び CPMF を含有する農作物 3 種類 (アスパラガス 2、メロン 1) を実試料への適用性試験用試料とした。

最初に有機溶媒の影響を受ける CPMA を効果的に抽出し、さらに他のニテンピラム及び CPMF についても良好な抽出効率を得ることのできる最適な抽出溶媒を選択するため、抽出溶媒中含水率の違いによる抽出効率の変化を調べた。CPMA はアセトンや酢酸エチル中で不安定であること²⁾から抽出溶媒はアセトニトリルを用いた。含水抽出溶媒として、アセトニトリル-水 (100 : 0, 65 : 35, 35 : 65, 10 : 90) の 4 種類を用いて抽出効率の比較を行った。1 で調製した試料 5g に上記 4 種類の抽出溶媒をそれぞれ 20 ml 加え、超音波抽出 5 min を行った。次いで遠心分離 (1882 ×g, 5 min) を行い、上澄みをろ過後、残渣に抽出溶媒 20 ml を加え、超音波抽出 5min、遠心分離 5min を行い 50 ml に定容した。これを非水系フィルター (GL クロマトディスク 25N 0.45 µm, GL Sciences 製) を用いて、ろ過したものを試験溶液とした。

添加回収試験溶液及び実試料への適用試験溶液の調製方法を図 2 に示した。上記に示した分析方法に従って操作を行い、添加回収試験溶液及び実試料への適用試験溶液の調製における抽出溶媒は、抽出溶媒中含水率検討結果からアセトニトリル-水 (65 : 35) とした。

2 HILIC-MS/MS 測定

LC は、Waters 社製 Waters2795、MS/MS は Waters 社製 Quattro Premier を使用した。分離カラムは、未修飾

シリカ型カラムである Waters 社製 Atlantis HILIC（長さ 150 mm，内径 4.6 mm，粒子径 3 μm ）を用いた。試料注入量は 10 μl ，カラム温度は 40 $^{\circ}\text{C}$ とし，移動相は蒸留水-アセトニトリル-500 mM 酢酸アンモニウム（25:70:5），流速は 0.5 ml min^{-1} とした。イオン化はエレクトロスプレー（ESI）によるポジティブモード（POS）で行い，multiple reaction monitoring（MRM）測定により定量した。キャピラリー電圧は 3.45 kV，ソース温度は 120 $^{\circ}\text{C}$ ，デゾルベーション温度は 350 $^{\circ}\text{C}$ ，デゾルベーションガス流量は 1000 l h^{-1} ，コーンガス流量は 100 l h^{-1} に設定した。なお，検量線は，無添加試料液を使用してマトリックス一致標準溶液を用いて作成した。

HILIC カラムの比較として，アミド型（TSKgel Amide 80, 2.0 mm i.d. $\times$ 150 mm L, 5 μm ，東ソー），スルホベタイン型カラム（ZIC-pHILIC, 4.6 mm i.d. $\times$ 150 mm L, 5 μm ，Merck KGaA），ジオール型（Inertsil HILIC, 4.6 mm i.d. $\times$ 150 mm L, 3 μm ，GL Sciences），トリアゾール型（COSMOSIL HILIC, 3.0 mm i.d. $\times$ 150 mm L, 5 μm ，ナカライ）を用いた。

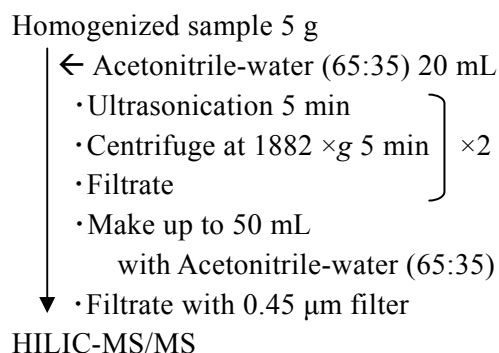


図2 HILIC-MS/MS 分析法のフロー

3 HPLC-UV 測定

HILIC-MS/MS と比較する従来法は，ニテンピラムについては厚生労働省通知試験法に従い，HPLC-UV 法を用いた。試料をアセトン抽出，多孔性ケイソウ土カラム及びシリカゲルカラムクロマトグラフィー精製後，HPLC-UV により測定を行った。

4 GC-FTD 測定

厚生労働省通知試験法による CPMA 及び CPMF 分析値の測定については，これらを CPF に誘導体化し，GC-FTD を用いて測定することになっている。そこで，HILIC-MS/MS と比較する従来法として，CPMA と CPMF は，CPF への誘導体化による GC-FTD 法を用いた。試料をアセトン抽出，トリエチルアミンによる誘導体化，多孔性ケイソウ土カラム及びシリカゲルカラムクロマトグラフィー精製後，GC-FTD により測定を行った。

結果及び考察

1 測定条件

HILIC においては，移動相の一部が固定相として機能し，固定相中に水が豊富な液相が形成される⁹⁾。HILIC における目的成分の分離は，この親水性の環境と移動相との間での分配的な相互作用によって達成される。そのため，分離が，移動相から供給される水相に大きく依存してしまうため，カラムの平衡化が不十分であった場合，保持時間の変動や再現性の低下等を引き起こす。このことから，移動相については，移動相組成が一定で，カラムを十分に平衡化させることができるイソクラテック条件を用いた。

また，LC-MS/MS 条件設定においては，各標準溶液 1 mg l^{-1} をフローインジェクションにより直接 MS 部に導入し，イオン化条件を検討した結果，表 1 に示す条件が最適となった。

表1 Nitenpyram, CPMA 及び CPMF の MRM 測定条件

Compound	t_R , min	Quantification transition	Cone, V	CE, eV	Confirmatory transition	Cone, V	CE, eV	Ion ratio
Nitenpyram	4.6	270.66→125.62	25	25	270.66→188.78	25	25	13.6
CPMA	5.1	256.18→126.12	25	25	256.18→176.45	25	10	2.3
CPMF	9.4	212.30→126.33	35	20	212.30→ 90.47	35	35	4.6

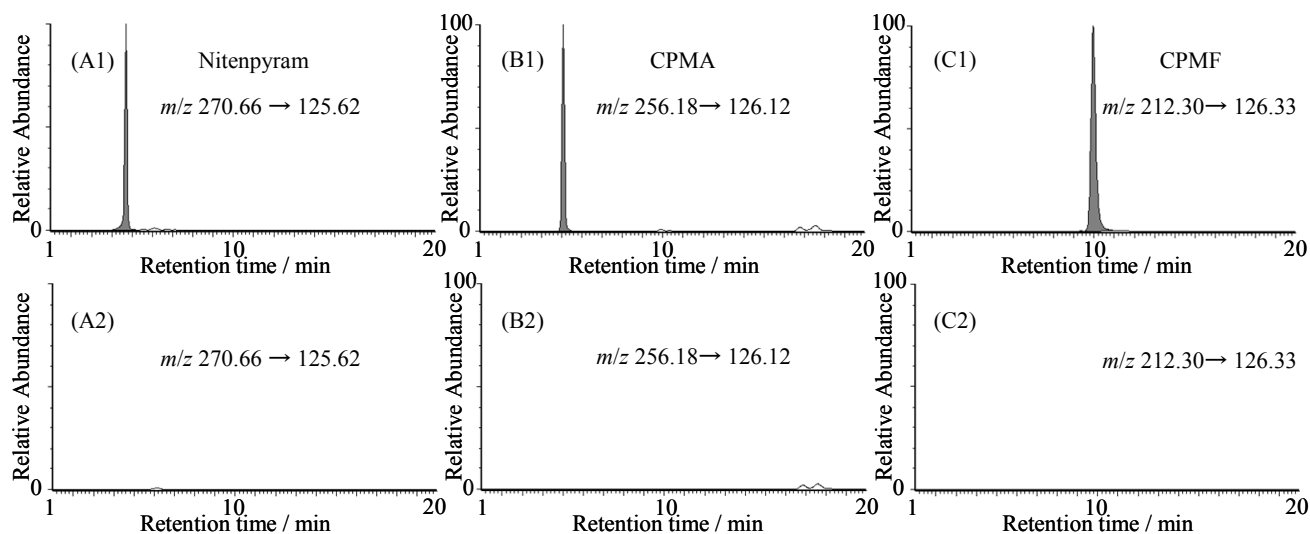


図3 ピーマン抽出溶液のMRMクロマトグラム

〔Nitenpyram 0.5 mg kg⁻¹ 添加(A1), CPMA 0.5 mg kg⁻¹ 添加(B1), CPMF 0.5 mg kg⁻¹ 添加(C1), 無添加(A2, B2, C2)〕

また、HILIC においては、未修飾シリカ型、アミド結合型、スルホベタイン型、ジオール型、トリアゾール型など、固定相が異なる様々な種類のものがあり、固定相の種類によって、化合物保持の特性が異なる。そこで今回、ニテンピラム、CPMA 及び CPMF の保持が良好なカラムを選択するため、これらのカラムの比較を行った。その結果、アミド型、スルホベタイン型、ジオール型及びトリアゾール型においては、リテンションタイムが 5 min 未満となり、十分な保持を得ることができなかった。一方、未修飾シリカ型においては、図 3 に示した通り、良好な保持(ニテンピラム:4.6 min, CPMA : 5.1 min, CPMF : 9.4 min) が得られた。クロマトグラムから得られた理論段数は、ニテンピラム : 5100, CPMA : 5200, CPMF : 5200 であった。そこで今回、ニテンピラム、CPMA 及び CPMF における分離カラムとして未修飾シリカ型 HILIC カラムを用いた。

2 検出限界及び定量限界

ニテンピラム、CPMA 及び CPMF の検量線については、マトリックス一致標準溶液を用いることにより 0.2 ~ 200 µg l⁻¹ (試料中濃度 0.002 ~ 2 mg kg⁻¹) の範囲で良好な直線性 ($R^2 > 0.999$) が得られた。

本条件の測定により得られたクロマトグラム例を図 3 に示した。HILIC-MS/MS では、HILIC による分離に併せ、高感度かつ選択性の大きい LC-MS/MS を測定に用いるため、試料を希釈して測定することが可能であり、精製操作を行う必要がない。そのため、目的成分に妨害ピークはなく、ピーク形状が良好なクロマトグラムが得られた。検量線の最小濃度における S/N 比か

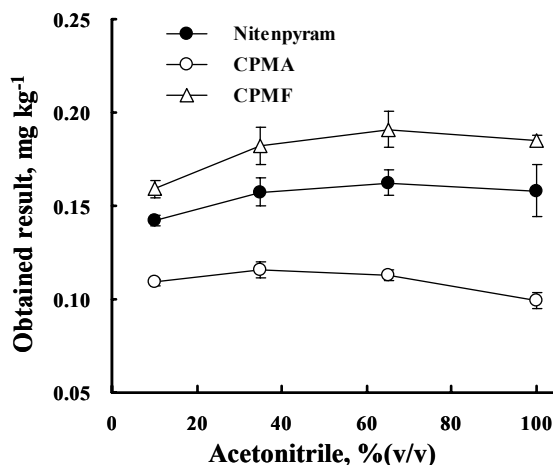


図4 ニテンピラム、CPMA 及び CPMF を含有するアスパラガスに対する含水溶媒中アセトニトリル濃度の違いによる抽出効率の変化

ら求めた検出限界は、試料中で、ニテンピラム : 0.24, CPMA : 0.14, CPMF : 0.17 µg l⁻¹ であった。また、定量限界は、試料中でニテンピラム : 0.80, CPMA : 0.47, CPMF : 0.56 µg l⁻¹ であった。この定量限界では、食品衛生法残留農薬基準における一律基準 (10 µg l⁻¹) の 10 分の 1 未満の濃度が測定可能である。よって、この定量限界はニテンピラム、CPMA 及び CPMF の測定に十分な濃度であると考えられる。

3 抽出溶媒検討結果

ニテンピラム、CPMA 及び CPMF を含有するアスパ

表2 添加回収試験結果

Compound	Sample	Concentration /mg kg ⁻¹	Recovery [RSD], % (n = 6)
Nitenpyram	Sweet	0.005	98.7 [4.0]
	pepper	0.5	103.0 [1.9]
	Mandarin	0.005	93.0 [3.0]
	orange	0.5	103.3 [3.5]
	Onion	0.005	105.0 [3.1]
		0.5	103.8 [1.7]
	Brown	0.005	99.3 [2.4]
	rice	0.5	103.7 [3.9]
CPMA	Sweet	0.005	99.3 [4.7]
	pepper	0.5	102.0 [4.6]
	Mandarin	0.005	99.3 [3.3]
	orange	0.5	101.8 [3.3]
	Onion	0.005	98.3 [5.4]
		0.5	105.3 [3.6]
	Brown	0.005	93.0 [5.0]
	rice	0.5	95.4 [7.4]
CPMF	Sweet	0.005	99.0 [5.2]
	pepper	0.5	106.6 [2.5]
	Mandarin	0.005	106.3 [7.0]
	orange	0.5	98.6 [6.8]
	Onion	0.005	103.7 [3.1]
		0.5	105.0 [5.5]
	Brown	0.005	99.3 [4.9]
	rice	0.5	105.5 [2.1]

ラガスを含水率の異なるアセトニトリルで抽出し、抽出効率の変化を調べた結果を図4に示した。ニテンピラム及びCPMFについては、アセトニトリル含有量が増加するにつれて、抽出効率も増加し、アセトニトリル含有量が65%で、最も大きな抽出効率を示した。これは、有機溶媒含有量の多い溶媒は、農作物試料細胞中に十分に行き渡り、抽出効率が上がったためと考えられる。一方、アセトニトリル100%の時、CPMAの抽出効率が低下した。これは、CPMAが、高極性であることから、抽出溶媒は、水を含まない溶媒より極性の高い水を含む抽出溶媒を用いた場合に、CPMAの抽出効率が上がるためと考えられる。これらの結果より、ニテンピラム、CPMA及びCPMFすべてについて十分な抽出効率が得られたアセトニトリル-水(65:35)を抽出溶媒とした。

3 測定結果

LC-MS/MSなどの質量分析計は、測定試料中に多量のマトリックスを含むと、イオン化の課程でイオンサプレッションやイオンエンハンスメントなどマトリックス効果を引き起こし、定量値に影響を与えることがある²⁾。そこで、添加回収試験は、葉緑素含有量の多い試料(ピーマン)、酸性試料(みかん)、スルフィドを多く含む試料(たまねぎ)及び脂質を多く含む試料(玄米)など、それぞれ多様なマトリックスを含む試料を用いて実施した。添加回収試験は試行回数6回で実施した。すべての試料について添加濃度は0.005及び0.5 mg kg⁻¹で行い、いずれの試料においても、妨害ピークのない良好なクロマトグラムが得られた。添加回収率の結果を表2に示した。0.005 mg kg⁻¹添加における回収率はニテンピラム:93.0~105.0% (RSD:2.4~4.0%)、CPMA:93.0~99.3% (RSD:3.3~5.4%)、CPMF:99.0~106.3% (RSD:3.1~7.0%)となった。0.5 mg kg⁻¹添加における回収率はニテンピラム:103.0~103.8% (RSD:1.7~3.9%)、CPMA:95.4~105.3% (RSD:3.3~7.4%)、CPMF:98.6~106.6% (RSD:2.1~6.8%)となった。多様な試料や添加濃度の違いによる回収率の変動はなく、すべての農作物試料について良好な回収率が得られた。水分含有量の低い玄米などを有機溶媒で抽出する場合、十分な抽出効率を得るためには、試料中に水を加えて抽出を行う必要があることが報告されている^{12,13)}。これは、穀類などの乾燥した試料に水を添加することにより、組織が膨潤されて有機溶媒による抽出効率が上がるためと考えられている。しかし、今回、抽出に水を含有する溶媒を用いることにより、試料中に水を加えることなく、水分含有量の低い玄米試料においても、十分な回収率を得ることができた。このことにより、水を含有する溶媒による超音波抽出は、試料組織の膨潤と農薬成分の抽出を同時に行うことが可能と考えられた。また、この分析法におけるピーマンを分析試料とした6日間のInter-day RSDは、ニテンピラムで7.0%、CPMAで3.9%、CPMFで3.9%となった。

本法の実試料への適用性の確認を目的として、ニテンピラム、CPMA及びCPMFが含まれる試料の検索を行った。60試料について分析を行い、ニテンピラム、CPMA及びCPMFが含有する試料が3試料(アスパラガス2、メロン1)検索された。これらニテンピラム、CPMA及びCPMFを含有する試料を用いて、HILIC-MS/MSと厚生労働省通知試験法に示されているHPLC-UV及びGC-FTDにより分析を行った。ニテ

表3 HILIC-MS/MS と従来法の比較

Sample	Compound	Residue level /mg kg ⁻¹		
		HILIC-MS/MS	Conventional method ^b	Ratio,% ^c
Asparagus 1	Nitenpyram	0.162±0.0069	0.155±0.0125	104.5
	CPMA	0.113±0.0028	—	—
	CPMF	0.191±0.0096	—	—
	CPF	0.267 ^a	0.274±0.0051	97.4
Asparagus 2	Nitenpyram	0.100±0.0044	0.094±0.0028	106.4
	CPMA	0.045±0.0012	—	—
	CPMF	0.035±0.0010	—	—
	CPF	0.068 ^a	0.070±0.0065	97.1
Melon	Nitenpyram	0.031±0.0005	0.031±0.0009	100.0
	CPMA	0.009±0.0005	—	—
	CPMF	0.033±0.0018	—	—
	CPF	0.038 ^a	0.036±0.0021	105.6

a. CPMA and CPMF values are measured in terms of CPF value.

b. Nitenpyram was measured by HPLC-UV and CPF was by GC-FTD.

c. Ratios are HILIC-MS/MS data to conventional methods data.

ンピラムについては、HILIC-MS/MS 測定値と HPLC-UV 測定値との比較を行った。CPMA 及び CPMF 分析における GC-FTD では、CPMA と CPMF を CPF に変換して測定する。そのため、HILIC-MS/MS における CPMA 及び CPMF 分析についても、各定量値を CPF 量に換算した後、合計して測定値を算出し、GC-FTD 測定値との比較を行った。分析値の比較を表3に示した。ニテンピラムに対する HPLC-UV と HILIC-MS/MS で得られた値の比は 100.0～106.4%、CPF に対する GC-FTD と HILIC-MS/MS で得られた値の比は 97.1～105.6%となり、同等の値を示した。農薬含有量の多い (>0.05 mg kg⁻¹) アスパラガス試料から含有量の少ない (<0.05 mg kg⁻¹) メロン試料まで、広範囲な濃度において、HILIC-MS/MS 法は通常法と比べ、同等の値を得られることが明らかとなり、HILIC-MS/MS 法が実試料に対しても有効な分析法であることが示された。

ま と め

高極性化合物を分析可能な HILIC-MS/MS を用いることにより、ニテンピラム、CPMA 及び CPMF を一斉に定量可能な分析法を開発した。添加回収試験及び含有試料について分析を行った結果、すべての試料について良好な値が得られた。HILIC-MS/MS 法は、選択性が高い LC-MS/MS を用いて測定を行うため精製する必要がなく、非常に簡易な方法である。また、ニテンピラム、CPMA 及び CPMF を同時に分析できるため、

分析時間が、約 1 hr/6 検体と短い。これは、ニテンピラム、CPMA 及び CPMF を分けて測定する必要がある厚生労働省通知試験法 (HPLC-UV 法及び GC-FTD 法) にかかる約 7 hr/6 検体に比べて7分の1であり、より迅速に結果を得ることができる。さらに、有機溶媒や試薬の使用量が少ない利点もある。本法は、農作物中のニテンピラム、CPMA 及び CPMF 残留量測定に対して非常に有効な手法であることが明らかとなった。

文 献

- 1) 厚生労働省：厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長通知,食安発第 0124001 号,平成 17 年 1 月.
- 2) 小林祐子：分析化学, **58**, 985-997(2009).
- 3) 津村ゆかり, 中村優美子, 外海泰秀, 柿本芳久, 田中雄三, 柴田正：食衛誌, **39**, 127-134(1998).
- 4) 吉田達雄, 飛野敏明：熊本県保健環境科学研究所報, **39**, 32-35(2009).
- 5) 福島孝兵, 増永ミキ, 宮原喜子, 飛野敏明：熊本県保健環境科学研究所報, **37**, 36-39(2007).
- 6) A. J. Alpert : *J. Chromatogr.*, **499**, 177-196(1990).
- 7) 岩崎雄介, 井之上浩一, 伊藤里恵, 吉村吉博, 斉藤貢一, 中澤裕之：分析化学, **54**, 135-142(2005).
- 8) 池上亨, 田窪宏貴, 田中信男：Chromatography, **29**, 1-6(2008).
- 9) C. Lamouroux, G. Foglia, G. Le Rouzo : *J. Chromatogr.*, **A**, 1218, 3022-3028(2011).

- 10) P. Jandera : *Anal. Chim. Acta*, **692**, 1-25(2011).
- 11) T. Yoshida, H. Hamada, H. Murakawa, H. Yoshimoto,
T.Tobino, K. Toda : *Anal. Sci.*, **28**, 179-182(2012).

- 12) 根本了 : 食衛誌, **51**, 349-359(2010).
- 13) 坂真智子, 飯島和昭, 粕由紀子, 藤田真弘, 小田
中芳次, 加藤保博 : 農薬学会誌, **31**, 431-434 (2006).