

3) 農産物中のイミノクタジン分析における簡易・迅速抽出法の開発

富永純司 本田大輔 松本理世 山口奈穂
小林将英 西名武士* 福島宏暢

要旨

農産物中のイミノクタジンを簡易かつ迅速に分析するため、分析の問題点であった抽出法について検討した。その結果、これまでの抽出法より簡易で、さらに十分な回収率が得られる抽出法を確立できた。本法は、8農産物中6農産物でその妥当性が示され、イミノクタジンが残留した農産物においても既報¹⁾と同等の残留値が得られた。さらに本法は、既存の抽出法と比較して、抽出時間を短縮できることから、イミノクタジンの簡易かつ迅速な分析を可能とする抽出法であると考えられた。

キーワード：イミノクタジン，簡易・迅速抽出法，硫酸添加

はじめに

イミノクタジン(図1)はグアニジン系殺菌剤で、現在、本県の主要農産物でもあるトマト、スイカ、不知火類など、幅広い農産物で使用登録がなされている。そのため、農薬の残留分析を行う際に、イミノクタジンが対象となる農産物が多いことが想定されるが、分析に用いる試料の調製方法が他の農薬とは異なるため、本県の残留農薬一斉分析法では測定できない。

現在、農産物中に残留するイミノクタジンは、厚生労働省からの通知により、強塩基性下でブタノールヘキサソール混液により抽出し、硫酸酸性下で水層に転溶し、イオン交換ミカラムにより精製して、ニンヒドリンによるポストカラム誘導体化HPLC法で測定することが規定されている(以下、公定法)²⁾。しかしこの手法は、反応液を送液するためにLC部とは別にポンプが必要であり、また反応液が塩基性であることから測定機器への負担が大きいといった問題点があった。また、定量限界が0.02mg/kgであることから、一律基準値である0.01mg/kgには対応できなかった。そこで近年では、測定機器としてLC/MSやLC/MS/MSを用いることで、イミノクタジンを測定する分析法が報告されるようになった^{3,4,5)}。これにより、公定法と比較して、測定作業が省力化されるとともに、感度が上昇することによ

って定量限界をより低濃度に設定することができるようになった。本県においても、LC/MS/MSを用いてイミノクタジンを高感度に分析する手法を既に報告している⁶⁾。しかしながら、これらの手法にはホモジナイズや分液作業が含まれており、抽出作業が煩雑で時間を要するといった問題点があった。

LC/MS/MSを用いた残留農薬分析において、本所では農薬の抽出法に含水アセトニトリルによる溶媒抽出法を用いている(図2、以下、従来法)^{6,7)}。従来法は、農産物と含水アセトニトリルを混和し、超音波で抽出後、遠心して上清をろ過するといった簡易な作業で残留農薬の抽出を迅速に行うことが可能である。そのため、従来法をイミノクタジンの抽出に用いることができれば、抽出作業における問題点が解決できると考えられる。

そこで今回、農産物からのイミノクタジンの抽出に、従来法が適応可能か検討した。また、検討した抽出法について、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」⁸⁾(以下、ガイドライン)に則って妥当性評価試験を実施し、その妥当性について検討した。併せて、イミノクタジンが残留した実試料を用いて、分析法の適応性についても検討したので報告する。

*現健康福祉部薬務衛生課

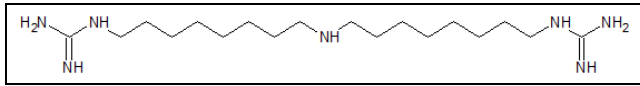


図1 イミノクタジンの分子構造式

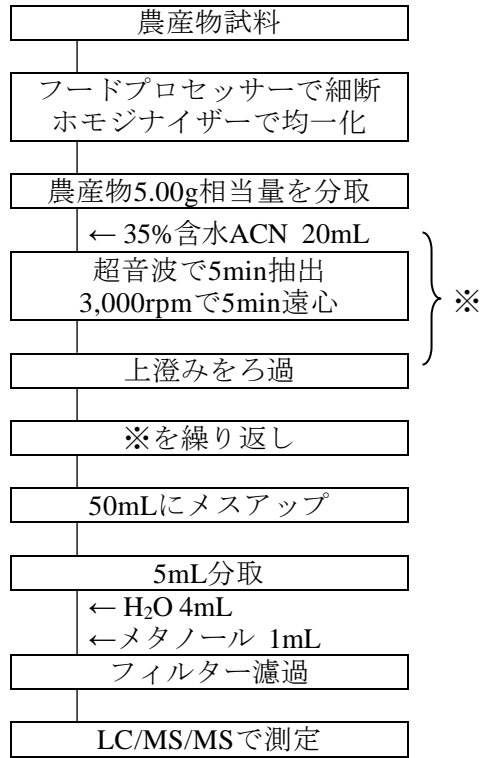


図2 従来法

実験方法

1 試薬材料等

1-1 標準品

標準品はイミノクタジンアルベシル酸塩標準品（富士フイルム和光純薬株式会社（以下、富士フイルム和光純薬））を用いた。標準原液は、イミノクタジンとして 100mg/L となるように、標準品 18.77mg をメタノールに溶解し、50mL に定容した。

1-2 試料

玄米、バレイショ、ハウレンソウ、トマト、温州ミカン及び甘夏は、市販のものを用いた。レタス及びハクサイは自家栽培のものを用いた。なお、自家栽培における栽培前及び栽培中のイミノクタジンの使用はなかった。試料の調製は、公定法に準じて、玄米は試料 20g に対し、塩酸グアニジン 5g、トリエチルアミン溶液 20mL 及び水 20mL を加え、30 分間放置後ホモジナイズした。その他の試料については、試料 100g に対して塩酸グアニジン 25g、トリエチルアミン溶液 100mL

を加えてフードプロセッサーで粉碎後、ホモジナイズしたものを用いた。調製後、分析までの期間は、 -20°C で保存した。

1-3 試薬

塩酸グアニジン：和光特級（富士フイルム和光純薬）
 トリエチルアミン：和光特級（富士フイルム和光純薬）
 水酸化ナトリウム：試薬特級（富士フイルム和光純薬）
 硫酸：有害金属測定用（富士フイルム和光純薬）
 ギ酸：LC/MS 用（富士フイルム和光純薬）
 酢酸アンモニウム：試薬特級（富士フイルム和光純薬）
 メタノール：高速液体クロマトグラフ用（富士フイルム和光純薬）
 アセトニトリル：高速液体クロマトグラフ用（富士フイルム和光純薬）
 トリエチルアミン溶液（TEA 溶液）：
 水酸化ナトリウム 40.0g 及びトリエチルアミン 0.75mL に水を加え、1000mL とする。
 2N 硫酸：
 水に濃硫酸 55.8mL を加え、放冷後、1000mL とする。
 35% 含水アセトニトリル（35% 含水 ACN）：
 水 350mL、アセトニトリル 650mL を混和
 0.3N 硫酸含水アセトニトリル（0.3N 硫酸含水 ACN）：
 2N 硫酸 150mL、水 200mL、アセトニトリル 650mL を混和（含水率 35%）

1-4 実験器具

イミノクタジンは塩基性条件下でガラスのシラノール基に吸着することが知られている¹⁾ことから、分析に用いた実験器具は全てポリプロピレン（PP）製のものとした。

2 LC/MS/MS の分析条件

LC/MS/MS の分析条件は、既報の通りとした⁵⁾。表 1 及び表 2 に条件を示す。なお、イミノクタジンの保持時間は約 6 分であることから、質量分析計の四重極の汚染を防ぐため、カラムからの溶出液は 4~8 分の間のみ質量分析計に送液して測定し、その他の時間については、質量分析計には送液せず、全て廃液とした。

3 検量線の条件

検量線は 5 点検量とし、濃度は、0.05, 0.25, 0.5, 2.5, 10ppb とした。なお、定量に用いた検量線は、作物由来の妨害を考慮するため、全て試料抽出液によるマトリックスマッチ検量線とした。

表1 LC/MS/MS 条件

機器	項目	設定値
LC	カラム	InertSustain® C18 HP (内径 2.1mm, 長さ 15cm, 粒径 3µm, GL science 社製)
	移動相	A 液: 0.1%ギ酸, 0.25mM 酢酸アンモニウム・水溶液 B 液: 0.1%ギ酸, 0.25mM 酢酸アンモニウム・メタノール溶液
	グラジエント条件	表 2 のとおり
	カラムオープン	30℃
	流速	0.4mL/min
	注入量	2µL
	MS/MS	イオン化法
	イオン源温度	600℃
	イオンスプレー電圧	5.5kV
	プリカーサーイオン	179
	プロダクトイオン	297 (定量イオン), 100 (定性イオン)
	保持時間	約 6 分

表2 グラジエント条件

時間(分)	A 液(%)	B 液(%)
0	100	0
1	100	0
7	50	50
7.1	0	100
17	0	100
17.1	100	0
25	100	0

結果及び考察

1 抽出法の検討

従来法が、イミノクタジンの抽出にも適応可能か検討するために、ハウレンソウ試料にイミノクタジン標準液を 0.05mg/kg になるように添加し、添加回収試験を実施した。その結果、回収率は 48% で、ガイドラインに示された回収率の目標値は 70~120% である (表 3) ことから、従来法では十分な回収率を得ることができなかった (表 4-従来法)。この原因としては、イミノクタジンの分子的性質によるものが考えられる。イミノクタジンはグアニジノ基 (-NH-(C=NH)-NH₂) を分子内に 2 つ有しており (図 1)、水素イオンを分子内に取り込んでイオン化し水溶性となる。そのため、水素イオンが不足しやすい塩基性条件下ではイオン化できない。イミノクタジンの分析において、試料を調製する際に添加する TEA 溶液には 1N 水酸化ナトリウムが含まれており、今回、抽出条件が塩基性であったため、抽出できなかったと考えられた。

そこで、抽出溶媒に公定法でも用いられている硫酸を添加し酸性にすることで、回収率の改善が図れないか検討した。イミノクタジンの分析に用いる試料は農産物 5g 相当量に対し、水酸化ナトリウムを 0.005mol 含むので、抽出溶媒 20mL 中に 0.006mol の水素イオン

を含む 0.3N 硫酸含水アセトニトリルを調製し、抽出作業 2 回のうち 1 回目を 0.3N 硫酸含水アセトニトリル、2 回目を含むアセトニトリルで抽出した。その結果、回収率の改善が見られた (表 4-硫酸添加法①) ため、さらに、1 回目は 0.01mol の水素イオンが含まれる 0.5N 硫酸含水アセトニトリル、2 回目は含水アセトニトリルで抽出する方法 (硫酸添加法②) 及び 0.3N 硫酸含水アセトニトリルで 2 回抽出する方法 (硫酸添加法③) について試みたところ、両抽出法ともガイドラインの目標値を達成する回収率を得ることができた (表 3,4)。そこで、作業効率を考慮し、本研究におけるイミノクタジンの抽出は、硫酸添加法③にあたる 0.3N 硫酸含水アセトニトリルでの 2 回抽出とした。確立した抽出法 (以下、新規法) の抽出フローを図 3 に示す。

表3 ガイドラインに示された各濃度の回収率及び精度の目標値

添加濃度 (mg/kg)	回収率 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
0.001 < ~ ≤ 0.01	70~120	25 >	30 >
0.01 < ~ ≤ 0.1	70~120	15 >	20 >
0.1 <	70~120	10 >	15 >

表4 抽出条件の検討

抽出法	抽出液中の硫酸濃度(N)		回収率 (%)	平均回収率 (%)	併行精度 (RSD%)
	1 回目	2 回目			
従来法	0	0	45, 49, 50	48	5.8
硫酸添加法①	0.3	0	69, 70, 71	70	1.5
硫酸添加法②	0.5	0	73, 76, 78	76	3.2
硫酸添加法③	0.3	0.3	74, 75, 78	76	3.2

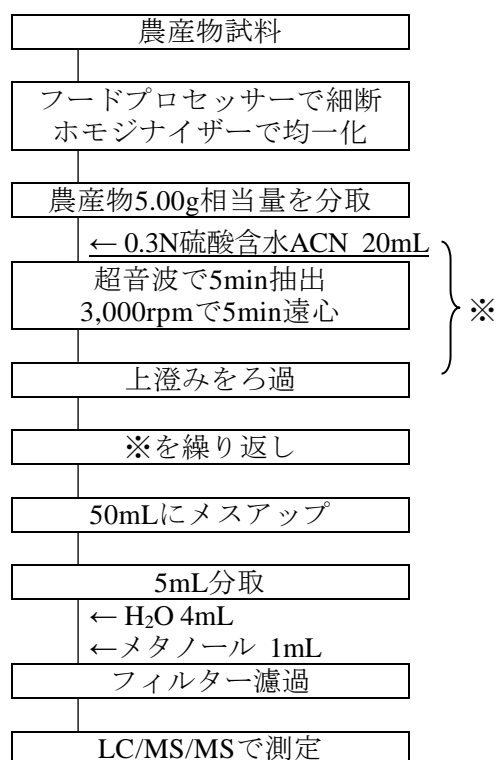


図3 新規法（下線部は変更点）

2 妥当性評価試験

新規法の妥当性を評価するために、玄米、バレイショ、ホウレンソウ、レタス、ハクサイ、トマト、温州ミカン及び甘夏を用いて、ガイドラインに基づいた妥

当性評価試験を実施した。試験は分析者5名の2併行で行い、イミノクタジンの添加濃度は、一律基準値である0.01mg/kg及び各農産物の基準値もしくは基準値の1/2量とした。ただし、甘夏は基準値が高く(1mg/kg)、検量線の測定範囲に入らない(検量線の測定範囲：0.001~0.2mg/kg)ことから、0.01mg/kgと0.1mg/kgで評価した。また、玄米については、試料調製の段階で農産物5gに対して水を5mL添加していることから、1回目の抽出には0.3N硫酸含水アセトニトリルを用いず、2N硫酸3mL及びアセトニトリル13mLを添加して抽出を行った。

評価試験の結果、玄米、ホウレンソウ、ハクサイ、トマト、温州ミカン及び甘夏の6農産物では、ガイドラインに示された目標値を満たし、新規法の妥当性が確認された(表5)。一方で、バレイショ及びレタスでは、目標値を満たす結果が得られず、特にバレイショでは回収率が悪かった。イミノクタジンはフルクトースと吸着しやすく、試料調製の際に塩酸グアニジンを追加することでその吸着を抑制できることが報告されている^{9,10)}。バレイショはデンプンが豊富で、異性化糖(グルコースとフルクトースを主成分とする液状糖)の原料でもあることから、今回の場合も、バレイショに含まれるデンプン由来の成分にイミノクタジンが吸着したことによって回収率が低下した可能性が考えられる。

表5 妥当性評価試験結果

農産物	基準値 (mg/kg)	添加濃度 (mg/kg)	実測値			判定		
			回収率	併行精度	室内精度	回収率	併行精度	室内精度
玄米	0.05	0.01	74	4.1	3.0	○	○	○
		0.05	80	1.7	2.3	○	○	○
バレイショ	0.02	0.01	13	—	—	×	—	—
		0.02	16	—	—	×	—	—
ホウレンソウ	0.1	0.01	79	1.9	1.7	○	○	○
		0.1	80	3.7	3.8	○	○	○
レタス	0.1	0.01	57	—	—	×	—	—
		0.1	62	—	—	×	—	—
ハクサイ	0.03	0.01	82	1.7	2.5	○	○	○
		0.03	89	4.5	3.8	○	○	○
トマト	0.3	0.01	77	5.2	6.5	○	○	○
		0.15	82	4.2	3.1	○	○	○
温州ミカン	0.2	0.01	79	4.7	4.0	○	○	○
		0.1	84	2.1	3.0	○	○	○
甘夏	1	0.01	83	8.3	8.9	○	○	○
		0.1	81	5.0	5.7	○	○	○

3 実試料への適応性試験

新規法がイミノクタジンが残留した農産物に対して適応できるか検討するために、イミノクタジンが残留した温州ミカンを用いて、新規法及び既報の抽出法¹⁾（以下、前法）で抽出し、イミノクタジンの残留量を比較した。なお、本来であれば新規法と公定法との比較を行うべきであるが、前法は抽出後の精製作業を省略しているものの、抽出段階における手法は公定法と同等であるため、前法との比較とした。また、前法は温州ミカンにおける妥当性評価を行っていないため、今回は分析と同時に添加回収試験（添加量 0.1mg/kg）を実施し、回収率が 70～120%であることを確認することで、前法の温州ミカンに対する妥当性を確認した。

分析の結果、測定したイミノクタジンの残留量は、新規法は 4.3µg/kg、前法が 4.0µg/kg であり、概ね同等の値となった（値の比 109%、表 6）。新規法における検出下限値は 1µg/kg で、今回測定した含有量は検出下限値に近い値であったため、分析値のばらつきが出る可能性が考えられたが、n=3 における併行精度も 3.1% で十分な精度であることから、新規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。併せて、新規法で抽出開始から測定試料調製までに要する時間は、約 2 時間/4 検体であり、公定法から精製作業が省略され分析作業が簡易かつ迅速化された前法の約 4 時間/4 検体と比較しても、抽出時間を大幅に短縮できることが示された。

まとめ

農産物中のイミノクタジンを簡易かつ迅速に分析するために、分析の問題点となっていた抽出法の検討を行った。その結果、当所で用いていた残留農薬の一斉分析法における抽出法を応用することで、十分な回収率が得られる抽出法を確立した。

本法の有効性を確認するために妥当性評価試験を実施したところ、8 農産物中 6 農産物でその妥当性が確

認され、さらに、イミノクタジンが残留した農産物においても、前法と同等の残留値を得ることができたことから、本法が有効な抽出法であることが示された。

本法は、既存の抽出法と比較して簡易であり、また抽出時間も短縮されることから、イミノクタジンの簡易かつ迅速な分析を可能にする抽出法であると考えられた。

文献

- 1) 富永純司, 中原優子, 松本理世, 山口奈穂, 西名武士: 熊本県保健環境科学研究所報, 47 42-47 (2017)
- 2) 「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 第 3 章個別試験法 イミノクタジン試験法(農産物)」(平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知)
- 3) T. Kawamoto, M. Yano, N. Makihata: *Anal. Sci.*, 22, 489-490 (2006)
- 4) 小林裕子: 分析化学, 58(12) 985-997 (2009)
- 5) 小林憲弘, 久保田領志, 佐々木俊哉, 五十嵐良明: 環境科学会誌, 28(2) 117-125 (2015)
- 6) 西名武士, 村川弘, 福島孝兵, 飛野敏明: 熊本県保健環境科学研究所報, 35 51-56 (2005)
- 7) 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 36-47 (2007)
- 8) 「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」(平成 19 年 11 月 15 日付け食安発第 1115001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知)
- 9) H. Kobayashi, O. Matano, S. Goto: *J. Pesticide Sci.*, 7 513-516 (1982)
- 10) H. Kobayashi, O. Matano, S. Goto: *J. Pesticide Sci.*, 9 449-453 (1984)

表 6 新規法の実試料への適応性試験

抽出法	回収率 (%)	実試料濃度 (µg/kg)	平均濃度* (µg/kg)	併行精度 (RSD%)	分析時間 (4 検体あたり)
新規法	70.1	4.2, 4.3, 4.5	4.3 (109)	3.1	約 2 時間
前法	73.9	3.9, 4.0, 4.0	4.0 (100)	1.8	約 4 時間

※括弧内の値は前法における平均濃度を 100 としたときの比