

4) LC/MS/MS によるミシマサイコに残留する

イミノクタジンの分析法の検討

富永純司 中原優子 松本理世
山口奈穂 西名武士

要旨

LC/MS/MS によるミシマサイコに残留するイミノクタジンの分析法について検討したところ、LC/MS/MS の測定条件は、当所の農産物中の残留農薬一斉分析で用いる測定条件を一部変更することにより設定することができた。また、公定法に示されている抽出法を一部変更することにより、十分な回収率が得られた。開発した分析法は、LC/MS/MS を用いることで高選択的かつ高精度な分析が可能となり、公定法に示されている濃縮及び精製の作業を省略することができるため、分析の簡易・迅速化が図られた。

キーワード : LC/MS/MS イミノクタジン ミシマサイコ

はじめに

イミノクタジンはグアニジン系殺菌剤で、細胞膜脂質の生合成を阻害することによる防除機能があると考えられている。現在、キュウリ、スイカなどのウリ類、イチゴ、茶など幅広い農作物で使用登録がされており、他の殺菌剤とは作用機構が異なることから、薬剤を変えながらの定期的な防除の実施及び薬剤耐性菌の発生抑制が期待され、今後も登録作物が増えることが予想される。

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ン混液により抽出し、硫酸酸性下で水層に転溶し、イオン交換ミニ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¹⁾ (以下、公定法という。)。そのほか、2M 水酸化ナトリウム・メタノール溶液で抽出する方法²⁾もあるが、抽出後はクロロホルムに転溶し、濃縮後、飽和炭酸水素ナトリウム溶液、トルエン及び1,1,1,5,5,5-ヘキサフルオロ-2,4-ペンタジオンを加え、

90℃で4時間放置するなどの作業があり、分析が大変煩雑である。また、イミノクタジンは幅広い農産物で使用登録されていることから、既に報告されている玄米、キュウリ、リンゴ及びブドウ^{3,4)}のほか、多くの農産物で公定法が適用できると考えられるが、化合物の特徴として、グアニジノ基(-NH-(C=NH)-NH₂)を2つ有しており、作物等へ吸着しやすいことが知られている^{1,3)}ことから、全ての農産物において適用できるかについては不明である。

本県では特産作物として、生薬「柴胡」の原料であるミシマサイコが球磨地域を中心に栽培されており、その栽培面積は国内でも上位である⁵⁾。そのため、本県においてミシマサイコを安定して生産するための技術の開発は、国内需要量の確保及び生産農家の活性化につながると考えられる。農作物の安定生産において、病害虫の防除は重要な課題の1つであるが、ミシマサイコで春から夏にかけて発生する炭疽病は、地下部の生育不良による収量の低下を引き起こすほか、採種株での発症により採種が皆無となることもあることから、

最も予防すべき病害の一つとして考えられている。しかし、ミシマサイコは栽培面積が少ないマイナー作物であり、また近年栽培が本格化してきたことから、使用登録されている農薬数が少なく、炭疽病に関しては現在3剤しか登録されていない。そこで、炭疽病にも実績があり、登録されている3剤の農薬成分とは作用機構が異なるイミノクタジンの使用登録が生産地から望まれている。しかし、使用登録されるためには作物中の農薬の残留量を測定する必要があり、先述のとおり、公定法がミシマサイコにおいても適用可能かどうかについては不明である。

そこで今回、高感度かつ選択性の高いLC/MS/MSを用いて、公定法に準じた抽出法によるミシマサイコ中のイミノクタジン分析法について検討した。また、抽出効率の向上を目的に改良法の検討を行い、「農薬登録申請に係る試験成績について」⁶⁾及び「農薬の登録申請に係る試験成績について」の運用について⁷⁾（以下、「ガイドライン」という。）に基づく妥当性評価を行ったので、その結果について報告する。

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（富士フィルム和光純薬，M.W.1335（イミノクタジン単体では M.W.356））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 18.77g をメタノールに溶解し、50mL に定容した。

1-2 試料

試料となるミシマサイコは、熊本県人吉市の栽培ほ場から採取した。なお、試料には柴胡として用いられる地下部のみを用い、地上部は除去した。分析に供した試料は、公定法に準じて、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 を加えて粉碎したものを用い、調製から分析までの期間は、-20℃で保存した。

1-3 試薬

- ・塩酸グアニジン：和光特級（富士フィルム和光純薬）
- ・トリエチルアミン：和光特級（富士フィルム和光純薬）
- ・水酸化ナトリウム：試薬特級（富士フィルム和光純薬）

- ・硫酸：有害金属測定用（富士フィルム和光純薬）
- ・塩酸：有害金属測定用（関東化学）
- ・ギ酸：LC/MS 用（富士フィルム和光純薬）
- ・酢酸アンモニウム：試薬特級（富士フィルム和光純薬）
- ・塩化ナトリウム：残留農薬試験用・PCB 試験用（関東化学）
- ・メタノール：高速液体クロマトグラフ用（富士フィルム和光純薬）
- ・*n*-ヘキサン：残留農薬試験用・PCB 試験用（関東化学）
- ・*n*-ブタノール：高速液体クロマトグラフ用（富士フィルム和光純薬）
- ・トリエチルアミン溶液：
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。
- ・25%塩酸グアニジントリエチルアミン溶液：
水酸化ナトリウム 40.0g、塩酸グアニジン 250g 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。

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、分液ロートを除いて、全てPP製のものとした。

2 LC/MS/MS の分析条件

- ・LC：Nexera X2（島津製作所社製）
- ・質量分析計：Triple QuadTM 5500（エービー・サイエックス製）
- ・イオン化法：エレクトロスプレーイオン化法ポジティブモード(ESI+)

結果及び考察

1 LC/MS/MS 分析条件の最適化

LC/MS/MS によるイミノクタジンの分析法は、農作物では報告がないが、水道水ではすでに小林ら⁸⁾によって報告されている。そこで、小林らの報告を参考に、分析条件の最適化を行った。

まず、プリカーサー及びプロダクトイオンの選定を行うために、イミノクタジン標準溶液を用いて、インフュージョンにてマススペクトルを測定した。その結果、プリカーサーイオンの選定において、*m/z* がイミ

表1 設定した 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 3 μ m, 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 $^{\circ}$ C
	流速	0.4mL/min
	注入量	2 μ L
	MS/MS	イオン化法
	イオン源温度	600 $^{\circ}$ C
	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	100, 297
	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

2 検量線の評価

検量線を評価するために、イミノクタジン標準液を 50%含水メタノールで希釈し、0.05, 0.1, 0.5, 2.5, 10ppb の検量線用標準液を作成した。まず 1 で最適化した条件で最も低濃度である 0.05ppb の標準液を測定し、m/z:100 及び m/z:297 のクロマトグラフを比較した。その結果、感度の指標である S/N 比は m/z:100 が 26.1, m/z:297 が 40.3 で、ともに S/N 比 \geq 10 となり、十分な感度が得られたが、m/z:297 の方が高い感度になった。このことは、m/z:297 の方が、m/z:100 と比較して分子量が大きいため、イオンの選択性が高く、ノイズが抑えられたからであると考えられる。そこで本研究では、新しく設定した m/z:297 のフラグメントを定量イオンとして用いることとし、m/z:100 のフラグメントを定性イオンとして用いることとした。次いで、各濃度の検量線用標準液を測定し、m/z:297 での検量線を作成した。その結果、検量線の決定係数 r^2 は 0.999 と高い値を示し、直線性は良好であった(図 5)。以上のことから、設定した測定条件において、0.05~10ppb の間で定量が可能であると考えられた。

3 抽出方法の検討

3-1) 公定法に準じた抽出方法による検討

農作物中のイミノクタジン分析法の公定法がミシマサイコにも適用可能かについて検討するために、試料にイミノクタジン標準液を 0.25ppm になるように加え、添加回収試験を実施した。なお、本研究

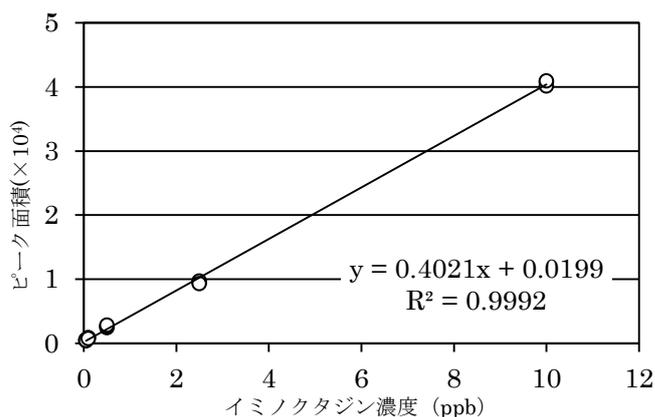


図5 イミノクタジンの検量線

では分析機器が LC/MS/MS で選択性が高いことから、公定法では行う抽出液の濃縮及びイオン交換ミニカラムによる精製作業は省略し、ブタノールヘキササン混液で抽出し、硫酸酸性下で水層に転溶後の溶液にメタノールを加え、100mL に定容したものを分析に供した。また定量は、イミノクタジン無添加のミシマサイコから得られた抽出液に妨害となるピークが見られなかったことから、マトリックスマッチ検量線を用いて行った。

公定法に準じて、試料 20g 相当量で抽出を行った結果、回収率は 10~11%であった。十分な回収率の目安として、添加濃度が 0.25ppm の場合、ガイドラインには 70~110%と示されており⁶⁾、非常に悪い結果となった(表 3)。原因としては、ミシマサイ

コにはサポニンなど多くの成分が含まれているため、これらにイミノクタジンが吸着し、抽出効率が低下したのではないかと考えられた。そこでミシマサイコに含まれる成分の影響を軽減するために、試料量を公定法の1/10となる2g相当量にして、同様に分析を行った。その結果、回収率は53~56%となり、改善はしたものの、十分な回収率とは言えなかった(表3)。そこで、抽出法の改良について検討することとした。

3-2) 抽出法の改良

2g相当量においても回収率が十分でなかった原因としては、20gで分析した際と同様に、ミシマサイコに含まれる成分への吸着が考えられた。また、試料量を削減したことによりトリエチルアミン溶液の添加量が減少し、抽出液のpHが十分に塩基性に

なっていないことも可能性として考えられた。公定法では、試料採取量が20g相当量であるため、トリエチルアミン溶液が20mL添加されるのに対し、試料2g相当量では2mLしかされない。そこで、作物体への吸着と抽出液を十分に塩基性にするために、試料2g相当量に25%塩酸グアニジントリエチルアミン溶液を10mL(公定法の約半量)添加し、同様に抽出を行った。その結果、回収率は82~83%となり、十分な回収率を得ることができた(表3)。さらに、公定法ではブタノールヘキサン混液での抽出を100mL+50mLの2回抽出としているが、50mL×3回抽出に変更したところ、回収率は92~96%と非常に良好な結果となった(表3)。相対標準偏差も1.9と良好な結果となったことから、ミシマサイコからのイミノクタジンの抽出は、図6に示すフローで行うこととした。

表3 検討した抽出法における回収率及び繰り返し測定(n=3)における相対標準偏差

試料量	TEA*添加	抽出液量	回収率(%)	回収率 平均	相対 標準偏差
20g	×	100mL+50mL	10, 10, 11	10	4.6
2g	×	100mL+50mL	53, 54, 56	54	2.9
2g	○	100mL+50mL	82, 82, 83	83	0.9
2g	○	50mL×3	92, 94, 96	94	1.9

*TEA: 25%塩酸グアニジントリエチルアミン溶液

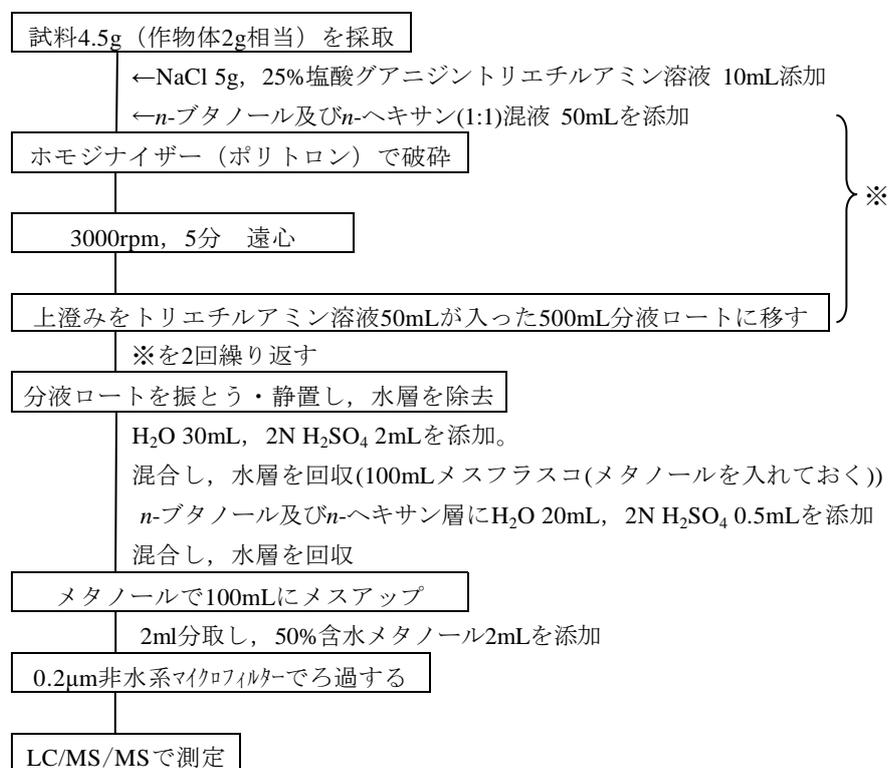


図6 イミノクタジンの分析フロー図

4 妥当性評価

決定した分析法の妥当性を評価するために、ガイドラインに基づいて、ミシマサイコにイミノクタジン標準液を 0.01ppm もしくは 0.25ppm となるように添加し、回収試験を実施した。

各濃度での回収率及び相対標準偏差を表 4 に示す。0.01ppm における回収率は 75~91%，0.25ppm における回収率は 81~89% となり、両濃度とも十分な回収率が得られた。また繰り返し分析による相対標準偏差も、0.01ppm では 7.5，0.25ppm では 3.8 となり、ガイドラインの目標値を満たす良好な結果が得られた。

表 4 回収率及び相対標準偏差

添加濃度 (ppm)	回収率 (%)	平均回収率 (%)	相対 標準偏差
0.01	87, 85, 79, 91, 75	83	7.5
0.25	81, 85, 89, 86, 81	85	3.8

ま と め

LC/MS/MS によるミシマサイコ中のイミノクタジンの分析法について検討した結果、イミノクタジンが十分に分析できるプリカーサーイオン及びプロダクトイオンを決定することができた。特にプロダクトイオンに関しては、これまで報告がなかったフラグメントを選択し、分析に用いることができることを示すことができた。また、LC 部においても、当所の通常の農薬一斉分析に用いる分離カラム及び移動相での分析が可能であることが示された。

さらに、抽出法に関しては、公定法に準じた抽出法では十分な回収率が得られなかったため、試料量、イミノクタジンの作物成分への吸着予防及び抽出回数を検討し、十分な回収率を得ることができた。また、LC/MS/MS を用いることによって、公定法では必要な濃縮及び精製作業を省略することができた。

本法を用いた 0.01ppm 及び 0.25ppm での回収試験では、各濃度とも十分な回収率が得られ、再現性も良

好な結果となった。

本研究で示した分析法は、公定法と比較して、濃縮や精製作業を省略できることから迅速・簡便であり、かつ LC/MS/MS を用いることによって、高選択的に低濃度までのイミノクタジンを分析できると考えられる。本研究ではミシマサイコを試料として用いたが、今後は他の農産物についても検討を行い、汎用的な分析法として確立する必要があると考えられる。

文 献

- 1) 「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)
- 2) 「(133)イミノクタジン酢酸塩およびイミノクタジンアルベシル酸塩分析法」(平成 9 年 4 月 30 日環境庁告示第 20 号(号外第 84 号))
- 3) 森芳計，八倉康二，片岡安克：農薬誌，7(1) 53-56 (1982)
- 4) 小林裕子，俣野修身，後藤真康：農薬誌，7(4) 513-516 (1982)
- 5) 薬用作物及び和紙原料等に関する試料(平成 28 年産)：公益財団法人日本特産農産物協会
- 6) 「農薬の登録申請に係る試験成績について」(平成 12 年 11 月 24 日付け 12 農産第 8147 号農林水産省農産園芸局長通知)
- 7) 「「農薬の登録申請に係る試験成績について」の運用について」(平成 13 年 10 月 10 日付け 13 生産第 3986 号農林水産省生産局生産資材課長通知)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 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)