

7 カルタップの液体クロマトグラフ質量分析計による分析法の適用範囲をイアコンサイレージに拡大するための妥当性確認

関口 好浩^{*1}, 板橋 葵^{*2}

Validation Study on Application of Cartap Determination Method by LC-MS to Ear-Corn Silage

SEKIGUCHI Yoshihiro^{*1} and ITABASHI Aoi^{*2}

(*¹ Kobe Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC)

(Now Nagoya Regional Center, FAMIC), *² Kobe Regional Center, FAMIC

(Now Fertilizer and Feed Inspection Department))

We have made a validation study on application of a cartap determination method which had been validated for corn and grass hay, to ear-corn silage (ECS). The method, which uses a liquid chromatograph-electrospray ionization-mass spectrometer (LC-ESI-MS), has been listed in the Feed Analysis Standard of Japan.

Cartap in ECS was extracted with hydrochloric acid (1:100) containing 1 w/v% L-cysteine hydrochloride monohydrate, and cartap was hydrolyzed to nereistoxin with nickel (II) chloride and ammonia. The sample solution was purified with Chem Elut (Volume: 50 mL) (Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA) and injected into a LC-MS to determine the concentration of cartap. The LC separation was then carried out on an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 3.5 μm, Agilent Technologies Inc.) with 1 v/v% heptafluorobutyric acid solution-methanol (4:1) as a mobile phase. In the MS analysis, the positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Whereas a recovery test was conducted on ECS where cartap was added with 175 μg/kg, the resulting mean recovery was low (28.3 %). Since low recovery results were similarly obtained for corn as well, the cause unfolding test for this was performed using corn. The test result indicated that the main causes of the low recovery rate might have been evaporation/dryness of hexane solution and ionization inhibition at mass spectrometry. Therefore, a further recovery test for corn was conducted with the application of different evaporation pressures, but no improvement was observed in the recoveries.

Key words: cartap; nereistoxin; liquid-chromatograph mass spectrometer (LC-MS); electrospray ionization (ESI); ear-corn silage; corn

キーワード：カルタップ；ネライストキシン；液体クロマトグラフ質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；イアコンサイレージ；とうもろこし

1 緒 言

カルタップは、武田薬品工業が開発したネライストキシンをリード化合物とする殺虫剤であり、国内では 1967 年に初回農薬登録されている¹⁾。国内における飼料中の残留基準値（カルタップ、ベンスルタップをカルタップ含量に換算したもの及びチオシクロラムをカルタップ含量に換算したものの総和）は、えん麦、大麦、小麦、とうもろこし、マイロ及びライ麦で 0.2 mg/kg 並びに牧草で

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター，現 名古屋センター

^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター，現 肥飼料安全検査部

0.7 mg/kg と定められている²⁾。

カルタップの分析法は、アンモニア塩基性条件下で加水分解することでカルタップをネライストキシシンに変換した後、多孔性ケイソウ土カラムで精製し、液体クロマトグラフ質量分析計（以下「LC-MS」という。）により定量する方法（以下「カルタップ分析法」という。）が飼料分析基準³⁾に記載されている。

近年、食料自給率向上の重点的な施策の取組の一つとしてイアコンサイレージ（とうもろこしの子実、芯及び外皮から調製したサイレージ。以下「ECS」という。）の生産及び利用が推進されているところである。しかしながら、カルタップ分析法は、ECSにおける妥当性が確認されておらず、カルタップの残留実態が把握できない状況にある。そこで、カルタップ分析法のECSへの適用の可否を検討したので概要を報告する。

参考にカルタップ及びネライストキシシンの構造式等を Fig. 1 に示した。

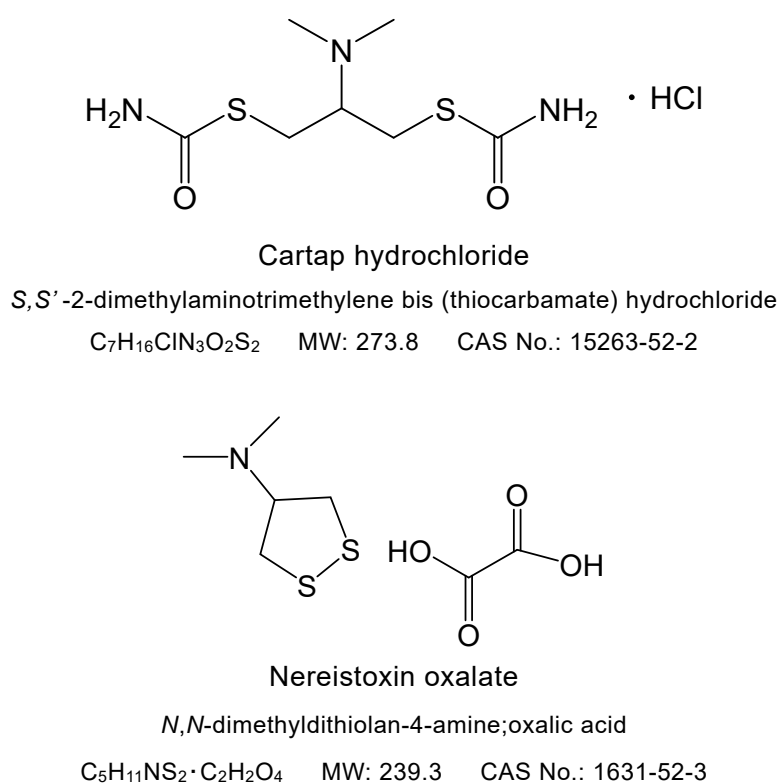


Fig. 1 Chemical structures of cartap hydrochloride and nereistoxin oxalate

2 実験方法

2.1 試料

ECSの分析用試料は、次のとおり調製した。とうもろこしの雌穂（完熟期）を1本毎にスクリーンを装着していないカッティングミル1で細断し、大きめに残った芯及び穂皮を更におおむね2 cm未満となるようにはさみで細断した。細断した雌穂5本分を1つの袋に収めて均質化した後、2つの密封用袋に分けた。バキュームシーラーを用いて脱気し密封後、28℃で36日間貯蔵し、ECSとした。ECSを60℃で6時間乾燥後、更に室内に静置して風乾した後、それぞれ目開き1 mmのスクリーンを装着したカッティングミル2で粉碎し、分析用試料とした。

低回収率の原因究明に用いたとうもろこし（子実のみ）は、ECSに用いたとうもろこしとは別

のものを、目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎し、分析用試料とした。

2.2 試薬

1) アセトン及びヘキサンは残留農薬・PCB 試験用を用いた。メタノールは LC-MS 用（富士フイルム和光純薬製）を用いた。L-システイン塩酸塩一水和物、塩化ニッケル（II）（無水）、塩酸、アンモニア水（質量分率 28~30 %）及びジエチレングリコールは試薬特級を用いた。水は、LC-MS 用（富士フイルム和光純薬製）又は Milli-Q Element A-10（Merck Millipore 製）により精製した超純水（JIS K0211 の 5218 に定義された超純水）を用いた。

2) ヘプタフルオロ酪酸溶液

ヘプタフルオロ酪酸液（東京化成製，Ion-Pair Reagent for LC-MS（約 0.5 mol/L 溶液））10 mL を水に溶かして 1 L とした。

3) ネライストキシシン標準液

ネライストキシシンしゅう酸塩（富士フイルム和光純薬製，残留農薬試験用，純度 98 %）64.1 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ，メタノールを加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えてネライストキシシン標準原液を調製した（この液 1 mL は，ネライストキシシンとして 0.4 mg を含有）。

使用に際して，ネライストキシシン標準原液 5 mL を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ，更に標線までメタノールを加え，1 mL 中にネライストキシシンとして 20 µg を含有する液を調製した。この液の一定量をヘプタフルオロ酪酸溶液-メタノール（4+1）で正確に希釈し，1 mL 中にネライストキシシンとしてそれぞれ 2, 25, 50, 100, 150 及び 200 ng を含有する各標準液を調製した。

試料への添加に当たっては，ネライストキシシン標準原液をメタノールで正確に希釈し，試料へ添加後，よく混合した。

4) カルタップ標準原液

カルタップ塩酸塩標準品（富士フイルム和光純薬製，残留農薬試験用，純度 98 %）25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ，メタノールを加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えてカルタップ標準原液を調製した（この液 1 mL は，カルタップとして 0.5 mg を含有）。

試料への添加には，カルタップ標準原液をメタノールで正確に希釈したのを用いた。

5) 抽出溶媒

使用時に，L-システイン塩酸塩一水和物 10 g を塩酸（1+100）に溶かして 1 L とした。

6) 塩化ニッケル溶液

塩化ニッケル（II）（無水）2 g を水に溶かして 100 mL とした。

2.3 装置及び器具

1) カuttingミル：

カuttingミル 1：SM-100 Retsch 製（回転数（仕様）1430 rpm）

カuttingミル 2：SM-2000 Retsch 製（目開き 1 mm スクリーン，回転数（仕様）835 rpm）

2) 粉碎機：ZM-200 Retsch 製（目開き 1 mm スクリーン，使用時回転数 14000 rpm）

3) 振とう機：MW-DRV 宮本理研工業製（使用時振動数 300 rpm）

4) 多孔性ケイソウ土カラム：Chem Elut（50 mL 保持用）Agilent Technologies 製

5) LC-MS :

LC 部 : Prominence 島津製作所製

MS 部 : LCMS-2010EV 島津製作所製

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出した。抽出液を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、650×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液 20 mL を 200 mL の共栓三角フラスコに正確に入れ、アルカリ加水分解に供する試料溶液とした。

2) アルカリ加水分解

試料溶液に塩化ニッケル溶液 2 mL 及びアンモニア水 5 mL を加えた後 15 分間振り混ぜ、カルタップをネライストキシシンに加水分解し、カラム処理に供する試料溶液とした。

3) カラム処理

試料溶液を多孔性ケイソウ土カラムに入れ 10 分間静置した。300 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、試料溶液の入っていた三角フラスコをヘキササン 10 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次カラムに加えた。液面が充てん剤の上端に達するまで自然流下させてネライストキシシンを溶出させ、更にヘキササン 120 mL をカラムに加えて同様に溶出させた後、溶出液にアセトノーゼエチレングリコール (49+1) 0.5 mL を加えた。溶出液を 37 °C 以下の水浴で約 2 mL まで減圧濃縮した後、乾固するまで静置した。ヘプタフルオロ酪酸溶液-メタノール (4+1) 4 mL を正確に加えて残留物を溶かし、5000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を LC-MS による測定に供する試料溶液とした。

4) LC-MS による測定

試料溶液及び各ネライストキシシン標準液各 2 µL を LC-MS に注入し、選択イオン検出 (以下「SIM」という。) クロマトグラムを得た。測定条件を Table 1 に示した。

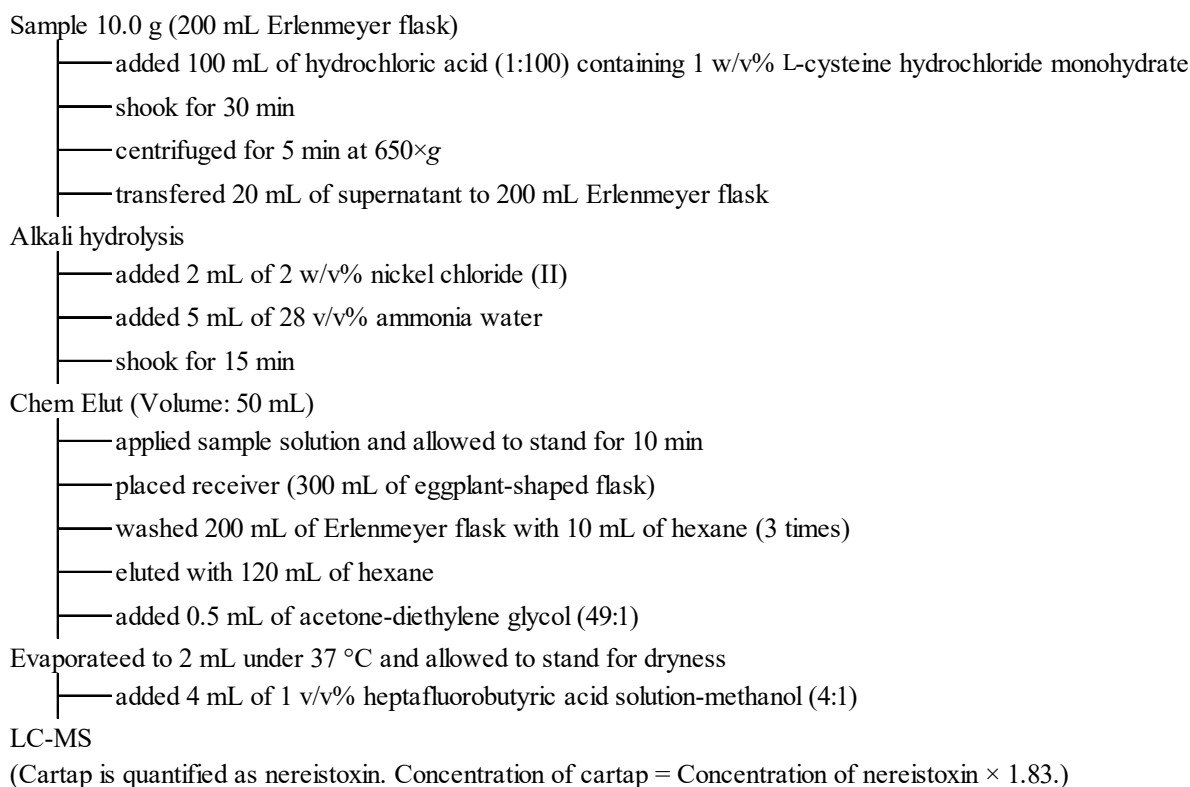
Table 1 Operation conditions of LC-MS

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d. × 150 mm, 3.5 µm), Agilent Technologies
Mobile phase	1 v/v% heptafluorobutyric acid solution-methanol (4:1)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Nebulizer gas	N ₂ (1.5 L/min)
Drying gas	N ₂ (10 L/min)
Heat block temperature	200 °C
CDL temperature	250 °C
Monitor ion	m/z 150

5) 計算

得られた SIM クロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のネライストキシシン量を算出し、これに 1.83 を乗じて試料中のカルタップ量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for cartap

2.5 予備検討

ECS について、カルタップを原物換算して 175 µg/kg 相当量（最終試料溶液中でネライストキシンとして 55 ng/mL）になるように添加後よく混合し、一夜静置した後に 2.4 に従って定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

なお、添加は風乾物試料に対してカルタップとして 200 µg/kg 相当量になるよう行い、原物中濃度への換算は、原物中及び風乾物中の水分含有量を 30 %及び 20 %と想定して、原物（水分含有量 30 %）中濃度 = 風乾物（水分含有量 20 %）中濃度 / 1.14 の式により行った。

とうもろこしについても、カルタップを 200 µg/kg 相当量（最終試料溶液中でネライストキシンとして 55 ng/mL）になるように添加後よく混合し、一夜静置した後に 2.4 に従って定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

2.6 低回収率の原因究明

低回収率の原因究明を行うため、下記の試験を神戸センターと本部で実施した。

1) 標準液の劣化の確認

とうもろこしにネライストキシン標準原液を 400 µg/kg 相当量（カルタップとして 732 µg/kg 相当量。最終試料溶液中でネライストキシンとして 200 ng/mL）になるように添加後よく混合し、2.4 に従って定量した。

2) 各操作の確認

次の試料溶液をそれぞれ調製し、2.4 に従って定量した。なお、カルタップ及びネライストキシンの添加は、それぞれ 2.2 の 3)及び 4)の標準液を用いた。

- i) とうもろこしにカルタップを 200 µg/kg 相当量（最終試料溶液中でネライストキシシンとして 55 ng/mL）になるように添加後よく混合し，2.4 に従って調製したもの。
- ii) とうもろこし 20 g に抽出溶媒 200 mL を添加し，2.4 に従って調製したもの。
- iii) ii)の遠心分離後の上澄み液 20 mL に，カルタップを 200 µg/kg 相当量（同 55 ng/mL）になるように添加後よく混合し，2.4 に従って調製したもの。
- iv) ii)のアルカリ加水分解液に，ネライストキシシンをカルタップとして 200 µg/kg 相当量（同 55 ng/mL）になるように添加後よく混合し，2.4 に従って調製したもの。
- v) ii)のケイソウ土カラムからの溶出液に，ネライストキシシンをカルタップとして 200 µg/kg 相当量（同 55 ng/mL）になるように添加後よく混合し，2.4 に従って調製したもの。
- vi) ii)で調製した試料溶液に，ネライストキシシンをカルタップとして 200 µg/kg 相当量（同 55 ng/mL）になるように添加後よく混合したもの。

本部においては，とうもろこしは神戸センターとは別のものを用い，LC-MS は神戸センターと同機種，カルタップ標準原液，ネライストキシシン標準原液及び LC-MS のカラムは同一のものを用いた。

2.7 減圧濃縮操作の確認

とうもろこし 20 g に抽出溶媒 200 mL を添加して 2.4 に従ってカラム処理まで行った後，ネライストキシシンをカルタップとして 200 µg/kg 相当量（最終試料溶液中でネライストキシシンとして 55 ng/mL）添加し，よく混合した後，圧力条件を 250 hPa，280 hPa 及び 290 hPa の 3 通りで減圧濃縮を行い，2.4 に従って定量した。

3 結果及び考察

3.1 予備検討

2.5 により予備検討を行った。その結果は Table 2 のとおり，平均回収率が 28.3 %と低い回収率であった。手技等に問題がないかを確認するために，既に妥当性確認されているとうもろこしについても試験を行ったところ，34.4 %と同様に低い回収率であった。

Table 2 Results of preliminary test

Sample	Spiked level (as cartap) (µg/kg)	Recovery ^{a)} (%)
ECS	200 ^{b)}	28.3
Maize	200	34.4

a) Mean ($n = 2$)

b) Spiked level as air-dried basis

3.2 低回収率の原因究明

既に妥当性が確認されているとうもろこしでも低回収率であったことから，試料である ECS が原因ではなく，手技等に原因があると考えられたため，とうもろこしを用いて 2.6 に従い原因究明を行った。試験室特有の要因によるものかを確認するため，本部でも同様の試験を行った。その結果は Table 3 のとおりであった。

減圧濃縮前及び最終試料溶液に添加した場合に回収率が大きく低下していることから，減圧濃

縮・乾固時の損失及びイオン化阻害が低回収率の主な原因と考えられた。また、抽出溶媒添加前にカルタップを添加した場合でも回収率が低くなる傾向が認められたことから、抽出時の試料への吸着の影響も考えられた。

ネライストキシン標準原液を抽出溶媒添加前に添加した場合と、アルカリ加水分解前にカルタップ標準液を添加した場合やカラム処理前にネライストキシン標準液を添加した場合とを比較して回収率が近かったことから、3.1 の添加に用いたカルタップ標準液に分析操作中の劣化はないものと考えられた。

本部でも同様の結果が得られたことから、低回収率の原因は、試験室特有の要因ではないことが裏付けられた。

Table 3 Cause unfolding results of low recovery

Stage of spike	Standard solution	Spiked level as cartap ($\mu\text{g}/\text{kg}$ equivalent)	Recovery (%)	
			Kobe regional center ^{a)}	Headquarters ^{b)}
Before adding extraction solution	Nereistoxin	732	57.8	57.6
Before adding extraction solution	Cartap	200	44.1	50.1
Before alkali hydrolysis	Cartap	200	50.1	55.4
Before Chem Elut treatment	Nereistoxin	200	57.2	48.8
Before evaporation	Nereistoxin	200	59.4	55.0
Final sample solution	Nereistoxin	200	77.9	64.3
Not spiked	—	—	ND ^{c)}	ND ^{c)}

a) Mean ($n = 2$)

b) $n = 1$

c) Not detected

3.3 減圧濃縮操作の確認

3.2 において、減圧濃縮・乾固の段階の損失が低回収率の原因の一つとして考えられたことから、2.7 に従い、減圧濃縮前にネライストキシンを添加し減圧条件の確認を行った。前項までの検討は減圧濃縮を 37 °C 以下 280 hPa⁴⁾ で実施したことから、温度は 35 °C で圧力を 280 hPa の他に 250 hPa 並びに 290 hPa の 3 通りを確認した。その結果は Table 4 のとおり、減圧濃縮時の圧力を変えても回収率は 50 % 程度と低回収率のままであった。

Table 4 Recoveries at various pressure conditions of evaporation

Pressure condition (hPa)	Recovery ^{a)} (%)
250	55.8
280	56.8
290	52.8

$n = 1$

a) 55 $\mu\text{g}/\text{kg}$ equivalent of nereistoxin was spiked after Chem Elut treatment.

4 まとめ

ECSに残留するカルタップについて、飼料分析基準による方法の適用の可否について検討したところ、以下の結果が得られ、低回収率の改善の検討が必要であることが分かった。

- 1) ECSについて、予備検討として添加回収試験を行ったところ、28.3%と低回収率の結果が得られた。とうもろこしについても同様に低回収率の結果が得られた。
- 2) とうもろこしを用いた原因究明を行った結果、減圧濃縮・乾固時の損失及びLC-MS測定時のイオン化阻害が主な原因として考えられた。
- 3) とうもろこしを用いてカラム処理後にネライストキシンを添加し、減圧条件を確認した結果、圧力を280 hPaから250 hPa又は290 hPaに変更しても、回収率の改善は認められなかった。

文 献

- 1) 食品安全委員会農薬専門調査会：カルタップ農薬評価書，令和元年6月(2016)。
- 2) 農林省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令，昭和51年7月24日，農林省令第35号(1976)。
- 3) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成20年4月1日，19消安第14729号(2008)。
- 4) 財団法人日本食品分析センター：平成17年度飼料の有害物質等残留基準設定等委託事業（分析法の開発） 飼料中の有害物質等の分析法の開発，3-134(2006)。