

## 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妥当性確認 ～イアコーンサイレージへの適用～

加藤 耕一<sup>\*</sup>, 嘉手苺 舞<sup>\*</sup>, 桑原 正良<sup>\*</sup>

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

KATO Koichi<sup>\*</sup>, KADEKARU Mai<sup>\*</sup> and KUWABARA Masayoshi<sup>\*</sup>

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

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 an 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.

As documented in the previous report, recovery test results on ECS and corn were both low. The cause investigation result indicated that acetone-diethylene glycol (49:1) added as a keeper to prevent vaporization of nereistoxin might have caused the low recovery rate because of ionization inhibition at mass spectrometry.

New recovery tests were conducted on ECS, applying the reduced volume of the keeper to 0.03 mL. ECS was added with 0.0175 and 0.614 mg/kg of cartap. The resulting mean recoveries ranged from 79.7 % to 83.7 %, and the repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD<sub>r</sub>) was less than 6.9 %. The reduced volume of the keeper to 0.03 mL was verified as effective for cartap recovery test.

This method was thus validated as useful for inspections of cartap in ECS.

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；イアコーンサイレージ；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、

\* 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

国内では 1967 年に初回農薬登録されている<sup>1)</sup>。国内における飼料中の残留基準値（カルタップ、ベンズ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 0.7 mg/kg と定められている<sup>2)</sup>。

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「飼料分析基準収載法」という。）が飼料分析基準<sup>3)</sup>に収載されている。

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ーンサイレージ（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。ECS の利用推進を図るためにはその安全性の確保が重要であるが、飼料分析基準収載法は、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ことから、飼料分析基準収載法の ECS への適用拡大が喫緊の課題となっている。

そこで、令和 2 年度に関口ら<sup>4)</sup>は、飼料分析基準収載法の ECS への適用の可否について検討したところ低回収率となり、飼料分析基準別表 3 の試験法の妥当性確認法ガイドライン（以下「妥当性確認法ガイドライン」という。）に定められた真度の目標値を満たさなかった。また、既に妥当性が確認されているとうもろこしにおいても同様に低回収率となった。これは減圧濃縮・乾固による損失及び質量分析におけるイオン化阻害が主な原因と考えられた。

今回、この原因究明を行い、飼料分析基準法について ECS に適用拡大するための検討を行っ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。

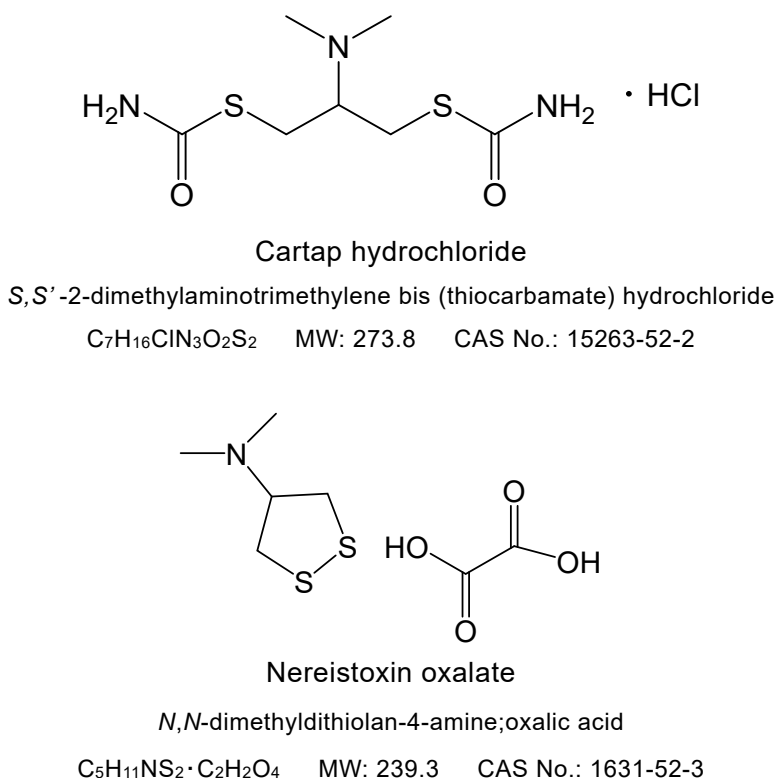


Fig. 1 Chemical structures of cartap hydrochloride and nereistoxin oxalate

## 2 実験方法

### 2.1 試料

ECS は、60 °C で 6 時間乾燥した後、更に室内に静置して風乾した。これを目開き 1 mm のスクリーンを装着したカッティングミルで粉砕し、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、目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕し、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、用事調製した。

#### 3) ネライストキシン標準液

ネライストキシンシュウ酸塩（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ン標準原液を調製した（この液 1 mL は，ネライストキシンとして 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 0.2, 2, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 150 及び 200 ng を含有する各検量線用標準液を用事調製した。

マトリックス効果の確認試験では、同様に 1 mL 中にネライストキシシンとして 191 ng を含有する標準液を用事調製した。

#### 4) カルタップ標準液

カルタップ塩酸塩標準品 (富士フィルム和光純薬製, 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てカルタップ標準液を用事調製した。

#### 5) 抽出溶媒

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、用事調製した。

#### 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) カッティングミル : 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) 振り混ぜ機 : MW-DRV 宮本理研工業製 (使用時振とう数 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ン 10 mL ずつで 3 回洗浄し、洗浄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流下させてネライストキシシンを

溶出させ、更にヘキサン 120 mL をカラムに加えて同様に溶出させた後、溶出液にキーパーとして、アセトン-ジエチレングリコール (49+1) 0.03 mL を添加した。溶出液を 37 °C 以下の水浴で約 2 mL まで 280 hPa 圧力条件で減圧濃縮した後、37 °C 以下で保温し、乾固した。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

試料溶液及び各検量線用標準液 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 1	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d. × 150 mm, 3.5 µm), Agilent Technologies
Column 2	VP-ODS (2.0 mm i.d. × 150 mm, 4.6 µm), Shimadzu
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 <sub>2</sub> (1.5 L/min)
Drying gas	N <sub>2</sub> (10 L/min)
Heat block temperature	200 °C
CDL temperature	250 °C
Monitor ion	<i>m/z</i> 150

#### 5) 計算

得られた SIM クロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中のネライストキシン量を算出し、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。

Sample 10.0 g (200 mL Erlenmeyer flask)

- added 100 mL of 1 w/v% L-cysteine hydrochloride monohydrate solution in hydrochloric acid (1:100)
- shook for 30 min
- centrifuged for 5 min at 650×g
- transferred 20 mL of supernatant to 200 mL Erlenmeyer flask

Alkaline hydrolysis

- added 2 mL of 2 w/v% nickel chloride (II)
- added 5 mL of 28 v/v% ammonia water
- shook for 15 min

Chem Elut (volume: 50 mL)

- applied sample solution and allowed to stand for 10 min
- placed receiver (300 mL of evaporator flask)
- washed 200 mL of Erlenmeyer flask with 10 mL of hexane (3 times)
- eluted with 120 mL of hexane
- added 0.03 mL of acetone-diethylene glycol (49:1)

Evaporated to 2 mL at 280 hPa under 37 °C and dried under 37 °C

- added 4 mL of 1 v/v% heptafluorobutyric acid solution-methanol (4:1)
- centrifuged for 5 min at 5000×g

LC-MS

(Cartap is quantified as nereistoxin. Concentration of cartap = Concentration of nereistoxin × 1.83.)

#### Scheme 1 Analytical procedure for cartap in ECS

### 2.5 低回収率の原因究明

- 1) とうもろこしに、カルタップとして 0.2 mg/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 2.2 の 4) で調製したカルタップ標準液を添加後よく混合した。この直後に抽出溶媒を加え、2.4 の 1) から 3) に従って操作し、濃縮前にキーパーを 0.5 mL（飼料分析基準収載法の添加量）及び 2 mL の 2 条件で添加し、それぞれの試料溶液を調製した。各試料溶液及び各 2 倍希釈試料溶液（ヘプタフルオロ酪酸溶液-メタノール（4+1）で 2 倍希釈した溶液）を 2.4 の 4) から 5) に従って定量した。
- 2) 1) と同様に、キーパーの添加量を 0 mL（添加無し）、0.1 mL、0.3 mL 及び 0.5 mL とした試験を実施した。

### 2.6 キーパー添加量の検討

とうもろこしに、カルタップとして 0.2 mg/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 2.2 の 4) で調製したカルタップ標準液を添加後よく混合した。この直後に抽出溶媒を加え、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、キーパーの添加量は 0.03 mL、0.1 mL 及び 0.5 mL の 3 条件で添加回収試験を行った。

### 2.7 ECS での添加回収試験

ECS に、カルタップを原物換算して 0.0175 及び 0.614 mg/kg 相当量（最終試料溶液中でネライストキシシンとして 5.5 ng/mL 及び 191 ng/mL）となるように 2.2 の 4) で調製したカルタップ標準液をそれぞれ添加後よく混合した。この直後に抽出溶媒を加え、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、ECS への添加は風乾物試料に対しカルタップとして 0.02 及び 0.7 mg/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。

### 3 結果及び考察

#### 3.1 低回収率の原因究明

令和2年度に実施したとうもろこしによる添加回収試験で、低回収率となった原因の一つと考えられたイオン化阻害について、①HPLCカラムの違い、②最終試料溶液の希釈の有無により軽減されるか確認した。また、減圧濃縮前に加えるキーパーの添加量を増やすことで、目的成分の揮散が抑えられ、損失が低減されるのではないかと考え、上記確認と併せて2.5の1)に従ってとうもろこしによる添加回収試験を行った。

その結果はTable 2のとおりであり、カラム2よりもカラム1の回収率が僅かに高く、最終試料溶液の希釈による回収率の改善は認められなかった。また、キーパーの添加量を増やすことにより、大幅に回収率が低下した。

このことから、HPLCカラムの変更や最終試料溶液の希釈による改善効果は低く、また、キーパーの添加量を増やすことでの改善は認められず、逆に悪化したため、キーパーによるイオン化阻害が疑われた。

Table 2 Effect of amount of keeper and dilution on recoveries

Keeper amount (mL)	Dilution	Recovery <sup>a)</sup> (%)	
		Column 1	Column 2
0.5	No	68.4	56.9
	Yes	54.6	35.2
2	No	39.3	27.0
	Yes	41.1	—

—: Not tested

a) Mean ( $n = 2$ )

この結果を踏まえ、キーパーの添加量を減らすことで、回収率の改善を図ることとした。そこで、2.5の2)により操作を行ったところ、その結果はTable 3のとおり、キーパーの添加量が増加するに従い、回収率が低下した。一方で、キーパー添加なしの場合は添加した場合に比べて回収率が低かった。

このことから、キーパーはネライストキシンの揮散を防ぐ効果はあるものの、一定量以上の添加によって回収率が低下することから、キーパーによるイオン化阻害の可能性が示唆された。

なお、以後の検討はカラム1を用いて行うこととした。

Table 3 Effect of keeper amount on recoveries

Keeper amount (mL)	Recovery <sup>a)</sup> (%)
0	58.7
0.1	76.5
0.3	62.8
0.5	57.7

a)  $n = 1$ 

### 3.2 キーパー添加量の検討

最適なキーパー添加量を検討するため、2.6 に従い、とうもろこしでの添加回収試験を行った。その結果は Table 4 のとおりであり、キーパーの添加量を 0.03 mL とすることでとうもろこしにおける低回収率が改善され、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす結果が得られたことから、同様の条件で ECS での検討を行うこととした。

Table 4 Recoveries for cartap from maize

Keeper amount (mL)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
0.03	77.0	12
0.1	66.4	13
0.5	57.1	4.8

a) Mean ( $n = 6$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

### 3.3 妨害物質の検討

ECS を用い、2.4 の 1) から 4) に従って得られた SIM クロマトグラムを確認した結果、定量を妨げるピークは認められなかった。

本検討により得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した。



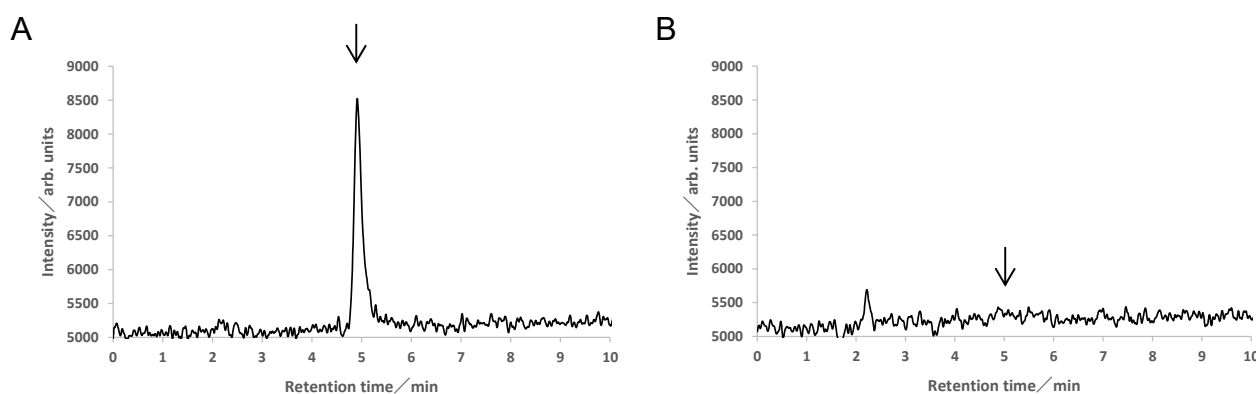


Fig. 2 Typical selected ion monitoring (SIM) chromatograms of nereistoxin in standard and blank sample solution (LC-MS conditions are shown in Tables 1. Arrows indicate the peaks of nereistoxin.)

A: Standard solution (5.5 ng/mL as nereistoxin)

B: Sample solution of ECS (blank)

### 3.4 マトリックス効果の確認

2.4の1)から3)に従って調製したECSのブランク試料溶液にネライストキシンとして191 ng/mL相当量(風乾物試料中のカルタップ0.7 mg/kg相当量)を添加したマトリックス標準液について、2.2の3)に従って調製した同濃度のネライストキシン標準液に対するピーク面積比を確認した。その結果はTable 5のとおりであり、ネライストキシンは試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。

Table 5 Matrix effect study

Sample	Concentration of nereistoxin		Matrix effect <sup>b)</sup> (%)
	Matrix standard solution (ng/mL)	Sample (as cartap) <sup>a)</sup> (mg/kg)	
ECS	191	0.7	98.7

$n = 3$

a) Converted from the concentration in matrix standard solution

b) Ratio of peak area of nereistoxin in the presence of matrix to that in the absence of matrix

### 3.5 添加回収試験

2.7に従ってECSを用いた添加回収試験を実施した。その結果はTable 6のとおり、平均回収率79.7~83.7%、その繰返し精度は相対標準偏差(RSD<sub>r</sub>)として、6.9%以下の成績が得られ、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値(真度:70%以上120%以下、精度:0.02 mg/kgでは22%以下、0.7 mg/kgでは17%以下)を満たす良好な結果であった。

なお、得られたSIMクロマトグラムの一例をFig. 3に示した。

Spiked level (mg/kg as fed basis) <sup>a)</sup>	Recovery (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)
0.0175	79.7 <sup>a)</sup>	5.3
0.614	83.7 <sup>b)</sup>	6.9

a) The cartap was spiked to air-dried ECS samples just before extraction. The spiked levels were 0.02 and 0.7 mg/kg as air dry basis for cartap. The levels of cartap as fed basis were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of ECS samples was 30 % as fed basis and 20 % as air dry basis.

The levels of pesticides as fed basis (moisture 30 %)

= the levels of pesticides as air dry basis (moisture 20 %) / 1.14

b) Mean ( $n = 6$ )

c) Mean ( $n = 5$ )

d) Relative standard deviation of repeatability

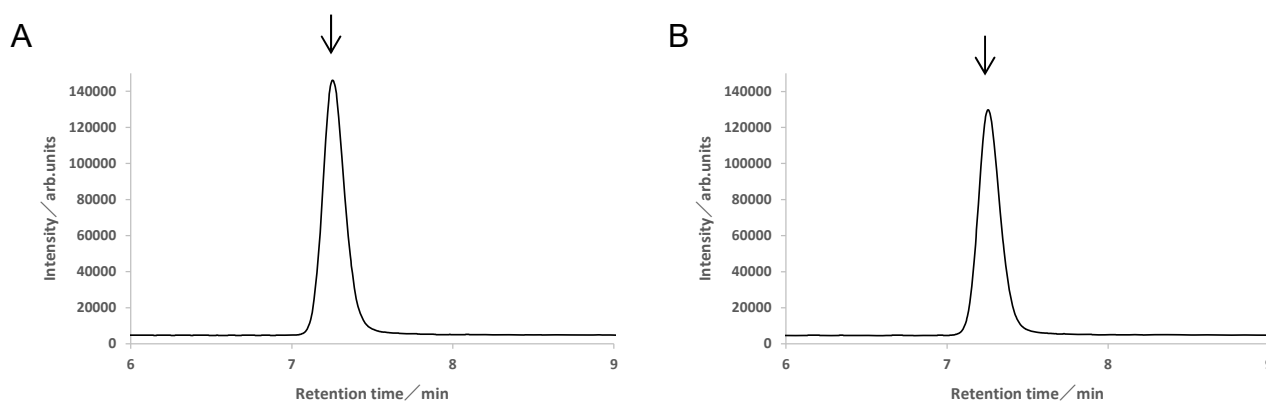


Fig. 3 Typical SIM chromatograms of nereistoxin in standard and spiked sample solution (LC-MS conditions are shown in Table 1. Arrows indicate the peaks of nereistoxin.)

A: Standard solution (191 ng/mL of nereistoxin (382 pg as injection amount))

B: Sample solution of ECS (spiked at 0.614 mg/kg as fed basis of cartap)

### 3.6 定量下限及び検出下限の検討

検量線が直線性を示した範囲, 0.2~200 ng/mL の下端付近となる濃度 (ECS 風乾物中で 0.02 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中のネライストキシシ 5.5 ng/mL 相当量)) の添加回収試験の結果は Table 6 のとおり良好であり, 得られたピークの SN 比が 10 以上であったため, カルタップの定量下限の濃度は ECS の風乾物中で 0.02 mg/kg とした. ECS 中のカルタップに残留基準値は設定されていないが, 牧草中の残留基準値 (0.7 mg/kg) を参考基準値として評価したところ, 定量下限とした 0.02 mg/kg は参考基準値の 1/35 であり, 妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値 (基準値の 1/5 以下) を満たしていた.

また本法の検出下限は, 3.5 の添加回収試験により得られた定量値の標準偏差に Student の  $t$ -値を乗じた値の 2 倍とした. その結果, カルタップの検出下限の濃度は風乾物中で 0.003 mg/kg であり, 妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値 (基準値の 1/10 以下) を満たしていた.

## 4 まとめ

令和2年度の検討において、飼料分析基準収載法による分析で、妥当性確認済のとうもろこしについて真度の目標値に適合しなかったため、原因を調査したところ、以下の結果が得られた。また、カルタップの飼料分析基準収載法について ECS への適用の可否を検討したところ、キーパーの添加量を 0.03 mL に変更することで以下の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

- 1) キーパーはネライストキシンの揮散を防ぐ効果があるものの、一定量以上を添加することで回収率が低下し、この原因としてイオン化阻害の可能性が示唆された。
- 2) とうもろこしにカルタップとして 0.2 mg/kg 相当量を添加し、キーパー添加量を 0.03 mL、0.1mL 及び 0.5 mL とする各条件において 6 点併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ、キーパーを 0.03 mL 添加することにより回収率は改善され、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす結果が得られた。
- 3) 本検討で用いた ECS について、本法に従って得られたクロマトグラムには、定量を妨げるピークは認められなかった。
- 4) 本法に従い得られた ECS 試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果、カルタップは試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。
- 5) ECS にカルタップとして原物換算して 0.0175 mg/kg 及び 0.614 mg/kg 相当量を添加し、本法に従って 5 点以上の併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす結果が得られた。
- 6) 本法の ECS におけるカルタップの定量下限は風乾物中で 0.02 mg/kg、検出下限は風乾物中で 0.003 mg/kg であった。設定した定量下限及び検出下限は、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値を満たしていた。

## 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) 関口 好浩，板橋 葵：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ンジに拡大するための妥当性確認，飼料研究報告，46，80-87(2021)。