

報 文

LC/MS/MSによるほうれん草およびみつば中グルホシネート及び
代謝物 3-メチルホスフィニコプロピオン酸の迅速分析法の検討

梶田弘子 畠山えり子

Rapid determination of glufosinate and 3-methylphosphinico-propionic acid in spinach and
japanese honewort by LC/MS/MS

Hiroko KAJITA and Eriko HATAKEYAMA

(Research Inst. for Env. Sci. and Public Health of Iwate Pref.)

要 旨

高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法(LC/MS/MS)を用いてほうれん草およびみつば中のグルホシネート及び代謝物である3-メチルホスフィニコプロピオン酸(MPPA)の迅速分析法を検討した。試料を90%メタノール溶液で抽出し、蒸留水で希釈した抽出液をスベルクリン ENVi Carb および限外ろ過膜 Microcon YM で精製した。本法による0.01 および0.1 $\mu\text{g/g}$ 濃度の回収率は、ほうれん草71~117%、みつば80~107%、変動係数13%未満で、グルホシネートの定量下限値は0.001 $\mu\text{g/g}$ であった。

Key words: グルホシネート glufosinate, 3-メチルホスフィニコプロピオン酸 3-methylphosphinico-propionic acid, 高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 LC/MS/MS

緒 言

グルホシネートは非選択性除草剤として広く使用されている含りんアミノ酸系農薬である。平成18年5月29日に施行されたポジティブリスト制度ではすべての食品で規制対象となり、残留基準値はほうれん草で0.50ppm、みつばでは一律基準の0.01ppmが適用されるため、より高感度な分析法が求められる。グルホシネートは高極性・イオン解離性で、有効なUV吸収を持たないことから通知法による一斉試験法の適用が困難であり、また、個別試験法¹⁾は水抽出、陰イオン交換樹脂精製、オルト酢酸トリメチルによる誘導体化、GC/FPD分析と操作が煩雑で迅速性に欠ける。LC/MS/MSは高感度・高選択性の機能を有するため食品中の夾雑成分の中から目的物質を検出する手法として有効であり、近年、同機器による農産物中の残留農薬分析法が多

数報告されている。著者らは、限外ろ過法を用いたLC/MS/MSによる農産物中の残留農薬一斉分析について報告²⁾したが、この方法は、試料のメタノール抽出液に水を加えて希釈した際に生成する直径100~200nmのコロイド状粒子を限外ろ過膜により除去し、得られた清澄なる液をLC/MS/MSで測定するという濃縮操作を省略した迅速分析法である。そこで今回、高極性物質の保持に優れている高親水性相互作用クロマトグラフィーカラム(HILICカラム)を用いた限外ろ過法によるグルホシネートおよび代謝物MPPAの迅速同時分析法を検討した。

実験方法

1. 試料および試薬

試料：ほうれん草は市販品，みつばは岩手県農業研究センターで栽培されたものを用いた。

標準品：グルホシネートはDr.Ehrenstorfer社，MPPAは和光純薬工業(株)製を用いた。

標準溶液：標準品10mgを精秤し，蒸留水に溶解して25mLとした。なお，標準原液は4 以下で保存した。これらの標準原液(400 μ g/mL)を混合し蒸留水で10 μ g/mLになるように標準溶液を調製した。

固相抽出用カートリッジカラム：スペルコ社製スペルクリンENVi Carb (500mg, 6cc)(以下ENVi Carbとする)を用いた。なお，使用時は50%メタノール溶液5mL，蒸留水5mLで順次コンディショニングした。

ろ過膜：限外ろ過膜Microcon YM30000 (Millipore社製)

2. 装置

高速液体クロマトグラフ：Agilent社製 1100シリーズ

質量分析装置：Applied Biosystems社製API4000

3. HPLC条件

分析カラム：ZIC-*p*HILIC (2.1 \times 150mm，粒子径5 μ m) SeQuant製，カラム温度：40，移動相：A液0.1%ギ酸，B液 アセトニトリル，グラジエント条件：0~5分(A:B - 60:40) 5.01~8分(A:B - 30:70) 8.01~16分(A:B - 60:40)，流速：0.2mL/min，注入量：5 μ L

4. MS条件

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化(ESI)，ネガティブモード，分析モード：Multiple Reaction Monitoring(MRM)モード，イオンスプレー電圧：-4.5kV，イオンソース温度：600

5. 検量線の作成

適宜希釈した混合標準溶液とグルホシネート，MPPA を含有していないことを確認したほうれん草およびみつばを用いて試料調製した試験溶液を1対9で混合し，0.0005, 0.001, 0.01, 0.05 および0.1 μ g/mLのマトリックス添加標準溶液を調製した。この標準溶液で検量線を作成し，MRM クロマトグラムのピーク面積から濃度を算出した(以下，マトリックス標

準添加法)。

6. 試験溶液の調製

磨砕均質化した試料5gを50mLポリプロピレン遠沈管に採取し，90%メタノール溶液20mLを加え，10分間振とう抽出した。抽出液を3,000rpmで10分間遠心分離した後，上清を採取し，蒸留水で25mLに定容した。この溶液を5mL分取し，蒸留水を同量添加し試料の10倍希釈液を作製した。希釈液をENVi Carbに負荷し，流出液をMicrocon YMで8,500rpm，10分間遠心ろ過したものを試験溶液とした。

結果及び考察

1. 標準溶液の安定性

グルホシネートおよびMPPA標準溶液の安定性をみるため，一律基準値である0.01 μ g/mL濃度の標準溶液について定量用および確認用のMRMトランジションイオンを10回連続測定した。Fig.1にその結果を示した。いずれも変動係数は6%以下と安定しており，定量分析として問題はないと考えられた。

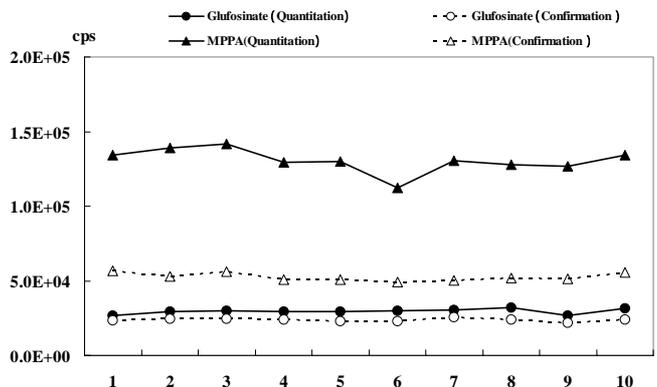


Figure 1. Stability of signal intensities of standard glufosinate and MPPA (0.01 μ g/mL)

2. LC条件

グルホシネートは非常に解離性が高く，ODS系のカラムに保持させることは困難である。今回，高極性物質の分析に適しているとされるHILICカラム2種類(ZIC-*p*HILIC，TSK-gel Amide-80)とマルチモード系ポリマーゲルカラム(TSK-gel VMPak25)について比較検討した結果，ZIC-*p*HILICカラムにおいて感度及びピーク形状とも良好なクロマトグラムが得られた(Fig.2)。

移動相について，添加する揮発性の添加剤(ギ酸，

酢酸アンモニウムおよびギ酸+酢酸アンモニウム)について検討したところ、酢酸アンモニウムを添加した場合、MPPAにおいて感度低下とピークのテーリングが認められたことから、カラムへの保持およびピーク形状とも最も良好であった0.1%ギ酸 - アセトニトリルを採用した。

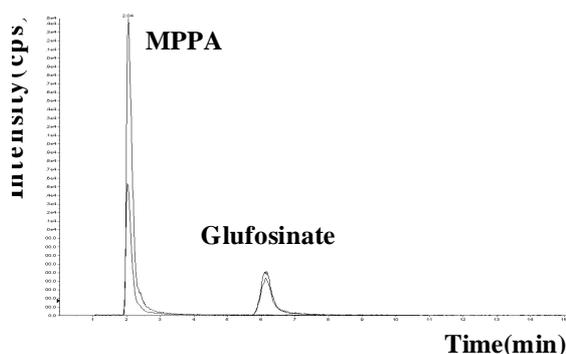


Figure 2. 2MRM chromatograms of standard glufosinate and MPPA (0.02 µg/mL)

3. MS条件

インターフェースには極性化合物のイオン化に適したESIを選択した。各標準溶液(0.1µg/mL)をインフュージョン法により直接MS部に導入しイオン化条件を検討した結果、Table 1に示す条件が最適であった。プリカーサーイオンとして[M-H]⁻が観測され、最も感度が強く得られたプロダクトイオンを定量用とし、次いで高感度だったプロダクトイオンを確認用を選択した。

Table 1. Compound-specific MS/MS Parameters

Pesticides	Quantitation				Confirmation			
	MRM transition (m/z)	DP ¹⁾	CE ²⁾	CXP ³⁾	MRM transition (m/z)	DP ¹⁾	CE ²⁾	CXP ³⁾
Glufosinate	180 63	-60	-54	-3	180 95	-60	-24	-5
MPPA	151 63	-60	-48	-3	151 107	-60	-30	-5

¹⁾ Declustering potential, ²⁾ Collision energy, ³⁾ Collision exit potential

4. 前処理法の検討

グルホシネートは高極性、イオン解離性であることから抽出溶媒には、個別分析法のように水が用いられていることが多いが、限外ろ過法²⁾ではメタノールで抽出する。そこで、抽出溶媒の至適メタノール濃度を検討した。メタノール濃度を0, 50, 80,

90 および 100%に調整し、ほうれん草試料を用いて回収試験(n=2, 濃度 0.125µg/g)を行った。その結果、90%メタノール溶液を用いた場合、回収率ももっとも良好で、次いで100%, 80%, 0%, 50%の順であったことから、抽出溶媒として90%メタノール溶液を用いることとした(Fig.3)。

限外ろ過膜のみによる精製ではイオン化抑制効果が著しかったことから、クロロフィルなどの色素除去効果が優れている固相カートリッジカラム ENVi Carb による精製も追加し、試料の10倍希釈液をENViCarb + Microcon YM で精製する方法を採用した。

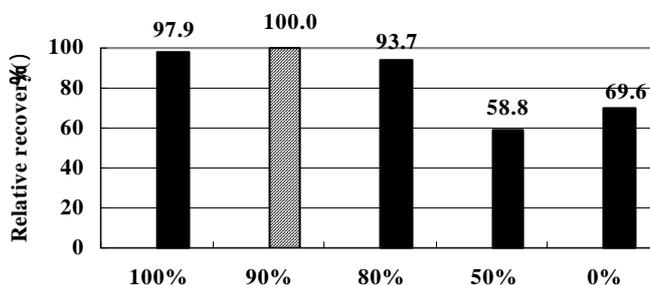


Figure 3. Relative recoveries of other concentration compared with the recoveries of 90% methanol

5. 添加回収試験

検量線は0.0005から0.1µg/mLの範囲で良好な直線性(グルホシネート: R² = 0.9997, MPPA: R² = 0.9995)を示した。添加回収試験はほうれん草およびみつばブランク試料に混合標準溶液を0.01µg/gおよび0.1µg/gとなるように添加し、試行数5回で試験を行った。Table 2に示したように、回収率は79.4~116.8%の範囲で、変動係数も0.7~12.6%と良好な結果が得られた。本法によるグルホシネート換算による定量下限(S/N 10)は0.001µg/gであったことから一律基準が適用されるみつばについても残留するグルホシネートを十分検出可能と考えられた。

Table 2. Recoveries of glufosinate and MPPA from spinach and japanese honewort

Sample	Fortification level (µg/g)	Recovery (%) ¹⁾	
		Glufosinate	MPPA
Spinach	0.01	79.4 ± 8.8	89.4 ± 2.9
	0.1	116.8 ± 3.8	71.0 ± 0.7
Japanese honewort	0.01	107.1 ± 12.6	79.9 ± 12.0
	0.1	92.4 ± 10.8	99.8 ± 9.3

¹⁾ Mean ± CV (n=5)

6. 保存試験

保存試験としてグルホシネートおよび MPPA を 0.125 μ g/g 濃度添加したみつばを冷凍保存し7ヵ月後、本法を用いて分析を行なった(n=2)。なお、保存試験用の試料は県農業研究センターで調整したものをを用いた。グルホシネートは 0.083, 0.084 μ g/g, MPPA は 0.101, 0.089 μ g/g で、平均回収率はグルホシネート 66.6%, MPPA 75.8%であった。

まとめ

含りんアミノ酸系農薬であるグルホシネート及び代謝物 MPPA について、ほうれん草およびみつば中の LC/MS/MS による迅速分析法を検討した。

1. 前処理法は90%メタノール溶液で抽出操作後、水で希釈し、試料の10倍希釈液を ENVi Carb + Microcon YM で精製した。
2. LC/MS/MS 条件は ESI(-) で、移動相には 0.1% ギ酸 - アセトニトリルを、カラムには ZIC-*p*HILIC を用いた。
3. 本法による定量下限値(S/N 10)は、0.001 μ g/g であった。
4. 0.01 および 0.1 μ g/g 濃度の添加回収試験では、79.4 ~ 116.8% の回収率を示し、CV は 0.7 ~ 12.6% であった。
5. グルホシネートおよび MPPA を各々 0.125 μ g/g 濃度添加後7ヶ月間冷凍保存したみつば試料について本法を用いて分析したところ、平均回収率はグルホシネート 66.6%, MPPA 75.8% であった。
6. 今回構築した分析法は、誘導体化することなく試料調製できることから、迅速簡易なほうれん草およびみつば中のグルホシネートおよび MPPA の残留分析法として有用と考えられた。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、試料提供にご協力いただいた岩手県農業研究センターの方々に深謝いたします。

参考文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“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”平成 17 年 1 月 24 日、食安発第 0124001 号(2005)。

- 2) Hatakeyama, E., Kajita, H., Sugawara, T., Sasaki, Y., Takahashi, S., Komukai, T., Simultaneous determination of pesticides in agricultural products by LC/MS/MS using clean-up with ultrafiltration. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **47**, 137-145 (2006)。

報 文

アツモリソウの無菌播種による育苗と遺伝資源の活用

岩手県環境保健研究センター/岩手県立大学大学院総合政策研究科

小山田 智彰

岩手県立大学 総合政策学部 教授

平塚 明

はじめに

アツモリソウ *Cypripedium macranthos* Sw. var. *speciosum* (Rolfe) Koidz. は、ラン科アツモリソウ属に属し、絶滅のおそれが非常に高い種である。岩手県に自生している植物の中で唯一国の「特定希少野生動植物」に指定され、野生個体の採取・損傷が「絶滅の危機に瀕した野生動植物の種の保存法」によって禁じられている。

絶滅危惧植物を保護するには、自生地の保全および自生地における個体数と遺伝的多様性の維持が望ましい。一方、植物園などの管理された施設で維持することも重要である。組織培養コレクションもその一つであるが、アツモリソウでは技術的問題を抱えている。本研究では、無菌播種法を用いた苗作出の問題点を検証する。一方、野生集団の保全は園芸植物の遺伝子供給源を確保するという意味でも重要である。その実践として、アツモリソウから新品種を創出した試みについて紹介する。

岩手県におけるアツモリソウ自生地の現状

岩手県環境保健研究センターには、希少植物の自生地分布情報が集約されている。その中で1985年以降4箇所が記録されているが、現在、生存個体は確認できない。2008年に岩手県全域を対象にした調査で確認された自生地は3箇所である。内2カ所については、開花個体周辺に発芽個体が確認されたが、周辺に他のア

ツモリソウ個体は見られなかった。残りの1カ所ではニホンジカの食害を受けた未開花の1個体のみが見られた。

増殖研究先進地での現状

1. 岩手県住田町のアツモリソウ増殖事業

住田町では、アツモリソウは町花として古くから親しまれている。同町増殖センターは事業化に合わせて培養施設を設備し、1995年から増殖を行っている。同町アツモリソウ研究会が無菌播種法によって作出した培養苗118本のうち、9年を経て開花した個体は3本、開花率は2.5%であった。

2. 礼文町高山植物培養センターのレブンアツモリソウ増殖事業

レブンアツモリソウの増殖に取り組んできた礼文町高山植物培養センターは、1992年から2003年の12年間で22,052本の苗を無菌播種法によって作出し、2001年に開花に成功した。2004年までに開花した個体は853本、開花率は3.9%であった。

無菌播種法の課題

無菌播種法は、小山田の「植物バイテクの実際(2003)」の手法を参考に実施した。その結果、以下のような生育の課題が明らかになった。

1) 人工交配により得られた種子から、無菌播種法により発芽・生育した個体は、初期の PLB から器官分化を行なってシュートを形成する。無菌播種 120 日の個体の器官分化を 4 段階で識別したところ、レベル 1 が多くを占めていた。発芽した個体の多くが器官分化していないことが確認された(写真 1)。

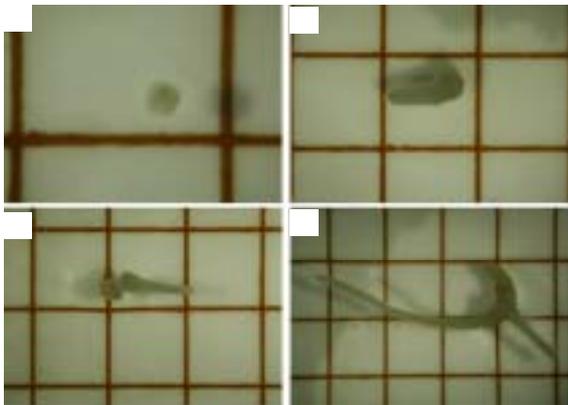


写真 1 試験管内の生育レベル(マス目:5mm)
無菌播種後 120 日

: 種皮を破り発芽した PLB	: rhizoid 形成
: 器官形成	: シュート形成

2) 順調に生育したシュートが黒色に変化し、褐変枯死することがある。正常なものと黒変化が見られた個体を比較した結果、浮き上がった苗に、より多くの黒変化が認められた。

3) 苗の生育を進めるため有効とされる低温処理を行うと、エチオレーション(徒長)が多数確認された。これらの個体の多くはその後枯死した。

以上のように、アツモリソウの無菌播種についていくつかの技術的な問題が明らかになった。現在は、本研究で得られた課題をもとに新たな培養法を検討し、いくつかの成果を得ている。また、作出した苗の野外における生存と利用方法について検討を行い、市の施設「遠野市ふるさと村」に移植し、経過を観察している。

新品種創出

1) 交配種の作出

国内産のアツモリソウ属 4 種(アツモリソウ、レブンアツモリソウ、ホテアツモリソウ、キバナアツモリソウ)、外国産のアツモリソウ属 6 種(*C. calceolus*, *C. macranthum*, *C. kentuckyense*, *C. reginae*, *C. fravum*, *C. fasciolatum*)を用い、開花期である 5 月初旬から 6 月中旬にかけて生育の優良な開花個体を選び交配をおこなった。得られた種子を無菌播種法で発芽させて栽培を行った。その結果、研究開始から 10 年目となる 2008 年 5 月から 6 月に 3 種の開花個体が確認された。

2) 英国王立園芸協会への新種登録

開花させた 3 種のうち、日本産のアツモリソウ、ホテアツモリソウを種子親に、中国原産の *C. fasciolatum* を花粉親として作出した 2 種については、未登録の可能性が高いことが判明した。そこで、英国王立園芸協会への国際登録を進めた結果、2008 年 9 月 8 日付で登録が受理された(写真 2)。



写真 2 新品種に認定された *Cypripedium Monto*

謝辞

本研究の一部は、独立行政法人日本学術振興会平成 20 年度科学研究費補助金奨励研究(課題番号: 20925015)の交付を受け実施した。ここに記して謝意を表します。



The Royal Horticultural Society
CERTIFICATE
OF
INTERNATIONAL REGISTRATION

This is to certify that
Cypripedium Iwahime

(*macranthos* {var} *speciosum* x
fasciolatum)

was officially registered by
A.Hiratsuka & T. Oyamada

Of Japan

with the Royal Horticultural Society
acting as
International Registration Authority for
Orchid Hybrids

Registrar Julian M.H. Shaw

Date 8th September 2008



The Royal Horticultural Society
CERTIFICATE
OF
INTERNATIONAL REGISTRATION

This is to certify that
Cypripedium Monto

(macranthos {var} hotei-atsumorianum x
fasciolatum)

was officially registered by
A.Hiratsuka & T. Oyamada

Of Japan

with the Royal Horticultural Society
acting as
International Registration Authority for
Orchid Hybrids

Registrar Julian M.H. Shaw

Date 8th September 2008