

LC/MS/MS による農産物中のアミトロールの迅速分析

畠野和広

福岡市保健環境研究所保健科学部門

Rapid Analysis of Amitrole in Agricultural Products Using Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry

Kazuhiro Hatano

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

Summary

A simple and rapid method was developed for the analysis of amitrole in agricultural products using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry(LC-ESI-MS/MS). Mass spectral acquisition was done in the positive ion mode by applying selected reaction monitoring(SRM). The amitrole was extracted with ethanol and 60% ethanol, and the extract solution was diluted with water for injection into the LC/MS/MS. The LC separation was performed on an ODS(2mm i.d. x 50mm) column using 5mmol/L IPCC-MS-7+methanol(60:40) as a mobile phase. The recoveries of amitrole from agricultural products fortified at 0.025ppm ~ 0.25ppm were 71.1% ~ 88.1%. The detection limit in agricultural products was 0.025ppm. Sixty-five wheat flour samples were analyzed by this method. No amitrole was detected in any sample.

Key Words : アミトロール amitrole, 残留分析 residual analysis, 高速液体クロマトグラフィー - タンデム質量分析 LC/MS/MS, 農産物 agricultural product

はじめに

アミトロールは、果樹園の下草防除や非農耕地の雑草防除などに使用される非選択性の除草剤である¹⁾。我が国においては、1975年に農薬としての登録が失効しており、食品衛生法における残留基準はほとんどの農産物で検出してはならないことになっている²⁾。また、近年では外因性内分泌搅乱物質の一つとしても疑われている³⁾。

アミトロールの分析法には、食品衛生法で定められた分析法（以下「告示法」）があるが、試料を抽出・酸化し、2種類のイオン交換樹脂により精製した後、蛍光誘導体化しHPLCにより測定する方法であり³⁾、操作が煩雑であるため我が国での分析事例はほとんどない⁴⁾。

このようなことから、農産物中の分析法としてはキャ

ピラリー電気泳動による方法が報告されている⁵⁾。しかし、前処理に透析膜及びカーボンディスクを用いるなど、操作がやや煩雑であるうえ、分析結果もピークの移動時間や吸収波長等選択性が低い情報から得られたものであるため、十分な同定能力を有しているとはいえない。

近年、高速液体クロマトグラフ/質量分析計(LC/MS)の普及に伴い、農産物中の残留農薬の分析法として同機器を用いた報告が見られるようになった^{6)~9)}。LC/MSによるアミトロールの分析については、現在のところ環境水中での報告はあるが、水試料を直接誘導体化して測定しており¹⁰⁾、農産物の分析にそのまま適用することはできない。

そこで、高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析装置(LC/MS/MS)を用いて農産物中のアミトロールの迅速分析法を検討した。

実験方法

1. 試料

市販品を用いた。

2. 試薬等

標準品：アミトロール標準品は Riedel-de Haen 社製を使用した。

標準原液：アミトロール標準品 20 ~ 30mg を精秤し、1000mg/L となるよう水で溶解し調製した。

標準溶液：標準原液を適宜 17% エタノールで希釈して使用した。

トリフルオロ酢酸（陽イオン用イオンペア試薬）：和光純薬工業（株）製液体クロマトグラフ用を使用した。

IPCC-MS-3（陽イオン用イオンペア試薬）：ジーエルサイエンス（株）製を使用した。

IPCC-MS-7（陽イオン用イオンペア試薬）：ジーエルサイエンス（株）製を使用した。

5mmol/L トリフルオロ酢酸及び IPCC-MS-3：トリフルオロ酢酸及び IPCC-MS-3 をそれぞれ当量とり水で溶解し 1L とした。

0.5, 2, 5 及び 10mmol/L IPCC-MS-7：IPCC-MS-7 を当量とりメタノール 50mL に溶解し水で希釈して 1L とした。

ろ紙：アドバンテック東洋（株）製 5A を使用した。

0.2μm フィルター：アドバンテック東洋（株）製 DISMIC-13HP を使用した。

3. 装置

高速液体クロマトグラフ：Agilent 社製 Agilent 1100 シリーズを使用した。

質量分析装置（MS/MS）：Applied Biosystems 社製 API2000 を使用した。

超音波装置：NEY 社製 208H を使用した。

遠心機：（株）コクサン製 H103-NR を使用した。

4. 測定条件

LC/MS/MS の測定条件は Table 1 に示した。

5. 試験溶液の調製

試料 6g を 50mL 遠沈管にとり、エタノール 40mL を加えてホモジナイズし、遠心分離（3500rpm, 10min）した。上澄み液をろ紙でろ過後、残留物に 60% エタノール 20mL を加えて同様の操作を繰り返し、ろ液を合わせてエタノールで 60mL とした。そのうち 2mL を蒸留水で 10mL に希釈し、0.2mm フィルターでろ過し試験溶

液とした。

Table 1. LC/MS/MS Conditions for Analysis of Amitrole

Column	YMC-Pack Pro C18 2mm × 50mm
Column temp.	30
Mobile phase	5mmol/L IPCC-MS-7 + methanol (60:40)
Injection volume	50μL
Ionization	ESI(+)
Ionspray voltage	5.5kV
Turbo gas temp.	500
Declustering potential	36V
Collision energy	27V
Nebulizer gas	Pure air, 20psi
Precursor ion	m/z 85
Product ion	m/z 58
Dwell time	150ms

6. 定量

標準溶液のクロマトグラムのピーク面積から作成した検量線を用いて、試験溶液中のアミトロール濃度を求める試料中の含量を算出した。

結果及び考察

1. LC/MS/MS の測定条件

アミトロールはアミノ基を有する複素五員環構造であるため、イオン化はエレクトロスプレー（ESI）によるポジティブモードで行い、選択反応検出法（SRM）を用いて定量を行った。

MS/MS 条件はインフュージョンポンプ及びフローラインジェクションを用いて最大感度が得られるように求めたが、プロダクトイオンについては感度が強く得られたイオン（m/z 43, m/z 57, m/z 58）のうち、S/N が最も大きく得られた m/z 58 をモニタリングイオンとして用いることにした。

LC 条件については、アミトロールは強極性物質であるため、移動相に揮発性のイオンペア試薬であるトリフルオロ酢酸（C=2）、IPCC-MS-3（C=4）及び IPCC-MS-7（C=8）を用いて ODS カラムへの保持の挙動を検討した。

イオンペア試薬の濃度を 5mmol/L、メタノール含量を 40% とし LC で測定した結果、トリフルオロ酢酸及び IPCC-MS-3 ではアミトロールはほとんど保持されなかったが、IPCC-MS-7 では保持時間は 5 ~ 6 分と良好に保持されたため、イオンペア試薬として IPCC-MS-7 を用いることにした。

次に、IPCC-MS-7 の濃度の違いによるカラムへの保持及び検出感度の変化について検討した。移動相としてメタノールが 40%含有する条件下で、IPCC-MS-7 の濃度を 0, 0.5, 2, 5 及び 10mmol/L に変化させ 0.1mg/L の標準溶液を測定し、キャパシティファクター (k') 及び検出感度を求めた。

Fig. 1 に示したとおり、IPCC-MS-7 の濃度が高くなるにつれてキャパシティファクター大きくなり（カラムへの保持は強くなり）、5mmol/L でほぼ平衡に達した。

また、Fig. 2 に示したとおり、検出感度は IPCC-MS-7 の濃度が 5mmol/L まではほとんど変化が見られなかつたが、10mmol/L で急激に減少した。

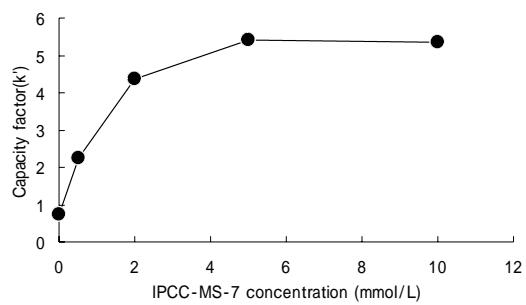


Fig. 1. Effect of IPCC-MS-7 concentration in mobile phase on capacity factor (k') of amitrole.

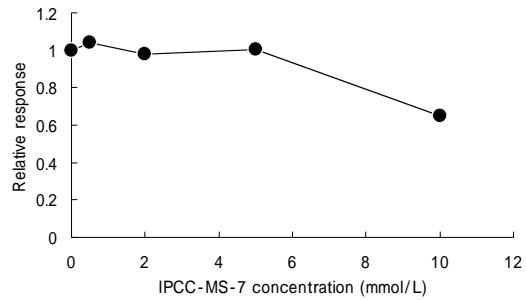


Fig. 2. Effect of IPCC-MS-7 concentration in mobile phase on response of amitrole.

The relative response = peak area of amitrole(0.1mg/L) in mobile phase containing IPCC-MS-7 / peak area of amitrole (0.1mg/L) in mobile phase without IPCC-MS-7.

以上のことから、IPCC-MS-7 濃度は 5mmol/L にすることにした。

なお、次の測定への影響をできるだけ少なくするため、測定終了後は IPCC-MS-7 + メタノール(5:95)で 10 分間、ついで IPCC-MS-7 + メタノール(60:40)で 10 分間保持し機器を安定化させた。

2. 検量線

LC/MS/MS で測定する際、試験溶液のエタノール含量

によりピーク強度に違いが見られたため、標準溶液は試験溶液とエタノールの組成が同等となるよう 17%エタノール溶液で調製した。

検量線は 0.0005 ~ 0.1mg/L の範囲で相関係数 0.9999 であった。

3. 前処理方法

LC/MS 分析を行う場合、試料由来のマトリックス成分によりイオン化が抑制または促進され検出感度が変化することが知られている^{11), 12)}。今回は、使用する LC/MS/MS の検出感度、残留基準（検出してはならない；0.025ppm 未満）及び操作の簡便性を考慮し、抽出溶液を濃縮・精製せず直接水で希釈して測定することが可能であるかについて検討した。なお、試料からのアミトロールの抽出は告示法に準じて行った。

小麦粉、玄米、りんご及びたまねぎ 6g を前述の方法で抽出し 60mL とし、うち 2mL(試料 0.2g 相当)にアミトロールを 0.025, 0.05, 0.1, 0.25 及び 0.5 μ g 添加し、それぞれ水で 5, 10, 20, 50 及び 100mL に希釈した試験溶液とエタノール含量を同じにした標準溶液 (0.005mg/L) のピーク強度を比較した。

いずれの試料においても 10mL 以上に希釈することによって、標準溶液に対する試験溶液の相対ピーク強度を 0.8 ~ 1.0 の範囲にすることができ定量に支障がないレベルとなった。

以上のことから、試験溶液の調製は試料 6g をエタノール及び 60%エタノールで抽出し 60mL とし、うち 2mL を水で希釈して 10mL にすることにした。

4. 添加回収試験

本法を用いてアミトロールを含まないことを確認した小麦粉、玄米、りんご及びたまねぎについて添加回収試験を行った。

Table 2 に示したとおり、回収率は 71.1 ~ 88.1%，標準偏差も 10%以内と良好であった。

Table 2. Recoveries of Amitrole from Agricultural Products

Sample	Fortified Level (ppm)	Recovery (%) ^{a)}
Wheat flour	0.25	80.1 ± 3.9
Wheat flour	0.025	88.1 ± 7.4
Brown rice	0.1	76.6 ± 2.3
Apple	0.1	83.0 ± 2.1
Onion	0.1	71.1 ± 3.0

^{a)} Values are mean ± SD (n=5).

また、いずれの試料についても定量に支障のある試料

由来の夾雜ピークは見られなかった。一例として Fig. 3 に小麦粉から得られた SRM によるクロマトグラムを示した。

なお、いずれの農産物についても 0.025ppm まで十分検出可能(S/N=3)であった。

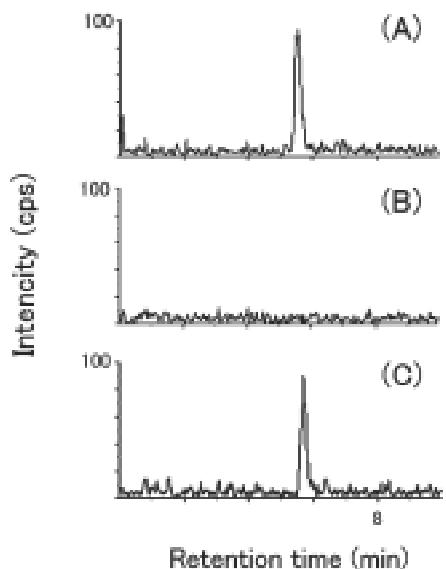


Fig. 3. SRM chromatograms of amitrole (0.0005mg/L) in standard solution (A), blank wheat flour (B) and wheat flour fortified with 0.025ppm (C).

5. 残留実態調査

本法を用いて市販の小麦粉 65 検体について残留実態調査を行ったが、いずれの検体からもアミトロールは検出されなかった。

ま と め

LC/MS/MS による農産物中のアミトロールの迅速分析法について検討した。

試料をエタノール及び 60% エタノールで抽出し、水で希釈して試験溶液とした。いずれの試料においても回収率及び標準偏差とも良好な結果が得られ、定量に支障を与える試料由来の夾雜ピークは見られなかった。

本法は HPLC による告示法に比べ、操作が簡便で迅速に分析できることから、日常の残留分析法として非常に有用な手法と考えられた。

文 献

1)農薬残留分析法研究班編：最新農薬の残留分析法，

43-45, 中央法規出版(東京), 1995

2)厚生省令第 199 号：食品、添加物等の規格基準の一部を改正について、平成 6 年 6 月 9 日

3)環境庁環境保健部環境安全課：外因性内分泌搅乱化学物質問題に関する研究班の中間報告書、平成 9 年 7 月 18 日

4)厚生労働省医薬局食品保健部基準課編：食品中の残留農薬、2001

5)Ritsuko, C. : Determination of amitrole in agricultural products by capillary electrophoresis, Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), 40, 396 ~ 400, 1999

6)Lacassie, E., Dreyfuss, M. F., Daguet, J. L., Vignaud, M., Marquet, P., Lachatre, G. : Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry multi-residue determination of pesticides in apples and pears, J. chromatogr. A, 830, 135 ~ 143, 1999

7)Barnes, K. A., Startin, J. R., Thorpe, S. A., Reynolds, S. L., Fussel, R. J. : Determination of the pesticide diflubenzuron in mushrooms by high-performance liquid chromatography-atmospheric-pressure chemical-ionization mass spectrometry, J. chromatogr. A, 712, 85 ~ 93, 1995

8)Newsome, W. H., Lau, B. P. Y., Ducharme, D., Lewis, D. : Comparison of liquid chromatography-atmospheric-pressure chemical-ionization mass spectrometry and liquid chromatography-postcolumn fluorimetry for determination of carbamates in food, J. AOAC Int., 78, 1,312 ~ 1,316, 1995

9)Masahiro, O., Yoko, K., Kazuhiko, A., Hirotaka, O., Shinjiro, H. : Determination of seventeen pesticides residues in agricultural products by LC/MS, Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), 43, 389 ~ 393, 2002

10)Bodelijk, I., Broess, K., Speksnijder, P., van Leerdam, T. : Determination of the herbicides amitrole in water with pre-column derivatization, liquid chromatography and tandem mass spectrometry, J. chromatogr. A, 938, 15 ~ 22, 2001

11)Riediker, S., Stadler, R. H. : Simultaneous determination of five β -lactam antibiotics in bovine milk using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry, Anal. Chem., 73, 1614 ~ 1621, 2001

12)Kazuhiro, H. : Simultaneous determination of five penicillins in muscle, liver and kidney from slaughtered animals using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry, Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), 44, 1 ~ 6, 2003