

短報

高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析装置を用いた穀類のイミダゾリノン系除草剤の分析について

佐藤久美子¹, 藤巻照久¹,
岸 美智子¹, 渡辺征夫²

Analytical Method for Imidazolinone Herbicides in Cereals with Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry System

Kumiko SATO¹, Teruhisa FUJIMAKI¹,
Michiko KISHI¹ and Ikuo WATANABE²

はじめに

イミダゾリノン系除草剤はアメリカン・サイアナミッド社 (現: ドイツ BASF 社) が開発した除草剤であり, イネ科雑草に対して幅広い除草活性を有する。

イミダゾリノン系除草剤の一つであるイマザモックスアンモニウム塩は豆類に対するイネ科雑草の除去に用いられ, 平成13年2月26日に食品衛生法規格基準が設定され, 基準値は大豆, 小豆, えだまめに0.1ppm, とうもろこし, えんどう, そらまめ, らっかせいおよびその他の豆類に0.05ppm となっている¹⁾。イマザモックスアンモニウム塩以外のイミダゾリノン系除草剤については現在食品衛生法の規格基準は設定されていない。

除草剤耐性穀類では遺伝子組み換えによるグリホサート, グルホシネート耐性大豆が国内で既に承認されている。イミダゾリノン耐性作物は遺伝子組み換えによらない方法で育種開発されてきた作物²⁾である。現在国内では承認されていないが, 今後海外で生産され, 作物や加工品が輸入される可能性が考えられる。平成18年度にはポジティブリスト制が施行される予定であり, 安全性を確保するためのイミダゾリノン系除草剤の残留分析法の検討は必要不可欠である。

イミダゾリノン系除草剤の一斉分析法については, 水,

土壌について高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析装置 (LC/MS/MS) を用いた報告例^{3,4)}があるが, 穀類等の食品についての報告は誘導体化してガスクロマトグラフで測定する報告例⁵⁾が見られるものの少ない。

イマザモックスアンモニウム塩の告示分析法⁶⁾は, メタノール・塩酸混液による抽出・濃縮後, 酢酸亜鉛処理を行い, 4種類のミニカラムを用いて精製した後, アセトニトリル・ヘキサンによる脱脂操作を行って試験溶液とし, UV-HPLC にて測定する方法で, 行程が長いにもかかわらず, タンパク・脂肪を含む穀類に対する精製効果は不十分であり検討を要する。

以上の背景から, イミダゾリノン系除草剤の穀類の精製法の簡易化と測定感度の向上を目的として, 選択性が高く, 高感度分析が可能と考えられる LC/MS/MS を用いた測定法を検討し, 国内で入手可能なイミダゾリノン系5農薬 (イマザピル, イマザモックス, イマゼタピル, イマザメタベンズメチル, イマザキン) (図1) について結果が得られたので報告する。

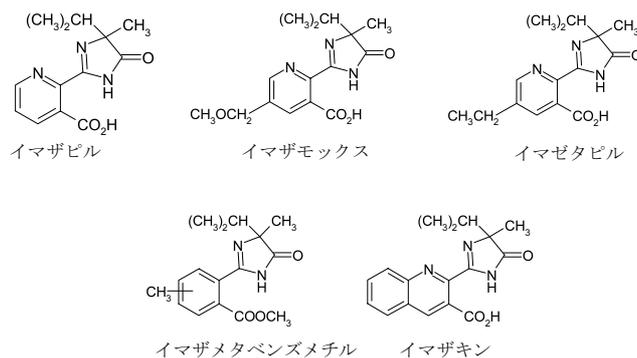


図1 イミダゾリノン5農薬の構造式

方法

1. 試料

市販されている玄米, 大豆, 小豆, とうもろこし(ポップコーン用原料) を用いた。

2. 標準品および試薬

イマザピル, イマザモックス, イマザキン標準品は和光純薬工業社製残留農薬試験用を用いた。また, イマザメタベンズメチルは林純薬工業社製残留農薬試験用をイマゼタピルスペルコ社製の標準品を用いた

塩酸, 酢酸亜鉛, 酢酸ナトリウム, ギ酸, 酢酸: 和光純薬工業社製特級を用い, メタノール, n-ヘキサン: 和光純薬工業社製残留農薬試験用を用いた。

精製用カートリッジカラムは Waters 社製 Oasis HLB (3cc 60mg), Varian 社製 Bond Elut C₁₈ (100mL) および Oasis MAX (3cc 60mg) を用いた。

1 神奈川県衛生研究所 理化学部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋 1 - 3 - 1
2 国立保健医療科学院生活環境部

3. 装置

LC/MS/MS の LC 部は Agilent 1100 シリーズ, MS/MS 部は Micromass Quattro LC を用いた。移動相はメタノール・1%酢酸溶液 (3:2) を用い, 流速を毎分0.2mL とした。カラムは L-column ODS-L (化学物質評価研究機構) 2.1×150mm, 粒径5 μ m を用いた。カラムオープン温度は40 とし, 注入量は2 μ L とした。MS/MS 条件は ESI ポジティブモードで行い, cone 電圧を SCAN・SIM モードでは50V, MRM モードでは30V とし collision 電圧は5農薬いずれも30eV とした。

HPLC 測定時, HPLC は Agilent 1100 シリーズを用い, カラム, カラムオープン, 移動相, 流速は LC/MS/MS と同様とした。検出器の測定波長は254nm とした。なお, 測定条件, 抽出条件時の検討では HPLC を用い, 添加回収試験では LC/MS/MS を用いた。

4. 検量線, 検出限界

HPLC 条件と LC/MS/MS の MRM モード条件下で 0.05~2ppm の混合溶液を2 μ L 注入し, 検量線の直線性を確認した。シグナルがノイズの3倍 (S/N=3) になる濃度を検出限界とした。

5. 抽出方法

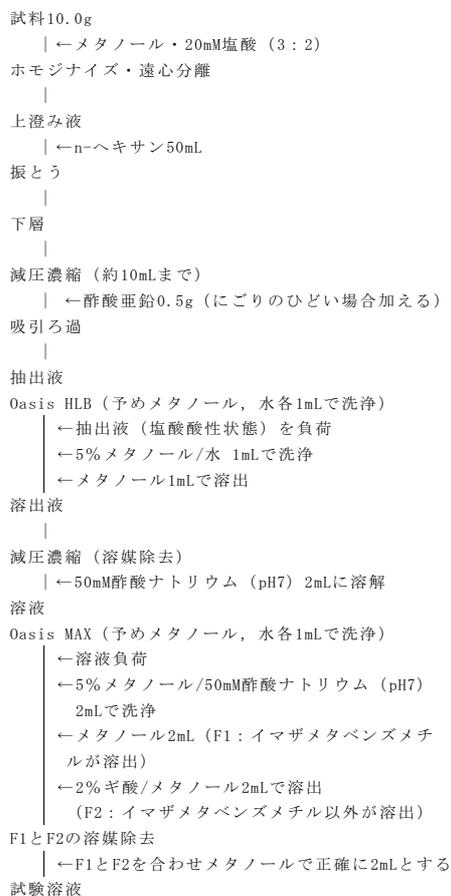


図2 イミダゾリノン5農薬の抽出法・精製法のスキーム

試料10.0g をメタノール・20mM塩酸(3:2)混液150mLにてホモジナイズ後, 遠心分離を行い, 上澄み液を得た。上澄み液に n-ヘキサン50mL を加え, 振とうし下層を約10mL になるまで減圧濃縮を行った。残留物のごりがある場合は酢酸亜鉛0.5g を加え吸引ろ過を行った。

得られた抽出液を予めメタノール, 水各1mLで洗浄した Oasis HLB に負荷し, 5%メタノール1mL で洗浄したのち, メタノール1mLで溶出した。得られた溶出液の溶媒を減圧除去し, 50mM酢酸ナトリウム (pH7) 2mLに溶解し, 予めメタノール, 水各1mLで洗浄した Oasis MAX に負荷し5%メタノール・50mM酢酸ナトリウム (pH7) 2mLで洗浄し, メタノール2mLで溶出 (F1) 後, さらに2%ギ酸/メタノール2mLで溶出 (F2) し, F1とF2を合わせて溶媒を減圧除去しメタノールで正確に2mLとし, 試験溶液とした。スキームを図2に示した。

結果および考察

1. 検討結果

1-1 HPLC 条件について

イマザモックスアンモニウム塩の告示分析法⁹⁾では内径4.6×250mm の ODS カラムを用い, 0.01mol/L リン酸・メタノール (3:2) 混液を移動相として用いることとなっている。しかし, LC/MS の測定では一般的にリン酸のような不揮発性の酸を用いることができず, ESI モードでは流量を少なく設定する必要があるため, 内径の小さいカラムと揮発性の酸を用いた条件を設定する必要があった。セミマイクロカラムを用い, 流量を ESI モードの最適流量とされる毎分0.2mL とし, 揮発性の酢酸を含む移動相条件を検討した。食品衛生法の方法ではイマザモックスは約18分で溶出するが, この条件下では約6分で溶出し, 分析時間は約3分の1に短縮可能であった。得られた HPLC クロマトグラムを図3に示した。測定時の検出限界はイマザピル, イマザモックス, イマゼタピル, イマザメタベンズメチルが0.05ppm, イマザキンが0.02ppm (S/N=3) であり, 測定感度においても従来法とほぼ同様であった。

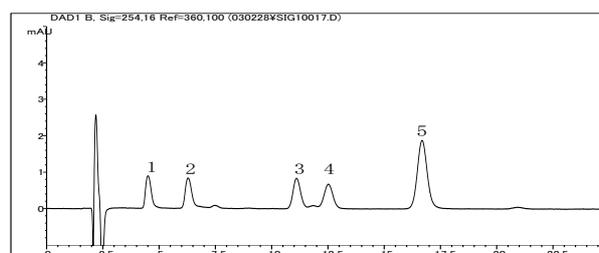


図3 イミダゾリノン5農薬の HPLC クロマトグラム

- (1.イマザピル, 2.イマザモックス, 3.イマゼタピル
4.イマザメタベンズメチル, 5.イマザキン 各2ng)

1-2 LC/MS/MS 条件

SCAN モードにてイミダゾリノン5農薬各1 μg/mL について分析した結果、それぞれの分子イオンピークのマスプロトグラムを抽出することにより5農薬すべてのマススペクトルを得ることができた。プリカーサーイオンは各農薬の分子イオンを選択し、プロダクトイオンはMS/MS スペクトルの中の強度の強いフラグメントイオンを選択した。表1にMRM 測定時の5農薬のプリカーサーイオン、プロダクトイオンを示し、標準溶液のMRM クロマトグラムを図4に示した。

表1 イミダゾリノン系5農薬のMRM モード測定時のプリカーサーイオン、プロダクトイオン

農薬名	プリカーサーイオン(m/z)	プロダクトイオン(m/z)
イマザピル	262	149
イマザモックス	307	193
イマゼタピル	290	159
イマザメタベンズメチル	289	144
イマザキン	312	199

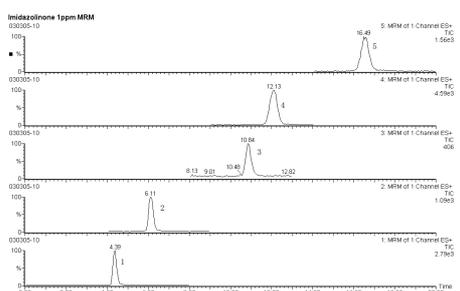


図4 イミダゾリノン系5農薬標準溶液 (1ppm) のMRM クロマトグラム

- 1. イマザピル, 2. イマザモックス, 3. イマゼタピル
- 4. イマザメタベンズメチル, 5. イマザキン

検量線は0.1 ~ 2ng の範囲においてイマザピルの回帰式は $y=305.72x-3.3483$, 相関係数 $r=0.9999$, イマザモックスの回帰式は $y=147.5x+1.7032$, 相関係数 $r=0.9995$, イマゼタピルの回帰式は $y=66.128x-3.257$, 相関係数 $r=0.9948$, イマザメタベンズメチルの回帰式は $y=1008.1x+1.0116$, 相関係数 $r=0.9998$, イマザキンの回帰式は $y=349.2x+1.005$, 相関係数 $r=0.9999$ であり, 概ね良好な直線性を示した。測定時の検出限界はイマザピルは0.005ppm, イマザモックス0.01ppm, イマゼタピル0.05ppm, イマザメタベンズメチル0.002ppm, イマザキン0.005ppm であり, HPLC よりもさらに高感度で測定可能であった。

2 抽出条件・精製条件の検討

メタノール・塩酸混液による抽出後, 脱脂を目的とし

たn-ヘキサン洗浄が可能か検討を行った。いずれのピークも検出されず, n-ヘキサン洗浄による損失はないと考えられた。

試験溶液の精製法について, 従来法では ODS, SCX, CH, NH₂の4種類のミニカラムを用いて煩雑な操作を行っているにもかかわらず, 十分な精製効果を得るのは困難であった。精製操作を簡略化するための検討を行った。

5農薬について ODS カラムと強陰イオン交換樹脂カラムについて検討を行った。ODS カラムについては従来法で用いられている Bond Elut C₁₈とポリマーの充填材を用いてシラノール基のない Oasis HLB を比較し, イオン交換樹脂カラムについては, 酸性物質の保持が可能なイオン交換充填剤を有する Oasis MAX について溶出を検討した。Bond Elut C₁₈, Oasis HLB についてはいずれも良好な回収率であったが, 再現性は Oasis HLB のほうが優れ, 少ない溶媒量で溶出可能であった。Oasis MAX についてはカルボキシル基を持たないイマザメタベンズメチルのみがメタノール (F1) で溶出し, カルボキシル基を有する4農薬が2%ギ酸・メタノール混液 (F2) で溶出した。今回は, 試験に再現性の良好な Oasis の2種のカラムを用い, 一緒に分析するために F1 と F2 を合わせて分析することとした。結果を表2に示した。

表2 イミダゾリノン系5農薬のミニカートリッジカラムの溶出結果 (n=3, 平均値 ± 標準偏差)

農薬名	回収率 (%)		
	Oasis HLB	Bond Elut C ₁₈ **	Oasis MAX
イマザピル	94.6 ± 1.4	102.2 ± 7.6	94.9 ± 3.1
イマザモックス	94.6 ± 1.0	90.6 ± 2.0	96.0 ± 2.5
イマゼタピル	95.2 ± 1.4	91.6 ± 1.4	97.3 ± 1.6
イマザメタベンズメチル	96.2 ± 1.3	93.9 ± 0.7	93.0 ± 1.0
イマザキン	94.4 ± 1.1	89.2 ± 1.2	95.3 ± 2.0

* メタノール・水各5mLでコンディショニングしたのち負荷し, 塩酸溶液 (pH2.5) 5mLで洗浄, メタノール・塩酸溶液 (pH2.5) (1:1)10mLで溶出

3 添加回収試験結果

添加回収試験結果を表3に示した。玄米, とうもろこしにおいては5農薬中4農薬が70%以上の良好な回収結果であった。玄米のHPLC クロマトグラムとMRM クロマト

表3 添加回収結果

農薬名	回収率 (%)			
	玄米	大豆	小豆	とうもろこし
イマザピル	58.1 ± 0.4	5.3 ± 1.2	11.7 ± 2.8	73.8 ± 13.0
イマザモックス	80.5 ± 1.2	10.8 ± 2.8	23.3 ± 1.0	73.3 ± 5.6
イマゼタピル	91.5 ± 7.9	17.8 ± 2.9	30.7 ± 1.8	74.6 ± 2.3
イマザメタベンズメチル	82.8 ± 5.0	41.2 ± 6.0	58.0 ± 6.6	75.1 ± 6.9
イマザキン	80.5 ± 7.0	23.6 ± 3.6	38.6 ± 3.2	57.7 ± 11.0

試料10.0gに各農薬を2μgずつ添加した。回収率(%)は平均値 ± 標準偏差として示した(n=3)。

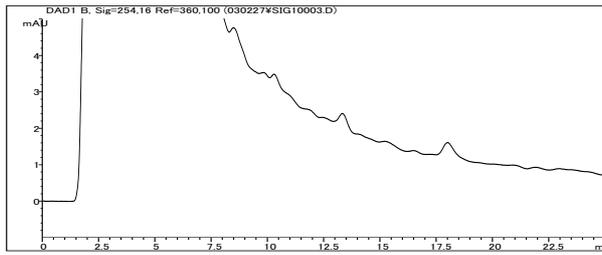


図5 玄米（blank）溶液から得られたHPLCクロマトグラム

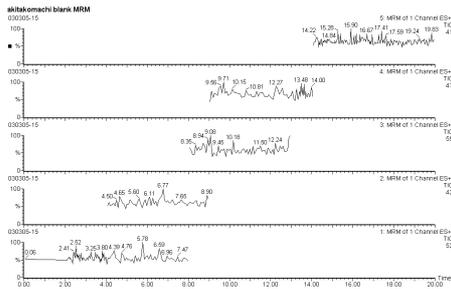


図6 玄米（blank）溶液から得られたMRMクロマトグラム

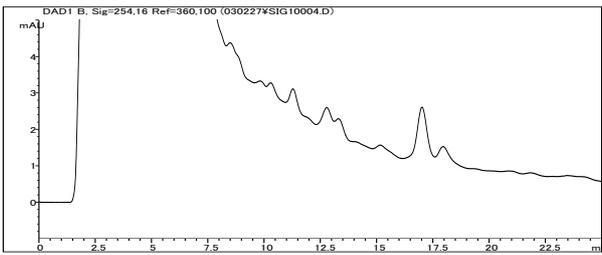


図7 玄米（添加）溶液から得られたHPLCクロマトグラム

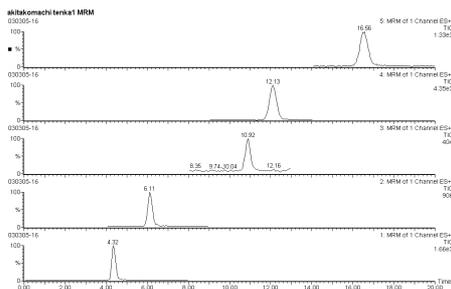


図8 玄米（添加）溶液から得られたMRMクロマトグラム

トグラムを図5～8に示した。HPLCクロマトグラムでは成分由来の影響を受け、検出不能であったが、MRMクロマトグラムでは、すべての試料で妨害ピークはみられず、5農薬のピークを検出可能であった。

大豆、小豆の添加回収率は5～58%にとどまった。大豆、小豆は玄米、とうもろこしよりもタンパク質を多く含んでいるために、妨害成分が除去しきれずに、イオン化の

阻害を行っている可能性が考えられた。

まとめ

今回の検討により、従来法よりも簡易な方法で玄米、とうもろこしのイミダゾリノン系5農薬のスクリーニング試験を行うことが可能と考えられた。豆類については良好な回収率が得られなかったため、回収率低下の原因やイオン化阻害の有無を解明し、精製方法等をさらに検討する必要がある。

謝 辞

本実験に御協力頂きました国立保健医療科学院の工藤雅子氏に深謝いたします。
(平成16年7月28日受理)

文 献

- 1) 食品・食品添加物等規格基準（抄），食品衛生学雑誌，45，J73-J75（2004）
- 2) The Food Directorate (involves Health Canada, the Canadian Food Inspection Agency), Novel Food Information-Food Biotechnology Imidazolinone Tolerant Rice, http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment/mh-dm/ofb-bba/nfi-ani/e_imidazolinone_rice.html (2002)
- 3) S.J.Stout, et al:Rapid Direct Determination of Imidazolinone Herbicides in Water at the 1ppb Level by Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry, J.Agric. Food Chem., 44, 2182-2186 (1996)
- 4) A.J.Krynitsky, et al:Maltiresidue Determination and Confirmation of Imidazolinone Herbicides in Soil by High Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry, J.AOAC Int., 82, 956-962 (1999)
- 5) Abul K.M.Anisuzzaman, et al:Synthesis of Derivatives of Imidazolinone Herbicides: Their Use in Efficient Gas Chromatographic Methods for the Determination of These Herbicides, J.Agric.Food Chem., 48, 5893-5902 (2000)
- 6) 厚生労働省監修，食品衛生検査指針残留農薬編，イマザモックスアンモニウム塩試験法，pp.192-197 (2003)