

LC/MS/MSによる環境水中のアミトロールの分析*

上堀 美知子**

キーワード

- ① amitrole ② LC/MS/MS ③ Sep-Pak Plus AC-2
④ Environmental water sample ⑤ Leachate from waste landfills

Summary

A sensitive and selective method was developed for the determination of amitrole in environmental water samples using by liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). Trace amount of amitrole was collected on Sep-Pak Plus AC-2 cartridge (AC-2 cartridge) and eluted with 10 ml of 25% ammonia water/chloroform/acetonitrile (10/9/81). The elute was separated by reversed-phase liquid chromatography and determined by tandem mass spectrometry. The collection efficiency of amitrole on AC-2 cartridge was from 97% to 100%. The detection limit of amitrole was 0.001 $\mu\text{g/l}$, and relative standard deviations of repeated analysis in 0.0025 $\mu\text{g/l}$ -0.01 $\mu\text{g/l}$ of sample were in the range of 6.9-8.0%. Amitrole was detected at 0.004 $\mu\text{g/l}$ level in the river water and 0.6 $\mu\text{g/l}$ level in leachate from waste landfills.

1. はじめに

1996年に米国でシーア・コルボーン等の著書 [Our Stolen Future(邦訳：奪われし未来)] が出版されて以来、内分泌攪乱化学物質による環境汚染等が問題となり、環境省においては「環境ホルモン戦略計画 SPEED'98」(平成10年5月環境庁)を公表した。この中で、アミトロールは内分泌攪乱作用を有する可能性のある化学物質としてリストアップされている。また、平成13年度には優先してリスク評価に取り組むべき物質として選定され、環境汚染物質排出移動登録制度(化学物質管理促進法：PRTR)における第一種指定化学物質にも指定されている。また、アミトロールの発がん

性や毒性等については、古くから報告されており^{1,2)}、Mattioli F.らは動物実験による発がん性の可能性を指摘している³⁾。分散染料、写真薬品、樹脂の硬化剤および除草剤として広範囲に使用されており、日本では1962年に農薬として登録されたが、1975年に失効している。米国では環境保護庁(EPA)の制限使用農薬リストにも含まれている。

アミトロールの分析には古くは比色分析法や高速液体クロマトグラフィー(HPLC)が用いられている^{4,5)}。また、HPLCを用いた分析方法ではHPLC/蛍光検出法⁶⁾、キャピラリー電気泳動法⁷⁾、イオン対あるいは陽イオン交換液体クロマトグラフ法⁸⁾が、ガスクロマトグラフィー(GC)を用いた方

* Determination of Amitrole in Environmental Water Samples

**Michiko UEBORI(大阪府環境情報センター)Environmental Pollution Control Center,Osaka Prefecture

法ではアルカリ炎イオン化検出器を用いたキャピラリーガスクロマトグラフィーによる分析法⁹⁾も報告されている。HPLC/蛍光検出法では、フルオレスカミンによる誘導体化をすることにより高感度化が図られ、GC法ではアセチル誘導体化による前処理が行われている等、いずれもアミトロールを誘導体化することにより分析する方法である。一方、アミトロールを直接分析する方法も報告¹⁰⁾されているが、検出限界は0.1 μ g/l程度である。最近では液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計(LC/MS/MS)を用いて検出限界が0.025 μ g/lとする方法が報告されている¹¹⁾。この方法は、9-フルオレニルメトキシカルボニルクロリドとの誘導体として測定する方法で、誘導体化反応に長時間を要する。また、「外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル」(平成10年10月環境庁)による方法も誘導体化による方法である。

本報告は、LC/MS/MSによる環境水中のアミトロールを誘導体化しないで直接分析する方法であり、簡単な固相抽出による前処理のみで一般環境試料水の分析が可能であったので報告する。

2. 実験方法

2.1 試薬および標準溶液

実験に使用したアミトロールの標準物質は和光純薬工業(株)製の残留農薬試験用標準品を使用した。標準品をアセトニトリルに溶解して1.0mg/mlのアセトニトリル溶液を調製し標準原液とし

た。標準溶液(0.1~100ng/ml)は標準原液をアセトニトリルで適宜希釈して調製した。

また、10~20ng/mlのアミトロールを含む試料水は精製水100mlに対して、標準原液から調製したアセトニトリル溶液(100 μ g/l)10~20 μ lを添加して調製した。pH調製は5%アンモニア水あるいは1mol塩酸で行った。

アセトニトリル、クロロホルムおよび蒸留水は和光純薬工業(株)製液体クロマトグラフ用、25%アンモニア水および酢酸アンモニウムは和光純薬工業(株)製試薬特級を用いた。

水質試料の捕集剤にはSep-Pak Plus AC-2(AC-2カートリッジと略す)(Waters社製)を用いた。AC-2カートリッジ、アセトニトリルおよびメタノール等使用溶媒からアミトロールは検出されなかった。

2.2 装置および分析条件

高速液体クロマトグラフはAgilent社製HP1100シリーズ、分析カラムはSUPELCO社製Discovery HS F5(4.6mm i. d. \times 250mm, 5 μ m)、移動相はアセトニトリル/10mM酢酸アンモニウム水溶液(pH6.8)(75/25)を使用した。質量分析計は、Applied Biosystems社製API4000三連四重極型質量分析計を用いた。イオン化法はTurbo Ion Spray(ESI)の正イオンモード(Positive Mode)、定量はMRM(multiple reaction monitoring)モードで行った。MS/MSで使用する窒素ガスおよび純空気はカケンジェネックス社製の窒素/Zero Air発

Table 1 Operating conditions of LC/MS/MS

HPLC	HP1100(Agilent)
Column	Discovery HS-F5(SUPELCO)(4.6mm i. d. \times 250mm, 5 μ m)
Mobile phase	Acetonitrile/10mM Ammonium acetate(pH6.8)(75/25)
Flow rate	0.3ml/min
Oven temperature	40 $^{\circ}$ C
Injection volume	5 μ l
MS/MS	API 4000(Applide Biosystems)
Spray Type, Mode	Turbo Ion Spray(ESI), Positive
Spray Voltage	5000V
Declustering potential	41V
Collision energy	33V
Ion source temperature	600 $^{\circ}$ C
Ion source gas	pure air 80ml/min
Curtain gas	nitrogen 30ml/min
Monitor ion	m/z 85 \rightarrow 43(m/z 85/43), m/z 85 \rightarrow 57(m/z 85/57)

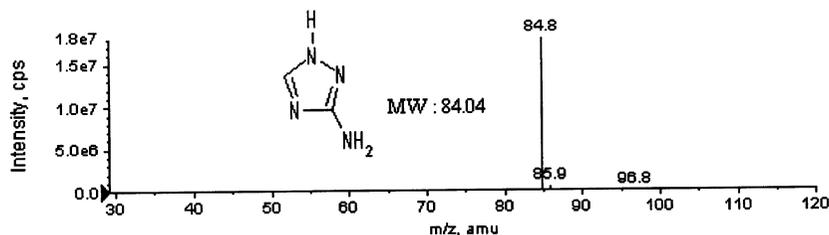


Fig. 1 Mass spectra of amitrole (positive mode)

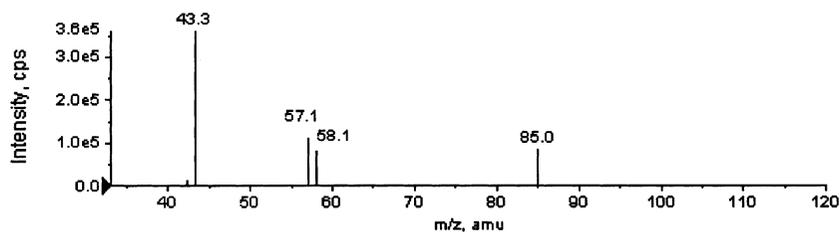


Fig. 2 Mass spectra of amitrole obtained by precursor scan on m/z 85

生装置で調製した。測定条件を **Table 1** に示した。

2.3 試料の前処理

水質試料は、アセトニトリル10ml および蒸留水20ml で洗浄したAC-2カートリッジに Waters 社製コンセントレータ Plus を用いて試料水を 10 ml/min の流速で200ml 通水した。通水後、AC-2 カートリッジに残留している水分を除去し、25% アンモニア水/クロロホルム/アセトニトリル (10/9/81) 混合溶媒10ml で溶出した。溶出液は窒素ガスを吹き付けて 1 ml まで濃縮し、あるいは溶出液そのものを分析試料とした。

2.4 実試料

河川水および廃棄物処分場からの浸出水を直径 47mm のガラス繊維濾紙(GS-25, ADVANTEC 製) で濾過して、**2.3 試料の前処理**に従って処理したものを分析試料とした。

3. 結果および考察

3.1 LC/MS/MS 条件

MRM 定量分析におけるモニターイオンは、100 ng/ml アミトロール標準溶液を ESI-Positive モードでインフュージョン分析により最適化した。Q1 スキャンでの質量スペクトル(**Fig. 1**)は $[M+H]^+$ イオンである m/z 85, この m/z 85 を前駆イオンとするプロダクトイオン(**Fig. 2**)の上位2つ

は m/z 43 および m/z 57 であった。スプレー電圧等の MS/MS 測定に関する最適条件は、m/z 43 あるいは m/z 57 についてフローインジェクション分析により最適化した。

LC 分析の分離カラムは、逆相系 ODS カラム、イオンペアー分離型カラム等について検討した。ODS 系カラムではほとんど保持されず、イオンペアー分離型のカラムではアミトロールのピークの直前にイオンペアー試薬の影響と思われるベースラインが落ち込む現象が現れるため、定量分析に影響した。ペンタフルオロフェニル基を導入した中疎水性カラムである Discovery HS F5 (4.6mm i. d. × 250mm, 5 μm) (SUPELCO 社製) を分離カラムとして、移動相に 10mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 6.8) / アセトニトリル (75/25) を使用し、流速を 0.3ml/min とした場合に良好な形状のピークが得られ、保持時間は 9.6 分であった。この条件でのアミトロールの保持時間の再現性は、1 日以内での相対標準偏差が 0.5% 以下であり、10 日間の連続分析においても 0.5% 以下であった。

3.2 試料の捕集

環境水中のアミトロールを捕集剤(固相)により捕集するために活性炭, シリカ系 C18, スチレンジビニルベンゼン共重合体等ポリマー系およびグラファイトカーボンブラック等のグラファイト系

Table 2 Effect of the pH value on the collection efficiency

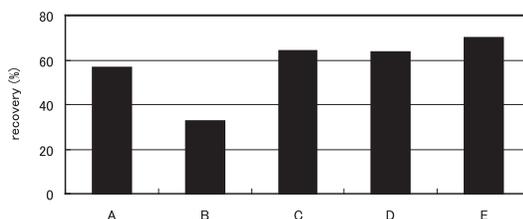
pH value of test samples	pH 3	pH 7	pH10
Percentage of Sample collection (%)	87.4	100	99.5

活性炭等, 8種類の固相について検討した。20ng/mlのアミトロールを含む水溶液20mlを各固相に通水し, さらに精製水100mlを通してアミトロールの捕集効率を求めた。アミトロールは水溶解度が高く極性も高いためシリカ系C18およびポリマー系の固相にはほとんど捕集されず, グラファイト系活性炭の固相でも捕集効率は50%以下であった。しかし, 活性炭を充填したSep-Pak Plus AC-2(Waters社製)カートリッジでは捕集効率が97~100%と良好な結果が得られた。以上の結果, 水質試料の捕集にSep-Pak Plus AC-2カートリッジを使用することとした。

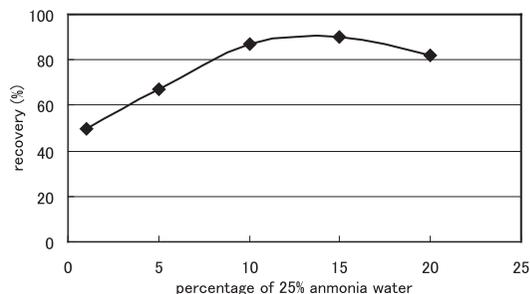
次に, AC-2カートリッジに水質試料を捕集する際, 捕集効率に及ぼす試料水のpHの影響について検討した。20ng/mlのアミトロールを含む水溶液のpHを1mol塩酸, 5%アンモニア水でそれぞれpH3, pH10に調製した試料水およびpH調製を行わなかった試料水(pH7)の3種類をAC-2カートリッジに通水し, 通水後の試料水中のアミトロール濃度から固相への捕集効率を求めた。結果をTable 2に示す。pHが酸性領域(pH3)では若干の溶出がみられ, 捕集効率は87%であった。中性領域(pH7)からpH10では通水後の試料水からアミトロールは殆ど検出されず, 捕集効率は100%であった。水質試料はpH7~10の範囲に調製して固相に通水することとした。

3.3 溶出溶媒および溶媒量の検討

試料水をAC-2カートリッジに通水して捕集した後, AC-2カートリッジからの溶出溶媒について検討した。10ng/mlのアミトロールを含む試料水を100ml通水し捕集した後, メタノールとアセトニトリルで溶出した。両溶媒とも2~3mlで約50%程度が溶出されたが, さらに溶媒量を増やしても溶出量は増加しなかった。また, メタノールを溶出溶媒とした場合にLCカラムでの展開溶媒の組成が異なるためアミトロールのピーク形状



A: Acetonitrile B: Acidic formic acid/acetonitrile
C: Ammonia water/acetonitrile(5/95)
D: Chloroform/acetonitrile(10/90)
E: Ammonia water/chloroform/acetonitrile(1:9:90)

Fig. 3 Recoveries of amitrole from AC-2 cartridge by various solvents**Fig. 4** Effect of 25% ammonia water ratios contained in eluting solution on the recovery

が悪くなりテーリングする傾向にあった。そこで, アセトニトリル(溶媒A)を主溶媒とする混合溶媒について検討した。検討した混合溶媒は, ギ酸酸性アセトニトリル(溶媒B), アンモニア水/アセトニトリル(5:95)(溶媒C), クロロホルム/アセトニトリル(10/90)(溶媒D), アンモニア水/クロロホルム/アセトニトリル(1/9/90)(溶媒E)である。

各混合溶媒5mlで溶出したときの回収率をFig. 3に示した。溶媒Bでは溶媒Aで溶出した場合より回収率は低く32.4%であった。アルカリ性の溶媒Cあるいはクロロホルムを含む溶媒Dにおいてはそれぞれ63.8%, 63.7%の回収率が得られた。また, 溶媒Cと溶媒Dの3種の溶媒を混合した溶媒Eでは70.1%と最も高い回収率が得られた。

この結果から, アンモニア水/クロロホルム/アセトニトリルの混合溶媒についてそれらの混合割合について検討した。なお, クロロホルムの割

合については Andreolini F.等¹²⁾のエストロジェンとその抱合体をグラファイトカーボンブラックから分画溶出する方法を参考に9%で一定とした。結果を Fig. 4 に示した。アンモニア水の割合が増加するに従って回収率が高くなり、クロロホルム/アセトニトリル(9/91)の混合溶媒に対し10~15%のときが最も回収率が高く87~90%であった。さらに、この混合系で溶出量を10mlに増やした場合、回収率は93~94%に向上した。以上の結果、溶出溶媒は25%アンモニア水/クロロホルム/アセトニトリル(10/9/81)の混合溶媒を使用し、溶出量を10mlとした。

3.4 捕集効率

AC-2カートリッジを3個直列に接続し、濃度0.1ng/mlおよび1ng/mlのアミトロール試料水を100ml~1000ml 通水して、各段のAC-2カートリッジに捕集されたアミトロールを溶出溶媒10mlで溶出してその割合を求めた。

通水量が200mlまでは0.1および1ng/mlの試料水とも1段目の捕集管で97~100%捕集することができた。500mlを通水した場合には1段目の捕集管で68.9~74.4%、1000mlを通水した場合は42.8~44.0%しか捕集されず2段目、3段目の捕集管へと破過していた。しかし、500mlを通水した場合、1段目と2段目の捕集管で100%捕集されていた。従って、200mlの水試料を処理する

Table 3 Recoveries of amitrole in river water

Amount added (ng)	recovery (%)	RSD* (%)
2	88.5	3.6
20	105	4.0

RSD*: Relative standard deviation n=6

場合には1本の捕集管、さらに500mlの水試料を処理する場合には2本の捕集管が必要であった。

3.5 検量線および検出限界(MDL)

0.1ng/ml~100ng/ml濃度範囲で検量線を作成したときの相関係数は1.00で良好な直線性が得られた。化学物質分析法開発マニュアル¹³⁾に基づいて0.2ng/ml標準液の測定値の標準偏差から計算した装置の検出限界は0.022ng/mlであった。

測定方法の検出限界(MDL)は、アミトロールの濃度を0.0025, 0.005および0.01ng/mlに調製した水試料200mlを2.3の操作手順に従って処理し、分析したときの測定値の標準偏差から化学物質分析法開発マニュアル¹³⁾に基づいて求めた。測定方法の検出限界(MDL)は0.001μg/lであった。標準のクロマトグラムを Fig. 5 に示した。

3.6 添加回収試験

アミトロールの濃度を0.01μg/l(A)および0.1μg/l(B)に調製したおのおの河川水200mlを2.3の操作手順に従って処理して実試料からの回収率

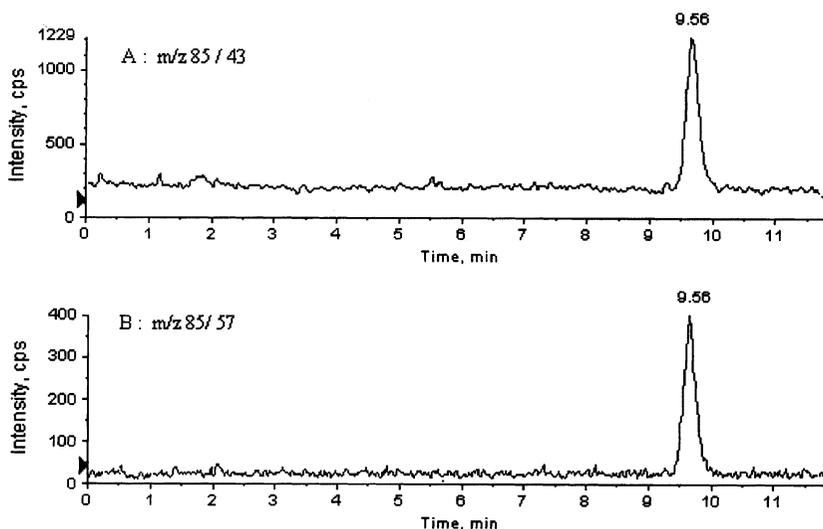
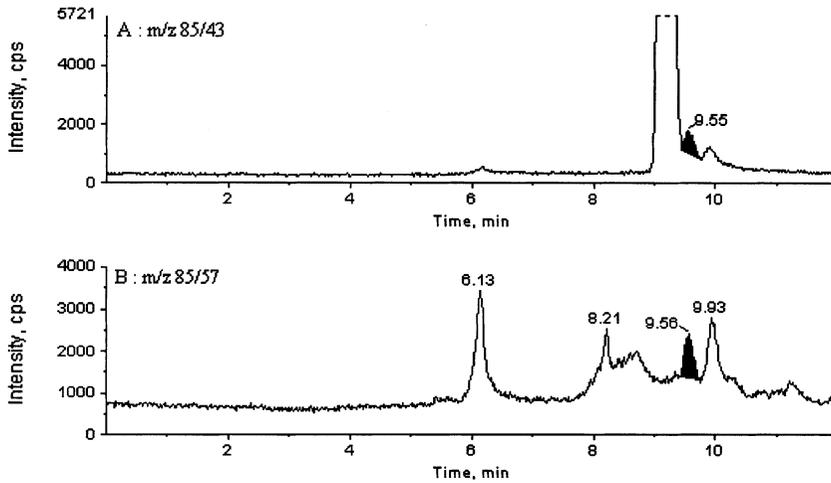
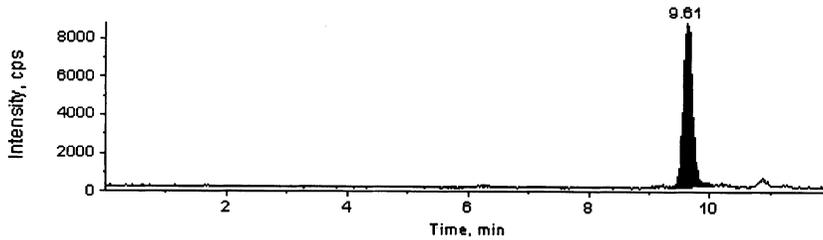


Fig. 5 LC/MS/MS-MRM chromatogram of standard solution (0.5 ng/ml) A: m/z 85/43, B: m/z 85/57



Sample water: river water in Osaka city
 Sample volume: 200 ml, Flow rate of Sample collection: 10 ml/min
 A: m/z 85/43, B: m/z 85/57

Fig. 6 LC/MS/MS-MRM chromatogram of river water in Osaka



Sample water: waste water leached from in landfill
 Sample volume: 100 ml Flow rate of Sample collection: 10 ml/min

Fig. 7 LC/MS/MS-MRM chromatogram of leachate from waste landfill (m/z 85/43)

を求めた。

試料溶液 A は 1 ml まで濃縮した試料を、試料溶液 B については溶出液そのものを分析試料溶液とした。各 6 試料溶液について前処理分析した結果、平均回収率は 88.5 および 105% であり、相対標準偏差は 3.6 および 4.0% であった。結果を Table 3 に示す。

3.7 実試料の分析

大阪市内の河川水 200 ml (平成 14 年 12 月下旬採水) を処理し、最終試料液 1 ml に濃縮して分析した。MRM 定量でのモニターイオン m/z 85/43 におけるマスクロマトグラムを Fig. 6(A) に示した。m/z 85/43 では、非常に大きなピークがアミトロールのピークの直前に出現し、アミトロールを定量するためには妨害となった。一方、m/z

85/57 で分析したクロマトグラムでは妨害となるピークは認められず、とくに妨害ピークを除くための試料水の処理は必要としなかった (Fig. 6(B))。したがって、このモニターイオンを用いて定量した。河川水中から微量ではあるが 0.004 $\mu\text{g/l}$ のアミトロールが検出された。

また、1 市の産業廃棄物埋立地の浸出水 100 ml を 2.3 の操作手順に従い処理し分析した。浸出水については溶出液そのものを分析試料溶液とし、m/z 85/43 で定量した結果、0.6 $\mu\text{g/l}$ 検出された。分析結果を Fig. 7 に示した。浸出水については m/z 85/43 で特に妨害となるピークは検出されなかった。

アミトロールは河川水および廃棄物埋立地浸出水からも検出されたように、水に溶けやすいこと

から様々な試料から検出されることが予想されるため、広範囲の環境試料等についての実態調査が必要と考える。

4. 結 論

環境水中のアミトロールをLC/MS/MSにより、誘導体化することなく直接分析することを目的として、前処理に固相抽出法を用いる分析方法について検討した。その結果、水質試料を捕集剤としてSep-Pak Plus AC-2カートリッジに通水して捕集した後、25%アンモニア水／クロロホルム／アセトニトリル(10/9/81)混合溶媒で溶出し、その溶出液をLC/MS/MSによるESI-Positive法で測定することでアミトロールを直接分析することができた。また、環境試料および飲料水等に含まれるpptレベルの低濃度アミトロールを精度良く定量できる方法である。なお、 m/z 85/43および m/z 85/57ともモニターイオンとして十分な測定精度があることから、実試料の分析についてはこの2つのイオンを同時にモニターすることにより精度を高めることが重要である。

(環境化学, vol.13 No. 2, 2003に掲載済, 本研究の一部は、環境省環境安全課の環境中化学物質安全性総点検調査により実施された。)

謝 辞

本研究を実施するにあたり、Applied Biosystems社からLC/MS/MS API 4000の装置を借用しました。ここに、謝意を表します。

要 約

LC/MS/MS法を用いて環境水中のアミトロールを誘導体化することなく直接分析する分析法を検討した。イオン化法はESI-Positive法を用い、LC分析の分離カラムにはDiscovery HS F5(4.6mm i.d. ×250mm, 5 μ m)を使用した。

河川水等環境水中のアミトロールは捕集剤(Sep-Pak Plus AC-2)に捕集し、25%アンモニア水／クロロホルム／アセトニトリル(10/9/81)混合溶媒で溶出する。溶出液10mlを適宜濃縮して分析する。捕集効率は97~100%であった。分析の繰返し測定精度の変動係数は6.9~8.0%であ

り、検出限界は0.001 μ g/lであった。市内の河川水から0.004 μ g/l, 産業廃棄物埋め立て地浸出水から0.6 μ g/lのアミトロールが検出された。

—参考文献—

- 1) Kirkwood R. C.: The relationship of metabolism studies to the modes of action of herbicides. *Pestic. Sci.*, 14, No. 4, 453-460(1983)
- 2) Steinhof D., Weber H., Boehme K., and Mohr U., Evaluation of amitrole for potential carcinogenicity in orally dosed rats, mice and golden hamsters: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 69, No. 2, 161-169(1983)
- 3) Mattioli F., Robbiano L., Fazzuoli L. and Baracchini P.: Studies on the Mechanism of the Carcinogenic Activity of Amitrole. *Fundam. Appl. Toxicol.* 23, No. 1, 101-106 (1994)
- 4) Galoux M., Van Damme, J-C. and Bernes A.: Colorimetric determination of 3-amino-1, 2, 4-triazole in grain or meal. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 65, 24-27(1982)
- 5) Soulier J., Farines M. and Vicens G.: Microanalysis of aminotriazole by high performance liquid chromatography. *Anal. Tech. Environ. Chem.* 203-209(1980)
- 6) Gracia Sanches F., Navas Diaz A., Gracia Pareja A., and Bracho V.: Liquid chromatographic determination of asulam and amitrole with pre-column derivatization. *J. Liq. Chromatogr. Relat Technol.*, 20, No. 4, 603-615(1997)
- 7) Wechsler K., Exinger A., Rombourg M., Breuzin C.: Analyse de pesticides a structure triazolique par electrophorese capillaire: possibilities et limites de la methode. *Ann Falsif Expert Chim Toxicol*, 87, No. 924, 23-24(1994)
- 8) Pichon V. and Hennion M-C.: Comparison of on-line enrichment based on ion-pair and cation-exchange liquid chromatography for the trace-level determination of 3-amino-1, 2, 4-triazole (aminotriazole) in water. *Anal. Chim. Acta.*, 284. No. 2, 317-326(1993)
- 9) Von Der Poll J. M., Vink M., and Quijrijs J.K.: Determination of amitrole in plant tissues and sandy soils by capillary gas chromatography with alkali flame ionization detection. *Chromatographia*, 30, No. 3/4, 155-158 (1990)
- 10) Pachinger A., Eisner E., Begutter H., and Klus H.: A simple method for the determination of amitrole in drinking and ground water. *Fresenius J. Anal. Chem.* 342, 413-415 (1992)
- 11) Bobeldijk I., Broess K., Speksnijder P. and Van Leer-dam, T.: Determination of the herbicide amitrole in water with pre-column derivatization, liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 938, No. 1/2, 15-22(2001)
- 12) Andreolini F., Borra C., Caccamo F., Corcia A. D. and Samperi R.: Estrogen Conjugates Late-Pregnancy Fluid: Extraction and Group Separation by a Graphitized Carbon Black Cartridge and Quantification by High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* 59, 1720-1725 (1987)
- 13) 化学物質分析法開発マニュアル 昭和62年3月 環境庁環境保健部保健調査室