ノート

LC-MS/MS による農産物中のヒドラメチルノンの分析

(平成 22 年 5 月 28 日受理)

高橋邦彦^{1,*} 松本隆二¹ 根本 了² 松田りえ子²

Analytical Method of Hydramethylnon in Agricultural Products by LC-MS/MS

Kunihiko TAKAHASHI^{1,*}, Ryuji MATSUMOTO¹, Satoru NEMOTO² and Rieko MATSUDA²¹Saitama Institute of Public Health: 639-1 Kamiokubo, Sakura-ku, Saitama-shi, Saitama 338-0824, Japan;²National Institute of Health Sciences: 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; * Corresponding author

A simple determination method of hydramethylnon in agricultural products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was developed. The sample was homogenized with phosphoric acid and extracted with acetone. An aliquot of crude extract was re-extracted with hexane and *sat.* NaCl solution. In the case of tea leaf, solidification processing using ammonium chloride and phosphoric acid was performed before re-extraction with hexane. Clean-up was performed using a silica-gel mini column (500 mg). The LC separation was performed on a C18 column using methanol-water (8:2) containing 10 mM ammonium acetate as the mobile phase and MS detection with positive ion electrospray ionization. The calibration curve was linear between 0.002–0.2 µg/mL of hydramethylnon. Recoveries ($n=5$) of hydramethylnon from 10 kinds of agricultural products fortified at 0.01 µg/g (0.05 µg/g for pineapple) were 82–110%, and their relative standard deviations were 2–12%.

(Received May 28, 2010)

Key words: ヒドラメチルノン hydramethylnon; 農産物 agricultural product; 液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析法 LC-MS/MS

はじめに

ヒドラメチルノン (Fig. 1) は、アミジノヒドラジン骨格を有する殺虫剤で、アリ、ゴキブリおよびシロアリなどに殺虫作用を有する。日本では農薬としての登録はされていないが、毒餌タイプのアリやゴキブリ駆除用殺虫剤として販売されている。

わが国の食品衛生法によるヒドラメチルノンの残留基準は、パイナップルに暫定基準値として 0.05 ppm が設定されているだけである。このため、パイナップル以外の食品には一律基準値 (0.01 ppm) が適用されることから、定量限界 0.01 ppm 以下を満足する分析法が必要である。

今までにヒドラメチルノンの分析法に関する報告は非常に少ない。Stout ら^{1),2)} は ECD-GC, GC-MS, UV-LC や LC-MS による農産物や牧草を分析対象とした分析法を報告しているが、UV 検出器や ECD 検出器では感度が低い

Fig. 1. Structure of hydramethylnon

こと、ジクロロメタンや塩酸を用いる抽出法、GC 測定でのパックドカラムの使用など現代的ではなく、新たな分析法が必要であると考えられる。また、Reyzer ら³⁾ は Solid-phase microextraction (SPME)-LC-MS による水中のヒドラメチルノンの測定法を報告しているが、農産物を分析対象としているものではない。

そこで、高感度で選択性の高い LC-MS/MS を用いた農産物中のヒドラメチルノンの分析法を検討したので報告する。

* 連絡先 takahashi.kunihiko@pref.saitama.lg.jp

¹ 埼玉県衛生研究所: 〒338-0824 さいたま市桜区上大久保 639-1² 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

実験方法

1. 試料および試薬

試料は埼玉県内で市販されている玄米、大豆、ハウレンソウ、バレイショ、キャベツ、リンゴ、オレンジ、タマネギ、パイナップルおよび茶を用いた。

ヒドラメチルノン標準品は林純薬工業(株)製の残留農薬分析用標準品(純度 99.9%)を用いた。標準品 50 mg を精秤し、アセトンで 50 mL としたものを標準原液 (1 mg/mL) とした。さらに、標準原液をアセトンで 1 µg/mL に希釈し標準溶液とした。標準溶液を適宜メタノール-水 (4:1) 混液で希釈し検量線用標準液とした。

凝固液は塩化アンモニウム 2 g およびリン酸 4 g に水を加えて 400 mL とした。

シリカゲルミニカラムは Sep-Pak Vac Si (500 mg) (Waters 社製) を使用し、あらかじめアセトン-ヘキサン (1:4) 混液 5 mL でコンディショニングした。

ヘキサン、アセトンおよび無水硫酸ナトリウムは残留農薬分析用、メタノールは液体クロマトグラフィー用、その他の試薬は特級を使用した。

2. 装置

液体クロマトグラフは Waters 社製 Alliance 2695、質量分析装置は Waters 社製 Quattro Premier を使用した。

3. 測定条件

LC-MS/MS の測定条件は、Table 1 に示した。

Table 1. LC-MS/MS operating conditions and MRM parameters

Parameter	Setting
LC conditions	YMC-pack Pro C18 (2.0 mm×150 mm, 3 µm)
Column	A=water
Mobile phase	B=methanol C=200 mM ammonium acetate A:B:C=15:80:5
Isocratic elution	
Flow rate	0.2 mL/min
Injection volume	5 µL
Column temperature	40°C
MS conditions	
Ionization mode	Electrospray ionization (positive mode)
Capillary voltage	3.5 kV
Source temperature	120°C
Desolvation temperature	400°C
Cone gas flow	N ₂ , 50 L/hr
Desolvation gas flow	N ₂ , 900 L/hr
Collision gas	Ar
Transition	
MRM transition Precursor (<i>m/z</i>) >Product (<i>m/z</i>)	Cone voltage (V) Collision energy (eV)
495>323	35 30
495>171	35 40
495>151	35 50

4. 試験溶液の調製

4.1 抽出

野菜および果実は試料重量の半量の 3% リン酸水溶液を加えてホモジナイズし、試料換算で 20 g に相当する量を採取した。玄米、大豆および茶は粉碎し、425 µm のふるいを通過したものを使用し、玄米および大豆は 10 g、茶は 5 g を採り 3% リン酸水溶液 20 mL を加えて 30 分放置し湿潤させた。これにアセトン 100 mL を加えてホモジナイズした後、ケイソウ土を敷いたろ紙を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物はアセトン 50 mL で洗浄し、ろ液を合わせアセトンで正確に 200 mL としたものを抽出溶液とした。

茶以外の場合は抽出溶液 20 mL を採り、飽和塩化ナトリウム溶液 10 mL およびヘキサン 10 mL を加え 5 分間振とう後、上層を採り 40°C 以下で減圧濃縮した。水が残った場合には、エタノール 2 mL を加えて減圧濃縮し水分を除去した。この残留物にアセトン-ヘキサン (1:4) 混液 2 mL を加えて溶解した。

茶の場合は凝固液による操作を追加した。すなわち、抽出溶液 20 mL を採り、凝固液 20 mL およびケイソウ土 1 g を加えて混和し 5 分間放置後、3,500 rpm (2,330×*g*) で 5 分間遠心分離した。上澄液を採り、残留物は凝固液-アセトン (1:1) 混液 20 mL を加えて同様に操作した。液層を合わせ塩化ナトリウム 10 g およびヘキサン 60 mL を加えて振とう後、上層を採り減圧濃縮した。水が残った場合には、エタノール 2 mL を加えて減圧濃縮し水分を除去した。この残留物にアセトン-ヘキサン (1:4) 混液 2 mL を加えて溶解した。

4.2 精製

シリカゲルミニカラムに上記で得られた液を負荷し、アセトン-ヘキサン (1:4) 混液 5 mL で洗浄後、アセトン-ヘキサン (7:3) 混液 8 mL で溶出した。溶出液を減圧濃縮し、残留物をメタノール-水 (4:1) 混液 2 mL (茶の場合は 1 mL) で溶解したものを試験溶液とした。

5. 定量

試験溶液および標準溶液それぞれ 5 µL を LC-MS/MS に注入し、得られた MRM (Multiple Reaction Monitoring) クロマトグラムのピーク面積を用いて絶対検量線法で定量した。

結果および考察

1. LC-MS/MS 測定条件の検討

LC 条件は、分析カラムに逆相系の C18 カラムを用い、水-メタノール系の移動相とした。ヒドラメチルノンは弱塩基化合物であり、酢酸アンモニウムを添加することによりピーク形状が向上した。数種のカラム (Mightysil RP-18 GP, XTerra MS C18, XBridge C18, YMC-pack Pro C18 など) を検討した結果、いずれのカラムでも測定可能であったが、ピーク形状が比較的良好であった YMC-pack Pro C18 を使用した。

MSの測定条件として、エレクトロスプレーイオン化(ESI)法を採用し、MRMモードで測定した。ヒドラメチルノンは、イオン化モードにポジティブモードを用いることで感度良く測定できた。プロトン化分子 $[M+H]^+$ である m/z 495をプリカーサーイオンに用い、衝突解離によって生じた m/z 323を定量イオンに、 m/z 171および m/z 145を確認イオンに用いた。それぞれのモニターイオンに最適な条件をTable 1に示した。

本測定条件で、検量線は $0.002\sim0.2\mu\text{g/mL}$ ($5\mu\text{L}$ 注入)の範囲で良好な直線性($r\geq0.998$)が得られた。ヒドラメチルノンの 0.01 および $0.1\mu\text{g/mL}$ 標準溶液を各5回測定したところ、面積値の相対標準偏差はいずれも3%以内であった。

2. 前処理法の検討

2.1 抽出法および精製法の検討

まず、通知一斉分析法^{*1}を用いてヒドラメチルノンの分析が可能であるかを検討した。その結果、GC/MSでは感度が低く、LC/MSによる農薬等の一斉分析法I(農産物)ではグラファイトカーボン(GCB)から溶出せず、LC/MSによる農薬等の一斉分析法II(農産物)ではシリカゲルミニカラムでの洗浄液で溶出し、その溶出量は一定ではなく、いずれも適用が困難であった。そこで、個別分析法を検討した。

抽出溶媒として、一般的に用いられているアセトンを使用した。残留農薬分析では、アセトン抽出液からアセトン除去し、種々の有機溶媒で転溶抽出する方法が多用されている。しかし、アセトン抽出液の減圧濃縮時の突沸、有機溶媒転溶操作でエマルジョンが生成し遠心分離や長時間の放置が必要となるなどの問題点が生じた。これらの問題点を解消するため、抽出液を有機溶媒に転溶する際に、アセトン除去せずに飽和食塩水およびヘキサンを加えて抽出する方法⁴⁾を採用した。これにより、抽出時のエマルジョンの発生が抑えられ、減圧濃縮操作を省略でき、かつ、抽出操作は1回で十分であった。また、ヒドラメチルノンはLC-MS/MS測定で検出感度が高く、抽出液のすべてを用いて転溶操作をする必要がないため、アセトン抽出液の一部(1/10量の 20 mL)を用いることで使用溶媒量の減少と操作時間の短縮が図れた。抽出後の減圧濃縮で微量の水分が残存した場合は、エタノールを加えて減圧濃縮することにより除去した。なお、ヒドラメチルノンは揮発性が低く、減圧濃縮乾固による損失はなかった。茶においては転溶濃縮後に多量の残留物が存在し、ミニカラムに全量負荷することができず回収率が低下した。そこで、凝固液による操作を追加したところ、残留物を除去することができ回収率が向上した。

精製法としてミニカラムによる精製法を検討した。GCB、シリカゲル、SAXやSCXなどのイオン交換カラム

を検討した結果、シリカゲルミニカラムで十分な精製効果が得られた。ヒドラメチルノンはアセトン-ヘキサン(1:4)混液 5 mL の洗浄ではカラムに保持され、アセトン-ヘキサン(7:3)混液 8 mL ですべて溶出したことから、これらの条件で洗浄および溶出操作を行った。大豆や玄米の油脂分の多い農産物においても、シリカゲルミニカラムの洗浄段階で油脂成分が溶出し、それ以上の油分除去操作は不要であった。ホウレンソウ抽出液を用い、3種のシリカゲルミニカラム(Sep Pac Vac Si (Waters), Supelclean LC-Si (SUPELCO)およびBONDELUT-SI (VARIAN))を用いて堅牢性を検討した。各ミニカラム($n=2$)での結果について分散分析を行ったところ、有意差は認められなかった($p<0.05$)。

一方、ヒドラメチルノンは光分解性があることが報告^{5),6)}されている。そこで、実験室内(蛍光灯下)における試料抽出液中のヒドラメチルノンの分解について検討したが、分解は少なく実験に影響を与えることはなかった。

3.2 標準液添加後放置による分解防止

試料に標準溶液を添加し、30分間放置後に抽出操作を行ったところ、ホウレンソウ、バレイショ、オレンジで回収率が $40\sim50\%$ 台と低い結果となった(Table 2)。標準溶液添加後直ちに抽出操作を行うと、良好な回収率が得られたことから、標準溶液添加後30分間放置中に何らかの原因でヒドラメチルノンが分解し、回収率が低下したものと考えられた。そこで、一般的に酵素による分解の防止目的で用いられているリン酸を添加したところ、標準溶液添加後30分間放置しても、検討したすべての農産物で良好な回収率が得られた(Table 2)。農産物の種類や個体差により分解は一定ではないが、さまざまな農産物に対応するために、ホモジナイズの際にはすべてリン酸を添加することとした。

4. 添加回収実験

添加回収実験用試料として、残留基準値の設定されているパイナップルなど10種の農産物を選び、パイナップルは基準値の $0.05\mu\text{g/g}$ 、その他の試料では一律基準の $0.01\mu\text{g/g}$ となるようにヒドラメチルノンを添加した。標準溶液を添加後30分間放置したのち抽出操作を行った。この結果、5回測定における回収率は約 $82\sim110\%$ 、相対標準偏差は $2\sim12\%$ であった(Table 2)。ホウレンソウのMRMクロマトグラムをFig. 2に示したが、検討したすべての試料において分析に支障となるピークは認められなかった。本法による定量下限($S/N\geq10$)は $0.002\mu\text{g/g}$ (大豆、玄米および茶は $0.004\mu\text{g/g}$)であった。

謝 辞

本研究は、平成20年度食品に残留する農薬等の成分である物質の試験法開発事業(厚生労働省)により実施したものである。関係各位に深謝いたします。

^{*1}「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日付け食安発第0124001号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知)

Table 2. Recoveries of hydramethylnon from spiked agricultural products

Sample	Fortified ($\mu\text{g/g}$)	With addition of phosphoric acid ($n=5$)		Without addition of phosphoric acid ($n=2$)	
		Recovery (%)	R.S.D. (%)	Recovery (%)	R.S.D. (%)
Brown rice	0.01	109.8	5.7	114.9	2.9
Soybean	0.01	96.6	8.9	101.4	0.8
Spinach	0.01	82.6	6.1	56.9	14.3
Cabbage	0.01	91.9	2.7	71.6	4.3
Potato	0.01	95.3	2.0	56.4	0.1
Orange	0.01	92.4	6.7	42.7	12.9
Apple	0.01	104.0	10.7	94.4	17.1
Pineapple	0.05	93.3	10.7	102.2	3.8
Green tea leaf	0.01	96.7	11.9	89.1	8.7
Onion	0.01	81.7	9.4	75.4	2.1

R.S.D.: relative standard deviation

Fig. 2. MRM chromatograms (m/z 495 $\rightarrow$ m/z 323) of (A) spinach fortified with hydramethylnon (0.01 $\mu\text{g/g}$), (B) blank spinach and (C) hydramethylnon standard (0.01 $\mu\text{g/mL}$)

文 献

- 1) Stout, S. J., Steller, W. A., Tondreau, R., Manuel, A. J., daCunha, A. R. Residue methodology for AMDRO fire ant insecticide (AC 217,300) in pasture grass and crops. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 71–75 (1985).
- 2) Stout, S. J., Peterson, R. P., Tondreau, R., daCunha, A. R., Picard, G. L. Determination of hydramethylnon residues in grass by liquid chromatography with confirmation by liquid chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC Int.*, **78**, 862–867 (1995).
- 3) Reyzer, M. L., Brodbelt, J. S. Analysis of fire ant pesticides in water by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry or high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Analyt. Chim. Acta*, **436**, 11–20 (2001).
- 4) 高橋邦彦, 石井里枝, 斉藤貢一, 堀江正一. 野菜及び果実中の残留農薬分析における抽出法の検討. 埼玉県衛生研究所報, **33**, 81–83 (1999).
- 5) Vander Meer, R. K., Williams, D. F., Lofgren, C. S. Degradation of the toxicant AC 217,300 in amdro imported fire ant bait under field conditions. *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 1045–1048 (1982).
- 6) Mallipudi, N. M., Stout, S. J., Lee, A., Orloski, E. J. Photolysis of AMDRO fire ant insecticide active ingredient hydramethylnon (AC217,300) in Distilled Water. *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 1050–1057 (1986).