

LC/MSによる乳中のブロモキシニル定量法

眞壁祐樹*, 橋本博之, 長谷川康行, 佐二木順子, 宮本文夫

Determination of Bromoxynil in Milk by Liquid Chromatography with Mass Spectrometry

Yuhki MAKABE*, Hiroyuki HASHIMOTO, Yasuyuki HASEGAWA,
Junko SAJIKI, and Fumio MIYAMOTO

Summary

A rapid analytical method was developed using liquid chromatography with mass spectrometry (LC/MS) for the determination of bromoxynil (BXN) and bromoxynil octanoate (BXN-O) in milk. BXN and BXN-O were extracted from milk with acetonitrile containing hydrochloric acid. The acidified acetonitrile layer was separated by salting out, and the acetonitrile was evaporated to dryness *in vacuo*. Lipid was removed from the residue dissolved in *n*-hexane saturated acetonitrile by liquid-liquid extraction with acetonitrile saturated *n*-hexane. After evaporation of acetonitrile, the residue was dissolved in methanol for BXN analytical sample. On the other hand, the methanol solution was hydrolyzed with sodium hydroxide, followed by cleaning up with an Oasis HLB cartridge. The eluate with methanol was used for BXN plus BXN-O analysis. The limit of quantifications of both compounds in milk were 1.25ng/g. The recoveries of BXN and BXN-O from milk spiked at 70ng/g were 86-98%. BXN and BXN-O were not detected in 9 milks.

キーワード：ブロモキシニル；ブロモキシニルオクタノエート；液体クロマトグラフィー質量分析法；牛乳

Key Word : Bromoxynil; Bromoxynil octanoate; LC/MS; Milk

はじめに

ブロモキシニル (BXN) は、海外で穀物やたまねぎ、ならびに牧草に対して使用されている除草剤である。平成18年5月29日にいわゆるポジティブリスト制が施行されたことに伴い、BXN についても国際基準や欧米等の基準を参考に15品目の農産物および28品目の畜産物に対して暫定基準が設定されたほか、飼料安全法に基づいて飼料用の牧草に対しても残留基準値 (0.1 μ g/g) が設定されている。

平成18年5月、アメリカより輸入された乾牧草から基準を超える BXN が検出された¹⁾。本県でもその乾牧草を摂取した乳牛から生産された牛乳中の BXN を迅速に定量する必要が生じた。

BXN はオクタン酸がエステル結合したブロモキシニルオクタノエート (BXN-O) として市販されており、散布されたのち加水分解されて遊離型の BXN となる (Fig.1) ため、規制の対象は BXN のみである。BXN の分析法としては BXN-O を加水分解後に BXN とともにメチル化して GC/MS で測定する方法^{2,3)}が報告されているが、溶媒転溶操作や誘導体化など操作が煩雑であり、

結果を得るまで時間を要する。また、公定法として LC/MS を用いた多成分一斉分析法⁴⁾もあるが、これらの方法は農産物を分析対象としており、畜産物を対象としていない。

本報では、畜産物のうち、乳について BXN を LC/MS で迅速に測定する方法および、BXN の前駆体である BXN-O を加水分解後、固相抽出で精製し、BXN とともに測定する方法を検討した。また検討確立した分析法を用いて残留実態調査を行ったのであわせて報告する。

実験方法

1. 試料

分析法の検討には千葉県内で市販されている牛乳を用いた。残留実態調査では BXN が残留した乾牧草を摂取した乳牛から生産された牛乳を収去した。

2. 試薬および試液

農薬標準品：AccuStandard 社製の残留農薬試験用を用いた。

農薬標準溶液：標準品50mgを精秤し、アセトンに溶解して1,000 μ g/mLとしたものを標準原液とした。標準

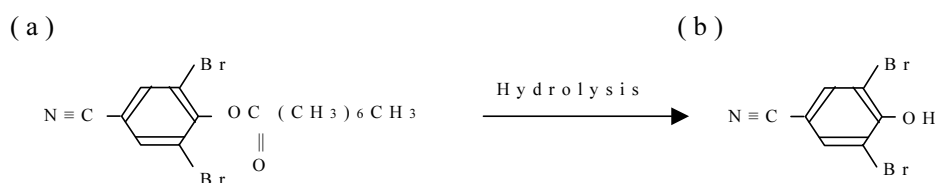


Fig.1 Chemical structures of BXN-O (a) and BXN (b)

溶液は標準原液をメタノールで適宜希釈して調製した。

有機溶媒: アセトニトリル、アセトン、*n*-ヘキサン、メタノールは和光純薬工業(株)製の残留農薬試験用を、LC/MSの移動相で用いるメタノールは和光純薬工業(株)製のLC/MS用を用いた。

その他の試薬:塩化ナトリウム(残留農薬試験用)、塩酸(試薬特級)、酢酸アンモニウム(試薬特級)、水酸化ナトリウム(試薬特級)、無水硫酸ナトリウム(残留農薬試験用)は和光純薬工業(株)製を用いた。

固相抽出用ミニカラム: Waters社製 OASIS-HLB (500 mg) (以下 HLB とする) に水10mLおよびメタノール10 mLを順次流してコンディショニングしたものを用いた。

3. 装置

高速液体クロマトグラフ: Waters社製 Alliance2695

質量分析装置: Waters社製 ZQ4000

4. HPLC 条件

分析カラム: Waters社製 SunFire C18 (2.1mm i.d.×150mm、粒子径3μm)、カラム温度: 40℃、移動相: A液 水、B液 メタノール、C液 100mmol/L 酢酸アンモニウム、グラジエント条件: 0分(A:B:C=80:15:5)→1~3.5分(55:40:5)→6分(45:50:5)→8分(40:55:5)→17.5~30分(0:95:5)→30~40分(80:15:5)、流速: 0.2mL/min、注入量: 5μL

5. MS 条件

イオン化法: ESI、ネガティブモード、分析モード: SRMモード、キャピラリー電圧: 3.0kV、コーン電圧: 35V、イオンソース温度: 120℃、コーンガス: N₂、50 L/hr、乾燥ガス: N₂、650L/hr、350℃、モニタリングイオン: 276.0 (定量)、274.0 (定性)

6. 定量

試験溶液 5μL を LC/MS に注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積から絶対検量線法により定量した。

7. 試験溶液の調製

乳20gを採りアセトニトリル50mLおよび4mol/L塩酸2mLを加え、pHを2以下にして3分間ホモジナイズした。これを遠心分離して上清を分取し、残渣にアセトニトリル50mLを加え再びホモジナイズし、遠心分離後に得られた上清を先の上清に合わせた。上清を分液ロートに移し、塩化ナトリウム10gを加えて10分間振とうした。静置後、有機層を採取し、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した後、溶媒を減圧乾固した。残渣にアセトニトリル飽和ヘキサン30mLを加えて溶解し、分液ロートに移した。さらにヘキサン飽和アセトニトリル30mLを加えて10分間振とうし、静置後、アセトニトリル層を分取した。これをさらに2回繰り返して、分取したアセトニトリル層を合わせて減圧乾固した。残渣をメタノール5mLに溶解し、うち1mLを0.45μmフィルターでろ過したものをBXN用試験溶液とした。残り4mLにメタノール16mLおよび1.5mol/L水酸化ナトリウム10mLを加え、30℃で1時間静置した。反応後、減圧濃縮してメタノールを

除去し、塩酸でpHを2以下にした。全量をHLBに負荷し、水10mLで洗浄後、メタノール10mLで溶出した。溶出液を減圧乾固したのち、残渣をメタノール4mLに溶解し、0.45μmフィルターでろ過したものをBXN+BXN-O用試験溶液とした。

以上の分析法の概要を Fig.2 に示す。

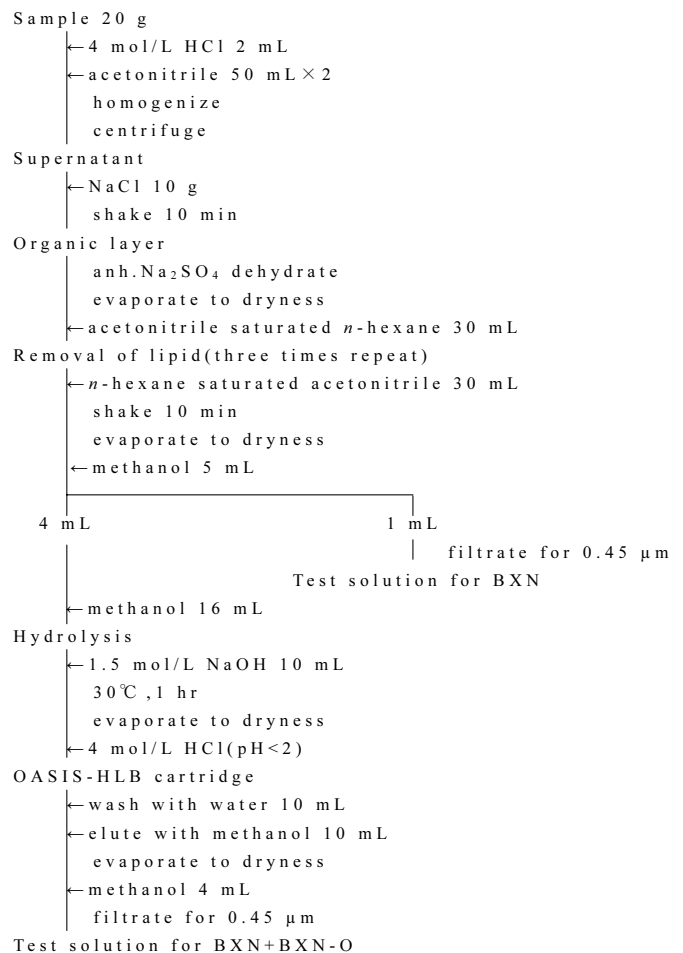


Fig.2 Analytical procedure for BXN and BXN-O

結果および考察

1. LC/MS 条件の検討

1 μg/mLに調製したBXN標準溶液をインフュージョンポンプを用いて測定し、LC/MS条件を検討した。Scanモードでは感度が得られなかったため、Single ion Monitoring (SIM) モードで測定することとした。定量イオンを用いて絶対検量線を作成したところ、0.005~0.5 μg/mLの範囲で良好な直線性が認められ、0.995以上の相関係数が得られた。また、BXNの定量下限は0.005 μg/mL (S/N≥10、試料換算0.00125 μg/g)であった。

2. 脱脂操作の検討

牛乳は分析を妨害する脂肪分を多量に含んでいることから脱脂操作を行う必要がある。脱脂操作としてはC18カラム⁴⁾、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC)、シリカゲルドライカラム、珪藻土カラム、アセトニトリルヘキサン分配などの方法がある。本報では迅速に検体を

処理する必要があったことから、アセトニトリル-ヘキサン分配とC18カラムを比較検討した。牛乳に対してそれぞれの脱脂操作を行い、操作前後の脂肪量を測定したところ、アセトニトリル-ヘキサン分配では脱脂操作前の残渣量が平均 $108.5 \pm 12.5 \text{ mg}$ (n=6)であったのに対し、操作後は $30.8 \pm 6.3 \text{ mg}$ と約70%の脂肪を除去することが可能であった。一方、C18カラムでは脂肪の除去率はアセトニトリル-ヘキサン分配とほぼ同等であったが、BXNの回収率が50-80%と低いうえにバラツキも大きかったため、本報ではアセトニトリル-ヘキサン分配を用い

ることとした。BXN無添加の牛乳から試験溶液を調製し、LC/MSでの妨害ピークの影響を検討したが、BXNの保持時間付近には定量下限値($0.005 \mu \text{ g/mL}$)の1/2以下のピークが検出されたのみで、定量にはほとんど影響を与えなかった(Fig.3)。一方、夾雑物の有無をみるために、試験溶液をGC/MSのFull scanモードで測定したところ、脂肪酸由来と思われる多数のピークを検出した(Fig.4)。これらの夾雑成分はカラムやMSに負荷をかけるため、今後、多数の検体を処理する場合は脱脂後の精製が必要となると思われる。

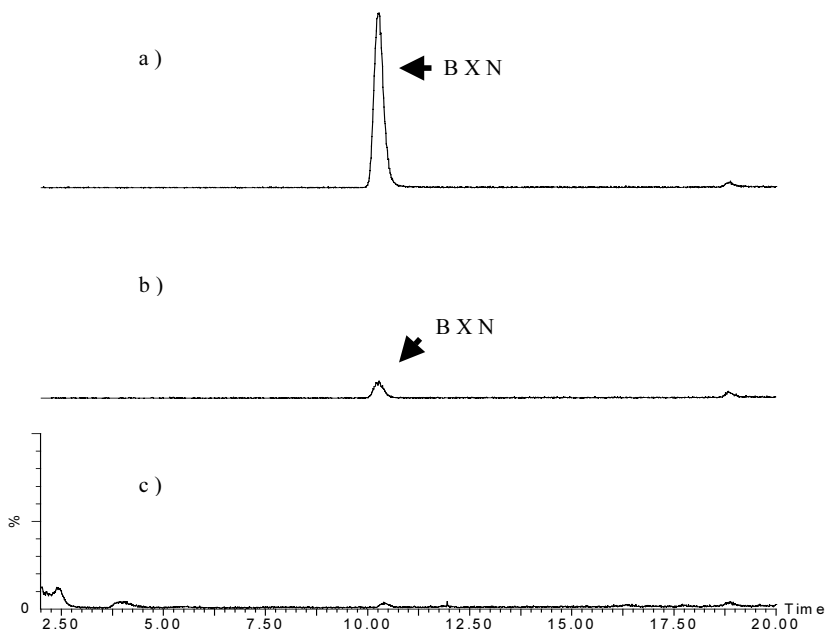


Fig.3 LC/MS chromatograms of BXN in the test solution and standard solution
 (a) standard solution of $0.05 \mu \text{ g/mL}$ BXN; (b) standard solution of limit quantification ($0.005 \mu \text{ g/mL}$ BXN); (c) test solution of milk (BXN is not spiked)

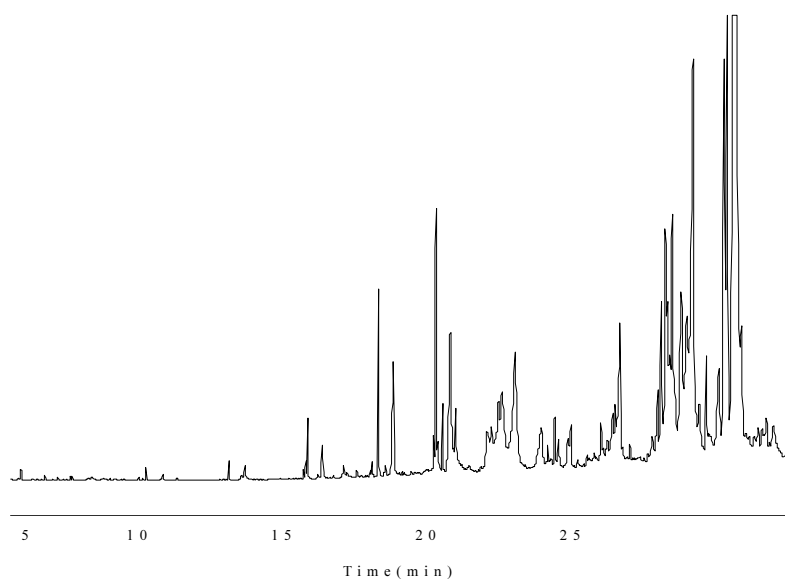


Fig.4 GC/MS total ion chromatogram of test solution for BXN
 Conditions : GC/MS : Trace GC2000 and Polaris Q (Thermo Fischer Electron); column: TR-5MS, $0.25 \text{ m} \times 30 \text{ m}$ (i.d.: $0.25 \mu \text{ m}$); column temperature: 50° C (1min)- 25° C/min - 175° C - 10° C/min - 300° C (10min); carrier gas: Helium; flow rate: 1.0 mL/min ; injection temperature: 240° C ; transfer line temperature: 280° C ; ion trap temperature: 250° C ; ionization voltage: 70 eV ; injection mode: splitless; injection volume: $2 \mu \text{ L}$

Table 1. Recoveries of spiked BXN and BXN-O in milk

Analyte	Recovery (%)*			
	Test solution for BXN		Test solution for BXN+BXN-O	
	Mean	RSD	Mean	RSD
BXN	97.5	2.71	95.0	0.12
BXN-O	—	—	86.0	2.79

*: Samples were spiked at 70 ng/g of each pesticide. Values are means of 5 trials (BXN) and 3 trials (BXN+BXN-O)

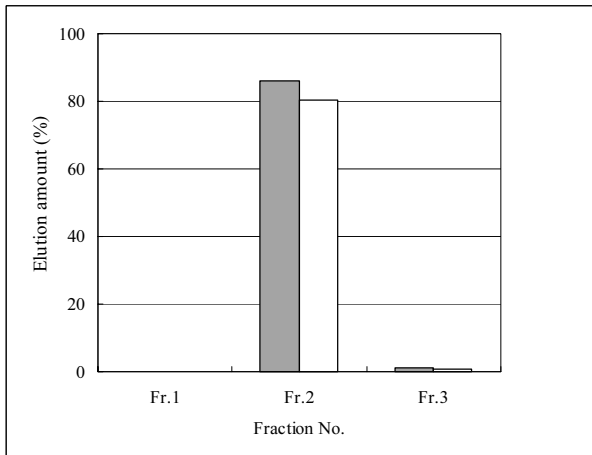


Fig.5 Elution profiles of BXN on HLB cartridge
Fr.1 : 10% methanol; Fr.2 : methanol; Fr.3 : methanol containing 2% ammonia water
■ : NaOH treatment; □ : ammonia solution treatment

3. 加水分解およびHLBからの溶出条件

前処理の時間を短縮するため、BXN-OをBXNに加水分解した後にHLBを用いて精製と濃縮を同時に行うことを試みた。10 μg/mL BXN-O標準溶液200 μLをメタノール20mLで希釈し、1.5mol/L水酸化ナトリウム5 mLまたはアンモニア水2 mLを加え30℃で1時間加温したあと、減圧濃縮してメタノールを除去した。5 mol/L塩酸でpHを2以下にして、HLBに全量を負荷した。HLBに10%メタノールを流し、次いで100%メタノール10mLおよびメタノール：アンモニア水(98:2)10mLを順次流してそれぞれを分取した。それぞれの画分についてBXNを測定したところ、Fig.5に示すように10%メタノールではBXNは溶出せず、100%メタノール画分でBXNが溶出した。メタノール：アンモニア水(98:2)でさらに溶出させたが、BXNは溶出しなかった。また、加水分解に用いる溶媒は、アンモニア水では回収率80.2%であったのに対し、1.5mol/L水酸化ナトリウムでは85.9%と水酸化ナトリウム溶液の方が高い回収率を示したため、水酸化ナトリウム溶液を用いることとした。

4. 添加回収試験

BXNまたはBXN-Oを食品衛生法の牛乳中の残留基準値である0.07 μg/mLとなるように市販の牛乳に添加し、30分間放置後に分析した結果をTable 1に示した。BXN

は加水分解未処理で93.0~99.9%と高い回収率を示した。加水分解処理を行ったBXN-Oの回収率は83.6~88.3%であった。加水分解処理後に測定したBXNは94.9~95.1%と加水分解未処理の回収率と同等であり、加水分解処理による影響はみられなかった。以上の結果から、加水処理前後でBXNを測定することによりBXNとBXN-Oを分別定量することが可能であると考えられた。

5. 残留実態調査

BXNが残留した乾牧草を摂取した乳牛から生産された牛乳9検体について、本法を用いて残留実態調査を行ったが、全ての検体においてBXNの残留は認められなかった。

まとめ

乳中のプロモキシニルを塩酸性下アセトニトリル抽出およびヘキサナーアセトニトリル分配という簡単な前処理のみで、誘導体化することなくLC/MSで直接分析することが可能となった。また、前駆体であるプロモキシニルオクタノエートも抽出、脱脂後に加水分解してHLBで精製することにより、プロモキシニルとプロモキシニルオクタノエートを分別定量することができた。

本法は迅速に測定することを目的としているため、精製操作を最小限に留めている。今後、多数の検体を分析するためには分析機器への負荷を軽減するため、脱脂後の精製がさらに必要であると思われる。

文献

- 1) 18消安第2886号 平成18年6月14日(2006)農林水産省消費・安全局長「輸入乾牧草の安全性確保について」
- 2) 杉村光永、豊田安基江、金森久幸(2004):GCによる農産物中のアイオキシニル、クロメプロップ及びプロモキシニルの同時分析法について、広島県保健環境センター報告、No.12、13-20
- 3) 堀切正賀寿、出納小枝、服部真由子、三井友紀子(2006):ガスクロマトグラフィーによる飼料中のプロモキシニルの定量、飼料研究報告、Vol.31、78-87
- 4) 食安発第024001号 平成17年1月24日(2005)厚生労働省医薬食品局食品安全部長「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」