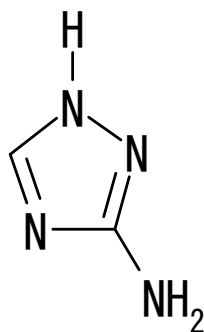


環境水中のアミトロールの分析

大阪府環境情報センター
上堀美知子



アミトロール

Amitrole

1, 2, 4-Triazole-3-ylamine

3-Amino-1H-1, 2, 4-triazole-

Aminotriazole

CAS 番号 : 61-82-5 $C_2H_4N_4$

物理化学的性状及び用途

分子量	融 点	比 重 (20°C)	蒸気圧 (mmHg,20°C)	log Pow	水溶解度 (25°C)
84.1	159°C	1.138	4.41×10^{-7}	-0.65	280g/L

溶 解 性

用 途

メタノール、エタノール、クロロホルムに可溶、酢酸エチルに微溶、エーテル、アセトンに不溶

除草剤(1962年農薬登録・1975年失効)、分散染料、樹脂の硬化剤

1. はじめに

アミトロールは、内分泌かく乱作用を有する可能性のある化学物質として「環境ホルモン戦略計画 SPEED'98」(平成 10 年 5 月環境庁) にリストアップされ、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た。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。分析は古くから比色分析法や高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法が用いられている。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。一方、直接分析する方法も報告されているが、検出限界は $0.1 \mu\text{g/L}$ 程度である。さらに、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法(LC/MS/MS)により検出限界が $0.025 \mu\text{g/L}$ とする方法が報告されているが、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、誘導体の生成に長時間を要する。

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、しかも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に適応できる方法である。

2. 分析方法

水質試料は固相カートリッジに一定流量で通水し、固相カートリッジに残っている水分を除き、25%アンモニア水/クロロホルム/アセトニトリル(10/9/81) 10 mL で溶出する。溶出液を直接あるいは濃縮して LC/MS/MS-MRM で分析する。

【試薬・器具】

[試薬]

- ・アミトロール：和光純薬工業(株)製の残留農薬試験用標準品
- ・アセトニトリル：和光純薬工業(株)製液体クロマトグラフ用
- ・クロロホルム：和光純薬工業(株)製液体クロマトグラフ用
- ・蒸留水：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・酢酸アンモニウム：和光純薬工業(株)製試薬特級

[試薬の安全性・毒性]

- ・アミトロール：発癌性分類 (IARC : 2B, ACGIH : A3, NTP : b, 日 : A3)
- ・アセトニトリル：眼、皮膚、気道を刺激する
- ・クロロホルム：強い麻酔作用がある。皮膚を刺激し、皮膚からも吸収される
- ・アンモニア水：息詰まるような刺激臭があり、激しく鼻やのどを刺激する

[器具]

- ・Waters 社製濃縮装置：試料の捕集に使用
- ・Sep-Pak Plus AC-2：Waters 社製
- ・20mL 容量注射器：Sep-Pak Plus AC-2 の洗浄及び水質試料を捕集した Sep-Pak Plus AC-2 の水分除去に使用

【試料の採取及び採取試料の保存】

環境庁「化学物質環境調査における試料採取にあたっての留意事項」に従う。採取後は速やかに前処理を行う。

【水質試料の捕集】

アセトニトリル10mL及び蒸留水20mLでコンディショニングした Sep-Pak Plus AC-2に、Waters 社製濃縮装置を用いて試料水を10mL/minの流速で200mL通水する（注1）。

【試料液の調製】

水質試料を通水した AC-2 カートリッジは、注射器で空気を通気して 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）10 mLで溶出する。溶出液を直接あるいは窒素ガスを吹き付けて1 mLまで濃縮し分析試料とする。

【標準溶液の調製】

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。

【測定】

〔測定条件〕

LC/MS/MS 条件

(a) LC 条件	: Agilent 社製 HP1100
カラム	: SUPELCO 社製 Discovery HS F5 (4.6mmφ×250mm,5μm)
溶離液	: アセトニトリル/10mM 酢酸アンモニウム (pH6.8) (75/25),
	: 0.3 mL/min
カラム温度	: 40°C
注入量	: 5μL
(b) MS 条件	: Applied Biosystems 社製 API4000
イオン化法及び測定モード	: Turbo Ion Spray (ESI) -Positive
スプレー電圧	: 5000V
イオンソース温度	: 600°C
イオンソースガス	: 純空気 80mL/min
カーテンガス	: 窒素 30mL/min
モニターイオン	: 85→43 (m/z 85/43), m/z: 85→57 (m/z 85/57) (注2)

〔検量線〕

0.1ng/mL～100 ng/mL 濃度範囲でのアミトロールのアセトニトリル標準溶液を調製し、5 μL を注入して検量線を作成する。

〔定量及び濃度の算出〕

水質試料を通水した AC-2 カートリッジを【試料液の調製】に従って処理したものを分析試料とし、LC/MS/MS を用いて分析する。

$$\text{計算値 (pg/L)} = \text{LC/MS 検出量 (ng/mL)} \times \text{最終液量(mL)} \times 1000 / \text{試料量 (L)}$$

〔装置検出限界〕

本分析に用いた LC/MS/MS の装置検出限界 (IDL) を表 1 に示す (注 3)。

物質名	アミトロール
IDL (ng/mL)	0.01
IDL 試料濃度換算値 (µg/L)	0.05

〔検出限界及び定量限界〕

本分析法における検出限界及び定量限界を下記に示す (注 4)。

物質名	アミトロール
検出限界 (D×3) (µg/L)	0.001
定量限界 (D×10) (µg/L)	0.004

注 解

(注 1) 200mL 以上の試料水を通水する場合は、Sep-Pak Plus AC-2 カートリッジ 2~3 段接続して捕集する。

(注 2) 試料によりアミトロールの分析に妨害となるピークが検出される場合は、モニターイオン m/z 85/43 及び m/z 85/57 で分析する。

(注 3) 装置検出限界は、平成 11 年度環境化学セミナーの「分析法開発における IDL 算定手順の具体案」に従い次のように求めた。

IDL (Instrument Detection Limit)

物質名	アミトロール	
試料量 (mL)	200	
最終液量 (mL)	1	
注入液濃度 (ng/mL)	0.1	
装置注入量 (μ L)	5	
結 果	1	2380
	2	2510
	3	2280
	4	2300
	5	2380
標準偏差	90.6	
C.V. (%)	3.8	
IDL (ng/mL)	0.01	
IDL 試料濃度換算値 (μ g/L)	0.05	

(注4)検出限界及び定量限界は「昭和62年3月 化学物質分析法開発マニュアル(案)」に定められた方法に従い次のように算出した。

検出限界及び定量限界の定め方 (算定法)

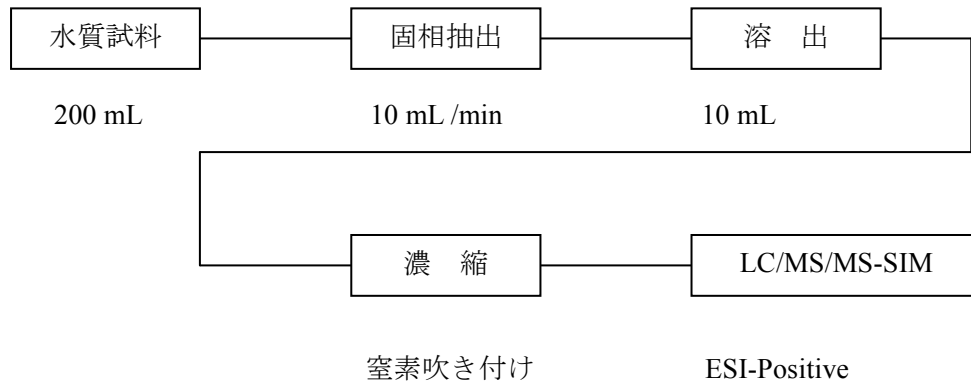
	水 質		
試料濃度(μ g/L)	0.0025	0.005	0.01
応答値(Intensity, cps)	9843	19236	36764
標準偏差	656	1543	2531
検出力 (Dn)	0.00020	0.00037	0.00064
検出限界 (D \times 3) (μ g/L)	0.00116		
定量限界 (D \times 10) (μ g/L)	0.00387		

3. 解説

【分析法】

[フローチャート]

水質試料の分析



[分析法]

1. 検量線

標準物質の検量線を図1に示す。アミトロールの濃度が0.1~100ng/mLになるように希釈調製した各アセトニトリル標準溶液5 μ LをLCに注入して作成した。

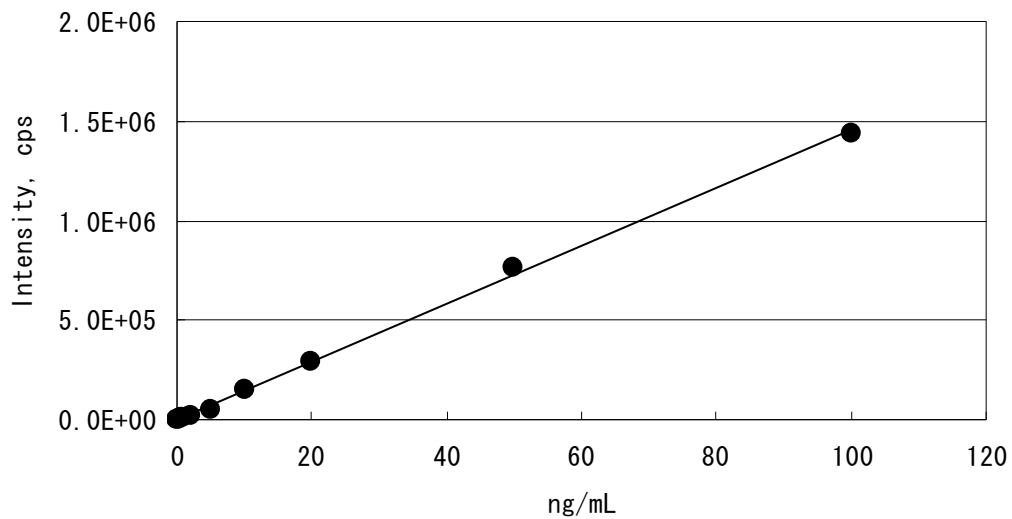


図1. 検量線

2. 捕集剤（固相カートリッジ）の検討

環境水中のアミトロールを測定するための捕集剤として活性炭、無極性充てん剤、スチレンジビニルベンゼン共重合体等ポリマー系及びグラファイト系活性炭等を充填した固相カートリッジについて検討した。各固相カートリッジに20ng/mLアミトロールを含む精製水を通水し、各固相カートリッジに保持されずに通過した溶液について分析した。

結果を図2に示す。AC-2 カートリッジを通過した溶液からはアミトロールはほとんど検出されなかった。

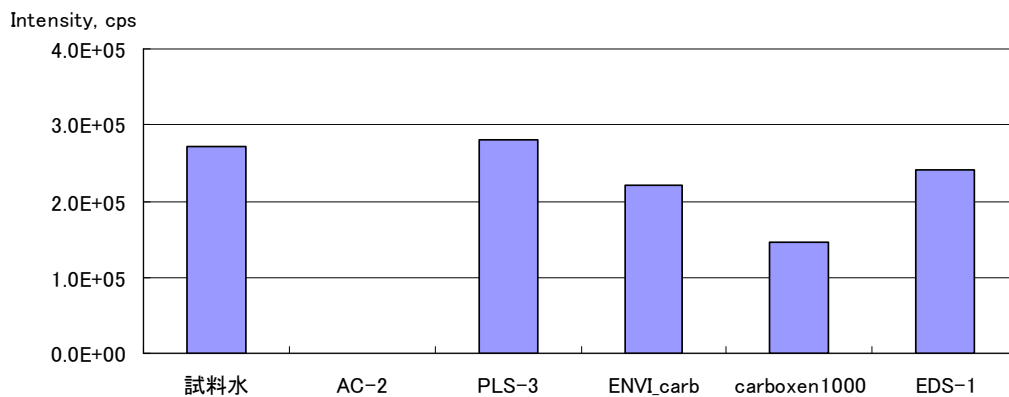


図2. 固相カートリッジを通過したアミトロールの量 (Intensity, cps)

3. 溶出溶媒の検討

各固相カートリッジにアミトロールを含む精製水を通水して捕集した後、固相からアミトロールを溶出する溶媒について検討した。溶出溶媒として(A)アセトニトリル、(B)ギ酸酸性アセトニトリル、(C)アルカリ性アセトニトリル、(D)クロロホルム/アセトニトリル (10/90)、(E)25%アンモニア水/クロロホルム/アセトニトリル (10/9/81) 等について検討した。その結果、(E)25%アンモニア水/クロロホルム/アセトニトリル (10/9/81) で90%以上の回収率が得られた。結果を図3に示す。

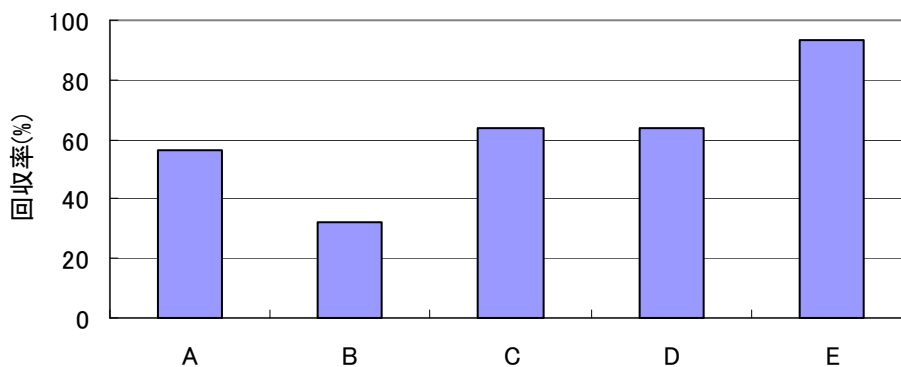


図3. 溶出溶媒と回収率

4. 添加回収試験

河川水にアミトロールを添加して 0.01 μ g/L 及び 0.1 μ g/L の溶液を調製し、添加回収試験を行った。結果を表2に示す。

表2 添加回収率

添加量 (ng)	試料量 (mL)	測定回数	回収率 (%)	RSD (%)
2	200	6	88.5	3.6
20	200	6	107	4.2

5. 標準物質のマススペクトル

標準物質のマススペクトルを図4に示す。

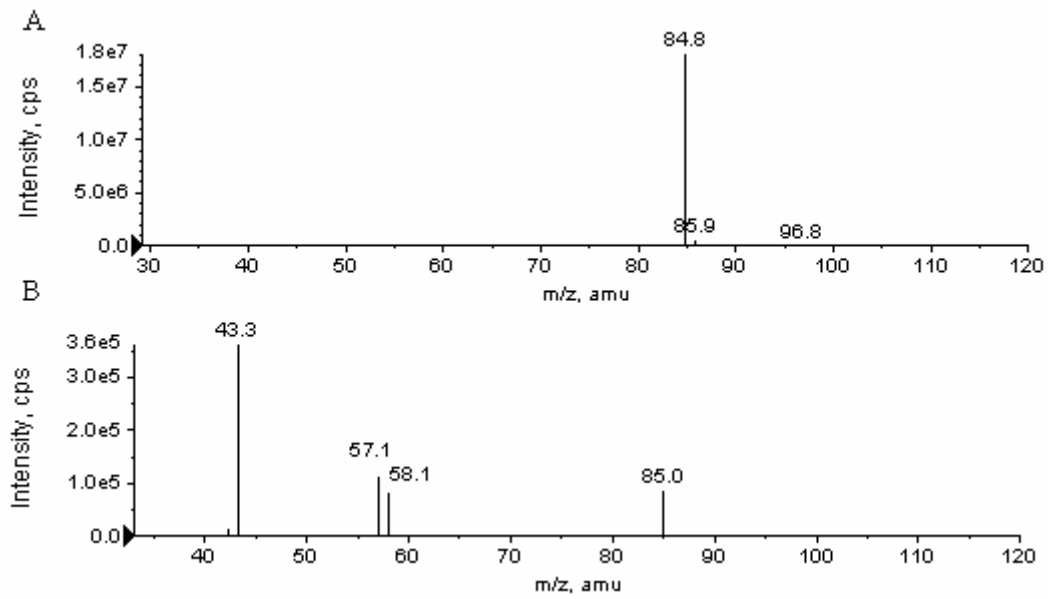


図4 標準物質のマススペクトル

A: Q1 スキャン B: プロダクトイオンスキャン

6. 標準物質のMRMクロマトグラム

標準物質のMRMクロマトグラムを図5に示す。

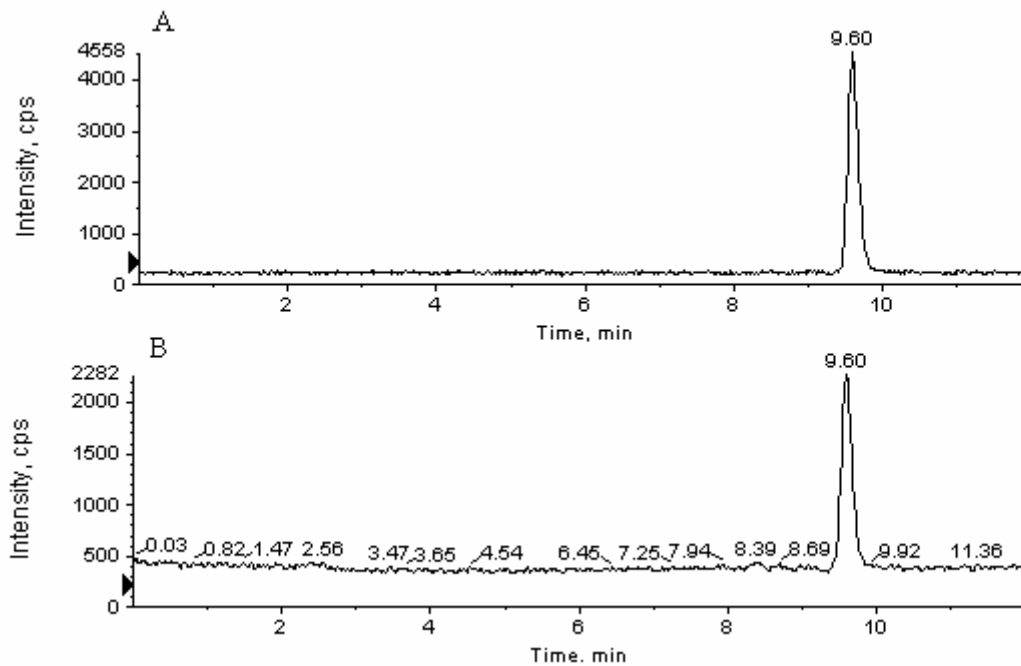


図5. 標準物質のMRMクロマトグラム

標準試料: 2ng/mL A: m/z 85/43 B: m/z 85/57

7. 環境試料水の分析例

(河川水)

大阪市内の河川水 200mL (平成 14 年 12 月下旬採水) を処理し、最終試料水 1mL に濃縮して分析した結果を図 6 に示す。

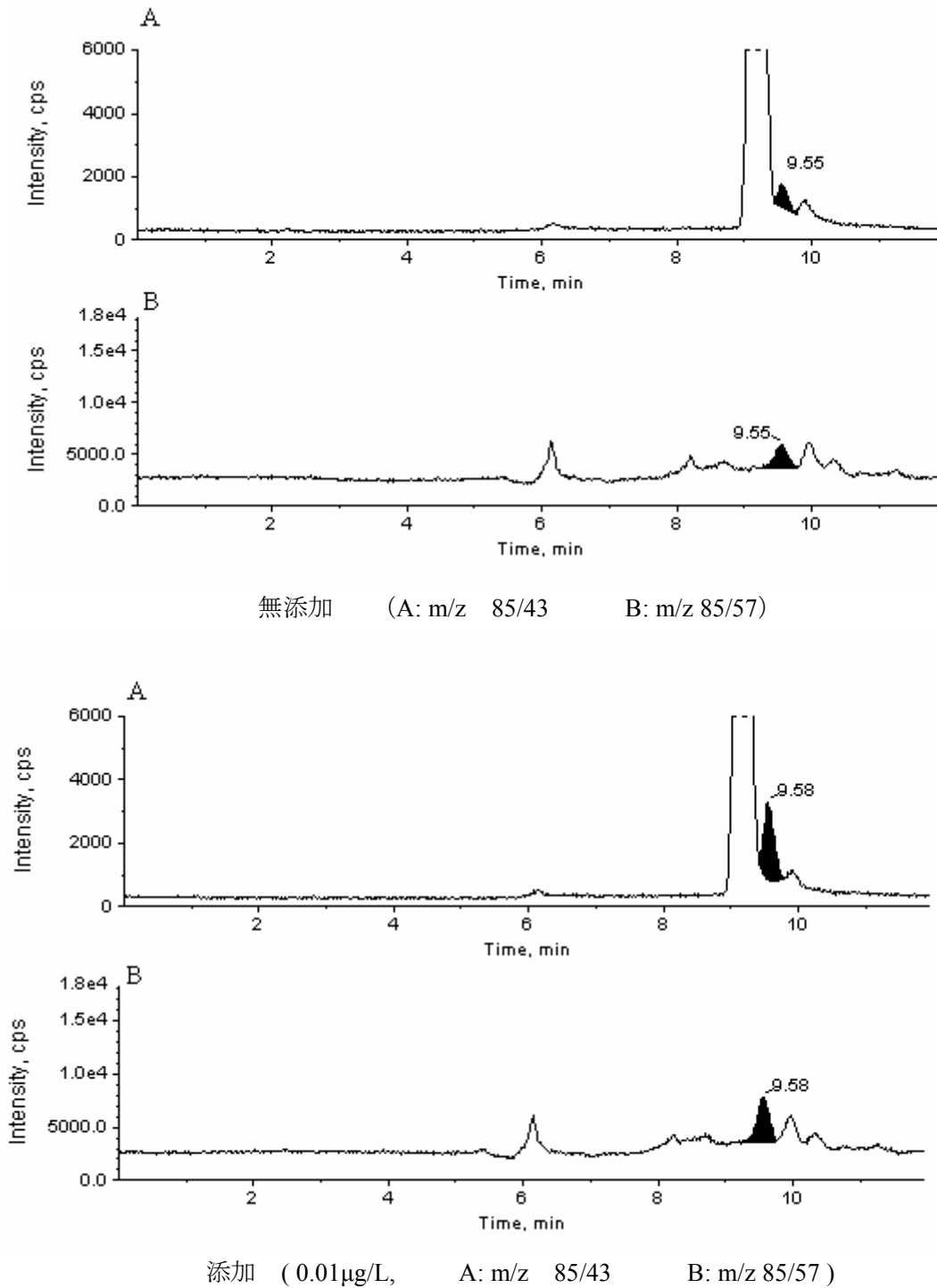


図 6 河川水の分析例 (amitrole : 0.004µg/L)

試料量 : 200 mL

測定した河川水ではモニターイオン m/z 85/43 で分析した場合、アミトロールのピークの直前に不明なピークが検出されたので、モニターイオン m/z 85/57 で再度分析した。

(廃棄物埋立地浸出水)

また、I市の産業廃棄物埋立地の浸出水 100mL を処理し分析した。浸出水については溶出溶液そのものを分析試料溶液とし、モニターイオン m/z 85/43 で特に妨害となるピークは検出されなかったため、 m/z 85/43 で定量した結果、0.6 μ g/L 検出された。分析結果を図7に示す。

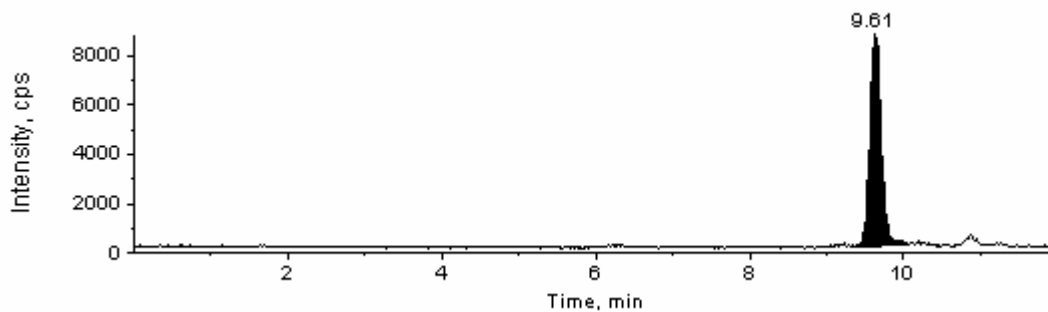


図7 廃棄物埋立地浸出水の分析例 (amitrole : 0.6 μ g/L)
試料量 :100 mL (濃縮操作なし)

【評価】

環境水中のアミトロールを LC/MS/MS により測定する方法である。
水質試料 200mL 程度を Sep-Pak Plus AC-2 カートリッジに通水捕集することで ppt レベルの分析ができる。

参考文献

- 1) 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)
- 2) Mattioli F, Robbiano L., Fazzuoli L. and Bara Cchini P.: Fundam. Appl. Toxicol. 23, No1, 101-106(1994)
- 3) Bobeljk 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)