

# 表層および堆積物中に含まれる ピレスロイドの高感度検出

## アプリケーションノート

### 著者

Stephan Baumann  
Agilent Technologies, Inc.  
Santa Clara CA 95051  
USA

### 概要

NCI GC/MS/MS とバックフラッシュを使用した Agilent 7000 シリーズトリプル四重極 GC/MS でピレスロイドの分析メソッドを開発しました。このメソッドでは水サンプルで 0.05 ppt、堆積物で 0.02 ppb という低い推定方法検出限界 (EMDL) が得られ、毒性を示すレベルのピレスロイドを水源で効率的に監視することが可能になります。

### はじめに

ピレスロイドは、除虫菊 (*Chrysanthemum cinerariaefolium* および *C. coccineum*) の花から得られる天然の殺虫剤、ピレトリンの合成誘導体です。ピレスロイドは、非常に毒性の高い有機リン酸塩や DDT に代わるものとして 30 年前に導入されました。天然ピレトリンは飛翔昆虫をすばやく落下させ、哺乳類に対する毒性が低く、環境中への残留性が低いといった特性があります。ただし、光や空気に曝されると急速に変質するため、屋外での使用では効能が低くなります。

合成ピレスロイドはピレトリンよりも大幅に変質が少なく、3500 を超える EPA 登録製品に含まれ、市販の殺虫剤として幅広く使用されています。ただし、哺乳類に対する毒性がピレトリンよりも非常に高く、魚やその他の水生生物に対してはきわめて低い濃度 (ppb) で高い毒性を示します。カリフォルニアの堆積物や水路で急性毒性レベルのピレスロイドが検出され、造園時などに害虫駆除に使用されたピレスロイドが住宅用水から流出したことが汚染の主な原因となっていることがわかりました [1]。したがって、都市および郊外の水源で水および堆積物中のピレスロイドを監視することは非常に重要であり、これには高感度の検出メソッドが必要です。



Agilent Technologies

最初は、ガスクロマトグラフと電子捕獲型検出器 (GC/ECD) を使用してピレスロイド分析を行っていました。その後、電子イオン化 (EI) モードでのガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC/MS) をメソッドとして採用しましたが、すべてのピレスロイドを監視するのに十分な感度はありませんでした。負イオン化学イオン化 (NCI) は、電子捕獲型検出器と同様にハロゲン化合物の求電子性を利用し、ピレスロイドの感度・選択性を向上させて検出することができます。

このアプリケーションノートでは、効率的な抽出手順、アジレントのキャピラリー・フロー・テクノロジーを用いたバックフラッシュ、NCI モードでの Agilent 7000 シリーズトリプル四重極 GC/MS を使用して、水および堆積物中のピレスロイドを高い感度で検出するためのメソッドについて説明します [2]。マルチプルリアクションモニタリング (MRM) MS/MS 分析では、0.01 ppb レベルのピレスロイドが検出可能で、ダイナミックレンジは 0.01~10 ppb となります。

## 実験

### 標準試料と試薬

すべての認定済みピレスロイド標準は Chem Service, Inc. (ウェストチェスター、ペンシルベニア州) から入手しました。キャリブレーション標準の検証用として、AccuStandard (ニューヘブン、コネティカット州) および Ultra Scientific (ノースキングスタウン、ロードアイランド州) から入手しました。個々のピレスロイドの原液はアセトン溶液で、これらを混合し、ピフェントリン、エスフェンバレレート/フェンバレレート、λ-シハロトリン、シフルトリン、およびペルメトリンの 6 種類の化合物が含まれる混合原液を調製しました。この混合液から、サンプル調製に使用するマトリックススパイク溶液をアセトンで生成しました。ピレスロイド混合原液は、イソオクタンで希釈し、0.01~10 ppb の範囲で機器のキャリブレーション混合液を調製するためにも使用しました。結果は、個々の立体異性体の濃度ではなく、各対象化合物の合計濃度として報告しました。ピレスロイドの定量には絶対検量線法を使用しました。

水サンプルのサロゲート (抽出とサンプル前処理のモニターに使用) には、Restek Corp (ベルフォント、ペンシルベニア州) から入手したジブromoオクタフルオロビフェニル (DBOB) を使用しました。堆積物サンプルでは、AccuStandard から入手したジブチルクロレンダート (DBCE) をサロゲートに使用しました。GPC キャリブレーション標準溶液は Ultra Scientific から、Florasil (60/100 メッシュ、PR グレード) は Floridin Corp (パークレースプリング、ウェストバージニア州) から入手しました。抽出物の精製には、OI Analytical のゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) カラム (J2 Scientific、コロンビア、ミズーリ州) を使用しました。PFE セルロースフィルタは Dionex (ソルトレークシティ、ユタ州) から入手しました。

## 装置

実験は、マルチモード注入口 (MMI) を備え、負イオン化学イオン化 (NCI) モードの Agilent 7000B トリプル四重極 GC/MS に結合された Agilent 7890A ガスクロマトグラフで行いました。分析は、Purged Ultimate Union を用いたバックフラッシュを使用して実行しました (図 1)。機器の条件を表 1 に示します。

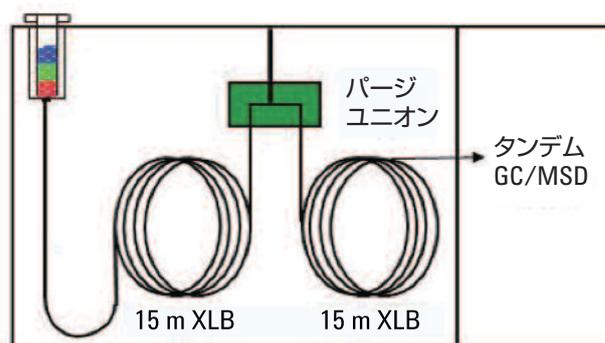


図 1. ミッドカラムバックフラッシュを使用したタンデム GC/MS システム構成。バックフラッシュでは、次の分析の前に分析に不要な溶出の遅い成分を注入口のスプリットフローベントからフラッシュすることで、これらの成分がカラム全体を通過し、Agilent トリプル四重極 GC/MS に入らないようにします。アジレントでは、バックフラッシュガスの付加による感度低下を最小限に抑える独自のバックフラッシュのアプローチを使用しています。ミッドカラムバックフラッシュの詳細については、技術概要 5990-5484EN をご覧ください

表 1. GC/MS 条件

**GC の条件**

プレカラム	DB-XLB 15 m x 0.25 mm、0.25 μm J&W 122-1212
分析カラム	DB-XLB 15 m x 0.25 mm、0.25 μm J&W 122-1212
注入量	2 μL
注入口温度	240 °C
注入モード	パルスドスプリットレス
オープンプログラム	150 °C、0 分間保持 30 °C/min で 150~220 °C、1 分間保持 5 °C/min で 220~300 °C、2 分間保持

ポストラン	時間 : 0.5 分間
オープンプログラム	プレカラム流量 : 19.7 mL/min 分析カラム流量 : 20 mL/min

キャリアガス	ヘリウム
トランスファーライン	300 °C
温度	

**MS の条件**

チューニング	NCI アンモニアオートチューン
EMV ゲイン	25
取り込みパラメータ	マルチプルリアクションモニタリング (MRM) を使用した NCI モード
試薬ガス	アンモニア、35 % フロー
コリジョンガス	窒素、定流量、0.75 mL/min
クエンチガス	ヘリウム、定流量、2.25 mL/min
溶媒待ち時間	10 分間
MS 温度	イオン源 150 °C、四重極 150 °C

**サンプル前処理**

図 2 にまとめた手順で水および堆積物サンプルを前処理しました [3]。1 L の水サンプルを褐色ガラスボトルに採取し、4 °C で冷蔵し、できる限り早く抽出しました。すべての水サンプルに、ピレスロイド農薬スパイク溶液と DBOB サロゲートを添加しました。添加した水サンプルを手でよく振り、120 mL のジクロロメタン (DCM) で 2 回抽出しました。硫酸ナトリウムを使用して抽出液を脱水し、K-D ガラス容器を使用して蒸発させて約 2~5 mL にしました。次に、石油エーテル (PE) 約 50 mL を 3 回加えてサンプルの溶媒交換を行いました。この液を蒸発させて 5 mL にし、さらに 1 mL 未満に濃縮して、イソオクタンで最終ボリュームを 2 mL にしました。

堆積物サンプルはホモジナイズした後、33 mL 抽出セルとセルロースフィルタを取り付けた Dionex (ソルトレークシティ、ユタ州) の ASE 200 Accelerated Solvent Extractor を使用して、高圧流体抽出 (PFE) 法で抽出しました。抽出液の精製は、自動化されたゲル浸透クロマトグラフィーを使用して行いました。移動相には流量 5 mL/min のジクロロメタン (DCM) を使用しました。19 分間廃棄、24 分間収集、10 分間洗浄という GPC プログラムを使用しました。精製した抽出液を DCM から石油エーテルに溶媒交換し、11 mm x 300 mm カラムに 25 g の Florisil (60/100 メッシュ) を使用して分画しました。次に相当する分画を濃縮し、イソオクタンに再溶解して、最終ボリューム 2 mL にしました。

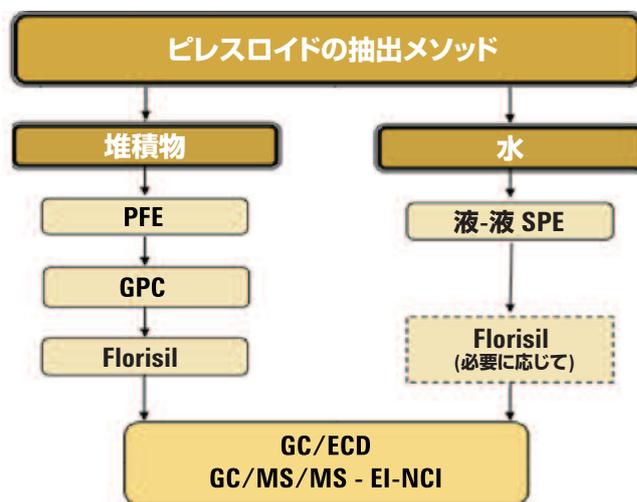


図 2. 水と堆積物のサンプル前処理手順の流れ図。PFE は Pressurized Fluid Extraction (高圧流体抽出)、GPC は Gel Permeation Chromatography (ゲル浸透クロマトグラフィー) の略です

**分析パラメータ**

使用したトリプル四重極 GC/MS のパラメータを表 2 に示します。

表 2. Agilent 7000B トリプル四重極 GC/MS の分析パラメータ

ピレスロイド	RT (分)	MRM	NCI モード		
			デュエル タイム (ミリ秒)	コリジョン エネルギー (EV)	ゲイン
ビフェントリン	11.30	386→205	100	4	25
		386→161	100	10	
シハロトリン	13.15	241→205	100	5	25
		241→35	100	5	
シフルトリン および シベルメトリン	16.34	209→37	75	5	75
		207→35	75	5	
		171→127	75	5	
デルタメトリン	19.57	297→81	100	4	25
		297→79	100	4	
フェンバレレート エスフェンバレ レート	18.60	213→169	75	4	25
		211→35	75	10	
ペルメトリン	14.58	209→37	100	5	75
		207→35	100	5	

## 結果と考察

### 最小検出限界の設定

ピレスロイドは、水または堆積物中に存在すると(場合によっては 1 ppb 未満で)水生生物に対して高い毒性を示すため、これらの化合物のテストに使用するメソッドには非常に低い検出下限が必要です。検出下限を設定するための有意な方法の 1 つに、LC<sub>50</sub> をガイドとして使用する方法があります。LC<sub>50</sub> は半数致死量であり、毒性物質により検体の半数が死亡する濃度として定義されています。ピレスロイドは堆積物中に隔離され、水中で分解されますが、水源から採取した水サンプルには、ピレスロイドによって汚染された可能性のある溶解固形物が含まれます。したがって、最小検出限界 (MDL) は、水では LC<sub>50</sub> に、堆積物では LC<sub>50</sub> の 10% に設定することができます。各生物の LC<sub>50</sub> とそれを考慮した必要な MDL の値を表 3 に示します。

表 3. 水および堆積物中のピレスロイドに必要な最小検出限界

合成ピレスロイド	水 ng/L (ppt)		堆積物 ng/g (ppb)		MDL の 目標: 10% LC <sub>50</sub>
	LC <sub>50</sub> オオ ミジンコ	LC <sub>50</sub> ミシッド シュリンブ	LC <sub>50</sub> ヨコエビ		
ビフェントリン	1600	4	5		0.5
シフルトリン	-	-	11		1.1
λ-シハロトリン	-	-	4.5		0.5
シベルメトリン	1000	5	3.8		0.4
エスフェンバレレート	150	-	15		1.5
ペルメトリン	320	46	108		11

MDL: 方法検出限界

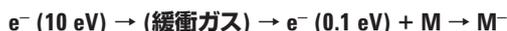
## NCI GC/MS/MS を使用した高感度検出

最初に、ガスクロマトグラフと電子捕獲型検出器 (GC/ECD) を使用してピレスロイド分析を実行しました。ただし、GC/ECD では偽陽性の発生率が高いため、電子イオン化 (EI) モードでの質量分析法を選択するメソッドとして採用しました。GC/MS/MS-EI は GC/ECD よりも大幅に高い選択性を示しますが、MDL のすべての要件を満たすほどの高い感度を備えていません。

負イオン化学イオン化 (NCI) では、電子イオン化質量分析法よりも選択性が高いため、複雑なマトリックスに含まれる電子親和性の高い化合物を検出し、定量することが可能になります。この方法では、これまでの電子捕獲型検出器と同様にハロゲン化合物の電子親和性の高さを利用します (図 3)。シフルトリンやベルメトリンなどのより重要なタイプ II ピレスロイドは、NCI では電気陰性です。ただし、従来の NCI 技術では検出されないタイプ I ピレスロイドが少なくとも 2 つ (レスメトリンおよびフェンプロパトリン) あります。アンモニアは、メタンに代わる試薬ガスとして広く使用されています。これは、アンモニアがメタンの 7 倍の熱平衡化能力を持っているからです [4]。

タンデム四重極質量分析装置を使用したときの利点は、プリカーサイオンからプロダクトイオンへの選択性の高いトランジションを選択できるため、干渉が最小限に抑えられ、S/N 比が最大化される点です。さらに、MS/MS を NCI モードで使用すると、選択性を維持しながら、EI モードよりも感度が大幅に高くなります。

### 負イオン化学イオン化



NCI の特性

- 電子親和性の高い分子だけが熱電子を取り込むことができる
- 電子捕獲はハロゲン化合物できわめて効率的なため、高い感度が得られる
- 一般的なマトリックスには電子は捕獲されず、汚染またはマトリックスによる影響を受けにくく、検出限界は非常に低くなる

図 3. 負イオン化学イオン化のプロセス

## EMDL、IDL、および定量

GC/MS/MS-NCI メソッドでは、水の 500 倍濃縮サンプルにおいて、ピレスロイドで設定されたほとんどの MLD よりも十分に低い推定メソッド検出限界 (EMDL) を得ることができます (表 4)。このメソッドは、0.01 ng/L、つまり水サンプルで 0.01 ppt までの感度でデルタメトリンを検出可能です。イソオクタン標準溶液での機器検出限界 (IDL) も表 4 に示します。この機器でのデルタメトリン検出におけるダイナミックレンジは最大で 10 ppb となり、検量線においても優れた R<sup>2</sup> 値 (0.9974) が得られました (図 4)。シベルメトリンは、水サンプル中では 0.1 ppt の濃度まで検出されます。この機器での検出のダイナミックレンジは最大で 10 ppb となり、検量線においても非常に高い R<sup>2</sup> 値 (0.9996) が得られました (図 5)。

表 4. アンモニア MS/MS-NCI 機器検出限界 (IDL) および推定方法検出限界 (EMDL)\*

合成ピレスロイド	推定方法検出限界 (EMDL)		
	IDL µg/L	水 ng/L	堆積物 ng/g
ビフェントリン	0.01	0.05	0.01
シフルトリン	0.05	0.1	0.2
λ-シハロトリン	0.02	0.05	0.02
シベルメトリン	0.05	0.1	0.18
デルタメトリン	0.005	0.01	0.03
エスフェンバレレート	0.001	0.05	0.05
ペルメトリン	0.05	0.1	1.5

推定 EMDL 値は、元の水サンプルを 500 倍濃縮、または水分を 50 % 含む 10 g の堆積物サンプルを 1 mL にした場合の値になります。EPA では、方法検出限界を「対象物質を含む与えられたマトリックスサンプルの測定において、99 % の信頼度で対象物質の濃度が 0 よりも大きいと測定、レポートできる最小の濃度」と定義しています。

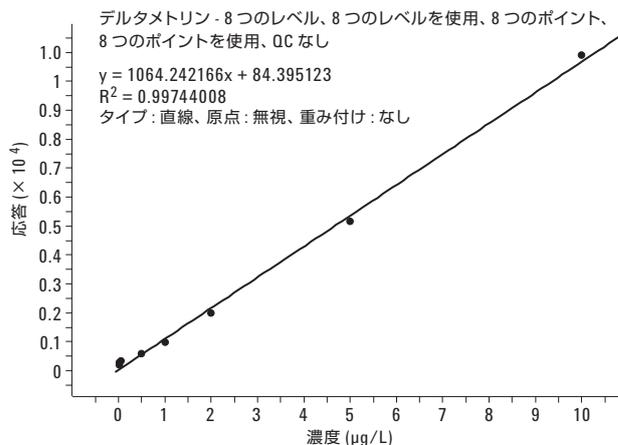


図 4. NCI GC/MS/MS でアンモニアを試薬ガスとして使用したときの、濃度範囲 0.01~10 µg/L のデルタメトリンの検量線

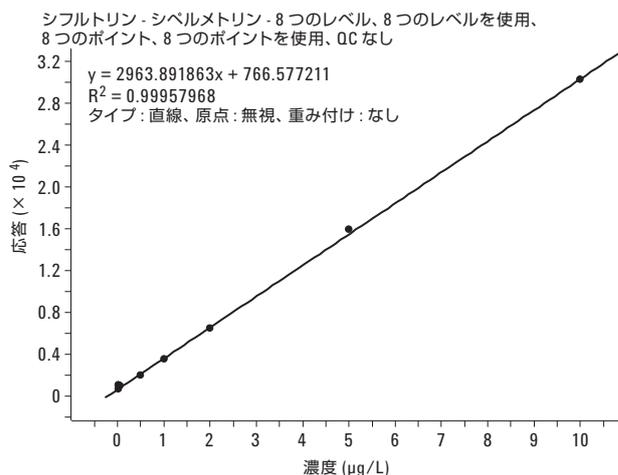


図 5. NCI GC/MS/MS でアンモニアを試薬ガスとして使用したときの、濃度範囲 0.050~10 µg/L のシベルメトリンの検量線

## 結論

アンモニア NCI GC/MS/MS 分析はピレスロイドの水および堆積物サンプル抽出物の分析において、既存の GC/ECD および GC/MS/MS-EI メソッドよりも高い感度と選択性が得られます。NCI GC/MS/MS を使用したときの EMDL は水および堆積物についてシフルトリンやペルメトリンなど、タイプ II ピレスロイドが毒性を示す値よりも十分に低い値となります。この方法によるピレスロイドの分析により、水性生物の安全性を確保するために必要な ppb 未満の検出限界が得られます。

## 参考文献

1. Weston D. P., Holmes R. W., You J., Lydy M. J. "Aquatic toxicity due to residential use of pyrethroid insecticides." *Environ Sci Technol.* **39**, 9778-9784 (2005).
2. Presentation by Dr. Abdou Mekebri at the September 29, 2010 Bay-Delta Science Conference.
3. Mekebri, D. B. Crane, G. J. Blondina, D. R. Oros and J. L. Rocca "Extraction and Analysis Methods for the Determination of Pyrethroid Insecticides in Surface Water. "Sediments and Biological Tissues at Environmentally Relevant Concentrations." *Bull Environ Contam Toxicol.* **80**, 455-60. (2008).
4. Modern Practice of Gas Chromatography, R.L. Grob and E.F. Barry (Eds.), John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 4th ed., p. 382 (2004).

## 詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web サイト ([www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)) をご覧ください。

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc., 2012

Printed in Japan

March 29, 2012

5991-0116JAJP



**Agilent Technologies**