

原著

LC/MS/MSを用いた水質中テトラメトリンの分析法の開発

塚谷裕子・飛石和大

環境水中におけるテトラメトリンの濃度を把握することを目的として、分析法の開発を行った。水質試料にアスコルビン酸及びメタノールを添加し、固相抽出カートリッジ（Sep-Pak C8 Plus）に通液しメタノールで溶出後、LC/MS/MS-SRM (ESI-Positive) で分析した。装置検出下限 (IDL) は0.0024 ng/mL、分析法の検出下限 (MDL) は0.035 ng/L (河川水) 及び0.029 ng/L (海水) であった。本法を用いて福岡県内河川水及び海水試料を測定したところ、いずれもテトラメトリンは検出されなかった。

[キーワード：テトラメトリン、LC/MS/MS、固相抽出]

1 はじめに

テトラメトリン (別名 ; シクロヘキサ-1-エン-1,2-ジカルボキシイミドメチル=(1RS)=cis-trans-2,2-ジメチル-3-(2-メチルプロパ-1-エニル)シクロプロパンカルボキシラート) は、医薬部外品原料 (防疫用殺虫剤) として使用されている¹⁾。しかしながら、生態系への影響が懸念されている化学物質である (魚類急性毒性値LC₅₀:0.0037 mg/L²⁾)。環境省では既報³⁾の毒性情報に基づき、環境水中のテトラメトリン濃度の把握が必要であるとして、要求下限を0.037 ng/Lと設定している。テトラメトリンは「特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善の促進に関する法律 (化管法)」において「第一種指定化学物質」であり、国内における環境中残留実態の把握が必要とされている。これまで、固相抽出や固相マイクロ抽出等を用いた環境水中のテトラメトリンを含む多成分同時分析等に関する報告がなされているが³⁻⁵⁾、テトラメトリンについて環境省が設定した要求下限を満たす分析法は報告されていない。そこで、環境省設定要求下限を満たす水質中のテトラメトリン分析法の開発を行った。抽出法は、液液抽出よりも使用溶媒量の少ない固相抽出法を用いた。開発した分析法を、福岡県内河川水及び海水試料に適用したので報告する。

2 方法

2・1 試薬

テトラメトリン (純度 100%) は AccuStandard (New Haven CT USA) 製、メタノール (LC/MS 用)、超純水 (LC/MS 用)、ギ酸 (LC/MS 用 ; 純度約 99%)、L(+)-アスコルビン酸 (試薬特級) は富士フィルム和光純薬 (株) (大阪) 製を使用した。

2・2 器具及び装置

水質試料からの抽出には、Sep-Pak C8 Plus (Waters製、Milford MA USA) カートリッジによる固相抽出を行った。ろ過操作にはガラス繊維ろ紙GS-25 (55 mmφ; ADVANTEC (東京) 製) を使用した。固相通液には、Sep-Pak コンセントレーター (Waters 製、Milford MA USA) を用いた。LC/MS/MS 測定は Alliance 2695/Quattro micro API (Waters 製、Milford MA USA) を用いた。定量は、ESI-Positive-SRM 法により行った。測定条件を表 1 に示す。

表1 LC/MS/MSの測定条件

LC	
機種	Waters製 Alliance 2695
カラム	Waters製 X Bridge C18 (2.1×150 mm, 5 μm)
カラム温度	40℃
移動相	A: ギ酸/超純水 (0.1:99.9) B: ギ酸/メタノール (0.1:99.9) 0→5 min A:50→0, B:50→100 linear gradient 5→15 min A:B=0:100 15→25 min A:B=50:50
流量	0.2 mL/min
注入量	10 μL
MS	
機種	Quattro Micro API
イオン化法	ESI-Positive
キャピラリー電圧	1.2 kV
コーン電圧	20 V
ソース温度	100℃
デゾルベーション温度	400℃
コーンガス量	100 L/hr
デゾルベーション流量	850 L/hr
コリジョン電圧	25 V
モニターイオン	m/z 332.1→164.1

2・3 水質試料

河川水 (雷山川加布羅橋 : N 33°33.900', E 130°11.417') 及び海水 (大牟田沖 : N 33°02.078', E 130°24.683') について、2015年10月に表層水を採取した。試料は採取後、水

福岡県保健環境研究所 (〒818-0135 太宰府市大字向佐野 39)

質試料500 mLに対してアスコルビン酸500 mgを添加し、分析直前まで冷蔵庫内（4℃）で保管し分析に供した。

2・4 分析方法

水質試料500 mLに、メタノール50 mLを添加して振とう後、メタノール10 mL、超純水10 mLでコンディショニングしたSep-Pak C8 Plus(C8)カートリッジに、10 mL/minの流速で全量を通液した。通液後、超純水約20 mLで水質試料容器内を洗い、この洗浄液もC8カートリッジに通液した。次に、C8カートリッジに超純水10 mLを通液して洗浄した後、注射器で空気を約20 mL通気してC8カートリッジ中の水分を除去した。メタノール5 mLをC8カートリッジに通液して溶出し、10 mLの共栓目盛付遠心管に受け、溶出液をメタノールで5 mLに定容し、試験液とした。

なおSSの多い水質試料については、固相抽出前にろ過操作を行った。ろ紙は、メタノール10 mL、超純水10 mLで洗浄したガラス繊維ろ紙を用いた。水質試料500 mLをろ過し、ろ紙はメタノール25 mLで2回超音波抽出(10 min)し、遠心分離(3000 rpm, 10 min)した後、上澄み液を採取した。得られた上澄み液（約50 mL）とろ液を合わせ、固相抽出操作を行った。

3 結果及び考察

3・1 分析法の定量性評価

3・1・1 テトラメトリンのピーク形状

テトラメトリン(5 ng/mL)のクロマトグラムを図1に示す。今回の測定条件では、テトラメトリンのピークは2つに分離した。テトラメトリンは、[1R,trans]、[1R,cis]、[1S,trans] [1S,cis]の4種の異性体混合物である。標準品の異性体構成比は不明であるが、工業製品原体においてはその構成比はほぼ4:1:4:1であり⁶⁾、trans : cis = 4:1となることから、クロマトグラムの各ピークは図1のように推定できる。本法では、テトラメトリンのピーク面積値を、cis、transの分離した二つのピーク面積の合算値として求めた。

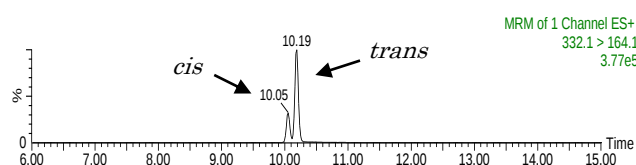


図1 テトラメトリン(5 ng/mL)のクロマトグラム

3・1・2 検量線及び装置検出下限、分析法の検出下限、定量下限

検量線は、0.01 ng/mLから10 ng/mLの濃度範囲において、相関係数0.99以上の良好な直線関係が得られた。標準液は、テトラメトリンをメタノールに溶解させた後希釈するこ

とにより作製した。装置検出下限(IDL)及び分析法の検出下限(MDL)、定量下限(MQL)は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」⁷⁾に記載される方法に従い求めた。IDLは0.0024 ng/mL、MDLは0.035 ng/L(河川水)及び0.029 ng/L(海水)、MQLは0.091 ng/L(河川水)及び0.073 ng/L(海水)であった。本法で得られたMDLは、環境省が設定した要求下限0.037 ng/Lを満たすことが明らかとなった。

3・1・3 添加回収試験

河川水及び海水試料それぞれについて、テトラメトリンの添加回収試験を行った。結果を表2に示す。河川水では83.4%、海水では93.7%の回収率が得られた。

表2 添加回収試験結果

試料	試料量 (L)	添加量 (ng)	最終 液量 (mL)	試験数	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)
河川水	0.500	無添加	5.00	2	ND	-	-
	0.500	0.10	5.00	7	0.167	83.4	5.4
海水	0.500	無添加	5.00	2	ND	-	-
	0.500	0.10	5.00	7	0.187	93.7	3.9

3・1・4 水質試料中のテトラメトリンの安定性

水質試料のpHによるテトラメトリンの分解性に対する影響を調べるために、pH 5、7、9の水溶液を調製し、20 ng/mLとなるようテトラメトリンを添加し、暗所(20℃)における7日後の残存率を求めた(各n=2)。結果を表3に示す。残存率はそれぞれ、98%(pH 5)、10%(pH 7)、4%(pH 9)で、酸性条件下で残存率が高い傾向が示された。また、pH 7の水溶液を用いて明所(20℃)で同様に試験したが残存率は14%であり、明確な光分解性は認められなかった。

表3 分解性試験結果

pH	試験数	調製濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL)(残存率(%))*		
			1時間 放置後	7日間放置後	
				暗所	明所
5	2	20	20.6 (103)	19.6 (98)	-
7	2	20	19.9 (99)	2.0 (10)	2.9 (14)
9	2	20	17.0 (85)	0.7 (4)	-

* 残存率(%): 調製濃度に対する残存率

さらに、水試料、試験液及び標準液の保存性試験を行った結果を表4に示す。テトラメトリンを添加した水質試料を冷暗所(4℃)に保存した後、2日後及び7日後に抽出操作を行い、得られた試験液をそれぞれ測定した。試験液については、添加回収試験を実施し得られた試験液を10 mL共栓目盛付遠心管中で冷暗所(4℃)にて保存し、2か月後に測

定した。標準液については、検量線用標準液を冷蔵保存し、2か月後に測定した。分解性試験結果から酸性条件下で残存率が高い傾向が示されたため、河川水 (pH 7.2) 及び海水試料 (pH 8.0) 各500 mLに対してアスコルビン酸500 mgを添加した試料についても（河川水、海水ともにpH 3.6）保存性試験を行った。その結果、アスコルビン酸添加試料において、7日間残存率が河川水で106%、海水で110%と良好な結果が得られたため、水質試料にアスコルビン酸を添加して冷蔵保存することとした。

表4 保存性試験結果

試料名	調製濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL) (残存率(%))*		
		2日間	7日間	2ヶ月間
試料	0.002	0.0016 (78)	0.0012 (58)	-
河川水 試料 (アスコルビン酸添加)	0.002	0.0021 (107)	0.0021 (106)	-
試験液	0.02	-	-	0.0197 (99)
試料	0.002	0.0004 (20)	0.0001 (5)	-
海水 試料 (アスコルビン酸添加)	0.002	0.0021 (107)	0.0022 (110)	-
試験液	0.02	-	-	0.0196 (98)
標準液 検量線最低濃度	0.01	-	-	0.0101 (101)
標準液 検量線最高濃度	10	-	-	10.41 (104)

* 残存率(%): 調製濃度に対する検出濃度の割合

3・2 前処理の検討

3・2・1 固相抽出の検討

3種の固相 (Sep-Pak C18 Plus(C18), Oasis HLB Plus(HLB) 及びSep-Pak PS-2 Plus(PS-2)) を用いて、テトラメトリンを超純水100 mLに添加し各固相に通液し、メタノール5 mLで溶出した (n=2、測定時濃度10 ng/mL)。固相ブランク及び操作ブランクは不検出であったが、回収率はC18で66%、HLBは55%、PS-2は43%であり良好な回収率は得られなかった。

次に、3種の固相 (C18, C8及びSep-Pak tC2 Plus(tC2)) を用いて、テトラメトリンを超純水100 mLに添加し各固相に通液し、メタノール10 mLで溶出した (n=2、測定時濃度10 ng/mL)。また、疎水性が高いため (log Pow; 4.73) 水質試料ガラス容器に残っている可能性があることから、容器内をメタノール10 mLで洗浄した溶液を溶出溶媒として用いて洗浄効果も調べた。結果を図2に示す。固相ブランク及び操作ブランクは不検出であったが、容器内を溶出溶媒で洗浄した場合でも回収率は0~4%程度しか向上せず、容器に吸着している可能性より、固相から完全に溶出されていない可能性が考えられた。

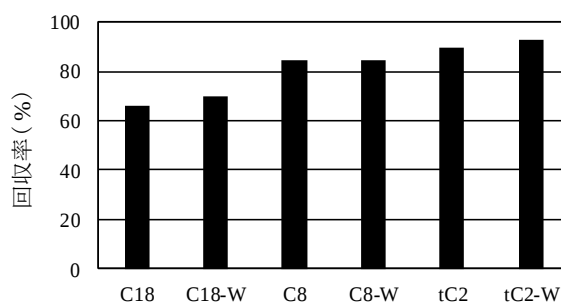


図2 3種の固相 (C18,C8,tC2) を用いたときの回収率 (C18-W,C8-W,tC2-W; 容器内を溶出溶媒で洗浄したもの)

そこで、固相への吸着力を弱めることを目的として、水質試料にメタノールを添加した溶液の固相抽出について検討した。超純水90 mLにテトラメトリンを添加後、メタノール10 mLを添加して振とうした。その後固相抽出 (C8, tC2) を行い、メタノール5 mLもしくは溶出力が高いアセトン5 mLを用いて、通常溶出もしくはバックフラッシュ溶出を行った (n=2、測定時濃度5 ng/mL)。全ての方法でほぼ100%の回収率が得られた。アセトン溶出法では窒素濃縮後メタノールに転溶する必要があるため、またバックフラッシュと通常溶出とで回収率は変わらなかったことから、より手順が少ない方法であるメタノールによる通常溶出を選択し、水質試料にメタノールを添加後、固相抽出を行うこととした。

3・2・2 河川水の固相溶出液におけるイオン化阻害

河川水、海水試料各100 mLにテトラメトリンを添加した後、メタノール10 mLを添加し振とう後、固相抽出を行った (C8, tC2及びC18)。溶出溶媒はメタノール5 mLとし、溶出を行った (n=2、測定時濃度5 ng/mL)。なお、無添加の河川水、海水においてテトラメトリンは検出されなかった。結果を図3に示す。メタノール溶出で環境試料を抽出する場合、C8が比較的高い回収率が得られた。

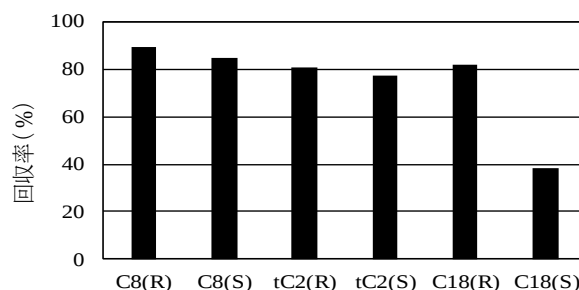


図3 河川水 (R) 及び海水 (S) の固相抽出結果

そこで、河川水、海水試料各500 mLにテトラメトリンを添加した後、メタノール50 mLを添加し振とう後、固相抽出を行った (C8を2個連結)。溶出溶媒はメタノール5 mLと

し、連結させたC8の上段と下段それぞれについて通常の溶出を行い、回収率を求めた（n=2、測定時濃度5 ng/mL）。なお、無添加の河川水、海水においてテトラメトリンは検出されなかった。結果を図4に示す。回収率は河川水で94%、海水で104%と良好な結果が得られた。

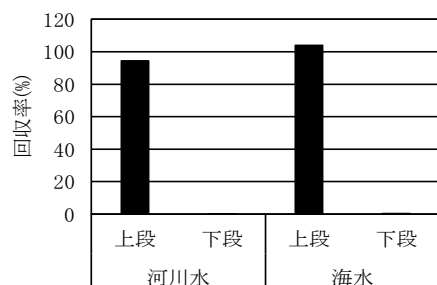


図4 環境水500 mLの固相抽出結果（C8を2個連結）

次にMDLを検討するため、低濃度条件下での河川水及び海水試料を用いた添加回収試験を行った。河川水、海水試料各500 mLにテトラメトリンを添加した後、メタノール50 mLを添加し振とう後、固相抽出を行った（C8を2個連結した）。溶出溶媒はメタノール5 mLとし、連結させたC8の上段と下段それぞれについて溶出を行い、室素濃縮後1 mLに定容した（n=2、測定時濃度0.1 ng/mL）。なお、無添加の河川水、海水においてテトラメトリンは検出されなかった。結果を図5に示す。回収率は、河川水で70.4%（上段68.4%、下段2.0%）、海水で96.2%（上段96.2%、下段0.0%）であり、河川水で比較的低い結果となった。

河川水試料の回収率が低下した原因として、室素濃縮を行い1 mL定容としたことから、マトリックス効果によるイオン化阻害が考えられた。LC/MS法では、共溶出する試料由来成分によってイオン化の抑制や促進が観測され、定量分析において誤った定量値を与えることが報告されている⁸⁾。マトリックス効果への対処方法として、マトリックスの量を減少させる方法（試料液のクリーンアップ、試料液の希釈、注入量の減少など）、マトリックス効果を減少させる方法（イオン化や移動相の変更など）、マトリックス効果を相殺する方法（安定同位体標識化合物を用いた内標準法、標準添加法など）が挙げられている⁸⁾。実務的に最も簡便かつ迅速な方法としては、試料液の希釈・注入量の減少などが多く用いられている。河川水試料の回収率低下には試料由来のマトリックスによる影響が考えられたため、標準物質無添加の河川水抽出液を用いて、測定直前に標準物質を添加し測定することで、室素濃縮有無による測定濃度の変化を調べた。

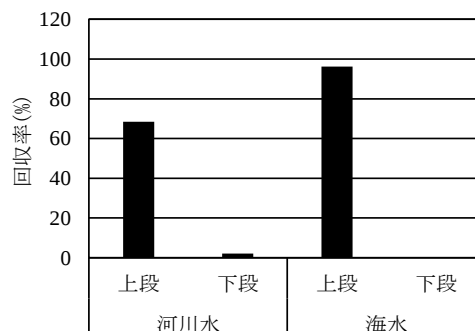


図5 低濃度条件下における環境水500 mLの固相抽出結果

河川水の固相溶出液におけるイオン化阻害の有無を調べるため、無添加河川水500 mLにメタノール50 mLを添加し振とう後、固相抽出（C8を2個連結）し、メタノール5 mLで上段、下段それぞれ溶出し、室素濃縮無しの場合（5 mL）と、室素濃縮して1 mLとした場合で比較検討を行った（各n=2）。各無添加最終溶出液に、測定時濃度が0.1 ng/mLとなるようテトラメトリンを添加して濃度を測定した。結果を表5に示す。結果から、最終液量が1 mLの上段で、添加後濃度0.1 ng/mLに対し測定結果は0.057 ng/mLとなり、溶出液を室素濃縮した場合にはイオン化阻害による測定値の誤差が大きいことが確認された。室素濃縮無し（最終液量5 mL）の場合では添加後濃度と測定結果の誤差は小さいことから、本法では固相溶出液を濃縮せずに測定することとした。また、前述の添加回収試験結果から、C8を2個連結した際上段にほとんど回収されることが確認されたため、C8を1個のみ使用して抽出を行うこととした。

表5 河川水のマトリックスによる測定結果の違い

最終液量	C8	測定結果(ng/mL)
5 mL	上段	0.092
	下段	0.105
1 mL	上段	0.057
	下段	0.103

3・2・3 ろ過操作を行った際の添加回収

河川水(SS; 8.8 mg/L)および海水(SS; 5.8 mg/L)試料各500 mLにテトラメトリンを添加後、ガラス繊維ろ紙でろ過した。ろ紙をガラス製遠沈管に入れた後メタノール25 mLを添加後、超音波抽出(10 min)及び遠心分離操作(3000 rpm, 10 min)を行い、上澄み液を採取した。この操作を2回繰り返す、得られた上澄み液（約50 mL）とろ液を合わせた。この溶液をC8に通液し、メタノール5 mLで溶出した（n=3、測定時濃度0.2 ng/mL）。回収率は、河川水で85%、海水で73%であった。

3・3 環境試料の調査結果

本法を用いて福岡県内の河川水（雷山川）及び海水（大牟田沖）を測定した結果、いずれもテトラメトリンは検出されなかった（図6-1、図6-2）。

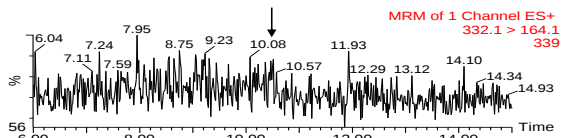


図6-1 河川水（無添加試料）のクロマトグラム

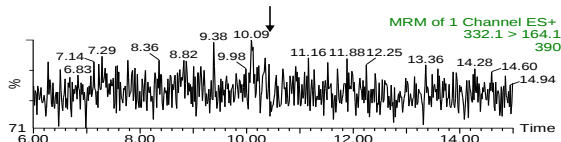


図6-2 海水（無添加試料）のクロマトグラム

4 まとめ

テトラメトリンの分析法を開発し、河川水及び海水試料の調査を実施した。テトラメトリンは、[1R,trans]、[1R,cis]、[1S,trans] [1S,cis]の4種の異性体混合物であるが、本法ではテトラメトリンのピーク面積値を、cis、transの分離した二つのピーク面積の合算値として求めた。また、水質試料500 mLにメタノール50 mLを添加し振とう後固相抽出することで、回収率が改善した。さらに、水質試料採取時にアスコルビン酸を添加することで、保存性が向上した。河川水試料抽出液の窒素濃縮液においてイオン化阻害が確認されたことから、固相抽出液の濃縮は行わずに測定液と

することでイオン化阻害を低減することが可能であった。本分析法の検出下限 (MDL) は0.035 ng/L (河川水) 及び0.029 ng/L (海水) であり、環境省が設定した要求下限0.037 ng/Lを満足するものであり、テトラメトリンの定量法に適用できることが示された。

謝辞

本研究は、環境省委託事業である化学物質環境実態調査として実施されたものである。

文献

- 1) 化学工業日報社：「16112の化学商品」, 2012.
- 2) Pesticide Ecotoxicity Database (US EPA) (<https://semispub.epa.gov/work/10/100002906.pdf>)
- 3) I. San Román *et al.*: *Talanta*, 100, 246-253, 2012.
- 4) M.L. Feo, E. Eljarrat & D. Barceló: *J. Chromatogr. A*, 1217, 2248-2253, 2010.
- 5) S. Mukdasai, C. Thomas & S. Srijaranai: *Talanta*, 120, 289-296, 2014.
- 6) 環境保健クライテリア (EHC: Environmental Health Criteria) (<https://www.nihs.go.jp/hse/ehc/sum2/ehc098/ehc098.html>)
- 7) 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課「化学物質環境実態調査実施の手引き」, 2016.
- 8) 四ノ宮美保: LC-MS/MSによる河川水中農薬分析におけるマトリックス効果, *環境化学*, 26, 191-201, 2016.

(英文要旨)

Development of an analytical method for determination of tetramethrin in river and sea water using liquid chromatography – tandem mass spectrometry

Hiroko TSUKATANI and Kazuhiro TOBIISHI

*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,
Mukaizano 39, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan*

A simple and selective method was developed for determining the concentration of tetramethrin in river and sea water samples using liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) with an electrospray ionization interface in the positive ion mode and selective reaction monitoring mode. Trace amounts of tetramethrin in a methanol/ascorbic acid solution were collected on a Sep-Pak C8 Plus cartridge and eluted with methanol. The method detection limits (MDL) for tetramethrin were 0.035 ng/L for river water samples and 0.029 ng/L for sea water samples. The average recovery from river water samples ($n=7$) spiked with 0.1 ng tetramethrin was 83.4%, with a relative standard deviation of 5.4%. The average recovery from sea water samples ($n=7$) spiked with 0.1 ng tetramethrin was 93.7%, with a relative standard deviation of 3.9%.

[Key words; tetramethrin, LC/MS/MS, solid phase extraction]