同位体希釈法によるディルドリン、 エンドリンの LRMS 測定法

清家 伸康, 大谷 卓

独立行政法人農業環境技術研究所 (〒305-8604 茨城県つくば市観音台3-1-3)

[平成17年4月6日受理]

Measurement of Dieldrin and Endrin by Low-Resolution Mass Spectrometry using Isotope Dilution Method

Nobuyasu SEIKE and Takashi OTANI

National Institute for Agro-Environmental Sciences
(3-1-3 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8604)

[Received April 6, 2005]

Summary

The operational conditions for high-resolution gas chromatograph (HRGC)/quadrupole mass spectrometry (low-resolution mass spectrometry, LRMS) for dieldrin and endrin measurement were examined in order to apply the isotope dilution method. The molecular ion (M^+ ; m/z 380 and 382) for dieldrin and the fragment ion ($[M-Cl]^+$; m/z 345 and 347) for endrin were set up as monitor ion for LRMS measurement. The calibration curves of dieldrin and endrin were sufficiently linear. The variation coefficient of the relative response factor of dieldrin and endrin were within 5 %. The minimum limits of determination for the sample were 0.72 ng g^{-1} for dieldrin and 0.78 ng g^{-1} for endrin, respectively. Analytical reference material [JSAC 0442 (S-low conc.)] was measured by LRMS. The result was a range of the certificated value.

Key words: Dieldrin, Endrin, Isotope Dilution, LRMS

1. はじめに

残留性有機汚染物質 (Persistent Organic Pollutants, POPs) が、大気や水の循環により越境移動し、極域の海棲哺乳類等の野生生物に蓄積していることが明らかにされてきた¹⁻³⁾。すなわち、POPs による環境汚染が地球規模で広がっていることを示している。そこで、国際的に協調して POPs の削減、廃絶等を推進するため、2001年5月に「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約」が採択され、2004年5月に本条約は発効した。

この条約で POPs とは、残留性 (難分解性)、生物蓄積

性、長距離移動性、毒性、の全ての特性を有する物質と定義されている。現在のところ、非意図的生成物質としてポリ塩化ジベンゾ-*p*-ダイオキシンとポリ塩化ジベンゾフラン (PCDD/Fs)、ヘキサクロロベンゼンの3物質、意図的生成物質としてポリ塩化ビフェニル (PCBs) と有機塩素系農薬の DDT、クロルデン、トキサフェン、アルドリン、ディルドリン、エンドリン、ヘプタクロル、マイレックスの9物質、合計12物質が対象となっている。

ディルドリンとエンドリンは1975年に農薬登録が失効した。それ以後、農耕地土壌中ディルドリン濃度は速や

かに減少したが、1980年代以降、その減少が極めて鈍化しており⁹⁾、近年においてもディルドリンが残留している例¹⁰⁾もある。英国ローザムステッド農業試験場の畑土壌におけるディルドリンの半減期は、21.7年¹⁰⁾とされており、ディルドリンは極めて長期にわたり土壌中に残留する物質であることが伺える。また、作物（キュウリ）中から残留基準値（0.02ppm）を超えるディルドリンが検出されている事例⁷⁾もある。残留基準値を超えるか否かは重要な問題であり、ディルドリン等の分析において高い精度が要求される。

現在のディルドリンやエンドリンの測定は、主にECDで行われている^{8,9)}が、四重極型質量分析計（低分解能質量分析計；LRMS）や二重収束型質量分析計（高分解能質量分析計；HRMS）と比較すると、定性能力は低い。また、精度や正確さを向上するためには、¹³C等の安定同位体でラベルされた標準物質を用いた同位体希釈法による分析が望ましい。ダイオキシン類やPCBs等の分析では、同位体希釈法によりHRMSで測定が行われているが、その調整・維持が極めて難しい。しかし、LRMSはHRMSと比較すると、安価で汎用性が広く、操作も簡便である。特に、多検体を分析する場合は、上記の理由により、LRMSによる測定が望ましい。そこで、同位体希釈法によるディルドリン、エンドリンのLRMS測定方法について検討した。

2. 実験方法

2. 1 試薬および装置

n-ヘキサン、ジクロロメタン、アセトンは和光純薬製の残留農薬・PCB試験用を用いた。無水硫酸ナトリウムは関東化学製の残留農薬・PCB試験用を用いた。クリーンアップ用吸着剤としてフロリジル（Mega Bond Elute FL, 5g, Varian）とグラファイトカーボン（Envicarb, 500mg, SUPELCO）を用いた。また、標準物質は、¹²C₁₂-ディルドリンと¹²C₁₂-エンドリン（M-680P-MLC, Accu Standard）、サロゲートとして¹³C₁₂-ディルドリン（CLM-4726-1.2, Cambridge Isotope Laboratories）と¹³C₁₂-エンドリン（CLM-4782-1.2, Cambridge Isotope Laboratories）、シリンジスバイクとして、¹³C₁₂-2,2',4,4',5,5'-HxCB（#153）（MBP-153, Wellington Laboratories）を用いた。

カラムクリーンアップにおける溶媒の送液は、定流量送液ポンプ（DPU-8特注品, GL Science）を、濃縮はロータリーエバポレーター（R-200, BÜCHI）を用いた。また、測定は、キャピラリーカラムとしてENV-8MS（30m×0.25mm i.d.×0.25μm film thickness, 関東化学）を装着したHRGC/LRMS（HP6890-5973N, Agilent Technologies）により行った。

2. 2 GC/MS 測定条件

ディルドリンやエンドリンをHRGC/LRMSのEI法により測定した場合、多数のフラグメントイオンを生成することがよく知られている。そこで、¹²C₁₂-ディルドリンと¹²C₁₂-エンドリン、¹³C₁₂-ディルドリンと¹³C₁₂-エンドリンのマススペクトルをスキャン測定により明らかにし、最適なモニターイオンを決定した。

また、¹³C₁₂ラベル体と¹²C₁₂のディルドリンとエンドリンのフラグメントイオンによるモニターイオンへの干渉について確認した。すなわち、¹³C₁₂-ディルドリンと¹³C₁₂-エンドリンのそれぞれ1ngをHRGC/LRMSに注入した時の¹²C₁₂-ディルドリンと¹²C₁₂-エンドリンのモニターイオンにおける面積値を算出した。また、¹²C₁₂-ディルドリンと¹²C₁₂-エンドリン（1～100ng）をHRGC/LRMSに注入した時の¹³C₁₂-ディルドリンと¹³C₁₂-エンドリンのモニターイオンにおける面積値を算出した。

2. 3 検量線

ディルドリンとエンドリンの各検量線作成用標準液（Table 1）を1濃度に対して5回HRGC/LRMSに注入して検量線を作成した。次に¹²C₁₂-ディルドリンと¹³C₁₂-ディルドリン、¹²C₁₂-エンドリンと¹³C₁₂-エンドリンの相対感度係数（RRF）とその変動係数を算出した。また、2004年10月～2005年3月におけるRRFの変動について確認した。すなわち、検量線作成時のRRFと検量線作成用標準液の中間の濃度（STD3）におけるRRFを比較した。

2. 4 検出・定量下限値

検出・定量下限値の算出方法は、JIS K 0312:1999¹⁰⁾に準拠した。以下その概要を記述する。アセトン300mℓをロータリーエバポレーターで5mℓに濃縮した模擬抽出液に、¹²C₁₂-ディルドリンと¹²C₁₂-エンドリンの標準溶液（各0.1ng μℓ⁻¹）を50μℓ（5ng相当）、サロゲート（¹³C₁₂-Dieldrin, ¹³C₁₂-Endrin；各1ng μℓ⁻¹）を100μℓ（100ng相当）添加した。この模擬抽出液を、*n*-ヘキサン25mℓが入った200mℓ分液ロートに移し、ヘキサン洗浄水100mℓを加え振とうした。静置後、水層を捨て、再びヘキサン洗浄水100mℓを加え振とう後、水層を捨て、無水硫酸ナトリウムによる脱水を行い、ロータリーエバポレーターにより濃縮し、粗抽出液とした。

粗抽出液を、フロリジルカラムに添加し、*n*-ヘキサン30mℓ（流速2.5mℓ min⁻¹）で夾雑物を溶出した。ついで、25%ジクロロメタン含有*n*-ヘキサン80mℓ（流速2.5mℓ min⁻¹）でディルドリン、エンドリンを溶出し、ロータリーエバポレーターで約1mℓまで濃縮した。この濃縮液を、グラファイトカーボンカラムに添加し、*n*-ヘキサン10mℓ（流速2.0mℓ min⁻¹）でディルドリン、エン

Table 1 The standard solution ($\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$) for the calibration curve of dieldrin and endrin

	STD 1	STD 2	STD 3	STD 4	STD 5
Native ($^{12}\text{C}_{12}$)					
Dieldrin	0.05	0.25	1	5	20
Endrin	0.05	0.25	1	5	20
$^{13}\text{C}_{12}$ labelled					
Surrogate					
Dieldrin	1	1	1	1	1
Endrin	1	1	1	1	1
Syringe Spike					
$^{13}\text{C}_{12}$ -22'44'55'- HxCB(#153)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

ドリンを溶出した。この溶液を、ロータリーエバポレーターと窒素気流下で濃縮後、シリンジスパイク ($^{13}\text{C}_{12}$ -2,2',4,4',5,5'-HxCB; $0.1\text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$) を $100\text{ } \mu\text{l}$ (10ng 相当) 添加し、最終濃縮量を $100\text{ } \mu\text{l}$ とした。この溶液の $1\text{ } \mu\text{l}$ を HRGC/LRMS に注入し、同定および定量を行った。これらの操作を 5 回行い、得られた測定値の標準偏差を求め、その 3 倍を測定方法の検出下限、10 倍を測定方法の定量下限とした。

2. 5 添加回収試験と標準試料の分析

添加回収試験は、あらかじめディルドリンやエンドリンが検出されないことを確認したキュウリと同じウリ科のヘチマの果実を用いて行った。すなわち、ヘチマ果実を細断後、約 10g を計りとり、 $^{12}\text{C}_{12}$ -ディルドリンと $^{12}\text{C}_{12}$ -エンドリンの標準溶液 ($1\text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$) を $200\text{ } \mu\text{l}$ (200ng 相当)、サロゲート ($^{13}\text{C}_{12}$ -ディルドリン, $^{13}\text{C}_{12}$ -エンドリン; 各 $1\text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$) を $100\text{ } \mu\text{l}$ (100ng 相当) 添加し、アセトン 300ml を加えポリトロン (PT3100, KINEMATICA) によりホモジナイズした。試料液をグラスファイバー濾紙 (GFP, KIRIYAMA) で吸引濾過後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、粗抽出液とした。 n -ヘキサンへの転溶、クリーンアップ方法は 2.4 項に、HRGC/LRMS による測定方法は、Table 2 に従った。なお、この添加回収試験は 3 回の繰り返し分析を行った。

標準試料の分析は、日本分析化学会が頒布している農薬成分分析用土壌標準物質 [JSAC 0442 (S-低濃度), 認証値; ディルドリン $76 \pm 14\text{ ng g}^{-1}$] を用いて行った。すなわち、約 5g の試料を、アセトン 300ml で 16 時間ソックスレー抽出後、クリーンアップ方法は 2.4 項に、HRGC/LRMS による測定方法は、Table 2 に従って分析

した。なお、この標準試料の分析は 3 回の繰り返し分析を行った。

3. 結果と考察

3. 1 GC/MS 測定条件

Fig. 1 に $^{12}\text{C}_{12}$ -ディルドリン, $^{12}\text{C}_{12}$ -エンドリン, $^{13}\text{C}_{12}$ -ディルドリン, $^{13}\text{C}_{12}$ -エンドリンのマススペクトルを示した。 $^{12}\text{C}_{12}$ -ディルドリンと $^{12}\text{C}_{12}$ -エンドリンのマススペクトルにおいて強度の強い、それぞれ、 m/z 263 や m/z 79 と $^{12}\text{C}_{12}$ -エンドリンの m/z 263 や m/z 81 は、 ^{13}C -ディルドリン, $^{13}\text{C}_{12}$ -エンドリンのフラグメントイオンに干渉することが分かった。そこで、ディルドリンは M^+ (m/z 380 と 382) を、エンドリン $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ (m/z 345 と 347) をモニターイオンとした。GC の昇温条件等を含めた HRGC/LRMS 測定条件を Table 2 に示した。

続いて、Table 2 の条件におけるモニターイオンへの干渉について検討した。すなわち、 $^{13}\text{C}_{12}$ -ディルドリンと $^{13}\text{C}_{12}$ -エンドリンのそれぞれ 1 ng (サロゲートとして 100 ng 添加し、最終濃縮量を $100\text{ } \mu\text{l}$ とした場合に相当) を HRGC/LRMS に注入した時の $^{12}\text{C}_{12}$ -ディルドリンと $^{12}\text{C}_{12}$ -エンドリンのモニターイオンにおける面積値を算出した結果、ディルドリン、エンドリンの両者とも干渉は確認されなかった。次に、 $^{12}\text{C}_{12}$ -ディルドリンと $^{12}\text{C}_{12}$ -エンドリン $1 \sim 100\text{ ng}$ を HRGC/LRMS に注入した時の $^{13}\text{C}_{12}$ -ディルドリンと $^{13}\text{C}_{12}$ -エンドリンのモニターイオンにおける面積値を算出した。その結果、ディルドリンについては干渉が確認されなかったが、エンドリンについては、 20 ng 以上の注入量の場合、 $0.05 \sim 0.2\%$ 干渉していることが分かった。この干渉は、RRF については小数点

Table 2 The operational condition for dieldrin and endrin determination by HRGC/LRMS

HRGC/LRMS (HP6890-5973N, Agilent Technologies)			
Column	ENV-8ms (30m × 0.25mm i.d. , 0.25 μm)		
Oven Temp.	120 °C – (10°C min ⁻¹) – 180 °C – (5°C min ⁻¹) – 300°C(10min)		
Inlet Temp.	250°C		
Carrier Gas	He (1mL min ⁻¹)		
Injection Vol.	1 μL		
MS Source Temp.	230°C		
MS Quad. Temp.	150°C		
Aux Temp.	280°C		
Monitor Ions (m/z)			
¹² C ₁₂			
Dieldrin	380	382	
Endrin	345	347	
¹³ C ₁₂			
Dieldrin	392	394	
Endrin	357	359	
22'44'55'-HxCB(#153)	372	374

Fig. 1 Mass spectrum of a) ¹²C₁₂-dieldrin, b) ¹³C₁₂-dieldrin, c) ¹²C₁₂-endrin, and d) ¹³C₁₂-endrin measured by HRGC/LRMS-EI

以下第2位を変動させるが、検量線の直線性およびRRFの変動係数において問題はなかった(次項で詳細を記述)。しかし、定量値において($^{12}\text{C}_{12}$ -エンドリン:20ng, $^{13}\text{C}_{12}$ -エンドリン:1ng注入;RRF=1とした場合),4%程度過小評価することになるため、エンドリンにおいてはHRGC/LRMSへの注入量が20ng程度となった場合は、希釈操作や分析重量を調節するなどして、再分析することが望ましい。

3.2 検量線

ディルドリンとエンドリンの検量線をFig.2とFig.3に示した。ディルドリンとエンドリンのHRGC/LRMSへの注入量が0.05ng~20ngの範囲において直線性が確認され、RRFの変動係数(RSD)は5%以下(ディルドリン;4.38%,エンドリン;4.91%)であった。また、2004年10月~2005年2月に測定した検量線作成用標準液(STD3)におけるRRFの変動について確認したところ

(Fig.3), 検量線作成時のRRF(ディルドリン;1.166, エンドリン;1.152)に対して全て $\pm 20\%$ 以内(ディルドリン; $+2.5\% \sim -5.8\%$, エンドリン; $+8.0\% \sim -4.1\%$)であった。このことから,RRFの変動は小さく,安定した測定が出来ることが分かった。

3.3 検出・定量下限値

ディルドリンとエンドリンの測定方法の検出・定量下限値をTable3に示した。これらの測定方法の定量下限値より得られるディルドリンとエンドリンの試料における定量下限値は,試料10g,最終濃縮量100 μl ,HRGC/LRMSへの注入量1 μl とした場合,0.72ng g^{-1} と0.78ng g^{-1} となった。なお,HRGC/LRMSへの注入量が0.05ngの時のSN比($n=5$)は,ディルドリンでは58~71,エンドリンでは55~79であり,SN比を考慮しても問題ない定量下限値であると言える。また,これらの試料における定量下限値は,食品に残留する農薬,

Fig. 2 The calibration curves of a) dieldrin and b) endrin measured by HRGC/LRMS

Fig. 3 Temporal changes of RRF for dieldrin and endrin measured by HRGC/LRMS from Oct. 2004 to Mar. 2005

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⁹⁾で求められている定量限界 (0.005ppm) 以下であった。

3. 4 添加回収試験と標準試料の分析

ウリ科のヘチマ果実を用い添加回収試験 (n = 3) を行った結果, ¹²C₁₂-ディルドリンは204, 205, 200ng, (RSD ; 1.34%) ¹²C₁₂-エンドリンは, 194, 198, 203ng (RSD ; 2.49%) であり, 回収率はほぼ100%であった。なお, その際のサロゲートの回収率は, 85%~93%であった。

農薬成分分析用土壌標準物質 [JSAC 0442 (S-低濃度)] (n = 3) を分析した結果 (Table 4), ディルドリン濃度 (平均値±SD) は74.3±3.52ng g⁻¹ (RSD ; 4.74%) であり, 認証値 (76±14ng g⁻¹) の範囲内であった。

以上のことから, ディルドリン, エンドリンのHRGC/LRMSによるSIM測定時において, モニターイオンを工夫することにより同位体希釈法による分析が可能となり, 精度の高い分析が実現できることが分かった。

謝 辞

本研究の一部は, 農林水産省「農林水産生態系における有害化学物質の総合管理技術の開発 (HC-05-2331-1)」の支援のもと行われた。ここに厚く御礼を表す。

要 約

HRGC/LRMSのEI法により測定した場合, 多数のフラグメントイオンを生成するディルドリン, エンドリンについて, ¹³Cラベル体を用いた同位体希釈法による測

定条件を決定した。SIM測定時のモニターイオンを, ディルドリンはM⁺ (m/z 380と382), エンドリンは[M-Cl]⁺ (m/z 345と347) に設定することにより, 精度および再現性の高い測定が実現できた。

文 献

- 1) Risebrough, R.W., Rieche, P., Peakall, D.B., Herman, S.G. and Kirven, M.N.: Polychlorinated biphenyls in the global ecosystem. *Nature*, **220**, 1098-1102 (1968)
- 2) Iwata, H., Tanabe, S., Sakai, N. and Tatsukawa, R.: Distribution of persistent organochlorines in the oceanic air and surface seawater and the role of ocean on their global transport and fate. *Environ. Sci. Technol.*, **27**, 1080-1097 (1993)
- 3) Iwata, H., Tanabe, S., Aramoto, M., Sakai, N. and Tatsukawa, R.: Persistent organochlorine residues in sediments from the Chukchi Sea, Bering Sea and Gulf of Alaska, *Mar. Pollut. Bull.* **28**, 746-753 (1994)
- 4) 中村幸二: 土壌等環境における農薬の動態, 日本農薬学会誌, **15**, 271-281 (1990)
- 5) Meijer, S.N., Halsall, C.J., Harner, T., Peters, A.J., Ockeden, W.A., Johnston, A.E. and Jones, K.C.: Organochlorine pesticide residues in archived UK soil. *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 1989-1995 (2001)
- 6) Nagami, H.: Dieldrin and chlordane residue in agricultural fields. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **59**, 383-388 (1997)
- 7) 近藤治美, 天川映子, 佐藤 寛, 安田和男, 大貫健一, 秋葉美智子, 金谷和明: 多摩地域産きゅうりに

Table 3 Detection limit and lower limit (ng) for determination of the measuring method

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	SD	3s (Detection limit)	10s (Lower limit for determination)
Dieldrin	0.0638	0.0464	0.0553	0.0465	0.0528	0.0072	0.0216	0.0721
Endrin	0.0415	0.0554	0.0527	0.0470	0.0619	0.0078	0.0235	0.0782

Table 4 Result of analysis of reference material [JSAC 0442 (S-low conc.)]

	Sample 1 (ng g ⁻¹)	Sample 2 (ng g ⁻¹)	Sample 3 (ng g ⁻¹)	Mean (ng g ⁻¹)	SD	RSD(%)
Dieldrin	70.4	75.4	77.2	74.3	3.5	4.74

- おけるディルドリン検出に関する事例研究, 東京都健康安全センター研究年報, **54**, 132-135 (2003)
- 8) 厚生労働省: 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 (2005)
- 9) 上路雅子, 小林裕子, 中村幸二: 2002年版残留農薬分析法, ソフトサイエンス社 (2001)
- 10) (財)日本規格協会: 工業用水・工業排水中のダイオキシン類及びコプラナー PCB の測定方法, JIS K 0312: 1999 (1999)