

GC/MS及びHPLCによる野菜中に残留するDDTとdicofolの分析

佐藤 寛*, 大橋 則雄**, 高田 千恵子*, 天川 映子*,
都田 路子*, 荻原 勉*, 青柳 陽子*, 鈴木 助治*

Determination of DDTs and Dicofol Residues in Vegetables by GC/MS and HPLC

HIROSHI SATOH*, NORIO OHASHI**, CHIEKO TAKADA*, EIKO AMAKAWA*,
MICHIKO MIYAKODA*, TSUTOMU OGIWARA*, YOKO AOYAGI* and SUKEJI SUZUKI*

The analytical method to determine *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT(DDTs) by GC/MS and dicofol by HPLC in vegetables was studied. DDTs and dicofol were extracted with acetone and internal standard (DDT-*d8*) was added to acetone extract. The acetone extract was evaporated under reduced pressure. Residual aqueous solution was mixed with 6% NaCl solution, then shaken with *n*-hexane. The organic layer was evaporated and the residue was cleaned up with Envi-carb/LC-NH₂ cartridge. In young soybeans, Extrelut 3 was used for removal of lipids. Stable isotope of DDTs was used as an internal standard by GC/MS-SIM. This proposed method showed good recoveries. Using HPLC, dicofol was separated from DDTs and their metabolites using a Zorbax C 8 column with methanol-water-acetic acid(80:20:0.2) as the mobile phase, then detected at 230nm. Dicofol, which was difficult to determine accurately because of pyrolysis in GC/MS analysis, could be determined quantitatively and showed good recoveries by HPLC. In frozen young soybeans and kidney beans, DDTs and dicofol, which may be endocrine disrupting chemicals, were detected.

Keywords : 残留農薬 pesticide residues, 野菜 vegetables, 内分泌かく乱化学物質 endocrine disrupting chemicals, DDT, ジコホ - ル dicofol, 安定同位体標準物質 stable isotope standard, ガスクロマトグラフ/質量分析計 GC/MS, 高速液体クロマトグラフィ - HPLC, フォトダイオードアレイ検出器 photodiode array detector

緒 言

DDTとその代謝物であるDDD, DDE及び類似構造を有するdicofol (Fig.1) には, 内分泌かく乱物質の疑いがあり¹⁾, 母乳や魚介類のみならず, 農産物中での残留が懸念されている. また, 生鮮野菜や冷凍野菜から内分泌かく乱物質の疑いのある endosulfan, heptachlor epoxide, DDT 等の塩素系農薬を検出した事例も相次いで報告されている^{2,4)}. 有機塩素系の農薬は他の農薬に比べて, 土壌中での残留期間が長い. また近年, 輸入食品の増加に伴い, 残留農薬規制が我が国とは異なる国からの食品も市場に多く出回っており, 我が国ではすでに使用禁止になった農薬もしばしば検出されている²⁻⁴⁾. そ

こで今回, 検出頻度の比較的高かったDDTに注目して分析法の検討を行った.

環境中の微量化学物質の分析に広く使用されているGC/MS法は, クロマト上に検出された成分はすべて分析できる汎用性がある反面, マトリックスの影響が大きい. そのため, 定量に際しては絶対検量線法より内部標準法が推奨されている⁵⁻⁷⁾. 今回, *o,p'*-DDTと*p,p'*-DDT (以下, DDTと略す) について安定同位体を内部標準物質として用いたGC/MS法を検討したところ, 良好な結果を得た. また, dicofolはGCの注入口の熱や汚れで分解し4,4'-dichlorobenzophenone (4,4'-DCB) になりやすく, dicofolとして正確な測定はできない. そこで, フォ

* 東京都立衛生研究所多摩支所理化学研究科 190-0023 東京都立川市柴崎町3 - 16 - 25

* Tama Branch Laboratory, The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, 3 - 16 - 25, Shibazakicho, Tachikawa, Tokyo, 190-0023 Japan

* * 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科

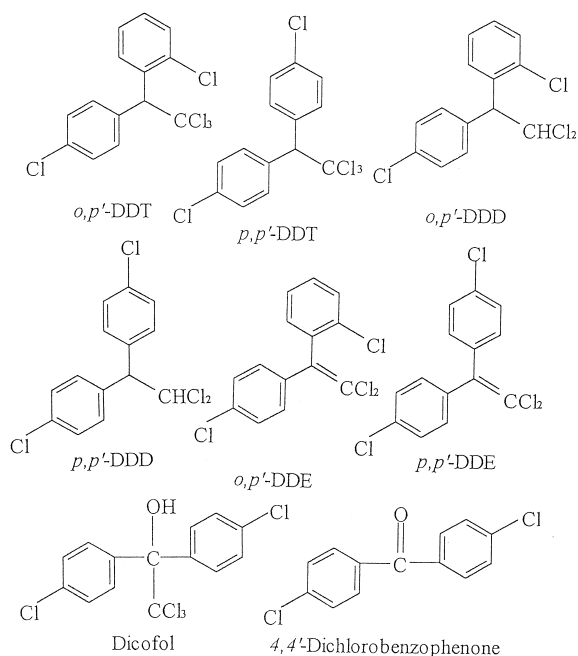


Fig. 1. Chemical Structures of DDTs and Their Related Compounds

トダイオードアレイ検出器 (PDA) を用いたHPLC法⁸⁻¹¹⁾ について検討を行ったところ, dicofolの測定が可能になった。さらに, 本法を用いてDDTが検出された冷凍野菜中の*o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT及びdicofolを測定したので併せて報告する。

実験方法

1. 試料 平成10年8月に多摩地域の小売店より購入した冷凍のインゲン及び枝豆各1試料を用いた。

2. 試薬 1) 標準品*o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDE, *p,p'*-DDEはジーエルサイエンス製, dicofolは関東化学^(株)製, 4,4'-DCBは東京化成工業^(株)製の残留農薬標準品を用いた。2) 各10ppm標準溶液上記の8種の標準品を50.0mgを量り, GC/MS用は*n*-ヘキサン, HPLC用はメタノールでそれぞれ正確に50mlとした(各1000ppm標準原液)。これらより, それぞれ*n*-ヘキサン又はメタノールで100倍に希釈し調製した。3) 1ppm 8種混合標準溶液 8種の各10ppm標準溶液から*n*-ヘキサン又はメタノールで混合希釈し調製した。4) 4ppm dicofol標準溶液 標準原液をメタノールで希釈し調製した。5) 内部標準物質*o,p'*-DDT-*d*8, *p,p'*-DDT-*d*8は関東化学^(株)製を用いた。6) 10ppm内部標準混液*o,p'*-DDT-*d*8, *p,p'*-DDT-*d*8の50.0mgを量り*n*-ヘキサンでそれぞれ50mlとした。これらを*n*-ヘキサンで100倍に混合希釈し調製した。7) 0.2ppm内部標準混液 10ppm内部標準混液を*n*-ヘキサンで希釈し調製した。8) 脱脂用ミニカラム: メルク社製Extrelut 3。9) 精製用ミニカラ

ム: スペルコ社製Envi-Carb/LC-NH2 (500mg)。10) その他の試薬はすべて残留農薬試験用を用いた。

3. 装置及び測定条件

3.1 GC/MS

ガスクロマトグラフ/質量分析計: Finniganmat社製TRACKER, カラム: HP-5MS 0.25mm i.d. × 30m, 0.10 μm, キャリヤ - ガス: He, カラムヘッド圧: 12psi, カラム温度: 40 (2min) 10 /min 280 (4min) 10 /min 290 (2min), 注入口温度: 80, インターフェース温度: 260, イオン源温度: 250, イオン化電圧: 70eV, イオン化法: EI, 測定モード: SIM, 注入量: 2 μl (スプリットレス)。

3.2 HPLC

高速液体クロマトグラフ: 送液ポンプ (LC10AT), PDA検出器 (SPD-M10A), オートサンプラ - (SIL-10A), データ処理システム (CLASS-LC10), いずれも^(株)島津製作所製, カラム: ヒュ - レットパッカ - ド社製Zorbax C8 4.6mm i.d. × 250mm, 5 μm, ガードカラム: Lichrospher RP-18, 5 μm, 流速: 1.2ml/min, カラム温度: 40, 移動相: メタノール - 水 - 酢酸 (80 : 20 : 0.2), 測定波長: 230nm, スペクトル測定波長範囲: 220 ~ 300nm, 注入量: 20 μl。

4. 試験溶液の調製

4.1 抽出

細切した試料50gにアセトン100mlを加え, 5分間ホモジナイズ (10,000rpm) した後, 吸引ろ過した。残渣をアセトン50mlで洗浄し, これらのろ液を合わせ正確に250mlとした。このうちから試料20gに相当する100mlを正確に取り, 0.2ppm内部標準混液 1mlを添加後, 40以下で約30mlに減圧濃縮した。残留物に6%塩化ナトリウム溶液50ml及び*n*-ヘキサン50mlを加え, 振とう抽出後, *n*-ヘキサン層を分取した。水層に再度*n*-ヘキサンを加え同様に操作した。*n*-ヘキサン層を合わせ, 無水硫酸ナトリウムで脱水後, 減圧濃縮し, *n*-ヘキサンで4mlにメスアップし抽出液とした。

4.2 脱脂

油分の多い枝豆の場合は, ミニカラムを用いて脱脂した。抽出液の2mlをExtrelut 3に負荷し, 直ちにExtrelut 3の出口を吸引してヘキサンを除いた後, ヘキサン飽和アセトニトリル20mlで溶出した。溶出液を減圧濃縮し, 窒素ガスを通気して乾固後, *n*-ヘキサンで2mlにメスアップした。

4.3 精製

抽出液の2mlまたは脱脂操作を行った液の全量を,

エ - テル - *n*-ヘキサン (5 : 95) でコンディショニングしたフロリジルカラムに負荷した。同液20mlで溶出し、溶出液を減圧濃縮後、アセトニトリル - トルエン (3 : 1) で2 mlに溶解した。この液の全量を同液でコンディショニングした ENVI-Carb/LC-NH₂に負荷した。同液20mlで溶出し、溶出液を減圧濃縮し、窒素ガスを通気して乾固後、同液で1 mlにメスアップしGC/MS及びHPLC用試験溶液とした。

5. GC/MSによる*o,p'*-DDT及び*p,p'*-DDTの分析

5.1 検量線の作成

検量線用の標準溶液については、*o,p'*-DDTと*p,p'*-DDTが0.005 ~ 0.1ppmになるように*n*-ヘキサンで混合希釈したものに*o,p'*-DDT-*d*8と*p,p'*-DDT-*d*8が各々0.1ppm含有されるように調製した。3.1 GC/MSに示した条件下で、DDTは*m/z* 235, DDT-*d*8は*m/z* 243を用いピ - ク面積法で測定した後、検量線をDDTとDDT-*d*8のピーク面積比及び濃度比から作成した。

5.2 定量

4. 試験溶液の調製の項に従って得られた試験溶液について、検量線作成の場合と同様に測定した。定量は検量線から検出濃度比を求め、次式により算出した。

定量値 (µg/g) = 検出濃度比 × 試験溶液中の内部標準濃度 (0.1ppm) × 1 ml / 試験溶液に相当する試料量 (10g)

6. HPLCによるdicofolの分析

4. 試験溶液の調製の項に従って得られた試験溶液について、3.2 HPLCに示した条件下で測定を行った。保持時間を確認した後、ピ - ク面積法を用いて、予め0.1 ~ 1.0ppmの範囲で作成した検量線により、試料中のdicofol含有量を算出した。

結果及び考察

1. 内部標準物質として安定同位体を用いたGC/MS-SIMによる*o,p'*-DDT 及び*p,p'*-DDTの分析

o,p'-DDTと*p,p'*-DDT及びそれらの*d*8体の標準溶液をGC/MSにより測定した結果、*o,p'*-DDTと*p,p'*-DDT、*o,p'*-DDT-*d*8と*p,p'*-DDT-*d*8はそれぞれ同一のマススペクトルを示した。また、*d*8体を内部標準物質に用いた場合の検量線は*o,p'*-DDT、*p,p'*-DDTとも0.005 ~ 0.1ppmの範囲で良好な直線性を示した。そこで、DDTが検出されないことを確認したインゲン及び枝豆に*o,p'*-DDTと*p,p'*-DDTを試料1g当り各0.008 µgを添加し回収率と標準偏差を求めたところ、Table 1 に示したように絶対検量線法では*o,p'*-DDTは各々平均105%、95%、標準偏差は3.5、13.9であり、*p,p'*-DDTは192%、77%で標準偏差は12.3、

Table 1. Recoveries of DDTs and Dicofol from Vegetables
n=3

Sample	DDTs and dicofol	GC/MS-SIM		HPLC
		Internal standard method	Direct calibration method	
		Recovery ± S.D. (%)	Recovery ± S.D. (%)	
Kidney beans	<i>o,p'</i> -DDT	102 ± 1.8	105 ± 3.5	89.4 ± 1.2
	<i>p,p'</i> -DDT	116 ± 6.6	192 ± 12.3	

Young soybeans	<i>o,p'</i> -DDT	81 ± 1.3	95 ± 13.9	75.6 ± 2.3
	<i>p,p'</i> -DDT	80 ± 3.8	77 ± 11.3	

		Dicofol		75.6 ± 2.3

DDTs spiked at 0.008 µg/g and dicofol at 0.40 µg/g

Table 2. Concentration of DDTs and Dicofol in Vegetables

Sample	DDTs and dicofol	GC/MS-SIM		HPLC
		Internal standard method	Direct calibration method	
		(µg/g)	(µg/g)	
Kidney beans	<i>o,p'</i> -DDT	0.011	0.013	0.065
	<i>p,p'</i> -DDT	0.001	0.002	

Young soybeans	<i>o,p'</i> -DDT	0.013	0.026	0.348
	<i>p,p'</i> -DDT	0.004	0.009	

		Dicofol		0.348

Detection limits : DDTs < 0.001 µg/g, dicofol < 0.010 µg/g

11.3であった。また、内部標準法では*o,p'*-DDTは各々平均102%、81%、標準偏差は1.8、1.3であり、*p,p'*-DDTは116%、80%、標準偏差は6.6、3.8であった。このように、絶対検量線法では192%と100%を大きく上回る数値もあり、またバラツキが内部標準法と比較して大きかった。内部標準法を用いることにより良好な回収率が得られた。GC/MSは定量時マトリックスの影響を受けやすい。特に、油分を多く含む枝豆等の場合、油分等が妨害して大きい定量誤差を生じたものと考えられる。そこで、本法を用いることで補正できppbオーダーの微量物質を精度良く定量できた。

次に、DDTが検出された冷凍のインゲンと枝豆について内部標準法を適用し、絶対検量線法での測定値と比較した。Table 2 に示したように*o,p'*-DDTについては内部標準法を用いると、インゲンと枝豆で、それぞれ0.011、0.013 µg/gであったが、絶対検量線法の場合、0.013 µg/g、0.026 µg/gと測定値は高くなった。*p,p'*-DDTについても同様の傾向がみられた。重水素同位体で標識された物質は非標識物質と物理化学的性質が近似し、分子量のみが異なる。GC法では両者を識別できないがGC/MS-SIMはこの質量数の差から物質を定量できる。安定同位体を用いた内部標準法によるGC/MS分析は今

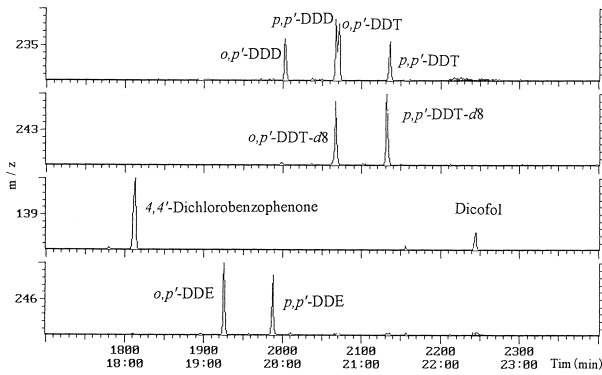


Fig. 2. GC/MS-SIM Chromatograms of DDTs and Their Related Compounds

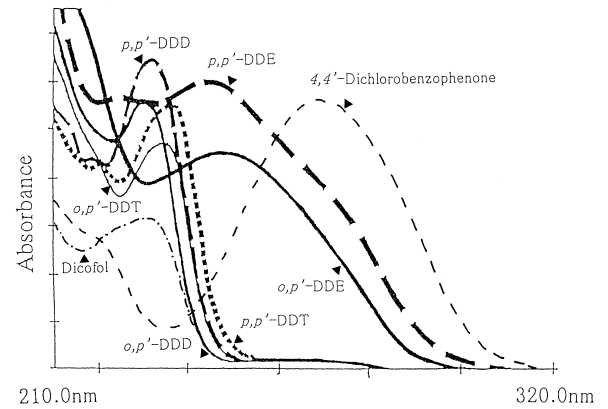


Fig. 3. UV Spectra of DDTs and Their Related Compounds

後，さらに利用が期待されると考える。

2. PDA検出器を用いたHPLCによるdicofolの測定

GC/MSではdicofolは熱分解されて4,4'-DCBになりやすく，dicofolとして正確な測定はできない．そこで，dicofolを測定するためにHPLC-PDAを用いた方法について検討した．併せて，Fig.2で分離の悪い o,p' -DDT及び p,p' -DDDに加えてDDT及びdicofolとその代謝物の計8種の分離について検討した．

まず，検出波長を決めるために分光光度計を用いて上記の標準物質8種のUVスペクトルを測定したところ，極大吸収波長は220～270nm (Fig. 3)にあったが，dicofolの極大吸収波長である230nmで測定することにした．Fig. 4に示したように8種の標準物質はZorbax C8カラムを用いることで，全てのピークが20分以内に分離でき，ピークの変離も概ね良好であった．また，dicofolは0.1～8 ppmの範囲で良好な直線性を示した．そこで，DDT及びdicofolが検出しないことを確認したインゲンと枝豆に0.40 $\mu\text{g/g}$ のdicofolを添加し，本法に従って回収率を求めたところ，Table 1に示したように，75.6～89.4%と良好な結果であった．このことから，本法によりdicofolの測定が可能であることがわかった．

次に，DDTが検出された中国産の冷凍インゲンと枝豆について本法を適用したところ，Table 2に示したようにいずれの試料からもdicofolが0.065～0.348 $\mu\text{g/g}$ 検出された．このことは，検出されたピークのUVスペクトルから確認できた．dicofolは昆虫やネズミ等で p,p' -DDTから代謝生成される¹²⁻¹⁴⁾．今回検出されたdicofolは殺ダニ剤としてDDTと併用して使用された農薬由来によるものと思われる．

HPLCは，GC/MSのように，測定に際し高温の加熱過程がないため，dicofolのような熱によって分解されやすい物質の測定に有用であると考えられる．今回，便利な食品として消費者の利用が増加している冷凍食品から内分泌

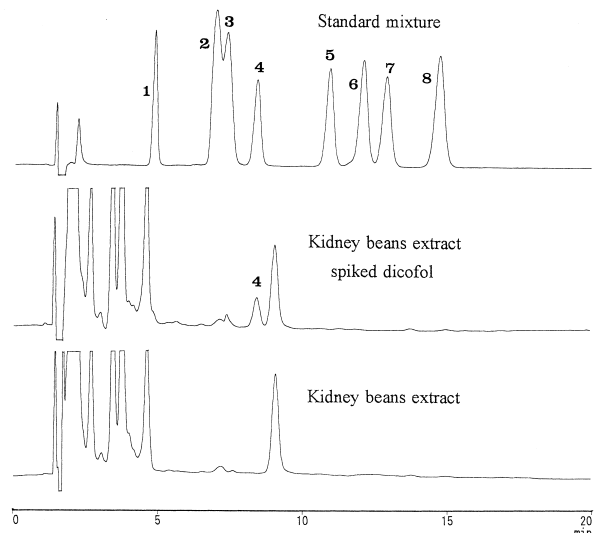


Fig. 4. HPLC Chromatograms of Standard Mixture of DDTs and Their Related Compounds and Kidney Beans Extract Spiked Dicofol

1: 4,4'-DCB, 2: p,p' -DDD, 3: o,p' -DDD, 4: dicofol, 5: o,p' -DDE, 6: p,p' -DDT, 7: o,p' -DDT, 8: p,p' -DDE

かく乱作用の疑いのある農薬を検出した．今後さらに，多種多様な食品中の残留実態を把握していく必要がある．

まとめ

1. GC/MS-SIMを用いたDDTの分析に重水素同位体を内部標準物質として使用することにより，マトリックスの影響を補正し，精度の高い測定を行うことが出来た．

2. HPLC-PDAを用いてDDTとその代謝物及び類似構造を示すdicofolの分析ができた．また，GC/MSでは4,4'-DCBに加熱分解するdicofolの測定がHPLC法により可能になった．

3. 中国産の冷凍インゲン及び枝豆から内分泌かく乱化学物質の疑いのあるDDTが0.012～0.017 $\mu\text{g/g}$ 及び

dicofolが0.065~0.348 $\mu\text{g/g}$ 検出された。

謝辞 本研究にあたり御協力をいただいた麻布大学環境保健学部田中智子氏に深謝致します。

文 献

- 1) 環境ホルモン戦略計画SPEED'98, 環境庁, 1998年5月.
- 2) 伊藤正子, 永山敏廣, 小林麻紀, 他: 東京衛研年報, 49, 101-108, 1998.
- 3) 橋本常生, 永山敏廣, 小林麻紀, 他: 東京衛研年報, 48, 163-169, 1997.
- 4) 大橋則雄, 天川映子, 荻原勉, 他: 地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部第10回理化学研究部会要旨集, 1999年2月.
- 5) 大橋則雄, 岡本 寛, 五十嵐剛, 他: 東京衛研年報, 44, 247-252, 1993.
- 6) 門上希和夫: 水環境学会誌, 20, 304-307, 1997.
- 7) 環境ホルモンのモニタリング手法, 第24回日本環境化学会講演会資料, 1998.
- 8) Rothman, A. M.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 63, 1296-1299, 1980.
- 9) 高附巧, 根本了, 松田りえ子, 他: 食衛誌, 40, 314-319, 1999.
- 10) 橋本常生, 永山敏廣, 小林麻紀, 他: 食衛誌, 39, 324-328, 1998.
- 11) 坂井亨, 小川正彦, 大熊和行, 他: 三重衛研年報, 42, 95-110, 1996.
- 12) Rathor, H. R. and Wood, R. J.: *Pestic. Sci.*, 12, 255-264, 1981.
- 13) Yosida, M., Fujita, T., Kurihara, N., *et al.*: *Pestic. Biochem. Physiol.*, 23, 1-6, 1985.
- 14) Gold, B., Leuschen, T., Brunk, G., *et al.*: *Chem. Biol. Interact.*, 35, 159-176, 1981.