

# Mass Fragmentographyによるラット臓器中のDCIPの定量 法

誌名	日本農薬学会誌
ISSN	03851559
著者	佐藤, 清 保野, 修身 後藤, 真康
巻/号	2巻2号
掲載ページ	p. 173-176
発行年月	1977年5月

# Mass Fragmentography によるラット臓器中の DCIPの定量法

佐藤 清, 俣野修身, 後藤真康

残留農薬研究所

東京都小平市鈴木町 2-772

(昭和 51 年 11 月 1 日受理)

## Mass Fragmentographic Determination of DCIP in Rat Tissues

Kiyoshi SATO, Osami MATANO and Shinko GOTO

*The Institute of Environmental Toxicology, Kodaira, Tokyo 187, Japan*

A highly specific mass fragmentographic method for quantitative determination of bis (2-chloro-1-methylethyl) ether [DCIP] in rat tissues was developed. DCIP in the white adipose tissue, liver, kidney and blood of rat was steam distilled and trapped in toluene. The toluene solution was dried over anhydrous sodium sulfate and injected directly into a gaschromatograph-mass spectrometer (GC-MS), equipped with a multiple ion detector. DCIP was determined by comparing the peak heights of two ion fragments ( $m/e$  121 and 123) with the corresponding peak heights of known amounts of standards. The experimental conditions of GC-MS were as follows: GC-column, 2.0 m  $\times$  3.0 mm (i.d.) glass column, packed with 2% OV-17 on Gaschrom Q; electron energy, 70 eV; flash heater temp., 200°C; column oven temp., 120°C; separator temp., 240°C; ion source temp., 270°C; and helium flow rate, 30 ml/min. The linearity and reproducibility of the response of the mass spectrometer detector was demonstrated in 0.2-4.0 ng range. Any interference on the mass fragmentograms was not observed in the analysis of the rat tissues. Using 10 g of the sample, the method was sensitive to 0.05 ppm and the recoveries of DCIP averaged 87  $\pm$  16%.

### 緒 言

ガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC-MS) において、M・S を特定の検出器として使用する、いわゆるマス・フラグメントグラフィー (M・F)<sup>1)</sup> のバイオメディカルな分野での成果は、最近めざましいものがある<sup>2,3)</sup>。検索しようとする化合物のフラグメンテーションの解析からその化合物固有の  $m/e$  値を持つフラグメントイオンまたは分子イオンを数種選び、それらのマス・フラグメントグラムを同時に記録できる多重イオン検出器 (MID) は、従来定性分析に用いられていた GC-MS に比して 2~3 けた感度がよく、ECD に匹敵する感度で選択性に富んだ定量を可能とした。しかし M・F を残留農薬の分析に応用した例はほとんどない<sup>4)</sup>。著者らは M・F を用いて、慢性毒性試験にともなう、ラット臓器中の殺線虫剤 DCIP

[bis (2-chloro-1-methylethyl) ether] の分析を行なうため、その分析法を確立したので報告する。

### 分 析 法

#### 1. 試薬および機器

トルエン: 特級品 (クロマトグラフィー用) 和光純薬社製

無水硫酸ナトリウム: 残留農薬分析用 和光純薬社製

DCIP 純品: 農林省農薬検査所提供 bp 185~190°C

ポリトロン・ホモジナイザー: Kinematica 社製

還流抽出装置: Dean-Stark 型 池田理化社製

ガスクロマトグラフ質量分析計: 島津 LKB-9000

多重イオン検出器: 島津 High-Speed MID-PM 9060S

#### 2. GC-MS および MID の条件

Table 1, 2 に示す。

Table 1 GC-MS conditions.

Instrument	Shimadzu LKB-9000
GC-column	2.0 m × 3.0 mm (i.d.) glass column, 2% OV-17 on Gaschrom Q, 60-80 mesh
Temperature	Flash heater: 200°C Column oven: 120°C Separator: 240°C Ion source: 270°C
Electron energy	70 eV
Magnet intensity	<i>m/e</i> 122
Trap current	60 μA
Gain	5
Helium flow rate	30 ml/min
GC-chart speed	10 mm/min

Table 2 MID-PM conditions.

Instrument	Shimadzu High-speed MID-PM 9060S	
Step	1-2	
Channel selector	Free	
Mass chart speed	10 mm/min	
Channel	Additional voltage (V)	Gain
1	3500 ( <i>m/e</i> 122, B.G.)	30
2	3528.9 ( <i>m/e</i> 121)	30
3	3471.5 ( <i>m/e</i> 123)	30
4	—	—

### 3. 検量線の作成

DCIP 純品の 0.10, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 ppm トルエン溶液を調製する。各溶液の 2 μl を前記条件の GC-MS に注入して、*m/e* 121 のピーク高を求め、縦軸にピーク高、横軸に DCIP の重量をとり、検量線を作成する。

### 4. 分析操作

Table 3 に示す量の試料を還流抽出装置の 500 ml 容丸底フラスコにとり、脂肪、肝臓には水 250 ml、腎臓、血液には水 150 ml を加え、ポリトロン・ホモジナイザーを用いてホモジナイズする。脂肪、肝臓には 8 ml、腎臓、血液には 3 ml のトルエンを加え、丸底フラスコを装置にとりつけ還流煮沸を行なう。沸とうがはじまってから 20 分間加熱したのち放冷し、トラップ中の水層を除き、トルエン層を 10 ml 容目盛付試験管にとる。装置の冷却管内部をトルエン 2 ml で洗い、トルエン層を合わせたのち、トルエンで、脂肪、肝臓は 10 ml、腎臓、血液は 5 ml とし、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水する。この液 2 μl を前記条件の GC-MS に注入して *m/e* 121 のピーク高を求め、検量線により DCIP の量を求める。

## 実 験

### 1. マス・スペクトル

DCIP のマス・スペクトルを Fig. 1 に示す。おもなピークは *m/e* 41, 45, 77, 121 に見られ、基準ピークは *m/e* 45 である。*m/e* 155 に脱メチルイオンピークがわずか

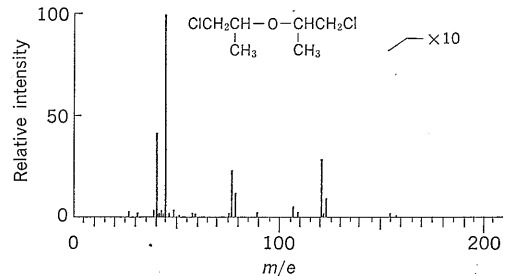


Fig. 1 Mass spectrum of DCIP.

に見られる程度で、分子イオンピーク (*m/e* 170) やそれに準ずる高質量部のピークは出現しない。M・Fを行なうにあたり、DCIP 特有のフラグメントを選定しなければならないが、基準ピークである *m/e* 45 は質量が小さすぎて妨害ピークが出るおそれがあり、分子イオンピークに近い *m/e* 155 は相対強度が低すぎるので、*m/e* 121 および 123 を選んだ。*m/e* 121 は DCIP から脱クロルメチルしたフラグメント、*m/e* 123 はその塩素安定同位体ピーク (P+2) と推定され、その相対強度はそれぞれ、24.1%、7.7% である。

### 2. 抽出および精製

Fig. 2 に示す還流抽出装置を用いる蒸留抽出法は<sup>5)</sup>

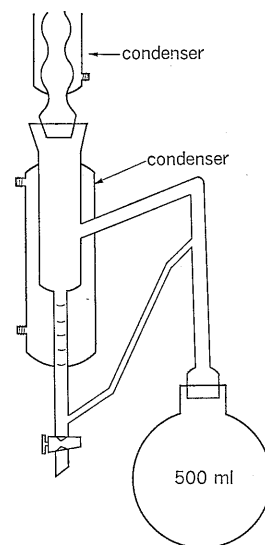


Fig. 2 Dean-stark steam-distillation apparatus.

試料を水とホモジナイズしたのち水蒸気蒸留を行ない、分析化合物をトルエン中に捕集するもので、抽出と精製が同時にできる点で、熱に安定な低沸点化合物に適しているので、この方法を応用した。

3. 検量線

M・Fにおける検量線は、内標準法を用いることが多い。しかし、内標準法は、セクター型質量分析法を用いてM・Fを行なう場合には、選定できる質量範囲が限定されるため、内標準物質の選定がきわめて困難である。そこで、迅速、簡便な絶対検量線での検討を行なった結果、Fig. 3 に示すように 0.2~4.0 ng の範囲で直線性を

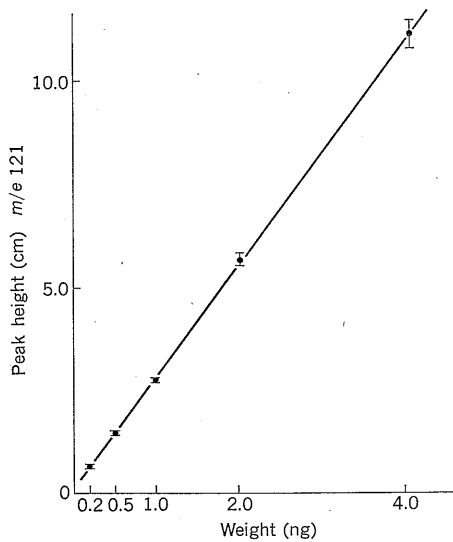


Fig. 3 Linearity of the standard curve. Crossed lines denote the range within a series (N=3). Solid circles represent the average of the series. The regression equation for the line is  $Y=2.766 \times 0.08$ ,  $r=0.9996$ .

示し、再現性も良好であった。ただし、4.0 ng 以上では、ビジグラフからふりきってしまうので、測定可能範囲がやや狭いことが欠点である。従来 M・F における絶対検量線法は再現性に乏しいとされていたが、著者らは、他の二、三の薬剤についても絶対検量線法を検討し、いずれも好結果を得ており、通常の残留分析には十分耐えるものと思われる。

4. 検出限界および回収率

DCIP 0.1 ng を注入したとき、マス・フラグメントグラム上で m/e 121, 123 とともに明瞭なピークが得られるので、こ

Table 3 Lower limit of detection of DCIP in rat tissues.

Tissues		Sample weight (g)	Lower limit of detection (ppm)
White adipose tissue	Male	14.8	0.04
	Female	8.0	0.05
Liver	Male	14.0	0.04
	Female	7.0	0.07
Kidney	Male	2.0	0.1
	Female	0.9	0.3
Blood	Male	4.0	0.06
	Female	3.0	0.08

Table 4 Recoveries of DCIP from rat tissues.

Tissues	Sample weight (g)	Recovery, fortified (μg)	Recovery, found (%)
White adipose tissue	14.0	20	71.6 (71.1, 72.4)
Liver	14.0	20	92.2 (85.4, 98.9)
Kidney	2.0	10	94.8 (93.9, 95.8)
Blood	5.0	10	91.6 (88.9, 94.2)

れを最小検出量とした。試料として、SD 系アダルト・ラット (約 85 週齢) の腹部脂肪組織、肝臓、腎臓、血液を摘出し分析に供した。各臓器の検出限界を表に示す。図 4 に見られるように、無処理試料では、いずれも DCIP に相当するピークは認められなかった。これらの試料に DCIP 10~20 μg を添加して回収率を測定した結果は 71~99% と良好であった。

考 察

DCIP は有機塩素系化合物であるが、ECD に対する感度が低く、通常の ECD ガスクロマトグラフでは分析

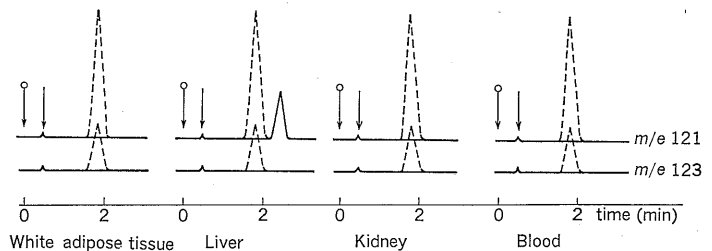


Fig. 4 Mass fragmentograms.

Solid line : Unfortified samples.

Dotted line: DCIP (1 ng).

○→: Injection.

—→: Opening of the interface of GC-MS.

が困難である。多重イオン検出器を用いるM・Fは選択性が高く、感度もECDに匹敵するのでこの装置を用いた分析法の確立を試みた。抽出精製法としてはDCIPが比較的沸点で、熱に安定であり、水に溶けにくいことから、くん蒸剤等の分析に用いられている還流抽出装置を用いることとした。M・Fにおいては、保持時間に加えて特定の $m/e$ という二重の情報により選択を行なうため、混在物による妨害を受けにくいという利点を有する。本分析においても、精製操作はきわめて簡単であるにもかかわらず、各臓器において、クロマトグラム上に妨害ピークはまったく認められなかった。肝臓で、DCIPの直後に $m/e$  121のピークがみられるが、保持時間の差に加えて $m/e$  123のピークが出ないことから、DCIPとは明らかに区別される。定量は絶対検量線法によったが、直線性と再現性は良好であった。

本分析法を用いて、慢性毒性試験にともなうラット臓器中のDCIPの定量を試みたところ、各臓器とも能率よく定量が可能であった。M・Fは高価な装置を必要とするが、選択性および感度がすぐれており、操作が簡単な

ので、動植物体中の残留農薬の分析に有効な手法であると考えられる。

#### 要 約

ラット臓器中のDCIPを蒸留抽出法で抽出、精製し、M・Fにより定量する方法を試みた。脂肪、肝臓、腎臓、血液について分析を行なったところ、DCIP以外のピークはほとんど認められず、ECDなみの感度で選択性に富んだ定量が可能となった。

最小検出量は0.1 ng。添加回収率は85%内外であった。

#### 引用文献

- 1) 渡辺敬三: 医薬品研究 **5**, 129 (1974)
- 2) A. E. Gordon & A. Frigerio: *J. Chromatogr.* **73**, 401 (1972)
- 3) R. W. Kelly: *Anal. Chem.* **45**, 2079 (1973)
- 4) B. A. Karlhuber, W. D. Hörmann & K. A. Ramsteiner: *ibid.* **47**, 2450 (1975)
- 5) R. Bielorai: *J. Agric. Food Chem.* **14**, 622 (1966)