

## 環境水中の1,2-ジブロモ-3-クロロプロパン(DBCP)の高感度分析の開発

Development of Ultra Microanalysis Method for Aquatic 1,2-Dibromo-3-chloropropane (DBCP)

砂古口 博文 白井 康子 小山 健 片山 正敏

Hirofumi SAKOGUCHI, Yasuko SHIRAI, Tsuyoshi KOYAMA, and Masatoshi KATAYAMA

In Kagawa Prefectural Center for the Study of the Environment, we have tried for analysis methods of “environmental hormones”, namely endocrine disrupting chemicals (EDCs) in a plan for three years since 1999.

But, we were not able to analyze some compounds by existing methods well. One of the compounds is 1,2-dibromo-3-chloropropane (DBCP) used as a nematocide for soil ever. Developing ultra microanalysis method of DBCP is very important and significance, because DBCP has strong endocrine disrupting action.

In an experiment of this time, we examined the analysis method that combined concentration by solid phase extraction with the HS-GC/MS method. As a result, ultra microanalysis method(0.01  $\mu$ g/l in water) of aquatic DBCP became possible in adopting cartridge for solid phase extraction of Waters® Sep-Pak Plus PS-2 and back-flash elution method.

This analysis method is new, and deserves attention.

キーワード 1,2-ジブロモ-3-クロロプロパン(DBCP) 固相抽出 バックフラッシュ溶出法 環境ホルモン

### はじめに

1996年、米国の動物学者Colbornらが、その著書の科学推理小説“*Our Stolen Future : Are We Threatening Our Fertility, Intelligence, and Survival? — A Scientific Detective Story*”のなかで、化学物質が生体内であたかもホルモン物質のように作用し、生殖機能を阻害したり、次世代の健康に悪影響を及ぼしたりすると警告した<sup>1)</sup>。これが、内分泌攪乱化学物質、いわゆる、環境ホルモン問題の発端になったことはよく知られている。

わが国においては、平成10年5月、環境庁が「外因性内分泌攪乱化学物質への環境庁の対応方針について—環境ホルモン戦略計画SPEED'98—」を定め、約70物質群を環境ホルモンとの疑いがあるとして、リストアップし<sup>2)</sup>、その測定方法に対する基本的な考え方を示した<sup>3)</sup>。

それを受け、香川県では、平成11年度から3ヵ年計画で、環境ホルモンのうち48物質群をピックアップし、分析方法の検討を行った。ほとんどの物質群については、

既存の方法<sup>3)4)5)</sup>を有効に活用することで、高精度な分析が可能となったが、揮発性有機化合物の1,2-ジブロモ-3-クロロプロパン (DBCP) は、日常のVOC分析で使用しているヘッドスペースオートサンプラー付ガスクロマトグラフ質量分析装置の感度不足のため、高感度測定が不可能であった(図1)。

このDBCPという化合物は、かつては強力で有用な土壤線虫用殺虫剤として使用された経緯のある農薬であるが、ラットでの実験において、精巣や生殖腺に異常が見られたほか、DBCP製造工場の従業員や散布作業者に無精子症などの障害が生じたといわれている<sup>6)7)8)9)10)11)12)13)</sup>。また、米国イリノイ州EPAのリストでは、内分泌攪乱作用が既知である物質のひとつに挙げられており、人間や動物に対して、内分泌系への影響が見出されたとされている<sup>14)</sup>。

日本国内において、農薬としての製造停止から20年以上経過しており、現在のところ、人体や野生動物への悪影響を懸念すべき材料はない<sup>3)</sup>と考えられるが、化学物質としては依然、重要であると考えられるので、このDBCPの高感度分析に取り組むことにした。

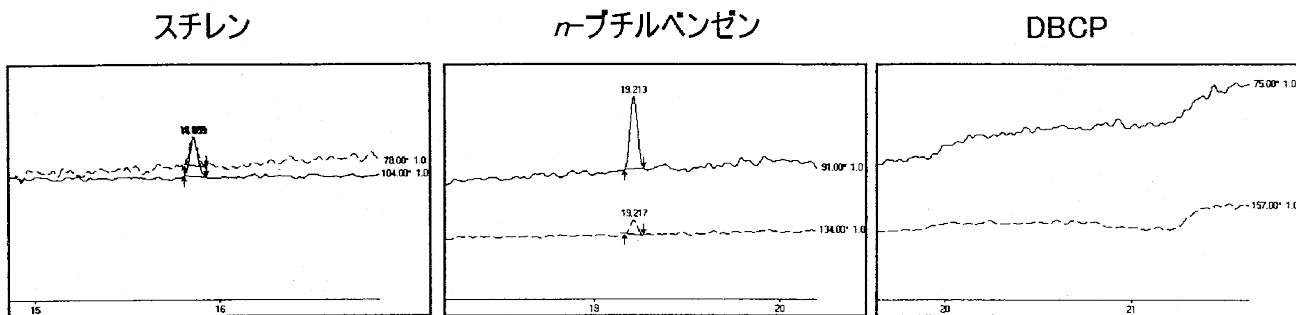


図1 各化合物のSIMクロマトグラム(各0.01 μg/l in Water)

前述したように環境ホルモンのリストに挙げられている物質群は、約70種類にも及んでおり<sup>2)</sup>、すべての環境ホルモン物質を、迅速に環境中の存在量を把握するためには、可能な限り、一斉分析法を取る必要がある<sup>3)</sup>。そこで、DBCPと同じく揮発性物質で、環境ホルモンのリストに挙がっている、スチレンと*n*-プロピルベンゼン(注. *n*-プロピルベンゼンについては、平成12年10月、環境庁平成12年度第2回内分泌攪乱化学物質問題検討会でリスクが想定しがたいとして環境庁のリストからは削除された<sup>15)</sup> <sup>16)</sup>)との一斉分析法をとることにし、前述したヘッドスペースオートサンプラー付GC/MS装置をはじめ日常使用している機器器具等を有効に活用したうえで、0.01 μg/lを目標検出限界<sup>3)</sup>として、検討することにした。

また、これらの化合物は、強い揮発性をもっているため、他の化合物のように、ロータリーエバポレータなどを用いて濃縮をしたのでは、損失が激しいと予想される。そこで、濃縮に固相抽出法の適用を検討したところ、新規な知見が得られたので、ここに報告する。

## 調査方法

### 1. 試薬

スチレン、*n*-プロピルベンゼン、DBCPの各標準物質については、いずれも、東京化成製 1 mg/ml(メタノール溶液)、1 mlアンプル入りを用いた。

内部標準物質：4-ブロモフルオロベンゼンは、東京化成製 1 mg/ml(メタノール溶液)、1 mlアンプル入りを用いた。

メタノールは、和光純薬製トリハロメタン測定用を用いた。

精製水は、市販のミネラルウォーターをそのまま使用

した。

塩化ナトリウムは、和光純薬製特級試薬をそのまま使用した。

固相抽出に用いた固相カートリッジは、いずれもWaters社製で、Sep-Pak Plus AC-2, Sep-Pak Plus C18, Sep-Pak Plus PS-2の3種を用いた。

### 2. 装置

#### 2-1 固相抽出装置

Zymark社製AutoTrace SPE WORKSTATION

流速：15ml/min

コンディショニング：メタノール10ml, 精製水10ml

洗浄：精製水10ml

脱水：約5秒(吸引)

溶出：メタノール

#### 2-2 ヘッドスペースオートサンプラー付ガスクロマトグラフ質量分析装置

ヘッドスペースオートサンプラー：PERKIN ELMER社製HS-40

サンプル加熱温度：60°C(30min)

ニードル加熱温度：110°C

トランスファーチューブ温度：150°C

キャリアーガス圧：150kPa(He)

サンプル加圧時間：3min

サンプル注入時間：0.2min

ガスクロマトグラフ部：島津製作所 GC-17A

カラム：J&W社製 DB-624(0.32mm I. D. ×60m, 1.8 μm)

昇温条件：40°C(4min)→10°C/min→200°C(3min)

注入口温度：150°C

質量分析部：島津製作所 QP-5000

MSインターフェイス温度：230°C

イオン化方式：EI  
 イオン化電圧：70eV  
 イオン化電流：60  $\mu$ A  
 検出器電圧：2.0kV

測定イオン(m/z)

スチレン：104, 78

n-ブチルベンゼン：91, 134

DBCP：75, 157, 155

## 結果及び考察

### 1. ヘッドスペース用試料調製条件の決定

固相抽出で得られるメタノール溶出液をよりよい条件で分析するため、まず、ヘッドスペース用試料調製条件の検討を行ったところ、メタノール抽出液1mlに水を9ml加え、塩化ナトリウム3gを可能な限り溶解させた条件が最適であった(図2)。これは、メタノール抽出液と水を混合した際、DBCP等が分離したためであると考えられる。

### 2. 装置検出限界

上記の調整条件で、DBCPのピークが確認できた最低濃

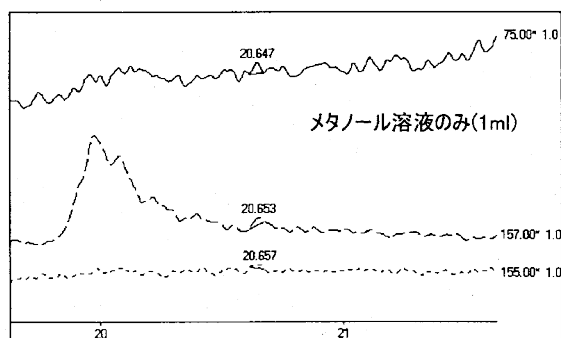


図2 HS用試料調製条件の決定 (DBCP:100  $\mu$ g/l in メタノール)

表1 装置検出限界

	スチレン	n-ブチルベンゼン	DBCP
標準偏差(s)	0.0215 $\mu$ g/l	0.0240 $\mu$ g/l	0.0444 $\mu$ g/l
変動係数(%)	4.21%	4.69%	9.77%
検出限界(3 $\times$ s)	0.0645 $\mu$ g/l	0.0720 $\mu$ g/l	0.133 $\mu$ g/l
定量限界(10 $\times$ s)	0.215 $\mu$ g/l	0.240 $\mu$ g/l	0.444 $\mu$ g/l

(HS用試料濃度:0.5  $\mu$ g/l, n=5)

度(0.5  $\mu$ g/l)で繰り返し試験を行い、得られた標準偏差(s)から、検出限界(3 $\times$ s)及び定量限界(10 $\times$ s)を算出したところ(表1)、いずれの化合物においても定量限界値が0.5  $\mu$ g/lを下回ったため、分析装置としては、0.5  $\mu$ g/lの測定は、定量的にも可能であると判断した。

### 3. 濃縮率の決定

ここまでを整理すると(図3)、メタノール溶出液を10倍希釈して作成したヘッドスペース用試料(濃度:0.5  $\mu$ g/l)の測定が可能となったことは、メタノール溶出液としては、5  $\mu$ g/lの測定が可能ということであり、今回、目標としている0.01  $\mu$ g/lの水試料を測定するためには、500倍濃縮が必要であることを意味する。

したがって、水試料500mlを固相抽出に供し、メタノール1mlで溶出させ、その全量をヘッドスペース用試料に供するとよいということになるが、1mlに定容し、全量を移すことは困難であり、固相カートリッジ自体に水分が含まれる場合、メタノールによって、その水分が溶解除去されるまでは、抽出効率はあまり良くないと予想される。そこで、水試料1000mlを固相抽出に供し、メタノールで溶出するとともに2mlに定容し、内部標準物質を一定量添加することで容量を補正し、ホールピペットで1mlを分取し、ヘッドスペース用試料に供することにした。

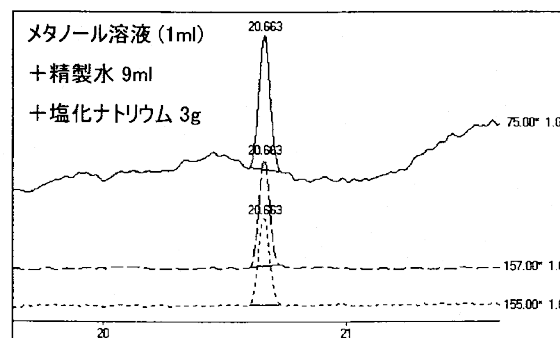


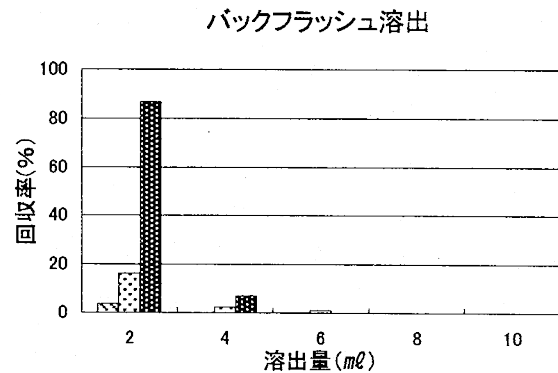
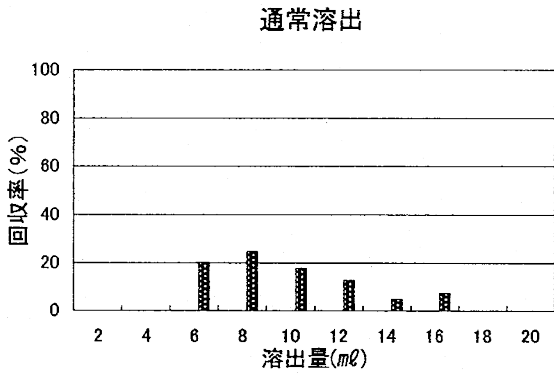
図3 濃縮条件の決定

#### 4. 固相カートリッジの選択

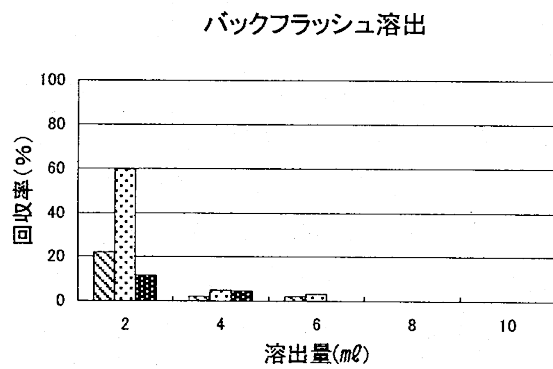
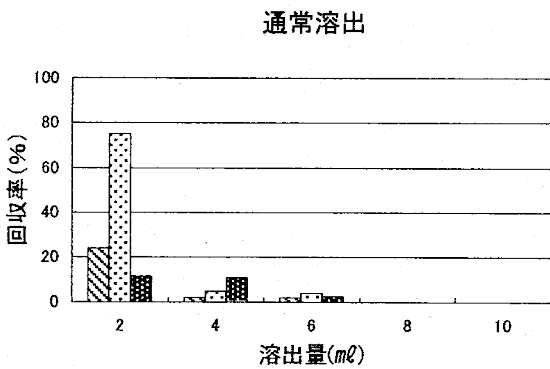
精製水に標準物質を添加し作成した0.1 μg/lの水試料を固相抽出に供し、3種類の固相カートリッジそれぞれの溶出パターンを見た。溶出方法は、試料を流したのと

同じ方向に溶出させる通常溶出法と逆方向に溶出させるバックフラッシュ溶出方法の2種類で検討し、2 mlずつのフラクションに分画した(図4)。

##### Sep-Pak Plus AC-2



##### Sep-Pak Plus C18



##### Sep-Pak Plus PS-2

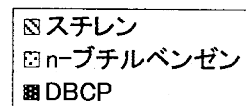
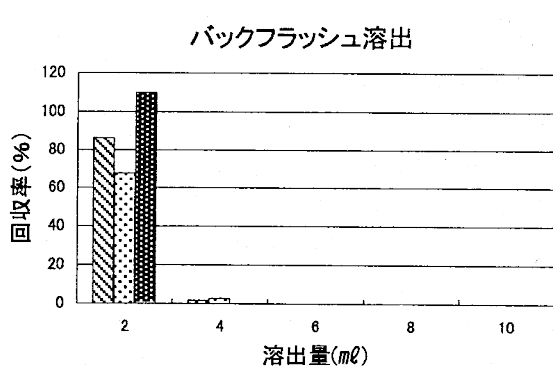
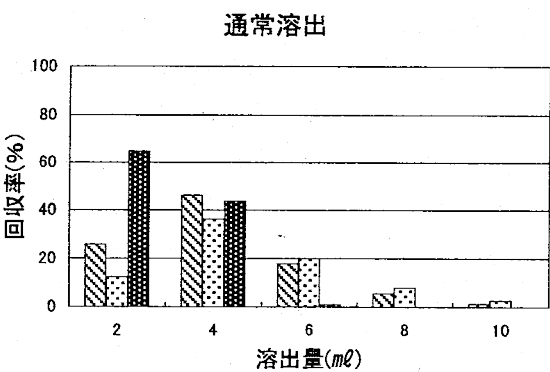


図4 固相抽出による溶出パターン

活性炭を充填してあるSep-Pak Plus AC-2の場合、DBCPについては、通常溶出方法では数フラクションに分かれて溶出し、バックフラッシュ溶出方法では第1フラクションに溶出し、回収率はともに約90%であった。スチレンと*n*-ブチルベンゼンについては、判断に多少苦しむが、吸着が強すぎて、メタノール程度の溶媒では溶出できないと考えられる。DBCPのみの分析を行うときは、バックフラッシュ溶出方法を採用することで分析は可能であるが、一斉分析法という観点からみると、不適當であった。

オクタデシルシラン (ODS) を充填してあるSep-Pak Plus C18の場合、*n*-ブチルベンゼンでやや良好な回収率を示したが、スチレンとDBCPはほとんど回収されていないことから、このカートリッジは、負荷量のキャパシティーが小さく、適用は不可能であると判断した。

スチレンジビニルベンゼン共重合体が充填してあるSep-Pak Plus PS-2の場合、スチレンとDBCPはともに100%近い回収率を示し、*n*-ブチルベンゼンについても70%程度の回収率を示した。特にバックフラッシュ溶出の場合、スチレンとDBCPは第1フラクションではほぼ全量回収できたことから、ほとんど充填剤の上部でのみで吸着されていると考えられ、負荷量はかなり高いと推定できる。

よって、固相カートリッジにはSep-Pak Plus PS-2を採用し、バックフラッシュ溶出方法で溶出することに決定した。

## 5. 低濃度添加回収試験

以上の条件で、0.01  $\mu\text{g}/\text{l}$ に調製した水試料に対して、低濃度添加回収試験を行った(表2)。

表2 低濃度添加回収試験

	スチレン	<i>n</i> -ブチルベンゼン	DBCP
回収率(%)	98.4%	67.6%	110%
変動係数(%)	7.99%	9.49%	61.9%

(0.01  $\mu\text{g}/\text{l}$ , n=5)

その結果、スチレンとDBCPはともに100%近い良好な回収率を示し、*n*-ブチルベンゼンについても70%近い回収率を示した。また各物質の変動係数も10%を下回っており、ばらつきも非常に小さい。また、DBCPのSIMクロマトグラムを見ても、 $m/z=75$ のピークのS/N比は3~6程度と十分な強度があった(図5)。

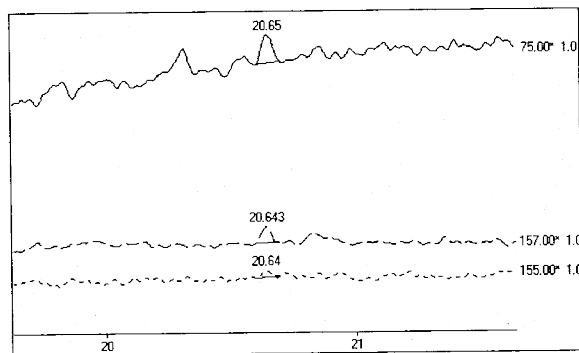


図5 DBCPのSIMクロマトグラム

## 6. 本分析方法の応用の可能性について

DBCPは、シトクロームP450によって、DNAと直接結合能力のある強力な変異原物質である2-プロモ-2-プロペナール<sup>17)23)</sup>に活性化されることが知られている<sup>18)</sup>。また、N-アセチルシステイン抱合やグルタチオン抱合を受け、活性化される経路も存在している<sup>18)</sup>。これらのシトクロームP450を介した活性化のメカニズムがDBCPの毒性の本態をなすものと考えられる。しかしながら、直接、精子に対して毒性があったという報告もある<sup>19)</sup>。これらの作用は、プロパンの臭化物共通のメカニズムであると考えられており、実際、近年、韓国で2-プロモプロパン(2BP)の暴露を受けた人に、DBCPと同様な障害が生じたとの報告もある<sup>19)20)21)22)</sup>。特に、二臭化物の場合、物理化学的性質はDBCPと似かよって可能性があるため、これらに対しても、本分析法は適用可能であると考えられる。

また、本分析方法の固相抽出による濃縮を有効に適用すれば、直接、HS-GC/MSで測定可能な揮発性有機化合物をSCAN法で分析できる可能性がある。SCAN法による分析データの蓄積は、後年、環境問題となりうる化学物質の過去の時点における動態が明らかとなる可能性があるため、試料の10年、20年単位の長期保存と同じくらい意義がある。実際、今回対象にした物質の保持時間近辺に、ダイオキシンの前駆物質と想像されるさまざまな形態の塩素化アルキルベンゼンが検出されるため、これらの形態を知る上で大きな手がかりとなる可能性がある。

## ま と め

1. Waters社製固相カートリッジSep-Pak Plus PS-2とバックフラッシュ溶出方法を用いた固相抽出方法とへ

ッドスペース-ガスクロマトグラフ質量分析法を組み合わせることで、DBCPの高感度分析が可能となった。本分析方法は、固相抽出を組み合わせた新規な分析方法として、注目に値するものである。

2. 同時に、スチレンと $n$ -ブチルベンゼンとの一斉分析が可能である。
3. プロパンの臭化物をはじめ、多くの揮発性物質に適用できる可能性がある。
4. 物質によれば、SCAN分析が適用できる可能性がある。

## 文 献

- 1) 長尾力訳(原著;T. Colborn, D. Dumanoski, and J. P. Myers): 奪われし未来(増補改訂版), 1-466, 翔泳社, (2001).
- 2) 環境庁: 外因性内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について -環境ホルモン戦略計画SPEED '98-, (1998).
- 3) 日本環境化学会: 第26回日本環境化学会講演会予稿集, (1998).
- 4) 環境庁水質保全局水質管理課: 外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル(水質、底質、水生生物), I-1-XI-10, (1998).
- 5) 環境庁水質保全局: 農薬等の環境残留実態調査分析法-環境中の極低濃度農薬等の効率的分析手法-, 1-164, (2000).
- 6) J. R. Goldsmith: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 26, 300-306, 1997.
- 7) G. Potashnik and A. Porath: *J. Occup. Environ. Med.*, 37, 1287-1292, 1995.
- 8) J. Lahdetie: *J. Occup. Environ. Med.*, 37, 922-930, 1995.
- 9) G. Potashnik and M. Phillip: *Andrologia.*, 20, 90-94, 1988.
- 10) G. Potashnik, J. Goldsmith, and V. Insler: *Andrologia.*, 16, 213-218, 1984.
- 11) D. W. Warren, J. R. Wisner Jr, and N. Ahmad: *Biol. Reprod.*, 31, 454-463, 1984.
- 12) D. W. Warren, N. Ahmad, and P. K. Rudeen: *Biol. Reprod.*, 39, 707-716, 1988.
- 13) E. M. Lui and G. P. Wysocki: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 90, 299-314, 1987.
- 14) <http://www.nihs.go.jp/hse/environ/illiepatable.htm>
- 15) <http://www.env.go.jp/chemi/end/kentol202/ref06.pdf>
- 16) 環境庁: 外因性内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について -環境ホルモン戦略計画SPEED '98-(2000年11月版), 39, (2000).
- 17) E. Eder and C. Hoffman: *Arch. Toxicol.*, 68, 471-479, 1994.
- 18) G. L. Weber, R. C. Steenwyk, P. G. Pearson, and S. D. Nelson: *Chem. Res. Toxicol.*, 8, 560-573, 1995.
- 19) 大谷勝巳: *Endocrine Disrupter NEWS LETTER*, 3, 2, 6, 2000.
- 20) Y. Kim, J. Park, and Y. Moon: *Scand. J. Work. Environ. Health.*, 22, 387-391, 1996.
- 21) T. Nakajima, S. Shimodaira, G. Ichihara, M. Kamijima, Y. Takeuchi, N. Asaeda, T. Kumazawa, H. Iwai, and I. Ichikawa: *J. Occup. Health.*, 39, 81-82, 1997.
- 22) O. Wada: *Asian. Med. J.*, 42, 291-294, 1999.
- 23) <http://www.hihs.go.jp/DCBI/PUBLIST/ehctrans/tran3/ehc17/ehc17.htm>