

【調査研究】

LC-MS/MSを用いた魚介類中有機スズ化合物の同時分析法の検討
Study on a Method for Simultaneous Determination of Organotin compounds
in marine products by LC-MS/MS

難波順子, 肥塚加奈江, 赤木正章, 金子英史, 北村雅美, 吉岡敏行* (衛生化学科)

*水質科

Junko Namba, Kanae Koeduka, Masaaki Akaki, Hidefumi Kaneko, Masami Kitamura, Toshiyuki Yoshioka*
(Food and Drug Chemical Research Section)

*Water Section

要 旨

LC-MS/MSを用いた魚介類中トリブチルスズ化合物 (以下「TBT」という。) とトリフェニルスズ化合物 (以下「TPT」という。) の同時分析法を検討した。アセトン及びヘキサン混液で抽出し, アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂を行い, 固相カラムで精製した後, LC-MS/MSで測定を行う分析法で, 回収率は100.6 ~ 105.5%, 併行精度は3.6 ~ 6.4%と十分な定量性が得られた。水産物8種類について実態調査を行ったところ, 4種類からTBT, TPT共に検出されたが, その値はTBTが0.002 ~ 0.004 $\mu\text{g/g}$, TPTが0.001 ~ 0.014 $\mu\text{g/g}$ であり, 健康影響上の問題の無い値であった。

[キーワード: トリブチルスズ, トリフェニルスズ, 同時分析法, 液体クロマトグラフタンデム質量分析計]

[Key Words: TBT, TPT, simultaneous determination, LC-MS/MS]

1 はじめに

有機スズ化合物であるTBT及びTPT等は, 船底あるいは養殖魚網への甲殻類, 貝類, 海藻の付着防止を目的とした防汚塗料に使用されてきた結果, 海洋への汚染, 魚介類への残留が社会問題となった。

そのため, 有機スズ化合物は難分解性 (自然的作用による化学変化を生じにくい), 高蓄積性 (生物の体内に蓄積されやすい) で長期毒性 (継続的に摂取される場合には, ヒトの健康を損なうおそれがある) を有する化学物質として, 化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律 (以下「化審法」という。) により製造や使用などの規制が行われており, 岡山県でも魚介類中の有機スズ化合物 (TBT, TPT, ジブチルスズ化合物 (以下「DBT」という。) 及びジフェニルスズ化合物 (以下「DPT」という。)) の検査を実施している。その分析法は, 衛生試験法注解2010¹⁾ に示された試験溶液調製法に準拠した液液分配やテトラエチルホウ酸ナトリウム溶液による誘導体化で前処理を行いGC-MS/MSで測定する一斉分析法²⁾ であるが, この分析法は分析工程が煩雑なため, 分析に熟練する必要がある, 結果が出るまでに時間を要し, また, 誘導体化剤の取扱には発火の恐れなどがあり¹⁾ 注意を要する。そこで, 近年, GC/MS法に代わりLC/MS法による方法が報告されている^{3) ~ 5)}。今回, 誘導体化を必要とせず, 簡便に前処理を行いLC-MS/

MSで測定する分析法を検討したので報告する。

2 方法

2.1 試料

試料は, 添加回収用試料として県内で販売されていたアジ, カキを用いた。これらは, 事前に従来のGC-MS/MSで測定する一斉分析法²⁾ により, 分析対象とする有機スズ化合物が検出されないことを確認して用いた。実態調査試料には, 県内で販売されていたアナゴ, サッパ/ママカリ*, アカシタピラメ/ゲタ*, コイ, ボラ, カレイ, カキ及びハマチを用いた。

*: 地方名

2.2 標準品, 固相カラム及び試薬

標準品: 二塩化ジブチルスズ, 塩化トリブチルスズ, 二塩化ジフェニルスズ, 塩化トリフェニルスズ (和光純薬工業製)

混合標準溶液: 各標準を精秤し, アセトニトリルに溶解し標準原液 (1000 $\mu\text{g/mL}$) を調製した。これらを混合し, 適宜0.1%ギ酸 1mmol/L 酢酸アンモニウムアセトニトリル溶液で希釈した。

サロゲート化合物標準品: 塩化トリブチルスズ-d27及び塩化トリフェニルスズ-d15 (林純薬工業製)

サロゲート混合標準溶液: 各サロゲート化合物を精秤

し、アセトニトリルに溶解し標準原液 (1000 μ g/mL) を調製した。これらを混合し、適宜0.1%ギ酸 1mmol/L 酢酸アンモニウム アセトニトリル溶液で希釈した。

Florisil : SUPELCO製 LC- Florisil 1g/6mL
 ENVI-Carb/LC-NH2 : SUPELCO製 500mg:500mg/6mL
 ENVI-Carb : SUPELCO製 500mg/6mL
 多機能カラムMultiSep PR : Romer Labs製
 メンブレンフィルター : Millipore製 Millex-LCR 0.45 μ m
 その他の試薬 : 残留農薬試験用又は特級試薬を用いた。

2.3 装置及び測定条件

2.3.1 LC-MS/MS

1) LC条件

LC機種 : 島津製作所製 LC-20A 高圧グラジエントシステム
 カラム : Agilent製 Poroshell 120 SB-C18, 2.1 x 100mm, 2.7 μ m
 カラム温度 : 40℃
 移動相A : 水 : アセトニトリル (950:50, 20mmol/L ヘプタフルオロ酪酸 (以下「HFBA」という。))
 B : アセトニトリル : 水 (800:200, 20mmol/L HFBA)
 グラジエント条件 : A/B=90/10 (0-1min) →0/100 (10-20min) →90/10 (25-35min)
 移動相流量 : 0.2mL/min
 試料注入量 : 5 μ L

2) MS条件

MS機種 : Applied Biosystems製 API3200 QTrap

表1 モニターイオン

物質名	条件	Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)
TBT	定量	291.2	179.0
	定性	291.2	122.9
		291.2	235.1
TPT	定量	351.0	119.9
	定性	351.0	197.1
		351.0	273.0
TBT-d27	定量	318.3	190.3
	定性	318.3	126.0
		318.3	254.0
TPT-d15	定量	366.2	120.1
	定性	366.2	202.1
		366.2	118.8
DBT	定量	269.1	155.1
	定性	269.1	213.0
		269.1	120.9
DPT	定量	309.0	197.1
	定性	309.0	154.8
		309.0	77.2

インターフェース : Turbo V source

測定法 : MRMモード

イオン化モード : ESI positive モード

イオン源温度 : 400℃

イオン化電圧 : 5500V

モニターイオン : 表1に示した

2.3.2 ゲル浸透クロマトグラフ (GPC)

カラム : 昭和電工製 GLNpak PAE-2000 AC
 (プレカラム : PAE-G AC)

カラム温度 : 40℃

移動相 : アセトン : シクロヘキサン (95 : 5)

移動相流量 : 4mL/min

試料注入量 : 2mL

2.4 試験溶液調製方法

分析フローを図1に示す。細切した試料2.0gを50mL遠沈管に量り取り、サロゲート (TBT-d27及びTPT-d15) を各0.2 μ gになるよう添加した。次に、精製水10mL, 1mol/L塩酸溶液 5mL, 塩化ナトリウム 5g, アセトン : ヘキサン (1:5) 10mLを加えてポリトロンでホモジナイズした後、10分間振とうした。700×Gで5分間遠心分離した。上層を分取し、下層をヘキサンで再抽出した。上層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水した。

分液ロートに移し、ヘキサン飽和アセトニトリル30 mL



図1 分析フロー

を加え、5分間振とうした。静置した後、アセトニトリル層を分取した。分離したヘキサン層にヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加え、5分間振とう静置し、アセトニトリル層を分取した。この操作を更に行い、得られたアセトニトリル層を合わせ、0.5%酢酸アセトニトリル2mLを加えた後、約2mLまで減圧濃縮し抽出液を得た。

ENVI-Carb/LC-NH₂カラム及びMultiSep PRカラムに、それぞれ0.5%酢酸アセトニトリル10mLを注入しコンディショニングした。上側にENVI-Carb/LC-NH₂、下側にMultiSep PRを連結し、抽出液を負荷した。0.5%酢酸アセトニトリル5mLで容器を洗い込み、さらに0.5%酢酸アセトニトリル15mLを添加し溶出液を得た。溶出液に0.1%ギ酸1 mmol/L酢酸アンモニウム アセトニトリル溶液1mLを加え、1mL以下になるまで減圧濃縮した。濃縮液を0.1%ギ酸1mmol/L酢酸アンモニウム アセトニトリル溶液で1mLに定容した。メンブレンフィルターでろ過したものをLC-MS/MS測定用試験溶液とした。

3 結果及び考察

3.1 LC-MS/MS測定条件

3.1.1 MS条件

イオン化法はESI positive モードを選択し、条件の検討を行った。MSスペクトルで測定された各測定物質の最も強度が高いイオンのm/zは、TBT : 291.2, TPT : 351.0, TBT-d27 : 318.3, TPT-d15 : 366.2, DBT : 269.1, DPT : 309.0であり、これらは[M+H-HCl]⁺に相当するピークであった。これらをプリカーサーイオンとした場合に得られるプロダクトイオンを強度の高い順に表1に示した。一番強度が高いイオンを定量イオン、その他のイオンを定性イオンとした。これらの条件は既報^{4), 6)}でのLC/MS測定条件の検討の際に測定されたプリカーサーイオン及びプロダクトイオン生成過程の考察と一致していた。

3.1.2 LC条件

分析カラムはC18, Phenyl (Waters製Xbridge 2.1 x 150mm, 3.5 μm) 及びHILIC (ナカライテスク製COSMOSIL 2.0 x 150mm, 5 μm) を、移動相はアセトニト

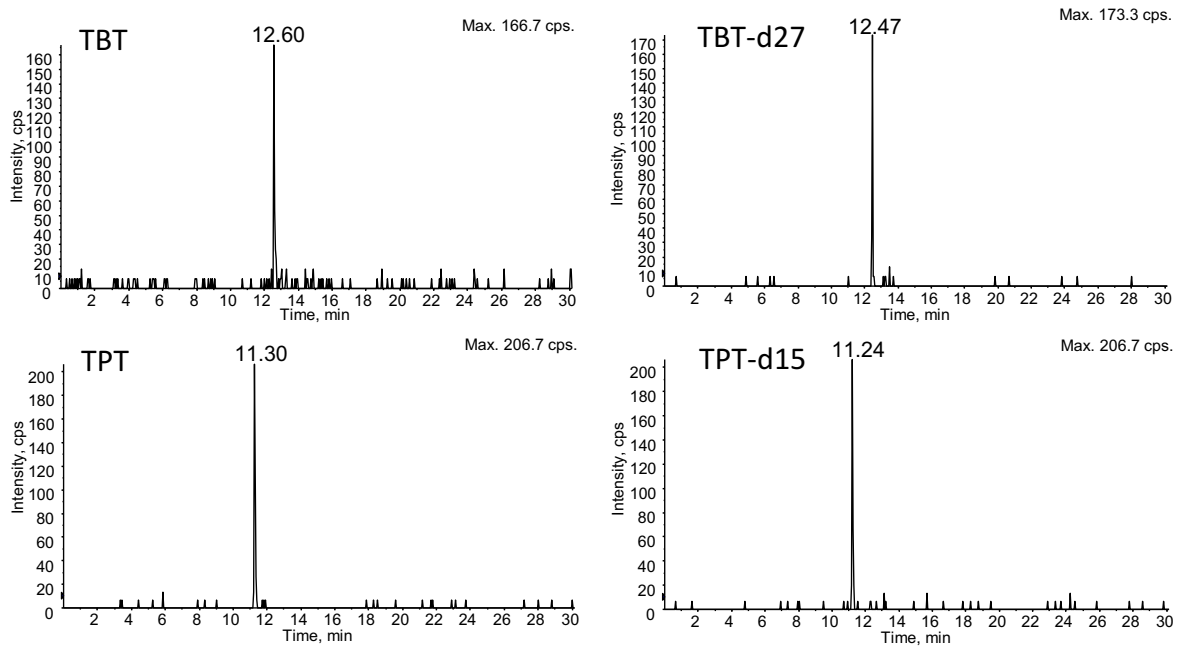


図2 MRMクロマトグラム (TBT, TPT, TBT-d27, TPT-d15 各0.002 μg/mL)

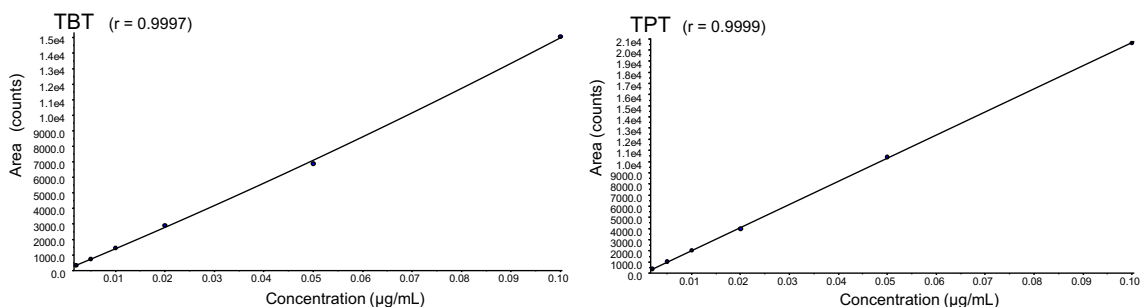


図3 検量線 (TBT, TPT)

リル,酢酸アンモニウム,ギ酸アンモニウムなどを各種組み合わせで検討した。その結果,アミノグリコシドの分析で用いられているC18カラムを用い,20 mmol/L HFBAを含有したアセトニトリルと水のグラジエント分析の条件⁶⁾でTBT,TPT,TBT-d27,TPT-d15標準品(0.002 μg/mL)は図2に示す良好なピーク形状を得ることが出来た。一方で,DBT,DPTは検討した全ての条件で感度が低く,良好なピーク形状を得ることが出来なかった。この結果から,DBT,DPTは以後の検討は行わなかった。

3.1.3 検量線及び定量限界値

0.002 μg/mLの濃度の混合標準溶液(検体濃度では0.001 μg/g)から得られるピークのS/N比を確認したところ,TBT,TPT,TBT-d27,TPT-d15標準品が目標値のS/N比 ≥ 10 を満たしていた。また,各標準品の0.002~0.1 μg/mL 0.1%ギ酸 1mmol/L 酢酸アンモニウム アセトニトリル溶液を6点調製し,LC-MS/MS測定を行った検量線を図3に示す。TBT,TPT共に良好な直線性(相関係数0.999以上)が得られた。目標とした定量限界値である検体濃度として0.001 μg/gで十分な定量性を確保できた。

3.2 試験溶液調製法

3.2.1 抽出法の検討

有機スズ化合物は強い共有結合,イオン結合により海産物中のタンパク質,血液などと結合していることが考えられるため⁸⁾,塩酸酸性下での抽出を検討した。小林らの方法⁵⁾を参考に,アセトン:ヘキサン混液で抽出することとし,その比を(1:1),(1:2),(1:3),(1:5)と変化させ,1mol/L塩酸,超純水,塩化ナトリウムを加えて抽出した結果を表2に示す。ヘキサンの比率を増やすほど抽出効率は良くなり,その効果はTBTで顕著であった。よって,アセトン:ヘキサン混液の比は(1:5)を採用し,抽出効率を増加させるためにヘキサンで再度抽出を行った。また,標準品を溶

かしている溶媒を乾固した後に再溶解するとTBTは60%程度に減少した。そのため,溶媒を濃縮する操作では0.5%酢酸アセトニトリル溶液を1mL添加した後に濃縮を行い,1mL以下程度になったら濃縮を止め,0.5%酢酸アセトニトリル溶液で1mLに定容した。なお,TPTは溶媒を乾固した後に再溶解した場合でも減少しなかった。

3.2.2 脱脂法の検討

脱脂法として,アセトニトリル/ヘキサン分配とGPCの検討を行った。アセトニトリル/ヘキサン(1:1)分配でのアセトニトリルへの分配率を表3に示す。1回での分配率はTBTが50%程度,TPTが90%程度であった。

GPCは魚介類中PCB検査の条件⁹⁾を参考に行い,TBT及びTPTの溶出結果を表3に示す。TBTは14~18分(4分:16mL),TPTは16~30分(14分:56mL)の画分に90%以上溶出した。大部分の脂肪成分は14分までに溶出する⁹⁾ので,脱脂法として有効であった。しかし,TPTの溶出時間が長いこと,洗浄も含めて1検体に1時間程度かかること等の理由により,アセトニトリル/ヘキサン分配を選択した。アセトニトリル/ヘキサン分配はアセトニトリルへの分配率を上げるために3回行うこととした。

3.2.3 精製法の検討

精製法としては固相カートリッジカラムのFlorisil,ENVI-Carb/LC-NH₂,ENVI-Carb及びMultiSep PRを検討した。標準溶液を0.5%酢酸アセトニトリル溶液に溶かし,各カラムに負荷した後,0.5%酢酸アセトニトリル溶液で溶出させた。結果を表4に示す。Florisil,ENVI-Carb/LC-NH₂,ENVI-Carbでは10mL,MultiSep PRでは15mLでほぼ100%溶出した。MultiSep PRは,脂肪酸エステル類の除去効果が高く,魚介類や畜産物試料の前処理方法として採用されている¹⁰⁾。そこで,精製効果を高めるために,MultiSep PRと性質の異なるカラム(Florisil又はENVI-Carb/LC-NH₂)をMultiSep PRの上に連結した連

表2 抽出溶媒の回収率(%)

物質名	アセトン:ヘキサン			
	1:1	1:2	1:3	1:5
TBT	41	44	62	92
TPT	84	86	92	96

表3 脱脂操作の回収率(%)

物質名	アセトニトリル/ヘキサン分配	GPC分画 (min)									合計
		12-14	14-16	16-18	18-20	20-22	22-24	24-26	26-28	28-30	
TBT	49	0	105	13	0	0	0	0	0	0	118
TPT	90	0	0	24	34	17	9	5	3	2	93

結カラム法での検討を行った結果を表5に示す。0.5%酢酸アセトニトリル溶液に溶かした標準溶液を各連結カラムに負荷すると、0.5%酢酸アセトニトリル溶液15mLでほぼ100%溶出した。なお、ENVI-Carb/LC-NH2で良い結果が得られたので、ENVI-CarbとMultiSep PRの連結カラムの検討は行わなかった。

ハマチ及びカキを試料として、試験溶液調製方法に従って得た抽出液を2種類の連結カラムを用いて精製したところ、FlorisilとMultiSep PRの連結カラムを用いたカキの溶出液のみが黄色に着色しており、精製が不十分であることが確認された。よって、ENVI-Carb/LC-NH2とMultiSep PRの連結カラムを採用した。

3.2.4 添加回収試験

添加回収試験はアジ及びカキを用いて実施した。細切したアジ及びカキ2gに各化合物を0.2μg添加し、試験溶液調製方法に従って5回併行で検査した。結果を表6に示す。回収率は100.6～105.5%、併行精度は3.6～6.4%であり、良好な結果が得られた。また、サロゲートの回収率はアジがTBT-d27：73.0%、TPT-d15：86.4%、カキがTBT-d27：74.7%、TPT-d15：89.9%であり、共に十分満足できる値であった。

4 実態調査

本法を用いて県内で市販されていた水産物8種類につ

表4 固相カラムの回収率 (%)

物質名	Florisil				ENVI Carb/LC-NH2				ENVI Carb				MultiSep PR			
	溶出液量 (mL)				溶出液量 (mL)				溶出液量 (mL)				溶出液量 (mL)			
	0-5	5-10	10-15	合計	0-5	5-10	10-15	合計	0-5	5-10	10-15	合計	0-5	5-10	10-15	合計
TBT	88	5	0	93	88	11	0	99	101	0	0	101	0	47	55	101
TPT	87	10	0	97	58	56	0	114	100	7	0	107	0	58	56	114

表5 連結カラムの回収率 (%)

物質名	Florisil + MultiSep PR					ENVI Carb/LC-NH2 + MultiSep PR				
	溶出液量 (mL)					溶出液量 (mL)				
	0-5	5-10	10-15	15-20	合計	0-5	5-10	10-15	15-20	合計
TBT	0	53	42	0	95	0	54	42	0	96
TPT	0	69	42	0	111	10	66	41	0	117

表6 添加回収試験結果

検体名	TBT		TPT	
	回収率(%)	併行精度(%)	回収率(%)	併行精度(%)
アジ	100.6	5.6	105.5	3.6
カキ	104.0	5.1	100.1	6.4

表7 実態調査検出結果 (μg/g)

検体名	TBT	TPT
アナゴ	0.002	0.005
ママカリ	0.004	0.003
ゲタ	< 0.001	< 0.001
コイ	< 0.001	< 0.001
ボラ	< 0.001	< 0.001
カレイ	< 0.001	< 0.001
カキ	0.004	0.014
ハマチ	0.003	0.001

いて実態調査を行った検査結果を表7に示す。アナゴ、マカリ、カキ及びハマチ4検体からはTBT,TPT共に検出され、その値はTBTが0.002～0.004 $\mu\text{g/g}$ 、TPTが0.001～0.014 $\mu\text{g/g}$ であった。ゲタ、コイ、ボラ、カレイ4検体からはTBT,TPT共に検出されなかった。また、カキ及びハマチを液液分配やテトラエチルホウ酸ナトリウム溶液による誘導体化で前処理を行いGC-MS/MSで測定する一斉分析法²⁾により検出した値は今回の分析法の検出値の2倍程度であった。この原因はGC-MS/MS測定ではマトリックス効果で値が高くなる傾向がある一方で、LC-MS/MS測定ではマトリックス効果によってイオン化抑制が起こり、値が低くなる傾向があること等が考えられた。今後は、環境標準物質を用いた検討等を行い両検査法の検証を行っていききたい。

厚生労働省のビス(トリブチルスズ)オキシド(以下「TBTO」という。)の暫定許容摂取量は1.6 $\mu\text{g/kg/日}$ としている¹¹⁾。平成26年の国民健康・栄養調査の結果、魚介類の平均摂取量は74.5g/人/日(20歳以上)とされていることから、体重50kgの人のTBTO暫定許容濃度は1.1 $\mu\text{g/g}$ となる。今回TBTの検出値が最も高かったカキ0.004 $\mu\text{g/g}$ (TBTO換算値0.004 $\mu\text{g/g}$)はこの値の0.4%相当であり、健康影響上の問題はないと考えられる値であった。

TPTについては、FAO(国連食糧農業機関)とWHO(世界保健機構)がTPTの暫定許容摂取量は0.5 $\mu\text{g/kg/日}$ としている¹²⁾。体重50kgの人のTPT暫定許容濃度は0.34 $\mu\text{g/g}$ となる。今回TPTの検出値が最も高かったカキ0.014 $\mu\text{g/g}$ はこの値の4.1%相当であり、健康影響上の問題はないと考えられる値であった。

5 まとめ

LC-MS/MSを用いた魚介類中TBT及びTPTの迅速同時分析法の検討を行い、次の結果を得た。

- (1) TBT,TPT,TBT-d27,TPT-d15をLC-MS/MSで感度良く測定出来た。しかし、DBT,DPTを感度良く測定することは出来なかった。
- (2) 抽出法は塩酸性下でアセトン:ヘキサン(1:5)で抽出し、抽出効率を増加させるためにヘキサンで再抽出を行うこととした。
- (3) 脱脂法はアセトニトリル/ヘキサン分配を採用し、1回での分配率はTBTが50%程度、TPTが90%程度であったため、3回抽出を行った。
- (4) 精製法はENVI-Carb/LC-NH₂とMultiSep PRの連結カラムを採用し、0.5%酢酸アセトニトリル溶液15mL

でほぼ100%溶出させた。

- (5) 添加回収試験はアジ及びカキを用いて実施し、回収率は100.6～105.5%、併行精度は3.6～6.4%であり、良好な結果が得られた。
- (6) 実態調査を水産物8種類について行った。4種類からTBT,TPT共に検出され、その値はTBTが0.002～0.004 $\mu\text{g/g}$ 、TPTが0.001～0.014 $\mu\text{g/g}$ であり、健康影響上の問題はない値であることがわかった。

今回は高濃度での添加回収試験を行ったので、より低濃度での添加回収試験及び環境標準物質を用いた検討等を引き続き行っていきたい。また、DBT,DPTのLC測定条件及び前処理方法の再検討もを行い、TBT及びTPTとの同時分析法の可能性を検討したい。

文 献

- 1) 衛生試験法・注解2010 2.4食品汚染物試験法 3) 有機スズ化合物(ジブチルスズ(DBT)、トリブチルスズ(TBT)、ジフェニルスズ(DPT)およびトリフェニルスズ(TPT))(2010年2月10日発行)
- 2) 山辺真一、武志保、肥塚加奈江、今中雅章：魚介類中の有機スズ実態調査(Ⅱ)、岡山県環境保健センター年報、29、117-122、2005
- 3) 吉元秀和、村上弘、福島孝兵、吉田達雄、飛野敏明：熊本県の港湾における有機スズ化合物の生物濃縮に関して—LC/MS/MSによる分析—、熊本県保健環境科学研究所報、39、35-42、2010
- 4) 古川浩司、橋本真、橋爪清：LC/MS/MSによる海水中のトリブチルスズ及びトリフェニルスズ分析、三重県保全環境事業団報告、42、175-182、2013
- 5) 小林麻紀、酒井菜穂子、上條恭子、小池裕、新藤哲也：LC-MS/MSを用いた魚介類中トリブチルスズ及びトリフェニルスズ化合物の分析、東京都健康安全研究センター年報、66、147-151、2015
- 6) Joseph H.Banoub, Judith Miller-Banoub, George V.Sheppard, Howard J.Hodder：Electrospray tandem mass spectrometric measurements of organotin compounds, Spectroscopy 18, 95-112, 2004
- 7) Andy Zhai：Agilent Bond Elut Plexa SPE, Agilent Poroshell 120カラム, LC/タンデムMSを使用したウシ筋肉中のアミノグリコシドの分析, Agilent Technologies アプリケーションノート
- 8) 食品衛生検査指針：Ⅱ. 試験法, 第6章食品中の汚染物質及び変質物, 試験法9.有機スズ(トリブチルスズおよびトリフェニルスズ), 694-702

- 9) 剣持堅志,武志保,難波順子,吉岡敏行, 西島倫子ら：
食品中の有害化学物質等に関する研究－ポリ塩化ビ
フェニル類（PCBs）全異性体及びポリ塩化ナフタレ
ン類（PCNs）の同時分析法確立のための基礎的検討
－, 岡山県環境保健センター年報, 26, 72-81, 2002
- 10) 吉岡敏行,難波順子,浅田幸男,赤木正章,北村雅美：食品
と医薬品等に含まれる有害物質等の分析技術の開発
に関する研究－水産物及び穀類等の残留農薬分析法
の検討について－, 岡山県環境保健センター年報, 40,
77-83, 2016
- 11) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課長：衛乳第18号,魚介類
中のピストリブチルオキシド（TBTO）について（通
知）,1985
- 12) FAO/WHO Monograph,1970 Evaluations of some
pesticides residues in food , 1971