

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

小林 麻紀^a, 酒井 奈穂子^a, 上條 恭子^a, 小池 裕^a, 新藤 哲也^a

魚介類中のトリブチルスズ化合物 (TBT) 及びトリフェニルスズ化合物 (TPT) の分析法を検討した。試料からアセトン及び*n*-ヘキサン混液で抽出し、ゲル浸透クロマトグラフィーで脱脂後、フロリジル及びグラファイトカーボンブラックカートリッジカラムに負荷し、0.5%酢酸含有メタノールで溶出して精製を行った。測定にはLC-MS/MSを用いた。種々の魚介類に添加したときの回収率は10 ng/gで85.4%~102.9%であった。本分析法は魚介類を対象としたTBT及びTPTの分析法として十分適用できると考える。

キーワード: トリブチルスズ化合物, トリフェニルスズ化合物, 魚介類, ゲル浸透クロマトグラフ, 液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計

はじめに

トリブチルスズ化合物 (TBT) 及びトリフェニルスズ化合物 (TPT) は、船底塗料や漁網防汚剤として使用されていたが、これら有機スズ化合物が海洋を汚染し、生物濃縮による魚介類への蓄積が問題となり、各国で有機スズ化合物の法的な規制が行われた。我が国においても、化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律 (化審法) で有機スズ化合物の製造や使用などの規制が行われ、海洋汚染は急速に改善され、魚介類中のTBT, TPTの含有量は減少傾向にあるが、低レベルでの汚染は持続している^{1,2)}。

有機スズ化合物の分析には、GC-ECD, GC-FPDまたはGC-MSを用いる報告³⁻¹²⁾が多い。しかし、これらは多くの液液分配操作や誘導体化を要する。近年、LC-MS/MSを用いた報告¹³⁻¹⁵⁾もあるが、多種類の魚介類について検討した報告はほとんどない。

今回、魚介類を対象とした低濃度のTBT及びTPTの検査に対応するため、誘導体化を必要としないLC-MS/MSで測定する試験法について検討したので報告する。

実験方法

1. 試料

市販のアサリ、アナゴ、イカ、スズキ、エビ、カニ、カレイ、サケ、タラ及びボラを用いた。

2. 試薬

1) 標準溶液

TBT及びTPT原液は関東化学 (株) の環境分析用標準原液1,000 µg/mLを適宜メタノールで希釈して用いた。

2) カートリッジカラム

ジーエルサイエンス社製のInertSep® FL (充てん剤量50 mg) 1 mL及び InertSep® GC (充てん剤量50 mg) 1 mL,

を用いた。

3) その他の試薬

有機溶媒は残留農薬試験用及びLC/MS用を用いた。塩化ナトリウム及び無水硫酸ナトリウムは残留農薬試験用を、塩酸及び酢酸は特級を用いた。

3. 装置

1) 自動ゲル浸透クロマトグラフ (GPC)

ジーエルサイエンス社製 G-Prep GPC8100

2) 液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計

Waters社製Quattro Premier XE System

4. 測定条件

1) GPC分析条件

GPCカラム: Bio-Beads S-X3 Beads 300×15 mm (200-400 mesh), 移動相: アセトン・*n*-ヘキサン (1:1) 混液, 流速: 2.0 mL/min, カラム温度: 40 °C, ダンプ時間: 14分, コレクト時間: 22分 (有機スズ分画)。

2) LC-MS/MS

(1) LC条件 分析カラム: サーモフィッシャーサイエンティフィック社製 Accucore Phenyl-Hexyl 粒子径2.6 µm, 2.1 mm i.d.×100 mm

移動相: A液 0.1%(v/v)ギ酸含有2 mmol/L酢酸アンモニウム溶液, B液 メタノール, グラジエント条件: 0分 A: B=90:10 → 4分 B=100 (4分保持) → 8.1分 A: B=90:10 → 10分 A: B=90:10, 流量: 0.3 mL/min, カラム温度: 50 °C

(2) LC-MS/MS条件 イオン化法: ESI(+), キャピラリー電圧: 3 kV, ソース温度: 120 °C, デソルベーション温度: 450 °C, コーンガス流量: N₂, 50 L/h, デソルベーションガス流量: N₂, 850 L/h. 測定条件はTable 1に, クロ

^a 東京都健康安全研究センター食品化学部残留物質研究科
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

マトグラムをFig.1に示した。

Table 1. MRM Mode Settings for Positive Ion MS-MS Analysis of TBT and TPT

Compound	Precursor ion	Product ion	Corn voltage(V)	Collision energy(eV)
TBT	291	179 ¹⁾	22	12
	291	123 ²⁾	22	30
TPT	351	197 ¹⁾	40	24
	351	120 ²⁾	40	36

1) Quantitative ion

2) Qualitative ion

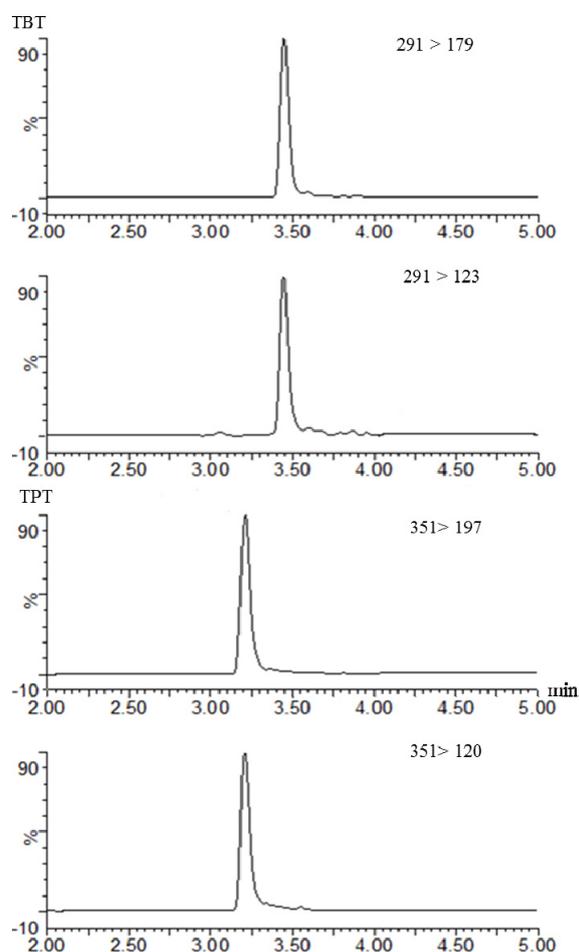


Fig.1. LC-MS/MS Chromatograms Obtained MRM Mode for TBT and TPT 2.5 ng/mL

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

イカ、スズキ、カレイ、サケ、サバ、タラ及びボラは可食部をフードプロセッサで細切、均一化した。アサリ、エビ及びカニは殻を除去し、フードプロセッサで細切、均一化した。試料2.0 gに塩化ナトリウム2 g, 1 mol/L の塩酸溶液5 mLを加え、30秒間ホモジナイズした後、アセトン・*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液10 mLを加え1分間ホモジナイ

ズし、9,000 rpmで5分間遠心分離した。上層を分取し、残りにアセトン・*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液10 mLを加え同様に操作し、得られた上層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水後、約3 mLまで減圧濃縮した。

2) 精製

濃縮した抽出液にアセトン・*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液を加え4 mL に定容後、2 mLをGPCに注入し、有機スズの分画を分取した。この分画液を約2 mLまで濃縮し、0.5 % (v/v) 酢酸含有メタノールで2 mLに定容した。あらかじめ0.5 % (v/v) 酢酸含有メタノールでコンディショニングした、フロリジル (FL) 及びグラファイトカーボンブラック (GCB) カートリッジカラムを接続したものに1 mL負荷した。次いで0.5 % (v/v) 酢酸含有メタノールを1 mLずつ2回注入した。溶出液を約2 mLまで濃縮し、メタノールで定容後、試験溶液とした。

結果及び考察

1. LC及びMS条件の検討

LC条件はLC-MS/MSを用いた分析法の報告¹³⁻¹⁵⁾を参考に、分析カラムはC18, Amide及びPhenyl Hexylについて、移動相はギ酸、酢酸アンモニウム、アセトニトリル及びメタノールとのグラジエント分析について検討した。その結果、Phenyl Hexylを用い、0.1 % (v/v) ギ酸含有2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及びメタノールとのグラジエントにより、定量分析に適した良好なピーク形状を得ることができた。

MS条件は、ESIモードで測定する最適な条件を検討した。MS スペクトルで測定された最も強度が高いイオンは、TBTで m/z 291, TPTでは m/z 351であった。これらをプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンは、TBTでは m/z 179及び123が、TPTでは、 m/z 197及び120が得られ、LC-MS/MSを用いた分析法の報告¹³⁻¹⁵⁾と同様であった。このうち、イオン強度の最も高いものを定量用イオン (TBT : m/z 179, TPT : m/z 197) に、次にイオン強度の高いものを定性用イオン (TBT : m/z 123, TPT : m/z 120) とした。

2. 抽出法の検討

TBT及びTPTは脂質に親和性を示し、水には極めて溶けにくい。魚介類からの抽出は脂肪組織と溶媒との間で効率的な分配 (抽出) が行われることが望ましいことから、TBT及びTPTを脂肪とともに抽出する方法を検討した。

また、振とう抽出法が多く用いられているが、短時間で細胞からの抽出効率をあげるため、高速ホモジナイザーを使用したホモジナイズ抽出法を用いることとした。

濃縮操作を考慮し、抽出溶媒は水と分離できる必要があるため、アセトン・*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液、酢酸エチル・*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液及びアセトニトリル・酢酸エチル (1 : 1) 混液について検討した。1 mol/L の塩酸溶液5 mLに標準溶液100 ng/mL (メタノール溶液) 20 μ Lを添加し、塩化ナトリウム2 gを加え、各溶媒10 mLでホモジナイズ後、

毎分9,000rpmで5分間遠心分離した。同様の操作を繰り返し、得られた上層をメタノールに置換後、LC-MS/MSで測定した。いずれも90%以上の回収が得られたが、試料に適用したところ、アセトニトリル・酢酸エチル (1:1) 混液では、ホモジナイズ時に試料と溶媒が均一に混和しない傾向が見られ、溶媒中での試料の分散が不十分であった。そこで、濃縮が短時間で可能であり、ホモジナイズ時に試料との混和均一性が最もよかったアセトン・*n*-ヘキサン (1:1) 混液を用いることとした。

3. GPC条件の検討

脱脂にはGPCを用いる方法について検討した。GPCは色素や脂肪を分子の大きさに基づいて分離させる方法である。移動相にアセトンを用いた報告¹⁶⁾があるが、アセトンのみでは脂肪との分離が困難であった。そこで *n*-ヘキサンとの混液について検討したところ、1:1混液で脂肪は28 mL (14分) までの画分に、TBTは28~40 mL (14~20分) 画分に、TPTは36~72 mL (18~36分) 画分に溶出し、有機スズと脂肪を分離することができた。そこで、初流から28 mL (14分間) までの画分は捨て、28~72 mL (22分間) の画分を分取することとした。

4. 精製法の検討

精製にはFLを用いた報告^{3,7,9-12)}が多いことから、FLカートリッジカラムを用い、また、GPCによる色素の除去は一部可能なものの、さけ及びあさりでは不十分であったことから、色素を除く目的でGCBカートリッジカラムとあわせて精製する方法を検討した。

カラムからの溶出は、LC-MS/MSで測定することから移動相に用いているメタノールを用い、0.5%(v/v) 酢酸となるよう調製したものを溶出溶媒とした。また、濃縮時間の短縮及び試料成分の溶出を避けるため、可能な限り少ない溶出液量となるよう試みた。

標準溶液をFL及びGCBカートリッジカラムに1 mL負荷

し、0.5%(v/v)酢酸含有メタノール1 mLを2回溶出したときのカートリッジカラムからの溶出率は、FLでは最初の1 mLで90%及びGCBでは80%であり、いずれも2 mLでほぼ100%溶出することが可能であった。

5. 検量線

各標準品の0.2~20 ng/mlメタノール溶液を8点調製し、5 µLをLC-MS/MSに注入し、ピーク面積で検量線を作成した。相関係数 (r) はいずれも0.9999以上で良好な直線性が得られた。本法での定量限界はいずれも試料中濃度として1 ng/gである。

6. 添加回収試験

各標準溶液をアサリ、イカ、スズキ、エビ、カニ、カレイ、サケ、サバ、タラ及びボラに添加し、添加回収試験を行った。添加量は試料中濃度が10 ng/gとなるよう添加した。5回試行時における回収率の平均は85.4%~102.9%、併行精度は1.3~7.5%であった。(Table 2)。

試料マトリックスの測定への影響について添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように調製したマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求めた。面積比は0.86~1.06であり、いずれの試料においても、マトリックスによる測定への顕著な影響は認められなかった。

ま と め

魚介類を対象とし、TBT及びTPTの分析法を検討した。試料から塩酸性下アセトン・*n*-ヘキサン混液で抽出し、GPCで脱脂後、FL及びGCBカートリッジカラムによる精製を行い調製した試験溶液をLC-MS/MSにより測定した。

本法による添加回収試験をアサリ等10試料において行ったところ概ね85%以上の回収率が得られた。

本法は日常のルーチン検査業務に十分適用できると考える。

Table 2. Recoveries of TBT and TPT Spiked in Sample¹⁾

	TBT			TPT		
	Recovery(%) ²⁾	RSD(%)	Mt ³⁾ /St ⁴⁾	Recovery(%)	RSD(%)	Mt/St
Short-necked clam[ASARI]	89.4	4.4	0.96	95.7	2.3	0.96
Conger eel[ANAGO]	102.9	3.6	0.90	101.1	1.3	0.96
Cuttlefish[IKA]	85.4	3.5	0.95	92.5	3.5	0.93
Shrimp[EBI]	99.0	1.4	0.99	97.9	4.7	0.95
Crab[KANI]	92.7	3.5	0.94	96.5	2.3	0.89
Flatfish[KAREI]	94.7	4.1	1.01	99.6	3.3	1.01
Salmon[SAKE]	90.6	5.6	0.99	91.0	2.5	1.06
Japanese seabass[SUZUKI]	99.5	2.0	0.96	102.9	7.5	0.96
Alaska pollack[SUKETODARA]	86.7	3.2	0.86	92.7	2.2	0.92
Flathead gray mullet[BORA]	101.5	3.1	0.95	91.7	3.2	0.97

1) Spiked level 10 ng/g

2) n=5

3) Mt: area of the matrix standard solution

4) St: area of the standard solution

文 献

- 1) 小野恭司, 水石和子, 浜野朋子, 他: 東京健安研セ年報, 59, 221-228, 2008.
- 2) 林 真輝, 田村康宏, 大谷陽範, 他: 東京健安研セ年報, 66, 217-222, 2015.
- 3) 竹内正博, 水石和子, 山野辺秀夫, 他: 分析化学, 36, 138-142, 1987.
- 4) 高見勝重, 奥村為男, 山崎裕康, 他: 分析化学, 37, 449-455, 1988.
- 5) 森崎澄江, 長田 忠, 二宮孝代, 他.: 食衛誌, 30, 36-41, 1989.
- 6) 竹内正博, 水石和子, 山野辺秀夫, 他: 分析化学, 38, 522-528, 1989.
- 7) 服部幸和, 山本仁史, 永井寛治, 他: 分析化学, 40, 25-31, 1991.
- 8) 佐藤郁子, 鈴木 滋, 石川 潔, 他: 宮城県保健環境セ年報, 10, 49-52, 1992.
- 9) 大藤升美, 鎌田 功, 茶谷裕行, 他: 京都府衛生公害研究所報, 38, 17-22, 1993.
- 10) 大藤升美, 鎌田 功, 近本武次, 他: 京都府衛生公害研究所報, 40, 38-39, 1995.
- 11) Mizuishi, K., Takeuchi, M. and Hobo, T.: Analyst, 123, 329-335, 1998.
- 12) 環境省水・大気環境局水環境課: 有機スズ化合物の分析法, 要調査項目等分析マニュアル (水質・底質・水生生物), 2002.
- 13) 吉元秀和, 村川 弘, 福島孝兵, 他: 熊本県保健環境科学研究所報. 39, 35-42, 2010.
- 14) 滝埜昌彦: 環境化学討論会要旨集, 20, p.94, 2011.
- 15) 古川浩司, 橋本 真, 橋爪 清: 三重県保全環境事業団報告, 42, 175-182, 2013.
- 16) 佐々木哲也, 佐々木晃一, 石橋耀一, 第2回日本内分泌攪乱化学物質学会学術講演要旨集, p.13, 1999.

Determination of Tributyltin and Triphenyltin Compounds in Fish and Shellfish by LC-MS/MS

Maki KOBAYASHI^a, Naoko SAKAI^a, Kyoko KAMIJO^a,
Hiroshi KOIKE^a and Tetsuya SHINDO^a

A procedure for the detection of tributyltin and triphenyltin compounds in fish and shellfish by liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS) was developed. Sample extraction was accomplished using acetone/*n*-hexane (1:1). The fat was removed from the extraction by gel permeation chromatography. The extraction was cleaned up with florisil and graphite carbon black cartridge columns. Tributyltin and triphenyltin compounds were analyzed by LC-MS/MS. Recovery of these compounds when added to several samples at a level of 10 ng/g was between 85.4% and 102.9%. This method is useful for the routine analysis of tributyltin and triphenyltin compounds in fish and shellfish.

Keywords: tributyltin compound, triphenyltin compound, fish and shellfish, gel permeation chromatography, LC-MS/MS

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan