

魚類中の有機スズ化合物の迅速分析

東忠英 網本智一 大塚有加 真鍋華子 武智拓郎* 金本昭 井上博雄

Rapid Analysis of Organotins in the Muscle of Fishes

Tadahide HIGASHI, Tomokazu AMIMOTO, Yuka OOTUKA, Hanako MANABE,
Takurou TAKETI*, Akira KANAMOTO, Hiroo INOUYE

A method for the simple and rapid analysis of organotins (TBT, TPT) in the muscle of fishes has been studied by isotope dilution GC/MS.

Organotins were firstly extracted with 1M HCl methanol/ethyl acetate (1:1), and the extract was concentrated. Then, using a diatomite column, the concentrated extract has been eluted with hexane. After deuterated organotins as internal standards were added in a fish sample, organotins were derivatized with sodium tetraethylborate at pH5; then, ethylated organotins were extracted with hexane and cleaned up by using a florisil minicolumn. Instrument measurement was carried out by GC/MS-SIM.

The results concerning the overall recovery tests for the muscle of fishes showed that the mean recovery rate were respectively 87.0%(TBT) and 75.9%(TPT). Their mean relative standard deviations were respectively 3.8%(TBT) and 5.1%(TPT).

Keywords : organotin, TBT, TPT, diatomite column, ethylation

はじめに

生物試料中の有機スズ化合物の分析法には、ハロゲン化合物をECD-GCで分析する方法¹⁾と、水素化またはアルキル化してGC-FPDで分析する方法²⁾がある。さらに、最近では、AED-GCやGC-ICP-MSを用いる方法³⁾も検討されているが、使用機器が高価で一般的ではない。ECD-GCは高感度であるが選択性に乏しく、試料夾雑物由来のピークとの分離が困難である。また、ハロゲン化合物は極性が高くカラムに負荷がかかる。FPD-GCは選択性はあるが、感度が低く、有機スズ化合物特有のテーリングがあり、定量性に乏しい。このことから、近年、アルキル化誘導体をGC-MSで分析する方法が検討されており、環境庁の外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアルにおける、トリブチルスズ化合物(TBT)、トリフェニルスズ化合物(TPT)の分析法⁴⁾にもこの方法が適用されている。

当所においては、昭和60年度から魚類中のトリブチルスズ化合物の残留分析を実施している。また、平成6年度からは、トリフェニルスズ化合物を追加した。分析

法は、水素化誘導体をFPD-GCで分析する方法で実施してきたが、トリブチルスズ及びトリフェニルスズが低濃度で内分泌攪乱作用を有すると疑われる物質にリストアップされていることから、高感度分析への移行を検討してきた。

今回、同位体希釈法を用いて、魚類筋肉中のトリブチルスズ化合物、トリフェニルスズ化合物について、ケイソウ土カラムによる固相抽出後誘導体化し、GC-MSにより分析することで、迅速化、高感度化を図ることができたので、その結果を報告する。

実験方法

1. 試料

瀬戸内海及び宇和海産の天然魚類筋肉

2. 試薬など

標準品：塩化トリブチルスズ-d 27, 塩化トリフェニルスズ-d 15, 塩化テトラブチルスズ-d 36及びテトラエチルホウ酸ナトリウムは和光純薬製。ヘキサン, アセトン, エタノール, 酢酸エチル, ジエチルエーテル及び無水硫酸ナトリウムは和光純薬製残留農薬試験用を使用した。ケイソウ土はVarian製ハイドロマトリックス, 固相カートリッジはWaters製Sep-Pak plus フロリジ

愛媛県立衛生環境研究所 松山市三番町8丁目234番地

* 保健福祉部健康衛生局薬務衛生課

ル 900 mg を使用した。

3. 装置

ガスクロマトグラフ質量分析計は、Agilent 製 GC 6890, MS D 5973 を使用した。

4. 測定条件

分離カラム：HP-5MS 内径 0.25mm, 長さ 30m, 膜厚 0.25 μ m

カラム槽温度：60°C (1min) \rightarrow 130°C (20°C/min)

\rightarrow 210°C (10°C/min) \rightarrow 240°C (5°C/min)

\rightarrow 270°C (20°C/min)

キャリアーガス：ヘリウム, 流量 1ml/min (定流量モード)

注入口温度：280°C

注入法：パルスドスプリットレス

インターフェイス温度：280°C

イオン源温度：230°C

モニターイオン：定量イオン (参照イオン)

エチルトリブチルスズ-d27 m/z: 217 (215)

エチルトリフェニルスズ-d15 m/z: 366 (364)

テトラブチルスズ-d36 m/z: 318 (316)

5. 試験溶液の調製

試料 5 g を精秤し, 1 N 塩酸含有メタノール・酢酸エチル (1:1) 30ml 加えホモジナイズし, 遠心分離を行う。同様の操作を繰り返し, 遠心分離した上層を合わせ, ロータリーエバポレーターで 10ml 以下に濃縮する。この液を無水硫酸ナトリウム及びケイソウ土を積層したカラムに負荷し, ヘキサン 100ml で溶出する。溶出液を留去し, エタノール 3ml に溶解する。

共栓付き試験管に, 溶出液, 0.2M 酢酸緩衝液 (pH5) 15ml, 2% テトラエチルホウ酸ナトリウム水溶液 1ml 及びヘキサン 2ml を加え, スターラーを用いて 1 時間攪拌し, エチル誘導体化及び有機層抽出を行う。上層のヘキサン層をフロリジルミニカラムに負荷し, 2% ジエチルエーテル含有ヘキサン 10ml で溶出する。この液を留去し, 内部標準物質テトラブチルスズ-d36 を添加, 5ml に定容して試験溶液とする。(図 1)

結果及び考察

1. 分析条件の検討

GC-MS で測定する TBT, TPT がエチル誘導体化物であることから, モニターイオンを選択するため, SCAN モードでマスフラグメントのデータを調べた。

(図 2, 3)

その結果, 定量イオンとしてエチル TBT は 217 (m/z), エチル TPT は 366 (m/z) でともに極大かつベースラインノイズの低いイオンを選定した。定量イオンでの検量線は両物質とも, 2~40 ppb の間で良好な直線性を示した。(図 4)

2. ケイソウ土カラムからの溶出条件の検討

試料からの抽出物は強酸性であるため, 補正の必要があるか否か, カラム負荷液の液性と溶出溶媒について検

討を行った。塩酸酸性下で抽出した TBT, TPT は一塩素置換体となるが, 液性が塩基性になると水酸基置換体となることが知られている。そこで, 液性を変えて溶出を行ったところ, 酸性及び中性では抽出率は TBT, TPT ともほぼ 100% で良好な回収が得られた。一方, pH 10 の塩基性では, 回収率は TBT で約 90% と良好であったが, TPT は約 60% と不良であった。溶出溶媒については, 環境庁の方法で試料抽出液からの液液抽出

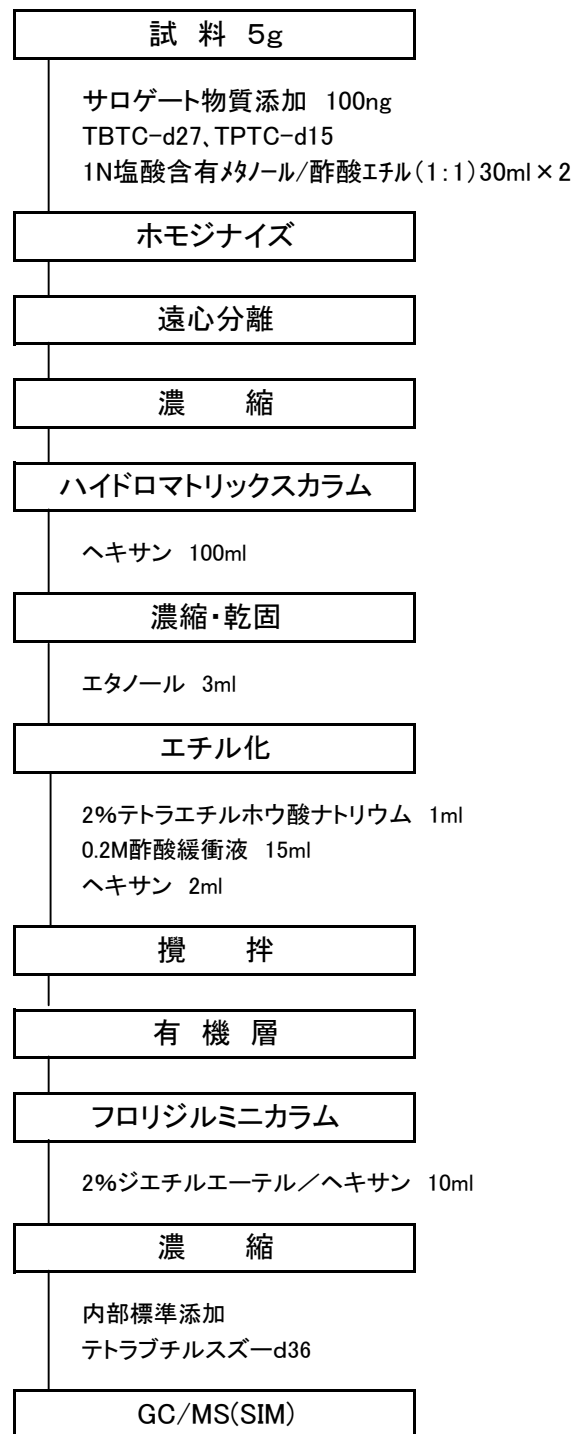


図 1 分析フロー

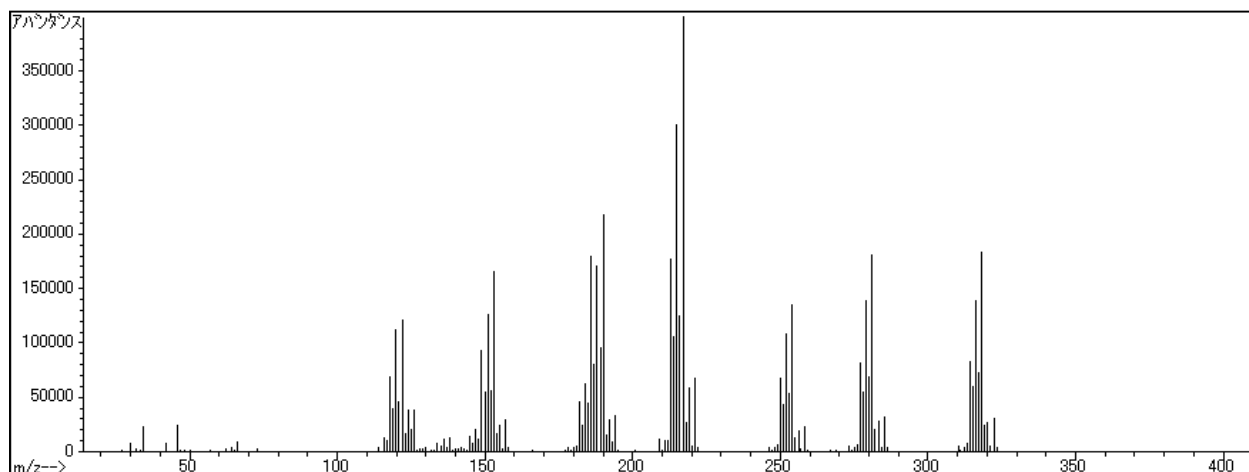


図2 エチルTBTのマススペクトル

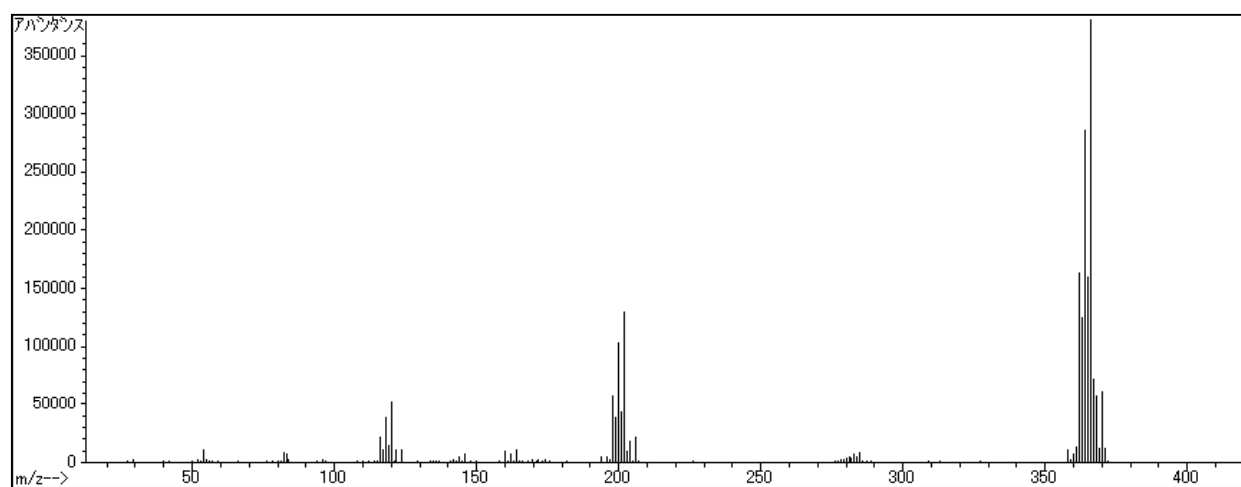


図3 エチルTPTのマススペクトル

に使用されている、酢酸エチルとヘキサンの混合液を使用し、最適な割合を求めたところ、ヘキサン単独でTBT, TPTとも十分溶出され、また夾雑物も極めて少なかった。そこで、試料抽出物から大部分の有機溶媒を除いた液を直接カラムに負荷し、ヘキサンで溶出することとした。

3. 誘導体化方法の検討

TBT, TPTの塩化物は極性が高く、ガスクロマトグラフで分離するためアルキル化することが求められるが、当所で実施していた水素化や環境庁の方法にあるグリニャール試薬によるプロピル化は、反応を有機溶媒中で行わなければならない、また脱水処理も必要になり操作が煩雑である。そこで、Ashbyらによるテトラエチルホウ酸ナトリウムを用いた水層での微量有機スズ化合物のエチル化⁵⁾⁶⁾を参考にして誘導体化することにした。エチル化には、テトラエチルホウ酸ナトリウムの1%、2%、3%水溶液を各1ml添加して行ったが、誘導化率に有意な差は認められなかった。また、エチル化物のヘキサン層への移行についても検討を行った。マグネティックスターラーによる1時間攪拌と、振とう5分の移行率

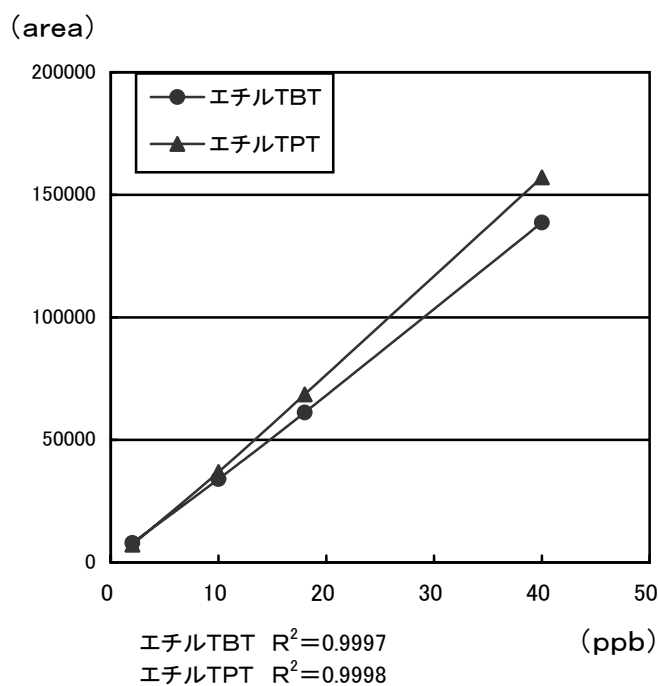


図4 エチルTBT、エチルTPTの検量線

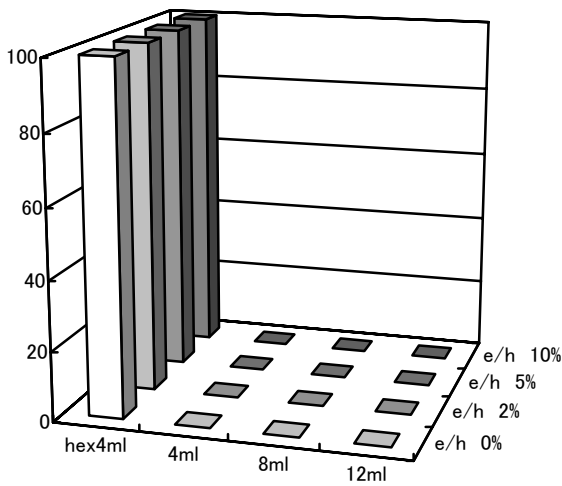


図5 エチルTBTのフロリジルカラムからの溶出パターン

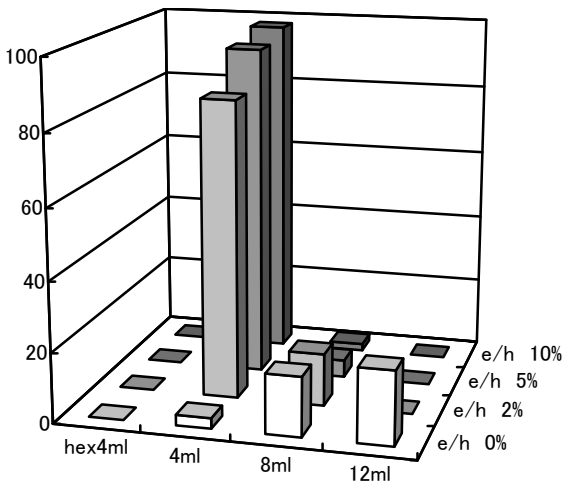


図6 エチルTPTのフロリジルカラムからの溶出パターン

表1 天然魚類筋肉中からのTBT, TPTの回収率(%)

項目	試料	平均回収率	標準偏差
TBT	エソ	85.5	1.1
	サワラ	86.3	2.6
	スズキ	88.5	6.5
	クロダイ	85.0	2.9
	ハマチ	89.5	5.7
TPT	エソ	72.7	6.9
	サワラ	75.8	4.2
	スズキ	77.0	7.5
	クロダイ	78.4	4.0
	ハマチ	75.7	2.7

(n = 3)

はほぼ同等であった。そこで、試料5gからの抽出物のエチル化及びヘキサン層への移行は、試料間の差を考慮して、2%テトラエチルホウ酸ナトリウム水溶液1mlを添加し、操作が容易なマグネティックスターラーで1時間攪拌する方法で行った。

4. フロリジルミニカラムからの溶出条件の検討

フロリジルミニカラムからの溶出溶媒について、TBT, TPTとも極性の低い溶媒で溶出することから、0%, 2%, 5%, 10%ジエチルエーテル含有ヘキサン溶液で検討を行った。また、溶出液量についても4ml毎の回収率をもとめて検討を行った。その結果、TBTはヘキサン4mlで溶出、TPTは2%以上のジエチルエーテルを含有するヘキサン溶液8mlで十分溶出することが確認できた。そこで、フロリジルミニカラムからの溶出条件は、試料をヘキサン4mlで負荷後、2%ジエチルエーテル含有ヘキサン溶液10mlで溶出を行うこととした。(図5, 6)

5. 添加回収試験

分析フロー(図1)に従い、5種類の天然魚筋肉にTBT-C-d27及びTPT-C-d15を各々0.1μg添加し、回収率を求めた。その結果TBTの回収率は85.0~89.5%(標準偏差1.1~6.5%), 5魚種平均で87.0%であったが、TPTの回収率は72.7~78.4%(標準偏差2.7~7.5%), 5魚種平均で75.9%と若干低い値を示した。(表1)

まとめ

今回、試料の塩酸酸性メタノール・酢酸エチル抽出液から、有機層へのTBT, TPTの転溶にケイソウ土カラムを使用したところ、溶出溶媒はヘキサンでTBT, TPTとも良好に回収され、また夾雑物の除去にも効果があった。

ケイソウ土カラムによる固相抽出、テトラエチルホウ酸ナトリウムによる水層でのアルキル化により分析時間の短縮化を図ることが可能となり、1日で分析の結果が得られるようになった。

各種魚類筋肉への添加回収試験の結果、TBTは平均87%, TPTは平均76%と良好な結果が得られた。これらのことから、本法がTBT, TPT化合物の残留分析に十分適用可能な方法であると考えられる。

文献

- 1) 近本武次ほか：食品衛生学雑誌, 29, 141 - 145 (1988)
- 2) 環境庁保健調査室：昭和63年度化学物質分析法開発報告書(1989)
- 3) 打田雅敏ほか：三重県保環研年報, 3, 112 - 114 (2001)
- 4) 環境庁水質管理課：外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル(1998)
- 5) J. Ashby et al : Appl. Organomet. Chem, 5, 173 - 181 (1991)
- 6) J. Ashby et al : Sci. Total. Environ, 78, 219 - 232 (1989)