

## 4) 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—

吉元 秀和 村川 弘 福島 孝兵\* 吉田 達雄 飛野 敏明

#### 要 旨

有機スズ化合物の分析には、多くの液液分配及び誘導体化が必要なため、作業者の安全・効率性に問題が生じ、技量が影響する。今回、解決策として抽出法を食品衛生検査指針に準拠させた LC/MS/MS による分析法を開発した。本法により、ムラサキイガイ中に残存する有機スズ化合物の経年変化を調査したところ、概ね減少していることが確認された。また、検体の大きさにより検出値に差の傾向が見られ、モニタリング調査では検体の大きさを揃える必要性が示唆された。

キーワード：トリブチルスズ，トリフェニルスズ，生物濃縮，ムラサキイガイ，LC/MS/MS

#### はじめに

トリブチルスズ (TBT) およびトリフェニルスズ (TPT) 等の有機スズ化合物は、以前は船舶防汚塗料や漁網防汚剤など、主に水圏環境で使用されてきた。しかし、水生生物に対する毒性及び内分泌攪乱作用の強さが懸念され、日本では平成 2 年に TBTO (トリブチルスズオキシド) が第一種特定化学物質に、その他 TBT 13 種、TPT 7 種が第二種特定化学物質に指定されている。さらに、2001 年に国際海事機関(IMO)において採択された船舶についての有害な防汚方法の管理に関する国際条約 (AFS 条約) の批准により、現在では製造・輸入及び使用はほとんど行われていない。ところが、今でも各地の沿岸域で、検出されている<sup>1~5)</sup>。

そこで今回、本県において平成 15 年度から 19 年度までに採取したムラサキイガイ (図 1) を試料として、有機スズ化合物の生物濃縮現象の大きさ別状況を調査したので報告する。

また、調査に伴い分析法の検討も行った。魚介類中の有機スズ化合物の分析には、通常 GC/FPD もしくは



図 1. ムラサキイガイ

GC/MS が用いられている<sup>6),7)</sup>。しかし、これらの装置を用いた分析には、多くの液液分配及び Grignard 試薬等を用いた誘導体化を要するため、作業者の安全性及び効率性に問題があり、技量にも左右されやすいという欠点がある。これらの問題を解決するため、有機スズ化合物の中でも特に水生生物への毒性が懸念される TBT 及び TPT について、抽出法を食品衛生検査指針<sup>7)</sup>に準拠させた LC/MS/MS による分析法を検討したので併せて報告する。

## 調査方法

### 1 検体

平成15年度から平成19年度にかけて本県の港湾15カ所においてムラサキガイを採取した。試料は、採集後、冷蔵状態で研究所に持ち帰った。その後、採集年度、地点、大きさごとに試料を分け、それぞれ固体の貝殻を取り除いたむき身の部分の一つに合わせ、ホモジナイズした後-20℃で冷凍保存した。

### 2 試薬

標準品：塩化トリブチルすず標準品、塩化トリフェニルすず標準品（共に和光純薬(株)製）

混合標準：各標準を秤量後、0.5%酢酸メタノールに溶解し1000 μg/mlとなるように原液を調製した。これらを混合し、0.5%酢酸メタノールで1 μg/mlとなるように調製した。

その他の試薬：残留農薬試験用、HPLC用を用いた。

### 3 装置及び分析条件

#### 1) 高速液体クロマトグラフ (HPLC)

HPLC 装置: Waters 社製 Waters2795

分析カラム: ワイエムシー社製 YMC-Pack PolymerC18(2.0×75mm, 6 μm), ワイエムシー社製ガードカートリッジカラム(2.0×10mm, 6 μm), 注入量: 10 μl, カラム温度: 40℃, 移動相: A 液(水), B 液(メタノール), C 液(0.5%ギ酸), グラジエント条件を表1に示す。

表 1. グラジエント条件

Time (min)	A液 (%)	B液 (%)	C液 (%)	流速 (mL/min)
0	85	10	5	0.2
3	85	10	5	0.2
10	20	75	5	0.2
20	20	75	5	0.2
20.01	0	95	5	0.2
30	0	95	5	0.2
30.01	85	10	5	0.2
40	85	10	5	0.2

#### 2) タンデム型質量分析計 (MS/MS)

MS/MS 装置: Waters 社製 Quattro Premier

イオン化法: ESI, 分析モード: MRM(ポジティブモード)

定量イオン: TBT: 291>179, TPT: 351>197

定性イオン: TBT: 291>123, 291>235, 289>177

TPT: 351>120, 349>195, 349>118

Capillary: 1.0kV, Source Temperature: 120℃, Desolvation Temperature: 350℃, Cone Gass Flow: 50ℓ/h, Desolvation Gass Flow: 1000ℓ/h

### 4 前処理

図2の分析フローに従い操作を行った。

## 5 検量線

標準原液を試験溶液で希釈し0.5, 1, 2, 5, 10, 25及び50ng/mlの7点調製し、マトリックス一致検量にて行った。マトリックスにはTBT及びTPTが含まれていないムラサキガイを用いた。

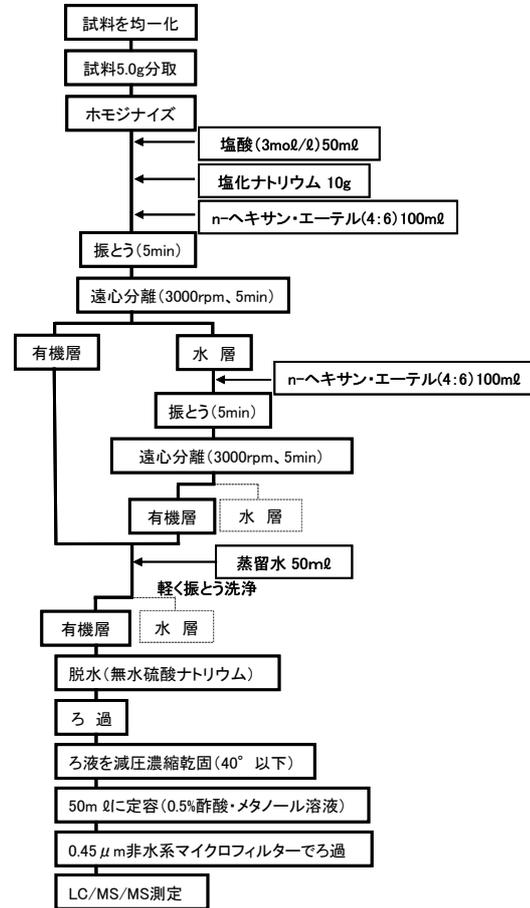


図 2. LC/MS/MS 分析法フロー

## 結果及び考察

### 1 LC/MS/MS を用いた分析法の検討

図2の分析フローに従い前処理を行った後、検量線の直線性を確認したところ、0.5~50ng/mlの範囲では良好な直線性を示し、 $R^2$ は0.999以上であった(図3)。図4に標準品及び試料抽出物のMRMクロマトグラムを示す。

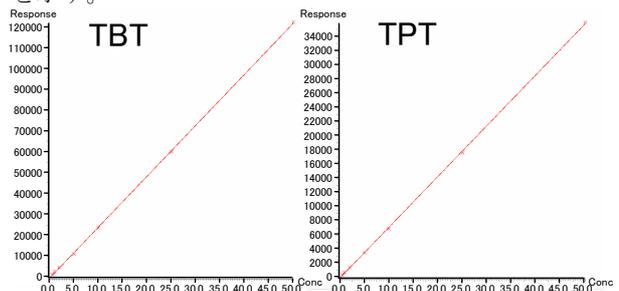


図 3. 検量線 ( $R^2 > 0.999$ )

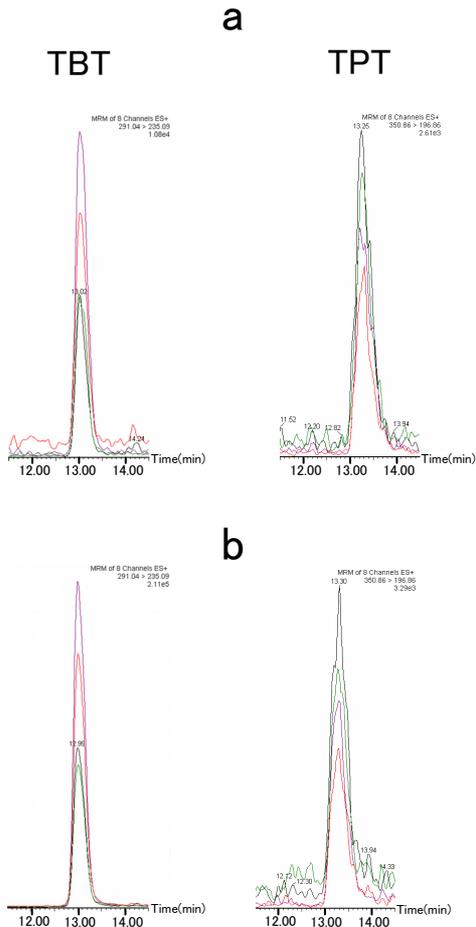


図 4. MRM クロマトグラム (a:標準品 各 1ng/mL, b:試料抽出物)

「食品中の農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」<sup>8)</sup>における真度（回収率）及び精度の目標値を表 2 に示す。試料には混合標準が 5ng/g になるように添加した。試験結果は表 3 のとおりとなり、ガイドラインを満たす良好な結果が得られた。また、TBT が検出された同一の実試料を用いて 2 日間に分けて試験を行った。結果は 1 日目が 51.1±4.0ng/g-wet(n=3;RSD 7.9%), 2 日目が 52.9±3.2ng/g-wet(n=3;RSD 6.1%)となり、妥当性評価試験の精度に比べやや悪いものの、ガイドラインの精度を十分満たしており、安定した測定結果が得られた (表 4)。

表 2. ガイドラインにおける各濃度毎の真度（回収率）及び精度の目標値

濃度 (ppm)	試行回数 (回)	真度 (回収率) (%)	併行精度 (RSD %)	室内精度 (RSD %)
<=0.001	5	70~120	30>	35>
0.001< ~ <=0.01	5	70~120	25>	30>
0.01< ~ <=0.1	5	70~120	15>	20>
0.1<	5	70~120	10>	15>

表 3. 枝分かれ試験結果 (2 併行, 5day)

	平均回収率	併行精度 RSD%	室内精度 RSD%
TBT	92.4	3.3	4.7
TPT	98.5	4.1	4.1

表 4. 同一の実試料による試験結果 (TBT)

	1回目 (ng/g - wet)	2回目 (ng/g - wet)	3回目 (ng/g - wet)	平均 (ng/g - wet)	併行精度 RSD %
1日目	49.8	55.6	47.9	51.1±4.0	7.9
2日目	56.6	51.6	50.6	52.9±3.2	6.1

これらの結果から、本法は、一定の精度を有するものであるとともに、誘導体化を省略できるため安全である。さらに従来の試験法 (図 5) と比較し、本法は前処理に要する時間が 6 検体当たり 8 時間程度で約半分程度 (図 6) であることから、多くの試料を効率よく分析する上で有効な分析法であると考えられる。

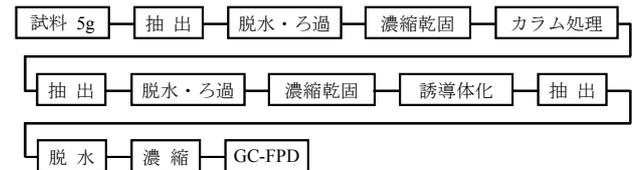


図 5. 食品衛生検査指針分析フロー

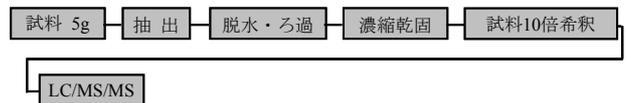


図 6. 検討分析法分析フロー (図 2. 概略フロー)

## 2 分析結果

ムラサキイガイの採取状況を表 5 に示す。貝の成長による生物濃縮の違いも確認するため、個体の大きさ (殻長) により小型 (5cm 未満), 中型 (5cm 以上 7cm 未満), 大型 (7cm 以上 9cm 未満), 特大型 (9cm 以上) に分けた。本法による TBT, TPT の分析結果 (重量あたりの含有量) をそれぞれ表 6, 7 に示す。大きさ毎に分け、経年変化を示したものが図 7, 8 である。採取地点ごとに TBT, TPT 濃度の経年変化を確認したところ、県内各地の沿岸において概ね減少していることが確認された。一部、増加傾向が確認され、具体的原因は判明できなかったが、船舶の往来の多い港湾を中心に採取していること、及びその湾の地形的閉鎖性も一因ではないかと推測される。

表5. ムラサキガイ採取状況(平成15~19年度)

※総重量はむき身

採取日	採取状況	小(5cm未満)		中(5cm以上7cm未満)		大(7cm以上9cm未満)		特大(9cm以上)	
		個数(個)	総重量(g)	個数(個)	総重量(g)	個数(個)	総重量(g)	個数(個)	総重量(g)
H19.12.26	A地区	17	25.47	84	427.75	19	207.65	-	-
H19.12.26	B地区	84	32.76	58	246.54	3	28.39	-	-
H19.12.26	C地区	89	127.55	100	413.17	17	180.37	-	-
H19.12.26	D地区	203	655.53	40	201.30	-	-	1	73.35
H19.12.27	E地区	13	24.72	151	797.15	33	336.24	-	-
H19.12.27	G地区	110	270.82	49	340.94	8	140.25	3	73.52
H19.12.27	J地区	234	467.72	49	190.89	30	266.94	5	78.98
H18.12.25	N地区	16	21.76	91	283.07	16	112.06	-	-
H18.12.25	A地区	12	17.05	65	269.74	28	203.03	-	-
H18.12.25	B地区	14	24.04	49	233.41	13	107.00	-	-
H18.12.25	C地区	18	40.93	131	545.77	34	362.61	-	-
H18.12.25	E地区	-	-	21	117.30	55	596.03	15	270.05
H18.12.26	G地区	10	25.23	14	76.30	9	86.55	7	137.41
H18.12.26	H地区	-	-	68	322.70	55	350.29	-	-
H18.12.26	J地区	-	-	45	156.08	107	673.59	9	80.44
H17.12.26	N地区	83	81.25	8	21.62	3	10.65	-	-
H17.12.26	A地区	125	174.15	112	239.55	-	-	-	-
H17.12.26	C地区	5	9.06	38	222.30	11	82.19	-	-
H17.12.27	E地区	-	-	38	272.21	36	290.86	1	21.13
H17.12.27	H地区	52	89.13	26	138.40	7	42.63	-	-
H17.1.7	O地区	210	314.65	-	-	-	-	-	-
H17.1.17	N地区	104	99.72	28	53.27	2	12.51	-	-
H17.1.17	A地区	12	12.35	79	183.36	20	85.48	-	-
H17.1.17	B地区	84	87.53	53	109.73	-	-	-	-
H17.1.17	E地区	9	14.01	75	270.44	20	115.96	-	-
H17.1.18	G地区	10	13.61	16	60.25	14	85.75	-	-
H17.1.18	H地区	29	43.72	51	228.16	-	-	-	-
H17.1.20	M地区	75	109.51	42	98.79	-	-	-	-
H17.1.20	I地区	17	20.70	48	122.23	13	84.24	1	16.15
H17.1.20	L地区	33	44.39	52	149.63	-	-	-	-
H17.1.20	J地区	60	108.70	66	178.20	4	24.07	-	-
H16.3.24	N地区	76	75.90	120	237.25	15	57.45	-	-
H16.3.24	A地区	29	30.83	134	567.19	18	82.22	-	-
H16.3.24	B地区	13	11.71	43	122.09	21	102.47	-	-
H16.3.24	E地区	-	-	37	187.29	28	151.16	-	-
H16.3.25	F地区	23	28.71	57	156.40	7	23.54	-	-
H16.3.25	I地区	19	32.01	111	266.71	18	68.98	-	-
H16.3.25	L地区	86	192.25	91	610.30	2	9.19	-	-
H16.3.25	K地区	-	-	70	267.64	18	117.05	-	-
H16.3.25	J地区	21	31.22	97	314.81	-	-	-	-

表6. TBT分析結果(重量あたりの含有量)

単位:ng/g-wet

採取日	採取状況	小型	中型	大型	特大型
		試料中	試料中	試料中	試料中
H19.12.26	A地区	ND	ND	ND	
H19.12.26	B地区	6.7	ND	15.1	
H19.12.26	C地区	8.4	5.7	5.7	
H19.12.26	D地区	31.2	28.9		12.0
H19.12.27	E地区	84.7	54.9	41.9	
H19.12.27	G地区	42.1	27.5	20.9	63.1
H19.12.27	J地区	16.7	13.3	7.7	5.1
H18.12.25	N地区	27.2	33.1	15.4	
H18.12.25	A地区	ND	ND	ND	
H18.12.25	B地区	10.3	6.1	5.0	
H18.12.25	C地区	6.9	7.0	5.3	
H18.12.25	E地区		13.4	9.1	9.6
H18.12.26	G地区	48.7	57.4	33.9	24.0
H18.12.26	H地区		30.0	22.9	
H18.12.26	J地区		7.9	9.4	5.3
H17.12.26	N地区	42.1	28.0	23.7	
H17.12.26	A地区	5.3	5.3		
H17.12.26	C地区	11.2	6.1	7.3	
H17.12.27	E地区		8.9	9.7	5.8
H17.12.27	H地区	43.9	25.8	23.5	
H17.1.7	O地区	63.3			
H17.1.17	N地区	114.5	116.8	90.0	
H17.1.17	A地区	13.3	8.1	7.0	
H17.1.17	B地区	15.2	14.7		
H17.1.17	E地区	37.7	40.7	19.3	
H17.1.18	G地区	265.1	141.0	72.0	
H17.1.18	H地区	118.1	87.2		
H17.1.20	M地区	71.2	63.0		
H17.1.20	I地区	53.3	40.6	28.9	23.6
H17.1.20	L地区	9.4	9.6		
H17.1.20	J地区	42.5	38.9	28.1	
H16.3.24	N地区	114.8	99.2	108.2	
H16.3.24	A地区	30.8	14.5	24.0	
H16.3.24	B地区	47.9	33.1	31.8	
H16.3.24	E地区		43.1	41.5	
H16.3.25	F地区	69.8	58.1	47.5	
H16.3.25	I地区	37.3	39.3	42.6	
H16.3.25	L地区	7.1	6.6	10.8	
H16.3.25	K地区		25.7	20.6	
H16.3.25	J地区	40.3	35.1		

※検出下限値:5.0 ng/g-wet

表7. TPT分析結果(重量あたりの含有量)

単位:ng/g-wet

採取日	採取状況	小型	中型	大型	特大型
		試料中	試料中	試料中	試料中
H19.12.26	A地区	ND	ND	ND	
H19.12.26	B地区	ND	ND	ND	
H19.12.26	C地区	5.4	5.5	ND	
H19.12.26	D地区	ND	ND		ND
H19.12.27	E地区	ND	ND	ND	
H19.12.27	G地区	7.7	5.9	5.7	6.9
H19.12.27	J地区	ND	ND	ND	ND
H18.12.25	N地区	ND	ND	ND	
H18.12.25	A地区	ND	ND	ND	
H18.12.25	B地区	5.1	5.0	ND	
H18.12.25	C地区	7.7	10.5	6.9	
H18.12.25	E地区		7.3	ND	ND
H18.12.26	G地区	7.1	9.7	8.9	9.4
H18.12.26	H地区		ND	ND	
H18.12.26	J地区		6.7	ND	ND
H17.12.26	N地区	5.9	ND	6.4	
H17.12.26	A地区	ND	ND		
H17.12.26	C地区	13.9	6.7	7.3	
H17.12.27	E地区		6.8	7.6	6.7
H17.12.27	H地区	ND	ND	ND	
H17.1.7	O地区	10.0			
H17.1.17	N地区	9.5	11.2	ND	
H17.1.17	A地区	ND	ND	ND	
H17.1.17	B地区	ND	5.1		
H17.1.17	E地区	ND	6.0	ND	
H17.1.18	G地区	19.0	15.2	17.7	
H17.1.18	H地区	ND	5.1		
H17.1.20	M地区	6.1	6.4		
H17.1.20	I地区	7.3	6.3	7.2	8.0
H17.1.20	L地区	ND	ND		
H17.1.20	J地区	ND	5.4	ND	
H16.3.24	N地区	ND	ND	ND	
H16.3.24	A地区	ND	ND	ND	
H16.3.24	B地区	ND	ND	ND	
H16.3.24	E地区		7.1	6.7	
H16.3.25	F地区	8.8	7.2	7.8	
H16.3.25	I地区	7.6	8.6	12.1	
H16.3.25	L地区	ND	ND	6.8	
H16.3.25	K地区		ND	ND	
H16.3.25	J地区	6.1	5.4		

※検出下限値:5.0 ng/g-wet

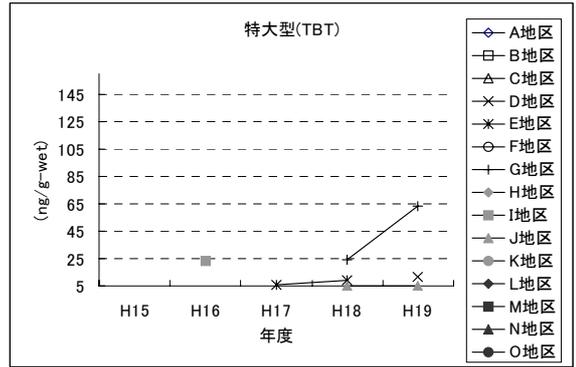
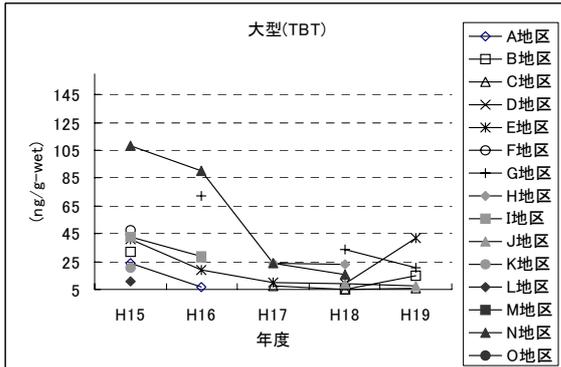
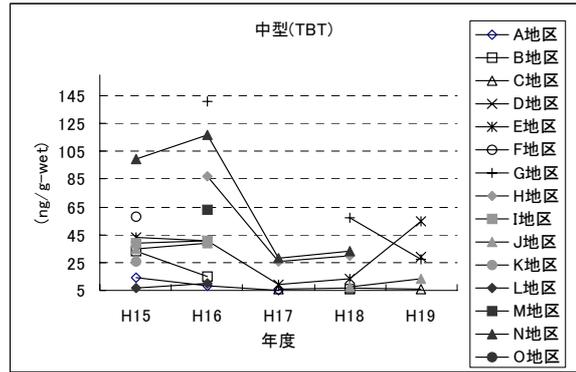
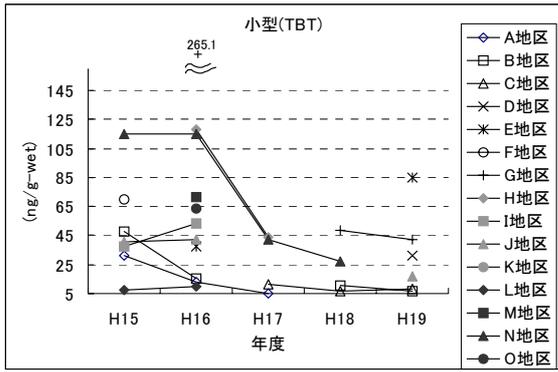


図 7. TBT 経年変化

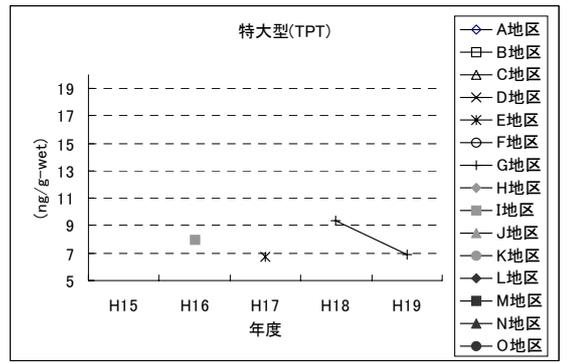
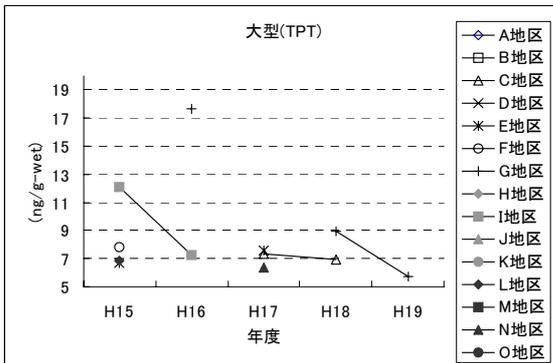
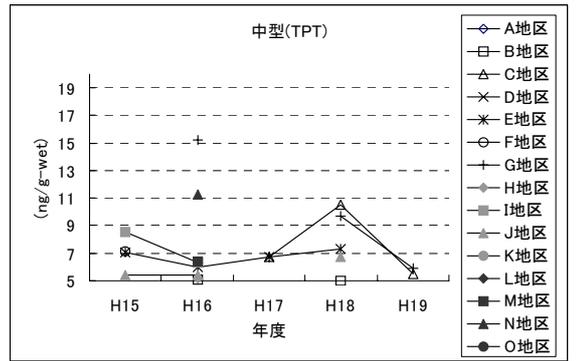
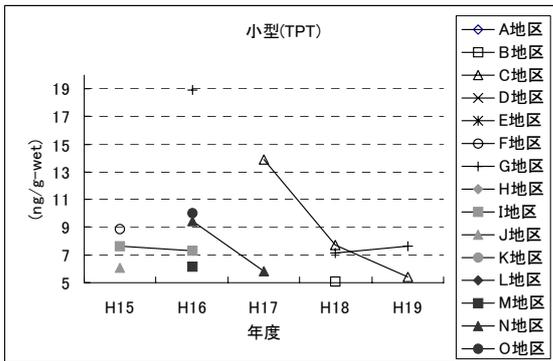


図 8. TPT 経年変化

また、沿岸海域で主に実施されている環境省のモニタリング調査等の結果と比較し、本調査の方が検出濃度 (ng/g-wet) が高い傾向が見受けられた{環境省モニタリング調査結果 (ムラサキイガイ)：平成 15 年度

TBT ; 2~25ng/g-wet TPT ; nd~25 ng/g-wet 平成 17 年度 TBT ; 1.5~25ng/g-wet TPT ; 0.6~15 ng/g-wet<sup>1)</sup> 2)}。理由として、モニタリング調査では、沿岸地域を中心に調査されているのに対し、本調査では、港湾を中心に調査したため船舶由来によるものと考えられる。

### 3 大きさ毎の比較検討

重量あたりの含有量(ng/g-wet)について、個体の大きさ毎の違いを比較するために、すべての大きさのムラサキガイが同時期、同場所にとれたものについて、それぞれ、中型の分析値(重量あたりの含有量)で、各大きさの分析値を除し係数を求め、その平均値を比較した(図9)。十分量採取できなかった特大型は除いた。今回の調査では、TBTについては大型検体より小型検体の方が、TBTの蓄積量が多く、有意な差が見受けられた。しかし、TPTにおいては有意な差が見受けられなかった。TBTについては他にも同様の報告があり、ろ過率、えら面積の広さ、主な生息場所(小型:潮間帯, 大型:地中)、TBTによる成長阻害などが原因としてあげられている<sup>10)</sup>。特大型は採取できた時期及び場所が他の大きさのものとは非常に少なかったため、参考までに小型—特大型(TBT n=5; TPT n=3)、中型—特大型(TBT n=8; TPT n=4)、大型—特大型(TBT n=7; TPT n=4)と個々に分け比較したところ、TBTにおいても有意な差は見受けられなかった。(n: 延べ採取地点, 以降同じ。)

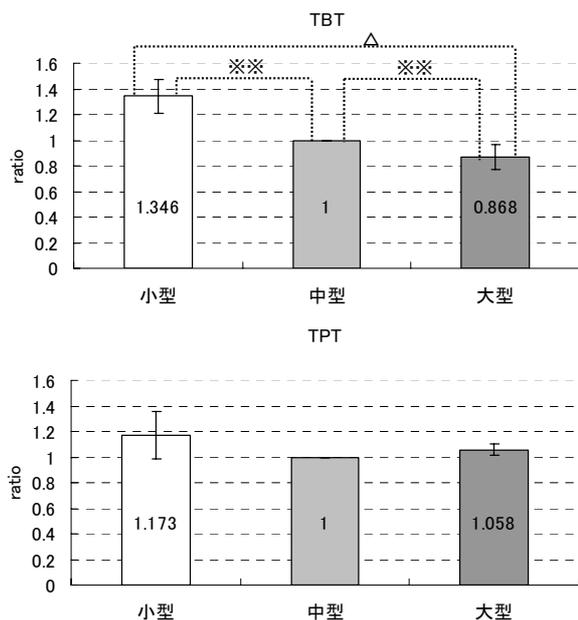


図9. 重量あたりの含有量(ng/g), サイズ間比較 (TBT:n=23 TPT:n=8 ※※:p<0.01 Δ:p<0.1 paired t-test) n: 延べ採取地点

1 個体あたりの平均含有量 (ng/個) について、重量あたりの含有量 (ng/g-wet) と同様に係数を求め、平均値を比較した(図10)。TBT, TPT 共に、小型検体より大型検体の方が、1 個体あたりの蓄積量が多く、

有意な差が見受けられた。このことにより、TBT,TPTともに、成長に伴い蓄積され続けていること<sup>11)</sup>(高蓄積性であること)が示唆された。特大型も同様の比較をしたところ、TBT においては小型—特大型 (n=8)、中型—特大型(n=7)で有意な差が見受けられ(p<0.05)、TPT においては小型—特大型 (n=3)、中型—特大型 (n=4)、大型—特大型 (n=4)において差の傾向が見受けられた (p<0.1)。

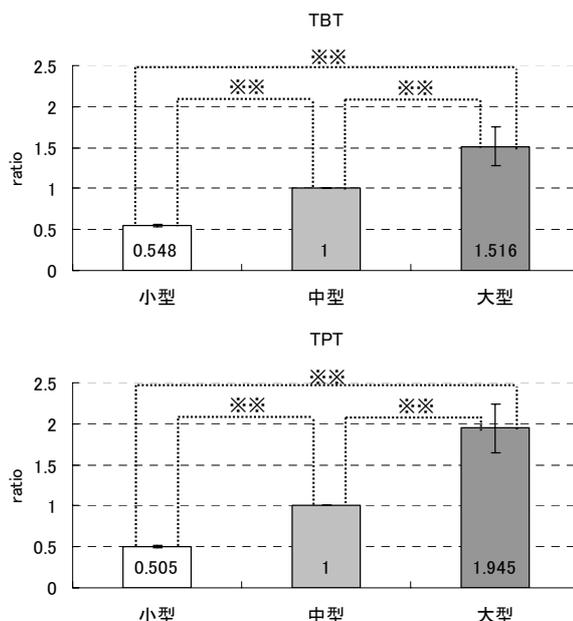


図10. 個体あたりの含有量(ng/個), サイズ間比較 (TBT:n=23 TPT:n=8 ※※:p<0.01 paired t-test) n: 延べ採取地点

### まとめ

LC/MS/MS を用いた分析法を検討し、「食品中の農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」等を参考に妥当性評価試験を実施したところ、良好な結果が得られた。同一の実試料を用いた測定においても、ガイドラインの精度を十分満たす結果であった。このことより、多くの液液分配及び誘導体化を省略でき、安全で効率的かつ一定の精度をもった分析法を確立できた。

本分析法を用いて、県内の沿岸海域(港湾)にて平成15年度から平成19年度にかけて採取したムラサキガイを分析し経年変化を確認した。前年度と比較し一部増加しているところが見受けられたものの概ね減少傾向にあることが確認された。

また、少なくとも9cm未満のムラサキガイについて、検体が小さいほど、TBTの重量あたりの含有量(ng/g-wet)が多く、検体が大きいほど、1 個体あたりの

TBT, TPT 含有量(ng/個)が多い傾向が見受けられた。このことから、モニタリング等期間及び地点間の比較を前提にした試験では、検体の大きさを一定に揃える必要性が示唆された。

#### 文 献

- 1) 環境省環境生活部環境安全課監修：“平成 16 年度版「化学物質と環境」”
- 2) 環境省環境生活部環境安全課監修：“平成 18 年度版「化学物質と環境」 添付資料「平成 17 年度モニタリング調査 (POPs 及び HCH 類以外の 3 物質群) 分析機関報告データ”：40-41,46-47.
- 3) 藤本啓, 上野健一, 田沢悌二郎, 橋本諭, 平間祐志, 西村一彦, 長南隆夫：道衛研所報, 57, 51-56 (2007).
- 4) 三沢松子, 阿部郁子, 佐久間隆, 氏家愛子, 阿部時男：宮城県保健環境センター年報, 21, 106-111 (2003).
- 5) 茶谷祐行, 大藤升美, 都築英明, 柳瀬杉夫, 北野隆一, 塩崎秀彰：京都府保環研年報, 53, 29-31 (2008).
- 6) 環境省水環境部企画課監修：“要調査項目等調査マニュアル(水質, 底質, 水生生物)”：173-184 (2002).
- 7) 厚生労働省監修：“食品衛生検査指針 理化学編” 日本食品衛生協会 458-467(2005).
- 8) 「食品中に残留する農薬などに関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」(平成 19 年 11 月 15 日付け食安発第 1115001 号) .
- 9) 「食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」(平成 20 年 9 月 26 日付け食安発第 0926001 号) .
- 10) Hyaec-Kyung Hong, Shin Takahashi, Byung-Yoon Min, Shinsuke Tanabe : Environmental Pollution, 117, 475-486 (2002).
- 11) 細見彬文 : Japanese Journal of Ecology, 16, 109-113 (1966).