

平成10年度 厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

内分泌かく乱化学物質の胎児、成人等の暴露に関する調査（指定研究）

毛髪及び血液中の有機スズ化合物の分析法に関する研究

主任研究者 中澤裕之

星薬科大学教授

分担研究者 織田 肇

大阪府立公衆衛生研究所 副所長

研究協力者 益川邦彦

神奈川県衛生研究所 所長

#### 研究要旨

有機スズ化合物の人体暴露量の調査を目的として、毛髪及び血液を対象とした分析法の検討を行った。炎光光度検出器付きガスクロマトグラフ（GC-FPD）及び質量分析装置付きガスクロマトグラフ（GC/MS）を用い、選択性の高い分析法の開発を行うことができた。

本分析法を用いたヒト毛髪中の有機スズ化合物の分析の結果、トリブチルスズ化合物が24検体中5検体から0.010～0.028ppm（検出限界0.010ppm）の範囲で検出された。さらに、検出された5検体中4検体についてはGC/MSの選択イオン検出法（SIM）により、金属スズ（Sn）の天然同位体存在比を基に主要なマスフラグメントのイオン強度比を標準品と比較した。その結果においても、人体毛髪中には有機スズ化合物の存在が示された。なお、血液については混合血液（全血）1検体からトリブチルスズ化合物0.014ppmが検出されたが、血漿3検体についてはいずれも不検出であった。

#### A. 研究目的

有機スズ化合物は、船底防汚塗料や漁網防汚剤として長年使用されてきたが化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律による法的規制や使用自粛によって、日本近海の環境汚染レベルは横ばいまたは減少傾向にある。しかし、水生生物への毒性が強

く、巻き貝に対してインボセックスが全国規模で観察<sup>1)</sup>されるなど、内分泌かく乱物質として新たに注目されている。海産魚介類をタンパク質源として多く摂取している我が国としてはその人体暴露量の評価が求められている。今回、有機スズ化合物の人体暴露量を評価するためにサンプルとして

入手が容易で運搬や保管が比較的簡単なヒト毛髪<sup>23)</sup>及び血液を対象とし、残留する有機スズ化合物の微量分析法の開発を目的とした検討を行った。

有機スズ化合物の分析法としては、すでに塩化物に対しては、電子捕獲検出器付きガスクロマトグラフ (GC-ECD) で測定する方法<sup>4)</sup>が、アルキル化体<sup>3)</sup>及び水素化体<sup>9)</sup>に対しては GC-FPD で測定する方法などがある。本研究では、誘導化体として安定なアルキル化体とした後、選択性が高い GC-FPD にて分析する方法を用いた。また、確認法としては低濃度のマススペクトルの確認は困難なため、SIM によるイオン強度比から金属スズ (Sn) の天然同位体存在比を基に毛髪中の有機スズ化合物の確認を行った。

## B. 実験方法

### B・1 試薬

標準品として用いた塩化トリブチルスズ、塩化ジブチルスズ、塩化トリフェニルスズ、塩化ジフェニルスズ及び内標準物質として用いた塩化トリペンチルスズはすべてアルドリッチ社製を用いた。アルキル化誘導化試薬として用いたエチルマグネシウムブロミドは東京化成製を用いた。溶媒は和光純薬製残留農薬用を用いた。その他、硫酸は精密分析用、水酸化カリウム、塩化ナトリウム、塩酸は特級の和光純薬製を用いた。

Sep-PakPlus フロリジルカートリッジカラム (910mg/cartridge) はウォターズ社製、毛髪の洗浄に用いた Extran MA02 (ガラス器具洗浄用洗剤) はメルク社製を用いた。

### B・2 装置及び分析条件

## GC-FPD

装置：HP6890 (HP 社) Sn フィルター  
610nm 使用

カラム：HP-5 30m × 0.32mm × 0.25 μm  
(HP 社)

注入口：スプリットレス、温度 250 °C、  
圧力 13.7psi

圧力プログラム：13.7psi (10min) -  
10psi/min - 53.7psi (3min)

昇温プログラム：50 °C (1min) - 20 °C/min  
- 230 °C (6min)

検出器温度：250 °C

検出器ガス流量：H<sub>2</sub> 180mL/min、Air  
90mL/min、メイクアップガス 150mL/min  
サンプル注入量：1 μL (オートサンプラー  
使用)

## GC/MS

装置：Auto Mass 150 (日本電子)

カラム：DB-5 30m × 0.25mm × 0.25 μm

注入口：スプリットレス、温度 220 °C

昇温プログラム：50 °C (1min) - 20 °C/min  
- 280 °C (10min)

イオン源温度：200 °C

GC/MS インターフェイス部温度：250 °C

サンプル注入量：2 μL (手打ち)

イオン化：EI

イオン化電圧：70eV

検出方法：SIM

モニターイオン：トリブチルエチルスズ  
(TBT-Et) の [M-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>]<sup>+</sup> である 291 及び  
スズの同位体由来する 289、287。  
TBT-Et の [M-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup> である 263 及び  
スズの同位体由来する 261、259。

X線マイクロアナライザー (走査型電子顕  
微鏡)

装置：走査型電子顕微鏡 JSM 5600LV (日

本電子)、X線マイクロアナライザー JED 2200 (日本電子)

分析条件: 反射電子像X線分析、加速電圧 15kV

超音波洗浄器

装置: ブランソン卓上形超音波洗浄器 1210 型

### B・3 試験溶液調製法

#### B・3・1 検体試料の前処理

図-1 に示した。

#### B・3・2 試験溶液の調製

図-2 に示した。

## C. 研究結果

### C・1・1 毛髪 の測定結果

表-1 に示した。1 才 (No.6) から 80 才台 (No.24,25) までのボランティアから毛髪 24 検体及び理髪店から得た不特定多数の混合毛髪 1 検体の分析を行った。ボランティアから得られた毛髪 24 検体中 5 検体から 0.010 ~ 0.028ppm (検出限界 0.010ppm) の範囲でトリブチルスズ化合物が検出された。No.2 の毛髪は 2 回の測定値が 0.027ppm と 0.028ppm であった。No.3 の毛髪は 2 回の測定がいずれも不検出であった。また、理髪店から得られた混合毛髪 1 検体の 3 回の測定では 0.125ppm、0.107ppm、0.149ppm のトリブチルスズ化合物が検出され、平均 0.127ppm であった。

**C・1・2 血液 (全血) 及び血漿の測定結果**  
表-2 に示した。神奈川県衛生研究所保管の不特定多数の混合血液 1 検体と日本赤十字社から入手した血漿 3 検体について分析を行った。混合血液から 0.014ppm (検出限界 0.010ppm) のトリブチルスズ化合物が検出された。血漿の 3 検体の分析結果は

不検出であった。

### C・2 定量法及び検出限界

ピーク高さにて、計算は絶対検量線法及び内標準法を用いた。検出限界は、TBT-Et、TPT-Et はともに 0.010ppm (S/N=3) であった。

### C・3 検量線及び添加回収率

絶対検量線法の標準品 TBT-Et、TPT-Et の濃度はそれぞれ 0.1ppm、0.5ppm であり、得られた検量線は原点を通る直線性を示した。測定したサンプルは試薬ブランク、混合毛髪 (No.1)、有機スズを 200ng 添加した混合毛髪、混合血液 (Blood) 及び有機スズを 200ng 添加した混合血液である (図-3、-4)。添加回収率は、毛髪において TBT-Et (0.2ppm) は 91%、TPT-Et (0.2ppm) は 57% であり、血液において TBT-Et (0.2ppm) は 166%、TPT-Et (0.2ppm) は 79% であった。内標準法の標準品の各種有機スズ濃度 (TBT-Et、TPT-Et、DBT-Et、DPT-Et) はそれぞれ 0.2ppm、0.4ppm であり、内標物質 TPenT-Et の濃度は 0.2ppm である (図-5)。各種有機スズ化合物 (TBT-Et、TPT-Et、DBT-Et、DPT-Et) の検量線は原点を通る直線性を示した。測定したサンプルの代表例として、試薬ブランク、混合毛髪 (No.1)、女性・44 才の毛髪 (No.2)、男性・10 才の毛髪 (No.3) を図-6、-7 に示した。

### C・4 GC/MS による確認

理髪店で入手した不特定多数の混合毛髪 No.1 (TBT-Et 0.149ppm 検出) と標準品について TBT-Et のマススペクトル (図-8) の測定を行った。

### C・5 同位体存在比による同定

トリブチルスズ化合物が検出された毛髪 No.10 (0.015ppm)、No.16 (0.018ppm)、No.17

(0.010ppm)、No.18 (0.010ppm) について選択イオン検出法 (SIM) による金属スズ (Sn) の天然同位体存在比を基に主要なマスフラグメントのイオン強度比を標準品と比較した。

金属スズの同位体は 10 種類存在するが、天然存在比が多い順に 3 種を選択すると  $\text{Sn}^{120}$  (32.97%)、 $\text{Sn}^{118}$  (24.01%)、 $\text{Sn}^{116}$  (14.24%) である。その 3 種の存在比は  $\text{Sn}^{120} : \text{Sn}^{118} : \text{Sn}^{116} = 1.00 : 0.73 : 0.43$  である。一方、TBT-Et の分子イオンピークは認められず (図-8)、主要なフラグメントイオンは 291 ( $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5]^+$ ) と 263 ( $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_9]^+$ ) である。291 と 263 にはスズの同位体由来するピークがそれぞれ 291 には 289 及び 287 が、263 には 261 及び 259 が存在しており、標準品においてそのイオン強度比はそれぞれ  $291 : 289 : 287 = 1.00 : 0.77 : 0.46$  及び  $263 : 261 : 259 = 1.00 : 0.75 : 0.40$  であった。このことから標準品の同位体ピークのイオン強度比はスズの天然存在比と一致することがわかった。そこで標準品の保持時間と同位体ピークのイオン強度比が一致するかどうか検討したところ上記の毛髪 No.10、No.16、No.17、No.18 はいずれも標準品と保持時間及び同位体ピークのイオン強度比が一致した (表-3)。代表的な検体 (No.17) について SIM のマスクロマトグラムと同位体存在比による同定例を、図-9、-10 に示した。

C・6 X線マイクロアナライザー (走査型電子顕微鏡) による金属スズの測定

毛髪 No.2 (TBT-Et 0.027 ~ 0.028ppm) で X線マイクロアナライザー (走査型電顕) による金属スズの測定<sup>7)</sup> を毛髪表面及び毛髪切断面での線分析を試みたところ、金属ス

ズの存在は毛髪表面ではなく内部にあることが示された。(図-11)

#### D. 考察

1. ヒト毛髪及び血液中の有機スズ化合物の分析を試みた結果、毛髪については TBT-Et と TPT-Et がそれぞれ添加回収率が 91%、57% であり、血液では TBT-Et と TPT-Et がそれぞれ 166%、79% であった。毛髪、血液については検出例が検出限界付近であるためさらに高感度で精度の高い分析法の検討が必要である。また、血液については今後、例数を追加するなどの検討を加えていきたい。

2. 毛髪 No.10、No.16、No.17、No.18 について選択イオン検出法 (SIM) による金属スズ (Sn) の天然同位体存在比を基に主要なマスフラグメントのイオン強度比を標準品と比較した結果、標準品と保持時間及び同位体ピークのイオン強度比が一致しており人体毛髪中にトリブチルスズの存在が確認された。

3. 毛髪 No.2 (成人 44 才、女性) から 0.028 ~ 0.027ppm の TBT-Et の検出が FPD-GC で認められた。この検体における愛知県衛生研究所のクロスチェックの結果は 0.032ppm (エチル化、GC-FPD) であった。また、三菱化学安全科学研究所の結果は 0.040ppm (プロピル化、GC/MS/SIM) であり、モニターイオン (277.1, 235.1, 289.1, 291.2) の強度比も TBT 標準物質と毛髪 No.2 はほぼ同じであった。このことから 2カ所の研究所のクロスチェックの測定値と今回の測定値 (0.028 ~ 0.027ppm) はほぼ同じ値であり、毛髪中にトリブチルスズが存在するものと推定される。

4. 理髪店で入手した不特定多数の混合毛髪 No.1 から 0.107 ~ 0.149ppm の TBT-Et が検出されたが、クロスチェックをした愛知県衛研研究所と三菱化学安全科学研究所のデータはいずれも 0.02ppm 前後の低い値であった。原因については不明であるが、混合試料の均一性が欠けていたのではないかと思われる。

#### E. 結論

1. 有機スズ化合物の人体暴露量の調査を目的として、毛髪及び血液を対象とした分析法の検討を行った。炎光光度検出器付きガスクロマトグラフ (GC-FPD) 及び質量分析装置付きガスクロマトグラフ (GC/MS) を用いた選択性の高い分析法の開発を行うことができた。

2. 開発した分析法を用いてヒトの毛髪中から有機スズ化合物であるトリブチルスズ化合物が 24 検体中 5 検体から 0.010 ~ 0.028ppm (検出限界 0.010ppm) の範囲で検出された。

3. 毛髪から検出されたトリブチルスズ化合物について GC/MS の選択イオン検出法 (SIM) による金属スズ (Sn) の天然同位体存在比を基に主要なマスフラグメントのイオン強度比を標準品と比較した結果、トリブチルスズ化合物を良好に同定できた。

#### (参考文献)

- 1) Horiguchi, T. et al. : Imposin and organotin compounds in *Thais clavigera* and *T. bronni* in Japan, *J. mar. biol. Ass. U.K.*, **74**, 651-669 (1994)
- 2) 井上堯子 : 毛髪分析による乱用薬物の使用証明、*ファルマシア*, **32**(5)、518-522 (1996)

3) Nagase M., et al. : Determination of tributyltin and triphenyltin compounds in hair and fish using a hydrolysis technique and gas chromatography with flame photometric detection, *Analysis*, **120**(7), 1923-1926 (1995)

4) 竹内正博、他 : 電子捕獲型検出器を用いるガスクロマトグラフィーによる魚介類中のトリブチルスズ化合物の定量、*分析化学*, **36**, 138-142 (1987)

5) Sasaki, K. et al. : Determination of tri-n-butyltin and di-n-butyltin compounds in fish by gas chromatography with flame photometric detection, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **71**, 360-363

6) 高橋一暢 : ガスクロマトグラフィーによる船底防汚塗料から海水中に溶出するジブチルスズおよびトリブチルスズ化合物の定量、*日本化学会誌*, **4**, 380-384 (1990)

7) Yoshizuka M., et al. : The role of the rat submandibular gland in the excretion of bis (tributyltin) oxide: electron microscopy, X-ray microanalysis and atomic absorption analysis, *Tissue. Cell.*, **24**(5), 725-733 (1992)

#### F. 研究発表

学会発表

学会名 : 日本薬学会第 119 年会

(1999 年 3 月 29 日 ~ 31 日開催)

演題名 : GC-FPD 及び GC-MS におけるヒ

ト毛髪中の有機スズ化合物の分析

演者及び共同研究者 : 神奈川衛研 ○ 藤巻照

久、佐藤修二、谷 孝之、益川邦彦、

星葉大 渡辺卓穂、吉村吉博、中澤

裕之