

## 生体試料中のフタル酸エステル類の分析法

### 【試験法の概要】

生体試料からアセトニトリルによりフタル酸エステル類 (PAE) <sup>注1、注2</sup>を抽出し、抽出液をフロリジル・PSA カラムクロマトグラフィーによって精製し、ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS) で定性、定量を行う。

分析の対象となる PAE は、フタル酸ジブチル (DBP)、フタル酸ブチルベンジル (BBP)、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP)、フタル酸ジイソオクチル (DiOP)、フタル酸ジイソノリル (DiNP) である。

なお、本法は血清に適用できる。

### 【試薬】

すべての試薬類は、クロマトグラム上で PAE の分析に支障のないことを確認した後用いる。

- ① 有機溶媒：n-ヘキサン、アセトニトリル、アセトンはフタル酸エステル試験用を用い、使用直前に開封する<sup>注3</sup>。
- ② 無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用を 200℃で 2 時間加熱し、放冷後使用する。
- ③ 塩化ナトリウム：フタル酸エステル試験用を 200℃で 2 時間加熱し、放冷後使用する。
- ④ 精製水：フタル酸エステル試験用の n-ヘキサンで洗浄した蒸留水を用いる<sup>注4</sup>。
- ⑤ フロリジル：フロリジール PR を 200℃で 2 時間加熱し、放冷後使用する。
- ⑥ PSA：ボンデシル PSA を用いる。
- ⑦ PAE 標準溶液：各標準品 20 mg を 20 mL のメスフラスコに量り取り、n-ヘキサンにて 20 mL とし、1000 μg/mL 溶液を調製する。適宜希釈し、PAE 標準溶液とする。
- ⑧ 内標準溶液：各フタル酸エステル-d4 標準品 20 mg を 20 mL のメスフラスコに量り取り、n-ヘキサンにて 20 mL とし、1000 μg/mL 溶液を調製する。適宜希釈し、内標準溶液とする。

### 【装置】

- ① ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS)：電子イオン化 (EI) イオン源及びキャピラリーカラム (スプリットレス) を装着し、選択イオン検出法 (SIM) による分析が可能な装置を用いる。
- ② フロリジル・PSA カラム：ガラス製クロマトカラム (内径 15 mm、長さ 110 mm) に、フロリジル 1 g、その上に PSA0.5 g、無水硫酸ナトリウム 2 g を充填する。使用前にアセトン 10 mL 及び n-ヘキサン 10 mL を用いて洗浄する。

### 【試験溶液の調製】<sup>注5</sup>

血清 1 mL を共栓試験管 (10 mL、ガラス製) に採り、アセトニトリル 5 mL、塩化ナトリウム 0.5 g、n-ヘキサン 1 mL 及び内標準溶液 (4 μg/mL) 25 μL を添加後、3 分間振とうする。3000 rpm で 5 分間遠心分離後、アセトニトリル層を分取し、減圧留去する。残渣を精

製水 2 mL に溶解し、n-ヘキサン 5 mL 及び 3 mL で 2 回抽出する。n-ヘキサン層をフロリジル・PSA カラムに負荷し、n-ヘキサン 3 mL でカラムを洗浄後、5%アセトン-n-ヘキサン 10 mL で PAE を溶出する。溶出液を減圧濃縮後、n-ヘキサンで 1 mL に定容し、試験溶液とする。

【試験操作】 定量分析<sup>注6</sup>

① GC/MS 測定条件：一例を以下に示す。

カラム：ヒューズドシリカ・キャピラリーカラム（内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25  $\mu$ m）、液層は 5%フェニルメチルシリコンを使用する<sup>注7</sup>。

カラム温度：80°C（3分）→10°C/分→300°C（5分）

キャリアーガス：ヘリウム、全流量 50 mL/分、カラム流量 1.5 mL/分

注入口温度：240°C

注入方式：スプリットレス

インターフェース温度：300°C

検出法：SIM

モニターイオン：表 1 に示した。

表 1 モニターイオン

物質名	略称	定量イオン	参照イオン
フタル酸ジ-n-ブチル	DBP	149	205、223
フタル酸ブチルベンジル	BBP	149	91、206
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	DEHP	149	167、279
フタル酸ジイソオクチル	DiOP	149	279
フタル酸ジイソノニル	DiNP	149	293
フタル酸ジ-n-ブチル-d4	DBP-d4	153	227、209
フタル酸ブチルベンジル-d4	BBP-d4	153	91、210
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル-d4	DEHP-d4	153	171、283
フタル酸ジオクチル-d4	DOP-d4	153	283
フタル酸ジノニル-d4	DNP-d4	153	297

② 定量：試験溶液の一定量を GC/MS に注入し、各 PAE のピーク面積を内標準物質のピーク面積で除した値を、検量線と比較して定量する。DiOP は主要な 2 本のピークを、DiNP は主要な 5 本のピーク面積をそれぞれ合計して定量対象とする。

③ 検量線の作成：内標準物質を含んだ PAE 標準溶液を GC/MS に注入し、各 PAE のピーク面積を内標準物質のピーク面積で除した値を用いて検量線を作成する。DiOP は主要な 2 本のピークを、DiNP は主要な 5 本のピーク面積をそれぞれ合計してピーク面積とする。

【検出下限・定量下限】

検出下限は、後述のごとく操作ブランク中の DBP 及び DEHP 濃度を低減化できるので、DBP、BBP、DEHP は 3 ng/mL に、DiOP、DiNP は 20 ng/mL に設定する。また、定量下限は、DBP、BBP、DEHP は 10 ng/mL に、DiOP、DiNP は 50 ng/mL に設定する。

## 【注解】

注1 PAE は、ポリ塩化ビニル製樹脂 (PVC) 等に使用されている可塑剤の一つである。PVC は家庭用品や建築材として広く使用され、これらからの揮散あるいは溶出により環境汚染が問題になっている化合物である。したがって、環境から混入するブランク値が問題となるため、分析を実施する上では特に操作ブランク値の低減化に注意を払う必要がある。

操作ブランクの低減化に関して、以下の項目が有効であることが判明している。これらの項目に注意を払わない場合には、操作ブランクの SIM プロファイル上に 100 ng/mL レベルの DBP 及び DEHP が出現するのに対して、これらのことを実施すると、操作ブランク値が、それぞれ 10 ng/mL 以下に低減されるので、本試験法を実施する際にはこれらの点に留意して実験を行うこと。

- a) 使用する水は、フタル酸エステル試験用の n-ヘキサンで洗浄した蒸留水を使用する。
- b) ホールピペット及びメスフラスコ以外の全ての実験器具（エバポレーターのトラップも含む）は、200℃、2時間加熱し、放冷した後に、使用する直前にフタル酸エステル試験用の n-ヘキサンで洗浄する。なお、n-ヘキサン洗浄は手が器具に直接触れないように、ピンセットを用いて実施する。
- c) 実験操作開始直前には必ず両手を石けんでよく洗い、その後は、極力実験器具以外には触れないようにする。特に、ドアノブに触れた場合には必ず両手を洗浄する。
- d) 使用する実験台は、アルミホイルで覆い、毎日交換する。
- e) エバポレーターは、使用する直前にフタル酸エステル試験用アセトンを濃縮乾固する。
- f) 標準品を扱う際は、作業する実験台とは異なる実験台で行う。
- g) ピペットの先端が実験室内の器具装置等に触れないようにする。
- h) ホールピペットは必ず基本操作どおり扱い、決して口で吹いたりして溶液を排出しない。
- i) 腕時計は外しておく。
- j) 髪の毛は小さくまとめる。
- k) 爪は短く切る。

注2 本法ではサロゲートによる内標準法を採用し、回収率を補正している。血清に DBP、BBP、DEHP の濃度がそれぞれ 100 ng/mL に、DiOP、DiNP の濃度が 200 ng/mL になるように添加したときの平均回収率は、98.7・123.7%、相対標準偏差は 0.86・7.52% である。

注3 開封後長期間経たものは、環境中から PAE が混入している可能性が高いので使用しない。

注4 使用する精製水に妨害ピークが認められた場合には、n-ヘキサンによる洗浄を繰り返し実施するとよい。

注5 PAE の分析では、試薬、器具等に起因する汚染に十分注意する必要があるため、ブランク試験を必ず実施して分析操作中に混入する PAE 量を把握する必要がある。

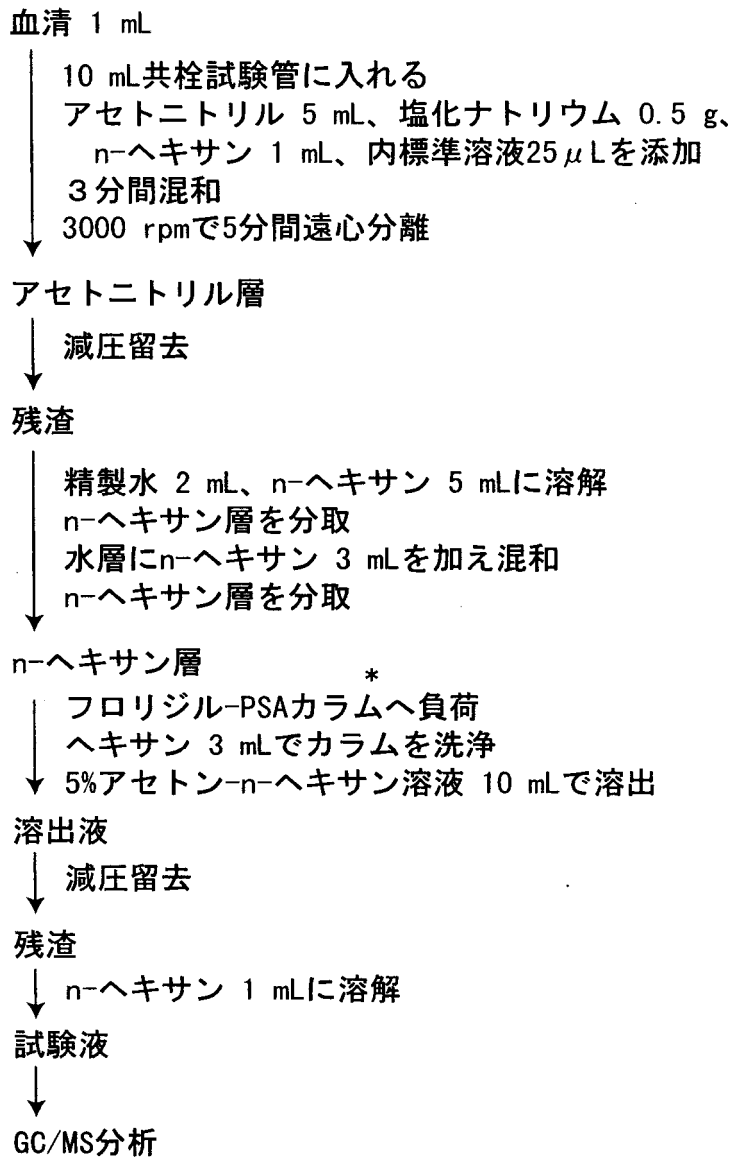
注6 標準品及び試料を分析する前に n-ヘキサンのみを数回注入し、GC/MS の状態をチェックすると良い。

注7 Agilent technologies 社製の HP-5MS、HP-5MS SV、J&W Scientific 社製の DB-5MS 等がある。

## 【参考文献】

下記に生体試料中のフタル酸エステル類分析に関する最近の報告例を示す。

- 1) Inoue K, Kawaguchi M, Okada F, Yoshimura Y, Nakazawa H, Column-switching high-performance liquid chromatography electrospray mass spectrometry coupled with on-line of extraction for the determination of mono- and di-(2-ethylhexyl) phthalate in blood samples. *Anal Bioanal Chem*, 375, 527-33 (2003)
  
- 2) Takatori S, Kitagawa Y, Kitagawa M, Nakazawa H, Hori S, Determination of di(2-ethylhexyl)phthalate and mono(2-ethylhexyl)phthalate in human serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*, 804, 397-401 (2004)
  
- 3) Colon I, Dimandja JM, High-throughput analysis of phthalate esters in human serum by direct immersion SPME followed by isotope dilution-fast GC/MS. *Anal Bioanal Chem*, 380, 275-283 (2004)



- \* フロリジル-PSAカラムの調製法  
ガラスカラム管の底にガラスフィルターを敷く  
フロリジル 1 g、PSA 0.5 g、硫酸ナトリウム 2 gの順に  
積層する  
アセトン 10 mL、n-ヘキサン 10 mLで洗浄する

図 血清中のフタル酸エステル類の分析法フローシート

## 生体試料中 4-ノニルフェノールの分析法

### 【試験法の概要】

生体試料を直接カラムスイッチングー液体クロマトグラフ/質量分析計(LC/MS(MS))<sup>注1</sup>に注入し、カラムスイッチングと抽出カラムを用いて、オンラインで前処理を行い、定性・定量を行う。

なお、本試験の対象化学物質は、4-ノニルフェノール(NP)であり、血清試料に適用できる。

### 【試薬】

全ての試薬類は、クロマトグラム上で NP の分析に支障のないことを確認した後用いる。

- ① 標準品(NP)：4-Nonylphenol 環境分析用（混合<sup>注2</sup> 95.0%以上）を用いる。
- ② 標準溶液の調製：NP 標準品 100 mg を 100 mL のメスフラスコに量りとり、アセトニトリルを加えて、100 mL として標準原液を調製し、適宜希釈して標準溶液とする。
- ③ 有機溶媒：残留農薬試験用、環境分析用または HPLC 用を用いる。
- ④ 精製水：NP の汚染が少ないミリ Q 水又は市販の蒸留水を使用する。
- ⑤ 内標準物質<sup>注3</sup>：4-(1-メチル)オクチルフェノールの重水素化体を使用して、内標準補正を行う。回収率や再現性等測定に支障のない場合は、絶対検量線法による測定も可能である。
- ⑥ 前処理カラム：クリーンアップに使用するカラムとして、その回収率及び精製効果により、カラムを選択する<sup>注4</sup>。
- ⑦ グルクロニダーゼ処理：血清 1mL に対し、 $\beta$ -グルクロニダーゼ(15 mL、89U/mL)及び酢酸アンモニウム(1.0M、200 mL)を加え、37°C で 3 時間インキュベートを行う<sup>注5</sup>。

### 【器具】

検体の調製に用いる器具は、事前に材質試験を行い、NP 不検出のものを用いる。

器具の洗浄は常に一定の条件で行う。特にガラス器具は洗浄後、200°C で 2 時間以上加熱し、環境中の NP の汚染を受けないところで放冷する。使用直後にアセトンで洗浄して使用する。

### 【装置】

カラムスイッチングー液体クロマトグラフ/質量分析計(LC/MS)：カラムスイッチングバルブを装着した LC/MS 装置にエレクトロスプレーイオン源による選択イオン検出(SIM) ( $m/z=219$  [ $M-H^-$ ])による分析が可能な装置を用いる。LC/MS/MS による測定も可能であるが、 $m/z$  219 の脱プロトンイオンをモニタリングすることとする。

### 【試験溶液の調製】<sup>注6</sup>

#### 方法 A

血清 1mL を量り取り、試験管に移す。血清が入った試験管にグルクロニダーゼ処理を行う。酵素反応終了後、精製水で、全量 1.5 mL に定容する。その後、内標準物質を暫定

濃度になるように加え、カラムスイッチング LC/MS に直接注入し、分析を行う。

#### 方法 B

血清 1mL を量り取り、試験管に移す。グルクロニダーゼ処理をした血清に内標準物質を暫定濃度になるように加える。血清と同量のアセトニトリルを加え、混和後、遠心分離 (3000 rpm、30 min、4°C) を行う。その後、上清をフィルター<sup>注7</sup>に通し、バイアル瓶に入れ分析に供する。

#### 【試験操作】

① LC/MS 測定条件：一例を以下に示す。

分析用カラム：C18 逆相系カラム(内径 2.0 mm、長さ 100mm、粒径 5  $\mu$ m)<sup>注8</sup>

カラム温度：40°C

分析用移動相：水：アセトニトリル(0.02 %酢酸アンモニウム<sup>注9</sup>でグラジエント溶出する。30：70 (8min)→5：95 (10 min)→5：95 (20 min)

分析用移動相の流速：0.2 mL/min

抽出用カラム：内面逆相系カラム(内径 4.6 mm、長さ 10mm、粒径 5  $\mu$ m)<sup>注4</sup>

抽出用移動相：精製水(100%)<sup>注10</sup>

抽出用移動相の流速：0.5 mL/min

バルブスイッチ時間：5 min

注入量：30  $\mu$ L

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化(ESI)法 ネガティブモード

MS モニターイオン：m/z=219 (NP)、m/z=224 (m-OP-d<sub>5</sub>)

#### ② 定性・定量

LC/MSにおいてSIM(m/z=219)測定において検出される1本のピークがベースライン分離を達成していることを確認後、そのピーク面積を用いて、定量を行う。内標準法により定量を実施する。検量線は、1~100 ppb の濃度範囲において作成する。また、検量線に用いた最も低濃度の標準溶液を5回以上測定し、その標準偏差(SD)の3倍を検出下限値 (LOD)、10倍を定量下限値(LOQ)とする。但し、操作ブランクのある場合には操作ブランク値の測定を行い、標準溶液と操作ブランク値のうち、大きい方の標準偏差を用いて算出する<sup>注11</sup>。

#### 【参考測定法】

1. K. Inoue, Y. Yoshimura, T. Makino, H. Nakazawa : Determination of 4-nonylphenol and 4-octylphenol in human blood samples by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical coulometric-array detection. *Analyst* 125, 1959-1961 (2000)
2. K. Inoue, M. Kawaguchi, F. Okada, N. Takai, Y. Yoshimura, M. Horie, S. Izumi, T. Makino, H. Nakazawa : Measurement of 4-nonylphenol and 4-octylphenol in human urine by column-switching liquid chromatography-mass spectrometry.

*Analytica Chimica Acta* 486, 41-50 (2003)

【注解】

- 注1 カラムスイッチング-LC/MS 法は、試料を直接 LC に導入することができ、前処理操作に伴うコンタミネーションを抑えることができる。また、LC のクロマトグラム上において、NP の異性体群が 1 本のピークとして確認できるため、定量が容易である。
- 注2 NP は側鎖であるノニル基が直鎖のものと分岐したものに大別できる。市販されている標準品は、ノニル基が種々に分岐した混合型と直鎖型単一成分からなるものがある。一般に環境試料や生物試料からは、混合型標準品に類似したピークパターンが観察される。したがって、混合型標準品を用いた評価が妥当である。しかし、市販されている混合型標準品の成分組成(ピークパターン)はメーカーや同一メーカーでもロットにより異なる場合があるので注意を要する。
- 注3 質量分析計で利用される NP の補正物質としては、直鎖型 4-n-NP (重水素・<sup>13</sup>C 安定同位体)と 4-(1-methyl) octylphenol-d<sub>5</sub> がある。直鎖型と分岐型では物理化学的性質が異なり、十分に内標準補正できない場合がある。そこで、この 2 つを比較し、内標準物質として 4-(1-methyl) octylphenol-d<sub>5</sub> を選択した。この内標準物質 (IS) を用いた時、保持時間は NP と異なり、十分に補正しているとは言い難い。今後、重水素・<sup>13</sup>C 安定同位体置換の混合体 NP が望まれる。
- 注4 TOSOH 社製 TSK-PRECOLUMN BSA/ODS-S (4.6 x 10 mm, 5 μm) などがあ  
る。または、これと同等の回収率及び精製効果を有するものを使用する。
- 注5 β-グルクロニダーゼでの脱抱合は、同じユニット U でなくても良いものとする。  
必ず、事前に抱合が外れる条件を確認するものとする。
- 注6 カラムスイッチングによる直接注入は少数検体には可能であるが、大量検体を測定する際には、約 20 検体(血清)で抽出カラムの回収率及び精製効果が得られなくなる。  
大量検体を測定するときには、方法 B の分析法が好ましい。
- 注7 Geiman Japan 社製 P/N Ekicrodisc 13 CR 0.45 μm PTFE などがあ  
る。
- 注8 関東化学社製 Mightysil RP18 GP などがあ  
る。
- 注9 酢酸アンモニウム濃度 0~2 mM の範囲において最大レスポンスを与える濃度を使用する。  
水、アセトニトリルの両溶媒に 0.02%酢酸アンモニウムになるよう調製した。
- 注10 カラムの洗浄を考慮し、10%までメタノールを混合することも可能である。その  
場合、抽出率を確認する必要がある。
- 注11 検出下限値及び定量下限値の算出方法は、「ダイオキシン類に係わる水質調査マニ  
ュアル」環境庁水質保全局水質規制課(平成 10 年 7 月)に従った。



## 方法A

血清 1 mL

↓  
β-グルクロニダーゼ(15 μL、89U/mL)、  
酢酸アンモニウム(1.0M、200 μL)を添加  
37°Cで3時間インキュベート

精製水で定容(全量1.5mL)  
内標準物質を暫定濃度添加

↓  
LC/MS(/MS)分析

## 方法B

血清 1 mL

↓  
試験管に移す  
β-グルクロニダーゼ(15 μL、89U/mL)、  
酢酸アンモニウム(1.0M、200 μL)を添加  
37°Cで3時間インキュベート

内標準物質を暫定濃度添加  
血清と同量のアセトニトリルを加え、5分間混和  
3000 rpmで30分間遠心分離 (4°C)

↓  
上清を採取

↓  
フィルターを通す

↓  
LC/MS(/MS)分析

☒ 血清中のノニルフェノール分析法フローシート