

(2) 採取・分析法

1. はじめに

樹脂原料等として用いられるビスフェノール A、可塑剤等として用いられるフタル酸エステル類、界面活性剤の原料等として用いられるアルキルフェノール類は、暴露量も多いと想定され、社会的にも注目される化学物質である。そのリスク評価を実施するには、生体影響評価に加えて、ヒト暴露量の評価が必要である。

この目的のためには、ヒト生体試料の信頼性の高い高感度測定法の構築やサンプリング・保存方法の基礎的検討が要求されている。しかし、これら化学物質の微量分析を実施するに当たっての共通の課題は、試料採取から分析に供するまでの測定環境における汚染（コンタミネーション）が懸念され、分析値に影響を及ぼすことが危惧されることである。

そこで、上記3種の化学物質を測定対象物質として、生体試料を視野に入れた分析精度の高い測定法を構築し、生体試料中の内分泌かく乱化学物質に関する分析ガイドラインの作成を行った。

一方、内分泌かく乱化学物質の生体影響評価を実施する際、実験動物を利用した *in vivo* 系試験が広く行われている。しかし、低用量域における生体影響を評価するための動物実験の信頼性を確保するためには、飼育・実験環境（飼料、床敷、給水瓶、空気等）における化学物質暴露の影響を明らかにする必要性が指摘されている。

そこで、上記3種の化学物質の他、植物エストロゲン等について飼料等の測定法を構築し、実試料への応用を試みた。

2. 食品中の内分泌かく乱化学物質分析ガイドラインについて

食品中の内分泌かく乱化学物質の分析ガイドラインについては、中間報告書追補（平成13年12月）において、当時の採取・分析法検討作業班が、「食品中の内分泌かく乱化学物質分析ガイドライン」を暫定的に取りまとめている。

今回、当作業班において、必要な情報を収集し、当該「食品中の内分泌かく乱化学物質分析ガイドライン」を再検討した結果、改訂すべき根拠となる新たな知見は、得られなかった。

3. 生体試料中の内分泌かく乱化学物質分析ガイドライン

第1部 一般試験法

はじめに

いわゆる内分泌かく乱化学物質の生体試料中に存在する濃度は一般的に低濃度であり、現在の分析測定技術レベルで信頼性の高い数値を得るためには、分析装置や測定室の設備に加えて、測定・分析操作等にかかわる一定水準以上の技術が要求される。そこで、内分泌かく乱化学物質等の生体試料中の濃度を測定する際の一般的留意点をまとめた。

なお、ここで示した以外の方法であっても測定結果の信頼性を確保できることが認められるならばその方法を採用しても良い。

1. 試料の採取、運搬及び保存

- 1) 試料の採取に当たっては、塩化ビニル製等の手袋が試料に接触することのないよう注意する。やむを得ず手袋を使用する時は、ラテックス製等のものを用いる。
- 2) 手袋等の選択に当たっては、ブランク試験を実施して、分析対象物質の汚染がないことを確認する。
- 3) 採取器具等は、ステンレス、ガラス製等のものを、分析対象物質の汚染がないことを確認した後使用する。
- 4) 採取容器等は、ガラス製ないしはフッ素樹脂製等のものを用いる。採取容器等の選択に当たっては、ブランク試験を行い、分析対象物質の汚染がないことを確認する。
- 5) 試料は少なくとも最低2回分析できる量（試料の均一性を確保する観点から可能な限り量を確保することが望ましい。）を採取し、二等分する（一方は再試験用）。
- 6) 試料は冷凍し、暗所に保存する。
- 7) 運搬・保存容器等は、ガラス製ないしはフッ素樹脂製等のものを用いる。運搬・保存容器等の選択に当たっては、ブランク試験を行い、分析対象物質の汚染がないことを確認する。

2. 器具・装置及び試薬類

2-1 器具・装置

- 1) 使用するすべての器具及び装置は、分析に悪影響を及ぼさないものを用いる。
- 2) 試料の汚染を防ぐ観点から、使用するすべての器具及び装置はクリーンな状態に保つこととし、当該分析対象物質専用とすることが望ましい。

〈例〉

- ・ガラス器具：電気炉中、450℃で5時間以上加熱処理する。
- ・ロータリーエバポレーター：大気開放コックの先に活性炭カラム、エアフィルターを装着するか、トラップ球を使用する等して室内空気等からの汚染を防ぐようにする。
- ・ガス吹き付け装置：抽出精製試料を濃縮する為に使用するもので、ガス管のライン上に活性炭又はフロリジル等を詰めた管を接続して使用する。

2-2 試薬類

2-2-1 標準品

- 1) 高純度のものを用いる。
- 2) ロット番号等を5. に従って記録する。

2-2-2 試薬

- 1) 高純度のもの(精密分析用、ダイオキシン分析用、残留農薬・PCB 分析用、フタル酸分析用、HPLC 用等)を用いる。
- 2) 必要に応じて蒸留、加熱処理、洗浄等により精製する。
- 3) 第2部の分析法に従って使用する量が、定量に悪影響を及ぼさないことを確認する。

〈例〉

- ・精製水：精製水製造装置等で得られるものを、必要に応じて n-ヘキサンで洗浄する等して精製する。
- ・硫酸：半導体製造用高純度硫酸等、高純度のものを用いる。必要に応じて n-ヘキサンで洗浄する。
- ・無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用等、高純度のものを用いる。必要に応じて 450℃ で5時間以上加熱処理する。
- ・シリカゲル：カラムクロマトグラフィー用シリカゲルを、メタノールにて超音波洗浄した後、減圧乾燥し、層の厚さが 10mm 以下になるようにガラス製ビーカーに入れて 130℃で約 18 時間乾燥した後、密閉可能な容器に入れ、デシケーター内で保管する。
- ・活性炭シリカゲル：活性炭シリカゲルをアセトンで超音波洗浄し、ろ過した後、トルエンでソックスレー抽出洗浄する。ロータリーエバポレーターで減圧乾燥させ、密閉可能な容器に入れ、デシケーター内で保存する。

3. 分析法

3-1 試料調製法(クリーンアップ、濃縮)

- 1) 操作ブランク試験を行い、分析対象物質の汚染の無いことを確認する。
- 2) 溶媒の濃縮に際しては、ロータリーエバポレーター、クデルナダニッシュ(KD)濃縮器及び窒素吹きつけ濃縮操作等での汚染を排除する。

3-2 測定(分析装置の保守管理、校正、洗浄)

- 1) ガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)の状態確認及び測定条件の設定 GC/MS を分析対象物質が測定できる条件に設定し、GC/MS の再現性、感度等が適切な状態であることを確認する。
- 2) HPLC 等の分析装置の状態確認及び測定条件の設定分析対象物質が測定できる条件に設定し、HPLC 等分析装置の再現性、感度等が適切な状態であることを確認する。
- 3) GC/MS、LC/MS で測定するときは、同位体希釈質量分析(IDMS)によることが望ましい。

4. 検出下限値

4-1 装置の検出下限値

1) 分析化学的な見地における検出下限値標準物質を測定したときのクロマトグラムピーク高が $S/N=3$ に相当する標準物質の絶対量を装置(HPLC、GC、GC/MS、LC/MS等)の検出下限値とするが、分析機器で検出できる低濃度標準溶液を5回以上繰り返し測定し、その標準偏差の3倍を検出下限値としても良い。

2) 実測定の検出下限値

実試料を測定し、そのときの分析対象物質のクロマトグラムピーク高を標準物質のピーク高と比較し、試料中のピーク高が $S/N=3$ に相当する標準物質濃度と、採取試料量等から計算した値を実測定における検出下限値とする。実試料でピークが出現しない化合物に関しては、 $S/N=3$ に相当するピーク高を、標準物質を測定したときのピーク高から推定し、それに等しいピーク高に相当する標準物質濃度と採取試料量等から計算した値を実測定の検出下限値とする。なお、試料の検出下限値は目標定量下限値を満足していなければならない。

5. 精度管理及び精度保証

概略を図1に示した。

測定値の精度保証のため以下のとおり、作業し、記録を取る。記録すべき事項を欠いている場合は、その原因を明らかにするとともに、可能な場合は原因を取り除いた後、再分析等を行う。

- 1) 分析法の標準作業書を作成する。
- 2) 試料採取の記録：試料の採取日時・場所、採取者、採取器具・容器、採取方法、運搬・保存容器、保存方法等を記録する。
- 3) 試験機関における試料の受付・確認の記録：試料確認の日時・場所、確認した者、運搬方法、試料の状態、保管場所、保管方法、管理番号等を記録する。運送業者を利用した場合、その配送伝票の複製を保管する。
- 4) 試薬類の記録：用いた標準品・試薬のメーカー名、製品名、ロット番号、純度、使用期限、購入日、購入先等を記録する。調製した場合その状況(調製日時・場所、調製者、試薬類の使用履歴等)を記録する。
- 5) 機器の記録：使用記録(使用状況、測定条件)、日常点検記録、感度の記録(測定時に必要な感度が得られていることを確認できる記録(クロマトグラム等))、保守点検・修理の状況等を記録する。
- 6) 分析の記録：分析の各段階における操作日時、分析場所及びその環境、分析者、分析した試料、分析に供した試料の量、試料の測定順序、用いた試薬類及び使用量、を記録する。
- 7) 最終溶媒ブランク、全操作ブランク、2重測定(同一試料バイアルからの2回測定、試料採取からの2重測定)等の記録を残す。
- 8) 同位体測定を行う場合、標準物質の同位体比を確認：測定した標準物質中の各化合

物に関して、2つのモニターイオンのレスポンス比が理論値とずれていないことを確認できる記録を残す。理論同位体存在比と実測同位体比の採用範囲は30%以内とする。

9) クロマトグラムの保管：標準溶液、最終溶媒ブランク、全操作ブランク、試料に係るクロマトグラムを保管する。

10) 計算

- ・計算工程の記録：標準溶液の濃度、内部標準の添加量、機器測定面積値、試料採取量から最終濃度算出までの計算工程がトレース可能となる記録を残す。
- ・回収率の確認・記録：回収率を記録する。回収率は、70～120%の範囲であることが望ましい。

11) ブランク試験

- ・採取器具、採取容器、運搬・保存容器等についてブランク試験を行い、その結果を記録する。
- ・試薬類のブランク試験を行い、その結果を記録する。このブランク試験は試薬類のロット番号が変わることに行う。
- ・全操作ブランク：試料に対して行う分析方法と同一の方法で操作を行い、その結果を全操作ブランクとして記録する。

12) 2重測定

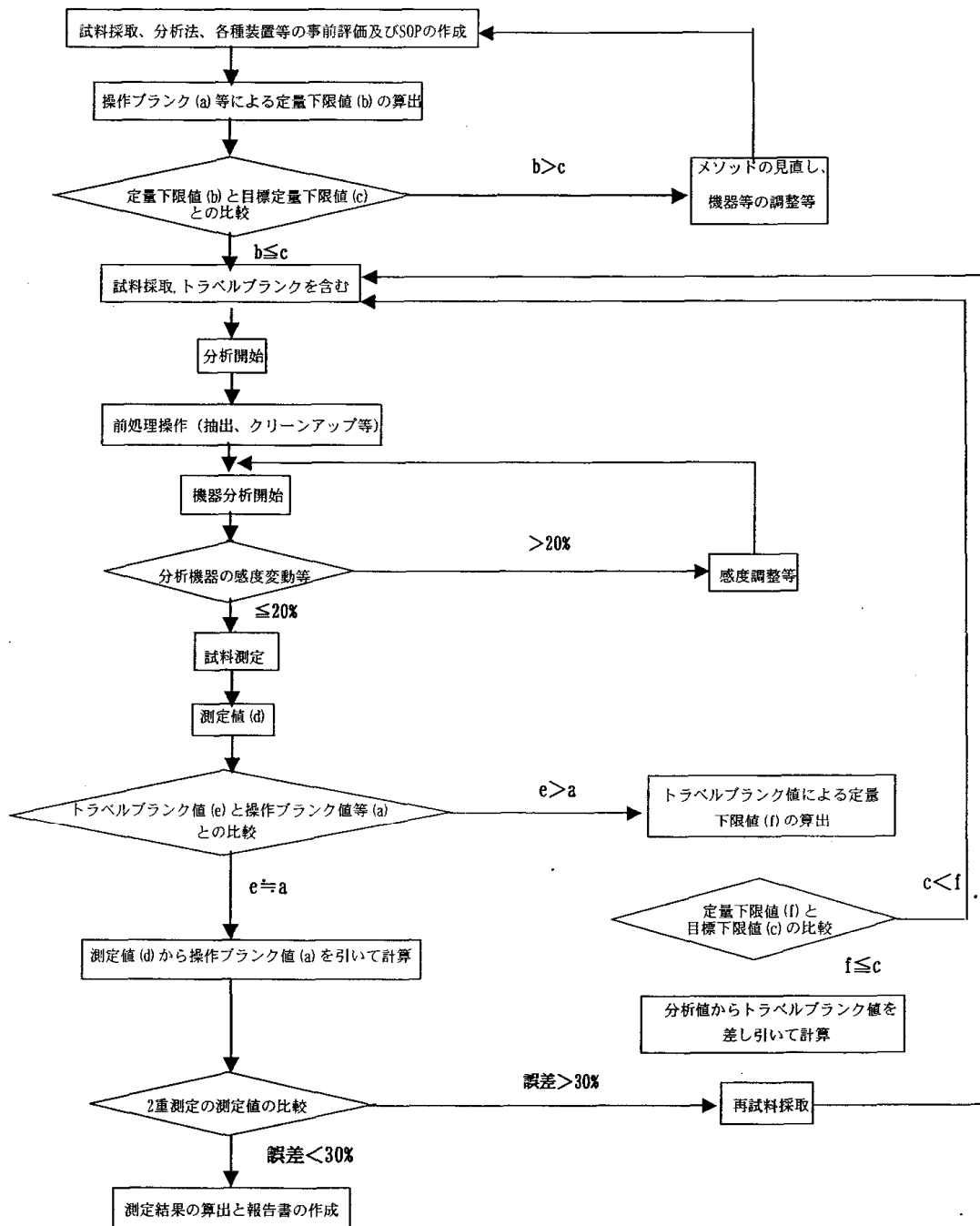
分析検体数10に対して1以上の頻度で行うことが望ましい。この2重測定の結果は各実測値の差が30%以内であることが望ましい（実測値が目標定量下限値の10倍以下の化合物に関しては規定しない）。

13) 外部機関とのインターキャリブレーションを行うことが望ましい。

6. その他

食品衛生法「食品衛生検査施設における検査等の業務管理要綱」参照。

図1



第2部

生体試料中のビスフェノール A の分析法

【試験法の概要】

①LC/MS 法^{注1}

血清あるいは尿試料を、マルチモードカートリッジを用いてクリーンアップし、高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS) で定性・定量する。

②GC/MS 法^{注2}

尿試料を、酸性下で C18 カートリッジを用いてクリーンアップ後、TMS 化し、更にフロリジルカートリッジでクリーンアップする。これをガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS) に注入し定性・定量する。

【試薬】

すべての試薬類は、クロマトグラム上でビスフェノール A (BPA) の分析に支障がないことを確認した後用いる。

- ① 標準品: BPA 及びビスフェノール A-d₁₆ (BPA-d₁₆) は、環境分析用試薬を用いる。
¹³C-BPA はケンブリッジアイソトープ製を用いる。
- ② BPA 標準溶液: BPA 標準品 100mg を 100mL 用メスフラスコに秤量し、メタノールを加えて溶解して 1000 μg/mL の標準原液とする。標準原液を適宜希釈し、標準溶液を調製する。
- ③ 内部標準物質溶液: 内部標準物質として LC/MS には BPA-d₁₆、GC/MS には ¹³C-BPA ^{注3}を用いる。各 10mg をそれぞれ 50mL 用メスフラスコに秤量し、メタノールを加えて溶解して 200 μg/mL の標準原液とする。内部標準物質を暫定濃度になるように加え、LC/MS もしくは GC/MS 法により標準溶液及び試料溶液を測定する。
- ④ β-グルクロニダーゼ: 100,000 units/mL 以上のものを用いる。
- ⑤ 精製用カートリッジ: マルチモードタイプカートリッジ(500 mg) ^{注4}及び C18 カートリッジ(500mg) ^{注5}。カートリッジは、予めメタノール 10mL、水 5mL の順で洗浄した後使用する。
フロリジルカートリッジ(500mg) ^{注6}は、予め n-ヘキサン 5mL で洗浄して使用する。
- ⑥ BSTFA ^{注7}: 環境分析用を用いる。
- ⑦ 精製水: BPA の汚染が少ないミリ Q 水を用いる。

その他の試薬はすべて特級品あるいは HPLC 用を用いる^{注8}。

【器具】

検体の採取及び調製に用いる器具^{注8}は、事前に材質試験あるいは溶出試験を行い、可能な限り BPA が検出されないものを用いる。また、ガラス器具類は、350℃で 2 時間以上加熱し、環境中の BPA の汚染を受けないところで放冷し、使用直前にアセトンで洗浄したものを使用する。

【装置及び測定条件】

測定には、高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS) 及びガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS) を用い、下記に示す条件 (代表例) で測定する。

測定条件

①LC/MS 法

分析用カラム：C18系カラム^{注9}(内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm)

カラム温度：40 °C

移動相：0.003%アンモニア水-アセトニトリル(58:42)^{注10}

流速：0.18 mL/min

注入量：10 μL

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

フラグメンター電圧：90V

モニターイオン： $m/z=227$ (BPA)、 $m/z=241$ (BPA-d₁₆)

②GC/MS 条件

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 μm)、液相は 5 %フェニルメチルシリコンを使用したもの^{注11}。

カラム温度：70°C(2min)-20°C/min-150°C-10°C/min-300°C(5min)

注入口温度：250°C

キャリアーガス：He、1mL/min

注入方法：スプリットレス パージオフ 1min

イオン源温度：230°C イオン化法：EI ポジ

イオン化電圧：70V

モニターイオン (m/z) : BPA(357、 372)、¹³C-BPA(369)

【検量線】

内部標準法により検量線を作成し、定量する。LC/MS においては、BPA と BPA-d₁₆。GC/MS においては、BPA と ¹³C-BPA の面積値の比から検量線を用いて定量値を求める。

①LC/MS 測定

安定同位体標識内部標準物質 BPA-d₁₆ を 5ng 含んだ BPA の 0.5~100ng/mL の溶液を調製し、その 10μL を LC-MS に注入する。検出には選択イオン検出(selected ion monitoring、SIM)法を採用し、それぞれモニターイオン $m/z=227$ 、 $m/z=241$ により得られた SIM クロマトグラムよりピーク面積を求め、BPA と BPA-d₁₆ の面積比により検量線を作成する。

②GC/MS 測定

試験管に BPA を 10~200ng の範囲で段階的に採り、これに安定同位体標識内部標準物質として ¹³C-BPA を 100ng 添加し、BSTFA 200μL を加え、アセトンで 1mL に定容する。これを一夜放置し、GC/MS-SIM で測定し、¹³C-BPA との面積比で検量線を作成する。

【試験溶液の調製】

① LC/MS 測定用試験溶液の調製

・遊離体 BPA 測定用試験溶液

血清、腹水は 1mL を、尿は 2mL を採り、内部標準物質である BPA-d₁₆ を 5ng 加えた後、マルチモードタイプカートリッジに負荷する。水 3mL 及び 20%メタノール 3mL で洗浄した後、メタノール 3mL で溶出し、減圧乾固後、20%メタノール 1mL に溶解して試験溶液とする。

・総 BPA 測定用試験溶液

血清、腹水は 1mL を、尿は 2mL を採り、0.2M 酢酸緩衝液(pH 5) 1mL、β-グルクロニダーゼ 6,500units/mL (試薬 β-グルクロニダーゼを 0.2M 酢酸緩衝液(pH 5) で 10 倍希釈) を 50μL 加えた後、37℃で 1 時間インキュベートする。その後の操作は、遊離体 BPA 測定用試験溶液と同様に行い、試験溶液を調製する。

② GC/MS 測定用試験溶液の調製

・遊離体 BPA 測定用試験溶液

尿試料 100 mL を共栓付き三角フラスコに採り、¹³C-BPA 0.1μg を加え、これに(1+1)リン酸 1mL を加え、pH 3 以下にする。これを、予めメタノール 5mL、精製水 10mL でコンディショニングした C18 カートリッジに負荷し BPA を抽出する。カートリッジを 10%メタノール 10mL で洗浄後、3mL のメタノールで BPA を溶出させ、100mL のナス型フラスコに受け、酢酸エチル 20mL を加え、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固する。フラスコに BSTFA 200μL とアセトン 2mL を加え一夜放置して TMS 化し、ロータリーエバポレーターでアセトンを留去する。これに n-ヘキサン 2mL を加え、超音波洗浄器を用いて溶解させ、予め n-ヘキサン 5mL で洗浄したフロリジルカートリッジに負荷し、流出液を試験管に採取する。更に、n-ヘキサン 2mL ずつでフラスコを 2 回洗浄し、カートリッジに負荷し、先の流出液と合わせる。流出液に窒素ガスを吹き付け、1mL に濃縮し、これを GC/MS-SIM で定量する。

・総 BPA 測定用試験溶液

尿試料 100mL を共栓付き三角フラスコに採り、β-グルクロニダーゼ溶液 100μL と ¹³C-BPA 0.1μg を加え、37℃で 90 分間酵素処理する。その後の操作は遊離体 BPA 測定用試験溶液と同様に行い、試験溶液を調製する。

【検出下限・定量下限】

全操作を通したブランク値の標準偏差 (SD) の 3 倍を検出下限値 (LOD)、10 倍を定量下限値 (LOQ) とする。

【注解】

ビスフェノール A (BPA) は、1891 年に合成された化学物質で、ポリカーボネート樹脂、エポキシ樹脂の原料やポリ塩化ビニルの安定剤として多用されている。その国内生産量は平成 13 年度で約 49 万トンである。BPA は 2 分子のフェノールとアセトン 1 分子の縮合反応物で、その性状は白色の粉末状で、アセトン、メタノールには溶解易いが、水には溶

け難い性質を有している。

体内動態の概要は次のとおりである。ヒトでは、消化器管から速やかに吸収され、肝臓等でグルクロン酸抱合体に代謝され、主に尿中に排泄される。低濃度暴露（50 μ g）及び高濃度暴露（1mg）共に24時間以内にそのほとんどが尿中(80-97%)に排泄される。

ラットに経口投与した実験（800mg/kg）では、2日以内に投与量の80%が糞尿中（主に糞中）に排泄され、8日後には完全に排泄される。

このように、経口投与されたBPAの排泄過程は種差により大きく異なり、ラットでは主に糞中に、ヒトやサルでは主に尿中に排泄される。

注1 LC/MS法は誘導体化操作を必要とせず、簡便である。しかし、夾雑成分の影響を受け易い点が、現状での課題である。

注2 本法は主に尿試料を分析対象とする。PFB化しNCI-GC/MSで測定する方法もある。

注3 BPA-d₁₆を用いても良い。

注4 International Sorbent Technology Ltd.製のIsolute Multimode等がある。

注5 スペルコ製、スペルクリン ENVI-18等がある。

注6 スペルコ製、スペルクリン ENVI フロリジル等がある。

注7 BSTFA：N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetoamide, ジーエルサイエンス社製等がある。

注8 BPAは、プラスチック製実験器具、精製水、駒込ピペットのゴムキャップなどにも含まれており、高感度分析を達成するためには次の点等に留意し、操作ブランク値の低減化を図る必要がある。

- ・ 精製水には、BPAの汚染が少ないミリQ水等を用いる。
- ・ ガラス器具は使用前にアセトンで洗浄して使用する。
- ・ カートリッジは、必ず一定量の溶媒等でコンディショニングを行う。
- ・ 試薬類の微量採取時には、プラスチック製チップは使用せず、ガラス製マイクロシリンジ等を使用する。
- ・ エバポレーター内をアセトンで留去するなどして十分洗浄して使用する。

注9 Agilent Technologies製のZonbax XDB等がある。

注10 移動相：0.01%酢酸-アセトニトリル(55:45)の利用も可能であるが、試料が尿の場合妨害を受け易い面がある。

注11 J&W Scientific社製のDB-5MS等がある。

《最近の動向》

米国環境保護庁（U.S. EPA）はラットを用いたビスフェノールA(BPA)の慢性毒性評価から参照用量(RfD：Reference Dose)を0.05mg/kg/dayに設定した。最近(2002年)、EUにおいてBPAのリスク評価(案)が出され、ラットを用いた慢性毒性試験結果から、NOAELとして5mg/kg/dayを採用し、不確実係数(安全係数)として1/500をかけて耐用一日摂取量(TDI)を0.01mg/kg/dayとしている。

ポリカーボネート食器等中に含まれる BPA の材質試験や、ポリカーボネート食器等から溶出する BPA の測定には、UV 検出器や蛍光検出器を用いた HPLC 法が汎用されてきた。しかし、血液や尿等の生体試料に含まれる BPA 濃度は極めて微量であり、高感度、高選択性且つ信頼性の高い分析法が必要とされている。生体試料中の BPA 測定について、最近の報告例をみると GC/MS 法や LC/MS(MS)が汎用されている。GC に用いられているキャピラリーカラムは高い分離能を有しており、Negative CI を用いた GC/MS 法は感度、選択性にも優れており、生体試料中の BPA 測定法として幾つか報告されている。しかし、BPA はフェノール基を有しており、GC 法ではカラムへの吸着やテーリングが見られることから、誘導体化操作が必要となる。一方、LC/MS 法は誘導体化の必要性はなく、感度、選択性共に優れていることから、生体試料中の BPA 分析法として最も汎用されている方法と言える。下記に生体試料中の BPA 分析に関する最近の報告例を示す。

- 1) Kawaguchi, M; Inoue, K; Yoshimura, M; Ito, R; Sakui, N; Okanouchi, N; Nakazawa, H, Determination of bisphenol A in river water and body fluid samples by stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *J-Chromatogr, B*, 805, 41-48 (2004)
- 2) Inoue, K; Kawaguchi, M; Funakoshi, Y; Nakazawa, H, Size-exclusion flow extraction of bisphenol A in human urine for liquid chromatography-mass spectrometry. *J-Chromatogr, B*, 798, 17-23 (2003)
- 3) Tsukioka, T; Brock, J; Graiser, S; Nguyen, J; Nakazawa, H; Makino, T, Determination of trace amounts of bisphenol A in urine by negative-ion chemical-ionization-gas chromatography/mass spectrometry. *Anal-Sci.* 19, 151-153 (2003)
- 4) Kuklenyik, Z; Ekong, J; Cutchins, CD; Needham, LL; Calafat, AM, Simultaneous measurement of urinary bisphenol A and alkylphenols by automated solid-phase extractive derivatization gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* 75, 6820-6825 (2003)
- 5) Matsumoto A, Kunugita N, Kitagawa K, Isse T, Oyama T, Foureman GL, Morita M, Kawamoto T. Bisphenol A levels in human urine, *Environ. Health Perspect.* 111, 101-4 (2003)
- 6) Yoshimura, Y; Brock, JW; Makino, T; Nakazawa, H, Measurement of bisphenol A in human serum by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal-Chim-Acta.* 458, 331-336 (2002)
- 7) Inoue, K; Yamaguchi, A; Wada, M; Yoshimura, Y; Makino, T; Nakazawa, H, Quantitative detection of bisphenol A and bisphenol A diglycidyl ether metabolites in human plasma by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J-Chromatogr, B*, 765, 121-126 (2001)
- 8) Katayama, M; Sasaki, T; Matsuda, Y; Kaneko, S; Iwamoto, T; Tanaka, M, Sensitive determination of bisphenol A and alkylphenols by high-performance

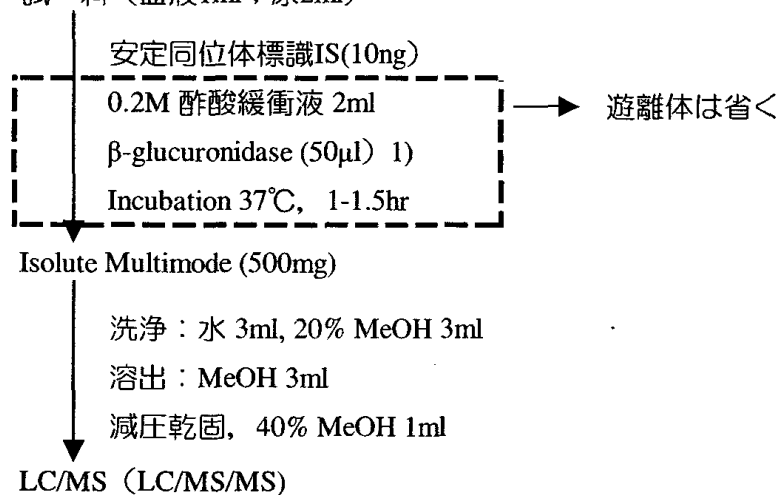
liquid chromatography with precolumn derivatization with 2-(4-carboxyphenyl)-5,6-dimethylbenzimidazole. Biomed-Chromatogr. 15, 403-407 (2001)

- 9) Shin,-BS; Park,-KL; Han,-SY; Lee,-BM; Kim,-HS; Lee,-KC; Eom,-HJ; Yoo,-SD, Sensitive micro-sample analysis of bisphenol A in serum by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. Chromatographia. 53, 669-672 (2001)
- 10) Sajiki,-Jm, Determination of bisphenol A in blood using high-performance liquid chromatography-electrochemical detection with solid-phase extraction. J-Chromatogr,-B, 755, 9-15 (2001)

BPAの試料調製法

◎ LC/MS法

試料 (血液1ml; 尿2ml)



注1) β-glucuronidase は125,000units/mlを0.2M酢酸緩衝液で10倍希釈し, その50μlを使用.

図 生体試料中のBPA分析法フローシート

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) ^{注1、注2} 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)、フタル酸ジイソノニル (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^{注3}。
- 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^{注4}。
- ⑤ フロリジル：フロリジル 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 μ g/mL 溶液を調製する。適宜希釈し、PAE 標準溶液とする。
- ⑧ 内部標準溶液：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 μ g/mL 溶液を調製する。適宜希釈し、内部標準溶液とする。

【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】^{注5}

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 及び内部標準溶液 (4 μ g/mL) 25 μ L 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^{注6}

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 μ m）、液層は 5%フェニルメチルシリコンを使用する^{注7}。

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-d ₄	DBP-d ₄	153	227, 209
フタル酸ブチルベンジル-d ₄	BBP-d ₄	153	91, 210
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル-d ₄	DEHP-d ₄	153	171, 283
フタル酸ジオクチル-d ₄	DOP-d ₄	153	283
フタル酸ジノニル-d ₄	DNP-d ₄	153	297

② 定量：試験溶液の一定量を GC/MS に注入し、各 PAE のピーク面積を内部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：内部標準物質を含んだ PAE 標準溶液を GC/MS に注入し、各 PAE のピーク面積を内部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すべての実験器具 (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部標準法を採用し、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。

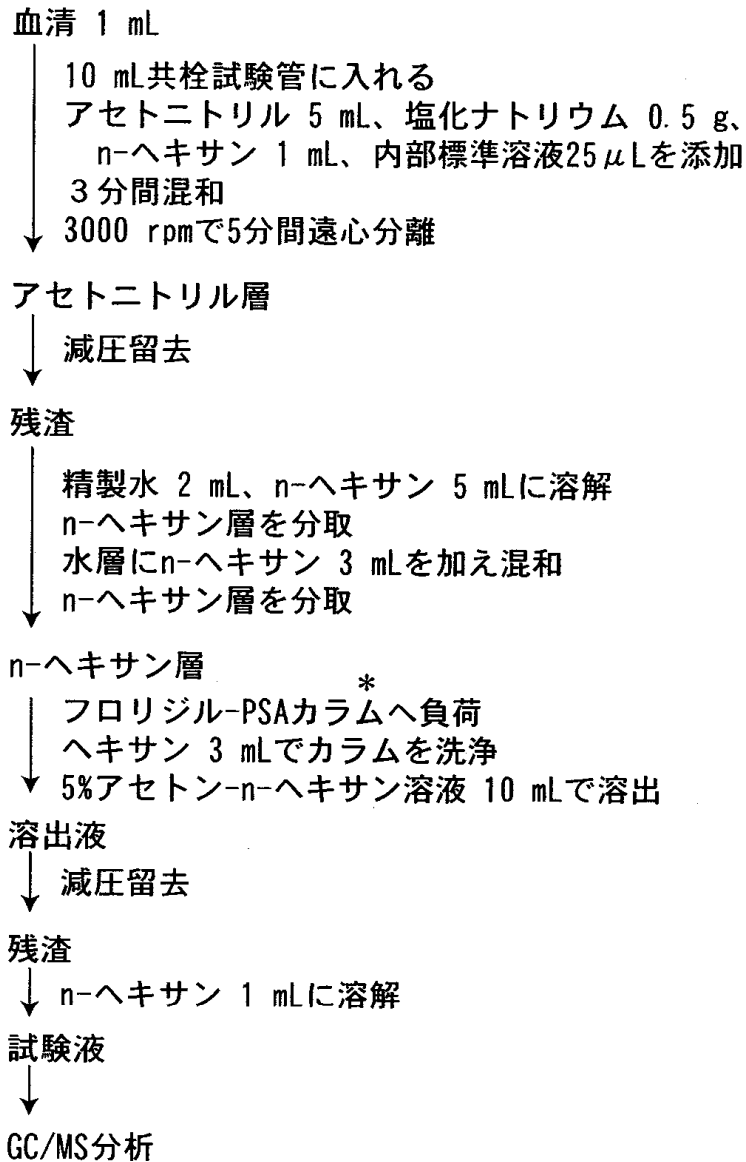
注7 Agilent technologies 社製の HP-5MS、HP-5MS SV、J&W Scientific 社製の

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

生体試料中の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))^{注1}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】

すべての試薬類は、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^{注2} 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 内部標準物質^{注3}：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、内部標準補正を行う。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^{注4}。
- ⑦ グルクロニダーゼ処理：血清 1mL に対し、 β -グルクロニダーゼ(15 μ L、89U/mL)及び酢酸アンモニウム(1.0M、200 μ L)を加え、37°Cで3時間インキュベートを行う^{注5}。

【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】^{注6}

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、内部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部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℃)を行う。その後、上清をフィルター^{注7}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 μ m)^{注8}

カラム温度：40℃

分析用移動相：水：アセトニトリル(0.02 %酢酸アンモニウム^{注9}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 μ m)^{注4}

抽出用移動相：精製水(100%)^{注10}

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 μ 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-d₅)

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。内部標準法により定量を実施する。検量線は、5~100 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^{注11}。

【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・13C安定同位体)と4-(1-methyl) octylphenol-d₅がある。直鎖型と分岐型では物理化学的性質が異なり、十分に内部標準補正できない場合がある。そこで、この2つを比較し、内部標準物質として4-(1-methyl) octylphenol-d₅を選択した。この内部標準物質(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・13C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

図 血清中のノニルフェノール分析法フローシート