

## 4. 実験動物飼育飼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が実験動物飼育飼料中に存在する可能性がある。飼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実験動物飼育飼料等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1kg以上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)。

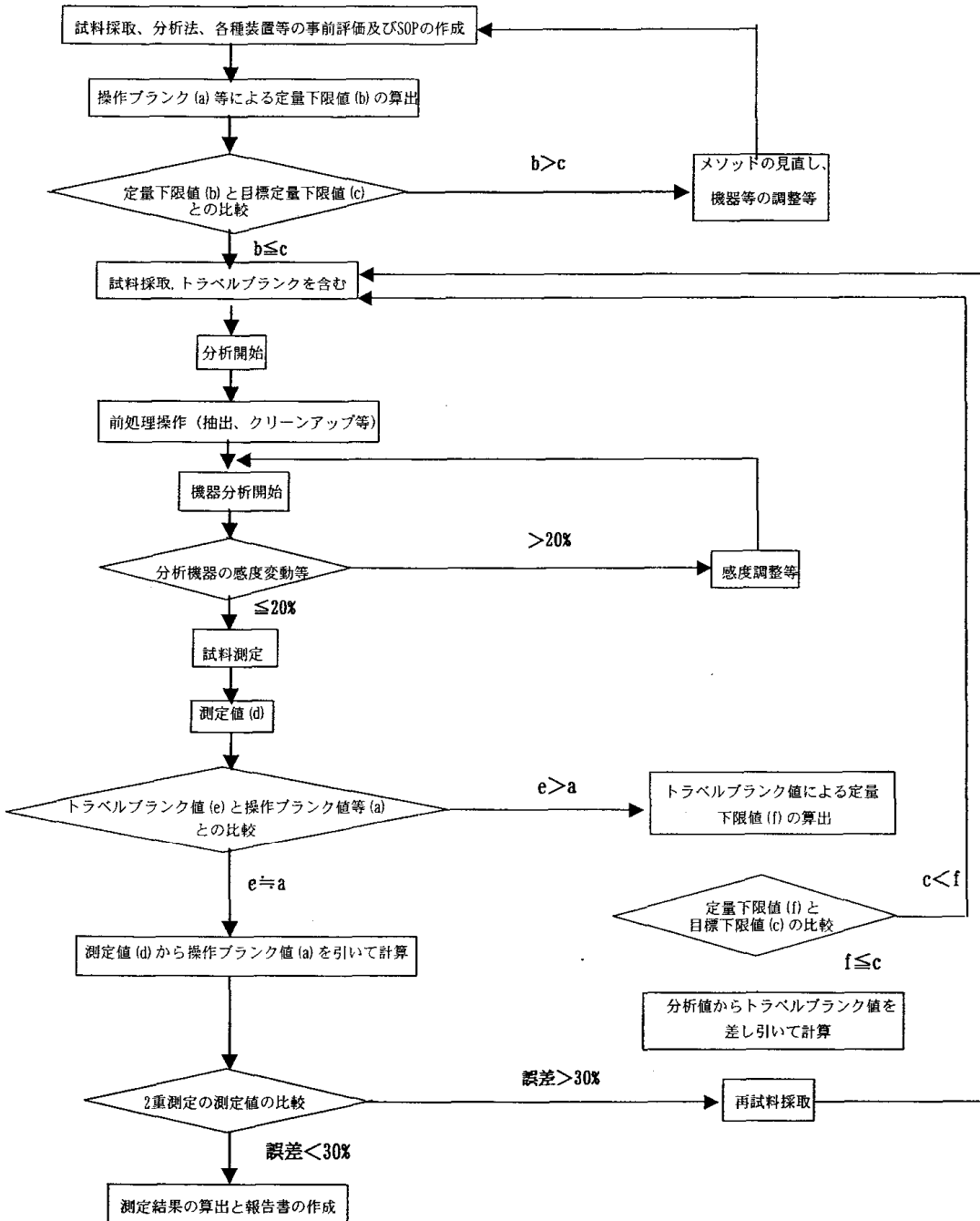
13) 外部機関とのインターキャリブレーションを行うことが望ましい。

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。

飼料分析基準研究会 編著、飼料分析法・解説-2004-、社団法人 日本科学飼料協会 参照。

図1



## 第2部

## 動物飼料中のビスフェノール A の分析法

## 【試験法の概要】

動物飼料を、アルミナ-A カートリッジ及びポリマーゲル充填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<sup>注1、注2</sup>。

## 【試薬】

すべての試薬類は、クロマトグラム上で BPA の分析に支障がないことを確認した後を用いる。

- ① 標準品: ビスフェノールA(BPA)及びビスフェノール A-d<sub>16</sub>(BPA-d<sub>16</sub>) は、環境分析用試薬を用いる。
- 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 BPA-d<sub>16</sub> を用い、10mg を 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 法により標準溶液及び試料溶液を測定する。
- ④ 精製用カートリッジ: アルミナ-A カートリッジ<sup>注3</sup> は、予めアセトン 5mL で洗浄した後使用する。  
ポリマーゲル充填カートリッジ<sup>注4</sup> は、予めメタノール 10mL、水 5mL の順で洗浄した後使用する。
- ⑤ 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<sup>注5</sup>。

## 【器具】

検体の採取及び調製に用いる器具<sup>注5</sup> 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/質量分析計を用い、下記に示す条件(代表例)で測定する。

## 測定条件

分析用カラム: C18 系カラム<sup>注6</sup> (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm)

カラム温度：40℃

移動相：0.003%アンモニア水-アセトニトリル(58:42) <sup>注7</sup>

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-d<sub>16</sub>)

#### 【検量線】

内部標準法により検量線を作成し、定量する。BPAとBPA-d<sub>16</sub>の面積値の比から検量線を用いて定量値を求める。

安定同位体標識内部標準物質 BPA-d<sub>16</sub> を 10 ng 含んだ BPA の 0.5~100ng/mL の溶液を調製し、その 10 μL 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-d<sub>16</sub>の面積比により検量線を作成する。

#### 【試験溶液の調製】

飼料 1 g を採り、内部標準物質である BPA-d<sub>16</sub> を 10 ng 加えた後アセトニトリル 25mL で 2 分間ホモジナイズ抽出する。抽出液を 3000rpm で 5 分間遠心分離後、上清を分取し、減圧乾固する。残留物をアセトン 5mL に溶解し、アルミナ-A カートリッジ<sup>注3、注8</sup>に負荷する。カートリッジをアセトン 5mL で洗浄後、水 5mL で溶出する。溶出液をポリマーゲル充填カートリッジ<sup>注4</sup>に負荷し、水 3 mL、20%メタノール 3mL で洗浄後、メタノール 3mL で溶出する。溶出液を減圧乾固し、40%メタノール 1mL に溶解して LC/MS 用試験溶液とする。

#### 【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、水には溶解難い性質を有している。

BPA は、その汎用性から様々な生産工程からの微量汚染が懸念されている。一方で、微量の BPA を投与する動物実験が実施され、その結果のみが議論されている。しかし、BPA に対する *in vivo* 系試験の信頼性確保には、実際に動物実験に使用されている飼料、ゲージ、給水瓶、床敷、及び実験環境下の大気等からの実験動物への暴露量を把握する必要がある。

したがって、動物飼料中に含まれる BPA の高感度・高精度な分析法の構築が必要とされている。しかし、飼料の主な原材料として、大豆が使用されていることから、飼料中に含まれる大豆イソフラボン分析に関する報告は幾つかなされているが、飼料中に含まれる BPA 分析に関する報告はほとんど見あたらない。

注1 LC/MS 法は誘導体化操作を必要とせず、簡便である。なお、試料の相違により時折夾雑成分の影響を受ける場合がある。

注2 本法は、床敷試料にも適用可能である。

注3 Waters 社製、Sep-Pak アルミナ-A カートリッジ (1.7 g) 等がある。

注4 Waters 社製、Oasis HLB カートリッジ (60 mg) 等がある。

注5 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6 Agilent Technologies 製の Zorbax XDB 等がある。

注7 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、試料が飼料の場合妨害を受け易い面がある。

注8 飼料は魚粉、大豆等を主原料としており、かなりの脂質成分を含んでいる。このことから、血清や尿を分析試料とした試験溶液調製法は適用困難である。フロリジル及びシリカゲルでは、脂質成分を完全に除去できないが、塩基性、中性及び酸性のいずれかの活性アルミナを用いることにより脂質成分を除去することが可能である。しかし、塩基性及び中性の活性アルミナでは、BPA の回収率が 30-40%である（酸性アルミナでは 60-80%）ことから、脂質の除去には酸性の活性アルミナが適している。

#### 《BPA 分析法の動向》

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等に含まれる 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 はフェノール性水酸基を有しており、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



されている方法となっている。

## 飼料中のビスフェノールA分析法



## 動物飼料中のフタル酸エステル類の分析法

### 【試験法の概要】

実験動物用飼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)、フタル酸ジイソノニル(DiNP)である。

なお、本法は飼料に適用できる<sup>注3</sup>。

### 【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4</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5</sup>。
- 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 μg/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-d<sub>4</sub>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 PSA 1 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6</sup>

飼料 5 g を共栓遠沈管(50 mL、ガラス製)に採り、精製水 5 mL、アセトニトリル 20 mL 及び内部標準溶液(4 μg/mL) 125 μL を添加後、1 分間ホモジナイズする。3000 rpm で 5 分間遠心分離後、上清を分取する。残渣に精製水 5 mL、アセトニトリル 15 mL を添加

し、同様に操作する。上清を合わせ、塩化ナトリウム 1.5 g を添加後 5 分間振とうする。アセトニトリル層を分取し、アセトニトリル飽和 n-ヘキサン 4 mL を添加後、5 分間振とうする。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 を加えた後共栓試験管（10 mL、ガラス製）に移す。30 秒間振とう後、3000 rpm で 5 分間遠心分離し、n-ヘキサン層を分取する。水層に n-ヘキサン 5 mL を加え、同様に操作する。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7</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8</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-d <sub>4</sub>	DBP-d <sub>4</sub>	153	227, 209
フタル酸ブチルベンジル-d <sub>4</sub>	BBP-d <sub>4</sub>	153	91, 210
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル-d <sub>4</sub>	DEHP-d <sub>4</sub>	153	171, 283
フタル酸ジオクチル-d <sub>4</sub>	DOP-d <sub>4</sub>	153	283
フタル酸ジノニル-d <sub>4</sub>	DNP-d <sub>4</sub>	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/gに、DiOP、DiNPは20 ng/gに設定する。また、定量下限は、DBP、BBP、DEHPは10 ng/gに、DiOP、DiNPは50 ng/g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。

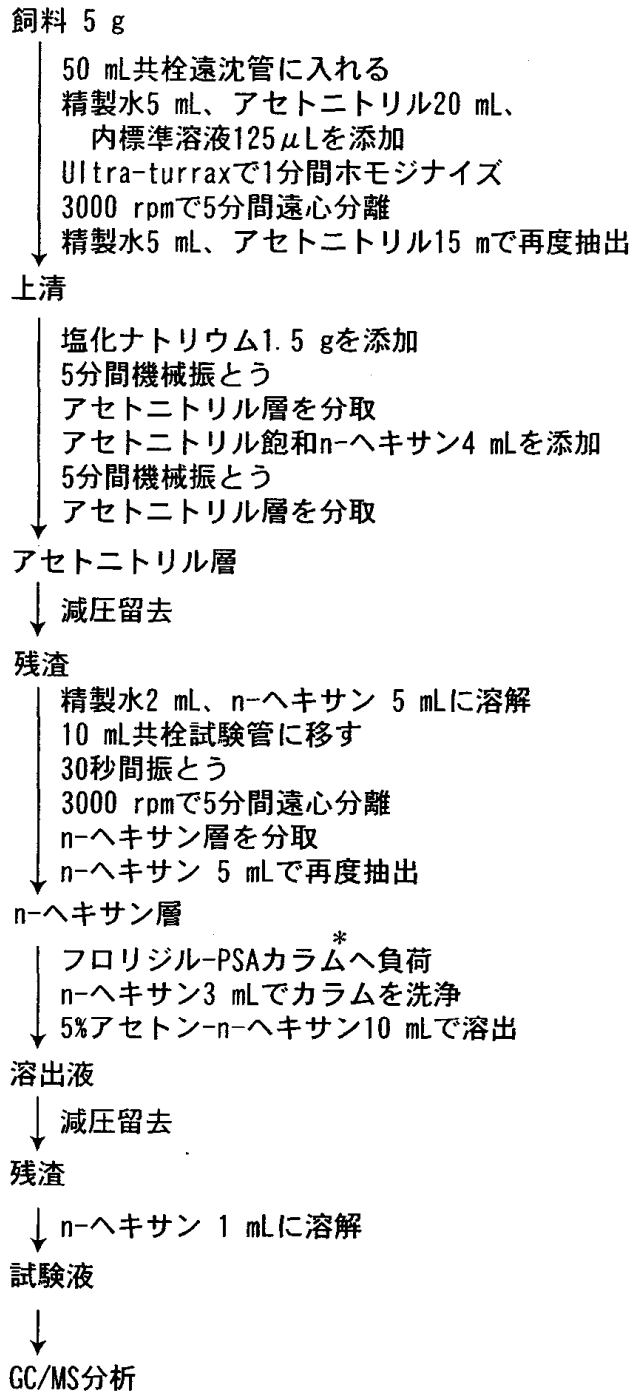
- a) 使用する水は、フタル酸エステル試験用のn-ヘキサンで洗浄した蒸留水を使用する。
- b) ホールピペット及びメスフラスコ以外のすべての実験器具(エバポレーターのトラップも含む)は、200℃、2時間加熱し、放冷した後に、使用する直前にフタル酸エステル試験用のn-ヘキサンで洗浄する。なお、n-ヘキサン洗浄は手が器具に直接触れないように、ピンセットを用いて実施する。
- c) 実験操作開始直前には必ず両手を石けんでよく洗い、その後は、極力実験器具以外には触れないようにする。特に、ドアノブに触れた場合には必ず両手を洗浄する。
- d) 使用する実験台は、アルミホイルで覆い、毎日交換する。
- 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。飼料にDBP、BBP、DEHPの濃度がそれぞれ100 ng/gに、DiOP、DiNPの濃度が500 ng/gになるように添加したときの平均回収率は、98.8・148%、相対標準偏差は0.4・7.8%である。

注3 本法は、床敷の分析にも応用可能である。ただし、抽出はアセトンを用い、減圧留去して得られる残渣をn-ヘキサン抽出後、フロシジル-PSAカラムで精製を行う。

注4 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5 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6 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7 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8 Agilent technologies 社製の HP-5MS、HP-5MS SV、J&W Scientific 社製の DB-5MS 等がある。



\* 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 1 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

☒ 飼料中のフタル酸エステル類の分析法フローシート

## 動物飼料中の4-ノニルフェノールの分析法

### 【試験法の概要】

動物飼料を精油定量装置を用い、前処理を行った後、液体クロマトグラフ/質量分析計(LC/MS(MS))<sup>注1</sup>で定性・定量を行う。

なお、本試験法は床敷及び給水にも適用できる。

### 【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<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、ヘキサンを加えて 100 mL として標準原液を調製する。適宜、メタノールで希釈して標準溶液を作製する。
- ③ 有機溶媒：残留農薬試験用、フタル酸エステル分析用、LC-MS 用を用いる。
- ④ 精製水：ミリQ 水又は市販の蒸留水を使用する。
- ⑤ 内部標準物質 (m-OP-d<sub>5</sub>) <sup>注3</sup>：4-(1-methyl) octylphenol-d<sub>5</sub> を重水素化体の内部標準物質として用いる。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。

### 【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℃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。

精油定量装置は、あらかじめ水 100mL とヘキサン 3mL を精油定量装置に入れ、約 30 分間、数回の蒸留を行う<sup>注4</sup>。毎回、蒸留後ヘキサン層は捨てる。

### 【装置】

液体クロマトグラフ/質量分析計(LC/MS)：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)による分析が可能な装置を用いる。液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計(LC/MS/MS)による場合はマルチプル リアクション モニタリング(MRM)による分析法とする。

### 【試験溶液の調製】

精油定量装置に水 100mL と試料 2g <sup>注5</sup> を入れ、ヘキサン 3mL、内部標準物質 m-OP-d<sub>5</sub> 50ng を入れて 1 時間、環流蒸留を行う。得られたヘキサン層<sup>注6</sup>を遠心エバポレーター<sup>注7</sup>で濃縮乾固し、メタノール 1mL を入れ、超音波で溶解した後、試験溶液とした。

## 【試験操作】

## LC/MS の場合

## 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℃

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

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。内部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。高濃度試料の場合は、必要に応じ検量線の濃度範囲を広げる。

## LC/MS/MS の場合

## ① LC/MS/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 2.1mm、長さ 150mm、粒径 5  $\mu$ m)<sup>注8</sup>

カラム温度：40℃

分析用移動相：水：メタノール(0.5mM 酢酸アンモニウム<sup>注9</sup>)

分析用移動相の流速：0.2 mL/min

注入量：20  $\mu$ 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

モニターイオン：NP プレカーサーイオン  $m/z=219$  プロダクトイオン  $m/z=133$

m-OP-d<sub>5</sub> プレカーサーイオン  $m/z=224$  プロダクトイオン  $m/z=123$

イオンスプレー電圧：-4500V

イオンソース温度：550℃

## ② 定性・定量

LC/MS/MSにおいてMRM( $m/z=219 \rightarrow 133$ )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、1~100 ppb の濃度範囲において作成する。高濃度試料の場合は、必要に応じ検量線の濃度範囲を広げる。

## 【検出下限値及び定量下限値】

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10</sup>。



## 【注解】

- 注1 LC/MS/MS法はLC/MS法で妨害のある場合、MRMモードで測定を行う。
- 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・ $^{13}\text{C}$ 安定同位体)が主であるが、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、m-OP-d<sub>5</sub>を内部標準物質として利用し、NPの回収率を良好に補正することが可能である。
- 注4 操作ブランク値が一定になるまで洗浄(おおよそ3~4回程度)を繰り返す。
- 注5 飼料及び床敷は2gであるが、給水の場合は試料水100mLとヘキサン3mLのみを用いて同様な操作を行う。
- 注6 若干、混入する水とヘキサンの分離はパスツールピペットを用いてヘキサンを分取するか、冷凍(-20℃)により水を除去する。しかし、その後無水硫酸ナトリウムによる脱水の必要はない。
- 注7 エバポレーターを使用する場合はあらかじめ、アセトン等の溶媒を減圧留去し、ガラス器具内を洗浄する。
- 注8 関東化学社製Mightysil RP18 GP、ジーエルサイエンス社製ODS-3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。
- 注10 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。

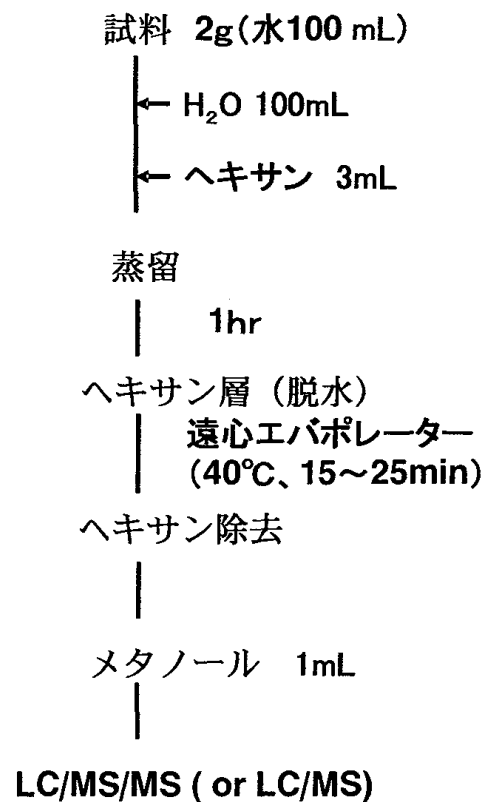


図 飼料・床敷き及び給水中の4-ノニルフェノール分析法フローシート

【参考文献】

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)

## 動物飼料中の植物エストロゲンの分析法(暫定)

### 【試験法の概要】

動物飼料から、80% メタノールを用いて抽出し、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。

### 【試薬】

すべての試薬類は、クロマトグラム上で植物エストロゲンの分析に支障がないことを確認した後用いる。

- ① 標準品: Daidzein, Genistein, Glycitein 及びイソフラボン配糖体、Malonyl 体、Acetyl 体、計 12 成分を用いる。
- ② 標準溶液: 標準溶液は、各標準品 10mg を精秤し、メタノール 100mL に溶解して標準原液を調製し、適宜 80%メタノールに溶解して標準溶液とする。

その他の試薬はすべて特級品あるいは HPLC 用を用いる。

### 【装置及び測定条件】

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

#### 測定条件

分析用カラム: C18 系カラム<sup>注1</sup>(内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 5 $\mu$ m)

カラム温度: 40 °C

移動相: 0.003%酢酸-アセトニトリル系 (gradient)

流速: 0.2 mL/min

注入量: 5  $\mu$ 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

フラグメンター電圧: 120V

モニターイオン:  $m/z=253, 415, 457, 269, 431, 473, 283, 445, 487$

#### ○ gradient 条件

A= 10% アセトニトリル (0.003%酢酸含有)

B= 50% アセトニトリル (0.003%酢酸含有)

0 min A/B=100:0 → 20min A/B=25:75

### 【検量線】

各イソフラボン標準の濃度が 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 及び 2  $\mu$ g/mL となる標準溶液を調製し、その 5  $\mu$ L を LC/MS に注入した。検出には SIM 法を採用し、得られた SIM クロマトグラムよりピーク面積を求め、絶対検量線法により検量線を作成する。

## 【試験溶液の調製】

飼料 1 g を採り、80%メタノール 15mL を加えて 2 分間ホモジナイズ抽出する。抽出液を 3000rpm で遠心分離後、上清を分取する。精製水を加えて 20mL に定容した後、必要に応じて Whatman シリンジフィルター(0.45  $\mu$ m)でろ過し、試験溶液とする。

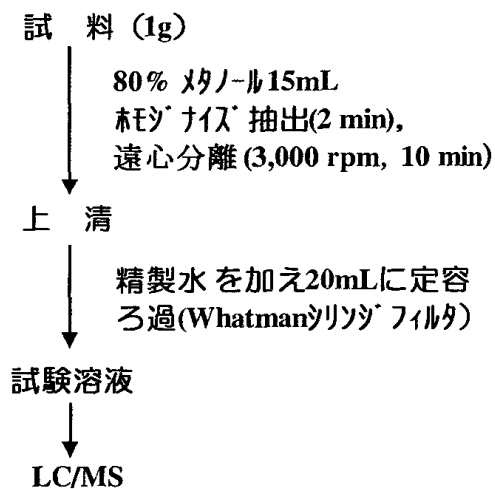
## 【検出下限・定量下限】

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。

## 【注解】

注 1 Agilent Technologies 製の Zonbax XDB 等がある。

## 飼料中の植物エストロゲンの分析法



動物飼料中の $17\beta$ -エストラジオールの分析法(暫定)

## 【試験法の概要】

動物飼料に含まれる $17\beta$ -エストラジオール(エストラジオール; $E_2$ )をメタノールで抽出し、グラファイトカーボン/アミノプロピルシリカゲル固層抽出カラムによるクリーンアップを行った後、LC/MS/MSで定性・定量する。

## 【試薬】

すべての試薬類は、クロマトグラム上で $E_2$ の分析に支障のないことを確認した後に用いる。

- ① 標準品： $E_2$ 標準品(97.0%以上)を用いる。
- ② 標準溶液の調製： $E_2$ 標準品 20 mgを20 mLのメスフラスコに量りとり、メタノールを加えて20 mLとして1000  $\mu\text{g/mL}$ 標準原液を調製する。適宜、メタノールで希釈して標準溶液を作製する。
- ③ 有機溶媒：残留農薬試験用、環境分析用、LC-MS用を用いる。
- ④ グラファイトカーボン/アミノプロピルシリカゲル固層抽出カラム<sup>注1</sup>は、予め20 mLのジクロロメタン/メタノール(50:50)及び20 mLのメタノールの順で洗浄したものを使用する。
- ⑤ 内部標準物質： $17\beta$ -エストラジオール( $16, 16, 17\text{-d}_3$ )標準品( $E_2\text{-d}_3$ )を内部標準物質として用いる。 $E_2\text{-d}_3$  20 mgを20 mLのメスフラスコに量りとり、メタノールを加えて20 mLとして1000  $\mu\text{g/mL}$ 内部標準原液を調製する。適宜、メタノールで希釈して内部標準溶液を作製する。

## 【器具】

検体の調製に用いる器具は、 $E_2$ の分析に支障のないことを確認する。通常、実験環境からの混入は、起こらないことから、十分に水洗したガラス器具を分析直前にアセトンで洗浄したものを使用すればよい。

## 【装置及び測定条件】

液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計(LC/MS/MS)によるマルチプル リアクション モニタリング(MRM)による分析を行う。測定条件の一例を以下に示す。

分析用カラム：C18逆相系カラム<sup>注2</sup>(内径, 2.0 mm; 長さ, 50 mm; 粒径, 3  $\mu\text{m}$ )

カラム温度：50°C

分析用移動相：(A) 0.02%アンモニア水; (B) アセトニトリル

グラジエント条件：(B), 20 → 60% (10 min), リニア

分析用移動相の流速：0.2 mL/min

注入量：5  $\mu\text{L}$

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

モニターイオン(プレカーサーイオン/プロダクトイオン)：

$E_2$ , ( $m/z=271/m/z=145$ ) ;  $E_2-d_3$ , ( $m/z=274/m/z=145$ )

#### 【試験溶液の調製】

粉碎した飼料 10 g に  $E_2-d_3$  を 100 ng 添加する。メタノールを 50 mL 加えて室温で 1 時間静置した後、ホモジナイズ（2 分間）を行う。超音波照射（10 分間）後、遠心分離し、上清を回収する。残渣にメタノール 10 mL を加えて洗浄し、遠心分離後、上清を回収し、先の上清と併せて 50 mL に定容する。この抽出液 2.0 mL をグラフアイトカーボン/アミノプロピルシリカゲル固層抽出カラムに負荷する。メタノール 20 mL で洗浄後、ジクロロメタン/メタノール（50：50）10 mL で溶出させる。窒素気流下で乾固させ、LC の溶出開始液 0.20 mL に溶解して試験溶液とする。

#### 【検量線】

内部標準法により定量する。すなわち、 $E_2-d_3$  に対する  $E_2$  の面積比から検量線を作成し、定量値を求める。

#### 【検出下限値及び定量下限値】

操作ブランク値の標準偏差の 3 倍を検出下限値（LOD）とし、10 倍を定量下限値（LOQ）とする。

#### 【注解】

動物飼料の原料として魚粉が使用されることがあるため、飼料中の  $E_2$  の分析方法を構築したものである。

注1：スペルコ製、スペルクリン ENVI-Carb/LC-NH<sub>2</sub> (500mg/500mg) 等がある。

注2：インタクト製、カデンツァ CD-C18, 2.0 x 50 mm, 3 μm 等がある。

飼料中のエストラジオール分析法

