

## 生体試料中内分泌かく乱化学物質分析ガイドラインの方向（案）

主任研究者 牧野 恒久

**第1部 通則、一般試料採取法****1 通則**

1-1 内分泌かく乱化学物質の生体中に存在する濃度は、一般的に極めて低濃度である。現在の分析測定技術レベルで考えられる範囲において、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・分析操作等に関わる一定水準以上の技術が要求される。

1-2 内分泌かく乱化学物質の生体試料中の濃度を測定するための一般的留意点をまとめた。

**1-3 調査対象物質**

本マニュアルでは、生体中の内分泌かく乱化学物質等を調査対象とする。

**1-4 調査計画**

試料採取の実施にあたっては、被験者や協力者に対して十分なインフォームド・コンセントを行う。事前に倫理審査等を受けることが望ましい。

**1-5 試料採取及び試料の取り扱い**

試料採取に当たっては、医師、看護師（保健師、助産師を含む）等、専門の技術を有するものが行う。採取した試料は、分析するまで冷凍し、暗所に保存する。試料は、病原菌等の感染の危険性があるので、感染防止に留意すること。

**1-6 分析に必要な器具・装置・試薬等**

ここでは、分析を行うに当たって必要な器具・装置・試薬等に関して必要とされる、または望ましい要求事項を示す。

**2 一般試験法****2-1 試料の採取**

2-1-1 試料の採取に当たっては、塩化ビニル製等の手袋で直接試料に接触しないよう注意する。止むを得ない時には、ラテックス等の手袋を使用する。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。

2-1-2 採取器具等は、ステンレス、ガラス等の器具を用い、分析対象物質の汚染がないことを確認した後、使用する。

2-1-3 採取容器等については、ガラス容器ないしはフッ素樹脂等の使用が望ましい。容器の選択に当たっては、ブランク試験を行い、汚染のないことを確認する。

2-1-4 試料は、少なくとも2回分析出来る量を採取し、二等分して分析するまで冷凍し、暗所に保存する（1回分は、再試験用に保存する）。

2-1-5 保存容器等は、ガラス容器ないしはフッ素樹脂等の使用が望ましい。容器の選択に当たっては、ブランク試験を行い、汚染のないことを確認する。

## 2-2 運搬及び保存

2-2-1 冷凍で運送することが望ましい。

2-2-2 パッキング材に発砲スチロール等の化成品を可能な限り使用しない。

2-2-3 トラベルブランクをとって、測定対象化合物の汚染がないことを確認しておく。

## 2-3 器具・装置

2-3-1 使用する全ての器具及び装置は、分析対象物質の測定分析に影響を及ぼさない物を用いる。

分析途中の試料の汚染を防ぐ観点から、使用する全ての器具等は可能な限り、当該化学物質分析専用とすることが望ましい。測定機器も可能な限りクリーンな状態に保つか、専用のものを用いる。

## 2-4 試薬類

2-4-1 標準品は、純度の確かな物を用いる。

2-4-2 試薬類は、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、フタル酸エステル分析用、HPLC用等）を使用する。

2-4-3 入手先、入手年月日、ロット、使用期限、純度、調製作業等を記録する。

2-4-4 必要に応じて蒸留、加熱処理、洗浄等の精製操作を行う。

2-4-5 本方法によって使用する量が、分析対象物質の定量に影響を及ぼさないことを確認した後、使用する。

## 2-5 分析法

2-5-1 試料調製法（クリーンアップ、濃縮）

2-5-1-1 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。

2-5-1-2 GC/MS、LC/MSで測定するときは、可能な限り同位体希釈質量分析（IDMS）によることが望ましい。

2-5-2 測定（分析装置の保守管理、校正、洗浄）

2-5-2-1 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を目的成分が測定できる条件に設定し、GC/MSが目的化学物質に対して適切な状態（再現性、感度等）であることを確認する。

2-5-2-2 HPLC等の分析装置の状態確認及び測定条件の設定  
 目的成分が測定できる条件に設定し、HPLC等の分析装置が目的化学物質に対して適切な状態（再現性、感度等）であることを確認する。

## 2-6 検出下限値

### 2-6-1 装置の検出下限値

#### 2-6-1-1 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さが $S/N=3$ 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。あるいは、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。

### 2-6-2 実測定の検出下限値

実際の試料を測定し、そのときの測定試料中の目的化合物のクロマトグラムピーク高さを標準物質のピーク高さと比較し、測定試料中のピーク高さが $S/N=3$ 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さを標準物質を測定したときのピーク高さから推定し、それに等しいピーク高さ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。

## 2-7 精度管理

概略を別添1に示した。

### 2-7-1 精度管理及び精度保証

目的化学物質の測定値を確認（精度保証等）出来るように下記の記録を取る。ここで示した各項目が満足されていない場合、その原因を明らかにし、取り除いた後、再分析等適切な処置をおこなう。

### 2-7-2 精度管理にかかわる作業とその記録

#### 2-7-2-1 試料採取の記録

試料の採取方法を記録する。

#### 2-7-2-2 試料確認の記録

試料採取後、試験機関に試料が入る段階（試料の受付）における試料の確認を記録する。試料確認の日時、確認した人の所属・氏名、試料の試料前処理室まで搬送された手段・状態、試料の入っていた容器の種類・サイズ、保管する場合その保管場所、保管方法、試料の管理番号を記録する。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。

#### 2-7-2-3 分析法の標準作業書を作成する。

#### 2-7-2-4 測定機器の記録

使用記録、測定条件、修理、保守点検の記録する。

#### 2-7-2-5 標準物質管理記録・標準溶液調製記録

分析に用いた試薬のメーカー名、製品名、ロット番号、購入日、使用期限等を記録

する。標準溶液を調製した状況（調製日、使用履歴等）を記録する。

#### 2-7-2-6 分析前処理記録

分析者の所属、氏名、試料の状態、分析の各段階における操作日時、試料量（分析に供した量）、各試薬使用量、試料前処理室雰囲気等一連の前処理において、必要な情報を記録する。

#### 2-7-2-7 測定機器の記録

使用状況記録、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））、修理、保守点検の記録を残す。

#### 2-7-2-8 同位体測定にあつては、標準物質の同位体比の確認

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。

#### 2-7-2-9 測定順の記録

分析機器による測定の順番を記録する。標準溶液、最終溶媒ブランク、全操作ブランク、試料、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）等試料の測定順番の記録を残す。

#### 2-7-2-10 クロマトグラムの記録

標準溶液、最終溶媒ブランク、全操作ブランク、試料に関する各測定質量数のクロマトグラムを記録する。

### 2-7-3 計算

#### 2-7-3-1 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までの計算過程がトレース可能である記録を残す。

#### 2-7-3-2 回収率の確認記録

回収率の記録を残す。回収率は、70-120%の範囲であることが望ましい。

### 2-7-4 ブランク試験

#### 2-7-4-1 採取容器のブランク試験を行い、その結果を記録する。

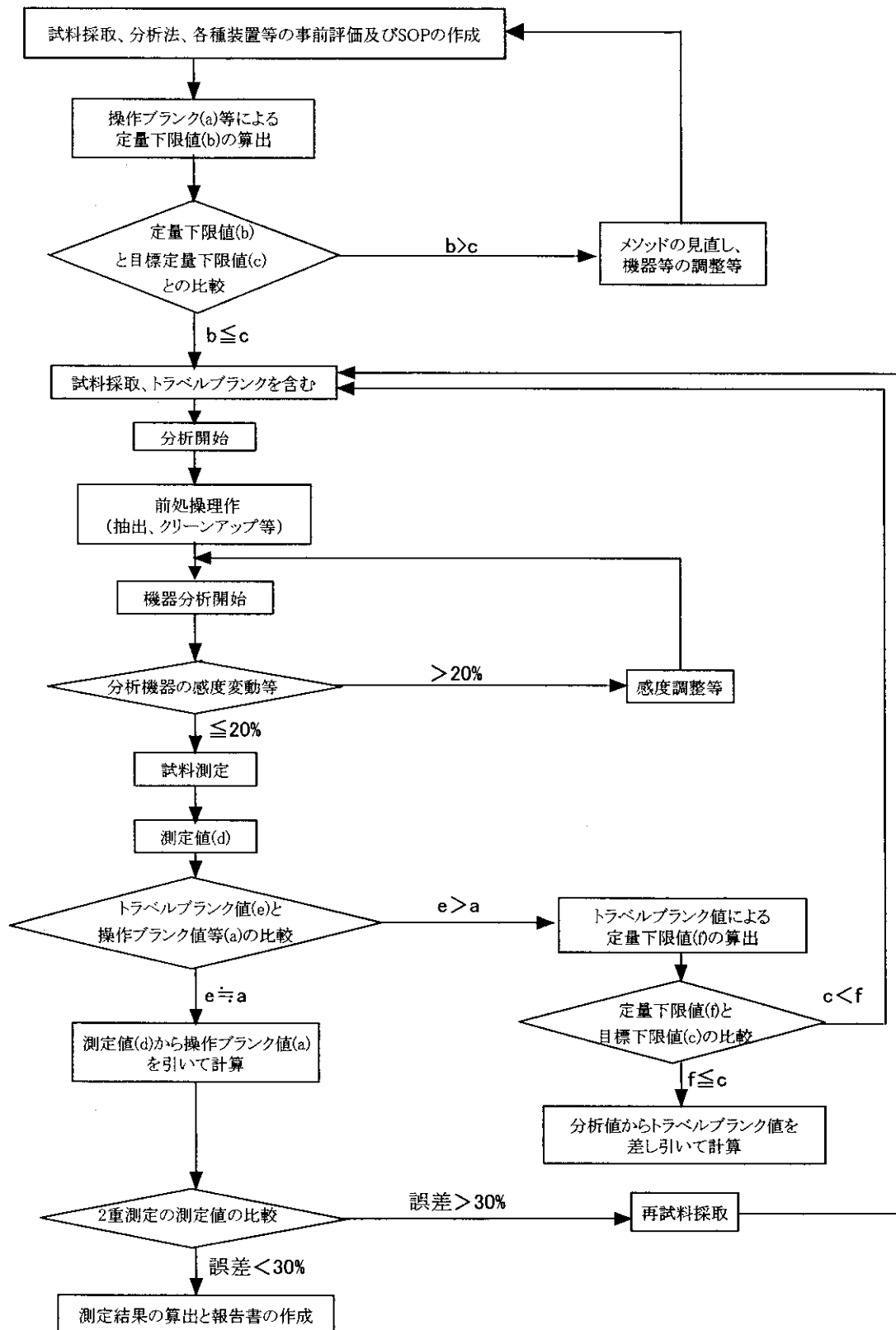
#### 2-7-4-2 全操作ブランク

試料に対して行う分析方法と同一の方法で操作を行う、全操作ブランクの試験の記録を残す。

#### 2-7-5 重測定（試料の前処理から）

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濃度の差が30%以内であることが望ましい（実測濃度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）。

#### 2-7-6 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。



## 第2部 各条

## 1 ノニルフェノール

## 体内動態の概要

ノニルフェノール(NP)は、代謝によりグルクロン酸抱合体になることが知られている。体内動態に関する研究では、ヒトへの経口投与及び静脈内注射による消失半減期は2~3時間である。また、バイオアベイラビリティは約20%となり、速やかに代謝されて、排出するものと考えられる。

## 1-1 試験法の概要

①カラムスイッチング-液体クロマトグラフ/質量分析計(LC/MS)<sup>注1)</sup>

生体試料を直接 LC 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、LC/MSにより定性、定量を行う。

②Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE)-加熱脱着ガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)<sup>注2)</sup>生体試料をポリジメチルシロキサン(PDMS)コーティング攪拌子<sup>注3)</sup>によって抽出し、加熱脱着 GC/MS<sup>注4)</sup>により定性、定量を行う。

## 1-2 試験法

## 1-2-1 検体の採取と試料の調製

検体の採取及び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。また、ガラス器具類は、350℃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。使用直前にアセトンで洗浄したものを使用する。

## 1-2-2 試料液の調製

## ①グルクロニダーゼ処理

生体試料 1 mL に対し、β-グルクロニダーゼ(25 μl)及び酢酸アンモニウム(1.0 M、200 μl)を加え、37℃で3時間インキュベートを行う。酵素反応終了後、精製水で、全量を 1.5 mL とする。

## ②カラムスイッチング-LC/MS 法

グルクロニダーゼ処理後の試料に内標準物質である 4-(1-methyl) octylphenol-d<sub>5</sub> (m-OP-d<sub>5</sub>)を暫定濃度となるように加え、カラムスイッチング LC/MS に直接注入し、分析を行う。

## ③SBSE-加熱脱着 GC/MS 法

グルクロニダーゼ処理後の試料に内標準物質である m-OP-d<sub>5</sub> を暫定濃度となるように加え、PDMS コーティング攪拌子により、60 分間の攪拌を行う。その後、加熱脱着 GC/MS により分析を行う。

## 1-2-3 検量線用標準液の調製

NP 標準品を化学天秤で 100 mL 用メスフラスコに 100 mg 量り取り、標準原液としてメタノールで 1.0 mg/mL とする。その後、各種濃度に精製水を加え調製する。又、内標準物質は暫定濃度になるように調製する。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し、内標準法を用い各濃度範囲内における検量線で、定量分析を行う。

## 1-2-4 測定法

## 測定条件

①カラムスイッチング-LC/MS 法：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 100 mm、粒径 5 μm)

カラム温度：40 °C

分析用移動相：水/アセトニトリル(0.1 mM 酢酸アンモニウム) (60/40[0-10 min]→20/80 [10-20 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<sup>注5)</sup>(内径 4.6 mm、長さ 50 mm、粒径 5 μm)  
 抽出用移動相：精製水(100%)  
 抽出用移動相の流速：0.5 mL/min  
 注入量：100 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  
 MS モニターイオン： $m/z=219$  (NP)、 $m/z=224$  (m-OP-d<sub>5</sub>)

②SBSE-加熱脱着 GC/MS 法：一例を以下に示す。

#### 加熱脱着条件

加熱脱着温度：20 °C → 60 °C/min → 280 °C (5 min)

トランスファーライン温度：300 °C

注入口温度：-150 °C → 12 °C/s → 300 °C (10 min)

注入方式：スプリットレス

#### GC/MS 分析条件

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<sup>注6)</sup>。

オープン温度：60 °C → 15 °C/min → 280 °C (5 min)

インターフェイス温度：280 °C

キャリアーガス：ヘリウム (1.2 mL/min)

イオン化法：電子衝撃(EI)法 (70 eV)

MS モニターイオン： $m/z=135$ 、107 (NP)、 $m/z=126$  (m-OP-d<sub>5</sub>)

#### 検量線

内標準法により、濃度範囲 0.5~10 ppb(LC/MS)及び 0.1~10 ppb(GC/MS)において検量線を作製する。

#### 定量

内標準法により定量を実施する。LC/MS において、SIM( $m/z=219$ )測定で検出される 1 本のピーク面積を用いて定量を行う。GC/MS の場合、SIM( $m/z=135$ )測定で検出される 5 本のピーク中、妨害を受けない 2 本のピーク面積を用いて定量を行う。又、全操作を通したブランク値の標準偏差の 3 倍を検出下限値、10 倍を定量下限値とする。

#### 試薬・試液等

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 95.0%以上)を用いる<sup>注7)</sup>。

②有機溶媒：残留農薬試験用、環境分析用又は HPLC 用を用いる。

③精製水：NP の汚染が少ないミリQ水を用いる。

④内標準物質：4-(1-methyl) octylphenol-d<sub>5</sub> を使用し、内標準補正を行う。回収率や再現性に支障のない場合は、絶対検量線による測定も可能である<sup>注8)</sup>。

#### 1-3 参考測定法

生体試料を分析対象とした方法として、以下に参考文献を示す。

“Measurement of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in human urine by column-switching LC/MS coupled with on-line extraction” K.Inoue, M.Kawaguchi, F.Okada, N. Takai, Y.Yoshimura, M.Horie, S.Izumi, T.Makino, H.Nakazawa: Anal. Chim. Acta in press

**1-4 注解**

- 1) カラムスイッチング-LC/MS 法は、試料を直接 LC に注入でき、前処理操作に伴うコンタミネーションを極限まで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。
- 2) PDMS コーティング攪拌子による抽出は、マトリックスの影響を受け難く、効率よく目的成分を抽出できる。GC/MS による NP の高感度な分析を行うためには、誘導体化が必須であるが、PDMS の高い濃縮効果により、簡便な高感度分析が可能となる。
- 3) Gerstel 社製の Twister™ 等がある。
- 4) 加熱脱着装置として Gerstel 社製の TDS 等がある。
- 5) TOSHO 社製の BSA-ODS/S 等がある。
- 6) J&W Scientific 社製の DB-5MS 等がある。
- 7) 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(Nonylphenol)と直鎖型単一成分(4-n-Nonylphenol)からなるものがある。一般に環境試料や生体試料からは、混合標準品に類似したパターンが観測される。従って、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。
- 8) 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)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、十分に内標準補正できない場合がある。そこで、4-(1-methyl) octylphenol-d<sub>5</sub> を内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。

**今後研究が必要な事項**

- 様々な生体試料ごとの分析バリデーションの確保。
- 本法の臓器への応用。
- 本法の動物試料への応用。



## 2. ビスフェノールA

### 体内動態の概要

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 μg）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。

### 2-1 試験法の概要

#### ① LC/MS 法<sup>注1)</sup>

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、LC/MSで定量した。

#### ② GC/MS 法<sup>注2)</sup>

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した。これをGC/MSに注入し定量した。

### 2-2 試験法（LC/MS法、GC/MS法）

#### 2-2-1 検体の採取と試料の調製

検体の採取及び調製に用いる器具は、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た。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した。

#### 2-2-2 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-d<sub>16</sub> を 5ng 加えた後、マルチモードタイプカートリッジ<sup>注3)</sup> に負荷した。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、10%メタノール 1mL に溶解して試験溶液とした。

###### ・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-グルクロナダーゼ 6,500units/mL（試薬 β-グルクロナダーゼを 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した。その後の操作は、遊離体 BPA 測定用試験溶液と同様に行い、試験溶液を調製した。

##### 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、<sup>13</sup>C-BPA 0.1μg を加え、これに(1+1)リン酸 1mL を加え、pH 3 以下にした。これを、予めメタノール 5mL、精製水 10mL で活性化した C18 カートリッジ<sup>注4)</sup> に負荷し BPA を抽出した。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で濃縮乾固した。フラスコに BSTFA <sup>注5)</sup> 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でアセトンを留去した。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<sup>注6)</sup> に負荷し、流出液を試験管に採取した。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た。流出液

に窒素ガスを吹き付け、1mLに濃縮し、これをGC/MS-SIMで定量した。

・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<sup>13</sup>C-BPA 0.1μgを加え、37℃で90分間酵素処理した。その後の操作は遊離体BPA測定用試験溶液と同様に行い、試験溶液を調製した。

### 2-2-3 検量線用標準液の調製

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1000μg/mLの標準原液とした。標準原液を適宜希釈し、標準溶液を調製した。内部標準物質としてLC/MSにはBPA-d<sub>16</sub>、GC/MSには<sup>13</sup>C-BPA<sup>注7)</sup>を用いた。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200μg/mLの標準原液とした。内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した。

### 2-2-4 測定法

#### 測定条件

#### ①LC/MS法

分析用カラム：C18系カラム<sup>注8)</sup> (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm)

カラム温度：40℃

移動相：0.01%酢酸-アセトニトリル(55:45)

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>)

#### 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<sup>注9)</sup>。

カラム温度：70℃(2min)→20℃/min→150℃→10℃/min→300℃(5min)

注入口温度：250℃

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℃ 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)、<sup>13</sup>C-BPA(369)

#### 検量線

#### ①LC/MS測定

安定同位体標識内部標準物質BPA-d<sub>16</sub>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-d<sub>16</sub>の面積比により検量線を作成した。

#### 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<sup>13</sup>C-BPAを100ng添加し、BSTFA 200μLを加え、アセトンで1mLに定溶した。これを一夜放置し、GC/MS-SIMで測定し、<sup>13</sup>C-BPAとの面積比で検量線を作成した。

#### 定量

内部標準法により定量を実施する。LC/MSにおいては、BPAとBPA-d<sub>16</sub>、GC/MSにおいて

は、BPAと $^{13}\text{C}$ -BPAの面積値の比から検量線を用いて定量値を求めた。なお、全操作を通じたブランク値の標準偏差の3倍を検出下限値、10倍を定量下限値とする。

#### 試薬・試液等

- ①標準品：ビスフェノールA(BPA)及びビスフェノール A- $\text{d}_{16}$ (BPA- $\text{d}_{16}$ ) は、環境分析用試薬を用いた。 $^{13}\text{C}$ -BPAはケンブリッジアイソトープ製を用いた。
  - ② $\beta$ -グルクロニダーゼ：100,000 units/mL以上のものを用いた。
  - ③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)及びC18カートリッジ(500mg)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した。フロリジルカートリッジ(500mg)は、予めn-ヘキサン5mLで洗浄して使用した。
  - ④BSTFA：環境分析用を用いた。
  - ⑤精製水：BPAの汚染が少ないミリQ水を用いた。
- その他の試薬はすべて特級品あるいはHPLC用を用いた。

#### 2-3 参考測定法

Tsukioka T. et al : Determination of Trace Amounts of Bisphenol A in urine by Negative-Ion Chemical-ionization-Gas Chromatography/Mass Spectrometry、Analytical Sciences、19、151(2003)

#### 2-4 注解

- 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やすい点が、現状での課題である。
- 2) PFB化しNCI-GC/MSで測定する方法もある。
- 3) International Sorbent Technology Ltd.製のIsolute Multimode等がある。
- 4) スペルコ製、スペルクリンENVI-18等がある。
- 5) BSTFA：N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide、ジーエルサイエンス社製等がある。
- 6) スペルコ製、スペルクリンENVI フロリジル等がある。
- 7) BPA- $\text{d}_{16}$ を用いても良い。
- 8) Agilent Technologies製のZonbax XDB等がある。
- 9) J&W Scientific社製のDB-5MS等がある。

#### 今後研究が必要な事項

- 様々な生体試料ごとの分析バリデーションの確保。
- 一日尿中のBPAを測定することによりBPA暴露量を評価。
- 本法の動物飼料への応用。
- GC/MS法の血液試料への応用。
- LC/MS/MS法の検討。

### 3 フタル酸エステル類

#### 体内動態の概要

フタル酸エステル類に対する暴露は、フタル酸エステル類が使用された製品に直接触れること、あるいはフタル酸エステル類を含む包装材料に触れた食品を介して起こる。

体内に摂取されたフタル酸エステル類は、小腸内のリパーゼあるいは小腸組織内の加水分解酵素によりモノエステル体となり、最終的にグルクロン酸抱合体として尿及び糞中に排泄される。モノエステル体は、フタル酸エステル類の毒性発現に関与していると推測されている。

フタル酸エステル類の中で現在最も汎用されているフタル酸ジエチルヘキシルは、腸内で加水分解されフタル酸モノエチルヘキシル及び2-エチルヘキサノールを生成するが、その後の代謝過程は複雑で、30種以上の代謝物が報告されている。

#### 3-1 試験法の概要

内標準物質としてフタル酸エステルの重水素標識体 (d4 体) を血清に添加する。その後、血清中のフタル酸エステルをアセトニトリルで抽出し、抽出液をフロリジル・PSA カラムクロマトグラフィーにより精製する。この試験溶液の GC/MS 分析を行い、定性・定量を実施する。なお、本試験法は血清中のフタル酸ジブチル (DBP)、フタル酸ブチルベンジル (BBP)、フタル酸 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) の分析に適用できる。

#### 3-2 試験法

##### 3-2-1 検体の採取と試料の調製

第1部 通則、一般試料採取法に準じて実施する。

##### 3-2-2 試料液の調製

血清を 1 g 採り、内標準物質としてフタル酸エステル-d4 溶液 (4  $\mu\text{g/mL}$ ) を 0.025 mL 添加し、これに食塩 0.5 g、アセトニトリル 5 mL、n-ヘキサン 1 mL を加えた後に、3 分間激しく振とうする。3000 rpm で 5 分間遠心分離した後に、アセトニトリル相を分取し、濃縮乾固する。これに水 2 mL を加えて残さを溶解し、n-ヘキサン 5 mL および 3 mL で 2 回抽出する。n-ヘキサン相に少量の無水硫酸ナトリウムを加えて、脱水し、フロリジル・PSA カラムクロマトグラフィーに負荷する。n-ヘキサン溶液負荷時の流出液は捨て、さらにカラムを n-ヘキサン 3 mL で洗浄した後に、5%アセトン-n-ヘキサン 10 mL でフタル酸エステルを溶出する。これを濃縮して n-ヘキサンで 1 mL に定容し、試験溶液とする。

##### 3-2-3 検量線用標準液の調製

フタル酸エステル標準溶液：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  $\mu\text{g/mL}$  溶液を作製する。適宜希釈して標準系列を作製する。

フタル酸エステル d4 溶液：各標準品 20 mg を 20 mL のメスフラスコにとり、n-ヘキサンで 20 mL とし、1000  $\mu\text{g/mL}$  溶液を作製する。適宜希釈し、内標準溶液とする。

##### 3-2-4 測定法

###### GC/MS 条件

イオン源：EI

カラム：DB-5MS (30 m x 0.25 mm, ID, 膜厚 0.25  $\mu\text{m}$ , J&W)

カラム温度：80°C (3分)  $\rightarrow$  10°C/分  $\rightarrow$  300°C (5分)

キャリアガス：He (圧力 100 kPa, 全流量 50 mL/分、カラム流量 1.5 mL/分)

注入口温度：240°C

インターフェイス温度：300℃  
モニターイオン：表1に示した。

表1 モニターイオン

フタル酸エステル	定量イオン	参照イオン	IS(定量イオン)
フタル酸ジ-n-ブチル(DBP)	149	-	DBP-d4 (153)
フタル酸ジ 2-エチルヘキシル(DEHP)	149	167	DEHP-d4 (153)
フタル酸ブチルベンジル(BBP)	149	91	BBP-d4 (153)
フタル酸ジイソオクチル(DiOP)	149	-	DiOP-d4 (153)
フタル酸ジイソノニル(DiNP)	149	-	DiNP-d4 (153)

### 検量線

内標準物質を含んだフタル酸エステル標準溶液を GC/MS に注入し、各フタル酸エステル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 本のピーク面積を合計してピーク面積とする。本試験法では、5 から 500 ppb の間で良好な直線性が得られる。

### 定量法

試験溶液を GC/MS に注入し、各フタル酸エステル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 本のピーク面積を合計して定量対象とする。

### 試薬等

n-ヘキサン、アセトニトリル、アセトン、硫酸ナトリウムは、フタル酸エステル測定用を用いる。DBP、BBP、DEHP、DiOP、DiNP およびこれらの d4 体は環境分析用を用いる。フロリジル及び PSA は、それぞれフロリジル PR 及びボンデシル PSA を使用する。

### フロリジル・PSA カラムの調製

内径 15 mm、長さ 110 mm のガラス製注射筒にグラスウールで栓をし、あらかじめ 200℃、2 時間活性化し、放冷したフロリジル 1 g、その上に PSA 0.5 g、無水硫酸ナトリウム 1 g を n-ヘキサンを用いて充填する。使用前にアセトン 10 mL および n-ヘキサン 10 mL を用いて洗浄する。

### 3-3 参考測定法

特になし。

### 3-4 注解

#### 3-4-1 操作ブランクの低減化

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 ppb 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 ppb 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。

- 1) 使用する水は、フタル酸エステル分析用の n-ヘキサンで洗浄した蒸留水を使用する。
- 2) 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分析用

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。

- 3) 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。
- 4) 使用する実験台はアルミホイルで覆い、毎日、交換する。
- 5) エバポレーターは使用する直前に、フタル酸エステル分析用アセトン濃縮乾固する。
- 6) 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。
- 7) 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。
- 8) 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。
- 9) 腕時計は外しておく。
- 10) 髪の毛は小さくまとめる。
- 11) 爪は短く切る。

### 3-4-2 添加回収率及び検出限界について

血清に DBP、BBP、DEHP の濃度がそれぞれ 100 ppb になるように、DiOP、DiNP の濃度が 200 ppb 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。また、検出限界は、上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 10 ppb に、DiOP、DiNP は 50 ppb に設定する。

#### 今後研究が必要な事項

- 本試験法の尿中分析への適用性の検討。
- フタル酸エステルの代謝物、主としてフタル酸モノエステルの分析法の検討。