

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認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°C 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°C 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、クテルナダニッシュ(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毎に行う。
- ・ 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

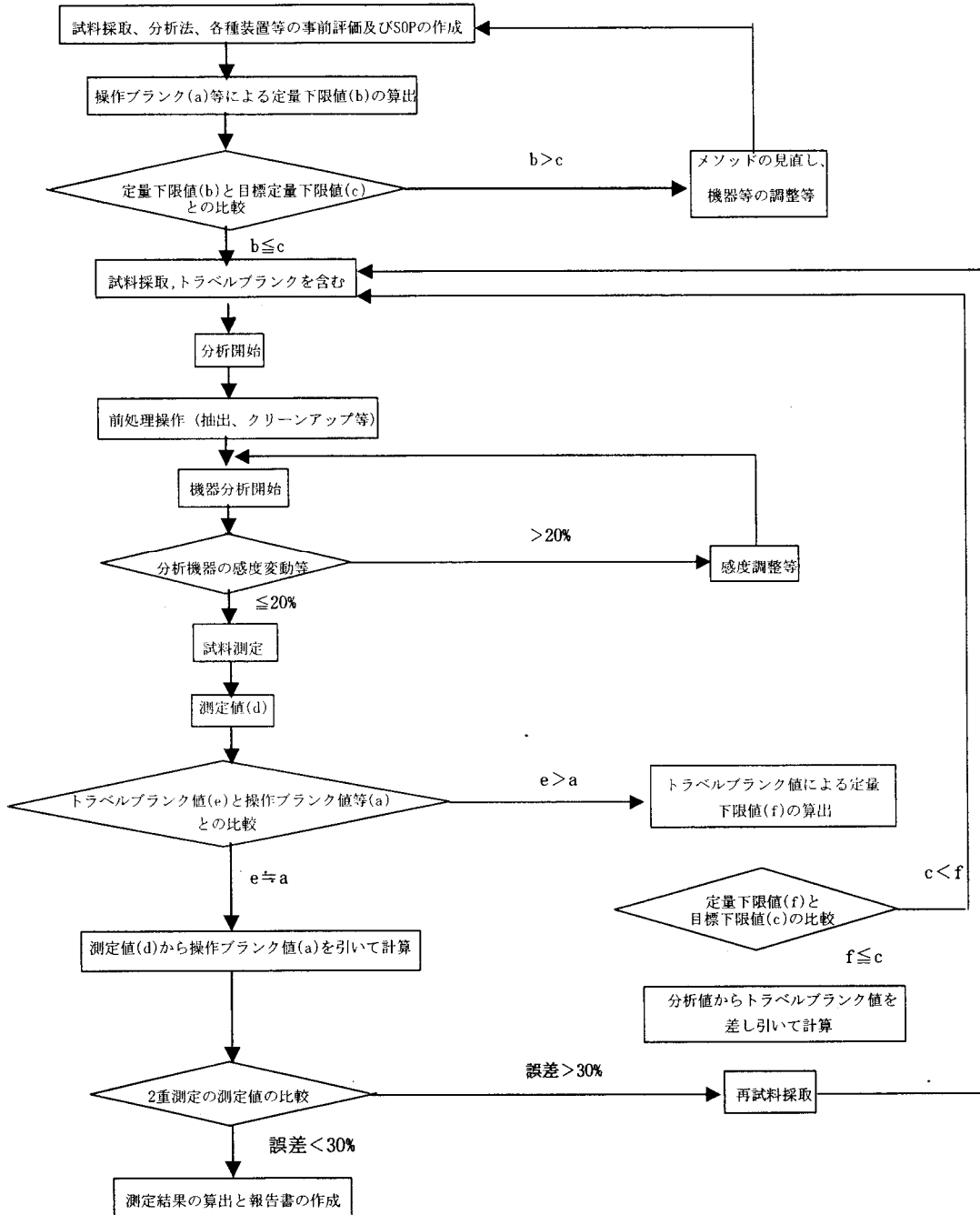
分析検体数10に対して1以上の頻度で行うことが望ましい。この2重測定の結果は各実測値の差が30%以内であることが望ましい(実測値が目標定量下限値の10倍以下の化合物に関しては規定しない)。

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。

7. 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】

全ての試薬類は、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-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。

②BPA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1000μg/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200μg/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。

④β-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。

⑥BSTFA^{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- d_{16})

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)、 ^{13}C -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- d_{16} 。GC/MS においては、BPA と ^{13}C -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- d_{16} 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_{16} 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 ^{13}C -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、 ^{13}C -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°C 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°C 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、メタノールには溶け易いが、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 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。

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。

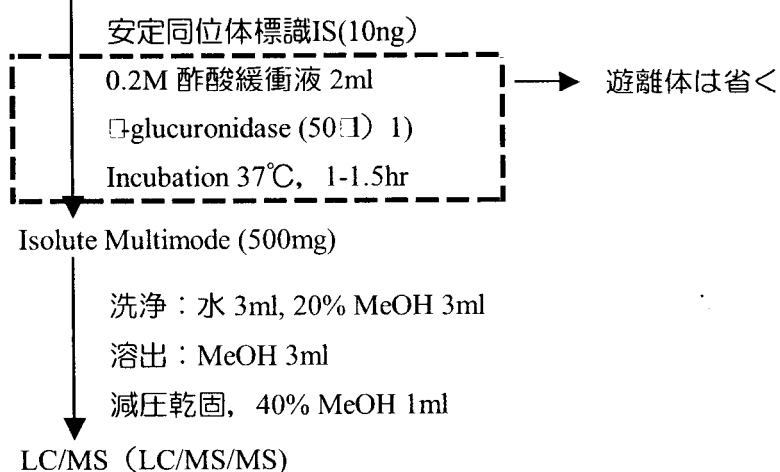
- 1) Kawaguchi,M; Inoue,-K; Yoshimura,-M; Ito,-R; Sakui,-N; Okanouchi,-N; Nakazawa,-H, Determination of bisphenol A in river water and body fluid samples by stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *J-Chromatogr, B*, 805, 41-48 (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