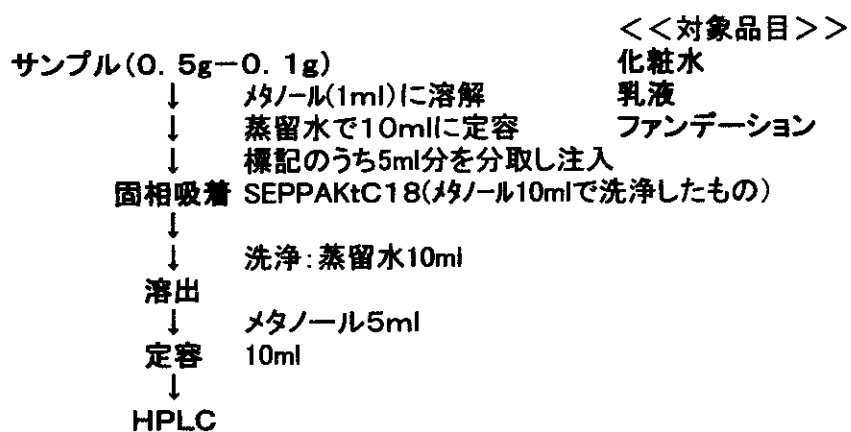


(70-2) 化粧品中のパラベン類の分析方法



HPLC条件

カラム: L-カラム 4.6x150mm

溶離液: 0.05MKH₂PO₄:アセトニトリル:メタノール
=55:27:18

UV:270nm 1ml/min

20 μ l注入

(フロー3) 生体試料中のクロロベンゼン類等の簡易分析法フローシー

血液試料(1ml) 遠心分離した血清試料
 ↓
 ↓ 12mlヘッドスペース瓶
 ↓
 希釈 <--- 蒸留水4ml
 ↓ <--- サロゲート添加(HCB-13C6:2ng)
 バイアルキャップ
 ↓
 加熱条件下でのヘッドスペース-SPME:
 ↓ 90°C30分
 GC/MSIによる測定

SPMEファイバー:
 スペルコ製65 μmPDMS-DVBコーティング

GC/MS条件
 JEOL: JMS-GC/mate
 カラム: HP-5: 0.32mmx30m df0.25 μm
 昇温条件: 60°C(2min) - 15°C/min - 180°C - 10°C/min - 290°C(3min)
 スプリットレスタイム: 2min
 キャリアー流量: ヘリウム1ml/min
 注入口温度: 250°C

モニターm/z		
HCB-13C6	289.8	291.8
HCB	283.8	285.8
trans、cis-クロルテン	372.8	374.8
trans、cis-ノナクロル	406.8	408.8
p,p'-DDE	246.0	317.9

図1 さい帯血と母体血とのメチルパラベン濃度の比較
(東海大学提供試料による)

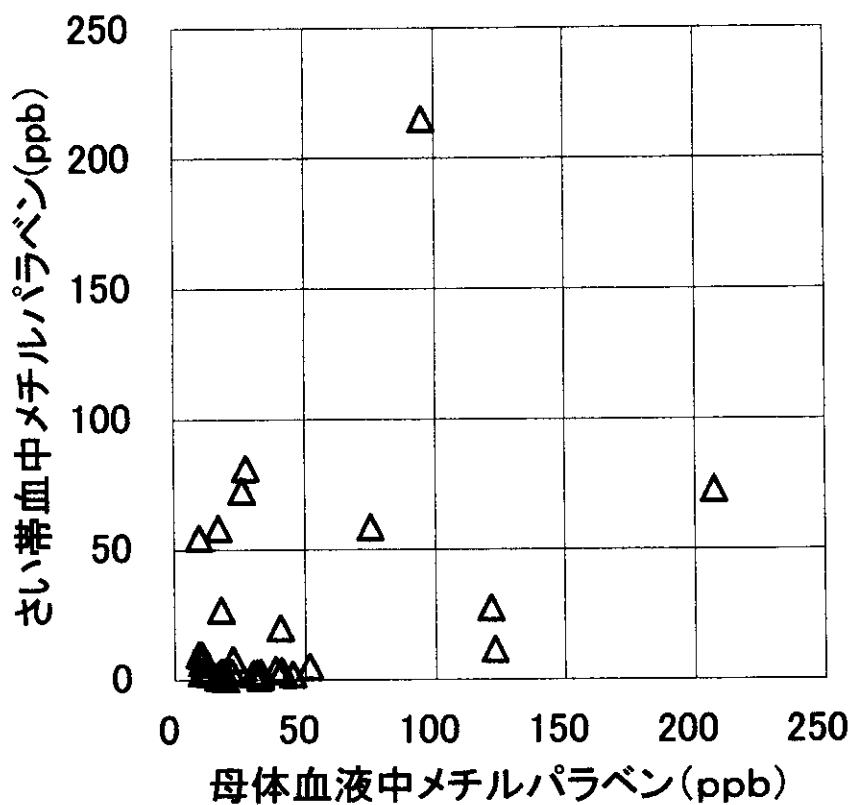


図2 マウスへの模擬化粧品塗布実験

模擬化粧品0.5g(2%ブチルパラベン含有)をマウスの皮膚に塗布:塗布量:10mg
(ppb)

経過時間 (hr)	ブチルパラベン	PHBA
0	0	0
1	6.3	39
2	5.7	42
3	3.5	51

値は、3検体の平均値

マウスの模擬化粧品塗布実験

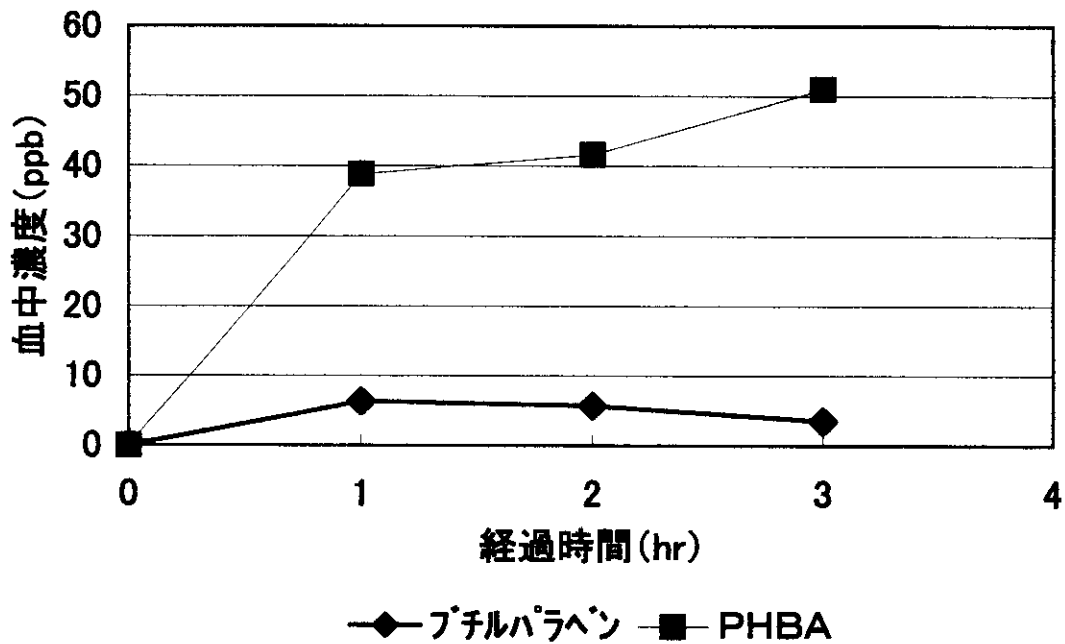


図3 化粧水の塗布実験結果

メチルパラベン:1000ppm、プロピルパラベン200ppm(エタノール10%)を含む模擬化粧水の0.5ml塗布

* 塗布量:メチルパラベン500 μ g、プロピルパラベン100 μ g

経過時間 (hr)	メチルパラベン	プロピルパラベン	pHBA
0	nd	nd	5.7
1	16.3	nd	88.4
2	6.8	nd	41.2
3	4.5	nd	40.7

(ppb)

値は、3検体の平均値

化粧水の塗布実験結果

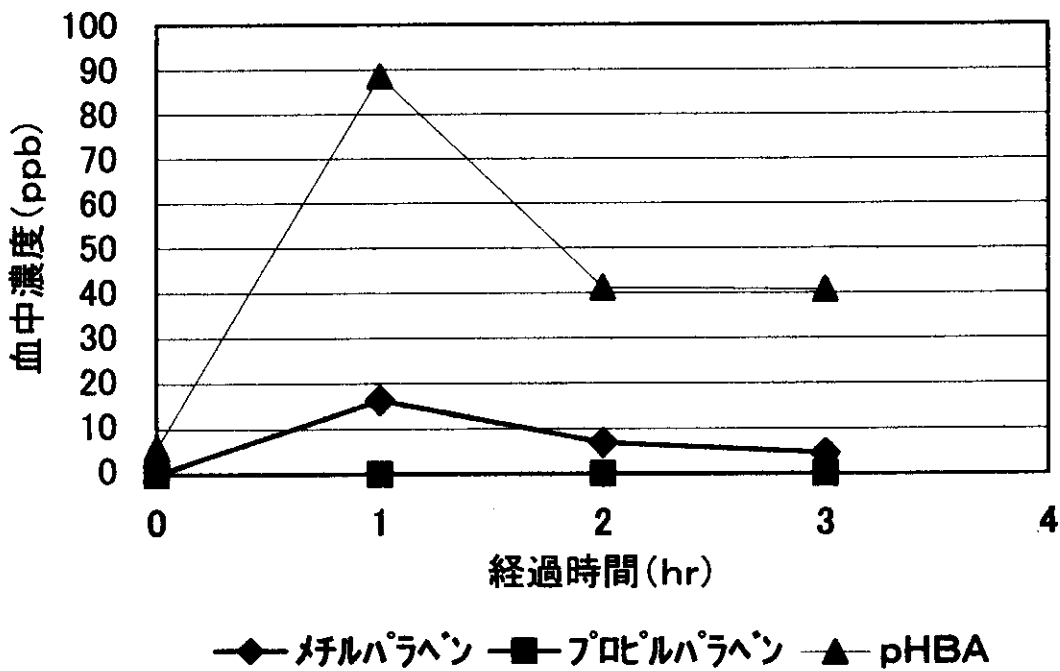
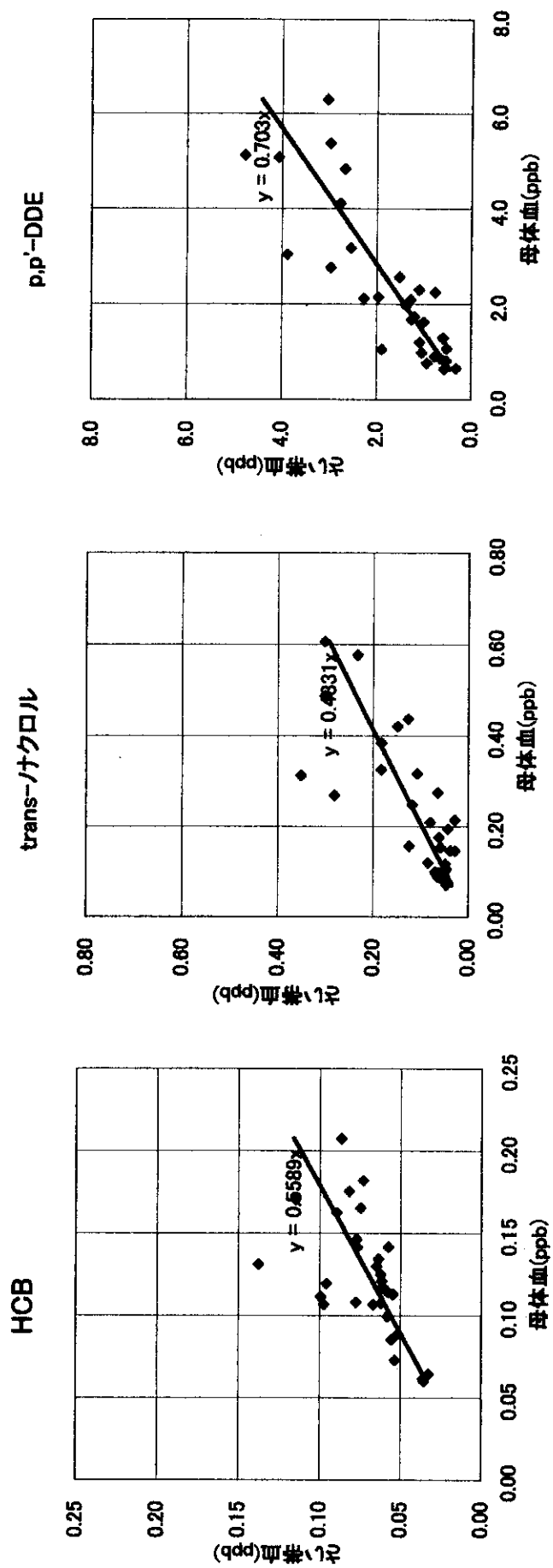


図4 内分泌かく乱化学物質の母体血とさい帯血との濃度比較



平成 12 年度 厚生科学研究 (生活安全総合研究事業)
分担研究報告書

内分泌かく乱物質に関する生体試料(さい帯血等)の分析法の開発と
その実試料分析結果に基づくヒト健康影響についての研究

フタル酸エステル類代謝物に関する分析法の開発及びその動態解明

主任研究者	牧野恒久	東海大学
分担研究者	中澤裕之	星薬科大学
研究協力者	吉村吉博	星薬科大学
	加藤嘉代子	星薬科大学
	井之上浩一	星薬科大学
	岡尚男	愛知県衛生研究所
	伊藤裕子	愛知県衛生研究所

研究要旨 プラスチックの可塑剤として汎用されているフタル酸ジエステル類の代謝物であるフタル酸モノエステル類に関する生体試料中からの高感度かつ再現性の良い分析法を開発した。本法を用いて、実試料(血清及び腹水)に応用した結果、フタル酸モノブチル及びフタル酸モノベンジルに関してはいずれも検出限界以下であった。また、フタル酸モノ-2-エチルヘキシルに関しては、最高 28.8ng/mL が検出された。生体中での代謝過程に関する動態解明に関して、ヒト血清へのジエステル体添加による代謝変換に関する検討を実施した際、種々の酵素により、フタル酸ジエステル類が分解され、モノエステル体へと代謝することを確認した。生体試料中フタル酸エステル類の分析には、様々な要因により、微量分析の詳細な検討が必要と推測される。

A. 研究目的

フタル酸エステル類は機能性、加工性、経済性等に優れたプラスチックの可塑剤である。塩化ビニル樹脂を中心としたプラスチック製品は生活用品全般のみならず、人工腎臓の血液回路、輸血用セット(チューブやバッグ)、カテーテル等医療器材としても広く使用されている。しかし、そのように幅広い用途で使用されるプラスチックの可塑剤が内分泌かく乱化学物質として疑われている。ヒトへの内分泌かく乱作用を検証する上で、生体試料

からの微量測定法の開発は必要不可欠である。しかし、フタル酸エステル類は生活環境中に多く存在するため、その暴露経路は空気、水等幅広く、その結果として高いバックグラウンド値として現れ、微量測定を困難としている。そこで、平成 10 年度厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)「内分泌かく乱化学物質の胎児、成人などの暴露に関する研究(指定研究)」において、高感度分析上の妨害となるバックグラウンドを極力排除した血中フタル酸エステル類の精度高い微量

分析法を開発した。

しかしながら、フタル酸ジエステル類は生体内に取り込まれると速やかに代謝を受け、血中にフタル酸モノエステル類として、また尿中にはフタル酸モノエステル類のグルクロン酸抱合体として存在することが報告されており、暴露量の評価にはモノエステル体を分析することが適当であると考えられる。

動物実験における毒性評価は、di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) はげっ歯類でペルオキシソーム (peroxisome) 増殖による肝癌が¹⁾報告されている。また、DEHP, dibutyl phthalate (DBP), butylbenzyl phthalate (BzBP) は動物で催奇形性が認められている²⁻³⁾。DBP はその代謝物である monobutyl phthalate (MBP) により毒性を示し⁴⁻⁷⁾、monobenzyl phthalate (MBzP) mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) はセルトリ細胞への毒性と催奇形性が報告されている⁸⁻⁹⁾。

そこで、これらの報告より、測定対象物を MBP, MEHP, MBzP とし、ヒト血清中のこれらフタル酸モノエステル類分析法を検討した。

B. 研究方法

B-1 試薬及びモノフタル酸エステル標準液

フタル酸モノブチル(以下 MBP)、フタル酸モノベンジル(MBzP)及びフタル酸モノ-2-エチルヘキシル(MEHP) (Fig. 1)、また各測定対象物の重水素化体である MBP-d4, MBzP-d4 及び MEHP-d4 は林純薬工業社製環境分析用を用いた。フタル酸ジブチル(以下 DBP)、フタル酸ブチルベンジル(BBzP)及びフタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)は関東化学社製フタル酸エス

テル試験用を使用した。移動相等に使用したギ酸、アセトニトリルは和光純薬工業社製試薬特級を用い、前処理等に使用したメタノール、2-プロパノールは和光純薬工業社製残留農薬試験用 300 とした。使用した超純水は、ミリポア社製 milliQ gradient A10 システムで精製したもの(>18.0M Ω)を用いた。

MBP, MBzP, MBP-d4 及び MBzP-d4 の標準溶液は、1000ng/mL 濃度で水に溶解した標準原液を各種濃度に水で希釈した。また MEHP, MEHP-d4 はメタノールに溶解し、順次水で希釈して用いた。DBP, BBzP は 1000ng/mL 濃度でメタノールに溶解し、DEHP は 1000ng/mL 濃度で 2-プロパノールに溶解し、順次水で希釈して用いた。

前処理法の諸検討に用いた血清は、乾燥プール血清(日水社製)とした。また、酵素分解挙動を検討するためのプロテインキナーゼ K は、32.2u/mg DW (フナコシ社製)力価を使用した。

B-2 装置及び器具

液体クロマトグラフィー/質量分析計(LC/MS)は、島津社製 LCMS-2001 システムを用いた。データ処理に関しては、LCMSsolution for Win. により、行った。

B-3 LC/MS 測定条件

LC 測定条件：測定用分離カラムは、GL サイエンス社製 Inertsil ODS-3(内径 4.6mm×100mm, 粒子径 3 μ m)を用い、移動相【0.05%ギ酸/アセトニトリル混液(50/50)を 2 分間送液後、1 分間かけてアセトニトリル濃度を 55%とし、さらに 7 分まで 90%としたグラジェント送液】1.0mL/min の流量で測定を行った。また、カラム温度は 40 $^{\circ}$ C に設定し、サンプル注入量は

50^oLとした。

MS測定条件:本測定においてのイオン化法は、大気圧化学イオン化法のネガティブモードで行った。ネブライザーガスはN₂を2.5mL/minとし、プローブ電圧を-4.0kVとした(プローブ電流-33.0^oA)。

各種フタル酸エステル類の検出イオンモニタリングを以下に記載した条件でSIMモード定量を実施した。

MBP	: m/z=221
MBP-d4	: m/z=225
MBzP	: m/z=255
MBzP-d4	: m/z=259
MEHP	: m/z=277
MEHP-d4	: m/z=281

B-4 前処理法の検討

ヒトプール血清を用いて前処理法を検討した。血清3mLに各標準の重水素化体を100, 50, 10ng/mL濃度で加え、逆相モード、陰イオン交換の二種のカートリッジを用いて固相抽出法を行った。Waters社製OASIS HLB(1mL/30mg)は、メタノール(1mL)、水(3mL)でコンディショニングし、血清(1mL)負荷後、10%メタノール(1mL)で洗浄後、メタノール(2mL)で溶出し、窒素気流下で濃縮後200^oLとしてLC/MSで分析した。OASIS MAX(1mL/30mg)は、0.1%ギ酸/メタノール(1mL)、水(3mL)でコンディショニングし、血清(1mL)負荷後、10%メタノール(1mL)で洗浄後、0.1%ギ酸/メタノール(3mL)で溶出し、窒素気流下で濃縮後200^oLとしてLC/MSで分析した。

C. 研究結果

C-1 LC/MSの測定検討

上記のLC/MS測定条件において、各

標品試料溶液を分析した際、保持時間(保持時間のRSD)、検量線の直線性及び検出限界(S/N=3)は、以下のように良好な結果となった。

MBP	: 4.1分(RSD=1.3%), 10~1000ng/mL (r=0.998), 検出限界5.0ng/mL
MBzP	: 4.5分(RSD=1.4%), 10~1000ng/mL (r=0.997), 検出限界5.0ng/mL
MEHP	: 7.5分(RSD=0.7%), 3~1000ng/mL (r=0.999), 検出限界1.0ng/mL

Fig. 2に100ng/mLの標準試料溶液のSIMクロマトグラムを示す。

C-2 ヒト血清における添加回収の検討

市販されているヒトプール血清を用い、構築した測定法により、各種フタル酸エステル類を分析した際、MBP(21.5ng/mL)、MBzP(25.2ng/mL)及びMEHP(268.9ng/mL)が高濃度で検出された(Fig. 3)。そのため、通常の標準試料溶液添加による前処理検討は、困難と考えられた。そこで、フタル酸モノエステル類の重水素化体を用いて添加回収試験を実施した。

(Table 1, Fig. 4)。陰イオン交換モードタイプ(OASIS MAX)と逆相モードタイプ(OASIS HLB)において回収率と再現性に関して、検討した結果、いずれも良好な結果が得られた。一方、クリーンアップ効果に関しては、PDAクロマトグラムで比較した場合、イオン交換モード用固相充填による処理では、夾雑ピークが少なく、よりMSのイオン化効率をあげるためには、本法が適していると推測される。そこで、本前処理においては、イオン交換モー

ドタイプを用いることにした。

C-3 ヒト血清酵素による影響

血清中にはリパーゼやエステラーゼ等の酵素が存在する。そのため、血液試料採取時に、フタル酸ジエステル類が混入し、モノエステル体へと代謝変換する可能性が考えられる。そこで、血清中にジエステル体を添加し、種々の条件でその代謝変換を検討した。その際、血清中に含まれるモノエステル体との区別のため、試薬はジエステルの d4 体混合 (DBP-d4, BBzP-d4, DEHP-d4) とし、1000ng/mL 濃度で添加し、変化したモノエステル体を d4 体として測定することとした。結果を Fig. 6-1 に示す。

A のクロマトグラムは、ブランクとして標準試料無添加のものである。いずれの重水素化体モノフタル酸エステル類は不検出である。

B においては、ヒト血清に標準試料添加後ただちに構築した測定法により、測定した結果である。いずれも不検出であった。

C においては、ヒト血清に標準試料添加後、室温で一時間放置後、測定を行った。その結果、DBP 及び DBzP の代謝分解が観察された。

D においては、37°Cで一時間インキュベーションした後、測定した。その結果、C 同様 DBP 及び DBzP の分解が観測された。

E においては、ヒト血清にプロテインキナーゼ K を加え、80°Cで一時間インキュベーションし、血清中の酵素を失活させた後、d4-ジエステル混合標準溶液を添加し、37°Cで一時間インキュベーションした後、測定した。その結果、モノエステル体は確認されなかった (Fig. 6-2)。

以上の結果より、ヒト血清内に含まれる酵素により、ジエステル体が代謝分解され、モノエステル体へ変換される可能性が示唆された。

C-4 実試料 (血清と腹水) の分析

本法を腹水と血清の測定に応用した。本研究において使用する生体試料は、平成 10 年度厚生科学研究 (生活安全総合研究事業) の「内分泌かく乱化学物質の胎児、成人等の暴露に関する調査研究」において“内分泌かく乱化学物質調査研究に最適な生体試料採取系・基礎的実験系の構築—試料採取系 (実験系) の汚染除去”において詳細に検討を重ねたものである。

2 種 5 サンプルにおいて MBP, MBzP は認められなかった。また、MEHP は N.D. ~28.8ng/mL であった。(Table 2)

D. 考察

本法の特徴は、生体試料中から非常に簡便なサンプル調製法により、フタル酸モノエステル類を抽出し、LC/MS で測定することで、選択性が高く迅速な分析を可能とした。また、測定環境下等からのジエステル体の混入により、モノエステル体が実際の暴露量よりも、多く検出する恐れがあることをみだし、生体試料採取に十分な注意が必要であることを確認した。

本法を用いて、生体試料中にフタル酸モノエステル類の動態を解明することが可能となり、ヒト健康影響を評価する上で有用な手段となることが期待される。

E 参考文献

- 1 J. Doull, R. Cattley, C. Elcombe, B. G. Lake, J. Swenberg, C. Wilkinson, G. Williams, M van Gemert, application of the new

- U.S. EPA Risk Assessment Guidelines. Regul Toxicol Pharmacol, 29, 327-357 (1999)
- 2 M. Ema, H. Amano, T. Itami, H. Kawasaki, Toxicol Lett, 69, 197-203, (1993)
 - 3 M. Ema, T. Itami, H. Kawasaki, Toxicology 79, 11-19 (1993)
 - 4 K. Shiota, M. J. Chou, H. Nichimura, Environ. Res. 22, 245-253 (1980)
 - 5 P. M. Foster, L. V. Thomas, M. W. Cook, S. D. Gangolli, Toxicol. Appl. Pharmacol., 54, 392-398, (1980)
 - 6 J.J Heindel, C. J. Powell, Toxicol. Appl. Pharmacol., 115, 116-123, (1992)
 - 7 T. J. Gray, J. A. Beaman, *Food Chem. Toxicol.*, 22, 123-131 (1984)
 - 8 M. Ema, A. Harazono, E. Miyawaki, Y. Ogawa, *Toxicol Lett*, 86, 116-123, (1996)
 - 9 L. E. Glay, C. Wolf, C. Lambright, P. Mann, M. Price, R. L. Cooper, J. Ostby, *Toxicol. Ind. Health.*, 15, 094-118 (1999)
- plasma.” , Kayoko Kato, Yoshihiro Yoshimura, Yuko Ito , Hisao Oka , Hiroyuki Nakazawa .

F. 研究業績

1. 日本薬学会第121年回 “HPLC/PDAによる生体内フタル酸モノエステル類の分析” 加藤嘉代子, 荘田 祥子, 吉村吉博, 中澤裕之(星薬大), 伊藤裕子, 岡 尚男(愛知衛研)
2. PITCON 2001, New Orleans, USA
“Determination of metabolites of the plasticizer (di(2-ethylhexyl) phthalate, dibutyl phthalate and butylbenzyl phthalate) in human

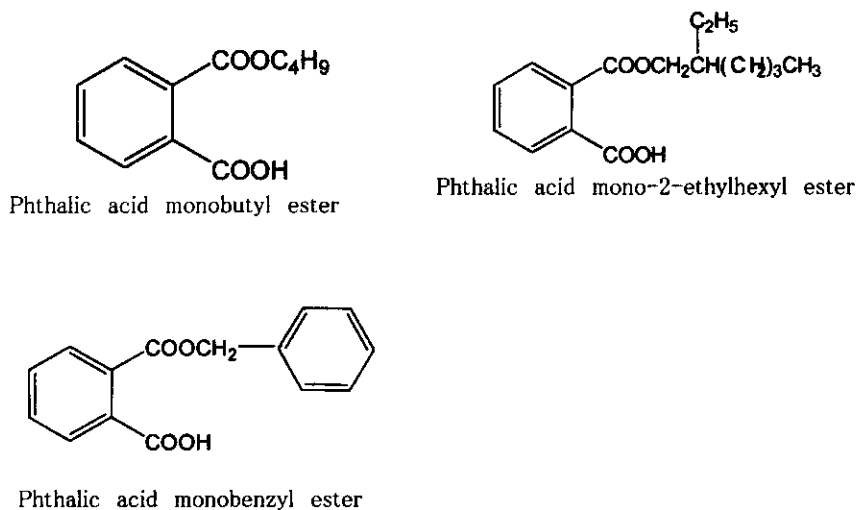


Fig.1 Chemical structures of mono ester phthalates

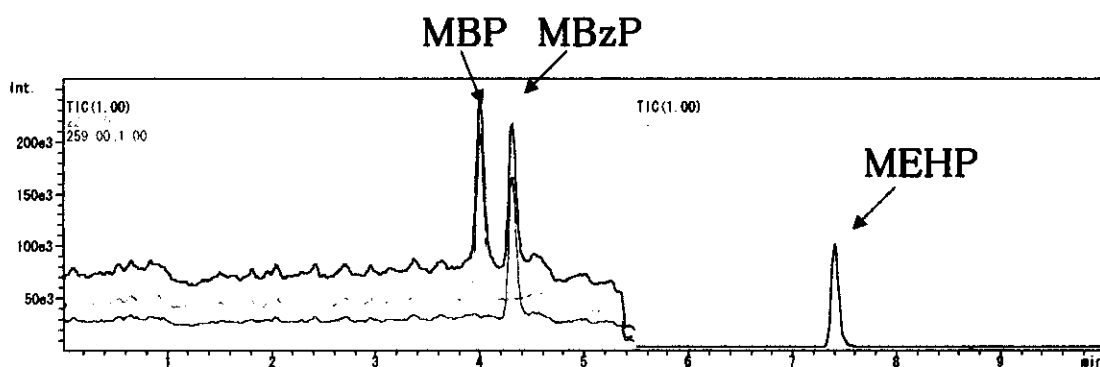


Fig.2 SIM Chromatograms of mono ester phthalate standards
(Standards conc. 100ng/mL)

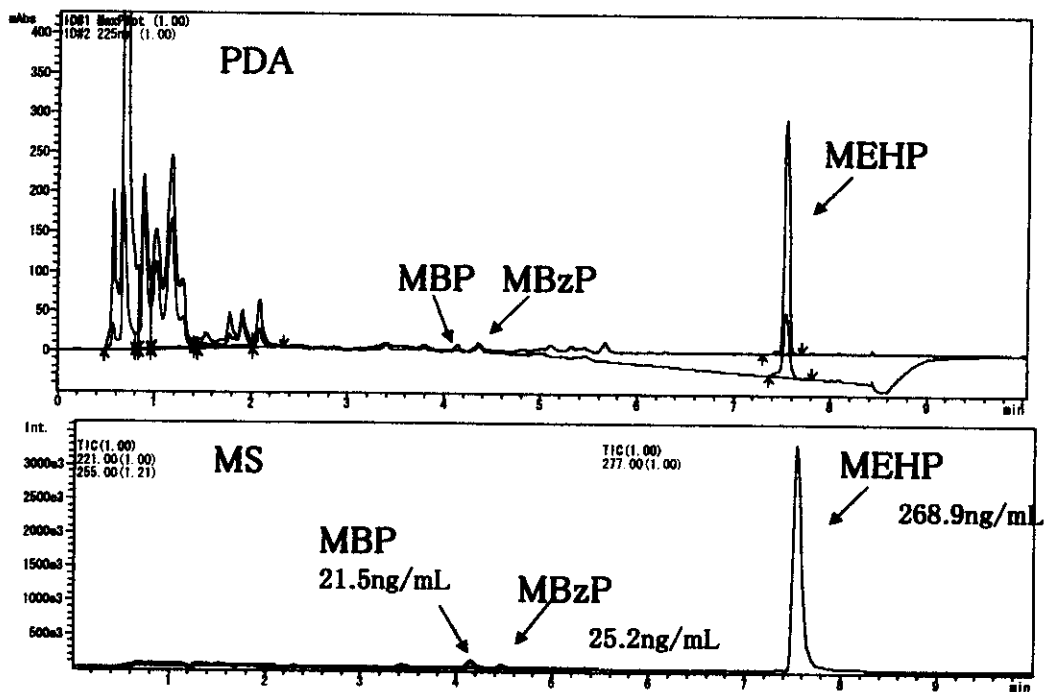


Fig.3 PDA and MS chromatograms of human pool serum

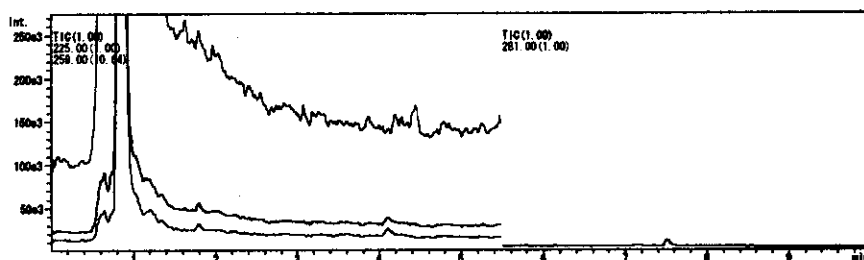


Fig.4 SIM chromatogram of human serum
addition of standards 10ng/mL

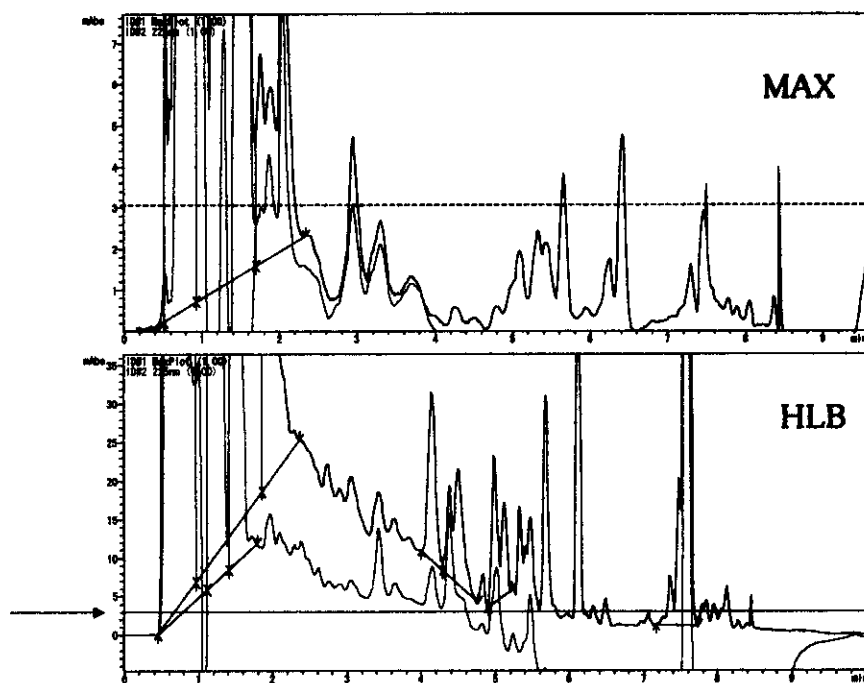


Fig.5 Comparison of HLB and MAX by PDA chromatograms

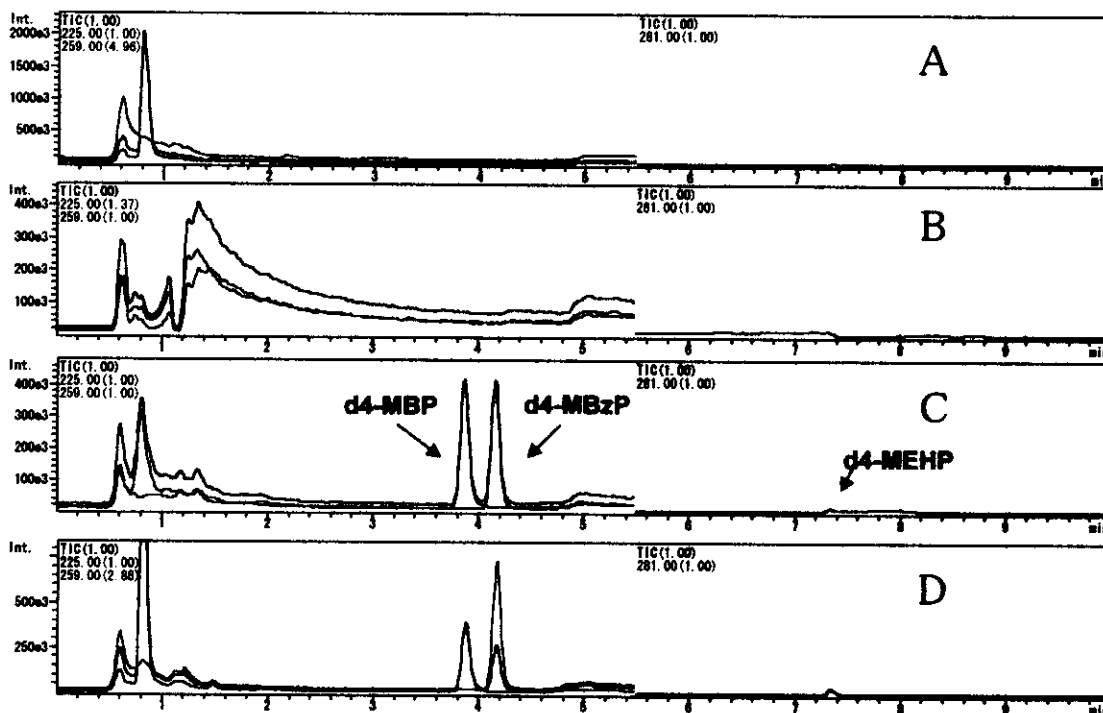


Fig.6-1 Effect of the enzyme in human serum on metabolic transformation of diester phthalates
 A: serum, B: serum+1ppm d4-diester phthalate,
 C: serum+1ppm d4-diester phthalate (room temp., 1h),
 D: serum+1ppm d4-diester phthalate (37°C, 1h)

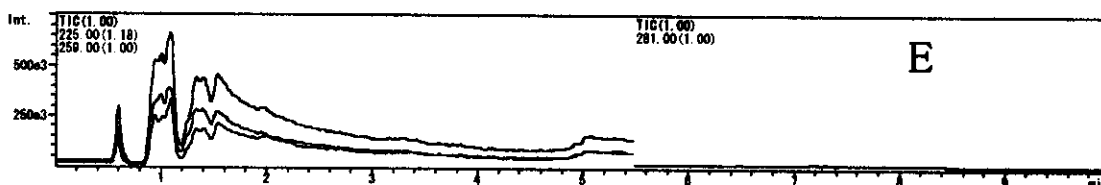


Fig.6-2 Effect of the protein kinase K on metabolic transformation of diester phthalates

E: serum+ protein kinase K (80°C, 1h)
 +
 1ppm d4-diester phthalate (37°C, 1h)

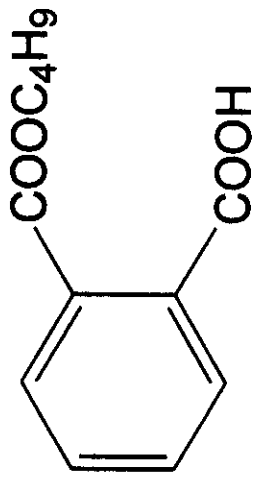
Table 1 Recovery test of mono ester phthalates from human serum

		Add (ng/mL)	MBP Recovery	MBzP (%) / RSD	MEHP (%)
Oasis	HLB	100	95.4/7.8	92.8/5.0	92.5/4.2
		10	85.5/13.6	82.8/10.5	80.3/7.3
Oasis	MAX	100	90.8/8.8	90.5/6.8	79.8/8.2
		50	89.9/7.5	84.9/9.2	83.6/7.9
		10	89.3/12.8	80.3/10.8	85.9/10.5

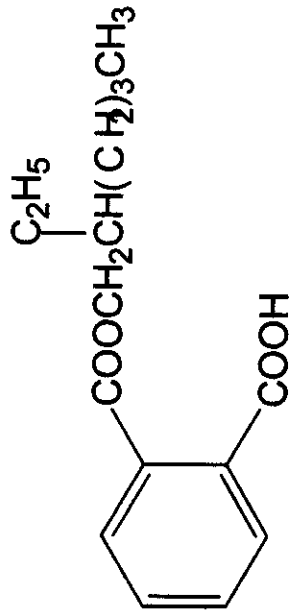
(N=4)

Table2 Determination of mono ester phthalates
in the serum and the ascites

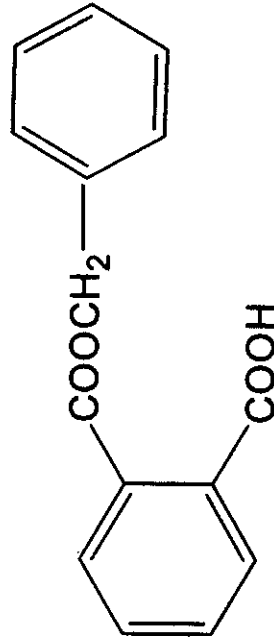
ng/mL	MBP	MBzP	MEHP
97 serum	N.D.	N.D.	trace
98 serum	N.D.	N.D.	2.6
98 ascites	N.D.	N.D.	3.3
99 serum	N.D.	N.D.	28.8
99 ascites	N.D.	N.D.	18.8



Phthalic acid monobutyl ester



Phthalic acid mono-2-ethylhexyl ester



Phthalic acid monobenzyl ester

Fig.1 Chemical structures of mono ester phthalates

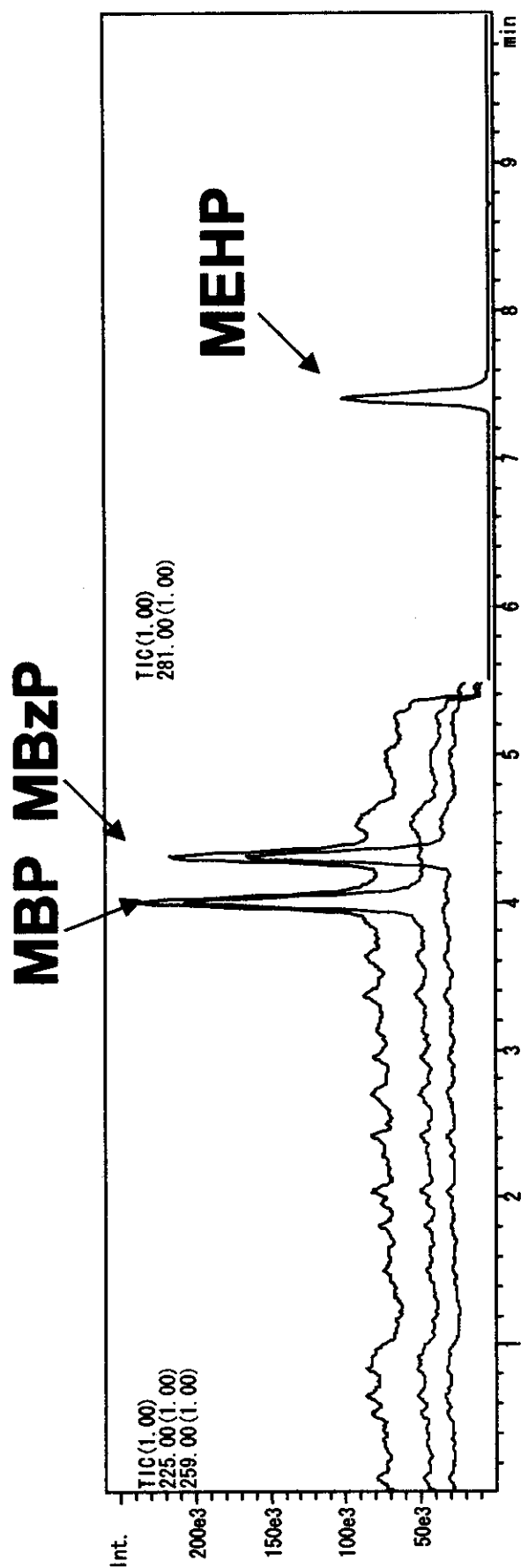


Fig.2 SIM Chromatograms of mono ester phthalate standards
 (Standards conc. 100ng/mL)

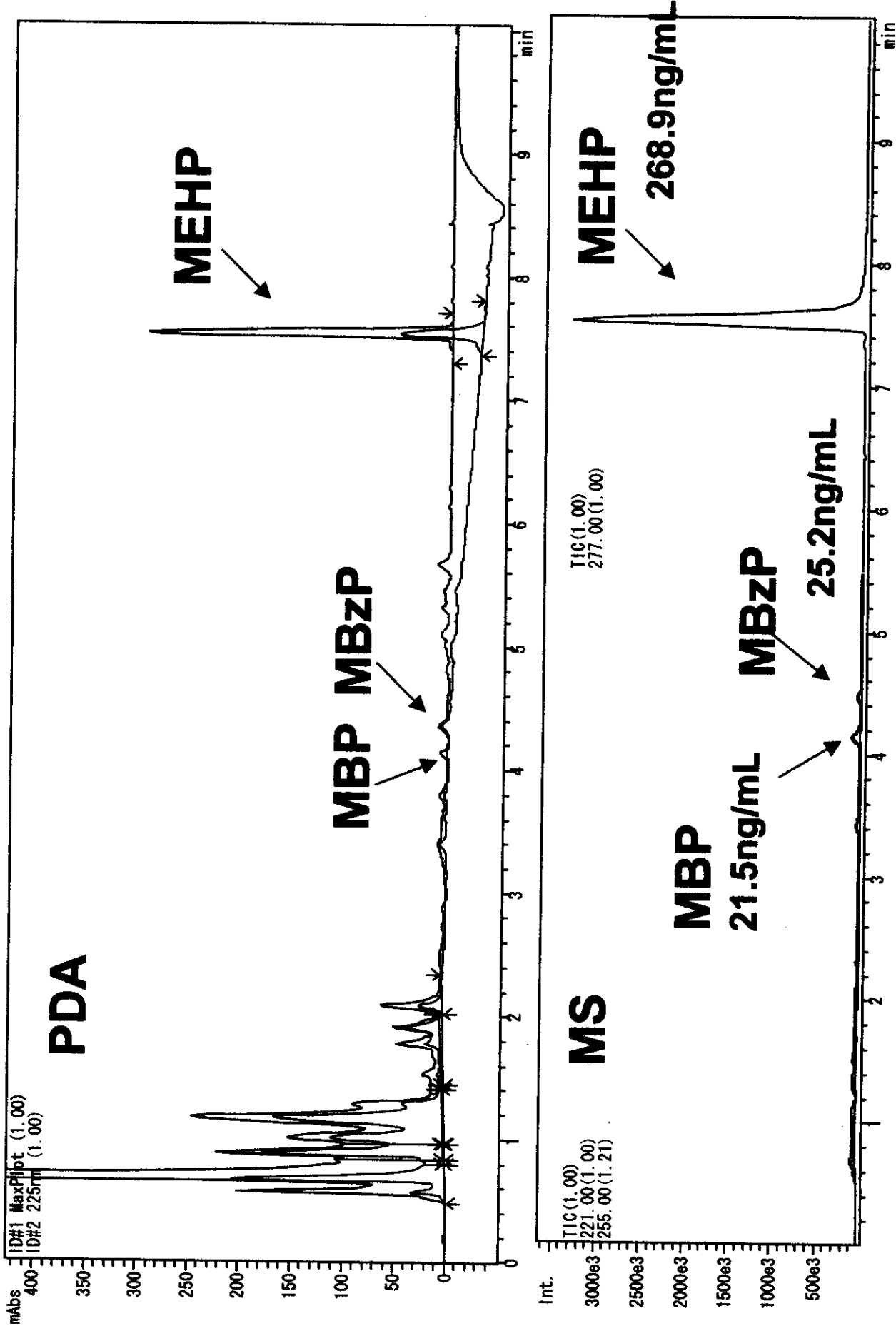


Fig.3 PDA and MS chromatograms of human pool serum

Table 1 Recovery test of mono ester phthalates from human serum

	Add (ng/mL)	MBP Recovery %	MBzP / RSD	MEHP %
Oasis HLB	100	95.4/7.8	92.8/5.0	92.5/4.2
	10	85.5/13.6	82.8/10.5	80.3/7.3
Oasis MAX	100	90.8/8.8	90.5/6.8	79.8/8.2
	50	89.9/7.5	84.9/9.2	83.6/7.9
	10	89.3/12.8	80.3/10.8	85.9/10.5

(N=4)