

表3 豚血清中のビスフェノールAの測定結果

検査機関	Bisphenol A (ppb)			
	Sample 1(Free)	Sample 1(Total)	Sample 2(Free)	Sample 2(Total)
A	-	<1.0	-	10.6
	-	<1.0	-	9.2
	-	<1.0	-	8.8
B	<0.2	<0.2	11.2	10.1
	<0.2	<0.2	10	10.8
	<0.2	<0.2	10.6	10.4
C	<0.2	<0.2	9.7	9.2
	<0.2	<0.2	9.5	9.5
	<0.2	<0.2	9.3	9.8
			10.05 ± 0.72	9.82 ± 0.69
			RSD = 7.2%	RSD = 7.0%

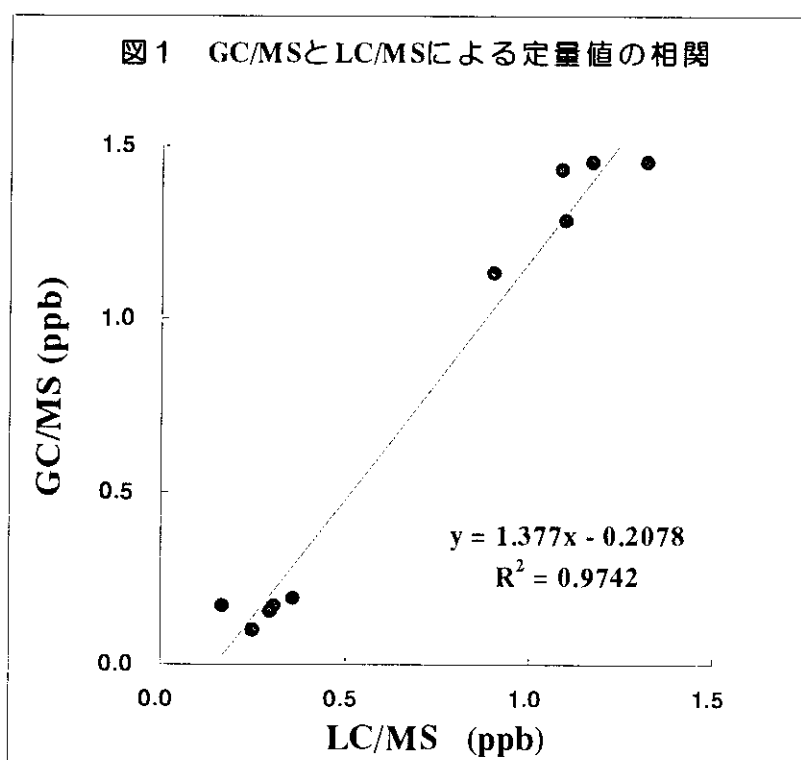
表4 ビスフェノールAの推定曝露量

	分析値(ppb)	平均値	尿量(mL)	BPA排泄量(ng)
長野(n=30)	0.10-1.45	0.59	1,460	905
埼玉(n=7)	0.31-1.73	0.74	1,110	821
	50.8 ¹⁾	-	980	49,784

1) 埼玉7例中、1例が高濃度レベルであった。

・BPAの平均一日排泄量 約1 μg

・EUにおけるBPA暫定TDI(0.01mg/kg/day)→500 μg/人/日



平成 15 年度 厚生労働科学研究(化学物質リスク研究事業)
試料分析の信頼性確保と生体暴露量のモニタリングに関する研究

『生体試料中化学物質の分析に関するガイドラインの作成
及び分析法のクロスチェック』

主任研究者

東海大学 医学部 専門診療学系産婦人科学部門 牧野 恒久

分担研究者

星薬科大学 薬品分析化学教室 中澤 裕之

研究協力者

東海大学 医学部 専門診療学系産婦人科学部門 和泉 俊一郎

星薬科大学 薬品分析化学教室 吉村 吉博

星薬科大学 薬品分析化学教室 井之上 浩一

星薬科大学 薬品分析化学教室 伊藤 里恵

星薬科大学 薬品分析化学教室 川口 研

星薬科大学 薬品分析化学教室 瀬下 文恵

星薬科大学 薬品分析化学教室 山崎 晴子

株式会社エスアールエル 医科学分析センター 太刀野 寿志

株式会社エルアールエル 医科学分析センター 宮川 秀則

株式会社東レリサーチセンター 環境分析研究部 中島 信行

株式会社東レリサーチセンター 環境分析研究部 大久保 賢治

神奈川県衛生研究所 理化学部 平山 クニ

神奈川県衛生研究所 理化学部 藤巻 照久

研究要旨

内分泌かく乱化学物質として疑われるノニルフェノールの環境及び生体への汚染は広く進行している。ヒト生体試料中のガイドライン作成を目指し、前年度までに構築したノニルフェノールの分析法のバリデーションを外部委託機関に依頼してクロスチェックを行った。試料にはブタ血清を用い、添加回収試験を行った。その検討には、内標準物質として、4-(1-メチル)オクチルフェノール-d₅を使用した内標準法を用いた。その結果、同様の測定条件で分析を行った 2 機関における平均回収率が 133.2 % (RSD<10.1 %) と良好な結果が得られた。

A.研究目的

4-ノニルフェノール(NP)は、環境を汚染し、生体への暴露を進行させていると

して、近年その汚染実態や生体暴露が注目され、NP の分析法が数多く報告されている。その分析対象とする試料は、

環境試料から生体試料まで幅広く、分析法についても、ELISA 法¹⁾、GC/MS 法²⁾、LC/MS 法³⁾など、種々の方法が報告されている。今後、全国的な汚染実態及び暴露調査を行う上でも、その分析法のバリデーション、精度管理が必要不可欠になっている。

また、ノニルフェノールによる環境汚染は広範囲に進行していると予想される。今後は全国各地の測定施設におけるノニルフェノール測定の必要性が示唆される。その分析法としては、高精度かつ再現性に優れた分析法でなければならない。そこで、本研究においては、前年度までに構築した血清中のノニルフェノールの分析法のバリデーションの一つとして、外部委託機関によるクロスチェックを行った。

これまでに構築した方法は、環境中からのコンタミネーション⁴⁾を低減するために、前処理をカラムスイッチング法によるオンライン固相抽出法を利用し、LC/MS による分析法であり、3機関による添加回収試験のクロスチェックもカラムスイッチング LC/MS 法により行った。また、高精度な分析法とするために、内標準法を選択した。

B. 研究方法

B.1. 試薬・装置

【試薬】ノニルフェノール(NP)は、環境分析用試薬(関東化学社製)を使用した。内標準物質として用いた 4-(1-メチル)オクチルフェノール-d₅(NP-d₅)は、環境分析用試薬(林純薬社製)を用いた。それぞれの構造式を図 1 に示す。

【溶媒】

LC/MS の移動相に使用したアセトニトリルは和光純薬社製 HPLC 用を、酢酸アンモニウムは和光純薬社製特級を選択した。また、前処理に利用した溶媒は、全て和光純薬社製残留農薬用を使用した。精製水は日本ミリポア社製 Milli-Q (EDS ポリッシャー付き)で精製した水を使用した。

【実験用器具】

ガラス製の実験器具は、すべて 200℃以上で加熱後使用した。

【LC/MS 装置及び測定条件】

LC/MS 装置 (機種: Agilent 1100 LC/MSD-SL)

LC 条件

- ・分析用カラム: 関東化学社製 Mightysil RP18 GP (2.1 x 100 mm, 5 μm)
- ・ガードカラム: 関東化学社製 Mightysil RP18 GP (2 x 5 mm, 5 μm)
- ・前処理用カラム: TOSOH 社製 TSK-PRECOLUMN BSA-ODS/S (4.6 x 10 mm, 5 μm)
- ・移動相: アセトニトリル + 0.02 % 酢酸アンモニウム / 0.02 % 酢酸アンモニウム 溶液 (70:30 (8 min) → 95:5 (10 min) (V/V))

- ・流速: 0.2 ml/min (分析カラム)
0.5 ml/min (前処理カラム)

- ・カラム温度: 40 °C

- ・注入量: 30 μl

MS 条件

- ・イオン化法: Electrospray (ESI), Negative

- ・Nebulizer gas: N₂ (35 psi)

- ・ Drying gas: N₂ (12 l/min, 350 °C)
- ・ フラグメンター電圧: 130 V (NP, NP-d₅)
- ・ モニタリングイオン (*m/z*): 219 (NP), 224 (NP-d₅)

B.2. オンライン前処理-LC/MS 法の測定概要

血清試料(ブタ)に同量のアセトニトリルを加え、遠心分離を行った。その後、上清を取り、暫定濃度になるように内標準物質を添加し、測定用試料とした。抽出精製・濃縮は、オンライン前処理固相カラムを用いて行い、カラムスイッチングにより、分析対象物質を分離部及び検出部(LC/MS)に導入する。検出には、ESI-MS による SIM モードネガティブで測定を実施した。

測定試料の調製法

測定対象としたブタ血清は神奈川県食肉衛生検査所にてした屠殺したブタ血液を用い、神奈川県衛生研究所で遠心分離(3000 rpm, 10 分間)を行い、使用に供するまで-80°Cにて凍結保存した。測定時には室温解凍し、転倒混和を行った後に、ピペッターで正確に1 ml を量り取り、試験管に移した。この試験管は、あらかじめ洗浄後に精製水、アセトンを通液したものを使用した。血清が入った試験管に標準溶液を血清中 50 µg/ml となるように添加した。次に、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°C)を行った。その後、上清 1 ml をバイアル瓶に正確に量り取り、暫定濃度になるように内

標準物質である、NP-d₅ を加え、測定に供した。

標準試料の調製法

各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、標準原液としてアセトニトリルで 1.0 mg/ml とする。その後、0.2~100 µg/ml の濃度範囲になるようにアセトニトリル/水=1/1(V/V)溶液を加え調製する。又、内標準物質を暫定濃度になるよう希釈する。

その後、LC/MS-SIM 法により標準試料溶液を測定し、内標準法を用いて各濃度範囲内における検量線を作成し、定量分析を行った。

C. 研究結果

C.1. オンライン抽出-LC/MS 法による分析法の検討

前年度までに構築した分析法による最適分析条件を表 1 に示す。本研究に使用可能な分析装置の現状を考慮し、再度、移動相の条件検討を行った(図 2)。また、システム装置を図 3 に示す。ブタ血清試料に標準溶液を添加後、その回収率を求めた結果、119.6~126.0 % (RSD < 2.7 %, n=3)であった(表 2)。また、添加回収実験におけるクロマトグラムを図 4 に示す。本法による検出限界(S/N > 3)及び定量限界(S/N > 10)は、それぞれ 0.2, 1 ng/ml であった。

C.2. 外部委託機関による分析法の構築及びバリデーション

試料調製後にサンプルバイアル瓶に入れた標準溶液及び血清を外部委託

(株式会社エスアールエル及び株式会社東レリサーチセンター)2機関に送付し、施設間誤差を検討した。できる限り同様の条件で行うために、分析シーケンスや測定モードを統一して行った。LCにおける移動相のグラジエントプロファイル及び移動相に添加する酢酸アンモニウムの濃度等は分析する装置の最適化に大きな影響を及ぼすため、各装置における最適化を行った。他の2機関で使用した装置及びその最適分析条件を表3に示す。また、分析シーケンスを表4に示す。

D.結果及び考察

オンライン前処理-LC/MS法で、統一シーケンスにより測定した3機関の結果を一覧で示す(表5)。その結果、B、C機関でほぼ同様の結果が得られた。A機関においては前処理カラムに除タンパク機能を持たないカラムを使用したために、他機関と異なる結果が得られたものと考えられる。B、C機関の添加回収試験の結果を比べてみると、平均回収率が133.2%、RSD<10.1%であった。内標準法を採択しているにもかかわらず、回収率が100%を超える原因としては、前年度に報告したように、ノニルフェノールの内標準物質として、4-(1-メチル)オクチルフェノール-d₅を使用しているために、イオン化効率や挙動がノニルフェノールと異なることが考えられた。

以上の結果より、感度及び精度がほぼ同等の複数施設間による施設間差としてのクロスチェックにより、本法の精度管理が可能であった。今後は各施設での測定においては、本法を用いることで、

正確な測定ができると思われる。

E.参考文献

- 1) J. Zeravik, K. Skryjová, Z. Nevoranková and M. Fránek, Development of direct ELISA for the determination of 4-nonylphenol and octylphenol., *Anal. Chem.* 76, (2004) 1021-1027
- 2) M. Kawaguchi, K. Inoue, N. Sakui, R. Ito, S. Izumi, T. Makino, Stir bar soptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for the measurement of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in human biological samples., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 799(1), (2004) 119-125
- 3) H. Narasaki, Determination of 4-nonylphenol in river-water samples by LC/MS using solid-phase sorbents., *Bunseki Kagaku* 52(8), (2003) 627-634
- 4) 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)

F.発表

発表論文

- 1) Koichi Inoue, Yoshihiro Yoshimura, Tsunehisa Makino and Hiroyuki 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) Koichi Inoue, Sachiko Kondo, Yuriko Yoshie, Kayoko Kato, Yoshihiro Yoshimura, Masakazu Horie and Hiroyuki Nakazawa “Migration of 4-nonylphenol from polyvinyl chloride films for food-wrapping into food simulants and foods.” *Food Additives & Contaminants* 18, 157-164 (2001)

- 3) Koichi Inoue, Migaku Kawaguchi, Fumio Okada, Natsuko Takai, Yoshihiro Yoshimura, Masakazu Horie, Shun-ichiro Izumi, Tsunehisa Makino and Hiroyuki Nakazawa “Measurement of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in human urine by column-switching liquid chromatography-mass spectrometry” *Analytica Chimica Acta* 486, 41-50 (2003)

表 1 LC/MS の最適分析条件

System	LC	Agilent 1100 series
	MS	Agilent 1100 series LC/MSD-SL
Extraction	前処理カラム	BSA-ODS/S (4.6 x 10 mm, 5 μ m)
	CS 用移動相	10 % Methanol
	CS 用流速	0.5 ml/min
	バルブスイッチ時間	5 min (Configuration A \rightarrow Configuration B)
Determination (LC parameter)	分離カラム	mightysil RP18GP (2.1 x 100 mm, 5 μ m)
	移動相 (A)	0.02 % Ammonium acetate in water
	移動相 (B)	0.02 % Ammonium acetate in Acetonitrile
	組成比率(A:B)	30:70 (0 min) \Rightarrow 30:70 (8 min) \Rightarrow 5:95 (10 min) \Rightarrow 5:95 (20 min)
	分析時間	25 min
	流速	0.2 ml/min
	カラム温度	40 $^{\circ}$ C
	注入量	30 μ l
Determination (MS parameter)	イオン化法	ESI
	検出モード	ネガティブ
	検出イオン	<i>m/z</i> 219 (NP), 224 (NP-d ₅)
	測定モニタリング	SIM
	Fragmentor voltage	130 (NP, NP-d ₅)
	Capillary voltage	3500 V
	Nebulizer	N ₂ (35 psi)
	Drying gas	N ₂ (12 l/min, 350 $^{\circ}$ C)

表 2 添加回收試驗結果

	(µg/ml)		(%)		S.D.	R.S.D.
	Spiked amount	Detect	Recovery	Recovery average		
NP	25	29.9	119.6		3.2	2.6
		31.5	126.0	122.8		
		30.7	122.8			

Background levels in unspiked serum can be neglected (S/N < 3)

表 3 外部委託機関での装置及び分析条件

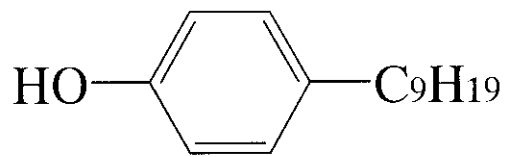
		機関	
		A	B
System	LC	Agilent 1100 Series	Shimadzu LC-10Avp
	MS	Micromass Quattro Ultima	Thermo Electoron LC-MS/MS TSQ-7000
Determination (LC parameter)	分離カラム	ODS-3 (2 x 250 mm, 5 µm)	mightysil RP18GP (2.1 x 100 mm, 5 µm)
	移動相(A)	0.1mmol/L Ammonium acetate in water :Acetonitrile(13:87)	0.02 % Ammonium acetate in water
	移動相(B)	-	0.02 % Ammonium acetate in Acetonitrile
	組成比率	-	A:B= 30:70 (0min) ⇒ 30:70 (8min)⇒ 5:95 (15min)
	分析時間	20 min 平衡化 10min	25min 平衡化 5min
Extraction	流速	0.2 ml/min	0.21 ml/min
	カラム温度	40℃	室温
	注入量	50µl	30µl
	前処理カラム	mightysil RP18 (2.1 x 50 mm, 5 µm)	BSA-ODS/S (4.6 x 10 mm, 5 µm)
	CS 用移動相	0.1 mmol/L Ammonium acetate in water :Acetonitrile (3:7)	10% Methanol
	CS 用流速	0.2 ml/min	0.5 ml/min
	バルブ	3.5~6.5 min	5 min
	スイッチ時間		
Determination (MS parameter)	イオン化法	ESI	ESI
	検出モード	ネガティブ	ネガティブ
	検出イオン	<i>m/z</i> 219 (NP) 224 (NP-d ₅)	<i>m/z</i> 219 (NP) 224 (NP-d ₅)
	モニタリング	SIM	SIM (Q1)
	Cone voltage	65 V (NP, NP-d ₅)	

表 4 NP 測定における注入プログラム

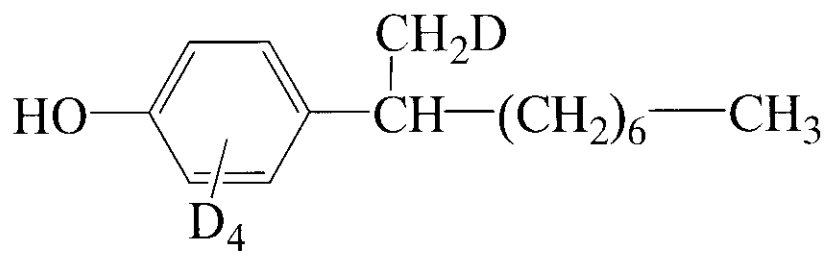
ライン	サンプル
1	MeOH
2	water
3	0.2ppb NP
4	0.5ppb NP
5	1ppb NP
6	2ppb NP
7	5ppb NP
8	10ppb NP
9	20ppb NP
10	50ppb NP
11	100ppb NP
12	MeOH
13	water
14	操作ブランク
15	操作ブランク
16	ブタ血清 ブランク A
17	MeOH
18	ブタ血清 ブランク B
19	MeOH
20	ブタ血清 標準品添加 A
21	MeOH
22	ブタ血清 標準品添加 B
23	MeOH
24	ブタ血清 標準品添加 C

表 5 各機関の NP のバリデーションデータ及び検出結果

		A	B	C	
精製水 (ppb)	検出限界	0.2	1	0.2	
	定量限界	1	5	1	
	検量線範囲	1-100	5-100	1-100	
	直線性 (r^2)	0.999	0.994	0.999	
	操作ブランク (ppb)	ND	ND	ND	
	試料必要量 (ml)	1	1	1	
ブタ 血清 (ppb)	試料ブランク A	2.5	ND	ND	
	試料ブランク B	2.0	ND	ND	
	添加試料 A	22.1	37.9	29.9	
	添加試料 B	26.1	32.9	31.5	
	添加試料 C	24.2	36.9	30.7	
		Detect average (ppb)	24.1	33.3	
		Recovery average (%)	96.5	133.2	
	SD (%)	2.0	3.3		
	RSD (%)	8.3	10.0		



ノニルフェノール



4-(1-メチル)オクチルフェノール-d₅

図1 ノニルフェノール及び4-(1-メチル)オクチルフェノール-d₅の構造式

【酢酸アンモニウム濃度の検討】

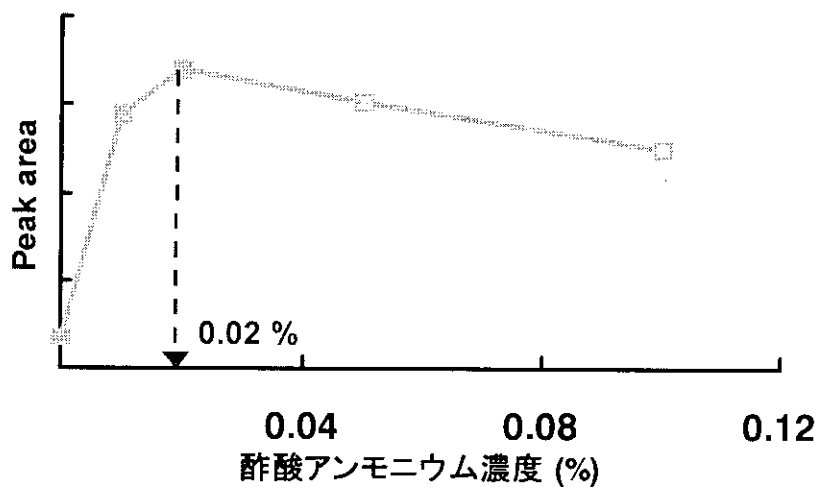
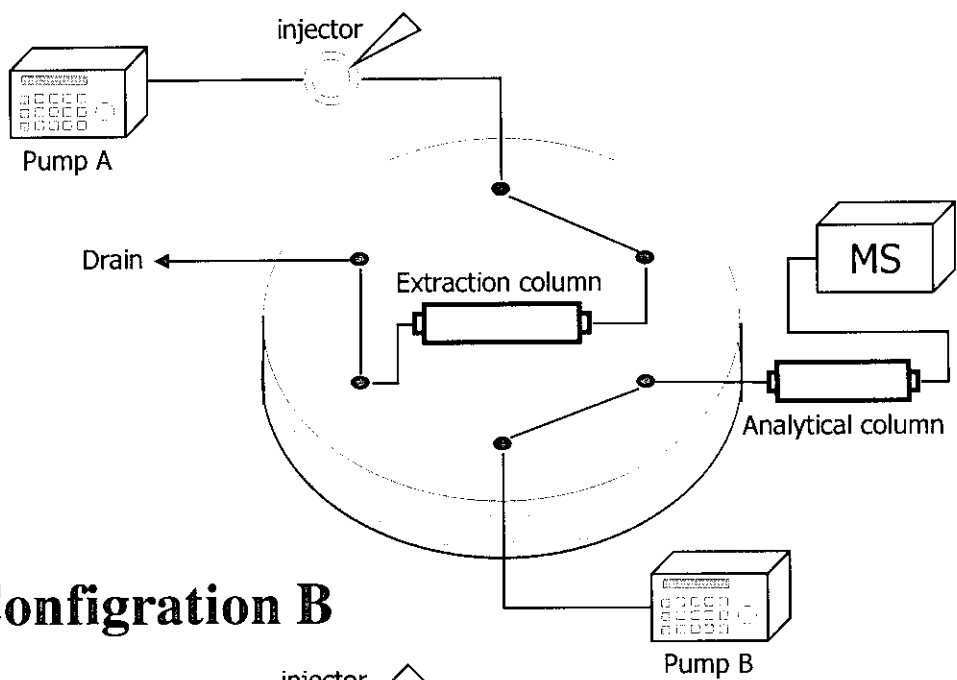


図 2 移動相に添加する酢酸アンモニウムの検討

Configuration A



Configuration B

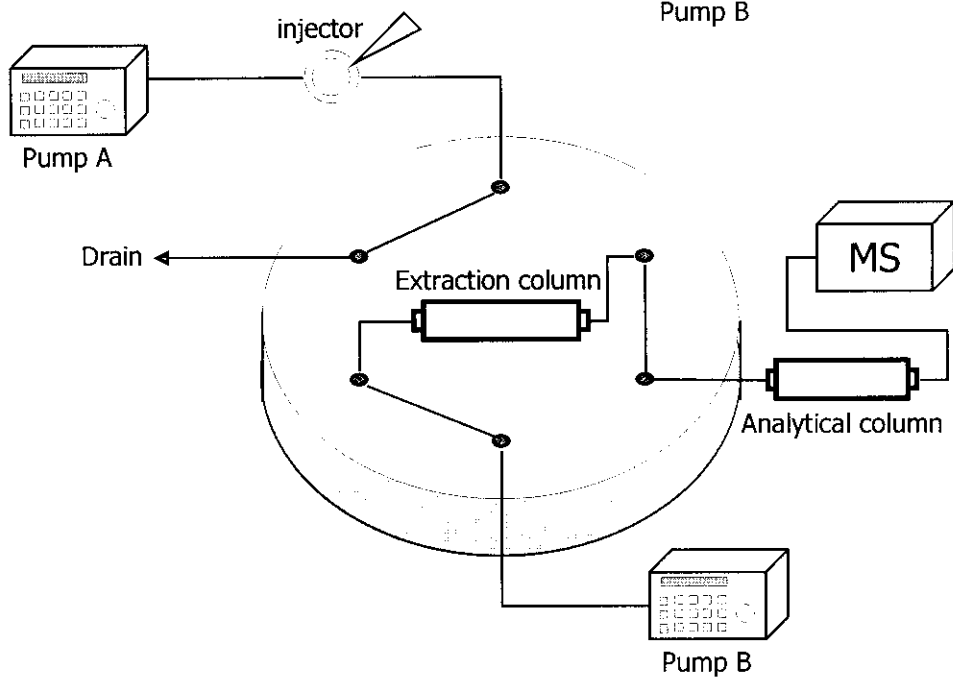


図3 カラムスイッチング-システム図

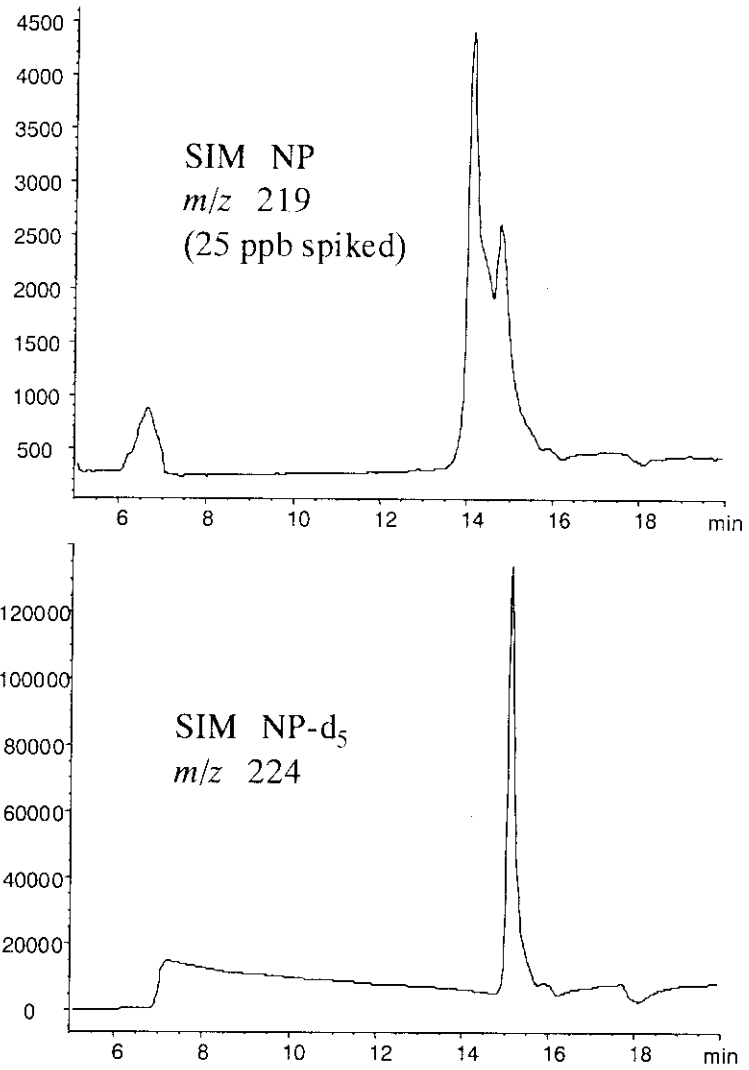


図4 NPの添加回収試験におけるクロマトグラム

平成 15 年度 厚生科学研究費補助金

(化学物質リスク研究事業)

協力研究報告書

試料分析の信頼性確保と生体暴露量のモニタリングに関する研究

飼料，床敷き等中の 4-ノニルフェノールの分析

主任研究者 牧野恒久 (東海大学医学部教授)

分担研究者 中澤裕之 (星薬科大学教授)

研究協力者 藤巻照久 (神奈川県衛生研究所)

平山クニ (神奈川県衛生研究所)

吉村吉博 (星薬科大学)

井之上浩一 (星薬科大学)

伊藤里恵 (星薬科大学)

川口 研 (星薬科大学)

瀬下文恵 (星薬科大学)

研究要旨

動物飼料等からの 4-ノニルフェノールの分析法として、精油定量装置を用い、LC/MS/MS で測定する方法を検討した。精油定量装置により前処理操作を簡素化することで、試験操作による汚染を低減化することが可能となった。本分析法を用い、市販のラット・マウス飼育用飼料及び床敷の分析を行った。その結果、飼料 3 検体から 10.5~18.7 ppb, 床敷 2 検体から 65.3 ppb, 32.2 ppb の 4NP が検出され、給水からは検出されなかった。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質の生体評価については、低用量域において再現性のある結果を得るのが困難な状況にあるのが現状である。その要因として、動物実験及び実験動物の飼育環境下による当該化学物質の暴露が問題点として指摘されている。

本研究では、実験動物の飼育環境下による暴露量を把握するため、飼料、床敷等に含まれる 4-ノニルフェノール(4NP)の微量分析法を構築し、市販の飼育用飼料及び床敷の分析を行った。

B. 研究方法

B-1 試薬

4-ノニルフェノール (4NP)：関東化学社製 (環境分析用)

4-(1-メチル)オクチルフェノール-d₅ (NP-d₅)：林純薬社製 1000 ppm ヘキサン溶液 (水質試験用)

ヘキサン，メタノール：関東化学社製 (フタル酸エステル測定用)

超純水：日本ミリポア社製純水/超純水製造システム EQS-5L で精製した。

B-2 標準溶液

4NP 標準溶液：4NP 100 mg を精秤し、ヘキサン 100 mL に溶解して 1000 ppm 標準原液を調製し、適宜メタノールで希釈

した。

NP-d₅ 溶液：市販の 1000ppm ヘキサン溶液を適宜メタノールで希釈し、内標準溶液として使用した。

B・3 試料

床敷 2 検体（日本チャールス・リバー社製ホワイトフレーク，オリエンタル酵母社製パルソフト），飼料 3 検体（日本クレア社製 CE-2 E2083-ZY，日本農産工社製ラボ MR ストック，オリエンタル酵母社製粉末 MF）は，市販品を購入した。給水 1 検体は，神奈川県衛生研究所の動物舎給水栓から得たものである。

B・4 装置及び測定条件

精油定量装置：

実験に用いるガラス器具はすべて洗浄後，180℃で 2 時間加熱した。次いで放冷し，アセトンで洗浄後使用した。

HPLC 装置：Agilent 社製 Agilent1100

HPLC 測定条件

分析カラム： ODS-3(2.1 mmx150 mm)
(ジーエルサイエンス社製)

カラム温度： 40 ℃

移動相： 95%メタノール

Flow rate： 0.2 mL/min

注入量： 10 μL

MS/MS 装置：Applied Biosystems 社製 API-3000

MS/MS 測定条件

Ion source： Turbo ion Spray (ESI)

Mode： MRM

Turbo gas temp.： 550℃

Polarity： Negative

Spray voltage： -4500V

B・4・1 検量線の作成

4NP の 0.5, 1, 10, 50, 100 ppb メタノール溶液を調製して，検量線を作成し

た。なお，内標準物質 (NP-d₅) の濃度は 50ppb とした。

B・5 試験溶液の調製

精油定量装置に水 100mL と試料 2g を入れ，ヘキサン 3mL を用いて 1 時間，還流蒸留を行った。得られたヘキサン層を減圧下で遠心濃縮後，メタノール 1 mL を入れ，超音波で溶解した後，試験溶液とした。給水の場合は試料水 100 mL とヘキサン 3 mL のみを用いて同様な操作を行った。

C. 結果及び考察

C・1 LC/MS/MS の測定条件について

4NP 及び NP-d₅ のメタノール溶液を用い，自動最適化を行った。4NP の Precursor ion 及び Product ion は，それぞれ 219, 133 であり，NP-d₅ は 224, 123 であった。

C・2 検量線について

B・4・1 で作成した標準溶液について検量線を作成したところ，図 1 に示すように相関係数 $r^2=0.9998$ と良好な結果が得られた。

C・3 検出下限値 (LOD) 及び定量下限値 (LOQ) について¹⁾

検量線に使用した最も低濃度の標準溶液 (4NP：0.5ppb, NP-d₅：50 ppb) を用いて 5 回の繰り返し測定を行った。その結果，平均値と標準偏差 (σ) は以下のとおりとなった。

$$0.4504 \pm 0.1687 \text{ ppb}$$

また，LOD は 0.5 ppb (3σ)，LOQ は 2 ppb (10σ) であった。

なお，4NP の LOD 及び LOQ におけるクロマトグラムを図 2 に示す。

C・4 精油定量装置を用いた抽出法の検討

C・4・1 蒸留時間による回収率について

精油抽出装置に水 100 mL を入れ、これに 4NP 及び NP-d₅ をそれぞれ 1 μg 添加し、ヘキサンを抽出溶媒として 15 分から 90 分間蒸留を行った。4NP 及び NP-d₅ は 15 分間蒸留することで、約 80%、30 分間でほぼ 100% の回収が得られた (図 3)。4NP の内標準物質として市販されている NP-d₅ は蒸留法においても内標準物質として使用することが可能であった。

C・4・2 装置内洗浄によるブランク値の低減下について

微量分析においては、操作ブランク値が問題となるため、ブランク値の低減下を目的に試験前の装置内の洗浄効果を検討した。

水とヘキサンで 30 分間、4 回洗浄し、それぞれの洗浄段階でブランク値を測定した。図 4 に示すように 3 回洗浄することでブランク値を 1~2 ppb の範囲に抑えることができたことから、3 回洗浄後試料を測定することとした。

C・4・3 遠心エバポレータによる 4NP 及び NP-d₅ の揮散についての検討

ヘキサン溶液 (A) 及びヘキサン溶液に水を入れ、ヘキサン層を再度分取したものの (B) を遠心エバポレータにかけ、25 分後及び 50 分後、ヘキサンに再溶解し、測定を行った。表 1 に示すように完全にヘキサンが除去できる 25 分間では 4NP 及び NP-d₅ は、ともに 90% 以上の回収率が得られ、ヘキサン除去後さらに 25 分間遠心エバポレータにかけた場合においても 90% 以上の回収率が得られた。

この結果から 4NP 及び NP-d₅ は、50 分後においても (A) と (B) の回収率にほとんど差がないことが確認できた。

従って、精油定量装置から分取したヘキサン層の無水硫酸ナトリウムによる脱水

操作を省略した。

なお、測定値は 4NP, NP-d₅ 各々の 50 ppb 標準溶液を用いて絶対検量線で測定した。

C・4・4 添加回収実験

水及び飼料に 4NP を 100 ng 添加し、添加回収実験を行った。なお、飼料については 4NP が 18.7 ppb 検出された飼料に添加し、サンプル量を補正した結果を表 2 示す。その結果、蒸留水については 105%、飼料は 71.7% であった。測定した飼料及び 4NP を添加した飼料のクロマトグラムは図 5 に示す。

飼料からの回収率がやや低い値を示した要因として、添加した飼料に 4NP が含有されており、飼料のばらつきが考えられる。

C・4・5 試料中の分析結果

飼料 3 検体から 10.5~18.7 ppb、床敷 2 検体から 65.3 ppb、32.2 ppb の 4NP が検出された。給水からは検出されなかった (表 3)。

D・結論

動物飼料等からの 4NP の分析法として、精油定量装置を用い、前処理操作を簡素化することで、試験操作による汚染を低減化することが可能となった。

本試験法の検討には、LC/MS/MS を用いて 4NP の測定を行った。4NP は異性体の混合物があることから、今後、さらに LC-MS との比較を行う予定である。

参考文献

- 1) 環境庁水質保全局水質規制課；ダイオキシン類に係る水質調査マニュアル，p. 32 (1998)

学会発表

日本薬学会第124年会;「動物実験環境下における各種試料中のノニルフェノール分析法」(2004);藤巻照久,平山クニ(神奈川衛研),瀬下文恵,伊藤里恵,井之上浩一,中澤裕之(星薬大),牧野恒久(東海大医学部)

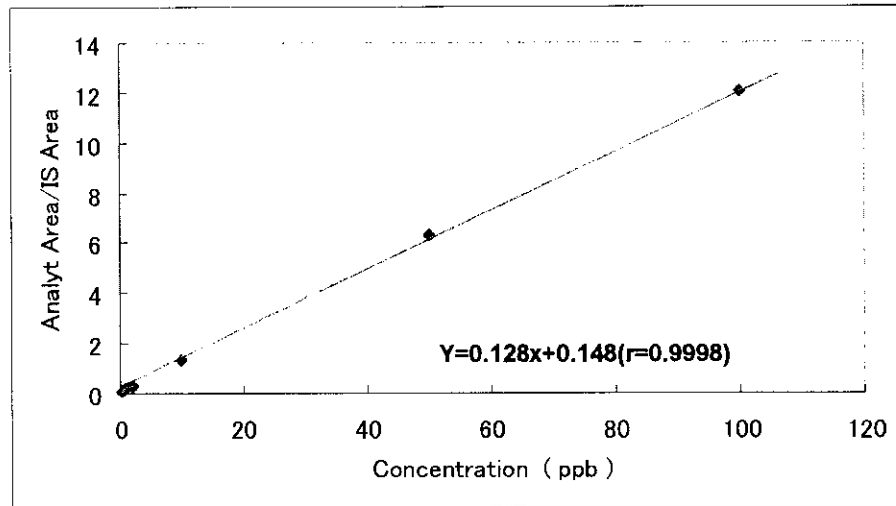


図1 4NPの検量線

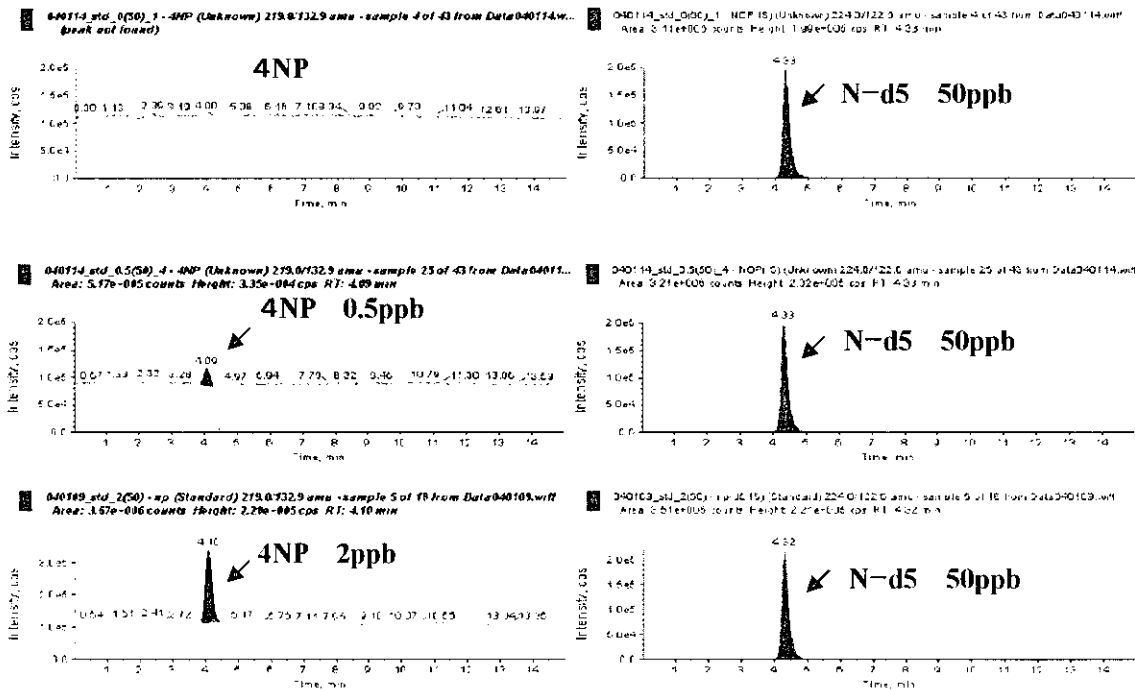


図2 4NPのLOD及びLOQにおけるクロマトグラム