

図2 動物飼料中のフタル酸エステル類の分析法

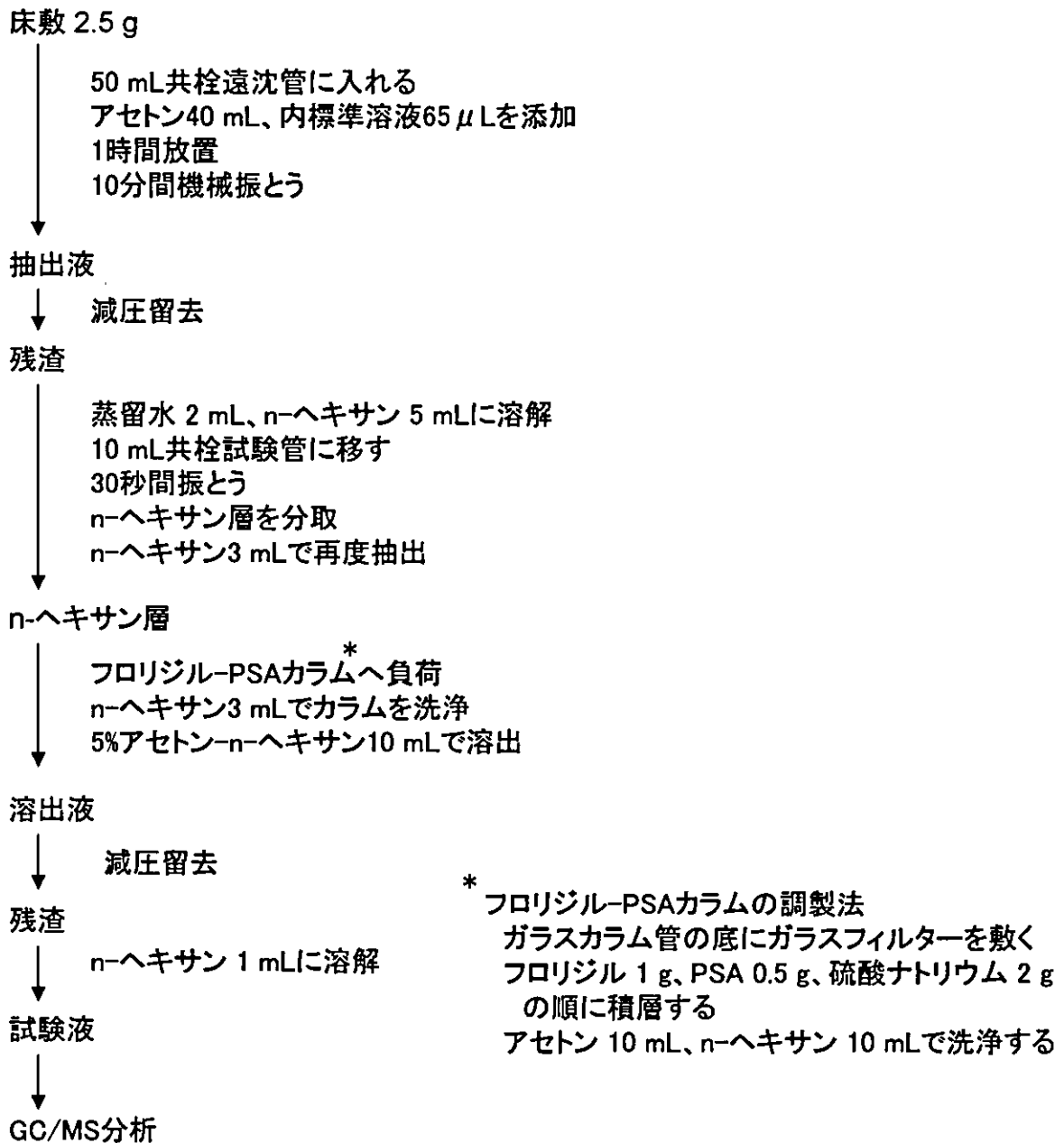


図3 床敷中のフタル酸エステル類の分析法

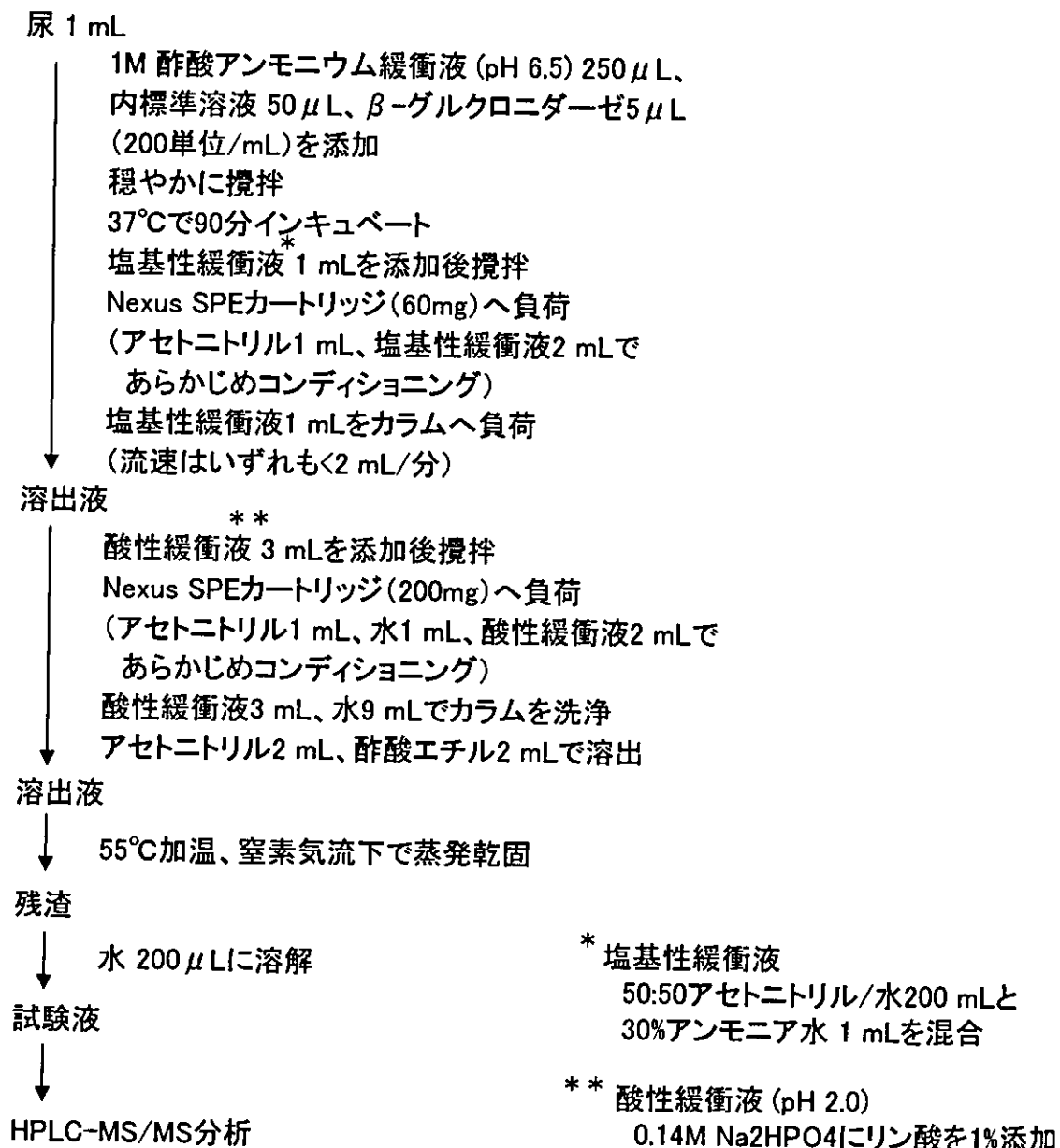


図4 尿中のフタル酸モノエステル類の分析法

### HPLC conditions

Column: Betasil phenyl column, 50 mm x 2 mm, 5 mm

Mobile phase:

Mobile phase A; 0.1% acetic acid in water

Mobile phase B; 0.1% acetic acid in acetonitrile

Gradient program:

Time (min)	0	1.0	10.0	11.0	11.2	11.5	12.0
%A	100	85	55	0	0	100	100
%B	0	15	45	100	100	0	0

Flow rate: 0.6 mL/min

### MS/MS conditions

Interface, mode: APCI, negative

Nitrogen sheath gas: 40 psi

API vaporizer temperature: 500°C

Heated capillary temperature: 250°C

Corona needle discharge: 9 mA

Tube lens voltage: 182 V

Electron multiplier: 1800 V

Collision-induced dissociation gas pressure: 2.0 mTorr

(M.J. Silva *et al*, J. Chromatogr. B, 2003, 789, 393-404)

Phthalate metabolites	Parent mass	Daughter mass
mMP	179	107
mEP	193	121
mBP	221	77
mCHP	247	77
mBzP	255	183
mEHP	277	134
mEOHP	293	121
mEHHP	291	121
mOP	277	125
mNP	291	245
mDP	305	155

图5 HPLC/APCI-MS/MS 分析条件

表1 モニターイオン

物質名	略称	血清、動物飼料、空気、水		床敷	
		定量イオン	参照イオン	定量イオン	参照イオン
フタル酸ジ-n-ブチル	DBP	149	205, 223	149	205, 223
フタル酸ブチルベンジル	BBP	149	91, 206	206	91, 149
フタル酸ジ-2-エチル ヘキシル	DEHP	149	167, 279	149	167, 279
フタル酸ジイソオクチル	DiOP	149	279	279	149
フタル酸ジイソノニル	DiNP	149	293	149	293
フタル酸ジ-n-ブチル-d4	DBP-d4	153	227, 209	153	227, 209
フタル酸ブチルベンジル-d4	BBP-d4	153	91, 210	210	91, 153
フタル酸ジ-2-エチル ヘキシル-d4	DEHP-d4	153	171, 283	153	171, 283
フタル酸ジオクチル-d4	DiOP-d4	153	283	283	153
フタル酸ジノニル-d4	DiNP-d4	153	297	153	297

表2 血清の空試験におけるフタル酸エステル類の検出量 (ng/g)

測定機関	DBP	BBP	DEHP	DiOP	DiNP
A	4.7	0.0	4.4	0.0	0.0
B	1.7	0.0	4.0	0.0	0.0
C	22.0	0.0	29.5	0.0	0.0
平均	9.4	0.0	12.6	0.0	0.0
標準偏差	11.0	0.0	14.6	0.0	0.0
相対標準偏差	116		116		

表3 血清のブランク試験におけるフタル酸エステル類の検出量 (ng/g)

測定機関	DBP	BBP	DEHP	DiOP	DiNP
A	5.9	0.0	4.9	0.0	0.0
B	1.4	0.0	3.7	0.0	0.0
C	18.6	0.0	62.3	0.0	0.0
平均	8.6	0.0	23.6	0.0	0.0
標準偏差	8.9	0.0	33.5	0.0	0.0
相対標準偏差	104		142		

表4 血清の添加試験における標準物質の回収率(%)

測定機関	DBP	BBP	DEHP	DiOP	DiNP
A	98.9	98.9	97.3	106	111
B	99.7	101	95.6	100	100
C	97.0	104	191	117	123
平均	98.5	101	128	108	111
標準偏差	1.4	2.6	54.6	8.6	11.5
相対標準偏差	1.4	2.5	42.7	8.0	10.3

表5 動物飼料の空試験におけるフタル酸エステル類の検出量(ng/g)

試料名	DBP	BBP	DEHP	DiOP	DiNP
試行1	1.5	0.0	10.2	0.0	0.0
試行2	1.3	0.1	3.1	0.0	0.0
試行3	2.7	0.2	11.1	0.2	0.0
平均	1.8	0.1	8.1	0.1	0.0
標準偏差	0.8	0.1	4.4	0.1	0.0
相対標準偏差	41.3	100	53.9	173	

表6 動物飼料のブランク試験におけるフタル酸エステル類の検出量(ng/g)

試料名	DBP	BBP	DEHP	DiOP	DiNP
試行1	177	2.5	106	3.5	5.8
試行2	160	0.9	115	1.9	6.0
試行3	181	2.5	117	2.3	6.4
平均	173	2.0	113	2.6	6.1
標準偏差	11.2	0.9	5.9	0.8	0.3
相対標準偏差	6.5	47.0	5.2	32.4	5.0

表7 動物飼料の添加試験における標準物質の回収率(%)

試料名	DBP	BBP	DEHP	DiOP	DiNP
試行1	134	98.7	150	109	113
試行2	119	99.2	149	108	112
試行3	116	98.5	145	109	115
平均	123	98.8	148	109	113
標準偏差	9.6	0.4	2.6	0.6	1.5
相対標準偏差	7.8	0.4	1.8	0.5	1.3

表8 動物飼料中のフタル酸エステル類濃度 (ng/g)

試料番号*	DEHP	DBP	BBP	DiOP	DiNP	総量
F-1	143	179	ND	ND	ND	322
F-2	160	46.3	ND	ND	ND	206
F-3	116	25.1	ND	ND	ND	141
F-10	511	146	157	ND	ND	814
F-11	156	41.4	ND	ND	ND	197
F-12	146	134	ND	ND	ND	280
F-13	118	36.1	ND	ND	ND	154
F-14	205	80.4	ND	ND	ND	285
F-15	281	205	22.2	ND	ND	508
F-16	422	403	18.4	ND	ND	843
F-17	257	344	ND	ND	ND	601
F-18	431	944	33.4	ND	ND	1410
検出数	12	12	4	0	0	12
平均値	246	215	57.8	—	—	507
中央値	183	140	27.8	—	—	397
最大値	511	944	157	—	—	1410
最小値	116	25.1	18.4	—	—	141

\* 試料番号は、他の測定対象物質と統一した。

表9 床敷の空試験におけるフタル酸エステル類の検出量 (ng/g)

試料名	DBP	BBP	DEHP	DiOP	DiNP
試行1	3.3	0.0	5.9	0.1	0.0
試行2	2.7	0.0	4.5	0.0	0.0
試行3	3.3	0.0	9.3	0.1	0.3
平均	3.1	0.0	6.6	0.1	0.1
標準偏差	0.3	0.0	2.5	0.1	0.2
相対標準偏差	11.2		37.6	87	173

表10 床敷のブランク試験におけるフタル酸エステル類の検出量 (ng/g)

試料名	DBP	BBP	DEHP	DiOP	DiNP
試行1	1330	4.8	467	3.9	25.1
試行2	1120	7.0	441	5.4	15.4
試行3	974	6.2	414	4.0	16.4
平均	1140	6.0	441	4.4	19.0
標準偏差	179	1.1	26.5	0.8	5.3
相対標準偏差	15.7	18.6	6.0	18.9	28.1

表11 床敷の添加試験における標準物質の回収率(%)

試料名	DBP	BBP	DEHP	DiOP	DiNP
試行1	134	102	150	125	90.7
試行2	138	101	149	118	94.5
試行3	125	103	139	115	98.8
平均	132	102	146	119	94.7
標準偏差	6.7	1.0	6.1	5.1	4.1
相対標準偏差	5.0	1.0	4.2	4.3	4.3

表12 床敷中のフタル酸エステル類濃度 (ng/g)

試料番号*	DEHP	DBP	BBP	DiNP	DiOP	総量
M-1	449	1380	ND	ND	ND	1830
M-2	23.8	757	ND	ND	ND	781
M-4	280	19.6	ND	ND	ND	300
M-5	498	765	ND	ND	ND	1260
M-6	20.5	ND	ND	ND	ND	20.5
M-7	187	128	ND	ND	ND	315
M-8	262	130	440	ND	ND	832
M-9	420	66.4	ND	ND	ND	486
M-10	132	538	ND	ND	ND	670
M-11	5070	1390	900	198	ND	7560
M-12	547	381	ND	ND	ND	928
M-13	443	55.5	ND	ND	ND	499
M-14	16.0	30.5	ND	ND	ND	46.5
検出数	13	12	2	1	0	12
平均値	642	470	670	-	-	1190
中央値	280	256	670	-	-	670
最大値	5070	1390	900	-	-	7560
最小値	16.0	19.6	440	-	-	20.5

\* 試料番号は、他の測定対象物質と統一した。

表13 実験動物舎の室内空気中のフタル酸エステル類濃度 (ng/m<sup>3</sup>)

採取日	DBP	DEHP	BBP	DiOP	DiNP	総量
04/11/29-30	357	31.4	ND	ND	ND	388
04/11/30-12/1	320	27.6	ND	ND	ND	348
04/12/1-2	261	31.9	ND	ND	ND	293
04/12/2-3	325	32.1	ND	ND	ND	357
検出数	4	4	0	0	0	4
平均値	316	30.8	-	-	-	347
中央値	323	31.7	-	-	-	353
最大値	357	32.1	-	-	-	388
最小値	261	27.6	-	-	-	293



表14 生体試料中のフタル酸モノエステル類の分析法

試料	測定対象物質	抽出、精製法	分析手段	著者	発表年	参考文献番号
尿	MEP, MBP, MCHP, MBzP, MEHP, MOP, MNP	固相抽出	HPLC-APCI-MS/MS	Blount B.C. et al	2000	4
尿	MEP, MBP, MCHP, MBzP, MEHP, MOP, MINP, MDP	固相抽出	HPLC-APCI-MS/MS	Blount B.C. et al	2000	5
尿	MEP, MBP, MCHP, MBzP, MEHP, MOP, MINP	固相抽出	HPLC-APCI-MS/MS	Hoppin B.C. et al	2002	6
尿	MMP, MEP, MBP, MCHP, MBzP, MEHP, MOP, MNP, MDP	オンライン固相抽出	HPLC-ESI-MS/MS	Kato K. et al	2003	7
尿	MMP, MEP, MBP, MCHP, MBzP, MEHP, MEOHP, MEHHP, MOP, MNP, MDP	固相抽出	HPLC-APCI-MS/MS	Silva M.J. et al	2003	8
尿	MEP, MBP, MBzP, MEHP	固相抽出	HPLC-APCI-MS/MS	Silva M.J. et al	2003	9
尿	MEP, MBP, MCHP, MBzP, MEHP, MOP, MINP	固相抽出	HPLC-APCI-MS/MS	Silva M.J. et al	2004	10
尿	MEHP, MEOHP, MEHHP	固相抽出	HPLC-APCI (or ESI)-MS/MS	Kato K. et al	2004	11
血清(牛)	MEHP, MEOHP, MEHHP, MECPP	液-液抽出	GC-MS	Dirven et al	1993	12
血清	DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP, MEHP	液-液抽出	GC-MS	Colon I. et al	2000	13
尿	MBP, MCHP, MBzP, MEHP, MIDP	液-液抽出	HPLC-APCI-MS	Warwick A.C. et al	2002	14
血清	DEHP, MEHP	カラムスイッチング	HPLC-ESI-MS/MS	Inoue K. et al	2003	15
血清	DEHP, MEHP	液-液抽出	HPLC	Paris, J et al	2003	16
臍帯血	DEHP, MEHP	不明	HPLC	Giuseppe L. et al	2003	17
尿	MEHHP, MEOHP, MEHP, MEP, MBP, MBzP, MOP	カラムスイッチング	HPLC-ESI-MS/MS	Koch H.M. et al	2003	18
尿	MEHHP, MEOHP, MEHP, MEP, MBP, MBzP, MOP	カラムスイッチング	HPLC-ESI-MS/MS	Koch H.M. et al	2003	19

MEP:フタル酸モノエチル, MBP:フタル酸モノブチル, MCHP:フタル酸モノシクロヘキシル, MBzP:フタル酸モノベンジル, MEHP:フタル酸モノ-2-エチルヘキシル, MOP:フタル酸モノオクチル, MNP:フタル酸モノノニル, MIDP:フタル酸モノイソデシル, MEOHP:フタル酸モノ-2-エチル-5-オキソヘキシル, MEHHP:フタル酸モノ-2-エチル-5-ヒドロキシヘキシル, MECPP:フタル酸モノ-5-カルボキシ-2-エチルペンチル

DMP:フタル酸ジメチル, DEP:フタル酸ジエチル, DBP:フタル酸ジブチル, BBP:フタル酸ブチルベンジル, DEHP:フタル酸ジ-2-エチルヘキシル

## 生体試料中のフタル酸エステル類の分析法

## 【試験法の概要】

生体試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、本法は血清に適用できる。

## 【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3</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4</sup>。
- ⑤ フロリジル：フロリジール 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-d4 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 PSA0.5 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5</sup>

血清 1 mL を共栓試験管 (10 mL、ガラス製) に採り、アセトニトリル 5 mL、塩化ナトリウム 0.5 g、n-ヘキサン 1 mL 及び内部標準溶液 (4 μg/mL) 25 μL を添加後、3 分間振とうする。3000 rpm で 5 分間遠心分離後、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 及び 3 mL で 2 回抽出する。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6</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 μm)、液層は 5%フェニルメチルシリコンを使用する<sup>注7</sup>。

カラム温度：80℃（3分）→10℃/分→300℃（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℃  
 注入方式：スプリットレス  
 インターフェース温度：300℃  
 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-d4	DBP-d4	153	227, 209
フタル酸ブチルベンジル-d4	BBP-d4	153	91, 210
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル-d4	DEHP-d4	153	171, 283
フタル酸ジオクチル-d4	DOP-d4	153	283
フタル酸ジノニル-d4	DNP-d4	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/mL に、DiOP、DiNP は 20 ng/mL に設定する。また、定量下限は、DBP、BBP、DEHP は 10 ng/mL に、DiOP、DiNP は 50 ng/mL 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。

- 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。
- 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。
- 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。血清に DBP、BBP、DEHP の濃度がそれぞれ 100 ng/mL に、DiOP、DiNP の濃度が 200 ng/mL 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。

注3 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4 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5 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。

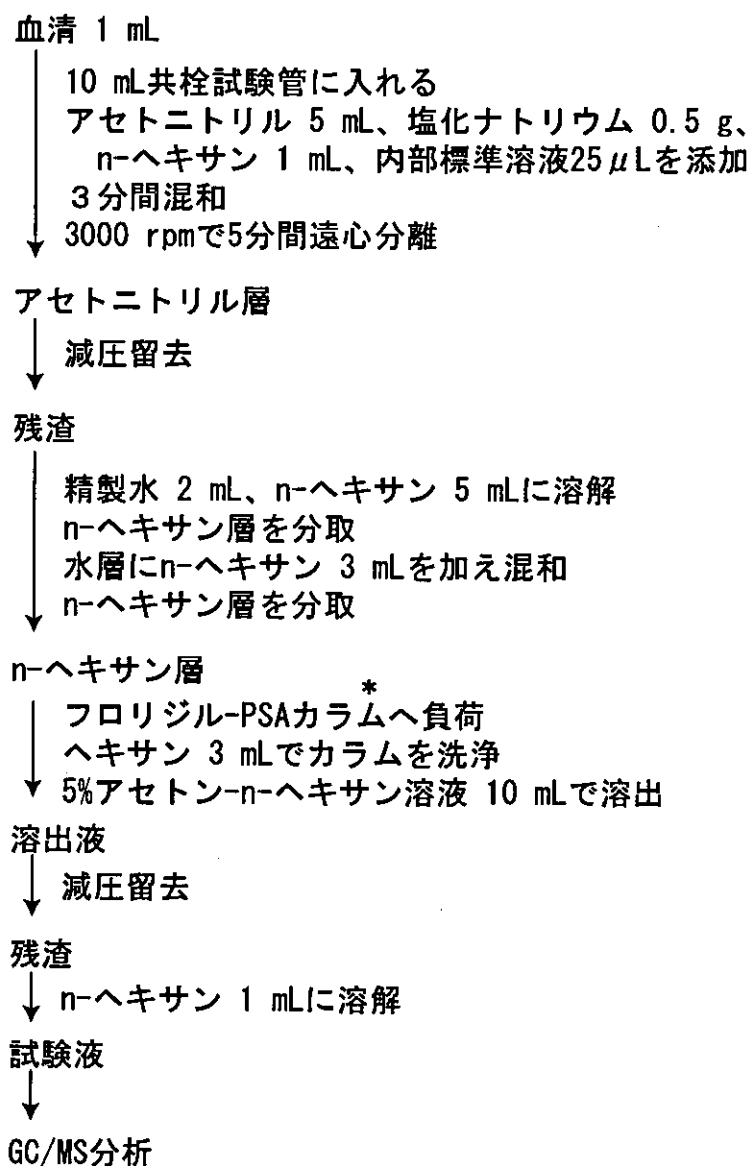
注6 標準品及び試料を分析する前に n-ヘキサンのみを数回注入し、GC/MS の状態をチェックすると良い。

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

#### 【参考文献】

下記に生体試料中のフタル酸エステル類分析に関する最近の報告例を示す。

- 1) Inoue K, Kawaguchi M, Okada F, Yoshimura Y, Nakazawa H, Column-switching high-performance liquid chromatography electrospray mass spectrometry coupled with on-line of extraction for the determination of mono- and di-(2-ethylhexyl) phthalate in blood samples. Anal Bioanal Chem, 375, 527-33 (2003)
- 2) Takatori S, Kitagawa Y, Kitagawa M, Nakazawa H, Hori S, Determination of di(2-ethylhexyl)phthalate and mono(2-ethylhexyl)phthalate in human serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr B, 804, 397-401 (2004)
- 3) Colon I, Dimandja JM, High-throughput analysis of phthalate esters in human serum by direct immersion SPME followed by isotope dilution-fast GC/MS. Anal Bioanal Chem, 380, 275-283 (2004)



※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 0.5 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

図 血清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：フロリジール 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-d4 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 μm）、  
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℃（3分）→10℃/分→300℃（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℃

注入方式：スプリットレス

インターフェース温度：300℃

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-d4	DBP-d4	153	227、209
フタル酸ブチルベンジル-d4	BBP-d4	153	91、210
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル-d4	DEHP-d4	153	171、283
フタル酸ジオクチル-d4	DOP-d4	153	283
フタル酸ジノニル-d4	DNP-d4	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。

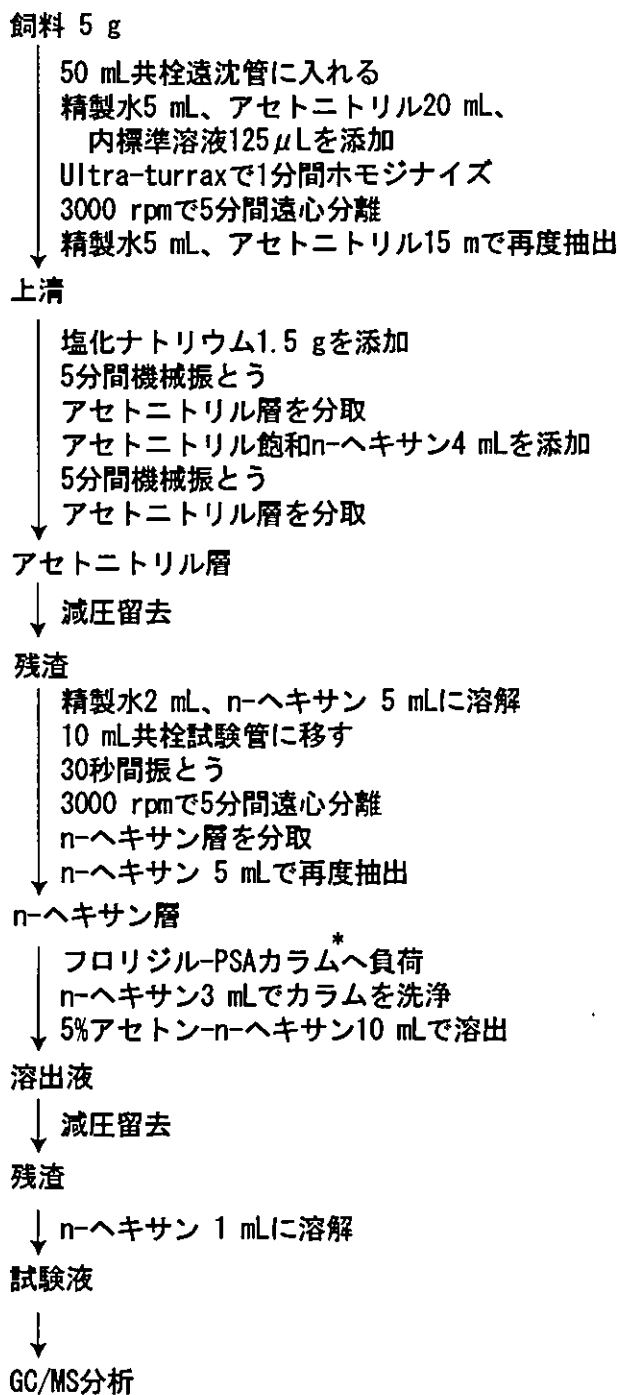
注5 使用する精製水に妨害ピークが認められた場合には、n-ヘキサンによる洗浄を繰り返し実施するとよい。

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。





<sup>\*</sup>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

図 飼料中のフタル酸エステル類の分析法フローシート

平成 14-16 度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担総合研究報告書

試料分析の信頼性確保と生体曝露量のモニタリングに関する研究  
生体試料等中のビスフェノール A の分析法の開発

主任研究者 牧野 恒久（東海大学医学部教授）  
分担研究者 堀江 正一（埼玉県衛生研究所）  
協力研究者 月岡 忠（長野県衛生公害研究所）  
石井 里枝（埼玉県衛生研究所）  
竹上 晴美（埼玉県衛生研究所）

#### 研究要旨

内分泌かく乱化学物質は、低用量においてその作用を発現することが指摘されている。このことから、適切な試料採取法及び高感度且つ選択性に優れた分析法の開発及び開発した方法によるヒト生体曝露量モニタリングの実施が必要とされている。そこで、本研究では「生体試料中のビスフェノールA分析法ガイドライン」を構築し、構築した試験法を用いて、生体試料中のビスフェノールA(BPA)の分析を行った。また、動物実験の信頼性を確保するため、「動物飼料、床敷中のビスフェノールA分析法ガイドライン」及び「飼料中の植物エストロゲン（イソフラボン）の分析法」の作成を試みた。血清（さい帯血、母体血）及び腹水中のBPA濃度を測定した結果、抱合体も含めた総BPA濃度は操作ブランクレベル(0.2ng/mL)であった。経口的に摂取したBPAは消化管から速やかに吸収され、投与量の殆どが24時間以内に尿中（主としてグルクロン酸抱合体）へ排泄された。従って、一日尿中のBPAを測定することによりBPAの曝露量を推定することが可能と考える。そこで、1日尿を用いてBPAの推定曝露量を求めた結果、1 $\mu$ g/day レベルであり、2002年5月に示されたEUの暫定TDI(500 $\mu$ g/day)に比べ問題のないレベルと思われた。飼料中に含まれる BPA は、ND~2.9ng/gで、ほとんどの飼料が検出下限値レベル(1ng/g)であった。一方、床敷の中には最高で704ng/g検出されたものも見られたが、給水中からはBPAは検出(0.02ng/mL)されなかった。更に、飼料中の植物エストロゲンを測定した結果、殆どの飼料から植物エストロゲンが検出された。最も高濃度で検出された植物エストロゲン濃度(569 $\mu$ g/g)より、マウスが飼料から摂取する植物エストロゲンを試算すると、3,414 $\mu$ g/日程度となった。

#### A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質は、低用量においてその作用を発現することが指摘されている。このことから、適切な試料採取法及び高感度且つ選択性に優れた分析法の開発及び開発した方法によるヒト生体曝露量モニタリングの実施が必要とされている。そこで、本研究では「生体試料中のビスフェノール A 分析法ガイドライン」を構築し、構築した試験法の信頼性を検証することを目的とした。次に、構築した試験法を用いて、生体試料中のビスフェノール A(BPA)の分析と一日尿中のBPAの分析から、BPA の一日曝露量を推定した。また BPA の問題に関しては、妊娠期投与により影響が出るという von Saal らを中心とする報告と、それに対し再現性は確認されないとする

報告があり、議論が繰り返されている。その一因として動物実験環境下におけるコンタミネーション等が考えられる。そこで、動物実験の信頼性を確保するため、「動物飼料、床敷、給水中のビスフェノール A 分析法ガイドライン」の作成を試みた。更に、動物実験の信頼性を検証するため、飼料中に含まれる植物エストロゲン（イソフラボン）の信頼性の高い分析法の策定を目的とした。

#### B. 研究方法

##### 1. 試料

さい帯血、母体血及び腹水は東海大学病院から提供されたものを用いた。さい帯血及び母体血は産科グループのボランティアから、腹水及び血液は婦人科グループのボランティア

アから採取した。採取した血液試料は、常法に従って血清を調製し、15分以内に凍結し、測定するまで-30℃で保存した。腹水も同様に採取後即座に凍結し、測定するまで-30℃で保存した。

尿は、埼玉県衛生研究所及び長野県衛生公害研究所職員のボランティアから採取した。採取した尿は速やかに分析に供するか、血液試料と同様に採取後即座に凍結し、測定するまで-30℃で保存した。なお、さい帯血、母体血、腹水及び尿の採取と使用に関しては、いずれもインフォームドコンセントを十分行い、理解が得られたボランティアから採取するなど、倫理面への配慮を行った。

豚血清は、埼玉県内にある食肉処理場から入手した豚血液から調製した。採取した豚血液試料は、常法に従って血清を調製し、15分以内に凍結し、測定するまで-20℃で保存した。

飼料40検体（日本クレア、日本農産工業、オリエンタル酵母、日本SLC）、床敷14検体（日本チャールズリバー、オリエンタル酵母、日本クレア、日本SLC、天然素材探索研究所、原商店、中部科学）、給水瓶3検体（日本クレア）は市販品を購入した。

## 2. 試薬

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>)は関東化学㈱製の環境分析用試薬を、<sup>13</sup>C-BPAはケンブリッジアイソトープ製を用いた。Daidzein, Genistein, Glycitein及びイソフラボン配糖体、Malonyl体、Acetyl体は和光純薬工業㈱あるいはナカライ化学㈱製の生化学用試薬を用いた。標準溶液は、各標準品10mg (Malonyl体及びAcetyl体は1mg)を精秤し、メタノール10mL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した。

β-グルクロニダーゼ：シグマ社製又は、和光純薬工業㈱製、生化学用（いずれも100,000 units/mL以上）を用いた。

精製用カートリッジ: Isolute Multimode カートリッジ (500 mg): International Sorbent Technology Ltd. 製、又は、スペルコ製、スペルクリン ENVI-18 (0.5g)を用いた。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：スペルコ製、ス

ペルクリン ENVI フロリジル (0.5g)を用いた。カートリッジは予めn-ヘキサン5mLで洗浄して使用した。

Oasis HLB カートリッジ：Waters 社製、充填量60mgを用いた。カートリッジは予めメタノール5mL、精製水5mLで洗浄して使用した。

アルミナ-A カートリッジ：Waters 社製、Sep-Pak アルミナ-A カートリッジ (1.7g)を用いた。カートリッジは予めアセトン5mLで洗浄して使用した。

BSTFA：ジーエルサイエンス㈱製を使用した。

その他の試薬はすべて特級品あるいはHPLC用を用いた。

## 3. 装置及び測定条件

### 3.1 血清、尿及び飼料等中のBPAの分析

3.1.1 高速液体クロマトグラフ/質量分析計：Hewlett Packard 製 HP1100 series LC/MSD を使用した。測定条件は表1のとおりとした。

3.1.2 ガスクロマトグラフ/質量分析計：日本電子㈱製 GC-mate を用いた。測定条件は次のとおりとした。

GC：HP-5890 シリーズII

カラム：DB-5MS 0.32mm×30m×0.25µm

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

MS：Jeol GC-mate

イオン源温度：230℃

イオン化電圧：70V

モニターイオン(m/z)：BPA (357, 372), BPA-d<sub>16</sub> (368, 386), <sup>13</sup>C-BPA (369)

### 3.2 飼料中の植物エストロゲンの分析

高速液体クロマトグラフ/質量分析計：Hewlett Packard 製 HP1100 series LC/MSD を使用した。測定条件は表2のとおりとした。

## 4. 検量線の作成

### 4.1 血清、尿及び飼料等中のBPAの分析 (LC/MS法)

安定同位体標識内部標準物質 BPA-d<sub>16</sub> を10ng 含んだBPAの1.0, 2.0, 5.0, 10及び50ng/mLの溶液を調製し、その20µL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した。

#### 4.2 尿中の BPA の分析 (GC/MS 法)

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  $^{13}\text{C}$ -BPA を 100ng 添加し、BSTFA 200  $\mu\text{L}$  を加え、アセトンで 1mL に定容した。これを一夜放置し、GC/MS-SIM で測定し、 $^{13}\text{C}$ -BPA との面積比で検量線を作製した。

#### 4.3 飼料中の植物エストロゲンの分析

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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となる標準溶液を調製し、その 5  $\mu\text{L}$  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した。

### 5. 試験溶液の調製

#### 5.1 血清、尿中の BPA 試験溶液の調製 (LC/MS 測定用)

##### 5.1.1 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- $d_{16}$  を 5ng 加えた後 Isolute Multimode カートリッジに負荷した。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。

##### 5.1.2 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、 $\beta$ -グルクロニダーゼ 6,500units/mL (試薬  $\beta$ -グルクロニダーゼを 0.2M 酢酸緩衝液 (pH 5) で 10 倍希釈) を 50  $\mu\text{L}$  加えた後、37°C 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。

#### 5.2 尿中の BPA 試験溶液の調製 (GC/MS 測定用)

##### 5.2.1 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、 $^{13}\text{C}$ -BPA 0.1  $\mu\text{g}$  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 200  $\mu\text{L}$  とアセトン 2mL を加え一夜放置し 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、超音波洗浄機で溶解させ、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。

##### 5.2.2 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、 $\beta$ -グルクロニダーゼ溶液 100  $\mu\text{L}$  と  $^{13}\text{C}$ -BPA 0.1  $\mu\text{g}$  を加え、37°C 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。

#### 5.3 飼料、床敷中の BPA 試験溶液の調製

飼料、床敷 1~2g を採り、内部標準物質である BPA- $d_{16}$  を 10~20ng 加えた後アセトニトリル 25mL (床敷は 50mL) で 2 分間ホモジナイズ抽出した。抽出液を 3000rpm で 5 分間遠心分離後、上清を分取し、減圧乾固した。残留物をアセトン 5mL に溶解し、Sep-Pak Alumina-A に負荷した。カートリッジをアセトン 5mL で洗浄後、水 5mL で溶出した。溶出液を Oasis HLB に負荷し、20%メタノール 3mL で洗浄後、メタノール 3mL で溶出した。溶出液を減圧乾固し、40%メタノール 1mL に溶解して LC/MS (LC/MS/MS) 用試験溶液とした。

#### 5.4 給水中の BPA 試験溶液の調製

給水瓶に BPA フリーの精製水 200mL を入れ、実験動物に給水する状態で 48 時間放置後、給水瓶中の精製水を実験に供した。給水瓶中の精製水 100mL を Oasis HLB カートリッジに負荷し、20%メタノール 3mL で洗浄後、メタノール 3mL で溶出した。溶出液を減圧乾固し、40%メタノール 1mL に溶解して LC/MS 用試験溶液とした。

#### 5.5 植物エストロゲン用試験溶液の調製

飼料、床敷 1~2g を採り、80%メタノール 20mL を加えて 2 分間ホモジナイズ抽出した。抽出液を 3000rpm で遠心分離後、上清を分取した。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