

(0.45 μm)でろ過し、試験溶液とした。

## C. 結果及び考察

### 1. LC/MSによる生体試料中のBPAの分析

BPAの総曝露量を評価するため、遊離体BPAと抱合体も含めた評価法を検討した。

#### 1.1 前処理法の検討

血清及び尿中の遊離体BPAの前処理には先に報告した方法(平成12年度研究成果報告書)を採用した。

総BPAの前処理、即ち抱合体の加水分解条件は、血清1mLに抱合体を含む尿50 μL添加して検討した。β-グルクロニダーゼ量を5、10、20及び30 μLと変えて加水分解率に及ぼす影響を調べた結果、いずれの量においても37℃、1時間インキュベートすることによりほぼ完全に加水分解された。そこで、本法では酵素量は5 μLとした。なお、5 μLのβ-グルクロニダーゼを再現良く分取することは困難であったので、0.2M酢酸緩衝液でβ-グルクロニダーゼを10倍希釈し、その50 μLを採用することとした。

#### 1.2 添加回収実験

血清及び尿にBPA及び安定同位体標識内部標準物質BPA-d<sub>16</sub>を添加(5ng/mL)し、回収率を求めた結果、血清及び尿とも概ね70%以上であった(BPA-d<sub>16</sub>による補正なしの回収率)。本法による検出限界は、血清で0.2ng/mLであった。

#### 1.3 BPA分析法ガイドラインのクロスチェック

○配付試料：埼玉県内にある食肉処理場から豚血液を入手し、遠心分離して得られた豚血清を用いた(ブランク豚血清、及びビスフェノールAを10ppbになるよう添加したものを配付)。

○分析法：構築したガイドライン(LC/MS法)に準拠して行った。

○数値の算出方法：分析方法に従い、ppb等の濃度で算出した。

配付試料について3機関(㈱東レリサーチセンター、㈱エスアールエル、長野県衛生公害研究所)でクロスチェックを実施した。無添加及び10ppb添加試料中のBPA濃度は、いずれの機関の分析値も良く一致し、室間再現性に優れていた(表3)、以上の結果から、構築した「BPA分析法ガイドライン」は、血清中のBPA分析法として有効であると考えら

れる。

#### 1.4 血清、腹水、尿中のBPA濃度

本法により、東海大学病院で採取された母体血、さい帯血、腹水等計27検体を分析した結果、遊離体BPAはいずれも操作ブランクレベル(0.2~0.3ng/mL)であった。一方、β-グルクロニダーゼ処理した一部の試料からは1~2ng/mLレベルでBPAが検出された。また、健康なボランティア5名から採取した一時尿を分析した結果、血液サンプルと同様、遊離体BPAはいずれも操作ブランクレベル(0.2~0.3ng/mL)であったが、抱合体を含めた総量では一部試料から1~2ng/mLレベルでBPAが検出された。

#### 1.5 BPAの体内動態

米国EPAによるBPAの参照用量RfD(0.05mg/kg)及び昨年出されたEUの暫定TDI(0.01mg/kg)値を参考にして、BPAの安全摂取量を算出した。それを基にBPAを低用量(50 μg)及び高用量(1mg)を経口的に単回投与し、摂取後の体内動態をGC/MS(低用量ケース)及びLC/MS(高用量ケース)を用いて調べた。低用量及び高用量のケースとも、BPAは消化管から速やかに吸収され、投与量の大半が尿中(クレアチニン補正：尿中クレアチニン濃度を1mg/mLとして算出、高用量ケースでは約80%が24時間以内に主としてグルクロン酸抱合体として)へ排泄された。しかし、血中への移行量は少なく、その殆どが抱合体(最高濃度：43ng/mL：経口摂取後0.5時間)で、その時の遊離体レベルは0.3ng/mL程度であった。血清試験溶液の代表的LC/MS-SIMクロマトグラムを図1に示す。

## 2. GC/MSによる生体試料中のBPAの分析

### 2.1 健康成人尿中のBPA濃度

成人尿(n=11)を採取し、GC/MS法により総BPAと遊離体BPAについて分析した結果、総BPA濃度は、0.19~1.38ng/mL(平均0.56ng/mL)、遊離体BPA濃度は、0.01~0.27ng/mL(平均0.08ng/mL)であり、遊離体BPAの割合は2.6~29%(平均12%)であった。

### 2.2 BPAの尿中への排泄

ボランティア25人にBPA-d<sub>16</sub> 50 μgを含む清涼飲料水を投与し、摂取後5時間の尿を採取して分析した。その結果、総BPA濃度は、27~80ng/mL(平均57.2ng/mL)、遊離体BPA濃度は、0.13~5.5ng/mL(平均1.13ng/mL)、

排泄量は 17.6~48.6  $\mu\text{g}$  (平均 38  $\mu\text{g}$ : 投与量の 76%) であり、遊離体 BPA の割合は 0.34~8.1% (平均 1.9%) であった。

更に、BPA- $d_{16}$  の排泄をみるため、BPA- $d_{16}$  100  $\mu\text{g}$  を含む清涼飲料水 100ml を投与し、一定時間間隔で 26.5 時間採尿し、分析した。その結果、摂取後 30 分後にグルクロン酸抱合体として尿中最高値の 90ng/mL、60 分後には 26ng/mL に減少し、5 時間後にはほぼ元の濃度付近にまで低下した。BPA は消化管から速やかに吸収され、尿中へグルクロン酸抱合体として排泄され、低用量暴露では 24 時間で約 97% が排泄された。

### 3. BPA の推定曝露量について

経口摂取された 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) へ排泄されることが解った。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 日尿を採取し、BPA の推定曝露量を求めた。37 例の一日尿を測定した結果、1 例を除いた尿中 BPA 濃度は 2ppb 以下であった (長野 30 例は GC/MS 法、埼玉 7 例は LC/MS 法により測定)。尿中 BPA 濃度及び尿量から BPA の平均排泄量を求めた結果、1  $\mu\text{g}/\text{day}$  レベルであった。2002 年 5 月に示された EU の BPA 暫定 TDI は、500  $\mu\text{g}/\text{day}$  であり、今回推定された平均曝露量は問題のないレベルであると思われる。

なお、一日尿 10 試料について、GC/MS 法による測定値と LC/MS 法による測定値を比較した結果、高い相関が得られた。長野と埼玉では異なった分析法を採用したが、問題はないと考えられる。

## 4. 飼料、床敷、給水中の BPA の分析

### 4.1 飼料、床敷及び給水中の BPA の分析法の検討

動物実験の信頼性を確保するため、動物実験環境 (飼料、床敷及び給水) からの BPA 曝露量を評価する分析法を検討した。飼料は魚粉、大豆等を主原料としており、かなりの脂質成分を含んでいた。このことから、血清や尿を分析試料とした試験溶液調製法は適用困難であった。そこで、脂質成分を除去する目的で活性アルミナ、フロリジル、シリカゲル等を用いて検討した。フロリジル及びシリカ

ゲルでは、脂質成分を完全に除去できなかった。一方、塩基性、中性及び酸性のいずれの活性アルミナを用いても脂質成分を除去することが可能であった。しかし、塩基性及び中性の活性アルミナでは、BPA の回収率が 30-40% であった (酸性アルミナでは 60-80%)。以上の結果から、脂質の除去には酸性の活性アルミナを用いることにした。

測定には先に構築した生体試料中の BPA 分析法 (分離分析法として優れている LC/MS 法) を用いることにした。なお、より選択的な分析結果を得る目的で、タンデム型高速液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS/MS) も採用した。

### 4.2 飼料、床敷、給水中のビスフェノール A

本法を用いて飼料 40 検体、床敷 14 検体、給水 3 検体中の BPA を測定した。飼料中 ( $n=40$ ) に含まれる BPA は、ND~2.9ng/g (表 4) で、ほとんどの飼料が検出下限値レベル (1ng/g) であった。最も高濃度で検出された BPA 濃度 (2.9ng/g) より、マウス及びラットが飼料から摂取する BPA を試算すると、マウスでは 17.4 ng/日 (一日の飼料摂取量を 6 g とした時)、ラットでは 72.5 ng/日 (一日の飼料摂取量を 25 g とした時) 程度となる。

また、床敷中 ( $n=14$ ) からは最高で 704ng/g 検出されたものも見られたが、給水中 ( $n=3$ ) からは BPA は検出 (0.02ng/mL) されなかった。

## 5. 飼料中の植物エストロゲン分析

### 5.1 LC/MS 測定条件の検討

分析対象として、Daidzein, Genistein, Glycitein, その配糖体である Daidzin, Genistin, Glycitin 及び各 Malonyl 体、Acetyl 体、計 12 成分を選んだ。イオン化モードは、いずれもフェノール性水酸基を有していることから Negative mode を採用した。また、移動相に微量の酢酸を加えることにより、各成分ともより高感度に検出された。しかし、酢酸の濃度が高くなるに従い検出感度は逆に低下することから、酢酸濃度は 0.003% とした。

次にイオン強度に及ぼすフラグメンター電圧の影響を検討した。各成分の脱プロトン化分子  $[\text{M}-\text{H}]^-$ 、あるいは糖脱離イオン  $[\text{M}-\text{glucose}-\text{H}]^-$  を効率良く生成する 120V に設定した。更に、他のパラメーターの最適測定条件を検討し、表 2 に示す条件を設定し

た。本条件によって得られた各イソフラボンの検出限界は、SIMモードでモニターイオンを各イソフラボンの脱プロトン化分子あるいは糖脱離イオンとした場合、概ね10ng/mL(絶対量として50pg)であった。

## 5.2. 前処理法の検討

飼料からの抽出には、アグリコン(Daidzein, Genistein, Glycitein)及び配糖体(Daidzin, Genistin, Glycitin)とも良好に回収される80%メタノールを用いた。LC/MSは選択性に優れており、クリーンアップ操作なしに飼料分析への応用が可能であった。

## 5.3 飼料中の植物エストロゲン

市販されている飼料40検体を購入し、測定に供した結果、ほとんどの飼料から植物エストロゲンが検出された(表5)。なお、植物エストロゲンフリーとして注文生産されている飼料からは植物エストロゲンは検出(<0.2µg/g)されなかった。

市販されている多くの実験動物飼料中に植物エストロゲンが含まれていた。そこで、最も高濃度で植物エストロゲン(569µg/g)が含まれていた飼料から、マウス及びラットが摂取する植物エストロゲン量の試算を試みた。マウスの一日の飼料摂取量を6gとした時、植物エストロゲンの推定摂取量は3,414µg/日、ラットでは14,225µg/日(一日の飼料摂取量を25gとした時)程度となった。

以上の結果から、マウス等の実験動物が飼育環境から植物エストロゲンの暴露を受けていることが示唆された。

## D 結論

### 1. 生体試料中のBPA分析法ガイドラインの構築

LC/MS及びGC/MSを用いたビスフェノールA(BPA)の信頼性の高い高感度分析法を構築し、血清(母体血、さい帯血)、腹水及び尿中のBPA濃度を測定した。

・血清(さい帯血、母体血)及び腹水中の遊離体BPA濃度は操作ブランクレベル(0.2ng/mL)であった。一方、抱合体も含めた総BPA濃度は、一部の試料からは1-2ng/mLレベルで検出された。

・尿中では、遊離体BPA濃度は平均で0.1ng/mL程度、抱合体も含めた総BPAは、平均で0.6ng/mL程度であった。

### 2. BPAの体内動態

低用量(50µg)及び高用量(1mg)のBPAを経口的に単回摂取し、摂取後の体内動態を調べた。

・BPAは消化管から速やかに吸収され、投与量の約80-97%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の曝露量を評価することが可能と考える。

・尿中への移行量に比べ、血中への移行量は少なく、その殆どが抱合体(最高濃度:43ng/mL;経口摂取後0.5時間)で、その時の遊離体BPA濃度は約0.3ng/mLであった(1mg経口摂取時)。

### 3. BPA分析法ガイドラインの検証

構築したBPA分析法ガイドラインについて、3機関でクロスチェックを実施したところ、良好な結果が得られた(RSD7%)

### 4. BPAの推定曝露量について

1日尿を用いてBPAの推定曝露量を求めた結果、1µg/dayレベルであり、2002年5月に示されたEUの暫定TDI(500µg/day)に比べ問題のないレベルと思われた。

### 5. 飼料、床敷中のBPA分析法ガイドラインの構築

動物実験の信頼性確保するため、動物実験環境(飼料、床敷、給水)からのBPA曝露量を評価する分析法を構築した。本法を用いて飼料等を分析した結果、飼料中(n=40)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。最も高濃度で検出されたBPA濃度(2.9ng/g)より、マウス及びラットが飼料から摂取するBPAを試算すると、マウスでは17.4ng/日(一日の飼料摂取量を6gとした時)、ラットでは72.5ng/日(一日の飼料摂取量を25gとした時)程度となる。また、床敷中(n=14)からは最高で704ng/g検出されたものも見られたが、給水中(n=3)からはBPAは検出(0.02ng/mL)されなかった。

### 6. 飼料中の植物エストロゲン分析法の構築

動物実験の信頼性を確保するため、飼料中に含まれる植物エストロゲン(イソフラボン)の分析法を検討した。

測定に供したほとんどの飼料(37/40)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(569µg/g)より、マウス及びラットが飼料から摂取

する植物エストロゲンを試算すると、マウスでは 3,414  $\mu$ g/日（一日の飼料摂取量を 6 g とした時）、ラットでは 14,225  $\mu$ g/日（一日の飼料摂取量を 25 g とした時）程度となる。以上の結果から、マウス等の実験動物が飼育環境から植物エストロゲンの暴露を受けていることが示唆された。なお、植物エストロゲンフリーとして注文販売されている飼料からは植物エストロゲンは検出 (<0.2  $\mu$ g/g) されなかった。

## E. 研究業績

### 1. 論文発表

1) Tadashi Tsukioka, John Brock, Sam Graiser, Johnny Nguyen, Hiroyuki Nakazawa and Tsunehisa Makino, Determination of trace Amounts of Bisphenol A in Urine by Negative-Ion Chemical-Ionization-Gas Chromatography/Mass Spectrometry, *Analytical Science*, 19, 151(2003)

2) Tadashi Tsukioka, Jun-ichi Terasawa, Shouichiro Sato, Yoshiyuki Hanaoka, Tsunehisa Makino and Hiroyuki Nakazawa, Development of analytical method for determining trace amounts of BPA in urine samples and estimation of exposure to BPA, *Journal of Environmental Chemistry*, 14, 57 (2004)

3) Masakazu Horie, Harumi Takegami, Sakiko Tannno, Kouichi Inoue, Hiroyuki Nakazawa, Shun-ichiro Izumi, Tsunehisa Makino, "Determination of nonylphenol and octylphenol in serum and urine by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry" *in submission*

### 2. 学会発表

1) 堀江正一, 吉田栄充, 中澤裕之, 牧野恒久, LC-MS による魚肉中ノニルフェノール, オクチルフェノールの分析, 第 83 回日本食品衛生学会 (東京) 平成 14 年 5 月

2) 堀江正一, 戸谷和男, 竹上晴美, 食品中ノニルフェノール, オクチルフェノールの分析法と実態調査, 第 39 回全国衛生化学技術協議会 (山形)

平成 14 年 10 月

3) 月岡 忠, John Brock, Sam Graiser, Johnny Nguen, 中澤裕之, 牧野恒久, NCI-GC/MS-SIM による生体試料中のオクチルフェノール, ノ

ニルフェノール及び BPA の定量, 第 10 回環境化学討論会, 平成 13 年 5 月

F. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし。

G. 健康危険情報  
該当なし。

表1 LC-MS測定条件（血清、尿中のBisphenol Aの分析）

Apparatus: HP1100 Series LC/MSD (Hewlett Packard)			
MS Conditions		HPLC Conditions	
Ionization Mode	ESI, Negative Mode	Column	Zorbax XDB-C18 (150 x 2.1)
Fragmentor	90V	Eluent	0.003% NH <sub>4</sub> OH - MeCN(58:42)
Nebulizer	N <sub>2</sub> (30 psi)	Flow rate	0.18 ml/min
Drying gas	N <sub>2</sub> (10 l/min, 350°C)	Oven temp.	40°C
V-cap	4500V	Injection size	20µl
SIM ion	m/z 227.1, 241.1		

表2 LC/MS 測定条件（飼料中のイソフラボン分析）

Apparatus: HP1100 Series LC/MSD (Hewlett Packard)			
MS Conditions		HPLC Conditions	
Ionization Mode	ESI, Negative Mode	Column	Zorbax XDB-C18 (150 x 2.1 mm)
Fragmentor	120V	Eluent	gradient (containing 0.003% AcOH)
Nebulizer	N <sub>2</sub> (40 psi)	Flow rate	0.2 ml/min
Drying gas	N <sub>2</sub> (10 l/min, 350°C)	Oven temp.	40°C
V-cap	4500V	Injection size	5µl
SIM ion	(M-H) <sup>-</sup> (M-glucose-H) <sup>-</sup>		

gradient

A= 10% MeCN (containing 0.003% acetic acid)

B= 50% MeCN (containing 0.003% acetic acid)

(min)	A	B
0	100	0
20	25	75
25	0	100

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 飼料・床敷・給水瓶中のBPAの分析

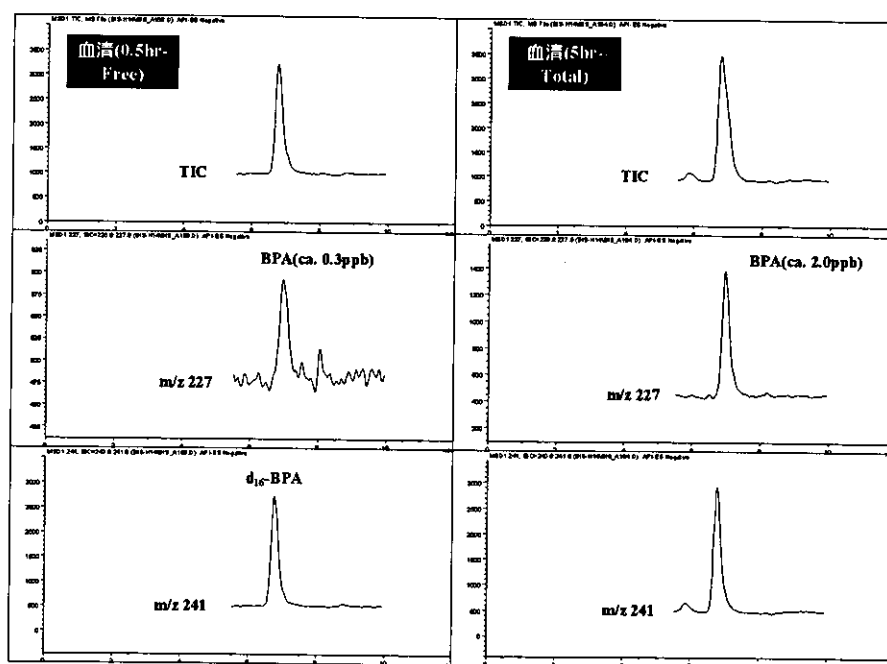
Sample	BPA (ppb)	Sample	BPA (ppb)	Sample	BPA (ppb)
F-1	<1.0	F-21	<1.0	M-1	1.9
F-2	<1.0	F-22	<1.0	M-2	1.8
F-3	<1.0	F-23	<1.0	M-3	704
F-4	1.3	F-24	<1.0	M-4	<1.0
F-5	1.2	F-25	2.9	M-5	<1.0
F-6	1.1	F-26	<1.0	M-6	<1.0
F-7	<1.0	F-27	<1.0	M-7	9.3
F-8	<1.0	F-28	<1.0	M-8	-
F-9	<1.0	F-29	<1.0	M-9	-
F-10	<1.0	F-30	<1.0	M-10	1.8
F-11	<1.0	F-31	2.2	M-11	559
F-12	<1.0	F-32	<1.0	M-12	-
F-13	<1.0	F-33	<1.0	M-13	-
F-14	<1.0	F-34	<1.0	M-14	1.7
F-15	<1.0	F-35	1.7		
F-16	<1.0	F-36	1.2	B-1	<0.02
F-17	<1.0	F-37	<1.0	B-2	<0.02
F-18	<1.0	F-38	1.5	B-3	<0.02
F-19	<1.0	F-39	<1.0		
F-20	<1.0	F-40	2.5		

表 5 飼料中の植物エストロゲンの分析結果

Sample	植物エストロゲン(ppm)	Sample	植物エストロゲン(ppm)
F-1	68	F-21	26
F-2	36	F-22	4.4
F-3	220	F-23	278
F-4	14	F-24	81
F-5	14	F-25	211
F-6	52	F-26	134
F-7	5	F-27	34
F-8	24	F-28	34
F-9	2.4	F-29	346
F-10	405	F-30	312
F-11	204	F-31	410
F-12	276	F-32	569
F-13	218	F-33	427
F-14	173	F-34	54
F-15	ND	F-35	3.4
F-16	105	F-36	135
F-17	180	F-37	262
F-18	ND	F-38	224
F-19	35	F-39	118
F-20	23	F-40	80

◎：T7107がソリ-飼料

図1 代表的なLC/MS-SIMクロマトグラム



平成 14-16 年度 厚生労働科学研究 (化学物質リスク研究事業)  
分担報告書

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  
『生体試料中化学物質 (ノニルフェノール) 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	牧野 恒久	(東海大学医学部専門診療学系)
分担研究者	中澤 裕之	(星薬科大学 薬品分析化学教室)
研究協力者	斉藤 貢一	(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)
	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)

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-d<sub>5</sub>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

アルキルフェノール類は、様々な工業製品、界面活性剤、樹脂モノマー、プラスチック添加剤等の原料として利用されてきた。1991年、A. M. Sotoらにより改良型ポリスチレン製実験器具から溶出する4-ノニルフェノール (NP) にヒト乳がん細胞 (MCF-7) 増殖能 (エストロゲン活性) を有することが報告された<sup>1)</sup>。そして、近年では、*in vitro* や *in vivo* 系での多くの研究が報告され、エストロゲン活性のみではなく、代謝阻害への影響<sup>2)</sup>、ヒト神経 Nicotinic acetylcholine receptor/channels への抑制<sup>3)</sup>、コルチゾール産生能に対する阻害<sup>4)</sup>などのヒト由来の細胞等を用いた検討でも、様々な活性が確認されている。そのNPが、環境を汚染し、生体への暴露を進行させているとして、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<sup>5)</sup>、GC/MS法<sup>6)</sup>、LC/MS法<sup>7)</sup>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、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<sup>8)</sup>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た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】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、用いた。

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-



d<sub>5</sub> (NP-d<sub>5</sub>) 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: N<sub>2</sub> (35 psi)
- ・Drying gas: N<sub>2</sub> (12 l/min, 350 °C)
- ・フラグメンター電圧: 130 V (NP, NP-d<sub>5</sub>)
- ・モニタリングイオン (m/z): 219 (NP), 224 (NP-d<sub>5</sub>)

#### 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℃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℃) 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-d<sub>5</sub> 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. 実験環境等の汚染状況

下記の試薬・実験器具より、汚染が確認された。

- ・セプタム: メタノールのブランク分析をした際、9.7 ppb の NP が検出された。そのため、NP の残留していない Agilent 社製 Screw cap septa (5182-0729) を使用することにした。
- ・精製水: NP が 0.2 ppb 程度検出されるものがあつた。そのため、NP の測定には、検出限界以下となるものを用いることとした。
- ・固相抽出用カートリッジ: メタノールで洗浄した溶液を測定した場合、3.5 ppb 程度の NP が検出された。そこで、オンライン固相抽出法を採用し、環境からの汚染をできるかぎり除外した。

採取器具: 一部の血液採取器具より、NP が残留することが報告されている。そこで、実際の採血や保存器具に関して、NP などの含まないものを使用するようにした。

## C.2. オンライン抽出-LC/MS 法による分析法の検討

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ィー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 機関では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-d<sub>8</sub> 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) A.M. Soto, H. Justicia, J.W. Wray, C. Sonnenschein, *Environ. Health Perspect.*, 92, 167-173(1991)
- 2) R. White, S. Jobling, S.A. Hoare, J.P. Sumpter, M.G. Parker, *Endocrinology* 135, 175-182 (1994)
- 3) T. Niwa, Y. Maekawa, M. Fujimoto, K. Kishimoto, Y. Yabusaki, F. Ishibashi, M. Katagiri, *Biolog. Pharm. Bull.*, 25, 235-238 (2002)
- 4) K. Nakazawa, Y. Ohno, *European J. Pharm.*, 430, 175-183 (2001)
- 5) S. Nakajin, S. Shinoda, S. Ohno, H. Nakazawa and T. Makino, *Environ. Toxicol. Pharm.*, 10, 103-110 (2001)
- 6) 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
- 7) 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
- 8) H. Narasaki, Determination of 4-nonylphenol in river-water samples by LC/MS using solid-phase sorbents., *Bunseki Kagaku* 52(8), (2003) 627-634
- 9) 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

### 1. 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 MS	Agilent 1100 Series Agilent 1100 Series LC/MSD SL
Extraction	前処理カラム CS用移動相 CS用流速(ml/min) バルブスイッチングタイム(min)	BSA-ODS/S (4.6 x 10 mm, 5 μm) 10% Methanol 0.5 5 (Configuration A→Configuration B)
Determination (LC parameter)	分離カラム 移動相(A) 移動相(B) 組成比率(A/B) 分析時間 流速(ml/min) カラム温度(°C) 注入量(μL)	mightysil RP18GP (2.1 x 100 mm, 5 μm) 0.02 % Ammonium acetate in water 0.02 % Ammonium acetate in Acetonitrile A:B= 30:70 (0min)⇒30:70 (8min)⇒ 5:95 (10min) 移動相 5:95のまま20minまで、その後、5minで平滑化 計 25min分析 0.2 40 30
Determination (MS parameter)	イオン化法 検出モード 検出イオン(m/z) 測定モニタリング Fragmentor voltage (V) Capillary voltage (V) Nebulizer Drying gas	ESI ネガティブ 219 (NP-d <sub>5</sub> : 224) SIM 130 (NP-d <sub>5</sub> : 130) 3500 N <sub>2</sub> (35 psi) N <sub>2</sub> (12 L/min, 350 °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 MS	Agilent 1100 Series Micromass Quattro Ultima	Shimadzu LC-10Avp Thermo Electoron LC-MS/MS TSQ-7000
Determination (LC parameter)	分離カラム 移動相(A) 移動相(B) 組成比率(A/B) 分析時間 流速(ml/min) カラム温度(°C) 注入量(µL)	ODS-3 (2 mm x 250 mm, 5 µm) 0.1mmol/L Ammonium acetate in water :Acetonitrile(13:87) - - 20 min 平衡化10min 0.2 40 50	mightyil RP18GP (2.1 x 100 mm, 5 µm) 0.02 % Ammonium acetate in water 0.02 % Ammonium acetate in Acetonitrile A:B= 30:70 (0min)⇒30:70 (8min)⇒ 5:95 (15min) 移動相 5:95のまま25minまで、5minで平滑化 0.21 室温 30
Extraction	前処理カラム CS用移動相 CS用流速(ml/min) ハルブススイッチングタイム(min) 3.5~6.5	mightyil RP18 (2.1 x 50 mm, 5 µm) 0.1mmol/L Ammonium acetate in water :Acetonitrile(3:7) 0.2	BSA-ODS/S (4.6 x 10 mm, 5 µm) 10% Methanol 0.5 5
Determination (MS parameter)	イオン化法 検出モード 検出イオン(m/z) 測定モニタリング Cone voltage (V)	ESI ネガティブ 219 (NP-d <sub>s</sub> : 224) SIM 65(NP-d <sub>s</sub> : 65)	ESI ネガティブ 219 (NP-d <sub>s</sub> : 224) SIM (Q1)

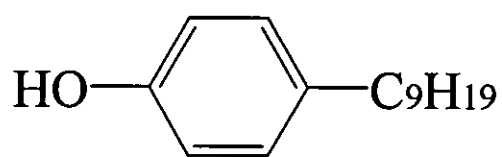
表 4 NP 測定における注入プログラム

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

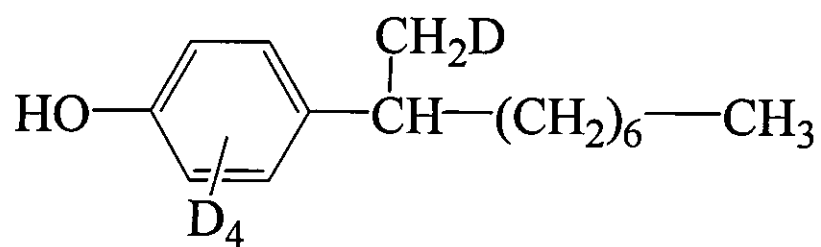
表 5 各機関の NP のバリデーションデータ及び検出結果

		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-d<sub>5</sub>

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-d<sub>5</sub>の構造式

### 【酢酸アンモニウム濃度の検討】

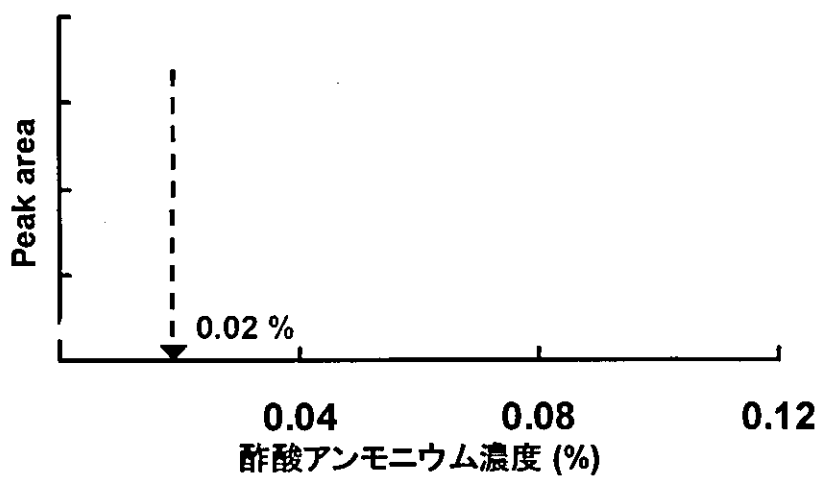
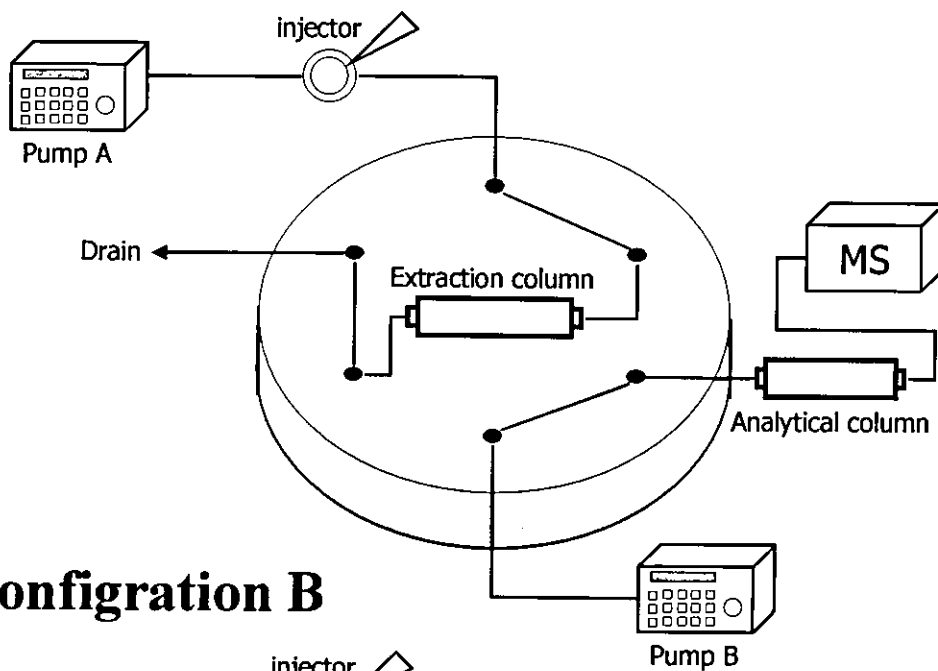


図2 移動相に添加する酢酸アンモニウムの検討

## Configuration A



## Configuration B

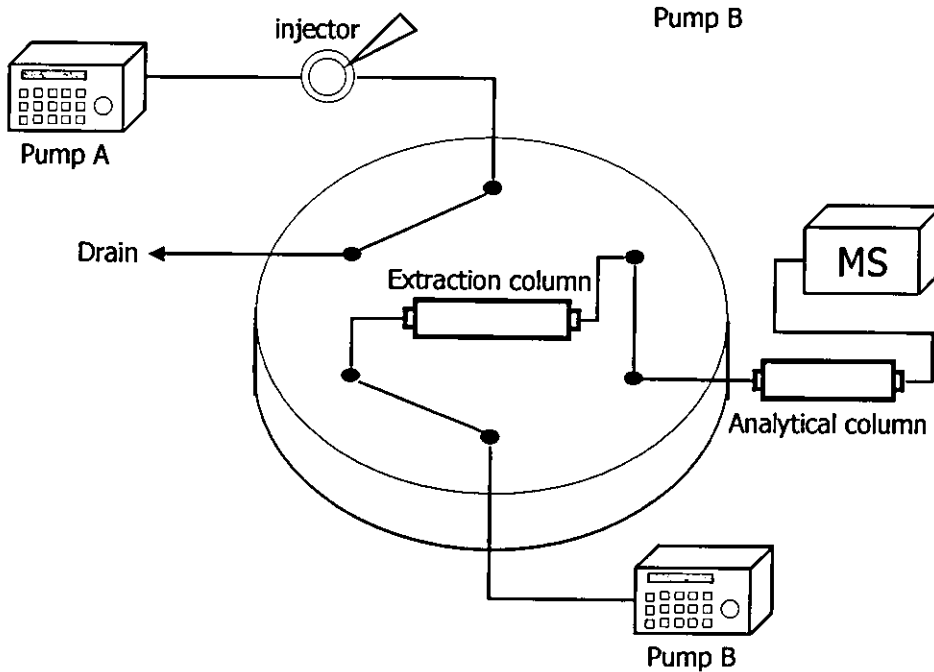


図 3 カラムスイッチング-システム図

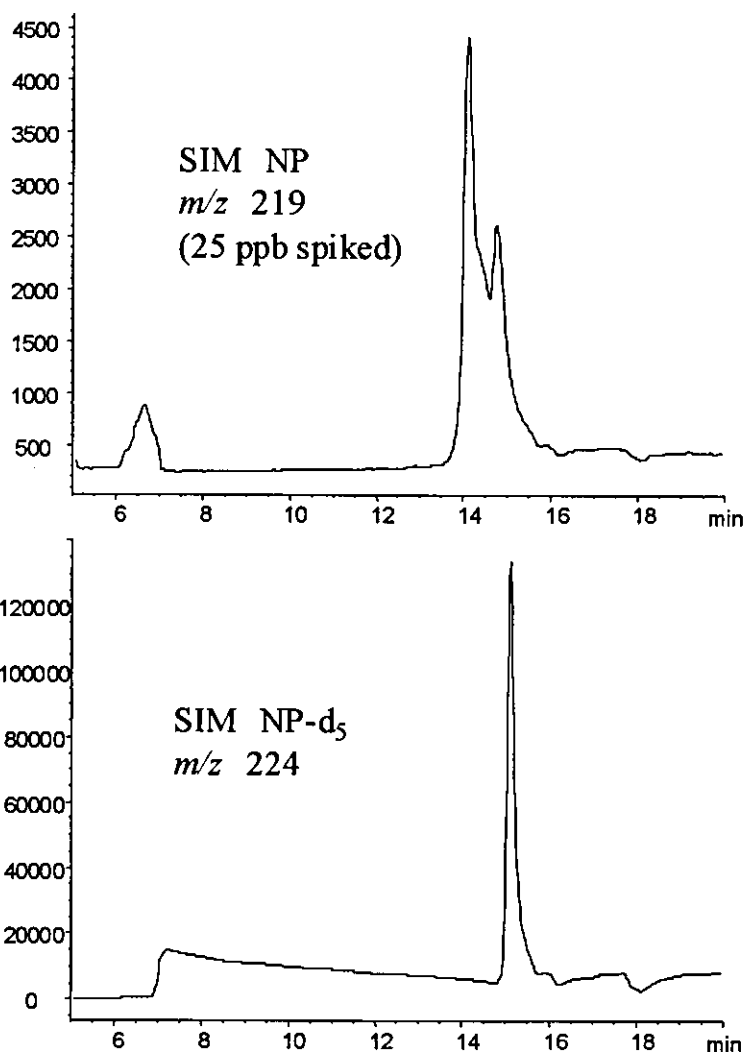


図 4 NP の添加回収試験におけるクロマトグラム