

## 薬の分析

FPD 検出器付きガスクロマトグラフ (FPD-GC) 及び ECD 検出器付きガスクロマトグラフ (ECD-GC) : Agilent 社製 6890 GC システムを用いた。測定条件は次のとおりとした。

### ○有機リン系農薬 (FPD-GC)

カラム : DB-1 0.25mm×30m×0.25 μm  
カラム温度 : 130°C (2min) - 10°C/min - 180°C - 5°C/min - 240°C (15min)

注入口温度 : 250°C

検出器温度 : 250°C

キャリアーガス : He, 1.5mL/min

注入方法 : スプリットレス

試料注入量 : 2 μL

### ○ピレスロイド系農薬 (ECD-GC)

カラム : DB-17 0.25mm×30m×0.25 μm

カラム温度 : 80°C (10min) - 10°C/min - 270°C (20min)

注入口温度 : 250°C

検出器温度 : 250°C

キャリアーガス : He, 1.5mL/min

注入方法 : スプリットレス

試料注入量 : 1 μL

## 4. 検量線の作成

### 4.1 尿中の 3-PBA の分析

内部標準物質として、3-PBA の安定同位体標識内部標準物質が市販されていないことから、3-PBA と構造が類似している 2-PBA を用いた。内部標準物質 2-PBA を 20 ng 含んだ 3-PBA の 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10 及び 100ng/mL の溶液を調製し、その 5 μL を LC/MS/MS に注入した。検出には MRM (Multiple Reaction Monitoring) 法を採用し、それぞれモニターイオン  $m/z$  213>90 により得られた MRM クロマトグラムよりピーク面積を求め、3-PBA と 2-PBA の面積比により検量線を作成した。

### 4.2 マーケットバスケット試料中の農薬の分析

各農薬標準品の濃度が 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 及び 1 μg/mL となる混合標準溶液を調製し、その 1 ~ 2 μL を GC に注入した。得られた GC 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 3-PBA 試験溶液の調製 (尿)

#### 5.1.1 遊離体 3-PBA 測定用試験溶液

尿 2mL を採り、内部標準物質である 2-PBA を 20 ng 加えた後 Oasis HLB カートリッジに負荷した。水 (3mL x 2) で洗浄した後メタノール 3mL で溶出し、減圧乾固後 40%アセトニトリル 1mL に溶解して試験溶液とした。

#### 5.1.2 総 3-PBA 測定用試験溶液

尿 2mL を採り、内部標準物質である 2-PBA を 20 ng 加えた後、0.2M 酢酸緩衝液 (pH 5) 2mL、β-グル

クロニダーゼ 6,500 units/mL (試薬 β-グルクロニダーゼを 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 5) で 20 倍希釈) を 50 μL 加え、37°C で 90 分間インキュベートした。その後の操作は遊離体 3-PBA 測定用試験溶液と同様に行い、試験溶液を調製した。

### 5.2 残留農薬測定用試験溶液の調製

マーケットバスケット用試料 20g を採り、アセトン 80 mL を加えてホモジナイズ抽出し、吸引ろ過した。残渣を更にアセトン 40mL を加え、ホモジナイズ抽出した後、同様に吸引ろ過した。ろ液を合わせ、あらかじめ飽和塩化ナトリウム水溶液 50mL の入れてある分液ロートに移し、ヘキサン 50mL で振とう抽出した。ヘキサン層を分取し、減圧乾固した後、ヘキサン 5mL に溶解し、その 1mL を有機リン系農薬分析用試験溶液とした。なお、2 ~ 5, 10 ~ 12 群については、アセトニトリル/ヘキサン分配による脱脂操作を追加した。

ピレスロイド系分析用試験溶液は、先のヘキサン溶液 3mL をフロリジルカラムクロマトグラフィ (内径 10mm, 長さ 300mm のカラムにフロリジル PR 3g をヘキサンを用いて湿式充填) で精製した。即ち、ヘキサン溶液 3mL をカラムに負荷し、15% エーテル-ヘキサン 40mL で溶出し、試験溶液とした。

## C, D. 研究結果 及び 考察

### 1. 3-PBA の LC/MS/MS による分析法の検討

ピレスロイド系農薬の多くは、3-phenoxybenzoic acid (3-PBA) に代謝される。そこで、3-PBA を指標成分とした LC/MS/MS による高感度分析法を検討した。イオン化モードは、3-PBA がカルボキシル基を有していることからネガティブモードが適していた。その他の LC/MS/MS 測定条件は表 2 に示すとおりである。

### 2. 尿中の 3-PBA の分析法の検討

大気あるいは食品を介して摂取されたピレスロイド系農薬は、肝臓において代謝され、尿中へ排泄される。そこで、ピレスロイド系農薬の曝露レベルを評価するために、尿中に含まれるピレスロイド系農薬の主代謝物 3-PBA の測定法を検討した。

#### 2.1 遊離体 3-PBA の前処理

3-PBA はカルボキシル基を有するものの、構造的に疎水性に富む化合物と考えられる。そこで、ポリマー逆相系カートリッジを用いた前処理法を採用することにした。尿をカートリッジに直接負荷し、水で洗浄後、メタノールで溶出する簡便な前処理法を構築した。本法による 3-PBA の添加回収率 (2 ppb 添加) は、平均で 92.7%, 相対標準偏差 RSD は 4.7% (n=5) であった。

#### 2.2 総 3-PBA の前処理

3-PBA は、グルクロン酸抱合体として尿中へ排泄されると考えられる。そこで、β-グルクロニダ

ーゼによる脱抱合体処理条件を検討した。検討の結果、インキューベーションは 1 時間以上、 $\beta$ -グルクロニダーゼの量は  $30 \mu\text{L}$  以上 ( $\beta$ -グルクロニダーゼを  $0.2 \text{ M}$  酢酸緩衝液 (pH 5) で 20 倍希釈したもの) で十分であった。そこで、インキューベーションは 90 分、 $\beta$ -グルクロニダーゼの量は  $50 \mu\text{L}$  とした。

本法による 3-PBA の添加回収率 (2 ppb 添加) は、平均で 82.7%、相対標準偏差 RSD は 7.5% (n=5) であった。

### 3. 成人尿中の 3-PBA レベル

埼玉県衛生研究所に勤務する職員、10 名 (男女各 5) の尿中の 3-PBA レベルは表 3 に示すとおり、遊離体は殆どが検出下限値 (LOD, 0.02 ppb) 以下、グルクロン酸抱合体は平均で 0.58ppb であった。代表的な尿サンプルの LC/MS-MRM クロマトグラムを図 2 に示す。今回の 3-PBA 濃度及び成人平均尿量から、構造中に 3-PBA を有するピレスロイド系農薬の尿中排泄量を推定すると約  $2 \mu\text{g}$  となる。なお、3.7ppb 検出された職員について、3 日後の尿を採取し、3-PBA 濃度を測定した結果、総 3-PBA は 0.3ppb であった。

なお、3-PBA が 3.7ppb 検出された尿を冷蔵 ( $5^{\circ}\text{C}$ ) で 7 日間保存し、3-PBA の尿中での安定性を調べた結果、3-PBA のグルクロン酸抱合体は比較的安定であった。

ピレスロイド系農薬は、農産物から有機リン系農薬について多く検出されている。また、家庭用殺虫剤として使用されている化学物質の 90%以上がピレスロイド系農薬とする調査報告がなされている。今回の測定結果から、ヒトは大気及び食品を介して極微量であるが、ピレスロイド系農薬に曝露されていることが示唆された。

今後は、夏季及び冬季の成人及び子どもの一日常尿を採取し、ピレスロイド系農薬の季節による曝露量の相違等を調査する予定である。更に、家庭用として汎用されているピレスロイド系防虫剤の中には、構造中に 3-PBA を有していないものもあることから、これらの曝露評価法についても検討する予定である。

### 4. 食品に含まれるピレスロイド系農薬及び有機リン系農薬の分析

家庭用殺虫剤として使用されている化学物質の 90%以上がピレスロイド系農薬とする調査報告がなされていることを先に述べた。また、農産物から最も高頻度で検出される農薬は有機リン系農薬であり、次いでピレスロイド系農薬が多く検出されている。そこで今回、私たちが日常の食生活を介してどの程度これらの農薬に曝露されているか調べた。トータルダイエット法により、食品中のピレスロイド系農薬 9 種及び有機リン系農薬 48 種の分析を実施した結果、今回の調査では、い

ずこの食品群からもピレスロイド系農薬、有機リン系農薬とも検出されなかった。

### E. 結論

1. ピレスロイド系農薬の曝露量を評価するため、LC/MS/MS を用いた主代謝物 3-PBA の高感度分析法を構築した (検出下限値 LOD, 0.02 ppb)。

2. 尿中の 3-PBA の前処理法として、Oasis HLB を用いた固相抽出法を構築した。本法を用いて成人尿 10 検体 (男女各 5) 中の 3-PBA 濃度を測定した結果、遊離体は殆ど LOD 以下であった。一方、グルクロン酸抱合体は 0.02-3.7ppb (Av. 0.58ppb) レベルで検出された。

3. トータルダイエット法により、ピレスロイド系農薬及び有機リン系農薬の曝露調査を実施したところ、今回の調査では、分析に供した食品群からピレスロイド系農薬及び有機リン系農薬とも検出されなかった。

### F. 健康危険情報

該当なし。

### G. 研究発表

該当なし。

### H. 知的所有権の取得状況

該当なし。

図1 ピレスロイド系農薬の主代謝物

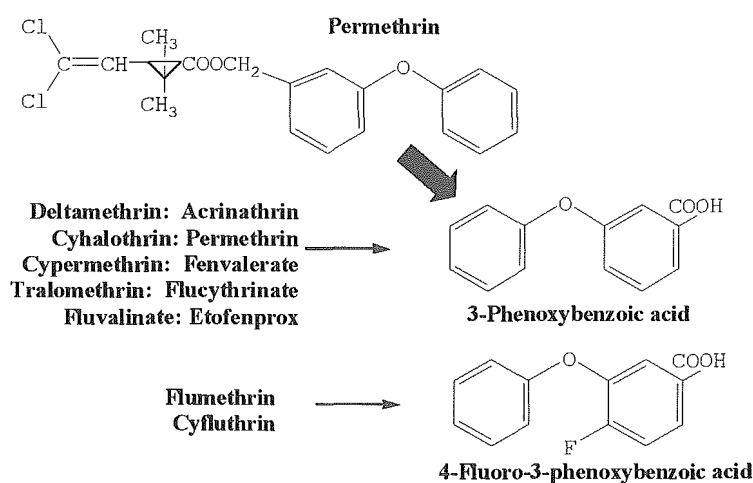


表1. 測定対象農薬

有機リン系農薬(48種)

メタミドホス, アセフェート, ジメトエート, トリクロホスメチル, マラチオン, イソフェンホス P=O, イソフェンホス, ブタミホス, ジクロロポス(DDVP), テルブホス, ピリミホスメチル, フェンチオン(MPP), ホスチアゼート, フェントエート(PAP), フェンスルホチオン, ホサロン, トリクロルホン, ダイアジノン, フェントロチオン(MEP), クロルピリホス, キナルホス, プロチオホス, EPN, エトプロホス, エトリムホス, E-ジメチルビンホス, Z-ジメチルビンホス, クロルフェンビンホス, バミドチオン, エディフェンホス(EDDP), ピラクロホス, エチルチオメトン, イプロベンホス(IBP), パラチオンメチル, パラチオン, メチダチオン(DMTP), シアノフェンホス(CYP), ピリダフェンチオン, カズサホス, スルプロホス, チオメトン, サリチオン, シアノホス(CYAP), ホルモチオン, ジクロロフェンチオン(ECP), クロルピリホスメチル, プロバホス, エチオン, ホスメット(PMP), プロフェノホス

ピレスロイド系農薬(9種)

シハロトリン, ペルメトリン, シペルメトリン, フェンバレレート, トラロメトリン, シフルトリン, フルシトリネート, フルバリネート, デルタメトリン

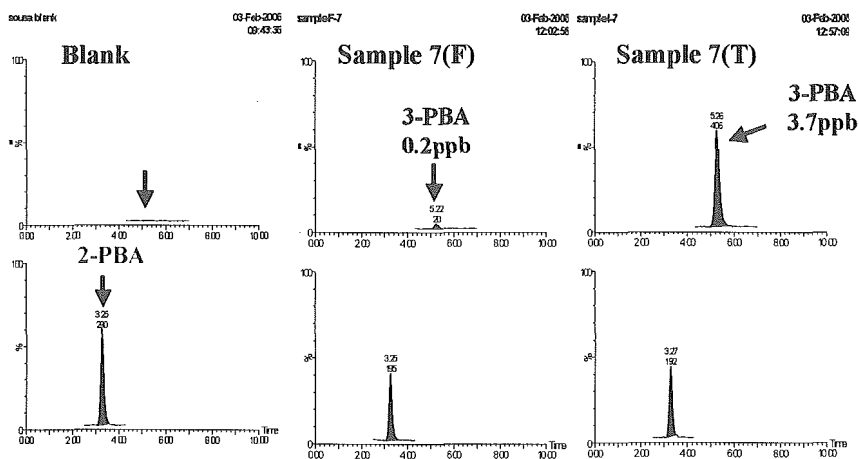
表2. LC/MS/MS 測定条件

LC/MS/MS Conditions	
<b>LC Conditions</b>	
Column	Symmetry C18 (2mm x 50mm)
Eluent	0.01% AcOH-MeCN (65:35)
Flow rate	0.2 mL/min
<b>MS/MS Conditions</b>	
Ionization	ESI (Nega)
Monitor Ion 3-PBA	m/z 213>169 Cone=30V, Collision=10eV
3-PBA	m/z 213>93 Cone=30V, Collision=20eV
2-PBA	m/z 213>169 Cone=20V, Collision=20eV
2-PBA	m/z 213>93 Cone=20V, Collision=25eV

表3 尿中の3-PBAレベル

Sample No.	Sex	Free	Glucuronide
Sample 1	F	<0.02	0.32
Sample 2	M	<0.02	0.76
Sample 3	M	<0.02	0.07
Sample 4	M	<0.02	0.23
Sample 5	F	<0.02	<0.02
Sample 6	F	<0.02	0.17
Sample 7	F	0.20	3.70
		<0.02	0.23
Sample 8	M	<0.02	0.28
Sample 9	M	0.09	0.50
Sample 10	F	<0.02	0.15
			0.58±1.05

図2 代表的なLC/MS-MRMクロマトグラム



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）分担研究報告書  
ヒト血液試料とハウスダスト中有機フッ素系化合物の一斉分析法の  
開発および LC/MS を用いたヒト尿中ニコチンの分析に関する研究

主任研究者	牧野 恒久	東海大学 医学部
分担研究者	中澤 裕之	星薬科大学 薬品分析化学教室
	斉藤 貢一	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
	岩崎 雄介	星薬科大学 薬品分析化学教室

#### 研究要旨

有機フッ素系化合物（PFCs）の中でも生活環境中で広範囲に存在し、生態系やヒトへの汚染が懸念されているパーフルオロオクタンスルホン酸（PFOS）、パーフルオロオクタンスルホンアミド（PFOSA）、パーフルオロオクタン酸（PFOA）、パーフルオロノナン酸（PFNA）、パーフルオロデカン酸（PFDA）について、ヒト成人および胎児期への曝露を評価するために、ヒト血液試料を対象とした PFCs の高感度分析法を構築し、分析法バリデーションについても検討した。更に、PFCs のヒトへの曝露源を解明するために、ハウスダストに着目してその分析法の構築を試みた。

また、タバコ煙に含まれる有害化学物質の中でも喫煙依存性を引き起こすことで問題視されているニコチンについて、生体内における曝露評価を行うために、ヒト尿中に含まれるニコチンの高感度・高精度な分析法を構築し、喫煙によるヒト曝露量評価についても検討した。

#### A. 研究目的

有機フッ素系化合物（PFCs）であるパーフルオロオクタンスルホン酸（PFOS）、パーフルオロオクタンスルホンアミド（PFOSA）、パーフルオロオクタン酸（PFOA）、パーフルオロノナン酸（PFNA）、パーフルオロデカン酸（PFDA）は、繊維類の撥水剤、界面活性剤、レベリング剤、消火剤、潤滑油および消泡剤等として用いられている。また、PFOA においては、テフロン加工製品にも応用されていることから、PFCs は、我々の生活環境中で広範囲に存在している。他方、PFCs は極めて安定な化学物質であると考えられており、河川水、海洋性哺乳類、魚類および鳥類等、生態系で分解することなく、長期にわたり残留することが報告されている。また、実験動物に対して、催奇形性、甲状腺ホルモンへの影響、パーオキシソーム増殖作用が報告されていることから、次世代への影響や発ガン作用、コレステロール代謝かく乱作用等が懸念されている。更に最近の報告では、PFOS および PFOA がヒト母体血を介して胎児へ移行する報告もある。そこで本研究では、ヒト血液試料における PFCs の高感度分析法の構築について検討した。

一方、近年、タバコ煙に含まれる有害化学物質は 200 種類を超えることが報告されており、喫煙による人体への悪影響が明らかとなっている。その中でもニコチンは喫煙により体内に吸収され、ニコチン依存症を引き起こすことから、必然的に喫煙行為を助長させる。また、女性の喫煙率は高まっており、周産期の妊婦がたばこの煙を吸うことによつて、妊婦や胎児に与える影響は大きいと考えられている。そこで、喫煙習慣を把握するた

めに、ニコチンおよびその代謝物質の高感度分析法が求められている。ニコチンの代謝物質の一つであるコチニンは、半減期が約 20 時間と長く、生物学的指標として適しており、喫煙習慣を認識するマーカーとししばしば分析対象となっている。そこで本研究では、カラムスイッチング-LC/MS を用いて、ヒト尿中に含まれるニコチンおよびその代謝物質であるコチニンの高感度分析法を構築し、喫煙者と非喫煙者の曝露実態の検討を行った。

#### B. 研究方法

##### 検討課題(1) ヒト血液試料およびハウスダスト中有機フッ素系化合物の一斉分析法の構築とバリデーション

①血液試料： 分析法に関しては、ヒト血漿中 PFOS、PFOSA、PFOA、PFNA および PFDA を測定対象とし、前処理操作の簡便化、測定時のコンタミネーションの軽減化および高感度化を目的に、可能な限り前処理操作を閉鎖系で実施するため、オンライン固相抽出-高速液体クロマトグラフィー（LC）/タンデム質量分析法（MS/MS）からなる測定システムを構築した。本システムは、アセトニトリルで除タンパクした試料溶液をオートサンプラーにより LC へ注入後、5 分間 50 mM 酢酸・酢酸アンモニウム緩衝液（pH = 4.7）/メタノール（90/10、v/v）を送液することで、固相抽出カートリッジ上で測定対象物質の濃縮とクリーンアップを行った。次に六方バルブを切り替え、1 mM 酢酸アンモニウムを添加した水/アセトニトリル混液をバックフラッシュ法によりグラジエント溶出することで、測定対象物質を固相抽出カート

リッジから溶出させ、分離部および検出部に導入した(Talbe 1, 2)。

②ハウスダスト：ハウスダストは固体試料であるため、前処理には固体試料にも応用可能な、超臨界流体抽出法を採用し、測定機器には高感度・高選択性を有する LC-MS/MS を用いた。ハウスダスト試料は、ダニの生息領域および家庭内特有のダストの領域だと考えられる 75  $\mu\text{m}$ ~1mm の領域を採取した。また、抽出条件の最適化を目的として、モディファイアの種類、流量および抽出時間の影響を検討した。実試料としてハウスダスト 20 検体の分析に応用し、PFOS 濃度の測定を行った。

#### 検討課題(2) LC/MS を用いたヒト尿中ニコチンの分析

前処理法には固相抽出法を適用し、測定に LC/MS を使用した。高精度な分析法を達成するために内標準法を採用し、内標準物質にニコチン- $d_3$  を使用した (Fig.1)。移動相に水 / メタノール (20/80, v/v) を使用し、流速は 0.2 ml/min とした。分析カラム (GL Sciences 社製 Inertsil-3 diol column (2.1 mm  $\times$  150 mm, 5  $\mu\text{m}$ )) で分離を行った後、MS 部に導入した。測定は、フラグメンター電圧を 110 V とし、選択イオン検出 (SIM) ポジティブイオンモードにて行った。モニタリングイオンは、分子量関連イオンである  $m/z$  163  $[\text{M}+\text{H}]^+$  とした (Table 3)。

#### C, D. 研究結果 及び 考察

##### 検討課題(1) ヒト血液試料中およびハウスダスト有機フッ素系化合物の一斉分析法の開発とバリデーション

① 血液試料：本分析法を用い、血漿試料における検出限界 (S/N = 3) を求めたところ、それぞれ PFOS: 0.08 ng/ml、PFOSA: 0.11 ng/ml、PFOA: 0.11 ng/ml、PFNA: 0.10 ng/ml、PFDA: 0.14 ng/ml であった。また、検量線を作成したところ、0.5~100 ng/ml の範囲で良好な直線性 (相関係数;  $r = 0.999$ ) が得られた (Table 4)。血漿試料を用いた添加回収試験 ( $n = 6$ ) においても、平均回収率 93.3%以上と良好な結果を得ることができた (Table 5)。

開発した分析法の信頼性を確保するため、内部精度管理を行った。10 ng/ml PFOS 標準溶液を用い、一日 4 検体を 20 日にわたって測定し、この結果をもとに管理図を作成し、本分析法の再現性について評価した。その結果、全ての測定日において、処置線を越える日が存在せず、本分析法の高い安定性が確認された。

更に、本分析法を用いて健常者の血液 6 検体を分析した結果、PFOS と PFOA は全員から検出され、それぞれ 2.11~21.3 ng/ml、0.73~4.57 ng/ml であったが、PFOSA と PFDA は検出されなかった (Fig. 2)。また、PFOS と PFOA の間に有意な相関

性 ( $r = 0.879$ ,  $n = 6$ ) が見られた。

② ハウスダスト試料：モディファイアにはメタノールを用い、抽出時間は 1 時間とした。本分析法を用い、ハウスダスト試料における検出限界を求めたところ、0.04 ng/g であった。また、検量線を作成したところ、0.5~100 ng/ml の範囲で良好な直線性 (相関係数;  $r=0.999$ ) が得られた。ハウスダスト試料を用いた添加回収試験 ( $n=6$ ) においても、回収率 93%以上と良好な結果を得ることができた。また、ハウスダスト 20 検体において PFOS はすべての検体から検出された (1.5~41.0 ng/g)。このことより、ハウスダストを介しての子どもへの PFOS の移行や影響が危惧される。

今後の展開として、母体血および臍帯血に応用し、羊水、母乳などに適用可能かどうか実証する予定である。また、PFCs のヒトへの暴露源を解明するために、ハウスダストと居住者の血液中 PFCs の調査を行う必要があると考える。

#### 検討課題(2) LC/MS を用いたヒト尿中ニコチンの分析

標準品を用いて構築した LC/MS 法の検出下限値は 0.5 ng/ml であった。ニコチンとコチニンの各安定同位体 (重水素置換体) をサロゲートとした内標準法を選択することで、高感度・高精度な分析法が達成できた (Table 6)。更に、尿を用いた添加回収試験では、コチニンについてはクリーンアップが不十分で実試料分析では良好なピークを得ることはできなかったが、ニコチンは夾雑物の影響を受けることなく、平均回収率 90%以上 ( $n = 3$ ) が得られた。そこで本年度の研究においてはニコチンのみを分析対象化合物として、本法を喫煙者および非喫煙者の尿に適用したところ、喫煙者におけるニコチン濃度が、非喫煙者に比べ有意に増加していることが観察され (Fig. 3)、暴露実態が明らかとなった。今後は、妊婦の尿に含まれるニコチンを測定し、暴露レベルを把握する予定である。

#### E. 結論

本年度は、次の 2 つの課題についての研究を行った。まず、ヒト血漿中 PFOS、PFOSA、PFOA、PFNA および PFDA を測定対象とし、前処理操作の簡便化、測定時のコンタミネーションの軽減化および高感度化を目的として、オンライン固相抽出-高速液体クロマトグラフィー (LC) / タンデム質量分析法 (MS/MS) からなる測定システムを構築し、そのバリデーションについて検討した。その結果、精度の高い分析法であることが確認された。更に、本分析法を用いて健常者の血液 6 検体を分析した結果、PFOS と PFOA は全員から検出され、PFOS と PFOA の間に有意な相関があることが示唆された。

また、喫煙に起因するニコチンの暴露評価を目的として、ヒト尿を測定対象とした LC/MS 分析法を検討した。その結果、ニコチンの代謝物である

コチニンについては、クリーンアップが不十分で実試料分析では良好なピークを得ることはできなかったが、ニコチンは夾雑物の影響を受けることなく測定可能であった。本法を喫煙者および非喫煙者の尿に適用したところ、喫煙者におけるニコチン濃度が、非喫煙者に比べ有意に増加していることが観察され、暴露実態が明らかとなった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 仲田尚生, 中田彩子, 岡田文雄, 伊藤里恵, 井之上浩一, 斉藤貢一, 中澤裕之, オンライン固相抽出 - LC/MS/MS を用いたヒト血漿中有機フッ素系化合物の一斉分析法の開発, 分析化学, 54, 877-884 (2005)

##### 2. 学会発表

1) 仲田尚生, 中田彩子, 岡田文雄, 井之上浩一, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 中澤裕之, 「カラムスイッチング - LC/MS/MS を用いた血液試料中有機フッ素系化合物の一斉分析法の構築」第 66 回 分析化学討論会 (2005)

2) Hisao Nakata, Migaku Kawaguchi, Teruaki Iwamoto, Koichi Inoue, Shiari Nozawa, Miki Yoshiike, Fumio Okada, Yusuke Iwasaki, Rie Ito, Koichi Saito, Hiroyuki Nakazawa, 「Determination of perfluorooctanesulfonic acid in human serum and semen samples by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry」, Fluoros (2005)

3) Hisao Nakata, Ayako Nakata, Migaku Kawaguchi, Yusuke Iwasaki, Rie Ito, Koichi Saito, Hiroyuki Nakazawa 「Development of analytical method of perfluorochemicals in human plasma and blood by liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with solid phase extraction using column switching technique」 25th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants (POPs)-Dioxin 2005 (2005)

4) Hiroyuki Nakazawa, Migaku Kawaguchi, Hisao Nakata, Tsunenobu Katumata, Ayako Nakata, Fumio Okada, Koichi Inoue, Rie Ito, Koichi Saito, Yasuaki Saijo, Fumihiko Sata, Reiko Kishi. 「Measurement of perfluorooctane sulfonate and related

perfluorinated compounds in human maternal and cord blood samples」 The Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC North America 26th Annual Meeting) (2005)

5) 中田彩子, 仲田尚生, 勝又常信, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 西條泰明, 佐田文宏, 岸 玲子, 中澤裕之 「カラムスイッチング - LC/MS/MS によるヒト母体血中の有機フッ素系化合物の測定」第 126 年会 日本薬学会 (2006) 仙台.

6) 勝又常信, 仲田尚生, 中田彩子, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 中澤裕之 「HPLC/MS/MS 法によるハウスダスト中パーフルオロ化合物の分析」第 126 年会 日本薬学会 (2006) 仙台.

#### H. 知的所有権の取得状況

- |           |    |
|-----------|----|
| 1. 特許取得   | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他    | なし |

Table 1 測定対象物質及びモニタリングイオンの設定

測定対象物質		
$\text{CF}_3\text{-(CF}_2\text{)}_7\text{-SO}_3^-$ PFOS	$\text{CF}_3\text{-(CF}_2\text{)}_6\text{-COOH}$ PFOA	$\text{CF}_3\text{-(CF}_2\text{)}_7\text{-SO}_2\text{NH}_3$ PFOSA
$\text{CF}_3\text{-(CF}_2\text{)}_7\text{-COOA}$ PFNA	$\text{CF}_3\text{-(CF}_2\text{)}_8\text{-COOA}$ PFDA	$\text{CF}_3\text{-(CF}_2\text{)}_5\text{-COOA}$ PFHpA (I.S)

モニタリングイオン				
Compound	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone voltage (-V)	Collision energy (eV)
PFOS	499[M-K] <sup>-</sup>	80	60	65
PFOSA	498[M-H] <sup>-</sup>	78	45	35
PFOA	369[M-COOH] <sup>-</sup>	169	30	18
PFNA	419[M-COOH] <sup>-</sup>	169	30	20
PFDA	468[M-COOH] <sup>-</sup>	169	30	22
PFHpA	319[M-COOH] <sup>-</sup>	169	28	18

Table 2 LC/MS/MS 操作条件

LC condition		Waters 2795	
Column	Inertsil ODS-3 (2.1x50 mm, 5µm)		
Extraction column	Oasis HLB (2.1 x 20 mm, 25mm)		
Flow rate (mL/min)	0.2		
Inject vol. (µL)	50		
Column temp. (°C)	40		
Mobile phase	A H <sub>2</sub> O B 100 mmol/L CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O C CH <sub>3</sub> CN		
Pump 1	Shimadzu LC-10AD		

MS condition				Quattro micro	
Capillary	(kV)	0.6	Gas	Argon (99.9999%)	
Extracto	(V)	4	Ionization mode	ES-	
Source temp.	(°C)	100	Inter-channel delay	0.1	
Desolvation temp.	(°C)	350	Inter-scan delay	0.1	
Gas flow			Repeats	1	
Desolvation	(L/hr)	350	Span	0.5	
Cone	(L/hr)	50			

Time program of column-switching LC/MS/MS

Time (min)	Column position	Mobile phase	
		Pump 1 <sup>a</sup> (A-B, v/v)	Pump 2 (A-B-C, v/v)
0.0	Configuration A	90:10	54:1:45
5.0	Configuration B	90:10	54:1:45
10.0	Configuration A		↓
12.0		90:10	14:1:85
14.9		90:10	14:1:85
15.0		90:10	54:1:45

<sup>a</sup>A: 50 mM Ammonium acetate buffer (pH = 4.7), B: Methanol



Table 3 ニコチン分析の LC/MS/MS 操作条件

LC		MS	
Pump-A	SHIMADZU LC-10 AD	Ionization	Electrospray
Mobile phase	MeOH(%) : 水(%) = 10 : 90	Mode	SIM positive ion mode
Flow rate	0.5 mL / min		Nicotine (m/z : 163)
Pump-B	Agilent 1100 series LC/MSD-SL		Cotinine (m/z : 177)
Mobile phase			Nicotine-d <sub>3</sub> (m/z : 166)
			Cotinine-d <sub>3</sub> (m/z : 180)
		Capillary Voltage	- 3000 V
		Nebulizer Pressure	35 psi
Flow rate	0.2 mL / min	Drying Gas Flow	N <sub>2</sub> (12 L / min)
Valve change time	3 min	Drying Gas Temperature	350 °C
Injection volume	20 μL	Fragmentor Voltage	110 V
Extraction column	Oasis HLB (2.1x50 mm, 25 μm)		
Analytical column	Inertsil HPLC column diol (5 μm 2.1 mm x 150 mm)		
Column temperature	40 °C		

Table 4 PFCs の分析法バリデーション

Analyte	LOD (ng/mL)	Linear range (ng/ml)	r	RSD <sub>RT</sub> (%)	RSD <sub>PA</sub> (%)
PFOS	0.08	0.5-100	0.999	0.9	6.0
PFOSA	0.11	0.5-100	0.999	0.9	6.4
PFOA	0.11	0.5-100	0.999	0.8	4.9
PFNA	1.10	0.5-100	0.999	0.9	7.2
PFDA	0.14	0.5-100	0.999	1.1	6.9

(n = 6)

Table 5 ヒト血漿試料中における PFCs の回収率

Compound	Spiked amount (ng/ml)	Average recovery (%)	RSD (%)
PFOS	5	99.3	3.0
	50	97.5	6.3
PFOSA	1	98.3	4.2
	10	105	4.2
PFOA	1	100	8.9
	10	97.3	4.8
PFNA	1	96.7	8.4
	10	94.7	3.1
PFDA	1	93.3	8.7
	10	103	4.7

(n = 6)

Table 6 ニコチンおよびコチニンの分析法バリデーション

	LOD (ppb)	LOQ (ppb)	検量線範囲 (ppb)	相関係数
ニコチン	0.2	1.0	1.0~1000	r=0.999
コチニン	0.2	1.0	1.0~1000	r=0.999

LOD: limit of detection (S/N=3), LOQ: limit of quantification (S/N>10)

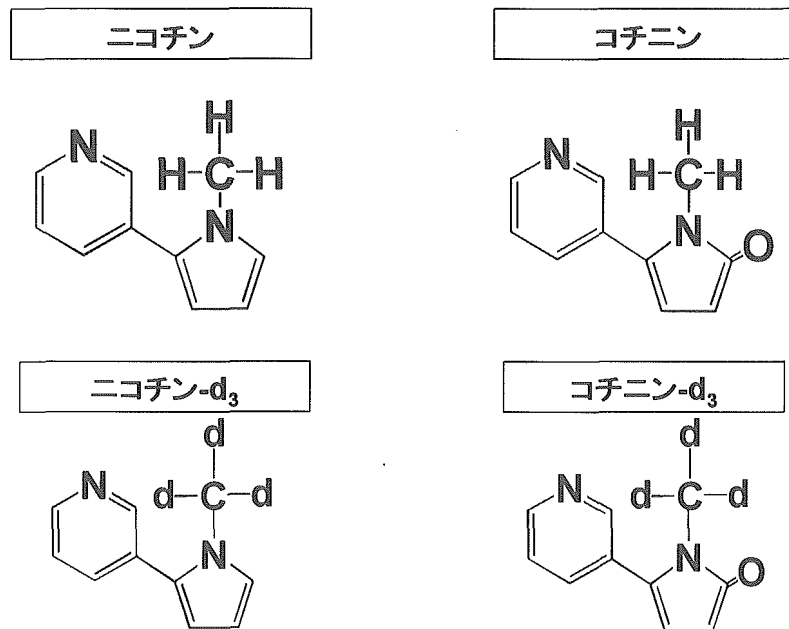


Fig. 1 ニコチン, コチニンおよび各サロゲートの構造式

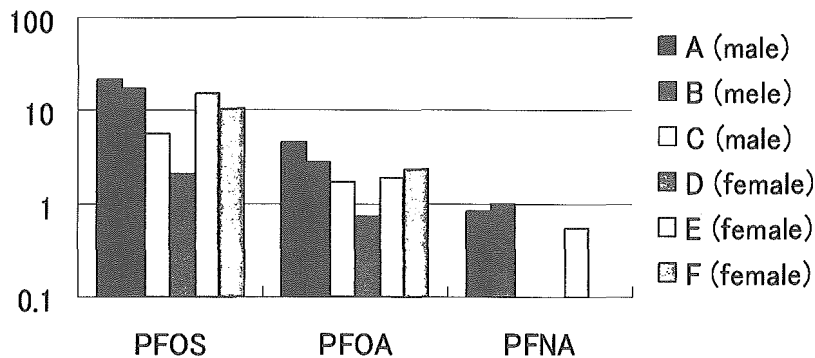


Fig. 2 健常人の血液中におけるPFCs曝露レベル

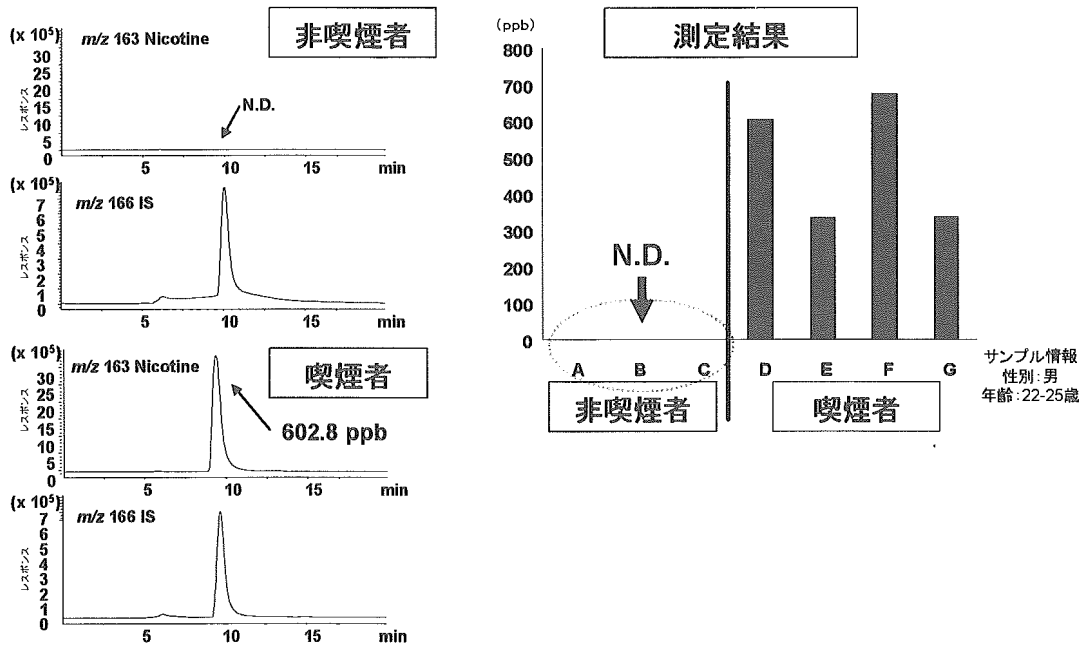


Fig. 3 喫煙者の暴露実態

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）分担研究報告書  
ハウスダスト中のポリ臭素化ジフェニルエーテルおよび  
有機塩素化合物の一斉分析法の開発

主任研究者	牧野 恒久	東海大学 医学部
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	阿久津和彦	大阪府立公衆衛生研究所
	高取 聡	大阪府立公衆衛生研究所

#### 研究要旨

ハウスダスト中のポリ臭素化ジフェニルエーテル（PBDEs）および有機塩素化合物の分析法を開発した。検討の結果、ハウスダスト抽出液を44%硫酸含浸シリカゲルカラムおよびゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）カラムで精製し、GC/MSで測定することにより、マトリックスによる妨害を受けずに精度良く測定対象化合物を定量できることが分かった。本分析法を用いて一般住宅等で採取したダスト試料の予備分析を実施した。その結果、PBDEsやクロルデン類、S-421等がppb～ppmオーダーで検出され、呼吸による非意図的なハウスダストの吸引によりこれらの化合物の日常的な人体暴露が起こっていることが示唆された。

#### A. 研究目的

ポリ臭素化ジフェニルエーテル（PBDEs）は1970年代から近年に掛けて国内外の人体や環境試料中での濃度上昇傾向が認められている化学物質であるが<sup>1-4)</sup>、国内における胎児・乳幼児期の汚染実態に関する知見は少ない。また、八塩化ジプロピルエーテル（S-421）は、主としてピレスロイド系農薬の共力剤として蚊取り線香等に含有されていることから<sup>5,6)</sup>、夏場を中心に比較的高レベルの人体汚染が起こっていると予想されるが、本化合物による人体汚染に関する報告は世界的にも数少ないのが実情であり、特に子どもの暴露実態に関しては不明な点が多い。また、子どもを対象として上記有機ハロゲン化合物の暴露実態と各種疾患との因果関係について詳細に比較検証した報告は少ない。これらの化合物は、食事を介した経口暴露のみならず、屋内汚染による慢性的な経気道暴露が懸念されることから、総合的な観点からの暴露実態の把握および健康影響の解明が望まれる。また、PBDEsと他の有機ハロゲン汚染物質の濃度相関データは、これら化学物質の暴露経路を推定する上で重要である。そこで、本年度はハウスダスト中のポリ臭素化ジフェニルエーテル（PBDEs）および有機塩素化合物の分析法を開発した。

#### B. 研究方法

##### B.1. 試料

一般住宅のハウスダスト（電気掃除機捕集物、H17.12.6に採取）および大阪府立公衆衛生研究所内の実験室通気口内部に付着したダスト（H17.7.15に採取）を予備実験に使用した。一般住宅ハウスダストはステンレス製ふるいにより、(1) 425 $\mu$ m以下、(2) 0.425～1mm、(3) 1mm以上のサイズに粗分けして分析を行った。添加回収試験にはハウスダスト代用物として無水硫酸ナ

トリウムを用いた。

##### B.2. 試薬

クリーンナップスパイク溶液には炭素安定同位体（<sup>13</sup>C）で標識化された<sup>13</sup>C -BDE-28, 47, 99, 153, 154, 183, 209、<sup>13</sup>C -CB-28, 52, 118, 153, 180および<sup>13</sup>C - $\delta$ -HCHのヘキサン混合溶液（各5ng/mL、<sup>13</sup>C -BDE-209については50ng/mL）を使用した。また、シリンジスパイクには<sup>13</sup>C -BDE-77のヘキサン溶液（5ng/mL）を使用した。

##### B.3. 操作

B.3.1. 前処理カラムにおける各化合物の溶出パターンの確認

###### B.3.1.1. GPCカラム

後述のGPC条件において標準溶液（化合物濃度4～100ng/g、アセトン/シクロヘキサン溶液）5mLを注入し、カラム溶出液を2分間隔（10mLずつ）で分画した。各フラクションにクリーンナップスパイク溶液1mLおよびノナン1mLを加えた後、窒素ガス吹き付けで1mLに濃縮し、GC/MS測定に供した。

###### B.3.1.2. 硫酸シリカゲルカラム

パスツールピペットに44%硫酸シリカゲルを1g乾式充填したミニカラムに標準溶液（化合物濃度20～500ng/g、ヘキサン溶液）1mLを負荷し、リザーバーにヘキサン10mLを加え溶出を行った。同様にヘキサン10mLで2回カラムを溶出し、3回の溶出液を別の容器に回収した。各フラクションにクリーンナップスパイク溶液1mLおよびノナン1mLを加えた後、窒素ガス吹き付けで1mLに濃縮し、GC/MS測定に供した。

###### B.3.2. 試験溶液の調製法

ダスト試料0.5gを50 mL容のねじ蓋付遠沈管に精密に秤取後、クリーンナップスパイク溶液1mLを添加し、アセトン10mL、ヘキサン20mLを加えて

超音波抽出を行った。抽出液を遠心処理 (3000rpm, 5min) し、上澄液をろ紙 (No. 5A) をろ過した。試験管内の残留物にアセトン10mL、ヘキサン20mLを加えて再度超音波抽出および遠心処理を行い、採取したろ液を合わせて濃縮乾固した。残渣をヘキサン1mLに溶解し、予めヘキサン10mLで洗浄した44%硫酸シリカゲルカラム (充填量1g) に負荷した。ヘキサン10mLでカラムを溶出し、溶出液を濃縮乾固した。残渣をアセトン/シクロヘキサン (3:7) に溶解して10mLとし、5mLをゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) で精製した。回収液を1mL程度まで濃縮後、濃縮試験管に移し、シリンジスパイク溶液0.5mLおよびノナン250 $\mu$ Lを添加し、窒素ガス吹き付けで250 $\mu$ Lに濃縮し、GC/MS測定に供した。添加回収実験では、無水硫酸ナトリウム0.5gに各化合物の混合標準溶液 (20~500ppb) 0.5mLを添加し同様に抽出・精製操作を行った。

#### B. 4. 装置条件

##### B. 4. 1. GPC条件

装置: abc laboratories AS-2000

カラム: Shodex CLNpak EV-GAC (ガードカラム) + CLNpak EV-2000AC

移動相: アセトン/シクロヘキサン (3:7, v/v)

流速: 5mL/min

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

採取条件: dump 14min, collect 18min, wash 8min (total 40min)

##### B. 4. 2. GC/MS条件

装置: JEOL JMS-GCmateII GC/MS system

注入口温度: 250 $^{\circ}$ C

注入法: パルスドスプリットレス、1 $\mu$ L

パルス圧: 20psi (0~1.6min)

キャリアガス: He (カラム流量1mL/min)

カラム: Restek社製Rtx-1ms (15 m $\times$ 0.25mm ID、膜厚0.1 $\mu$ m)

昇温条件: 100 $^{\circ}$ C (2 min) -10 $^{\circ}$ C/min-310 $^{\circ}$ C (3min)

トランスファーライン温度: 310 $^{\circ}$ C

イオン源温度: 280 $^{\circ}$ C

イオン化電流: 300 $\mu$ A

イオン化エネルギー: 35eV

加速電圧: 2500V

マルチプライヤー電圧: 400V

分解能: 500

イオン化モード: EI

検出法: SIM

モニターイオン: 省略

#### C, D. 研究結果 及び 考察

上述のGPC条件において目的化合物は試料注入後14~32minの範囲に溶出した。また、44%硫酸シリカゲルを1g充填したミニカラムにおいて、目的化合物 (図1a, 1b) はヘキサン10mLでほぼ100%溶出することが分かった。

まず硫酸シリカゲルカラム処理のみを施したハウスダスト抽出試料をGC/MSに注入したところ、比較的妨害の少ないSIMクロマトグラムが得られたが、数回の注入で注入口の汚染やカラムの劣化によると思われる著しいピークテーリングおよびBDE-209の感度低下が認められ、マトリックスの除去が不十分であることが示唆された。そこでさらにGPC処理を追加し測定を行ったところ、上記のような悪影響はほとんど認められなかった。また、測定対象化合物の回収率は概ね80~110%の範囲内であり満足できる結果であった (表1)。

以上から、硫酸シリカゲルカラム処理とGPCを組み合わせた手法 (図2) がハウスダストの前処理法として有用であることが分かった。

なお、今回予備実験で使用したハウスダスト試料から比較的高濃度 (ppmオーダー) のPBDEsが検出され、食事以外からのPBDEs暴露経路としてハウスダストの吸引は無視できないことが示唆された (表2)。

本法により得られた実試料のクロマトグラム例を図3に示した。

#### E. 結論

ハウスダスト中のポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs) および有機塩素化合物の分析法を開発した。一般住宅等で採取したダスト試料からPBDEsやクロルデン類、S-421等がppb~ppmオーダーで検出され、呼吸による非意図的なハウスダストの吸引により、これらの化合物の日常的な人体暴露が起こっていることが危惧された。成人と比較して、子ども、特に乳幼児はダストに対して無防備であり、ハイハイやおしゃぶりなどの行動により、ダストを吸引・摂取しやすいと予想される。食事を介した経口暴露のみならず、総合的な観点からの暴露実態の把握および健康影響の解明が急務であろう。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

該当なし

#### H. 知的所有権の取得状況

該当なし

#### I. 参考文献

- 1) Meironyté D, Norén K, Bergman Å. 1999. Analysis of polybrominated diphenyl ethers in Swedish human milk. A time-related trend study, 1972-1997. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 58: 329-341.
- 2) Ikonou MG, Rayne S, Addison RF. 2002. Exponential increases of the brominated flame retardants, polybrominated diphenyl ethers,

in the Canadian Arctic from 1981 to 2000.

Environmental Science and Technology 36:

1886-1892.

3) Akutsu K, Kitagawa M, Nakazawa H, Makino T, Iwazaki K, Oda H, Hori S. 2003. Time-trend (1973-2000) of polybrominated diphenyl ethers in Japanese mother's milk. Chemosphere 53: 645-654.

4) Sjödin A, Jones RS, Focant JF, Lapeza C, Wang RY, McGahee EE III, Zhang Y, Turner WE, Slazyk B, Needham LL, Patterson DG Jr. 2004.

Retrospective time-trend study of polybrominated diphenyl ether and polybrominated and polychlorinated biphenyl levels in human serum from the United States.

Environmental Health Perspectives 112:

654-658.

5) Yoshida S, Taguchi S, Kitagawa M. 2001.

Isolation of a new organochlorine pollutant 2,3,3,3,2',3',3',3'-octachlorodipropyl ether from fish. Bulletin of environmental contamination and toxicology 67: 568-573.

6) Krieger RI, Dinoff TM, Zhang X. 2003.

Octachlorodipropyl ether (s-2) mosquito coils are inadequately studied for residential use in Asia and illegal in the United States.

Environmental Health Perspectives 111:

1439-1442.

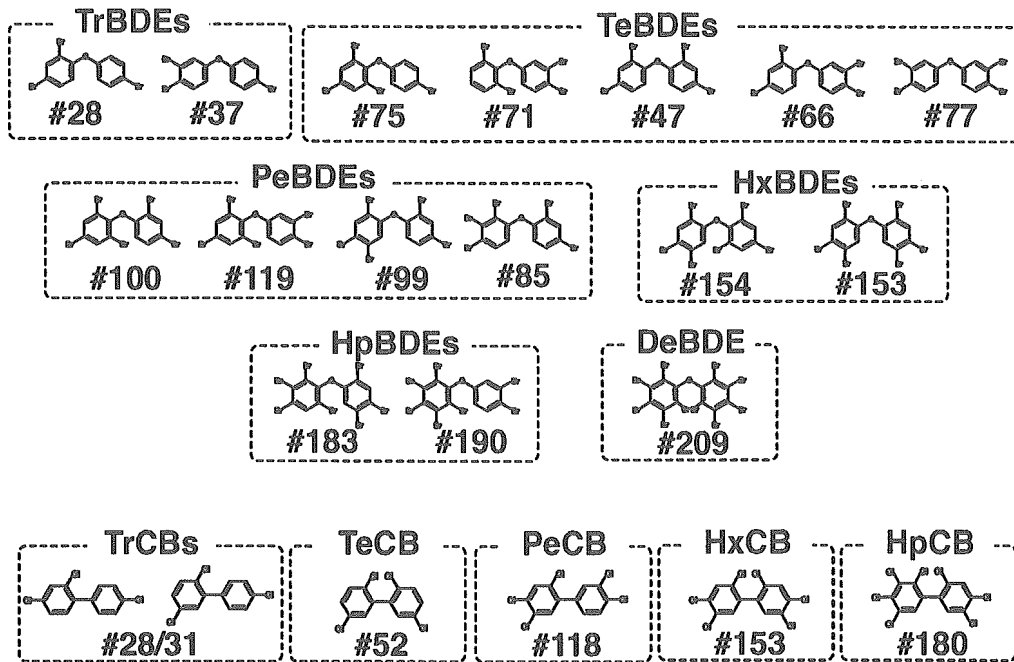


図1a 測定対象化合物(PBDEsおよびPCBs)

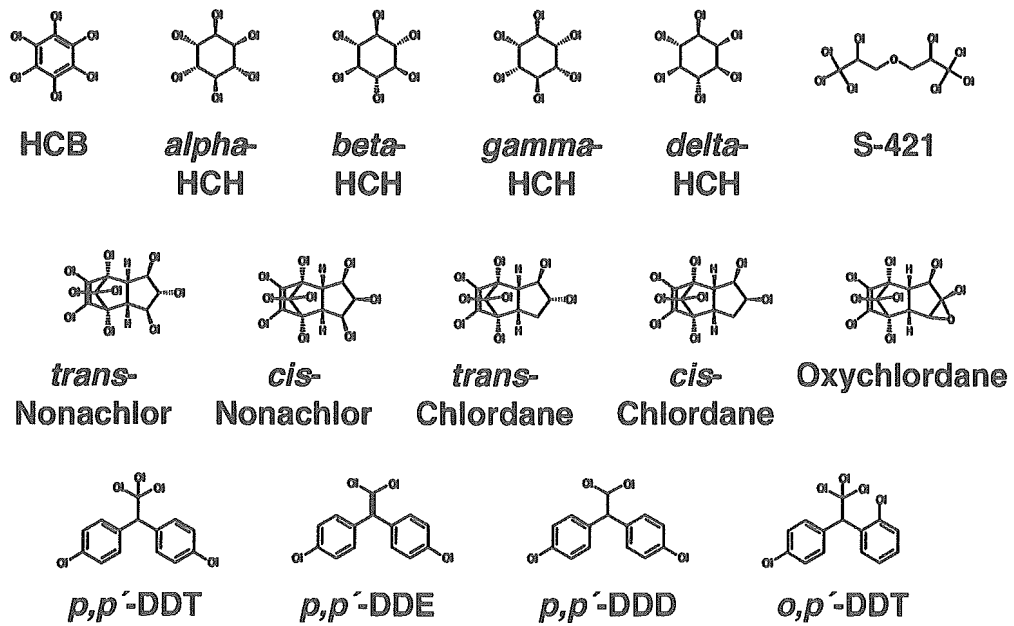


図1b 測定対象化合物(HCB, HCHs, S-421, クロルデン類, DDT類)

表1 測定対象化合物の回収率(%)

化合物	硫酸シリカゲル処理のみ (n = 2)			硫酸シリカゲル+GPC処理 (n = 2)		
	1回目	2回目	平均	1回目	2回目	平均
CB-28/31	88	90	89	92	93	93
CB-52	89	93	91	92	94	93
CB-118	92	97	95	94	95	94
CB-153	90	92	91	94	96	95
CB-180	85	91	88	95	92	94
TrBDE-28	94	98	96	94	92	93
TrBDE-37	94	98	96	92	92	92
TeBDE-75	94	101	98	98	96	97
TeBDE-71	91	95	93	95	95	95
TeBDE-47	89	95	92	96	93	94
TeBDE-66	88	95	92	94	97	95
TeBDE-77	88	95	91	86	90	88
PeBDE-100	93	96	94	95	97	96
PeBDE-119	92	95	94	95	97	96
PeBDE-99	90	98	94	94	93	93
PeBDE-85	91	99	95	94	94	94
HxBDE-154	94	94	94	99	94	97
HxBDE-153	91	95	93	97	96	97
HpBDE-183	89	95	92	98	96	97
HpBDE-190	93	100	96	92	87	89
DeBDE-209	96	100	98	98	101	100
$\alpha$ -HCH	86	88	87	90	93	91
$\beta$ -HCH	92	94	93	94	94	94
$\gamma$ -HCH	90	87	89	93	87	90
$\delta$ -HCH	89	90	89	91	89	90
HCB	85	87	86	89	89	89
Heptachlor	102	103	103	85	81	83
Oxychlordane	98	100	99	89	87	88
<i>trans</i> -Chlordane	95	93	94	94	92	93
<i>cis</i> -Chlordane	93	91	92	93	90	92
<i>trans</i> -Nonachlor	92	90	91	93	91	92
<i>cis</i> -Nonachlor	88	83	86	89	84	87
<i>p,p'</i> -DDE	93	91	92	95	92	93
<i>p,p'</i> -DDD	106	103	104	83	81	82
<i>o,p'</i> -DDT	104	96	100	78	81	80
<i>p,p'</i> -DDT	95	97	96	83	79	81
S-421	94	101	98	94	90	92



表2 ハウスダスト試料中の各化合物濃度

	試料中濃度 (ng/g)									
	操作プラン ク (分析法1)	操作プラン ク (分析法2)	公衛研 実験室 (分析法1)	公衛研 実験室 (分析法2)	一般住宅 ≤0.425mm (分析法1)	一般住宅 ≤0.425mm (分析法2)	一般住宅 0.425-1mm (分析法1)	一般住宅 0.425-1mm (分析法2)	一般住宅 >1mm (分析法1)	一般住宅 >1mm (分析法2)
CB-28/31	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0
CB-52	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
CB-118	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0
CB-153	0	0	2	3	0	0	0	0	0	0
CB-180	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
TrBDE-28	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
TrBDE-37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TeBDE-75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TeBDE-71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TeBDE-47	0	0	14	13	8	8	2	2	4	4
TeBDE-66	0	0	3	4	0	1	0	0	0	0
TeBDE-77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PeBDE-100	0	0	2	2	3	3	1	1	1	1
PeBDE-119	0	0	2	2	0	0	0	0	0	1
PeBDE-99	0	0	25	26	20	19	4	4	7	6
PeBDE-85	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0
HxBDE-154	0	0	4	4	2	2	0	0	1	1
HxBDE-153	0	0	57	65	2	2	1	0	1	1
HpBDE-183	0	0	145	151	1	1	0	0	2	2
HpBDE-190	1	1	4	4	1	0	0	0	0	0
DeBDE-209	6	6	569	800	1644	1255	430	666	661	767
α-HCH	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
β-HCH	0	0	7	5	1	1	0	0	1	1
γ-HCH	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1
δ-HCH	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
HCB	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
Heptachlor	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
Oxychlorane	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
trans-Chlordane	0	0	7	7	2	2	1	1	3	1
cis-Chlordane	0	0	6	6	1	1	1	1	2	1
trans-Nonachlor	0	0	7	7	1	1	1	1	2	1
cis-Nonachlor	0	0	4	4	0	0	0	0	1	0
p,p'-DDE	0	0	6	7	1	1	0	0	1	1
p,p'-DDD	0	0	5	2	0	0	0	0	0	0
o,p'-DDT	0	0	7	3	0	0	0	0	0	0
p,p'-DDT	0	1	38	35	3	1	2	1	5	2
S-421	0	1	13	10	10	10	5	5	15	11

分析法1: 硫酸シリカゲル処理のみ

分析法2: 硫酸シリカゲル+GPC処理

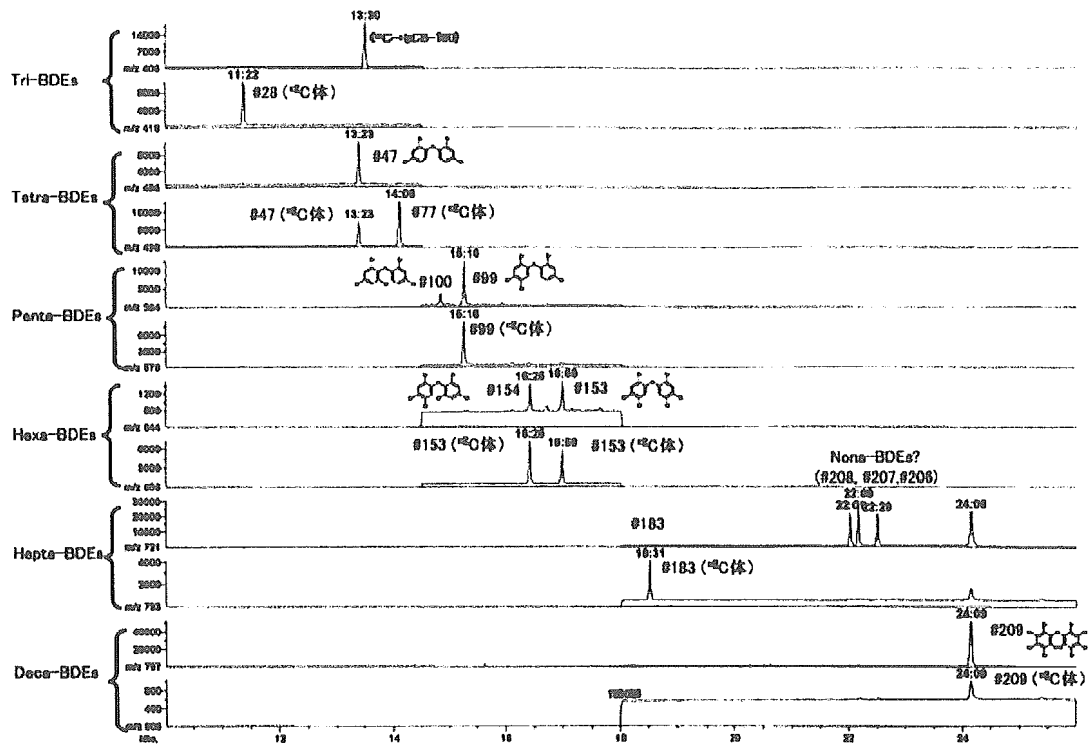


図3 一般家庭ハウスダスト(≤ 425 μm)試料のクロマトグラム(PBDEs)

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）分担研究報告書  
フタル酸エステル類の子どもへの暴露評価に関する研究

主任研究者	牧野 恒久	東海大学 医学部
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	高取 聡	大阪府立公衆衛生研究所
	阿久津和彦	大阪府立公衆衛生研究所

#### 研究要旨

血清中のフタル酸モノエステル類〔フタル酸モノメチル、フタル酸モノエチル、フタル酸モノブチル、フタル酸モノベンジル、フタル酸モノ(2-エチルヘキシル)、フタル酸モノ(2-エチル-5-ヒドロキシヘキシル)及びフタル酸モノイソノニル〕の高精度分析法を開発した。上記分析対象物質 5.0 または 50 ppb をヒト血清に添加した際の回収率は、93.1~103% (RSD <10%) であった。本法の定量下限値は、0.2~1.0 ppb であった。本法を用いてヒト血清を分析したところ、グルクロン酸抱合体を含めて MBP (0.65 ppb) 及び MEHP (< 1.0 ppb) を検出した。本法は、血清中のフタル酸モノエステル類を分析するうえで有用である。

#### A. 研究目的

フタル酸ジエステル類は、主に塩化ビニル樹脂の可塑剤として工業製品中に多用されており、日常的な暴露が危惧される化学物質の一群である。当該化学物質群に危惧される生体影響としてフタル酸モノエステル類による精巣毒性があり、妊婦及び胎児もしくは男子乳幼児が高感受性グループとして認識されている。当該化学物質群の暴露量を把握するうえで、生体試料中のフタル酸ジエステル類の主要代謝物であるフタル酸モノエステル類（グルクロン酸抱合体を含む）を測定することは、重要である。今年度、研究者らは、血清中のフタル酸モノエステル類の高精度分析法を開発することとした。本研究は、当該化学物質群に対する適切かつ安全な利用を促進し、子どもを主眼においた健康影響対策を講ずるうえで役立つと期待される。

#### B. 研究方法

##### B-1. 試薬等及び器具

以下の7種類のフタル酸モノエステル類、すなわち、フタル酸モノメチル (MMP)、フタル酸モノエチル (MEP)、フタル酸モノブチル (MBP)、フタル酸モノベンジル (MBzP)、フタル酸モノ(2-エチルヘキシル) (MEHP)、フタル酸モノ(2-エチル-5-ヒドロキシヘキシル) (MEHHP) 及びフタル酸モノイソノニル (MINP) を分析対象とした。MMP, MMP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>, MEP, MEP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>, MBP, MBP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>, MBzP, MBzP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>, MEHP, MEHP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>, MEHHP, MEHHP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>, MINP 及び MINP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub> の各 100 ppm アセトニトリル標準溶液は、Cambridge Isotope Laboratories 社より購入した。4-Methylumbelliferone (4-MU) 及び 4-Methylumberriferyl glucuronide (4-MU-Glu) は、SIGMA 製を用いた。beta-Glucuronidase は、和光純薬社製 (8.5 U/mL; *E. coli* 由来) を用いた。リン酸及びギ酸は、HPLC 用を用いた (和光純薬)。酢酸アンモニウムは、特級を用いた (和光純薬)。25%ア

ンモニア水溶液は、精密分析用を用いた (和光純薬)。アセトニトリルは、環境分析用を用いた (和光純薬)。超純水は、ミリポア社製の Milli-Q SP.TOC. により作成したもの (MilliQ 水) をそのまま用いた。

コンタミネーションの原因となりうる樹脂製器具を可能な限り排除し、加熱可能なガラス器具は、MilliQ 水、アセトン及びヘキサンの洗浄した後、乾熱乾燥機中で 200°C で 2 時間以上加熱し、清浄な場所で冷却して用いた。

##### B-2. 採血及び血清の調製

大阪府立公衆衛生研究所に在籍する健康な 30 代の男性より採血した。採血用具は、予め調べた結果、測定対象物質の混入が認められなかった、テルモ社製真空採血管 (ベノジェクト II プレーン) 及び採血針 (ベノジェクト II 21G) を用いた。採血後、室温で 30 分間静置して血球成分の凝固を認めたものを 3,000 rpm で 10 分間遠心分離して上清となる血清を清浄な試験管に分取して実験まで -40°C で保存した。

##### B-3. 標準溶液

フタル酸モノエステル標準混合溶液：MMP, MEP, MBP, MBzP, MEHP, MEHHP 及び MINP の各 100 ppm アセトニトリル溶液及びアセトニトリルを混和して 5.00 ppm の標準原液とした。これを適宜、MilliQ 水及びアセトニトリルで希釈して用いた。

フタル酸モノエステル内部標準混合溶液：MMP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>, MEP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>, MBP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>, MBzP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>, MEHP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>, MEHHP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub> 及び MINP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub> の各 100 ppm アセトニトリル溶液及びアセトニトリルを混和して 5.00 ppm の内部標準原液とした。これを適宜、MilliQ 水及びアセトニトリルで希釈して用いた。

##### B-4. 試験液の調製及び分析条件

概要をスキーム 1 に示した。解凍後直ちに血清 1.00 g に 1.25 mol/L リン酸 100  $\mu$ L を添加し混和した (1)。次に 100 ppb 内部標準混合溶液 100  $\mu$ L, 2.5 mol/L 酢酸アンモニウム緩衝溶液 (pH 6.5), 8.5 U/mL beta-Glucuronidase 60  $\mu$ L 及び 1.0 ppm 4-MU-Glu 100  $\mu$ L を添加して攪拌後、40°C で 45 分間インキュベートした。インキュベート後、氷上に移し、25%アンモニア水溶液を添加した。全量を予め、アセトニトリル 15 mL 及び MilliQ 水 5 mL でコンディショニングした OASIS MAX (6cc, 150 mg; Waters) に負荷した (2)。次にカラムを MilliQ 水 5 mL 及びアセトニトリル 10 mL で洗浄し、2%ギ酸含有アセトニトリル 5 mL で測定対象物質を溶出した。当固相抽出過程にはビジプレッパバキュームマニホールド (SPELCO) を使い、カラム先端には、ディスポーザブルライナー (SPELCO) を装着して試料間のコンタミネーションを排除した。溶出液は、窒素気流下、40°C で乾固した後、20%アセトニトリル含有水 1.00 mL に再溶解して LC/MS/MS の試験液とした。LC/MS/MS の条件は、表 1 に記した。

#### B-5. 倫理面への配慮

実験試料となる血液の採取は、大阪府立公衆衛生研究所の倫理規定に則って行った。すなわち、採血に先だって本研究目的の趣旨を文書により説明し、同意書を得た。採血は、医師の立ち会いの下、有資格者によって行われた。また、実験に用いた有機溶媒等は、環境中へ排出されないよう回収を徹底した。

### C. 研究結果

#### C-1. 試験液の調製

図 1 に測定対象物質の構造式を示した。グルクロン酸抱合体の脱抱合反応の条件は、Kato らの報告を参考にした。インキュベート時間の最適化には、4-MU-Glu から 4-MU への変換を指標とした。その結果、40°C で 45 分間でプラトーに達することが分かった (図 2)。固相抽出の条件は、吉村らの報告を参考にした。溶出液を 2%ギ酸含有アセトニトリルに変更することで測定対象物質に加えて 4-MU-Glu 及び 4-MU を同時に回収することが可能となった。

#### C-2. 測定及び定量の条件

測定対象物質を 0.05% ギ酸含有 50% アセトニトリル水溶液に 0.1 ppm になるよう希釈し、MS/MS にインフュージョンで導入して MS/MS 条件の最適化を行った。また、分析に際して移動相に添加するギ酸の濃度は、感度が最高となる、 $2.0 \times 10^{-4}\%$  とした。

検出下限値 (LOD) は、無添加の血清から得た試験液に標準混合溶液を添加した際に S/N = 5 をクリアできる濃度である 0.1 ppb とした。

ただし、無添加血清中に存在が認められる MBP 及び MEHP については、標準溶液を用いて評価した。

操作ブランクは、測定対象となるフタル酸モノエステル類が検出されない MilliQ 水を試料として一連の操作を実施した際に試験液中に認められるフタル酸モノエステル類の濃度とした。脱抱合反応を行わない場合または行う場合、それぞれに調べた結果を表 2 に示した。脱抱合反応を行う場合は、行わない場合と比較して MBP 及び MEHP の双方で高くなる傾向にあった。これは、使用試薬量の追加と操作過程の延長に起因する。

操作ブランク中に存在が認められた、MBP 及び MEHP の定量下限値 (LOQ) は、操作ブランクにその標準偏差の 10 倍を加算した濃度とした (表 3)。また、操作ブランク中に存在が認められない、MMP, MEP, MBzP, MEHHP 及び MINP については、S/N = 10 以上をクリアできる 0.2 ppb とした。

検量線は、0.2-5.0 及び 1.0-200 ppb のいずれにおいても直線性が認められた ( $r^2 > 0.999$ ; 図 3)。

#### C-3. 添加回収試験

ヒト血清に測定対象とするフタル酸モノエステル類を 5.0 または 50 ppb 添加して本法の回収率を調べた (表 4)。用いた血清に MBP 及び MEHP が含まれるため、それらを差し引いて回収率を求めた。その結果、回収率は、93.1-103% となり、RSD についても 10% 未満であった。

#### C-4. 実試料の予備測定

健康な 30 代男性から採取した血清を 4 回測定した際の結果を表 5 に示した。グルクロン酸脱抱合反応の有無に関わらず、MBP 及び MEHP が検出された。脱抱合反応を行った際の MBP の定量値には、操作ブランク (0.35 ppb) が含まれる。これを差し引いた 0.65 ppb が実質的濃度と算出される。脱抱合反応なし (フリー体) で MBP の血清中濃度は、0.49 ppb であり、脱抱合反応あり (フリー体及び抱合体の合算値) で 0.65 ppb であったことから抱合体は、0.16 ppb と算出された。MEHP については、LOQ 未満であった。また、トレースレベルの MEHHP の存在が認められた。

### D. 考察

血清中のフタル酸モノエステル類の分析に際しては、血清中に存在するエステラーゼ活性が、操作過程で混入したフタル酸ジエステル類を加水分解し、見かけ上のフタル酸モノエステル類の濃度の上昇を引き起こすこと及び血清 1 mL あたり 125  $\mu$ mol のリン酸を添加することでエステラーゼ活性を阻害することができると報告