

している (1). 本研究者らも同一の添加量でヒト血清にフタル酸ジエステル類 (DMP, DEP, DBP, BzBP, DEHP, DINP) を添加して記載の脱抱合反応を行った際にこれらフタル酸ジエステル類の加水分解を示唆するフタル酸モノエステル類の濃度の上昇が認められないことを確認した. 同時にこのことは, 用いた beta-Glucuronidase 溶液に由来するエステラーゼ活性も適切にコントロールされている状況を保証する. 更に研究者らは, 加えてフタル酸ジエステル類測定ガイドラインの注意事項を遵守し, フタル酸モノエステル類の混入の潜在的原因となるフタル酸ジエステル類の混入の低減化を計った (3).

精製過程の固相抽出法については, 吉村らが開発した尿中のフタル酸モノエステル類の分析法にあるものを一部改良して採用した. 本法は, 1 種類のマルチモード固相カートリッジで LC/MS/MS で分析できる精製度に到達していた. 2%ギ酸含有アセトニトリルを溶出液とすることで脱抱合反応進行の指標となる 4-MU-Glu 及び 4-MU が回収することが可能となった. 本法は, 簡便であり, 予備実験では乳汁中のフタル酸モノエステル類の分析過程においても適応可能と考えられる結果を得ている.

本分析法の回収率, 操作ブランク値及び定量下限値等の基本的な分析性能について評価した結果, 良好な結果を得た. Silva らは, National Health Examination Survey の一環として血清中のフタル酸モノエステル類の分析を行っている (4). その結果, 米国人の血清中から抱合体を含めて MEP, MBP 及び MEHP を検出しており, それらの幾何平均値は, 4.49, 13.54 及び 4.96 ppb と報告している. この分析対象範囲において本法は, 適用可能と考えられる.

実試料 1 検体について繰り返し分析した結果, MBP 及び MEHP が検出されたが, MEP は, 検出されなかった. 予備実験として他の 3 名の健康な 30 代男性から採取した血清を分析したところ, 同様に MBP 及び MEHP が検出されたが, MEP は検出されなかった. 現時点での例数は少ないが, MEP の検出頻度において米国人と日本人との間で差があることも予測される.

フタル酸ジエステル類の暴露評価については, 血中よりも高濃度にフタル酸モノエステル類が検出される尿を分析する方が効率的であると考えられる (5-6). また, 尿中への排泄速度定数と全消失速度定数を知ることによって摂取量を推計することも可能である (7-9). しかしながら, フタル酸エステル類に対するハイリスク群に位置づけられる胎児に対する暴露量の評価に際しては, 母体血と臍帯血との間での濃度関係を明らかにする必要がある. 本法は, 血液 (血清) 中の高濃度にフタル酸モノエステル類を分析するうえで有用である. 現在, 乳児の主要な暴露源となりうる母乳中のフタル酸モノエステル

類の分析法を検討している.

#### E. 結論

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. 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.

#### 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. 参考文献等

- (1) Kato, K., *et al.*, *J. Analytical Toxicol.*, 27, 284 (2003)
- (2) 吉村ら, 日本分析化学会年会, 2005 年 9 月, 名古屋.
- (3) 内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会中間報告追補その 2, p.38, (2005)
- (4) Silva, M., *et al.*, *Arch. Toxicol.*, 77, 561 (2003)
- (5) Silva, M., *et al.*, *Environ Health Perspect.*, 112, 331 (2004)
- (6) Hauser, R., *et al.*, *Environ Health Perspect.*, 112, 1734 (2004)
- (7) Kohn, MC, *et al.*, *Environ Health Perspect.*, 108, A442 (2000)
- (8) Koch HM, *et al.*, *Int. J. Hyg. Health.*, 206, 77 (2003)
- (9) 中西ら, フタル酸エステル, 丸善, p.115 (2005)

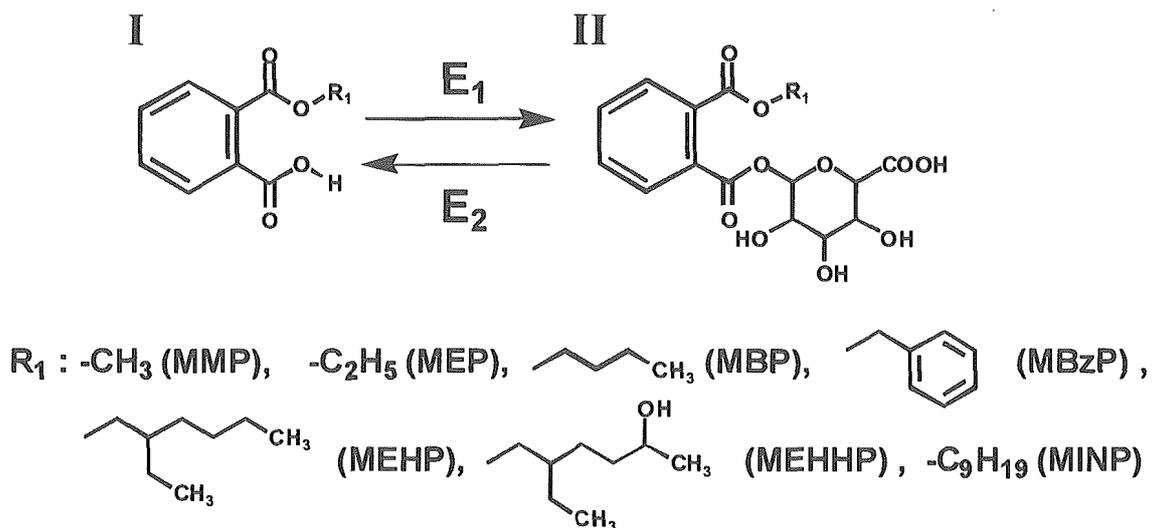


図1. 分析対象物質の構造.

I, フタル酸モノエステル; II, フタル酸モノエステルグルクロン酸抱合体;  $E_1$ , グルクロノシルトランスフェラーゼ;  $E_2$ ,  $\beta$ -グルクロナダーゼ.

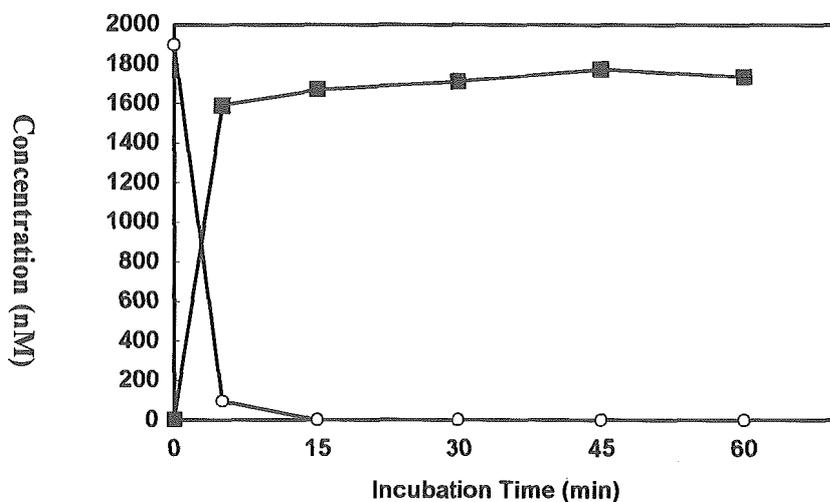


図2. グルクロン酸脱抱合反応時間の検討. 4-MU-Glu, ○; 4-MU, ■. ヒト血清 (1.0 g) に 1.25 mol/L リン酸 (100  $\mu$ L), 2.5 mol/L 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 6.5) 3.0 mL 及び 8.5 U/mL beta-Glucuronidase (60  $\mu$ L) に 4-MU-Glu (2000 nM) を添加し、40°Cでインキュベートした. 各点は、2回実験した際の平均値を示す.

血清 (1.00 g) に下記の試薬を 1-5 の順で添加して混和する (1).

1 : 1.25 mol/L	リン酸水溶液	100 uL
2 : 100 ppb	内部標準混合溶液	100 uL
3 : 2.5 mol/L	酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 6.5)	3 mL
4 : 8.5 U/mL	beta-Glucuronidase	60 uL *
5 : 1 ppm	4-MU-Glu 水溶液	100 uL

インキュベート (40°C, 45 min) \*\*

25% アンモニア水溶液 100 uL 添加する.

OASIS MAX (6cc, 150 mg) に全量を負荷する (2).

- 1 : コンディショニング
- |           |       |       |
|-----------|-------|-------|
| ・アセトニトリル  | 15 mL |       |
| ・MilliQ 水 |       | 10 mL |
- 2 : 洗浄
- |           |  |      |
|-----------|--|------|
| ・MilliQ 水 |  | 5 mL |
| ・アセトニトリル  |  | 5 mL |
- 3 : 溶出
- |                 |  |      |
|-----------------|--|------|
| ・2% ギ酸含有アセトニトリル |  | 5 mL |
|-----------------|--|------|

溶出液を窒素気流下, 40°C で乾固する.

20%アセトニトリル含有水 1.00 mL に再溶解し試験液とする.

LC/MS/MS による分析

スキーム 1. 血清中のフタル酸モノエステル類の分析法.

\*, \*\* グルクロン酸脱抱合反応を実施しない場合は, 省略する.

(1) Kato, K., *et al.*, *J. Analytical Toxicol.*, 27, 284 (2003)

(2) 吉村ら, 日本分析化学会年会, 2005年9月, 名古屋.

・HPLC 条件

---

カラム	C18 Symmetry (2.1 x 50 mm; 3.5 $\mu$ m; Waters) ;		
移動相	A) 2.0 x 10 <sup>-4</sup> % ギ酸水溶液 ; B) 2.0 x 10 <sup>-4</sup> % ギ酸含有アセトニトリル		
流速	200 $\mu$ L/min ;	注入量	5.0 $\mu$ L ; カラム温度 40°C

---

・グラジエントプロフィール

Time (min)	A (%)	B (%)	Mode
0	60	40	Linear
5.0	35	65	
5.0	0	100	Step
10.0	0	100	

・MS/MS 条件

インターフェイス/モード, Electrospray Ionization / Negative (Positive)

キャピラリー電圧/温度, -4500 (4500) V/450°C

Precursor, Product Ions 及びその際の Collision Energy は下表の通り.

化学物質名	Precursor	Product (Collision Energy)
MMP	-179	- 107 (-16)
MMP- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	-183	- 79 (-24)
MEP	-193	- 121 (-16)
MEP- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	-197	- 79 (-26)
MBP	-221	- 77 (-26)
MBP- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	-225	- 79 (-24)
MBzP	-255	- 77 (-32)
MBzP- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	-259	- 107 (-20)
MEHP	-277	- 134 (-24)
MEHP- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	-281	- 138 (-24)
MEHHP	-293	- 121 (-30)
MEHHP- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	-297	- 145 (-20)
MINP	-291	- 141 (-26)
MINP- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	-295	- 79 (-36)
4-MU	+177	+ 77 (+49)
4-MU-Glu	+353	+ 177 (+23)

表 1. LC/MS/MS の条件.

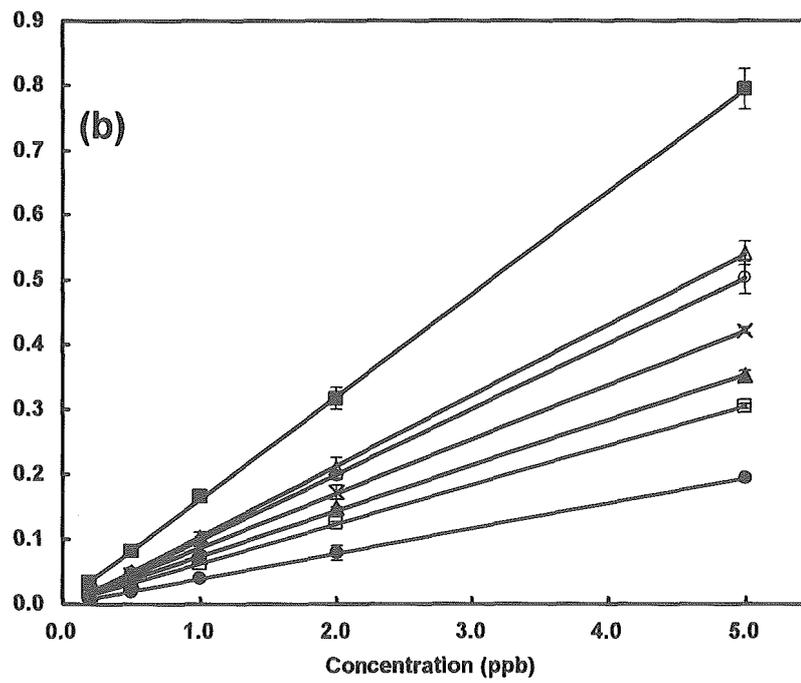
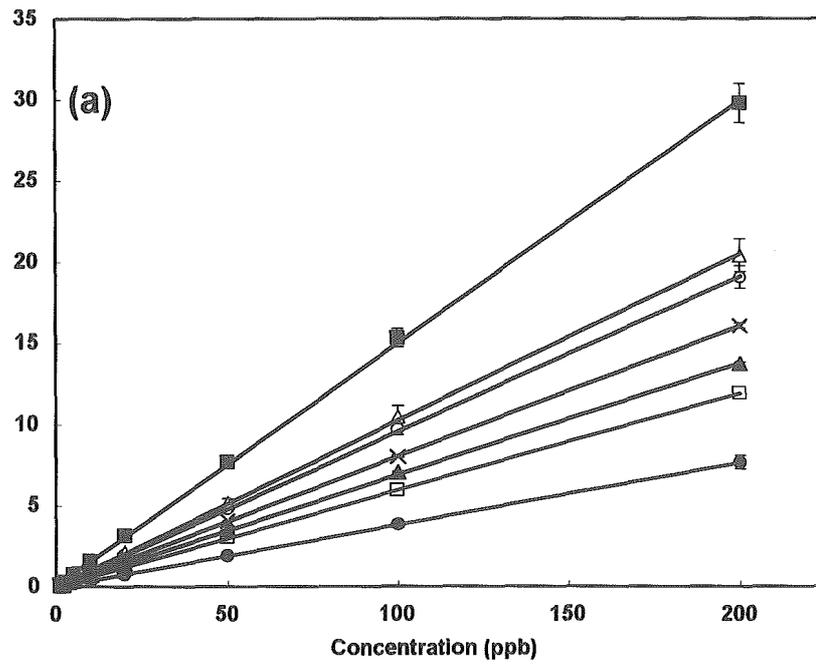


図 3. 測定対象フタル酸モノエステル類の相対検量線. (a), 1-200 ppb; (b), 0.2-5.0 ppb. MMP, ○; MEP, △; MBP, X; MBzP, ●; MEHP, ▲; MEHHP, □; MNP, ■. 各点は、5 回の実験の平均値を示す.

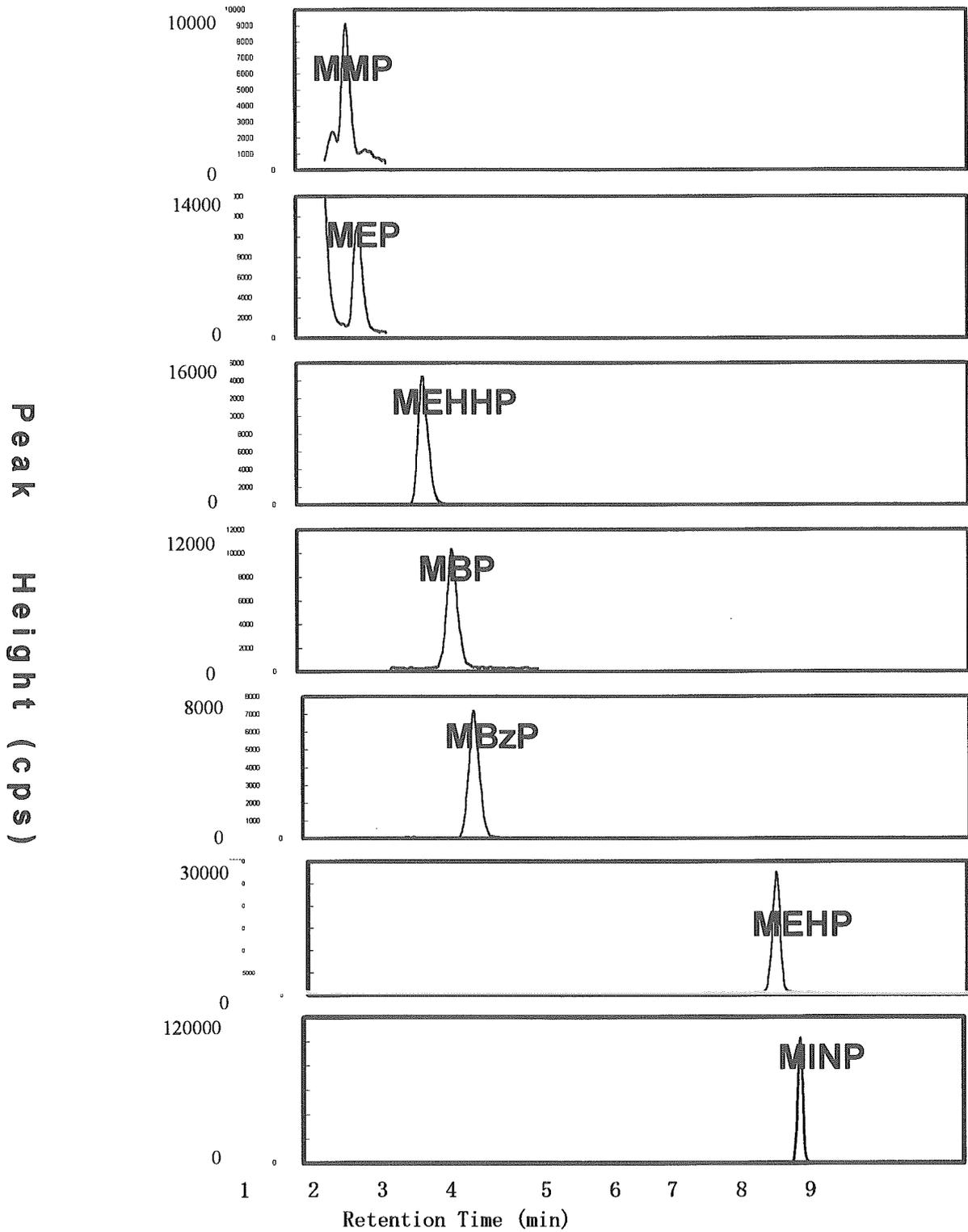


図 4. ヒト血清にフタル酸モノエステル類 (5.0 ppb) を添加した際のクロマトグラム.

Peak Height (cps)

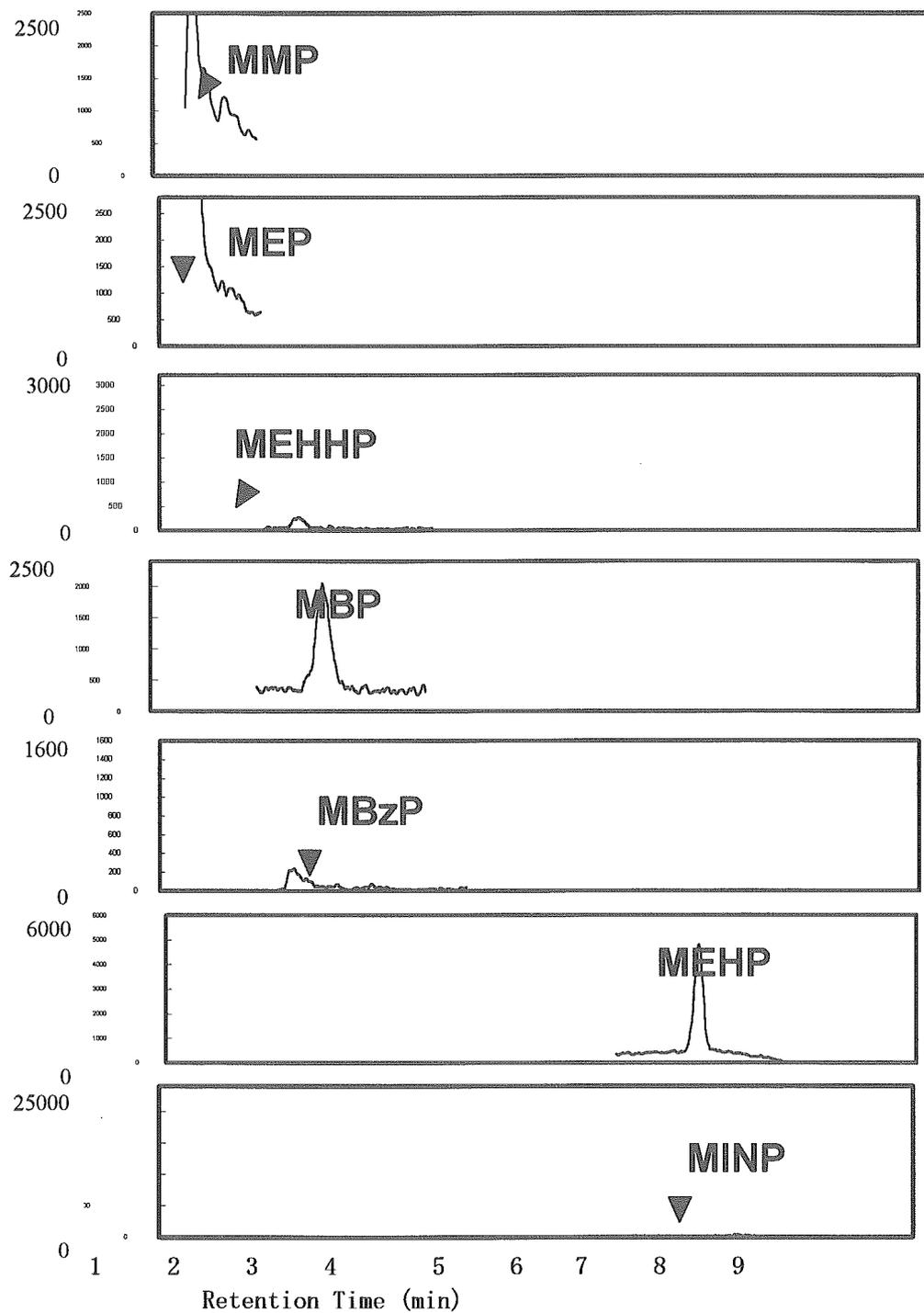


図 5. ヒト血清を分析した際のクロマトグラム.  
各縦軸のスケールは、図 4 の 1/5 にして拡大表示した。

化学物質名	脱抱合反応なし (ppb)	脱抱合反応あり (ppb)
MMP	< 0.1	< 0.1
MEP	< 0.1	< 0.1
MBP	< 0.1	0.35 ± 0.02
MBzP	< 0.1	< 0.1
MEHP	0.37 ± 0.03	0.54 ± 0.04
MEHHP	< 0.1	< 0.1
MINP	< 0.1	< 0.1

(n = 4)

表 2. フタル酸モノエステル類の操作ブランク値.

化学物質名	脱抱合反応なし (ppb)	脱抱合反応あり (ppb)
MMP	0.2	0.2
MEP	0.2	0.2
MBP	0.2	0.6
MBzP	0.2	0.2
MEHP	0.7	1.0
MEHHP	0.2	0.2
MINP	0.2	0.2

表 3. フタル酸モノエステル類の定量下限値.

化学物質名	5.0 ppb (%)	50 ppb (%)
MMP	94.8 (9.28)	94.5 (2.54)
MEP	101.7 (1.10)	94.6 (3.70)
MBP	94.4 (2.65)	100.7 (2.68)
MBzP	100.4 (1.10)	103.3 (1.74)
MEHP	93.1 (1.61)	102.0 (2.65)
MEHHP	100.2 (0.90)	101.1 (2.67)
MINP	99.4 (0.91)	98.5 (0.91)

(n = 5)

表 4. フタル酸モノエステル類のヒト血清に対する添加回収試験結果.  
回収率 (RSD). 脱抱合反応あり.

化学物質名	脱抱合反応なし (ppb)	脱抱合反応あり (ppb)
MMP	< 0.1	< 0.1
MEP	< 0.1	< 0.1
MBP	0.49 ± 0.08	1.00 ± 0.11
MBzP	< 0.1	< 0.1
MEHP	< LOQ (0.61 ± 0.04)	< LOQ (0.80 ± 0.12)
MEHHP	< 0.1	< 0.1
MINP	< 0.1	< 0.1

(n = 4)

表 5. ヒト血清中のフタル酸モノエステル類の分析例.

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  
ヒト生体試料中の化学物質の分析  
（フタル酸モノエステル類、重金属類、揮発性有機化合物）

主任研究者	牧野 恒久	東海大学 医学部
分担研究者	近藤 文雄	愛知県衛生研究所
研究協力者	林 留美子	愛知県衛生研究所
	猪飼 誉友	愛知県衛生研究所
	高取 聡	大阪府立公衆衛生研究所
	中澤裕之	星薬科大学

#### 研究要旨

尿中のフタル酸モノエステル類、血清及び尿中の重金属類、血清及び尿中の揮発性有機化合物（1,4-ジクロロベンゼン、2-エチル-1-ヘキサノール、2-エチル-1-ヘキサナール）の分析法を確立した。

#### 1. 尿中のフタル酸モノエステル類

測定対象物質は、フタル酸モノエチル（MEP）、フタル酸モノブチル（MBP）フタル酸モノエチルヘキシル（MEHP）、フタル酸モノイソノニル（MINP）、フタル酸モノベンジル（MBzP）とした。試料をβ-グルクロニダーゼにより加水分解し、メチル化後フロリジルカラムで精製した。測定にはGC/MSを用い、定量には安定同位体内部標準法を用いた。対象とした5種類のフタル酸モノエステルの検量線は、いずれも良好な直線性（相関係数0.999以上）を示した。測定対象5物質の標準品を添加して行った試験（n=3）では、回収率が86.3～119%、相対標準偏差が6.1%以下であった。

#### 2. 血清及び尿中の重金属類

誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS）を用いた血清及び尿中の多元素同時分析法を確立した。測定対象元素は、血清では20元素、尿では24元素とした。前処理法としては、血清ではマイクロ波分解法、尿では酸分解法が最適であった。血清及び尿に標準品を添加し、各試料の前処理法に従って行った試験（n=5）では、回収率が血清では85.5～99.5%、尿では84.6～101%、相対標準偏差が血清では6.5%以下、尿では3.6%以下であった。

#### 3. 血清及び尿中の揮発性有機化合物（1,4-ジクロロベンゼン、2-エチル-1-ヘキサノール、2-エチル-1-ヘキサナール）

標準添加法によるヘッドスペース-GC/MS法を用いた血清及び尿中の1,4-ジクロロベンゼン、2-エチル-1-ヘキサノール、2-エチル-1-ヘキサナールの同時分析法を確立した。血清、尿ともに3物質すべて良好な直線性（相関係数0.998以上）を示した。測定対象3物質の標準品を添加して行った試験（n=10）では、相対標準偏差が血清では8.5%以下、尿では10.5%以下であった。

#### A. 研究目的

本研究では、一般人での暴露量が多いフタル酸エステル類、重金属、揮発性有機化合物に対する生体曝露量を、特に胎児期を中心としてモニタリングする。さらに、曝露と子宮内膜症等産婦人科領域の疾患発症との因果関係を比較検証することを目的とする。具体的な測定対象物質は、フタル酸エステル類の代謝物であるフタル酸モノエステル類、ヒトにおいて健康との関連が大きいと考えられる必須ミネラルを始めとする重金属類、さらには、主に防虫剤として用いられる1,4-ジクロロベンゼン、フタル酸ジ-2-エチルヘキシルの代謝物である2-エチル-1-ヘキサノール及び2-エチル-1-ヘキサナールとし、同一母体から得られる母体血、臍帯血、胎盤、胎便、母乳、尿、毛髪等を測定する。研究初年度の本年度は、上記測定対象化学物質のヒト生体試料中の分析法について

検討を加えた。

#### B. 研究方法

##### 1. フタル酸モノエステル類

##### （1）試薬及び材料

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）、フタル酸モノエチルヘキシル（MEHP）、フタル酸モノイソノニル（MINP）、フタル酸モノベンジル（MBzP）、MMP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>、MEP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>、MBP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>、MEHP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>、MINP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>、MBzP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>はCambridge Isotope Laboratories社製、β-グルクロニダーゼ溶液（100 units）、フロリジル PRは和光純薬製、酢酸アンモニウムは和光純薬製特級、硫酸ナトリウムは和光純薬製残留農薬用、Methyl tertiary-butyl ether（MTBE）は関東化学製水質試験用、ヘキサン、アセトン、塩化ナトリウムは関東化学製フタル酸エステル

試験用、N-Methyl-N-nitro- N-nitrosoguanidine はジーエルサイエンス製を使用した。

## (2) 器具・試薬の前処理

ホールピペット、メスフラスコ以外の器具は、200℃で2時間加熱し、使用直前にヘキサンで洗浄した。

塩化ナトリウム、フロリジル、硫酸ナトリウムは、200℃で2時間加熱した。

## (3) フロリジルカラムの調製

内径 15 mm、長さ 110 mm のガラス製カラムの底に、ガラス繊維濾紙を敷き、フロリジル 1 g 及び無水硫酸ナトリウム 2 g を積層した。使用直前にアセトン 10 mL、ヘキサン 10 mL で洗浄した。

## (4) 試験溶液の調製法

試験溶液の調製法を図 1 に示した。尿 1 mL を共栓付遠心管 (10 mL、ガラス製) にとり、0.1M 酢酸アンモニウム 0.25 mL、内部標準溶液 25  $\mu$ L、 $\beta$ -グルクロニダーゼ 15  $\mu$ L を加え混和した後、37℃で1時間インキュベートした。10%硫酸で pH2 に調整後、ヘキサン 5 mL、塩化ナトリウム 0.25 g を加え、3分間混和後 3000 rpm で5分間遠心分離した。ヘキサン相を分取し、窒素気流下で乾固した。残渣にジアゾメタン-MTBE 溶液 0.5 mL を加え、30分間放置後、窒素気流下で乾固した。残渣をヘキサン 5 mL に溶解し、フロリジルカラムに負荷した。ヘキサン 3 mL でカラムを洗浄後、5%アセトン-ヘキサン 10 mL で溶出した。溶出液を窒素気流下で 0.5 mL に濃縮して試験溶液とした

## (5) ガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS) 条件

装置: Agilent 6890N GC/5973N MSD

イオン源: EI

カラム: HP-5MS SV (30 m x 0.25 mm ID、膜厚 0.5  $\mu$ m)

カラム温度: 80℃ (3分)  $\rightarrow$  20℃/分  $\rightarrow$  240℃  $\rightarrow$  10℃/分  $\rightarrow$  300℃ (5分)

キャリアガス: He (カラム流量 1.2 mL/分)

注入口温度: 250℃

試料注入法: パルスドスプリットレス

四重極温度: 150℃

イオン源温度: 230℃

検出法: 選択イオン検出 (SIM)

モニターイオン: 表 1

## (6) 定量法

試験溶液 2  $\mu$ L を GC/MS に注入し、各メチル化フタル酸モノエステルのピーク面積を内部標準のピーク面積で割った数値と、標準溶液のそれと比較して定量した。

## 2. 重金属類

### (1) 試薬及び材料

ICP-MS Quality Control Sample 2 (25 Components) はメルク製を、マグネシウム (Mg)、カルシウム (Ca)、鉄 (Fe)、銅 (Cu)、亜鉛 (Zn)、リチウム (Li)、ホウ素 (B)、アルミニウム (Al)、ヒ

素 (As)、ルビジウム (Rb)、ストロンチウム (Sr)、スズ (Sn)、水銀 (Hg)、スカンジウム (Sc)、イットリウム (Y)、イリジウム (Ir) はメルク製 ICP 標準液を、硝酸、過酸化水素は関東化学製 Ultrapur を使用した。また、血清標準試料 (Seronom N00371 Level 2) は SERO 製を、血清試料 (コントロール血清 I ワコー/B) は和光純薬製を、尿標準試料 (Lyphochek 1) は BIO-RAD 製を使用した。

## (2) 測定項目

測定対象元素は、Mg、Ca、Fe、Cu、Zn、クロム (Cr)、マンガン (Mn)、コバルト (Co)、セレン (Se)、モリブデン (Mo)、Li、B、Al、バナジウム (V)、ニッケル (Ni)、As、Rb、Sr、カドミウム (Cd)、Sn、アンチモン (Sb)、バリウム (Ba)、Hg、鉛 (Pb) の 24 元素とした。

## (3) 器具の洗浄

ピペットチップ、サンプルカップ等の使用器具は、10%硝酸槽に一夜浸漬し、水道水及びイオン交換蒸留水で十分に洗浄後、乾燥・保存し、使用前に超純水で洗浄した。

## (4) 試料の前処理法

1) 血清 マイクロ波分解法; マイクロ波分解用容器 (MV-7 専用 PFA 小容器、ジーエルサイエンス製) に血清 0.5 mL、硝酸 1 mL、過酸化水素 0.1 mL を入れて一夜放置し、電子レンジ (200 W) で 5 分、2 回加熱後、水中で 1 時間冷却した。

酸分解法; テフロン試験管に血清 0.5 mL、硝酸 1 mL を入れ、80℃アルミブロックバス中で過酸化水素及び硝酸を適宜追加し、ほとんど無色となるまで酸分解した。

2) 尿 酸分解法; テフロン試験管に尿 10 mL を入れ、硝酸 2.5 mL を加えて 70℃水浴中で 5 mL 以下になるまで酸分解した。

ろ過法; 尿をメンブランフィルター (0.45  $\mu$ m) でろ過した。

## (5) 試験溶液の調製法

血清 前処理法に従って酸分解後、ポリエチレン製遠沈管 (15 mL) に入れ、超純水で分解用容器内を洗い込んで全量を 3 mL にする (6 倍希釈)。混和後、その 1.8 mL を ICP-MS オートサンプラー用サンプルカップ (15 mL) にとり、0.1%硝酸 0.9 mL、内部標準溶液 (Sc, Y, Ir 各 100 ppb) 0.3 mL を加え、混和して試験溶液とした (10 倍希釈)。

尿 前処理法に従って酸分解後、ポリエチレン製遠沈管 (15 mL) に入れ、超純水でテフロン試験管内を洗い込んで全量を 5 mL にする (2 倍濃縮)。混和後、その 1.5 mL を ICP-MS オートサンプラー用サンプルカップ (15 mL) にとり、0.1%硝酸 1.2 mL、内部標準溶液 0.3 mL を加え、混和して試験溶液とした。

## (6) 誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) 条件

装置: ICP-MS (Agilent 7500i、横河アナリティカルシステムズ)

測定条件: RF パワー; 1500 W

サンプリング位置; 8 mm

プラズマガス ; Ar 15 L/min  
ネブライザ型 ; バビントン型  
内部標準元素 ; Sc(45)、Y(89)、Ir(193)  
干渉補正式 ;  
 $V(51) = (51) \cdot 1 - (53) \cdot 3.127 + (52) \cdot 0.3534$   
 $Se(78) = (78) \cdot 1 - (76) \cdot 0.1869$

### (7) 定量法

試験溶液を ICP-MS に導入し、各元素のカウン  
ト数を内部標準のカウント数で割った数値と、標  
準溶液のそれと比較して定量した。

## 3. 揮発性有機化合物

### (1) 試薬および材料

2-エチル-1-ヘキサナール標準品はアルドリッ  
チ製を、トルエン-d<sub>8</sub>及び2-エチル-1-ヘキサノ  
ール標準品は和光純薬製を、1,4-ジクロロベンゼン  
標準品は GL サイエンス製を、メタノールは関東  
化学製の残留農薬・PCB 測定用を、塩化ナトリウ  
ムは関東化学製の特級をそれぞれ用いた。血清は  
と畜場においてと殺直後の豚血液を採取し、3000  
rpm で遠心分離したものを、尿試料についてはボ  
ランティアより採取したものをそれぞれ使用し  
た。

### (2) 分析操作

**測定** 希釈水 10 mL が入ったヘッドスペースバイ  
アルに、試料 (血清 0.5 mL、尿 2 mL) 及び混合  
標準溶液 1 μL を加えた後、テフロン張りのシリ  
コンゴムセプタムおよびアルミシールで密封し  
た。これらの操作は、活性炭による空気浄化機能  
を有するグローブボックス (自家製) 内で行った。  
このバイアルをヘッドスペースオートサンプラ  
ーにセットし、ヘッドスペース-GC/MS により測定  
を行った。

**希釈水** 300 °C で 5 時間加熱処理した塩化ナトリ  
ウムと Milli Q 水とで調製した飽和食塩水を、  
80 °C で加温しながら高純度ヘリウムを 5 分間ば  
っ気 (約 1L/分) した。その後、超音波水槽中で  
アスピレーターにより脱気する処理を 3 回繰り返  
すことにより、揮発性の溶質を除去した。

**混合標準溶液** 2-エチル-1-ヘキサナール、2-エ  
チル-1-ヘキサノール及び 1,4-ジクロロベンゼン  
標準品をメタノールに溶解して 1000 ppm 溶液と  
し、それらをメタノールで段階的に希釈して、次  
の 6 段階の混合標準溶液を調製した。なお、各標  
準溶液には内部標準としてトルエン-d<sub>8</sub> を 1 ppm  
添加した。標準溶液 1 (2-エチル-1-ヘキサナ  
ール:0.4 ppm / 2-エチル-1-ヘキサノール:0.4 ppm  
/ 1,4-ジクロロベンゼン:0.2 ppm)、標準溶液 2  
(同 0.8 / 0.8 / 0.4)、標準溶液 3 (同 1.6 / 1.6  
/ 0.8)、標準溶液 4 (同 4.0 / 4.0 / 2.0)、標準  
溶液 5 (同 8.0 / 8.0 / 4.0)、標準溶液 6 (同 20.0  
/ 20.0 / 10.0)

**検量線/定量方法** 内部標準のみを添加した試  
料、及び一定濃度の標準溶液 (内部標準を含む)  
を添加した試料を測定し、測定対象化合物とトル

エン-d<sub>8</sub> のピーク面積比を基に検量線を作成後、  
その傾き及び切片から試料中の濃度を算出した。

### (3) 分析条件

**ヘッドスペース条件** 装置: Tekmer 7000 (Tekmer)、  
バイアル容量: 22 mL (Chromacol, CV-22)、バ  
イアル加熱条件: 85 °C (20 分)、バイアル振とう  
機能: 使用 (Power 5: 3 分)、サンプルループ容  
量: 1 mL、サンプルループ温度: 150 °C、トラン  
スファーライン温度: 160 °C

**GC/MS 条件** 装置: AUTO MASS SYSTEM II (日本電  
子) カラム: Vocol (0.25 mm i. d. x 60 m、膜厚:  
1.5 μm、Supelco) カラム温度: 40 °C で 4 分間  
保持し、230 °C まで毎分 10 °C で昇温後、230 °C  
で 5 分間保持。イオン源温度: 210 °C イオン化:  
EI、イオン化電圧: 70 eV、検出方法: SIM 法、  
モニターイオン: 2-エチル-1-ヘキサナール (m/z  
72)、2-エチル-1-ヘキサノール (m/z 57)、1,4-  
ジクロロベンゼン (m/z 146)、トルエン-d<sub>8</sub> (m/z 98)

## C, D. 研究結果 及び 考察

### 1. 尿中のフタル酸モノエステル類の分析

尿中のフタル酸モノエステル類の分析法とし  
て、ジアゾメタンでメチル化後、GC/MS で分析す  
る方法を検討した。5 種のフタル酸モノエステル  
(MEP、MBP、MEHP、MINP、MBzP) のメチル化体の  
マススペクトル上には、m/z 163 がいずれもベース  
ピーク (最も強く検出されるイオン) として観察  
され、次いで m/z 149 が強く観察される。また、  
内部標準物質として使用したフタル酸モノエス  
テルの安定同位体のメチル化体のマススペクト  
ル上には、同様に m/z 167 と m/z 153 が強く検出  
される。フラグメントイオン m/z 163 と m/z 167  
はフタル酸モノエステルのメチル化体に特徴的  
なイオンで、一方、m/z 149 と m/z 153 は、o-フ  
タル酸化合物に特徴的なイオンである。

5 種のフタル酸モノエステル及びそれらの安  
定同位体をジアゾメタンでメチル化後、GC/MS 分  
析して得られた SIM クロマトグラムを図 1 に示し  
た。5 種の標準物質及びそれらの安定同位体のメ  
チル化体のピークは良好に分離しており、分析に  
支障のないことが確認された。

前処理法を検討した結果、図 2 に示す方法を確  
立した。この方法を用いて尿を分析して得られた  
SIM クロマトグラムを図 3 に示した。MINP を除く  
4 物質が検出され、特に MEP と MBP のピークが強  
い強度で検出された。なお、尿試料を分析した場  
合、内部標準物質として添加した MBP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub> のメチ  
ル化体のベースピーク (m/z 167) の測定に妨害  
となる夾雑ピークが認められた。そこで、定量イ  
オンとして m/z 153 を用いた。これに伴い、MBP  
の定量イオンも、同じ分子構造のフラグメントイ  
オンである m/z 149 とした。他の 4 物質及びそれ  
らの安定同位体の定量イオンは、m/z 163 及び  
m/z 167 とした。(表 1)

5 種のフタル酸モノエステルについて、安定同

位体内標準法を用いて作成した検量線を図4に示した。いずれも相関係数が0.999以上と良好な直線性を示したことから、安定同位体内標準法が定量分析に適用可能であることが明らかとなった。

尿の代わりに蒸留水を試料として用いて試験を行い、試験操作に由来するバックグラウンド値を求めた(表2)。その結果、MEPとMEHPが検出され、検出濃度の平均値はMEPが1.6 ppb、MEHPが3.0 ppbであった。MBP、MINP及びMBzPは検出されなかった。なお、定量下限値は、ブランクの標準偏差の10倍あるいは、検量線に使用した最も低濃度の標準溶液を5回繰り返し測定した時の標準偏差の10倍とした。MEP、MBP、MINPは1.0 ppb、MEHP、MBzPは5.0 ppbであった。

添加回収試験におけるフタル酸モノエステル類の回収率を表3に示した。回収率の平均値は、MEPが86.3%、MBPが119%、MEHPが100%、MINPが98.0%、MBzPが89.1%であった。MEPとMBPの回収率にややばらつきが認められたが、試料中に含まれている両物質の濃度が高いことが要因の一つと考えられた。相対標準偏差は、0.55~6.1%と良好な結果であった。また、本分析法の再現性を検証するために、同一試料を繰り返し分析した結果、4回の分析での相対標準偏差は、0.0~7.5%と良好な結果であった。

本分析法を用いて尿試料の予備的な測定を行った(表4)。MEP、MBP及びMEHPは全ての検体から検出され、検出濃度範囲はそれぞれ12~160 ppb、100~500 ppb、5.5~34 ppbであった。MINP及びMBzPは各1名から検出され、濃度は7.3 ppb、17 ppbであった。

## 2. 重金属類

### (1) 血清中の多元素分析法

24元素の表示値が示された血清標準試料(Seronorm N00371 Level 2)を、マイクロ波分解法及び酸分解法で前処理し、ICP-MSで分析を行った。その結果、マイクロ波分解法では20元素において、酸分解法では17元素において、業務管理基準(GLP)内部精度管理の許容範囲に用いられる表示値の±30%以内の測定値が得られた(表5)。この結果から、血清の前処理は、20の元素を精度よく測定することができたマイクロ波分解法で行うこととした(図5)。

また、血清試料に20元素の標準品を添加(血清中濃度として10~10000 ppb)し、前処理法にマイクロ波分解法を用いて回収試験を実施した結果、各元素の回収率は85.5~99.5%、相対標準偏差は6.5%以下(n=5)と、良好な結果を示した(表6)。

以上の結果から、血清中の重金属類の分析法として、マイクロ波分解法によって共存する有機物を酸分解し、ICP-MSを用いてMg, Ca, Fe等の20元素を同時分析する方法を確立した。

### (2) 尿中の多元素分析法

24元素のうち13元素の表示値が示された尿標準試料(Lyphochek 1)を、酸分解法及びろ過法で前処理し、ICP-MSで分析を行った。その結果、酸分解法では表示値が示されている13元素すべてにおいて、ろ過法ではそのうち11元素において、表示値に併せて示された許容範囲内の測定値が得られた(表7)。この結果から、尿の前処理は、表示値が示された13元素すべてが測定可能であった酸分解法で行うこととした(図5)。

また、尿中の24元素を同時分析する方法を検討するために、尿試料に24元素の標準品を添加(尿中濃度として25~5000 ppb)し、前処理法に酸分解法を用いて回収試験を実施した結果、各元素の回収率は84.6~101%、相対標準偏差(RSD)は3.6%以下(n=5)と、良好な結果を示した(表8)。従って、尿試料では24元素すべてのICP-MSによる同時分析が可能であると考えられた。

以上の結果から、尿中の重金属類の分析法として、酸分解法によって共存する有機物を分解し、ICP-MSを用いてMg, Ca, Fe等の24元素を同時分析する方法を確立した。

## 3. 揮発性有機化合物

揮発性有機化合物を分析するための代表的な前処理法としては、パージ&トラップ法とヘッドスペース法がある。前者は高感度ではあるが、試料をばっ気する必要があるので、血液や尿など発泡しやすい試料に適用することが難しいという短所がある。それに対して、後者は前者ほどの感度は望めないが、発泡しやすい試料でも測定が可能であるため、今回はこの方法を用いて検討を行った。

ヘッドスペース法は、密封したバイアル中の試料溶液を加熱・振とうすることにより、試料溶液に含まれる揮発性の成分をバイアル上部の気相部分に抽出し、その気相の一部をGCなどの分離・検出装置に導入するという前処理法である。この方法は、気相に抽出される揮発成分の量が、試料中のマトリックスにより大きく影響を受けるため、その影響を補正する目的で内部標準法あるいは標準添加法が用いられるのが一般的である。これらのなかで最も効率的で精度が良いと考えられる方法は、個々の測定対象化合物の安定同位体を内部標準物質に用いる方法であることから、それぞれの測定対象化合物の安定同位体(2-エチル-1-ヘキサナール-d<sub>18</sub>、2-エチル-1-ヘキサノール-d<sub>17</sub>、1,4-ジクロロベンゼン-d<sub>4</sub>)を内部標準物質に用いて測定を試みた。その結果、血清に添加した2-エチル-1-ヘキサナール-d<sub>18</sub>の一部が加熱処理中に2-エチル-1-ヘキサナール-d<sub>17</sub>に変化し、内部標準として十分な機能を果たさないことが明らかとなった。この2-エチル-1-ヘキサナール-d<sub>18</sub>は重水素置換により自家調製したものであり、それに代わるような化合物も現在市販され

ていないという理由から、今回は、標準添加法とトルエン-d<sub>8</sub>による内部標準法を併用するという方法を用いて測定条件を検討した。

血清は、使用できる試料量が数 mL と少ない上に、標準添加法は1試料につき2~3回の測定が必要である。また、血清はマトリックスとして脂質を含んでおり、それが測定対象化合物の気相への抽出を強く阻害するという問題もある。そのため、血清試料の場合は1回の測定試料の量を0.5 mL に設定し、マトリックスの影響の軽減及び塩析効果による感度向上を目的として、飽和食塩水10 mL で希釈してヘッドスペース分析用試料を調製した。一方、尿試料の調製に関しては、血清試料ほどマトリックスの影響が大きいことから、試料量を2 mL とし、血清試料と同様に10 mL の飽和食塩水で希釈する方法を採用した。

豚血清及び尿に標準添加した試料を測定して得られた標準添加検量線を図6に示した。豚血清では2-エチル-1-ヘキサナール及び2-エチル-1-ヘキサノール0~20 ppb、1,4-ジクロロベンゼン0~10 ppbの添加レベルにおいて、また、尿では0~5 ppb及び0~2.5 ppb添加においてそれぞれ良好な直線性 ( $r=0.998\sim 1.000$ ) が認められた。図7には、豚血清及び尿へ標準を添加した試料を分析して得られたSIMクロマトグラムを示した。いずれの試料においても、測定対象化合物のピークは良好に分離しており、測定の妨害となるピークは認められなかった。添加回収試験結果を表9 (豚血清) 及び表10 (尿) に示した。豚血清における2-エチル-1-ヘキサナールの相対標準偏差が8.5%、尿における2-エチル-1-ヘキサノールの相対標準偏差が10.5%と幾分高かった以外は、良好であると評価された。以上の結果より、本法を用いれば血清及び尿試料中の2-エチル-1-ヘキサナール、2-エチル-1-ヘキサノール及び1,4-ジクロロベンゼンの3種類の揮発性有機化合物を精度よく測定出来ると考えられた。定量下限値は、試料及び添加する標準溶液の濃度レベルによっても異なるが、血清中の2-エチル-1-ヘキサナール及び2-エチル-1-ヘキサノールは1 ppb、1,4-ジクロロベンゼンは0.2 ppb、尿中の2-エチル-1-ヘキサナール及び2-エチル-1-ヘキサノールは0.25 ppb、1,4-ジクロロベンゼンは0.1 ppb程度であると考えられた。

#### E. 結論

1. 尿中のフタル酸モノエステル類の分析法を確立した。対象とした5種類のフタル酸モノエステルの検量線は、いずれも良好な直線性 (相関係数0.999以上) を示し、また、測定対象5物質の標

準品を添加して行った試験 ( $n=3$ ) では、回収率が86.3~119%、相対標準偏差が6.1%以下と良好であった。

2. 誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) 法を用いた血清及び尿中の多元素同時分析法を確立した。前処理法としては、血清ではマイクロ波分解法、尿では酸分解法が最適であった。本法により、血清では20元素、尿では24元素の同時分析が可能であった。

3. 血清および尿中の1,4-ジクロロベンゼン、2-エチル-1-ヘキサノール、2-エチル-1-ヘキサナールの同時分析法として、標準添加法とヘッドスペース-GC/MS法を組み合わせた方法を確立した。血清、尿ともに3物質すべて良好な直線性 (相関係数0.998以上) を示した。測定対象3物質の標準品を添加して行った試験 ( $n=10$ ) では、相対標準偏差が血清では8.5%以下、尿では10.5%以下と良好であった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

近藤文雄、猪飼誉友、林 留美子、富田伴一、高取 聡、吉村真理子、中澤裕之、牧野恒久; GC/MSによる尿中フタル酸モノエステル類の分析法の開発; 日本薬学会第126年会 (2006)

#### H. 知的所有権の取得状況

なし

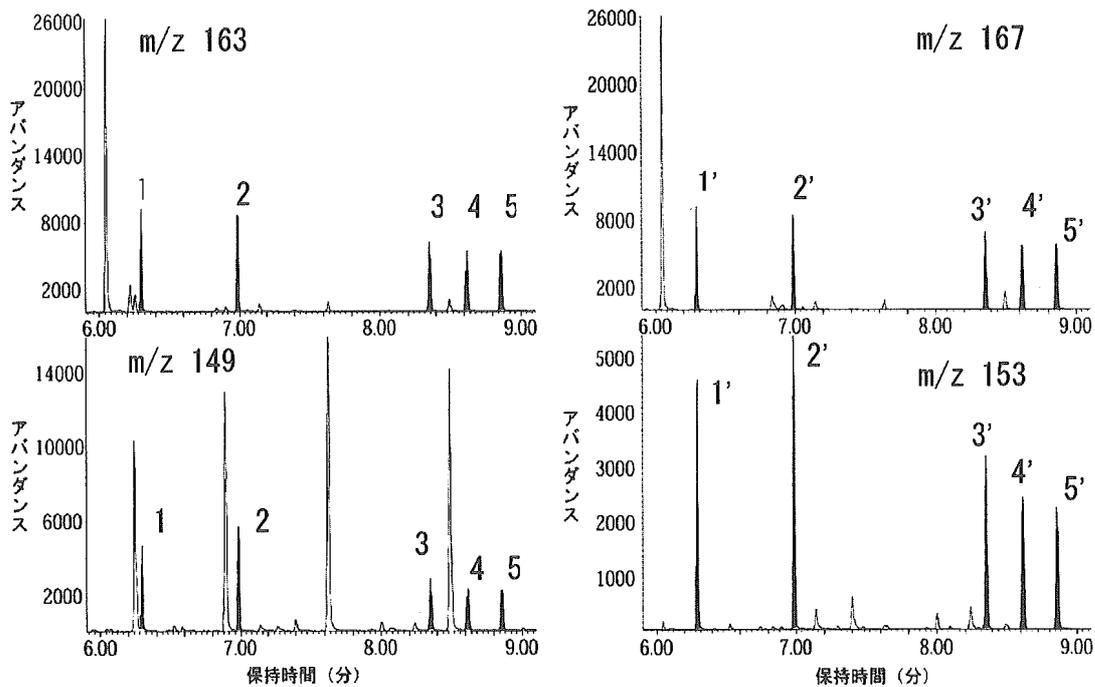


図1 フタル酸モノエステル標準品のメチル誘導体のGC/MS-SIMクロマトグラム  
 1: Me-MEP, 2: Me-MBP, 3: Me-MEHP, 4: Me-MINP, 5: Me-MBzP  
 1'から6'はそれぞれの安定同位体 ( $^{13}\text{C}$ - $_4$ )

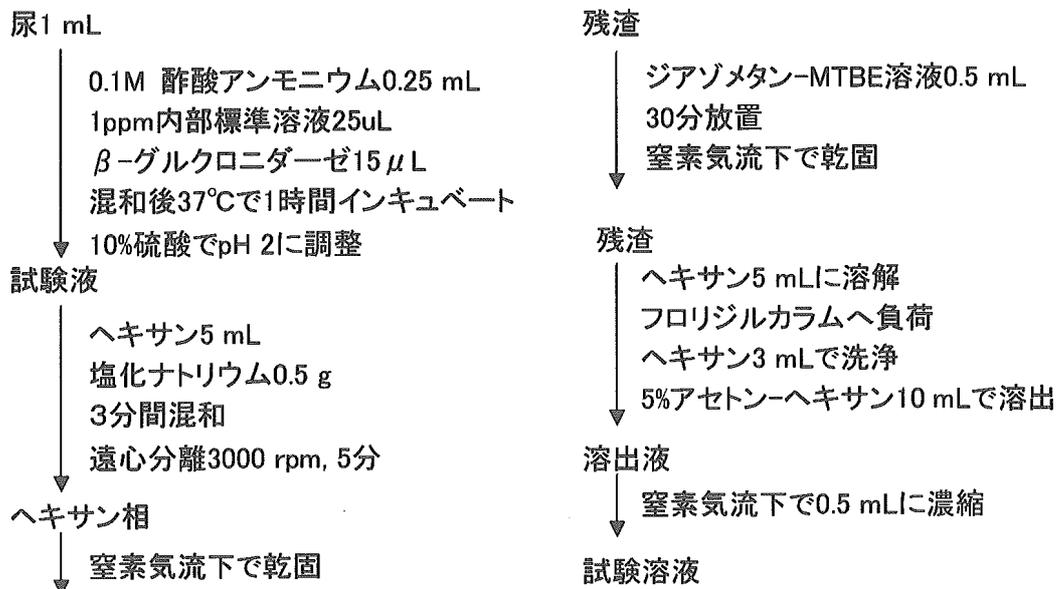


図2 ヒト生体試料中のフタル酸モノエステル類分析のための前処理法

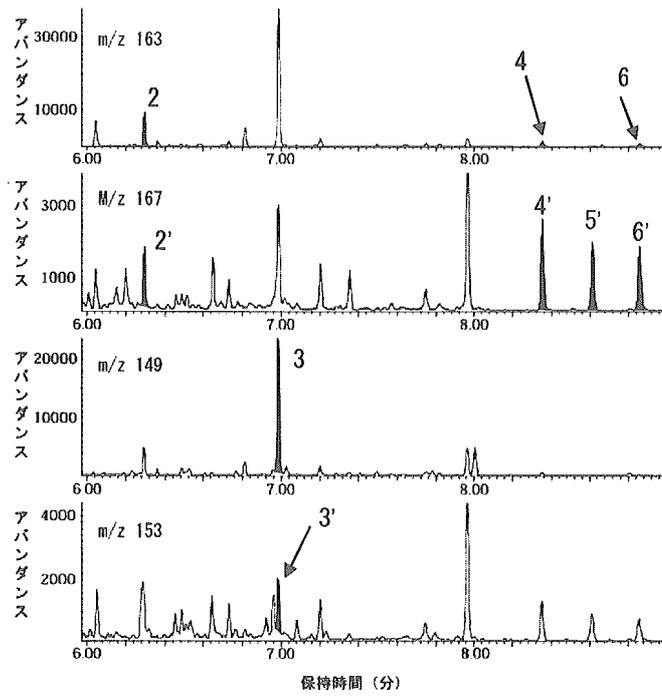


図3 尿試料のGC/MS-SIMクロマトグラム

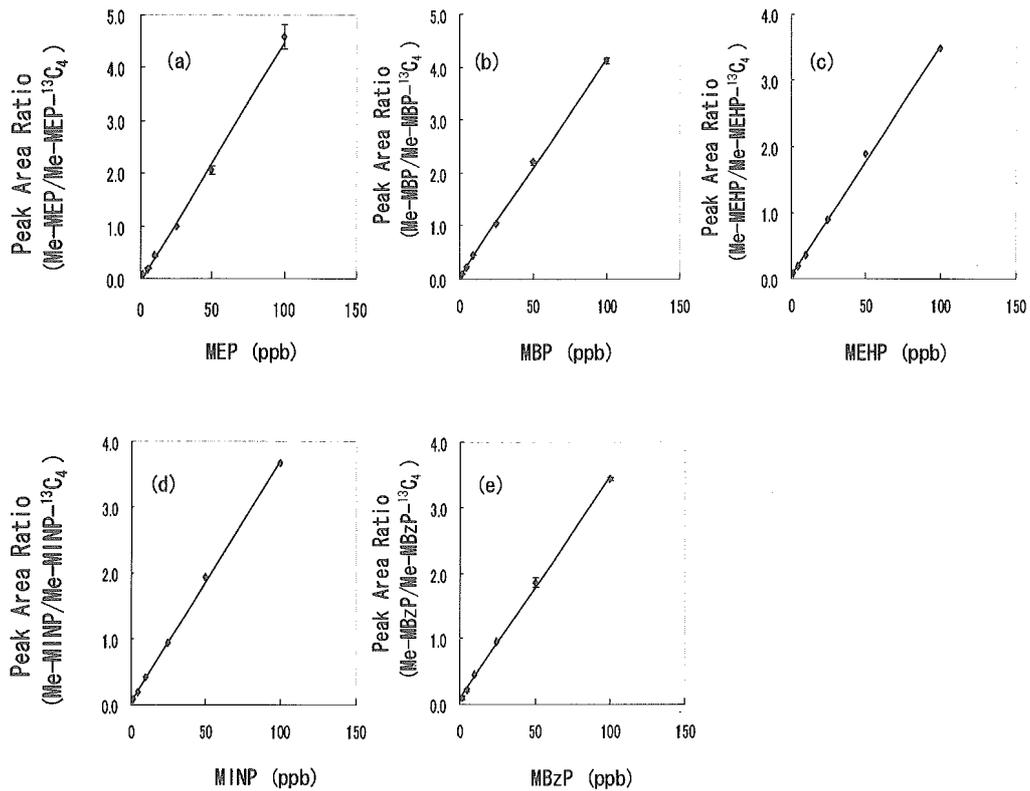


図4 5種のパタル酸モノエステルの検量線

- (a) MEP:  $y = 0.0456x - 0.0727$ ,  $r=0.999$   
 (b) MBP:  $y = 0.0413x + 0.0294$ ,  $r=0.999$   
 (c) MEHP:  $y = 0.035x + 0.028$ ,  $r=0.999$   
 (d) MINP:  $y = 0.0367x + 0.033$ ,  $r=0.999$   
 (e) MBzP:  $y = 0.0341x + 0.0723$ ,  $r=0.999$

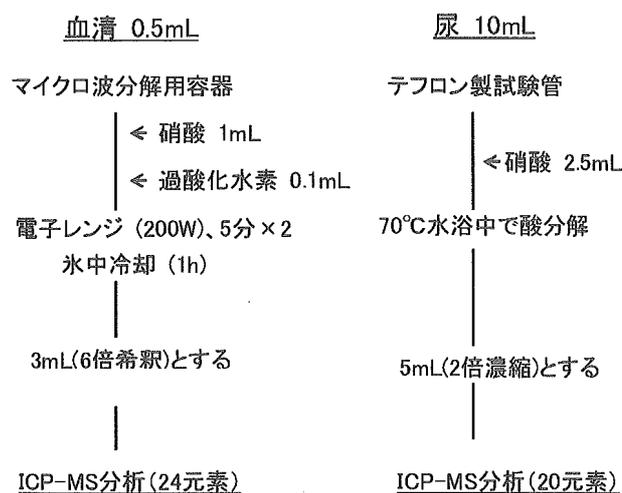


図5 血清および尿中多元素分析法

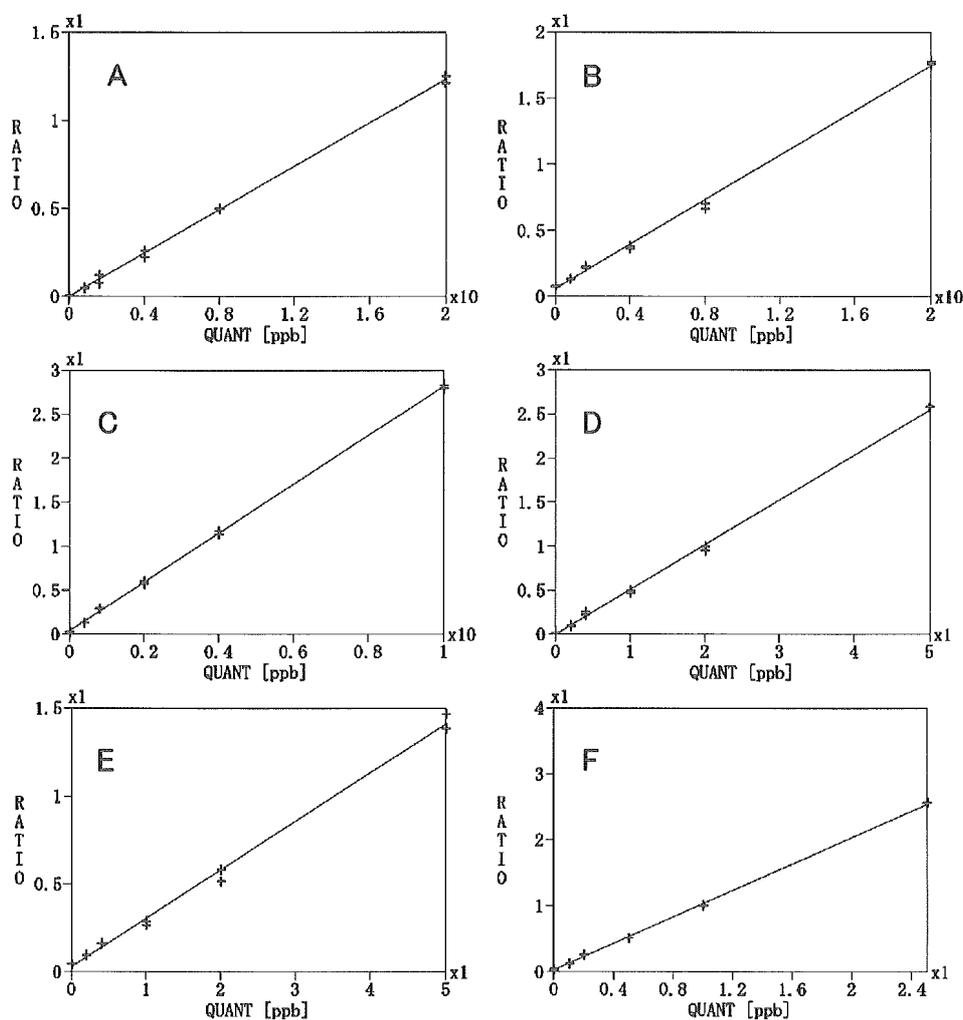


図6 豚血清及び尿試料への標準添加検量線

- A 2-エチル-1-ヘキサナール, 豚血清 0.5 mL 中に 0~20 ppb 添加 (r=0.999)
- B 2-エチル-1-ヘキサノール, 豚血清 0.5 mL 中に 0~20 ppb 添加 (r=0.999)
- C 1,4-ジクロロベンゼン, 豚血清 0.5 mL 中に 0~10 ppb 添加 (r=1.000)
- D 2-エチル-1-ヘキサナール, 尿 2.0 mL 中に 0~5 ppb 添加 (r=0.999)
- E 2-エチル-1-ヘキサノール, 尿 2.0 mL 中に 0~5 ppb 添加 (r=0.998)
- F 1,4-ジクロロベンゼン, 尿 2.0 mL 中に 0~2.5 ppb 添加 (r=1.000)

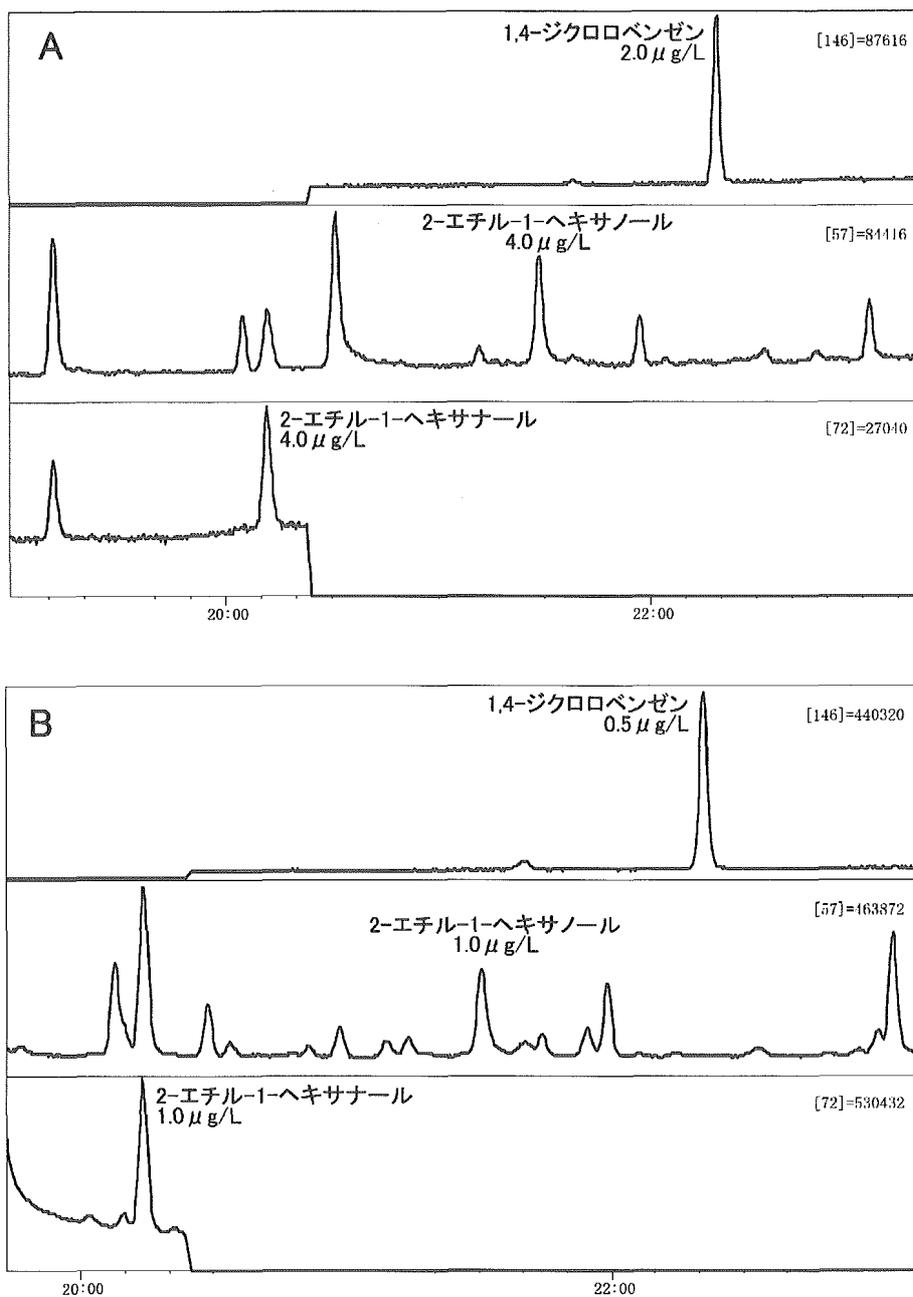


図7 試料に標準添加した測定対象化合物のSIMクロマトグラム  
 A 豚血清 0.5 mL、 B 尿 2 mL

表1 モニターイオン

測定対象物質	略称	定量イオン	参照イオン
フタル酸モノエチル	MEP	163	149
フタル酸モノブチル	MBP	149	163
フタル酸モノエチルヘキシル	MEHP	163	149
フタル酸モノイソノニル	MINP	163	149
フタル酸モノベンジル	MBzP	163	149
フタル酸モノエチル- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	MEP- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	167	153
フタル酸モノブチル- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	MBP- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	153	167
フタル酸モノエチルヘキシル- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	MEHP- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	167	153
フタル酸モノイソノニル- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	MINP- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	167	153
フタル酸モノベンジル- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	MBzP- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	167	153

表2 空試験におけるフタル酸モノエステル類の検出量と定量下限値(単位: ppl)

	MEP	MBP	MEHP	MINP	MBzP
平均値	1.6	<1.0	3.0	<1.0	<5.0
標準偏差	0.09	—	0.48	—	—
定量下限値	1.0	1.0	5.0	1.0	5.0

表3 添加回収試験結果

	MEP	MBP	MEHP	MINP	MBzP
回収率(%)	86.3	128	100	98.6	87.0
相対標準偏差(%)	2.2	6.1	0.55	0.8	2.1

添加濃度: 250 ppb

試験に用いた尿試料中の濃度: MEP 120 ppb、MBP 375 ppb、MEHP 15.9 ppb、MINP <1.0 ppb、MBzP 9.2 ppb

表4 尿試料の分析結果

試料	濃度(ppb)				
	MEP	MBP	MEHP	MINP	MBzP
A	140	180	34	7.3	<5.0
B	96	260	31	<1.0	<5.0
C	160	500	22	<1.0	<5.0
D	12	100	5.5	<1.0	<5.0
E	160	470	25	<1.0	17

表5 血清標準試料 (Seronorm N00371 Level 2) の分析 (n=5) (ppb、\* ppm)

元素		Mg*	Ca*	Fe	Cu	Zn	Cr	Mn	Co	Se	Mo	Li	B
マイクロ波 分解法	平均値	27.8	118	1898	2523	916	11.1 <sup>#</sup>	18.7	2.8	150	1.5	7757	41
	(標準偏差)	(0.9)	(4.3)	(18)	(77)	(16)	(0.3)	(1.4)	(0.1)	(4.5)	(0.2)	(93)	(5.2)
酸分解法	平均値	27.5	118	1882	2501	1311 <sup>#</sup>	10.0 <sup>#</sup>	18.3	2.4	183 <sup>#</sup>	1.7	7697	39
	(標準偏差)	(0.9)	(9.3)	(74)	(98)	(35)	(2.1)	(0.8)	(0.6)	(6.2)	(0.4)	(281)	(2.2)
表示値		28.9	117	1910	2600	920	5.2	19.1	3.2	136	1.3	10600	41
元素		Al	V	Ni	As	Rb	Sr	Cd	Sn	Sb	Ba	Hg	Pb
マイクロ波 分解法	平均値	105	2.7 <sup>#</sup>	10.5	3.4 <sup>#</sup>	7.0	125	0.32	8.8 <sup>#</sup>	20.9	269	2.3	3.2
	(標準偏差)	(13)	(0.3)	(2.1)	(1.7)	(0.5)	(4.8)	(0.1)	(1.8)	(0.7)	(10)	(0.1)	(0.4)
酸分解法	平均値	94.8	1.9 <sup>#</sup>	11.5	2.0 <sup>#</sup>	7.6	127	0.51 <sup>#</sup>	6.0 <sup>#</sup>	22.7	276	2.5	3.0
	(標準偏差)	(4.5)	(1.5)	(3.5)	(0.4)	(0.5)	(4.4)	(0.2)	(1.0)	(0.7)	(16)	(0.1)	(0.5)
表示値		111	1.1	10.7	<1	7.2	130	0.32	2.9	21	271	1.9	3.0

<sup>#</sup> 表示値±30%を外れる値

表6 血清からの20元素の回収率(n=5)

元素	Mg	Ca	Fe	Cu	Zn	Mn	Co	Se	Mo	Li
添加量 (ppb)	500	10000	1000	200	200	100	100	100	100	200
回収率 (%)	92.8	92.4	95.7	91.8	92.7	91.5	89.2	98.8	98.2	85.5
相対標準偏差 (%)	2.7	1.8	3.6	2.7	2.8	3.2	3.5	2.0	2.9	1.5
元素	B	Al	Ni	Rb	Sr	Cd	Sb	Ba	Hg	Pb
添加量 (ppb)	100	100	100	50	100	100	100	100	10	100
回収率 (%)	91.3	99.5	87.4	97.3	98.7	92.0	97.4	96.3	96.9	92.9
相対標準偏差 (%)	1.2	4.2	4.3	3.0	2.6	2.7	1.7	2.0	6.4	3.0

表7 尿標準試料 (Lyphochek 1) の分析 (酸分解法 : n=5、ろ過法 : n=10) (ppb)

元素		Zn	Cu	Mn	Se	Co	Cr	Ni
酸分解法	平均値	682	9.1	1.8	69	3.7	2.4	2.8
	(標準偏差)	(4.4)	(0.2)	(0.1)	(2.0)	(0.2)	(0.2)	(0.1)
ろ過法	平均値	544 <sup>#</sup>	8.0	2.2	87	3.8	3.4 <sup>#</sup>	3.8
	(標準偏差)	(9.7)	(0.6)	(0.1)	(3.0)	(0.1)	(0.2)	(0.1)
表示値		713	10.3	<3.5*	77*	4.2	2.0*	<12*
許容範囲		571~856	7.7~12.8		58~96	3.4~5.1	1.5~2.5	
元素		Al	Pb	Cd	As	Hg	Pb	
酸分解法	平均値	24	13.9	5.4	53	38	18.0	
	(標準偏差)	(0.8)	(0.1)	(0.03)	(1.0)	(0.6)	(0.2)	
ろ過法	平均値	19	13.4	5.0	64	28	18.4	
	(標準偏差)	(0.5)	(0.1)	(0.1)	(2.0)	(0.7)	(0.4)	
表示値		24	13.1	6.2	56	37	18.9	
許容範囲		19~29	10.5~15.7	4.9~7.4	42~70	26~49	15.1~22.7	

<sup>#</sup> 許容範囲を外れる値 測定:ICP-MS法、\* 原子吸光法

表8 尿からの24元素の回収率(n=5)

元素	Mg	Ca	Fe	Cu	Zn	Cr	Mn	Co	Se	Mo	Li	B
添加量 (ppb)	1000	5000	500	50	250	50	50	50	50	100	50	250
回収率 (%)	92.6	92.8	92.0	90.6	97.8	94.6	92.5	91.2	100	98.7	87.4	85.6
相対標準偏差 (%)	1.2	1.4	3.6	0.7	1.3	0.2	0.5	0.5	2.4	1.1	0.2	0.6
元素	Al	V	Ni	As	Rb	Sr	Cd	Sn	Sb	Ba	Hg	Pb
添加量 (ppb)	50	50	50	250	250	100	50	50	50	50	25	50
回収率 (%)	95.4	98.4	89.4	85.1	95.2	99.3	84.6	91.8	89.6	99.9	96.8	101
相対標準偏差 (%)	2.4	0.5	0.9	0.7	0.9	0.4	1.0	0.2	0.4	0.5	0.7	0.4

表9 豚血清を用いた添加回収実験結果

測定対象化合物	n	添加濃度	測定値		
			平均	範囲	相対標準偏差
2-エチル-1-ヘキサナール	10	4 ppb	4.0 ppb	3.4-4.4 ppb	8.5 %
2-エチル-1-ヘキサノール	10	4 ppb	3.7 ppb	3.4-4.0 ppb	4.7 %
1,4-ジクロロベンゼン	10	2 ppb	2.0 ppb	1.8-2.1 ppb	4.4 %

表10 尿を用いた添加回収実験結果

測定対象化合物	n	添加濃度	測定値		
			平均	範囲	相対標準偏差
2-エチル-1-ヘキサナール	10	1 ppb	1.03 ppb	0.94-1.10 ppb	5.1 %
2-エチル-1-ヘキサノール	10	1 ppb	1.02 ppb	0.87-1.19 ppb	10.5 %
1,4-ジクロロベンゼン	10	0.5 ppb	0.48 ppb	0.48-0.51 ppb	2.0 %