

内分泌かく乱物質に関する生体試料（さい帯血等）の分析法の開発とその実試料分析結果に基づくヒト健康影響についての研究

生体試料中のフタル酸及びアジピン酸エステル類の高感度一斉分析測定法の開発

主任研究者 牧野恒久
東海大学
分担研究者 牧野恒久
東海大学
研究協力者 岩崎克彦
和泉俊一郎
東海大学

【要旨】

フタル酸エステル類及びアジピン酸エステルは、内分泌かく乱物質の一つと考えられている。現在、プラスチック製品の可塑剤として汎用されており、健康影響に関する調査研究の実施が急務とされている。この目的のために、ヒト体液中での、これらエステル類の高感度かつ迅速な一斉分析法を開発した。

本法は、試料をヘキサン：アセトニトリルと振とうするだけで、抽出・精製が可能で、前処理操作が極めて簡便かつ迅速である。それ故、定量操作過程への、エステル類の混入が、極めて少ないという利点がある。また、比較的高感度で 1 ng/ml（生体試料）のエステル類の測定が可能である。本法により、ヒト体液中のフタル酸エステル及びアジピン酸エステルが、高感度で、アーティファクトの可能性が極めて低い状態で測定可能である。また、迅速かつ簡便であるなど、スクリーニング法として優れた特徴を有するため、内分泌かく乱物質の健康影響に関する調査研究の実施に極めて有用である。

A. 研究目的

フタル酸エステル類及びアジピン酸エステルは、内分泌かく乱物質の一つと考えられている。現在、プラスチック製品の可塑剤として汎用されており、健康影響に関する調査研究の実施が急務とされている。この目的のために、ヒト

体液中での、これらエステル類の高感度かつ迅速な一斉分析法を開発した。本法は、生体試料からヘキサンアセトニトリルでエステル類を抽出し、GC-MS 分析することに基づく。ウサギ標準血清を生体試料のモデルとして用い、分析法の最適化を行った。

B. 研究方法

<1. 試薬及び器具>

フタル酸ジエチル（略号 DEP）及び DEP-d₁₀：関東化学。

フタル酸ジイソブチル（略号 DIBP）及び DIBP-d₁₀：関東化学。

フタル酸ジブチル（略号 DBP）及び DBP-d₁₀：関東化学。

フタル酸ジベンチル（略号 DBP）及び DPP-d₁₀：関東化学。

フタル酸ペンジルブチル（略号 BBP）：関東化学。

フタル酸ジシクロヘキシル（略号 DCHP）及び DCHP-d₁₀：関東化学。

フタル酸ジ-2-エチルヘキシル（略号 DEHP）：関東化学。

アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル（略号 DEHA）：関東化学。

BBP-d₁：キシダ化学。

DEHP-d₁：GLサイエンス。

DEHA-d₈：林純薬。

フェナンスレン-d₁₀（内標準物質）：日本酸素。

フルオランテン d₁₀、クリセン-d₁₂（内標準物質）：GLサイエンス。

n-ヘキサン：フタル酸分析用、関東化学。

アセトニトリル：残留農薬試験用（1000倍濃縮）、関東化学。

ウサギ標準血清：和光純薬。

操作ブランク用水：フタル酸分析用、和光純薬。

水：イオン交換水を、超純水製造装置（Milli RO 8 Water purification system 及び Milli-Q SP reagent water system）で精製した。

ガラス器具の摺り合わせは全て SPC を用い、Extrane MA 01 alkaline（Merck 社）5%溶液に1夜浸け置きし、超音波洗浄器を用い水、アセトン洗浄し、超純水で置換し乾燥した。さらに、窒素気流下、200℃で3時間加熱し、放冷した器具を、使用する直前に、ヘキサンでリンスして使用した。

<1.2 標準溶液の調製>

標準試料溶液

各エステル類を、200 μg/ml の濃度にヘキサンで調製し、さらにヘキサンで希釈して、2 μg/ml 溶液とした。

サロゲート溶液

各エステル類対応のサロゲート物質を、100 μg/ml の濃度にヘキサンで調製し、さらにヘキサンで希釈して、4 μg/ml 溶液とした。

内標準溶液

フェナンスレン-d₁₀、フルオランテン d₁₀ 及びクリセン-d₁₂ を 200 μg/ml の濃度にヘキサンで調製し、さらにヘキサンで希釈して 20 μg/ml 溶液とした。

<1.3 試料>

ヒト血清は、7人のボランティアから得た。血清試料は、常法に従って調製し、15分以内に凍結し、測定するまで-30℃で保存した。

<2. 装置>

GC-MS 島津製, QP-5050A 型

<3. 分析法>

定量操作

10 ml の共栓付き試験管に、試料溶液 2ml を加える。これに、サロゲート化合物溶液を 50 μ l 添加し、混和後 5 分間放置する。アセトニトリル 2ml、ヘキサン 1.8ml を添加し、N₂ でヘッドスペースを置換して、ボルテックスミキサーを用い、1 分間抽出する。1000g で 5 分間、遠心分離し、ヘキサン層を分取し、内標準溶液 20 μ l を加え、その 2 μ l を GC-MS に付す。

《GC-MS 条件》

GC

カラム : DB-5, 0.25mm \times 30m, df 0.25 μ m

温度 : カラム、100 $^{\circ}$ C (1min) \rightarrow + Δ 8 $^{\circ}$ C /min \rightarrow 280 $^{\circ}$ C (15min)

注入口、300 $^{\circ}$ C

インターフェイス、280 $^{\circ}$ C

キャリアガス : ヘリウム (1.2ml/min)

注入 : スプリットレス

高圧注入、100Kpa (注入口圧)

サンプリング時間、1min

注入量、2 μ l

MS

イオン化法 : EI

イオン化電圧 : 70V

<4. 検量線>

1.2 項の標準試料溶液をヘキサンで希釈して、1, 5, 10, 50, 100, 200ng/ml の溶液に、サロゲート及び内標準物質をそれぞれ 100 ng/ml、200 ng/ml となるように添加した溶液を、上記分析条件で

測定した。エステル類と対応するサロゲート物質の、ピーク面積値の比と、重量比から、検量線を作成した。

<5. 定量計算>

得られたエステル類と、対応するサロゲート物質とのピーク面積値の比から、検量線より検出量を求め、次式により生体試料中の濃度 (Cs) を算出した。

$$Cs \text{ (ng/ml)} = (Wd - Wb) \times (Vs / Vi) \times (1000 / Ws)$$

Wd : 検出量 (ng)

Wb : 操作ブランク (ng)

Ws : 試料採取量 (2ml)

Vs : 測定試料液量 (1.5ml)

Vi : 注入量 (2 μ l)

また、測定ごとに一定量添加したサロゲート物質により、それぞれの測定対象の回収率を算出した。サロゲートの定量は感度計数 (RF) 法で行った。

$$RF = (As \times Cis) / (Ais \times Cs)$$

As : サロゲートの測定イオンのピーク面積

Ais : 内標準の測定イオンのピーク面積

Cis : 検量線標準液中の内標準物質質量 (ng)

Cs : 検量線標準液中のサロゲート物質質量 (ng)

C. D. 研究結果および考察

<1. クロマトグラム>

50 ng/ml (0.1 ng/ 2 μ l 注入量) のエステル類及び100 ng/ml (0.2 ng/2 μ l 注入量) のサロゲートを含む溶液、2 μ l から得たクロマトグラムを Fig. 1-1, 1-2 に示す。本条件下で、DCHP と DEHP 及びそのサロゲートは、ベースライン分離しなかったが、定量には十分な分離だった。その他の化合物は、完全にベースライン分離した。

<2. マススペクトル>

本装置によりエステル類、それらのサロゲート物質及び内標準物質のマススペクトルを測定した結果を Fig. 2-1~2-3 に示す。本測定に使用した試料の濃度はいずれも 400 ng/ml で、1 μ l 注入して行った。以後測定に用いたモニターイオンは、これらのスペクトルに基づいて決定した。(Table 1)

<3. 検量線及び検出限界>

エステル類及びそれらのサロゲートの検量線は、少なくとも 200 ng/ml (0.4 ng/ 2 μ l 注入量) までの良好な直線性を示した。サロゲート物質 100 ng/ml (0.2 ng/2 μ l 注入量) を加えて作成した、エステル類の検量線 (Fig. 3) も良好な直線性を示し、寄与率 $\gamma = 0.9992$ から $\gamma = 0.9999$ と良好であった。検出限界 (S/N=3) は、1 ng/ml (2 pg/2 μ l 注入量) のエステル類を用いて得たクロマトグラム (Fig. 1-3) より算出した。(Table 2)。

<4. 生体試料への応用>

本法をヒト体液 (腹水、血清、さい帯血) に応用するため、ウサギ標準血清をモデルとして用い、諸条件を検討した。

クロマトグラム

操作法に従って血清を処理して得られたクロマトグラムを、Fig. 4-1、4-2 に示す。DBP 及び DEHP が、1.4 及び 1.3ng/ml 検出され、それぞれの参照イオン (Table 1) との強度比は (100:2、100:29:7)、標準物質の強度比 (100:3、100:31:6) とほぼ同じであることを確認している。このときの操作ブランクの DBP 及び DEHP は、0.7 及び 0.4ng/ml であった。一方、その他のエステル類は全く検出されなかった。また、生体試料由来の妨害ピークは観測されなかった。

抽出条件

アセトニトリル:ヘキサン、メタノール:ヘキサン、メタノール:ヘプタン、ヘキサン、酢酸エチルを用い、抽出条件を検討した。この中でアセトニトリル:ヘキサンによる抽出が、血清に対する抽出溶媒の量を少なくしても、エマルジョンが全く起こらなかった。それ故、アセトニトリル:ヘキサン=2:1.5 を用いて抽出した。

操作ブランク、回収率及び定量限界

本法の操作ブランクを 7 回測定した結果を Table 3 に示す。DBP 及び DEHP は、それぞれ 0.8 及び 1.0 ng/ml の操作ブランクが検出された。それ以外の測定対象のピークは全く観測されなかった。

ウサギ血清にエステル類を各

50ng/ml の濃度添加した溶液を5回ずつ測定した (Table4 及び5)。それぞれの測定値から、回収率を算出したところ、DEP が 14%、と極端に低い他は、60 から 90%と比較的良好であった。

検出限界をそれぞれの回収率を加味し、試料あたりに換算した結果を Table 2 に示す。回収率が低い、DEP、BBP 以外は 1ng/ml 以下と良好な値を示したので、これらを定量限界とした。しかし、DBP と DEHP は、操作ブランクが検出されたことから、次式から定量限界を算出し、それぞれ 1.0 及び 1.5 ng/ml とした。

定量限界 = 平均値 + 1.943 × 標準偏差

ヒト血清の測定

本法を用いてボランティアのヒト血清を測定した結果を、Table 6 に示す。ここに示すように、汚染の可能性が考えられる DBP が、定量限界をわずかに超える程度検出された。これは、プラスチック製品が多数存在する P-2 実験室内のさらなる汚染防止と、サンプリングの操作ブランクを測定し、考察する必要性を示唆する。

E. 結論

GC-MS を用いる、ヒト体液中のフタル酸エステル及びアジピン酸エステルの一斉分析法を開発した。本法は、試料をヘキサン:アセトニトリルと振とうするだけで、抽出・精製が可能で、前処理操作が極めて簡便かつ迅速である。それ故、定量操作過程への、エステル類の混入が、極めて少ないという利点がある。また、

比較的高感度で 1 ng/ml (生体試料) のエステル類の測定が可能である。

本法はヒト体液中のフタル酸エステル及びアジピン酸エステルを、高感度で、ア-ティファクトの可能性が極めて低い状態で測定可能である。また、迅速かつ簡便であるなど、スクリーニング法として優れた特徴を有する。それ故、内分泌かく乱物質の健康影響に関する調査研究の実施に極めて有用である。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

Table 1 Retention time, monitor ion and reference ion

Phthalate and adipate	Retention time	Monitor ion	Reference ion
DEP	11.83	149.1	177
DEP-d ₄	11.80	153.1	
Phenanthrene-d ₁₀	14.91	188.2	
DIBP	15.79	149.1	223.1
DIBP-d ₄	15.77	153.1	
DBP	17.08	149.1	223.1
DBP-d ₄	17.05	153.1	
Fluoranthene-d ₁₀	18.72	212.2	
DPP	19.48	149.1	237.2
DPP-d ₄	19.45	153.1	
BBP	21.86	149.1	206.2
BBP-d ₄	21.83	153.1	
DEHA	22.25	129.1	147.2, 241.2
DEHA-d ₈	22.17	137.2	
Chrysene-d ₁₂	23.38	240.25	
DCHP	23.73	149.1	167.1, 249.2
DCHP-d ₄	23.71	153.1	
DEHP	23.81	149.1	167.1, 279.2
DEHP-d ₄	23.78	153.1	

Table 2 Detection limits (S/N=3) of phthalates and adipate

Phthalates and adipate	Detection limits	
	ng/2 μ l injection	ng/ml sample
DEP	0.8	4
DIBP	0.5	0.6
DBP	0.4	0.5
DPP	0.4	0.4
BBP	1.2	1.9
DEHA	1.1	0.9
DCHP	0.9	0.8
DEHP	0.6	0.5

Table 3 Blank

	DEP, ppb (DEP-d4, %)	DIBP, ppb (DIBP-d4, %)	DBP, ppb (DBP-d4, %)	DPP, ppb (DPP-d4, %)	BBP, ppb (BBP-d4, %)	DEHA, ppb (DEHA-d8, %)	DCHP, ppb (DCHP-d4, %)	DEHP, ppb (DEHP-d4, %)
1	ND 17%	ND 69%	0.7 68%	ND 81%	ND 48%	ND 87%	ND 82%	1.5 82%
2	ND 15%	ND 67%	0.6 67%	ND 80%	ND 45%	ND 85%	ND 80%	0.6 80%
3	ND 13%	ND 54%	0.8 49%	ND 73%	ND 36%	ND 51%	ND 75%	0.9 51%
4	ND 16%	ND 67%	2.1 66%	ND 78%	ND 45%	ND 81%	ND 76%	0.8 78%
5	ND 16%	ND 67%	0.7 66%	ND 79%	ND 44%	ND 80%	ND 76%	0.8 78%
6	ND 16%	ND 69%	0.9 69%	ND 82%	ND 46%	ND 85%	ND 78%	1.1 82%
7	ND 15%	ND 60%	0.7 53%	ND 70%	ND 38%	ND 46%	ND 70%	1 46%
Means	- 16	- 68	0.8 68	- 80	- 46	- 84	- 78	1 79
SD	- 0.7	- 1.3	0.1 1.4	- 1.5	- 1.3	- 2.5	- 2.1	0.2 3.2
RSD	- 4.3	- 1.8	9.4 2	- 1.9	- 2.7	- 3	- 2.7	23.8 4

Table 4 Phthalates and adipate in rabbit serum

	DEP, ppb (DEP-d4, %)	DIBP, ppb (DIBP-d4, %)	DBP, ppb (DBP-d4, %)	DPP, ppb (DPP-d4, %)	BBP, ppb (BBP-d4, %)	DEHA, ppb (DEHA-d8, %)	DCHP, ppb (DCHP-d4, %)	DEHP, ppb (DEHP-d4, %)
1	ND 14	ND 61	7.7 64	ND 76	ND 44	ND 74	ND 81	1.3 73
2	ND 14	ND 61	8.1 65	ND 76	ND 45	ND 77	ND 82	1 78
3	ND 14	ND 63	9 66	ND 78	ND 48	ND 87	ND 86	0.9 86
4	ND 14	ND 62	8.2 64	ND 76	ND 44	ND 87	ND 81	1 83
5	ND 15	ND 66	8.6 67	ND 80	ND 45	ND 82	ND 85	1.3 83
Means	- 14	- 63	8.3 65	- 77	- 45	- 81	- 83	1.1 81
SD	- 0.4	- 2.1	0.5 1.3	- 1.8	- 1.6	- 5.9	- 2.3	0.2 5.1
RSD	- 3.2	- 3.3	6 2	- 2.3	- 3.6	- 7.2	- 2.8	17 6.4

Table 5 Recoveries of phthalates and adipate

	DEP, ppb (DEP-d4, %)	DIBP, ppb (DIBP-d4, %)	DBP, ppb (DBP-d4, %)	DPP, ppb (DPP-d4, %)	BBP, ppb (BBP-d4, %)	DEHA, ppb (DEHA-d8, %)	DCHP, ppb (DCHP-d4, %)	DEHP, ppb (DEHP-d4, %)
1	14	60	61	76	48	86	86	85
	13	59	64	78	46	88	85	88
2	14	57	62	73	47	81	80	79
	13	57	64	76	47	83	83	84
3	15	61	68	78	50	89	89	92
	15	63	70	81	51	93	91	95
4	15	62	69	79	49	91	88	92
	15	63	71	83	50	95	91	96
5	14	60	64	76	46	87	84	88
	14	61	68	80	45	92	88	91
Means	14	60	65	76	48	87	85	87
	14	61	67	80	48	90	88	91
SD	0.5	1.9	3.6	2.3	1.6	3.8	3.6	5.4
	1	2.6	3.3	2.7	2.6	4.8	3.6	5
RSD	3.8	3.1	5.5	3	3.3	4.3	4.2	6.2
	7.1	4.3	4.3	3.4	5.4	5.3	4.1	5.5