

平成 12 年度 厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

高分子素材からなる生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質の分析及び  
動態研究

NCI-GC/MSによる尿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

主任研究者 中澤裕之 星薬科大学  
分担研究者 畑山善行 長野県衛生公害研究所  
月岡 忠 長野県衛生公害研究所  
寺澤潤一 長野県衛生公害研究所  
研究協力者 John Brock CDC (USA)  
Sam Graiser CDC (USA)

#### 研究要旨

内分泌かく乱化学物質は、多くの生活用品に幅広く使用されており、各高分子素材ごとに異なった暴露形態を示すことから暴露経路を把握するとともに、生体におけるターゲットとした化学物質におけるトータルな暴露量の把握が重要となっている。そこで、内分泌かく乱作用が確認されているオクチルフェノール、ノニルフェノール及びビスフェノールA（BPA）の尿中の濃度を測定し尿からの排泄量を把握することを目的とし、尿中の上記フェノール類を酵素分解した後、ODSカラムで抽出、PFB化、フロリジルカラムによるクリンアップ後、NCI-GC/MSで定量する分法を開発した。

#### A．研究目的

BPA、ノニルフェノール等はプラスチック素材等に使用され、幅広い経路から生体内に取り込まれている。特にBPAは、缶飲料等に含まれていることが知られているが、近年はBPAの溶出防止対策をした製品が普及するなど対策が進んでいるといわれている。しかしながら、ヒトが一日あたりどの程度のBPAを摂取しているかなど、基本的に不明な要素が多く、血液中濃度もいろいろな測定例が報告されるがはっきりした測定例が示されていない

のが現状である。BPAについては生体内での代謝が不明であったことから、代謝物も含めた分析法の開発を行った。

#### B．研究方法

##### B・1 試薬・試液

研究には次の試薬を用いた。  
水酸化ナトリウム（Mallinckrodt）、テトラブチルアンモニウムヒドロゲンサルフェート（Kodak）、ジクロロメタン（Caledon）、酢酸エチル（Caledon）、2,2,2-trimethylpentane（Caledon）、Methanol（Caledon）、ペンタフルオロ

ベンジルブロマイド(スペルコ)、ter-  
オクチルフェノール(アルドリッチ)、  
4-オクチルフェノール(アルドリッチ)、  
ノニルフェノール(アルドリッチ)、  
ビスフェノールA(アルドリッチ)、<sup>13</sup>C-  
ノニルフェノール(ケムブリッジアイ  
ソトープ)、<sup>13</sup>C-BPA(ケムブリッジ  
アイソトープ)、C18カートリッジ  
(J.T.Baker)、フロリジルカートリッジ  
(J.T.Baker)、C-カートリッジ  
(Superuco)、精製水(Caledon)、酢  
酸アンモニウム(シグマ特級)、  
-glucuronidase(E.coli K12)、

## B. 2 装置

超音波洗浄器、GC/MS

## B. 3 操作方法

試料 2 ml を 15 ml の試験管に採り、こ  
れにサロゲート化合物として<sup>13</sup>C-ノ  
ニルフェノール 0.1 ppm 溶液 20  $\mu$  l、  
<sup>13</sup>C-BPA 0.076 ppm 20  $\mu$  l を加え、1 %  
-グルクロニダーゼ含有酢酸アンモニ  
ウム溶液 200  $\mu$  l を加え、37 °C で 90 分間  
酵素分解を行い、これに 32% 蟻酸 1 ml  
を加え、超音波洗浄器で 5 分間、照射  
する。これを、予めメタノール 10 ml、  
精製水 5 ml で洗浄した C18 カラムに負  
荷する。10% メタノール溶液 5 ml で洗浄  
後、メタノール 3 ml で 15 ml の遠心管に  
溶出させ、0.2 M 水酸化ナトリウム溶液  
0.5 ml を加え、窒素ガスを吹き付けて、  
0.2 ml 程度まで濃縮する。これに、ジク  
ロロメタン 2 ml、0.2 M 水酸化ナトリウ  
ム溶液 0.5 ml、0.1 M テトラブチルアン  
モニウムハイドロゲンサルフェート溶  
液 0.5 ml、PFBBR 20  $\mu$  l を加え、アル

ミ栓をして、超音波洗浄器で 20 分間超  
音波を照射する。照射後、3000 回転/分  
で 5 分間遠心分離し、下層をピペット  
で 10 ml の遠心分離管に採り、窒素ガス  
を吹き付けてジクロロメタンを蒸発さ  
せる。残渣を 0.5 ml のイソオクタンに溶  
解し、予めイソオクタン 10 ml で洗浄し  
たフロリジルカートリッジに負荷し、  
最初イソオクタン 5 ml で洗浄した後、  
1% 酢酸エチル含有イソオクタン 10 ml  
で溶出させる(オクチルフェノール、  
ノニルフェノール)。更に、10% 酢酸エ  
チル含有イソオクタン 5 ml で溶出させ  
る(BPA)。これを窒素ガスで濃縮乾固  
し、0.5 ml のイソオクタンに溶解しこれ  
を GC/MS で測定する。

## B. 4 GC/MS 条件

GC : Agilent 6890

カラム : HP-5MS 30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  
 $\mu$  m

カラム温度 : 60 °C - 15 °C /min - 215  
(7 min) - 20 °C /min - 300 °C (5 min)

注入口温度 : 245

MS : Agilent 5973

反応ガス : メタン

イオン源温度 : 230

モニターイオン : m/z = 205 (オクチルフ  
ェノール), 219 (ノニルフェノール),  
225 (<sup>13</sup>C-ノニルフェノール),  
407 (BPA), 419 (<sup>13</sup>C-BPA)

## C. 結果及び考察

### C. 1 グルクロン酸抱合体の分解に ついて

人体に取り込まれた難溶性化合物は

代謝の過程で、水溶性の高いグルクロン酸抱合体に変化して、体外へ排泄される。オクチルフェノール、ノニルフェノールは水溶性が高いため、そのまま排泄されると考えられたが、BPAは水に難溶であるため、グルクロン酸抱合体として尿中に排泄されている可能性が高いと考えられた。そこで、 $\beta$ -グルクロニダーゼを用いて、その必要量と、反応時間等について検討した。図1は実際の尿に $\beta$ -グルクロニダーゼを1~5  $\mu$ l添加し、37℃で90分間酵素分解した時の、BPAの測定値を示した。

4-オクチルフェノールはグルクロン酸抱合体になっていないため、酵素量を多くしても濃度が増加しなかった。しかし、ter-オクチルフェノールとノニルフェノールは酵素中に不純物として存在したため、酵素添加量と比例して増加した(図2)。BPAは尿2mlに対して、1  $\mu$ l添加する事により、ほぼ100%分解されると考えられた。本法では余裕を考慮して2  $\mu$ l添加する事にした。また、図3に分解時間の検討結果を示した。分解時間は60分程度でほぼ終了したが、90分間酵素分解することにした。

#### C. 2 C18による抽出、洗浄及び溶出

ODSカートリッジによるフェノール類の抽出は、一般にpH3.5以下にして抽出されている。本法では、尿中のタンパク質を変性させるため、32%蟻酸を1ml加えてあり、pHは3以下になっているため、pHについて検討する必要はなかった。尿中には様々な物質が存在す

るため、できるだけ目的物質以外を洗浄で除去し、誘導体化する必要がある。本法では、10%メタノール溶液を用いて洗浄を検討した結果、10mlを用いて洗浄しても、目的物質はほとんど溶出しなかった。溶出溶媒としては一般に用いられている、メタノールを用いて検討した結果、3mlを用いることによりほぼ100%溶出した。図4に溶出状況を示す。

#### C. 3 窒素ガスによる濃縮

メタノールによる溶出溶液はまだ蟻酸が残っているため、酸性を示し、窒素ガスを吹き付けることにより気散することが確認されたため、キーパーとして0.2M水酸化ナトリウム溶液0.5mlを加え、気散を押さえることにした。また、窒素ガスの吹きつけ圧力もできるだけ低くし5 PSI以下で、濃縮した。

#### C. 4 PFBBBrによる反応

NCI-GC/MSで測定する場合にPFB化合物として測定する方法が感度的に最も優れていると考えられたため、これを用いた誘導体化について検討した。ジョン・ブロックらの方法は回転円盤法を用いているが、この方法は栓からの漏れなどでデータが得られない場合があるため、超音波による方法を採用した。この方法でも20分間超音波を照射する事により、回転円盤法と同等の生成率が得られた。図5, 6, 7, 8にNCIマススペクトルを示す。NCIでは、フラグメントピークが少ないため、EIのようなフラグメントが生成されず、

確認フラグメントが得られにくい欠点がある。スペクトルから、定量用のフラグメントイオンにオクチルフェノールは $m/z=205$ 、ノニルフェノールは $m/z=219$ 、 $^{13}C$ ノニルフェノールは $m/z=225$ を用いることにし、BPAは $m/z=407$ 、 $^{13}C$ -BPAは $m/z=419$ を用いることにした。

#### C . 5 フロリジルカートリッジによるクリンアップ

NCI法は妨害ピークが少ないと言われているが、実際にはクリンアップを行わないと妨害成分とピークが重なり、誤差の原因となる。本法ではフロリジルとシリカゲルカートリッジを用いて検討した。その結果、フロリジルカートリッジのほうがクリンアップ効化が大きかったためこれを採用した。オクチルフェノールとノニルフェノールのPFB化物は比較的低極性の溶出溶媒で溶出したが、BPAのPFB化物は極性を高めないと溶出しなかったため、溶出溶媒を別々にした。即ち、オクチルフェノールとノニルフェノールはイソオクタン 5 mlで洗浄した後、1%酢酸エチル含有イソオクタン10mlで溶出させ、その後10%酢酸エチル含有イソオクタン 5 mlでBPAを溶出させることにした。オクチルフェノールとノニルフェノールは1%酢酸エチル含有イソオクタン 10mlでほぼ100%溶出した。また、酢酸エチルの濃度を2%に上昇するとサンプルによっては $^{13}C$ -ノニルフェノールのピークと重なる物質が溶出したため、1%溶液を用いることにした。BAPの場合

も酢酸エチルの濃度を20%以上にすると妨害物質が溶出したため、10%溶液を採用した。

#### C . 6 検量線の作成と添加回収実験

検量線はそれぞれ0.05ppmから1ppmまでの標準溶液を段階的に作りこれを20  $\mu$ lずつ試験管に採り、サロゲート化合物を加えB . 3の標準操作法の反応から操作し、サロゲート化合物との面積比から検量線を作成した( $n=4$ )。ノニルフェノールは混合物であるため、代表的な3本のピークを用いて検量線を作成した。図9に検量線例を示す。ノニルフェノールはブランク値が高く、簡単には低減できなかった。また検量線の直線範囲は、GC/MS注入濃度で2  $\mu$ g/mlまで直線を示した。回収率はサロゲート化合物を用いているため、多少低くても分析精度に影響しないが、尿への添加回収実験は80%程度は回収されていた。

#### C . 7 実試料への応用

本法の応用例として、実際の尿に応用した。その結果、ter-オクチルフェノール、4-オクチルフェノールは検出されなかったが、ノニルフェノール(N.D. ~ 74ppb)とBPA(0.2 ~ 3.8ppb)が検出された。図10に標準物質、図11に測定例を示す。

#### D . 結論

ヒトの尿試料中の内分泌かく乱化学物質を測定するため、グルクロン酸抱合体を酵素で分解し高感度で測定する

方法を開発した。

この方法を用いてヒトの尿試料を分析した結果、ノニルフェノールとBPAが検出された。