

動物飼料中のフタル酸エステル類の分析法

【試験法の概要】

実験動物用飼料からアセトニトリルによりフタル酸エステル類（PAE）^{注1、注2}を抽出し、抽出液をフロリジル・PSA カラムクロマトグラフィーによって精製し、ガスクロマトグラフ/質量分析計（GC/MS）で定性、定量を行う。

分析の対象となる PAE は、フタル酸ジブチル（DBP）、フタル酸ブチルベンジル（BBP）、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル（DEHP）、フタル酸ジイソオクチル（DiOP）、フタル酸ジイソノリル（DiNP）である。

なお、本法は飼料に適用できる^{注3}。

【試薬】

すべての試薬類は、クロマトグラム上で PAE の分析に支障のないことを確認した後用いる。

- ① 有機溶媒：n-ヘキサン、アセトニトリル、アセトンはフタル酸エステル試験用を用い、使用直前に開封する^{注4}。
- ② 無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用を 200℃で 2 時間加熱し、放冷後使用する。
- ③ 塩化ナトリウム：フタル酸エステル試験用を 200℃で 2 時間加熱し、放冷後使用する。
- ④ 精製水：フタル酸エステル試験用の n-ヘキサンで洗浄した蒸留水を用いる^{注5}。
- ⑤ フロリジル：フロリジール PR を 200℃で 2 時間加熱し、放冷後使用する。
- ⑥ PSA：ボンデシル PSA を用いる。
- ⑦ PAE 標準溶液：各標準品 20 mg を 20 mL のメスフラスコに量り取り、n-ヘキサンにて 20 mL とし、1000 µg/mL 溶液を調製する。適宜希釈し、PAE 標準溶液とする。
- ⑧ 内標準溶液：各フタル酸エステル-d4 標準品 20 mg を 20 mL のメスフラスコに量り取り、n-ヘキサンにて 20 mL とし、1000 µg/mL 溶液を調製する。適宜希釈し、内標準溶液とする。

【装置】

- ① ガスクロマトグラフ/質量分析計（GC/MS）：電子イオン化（EI）イオン源及びキャピラリーカラム（スプリットレス）を装着し、選択イオン検出法（SIM）による分析が可能な装置を用いる。
- ② フロリジル・PSA カラム：ガラス製クロマトカラム（内径 15 mm、長さ 110 mm）に、フロリジル 1 g、その上に PSA 1 g、無水硫酸ナトリウム 2 g を充填する。使用前にアセトン 10 mL 及び n-ヘキサン 10 mL を用いて洗浄する。

【試験溶液の調製】^{注6}

飼料 5 g を共栓遠沈管（50 mL、ガラス製）に採り、精製水 5 mL、アセトニトリル 20 mL 及び内標準溶液（4 µg/mL）125 µL を添加後、1 分間ホモジナイズする。3000 rpm で 5 分間遠心分離後、上清を分取する。残渣に精製水 5 mL、アセトニトリル 15 mL を添加し、同

様に操作する。上清を合わせ、塩化ナトリウム 1.5 g を添加後 5 分間振とうする。アセトニトリル層を分取し、アセトニトリル飽和 n-ヘキサン 4 mL を添加後、5 分間振とうする。アセトニトリル層を分取し、減圧留去する。残渣を精製水 2 mL に溶解し、n-ヘキサン 5 mL を加えた後共栓試験管（10 mL、ガラス製）に移す。30 秒間振とう後、3000 rpm で 5 分間遠心分離し、n-ヘキサン層を分取する。水層に n-ヘキサン 5 mL を加え、同様に操作する。n-ヘキサン層をフロリジル・PSA カラムに負荷し、n-ヘキサン 3 mL でカラムを洗浄後、5% アセトン-n-ヘキサン 10 mL で PAE を溶出する。溶出液を減圧濃縮後、n-ヘキサンで 1 mL に定容し、試験溶液とする。

【試験操作】定量分析^{注7}

① GC/MS 測定条件：一例を以下に示す。

カラム：ヒューズシリカ・キャピラリーカラム（内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm ）、液層は 5%フェニルメチルシリコンを使用する^{注8}。

カラム温度：80°C（3 分）→10°C/分→300°C（5 分）

キャリアガス：ヘリウム、全流量 50 mL/分、カラム流量 1.5 mL/分

注入口温度：240°C

注入方式：スプリットレス

インターフェース温度：300°C

検出法：SIM

モニターイオン：表 1 に示した。

表 1 モニターイオン

物質名	略称	定量イオン	参照イオン
フタル酸ジ-n-ブチル	DBP	149	205、223
フタル酸ブチルベンジル	BBP	149	91、206
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	DEHP	149	167、279
フタル酸ジイソオクチル	DiOP	149	279
フタル酸ジイソノニル	DiNP	149	293
フタル酸ジ-n-ブチル-d4	DBP-d4	153	227、209
フタル酸ブチルベンジル-d4	BBP-d4	153	91、210
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル-d4	DEHP-d4	153	171、283
フタル酸ジオクチル-d4	DOP-d4	153	283
フタル酸ジノニル-d4	DNP-d4	153	297

② 定量：試験溶液の一定量を GC/MS に注入し、各 PAE のピーク面積を内標準物質のピーク面積で除した値を、検量線と比較して定量する。DiOP は主要な 2 本のピークを、DiNP は主要な 5 本のピーク面積をそれぞれ合計して定量対象とする。

③ 検量線の作成：内標準物質を含んだ PAE 標準溶液を GC/MS に注入し、各 PAE のピーク面積を内標準物質のピーク面積で除した値を用いて検量線を作成する。DiOP は主要な 2 本のピークを、DiNP は主要な 5 本のピーク面積をそれぞれ合計してピーク面積とする。

【検出下限・定量下限】

検出下限は、後述のごとく操作ブランク中の DBP 及び DEHP 濃度を低減化できるので、DBP、BBP、DEHP は 3 ng/g に、DiOP、DiNP は 20 ng/g に設定する。また、定量下限は、DBP、BBP、DEHP は 10 ng/g に、DiOP、DiNP は 50 ng/g に設定する。

【注解】

注1 PAE は、ポリ塩化ビニル製樹脂 (PVC) 等に使用されている可塑剤の一つである。PVC は家庭用品や建築材として広く使用され、これらからの揮散あるいは溶出により環境汚染が問題になっている化合物である。したがって、環境から混入するブランク値が問題となるため、分析を実施する上では特に操作ブランク値の低減化に注意を払う必要がある。

操作ブランクの低減化に関して、以下の項目が有効であることが判明している。これらの項目に注意を払わない場合には、操作ブランクの SIM プロファイル上に 100 ng/mL レベルの DBP 及び DEHP が出現するのに対して、これらのことを実施すると、操作ブランク値が、それぞれ 10 ng/mL 以下に低減されるので、本試験法を実施する際にはこれらの点に留意して実験を行うこと。

- a) 使用する水は、フタル酸エステル試験用の n-ヘキサンで洗浄した蒸留水を使用する。
- b) ホールピペット及びメスフラスコ以外の全ての実験器具（エバポレーターのトラップも含む）は、200℃、2 時間加熱し、放冷した後に、使用する直前にフタル酸エステル試験用の n-ヘキサンで洗浄する。なお、n-ヘキサン洗浄は手が器具に直接触れないように、ピンセットを用いて実施する。
- c) 実験操作開始直前には必ず両手を石けんでよく洗い、その後は、極力実験器具以外には触れないようにする。特に、ドアノブに触れた場合には必ず両手を洗浄する。
- d) 使用する実験台は、アルミホイルで覆い、毎日交換する。
- e) エバポレーターは、使用する直前にフタル酸エステル試験用アセトンを濃縮乾固する。
- f) 標準品を扱う際は、作業する実験台とは異なる実験台で行う。
- g) ピペットの先端が実験室内の器具装置等に触れないようにする。
- h) ホールピペットは必ず基本操作どおり扱い、決して口で吹いたりして溶液を排出しない。
- i) 腕時計は外しておく。
- j) 髪の毛は小さくまとめる。
- k) 爪は短く切る。

注2 本法ではサロゲートによる内標準法を採用し、回収率を補正している。飼料に DBP、BBP、DEHP の濃度がそれぞれ 100 ng/g に、DiOP、DiNP の濃度が 500 ng/g になるように添加したときの平均回収率は、98.8・148%、相対標準偏差は 0.4・7.8% である。

注3 本法は、床敷の分析にも応用可能である。ただし、抽出はアセトンを用い、減圧留去して得られる残渣を n-ヘキサン抽出後、フロシジル-PSA カラムで精製を行う。

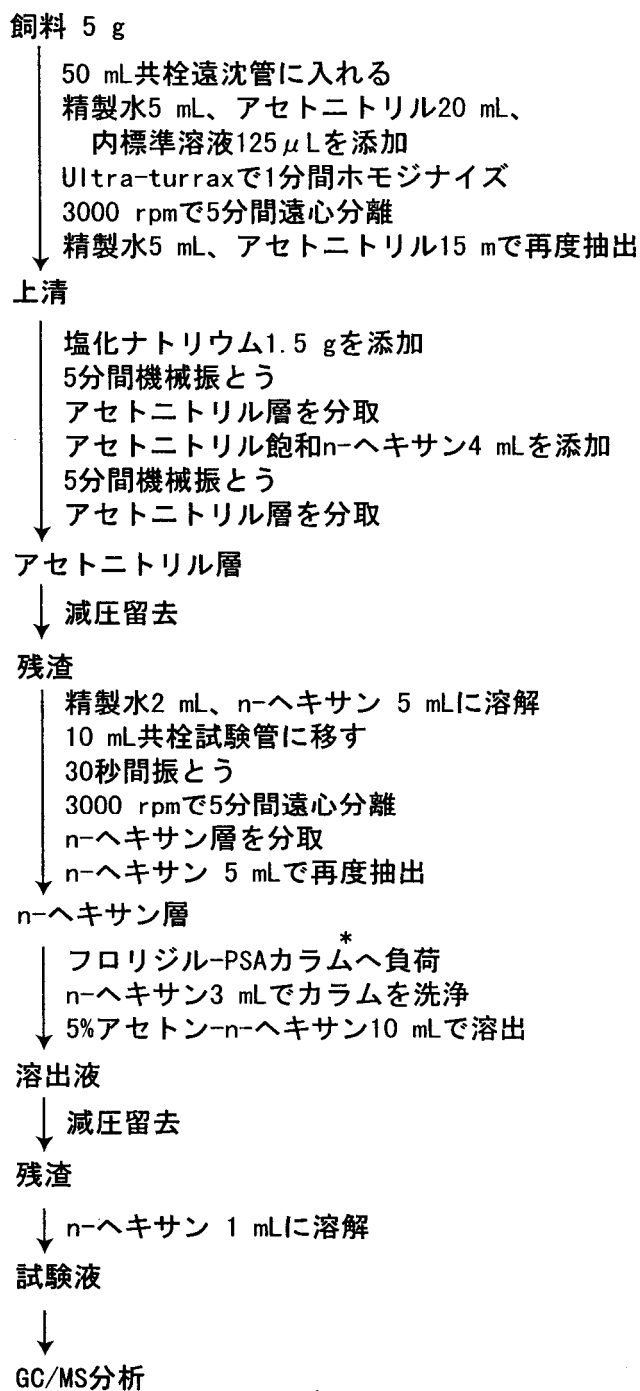
注4 開封後長期間経たものは、環境中から PAE が混入している可能性が高いので使用しない。

注5 使用する精製水に妨害ピークが認められた場合には、n-ヘキサンによる洗浄を繰り返し実施するとよい。

注6 PAE の分析では、試薬、器具等に起因する汚染に十分注意する必要があるため、ブランク試験を必ず実施して分析操作中に混入するPAE量を把握する必要がある。

注7 標準品及び試料を分析する前にn-ヘキサンのみを数回注入し、GC/MSの状態をチェックすると良い。

注8 Agilent technologies 社製の HP-5MS、HP-5MS SV、J&W Scientific 社製の DB-5MS 等がある。



* フロリジル-PSA カラムの調製法
ガラスカラム管の底にガラスフィルターを敷く
フロリジル 1 g、PSA 1 g、硫酸ナトリウム 2 g
の順に積層する
アセトン 10 mL、n-ヘキサン 10 mL で洗浄する

図 飼料中のフタル酸エステル類の分析法フローシート

動物飼料中 4-ノニルフェノールの分析法

【試験法の概要】

動物飼料を精油定量装置を用い、前処理を行った後、液体クロマトグラフ/質量分析計(LC/MS/MS)^{注1}で定性・定量を行う。

なお、本試験法は床敷及び給水にも適用できる。

【試薬】

全ての試薬類は、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る。

- ⑧ 標準品(NP)：4-Nonylphenol 環境分析用（混合^{注2} 95.0%以上）を用いる。
- ⑨ 標準溶液の調製：NP 標準品 100 mg を 100 mL のメスフラスコに量りとり、ヘキサンを加えて 100 mL として標準原液を調製する。適宜、メタノールで希釈して標準溶液を作製する。
- ⑩ 有機溶媒：残留農薬試験用、フタル酸エステル分析用、LC-MS 用を用いる。
- ⑪ 精製水：ミリ Q 水又は市販の蒸留水を使用する。
- ⑫ 内標準物質 (m-OP-d₅)^{注3}：4-(1-methyl) octylphenol-d₅ を重水素化体の内標準物質として用いる。回収率や再現性等測定に支障のない場合は、絶対検量線法による測定も可能である。

【器具】

検体の調製に用いる器具は、事前に材質試験を行い、NP 不検出のものを用いる。

器具の洗浄は常に一定の条件で行う。特にガラス器具は洗浄後、200℃で 2 時間以上加熱し、環境中の NP の汚染を受けないところで放冷する。使用直後にアセトンで洗浄して使用する。

精油定量装置は、あらかじめ水 100mL とヘキサン 3mL を精油定量装置に入れ、約 30 分間、数回の蒸留を行う^{注4}。毎回、蒸留後ヘキサン層は捨てる。

【装置】

液体クロマトグラフ/質量分析計(LC/MS)：LC/MS 装置にエレクトロスプレーイオン源による選択イオン検出(SIM)による分析が可能な装置を用いる。液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計(LC/MS/MS)による場合はマルチプル リアクション モニタリング(MRM)による分析法とする。

【試験溶液の調製】

精油定量装置に水 100mL と試料 2g^{注5}を入れ、ヘキサン 3mL、内標準物質 m-OP-d₅ 50ng を入れて 1 時間、環流蒸留を行う。得られたヘキサン層^{注6}を遠心エバポレーター^{注7}で濃縮乾固し、メタノール 1mL を入れ、超音波で溶解した後、試験溶液とした。

【試験操作】

LC/MS の場合

① LC/MS 測定条件：一例を以下に示す。

分析用カラム：C18 逆相系カラム(内径 2.0 mm、長さ 100mm、粒径 5 μ m)^{注8}

カラム温度：40℃

分析用移動相：水：アセトニトリル(0.02 %酢酸アンモニウム^{注9}でグラジエント溶出する。30：70 (8min)→5：95 (10 min)→5：95 (20 min)

分析用移動相の流速：0.2 mL/min

注入量：30 μ L

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化(ESI)法 ネガティブモード

MS モニターイオン： $m/z=219$ (NP)、 $m/z=224$ (m-OP-d5)

② 定性・定量

LC/MSにおいてSIM($m/z=219$)測定において検出される1本のピークがベースライン分離を達成していることを確認後、そのピーク面積を用いて、定量を行う。内標準法により定量を実施する。検量線は、1~100 ppb の濃度範囲において作成する。

LC/MS/MS の場合

① LC/MS/MS 測定条件：一例を以下に示す。

分析用カラム：C18 逆相系カラム(内径 2.1mm、長さ 150mm、粒径 5 μ m)^{注8}

カラム温度：40℃

分析用移動相：水：メタノール(0.5mM 酢酸アンモニウム^{注9})

分析用移動相の流速：0.2 mL/min

注入量：20 μ L

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化(ESI)法 ネガティブモード

モニターイオン：NP プレカーサーイオン $m/z=219$ プロダクトイオン $m/z=133$
m-OP-d5 プレカーサーイオン $m/z=224$ プロダクトイオン $m/z=123$

イオンスプレー電圧：-4500V

イオンソース温度：550℃

②定性・定量

LC/MS/MS においてMRM($m/z=133$)測定において検出される1本のピークがベースライン分離を達成していることを確認後、そのピーク面積を用いて、定量を行う。内標準法により定量を実施する。検量線は、1~100 ppb の濃度範囲において作成する。

【検出下限値及び定量下限値】

検量線に用いた最も低濃度の標準溶液を5回以上測定し、その標準偏差(SD)の3倍を検出下限値 (LOD)、10倍を定量下限値(LOQ)とする。但し、操作ブランクのある場合には操作ブランク値の測定を行い、標準溶液と操作ブランク値のうち、大きい方の標準偏差を用いて算出する^{注10}。

【注解】

注1 LC/MS/MS 法はLC/MS 法で妨害のある場合、MRM モードで測定を行う。

注2 NP は側鎖であるノニル基が直鎖のものと分岐したものに大別できる。市販され

ている標準品は、ノニル基が種々に分岐した混合型と直鎖型単一成分からなるものがある。一般に環境試料や生物試料からは、混合型標準品に類似したピークパターンが観察される。したがって、混合型標準品を用いた評価が妥当である。しかし、市販されている混合型標準品の成分組成(ピークパターン)はメーカーや同一メーカーでもロットにより異なる場合があるので注意を要する。

- 注3 質量分析計で利用されるNPの補正物質としては、直鎖型4-n-NP(重水素・ ^{13}C 安定同位体)が主であるが、直鎖型と分岐型では物理化学的性質が異なり、十分に内標準補正できない場合がある。そこで、m-OP-d₅を内標準物質として利用し、NPの回収率を良好に補正することが可能である。
- 注4 操作ブランク値が一定になるまで洗浄(おおよそ3~4回程度)を繰り返す。
- 注5 飼料及び床敷は2gであるが、給水の場合は試料水100mLとヘキサン3mLのみを用いて同様な操作を行う。
- 注6 若干、混入する水とヘキサンの分離はパスツールピペットを用いてヘキサンを分取するか、冷凍(-20℃)により水を除去する。しかし、その後無水硫酸ナトリウムによる脱水の必要はない。
- 注7 エバポレーターを使用する場合はあらかじめ、アセトン等の溶媒を減圧留去し、ガラス器具内を洗浄する。
- 注8 関東化学社製 Mightysil RP18 GP、シーエルサイエンス社製 ODS-3 などがある。
- 注9 酢酸アンモニウム濃度 0~2 mM の範囲において最大レスポンスを与える濃度を使用する。
- 注10 検出下限値及び定量下限値の算出方法は、「ダイオキシン類に係わる水質調査マニュアル」環境庁水質保全局水質規制課(平成10年7月)に従った。

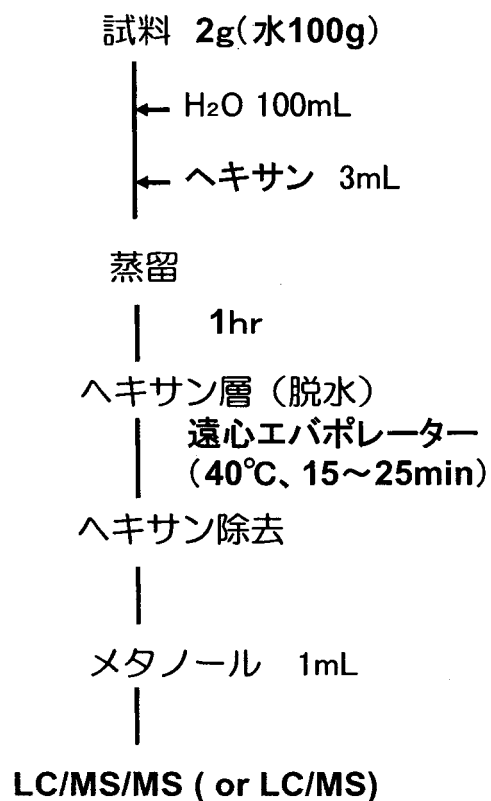


図 飼料中の4-ノニルフェノール分析法フローシート

【参考文献】

1. 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)
2. K. Inoue, M. Kawaguchi, F. Okada, N. Takai, Y. Yoshimura, M. Horie, S. Izumi, T. Makino, H. Nakazawa : Measurement of 4-nonylphenol and 4-octylphenol in human urine by column-switching liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 486, 41-50 (2003)