

ヒトに対するパラベン類曝露評価のための尿中代謝物分析法開発

○ 古賀 遼, 益永 茂樹

(横国大・大学院環情)

【はじめに】

パラヒドロキシ安息香酸エステル類 (以下, パラベン類) は殺菌剤, 防かび剤, 保存料として食品, 医薬品や化粧品などに幅広く使用されている。食品では, 醤油、清涼飲料水などに基準値が設定されている¹⁾。また, 化粧品については化粧品基準で1%までの使用が認められている²⁾。近年パラベン類に対してエストロゲン様作用や雄ラットの精子数の減少などの影響が報告されているが³⁾, 一日許容摂取量 (ADI) はこれらの影響を考慮していない。また, 化学物質のリスクを考える上では, 毒性情報だけでなく, その物質の曝露量についての情報も不可欠であるが, さまざまな製品に使用されているパラベン類は多様な曝露経路が存在し, 正確な曝露量を把握することは困難である。

そこで本研究では, パラベン類の尿中代謝物をバイオマーカーとすることにより, ヒトに対するパラベン類の曝露量を把握することを目的としている。今回の発表では, LC/MS/MS を用いたパラベン類およびその代謝物の分析法を検討したので報告する。

【方法】

対象物質

メチルパラベン (MP), メチルパラベン-d4 (MP-d4), エチルパラベン (EP), n-プロピルパラベン (n-PP), iso-プロピルパラベン (i-PP), n-ブチルパラベン (n-BP), iso-ブチルパラベン (i-BP), p-ヒドロキシ安息香酸 (PHBA), p-ヒドロキシ安息香酸-d4 (PHBA-d4) の計9物質を対象とした。

分析方法

尿試料を解凍後、超音波振とうし、サロゲート物質を添加した後、試料を酵素処理するものとしないうちに分けた。試料の pH を 3.5 に調整し、固相抽出を行った。メタノール 10 ml で溶出し、窒素パーズで濃縮し、メタノールで 1 ml に定容し、LC/MS/MS で測定した。β-グルクロニダーゼで酵素処理を行わない試料からは遊離体の濃度を、酵素処理を行った試料からは遊離体+グルクロン酸抱合体濃度を算出し、抱合体濃度はそれら濃度の差で算出した。尿試料中のパラベン類および代謝物の濃度は発表時に報告する。

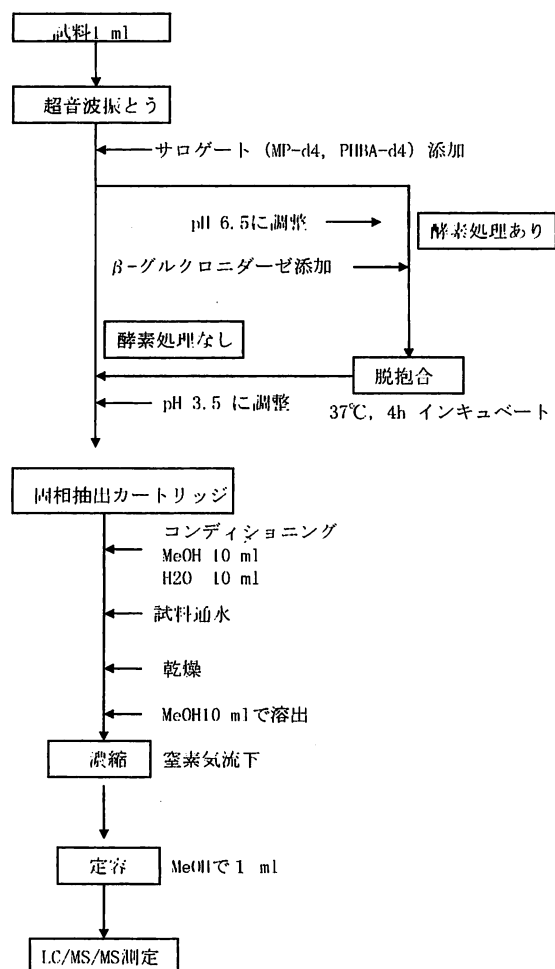


Fig.1 尿中パラベン類分析フローチャート

Table 1 LC/MS/MS 分析条件

Instrument
LC : Agilent 1100
MS : Micromass Quattro Ultima
Colum : CAPCELL PAK C18 (4.6×250 mm, 資生堂)
Solvent
A : 0.1 %ギ酸含有 10 mM 酢酸アンモニウム
B : メタノール
Gradient : min 0→7.5→9.0→13.0→25
B (%) 50→55→60→50→next
Flow rate : 0.8 ml/min, Injection volume : 10 µl
Ionization mode : ESI ⁻ , Source temperature : 450°C

Table 2 モニターイオン

Compounds	m/z (Q1→Q3)	CE (kV)
MP	150.9→91.8	35
MP-d4	154.9→96.0	40
EP	164.9→91.8	40
PP	178.9→91.9	45
BP	192.9→136.0	45
PHBA	136.9→92.8	40
PHBA-d4	140.9→96.9	35

【結果および考察】

本研究ではまずメタノールに溶解させたパラベン類の標準混合液を作成し, LC での分離条件および MS/MS 分析条件を検討した。検討より得られた最適条件を Table 1, および Table 2 に示した。移動相にアセトニトリルを用いた検討も行ったが, PP と BP の各異性体の分離がうまく図れなかった。そこで移動相をメタノールにしたところ, うまく分離することができた。また, 標準混合液では BP に対してのモニターイオンを m/z=192.9→91.9 で設定していたが, 尿試料に適用したところ強い妨害ピークがあらわれたため, モニターイオン m/z=192.9→136.0 を用いることにした。固相抽出カートリッジは Sep-pak tC18 を用いて検討を行った。尿試料での回収率, 検出限界, 定量限界の結果は Table 3 に示した。検出限界は S/N = 3, 定量限界は S/N = 10 を用いて算出した。尿サンプルに対して酵素処理を行わない場合は概ね良好な回収率を得ることができたが, 酵素処理を行うと回収率の低下がみられた。また, 親水性の PHBA が回収できなかった。なお PHBA の検出限界, 定量限界は抽出後の試料に標準試料を添加することにより算出した。今後, 尿試料からパラベン類の曝露評価を行っていくためには固相抽出を含めた前処理のさらなる検討が必要である。

Table.3 回収率 (%), 検出限界, 定量限界 (ng/ml)

酵素処理なし	回収率	検出限界	定量限界
PHBA	<5	0.02	0.07
MP	77	0.04	0.14
EP	81	0.01	0.02
n-PP	80	0.04	0.15
i-PP	87	0.02	0.07
n-BP	76	0.02	0.07
i-BP	84	0.02	0.07

【参考文献】

- 1) 厚生省告示 370 号 食品, 添加物等の規格基準, 1972.
- 2) 厚生省告示 331 号 化粧品基準, 2000.
- 3) S. Oishi, Food Chem. Toxicol.40, 1807-1813, 2002.
- 4) Ye. X, Kuklenyik. Z, Bishop. AM, Needham. LL, Calafat. AM, Environ Health Perspect. 114, 1843-1846, 2006.

酵素処理あり	回収率	検出限界	定量限界
PHBA	<5	0.02	0.07
MP	59	0.03	0.09
EP	56	0.04	0.14
n-PP	61	0.08	0.25
i-PP	60	0.01	0.02
n-BP	54	0.08	0.27
i-BP	56	0.04	0.15