

パラベン類の水環境における動態およびヒトの暴露  
を把握する分析方法に関する研究

Study on behaviors of parabens in water environment and  
analytical methods of parabens and those conjugates to  
reveal human exposure.

原田 祥行



## 目次

- I. 研究の背景と目的
- II. パラベン類の分析法開発および東海地域における環境調査
- III. プリカーサーイオンスキャンと精密質量分析によるヒト尿中パラベン抱合体の同定
- IV. LC/MS/MS による尿中エチルパラベン抱合体の酵素分解挙動の分析とその LC/MS/MS 間接定量法の研究
- V. 総括
- VI. 業績



## I. 本研究の背景と目的

技術の発展や経済成長に伴い、我々の生活は多種多様な化学物質と密接な関わりを持つようになった。2017年12月現在、CASに登録されている化学物質は1億3500万件以上あり、日々約2万件の新しい化学物質が追加されている<sup>1)</sup>。

これらの化学物質は利便性に富んでいる反面、使用により環境中に排出されてどのような挙動をするのか、生態系への毒性影響はどうかなど、十分な検討がされないまま広く使用されているものが少なくない。特に日常生活のなかで使用される界面活性剤や添加剤などは、製造業はもとよりその他の事業所、あるいは家庭で広く使用されており経済産業省及び環境省による平成27年度の排出量集計では33千トンと推計されている<sup>2)</sup>。それらの物質を使用することでヒトが直接暴露されるほか、排水・下水処理施設を介して、又は直接河川などの環境水中に排出されることで、生息する多様な生物も暴露されるため、その影響も懸念されている。

こうした人の健康や環境に影響を及ぼすおそれのある化学物質に対する行政レベルの取り組みは、1970年前後に先進工業国で立法化<sup>3)</sup>され、今日まで徐々に国際的に広がりつつある。例えばアメリカでは、1977年に有害物質規制法(TSCA)が人の健康又は環境を損なう不当なリスクをもたらす化学物質及び混合物を規制することを目的として発行された。EUでは、1967年に危険物の取扱いに関する指令として理事会指令67/548/EECが制定されその後、2006年12月18日に新たな化学物質規制である「化学物質の登録、評価、認可及び制限(REACH)に関する規則(REACH規則)」が成立し、2007年6月1日から施行された<sup>4)</sup>。

我が国では、水俣病、イタイイタイ病など高度経済成長期に生じた深刻な化学物質環境汚染への反省から、「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」(化審法)が、経済産業省(通産省)、厚生労働省(厚生省)を主管として昭和48年に施行された<sup>5)</sup>。環境省(環境庁)が化審法を支える事業として昭和49(1974)年度から今日まで継続して進めている化学物質環境調査は、平成27年度までに水質(1171物質)、底質(1027物質)、生物(475物質)、大気(473物質)、食事(27物質)などを調査している<sup>6)</sup>。

ヒトが直接暴露を受ける化学物質は、優先して取り組むべき化学物質としてとくに重要である。パーソナルケア製品(Pharmaceutical and Personal Care Products; PPCPs)には、ヒトが直接暴露を受ける化学物質が含まれることが多く、内分泌かく乱作用などの有害性を示す物質も少なくない。内分泌かく乱作用を有する化学物質は人の健康だけでなく野生生物などの生態系に及ぼす影響についても、科学的に未解明な点が多く長期間にわたり影響を及ぼす恐れがあり、重要な課題として考えられている。

内分泌かく乱作用化学物質に関する我が国の取り組みは、平成10年の「内分泌かく乱化学物質問題への環境庁の対応方針について-環境ホルモン戦略計画 SPEED' 98- (SPEED' 98)」にもとづく環境および生物の調査からである<sup>7)</sup>。SPEED' 98のスキームは、優先して調査研究を進める物質群として65物質をリストアップし、①環境および野生生物等に係る実態調査、②内分泌かく乱作用に関する試験研究及びその方法の開発、③環境リスク評価、環境リスク管理及び情報提供、及び④国際的なネットワーク強化である。調査は、平成10年度から平成16年度まで、水質、底質、土壌、大気環境4媒体と、生物(魚類、貝類、両生類、鳥類、ほ乳類)、室内空気及び食事試料について、内分泌かく乱作用の有無、強弱、メカニズム等の解明を目指して行われた。米国EPA等の内分泌かく乱作用に関する評価の見直し等に伴い、我が国の内分泌かく乱作用化学物質の対応にも変化があった。平成17年には「化学物質の内分泌かく乱作用に関する環境省の今後の対応方針について-ExTEND2005- (ExTEND2005)」<sup>8)</sup>では、従来の物質のリストアップを取りやめ、化学物質環境実態調査(初期環境調査、詳細環境調査及び暴露量調査)の結果を活用しながら、試験対象物質の選定や評価を環境中の検出状況や既存知見を踏まえて進めることとし、①野生生物の観察、②環境中濃度の実態把握及びばく露の測定、③基盤的研究の推進、④影響評価、⑤リスク評価、⑥リスク管理及び⑦情報提供とリスクコミュニケーション等の推進を基本的な柱とした。平成22年の「化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応-EXTEND2010- (EXTEND2010)」<sup>9)</sup>では、ExTEND2005の枠組みを踏襲・改善した上で以後5年間程度を見据えたプログラムとして、①野生生物の生物学的知見研究及び基盤的研究、②試験法の開発及び評価の枠組みの確立、③環境中濃度の実態把握及びばく露の評価、④作用・影響評価、⑤リスク評価及びリスク管理、⑥情報提供等、⑦国際協力の推進を基本的な柱として、平成28年度の「化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応-EXTEND2016- (EXTEND2016)」<sup>10)</sup>では、生態系への影響について優先的に取り組み物質の評価とともに、海外の動向を踏まえつつリスク管理に向けた議論を深めていくこととされている。

これまでの内分泌かく乱化学物質への環境省による取り組みと環境研究によって、人の健康や環境に影響を及ぼすおそれのある幾つかの化学物質の動態が明らかにされて来た。SPEED' 98では4-ノニルフェノール(分岐型)、4-*t*-オクチルフェノール、ビスフェノールA、*o*、*p'*-DDTにおいてメダカに対し内分泌かく乱作用を有することが推察され<sup>7)</sup>、EXTEND2010ではエストロン、4-*t*-オクチルフェノール、4-ノニルフェノール(分岐型)、4-ヒドロキシ安息香酸メチル(メチルパラベン)、4-*t*-ペンチルフェノールについて、雄肝臓中のビテロゲン濃度の上昇が認められ、エストロゲン様作用を有するとされた。またエスト

ロン、シアナジン、1-ナフトール、4-ノニルフェノール（分岐型）、4-ヒドロキシ安息香酸メチル、フェニトイン、4-*t*-ペンチルフェノール、りん酸トリフェニルについては、メダカの産卵数の減少が認められることが明らかとなった<sup>9)</sup>。

パラベン は 1930 年代から PPCPs や食品中に防腐剤として添加されている。一般に広く使われているパラベン類にはメチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、ブチルパラベン、ベンジルパラベンがあり、このうちプロピルパラベンは環境省の EXTEND2010 によって環境ホルモン作用が明らかとなりつつある化合物である。我が国におけるパラベンの製造・輸入量は平成 27 年度実績で年間 4,000~5,000 トン程度であると報告されており近年増加傾向となっている<sup>11)</sup>。

パラベンは安息香酸エステルのパラ位にフェノール性の水酸基を有する構造を持ち、グラム陰性菌を除く広範囲の微生物であるカビや酵母に対して静菌的に作用し、アルキル側鎖が長い程抗菌作用が強いことが確認されている<sup>12)</sup>。パラベンは、フェノール性水酸基のエストロゲン様作用など環境ホルモンとしての疑いが持たれており<sup>9)</sup>、パラベンのエストロゲン活性は 1998 年に初めて同定され、以来 *in vitro* 及び *in vivo* で検証されている<sup>13-15)</sup>。パラベンのエストロゲン活性はエストラジオールと比べて 10,000~1,000,000 倍低いとされているが、ヒトのエストロゲン受容体に結合することが知られている<sup>14,16)</sup>。Nishihara らは *in vitro* 試験でエストロゲン受容体への結合能を持つこと、*in vivo* 試験では胎児期暴露による出生オスの精子数の低下やテストステロンの減少を報告している<sup>17)</sup>。

パラベン類の人体暴露による影響も懸念されている。パラベン類の一日あたりの平均曝露量は 76mg でその内訳は化粧品など PPCPs 等から 50mg、医薬品から 25mg、食品から 1mg であると報告されている<sup>18-20)</sup>。パラベンは人の組織や体液（尿、血清、母乳、精液）からも検出されており<sup>21-26)</sup>、PPCPs の使用により経皮暴露した際の調査では、パラベン類の皮膚吸収率は平均的に 1~10% と推定されている<sup>27)</sup>。経口及び皮膚から吸収されたパラベン類は腸および肝臓内のカルボキシエステラーゼによって代謝され、尿中や胆汁中へと排出される<sup>13)</sup>。近年ではパラベン類は、乳がん患者の乳房組織から比較的高濃度で検出されておりパラベン類（メチルパラベン、エチルパラベン、*n*-プロピルパラベン、ブチルパラベン、イソブチルパラベン）の中央値として 85.5ng/g が検出されている<sup>25)</sup>。制汗スプレーなど脇に添加された化粧品から高濃度のパラベン類が乳房組織に暴露することによって乳がんの発生率が増加している可能性が示唆されている<sup>28)</sup> が、正常な乳房組織におけるエストラジオールの濃度が 55.3pg/g であり<sup>25)</sup>、<sup>29)</sup>、前述したようにパラベンのエストラジオール活性がエストラジオールよりも数桁低いことから脇に添加する化粧品中のパラベン類と乳がんの発生率の増加

との因果関係を現在立証するのは困難であると考えられる。しかし、パラベン類はエストラジオールと比較すると単独ではエストラジオール活性が低いが、他の化合物との相乗効果を起こすことが報告されている。例えば、ブチルパラベンとヘレグリン (HRG) を乳がん細胞 (BT-474) に暴露した試験では、それぞれ単独で使用したときに比べて 2 種類を混合して暴露した場合では、乳がん細胞が増殖した際のブチルパラベンの添加量の減少が確認されている<sup>30)</sup>。

ヒトの尿サンプルを調べた米国での報告では、2548 人の尿を調査したところパラベン類の内、メチルパラベン及びプロピルパラベンはそれぞれ検出率が 99%及び 93%、中央値は 63.5mg/L 及び 8.7mg/L であり、エチルパラベン及びブチルパラベンはそれぞれ検出率が 42.4%及び 47%であり中央値はエチルパラベン、プロピルパラベンと比べて 1 桁以上低かったと報告している<sup>26)</sup>。日本では環境省がこれまでに延べ 90 人の尿を対象にパラベン類の調査を実施し中央値はそれぞれメチルパラベン (72  $\mu$ g/g)、エチルパラベン (3.8  $\mu$ g/g)、プロピルパラベン (0.62  $\mu$ g/g)、ブチルパラベン (ND)、ベンジルパラベン (ND) であり、最高値はメチルパラベン (2,500  $\mu$ g/g) であった<sup>31)</sup>。また他にも、尿中パラベン濃度と血清、精液中のパラベン濃度に相関が見られるとの報告<sup>22)</sup>があり、パラベンと精子の DNA 損傷についても多く研究がされている。

パラベンに関わる法規制では、食品衛生法により食品中の保存料としてそれぞれ、しょうゆ (0.25g/L)、酢 (0.10g/L)、果実ソース (0.20g/kg)、清涼飲料水およびシロップ (0.10g/kg)、果実及び果菜の表皮 (0.012g/kg) にパラオキシ安息香酸として使用基準を定めている<sup>32)</sup>。また、食品に使用できるパラベン類としては、エチルパラベン、イソプロピルパラベン、プロピルパラベン、イソブチルパラベン、ブチルパラベンの計 5 種類が食品衛生法第 10 条に基づき、食品添加物として指定されている。一方で、しょうゆの日本農林規格では、保存料として安息香酸ナトリウム、パラオキシ安息香酸イソブチル、パラオキシ安息香酸イソプロピル及びパラオキシ安息香酸ブチルのうち 3 種類以下と定められている<sup>33)</sup>。

以上のようにパラベン類は広く使用され、その多くが環境に放出され、ヒトがパラベン量から受ける健康リスク、環境中のパラベンが生息する生物与える影響などが懸念され、それらについての研究が求められるが、これまでの科学的な知見は限られる。パラベンとその抱合体の分析法に限られることも、パラベンのリスクを明らかにできない一要素である。とくにパラベンは体内に摂取されるとその多くが抱合体として代謝されるため、パラベンの摂取、代謝を解析する分析法が必要であるが、これまでのところ代謝物の同定、定量に関する方法は、極めて不十分である。

液体クロマトグラフ - 質量分析法 (Liquid Chromatograph/Mass

Spectrometer ; 以後 LC/MS と略す) は、近年機器の進歩を背景とした研究の展開が著しく、食品分析、医薬品・代謝物分析、天然物分析など多くの分野で応用されており、多様な有機化合物及び有機金属錯体などの定性分析および定量分析に用いられている。LC/MS では高極性・難揮発性物質を幅広く測定することが可能である。溶媒と対象成分との間の電化の受け渡しによって、ソフトなイオン化が行われるために、検出されるイオンとしては $[M+H]^+$ 、 $[M-H]^-$ といった比較的安定な偶数電子イオンが得られる特徴があるが、安定なイオンはフラグメントが少ないため、構造情報を得難いのも特徴のひとつある。そのため LC/MS における定性分析では、①プロトン化分子 ( $[M+H]^+$ )、脱プロトン化分子 ( $[M-H]^-$ )、付加イオン、分子イオンなどを利用して分子量を推定する。②精密質量数を求め、計算された元素組成から分子式又はイオンの組成式を推定する。③炭素、塩素、臭素、硫黄、各種金属元素などの同位体が存在する特定元素についてそれらの同位体イオンを確認し、化合物中における特定元素の存在の推定を行う、あるいはその同位体存在比から含まれる原子数を推定する。④分子量関連イオンとフラグメントイオン間の質量差などから官能基の種類及び部分構造を推定する、などの手法を組み合わせる必要がある。

本研究では、環境中のパラベン類の定量、ヒトから排泄されるパラベン類とその抱合体の同定、標準物質が入手できないパラベン抱合体の定量分析を行うため、抱合体などの極性物質とパラベン類を分析する様々な LC/MS/MS の分析方法を研究し、効果的な分析法を開発した。

以下に各章の内容を示す。

## 「Ⅱ パラベン類全 7 種類の分析法開発および東海地域における環境動態調査」

パラベン類の環境中の濃度に関する調査は、我が国だけでなく米国、中国、ヨーロッパ等の各国において行われ、環境水、底質から検出され、環境影響が懸念されている。我が国においては、化学物質環境実態調査<sup>6)</sup>により調査が行われているが、調査は十数地点に留まっており十分な結果は得られていない。東海地域におけるパラベン類の調査はこれまでに行われておらず、これまでパラベン類の環境濃度は明らかでなかった。そのため、我々は東海地域におけるパラベン類全 7 種類の環境動態調査を行った。著者らが過去に行った調査<sup>34)</sup>において、パラベン類の主要な発生源が下水処理施設ではない事が推察されたため、調査地点を無作為とし広範囲に愛知県、岐阜県の 27 地点において水質、底質中のパラベン類の環境調査を行い、東海地域における環境濃度レベルを調査し、化学物質環境実態調査の結果と合わせて、その環境動態について考察した。

### 「Ⅲ プリカーサーイオンスキャンと精密質量分析によるヒト尿中パラベン類抱合体の同定」

パラベン類の摂取と排泄に関する研究として、代謝物であるパラベン類の抱合体について研究を行った。パラベン類は人体に摂取された後にその一部が酵素反応によって抱合体化され尿中へ排出されるとされている<sup>20)</sup>。パラベン類は乳癌患者の乳房組織から検出されたほか、これまでに尿、血清、母乳、精液中から検出されている<sup>21-26)</sup>。尿中のパラベン類の調査では、メチルパラベンとプロピルパラベンが最も多く検出<sup>26,31)</sup>されており、尿中のパラベン濃度は血清及び精しょう中のパラベン濃度と相関するという報告<sup>22)</sup>もあることから尿中のパラベン濃度を把握することは、体内のパラベン濃度の把握に繋がるものと考えられる。

これまでのパラベン類の抱合体の分析および調査<sup>35-37)</sup>では、グルクロン酸抱合体と硫酸抱合体を脱抱合の酵素反応により解離させ、生じたパラベン類を全量で定量するものがほとんどであり、グルクロン酸、硫酸以外のパラベンの抱合体の存在可能性に関する研究は見当たらない。著者らは近年環境分析分野で普及している高速液体クロマトグラフ質量分析計（以下 LC/MS/MS とする）のプリカーサーイオンスキャンと高速液体クロマトグラフ四重極-飛行時間型質量分析計（以下、LC/Q-ToF MS/MS とする）の精密質量分析により、パラベン類の抱合体の網羅的な探索と同定を行った<sup>38)</sup>。

この研究では、第一の目的を抱合体物質の探索とし、LC/MS/MS によるプリカーサーイオンスキャンによる方法を検討した。この方法を検討した根拠は、タンデム質量分析計 (MS/MS) の衝突励起解離 (CID) では、プリカーサーイオン（前駆イオン）となった物質は、プロダクトイオンにその原料の物質のイオンを見つける可能性が高いことである。すなわちパラベンの抱合体であるなら、そのプロダクトイオンにはそれぞれ元の物質であるパラベンのイオンがある可能性が高い。そこで LC/MS/MS の後段である Q3 でパラベンのイオンをモニターし、そのプレカーサーイオンをスキャンすればパラベン類の抱合体イオンを探索できる。LC/MS/MS のプリカーサーイオンスキャンによりパラベン抱合体の候補を抽出した。次に抽出された前駆イオンについて、LC/Q-ToFMS/MS による精密質量分析を行い、その組成式を推定した。得られた組成式からパラベン類に抱合している可能性のある物質の化学式を計算し、候補物質の構造推測を行った。候補物質のうち LC/MS/MS、LC/Q-ToF MS/MS で得られた保持時間と  $\log P_{ow}$  から推定される保持時間とに矛盾しないものを探索して抱合体物質の網羅的な解析手法の検討を行った。

#### 「IV LC/MS/MS による尿中エチルパラベン抱合体の酵素分解挙動の分析とその LC/MS/MS 間接定量法の研究」

従来、尿中のパラベン抱合体濃度を算出する方法としては、グルクロン酸抱合体及び硫酸抱合体に限るとパラベン抱合体を脱抱合酵素（グルクロニダーゼ/アリルスルファターゼ）により解離させ、Free 体のパラベン類と解離したパラベン類とを合算して測定し、合算したパラベン濃度から、酵素反応なしで測定した Free 体パラベン濃度を減算することで抱合体の濃度を求める方法が知られている<sup>39)</sup>。

しかし、上述した従来の酵素反応により脱抱合させて分析する方法では、酵素処理の前処理が必要となること、特定の抱合物質とパラベンの抱合体に絞った分析であること、直接抱合体を分析していないことなどから、個別の抱合体濃度が不明であり、抱合体の全体像を把握する分析法に発展させることは難しい。抱合体の全体像を把握する分析法に発展させるには、パラベン類の抱合体の分析法開発が必要であるが、これまでにパラベン類の抱合体そのものを定量する方法の報告は見当たらない。その理由として、パラベン類の抱合体の標準物質が市販されておらず、また合成することも難しいことがあげられる。本章では、パラベン類のグルクロン酸および硫酸抱合体からパラベンへの酵素分解を行い、分解開始からの各経過時間における選択イオン検出 (SRM) のクロマトグラムのピーク面積値と Free 体パラベンの濃度を測定し、ピーク面積の減少とパラベンの濃度の増加との関係を解析し、パラベン類のグルクロン酸および硫酸抱合体を間接定量する方法を研究した。

## 【引用文献】

- 1) CAS, A DIVISION OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY  
<http://support.cas.org/>
- 2) 経済産業省, 平成 27 年度 PRTR 届出外排出量の推計方法等の概要 (平成 29 年 3 月)
- 3) 環境省, 諸外国の新規化学物質審査規制制度の概要 (平成 19 年 12 月)
- 4) EU, REACH 規則 (欧州議会・理事会規則 1907/2006)
- 5) 経済産業省, 化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律 (昭和 48 年 10 月 16 日法律第 117 号)
- 6) 環境省, 平成 28 年度版 化学物質と環境 (平成 29 年 3 月)
- 7) 環境省, 内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について-環境ホルモン戦略計画 SPEED' 98- (1998 年 5 月)
- 8) 環境省, 化学物質の内分泌かく乱作用に関する環境省の今後の対応方針について-ExtEND2005- (2005 年 3 月)
- 9) 環境省, 化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応-EXTEND2010- (平成 22 年 7 月)
- 10) 環境省, 化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応-EXTEND2016- (平成 28 年 6 月)
- 11) 経済産業省, 一般化学物質等の製造・輸入数量 (平成 27 年度実績) について (公表) (平成 29 年 3 月 28 日): (ヒドロキシ安息香酸アルキル (C=1~22) として) 製造・輸入 4,000~5,000t (化審法監視化学物質届出結果公表値)
- 12) Smolinske, S. C. "Handbook of Food, Drug, and Cosmetic Excipients." CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp 251-258 (1992).
- 13) Cosmetic Ingredient Review Expert Panel. Final amended report on the safety assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Isopropylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, and Benzylparaben as used in cosmetic products. *Int J Toxicol.* 27 (Suppl 4):1-82 (2008).
- 14) Routledge EJ, Parker J, Odum J, et al. Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. *Toxicol Appl Pharmacol.* 153(1):12-9 (1998 Nov).
- 15) Harvey PW, Darbre P. Endocrine disrupters and human health: could oestrogenic chemicals in body care cosmetics adversely affect breast cancer incidence in women? *J Appl Toxicol.* 2004 May;24(3):167-76.
- 16) Blair RM, Fang H, Branham WS, et al. The estrogen receptor relative

- binding affinities of 188 natural and xenochemicals: structural diversity of ligands. *Toxicol Sci.* 2000 Mar;54(1):138-53.
- 17) Nishihara, T., Nishikawa, J., Kanayama, T., Dakeyama, F., Saito, K., Imagawa, M., Takatori, S., Kitagawa, Y., Hori, S. and Utsumi, U.: Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. *J. Health Sci.*, 46, 282-298 (2000).
  - 18) Cashman AL, Warshaw EM. Parabens: a review of epidemiology, structure, allergenicity, and hormonal properties. *Dermatitis.* 2005 Jun;16(2):57-66.
  - 19) Sasseville D. Hypersensitivity to preservatives. *Dermatol Ther.* 2004;17(3): 251-63.
  - 20) Soni MG, Carabin IG, Burdock GA. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food Chem Toxicol.* 2005 Jul;43(7): 985-1015.
  - 21) Darbre PD, Aljarrah A, Miller WR, et al. Concentrations of parabens in human breast tumours. *J Appl Toxicol.* 2004 Jan;24(1):5-13.
  - 22) Frederiksen H, Jorgensen N, Andersson AM. Parabens in urine, serum and seminal plasma from healthy Danish men determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 2011 May;21(3):262-71.
  - 23) Meeker JD, Yang T, Ye X, et al. Urinary concentrations of parabens and serum hormone levels, semen quality parameters, and sperm DNA damage. *Environ Health Perspect.* 2011 Feb;119(2):252-7.
  - 24) Ye X, Bishop AM, Needham LL, et al. Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method with peak focusing for measuring parabens, triclosan, and other environmental phenols in human milk. *Anal Chim Acta.* 2008 Aug;622(1-2):150-6.
  - 25) Barr L, Metaxas G, Harbach CA, et al. Measurement of paraben concentrations in human breast tissue at serial locations across the breast from axilla to sternum. *J Appl Toxicol.* 2012 Mar;32(3):219-32.
  - 26) Calafat AM, Ye X, Wong LY, et al. Urinary concentrations of four parabens in the U.S. population: NHANES 2005-2006. *Environ Health Perspect.* 2010 May;118(5):679-85.
  - 27) 白井さやか, パラベン類-パーソナルケア製品からの経皮吸収と妊娠期暴露による男児生殖影響, 東京大学修士論文(2011)
  - 28) Harvey PW. Parabens, oestrogenicity, underarm cosmetics and breast

- cancer: a perspective on a hypothesis. *J Appl Toxicol.* 2003 Sep;23(5):285-8.
- 29) Golden R, Gandy J, Vollmer G. A review of the endocrine activity of parabens and implications for potential risks to human health. *Crit Rev Toxicol.* 2005 Jun;35(5):435-58.
- 30) Shawn Pan, Chaoshen Yuan, et al. Parabens and Human Epidermal Growth Factor Receptor Ligands Cross-Talk in Breast Cancer Cells. *Environ Health Perspect*; DOI:10.1289/ehp.1409200. 2015
- 31) 環境省,平成 28 年度化学物質の人へのばく露量モニタリング調査結果について (平成 29 年 3 月)
- 32) 食品衛生法 (昭和 22 年 12 月法律代 233 号)
- 33) しょうゆの日本農林規格 (H21. 8. 31 農水告第 1218 号)
- 34) 原田祥行、鈴木茂、 June 11、2009、 LC/MS による環境水中のパラベン類の動態に関する基礎研究、 第 18 回環境化学討論会講演要旨集、 352-353、茨城県
- 35) Pycke BF, et al. Maternal and fetal exposure to parabens in a multiethnic urban U. S. population. *Environ Int.* 2015 Nov;84:193-200. doi: 10.1016/j.envint.2015.08.012.
- 36) Hui-Ting Z, et al. Determination of parabens in human urine by optimal ultrasound-assisted emulsification microextraction and on-line acetylation gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2017 Jul 15;1058:14-18. doi: 10.1016/j.jchromb.2017.05.009. Epub 2017 May 10.
- 37) Vela-Soria F, et al. A new treatment by dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of parabens in human serum samples. *Anal Bioanal Chem.* 2013 Sep;405(23):7259-67. doi: 10.1007/s00216-013-7181-x. Epub 2013 Jul 16.
- 38) 児玉和子,鈴木茂,原田祥行: 前駆イオンスキャンと精密質量分析を組み合わせた LC/MS/MS によるヒト尿中のパラベン抱合体の分離と同定,環境化学, 27, 1-8 (2017).
- 39) Ye, et al. Quantification of the urinary concentrations of parabens in humans by on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry : *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2006 Nov 21;844(1):53-9. Epub 2006 Aug 7.

## II. パラベン類の分析法開発および東海地域における環境調査

### 1. はじめに

パラベン類は、パーソナルケア用品、医薬品、食品においてその静菌作用から防腐剤として使用されている。我々が日常使用している化粧品、シャンプー、洗剤、日焼け止め、歯磨き粉などあらゆる製品に使用されており、ある調査では、化粧品中のパラベン類を調査した結果、44%の製品中にパラベン類が含まれていたと報告している<sup>1)</sup>。

パラベン類はフェノール性水酸基を有することから環境中で環境ホルモン作用が懸念されており、環境省においても「EXTEND2010」において調査した結果、メチルパラベンがメダカの雄肝臓中のビテロゲニン濃度の上昇や産卵数の減少の作用をした示したことを確認している<sup>2)</sup>。またパラベン類がもつその静菌作用から環境中での生態系への影響も懸念されている。

環境中の濃度としてはこれまでに海外において、環境水中で 7ng/L、排水中で最高 6 $\mu$ g/L、土壌中で 0.5~8ng/g、ハウスダスト中で 2400ng/g であったと報告されている<sup>3-7)</sup>。国内でも報告されている。木村らはさいたま市内の河川水調査において、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、ブチルパラベンの計 4 種類のパラベン類の検出を確認しており、最も検出頻度が高かったものはプロピルパラベン (84 地点中 29 地点で検出) で、最大濃度はエチルパラベンの 951ng/L であったと報告している<sup>8)</sup>。

海洋哺乳類を調査した研究では、フロリダ、カリフォルニア、ワシントン、アラスカの沿岸海域において 8 種の海洋哺乳類及び 121 種の組織サンプルのパラベン類を調査した結果、メチルパラベンが最も多くの組織サンプルから検出され、パラベン類の主要な代謝物であるパラヒドロキシ安息香酸は全ての組織サンプルから検出された。また、最高濃度は[bottlenosedolphins] (イルカ) の肝臓サンプルにおいて 865ng/g (wet weight[wet wt]) であったと報告している<sup>9)</sup>。

我国でも環境省の化学物質環境実態調査<sup>10)</sup>において 2000-2012 年にかけてパラベン類の調査が行われているが、16 地点の調査にとどまり調査地域は広いとはいえない。また、その内メチルパラベン及びプロピルパラベンは 1 地点において共に検出されている。東海地域におけるパラベン類の調査はこれまでに行われておらず、日本の 3 大都市である名古屋市におけるパラベン類の環境への汚染が懸念される。そのため、我々は東海地域におけるパラベン類の環境動態調査を行った。過去の調査において、パラベン類の主要な発生源として生活排水が多く流入する下水処理施設と考えられたため、下水処理場における流入水と放流水の調査を実施した。その結果、流入水中にはメチルパラベンが最も多く

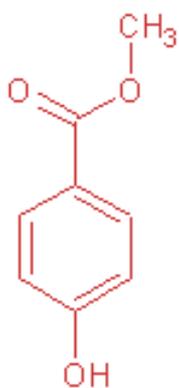
含まれており、また下水処理工程によってパラベン類は 90%以上除去されていることを確認している<sup>11)</sup>。主要な発生源が下水処理場ではない事が推察されたため、調査地点を無作為とし広範囲とした上で愛知県、岐阜県の 27 地点においてパラベン類の環境調査を行った。

分析法については、GC/MS による TMS 誘導体化によるパラベン類 7 種の分析法、HPLC については UV によるパラベン類の分析法が一般的に知られている。また近年は LC/MS/MS を使用した分析法<sup>12-14)</sup>も開発されているがパラベン類 7 種の同時分析法については見当たらない。今回、環境中のパラベン類を ppt レベルで簡便にベンジルパラベンを含む全 7 種類すべてを検出することを目的とし分析法の開発を行った。なお、この分析法は「水生生物の保全に係る水質環境基準」の項目である直鎖アルキルベンゼンスルホン酸及びその塩 (LAS) にも適用可能である。直鎖アルキルベンゼンスルホン酸及びその塩 (LAS) は公共用水域調査において定期的に調査が行われている項目であるため、本分析法を適用することで簡便にパラベン類の調査も可能となることが期待される。

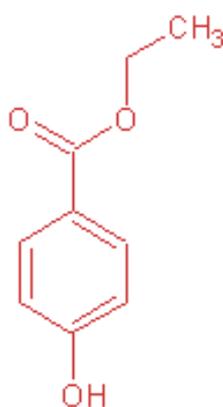
## 2. パラベンの分析法開発

### 2.1 パラベンの化学構造及び物性

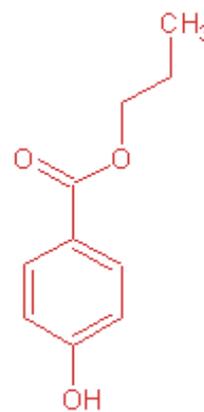
パラベンに関する物理化学的性状を以下に示す。



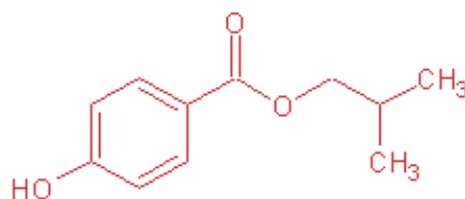
メチルパラベン



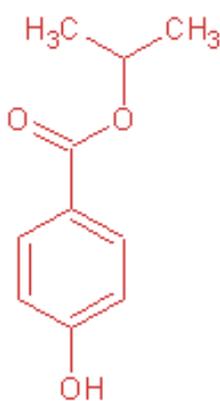
エチルパラベン



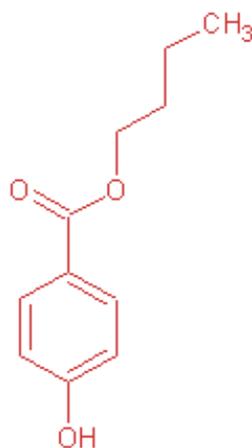
プロピルパラベン



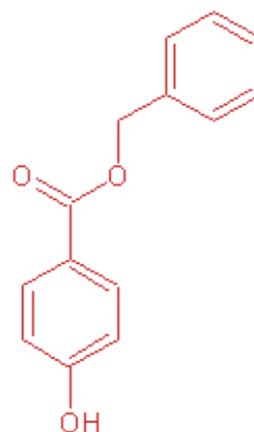
イソブチルパラベン



イソプロピルパラベン



ブチルパラベン



ベンジルパラベン

Fig.1 パラベン類の構造式

① 同族体

Fig. 1 に示す 7 同族体

② パラベン類の物性情報

| 化学名                   | 略称                  | CAS       | 分子量m/z | logPow |
|-----------------------|---------------------|-----------|--------|--------|
| 4-ヒドロキシ安息香酸<br>メチル    | メチルパラベン<br>(MP)     | 99-76-3   | 152.15 | 1.67   |
| 4-ヒドロキシ安息香酸<br>エチル    | エチルパラベン<br>(EP)     | 120-47-8  | 166.18 | 2.56   |
| 4-ヒドロキシ安息香酸<br>イソプロピル | イソプロピルパラベン<br>(iPP) | 4191-73-5 | 180.20 | 2.94   |
| 4-ヒドロキシ安息香酸<br>プロピル   | プロピルパラベン<br>(PP)    | 94-13-3   | 180.20 | 2.93   |
| 4-ヒドロキシ安息香酸<br>イソブチル  | イソブチルパラベン<br>(iBuP) | 857259    | 194.23 | 3.46   |
| 4-ヒドロキシ安息香酸<br>ブチル    | ブチルパラベン<br>(BuP)    | 94-26-8   | 194.23 | 3.57   |
| 4-ヒドロキシ安息香酸<br>ベンジル   | ベンジルパラベン<br>(BeP)   | 94-18-8   | 228.25 | 3.60   |

③ 製造輸入量

4,000～5,000 t (平成 27 年度)\*

\*(化審法監視化学物質届出結果公表値:ヒドロキシ安息香酸アルキルとして)

④ 用途

殺菌剤、防腐剤、紫外線吸収剤

## 2.2 環境水の分析法の検討

### 2.2.1 試薬・器具

分析に使用した試薬及び実験器具を以下に示す。

#### 【試薬】

methyl 4-Hydroxybenzoate (東京化成 特級)  
ethyl 4-Hydroxybenzoate (東京化成 特級)  
propyl 4-Hydroxybenzoate (東京化成 特級)  
Isopropyl 4-Hydroxybenzoate (東京化成 特級)  
butyl 4-Hydroxybenzoate (東京化成 特級)  
Isobutyl 4-Hydroxybenzoate (東京化成 特級)  
Benzyl 4-Hydroxybenzoate (東京化成 特級)  
アセトン Acetone (関東化学 PCB 試験用)  
メタノール Methanol (MERCK HPLC 用)  
アセトニトリル Acetonitril (MERCK 液体クロマトグラフィー用)  
超純水 Ultra pure Water (和光純薬 LC/MS 用)

#### 【器具】

L column (財団法人化学分析評価研究機構)  
ABS ELUT-NEXUS、200MG 6ML、30/PK (VARIAN)  
DISMIC-13HP PTFE 0.45  $\mu$ m (ADVANTEC)

#### 【標準液の調製】

各パラベンの標準試薬をそれぞれ 10mg 正確に量り取り、メタノールで 10mL に定容し 1000mg/L の標準原液を作成した。

#### 【検量線用標準液の作成】

1000mg/L の標準原液をメタノールで適時希釈した後、最終液量の濃度として 1.0  $\mu$ g/L から 1000  $\mu$ g/L の範囲で検量線用標準液を作成した。

## 2.2.2 パラベン類の LC/MS 測定条件

LC/MS による測定は Agilent 製 HP1100/ABsciex 製 API4000 を用いて、定量は ESI-Negative-MRM モードにより行った。測定条件を以下に示す。

### [LC 条件]

LC 機種 : Agilent 製 HP1100

カラム : L-column ODS (2.1mm×150mm、3 μ m) 化学物質表研究機構

移動相 : A:Water B:CH3OH

0→22min A:90→5、B:10→95 linear gradient

22→25min A:B = 5:95

25→26min A:5 →90、B:95→10 linear gradient

26→35min A:B = 90 : 10

流量 : 0.2mL/min

カラム温度 : 40°C

注入量 : 10 μ L

### [MS 条件]

機種 : ABsciex 製 API4000

イオン化法 : ESI (nega) SRM

モニターイオン : 151 > 92 メチルパラベン

165 > 92 エチルパラベン

179 > 92 プロピルパラベン

193 > 92 ブチルパラベン

227 > 92 ベンジルパラベン

前駆イオンは各パラベン類の  $[M-H]^-$  をモニターしプロダクトイオンは  $[C_6H_4O]^-$  をモニターした。そのクロマトグラムを Fig. 2 に示す。

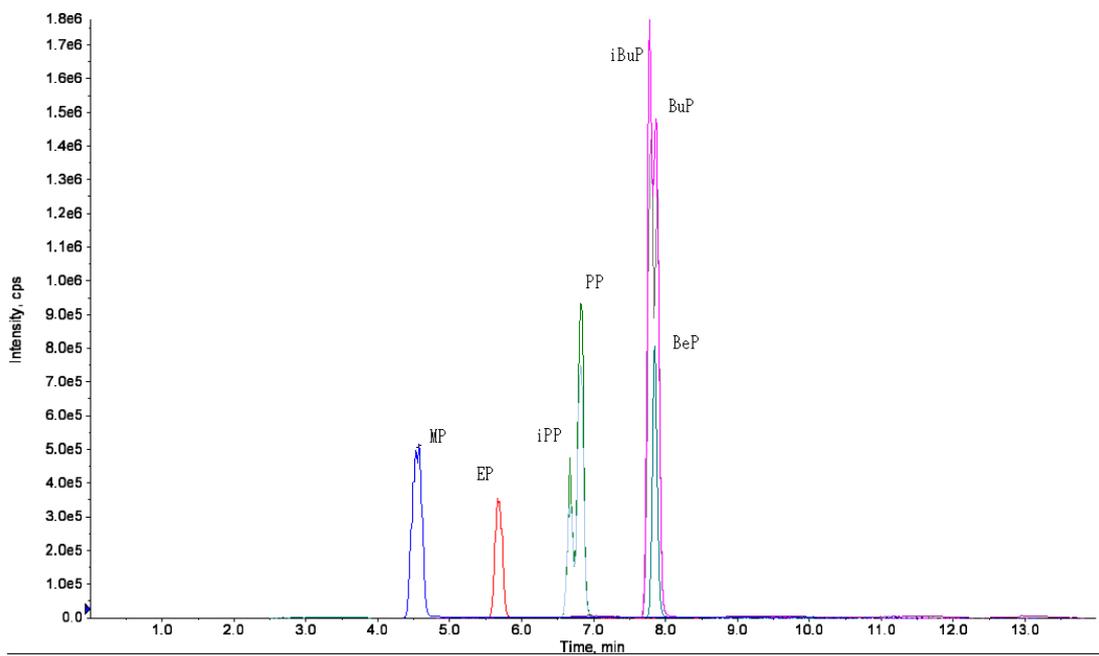


Fig.2 パラベン類全7種の標準物質 (100  $\mu$ g/L) のクロマトグラム

### [検量線]

検量線用標準液 10 $\mu$ L を LC/MS に注入した。得られた標準物質のピーク面積と濃度から検量線を作成した。メチルパラベン、エチルパラベン、イソプロピルパラベン、プロピルパラベン、イソブチルパラベン、ブチルパラベン、ベンジルパラベンとも、それぞれ検量線は 1ng/L から 1000ng/L の濃度範囲において相関係数 0.99 以上で良好な直線性を示した。各パラベン類の感度は概ね同じであった。検量線を Fig. 3 に示す。

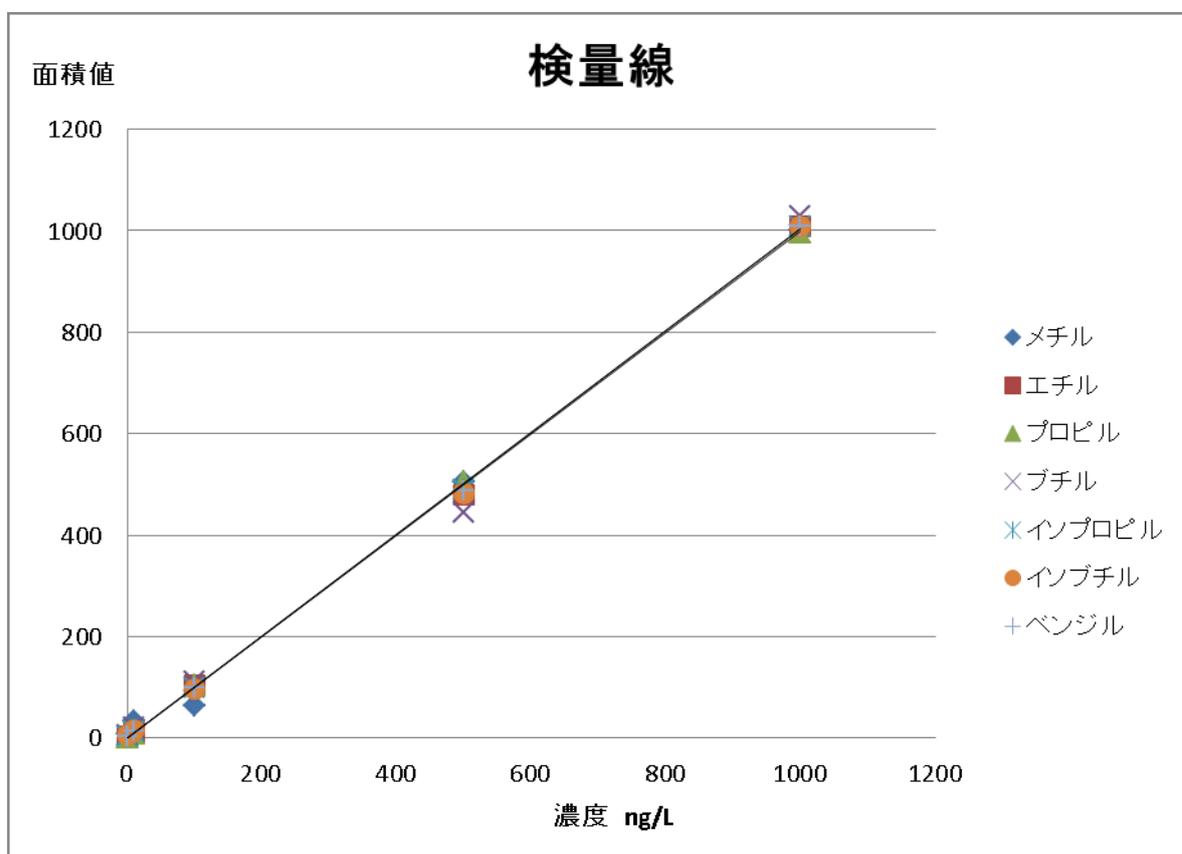


Fig. 3 検量線 (パラベン類全 7 種類)

### [定量]

試験液 10 $\mu$ L を LC/MS に注入し、得られた対象物質のピーク面積と検量線から試験液中のパラベン濃度を定量した。

### 2.2.3 前処理方法

試料処理のフローを Fig. 4 に示す。水試料 500mL をメタノール 10mL と精製水 10mL でコンディショニングした NEXUS 固相カートリッジに通水しパラベン類の吸着・捕集を行った。通水後、精製水 5mL を通して固相カートリッジを洗浄し、メタノール 5mL でパラベン類の溶出を行い試験管に受けた。次に N<sub>2</sub> ガスにて 1mL まで溶出液を濃縮し試料液とした。

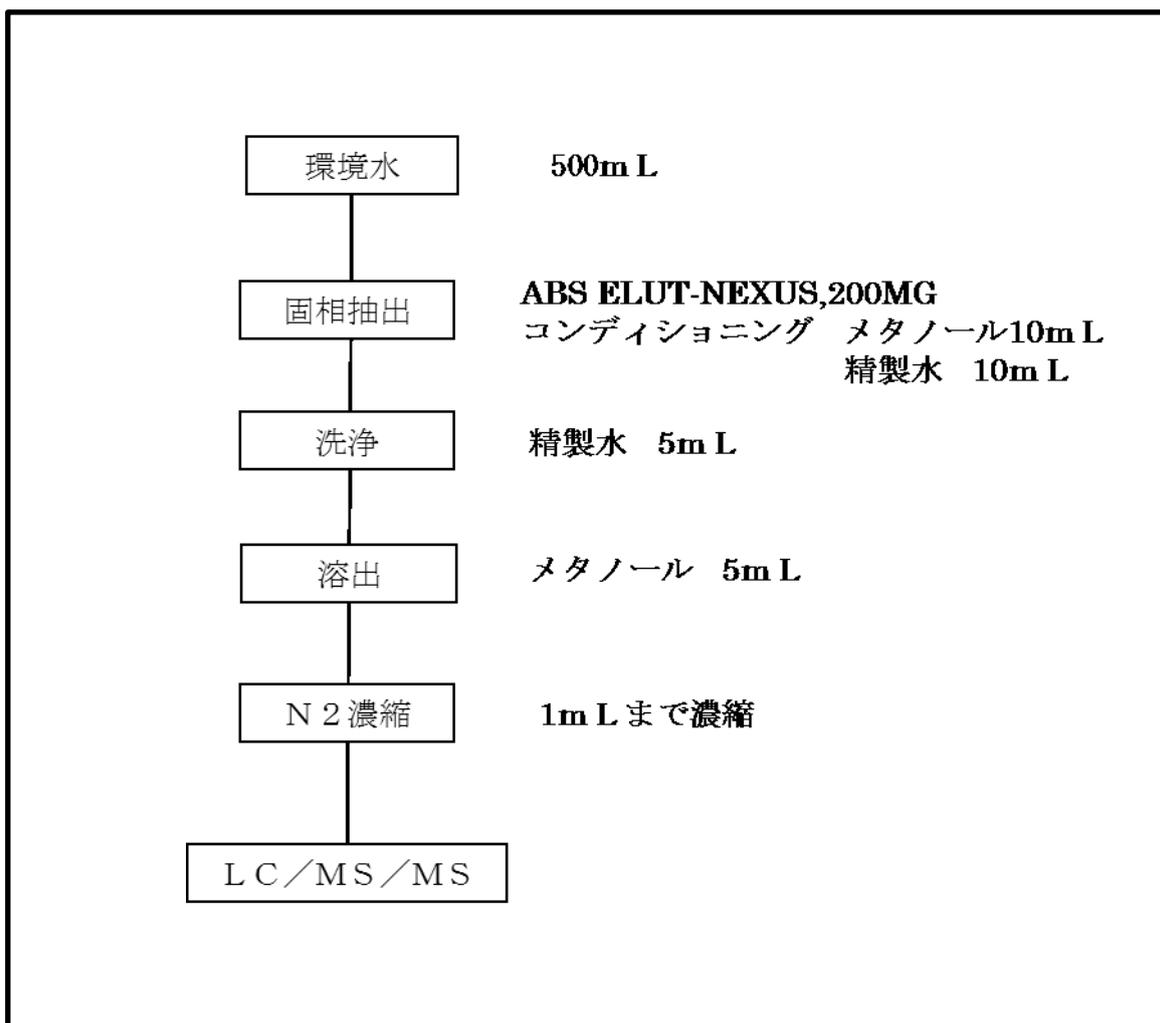


Fig. 4 試料処理フロー

#### 2.2.4 分析法の検出限界、回収率、保存性の評価

##### [測定方法の検出下限 (MDL) 及び定量下限 (MQL)]

本試験方法における MDL および MQL は、河川水に各パラベン類の濃度が 1ng/L となるように標準物質を添加し、Fig. 4 に示す試料処理のフローに従って処理を行い LC/MS/MS により測定して求めた。その結果を Table1 に示す。

測定方法の検出下限 (MDL) 及び定量下限 (MQL) の算出は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」<sup>15)</sup>を採用した。

各パラベンの MQL は 0.29~0.57ng/L であったため、水質の多様性を考慮し本分析法における各パラベン類の定量下限値は 1ng/L とした。

##### [添加回収率]

添加回収率は Table1 の結果から求めた。操作ブランクが ND であったため、添加した各パラベン類の回収率を添加回収率とした。各パラベン類の 7 回の平均回収率は 73~117%であり、相対標準偏差 (RSD(%)) は 2.5~6.5 で良好な回収率を得た。

##### [採取試料の保存性]

環境水中の低濃度の各パラベン類のポリ容器中での保存性を評価するため、9 日間の保存性試験を実施した。河川水 500mL に各パラベン類の標準物質をそれぞれ 1ng/L となるように添加し、冷暗所で保管後、その試料を Fig. 4 に示す前処理を行い残留するパラベン類を測定した。結果を Table2 に示す。メチルパラベン、プロピルパラベンの保存回収率の RSD がそれぞれ 37%、19%と大きく、これらのパラベンは生活用品に多く含まれることから、分析時の汚染の可能性もある。他のパラベン類の RSD は 8~14%、平均回収率 71~97%と概ね 9 日間の保存が可能であることが示唆された。従って実際の調査では、採取・保存時の汚染に注意し、採取後速やかに分析することとした。

Table1 MDL 及び MQL の算出結果

| 物質名                   | MP      | EP      | iPP     | PP      | iBuP    | BuP     | BeP     |
|-----------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 試料                    | 河川<br>水 |
| 試料料 (L)               | 0.5     | 0.5     | 0.5     | 0.5     | 0.5     | 0.5     | 0.5     |
| 標準添加量 (ng)            | 0.5     | 0.5     | 0.5     | 0.5     | 0.5     | 0.5     | 0.5     |
| 試料換算濃度 (ng/L)         | 1       | 1       | 1       | 1       | 1       | 1       | 1       |
| 最終液量 (mL)             | 1       | 1       | 1       | 1       | 1       | 1       | 1       |
| 注入濃度 (ng/L)           | 500     | 500     | 500     | 500     | 500     | 500     | 500     |
| 装置注入量 ( $\mu$ L)      | 10      | 10      | 10      | 10      | 10      | 10      | 10      |
| 操作ブランク平均 (ng/L)<br>※1 | ND      |
| 無添加平均 (ng/L) ※2       | ND      |
| 結果 1 (ng/L)           | 0.66    | 1.06    | 1.05    | 1.17    | 1.05    | 1.11    | 1.08    |
| 結果 2 (ng/L)           | 0.78    | 1.06    | 0.95    | 1.22    | 0.97    | 1.06    | 1.10    |
| 結果 3 (ng/L)           | 0.67    | 1.01    | 0.89    | 1.13    | 0.98    | 1.04    | 0.97    |
| 結果 4 (ng/L)           | 0.71    | 1.00    | 0.96    | 1.14    | 0.99    | 1.03    | 1.03    |
| 結果 5 (ng/L)           | 0.73    | 1.11    | 1.01    | 1.19    | 1.07    | 1.13    | 1.11    |
| 結果 6 (ng/L)           | 0.76    | 1.01    | 0.97    | 1.18    | 1.00    | 1.04    | 0.98    |
| 結果 7 (ng/L)           | 0.76    | 1.02    | 0.90    | 1.16    | 1.02    | 1.10    | 1.04    |
| 平均値 (ng/L)            | 0.73    | 1.04    | 0.96    | 1.17    | 1.01    | 1.07    | 1.05    |
| 標準偏差 (ng/L)           | 0.047   | 0.040   | 0.057   | 0.029   | 0.038   | 0.040   | 0.057   |
| MDL (ng/L) ※3         | 0.18    | 0.15    | 0.21    | 0.11    | 0.15    | 0.15    | 0.22    |
| MQL (ng/L) ※4         | 0.47    | 0.40    | 0.57    | 0.29    | 0.38    | 0.40    | 0.57    |
| RSD (%)               | 6.5     | 3.8     | 5.9     | 2.5     | 3.8     | 3.7     | 5.4     |

※1 操作ブランク平均：試料マトリックスのみがない状態で他は同様の操作を行い測定した値の平均 (n=3)

※2 無添加平均：MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値 (n=3)

※3  $MDL=t(n-1, 0.05) \times \text{標準偏差} \times 2$

※4  $MQL=\text{標準偏差} \times 10$

Table2 パラベン類の保存性試験結果

|          | MP  | EP | iPP | PP  | iBuP | BuP | BeP |
|----------|-----|----|-----|-----|------|-----|-----|
| 結果 1 (%) | 81  | 59 | 65  | 68  | 56   | 60  | 94  |
| 結果 2 (%) | 65  | 67 | 70  | 60  | 62   | 64  | 89  |
| 結果 3 (%) | 157 | 81 | 89  | 107 | 89   | 92  | 104 |
| 結果 4 (%) | 111 | 64 | 66  | 89  | 82   | 80  | 107 |
| 結果 5 (%) | 77  | 82 | 84  | 91  | 78   | 77  | 89  |
| 平均値 (%)  | 98  | 71 | 75  | 83  | 73   | 75  | 97  |
| RSD (%)  | 37  | 10 | 11  | 19  | 14   | 13  | 8   |

## 2.3 東海地域における水環境中パラベン類の調査

開発したパラベン類の分析法を用いて東海地域における水環境中パラベン類全7種類を調査した。

### 2.3.1 試料

水質試料は東海地域の河川及び伊勢湾を対象とし2014年の7月2日～11月5日の間で27地点66試料を分析した。サンプリング地点の概略図をFig.5に示す。

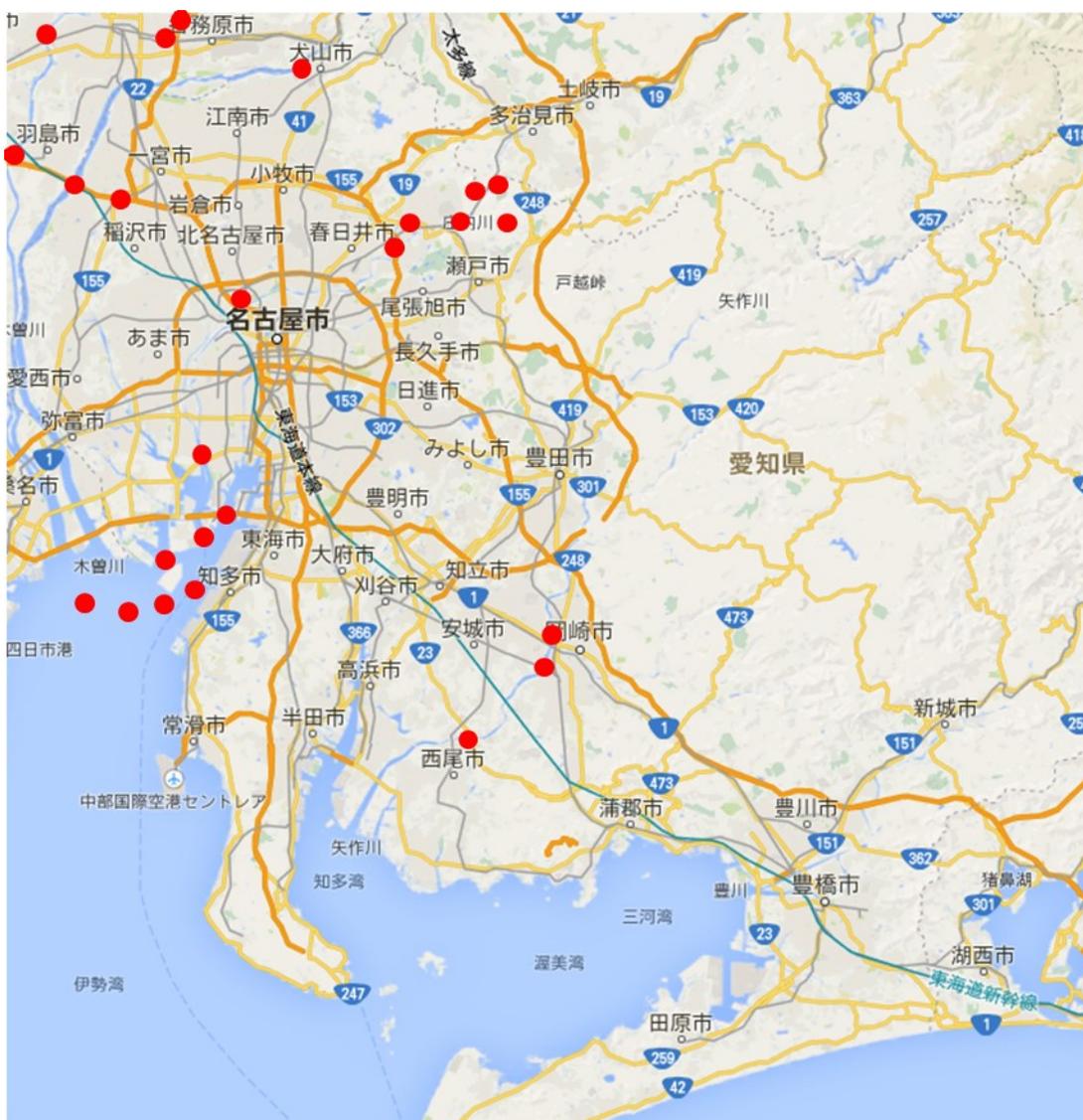


Fig.5 東海地域におけるサンプリング地点概略図

### 2.3.2 調査結果

東海地域における水環境中パラベン類の調査結果を Table3-1～3-3 に示す。調査の結果、メチルパラベン<sup>①</sup>は 6 地点において、プロピルパラベン<sup>②</sup>は 7 地点において定量下限値である、1.0ng/L 以上検出され、他のパラベン類は検出されなかった。代表的なパラベン類のクロマトグラムを Fig.6 に示す。

Table3-1 東海地域の水環境中パラベン類調査結果

| 採取日  | 採取場所         | MP  | EP  | iPP | PP  | iBuP | BuP | BeP |
|------|--------------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|
| 7/2  | 名古屋港①        | ND* | ND* | ND* | ND* | ND*  | ND* | ND* |
| 7/2  | 名古屋港②        | ND  | ND  | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 7/2  | 名古屋港③        | ND  | ND  | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 7/2  | 名古屋港④        | ND  | ND  | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 7/2  | 名古屋港⑤        | ND  | ND  | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 7/2  | 名古屋港⑥        | ND  | ND  | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 7/2  | 伊勢湾          | ND  | ND  | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 7/2  | 長良川 藍川橋      | ND  | ND  | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 7/2  | 長良川 長良大橋     | ND  | ND  | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 7/2  | 貯水池 (表面)     | ND  | ND  | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 7/2  | 矢作川 明治用水頭首工① | ND  | ND  | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 7/2  | 矢作川 岩津天神橋①   | ND  | ND  | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 7/2  | 矢作川 米津大橋①    | ND  | ND  | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 7/16 | 日光川 北今橋      | ND  | ND  | ND  | 1.7 | ND   | ND  | ND  |
| 7/17 | 木曾川 犬山橋      | ND  | ND  | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 7/17 | 木曾川 濃尾大橋     | 1.0 | ND  | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 8/1  | 日光川 北今橋      | ND  | ND  | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 8/6  | 名古屋港①        | ND  | ND  | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 8/6  | 名古屋港②        | ND  | ND  | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 8/6  | 名古屋港⑥        | ND  | ND  | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 8/6  | 伊勢湾          | ND  | ND  | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |

Table3-2 東海地域の水環境中パラベン類調査結果

| 採取日  | 採取場所               | MP  | EP | iPP | PP  | iBuP | BuP | BeP |
|------|--------------------|-----|----|-----|-----|------|-----|-----|
| 8/6  | 東栄浄化センター 周辺域 ①     | ND  | ND | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 8/6  | 東栄浄化センター 周辺域 ②     | ND  | ND | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 8/20 | 河川水 No. 1          | ND  | ND | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 8/20 | 河川水 No. 2          | ND  | ND | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 8/27 | 揖斐川 岡島橋            | ND  | ND | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 8/27 | 揖斐川 鷺田橋            | ND  | ND | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 8/27 | 貯水池 (s t 3 - 1 表面) | ND  | ND | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 8/28 | 海水 ① 1 - 表         | 1.6 | ND | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 8/28 | 海水 ② 5 - 表         | 1.3 | ND | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 8/28 | 海水 ③ 6 - 表         | ND  | ND | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 8/28 | 海水 ④ 7 - 表         | ND  | ND | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 8/28 | 海水 ⑤ 1 1 - 表       | ND  | ND | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 9/3  | 名古屋港①              | ND  | ND | ND  | 6.4 | ND   | ND  | ND  |
| 9/3  | 名古屋港②              | ND  | ND | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 9/3  | 名古屋港⑥              | ND  | ND | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 9/3  | 伊勢湾                | ND  | ND | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 9/3  | 長良川 藍川橋            | ND  | ND | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 9/3  | 長良川 長良大橋           | ND  | ND | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 9/11 | 日光川 北今橋            | ND  | ND | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 9/18 | 木曾川 犬山橋            | ND  | ND | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 9/18 | 木曾川 濃尾大橋           | ND  | ND | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 9/19 | 揖斐川 岡島橋            | ND  | ND | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 9/20 | 揖斐川 鷺田橋            | ND  | ND | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 10/1 | 名古屋港①              | 3.5 | ND | ND  | 18  | ND   | ND  | ND  |
| 10/1 | 名古屋港②              | 1.1 | ND | ND  | 6.1 | ND   | ND  | ND  |
| 10/1 | 名古屋港③              | 10  | ND | ND  | 54  | ND   | ND  | ND  |
| 10/1 | 名古屋港④              | ND  | ND | ND  | 3.5 | ND   | ND  | ND  |
| 10/1 | 名古屋港⑤              | ND  | ND | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |
| 10/1 | 名古屋港⑥              | ND  | ND | ND  | ND  | ND   | ND  | ND  |

Table3-3 東海地域の水環境中パラベン類調査結果

| 採取日   | 採取場所              | MP | EP | iPP | PP | iBuP | BuP | BeP |
|-------|-------------------|----|----|-----|----|------|-----|-----|
| 10/1  | 伊勢湾               | ND | ND | ND  | 4  | ND   | ND  | ND  |
| 10/8  | 貯水池（s t 3 - 1 表面） | ND | ND | ND  | ND | ND   | ND  | ND  |
| 10/9  | 日光川 北今橋           | ND | ND | ND  | ND | ND   | ND  | ND  |
| 10/9  | 湖東浄化センター 周辺域      | ND | ND | ND  | ND | ND   | ND  | ND  |
| 10/9  | 湖東浄化センター 周辺域      | ND | ND | ND  | ND | ND   | ND  | ND  |
| 10/9  | 舘山寺浄化センター 周辺域     | ND | ND | ND  | ND | ND   | ND  | ND  |
| 10/9  | 舘山寺浄化センター 周辺域     | ND | ND | ND  | ND | ND   | ND  | ND  |
| 10/24 | 海水 石狩 1 - 表       | ND | ND | ND  | ND | ND   | ND  | ND  |
| 10/24 | 海水 石狩 5 - 表       | ND | ND | ND  | ND | ND   | ND  | ND  |
| 10/24 | 海水 石狩 6 - 表       | ND | ND | ND  | ND | ND   | ND  | ND  |
| 10/24 | 海水 石狩 7 - 表       | ND | ND | ND  | ND | ND   | ND  | ND  |
| 10/24 | 海水 石狩 1 1 - 表     | ND | ND | ND  | ND | ND   | ND  | ND  |
| 11/5  | 貯水池（表面）           | ND | ND | ND  | ND | ND   | ND  | ND  |
| 11/5  | 矢作川 明治用水頭首工①      | ND | ND | ND  | ND | ND   | ND  | ND  |
| 11/5  | 矢作川 岩津天神橋①        | ND | ND | ND  | ND | ND   | ND  | ND  |
| 11/5  | 矢作川 米津大橋①         | ND | ND | ND  | ND | ND   | ND  | ND  |

\*NDはすべての試料で0.3ng/L未満であることを表す。

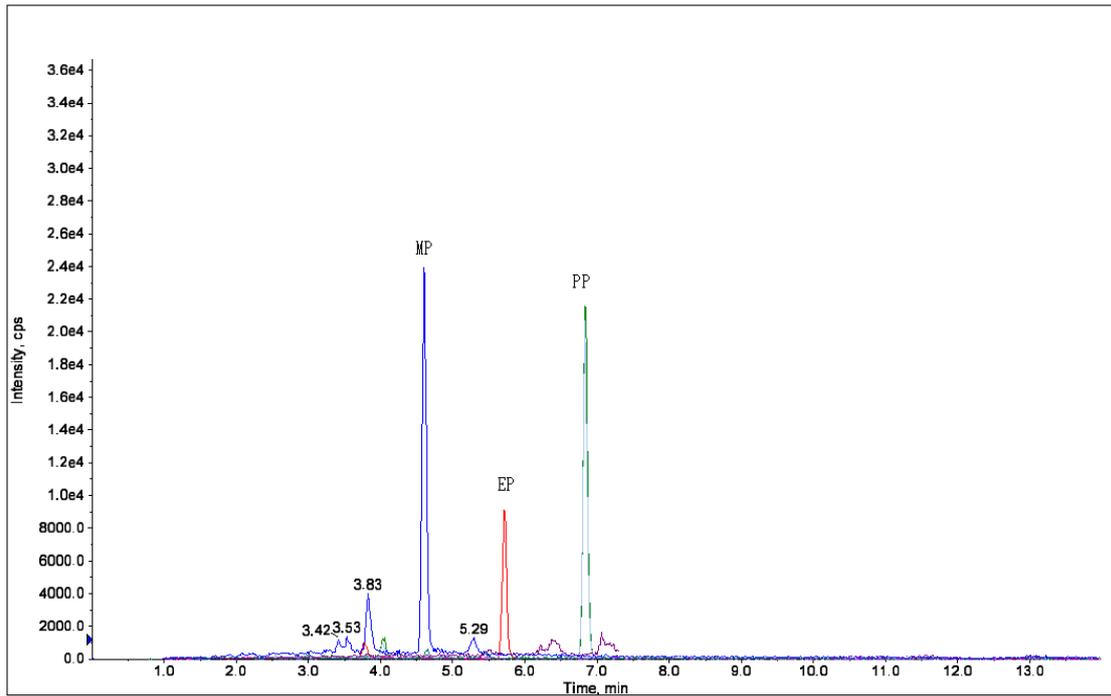


Fig. 6 水環境中パラベン類の測定例 (名古屋港試料)

### 3. 考察

東海地域における環境水中のパラベン類は、主にメチルパラベンとプロピルパラベンが検出された。この結果は、環境省の化学物質環境実態調査<sup>16)</sup>(2000-2012年)のパラベン類の調査結果と同じ濃度レベルと傾向を示している。パラベン類は生活用品中に多く含まれており、中でもメチルパラベンとプロピルパラベンは主要な添加物であることを反映していると考えられる。

調査地点において名古屋港の検出頻度及び濃度が高かった。名古屋港のパラベン類の調査地点の平面図をFig. 7に示す。

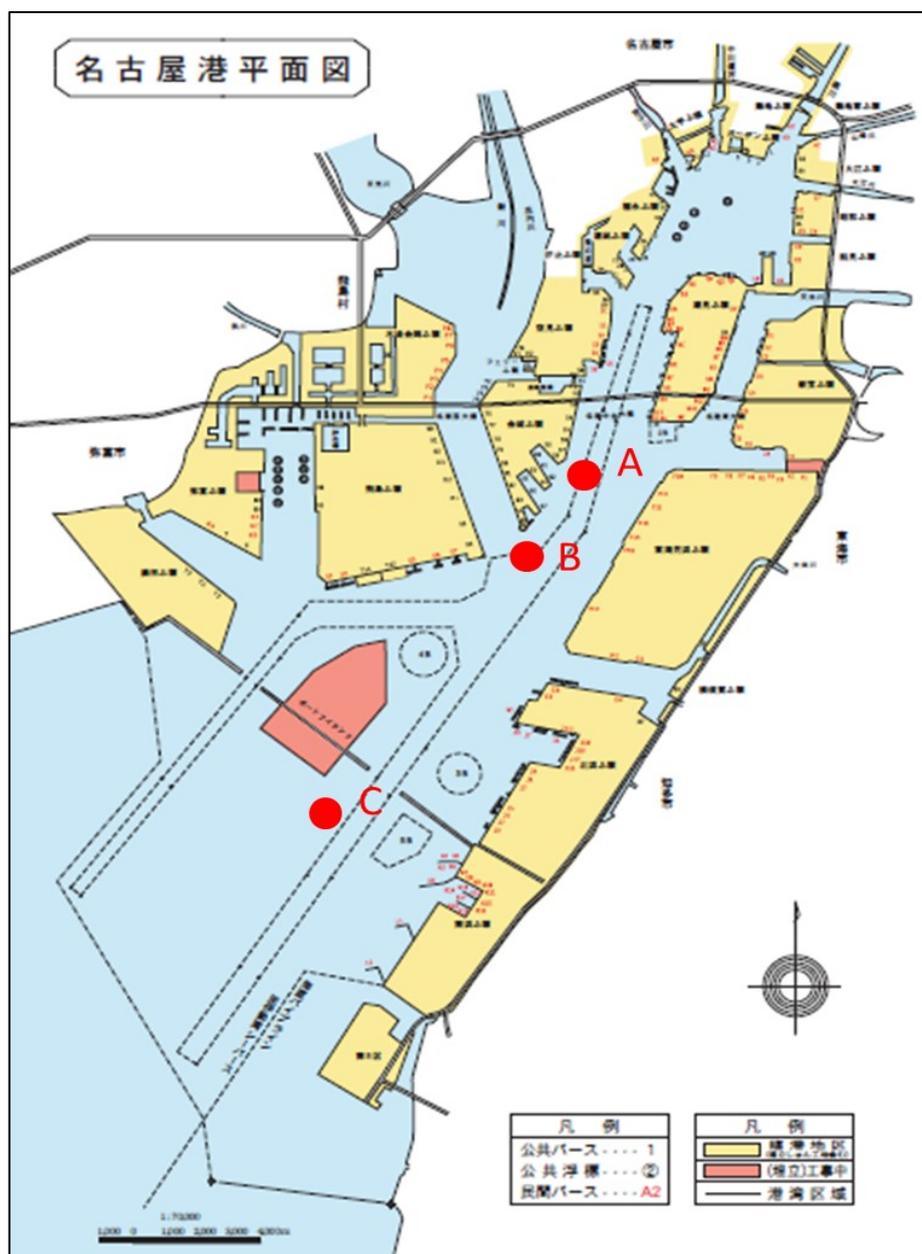


Fig. 7 名古屋港サンプリング地点概略図

Fig. 7 の A、B、C はそれぞれ、Table3-2 の名古屋港③、名古屋港①、名古屋港②を表しており、10月の調査では河口域から伊勢湾に向かうにしたがってメチルパラベン及びプロピルパラベンの濃度が低下している。これはメチルパラベン及びプロピルパラベンがこの付近に河口がある堀川、天白川などの河川から流入していることを示唆している。なお、堀川、天白川の河川水のパラベン類の調査は行わなかったため、結果として名古屋港の濃度が高い傾向を示した。堀川、天白川の河川水中のパラベン類の濃度は今後調査すべきと考える。

パラベン類の水環境中の検出濃度の分布を評価するため、河川水と海水それぞれをについて、メチルパラベン、プロピルパラベンの検出濃度（対数）の度数分布を Fig. 8～11 に示す。なお、度数分布では ND は検出下限値である 0.3ng/L の 1/2（切り上げ）である 0.2ng/L を用いた。

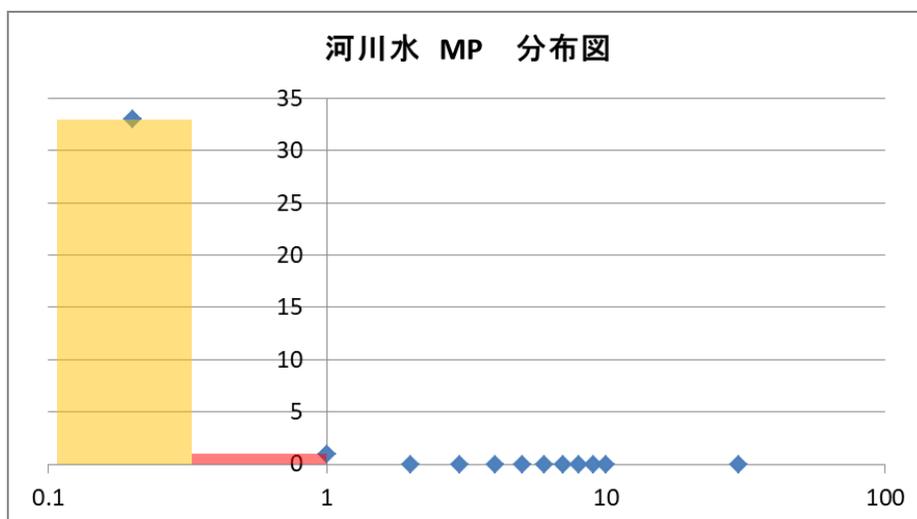


Fig. 8 河川水におけるメチルパラベンの検出濃度の度数分布

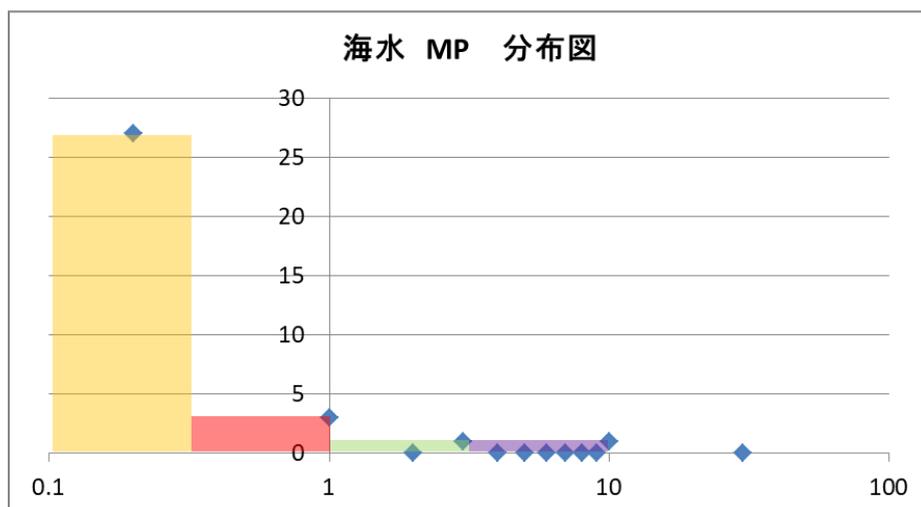


Fig. 9 海水におけるメチルパラベンの検出濃度の度数分布

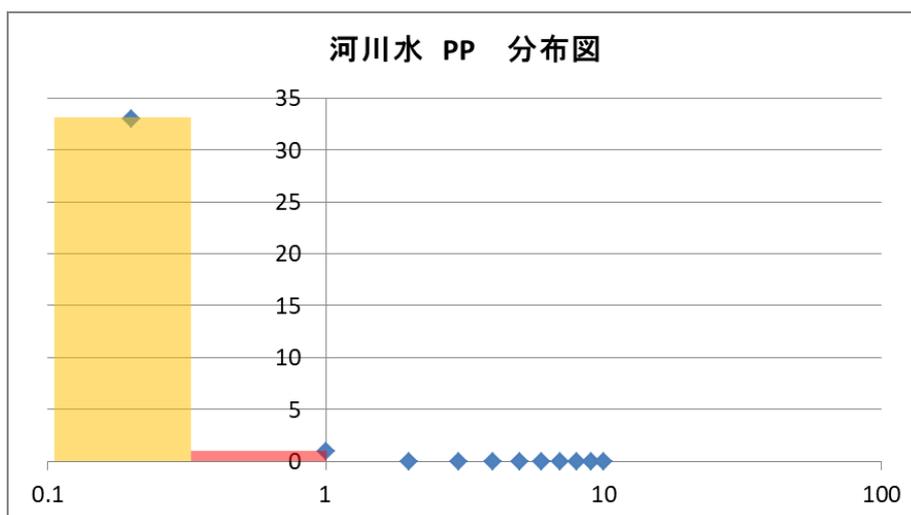


Fig. 10 河川水におけるプロピルパラベンの検出濃度の度数分布

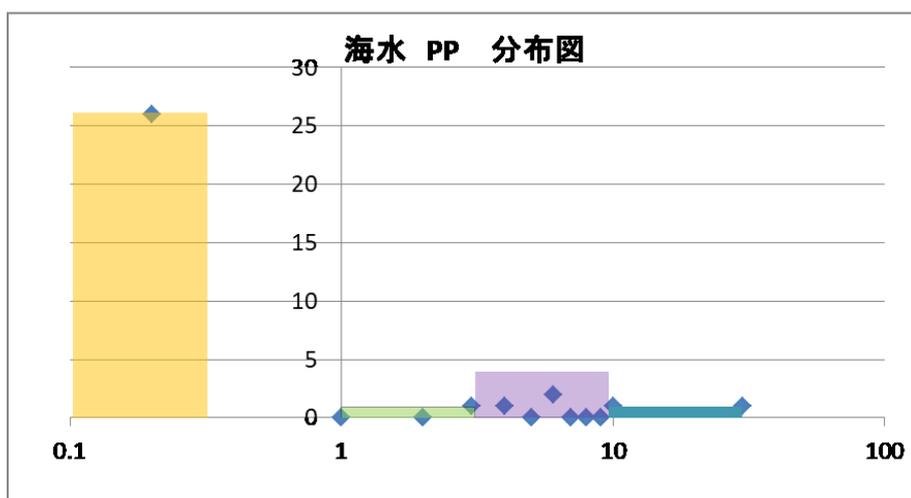


Fig. 11 海水におけるプロピルパラベンの検出濃度の度数分布

メチルパラベンは、Fig. 8～9 から河川水および海水共に検出濃度が高くなるに従い検出頻度が低くなる対数正規分布の傾向が示唆される。環境中には一般に汚染物質は広い範囲にわたって拡散し、その濃度の最低値と最高値の比は100～1000倍にもなる。多くの環境は主要な発生源から離れているため濃度が低く、環境調査では低濃度の検出頻度が高くなるのが一般的である。今回の結果はこの傾向と一致しており、低濃度では検出頻度が高く、高濃度では検出頻度が低い。すなわち東海地域全域に面的汚染源があるのではなく、下水処理施設などのある主要な汚染源からパラベン類が環境中に排出されていると示唆される。

プロピルパラベンは、Fig. 10～11 から基本的には対数正規分布の傾向が見られるが、海水については高濃度域で幾分検出頻度が上がっている。メチルパラ

ベンではこの傾向が認められないことから、メチルパラベンとプロピルパラベンの環境残留性が異なる可能性があるが、それらに関する研究結果は見当たらない。

パラベン類の検出地点数を河川水と海水で比較すると、河川水で 2 地点、海水で 8 地点となり、海水での検出頻度が河川水より高い。その原因としては、2 つ考えられる。1 つは、調査した海域が比較的高濃度のパラベン類が存在すると可能性のある堀川、天白川の河口から近く、それらの河川からのパラベン類の影響が大きい地点であったこと、かつ河川水の調査地点には堀川、天白川が含まれないことが考えられる。2 つ目は、パラベン類が紫外線吸収剤であり、紫外線による光分解を受けやすいと考えられることである。河川水中では光によりパラベン類の分解が考えられるが、海水中では塩類や金属イオン、有機物が多量に含まれるため、それらの影響によりパラベン類の分解が抑制されている可能性が考えられる。ある研究では、淡水中と海水中での農薬類の半減期を比較した結果、海水の方が生分解性及び光分解性の両方の影響により半減期が約 20 倍程度長くなったと報告<sup>15)</sup>している。

パラベン類が検出された地点におけるメチルパラベンとプロピルパラベンの相関を Fig. 12 に示す。

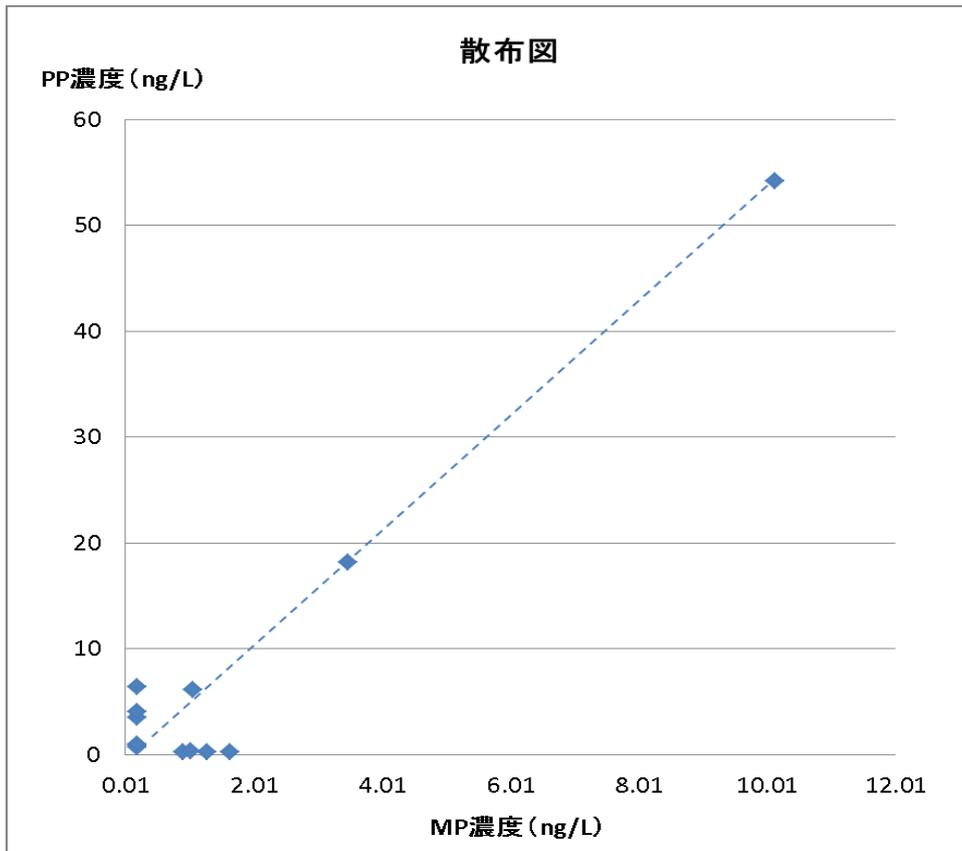


Fig. 12 メチルパラベンとプロピルパラベン濃度の相関

Fig. 12 より、パラベン類の検出割合が低くデータが不足しているが、高濃度で検出された名古屋港の 3 地点のメチルパラベン濃度とプロピルパラベン濃度には一定の相関が見られ、低濃度で検出されたパラベンでは相関が認められなかった。

河川中でのパラベン類の発生源としては主に下水処理施設が考えられるが、過去に下水処理施設でのパラベン類を調査したところ流入水中のパラベン類は90%以上除去されて放流されていることを確認している<sup>11)</sup>。(Table4、Fig. 13)

今回の調査では河川水中ではパラベン類の検出は少なかったが、米国・日本・韓国を対象とした底質の調査では、すべてのサンプルにおいてメチルパラベンが検出されており、プロピルパラベンも 79%の割合で検出されたと報告<sup>16)</sup>されているため、河川中へのパラベン類の汚染は存在しているものと推察される。

Table4 流入水および放流水中のパラベン濃度調査結果

| 流入水  | 9/30 | 10/29 | 11/5  | 11/11 | 11/18 | 11/25 | 12/2 | 12/9  | 12/16 | 平均値  |
|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|------|
| MP   | 92.3 | 78.3  | 186.7 | 10.6  | 30.5  | 114.3 | 70.1 | 185.6 | 9.2   | 86.4 |
| EP   | 8.4  | 1.6   | 4.4   | 2.2   | 6.2   | 8.2   | 8.7  | 3.1   | ND    | 4.8  |
| iPP  | ND   | ND    | ND    | 0.3   | 0.5   | 0.5   | 0.5  | 0.5   | 0.6   | 0.4  |
| PP   | 9.2  | 3.6   | 4.9   | 4.0   | 13.4  | 3.7   | 2.7  | 4.2   | 1.4   | 5.2  |
| iBuP | 1.4  | 0.7   | 0.7   | ND    | ND    | ND    | 0.4  | 0.3   | 0.3   | 0.5  |
| BuP  | 5.4  | 3.7   | 3.7   | 2.4   | 2.2   | 3.2   | 7.1  | 1.9   | 1.4   | 3.4  |
| BeP  | ND   | ND    | ND    | 0.4   | 0.9   | 0.3   | 0.5  | 0.6   | 0.6   | 0.4  |
| 放流水  | 9/30 | 10/29 | 11/5  | 11/11 | 11/18 | 11/25 | 12/2 | 12/9  | 12/16 | 平均値  |
| MP   | 3.6  | 2.6   | 1.5   | 0.6   | 0.1   | ND    | 2.7  | ND    | ND    | 1.1  |
| EP   | 0.3  | ND    | ND    | ND    | ND    | ND    | ND   | ND    | ND    | ND   |
| iPP  | ND   | ND    | ND    | ND    | 0.5   | 0.5   | 0.6  | 0.5   | 0.6   | 0.3  |
| PP   | 0.6  | 0.7   | 0.5   | 0.3   | 0.5   | 0.5   | 1.7  | 0.5   | 0.5   | 0.6  |
| iBuP | 0.7  | 0.7   | 0.7   | 0.7   | 0.5   | ND    | ND   | ND    | ND    | 0.4  |
| BuP  | 0.7  | 0.2   | 0.4   | 0.3   | 0.3   | ND    | ND   | ND    | 0.2   | 0.3  |
| BeP  | 0.3  | ND    | 0.5   | ND    | 0.3   | 0.3   | 1.3  | ND    | 0.4   | 0.4  |

\*ND はすべての試料で 0.3ng/L 未満であることを表す

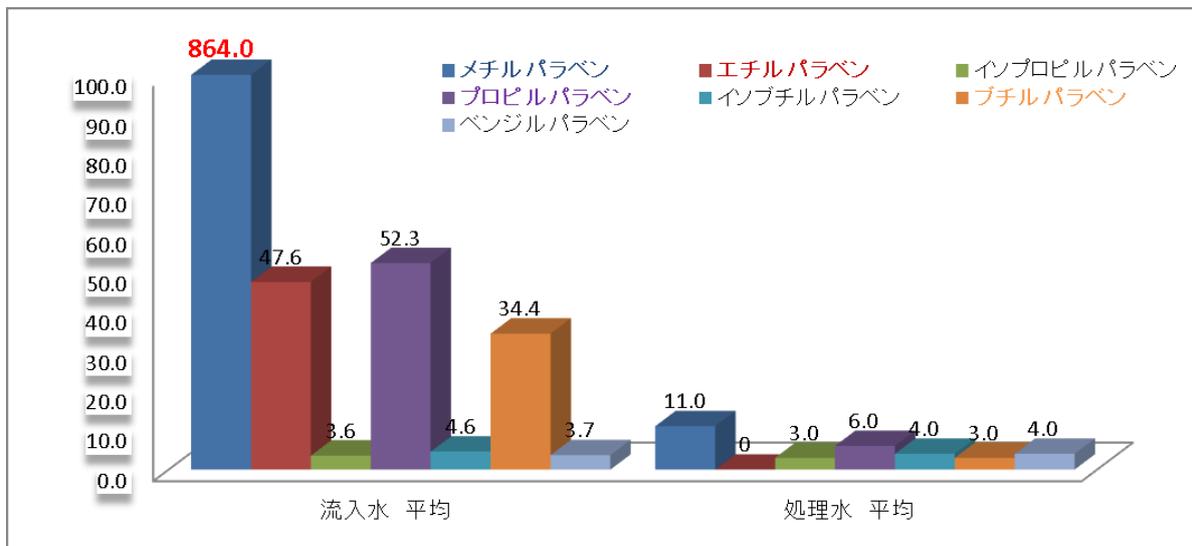


Fig. 13 流入水および放流水中のパラベン類濃度の変化図

#### 4. まとめ

環境水中のパラベン類の LC/MS/MS 分析法を開発した。

MDL と回収率、相対標準偏差はそれぞれ 0.11~0.22 ng/L、73~117%、2.5~6.5%であり東海地域の水環境の調査に応用した。

環境水中では、メチルパラベンは ND (0.3ng/L) ~10ng/L の間でプロピルパラベンは ND (0.3ng/L) ~54ng/L の範囲で検出され、その度数分布は対数正規分布を示唆するものであった。海水中の濃度が高い傾向が認められたが、これは調査を行わなかった高濃度のパラベン類があると推察される河川からの影響及び海水中的でのパラベン類の酸化が河川水中に比べ抑制されていることによると考えられる。

## 【参考文献】

- 1) Yazar K、 Johnsson S、 Lind ML、 et al. Preservatives and fragrances in selected consumer-available cosmetics and detergents. *Contact Dermatitis*. 2011 May;64(5):265-72.
- 2) 環境省, 化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応-EXTEND2010-(平成 22 年 7 月)
- 3) Gonzalez-Marino I、 Quintana JB、 Rodriguez I、 et al. Simultaneous determination of parabens、 triclosan and triclocarban in water by liquid chromatography/ electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2009 Jun;23(12):1756-66.
- 4) Pedrouzo M、 Borrull F、 Marce RM、 et al. Ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determining the presence of eleven personal care products in surface and wastewaters. *J Chromatogr A*. 2009 Oct;1216(42):6994-7000.
- 5) Ferreira AM、 Moder M、 Laespada ME. Stir bar sorptive extraction of parabens、 triclosan and methyl triclosan from soil、 sediment and sludge with in situ derivatization and determination by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2011 Jun;1218(25):3837-44.
- 6) Perez RA、 Albero B、 Miguel E、 et al. Determination of parabens and endocrinedisrupting alkylphenols in soil by gas chromatography-mass spectrometry following matrix solid-phase dispersion or in-column microwave-assisted extraction: a comparative study. *Anal Bioanal Chem*. 2012 Mar;402(7): 2347-57.
- 7) Ramirez N、 Marce RM、 Borrull F. Determination of parabens in house dust by pressurised hot water extraction followed by stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2011 Sep;1218(37):6226-31.
- 8) 木村ら (2012) 第 46 回日本水環境学会年会講演集 p. 525
- 9) Jingchuan Xue、 Nozomi Sasaki、 Madhavan Elangovan、 Guthrie Diamond、 and Kurunthachalam Kannan : Elevated Accumulation of Parabens and their Metabolites in Marine Mammals from the United States Coastal Waters. *Environ. Sci. Technol.*、 2015、 49 (20)、 pp 12071-12079
- 10) 環境省, 平成 28 年度版 化学物質と環境 (平成 29 年 3 月)
- 11) 原田祥行、鈴木茂、 June 11、 2009、 LC/MS による環境水中のパラベン類の動態に関する基礎研究、 第 18 回環境化学討論会講演要旨集、

352-353、茨城県

- 12) 環境省, 化学物質分析法開発調査報告書 (平成 19 年度)
- 13) González-Mariño I, et al. Simultaneous determination of parabens, triclosan and triclocarban in water by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2009 Jun;23(12):1756-66.
- 14) 白井さやか, パラベン類-パーソナルケア製品からの経皮吸収と妊娠期暴露による男児生殖影響, 東京大学修士論文(2011)
- 15) 環境省, 化学物質環境実態調査実施の手引き 平成 20 年度版 (平成 21 年 3 月)
- 16) 環境省, 平成 28 年度版 化学物質と環境 (平成 29 年 3 月)
- 17) Chikumbusko Chiziwa Kaonga, et al. Photodegradation and bio degradation of selected pesticides and their fate in Seto Inland Sea, Japan
- 18) Chunyang Liao, et al. Parabens in Sediment and Sewage Sludge from the United States, Japan, and Korea: Spatial Distribution and Temporal Trends.

### Ⅲ. プリカーサーイオンスキャンと精密質量分析によるヒト尿中パラベン抱合体の同定

#### 1. はじめに

我々が日常使用しているパーソナルケア商品であるシャンプー、化粧品、手洗い石鹸、日焼け止めなどの化粧品には紫外線吸収剤として又、防腐剤の役割として一般的にパラベン類が配合されている。国内においてパラベン類は化粧品中には 1%、紫外線吸収剤には 4%まで配合が認められている。食品においては、エチルパラベン、イソプロピルパラベン、プロピルパラベン、イソブチルパラベン、ブチルパラベンの計 5 種類が食品衛生法第 10 条に基づき、食品添加物として指定されている。

パラベン類は 1930 年代から食品、化粧品、医薬品等に使用されており、アレルギー性や薬との相互作用が低く、食品中における抗菌活性も高いことが知られている。パラベン類以外の代替防腐剤としては、ホルムアルデヒド、イミダゾリジニル尿素、ジアゾリジニル尿素、ジメチルホルムメチルヒダントイン等があるが、これらはアレルギーを起こす場合が多く、ホルムアルデヒドなどは発がん性も懸念される<sup>1)</sup>。天然成分の防腐剤としては、グレープフルーツの種子抽出物である (GSE) がある<sup>2)</sup> が、薬物代謝において重要な酵素と相互作用をすることが知られており<sup>3)</sup>、医薬品に使用することが困難である。その他の防腐剤では、チモール、シンナムアルデヒド、アリルイソチオシアネート、クエン酸、アスコルビン酸、ローズマリー抽出物が知られている<sup>4-5)</sup> が、invitro での抗菌作用は認められる一方、食品中での抗菌作用は曖昧な結果となっている<sup>4, 6, 7)</sup>。このような事情から、抗菌性や安定性が高く、また安価であるためパラベン類は 80 年以上にわたって広く使用されており、現在までに最も耐容性の高い防腐剤として仕様されていると考えられる。

人が一日に暴露されるパラベン類の量は、76mg とされ、化粧品とパーソナルケア用品から 50mg、医薬品から 25mg、食品から 1mg とされている<sup>8-10)</sup>。皮膚から吸収されたパラベン類は、エステラーゼ酵素により代謝され尿や胆汁中に排泄されている<sup>11-12)</sup>。また口腔または静脈から摂取されたパラベン類は腸や肝臓内のエステラーゼ酵素によって代謝される<sup>13)</sup>。代謝された酵素はパラヒドロキシ安息香酸、グリシン、グルクロニド、硫酸と抱合体を形成し尿中へ排出される<sup>14)</sup>。

近年、人体に対する健康影響が懸念されている。2004 年に乳癌患者の乳房組織からパラベン類が検出されたことでパラベン類の健康影響に対する懸念が高まっている<sup>15)</sup>。これまでにパラベン類は尿、血清、母乳、精液中から検出されており<sup>16-20)</sup>、尿中のパラベン類の調査では、男性よりも女性のパラベン濃度が

高く、また検出されたパラベン類内メチルパラベンとプロピルパラベンが 9 割以上で最も高かったと報告されている<sup>21-23)</sup>。また尿中のパラベン濃度は血清及び精しょう中のパラベン濃度と相関するといった報告があり<sup>24)</sup>、尿中のパラベン濃度を把握することは、体内中のパラベン濃度の把握に繋がるものと考えられる。

これまでのパラベン類の抱合体の調査ではパラベン類はグルクロン酸抱合体、グリシン抱合体、硫酸抱合体を形成することが知られているが<sup>25)</sup>酵素反応により抱合体を分解して測定した結果によると考えられるものが主であり、抱合体自体とパラベン類を網羅的に調査した例は見当たらない。著者らは、抱合体の網羅的な把握を目的として、近年環境分析分野で普及している高速液体クロマトグラフ質量分析計（以下 LC/MS/MS する。）及び高速液体クロマトグラフ四重極-飛行時間型質量分析計（以下、LC/Q-ToF MS/MS とする）を用いて、尿中のパラベン類とその抱合体を定性する分析方法の研究を行った。

はじめに尿中のパラベン類の抱合体物質の網羅的探索を目的とし、LC/MS/MS によるプリカーサーイオンスキャンによる方法を検討した。プリカーサーイオンスキャンでは衝突励起解離（CID）により生成した各パラベンイオンを LC/MS/MS の後段である Q3 で指定する。パラベンをプロダクトイオンとする前駆イオンスキャンの全イオンクロマトグラムのピークについて、質量スペクトルを分析し、パラベン類の抱合体の候補物質のイオンを抽出した。次に抽出された抱合体候補物質のイオンを標的に、高分解能 LC/Q-ToF MS/MS による精密質量分析を行い、抱合体候補物質の組成式の推定を行った。得られた組成式からパラベン類の化学式と反応による脱離する分子を減算し、パラベン類に抱合している可能性のある物質の化学式を求めた。この化学式と一致する化学構造を chemical structure database 「ChemSpider<sup>26)</sup>」から抽出し、抽出された化学構造とパラベンとの抱合体の log $P_{ow}$  の推定値 (log $K_{ow}$ ) を Chem3D Pro13.0<sup>27)</sup> 及び EPIsuite<sup>28)</sup> により計算した。一般に、逆相系液体クロマトグラフィーでは、物質の保持時間とその log $K_{ow}$  とは、良い相関関係がある<sup>29)</sup>。すなわち、ChemSpider で抽出された化学構造のうち、パラベンとの抱合体の log $P_{ow}$  の推定値が LC/MS/MS、LC/Q-ToF MS/MS における log $P_{ow}$  と保持時間と矛盾しないものを、抱合物質の候補とした。

## 2. パラベン抱合体の探索方法

パラベン類の抱合体は、標準試薬が無くまた、合成も困難であることから LC/MS/MS 条件を設定には、パラベン類の標準試薬を用いた。

### 2.1 試薬及び器具

試験に使用した試薬及び器具を以下に示す。

#### 【試薬】

アセトニトリル (Sigma-Aldrich 製 HPLC 用)

蒸留水 (関東化学 HPLC 用)

アセトン (関東化学 特級)

メタノール (Merck KGaA HPLC 用)

methyl 4-Hydroxybenzoate (東京化成 特級)

ethyl 4-Hydroxybenzoate (東京化成 特級)

propyl 4-Hydroxybenzoate (東京化成 特級)

butyl 4-Hydroxybenzoate (東京化成 特級)

Benzyl 4-Hydroxybenzoate (東京化成 特級)

#### 【器具】

InertSep C18 500mg/6mL (ジーエルサイエンス製)

DISMIC-13HP (アドバンテック東洋製)

#### 【パラベン標準原液の調製】

各パラベンの標準試薬をそれぞれ 10mg 正確に量り取り、アセトニトリルで 10 mL に定容し 1000mg/L の標準原液を作成した。

#### 【分析用標準液の作成】

1000mg/L の標準原液を蒸留水/アセトニトリル=50/50 (v/v) で適時希釈した後、最終液量の濃度として 1.0  $\mu$ g/L から 1000  $\mu$ g/L の範囲で標準液を調製した。

## 2.2 LC/MS/MSによるプリカーサーイオンによるパラベン類と抱合体の測定

LC/MS/MSによる測定は2種類の機器によって行った。初めに主に衝突誘起解離(CID)によりパラベン類のイオンを生成する前駆イオンを探索するため、低分解能のLC/MS/MSとしてSHIMADZU prominence LC-20AD/AB SCIEX API4000を用いた。次に探索された前駆イオンの精密質量を得るため、高分解能MSとしてAgilent 1290 infinity LC/Agilent 6550 Accurate-Mass Q-TOF LC/MSを用いた。測定はESI-Negativeにより行った。測定条件をそれぞれ以下に示す。

### [LC条件] (低分解能LC/MS/MS)

LC機種： SHIMADZU prominence LC-20AD

カラム： InertSustainC18 (2.1×100mm 3μm ジーエルサイエンス製)

移動相： A:Water B:20%CH<sub>3</sub>CN-MeOH

|          |                |                 |
|----------|----------------|-----------------|
| 0→10min  | A:95→0、B:5→100 | linear gradient |
| 10→11min | A:B = 0:100    |                 |
| 11→26min | A:0→95、B:100→5 | linear gradient |
| 26→35min | A:B = 95:5     |                 |

|       |             |
|-------|-------------|
| 流量    | : 0.2mL/min |
| カラム温度 | : 40°C      |
| 注入量   | : 10 μL     |

### [MS条件]

機種： Agilent LC/MSD-Trap-XCT

イオン化法： ESI(nega)

Scan Type： Precursorion Scan

Ion spray： -4500V

Ion source temp： 600°C

Collision Energy： -75eV

Declustering Potential： -18eV

|               |       |          |
|---------------|-------|----------|
| プロダクトイオンチャンネル | : 151 | メチルパラベン  |
|               | 165   | エチルパラベン  |
|               | 179   | プロピルパラベン |

[LC 条件] (精密質量 LC/Q-ToF/MS)

LC 機種 : Agilent 1290 infinity LC

カラム : ZORBAX Eclipse Plus C18 (2.1×100mm 1.8μm Agilent 製)

移動相 : A:0.1%HCOOH B:CH<sub>3</sub>CN

0→30min A:90→0、B:10→100 linear gradient

30→31min A:0→90、B:100→10 linear gradient

31→40min A:B = 90:10

流量 : 0.2mL/min

カラム温度 : 40°C

注入量 : 1μL

[MS 条件]

機種 : Agilent 6550 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS

イオン化法 : ESI(nega)

Scan Type : Auto-MSMS

Ion spray: 4000V

Ion source temp: 600°C

Collision Energy: 30 eV

Declustering Potential:120V

### 2.3 試料処理方法

試料処理の概要を Fig.1 に示す。前日にエチルパラベンを含むドリンク剤を摂取した翌日の尿を尿試料とした。尿試料 2mL にアセトニトリルを 2mL 加えた後、事前にアセトン 6mL、アセトニトリル 6mL、メタノール 6mL、蒸留水 6mL で順次コンディショニングを行った C18 固相カートリッジに通水し、固相を通り抜けたパラベン抱合体を含むアセトニトリル溶液を試験管に捕集した。その後、固相カートリッジに、メタノール 6mL を添加し、固相に保持されたパラベン抱合体の一部とパラベンを溶出させ、前の操作で回収したアセトニトリル溶液と合わせ全量を約 10mL とした。その溶液を N<sub>2</sub> ガスにて約 4mL まで濃縮し、メンブランフィルターでろ過後、アセトニトリルを加えて全量 4mL の試料溶液とした。

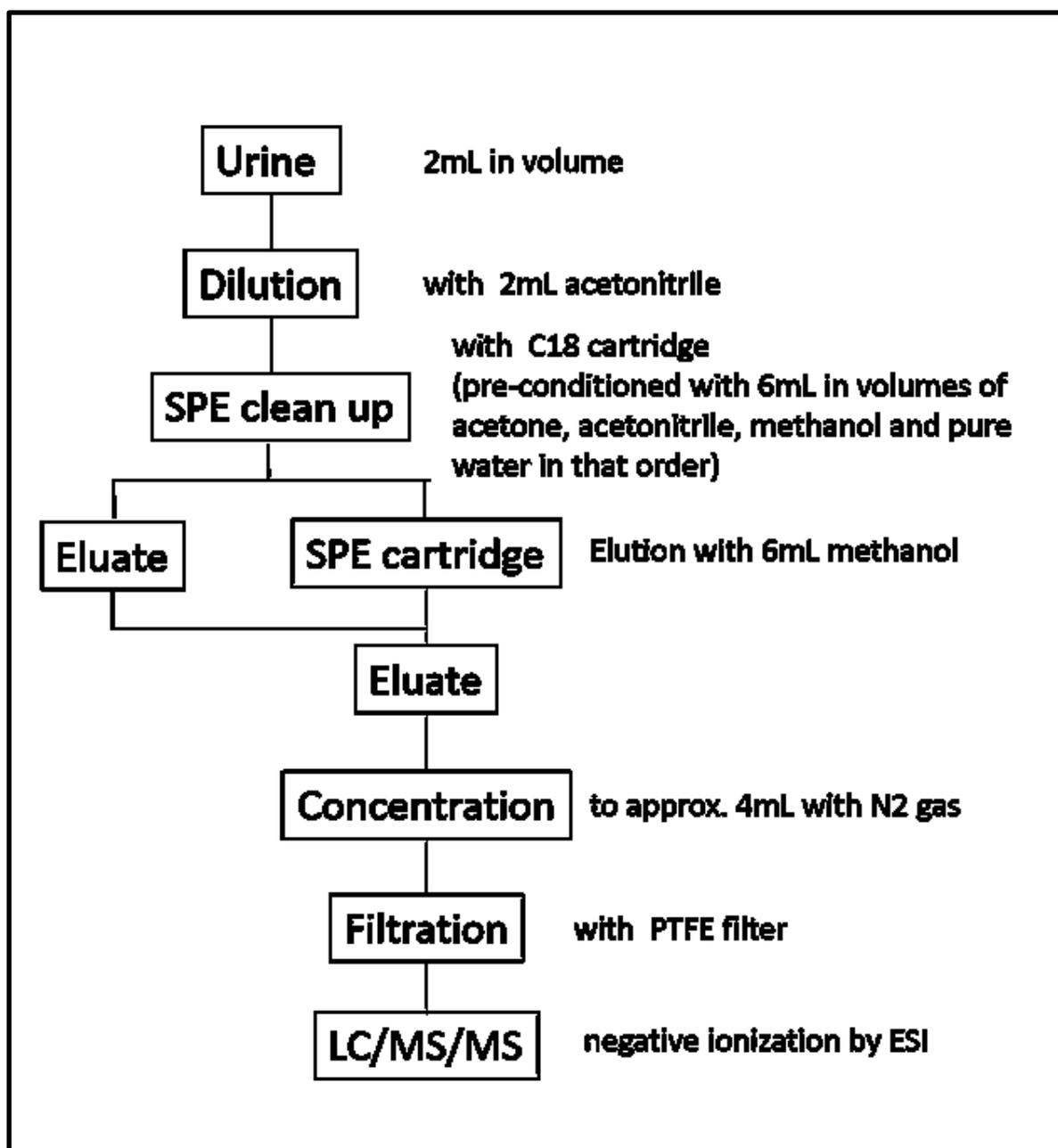


Fig.1 Analysis scheme of parabens and paraben conjugates in human urine

## 2.4 質量分析法によるパラベン抱合体の同定方法

### 2.4.1 パラベン類抱合体同定の原理

質量分析で生成するイオンは余剰なエネルギーが与えられると解離し、その物質の原料のイオンがしばしば観測される。Diels-Alder 反応生成物のイオン化では逆反応による共役ジエンのイオンが、また、フタル酸エステルイオン化では加水分解物であるフタル酸イオンがフラグメントイオンとして生成することはよく知られている。

パラベンは抱合物質とエーテルを形成しているとされ、質量分析では衝突誘起解離 (CID) によりパラベン抱合体が開裂し、パラベン [M-H]<sup>-</sup> イオンが生成すると考えられる。そこで、低分解能 LC/MS/MS を用いプリカーサーイオンスキャンを行った。LC/MS/MS 装置の後段の MS でパラベンの [M-H]<sup>-</sup> に相当するイオンをモニターし、前段の MS をスキャンしてパラベンの [M-H]<sup>-</sup> に相当するイオンを生成する前駆イオンのスペクトルを得た。

前駆イオン MS スペクトルを解析し、整数質量のパラベン抱合体の一次候補を得た。

LC/Q-TOF/MS を用いて、低分解能 MS のプリカーサーイオンスキャンによって得られたパラベン抱合体の一次候補の精密質量を測定した。

### 2.4.2 プリカーサーイオンスキャンによるパラベン抱合体一次候補の探索

Fig. 1 に従って調製した尿試料を低分解能 LC/MS/MS によるプリカーサーイオンスキャンで分析した。メチル、エチル、プロピル、ブチル、ベンジルパラベンのそれぞれの [M-H]<sup>-</sup> をプロダクトイオンとする前駆イオンスキャン測定を行い、パラベン抱合体の一次候補のイオンのクロマトグラムとその低分解能質量スペクトルを得た。低分解能質量であるため、ここで得た質量スペクトルからは抱合体候補の元素組成などの推定は行えない。他方、LC/Q-ToF/MS で精密質量を得るにはプリカーサーイオンスキャンは行えないため、この方法による前駆イオンの探索が必要である。

### 2.4.3 LC/Q-ToF/MS によるパラベン抱合体候補の精密質量分析

低分解能 LC/MS/MS によって得られた前駆イオンの精密質量を確認するため、LC/Q-ToF/MS による測定を行った。LC/Q-ToF/MS では、前段の質量分離部 (Q1) が四重極型 MS で低分解能であるため、前駆イオンスキャンで前駆イオンの精密質量は得られない。そこで、LC/Q-ToF/MS の衝突エネルギーの高/低を高速 (100ms 程度) で切り替え、CID を行わないイオンと CID を行ったイオン (MS/MS のプロダクトイオンに相当するイオンが含まれる。以下フラグメントイオンと称する。) の精密質量スペクトルを交互に並行して収集した。

#### 2.4.4 パラベン抱合体候補の探索

パラベン類抱合体の一次候補のイオンと対応するパラベン類のイオンに相当するフラグメントイオンの精密質量を解析し、それぞれの元素組成を求めた。また、以下の式によりパラベン抱合基の精密質量とその元素組成を求めた。

抱合基の質量＝

$$(\text{前駆イオンの質量}) - (\text{パラベンの質量}) - (\text{Hの質量}) + (\text{H}_2\text{Oの質量})$$

演算で求めた抱合基の元素組成と化学構造データベース ChemSpider<sup>19)</sup>、推定される保持時間からその構造を推定した。元素組成と一致する化学構造を ChemSpider<sup>26)</sup> から文献出現頻度が高い順にすべて検索した。検索された化学種のうちパラベンと抱合体を生成する可能性のない化学構造のものを除外し、フラグメントイオンの元素組成がパラベン類の化学構造と矛盾しないものを選び二次候補とした。それらのオクタノール/水分配係数推定値 ( $\log K_{ow}$ ) を Chem3D Pro13.0<sup>27)</sup> 及び EPIsuite<sup>28)</sup> を用いて推定した。 $\log K_{ow}$  と逆相 LC の保持時間との間には、ある程度の相関があることから、パラベン抱合体一次候補のうち  $\log K_{ow}$  値が LC の保持時間と矛盾するものを除外し、さらにそこから、尿中代謝物として考えられない構造のものも除外し、パラベン抱合体候補物質とした。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 プリカーサーイオンスキャンによるパラベン抱合体一次候補イオンの探索

Fig. 2 に、低分解能 LC/MS/MS を用いたプリカーサーイオンスキャンにより得られたパラベン類の抱合体の MS スペクトルを示す。エチル、ベンジルパラベンについてはグルクロン酸抱合体、メチル、エチル、プロピル、ベンジルパラベンについては硫酸抱合体に相当するイオンがそれぞれ確認された。それ以外の抱合体候補イオンも、例えば Fig. 2 のメチルパラベン、プロピルパラベンの前駆イオンスペクトルに観測される。

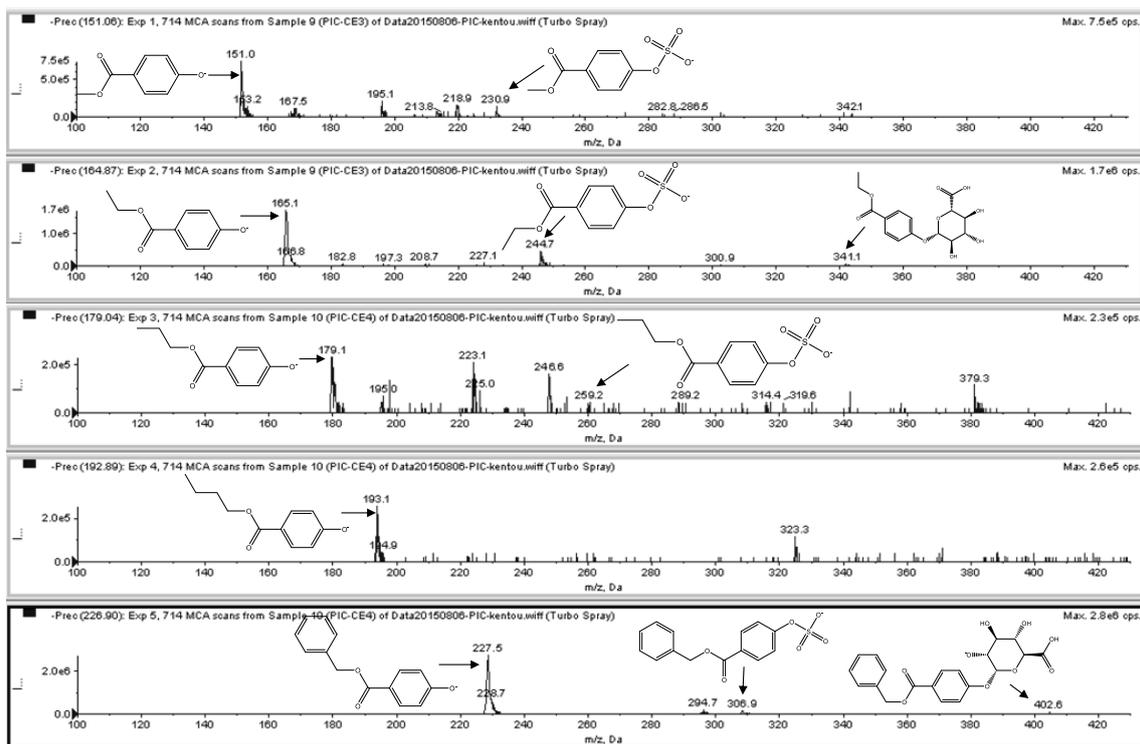


Fig. 2 Precursor ion mass spectra of methyl-, ethyl-, propyl-, butyl- and benzyl parabens in human urine.

前駆イオンの質量スペクトルには、グルクロン酸抱合体、硫酸抱合体に相当するイオンが観測された。摂取したドリンク剤に含まれるエチルパラベンについては、グルクロン酸抱合体と硫酸抱合体に相当するイオンが明瞭に観測された。メチルパラベン、プロピルパラベンは硫酸抱合体に相当するイオンが確認される一方、グルクロン酸抱合体に相当するイオンは確認されなかった。第4章で考察しているが、パラベン類のグルクロン酸抱合体は硫酸抱合体に比べて検出感度が30倍程度低いことに起因している可能性がある。ブチルパラベンはグルクロン酸抱合体、硫酸抱合体に相当するイオンは観測されなかった。ブチルパラベンの使用量が、メチルパラベン、プロピルパラベンに比べて少ないことによるものと考えられる。ベンジルパラベンは使用量が少ないと考えられるが、グルクロン酸抱合体、硫酸抱合体に相当するイオンが観測された。この原因は明らかではないが、ベンジルパラベンの抱合体の感度が他のパラベン類の抱合体に比べ高い可能性がある。

プリカーサーイオンスキャンは、以上のように尿中のパラベンの抱合体の候補を全貌できる点で優れた方法であった。

### 3.2 LC/Q-ToF/MS の精密質量分析によるパラベン抱合体の同定および推定

低分解能 LC/MS/MS により得られたパラベン類それぞれの抱合体に相当するイオンについて LC/Q-ToF/MS による精密質量の測定を実施した。Fig. 3 に得られたメチル、エチル、プロピルパラベンとそのグルクロン酸抱合体、硫酸抱合体の精密質量のクロマトグラムを示す。

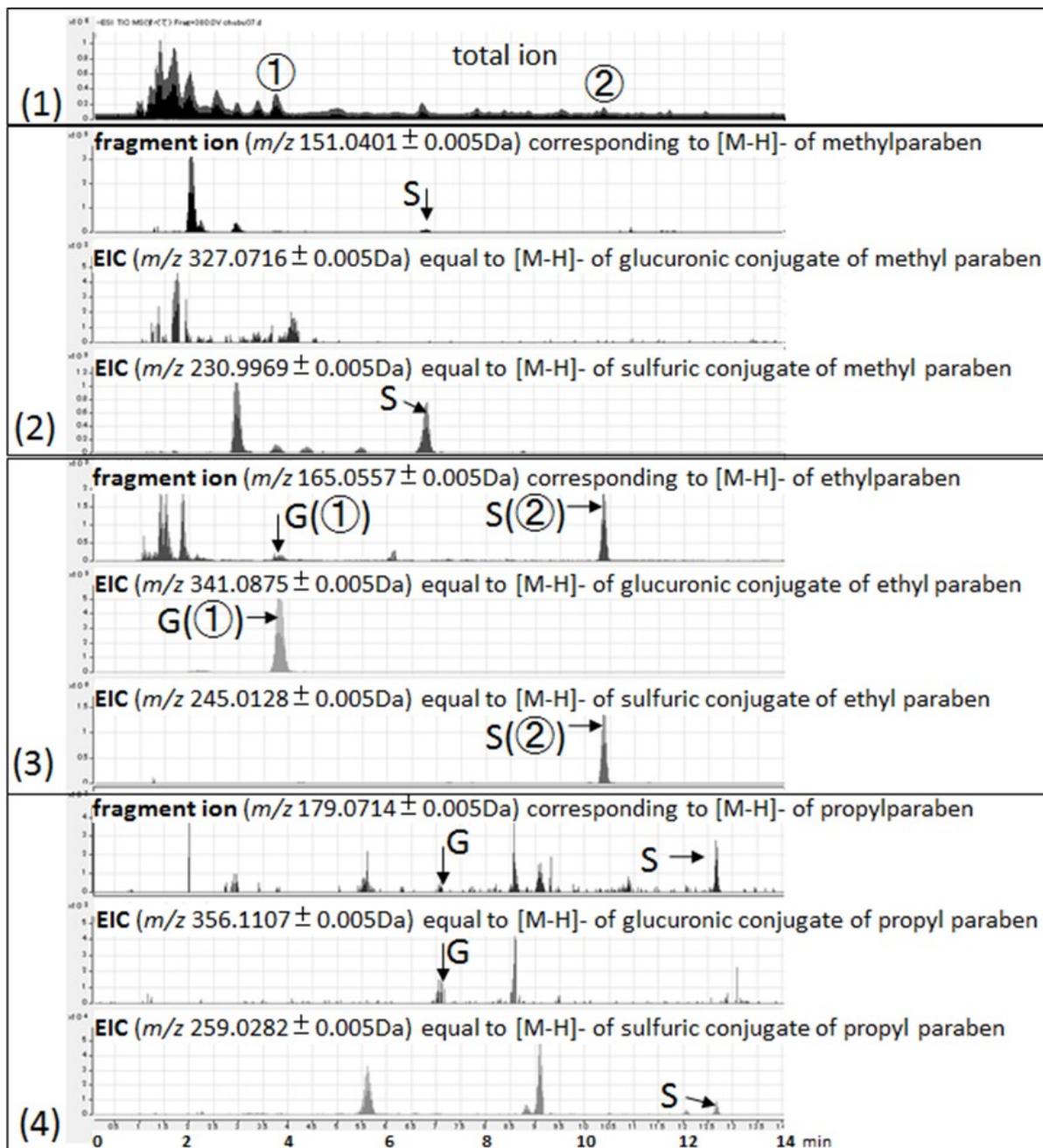


Fig. 3 Extracted ion chromatograms corresponding to [M-H]<sup>-</sup> ions of glucuronic and sulfuric conjugates of methyl-, ethyl and propylparaben, and extracted fragment ion chromatograms equal to [M-H]<sup>-</sup> ions of the three parabens in human urine alternatively measured by LC/Q-ToF MS.

Fig. 3 の (1) は LC/Q-ToF/MS によって得られた Total ion のクロマトグラム、(2) はメチルパラベン、グルクロン酸抱合体メチルパラベン、硫酸抱合体メチルパラベンの精密質量に相当するイオンのクロマトグラム、(3) はエチルパラベン、エチルパラベンのグルクロン酸抱合体、エチルパラベンの硫酸抱合体に相当するイオンの精密質量のクロマトグラム、(4) はプロピルパラベン、グルクロン酸抱合体プロピルパラベン、硫酸抱合体プロピルパラベンに相当するイオンの精密質量クロマトグラムをそれぞれ示す。測定の結果、前駆イオンである抱合体パラベンとフラグメントイオンであるそれぞれのパラベン類についていくつか保持時間の一致するピークが得られた。これらの結果を元にパラベン類の抱合体について推定を行った。

最初にエチルパラベンの抱合体について推定を行った。Fig. 3 の (3) のクロマトグラムで、精密質量の『前駆イオン』が比較的高濃度で出現した保持時間 3.8min 付近のピーク①と 10.3min 付近のピーク②について述べる。これらのピークの精密質量スペクトルには、それぞれエチルパラベンのグルクロン酸と硫酸抱合体の [M-H]<sup>-</sup> に相当する m/z-341.0875 (1.5ppm の精度で C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>O<sub>9</sub> と一致) と m/z-245.0138 (1.5ppm の精度で C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>SO<sub>6</sub> と一致)、およびエチルパラベン [M-H]<sup>-</sup> とそのフラグメントイオンに相当する m/z165.0553、137.0239、92.0264 がパラベン類の分子構造を反映するため、これら①と②はそれぞれエチルパラベンのグルクロン酸抱合体と硫酸抱合体分子の [M-H]<sup>-</sup> と考えられた。次に同様の方法により、Fig. 3 (2) のメチルパラベンについて推定を行った。エチルパラベンで推定されたグルクロン酸抱合体のピークと硫酸抱合体のピーク及びパラベン類の LogK<sub>ow</sub> を用いて推定した保持時間から、6.8min 付近のピークはメチルパラベンの硫酸抱合体の [M-H]<sup>-</sup> に相当するイオンであると考えられる。Fig. 3 (4) のプロピルパラベンについては、エチルパラベンと同様にグルクロン酸抱合体と硫酸抱合体およびパラベン類の LogK<sub>ow</sub> を用いて各ピークの保持時間を推定し、12.3min 付近にプロピルパラベンの硫酸抱合体、7.1min 付近にプロピルパラベンのグルクロン酸抱合体とそれぞれ考えられるピークを探索した。Fig. 3 (2) のメチルパラベンではグルクロン酸抱合体のピークは確認されなかった。今回 Fig. 3 に示してはいないが、ブチルパラベン、ベンジルパラベンの硫酸抱合体、グルクロン酸抱合体の有無を調べたが、感度不足により元素組成の推定は困難であった。

次に、エチルパラベンのグルクロン酸抱合体、硫酸抱合体と推定したピーク①と②について詳細な同定を行った。精密質量から導いた組成式はそれぞれ①が C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>、②が C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>SO<sub>6</sub> である。この組成から、パラベンの抱合基の組成を「2.2.4.4」に記した方法で演算すると、①と②の抱合物質の組成はそれぞれ C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> となり、それらの組成式に対応する分子構造を ChemSpider で検索

した。ピーク②の組成  $H_2SO_4$  に対応する分子構造は硫酸のみであった。ピーク①の組成  $C_6H_{10}O_7$  に対応する分子構造の候補はグルクロン酸を含む 96 種が検索され、そこから同一物質と考えられるものを除くと 89 種の候補が残った。このうち抱合物質として報告があるものはグルクロン酸のみであった。さらに、尿試料をグルクロン酸および硫酸の脱抱合酵素グルクロニダーゼにより処理するとそれらの SRM のクロマトグラム (Fig. 4) から、ピーク①およびピーク②が消失または縮小した。これらの結果から、ピーク①はエチルパラベンのグルクロン酸抱合体、ピーク②は硫酸抱合体 と同定した。同定された硫酸とグルクロン酸は、これまでに数多く報告されているパラベンの抱合基である。それらがエチルパラベンの硫酸抱合体、グルクロン酸抱合体を形成していることが、本研究でも合理的に説明できた。

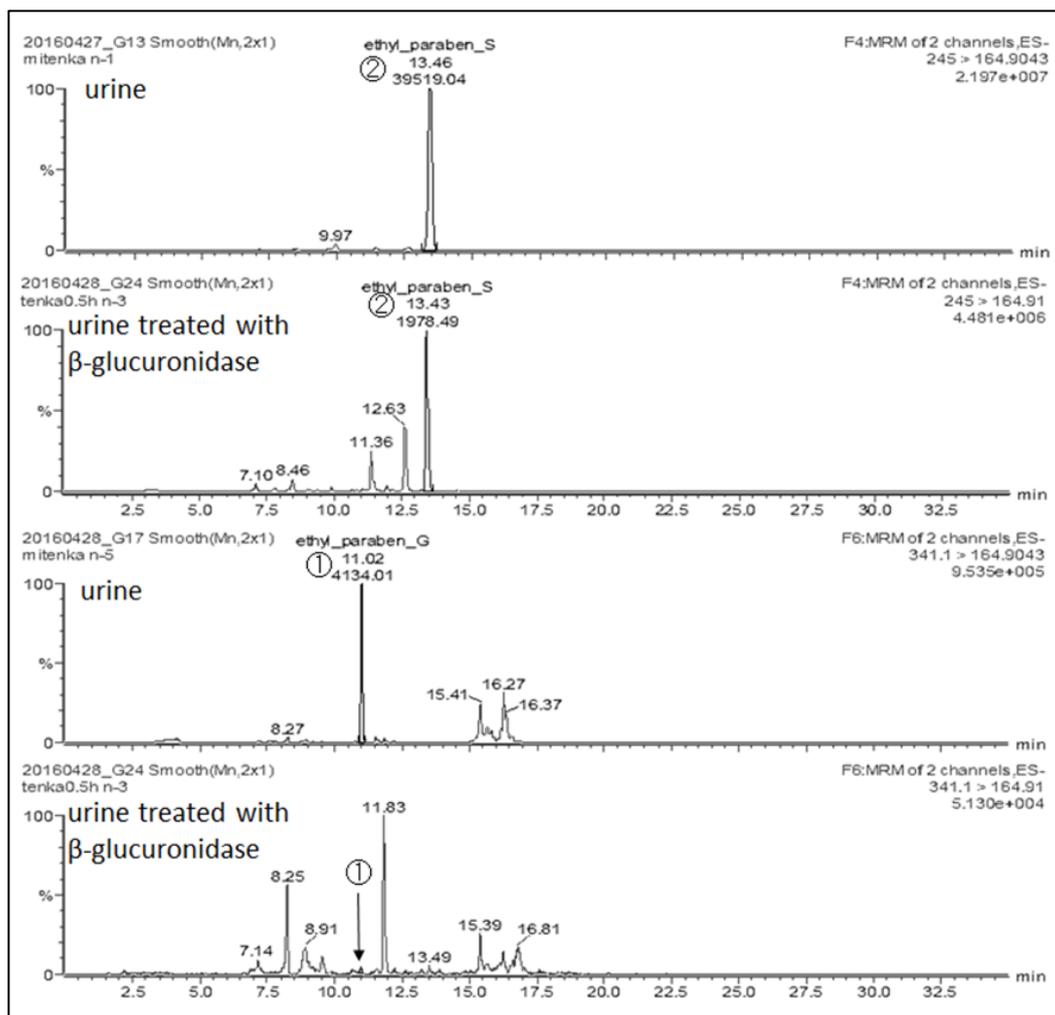


Fig.4 SRM chromatograms of ethylparaben conjugates in urine before and after being treated with glucuronidase.

①glucuronic acid conjugate of ethylparaben, ②sulfuric acid conjugate of ethylparaben. the peak numbers of ① and ② are the same numbers as in Fig.3.

top pane: urine sample monitored with  $m/z$  -341  $\rightarrow$  -165, corresponding to a collision of ethylparaben glucuronate.

2nd pane: urine treated with glucuronidase monitored with the same ion set of the 3rd pane.

3rd pane: urine sample monitored with  $m/z$  -245  $\rightarrow$  -165, corresponding to a collision of ethylparaben sulfates.

bottom pane: urine treated with glucuronidase monitored with the same ion set of the top pane.

#### 4. まとめ

プリカーサーイオンスクランおよび精密質量分析によってパラベン類の抱合体の探索を行った。これらの方法はパラベン類以外の他の化合物においても抱合体の探索に有効であると考えられ、これまでの報告にあるターゲットを絞った酵素反応等による方法とは異なり、抱合体のターゲットを絞らずに網羅的に調査できる方法である。なお、LC/Q-ToF/MS による精密質量分析の結果からも、更にいくつかのパラベン類の抱合体の可能性のある組成式が得られている (Table1)。イオン強度が不十分であるため、同定には至らないが、グルクロン酸、硫酸以外にも、パラベンに抱合している物質の存在可能性が示唆された。

Table 1

| パラベン類との抱合体が示唆される組成式一覧 |  |         |
|-----------------------|--|---------|
|                       | 組成式  | 精密質量    |
| 1                     | C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | 148.160 |
| 2                     | C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>  | 108.096 |
| 3                     | C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | 134.134 |
| 4                     | C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>                | 210.182 |

## 【参考文献】

- (1) Sasseville D. Hypersensitivity to preservatives. *Dermatol Ther.* 2004;17(3): 251-63.
- (2) von Woedtke T、 Schluter B、 Pfliegel P、 et al. Aspects of the antimicrobial efficacy of grapefruit seed extract and its relation to preservative substances contained. *Pharmazie.* 1999 Jun;54(6):452-6.
- (3) Brandin H、 Myrberg O、 Rundlof T、 et al. Adverse effects by artificial grapefruit seed extract products in patients on warfarin therapy. *Eur J Clin Pharmacol.* 2007 Jun;63(6):565-70.
- (4) Schirmer BC、 Langsrud S. Evaluation of natural antimicrobials on typical meat spoilage bacteria in vitro and in vacuum-packed pork meat. *J Food Sci.* 2010 Mar;75(2):M98-M102.
- (5) Kunicka-Styczynska A、 Sikora M、 Kalembe D. Antimicrobial activity of lavender、 tea tree and lemon oils in cosmetic preservative systems. *J Appl Microbiol.* 2009 Dec;107(6):1903-11.
- (6) Fratianni F、 De Martino L、 Melone A、 et al. Preservation of chicken breast meat treated with thyme and balm essential oils. *J Food Sci.* 2010 Oct;75(8):M528-35.
- (7) Hakkim FL、 Mathiraj、 Essa MM、 et al. Evaluation of food protective property of five natural products using fresh-cut apple slice model. *Pak J Biol Sci.* 2012 Jan;15(1):10-8.
- (8) Cashman AL、 Warshaw EM. Parabens: a review of epidemiology、 structure、 allergenicity、 and hormonal properties. *Dermatitis.* 2005 Jun;16(2):57-66.
- (9) Sasseville D. Hypersensitivity to preservatives. *Dermatol Ther.* 2004;17(3): 251-63.
- (10) Soni MG、 Carabin IG、 Burdock GA. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food Chem Toxicol.* 2005 Jul;43(7): 985-1015.
- (11) Cosmetic Ingredient Review Expert Panel. Final amended report on the safety assessment of Methylparaben、 Ethylparaben、 Propylparaben、 Isopropylparaben 、 Butylparaben 、 Isobutylparaben 、 and Benzylparaben as used in cosmetic products. *Int J Toxicol.* 2008;27(Suppl 4):1-82.
- (12) Cashman AL、 Warshaw EM. Parabens: a review of epidemiology、

- structure, allergenicity, and hormonal properties. *Dermatitis*. 2005;16:57-66.
- (13) Darbre PD, Harvey PW. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *J Appl Toxicol*. 2008 Jul;28(5):561-78.
- (14) Pedersen S, Marra F, Nicoli S, et al. In vitro skin permeation and retention of parabens from cosmetic formulations. *Int J Cosmet Sci*. 2007 Oct;29(5):361-7
- (15) Darbre PD, Aljarrah A, Miller WR, et al. Concentrations of parabens in human breast tumours. *J Appl Toxicol*. 2004 Jan;24(1):5-13.
- (16) Frederiksen H, Jorgensen N, Andersson AM. Parabens in urine, serum and seminal plasma from healthy Danish men determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 2011 May;21(3):262-71.
- (17) Meeker JD, Yang T, Ye X, et al. Urinary concentrations of parabens and serum hormone levels, semen quality parameters, and sperm DNA damage. *Environ Health Perspect*. 2011 Feb;119(2):252-7.
- (18) Ye X, Bishop AM, Needham LL, et al. Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method with peak focusing for measuring parabens, triclosan, and other environmental phenols in human milk. *Anal Chim Acta*. 2008 Aug;622(1-2):150-6.
- (19) Barr L, Metaxas G, Harbach CA, et al. Measurement of paraben concentrations in human breast tissue at serial locations across the breast from axilla to sternum. *J Appl Toxicol*. 2012 Mar;32(3):219-32.
- (20) Calafat AM, Ye X, Wong LY, et al. Urinary concentrations of four parabens in the U.S. population: NHANES 2005-2006. *Environ Health Perspect*. 2010 May;118(5):679-85.
- (21) Lei Wang, et al. Profiles of Urinary p-Hydroxybenzoic Acid and its Esters (Parabens) in Children and Adults from the United States and China: *Environ. Sci. Technol*. 2013, 47 (4), pp 2069-2076
- (22) Schlittenbauer, Seiwert, Reemtsma. Ultrasound-assisted hydrolysis of conjugated parabens in human urine and their determination by UPLC-MS/MS and UPLC-HRMS: *Anal Bioanal Chem*. 2016 Feb;408(6):1573-83. doi: 10.1007/s00216-015-9265-2. Epub 2016 Jan 11.

- (23) Frederiksen, Jørgensen, Andersson. Parabens in urine, serum and seminal plasma from healthy Danish men determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS): J Expo Sci Environ Epidemiol. 2011 May-Jun;21(3):262-71. doi: 10.1038/jes.2010.6. Epub 2010 Mar 10.
- (24) Hanne Frederiksen, Niels Jørgensen and Anna-Maria Andersson. Parabens in urine, serum and seminal plasma from healthy Danish men determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS): Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology (2011) 21, 262-271; doi:10.1038/jes.2010.6; published online 10 March 2010.
- (25) Cashman AL, Warshaw EM. Parabens: a review of epidemiology, structure, allergenicity, and hormonal properties. Dermatitis. 2005;16:57-66.
- (26) ChemSpider<sup>19</sup>:The Royal Society of Chemistry
- (27) Chem3D Pro13 : PerkinElmer, Waltham, MA, USA
- (28) United States Environmental Protection Agency, EPI Suite™-Estimation Program Interface.
- (29) S.M. Petrovic, E. Loncar, Lj. Kolarov and V. Pejanovic, Correlation Between Retention and 1-Octanol-Water  
<https://www.epa.gov/tsca-screening-tools/epi-suite-estimation-program-interface>.
- (30) Partition Coefficients of Some Estrane Derivatives in Reversed-Phase Thin-Layer Chromatography, Journal of Chromatographic Science, Vol. 40, pp170-175, November/December 2002.

#### 謝辞

本研究に関連して、精密質量測定および元素組成演算に関連して多くのご協力をいただいたアジレントテクノロジー株式会社アプリケーションセンターの滝埜昌彦博士、また本研究にご助言いただいた吉永淳東洋大学教授に感謝申し上げます。

#### IV. LC/MS/MS による尿中エチルパラベン抱合体の酵素分解挙動の分析とその LC/MS/MS 間接定量法の研究

##### 1. はじめに

これまでの研究により、人体に摂取されたパラベン類はその大部分 (9 割以上) が体内の代謝酵素により腸及び肝臓においてパラヒドロキシ安息香酸への加水分解やグルクロン酸、硫酸と修飾されて抱合体として尿中に排出されている<sup>1-5)</sup> ことが知られている。

人が摂取したパラベン類の量を推定するには、飲食物、入浴、洗顔、化粧、整髪等で使用した生活用品の量とそれぞれに含まれるパラベン類の全てを分析するか、摂取後その大部分が代謝される尿中のパラベン類とその抱合体を分析することになる。前者は、パラベン類を分析する対象が飲食物、生活用品すべてであるため実施は困難である。後者の方法として、尿試料を脱抱合酵素により解離させ Free 体のパラベン類と脱抱合により解離したパラベン類を合わせて分析する方法<sup>6)</sup>があり、グルクロン酸抱合体及び硫酸抱合体濃度に限ると、 $\beta$ -glucuronidase と arylsulfatase を使用して抱合体をパラベンに解離させ、パラベン濃度として測定し、その濃度から酵素反応なしで測定したパラベンの濃度を減算して、抱合体の濃度を求める方法が報告されている<sup>1)</sup>。尿試料中のパラベン類の調査結果はいくつか報告されており、それらをまとめると Free 体のパラベン類ではメチルパラベンとプロピルパラベンの検出率が最も高く共に 9 割以上であること、そして抱合体として排出されているパラベン類の割合が高く、硫酸抱合体が 6 割程度、グルクロン酸抱合体が 3 割程度であったと報告されている<sup>7-11)</sup>。

パラベン類の代謝物にはパラヒドロキシ安息香酸も含まれるが、パラヒドロキシ安息香酸はパラベン類以外からも代謝されているため、パラベン摂取のバイオマーカーとすることは難しい。このことについて、パラヒドロキシ安息香酸は非特異的な代謝産物であるため、特定の物質の代謝と関連づけることは望ましくないとの報告がある<sup>12)</sup>。

酵素反応により脱抱合させて分析する従来のパラベン抱合体の分析方法では、酵素処理を行うため都度前処理が必要となる点、2 種類の抱合体を同時に酵素処理するため、個々の抱合体濃度を定量的に把握することが困難な点が挙げられる。

パラベン類の抱合体を  $\beta$ -glucuronidase などに代表される脱抱合酵素により加水分解し得られた Free 体のパラベン類を測定した報告は、この節で既に紹介したが、パラベン類の抱合体そのものを定量したという報告は見当たらない。その理由としては、パラベン類の抱合体の標準物質が市販されておらず、抱合

体を直接定量することが困難な点があげられる。著者らは、今回の研究に先立って純正化学(株)より販売されている 2, 3, 4-トリ - 0 - アセチル - 1 - 0 - (トリクロロアセトイミドイル) -  $\alpha$  - D - グルクロン酸メチルを用いてエチルパラベンのグルクロン酸抱合体の合成を試みたが、良好な結果が得られず合成を断念した。理由としては、合成試薬自体が加水分解の影響を受けやすく水分を極力排除した実験系でなければ抱合体の合成が難しいこと、また仮に抱合体の標準試薬の化学合成、生合成したものを精製するなどを、その能力を有する外部機関に依頼出来た場合でも、高額な費用がかかると考えられるため、標準試薬により抱合体を直接定量する方法の開発は難しいと判断した。

第 3 章で述べたこれまでの著者らの研究<sup>13)</sup>で、パラベン類の尿中の主要な抱合体としてグルクロン酸抱合体と硫酸抱合体が観測されることを明らかにした。他のパラベン抱合体の存在を否定する結果ではないが、前駆イオンスキンの結果は、尿試料の中に他の抱合体を示唆するイオンは見いだされなかった。これらのことから、パラベンのグルクロン酸抱合体、硫酸抱合体を複合酵素により同時に分解させ、それぞれの抱合体の LC/MS (SRM) クロマトグラムのピーク面積の減少量と分解によって増加した Free 体パラベンの定量値との因果関係を定量的に求めた。

パラベンのグルクロン酸抱合体、硫酸抱合体それぞれの SRM クロマトグラムのピーク面積の減少と酵素分解反応の経過時間を解析した結果、グルクロン酸抱合体、硫酸抱合体は、それぞれ「見かけ上は 1 次反応」であることを見いだした。このことは、パラベンの濃度は、2 種類の抱合体の SRM クロマトグラムのピーク面積値を変数とする一次方程式で表現できることを意味している。酵素分解の各経過時間で、時間の変数である 2 つの抱合体のピーク面積値とパラベン濃度を求めて、この一次方程式の係数、定数を決定し、パラベン類のグルクロン酸抱合体と硫酸抱合体の濃度をそれぞれ間接定量できることを、以下の研究で明らかにした。

## 2. 方法

エチルパラベンを含むドリンク剤を摂取して得られた尿に  $\beta$ -glucuronidase/arylsulfatase を作用させ、エチルパラベンのグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体のピーク面積の減少とエチルパラベンの濃度の増加の時間変化の観測とその結果を用いたグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体の間接定量法を検討した。

## 2.1 試薬・器具

分析法の検討に使用した試薬及び実験器具を以下に示す

### 【試薬】

ethyl 4-Hydroxybenzoate (東京化成 特級)

アセトン Acetone (関東化学 残留農薬試験用)

メタノール Methanol (関東化学 LC/MS 用)

ギ酸 Fomic Acid (和光純薬 LC/MS 用)

アセトニトリル Acetonitril (Merck-Millipore LC/MS 用)

超純水 Ultra Pure Water (関東化学 LC/MS 用)

$\beta$ -glucuronidase/arylsulfatase (Cat. No. 10127060001、from Helix pomatia  $\beta$ -D-Glucuronide glucuronosohydrolase / aryl-sulphate sulphohydrolase EC 3.2.1.31 / EC 3.1.6.1)2、3、4-トリクロロアセトイミドイル- $\alpha$ -D-グルクロン酸メチル (純正化学製 生化学試験用)

### 【器具】

ABS ELUT-NEXUS、200MG 6ML、30/PK (Agilent)

Mini-UniPrep filter vial (General Electric Company)

### 【標準液の調製】

エチルパラベンの標準試薬をそれぞれ 10mg 正確に量り取り、メタノールで 10 mL に定容し 1000mg/L の標準原液を作成した。

### 【検量線用標準液の作成】

1000mg/L の標準原液をメタノールで適時希釈した後、最終液量の濃度として 1.0  $\mu$ g/L から 200  $\mu$ g/L の範囲で検量線用標準液を作成した。

## 2.2 エチルパラベンの LC/MS 定量分析条件

LC/MS による測定は Waters 製 ACQUITY UPLC H-class/Xevo TQ-S micro を用いて、定量は ESI-Negative-SRM モードにより行った。測定条件を以下に示す。

[LC 条件]

LC 機種 : Waters ACQUITY UPLC H-class

カラム : ACQUITY UPLC HSS T3 (3.0×100mm、1.8 μm) Waters 製

移動相 : A:Water B:CH<sub>3</sub>CN C:50mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>

0→1.2min A:85、B:10、C:5

1.2→20min A:85→0、B:10→95、C:5 linear gradient

20→24min A:0、B:95、C:5

24→26min A:0→85、B:95→10、C:5 linear gradient

26→36min A:85、B:10、C:5

流量 : 0.2mL/min

カラム温度 : 40°C

注入量 : 10 μL

[MS 条件-2]

機種 : Waters 製 Xevo TQ-S micro

イオン化法 : ESI (nega) SRM

Ionization mode : ESI-Negative

Capillary : 0.5kV

Cone Voltage : 50V

Desolvation Temp : 500°C

Desolvation Flow : 700L

Cone Flow : 50L

Collision Energy MS : 3V

モニターイオン :

165 > 92 エチルパラベン

341.1 > 164.9 エチルパラベンのグルクロン酸抱合体

245 > 164.9 エチルパラベンの硫酸抱合体

### [検量線]

検量線用標準液 10  $\mu$ L を LC/MS に注入し、得られた標準物質のピーク面積と濃度から検量線を作成した。エチルパラベンの検量線は 1  $\mu$ g/L から 200  $\mu$ g/L の濃度範囲において相関係数 0.99 以上で良好な直線性を示した。クロマトグラムの一例を Fig. 1 に検量線を Fig. 2 に示す。

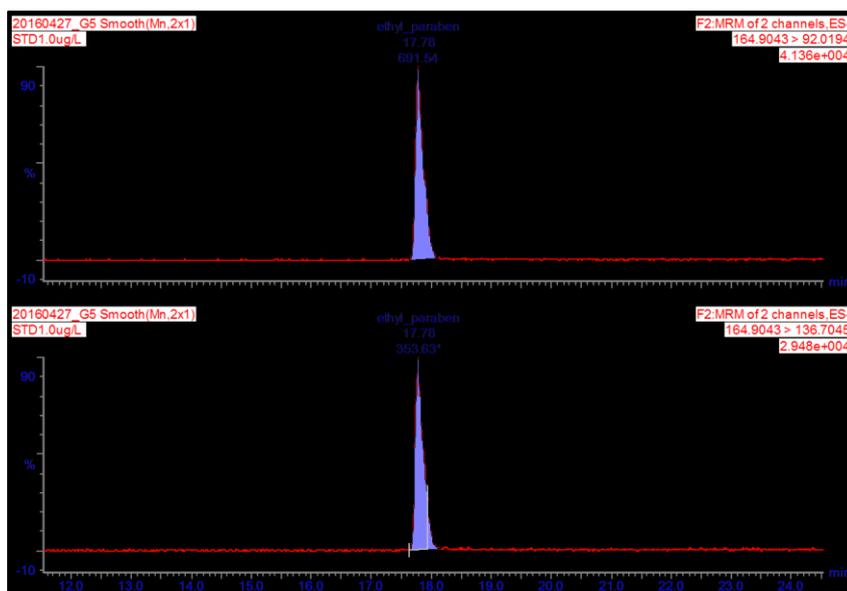


Fig. 1 エチルパラベンのクロマトグラム

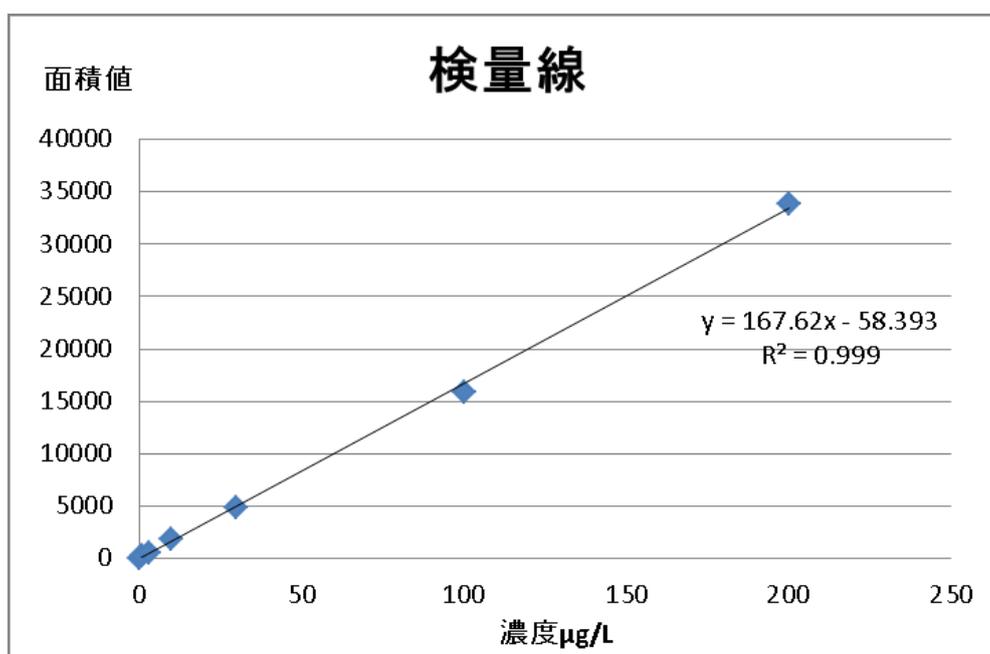


Fig. 2 検量線

### 2.3 試料処理方法

分析フローを Fig. 3 に示す。試験に使用する尿試料は、著者が前日の夜にエチルパラベンを高濃度に含むサプリメントを摂取し、翌日の第一尿の全量 (430 mL) を試料とした。尿試料は 50mL ずつ分注し、 $-20^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存した。冷凍された尿試料を室温にて自然解凍した後、3000rpm で 10 分間遠心分離を行った。その後、上澄み液を精確に 50mL、2 本に取り分けた。少量の 23mol/L ギ酸を用いてそれぞれの pH を pH4.3 と pH5.6 に調整した。これらは、予備試験においてエチルパラベンのグルクロン酸及び硫酸抱合体それぞれの高い脱抱合反応速度が個々に得られている。pH 調整した各試料に、それぞれ  $\beta$ -glucuronidase/arylsulfatase を  $40\ \mu\text{L}$  添加した。その後、調整した尿試料をそれぞれ 10mL ずつ 5 つの試験管に取り分け、 $37^{\circ}\text{C}$  の水浴条件下でグルクロン酸抱合体及び硫酸抱合体の加水分解を行った。反応時間がそれぞれ 0、1、3、10、30、60、120、および 180 分後にそれぞれの試験管から精確に 1mL 分取した。その後、試料中のタンパク成分の除去のためアセトニトリル 1mL を添加し 30 秒攪拌させた後、ABS Elut-NEXUS カートリッジを用いて前処理を行った。具体的には、事前に、アセトン、アセトニトリル、メタノールの順にそれぞれ 6mL で洗浄し、最後に超純水で 12mL 洗浄したカートリッジに上記手順で調製した試料 2mL とメタノール 8mL を通液し、溶出液をメタノールで 10mL に定容した。その後、Mini-UniPrep filter vial でろ過を行い、試験液とした。

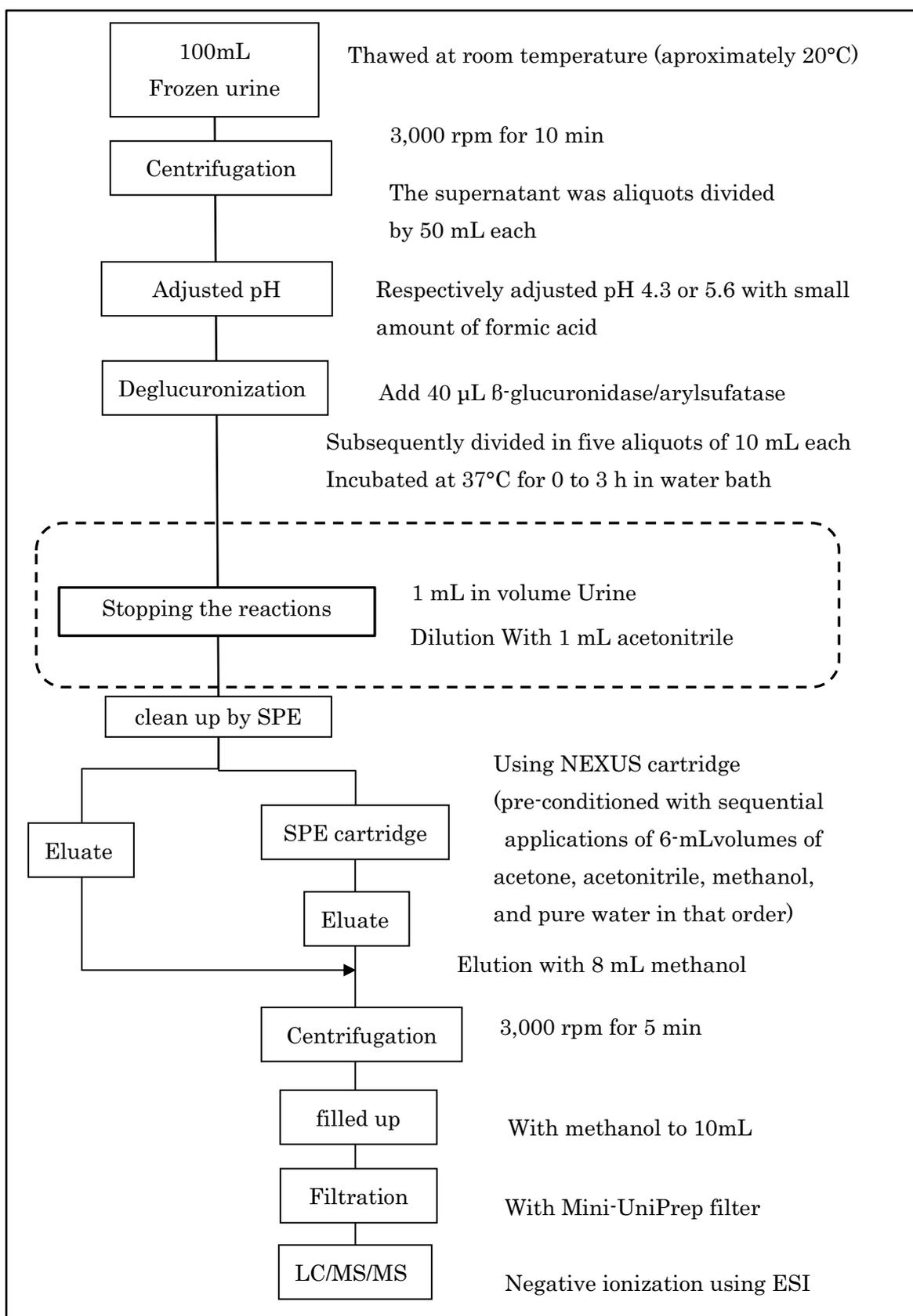


Fig. 3 Analysis scheme of parabens and their conjugates in human urine

### 3. 結果と考察

#### 3.1 尿中エチルパラベン分析法の評価 [尿中エチルパラベンの検出限界 (LOD) 及び定量限界 (LOQ)]

本分析法により尿中のエチルパラベンが定量的に回収されていることを検証するため、Fig. 3 のフローに従って添加回収試験 (n=7) を実施した。結果を Table 1 に示す。尿試料には予めメチルパラベン及びエチルパラベンをそれぞれ 10ng 添加し試験を実施した。試験の結果、コントロール試料からメチルパラベン及びエチルパラベンが検出されたため、回収率の算出にあたっては添加試料の濃度からコントロール試料の濃度を差し引くことで回収率を算出した。Table 1 より、メチルパラベンの平均回収率は 94%、相対標準偏差 (RSD) は 3.7% であり、エチルパラベンの平均回収率は 114%、RSD は 4.7% であった。またメチルパラベンの検出限界 (LOD) 及び定量限界 (LOQ) はそれぞれ 13  $\mu$ g/L 及び 38  $\mu$ g/L であり、エチルパラベンの LOD/LOQ はそれぞれ 22  $\mu$ g/L 及び 66  $\mu$ g/L であった。グルクロン酸及び硫酸抱合体の間接定量で、メチルパラベン及びエチルパラベンの尿試料中濃度は、上述した精度の範囲で測定した。

Table 1 Recovery of methylparaben (M.P.) and ethylparaben (E.P.) from urine sample\*<sup>1</sup>(n=7)

| Substance name                  | Methyl paraben | Ethyl paraben |
|---------------------------------|----------------|---------------|
| Control urine Avg. ( $\mu$ g/L) | 7.9            | 25            |
| Spiked amount [ng]              | 100            |               |
| Recovered Avg. ( $\mu$ g/L)     | 102            | 140           |
| Recovery Avg. [%]               | 94             | 115           |
| RSD (%)                         | 3.7            | 4.7           |
| LOD ( $\mu$ g/L) * <sup>2</sup> | 13             | 22            |
| LOQ ( $\mu$ g/L) * <sup>3</sup> | 38             | 66            |

\*<sup>1</sup> The recovery experiment was performed by adding methylparaben (M.P.) and ethylparaben (E.P.) to control urine.

\*<sup>2</sup> LOD=3.29×S.D. (S.D.: standard deviation obtained with the present study)

\*<sup>3</sup> LOQ=3.04×LOD

### 3.2 $\beta$ -glucuronidase/arylsulfatase による尿中エチルパラベンのグルクロン酸及び硫酸抱合体の脱抱合挙動

本試験を行うにあたり事前に  $\beta$ -glucuronidase/arylsulfatase の最適 pH を考慮し pH を 4.5、5.5、7.2 の 3 条件で予備試験を実施した。その結果、脱抱合反応が良好であった pH 4.5、5.5 付近を本試験に採用した。

$\beta$ -glucuronidase/arylsulfatase を添加した尿サンプル中のエチルパラベンおよびそのグルクロン酸および硫酸抱合体の濃度を、解離反応が開始した 1, 3, 10, 30, 60, 120 および 180 分後に測定した。結果の一例のクロマトグラムを Fig. 4 に示す。Fig. 4 中の左側は脱抱合反応前のクロマトグラムを、右側は脱抱合反応を 180 分行った後のクロマトグラムを示す。脱抱合反応の前後においてグルクロン酸抱合体及び硫酸抱合体エチルパラベンのピーク強度が減少していること、またエチルパラベンのピーク強度が増加していることが確認できる。4-ヒドロキシ安息香酸については脱抱合反応における生成は確認されなかった。

pH 4.3 及び pH 5.6 の条件下で脱抱合反応を行った。その各経過時間と、エチルパラベンのグルクロン酸抱合体、硫酸抱合体の各ピーク面積値、エチルパラベンの濃度の関係をそれぞれ Fig. 5 に示す。Fig. 5 より 10~180 分間の脱抱合反応においてエチルパラベンのグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体のピーク面積は、反応時間に対して明瞭な対数減衰を示した。なお、脱抱合反応の初期 1, 3, 10 分で幾分減衰速度が低いが、これは調製した尿試料が室温で、水浴に入れてから反応温度に達するまで加温不足によるものと考えられる。しかし Fig. 3 に示すとおり、加温不足によるエチルパラベン抱合体の脱抱合反応の速度への影響は、グルクロン酸及び硫酸の抱合体の何れも影響が現れない程度であった。硫酸抱合体の減衰速度は Fig. 5 より pH 4.3 よりも pH 5.6 の方が高かったが、他方グルクロン酸抱合体の減衰速度は両方の pH 条件下でほぼ同等であった。これは、 $\beta$ -glucuronidase の最適 pH が 4.5 付近と酸性付近であり、本試験の pH 4.3、pH 5.6 はいずれも酸性のため差がなかったのに対し arylsulfatase は最適 pH が 6.2 付近と中性付近であるため、酸性度の高い pH 4.3 では pH 5.6 と比べて酵素反応が抑制されたと考えられる。なお、本試験の脱抱合反応で pH 5.6 の結果が良好であったことから、以降の試験操作はすべて pH 5.6 で実施した。

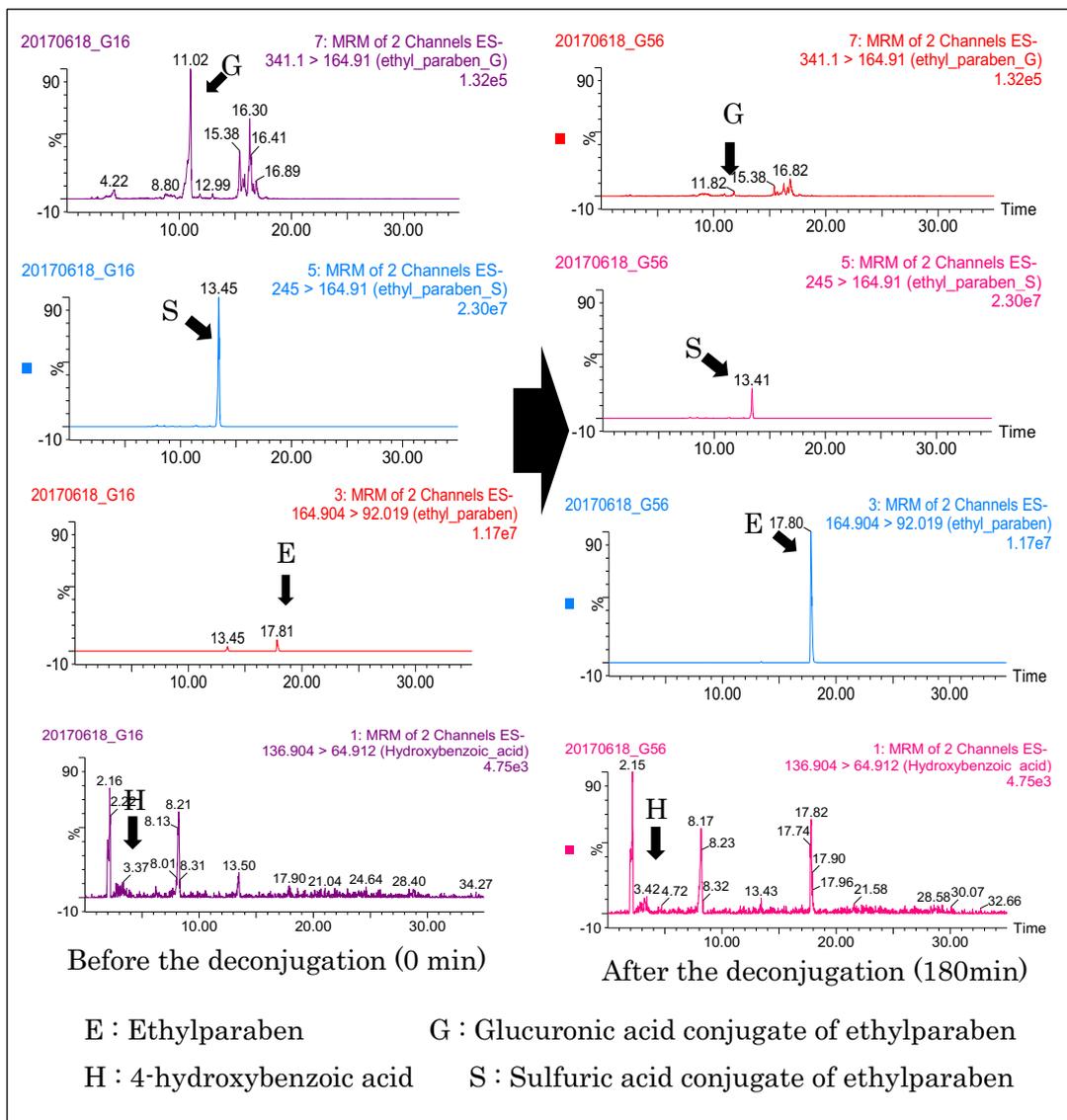


Fig.4 SRM chromatograms illustrating before and after the deconjugation of the two ethylparaben conjugates to produce the intact ethylparaben in urine samples.

The deconjugation reaction was performed under pH5.6.

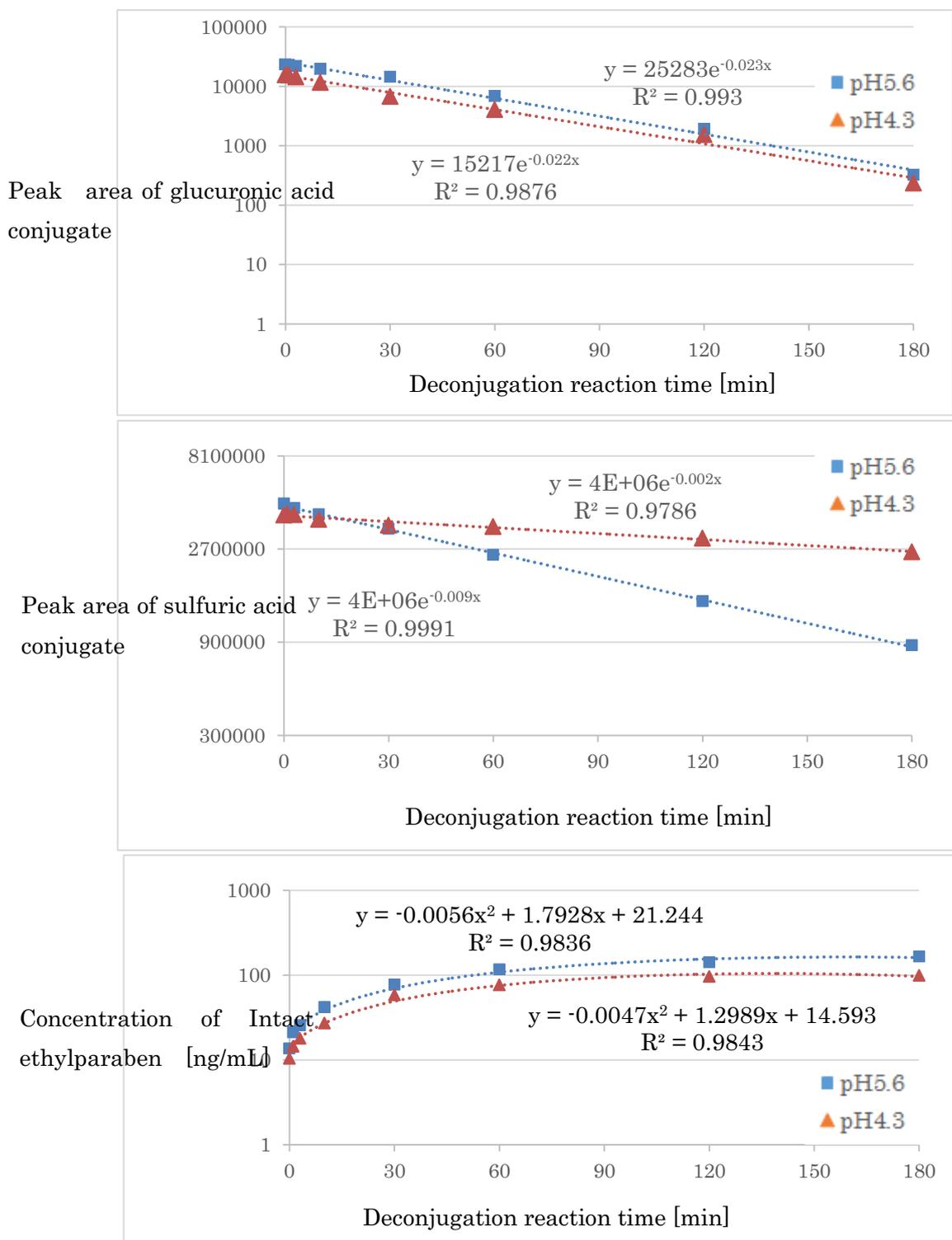


Fig.5 Peak areas corresponding to the two ethylparaben conjugates and concentrations of intact ethylparaben plotted against the simultaneous deconjugation reaction time.

The deconjugation reaction was performed under pH5.6.

### 3.3 エチルパラベンのグルクロン酸及び硫酸抱合体の間接定量法

エチルパラベンのグルクロン酸及び硫酸抱合体の脱抱合反応は、それぞれ同時に進行すると仮定し、エチルパラベン濃度の増加量を目的変数、脱抱合反応によるそれぞれの抱合体ピーク面積の減少量を説明変数とし、重回帰分析 (MRA) を行った (Table 2)。Table 2 に示す重回帰式 (1) よりエチルパラベン濃度 (Cep) の増加量とグルクロン酸抱合体のピーク面積の減少量 (Ae-g) および硫酸抱合体のピーク面積の減少量 (Ae-s) の関係は (R2adj = 0.99、P < 0.01) となった。ここで、一般に重回帰式 (1) の Ae-g、Ae-s、および定数 5.9 の係数は、分析条件および尿サンプルに依存すると考えられる。したがって、式は、一般に次のようになる。

$$Cep = A * Ae-g + B * Ae-s + C \quad (A, B \text{ は係数、} C \text{ は定数}) \quad (1)$$

式 (1) における係数 A、B、および定数 C は、SRM 測定から得られた Cep、Ae-g および Ae-s の値を用いて MRA で求められる。次に、係数 A、B および定数 C が決定された式 (1) を用いることで、エチルパラベンのグルクロン酸および硫酸抱合体の濃度を間接的に求めた。

同様に、メチルパラベンのグルクロン酸および硫酸抱合体の尿中濃度も、2つの抱合体のピーク面積の減少とメチルパラベン濃度の増加との間の関係を MRA によって解くことで間接的に求めた (Table 2)。メチルパラベン濃度 (C\_mp) とグルクロン酸抱合体 (A\_mg) および硫酸抱合体 (A\_ms) のピーク面積の関係について、重回帰式 (2) (Table 2) を得た。(R2adj = 0.96、硫酸抱合体 : P < 0.01、グルクロン酸抱合体 : P = 0.29)。グルクロン酸抱合体の P 値が高いが、今回の実験ではメチルパラベンを意図的に摂取しなかったため、尿中のメチルパラベン濃度が低濃度であり、またグルクロン酸抱合体が硫酸抱合体よりも低感度であったため感度不足による値のバラツキが原因と考えられる。

Fig. 6 は、式 (1) を用いてエチルパラベンのグルクロン酸および硫酸抱合体のピーク面積から算出したエチルパラベン濃度と実際に観測されたエチルパラベン濃度との相関図を示す。同様に、メチルパラベンについて式 (2) で計算した結果を Fig. 7 に示す。Fig. 6 および Fig. 7 より、間接定量から推定されるパラベン濃度と観測されたパラベン濃度の間にはエチルパラベンでは R2adj = 0.99、メチルパラベンでは R2adj = 0.96 となり、高い相関関係が認められた。このことから、メチルパラベンおよびエチルパラベンのグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体の濃度は、本法によって間接的に定量することが可能と結論する。

最後に、本法を用いて著者の尿中エチルパラベンの間接定量を行った。エチ

ルパラベン含有サプリメント摂取後の翌朝最初の尿試料を用いて、尿中エチルパラベンのグルクロン酸および硫酸抱合体濃度を算出した。測定はすべて n=5 で行い算出結果の平均値はそれぞれ、エチルパラベン 140ng / mL (RSD3.3%)、グルクロン酸抱合体エチルパラベン 950ng / mL (RSD3.4%)、硫酸抱合体エチルパラベン 620 ng/mL (RSD 1.2%)となった。摂取後の翌朝の尿中のエチルパラベン排出量の総量は 780  $\mu$ g (RSD 2.3%) であり、前日の夜に摂取したエチルパラベンの約 16%を占めていた。メチルパラベンやその他のパラベン類については、尿中濃度が低く、メチルパラベンのグルクロン酸および硫酸抱合体について高い精度、確度の間接定量する関係式が求められなかった。尿中のパラベンのグルクロン酸および硫酸抱合体の挙動に関する報告が限られていることから、今後より高感度な尿中の測定方法を開発し、メチルパラベンを含むその他のパラベン類も間接定量法の開発を進める。

Table 2 Results of MRA between concentration increases of methyl and ethyl parabens and peak area decreases of t those conjugates of glucuronic acid and sulfuric acid (N=35)

| multiple regression equations |                       | $C_{ep}^{*1} = 0.0041A_{e-g}^{*2} + 0.000013A_{e-s}^{*3} + 5.9$   |   | (1)      |            |                         |
|-------------------------------|-----------------------|---|---|----------|------------|-------------------------|
|                               |                       | $C_{mp}^{*4} = 0.0019A_{m-g}^{*5} + 0.000028A_{m-s}^{*6} + 0.019$ |   | (2)      |            |                         |
| objective variable            | explanatory variables | partial regression coefficient                                    | standardized partial regression coefficient | T- value | p- value   | R <sup>2</sup> adjusted |
|                               | $A_{e-g}$             | 0.0041  | 0.67  | 6.9      | 0.00000089 | 0.9869                  |
| $C_{ep}$                      | $A_{e-s}$             | 0.000013  | 0.33  | 3.4      | 0.0021     |                         |
|                               | constants             | 5.9   | -   | 3.5      | 0.0013     |                         |
|                               | $A_{m-g}$             | 0.0019  | 0.25  | 1.1      | 0.29       | 0.9553                  |
| $C_{mp}$                      | $A_{m-s}$             | 0.000028  | 0.73  | 3.2      | 0.0034     |                         |
|                               | constants             | 0.019   | -   | 0.097    | 0.92       |                         |

The deconjugation reaction was performed under pH5.6.

\*1: increase in ethylparaben concentration.

\*2 and \*3: decrease in the ethylparaben conjugate peak areas of glucuronic acid and sulfuric acid, respectively.

\*4: increase in methylparaben concentration.

\*5 and \*6: decrease in the methylparaben conjugate peak areas of glucuronic acid and sulfuric acid, respectively.

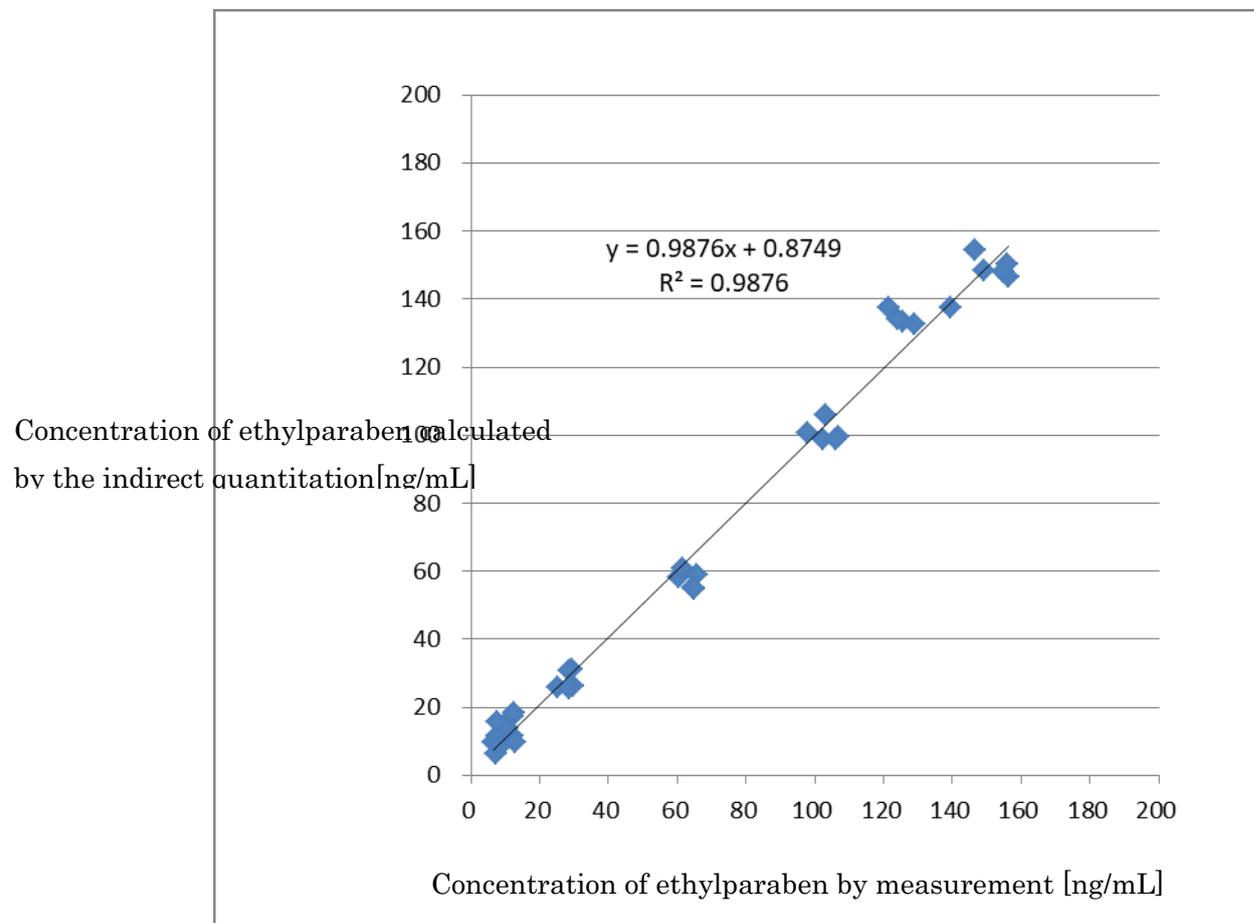


Fig. 6 Scatter plots of calculated and measured values of the ethylparaben concentration increases by deconjugations of its glucuronic acid and sulfuric acid conjugates

The deconjugation reaction was performed under pH5.6.

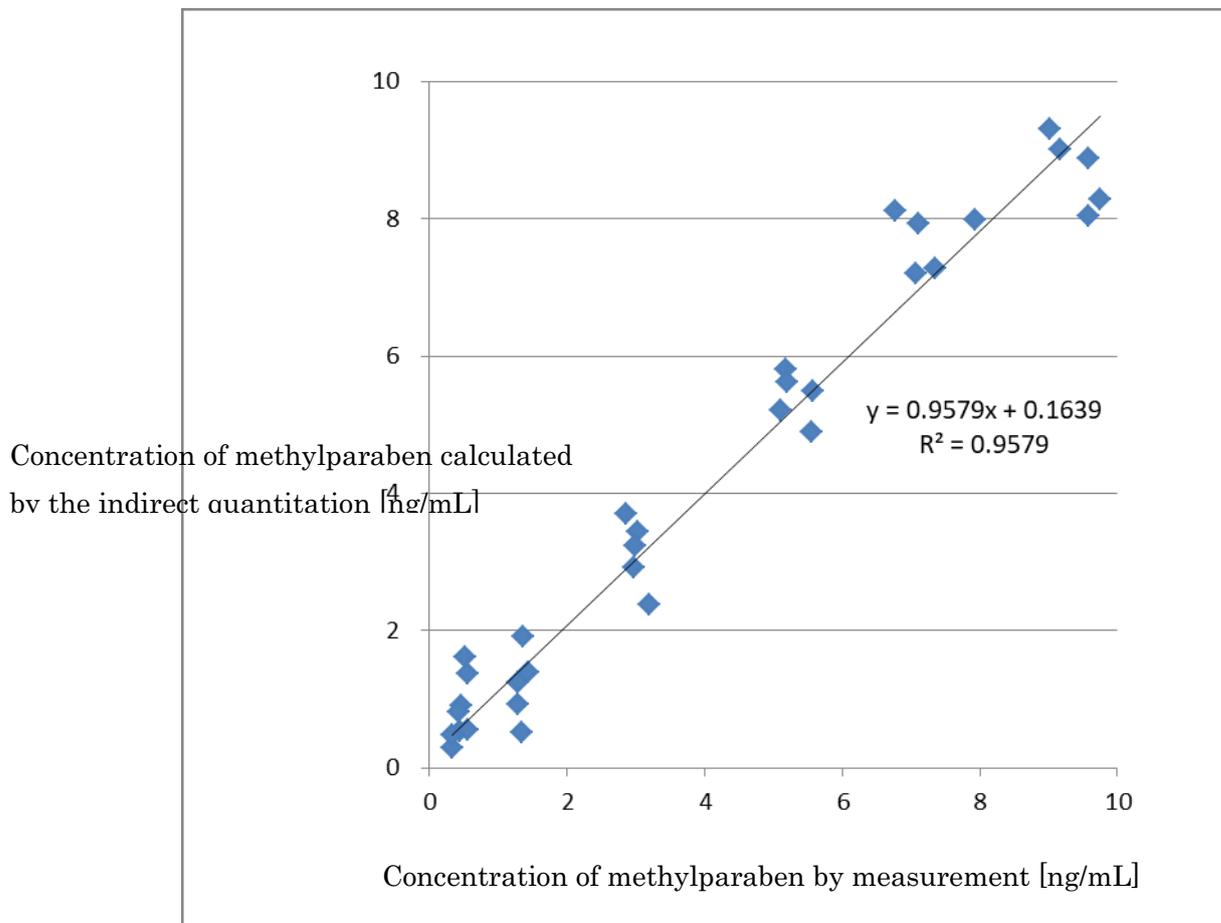


Fig. 7 Scatter plots of calculated and measured values of the methylparaben concentration increases by deconjugations of its glucuronic acid and sulfuric acid conjugates

The deconjugation reaction was performed under pH5.6.

#### 4. まとめ

本章では、標準試薬が入手できないエチルパラベンのグルクロン酸および硫酸抱合体の濃度を把握するために開発した、それらの LC/MS/MS 間接定量法の研究について報告した。2 つのエチルパラベン抱合体は、 $\beta$ -glucuronidase/arylsulfatase を使用することで、反応時間に対して対数減衰が確認され、それぞれ同時に「見かけ上 1 次反応」によってエチルパラベンを生成する脱抱合反応が起こることが確認された。またこの際、4-ヒドロキシ安息香酸の生成は認められなかった。エチルパラベン、そのグルクロン酸および硫酸抱合体の間接定量法は、尿試料に  $\beta$ -glucuronidase/arylsulfatase を添加し、0~180 分の脱抱合反応時間に、尿に含まれるエチルパラベン濃度とエチルパラベンのグルクロン酸および硫酸抱合体のピーク面積との関係を重回帰分析して求めた ( $R^2_{adj} = 0.987$ 、 $P < 0.01$ )。なお、本研究では、 $\beta$ -glucuronidase/arylsulfatase の複合酵素試薬を用いて実験を行った。繰り返し 5~7 回程度使用する尿試料で脱抱合化反応の時間経過を観測するには尿の量が限られる。複合酵素試薬を用いることで、1 つの尿試料による均一な質の尿の実験を可能にし、エチルパラベンのグルクロン酸および硫酸抱合体の間接定量に十分な結果を得た。エチルパラベン含有サプリメントを摂取した翌朝の尿中エチルパラベン及びそのグルクロン酸抱合体、硫酸抱合体の濃度を本法により間接定量した。前日の夜に摂取したエチルパラベンの約 16% が、パラベンとそのグルクロン酸抱合体、硫酸抱合体として翌日の尿中に排泄されていた。これは、尿中エチルパラベン及びそのグルクロン酸抱合体、硫酸抱合体を同時に分離分析したはじめての LC/MS/MS 分析結果であり、間接定量結果である。この間接定量法を用いることで生体試料中のパラベン及びその抱合体の濃度と各物質の存在割合を同時分析でき、本研究を発展させ、最終目標であるパラベン類の代謝および環境動態の把握に役立てたい。また、ヒトが摂取するパラベンの代謝に関する研究として、食品、医薬品、化粧品等で許容されるパラベン濃度の研究、代謝挙動の解明に貢献できると考える。

## 【参考文献】

- (1) Xiaoyun Ye、 Amber M. Bishop、 John A. Reidy、 Larry L. Needham、 and Antonia M. Calafat. Parabens as Urinary Biomarkers of Exposure in Humans: *Environ Health Perspect.* 2006 Dec; 114(12): 1843-1846.
- (2) Cashman AL、 Warshaw EM. Parabens: a review of epidemiology、 structure、 allergenicity、 and hormonal properties. *Dermatitis.* 2005 Jun; 16(2):57-66; quiz 55-6.
- (3) Kiwada H、 Awazu S、 Hanano M. Study on the biological fate of paraben at the dose of practical usage in rat. 1. Metabolism and excretion of ethyl para-hydroxybenzoate (ethyl paraben) and para-hydroxybenzoic acid. *J Pharmacobio-Dynam.* 1979;2:356-364.
- (4) Kiwada H、 Awazu S、 Hanano M. The study on the biological fate of paraben at the dose of practical usage in rat. II. The pharmacokinetic study on the blood concentration after the administration of ethyl paraben or p-hydroxybenzoic acid. *J Pharmacobiodyn.* 1980 Jul; 3(7):353-63.
- (5) Soni MG、 Carabin IG、 Burdock GA. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food Chem Toxicol.* 2005 Jul; 43(7):985-1015.
- (6) Ye 、 Kuklennyik 、 Bishop 、 Needham 、 Calafat. Quantification of the urinary concentrations of parabens in humans by on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry : *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2006 Nov 21;844(1):53-9. Epub 2006 Aug 7.
- (7) Calafat、 A. M.、 X. Y. Ye、 L. Y. Wong、 B. A.M. & L. L. Needham (2010) Urinary Concentrations of Four Parabens in the US Population: NHANES 2005-2006. *ENVIRONMENTAL HEALTH PERSPECTIVES*、 118、 679-685.
- (8) Janjua、 N. R.、 H. Frederiksen、 N. E. Skakkebæk、 H. C. Wulf & A.-M. Andersson (2008) Urinary excretion of phthalates and paraben after repeated whole-body topical application in humans. *International journal of andrology*、 31、 118-136.
- (9) Xiaoyun Ye、 Amber M. Bishop、 John A. Reidy、 Larry L. Needham & A. M. Calafat (2006) Parabens as Urinary Biomarkers of Exposure in Humans. *Environmental Health Perspectives*、 114、 1843-1846.
- (10) Calafat、 A.、 J. Weuve、 X. Ye & R. Hauser (2009) Exposure to Bisphenol

A and Other Phenols in Neonatal Intensive Care Unit Premature Infants. ENVIRONMENTAL HEALTH PERSPECTIVES, 117, 639-644.

- (11) Meeker, J. D., T. Yang, X. Ye, A. M. Calafat & R. Hauser (2011) Urinary Concentrations of Parabens and Serum Hormone Levels, Semen Quality Parameters, and Sperm DNA Damage. ENVIRONMENTAL HEALTH PERSPECTIVES, 119, 252-257.
- (12) Ye X., Bishop A. M., Reidy J. A., Needham L. L. and Calafat A. M., “Parabens as urinary biomarkers of exposure in humans”, Environmental Health Perspectives, 114 (2006) 1843-1846.
- (13) 児玉和子、鈴木茂、原田祥行、前駆イオンスキャンと精密質量分析を組み合わせた LC/MS/MS によるヒト尿中のパラベン抱合体の分離と同定、環境化学 (2017)

## V 総括

本博士論文「パラベン類の水環境における動態およびヒトの暴露を把握する分析方法に関する研究」は著者が行った環境水中のパラベン類の定量および尿中のパラベン類とそれらの抱合体の定性と定量に関する質量分析法の研究に関する一連の結果とその考察である。

我々の生活の中には、その利便性のためにパラベンを初めとした様々な化学物質が防腐剤、安定剤としてパーソナルケア製品 (Pharmaceutical and Personal Care Products; PPCPs) や食品中に防腐剤として添加されている。従来までの研究では安全と評価されていた反面、近年の科学技術の進歩によって急性毒性以外にも慢性毒性や他の化学物質との相互作用により毒性が上がるものが報告されている。本研究の対象物質であるパラベン類についても 1930 年代から一般に広く使われている化学物質である。

近年、PPCPs とその動態が注目されている。パラベン類においてもプロピルパラベンが環境ホルモン作用を有することが「EXTEND2010」によって明らかになりつつあり、またパラベン類の環境中の濃度も米国、中国、ヨーロッパ等の各国において環境水、底質から検出されていることが知られ、日本においても黒本調査においてメチルパラベン、プロピルパラベンが環境水中から検出されている。

人体に関する影響では、パラベン類が乳がん患者の乳房組織から高濃度で検出された報告以降、パラベン類の人体毒性に対する注目が集まっている。これまでに体液や血液、尿、精漿、組織からパラベン類が検出されたとの報告があり、メチルパラベン、プロピルパラベンは調査した尿試料の 90% 以上で検出されている。またブチルパラベンではヘレグリン (HRG) との共存下において発がん毒性が高まることも知られており、イソブチルパラベンは自閉症の発症に関係するといった報告もされている。パラベン類は人体に吸収されると酵素の働きによって分解、抱合体化することが知られているが、現在のところ抱合体化したパラベン類の標準試薬は販売されておらず、尿試料の酵素処理によって分離したパラベン類を分析する方法が取られている。

本研究では環境中のパラベン類およびヒトから排泄されるパラベン類、その抱合体を対象に LC/MS/MS を用いて、様々な質量分析の方法と分析技術を研究して、調査・研究を行った。

以下にそれらを総括する

### 「II パラベン類の分析法開発および東海地域における環境調査」

環境水中におけるパラベン類の LC/MS/MS 分析法を開発した。MDL と回収率、

相対標準偏差はそれぞれ 0.11~0.22 ng/L、73~117%、2.5~6.5 であり東海地域の環境水の調査に応用した。環境水中では、メチルパラベンが ND (0.3ng/L) ~10ng/L の間でプロピルパラベンは ND (0.3ng/L) ~54ng/L の範囲で検出され、その度数分布は対数正規分布を示唆するものであった。海水中の濃度が高い傾向が認められたが、これは調査を行わなかった高濃度のパラベン類があると推察される河川からの影響及び海水中でのパラベン類の酸化が河川水中に比べ抑制されていることによると考えられた。

### 「Ⅲ プリカーサーイオンスキャンと精密質量分析によるヒト尿中パラベン類抱合体の同定」

質量分析計によるプリカーサーイオンスキャンおよび精密質量測定によってパラベン類の抱合体の有無を明らかとする事が出来た。この手法はパラベン類以外の他の化合物においても抱合体の探索に有効であると考えられ、これまでの報告にあるターゲットを絞った酵素反応等による方法とは異なり、抱合体のターゲットを絞らずに網羅的に調査できる手法であると評価できる。また、今回の LC/Q-ToF/MS による精密質量分析の結果から、いくつかのパラベン類の抱合体の可能性のある組成式を得ることが出来た。本研究にあたっては、イオン強度が不十分であるため、得られた組成式から他の抱合体の同定には至らなかったが、グルクロン酸、硫酸以外にも、パラベンに抱合している物質の存在可能性を示唆する結果が得られた。

### 「Ⅳ LC/MS/MS による尿中エチルパラベン抱合体の酵素分解挙動の分析とその LC/MS/MS 間接定量法の研究」

尿中エチルパラベン抱合体の挙動およびその間接定量法の研究を行った。検討にあたり尿中のパラベン類およびパラベン類抱合体の精製のため前処理の検討を行い、メチルパラベンの平均回収率は 94%、相対標準偏差 (RSD) は 3.7% であり、エチルパラベンの平均回収率は 114%、RSD は 4.7%。メチルパラベンの検出限界 (LOD) 及び定量限界 (LOQ) はそれぞれ 13  $\mu$ g/L 及び 38  $\mu$ g/L、エチルパラベンの LOD/LOQ はそれぞれ 22  $\mu$ g/L 及び 66  $\mu$ g/L と算出した。

$\beta$ -glucuronidase/arylsulfatase によるエチルパラベンのグルクロン酸抱合体における酵素反応を確認した結果、エチルパラベンのグルクロン酸抱合体は反応時間に対して一定の割合で面積値が低下していることから対数減衰が確認され、 $\beta$ -glucuronidase/arylsulfatase とメチルパラベン及びエチルパラベンの抱合体の加水分解反応は「見かけ上は 1 次反応」であることがわかった。エチルパラベン、そのグルクロン酸および硫酸抱合体の間接定量法は、尿試料に  $\beta$ -glucuronidase/arylsulfatase を添加し、0~180 分の脱抱合反応時間に、尿に

含まれるエチルパラベン濃度とエチルパラベンのグルクロン酸および硫酸抱合体のピーク面積との関係を重回帰分析することで求めた ( $R^2_{adj} = 0.987$ ,  $P < 0.01$ )。なお、本研究では、 $\beta$ -glucuronidase/arylsulfatase の複合酵素試薬を用いることで、1つの尿試料による均一な質の尿の実験を可能にし、エチルパラベンのグルクロン酸および硫酸抱合体の間接定量に十分な結果を得た。

開発した間接定量法を用いてエチルパラベン含有サプリメントを摂取した翌朝の尿中エチルパラベン及びそのグルクロン酸抱合体、硫酸抱合体の濃度を定量した。前日の夜に摂取したエチルパラベンの約16%が、パラベンとそのグルクロン酸抱合体、硫酸抱合体として翌日の尿中に排泄されていた。これは、尿中エチルパラベン及びそのグルクロン酸抱合体、硫酸抱合体を同時に分離分析したはじめてのLC/MS/MS分析結果であり、間接定量結果である。

## VI. 業績

### 1. 査読付学術論文

1. 児玉和子、鈴木茂、原田祥行、前駆イオンスキャンと精密質量分析を組み合わせた LC/MS/MS によるヒト尿中のパラベン抱合体の分離と同定  
環境化学, Vol. 27, No. 1, 1-8 (2017)
2. Yoshiyuki HARADA, Shigeru SUZUKI, Kazuko KODAMA, Deconjugation characteristics of ethylparaben conjugates in human urine by indirect liquid chromatography tandem-mass spectrometry  
環境化学, (accepted)

### 2. 学会発表

1. 原田祥行、LC/MS による環境水中のパラベン類の動態に関する基礎研究、2016 年度第 6 回生物機能開発研究所講演会（環境科学セミナー）2016
2. 原田祥行、水道農薬の前処理におけるろ過材の重要性、全国給水衛生検査協会東海北陸支部総会技術発表、(岐阜) 2015
3. 原田祥行、LC/MS/MS によるハロ酢酸分析の問題点と対策、第 30 回愛知県建築物環境衛生管理研究集会、(名古屋市) 2015
4. 原田祥行、鈴木茂、LC/MS による環境水中のパラベン類の動態に関する基礎研究、第 45 回 中部化学関係学協会支部連合秋季大会、(春日井) 2014
5. 原田祥行 (分担執筆)、パラヒドロキシ安息香酸エステル (パラベン) の LC/MS 分析法、「有害物質分析ハンドブック」(朝倉書店)、ISBN978-4-254-14095-8 (2014)

## VII. 謝辞

本研究の遂行と論文の作成にあたり、多くの皆様のご指導をいただきました。特に、中部大学大学院応用生物学研究科の鈴木茂教授には、本研究をまとめるにあたり、実験の進め方や測定法・装置に関する知識、実験結果の取りまとめ方など、基礎の考えから学術研究とまとめ方まで様々なことをご教授頂きました。本論文を完成させることが出来たのは、ひとえに同教授の豊富な知識と温かいご指導によるものであり、心より深く感謝いたします。並びに、論文の作成にあたり、研究者としての考え方、博士を取るという意味について、ご指導を頂きました中部大学大学院応用生物学研究科の山本敦教授、堤内要教授に厚く感謝いたします。

本研究の遂行の機会を与えてくださいました（一般財団法人）東海技術センターの内山専務理事並びに業務のサポートをして頂きました、土屋忍部長、大脇千泉部門長をはじめ職員の方々には心より感謝しております。

最後に、本論文を完成するまであたたかく見守っていただいた両親と妻に心より感謝し、結びと致します。