

# 前処理法等に関する情報

## 1. 概要

表-1 ELISA による測定概要

ELISA で		大まかな区分	対象試料・方法	備考
測定可能	前処理（濃縮）が必要	・妨害物質の影響あり ・対象物質濃度がキットの定量下限以下	2.前処理法参照	殆どの測定例がこれに該当
	ダイレクト（希釈のみ）	・妨害物質の影響がない ・対象物質濃度がキット定量範囲内（以上）	3.ダイレクト測定参照	現実的に LAS、APE、AE の環境水のみ
測定不可		・現実的前処理で、妨害の影響を回避不可	畜産系排水、尿、母乳、汚泥・底質、糞便、バイオソリッド、他	

## 2. 前処理法

表-2 測定対象、マトリクス別、前処理法一覧（左アルファベット：データの有無、右番号：別添の資料番号）

キット	マトリクス 測定対象名	環境水				生体試料
		河川水 地下水 上水 湖水	海水	下水		血清
				放流水	流入水	
LAS	直鎖アルキルベンゼンスルホン酸	A1	C1	C1	C1	D
APE	アルキルフェノールエトキシレート	A1	C1	A1	B1	D
	ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル					
AE	アルコールエトキシレート	B2	C2	C2	C2	D
	ポリオキシエチレンアルキルエーテル					
	アルキルエトキシレート					
BPA	ビスフェノールA	A3	C3	C3	C3	B8
	2,2-ビス(4-ヒドロキシフェニル)プロパン					
	4,4'-(1-メチルエチリデン)ジフェノール					
AP	アルキルフェノール	C4	A4	C4	C4	D
E2	17β-エストラジオール (E2)	C5	C5	A5	A5	C8
E1	エストロン (E1)	C5	C5	A5	A5	C8
EE2	17α-エチニルエストラジオール	C5	C5	A5	A5	B8
		C6	C6	A6	A6	
ES	エストロゲン類 (E1+E2+E3) E3: エストリオール	C5	C5	C5	C5	C8

- A: 測定可能 (機器分析との相関データあり、推奨法)  
 B: 測定可能 (添加回収データあり、推奨法)  
 C: 測定可能と考えられる (データはないが測定可能と考えられる)  
 D: 測定できる可能性あり (使用可否等は自身で確認いただく方法)

## 3. ダイレクト測定

表-3 ダイレクト測定の可否

キット	河川水、地下水、上水、湖水	海水	下水	
			放流水	流入水
LAS	A	E	C	C
APE	D	E	D	D
AE	B	E	D	D

A~D の意味は表-2 に同じ、E は測定不可

## 4. その他の測定例

- ・培地中の BPA 測定 → 別添資料 9
- ・布に吸着した界面活性剤の測定方法 → 別添資料 10

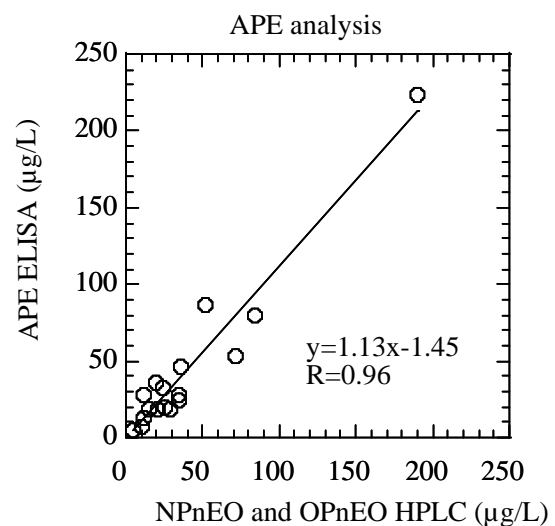
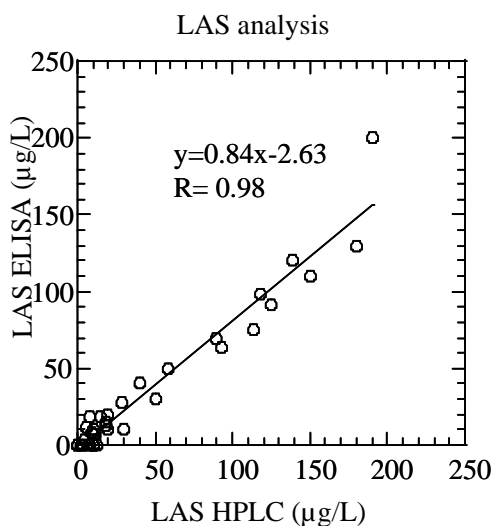
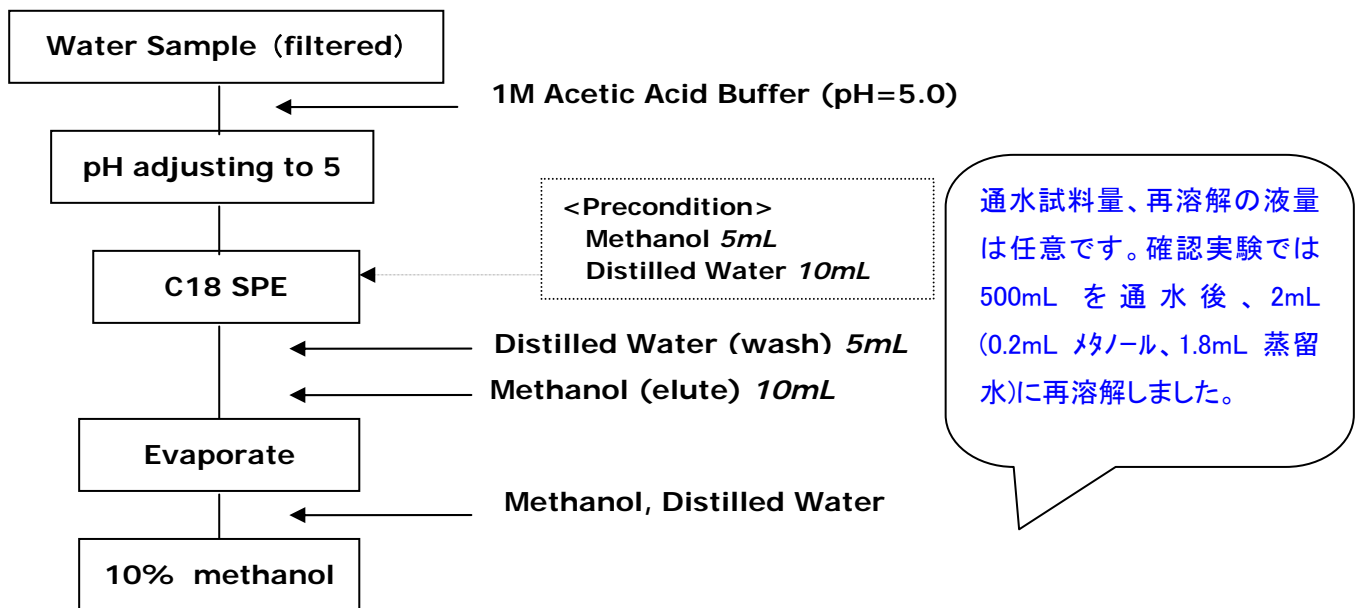
ELISA (Target)	Matrix	Procedure
LAS, APE	Water	SPE

## 水試料中のLAS、APEの測定方法

### Extractions from Water Sample for LAS and APE ELISA

#### LAS, APE

1. Filter raw water samples through the glass fiber filter (1 $\mu$ m pore diameter), and adjust the pH to 5 with 1M acetic acid buffer (pH=5.0).
2. Pour the filtrate, prepared above, through a C18 cartridge, preconditioned with methanol and distilled water.
3. Wash the cartridge with distilled water.
4. Elute the analyte with methanol, then evaporate the solvent with nitrogen.
5. Dissolve the residue in methanol to adjust the content at 10% (v/v). (If there remains undissolved residue, add 100% DMSO and MeOH to adjust the ration at 1%DMSO and 10%MeOH solution. The solvent for standards also need to adjusted at 1%DMSO and 10%MeOH in this case.)



ELISA (Target)	Matrix	Procedure
AE	Water	SPE

## 水試料中のAEの測定方法

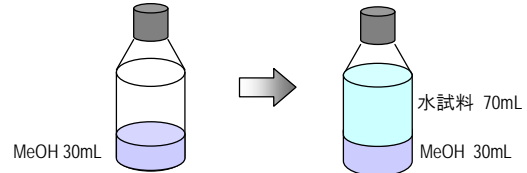
### ①30%メタノール試料の調製

水試料にメタノールを添加して 30%メタノール試料とします。(試料を採取する時点で 30%メタノールに調製することで、AE の容器への吸着を低減できます。)

#### 【実施例】

- (1)ガラス容器(例:100mL メジューム瓶)を水洗後、アセトンで 2~3 回リンスし、自然乾燥させます。
- (2)容器にあらかじめメタノールを 30mL 入れておきます。
- (3)水試料 70mL を添加後、転倒混和し、30%メタノール試料 100mL とします。

#### 30%メタノール試料の調製(例)



AE の吸着ロスを防ぐため、水試料に 30%となるようメタノールを添加しておきます。

### ②固相抽出例(15 倍濃縮)

固相カラム洗浄液の調製

固相カラム洗浄液として、30%メタノール水溶液を調製します。  
(例: メタノール 60mL + 蒸留水 140mL を混合 → 10 検体分)。

器具のアセトン洗浄

ボルテックスミキサーを用いて、溶出液を受ける遠心沈殿管をアセトン 2mL で 4 回洗浄し、自然乾燥させます。試料調製用フラスコ等も、水洗後、アセトンで 2~3 回リンスし、自然乾燥させます。

固相カラムのコンディショニング  
(カラム: Isolute MM)

アセトン 5mL、メタノール 5mL、固相カラム洗浄液(30%メタノール水溶液) 10mL の順に通液します(流速 5mL/分程度)。

【使用カラム】Isolute MM 300mg, 3mL, International Sorbent Technology 製、品番 904-0030-B)

※ 逆相系樹脂、陰イオン交換樹脂、陽イオン交換樹脂の三種混合固相をご使用ください。

試料通液・洗浄・乾燥

あらかじめ調製した 30%メタノール試料 100mL のうち、43mL を固相カラムに通液します(水試料として 30mL 分になります)。

次に、固相カラム洗浄液(30%メタノール水溶液) 10mL でカラムを洗浄し、水分を除去するため 2 分間吸引します(流速 5mL/分程度)。

AE の溶出

メタノール 2mL を用いて、固相から AE を溶出します(流速 2mL/分程度)。溶出液は目盛り付きのチューブに受け、溶出液がカラムから出なくなったのを確認します(1.8mL 程度溶出)。

チューブを取り出し、目盛りを見ながら 100%メタノールで 2mL にメスアップします(水試料 30mL を 2mL まで濃縮するため、15 倍濃縮となります)。

AE 測定試料の着色

試料の添加忘れを防止するため、AE 溶出液(100%MeOH)と「③試料着色液」を 10:1 で混合します(例: AE 溶出液 2mL に着色液を 200  $\mu$ L 添加)。

※試料の希釈が必要なときは、100%メタノールと「③試料着色液」を 10:1 で混合し、希釈に使用します。

● 添加回収実験による精度確認

上水試験方法では有機物測定に求められる定量下限値の変動係数は 20%以下である。このことから高感度 AE ELISA が非イオン界面活性剤の基準値  $20 \mu\text{g/L}$  からその 1/10 にあたる  $2 \mu\text{g/L}$  までの範囲を変動係数 20%以下で測定できるかを確認した。

水道水および河川水(淀川)を 30%メタノール水溶液としたのちに、AE(C12E07)を水試料中の濃度として 0, 2, 5, 10,  $20 \mu\text{g/L}$  となるように添加し、前処理から測定まで 5 回繰り返した。また、ここではマイクロプレート法とともにチューブ法でも同様の実験を実施した。マイクロプレート法、チューブ法の測定結果をそれぞれ表 1、2 に示す。全ての場合で AE 無添加での数値は確認されず、また河川水での 1 点( $2 \mu\text{g/L}$ ) 添加試料のチューブ測定結果)を除き、目標回収率  $100 \pm 20\%$  以内、変動係数(CV)20%以下で測定できた。

また簡易濃縮を行わず、水試料を 30%メタノール水溶液としたのち、そのまま ELISA 測定する手法を用いて添加回収実験を行った。ただしこの場合の定量下限値は水試料中の濃度で  $5 \mu\text{g/L}$  程度であることから、AE 添加濃度は  $5 \sim 20 \mu\text{g/L}$  の範囲とした。結果を表 3、4 に示す。こちらの場合も AE 無添加試料での数値は検出されず、また添加した AE についても回収率  $84 \sim 112\%$ 、変動係数(CV)20%以下となり、濃縮なしでも水試料中の AE 濃度  $5 \mu\text{g/L}$  程度まで、十分な精度で測定できることを確認した。

表1 AE添加回収実験(濃縮あり:マイクロプレート)

測定試料	AE添加 濃度 $\mu\text{g/L}$	AE試料 平均濃度 $\mu\text{g/L}$	濃度CV n=5 %	平均回収率 n=5 %
水道水	0	<0.67	-	-
	2	2.0	19	102
	5	4.3	9.1	86
	10	8.6	5.5	86
	20	19	6.9	95
河川水(淀川)	0	<0.67	-	-
	2	2.1	15	104
	5	4.7	6.1	94
	10	8.4	7.3	84
	20	18	11	89

表2 AE添加回収実験(濃縮あり:チューブ)

測定試料	AE添加 濃度 $\mu\text{g/L}$	AE試料 平均濃度 $\mu\text{g/L}$	濃度CV n=5 %	平均回収率 n=5 %
水道水	0	<0.67	-	-
	2	2.3	15	113
	5	4.7	17	94
	10	9.2	11	92
	20	20	6.6	100
河川水(淀川)	0	<0.67	-	-
	2	2.6	10	131
	5	5.2	9.6	105
	10	10.3	3.4	103
	20	16	10	82

(注)チューブ法キットは製造中止となっています。

表3 AE添加回収実験(濃縮なし:マイクロプレート)

測定試料	AE添加 濃度 μg/L	AE試料 平均濃度 μg/L	濃度CV n=5 %	平均回収率 n=5 %
水道水	0	<3.5	-	-
	5	5.6	15	112
	10	9.7	17	97
	20	20	4.2	99
河川水(淀川)	0	<3.5	-	-
	5	5.3	13.0	105
	10	9.7	12.0	97
	20	21	8.5	104

表4 AE添加回収実験(濃縮なし:チューブ)

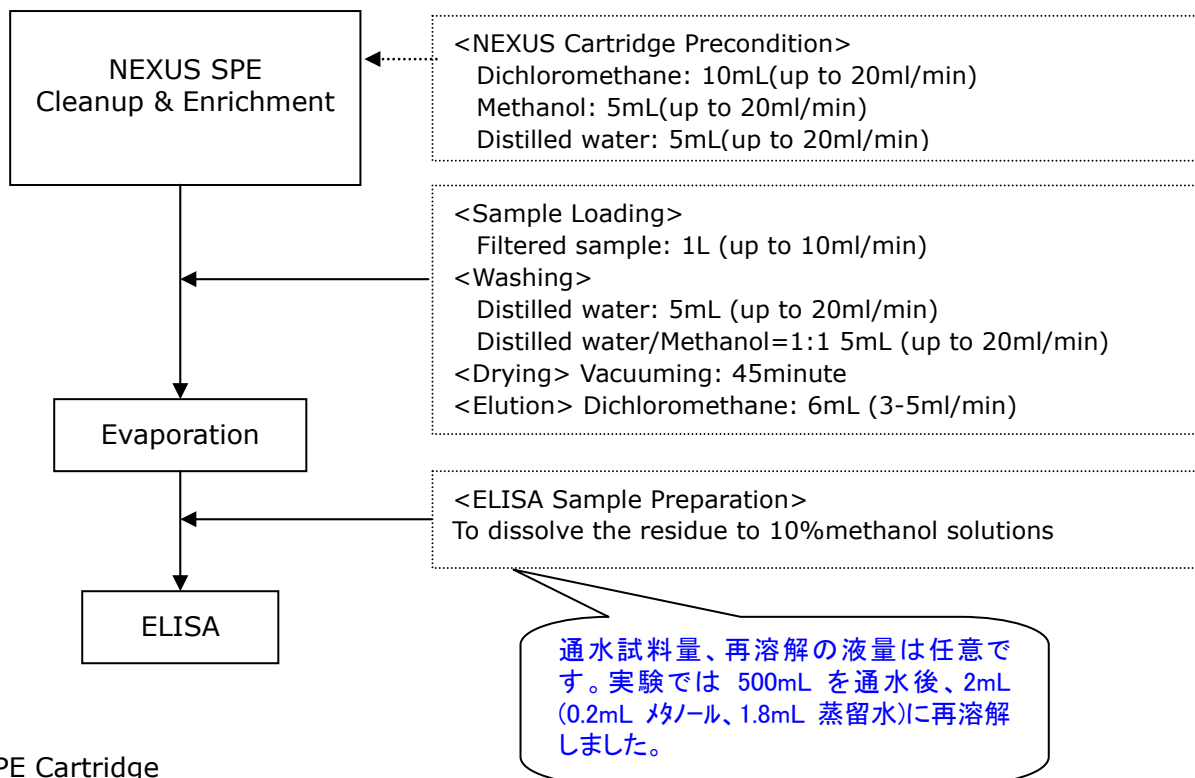
測定試料	AE添加 濃度 μg/L	AE試料 平均濃度 μg/L	濃度CV n=5 %	平均回収率 n=5 %
水道水	0	<3.5	-	-
	5	4.2	12	84
	10	10.4	18	104
	20	19	12	95
河川水(淀川)	0	<3.5	-	-
	5	4.6	12	92
	10	11	17	110
	20	21	10	103

(注)チューブ法キットは製造中止となっています。

ELISA (Target)	Matrix	Procedure
BPA	Water	SPE

## 水試料中のBPAの測定方法

### Flowchart: ssBPA ELISA for environmental water sample



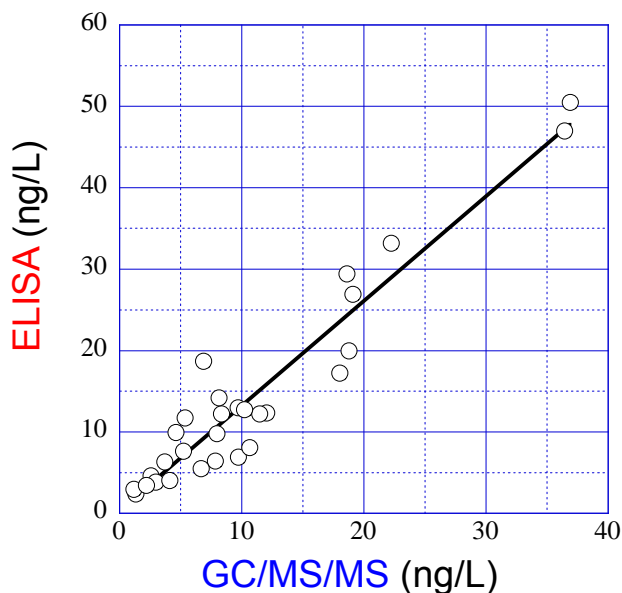
#### NEXUS SPE Cartridge

Producer: VARIAN  
 PART#: 1210-3102  
 ABS ELUT-NEXUS, 200MG 6ML, 30/PK

#### NEXUS Cartridge made of glass (not plastic) **Recommended**

Producer: GL Science Ltd. (Tokyo, Japan)  
 PART#: 5010-26021  
 GL-Pak GLASS SPE NEXUS 200mg/6ml 20/PK

$$\text{ELISA} = 1.29 \text{GC/MS/MS} + 0.39 \quad (R^2 = 0.91)$$

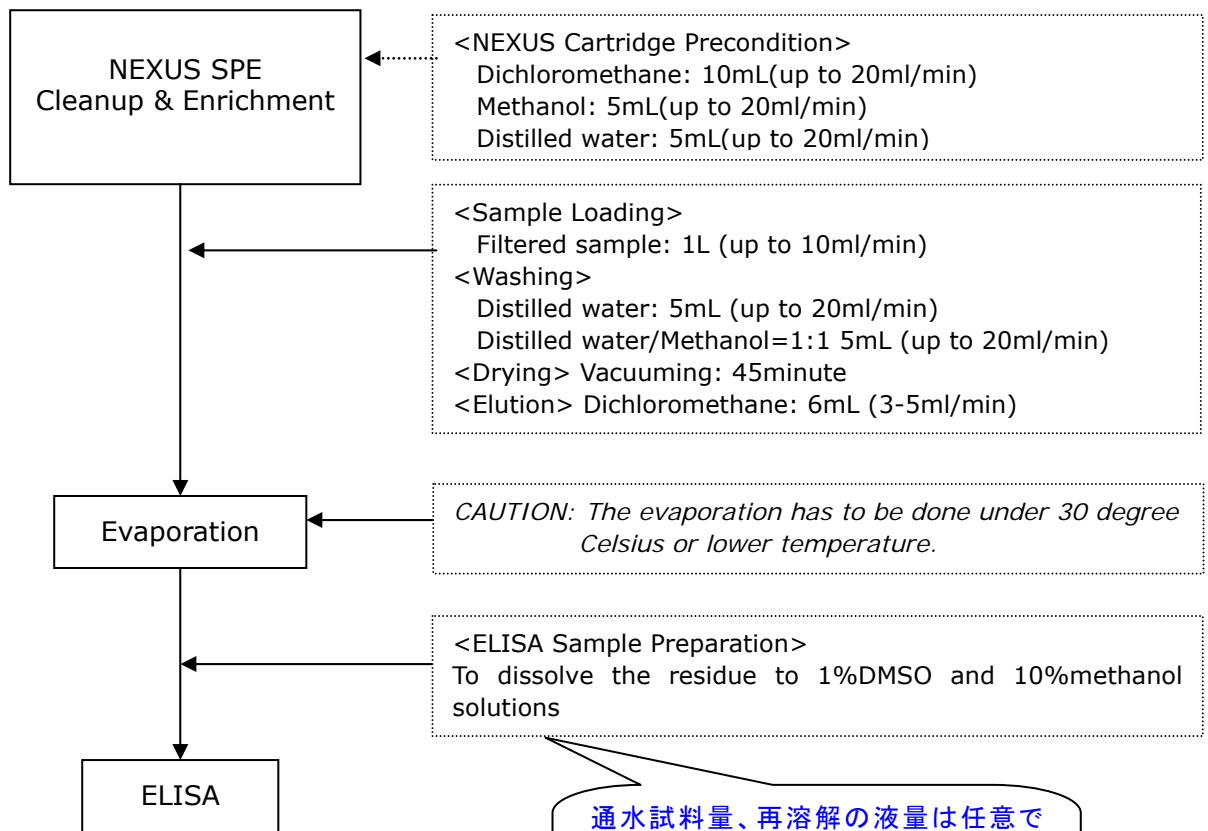


湖沼水試料について ELISA 値と GC/MS/MS 値 (前処理: Nexus → アミノピロ) を比較したところ良好な相関関係を確認した。このことから ELISA (前処理: Nexus のみ) を用いることにより簡易の環境水中の BPA を測定できることを確認できた。

ELISA (Target)	Matrix	Procedure
AP	Water	SPE

### 水試料中のアルキルフェノール(AP)の測定方法

#### Flowchart: AP ELISA



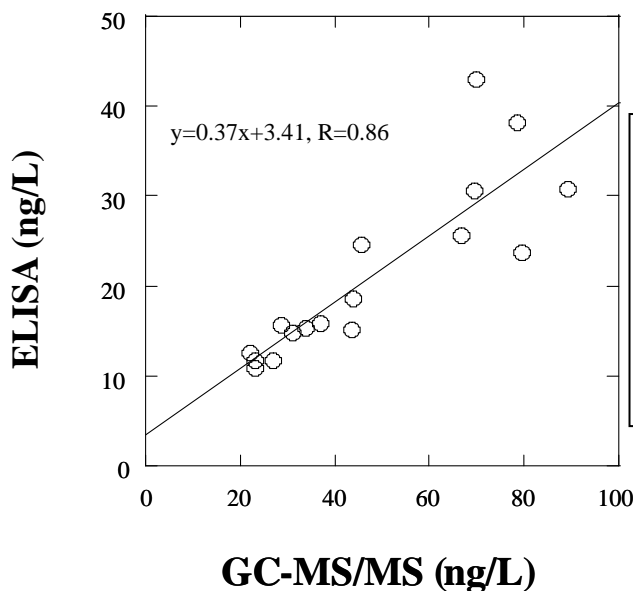
通水試料量、再溶解の液量は任意です。実験では 500mL を通水後、2mL (0.2mL メタノール、1.8mL 蒸留水)に再溶解しました。

#### NEXUS SPE Cartridge

Producer: VARIAN  
 PART#:1210-3102  
 ABS ELUT-NEXUS,200MG 6ML,30/PK

#### NEXUS Cartridge made of glass (not plastic) **Recommended**

Producer: GL Science Ltd. (Tokyo, Japan)  
 PART#:5010-26021  
 GL-Pak GLASS SPE NEXUS 200mg/6ml 20/PK



海水試料について ELISA 値と GC-MS/MS 値(前処理:NEXUS→アミノプロピル)を比較したところ良好な相関関係を確認した。このことから ELISA(前処理:Nexusのみ)を用いることにより簡易の環境水中の APを測定できることを確認できた。

ELISA (Target)	Matrix	Procedure
E1, E2, EE2, ES	Water	SPE

## 5

### 女性ホルモン ELISA 環境試料前処理法 グラファイトカーボンカラムによる固相抽出

#### 【 必要な試薬・器材 】

##### サンプル濾過器具

1. ガラス繊維フィルター(GS-25 アトバンテック社製、品番 36481047、φ47mm)
2. 減圧濾過装置(減圧濾過用フィルターホルダー(ガラスタイプ)と 濾過びん 2L)

##### 固相抽出 試薬

3. グラファイトカーボンカラム (GL-Pak Carbograph 1000mg/12mL、ジールサイエンス社製、品番 5010-23015、20 本/箱)  
※回収率および分離効率確保のため、必ず指定のカラムサイズをお使いください。
4. メタノール(5000) (和光純薬工業、残留農薬・PCB 試験用、品番 132-14161、1L)
5. ジクロロメタン(和光純薬工業、試薬特級、品番 135-02446、500mL)
6. BSA (Albumin, Bovine, SIGMA 社製、A-7638、10g)
7. ポリペプトン(和光純薬工業、培養基材、品番 394-00115、500g)

##### 固相抽出 器具

8. 固相抽出マニホールド (VAC ELUTE SPS 24、Varian 社製、型式 1223-4022、ジールサイエンス品番 5010-19251)
9. ダイヤフラム真空ポンプ(イワキエアポンプ、(株)イワキ社製、型式 APN-215MV-1-50)
10. 固相抽出用アダプター(ボンドエリート用アダプター、12・20mL リザーバー用、Varian 社製、型式 1213-1003、ジールサイエンス品番 5010-19121)
11. テフロンチューブ (LS チュービング 12(ボンドエリート 12 本処理用セット)、ジールサイエンス品番 5010-50211)
12. ルアーストップバルブ(テフロン)(ジールサイエンス品番 5010-28101)
13. ガラス遠心沈殿管(円錐、目盛りつき)(旭テクノグラス社製、品番 8084CTF)
14. 抽出液濃縮器(リアクティサーモⅢ・リアクティブアップⅢ、PIERCE 社製、ジールサイエンス品番 1030-44030・1030-44034)

##### その他

15. マイクロピペット(ギルソンプリペットマン P-20、P-200、P-1000 )
16. ピペットチップ
17. 1L 三角フラスコ
18. 1L メスシリンダー
19. 100mL または 200mL メスシリンダー
20. 10mL メスピペット
21. シリコン安全ピペッター
22. 200mL メジューム瓶
23. 15mL バイアル
24. ビーカー
25. アセトン(和光純薬工業、試薬特級、品番 012-00343、3L)
26. パラフィルム

#### 【 準備 】

##### ①使用する器具類の洗浄

###### ◇ガラス遠心沈殿管

→ボルテックスミキサーを用いてアセトンで2~3 回リンスし、自然乾燥させます。

###### ◇減圧濾過装置、三角フラスコ、メスシリンダー、メスピペット、ビーカー、メジューム瓶

→水洗後、アセトンで2~3 回リンスし、自然乾燥させます。

###### ◇テフロンチューブ



→固相抽出装置に装着して水を1~2L 通液させた後、アセトンチューブ1本あたり約10mL 通液してリンスします。アセトンが蒸発するまで数分吸引させて乾燥させます。

◇固相抽出用アダプター、ルアーストップバルブ、リアクティブアップのニードル

→水洗後、1Lビーカーを用いてアセトンを浸る程度に入れ、5~10分超音波洗浄器にかけます。キムタオルの上で自然乾燥させます。

②試薬の調製

◇溶出液① メタノール:ジクロロメタン=7:3

→200mL メジューム瓶にメタノール 140mL、ジクロロメタン 60mL をメスシリンダーで量り入れ、振り混ぜて混合します。

◇溶出液② メタノール:ジクロロメタン=5:5

→200mL メジューム瓶にメタノール 100mL、ジクロロメタン 100mL をメスシリンダーで量り入れ、振り混ぜて混合します。

◇キーパー(1% BSA)

→15mL バイアルにBSA 0.1gを10mLの蒸留水で溶解します。4°Cで保存します。

◇ポリペプトン溶液

→10g ポリペプトンを蒸留水1Lに溶解します。

【試料の取扱い】

- 1) 水試料はポリタンクやガラス瓶などの容器に採水し、微生物による分解を最小限にするため、できるだけ空気に触れないよう容器の口までいっぱい満たした状態にしておきます。
- 2) 輸送する場合は冷蔵で取り扱ってください。
- 3) すぐに前処理しない場合は、水試料を冷凍保存するか、または微生物による生分解を防ぐために、1L水試料に対し1mLの塩酸と0.25gの硫酸銅(5水和物)を添加後、4°Cで保存してください。
- 4) 本試料を水系へ廃棄する場合は、アルカリ処理後、銅を沈澱除去したのち、廃棄してください。

【試料の濾過】

沈澱物や浮遊物のある水試料は、固相カラムの詰まりを防ぐため、ガラス繊維フィルターと減圧濾過装置を用いて濾過しておきます。濾過した試料を長期間保存すると再び沈澱が生じることがありますので、濾過後は数日以内に前処理します。

【ポリペプトン溶液の添加】

試料1Lに対しポリペプトン溶液を10mL添加してください。ここで用いるグラファイトカーボンカラムは清澄な試料(蒸留水)において回収率が低い傾向にあります。ポリペプトン溶液を添加することで、回収率を改善することができます。

【スパイクサンプルの調製】

スパイクサンプルを調製する必要がある場合は、フラスコ内壁への標準液の吸着を最小限にするため、メタノールに標準液を添加してから水試料と混合します。

\*調製例：1Lの場合

- (1) 1L 三角フラスコにあらかじめメタノール 10mL をメスピペットで入れておきます。
- (2) 10%メタノール標準溶液をマイクロピペットで添加します。
- (3) ガラス繊維フィルターで濾過した水試料 1L をメスシリンダーで量りとり、まず約 500mL を三角フラスコに入れて振り混ぜます。ある程度混ざったところで、残りの水試料を入れて軽く振り混ぜます。

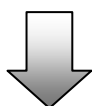
## 【固相抽出】

### 固相カラムのコンディショニング



ジクロロメタン 10mL → メタノール 10mL → 蒸留水 20mL の順に通液します(流速 5mL/分程度)。

### 試料通液



固相カラムにアダプターをつけてテフロンチューブを接続し、水試料を通液します(流速 5mL/分程度)。

※ チューブがずれないように、パラフィルム等でチューブを試料容器に固定してください。

### 洗浄



メタノール 10mL を通液します(流速 5mL/分程度)。

### 溶出①(EЕ2)



溶出液①(メタノール:ジクロロメタン=7:3) 10mL で溶出します(流速 2mL/分程度)。EE2 が溶出されます。

溶出液はあらかじめキーパー(1%BSA)を 10  $\mu$ L 入れたガラス遠心沈殿管に受け取ります。

### 溶出②(E1、E2)



溶出液②(メタノール:ジクロロメタン=5:5) 10mL で溶出します(流速 2mL/分程度)。E1 および E2 が溶出されます。

溶出液はあらかじめキーパー(1%BSA)を 10  $\mu$ L 入れたガラス遠心沈殿管に受け取ります。

### 蒸発乾固・再溶解



抽出液濃縮装置で窒素ガス吹き付けにより蒸発乾固させます(50°C)。10%メタノール溶液になるよう再溶解します。

《例》メタノール 100  $\mu$ L を添加し、ボルテックスミキサーで 30 秒攪拌して溶解します。次に、蒸留水 900  $\mu$ L を添加してボルテックスミキサーで 10 秒攪拌し、10%メタノール溶液 1mL とします。

### ELISA

## 【測定例/添加回収試験/機器分析法との比較】

以下にグラファイトカーボンカラム(GCBと略)による前処理法の評価結果を示します。

### ・添加回収試験(従来法との比較)および ELISA と機器分析(LC-MS/MS 法)との比較

GCB による前処理と従来の推奨処理法である NEXUS カラム前処理を、下水実試料(primary effluent : 初沈越流水、エアレーションタンク水、secondary effluent : 2次処理水、tertiary effluent : 3次処理水)における添加回収試験をエストロゲン類について行うことにより比較した。2次処理水については A、B2 種類の試料を用意した。E2 と E1 の添加濃度は、各資料に通常存在する濃度の2~3倍程度を想定した。EE2 は合成医薬品であり、下水中にはごく微量しか含まれないと考えられる為、すべて 3ng/L の添加とした。測定はエコロジーナ E2 , E1 ,EE2 ELISA キットおよび機器分析(LC-MS/MS) にて行った。結果を Table1.に示す。

GCBとNEXUSの比較では、特にE2とE1の初沈越流水においてGCBの方がLC-MS/MSの値に近く、また回収率も良い傾向にあった。GCB はNEXUSより妨害物質を効果的に除去でき、回収率が安定することを示すものと思われた。

Table1. Comparison between LC-MS/MS and ELISA in real samples (representative data)

#### E2 ELISA

WWTP (water)	Spiked ng/L	GCB				NEXUS		Ratio(ELISA/LC)	
		LC-MS/MS		ELISA		ELISA		GCB	NEXUS
		ng/L	recovery(%)	ng/L	recovery(%)	ng/L	recovery(%)		
tertiary effluent	0	<0.1	-	0.16	-	0.3	-	-	-
	3	2.7	90	2.8	84	4.2	131	1.0	1.6
secondary effluent A	0	<0.1	-	0.15	-	0.33	-	-	-
	3	2.8	93	2.8	89	3.9	119	1.0	1.4
secondary effluent B	0	0.28	-	0.86	-	6.6	-	3.1	24
	3	3.2	97	3.8	97	8.9	76	1.2	2.7
aeration tank	0	3.5	-	3.9	-	10.7	-	1.1	3.1
	3	6.9	113	7.2	110	15.3	153	1.0	2.2
primary effluent	0	10.7	-	13.5	-	100	-	1.3	9.4
	20	29.6	95	31.6	90	189	446	1.1	6.4

#### E1 ELISA

WWTP (water)	Spiked ng/L	GCB				NEXUS		Ratio(ELISA/LC)	
		LC-MS/MS		ELISA		ELISA		GCB	NEXUS
		ng/L	recovery(%)	ng/L	recovery(%)	ng/L	recovery(%)		
tertiary effluent	0	<0.1	-	0.57	-	1.7	-	-	-
	3	2.6	87	2.8	74	5.4	123	1.1	2.1
secondary effluent A	0	<0.1	-	1.5	-	3.6	-	-	-
	3	3.0	100	4.7	106	7.1	116	1.6	2.4
secondary effluent B	0	2.3	-	7.3	-	12.1	-	3.2	5.4
	3	5.5	107	11.5	141	14.1	65	2.1	2.6
aeration tank	0	3.8	-	7.2	-	11.8	-	1.9	3.1
	3	7.1	110	11.7	150	18.0	207	1.7	2.5
primary effluent	0	19.7	-	34.7	-	118	-	1.8	6.0
	50	66.8	94	75.0	81	141	46	1.1	2.1

#### EE2 ELISA

WWTP (water)	Spiked ng/L	GCB				NEXUS		Ratio(ELISA/LC)	
		LC-MS/MS		ELISA		ELISA		GCB	NEXUS
		ng/L	recovery(%)	ng/L	recovery(%)	ng/L	recovery(%)		
tertiary effluent	0	<0.1	-	<0.1	-	<0.1	-	-	-
	3	2.8	93	2.7	91	2.8	92	1.0	1.0
secondary effluent A	0	<0.1	-	<0.1	-	<0.1	-	-	-
	3	3.2	107	2.7	90	3.0	98	0.8	0.9
secondary effluent B	0	<0.1	-	<0.1	-	<0.1	-	-	-
	3	2.9	97	2.4	82	2.5	83	0.9	0.9
aeration tank	0	<0.1	-	<0.1	-	<0.1	-	-	-
	3	2.9	97	2.8	93	2.6	87	1.0	0.9
primary effluent	0	<1	-	<0.1	-	<0.1	-	-	-
	3	<1*	-	3.2	107	3.7	122	-	-

\*EE2 was not detected with LC-MS/MS due to interfering peaks.

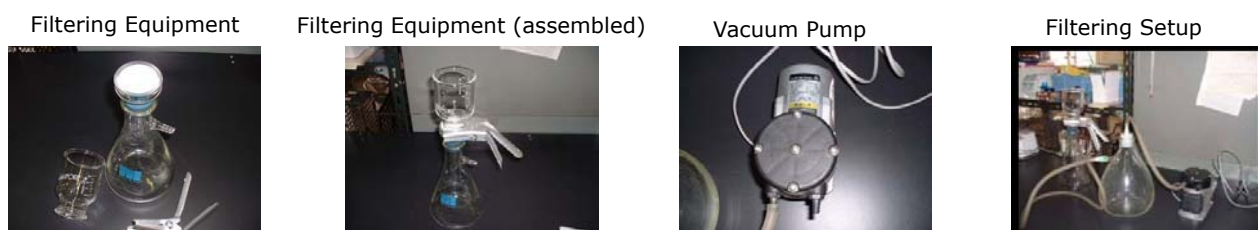
ELISA (Target)	Matrix	Procedure
EE2	Water	SPE

## 水試料中のEE2 測定方法

### Essential Reagents/Materials for Pretreatment

1. Disposable test tubes (e.g. ASAHI TECHNO GLASS, item No. 9831-1207)  
\*Be sure to use disposable tubes to avoid adsorption.
2. Glass fiber filter  
(1) ADVANTEC (Toyo Roshi, JAPAN)  
<http://www.advantec.co.jp/english/contact/index.html>.  
FILTER PAPER GLASS FIBER, GS-25,47mmφ  
CodeNo.36481047  
100quantity/box

### 3. Filtering equipment



4. Micropipettes (20μL - 200μL and 100μL - 1000μL, e.g. Gilson Pipetman P-200, P-1000) and tips (e.g. ICN Superpack 96NS)
5. Multichannel pipettes (50μL - 300μL e.g. LabSystems Finnpipette Digital 8-channel Pipettor) and tips (e.g. ICN Superpack 96NS)
6. Microplate reader (450nm wavelength) (e.g. TECAN Sunrise Remote)
7. Stop watch
8. Strip ejector (e.g. COSTAR, No.2578)
9. Solvent: Methanol, Hexane, Dichloromethane (HPLC grade)
10. C18 or NEXUS Solid phase extraction cartridge

#### C18 SPE cartridge

- (1) J.T. Baker Inc. (NJ, USA):  
<http://www.jtbaker.com/>  
BAKERBOND spe Octadecyl (C18) Disposable Extraction Columns  
6ml Solid Phase Extraction Columns, 500mg per column  
\*Code No.7020-06 \*30quantity/box
- (2) Waters Corporation (MA, USA):  
<http://www.waters.com/WatersDivision/>  
Sep-Pak C18, 500mg/6cc  
\*Code No.043395 \*30quantity/box

#### NEXUS SPE Cartridge

- (1) VARIAN  
<http://www.varianinc.com/cgi-bin/nav?/>  
\*PART#:1210-3102  
ABS ELUT-NEXUS,200MG 6ML,30/PK

#### NEXUS Cartridge made of glass (not plastic)

- (1) GL Science Ltd. (Tokyo, Japan)  
[http://www.gls.co.jp/index\\_e.html](http://www.gls.co.jp/index_e.html)  
\*PART#:5010-26021  
GL-Pak GLASS SPE NEXUS 200mg/6ml 20/PK

### 11. Aminopropyl (NH<sub>2</sub>-propyl) Solid phase extraction cartridge

- (1) Waters Corporation (MA, USA)  
<http://www.waters.com/WatersDivision/>  
Sep-Pak Plus NH<sub>2</sub> Cartridges  
360mg/cartridge  
\*Code No. WAT 020535 \*50quantity/box

\*Vacuum manifold is useful for higher sample throughput.

Vacuum Manifold with SPE C18 or NEXUS Cartridge



## 1. Sample Filtration

Filter raw water sample (e.g. 1 liter) through the specified glass fiber filter (1 $\mu$ m pore diameter). To save time, suctioning with a vacuum pump is recommended. Change filters if necessary. As a rule of thumb, one filter can process 300-500ml of treated water (effluent) or 100-200ml of raw wastewater (influent). If an influent sample contains a large quantity of suspended matter, centrifuge the sample to obtain the supernatant for filtering.

If there remains sediment on the filter, pour MeOH to extract the analyte from the solid and add the eluant to the filtrate.

Make sure the amount of MeOH dose not exceed 1% of the total volume of the filtrate. i.e. For 1liter of filtered sample, the amount of MeOH should be less than 10mL.

Confirm the pH of the filtrate is between 5 and 8. If pH is out of this range, add acid or base to adjust pH.

## 2. Solid Phase Extraction

### (1) Protocol

1. Rinse a C18 or NEXUS cartridge with 5 ml of methanol and then 10 mL of distilled water (Preconditioning). To save time, suctioning with a vacuum pump is recommended. Flow rate, then, should not exceed 20mL/minute.
2. Then, pour the filtrate, prepared in Section 1 (Sample Filtration), through the C18 or NEXUS cartridge at a flow rate, not faster than 20mL/minute.
3. Wash the cartridge with 5mL of distilled water (up to 20mL/minute). Keep suctioning for about a minute to dry the cartridge. Then, wash the cartridge with 5ml of hexane (up to 20mL/minute).
4. Elute the analyte with 5mL of dichloromethane at a rate of 3mL/minute.
5. Evaporate the solvent with nitrogen gas.

The typical setup is shown in the picture. Nitrogen gas, or (only if not available) compressed air, is supplied through pasteur pipettes into 10mL tubes containing eluted sample. Temperature is controlled at 40 - 50 degrees C with a water bath to accelerate evaporation.

6. Add 100% methanol to the residue and stir the mixture with a vortex. Terminate the mixing and pour distilled water to adjust the content at 10% methanol (v/v).

If the initial amount of sample is 1liter, 1mL of the resulting 10% MeOH solution means 1000 fold concentration. Also prepare a 10-fold dilution from this concentrate so that the absorbance of either sample will fall in the dynamic range of the kit. Further dilutions may be necessary for some samples such as untreated wastewater.

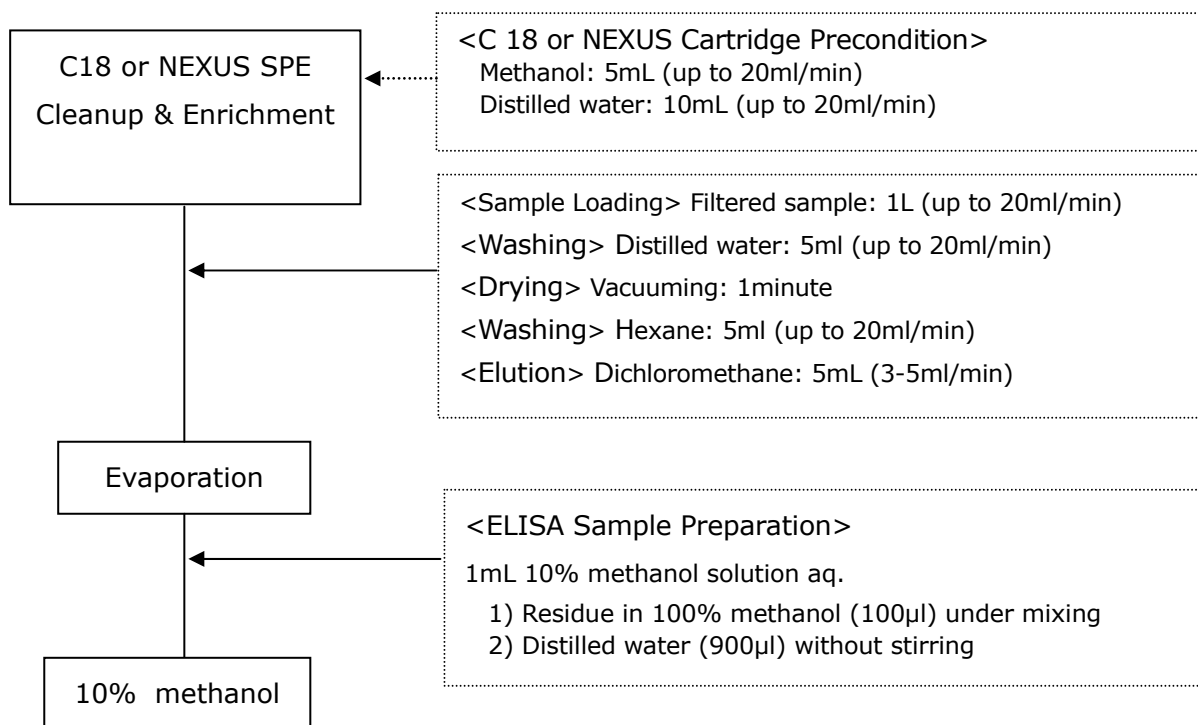


Example:

Sample Matrix	Typical Concentration	Recommended Sample Series
Treated water (effluent) River water	1ng/L (EE2)	- 1000-fold concentration - 10-fold dilution of the above concentrate
Raw wastewater (influent)	10-100ng/L (EE2)	- 1000-fold concentration - 10-fold & 100-fold dilutions of the above concentrate

If most of the residue remains undissolved, evaporate the 10% methanol solution again with nitrogen gas. Add 10 $\mu$ L of 100% DMSO to the obtained residue and stir the mixture with a vortex. Then, add 100 $\mu$ L of 100% MeOH, 10 times of the volume of DMSO, terminate the mixing, and add distilled water until the total volume amounts to 1000 $\mu$ L (1mL). The composition of the resulting solution should be 1%DMSO and 10%MeOH aqueous solution. Then, the solvent composition in each standard solution must be prepared likewise as 1%DMSO and 10%MeOH aqueous solution.

## Flowchart



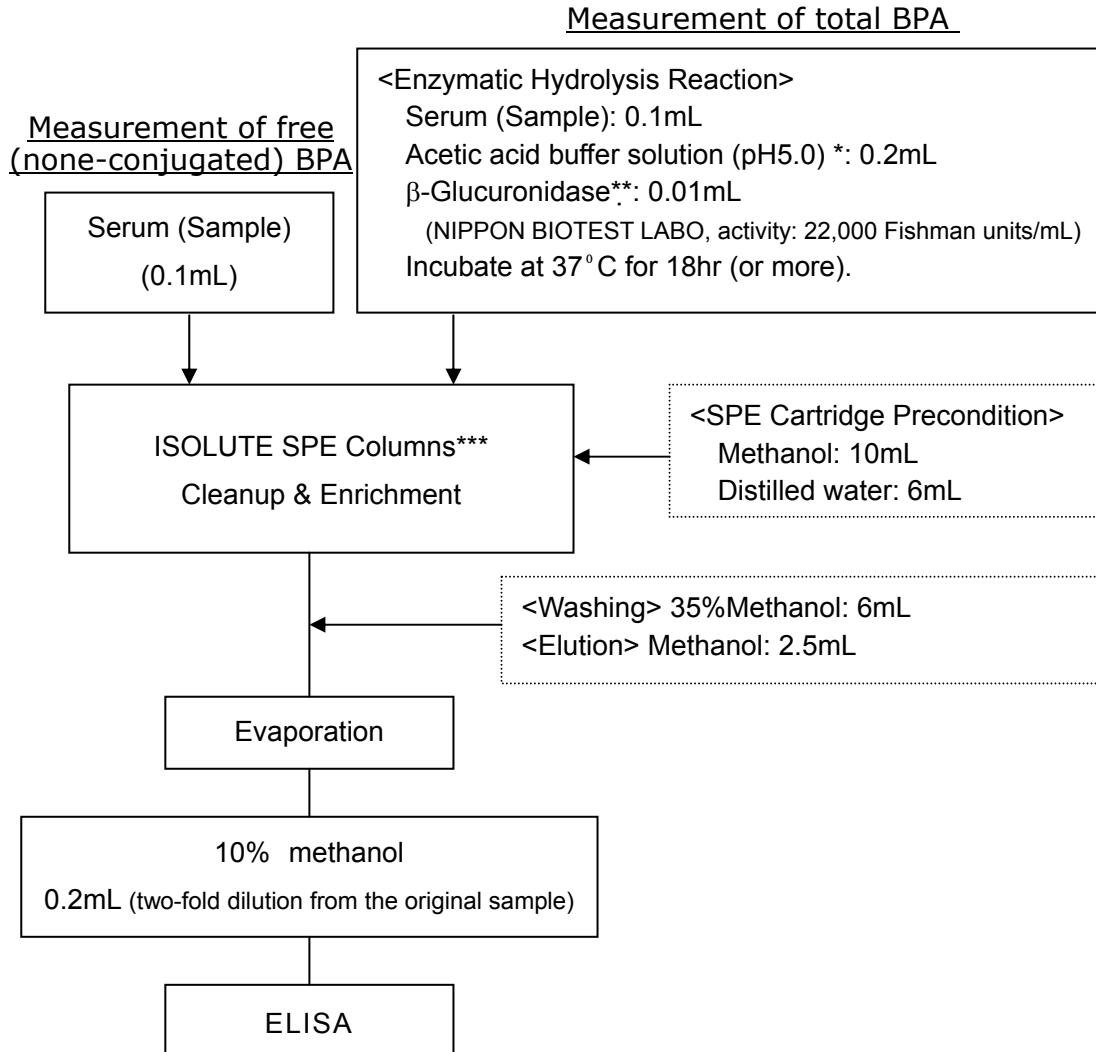
相関性等に関するデータは前項(6.グラファイトカーボンカラム法による女性ホルモンの測定)のEE2、NEXUSカラムの部分を参照。

ELISA (Target)	Matrix	Procedure
BPA	Serum	Enzymatic Hydrolysis + SPE

## 血清中のBPA測定方法

### Clean-up Procedure for Serum Samples with ELISA for BPA

#### 1) Flow Chart



#### 2) Materials

Solid phase extraction cartridge (e.g. Isolute M-M Cartridge  
 Producer: ISOLUTE M-M 500mg/3ml PART#:904-0050-B  
 INTERNATIONAL SORBENT TECHNOLOGY)

\*Acetic acid Buffer solution (pH5.0)

Sodium Acetate	1.2 g
Acetic Acid	1 mL
L-Ascorbic Acid	0.15 g
EDTA-2Na	0.01 g
Distilled Water	100 mL

\*\*beta- glucuronidase(example)

Distributor	Product No.	Origin	Optimum pH	Activity (Fishman units)
NIPPON BIOTEST	type-AI	Pomacea canaliculata	5.0	22,000 units/mL
Sigma-Aldrich	G0751	Helix pomatia	5.0	>300,000 units/g solid

Note:

1. When using beta-glucuronidase except for NIPPON BIOTEST, please adjust the activity of enzyme solution to approximately 22,000 Fishman units / mL.

\*\*\*ISOLUTE M-M, 500mg/3mL (Biotage ab., #904-0050-B)

Target BPA	Free-BPA(ng/mL)		Total-BPA(ng/mL)	
Analytical Method	HPLC	ELISA	HPLC	ELISA
No. 1	<0.20	0.45	0.57	3.9
No. 2	<0.20	1.3	1.6	100
No. 3	<0.20	0.70	0.84	3.0
No. 4	<0.20	0.47	1.5	7.3
No. 5	<0.20	1.0	1.6	9.9
No. 6	<0.20	0.48	0.87	5.6
No. 7	<0.20	0.67	0.28	1.9
No. 8	<0.20	1.0	0.52	15
No. 9	<0.20	0.46	0.25	1.2
No. 10	<0.20	0.45	0.30	4.6

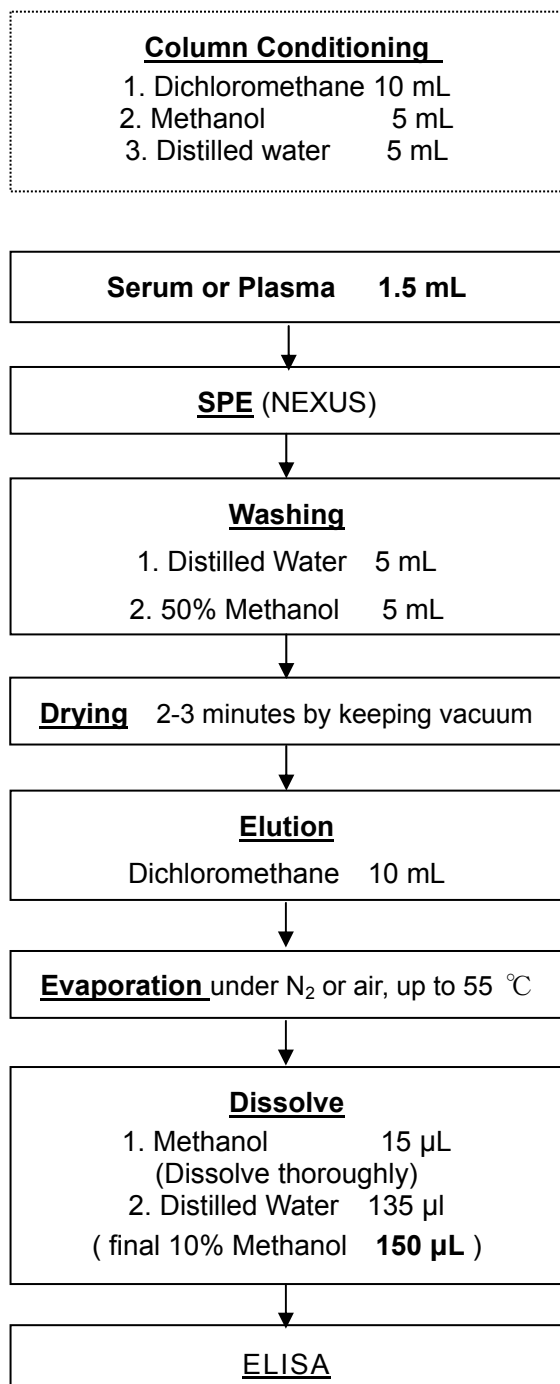
ELISA (Target)	Matrix	Procedure
Estrogens	Serum	SPE

## 血清中のエストロゲン類の測定方法

### Procedure for measuring estrogens in Serum with ELISA

#### Flow Chart

(Samples are concentrated 10 fold with a following procedure.)



#### <Recovery Test Result>

##### RUN-1

Sample	n	EE2 (ng)	Recovery(%)
Serum	1	303	101
	2	294	98
Distilled Water	1	326	109
	2	378	126

##### RUN-2

Sample	n	EE2 (ng)	Recovery(%)
Serum	1	303	101
	2	321	107
Distilled Water	1	270	90
	2	318	106

300ng of EE2 was spiked to 1.5 mL of human serum or distilled water.

#### NEXUS SPE Cartridge

Producer: VARIAN

PART#:1210-3102

ABSELUT-NEXUS,200MG 6ML,30/PK



ELISA (Target)	Matrix	Procedure
BPA	Culture	Dilution

## 培地中の BPA 測定

### 方法

#### 1. サンプル調製

培地(10ml)に BPA を添加(最終濃度:100, 10, 1, 0.1 mg/L)後、BPA 添加培地及び無添加培地を下記のように 10% MeOH で希釈し、低感度 BPA ELISA と高感度 BPA ELISA により測定を行った。

#### 2. サンプル希釈

各 ELISA の  $Ic_{50}$  付近(低感度 ELISA:20  $\mu$ g/L、高感度 ELISA:0.5  $\mu$ g/L)となるように 10%MeOH で以下の様に希釈後、測定した。

BPA 添加量[mg/L]	希釈倍率	
	低感度 ELISA	高感度 ELISA
100	× 5,000	× 200,000
10	× 500	× 20,000
1	× 50	× 2,000
0.1	× 5	× 200

### 結果

BPA 添加量[mg/L]	回収率 [%]	
	低感度 ELISA	高感度 ELISA
100	104	94
10	102	88
1	112	80
0.1	117	77

### 結論

無添加培地の測定値は定量下限値以下であったのに対し、添加培地ではいずれの添加量でも回収率はほぼ 100%であった。このことから、本培地中の BPA 測定に低感度 ELISA 及び高感度 ELISA は使用可能であると判断した。

ELISA (Target)	Matrix	Procedure
LAS, AE, NP, APE	布	MeOH 抽出

## 布に吸着した LAS、AE、NP、APE の測定

### (1) サンプルングと保存方法

- ①分析する布1gを秤量
- ②蓋付きの三角フラスコにメタノール 25mLを加え、その中に①の布を入れ、1分間手で攪拌する。
- ③②を一晩放置する。
- ④手でよく攪拌してから布を取り出し、三角フラスコに蓋をして保存サンプルとする。

### (2) ELISA 測定用試料の作成

- ①上記保存サンプルから 100  $\mu$ L を使い捨て培養試験管に入れる。(100%メタノール溶液)
- ②蒸留水 900  $\mu$ L を正確に加え ELISA 用試料とする。(10%メタノール溶液)

洗浄条件	被洗布への残留洗剤濃度	
	単位: $\mu$ g/g・布	
	LAS	AE
1	221	196
2(すすぎあり)	104	294
2(すすぎなし)	59	637

使用洗剤:

A(成分: LAS 21%, AE 7%)

B(成分: AE 31%)

サンプル	ELISA測定値		計算値
	AP+APE:①	APE:②	①-②*
毛	1074	529	545
顔料プリント	457	414	43
染料プリント	218	183	35
ナイロン	205	151	54
絹	191	186	6
ポリエステル	198	131	66
綿	47	21	26
レーヨン	15	<20	
アクリル	<5	<20	
布なし(ブランク)	<5	<20	

\*: ①-②: アルキルフェノール