

スターバー抽出-加熱脱着-GC/MS法を用いた
フェノール性内分泌かく乱化学物質の分析

2006年

川口 研

目次

論文リスト		P. 1
略語リスト		P. 2
序論		P. 4
第一章	SBSE-TD-GC/MS法を用いた河川水中OP及びNPの測定	
第一節	はじめに	P. 8
第二節	実験方法	P. 8
第三節	結果及び考察	P. 11
第四節	小括	P. 16
第二章	<i>In situ</i> 誘導体化を伴うSBSE-TD-GC/MS法による河川水中 フェノール性内分泌かく乱化学物質の一斉分析	
第一節	はじめに	P. 17
第二節	実験方法	P. 18
第三節	結果及び考察	P. 22
第四節	小括	P. 29
第三章	<i>In situ</i> 誘導体化を伴うSBSE-TD-GC/MS法によるヒト尿中 フェノール性内分泌かく乱化学物質の一斉分析	
第一節	はじめに	P. 31
第二節	実験方法	P. 32
第三節	結果及び考察	P. 35
第四節	小括	P. 43
結論		P. 44
謝辞		P. 45
参考文献		P. 46

論文リスト

本論文は、学術雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

1. Determination of 4-nonylphenol and 4-*tert*-octylphenol in water samples by stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry, M. Kawaguchi, K. Inoue, M. Yoshimura, R. Ito, N. Sakui, H. Nakazawa, *Anal. Chim. Acta*, 505 (2004) 217-222 (第一章)
2. Trace analysis of phenolic xenoestrogens in water samples by stir bar sorptive extraction with *in situ* derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry, M. Kawaguchi, K. Inoue, M. Yoshimura, N. Sakui, N. Okanouchi, R. Ito, Y. Yoshimura, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. A*, 1041 (2004) 19-26 (第二章)
3. Stir bar sorptive extraction with *in situ* derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for measurement of phenolic xenoestrogens in human urine samples, M. Kawaguchi, N. Sakui, N. Okanouchi, R. Ito, K. Saito, S. Izumi, T. Makino, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. B*, 820 (2005) 49-57 (第三章)

略語リスト

APs	Alkylphenols
APEOs	Alkylphenol ethoxylates
BP	4- <i>tert</i> -Butylphenol
BP-d	Deuterium 4- <i>tert</i> -butylphenol
BPA	Bisphenol A
BPA- ¹³ C	Bisphenol A- ¹³ C ₁₂
CIS	Cooled injection system
DCP	Dichlorophenol
DCP-d	Dichlorophenol-d ₄
EDCs	Endocrine disrupting chemicals
EI	Electron ionization
GC	Gas chromatography
HPLC	High performance liquid chromatography
LC	Liquid chromatography
LLE	Liquid-liquid extraction
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
MS	Mass spectrometry
NOAEL	No-observed-adverse-effect level
NP	4-Nonylphenol
NP-d	4-(1-Methyl) octylphenol-d ₅
OP	4- <i>tert</i> -Octylphenol
OP-d	Deuterium 4- <i>tert</i> -octylphenol
PCP	Pentachlorophenol

PCP- ¹³ C	Pentachlorophenol- ¹³ C ₆
PDMS	Polydimethylsiloxane
PTV	Programmable temperature vaporization
RSD	Relative standard deviation
SBSE	Stir bar sorptive extraction
SIM	Selective ion monitoring
S/N	Signal to noise ratio
SPE	Solid phase extraction
SPME	Solid phase microextraction
TD	Thermal desorption
TDS	Thermal desorption system
TIC	Total ion chromatogram

序論

我々が快適で豊かな生活を享受できるのは、化学物質の恩恵と言っても過言ではない。これまでに様々な化学物質が作られ、環境や生物に対する安全性を評価するために多くの試験がなされてきた。しかし、1996年、Colbornらは、環境に放出された化学物質の中に、内分泌系をかく乱し、生殖、発達、神経などに影響を及ぼす化学物質が存在することを提唱した[1]。その後、これらの化学物質は、内分泌かく乱化学物質(EDCs)として注目されるようになり、様々な研究が行われている。その結果、暴露量が比較的多いと予想される合成高分子素材(プラスチック)由来のフェノール性化合物の一部に、弱い女性ホルモン様作用があることが判明し、野生生物やヒトへの影響が懸念された[2, 3]。従って、当該化学物質の生体リスク評価が必要である。さらに、リスク評価を行うためには、ヒト暴露量を正確に把握するための微量分析法の開発が要求されている。

我が国では、環境省が1998年10月に水質、底質、水生生物を対象とした外因性内分泌かく乱化学物質調査暫定マニュアルを発表した[4]。この中でフェノール類の分析手法として、ジクロロメタンを用いる液-液抽出(LLE)法やオクタデシルシリル基をベースとした固相抽出(SPE)法等の前処理を行った後、ナフタレン- d_8 及びフェナントレン- d_{10} を内標準物質としたガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)によるSIM測定法が報告されている。しかしながら、これらの前処理法では、高い感度を得るために、河川水で1 L、生物試料で20 gと大量の試料を必要とした。また、ナフタレン- d_8 及びフェナントレン- d_{10} を用いた内標準法では、分析対象物質との物理化学的性質が異なるため、前処理過程での回収率の補正を行うことは難しく、精度の点において問題がある。よって、必要な試料量を可能な限り少なくするためにも、より高感度かつ高精度であり、簡便な分析法が要求されている。

近年の科学技術の発展において、機器分析は目覚ましい進歩を遂げている。とりわけ、ガスクロマトグラフ法 (GC) や高速液体クロマトグラフ法 (HPLC) といった機器は、その汎用性から分離分析の主軸を担っている。更に、質量分析計 (MS) を検出器とする GC/MS や LC/MS といったハイブリッドな分析機器が開発され、高感度な分析法の構築を可能としている。更に、MS は、質量の異なるものを分離することが可能である。この特徴を利用した同位体希釈質量分析法は、分析対象物質の水素や炭素といった原子を安定同位体 (^2H 及び ^{13}C) で置き換えたサロゲート物質を用いて、前処理操作における回収率の補正を行うことにより、高精度な分析法を構築できることから、近年注目を集めている[5-8]。

一方、前処理技術は古くから液々分配の原理を利用した LLE 法が用いられてきた。しかしながら、大量の有機溶媒を必要とすることや高感度化のためには濃縮操作が必要であった。また、1970 年代後半には、液体と固体間での物理的な吸着によって化学物質を抽出する SPE 法が開発され、現在でも広く用いられている[9]。しかし、SPE 法は、操作が煩雑であり、大量の有機溶媒を使用するなどの問題点があった。この問題点を解決するために 1980 年代後半になって、無極性の液相であるポリジメチルシロキサン (PDMS) をコーティングしたファイバーによって化学物質を抽出する固相マイクロ抽出 (SPME) 法が開発された[10]。この液相を用いた化学物質の収着は、化学物質個々の分配係数に支配される。また、LLE 法のように大量の有機溶媒を必要としないなどの利点がある。しかしながら、ファイバーにコーティングできる PDMS 相は、約 $0.5 \mu\text{l}$ と少量であり、試料によっては、マトリックスの影響を受けて、抽出・濃縮プロセスが良好に進行しないなどの問題点がある。1999 年、この課題を解決する方法として、Ghent 大学 (ベルギー) の Sandra、Eindhoven 技術科学大学 (オランダ) の Baltussen らによってスターバー抽出 (SBSE) 法が開発された[11]。SBSE

法は、大量の PDMS(24-126 μ l)をコーティングしたガラス製攪拌子を用いて、試料中の微量分析対象物質を効率よく抽出・濃縮・精製する方法である(Fig. 1)。この方法の最も大きな特徴は、水系試料に PDMS 攪拌子を入れ、スターラーで攪拌するといった極めて簡便な操作で、前処理を行うことができる点にある(Fig. 2)。また、PDMS 攪拌子に移行した成分は、加熱脱着装置 (TDS) の搭載されたガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS)を用いてオンラインで測定でき、分析対象物質を大量にカラムに導入できるため、高感度な測定が可能である。そのため、SPE 法や SPME 法といった従来の前処理法よりも、操作性及び感度に優れた高感度分析を行うことが可能であり、環境、生体及び食品分析への応用が期待されている[12-22]。

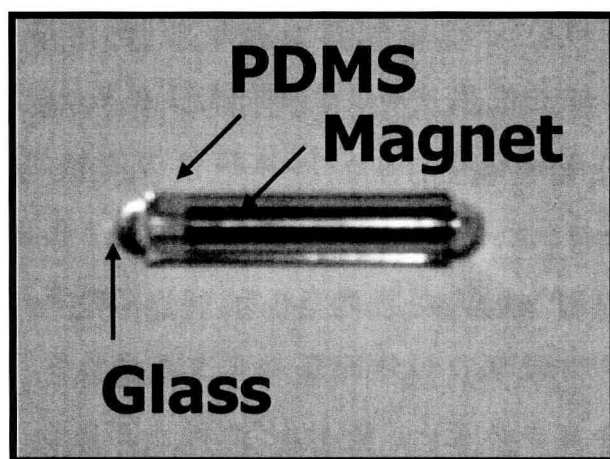


Fig. 1 Picture of PDMS stir bar

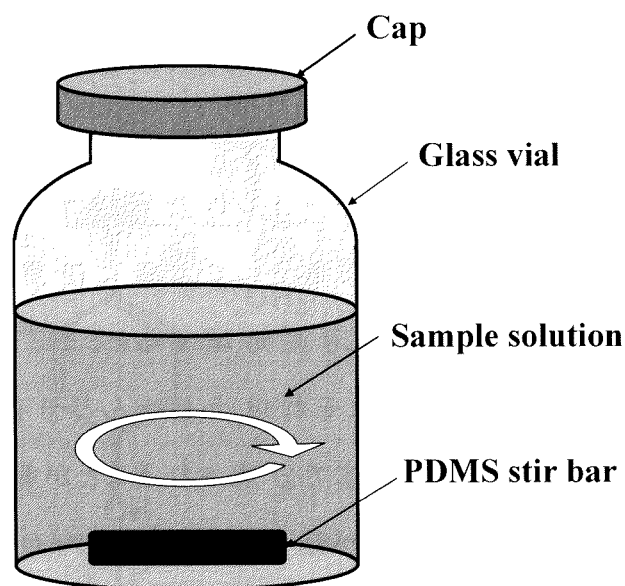


Fig. 2 Schematic of SBSE set up

本研究では、SBSE法を用いて、ヒト暴露量を評価するための生体試料中フェノール性内分泌かく乱化学物質を簡便かつ高感度に分析する方法の構築を試みた。また、分析対象物質の安定同位体標識物質をサロゲートとして利用し、回収率を補正することで高精度な分析法を開発した。第一章では、単純なマトリックスである河川水を対象試料とし、SBSE-加熱脱着(TD)-GC/MS法を用いて4-*tert*-オクチルフェノール(OP)及び4-ノニルフェノール(NP)の分析法を構築し、その有用性を検討した。第二章では、更なる高感度化を目指し、SBSE法の操作過程に誘導体化試薬を加えて、誘導体化と抽出を同時に行う*in situ*誘導体化を伴うSBSE法を開発した。本法を用いて、河川水中フェノール性内分泌かく乱化学物質の一斉分析を行った。更に、第三章では、*in situ*誘導体化を伴うSBSE-TD-GC/MS法を用いて、ヒト尿中フェノール性内分泌かく乱化学物質の一斉分析法を構築し、当該化学物質のヒト暴露実態を解明した。

第一章 SBSE-TD-GC/MS法を用いた河川水中 OP 及び NP の測定

第一節 はじめに

アルキルフェノール類 (APs) は非イオン性界面活性剤であるアルキルフェノールエトキシレート (APEOs) の原料として大量に使用されており、汚水中で APEOs を好気性条件下で活性汚泥処理すると、モノまたはジエトキシレートまで分解するが、この条件ではそれ以上ほとんど分解が進行しない。一方、嫌氣的条件下では APs にまで分解されることが報告されている[23]。現実の排水中でも同様な反応が起こっており、APEOs は通常の活性汚泥処理により速やかに除去されるが、APs は、そのままの条件下では代謝分解除去され難い[24]。また、APs の一種である OP 及び NP は、内分泌かく乱作用を有すると報告されている物質であり、その女性ホルモン様作用が指摘されている[2]。アメリカ及びヨーロッパ諸国では、ニジマスへの生殖異常を起こさせる NP の閾値の約 $10 \mu\text{g/l}$ [25] に安全係数 $1/10$ を乗じた $1 \mu\text{g/l}$ が規制の目安と考えられている[26]。そのため、この数値を正確に測定できる分析法が要求されている。

本章では、SBSE-TD-GC/MS法を用いた OP 及び NP の高感度かつ高精度であり、簡便な分析法を構築した。更に、安定同位体標識物質をサロゲート物質として使用し、回収率を補正することで、高精度な測定を可能とした。

第二節 実験方法

2-1. 試薬

OP 及び NP は、関東化学社製環境分析用標準品を用いた。サロゲート物質である OP-d、NP-d は、林純薬工業社から購入した。分析対象物質の構造式を Fig. 1-1 に示す。その他の試薬は、和光純薬社より購入し

たものを用いた。精製水は、ミリポア社製 EDS ポリッシャー付き Milli-Q gradient A10 によって精製したものをを用いた。

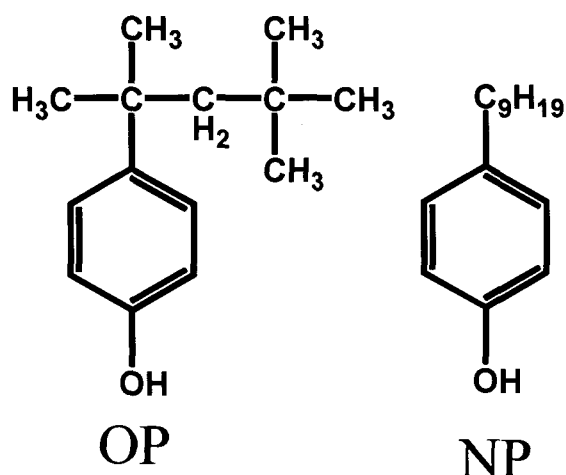


Fig. 1-1 Chemical structure of OP and NP

2-2. 装置

PDMS 相 (約 24 μ l) をコーティングした攪拌子は、Gerstel 社から購入した。使用前に、ヘリウム気流下で 300 °C、4 時間のプレコンディショニングしたものをを用いた。また、この攪拌子は再コンディショニング (ヘリウム気流下で 300 °C、4 時間) を行うことで 50 回以上繰り返して使用しても、測定に影響を及ぼすことはなかった。SBSE 法を行う際のバイアル瓶は、Agilent 社製ヘッドスペースサンプル (10 ml) をを用いた。加熱脱着には、Gerstel 社製 TDS2 加熱脱着装置及び Gerstel 社製 CIS 4 プログラム温度昇温装置を使用した。CIS は、PTV の一種であり、注入口を低温にすることで、一度、化学物質を保持した後、急激な温度上昇により全量を GC/MS に導入するシステムである。オートサンプラーには、Gerstel 社製 TDS A オートサンプラーを用いた。GC/MS 装置は、Agilent 社製 6890N ガスクロマトグラフと Agilent 社製 5973N 質量分析計を用いた。

2-3 標準溶液及び検量線の作成

OP 及び NP 標準品を化学天秤で 100 ml 用メスフラスコに 100 mg 量り取り、メタノールで 1.0 mg/ml となるように調製し、標準原液とした。また、各標準原液を混合し、10 µg/ml となるように希釈し、標準混合溶液を調製した。0.001-10 ng/ml(OP)及び 0.1-10 ng/ml(NP)となるように精製水を用いて調製し、検量線作成用標準溶液とした。また、各サロゲート物質を任意の濃度になるようメタノールで希釈した。

SBSE-TD-GC/MS-SIM 法により、検量線作成用標準溶液を測定し、サロゲート物質とのピーク面積比を利用して検量線を作成して定量分析を行った。

2-4 加熱脱着条件

TDS 2 加熱脱着装置：

初期温度 20 °C (1 分保持) → (60 °C/分) → 280 °C (5 分保持)

CIS 4 プログラム温度昇温装置：

初期温度 -150 °C → (12 °C/秒) → 300 °C (10 分保持)

2-5 GC/MS 条件

<GC>

注入口：スプリットレス

カラム：DB-5MS fused silica column

(30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 µm 膜厚、Agilent 社製)

カラム恒温槽：初期温度 60 °C → (15 °C/分) → 280 °C (5 分保持)

移動相：ヘリウム(99.9999%)

流速：1.2 ml/分

<MS>

イオン化 : EI (70 eV)

質量分離モード :

SIM (各化学物質のモニタリングイオンを Table 1-1 に示す。)

Table 1-1
Monitoring ion of GC/MS

Componnd	Target ion (<i>m/z</i>)	Qualifier ion (<i>m/z</i>)
OP	135	107
OP-d	140	—
NP	135	107
NP-d	126	—

2-6 SBSE 法による試料前処理操作

バイアル瓶にサロゲート物質である OP-d 及び NP-d を添加した河川水 (2 ml) を加えた。その後、PDMS 攪拌子をバイアル瓶に入れて密封し、スターラー (500 rpm) で 60 分間攪拌した。その後、PDMS 攪拌子を取り出して、TDS に挿入し、GC/MS で測定した。

第三節 結果及び考察

3-1 GC/MS 条件の最適化

EI 法を用いて、スキャン測定した分析対象物質のマススペクトルを Fig. 1-2 に示す。OP 及び NP では、*m/z* 135 が基準ピークとして、*m/z* 107 がフラグメントイオンピークとして観察された。更に、NP のサロゲート物質である NP-d は、基準ピークが *m/z* 126 に観察された。一方、OP のサロゲート物質である OP-d は、*m/z* 140 付近に複数のイオンピークがみられた。これらのピークは、OP-d が重水素を 1-12 個持つ異性体であるため、複数のピーク

クが得られたと考えられる。しかし、OP の定量イオンである m/z 135 にフラグメントイオンを持たないことから、OP-d は、OP のサロゲートとして使用することが可能である。MS での SIM 測定におけるモニタリングイオンを Table 1-1 に示す。

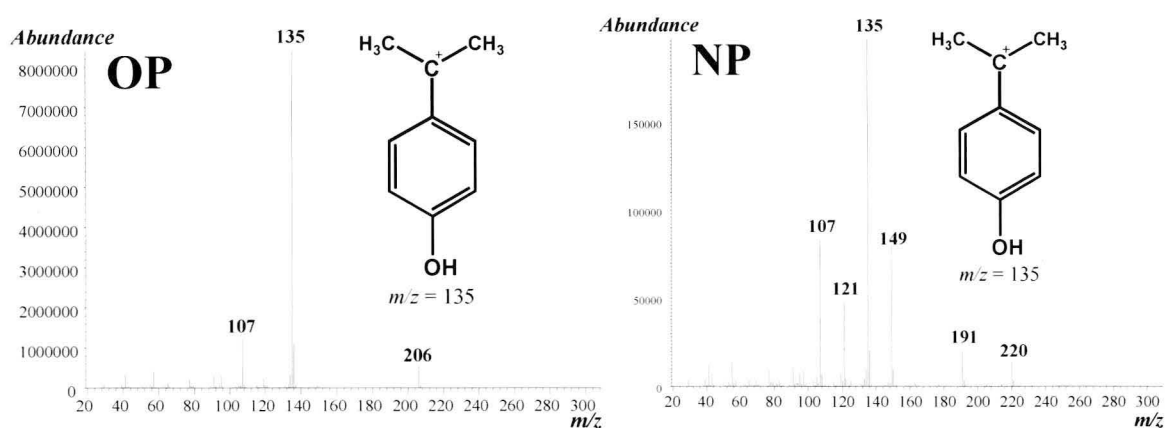


Fig. 1-2 Mass spectra of OP and NP

OP 及び NP の保持時間は、それぞれ 9.30 及び 10.05-10.45 分であった。NP では、 m/z 135 において、5 本のピークが観察されたが、これは NP が異性体の混合物であるためである。NP の定量には、5 本のピーク面積を全て加算したものをを用いた。

3-2 SBSE 攪拌時間の検討

SBSE 法における攪拌時間の最適化を検討した。精製水 (2 ml) に 10 ng/ml となるように OP 及び NP 標準混合溶液を添加したものをを用いた。攪拌時間を 1-90 分としたときの各化学物質の相対レスポンスを比較した。得られた結果を Fig. 1-3 に示す。約 60 分の攪拌で分析対象物質の PDMS 相への分配が平衡に達したため、最適時間を 60 分として、以後の

実験を行った。

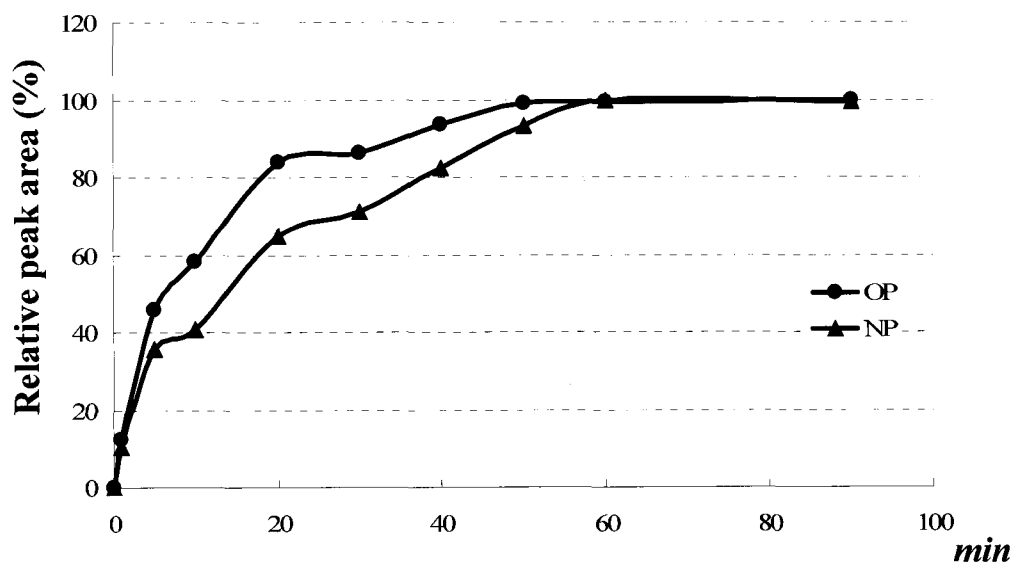


Fig. 1-3 Extraction time profiles of OP and NP in water samples using PDMS stir bar.

A stir bar coated with PDMS is added to 2.0 ml of a water sample and stirring is commenced for 1 to 90 min at room temperature (25 °C) in a glass vial. The extract is then analyzed by TD-GC-MS.

3-3 検出限界及び定量限界

OP及びNPの検出限界(LOD、S/N=3)は、それぞれ0.002、0.02 ng/mlであり、定量限界(LOQ、S/N>10)は、0.01、0.1 ng/mlであった。サロゲート物質を用い、内標準法によって検量線を作成した結果、0.01-10 ng/ml(OP)及び0.1-10 ng/ml(NP)の濃度範囲において、相関係数0.999以上と良好であった。分析バリデーションの概要をTable 1-2に示す。また、河川水(2 ml)に0.5 ng/mlとなるように標準混合溶液を添加したものを測定した際のSIMクロマトグラムをFig. 1-4に示す。

Table 1-2

Validation of SBSE-TD-GC-MS method for analysis of OP and NP in river water sample

Compound	Retention time (min)	LOD ^a (ng/ml)	LOQ ^b (ng/ml)	Range (ng/ml)	Correlation coefficient (r)
OP	9.3	0.002	0.01	0.01-10	0.999
NP	10.05-10.45	0.02	0.1	0.1-10	0.999

^aLOD : limit of detection (S/N = 3)^bLOQ : limit of quantification (S/N > 10)

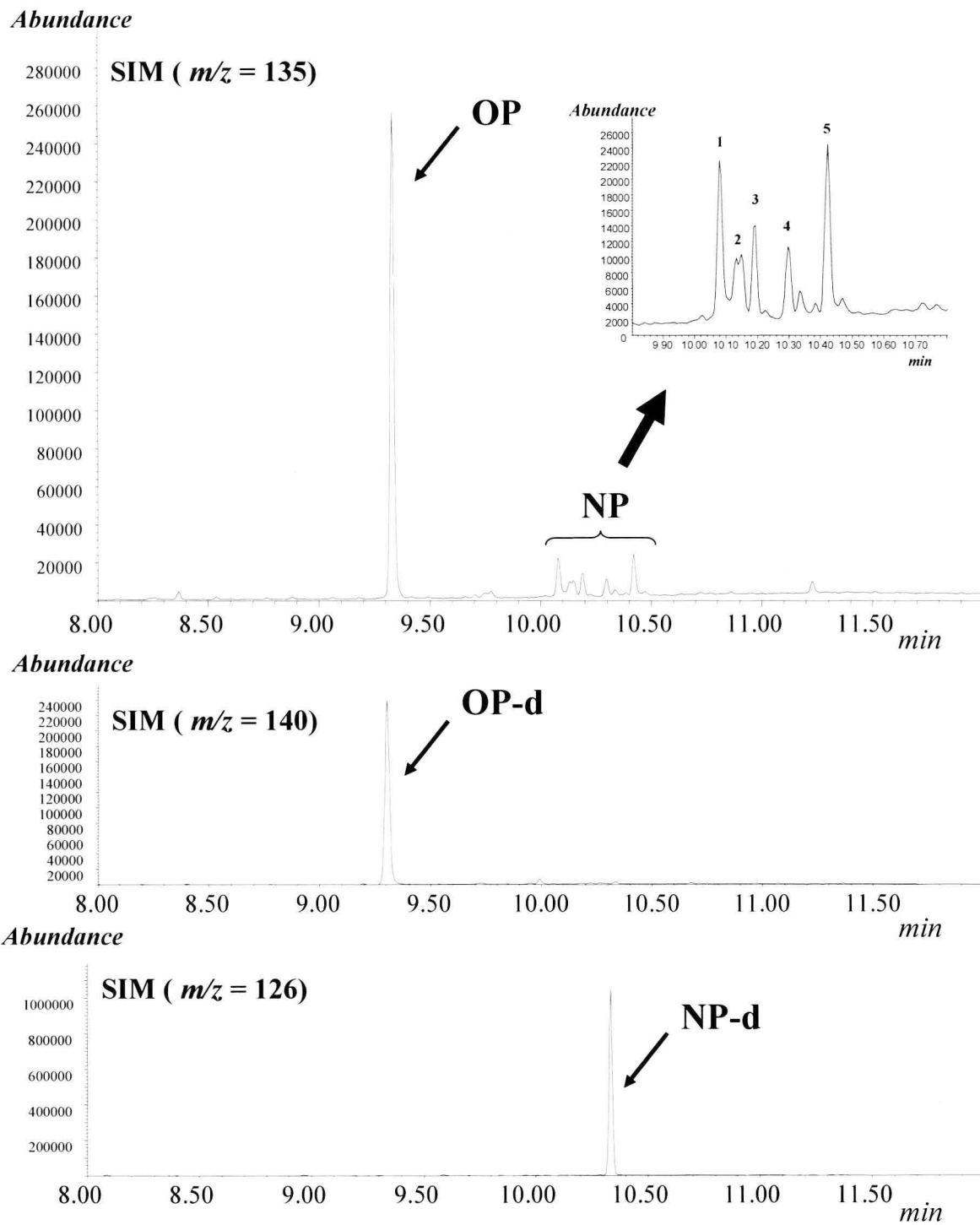


Fig. 1-4 SIM chromatograms of river water sample spiked with the 0.5 ng/ml standard and surrogate standards

3-4 添加回収試験

本法の回収率及び再現性を評価するために、添加回収試験を行った。河川水(2 ml)に対し、0.5 及び 10 ng/ml となるように OP 及び NP 標準混合溶液を添加して、SBSE-TD-GC/MS 法を用いて測定した(n=6)。また、回収率の算出には、ブランク測定を行い、添加したものからブランク値を減算したものをを用いた。また、回収率は、サロゲート物質を用いて補正した。結果を Table 1-3 に示す。回収率 97.3-106.2 % (RSD: < 6.6 %)と良好な結果が得られた。従って、本法を用いることで、河川水中 OP 及び NP の高感度かつ高精度な分析を行うことが可能であると示唆された。

Table 1-3
Recoveries of OP and NP in spiked river water samples

Compound	Amount spiked		10 ng/ml	
	0.5 ng/ml		Recovery (%)	RSD (%) [*]
	Recovery (%)	RSD (%) [*]	Recovery (%)	RSD (%) [*]
OP	106.2	4.4	99.3	5.3
NP	97.3	6.6	98.5	5.3

^{*}The recoveries and precision were also examined by replicate analysis (n = 6) of river water samples.

第四節 小括

SBSE-TD-GC/MS 法を用いて、河川水中の OP 及び NP の分析法を開発した。SBSE 法の攪拌時間を検討した結果、約 60 分の攪拌で分析対象物質の PDMS 相への分配が平衡に達したため、最適時間を 60 分とした。更に、GC/MS 測定条件の最適化を検討し、OP 及び NP の定量イオンを m/z 135、定性イオンを m/z 107 とした。本法の OP 及び NP の検出限界は、それぞれ 0.002 及び 0.02 ng/ml であり、定量限界は、0.01 及び 0.1 ng/ml となり、高感度分析法を達成することができた。更に、添加回収試験において、サロゲート物質を用いることで、回収率の補正を行うことができ、回収率 97.3-106.2 % (RSD: < 6.6 %)と良好な結果が得られた。

第二章 *In situ* 誘導体化を伴う SBSE-TD-GC/MS 法による河川 水中フェノール性内分泌かく乱化学物質の一斉分析

第一節 はじめに

ビスフェノール A (BPA) は、主としてポリカーボネート及びエポキシ樹脂の原料として使用され、その用途は広い。そのため、環境中に BPA が放出されることも考えられる。しかし、アルキルフェノールと同様に女性ホルモン様作用を示すことが報告されている[3]。更に、河川水から BPA が低濃度で検出されたという報告がなされている[27]。しかし、その濃度は、数十 pg/ml であるため、高感度かつ高精度な分析法が求められている。

第一章で構築した SBSE-TD-GC/MS 法を用いて、河川水中 BPA の測定に適用した。BPA は、定量イオンを m/z 213、定性イオンを m/z 228 とした。しかし、BPA の検出限界及び定量限界は、0.5 及び 2.0 ng/ml であり、期待以上の感度を得ることはできなかった。この原因として、BPA は構造中に2つのフェノール性水酸基を有しているため極性が高く、無極性である PDMS 相による抽出・濃縮が良好に行われなかったことや GC のキャピラリーカラム内での分離に悪影響を与えたことが考えられた。更に、BPA は揮発性に乏しいことから、加熱による PDMS 攪拌子からの脱着が不十分であることや GC の注入口やカラムへの吸着などが推察された。

本章では OP、NP 及び BPA を含むフェノール性内分泌かく乱化学物質の水酸基を誘導体化し、SBSE-TD-GC/MS で測定することを検討した。誘導体化を行うことで、極性の低下及び揮発性の向上を目指した。これらが達成されれば、SBSE 法での回収率の向上及び加熱脱着時における気化が良好に進行し、感度の上昇が期待される。

これまでに、GC 分析におけるフェノール性化学物質の誘導体化は種々の報告がなされている[28]。最も広く用いられている誘導体化法は、トリメ

チルシリル化である。この方法は、様々な官能基(水酸基、アルデヒド基、カルボキシ基及びアミノ基)を誘導体化することが可能である。しかし、水が存在すると加水分解が起こり、誘導体化反応が進行できないため、トリメチルシリル化は、河川水のような水系試料を対象としたSBSE法に適用することは、困難である。他方、無水酢酸を用いるアシル化は、水が存在する条件下でも、フェノール性水酸基を誘導体化することが可能である。そこで、測定試料中に誘導体化試薬を加えて、その場で誘導体化反応を行うと同時に、SBSE法で抽出・濃縮する *in situ* 誘導体化法を検討した。

本章では、測定対象物質として、内分泌かく乱作用の疑われているフェノール性化合物である 2,4-ジクロロフェノール(DCP)、4-*tert*-ブチルフェノール(BP)、OP、NP、ペンタクロロフェノール(PCP)及び BPA を選定し、計 6 種類のフェノール性内分泌かく乱化学物質の一斉分析法を試みた。

第二節 実験方法

2-1 試薬

DCP、BP、OP、NP 及び BPA は、関東化学社製環境分析用標準品を用いた。PCP は、メルク社製標準品を使用した。サロゲート物質である BP-d、OP-d、NP-d は、林純薬工業社から購入した。また、DCP-d、PCP-¹³C 及び BPA-¹³C は、Cambridge Isotope Laboratories 社から市販されているものを用いた。分析対象物質の構造式を Fig. 2-1 に示す。炭酸ナトリウム及び炭酸水素ナトリウムは、和光純薬社製特級試薬を用いた。無水酢酸は、関東化学社製微量分析用試薬を用いた。精製水は、ミリポア社製 EDS ポリッシャー付き Milli-Q gradient A10 によって精製したものをを用いた。

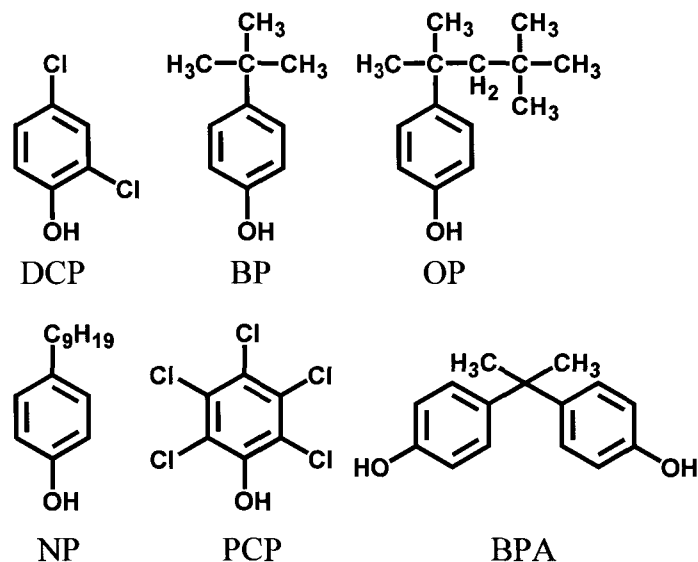


Fig. 2-1 Chemical structures of DCP, BP, OP, NP, PCP and BPA

2-2 装置

PDMS 相 (約 24 μ l) をコーティングした攪拌子は、Gerstel 社から購入した。使用前に、ヘリウム気流下で 300 $^{\circ}$ C、4 時間のプレコンディショニングしたものを用いた。また、この攪拌子は再コンディショニング (ヘリウム気流下で 300 $^{\circ}$ C、4 時間) を行うことで 50 回以上繰り返して使用しても、測定に影響を及ぼすことはなかった。SBSE 法を行う際のバイアル瓶は、Agilent 社製ヘッドスペースサンプルバイアル瓶 (20 ml) を用いた。加熱脱着には、Gerstel 社製 TDS2 加熱脱着システム及び Gerstel 社製 CIS 4 プログラム温度昇温装置を使用した。オートサンプラーには、Gerstel 社製 TDS A オートサンプラーを用いた。GC/MS 装置は、Agilent 社製 6890N ガスクロマトグラフと Agilent 社製 5973N 質量検出器を用いた。

2-3 標準溶液及び検量線の作成

DCP、BP、OP、NP、PCP 及び BPA 標準品をそれぞれ化学天秤で 10 ml 用メスフラスコに 10 mg 量り取り、メタノールで 1.0 mg/ml となるように調

製し、標準原液とした。その後、各標準原液を混合し、10 µg/ml となるように希釈し、標準混合溶液を調製した。また、各サロゲート物質を任意の濃度になるようにメタノールで希釈した。10-1000 pg/ml (DCP)、5-1000 pg/ml (BP)、2-1000 pg/ml (OP)、20-1000 pg/ml (NP)、10-1000 pg/ml (PCP)、10-1000 pg/ml (BPA)となるように精製水を用いて調製し、検量線作成用標準溶液とした。

In situ 誘導体化を伴う SBSE-TD-GC/MS-SIM 法により、検量線作成用標準溶液を測定し、サロゲート物質とのピーク面積比を利用して検量線を作成して定量分析を行った。

2-4 加熱脱着条件

TDS 2 加熱脱着装置：

初期温度 20 °C (1 分保持) → (60 °C/分) → 280 °C (5 分保持)

CIS 4 プログラム温度昇温装置：

初期温度 -150 °C → (12 °C/秒) → 300 °C (10 分保持)

2-5 GC/MS 条件

<GC 条件>

注入口：スプリットレス

カラム：DB-5MS fused silica column

(30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 µm 膜厚、Agilent 社製)

カラム恒温槽：初期温度 60 °C → (15 °C/分) → 300 °C (4 分保持)

移動相：ヘリウム(99.9999%)

流速：1.2 ml/分

<MS 条件>

イオン化 : EI (70 eV)

質量分離モード :

SIM (各化学物質のモニタリングイオンを Table 2-1 に示す。)

Table 2-1
Monitoring ion of GC/MS

Componnd	Target ion (<i>m/z</i>)	Qualifier ion (<i>m/z</i>)
DCP	162	164
DCP-d	169 ^a /165 ^b	—
BP	135	150
BP-d	145	—
OP	135	177
OP-d	140	—
NP	135	177
NP-d	126	—
PCP	266	268
PCP- ¹³ C	276	—
BPA	213	228
BPA- ¹³ C	225	—

^a River water sample

^b Human urine sample

2-6 *In situ* 誘導体化を伴う SBSE 法による試料前処理操作

バイアル瓶にサロゲート物質である DCP-d、BP-d、OP-d、NP-d、PCP-¹³C 及び BPA-¹³C を添加した河川水 (10 ml) を加えた。次に、炭酸ナトリウム (53.0 mg) 及び炭酸水素ナトリウム (42.0 mg) を加え、pH を 10.5 に調整した。その後、無水酢酸 (200 µl) を加え、PDMS 攪拌子をバイアル瓶に入れて密封し、スターラー (1000 rpm) で 90 分間攪拌した。PDMS 攪拌子を取り出し、TDS に挿入し、GC/MS で測定を行った。

第三節 結果及び考察

3-1 MS条件の最適化

EI法を用いて、スキャン測定して得られた誘導体化された各化学物質のマススペクトルを Fig. 2-2 に示す。全ての化合物において m/z 43 を確認することができた。このイオンは、誘導体化によってフェノール性水酸基がアシル化されたために生じるイオンと示唆された。DCP、BP、OP、NP、PCP 及び BPA において、それぞれ m/z 162、135、135、135、266 及び 213 が基準ピークとして観察され、SIM 測定においてこれらのイオンをモニタリングした。サロゲート物質である DCP-d、NP-d、PCP- ^{13}C 、BPA- ^{13}C では、 m/z 165、125、272、225 が基準ピークとして観察された。NP-d、BPA- ^{13}C では、基準ピークである m/z 125 及び 225 をモニタリングイオンとした。しかし、PCP- ^{13}C では、基準ピークと測定対象物質のフラグメントイオンが重なったため、 m/z 276 をモニタリングイオンとした。DCP-d では、夾雑イオンの影響から m/z 169 をモニタリングイオンとした。また、BP 及び OP のサロゲート物質である BP-d、OP-d は、それぞれ m/z 145、140 付近に複数のイオンピークがみられた。これらのピークは、BP-d、OP-d が重水素を 11-14 及び 1-12 個持つ異性体であるため、複数のピークが観察されたと考えられる。しかし、BP-d 及び OP-d は、フラグメントイオンとして BP 及び OP の定量イオンである m/z 135 を持たないことから、BP-d 及び OP-d は、サロゲートとして使用することが可能であった。以上の結果から、MS での SIM 測定におけるモニタリングイオンを決定した (Table 2-1)。

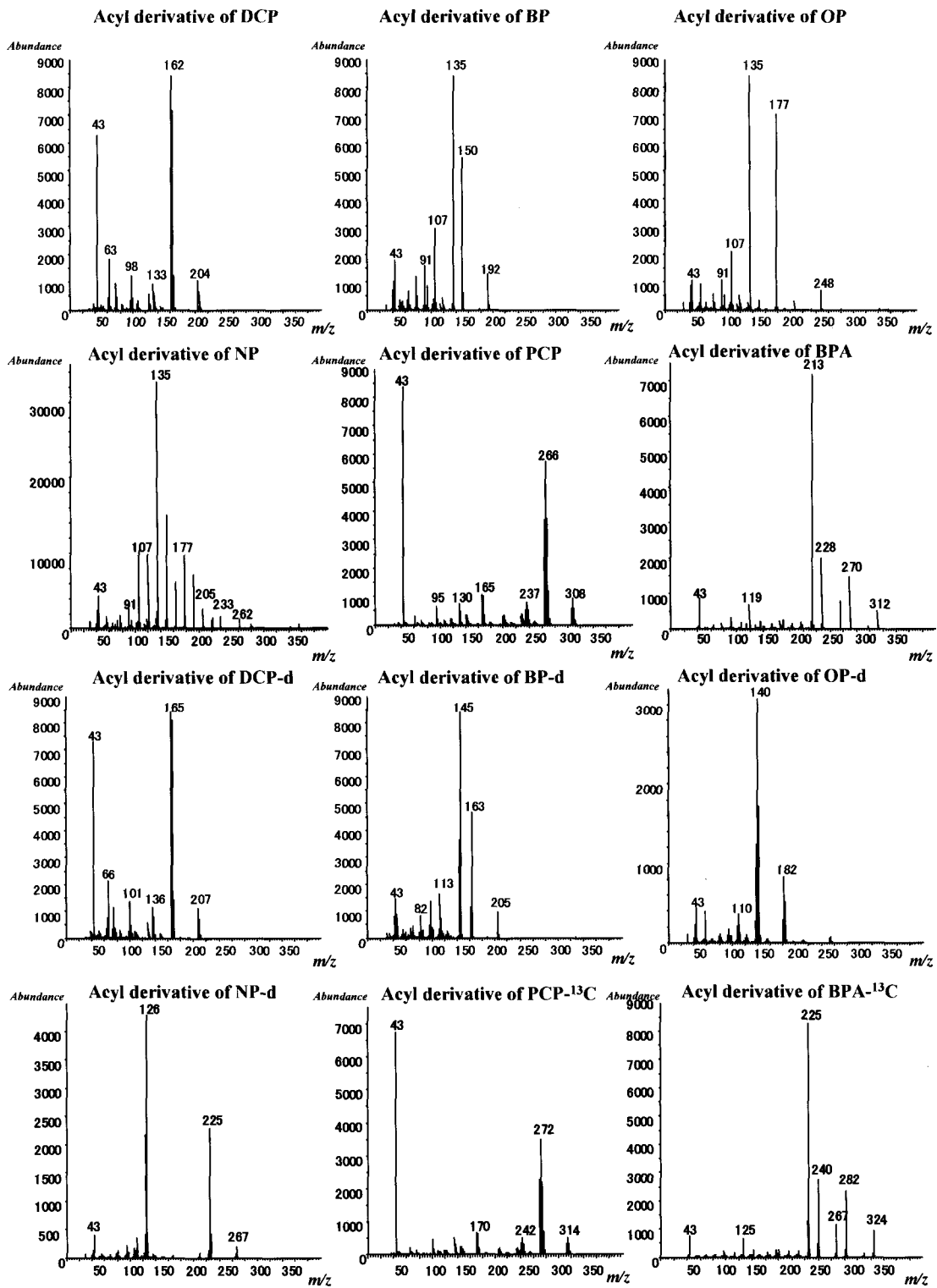


Fig. 2-2 Mass spectra of acyl derivatives of DCP, BP, OP, NP, PCP, BPA, DCP-d, BP-d, OP-d, NP-d, PCP-¹³C and BPA-¹³C

3-2 *In situ* 誘導体化を伴う SBSE 法の攪拌時間の検討

In situ 誘導体化を伴う SBSE 法の最適条件を検討した。河川水 (10 ml) に 1.0 ng/ml となるように標準混合溶液を添加したものをを用いた。PDMS 攪拌子による攪拌時間を 10-180 分としたときの各化学物質の相対レスポンスを比較した。得られた結果を Fig. 2-3 に示す。約 90 分の攪拌及び誘導体化時間で化学物質のレスポンスが平衡に達したため、試料 10 ml での最適時間を 90 分として、以後の実験を行った。

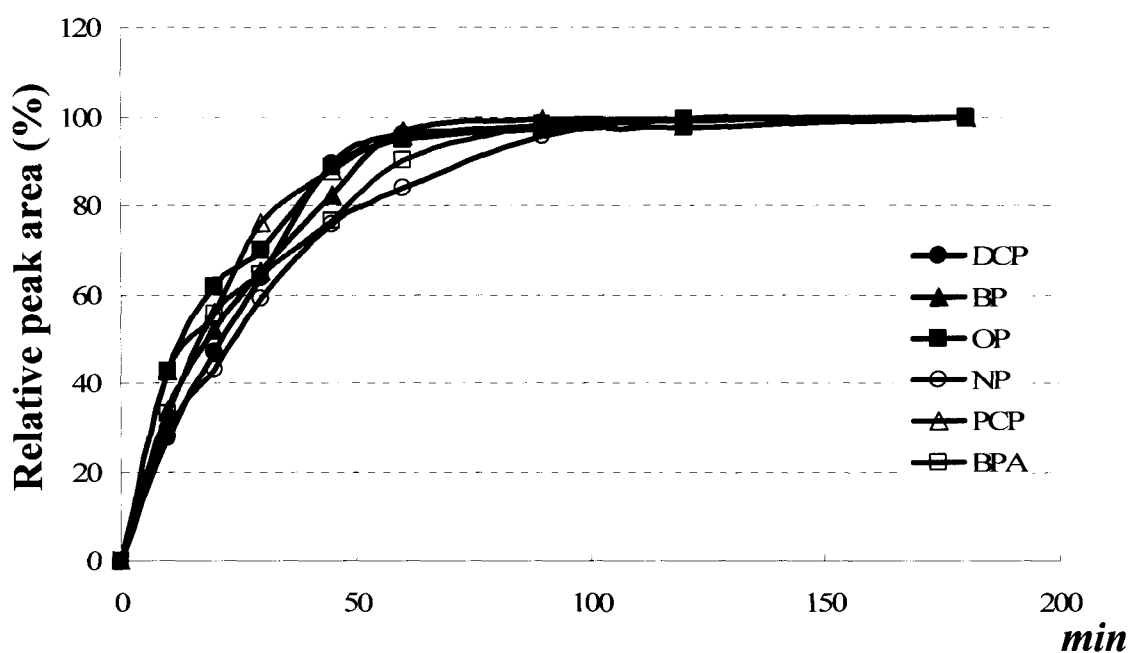


Fig. 2-3 Extraction time profiles of phenolic xenoestrogens in water samples using PDMS stir bar.

A PDMS-coated stir bar and derivatization reagents were added to 10 ml of standard solutions (1.0 ng/ml) and stirring was commenced for 10 to 180 min at room temperature (25 °C) in a glass vial. The extract was then analyzed by TD-GC-MS.

3-3 検出限界及び定量限界

DCP、BP、OP、NP、PCP 及び BPA の検出限界は、それぞれ 2、1、0.5、5、2 及び 2 pg/ml であり、定量限界は、10、5、2、20、10 及び 10 pg/ml

であった。サロゲート物質を用い、内標準法によって検量線を作成した結果、10-1000 (DCP)、5-1000 (BP)、2-1000 (OP)、20-1000 (NP)、10-1000 (PCP)及び 10-1000 (BPA) pg/ml の範囲において、重相関係数 0.998 以上なり、直線性は良好であった。分析バリデーションの概要を Table 2-2 に示す。また、精製水(10 ml)に 100 pg/ml となるように標準混合溶液を添加した試料に対して、SBSE 法及び *in situ* 誘導体化を伴う SBSE 法を用いて測定した際のクロマトグラムを Fig. 2-4 に示す。いずれの化合物においても、*in situ* 誘導体化を行うことで、高い強度のレスポンスが得られ、高感度な測定が可能となった。

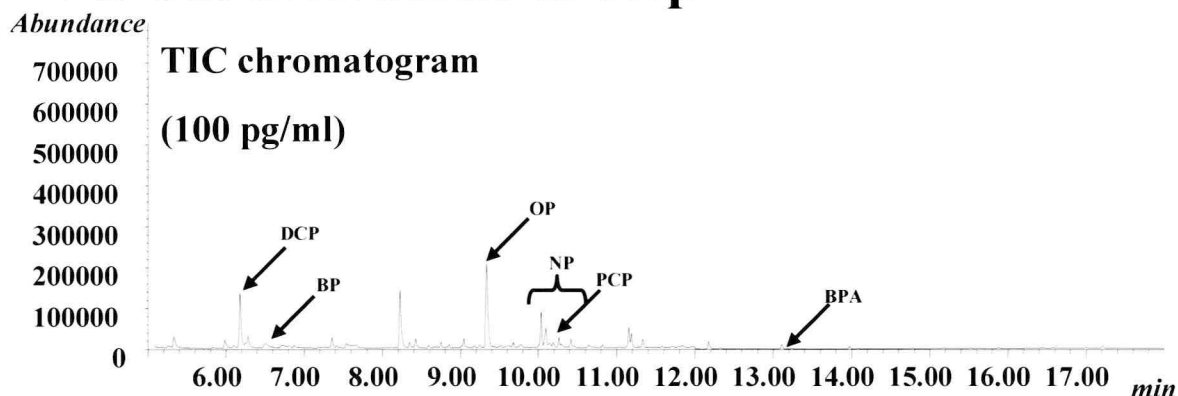
Table 2-2
Validation of SBSE with *in situ* derivatization and TD-GC-MS method for analysis of phenolic xenoestrogens in river water sample

Compound	LOD ^a (pg/ml)	LOQ ^b (pg/ml)	Range (pg/ml)	Correlation coefficient (r)
DCP	2	10	10-1000	0.999
BP	1	5	5-1000	0.999
OP	0.5	2	2-1000	0.999
NP	5	20	20-1000	0.999
PCP	2	10	10-1000	0.999
BPA	2	10	10-1000	0.999

^aLOD : limit of detection (S/N = 3)

^bLOQ : limit of quantification (S/N > 10)

Without derivatization step



In situ derivatization step

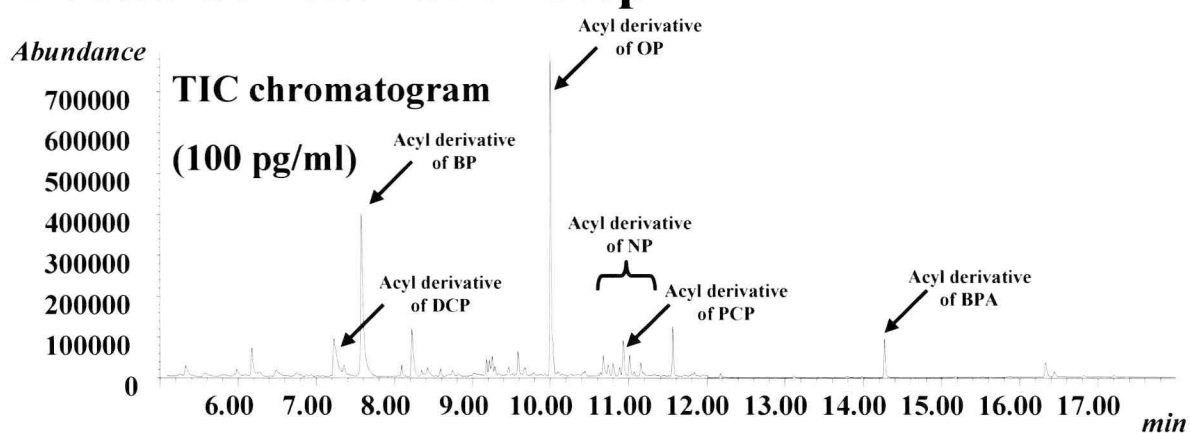


Fig. 2-4 Comparison of chromatogram of phenolic xenoestrogens subjected to SBSE with *in situ* derivatization with that subjected to SBSE without derivatization

For SBSE with *in situ* derivatization: A PDMS-coated stir bar and derivatization reagents were added to 10 ml of phenolic xenoestrogen standard solutions (100 pg/ml) and stirring was commenced for 90 min at room temperature (25 °C) in a glass vial. The extract was then analyzed by TD-GC-MS.

For SBSE without derivatization: The same procedure was performed except that no derivatization reagents were added.

3-4 添加回収試験

本法の回収率及び再現性を評価するために、添加回収試験を行った。河川水(10 ml)に対し、0.1 及び 1.0 ng/ml となるように標準混合溶液を加えて、*in situ* 誘導体化を伴う SBSE-TD-GC/MS 法を用いて測定した(n=6)。また、回収率の算出には、ブランク測定を行い、添加したものからブランク値を減算したものをを用いた。また、回収率は、サロゲート物質を用いて補正した。結果を Table 2-3 に示す。回収率 93.9-113.0 % (RSD: < 7.2 %)と良好な結果が得られた。従って、本法を用いることで、河川水中フェノール性内分泌かく乱化学物質の高感度かつ高精度な分析を行うことが可能であると示唆された。

Table 2-3
Recoveries of phenolic xenoestrogens in spiked river water samples

Compound	Amount spiked		1.0 ng/ml	
	0.1 ng/ml		Recovery (%)	RSD (%) [*]
	Recovery (%)	RSD (%) [*]	Recovery (%)	RSD (%) [*]
DCP	102.8	6.0	108.8	5.5
BP	102.1	7.2	107.1	3.6
OP	93.9	6.1	96.8	3.3
NP	113.0	5.9	112.3	5.3
PCP	107.8	6.0	101.8	3.9
BPA	103.0	5.3	99.3	4.3

^{*}The recoveries and precision were also examined by replicate analysis (n = 6) of river water samples.

3-5 実試料の測定

1998 年、環境省の調査により、多摩川のコイ(雄)の約 30 %に生殖異常が確認された[4]。この原因の一つとして、内分泌かく乱化学物質による疑いがもたれている。そこで、多摩川の上・中・下流の3ヶ所において、サンプリングを行い、測定に供した。結果を Table 2-4 に示す。PCP 以外の 5

物質において、数十 pg/ml のレベルで測定することができ、本法は、河川水に含まれる極微量のフェノール性内分泌かく乱化学物質の測定を行うことが可能であった。下流で採取した河川水を測定した際の SIM クロマトグラムを Fig. 2-5 に示す。また、下流に向かうに従って、高濃度に検出された。このことから、家庭や工場からの排水によって、これら化学物質による汚染が拡大していることが示唆された。しかしながら、これら化学物質の女性ホルモン様作用は、魚類に対する *in vivo* 試験系において、最大無毒性量 (NOAEL) が数十 ng/ml であるとする報告 [25] を考慮すると、雄のコイの生殖異常がこれら化学物質によってのみ起こっているとは考えがたい。また、内分泌かく乱化学物質の作用機序は、いまだに明らかにされていないものも存在する。更に、生体に対する影響についても化学物質単独による評価が現状である。多数の化学物質が共存した時、相乗効果が起こることも考えられる。今後は、様々な化学物質の影響を総合的に判断することが必要と思われる。その際に、環境に対する複数の化学物質のリスク評価が要求される。このリスク評価を行うためには、多数の化学物質に対する高感度かつ高精度な分析法が必要であり、本法は、この条件を満たし得る方法である。

Table 2-4
Concentrations of phenolic xenoestrogens in river water samples

Compound	Tama river (pg/ml)		
	Upstream	Midstream	Downstream
DCP	29.8	68.2	81.4
BP	7.2	18.9	26.8
OP	N.D.	10.0	19.2
NP	37.6	48.5	57.9
PCP	N.D.	N.D.	N.D.
BPA	41.5	46.9	72.2

N.D. indicates DCP, BP, OP, NP, PCP and BPA concentrations lower than 10, 5, 2, 20, 10 and 10 pg/ml, respectively.

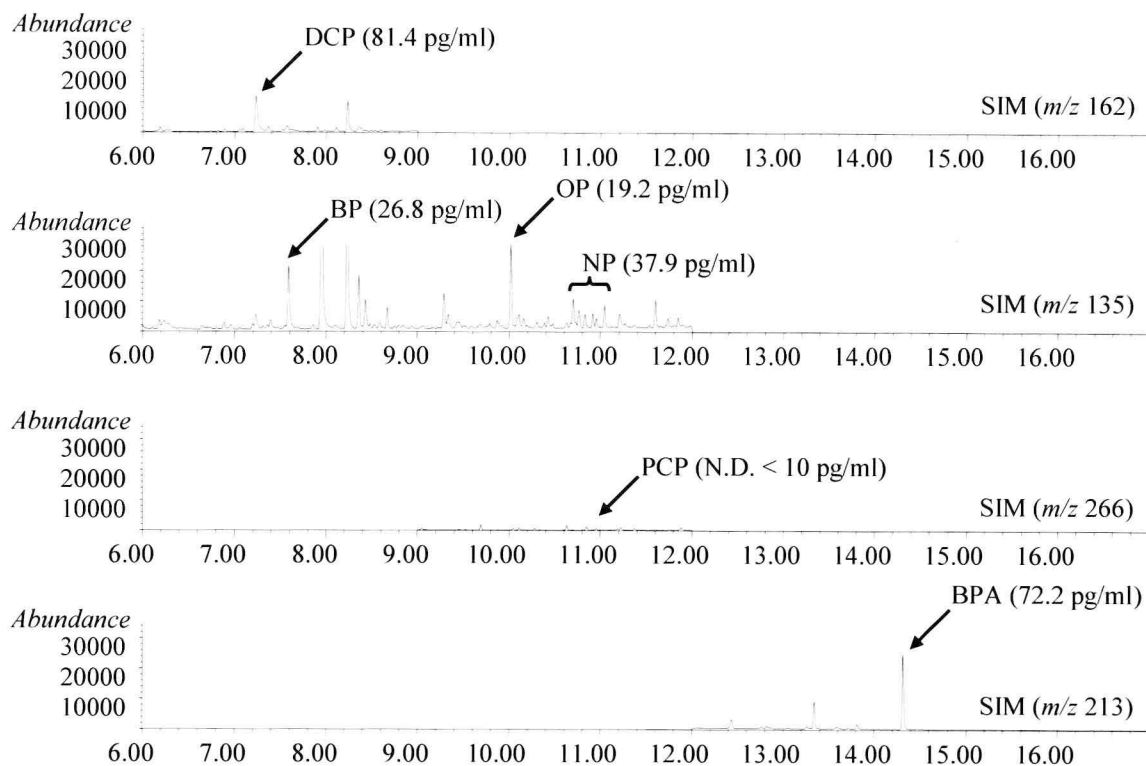


Fig. 2-5 Chromatograms of phenolic xenoestrogens in river water samples.

A PDMS-coated stir bar, surrogate standards and derivatization reagents were added to 10 ml of river water sample and stirring was performed for 90 min at room temperature (25 °C) in a glass vial. The extract was then analyzed by TD-GC-MS.

第四節 小括

本章では、SBSE 法の操作過程に誘導体化試薬を加えて、PDMS 攪拌子による抽出・濃縮と誘導体化反応を同時に行う *in situ* 誘導体化を試みた。フェノール性水酸基に対しての *in situ* 誘導体化には、無水酢酸を用いるアシル化を試みた。その結果、操作過程に誘導体化試薬を加えるだけで、簡便に誘導体化と前処理を行うことができた。MS 条件、*in situ* 誘導体化を伴う SBSE 条件の最適化を検討した結果、DCP、BP、OP、NP、PCP 及び BPA の検出限界は、それぞれ 2、1、0.5、5、2 及び 2 pg/ml

であり、定量限界は、10、5、2、20、10 及び 10 pg/ml となり、高感度な測定法であった。本法の有用性を確認するために、河川水を用いて添加回収試験を行った結果、回収率 93.9-112.3 % (RSD: < 7.2 %)と良好であった。本法を用いて、多摩川からサンプリングした試料を測定した結果、PCP を除く 5 種の化合物を定量することができた。本法は、河川水中フェノール性内分泌かく乱化学物質の高感度かつ高精度であり、簡便な測定法として有用であった。

第三章 *In situ* 誘導体化を伴う SBSE-TD-GC/MS 法によるヒト尿 中フェノール性内分泌かく乱化学物質の一斉分析

第一節 はじめに

APs の一種である OP 及び NP は、抗酸化剤としてプラスチック製品などに添加され、食品などを経路してヒトへの暴露や環境汚染を生じる可能性が示唆されている。NP の女性ホルモン様作用については、ヒト乳癌由来培養細胞(MCF-7)を用い、 10^{-6} M からその増殖作用が見出された[2]。その後、MCF-7を利用して OP 及び NP の比較検討を行い、NP(10^{-7} M で増殖)よりも OP(10^{-7} M 以上で増殖)で女性ホルモン活性が高いことなどが報告された[29]。そのほかにも *in vitro* 系(E-SCREEN assay、酵母を用いた Two-hybrid assay、Receptor binding assay など)でその女性ホルモン様作用の報告が多くあり、いずれも 17β -エストラジオールに対して数千-数万分の1の活性を有すると言われている[30-37]。*In vivo* 系では、実験動物を利用した子宮増殖アッセイにおいて、NP の NOAEL が約 37.5-100 mg/kg/day[38, 39]、OP に関しては約 166 mg/kg の報告がある[40]。そのリスクアセスメントを考慮した場合、NP の生殖発生毒性に関する最も低い経口摂取無作用量は多世代生殖として 15 mg/kg/day[41]であり、通常のヒト(職業的な暴露などを受けていない)の NP 暴露量は最大で 2.7 μ g/kg/day[42, 43]と推定され、その安全域は約 5,000 と推測されている。また、ヒトにおける代謝などの体内動態に関して、経口投与によるバイオアベイラビリティは、約 20%であるとの報告[44]より、ヒト生体内においては代謝されて、主にグルクロン酸抱合体として速やかに排泄されるものと考えられる。

また、BPA は、食品への移行、更には、ヒトへの暴露及びその暴露量における内分泌かく乱作用の有無に関心が集まっている。また、低濃度(2.4

μg/kg/day)のBPA含有飼料を妊娠11-17日のマウスに与えると、出生後の雌マウスの発情期が早まったという報告がある[45]。

この様に、フェノール性内分泌かく乱化学物質のヒトへの生体影響が懸念されている。そこで、ヒトに対するリスク評価が要求される。この目的を達成するためにはヒト暴露量評価を行う必要があり、高感度かつ高精度な分析法が必要である。

一般に、フェノール性化学物質が経口で摂取された場合、グルクロン酸抱合体及び硫酸抱合体として代謝され、尿中に排泄されることが知られている。これまでに、NPやBPAにおいても、グルクロン酸抱合体として尿中に排泄されることが報告されている[44, 46]。従って、ヒト尿中フェノール性内分泌かく乱化学物質を測定することで、当該化学物質の暴露量を推測することが可能である。

二章において、*In situ* 誘導体化を伴うSBSE-TD-GC/MS法を用いることで、河川水中のフェノール性内分泌かく乱化学物質の高感度かつ高精度な分析法を構築することができた。本章では、この方法をヒト尿中フェノール性内分泌かく乱化学物質の測定に応用し、当該化学物質の暴露実態を解明した。

第二節 実験方法

2-1 試薬

DCP、BP、OP、NP及びBPAは、関東化学社製環境分析用標準品を用いた。PCPは、メルク社製標準品を用いた。サロゲート物質であるBP-d、OP-d、NP-dは、林純薬工業社から購入した。また、DCP-d、PCP-¹³C及びBPA-¹³Cは、Cambridge Isotope Laboratories社から市販されているものを使用した。*E. coli*由来のβ-グルクロニダーゼ(25,000 units/0.4 ml)及び*H. pomatia*由来のサルファターゼ(3540 units/ml)は、

Sigma-Aldrich 社から購入したものをを用いた。 β -グルクロニダーゼは、使用直前に 0.1 M の酢酸アンモニウム水溶液で、10,000 units/ml になるように希釈した。炭酸カリウム、酢酸アンモニウム、アセトニトリルは、和光純薬社製特級試薬を用いた。無水酢酸は、関東化学社製微量分析用試薬を使用した。精製水は、ミリポア社製 EDS ポリッシャー付き Milli-Q gradient A10 によって精製したものをを用いた。

2-2 装置

PDMS 相 (約 24 μ l) をコーティングした攪拌子は、Gerstel 社から購入した。使用前に、ヘリウム気流下で 300 °C、4 時間のプレコンディショニングしたものをを用いた。また、この攪拌子は再コンディショニング (ヘリウム気流下で 300 °C、4 時間) を行うことで 50 回以上繰り返して使用しても、測定に影響を及ぼすことはなかった。SBSE 法を行う際のバイアル瓶は、Agilent 社製ヘッドスペースサンプルバイアル瓶 (20 ml) をを用いた。加熱脱着には、Gerstel 社製 TDS2 加熱脱着システム及び Gerstel 社製 CIS 4 プログラム温度昇温装置を用いた。オートサンプラーには、Gerstel 社製 TDS A オートサンプラーを用いた。GC/MS 装置は、Agilent 社製 6890N ガスクロマトグラフと Agilent 社製 5973N 質量検出器を用いた。

2-3 標準溶液及び検量線の作成

DCP、BP、OP、NP、PCP 及び BPA 標準品をそれぞれ化学天秤で 10 ml 用メスフラスコに 10 mg 量り取り、メタノールで 1.0 mg/ml となるように調製し、標準原液とした。その後、各標準原液を混合し、10 μ g/ml となるように希釈し、標準混合溶液を調製した。また、各サロゲート物質を任意の濃度になるようにメタノールで希釈した。0.1-50 (DCP)、0.05-10 (BP)、0.05-10 (OP)、0.2-10 (NP)、0.1-10 (PCP)、0.1-10 (BPA) ng/ml となるよ

うに精製水を用いて調製し、検量線作成用標準溶液とした。

In situ 誘導体化を伴う SBSE-TD-GC/MS-SIM 法により、検量線作成用標準溶液を測定し、サロゲート物質とのピーク面積比を利用して検量線を作成して定量分析を行った。

2-4 加熱脱着条件

TDS 2 加熱脱着装置：

初期温度 20 °C (1 分保持) → (60 °C/分) → 280 °C (5 分保持)

CIS 4 プログラム温度昇温装置：

初期温度 -150 °C → (12 °C/秒) → 300 °C (10 分保持)

2-5 GC/MS 条件

<GC 条件>

注入口：スプリットレス

カラム：DB-5MS fused silica column

(30 m x 0.25 mm i.d., 0.5 μm 膜厚、Agilent 社製)

カラム恒温槽：初期温度 60 °C → (15 °C/分) → 280 °C (5 分保持)

移動相：ヘリウム(99.9999%)

流速：1.2 ml/分

<MS 条件>

イオン化：EI (70 eV)

質量分離モード：

SIM (各化学物質のモニタリングイオンを第二章 Table 2-1 に示す。)

2-6 *In situ* 誘導体化を伴う SBSE 法によるヒト尿試料の前処理操作

尿試料 (1 ml) にサロゲート物質を添加し、1.0 M の酢酸アンモニウム水溶液 (50 μ l、pH 6.8) を加えた。次に、 β -グルクロニダーゼ (10 μ l、10,000 units/ml) 及びサルファターゼ (10 μ l、3540 units/ml) を添加し、37 °C、3 時間インキュベーションし、脱抱合体化処理を行った。この脱抱合体化処理の過程は、BPA のグルクロン抱合体の脱抱合体化処理を参考にした [47, 48]。酵素反応終了後、アセトニトリル (2 ml) を加え、遠心分離 (1400 x g、10 分) して、除タンパク操作を行った。上清を SBSE 用バイアル瓶に移し、15 ml の精製水で希釈した。1.0 M の炭酸カリウム水溶液 (1 ml) を添加し、pH を 11.5 に調整し、誘導体化試薬である無水酢酸 (100 μ l) を添加した。10 分間静置後、PDMS 攪拌子を加え、スターラーで 150 分間攪拌した。攪拌後、PDMS 攪拌子を取り出して、加熱脱着装置に挿入し、GC/MS で分析した。

第三節 結果及び考察

3-1 除タンパク法の最適化

除タンパク処理をしていない尿試料にたいして、*in situ* 誘導体化を伴う SBSE-TD-GC/MS 法で測定した結果、OP 及び NP において、誘導体化の妨害が観察された。そこで、有機溶媒を用いた除タンパク操作を検討した。しかし、SBSE 法は、無極性の液相である PDMS 相を抽出媒体とするため、有機溶媒を大量に含む試料からの抽出には、不向きであると考えられた。そこで、除タンパク操作に使用する有機溶媒の最適量を検討した。

除タンパク用の有機溶媒として、一般的に使用されているアセトニトリルを選定した。脱抱合体化処理を行った尿試料 (1 ml) にアセトニトリル (0-3.0 ml) を添加し、遠心分離 (1400 x g、10 分) した。上清を SBSE 用バイアル瓶に移し、精製水 15 ml で希釈した後、*in situ* 誘導体化を伴う

SBSE-TD-GC/MS 法により測定した。結果を Fig. 3-1 に示す。除タンパクに使用するアセトニトリルを 2 ml としたとき、DCP 以外のフェノール性内分泌かく乱化学物質において、最も高い相対レスポンスが得られた。これまでの研究から、尿中 DCP は比較的高濃度で存在することを報告しており [19]、アセトニトリル 2 ml を最適条件とした。

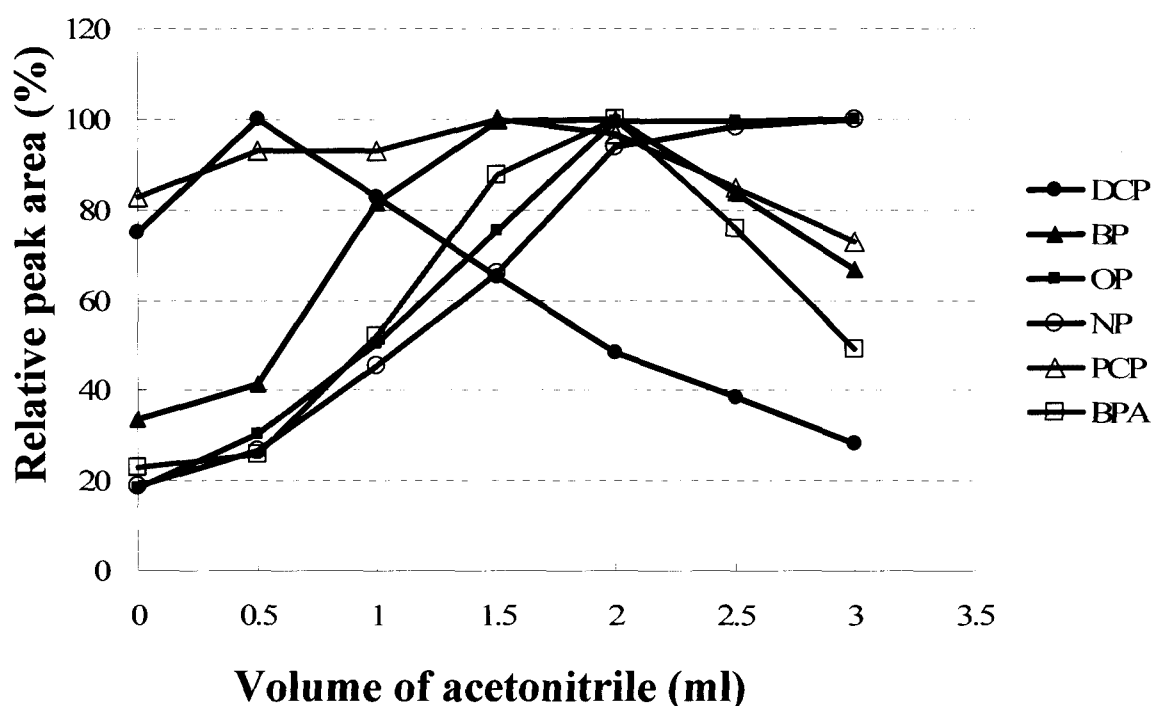


Fig. 3-1 Determination of volume of acetonitrile for optimization of protein precipitation

3-2 *In situ* 誘導体化を伴う SBSE 法の攪拌時間の検討

In situ 誘導体化を伴う SBSE 法の最適条件を検討した。尿試料 (1 ml) に 10 ng/ml となるように標準混合溶液を添加したものをを用いた。除タンパク操作後、遠心分離を行い、上清を精製水 15 ml で希釈した試料を *in situ* 誘導体化を伴う SBSE-TD-GC/MS 法で測定した。その際、PDMS 攪拌子による攪拌時間及び誘導体化反応時間を 10-180 分としたときの

各化学物質の相対レスポンスを比較した。得られた結果を Fig. 3-2 に示す。約 150 分の攪拌及び誘導体化時間で化学物質のレスポンスが平衡に達したため、最適攪拌時間を 150 分として、以後の実験を行った。

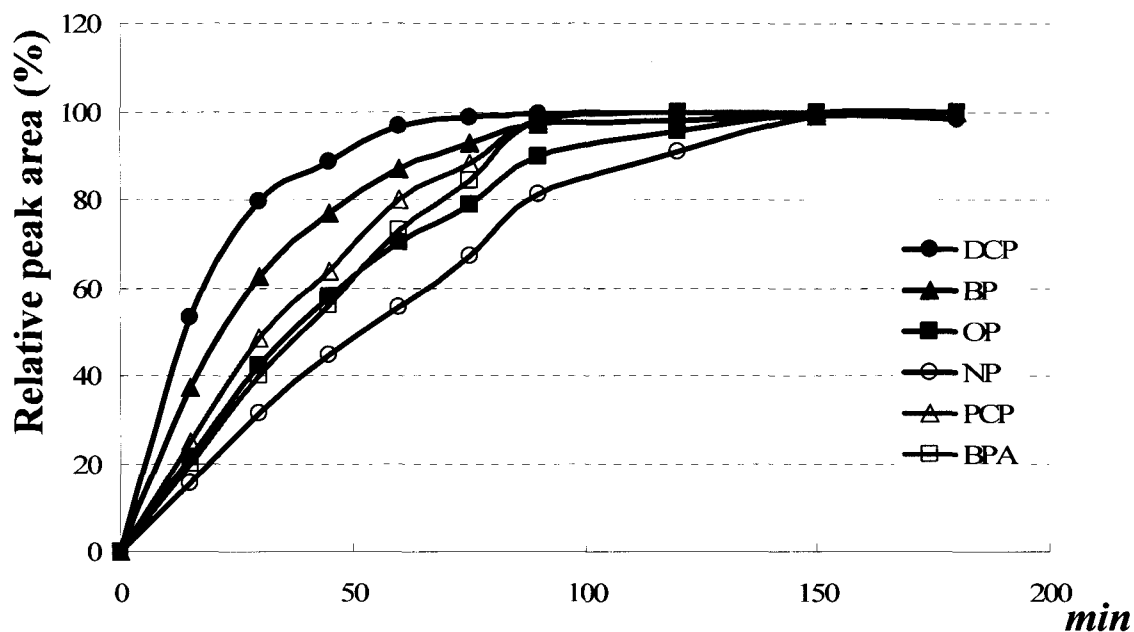


Fig. 3-2 Extraction time profiles of phenolic xenoestrogens in human urine samples using PDMS stir bar.

After enzymatic de-conjugation, protein precipitation and centrifugation of the human urine sample spiked with 10 ng/ml phenolic xenoestrogens standard solution, the supernatant was diluted with purified water (15 ml). A PDMS-coated stir bar and derivatization reagents were added to the sample and stirring was commenced for 0 to 180 min at room temperature (25 °C) in a glass vial. The extract was then subjected to TD-GC-MS.

3-3 検出限界及び定量限界

ヒト尿試料中 DCP、BP、OP、NP、PCP 及び BPA の検出限界は、それぞれ 0.02、0.01、0.01、0.05、0.02 及び 0.02 ng/ml であり、定量限界は、0.1、0.05、0.05、0.2、0.1 及び 0.1 ng/ml であった。サロゲート物質を用い、内標準法によって検量線を作成した結果、0.1-50 (DCP)、0.05-00 (BP)、0.05-10 (OP)、0.2-10 (NP)、0.1-10 (PCP) 及び 0.1-10 (BPA) pg/ml の範囲において、相関係数 0.99 以上と良好であった。分析バリデーションの概要を Table 3-1 に示す。また、ヒト尿試料 (1 ml) に 10 ng/ml となるように標準混合溶液を添加した試料に対して、SBSE 法及び *in situ* 誘導体化を伴う SBSE 法を用いて測定した際のクロマトグラムを Fig. 3-3 に示す。いずれの化合物においても、*in situ* 誘導体化を行うことで、高い強度のレスポンスが得られ、高感度な分析が可能となった。

Table 3-1
Validation of SBSE with *in situ* derivatization and TD-GC-MS method for analysis of phenolic xenoestrogens in human urine sample

Compound	LOD ^a (ng/ml)	LOQ ^b (ng/ml)	Range (ng/ml)	Correlation coefficient (r)
DCP	0.02	0.1	0.1-50	0.99
BP	0.01	0.05	0.05-10	0.99
OP	0.01	0.05	0.05-10	0.99
NP	0.05	0.2	0.2-10	0.99
PCP	0.02	0.1	0.1-10	0.99
BPA	0.02	0.1	0.1-10	0.99

^aLOD : limit of detection (S/N = 3)

^bLOQ : limit of quantification (S/N > 10)

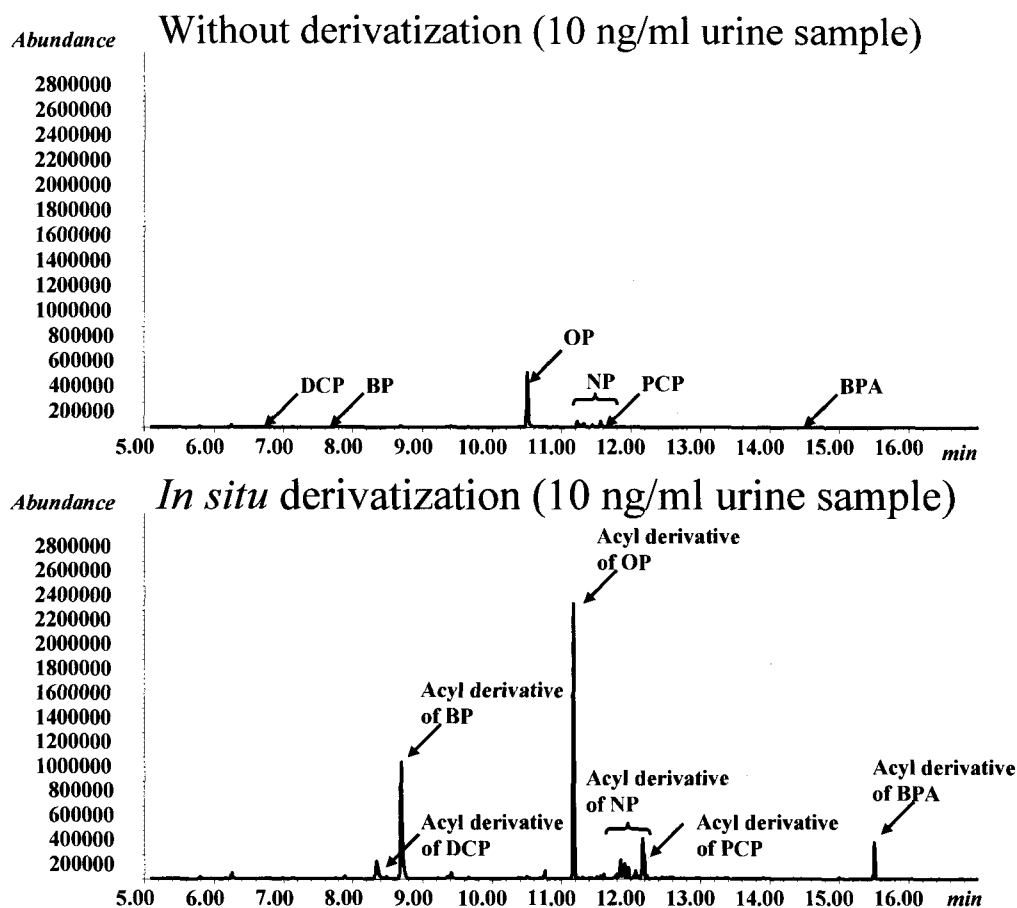


Fig. 3-3 Comparison of chromatogram of phenolic xenoestrogens in human urine sample subjected to SBSE with *in situ* derivatization with that subjected to SBSE without derivatization

For SBSE with *in situ* derivatization: After protein precipitation and centrifugation of the human urine sample (1 ml) spiked with 10 ng/ml phenolic xenoestrogens standard solution, the supernatant was diluted with purified water (15 ml). A PDMS-coated stir bar and derivatization reagents were added to the sample and stirring was commenced for 150 min at room temperature (25 °C) in a glass vial. The extract was then subjected to TD-GC-MS.

For SBSE without derivatization: The same procedure was performed except that no derivatization reagents were added.

3-4 添加回収試験

本法の回収率及び再現性を評価するために、添加回収試験を行った。ヒト尿試料(1 ml)に 0.5 及び 5 ng/ml となるように標準混合溶液を加えて、除タンパク処理及び希釈操作を行った後、*in situ* 誘導体化を伴う SBSE-TD-GC/MS 法を用いて測定した(n=6)。また、添加回収率の算出には、ブランク測定を行い、添加したものからブランク値を減算したものをを用いた。また、回収率は、サロゲート物質を用いて補正した。結果を Table 3-2 に示す。回収率 95.0-101.8 % (RSD: < 8.6 %)と良好な結果を得ることができた。従って、本法を用いることで、ヒト尿中フェノール性内分泌かく乱化学物質の高感度かつ高精度な分析を行うことが可能であると示唆された。

Table 3-2
Recoveries of phenolic xenoestrogens in spiked human urine samples

Compound	Amount spiked			
	0.5 ng/ml		5.0 ng/ml	
	Recovery (%)	RSD (%) [*]	Recovery (%)	RSD (%) [*]
DCP	99.1	4.2	99.6	2.7
BP	99.0	5.3	99.5	2.7
OP	98.9	4.5	97.8	3.7
NP	101.7	8.6	101.8	5.1
PCP	95.0	4.4	99.8	2.5
BPA	95.2	4.8	98.9	4.2

^{*}The recoveries and precision were also examined by replicate analysis (n = 6) of human urine samples.

3-5 実試料の測定

本法を用いて健常人 5 名から提供された尿試料の分析を行った。結果を Table 3-3 に示す。また、代表的なクロマトグラムとして、健常人 A の尿

試料を測定した際に得られたクロマトグラムを Fig. 3-4 に示す。DCP が比較的高濃度に検出されたが、他のフェノール性内分泌かく乱化学物質は、極低濃度で検出された。従来法である SPE 法を用いた測定では感度が不足しており、十分な定量はできないと考えられた。また、これまでに、ヒト尿中 NP の定量が可能な高感度分析法は報告されておらず、本法を用いることで、はじめて、ヒト尿中 NP の正確な定量を行うことが可能となった。更に、フェノール性内分泌かく乱化学物質が健常人の尿試料から検出されたことは、当該化学物質の恒常的な暴露が示唆された。本法は、簡便であり、高感度かつ高精度な分析法として、フェノール性内分泌かく乱化学物質の暴露実態の解明に有用な手法であった。

Table 3-3
Concentrations of phenolic xenoestrogens in human urine samples

Compound	Human urine sample (ng/ml)				
	A	B	C	D	E
DCP	20.75	41.86	30.47	14.06	20.02
BP	5.83	0.82	0.93	0.10	3.53
OP	N.D.	N.D.	N.D.	0.05	N.D.
NP	1.42	1.04	1.24	2.00	2.00
PCP	1.04	0.46	0.46	N.D.	0.28
BPA	2.08	5.41	N.D.	0.93	1.84

N.D. indicates DCP, BP, OP, NP, PCP and BPA concentrations lower than 0.1, 0.05, 0.05, 0.2, 0.1 and 0.1 ng/ml, respectively.

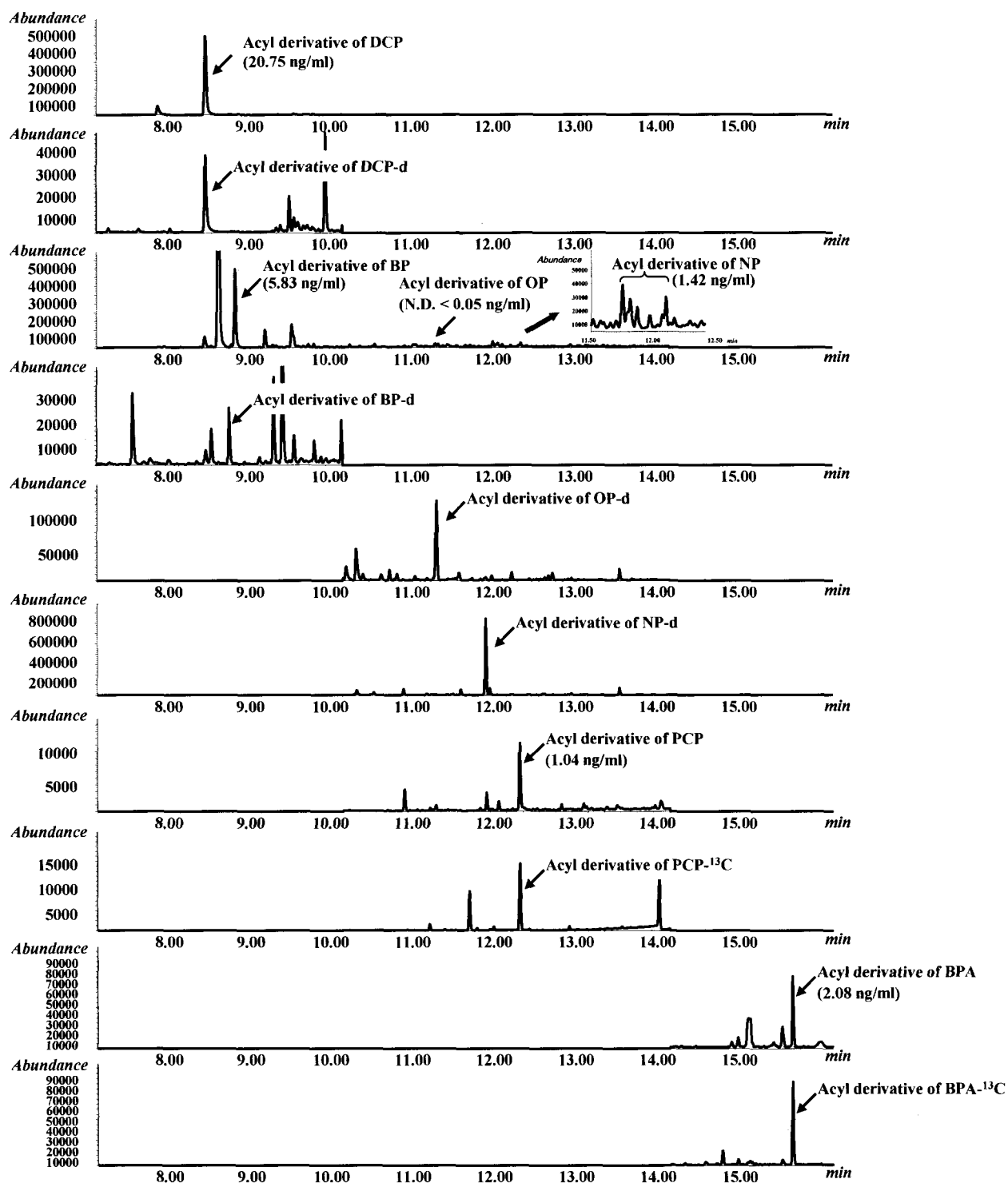


Fig. 3-4 Chromatograms of acyl derivative of phenolic xenoestrogens and surrogate standards in human urine sample (Volunteer A)

第四節 小括

本章では、*in situ* 誘導体化を伴う SBSE-TD-GC/MS 法を用いて、ヒト尿中フェノール性内分泌かく乱化学物質の分析法を構築した。ヒト尿中の夾雑成分により、OP 及び NP の誘導体化効率が低下したが、アセトニトリルを用いる除タンパク操作を組み込むことで、問題点を克服した。*In situ* 誘導体化を伴う SBSE 法の最適化条件を検討した結果、DCP、BP、OP、NP、PCP 及び BPA の検出限界は、それぞれ 0.02、0.01、0.01、0.05、0.02 及び 0.02 ng/ml であり、定量限界は、0.1、0.05、0.05、0.2、0.1 及び 0.1 ng/ml となり、高感度な測定法を構築することができた。本法の有用性を確認するために、ヒト尿試料を用いて添加回収試験 (n=6) を行った結果、回収率 95.0-101.8 % (RSD: < 8.6 %) と良好な結果を得ることができた。本法を用いて、実際の健常人 5 名から提供された尿試料を測定した結果、6 種類のフェノール性内分泌かく乱化学物質を定量することができた。本法は、ヒト尿中フェノール性内分泌かく乱化学物質の高感度、高精度かつ簡便な測定法として有用であった。また、尿中からフェノール性内分泌かく乱化学物質が検出され、当該化学物質の恒常的な暴露を示唆する結果が得られた。

結論

SBSE 法は、簡便かつ高感度な分析を可能とするためのクロマトグラフィ一用試料前処理技術である。大量の PDMS を用いることで、従来法である SPME 法よりも、高い回収率を得られ、幅広い物質に適用可能である。また、試料抽出に溶媒を使用しないことから、環境にやさしい分析法である。本研究では、SBSE 法を用いて、ヒト暴露量を評価するための生体試料中フェノール性内分泌かく乱化学物質を簡便かつ高感度に分析する方法の構築を試みた。また、分析対象物質の安定同位体標識物質をサロゲートとして利用し、回収率を補正することで高精度な分析法を開発した。第一章では、単純なマトリックスである河川水を対象試料とし、SBSE-TD-GC/MS 法を用いて OP 及び NP の分析法を構築し、その有用性を検討した。第二章では、更なる高感度化を目指し、SBSE 法の操作過程に誘導体化試薬を加えて、誘導体化と抽出を同時に行う *in situ* 誘導体化を伴う SBSE 法を開発した。本法を用いて、河川水中フェノール性内分泌かく乱化学物質の一斉分析を行った。更に、第三章では、*in situ* 誘導体化を伴う SBSE-TD-GC/MS 法を用いて、ヒト尿中フェノール性内分泌かく乱化学物質の一斉分析法を構築し、当該化学物質のヒト暴露実態を解明した。SBSE 法は、環境及び生体試料の微量分析において、有用性が高く、今後さらなる発展が期待される。

謝 辞

本研究に際し、御懇篤なるご指導ならびにご鞭撻を賜りました星薬科大学 薬品分析化学教室 中澤裕之教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行にあたり、ご指導いただきました東海大学医学部 牧野恒久名誉教授、和泉俊一郎助教授に心より御礼申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり、ご指導並びにご助言を賜りました酪農学園大学獣医学部 横田 博教授、日本薬科大学薬学部 吉村吉博教授、(独)国立病院機構 中嶋徳弥氏、(株)横河アナリティカルシステムズ 佐久井徳広氏に心より御礼申し上げます。

最後に、本研究にご協力くださいました星薬科大学 薬品分析化学教室の皆様方に御礼申し上げます。

参考文献

- [1] T. Colborn, D. Dumanoski, J. Peterson, "Our Stolen Future" (1996)
- [2] A.M. Soto, H. Justicia, J.W. Wray, C. Sonnenschein, p-Nonyl-phenol: An estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene, *Environ. Health Perspect.* 92 (1991) 167
- [3] A.V. Krishnan, P. Stathis, S.F. Petmuth, L. Tokes, D. Feldman, Bisphenol-A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving, *Endocrinology* 132 (1993) 2279
- [4] Ministry of Construction of Japan, (<http://www.env.go.jp/>)
- [5] X. Ye, Z. Kuklennyik, L.L. Needham, A.M. Calafat, Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method with peak focusing for the determination of nine environmental phenols in urine, *Anal. Chem.* 77 (2005) 5407
- [6] Z. Kuklennyik, J. Ekong, C.D. Cutchins, L.L. Needham, A.M. Calafat, Simultaneous Measurement of Urinary Bisphenol A and Alkylphenols by Automated Solid-Phase Extractive Derivatization Gas Chromatography/Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6820
- [7] P. Varelis, D. Balafas, Preparation of 4,4'-(1-[2H6] methylethylidene)bis-[2,3,5,6-2H4]phenol and its application to the measurement of bisphenol A in beverages by stable isotope dilution mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 883

(2000) 163

- [8] X. Ye, Z. Kuklennyik, L.L. Needham, A.M. Calafat, Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 831 (2006) 110
- [9] I. Rodríguez, M.P. Llompарт, R. Cela, Solid-phase extraction of phenols, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 291.
- [10] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145.
- [11] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C.A. Gramers, Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles, *J. Microcol. Sep.* 11 (1999) 737.
- [12] M. Kawaguchi, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa, Novel stir bar sorptive extraction methods for environmental and biomedical analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 500-508
- [13] M. Kawaguchi, K. Inoue, N. Sakui, R. Ito, S. Izumi, T. Makino, N. Okanouchi, H. Nakazawa, Stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for the measurement of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in human biological samples, *J. Chromatogr. B*, 799 (2004) 119
- [14] M. Kawaguchi, K. Inoue, M. Yoshimura, R. Ito, N. Sakui, N. Okanouchi, H. Nakazawa, Determination of bisphenol A in

- river water and body fluid samples by stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, 805 (2004) 41
- [15] M. Kawaguchi, S. Takahashi, F. Seshimo, N. Sakui, N. Okanouchi, R. Ito, K. Inoue, Y. Yoshimura, S. Izumi, T. Makino, H. Nakazawa, Determination of 4-tert-octylphenol and 4-nonylphenol in laboratory animal feed sample by stir bar sorptive extraction followed by liquid desorption and column switching-liquid chromatography-mass spectrometry with solid phase extraction, *J. Chromatogr. A*, 1046 (2004) 83
- [16] M. Kawaguchi, Y. Ishii, N. Okanouchi, N. Sakui, R. Ito, K. Inoue, K. Saito, H. Nakazawa, Trace analysis of chlorophenols in river water samples by stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography - mass spectrometry, *Organohalogen Compounds*, 66 (2004) 179
- [17] M. Kawaguchi, Y. Ishii, N. Sakui, N. Okanouchi, R. Ito, K. Inoue, K. Saito, H. Nakazawa, Stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry in the multi shot mode for determination of estrogens in river water samples, *J. Chromatogr. A*, 1049 (2004) 1
- [18] M. Kawaguchi, N. Sakui, N. Okanouchi, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa, Stir bar sorptive extraction and trace analysis of alkylphenols in water samples by thermal desorption with in

- tube silylation and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1062 (2005) 23
- [19] M. Kawaguchi, Y. Ishii, N. Sakui, N. Okanouchi, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa, Stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for determination of chlorophenols in water and body fluid samples, *Anal. Chim. Acta*, 533 (2005) 57
- [20] M. Kawaguchi, R. Ito, Y. Hayatsu, H. Nakata, N. Sakui, N. Okanouchi, K. Saito, H. Yokota, S. Izumi, T. Makino, H. Nakazawa, Stir bar sorptive extraction with in situ de-conjugation and thermal desorption gas chromatography-mass spectrometry for measurement of 4-nonylphenol glucuronide in human urine sample, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 40 (2006) 82
- [21] M. Kawaguchi, R. Ito, N. Sakui, N. Okanouchi, K. Saito, H. Nakazawa, Dual derivatization-stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for the determination of 17 β -Estradiol in water sample, *J. Chromatogr. A*, 1105 (2006) 140
- [22] M. Kawaguchi, R. Ito, N. Endo, N. Sakui, N. Okanouchi, K. Saito, N. Sato, T. Shiozaki, H. Nakazawa, Stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for trace analysis of benzophenone and its derivatives in water sample, *Anal. Chim. Acta*, 557 (2006) 272
- [23] W. Giger, P.H. Brunner, C. Schaffner, 4-Nonylphenol in

- sewage sludge: accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants, *Science* 225 (1984) 623
- [24] W. Giger, M. Ahel, M. Koch, H.U. Laubscher, C. Scaffner, J. Schneider, Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactants and of nitrilotriacetate in sewage treatment, *Water Sci. Technol.* 19 (1987) 449
- [25] S. Jobling, D. Sheahan, J.A. Osbone, P. Matthiessen, J.P. Sumpter, Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals., *Environ. Toxicol. Chem.* 15 (1996) 194
- [26] R. Renner, European bans on surfactant trigger transatlantic debate, *Environ. Sci. Technol.* 31 (1997) 316a
- [27] S. Masunaga, T. Itazawa, T. Furuichi, Sunardi, D.L. Villeneuve, K. Kannan, J.P. Giesy, J. Nakanishi, Occurrence of estrogenic activity and estrogenic compounds in the Tama river, Japan., *Environ. Sci.* 7 (2000) 101
- [28] M. Rompa, E. Kremer, B. Zygmunt, Derivatisation in gas chromatographic determination of acidic herbicides in aqueous environmental samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 590
- [29] R. White, S. Jobling, S.A. Hoare, J.P. Sumpter, M.G. Parker, Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic, *Endocrinology* 135 (1994) 175.
- [30] E.J. Routledge, J.P. Sumpter, Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 3280

- [31] R.M. Blair, H. Fang, W.S. Branham, B.S. Hass, S.L. Dial, C.L. Moland, W. Tong, L. Shi, R. Perkins, D.M. Sheehan, The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: Structural diversity of ligands, *Toxicol. Sci.* 54 (2000) 138.
- [32] M.D. Shelby, R.R. Newbold, D.B. Tully, K. Chae, V.L. Davis, Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of in vitro and in vivo assays, *Environ. Health. Perspect.* 104 (1996) 1296.
- [33] K.W. Gaido, L.S. Leonard, S. Lovell, J.C. Gould, D. Badai, C.J. Portier, D.P. McDonnel, Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 143 (1997) 205.
- [34] N.G. Goldham, M. Dave, S. Sivapathasundaram, D.P. McDonnel, C. Connor, M.J. Sauer, Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay, *Environ. Health Perspect.* 105 (1997) 734.
- [35] F. Shiraishi, H. Shiraishi, J. Nishikawa, T. Nishihara, M. Morita, Development of a simple operational estrogenicity assay system using the yeast two-hybrid system, *J. Environ. Chem.* 10 (2000) 57.
- [36] J. Legler, C.E. van den Brink, A. Brouwer, A.J. Murk, P.T. van der Saag, A.D. Vethaak, B. van der Burg, Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line,

- Toxicol. Sci. 48 (1999) 55.
- [37] G. Kuiper, J.G. Lemmen, B. Carsson, J.C. Corton, S.H. Safe, P.T. van der Brug, J. Gustafsson, Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β , *Endocrinology* 139 (1998) 4252.
- [38] J. Odum, I.T.G. Pyrah, A.R. Soames, J.R. Foster, J.P. Vanmiller, R.L. Joiner, J. Ashby, Effects of p-nonylphenol (NP) and diethylstilboestrol (DES) on the Alderley Park (Alpk) rat: Comparison of mammary gland and uterus sensitivity following oral gavage or implanted mini-pumps, *J. Appl. Toxicol.* 19 (1999) 367.
- [39] J. Odum, I.T.G. Pyrah, J.R. Foster, J.P. Vanmiller, R.L. Joiner, J. Ashby, Comparative activities of p-nonylphenol and diethylstilbestrol in noble rat mammary gland and uterotrophic assays, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 29 (1999) 184.
- [40] R.J. Bicknell, A.E. Herbison, J.P. Sumpter, Oestrogenic activity of an environmentally persistent alkylphenol in the reproductive tract but not the brain of rodents, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 54 (1995) 7.
- [41] R.E. Chapin, J. Delaney, Y.F. Wang, L. Lanning, B. Davis, B. Collins, N. Mintz, G. Wolfe, The effects of 4-nonylphenol in rats: A multigeneration reproduction study, *Toxicol. Sci.* 52 (1999) 80.
- [42] H.M. Bolt, U.S. Schuhmacher, G.H. Degen, Special aspects of endocrine modulators in human and environmental risk

- assessment of existing chemicals, *Arch. Toxicol.* 72 (1998) A72.
- [43] S. Müller, P. Schmid, C. Schlatter, Evaluation of the estrogenic potency of nonylphenol in non-occupationally exposed humans, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 6 (1998) 27.
- [44] S. Müller, P. Schmid, C. Schlatter, Pharmacokinetic behavior of 4-nonylphenol in humans, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 5 (1998) 257.
- [45] K.L. Howdeshell, A.K. Hotchkiss, K.A. Thayer, J.G. Vandenberg, F.S. Vom Saal, Environmental toxins: Exposure to bisphenol A advances puberty, *Nature* 401 (1999) 763.
- [46] W. Volkel, T. Colnot, G.A. Csanady, J.G. Fiser, W. Dekant, Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration, *Chem. Res. Toxicol.* 15 (2002) 1281
- [47] J.W. Brock, Y. Yoshimura, J.R. Barr, V.L. Maggio, S.R. Graiser, H. Nakazawa, L.L. Needham, Measurement of bisphenol A levels in human urine, *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* 11 (2001) 323
- [48] K. Ouchi, S. Watanabe, Measurement of bisphenol A in human urine using liquid chromatography with multi-channel coulometric electrochemical detection, *J. Chromatogr. B* 780 (2002) 365