

誘導体化を伴うスターバー抽出法 による環境汚染物質の測定

産業技術総合研究所 計測標準研究部門

有機分析科 バイオメディカル標準研究室

川口 研

*National Institute of
Advanced Industrial Science
and Technology*

AIST

試料前処理操作の重要性

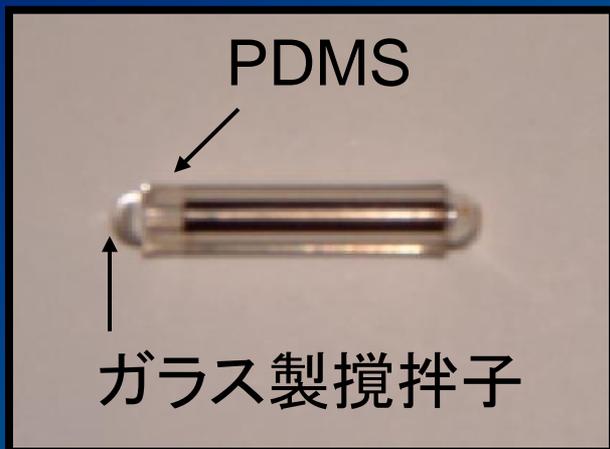
一般的な分析手順



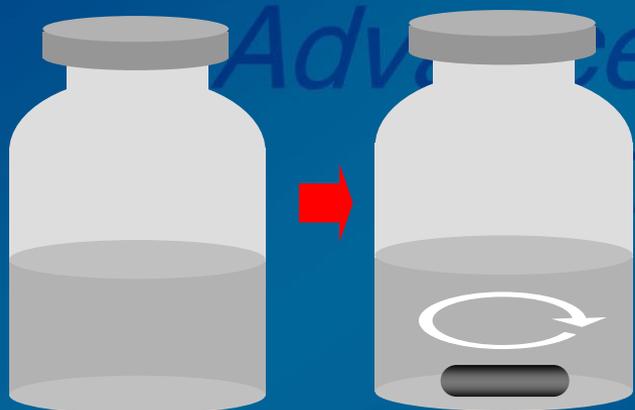
前処理操作を工夫することで、更なる高感度化

→ μ Lレベルの抽出媒体を用いるマイクロ抽出法

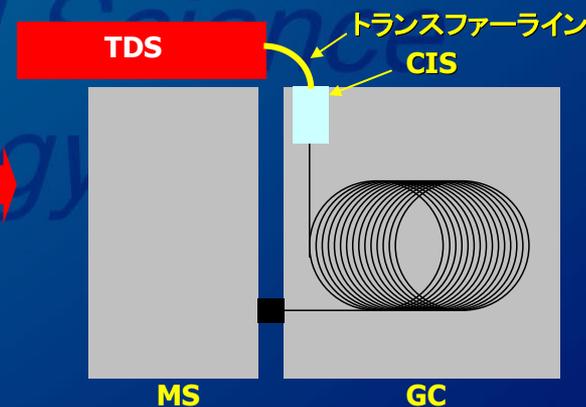
スターバー抽出(SBSE)法の概要



- ポリジメチルシロキサン(PDMS)を撈拌子にコーティング
- 液-液抽出の原理
- 抽出・濃縮・精製



加熱脱着チューブ



Vial

加熱脱着(TD)-GC/MS

環境汚染物質

- 化学物質 → 快適で豊かな生活

微量化学物質の暴露による
野生生物・ヒトへの影響？

内分泌かく乱化学物質... ▶ プラスチック由来のフェノール性化合物
の一部に女性ホルモン様作用

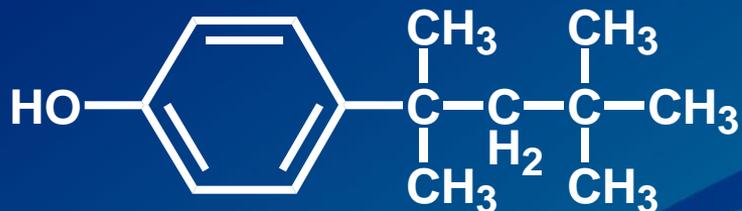
生体リスク評価
毒性

暴露量 → 分析化学による定量

本研究の目的

ヒト暴露量を評価するための高感度
かつ高精度な分析法の構築

フェノール性内分泌かく乱化学物質

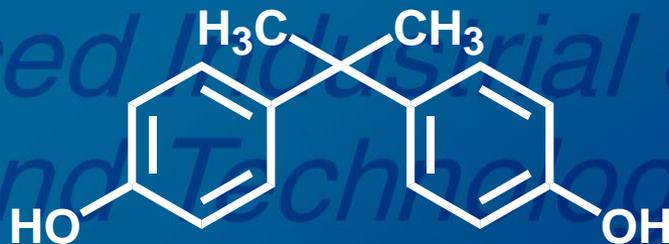


4-*tert*-オクチルフェノール(OP)



4-ノニルフェノール(NP)

- ・非イオン性界面活性剤の原料
- ・女性ホルモン様作用 (A.M. Soto et al. Environ. Health Perspect. 92 (1991) 167)



ビスフェノール A (BPA)

- ・ポリカーボネイト及びエポキシ樹脂の原料
- ・女性ホルモン様作用 (Krishnan et al. Endocrinology 132 (1993) 2279)

研究の概要

- **第一章**
SBSE-TD-GC/MS法
試料: 比較的単純なマトリックスが含まれる河川水
OP、NP、BPAの測定
- **第二章**
更なる高感度化
試料: 河川水
フェノール性内分泌かく乱化学物質の一斉分析
- **第三章**
試料: 複雑なマトリックスが含まれるヒト生体試料
フェノール性内分泌かく乱化学物質の一斉分析

第一章

SBSE-TD-GC/MS法を用いた 河川水中OP及びNPの測定

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

SBSE-TD-GC/MS法による 河川水中OP、NP及びBPAの分析

Surrogate standards

Deuterium octylphenol (OP-d)

4-(1-methyl) octylphenol-d₅ (NP-d)

Bisphenol A-¹³C₁₂ (BPA-¹³C)



攪拌条件: 60 分、500 rpm、室温

TD-GC/MS

TD-GC/MSによるOP、NP及びBPA測定条件

TDS conditions

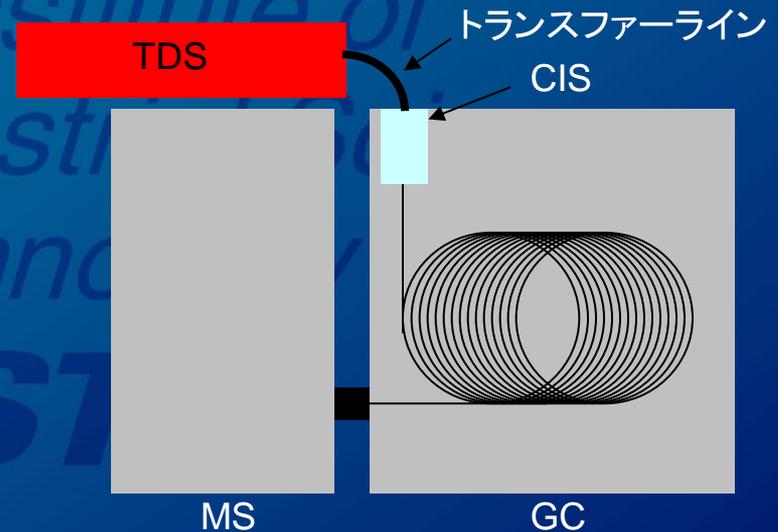
Flow Mode : Splitless
 Initial Temp : 20 °C
 Transfer Temp: 300 °C
 Ramp Rate : 60 °C/min
 Final Temp : 280 °C
 Final Time : 5 min

CIS conditions

Initial Temp : -150 °C
 Ramp Rate : 12 °C/s
 Final Temp : 300 °C
 Final Time : 10 min

GC/MS conditions

Flow gas : Helium (99.9999 %)
 Flow rate : 1.2 ml/min
 Injection : splitless
 Column : DB-5ms (0.25 mm X 30 m, 0.25 µm)
 Oven Temp : 60 °C - 15 °C/min - 280 °C (5 min)
 Ionization : EI (70 eV)
 Monitoring: SIM or SCAN



TD-GC/MS

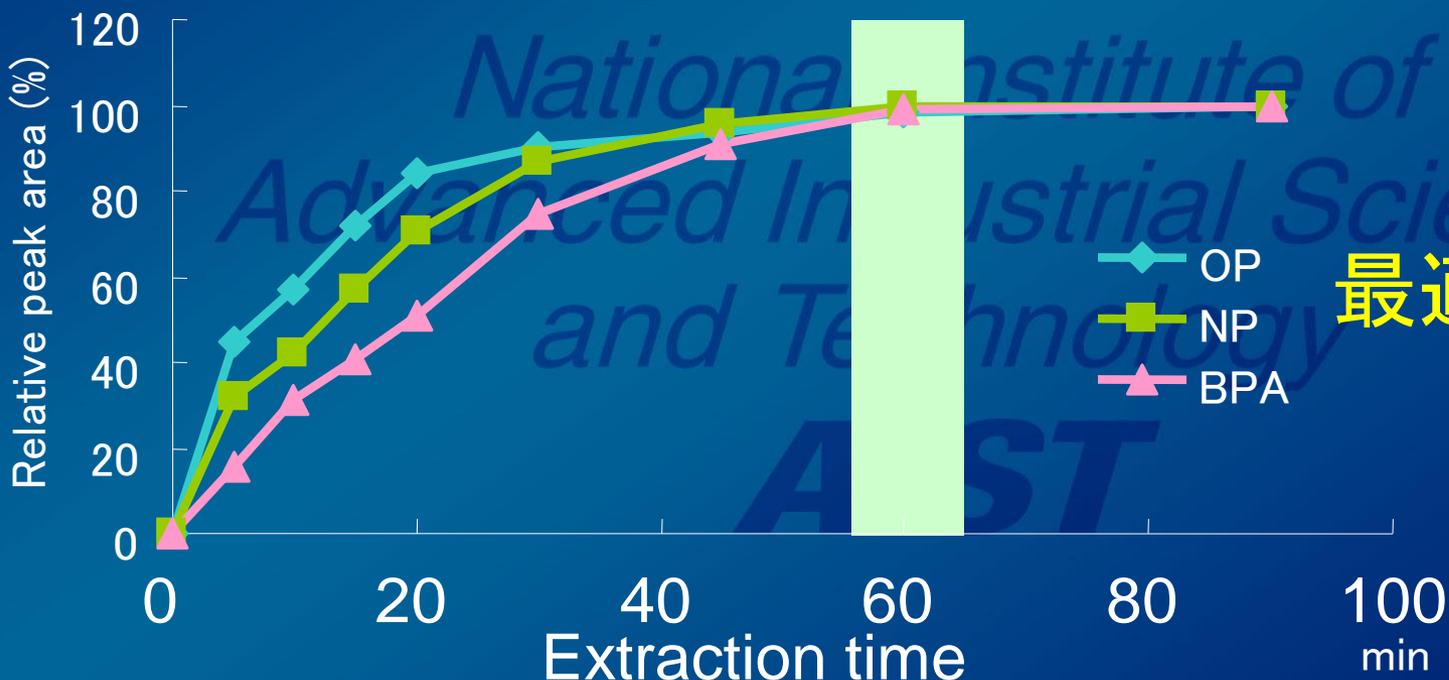
SBSE法の攪拌時間の最適化

精製水 (2 ml)
Standards 10 ng/ml



攪拌条件: 0 ~ 90 分、500 rpm、室温

TD-GC/MS



最適攪拌時間

60 分

SBSE-TD-GC/MS法の分析バリデーション

Compound	LOD ^a (ng/ml)	LOQ ^b (ng/ml)	Range (ng/ml)	Correlation coefficient (r)
OP	0.002	0.01	0.01~10	0.999
NP	0.02	0.1	0.1~10	0.999
BPA	0.5	2.0	2~100	0.999

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

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

- OP, NPでは、高感度分析を達成
- BPAでは、期待以上の感度は得られず・・・

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

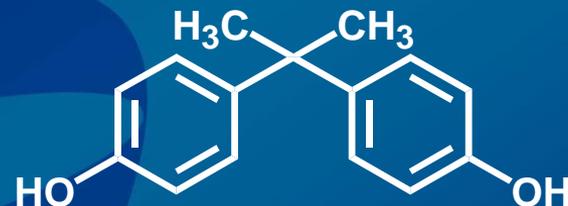
Trace analysis of phenolic xenoestrogens in water samples by stir bar sorptive extraction with *in situ* derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry,

M. Kawaguchi, K. Inoue, M. Yoshimura, N. Sakui, N. Okanouchi, R. Ito, Y. Yoshimura, H. Nakazawa,
J. Chromatogr. A, 1041 (2004) 19-26

BPA感度不足に関する考察

- BPA・・・二つのフェノール性水酸基

フェノール性水酸基



極性↑

揮発性↓

・SBSE法

無極性のPDMS相による抽出効率↓

PDMS攪拌子からの脱着効率↓

・GC/MS法

キャピラリーカラムでの分離↓

注入口及びカラムでの吸着率↑

誘導体化



試料中で誘導体化(*In situ*誘導体化)



誘導体化と抽出を同時に行う！

In situ誘導体化を伴うSBSE-TD-GC/MS法

誘導体化と抽出を同時に行う！ → 水中での誘導体化反応

フェノール性水酸基の誘導体化

シリル化・・・BSA、BSTFA等 → 水中で加水分解 ×

アシル化・・・無水酢酸等 → 水中でも反応 ○



In situ誘導体化を伴うSBSE-TD-GC/MS法を用いた フェノール性内分泌かく乱化学物質の一斉分析法

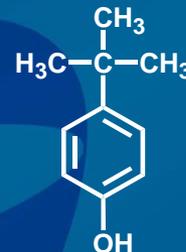
Phenolic xenoestrogens

試料 (10 ml)
Surrogate standards
Na₂CO₃ (53.0 mg)
NaHCO₃ (42.0 mg)
無水酢酸 (0.2 ml)

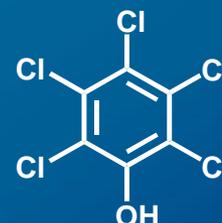
PDMS攪拌子



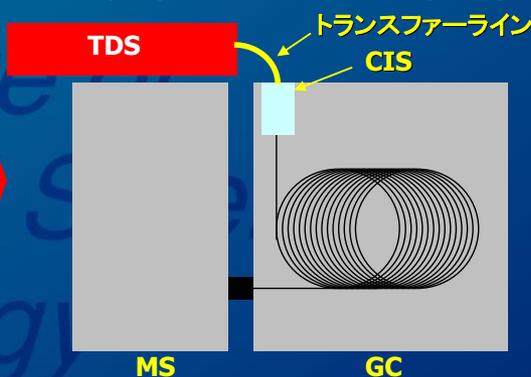
2,4-Dichlorophenol
(DCP)



4-*tert*-Butylphenol
(BP)



Pentachlorophenol
(PCP)



Surrogate standards

- OP-d, NP-d, BPA-¹³C
- 2,4-dichlorophenol-d₄ (DCP-d)
- Deuterium 4-*tert*-butylphenol (BP-d)
- Pentachlorophenol-¹³C₆ (PCP-¹³C)

攪拌条件: 90 分、1000 rpm、室温

TD-GC/MS

TD-GC/MSによるフェノール性 内分泌かく乱化学物質の測定条件

TDS conditions

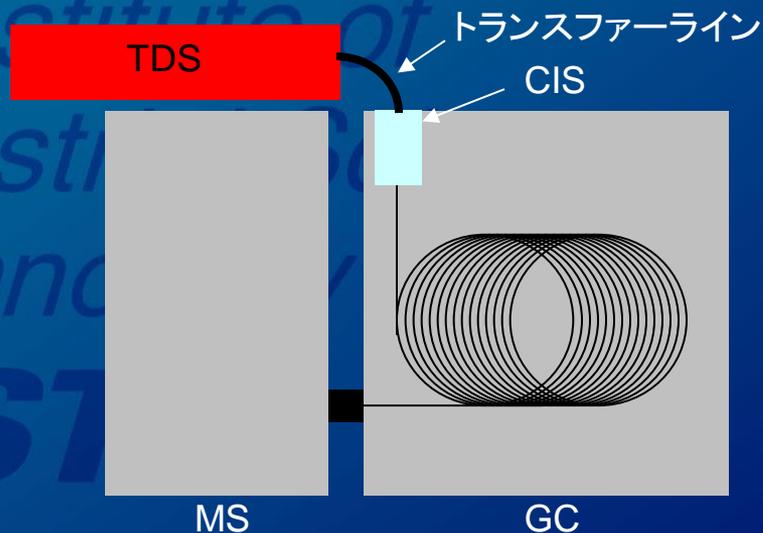
Flow Mode : Splitless
 Initial Temp : 20 °C
 Transfer Temp: 300 °C
 Ramp Rate : 60 °C/min
 Final Temp : 280 °C
 Final Time : 5 min

CIS conditions

Initial Temp : -150 °C
 Ramp Rate : 12 °C/s
 Final Temp : 300 °C
 Final Time : 10 min

GC/MS conditions

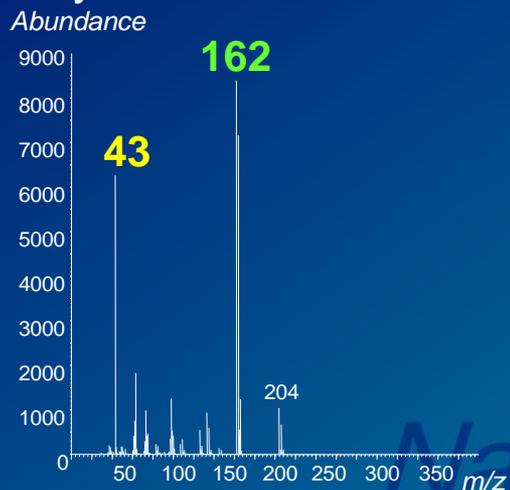
Flow gas : Helium (99.9999 %)
 Flow rate : 1.2 ml/min
 Injection : splitless
 Column : DB-5ms (0.25 mm X 30 m, 0.25 μm)
 Oven Temp : 60 °C - 15 °C/min - 300 °C (4 min)
 Ionization : EI (70 eV)
 Monitoring: SIM or SCAN



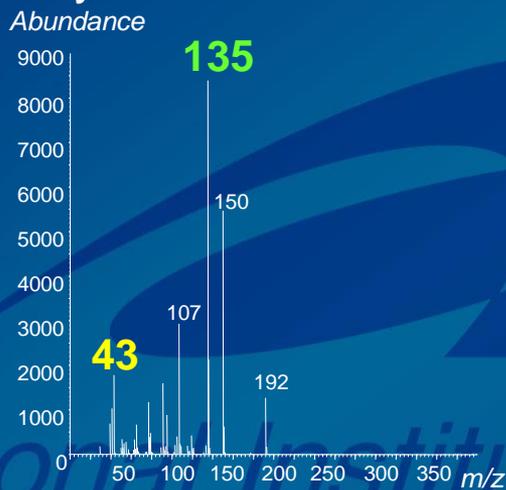
TD-GC/MS

分析対象物質のMSスペクトル

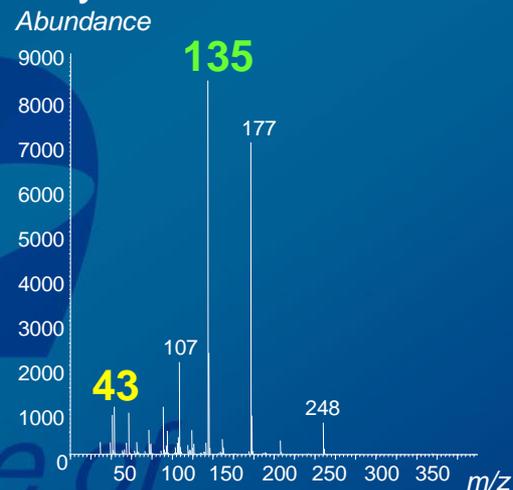
Acyl derivative of DCP



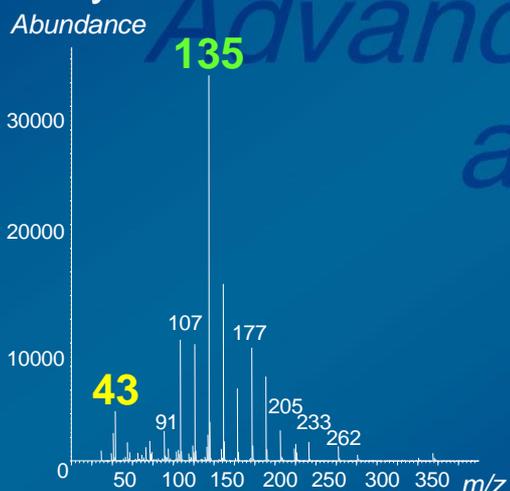
Acyl derivative of BP



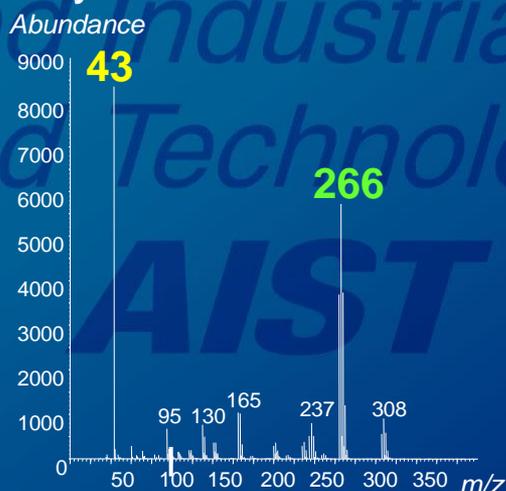
Acyl derivative of OP



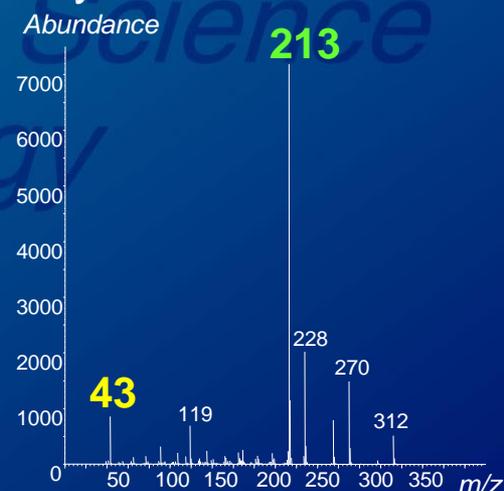
Acyl derivative of NP



Acyl derivative of PCP



Acyl derivative of BPA



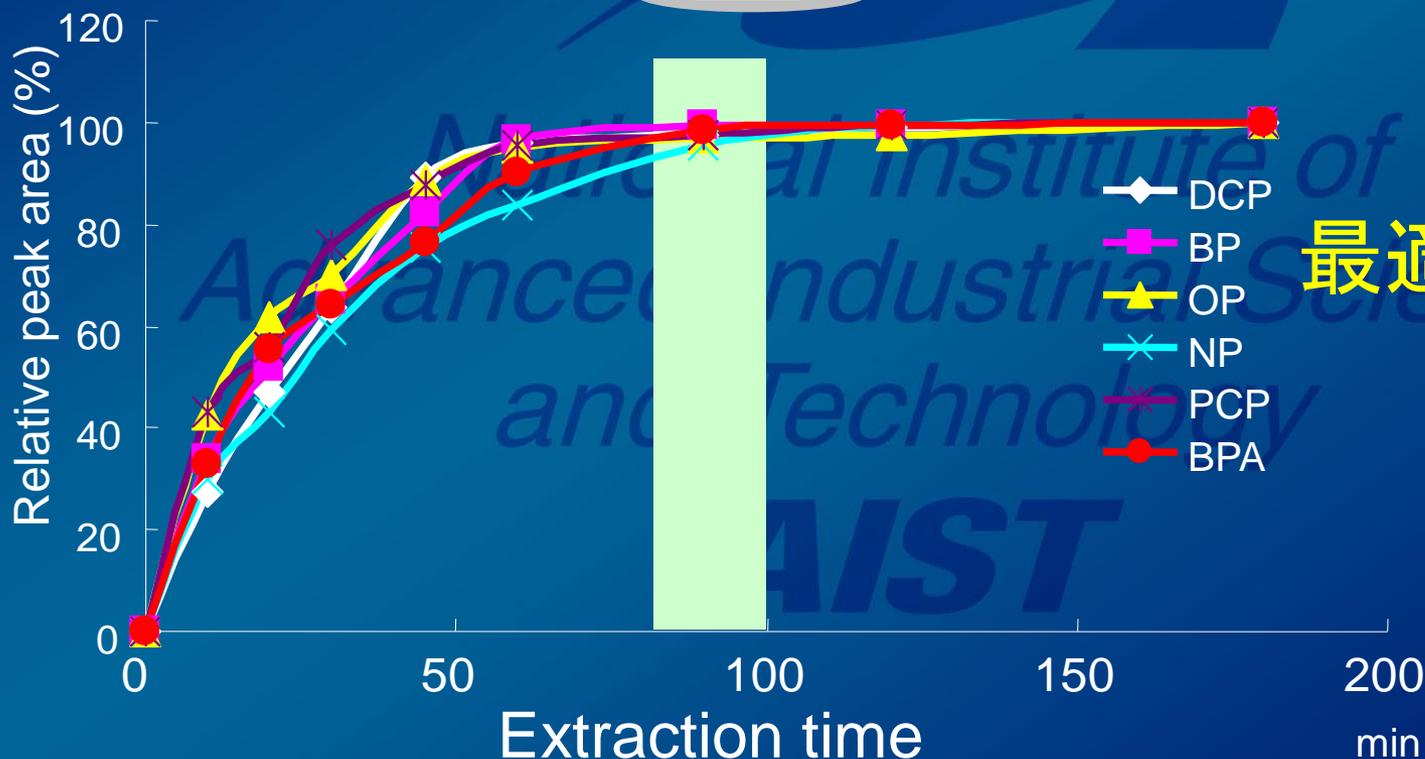
In situ誘導体化を伴うSBSE法の攪拌時間の検討

河川水 (10 ml)
Standards 1.0 ng/ml
Na₂CO₃ (53.0 mg)
NaHCO₃ (42.0 mg)
無水酢酸 (0.2 ml)



攪拌条件: 0 ~ 180 分、1000 rpm、室温

TD-GC/MS

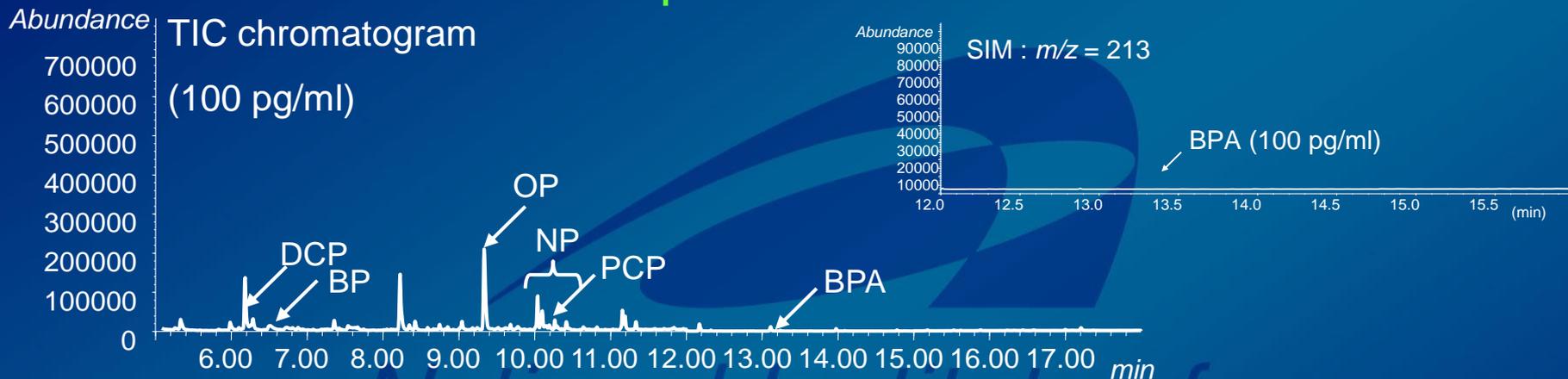


最適攪拌時間

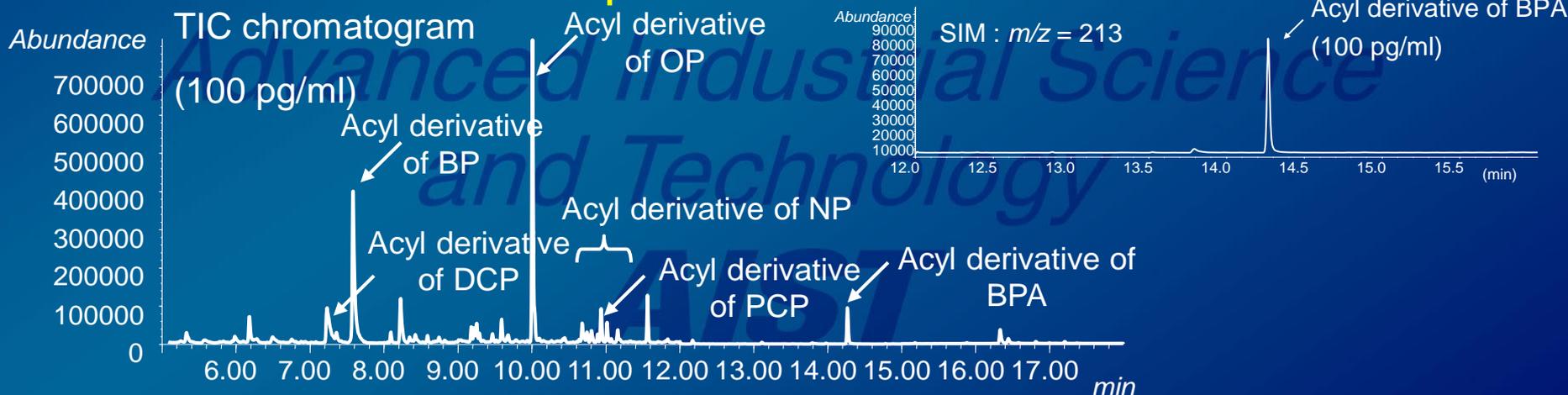
90 分

誘導體化による感度への影響

Without derivatization step



In situ derivatization step



In situ誘導體化 → 高感度化

分析法バリデーション

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)

- 検出限界: 0.5 ~ 5 pg/ml
- 定量限界: 2 ~ 20 pg/ml → 極めて高感度
- 直線性: $r > 0.999$ → 良好

河川水を用いた添加回収試験

Compound	Amount spiked			
	0.1 ng/ml		1.0 ng/ml	
	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.

- 回収率: 93.9 ~ 113.0 %
- 再現性: RSD 3.9 ~ 7.2 % → 良好

応用例

- 多摩川

雄のコイの約30%に生殖異常(1998年『環境省』)  内分泌かく乱化学物質の疑い

多摩川河川中フェノール性内分泌かく乱化学物質

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

 PCPを除く5物質を検出 → 河川水のモニタリングに有用

小括

- *In situ*誘導体化を用いた河川中フェノール性内
分泌かく乱化学物質の分析
フェノール性水酸基
→ 無水酢酸を用いるアシル化
SBSE法の操作過程に誘導体化試薬を添加
→ *In situ*誘導体化
→ sub pg/mlの測定

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

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

生体リスク評価のための測定法

生体試料

血液、尿etc

フェノール性化学物質が体内に取り込まれた場合、
グルクロン酸抱合体や硫酸抱合体として代謝

→ 尿に排泄

フェノール性内分泌かく乱化学物質も同様

S. Müller *et al.* Environ. Toxicol. Pharmacol. 5 (1998) 257

W. Volkel *et al.* Chem. Res. Toxicol. 15 (2002) 1281



ヒト尿中フェノール性内分泌かく乱化学物質の測定

脱抱合体化处理

尿中に、グルクロン酸抱合体や硫酸抱合体として存在

→ 極性が高くSBSE法では、抽出・濃縮できない

脱抱合体化处理

- 尿試料 1 ml
- 1M 酢酸アンモニウム水溶液 (50 μ l)
- β -グルクロニダーゼ (100 units)
- サルファターゼ (35.4 units)



37 °C、3 時間

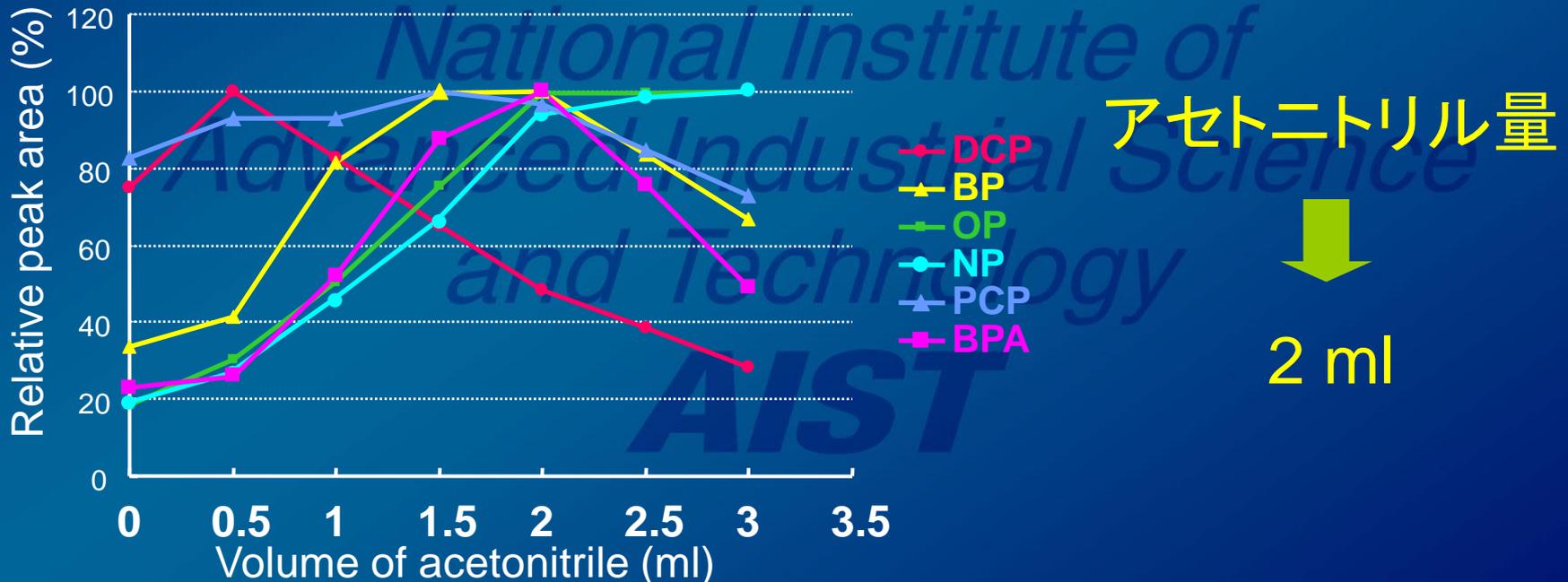
試料(脱抱合体化处理済)

除タンパク処理の検討

- *In situ*誘導体化を伴うSBSE-TD-GC/MS法を適用
- OP及びNPの*in situ*誘導体化
- 尿試料中では、誘導体化の阻害(マトリックスの影響?)
- 除タンパク処理の検討
アセトニトリルを使用
SBSE法の原理(液液抽出)より、有機溶媒の使用量に制限
- 最適化の必要性

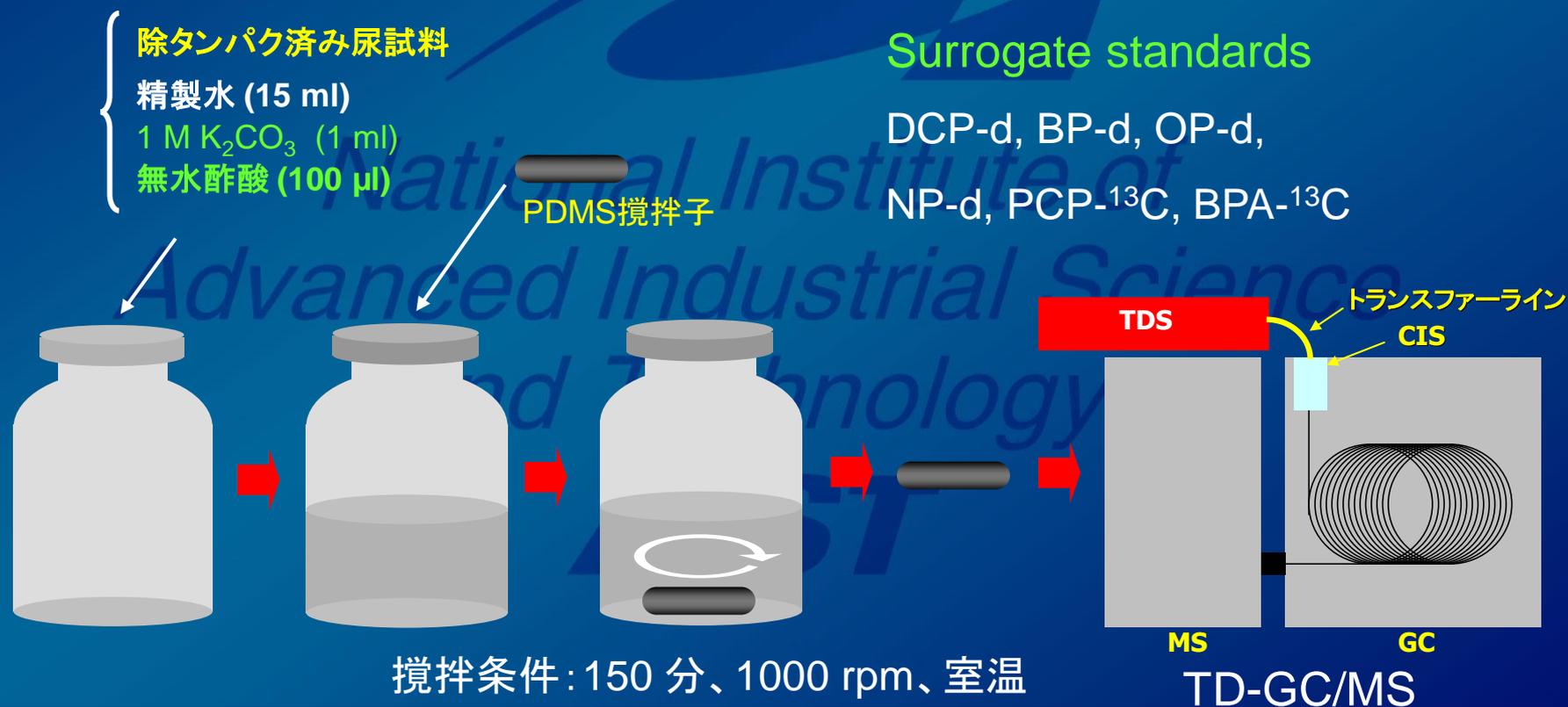
除タンパク法の最適化

- 試料(脱抱合体化処理済)
- 標準品を10 ng/mlになるように添加
- アセトニトリル(0 ~ 3 ml)を検討
- 遠心分離後(1400 x g, 10 分)、上清を精製水(15 ml)で希釈→*In situ*誘導体化を伴うSBSE法により測定



In situ誘導体化を伴うSBSE-TD-GC/MS法

1. 尿試料 1 mlにサロゲート物質を添加した後、脱抱合体化処理
2. 除タンパク処理(アセトニトリル 2 ml)
3. 遠心分離(1400 x g, 10 分)後、上清をサンプル瓶に移す



In situ誘導体化を伴うSBSE法の攪拌時間の検討

除タンパク済み尿試料

Standards 10 ng/ml

精製水 (15 ml)

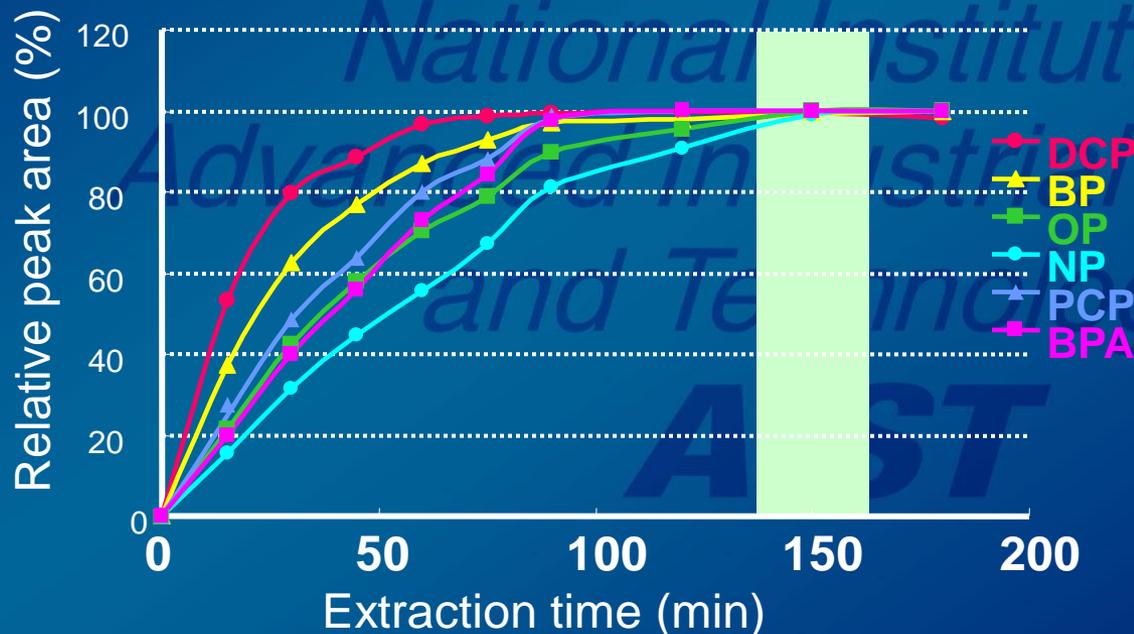
1 M K_2CO_3 (1 ml)

無水酢酸 (100 μ l)



攪拌条件: 0 ~ 180 分、1000 rpm、室温

TD-GC/MS



最適攪拌時間

150 分

分析法バリデーション

検出限界及び定量限界

Compound	LOD (ng/ml)	LOQ (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

LOD: limit of detection (S/N = 3)

LOQ: limit of quantification (S/N >10)

- 検出限界: 0.01~0.05 ng/ml → 高感度
- 定量限界: 0.05~0.2 ng/ml
- 直線性: $r > 0.99$ → 良好

ヒト尿試料の添加回収試験

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.

- 回収率: 95.0 ~ 101.8 %
- 再現性: RSD 2.5 ~ 8.6 %

→ 良好

応用例

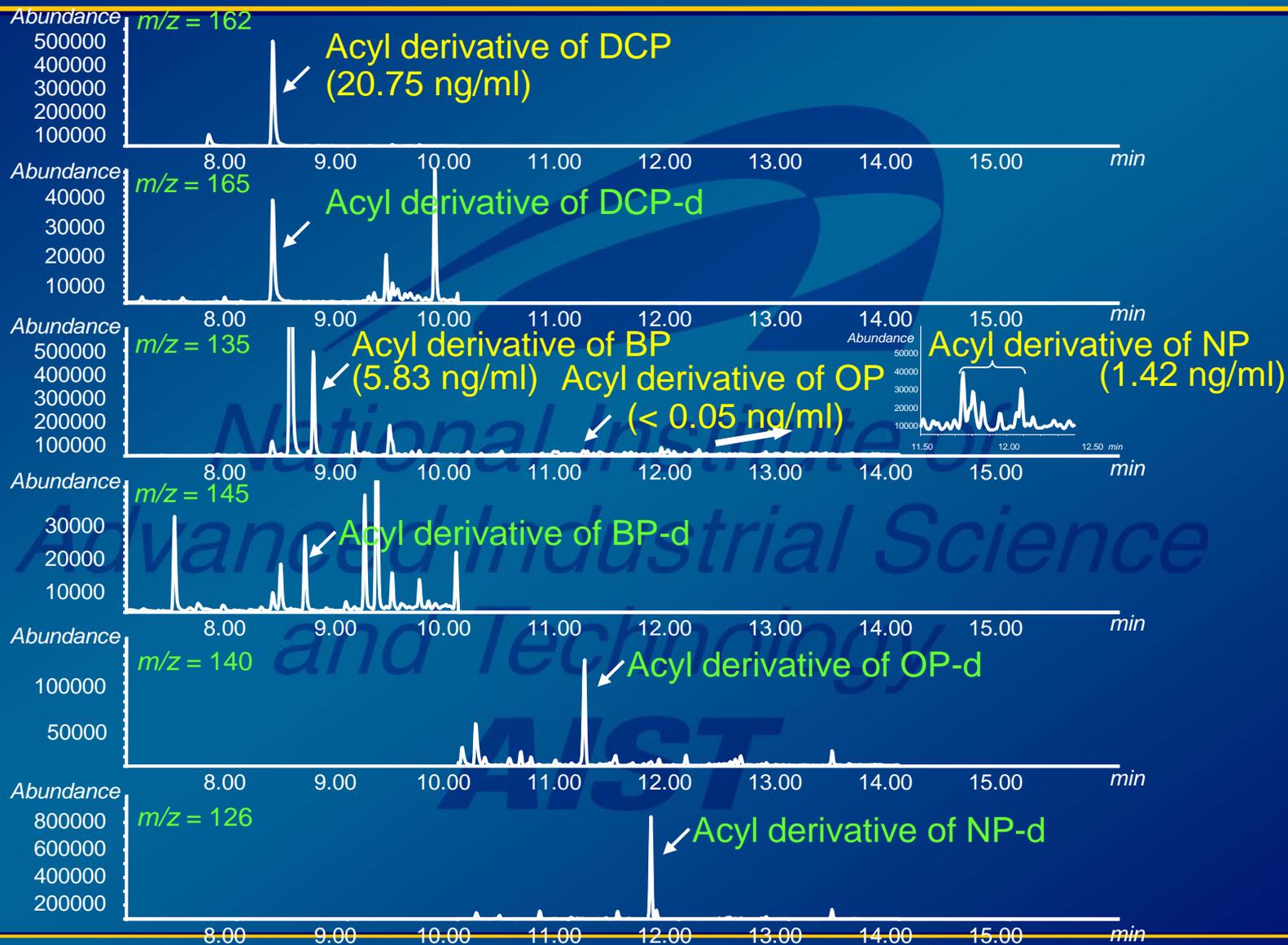
- 健常人5名(A~E)から提供された尿試料の測定
 脱抱合体化未処理 → N.D.

脱抱合体化処理済み

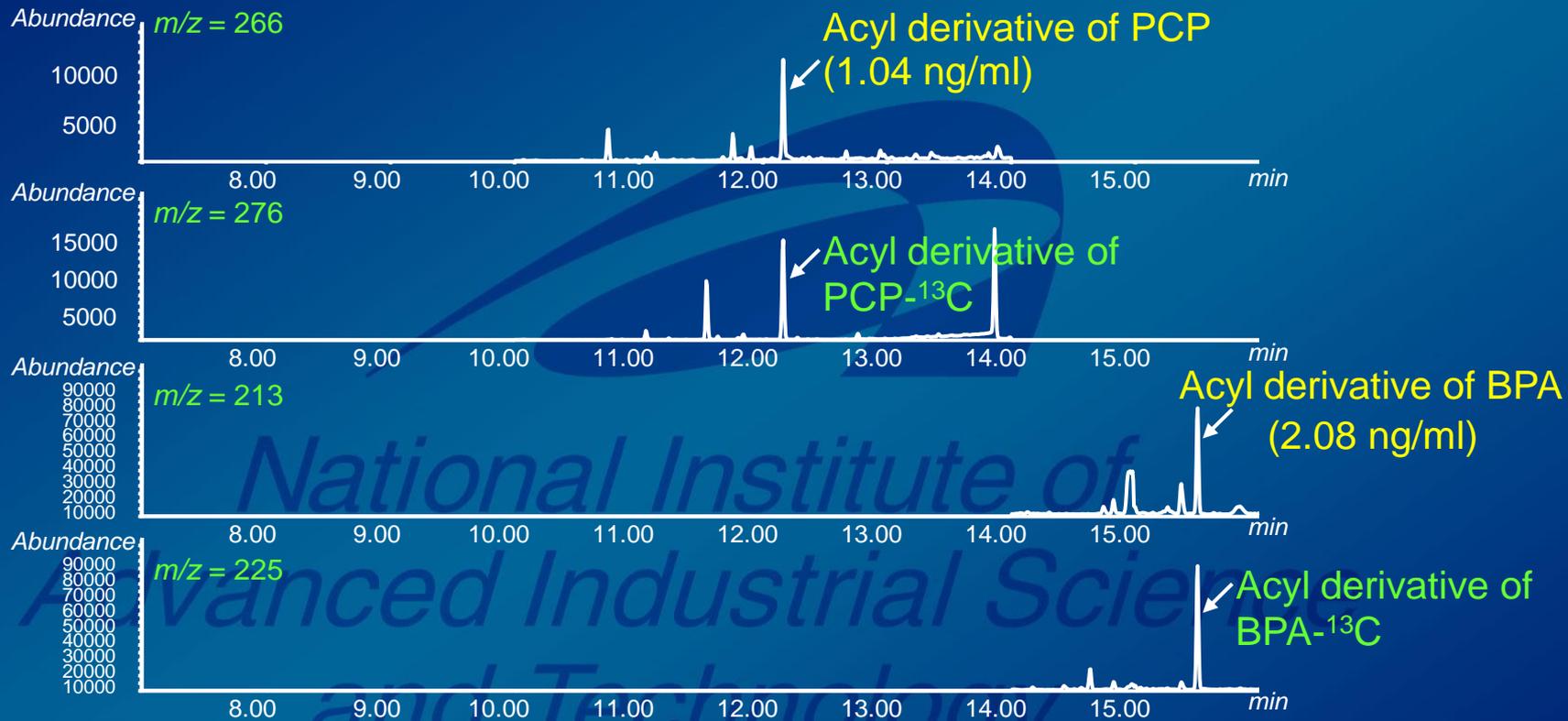
Compound	Human urine sample (ng/ml)				
	A	B	C	D	E
DCP	20.75	41.86	30.47	14.06	20.02
BP	5.83	0.82	0.93	0.10	3.53
OP	N.D.	N.D.	N.D.	0.05	N.D.
NP	1.42	1.04	1.24	2.00	2.00
PCP	1.04	0.46	0.46	N.D.	0.28
BPA	2.08	5.41	N.D.	0.93	1.84

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.

健常人Aのクロマトグラム(1)



健常人Aのクロマトグラム(2)



・健常人の尿中フェノール性内分泌かく乱化学物質の定量を達成

→ 当該化学物質の恒常的暴露を示唆

小括

- SBSE-TD-GC/MS法を用いたOP, NP及びBPAの分析
 - OP及びNP → 高感度分析の達成
 - BPA → 感度が得られず
- *In situ*誘導体化を用いた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
 - 無水酢酸を用いるアシル化(試料中)
 - In situ*誘導体化 → sub pg/mlの測定
- ヒト尿中フェノール性内分泌かく乱化学物質の分析
 - 除タンパク操作+*In situ*誘導体化 → sub ng/mlの測定

SBSE法

環境・生体試料中フェノール性内分泌かく乱化学物質の高感度測定

SBSE法の応用例

<誘導体化反応>

*National Institute of
Advanced Industrial Science
and Technology*

AIST

In situ 誘導体化を伴うSBSE法

PDMS相は、無極性



極性基を有する化合物の抽出は、
不向き



誘導体化と抽出を同時に行う！

- 河川及び尿中ビスフェノールA(BPA)
J. Chromatogr. B, 805 (2004) 41-48
- 河川中フェノール性内分泌かく乱化学物質
J. Chromatogr. A, 1041 (2004) 19-26
- 尿中フェノール性内分泌かく乱化学物質
J. Chromatogr. B, 820 (2005) 49-57
- 河川及び尿中クロロフェノール類
Anal. Chim. Acta, 533 (2005) 57-65.
- 河川水中エストラジオール類
J. Chromatogr. A, 1049 (2004) 1-8



Multi shot modeを用いたTD-GC/MS法

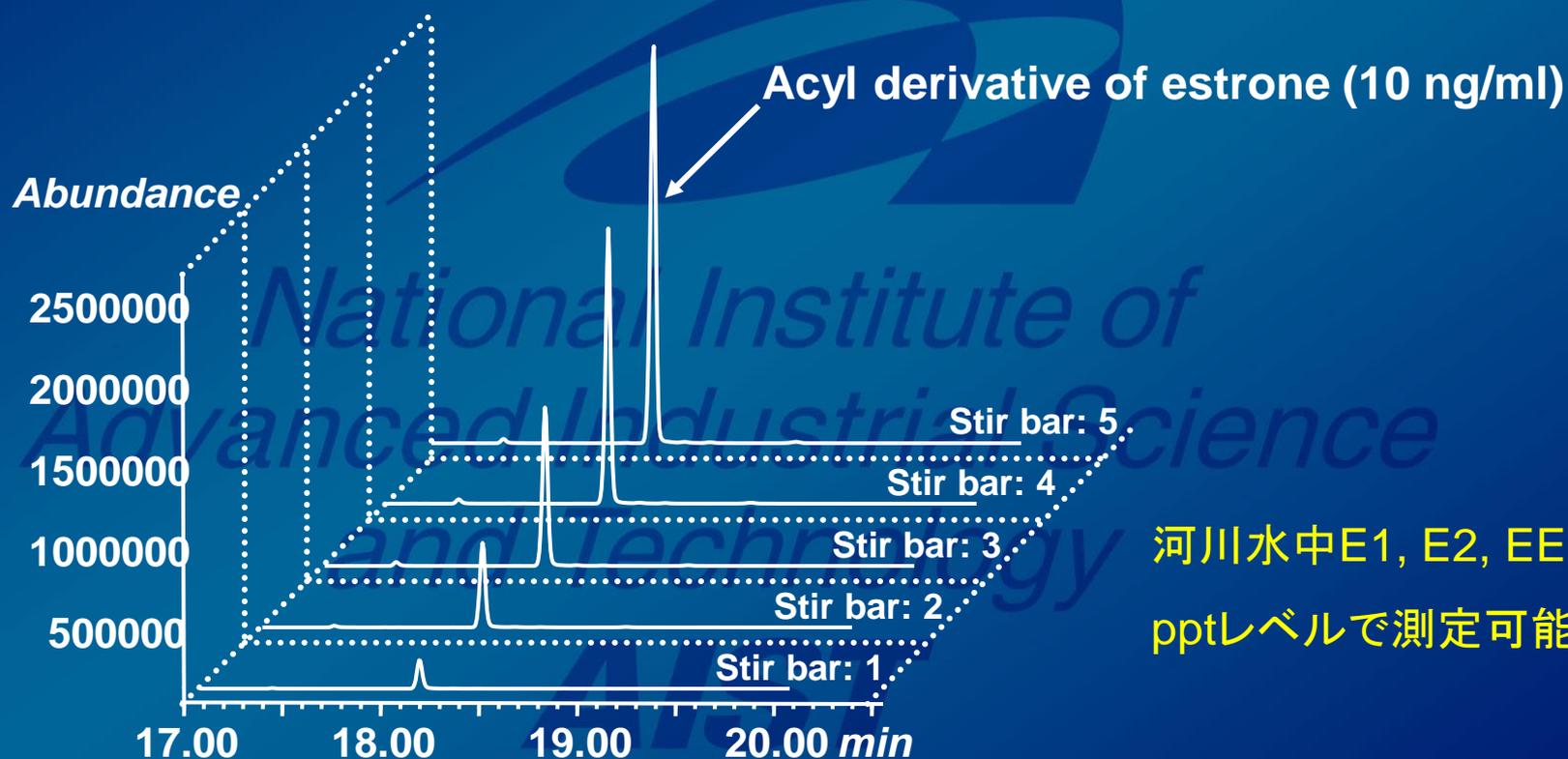


- 複数のPDMS攪拌子を同時に加熱脱着
- 更なる高感度化へ！！

Multi shot法を用いたエストロゲン類の分析

試料: 標準添加精製水(10 ml)

In situ 誘導体化を伴うSBSE法



河川水中E1, E2, EE
pptレベルで測定可能

PDMS攪拌子の増加 → ピーク強度上昇

M. Kawaguchi et al. J. Chromatogr. A 1049 (2004) 1-8.

In situ 脱抱合体化を伴うSBSE法

脱抱合体化と前処理に時間がかかる

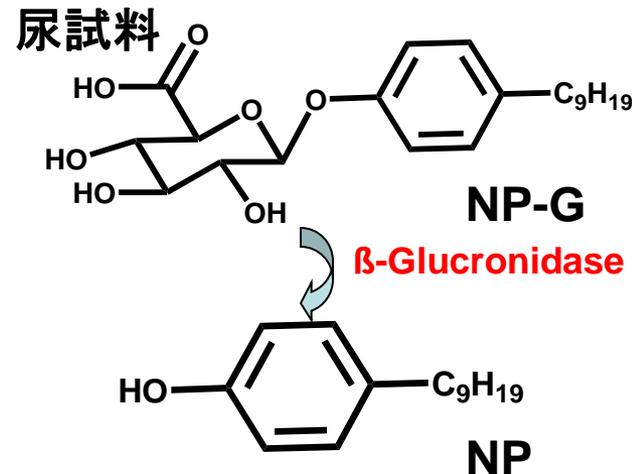
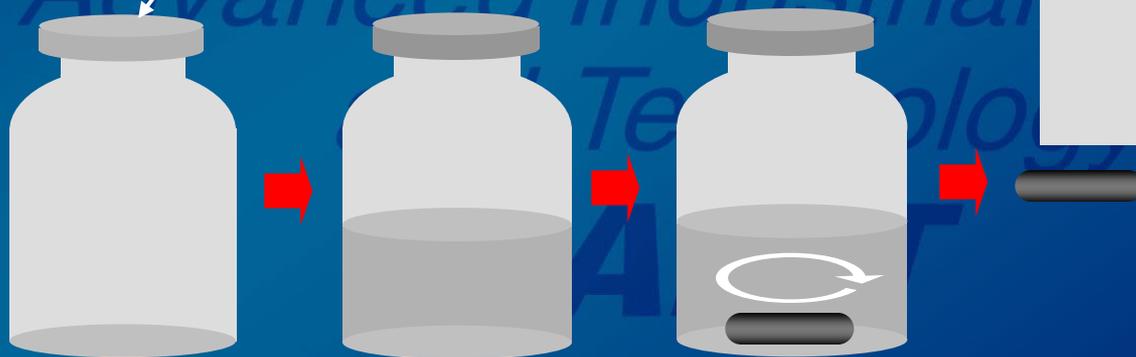


脱抱合体化と前処理を同時に行う！！

→ 簡便性の向上

尿試料
酢酸アンモニウム水溶液
β-Glucuronidase

PDMS 攪拌子



PDMS相

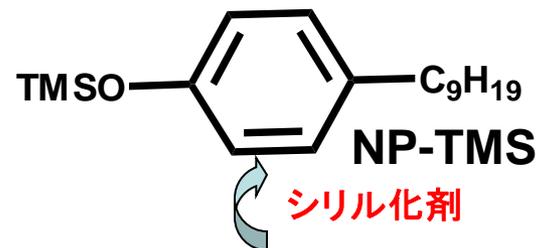
In tube 誘導体化法を伴うTD-GC/MS法

- フェノール性水酸基 → 微極性、低揮発性
→ GC/MSによる測定で感度低下

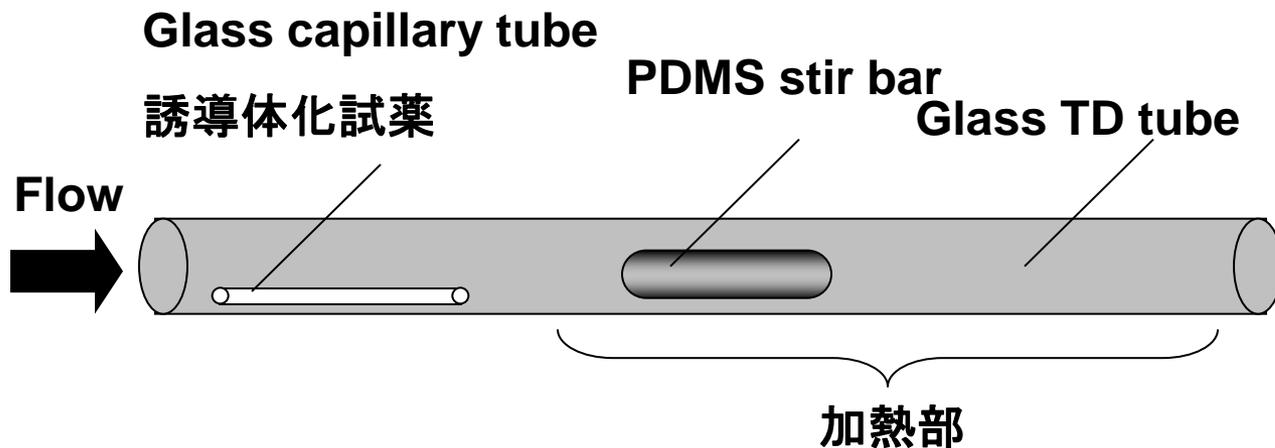
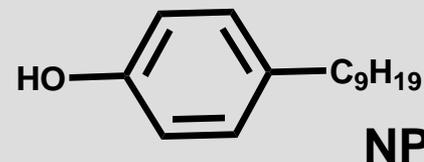
加熱脱着時に誘導体化！！

→ 更なる高感度化

キャリアーガス



PDMS相



ヒト尿中ノニルフェノール及び オクチルフェノールの測定

■ 実験の概要

試料: 健常人の尿(1 ml)

簡便性の向上

更なる高感度化

方法: **In situ 脱抱合体化を伴うSBSE法** + **In tube 誘導体化を伴うTD-GC/MS法**

• 検出下限及び定量下限

誘導体化なし

従来法(固相抽出法)

Compound LOD (ng/ml)

NP 0.22

OP 0.07

Compound LOD (ng/ml)

NP 5.0

OP 0.7

従来法に比べて、50倍の高感度化が達成

In tube 誘導体化を適用

Anal. Chem. 75 (2003) 6820.

Compound LOD LOQ Correlation coefficient

(S/N =3, ng/ml) (S/N > 10, ng/ml) (r)

NP 0.11 0.44 0.99 (0.44 - 44 ng/ml)

OP 0.01 0.04 0.99 (0.04 - 4 ng/ml)

実試料の測定

健常人6名の尿を測定

βグルクロニダーゼ添加無し → **すべてN.D.**

In situ 脱抱合体化を適用 (βグルクロニダーゼ添加)

Compound	Human					
	A	B	C	D	E	F
NP	1.75	1.58	1.95	0.62	1.39	0.86
OP	0.12	0.12	0.18	0.13	0.15	<0.04

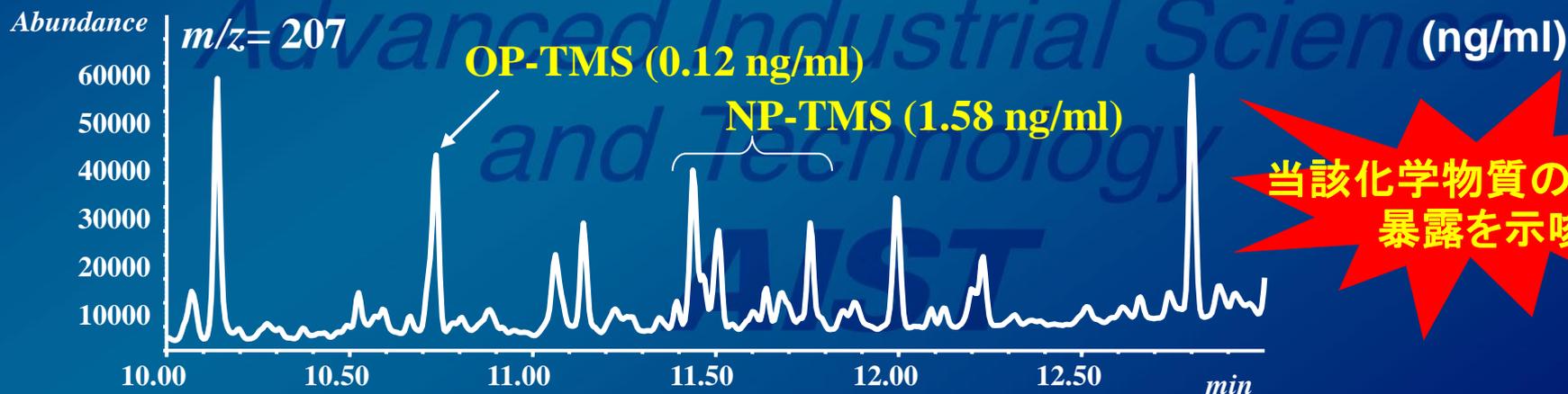


Fig. 健常人Bのクロマトグラム

小括

- SBSE法
 - In situ 誘導体化
 - In tube 誘導体化
 - Multi shot mode
 - In situ 脱抱合
- 組み合わせることで、
簡便かつ高感度な測定
が可能