

SPME-GC/MSによる尿中のフェノール類の分析

月岡 忠*・寺澤潤一**・牧野恒久***・中澤裕之****

フェノール類の中には内分泌かく乱作用が疑われている物質が多い。内分泌かく乱作用は極低濃度でその作用を発現すると言われているため、生体試料を対象とした微量分析法の構築が必要である。そこで、ヘッドスペース-SPME-GC/MSによる尿中のフェノール類の微量分析法を構築した。この方法は少量の試料で高感度測定が可能で、有害な溶媒を殆ど使用せず、分析時間が短く、分析コストが安いメリットがある。この方法を用いて、人にフェノール類を暴露した場合の排泄実験と実際の尿試料の分析を行い以下の結果を得た。人へのブチル～ノニルフェノールの暴露実験では、ブチルとペンチルフェノールは排泄が早く、5時間程度でグルクロン酸抱合体としてほぼ100%排泄された。しかし、アルキル鎖の長い、ノニルフェノールとオクチルフェノールは尿から排泄されにくかった。また、実際の尿試料を分析した結果、オクチルフェノール、ペンチルフェノール及びブチルフェノールは検出されなかった (< 0.1 ng/ml)。ノニルフェノールは一時尿から平均 0.37 ng/ml (0.2~2.0 ng/ml) 検出された。フェノールは平均 6.33 µg/ml (0.6~30.5 µg/ml)、一日排泄量は平均 14.4 mg (3.0~78.8 mg) であった。p-クレゾールは平均 21.4 µg/ml (0.06~165 µg/ml) 検出され、一日排泄量は平均 43.1 mg (1.2~78 mg) であった。p-クレゾールはフェノールの約3倍量排泄された。2,5-DCPは平均 168 ng/ml (5.4~4650 ng/ml) 検出され、一日排泄量は平均 150 µg (10.5~705 µg) であった。

キーワード：ノニルフェノール、オクチルフェノール、ペンチルフェノール、ブチルフェノール、p-クレゾール、フェノール、2,5-ジクロロフェノール、尿試料

1. はじめに

フェノール類は界面活性剤、殺菌剤、合成樹脂の酸化防止剤、農薬原料等として、大量にかつ広範囲に使用されている。フェノール類の中には内分泌かく乱作用を疑われている、ノニルフェノール、オクチルフェノール、ビスフェノールA、2,4-ジクロロフェノール、ペンタクロロフェノール等がある^{1)~3)}。内分泌かく乱物質は、低用量においてその作用を発現することが指摘されているため、高感度で選択性の高い分析法の開発が必要である。

アルキルフェノール類の分析法としては、GC^{4),5)}、GC/MS^{6)~10)}、HPLC^{11)~14)}、LC/MS^{15)~18)}が一般的である。GC法は分離能に優れているが、低濃度ではカラム吸着をおこすため、ピーク形状が不良で、十分な感度が得られないため、TMS化やPFB化等の誘導体化を行っている。一方、HPLC法は分離能と選択性の面で劣るため、夾雑物の多い試料ではデータの信頼性に問題がある。そのため、最近では検出器に選択性の高いMSを用いた方法が多く報告されている。アルキルフェノール類の液体試料からの抽出は主に

酸性下で、溶媒抽出やC18カートリッジで抽出する方法が一般的である。

今回分析対象とした、フェノール類の中でノニルフェノールは、操作が長くなるとブランク値が高くなり、微量分析においては信頼性の高いデータは得にくくなる。そこで、操作が簡単で、試薬を殆ど使用しないヘッドスペース-SPME法でフェノール類を抽出し、GC/MSで測定する方法を検討した。その結果、高感度でノニルフェノールのブランク値を0.1 ng/ml程度に抑えることが可能であった。また、SPME法で欠点と言われている分析精度はサロゲートを添加することにより改良された。この方法を用いて、成人の尿試料を分析し、興味ある知見が得られたので報告する。

2. 実験

2.1 試薬・試液

精製水は超純水を活性炭処理して用いた。リン酸は試薬特級を、β-グルクロナダーゼ (200 U/ml) は和光純薬 (株)、生化学用を用いた。メタノール、アセトンは残留農薬測定用を用いた。

* 長野県環境保全研究所 保健衛生チーム (現 飯田保健所 〒389-0034 飯田市追手町2-678)

** 現 松本保健所, *** 東海大学医学部, **** 星薬科大学

¹³C-ノニルフェノール (¹³C-NP), 2,4-ジクロロフェノール-d3 (2,4-DCP-d3), フェノール-d5: ケンブリッジアイソトープ製をそれぞれアセトンに溶解し, 1000 μg/ml溶液を作成し, これを標準原液とした. 必要に応じてメタノールで希釈して用いた.

4-ノニルフェノール (4-NP), 4-*n*-オクチルフェノール (4-*n*-OP), 4-*ter*-オクチルフェノール (4-*t*-OP), 4-*n*-ペンチルフェノール (4-*n*-PH), 4-*ter*-ペンチルフェノール (4-*t*-PH), 4-*n*-ブチルフェノール (4-*n*-BP), 4-*ter*-ブチルフェノール (4-*t*-BP), *o*, *m*, *p*-クレゾール, フェノール, 2,5-DCP: 和光純薬(株)及び関東化学(株)製をそれぞれアセトンに溶解し, 1000 μg/ml溶液を作成し, これを標準原液とした. 必要に応じてメタノールで希釈して用いた.

2.2 器具・装置

ヘッドスペース瓶: テクマー製 22 ml容量のものを使用した.

ヘッドスペース瓶用セプタム: GLサイエンス製を使用した.

ヒーター: ピアース製 Reacti-therm III を用いた.

SPME: スペルコ製 膜厚 65 μmのポリジメチルシロキサン (PDMS)/ジビニルベンゼン (DVB) ファイバーを用いた.

GC/MS: 日本電子(株)製 GC-mateを用いた.

2.3 試料の採取

尿試料は全て, インフォームドコンセントを実施後に採取した.

一時尿: 平成 13 年 9 月~10 月に男性 41 人, 女性 17 人から 2 回分の尿で 200 ml以上を採取した.

一日尿: 平成 14 年 1 月~2 月に男性 11 人, 女性 11 人から採取した.

暴露実験: 平成 13 年 11 月に男性 2 人にブチル~ノニルフェノール, 各 100 μgをドリンク剤 (リポビタンD, 大正製薬) 100 mlに添加して摂取させ, 10 時間尿を採取した.

2.4 操作方法

総フェノール類 (抱合体及び遊離体): 尿試料 30 mlを共栓付試験管に採り, β-グルクロニダーゼ溶液 30 μlを加え, 37°Cで 90 分間, 酵素分解して分析した (遊離フェノール類は採取した尿試料をそのまま用いた).

2.4.1 ブチル~ノニルフェノール

酵素分解液 5 mlを 22 ml容量のヘッドスペース瓶に採り, これに精製水 5 ml, ¹³C-ノニルフェノール溶液 (1 μg/ml) 5 μl, (1+1)リン酸 0.5 mlを加え, 密栓し, 80°Cで 30 分間ヘッドスペースガスから膜厚 65 μmのPDMS/DVBのSPMEファイバーで抽出し, GC/MS-SIMで定量した.

2.4.2 フェノール, クレゾール

酵素分解液 0.1~1 mlを 22 ml容量のヘッドスペース瓶に採り, これに精製水を加え 10 mlとし, これにフェノール-d5 溶液 (50 μg/ml) 20 μl, (1+1)リン酸 0.5 mlを加え密栓し, 80°Cで 30 分間ヘッドスペースガスから膜厚 65 μgのPDMS/DVBのSPMEファイバーで抽出し, GC/MS-SIMで定量した.

2.4.3 2,5-DCP

酵素分解液 1 mlを 22 ml容量のヘッドスペース瓶に採り, これに精製水 9 ml, 2,4-DCP-d3 溶液 (2.0 μg/ml) 10 μl, (1+1)リン酸 0.5 mlを加え密栓し, 80°Cで 30 分間ヘッドスペースガスから膜厚 65 μmのPDMS/DVBのSPMEファイバーで抽出し, GC/MS-SIMで定量した.

2.5 GC/MS条件

GC: HP-5890 シリーズ II

注入口温度: 250°C

キャリアーガス: He 流速 1 ml/min

ブチル~ノニルフェノール

カラム: HP-5 MS 内径 0.32 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25 μm

カラム温度: 50°C (1 min) - 7°C/min - 250°C (5 min)

2,5-DCP, フェノール, クレゾール

カラム: DB-624 内径 0.32 mm, 長さ 30 m, 膜厚 1.8 μm

カラム温度: 50°C (1 min) - 10°C/min - 230°C (5 min)

MS: JEOL GC-mate

イオン源温度: 230°C, イオン化電圧: 70 V

イオン化電流: 300 μA

モニターイオン

ブチル~ノニルフェノール:

m/z = 107, 121, 135, 150, 164, 206, 113 (¹³C-ノニルフェノール)

2,4-DCP: m/z = 162, 164,

167 (2,4-DCP-d3)

フェノール, クレゾール:

$m/z = 94, 99$ (フェノール-d5), 107, 108

2.6 検量線の作成

ブチル～ノニルフェノール：22 ml容積のヘッドスペース瓶に精製水 10 mlを採り、これに混合標準溶液 0.05～1.0 $\mu\text{g/ml}$ を 20 μl , ^{13}C -ノニルフェノール溶液 (1 $\mu\text{g/ml}$) 5 μl , (1+1) リン酸 0.5 mlを加え密栓し、80℃で 30 分間ヘッドスペースガスから SPMEファイバーで抽出し、GC/MS-SIMで測定し、 ^{13}C -ノニルフェノールとの面積比で検量線を作成した。ノニルフェノールは主要な 5 本のピーク面積の和を用いて検量線を作成した。検出限界はブチル、ペンチル、オクチルフェノールが 0.1 ng/ml, ノニルフェノールが 0.2 ng/mlである。図 1 にブチル、ペンチル、オクチル、ノニルフェノールの SIMクロマトグラムを示す。

2,5-DCP：上記と同様に精製水を採り、これに 2,5-DCP標準液 0.25～2.0 $\mu\text{g/ml}$ を 20 μl , 2.0 $\mu\text{g/ml}$

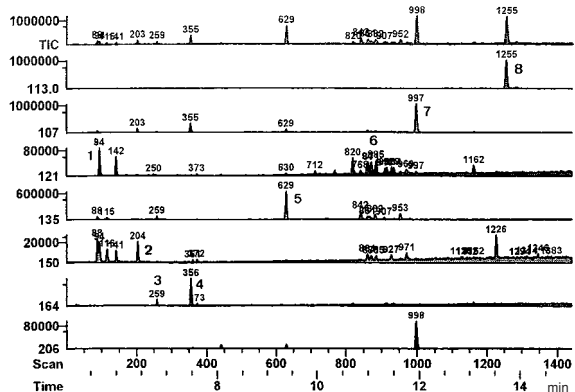


Fig. 1 SIM chromatograms of alkylphenols.

Peaks : 1, 4-*t*-BP ; 2, 4-*n*-BP ; 3, 4-*t*-PH ; 4, 4-*n*-PH ;
5, 4-*t*-OP ; 6, 4-*n*-P ; 7, 4-*n*-OP ; 8, ^{13}C -NP.

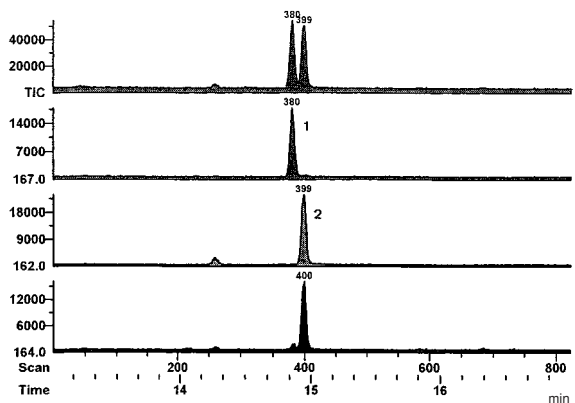


Fig. 2 SIM chromatogram of 2,5-DCP.

Peaks : 1, 2,4-DCP-d3 ; 2, 2,5-DCP.

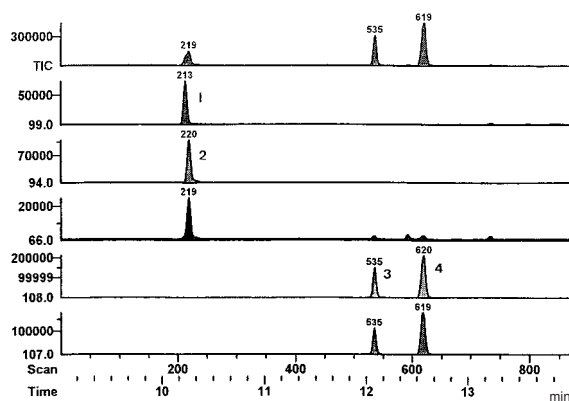


Fig. 3 SIM chromatograms of phenol and cresol.

Peaks : 1, phenol-d₅ ; 2, phenol ; 3, *o*-cresol ; 4, (*m+p*)-cresol.

の 2,4-DCP-d3 を 10 μl , (1+1) リン酸 0.5 mlを加え同様に操作し、2,4-DCP-d3 との面積比で検量線を作成した。検出限界は 1 ng/mlである。図 2 に 2,5-DCPの SIMクロマトグラムを示す。2,5-DCP はブチル～ノニルフェノールの GC条件でも測定可能であるが、検出濃度が異なり同時測定が困難であったため単独で測定した。

フェノール、クレゾール：上記と同様に精製水を採り、これにフェノール 25～200 $\mu\text{g/ml}$, クレゾール 10～200 $\mu\text{g/ml}$, フェノール-d5 50 $\mu\text{g/ml}$ の混合標準溶液を 20 μl と (1+1) リン酸 0.5 mlを加え同様に操作し、フェノール-d5 との面積比で検量線を作成した。検出限界はフェノール 10 ng/ml, クレゾール 5 ng/mlであった。図 3 にフェノールとクレゾールの SIMクロマトグラムを示す。

3. 結果及び考察

3.1 抱合体の酵素分解について

ノニルフェノール、オクチルフェノール等のアルキルフェノール類がグルクロン酸抱合体として排泄されているか不明確だったため、100 μg のこれらアルキルフェノール類をボランティアに投与し、採尿して分析した結果、これらのアルキルフェノール類は大部分がグルクロン酸抱合体として排泄されていた。酵素添加量、分解時間については既報¹⁹⁾と同様である。

3.2 SPME条件

ヘッドスペース中の目的物質を効率良く抽出するファイバーを選定するため、PDMS, PDMS/DVB, Carboxen/PDMS, Carbowax/PDMS, Polyacrylateについ

て検討した結果、PDMS/DVBとCarbowax/DVBが感度面で優れていた。そこで、本法では、65 μ m膜厚のPDMS/DVBを用い、80 $^{\circ}$ Cで30分間抽出することにした。

3.3 暴露実験

暴露実験結果を図4、5に示す。アルキル基の短いブチルとペンチルフェノールは消化管から速やかに吸収され、摂取後30分ですでに排泄が始まり、1時間後に最高濃度に達し、5時間でほぼ排泄された。しかし、オクチルやノニルフェノールでは排泄が遅く、4-*ter*-オクチルフェノールでははっきりした濃度上昇は見られたが、ノニルフェノールでは濃度上昇が低く、4-*n*-オクチルフェノールでは明確な濃度上昇曲線は得られず、10時間経過しても明確な濃度低下は認められなかった。全体の排泄量は4-*ter*-ブチルフェノール88%、4-*n*-ブチルフェノール98%、4-*ter*-ペンチルフェノール65%、4-*n*-ペンチルフェノール100%、4-*ter*-オクチルフェノール50%、ノニルフェノール12%、4-*n*-オクチルフェノール8%程度であった。このことは、長鎖のアルキルフェノール類による暴露を受けた場合、体内に長く残留し、尿よりも糞から排泄される可能性を示唆していると考えられた。

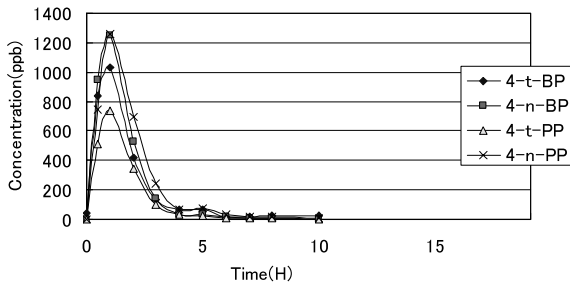


Fig. 4 Results of excretion for butylphenol and pentylphenol in urine after 100 ml of a drink containing 100 μ g of each phenol was administered.

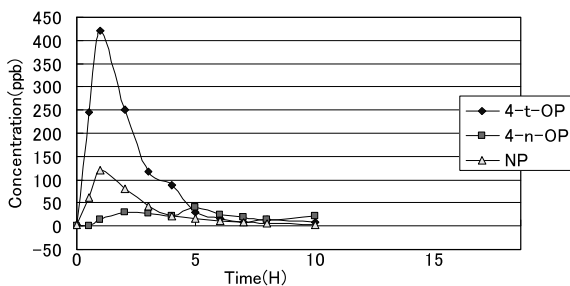


Fig. 5 Results of excretion for octylphenol and nonylphenol in urine after 100 ml of a drink containing 100 μ g of each phenol was administered.

3.4 尿中のフェノール類の測定結果

一時尿と一日尿を測定した結果、ブチル、ペンチル、オクチルフェノールは検出されなかった(検出限界は0.1 ng/ml)。ノニルフェノールは平均0.37 ng/ml (0.2~2.0 ng/ml, n= 58) 検出された。一日尿からは平均1.0 ng/ml (0.29~2.5 ng/ml) 検出され、一時尿に比べ平均で約3倍高い値になった。これはサンプリング時間が長かったため保存中に汚染された可能性があると思われたため、このデータを採用しないことにした。図6に一時尿のノニルフェノールの測定結果をヒストグラムで示す。ノニルフェノールはブランク値が高いため、本研究ではSPME法による直接抽出法を採用したが0.1~0.2 ng/ml程度のブランク値は避けられなかった。

フェノールは一時尿で平均6.31 μ g/ml (0.6~29.4 μ g/ml, n= 58)、一日尿で平均6.38 μ g/ml (1.3

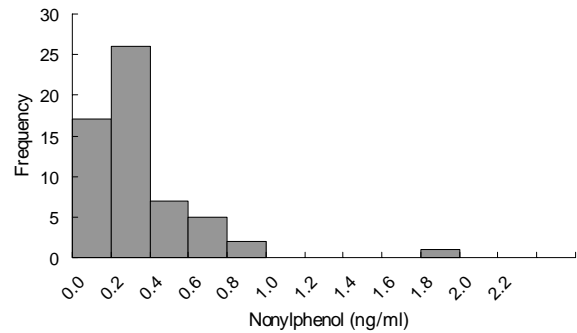


Fig. 6 Histogram of the nonylphenol in urine.

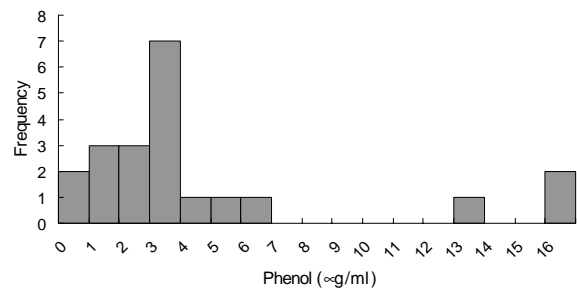


Fig. 7 Histogram of the phenol in urine.

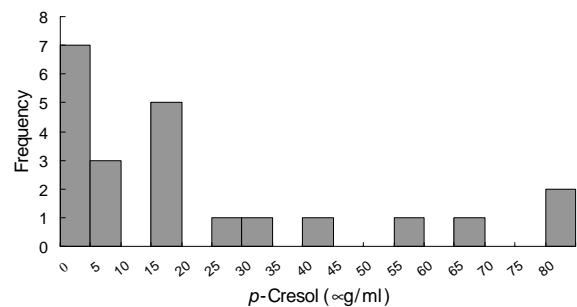


Fig. 8 Histogram of the *p*-cresol in urine.

～30.5 μg/ml, n= 22) であり, 両者を合わせた平均は 6.33 mg/mlであった. また, 一日排泄量は平均 14.4 mg/day (3.0～78.8 mg/day) であった. 図7にフェノールのヒストグラムを示すが, 平均値を中心とした対称性の良いグラフは示さず, 18 μg/mlを越えるボランティアが4人で, 最低と最大濃度では50倍の差があった. 供給源については食事由来と思われるが現在のところ不明である.

p-クレゾールは一時尿で平均 20.4 μg/ml (0.06～165 μg/ml, n= 58), 一日尿で平均 23.9 μg/ml (0.61～87.3 μg/ml, n= 22) であり, 両者を合わせた平均値は 21.4 μg/mlであった. 一日排泄量は平均 43.1 mg/day (1.2～78 mg/day) で, 約40%がグルクロン酸抱合体として排泄されていた. 図8に*p*-クレゾールのヒストグラムを示すが, 約半数のボランティアが 10 μg/ml以下で, 平均値を中心とした対称性の良いヒストグラムにはならなかった. *p*-クレゾールはフェノールの約3倍濃度検出され, 150 μg/mlを超えるボランティアが2人で, 最低値と最高値では約3000倍の差があった. また, クレゾールは誘導体化しないと, DB-624のキャピラリーカラムでは *m*-体と *p*-体が分離できないため, TMS化して分離し, *p*-体であることを確認した. *p*-クレゾールはチロシンから生成されると言われている. 豚の例ではチロシンの代謝異常により肉が異臭を呈し, 廃棄処分されたという報告例²⁰⁾がある.

パラジクロロベンゼンの代謝物である 2,5-DCP は一時尿で平均 208 ng/ml (5.4～4650 ng/ml, n= 58), 一日尿で平均 63.3 ng/ml (5.8～265 ng/ml, n= 22) であった. 一時尿の平均値が一日尿に比べ高いのは, 1 μg/mlを越えるボランティアが3人いたためであり, この3人を除外すると平均値は 88.9 ng/mlで, 一日尿とほぼ同じ値になる. 一日排泄量は平均 150 μg/day (10.5～705 μg/day) であった. 一時尿で3検体が 1 μg/mlを越えていたことは, パラジクロ

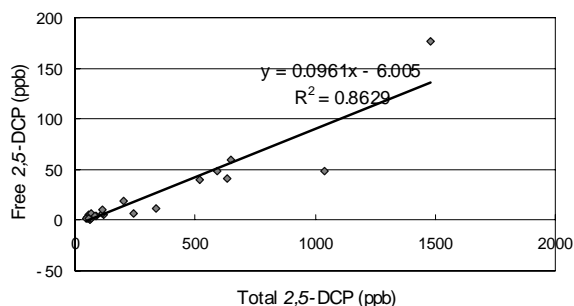


Fig.9 Relation in concentration between the total 2,5-DCP and free 2,5-DCP in urine.

ロベンゼンが防虫剤や防臭剤として使用されており, 住宅の高機密化が高い値を示す要因になっていると考えられる. また, 家庭でパラジクロロベンゼンを使用していない人からも検出されており, 一般大気がパラジクロロベンゼンに汚染されている可能性が考えられる. 図9に酵素分解前のフリーの 2,5-DCPとトータルの 2,5-DCPの関係を示すが, 2,5-DCPの場合は約9割がグルクロン酸抱合体として排泄されていた.

4. 結論

ヘッドスペース-SPME-GC/MSによる尿中のフェノール類の微量分析法を構築した. この方法は少量の試料で高感度測定が可能で, 有害な溶媒を殆ど使用せず, 分析時間が短く, 分析コストが安いメリットがある. この方法を用いて, 人にフェノール類を暴露した場合の排泄実験と実際の尿試料の分析を行い以下の結果を得た. 人へのブチル～ノニルフェノールの暴露実験では, ブチルとペンチルフェノールは排泄が早く, 5時間程度でグルクロン酸抱合体としてほぼ100%排泄された. しかし, アルキル鎖が長くなると尿からの排泄は少なく, ノニルフェノールでは10時間で12%, 4-*n*-オクチルフェノールでは8%程度の排泄であった. また, 実際の尿試料を分析した結果,

1. オクチルフェノール, ペンチルフェノール及びブチルフェノールは検出されなかった (< 0.1 ng/ml).
2. ノニルフェノールは一時尿から平均 0.37 ng/ml (0.2～2.0 ng/ml) 検出された.
3. フェノールは平均 6.33 μg/ml (0.6～30.5 μg/ml), 一日排泄量は平均 14.4 mg (3.0～78.8 mg) であった.
4. *p*-クレゾールは平均 21.4 μg/ml (0.06～165 μg/ml) 検出され, 一日排泄量は平均 43.1 mg (1.2～78 mg) であった. *p*-クレゾールはフェノールの約3倍量排泄された.
5. 2,5-DCPは平均 168 ng/ml (5.4～4650 ng/ml) 検出され, 一日排泄量は平均 150 μg (10.5～705 μg) であった.

謝 辞

本研究は長野県衛生公害研究所で平成 11 年～ 13

年度の厚生労働科学研究費によって行われた。尿試料を提供していただいた皆様に感謝いたします。

文 献

- 1) 化学同人 (1998) 環境ホルモン&ダイオキシン, p 30-33.
- 2) 中澤裕之, 宮崎奉之, 竹葉和江 (1999) 生活関連化学物質データブック.
- 3) 日本化学会編 (2001) 内分泌かく乱物質研究の最前線.
- 4) Stephanou E. and Giger W. (1990) *Environ. Sci. Technol.*, **16**, 800.
- 5) Wahlberg C., Renberg L. and Wideqvist U. (1990) *Chemosphere*, **20**, 179.
- 6) Tsuda T., Takino A., Kojima M., Harada H. and Muraki K. (1999) *J. Chromatogr. B.*, **723**, 273.
- 7) Kawanaka Y., Torigai M., Yun S., Hashiba T. and Iwashima K. (2000) *J. Environ. Chem. Jpn.*, **10**, 73.
- 8) Ding W. H. and Twing S. H. (1998) *J. Chromatogr. A*, **824**, 79.
- 9) Ding W. H. and Fann J. C. H. (2000) *J. Chromatogr. A*, **866**, 79.
- 10) Kawamura Y., Maehara T., Iijima H. and Yamada T. (2000) *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **41**, 212.
- 11) Ahal M. and Giger E. (1985) *Anal. Chem.*, **57**, 1577.
- 12) Kawamura Y., Tagai C., Maehara T. and Yamada T. (1999) *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **40**, 274.
- 13) Ahel M. and Giger W. (1985) *Anal. Chem.*, **57**, 2584.
- 14) Marcomini A. and Giger W. (1987) *Anal. Chem.*, **59**, 1709.
- 15) Castillo M., Alpendurada M. and Barcelo' D. (1997) *J. Mass Spectrom.*, **32**, 1100.
- 16) Yonekubo M., Sasaki S., Ichiki M., Kanai M. and Sasaki H. (1999) *Bunseki Kagaku*, **48**, 571.
- 17) Pedersen S. N. and Lindholst C. (1999) *J. Chromatogr. A*, **864**, 17.
- 18) Motoyama A., Suzuki A., Shirota O. and Namba R. (1999) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **13**, 2204.
- 19) Tsukioka T., Brock J., Graiser S., Nguyen J., Nakazawa H. and Makino T. (2003) *Anal. Sci.*, **19**, 151.
- 20) Okada S. (2003) *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **44**, J-12.

Determination of phenols in urine samples by SPME-GC/MS

Tadashi TSUKIOKA*, Jyun-ichi TERASAWA, Tsunehisa MAKINO and Hiroyuki NAKAZAWA

* *Nagano Environmental Conservation Research Institute, Public Health Team, 1978 Komemura, Amori, Nagano-shi, 380-0944 Japan.*

Abstract

Many of phenols are suspected to exhibit endocrine disrupting actions. The endocrine disrupting action is said to be effective even at low concentrations, and therefore it is necessary to develop a microanalytical method for phenols in living body samples. Under such a situation, the present authors used the method of headspace SPME-GC/MS to develop a microanalytical method for phenols in urine. This method is superior to the conventional method in sensitivity, manageability, and selectivity. It also requires low analytical costs, and is friendly to the environment. This method was applied to experiments on excretion after exposure of human bodies to phenols and to analyses of actual urine samples.

In the exposure-excretion experiments with butylphenol~nonylphenol, the butylphenol and pentylphenol were excreted so quickly that they were almost 100% excreted as glucuronide conjugates in 5 hours; in contrast, the nonylphenol and octylphenol having longer alkyl chains were hardly excreted in urine.

In the analyses of actual urine samples, none of butyl-, pentyl-, and octylphenol were detected in the urine samples. Nonylphenol was detected in spot urine at an average of 0.37 ng/ml. Phenol was detected at an average of 6.33 $\mu\text{g/ml}$, its 1-day amount excreted being an average of 14.4 mg. *p*-Cresol was detected at an average of 21.4 $\mu\text{g/ml}$, its 1-day amount excreted being an average of 43.1 mg, ca 3 times as much as phenol. 2,5-Dichlorophenol (DCP) was detected at an average of 168 ng/ml, its 1-day amount excreted being an average of 150 μg .

Key words: Nohylphenol, Octylphenol, Pentylphenol, Butylphenol, *p*-Cresol, Phenol, 3,5-Dichlorophenol, Urine sample