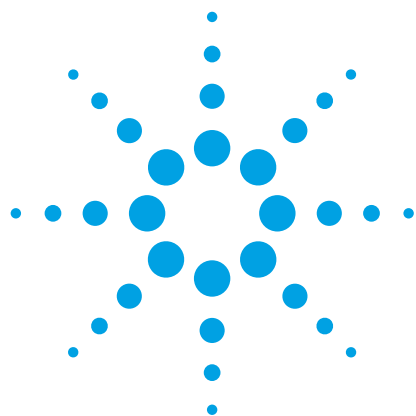




Agilent 7000B トリプル四重極 GC/MS を使用したヒト尿中 PAHs 代謝物の ppt レベルの分析

アプリケーションノート

環境

著者

Éric Gaudreau、Jean-François Bienvenu、
René Bérubé、Éric Daigle、
Simon Chouinard
Centre de Toxicologie du Québec
Institut National de Santé
Publique du Québec
Québec
Canada

Marcus Kim
Agilent Technologies, Inc.
Mississauga
Canada

要旨

Agilent 7000B トリプル四重極 GC/MS システムを使用して、尿に含まれるきわめて低濃度の多環芳香族炭化水素 (PAHs) 代謝物を高い感度で確実にモニタリングするためのメソッドを開発しました。得られた検出下限 (LOD) は 0.7 ppt、定量下限 (LOQ) は 2.5 ppt と低く、19 種類のすべての PAHs 代謝物について 100 % に近い回収率を達成しました。このメソッドは、カナダ健康指標調査 (CHMS) で使用するために開発されたものです。



Agilent Technologies

はじめに

PAHs は、最大で 6 つのベンゼン環が融合し、隣接する任意の 2 つのベンゼン環が 2 本の炭素結合を共有する 100 種類以上の化学物質が含まれています。PAHs は、主に炭素が含まれる化合物を燃焼させることで得られます。PAHs は、ガソリンおよびディーゼル排気、すす、コークス、葉巻、タバコの煙に含まれます。少量の PAHs が含まれる食品には、燻製食品、バーベキュー調理した食品、炭火焼き食品、ローストコーヒー、ソーセージなどがあります。

PAH 混合物に曝されたヒトで癌 (肺、皮膚、および泌尿器系の癌) の発生率が上がることが多くの研究で示されているため、PAHs は健康上の懸念となっています [1]。個別の PAH 化合物の多くは、米国保健省国家毒性プログラム、米国環境保護庁 (EPA)、カナダ保健省などの機関により、発癌性が疑われる、または発癌性の可能性がある物質として分類されてきました。

健康への影響は、主に曝露の程度 (時間など)、曝露量 (または濃度)、PAHs の本来の毒性、曝露の経路 (吸入、摂取、皮膚への接触) によって決まります。このような曝露が健康に与える影響には、それまでの健康状態や年齢など、その他のさまざまな要素も関わっています。

尿中 PAHs 代謝物レベルの分析による曝露の生物学的モニタリングは、吸収量を評価するための一般的な方法になりつつあります [2]。PAHs は、肝臓内ですばやくヒドロキシ化され (第 1 相代謝)、通常はグルクロニドに結合します。その結果、より水に溶けやすくなり、尿として排泄されます [3]。いくつかの産業衛生学の研究では、尿中の 1-ヒドロキシピレンが PAH に対する職業曝露の有効な生体マーカーとなることが示されています。さらに、ヒト尿中のベンゾ[a]ピレン代謝物の濃度測定を PAH 汚染の指標として使用することができます [4、5]。これらの化合物は、カナダでは重要な汚染物質と見なされるため、尿中の代謝生成物を監視することで PAHs への環境曝露を評価するメソッドが開発されてきました。

このアプリケーションノートでは、Agilent 7000B シリーズトリプル四重極 GC/MS を用いて (GC/MS/MS)、ヒト尿中のヒドロキシ化された PAHs 代謝物を測定するメソッドの開発について紹介します。LOQ は 0.0025 µg/L (2.5 ppt) と低く、2-ナフトールを除き、12 ppt を超えませんでした。ほとんどの代謝物の回収率の範囲は 94~104 % で、日内および日間精度 (相対標準偏差) は、分析した 19 種類のどの代謝物についても 10 % を超えることはありませんでした。

実験方法

標準と試薬

ヒドロキシベンズ[a]アントラセン、ヒドロキシベンゾ[a]ピレン、ヒドロキシクリセン、ヒドロキシフルオランテン、およびそれぞれの異性体は Midwest Research Institute (カンザスシティ、ミズーリ州) から入手しました。ヒドロキシフルオレンおよびナフトール異性体は Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州) から入手しました。ヒドロキシフェナントレン、ヒドロキシピレン、およびそれぞれの異性体は Dr. Ehrenstorfer GmbH (アウグスブルク、ドイツ) から入手しました。Midwest Research Institute (カンザスシティ、ミズーリ州) から入手した 3-ヒドロキシフルオランテン-¹³C₆ を除き、すべての ¹³C 標識化標準は、Cambridge Isotope Laboratories (アンドーバー、マサチューセッツ州) から入手しました。重水素標識化したすべての標準は、Toronto Research Chemicals (トロント、カナダ) から入手しました。β-グルクロニダーゼ酵素 (水中) は Sigma-Aldrich から、尿サンプルは、PAH への曝露がないボランティアから入手しました。誘導体化試薬、N-メチル-N-(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド (MSTFA) は、Thermo Fisher Scientific から入手しました。使用した内部標準と対応する対象化合物を表 1 に示します。

表 1. 標識化された内部標準と対応する定量対象の化合物

内部標準	対象化合物
1-ナフトール- ¹³ C ₆	1-ナフトール
2-ナフトール- ¹³ C ₆	2-ナフトール
2-フルオレン-d ₉	2、3、および 9-OH-フルオレン
3-OH-フェナントレン- ¹³ C ₆	1、2、3、および 4-OH-フェナントレン
9-OH-フェナントレン- ¹³ C ₆	9-OH-フェナントレン
3-OH-フルオランテン- ¹³ C ₆	3-OH-フルオランテン
1-OH-ピレン- ¹³ C ₆	1-OH-ピレン
6-OH-クリセン- ¹³ C ₆	2、3、4、および 6-OH-クリセン 1 および 3-OH-ベンズ[a]アントラセン
3-OH-ベンゾ[a]ピレン- ¹³ C ₆	3-OH-ベンゾ[a]ピレン (3-OH-BaP)

サンプル前処理

5 mL の尿サンプルを収集し、尿代謝物を β-グルクロニダーゼで処理しました。次に、ヘキサンを使用して中性 pH 下ですべてのサンプルを抽出し、N-メチル-N-(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド (MSTFA) で誘導体化しました。

機器

この実験は、マルチモード注入口 (MMI) を備えた、Agilent 7000B シリーズトリプル四重極質量分析、マルチプルリアクションモニタリング (MRM) モードおよび電子イオン化 (EI) を使用して行いました。表 2 に機器の条件を示します。

結果

分離

ヒドロキシ-PAHs は位置異性体 (4-OH-クリセンや 6-OH-クリセンなど) です。異性体はリテンションタイムが異なりますが、各異性体グループ内では MS/MS トランジションはすべて同一です (図 1 および 2)。共溶出干渉は定量および検出下限に影響を与えることがあるため、クロマトグラフの良好な分離が非常に重要です。シャープなガウスピーク形状が得られるように、また、対象化合物のピークが干渉ピークから十分に分離されるように、ガスクロマトグラフメソッドを最適化しました (図 3)。

表 2. Agilent 7890/7000 ガスクロマトグラフと質量分析装置の条件

GC の実行条件

分析カラム	Agilent DB-XLB 30 m × 0.25 mm、 0.10 μm (p/n 122-1231E)
注入	1 μL、パルスドスプリットレス
インジェクタ温度	130 °C で 0.1 分間 720 °C/min で 130~270 °C
キャリアガス	ヘリウム、定流量、1 mL/min
オープン温度	65 °C で 1 分間 15 °C/min で 65~160 °C 5.3 °C/min で 160~270 °C 40 °C/min で 270~320 °C 2 分間保持
トランスファーライン温度	250 °C
合計分析時間	31.67 分間

MS の条件

取り込みモード	電子イオン化 (EI)、マルチプル リアクションモニタリング
チューニング	atunes.eiex.tune.xml
EMV ゲイン	ナフトールで 15、3-OH-B[a]P で 50、 残りのタイムセグメントで 40
コリジョンガス流量	窒素、1.5 mL/min
クエンチングガス流量	ヘリウム、2.5 mL/min
イオン源温度	230 °C

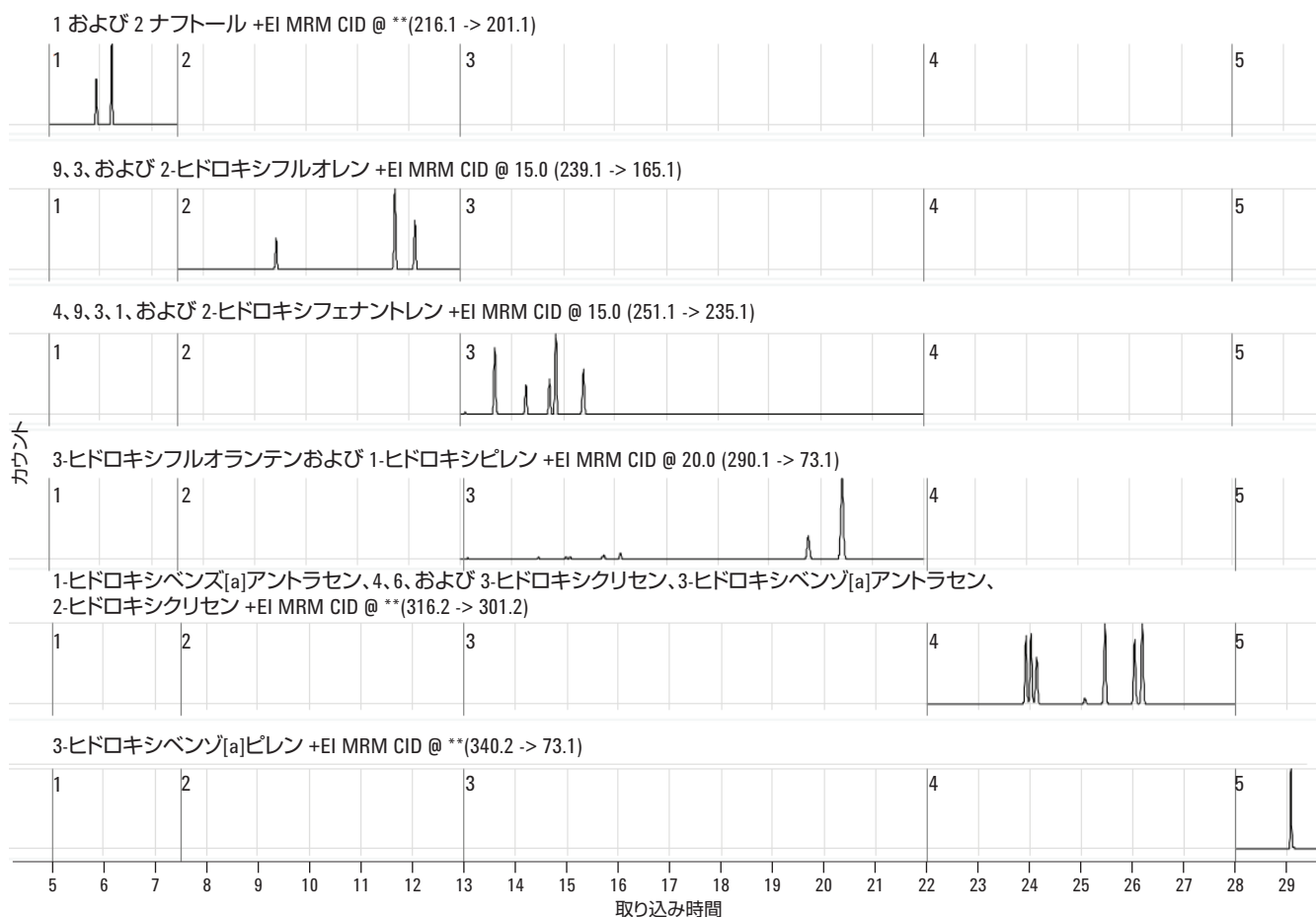


図 1. ヒドロキシ PAHs のクロマトグラム

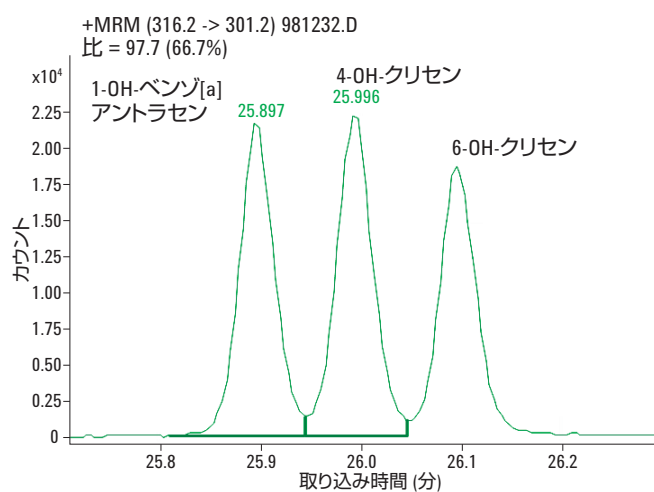


図 2. 3 種類のヒドロキシ PAHs の分離を示す代表的なクロマトグラム

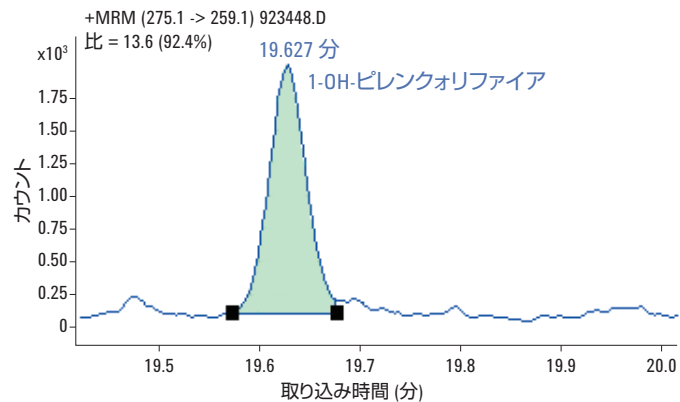
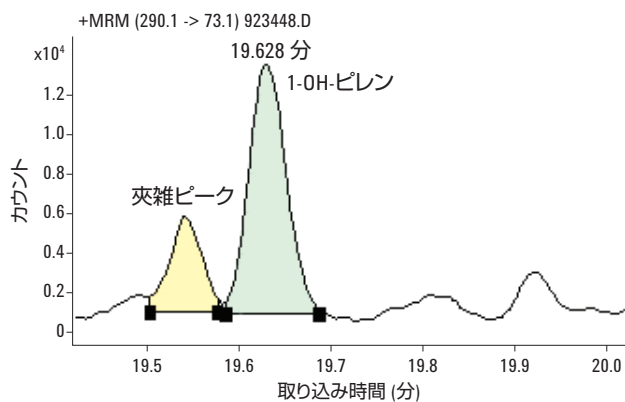


図 3. 1-OH-ピレンの定量および定性イオン（夾雑ピークからの良好なクロマトグラフ分離）

要求される感度を満たすには、濃度 0.01 $\mu\text{g/L}$ で 3-OH-ベンゾ[a]ピレンの S/N 比が 10 以上でなければなりません (図 4)。ヒドロキシル化ベンゾ[a]ピレンを選択したのは、その毒性が広く知られており、環境内で活発に監視されているからです。排泄物が主な排泄経路であるため (最大で 90 %)、尿中の 3-OH-ベンゾ[a]ピレンについては極めて低い検出下限が必要です [6]。

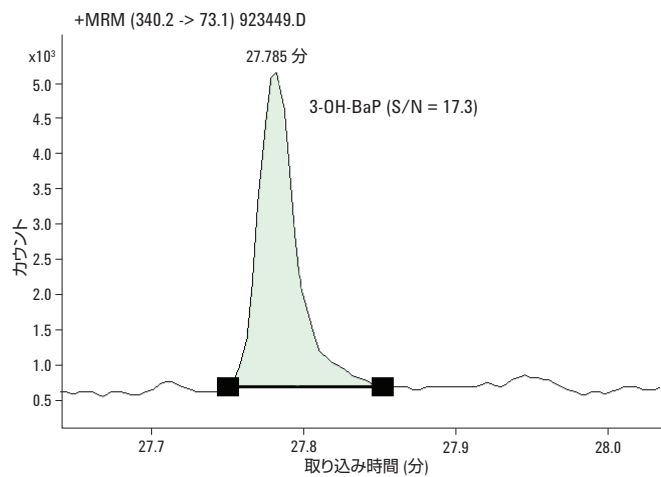


図 4. 10 ppt で S/N 比 17.3 を示す 3-OH-BaP の感度

定量

ヒドロキシ PAHs の検量線は、ベンゼンなどの溶媒よりも尿抽出物を用いて調製した場合の方が正確な結果が得られました。これは、おそらくベンゼンでのような溶媒を用いた場合ヒドロキシ PAHs がガラスバイアルに吸着したり、GC 流路内の活性部位と相互作用を起こすためと考えられます。キャリブレーション用標準溶液を含むすべてのサンプルは、酵素 β -グルクロニダーゼで処理しました。尿中のヒドロキシ PAHs の 90 % 以上が結合していることが報告されています [6]。しかし、 β -グルクロニダーゼを使用して処理した尿と処理していない尿で測定した検量線は、本質的には同一でした (図 5)。最大限の定量精度を得るために、各対象化合物に適した内部標準を使用することが重要です。例えば、重水素化したの内部標準 (1 および 2-ナフトール- d_7) を ^{13}C 型 (1- および 2-ナフトール- $^{13}C_6$) に変える方がネーティブの 1-および 2-ナフトールをより正確に定量することができます (表 1)。

尿サンプル内での対象化合物の安定性

予備実験の結果、 $-20^{\circ}C$ 以下で保管したときにすべてのヒドロキシ-PAH が 6 週間以上安定性を維持することが分かりました。室温では、遊離ヒドロキシ-PAHs は結合型よりも安定性が低く (図 6)、一部のヒドロキシ PAHs は、結合型でも室温では 3~6 週間で劣化します (図 7)。したがって、すべての尿サンプルを $-20^{\circ}C$ 以下で保管しました。

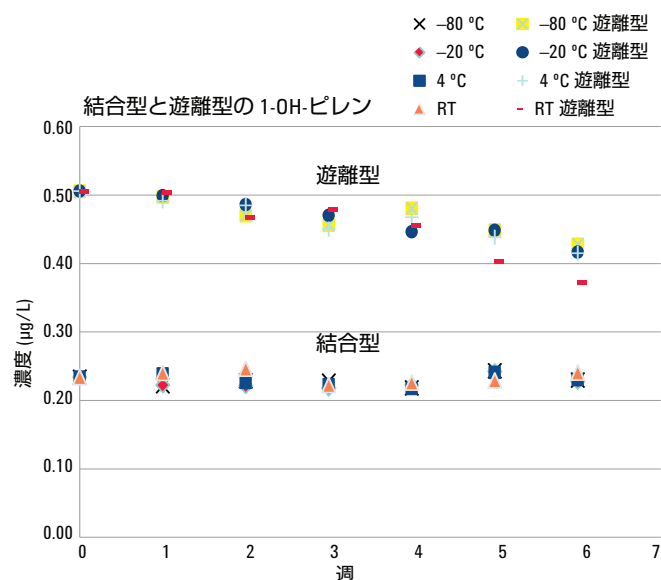


図 6. 遊離型のヒドロキシ-PAH は結合型よりも安定性が低い

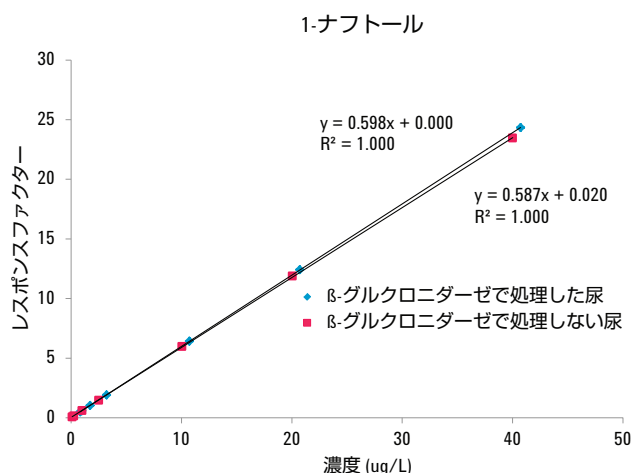


図 5. β -グルクロニダーゼの有無にかかわらずほぼ同一になる 1-ナフトールの代表的な検量線

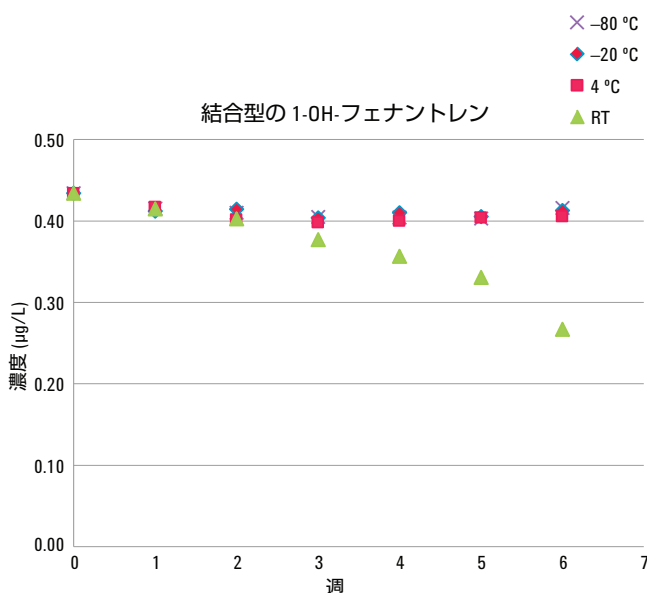


図 7. さまざまな保管温度における結合型ヒドロキシ-PAH の時間の関数としての安定性

メソッドの性能

このメソッドは、19 種類のヒドロキシ-PAHs で優れた感度と回収率に加えて、優れた日内および日間精度を示しました (表 3)。LOD は 0.7 ppt (0.0007 µg/L)、LOQ は 2-ナフトールを除き 2.5 ppt と低く、11 ppt を超えたものは 2 化合物のみでした。定量性については、ほぼ 5 桁の範囲まで直線性を示しました。1 化合物を

除くすべての PAHs の回収率が 94～104 % の範囲内に収まっています。日内精度の相対標準偏差 (RSD) は 6.5 % を超えることはなく、一部のヒドロキシ PAHs では 0.8～0.9 % という低い値が得られました。日間精度においても 10 % を超えることはなく、いくつかの対象化合物では 3～5 % の低い値となりました。

表 3. メソッドの性能

対象化合物	検出下限 (µg/L)	定量下限 (µg/L)	直線性 (µg/L)	回収率 (%)	精度		
					濃度 (µg/L)	日内 (%RSD*)	日間 (%RSD*)
1-OH-ベンズ[a]アントラセン	0.0023	0.0076	LOQ～10	97	0.022	2.7	9.4
3-OH-ベンズ[a]アントラセン	0.0018	0.0061	LOQ～10	98	0.020	3.2	7.2
3-OH-ベンゾ[a]ピレン	0.0014	0.0048	LOQ～10	102	0.020	4.1	8.8
2-OH-クリセン	0.0028	0.0095	LOQ～10	103	0.030	4.1	8.8
3-OH-クリセン	0.0025	0.0082	LOQ～10	102	0.022	4.3	7.0
4-OH-クリセン	0.0033	0.0110	LOQ～10	98	0.020	5.3	9.1
6-OH-クリセン	0.0027	0.0091	LOQ～10	94	0.024	5.3	6.6
3-OH-フルオランテン	0.0020	0.0067	LOQ～10	104	0.039	6.3	9.9
2-OH-フルオレン	0.0019	0.0062	LOQ～10	97	0.120	0.8	4.0
3-OH-フルオレン	0.0007	0.0024	LOQ～10	96	0.044	0.9	5.2
9-OH-フルオレン	0.0027	0.0089	LOQ～10	98	0.120	0.8	9.7
1-OH-フェナントレン	0.0020	0.0680	LOQ～10	101	0.100	1.7	2.7
2-OH-フェナントレン	0.0016	0.0052	LOQ～10	99	0.062	2.1	5.3
3-OH-フェナントレン	0.0016	0.0054	LOQ～10	98	0.057	1.5	3.8
4-OH-フェナントレン	0.0007	0.0025	LOQ～10	98	0.015	2.7	5.2
9-OH-フェナントレン	0.0030	0.0100	LOQ～10	114	0.030	5.3	9.0
1-OH-ピレン	0.0014	0.0048	LOQ～10	98	0.044	1.8	6.5
1-ナフトール	0.0260	0.0860	LOQ～10	98	1.800	2.4	7.4
2-ナフトール	0.0400	0.1300	LOQ～10	100	1.900	0.9	6.5

*%RSD – 相対標準偏差 (%)

結論

ヒト尿中の PAHs 代謝物を高い信頼性でモニタリングするための高感度、高信頼性の GC/MS/MS メソッドを 7000 シリーズトリプル四重極 GC/MS システムで開発しました。最大の分離能を提供し、マトリックス効果からの影響を受けず、5 桁のダイナミックレンジ、高い回収率、および ppt レベルの感度を提供するように、メソッドパラメータを最適化しました。このメソッドは、現在 CHMS で使用されています。

参考文献

1. The Superfund Research Center, Oregon State University, (http://oregonstate.edu/superfund/about_PAHs) accessed June 26 2012.
2. M. Bouchard, L. Pinsonneault, C. Tremblay, J.P. Weber, "Biological monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in subjects living in the vicinity of a creosote impregnation plant." *Int Arch Occup Environ Health* 74, 505-513 (2001).
3. C. Anyakora, F. Babalogbon, U. Obiakor, I. Afolami, H. Coker, "Phase 1 metabolites of polynuclear aromatic hydrocarbons in blood samples of exposed subjects." *Sci Res and Essay* 3, 254-258 (2008).
4. F.J. Jongeneelen, "Biological monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons; 1-hydroxypyrene in urine of people." *Toxicol. Lett.* 72, 205-211 (1994).
5. B.A. Hatjian, J.E. Edwards, J. Harrison, F.M. Williams, P.G. Blain, "Ambient, biological, and biological effect monitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)." *Toxicol. Lett.* 77, 271-279 (1995).
6. A. Ramesh, S.A. Walker, D.B. Hood, M.D. Guillen, K. Schneider, E.H. Weyand, "Bioavailability and Risk Assessment of Orally Ingested Polycyclic Aromatic Hydrocarbons" *Int. J. Toxicol.* 23, 301-333 (2004).
7. L.C. Romanoff, Z. Li, K.J. Young, N.C. Blakely III, D.G. Patterson, C. D. Sandau, "Automated Solid-Phase Extraction Method for Measuring Urinary Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolites in Human Biomonitoring using Isotope-Dilution Gas Chromatography High-Resolution Mass Spectrometry" *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 835, 47-54 (2006).

詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web サイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc., 2012

Printed in Japan

August 30, 2012

5991-0991JAJP



Agilent Technologies