

<論文>

下水試料中のエストロゲン遊離体の高分解能GC/MSによる測定法

Determination of Free Estrogens in Wastewater by GC/HRMS

○大岩俊雄¹・末岡峯数²・田辺薫²・小森行也³・鈴木穰³・田中宏明⁴

- 1 帝人エコ・サイエンス(株) 技術開発部 (〒108-0073 東京都港区三田三丁目3-8)
- 2 帝人エコ・サイエンス(株) 羽村技術所 (〒205-0023 東京都羽村市神明台4-8-43)
- 3 独立行政法人土木研究所水循環研究グループ (〒305-8516 茨城県つくば市南原1番地6)
- 4 京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター (〒520-0811 滋賀県大津市由美浜1-2)

T. Ohiwa, M. Sueoka, K. Tanabe (TES), K. Komori, S. Suzuki (PWRI) and H. Tanaka (Kyoto-Univ.)

An improved analytical method of four free estrogens, [estrone (E1), 17 β -estradiol (E2), estriol (E3) and ethynylestradiol (EE2)] was proposed to lower their detection limits in water samples. After silyl-derivatization, their quantification was conducted by a high-resolution gas chromatography/double-focusing mass spectrometry (GC/HR/MS) method. Among four commercially available silylation agents, N,O-bis(trimethylsilyl)acetamide (BSA) was selected for trimethylsilyl (TMS) derivatization, because of the highly efficient silylation for all the selected estrogens and the simple sample condensation protocol after the silylation. 3-TMS-E1, 3, 17-TMS-E2, 3,16,17-TMS-E3, 3,17-TMS-EE2 were selected as monitoring ions for E1, E2, E3 and EE2, respectively. The instrument detection limits (IDL) ranged from 0.2 to 0.5 pg for the estrogens, which resulted in one order of magnitude more sensitive than those of the conventional liquid chromatography/tandem mass-spectrometry (LC/MS/MS) method. The detection limits for water sample were 0.04 ng·L⁻¹, 0.02 ng·L⁻¹, 0.05 ng·L⁻¹, 0.04 ng·L⁻¹ for E1, E2, E3 and EE2, respectively. The method using GC/HR/MS was confirmed to be more sensitive than the conventional LC/MS/MS for wastewater samples, because the former method could quantify E2 and E3 in the secondary effluent, which could not be detected by the latter method. However, EE2 in wastewater samples was below detection limit (0.04 ng·L⁻¹) even if the GC/HR/MS method was applied.

Keywords : GC/MS, free-estrogen, derivatization, ethynylestradiol, wastewater

1. はじめに

人畜由来のエストロゲンである17 β -エストラジオール (E2) は、最もエストロゲン活性の高い合成化学物質と比較しても、重量当たりのエストロゲン活性が1,000倍以上も高く^{1),2)}、内分泌攪乱化学物質同様に注目されている物質である。E2は、成人女性では一日あたり数十から数百 μ g 分泌される³⁾といわれており、肝臓等でエストロン (E1)、エストリオール (E3) 等の代謝産物を生じ、更にこれらは水溶性の高い硫酸抱合体、グルクロン酸抱合体として排泄される²⁾。また、これらの天然由来のエストロゲン以外に経口避妊薬の主成分であるエチニルエストラジオール (EE2) もエストロゲン様活性を有している²⁾。

下水流入水、下水処理水および環境水におけるエストロゲン活性に占める人畜由来のエストロゲンの比率は、合成化学物質と比較して高いことが報告²⁾されていることから、下水処理場における実態把握、あるいは環境への影響評価においてこれらエストロゲンの測定は重要であり、下水試料を対象としたこれらのエストロゲンの測定法について、液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計 (LC/MS/MS) を用いた測定法で試料の前処理精製方法を含めた検討を行い報告してきた⁴⁾⁶⁾。LC/MS/MSによる測定法では、エストロゲン類の検出下限値は、約0.5 ng·L⁻¹あった。医薬品として使用されている経口避妊薬であるEE2は、現在、我が国では下水及び環境水中における実態調査ではそのレベルでの検出報告例がほとんどないが、英国の報告によると0.1 ng·L⁻¹程度で環境管理が検討されておりEE2の汚染実態の把握のためには、より高感度の検出方法の開発が期待されている。

また、エストロゲン遊離体であるE2の測定法として、環境庁の暫定マニュアル⁷⁾では、酵素免疫法とGC/MS法(四重極型)しか規定されていないことから、LC/MS/MSによるE2以外のエストロゲン遊離体も含めて、その測定結果の信頼性を確認する上でも高感度の二重収束型質量分析計を用いたGC測定法(GC/HR/MS)で検証する必要がある。なお、酵素免疫法は、使用する抗体がエストロゲン以外の物質にも交差反応することから、真の値より高めの誤差を生じる問題

点を有することが報告⁹⁾されている。

本研究で対象としたエストロゲン⁹⁾は Fig. 1 に示した遊離体の 3 種類 (E1、E2、E3) のほかに医薬品として使用され下水処理場の流入水や処理水に含まれる可能性のある EE2 を取り上げた。特に EE2 が流入水及び処理水中に存在するかどうかを確認するために、これまで LC/MS/MS で対象としていた検出下限値 (約 0.5 ng・L⁻¹) を下げることを目標とするとともに、下水処理場での流入下水と処理水の同一試料を LC/MS/MS と GC/HR/MS で測定し測定結果の比較を行った。

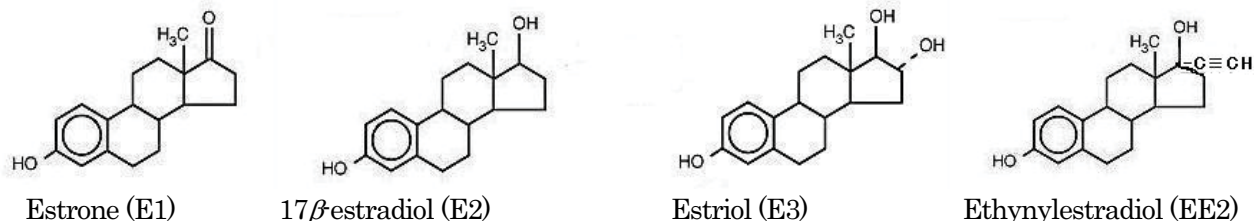


Fig. 1 エストロゲン遊離体の構造式

2. 分析方法

2.1 試薬等

標準試薬として、E1、E2、E3、EE2 は、SIGMA 製の試薬 (純度 98%以上) を、また、同一物質の重水素置換体であるサロゲートとして、エストロン-d 体 (E1-d2)、17β-エストラジオール-d 体 (E2-d3)、エストリオール-d 体 (E3-d2)、17α-エチニルエストラジオール-d 体 (EE2-d4) は、CDN Isotope 製を用い、いずれもメタノールに溶解して使用した。誘導体化試薬、溶媒等は和光純薬製の試薬特級以上のもの、または用途に応じてクロマトグラフ用を使用した。固相抽出には、Oasis HLB plus (Waters 製) を用いた。フロリジルカラムは、Sep-pak plus Florisil (Waters 製)、NH₂カラムは、Sep-pak plus NH₂ (Waters 製) を用いた。ガラス繊維ろ紙は孔径 1 μm の GF/B (Whatman 製) をアセトン洗浄後使用した。

2.2 試料の前処理方法

下水試料を対象とした試料の前処理精製方法は既報の方法^{4),9)}に準じ、精製工程における損失の低減も考慮し、固相抽出した試料は順相系カラム及びイオン交換型カラムを用いて夾雑成分の分離精製を行った。また、測定精度を高める目的で、各測定成分ごとに同一物質の重水素置換体をサロゲートとして添加した。

前処理操作のフローを Fig. 2 に示す。試料 1,000 mL をガラス繊維ろ紙 (孔径 1 μm) でろ過し、ろ紙に残った浮遊物質 (SS) は、メタノール約 10 mL で超音波を用いて 2 回抽出し、抽出液はろ液に合わせた。ろ液に各サロゲート物質 (E1、E2、EE2 及び E3 の各 d 体) をそれぞれ 20 ng 添加した後、予めメタノールと精製水でコンディショニングした Oasis HLB カートリッジに通水 (15 mL・min⁻¹) した。精製水で洗浄した後、カートリッジは遠心分離と窒素ガスパージにより脱水乾燥を行った。次に酢酸エチル/メタノール (1/1) 約 6 mL でエストロゲンを溶出させ、溶出液は窒素ガス吹き付けにより濃縮乾固した。次にヘキサン/ジクロロメタン (1/1) 1 mL に溶解し、フロリジルカートリッジに通して精製した。カートリッジは、ヘキサン/ジクロロメタン (1/1) 10 mL を通して不純物を溶出した後、アセトン約 6 mL を通して、吸着しているエストロゲンを溶出した。溶出液は窒素ガス吹き付けにより濃縮乾固した。メタノール 1 mL に再溶解し、NH₂ カートリッジに通してイオン性の塩類を吸着分離した。更に、メタノール約 5 mL でエストロゲンを溶出して窒素ガス吹き付けにより乾固した。

LC/MS/MS 測定では、アセトニトリル/水 (6/4) 1 mL に溶解し測定試料とした。一方、GC/HR/MS 測定には、更に誘導体化を行い濃縮乾固後、ウンデカン 100 μL に溶解し測定試料とした。誘導体化条件は、溶媒 Dimethylformamide (DMFA) 100 μL、TMS 化剤、N,O-bis(trimethylsilyl)acetamide (BSA) を 200 μL 加えて超音波処理により約 5 分間溶解後、密栓して約 80°C で 60 分間誘導体化した。

なお、これまでエストロゲン遊離体の測定で固相抽出には一般にシリカ担体に C18 をコーティングした逆相系のカートリッジが用いられていたが、エストロゲン遊離体のうち E1、E2 及び EE2 のみを測定対象とする場合には適用するこ

とができた。ただし E2 が代謝されたエストロゲンである E3 も水質試料における挙動を把握するために測定対象に加える場合、C18 カートリッジでは E3 の回収率が 40~80% と不安定でかつ劣り、ポリマー共重合系カートリッジの方が優れていることを確認した。そこで性能及び回収率が安定している点からジビニルベンゼン/ビニルピロリドン共重合系の Oasis HLB を選択した。

2.3 GC/HR/MS および LC/MS/MS におけるエストロゲン遊離体の測定条件

装置及び測定条件を Table 1 に示す。LC/MS/MS 測定では Elecrospray Ionization (ESI) 法負イオンモードで、Table 1 に示す Selected Reaction Monitoring (SRM) イオンを用いて定量した。GC/HR/MS 測定では、E1 は 3-TMS-E1、E2 は 3,17-TMS-E2、E3 は 3,16,17-TMS-E3、EE2 は 3,17-TMS-EE2 のイオン (SIM) をモニターすることにより定量した。

Table 1 GC/HR/MS 及び LC/MS/MS によるエストロゲン遊離体の測定条件

	GC/HR/MS	LC/MS/MS
装置	HP 6890 Series	Agilent 1100 Series
カラム	HP-5MS 0.25 mm×30 m	Zorbax Extend C18 2.1×150 mm
温度	150-300°C (20 min) , 20°C/min	40°C
注入量	1 µL	10 µL
移動相	ヘリウムガス	10 mM-NH ₃ 水/アセトニトリル(4/6)
流速	1 mL・min ⁻¹	0.14 mL・min ⁻¹
MS設備	JEOL JMS-700D	Thermo Quest TSQ API-2
イオン化	EI-Positive SIM R = 1000	ESI-Negative MS/MS (SRM)
対象成分	m/z	m/z (衝突エネルギー)
E1	342.21	269 > 145 (45V)
E2	416.26	271 > 145 (45V)
E3	504.30	287 > 171 (45V)
EE2	425.24	295 > 145 (45V)
E1-d2	344.22	271 > 147 (45V)
E2-d3	419.28	274 > 145 (45V)
E3-d2	506.31	289 > 173 (45V)
EE2-d4	429.26	299 > 147 (45V)

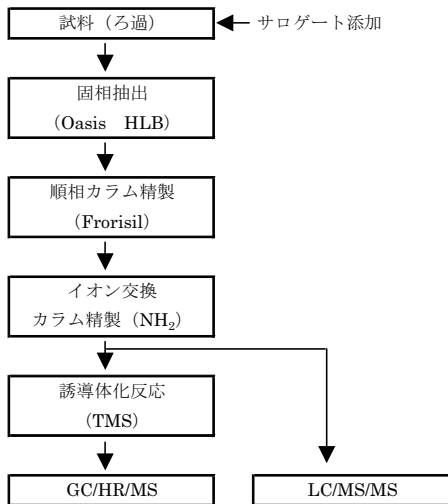


Fig. 2 下水試料の前処理操作フロー

3. 分析方法の検討

3.1 GC/HR/MS 測定のための誘導体化条件の検討 (誘導体化試薬の選択及び誘導体化の反応条件)

(1) 実験方法

GC/HR/MS における測定のためには、エストロゲン遊離体を誘導体化することが必要であり、誘導体化としてシリル化反応について検討した。Fig. 3 に示すようにシリル化反応として汎用されるトリメチルシリル化 (TMS) と環境庁の暫定マニュアル¹⁾の方法であるターシャリーブチルジメチルシリル化 (TBDMS) について比較した。



Fig. 3 シリル化反応

シリル化反応試薬としては Table 2 に示す市販の下記 4 種類について、また、溶媒としては TMS 化には無溶媒とジメチルホルムアミド (DMFA) を用い比較した。また、TBDMS 化には、さらにジエチルアミン 5%DMFA 溶媒 (5%DEA/DMFA) を用いて比較した。エストロゲン標準物質を用いた誘導体化検討のフローを Fig. 4 に示す。誘導体化反応後、濃縮乾固してジエチルエーテルで抽出 (2 回) し、さらに濃縮乾固させてウンデカン 100 μL に溶解し分析試料とした。

Table 2 シリル化反応試薬一覧表

TMS 化剤	N,O-bis(trimethylsilyl)acetamide (BSA)
	N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA)
	1%Trimethylchlorosilane+BSTFA (1%TMCS/BSTFA)
TBDMS 化剤	N-methyl-N-ter(buthyldimethylsilyl)trifluoroacetamide (MTBSTFA)

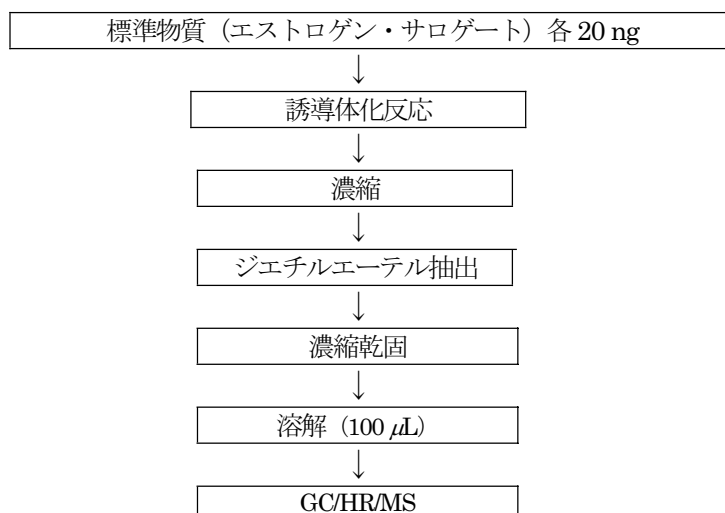


Fig. 4 標準物質を用いた誘導体化検討フロー

(2) 結果および考察

Fig. 5 は、E2 について TMS 化反応 (80°C、60 分間) したときの生成イオン強度を比較したものである。なお、Fig. 5 から Fig. 8 における縦棒とエラーバーは、それぞれ平均値 ($n = 5$) と最大最小値を表している。TMS 化試薬としては BSA、BSTFA および 1%TMCS/BSTFA について各 100 μL を用い、溶媒として DMFA を 100 μL 添加した場合と無添加の場合について測定し、一番イオン強度の高かった DMFA 溶媒下 BSA 試薬の結果を基準にして比較した。BSA 試薬については無溶媒の場合もほぼ同じイオン強度が得られた。一方 BSTFA 試薬については同じ条件下での誘導体化反応では BSA 試薬に比較してイオン強度は低かった。ただし反応促進剤として TMCS を 1%添加した試薬 (1%TMCS/BSTFA) では BSA と同じ程度のイオン強度が得られた。

このことから E2 の誘導体化に BSTFA を用いた場合、BSA の場合よりさらに反応温度を高くする必要があると推定される。本検討では E2 に対して BSA のほうが反応が比較的容易に進行することが分かった。

Fig. 6 は E2 について TBDMS 化反応 (40°C、80°C、各 60 分間) したときの生成イオン強度を比較したものである。TBDMS 化試薬としては MTBSTFA を 100 μL 、溶媒は無溶媒と DMFA を 100 μL および 200 μL 、また 5%ジエチルアミン添加 DMFA (5%DEA/DMFA) 100 μL について、反応温度を変えて測定した。一番イオン強度の高かった DMFA 200 μL 、反応温度 40°C の結果を基準に比較して示す。MTBSTFA による誘導体化反応では無溶媒では反応が不十分であった。溶媒を用いた検討条件下では、ばらつきの範囲で比較的反応は容易に進行することが分かった。

E2 についての、TMS 化物と TBDMS 化物の GC/MS による SIM イオンの種類と相対強度の関係を Table 3 に示す。TMS 化物及び TBDMS 化物も誘導体化物の分子イオン ($[\text{M}]^+$) の強度はほぼ同程度であったが、TBDMS 化物については誘導体化分子よりメチル基が 1 個取れたイオン ($[\text{M}-\text{CH}_3]^+$) の強度は約 3 倍高い値であった。ただし、TBDMS 化反

応は、EE2、E3については、17位の立体障害による反応阻害も懸念されるため、Fig. 5の結果から誘導体化の反応が温度や溶媒の影響が少なく、かつ反応後の濃縮操作も比較的容易なことからBSAをTMS化の誘導体化試薬に選択した。

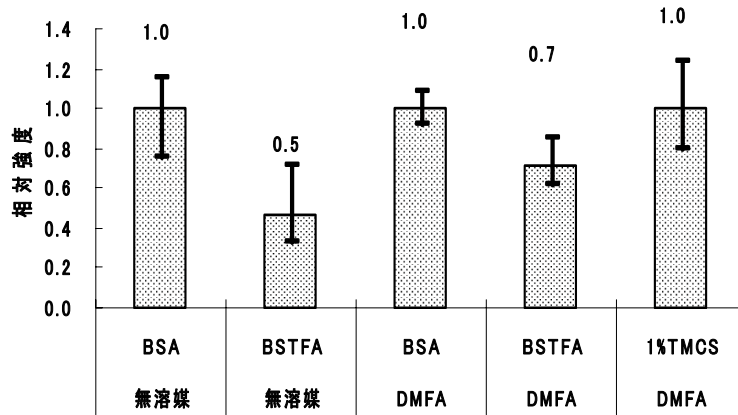


Fig. 5 E2のTMS化条件と誘導体化物のSIM強度比

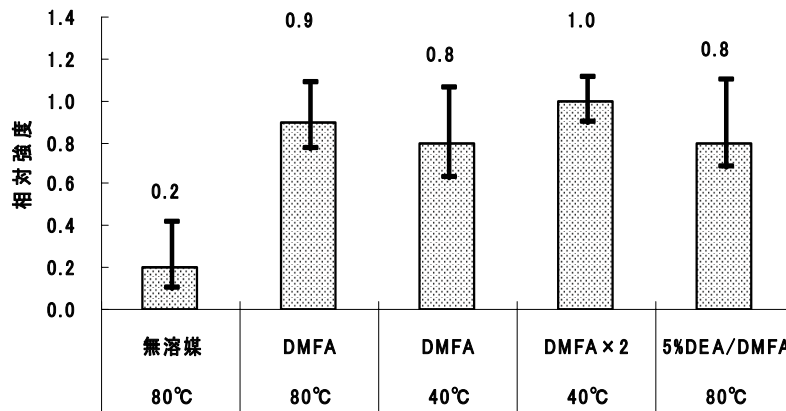


Fig. 6 E2のTBDMS化条件と誘導体化物のSIM強度比

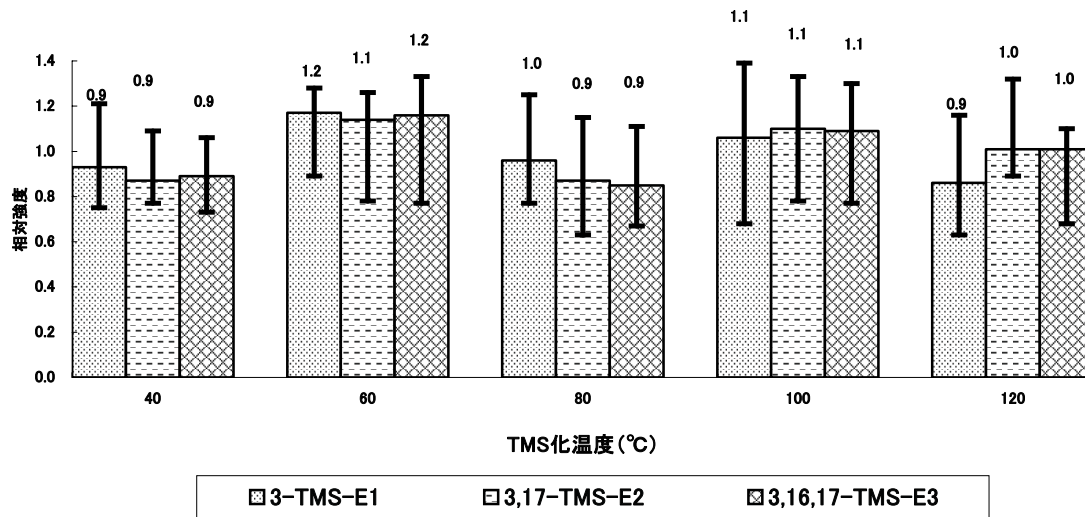
Table 3 E2のTMS化物およびTBDMS化物のSIM強度比

SIMイオン種類	TMS化物		TBDMS化物	
	[M] ⁺	[M-CH ₃] ⁺	[M] ⁺	[M-CH ₃] ⁺
SIMイオン強度比	1.0 (基準)	0.1	1.0	2.8

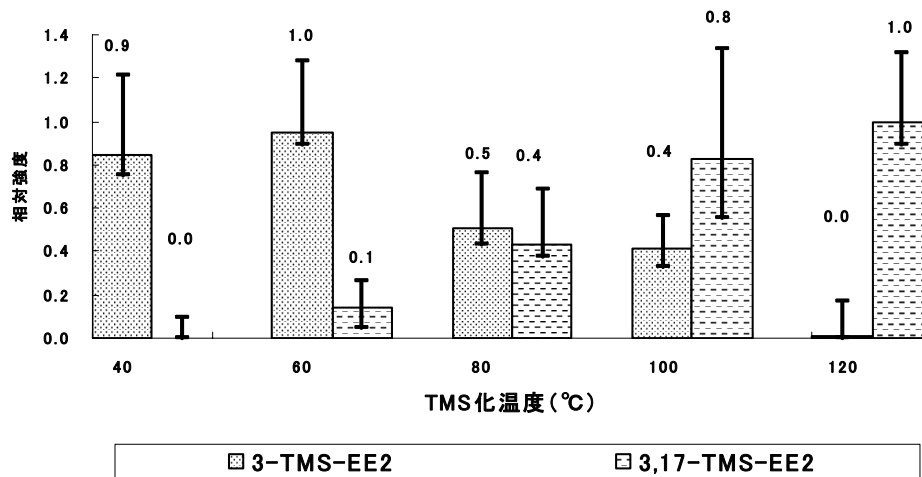
Fig. 7(a)はE1、E2、E3について、Fig. 7(b)はEE2についてBSAによるTMS化反応を温度40~120°Cの範囲で比較した結果を示す。(a)は反応温度100°Cの平均値(n=5)を基準にしたときの相対的な値を示す。一方、(b)は3-TMS-EE2、3,17-TMS-EE2について、それぞれ最大強度(60および120°C)を基準として示す。

E1、E2、E3についてはいずれも反応温度60°C以上では特に生成イオン強度に顕著な差は認められなかった。ただし、EE2については、60°C以下では3位のみ誘導体化された3-TMS-EE2の生成量が多く、反応温度の上昇とともに、3,17-TMS-EE2の生成量が多くなることが分かった。これは、40から60°CではEE2の17位の水酸基は近接するエチニ

ル基による立体障害で反応が妨害されていることが推定される。したがって、EE2 については、反応温度が 80°C 未満では 3-TMS-EE2 イオンを反応温度が 80°C 以上では 3,17-TMS-EE2 イオンを選択する必要があることが分かった。



(a) E1, E2, E3 の例



(b) EE2 の例

Fig. 7 エストロゲン類の TMS 化温度の影響

Fig. 8 は E1, E2, E3 の TMS 化反応で溶媒 (DMFA) 100 μ L に対する TMS 化剤 (BSA) の比率について反応温度 80°C, 60 分間の条件で比較した結果を示す。いずれも DMFA 溶媒に対し、検討した条件 (溶媒量、反応温度、反応時間) では約 2 倍量以上が必要であることが分かった。

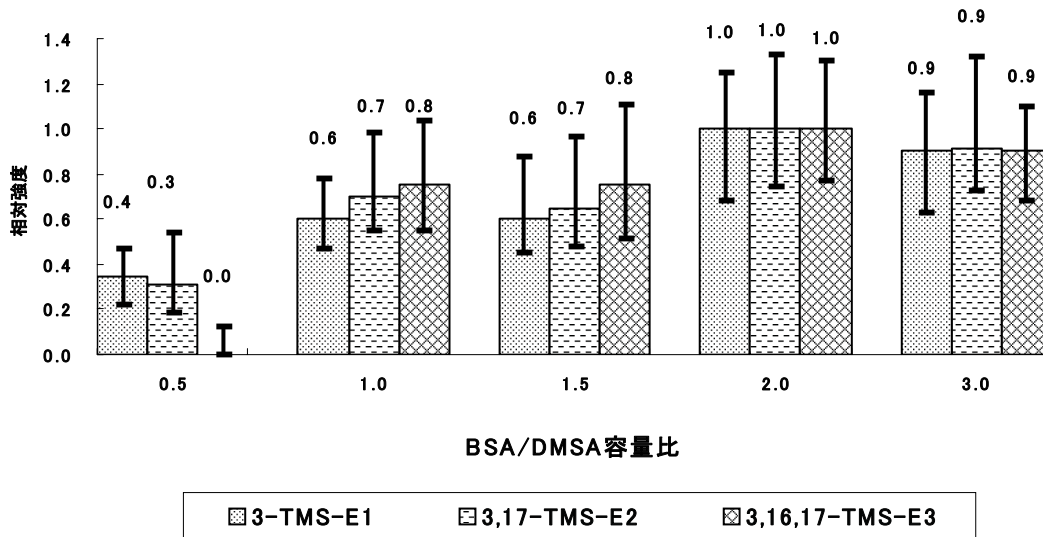


Fig. 8 TMS 化剤 (BSA) 濃度の影響

3.2 誘導体化物の SIM イオンの選択

(1) 実験方法

エストロゲン遊離体の4種について、BSAを用いたTMS誘導体化反応(80°C、60分間)を行った後、各遊離体別にその分子内の水酸基の数ごとの誘導体化物のイオン強度を比較した。

(2) 結果および考察

E1、E2、E3については、分子内の全ての水酸基がTMS化されたイオンが主で、一部の水酸基しか誘導体化されなかったイオンはほとんど検出されなかった。一方、EE2については、反応条件、特に反応温度によっては3位の水酸基しか誘導体化されなかったものと3,17位の水酸基がいずれも誘導体化されたイオンの2種類が検出された(Fig. 7(b)参照)。

Table 4はエストロゲン遊離体4種類のTMS誘導体化物についてその分子イオン([M]⁺)と誘導体化分子からメチル基が1個とれたイオン([M-CH₃]⁺)についてそれぞれのイオン強度を比較したものである。ESI法によるイオン化では一般に分子イオンの生成が主であるが、シリル化誘導体化化合物の場合、その分子構造によって誘導体化分子からアルキル基がとれたイオンの生成が主になる場合がある。したがって各エストロゲンの誘導体化物について、[M]⁺と[M-CH₃]⁺イオン強度について比較した。その結果、定量用のSIMイオンとして相対強度の高いイオンを選択した。すなわち、EE2の3,17-TMS-EE2については、メチル基の1個とれたイオン([M-CH₃]⁺)を、その他の遊離体については誘導体化物の分子イオン([M]⁺)を定量のSIMイオンとして選択した。

Table 4 エストロゲン誘導体化(TMS化)物のGC/MSによるイオン強度

TMS 化物	[M-CH ₃] ⁺ / [M] ⁺
3-TMS-E1	0.1
3,17-TMS-E2	0.1
3-TMS-EE2	0.1
3,17-TMS-EE2	2.0
3,16,17-TMS-E3	0.1

4. GC/HR/MS 法の定量性と回収率の検討

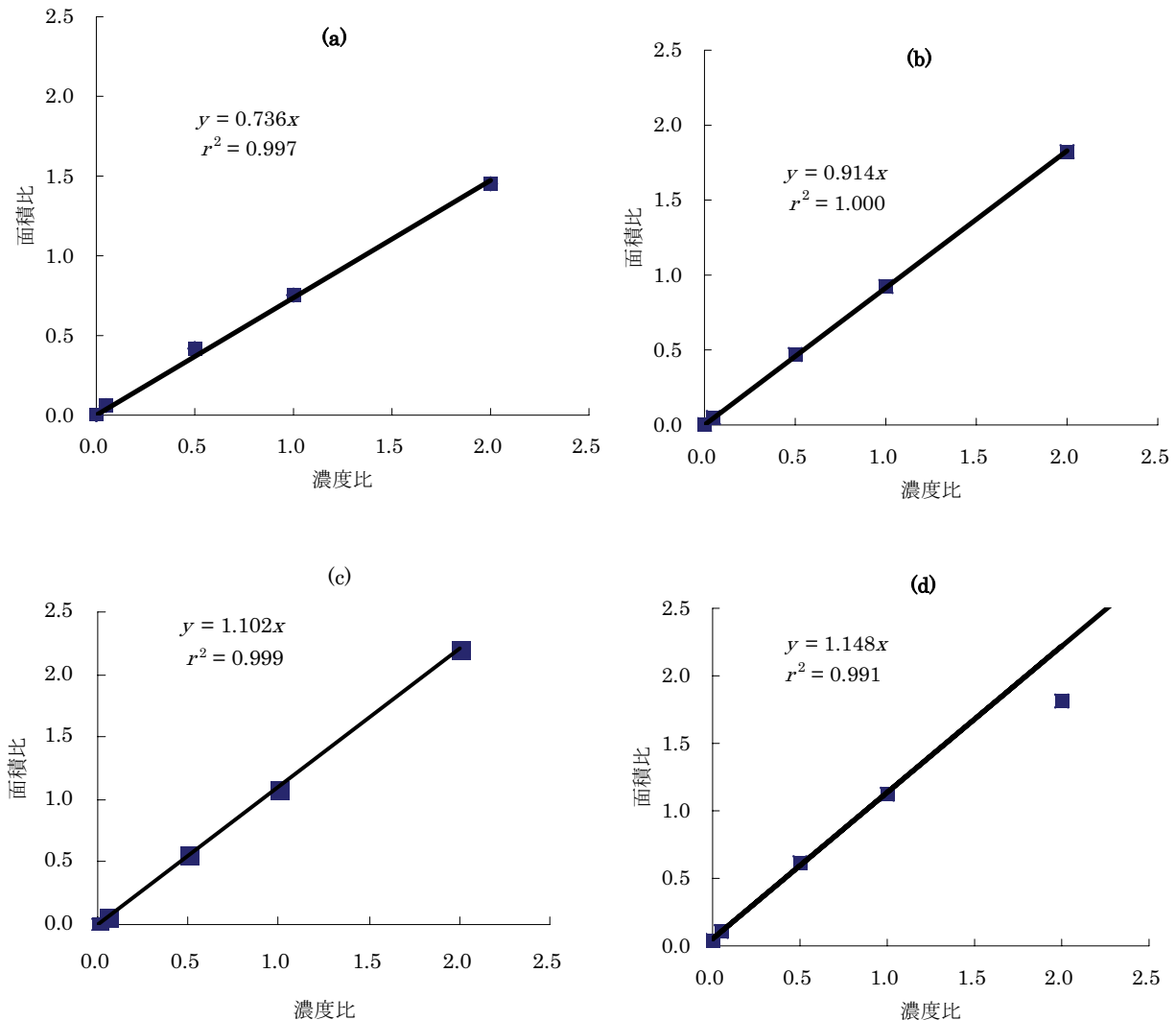
4.1 標準液による定量性の検討

(1) 実験方法

エストロゲン遊離体 4 種類について各 0~40 ng を 5 段階にとり、それぞれに各遊離体に対応するサロゲートを各 20 ng 添加した標準液を調製した。いったん乾固した後、BSA で誘導体化 (80°C、60 分間) し、濃縮した後、ウンデカンで最終液量 100 μL にした試料について前述の GC/HR/MS 条件で測定した。

(2) 結果および考察

各成分の SIM 面積と対応するサロゲート成分の SIM 面積の比と濃度比の関係から検量線を作成した。その検量線の一例を Fig. 9 に示す。E3 を除いて一次回帰した直線の決定係数 (r^2) は、0.99 以上であり良好な直線性が認められた。しかし、E3 については高濃度において検量線の傾きが減少する傾向が認められた。これは反応する水酸基が E3 では 3 個存在するため、高濃度域になると反応率が減少するためと考えられる。なお、E3 の検量線の濃度比 2.0 については、直線から外れたのでこの点を除いて回帰式を求めた。



(a): E1 検量線 (b): E2 検量線 (c): EE2 検量線 (d): E3 検量線

Fig. 9 GC/HR/MS 法によるエストロゲン遊離体 (4 種類) の検量線

4.2 標準液による繰り返し測定再現性と検出下限値

(1) 実験方法

GC/HRMS 測定には、検量線作成用に誘導体化調製したエストロゲン遊離体4種の各 $1 \text{ ng} \cdot (0.1 \text{ mL})^{-1}$ 溶液を用いて6回繰り返し測定した(装置注入量: $1 \mu\text{L} = 10 \text{ pg}$)。一方、LC/MS/MS 測定には、エストロゲン遊離体4種の各 $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液を用いて装置注入量が同じ 10 pg (装置注入量: $10 \mu\text{L}$) で6回繰り返し測定した。

(2) 結果および考察

結果を Table 5 に示す。GC/HRMS での繰り返し測定再現性の変動係数 (C.V.) は $0.5 \sim 1.7\%$ と LC/MS/MS 法の $6.0 \sim 10.4\%$ よりも良好な再現性が得られた。また、繰り返し測定再現性の結果から求めた標準偏差 (s) の3倍を検出下限値と定義すると、GC/HRMS 法では、エストロゲン遊離体の装置検出下限値はそれぞれ $0.2 \sim 0.5 \text{ pg}$ となり、LC/MS/MS 法と比較してほぼ一桁高い感度が得られた。LC/MS/MS 法による装置検出下限値については、石井等¹⁰⁾は E1、E2、EE2 について測定し、ピークの S/N 比から算出した値 (S/N = 3, $5 \mu\text{L}$ 注入) から、それぞれ $0.5, 1.3, 2.5 \text{ pg}$ と報告しており、検出下限値の算出方法は異なるがほぼ同じ程度である。

Table 5 GC/HRMS 法と LC/MS/MS 法による標準液の繰り返し測定再現性の比較

測定対象	GC/HRMS 測定 (n=6)			LC/MS/MS 測定 (n=6)		
	平均濃度 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	C.V. %	IDL pg	平均濃度 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	C.V. %	IDL pg
E1	10.4	1.2	0.4	1.1	6.0	2
E2	10.0	0.5	0.2	1.1	6.9	2
EE2	10.6	1.4	0.4	1.0	10.4	3
E3	10.6	1.7	0.5	1.2	10.4	4

注入量 10 pg GC/HRMS 法 注入量 $1 \mu\text{L}/10\text{ppb}$ [$1 \text{ ng} \cdot (0.1 \text{ mL})^{-1}$]標準液

LC/MS/MS 法 注入量 $10 \mu\text{L}/1\text{ppb}$ [$1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$]標準液

IDL: instrument detection limit、装置検出下限(注入量の $3s$ 値)

GC/HRMS 法と LC/MS/MS 法について比較した結果を、試料の前処理における濃縮倍率と装置注入量から換算した試料中の検出下限値を Table 6 に示す。試料中の検出下限(濃度)は GC/HRMS 法では、 $0.02 \sim 0.05 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ となり、LC/MS/MS 法による $0.2 \sim 0.4 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ と比較してほぼ一桁高い感度になった。

Table 6 濃縮前の試料中での検出下限値の比較 単位: $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$

測定対象	GC/HRMS 法	LC/MS/MS 法
E1	0.04	0.2
E2	0.02	0.2
EE2	0.04	0.3
E3	0.05	0.4

4.3 下水試料を用いた回収率の検討

(1) 実験方法

エストロゲン遊離体4種について純水および実試料(下水流入水と下水処理水)への添加回収実験を行った。純水、処理水、流入水それぞれ 500 mL にエストロゲン遊離体を各 20 ng 添加し、前述の試料前処理方法および測定条件に従い測定し、各成分の回収率を求めた。なお、下水試料は主に住宅地からの下水を対象とした標準活汚泥法を採用している下水処理場から採水した。

(2) 結果および考察

回収率の結果を Table 7 に示す。添加回収率は標準添加試料の測定値から無添加の測定値を差し引いて算出した。夾雑成分の多い下水試料を測定対象としているため、測定対象成分ごとにサロゲート物質を用い、これを内部標準物質としてマトリックスの影響を補正しているため、添加回収率は $94 \sim 110\%$ で、純水、処理水、流入水ともに良好であった。なお、E1のサロゲートに用いた E1-d2 中に重水素置換体でない E1 が試薬中に含まれており純水の無添加試料中に E1 が 0.1 ng

の値が検出された。

Table 7 添加回収試験結果

測定対象	純水			処理水			流入水		
	無添加 ng	添加 ng	回収率 %	無添加 ng	添加 ng	回収率 %	無添加 ng	添加 ng	回収率 %
E1	0.1 *	20.1	100	1.0	21.5	103	4.0	26.0	110
E2	0.0	21.1	106	0.2	20.2	100	1.2	22.0	104
EE2	0.0	18.9	95	0.0	18.9	95	0.0	18.7	94
E3	0.0	20.0	100	0.9	20.3	97	24.3	44.4	101

試料 純水、処理水、流入水 (各 0.5 L)、添加量 各 20 ng、内部標準 (サロゲート) 各 20 ng

*: 添加したサロゲートに含まれる不純物による。

5. 下水試料への適用及び LC/MS/MS 法との比較

(1) 実験方法

試料は、4.3 の実験と同じ下水処理場の流入水及び処理水を同時に前処理し、エストロゲン遊離体 4 種 (E1、E2、E3、EE2) を GC/HR/MS 法と LC/MS/MS 法で測定した結果を比較した。

(2) 結果および考察

同一下水試料について GC/HR/MS 法と LC/MS/MS 法で測定した結果を Table 8 に示す。両者は、E1、E2、EE2、E3 ともよく一致していた。ただし、E3 については高濃度である流入下水では LC/MS/MS 法測定による測定値のほうが GC/HR/MS 法測定による測定値よりも 30% 程度高い値が測定された。どちらの結果が妥当かは、比較データが少ないので断定は困難であり、今後さらにデータを収集し、比較することが必要であるが、高濃度側では検量線の直線性の範囲が LC/MS/MS 法の方が GC/HR/MS 法より優れていること、更に GC/HR/MS 法は試料中の妨害成分による誘導体化反応阻害も原因となっていると推定される。低濃度領域では LC/MS/MS 測定では検出できない処理水中の E2、E3 であっても、GC/HR/MS 測定では検出された。これは検出下限値が約 1 桁低いことから低濃度域の測定には明らかに GC/HR/MS 法が優れている。ただし、GC/HR/MS 法による測定には誘導体化反応が必要であり、前処理操作がある分、煩雑である。したがって、本法は LC/MS/MS による測定で検出下限以下の成分について、さらに低濃度まで確認が必要な場合、適用することができる。

今回の結果 (Table 8) と以前の結果 (Table 7) を比較すると、流入水および処理水では、今回のほうが高い濃度である例が多かった。この理由として、検討に用いた試料のサンプリングの時期の違いによると考えられるが、下水試料中のエストロゲンについて時間帯、季節による違いなどおよび下水処理方法の違いなどデータの収集が必要であると考える。なお、この GC/HR/MS 法を用いた検出方法においても、EE2 は今回測定した流入水、処理水ともに検出されなかった。

Table 8 GC/HR/MS 法及び LC/MS/MS 法による流入水・処理水の測定結果 単位: ng・L⁻¹

測定対象	流入水		処理水 (最終沈殿池流出水)	
	GC/HR/MS 法	LC/MS/MS 法	GC/HR/MS 法	LC/MS/MS 法
E1	28.8	27.2	4.8	4.4
E2	4.0	3.2	0.2	<0.5
EE2	<0.04	<0.5	<0.04	<0.5
E3	99.8	130.1	0.4	<0.5

6. まとめ

エストロゲンの遊離体 4 種 (E1、E2、E3、EE2) についてシリル化誘導体化して、二重収束型質量分析計を用いた GC/HR/MS 法による分析方法を開発した。試料の前処理方法としては、固相抽出後に順相系カラムとイオン交換型カラムを用いて精製した。また、測定精度を高める目的で測定成分ごとに同一物質の重水素置換体をサロゲートとして添加した。誘導体化は、シリル化反応が比較的迅速で、かつ、反応後の濃縮が容易な BSA を用いた TMS 化条件を選択した。E1、E2、E3 遊離体については、3-TMS-E1、3,17-TMS-E2、3,16,17-TMS-E3 の分子イオン ([M]⁺) を、また、EE2 については、3,17-TMS-EE2 の脱メチルイオン ([M-CH₃]⁺) を SIM イオンとして選択した。

その結果、GC/HR/MS法による装置検出下限(IDL)は約0.2から0.5 pgでLC/MS/MS法より最大1桁高感度に測定されることが分かった。また、試料を10,000倍濃縮する場合の水試料の検出下限値は、E1で0.04 ng・L⁻¹、E2で0.02 ng・L⁻¹、EE2で0.04 ng・L⁻¹、E3で0.05 ng・L⁻¹であり、また、下水の実試料について開発された本法での添加回収率は94から110%範囲内と良好な結果が得られ、信頼性のある測定方法であることが確認できた。

本研究で開発したGC/HR/MS法と従来のLC/MS/MS法を用いて、下水処理場の流入水および処理水のエストロゲンを測定した。この結果、エストロゲン遊離体について、本研究で開発したGC/HR/MS法はLC/MS/MS法とほぼ同じ測定値が得られたが、LC/MS/MSでは検出できなかった処理水中のE2、E3でもGC/HR/MS法は検出下限値が低くなるため定量可能であった。しかし、合成エストロゲンであるEE2については、本研究で開発したGC/HR/MS法でも検出下限値(0.04 ng・L⁻¹)以下であった。

なお、本研究は、帝人エコ・サイエンス(株)と独立行政法人土木研究所が共同研究として実施したものであり、日英内分泌かく乱物質の共同研究の一環としても実施している。

[参考文献]

- 1) 環境庁：内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について—環境ホルモン戦略計画 SPEED'98—，環境庁，p.10(2000)。
- 2) 矢古宇靖子，高橋明宏，東谷忠，田中宏明：組み換え酵母を用いた下水中のエストロゲン活性の測定，*環境工学論文集*，**36**，pp.199–208(1999)。
- 3) 五十嵐正雄：内分泌婦人科学・生殖内分泌の基礎と臨床，南山堂，p.17(1978)。
- 4) 小森行也，八十島誠，田中宏明：LC/MS/MSによるエストロゲンの分析，*第36回日本水環境学会年会講演要旨集*，p.431(2001)。
- 5) 小森行也，八十島誠，田中宏明，末岡峯数，大岩俊雄，久野正：下水試料を対象としたエストロゲンの測定，*第5回日本水環境学会シンポジウム講演集*，p.186(2002)。
- 6) 八十島誠，小森行也，田中宏明：LC/MS/MSによるエストロゲンの分析法と下水への応用，*土木学会論文集*，[727]，pp.103–111(2003)。
- 7) 彼谷邦光：エストロジェンの抽出及び測定法，*第26回日本環境化学学会講演会予稿集*，pp.157–165(1998)。
- 8) 岡安祐司：ELISA法による水中の17βエストラジオール測定の課題と改良，*土木技術資料*，**44**[8]，pp.48–53(2002)。
- 9) 末岡峯数，大岩俊雄，田辺薫，八十島誠，小森行也，田中宏明：下水試料を対象としたエストロゲンのGC/MSによる高感度測定法，*第6回日本水環境学会シンポジウム講演集*，p.97(2003)。
- 10) 石井義昭，沖田智，鳥貝真，尹順子：液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法による環境水中のエストロゲンの定量，*分析化学*，**49**[10]，pp.753–758(2000)。

(受付 2005. 4.28)

(受理 2005. 8.19)