

液体クロマトグラフータンデム質量分析計による 東京都島しょ及び奥多摩地域における水道水中の女性ホルモン類の分析

富士栄 聡子*, 小西 浩之*, 瀬戸 博**, 矢口 久美子*

Determination of Estrogens in Drinking Water in Islands and Okutama Area, Tokyo by Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry

Satoko FUJIE*, Hiroyuki KONISHI*, Hiroshi SETO** and Kumiko YAGUCHI*

Keywords : 液体クロマトグラフータンデム質量分析計 LC/MS/MS, 女性ホルモン estrogens, 水道水 drinking water, 固相抽出 solid phase extraction, クリーンアップ purification, 実態調査 investigation

諸 言

近年内分泌かく乱化学物質による環境汚染が問題になっており、環境中での実態調査が進められている。一方環境中には人畜由来の天然のエストロゲンであるエストロン、エストラジオール、エストリオール及びそれらの抱合体と、医薬品由来の合成エストロゲンも存在しており、それらは内分泌かく乱化学物質よりも高いエストロゲン活性を持ち、非常に微量でもその影響が現れる^{1, 2)}。

尿から排泄されるエストロゲンの大半はグルクロン酸、硫酸の抱合体であり、糞から排泄されるフリー体と比べエストロゲン活性は低い。しかし環境中あるいは生体に取り込まれた時に脱抱合され、活性の高いフリー体となることが指摘されている^{3, 4)}。また医薬品由来の合成エストロゲンは、一部が不活化されずに糞中から排泄される³⁾。このため、環境中のエストロゲンの測定に際しては、フリー体及び抱合体の双方を測定することが必要となる。

エストロゲンの測定法には、ELISA 法、ガスクロマトグラフ質量分析法 (以下 GC/MS 法と略す)、液体クロマトグラフータンデム質量分析法 (以下 LC/MS/MS 法と略す) などがある。ELISA 法は前処理が簡便であるが、目的物質以外の物質との交差反応を起こすため、実際の濃度に比べ高濃度で測定されるという指摘がある⁵⁾。GC/MS 法は抱合体の加水分解と-OH 基の誘導体化が必要で^{2, 6-8)}、前処理が煩雑である。これに対し LC/MS/MS 法は^{1, 9, 10)}、誘導体化の必要がなく抱合体を含め直接測定が可能で、より簡便にエストロゲンを一斉分析できる。

そこで、フリー及び抱合体のエストロゲンについて、既存の方法⁹⁾を参考に LC/MS/MS を用いた一斉分析法の改良を行い、東京都島しょ及び奥多摩地域における水道原水ならびに浄水の調査に適用したので報告する。

実験方法

1. 試薬及び分析装置

1) 試薬 標準液は、Aldrich 社製のフリー体 6 種類エストロン (以下 E1 と略す)、17 α -エストラジオール (以下 α -E2 と略す)、17 β -エストラジオール (以下 β -E2 と略す)、17 α -エチニルエストラジオール (以下 EE2 と略す)、エストリオール (以下 E3 と略す)、重水素化エストラジオール (以下 β -E2d₄ と略す)、抱合体 10 種類 17 β -エストラジオール-3 グルクロナイド-17 サルフェート (以下 E2-3G17S と略す)、17 β -エストラジオール-3 サルフェート-17 グルクロナイド (以下 E2-3S17G と略す)、エストリオール-3 グルクロナイド (以下 E3-3G と略す)、17 β -エストラジオール-3,17 ジサルフェート (以下 E2-3,17S と略す)、エストリオール-3 サルフェート (以下 E3-3S と略す)、エストロン-3 グルクロナイド (以下 E1-3G と略す)、17 β -エストラジオール-17 グルクロナイド (以下 E2-17G と略す)、17 β -エストラジオール-3 グルクロナイド (以下 E2-3G と略す)、エストロン-3 サルフェート (以下 E1-3S と略す)、17 β -エストラジオール-3 サルフェート (以下 E2-3S と略す) をメタノールに溶解して調製した。

メタノール (以下 MeOH と略す)、ヘキサン (以下 Hex と略す)、ジクロロメタン (以下 DCM と略す) 及びアセトン (以下 Ac と略す) は、残留農薬・PCB 試験用、関東化学 (株) 製を用いた。アセトニトリル (HPLC 用)、酢酸 (特級) も関東化学 (株) 製を、トリエチルアミン (以下 TEA と略す、特級) 及び酢酸エチル (残留農薬・PCB 試験用) は和光純薬工業 (株) 製を用いた。

2) 分析装置 LC : Waters 2690, MS/MS : MICROMASS Quattro Ultima Pt, MS : Waters Platform LCZ

* 東京都健康安全研究センター環境保健部水質研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** 東京都健康安全研究センター環境保健部環境衛生研究科

2. 分析条件及び分析方法

1) 分析条件 LC条件: カラム Xterra MSC18 (100 mm × I.D. 2.1 mm, 粒子径 3.5 または 5.0 μm, Waters), カラム温度 35°C, 移動相 アセトニトリル:精製水:100 mmol/L TEA が 0:80:20 (0 min)→12 min→40:40:20→15 min→80:0:20 (7 min) となる直線グラジエント, 注入量 20 μL, 流速 0.2 mL/min.

MS および MS/MS 条件: イオン化法 ESI-ネガティブモード, キャピラリー電圧 3,000 V, イオン源温度 230°C, 測定モード MRM または SIM. モニターイオンは表 1 に示す.

表 1. LC/MS/MSにおける対象化合物の分析条件

標準物質	プレカーサーイオン	プロダクトイオン	Cone (V)	Collision (V)
E1	269	> 145	80	40
α-E2	271	> 145	80	40
β-E2	271	> 145	80	40
E3	287	> 171	80	35
EE2	295	> 145	80	40
β-E2d ₄	275	> 147	80	40
E2-3G17S	263	> 253	40	30
E2-3S17G	263	> 271	35	30
E3-3G	463	> 287	40	40
E2-3,17S	215	> 97	35	35
E3-3S	367	> 287	35	30
E1-3G	445	> 269	40	40
E2-17G	447	> 271	40	35
E2-3G	447	> 271	40	35
E1-3S	349	> 269	70	40
E2-3S	351	> 271	70	35

* SIMモードのモニターイオンはプレカーサーイオンを用いた.

2) 分析方法

Isobe⁹⁾らの方法に準じて次に示す方法で行った.

(1) 固相抽出 試料水 1 L にサロゲート(β-E2d₄) 1 mg/L を 20 μL 添加, 酢酸を加え pH 3-5 とし, あらかじめメタノール及びミネラルウォーターでコンディショニングした N-ビニルアセトアミド含有親水性共重合体カラム (EDS-1, Shodex) に 20 mL/min で通水した. カラムは N₂ ガスバージで乾燥後, 酢酸エチル 7 mL (第 1 画分), 次いで 5 mmol/L TEA/MeOH 10 mL (第 2 画分) で溶出した.

(2) クリーンアップ 第 1 画分を N₂ ガス吹き付け乾固後, Hex/DCM(3:1) 1 mL で再溶解し, フロリジルカラム (Bond Elut FL, GL Sciences) に負荷後, Hex/DCM(3:1) 4 mL で洗浄, 40% Ac/DCM 20 mL で溶出した.

(3) 試料液の調製 クリーンアップ後の第 1 画分及び第 2 画分溶出液を N₂ ガス吹き付け乾固後, 5%アセトニトリル

水溶液 0.5~1 mL に溶解し, LC/MS/MS で測定した. 一部の分析条件の検討については LC/MS を用いた.

3. 分析方法の検討

1) 水道水における固相抽出の確認 2.2)(1)の固相抽出法を水道水に適用できるかを確認した. 試料水として水道水 1 L を用い, 残留塩素除去のためアスコルビン酸を添加した. 標準液各 100 ng を添加し固相抽出を行い, 2.2)(3)の方法で試料液を調製し, LC/MS/MS で測定した.

2) クリーンアップにおける溶出液の検討 2.2)(2)のクリーンアップにおける溶出液の検討を行った. 各 100 ng (LC/MS で測定する場合はフリー体 500 ng) を含む標準液を乾固後, 5, 40, 50%の Ac/DCM 溶出液について検討した. 測定は, LC/MS/MS または LC/MS で行った.

4. 水道原水, 水道水中の女性ホルモン類の実態調査

1) 地域 東京都島しょ (大島, 利島, 新島, 式根島, 神津島, 三宅島, 御蔵島, 八丈島, 青ヶ島, 小笠原) 及び奥多摩 (檜原村, 奥多摩町).

2) 期間 2004 年 7 月 15 日~8 月 6 日.

3) 試料水 水道原水 24 件及びそれらの浄水 24 件.

4) 採水及び試料搬送方法 試料は, 精製水及びアセトンで洗浄したガラス瓶に採水し, 浄水については試料水 1 L に対してアスコルビン酸ナトリウム約 0.02 g を添加した. 試料は保冷剤を入れたスチロール製の箱に入れ, チルド便で搬入した.

結果及び考察

1. 水道水における固相抽出の確認

3.1)の方法を用い, この固相抽出法が水道水に適用できるか確認した. その結果を表 2 に示す.

フリー体はおおむね酢酸エチルの第 1 画分に, 抱合体は全て第 2 画分の 5 mmol/L TEA/MeOH に溶出された. しかし E3 はこの第 2 画分にも分かれて溶出された. これは, E3 には-OH が 3 つあり極性が高いためであると思われる. このため, E3 は第 1 画分と第 2 画分の合計量とすることとした.

2. クリーンアップにおける溶出液の検討

第 1 画分にも E3 が一部溶出されたため, 3.2)のクリーンアップ法により, E3 も良好に回収できる溶出液を検討した.

結果を表 3 に示す.

E3 を除くフリー体回収率はいずれの溶出液でも良好であった. しかし E3 は 5% Ac/DCM ではほとんど溶出しなかった. これは E3 が他のフリー体に比べ極性が高いためであると考えられる. E3 の最も良好な回収率は 40% Ac/DCM であった. このため第 1 画分におけるクリーンアップ後の溶出液は, 40% Ac/DCM を用いることとした.

一方抱合体は E1-3S および E2-3S が一部 40, 50%

表 2. 水道水の固相抽出における女性ホルモン類回収率(%)

溶出液	フ リ ー 体 回 収 率 (%)				
	E1	α -E2	β -E2	EE2	E3
1st: 酢酸エチル	82.6	74.5	91.8	76.6	60.6
2nd: 5mmol/L TEA/MeOH	2.6	2.7	3.4	3.3	46.3

溶出液	抱 合 体 回 収 率 (%)									
	E1-3G	E2-3G	E2-17G	E1-3S	E2-3S	E3-3S	E2-3,17S	E2-3S17G	E2-3G17S	
1st: 酢酸エチル	0.4	0.5	0.9	0.2	0.2	0.2	0.5	0.8	1.4	
2nd: 5mmol/L TEA/MeOH	104.4	103.4	111.7	102.0	103.1	100.6	95.0	103.0	20.3	

表 3. クリーンアップにおける各溶出溶媒での回収率(%)

溶出液	フ リ ー 体 回 収 率 (%)				
	E1	α -E2	β -E2	EE2	E3
5%Ac/DCM	96.0	98.9	100.3	101.2	1.3
40%Ac/DCM	96.7	87.4	100.8	104.0	65.0
50%Ac/DCM	115.6	104.3	103.4	105.6	20.9

溶出液	抱 合 体 回 収 率 (%)									
	E1-3G	E2-3G	E2-17G	E3-3G	E1-3S	E2-3S	E3-3S	E2-3,17S	E2-3S17G	E2-3G17S
5%Ac/DCM	0.8	0.9	1.6	0.0	0.4	0.4	0.2	0.4	1.6	0.0
40%Ac/DCM	0.8	1.0	1.1	0.0	43.5	25.6	5.5	0.6	1.5	0.0
50%Ac/DCM	0.0	0.0	0.0	0.0	96.0	48.4	0.9	0.0	0.0	0.0

Ac/DCM で溶出されたが、大半の抱合体がいずれの溶出条件でも溶出されなかった。これは E3 以上に抱合体の極性が高いためであると考えられる。このため抱合体が多く溶出される 5 mmol/L TEA/MeOH の第 2 画分は、クリーンアップを行わないこととしたが、LC/MS/MS による分析では特に妨害ピークは認められなかった。

3. 検出限界, 検量線

本分析条件における装置の検出限界, 定量下限値を表 4 に示す。

検出限界は, フリー体 0.25~0.58 ng/L, 抱合体 0.0063~0.19 ng/L, 定量下限値は, フリー体 0.83~1.94 ng/L, 抱合体 0.021~0.62 ng/L であった。特に抱合体の測定に優れていた。

0.2~200 μ g/L におけるフリー体の検量線を図 1 に, 抱合体の検量線を図 2 に示す。いずれも $R^2 > 0.99$ 以上と良好な直線性であった。

4. 水道水を用いた添加回収試験

以上の結果より, LC/MS/MS による水道水中のエストロゲン類の分析は図 3 の方法により行うこととした。

表 4. 検出限界, 定量下限値

	検出限界 (S/N=3) (ng/L)	定量下限値 (S/N=10) (ng/L)
E1	0.25	0.83
α -E2	0.28	0.95
β -E2	0.58	1.94
EE2	0.57	1.91
E3	0.56	1.87
E1-3G	0.0063	0.021
E2-3G	0.012	0.04
E2-17G	0.11	0.36
E3-3G	0.13	0.43
E1-3S	0.018	0.06
E2-3S	0.019	0.062
E3-3S	0.045	0.15
E2-3,17S	0.19	0.62
E2-3S17G	0.013	0.043
E2-3G17S	0.15	0.50

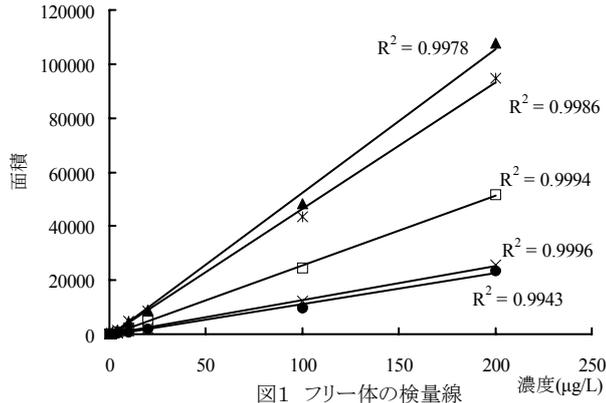


図1 フリー体の検量線

× E3 ▲ E1 × E2 □ αE2 ● EE2

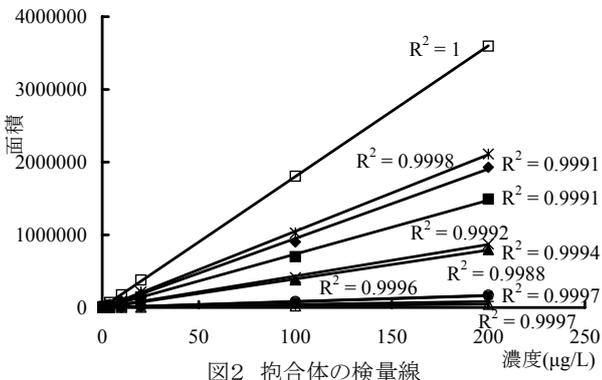


図2 抱合体の検量線

■ E2-3,17-Dis △ E2-3G17S ▲ E2-3S17G + E3-3G
 □ E3-3S × E1-3G × E2-3G ○ E2-17G
 ◆ E1-3S ■ E2-3S

ム添加により残留塩素を除去した水道水を用いて行った。結果を表5に示す。

表5. 添加回収試験による回収率および変動係数

	検体数	回収率(%)	変動係数(%)
E1	6	64.2	10.5
α-E2	6	51.4 (92.1)*	14.2 (5.4)*
β-E2	6	55.8 (94.6)*	14.8 (2.0)*
EE2	6	54.6	16.4
E3	5	65.3	8.1
E2-3G17S	6	72.1	15.3
E2-3S17G	6	76.0	14.1
E3-3G	6	93.9	26.4
E2-3,17S	6	90.4	5.5
E3-3S	6	115.1	10.5
E1-3G	6	129.6	16.2
E2-17G	5	112.2	25.0
E2-3G	6	131.3	19.0
E1-3S	6	110.3	8.6
E2-3S	6	115.7	10.4

添加濃度：E1 20ng/L, α-E2 80ng/L, β-E2 80ng/L, EE2 20ng/L, E3 200ng/L, 抱合体 各100ng/L 水道水に添加
 * ()はd体補正

フリー体に比べ抱合体の回収率が全般的に良好であった。α-E2, β-E2 においては β-E2d₄ でサロゲートを用いて補正することにより良好な回収率がえられた。

5. 実態調査

図3の方法を用い、東京都島しょ及び奥多摩地域の簡易水道事業体における水道原水24件(表流水8件, 地下水等12件, 天水2件, ダム水2件), それら浄水24件の実態調査を行った。その結果, 全ての項目においていずれも定量下限値未満であった。

まとめ

LC/MS/MS法によるE1, α-E2, β-E2, EE2, E3およびそれら抱合体の一斉分析法を行った。固相抽出は酢酸エチル7mL→5mmol/L TEA/MeOH 10mLで溶出, クリーンアップは酢酸エチル分画を40% Ac/DCMで溶出を行った。この一斉分析法は特に抱合体の測定に優れていた。東京都島しょ及び奥多摩地域の簡易水道水における実態調査については, いずれも定量下限値未満であった。

謝辞 本分析にあたり協力をいただいた, 工学院大学工学部応用科学研究科応用分析化学研究室の榎本宏氏に感謝します。

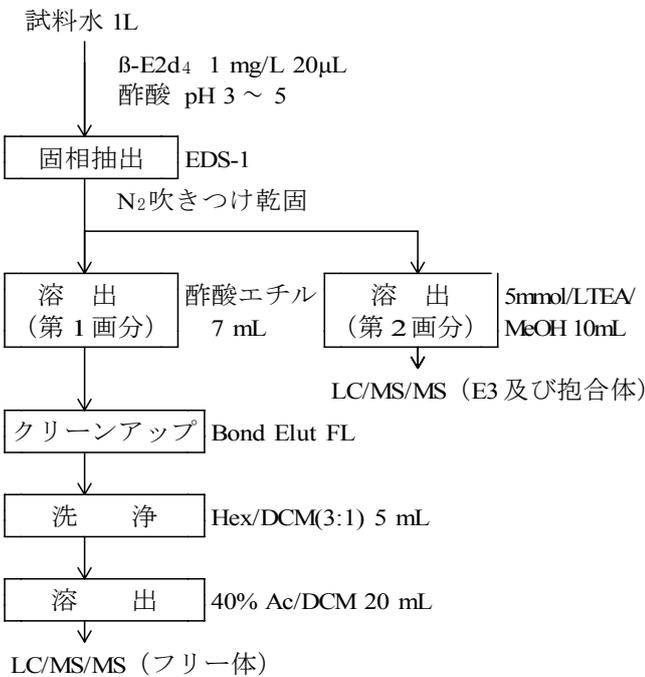


図3. 分析法の流れ図

本法における添加回収試験を, アスコルビン酸ナトリウ

文 献

- 1) 今井美江, 宇田川富男: 水道協会雑誌, **72**, 12-20, 2003.
- 2) 伊藤伸一, 上村仁: 水道協会雑誌, **807**, 33-24, 2002.
- 3) 伊藤伸一, 上村仁, 節田節子: 水道協会雑誌, **795**, 41-48, 2000.
- 4) 伊藤伸一, 上村仁: 水道協会雑誌, **818**, 26-34, 2002.
- 5) 田嶋晴彦, 辻村和也, 山口政俊: 水道協会雑誌, **807**, 33-37, 2001.
- 6) 環境庁水質保全局水質管理課“外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル”XI-1~XI-10, 1998.
- 7) 環境庁水質保全局水質管理課“要調査項目等マニュアル” p.47~62, 1999.
- 8) 山辺真一, 林隆義, 今中雅章, 他: 岡山環境保健センター年報, **26**, 24-25, 2002.
- 9) Isobe, T., Shiraishi, H., Yasuda, M., et al.: J. Chromatogr. A, **984**, 195-202, 2003.
- 10) 日本薬学会第 124 年会 環境・衛生部資料, p.27-29, 2004.