

XI . -エストラジオールの分析法

1 対象物質

-エストラジオール

2 目標検出限界

本分析法の目標検出限界は2.8ng/L (10pM)である。

3 分析法の概要

下水処理場などから環境中に放出されるエストロゲン様物質にはヒトや家畜の排泄物由来のもの、食物由来のもの、医薬品由来のものなど有りあらゆるものが含まれているはずである。この中でエストロゲンとしての活性が最も高く、環境中への放出量も多いと思われるものは -エストラジオールである。ここでは -エストラジオールがエストロジェンの活性のほとんどを占めるものと考え、 -エストラジオールを定量することによってエストロゲン量に代えることとする。ヒトの場合、尿から排泄される -エストラジオールのほとんどは硫酸やグルクロン酸の抱合体で、一方糞ではほとんどがフリーの状態であると云われている。 -エストラジオールの抱合体の活性は弱いとされているが、環境中や生体に取り込まれた時に抱合体がはずれて、活性を取り戻すことも予想される。したがって、環境中の -エストラジオールの測定に際してはフリーの -エストラジオールとその抱合体の合計を測定することが必要となる。

ラジオアイソトープラベルした -エストラジオールを用いた底質からの回収実験では、添加した -エストラジオールの40%は水溶液で溶出されるが、60%は底質と強く結合し、有機溶媒でないと回収できないことが知られている¹⁾。ここでは、底質からの -エストラジオールの抽出にメタノールを用いることとした。

次に問題となるのはどこまで測定すれば良いのかという問題である。これまでの文献には、20pM以上のエストロゲンで湖沼の生態系に影響があったこと、20pMの -エストラジオールでアルファルファの成長が促進されたこと、等が記載されている²⁾。ここでは20pMの1/2である10pMを定量することを条件として測定法を組み立てた。

-エストラジオールの定量法にはELISA法とGC/MS法がある。この他にLC/MS法も良い方法と思われるがLC/MSの普及がまだ十分ではないので、前の二者で測定することとした。

前段でも述べたように、 β -エストラジオールの抱合体も測定の対象とするので、試料の前処理に抱合体を加水分解するステップが必要となる。前処理後の試料は ELISA 法と GC/MS の両方に使用される。市販されている ELISA 法のキットでは 10~500pg/ml の β -エストラジオールが検出できるが検量線が対数目盛りであるので、誤差もその分だけ大きくなることになる。また、エストロンなど類似構造を持つステロイドも弱い結合することも考慮しておくことが必要であろう。回収率は 85~90%であるが、製品によっては 100%±5%というものもあるようである。

GC/MS 法では、混在するステロイドの数が数十種類を越えることが予想されるので、TLC や HPLC によるクリーンアップが必要である。操作の煩雑さから定量誤差が生じないように内部標準として d4- β -エストラジオールを使うことにした。 β -エストラジオールは t-BDMS 化誘導体として 100 μ l に定容量にする。1 μ l を GC に注入する。GC はステロイド分析用のキャピラリーカラムを使う昇温プログラムとした。MS のイオン化は電子衝撃イオン化とし、検出は内部標準として用いた d 置換 β -エストラジオールの m/z 447(d4)[M⁺-57(C(CH₃)₃)]と β -エストラジオール m/z 443[M⁺-57(C(CH₃)₃)]の選択イオン検出とした。

4 試薬・器具

(1) 試薬

メタノール： 残留農薬試験用

ヘキサン： 残留農薬試験用

酢酸エチル： 残留農薬試験用

クロロホルム：残留農薬試験用

塩化ナトリウム：試薬特級

アセトニトリル：残留農薬試験用

アセトン：残留農薬試験用

トリエチルアミン：試薬特級以上で、エストラジオールの保持時間に相当する位置にピークのないもの。

ウンデカン：試薬特級以上で、エストラジオールの保持時間に相当する位置にピークのないもの。

酢酸、酢酸ナトリウム、塩酸、水酸化ナトリウム：試薬特級以上のもの

t-BDMS 化剤：N-メチル-N-t-ブチルジメチルシリルトリフルオロアセトアミド

(注1)

フィルター：グラスマイクロファイバーフィルター (GF/C) (注2)

固相抽出カートリッジ：シリカにオクタデシル (ODS または C18 と呼ばれているもの) が結合したもの (注3)

TLC プレート：厚さ 0.25mm のシリカゲルプレートで蛍光剤が添加してあるもの

(注4)

高速液体クロマト用カラム：逆相 (C18) 分析用カラム

標準品： - エストラジオールおよび - エストラジオール (試薬用のもの)

内部標準品： - エストラジオール(2,4,16,16-d4) (市販のもの) (注5)

窒素ガス：99.99%以上の高純度のもの

ELISA キット (注6)

(2) 器具および装置

50ml のディスプレイザブル注射器または固相抽出装置

アスピレーター

ガラス濾過器

薄層クロマトグラフ用展開槽または液体クロマトグラフ装置

ガスクロマト質量分析計

5 試料の前処理

(1) 環境水

洗剤、水、1 M塩酸-メタノール、水、アセトンの純で洗浄した 1L の共栓付ガラスビンに試料水を採取し、冷暗所 (4 以下) で保存する (注7)

(2) 底質

湿重量約 50 g の底質を採取し、遠心分離 (2,000g, 20分) して水分をできるだけ除いた後、凍結乾燥する。乾燥試料は均一に混合し、冷暗所 (4 以下) で保存する。

6 試験溶液の調整

(1) 試料水の濾過と分画

(a)ELISA 用試料

試料水 1 L を正確に計り取り、ガラスフィルター（GF/C）で濾過する。フィルターに残った SS(浮遊物質) からエストラジオールを抽出するためにメタノール・pH 5.0 の 1 M 酢酸緩衝液（9:1,v/v）10 ml でフィルターをよく洗う。（注 8）メタノール溶液は SS 濾過液に加えて均一に混合しておく。この溶液を 10 ml のメタノールおよび 20 ml の水で洗浄し、活性化した固相抽出用カートリッジに通し、エストラジオールをカートリッジに吸着させる。通し終わったら、純水 5 ml，ヘキサン 5 ml で洗浄し、酢酸エチル・メタノール（5:1,v/v）5 ml でエストラジオールを溶出させる。溶出液をねじ蓋付き試験管に取り窒素気流下、40 で蒸発乾固させる。

(b)GC/MS 用試料

試料水 1 L を正確に計り取り、ガラスフィルター（GF/C）で濾過する。フィルターに残った SS(浮遊物質) からエストラジオールを抽出するためにメタノール・pH 5.0 の 1 M 酢酸緩衝液（9:1,v/v）10 ml でフィルターをよく洗う。（注 8）メタノール溶液は SS 濾過液に加え、さらに内部標準（2,4,16,16-d4-エストラジオール）5ng 相当を添加し、均一に混合する。この溶液を 10 ml のメタノールおよび 20 ml の水で洗浄し、活性化した固相抽出用カートリッジに通し、エストラジオールをカートリッジに吸着させる。通し終わったら、純水 5 ml，ヘキサン 5 ml で洗浄し、酢酸エチル・メタノール（5:1,v/v）5 ml でエストラジオールを溶出させる。溶出液をねじ蓋付き試験管に取り窒素気流下、40 で蒸発乾固させる。

（2）底質からの抽出と分画

(a)ELISA 用試料

底質 10 g を正確に計り、50 ml の遠沈管に入れる、40 ml のメタノール・pH5.0 の 1 M 酢酸緩衝液（9:1,v/v）を加えて 30 分間振とう抽出後、遠心分離（2000rpm，20 分）し、上澄を分取する。残渣に 40 ml のメタノールを加えて 5 分間振とう抽出し、吸引ろ過する。遠沈管およびろ過器の残渣を 20ml のメタノールで洗浄し、吸引ろ過する。上澄およびろ液を合わせてロータリーエバポレーター用フラスコに入れ、40 で 10 ml 以下（5~10 ml）になるまで濃縮する。これに精製水 200 ml を加えて超音波で均一にする。この溶液を 10 ml のメタノールおよび 20ml の水で洗浄し、活性化した固相抽出用カートリッジに通し、エストラジオールをカートリッジに吸着させる。通し終わったら、純水 5 ml，ヘキサン 5 ml で洗浄し、酢酸エチル・メタノール（5:1,v/v）5 ml でエストラジオールを溶出させる。

溶出液をねじ蓋付き試験管に取り窒素気流下、40℃で蒸発乾固させる。

(b)GC/MS 用試料

底質 10 g を正確に計り、50ml の遠沈管に入れる。内部標準 (2,4,16,16-d4- エストラジオール)5ng 相当を添加し、40ml のメタノール・pH5.0 の 1 M 酢酸緩衝液 (9:1, v/v) を加えて 30 分間振とう抽出後、遠心分離 (2000rpm, 20 分) し、上澄を分取する。残渣に 40 ml のメタノールを加えて 5 分間振とう抽出し、吸引ろ過する。遠沈管およびろ過器の残渣を 20ml のメタノールで洗浄し、吸引ろ過する。上澄およびろ液を合わせてロータリーエバポレーター用フラスコに入れ、40℃で 10 ml 以下 (5~10 ml) になるまで濃縮する。これに精製水 200 ml を加えて超音波で均一にする。この溶液を 10 ml のメタノールおよび 20 ml の水で洗浄し、活性化した固相抽出用カートリッジに通し、エストラジオールをカートリッジに吸着させる。通し終わったら、純水 5 ml, ヘキサン 5 ml で洗浄し、酢酸エチル・メタノール(5:1, v/v) 5ml でエストラジオールを溶出させる。溶出液をねじ蓋付き試験管に取り窒素気流下、40℃で蒸発乾固する。

(3) 抱合体の分解

蒸発乾固させた残渣に 1M 塩酸メタノール溶液 1 ml を添加し、強く密封した後 80℃で 20 分間加熱する。冷却後、窒素気流下、40℃で蒸発乾固する。

(4) ELISA 用試料の調整

残渣を 0.1 ml メタノールに懸濁させ、これに 1M トリエチルアミン/メタノール溶液を 1 滴加え攪拌後、窒素で蒸発乾固させる。残渣に ELISA キットの緩衝液 1 ml を加えて残渣を溶かす。

(5) GC/MS 用クリーンナップ

TLC クリーンナップ:

残渣を 0.2 ml のメタノール溶かし、シリカゲル TLC (F254 の蛍光指示薬入り) に帯状に塗布し、風乾後、展開する。展開溶媒はクロロホルム/アセトン (9:1, v/v) またはベンゼン/アセトン (2:1, v/v) を用いる。(R_f はそれぞれ 0.50 と 0.62 である)。R_f0.50 または 0.65 付近をかき取りメタノールで抽出する。抽出液は窒素気流下、40℃で蒸発乾燥固する。

HPLC クリーンナップ：

試料を 20%アセトニトリル/蒸留水に溶かし、ODS カラム (ODS, 2.1mm x 150mm)、移動相 36%アセトニトリルで展開すると、約 20 分にエストラジオールが溶出する。検出は 280nm、検出限界は 10 pmol 程度である。エストラジオールの部分を分取し、蒸留水で 10 倍に希釈して ODS カートリッジで濃縮・洗浄して酢酸エチル・メタノール(5:1,v/v) 5 ml で溶出する。溶出液は窒素気流下、40 ℃ で蒸発乾固する。

(6) 誘導体 (tBDMS) 化

残留物を 5%塩酸ジエチルアミンを含むジメチルホルムアミド溶液 100 μ l に溶かし、N-メチル-N-tert ブチルジメチルシリルトリフルオロアセトアミド (MTBSTFA) 50 μ l 添加し、80 ℃、60 分間加熱する。窒素気流下、40 ℃ で蒸発乾燥固する。これをクロロホルム・ヘキサン (1:1,v/v) 0.2ml に溶解する。

(7) 誘導体の精製

Sephadex-LH20 カラム：ゲルをクロロホルム・ヘキサン (1:1, v/v) 混合液で 1 2 時間以上膨潤させ、シラン処理した石英ウールを詰めたパスツールピペット (内径 5mm, 長さ 145mm) に 20mm の高さに充填し、2 ml のクロロホルム・ヘキサン(1:1)で洗浄、tBDMS 溶液添加し、2.5ml のクロロホルム/ヘキサン(1:1)で溶出した画分を分取。これを窒素気流下で濃縮乾固。これを 100 μ l のウンデカンに溶解する。1 μ l を注入する。

7 空試験液の調整

試料と同量の精製水を用いて、試料と同時に、同操作を行い空試験溶液とする。

8 内部標準物質溶液：

-エストラジオール-d4 を 10mg 正確に秤り取り、メタノールで正確に 100ml とし、100 μ g/ml の標準液を調整する。この標準液 1ml をを正確に取り、メタノールで正確に 100ml にする。この溶液には -エストラジオール 1 μ g/ml を含む。これを正確に 100 倍希釈し、10ng/ml の溶液を調整する。

9 測定

(1) ELISA による測定

市販の ELISA キットの場合、各キットによって使用する試料の量が異なるが、一例として試料溶液 50 μ l を添加する。測定の誤差を小さくするために、試料溶液を 2 段階に希釈し（原液 1 段希釈および 2 段希釈の 3 試料となる）、これを 2 系列（3 試料 \times 2 系列 = 6 試料）セットする。標準液はキットのものを使用する。回収率はセットに記入されている方法で求める。国内で 20 種類前後のキットが入手可能です。使用にあたってキットの反応特異性、定量範囲、回収率等を確認することが必要です。

(2) GC/MS の測定条件

カラム：溶融シリカ管（内径 0.25 mm，長さ 15m）の内壁に液相メチルシリコンを化学結合させたもの（膜厚 0.25 μ m）カラム温度：150 から 210 まで 1 分間に 20 の割合で昇温し、210 から 300 まで 1 分間まで 1 分間に 10 の割合で昇温した後、300 を 8 分間保持する。

注入口温度：250

試料注入方式：スプリットレス、パージタイム 3.0 分

内標物質：[2,4,16,16-d4]- β -エストラジオール（添加量：5 ng）

イオン化法（イオン化エネルギー）：電子衝撃イオン化（70 eV）

選択イオン： β -エストラジオール m/z 443{ M^+ -57[C(CH₃)₃] }

d4- β -エストラジオール m/z 447{ M^+ -57[C(CH₃)₃] }

(3) 検量線

β -エストラジオール 10 mg を正確に秤り取り、メタノールで正確に 100ml とする（100 μ g/ml）。この溶液から正確に 1ml を取り、メタノールで 100 倍に希釈する（1 μ g/ml）。さらに希釈液から正確に 1ml を取り、メタノールで 100 倍に希釈する（10 ng/ml）。この基準液 0.1ml, 0.2ml, 0.4ml, 0.8ml, 1.6ml を正確に共栓付き耐圧スピッツ管に取り分け、各々に内部標準液 0.5ml（5ng 相当を添加する。窒素気流下、40 で蒸発乾固させ、以下試料と同様の操作を行う。ウンデカン 100 μ l に溶かし、1 μ l をガスクロマトグラフに注入する。 β -エストラジオール(m/z 443)と内部標準の d4- β -エストラジオール(m/z 447)の面積比から β -エストラジオールの重量を求め、検量線を作成する。

10 同定、定量および計算

検量線と同様に測定用試料液（1 μ l）をガスクロマトグラフに注入し、内部標準（m/z

447)と -エストラジオール(m/z 443)との面積比から、検量線により -エストラジオールの重量を求める。

1 1 分析精度管理

内部標準物質である d4- -エストラジオールの回収率は通常87%から94%で、SDは±4.4%である。回収率が70%以上の測定値を採用し、それ以下の場合の測定値は棄却する。

(注1) N-メチル-N-t-ブチルジメチルシリルトリフルオロアセトアミド (MTBSTFA) は5%塩酸ジエチルアミンを含むジメチルホルムアミド (DMF) 中で反応させる。

(注2) グラスマイクロファイバーフィルター (GF/C) はワットマンの製品ですが同程度の品質のものでよい

(注3) 例えばセップパックプラス C18 カートリッジなど

(注4) メルクの HPTLCF254 (10 cm×20 cm) を切って使うと便利である。

(注5) C I L 社から販売されている (純度 97%)

(注6) ハイエストロテック (持田製薬)、ハイモニター E (帝国臓器)、ネオエスト (森永乳業)、ケーマン社、NEOGEN 社、Diagnostic System Laboratory, Inc. などがある。

(注7) ガラスに吸着されやすいので、試料採取後速やかに前処理操作を行う。

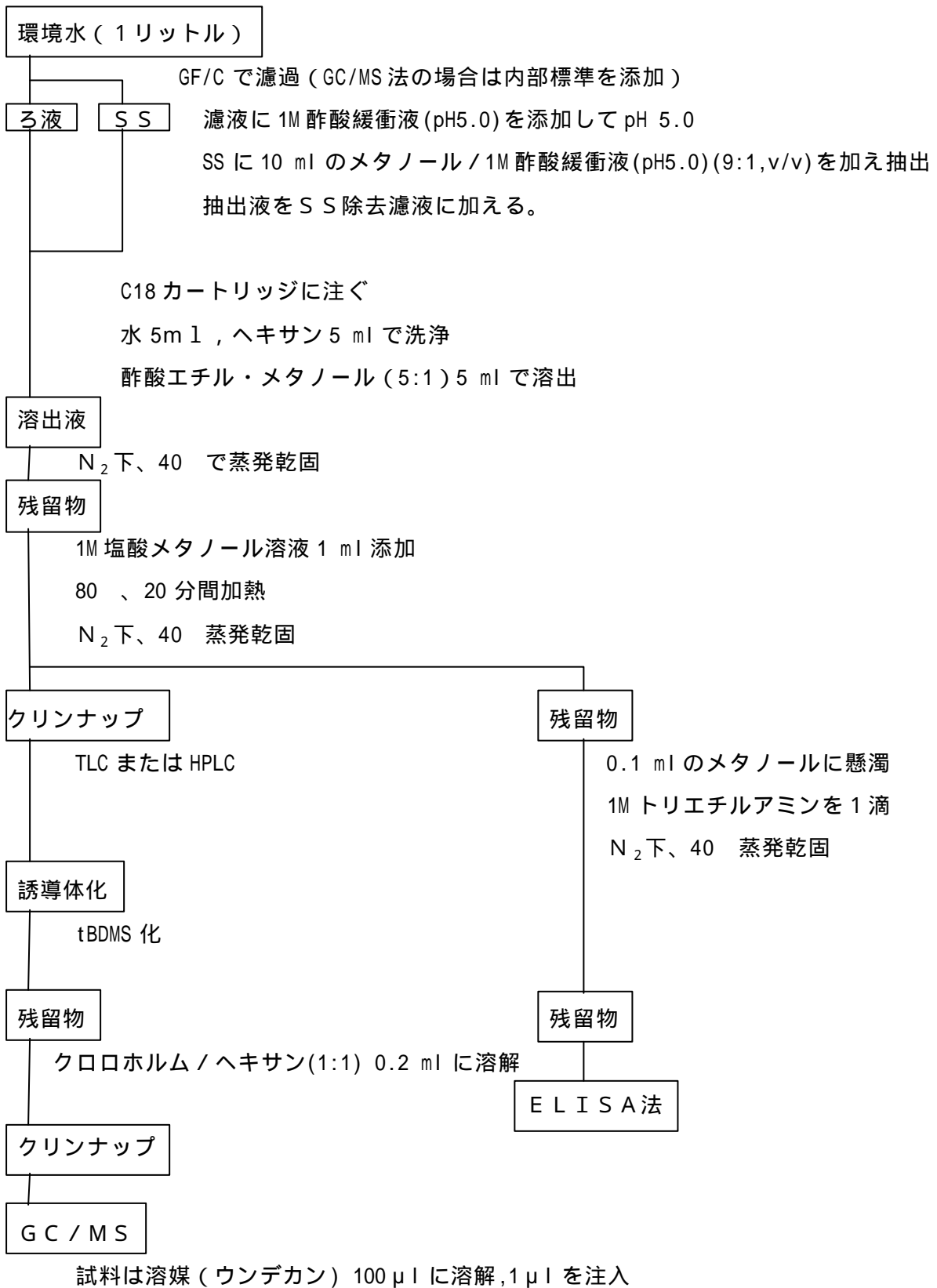
(注8) アスピレーターを止め、フィルターを外してビーカーに入れ、メタノール溶液でフィルターを洗う。メタノール溶液は GF/C で濾過し、ろ液を SS 除去ろ液に加える。

文献

1) Shore, L. S., Gurevitz, M., and Shemesh. Estrogen as an Environmental Pollutant, Environ. Contam. Toxicol. 51, 361-366(1993)

2) 環境庁リスク対策検討会監修「環境ホルモン」 環境新聞社発行

環境水中のエストラジオール定量の概略



底質からの -エストラジオールの抽出

-

