

# 環境水試料中のエストラジオール類分析方法の検討について

## (中間報告)

折原智明<sup>※1</sup> 木原敏博 箕岡健輔 山口弘行<sup>※2</sup> 石田 睦 山口 亮

### 1. 緒 言

17 $\beta$ -エストラジオール(E2)、17 $\alpha$ -エチニルエストラジオール(EE2)、エストロン(E1)及びエストリオール(E3)の4物質(図1)は医薬品としても利用されているため、これら4物質の環境水(河川水及び海水)試料中濃度を、過去の調査より低濃度である検出下限値、0.00001  $\mu\text{g/L}$  で定量するための分析方法を検討した。これは令和元年度、環境省化学物質環境実態調査における分析法開発として札幌市が受託したものである。検出下限値は分析法の要求感度として、環境省がメダカでのLOEC(最低影響濃度)から設定したものである。本報告では、令和元年度及び2年度に行った分析法開発のうち、LC-MS/MSでの機器測定高感度化の検討について報告する。

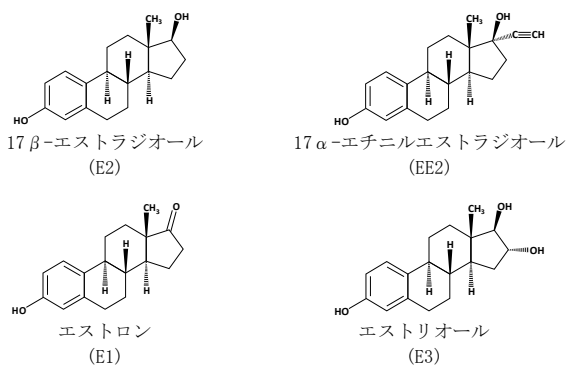


図1 対象物質の構造

### 2. 方 法

環境水調査を行うにあたり、複数地点の試料を採水する場合、1地点あたりの試料量は多くても2~3Lと想定される。試料量を2Lとし、固相抽出

による抽出液(試験液)量を0.5~1.0 mLとすると、濃縮倍率は2000~4000倍となる。2000倍濃縮試験液において試料換算濃度0.00001  $\mu\text{g/L}$ を検出するために、試験液の測定で0.02  $\mu\text{g/L}$ を検出可能(SN比>10)とすることを検討の目標とした。

#### 2-1 試薬

分析対象物質としては、東京化成工業製のE2、EE2、E1及びE3を使用した。サロゲート用のラベル化体としては、Cerilliant(SIGMA-ALDRICH)製のE2-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>溶液(10  $\mu\text{g/mL}$ )及びE1-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>溶液(10  $\mu\text{g/mL}$ )、Tront Research Chemicals製のEE2-*d*<sub>4</sub>及びE3-*d*<sub>3</sub>を用いた。

試薬は関東化学製のアセトニトリル(LC/MS用)、メタノール(LC/MS用)、アセトン(残留農薬試験用5000)及びアンモニア水(Ultrapur)、富士フィルム和光純薬製の*N,N*-ジメチルホルムアミド(高速液体クロマトグラフ用)、メタノール-*d*<sub>4</sub>(NMR用)及びフッ化アンモニウム(NH<sub>4</sub>F, 和光特級)を使用した。

精製水はMilli-Q Advantage Q-POD Elementで製造したものを使用した。

#### 2-2 標準液の調製

標準原液は、E2、EE2及びE3はメタノールで溶解し、E1は*N,N*-ジメチルホルムアミドで溶解し100  $\text{mg/L}$ に調製した。

標準液は標準原液を各々アセトニトリルで希釈し1000  $\mu\text{g/L}$ に調製した。

サロゲート標準原液はEE2-*d*<sub>4</sub>及びE3-*d*<sub>3</sub>をメタノール-*d*<sub>4</sub>で溶解し100  $\text{mg/L}$ に調製した。

サロゲート標準液はE2-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>溶液、EE2-*d*<sub>4</sub>標準原

※1 現 下水道河川局豊平川水処理センター ※2 現 退職

液、E1-<sup>13</sup>C<sub>3</sub> 溶液及び E3-d<sub>3</sub> 標準原液を各々アセトニトリルで希釈し 1000 µg/L に調製した。

検量線用標準液は各標準液をメタノール/精製水(4:6, v/v)にて希釈して調製した。

### 2-3 移動相組成の検討

イオン化モードはNegativeであり、移動相の添加剤をアンモニア(NH<sub>3</sub>)とした。移動相Aを10 mM NH<sub>4</sub> 精製水、移動相Bを①10 mM NH<sub>4</sub> アセトニトリル、②10 mM NH<sub>4</sub> アセトニトリル/メタノール(1:1, v/v)、③10 mM NH<sub>4</sub> メタノールとして①~③におけるE2とEE2のピーク応答値(面積値、高さ)等の比較を行った。

### 2-4 移動相添加剤の検討

移動相添加剤としてアンモニア及びフッ化アンモニウムの添加濃度の検討を行った。

### 2-5 試験液溶媒組成の検討

LC-MS/MS 測定時のグラジエント条件は同一で、試験液注入量を 50 µL としたとき、試験液の溶媒組成を①50%メタノール(メタノール/精製水(50:50, v/v))としたもの、②40%メタノール(同(40:60, v/v))としたもの、③40%アセトニトリル(アセトニトリル/精製水(40:60, v/v))としたもの、④30%アセトニトリル(同(30:70, v/v))としたもの、⑤20%アセトニトリル(同(20:80, v/v))としたものによるピーク形状への影響について調べた。

### 2-6 ESI と APCI イオン化法の検討

対象4物質はESI-Negative及びAPCI-Negativeの両イオン化法で測定可能であるが、夾雑物による影響について調べた。

検討は試料水として夾雑物の多いと考えられる下水処理水2 Lを用い、各サロゲート物質を添加後、Oasis HLB Plusによって固相抽出した。Oasis HLB Plusを乾燥後、メタノールまたはアセトンで溶出し溶媒乾固後、40%メタノール 1.0 mLで溶解した試験液についてサロゲート回収率を調べた。フローチャートを図2に示す。

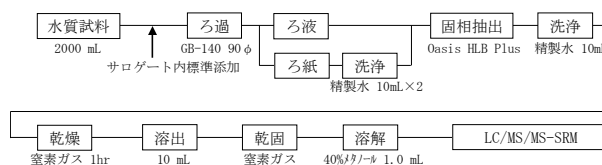


図2 フローチャート

## 3. 結果と考察

### 3-1 移動相組成の検討結果

移動相Bの組成を①、②、③として測定したクロマトグラムを図3~5に示す。またこの時の溶出時間、ピーク応答値の結果を表1に示す。なおこの検討は移動相③の場合、ESIではカラムの耐圧(60MPa)を超えたためAPCIにて実施した。

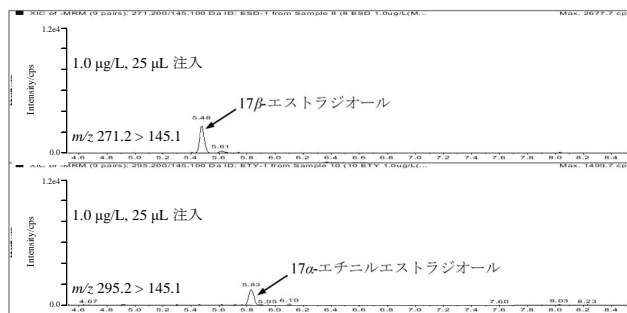


図3 移動相B① アセトニトリル

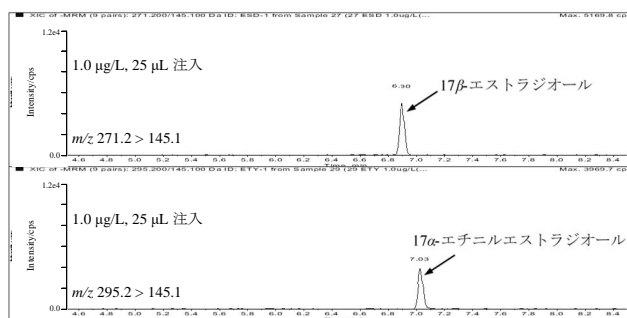


図4 移動相B② アセトニトリル/メタノール(1:1)

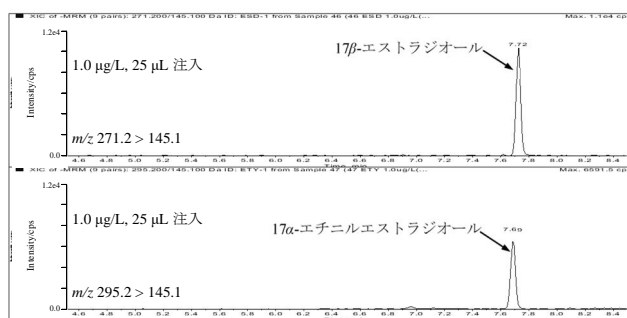


図5 移動相B③ メタノール

表 1 移動相調製組成による測定感度の差 (APCI 測定時)

移動相組成			流速 (mL/min)	17β-エストラジオール			17α-エチニルエストラジオール		
アンモニア濃度 (mM)	アセトニトリル (%)	メタノール (%)		1.0 μg/L		25 μL 注入 高さ	1.0 μg/L		25 μL 注入 高さ
				溶出時間 (min)	面積		溶出時間 (min)	面積	
10	100	0	0.80	5.48	6173	2693	5.83	4183	1517
10	50	50	0.80	6.90	12338	5189	7.03	9895	3692
10	0	100	0.80	7.72	24419	10526	7.69	16520	6661

表 2 移動相添加剤濃度による測定応答値の比較 (ESI 測定時)

移動相添加剤 種類	濃度 (A,B 共) (mM)	17β-エストラジオール		17α-エチニルエストラジオール		エストロン		エストリオール	
		1.0 μg/L	50 μL	1.0 μg/L	50 μL	0.20 μg/L	50 μL	1.0 μg/L	50 μL
		面積	高さ	面積	高さ	面積	高さ	面積	高さ
NH <sub>4</sub> F	0.10	425884	94977	335475	76861	335188	72681	236853	50020
	0.50	250281	58646	225403	53581	238864	56718	94797	21375
	5.0	83018	19757	58477	13759	76351	17429	79207	17789
NH <sub>4</sub>	5.0	448096	99532	228472	49863	377381	89967	414757	85220
	10	348005	78489	253409	60081	259031	58993	271641	58359
	20	260238	63797	184127	45499	189511	44939	155174	34864

表 3 移動相添加剤濃度による測定応答値の比較 (APCI 測定時)

移動相添加剤 種類	濃度 (A,B 共) (mM)	17β-エストラジオール		17α-エチニルエストラジオール		エストロン		エストリオール	
		1.0 μg/L	50 μL	1.0 μg/L	50 μL	0.20 μg/L	50 μL	1.0 μg/L	50 μL
		面積	高さ	面積	高さ	面積	高さ	面積	高さ
NH <sub>4</sub> F	0.10	32716	11313	28408	9796	53939	19202	10551	3816
	0.50	27527	9244	22867	7748	58029	20195	17373	6143
	5.0	1420	445	1488	539	4724	1624	1879	621
NH <sub>4</sub>	5.0	52735	18585	43456	15230	79541	28726	39155	13851
	10	79898	26759	64751	21509	105379	34908	78659	25850
	20	72152	25327	60796	21628	92245	31993	64547	22166

メタノール濃度を0%から50%、100%と高くすることによりピーク応答値は、約2倍、4倍と増加したが、E2とEE2の溶出時間の差は縮まり、メタノール濃度100%では、ほぼ同じ溶出時間となり分離出来ない結果となった。グラジエントパターンを変えた検討も実施したが分離は向上しなかった。以上の結果から、ピーク応答値を増加させつつ

ピーク分離も確保するため、移動相Bの組成はアセトニトリル/メタノール(1:1, v/v)とする。

### 3-2 移動相添加剤の検討結果

ESI測定時の添加剤フッ化アンモニウム及びアンモニア各添加濃度における各対象物質のピーク応答値の結果を表2に示す。APCI測定時の結果を表3に示す。

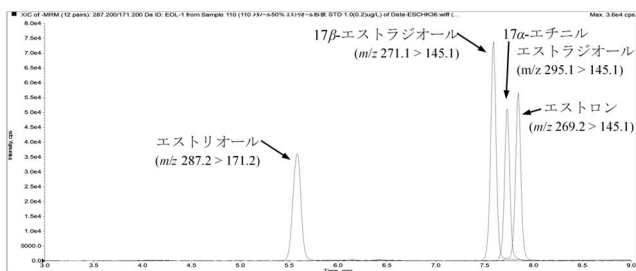


図6 ①50%メタノール溶媒調製試験液

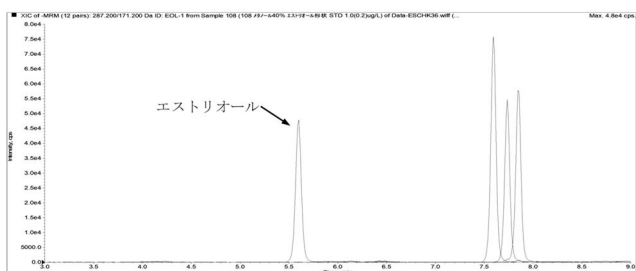


図7 ②40%メタノール溶媒調製試験液

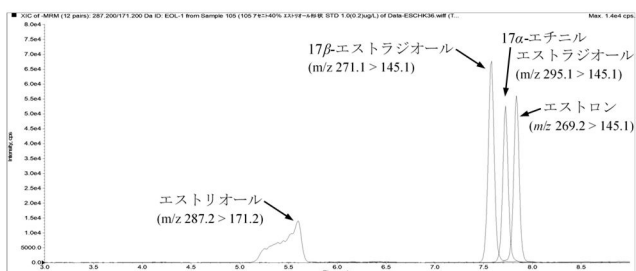


図8 ③40%アセトニトリル溶媒調製試験液

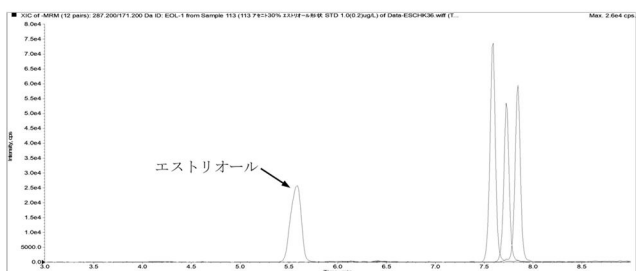


図9 ④30%アセトニトリル溶媒調製試験液

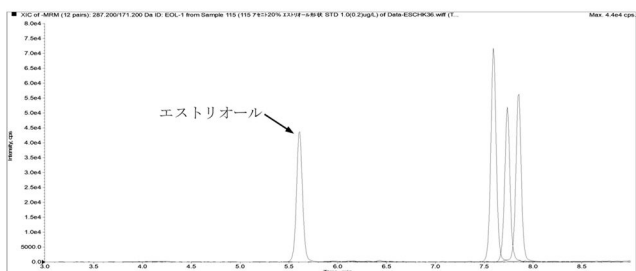


図10 ⑤20%アセトニトリル溶媒調製試験液

ESI と APCI では添加剤による挙動が異なっており、ESI では 0.10 mM フッ化アンモニウム及び 5.0 mM アンモニアの場合が良好であり、APCI ではフッ化アンモニウムでのピーク応答値は小さく添加剤としては不適であり、10 mM アンモニアの場合が良好であったことから、各イオン化法において適当な添加剤種及び濃度は異なる結果となった。

ESI と APCI ではイオン化時の温度やチャージが液滴中か気化した状態かといった違いにより差が生じると考えられる。

### 3-3 試験液溶媒組成の検討結果

ESI 測定時における、試験液溶媒組成①～⑤で得られたクロマトグラムを図 6～10 に示す。溶出時間の早い E3 のピーク形状へ特に影響があり、試験液中の有機溶媒はメタノールの場合で 40%以下、アセトニトリルでは 20%以下としなければ SN 比の良いピークは得られない結果となった。APCI でも同様の結果であった。

以上の 3-1～3-3 の検討結果より ESI 及び APCI のどちらでも、標準液濃度 0.02 µg/L (E1 については 0.004 µg/L) での測定 (SN 比 > 10) が可能となった。また標準液濃度 0.02～1.0 µg/L、1.0～10 µg/L の範囲 (E1: 0.004～0.2, 0.2～2.0 µg/L) で良好な直線性を示す ( $r^2 > 0.99$ ) 検量線も得られた。

### 3-4 ESI と APCI イオン化の検討結果

下水処理水を用いた 2000 倍濃縮では、メタノール溶出試験液は濃い緑色に着色していたが、アセトン溶出試験液は黄色の着色であったことから、メタノールの溶出能力が高く夾雑物も多く溶出していると考えられた。

ESI と APCI イオン化の比較試験を行うにあたり、メタノール溶出試験液とアセトン溶出試験液中の 4 種のサロゲート測定をそれぞれのイオン化法で行い、回収率を比較した結果を表 4 に示す。

いずれのサロゲートについても、APCI のアセトン溶出試験液が最も良い回収率が得られることが

表4 下水処理水 2000 倍濃縮試験液測定結果

イオン化法	サロゲート物質	回収率 (%)	
		メタノール溶出	アセトン溶出
ESI	17β-エストラジオール- <sup>13</sup> C <sub>3</sub>	15.3	18.3
	17α-エチニルエストラジオール- <i>d</i> <sub>7</sub>	13.7	17.1
	エストロン- <sup>13</sup> C <sub>3</sub>	28.7	38.9
	エストリオール- <i>d</i> <sub>3</sub>	18.9	26.0
APCI	17β-エストラジオール- <sup>13</sup> C <sub>3</sub>	54.6	72.2
	17α-エチニルエストラジオール- <i>d</i> <sub>7</sub>	79.0	103.3
	エストロン- <sup>13</sup> C <sub>3</sub>	62.4	87.6
	エストリオール- <i>d</i> <sub>3</sub>	53.9	90.3

判明した。

両イオン化測定では全く同じ試験液を測定しているため、回収率の差はイオン化方法の違いによるものであり、夾雑物による感度への影響が少ないのは APCI であった。

表4の結果から Oasis HLB Plus 固相カートリッジからの対象物質の溶出溶媒はアセトンを選択し、イオン化法については4種のサロゲート全ての回収率が70~120%の範囲に収まる APCI を採用することとした。

APCI イオン化法は気化後にイオン化させるため、ESI イオン化における液滴中でのチャージの奪い合いによるイオン化抑制が発生しにくいためと考えられる。

#### 4. 結 語

本検討により、目的とした試験液中の対象4物質を0.02 µg/Lで検出可能となった。そのLC-MS/MS条件を表5に示す。

今回の検討結果は、環境水試料中のエストラジオール類の分析方法としてはLC-MS/MSの測定条件の設定までであり、実際に、環境水試料について検査するには、抽出方法、分解性スクリーニング試験、保存性試験等の検討が必要となる。

表5 LC-MS/MS条件

LC: 島津 Nexera X2	
カラム	: Poroshell HPH-C18 (150×4.6 mm 2.7 µm)
移動相	: A: 10mM NH <sub>4</sub> /精製水 B: 10mM NH <sub>4</sub> /AcCN/MeOH ※AcCN/MeOH(1:1, v/v)
	: 0→1 min(B 30%) 1→7 min(B 30→90%) 7→9 min(B 90%)
流量	: 0.8 mL/min (約37MPa)
注入量	: 50 µL
MS: Sciex QTRAP4500	
イオン化法	: APCI-Negative
カーテンガス	: 20 psi
コリジョンガス	: 12
ネブライザ電流	: -3.0 mA
スプレー位置	: X 8 mm, Y 7 mm
ガス温度	: 400°C
ネブライザガス	: 60.0 psi
出口電圧	: -10.0 V
N <sub>2</sub> 発生装置	: PEAK製 AB-3G
CURTAIN	: 60 psi
SOURCE	: 110 psi
EXHAUST	: 60 psi
モニターイオン	
E2	: <i>m/z</i> 271.2→145.1(CE-55)
EE2	: <i>m/z</i> 295.1→145.1(CE-55)
E1	: <i>m/z</i> 269.2→145.1(CE-50)
E3	: <i>m/z</i> 287.2→171.1(CE-50)