

# 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 (報告その2)

折原智明\*<sup>1</sup> 木原敏博\*<sup>2</sup> 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(MDL)、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、令和元年度から3年度に行った分析法開発のうち、固相抽出による抽出方法の検討について報告する。

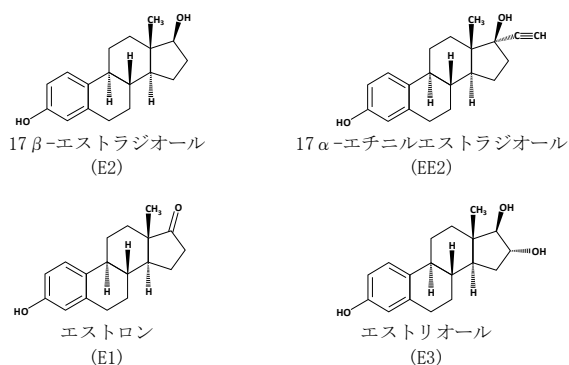


図1 対象物質の構造

## 2. 方 法

前報告<sup>1)</sup>にて固相抽出による濃縮倍率を2000倍濃縮として、抽出液(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、試験液の測定で0.02  $\mu\text{g/L}$ を検出可能(SN比>10)とするLC-MS/MS

条件について報告した。今回、固相カートリッジにOasis HLB Plusの他、分子鑄型固相カートリッジのAFFINIMIP SPE Estrogensも使い、検出下限を達成するための固相抽出方法の検討を行った。

### 2-1 試薬

前報告<sup>1)</sup>の検討時から、サロゲート用のラベル化体を、Tront Research Chemicals製のEE2-*d*からAlsachim製のEE2-2, 3, 4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>へ、Tront Research Chemicals製のE3-*d*からCambridge Isotope Laboratories製のE3-2, 3, 4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>溶液(100  $\mu\text{g/mL}$ )へ変更した。

### 2-2 標準液の調製

サロゲート標準原液はEE2-2, 3, 4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>をメタノールで溶解し100  $\text{mg/L}$ に調製した。

サロゲート標準液はEE2-2, 3, 4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>サロゲート標準原液及びE3-2, 3, 4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>溶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。

これら以外の標準液の調製は前報告<sup>1)</sup>と同じである。

### 2-3 サロゲート物質の検討

EE2-*d*及びEE2-2, 3, 4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>の10  $\mu\text{g/L}$ 溶液(溶媒:メタノール/精製水(4:6, v/v))をAPCI-Negativeで測定し比較を行った。

E3-*d*及びE3-2, 3, 4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>の10  $\mu\text{g/L}$ 溶液(溶媒:メタノール/精製水(4:6, v/v))をAPCI-Negativeで測定し比較を行った。

### 2-4 Oasis HLB Plus 洗浄液の検討

環境水試料濃縮後の固相カートリッジの洗浄液について検討を行った。Oasis HLB Plusに、標準液(E2:1.0  $\mu\text{g/L}$ 、EE2:1.0  $\mu\text{g/L}$ 、E1:0.20  $\mu\text{g/L}$ 、

\*1 現 下水道河川局豊平川水処理センター \*2 退職

E3:1.0 µg/L、溶媒:メタノール/精製水(1:9, v/v)を 10 mL 負荷し、窒素ガスで乾燥した後、各メタノール濃度の洗浄液で洗浄を行った。Oasis HLB Plus を通過した洗浄液に各サロゲートを添加し濃度を測定して漏出率を算出した。

## 2-5 AFFINIMIP SPE Estrogens 洗浄液の検討

AFFINIMIP SPE Estrogens に、標準液 (E2:4.0 µg/L、EE2:4.0 µg/L、E1:1.0 µg/L、E3:4.0 µg/L、溶媒:精製水) を 10 mL 負荷し、窒素ガスで乾燥した後、各アセトニトリル濃度の洗浄液 10 mL 及び各メタノール濃度の洗浄液 10 mL で洗浄を行った。AFFINIMIP SPE Estrogens を通過した洗浄液 10 mL から 2.5 mL 分取してサロゲートを添加し、精製水で 10 mL に定容後、濃度を測定して漏出率を算出した。試験液溶媒のアセトニトリル濃度が高いとピーク形状が悪いため精製水で希釈を行った<sup>1)</sup>。

## 2-6 AFFINIMIP SPE Estrogens 溶出溶媒の検討

AFFINIMIP SPE Estrogens に、標準液 (E2:1.0 µg/L、EE2:1.0 µg/L、E1:0.20 µg/L、E3:1.0 µg/L、溶媒:精製水) を 10 mL 負荷し、窒素ガスで乾燥した後、アセトニトリルで 2.5 mL 毎に溶出し、各サロゲートを添加後、精製水で 10 mL に定容し濃度を測定して溶出率を算出した。

アセトニトリルをメタノールに変更し同様に実施した。

## 2-7 分子鑄型充填剤効果の検討

分子鑄型固相は鑄型に合わない分子を保持しないことからクリーンアップ効果を期待できるため、その確認を行った。試料水として夾雑物の多いと考えられる下水処理水 1000 mL を用い、各サロゲート物質を添加後、AFFINIMIP SPE Estrogens は図 2 のフローチャートにより、Oasis HLB Plus は図 3 のフローチャートによって 2000 倍濃縮の固相抽出を行った。得られた試験液について濃度測定を行いサロゲート回収率を算出した。

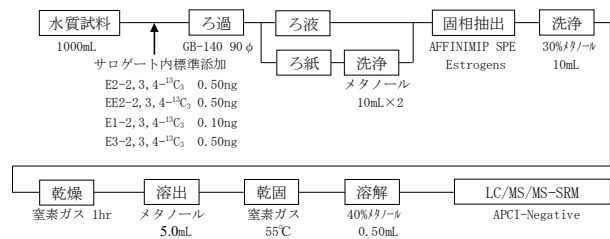


図 2 AFFINIMIP 用フローチャート

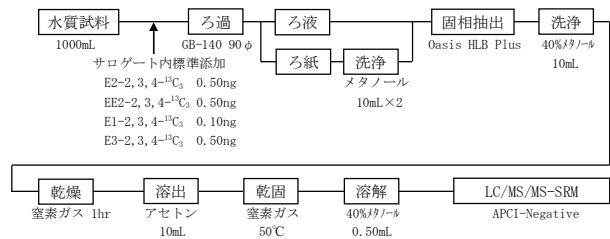


図 3 Oasis 用フローチャート

## 2-8 河川水 4000 倍濃縮の検討

図 2 のフローチャートの水質試料量を 2000 mL に変更し、河川水(豊平川)を用いて AFFINIMIP SPE Estrogens による 4000 倍濃縮を行い、クロマトグラムのベースライン状況の確認を行った。なおネイティブ(標準物質)は添加せず実施した。

## 2-9 MDL の検討

固相カートリッジを AFFINIMIP SPE Estrogens とし図 2 のフローチャートに従い、河川水(琴似川)を用いて MDL の検討を行った。

## 3. 結果と考察

### 3-1 サロゲート物質の検討結果

EE2-*d* のクロマトグラムを図 4 に、EE2-2,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub> のクロマトグラムを図 5 に示す。

測定濃度 10 µg/L は、実際の添加濃度より 10 倍濃い設定ではあるが、APCI 測定時には-*d* 体からネイティブ定量イオンの *m/z* 295.2>145.1 及び E2 の定量イオンである *m/z* 271.2>145.1 が検出された。-2,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub> 体からは、どちらのピークも検出されなかったため、EE2 のサロゲートには-2,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub> 体を使用することとした。

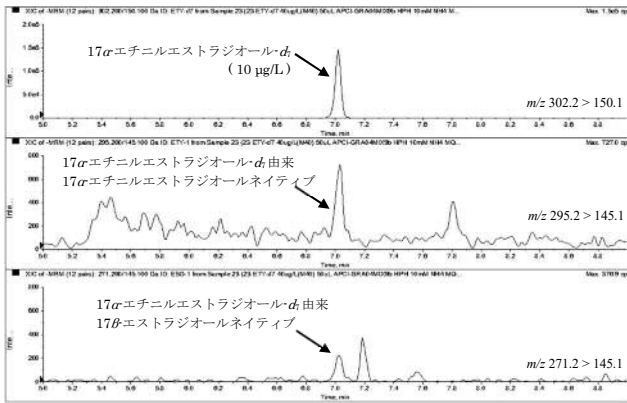


図4 EE2- $d_7$  のAPCIクロマトグラム

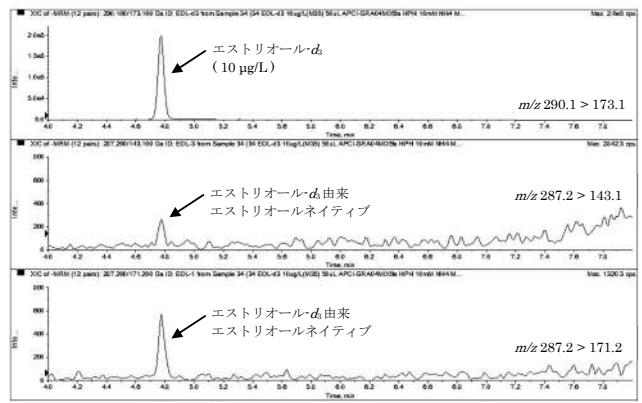


図6 E3- $d_8$  のAPCIクロマトグラム

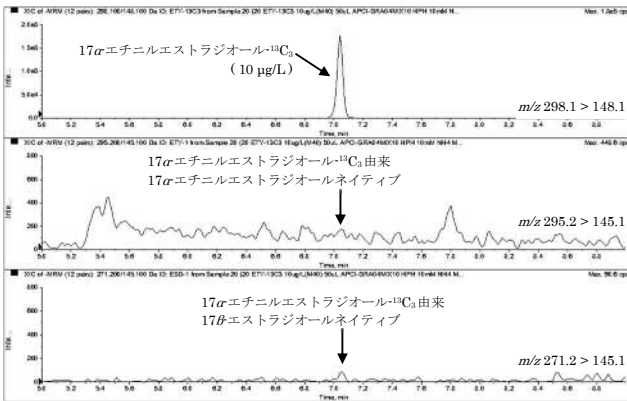


図5 EE2-2,3,4- $^{13}C_3$  のAPCIクロマトグラム

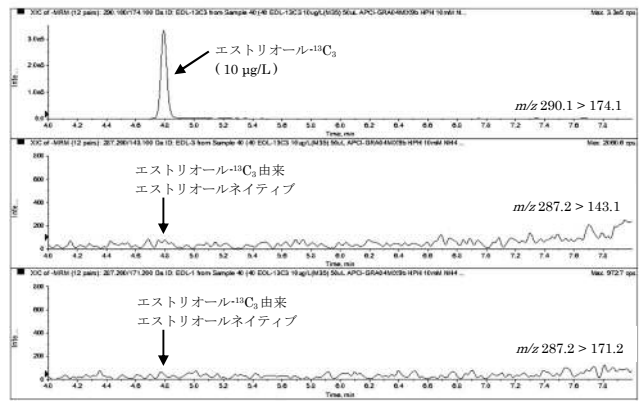


図7 E3-2,3,4- $^{13}C_3$  のAPCIクロマトグラム

なお、EE2にはエチニル基の炭素原子を $^{13}C$ に置き換えたEE2-ethynyl- $^{13}C_2$ も販売されているが、ネイティブと2Daしか質量差が無く、ネイティブには構造中20個も炭素原子があり、自然由来の $^{13}C$ と思われる295.2+2Daの質量数のものも含まれているため、標準液の濃度を高くした際、 $^{-13}C_2$ 体サロゲートの応答値が上昇する現象が起きたため利用することは出来なかった。

次に、E3- $d_8$ のクロマトグラムを図6に、E3-2,3,4- $^{13}C_3$ のクロマトグラムを図7に示す。

測定濃度10 µg/Lは、実際の添加濃度より10倍濃い設定ではあるが、APCI測定時には- $d_8$ 体からネイティブの定量及び確認イオンが検出された。-2,3,4- $^{13}C_3$ 体からは、ネイティブのピークは検出されなかったため、E3のサロゲートには-2,3,4- $^{13}C_3$ 体を使用することとした。

### 3-2 Oasis HLB Plus 洗浄液の検討結果

各メタノール濃度の洗浄液での漏出結果を表1

に示す。メタノール/精製水(50:50, v/v)において洗浄液量が10 mLを超えるとE3が漏出することが判明した。この結果より、Oasis HLB Plusの洗浄は、10 mL以上洗浄しても漏れない、メタノール/精製水(40:60, v/v) 10 mLとすることとした。

### 3-3 AFFINIMIP SPE Estrogens 洗浄液の検討結果

各アセトニトリル濃度の洗浄液による漏出結果を表2に示す。また、各メタノール濃度の洗浄液による漏出結果を表3に示す。表2及び表3の結果から、対象物質がほぼ100%で回収されており、AFFINIMIP SPE Estrogensにて捕捉されていることも確認できた。

洗浄液をアセトニトリル溶液10 mLとした場合、10%を超えるとエストリオールが漏出するが、メタノール溶液10 mLの場合、30%までであれば漏出を防げるため、有機溶媒濃度を高くできるメタノール/精製水(30:70, v/v) 10 mLとした。

表1 Oasis HLB Plus 洗浄液漏出率

洗浄液組成 (v/v)		洗浄量 (mL)	漏出率 (%)			
メタノール(%)	精製水(%)		17β-エストラジール	17α-エチルエストラジール	エストロン	エストリオール
10	90	0-10	0.0	0.0	0.0	0.0
		10-20	0.0	0.0	0.0	0.0
20	80	0-10	0.0	0.0	0.0	0.0
		10-20	0.0	0.0	0.0	0.0
30	70	0-10	0.0	0.0	0.0	0.0
		10-20	0.0	0.0	0.0	0.0
40	60	0-10	0.0	0.0	0.0	0.0
		10-20	0.0	0.0	0.0	0.0
50	50	0-10	0.0	0.0	0.0	0.0
		10-20	0.0	0.0	0.0	1.1
60	40	0-10	0.0	0.0	0.0	24.6
		10-20	0.0	0.0	0.0	48.9

表2 AFFINIMIP SPE Estrogens 洗浄液溶出率(アセトニトリル)

洗浄液組成 (v/v)			洗浄量 (mL)	溶出率 (%)			
アセトニトリル (%)	精製水 (%)			17β-エストラジール 合計	17α-エチルエストラジール 合計	エストロン 合計	エストリオール 合計
10	90	10	0.0	0.0	0.0	0.0	
20	80	10	0.0	0.0	0.0	3.3	
30	70	10	1.8	0.0	0.0	85.2	
40	60	10	68.2	33.3	43.8	7.9	
50	50	10	26.2	60.7	51.8	0.0	
60	40	10	1.0	3.1	1.9	0.0	
100	0	10	0.0	0.0	0.0	0.0	

17β-エストラジール合計: 97.2  
 17α-エチルエストラジール合計: 97.2  
 エストロン合計: 97.4  
 エストリオール合計: 96.4

表3 AFFINIMIP SPE Estrogens 洗浄液溶出率(メタノール)

洗浄液組成 (v/v)			洗浄量 (mL)	溶出率 (%)			
メタノール (%)	精製水 (%)			17β-エストラジール 合計	17α-エチルエストラジール 合計	エストロン 合計	エストリオール 合計
10	90	10	0.0	0.0	0.0	0.0	
20	80	10	0.0	0.0	0.0	0.0	
30	70	10	0.0	0.0	0.0	0.0	
40	60	10	0.0	0.0	0.0	0.5	
50	50	10	0.0	0.0	0.0	9.4	
60	40	10	1.8	1.1	0.5	48.9	
100	0	10	94.8	96.8	103	36.2	

17β-エストラジール合計: 96.6  
 17α-エチルエストラジール合計: 98.0  
 エストロン合計: 103  
 エストリオール合計: 94.9

### 3-4 AFFINIMIP SPE Estrogens 溶出溶媒の検討結果

アセトニトリルの場合の結果を表 4 に示す。メタノールの場合を表 5 に示す。

アセトニトリル 100%では E1 がわずかに溶出されるものの、他の 3 物質は溶出されなかった。表 2 の結果とは異なるが、水分の有無によって溶出の状況が異なると考えられる。これは固相カートリッジの乾燥が不十分であると溶出し、十分であると溶出しないこととなる。

メタノールの場合、溶媒量 5.0 mL までで 4 物質をほぼ溶出可能であったため、これを溶出溶媒と

することとした。

### 3-5 分子鑄型充填剤効果の検討結果

各サロゲートの回収率の結果を表 6 に示す。AFFINIMIP SPE Estrogens の方が良好であったが、Oasis HLB Plus を用いた場合の回収率も 50~120% の範囲にあり、手法としては利用可能と言える。

固相の違いにより回収率に差が生じた原因は、サロゲート回収率の差ではなく、試験液中の夾雑物によるイオン化抑制の差と考えられる。APCI 測定は、ESI 測定より夾雑物の影響を受けにくい、夾雑物がより少ない方が結果は良好になる。また、

表 4 AFFINIMIP SPE Estrogens 溶出溶媒量の検討結果 (アセトニトリル)

溶出溶媒	溶出量 (mL)	溶出率 (%)			
		17β-エストラジオール 合計	17α-エチルエストラジオール 合計	エストロン 合計	エストリオール 合計
アセトニトリル	0.0 - 2.5	0.0	0.0	0.2	0.0
	2.5 - 5.0	0.0	0.0	0.7	0.0
	5.0 - 7.5	0.0	0.0	3.1	0.0
	7.5 - 10	0.0	0.0	9.8	0.0
		0.0	0.0	13.8	0.0

表 5 AFFINIMIP SPE Estrogens 溶出溶媒量の検討結果 (メタノール)

溶出溶媒	溶出量 (mL)	溶出率 (%)			
		17β-エストラジオール 合計	17α-エチルエストラジオール 合計	エストロン 合計	エストリオール 合計
メタノール	0.0 - 2.5	94.4	88.9	85.5	97.9
	2.5 - 5.0	1.9	1.9	8.7	0.9
	5.0 - 7.5	0.2	0.0	0.7	0.0
	7.5 - 10	0.0	0.0	0.0	0.0
		96.3	90.8	94.2	98.8

表 6 下水処理水 2000 倍濃縮時のサロゲート回収率結果 (n=1)

試料	サロゲート物質	回収率 (%)	
		AFFINIMIP SPE Estrogens	Oasis HLB Plus
下水処理水	17β-エストラジオール- <sup>13</sup> C <sub>3</sub>	74.8	59.1
	17α-エチルエストラジオール- <sup>13</sup> C <sub>3</sub>	70.8	55.8
	エストロン- <sup>13</sup> C <sub>3</sub>	85.8	69.2
	エストリオール- <sup>13</sup> C <sub>3</sub>	89.2	63.0

AFFINIMIP SPE Estrogens による分子鑄型固相による抽出はクリーンアップ効果があると言える。

参考までに試験液(抽出液)の着色状況を図8に示す。AFFINIMIP SPE Estrogens による試験液は薄い緑色、Oasis HLB Plus による試験液は濃い黄色であった。

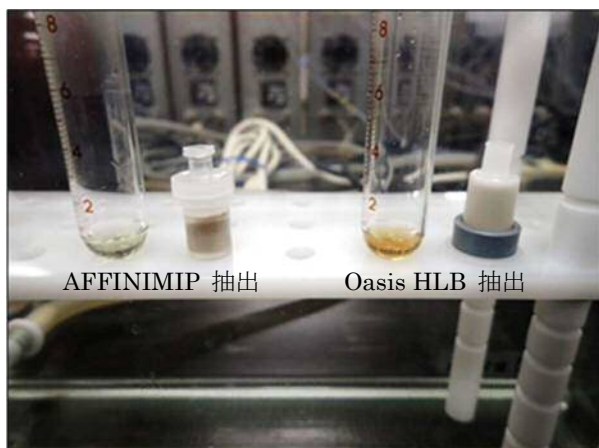


図8 試験液の着色状況

### 3-6 河川水 4000 倍濃縮の検討結果

測定したクロマトグラムを図9に示す。河川水ブランクと言える結果となるが、対象4物質のベースラインは測定強度が大きく、0.02 µg/L 程度の物質を検出するのは困難であることが判明し、固相抽出による濃縮は2000倍濃縮とした。

### 3-7 MDL の検討結果

MDL と MQL の結果を表7に示す。EE2 については目標の 0.00001 µg/L にわずかに及ばなかったが、ほぼ同等の感度が得られた。なお、E3 のモニターイオンは、実試料の測定で  $m/z$  287.2 > 143.1 の方が夾雑物の影響を受けにくかったため変更した。各モニターイオンについては表8に示す。

## 4. 結 語

本検討により、エストラジオール類の環境水中濃度をほぼ目標の検出下限値で測定可能となった。

また、別途実施した分解性スクリーニング試験、保存性試験については良好であり問題はなかった。

以上の検討結果より、固相抽出方法は図2のフローチャートとすることで、環境水中濃度を感度

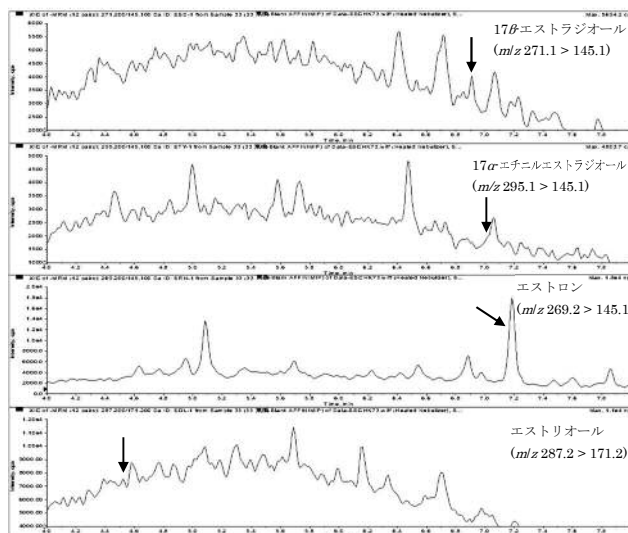


図9 河川水 4000 倍濃縮液のクロマトグラム

表7 MDL 及び MQL 結果

物質名	試料量 (L)	最終液量 (mL)	MDL (ng/L)	MQL (ng/L)
E2	1.0	0.50	0.0050	0.013
EE2	1.0	0.50	0.011	0.029
E1	1.0	0.50	0.0048	0.012
E3	1.0	0.50	0.0095	0.024

表8 モニターイオン

E2	(定量用)	271.2→145.1(CE-55)
	(確認用)	$m/z$ 271.2→183.1(CE-55)
	$-2,3,4-^{13}C_3$	274.1→148.1(CE-55)
EE2	(定量用)	295.2→145.1(CE-55)
	(確認用)	$m/z$ 295.2→159.1(CE-55)
	$-2,3,4-^{13}C_3$	298.1→148.1(CE-55)
E1	(定量用)	269.2→145.1(CE-50)
	(確認用)	$m/z$ 269.2→159.1(CE-50)
	$-2,3,4-^{13}C_3$	272.1→148.1(CE-50)
E3	(定量用)	287.2→143.1(CE-70)
	(確認用)	$m/z$ 287.2→171.2(CE-50)
	$-2,3,4-^{13}C_3$	290.1→174.1(CE-50)

よく測定できる分析方法を確立した。

## 5. 文 献

- 1) 折原智明, 木原敏博, 箕岡健輔 他: 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), 札幌市衛生研究所年報, 48, 58-62, 2021