報 文

液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法による河川水及び 下水放流水中の 17β -エストラジオール分析法の開発

田嶋 晴彦^{®*}, 辻村 和也^{*}, 山口 政俊^{**}

Development of an analytical method of 17β -estradiol in river water by liquid chromatography/tandem mass spectrometry

Haruhiko TAJIMA, Kazunari TSUJIMURA^{*} and Masatoshi YAMAGUCHI^{**}

^{*}Chemicals Evaluation and Research Institute, Kurume Laboratory, 19-14, Chuoh-machi, Kurume-shi, Fukuoka 830-0023

^{**}Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University, 8-19-1, Nanakuma, Johnan-ku, Fukuoka 814-0180

(Received 19 June 2000, Accepted 10 August 2000)

A sensitive method for the determination of 17β -estradiol, estrone and estriol in river water has been developed, based on SPE cartridge extraction and HPLC coupled with negative electron ion spray tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) in the multiple reaction monitoring mode (MRM). An internal standard calibration method using a stable isotopic labeled 17β -estradiol was employed for quantitation. The limit of detection (LOD) for these estrogens in river water was 0.3 ng/l. Good linearities of the calibration curve were obtained in the concentration range from 0.4 ng/l to 80 ng/l. The correlation coefficients were >0.995 for all estrogens. The recoveries of these estrogens were 65.9~96.9%. The relative standard deviations were 5.8~11.1% for 0.4 ng/l, 8.1~11.8% for 0.8 ng/l, 4.2~12.6 ng/l for 1.6 ng/l. Using this method, the behavior and occurrence of estrogens in river water and the effluent of sewage treatment plants were investigated in Chikugo-river (Kyusyu, Japan). A few estrogens were detected in the river water by LC/MS/MS, and the levels were ND-0.6 ng/l. However, in all samples of sewage-treatment plants, 17β -estradiol and estrone were detected, and the levels were 0.5~4.2 ng/l (17β -estradiol) and 5.3~35.1 ng/l (estrone). On the other hand, 17β -estradiol was detected in most samples, including river water, by ELISA (17/18); the levels in sewage-treatment plants were 6.0~13.5 times higher than those by LC/MS/MS. The differences in these results might be due to the cross reaction of ELISA.

Keywords : 17β -estradiol; estrone; estriol; estrogen; river water; sewage treatment plant; LC/MS/MS; ELISA.

1 緒 言

近年、環境に放出されたある種の化学物質が、ヒトや野生生物の内分泌機能に障害を与えるのではないかという問題が大きな関心を集めている。環境庁及び建設省は、平成10年度から内分泌攪乱作用が疑われている化学物質につ

いて、全国の河川、湖沼、下水処理場等における実態調査を実施している。その調査の中でフタル酸エステル類、ビスフェノール A、ノニルフェノール等が高い検出率で検出されたが、意外なことに最も多くの地点から検出されたのは、人畜由来の天然ホルモンである 17β -エストラジオールであった¹⁾²⁾。 17β -エストラジオールは低濃度でも内分泌攪乱化学物質と比較すれば非常に強いホルモン作用を持つと考えられており、その正確な定量法の開発と環境実態調査は、環境に存在する他の内分泌攪乱化学物質のリスク

^{*} (財)化学物質評価研究機構久留米事業所: 830-0023 福岡県久留米市中央町 19-14

^{**} 福岡大学薬学部: 814-0180 福岡県福岡市城南区七隈 8-19-1

評価にとっても重要な課題である。

環境中 17 β -エストラジオールの定量法は、酵素抗体法 (ELISA 法)³⁾ やガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC/MS) がある^{4)~7)}。現在、その簡便さから ELISA 法が主に用いられている⁸⁾。しかし、ELISA 法は本来臨床検査の方法であり、環境試料中の妨害物質についてはよく分かっておらず、交差反応や酵素活性阻害などの影響で、実際の 17 β -エストラジオール濃度より高い濃度を示すことが懸念されている。また、環境中に存在する低濃度レベルでの測定精度の問題もある。一方、GC/MS 法は誘導体化が必要であり、クリーンアップなどの前処理の煩雑さが問題として挙げられる。

更に、環境中に存在するエストロゲンは 17 β -エストラジオール (E2) だけでなく、その代謝物であるエストロン (E1) やエストリオール (E3) もホルモン作用を持つことから、これらも同時に調査する必要がある。

そこで、著者らは近年インターフェース部分の開発や付随する技術の向上により、高感度な分析が可能となった高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計 (LC/MS/MS) に着目した。LC/MS/MS による 17 β -エストラジオールの分析は尿や血しょうでの例はあるが⁹⁾¹⁰⁾環境実態調査への応用例はほとんどない。著者らは LC/MS/MS 法による環境中 17 β -エストラジオール、エストロン及びエストリオールの同時分析法の開発を試みた。更に開発した分析法を用い、筑後川水系の河川水及び下水処理場放流水中の 17 β -エストラジオール等の実態調査を行い、ELISA 法との比較も行ったので報告する。

2 実験

2.1 試薬

17 β -エストラジオールはメルク製、エストロン、エストリオールは和光純薬製、17 β -エストラジオール- d_4 は Cambridge Isotope Laboratories 製をそれぞれ用いた。メタノール、 n -ヘキサン、酢酸エチル、塩酸、水酸化ナトリウム、トリエチルアミン、ジメチルスルホキシド、酢酸は和光純薬製を使用した。オクタデシル (C18) 固相抽出 (SPE) カートリッジ (Bondelute C18HF, Megabond elute) は Varian 製を、ガラスフィルターはミリポア製を使用した。ELISA キットは Assay Design 製を用いた。

2.2 装置及び測定条件

LC/MS/MS は Micromass 製四重極型 LC/MS/MS Quattro-LC を使用した。HPLC は Hewlett-Packard 1100 システムを用いた。カラムは L-カラム ODS (150 mm $\times$ 2.1 mm i.d., 5 μ m 化学物質評価研究機構製) を用い、移動相組成は、メタノール/アセトニトリル/水混液 (3:1:2 v/v) とした。流量は 0.2 ml/min とし、ポストカラムで

10% (v/v) トリエチルアミン/メタノールを 0.015 ml/min で添加した。試料注入量は 20 μ l とした。

測定はエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法ネガティブモードで行った。コーン電圧 70 V (内標準物質は 50 V)、衝突エネルギー 40 eV、イオン源温度 100 $^{\circ}$ C、Desolvation 温度 250 $^{\circ}$ C とした。測定モードは、マルチプルリアクションモニタリング (MRM) で行った。測定質量数は、 m/z 271 $\rightarrow$ 144 (17 β -エストラジオール)、 m/z 275 $\rightarrow$ 146 (内標準物質 17 β -エストラジオール- d_4) とした。また、確認質量数として m/z 271 $\rightarrow$ 182 (17 β -エストラジオール) を設定した。エストロン、エストリオールについては、それぞれコーン電圧 40 V、衝突エネルギー 40 eV で測定し、測定質量数は m/z 269 $\rightarrow$ 145 (エストロン)、 m/z 287 $\rightarrow$ 171 (エストリオール) とした。

2.3 分析法のバリデーション

測定法の確かさを確認するため、3 濃度、 $n = 4$ で添加回収試験を行い、回収率、相対標準偏差 (RSD)、検出限界値を求めた。また、17 β -エストラジオール、エストロン及びエストリオールが本法により分離・分析できることを確認した。

2.4 試料の採取

1999 年 3 月、九州の一級河川である筑後川の上流から下流まで計 13 地点について河川水を採水した。また、17 β -エストラジオールの発生源と考えられる下水処理場放流口付近の 5 地点についても採水した。採水地点を Fig. 1 に示す。

2.5 試料の前処理方法

試料の前処理は、環境庁外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル⁷⁾を参考にして以下のように行った。試料水 500 ml をガラスフィルターを用いて汙過した。残留物に酢酸塩緩衝液 (pH 5)/メタノール (9:1) 10 ml を加え 10 分間超音波抽出を行った。抽出液を再度汉過し、この汉液と最初の汉液を合わせ、C18 固相抽出を行った。精製水及びヘキサンで順次洗った後、酢酸エチル/メタノール (5:1 v/v) 3 ml で溶出した。溶出液を窒素気流下で乾固し、1 M 塩酸メタノール 0.5 ml を加え 80 $^{\circ}$ C、20 分間密封加熱した。冷却後、1 M 水酸化ナトリウム水溶液 0.5 ml で中和し、塩化ナトリウム 3 g、精製水 3 ml、酢酸エチル 3 ml を加え振り混ぜ抽出した。酢酸エチル相を分取し、精製水 5 ml で洗浄した。酢酸エチル相を窒素気流下で乾固後、メタノール 1 ml を加え容器内を洗浄し、再度乾固した。残留物を内標準溶液 (100 ng/ml, HPLC 移動相溶液) 0.1 ml に溶かし、これを LC/MS/MS 分析用試料とした。また、同様に処理した残留物をジメチルスルホキシド

Fig. 1 Location of sampling sites in Chikugo river

に溶かし ELISA 測定用試料とした。

3 結果と考察

3.1 分析条件の最適化

LC/MS/MS 法のイオン化は ESI 及び大気圧化学イオン化 (APCI) について, それぞれポジティブモード, ネガティブモードで検討した。17 β -エストラジオールは ESI のネガティブモードが最も高感度であった。HPLC 移動相にメタノールを添加すると, 17 β -エストラジオールがイオン化しやすくなることが分かったが, 水/メタノール系だとカラム圧が高くなるため, それらを考慮して移動相組成を決定した。また, LC/MS/MS は試料中マトリックスによって感度変動をうけやすいため, イオン化を安定させるためにポストカラムで 10% (v/v) トリエチルアミン/メタノールを添加した。

3.2 分析法バリデーション

Table 1 に 17 β -エストラジオール, エストロン及びエストリオールの添加回収試験の結果を示す。17 β -エストラジオールで, 回収率 81.0~95.8%, 相対標準偏差 (RSD) 値 5.8~8.1%, エストロンで回収率 83.3~96.9%, RSD 値 4.7~11.8%, エストリオールで回収率 65.9~76.9%, RSD 値 11.1~12.6% であった。また, 17 β -エストラジオールにおける河川水添加回収 (5.0 ng/l) は 80.1%, RSD 値は 5.0% であった。これらの結果を基に各濃度における測定値の標準偏差を求め, 次式により検出力 D を求めた¹¹⁾。

$$D = t(n-1, 0.05) \cdot \left(\frac{\sigma_R}{\sqrt{n}} \right) \cdot (dC/dR)$$

Table 1 Recoveries of estrogens from a sample solution prepared by purified water

Estrogens	Sample concentration/ ng l ⁻¹	Number	Recovery, %	RSD
17 β -Estradiol	0.4	4	95.8	5.8
	0.8	4	81.0	8.1
	1.6	4	82.2	4.2
	5.0*	4	80.1	5.0
Estrone	0.4	4	83.3	9.9
	0.8	4	96.9	11.8
	1.6	4	85.6	4.7
Estriol	0.4	4	76.9	11.1
	0.8	4	65.9	11.6
	1.6	4	68.0	12.6

* river water

但し, σ_R : 標準偏差, C : 濃度, R : 応答値。検出力の 3 倍を検出限界値とした。各物質の検出限界は, 共に 0.3 ng/l であり, 従来行われている ELISA 法と同程度であった。

3.3 河川水及び下水処理場放流水中の 17 β -エストラジオール濃度測定

本法により筑後川河川水及び下水処理場放流水中の 17 β -エストラジオール濃度を測定した (Fig. 2 及び Table 2)。また, 同ポイントでの ELISA 法による測定結果も同様に示した。

筑後川河川水試料 13 点のうち, LC/MS/MS 法で検出されたのは 3 地点のみで, その濃度も 1 ng/l 以下と低濃度であった。上流の天ヶ瀬付近は放牧が盛んであり, その影響で 17 β -エストラジオールが検出されることが予想さ

Fig. 2 17 β -estradiol levels in Chikugo riverTable 2 Comparison of 17 β -estradiol concentration in surface waters detected by LC/MS/MS and by ELISA

Point	LC/MS/MS/ ng l ⁻¹	ELISA/ ng l ⁻¹	Ratio
Tsuetate	N.D.	0.9	—
Kusugawa	N.D.	1.0	—
Omiyabashi	N.D.	1.2	—
Amagase	N.D.	0.6	—
Mikumaohashi	N.D.	N.D.	—
Shimauchi	N.D.	1.3	—
Kawashita	N.D.	1.8	—
Arase	N.D.	0.8	—
Katanose	0.5	0.4	0.8
Kamishirobashi	N.D.	0.8	—
Senoshita	N.D.	2.5	—
Rokugorobashi	0.6	1.3	2.2
Wakatu	0.5	0.4	0.8
Hitashi s.p.	1.1	6.8	6.2
Homangawa s.p.	0.5	3.8	7.6
Tosushi s.p.	1.1	8.0	7.3
Chuo s.p.	1.1	14.9	13.5
Nanbu s.p.	4.2	25.3	6.0

s.p.: sewage plant

れたが、不検出であった。検出された地点のうち、下流域の六五郎橋と若津は久留米市の2箇所の下水処理場放流水の影響と、この地域は下水道が普及していないため生活排水の一部が直接河川に流入することが原因と考えられる。一方 ELISA 法では、13 地点のうち 12 地点から検出され、その濃度も 0.6~2.5 ng/l と LC/MS/MS 法に比べて同等か高い値を示した。

下水処理場放流口付近の試料 5 点からは、LC/MS/MS

Table 3 Concentrations of 17 β -estradiol and estrone of surface waters released from sewage plants

Point	Estrone/ ng l ⁻¹	17 β -Estradiol/ ng l ⁻¹	Ratio*
Hitashi s.p.	11.5	1.1	10.5
Homangawa s.p.	5.4	0.5	10.8
Tosushi s.p.	5.3	1.1	4.8
Chuo s.p.	22.1	1.1	20.1
Nanbu s.p.	35.1	4.2	8.4

s.p.: sewage plant. * Value of 17 β -Estradiol = 1

法及び ELISA 法とも全地点から 17 β -エストラジオールが検出された。しかし、ELISA 法での定量値は LC/MS/MS 法の定量値に比較して 6.0~13.5 倍と高い値を示した。

また、エストラジオールを定量した下水処理場放流口付近の試料 5 点について、LC/MS/MS を用いてエストロンを定量し、17 β -エストラジオール定量値と比較した (Table 3)。測定の結果、下水処理場放流口付近の試料から、17 β -エストラジオール濃度の 4.8~20.1 倍のエストロンが検出された。一方、エストリオールは全地点から検出されなかった。

3・4 LC/MS/MS 法及び ELISA 法における 17 β -エストラジオールと他のエストロゲンとの交差反応

下水処理場放流水等の環境試料には 17 β -エストラジオール以外にもエストロン、エストリオール等のエストロゲンが存在すると考えられる。これらのエストロゲンは構造、化学的性質が 17 β -エストラジオールと類似している

Fig. 3 Multiple reaction monitoring(MRM) chromatogram of estriol, estrone and 17β -estradiol

Table 4 Cross reactivity for estrone

Estrone concentration/ ng l^{-1}	Measured 17β -Estradiol concentration in the 17β -Estradiol ELISA/ ng l^{-1}
10	0.62

物が多く、 17β -エストラジオールを定量する際に妨害することが予想される。

そこで、今回はエストロゲン活性が強く、環境中での存在が示唆されているエストロン及びエストリオールについて、LC/MS/MS 法及び ELISA 法における妨害について検討した。

Fig. 3 に 17β -エストラジオール、エストロン及びエストリオール混合標準液の MRM クロマトグラムを示す。本法において構造の似ているエストリオール、エストロン、 17β -エストラジオールは、クロマトグラム上で分離されており、かつ各々は測定質量に干渉しないことから十分分離、分別定量できることが分かった。

17β -エストラジオール測定 ELISA 法キットにおけるエストロンの交差反応を Table 4 に示す。10 ng/l のエストロンを ELISA 法キットで定量すると、0.62 ng/l の 17β -エストラジオールとして定量された。

ここで、LC/MS/MS で定量されたエストロン量と ELISA 法におけるエストロンの交差反応から、ELISA 法で定量された 17β -エストラジオール定量値に占めるエストロンの寄与を計算し Fig. 4 に示す。ELISA 法で定量された値のうち、 17β -エストラジオールは 7.4~16.2%，エストロンは 4.1~10.5%，その他未知のエストロゲン又は妨害物質による ELISA 酵素反応阻害が 69.3~85.0% であると推定された。

Fig. 4 Cross reactivity for ELISA

3.5 まとめ

(1) LC/MS/MS 法による環境水質中の 17β -エストラジオール分析法を確立した。

(2) 本法は従来の ELISA 法と同等の高感度分析法であり、かつ ELISA 法で問題となるエストロンやエストリオールなどのエストロゲンの妨害も受けない高選択的な分析法である。

(3) 本法は GC/MS 法のように誘導体化の必要もなく、前処理も簡便であり、再現性、分析精度も良好である。

(4) 筑後川河川水の実試料の定量も実行的に行うことができた。

(5) エストロン、エストリオールも同時分析できる。

(6) ELISA 法は LC/MS/MS 法に比べて高い定量値を示した。その原因の一つとしてエストロンとの交差反応が示唆された。

(7) LC/MS/MS 法は ELISA 法の欠点を補う方法としてより広範囲な環境調査に応用できると考えられる。

本研究は、新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の委託試験で開発した分析方法の一部を応用した。

(1999 年 7 月, 第 8 回環
境化学討論会で一部発表)

文 献

- 1) 是沢裕二: 水道公論, **35**, 33 (1999).
- 2) 西村孝彦, 那須 基, 岡本達也, 後藤雅子: 第 34 回日本水環境学会年会講演集, p. 306 (2000).
- 3) M. L. Johnson, A. Salveson, L. Holmes, M. S. Denison, D. M. Fry: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **60**, 609 (1999).
- 4) H. B. Lee, T. E. Peart: *J. AOAC Int.*, **81**, 1209 (1998).
- 5) 山本耕司, 角谷直哉, 福島 実, 神浦俊一: 第 34 回日本水環境学会年会講演集, p. 9 (2000).
- 6) 中村貞夫, 滝埜昌彦, 代島茂樹: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **49**, 181 (2000).
- 7) 環境庁水質保全局: 外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル, (1998).
- 8) H. Zhang, J. Henion: *Anal. Chem.*, **71**, 3955 (1999).
- 9) R. Draisci, L. Palleschi, E. Ferretti, C. Marchiafava, L.

- Lucentini, P. Cammarata: *Analyst* (London), **123**, 2605 (1998).
10) A. Tjernberg, PO. Edlund, B. Noren: *J. Chromatogr. B*, **715**, 395 (1998).
11) 環境庁環境保全部: 平成9年度 化学物質と環境, p. 113 (1988).

要 旨

高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 (LC/MS/MS) による環境中の 17β -エストラジオール, エストロン及びエストリオールの同時分析法を開発した. この方法は環境水質試料を固相抽出 (SPE) カートリッジで抽出し, ネガティブエレクトロイオンスプレーモードで LC/MS/MS によりマルチプルリアクションモニターモードで測定するものである. 内標準物質として同位体ラベル化した 17β -エストラジオールを用いた. 検量線は $0.4 \sim 80$ ng/l の濃度範囲で良い直線性を示した (相関係数 0.995 以上). 検出限界値 (LOD) は 0.3 ng/l で, 添加回収試験において回収率は $65.9 \sim 96.9\%$, 相対標準偏差 (RSD) はそれぞれ添加濃度 0.4 ng/l で $5.8 \sim 11.1\%$, 0.8 ng/l で $8.1 \sim 11.8\%$, 1.6 ng/l で $4.2 \sim 12.6\%$ であった. 本法を用いた環境水中 17β -エストラジオールの測定を九州の一級河川である筑後川について行った. その結果, ほとんどの地点で検出限界以下であった. しかし, 下水処理場放流口付近からは 17β -エストラジオールが $0.5 \sim 4.2$, エストロンは $5.3 \sim 35.1$ ng/l 検出された. 一方, 同試料を酵素抗体法 (ELISA 法) で 17β -エストラジオール測定を行うと, LC/MS/MS で測定した値の $6.0 \sim 13.5$ 倍高い値を示した. これは ELISA の交差反応によるものと考えられた.