環境水中のジエチルスチルベストロールの高感度分析法

長谷川 瞳¹⁾, 渡辺 正敏²⁾, 鈴木 茂³⁾¹⁾名古屋市環境科学調査センター (〒457-0841 愛知県名古屋市南区豊田5-16-8)²⁾前 名古屋市環境科学調査センター (〒457-0841 愛知県名古屋市南区豊田5-16-8)³⁾中部大学大学院応用生物学研究科 (〒487-8501 愛知県春日井市松本町1200)

[平成24年 6 月18日受付, 平成24年12月25日受理]

An Analytical Method for the Determination of Trace Levels of Diethylstilbestrol in Environmental Water

Hitomi HASEGAWA¹⁾, Masatoshi WATANABE²⁾ and Shigeru SUZUKI³⁾¹⁾Nagoya City Environmental Science Research Institute
(5-16-8 Toyoda, Minami, Nagoya, Aichi 457-0841)²⁾Pre-Nagoya City Environmental Science Research Institute
(5-16-8 Toyoda, Minami, Nagoya, Aichi 457-0841)³⁾Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Chubu University
(1200 Matsumoto, Kasugai, Aichi 487-8501)

[Received June 18, 2012; Accepted December 25, 2012]

Summary

A liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC/MS/MS) method has been developed for highly sensitive determination of diethylstilbestrol (DES) in water.

Two grams of ascorbic acid and five nano grams of diethylstilbestrol-*d8* as the surrogate were added to every 2000 mL of water sample. The sample was filtrated with glass fiber filter (GS25) and adjusted to pH2. 5 with 6 mol/L of HCl followed by solid phase extraction with a cyclohexyl silica cartridge (InertSep CH). The fraction eluted with 5 mL of methanol was passed through a multilayer solid phase extraction cartridge (GC/SAX/PSA) to remove matrices. The analyte was eluted from the cartridge with 12 mL of methanol. The elute was concentrated to volume approximately 0. 25 mL in a test tube at 40 °C in water bath under nitrogen gentle stream, and then it was filled up to 0. 5 mL with pure water for LC/MS/MS measurement.

Negative electrospray ionization (ESI-negative) was used to ionize diethylstilbestrol and the internal standard (i.e. diethylstilbestrol-*d8*). The determination was performed by the selected-reaction-monitoring (SRM) method using precursor/product ion transition m/z 267. 45 to 237. 41 for diethylstilbestrol and m/z 275. 43 to 245. 47 for diethylstilbestrol-*d8*.

The method detection limit (MDL) and the method quantification limit (MQL) are 0. 005 ng/L and 0. 013 ng/L, respectively. The average recoveries ($n = 5$) from river water and sea water spiked with 0. 5 ng of diethylstilbestrol are 104% (RSD 4. 0%) and 106% (RSD 2. 9%), respectively.

In all the river waters and sea waters sampled in Nagoya city, the concentrations of diethylstilbestrol were below the MDL.

Key words: diethylstilbestrol, LC/MS/MS, multilayer solid phase extraction

1. はじめに

ジエチルスチルベストロール (Diethylstilbestrol, DES) は、かつて流産防止剤などに用いられてきた合成女性ホルモンの薬剤で、IARC 発ガン性リスクの Group 1 に分類されている。1938 年にイギリスで合成され、女性ホルモン様作用が発見されて以降、切迫流産防止剤としてだけでなく、更年期障害・老人性陰炎・不妊症に対し

でも広く用いられてきた¹⁾。アメリカにおいては、1938 年から 1971 年にかけて 500 ~ 1000 万人に処方されたとも言われている。1970 年代以降、胎児期に DES の暴露を受けた女性に陰腺ガンや子宮形成不全などの女性器障害が発生²⁾、同男性についても生殖器異常の確率が高い³⁾との報告があり、DES 使用によるヒトへの影響が懸念されるようになった⁴⁻⁶⁾。その後、アメリカ食品医薬品局 (FDA) は 1971 年に妊婦に対する DES の使用を禁止し、厚生省 (現厚生労

働省)は同年12月、薬務局長名で、DESまたはその誘導体を含む製剤(外用剤除く)は、「妊娠中は使用しないこと、また、効能の事項に『流産、習慣性流産』など妊娠に使用されるおそれのある表示があれば削除するように」という通知を出した。

DESのように女性ホルモン様作用を持つステロイドホルモン類は、極微量であっても生物に影響を与える可能性が高いとされるため⁷⁾、環境中における微量のDESの高感度分析が求められる。日本においては、DESの環境基準値は設定されていないが、厚生労働省が定める残留農薬等ポジティブリスト制度では、食品中のDESは不検出であること、と設定されており、その検出下限値は0.0005 ppm (500 ng/L)と定められている。また、環境省は、既報の毒性情報に基づいて⁸⁾、環境水中のDESをより高感度で測定すべきとの方針を出し、検出下限値を0.01 ng/Lと設定している。

これまで、GC/MSやLC/MSにより、環境中における種々のステロイドホルモン類の測定がなされ、ng/L～μg/Lレベルでの検出が報告されている^{9,10)}。DESについては、環境水や下水処理水から、溶媒抽出法やC18などによる固相抽出法^{11,12)}により、検出下限値数～数百ng/Lレベルの報告がなされている¹¹⁻¹⁵⁾が、環境省の方針に対応する検出下限値を満足するには、試料濃縮率や精製方法の改良が求められる。

著者等は、試料のクリーンアップ方法、大量試料導入方法を検討し、環境水中のDESの高感度分析方法(検出下限値0.01 ng/L)を開発し、環境を調査した。ここでは、開発した分析方法の要素技術の検討結果および、名古屋市内で行った環境調査結果について報告する。

2. 実験

2. 1 試薬

DES(純度98+%, HPLC用)、アセトン(残留農薬試験用)、ヘキサン(残留農薬試験用)、1 mol/L酢酸アンモニウム溶液(LC/MS用)は和光純薬(株)(大阪)製、DES-*d*₈(純度98.7%)はCDN isotopes社製(Quebec, Canada)を使用した。メタノール(LC/MS用)は関東化学(株)(東京)製を使用した。

DES標準原液、標準液は、DESをメタノールで希釈して作製した。DES-*d*₈も同様にしてメタノールで希釈して内標準液を作製した。内標準液は、各検量線用標準液および試験液中に10.0 ng/mLになるように添加した。

2. 2 器具および装置

水質試料からの抽出には、シクロヘキシルシリカカートリッジ(InertSep CH 500 mg, GL Sciences 社, 東京)、試験液のクリーンアップにはグラファイトカーボン/強陰イオン交換/極性相互作用+陰イオン交換混合固相(InertSep GC/SAX/PSA 500 mg/500 mg/500 mg, GL Sciences 社, 東京)を使用し、固相への通液はコンセントレーター(Waters 社, Milford, MA, USA)により行った。濃縮操作は窒素吹付装置を用いて行った。

LC-MS測定はAlliance2695/Micromass Quattro micro API(Waters 社, Milford, MA, USA)を用い、定量はESI-Negative-SRMモードにより行った。測定条件を以下に示す。

[LC条件]

LC: Alliance2695

カラム:XBridge™ Shield RP18 3.5 μm 2.1 × 100 mm (Waters 社)
移動相:A: 2 mol/L酢酸アンモニウム水溶液 B: メタノール
0～5 min A: 70→20 B: 30→80 linear gradient
5～20 min A: 20 B: 80

20～22 min A: 20→70 B: 80→30 linear gradient
22～30 min A: 70 B: 30
流量: 0.2 mL/min
カラム温度: 40℃, 注入量: 100 μL

[MS条件]

MS: Micromass Quattro micro API

Cone voltage: 40 V, Collision Energy: 30 eV

Capillary voltage: 3 kV, Source Temp.: 120℃,

Desolvation

Temp.: 350℃

Desolvation Gas: 700 L/hr, Cone Gas: 50 L/hr

イオン化法: ESI-Negative-SRM

モニターイオン: DES 267.45→237.41, DES-*d*₈ 275.43→245.47

2. 3 分析方法

水試料2 Lに、DESのフェノール性OH基の酸化分解を抑えることを目的としてアスコルビン酸2 gを添加し、さらにサロゲートとしてDES-*d*₈溶液(1 μg/mL)を5 μL添加後、ろ過した。ろ紙上のSSはメタノール5 mLで2回洗い込み、ろ液と合わせ、6 mol/L塩酸でpH2.5に調整した。10 mLのメタノールでコンディショニングしたInertSep CHカートリッジに、試験液を20 mL/minの速度で通水し、精製水20 mLで洗い込んだ後、15分間吸引脱水した。次いで10 mL試験管を受器として5 mLのメタノールで溶出した。溶出液はクリーンアップのため、10 mLのメタノールでコンディショニングしたInertSep GC/SAX/PSAカートリッジに、1 mL/min程度の通液速度で負荷し、12 mLのメタノールで溶出した。溶出液は40℃の水浴を備えた窒素吹き付け装置で0.25 mLまで濃縮し、精製水で0.5 mLにメスアップし、試験液とした。

なお、固相抽出後の吸引脱水は、抽出液中への水の混入を減らすことを目的として行っており、脱水時間については15～30分程度で良好であった。また、InertSep GC/SAX/PSAカートリッジからの溶出液量に関しては、検討の結果、DESを100%回収するための必要最低限のメタノール量とした。

3. 結果および考察

3. 1 分析法の定量性とその評価

3. 1. 1 検量線および装置検出下限、測定方法の検出下限、定量下限

検量線は、0.0500 ng/mLから50.0 ng/mLの濃度範囲において相関係数0.9997で十分な直線性を示した。また、「化学物質環境実態調査実施の手引き」¹⁶⁾に記載される方法に従い、検量線の最低濃度を繰り返し測定して装置検出下限(IDL)を求め、定量下限値付近の濃度を持つ試料を前処理から測定まで繰り返し行うことで、測定方法の検出下限(MDL)及び定量下限(MQL)を求めた。それらをTable. 1, 2に示す。

3. 1. 2 添加回収

精製水、河川水(庄内川)、海水(名古屋港)に、それぞれ定量下限(MQL)の20倍にあたる標準物質を添加した回収実験の結果をTable 3に示す。精製水については68.4%の回収率が得られたが、河川水、海水に関しては共に40%程度の回収率であった。これは4000倍の試料濃縮と、装置への100 μL注入によるイオン化抑制に起因すると考えられるが、相対標準偏差が小さいことから、このままでも定量的評価は可能と考えられる。また、Table 3に示した通り、DES-*d*₈により補正を行うことで定量値の確かさを確認することも可能であると判断される。なお、イオン化抑制の評価に関

する考察は、3.2.4で述べる。

3. 1. 3 試料水中における DES の保存性

河川水、海水および標準試料の DES の保存性を Table 4 に示す。試料水ではアスコルビン酸を添加した場合と無添加の場合および、試料の粗抽出液中の保存性を標準溶液と比較した。

環境水試料中の DES は、アスコルビン酸の有無に関わらず、1 週間の保存が可能であり、粗抽出液に関しては 2 週間の保存が可能であった。また、標準溶液に関しては 0.2 ng/mL という比較的低濃度であっても 1 か月は保存できた。

3. 2 分析法に関する要素技術とその評価

3. 2. 1 カラム分離

DES は *cis* 体 *trans* 体の異性体を持ち、通常の C₁₈ カラムでは 2 本のピークに分離された (Fig. 1)。後出のピークは小さく、試料中濃度が低いとピークが認識されなくなり、定量の感度と精度が低下するため、本研究では異性体を分離せず、ピークが 1 本で分析され

る Shield RP18 カラムを使用した。

3. 2. 2 固相抽出剤の違いによる回収率の評価

河川水 1 L に DES を 50 ng 添加した試料液を、2.3 に示す方法により、以下 7 種類の固相を用いて抽出した。① Oasis HLB-Plus (Waters 社製)、② Sep-Pak-Plus PS-2 (Waters 社製)、③ Aquasis-PLS-3-Jr 230 mg (GL Sciences 社製)、④ Autoprep EDS-1 250 mg (昭和電工社製)、⑤ InertSep CH 500 mg (GL Sciences 社製)、⑥ InertSep mini RP-1 230 mg (GL Sciences 社製)、⑦ Empore disk SDB-RPS 47 mm (3 M 社製)。上記固相のうち、①～⑤については、捕集後、メタノール 5 mL で溶出して、その 20 μ L を LC/MS へ注入した。結果の概要を Fig. 2 に示す。回収率を算出したところ 62.1 %～73.2 %で、大差はなかった。DES は log Kow が 5.07 程度と大きいので、①から⑤の疎水性固相の構造にほとんど依存せずに捕集、抽出されたと考えられる。また、上記①～⑦の溶出液に対して、3.2.3 に記述するクリーンアップ操作を行ったところ 10 % 程度の回収率の向上が見られた。

Table 1 IDL value of DES

compound		DES
volume of sample	(L)	2
volume of prepared sample	(mL)	0.5
concentration of prepared sample	(ng/mL)	0.05
Injection volume for LC/MS	(μ L)	100
IDL	(ng/mL)	0.0065
limit of detection calculated with IDL	(ng/L)	0.0016
standard deviation	(ng/L)	0.0017

Table 2 MDL and MQL values of DES

compound		DES
volume of sample	(L)	2
volume of prepared sample	(mL)	0.5
concentration of prepared sample	(ng/mL)	0.05
Injection volume for LC/MS	(μ L)	100
MDL	(ng/L)	0.005
standard deviation	(ng/L)	0.0013
MQL	(ng/L)	0.013

Table 3 Recoveries (%) of DES in purified water, river water and sea water

types of water samples	purified water	river water	sea water
volume of sample (L)	2	2	2
amount of spiked DES (ng)	0.5	0.5	0.5
number of experiments	2	5	5
recovery (%)	67	45	45
Surrogate recovery (%)	68	43	42
recovery (corrected with surrogate) (%)	98	104	106
R.S.D.(%)		4.0	2.9

Table 4 DES recoveries from preserved samples

	sample	concentration of prepared sample (ng/mL)	recovery(%)		
			7 days	14 days	1 month
river water	sample added with ascorbic acid	0.2	88		
	sample in plain	0.2	90		
	raw extract in methanol	0.4		95	
sea water	sample added with ascorbic acid	0.2	85		
	sample in plain	0.2	85		
	raw extract in methanol	0.4		98	
standard solution	10 times of MDL in concentration	0.2			100
	highest concentration in the working curve	50			96

いずれの固相も回収率に大差はないが、クリーンアップ後の回収率が最も高かった⑤ InertSep CH 500 mg を選択した。尚、2 L の試料を通水する際に破過することが懸念されたため、固相を2連にして同様に操作を行ったが、2段目の固相への破過は認められなかった。

3. 2. 3 クリーンアップ方法の検討

本分析では、前処理における濃縮率が高いため、試料マトリックスによるイオン化抑制が無視できない。都市の河川水から抽出される主な夾雑成分としては陰イオン (LAS)、非イオン界面活性剤 (NPnEO) 及びその分解物 (NPnEC)、クロロフィル等が考えられ、これらの物質のうち、LAS、NPnEC の多くは、DES の保持時間 (11 分) 付近に検出された。環境水中濃度としては LAS が約 10 ng/mL と NPnEC が約 1 ng/mL と低濃度であるが、試料液の濃縮率を高

Fig. 1 Difference in separation of DES isomers between two types of HPLC columns
upper: XBridge TM Shield RP18, down: a conventional C18 column

Fig. 2 Recoveries of DES from river water by using seven SPE cartridges

1. Oasis HLB-Plus (Waters), 2. Sep-Pak-Plus PS-2 (Waters), 3. Aquasis-PLS-3-Jr 230 mg (GL Sciences), 4. Autoprep EDS-1 250 mg (Showa-denko), 5. InertSep CH 500 mg (GL Sciences), 6. InertSep mini RP-1 230 mg (GL Sciences), 7. Empore disk SDB-RPS 47 mm (3 M)

くするため、夾雑成分もかなり高濃度になることが考えられ、クリーンアップ方法の検討を行った。

(1) クリーンアップの候補固相に関する DES 抽出率の検討

試料のクリーンアップのために、活性炭カートリッジを用いる方法を検討した。① Inertsep GC (GL Sciences 社製)、② ENVI-Carb (SUPELCO 社製)、③ Autoprep AC (昭和電工社製)、④ SeP-PAK AC2 (waters 社製) の 4 種類の固相について検討を行った。DES の回収率を Fig. 3 に示す。

精製水 10 mL に DES 20 ng を添加したものを試験液とし、上記の活性炭カートリッジに通液した。カートリッジからの溶出は第一分画 (F1) メタノール 12 mL、第二分画 (F2) メタノール 12 mL で行った。結果、①および②は、F1 のみで 98.6 %、98.8 % の DES の回収率が得られた一方で、③および④からは F1、F2 ともに DES は全く回収されなかった。①、②はいずれも③、④の活性炭に比べ表面積の小さいグラファイトカーボンであることによるため、DES との相互作用が比較的小さく、良好な回収率が得られたと考えられる。

(2) 活性炭系固相による主要夾雑成分の除去効率の検討

次に、(1) の検討試料と同様の試料に、夾雑成分として、陰イオン界面活性剤 (LAS) 200 ng、非イオン界面活性剤の分解物 (NPnEC) 20 ng を添加し、①～④の活性炭カートリッジに通液した。カートリッジからの溶出は第一分画 (F1) メタノール 12 mL、第二分画 (F2) メタノール 12 mL で行った。

(1) の検討結果より、①、②の固相においては DES が 100 % 近く回収されているはずであるにも関わらず、いずれの場合においても回収率は低く、最も高い①でも、22 % 程度の回収率であった。一方で、夾雑成分として添加した LAS や NPEC は、その多くが試験液中に回収されていたこと、活性炭系固相を通す前の未処理試料を測定しても回収率が 20 % 程度であること、の 2 点を合わせて考察すると、DES が回収されていないのではなく、イオン化抑制により、見かけ上、回収率が悪いことが示唆された。そこで、環境試料中の DES のクリーンアップを行う際には、活性炭カートリッジのみでは不十分であり、陰イオン交換作用や極性相互作用を持つ固相を合わせて使用することとした。

Fig. 3 Recoveries (%) of DES from purified water by using 4 kinds of activated carbon cartridges

F1: the first fraction with 12 mL of Methanol,
F2: the second fraction with another 12 mL of Methanol

上記4種類の固相の中で回収率のよかった① Inertsep GCを中心に、極性相互作用と弱陰イオン交換作用を持つ PSA、強陰イオン交換作用を持つ SAX を組み合わせた GC/PSA および、GC/SAX/PSA を用いて検討を行った。

上記検討と同様に、精製水 10 mL に DES 50 ng と、さらに夾雑成分として、陰イオン界面活性剤 (LAS) 200 ng、非イオン界面活性剤の分解物 (NPEC) 20 ng を添加したものを試験液として、固相カートリッジへ通液した。固相カートリッジからの溶出は第一分画 (F1) メタノール 12 mL、第二分画 (F2) 2 % 酢酸/メタノール 12 mL で行った。DES, LAS, NPEC の回収率をそれぞれ Fig. 4, 5,

Fig. 4 Recoveries (%) of DES from purified water by using three SPE cartridges

F1 : the first fraction with 12 mL of Methanol 12 mL,
F2 : the second fraction with another 12 mL of Methanol.
GC: Inertsep GC, GC/PSA: InertSep GC/PSA, GC/SAX/PSA: InertSep GC/SAX/PSA
(GC: Graphite Carbon, PSA: Primary-Secondary Amine, SAX: Strong Anion eXchange)

Fig. 5 Recoveries (%) of LAS from purified water using activated carbon SPE cartridges

F1 : the first fraction with 12 mL of Methanol (DES is eluted in this fraction)
F2 : the second fraction with 12 mL of 2 % HCOOH/Methanol.
GC, GC/PSA and GC/SAX/PSA are the same abbreviations as those in Fig. 4.

6 に示す。

DES が F1 に溶出することを考慮すると、イオン化抑制を抑えるためには、F1 に LAS および NPEC が溶出しなことが望ましい。Fig. 5, 6 より、GC を用いた場合、LAS や NPEC の多くが F1 に溶出し、クリーンアップが十分にできていないことが示された。GC/PSA を用いた場合、GC と比較するとクリーンアップ効果が期待できるが、10 ~ 20 % 程度が F1 に溶出してくる結果となった。一方で GC/SAX/PSA を用いると LAS, NPEC とともに F1 にはほとんど溶出してこなかった。これは SAX, PSA の両方の効果により、LAS, NPEC が十分に保持されたためだと考えられる。

Fig. 4 より、各クリーンアップカートリッジを用いた際の回収率を比較すると、GC, GC/PSA, GC/SAX/PSA の順で回収率が高くなった。これは、Fig. 5, 6 の結果からもわかるように、試料液中の夾雑成分が除去され、イオン化抑制の影響を抑えることができたためであると考えられる。

実際、環境試料にこの固相を適用した結果、LAS, NPnEC は 90 % 以上除去され、クロロフィル等の色素も除去された。以上の検討結果より、試料液のクリーンアップには GC/SAX/PSA 固相を用いることとした。

3. 2. 4 試料濃縮率及び LC/MS への注入量の違いによる回収率への影響

精製水及び河川水、海水 2 L に DES を 50 ng 添加して、InertSep CH カートリッジで抽出し、InertSep GC/SAX/PSA カートリッジでクリーンアップした試料を、濃縮倍率ごとに回収率を比較した。濃縮倍率が 200, 1000, 2000 倍と変わっても、クリーンアップ操作をしていれば、回収率に大差はなかった。

ただし、本法では DES の微量分析を行っており、目的の感度を得るためには、LC/MS への注入量を、通常の 20 倍程度にする必要がある。5 μ L 程度の注入量であれば、特に注意の必要はないが、今回は 100 μ L の大容量を注入するため、最終溶液の溶媒組成も併せて測定結果への影響を検討した。結果、LC/MS への注入量が 50 μ L 以上の場合、最終溶液の溶媒組成を、移動相の初期状態の組成に近づけないとピーク形状が悪くなった。一方で、最終溶液に水

Fig. 6 Recoveries (%) of NPEC in purified water collected in activated carbon SPE cartridges

F1 : the first fraction with 12 mL of Methanol (DES is eluted in this fraction)
F2 : the second fraction with 12 mL of 2 % HCOOH/Methanol
GC, GC/PSA and GC/SAX/PSA are the same abbreviations as those in Fig. 4

を加えることによる DES の不溶解物質への吸着や溶解度の低下が影響し、見かけ上の回収率は低下した。結果、ピーク形状を良好に保つ限界の溶媒組成比メタノール：水 = 1 : 1 を最終溶液として選択した。

2.3 に示す方法に従って処理（4000 倍濃縮）した精製水および海水試料を 5 ～ 100 μL 注入した場合の回収率を Fig. 7 に示す。注入量が増加するとサロゲートの絶対回収率が低下した。しかし、Table 2 の添加回収試験結果に示す通り、DES- d_8 による回収率補正を行うことにより、98 % 以上の回収率が得られた。

3. 3 環境試料の測定結果

名古屋市河川水および名古屋港海水を本法により分析した結果を、Fig. 8、Fig. 9 に示す。Fig. 8 は名古屋市北部を流れる庄内川中流域で採水した河川水を分析した結果で、DES は 0.005 ng/L 以下で検出されなかった。Fig. 9 は名古屋市中部を流れる堀川の河口部で採水した海水を測定した結果で、DES は同じく 0.0050 ng/L 以下で検出されなかった。Fig. 9 で、DES の保持時間付近に未知物質のピークが検出されたが、同じ試料を用いて添加回収試験を行ったところ、この未知物質は DES とは分離され、定量に問題はなかった。

Fig. 7 Effect of injection volume on overall recoveries (%) of DES- d_8 in purified water and sea water samples

Fig. 8 An SRM chromatogram of DES in river water

いずれの地点からも DES は検出されなかったが、これは日本国内において、DES の使用が非常に限られており、前立腺癌の治療薬「ホンバン錠」として一部で使用されているのみであるためと考えられる。このことを考慮すると、病院排水など、限られた水質汚染の確認の課題は残るが、現在はこの薬剤も製造中止になっているため、環境への影響は低いと考えられる。

4. まとめ

本報告では DES の極微量分析を行うため、試料のクリーンアップ方法、大量試料導入方法を検討し、LC/MS/MS による分析方法を開発した。本法によって、環境水中の DES を界面活性剤などの夾雑成分による影響を抑え、DES の回収率 98 % 以上で安定して分析できた。また、複数箇所の水質試料を用いて MDL を計算したところ、いずれも 0.005 ng/L で、水質試料において環境省が設定した DES の検出下限値 0.01 ng/L を満足した。

本研究の一部は、「化学物質分析法開発事業」（平成 21 年度環境省委託）によった。

要 約

環境省の要求する検出下限値（0.01 ng/L）を満足する環境水中の DES の高感度分析方法を開発し、環境調査を行った。環境水を高濃縮し大量試料導入するため、機器分析の際に夾雑成分の影響を抑制する方法を検討し、固相抽出後、GC/SAX/PSA を用いてクリーンアップを行う方法を開発した。本分析法の検出下限値は 0.005 ng/L、定量下限値は 0.013 ng/L で、添加回収率は河川水で 104 %、海水で 106 % であった。名古屋市内において環境調査を行った結果、河川水、海水ともに不検出であった。

文 献

- 1) 武田玲子, 吉田由布子:「ピルの危険な話」東京書籍, (2000)
- 2) Herbst, A.L., Ulfelder, H. and Poskanzer, D.C.: Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *N Engl J Med.*, **284**, 878-881 (1971).
- 3) Henderson, B.E., Benton, B., Cosgrove, M., Baptista, J., Townsend, D. and Hart, W., Mack, T.M.: Urogenital tract abnormalities in sons of women treated with diethylstilbestrol. *Pediatr*

Fig. 9 An SRM chromatogram of DES in sea water

- rics, **58**, 505–507 (1976).
- 4) Mittendorf, R.: Teratogen update carcinogenesis and teratogenesis associated with exposure to diethylstilbestrol (DES) in utero. *Teratology*, **51**, 435–445 (1995).
 - 5) Giusti, R.M., Iwamoto, K. and Hatch E.E.: Diethylstilbestrol revisited: a review of the long-term health effects. *Ann Intern Med.*, **122**, 78–88 (1995).
 - 6) Herbst, A.L.: Behavior of estrogen-associated female genital tract cancer and its relation to neoplasia following intrauterine exposure to diethylstilbestrol (DES). *Gynecol Oncol*, **76**, 147–156 (2000).
 - 7) Vom Saal, F.S., Barry G.T., Monica, M.M., Paola, P., Kristina, A.T., Susan, C.N., Minati, D.D., V.K. Ganjam, Stefano, P. and Wade, V.W.: Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2056–2061 (1997).
 - 8) Zhong X., Xu Y., Liang Y., Liao T. and Wang J.: The Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) as an in vivo model for endocrine disruption in freshwater teleosts : a full life-cycle test with diethylstilbestrol., *Aquatic Toxicology*, **71** (1), 85–95 (2005)
 - 9) Yamamoto, A., Kakutani, N., Yamamoto, K., Kamiura, T. and Miyakoda, H.: Steroid hormone profiles of urban and tidal rivers using LC/MS/MS equipped with electrospray ionization and atmospheric pressure photoionization sources., *Environ. Sci. Technol.*, **40**, 4132–4137 (2006).
 - 10) Jeannot, R., Hassan, S., Emmanuel, S., Thierry, D. and Katja, D.: Determination of endocrine-disrupting compounds in environmental samples using gas and liquid chromatography with mass spectrometry., *J. Chromatogr. A*, **974**, 143–159 (2002).
 - 11) Benijts, T., Dams, R., Gunther, W., Lambert, W. and Leenheer, A.D.: Analysis of estrogenic contaminants in river water using liquid chromatography coupled to ion trap based mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **16**, 1358–1364 (2002).
 - 12) Lopez, de Alda, M.J. and Barcelo, D.: Use of solid-phase extraction in various of its modalities for sample preparation in the determination of estrogens and progestogens in sediment and water, *J. Chromatogr. A*, **938**, 145–153 (2001).
 - 13) Pedrouzo, M., Borrull F., Pocurull E. and Maria M.R.: Estrogens and their conjugates: Determination in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Talanta*, **78**, 1327–1331 (2009).
 - 14) Chen, H.C., Kuo H.W. and Ding W.H.: Determination of estrogenic compounds in wastewater using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure photoionization following desalting extraction, *Chemosphere*, **74**, 508–514 (2009).
 - 15) Lei, B., Huang, S., Zhou, Y., Wang, D. and Wang, Z.: Level of six estrogens in water and sediment from three river in Tianjin area, China, *Chemosphere*, **76**, 36–42 (2009).
 - 16) 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課：「化学物質環境実態調査実施の手引き」(2009)