

(30) LC/MS/MS によるエストロゲン抱合体の分析法と下水試料への適用

Determination of Conjugated Estrogens in Wastewater by LC/MS/MS

末岡峯数^{*}、田辺薫^{*}、大岩俊雄^{*}、小森行也^{***}、鈴木穰^{***}、田中宏明^{***}
Minekazu SUEOKA^{*}, Kaoru TANABE^{*}, Toshio OHIWA^{*}, Koya KOMORI^{***},
Yutaka SUZUKI^{***}, Hiroaki TANAKA^{***}

ABSTRACT ; In order to investigate the behaviors of transformation of conjugated estrogens (CEs) to free estrogens [FEs; estrone(E1),17 β -estradiol(E2),estriol(E3)] in wastewater, it is necessary to determine not only FEs but also CEs. Previously, we reported a procedure for determination both of FEs and CEs in wastewater by liquid chromatograph/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). But the recovery ratio of CEs was particularly low for glucuronated estrogens (GEs) (less than 30%). In order to overcome, we improved a pretreatment procedure and a subsequent separation by liquid chromatography (LC).

This paper explains an improved analytical method for quantifying CEs in wastewater using LC/MS/MS. After addition of an ion-pair reagent and surrogates (E2-3S-d4 and E2-17G-¹³C4) to the sample, solid phase extraction (SPE) was performed using Oasis HLB cartridge. Subsequently, the cartridge was washed with ethyl acetate/n-hexane solution and eluted with ethyl acetate/methanol solution containing 0.05% ammonia. After solvent removal, the residue was dissolved in acetonitril/water solution, which was then analyzed by LC/MS/MS. (SRM-negative ions with electro spray ionization). the LC-mobil phase used in the gradient mode was acetonitril/water containing 10 mmol $\cdot$ L⁻¹ formic acid. For quantification the added surrogates served as internal standards (E2-3S-d4 for SEs and E2-17G-¹³C4 for GEs, respectively).

Applying this method, the method detection limit(MDL) of four sulfated estrogens(SEs) ranged from 0.6 to 1.2 ng $\cdot$ L⁻¹ and five GEs ranged from 2.9 to 3.9 ng $\cdot$ L⁻¹. The obtained recovery efficiencies ranged from 80 to 110 % for SEs and 60 to 120 % for GEs, respectively.

KEYWORDS ; Estrogen; Conjugate; LC/MS/MS; Wastewater

1. はじめに

エストロゲン活性を有する物質を検出することができる組換え酵母を使用して化学物質や天然由来のエストロゲンの活性を比較すると、多くの人工化学物質は活性の高い化学物質でも天然由来のエストロゲンの中で最も活性の高い17 β -エストラジオール (E2) と比較するとその比活性値は、1/1,000~1/10,000 程度であ

^{*} 帝人エコ・サイエンス(株) (Teijin Eco-Science LTD)

^{**} (独) 土木研究所水循環研究グループ水質チーム (Water Quality Research Team, Public Works Research Institute)

^{***} 京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター (Research Center for Environmental Quality Management, Kyoto Univ.)

る¹⁾。また、環境水におけるエストロゲン活性のかなりの部分が天然のエストロゲンに由来するといわれている²⁾。天然エストロゲンは、 17β -エストラジオール (E2)、エストロン (E1)、エストリオール (E3) の3種が主要なエストロゲンである。エチニルエストラジオール (EE2) は、医薬品として用いられる合成化学物質であるが、用途が経口避妊薬 (いわゆるピル) であり、その発生源はヒトであること及び化学構造が天然由来のエストロゲンと極めて類似した骨格を有することから、天然由来のエストロゲンと同様に取り扱われることが多い。

エストロゲンが、尿中へ排泄されるときに形態は、水溶性のグルクロン酸抱合体 (以下 G と略す) と硫酸抱合体 (以下 S と略す) が報告³⁾ されている。汚泥にエストロゲン抱合体である E2-グルクロン酸抱合体 (E2-G) を添加すると極めて速やかに E2 が生成⁴⁾ することから、環境水中では、グルクロン酸抱合体は容易に分解することが推定される。

以上の知見から環境中におけるエストロゲンの挙動を把握するためには、遊離体に加え抱合体も含めた実態把握が必須である。現在、エストロゲン抱合体の分析は、LC/MS または LC/MS/MS によるいくつかの方法が提案されている。辻村ら⁵⁾ は、C18 カラムを用いて固相抽出した試料を LC/MS/MS を用いて、下水流入水中の E2-3S (E2 の3位が硫酸塩の抱合体) を検出している。なお、抱合体の検出下限値は、 $0.7\sim 0.8\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ である。石井ら⁶⁾ は、C18 カラムによる固相抽出後、溶出液を GPC で遊離体画分と抱合体画分に分離し、遊離体画分は乾固、再溶解後、 NH_2 固相カートリッジで精製、抱合体画分は、乾固、再溶解後、CN カートリッジで精製後、再濃縮して LC/MS/MS 用試料とし、河川試料中の E2-3S を検出している。磯部ら⁷⁾ は、夾雑物の多い水試料について固相 (Shodex Autoprep EDS-1) から、酢酸エチルで遊離体を溶出し、GPC、Florisil カラム処理後 LC/MS/MS で測定し、抱合体成分は、固相からトリエチルアミン/メタノールで溶出し、ポリアミドカラムで精製後、LC/MS/MS で測定している。G.D 'Ascenzo ら⁸⁾ は、固相 (Carbograph4) に吸着させた試料を $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ の酢酸ナトリウムを含むジクロロメタン/メタノール (3/2) で溶出し、溶媒を除いた後、内部標準物質を含む水/メタノール (1/1) に再溶解し、LC/MS で測定している。

以上のようにエストロゲン抱合体の測定法は、いくつか報告されているが、下水試料のような夾雑成分を多く含んだ試料や、抱合体のうち特にグルクロン酸抱合体について、適当な前処理法は提案されていないのが現状である。また、ヒトの代謝では硫酸抱合がグルクロン酸抱合より優位であるといわれているので、エストロゲンにおいても硫酸抱合体の存在比率が高いと予想され、実態把握においても硫酸抱合体の挙動を把握することも重要と考えられる。

我々は、過去に LC/MS/MS を用いたエストロゲン遊離体及び抱合体の同時前処理による測定法について報告^{9) - 12)} を行ってきたが、前処理作業として、固相抽出後、さらに Florisil カラムおよび NH_2 カラムを用いて精製を繰り返す必要があること、また、抱合体のうち、グルクロン酸抱合体の回収率が極めて低い (<30%) ことが大きな課題であった。そこで我々は、今回、抱合体の測定方法について、遊離体の測定とは別に前処理工程を簡略化し、固相抽出以降の精製処理の代りに、目的成分以外の物質を洗浄溶媒により除去する方法を検討し、抱合体の中で特に不安定なグルクロン酸抱合体の回収率を改善することができた。

本方法を用いて下水処理場のエストロゲン抱合体を測定した結果を本論文で報告する。なお、遊離体については従来法で測定した結果も併記した。

2. 分析方法

2. 1 試薬等

本検討に用いた標準試薬及び前処理精製に用いたカラム等について、表-1、表-2に示す。標準試薬類はメタノール (試薬特級) に溶解して使用した。その他の試薬は和光純薬製の試薬特級以上のもの、または用

途に応じてクロマトグラフ用を使用した。

固相抽出には、Waters Oasis HLB plus、IPC 試薬は IPC-DBAA 0.5 mol・L⁻¹ 水を用いた。一方、従来法による遊離体の分析の前処理に使用したフロリジルカラムは Sep-pak plus Florisil、NH₂ カラムは、Waters Sep-pak plus NH₂ を用いた。ガラス繊維ろ紙は (孔径 1 μm) のものをアセトン洗浄後使用した。使用したすべてのガラス器具類は、洗剤及び水道水による洗浄後、純水、アセトンの順に洗浄して使用した。

表-1 エストロゲン抱合体の標準試薬及びサロゲート一覧表

標準試薬	メーカー	略称	備考
エストロン-3 S	SIGMA	E1-3S	Sは硫酸抱合体、Gはグルクロン酸抱合体を示す。また、数字は置換位置を示す。
17β-エストラジオール-3 S	SIGMA	E2-3S	
エストリオール-3 S	SIGMA	E3-3S	
エストロン-3 G	SIGMA	E1-3G	
17β-エストラジオール-3 G	SIGMA	E2-3G	
17β-エストラジオール-17 G	SIGMA	E2-17G	
エストリオール-3 G	SIGMA	E3-3G	
エストリオール-17 G	SIGMA	E3-17G	
17β-エストラジオール-3 S 17 G	SIGMA	E2-3S17G	
17β-エストラジオール-3 G 17 S	SIGMA	E2-3G17S	
エストロン-3 S-d4	SIGMA	E1-3S-d4	シリンジスパイク
17β-エストラジオール-3 S-d4	SIGMA	E2-3S-d4	硫酸抱合体用サロゲート
17β-エストラジオール 17 G- ¹³ C 4	住化分析センター	E2-17G- ¹³ C4	グルクロン酸抱合体用サロゲート

表-2 使用したカラム等の一覧

固相カートリッジ	Waters	Oasis HLB plus
フロリジルカラム	Waters	Sep-pak plus Florisil
NH ₂ カラム	Waters	Sep-pak plus NH ₂
IPC	東京化成	IPC-DBAA 0.5 mol・L ⁻¹

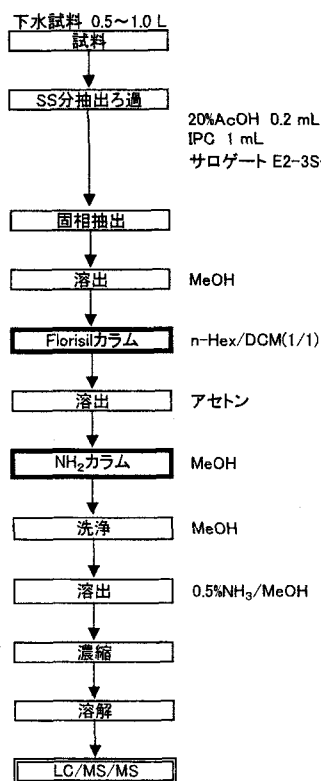
2. 2 試料の前処理方法

下水試料中のエストロゲン抱合体測定の前処理方法の概略フローを、従来法と比較して図-1に示す。

試料 300 mL (処理水)、200 mL (流入水) を、純水で約 500 mL に希釈した後、ガラス繊維ろ紙 (孔径 1 μm) でろ過し、ろ紙に残った浮遊物質 (SS) は、メタノール約 10 mL で超音波を用いて 2 回抽出して、抽出液はろ液に合わせる。ろ液に各サロゲート物質 (E2-3S-d4, E2-17G-¹³C4) をそれぞれ 50 ng 添加した後、IPC 試薬 (0.5 mol・L⁻¹) を 1 mL、20% 酢酸 0.2 mL を加える。予めメタノールと精製水でコンディショニングした Oasis HLB カートリッジに通水 (15 mL・min⁻¹) する。精製水で洗浄した後、カートリッジは遠心分離と窒素ガスパージにより脱水乾燥を行う。

次に酢酸エチル/ヘキサン (1/1) 約 5 mL で洗浄する。その次に酢酸エチル/メタノール (1/1) 約 0.05% NH₃、水 2%(v/v) の約 6 mL でエストロゲン抱合体を溶出させ、溶出液は窒素ガス吹き付けにより乾固直前まで濃縮する。次にアセトニトリル/水 (6/4) 1 mL に溶解後、シリンジスパイクとして E1-3S-d4 を添加し LC/MS/MS 測定試料とした。

従来法



改良法

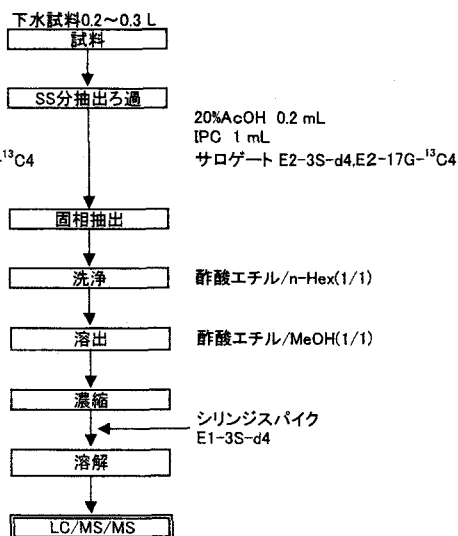


図-1 エストロゲン抱合体測定前処理方法の概略フロー

2. 3 装置及び測定条件

エストロゲン抱合体の測定に用いた装置及び測定条件を表-3(a)、(b)に示す。

表-3(a) 装置及び測定条件(LC)

LC	設備	Agilent 1100 Series
	カラム	Zorbax Extend-C18 2.1×150 mm
	溶離液	① 10 mmol・L ⁻¹ ギ酸 ② 10 mmol・L ⁻¹ ギ酸/アセトニトリル
	組成比及び流速	①/②: 80/20-10 min-40/60(20 min)-5 min-80/20 (5 min) 0.20 mL・min ⁻¹
	温度	40 ℃
	注入量	5 µL

表－ 3 (b) 装置及び測定条件(MS/MS)

MS/MS	設備	Thermo Quest TSQ API-2	
	イオン化	ESI-Negative Ion	
	測定成分及び SRM	E1-3S	349.1>269 (35 V)
		E2-3S	351.1>271 (35 V)
		E3-3S	367.1>287 (35 V)
		E2-S/G*	527.3>351 (35 V)
		E2-3S-d4	355.1>275 (35 V)
		E1-3G	445.2>269 (35 V)
		E2-3G&17G	447.2>271 (35 V)
		E3-3G&17G	463.2>287 (35 V)
		E2-17G- ¹³ C4	451.2>275 (35 V)
		E1-3S-d4	353.1>273 (35 V)

* : E2-3S17G 及び E2-3G17S

3. 検討結果及び考察

3. 1 前処理方法の検討結果

(1) 固相抽出カートリッジ

水試料からの濃縮に用いる固相カートリッジについて、エストロゲンの回収（捕集）率を比較した結果を表－ 4 に示す。

逆相系の固相抽出カートリッジとして一般にシリカ担体に C18 をコーティングした系が用いられておりエストロゲン遊離体のうち E1、E2 及び EE2 を測定対象とする場合に適用することができる。ただし遊離体の E3 及び抱合体を測定対象とした場合、C18 系では回収率が劣りポリマー共重合系カートリッジの方が優れていることを確認した。そこで性能及び回収率が安定している点からジビニルベンゼン/ピロリドン共重合系の Oasis HLB を選択した。

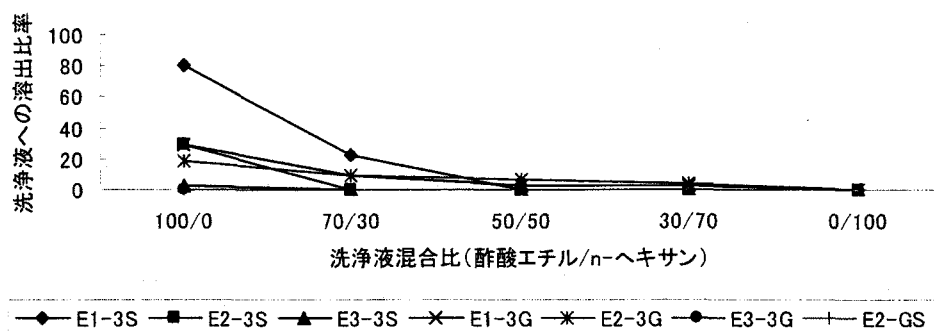
表－ 4 固相によるエストロゲン遊離体と抱合体の回収率比較

固相抽出カラム	遊離体		抱合体	
	E1、E2、EE2	E3	mono 置換体	di 置換体
C18 シリカゲルカラム	約 100%	40～80%	約 30%	約 30%以下
Oasis HLB (co-polymer)	約 100%	約 100%	約 90%以上	80～90%

(2) 洗浄溶媒

抱合体測定の場合は固相抽出以降の精製処理を省略する代わりに抽出カートリッジに吸着した成分のうち、目的成分以外の妨害物質を洗浄溶媒により除去する方法を検討した。その結果の一部を図－ 2 に示す。洗浄溶媒は、混合溶媒として、その混合比（酢酸エチル/n-ヘキサン）を 5 種類（100/0、70/30、

50/50、30/70、0/100) として、その洗浄液への溶出の比率を調べた。その結果、純水への抱合体各 50 ng 添加試料では洗浄液側への溶出はみられなかったが、下水処理水や下水流入水への添加試料では、洗浄液として酢酸エチル/n-ヘキサンが 100/0 あるいは 70/30 と酢酸エチルの比率が高い場合は、E1-3S、E2-3S が洗浄液側へ溶出し、回収率が低減することが分かった。一方、無極性の n-ヘキサン(0/100)では妨害物質の洗浄効果が低減することから、洗浄液として酢酸エチル/n-ヘキサン混合比 50/50 を選択した。

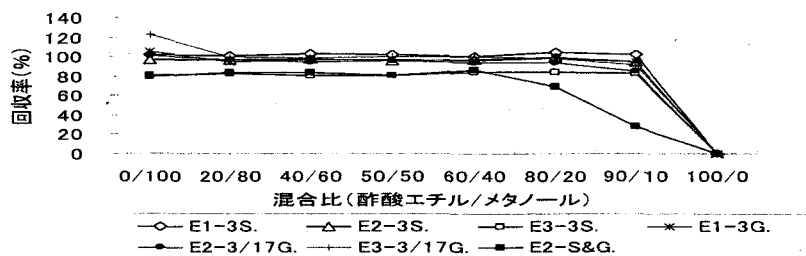


図－2 洗浄溶媒の混合比と洗浄液へのエストロゲン抱合体の溶出比率の関係

(3) 溶出溶媒

前項に記載したように、固相抽出処理し、カートリッジ洗浄後、固相に吸着しているエストロゲン抱合体を溶出させる溶媒の検討を行った。溶出溶媒として酢酸エチルとメタノールの混合液をそれぞれの溶媒の混合比 (酢酸エチル/メタノール) を 0/100～100/0 の範囲で、アンモニア (NH₃) : 0.05%、水 : 2.0%(v/v)を含む溶媒 6 mL で溶出し、その回収率を求めた。

その結果を図－3に示す。混合比 100/0 即ち酢酸エチル 100%では、抱合体は溶出されず、回収率は 1%以下であった。また、抱合体の種類により、若干、傾向の差があるものの、酢酸エチル/メタノール混合比で酢酸エチルの比率が 60%以下 (0/100～60/40) では抱合体の溶出がほぼ同程度になることが分かった。一方、極性の高いメタノールの比率が高くなるほど、他の夾雑妨害成分の溶出も多くなることから溶出溶媒として弱塩基性の酢酸エチル/メタノール混合比 (50/50) を選択した。なお、遊離体のみを測定対象とした場合は固相抽出後の洗浄処理は必要なく、直接酢酸エチルとメタノール等量混合液で溶出できる。また、遊離体のうち E3 を測定対象としない場合は酢酸エチルとメタノール混合比 (90/10) で溶出可能であった。



図－3 溶出溶媒の混合比と回収率の関係

3. 2 分析方法の検討結果

(1) LC 分離条件 (ギ酸濃度)

LC での分離条件を検討する目的で溶離液 (アセトニトリル/水混合系) に用いるギ酸の濃度を $7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $55 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ の 4 通りの条件で、E2-3S-d4、E2-17G- $^{13}\text{C}4$ の 2 種類のサロゲートを用いて、それぞれのギ酸濃度におけるイオン強度を比較した。その結果の一部を図-4に示す。イオン強度は、ギ酸の濃度が高くなるにしたがって低下する傾向がみられた。ただし、分離及び調製の安定性等を考慮して、ギ酸濃度は約 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ を選択した。

(2) MS/MS 条件

1) キャピラリーチューブの温度

キャピラリーチューブ温度の最適化の目的で、E2-3S-d4、E2-17G- $^{13}\text{C}4$ の 2 種類のサロゲートを用いて、それぞれ、 250°C 、 300°C 、 350°C の 3 条件のキャピラリーチューブ温度におけるイオン強度を比較した。その結果を図-5に示す。イオン強度は、キャピラリーチューブの温度の上昇にしたがって増加する傾向がみられた。ただし真空シールパッキンの熱安定性等を考慮し、キャピラリー温度は、 350°C を選択した。

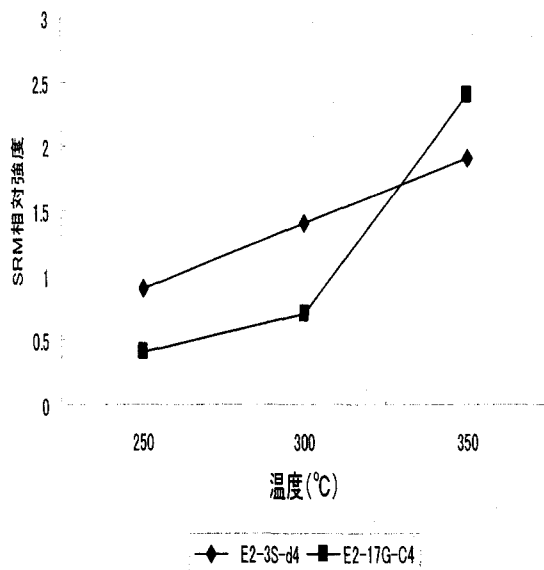
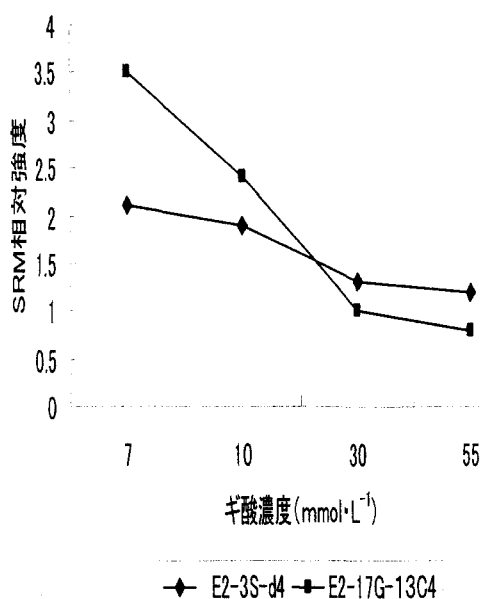
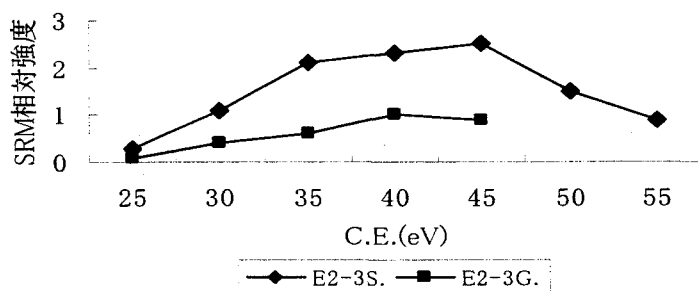


図-4 溶離液に用いるギ酸濃度とイオン強度の関係 図-5 キャピラリーチューブの温度とイオン強度の関係

2) コリジョンエネルギー

コリジョンエネルギーの違いによる SRM 強度について検討した。コリジョンエネルギーは、 $25 \sim 55 \text{ eV}$ までの 5 eV 間隔の 7 条件で E2-3S、E2-3G の 2 種類について、それぞれの条件における SRM 強度を測定した。その結果を図-6に示す。SRM 強度は、コリジョンエネルギーの増加にしたがって増加したが、コリジョンエネルギーがさらに高くなると逆に減少する結果が得られた。そこで、コリジョンエネルギー約 $35 \sim 40 \text{ eV}$ 付近で最適化した。

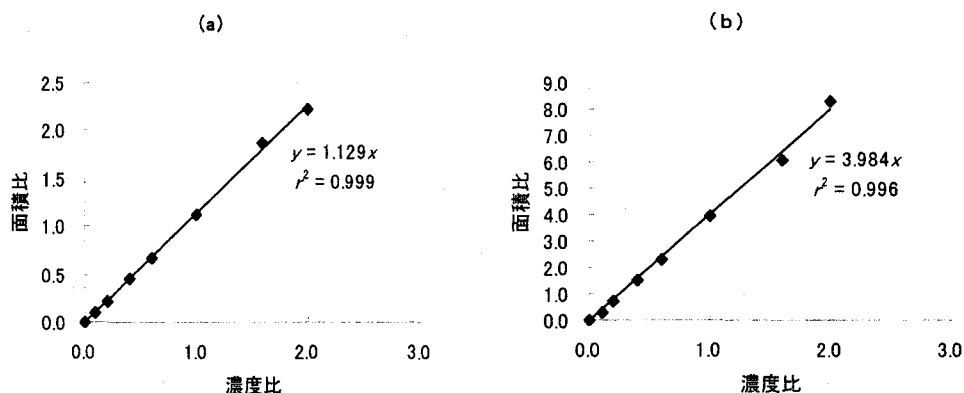


図－6 コリジョンエネルギーとイオン強度の関係

(3) 標準溶液の測定

1) 検量線

E1-3G、E2-3G、E2-17G、E3-3G、E3-17G、E1-3S、E2-3S、E3-3S、E2-S/Gの混合標準液を各々5、10、20、30、50、80、100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ の7段階の濃度に調製し、サロゲート (E2-17G- $^{13}\text{C}_4$ 、E2-3S-d4)を50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ の濃度で添加して、測定対象物質とサロゲートの面積比と濃度比の関係から検量線を作成した。0～100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ の範囲で一次回帰した直線の決定係数 (r^2) は0.987～0.999の範囲であり、良好な直線性が認められた。図－7に抱合体の検量線の一例としてE2-3SとE2-3Gの検量線を示す。



図－7 抱合体測定の検量線の例 (a) E2-3S 及び (b) E2-3G

2) 測定精度と試料中の検出下限値

装置の検出下限値は、検量線の最も低い濃度である5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (注入量、5 μL = 25 pg) の標準液を6回繰り返し測定した結果から求めた。繰り返し測定結果の標準偏差 (s) の3倍値 ($3s$) を検出下限値とした。その結果、表－5に示すように装置検出下限値(IDL)は、4種類の硫酸抱合体では、0.9～1.8 pg、5種類のグルクロン酸抱合体では4.4～5.8 pgであった。

また、下水試料300 mLを用いて分析した場合の水試料の検出下限値(MDL)は、表－6に示すように4

種類の硫酸抱合体では0.6~1.2 ng・L⁻¹、5種類のグルクロン酸抱合体では、2.9~3.9 ng・L⁻¹の値に換算される。ただし、この値は試料量が300 mLでそれを最終液量1 mL、注入量5 μ Lとしたときの値である。

表-5 5 μ g・L⁻¹のエストロゲン抱合体標準液5 μ Lを6回の繰り返し測定結果

測定成分	硫酸抱合体				グルクロン酸抱合体				
	E1-3S	E2-3S	E3-3S	E2-S/G	E1-3G	E2-3G	E2-17G	E3-3G	E3-17G
平均値 (ng・mL ⁻¹)	4.95	4.61	5.15	3.96	4.65	4.47	4.07	5.7	4.41
変動係数(%)	2.4	2.6	1.2	3.0	6.2	7.4	9.6	5.4	7.3
装置検出下限値(pg)	1.8	1.8	0.9	1.8	4.4	5.0	5.8	4.6	4.9

表-6 300倍に濃縮した水試料中に換算された検出下限値 (注入量 5 μ L)

測定成分	硫酸抱合体				グルクロン酸抱合体				
	E1-3S	E2-3S	E3-3S	E2-S/G	E1-3G	E2-3G	E2-17G	E3-3G	E3-17G
試料検出下限値(ng・L ⁻¹)	1.2	1.2	0.6	1.2	2.9	3.3	3.9	3.1	3.2

(4) 添加回収試験

試料として、純水 (0.5 L)、二次処理水 (0.3 L)、流入水 (0.2 L) にそれぞれ抱合体を各 50 ng ずつ添加し、回収率を求めた。繰り返し測定 (n=5) の平均値と最大最小値の範囲を図-8 に示す。

純水への添加回収試験では、ほぼ定量的回収率 100 $\pm$ 5%が得られた。一方、下水試料においては、二次処理水の場合、硫酸抱合体については約 90~110%の回収率であったが、グルクロン酸抱合体については 100~120%と見かけ上高い値が得られた。流入水では硫酸抱合体で 80~100%、グルクロン酸抱合体については 60~120%と二次処理水と比較してばらつきが認められた。硫酸抱合体の回収率のばらつきは夾雑成分によると推定される。一方、グルクロン酸抱合体の回収率のばらつきは夾雑成分の影響以外に個別抱合体間の安定性に差があることによると推定される。従来法による測定ではグルクロン酸抱合体の回収率は、いずれも 30%以下であった。この原因として試料の前処理方法で固相抽出後の濃縮、乾固の操作の繰り返しが多いこと (図-1 参照) が原因と推察された。本方法では固相抽出後の洗浄及び溶出溶媒を検討し濃縮乾固の操作を少なくすることで処理工程での分解等を減じ、回収率の大幅な改善が得られた。

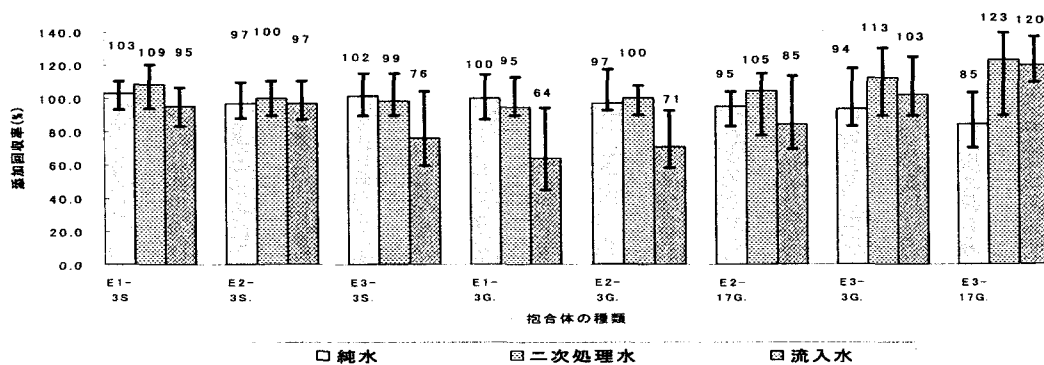


図-8 純水、二次処理水、流入水への各抱合体の添加回収率比較

4. 下水試料への適用

(1) 測定方法

下水試料は採水後4℃以下に冷蔵保存し、採水後2日以内に分析に使用した。分析試料は流入水200 mL 処理水300 mLを用い、前述の前処理方法に従って調製した。

LC/MS/MSによる測定条件は表-3に従い、抱合体のうち硫酸抱合体4種(E1-3S、E2-3S、E3-3SおよびE2-S/G)は、E2-3S-d4を基準に算出した。また、グルクロン酸抱合体5種(E1-3G、E2-3G&17G、E3-3G&17G)は、E2-17G-¹³C4を基準に算出した。なお、シリンジスパイクのE1-3S-d4はサロゲートの回収率の確認(>80%)に用いた。

(2) 下水試料の測定結果

住宅地からの排水を主に集水する下水処理場の流入水及び二次処理水の分析を行った。エストロゲン遊離体4種は従来法⁹⁾¹²⁾で、またエストロゲン抱合体(硫酸抱合体4種及びグルクロン酸抱合体5種)は、本試験方法を用いて測定した。その結果を表-7に示す。なお、遊離体は誘導体化した試料を二重束型質量分析計を用いたGC/MS(GC/HR/MS)で測定した結果¹³⁾も比較のために併記した。(抱合体は、GC/HR/MS法では、測定不可)

その結果、流入水ではグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体が検出され、処理水においても低濃度の硫酸抱合体が検出された。

表-7 下水試料のLC/MS/MSとGC/HR/MSによる測定結果(ng・L⁻¹)

測定対象	試料	二次処理水		流入水	
		LC/MS/MS	GC/HR/MS	LC/MS/MS	GC/HR/MS
遊離体	E1	3.8	4.7	28.5	30.6
	E2	0.3	0.6	12.9	16.0
	E3	N.D. (<0.5)	0.3	133.9	129.9
	EE2	N.D. (<0.5)	N.D. (<0.05)	N.D. (<0.5)	N.D. (<0.05)
硫酸抱合体	E1-3S	N.D. (<1)	*	1.2	*
	E2-3S	1.8	*	66.7	*
	E3-3S	0.6	*	24.7	*
	E2-S&G	N.D. (<1)	*	N.D. (<1)	*
グルクロン酸抱合体	E1-3G	N.D. (<4)	*	N.D. (<4)	*
	E2-3G	N.D. (<4)	*	13.2	*
	E2-17G	N.D. (<4)	*	20.0	*
	E3-3G	N.D. (<4)	*	54.0	*
	E3-17G	N.D. (<4)	*	30.0	*

* : 抱合体はGC/HR/MSでの測定ができない。

N.D. : 検出下限値未満

5. 結論

(1) 従来の測定法との相違点

本研究では、先に報告したエストロゲン抱合体の測定における課題であったグルクロン酸抱合体の回収率の問題を解決する手法を検討した。そのために、前処理操作中におけるグルクロン酸抱合体の分解を軽減するために操作を簡易化し、回収率が向上した結果、より信頼性の高い測定方法を確立できた。

(2) 本測定法の回収率

この方法を用いて実試料である下水流入水及び下水処理水を用いた添加回収率は、硫酸抱合体では 80～110%、グルクロン酸抱合体では 60～120%であり、従来法と比較し、特にグルクロン酸抱合体の回収率の課題 (<30%) の大幅な改善ができ、実下水試料の測定への信頼性が向上した。

(3) 本測定法による検出下限値

本法による装置検出下限値 (IDL) は、4 種類の硫酸抱合体では、0.9～1.8 pg、5 種類のグルクロン酸抱合体では、4.4～5.8 pg であり、水試料を 300 倍濃縮した場合の試料検出下限値 (MDL) は、4 種類の硫酸抱合体では、0.6～1.2 ng・L⁻¹、5 種類のグルクロン酸抱合体では、2.9～3.9 ng・L⁻¹の値に換算される。

(4) 今後の課題

環境水や下水処理でのエストロゲンの挙動及びその物質収支を把握するためには、遊離体、抱合体を含めたエストロゲンの調査を行うことが必要であり、今後、更なるデータの蓄積を行う必要がある。ただし、エストロゲンの抱合体は、全てのエストロゲン抱合体について、その標準物質が市販されていないため、今後の精度向上のため、例えば抱合体について脱抱合処理等による生成遊離体を測定することで全抱合体の定量を行う方法等の検討も望まれる。

6. 参考文献

- 1) 矢古宇靖子、高橋明宏、東谷忠、田中宏明：組み換え酵母を用いた環境エストロゲンの測定、第 2 回日本内分泌攪乱化学物質学会研究発表会要旨集, 85 (1998)
- 2) 矢古宇靖子、高橋明宏、東谷忠、田中宏明：組み換え酵母を用いた下水中のエストロゲン活性の測定、環境工学論文集, Vol.36, 199-208 (1999)
- 3) 五十嵐正雄：内分泌婦人科学・生殖内分泌の基礎と臨床、南山堂 (1978)
- 4) Ternes TA. et al: Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge, *Sci Total Environ*, 225, 91-99 (1999)
- 5) 辻村和也、田嶋晴彦：LC/MS/MS による環境中エストラジオール及び類縁物質の同時分析法の開発、第 9 回環境化学討論会講演要旨集, 58-59 (2000)
- 6) 石井善昭、沖田智、尹順子：LC/MS/MS を用いた環境水中エストロゲンおよびその抱合体の分析、第 10 回環境化学討論会講演要旨集, 318-319 (2001)
- 7) 磯部友彦、白石寛明、森田昌敏：LC/MS/MS を用いた堆積物中エストラジオール及び抱合体の分析、第 12 回環境化学討論会講演要旨集, 750-751 (2003)
- 8) G.D 'Ascentzo et al : Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities, *Sci Total Environ*, 3021, 199-209 (2003)
- 9) 八十島誠、小森行也、田中宏明：LC/MS/MS によるエストロゲンの分析法と下水への応用、土木学会論

文集, No.727, VII-26, 103-111 (2003)

- 10) 小森行也、八十島誠、田中宏明：LC/MS/MSによるエストロゲンの分析,第36回水環境学会年会講演集, 431 (2003)
- 11) 小森行也、八十島誠、田中宏明、末岡峯数、大岩俊雄、久野正：下水試料を対象としたエストロゲンの測定,第5回日本水環境学会シンポジウム講演集, 186 (2002)
- 12) 大岩俊雄、末岡峯数、田辺薫、小森行也、鈴木穰：下水試料を対象としたエストロゲン抱合体のLC-MS/MSによる測定方法, 環境ホルモン学会第7回研究発表会要旨集, 145 (2004)
- 13) 末岡峯数、大岩俊雄、田辺薫、八十島誠、小森行也、田中宏明：下水試料を対象としたエストロゲンのGC/MSによる高感度測定法,第6回日本水環境学会シンポジウム講演集, 97 (2003)