

(39) GC/MSを用いた天然エストロゲン抱合体の分析 における脱抱合処理条件

橋本 健¹・劉 則華¹・奥村 洋一¹・水谷 聡¹・貫上 佳則^{1*}

¹大阪市立大学大学院工学研究科 (〒558-8585大阪市住吉区杉本3-3-138)

* E-mail: kanjo@urban.eng.osaka-cu.ac.jp

GC/MSを用いた天然エストロゲン抱合体の分析法における脱抱合処理とその条件について検討し、抱合体と遊離体を含む混合試料に対する同時分析法について検討した。抱合体の脱抱合処理法として酸処理法と酵素処理法による結果を比較し、酸処理法では80℃で270分、酵素処理法では37℃で24時間、酵素量50μl, pH4.8で処理することが適切であるとわかった。さらに、都市下水を用いた添加回収試験の結果、酵素処理法の平均回収率が酸処理法よりも高くなり、遊離体 (E1, E2)、抱合体 (E1-3S, E2-3S, E3-3S, E1-3G) が同時分析可能であることが確認できた。

Key Words : estrogen conjugates, natural estrogens, GC/MS, Enzyme hydrolysis, Acid hydrolysis

1. はじめに

近年、下水道整備により都市域では水環境の改善が進んでいる。しかしながら依然環境水中には生物に悪影響を及ぼす物質が存在しており、その物質の一つに天然エストロゲンがある。天然エストロゲンは体外に排出される際に硫酸基もしくはグルクロン酸基が付加されてエストロゲン (ER) 活性の低い抱合体となることが知られている¹⁾。これらの抱合体は、下水中や環境水中でER活性の高い遊離体に戻ることが懸念されている²⁾。それゆえ、下水中に含まれる天然エストロゲンをモニタリングするには、遊離体と抱合体を含めた天然エストロゲン全体の挙動を把握することが重要になる。

現在、遊離体と抱合体の測定手法として高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計 (LC/MS/MS) の利用が進められている。しかし、現時点ではLC/MS/MSは十分に普及しておらず、その使用は一部の研究機関や大学の施設に限られている。一方、ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS) はすでに広く普及しており³⁾、GC/MSで天然エストロゲン抱合体を測定する手法を開発することができれば、水環境中の天然エストロゲンの実態把握に広く貢献することができると考えられる。

そこで本研究では、環境庁告示暫定マニュアル⁴⁾の分析法をもとに、GC/MSによるエストロゲン抱合体と遊離

体の同時分析法を確立するため、2種類の脱抱合処理法の条件について検討した。

2. 実験方法

(1) 概要

エストロゲン抱合体を GC/MS で測定するためには、抱合体を遊離体に変換させる操作 (脱抱合操作) と、脱抱合した遊離体を GC/MS の設定温度範囲内でガス化する物質に変換する操作 (誘導体化操作) を行う必要がある。誘導体化操作については環境庁告示暫定マニュアル⁴⁾や伊藤ら⁵⁾が定めた分析条件がある。一方、脱抱合処理については酸処理法⁴⁾と酵素処理法⁶⁾の二通りの方法が提案されているが、いずれの方法でもエストロゲン抱合体全てが測定可能な分析条件は確立されておらず、またどちらの処理法がエストロゲン抱合体の分析で精度が高いのかも解明されていない。そこで本研究では酸処理法と酵素処理法のエストロゲン抱合体全てが測定可能な分析条件の検討、さらに超純水と都市下水試料を用いた添加回収試験を行い、どちらの脱抱合処理法が都市下水や環境水を測定する上で適しているのかを検討した。

(2) 分析方法

測定対象物質は、表-1に示すとおりエストロゲン遊離

体3種、硫酸抱合体3種、グルクロン酸抱合体3種（林純薬社製）とした。内部標準物質には Estrogens surrogate mix I solution (17β -Estradiol- $^{13}C_4$ (E2-13C)・Estriol- $^{13}C_4$ (E3-13C)・Estrone- $^{13}C_4$ (E1-13C)) (いずれも林純薬社製)を用いた。これらの標準液はエストロゲン類を各々メタノールに溶解して調製した。エストロゲン抱合体 (E1-3S, E2-3S, E3-3S, E1-3G, E2-3G, E3-3G) 混合標準溶液 (1 μ g/ml) は、エストロゲンの各標準液を適宜採取混合して、メタノールで段階的に希釈して調整した。その後、標準液と混合標準液を冷蔵保存した。

分析に用いた GC/MS 分析装置は、GC 部に HP6890, MS 部に HP5973MSD (Agilent Technology 社製) を備えたものである。分析条件を表-2と表-3に示す。

(3) 実験方法

a) 酸処理法

環境庁告示暫定マニュアル⁹⁾の酸処理条件で行った伊藤らの報告^{5), 14)}では、硫酸抱合体の脱抱合が確認されているが、グルクロン酸抱合体の脱抱合は確認されていない。その理由として酸処理後の試料中に塩酸が微量に残留し、遊離体を分解している可能性がある。そのため、伊藤らの行った酸処理の方法 (図-1: 方法①) と酸処理後に固相抽出を行って、塩酸を除去する方法 (図-1: 方法②) の2種類の方法を検討した。試料には硫酸抱合体 (E1-3S, E2-3S, E3-3S) とグルクロン酸抱合体 (E1-3G, E2-3G, E3-3G) がそれぞれメタノール 1ml 中に 1 μ g 含まれるよう各抱合体標準溶液 (1 μ g/ml) と硫酸抱合体混合標準溶液 (E1-3S, E2-3S 及び E3-3S 1 μ g/ml), グルクロン酸抱合体混合標準溶液 (E1-3G, E2-3G 及び E3-3G 1 μ g/ml) を用いた。方法②では、酸処理後に試料を超純水で 50ml に希釈し、Bond Elut Jr- C18 (Varian 社製) に通水 (速度 15ml/min) した。通水後、真空マニフォールドで 1 時間空気乾燥し、酢酸エチル (和光純薬社製) 6ml で溶出し、窒素気流下で乾固させた後、Liu ら⁷⁾の方法に従って、誘導体化操作を行い、GC/MS で測定した。

まず伊藤らの文献で脱抱合することが確認されている硫酸抱合体を用いて、図-1に示した2つの方法の違いによる反応時間と脱抱合率の関係を調べ、最適な分析方法を検討した。次に脱抱合率の高い方法を用いて、グルクロン酸抱合体に対する脱抱合条件を反応時間を変化させて脱抱合率を確認し、伊藤ら^{5), 14)}の研究で確認できていないグルクロン酸抱合体の最適な分析条件の検討を行った。

b) 酵素処理法

酵素処理法は環境庁告示暫定マニュアルに定義されていなかったため、Seon ら⁹⁾の方法を参考とし、図-2の手

表-1 測定対象物質

水中での形態		物質名	略称
遊離体		Estrone	E1
		17β-Estradiol	E2
		Estriol	E3
抱合体	硫酸抱合体	Estrone-3-Sulfate	E1-3S
		Estradiol-3-Sulfate	E2-3S
		Estriol-3-Sulfate	E3-3S
	グルクロン酸抱合体	Estrone-3-Glucuronide	E1-3G
		Estradiol-3-Glucuronide	E2-3G
		Estriol-3-Glucuronide	E3-3G

表-2 GC/MS 分析条件

カラム温度	70℃ (2分間保持) → 20℃/分 → 200℃ (0分間保持) → 10℃/分 → 295℃ (20分間保持)
カラム	HP社製 HP5 - MS (30nm × 0.25mm i.d., 0.25 μ m)
カラム流速	1.0ml/min
注入口温度	250℃
イオン源温度	230℃
注入モード	バルスドスプリットレス
バルス圧力	28psi
注入量	3 μ l

表-3 GC/MS 測定における SIM モニターイオン

物質名	測定質量数 (m/z)	
	定量イオン	定性イオン
E1	327	348
E2	443	367, 500
E3	367	247, 273
E1-13C	331	352
E2-13C	447	371, 504
E3-13C	371	251, 277

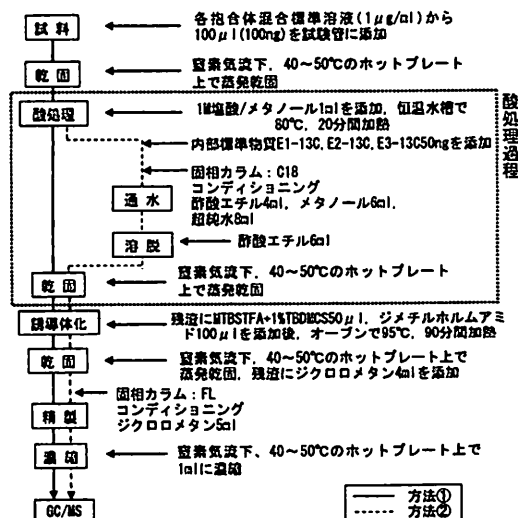


図-1 酸処理法によるエストロゲン抱合体の分析手順

順で行った。試料には、酸処理法の検討に用いた各抱合体標準溶液 (1 μ g/ml) と硫酸抱合体混合標準溶液 (各 1 μ g/ml), グルクロン酸抱合体混合標準溶液 (各 1 μ g/ml) を用いた。試料を窒素乾固後, 硫酸抱合体試料には Sulfatase from *Helix pomatia* (Sigma 社製) を 50 μ l と, 0.2M 酢酸ナトリウム溶液を酢酸で pH を 5.0 に調製し, L-アスコルビン酸を加えた L-アスコルビン酸含有 0.2N 酢酸緩衝液 (pH5.0) (和光純薬社製) を 1ml 加えた。グルクロン酸抱合体試料には, β -Glucuronidase from *Helix pomatia* (Sigma 製) を 50 μ g と, L-アスコルビン酸含有 0.2N 酢酸緩衝液 (pH5.0) (和光純薬社製) を 1ml 加え, インキュベータで加温した。その後, 各試料を 100ml の超純水で希釈し, それに炭酸カリウム 100mg を加えた。希釈したサンプルを C18 固相抽出カラムに通水後, 酢酸エチル 6ml で溶脱した。乾固直前で各々に内部標準物質 E1-13, E2-13, E3-13C (1 μ g/ml) から 50 μ l (50ng) 添加し, 完全に乾固した後, 酸処理法と同様の誘導体化操作を行い, GC/MS で測定した。

Seon ら⁹⁾の研究は, 人の尿中のエストロゲン濃度を測定するための方法なので, 環境試料でも適用できるのかを検討する必要がある。そのため, Seon らが提案している 37 $^{\circ}$ C, 反応時間 12h, 酵素量 50 μ l の条件と, 55 $^{\circ}$ C, 反応時間 3h, 酵素量 50 μ l の条件で実験を行った結果, 37 $^{\circ}$ C, 反応時間 12h, 酵素量 50 μ l で全てのエストロゲン抱合体の脱抱合が確認できた。そのため, 温度条件を 37 $^{\circ}$ C で一定とし, 脱抱合率に影響すると考えられる反応時間と酢酸緩衝液の pH の最適条件について検討を行った。

(4) 実試料を用いた確認方法

都市下水は, K 下水処理場にて 2009 年 1 月にスポット採水した。超純水 1L と都市下水 1L に遊離体 E1, E2 及び E3 を各々 50ng, 硫酸抱合体 E1-3S, E2-3S 及び E3-3S を各々 150ng, グルクロン酸抱合体 E1-3G, E2-3G 及び E3-3G を各々 150ng 添加して添加回収実験用の試料を用意し, 後述の図-9 の前処理法を行った。

(5) 評価方法

脱抱合操作を行うと, エストロゲン抱合体 1 分子から遊離体 1 分子が生成される。そのため, GC/MS による遊離体測定値のモル濃度を, 抱合体のモル濃度で除して脱抱合率を算出した。そして目標脱抱合率を下水試験法⁹⁾を参考にして 60~120% と設定した。

検量線は 6.75~100ng/ml の範囲で内部標準法を用いて作成した。内部標準物質である E1-13C, E2-13C, E3-13C は脱抱合処理前に添加すると物質が変化し, 測定物質の質量数 (m/z) と重なることが報告されている⁹⁾ ので, 脱

抱合操作後に添加した。なお, 検出下限値は, E1 遊離体と抱合体が 1.52ng/ml, E2 遊離体と抱合体が 1.80ng/ml, E3 遊離体と抱合体が 1.63ng/ml であった。定量下限値はそれぞれ, 5.07ng/ml, 5.99ng/ml, 1.63ng/ml, 変動係数は, 6.68%, 7.87%, 7.47%, 重相関 R² は, 0.9995, 0.994, 0.997 であった。

3. 実験結果と考察

(1) 酸処理の検討

各硫酸抱合体標準溶液 (1 μ g/ml), 硫酸抱合体混合標準溶液 (各 1 μ g/ml) から液量 100 μ l (100ng) をそれぞれ 10ml ねじ口試験管に添加したものを試料とし, 図-1 の実験手順で行った。図-3 に反応温度を 80 $^{\circ}$ C で一定とした際の方法①と方法②での酸処理の反応時間と脱抱合率との関係を示す。図-3 から, 方法①と方法②を比較すると, 方法②の E1-3S と E2-3S の脱抱合率が反応時間 30 分で約 130%, E3-3S が 103% に達し, 方法①よりも高いことから, 方法②の操作で反応温度 80 $^{\circ}$ C, 反応時間 30 分とすることが硫酸抱合体の適切な酸処理条件であると考えられる。

次に各グルクロン酸抱合体標準溶液 (1 μ g/ml), グルクロン酸抱合体混合標準溶液 (各 1 μ g/ml) から液量 100 μ l (100ng) をそれぞれ 10ml ねじ口試験管に添加したものを試料とし, 図-1 の方法②で実験手順で行った。反

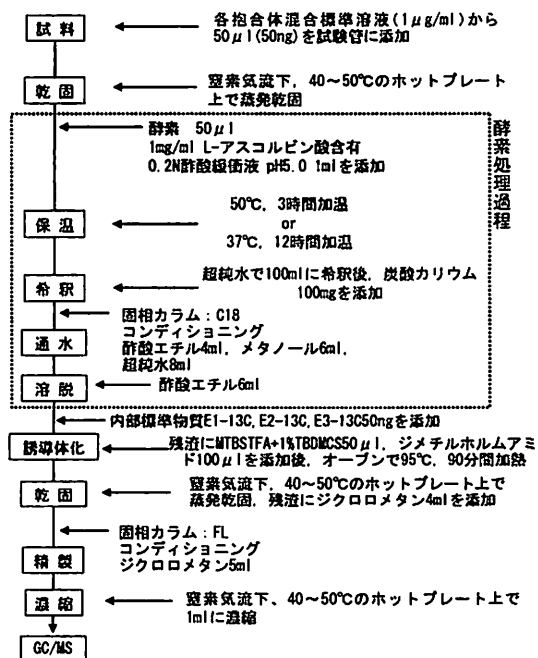


図-2 酵素処理法によるエストロゲン抱合体の分析手順

応温度 80℃における方法②での反応時間と脱抱合率との関係を図-4 に示す。図-4 から、反応時間 270 分で E1-3G と E3-3G の脱抱合率が約 80%、E2-3G の脱抱合率が 56%と最大値を示し、その後減少する傾向を示した。この時の脱抱合率は、E1-3G と E3-3G では目標値を達成したが、E2-3G の脱抱合率は目標値に達しなかった。また反応時間 270 分での硫酸抱合体の脱抱合率はいずれも目標値を達成していることから、E2-3G 以外のエストロゲン抱合体を同時に分析するための適切な酸処理条件は、反応温度 80℃、反応時間 270 分であることがわかった。

(2) 酵素処理の検討

各抱合体標準溶液 (1 μ g/ml)、硫酸抱合体混合標準溶液 (各 1 μ g/ml)、グルクロン酸抱合体混合標準溶液 (各

1 μ g/ml) から液量 50 μ l (50ng) をそれぞれ 10ml ねじ口試験管に添加したものを試料とし、図-2 の実験手順で行った。反応時間だけを 12 時間、24 時間、48 時間と変えた時の結果を各々図-5 と図-6 に示す。一方、E1-3G と E2-3G の脱抱合率は反応時間にあまり影響されなかったが、E3-3G の脱抱合率は 24h で最大となった。E1-3S、E2-3S および E3-3S は反応時間が 24h で脱抱合率が 100%付近に達し、良好な結果が得られた。これらの結果から、グルクロン酸抱合体と硫酸抱合体に対する反応時間は 24h が最適であると判断できる。

次にグルクロン酸抱合体試料の pH を酢酸緩衝液を用いて 5.0 もしくは 4.8 に調整した試料を用意し、反応時間を 24h とした以外は Seon ら⁹⁾ の条件で行った。その結果を図-7 に示す。pH を 5.0 から 4.8 に変えることにより、

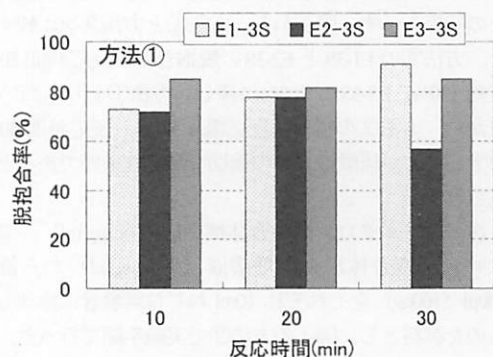


図-3 2 種類の酸処理法による反応時間と硫酸抱合体の脱抱合率との関係

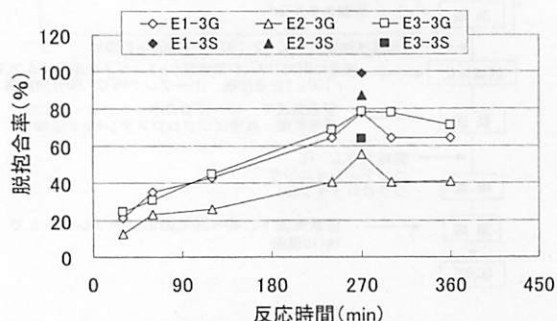


図-4 方法②における反応時間とグルクロン酸抱合体の脱抱合率との関係

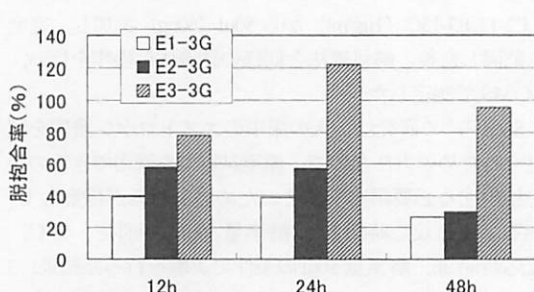


図-5 反応時間を変化させた時のグルクロン酸抱合体の脱抱合率

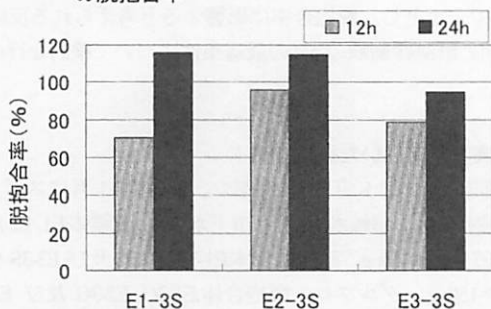


図-6 反応時間を変化させた時の硫酸抱合体の脱抱合率

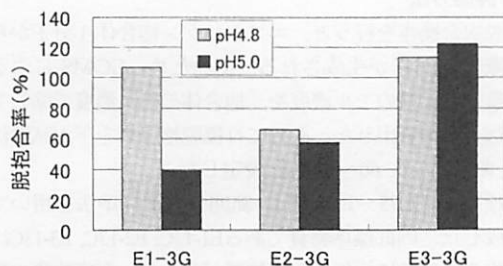


図-7 pH を変化させた時のグルクロン酸抱合体の脱抱合率

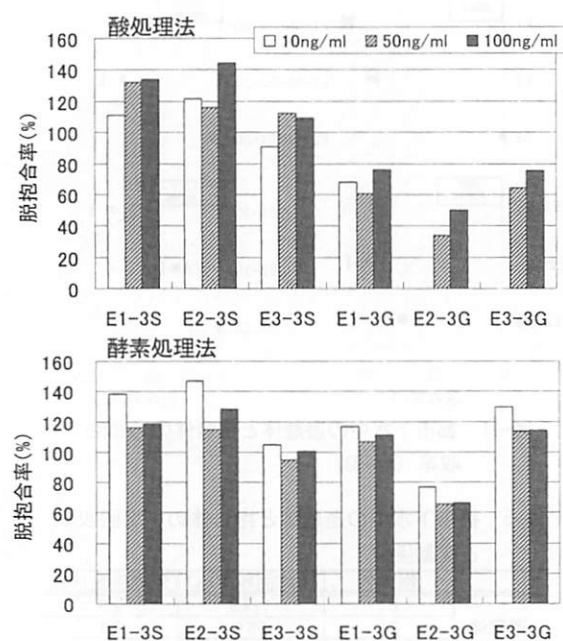


図-8 それぞれの濃度における抱合体の脱抱合率 (n=3)

E1-3G と E2-3G の脱抱合率が上昇して目標値に達したので、酢酸緩衝液の pH は 4.8 が適切であると判断できる。以上の結果から、酵素処理法は 37℃ で 24h、酵素量を 50μl とし、酢酸緩衝液の pH を 4.8 に設定することでエストロゲン抱合体に対して高い脱抱合率が得られることがわかった。

(3) 抱合体の濃度の違いによる脱抱合率への影響

酸処理法と酵素処理法における硫酸抱合体とグルクロン酸抱合体の濃度の違いによる脱抱合率への影響について検討した。既存文献⁹⁻¹³⁾を参考に、各抱合体混合標準溶液 (各 1μg/ml) から液量 100μl (各 100ng)、液量 50μl (各 50ng)、各抱合体混合標準溶液 (各 100ng/ml) から液量 100μl (各 10ng) をそれぞれ 10ml ねじ口試験管に添加したものを試料とした。図-8 に、10ng/ml、50ng/ml、100ng/ml の各抱合体濃度に対する脱抱合率を示す。酸処理法では、3 段階の濃度ともグルクロン酸抱合体の脱抱合率が低くなり、特に 10ng/ml の E2-3G と E3-3G は検出することができなかった。これに対して、酵素処理法では、E2-3G 以外は高い脱抱合率が得られ、E2-3G の脱抱合率も目標値をこらうじて達成することができた。ただ 10ng/ml では E1-3S と E2-3S の脱抱合率が 130% を超える大きな値を示した。全体的にみて、10ng/ml の場合は他の濃度と比べて 10~20% 程度脱抱合率が高くなる傾向がみられた。このように、酸処理法では 10ng/ml のグルク

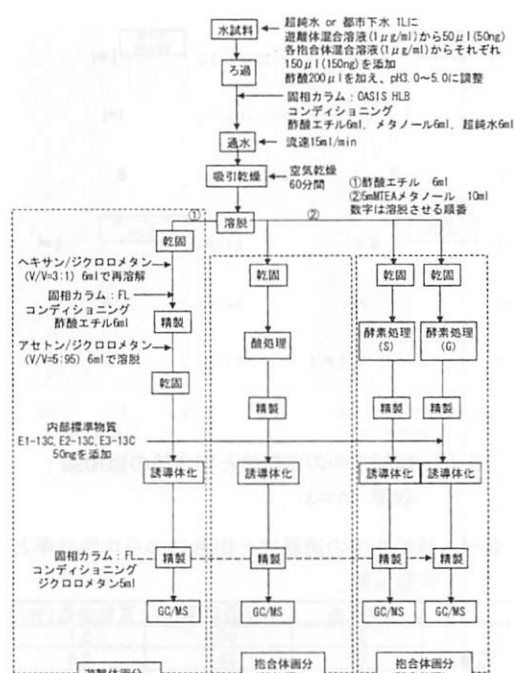


図-9 前処理フロー図

ロン酸抱合体が測定できなかったが、酵素処理を行えば、6 種類すべての抱合体が分析可能となった。

(4) 遊離体と抱合体の混合試料への適用性

遊離体と抱合体の混合試料に対する分析法の確認のため、超純水と都市下水を用いて添加回収試験を行った。図-9 に手順を示す。試料は遊離体混合溶液 (各 1μg/ml) から液量 50μl (各 50ng) と各抱合体混合標準溶液 (各 1μg/ml) から液量 150μl (各 150ng) と酢酸を添加して試料の pH を 3.0~5.0 に調整した超純水と都市下水をそれぞれ全量を 1L としたものである。まずろ過を行い、その後 OASIS HLB カラム (OASIS 社製) に通水し、空気乾燥後、酢酸エチル 6ml、5mM TEA 含有メタノール 10ml の順に溶脱し、遊離体画分、抱合体画分とした。遊離体画分は、FL カラムを用いて精製を行い、その後窒素気流下で乾固直前まで揮発させ、内部標準物質 E1-13C, E2-13C, E3-13C (各 1μg/ml) から液量 50μl (各 50ng) を添加し、乾固後、誘導体化操作を行い、GC/MS で測定した。抱合体画分は乾固後、5mM TEA 含有メタノール 3ml を添加し、混合後、1ml ずつねじ口試験管に分け、それぞれ酸処理、硫酸酵素処理 (S)、グルクロン酸酵素処理 (G) の画分として 3. (1), (2) で得られた処理条件で脱抱合操作を行った。脱抱合操作後、精製操作、誘導体化操作して GC/MS で測定した。

なお下水試験方法に記載のある規定値(平均回収率が

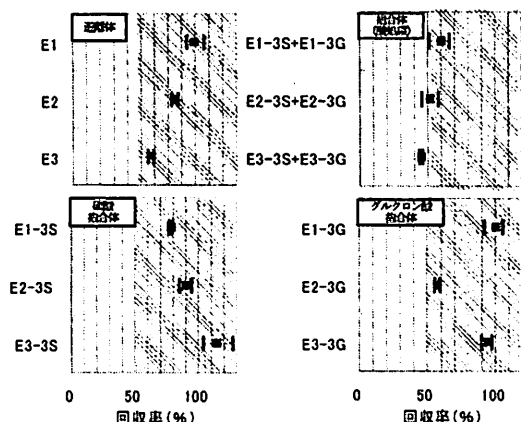


図-10 超純水中の遊離体と抱合体の添加回収率 (n=3)

表-4 超純水中の遊離体と抱合体の平均回収率と変動係数

	物質名	平均回収率(%)	変動係数(%)
遊離体	E1	88.7	5.7
	E2	74.7	2.6
	E3	57.4	2.5
酸処理	E1-3S,E1-3G	59.8	10.4
	E2-3S,E2-3G	51.8	9.6
	E3-3S,E3-3G	45.1	2.7
酵素処理	E1-3S	78.1	1.1
	E2-3S	90.0	4.2
	E3-3S	114.4	7.3
	E1-3G	100.5	5.0
	E2-3G	57.2	2.3
	E3-3G	94.0	2.9

(n=3)

50%~120%, 変動係数が20%以下)を目標とした。超純水を用いて添加回収試験を行った結果を図-10と表-4に示す。遊離体はE1, E2及びE3とも変動係数が6%以下と安定したが、E3の回収率は50%台となり、E1やE2と比較すると低かった。これはE3の高い極性のため、E3が酢酸エチルによって溶脱されにくくなるのではないかと考えられる。一方、抱合体では酸処理のE3-3SとE3-3Gを除いた全てのサンプルで平均回収率の目標値を達成することができた。また全てのサンプルで変動係数の目標値を達成できた。

都市下水を用いて添加回収試験を行った結果を図-11と表-5に示す。遊離体ではE1とE2が、酸処理法を用いた抱合体ではE1-3S, E1-3G, E2-3S及びE2-3Gが、硫酸酵素を用いた処理法では全ての硫酸抱合体が、グルクロン酸酵素を用いた処理法ではE1-3Gがそれぞれの回収率と変動係数の目標値を達成できた。酸処理による硫酸抱合体の回収率と酵素処理による硫酸抱合体の回収率を比較すると、硫酸酵素処理の方が変動係数が小さく安定していた。これは酸処理によって抱合体が十分に精製できていなかったためであると考えられた。その原因として酸処理後、C18カラムに通水する際のpHが低いためだと考えられる。J.B quintanaらの研究では、C18カ

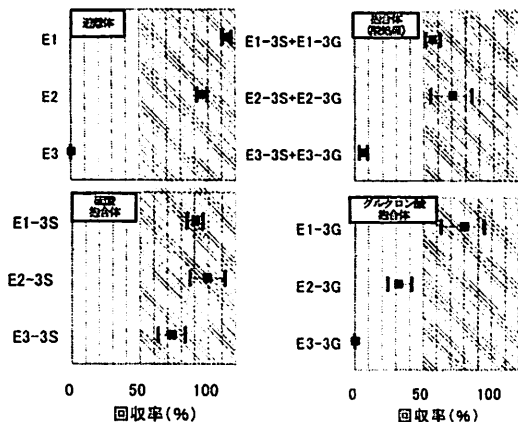


図-11 都市下水中の遊離体と抱合体の添加回収率 (n=3)

表-5 都市下水中の遊離体と抱合体の平均回収率と変動係数

	物質名	平均回収率(%)	変動係数(%)
遊離体	E1	114.9	2.6
	E2	95.9	3.1
	E3	—	—
酸処理	E1-3S,E1-3G	56.4	7.7
	E2-3S,E2-3G	70.4	17.2
	E3-3S,E3-3G	6.3	46.3
酵素処理	E1-3S	90.7	5.4
	E2-3S	99.0	10.5
	E3-3S	73.3	11.1
	E1-3G	79.9	16.3
	E2-3G	31.6	24.4
	E3-3G	—	—

(n=3)

ラムはpH7.0付近であれば夾雑物質の保持を抑制できると報告されている¹⁷⁾。また、酸処理操作で硫酸抱合体の回収率とグルクロン酸抱合体の回収率を比較すると、グルクロン酸抱合体の回収率が小さくなった。これは超純水による添加回収試験において、グルクロン酸抱合体はほぼすべてのサンプルで下水試験法の規定値を満たしていることも考慮に入れると、グルクロン酸抱合体の方が硫酸抱合体よりも、夾雑物質の影響を受けやすく、脱抱合しにくいためであると考えられる。さらに酸処理法と酵素処理法とでは、酵素処理法による平均回収率の方が高く、変動係数が小さくて安定していた。しかし、脱抱合処理は夾雑物質や他の共存物質の影響を受ける恐れがあるので、5mM TEA 含有メタノールで溶脱後や脱抱合処理の前後に精製操作を行う必要があると考えられる。

以上の結果より、酵素処理法が脱抱合処理として安定していること、また都市下水中のE1とE2、3種の硫酸抱合体、及びE1-3Gが測定できること、しかし都市下水中のE3とE2-3G及びE3-3Gを測定することは難しいことがわかった。また添加回収試験で用いたエストロゲン濃度(各50ng/L)は、既存文献^{15),16)}から都市下水中にはE1, E2遊離体6~29ng/L, E3遊離体100~134ng/L, 硫酸抱合体E1-

3S, E2-3S, E3-3S 1~110ng/L, グルクロン酸抱合体 E1-3G, E2-3G, E3-3G 11~54ng/L の範囲内に存在することから, 本法は都市下水での E1 と E2, 硫酸抱合体 E1-3S, E2-3S, E3-3S, 及び E1-3G の同時分析法として適用可能であるとわかった。

4. 結論

本研究では, GC/MSを用いてエストロゲン遊離体と硫酸抱合体, 及びグルクロン酸抱合体の同時分析条件について検討し, 以下の結果が得られた。

- 1) 酸処理法では, 1M塩酸メタノールを用いて80℃, 270分の反応条件で硫酸抱合体とグルクロン酸抱合体が分析可能であることがわかった。
- 2) 酵素処理法では, 緩衝液にL-アスコルビン酸含有酢酸緩衝溶液 (pH4.8, 酢酸濃度0.2N) を用い, 酵素処理の条件を37℃, 24h, 酵素量を50μlとすることが, 適切であることがわかった。
- 3) 酵素処理法では, 10~100ng/mlの濃度範囲でも6種全てのエストロゲン抱合体が分析可能であることが分かった。
- 4) 超純水を用いた添加回収試験では, 遊離体と抱合体 (E3-3S, E3-3Gを除く) の平均回収率が目標値を満足した。
- 5) 都市下水中のE1とE2, E1-3S, E2-3S, E3-3S及びE1-3Gの平均回収率は, 目標値を達成した。
- 6) 酸処理法と酵素処理法を比較すると, 酵素処理法の方が分析可能な抱合体の種類が多かったことから, 環境試料の分析には酵素処理の方が適切であると判断できる。

参考文献

- 1) 社団法人日本水環境学会関西支部: アプローチ環境ホルモン—その基礎と水環境における最前線— 技報堂出版
- 2) 小林義和ら: 都市下水の高度処理システムにおける遊離体および抱合体エストロゲン類の動態, 環境衛生工学研究, Vol.20, No3, pp.55-58, 2006
- 3) 日本分析化学会ガスクロマトグラフィー研究懇談会: ガスクロ自由自在Q&A準備・試料導入編, 丸善, 2007
- 4) 環境庁水質保全局水質管理課: 外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル(水質, 底質, 水生生物), 1998
- 5) 伊藤伸一ら: 固相抽出-GC/MS法を用いたエストロゲン

の分析, 水道協会雑誌, Vol. 69, No. 12, pp.41-48

- 6) Seon et al: Estrogens and polyamines in breast cancer: their profiles and values in disease staging cancer Letters, pp.47-56, 1998
- 7) Ze-hua et al: Simultaneous analysis of natural estrogens and their conjugates in wastewater by GC-MS, 投稿準備中
- 8) 日本下水道協会: 下水試験方法(追補暫定版)-内分泌攪乱化学物質及びクリプトスポリジウム編-, pp.58-72, 2002
- 9) 北本靖子ら: エストロゲンとその抱合体の水源における存在状況及び高度浄水処理における挙動, 第17回環境化学討論会講演要旨, pp.592-593, 2008
- 10) 小林義和ら: 都市下水の高度処理システムにおける遊離体および抱合体エストロゲン類の動態, 環境衛生工学研究, Vol.20, No3, pp.55-58, 2006
- 11) 富士栄ら: 液体クロマトグラフィータンデム質量分析計による東京都島しょ及び奥多摩地域における水道水中の女性ホルモンの分析, 東京健康安全研究センター年報, pp.293-297, 2005
- 12) 北本靖子ら: エストロゲンとその抱合体の水源における存在状況及び高度浄水処理における挙動, 水道協会雑誌, Vol.77, No.12, pp.2-12, 2008
- 13) 今井ら: GC/MS法によるエストロゲン抱合体分析方法の検討, 下水道研究発表会講演集, Vol.44, pp.121-123, 2007
- 14) 伊藤伸一ら: 河川水中でのエストロゲン及びその抱合体の生分解性, 水道協会雑誌, Vol. 71, No. 11, pp.26-34
- 15) 小森行也ら: 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, pp.186, 2002
- 16) 末岡数ら: LC/MS/MSによるエストロゲン抱合体の分析方法と下水試料への適用, 環境工学研究論文集, Vol. 42, pp.274, 2005
- 17) J.B quintanaら: Determination of natural and synthetic estrogens in water by gas chromatography with mass spectrometric detection, Journal of chromatography, pp.182, 2004

(2009.5.22受付)

Analytical condition for natural conjugated estrogens with Gas Chromatography – Mass Spectrometry

Takeshi HASHIMOTO¹, Ze-hua LIU¹, Yoichi OKUMURA¹, Satoshi MIZUTANI¹ and
Yoshinori KANJO¹

¹Graduate School of Engineering, Osaka City University

Suitable deconjugation condition of acid hydrolysis method and enzyme hydrolysis method were examined for natural estrogen and their conjugates.

The result shows that suitable condition for acid hydrolysis method was 80°C for 270 minutes, and that for enzyme hydrolysis method was 37°C for 24 hrs with 50µl of each enzyme and buffer (pH4.8). The result of additive recovery test with sewage samples confirmed that natural estrogens (E1,E2) and their conjugates(E1-3S,E2-3S,E3-3S and E1-3G) are analyzed simultaneously. In addition, average recovery ratio was by the enzyme hydrolysis higher than that by acid hydrolysis method.