

[資料]

GC/NCI-MS法を用いた鴨川河川水、底質試料中のエストロゲンの分析

野尻喜好 茂木守 細野繁雄

1 はじめに

これまで、国内における内分泌かく乱化学物質に関する水環境調査においてノニルフェノール、4-tert-オクチルフェノール、ベンゾフェノン、ビスフェノールA、フタル酸エステル類などが高頻度で検出されている¹⁾。人畜由来ホルモンであるエストロゲンは内分泌かく乱化学物質としてよく知られているノニルフェノールをはじめ、その他前述の化学物質と比べてエストロゲン様活性がかなり高いことが示されている²⁾。ただし、その環境中の濃度レベルは低く、環境省で規定している分析法³⁾(以下、環境省マニュアルという)においては、水質試料で0.1ng/L、底質試料で0.01 μg/kgの目標検出下限が求められている。そのため、環境省マニュアルでは測定にペンタフルオロベンジル誘導体化・GC/NCI-MS法と高分解能等の高感度MSを用いてのメチル誘導体化・GC/MS-SIM法が採用されている。

NCI(負イオン化学イオン化)-MS法は、一般に用いられているEI(電子イオン化)-MS法と比較し、電子親和性の高い化合物を、高感度、高選択的に測定できる手法である⁴⁾。分子中にフェノール性水酸基をもつエストロゲンはペンタフルオロベンジル誘導体化されることにより電子親和性が高まり、NCI-MS法で測定可能となる。

本資料では、環境省マニュアルに示されている17α-エストラジオール、17β-エストラジオールに加え、水環境中に存在が認められているエストロン、エストリオールを含めた一斉分析を目的とし、環境省マニュアルにおけるGC/NCI-MS法を修正した結果を報告する。また、この分析方法を用い、河川水、底質試料中のエストロゲン濃度を測定した結果を示す。

2 実験方法

2.1 試薬

標準物質である17α-エストラジオール(α-E2)はDr. Ehrenstor GmbH製、17β-エストラジオール(β-E2)はMerck製、エストロン(E1)はAcros Organics製、エストリオール(E3)はCalbiochem-Novabiochem製を用いた。ラベル化合物である17β-エストラジオール-d₄(β-E2-d₄)は関東化学製、エストロン-¹³C₄(E1-¹³C₄)、エストリオール-¹³C₄(E3-

¹³C₄)、エチニルエストラジオール-d₂, -¹³C₂(EE2-d₂, -¹³C₂)は林純薬工業製を用いた。

有機溶媒類は、すべて関東化学製の残留農薬測定用を用いた。水は精製水(日本ミリポア製、超純水装置MQ Gradient)を使用した。

誘導体化に用いた試薬である炭酸カリウム、2-プロパノールは関東化学製、18-クラウン-6、臭化ペンタフルオロベンジル(PFBBBr)はAldrich-Chemical製、トリメチルシリルイミダゾール(TMSI)は和光純薬製を用いた。

水試料の固相抽出にはWaters製Sep-Pak Plus C18(C18カートリッジ)または3M製Empore C18 Extraction Disk φ47 mm(C18ディスク)を用いた。水質試料のろ過にはWhatman製ガラス繊維ろ紙(GF/C)を用いた。水試料ならびに底質試料のクリーンアップ操作にはWaters製Sep-Pak Plus Silica(シリカゲルカートリッジ)、Sep-Pak Plus Florisil(フロリジルカートリッジ)、昭和電工製 EDS-1 SC400mg(EDS-1カートリッジ)を用いた。

2.2 装置及び測定条件

GCはHP6890(Agilent製)、MSはGCmate II BU25(日本電子製)、また、分離カラムはDB-5MS(0.25mm i.d.×30m, df=0.25 μm J&W製)を用いた。イオン化電圧は70eVとし、化学イオン化の反応ガスはイソブタンを用いた。GC/MSの測定条件は表1に示した。

表1 GC/MSの装置及び測定条件

GC部				
使用機器	HP6890			
分離カラム	DB-5MS (0.25mm i.d.×30m, df=0.25 μm)			
キャリアーガス	He(1.2mL/分)			
注入モード	splitless			
注入口温度	270°C			
注入量	0.5 μL			
カラムオープン温度	150°C(1分)→10°C/分→300°C(6分)			
MS部				
使用機器	日本電子 GCmate II BU25			
イオン化モード	CI ネガティブ			
イオン源温度	300°C			
トランスファーライン温	300°C			
測定モード	SIM			
イオン化電圧	70eV			
反応ガス	イソブタン			
分解能	600			
モニターイオン m/z	α-E2	343.2	β-E2	343.2
	E1	269.2	E3	431.2
	β-E2-d ₄	347.2	E1- ¹³ C ₄	273.2
	E3- ¹³ C ₄	435.3	EE2-d ₂ , - ¹³ C ₂	371.2

質量スペクトルはSCANモード(測定質量範囲 $m/z=150\sim 500$ 、走査速度 0.5秒/scan)で測定した。定量にはSIM法を用い、表1に定量に使用した各エストロゲンの設定質量数(m/z)を示した。定量における内標準物質は、対応するラベル化合物を用いたが、 17α -E2は β -E2-d4を内標準物質とした。また、EE2-d2、 $-^{13}C_2$ は内標準物質の回収率を確認するために使用した。

3 結果および考察

3.1 質量スペクトル

図1に環境省マニュアルに従いPFB、TMS誘導体化した β -E2、E1、E3の質量スペクトルを示す。ここでの誘導体化では、エストロゲン中のフェノール性水酸基がPFB化され、残りのアルコール性水酸基はTMS化されている⁵⁾。各エストロゲンの質量スペクトルは、 $[M-PFB]^-$ の基準ピークが生成しており、その他のフラグメントイオンは認められなかった。また、 $[M-PFB+1]^-$ が2番目に強いピークとして出現したが、これは、イオン中に ^{13}C 、 ^{29}Si が含まれるためと考えられる⁶⁾。

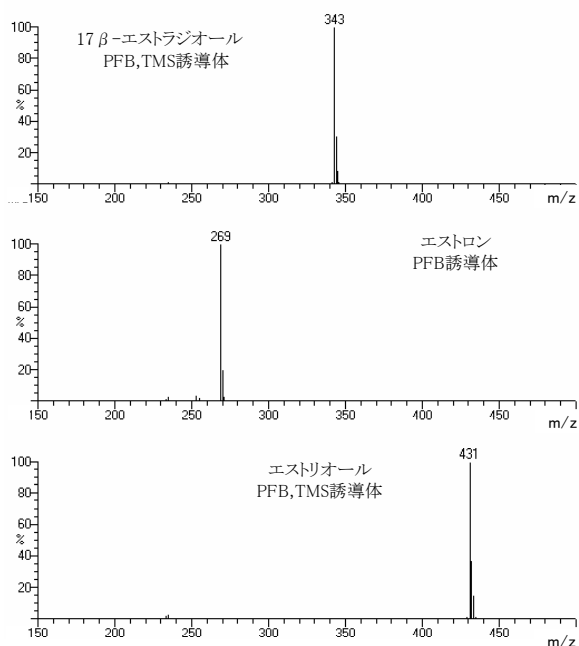


図1 誘導体化したエストロゲンの質量スペクトル

3.2 クリーンアップ等の検討

水質試料と底質試料を対象とした検討結果の分析手順をそれぞれ、図2、図3に示す。水質試料、底質試料とも基本的な操作は環境省マニュアルに準拠した。主な修正点は以下の(1)から(6)のとおりである。

(1) E1、E3を分析対象に含めることから、ラベル化合物であるE1- $^{13}C_4$ 、E3- $^{13}C_4$ を β -E2-d4と同様に各5ng添加した。

(2) フロリジルカートリッジによるクリーンアップ操作において、E3は α -E2、 β -E2、E1と異なる挙動を示し、図2に示した5%アセトン・ジクロロメタン6mLの画分(Fr.1)では溶出せず、50%アセトン・ジクロロメタン6mLでの画分(Fr.2)に溶出した。よって、E3も含め分析対象とするので、Fr.1とFr.2を混合し、以後の誘導体化操作を行った。

(3) PFB誘導体化後のE3のヘキサンによる抽出率は、環境省マニュアルにおけるヘキサン2mLによる2回抽出で約60%であったが、5%酢酸エチル・ヘキサン2.5mLによる2回抽出で約80%まで上がった。よって、E3の抽出を良好に行うため、5%酢酸エチル・ヘキサン2.5mLで3回抽出した。

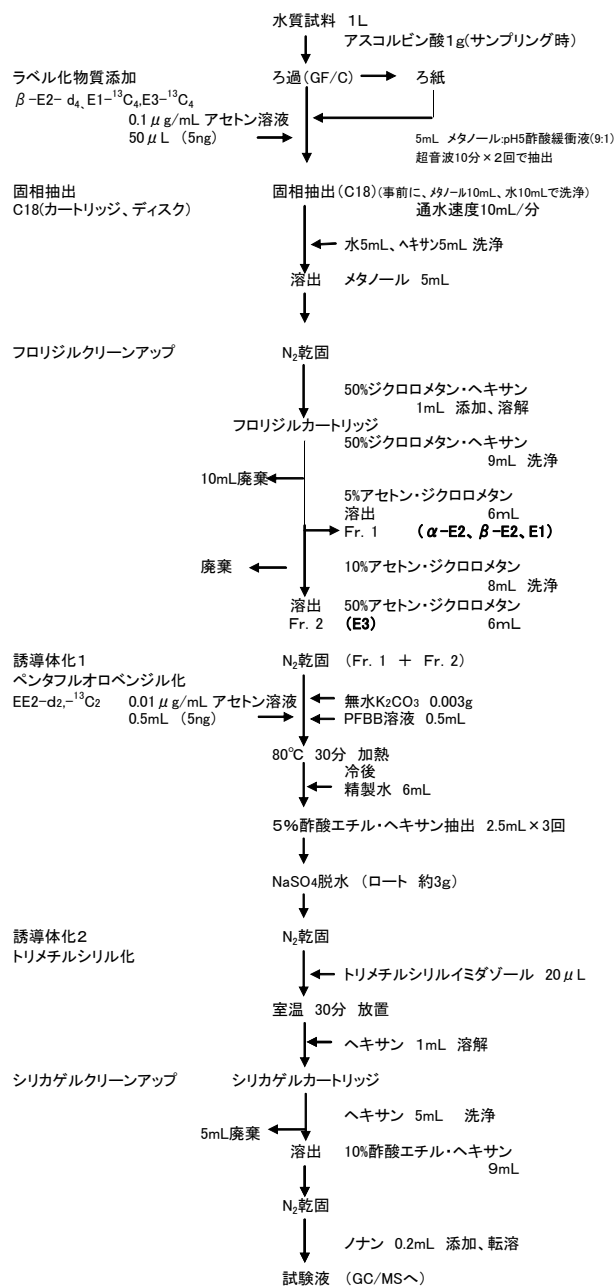


図2 水質試料中のエストロゲン分析手順

(4) TMS誘導体化後のシリカゲルカートリッジによるクリーンアップ操作において、環境省マニュアルの10%酢酸エチル・ヘキサン5mLでは、E1のカートリッジからの溶出が不十分であったことから溶離液を10%酢酸エチル・ヘキサン9mLとした。

(5) 底質試料の分析では、メタノール抽出後、メタノールを除去し、塩酸酸性でジクロロメタンへ抽出する操作とした。環境省マニュアルではメタノール除去後、C18カートリッジを使用する操作となっているが、E3が十分保持されないことが予想されることから変更した。

(6) 夾雑物質が多い底質試料において、フロリジルカートリッジによるクリーンアップ操作のみでは、試験液が着色を呈することがあった。そこで、EDS-1カートリッジを用いたクリーンアップを実施したところ、試験液の着色の除去に有効であることが認められた。

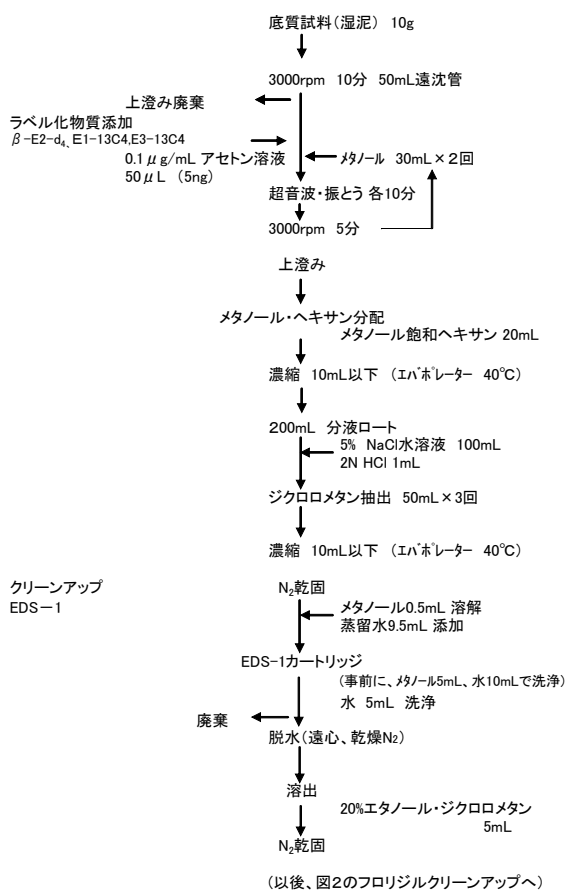


図3 底質試料中のエストロゲン分析手順

3.3 内標準物質の回収率

内標準物質として添加したE1-¹³C₄、β-E2-d₄、E3-¹³C₄の回収率を求めめるため、PFB誘導体化時にEE2-d₂-¹³C₂を5ng添加し、次式に従って内標準物質の回収率を算出した。

内標準物質回収率(%)

$$= (AI_{\text{Sample}}/AEE2_{\text{Sample}}) / (AI_{\text{Std}}/AEE2_{\text{Std}}) \times 100$$

AI_{Sample} : 内標準物質のピーク面積

AEE2_{Sample} : EE2-d₂-¹³C₂のピーク面積

AI_{Std} : 標準液の内標準物質のピーク面積

AEE2_{Std} : 標準液のEE2-d₂-¹³C₂のピーク面積

その結果、河川水をC18ディスクで固相抽出した場合、内標準物質の回収率は、β-E2-d₄が57~76%、E1-¹³C₄が67~95%、E3-¹³C₄が44~83%であった。底質試料での回収率はβ-E2-d₄が76~78%、E1-¹³C₄が107~108%、E3-¹³C₄が71~84%であった。

河川水では、E3-¹³C₄の回収率が50%を下回る結果が示されたが、分析値はラベル化物質をサロゲートとして用いているので補正されていると考えられる。また、底質試料と比較し、河川水で内標準物質の回収率の低下が生じており、この原因は、C18ディスクによる河川水の固相抽出において、E3の保持が不十分であったためと推測された⁷⁾。

3.4 検出下限値

各標準物質0.1ngを、図2に示すとおり誘導体化し、表1に示す条件で5回測定を行った。その測定値の標準偏差の3倍を装置の検出下限とした。この装置の検出下限から、水質試料1L、乾燥底質試料10gを試料量とした場合の検出下限を表2に示す。

環境省マニュアルで示されているエストラジオールの目標検出下限は水質試料で0.1ng/L、底質試料で0.01 μg/kg-dsである。今回改良した方法は、E1、E3ともこの検出下限以下となった。

図4に標準溶液、河川水、底質試料のSIMクロマトグラムを示す。標準溶液のクロマトグラムは、環境省マニュアルで目標検出下限に相当する濃度のものであるが、S/N比は100以上となった。また、河川水、底質試料のクロマトグラムとも夾雑物質による影響はあまりなく、各エストロゲンが測定できた。

表2 水質試料、底質試料におけるエストロゲン検出下限

	水質試料 (ng/L)		底質試料 (μg/kg-ds)		装置の検出下限 (pg)
	要調査*	本法**	要調査*	本法**	
α-E2	0.1	0.008	0.01	0.0008	0.02
β-E2	0.1	0.008	0.01	0.0008	0.02
E1	—	0.02	—	0.002	0.05
E3	—	0.02	—	0.002	0.05

* 「要調査項目等調査マニュアル 平成11年12月 環境庁」に示されている目標検出下限

** 水質試料1L、乾燥底質試料10gを試料量とし、装置の検出下限より算定した検出下限

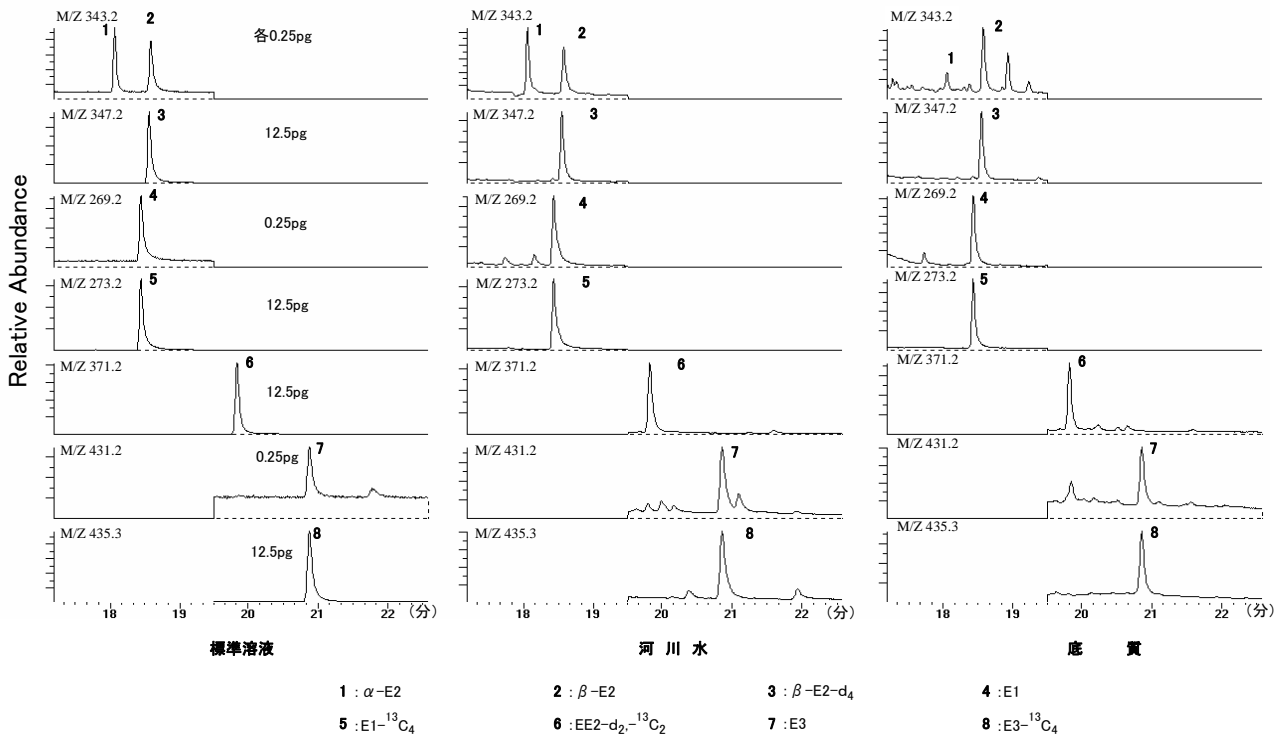


図4 標準溶液、河川水、底質試料のSIMクロマトグラム

3.5 鴨川河川水質および底質の測定

3.5.1 鴨川及びその流域の概要

鴨川は埼玉県の主要河川である荒川に合流する河川で、上尾市、さいたま市を主な流域とし、水質的には生活排水や事業場排水の影響を受けている都市河川とみなせる。平成15年7月から平成16年4月にかけて調査を実施した鴨川の採取地点の概略図と地点名を図5に示す。鴨川の左岸流域の

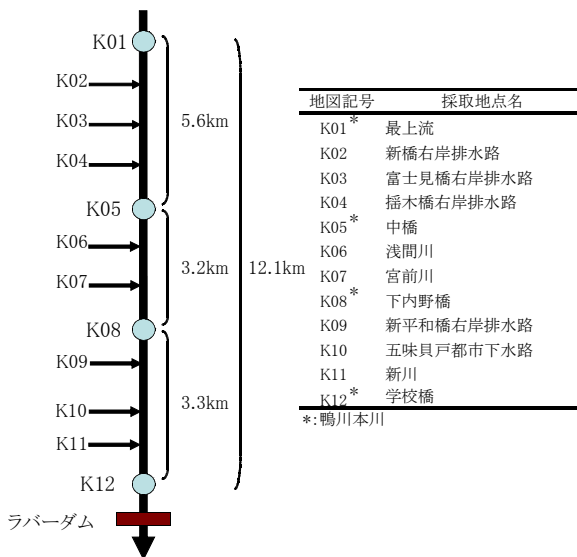


図5 鴨川採取地点の概略図と地点名

下水道普及率はほぼ100%であるが、右岸流域は下水道未供用の地域が約50%残っている。鴨川下流域は感潮域であるが、今回の調査区間は最下流にラバーダムがあるため、この影響は受けない。また、鴨川最上流部のK01より上流は都市下水道で暗渠となっているが、この流域には、下水道未供用の地域が残っている。

採取地点K01、K05、K08、K12は鴨川本川であり、他の採取地点はすべて流入している支川または水路である。なお、底質試料の採取は本川において実施した。

3.5.2 鴨川及びその支川、流入水路の水質、底質調査結果

表3は平成15年7月(夏期)から平成16年4月(春期)にかけて季節ごとに4回採取し、測定した調査結果である。

河川水、流入水路水中のエストロゲン濃度は、α-E2が<0.0001~0.0036 μg/L、β-E2が0.0001~0.0039 μg/L、E1が0.0021~0.020 μg/L、E3が0.0002~0.023 μg/Lの範囲で検出された。E1とE3の濃度がα-E2、β-E2よりも高い地点が多く認められた。

本川の底質試料中のエストロゲン濃度は、α-E2が<0.01~0.20 μg/kg-ds、β-E2が<0.01~1.6 μg/kg-ds、E1が0.02~8.0 μg/kg-ds、E3が<0.01~0.79 μg/kg-dsの範囲で検出された。すべての調査地点において、E1濃度がα-E2、β-E2、E3よりも高かった。

表3 鴨川本川、流入支川、水路におけるエストロゲン濃度及び一般項目の測定結果

採取日 平成15年7月11日 夏期

採取場所	水質										底質					
	α-E2	β-E2	E1	E3	SS	COD	pH	EC	水温		α-E2	β-E2	E1	E3	含水率	強熱減量
	μg/L	μg/L	μg/L	μg/L	mg/L	mg/L		mS/m	℃		μg/kg-ds	μg/kg-ds	μg/kg-ds	μg/kg-ds	%	%
K01	0.0001	0.0003	0.0045	0.0059	4	6.7	7.7	29	25		0.04	0.25	0.70	<0.01	34	6.4
K02	0.0010	0.0004	0.0062	—	7	10	7.3	37	23		—	—	—	—	—	—
K03	0.0004	0.0018	0.0068	—	8	12	7.1	154	22		—	—	—	—	—	—
K04	0.0001	0.0008	0.0053	—	11	11	7.0	34	23		—	—	—	—	—	—
K05	0.0016	0.0011	0.010	0.0034	10	6.0	7.8	46	27		0.11	1.4	4.7	0.15	41	10
K06	0.0012	0.0011	0.010	0.0029	5	11	7.5	47	26		—	—	—	—	—	—
K07	0.0001	0.0006	0.010	0.0005	6	6.6	7.6	34	25		—	—	—	—	—	—
K08	0.0036	0.0016	0.015	0.0028	4	6.2	7.8	46	29		0.08	0.38	2.6	0.13	42	20
K09	0.0005	0.0020	0.011	—	14	19	7.2	46	27		—	—	—	—	—	—
K10	0.0006	0.0020	0.017	—	8	12	7.4	45	24		—	—	—	—	—	—
K11	0.0005	0.0014	0.0089	0.0054	7	7.9	7.8	39	28		—	—	—	—	—	—
K12	0.0003	0.0012	0.012	0.0031	5	6.2	7.8	43	32		<0.01	0.02	0.22	<0.01	25	1.5

採取日 平成15年10月8日 秋期

採取場所	水質										底質					
	α-E2	β-E2	E1	E3	SS	COD	pH	EC	水温		α-E2	β-E2	E1	E3	含水率	強熱減量
	μg/L	μg/L	μg/L	μg/L	mg/L	mg/L		mS/m	℃		μg/kg-ds	μg/kg-ds	μg/kg-ds	μg/kg-ds	%	%
K01	<0.0001	0.0001	0.0021	—	3	3.8	7.6	28	21		0.01	0.18	0.45	<0.01	34	6.1
K02	0.0001	0.0002	0.0049	—	415	27	7.4	95	21		—	—	—	—	—	—
K03	0.0004	0.0015	0.0069	—	9	8.9	7.2	92	21		—	—	—	—	—	—
K04	0.0002	0.0009	0.0070	—	7	8.0	7.4	34	21		—	—	—	—	—	—
K05	0.0001	0.0012	0.0099	—	14	5.2	7.6	48	19		0.20	1.6	8.0	0.10	57	13
K06	0.0010	0.0009	0.0079	—	15	8.4	7.5	45	20		—	—	—	—	—	—
K07	0.0001	0.0005	0.0056	—	8	6.5	7.5	33	22		—	—	—	—	—	—
K08	0.0003	0.0010	0.0084	—	13	8.0	7.5	45	20		0.07	0.39	3.3	0.17	57	13
K09	0.0007	0.0023	0.0098	—	12	15	7.6	44	21		—	—	—	—	—	—
K10	0.0004	0.0010	0.0097	—	7	9.2	7.6	42	21		—	—	—	—	—	—
K11	0.0004	0.0013	0.0086	—	12	7.4	7.6	41	19		—	—	—	—	—	—
K12	0.0008	0.0011	0.0090	—	20	6.8	7.6	42	20		<0.01	<0.01	0.02	<0.01	24	2.2

採取日 平成16年1月6日 冬期

採取場所	水質										底質					
	α-E2	β-E2	E1	E3	SS	COD	pH	EC	水温		α-E2	β-E2	E1	E3	含水率	強熱減量
	μg/L	μg/L	μg/L	μg/L	mg/L	mg/L		mS/m	℃		μg/kg-ds	μg/kg-ds	μg/kg-ds	μg/kg-ds	%	%
K01	0.0003	0.0011	0.0060	—	2	8.3	7.4	37	14		0.02	0.22	0.45	0.01	39	6.9
K02	0.0001	0.0005	0.0049	—	14	19	7.0	33	15		—	—	—	—	—	—
K03	0.0005	0.0015	0.0036	—	9	15	7.2	146	14		—	—	—	—	—	—
K04	0.0006	0.0015	0.0083	—	8	15	7.5	39	14		—	—	—	—	—	—
K05	0.0003	0.0029	0.0095	—	11	10	7.6	49	11		0.10	1.1	2.9	0.24	48	8.6
K06	0.0020	0.0016	0.0074	—	14	11	7.5	47	10		—	—	—	—	—	—
K07	0.0002	0.0008	0.0082	—	5	8.3	7.7	37	13		—	—	—	—	—	—
K08	0.0008	0.0024	0.011	—	8	11	7.5	42	10		0.15	0.70	4.8	0.28	59	16
K09	0.0014	0.0032	0.010	—	90	25	7.6	50	13		—	—	—	—	—	—
K10	0.0018	0.0030	0.011	—	452	130	7.3	50	14		—	—	—	—	—	—
K11	0.0015	0.0036	0.0090	—	17	14	7.5	67	10		—	—	—	—	—	—
K12	0.0012	0.0027	0.011	—	12	8.4	7.3	43	11		<0.01	0.06	0.38	<0.01	25	2.1

採取日 平成16年4月13日 春期

採取場所	水質										底質					
	α-E2	β-E2	E1	E3	SS	COD	pH	EC	水温		α-E2	β-E2	E1	E3	含水率	強熱減量
	μg/L	μg/L	μg/L	μg/L	mg/L	mg/L		mS/m	℃		μg/kg-ds	μg/kg-ds	μg/kg-ds	μg/kg-ds	%	%
K01	<0.0001	0.0009	0.0084	0.023	3	11	7.6	27	16		0.07	0.50	0.79	0.31	56	10
K02	<0.0001	0.0002	0.0030	0.0002	4	5.7	7.1	33	16		—	—	—	—	—	—
K03	0.0005	0.0022	0.0083	0.022	7	11	7.2	87	17		—	—	—	—	—	—
K04	0.0001	0.0014	0.0088	0.0086	9	15	7.4	37	17		—	—	—	—	—	—
K05	0.0022	0.0024	0.0096	0.0072	8	7.6	7.5	54	14		0.16	1.0	3.4	0.79	59	10
K06	0.0002	0.0021	0.0080	0.0099	5	12	7.6	50	16		—	—	—	—	—	—
K07	0.0003	0.0014	0.0073	0.014	12	10	7.6	159	20		—	—	—	—	—	—
K08	0.0008	0.0030	0.011	0.0086	6	9.7	7.4	40	18		0.13	0.47	3.2	0.28	50	10
K09	0.0010	0.0039	0.018	0.044	24	26	7.2	48	17		—	—	—	—	—	—
K10	0.0014	0.0036	0.020	0.014	9	19	7.4	50	17		—	—	—	—	—	—
K11	0.0009	0.0028	0.010	0.018	18	15	7.4	51	16		—	—	—	—	—	—
K12	0.0012	0.0020	0.0094	0.0083	7	9.8	7.4	47	18		<0.01	0.03	0.20	0.02	37	3.3

(注) 表中の「—」は欠測

環境省による全国調査¹⁾では、水質で α -E2が $<0.0001\sim 0.021\mu\text{g/L}$ 、 β -E2が $<0.0001\sim 0.28\mu\text{g/L}$ 、底質で α -E2が $<0.01\sim 0.50\mu\text{g/kg}$ 、 β -E2が $<0.01\sim 1.4\mu\text{g/kg}$ の濃度範囲で検出されている。今回の調査では、 β -E2が底質において全国調査の範囲を越える地点(K06、秋期)が認められた。

4 まとめ

環境省マニュアルを一部修正することで、河川水、底質試料中の4種のエストロゲンが高感度に測定できた。また、この方法を用いて鴨川の河川水、底質試料を調査したところ河川水ではE1とE3が、底質試料においてはE1が他のエストロゲンと比べ高い濃度で含まれていることが認められた。

今回測定対象としたエストロゲンは遊離体のみであるが、水環境中にはエストロゲンが硫酸やグルクロン酸と結合し、不活性状態となった抱合体も存在する⁸⁾。従って、河川中のエストロゲンの挙動を明らかにするためには、GC/MSによる遊離体の分析だけでなく抱合体の測定も必要である。近年、LC/MS/MS^{9, 10)}による抱合体の分析方法が報告されている。これらの方法や、本報告の方法を用いて、水環境中のエストロゲンの挙動を明らかにすることが今後の課題である。

文 献

- 1) 環境省環境管理水環境部水環境管理課(2001)平成12年度水環境中の内分泌攪乱化学物質(いわゆる環境ホルモン)実態調査結果.
- 2) Nishihara, T., Nishikawa, J., Kanayama, T., Dakeyama, F. and Imagawa, M.(2000)Estrogenic Activities of Chemicals by Yeast Two-Hybrid Assay, *J. Health Science*, **46(4)**, 282-298.
- 3) 環境庁水質保全局水質管理課(1999)要調査項目等調査マニュアル(水質、底質、水生生物).
- 4) 中村貞夫, 滝埜昌彦, 代島茂樹(2000)ガスクロマトグラフィー/負イオン化学質量分析法によるクロロフェノール類, ビスフェノールA及び17 β -エストラジオールの定量, *分析化学*, **49(3)**, 181-187.
- 5) Nakamura, S., Sian, T.H. and Daishima, S.(2001)Determination of estrogens in river water by gas chromatography-negative-ion chemical-ionization mass spectrometry, *J. Chromatography A*, **919**, 275-282.
- 6) Kuh, H.M. and Ballschmiter, K.(2001)Determination of Endocrine-Disrupting Phenolic Compounds and Estrogens in Surface and Drinking Water by HRGC-(NCI)-MS in Picogram per Liter Range, *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 3201-3206.
- 7) Xiao, X.-Y., MaCalley, D.V. and McEvoy, J.(2001)Analysis of estrogens in river water and effluents using solid-phase extraction and gas chromatography-negative chemical ionisation mass spectrometry of pentafuorobenzoyl derivatives, *J. Chromatography A.*, **923**, 195-204.
- 8) (社)日本水環境学会関西支部(2003)アプローチ環境ホルモン, 技報堂, 164-165.
- 9) 大岩俊雄, 末岡峰数, 田辺薫, 小森行也, 鈴木譲(2004)下水試料を対象としたエストロゲン抱合体のLC-MS/MSによる測定法, 環境ホルモン学会第7回研究発表会要旨集, 145.
- 10) Isobe, T., Shiraishi, H., Yasuda, M., Shinoda, A. Suzuki, H. and Morita, M.(2003)Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, **984**, 195-202.