

HPLCによるエストロゲンとビスフェノールAの一斉分析法の検討

櫛島智恵子 植田忠彦* 山崎くみ子**

(*現東京都衛生研究所、**非常勤研究員)

要 旨

電気化学検出器 (ECD) 付き高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いて抱合体を含めたエストロゲンとビスフェノールA (Bis) の一斉分析方法を検討した。測定対象としたエストロゲンはエストリオール (E3)、 17β -エストラジオール (β E2)、 17α -エストラジオール (α E2)、エチニルエストラジオール (EE2)、エストロン (E1) 及びE1、 β E2、E3のグルクロン酸抱合体である。エストロゲン抱合体は試料水を凍結乾燥させた後、塩酸-メタノール溶液により加熱分解を行い、フリー体としてHPLCで検出した。

添加回収試験を行った結果、フリー体が分解されることなく、エストロゲン抱合体が回収率61~89%で分析可能である事が分かった。

キーワード：電気化学検出器、高速液体クロマトグラフ、エストロゲン、ビスフェノールA、抱合体

1 はじめに

人や野生生物のホルモン作用を攪乱し、生殖機能阻害等を引き起こす可能性のある内分泌攪乱化学物質による環境汚染の解明が必要とされている。

天然の女性ホルモンである β E2やE1のホルモン作用は、他の内分泌攪乱化学物質に比べエストロゲン様活性が非常に強いことが知られている。¹⁾これらエストロゲンは体外に排出される際にグルクロン酸抱合や硫酸抱合等の抱合体 (エストロゲン抱合体) として排出されるため、これらが環境中で脱抱合し (エストロゲンフリー体) 再活性化する可能性が懸念される。そのため、環境中におけるエストロゲンの挙動解明のためにはフリーのエストロゲンと同時にエストロゲン抱合体の分析方法の開発が必要とされている。

しかし、要調査項目等調査マニュアル等^{2,3)}ではエストラジオール類の分析方法は酵素免疫測定法 (ELISA法) と誘導体化GC/MS法とされている。このうち、ELISA法は他物質との交差反応により測定値に正の誤差を生じる事が知られている。⁴⁾一方、誘導体化GC/MS法では現在抱合体の分析方法が確立されていない。

そこで、電気化学検出器 (ECD) 付き高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法を用いて、誘導体化を行わずにビスフェノールAとグルクロン酸抱合体を含めた5種のエストロゲンの同時分析法を検討したので報告する。

2 実験方法

(1) 試料及び試薬

ビスフェノールAは環境分析用、エストロゲン標準品5種は生化学用を使用した。エストロゲン抱合体はシグマ製の以下6種を使用した。

エストリオール-3-(β -D-グルクロニド) (E3-3- β DG)

エストリオール-16 α -(β -D-グルクロニド) (E3-16- β DG)

エストリオール-17 β -(β -D-グルクロニド) (E3-17- β DG)

β -エストラジオール-3-(β -D-グルクロニド) (β E2-3- β DG)

β -エストラジオール-17-(β -D-グルクロニド) (β E2-17- β DG)

エストロン-(β -D-グルクロニド) (E1- β DG)

3M塩酸-メタノール溶液は脱水メタノール (有機合成用) に塩化アセチル (特級) を加えて調製した。その他の有機溶媒はHPLC用を使用した。

(2) HPLC条件

HPLCは資生堂社製NANOSPACE SI-1を使用した。検出器は資生堂社製パルス式電気化学検出器2016を一定電位酸化モードで使用した。分離カラムは医理化製RP-18T (内径2mm、長さ25cm)を使用した。溶離液は水60%/アセトニトリル40%に50mMの過塩素酸ナトリウムを添加し、リン酸でpH2.6に調製したものを使用した。溶離液は流速0.2mL/min、試料注入量は10 μ Lとした。

ア ECD印加電圧の検討

測定対象物質をHPLCで高感度に分析するために、各物質に対するECDの最適印加電圧を検討した。

各物質0.1 μ gを注入して印加電圧を650から1000mVの範囲内で変化させた時の相対的反応性を測定した。

(3) 処理操作

分析法フローチャートを図1に示す。

試料水100mLは凍結乾燥した後、エストロゲン抱合体をフリー体に脱抱合する操作（抱合体分解操作）の至適条件を明らかにするために加熱温度と時間について検討した。

抱合体分解操作後、試料を超純水に転溶し固相抽出を行った。固相カラムはVarian社製absolut NEXUS、

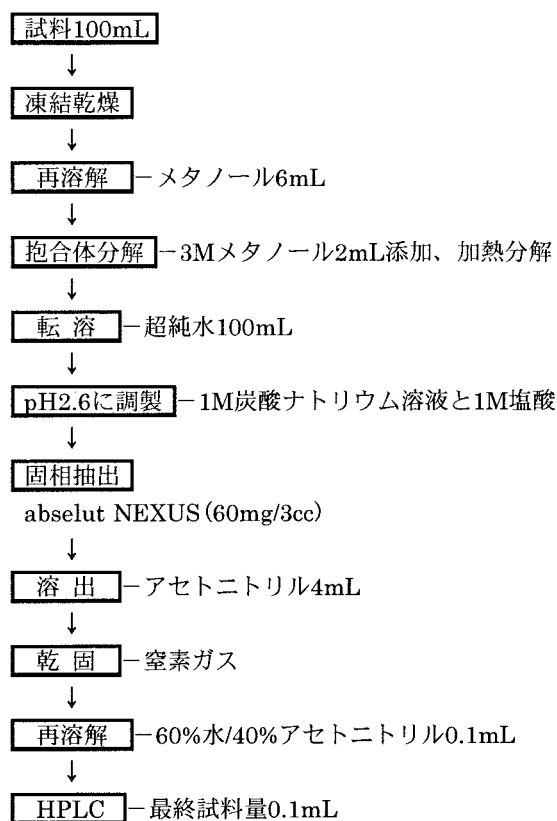


図1 分析フロー

ポリマー充填剤量60mgを使用直前にアセトニトリル、メタノール、水各3mlの順にコンディショニングしたものを使用した。⁵⁾また、本実験に用いた水は全て超純水を上記固相カラムで精製したものを使用した。

イ 抱合体分解条件の検討

グルクロン酸抱合体標準液に3M塩酸-メタノール溶液2mL添加後、密栓状態・加熱時間1時間の条件で加熱温度を60°Cから80°Cの範囲内で変化させて分解時の加熱温度を検討した。

同様に、加熱温度80°Cに設定して1時間から3時間の範囲内で変化させて分解時の加熱時間を検討した。

ウ フリー体の添加回収試験

抱合体分解操作によりフリー体のエストロゲンが分解される可能性を考慮して、エストロゲンフリー体標準液を用いて、抱合体分解操作の有無による添加回収率の比較を行った。

3 結果

(1) 至適ECD印加電圧

印加電圧-酸化電流の相対的反応性を調べ、酸化電流をピーク面積で表した結果を図2に示す。

E1以外の各物質の酸化電流は700mV以上から、E1は750mV以上から生じ、印加電圧の増加とともに酸化電流も増加した。

高感度に分析するためには印加電圧を1000mVとすれ

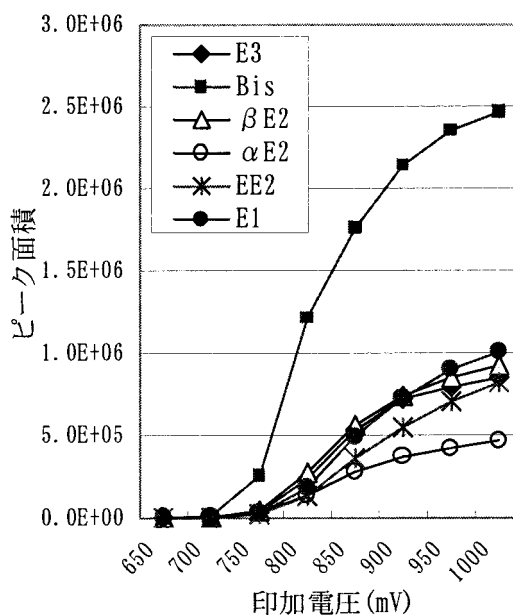


図2 ECD印加電圧の検討

ば良いが、電極にかかる負担と印加電圧が高くなるにつれ夾雑物が増加する事を考慮して900mVを最適印加電圧とした。

(2) 抱合体の分解条件

ア 加熱温度について

加熱温度-添加回収率曲線を図3に示す。

回収率は温度上昇と共に増加した。また、グルクロン酸抱合基が3位置に付加したエストロゲンは同種で比較した場合、フリー体への分解率が低い傾向にあった。

80°C以上に加熱温度を上げた方が回収率が上がる可能

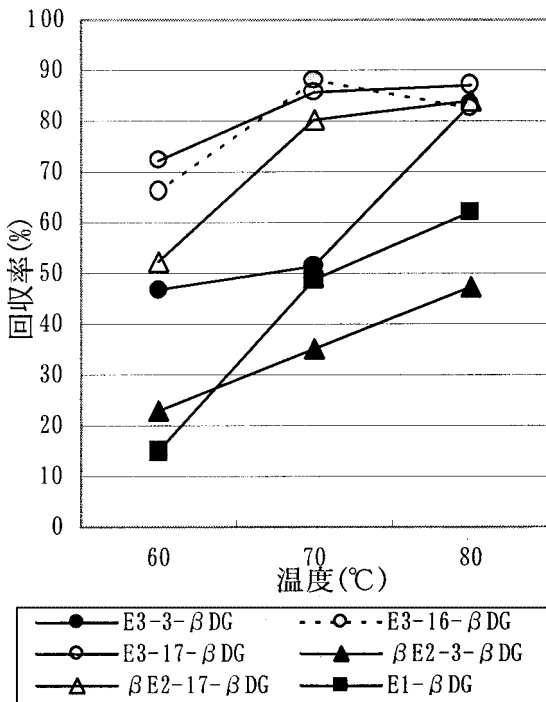


図3 分解加熱温度の検討

性もあるが、ガラス製のねじ口試験管の安全性を見て加熱温度を80°Cとした。

イ 加熱時間について

加熱時間-添加回収率曲線を図4に示す。

傾向に若干のばらつきも見られるが、全体的に加熱時間が2時間の場合、最も良好で61~89%の回収率であった。(表1)

(3) フリー体の分解状況

添加回収試験の結果を表2に示す。

抱合体分解操作により若干回収率の減少が見られるが、エストロゲンフリー体に与える影響は少ないとい

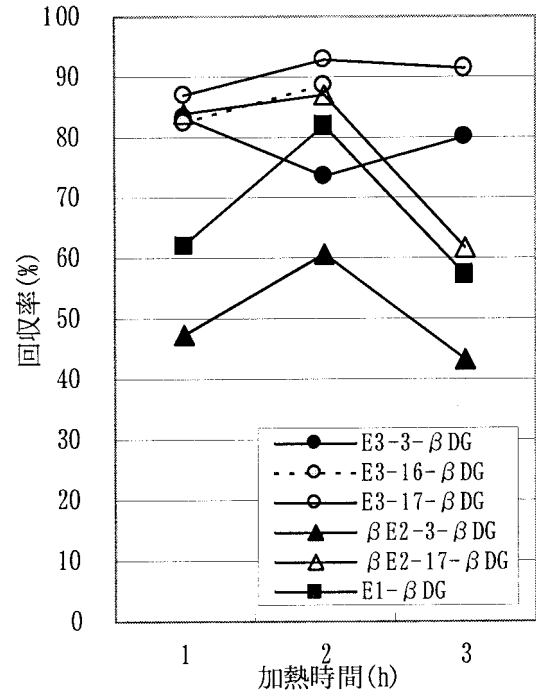


図4 分解加熱時間の検討

表1 至適抱合体分解条件における添加回収率

n=3

	フリー体		抱合体		
	回収率 (%)	標準偏差		回収率 (%)	標準偏差
Bis	95.7	1.0	E3-3-β DG	78.4	1.4
E3	77.2	6.0	E3-16-β DG	88.7	0.6
β E2	84.7	1.5	E3-17-β DG	88.8	0.6
α E2	71.1	2.4	β E2-3-β DG	60.6	2.3
EE2	92.6	3.8	β E2-17-β DG	87.0	3.6
E1	99.1	5.2	E1-β DG	81.9	3.0

える。

(4) 環境試料への適用

以上の検討結果を元に、実際の環境試料へ適用した。一例として都内河川水の分析結果を図5に示す。今回、河川水の分析におけるE3以外の物質の定量下限値は0.01 $\mu\text{g/L}$ である。本実験のHPLC条件ではE3の溶出が早いため、河川水では夾雑物とピークが重なり、測定不能であった。

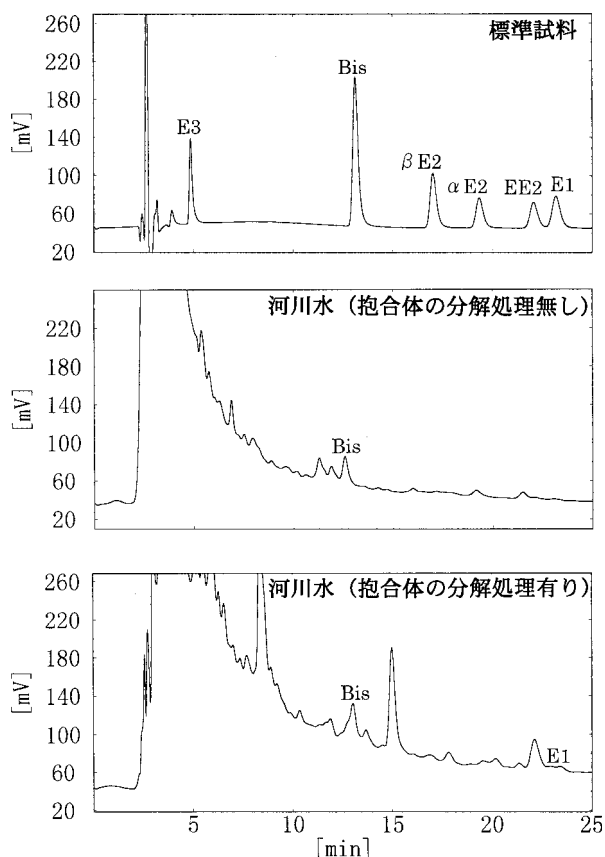


図5 河川水への適用

抱合体の分解処理を行わない場合ではBisが0.14 $\mu\text{g/L}$ 検出されたが、エストロゲンは全く検出されなかった。

抱合体の分解処理を行った場合ではBisが0.21 $\mu\text{g/L}$ とE1が0.02 $\mu\text{g/L}$ 検出された。

4 考察

エストロゲン抱合体の分析操作は以下の条件で可能であることが分かった。

<抱合体分解条件>

添加溶液：3 M塩酸-メタノール溶液 2 mL

加熱温度：80°C

加熱時間：2時間

この時の添加回収率は表2のとおり良好であり、本法により抱合体が十分回収されることが確認された。

しかし実際の環境試料に適用した場合、夾雑物とピークが重なり目的物質のピーク形状の悪化やバックグラウンドノイズの上昇が見られ目的物質のピーク分離は完全ではなかった。特に抱合体分解処理によりこの傾向が顕著であった。また、この影響により定量下限値が河川水等の実試料中に存在すると思われるエストロゲン濃度よりも高くなり、実試料への適用時の問題点が明らかとなった。

今後、前処理操作におけるクリーンアップや選択性の高い検出器を用いた分析法の検討を行い、これらの問題を改善する必要がある。

表2 フリー体に対する抱合体分解操作の影響

n=3

	抱合体分解処理なし		抱合体分解処理あり	
	回収率 (%)	標準偏差	回収率 (%)	標準偏差
Bis	98.3	2.8	95.7	1.0
E3	102.5	4.3	77.2	6.0
β E2	87.6	1.7	84.7	1.5
α E2	101.7	8.3	71.1	2.4
EE2	95.7	2.3	92.6	3.8
E1	97.9	2.4	99.1	5.2

引用文献

- 1) 矢古宇靖子ら：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, 環境工学研究論文集, 36, pp. 199-208 (平成11年)
- 2) 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), 環境庁水質保全局水質管理課 (平成10年10月)
- 3) 環境庁水質保全局水質管理課：要調査項目等調査マニュアル(水質、底質、水生生物), 環境庁水質保全局水質管理課 (平成11年12月)
- 4) 国土交通省都市・地域整備局下水道部：平成12年度下水道における内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)に関する調査報告 (平成13年5月)
- 5) 櫛島智恵子ら：固相抽出-電気化学検出器付きHPLC法によるビスフェノールA、エストロゲン一斉分析法の検討並びにその応用, 第15回全国環境・公害研究所交流シンポジウム予稿集, pp. 51-54(平成12年2月)

A Study on the Analysis for Estrogen and Bisphenol A by HPLC with an Electrochemical Detector

Chieko Nudejima, Tadahiko Ueta*, Kumiko Yamazaki**

(*Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, **Associate researcher)

Summary

An analytical method for the determination of bisphenol A (Bis) and estrogen included conjugates in water samples was developed by HPLC with an electrochemical detector (ECD/HPLC). Objects of analysis for estrogen were estradiol (E2), 17 β -estradiol (β E2), 17 α -estradiol (α E2), ethynylestradiol (EE2), estrone (E1) and glucuronide conjugates of E1, E2 and E3. After water samples were performed freeze-drying, estrogen conjugates were resolved by adding 3M hydrochloric acid-methanol and heating. Estrogens changed from conjugate to free it were detected by HPLC with ECD. The recoveries from pure water spiked standards of estrogen conjugates were 61~89% without resolving free conjugate.

Keywords: ECD, HPLC, estrogen, bisphenol A, conjugate