

高速液体クロマトグラフ/電気化学検出法によるエストロゲン 及びビスフェノールAの一斉分析法の開発

石山 高* 嶋津暉之 棚島智恵子** 星 純也 佐々木裕子
(*現埼玉県環境科学国際センター **現環境局環境改善部)

要 旨

高速液体クロマトグラフ/電気化学検出法によるエストロゲン(エストリオール、17β-エストラジオール、17α-エストラジオール、エチニルエストラジオール、エストロン)及びビスフェノールAの一斉分析法を開発した。固相抽出の際にメタノール水溶液によるクリーンアップを施すことにより、河川水や下水処理場放流水中 ng L⁻¹レベルの直接定量が可能となった。この方法は、誘導体化のような煩雑な前処理を必要とする従来の分析法に比べて簡便かつ迅速である。

キーワード : 高速液体クロマトグラフ/電気化学検出法、エストロゲン、ビスフェノールA、一斉分析、河川水、下水処理場放流水

Development on Simultaneous Determination of Estrogens and Bisphenol A by High-Performance Liquid Chromatography with an Electrochemical Detection

Takashi Ishiyama*, Teruyuki Shimadu, Chieko Nudeshima**, Junya Hoshi, and Yuko Sasaki
* Center for Environmental Science in Saitama, **Environmental Improvement Division

Summary

Simultaneous determination of estrogens (estriol, 17β-estradiol, 17α-estradiol, ethynylestradiol and estrone) and bisphenol A by high-performance liquid chromatography with an electrochemical detection was developed. The direct determination of these compounds at ng L⁻¹ level in river water and discharge water of sewage treatment plant could be achieved by using clean up with methanol-water solution in solid phase extraction step. The proposed method is more simple and rapid than conventional analysis with troublesome pretreatment process such as derivatization.

Key words: high-performance liquid chromatography with an electrochemical detection, estrogens, bisphenol A, simultaneous determination, river water, discharge water of sewage treatment plant

1 はじめに

ビスフェノールA、ノニルフェノール、フタル酸エステルや有機スズ化合物等の内分泌かく乱化学物質が環境に及ぼす影響は深刻であり、現在、大きな社会問題として取り上げられている。特に天然女性ホルモンである17-エストラジオールやエストロン、合成女性ホルモンであるエチニルエストラジオールは内分泌かく乱作用が非常に強く、そのエストロゲン活性度はビスフェノールAやノニルフェノールの1000から10000倍以上もあると報告されている¹⁾。女性ホルモン(エストロゲン)は人体からの尿が発生源であるため、下水を通して環境中へ放出される。したがって、河川水及び下水処理場での流入水・放流水中のエストロゲン濃度を高感度で精度よく測定することは、その環境実態を把握するうえで極めて重要である。

エストロゲンの定量法としては、酵素免疫測定(ELISA)法やガスクロマトグラフ/質量分析(GC/MS)法が一般的に用いられている^{2,3)}。ELISA法は簡易性及び迅速性に優れた分析法であるが、交差反応の影響を受けるため定量精度に問題がある。一方、GC/MS法は、定量に先立ち、目的物質を誘導体化する必要があるため、操作が煩雑で熟練と時間を要する。前処理操作を全く必要としない高感度分析法として高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析法を河川水あるいは下水処理水に応用した研究が最近、報告されているが⁴⁻⁶⁾、この装置は非常に高価であり、かつ現段階では各研究機関に十分普及しているとは言えない。このように既存の分析法にはいくつかの問題が存在するため、これらの方法とは原理の全く異なる新しい分析技術の開発が切望されている。

フェノール基を有するエストロゲンやビスフェノールAは電気化学的に活性な物質である。電気化学検出法は、作用電極上で目的物質が電極反応する際に生じる酸化還元電流を測定する高感度分析技術である。この方法は電気活性物質のみを対象としているため選択性が高く、高速液体クロマトグラフと組み合わせた分析システムはカテコールアミン類やフェノール化合物の定量に汎用されている⁷⁾。しかし、電気化学検出法をエストロゲン及びビスフェノールAの定量に適用した研究は非常に少なく、環境試料への応用例としてはわずかにPenalverら⁸⁾による論文が報告されているのみである。

本研究では、エストロゲン(エストロジオール(E3)、

17-エストラジオール(E2)、17-エストラジオール(E2)、エチニルエストラジオール(EE2)、エストロン(E1))及びビスフェノールA(BPA)の一斉分析法として高速液体クロマトグラフ/電気化学検出(HPLC/ECD)法の適用を試み、移動相の組成やpH、作用電極に印加する電位等の基礎的な実験条件について最適化した。また、この方法を河川水や下水処理場放流水へ応用し、簡易性及び迅速性に優れた高感度分析法を開発した。

2 実験

(1) 装置

電気化学検出器が組み込まれたセミマイクロカラム高速液体クロマトグラフ NANOSPACE SI-1(資生堂製)を使用した。分析用カラムには医理化学機器製のRP-18T C18(内径2.0mm、長さ250mm、充填剤粒径5 μ m)を用い、カラム温度は30 $^{\circ}$ Cに設定した。移動相は、過塩素酸ナトリウムを含むアセトニトリルと水の混合溶液とし、7mol L⁻¹リン酸でpH調製した。移動相の流速は0.15mL min⁻¹、試料注入量は0.01mLとした。固相抽出カラムには日本ウォーターズ製のOASIS HLBカートリッジ(充填剤重量30mg)を用い、メタノール及び超純水10mLを順次通してコンディショニングした。固相抽出操作は硬質ガラス製のエキストラクションマニホールド(日本ウォーターズ製)で行った。グラシーカーボン作用電極は、酸化アルミニウムの粉末でエマルジョン研磨した後、表面を水洗して使用した。この前処理により、作用電極は少なくとも50回の連続測定に使用できた。対極には白金、参照電極には銀-塩化銀(Ag/AgCl)電極を用いた。

(2) 試薬

水には、逆浸透、蒸留及びイオン交換で精製した超純水を使用した。エストロゲン(E3、E2、E2、EE2、E1)の標準試薬はすべて生化学用(和光純薬製)、BPAの標準試薬は環境分析用(関東化学製)とした。アセトニトリルは和光純薬製の高速液体クロマトグラフ用とし、アセトン及びメタノールには和光純薬製の残留農薬試験用1000を用いた。その他の試薬はすべて特級品とし、精製せずにそのまま使用した。

エストロゲン及びBPAの標準試薬約0.1gを精秤した後、メタノール100mLに溶解したものを標準原液(各物質:1000 μ g mL⁻¹)として保管した。標準溶液は標準原

液の一定量をメスフラスコに取り、移動相で定容にして調製した。

(3) 操作手順

炭酸ナトリウム水溶液で pH 9-10に調製した水質試料500mL を固相抽出カラムに10mL min⁻¹の速度で通した後、45vol%メタノール水溶液 (pH9-10) 20mL でカラムをクリーンアップした。十分に通気してカラムを乾燥させた後、アセトン5mL を4mL min⁻¹の速度で通してエストロゲン及びBPAを溶出した。この溶出液に窒素ガスを吹き付けて乾固させた後、移動相0.1mL で溶解したものを HPLC/ECD で分析した。操作手順のフローチャートを図1に示す。

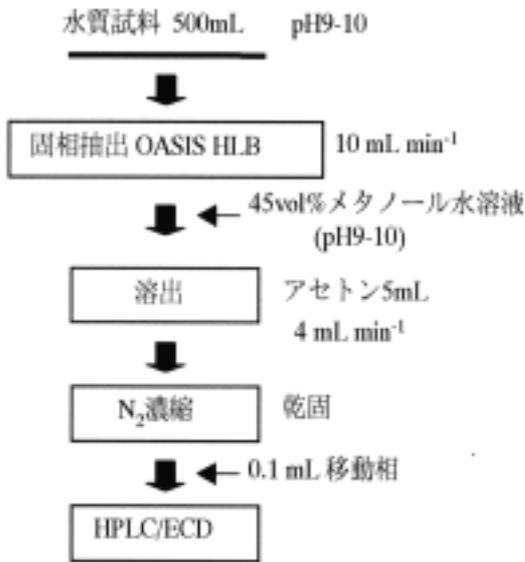


図1 操作手順

3 結果と考察

(1) 電気化学検出器の分析条件

ア 移動相の検討

本法では、セミマイクロカラム (カラム径 2mm) を分析用カラムとして使用した。このカラムは汎用カラム (カラム径4.5mm) よりも径が小さいため、試料溶液が希釈されにくく、これにより非常に高感度な分析結果を得ることができる。しかし、移動相に使用する有機溶媒によってはカラム圧が上昇しやすく、このことが操作上の問題となることが多い。そこで、カラム圧の上昇をできるだけ抑制する目的から、粘性率の低いアセトニトリル (粘性率: 0.34mPas) と水の混合溶液を移動相として選

定した。メタノール (粘性率: 0.54mPas) と水の混合溶液ではカラム圧が大きく上昇したので、移動相としての適用は困難であった。

図2に示すとおり、アセトニトリルの含有率が増加するほど移動相の極性が低下するため、各物質の保持時間は減少した。特に、EE2は他の物質よりも移動相の極性の影響を受けやすく、アセトニトリル含有率が35vol%以下ではE1と、50vol%以上ではE2とピークが重なった (同図 a, c)。ピーク分離性の観点から、アセトニトリルの含有率は45vol%とした。

移動相の流速を遅くするとピーク分離性は向上する傾向を示したが、測定時間を考慮して流速は0.15mL min⁻¹とした。この条件下では、30分以内にすべての物質のピークが検出された。

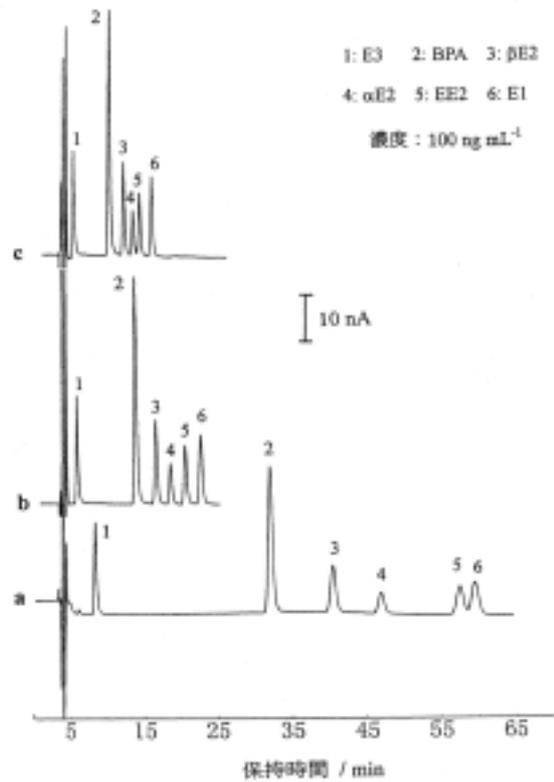


図2 エストロゲン, BPAのクロマトグラム
アセトニトリル含有率: a 35, b 45, c 50vol%
移動相: アセトニトリル-水
(0.07 mol L⁻¹ NaClO₄, pH 2.7)
0.15 mL min⁻¹
分析カラム: RP-18TC18, 30
作用電極: グラシーカーボン
印加電位: 1.05 V vs. Ag/AgCl

電気化学検出法では作用電極への目的物質の移動を迅速にするため、移動相に支持電解質と呼ばれる強電解質を加える必要がある。本法では水とアセトニトリルのどちらにも溶解し、かつ電気化学的に不活性であった過塩素酸ナトリウムを支持電解質として選択した。図3に示すとおり、過塩素酸ナトリウム濃度が増加すると各物質のピーク面積は直線的に大きくなり、 0.05mol L^{-1} 以上で最大値に達した。感度の観点から過塩素酸ナトリウム濃度は 0.07mol L^{-1} とした。これ以上の過塩素酸ナトリウム濃度では残余電流が増加してバックグラウンド電流が不安定となった。

移動相の pH に関しては図4に示すとおり、2.5以上に調製すれば、エストロゲンのピーク面積はほぼ一定であった。これに対し、BPA のピーク面積は、pH 3以上になると直線的に減少する傾向を示した。よって、各物質のピーク面積が最大となった pH 2.7を移動相の最適 pH とした。移動相の pH が2以下になると各物質の酸化還元電位が正方向へ移動して十分な加電圧が得られなくなったため、ピーク面積が減少したものと考えられる。

イ 電気化学検出法の最適化

エストロゲン及び BPA の酸化還元電位は $0.8\sim 0.9\text{V vs. Ag/AgCl}$ と報告されているので^{9,10}、作用電極にはこの

電位範囲で使用可能なグラシーカーボンを選択した。この電位範囲で水銀電極（使用可能な電位範囲： $-1.2\sim 0.3\text{V vs. Ag/AgCl}$ ）を使用すると表面に酸化被膜が生じ、白金電極（使用可能な電位範囲： $-0.3\sim 1.6\text{V vs. Ag/AgCl}$ ）ではバックグラウンド電流が高くなるため、どちらも作用電極には不相当である。電気化学検出法では目的物質の電極反応を促進するため、酸化還元電位よりも $0.2\sim 0.3\text{V}$ 正あるいは負な電位を作用電極に印加する。グラシーカーボン電極に印加した電位（印加電位）とピーク面積の関係を図5に示す。本法では十分な加電圧が得られる 1.05V vs. Ag/AgCl を最適印加電位とした。これよりも正な電位範囲では水の電気分解に伴う酸化電流が生じ、バックグラウンド電流が不安定になった。

ウ 検量線

ピーク面積で作成した検量線は、図6のとおり、 $10\sim 1000\text{ng mL}^{-1}$ で原点を通る直線（相関係数： 0.999 以上）となり、 100ng mL^{-1} における変動係数（ $n=5$ ）は $0.6\sim 2\%$ であった。また、 5ng mL^{-1} の繰り返し測定から算出した検出限界（ 3 , $n=20$ ）は、 $0.5\sim 2.3\text{ng mL}^{-1}$ であった（表1）。

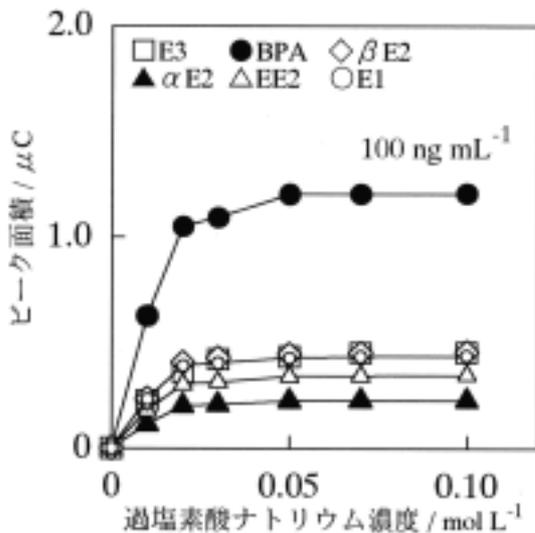


図3 過塩素酸ナトリウムとピーク面積の関係
* 実験条件は図2 参照

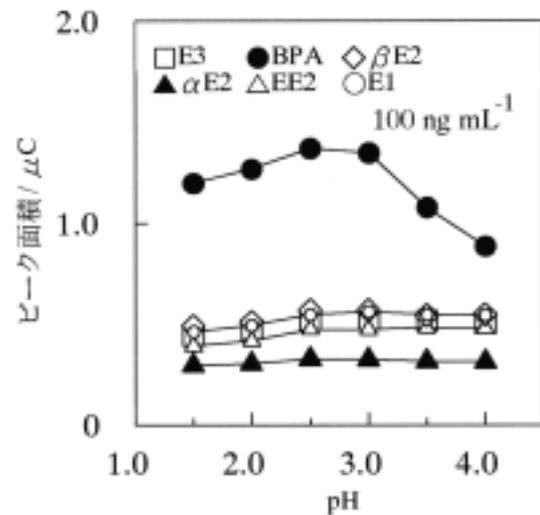


図4 移動相 pH とピーク面積との関係
* 実験条件は図2 参照

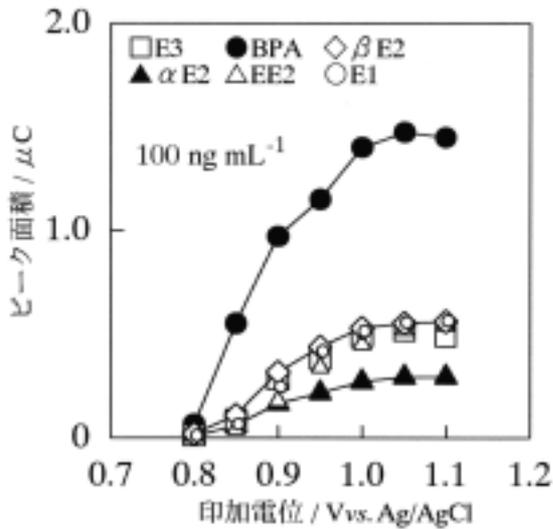


図5 印加電位とピーク面積の関係
*実験条件は図2参照

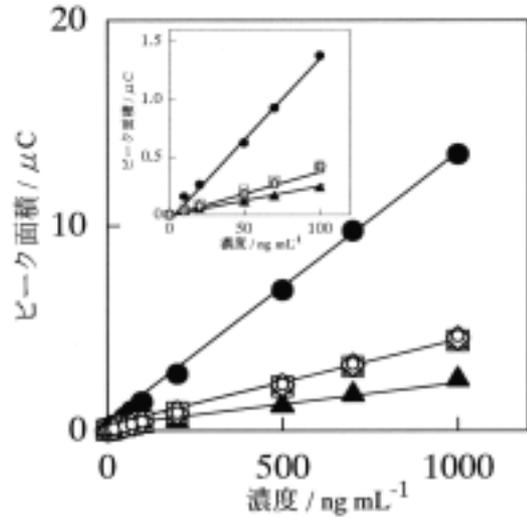


図6 検量線(E3, BPA, E2, EE2, E1)
*実験条件は図2参照

表1 各化学物質の検出限界

単位: ng mL⁻¹

化学物質	E3	BPA	E2	E2	EE2	E1
検出限界	1.0	0.5	1.4	2.3	1.5	1.6

(2) 河川水及び下水処理場放流水への応用

ア クリーンアップ

HPLC/ECD によるエストロゲン及び BPA の一斉分析法を河川水、下水処理場放流水に応用した。抽出操作を含む前処理は、外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル²⁾に基づいて行った。

得られたクロマトグラムは図7b のとおり、バックグラウンド電流が大きく、フミン物質やクロロフィル等の共存物質による妨害を顕著に受けることが分かった。この妨害は保持時間の短い領域(10分以内)に集中していることから、これら妨害物質の多くはエストロゲンや BPA よりも高い極性を有しているものと思われる。そこで、溶出操作前にメタノールと水の混合溶液をカラムに通して妨害物質のみをカラムから除去するクリーンアップの手法について検討した。

クリーンアップ溶液のメタノール含有率とエストロゲン及び BPA の回収率との関係を図8 に示す。メタノール含有率50vol%まで各物質の回収率はほぼ100%であったが、これ以上の含有率になると徐々に減少した。メタノール

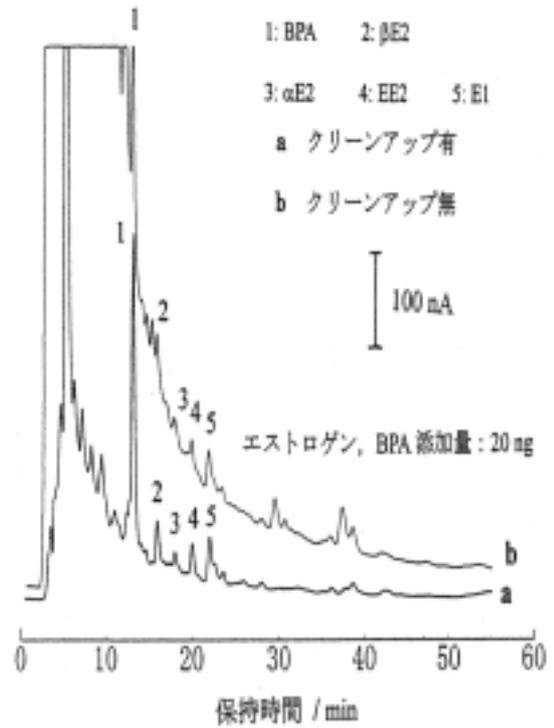


図7 河川水5000倍濃縮試料のクロマトグラム
*実験条件は図2参照

水溶液の pH と各物質の回収率との関係についても調べたところ、図9のとおり、pH10まで回収率の低下は認められなかった。エストロゲン及び BPA が溶出しにくい範囲の上限でクリーンアップしたほうがより多くの共存物質

からの妨害を除去できるので、本法では pH 9 - 10 に調製した 45 vol% メタノール水溶液を使用することにした。

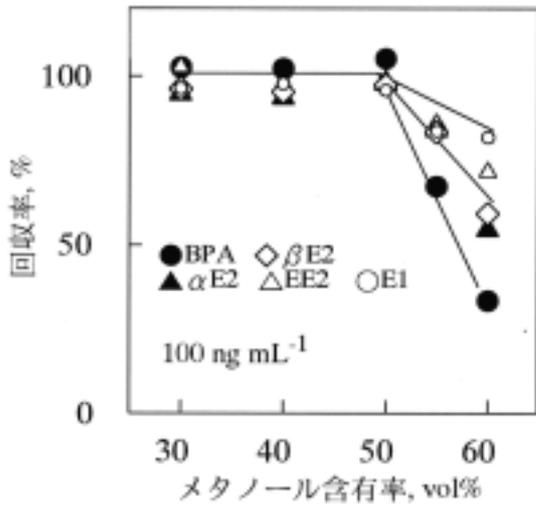


図8 回収率に及ぼすメタノール含有率の影響
* 実験条件は図2 参照

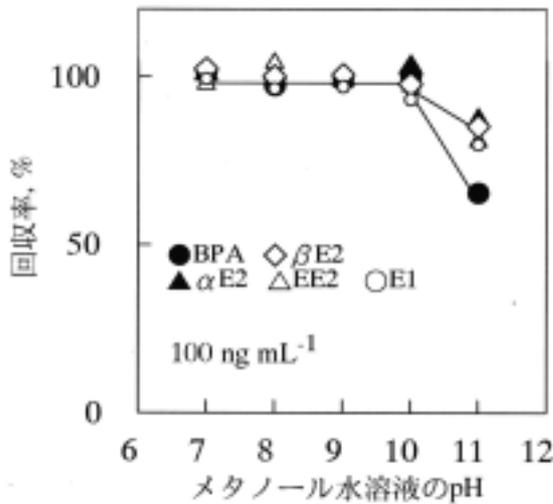


図9 回収率に及ぼすメタノールの pH の影響
* 実験条件は図2 参照

図 7a のとおり、このクリーンアップの適用により、共存物質からの妨害は大きく抑制でき、河川水や下水処理場放流水へ応用した際にも安定したバックグラウンド電流を得ることができた。ただし、エストロゲンの中で最も極性の高い E3 だけはメタノール水溶液によるクリーンアップの際に共存物質とともに溶出したため、ピークは得られなかった。

イ 固相抽出の条件

固相抽出カラムに tC18 を用いると、20 vol% メタノール水溶液を通しただけでもエストロゲン及び BPA の一部が漏出して回収率が大きく低下した。したがって、メタノール水溶液によるクリーンアップを適用する本法では、tC18 は使用できなかった。

従来法^{2,3)}ではエストロゲンや BPA の解離を防ぐ目的から、試料溶液にあらかじめ酸を加えて溶媒抽出あるいは固相抽出している。OASIS HLB カラムで固相抽出する際の試料溶液の pH と各物質の回収率との関係を調べたところ、図10のとおり試料溶液の pH を10まで上げてても回収率の低下は認められなかった。通水時の pH をできるだけ上げたほうが共存物質のカラムへの吸着が起こりにくくなるので、本法では炭酸ナトリウム水溶液で pH 9 - 10 に調製した試料溶液を固相抽出カラムに通すことにした。

溶出液について検討したところ、表2のとおりアセトニトリルあるいはアセトンではほぼ 100% の回収率が得られた。ジクロロメタンでは BPA の溶出が不十分であり、約 60% の回収率しか得られなかった。本法では固相抽出後、窒素ガスを吹き付けて試料溶液を濃縮するため、蒸気圧の高いアセトンを溶出液として選択した。また、分離曲線の結果からアセトンの液量は 5 mL とした。

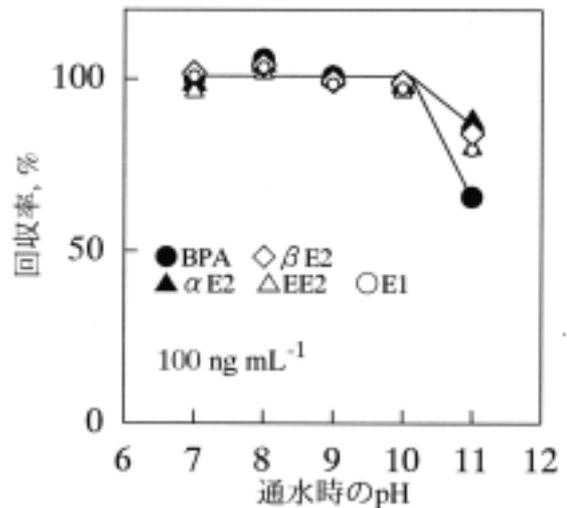


図10 通水時の pH と回収率の関係
* 実験条件は図2 参照

ウ 河川水等の分析結果

河川水試料にエストロゲン及びBPAの標準溶液の一定量を添加して作成した検量線は、図11のとおり添加量5~50ngで直線（相関係数：0.999以上）となった。この検量線は標準溶液で作成した検量線（図6）と傾きが一致したことから、メタノール水溶液を用いたクリーンアップの適用により共存物質による妨害は低減し、標準溶液で作成した検量線から直接、実試料分析できることが分かった。S/N比（S/N=3）から求めた検出限界は5ng L⁻¹程度であり、誘導体化 GC/MS 法^{2,3)}に近い感度が得られた。

表2 溶出液組成と回収率の関係

単位：%

溶出液	BPA	E2	E2	EE2	E1
アセトニトリル	105	97	94	101	103
アセトン	101	98	99	99	98
ジクロロメタン	60	101	100	97	93

溶出液量：5 mL

河川水等のエストロゲン及びBPAを定量した結果の例を表3に示す。E2は河川水中では検出されなかったが、下水処理場放流水中には13ng L⁻¹含まれていた。これに対し、E1は河川水、下水処理場放流水どちらでも検出され、河川水中でも10ng L⁻¹以上含まれていた。本法と従来法の手順を図12に示す。本法は固相抽出の際に、メタノール水溶液によるクリーンアップを施すだけでそのまま河川水や下水処理場放流水に応用できるため、誘導体化のような煩雑な前処理を必要とする従来の分析法に比べて簡便かつ迅速である。固相抽出以降の分析所用時間は、約40分間であった。

表3 エストロゲン、BPAの分析結果

単位：ng L⁻¹

	BPA	E2	E2	EE2	E1
河川水	39	ND	ND	ND	13
下水処理場放流水	69	13	ND	ND	65

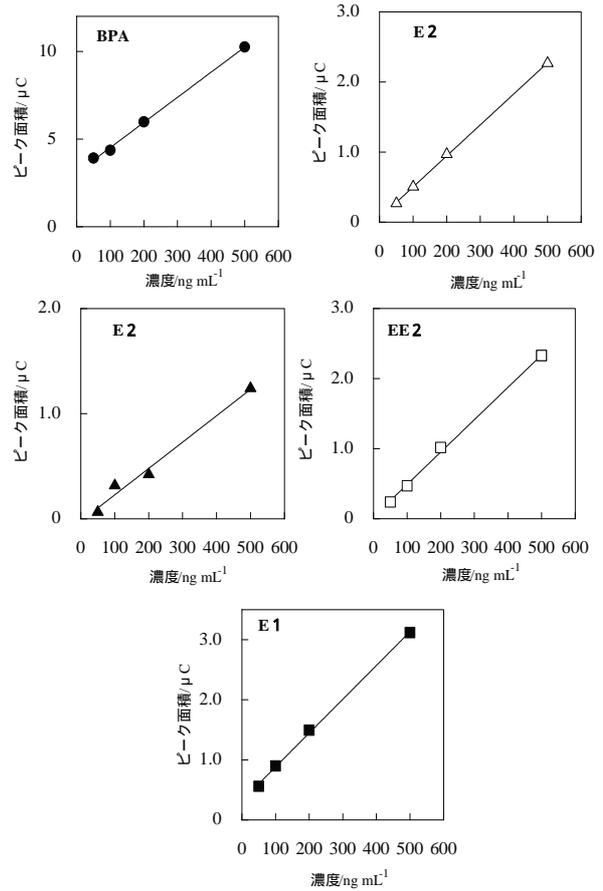


図11 マトリックス共存下での検量線

*実験条件は図2参照



図12 従来法との操作手順の比較

4 まとめ

本研究により得られた結論を以下に示す。

高速液体クロマトグラフ/電気化学検出法によるエストロゲン及びビスフェノールAの一斉分析法を開発した。

検量線は 10~1000ng mL⁻¹ で原点を通る直線となり (相関係数: 0.999 以上) 100ng mL⁻¹ での変動係数 (n=5) は 0.6~2%であった。検出限界 (3σ, n=20) は 0.5~2.3ng mL⁻¹ であった。

メタノール水溶液を用いたクリーンアップの適用により共存物質の妨害は抑制でき、河川水及び下水処理場放流水中 ng L⁻¹ レベルのエストロゲン、ビスフェノールAの定量が可能となった。

開発した方法は、安価な装置で分析可能であるばかりでなく、誘導体化のような煩雑な前処理を必要としないので、既存の分析法に比べて簡便性、迅速性が向上した。

今後は、この方法の更なる発展を目指し、具体的にはノニルフェノール等のフェノール基を有する他の内分泌かく乱化学物質の定量法としての適用を試みることにしたい。

参考文献

- 1) 嶋津暉之ら: 多摩川等の環境ホルモン問題に関する研究 (その3), 東京都環境科学研究所年報, pp. 165-171 (2000)
- 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) (1998)
- 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) (1999)
- 4) 石井善昭他: 液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法による環境水中のエストロゲンの定量, 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), 49, pp.753-757 (2000)
- 5) 田嶋晴彦他: 液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法による河川水及び下水放流水中の 17β-エストラジオール分析法の開発, 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), 49, pp.843-848 (2000)
- 6) 中村由美子他: 液体クロマトグラフィー/タンデム

質量分析法による下水試料中の女性ホルモン類定量分析法の開発, 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), 52, pp.107-113 (2003)

- 7) 今井一洋ら編: 超高感度高速液体クロマトグラフィー, 学会出版センター, 第2版, pp.98-125 (1990)
- 8) Penalver, A. et al.: Method based on solid-phase microextraction-high-performance liquid chromatography with UV and electrochemical detection to determine estrogenic compounds in water samples, *J. Chromatogr. A*, 964, pp. 153-160 (2002)
- 9) 日本化学会編: クロマトグラフィーの新展開, 学会出版センター, pp.91-97 (1990)
- 10) 白石寛明ら: フェノール骨格を持つ環境ホルモンの電気化学検出器による高感度分析法に関する研究, 環境ホルモン学会第1回研究発表会, pp.15 (1998)