

【資料】

エストラジオール類の固相抽出における溶出条件の検討

山辺真一, 林 隆義, 今中雅章, 吉岡敏行, 西島倫子 (水質第二科)

[キ-ワード: 17 -エストラジオール, エチニルエストラジオール, 環境ホルモン]

1 はじめに

GC/MS法によるエストラジオール類の分析法は「外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル」¹⁾(以下暫定マニュアル), および「要調査項目等調査マニュアル」²⁾に示されている。水試料について, 両マニュアルともに, 固相抽出 クリナップ 誘導体化 クリナップ GC/MS のフローとなっている。暫定マニュアルでは, この誘導体化前後のクリナップがTLC, HPLC, カラムクロマト等を使用する複雑な方法となっている。要調査項目マニュアルではこのクリナップの方法を市販の汎用カートリッジを使用する方法に変更することにより, 簡便化を図っている。

本研究では, 固相からの溶出溶媒等を変更することにより, 目的成分以外の溶出をできるだけ抑え, 誘導体化前のクリナップを省略することが可能となったので報告する。

2 実験方法

河川水をガラス繊維ろ紙 (GF/C) でろ過し, ろ液 500ml に対して酢酸0.75mlを加え, 17 -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, メストラノール100mg/l メタノール溶液を各20 μ 添加し試料とした。ろ液にエストラジオール類を加えないものをブランクとした。試料およびブランクを固相 (Shodex EDS-1 250mg) に20ml/minの流速で通し, 遠心分離機 (3000回転/min) で水滴を除去し溶出試験に供した。溶出に用いた溶媒は表1に示すが, ジクロロメタンは単品

表1 溶出溶媒一欄表 (ヘキサン溶液)

	fr1	fr2	fr3	fr4
	5ml	5ml	5ml	5ml
ジクロロメタン	100%	—	—	—
酢酸メチル	25%	50%	75%	100%
酢酸エチル	25%	50%	75%	100%
アセトン	25%	50%	75%	100%

で使用し, 酢酸メチル, 酢酸エチル, アセトンについてはヘキサンとの混合溶媒を用いた。各混合溶媒での溶出は, fr1 ; 25%・5ml, fr2 ; 50%・5ml, fr3 ; 75%・5ml, fr4 ; 100%・5mlとした。

各溶出液は40 窒素気流下で軽く蒸発乾固させ, アセトニトリルを0.4ml 加え溶解し, HPLCで分析した。

HPLC分析条件 (島津LC10)

カラム : Waters Symmetry RP18 2.1 \times 150mm

移動相 : A : 20mMギ酸アンモニウム (pH2.7)

B : アセトニトリル

グラジェント	0	2.5min A:70%	2.5 10min A:70 30% リニア	10 18min A:30%	18 21min A:30 70% リニア	21 30min A:70%	30min STOP
--------	---	--------------	------------------------	----------------	-----------------------	----------------	------------

流量 : 0.3ml/min

温度 : 40

検出器 : UV 270nm

注入量 : 10 μ l

3 結果及び考察

図1に妨害ピークの溶出率の変化をジクロロメタンのピーク面積に対する各溶媒の比率として示している。このピ

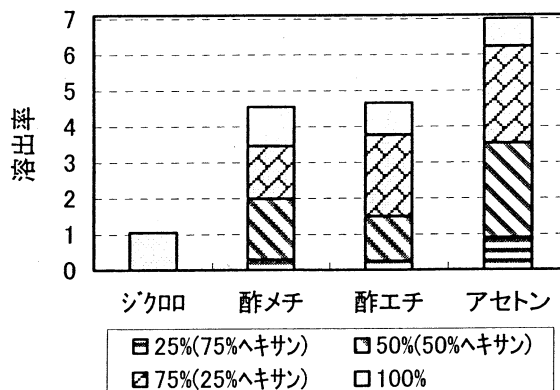


図1 妨害ピークの溶出率

ークは誘導体化に影響を与えるので小さい方が良いが、各混合溶媒の値は25%まではジクロロメタンの値よりも小さく、50%以上では1.5倍から7倍の値となっている。

図2に17-エストラジオールの溶出率の変化を示す。酢酸メチル、酢酸エチルでは25%でジクロロメタンより低いですが、50%でジクロロメタンの値を超え、この段階で大部分が溶出していた。最終的な溶出率はアセトン、酢酸エチルが同程度に良く酢酸メチル、ジクロロメタンの順となった。

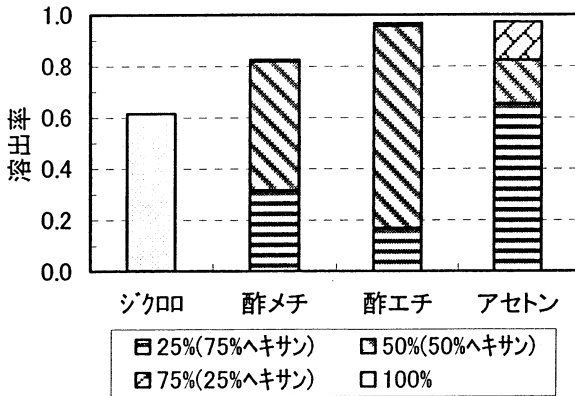


図2 17-エストラジオールの溶出率

図3にエチニルエストラジオールの溶出率の変化を示す。結果は17-エストラジオールの結果とほぼ同様となった。

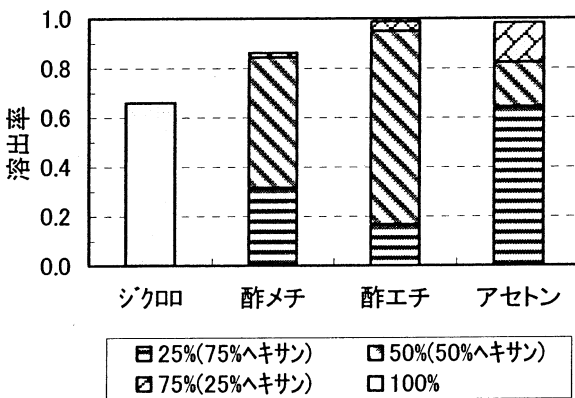


図3 エチニルエストラジオールの溶出率

図4にエストロンの溶出率の変化を示す。混合溶媒における溶出率上昇のパターンは前二者とよく似ていたがエストロンの場合はジクロロメタンの溶出率が良く、どの溶媒でも概ね100%の溶出となった。

図5にメストラノールの溶出率の変化を示す。メストラノールは前3者と比較して25%での溶出が多かった。酢酸メチル、酢酸エチルでは50%で更に溶出があったが、

アセトンでは50%および75%での溶出は小量であった。

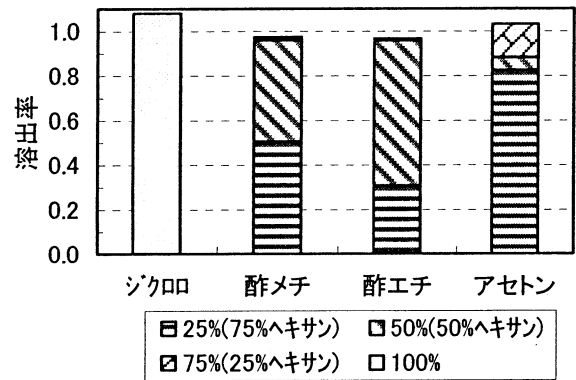


図4 エストロンの溶出率

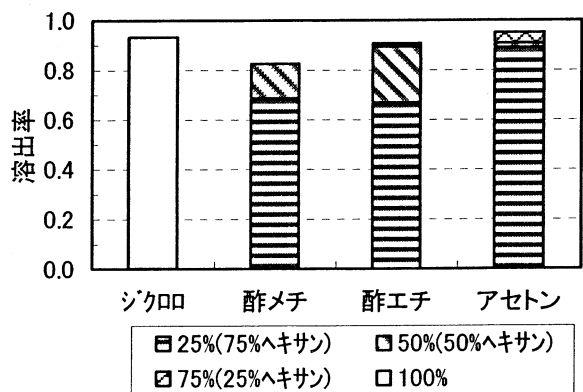


図5 メストラノールの溶出率

以上から、最適溶媒を検討すると、妨害ピークのみで判断するとジクロロメタンが最も良いが、17-エストラジオールおよびエチニルエストラジオールの溶出率が十分でないため除外する。アセトンと酢酸エチルを比較すると目的成分の溶出率は同程度であるが、妨害ピークが酢酸エチルの方が小さい。また、酢酸エチルと酢酸メチルでは妨害ピークが同程度で、目的成分の溶出率が酢酸エチルの方が高いので、実験を行った4種の溶媒中では酢酸エチルが最も良いと判断された。酢酸エチルの混合率を50%から75%に増加させても目的成分の溶出率はわずかしき増加しないが、妨害ピークは2倍以上となるので50%が最適割合と考えられた。

文 献

- 1) 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，pXI-1～XI-10，1998
- 2) 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，p47～62，1999