

【資料】

エストラジオール抱合体の分析条件の検討

山辺真一, 林 隆義, 斎藤直己, 吉岡敏行 (水質第二科)

[キーワード: β -エストラジオール, 抱合体, 環境ホルモン]

1 はじめに

17 β エストラジオールの主要な排出源は人や家畜であるが主にグルクロン酸等の抱合体として排泄されるといわれている。17 β エストラジオールの抱合体としてはグルクロン酸抱合体, 硫酸抱合体が知られている。これらの物質は遊離体よりもエストロゲン活性は低いが環境中で分解され遊離体となることから魚類などへの影響が懸念されている。

これら抱合体の分析法は「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), に示されており, 固相抽出後, 塩酸メタノール分解 → 乾固 → 誘導体化のフローとなっている。

本研究では, 抽出方法, 分解方法等の検討を行うとともに実試料の測定も行ったので報告する。

2 分析方法

2.1 抽出法

2.1.1 水 質

水質試料の抽出は固相抽出 (Shodex EDS-1 以下同じ) で行った。

溶出溶媒

抱合体分解前; 5 mM トリエチルアミンメタノール
..... 8 ml

抱合体分解後; 酢酸エチル:ヘキサン (7:3)
..... 8 ml

2.1.2 底 質

底質試料はメタノール, 酢酸バッファー混合液 (暫定マニュアルのとおり) で抽出し, 濃縮後の処理として「水で希釈後ジクロロメタン抽出」と「水で希釈後固相抽出」の二法の検討を行った。

2.2 抱合体の分解

抱合体の分解, 誘導体化の一例を図1に示す。

2.2.1 グルクロニダーゼ処理

5種類の抱合体 (β -Estradiol 3-Glucuronide,

β -Estradiol 17-Glucuronide, β -Estradiol 3-Glucuronide 17-Sulfate, β -Estradiol 3-Sulfate 17-Glucuronide, β -Estradiol 3,17-Disulfate 以下同じ) のメタノール溶液 (100mg/ml) 各0.1ml を共栓試験管に取り, 窒素吹きつけにより乾固し β -Glucuronidase (SIGMA 社製:100u/ml) で pH 6.8, 37°C 1 hr 分解を行った。次にこれを水100ml で希釈し約 pH 4 に調整後, 固相抽出を行った。

2.2.2 塩酸メタノール処理

5種類の抱合体溶液 (100mg/ml) 各0.1ml をネジ口試験管に取り, 窒素吹きつけにより乾固し, 1M塩酸メタノールを1ml 加え80°Cで20min 分解を行った。次にこれを水100ml で希釈し約 pH 4 に調整後, 固相抽出を行った。

2.3 誘導体化

鷹野ら²⁾の方法に従いN,O-bis [Trimethylsilyl] tri-

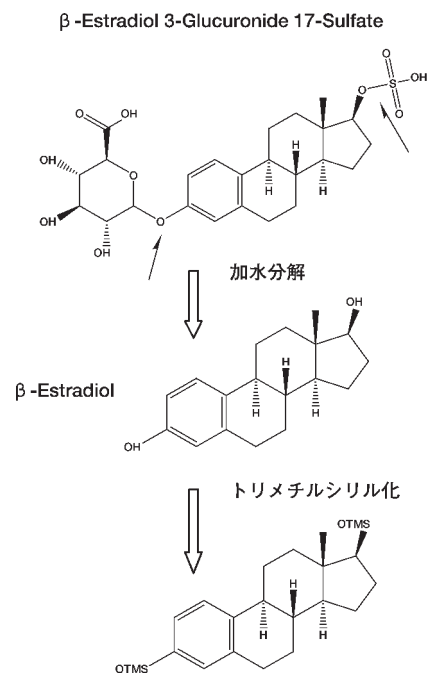


図1 β -エストラジオール抱合体の分解, 誘導体化過程の一例

fluoroacetamide, ジメチルホルムアミド各0.1ml で80℃ 1hr, 誘導体化を行い, スペルクリン Silica glass 1g 及び ENVI-Carb 250mg でクリーンアップを行った。

2.4 装置, 測定条件

装置: 日本電子 GC/MS JMS-SUN

カラム: DB-5 MS, 0.25mmφ×30m, 0.25μm

注入方式: スプリットレス注入 1μl, 250℃, パーシジ開始時間1.5min

キャリアガス: He 1ml/min (定流量)

カラム温度: 50℃ (2分) - 20℃/min - 200℃ - 6℃/min - 310℃ (5分)

イオン化条件: イオン化電圧 70eV (EI)

イオン化電流 300μA

イオン源温度 210℃

測定条件: SIM 法

3 結果及び考察

3.1 抽出法

湿泥約15g にβ-Estradiol 3-Glucuronide 17-Sulfate を5ng (β-Estradiol として) 添加し回収率を求めたところ, メタノール抽出液を水で希釈後ジクロロメタン抽出により処理した場合 (20%) より, 固相抽出により行ったもの (55%) の方が良好であった。

3.2 抱合体の分解

3.2.1 グルクロニダーゼ処理

β-Estradiol 3-Glucuronide 及びβ-Estradiol 17-Glucuronide は90%以上の分解率が得られたが, β-Estradiol 3-Glucuronide 17-Sulfate, β-Estradiol 3-Sulfate 17-Glucuronide, β-Estradiol 3, 17-Disul-

fate は分解しなかった。

3.2.2 塩酸メタノール処理

80℃, 20分間の加熱で各抱合体は68~92%分解し, グルクロニダーゼでは分解しない硫酸抱合体も分解した。分解後の処理は暫定マニュアルでは, 乾固後に誘導体化するとあるが, 塩酸メタノールの乾固によりエストラジオールの分解が一部みられたので, 水で希釈し pH 調整後, 固相抽出を行うこととした。

3.3 実試料の分析

表1, 図2に各種試料中のエストラジオール(E2)遊離体および抱合体の濃度, 割合を示す。

浄化槽排水のグルクロニダーゼ処理による抱合体の濃度が0.5ng/Lに対して塩酸メタノール処理による値は20倍の10ng/Lを示した。このことは, グルクロン酸抱合体は分解しやすいため, 浄化槽中で遊離体に分解し, 分解し難い硫酸抱合体の比率が高くなっているも

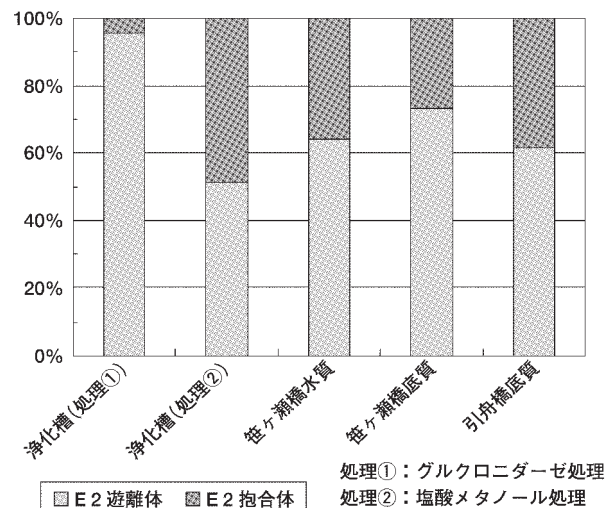


図2 各種試料中の E2 遊離体, E2 抱合体の割合

表1 各種試料中の E2 遊離体, E2 抱合体の濃度

	採取日	① 遊離体 (未処理)	② 遊離体 + 抱合体 (分解処理)	抱合体 (② - ①)
浄化槽排水 (単独処理)	'02.9.18			
①グルクロニダーゼ処理	—	10.6	11.1	0.5
②塩酸メタノール処理	—	10.6	20.6	10.0
笹ヶ瀬橋 水質 (笹ヶ瀬川)	'02.11.20	0.74	1.15	0.41
笹ヶ瀬橋 底質 (笹ヶ瀬川)	'02.10.15	5.7	7.8	2.1
引舟橋 底質 (足守川)	'02.10.15	1.6	2.6	1.0

単位 水質; ng/L 底質; μg/kg-dry

のと考えられる。また、浄化槽排水の塩酸メタノール処理によるE2遊離体：抱合体は約1：1であり、河川水中では約2：1であった。笹ヶ瀬橋と引舟橋は距離的に近く、水質も良く似た地点であるが、底質の性状が笹ヶ瀬橋は粘土質、引舟橋は砂質が多いためE2遊離体、抱合体ともに大きな差がみられたものと思われる。

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，p XI-1～XI-10，1998
- 2) 鷹野 洋,小倉 肇：女性ホルモン様化学物質(環境ホルモン)のバイオアッセイとGC/MS分析，岡山県環境保健センター年報，24-19，20，1999