

2PE-07

エストラジオールのオンライン LC-GC 誘導体化分析法の開発

○馬場健史¹, 山下俊幸¹, 奥野将司¹, 内田滋², 佐々野僚一², 福崎英一郎¹
 (¹大阪大学, ²(株) アイスティサイエンス)

【はじめに】

環境試料中におけるエストラジオールの分析は、夾雑物の除去、誘導体化が必要になるなど前処理に手間がかかり、分析作業が煩雑になっている。演者らは、夾雑物の除去と誘導体化を自動で行うオンライン LC-GC 誘導体化法の開発を行い、エストラジオールの自動誘導体化分析が可能になったので、その知見と共に報告する。

【方法】

装置 HPLC: Agilent 1100、LC-GC インターフェース: LGI-S110、大量注入口装置: LVI-S200、GC/MS: Agilent 6890N / 5975C

オンライン LC-GC 誘導体化法 逆相系 HPLC で目的物質が溶出される付近（予め標準溶液で目的物質のリテンションタイムを調べておく）を分取しながらその分取液に水を加えて希釈し、そのまま固相カートリッジ(C18-10 mg)へ通水させ、目的物質を吸着（保持）させた(図 1)。その後、固相を窒素ガスで乾燥させた後、溶出させながら、スパイラルインサートを備えた GC へ溶出液を直接注入し(図 2)、大量注入法を用いて測定を行った。固相からの溶出は 5%MSTFA 含有アセトン-ヘキサン(1/3)混合溶液 60 μ L で行った。インサート中での濃縮および誘導体化時間は 36 秒、その温度は 70°C で行った。

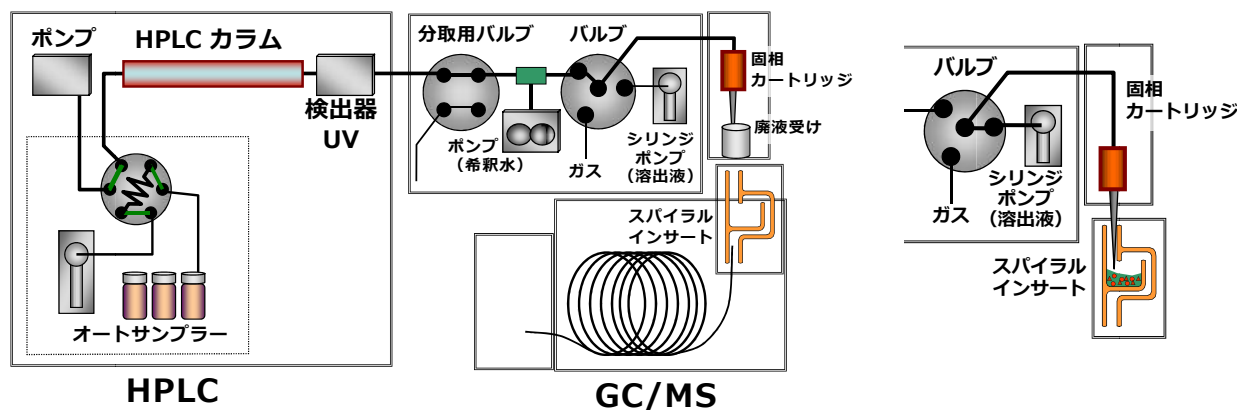


図 1. HPLC-(SPE)-GC/MS システム

図 2. 溶出と誘導体化注入工程

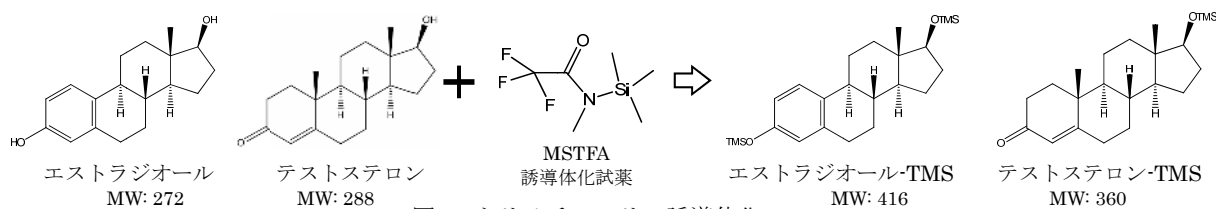


図 3. トリメチルシリル誘導体化

Development of the on-line LC-GC automatic derivatization method of estradiol

○Takeshi BAMBA¹, Toshiyuki YAMASHITA¹, Masashi Okuno¹, Shigeru UCHIDA², Ryoichi SASANO², Eiichiro FUKUSAKI¹

¹Osaka University, 2-1 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan ²AiSTI SCIENCE co., 120-6 Kuroda, Wakayama 640-8341, Japan

【結果と考察】

1. 誘導体化について

手作業で誘導体化した 17β -エストラジオール-TMS を GC/MS で測定したものをスタンダードとして、オンライン LC-GC/MS で誘導体化分析法により得られた回収率は 80% (n=5) であった。また、非誘導体化の 17β -エストラジオールは検出されなかった。再現性は相対標準偏差 (RSD; n=5) が 2%以内と良好な結果が得られた。従来の誘導体化は 30 分以上の時間を要するが本法は 36 秒と大幅に時間を短縮できた。誘導体化が効率良く行われた理由として、誘導体化試薬 MSTFA を添加したアセトン-ヘキサン混合溶液で溶出させながら直接 GC へ注入した後、インサート中での濃縮工程において溶媒分子が少なくなることで、エストラジオール分子と誘導体化試薬分子の衝突率が高まり、さらに注入口の熱が加わることで反応が促進されたことによると考えられた。さらに実用性を考慮し、エストラジオールの近くに溶出するテストステロンを添加した混合標準液を本法により測定した結果、両化合物の分離および検出が可能であった。

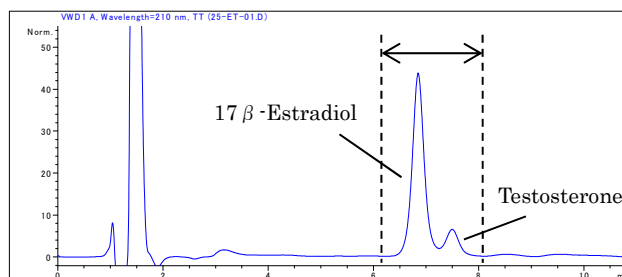


図 4. HPLC-UV クロマトグラムと分取部分

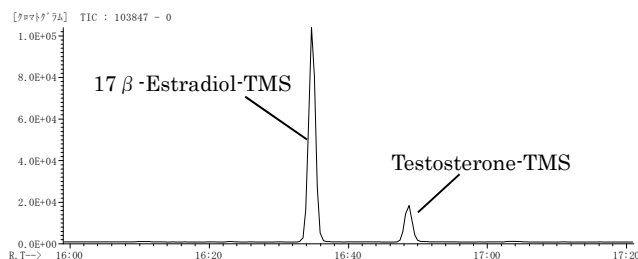


図 5. HPLC-GC/MS トータルイオンクロマトグラム

2. 感度について

本法では HPLC に注入した目的物質を固相に保持させて、その全量を GC/MS へ導入しているため、HPLC の注入量を増加させることで容易に感度を向上することができた。

3. 環境水への応用について

本法を用いて水試料中のエストラジオール分析への応用を試みた。

前処理の簡易化：

本法により装置の感度を大幅に向上できたことから、試料水の量を従来の 1 L から 100 mL に減らすことができた。そして、前処理の固相の充填量も少量化することができた。また、誘導体化は水分があると不安定になることが多く、通常、濃縮乾固するか、固相を十分に吸引乾燥させて水分を完全に除去する必要がある。本法では最終検液を HPLC に注入するため、最終検液に水分が含まれた状態でも分析可能であることから、乾燥作業工程を省くことができた。これらにより、本法では前処理時間を大幅に短縮することができた。

試料水 100 mL

固相 Smart-SPE HLBi5-10 mg (保持)

*SDB系コンビネーションカラム

洗浄 水 2 mL

溶出 アセトニトリル/水(1/1) 0.8 mL

定容 1 mL (水で調製)

HPLC-GC/MS システム (100 μ L 注入)

図 6. 水中エストラジオール分析法

精製水における添加回収試験：

精製水を用いて試料中濃度 1 ng/L での添加回収試験を行った (n=5)。検量線は HPLC-GC/MS で作成した。その結果、 17β -エストラジオールの回収率は 101%、再現性は RSD が 5.1%と良好な回収率と再現性を得ることができた。

【まとめ】

オンライン LC-GC 誘導体化分析法により、再現性の良いエストラジオールの自動誘導体化分析が可能となった。また、本法は前処理の簡易化および迅速化、さらには高感度分析が実現できた。

今後、夾雑物の多い試料中の誘導体化を行う分析への応用が期待できる。