

# 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<sup>1</sup>, 山下俊幸<sup>1</sup>, 奥野将司<sup>1</sup>, 内田滋<sup>2</sup>, 佐々野僚一<sup>2</sup>, 福崎英一郎<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>大阪大学大学院工学研究科, <sup>2</sup>(株) アイスティサイエンス)

## 1 目的

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、17β-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(図1)。

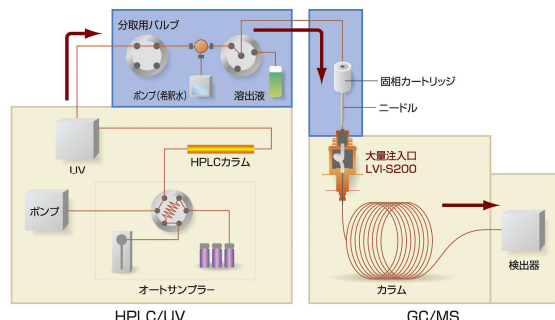


図1 オンラインHPLC-GC/MSシステム

## 2 方法

### 2.1 オンラインLC-GC誘導体化注入

逆相HPLCで目的物質を固相カートリッジに分取した後、5%MSTFA含有アセトン/ヘキサン(1/3)混合溶液60μLでGCインサートへ溶出しながら注入した(図2)。

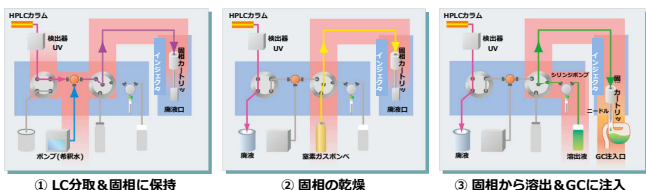


図2 オンラインLC-GC注入の流れ

GCインサート中での濃縮および誘導体化導入は70℃、36秒でおこな(図3)、表1のLC-GC/MS条件で測定した。

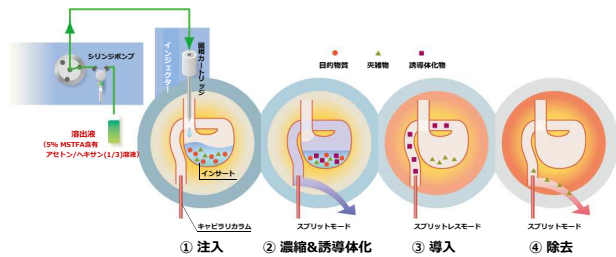


図3 GC注入口における濃縮および誘導体化導入の流れ

表1 LC-GC/MS条件

HPLC (MIDAS;Spark, Agilent 1100)	
Injection:	100 μL, Sample loop
Column:	3.0 mm i.d. × 100 mm Inertsil ODS-3
Solvents:	A: water B: Acetonitrile
flow rate:	0.5 mL/min
Gradient(B%):	0min(40%)-9min(40%)-12min(90%)-14min(90%)
Detector:	UV 210 nm
Interface LC-GC (LGI-S110; AiSTI)	
SPE:	2 mm i.d. × 10 mm C18
Diluting:	water 0.5 mL/min
Purge:	N <sub>2</sub> gas, 3 min
Elution:	acetone/Hexane(1/3), 50 μL
Interface Injector (LVI-S200; AiSTI)	
Insert:	Spiral Insert
Solvent Vent:	0.60min, Purge flow 150 mL/min
Splitless:	4 min
Inj. Temp.:	70°C(0.6min)-120°C/min-290°C(15min)
GC/MS (6890N/5975C; Agilent)	
Column:	0.25 mm i.d. × 30 m, df 0.25μm BPX-5
Oven:	60°C(4min)-20°C/min-300°C(3min)
Carr. gas:	He, 1 mL/min
MS:	SIM

## 3 結果と考察

### 3.1 誘導体化について

オンラインLC-GC/MS誘導体化分析法による17β-エストラジオールのTMS誘導体化率は81% (n=5)であった。また、非TMS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(表2)。

LCにおいて17β-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, 図5)。

表2 17β-エストラジオールのTMS誘導体化試験結果

	GC/MS (pg)		LC-GC/MS (pg)						RSD(%)	REC(%)
	ST-1	ST-2	1	2	3	4	5	Ave.		
17β-Estradiol-TMS	1000	500	803	815	793	800	817	806	1.26	80.6
Testosterone-TMS	1000	500	815	827	820	816	821	820	0.58	82.0

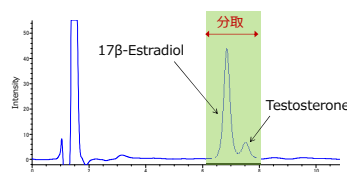


図4 HPLC-UV(210 nm)クロマトグラム

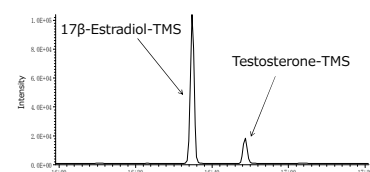


図5 HPLC-GC/MS トータルイオンクロマトグラム

従来のTMS誘導体化は30分以上の時間を要するが本法では36秒と大幅に時間を短縮できた。誘導体化が効率よく行われた理由として、誘導体化試薬を含有させた溶液で固相カートリッジから目的成分を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、17β-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が考えられた。

### 3.2 感度について

本法ではHPLCに注入した目的物質を固相カートリッジに保持させ、その全量をGC/MSに導入できる。HPLCの注入量を100μLに増加させることにより本システムの検出感度は向上し、50pg/mLの17β-エストラジオールおよびテストステロンを検出できた(図6)。

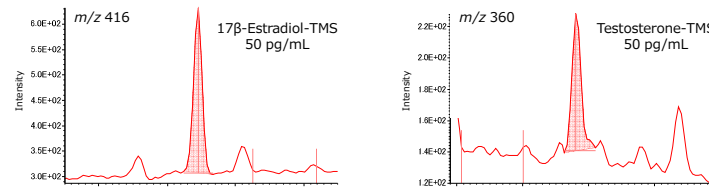


図6 HPLC-GC/MS マスクロマトグラム

### 3.3 前処理の簡易化・迅速化について

水試料を固相抽出し、本法により分析した(図7)。

3.2で示したように本システムは高感度であるため、試料量を従来法の1Lから100mLに減らすことができた。

さらに、最終検液に水分が含まれた状態でも分析可能であるため、固相の乾燥工程を省くことができた。これらにより、本法は従来法と比較して前処理時間を大幅に短縮することができた。

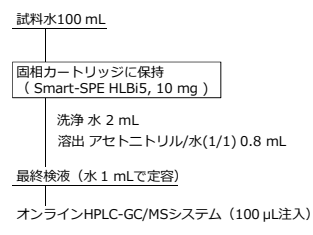


図7 水試料前処理フロー

### 3.4 精製水における添加回収試験および河川水の分析

17β-エストラジオール濃度が1ng/Lとなるように調製した精製水100mLを用いて添加回収試験を行った(n=5)。検量線はHPLC-GC/MSで作成し、回収率が101%、再現性がRSD=5.1%と良好な結果が得られた(表3)。

表3 精製水における添加回収試験

	Recovery (%)					RSD(%)	
	1	2	3	4	5		
17β-Estradiol	98	104	97	98	109	101	5.1

和歌山市で採取した河川水100mLを前処理し分析した(図8)。その結果、17β-エストラジオール濃度は0.39ng/L (n=4)、河川水における添加回収率は99%であった(1ng/L, n=2)。

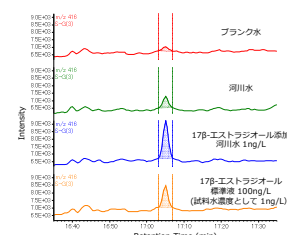


図8 河川水分析のマスクロマトグラム

## 4 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17β-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。精製水における添加回収および再現性の試験結果は良好であり、河川水の分析も可能であった。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。