

## 2B-04

### 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 (第 2 報)

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

(<sup>1</sup>(株) アイスティサイエンス, <sup>2</sup>大阪大学)

#### 【はじめに】

生体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。前回、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、水中エストラジオールの自動誘導体化分析法を報告<sup>1)</sup>した。また、近年、残留農薬分析では抽出作業が簡易で効率的な QuEChERS 法<sup>2)</sup>や STQ 法<sup>3)</sup>(= QuEChERS 法+固相カートリッジ)が報告されている。そこで、今回は、血清のタンパク除去や抽出工程に QuEChERS 抽出を取り入れて、血清中のエストラジオール分析への応用を試み、その知見を得られたので報告する。

#### 【方法】

**試料:** 市販のコイの血清 **目的成分:** 17β-エストラジオール、テストステロン

#### 前処理法:

##### ■ ACN-固相法 (アセトニトリル抽出)

試料: コイの血清 1mL

アセトニトリル 1mL  
振とう (1min)  
遠心分離 (3500rpm-5min)  
上澄液  
分取 1mL  
Smart-SPE C18-30mg  
流出液  
定容 1mL  
HPLC-GC/MS (100μL注入)

##### ■ STQ法 (QuEChERS抽出)

試料: コイの血清 1mL

食塩 0.1g  
クエン酸3Na 0.1g  
クエン酸2Na 0.05g  
無水硫酸Mg 0.4g  
アセトニトリル 1mL  
振とう (1min)  
遠心分離 (3500rpm-5min)  
ACN層  
分取 0.5mL  
添加: 水 0.2mL  
Smart-SPE C18-30mg  
流出液  
定容 1mL  
HPLC-GC/MS (100μL注入)

##### ACN-固相法

アセトニトリルで抽出すると同時に除タンパクを行い、上澄液を分取し、固相カートリッジ Smart-SPE C18-30 (AiSTI) で精製を行った。

##### STQ 法

(Solid Phase Technique with QuEChERS): 抽出までは QuEChERS 法で行い、精製は同様に固相カートリッジ Smart-SPE C18-30 を用いた。<sup>3)</sup>

**装置:** HPLC: 1100(Agilent), 注入量 100μL, LC-GC インターフェース: LGI-S110 (AiSTI), 大量注入装置: LVI-S200(AiSTI), GC/MS: 7890A/5975C(Agilent)。オンライン LC-GC 誘導体化法: 逆相系 HPLC で分取し目的物質をその固相へ吸着 (保持) させた後、5%MSTFA 含有アセトン-ヘキサン(1/3)で溶出させながら GC へ直接注入し、大量注入法を用いた誘導体化により GC/MS で測定した。

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

Ryoichi SASANO<sup>1</sup>, Toshiyuki YAMASHITA<sup>2</sup>, Masashi OKUNO<sup>2</sup>, Shigeru UCHIDA<sup>1</sup>, Eiichiro FUKUSAKI<sup>1</sup>, Takeshi BAMBA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>AiSTI SCIENCE Co., 120-6 Kuroda, Wakayama 640-8341, Japan <sup>2</sup>Osaka University, 2-1 Yamada-oka, Suita, Osaka, 565-0871, Japan

### 【結果と考察】

**抽出法について**：コイの血清を用いてアセトニトリル抽出および QuEChERS 法による抽出操作を行った遠心分離後の写真を図 1、2 に示す。QuEChERS 法はアセトニトリル層と試料層と水層の 3 層に別れ、試料層は固まった状態となり、アセトニトリル層と水層が混ざらないため、エストラジオールが抽出されている上層のアセトニトリル抽出液を採取し易くなった。アセトニトリル抽出法と比較しても、塩類を加えるだけで、作業時間はほとんど同じであった。

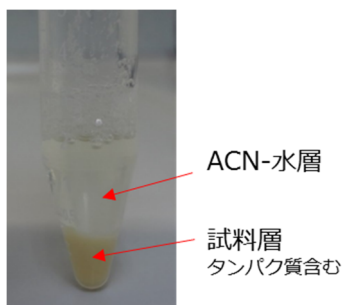


図 1. アセトニトリル抽出

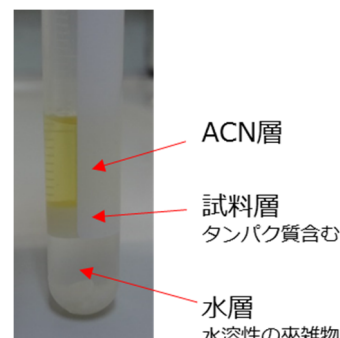


図 2. QuEChERS 抽出

また、除タンパクも良好であった。

**精製工程について**：本 LC-GC システムでは最終検液を HPLC に 100 $\mu$ L 注入するため LC カラムへの負担を考慮して、固相カートリッジ (C18) による精製を行った。固相 C18 に通液することで、疎水性の夾雑物を固相に吸着させて除去した。

**前処理法について**：分取するために必要なリテンションタイム確認のためのスタンダード (1ppm) とそれぞれの前処理によるコイの血清の HPLC-UV クロマトグラムを図 3 に示す。

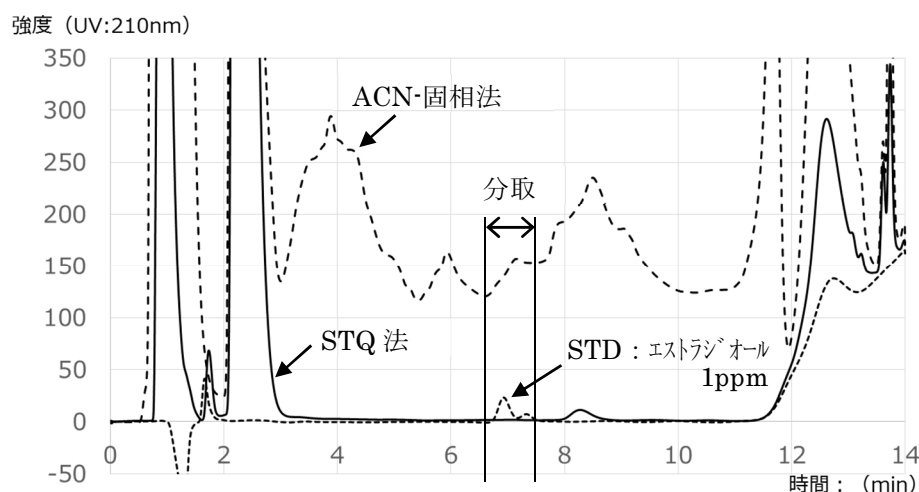


図 3. HPLC-UV クロマトグラム比較

STQ 法はアセトニトリル抽出法と比較して、夾雑物が少なく、LC への負荷を大きく減らすことができた。これは QuEChERS 法の抽出法を取り入れることで、アセトニトリルと水の液液分配を同時に行っており、試料に多く含まれている水溶性の夾雑物を水層へ移行させて、効率よく取り除く

ことが可能となったためと考えられる。一方、アセトニトリル抽出法は水溶性の夾雑物も同時に分取してしまうために、LC への負荷が大きくなったと思われる。

**オンライン LC-GC 誘導体化法について**：従来の誘導体化は水分を完全に除去しなければならず、前処理工程において検液を減圧濃縮乾固する必要があった。LC-GC 誘導体化法では LC-GC のインターフェースで水分除去および誘導体化を自動で行っており、前処理工程を簡易化することができた。

### 【まとめ】

QuEChERS 抽出を用いた STQ 法による前処理と LC-GC/MS 誘導体化法の組み合わせにより水溶性の夾雑物を大幅に取り除くことで、血清中のエストラジオール分析が簡易になった。

### 【参考文献】

- 1) 馬場ら：第 22 回環境化学討論会講演要旨集、P666-667 (2013)
- 2) <http://quechers.cvua-stuttgart.de/>
- 3) 佐々野ら：日本食品衛生学会第 95 回学術講演要旨、(2008)