

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)

○佐々野僚一¹, 山下俊幸², 奥野将司², 内田滋¹, 福崎英一郎², 馬場健史²
(¹(株) アイスティサイエンス, ²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¹⁾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²⁾や STQ 法³⁾(= 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。³⁾

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 SASANO¹, Toshiyuki YAMASHITA², Masashi OKUNO², Shigeru UCHIDA¹, Eiichiro FUKUSAKI¹, Takeshi BAMBA¹
¹AiSTI SCIENCE Co., 120-6 Kuroda, Wakayama 640-8341, Japan ²Osaka 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。

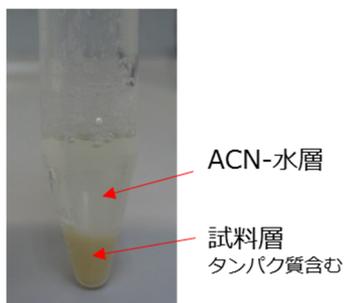


図 1. アセトニトリル抽出

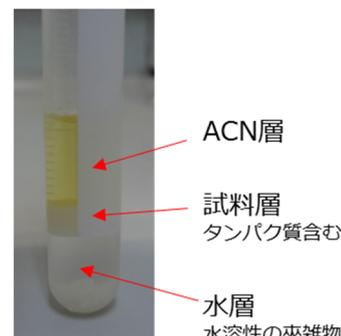


図 2. QuEChERS 抽出

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 μ 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。

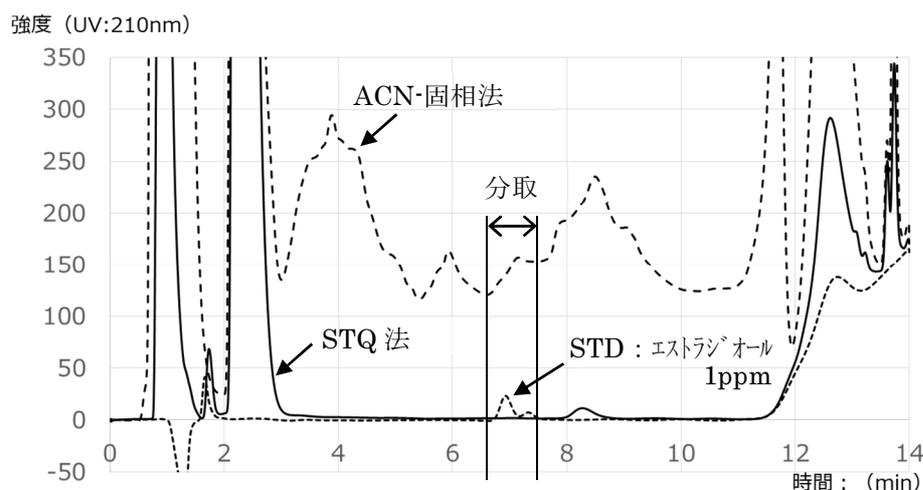


図 3. HPLC-UV クロマトグラム比較

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)

エストラジールのオンラインLC-GC 誘導体化分析法の開発（第2報）

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

¹ (株) アイスティサイエンス, ²大阪大学

目的

■ 血清中のエストロジオール分析

血清

タンパク除去
抽出
精製

エストロジオール分析

誘導体化
微量分析

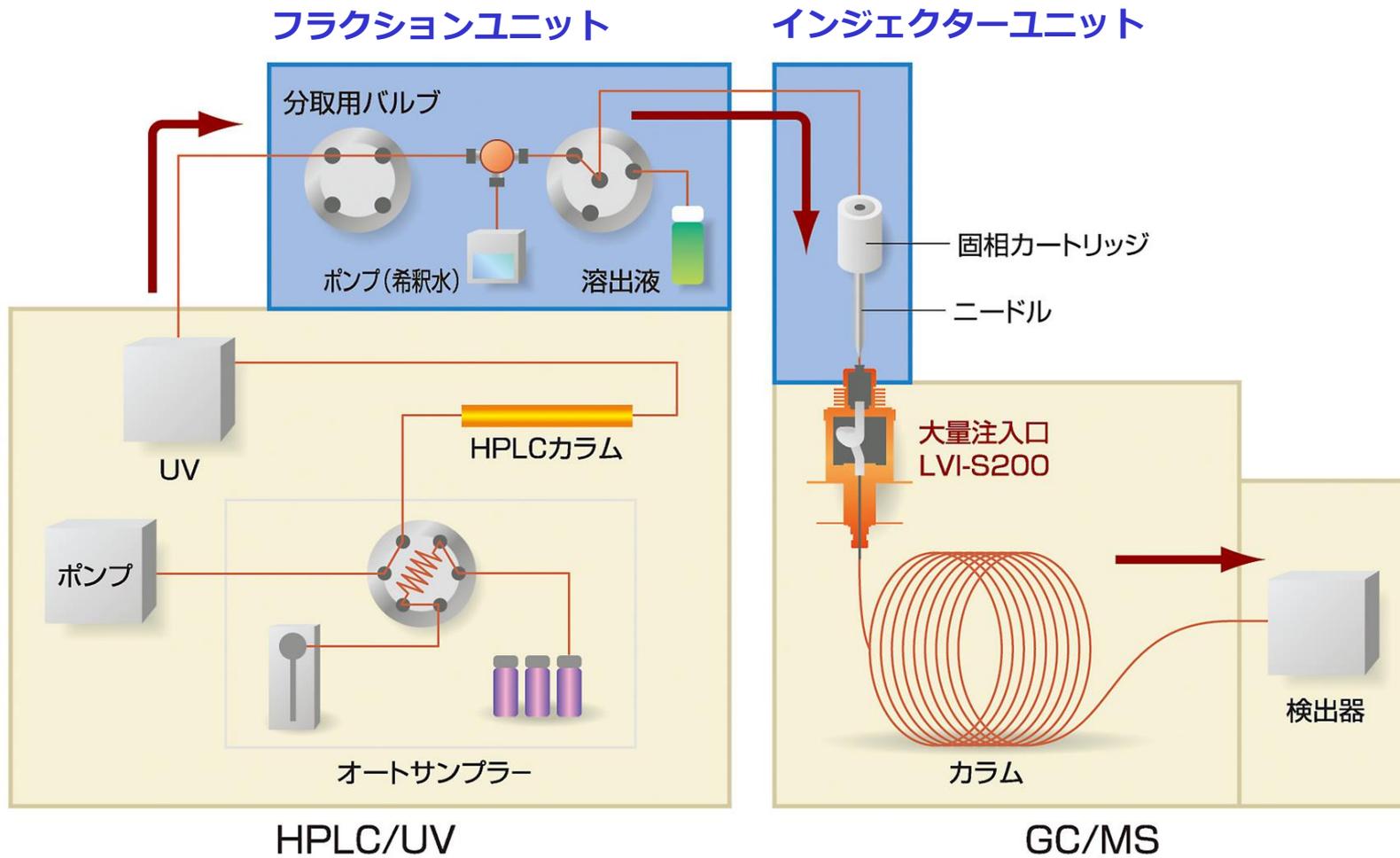
■ 前処理

STQ法
(QuEChERS抽出+固相ミニカラム精製)

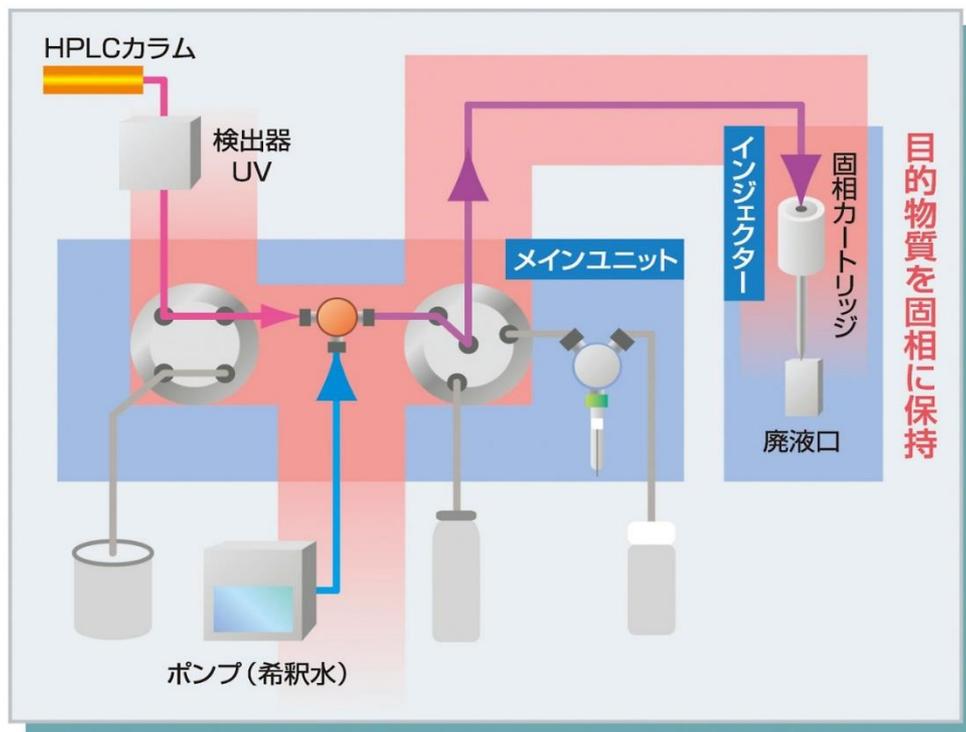
■ 測定システム

オンラインLC-GC誘導体化法

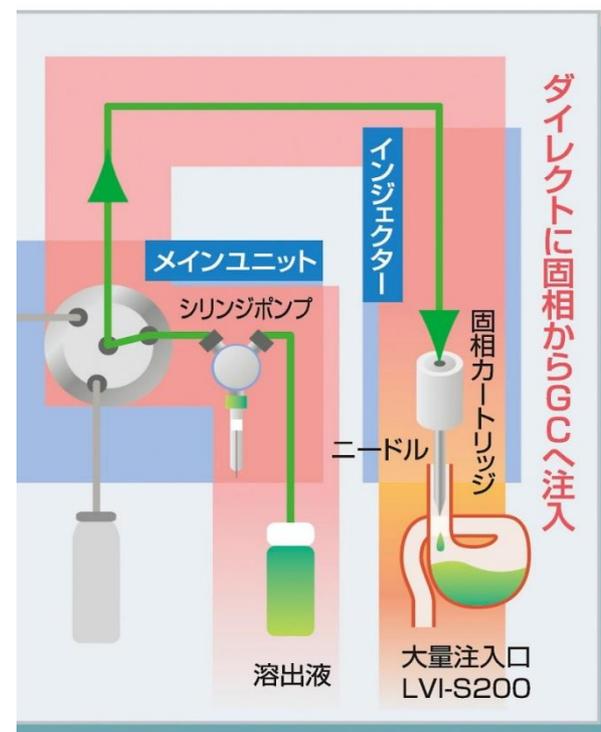
LC-GCシステム



LC-GCインターフェース

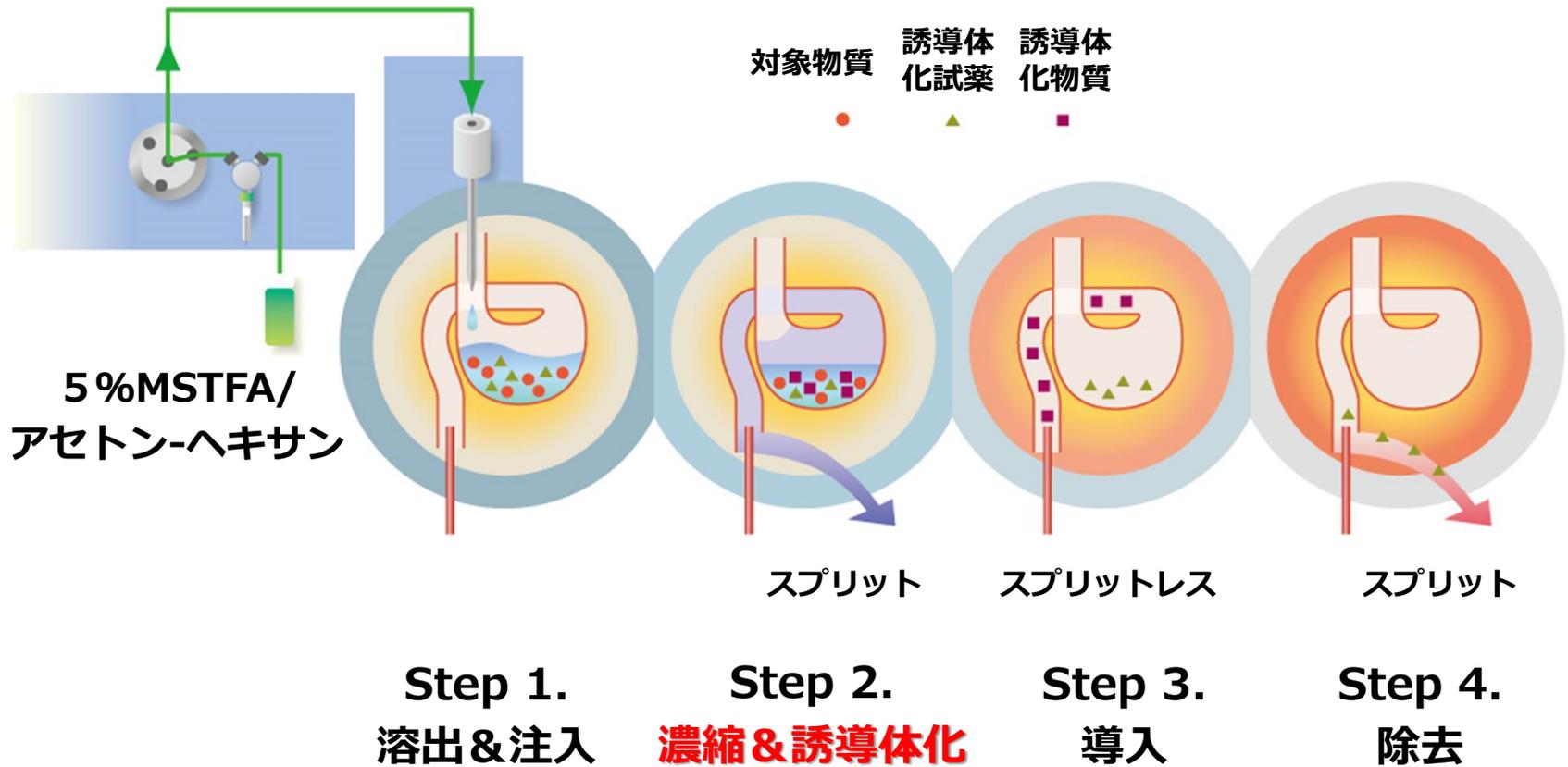


Step 1. LC分取&固相濃縮

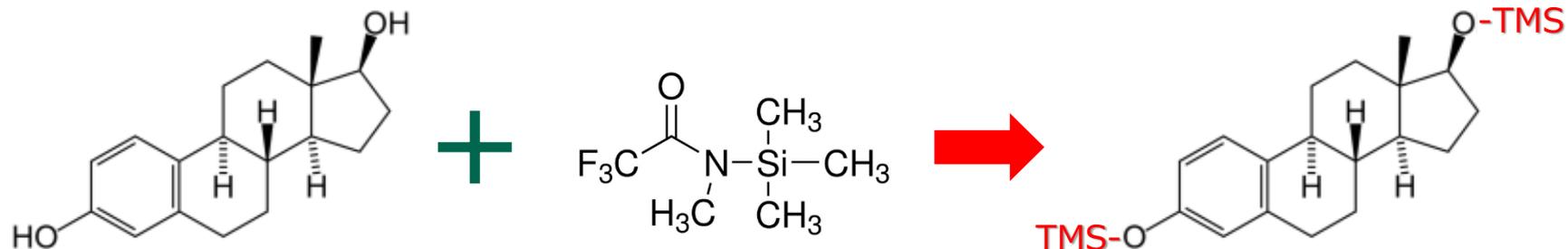


Step 2. 溶出&注入

誘導体化注入法



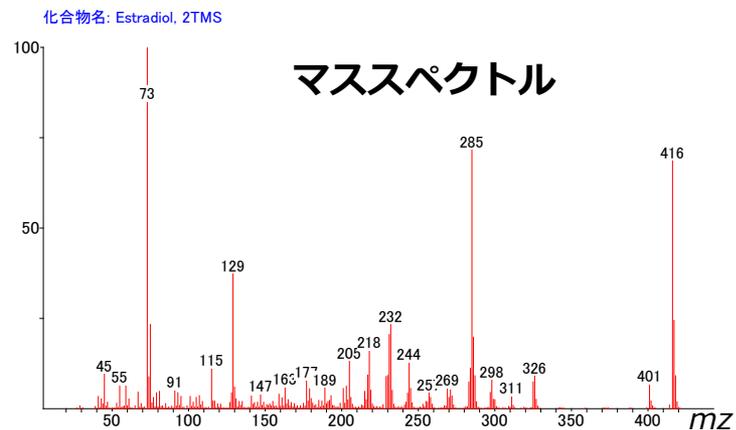
誘導体化



17β-エストラジオール
分子量：272

MSTFA

2TMS-エストラジオール
分子量：416



実験方法

- **試薬**
 - ・ 17 β -Estradiol (LogPOW=3.5)
- **試料**
 - ・ コイの血清
- **混合標準溶液**
 - ・ 17 β -Estradiol 30mg/3mL-Acetone
 - ・ 混合標準溶液 : 1ppm/ACN-水(1/1)
 - ・ 添加用混合標準溶液 : 10ppb/ACN-水
- **試料添加濃度**
 - ・ コイの血清 : 0.2ppb (0.2ng/mL)
- **抽出法の比較検討**
 - ・ アセトニトリル抽出
 - ・ QuEChERS抽出 (STQ法)
- **LC-GC/MS誘導体化法の評価**
 - ・ 検量線の直線性
 - ・ 再現性
- **血清中エストラジオール分析の評価**
 - ・ 添加回収試験
 - ・ 再現性

LC-GC/MS条件

■ HPLC (Agilent 1220 Infinity; TOSOH)

Injection: 100 μ L

Column: Inertsil ODS-3 3.0 mm i.d.×150 mm

Solvents: A: Water

B: Acetonitrile

Gradient: B:40%(0-9min)- 90%(12-14min)

Flow rate: 0.5 mL/min

Detector: UV 210 nm

■ GC/MS (Agilent 7890A / 5975C)

Column: DB-5MS 0.25mm i.d.×30m, 0.25 μ m

Oven T.: 60°C(4min)-20°C/min-300°C(4min)

Carr. gas: He, 1.2 mL/min

MS: SIM

■ Interface SPE (LGI-S110; AiSTI)

SPE: 2 mm i.d.×10 mm C18

Fraction: 6.5-7.2min

Diluting: Water 1 mL/min

Purge: N₂ gas, 2 min

**Elution: 5%MSTFA
in Acetone-Hexane, 50 μ L**

■ Injector (LVI-S200; AiSTI)

Insert: Spiral Type Insert

Vent Time: 0.5min

Vent Flow: 150mL/min

Splitless: 4 min

Inj.Temp.: 70°C(0.5min)-120°C/min-
240°C/min-50°C/min-290°C(12min)

抽出法の検討

■ 前処理 : ACN-固相

試料 : コイの血清 1mL (0.2ng/mL)

ACN 1mL
 振とう (1min)
 遠心分離
 (3500rpm-5min)
 上澄液
 分取 1mL (0.1ng)
 Smart-SPE C18-30
 流出液
 定容 1mL (水で調製 : バイアル中濃度0.1ng/mL)

■ 前処理 : STQ法

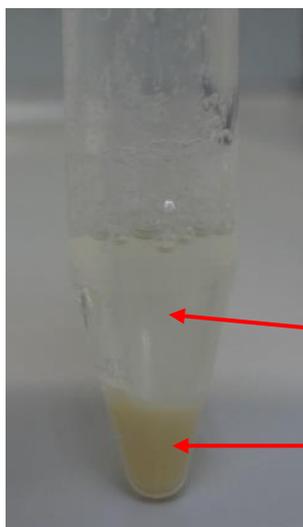
試料 : コイの血清 2mL (0.2ng/mL)

食塩 0.2g
 クエン酸3Na 0.2g
 クエン酸2Na 0.1g
 無水硫酸Mg 0.8g
 ACN 2mL
 振とう (1min)
 遠心分離
 (3500rpm-5min)
 ACN層
 分取 0.5mL (0.1ng)
 添加 : 水 0.2mL
 Smart-SPE C18-30
 流出液
 定容 1mL (水で調製 : バイアル中濃度0.1ng/mL)

QuEChERS法の
抽出工程を採用

抽出状態の比較

■ 前処理：ACN-固相



ACN-水層

試料層 (除タンパク)

■ 前処理：STQ法



ACN層 (エストラジオール抽出)

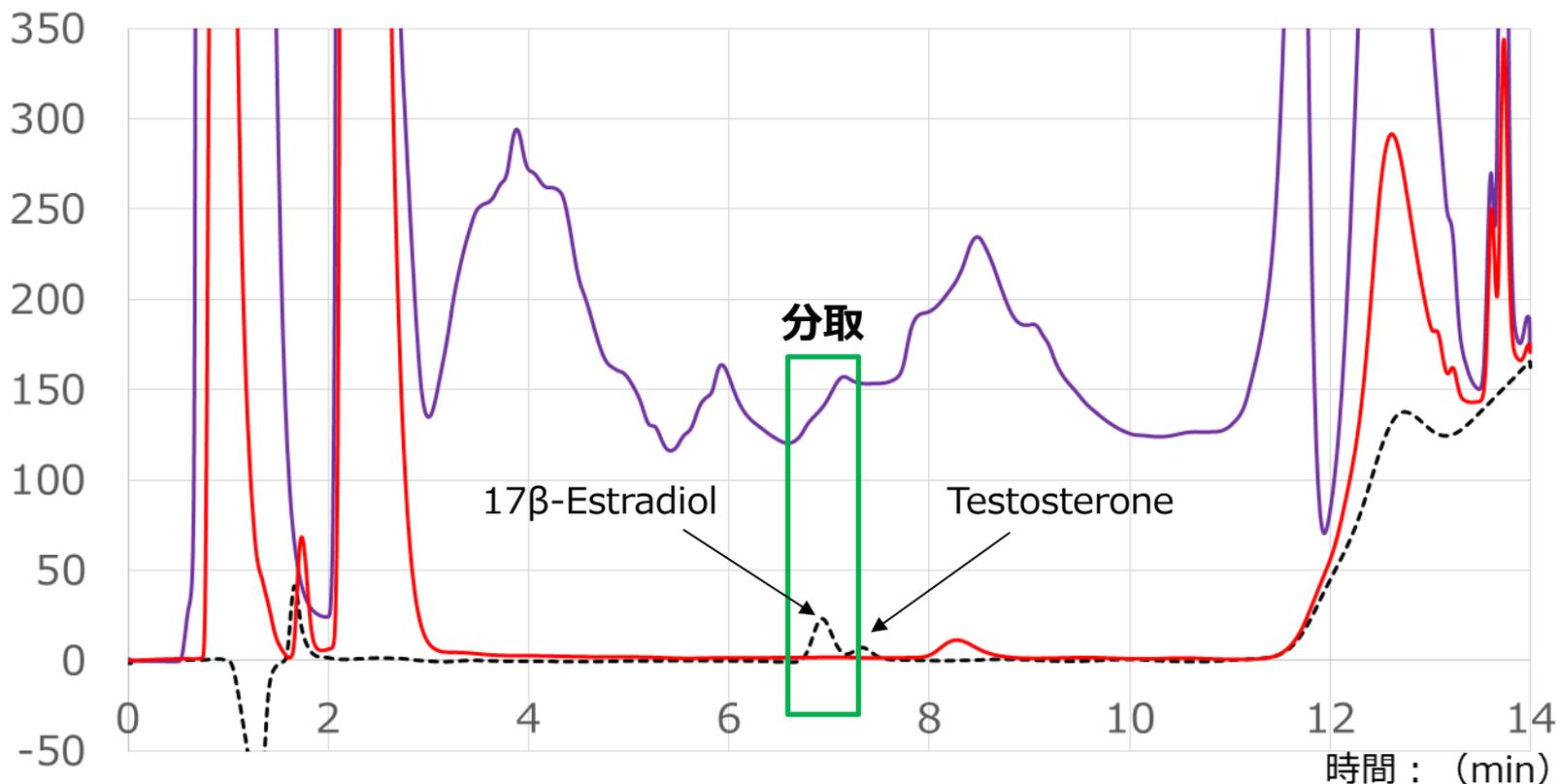
試料層 (除タンパク)

水層 水溶性の夾雑物

- QuEChERS法の抽出法を取り入れることで、試料に多く含まれている水溶性の夾雑物を効率よく取り除くことが可能となった。
- 目的成分が抽出される有機層が上層にあり、しかも、試料層 (除タンパク) が水層の蓋のような役割をするため、分取しやすくなった。

HPLC-UVクロマトグラム比較

強度 (UV:210nm)

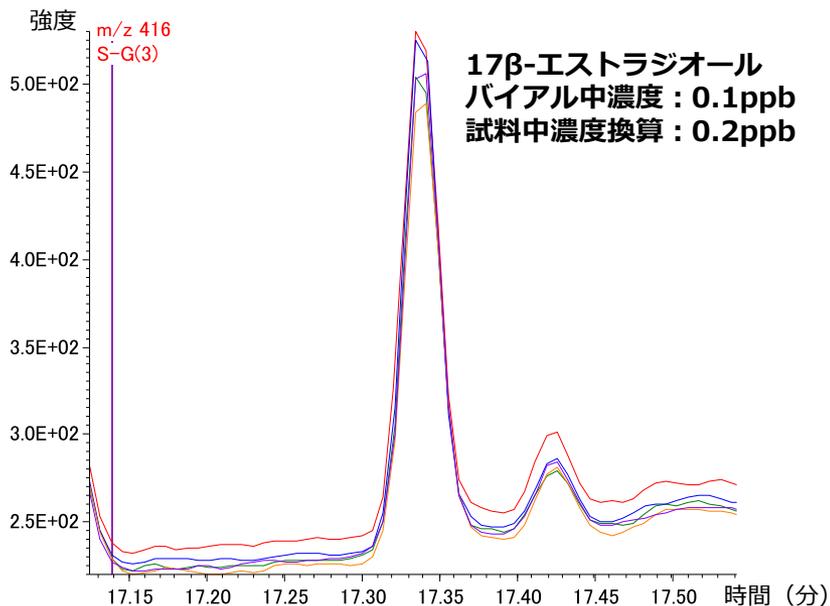


■ 前処理 : ACN-固相

■ 前処理 : STQ法

■ スタンダード

検量線 & 再現性



検量線: 比例
面積(比率)=9589.83141*Q
相関係数=0.9993174

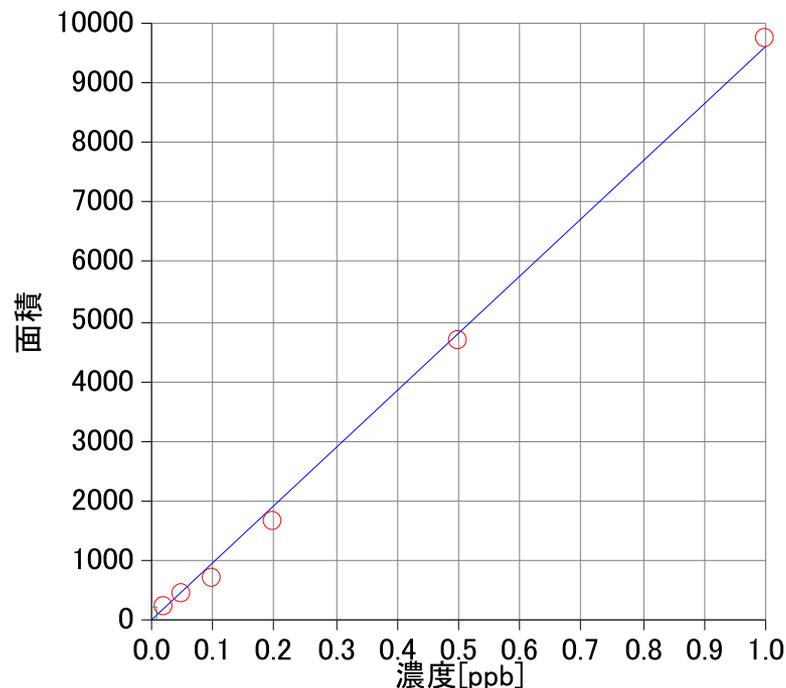


図. LC-GC/MSによる繰り返し測定による
定量イオンクロマトグラム重ね描き (n=5)

表. HPLC-GC/MSによる繰り返し測定結果 (再現性)

No.	1	2	3	4	5	Ave.	RSD (%)
ピーク 面積値	949	910	951	890	913	922	2.88

図. LC-GC/MSによる検量線
(6点 : 0.02ppb-1.00ppb)

添加回収試験

実験方法

試料：コイの血清 2mL (0.2ng/mL)

← 添加回収試験 (前処理前添加)

抽出

分取 0.5mL (0.1ng)

精製

前
処
理

← 前処理後添加

定容 1mL

(水で調整：バイアル中濃度0.1ng/mL)

スタンダード

溶媒

HPLC-GC/MSシステム測定
(100 μ L注入)

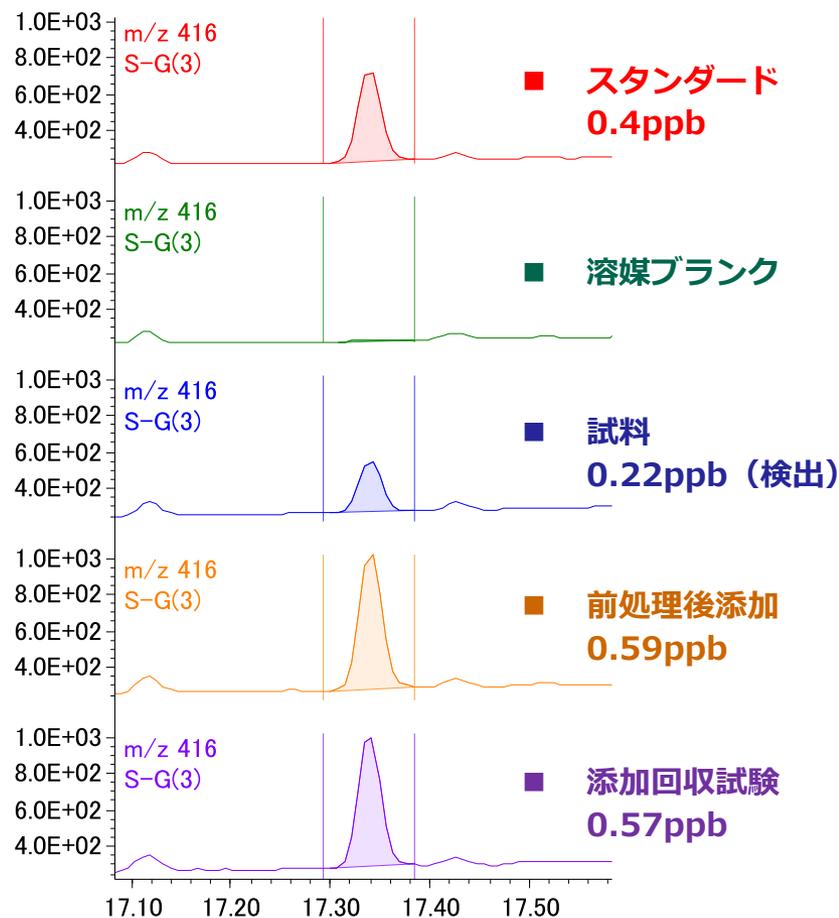


図. 定量イオンクロマトグラム比較と定量値 (試料中濃度)

添加回収試験 (n=5, 再現性)

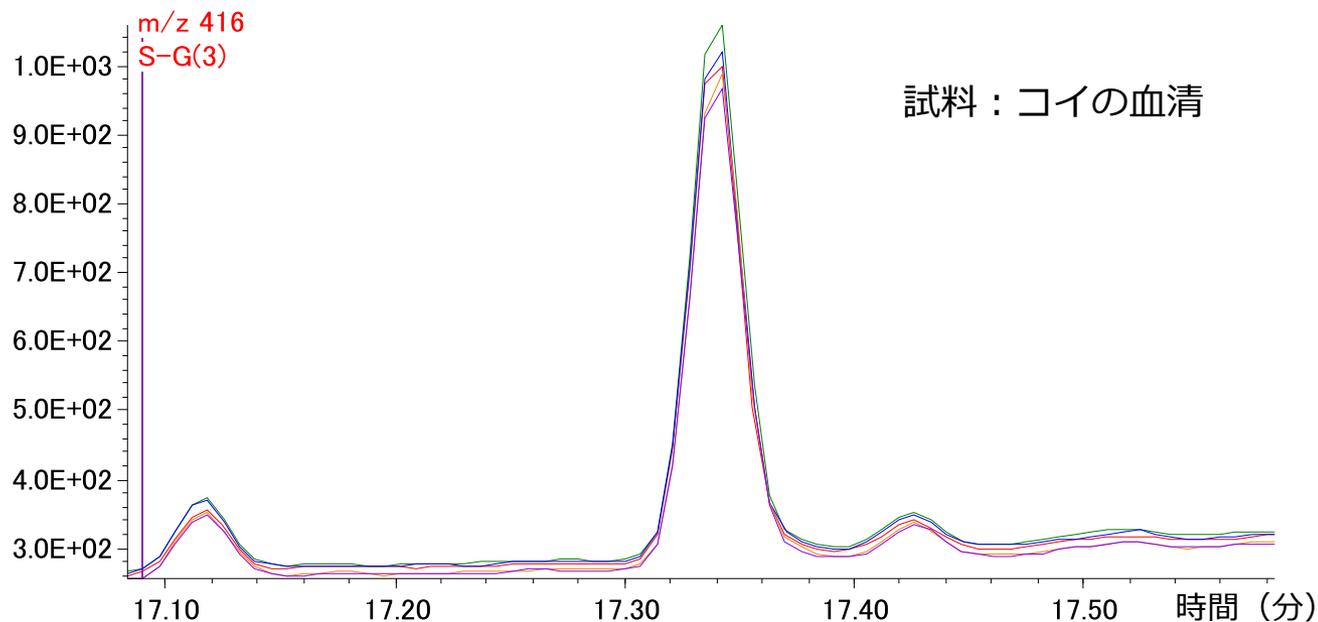


図. 本法の繰り返し添加回収試験による定量イオンクロマトグラムの重ね描き (n=5)

表. 繰り返し添加回収試験による回収率結果 (n=5)

No.	1	2	3	4	5	Ave.	RSD(%)
回収率(%)	96	103	98	96	93	97.2	3.8

$$\text{回収率 (\%)} = \frac{\text{添加回収試験}}{\text{前処理後添加}} \times 100$$

まとめ

- QuEChERS法の抽出工程を取り入れることで、効率的に除タンパクすることが可能となった。
- QuEChERS法の液液分配の抽出法により、水溶性の夾雑物を取り除くことが可能となった。
- 抽出液を固相C18ミニカラムに通液させることで、疎水性の夾雑物を取り除くことが可能となった。
- QuEChERS抽出と固相ミニカラム精製を組み合わせたSTQ法による精製能力の高い前処理により、LCへ100uL注入することが可能となり、かつ、その分画を全量GCへ注入することで高感度な分析が可能となった。
- **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、血清中のエストラジオール分析が簡易になった。**