

5 α -ジヒドロテストステロンの分析法開発及び

名古屋市内水環境中の濃度

長谷川 瞳，渡辺 正敏

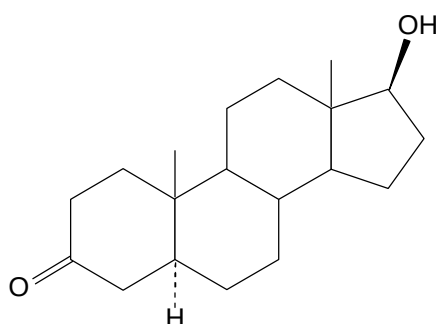
Analytical Method of 5 α -Dihydrotestosterone, and Concentration of Water Environment in Nagoya

Hitomi Hasegawa, Masatoshi Watanabe

はじめに

5 α -ジヒドロテストステロン（ジヒドロテストステロン，DHT）の分析法開発は，平成 19 年度環境省化学物質環境実態調査分析法開発業務の一環で行ったものである。分析法開発業務とは，環境省の各担当部署からの要望により選ばれた化学物質について，環境調査を行うための分析法を開発することである。環境媒体としては水質・底質・生物・大気があり，分析法が開発された翌年度から環境調査が行われる^{1),2)}。

物 性 ・ 用 途 等 ³⁾



C₁₉H₃₀O₂

5 α -Dihydrotestosterone

CAS 番号 521-18-6

分子量	蒸気圧 (kPa)	水溶解度 (mg/L)	LogPow
290.44	1.493E-6	41.97	3.07

毒性情報 : ラット (35 日間 TD_{Lo}) 17.5 mg/kg

用途 : 男性ホルモン，医薬品原料

器 具 ・ 試 薬

【試薬】

ジヒドロテストステロン：和光純薬製，ジヒドロテストステロン-2,2,4,4-*d*₄：セントラル薬品製，メタノール，アセトニトリル：関東化学製 LC/MS 用，固相カートリッジ：昭和電工製 autoprep EDS-1@Liq. 500 mg，酢酸エチル，ヘキサン，アセトン，ジクロロメタン：和光純薬製残留農薬試験用

【器具】

メスシリンダー，メスフラスコ，ビーカー，試験管
コンセンレーター：ウォータース社製 Concentrator-Plus.

分 析 方 法

【試料の採取及び保存】

環境省「化学物質環境調査における試料採取にあたっての留意事項」に従う。

【試料の前処理及び試料液の調製】

試料 200 mL に 100 ng/mL のサロゲート溶液を 50 μ L 添加し，10 mL の LC/MS 用メタノールと 10 mL の精製水でコンディショニングした固相カートリッジに 20 mL/min で通水し抽出する。通水終了後の固相カートリッジに精製水 10 mL を通して洗浄した後，30 分間通気乾燥させ，十分に水分を取っておく。次いで 3 mL のメタノール，3 mL の酢酸エチルの順で溶出し，10 mL 容試験管に受ける。窒素ガスを吹き付けて乾固させ，0.5 mL の 40%メタノール水溶液で再溶解し，試料液とする。

【空試験液の調製】

試料と同量の精製水を用い、【試料の前処理及び試料液の調製】の項に従って操作し、得られた試料液を空試験液とする。

【標準液の調製】

ジヒドロテストステロン(DHT) 100 mg を正確に秤取り、アセトン 100 mL に溶解し標準原液(1000 µg/mL)とする。標準原液を 40%メタノール水溶液で順次希釈し、0.1 ng/mL から 10 ng/mL の標準液を作成する。

内標準についても同様に、ジヒドロテストステロン-2,2,4,4- d_4 (DHT- d_4) 10 mg を正確に秤取り、アセトン 100 mL に溶解し内標準原液(100 µg/mL)とする。内標準原液を 40%メタノール水溶液で希釈し 100 ng/mL の内標準液を作成し、サロゲート溶液として使用する。

【測定】

〔LC/MS 条件〕

LC/MS：Waters 社製 2695/QuattroMicro API

カラム：資生堂 MG-II C-18

(2 mm×100 mm×3 µm)

移動相：A：H₂O B：CH₃OH

0→1 min A:B=60：40

1→15 min A:60→10 B：40→90

15→20 min A:B=10：90

20→27 min A:B=60：40

流量：0.2 mL/min

カラム温度：45 °C

注入量：10 µL

(MS)

コーン電圧：20 V

コリジョン電圧：30 eV

キャピラリー電圧：3.80 kV

コーンガス流量：50 L/hr

デソルベーションガス流量：N₂(600 L/hr)

ソース温度：115 °C

デソルベーション温度：500 °C

イオン化法：ESI (+) SRM

モニターイオン：

定量用 291>255 確認用 291>159

モニターイオン (内標準)：

定量用 295>259 確認用 295>163

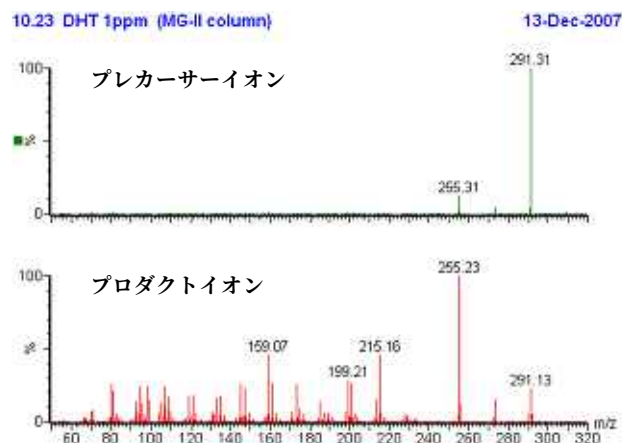


Fig.1. マススペクトル

〔検量線〕

検量線用標準溶液は、濃度の有効数字が2桁以上かつ許容差±15%以下である事を基本とするメタノール溶液とし、0.1～10 ng/mL の範囲に亘る4種類以上の濃度で作成する。各濃度の標準溶液には10.0 ng/mLの濃度となるように内標準物質(ジヒドロテストステロン-2,2,4,4- d_4)を添加する。

内標準物質のみを添加した溶媒ブランクを含めて、5種類以上の検量線用標準溶液10 µLをLC/MS/MSに導入して分析する。溶媒ブランク試料からは被検物質のピークが検出されない事を確認する。得られる各クロマトグラムにおいて、標準物質のピーク面積を内標準物質のピーク面積で割って得られる比を計算し、検量線の縦軸とする。分析した検量線用標準溶液に含まれる標準物質の濃度を内標準物質の濃度で割って得られる比を計算し、検量線の横軸とする。重み付けなしで、最小二乗法により一次の検量線を作成し、関係式及び寄与率(r^2)を計算する。寄与率が0.995以上であることを確認する。各測定点における濃度比の残さを計算し、測定誤差が±15%以下であることを確認する。

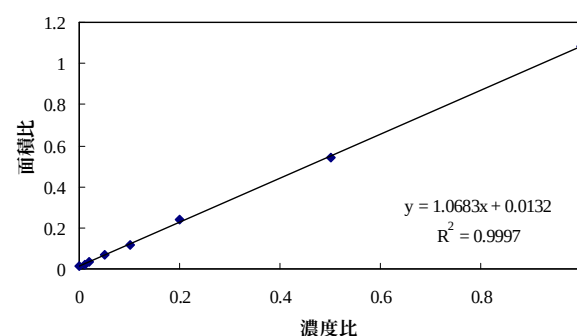


Fig.2. 検量線

〔定量〕

試料液 10 μ L を LC/MS/MS に導入して分析する。得られた被検物質のピーク面積を内標準物質のピーク面積で割った比から、検量線を基にして、被検物質濃度を内標準物質濃度で割った比 (R) を求める。

〔濃度の算出〕

試料水中濃度 C (ng/L) は次式により算出する。

$$C = R \cdot Q/V$$

R: 検量線から求めた被検物質濃度を内標物質濃度で割った比

Q: 試料中に添加した内標準の量(ng)(=添加する内標準の濃度 (ng/ μ L) $\times$ 添加する内標準の容量 (μ L))

V: 試料水量(L)

〔装置検出下限 (IDL)〕

本分析に用いた LC/MS (Waters QuattroMicro API) の IDL を下表に示す (注)

Table 1. 装置検出下限(IDL)の算出

物質名	ジヒドロテストステロン
試料量(mL)	200
最終液量(mL)	0.5
注入濃度(ng/mL)	0.1
装置注入量(μ L)	10
結果1(ng/mL)	0.11
結果2(ng/mL)	0.10
結果3(ng/mL)	0.09
結果4(ng/mL)	0.10
結果5(ng/mL)	0.10
結果6(ng/mL)	0.09
結果7(ng/mL)	0.11
平均値(ng/mL)	0.100
標準偏差(ng/mL)	0.0087
IDL(ng/mL)	0.034
IDL試料換算値(ng/L)	0.085
S/N	9.0
CV(%)	8.7

$$IDL=t(n-1,0.05)*2*\sigma_{n-1}$$

〔測定方法の検出下限 (MDL), 定量下限 (MQL)〕

本測定方法における検出下限及び定量下限を次に示す (注)

(注)

装置検出下限 (IDL)・測定方法の検出下限 (MDL) 及び定量下限 (MQL) は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 17 年 3 月) により算出した。

Table 2. 測定方法の検出下限 (MDL) 及び定量下限 (MQL) の算出

物質名	ジヒドロテストステロン
試料	海水
試料量 (L)	0.2
標準添加量(ng)	0.5
試料換算濃度(ng/L)	2.5
最終液量(mL)	0.5
注入液濃度(ng/mL)	1
装置注入量(μ L)	10
操作ブランク平均(ng/L)	0
無添加平均(ng/L)	0
結果1(ng/L)	2.548
結果2(ng/L)	2.490
結果3(ng/L)	2.488
結果4(ng/L)	2.509
結果5(ng/L)	2.470
結果6(ng/L)	2.486
結果7(ng/L)	2.508
平均値(ng/L)	2.500
標準偏差(ng/L)	0.0251
MDL(ng/L)	0.098
MQL(ng/L)	0.25
S/N	62
CV(%)	1.01

$$MDL=t(n-1,0.05)*2*\sigma_{n-1}$$

$$MQL=10*\sigma_{n-1}$$

結果 および 考察

〔添加回収実験結果〕

名古屋市河川水への標準物質添加回収実験結果を Table.3 に示す。

Table.3 添加回収実験結果

試料	試料量 (mL)	添加量 (ng)	回収率 (%)	変動係数 (%)	繰り返し n
精製水	200	無添加	-	-	1
	200	5	79	7.1	3
河川水	200	無添加	-	-	1
	200	5	67	8.7	3
海水	200	無添加	-	-	1
	200	5	87	5.9	3

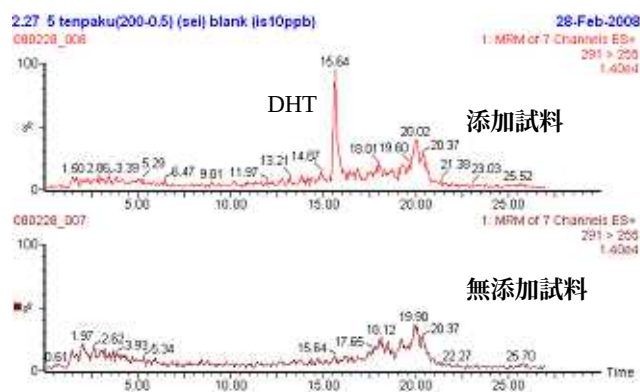


Fig.3. 河川水への添加回収試験結果

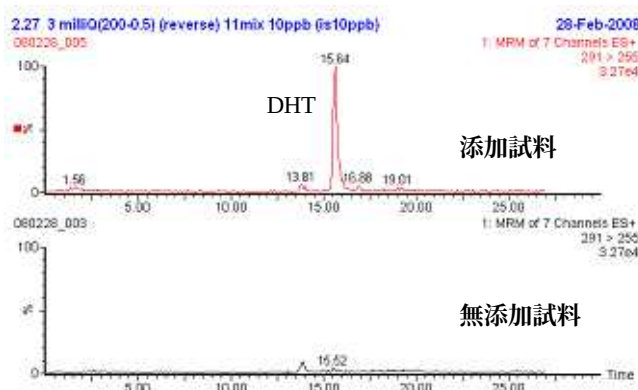


Fig.4. 精製水への添加回収試験結果

〔分解スクリーニング試験結果〕
分解性スクリーニング試験結果を Table.4 に示す。

Table.4 分解性スクリーニング試験結果

pH	初期濃度(ng/mL)	1時間後の残存率(%)	5日後の残存率(%)	
			暗所	明所
5	10	92.2	92.0	-
7	10	94.6	98.7	96.8
9	10	98.1	96.6	-

〔固相抽出検討結果〕

前処理で試料を濃縮するために使用する固相の検討を行った。

500 mL の精製水に 5 ng のジヒドロテストステロンを添加し、メタノール 5 mL と精製水 5 mL でコンディショニングした各種固相へ通液した。30 分の通気乾燥の後、メタノール 8 mL で溶出し、N₂ パージにより乾固させ、40%メタノール水溶液 500 μ L で再溶解して試験溶液とした。Fig.5 に、各種固相別の回収率を示す。

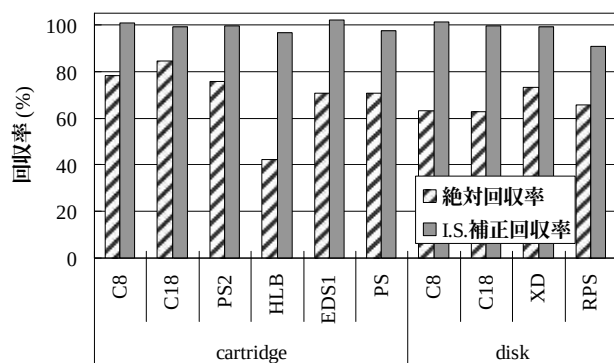


Fig.5. 固相ごとの回収率の違い

ほとんどの固相で絶対回収率 70%前後の結果が得られた。最も回収率がよかったのは C18 カートリッジを使用した場合であった。しかし、河川水や海水を前処理した場合、他の固相に比べて、多くのマトリックスを溶出してしまう欠点がある。それを避けるため、今回は EDS1 カートリッジを使用することとした。

また EDS1 を用いた場合、メタノール溶出後、酢酸エチルでさらに溶出することで回収率が数%から 10% 程度向上したので、溶出溶媒にはメタノール、酢酸エチルの 2 種類を用いることとした。

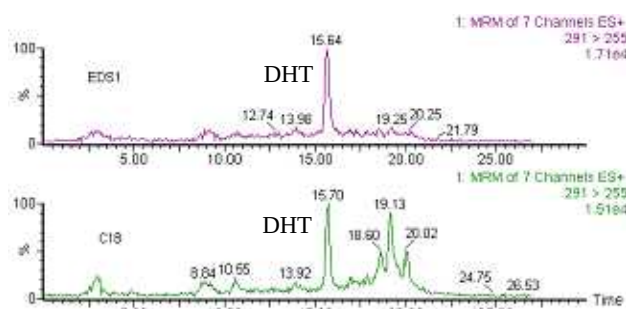


Fig.6. 河川水を前処理した場合の 2 種の固相 (上: EDS1, 下: C18) のクロマトグラムの違い

〔クリーンアップ検討結果〕

蒸留水や海水、山村部の河川水などは測定の妨害となるマトリックスの存在が少なく、クリーンアップをすることなく測定をすることができるが、一方、都市河川水などを濃縮すると、試験溶液中にはマトリックスが存在し、測定の妨害になる。そのため、固相抽出・溶出・濃縮・乾固後に行うクリーンアップ方法について検討した。

n-ヘキサン：ジクロロメタン=3:1 の混合溶媒 1 mL に、5 ng のジヒドロテストステロンを添加し、試験溶液とした。n-ヘキサン 5 mL でコンディショニングしたフロリジルカートリッジ (SepPak Plus Florisil Cartridge) に負荷し、n-ヘキサン：ジクロロメタン=3:1 の混合溶媒 10 mL で洗浄した。その後、アセトン/ジクロロメタンの混合溶媒を混合割合を変えながら (アセトン割合 0~20%) それぞれ 5 mL で分画を行い 6 回溶出した (F1~F6)。窒素ガスを吹き付けて乾固させ、40%メタノール水溶液 500 μ L で再溶解したものを測定した。なお、試験溶液負荷後、n-ヘキサン：ジクロロメタン=3:1 の混合溶媒 10 mL でカートリッジを洗浄しても、ジヒドロテストステロンは溶出してこなかった。

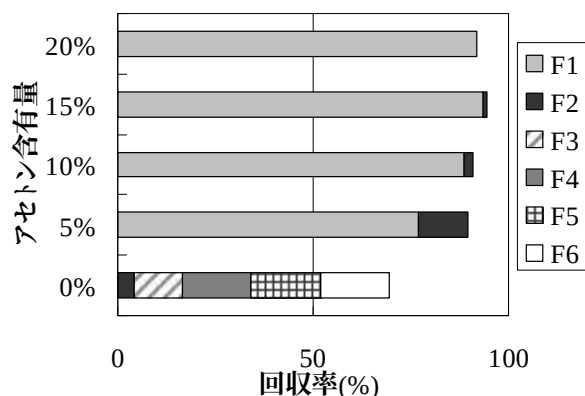


Fig.7. クリーンアップ方法の検討結果

結果を Fig.7 に示す。溶出溶媒にジクロロメタンのみを使用すると、F1 から F6 まで 30 mL 流しても回収率が 70%程度にしかならず、全てを溶出することは出来なかった。一方で、溶出溶媒にアセトン/ジクロロメタンの混合溶媒を用いると、F1, F2 の 10 mL で 90%程度溶出することがわかった。ただし、アセトンの割合を 20%にした場合、溶出は速いが、同時に妨害物質まで溶出してしまう可能性が高い。検討の結果から、*n*-ヘキサン：ジクロロメタン=3:1 の混合溶媒 10 mL で洗浄した後、10%アセトン/ジクロロメタンの混合溶媒 10 mL で溶出することとした。

名古屋市内河川水試料に対して、固相抽出・溶出・濃縮・乾固後に上記条件でクリーンアップを行った結果を Fig.8 に示す。クリーンアップをすることにより、測定溶液中のマトリックスが減少し、クリーンアップしない場合と比較して、回収率が 60%程度から 75-80%程度へ向上した。

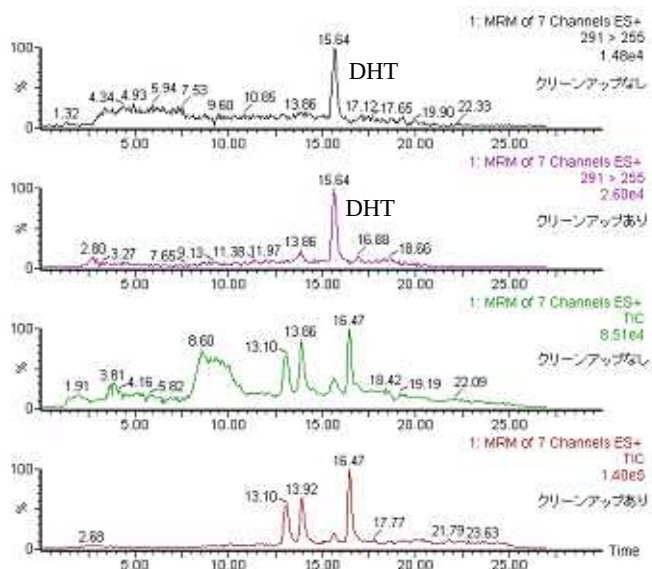


Fig.8. クリーンアップの有無によるクロマトグラムの違い

まとめ

名古屋市内河川および名古屋港海水を測定した結果を Fig.9 に示す。どちらの試料もジヒドロテストステロンは検出されなかった。他にも数地点において測定を行ったが、いずれも不検出であった。

本法により、水試料中ジヒドロテストステロンの 0.1 ng/L オーダーの検出が可能であり、0.3 ng/L オーダーの定量が可能である。

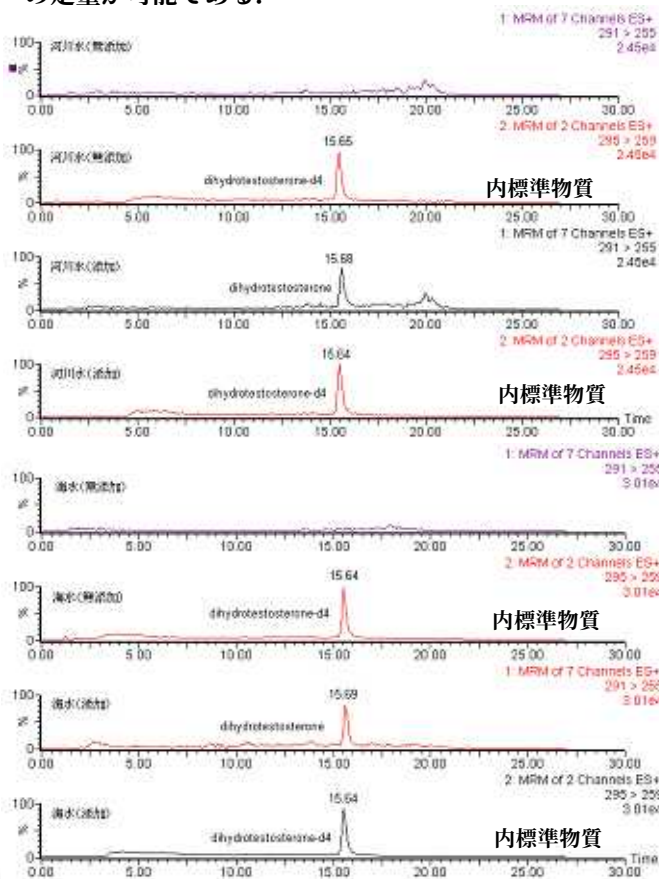


Fig.9. 環境試料測定時のクロマトグラム

文献

- 1) 平成 19 年度 化学物質環境実態調査委託業務詳細要領 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課
- 2) 「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 17 年 3 月) 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課
- 3) chemicalbook より
http://www.chemicalbook.com/ProductIndex_JP.aspx

