

有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究

—LC/MS/MSを用いた水質中L-チロキシンの分析法—

前田大輔，劔持堅志，吉岡敏行，藤原博一，中桐基晴（水質第二科）

【調査研究】

有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究

—LC/MS/MSを用いた水質中L-チロキシンの分析法—

An Analytical Method of L-thyroxine in Water by LC/MS/MS.

前田大輔, 剣持堅志, 吉岡敏行, 藤原博一, 中桐基晴 (水質第二科)

Daisuke Maeda, Katashi Kenmotsu, Toshiyuki Yoshioka,

Hiroichi Fujiwara, Motoharu Nakagiri

要 旨

環境試料(水質)中のL-チロキシンの分析及び3,3',5-トリヨード-L-チロニン(以下T3とする)の分析法を検討した。分析法は、逆相系固相抽出し、LC/MS-SRMで測定する方法とした。固相抽出条件の最適化とマトリックスによるイオン化抑制を防止するためのクリーンアップ法についても検討を行った。本法による定量下限値はL-チロキシンの0.13ng/L, 3,3',5-トリヨード-L-チロニンが0.18ng/Lであった。

[キーワード：L-チロキシン, 3,3',5-トリヨード-L-チロニン, 甲状腺ホルモン, 水質, LC/MS/MS]

[Key words : L-thyroxine, 3,3',5-triiodo-L-tyronine, thyroid hormone, water, LC/MS/MS]

1 はじめに

L-チロキシン(図1)は甲状腺から分泌される主要なホルモンであり、甲状腺の濾胞上皮細胞でチログロブリンから血液中に放出される。また、L-チロキシンは脱ヨウ素化されて3,3',5-トリヨード-L-チロニン(図1)となり、細胞の代謝を幅広く刺激する作用を示す。L-チロキシンは生体の基礎代謝を高める作用があり、粘液水腫、クレチン病、甲状腺機能低下症(原発性及び下垂体性)、甲状腺腫等の治療薬として用いられる。L-チロキシンはこうした治療のための医薬品として用いられるが、近年医薬品による環境汚染が注目されるようになり²⁾、環境省の実施する化学物質環境実態調査の調査対象物質として選定され、岡山県に分析法の開発が委託された。このため筆者らは分析法開発対象物質であるL-チロキシン及び代謝物であるトリヨードチロニン(正式名：3,3',5-ト

リヨード-L-チロニン、以下T3とする)をLC/MS/MSを用いて同時分析する方法を検討したので報告する。

2 実験方法

2.1 試薬

L-チロキシン：和光純薬工業株式会社製

L-チロキシン-RING-¹³C₆：CIL社製

T3：東京化成製

固相カートリッジ：Oasis HLB Plus, Oasis MAX Plus, Oasis MAX 6cc/150mg (Waters社製)

その他試薬は、残留農薬分析用、LC/MS分析用または特級試薬を用いた。

2.2 LC/MSの測定条件

LC/MSの測定条件を次に示す。

(LC条件)

カラム：Atlantis T3 3 μ m 2.1mm ϕ ×150mmL(Waters社製)

移動相：A：0.2%ギ酸, B：メタノール

0～5min A：B = 80：20

5～10min A：80→10 B：20→90 linear gradient

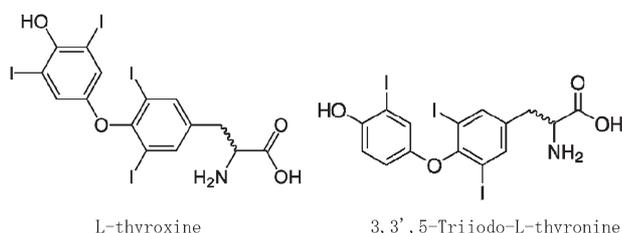


図1 L-チロキシン及び3,3',5-トリヨード-L-チロニンの構造

10～20min A : B = 10 : 90
 20～20.1min A : 10 → 80 B : 90 → 20
 linear gradient
 20.1～32min A : B = 80 : 20

流量 : 0.2mL/min

カラム温度 : 40℃

注入量 : 10 μL

(MS条件)

使用機種 : Micromass Quattro micro API

Cone : 40V, Collision : 24eV, SourceTemp : 100℃, DesolvationTemp : 500℃

DesolvationGas : 600L/hr, ConeGas : 50L/hr

イオン化法 : ESI Positive

モニターイオン :

777.9 → 732.0 (L-チロキシン)

784.2 → 738.0 (L-チロキシン-RING-¹³C₆)

652.1 → 605.9 (T3)

2.3 分析法

図2に示す分析法について検討した。その詳細は次のとおりである。

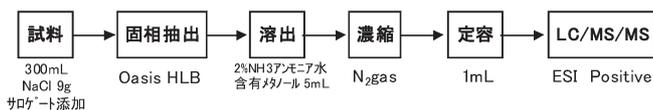


図2 分析法フローチャート

試料300mLにサロゲート溶液(100ng/mL,メタノール)を10 μL添加し十分に混和した後、塩化ナトリウム9gを溶解し、10mLのメタノールと20mLの精製水でコンディショニングした固相カートリッジ(Oasis HLB Plus)に10mL/min.で通水した。通水終了後の固相カートリッジに20%メタノール5mLを通して洗浄した後、窒素ガスを5分間通気して間隙水を除き、アンモニア水(25%)を2%含有するメタノール5mLを用いて溶出した。溶出液は30℃で窒素ガスを吹き付けて濃縮した後、メタノールで1mLに定容し、測定用試料液とした。

3 結果及び考察

3.1 固相抽出条件の検討

8種類の固相カートリッジカラムを用いて、精製水からの添加回収実験を行った。実験は精製水100mLに標準品10ng添加して通水・脱水後、メタノール5mL及びア

セトニトリル5mLで溶出を行った。対象物質は2回目の溶出液であるアセトニトリルからは溶出されず、最初のメタノールから溶出されたが最も良い回収率を示したPS-2のL-チロキシンの回収率は約70%、T3の回収率は約80%程度だった(図3)。

L-チロキシンは酸又はアルカリのメタノール溶液に溶けやすい性質があることから、ギ酸又は25%アンモニア水を2%含むメタノールで溶出を行ったところ図4に示すとおりイオン交換系カラムや湿潤性逆相ポリマーであるHLBカラムの回収率は向上した。MCX, WAX, WCXなどのイオン交換系カラムは、溶出時に酸やアルカリを

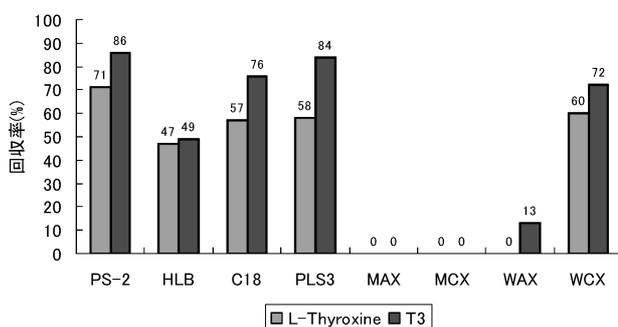


図3 各種固相による回収率(添加濃度10ng/100mL, 精製水)(溶出溶媒:メタノール5ml)

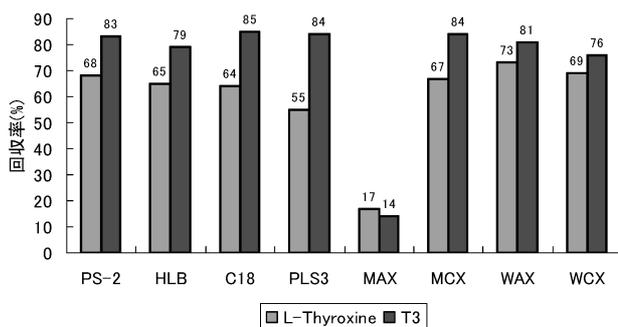


図4 各種固相による回収率(添加濃度10ng/100mL, 精製水)(ギ酸またはアンモニア水含有メタノール5mLによる溶出)

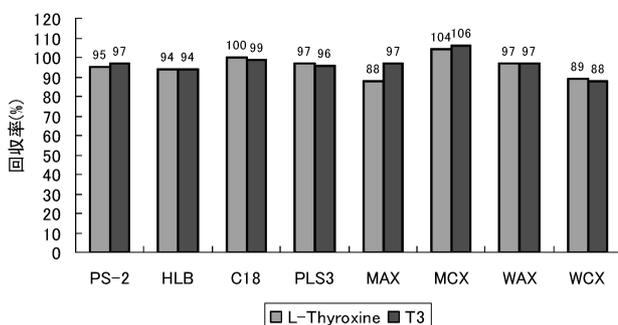


図5 塩析を行った場合の固相抽出率(添加濃度10ng/100mL, 精製水)

加えることで非イオン化状態になり逆相だけの保持となるため、溶出されやすくなりメタノールのみでの溶出よりも回収率が向上するものと推定された。

水相から固相への吸着率の向上を目的に、塩析剤(NaCl 3%)を添加し、25%アンモニア水を2%含むメタノール(MAXのみギ酸を2%含むメタノール)で溶出した場合の添加回収率を図5に示したが、ほとんどの固相カートリッジカラムで100%に近い回収率を得ることができた。

精製水を用いた添加回収実験により十分回収率が得られたことから、実際に環境中の微量なL-チロキシンやT3を測定することを考慮に入れて河川水200mLに低濃度標準品(0.2ng)を添加して固相抽出を行い、25%アンモニア水を2%含むメタノール(MAXのみギ酸を2%含むメタノール)で溶出を行ったところ図6に示すようにL-チロキシンの回収率が著しく低下した。回収率が低下した原因を検討するため、標準品を試料水に添加し固相抽出を行った場合と、添加しないで固相抽出を行って得ら

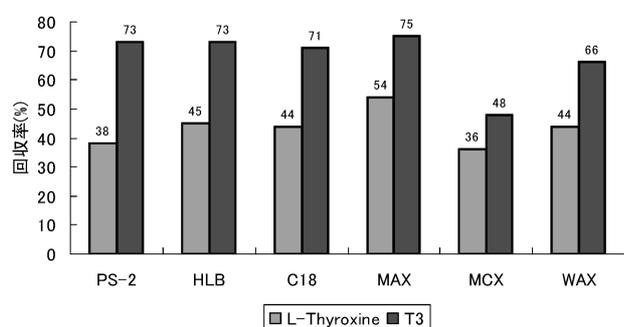


図6 河川水の低濃度添加回収実験結果(添加濃度0.2ng/200mL)

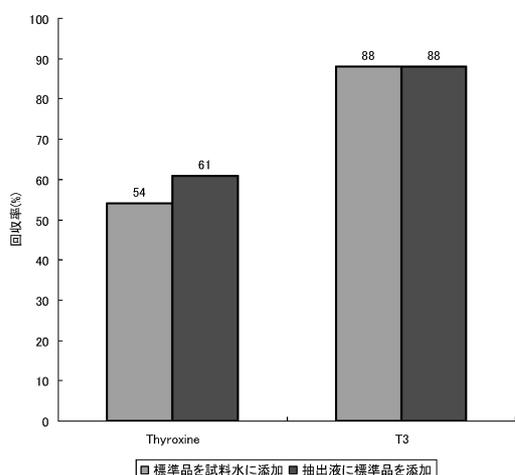


図7 標準品を河川水に添加し固相抽出した場合と河川水の固相抽出液に標準品を添加した場合の回収率(添加量0.3ng)

れた抽出液に同量の標準品を添加した場合の比較結果を図7に示したが、L-チロキシンは抽出液に添加した場合の測定結果で添加量の60%程度となり、同時に抽出される河川水中に含まれる夾雑物がイオン化を抑制し、実際の固相回収率は良いにもかかわらず、見かけ上回収率が低下していることが判明した。

3.2 クリーンアップの検討

夾雑物の影響でイオン化抑制が生じている可能性があることから、イオン交換系固相カートリッジを用いてイオン化抑制物質を分離除去することを検討した。MAXカラムはアニオン交換と逆相モードを合わせ持つ固相剤で、高いpHではイオン交換による強い保持とわずかながらの逆相保持能力を有し、解離した酸性化合物を保持できる性質があるため、試料を通水後、アンモニア水を2%含有するメタノール5mL及びメタノール5mLでカラムを洗浄して妨害物質を除去した後、2%ギ酸メタノールで溶出させる方法を検討した。河川水300mLをMAXカラムで抽出後、各抽出分画に標準品を0.3ng添加した結果を図8に示したが、イオン化抑制を生じる成分は2%アンモニアメタノールの分画に溶出され、目的成分が溶出する2%ギ酸メタノール分画ではイオン化抑制を防止することができた。

しかし、図9に示すように水試料に標準品を添加して固相抽出した後、カラムをアンモニアメタノール溶液で洗浄した場合は、L-チロキシンが強く固相に結合し、ギ酸の濃度を高めても完全に溶出することができなかった。このようにMAXカラムで直接試料水を抽出する方法では回収率が低下するため、HLBカラムで固相抽出し、その溶出液をMAXカラムでクリーンアップする方法を試みた。カラムとしてPlusタイプ(225mg)と注射筒タイプ(6cc, 150mg)を用いて、標準液を2%アンモニアメタノール溶液で負荷することにより、ほぼ100%の回収率が得られたが、Plusタイプよりも固相剤の量が少ない注射筒タイプの方が少ない溶離液で溶出できることが判明した(図10)。河川水をHLBカラムで抽出し、HLBカラム溶出液を注射筒タイプのMAXカラムで分画し、各溶出液に標準品を添加してイオン化抑制効果を検討した結果を図11に示したが、目的物質が溶出する10%ギ酸の分画はイオン化抑制が防止され、また図12に示すように妨害成分を効果的に除去できる効果があったが、L-チロキシンの回収率は約60%、T3の回収率は約80%と全体の

回収率が低下する傾向にあり、今後さらに検討を行っていく予定である。

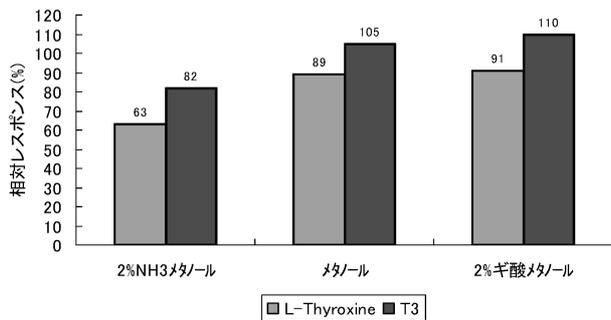


図8 MAXカラムによる河川水抽出分画におけるイオン化抑制効果（河川水300mLを固相抽出し、各溶出液5mLで溶出後、標準品0.3ng添加）

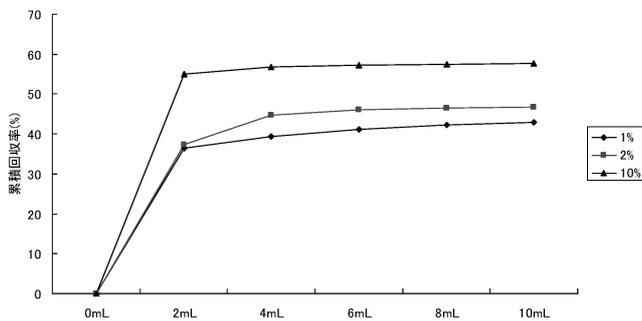


図9 MAXカラムによる河川水の固相抽出における溶出溶媒中のギ酸濃度の回収率に与える影響（添加濃度0.3ng/300mL）

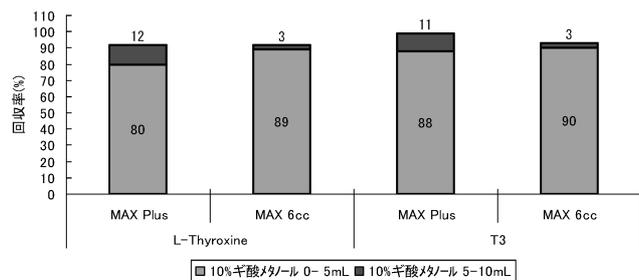


図10 2%のアンモニアメタノール溶液で負荷させた場合の回収率（添加量0.3ng）

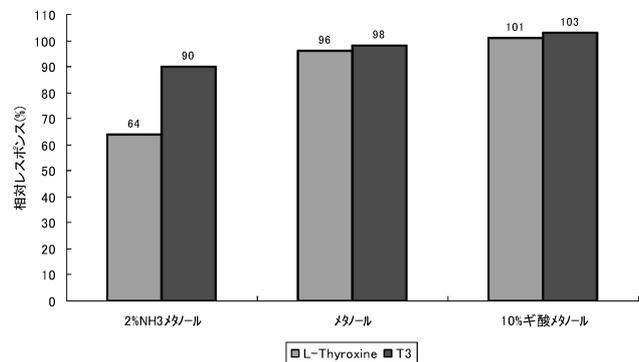


図11 河川水をHLBで抽出後の抽出液をMAX(6cc)カラムで分画した場合のイオン化抑制効果（溶出液各5mL）

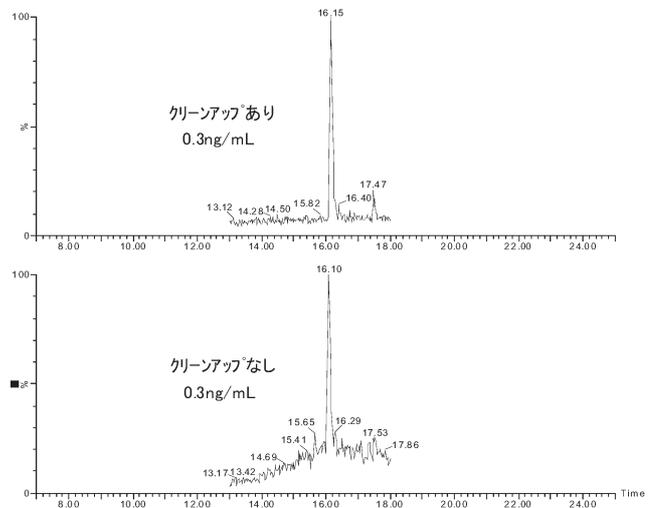


図12 MAXカラムによる河川水試料のクリーンアップ効果

3.3 分解性スクリーニング試験結果

環境水中における分解性を検討するため、分解性スクリーニング試験を行い、その結果を表1に示した。L-チロキシン及びT3共に明所で分解する傾向を示し、暗所で塩基性で保存することで分解性は減少した。

表1 分解性スクリーニング試験結果

物質名	pH	初期濃度 (μg/L)	1時間後の残存率 (%)	7日後の残存率 (%)	
				暗所 (%)	明所 (%)
L-チロキシン	5	0.1	100	82	78
	7	0.1	100	89	50
	9	0.1	100	100	33
3,3',5-トリヨード-L-チロニン	5	0.1	100	86	93
	7	0.1	100	86	79
	9	0.1	100	97	82

3.4 検出下限値

検出下限値を表2に示したが、添加回収実験は固相カートリッジHLBを用い分析法に従って行った。共に0.2ng/L以下の検出下限値が得られ、高感度な測定が可能であった。

表2 検出下限値及び定量下限値

物質名	試料量 (mL)	最終液量 (mL)	検出下限値(MDL) (ng/L)	定量下限値(MQL) (ng/L)
L-チロキシン	300	1	0.13	0.34
3,3',5-トリヨード-L-チロニン	300	1	0.18	0.46

4 まとめ

L-チロキシン及びT3の分析法を検討し、次の結果を得た。

- 1) 対象物質はESI Positiveモードでイオン化され、SRM(MS/MS)法による高感度測定が可能であった。
- 2) 固相抽出では塩析により抽出率が向上し、またアンモニア水を含むメタノールで溶出することにより高い溶出率が得られた。
- 3) 汚濁の少ない環境試料水で試料水の量も少なければ高い回収率を得られたが、HLBカラムを用いた固相抽出では、試料水量が増大したり、添加量が減少した場合には、マトリックスによるイオン化抑制が生じて、回収率が見かけ上低下した。
- 4) イオン交換系の固相カートリッジMAXを用いることにより対象物質を選択的に保持し、洗浄により妨害物質を分離でき、イオン化抑制を低下させることがで

きたが、回収率が低下する傾向が認められた。

なお、本研究は環境省委託の平成20年度化学物質分析法開発調査(環境安全課)³⁾と連携して実施した。

文 献

- 1) 環境省総合環境政策局環境保全部環境安全課，化学物質環境汚染実態調査の手引き(平成17年度版)，平成18年3月
- 2) 清野他，わが国の水環境中における人用・動物医薬品の存在，水環境学会誌，Vol27，No.11，pp685-691(2004)
- 3) 環境省環境保健部環境安全課：平成20年度化学物質分析法開発調査報告書(L-チロキシン及び3,3',5-トリヨード-L-チロニン)，掲載予定，2009