

【調査研究】

底質中の 17β -エストラジオール及びエチニルエストラジオールの ELISA 測定に対する前処理法の検討

林 隆義, 山辺真一, 吉岡敏行, 斎藤直己 (水質第二科)

要 旨

ELISA 法による底質中の 17β -エストラジオール及びエチニルエストラジオールの前処理法を GPC 及び、ジクロロメタンによる液々抽出法を用いて検討した。GPC により、E2 とその交差反応物が分離できることが確認された。また、ジクロロメタン液々抽出法により、底質中のエストラジオール類のより効率的な抽出が可能であった。

[キーワード：環境ホルモン, 17β -エストラジオール, エチニルエストラジオール, ELISA, GPC]

1 はじめに

人畜由来の天然女性ホルモンの 17β -エストラジオール (以下「E2」という。)の分析は、「外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル」(以下「暫定マニュアル」という。)¹⁾に示されており、本県における環境ホルモン実態調査もこの暫定マニュアルに基づき水質及び底質について実施している。

平成12年度からは、ELISA 法を用いてE2の測定を行うとともに、合成女性ホルモンのエチニルエストラジオール (以下「EE2」という。)についても同様の前処理を用いて測定している²⁾。

しかし、底質中のE2分析については、暫定マニュアルに準じた前処理方法では、底質試料の場合水質試料に比べ色素等の夾雑物が多く、C18固相抽出時に詰まりを生じたり、抽出液の強い着色が認められた。

このため、抽出法及びブクリンアップ法の改良が必要と思われ、今回、ゲル浸透クロマトグラフィー (以下「GPC」という。)を用いた固相抽出液のブクリンアップとジクロロメタンを用いた液々抽出法の二つの前処理方法を検討したので報告する。

2 実験方法

底質中のE2およびEE2の前処理法は、以下のとおり実施し、ELISA 分析は、キットの説明書に従った。

2.1 試 薬

C18固相カラム

Waters 社製 Sep-Pak Plus, 使用前に予めメタノール 5 mL と精製水 10 mL でコンディショニングしたも

の

フロリジルミニカラム

Waters 社製 Sep-Pak florisol Vac 6 ml (1 g)

その他試薬は、残留農薬試験用を使用した。

ELISA キット

武田薬品工業(株)製の 17β -Estradiol (E2) ELISA キット及び Ethynylestradiol (EE2) ELISA キット

2.2 分析方法

(1) 暫定マニュアル準拠法¹⁾

50 ml 遠心管に底質 10 g (乾燥重量換算以下同じ) を秤量する。メタノール・1 N 酢酸緩衝液 (pH 5.0) (9 : 1) 40 ml を加え 30 分間振とう抽出し、上澄を遠心分離した。残渣をメタノール 40 ml 及び 20 ml で 2 回再抽出した後、抽出液を合わせてメタノール飽和ヘキサン 30 ml で洗浄した。抽出液をエバポレーターで約 10 ml に濃縮後、精製水 200 ml に溶解し C18 固相カラムに通過させた。精製水 5 ml 及びヘキサン 5 ml で C18 固相カラムを洗浄後ジクロロメタン 5 ml で溶出した。溶出液に窒素ガスを吹き付けて乾固した後、10%メタノール溶液に溶解し、ELISA 測定に供した。

(2) ジクロロメタン液々抽出法

要調査項目等調査マニュアル³⁾のエストラジオール類の分析法を参考にして以下の前処理を実施した。

100 ml 遠心管に底質 10 g を秤量し、メタノール 50 ml で 30 分間振とう抽出し遠心分離した。さらに残渣をメタノール 30 ml 及び 20 ml で 2 回抽出し、先の抽出液に合わせた後、メタノール飽和ヘキサン 30 ml で抽出液を洗浄した。

5%NaCl 水溶液300ml に抽出液を希釈し、ジクロロメタン50ml で2回振とう抽出し、抽出液にヘキサン30ml を添加後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、エバポレーターで濃縮乾固した。

クリーンアップは、以下のとおり行った。

ヘキサン 5 ml で予め洗浄したフロリジルミニカラムにヘキサン・ジクロロメタン (1 : 1) 10ml で試料液を负荷した後、アセトン・ジクロロメタン (5 : 95) 10ml で E 2 及び EE 2 を含むフラクションを溶出した。溶出液に窒素ガスを吹き付けて乾固、5%メタノール溶液10ml に再溶解、C18固相カラムに负荷、精製水 5 ml・ヘキサン 5 ml でカラム洗浄後、ジクロロメタン 5 ml で溶出させた。溶出液に窒素ガスを吹き付けて乾固した後、10%メタノール溶液とし、ELISA 測定に供した。

(3) GPC 精製法

上記(1)暫定マニュアル準拠法に従って調整した試料液 (ジクロロメタン溶液) に、窒素ガスを吹き付けて乾固し、アセトン約 1 ml に再溶解して GPC により精製した。

GPC の条件

カラム 昭和電工 ShodexCLNpakPAE-2000 Ac (20mmφ×300mm)

プレカラム 昭和電工 ShodexCLNpakPAE-GAc (8mmφ×50mm)

移動相 アセトン 4 ml/min

カラム温度 40℃

分取液に窒素ガスを吹き付けて乾固した後、10%メタノール溶液とし、ELISA 測定に供した。

3 結果と考察

GPC 精製法による E 2 測定では、暫定マニュアル準拠法より抽出した底質 A (泥状) の抽出液と標準溶液 (E 2) を用いて GPC 精製を行い 1 分ごとに 4 ml ずつのフラクションを採取し、各フラクションを ELISA 法により測定した。

標準溶液で E 2 は、16-17 分のフラクションが最大で 17-18 分のフラクションまで検出されたが、底質 A の抽出液では、16-17 分が最大の測定値を示すものの、14-16 分の早い溶出のフラクションにも反応が認められた (図 1)。

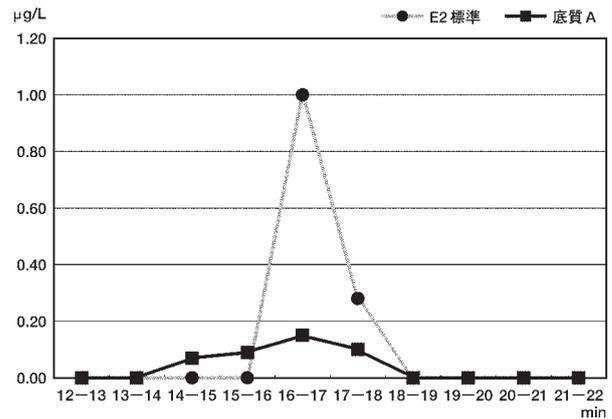


図 1 底質中の17β-エストラジオールの GPC 分画

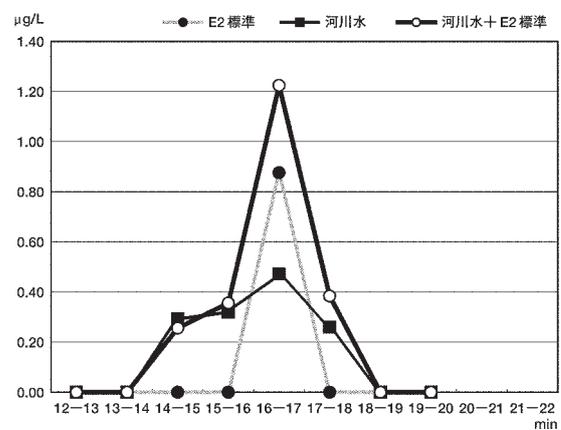


図 2 河川水中の17β-エストラジオールの GPC 分画

また、河川水抽出液においても、標準溶液の E 2 よりも早く溶出され、ELISA 法で交差反応する物質の存在が確認された。

これは、マトリックスの影響により E 2 のピークが、単に広がっただけなのか、交叉反応物質が存在するかを確認するため、この河川水抽出液に E 2 を添加して GPC 精製を実施したところ標準物質のピークがほぼそのまま河川水のピークに加算された (図 2)。

このことから、14-16 分のフラクションに、E 2 よりも分子量の大きくかつ交叉反応する物質 (抱合体等) の存在が確認された。交叉反応する物質の影響は、全量の約 4 割を占めており、GPC 処理することにより、これらの影響を排除できることが確認できた。

EE 2 測定においても E 2 と同様の条件で GPC 精製法を実施し、EE 2 標準溶液、底質 B (砂状) 抽出液及び底質 B 抽出液に EE 2 を添加したものについて 1 分ご

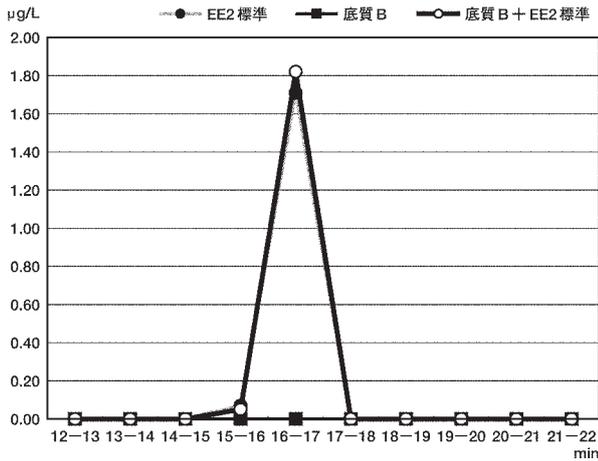


図3 底質中のエチニルエストラジオールの GPC 分画

とのフラクションを採取した。底質B抽出液には EE 2 が認められず、EE 2 標準溶液と EE 2 を同量添加した底質B抽出液は、同じフラクションにほぼ同じ値を示した (図3)。

標準物質による GPC 精製に伴う回収率は、E 2, EE 2 とともに、90%以上が得られた。

一方、ジクロロメタン液々抽出法は、暫定マニュアル準拠法で固相抽出が困難な、都市部河川のヘドロ状の底質などであっても30g以上(乾泥10g以上)の試料から抽出が可能であった。また、フロリジルミニカラムとC18固相カラムを用いた2段階のクリーンアップ法で、大部分の色素成分が除去できた。

精製水10mlにE 2, EE 2をそれぞれ1ng添加した

回収試験ではE 2 92.8%EE 2 87.5%と良好な回収率を示した。

特に EE 2 では、準拠法と比較すると10倍以上の感度 (0.005 µg/kg-dry) で測定可能であったことから、今後、底質試料を用いた、添加回収、GPC の効果の検討等を実施する予定である。

4 まとめ

1. 底質試料の GPC 精製により、ELISA 測定における E 2 とその交差反応物が分離できることが確認された。
2. EE 2 では、交差反応物は確認されなかった。
3. ジクロロメタン液々抽出法は暫定マニュアル準拠法よりもエストラジオール類のより効率的な抽出が可能であった。

文 献

- 1) 環境庁水質保全局水質管理課：外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル, p XI- 1 ~p XI-10, 1998
- 2) 林 隆義他：ELISA 法を用いた水中の女性ホルモンの分析, 岡山県環境保健センター年報, 26, 21-23, 2002
- 3) 環境庁水質保全局水質管理課：要調査項目等調査マニュアル (水質, 底質, 水生生物), p 47-p 74, 1999