

LC/MS を用いた分析法開発 (6)

- 11-ケトテストステロン -

清水 明 吉澤 正 杉山 寛

1 はじめに

当センターでは環境省が実施する「化学物質環境実態調査」に参画し、2005 年度からは「化学物質分析法開発調査」においてLC/MSを用いた環境中に残留する微量化学物質の分析法の開発も行っている。

今回、雄硬骨魚のアンドロゲンである 11-ケトテストステロンの分析法の開発の過程で、環境水を濃縮することにより LC/MS の測定を行ったときに対象物質のイオン化抑制が生じた。また、対象物質を環境水中で保存することにより生物分解と考えられる濃度低下が生じた。ここでは、それらに対する対応についての検討結果を報告する。

2 11-ケトテストステロンの構造及び物性

11-ケトテストステロンの構造式(CAS 番号, 分子式)を図 1 に、物性を表 1 に示した。

3 分析条件

3・1 分析条件の概要

分析フローを図 4 に示した。

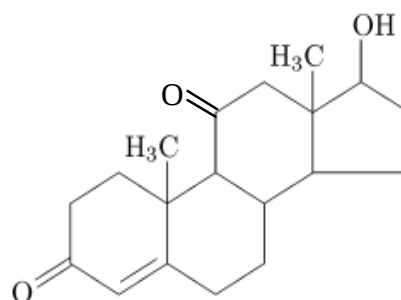
水試料 200 mL を固相カートリッジ(Oasis HLB)

に通水して 11-ケトテストステロンを抽出し、抽出液を固相抽出管(ENVI-Carb C ,Discovery Ag-ION)で精製して、測定用試料とした。これを LC/MS/MS-SRM 法で定量した。本分析法で使用した主な試薬等を表 2 に示した。

標準物質のマスペクトル及びプロダクトイオンのマスペクトルを図 2, 3 に示した。

3・2 LC/MS/MS条件

使用機器及び条件は、表 3 のとおりとした。



CAS番号 : 564-35-2

分子式 : C₁₉H₂₆O₃

図 1 11-ケトテストステロンの構造式

表 1 11-ケトテストステロンの物性

分子量	融点()	水溶解度(mg/L)	Log Pow
302.4	186 ~ 187	875 (計算値)	1.92 (計算値)

分子量, 融点: SIGMA-ALDRICH MSDS

表 2 分析に使用した主な試薬等

11-ケトテストステロン	SIGMA-ALDRICH製 (含量98.0%)
ヒドロコルチゾン-9,12,12- <i>d</i> ₃	Cambridge Isotope Laboratories, Inc.製(含量98.0%)
メタノール	LC/MS用
酢酸アンモニウム, 塩酸	試薬特級
ジクロロメタン, アセトン, ヘキサン, トルエン	残留農薬試験・PCB試験用(300倍濃縮)
固相カートリッジ	Oasis HLB Plus 225 mg (Waters)
固相抽出管	ENVI-Carb C 100mg/ 1mL (SUPELCO)
	Discovery Ag-ION 750 mg/ 6 mL (SUPELCO)

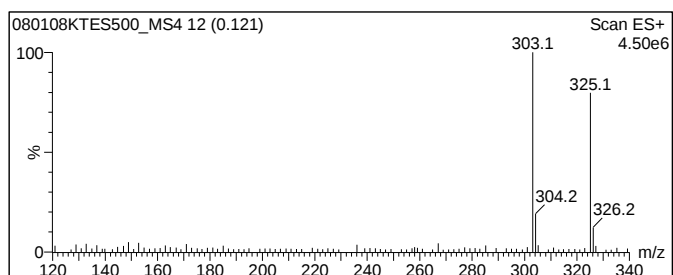


図2 11-ケトテストステロン標準物質のマススペクトル

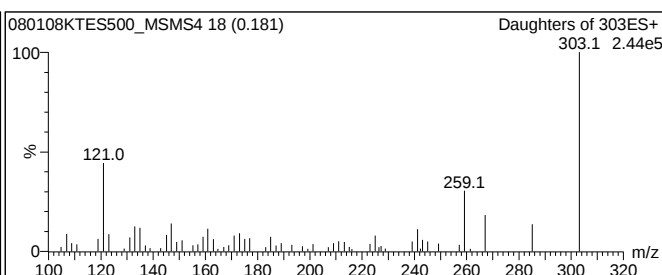


図3 m/z 303.1のプロダクトイオンのマススペクトル

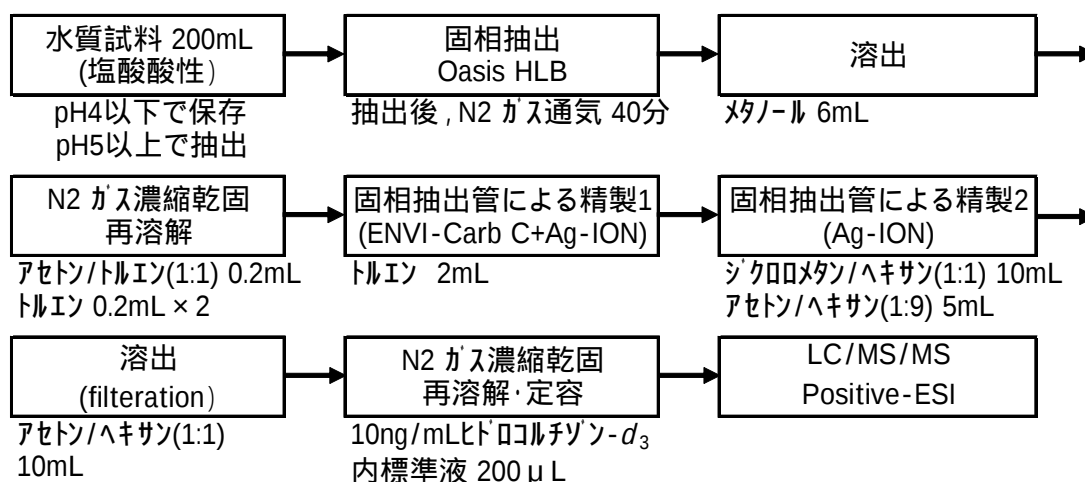


図4 分析フロー

表3 LC/MS/MS条件

LC/MS機種名: Waters Alliance 2695/Quattro micro API (LC)		
カラム: SUPELCO Ascentis RP-Amide (2.1mm × 150mm × 3 μm)		
移動相: A: 水 B: メタノール C: 1mM 酢酸アンモニウム		
0 min	A: B: C = 50: 40: 10	
0 → 6.0 min	B: 40 → 90 linear gradient (A: 50 % → 0 % C: Fixed)	
6.0 → 15.0 min	A: B: C = 0: 90: 10	
流量: 0.2 mL/min	カラム温度: 40	注入量: 10 μL
(MS)		
イオン化法: ESI(+) SRM		
キャピラリー電圧: 3.6 kV		
コーン電圧: 35 V		
コリジョン電圧: 22 V		
ソース温度: 120	デゾルベーション温度: 500	
コーンガス: N ₂ 50 L/hr	デゾルベーションガス: N ₂ 700 L/hr	
モニターイオン: <i>m/z</i> 303.1 > 259.0 (確認用; 303.1 > 121.0)		
モニターイオン(内標準): <i>m/z</i> 366.1 > 121.0 (ヒドロコルチゾン- <i>d</i> ₃)		

4 検討内容

河川水を固相抽出して濃縮後、11-ケトテストステロン標準物質の既知量を添加した試料（以後、河川水後添加試料という）を測定したところ、標準液では検出できていた 11-ケトテストステロンのピークが検出されなくなった。このため、このイオン化抑制の軽減や、サロゲート補正のような手法が必要となった。また、11-ケトテストステロン標準水溶液を 7 日間保存する「分解性スクリーニング試験¹⁾（表 4）」では濃度低下は認められなかったが、環境水に標準品を添加した7日間の「保存性試験¹⁾」では、試料中からまったく検出されなくなった。これは生物分解と考えられ、化学物質環境実態調査では採水後数日間の保存の必要な場合があるため、生物分解を抑える方法が必要となった。以下、それらの検討内容を示す。

4・1 イオン化抑制に対する検討

イオン化抑制が認められた河川水について固相抽出のみで 1000 倍濃縮した試料を用いて、LC のクロマトグラム上で 11-ケトテストステロンのリテンションタイム付近を MS スキャンした。図 5 に示したようなマススペクトルが確認されたので、 m/z 148.9, 177 で SIR 測定したところ、11-ケトテストステロンのリテンションタイムと非常に近い位置に大きなピークがあることがわかった。そのため、 m/z 148.9 を持ち、リテンションタイムが近接している物質が、主な妨害物質である可能性が高いと考え、それらのピークの LC カラムによる分離を検討した。また、分離後も残っていたイオン化抑制を軽減するために、固相抽出管による精製や内標準物質の使用について検討を行った。

4・1・1 LCカラムの検討(妨害ピークの分離)

逆相系の XBridge C18 カラム(2.1 × 100mm, 3.5 μm; Waters 製)や XBridge Phenyl カラム(2.1 × 100 mm, 3.5μm; Waters 製)、シアノプロピル基を持つ Inertsil CN-3 カラム(2.1 × 150mm, 5μm; GL Sciences 製)で河川水後添加試料を測定したが、妨害物質との分離は出来なかった。Phenyl カラムのクロマトグラムを図 6 の下段に示す。(上段は、11-ケトテストステロン標準液のクロマトグラム)

アミド基が修飾されている Ascentis RP-Amide カラム(2.1 × 150mm, 3μm)で、妨害ピークと対象物質のピークを分離することができた。(図 7)

LC カラムの検討により大きな妨害物質との分離ができて、河川水後添加試料で 11-ケトテストステロンの検出が可能となったが、そのピーク面積は同じ濃度の標準液の 20%程度であった。

4・1・2 環境水抽出試料の精製

逆相系の固相カートリッジ(Oasis HLB)を、水質試料からの抽出に使用しているため、精製に使用する固相は異なった特性を持つものについて検討した。

順相系の固相として、構造式に二重結合を持つ化合物に対して強い結合能力を持つ Ag-ION 固相抽出管が 11-ケトテストステロンを良好に吸着したので、順相系の溶媒(ヘキサン、ジクロロメタン)で精製を行ったところ、河川水後添加試料のピーク面積は同濃度の標準液の 50%程度まで改善した。

さらに ENVI-CarbC 固相抽出管(活性炭吸着)を Ag-ION 固相抽出管の前段に取り付け、そこからトルエンで溶出した試料を下段の Ag-ION 固相抽出管に吸着させる精製工程を加えたことにより、ピーク面積は 60%以上に改善した。(図 8)

4・1・3 内標準物質の選択

これ以上のイオン化抑制の軽減が望めなかったため、定量値の補正についての検討を行った。

サロゲート物質での補正ができる場合、ネイティブの絶対回収率は 50%程度でも認められているが¹⁾、11-ケトテストステロンのサロゲート物質は市販されていない。そこで、同じ割合でイオン化抑制を受けるような物質を内標準物質として使用できるかの検討を行うこととした。そのために、11-ケトテストステロンと構造式が似ている化合物を候補とし、イオン化抑制の影響を同程度受けるように、なるべくクロマトグラム上でリテンションタイムが近接している物質を選択した。

11-ケトテストステロンと同様にステロイド骨格を持つ、テストステロン、β-エストラジオール、ヒドロコルチゾン候補として LC/MS で測定を行った。妨害物質の分離ができた Amide カラムを使用した LC 条件で、11-ケトテストステロンのリテン

ションタイムが 9 分付近に対して、テストステロンは 11 分付近、 β -エストラジオールは 12 分付近であったが、ヒドロコルチゾンはほぼ同じ 9 分付近のリテンションタイムであったので、その安定同位体標識化合物を内標準物質として選択した。

内標準物質による補正は、抽出・精製後にヒドロコルチゾン-*d*₃ を一定量添加することにより、イオン化抑制を補正する方法とした。千葉県内の 3 河川水と東京湾内湾の海水で、分析フローと同様に抽

出・精製を行い 11-ケトテストステロン標準物質の既知量を添加した試料を作成し、ヒドロコルチゾン-*d*₃ を添加した場合に補正が有効であるかを検討した。結果を表 5 に示した。イオン化抑制により同濃度の標準液に対する検出値(面積値)は減少し、補正前の濃度はその割合に応じた値となっているが、補正後の定量値はどの試料でも添加濃度とほぼ一致し、県内水域の環境水試料において本方法は適用可能であった。

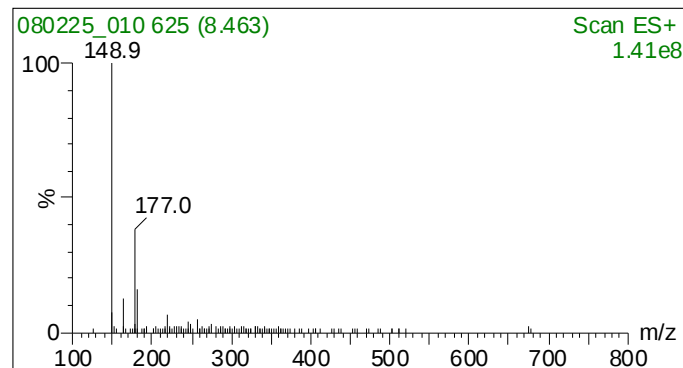


図 5 河川水(×1000)のマスペクトル
〔11-ケトテストステロンのリテンションタイム
付近をMSスキャン〕

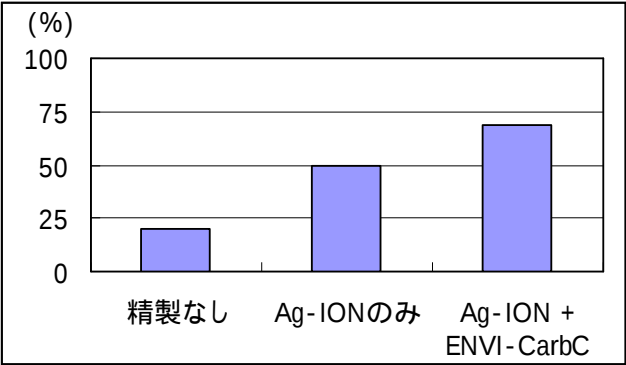


図 8 環境水に添加した標準品の検出値
(面積値)の割合
〔同濃度の標準液の検出値(面積値)を100として〕

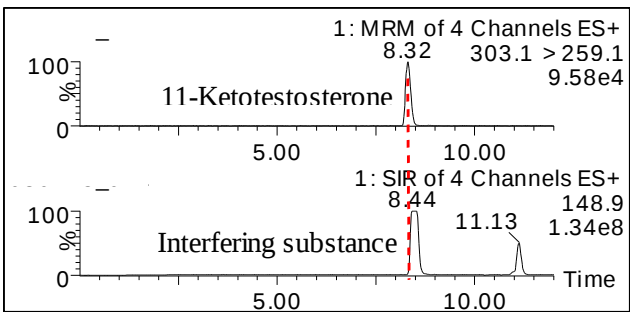


図 6 Phenylカラムのクロマトグラム

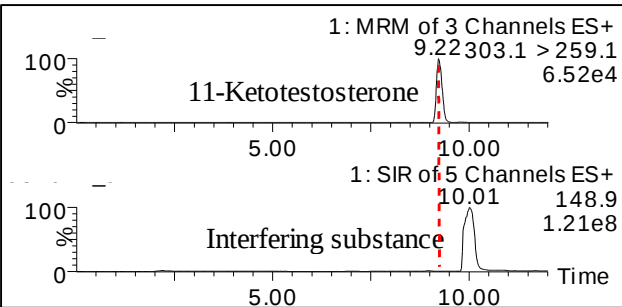


図 7 Amideカラムのクロマトグラム

表 4 標準液の分解性スクリーニング試験

pH	初期濃度 (ng/L)	1時間後の 残存率 (%)	7日後の残存率 (%)	
			暗所	明所
5	10	99	100	-
7	10	98	99	99
9	10	100	99	-

表 5 標準液を環境水試料に添加したときの定量値

	環境水中の11-ケトテストステロン 濃度(5 ng/L)	
	内標準補正前の 濃度(ng/L)	内標準補正後の 濃度(ng/L)
河川水1(B類型地点)	3.3	4.9
河川水2(B類型地点)	2.9	4.8
河川水3(D類型地点)	2.9	4.8
海 水 (C類型地点)	3.6	4.9

4・2 環境水中における濃度低下に対する検討

環境水中での保存が問題となるフェノール類の「衛生試験法・注解(保管方法)²⁾」に準じて、硫酸銅、リン酸を添加して保存性試験を行い、生物分解抑制について検討した。

表 6 に示したとおり、硫酸銅とリン酸を添加することにより分解は抑制され、濃度低下は認められなかった。どちらか一方のみを添加した場合でも、11-ケトテストステロンの濃度低下はほとんど認められなかったため、簡便性を考え塩酸添加により pH4 以下での保存性を検討した。

結果を表 7 に示した。河川水及び海水のいずれにおいても濃度の低下は認められず、数日間の冷暗所保存が可能となった。

次に、現場での塩酸添加が必要かどうかの検討を行った。ここでは、採水後、実験室に試料を持ち帰った後の塩酸添加でも支障が無いかをチェックするため、環境水に標準液を添加してから 4 時間後に塩酸を添加した。

表 8 に示したように残存率は低下しており、環境水中では比較的短時間で 11-ケトテストステロンが分解するため、現場での塩酸添加は必須であった。

5 結果

5・1 装置検出下限値(IDL)及び、

分析方法の検出下限値(MDL)、定量下限値(MQL)

IDL を表 9 に、MDL、MQL を表 10 に示す。また、IDL 測定時のクロマトグラムを図 9 に示す。

5・2 検量線

内標準物質(ヒドロコルチゾン-*d*₃)濃度 10 ng/mL で測定したときの、0.1 ng/mL ~ 10 ng/mL の 11-ケトテストステロン標準液の検量線は、

$$y = 1.24x + 0.004$$

となり、1 次回帰も良好($R^2=0.999$)であった。

5・3 添加回収試験

11-ケトテストステロン標準液を精製水、河川水(養老川)及び海水(千葉港)へ添加したときの添加回収試験結果を、表 11 に示す。表中の河川水、海水ではイオン化抑制により検出値が小さくなっているため絶対回収率が低くなっているが、内標準補正によりその回収率は 90%以上となった。

5・4 環境水の分析

養老川及び千葉港の水を環境水試料として、本法により分析した結果、これらの試料からは 11-ケトテストステロンは検出されなかった。

6 まとめ

11-ケトテストステロンの分析法開発にあたり、1 つ目の問題点として LC/MS 測定時にイオン化抑制が生じたため、それに対する検討を行った。LC カラムによる妨害物質との分離や前処理(精製)方法の検討を行い、イオン化抑制を軽減した。さらに内標準物質(ヒドロコルチゾン-*d*₃)を使用することにより、イオン化抑制により減少している検出値の補正をすることができた。

2 つ目の問題点としては、水質試料保存時の環境

水中での 11-ケトテストステロンの濃度低下であり，保存方法の検討を行った。塩酸で pH4 以下とすることにより，7 日間の環境水中での保存が可能となった。また，環境水中では比較的短時間で濃度低下が認められることから，環境実態調査等では，採水時に塩酸の添加が必要であるという知見を得た。

開発した分析法の検出下限値 (MDL) は，0.088 ng/L であり，「分析法開発調査」事業で要求された検出下限値 (0.1ng/L) を満たし，水試料中の 11-ケトテストステロンを 0.23 ng/L レベルまで定量が可能と

なった。

なお，この分析法の検討は，平成 19 ～ 21 年度化学物質環境実態調査の「化学物質分析法開発調査」事業において行った。

参考文献

- 1) 化学物質環境実態調査実施の手引き (平成 20 年度版) 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課，pp.101-129. (2009.3)
- 2) 衛生試験法・注解 日本薬学会編，pp.792-794. (2005)

表 6 河川水にリン酸，硫酸銅を添加したときの残存率

試料	初期濃度 (ng/L)	残存率 (%) 3日間
河川水 (リン酸)	3.0	98
河川水 (硫酸銅)		99
河川水 (硫酸銅+リン酸)		100

表 7 塩酸酸性条件下における残存率

試料	試験数 (n)	初期濃度 (ng/L)	残存率 (%) 7日間
河川水(養老川)	2	0.5	100
海水 (東京湾)	2	0.5	99
塩酸無添加の河川水(養老川)	2	1.0	0

表 8 塩酸を4時間後に添加したときの残存率

試料	試験数 (n)	初期濃度 (ng/L)	残存率 (%)
河川水(養老川)	2	0.5	76
海水 (東京湾)	2	0.5	88

表 9 装置の検出下限値(IDL)

物質名	IDL (ng/mL)	試料量 (L)	最終液量 (mL)	IDL試料換算値 (ng/L)
11-ケトテストステロン	0.032	0.200	0.200	0.032

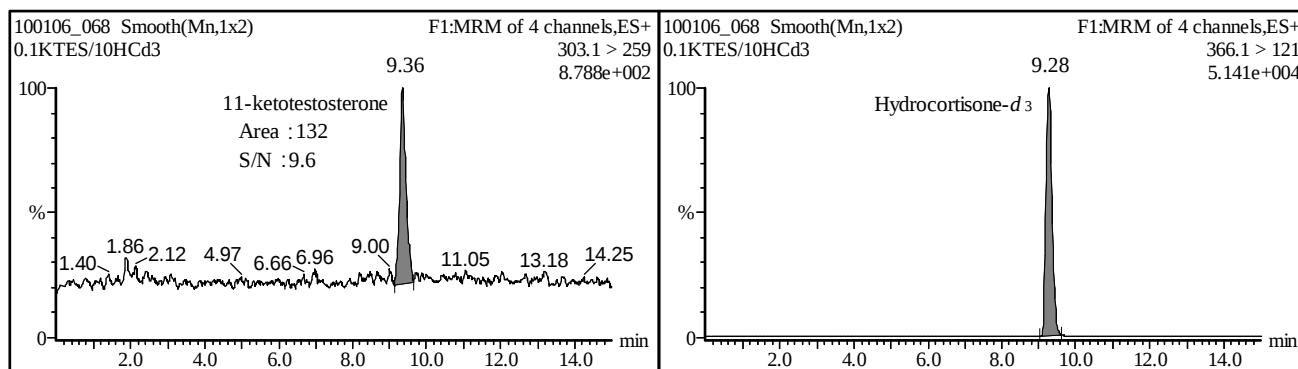


図 9 IDL 測定時のクロマトグラム

表 1 0 分析方法の検出下限値(MDL)及び定量下限値(MQL)

物質名	試料量 (L)	最終液量 (mL)	検出下限値 (ng/L)	定量下限値 (ng/L)
11-ケトテストステロン	0.200	0.200	0.088	0.23

表 1 1 添加回収試験結果

試料	試料量 (L)	添加量 (ng)	測定 回数	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	内標準補正 回収率(%)
精製水	0.200	無添加	1	ND	-	-
	0.200	0.1	1	0.51	98	101
	0.200	0.6	1	3.0	90	95
河川水	0.200	無添加	2	ND	-	-
	0.200	0.1	7	0.48	65	94
海水	0.200	無添加	1	ND	-	-
	0.200	0.6	5	2.8	73	90

An analytical method for the determination of 11-Ketotestosterone in water by liquid- chromatography mass spectrometry(LC/MS/MS)

Akira SHIMIZU, Tadashi YOSHIKAWA, Hiroshi SUGIYAMA

水質試料中の 11-ケトテストステロンの，LC/MS による分析法開発を行った。検出下限値(0.1 ng/L)を満たすために環境水試料を高倍率で濃縮したところ，イオン化抑制が生じた。その対応策として，LC カラムの検討や環境水試料の精製法の検討を行い，イオン化抑制を軽減した。さらにヒドロコルチゾン-*d*₃ を内標準物質として使用することにより，イオン化抑制による検出値の減少分を補正することが出来た。また，環境水中で生物分解によるものと考えられる 11-ケトテストステロンの濃度低下が認められたため，その対応策として採水直後に酸性条件下(pH4 以下)にすることで，環境水の保存を可能とした。

これらの検討の結果，分析法として要求された検出下限値を満たし，環境水中の 11-ケトテストステロンの定量(定量下限値：0.23 ng/L)が可能となった。

キーワード：11-ケトテストステロン，LC/MS，環境水，化学物質分析法開発，化学物質環境実態調査