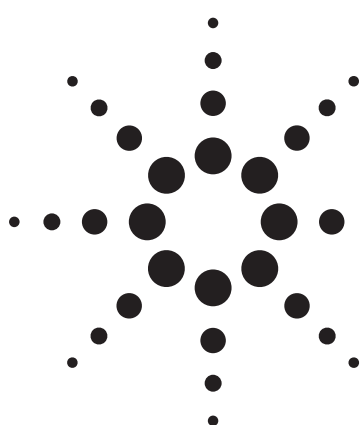


LC-(ESI-)-MS/MSによるsub-pptレベルでの 水中のエストロン-3-硫酸塩の同定



アプリケーション

環境

概要

Emmanuelle Bichon, Soazig Elaudais, and Bruno Le Bizec
Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les
Aliments (LABERCA)
USC INRA 2013
École Nationale Vétérinaire de Nantes (ENVN)
BP 50707
44307 Nantes Cedex 3, France

概要

固相抽出(SPE)および液体クロマトグラフィ/タンデム質量分析(LC-MS/MS)をネガティブエレクトロスプレーモードで使用して、エストロン-3-硫酸塩をsub-pptレベルで分析しました。

はじめに

水中環境に存在するステロイドが水生生物の正常な内分泌機能に与える影響は、現在懸念されている問題です。汚染区域に生息する鳥類、爬虫類、および哺乳類の内分泌/生殖系が変質していることもいくつかの研究において示されています。

現在では、多数の化学物質が内分泌攪乱物質になっていることが実証されています。なかでも、天然および合成エストロゲンは低濃度でも既に悪影響を示していました。文献から利用できる多数の分析的アプローチのおかげで、最近では環境水においてこれらを効率的にコントロールできるようになりました。これは、エストラジオール(E2)、エストロン(E1)、エストリオール(E3)、およびエチニルエストラジオール(EE2)測定の場合

です。エストロン-3-硫酸塩も環境での安定性のため注目する必要がありますが、これまでにこの化合物を扱った論文は比較的少数です。

そのため、このアプリケーションノートでは水中のエストロン-3-硫酸塩の定量に特化した分析メソッドの開発を紹介します。そして、超微量レベルにおいても、2002/657/ECの決定に基づいてステロイドの存在を確認しました。

実験手法

サンプル前処理手順

1. 10ngの内部標準(硫酸ボルデノン-d₃)を添加します。
2. 必要に応じて、0.45 μmのグラスファイバフィルタで水サンプルをろ過します。
3. 水サンプルをMM4 SPEカートリッジ(1g, 6mL)(Interchim社、フランス)に注入します。
4. 化合物を12mLのMeOH/NH₄OHで溶出します(98:2, v/v)。
5. 抽出物を乾固させます。
6. 抽出物を50μLのMeOH/H₂O(80:20, v/v)に再溶解します。

検量線

上記のサンプル前処理手順を使用して、0、1、2、3、4、および5ng/L(ppt)で6つのキャリブレーションサンプルが添加され、抽出されました。



Agilent Technologies

LC-MS/MS測定(ネガティブエレクトロスプレーモード)

LC: Agilent 1200
カラム: Gemini (50mm x 2mm、3 µm) C18 110 A (Phenomenex)
対応するアジレント部品:
Extend-C18 3.5 µm、2.1 x 50mm (P/N 735700-902)
カラム温度: 40°C
移動相: A: 酢酸アンモニウムバッファ25mM、
pH 9.2
B: アセトニトリル (ACN)
流速: 0.3mL/min

表1. グラジエント条件

| 時間(分) | %B |
|-------|-----|
| 0 | 5 |
| 0.5 | 5 |
| 15.5 | 100 |
| 18.5 | 100 |
| 21 | 5 |
| 26 | 5 |

注入量: 10 µL

MS: Agilent 6410 トリプル四重極LC/MS
イオン化: ESI (-)
キャピラリ電圧: 3,500V
ネブライザガス圧力: 40psi
乾燥ガス流量: 13L/min
乾燥ガス温度: 275°C

MS/MSパラメータ

表2. MS/MSパラメータ

| 分子 | プリカーサ イオン | MS1 分解能 | プロダクト イオン | MS2 分解能 | ドウェルタイム (ms) | フラグメンタ | コリジョン エネルギー |
|------------------------|--------------|------------|--------------|------------|-----------------|--------|----------------|
| 硫酸ボルデノン-d ₃ | 368.3 | Wide | 353.3 | Widest | 200 | 120 | 15 |
| エストロン-3-硫酸塩T1 | 349.2 | Wide | 269.2 | Widest | 300 | 200 | 35 |
| エストロン-3-硫酸塩T2 | 349.2 | Wide | 145.2 | Widest | 300 | 200 | 60 |

結果と考察

分析の性能

バリデーションでは、2002/657/ECの決定に基づいて、sub-pptレベルでのメソッド性能を評価しました。異なる水源(表流水または地下水)から得た種々の水サンプルをブランクサンプルとして分析しました。スパイクしたサンプル(1、2、3、4、および5pptのエストロン-3-硫酸)から5つの検量線が得られました。これらのサンプルはすべて、前記のサンプル前処理手順に従って抽出されました。エストロン-3-硫酸塩について2つ、硫酸ボルデノン-d₃について1つのシグナル(MRMトランジション)がモニタされました。図1は、モニタされたシグナルの高い選択性と、直線性に関する良好なパフォーマンスを示しています。

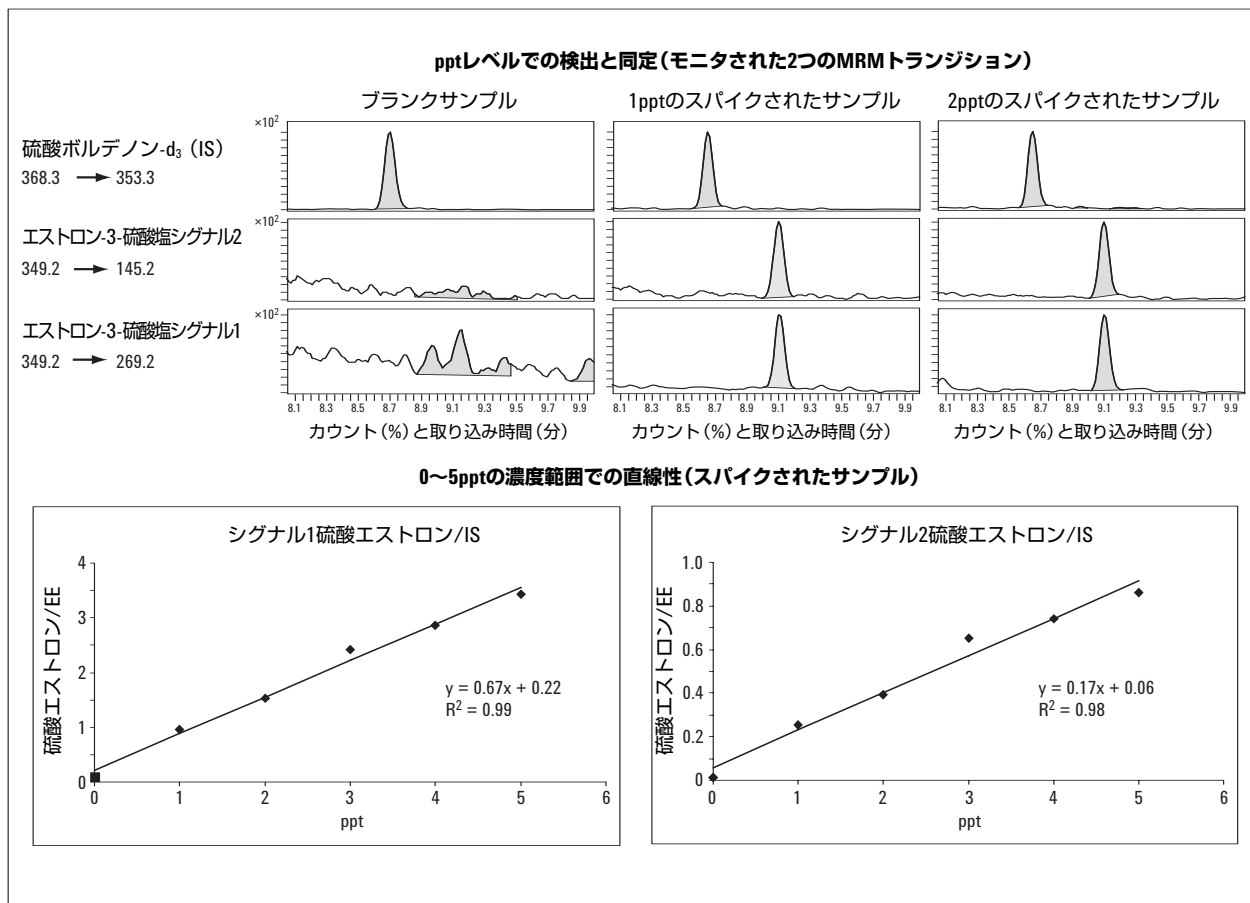


図1. 開発されたメソッドの主要パフォーマンスパラメータ(選択性、感度、および直線性)

バリデーションパラメータ

表3は、直線性(5つの異なる検量線)、反復性(5つの異なる水に対する1、2、3、4、および5pptの添加レベル)、検出下限(CC α)、および検出能力(CC β)の各遷移に対して測定されたパフォーマンスを示しています。

表3. バリデーションパラメータ

| | 直線性 (5つの検量線 でR ² の範囲) | 反復性(n=25) (5つのテストされた 濃度レベルそれぞれに ついて5回複製) | CC α (ng.L ⁻¹) | CC β (ng.L ⁻¹) |
|------------------------------|--|---|--------------------------------------|-------------------------------------|
| エストロン-3-硫酸塩 349.2 → 145.2 | 0.954 – 0.977 | 6.8 – 22.6 % | 0.08 | 0.15 |
| エストロン-3-硫酸塩 349.2 → 269.2 | 0.976 – 0.991 | 3.9 – 17.2 % | 0.10 | 0.53 |

未知サンプルの分析

図2は、開発したメソッドを表流水および地下水サンプルのバッチに適用した後で取得した結果を示しています。これらの結果は、感度と選択性を示すことで、メソッドの効率を立証しています。

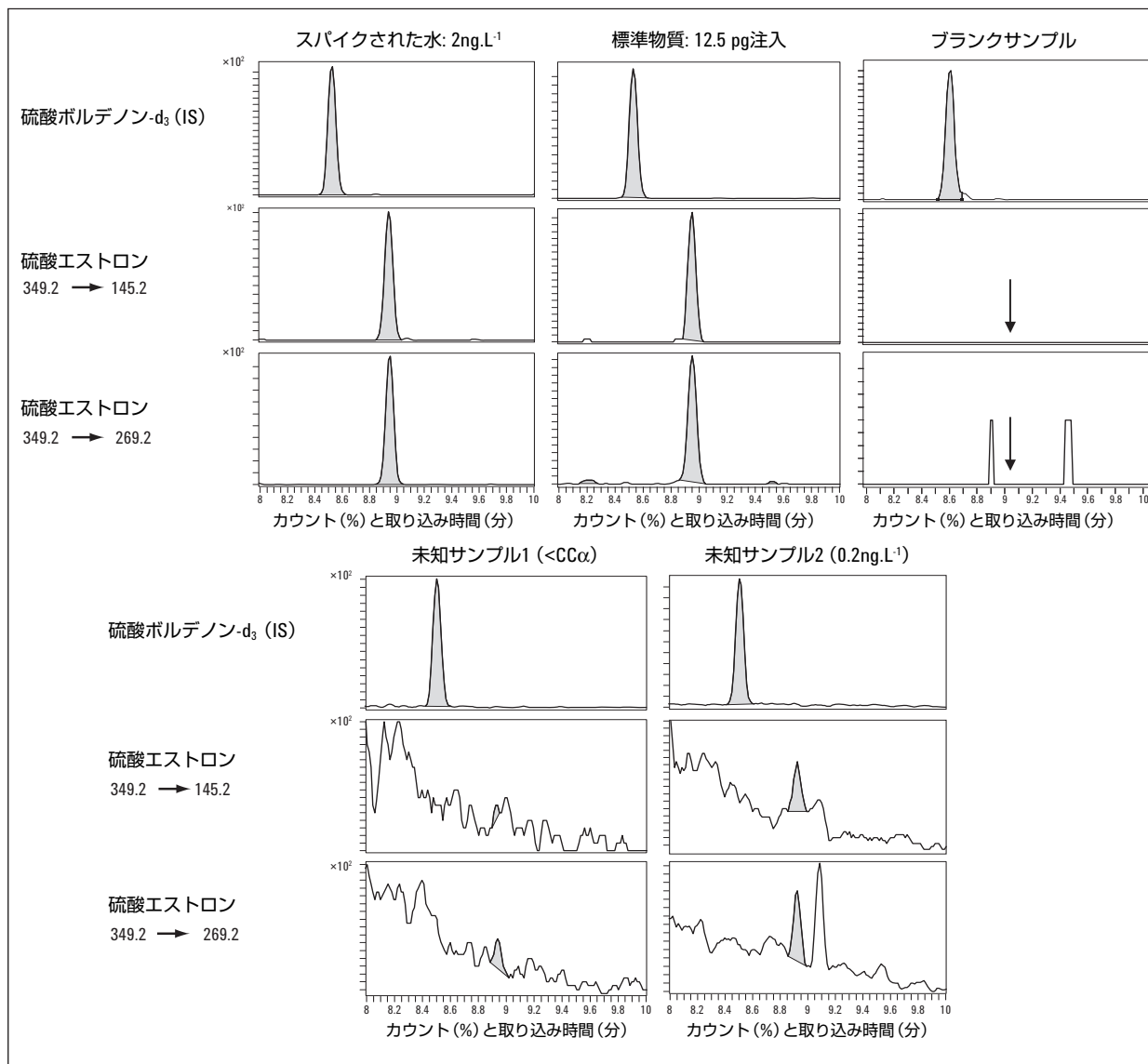


図2. ルーチン分析シリーズ(スパイク、標準、ブランク、および2つの未知水サンプルを含む)について取得された典型的なMRMクロマトグラム

結論

選択的SPE前処理と特異的なLC-MS/MS検出 (Geminiカラム、Phenomenex、Agilent 6410 トリプル四重極LC/MSシステム) を用いてエストロン-3-硫酸塩に着目してメソッドを開発しました。2002/657/EC基準に従って実行したバリデーションでは、超微量レベルにおいても、ステロイドの存在を確認できました。

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2008

Printed in Japan
June 24, 2008
5989-8480JAJP