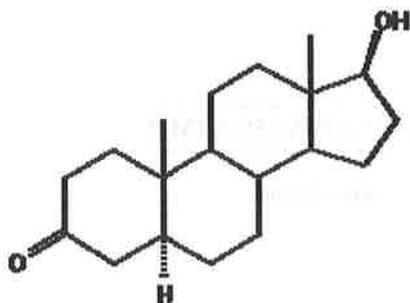


5 α -ジヒドロテストステロン

【対象物質及び構造式】

C₁₉H₃₀O₂5 α -Dihydrotestosterone

CAS 番号 521-18-6

【物性】

分子量	沸点 (°C)	蒸気圧 (kPa)	水溶解度 (mg/L)	log P _{ow}
290.44	—	1.493E-6*	41.97*	3.07*

(* 計算値)

【毒性、用途等】

毒性情報 : ラット(35日間 TD_{L0}) 17.5 mg/kg

用途 : 男性ホルモン、医薬品原料 (インターネットより)

§ 1 分析法

(1) 分析法概要

水試料にサロゲートを添加した後、固相カートリッジに通水し、ジヒドロテストステロンを濃縮する。これをメタノール及び酢酸エチルで溶出し、LC/MS/MS(+法)で定量をする。

(2) 試薬・器具

【試薬】

ジヒドロテストステロン : 和光純薬社製

ジヒドロテストステロン-2,2,4,4- d_4 ：セントラル薬品
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：残留農薬試験用

【試薬の安定性・毒性】

暴露されないよう取り扱いに注意する。

【器具】

メスシリンダー、メスフラスコ、ビーカー、試験管
コンセントレーター：ウォーターズ社コンセントレーターConcentratorPlus

(3) 分析法

【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】

〔水質〕

試料 200 mL に 100 ng/mL のサロゲート溶液を 50 μ L 添加し、コンディショニングした固相カートリッジ（注 1）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 分間通気乾燥させる（注 2）。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 100 mg を正確に秤取り、アセトン 100 mL に溶解し標準原液(1000 μ g/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 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 μ g/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] (注 3)

LC/MS 機種名 : Waters 社製 2695/QuattroMicro API

LC 機種 : Waters 2695

カラム : 資生堂 MG-II C-18 (2.1 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 linear gradient

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)

機種 : Waters QuattroMicro API

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/min.

デソルベーションガス流量 : N₂(600 L/min)

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

[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、原点を通過する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。

[定量]

試料液10 μL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準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/μL) × 添加する内標準の容量 (μL))

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 4)。

物質	IDL (ng/mL)	試料量 (L)	最終液量 (mL)	IDL 試料換算値 (ng/L)
ジヒドロテストステロン	0.03	0.2	0.5	0.09

〔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 5)。

物質	試料量 (L)	最終液量 (mL)	MDL (ng/L)	MQL (ng/L)
ジヒドロテストステロン	0.2	0.5	0.10	0.25

(注 1)

固相カートリッジは、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ものを使用する。

(注 2)

固相は十分に乾燥させること。

(注 3)

LC/MS 条件は、本測定に使用した機種 (Waters QuattroMicro API) 特有である。

(注 4)

装置検出下限 (IDL) は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 17 年 3 月) に従って、表 1 のとおり算出した。また、IDL 測定時のクロマトグラムを図 1 に示す。

表 1 装置検出下限(IDL)の算出 (Waters QuattroMicro API)

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(μL)	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)	0.1
標準偏差(ng/mL)	0.009
IDL(ng/mL)	0.03
IDL 試料換算値(ng/L)	0.09
S/N	9
CV(%)	8.7

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

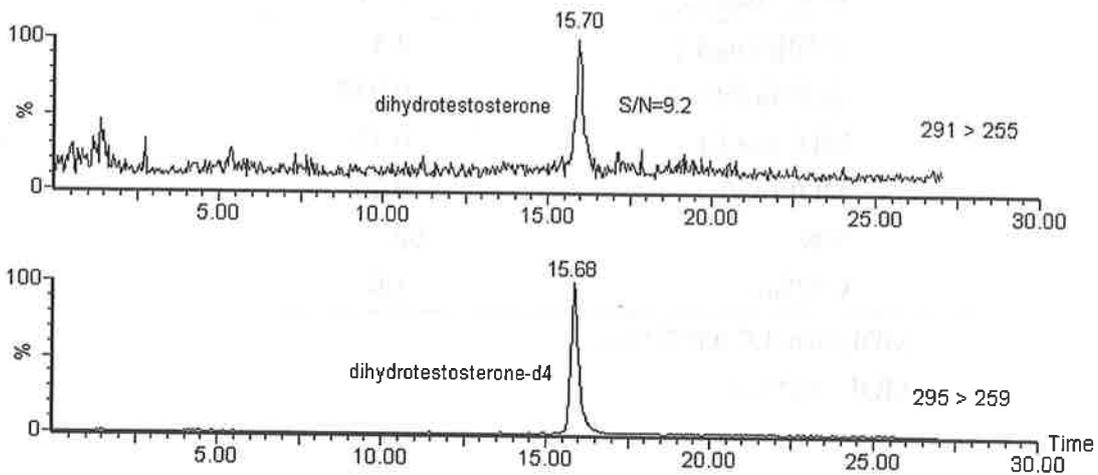


図 1 IDL 測定時のクロマトグラム

(注 5)

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、次のとおり算出した。

表 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 (mL)	200
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(μL)	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)	2.55
結果 2(ng/L)	2.49
結果 3(ng/L)	2.49
結果 4(ng/L)	2.51
結果 5(ng/L)	2.47
結果 6(ng/L)	2.49
結果 7(ng/L)	2.51
平均値(ng/L)	2.5
標準偏差(ng/L)	0.025
MDL(ng/L)	0.10
MQL(ng/L)	0.25
S/N	62
CV(%)	1.0

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

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

§ 2 解説

【分析法】

〔フローチャート〕

分析のフローチャートを図2に示す。

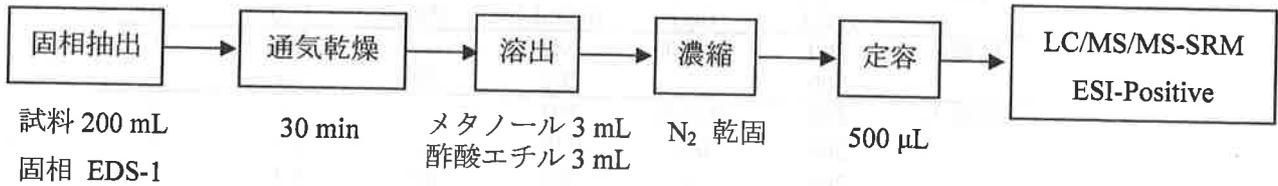


図2 分析フロー

〔検量線及びマススペクトル〕

検量線及びマススペクトル図等を図3,4に示す。

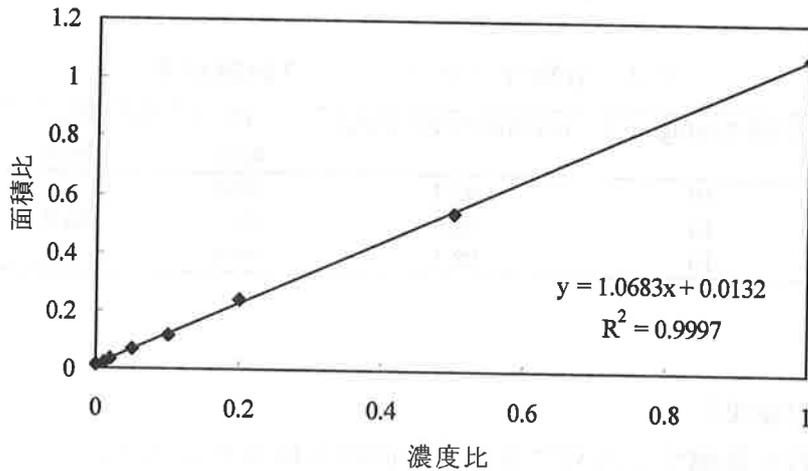


図3 検量線

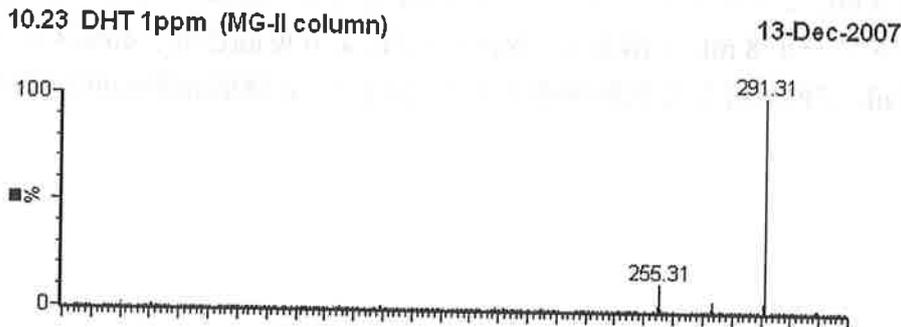


図4 マススペクトル

〔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表 3 に示す。

表 3 添加回収実験結果

試料	試料量 (mL)	添加量 (ng)	検出濃度 (ng/mL)	回収率 (%)	変動係数 (%)	繰り返し n
精製水	200	無添加	ND	-	-	1
	200	5	9.9	79	7.1	3
河川水	200	無添加	ND	-	-	1
	200	0.5	0.96	63	5.1	3
	200	5	9.8	67	8.7	3
海水	200	無添加	ND	-	-	1
	200	5	9.8	87	5.9	3

〔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表 4 に示す。

表 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。図 5 に、各種固相別の回収率を示す。

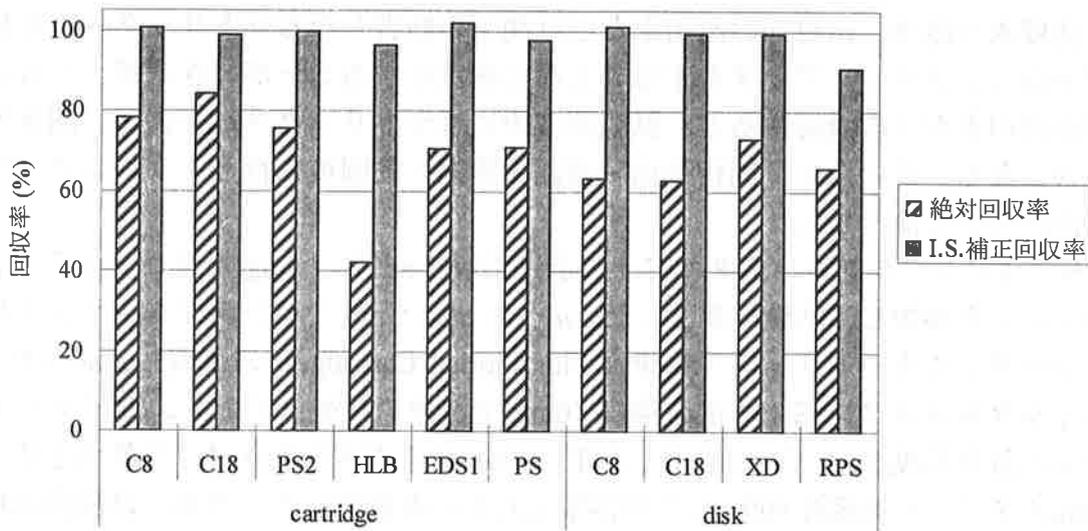


図5 固相ごとの回収率の違い

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。

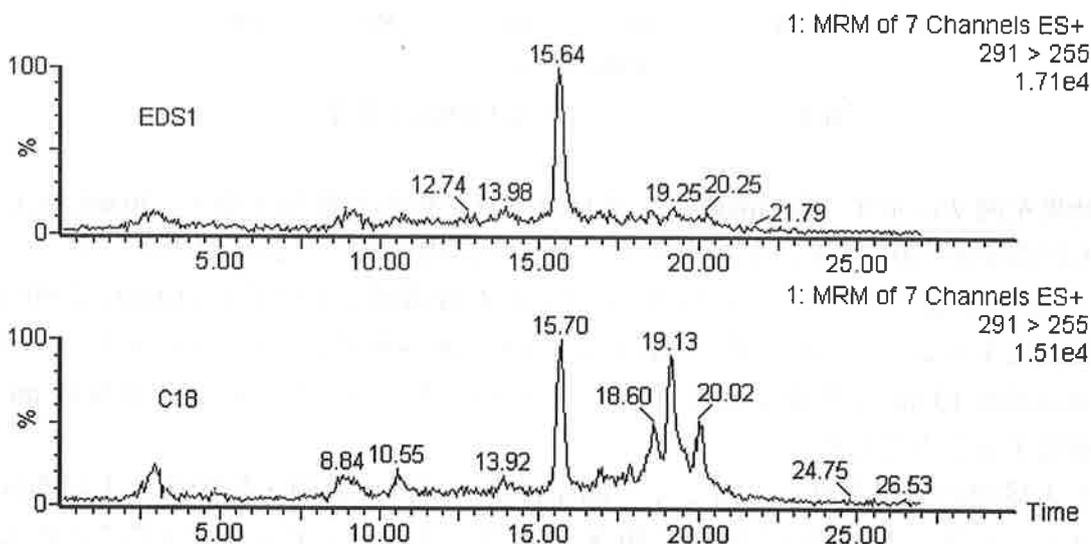


図6 河川水を前処理した場合の 2 種の固相(上: EDS1, 下: C18)のクロマトグラムの違い

[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 で洗浄した後、アセトン/ジクロロメタンの混合溶媒 5 mL で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。

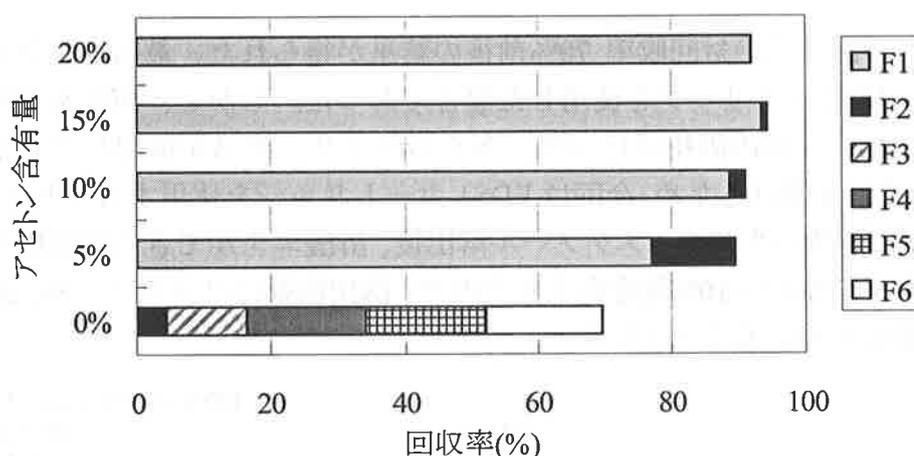


図7 クリーンアップ方法の検討結果

結果を図7に示す。溶出溶媒にジクロロメタンのみを使用すると、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、10 mL で90%程度溶出することがわかった。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図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。

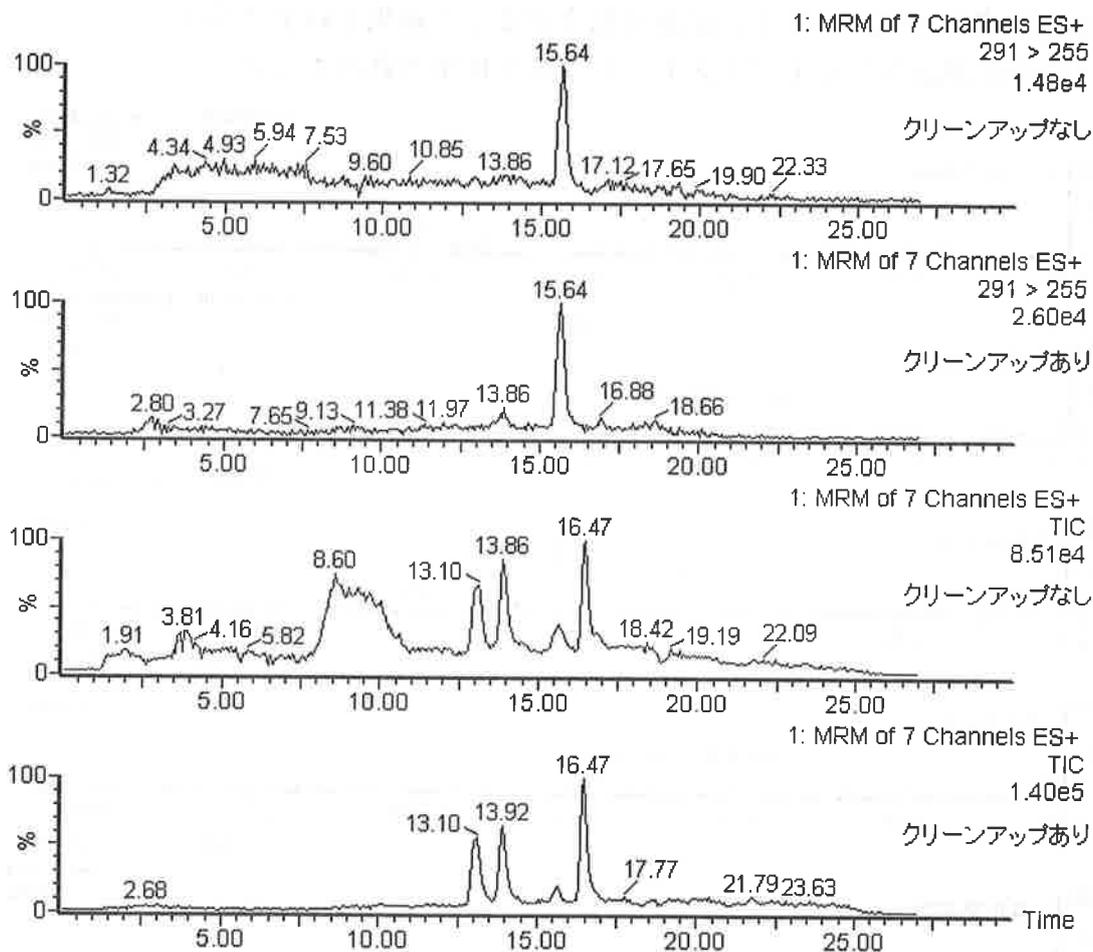


図 8 クリーンアップの有無によるクロマトグラムの違い

[環境試料測定結果]

名古屋市河川および名古屋港海水を測定した結果を以下に示す。

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。

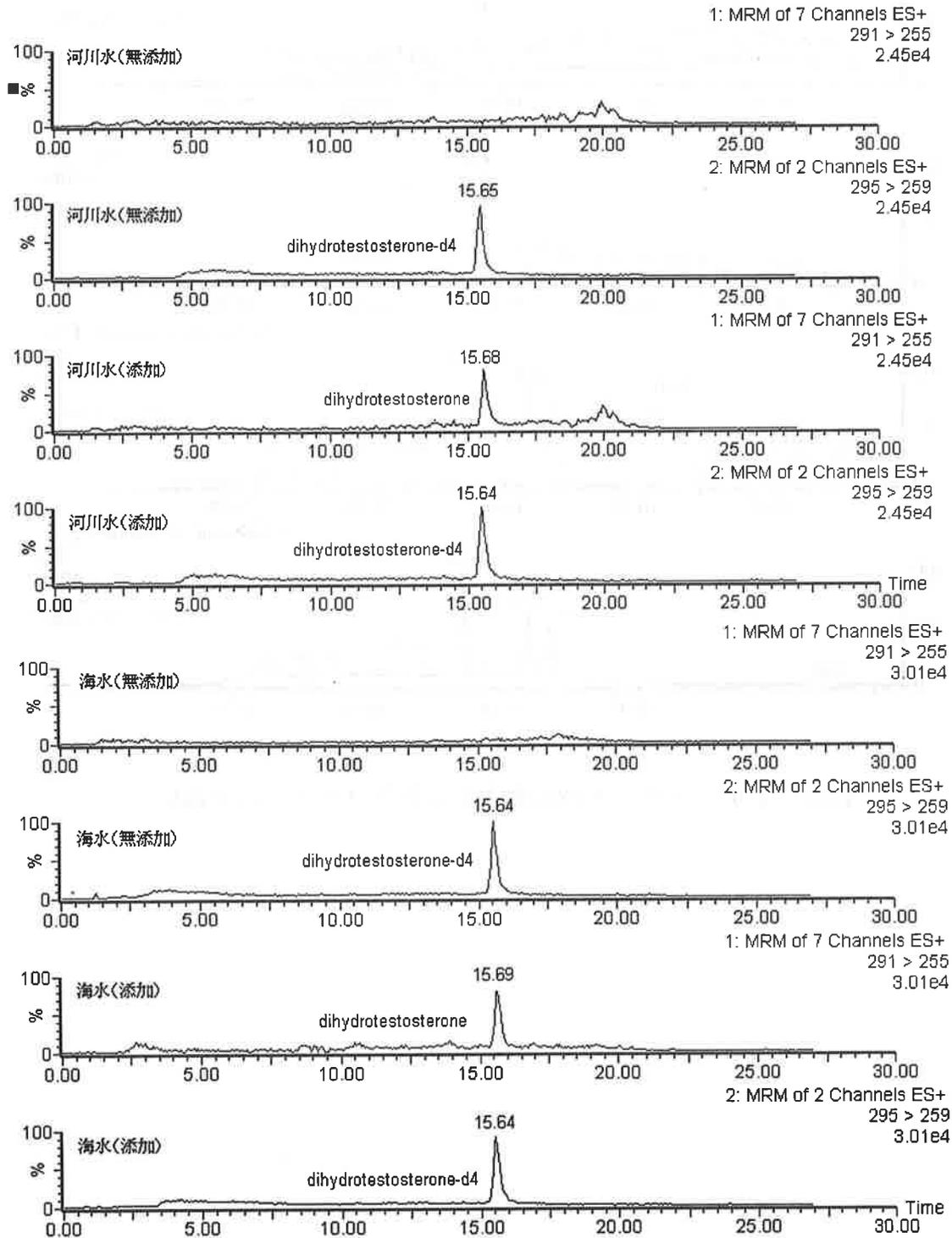


図9 環境試料測定時のクロマトグラム

【評価】

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、30 ng/L オーダーの定量が可能である。

【担当者氏名・連絡先】

担当 名古屋市環境科学研究所

住所 〒457-0841 名古屋市南区豊田 5-16-8

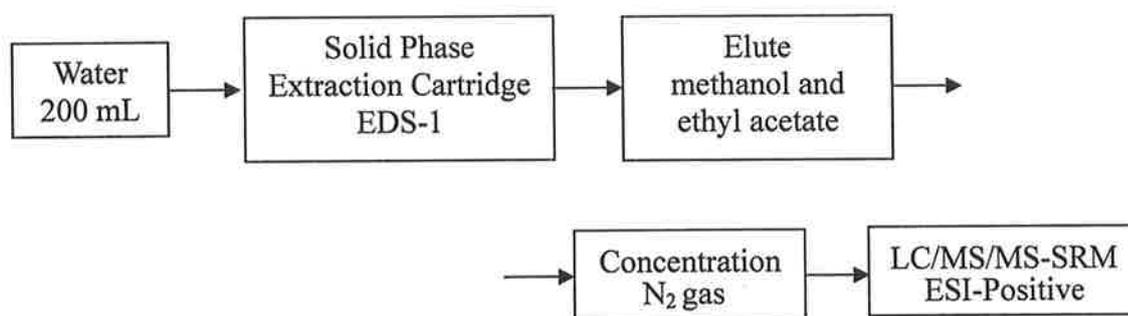
TEL : 052-692-8481 FAX : 052-692-8483

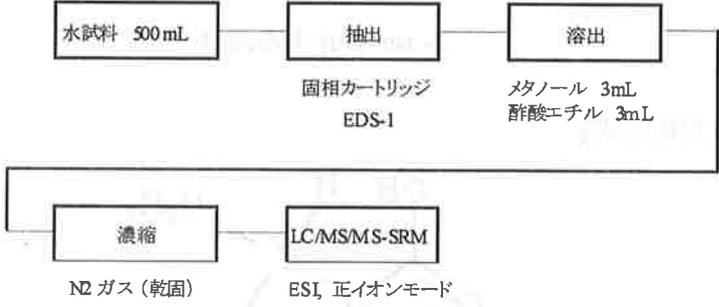
担当者 長谷川瞳 渡辺正敏

E-mail : hitomi@nagoyakankaken.net

Dihydrotestosterone

This method provides procedures for the determination of dihydrotestosterone in water sample by liquid chromatography / tandem quadrupole mass spectrometry (LC/MS/MS). Stable isotopically labeled dihydrotestosterone is spiked into a 200 mL water sample as internal standard. A water sample passes through a preconditioned the solid phase extraction cartridge at a flow rate of 20 mL/min. (The solid phase extraction cartridge is conditioned by 10 mL methanol and 10 mL water.) Then the cartridge is dried by aspiration for 30 minutes, and adsorbed analytes are eluted with 3 mL methanol and 3 mL ethyl acetate. The sample solution is dried up by N₂ gas, and analyze by positive ion mode-ESI-LC/MS/MS-SRM. The analytes are determined in the multiple reaction monitoring (MRM) mode as the precursor/product ion pair of m/z 291/255 for dihydrotestosterone and m/z 295/259 for the internal standard dihydrotestosterone-*d*₄. The instrumental detection limit (IDL), the method detection limit (MDL) and the method quantification limit (MQL) is 0.03 ng/mL, 0.10 ng/L and 0.25 ng/L. The recoveries for standard aqueous solutions containing 10 ng/L were 79%. These relative standard deviations were 7.1%. The recoveries of dihydrotestosterone, using surface sea water were 87%. The relative standard deviation was 5.9%.



物質名	分析法フローチャート	備考
ジヒドロテストステロン	 <pre> graph LR A[水試料 500mL] --> B[抽出 固相カートリッジ EDS-1] B --> C[溶出 メタノール 3mL 酢酸エチル 3mL] C --> D[濃縮 N2 ガス (乾固)] D --> E[LC/MS/MS-SRM ESI, 正イオンモード] </pre>	LC/MS/MS-SRM 正イオン カラム MG-II C-18 長さ 100mm 内径 2.1mm 粒径 3 μ m 検出下限 <水質> 0.10 ng/L