

平成10年度 厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

内分泌かく乱化学物質の胎児，成人等の暴露に関する調査（指定研究）

血中のビスフェノール A 高感度分析法に関する研究

主任研究者 中澤裕之
星薬科大学教授

研究要旨

ビスフェノール A(BPA)には，内分泌系をかく乱する可能性があるとして指摘されており，ポリカーボネート樹脂やエポキシ樹脂等を用いた食品用容器や金属缶からの溶出が報告されている。そのため，食品や環境などから BPA がヒトへ暴露される可能性も十分に考えられる。この暴露量を至急解明しなければならない。そこで，極めて微量である BPA の高感度かつ簡単迅速な分析法の開発が要求されている。前処理に固相抽出法，検出に電気化学検出高速液体クロマトグラフィー（HPLC/ECD）を用いた高感度分析法の開発を目的に基礎的な検討を行った。

A. 研究目的

ビスフェノール A(BPA)は，Krishnanらによりポリカーボネート製実験器具より溶出し，ヒト乳がん細胞（MCF-7）を増殖させることが報告された¹⁾。その後，妊娠マウスに BPA を投与し，産まれてきたマウスに前立腺肥大や精子減少などの影響も報告されている²⁾。

このように内分泌かく乱作用が指摘される一方，BPA は我々の身の回りにおいて給食用食器や歯科治療用充填材の高分子素材³⁾などに利用されている。そのため，環境中や食品中に

おける存在量が問題となり，モニタリングが要求されている。

しかし，プラスチック原料に由来する内分泌かく乱化学物質を測定する際，実験系自体から汚染される可能性があり，微量測定には慎重な操作が必要である⁴⁾。BPA はポリカーボネート，エポキシ樹脂などの原料に使用されており，器具の洗浄，試薬調製などに利用される精製水への混入や実験器具からの汚染等が考えられる。BPA の分析法を構築するにあたってバックグラウンド値に対する影響

を及ぼすような要因について明らかにすることは分析値の信頼性を確保する上で重要である。

BPA 微量分析として、TMS 誘導体化後、GC/MS^{5,6)}で測定する方法がある。また、TMS 誘導体化の操作が必要ない液体クロマトグラフ (HPLC) 法では UV 検出器⁷⁾や蛍光検出器⁸⁾などの報告がある。しかし、これらの方法では操作性や検出感度に問題を抱えている。そこで、我々はフェノール性化合物を選択的かつ高感度に検出できる電気化学検出高速液体クロマトグラフ (HPLC/ECD)^{9,10)}を利用することにより、高感度な BPA 分析を試みた。また、アンペロメトリック型電気化学検出器¹¹⁾のように保持時間のみでは化合物の同定に不十分であることから、クーロメトリック型多電極電気化学検出器を用い、そのピーク高さ比により同定することを検討した。

B. 研究方法

B・1 試薬

BPA は環境分析用試薬 (和光純薬工業社製) を使用した。抽出、洗浄に用いた有機溶媒は残留農薬試験用アセトニトリル 300, アセトン 300, メタノール 300, ジクロロメタン 300 (いずれも和光純薬製) を、精製水には日本ミリポア社製 Milli-Q で製したものをを用いた。移動相のアセトニトリル、リン酸はいずれも和光純薬製、試薬特級を使用した。

BPA はアセトニトリル/水 (1/1 : V/V) に溶解して 1.0 mg/mL の標準液

を調製し、標準液を更にアセトニトリル/水 (1/1) で各種濃度に調製し、実験に供した。

B・2 装置及び器具

高速液体クロマトグラフとしてポンプ、恒温槽には島津製作所製 LC10AD, CTO-2A, 電気化学検出器 (ECD) は ESA 社製 Coul Array MODEL 6210, データ処理は CoulArray System ver.1.0 を用いた。試料注入には Kontron Instruments 社製 Autosampler460 を用いた。分離カラムには資生堂製 CAPCELL PAK UG 120 C₁₈ (4.6 × 150 mm) を使用した。

固相抽出用のカートリッジは、Waters 社製 OASIS HLB (充填量:130mg/カートリッジ容量:2.8mL) 及び Varian 社製 Bond Elut Certify (60mg/3mL) を用いた。またディスクは、3M 製 Empore SDB-RPS (直径 13mm, 膜厚 0.5mm) を用いた。固相処理操作には、Waters 社製エキストラクションマニホールドを用いた。実験に用いるガラス器具はすべてアセトン洗浄後、200°C, 4 時間加熱して使用した。

B・3 測定条件

カラム温度を 30°C とし、移動相にアセトニトリル/0.3%リン酸水溶液 (40/60) を 1.0mL/min で送液した。また、ECD の設定電圧 (Ch₁~Ch₄) は Tabel 1 に示した分析条件に合わせて用いた。試料注入量を 50 μL とした。各試料の HPLC 測定毎にアセトニトリルを注入してブランクのモニタリングを行っ

た。

C. 研究結果

C・1 HPLC/ECD 測定条件の検討

C・1・1 移動相の検討

移動相には、アセトニトリル/リン酸水溶液を用い、リン酸濃度における検出感度の影響を検討した。BPA のピーク面積と印加電圧をプロットしてヒドロダイナミックボルタモグラムを作成した (Fig.1) .その結果、高い感度が得られ、S/N比も低い0.3%リン酸水溶液を用いて以下の実験を行うことにした。

C・1・2 多電極による BPA の同定

クーロメトリック型多電極電気化学検出器では、保持時間及び二つの電極間のピーク高さ比によって同定可能である¹²⁾。Ch₁~Ch₄の印加電圧を変え、BPA 特有のピーク高さ比(h_1/h_2)を Fig.2 より求めた。

C・1・3 検量線の作成

BPA をそれぞれ 0.01~100ng/mL に調製し、その 50 μ L を注入して、得られたクロマトグラムよりピーク面積を求め、絶対検量線法により検量線を作成した。その結果、検出限界は 0.01ng/mL (絶対量として 0.5pg, S/N=3) であった。検量線は 0.1~100ng/mL(5pg~5ng)の範囲で良好な直線性 (相関係数=0.999) が得られ、5.0, 50ng/mL 標準液の 9 回繰り返し測定では保持時間 10.40 分 (RSD=0.05%), 10.44 分(0.07%)であり、

ピーク高さ比 0.35(4.86%) , 0.37(0.77%)と良好な結果を得た。

C・2 前処理法の検討

C・2・1 試験用水の BPA 測定

前処理などの分析に用いる水は、さまざまな要因から BPA に汚染されている可能性が考えられる。そこで通常の実験に利用している精製水及び水道水中の BPA を測定した。また、分析に用いるすべての水は、精製水を Empore SDB-RPS(直径 47mm, 膜厚 0.5mm)に通過させることにより、BPA をディスク上に捕集させた。捕集能力は BPA1.0ng/mL 添加水を用い、ディスクに通過させて求めた。その結果、2L まで 100%の捕集率があった (Fig.3)。

それぞれの水に対する BPA 測定法は、操作過程の BPA 汚染を考慮してガラス製器具のみを利用した液-液抽出法で行った (Fig.4) .その結果、水道水及び精製水では 0.01ng/mL, 0.02ng/mL の検出値を得た。また Empore 処理後の水に関しては、6.5pg/mL の検出値が得られた。

C・2・2 固相抽出法

環境水中 BPA の前処理法として、ジクロロメタンを用いた液-液抽出法が利用されている¹³⁾。しかし、簡便迅速な手段ではなく、多量の有機溶媒を用いるため、本実験では固相抽出法を採用した。しかし、この固相抽出用カートリッジやディスクも高分子素材であり、一般にその素材が不

明であるケースが多い。これらカートリッジ等を使用した場合、抽出過程において BPA の汚染が考えられる。そこで実験に用いるカートリッジ及びディスクの溶出試験を行った。固相抽出法に用いるカートリッジ及びディスクの溶出試験方法は室温条件下、本実験で溶出液として利用したメタノール 100mL に浸漬した後、溶出液 10mL を濃縮乾固させ、アセトニトリル/水(1/1)100 μ L に溶解させた。カートリッジに関しては、内部を分解しそれぞれの部位に分け、溶出試験を行った。その結果、それぞれのカートリッジ、ディスクの部位より 0.006~0.013ng/mL の溶出が確認された (Fig.5)。

また、固相の洗浄による BPA の溶出検討した。検討方法は、メタノール 3 mL を 5 回固相に通し、その溶出液を濃縮し、アセトニトリル/水(1/1)100 μ L に溶解させた後、測定を行った。その結果、メタノール 15mL の洗浄により、BPA の混入がないことを確認した。よって固相抽出過程において 15mL 以上の洗浄が必要と思われる (Fig.6)。

固相抽出の水添加回収の結果、各固相に対する 0.5, 0.05ng/mL 添加回収率は平均 83.8~98.2%、標準偏差はいずれも 6.5%以内であり、BPA 分析として有用である (Fig.7)。

また、ウサギ血清の添加回収では水における添加回収率の最も良かった OASIS HLB を用いて、0.1, 1.0 ng/mL 添加回収率を求めた。その結果、

87.3%及び 79.0%であり、標準偏差は 13.5%及び 5.1%であった (Fig.8)。

C.3 ヒト血清中の BPA 濃度

血清は日赤製分画用血清 (凝固因子用) 検体を用いた。

平成 11 年 2 月 4 日に採取後、保存バックに入れ、冷凍保存を行ったものを用いた。

血清中の BPA 濃度を測定した結果、0.32ng/mL の濃度を検出した (Fig.9)。

D. 考察

以上の結果から、電気化学検出器を利用した測定法は、選択性及び再現性にも良好な結果を得ることができた。検出限界 (0.01ng/mL) 及び検量線の直線性 (相関係数 $R=0.999$) においても良好な結果を得ることができた。

固相抽出においては、洗浄、前処理に利用される水やカートリッジ及びディスクからの BPA 溶出が確認された。しかし、抽出過程におけるメタノール洗浄を通常よりも多く行うことにより、0.01ng/mL 以上の BPA 汚染を防ぐことができた。

以上より本方法を用いることにより 0.1ng/mL の定量限界は十分に可能であると考察される。

E. 結論

生体などの微量な BPA を分析する時に、今までの手段では前処理での汚染、検出感度の問題があり、実際に応用することが難しいと思われる。

本実験では HPLC/ECD での高感度な分析法及び前処理過程での汚染の軽減を試みた。これにより、今まで以上に高感度かつ正確な分析を行うことが可能となった。

また、本結果においてヒト血清から、0.32ng/mL 濃度が検出された。しかし、保存用バックからの BPA 溶出や血液採取時における汚染等も考えられるため、今後はこれらの検討も必要である。

文献

- 1) A.V.Krishnan, P.Stathis, S.F.Petmuth, L.Tokes, D.Feldman : *Endocrin.*, 132, 2279 (1993)
- 2) S.C.Nagel, F.S.vom Saal, K.A.Thayer, M.Dhar : *Environ.Health Persp.*, 105, 70 (1997)
- 3) 本郷敏雄:東京都歯科医師会雑誌, 46, 12 (1998)
- 4) 高田秀重:現代化学, 1999, 38
- 5) 神浦俊一, 田島裕子, 中原武利:環境化学, 7, 275 (1997)
- 6) M.D.Olmo, A.G.Casado, N.A.Navas, J.L.Vilchez : *Anal.Chim.Acta*, 346, 87 (1997)
- 7) 河村葉子, 小谷野有希, 武田由比子, 山田隆:食衛誌., 39, 206 (1998)
- 8) C.Lambert, M.Larroque : *J.Chromatogr.Sci.*, 35, 57 (1997)
- 9) J.Ruana, I.Urbe, F.Borrull : *J.Chromatogr.A*, 655, 217 (1993)
- 10) G.Achilli, G.P.Cellerino, G.V.M.d'Eril, F.Tagliaro : *J.Chromatogr.A*, 729, 273 (1996)
- 11) K.Peltonen, J.Pukkila : *J.Chromatogr.*, 439, 375 (1988)
- 12) H.Takeda, T.Matsumiya, T.Shibuya : *J. Chromatogr.*, 515, 265 (1990)
- 13) 環境庁水質管理課編:外因性内分泌かく乱化学物質調査暫定マニュアル, III-8 (1998)