

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
内分泌攪乱物質の胎児、成人等の暴露に関する調査（指定研究）

<詳細報告書 2 : >

生体試料中ビスフェノール A の高感
度分析法の開発

主任研究者 中澤裕之
星薬科大学教授

分担研究者 牧野恒久
東海大学医学部教授

研究要旨

誘導体化試薬としてジエチル硫酸を用いた、生体試料中ビスフェノール A のエチル誘導体化 GC-MS 法を開発した。本法の誘導体化反応生成物は、極めて安定で、夾雑する生体由来の妨害物質を加水分解により精製することが可能であった。また、検量線は、少なくとも 125 ng/ml（試料）まで直線性を示し、検出限界は 0.25ng/ml（生体試料）と、極めて高感度であった。血清及び母乳における回収率(n=5)は、それぞれ 74 及び 80%、相対標準偏差（n=5）は、3.5 及び 1.6%と、極めて良好であった。

A. 研究目的

ビスフェノール A (BPA) は、内分泌攪乱物質の一つと考えられており、ヒトの健康影響に対する関心が高まりつつある。最近、京都大学のグループにより、さい帯中の BPA の存在が報告され、次世代への影響の可能性が示唆された。それにともない現在、本化学物質のヒト、特に母体、胎児への暴露実態調査の早急な実現が、強く望まれている。

これらの調査を実施するためには、感度と選択性に優れた MS を用いた測定法の開発が必須である。しかし現在まで、生体試料（血液、さい帯血、母乳、腹水）中 BPA の、MS を用いた測定法は全く報告されてい

ない。近年、ジエチル硫酸を用いたエチル誘導体化 GC-MS 法が開発され、環境試料へ適用されている。本 BPA 誘導体が極めて安定で、夾雑する生体由来の妨害物質を加水分解により精製することが可能であることに着目し、本誘導体化を用いる GC-MS 法の開発を試みた。本法の原理は、生体試料から BPA を C₁₈ カラムカートリッジで抽出・精製し、ジエチル硫酸でフェネトール体に誘導体化する。この反応溶液中に夾雑する脂質を、加水分解除去したのち、フロリジルカラムで精製し、GC-MS 分析することに基づく。

さらに現在 BPA の分析法としてもっとも広く用いられている、トリメ

チルシリル誘導体化法を用いる GC-MS 法と比較検討し、本法の方が生体試料に応用するさいに数々の利点を有し、有用かつ実用的であることを実証した。

B. 試薬、装置及び分析法

B.1.1 試薬及び器具

標準試薬は、ビスフェノール A (略号 BPA) は関東化学製、ビスフェノール A -d₁₆ (略号 BPA-d₁₆、サロゲート) 及びフルオランテン-d₁₀ (内標準物質) は CDN 製、ピレン-d₁₀ (内標準物質) を Isotec Inc. 製を用いた。誘導体化試薬の BSTFA は GL サイエンス、和光純薬及び Pierce 製、ジエチル硫酸は関東化学製を用いた。メタノールは、関東化学製 フタル酸エステル分析用、エタノール、ジクロロメタン、n-ヘキサン及びジエチルエーテルは関東化学製 残留農薬試験用(1000 倍濃縮)を使用した。塩酸は、キシダ化学製 精密分析用、塩化ナトリウムは関東化学製 残留農薬試験用、水酸化カリウム、水酸化ナトリウムは、純正化学製 特級を使用した。無水硫酸ナトリウムは関東化学製 残留農薬試験用を、汚染除去のため、電気炉で、700℃で 8 時間、焼成したものをを用いた。

C₁₈ カラムカートリッジは Varian 製 Bond Elut Glass C₁₈ (1000 mg / 6ml)、フロリジルカートリッジは、Waters 製 Sep-pak Plus Florisil (910mg)、C₁₈ ディスクカートリッジは、3M 製 エムポアディスク C₁₈ HD (47 mm)を用いた。C₁₈ カラムカートリッジは、ジクロロメタン 30 ml ついでメタノール 30 ml で自然落下により予備洗浄し、水 10 ml で平衡

化して用いた。

実験に使用した水は、イオン交換水を、超純水製造装置 (Milli RO 8 Water purification system 及び Milli-Q SP reagent water system) で精製した。さらに C₁₈ ディスクカートリッジを用いてさらに精製した物を測定に使用した。この精製では、ディスクは未洗浄の状態で使用し、1/1 時間の流速で通水した。ディスクは 11 の精製に 1 枚使用した。なお、本精製法は、星薬科大学教授中澤先生にご教授いただいた。

全てのガラス器具は、Extrane MA 01 alkaline (Merck 社) 5%溶液に 1 夜浸け置きし、超音波洗浄器を用い水、アセトン洗浄し、超純水で置換し乾燥した。さらに使用する直前に、ジクロロメタンで洗浄し、乾燥したものをを用いた。

B.1.2 試料溶液

I) BPA 標準試料溶液

BPA の 1 mg/ml のジクロロメタン溶液を、ジクロロメタンで希釈して 10 μg/ml 溶液を調製した。

II) サロゲート BPA-d₁₆ 溶液

BPA-d₁₆、1mg /ml のジクロロメタン溶液を、アセトンで希釈して 10 μg/ml 溶液を調製した。

III) 内標準溶液

フルオランテン-d₁₀、1 mg /ml のヘキサン溶液を、ヘキサンで希釈して 10 μg/ml 溶液を調製した。測定には、さらにヘキサンで 0.5 μg/ml に希釈したものをを用いた。

ピレン-d₁₀、1 mg /ml のジクロロメタン溶液を、ジクロロメタンで希釈して 1 μg/ml 溶液を調製した。

B.1.3 試料

血清試料は、常法に従って調製し、15分以内に凍結し、測定するまで-30℃で保存した。母乳試料も同様に採取後即座に凍結し、測定するまで-30℃で保存した。

B.2 装置

GC-MS：島津製，QP-5050A型

B.3 分析法

B.3.1 誘導体化操作

試料溶液を N₂ 気流下乾固し、1 M KOH エタノール溶液 0.5 ml 及びジエチル硫酸 0.2 ml を加え良く振とうする。これを室温、1時間反応させ、得られる反応混液に、1M KOH エタノール溶液 4.2 ml、水 3 ml 及び内標準溶液 (0.5 μg/ml、フルオランテン-d₁₀・ヘキサン溶液) 1 ml を加える。これを激しく振とう後、遠心分離し、ヘキサン層を、Na₂SO₄ 脱水し、その 1 μl を GC-MS に付す。

B.3.2 GC-MS 条件

カラムは、J&W 社製 DB-5 (0.25 mm x 30 m, df 0.25 μm) を用い、温度条件は、注入口及びインターフェイスを 280℃、カラムの昇温を 60℃ (1 min) から 15° /min で 280℃ (3 min) の条件で行った。キャリアガスは、ヘリウム (1.2 ml/min) を用いた。試料注入は、スプリットレス法でサンプリング時間、1 min で行った。注入量は 1 μl とした。モニターイオンは、BPA は 269.1、BPA-d₁₆ は 280.1、フルオランテン-d₁₀ は、212.1 を用いた。

B.4 検量線

B.1.2 項の標準試料溶液をジクロロメタンで希釈して、0.5, 1, 5, 10, 50 ng/ml の溶液を調整し、その 1 ml を上記分析法に従って測定した。

BPA と BPA-d₁₆ とのフェネトール誘導体の、ピーク面積値の比と重量比から検量線を作成した。

B.5 定量計算

得られた BPA のフェネトール誘導体と、BPA-d₁₆ とのピーク面積値の比から、検量線より検出量を求め、次式により生体試料中の BPA 濃度 (Cs) を算出した。

$$Cs(\text{ng/ml}) = Wd \times (Vs/Vi) \times (1000/Ws)$$

Wd : 検出量 (ng)

Ws : 試料採取量 (2 ml)

Vs : 測定試料液量 (1ml)

Vi : 注入量 (1 μl)

また、測定ごとに一定量添加したサロゲート物質 BPA-d₁₆ により、回収率を算出した。サロゲートの定量は感度計数(RF)法で行った。

$$RF = (As \times Cis) / (Ais \times Cs)$$

As : サロゲートのピーク面積

Ais : 内標準のピーク面積

Cis : 検量線標準液中の内標準物質質量 (ng)

Cs : 検量線標準液中のサロゲート物質質量 (ng)

C. 結果・考察

C.1 クロマトグラム

10 ng/ml (0.01 ng/1 μl 注入量) の BPA 及び 100 ng/ml (0.1 ng/1 μl 注

入量) BPA-d₁₆ 溶液 1ml を、本誘導体化操作に従い処理して得たクロマトグラムを Fig.1 に示す。本条件下で、これら全ての化合物は、完全にベースライン分離した。また試薬由来の妨害ピークは、全く存在しなかった (Fig.2)。

C.2 マススペクトル

本装置により BPA、BPA-d₁₆、並びにフルオランテン-d₁₀ のマススペクトルを測定した結果を、Fig.3 に示す。本測定に使用した試料の濃度はいずれも 1 μ g/ml で、1 μ l 注入して行った。以後測定に用いたモニターイオンは、これらのスペクトルに基づいて決定した。

C.3 検量線・検出限界

BPA 及び BPA-d₁₆ の検量線 (Fig. 4) は、少なくとも 250 ng/ml (0.25 ng/1 μ l 注入量) まで良好な直線性を示した。BPA-d₁₆ 100 ng/ml (0.1 ng/1 μ l 注入量) を加えて作成した、BPA の検量線 (Fig. 5) も良好な直線性を示し、寄与率 $\gamma=0.9993$ と良好であった。検出限界 (S/N=3) は、0.5 ng/ml (0.5 pg/1 μ l 注入量) の BPA を用いて得たクロマトグラム (Fig.6) より、0.5 ng/ml (0.5 pg/1 μ l 注入量、0.25 ng/ml 試料) とした。

C.4 生体試料への応用

本法をヒト体液 (腹水、血清、さい帯血、母乳) に応用するために、ヒトプール血清及びプール母乳をモデルとして用い、諸条件を検討した。

C.4.1 操作法

試料 2 ml に、BPA-d₁₆ を 100 ng 添加し、室温で 15 分放置した。これ

に Et-OH 8 ml を加え、渦動攪拌機 (ポルテックスミキサー) を用い 1 分間抽出した。抽出液を、水 70 ml で希釈し、C₁₈ カラムカートリッジに付した。水 10 ml でカートリッジを洗浄後、MeOH 6 ml で溶出した。MeOH 画分に、1M HCl 1 ml、10% NaCl 14 ml 加えた溶液を、ジクロロメタン 2 ml で 2 回抽出した。ジクロロメタン層を Na₂SO₄ で脱水した後、試料溶液を N₂ 気流下乾固した。残渣に 1M KOH エタノール溶液 0.5 ml 及びジエチル硫酸 0.2 ml を加え良く振とうした。これを室温、1 時間反応させ、得られる反応混液に、1M KOH エタノール溶液 4.2 ml 及び水 3 ml を加え、70 °C、1 時間加熱した。冷後、内標準溶液 (0.5 μ g/ml、フルオランテン-d₁₀・ヘキサン溶液) 1 ml を加え、激しく振とう後、遠心分離した。得られるヘキサン層を、Na₂SO₄ 脱水し、N₂ 気流下濃縮乾固し、エーテル：ヘキサン溶液 (4:96, v/v) 1 ml に溶解した。この溶液を、あらかじめエーテル：ヘキサン溶液 (4:96, v/v) 10 ml で洗浄しておいたフロリジルカラムカートリッジに付す。エーテル：ヘキサン溶液 (4:96, v/v) 8 ml で溶出し、素通り画分と溶出画分を合わせ、N₂ 気流下 1ml まで濃縮し、1 μ l を GC-MS に付す。

生体試料からの抽出・精製条件を検討するため、下記の 2 つの方法と比較検討した。

操作-2

(ジクロロメタン・NaOH 液液分配による精製、誘導体化後の加水分解-フロリジルカラム精製)

試料 2 ml に、BPA-d₁₆ を 100 ng 添加し、室温で 15 分放置した。これに Et-OH 8 ml を加え、渦動攪拌機（ボルテックスミキサー）を用い 1 分間抽出した。抽出液を、水 70 ml で希釈し、C₁₈ カラムカートリッジに付した。水 10 ml でカートリッジを洗浄後、ジクロロメタン 6 ml で溶出した。ジクロロメタン画分を 1M NaOH 2ml、1ml で抽出した。抽出液を、1M HCl（10% NaCl）で酸性にし、ジクロロメタン 2 ml で 2 回抽出した。ジクロロメタン層を Na₂SO₄ で脱水後、N₂ 気流下乾固し、1M KOH エタノール溶液 0.5 ml 及びジエチル硫酸 0.2 ml を加え良く振とうした。これを室温、1 時間反応させ、得られる反応混液に、1M KOH エタノール溶液 4.2 ml 及び水 3 ml を加え、70 °C、1 時間加熱した。冷後、内標準溶液（0.5 μg/ml、フルオランテン-d₁₀・ヘキサン溶液）1 ml を加え、激しく振とう後、遠心分離した。得られるヘキサン層を、Na₂SO₄ 脱水し、N₂ 気流下濃縮乾固し、エーテル：ヘキサン溶液（4:96, v/v）1 ml に溶解した。この溶液を、あらかじめエーテル：ヘキサン溶液（4:96, v/v）10 ml で洗浄しておいたフロリジルカラムカートリッジに付す。エーテル：ヘキサン溶液（4:96, v/v）8 ml で溶出し、素通り画分と溶出画分を合わせ、N₂ 気流下 1 ml まで濃縮し、1 μl を GC-MS に付す。

操作-3

（ジクロロメタン・NaOH 液液分配による精製）

操作-2 と全く同様の操作で、ジクロロメタン溶出し、ジクロロメタン・

NaOH で精製した試料を、誘導体化操作に従って処理し、加水分解による精製なしで GC-MS に付す。

C.4.2 クロマトグラム

操作法に従って血清及び母乳を処理して得られたクロマトグラムを、Fig.7 及び Fig.8 に示す。血清及び母乳いずれも、0.2 ng/ml の BPA が検出され、その他の生体試料由来の妨害ピークは観測されなかった。これらの測定値はいずれも検出限界以下で、このときの操作ブランク（Fig.9）は 0.2 ng/ml で、操作ブランクによる物と考えられる。

C.4.3 抽出・精製条件

固相抽出の条件の最適化を図るために、C₁₈ カラムカートリッジを用い、溶離溶媒としてメタノール及びジクロロメタンを用い、溶出条件を検討した（Fig.10）。その結果メタノール及びジクロロメタンいずれも 6 ml 以内で溶出した。それ故、測定には 6 ml の溶媒を用いた。

また、精製効率を検討するために、固相からの溶離溶媒、ジクロロメタン・NaOH 液液分配による精製、誘導体化後の加水分解-フロリジルカラム精製の効果を検討した。本定量操作（メタノール溶出、誘導体化後の加水分解-フロリジルカラム精製）、操作-2（ジクロロメタン・NaOH 液液分配による精製、誘導体化後の加水分解-フロリジルカラム精製）、操作-3（ジクロロメタン・NaOH 液液分配による精製）で血清及び母乳を処理し、精製効果を検討した（Fig.11）。これらの結果と操作効率を検討し、メタノール溶出、誘導体

化後の加水分解-フロリジルカラムで精製を行った。

C.4.4 妨害物質

実験室内の種々の器具、試薬、溶媒類は、ビスフェノール A に汚染されている可能性があり、正確な定量を妨げることが知られている。そのため、全定量操作に用いる溶媒、試薬、及び器具について、ビスフェノール A の汚染の程度を検討した。その結果を Table 1 に記す。有機溶媒、NaCl は、操作に使用する程度の量では、検出されなかった。残留農薬試験用の無水硫酸ナトリウムは、検出されたが、700 °C で 8 時間焼成することで汚染除去が可能であった。実験に使用している超純水からも検出された。これは、C₁₈ ディスクカートリッジで濾過することで検出限界以下になった。また全てのガラス器具は洗浄後、超純水で置換し乾燥させた物を使用しているため、汚染の可能性が考えられる。従って全てのガラス器具は使用前にジクロロメタンで洗浄した物を使用した。使用した C₁₈ カラムカートリッジはガラス容器及びテフロン製のフリットからできており、材質からの溶出は考えられない。しかし、本カートリッジのパッキングの素材にポリカーボネートの素材が使用されており、Fig.12 に示すように、メタノール及びジクロロメタン溶出液から多量の妨害物質が検出された。これらの結果からカートリッジは、ジクロロメタン 30 ml、ついでメタノール 30 ml で洗浄し使用した。

C.4.5 操作ブランク、回収率並びに相対標準偏差値

全ての取りうる汚染対策を全て行い測定した、本法の操作ブランクを Table 2 に示す。7 回測定はいずれも 0 にはならなかったが、検出限界以下であった。また、操作ブランクから対象物質が検出される場合の検出限界の算出方法：

$$\text{検出限界} = \text{平均値} + 1.943 \times \text{標準偏差}$$

から検出限界 0.14ng/ml を得た。これは S/N=3 より算出した 0.25 より小さい値であった。それ故、本測定法の定量限界は、0.25 ng/ml とした。

ヒト血清及び母乳に BPA を 5 ng/ml の濃度添加した溶液を 5 回ずつ測定したところ、その相対標準偏差値はそれぞれ 3.5 及び 1.6 と良好だった。またそれぞれの測定値から、回収率を算出したところ、それぞれ 74%、80% と良好だった。

D. 結論

ジエチル硫酸を用いる、ヒト体液中の BPA のエチル誘導体化 GC-MS 法を開発した。本法は (1) 比較的高感度で 0.25 ng/ml (生体試料) の BPA の測定が可能で、(2) また室温、1 時間放置するだけで反応が終了し、操作が簡便である。また、反応生成物であるフェネトール体は、極めて安定で、本法を生体試料に応用するとき、(3) 反応生成物を加水分解を用いて精製することが可能である。それ故極めて高い精製効率が期待される。

本法は極めて高感度で、夾雑物が多量に存在する試料中の BPA を精度よく測定することが可能である。それ故、内分泌攪乱物質の健康影響に

関する調査研究の実施に極めて有用 と思われる。