

## <詳細報告書 3 : >

生体試料中ビスフェノール A の高感度分析法の開発

——トリメチルシリル誘導体化 GC-MS 法の開発とエチル誘導体化 GC-MS 法との比較検討

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

### A. 研究目的

現在、ビスフェノール A の測定法としてトリメチルシリル(TMS)誘導体化 GC-MS 法が汎用されている。本エチル誘導体化法と TMS 誘導体化法の有用性を比較検討するために、TMS 化法を用いる生体試料の測定法を開発し、感度、操作性、生体試料への応用性を比較検討した。本 TMS 誘導体化 GC-MS 法は、生体試料から BPA を  $C_{18}$  カラムカートリッジを用いて抽出し、ジクロロメタン・NaOH で精製し、BSTFA で TMS 誘導体化する。ドデカン存在下、過剰の試薬を除去し GC-MS 分析することに基づく。本法の検量線は、少なくとも 100 ng/ml (試料) まで直線性を示し、検出限界 (S/N = 3) は、0.1 ng/ml (試料) と、高感度であった。

### B. 分析法

#### B.1 誘導体化操作

試料のジクロロメタン溶液 200  $\mu$ l に、BSTFA を 200  $\mu$ l 添加し、室温、1 時間反応させる。この反応混液に、ドデカン 100  $\mu$ l を加え  $N_2$  気流下過剰の BSTFA を留去する。これに、ピレン- $d_{10}$  を 100ng 添加後、ジクロロメタンで 1 ml 定容し、その 1  $\mu$ l を GC-MS 分析する。

#### B.2 GC-MS 条件

カラムは J&W 社製 DB-5(0.25 mm x 30 m, df 0.25  $\mu$ m) を用いた。温度条件は、注入口及びインターフェイスを 280 $^{\circ}$ C、カラムの昇温を 60 $^{\circ}$ C (1 min)  $\rightarrow$  15 $^{\circ}$ C/min  $\rightarrow$  280 $^{\circ}$ C (3 min) で行った。キャリアガスはヘリウム (1.2 ml/min) を使用し、試料注入はスプリットレス法、サンプリング時間は 1 min で行った。注入量は 1  $\mu$ l とした。モニターイオンは BPA を 357.3、BPA- $d_{16}$  を 368.4、ピレン- $d_{10}$  を 212.2 とした。

### B.3 検量線

エチル誘導体化法に準じて調製した標準試料溶液を、ジクロロメタンで希釈して、0.5, 1, 2.5, 5, 25, 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-d<sub>16</sub> との TMS 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.4 定量計算

得られた BPA の TMS 誘導体と、BPA-d<sub>16</sub> 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 $\mu$ l)

また、測定ごとに一定量添加したサロゲート物質 BPA-d<sub>16</sub> 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

質量 (ng)

## C. 結果・考察

### C.1 クロマトグラム

5 ng/ml (0.005 ng/1 $\mu$ l 注入量) の BPA 及び 100 ng/ml (0.1 ng/1 $\mu$ l 注入量) BPA-d<sub>16</sub> 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.13 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.14)。

### C.2 マススペクトル

本装置により BPA、BPA-d<sub>16</sub> 並びにピレン-d<sub>10</sub> のマススペクトルを測定した結果を、Fig.15 に示す。本測定に使用した試料の濃度はいずれも 500ng/ml で、2 $\mu$ 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 試薬ブランクの除去

本法に従い試薬ブランクを調製し、試薬を留去することなく GC-MS に付すと 1.5 ng/ml (生体試料) の BPA が検出された。高田らは (現代科学、1, 38-43 (1999))、TMS 化剤には、少量の BPA が存在し、この試薬の汚染のために高感度な測定ができないと報告した。また、GC-MS のシリンジに使用されているエポキシ樹脂から試薬ブランクが出ることも、学会で

取りざたされている。これらの原因を解明するために、濃度の違った試薬溶液を調製し、試薬中のブランクを測定した。その結果、Fig.16 に示すように、試薬濃度とブランク量に直線性がなく、試薬ブランクの原因は、試薬に少量存在する BPA が原因ではないことが分かった。そこで試薬ブランクの原因を、GC-MS のシリレンジに使用されているエポキシ樹脂からの溶出と仮定し、過剰の試薬を  $N_2$  で留去して測定したところ、試薬ブランクは全く検出されなくなった。

以上の結果に基づき、キーパーとしてドデカンを入れて作成した検量線は、直線性を示し、検量線の 0 には、BPA ブランクは観測されなかった (Fig.14)。

#### C.4 検量線・検出限界

BPA 及び BPA- $d_{16}$  の検量線 (Fig. 17) は、少なくとも 100 ng/ml (0.1 ng/ $1\mu$ l 注入量) まで良好な直線性を示した。BPA- $d_{16}$  100 ng/ml (0.1 ng/ $1\mu$ l 注入量) を加えて作成した、BPA の検量線 (Fig. 18) も良好な直線性を示し、寄与率  $r=0.9999$  と良好であった。検出限界 ( $S/N=3$ ) は、0.5 ng/ml (0.5 pg/ $1\mu$ l 注入量) の BPA を用いて得たクロマトグラム (Fig.19) より、0.2 ng/ml (0.2 pg/ $1\mu$ l 注入量、0.1 ng/ml 試料) とした。この感度はエチル誘導体化 GC-MS 法に匹敵する。

#### C.5 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.5.1 定量操作-1

試料 2 ml に、BPA- $d_{16}$  を 100ng 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、 $C_{18}$  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、ジクロロメタン画分を、1M NaOH、2 ml ついで 1 ml で抽出した。得られた水層を 1 M HCl (10% NaCl) で酸性にし、ジクロロメタン 2 ml、ついで 1 ml で抽出した。ジクロロメタン層を  $Na_2SO_4$  で脱水後、 $N_2$  気流下溶媒を留去し、残渣を誘導体化操作に従い TMS 化し GC-MS 分析する。

##### C.5.2 定量操作-2

試料 2 ml に、BPA- $d_{16}$  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、 $C_{18}$  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 6ml で溶出した。MeOH 画分を、 $N_2$  気流下溶媒を留去し、残渣にジクロロメタン 5 ml 加え、十分振とうし溶解した。このジクロロメタン溶液を、1M NaOH、2 ml

ついで 1 ml で抽出した。得られた水層を 1 M HCl (10% NaCl) で酸性にし、ジクロロメタン 2 ml、ついで 1 ml で抽出した。ジクロロメタン層を  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で脱水後、 $\text{N}_2$  気流下溶媒を留去し、残渣を誘導体化操作に従い TMS 化し GC-MS 分析した。

#### C.5.3 クロマトグラム

操作-1 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. 20 及び Fig. 21 に示す。血清においては、0.2 ng/ml の BPA が観測され、血清成分由来のピークは観測されなかった。このときの操作ブランクは (Fig. 22) 0.2 ng/ml で、操作ブランクによる物と考えられる。一方母乳においては、BPA の溶出位置に母乳由来のピークが観測され、本定量条件での BPA 測定は不可能であった。

#### C.5.4 回収率

ヒト血清及び母乳に 50 ng/ml の濃度で BPA を添加し、その回収率を算出したところ、Table 4 に示すように 150 % の値を示した。血清のロットを変えて測定したところ、188 % と変化した。また、水に 50 ng/ml 添加した最終溶液を、ジクロロメタン及び血清を処理して得られる溶液で 2 倍希釈し、BPA を測定したところ、血清のマトリックスが存在する溶液で希釈した溶液は、ジクロロメタンで希釈した溶液の約 1.5 倍のピーク面積値を示した。以上の結果により、試料最終溶液に生体試料由来の多量の

夾雑物質が存在し、それらの影響で標準系に比べて 1.5 倍の値を示すことが考えられる。これらのマトリックスの影響は、より精製効果の高いと考えられる操作-2 を用いても改善されなかった。

#### D. 結論

誘導体化試薬 BSTFA を用いる、ヒト体液中の BPA の TMS 誘導体化 GC-MS 法を開発した。試薬ブランクの原因を詳細に検討し、過剰な試薬を  $\text{N}_2$  パージで除去することにより、試薬ブランクの完全除去に成功した。

本法は (1) 比較的高感度で 0.1 ng/ml 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。この感度及び操作性は、エチル誘導体化法に匹敵する。しかし、本法を血清及び母乳の生体試料に応用を検討したところ、試料最終溶液中に夾雑する多量の物質のために、回収率が 150 から 180% となり、本法の応用は不可能であった。

本法は極めて高感度かつ簡便な方法である。しかし血清や母乳のように多量の夾雑物が存在する試料中の BPA を精度よく測定することは不向きであった。それ故、本法は比較的夾雑物が少ない試料中 BPA の、高感度かつ正確な測定に有用と思われる。