

内分泌かく乱化学物質に関する生体試料（臍帯血等）分析法の開発とその実試料分析結果に基づくヒト健康影響についての研究

ビスフェノール A の高感度分析法の開発と生体への応用に関する研究

主任研究者： 牧野 恒久  
東海大学  
分担研究者： 中澤 裕之  
星薬科大学

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。従って、食品や生活環境などから BPA がヒトへ暴露される可能性も十分に考えられる。しかし生体内では極めて微量で存在する BPA の高感度かつ迅速な分析法の開発が要求されている。今回、前処理に固相抽出法、検出にはガスクロマトグラフィー／質量分析法 (GC/MS) を用いた高感度分析法を開発し、ヒト血清等の生体試料へ応用した。BPA の検出方法として、BPA を臭化ペンタフロロベンジル (PFBBr) によりアルキル化して、ペンタフロロベンジルービスフェノール A (PFB-BPA) に誘導体化した。これを生体成分に対して影響が少ない GC/MS のネガティブモードで検出を行った。本法による PFB-BPA の保持時間は 26.6 分であった。その定量範囲は 0.01~100ng/mL までの広範囲なダイナミックレンジで測定でき、相関係数は 0.998 と良好であった。また、検出限界は S/N=3 で 0.005ng/mL で、繰り返し分析精度は 1 及び 0.1ng/mL で 4.76、5.42%と良好であった。10ng/mL の BPA 標準溶液を添加して、その添加回収試験を実施したところ、ヒト血清では 98.5%、コントロール血清では 100.9%と良好な結果が得られた。

A. 研究目的

ビスフェノール A (BPA) は、1936 年 Dodds らによりホルモン様作用のあることが指摘され、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ている。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。BPA はポリカーボネート樹脂、エポキシ樹脂の原材料として広く用いられている。我々の身の回りにおいてソフトドリンクや水の容器、ほ乳瓶、給食用食器や歯科治療用充填材の高分子素材などに利用されており、需要も増えている。このように使用量の多いビスフェノール A の環境中での動態、生態系への影響についてはまだよく知られていない。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、プラスチック原料由来の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。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も考えられ、バックグラウンドが重要な要因となる。

BPA の微量分析法として多くの分析法が検討されており、BPA を直接ガスクロマトグラフィーにより測定する方法、TMS 誘導体化後ガスクロマトグラフィー／質量分析法 (GC/MS) で測定する方法がある。また、液体クロマトグラフ (HPLC) 法では吸光度検出器、蛍光検出器、電気化学検出器及び質量分析などの報告がある。しかし、これらの方法では生体中の微量の BPA を測

定するには、バックグラウンドや検出感度において問題がある。また BPA は生体内で一部代謝されており、その代謝物の分析することは重要である。

そこで、BPA を PFBBBr によりアルキル化して、ペンタフロロベンジルービスフェノール A (PFB-BPA) に誘導体化した。これを生体成分に対して影響が少ない GC/MS のネガティブモードで測定する方法を検討した。

## B. 研究方法

BPA の標準試薬及び内標準として用いた  $^{13}\text{C}$  ラベル化 BPA は Cambridge Isotope Laboratories Inc 製を使用した。抽出、洗浄に用いた有機溶媒であるアセトンは JT Baker、ヘキサン及びメタノールは B&J Brand、イソオクタンは Mallinckrodt Chemical、ジクロロメタンは Caledon Laboratories 製をそれぞれ用いた。水は市販の精製水 (Caledon Laboratories 製) を  $\text{C}_{18}$  固相抽出カラムの Baker Bond SPE  $\text{C}_{18}$  (J.T. Baker) で処理して用いた。PFB 化剤として用いた Pentafluorobenzyl bromide (PFBBBr) は SUPELCO のものを用いた。BPA 標準液はメタノールに溶解して調製し、実験に供した。

ガスクロマトグラフ/質量分析装置 (GC/MS) はヒューレットパッカード社製 HP5973 型、オートサンプラーは HP7683 を用いた。分離カラムは DB-5(J&W scientific 0.25mm i.d. x 30 m thickness:0.25  $\mu\text{m}$ ) を用いた。

固相抽出用のカートリッジは、J.T. Baker 製の Baker Bond SPE  $\text{C}_{18}$  (wide-mouth, 500mg) を用いた。固相処理操作には、SUPELCO 製 Extractor :Visiprep を用いた。濃縮装置は Zymark 製の Turbo Vap LV evaporator を用いた。また、実験に用いるガラス器具はすべてアセトン及びヘキサン洗浄して用いた。

BPA のペンタフロロベンジル化 (PFB 化) は PFBBBr を用いて行った。BPA 標準溶液 0.5mL にジクロロメタン 0.5mL、0.1M 硫酸水素テトラブチルアンモニウム 0.5mL、0.2M 水酸化ナトリウム 0.5mL 及び PFBBBr 試薬 20  $\mu\text{L}$  を加え、室温で攪拌しながら 20

分間反応させる。この溶液にイソオクタン 1mL を加えて攪拌後、窒素気流下で蒸発乾固させる。さらにイソオクタン 0.5mL を加えて GC/MS の NCI モードで分析を行った。

## C. 研究結果

### PFBBBr による反応生成物の同定

PFBBBr 試薬による BPA の PFB 化を試み、10ng/mL BPA 標準溶液を用いて GC/MS により測定した。反応生成物のピークが 26.59 分にみられ、このピークのマススペクトルを確認したところ、 $m/z:407$  に  $\text{M}^-$  の分子イオンピークが認められたことから、本反応による生成物は、BPA の OH 基の 1 つが PFBBBr によりアルキル化して PFB-BPA (MW:407) を生じたことが確認された。その結果、他の物質との妨害の影響なく分離が可能であった。

### PFBBBr による反応生成物の同定

50ng/mL BPA 標準溶液にジクロロメタン、硫酸水素テトラブチルアンモニウム、水酸化ナトリウム及び PFBBBr (以上 4 種を PFB 化試薬) を加えて反応させた。その反応溶液に各種有機溶媒を 1mL 添加した場合の PFB-BPA の生成量について検討した。さらに蒸発乾固後に各種有機溶媒を添加し、その PFB-BPA の抽出効果についても検討し、その有機溶媒の組み合わせ効果について検討した。その結果、イソオクタン/イソオクタンの抽出溶媒の組み合わせが最もよかった。これは BPA が水相のアルカリ条件下でテトラブチルアンモニウムとイオン対を生成してイオンペア反応生成物を生成する。この生成物はメタノールよりもイソオクタンに抽出されやすいものと考えられる。さらに、この反応生成物が有機相へ移行して PFBBBr と反応して PFB-BPA を生じる。この PFB-BPA はジクロロメタンやヘキサンよりもイソオクタンに抽出されやすいと考えられる。また、PFB 化試薬と同時にイソオクタン 1mL 加えて反応させた場合と反応後にイソオクタンを加えた場合を比較した結果、反応後イソオクタン加えた方が 9.4 倍増加した。

### PFBBBr に対するイソオクタン添加量の検討

50ng/mL BPA 標準溶液に PFB 化試薬を加えて反応後、イソオクタン添加量について検討した。その結果、イソオクタン 1mL の添加が最もよい結果が得られた。またイソオクタンを全く添加しない場合に比べて 430 倍の差が認められた。これは、水相と有機相の界面での平衡状態において、BPA とテトラブチルアンモニウムとのイオンペア生成物がイソオクタン 1mL の添加で最も有機相へ移動しやすくなったものと考えられる。

#### PFB 化剤の調製における水の影響

PFB 化試薬として使用している 0.1M 硫酸水素テトラブチルアンモニウム及び 0.2M 水酸化ナトリウムの調製には水溶媒を用いている。今回、その水溶媒として、市販の HPLC 用水とイオン交換水及び予め C<sub>18</sub> カートリッジ処理した水 (SPE 処理水) をそれぞれ試薬調製に用いて PFB-BPA の分析法を検討した。その結果、SPE 処理水は市販の水及びイオン交換水と比較して約 18 倍の差がみられた。これは、市販の水、及びイオン交換水は処理過程で高分子フィルターを使用しているため、BPA がコンタミネーションしたものと考えられる。従って、以後使用する水は全て SPE 処理した水を用いることとした。

#### PFB-BPA の検量線及び検出限界

BPA 標準溶液を 0.01~100ng/mL に調製して、PFB 化試薬を加えて生成した PFB-BPA について検量線を作成した。その結果、0.01~100ng/mL に対して良好な相関性 ( $r^2=0.998$ ) が認められ、またそのダイナミックレンジも広範囲であった。また本法の検出限界は 5pg/mL (絶対量として 10 fg) であった。1ng/mL 及び 0.1ng/mL PBA 標準溶液を用いて再現性を検討した結果、それぞれ 4.76、5.42% (n=5) と良好の結果が得られた。

#### 血清の SPE 処理の検討

生体試料としては、ヒト血清を使用した。血清 1mL に 32%ギ酸溶液 1mL を加え、5 分間超音波処理を行った後、C<sub>18</sub> カートリッジ (500mg) 及びフロリジルの固相抽出法 (SPE) で試料のクリーンアップを検討し

た。C<sub>18</sub> 固相カートリッジは予め、エタノール 15mL 及び水 3mL を用いて処理し、フロリジルは 15%のエチルエーテル/石油エーテル 5mL、メタノール 10mL で処理した。その結果、C<sub>18</sub> カートリッジによる SPE 処理後、C<sub>18</sub> カラムでろ過したもので最もよい回収率が得られた。次に、SPE 処理での BPA のメタノールによる溶出効果について検討した結果、メタノール量の増加に伴い、BPA の溶出量も増加し 8mL 以上では変化がみられなかった。

#### 添加回収率

ヒト血清及びコントロール血清に 10ng/mL の BPA 標準溶液を添加した結果、BPA のピークは他の成分とよい分離が得られた。また 10ng/mL BPA 添加の回収率を求めた結果、ヒト血清では 98.5% (n=5)、コントロール血清では 100.9% (n=5)、1ng/mL BPA 添加では 101.0% とそれぞれ良好な結果が得られた。なお、ヒト血清及びコントロールの BPA 含量はそれぞれ、0.79、4.46ng/mL であった。

#### D. 考察

従来から用いられている BPA 及び TMS 化した BPA の定量法について検討を行ったが、検出感度が 20ng/mL 及び 50ng/mL であり、改良すれば感度の上昇が望めるが生体成分中の微量の BPA 測定には難しいと考えられる。

生体成分を分析する場合、GC/MS は非常に有効であるが、バックグラウンドも問題となる。本来、感度の面からでは MS は EI 検出で行った方がよいが、バックグラウンドを考慮に入れて、NCI モードで行った。また、そのためには BPA をハロゲン誘導体化する必要があるため、PFBBBr 試薬を用いてその誘導体化を試みた。その結果、PFB-BPA による分析法は、非常に高感度であり、また選択性、再現性にすぐれており、生体成分に BPA 分析法として最適であった。

BPA の PFB 化の反応は単純ではなくて、BPA とイオンペア試薬との反応物が水相/有機相の平衡状態で移動が行われるため、その有機相と水相の量など大きなファクターとなる。今回、有機溶媒としてイソオク

タンを用いて、その BPA イオンペア反応物がイソオクタン添加により抽出効果に大きな影響を与えて、高感度分析が可能になった。

しかし、高感度分析において、バックグラウンドが問題となることが多い。器具や試薬等のコンタミネーションが大きな障害となるが、今回、試薬調製用の水からも BPA が検出され、定量分析に大きな影響を与えた。しかし C<sub>18</sub>SPE カートリッジを用いることにより、バックグラウンドレベルまで抑制することができた。

本法をヒト血清試料に応用し、その回収率を測定した結果、良好な回収率が得られ、種々の生体試料中の BPA 分析に有効であると考えられる。

## E. 結論

BPA の検出方法として、BPA を PFBB<sub>r</sub>によりアルキル化して、PFB-BPA に誘導体化した。これを生体成分に対して影響が少ない GC/MS の NCI モードで検出を行った。本法による PFB-BPA の保持時間は 26.6 分であった。その定量範囲は 0.01~100ng/mL までの広範囲なダイナミックレンジで測定でき ( $r^2=0.998$ ) と良好であった。また、検出限界は 0.005ng/mL ( $s/n=3$ ) で、繰り返し分析精度は 1 及び 0.1ng/mL で 4.76、5.42% と良好であった。10ng/mL の BPA 標準溶液を添加して、その添加回収率を求めた。その結果、ヒト血清では 98.5% ( $n=5$ )、コントロール血清では 100.9% ( $n=5$ ) と良好な結果が得られた。

## F. 研究業績

学会発表

1. Analysis of endocrine disruptors derives from the polymer materials in the biological specimen : Yoshihiro Yoshimura, Kayoko Kato, Koichi Inoue, Isao Yajima, Hiroyuki Nakazawa,

PITTCON 2000, March, 2000, New Orleans, USA

2. 蛍光誘導体化 HPLC による生体試料中ビスフェノール A の分析: 中澤裕之、山本博史、井之上浩一、加藤嘉代子、渡辺卓穂、吉村吉博、黒田直敬、中島憲一郎、牧野恒久、第 2 回日本内分泌攪乱化学物質学会、p20、1999 年、神戸
3. 生活関連物質の E-Screen Assay による評価: 山口晃子、山崎聖美、坂部 貢、中澤裕之、第 2 回日本内分泌攪乱化学物質学会、p69、1999 年、神戸
4. 内分泌攪乱化学物質の分析を取り巻く課題: 中澤裕之、第 25 回環境トキシコロジーシンポジウム・第 3 回衛生薬学フォーラム合同大会、p21、1999 年、愛知
5. 内分泌攪乱化学物質と分析化学: 中澤裕之、第 43 回日本薬学会関東支部大会、p28、1999 年、東京
6. 生体試料中におけるビスフェノール A の高感度分析の開発: 井之上浩一、宮島裕子、加藤嘉代子、吉村吉博、中澤裕之、鈴木 勉、日本分析化学会 第 48 年会、p77、1999 年、神戸
7. 電気化学検出高速液体クロマトグラフィー (ECD/HPLC) によるビスフェノール A の高感度分析: 井之上浩一、佐々木春美、加藤嘉代子、渡辺卓穂、吉村吉博、中澤裕之、本郷敏雄、堀江正一、第 119 年会日本薬学会、p77、1999 年、徳島