

平成11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HPLC-蛍光および化学発光定量法の開発

主任研究者 牧野 恒久
東海大学医学部
分担研究者 中澤 裕之
星薬科大学
研究協力者 中島憲一郎
黒田 直敬
長崎大学薬学部

研究要旨

血液中のビスフェノールA (BPA)の高感度で高精度な測定法の開発を目的として、フェノール類やアミン類の選択的な蛍光ラベル化試薬である、4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl)benzoyl chloride (DIB-Cl)を用いた、HPLC-蛍光および化学発光検出定量法を検討した。その結果、検出下限がHPLC-蛍光法では0.05 ppb (S/N=3)、過シュウ酸エステル化学発光法では0.38 ppb (S/N=3)の感度を有する計測法を開発することができた。ウサギの添加血漿を用いてHPLC-蛍光法を検討したところ、回収率95%前後、定量下限1 ppbであり、生体試料への適用が可能であることが分かった。

A. 研究目的

ビスフェノールA (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使用されているが、内分泌かく乱作用が疑われている。BPAはポリカーボネート製の容器、包装品、歯科のシーラント剤、缶詰内部の保護膜などから、飲料水や食物などを經由して極微量の生体に取り込まれることが考えられる。内分泌かく乱作用は、

動物実験の結果、極微量のBPA(25 nM, 6 ppb)でも発現するため、その作用や人体曝露量あるいは体内動態を明らかにするには、血液などの生体試料中のBPAを高感度に測定する方法が不可欠となる。本研究では、研究協力者らが開発した、フェノール類やアミン類に選択的な蛍光ラベル化試薬、DIB-Clを用いてBPAを蛍光ラベル化後、HPLC-蛍光あるいは化学発光検出する方法

を検討した。また、プラスチックなどに由来する BPA などの微量の化学物質が生活環境中にも多く存在し、高いバックグラウンド値に反映するため、これらのバックグラウンドを排除するための検討を行う必要がある。そこで、固相抽出によるクリーンアップを試みた。

B. 研究方法

定量方法 今回、DIB-BPA 誘導体の定量には蛍光検出と化学発光検出の2つのシステムを検討した。

1) HPLC-蛍光定量法

BPA のアセトニトリル溶液 200 μL に 1.5 % トリエチルアミンを含む、15 mM の DIB-C1 アセトニトリル溶液 200 μL を加え、室温、10 分間反応させた。これに、溶離液 400 μL を加え、室温 30 min 放置後、HPLC に注入した。分離カラムに YMC 製 YMC-Pack Pro C18 (250x4.6 mm I.D., 5 μm)、溶離液はアセトニトリル/H₂O/MeOH=60:6:34, v/v/v) を用い、島津 LC10Adv ポンプで 1.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ の速度で送液した。試料は 5 μL を注入し、島津 RF-10AXL 検出器により、励起波長 340 nm、蛍光波長 470 nm で検出した。

2) HPLC-過シュウ酸エステル化学発光検出法

BPA のアセトニトリル溶液 100 μL に 10 mM の DIB-C1 アセトニトリル溶液 10 μL および 30% トリエチルアミンのアセトニトリル溶液 5 μL を加え、室温 20 min 反応させた。得られた溶液を ODS カートリッジに負

荷し、70%アセトニトリル水溶液 5 mL で洗浄後、300 μL のアセトニトリルで溶出し、得られた溶液を HPLC に注入した。分離カラムはダイソー製の Daisopack-SP-120-5-ODS (250x4.6 mm I.D., 5 μm)、溶離液にはアセトニトリル/40 mM Imidazole-HNO₃ buffer (pH 7.0)=83:17(v/v) を使用し、島津 LC10Adv ポンプにより、1 mL/min で送液した。試料は 5 μL を注入した。ポストカラム化学発光試薬は 0.6 mM TDPO と 25 mM 過酸化水素のアセトニトリル混合溶液を使用し、LC10Adv ポンプを用いて、1.0 μL の速度で送液した。

C. 研究結果

HPLC-蛍光定量法 標準溶液を用いて得られたクロマトグラム上で、DIB-BPA ピークの保持時間は約 16 min であり、試薬の妨害ピークの影響は見られなかった。検量線を作成したところ、0.1~50 ppb の濃度範囲でピーク面積および高さとの間に良好な直線関係 ($r \geq 0.999$) が得られた。検出下限は 0.05 ppb (S/N=3) と非常に高感度であった。また、くり返し測定の精度は 10 ppb および 50 ppb でピーク面積、高さともに RSD が約 5% と良好な結果を得た。

実試料への適用性を調べる目的でウサギ血漿に添加した BPA の測定を試みた。血漿 1 mL を除タンパク後、固相抽出 (Waters Oasis HLB) により BPA を抽出する clean-up を行い、バックグラウンドの減少を図った。抽出液は窒素気流下、乾固し、アセトニト

リルに再溶解して蛍光ラベル化に付した。過剰量の未反応試薬は Sep-pak C18 カートリッジを通じて除去し、ろ液を HPLC に注入した。BPA を 1 および 10 ppb, ウサギ血漿に添加した場合の回収率はいずれも 4 回の測定で平均 95%前後であり (RSD<5%), 検出下限も 1 ppb と良好な結果を得た。

HPLC-化学発光定量法 標準溶液を用いて得られたクロマトグラムで, DIB-BPA のピーク保持時間は約 48 min であった。過シュウ酸エステル化学発光反応により得られる試薬ブランク由来のピークが DIB-BPA の分離を妨害したため, 固相抽出による未反応試薬の除去を検討した。その結果, ODS カートリッジ (ODS-A, 50 μ m, 100 mg, Daiso) を用いた場合, 先の操作法に記載した条件で抽出すると, 最も効果的に試薬を除去することができた。ここでの, clean-up 操作を行った場合の DIB-BPA の回収率は約 60% であった。

標準溶液を用いて検量線を作成したところ, 0.56~22.7 ppb の範囲で良好な直線性 ($r=0.996$) が得られ, $S/N=3$ における検出下限は 0.38 ppb であった。

本法を市販のポリカーボネート製ほ乳びんから溶出する BPA の定量に適用した。ほ乳びんに 95°C のお湯 100 μ l を加え, 同温度で 30 min 恒温室に放置後, 溶出した BPA を定量した。検討した 2 種類のほ乳びんから, 0.53 および 0.74 ppb の BPA が検出さ

れた。なお, 2 度目の溶出操作では検出されたものの, 検出下限値以下であった。

D. 考察

蛍光ラベル化試薬, DIB-Cl を用いて BPA を蛍光誘導体に導いた後, カラム分離し, 蛍光あるいは過シュウ酸エステル化学発光検出する BPA の HPLC 定量法を検討した。いずれの方法も非常に高感度であり, 特に蛍光検出法では 0.05 ppb を検出することができた。蛍光検出法を用いて, ウサギ血漿中の BPA 定量を検討した結果, 感度も十分であり, この方法がヒト血漿の定量に十分応用できることが示唆されたことで, 現在, ヒト血漿試料中の BPA 定量に取り組んでいる。一方, 化学発光検出法は蛍光法に及ばないものの, 0.38 ppb が検出可能であり, ほ乳びんから溶出する BPA の検出に利用することが可能であった。ただし, 試薬由来の妨害ピークを除去することが必要であり, これはまた, 感度の低下を来すことになった。そこで, カラムスイッチング法などを取り入れ, より効率的なバックグラウンド除去方法の検討が必要である。同時に, 分析時間の短縮のため, 分離時間を再検討することも考慮したい。

E. 結論

BPA の高感度 HPLC-蛍光および化学発光検出定量法を開発した。それぞれ, 0.05, 0.38 ppb の BPA が検出可能であり, 基礎検討の結果, ヒト血漿など生体試料中の微量

BPAの定量に適用できる可能性が示された。現在、clean-up法の再検討や、カラムスイッチング法の導入、マイクロカラムの使用などの検討を行っているが、良好な結果が得られており、実試料への適用を十分図ることができるものとする。

F. 研究業績

学会発表

1. 孫艶, 和田光弘, 黒田直敬, 中嶋弥穂子, 高橋正克, 中島憲一郎: HPLC-過シュウ酸エステル化学発光検出によるほ乳びん中ビスフェノールAの定量, 第16回日本薬学会九州支部大会, 2B-11, 1999, 長崎.
2. 中島憲一郎, 孫艶, オサマ・アルデハ

シ, 和田光弘, 黒田直敬, 中澤裕之, 牧野恒久: 生体試料中のビスフェノールAの高感度分析法の開発に関する基礎研究, 第10回日本臨床化学会九州支部総会, 9, 2000, 福岡.

3. 孫艶, Al-Dirbashi Osama, 和田光弘, 黒田直敬, 中島憲一郎, 中澤裕之, 牧野恒久: カラムスイッチングを利用するビスフェノールAのセミマイクロHPLC蛍光計測, 日本薬学会第120年会, 31[PF]10-03, 2000, 岐阜.