

ビスフェノールAの塩素処理による反応生成物の同定とエストロゲン様作用の評価

国立公衆衛生院水道工学部 相澤 貴子、大久保慎二、国包章一
北京大学 胡建英

1. はじめに

昨年度、水道水を対象に実施した33種類の内分泌攪乱化学物質実態調査において検出された物質は主としてフェノール化合物であった。また、水道用資機材からの溶出試験においてもフェノール化合物が溶出することが確認された。フェノール化合物は化学反応性が高い特性があることから、水道におけるフェノール化合物が引き起こす内分泌攪乱作用を正確に評価し、制御するには、塩素処理による反応生成物を同定し、そのエストロゲン様活性の寄与を考慮しなければならない。

反応生成物の同定にはGC/MS法やLC/MS法等の分析手段が用いられているが、反応メカニズムが明らかにされていない反応では、これらの分析手段のみではすべての副生成物を同定するには多大な時間を要する。水道の塩素処理副生成物の生成メカニズム解明では、フェノール類と塩素との反応経路がモデルとなって研究されているケースが多いが、これらの反応メカニズムに関する研究は簡単な構造のフェノール類が扱われている。ビスフェノールAのような若干複雑な構造では、フェノール類と塩素との反応メカニズムは明らかにされておらず、GC/MS法やLC/MS法のみでは完全な塩素分解生成物の同定は不可能であり、LC/NMR法などの導入も必要になってくる。

一方、有機合成分野で化学反応経路を予測するには分子軌道法がよく使われている。分子軌道法は有機反応化学を“経験則”から脱却させ、有機反応を統一的に理解することができる。環境分野では処理プロセスや環境中における化学物質の分解経路に関する研究も実験に基づく経験則で論議されており、分子軌道法の応用は殆ど行われていないのが現状である。

上記の背景に踏まえて、本研究では水道原水からの検出頻度が高いビスフェノールAをモデル物質とし、塩素との反応メカニズムを理論計算から推定し、LC/MSによる塩素処理分解物の測定結果に基づき理論値と実験値を比較、解釈することとした。また、ビスフェノールAの塩素処理によってエストロゲン様活性が変化する可能性があるため、エストロゲンレセプター結合活性で評価することとした。

2. 実験方法

2.1 反応経路に関する計算方法

ビスフェノールAと塩素との反応解析に必要な部分電荷、HOMO軌道密度、分子軌道エネルギー、最適化構造、反応座標、振動スペクトル(IR)は半経験分子軌道法プログラムのCACHÉ MOPAC(CACHÉ Scientific社)のPM3ハミルトニアンを用いて得られた。

2.2 塩素処理条件

BPA 濃度が 0.5mg/L、リン酸緩衝液で pH 7.5 に調製した試料水 (7L) から 1L を反応前の試料水として採取した。その後、試料水に塩素濃度が 1.46mg/L になるように塩素水を添加し、25°C 一定で反応を開始させた。反応開始 10、30、60 分後に反応液を各 1L 採取した後、残留塩素を消去した。反応前及び後の試料は SPE-GLF 固相カートリッジ (GLF、横河アナリティカルシステムズ製) に通水し、ジクロロメタンで抽出し、溶媒を窒素パーズにより完全除去した後、DMSO で 0.1mL までメスアップした。調製した試料の一部はエストロゲンレセプター結合アッセイ試験 (Full-Range Beacon 2000, PanVera 社) に、2 μ L は LC/MS 分析用に供した。

2.3 LC/MS 分析条件

本実験で使用した LC/MS は APCI を取り付けた日立 M-1200H 型、LC は日立 L-6200 型ポンプを用いた。分離カラムはシリカ充填 CAPCELL PAK C18UG120 S3 (4.6mm x 150mm, 粒子径 3 μ m, 資生堂社製) を用いた。標準試料の注入量は 2 μ L で、流速は 1mL/min に設定して負イオンモードで測定を行った。

溶離液はアセニトリル-0.1% 酢酸水溶液を実験に供した。

MS 測定条件: SIM と Scan モードのスイッチングレートは 20.033amu/s ; 分解能: 48 ; 測定マス幅: 150-550amu ; 霧化温度: 180 ° C ; 脱溶媒温度: 400 ° C ; ドリフト電圧: 80V

溶離液条件: 0.1% 酢酸の割合を最初の 80% から 17 分後に 50%、55 分に 45%、60 分に 40% を変化させるグラジエント条件を用いた。

2.4 蛍光偏光度法によるエストロゲンレセプター結合アッセイ

エストロゲンレセプター結合アッセイは EDC Assay Kit (宝酒造社製) を用いた。蛍光偏光度法の測定は、蛍光偏光度測定システム Full-Range Beacon 2000 (Pan Vera 社製) を用い、360nm の励起波長と 530nm の蛍光波長を用いて測定を行った。

48 μ L の 10mM スクリーニング緩衝液の中で 2 μ L の DMSO 標準試料を加え、エストロゲン受容体と蛍光エストロゲン物質との複合体を 50 μ L 添加して、室温で競合反応させた。1 時間放置後に反応系の蛍光偏光度を測定し、蛍光偏光度と化学物質添加濃度との関係から対象物質のエストロゲン受容体結合活性を測定した。

3. 実験結果および考察

3.1 LC/MS 法による副生成物の同定

ビスフェノール A を塩素との反応 10 分後の LC/MS 法で測定したときのクロマトグラムを図 1 に示す。クロマトグラム上には数多くのピークが現れた。表 1 は反応時間毎の各ピークに対応したマススペクトルをまとめた。表 1 から A、C、E と G の四つのピークはビスフェノール A の塩素置換数それぞれ 1、2、3、4 に相当すると推測できるが、マススペクトルから塩素の置換位置を決めることは困難であった。その他のピークは明らかにビスフェノール A の塩素置換物ではなく、文献報告から副反応によるフェノールの二量体の可能性が高いと推測できるが、その構造は表 1 の情報だけでは特定できなかった。

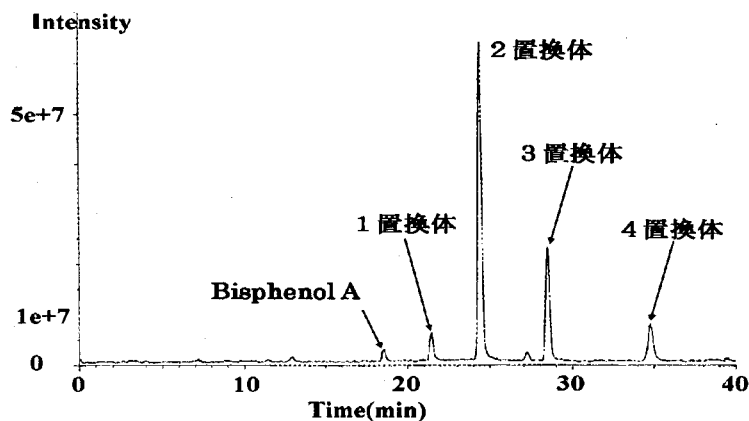


図-1 BPAの塩素処理試料のLC/MSクロマトグラム（反応時間10分後）

	保持時間	m/z(%相対強度、RI)		
		10min	30min	60min
A	21.31	261(100)	—	—
B	22.71	311(100),295(70)	311(100),293(65)	313(100),295(65)
C	24.59	295(100)	295(100)	295(100)
D	26.0	278(100)	278(100)	278(100)
E	28.5	331(100)	331(100)	331(100)
F	29.49	381(100),363(60)	381(100),363(60)	381(100),363(60)
G	34.72	365(100)	365(100)	365(100)
H	51.2	421(100),457(100)	491(100),455(20), 331(100)	491(100),455(20), 331(20)
I	60.38	457(100)	457(100)	457(100)
J	63.5		357(100)	357(100)
K	65.1		525(100)	525(100)

表-1 ビスフェノールAの塩素反応生成物のLC/MSスペクトル

3. 2 分子軌道法による反応経路解析

3. 2. 1 塩素置換反応経路解析

前記のようにLC/MSのみで反応生成物の同定には情報が乏しく、困難な場合が多い。そのため、ビスフェノールAと塩素との反応経路の解析を分子軌道法により推定した。

まずビスフェノールAについての計算結果を述べる。キーワードESPを用いて静電ポテンシャル電荷を求め、水素原子以外のベンゼン環上の炭素原子の値を比較した(図-2)。図-2のように、電荷が支配する反応の場合、ビスフェノールAのC4またはC19原子

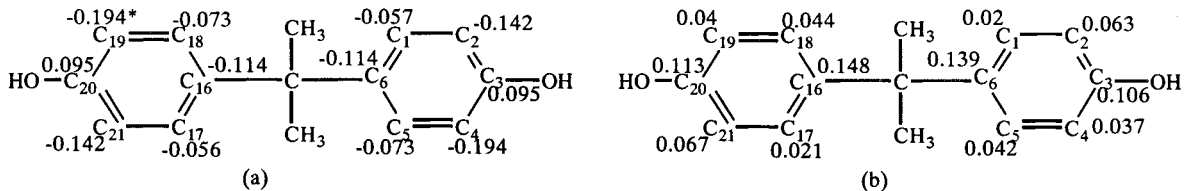


図-2 ビスフェノールAの静電ポテンシャル電荷(各原子の部分電荷)(a)、およびHOMO密度(b)

の静電ポテンシャル電荷が最も負の値が大きく、塩素分子における正電荷をもつCl原子の求電子を最も受けやすいと考えられる。一方、HOMO(最高被占軌道エネルギー)におけるビスフェノールAの各原子の密度を図-2(b)に示した。各原子のHOMO密度を比較すると、図-2(b)に示したようにC6またはC16原子で最も大きくなっており、求電子攻撃を受けやすいと考えられる。従って、塩素がベンゼン環の置換位置を決めるには、塩素とビスフェノールAとの反応は分子軌道的な反応か、それとも静電ポテンシャルを見るべきかを決めなければならない。そのためには、塩素置換反応の遷移状態を求め、活性化エネルギーの大きさを比較する必要がある。

まず、C2に塩素原子の攻撃を受けた生成物を最適化し、図-3の様な構造を得た。この構造をもとに図に示したCとC1原子距離を縮小する方向(結合する方向)に変化させてポテンシャル曲線を描くと図-4に示したようになり、両原子の距離が3.6Åの時の構造が遷移状態に近いと考えられた。続いて、CとC1距離が3.7Åの構造をもとに、キーワードTSを用いて遷移状態の構造を最適化した。得られた遷移状態の振動解析をキーワードFORCEを用いて行った結果、虚の振動数一つが得られた。得

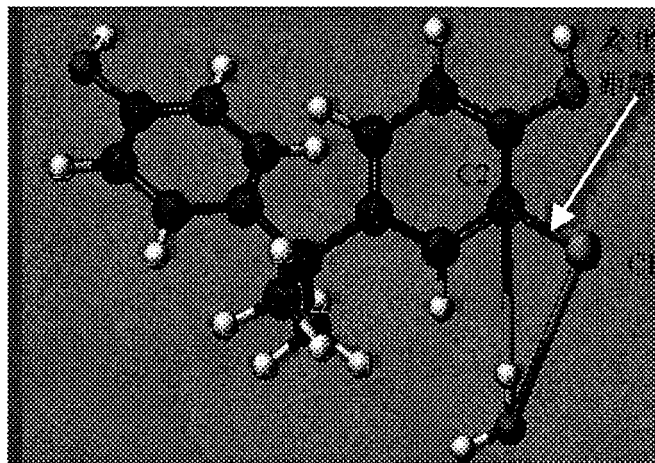


図-3 C2に塩素攻撃を受けた生成物の構造と変化した距離

られた遷移状態のIRC計算を行った結果、反応原系と生成系が得られ、その活性化エネルギーは0.08kcal/molであった。

これと比較するために、HOMO密度がC2より高く、部分電荷がC2より負から遠いC6位置の塩素置換反応の遷移状態のIRC計算を行った。図-5はC6に塩素原子の攻撃を受けた生成物を最適化したもので、この構造をもとに図に示したC6とCl原子距離を1.7から2.5と伸ばす方向（結合が切れる方向）に変化させ

ポテンシャル曲線を得た。遷移状態に近い構造をもとにIRC計算を行うと、図-6に示したような反応原系と生成系が得られた。図-6より反応活性化エネルギーは0.04kcal/molで、上記反応より倍近く高くなっている。その結果から、ビスフェノールAベンゼン環への置換は分子軌道反応に基づく反応が支配的であると示唆された。しかしながら、C6への置換反応が立体障害を受けるために、反応速度は必ずしもC2への置換反応より早いと断言できず、立体効果を考慮する必要がある。

上記計算から、塩素とビスフェノールAとの反応で最初に生成される生成物は図8-1に示した反応経路のうちの(1)モノクロロビスフェノールA、(2)モノクロロフェノール、(3)p-ヒドロキシフェニルプロパノールである。

この三種類の生成物は塩素とさらに反応し、新たな生成物が形成される。どのような反応生成物が形成されるかを検討するために、モノクロロビスフェノールA(1)の静電ポテンシャルとHOMO密度を計算し、図-7に示した。図のようにビスフェノールAと同様に分子軌道反応が支配的な場合には、塩素原子がHOMO密度が高いC6またはC5に優先的に攻撃すると考えられる。その他の原子のHOMO密度がとても低いため、LC/MS法で

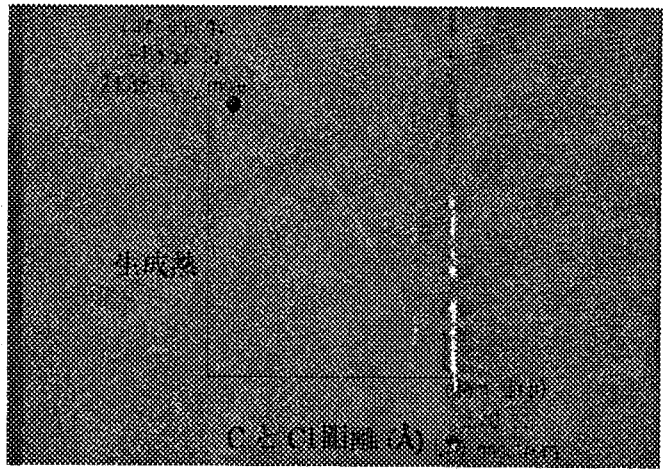


図-4 C2とCl距離を変化させた場合のポテンシャル曲線 (Minimum energy path)

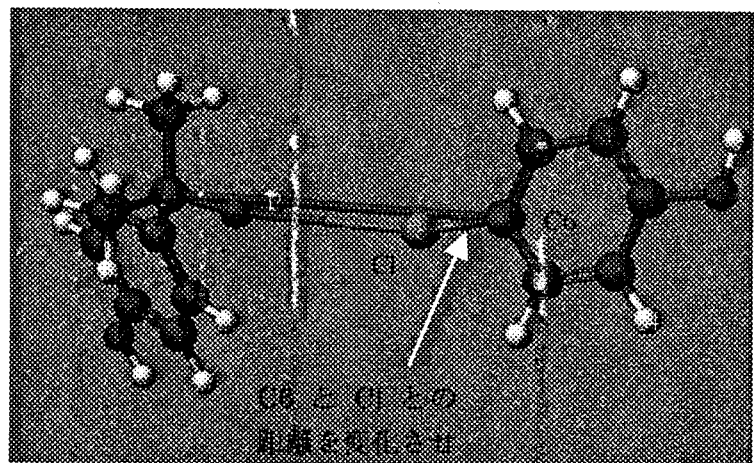


図-5 C6に塩素攻撃を受けた生成物の構造と変化させた距離

検出された塩素置換数3と4の生成物は非常に生成しにくい。一方、静電ポテンシャル電荷を比較すると、C19、C4とC21の電荷値からその三原子に塩素を置換し、塩素置換数3と4の生成物が生成されると考えられる。そのため

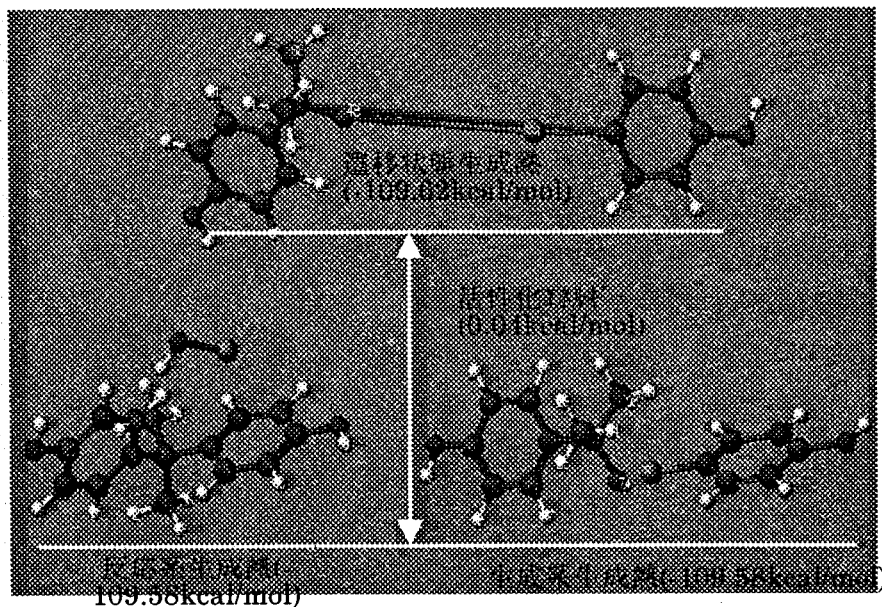


図-6 C6に攻撃する場合における反応系、遷移状態、生成系フェノールA (I)の

C19、C5 への塩素置換反応の活性化エネルギーを計算し、その結果を表-2に示した。表-2より反応速度論として考えると、C19への塩素置換活性化エネルギーが最も低く、反応速度論的に優先であることが明らかである。従って、(1)と塩素との反応は電荷が支配的な反応で、(4)のジクロロビスフェノール A が主に生成される。(4)の静電ポテンシャルを計算し、塩素との反応生成物は(5)のトリクロロビスフェノール A となり、さらに反応を進むと、テトラクロロビスフェノール A(6)が生成されるとの計算結果が得られた(図-8-1)。

3.2.2 二量体の構造

フェノールと塩素との反応で、フェノールや塩素化フェノールの二量体が生成するとされている。本研究では、

表-2 反応生成物 (I) の C19、C5 への付加反応性

反応位置	HOMO 密度	部分電荷	活性化エネルギー
C19	0.01	-0.194	0.07kcal/mol
C5	0.106	-0.058	0.14kcal/mol

分子軌道法による計算では至らなかったが、LC/M S法の結果と上置換反応経路から図-8-2に示した(11)-(16)のような構造を持つ物質の可能性が高い。今後、分子軌道法を用いてその反応メカニズムをさらに検討する必要がある。

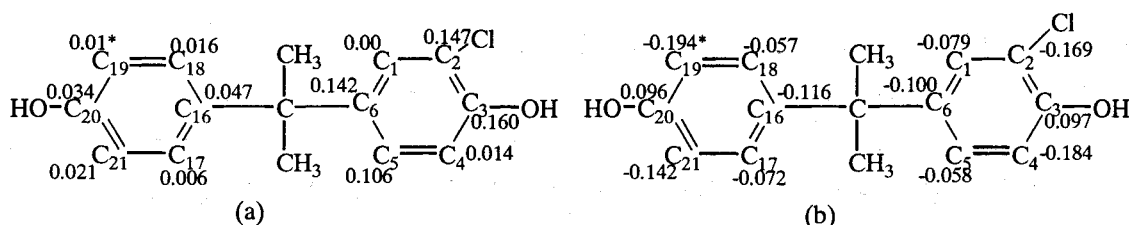


図-7 モノクロロビスフェノールA(I)の HOMO 密度 (a) と静電ポテンシャル電荷 (b)

3.3 塩素処理がエストロゲンレセプター結合活性へ及ぼす影響

前記のように、ビスフェノール A と塩素とが反応する事によって、多くの副生成物が新たに生成される。水道水にビスフェノール A が存在する際、ビスフェノール A が引き起こす内分泌攪乱作用を評価するには、その副生成物の活性を考慮する必要がある。そのために、ビスフェノール A の塩素反応時間に対するエストロゲンレセプター結合活性の変化を調べ、その結果を図-9に示した。図-9より、エストロゲンレセプター結合活性は塩素反応時間が増す毎に高くなることが確認された。濃縮倍率で換算した EC50 値は、それぞれ 11610 (0分)、2992 (10分)、1094 (30分)、473.9 (60分) であり、反応 60 分後には反応開始前の 24 倍も活性が高くなった。

上記エストロゲンレセプター結合活性の増加には塩素罹患体や二量体の生成量の増加が関与していると考えられるが、どの副生成物に起因するかを調べるためには、BPA の塩素処理で生成した塩素置換体や二量体等の標準品が必要である。しかしながら、現段階では標準品が入手できないため、生成物の同定には至らなかった。副生成物量の定量化とエストロゲンレセプター結合活性との関連についての解析は今後の課題としたい。

4. まとめ

ビスフェノール A をモデル物質とし、塩素との反応メカニズムを理論計算から推定し、LC/MS による塩素処理分解物の測定結果に基づき理論値と実験値を比較、解釈した。

ビスフェノール A を塩素との反応生成物を LC/MS 法で測定した結果、クロマトグラム上数多くのピークが現れ、マススペクトル解析の結果ビスフェノール A に塩素が各々 1, 2, 3, 4 付加した塩素付加物とフェノールの二量体と推測される副生成物が測定された。

分子軌道法を用いて反応経路の解析を行った結果、ビスフェノール A のベンゼン環への塩素置換反応は分子軌道に基づく反応が支配的であり、反応初期の副生成物はモノクロロビスフェノール A、モノクロロフェノール、4-ヒドロキシフェニルイソプロパノールと推定された。これらの反応生成物は更に塩素と反応し、最終生成物としてはテトラクロロビスフェノール A、トリクロロフェノール、4-ヒドロキ-3,5-ジクロロシルフェニルイソプロパノールになると推定された。一方、二量体の生成にはジメチルフェノール等が出発物質となり 6 個の反応生成物が生成されると推定された。

さらに、ビスフェノール A の塩素処理によって生成された分解生成物についてエストロゲンレセプター結合アッセイを行った結果、エストロゲンレセプター結合活性の増加が認められ、塩素罹患体や二量体の生成量の増加が関与していると考えられた。

これらの確認には、BPA の塩素処理で生成する塩素置換体や二量体等の標準品が必要であり、現段階では標準品が入手できないため、今後の検討課題となった。

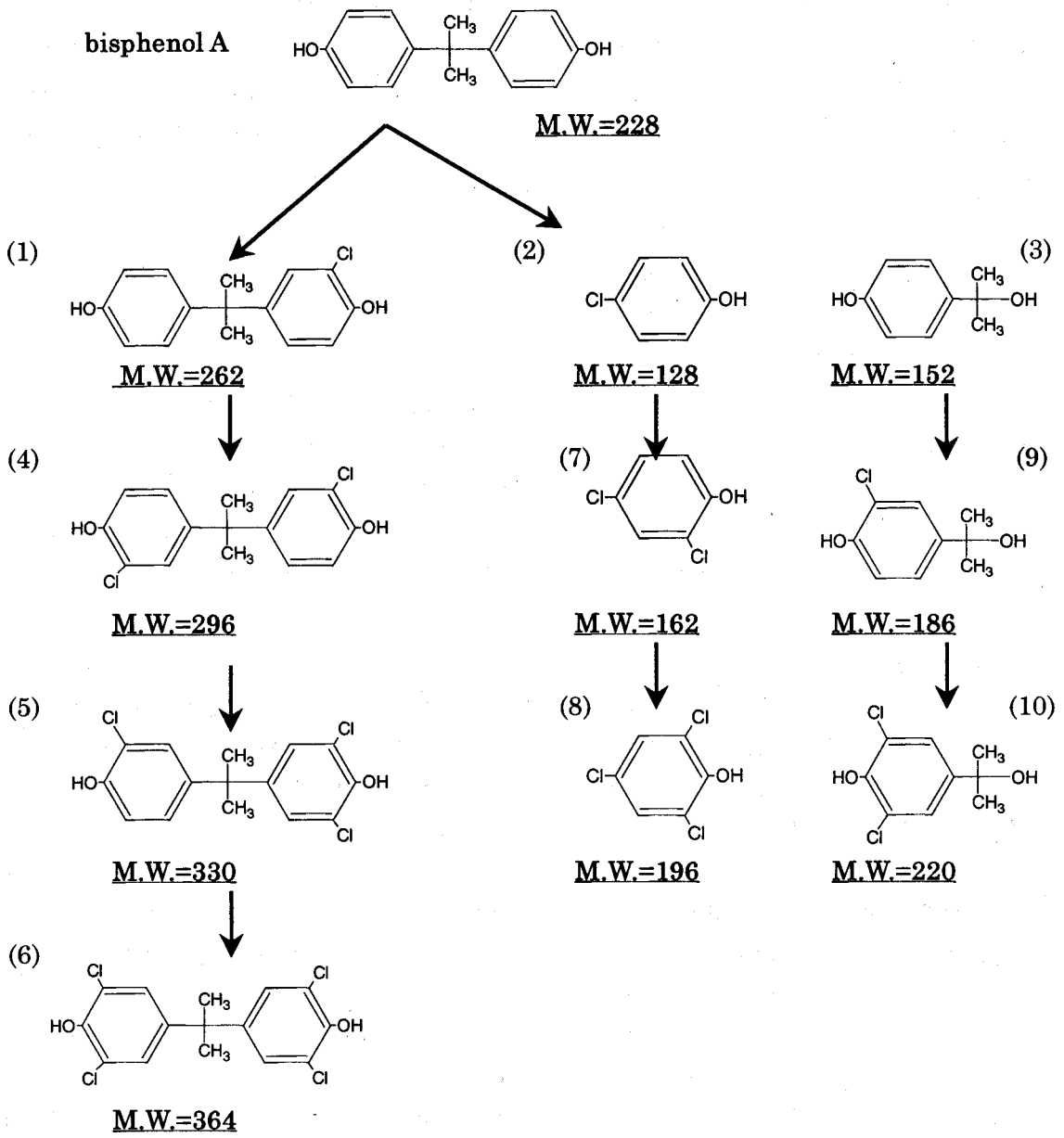


図-8-1 ビスフェノール A の塩素置換反応

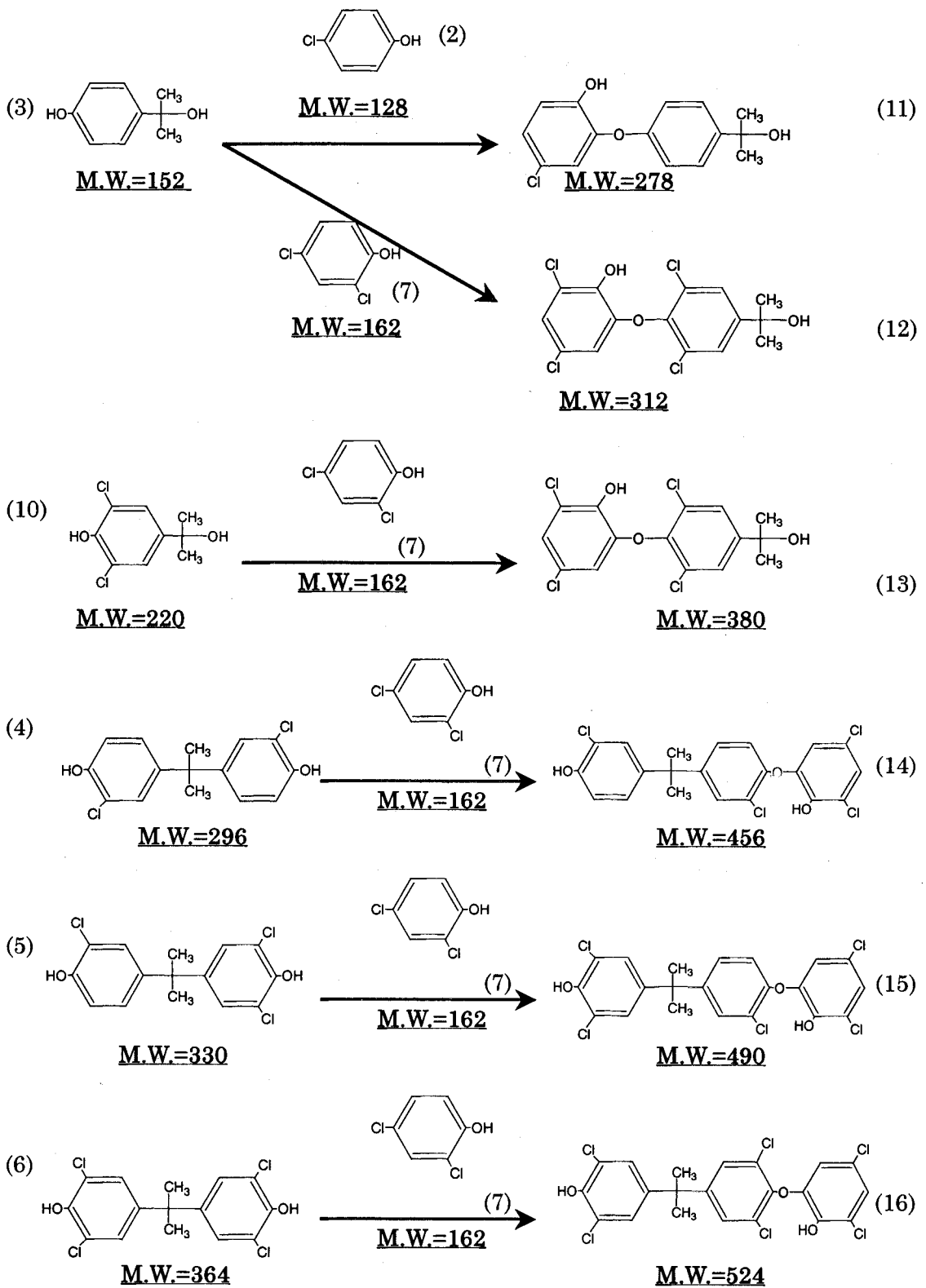


図-8-2 ビスフェノール A の塩素処理において生成が予測されるフェノール類二量体

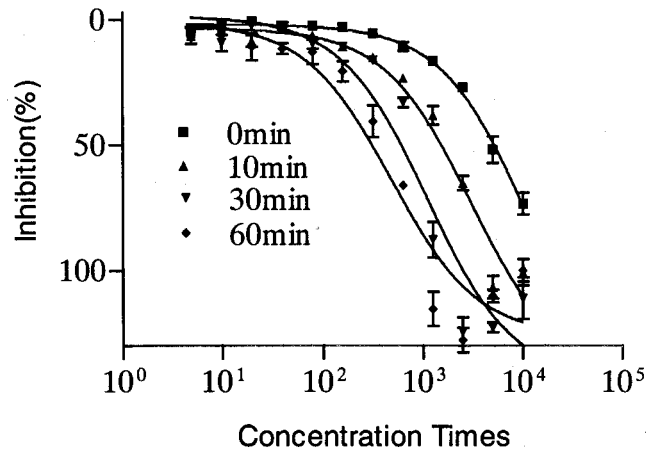


図-9 BPA 塩素処理試料の反応時間に対するエストロゲンレセプター結合活性の変化