

3) 本郷敏雄 他 : 蛍光による歯科用レジン
の高感度分析法、歯材器、17 (SI. 32):119、
1998

4) 配島由二 他 : ポリカーボネートおよ
びポリスルホン製血液透析器からのビスフェ
ノールAの溶出, 日本薬学会第119年会, 1999.
6

5) Comparison of short-term estrogenic
ity tests for identification of hormon-d
isrupting chemicals. Environ. Health Pers
pect., 107 Suppl 1:89-108, 1999.

6) Gray, L. E., et al. : Dibutyl phthal
ate (DBP) induces antiandrogenic but not
estrogenic in vivo effects in LE hooded
rats, Toxicologist, 42:176, 1998.

7) Ema, M., et al., : Critical period f
or adverse effects on development of rep
roductive system in male offspring of ra
ts given di-n-butyl phthalate during lat
epregnancy. Toxicol. Lett. , 111: 271-2
78, 2000.

8) Kleinsasser, N.H., et al. : Phthala
tes demonstrate genotoxicity on human mu
cosa of the upper aerodigestive tract ,
Environ. Mol. Mutagen., 35(1):9-12. 2000.

9) 徳永祐司 他 : 未発表

10) Sonnenschein.C., et al. : An update
d review of environmental estrogen and a
ndrogen mimics and antagonists, J Stero
id Biochem Mol Biol., 65 :143-50, 1998.

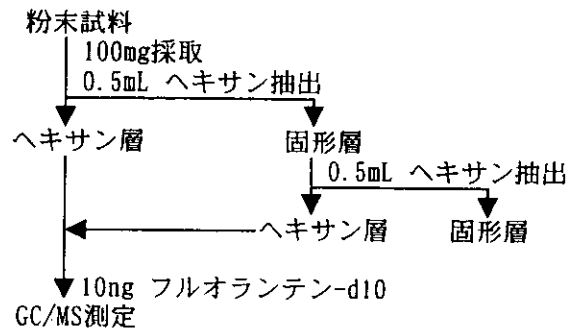


図 1 Powder 試料の前処理方法

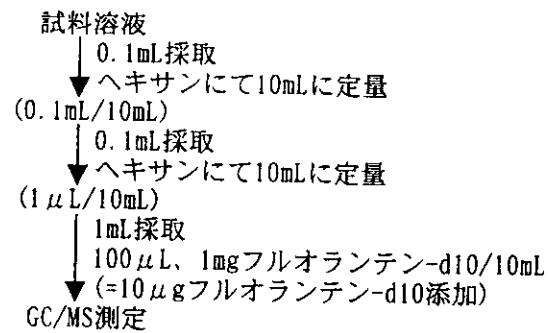


図 2 Liquid 試料の前処理方法

表 1 裏層材中のフタル酸-n-ブチル量

試料	検出値 $\mu\text{g/g}$
A	120
B	N. D.
C	240
D	240
E	4500
F	5100
G	230
H	180
I	180
J	8500

* N. D. : 検量線最下限濃度以下

* フタル酸-n-ブチル以外のフタル酸
エステル類は検量線最下限濃度以下

RT: 9.97 - 25.09

NL:
1.23E8
TIC MS
20000309a
04

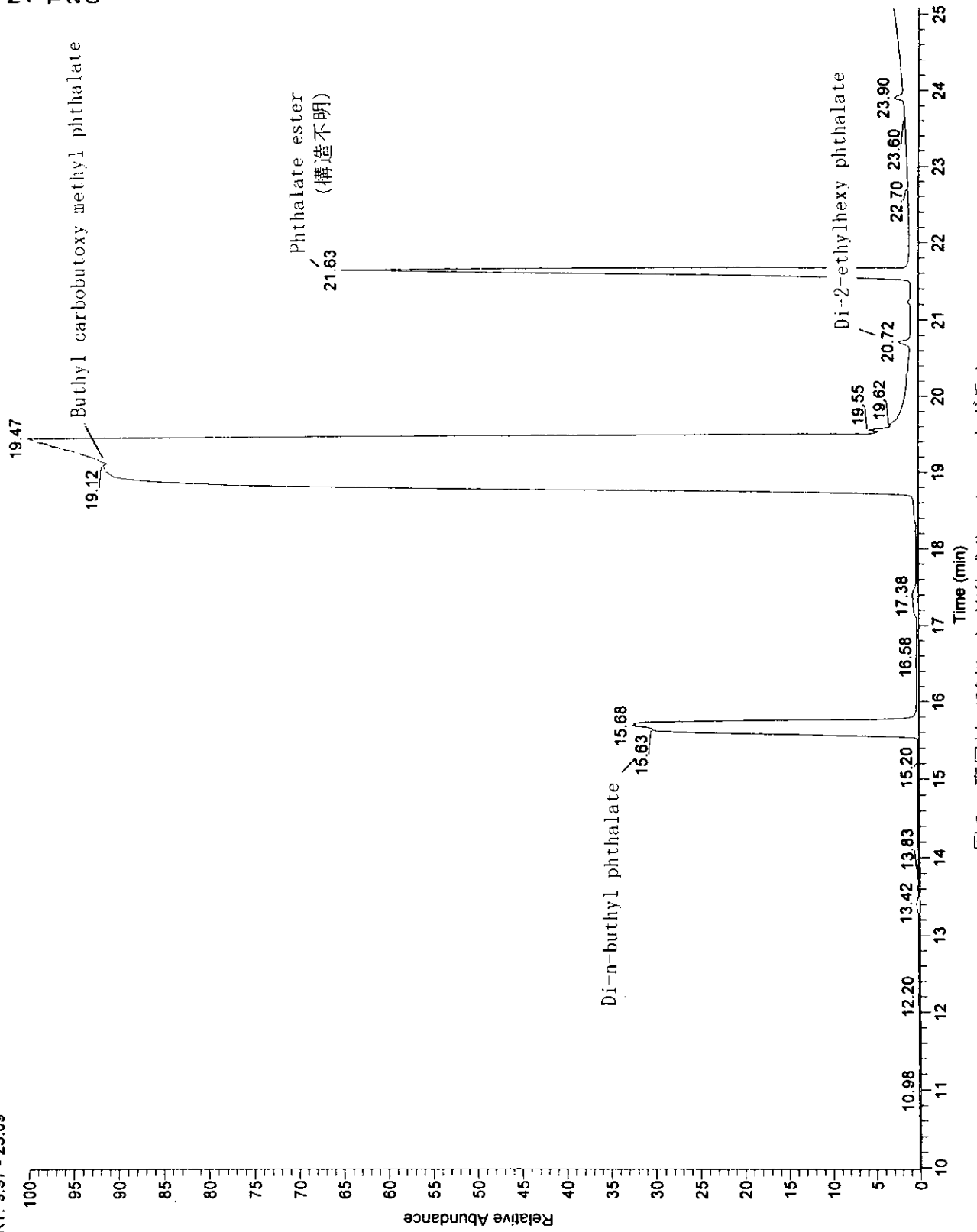


図3 裏層材 (試料D) 液体成分のクロマトグラム

RT: 12.90 - 23.93

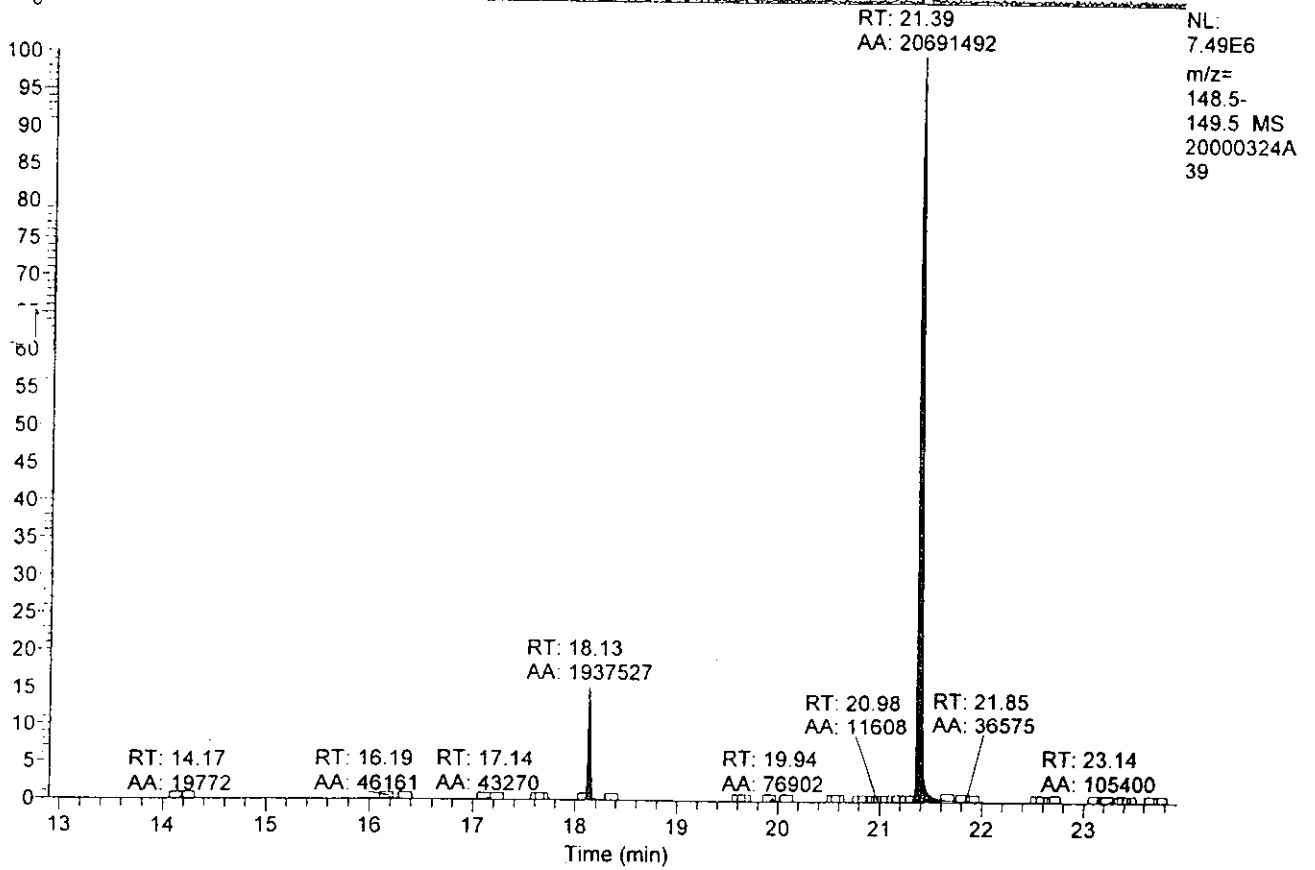
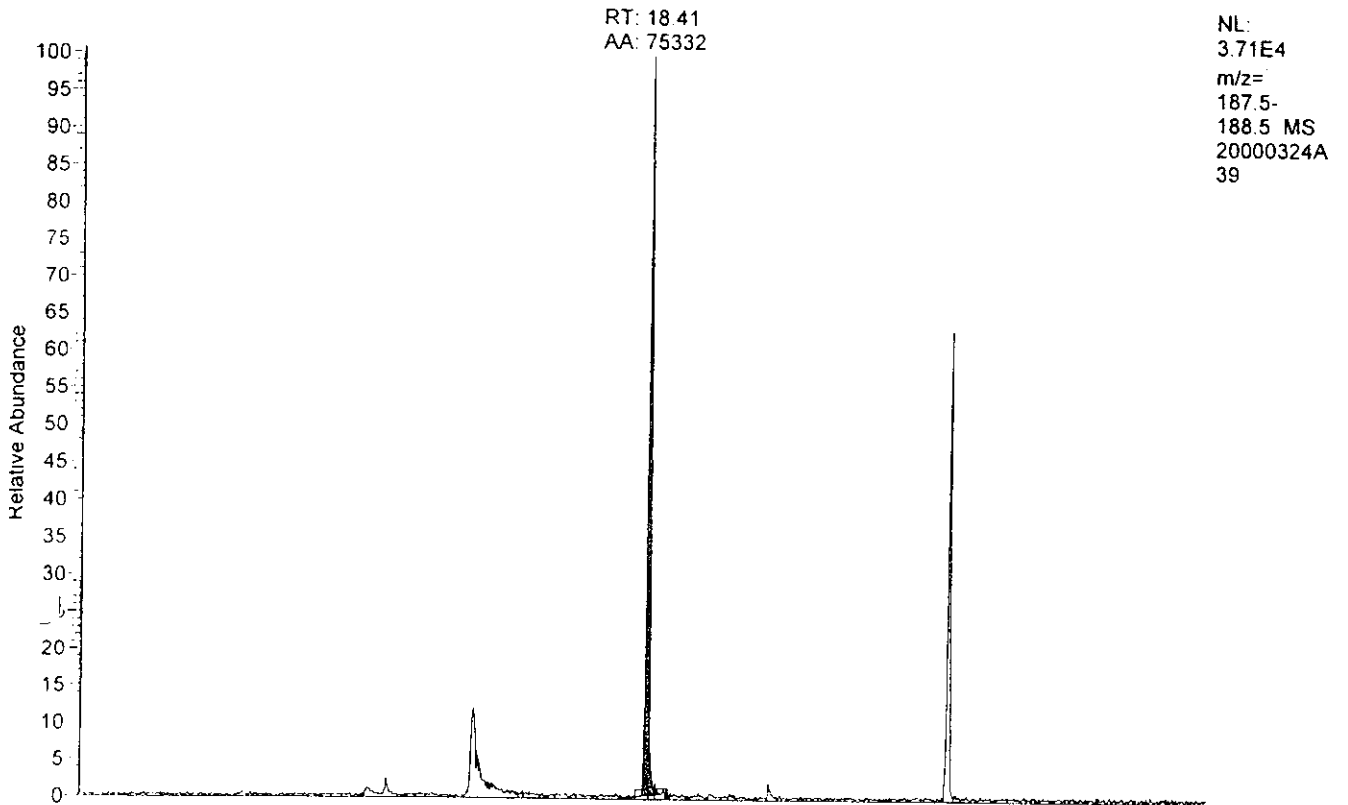


図4 裏層材 (試料B) 液体成分のクロマトグラム

RT: 12.90 - 24.15

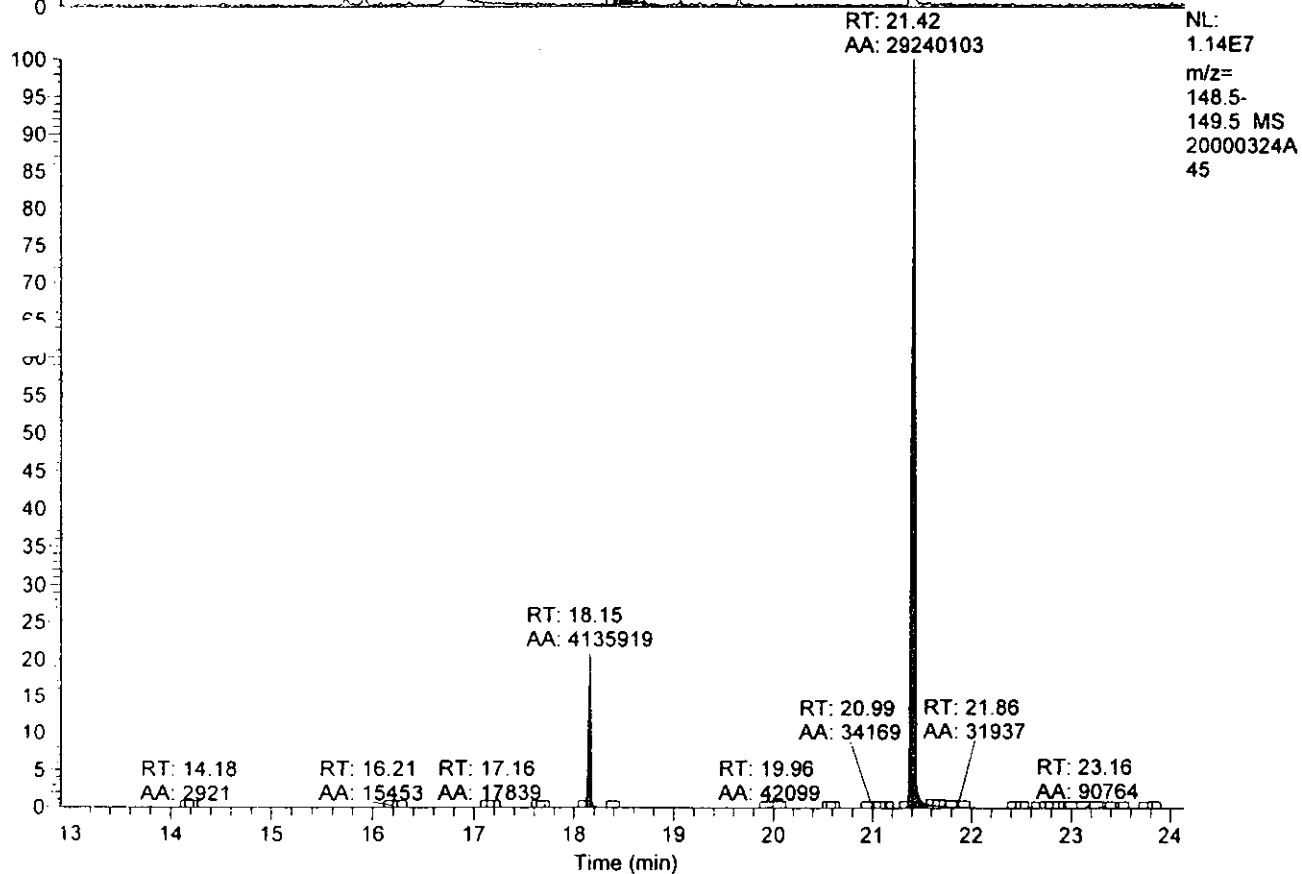
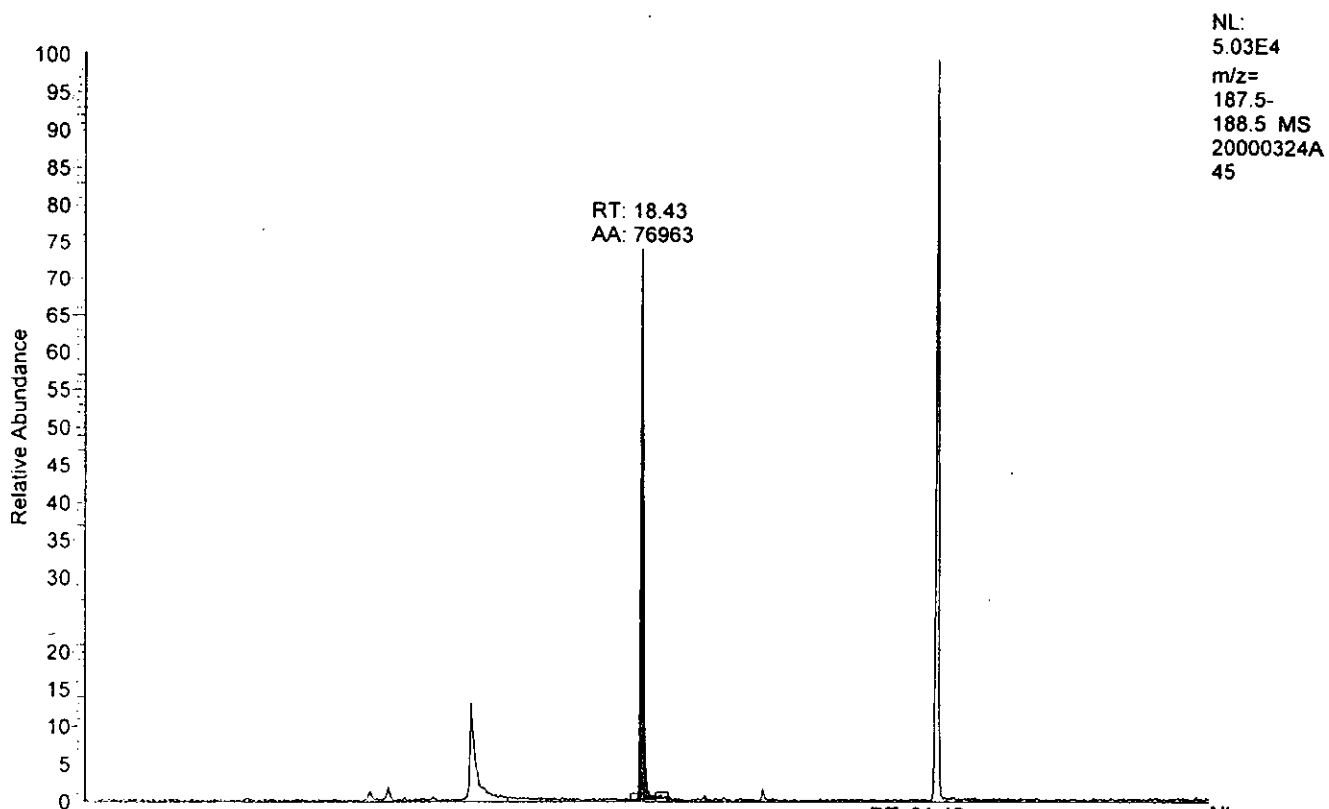


図5 裏層材（試料H）液体成分のクロマトグラム

RT: 12.90 - 23.93

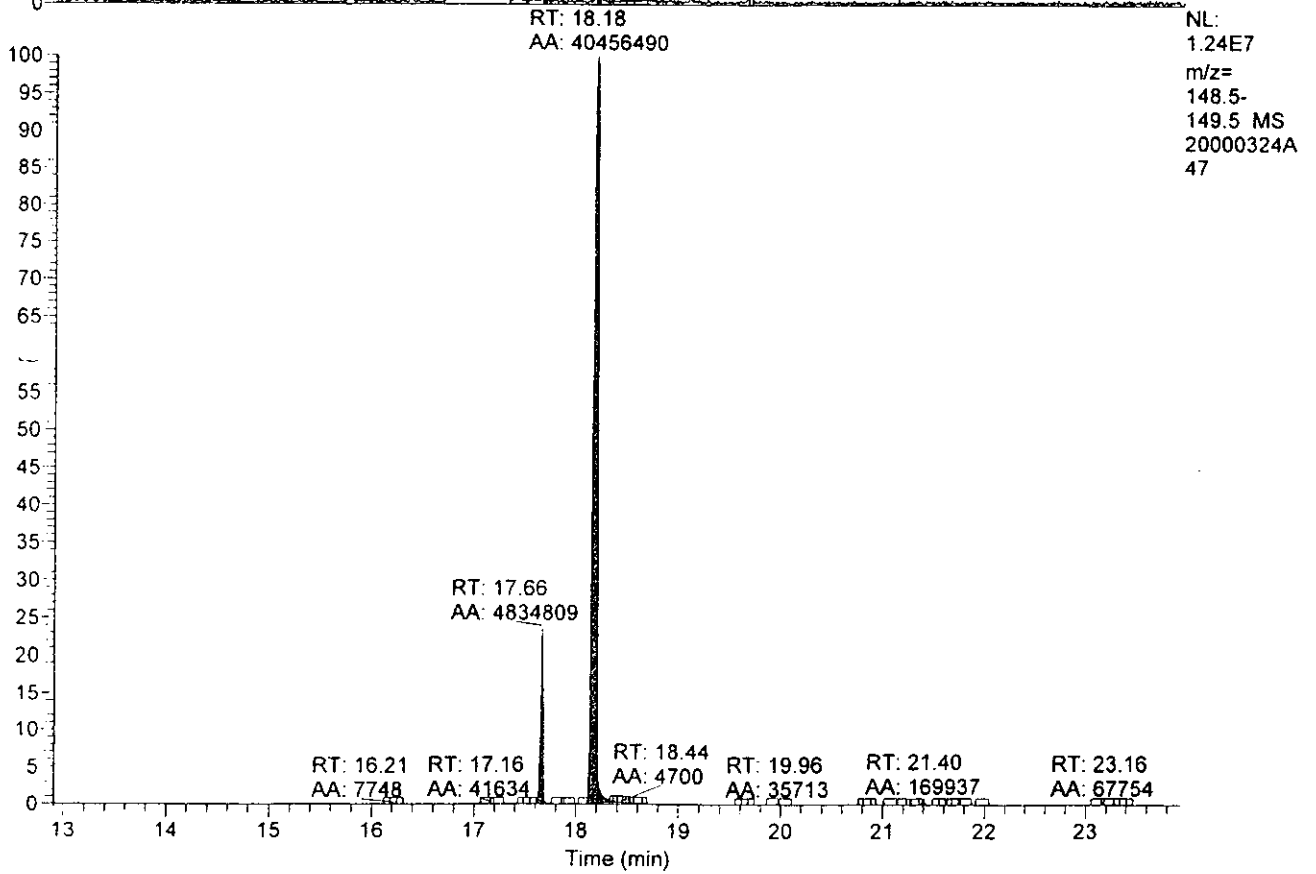
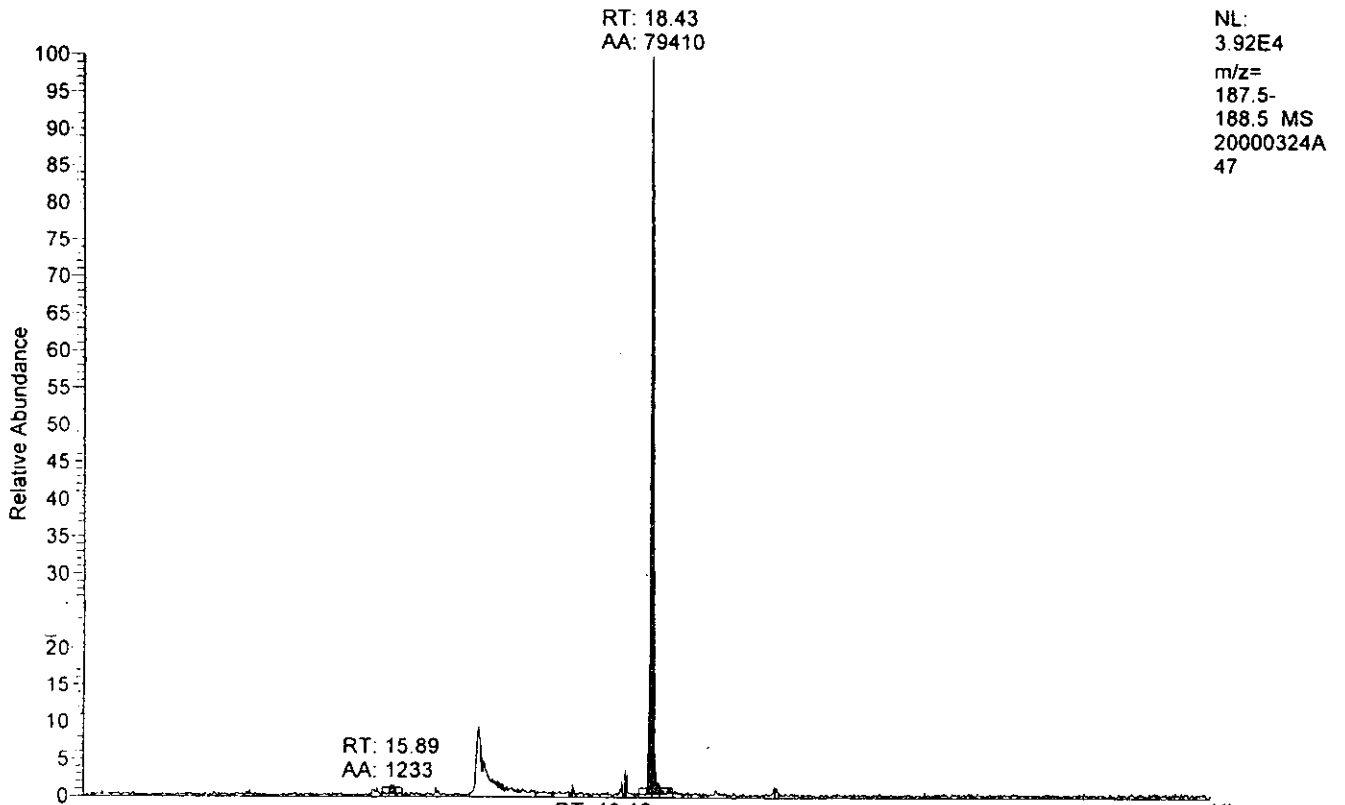


図6 裏層材 (試料J) 液体成分のクロマトグラム

別添 3

厚生科学研究費補助金分担研究報告書
プラスチック製医療用具中の分析

国立医薬品食品衛生研究所療品部
配島 由二

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

ポリカーボネートおよびポリスルホン製血液透析器からの
ビスフェノール A 溶出に関する研究

分担研究者 配島由二 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨：ポリカーボネート樹脂およびポリスルホン樹脂などの原料であるビスフェノール A (BA) はエストロゲン様作用を持つ内分泌攪乱物質の一つとして認識されている。現在、これらの樹脂は様々な分野において使用されており、医療用具の構成材料としても重要な位置を占めている。平成10年度の本研究では、これらの樹脂から製造された血液透析器の安全性を調査するため、数種の条件における同製品からの BA の溶出状況に関して検討した。その中で、牛血清を循環溶媒として使用した溶出系は、血液透析器の実際の使用状態にもっとも近似したものと思われるが、血清からの BA 回収は、液々抽出および固相抽出の二段階の作業を行うことが必要であり、操作的に煩雑である。また、牛血清自体も高価であり、コスト的にも問題がある。そこで、平成 11 年度は牛血清と同じ BA 溶出量を与える疑似溶媒組成について検討した。その結果、17.2% エタノールが牛血清の疑似溶媒として使用できることが明らかになり、また、17.2% エタノール循環による血液透析器からの BA 溶出は、およそ 2 - 3 時間で平衡状態に達することも判明した。本溶出系は、定量分析時における前処理が必要なく、コスト的にも安価であり、ポリカーボネートおよびポリスルホン製血液透析器からの BA 溶出を検討する上で非常に有益であると思われる。

主任研究者 佐藤温重
昭和大大学歯学部歯科理工学教室

A. 研究目的

近年、有機塩素系農薬や洗剤中のある種の界面活性剤などが内分泌（ホルモン）機能を攪乱し、生態系や人の健康に影響を及ぼす懸念が指摘されている。これが、いわゆる内分泌攪乱物質（環境ホルモン）問題である。

ポリカーボネート（PC）樹脂およびポリスルホン（PS）樹脂などの原料であるビスフェノール A (BA) はエストロゲン様作用を持つ内分泌攪乱物質の一つとして認識されている¹⁾。現在、これらの樹脂は様々な分野において使用されており、医療用具の構成材料としても重要な位置を占めている。本研究では、これらの樹脂

から製造された血液透析器の安全性を調査することを目的として、同製品からの BA の溶出状況に関して検討した。

平成 10 年度の本研究において PC および PS 樹脂原材料ペレット中の BA 総含量分析、血液透析器充填水（RO 水）中の BA 濃度分析および牛血清を含めた各種溶媒循環による血液透析器からの BA 溶出実験を行った結果、いずれの実験においても BA が検出された。しかし、その溶出量は微量（最大値：牛血清循環時 2.09 $\mu\text{g}/\text{個}$ ・平成 10 年度総括または分担研究報告書参照）であり、BA のエストロゲン様作用の強度、血液透析器の有用性および血液透析器か

ら溶出するレベルの BA が人の健康に重大な影響を与えるという科学的知見が現在までに得られていないことを考慮した場合、現段階で、これらの樹脂から構成される血液透析器の使用を中止する必要性はないものと判断された。しかし、内分泌攪乱物質の問題は新たな課題であり、微量であっても作用を引き起こすという指摘や内分泌系のフィードバック機構が確立している成人に対しては無毒性であっても、内分泌系が未発達の子供には影響を与えるとの指摘もあるため、今後、低濃度領域における BA の生体影響に関して更に検討して行く必要があるものと思われる。

牛血清を循環溶媒として使用した溶出系は、血液透析器の実際の使用状態にもっとも近似したものと思われるが、血清からの BA 回収は、液々抽出および固相抽出の 2 段階の作業を行うことが必要であり、操作的に煩雑である。また、牛血清自体も高価であり、コスト的にも問題がある。そこで、平成 11 年度の本研究では、牛血清と同じ BA 溶出量を与える疑似溶媒の開発に関して検討した。

B. 研究方法

1) 血液透析器

ホローファイバー型血液透析器として、以下の 4 種を使用した。カッコ内には中空糸およびハウジングの材質を示した。

- A 社製血液透析器 I (セルロース/PC)
- A 社製血液透析器 II (PS/PC)
- B 社製血液透析器 (PS/PC)
- C 社製血液透析器 (PS/ポリスチレン)

2) HPLC 条件

カラム : Luna 3 μ C18(2) (150 x 4.6 x, 3 μ m)
カラム温度 : 40°C
溶離液 : アセトニトリル/無蛍光水 (1:1)
流速 : 0.75 ml/min
インジェクション量 : 50 μ l
オートサンプラー : 日立 AS-2000
検出器 : 日立 F-1080 (蛍光検出器)
波長 Ex 280 nm, Em 310 nm
日立 L-4250 (UV 検出器)
波長 235 nm

ポンプ : 高圧グラジエントシステム

日立 L-6020/L-6320

システム制御 : D-7000 システムマネージャー

3) 疑似溶媒組成の検討

A 社製血液透析器 II の充填水を除去後、無蛍光水で 3 回洗浄し、窒素ガスを流通させて中空糸内に残留する無蛍光水を除去した。種々の濃度のエタノール/無蛍光水 (250 ml) を 10 ml/min の流速で室温下、16 時間、中空糸内外に中圧ポンプを使用して循環させた。循環溶媒の 25 ml を分取し、減圧下に乾固させた後、アセトニトリル/無蛍光水 (1:1) に溶解させ、グラスウール濾過した後、HPLC 用試料とした。

4) 疑似溶媒を使用した BA の溶出動態

17.2% エタノール/無蛍光水 500 ml を 10 ml/min の流速で A 社製血液透析器 II に循環させ、種々の時間に 25 ml 毎の循環溶媒を分取した。各サンプルを減圧下に蒸発乾固させた後、アセトニトリル/無蛍光水 (1:1) に溶解させ、グラスウール濾過した後、HPLC 用試料とした。

5) 分析バリデーション

精度プロットは 0.6, 1, 2, 4, 8 ppb の BA 標準液を使用して、それぞれ 5 回の繰り返し測定から求めた。データ解析は、FUMI 理論を実践するプログラム TOCO (Total Optimization of Chemical Operations) を用いて行った。

6) その他

検量線の作成、分析機器の精度管理などは平成 10 年度と同様の方法により行った (平成 10 年度総括または分担研究報告書参照)。

C. 研究結果

1) 疑似溶媒による BA 溶出

0, 5, 10, 15, 20% エタノール/無蛍光水を A 社製血液透析器 II に循環させ、各種の濃度の循環溶媒による BA の溶出状況を検討した。その結果、BA 溶出量はエタノール濃度の上昇とともに増加する傾向が認められ、同透析器からは各濃度の溶媒循環により、それぞれ 141.8 ng/個 (0%)、479.7 ng/個 (5%)、866.4 ng/個

(10%)、1423.4 ng/個 (15%) および 3060.9 ng/個 (20%) の BA が回収された (図 1)。牛血清循環における A 社製血液透析器 II からの BA 溶出量は 2.09 μg /個であることが昨年度の研究により既に明らかになっており、図 1 の結果から、牛血清使用時と同じ BA 溶出量を与える疑似溶媒組成は 17.2% エタノールであることが判明した。また、図 2 に示すように、これらの疑似溶媒を使用した溶出実験では、HPLC 分析における BA ピークの分離が非常に良好であり、サンプル調製時の前処理を必要としないことも明らかになった。

2) 疑似溶媒による BA 溶出の時間変化

17.2% エタノールを循環溶媒とした実験系における A 社製血液透析器 II からの BA 溶出動態を検討した。その結果、図 3 に示したように、同透析器からの BA 溶出は循環開始後、およそ 2-3 時間で平衡状態に達することが判明した。すなわち、先の結果と合わせ、牛血清を使用した実験系 (250 ml, 10 ml/min, 16 時間) での BA 溶出は、17.2% エタノール (250 ml, 10 ml/min) を 2-3 時間程度循環させれば再現できることが明らかとなった。

3) 他の血液透析器への適用

先の結果において、A 社製血液透析器 II の疑似溶媒としては 17.2% エタノールが利用できることを示したが、本疑似溶媒が他の血液透析器に対しても利用可能かどうか検討した。牛血清を循環溶媒とした場合、A 社製血液透析器 I、B 社製血液透析器および C 社製血液透析器からは、それぞれ 196.1 ng/個、1.01 μg /個および 140.7 ng/個の BA が回収される (平成 10 年度総括または分担研究報告書参照)。これに対し、循環溶媒に 17.2% エタノールを使用した場合、A 社製血液透析器 II と中空糸およびハウジングともに同じ材質 (PC/PS) で構成されている B 社製血液透析器からは、986.4 ng/個の BA が回収され、牛血清循環と疑似溶媒循環の間に、BA 回収に関する良好な相関関係が認められた。また、中空糸のみが同じ材質 (PS) で構成されている C 社製血液透析器およびハウジングのみが同じ材質 (PC) で構成されている A 社製血液透析器 I からも、それぞれ 153.3 ng/

個および 173.8 ng/個の BA が回収されたことから、中空糸またはハウジングが異なる材質から構成されている血液透析器についても、牛血清の代替えとして 17.2% エタノールを使用できることが明らかになった。

4) HPLC 分析データの信頼性

図 4 の精度プロットでは HPLC 分析により、各々 5 回の繰り返し測定から求めた RSD を ● で示し、FUMI 理論から求めた RSD を曲線で示している。この図より、ベースラインの揺らぎとシグナルの形から求めた測定値の RSD と繰り返し測定から求めた RSD が良い一致を示していることが分かる。

● に重ねて表示してあるバーは、カイ 2 乗分布から計算した実験的 RSD の 95% 信頼区間を示している。95% 信頼区間は実験的 RSD の統計的信頼性、言い換えれば実験的 RSD 推定値の RSD を示している。繰り返し数が 5 回であるので、95% 信頼区間はかなり広がっている。しかし、理論曲線が 95% 信頼区間に含まれていることは、統計的には理論曲線が信頼できることを意味している。また、実験から理論曲線のように連続した濃度に対する RSD を求めることは不可能であることから、FUMI 理論の有用性も理解できる。

D. 考察および結論

我々の周囲には人為的に作り出された様々な有害化学物質が存在し、長期的な曝露により人間の健康および生態系への影響が懸念されている。環境庁は 1998 年 5 月に「外因性内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について」(環境ホルモン戦略計画 SPEED '98) を発表し、汚染の実態調査、試験研究の推進を図るなどの取組みについて示すとともに、1998 年 8-9 月に建設省と共同で第 1 次全国実態調査を実施し、同年 10 月に、暫定的な分析法が日本環境化学会より開示された。上記の調査結果から、ビスフェノール A とノニルフェノールはフタル酸ジ-2-エチルヘキシル、17- β -エストラジオールとともに検出率の高い化合物として位置付けられた。前述のように、BA から製造された PC 樹脂および PS 樹脂などは、様々な医療用具の構成部品として利用されている。歯科材

料からの BA および関連物質の溶出状況に関しては、現在までに幾つか報告されている^{14,7)}。また、微量での *in vitro* 試験データは現在までに報告されていないが、相当量の BA を使用した各種生体毒性^{3,8,71)}に関する研究結果も報告されている（平成 10 年度総括または分担研究報告書参照）。

本研究において、血液透析器の実際の使用条件に最も近いと思われる牛血清循環時と同じ BA 溶出量を与える疑似溶媒組成について検討した結果、17.2% エタノールが牛血清の疑似溶媒として使用できることが明らかになった。また、17.2% エタノール循環による血液透析器からの BA 溶出は、およそ 2-3 時間で平衡状態に達することも判明した。本溶出系は、定量分析時における前処理が必要なく、コスト的にも安価であり、PC および PS 製血液透析器からの BA 溶出を検討する上で非常に有益であると思われる。対象は異なるが、各種食品・食器などからの BA 回収に関する疑似溶媒としては、*n*-ヘプタン（油脂および脂溶性食品）、4% 酢酸（水溶性酸性食品）、エタノール（酒類）、水（その他の食品）などが知られている¹⁹⁾。

現在の分析化学分野においては、分析データの信頼性を保証する必要がある。FUMI 理論は、ベースラインのゆらぎ、シグナルの形、独立誤差（HPLC では注入誤差にあたる）に基づいて、測定値の精度を推定する方法である。1 つのクロマトグラムがベースラインノイズとシグナルを含んでいれば、このクロマトグラムだけで解析を完了することができるので、FUMI 理論には繰り返し測定は必要がない。FUMI 理論は、機器測定のパラッキ（SD）だけを予測するので、サンプル調製を含めた繰り返し測定データを解析すれば、調製誤差と測定誤差の大きさを推定することができる。また、一般に、ある分析系で同一サンプルを全く同じ条件で測定する場合、測定値は測定するたびに少しずつ異なるが、測定値には真の平均と真のパラッキ（SD と RSD）があると仮定する。測定の再現性の度合いは常に同じと言い換えられるものと思われる。しかし、通常の繰り返し測定値の平均、SD、RSD が真の値であるとは考えられないので、これらを平均の推定値、SD 推定値、RSD 推定値と呼ぶ。測定値がばらつく限り、平均の推定値、SD

推定値、RSD 推定値も求めるたびに異なる。そこで、これらの推定値の信頼性が問題となる。推定値の信頼性を調べるためには平均の推定値の RSD、SD 推定値の RSD、RSD 推定値の RSD などを用いる必要がある。本研究で使用した分析系は、ベースラインの揺らぎとシグナルの形から求めた測定値の RSD と繰り返し測定から求めた RSD が良い一致を示した。また、繰り返し数が 5 回であるので、95% 信頼区間はかなり広がってが、理論曲線が 95% 信頼区間に含まれていたことから、本研究に使用した分析系の理論曲線は統計的に信頼できるものであった。これらの結果から、本分析系により得られたデータの信頼性はバリデートされた。

E. 研究発表

- 1) 配島由二、矢上 健、林 譲、松田りえ子、中村晃忠。ポリカーボネートおよびポリスルホン製血液透析器からのビスフェノール A の溶出。日本薬学会第 119 年会（1999 年）。

F. 参考文献

- 1) Olea N., et. al. (1996). Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ. Health Perspect.*, 104, 298-305.
- 2) Feldman D. and Krishnan A. (1995). Estrogens in unexpected places: possible implications for researchers and consumers. *Environ. Health Perspect.*, 103, 129-133.
- 3) Nagel S.C., et. al. (1997). Relative binding affinity-serum modified access (RBAA-SMA) assay predicts the relative *in vivo* bioactivity of the exoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ. Health Perspect.*, 105, 70-76.
- 4) Nathanson D., et. al. (1997). *In vitro* elution of leachable components from dental sealants. *JADA*, 128, 1517-1523.
- 5) Hamid A. and Hume W.R. (1997). A study of component release from resin pit and fissure sealants *in vitro*. *Dent. Mater.*, 13, 98-102.
- 6) Spahl W., et. al. (1998). Determination of leachable components from four commercial dental composites by gas and liquid chromatography / mass spectrometry. *J. Dentistry*, 26, 137-145.
- 7) 本郷敏雄，浜崎辰夫，佐藤温重. (1998). フ

イッシャーシラントからの溶出物の同定. 歯科材料・器械, 17, 95.

- 8) EPA, "IRIS", CIS online (1995).
- 9) Gould J.C., et. al. (1998). Maternal effects and secretion into milk of low doses of bisphenol A given to rats via drinking water. SOT Annual Meeting, No. 866.
- 10) Liaw I.J., et. al. (1998). Reproductive development on female rats prenatally and lactationally exposed to bisphenol A. SOT Annual Meeting No. 867.
- 11) Knaak J.B. and Sullivan L.J. (1966). Metabolism of bisphenol A in the rat. Toxicol. Appl. Pharmacol., 8, 175-184.
- 12) 河村葉子, 小谷野有希, 武田由比子, 山田隆. (1998). ポリカーボネート製品からのビスフェノール A の溶出. 食衛誌. 39, 206-212.

【協力研究員】

矢上 健 (国立医薬品食品衛生研究所)
林 讓 (国立医薬品食品衛生研究所)
松田りえ子 (国立医薬品食品衛生研究所)
中村 晃忠 (国立医薬品食品衛生研究所)

図1. エタノール/無蛍光水循環によるビスフェノールA溶出

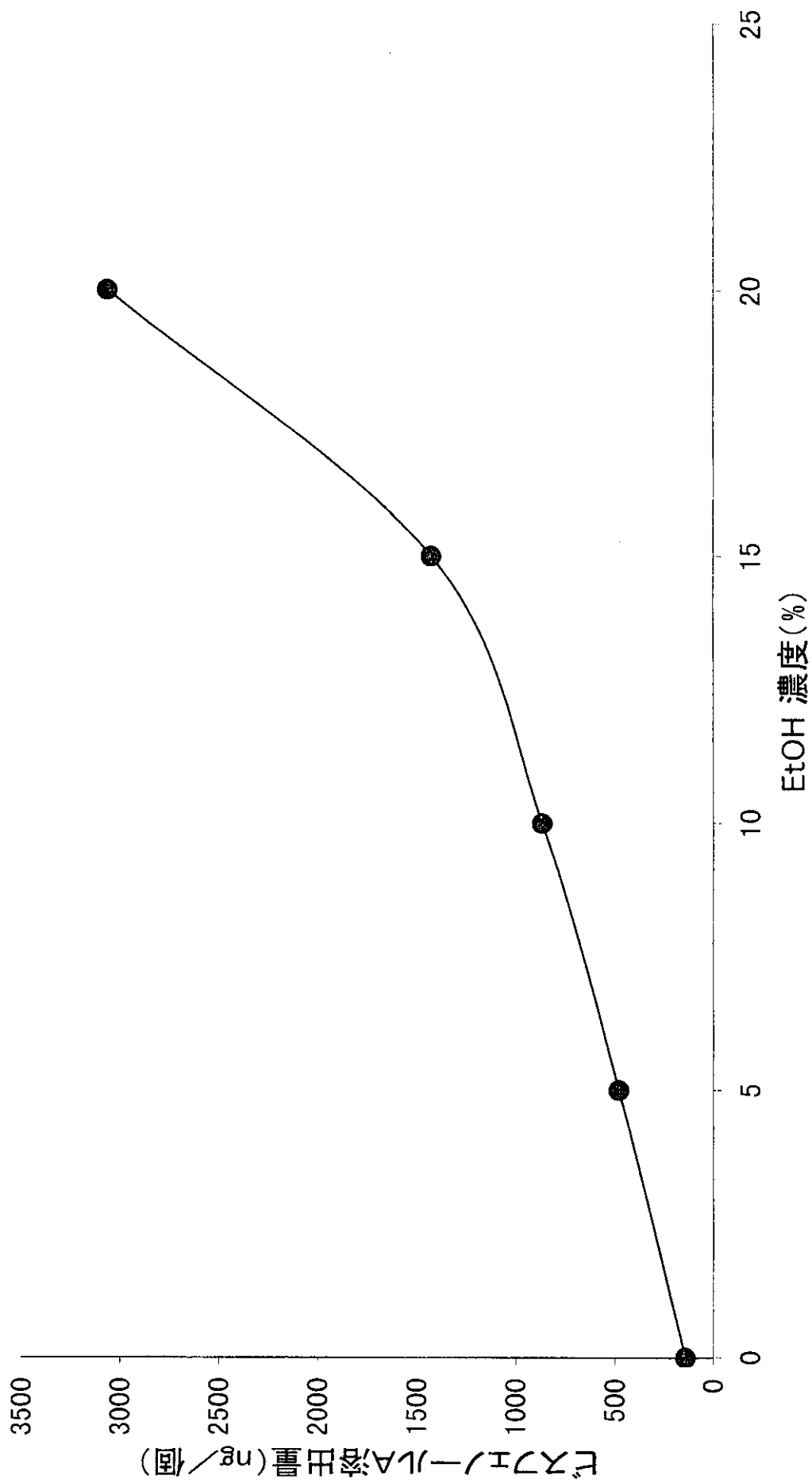


図2. ビスフェノールA分析のHPLCクロマトグラム

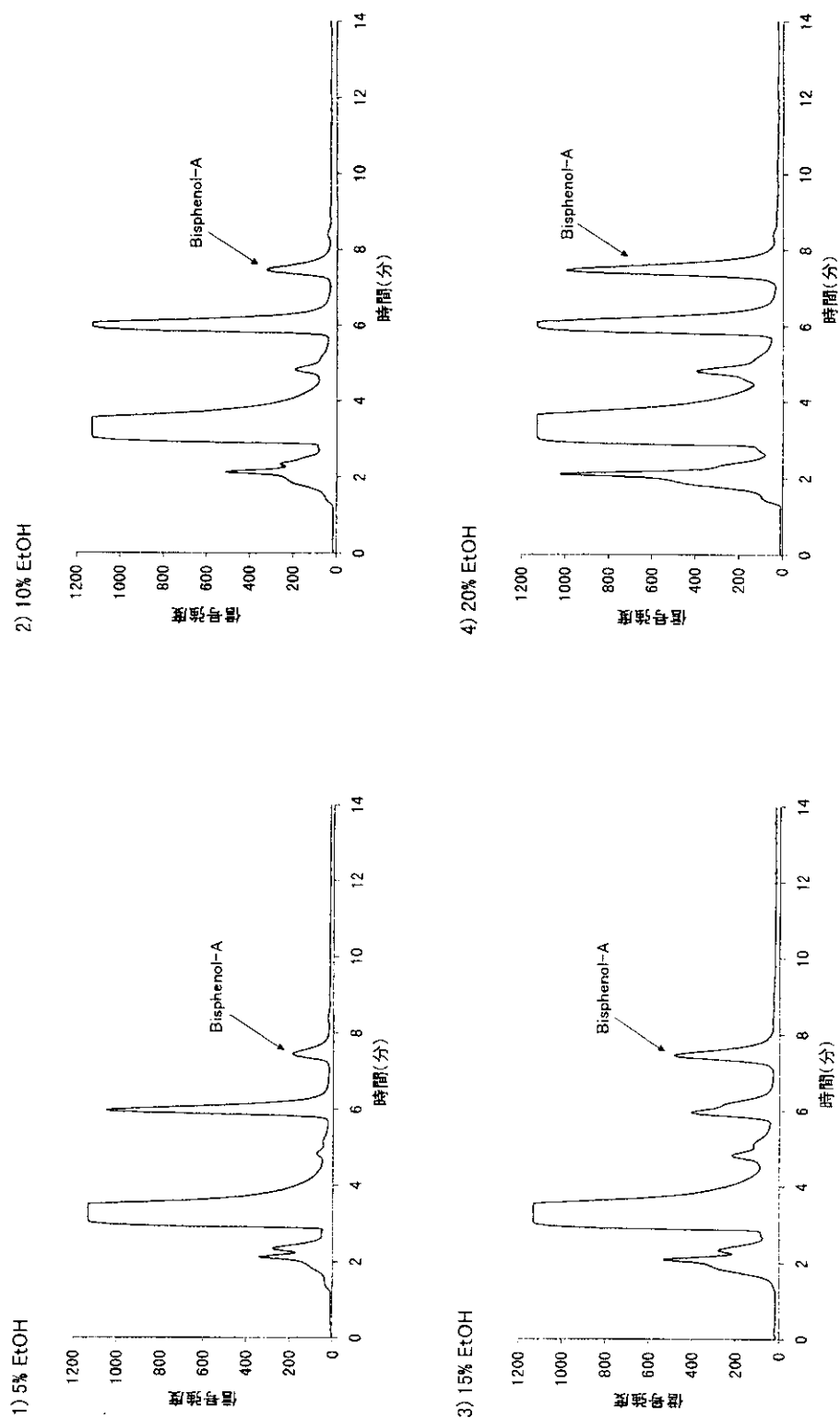


図3. 17.2%エタノール循環によるビスフェノールA
溶出の経時変化

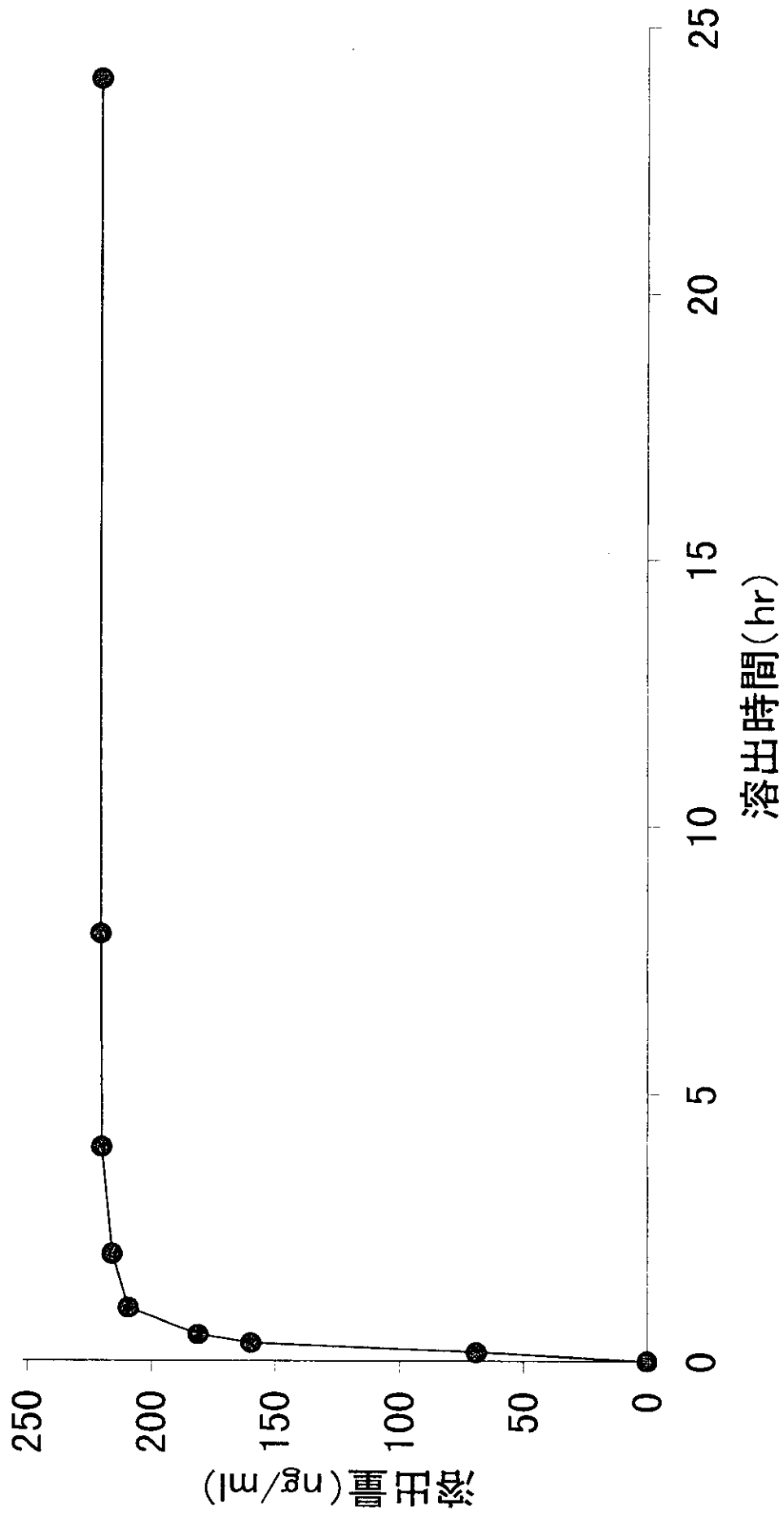
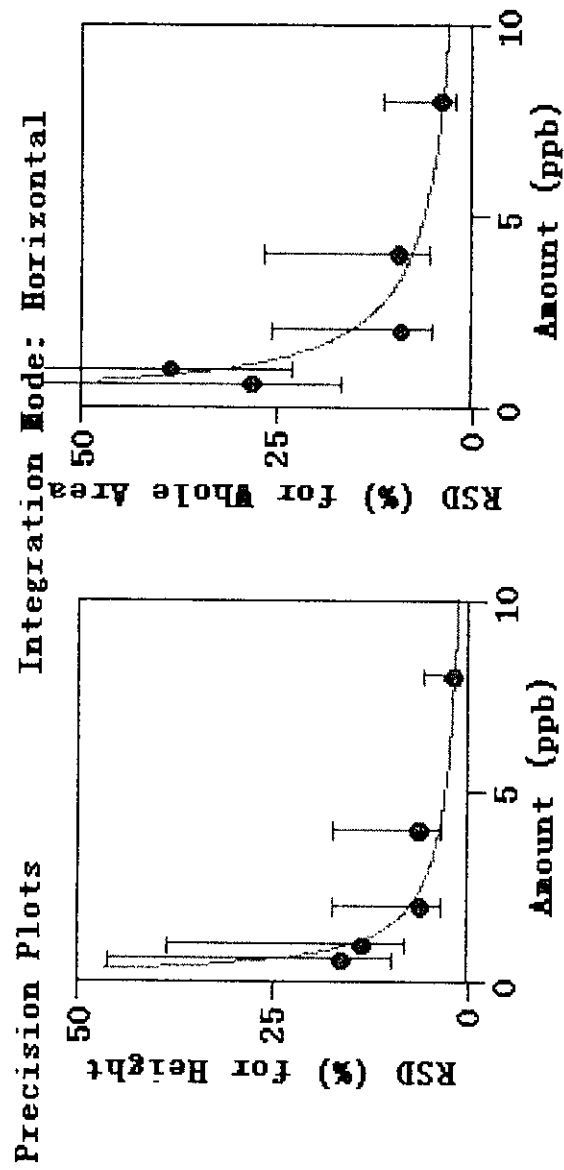


図4. 精度プロット



別添 3

厚生科学研究費補助金分担研究報告書

化粧品、医薬部外品中の分析

国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部療品部

徳永 裕司

分担研究報告書

医療材料などにおけるエンドクリン阻害物質に関する研究 化粧品、医薬部外品中の分析

分担研究者

徳永裕司、国立衛研、環境衛生化学部

要約

化粧品および医薬部外品に含まれると想定されるエンドクリン障害物質の経皮吸収的な試験をモルモットの剥離皮膚を用いて実施するため、溶剤として用いられるフタル酸ジエチルについて検討した。6個のモルモットの腹部剥離皮膚を装着した Franz 型拡散セルでの検討の結果、フタル酸ジエチルは9.35～14.28時間（平均値12.37時間）のLag timeの後、Franz型拡散セルのreceptor側に現れ、Fluxは1.04～3.15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ （平均値2.11 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ ）であった。24時間後のフタル酸ジエチルの累積透過量は15.2～37.4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ （平均値21.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ）であった。界面活性剤のドデシル硫酸ナトリウム、塩化ベンザルコニウム、ポリオキシエチレン(10)オレイルエーテルを用いて32℃で2時間、剥離皮膚を処理した後、フタル酸ジエチルの剥離皮膚透過量を測定したとき、フタル酸ジエチルのFluxは、それぞれ、190%、174%及び110%と増加し、界面活性剤による皮膚角質層への影響が示唆された。また、フタル酸ジエチル溶液中に界面活性剤が共存した場合、フタル酸ジエチルのFluxは、controlに比較して、それぞれ、81.9%、105.7%及び99%を示し、ドデシル硫酸ナトリウムが共存した場合、フタル酸ジエチルの透過が低下することが示唆された。

A. 研究目的

化粧品および医薬部外品に含まれると想定されるエンドクリン障害物質（ビスフェノールA、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジエチル、ノンフェノール、オクチルフェノール、ベンゾフェノンなど）の経皮吸収的な試験をモルモットの剥

離皮膚を用いて実施すると共に化粧品および医薬部外品の可溶化剤として多用され、皮膚角質層への影響が懸念される界面活性剤で処理後の剥離皮膚への影響並びに界面活性剤が共存した時の影響を、専ら爪化粧品の溶剤として用いられるフタル酸ジエチルにて検討したので報告する。

B. 研究方法

1) 試薬および試液

フタル酸ジエチル (DEP) は和光純薬工業株式会社から購入した。液体クロマトグラフ (HPLC) 用カラムは Unisil Q C₁₈ カラム (粒径 5 μm、内径 4.6mm、長さ 15cm) をジーエルサイエンス社から購入した。HPLC 用アセトニトリル、塩化ベンザルコニウム (BK)、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、ポリオキシエチレン (10) オレイルエーテル (POE, OE) は和光純薬工業株式会社より購入した。その他の試薬は、試薬特級品を用いた。

20%プロピレングリコール試液：プロピレングリコール 20 mL に水を加え、100 mL とする。

DEP 溶液：DEP 約 0.05 g を精密に量り、20%エタノール溶液に溶かし、正確に 100 mL とした (0.05%)。

10 mM-BK 溶液：BK 約 36.7 mg を精密に量り、水 10.0 mL に溶解する。

10 mM-SDS 溶液：SDS 約 28.8 mg を精密に量り、水 10.0 mL に溶解する。

0.5% POE, OE 溶液：POE, OE 約 50 mg を精密に量り、水 10.0 mL に溶解する。

DEP を含む界面活性剤溶液：BK 約 36.7 mg、SDS 約 28.8 mg あるいは POE, OE 約 50 mg を、それぞれ、別々に量り、それぞれに DEP 溶液 10.0 mL を加えて溶解する。

2) 剥離皮膚の調製法

モルモット (ハートレー系、オス、250-300 g) をエーテル麻酔後、エーテルでの深麻酔および呼吸停止により処理した。腹部の毛を電気バリカンで除いた後、腹部の皮膚を剥離した。皮下脂肪を除き、凍結保存し、必要なときに解凍し

て用いた。

3) DEP の皮膚透過実験 (1)

モルモット剥離皮膚を縦型の Franz 型拡散セル (有効透過面積 0.246cm²) に表皮を donor 側に向けて装着した。donor 側に水、10 mM-SDS 溶液、10 mM-BK 溶液あるいは 0.5% POE, OE 溶液 1.0 mL を加え、receptor 側に 20%プロピレングリコール試液 1.9 mL を加えた。32°C で 2 時間放置後、donor 側の溶媒を除き、水で数回 donor 側を洗う。DEP 溶液 1.0 mL を donor 側に加え、32°C で 16~24 時間後に receptor 側の溶液 0.2 mL を分取した。この液 50 μL を用いて HPLC 法にて測定を行い、あらかじめ作成した検量線を用いて透過した DEP 量を求めた。なお、receptor 側に 20%プロピレングリコール試液 0.2 mL を加え、receptor 側の容量を一定とした。

(HPLC 条件)

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長：255 nm)

カラム：Unisil Q C₁₈ カラムを用いた。

カラム温度：35°C 付近の一定温度

移動相：水/アセトニトリル混液 (1:1)

流量：1 mL/min

4) DEP の皮膚透過実験 (2)

モルモット剥離皮膚を縦型の Franz 型拡散セル (有効透過面積 0.246cm²) に表皮を donor 側に向けて装着した。donor 側に DEP および DEP を含む界面活性剤溶液 1.0 mL を加え、receptor 側に 20%プロピレングリコール試液 1.9 mL を加えた。32°C で 16~24 時間後の receptor 側の溶液 0.2 mL を分取した。以下、3) DEP の皮膚透過実験 (1) と同様に操作した。

C. 研究結果

DEP 溶液を 20% プロピレングリコール 試液で正確に希釈し、1 mL 当たり 10 μ g を含む液を調製し、以後の実験に使用した。

1) 移動相について

Nancy らは¹⁾ 市販の levothyroxine sodium 錠へのパッケージからの DEP の溶解性を HPLC 法にて検討している。彼らは、DEP の分析に、 μ Bondapak C18 (30 \times 3.9 cm) を用い、移動相に水/アセトニトリル/リン酸混液 (65 : 35 : 0.1) を用いて分析している。そこで、逆相系の Unisil Q C18 カラムを用い、水/アセトニトリル混液の組成比を (65 : 35) ~ (50 : 50) と変化させたときの DEP の保持時間 (t_R) の変化を検討し、その結果を Fig.1 に示した。

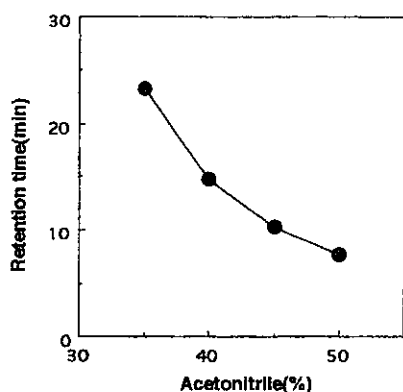


Fig.1 Effect of acetonitrile on retention time of DEP

Fig.1 から分かるように、アセトニトリルの濃度が増加するに従い、DEP の t_R が減少することが分かった。分析時間を 10 分付近にすることを考慮し、移動相として、水/アセトニトリル混液 (1 : 1) を用いることにした。

2) カラム温度について

移動相に水/アセトニトリル混液 (1 : 1) を用い、カラム温度を 25 ~ 40 $^{\circ}$ C に変更したときの結果を Fig.2 に示した。

カラム温度の上昇により、徐々に DEP の t_R が小さくなることが分かった。この結果より、カ

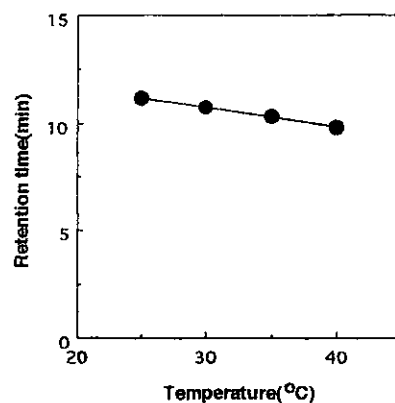


Fig.2 Effect of temperature on retention time of DEP

ラム温度を 35 $^{\circ}$ C とすることにした。

3) 検量線について

DEP 0.05 ~ 0.4 μ g/mL の溶液 50 μ L を用いて HPLC 条件にて検量線の作成を行った。その結果を Fig.3 に示した。

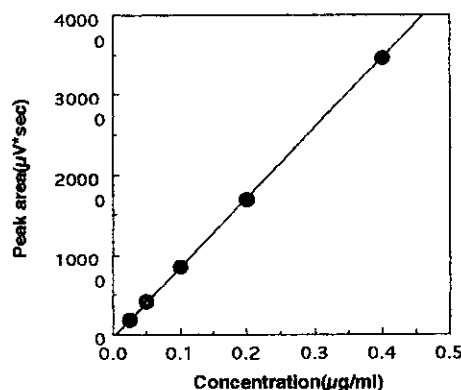


Fig.3 Working curve for DEP

濃度と Peak area の間には、回帰方程式 $y = -325.9 + 89319x$ ($r^2 = 1.000$) で示される良好な直線関係を示した。

4) DEP の剥離皮膚透過について

DEP の皮膚透過実験 (1) に従い、水あるいは 10 mM - SDS 溶液 1.0 mL を Franz 型拡散セルの donor 側に入れ、32 $^{\circ}$ C で 2 時間、剥離皮膚を処理した後、数回 donor 側を水で洗う。donor 側に DEP 溶液 1.0 mL を加え、32 $^{\circ}$ C で 14 ~ 24 時間後に剥離皮膚を透過する DEP 量を測定した。その結果を Fig.4 に示した。