

図2. Results of FTIR analysis. (a) Oxidation index. (b) Crystallinity.

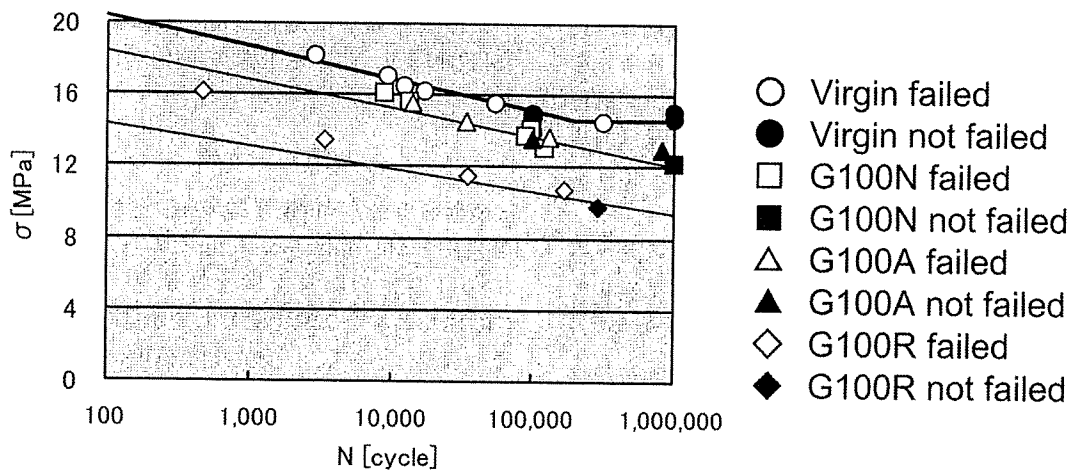


図3. Results of fatigue tests. Thick line shows the S-N curve for a virgin specimen. Fine lines indicate 90% and 70% stress levels.

はvirginのS-N曲線とともに、これに対して応力値でそれぞれ10%および30%低い値を示す直線を比較のために記載している。いずれの試料でも、一般的なS-N曲線と同様、右下がりの直線上に分布することがわかった。G100NとG100Aはほぼ同様の結果で、いずれもvirginのわずか下方に分布し、およそ10%の疲労特性の低下が認められた。G100Rはこれらより大きく下方に位置し、virginと比べおよそ30%の疲労特性の低下が認められた。

図4にG100Nの破断面のSEM観察結果を示す。なお、G100AとG100Rについては、G100Nとほぼ同様であったため示していない。架橋試

料では、virginと同様に菱形模様やストライエーション様の模様が観察されたが、virginに比べ菱形模様が不鮮明で、塑性が低下しているものと思われた。

考 察

本研究では、試作したHXLPEの疲労特性を、小さな試験片を用いる新しい試験法を用いて評価した。このことにより、不具合により抜去されたインプラントと直接比較し、評価することが可能になった。架橋試料ではいずれもvirginに比べ10%以上、疲労特性が低下しており、100kGyのガンマ線照射によりある程度疲労特

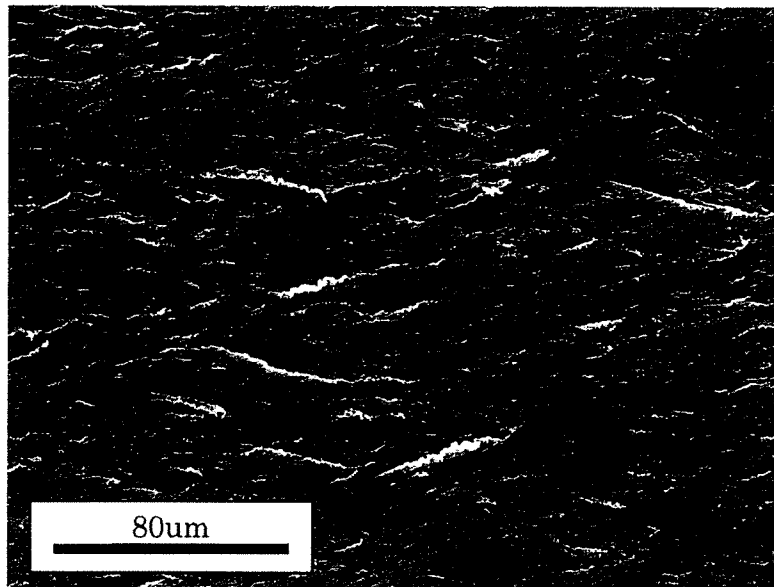


図4. SEM pictures of the fracture surface of G100N showing a striation-like pattern and trace of diamond-like pattern. Original magnification : $\times 500$.

性が低下するものと思われた。アニーリング処理を行った試料の疲労特性は、熱処理を行わなかったものとはほぼ同様であり、アニーリング処理による疲労特性の低下は少ないものと考えられた。溶融処理を行った試料ではvirginに比べおよそ30%程度の疲労特性の低下が見られた。G100Rでは、結晶化度の低下が見られており、これが疲労特性の低下につながった可能性が考えられた。この結果を、昨年度報告した抜去インプラントの測定結果¹¹⁾と比較すると、酸化劣化とデラミネーションが観察された膝関節脛骨UHMWPEコンポーネントで30%程度の疲労特性の低下が観察され、本研究におけるG100Rとほぼ同程度の疲労特性であることがわかった。

以上の結果は、HXLPE製品においても抜去インプラントと同様にデラミネーションが発生する可能性を示唆するものであるが、今後検討を要する点も少なくない。例えば、抜去インプラントの疲労特性評価では、実質的にコンポーネントのバルク部分の評価を行っている¹¹⁾。酸化による材料劣化はデラミネーションが発生する表層付近において最も進行することが知られ

ており、この部分の疲労特性は測定値よりさらに低いことが予想される。また、HXLPEの試作条件についても検討が必要と思われる。実際の製品では照射時の温度など、製造条件を詳細に検討していると考えられ⁹⁾、それらによる疲労特性への影響について考察、あるいは製品の直接評価が必要であると思われる。さらに、疲労特性は形状にも大きく依存することから、材料特性としての評価だけでなく、形状や動作なども考慮に入れ、疲労特性とデラミネーションに代表される不具合との関連性について検討を重ねる必要があると思われる。

結 論

抜去インプラントや最終製品の試験が可能な小さな試験片を用い、汎用の疲労試験機を使用して試作したHXLPEの疲労特性の評価を行った。ガンマ線処理によりわずかに疲労特性が低下すること、溶融処理によりさらに疲労特性が低下することがわかった。100kGyのガンマ線照射を行い、さらに溶融処理をした試料では、およそ30%疲労特性が低下しており、同条件で試験を行った、デラミネーションが観察された

膝関節抜去脛骨コンポーネントとほぼ同程度であった。この結果, HXLPEの中には疲労特性が低いものがある可能性があり, また, それによる不具合の発生が否定できないことから, 今後, さらに検討が必要であると思われる。

<謝 辞>

本研究は厚生労働科学研究費 医薬品医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業「医療機器・医用材料の安全性評価手法開発に関する研究」および安心安全次世代医療機器事業費による成果である。

文 献

- 1) ASTM E0647-00 : Standard test method for measurement of fatigue crack growth rates.
- 2) ASTM F2102-01 : Standard guide for evaluating the extent of oxidation in ultra-high-molecular-weight polyethylene fabricated forms intended for surgical implants.
- 3) Baker DA, Hastings RS et al. : Study of fatigue resistance of chemical and radiation crosslinked medical grade ultrahigh molecular weight polyethylene. *J Biomed Mater Res* 46 : 573-581, 1999.
- 4) Cole JC, Lemons JE et al. : Gamma irradiation alters fatigue-crack behavior and fracture toughness in 1900H and GUR 1050 UHMWPE. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 63 : 559-566, 2002.
- 5) Costa L, Jacobson K et al. : Effects of microto-
- my on the material properties of ultra high molecular weight polyethylene. *Polymer Testing* 20 : 649-659, 2001.
- 6) Digas G, Karrholm J et al. : Clinical performance of highly cross-linked PE with 5 year follow-up. *Orthopaedic Research Society, 53rd Annual Meeting* 53 : 392, 2007.
- 7) Gencur SJ, Rimnac CM et al. : Fatigue crack propagation resistance of virgin and highly crosslinked thermally treated ultra-high molecular weight polyethylene. *Biomaterials* : 27, 1550-1557, 2006.
- 8) Goldman M and Pruitt L : Comparison of the effects of gamma radiation and low temperature hydrogen peroxide gas plasma sterilization on the molecular structure, fatigue resistance, and wear behavior of UHMWPE. *J Biomed Mater Res* : 40, 378-384, 1997.
- 9) Greenwald AS, Ries MD et al. : Highly cross-linked polyethylenes : hopes vs. realities. *American Academy of Orthopaedic Surgeons, 72nd Annual Meeting* 2005.
- 10) Kurtz SM, Muratoglu OK et al. : Advances in the processing, sterilization, and crosslinking of ultra-high molecular weight polyethylene for total joint arthroplasty. *Biomaterials* 20 : 1659-1688, 1999.
- 11) 追田秀行, 鄭徳泳 他 : 微小試験片を用いた人工関節用UHMWPEの疲労特性評価. *日本臨床バイオメカニクス学会誌* 29 : 367-372, 2008.
- 12) Ulrich SD, Seyler TM et al. : Total hip arthroplasties : What are the reasons for revision ? *International Orthopaedics* 2007.

Chapter 16

Gamma-ray Irradiated Poly(L-lactide) for Bone Repair

Kazuo Isama and Toshie Tsuchiya

National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

1 Introduction

Poly(L-lactide) (PLLA) with a high molecular weight is used as biodegradable screws, pins and plates for internal bone fixation in the orthopedics. PLLA has been well reported on a good osteocompatibility *in vivo* and *in vitro*. The γ -ray irradiated PLLA sample was implanted *in vivo*, and newly bone was formed around the PLLA implant [1]. It was not clear whether there was the effect of γ -irradiation on the formation of newly bone in this result. However, it was the fact that γ -irradiation decreased the molecular weight and mechanical strength of PLLA. If the satisfied mechanical property was maintained, the γ -irradiation was suitable for PLLA devices. We performed the wear test of the γ -irradiated PLLA sheets and measured the particle size distribution of wear debris. On the other hand, PLLA fibers formed bone-like apatite in a simulated body fluid [2]. It was reported that the apatite layer formed on the bioactive glass increased the attachment and initial proliferation of osteoblasts [3]. If the apatite-forming ability of PLLA is increased by γ -irradiation, there may be a good influence on osteoblasts cultured on the irradiated PLLA. We clarified the effects of the γ -irradiated PLLA sheet on the osteoblasts and apatite formation *in vitro*.

2 Wear Characteristic of the Gamma-ray Irradiated PLLA Sheets

2.1 *Gamma-ray Irradiation of the PLLA Sheets*

The PLLA sheets made of high molecular weight PLLA with thickness of 0.3 mm were obtained from Shimadzu Co. (Kyoto, Japan). The PLLA sheets were γ -ray irradiated at the dose of 10, 25 or 50 kGy using ^{60}Co as the radiation source. The γ -irradiated PLLA sheets were preserved in the silica gel desiccator until next measurement.

2.2 *Molecular Weight of the PLLA*

The molecular weight of the γ -ray irradiated PLLA was determined by gel permeation chromatography. The polydispersity index was calculated as the ratio of the weight average molecular weight (M_w) to the number average molecular weight (M_n). The M_w of the γ -irradiated PLLA extremely decreased with the increasing irradiation dose. The M_w of 271,000 of the unirradiated PLLA was decreased to 95,000 by irradiation at 50 kGy. In contrast, the polydispersity index of the γ -irradiated PLLA was confined to the slight increase with the increasing irradiation dose, compatible with a random cleavage in the degradation mechanism [4–6]. Yoshioka et al. reported γ -irradiation of PLLA caused random cleavage of molecular chain with hydrolysis of ester bonds. In addition, they detected decomposition products having a molecular weight higher than lactic acid in alkali hydrolysis products of irradiated PLLA, and they suggested crosslinkage of molecular chain also occurred [7, 8]. We also analyzed of the γ -irradiated PLLA by high performance liquid chromatography after alkali hydrolysis. However, the quantity of decomposition products having a molecular weight higher than lactic acid was extremely slight. Otto et al. also observed that the molecular weight of PLLA was decreased from 160,000 to 35,200 by γ -irradiation at 25 kGy [9]. Thus, γ -irradiation caused cleavage for molecular chain and decreased the molecular weight of PLLA.

2.3 *Wear Test*

The PLLA sheets were cut out in the disk with the 14.0 mm diameter, and glass column of 11.0 mm diameter and 2.5 g weight was bonded on each PLLA disk. Then, the PLLA specimen was put in the cylindrical vessel of the 30.0 mm inside

diameter, in which bottom plane was #400 waterproof abrasive paper. Five milliliter of balanced electrolyte solution was added in the cylindrical vessel, and the whole vessel was gyrated of 15 mm radius at 200 rpm for 1 hour using a rotatory shaker.

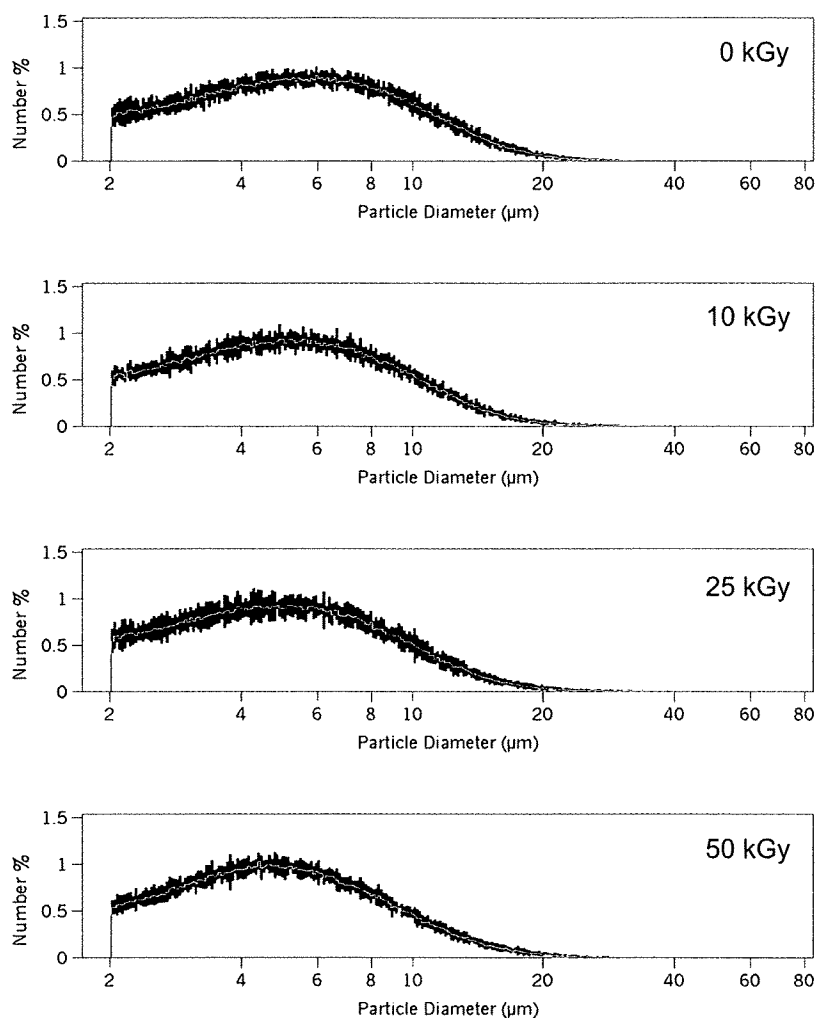


Figure 1. The particle size distribution of wear debris derived from the γ -irradiated PLLA sheet. The center line showed the mean, and the vertical width showed the mean \pm 2SD ($n = 9$).

2.4 Coulter Counter Analysis of Wear Debris

The particle size of PLLA wear debris in balanced electrolyte solution obtained by wear test was measured using the Coulter counter. The orifice tube with nominal aperture diameter of 100 μm was used and the particle diameter was measured in the range of 2–60 μm . The particle size distribution was obtained from mean number of each particle diameter. The mean particle diameter of PLLA wear debris was calculated from 9 times experiment.

2.5 Particle Size Distribution of Wear Debris from the PLLA Sheets

The particle size distributions of wear debris derived from the γ -ray irradiated PLLA sheets were shown in Fig.1. With the increasing irradiation dose, the particle size distribution of wear debris derived from irradiated PLLA shifted toward the smaller diameter size. The relationship between the irradiation dose of PLLA and the mean diameter of PLLA wear debris was shown in Fig.2. The mean diameter of PLLA wear debris was decreased 9.3% by irradiation at 50 kGy. The mean diameter of PLLA wear debris significantly decreased ($P < 0.0001$ by ANOVA) with the increasing irradiation dose. The tensile strength of irradiated PLLA also decreased with the increasing irradiation dose [4]. When the abrasive wore the PLLA specimen, the surface of PLLA would be easily cracked, because the tensile strength was lower. In fact, the minute crack had been observed on the surface of the 50 kGy irradiated PLLA disk,

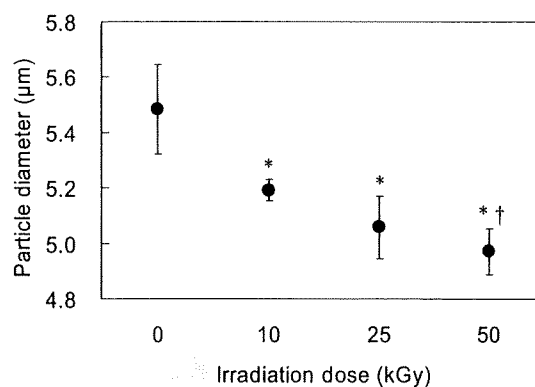


Figure 2. The effect of γ -ray irradiation on particle size distribution of PLLA wear debris. *Significant difference compared with unirradiated PLLA at $P < 0.01$. †Significant difference compared with 10 kGy irradiated PLLA at $P < 0.01$.

microscopically. Therefore, the decrease of tensile strength of PLLA by the γ -irradiation caused the decrease in particle diameter of PLLA wear debris.

3 Apatite Formation on the Gamma-ray Irradiated PLLA Sheets

3.1 Soaking in the Acellular Medium

The PLLA sheet was cut into 14.0 mm diameter disk and laid in a 24-well dish. The complete medium of 1 ml was added without the cells. Then, the dish was stored in a 37°C humidified atmosphere of 5% CO₂, and the complete medium was changed three times a week. After soaking for 2 weeks, the PLLA disk was washed in deionized water five times quickly and dried in a silica gel desiccator.

3.2 Surface Analysis

The surface of the PLLA sheet before and after soaking in the complete medium without the cells was characterized by scanning electron microscope (SEM), energy dispersive X-ray analysis (EDX), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) according to the conventional methods.

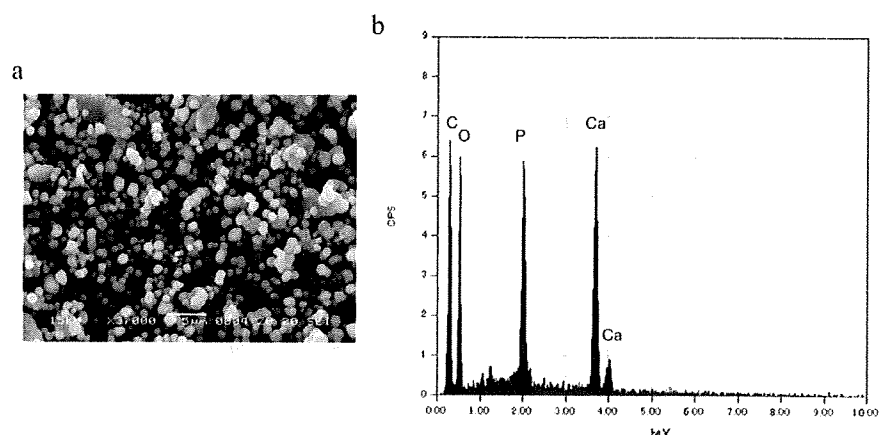


Figure 3. The SEM image (a) and the EDX spectrum (b) of the PLLA sheet after soaking in the acellular medium for 2 weeks.

3.3 Apatite Formation on the PLLA Sheets in the Acellular Medium

The SEM micrograph exhibited crystal particles on the surface of the PLLA sheet after soaking in the complete medium without the cells (Fig.3a). The crystal particles were identified with hydroxyapatite by EDX, FT-IR and XPS spectra (Fig.3b). The phosphate band in attenuated total reflection (ATR)/FT-IR spectra became strong with irradiation dose (Fig.4a). Moreover, the element ratios of calcium and phosphorus increased but that of carbon decreased with irradiation dose, in XPS analysis (Fig.4b). The amount of hydroxyapatite formed on the γ -ray irradiated PLLA sheet increased with irradiation dose [10].

3.4 Surface Carboxyl Group on the PLLA Sheets

The surface carboxyl group on the γ -ray irradiated PLLA sheets was determined by XPS in combination with chemical derivatization. The carboxyl group content of the PLLA surface was increased by γ -irradiation.

The γ -irradiation increased the apatite-forming ability of the PLLA sheet. Tanahashi and Matsuda reported that some negatively charged groups such as phosphate and carboxyl group strongly induced apatite formation in a simulated body fluid. They described that the apatite formation was initiated via calcium ion-absorption upon complexation with a negative surface-charged group [11]. In our study, the molecular weight of PLLA decreased with hydrolysis of ester bonds by γ -irradiation [4]. Therefore, the surface density of carboxyl group of the γ -irradiated PLLA sheets increased with irradiation dose, and the carboxyl group would promote the apatite-forming ability of the PLLA sheet.

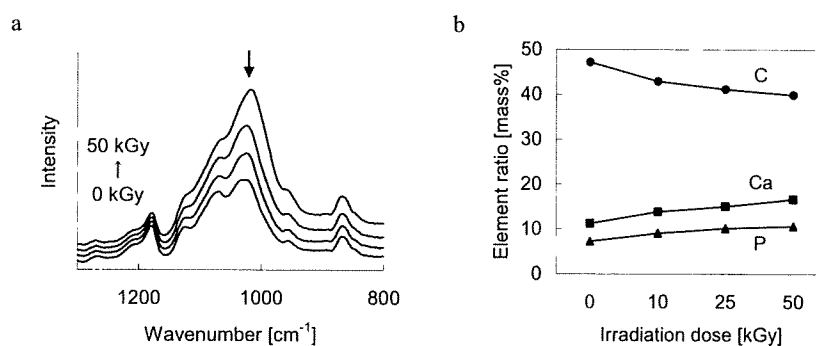


Figure 4. The phosphate band (a) and the element ratios of calcium, phosphorus and carbon of the γ -irradiated PLLA sheet after soaking in the medium.

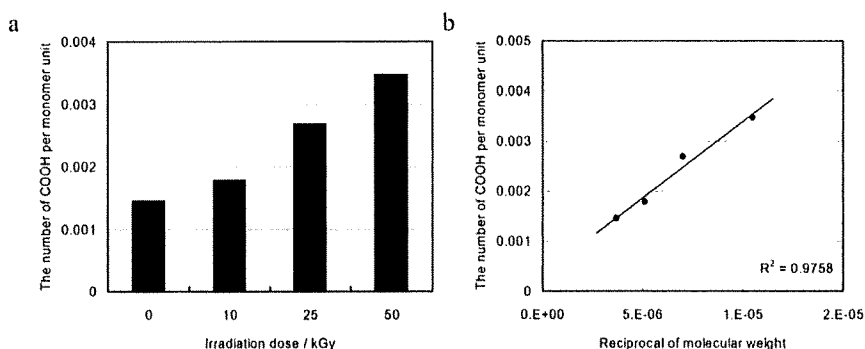


Figure 5. The surface density of carboxyl group of the γ -irradiated PLLA sheets by XPS with chemical derivatization (a) and the relation between the surface density of carboxyl group and the molecular weight of the γ -irradiated PLLA sheet (b).

4 Osteoblast Differentiation on the Gamma-ray Irradiated PLLA Sheets

4.1 Micromass Culture of Osteoblasts

Mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells (RIKEN Cell Bank, Japan) and normal human osteoblast NHOst cells (Clonetics Corporation, MD, USA) were grown in alpha minimum essential medium (α -MEM) supplemented with 20% fetal bovine serum. The PLLA sheet was cut into 14.0 mm diameter disk and laid in a 24-well dish. The 20 μ l of cell suspension (2×10^6 cells/ml) was delivered on the disk. After the cells were attached on the disk, 1 ml of the complete medium that contained 10 mM disodium β -glycerophosphate in the culture medium was added. The complete medium was changed three times a week, and the cells cultured for 2 weeks in a 37°C humidified atmosphere of 5% CO₂.

4.2 Assay of Proliferation and Differentiation of Osteoblasts

The cell proliferation was estimated with the cell number, the protein and DNA content. The number of the cells cultured on the PLLA sheet was determined by WST-8 assay. The protein and DNA contents of the cell lysate were measured by the Lowry method and the fluorescence assay using Hoechst 33258 dye, respectively [12, 13].

The osteoblastic differentiation was estimated with the calcification, the collagen synthesis and the alkaline phosphatase (ALP) activity. The calcium depositions of the cell cultures were stained by alizarin red S, and the areas stained dark-red were measured. The calcification was calculated as the normalized area in the cell number. Moreover, the collagen synthesis was evaluated by the hydroxyproline content of the cell lysate, and the ALP activity of the cells was measured using p-nitrophenylphosphate as a substrate [12, 13]. The osteoprogenitor cells first differentiate into immature osteoblasts characterized by the expression of ALP and then into mature osteoblasts characterized by the expression of osteocalcin and calcification [14].

4.3 Osteoblasts Cultured on the PLLA Sheets

The cell number of MC3T3-E1 cells cultured on the PLLA sheet did not change with increasing irradiation dose (Fig.6a). The protein and DNA contents of the cells also did not change. The other side, the cell number, protein and DNA contents of NHOst cells cultured on the PLLA sheet slightly decreased with irradiation dose (Fig.6b). The calcification of MC3T3-E1 cells (Fig.7a) and

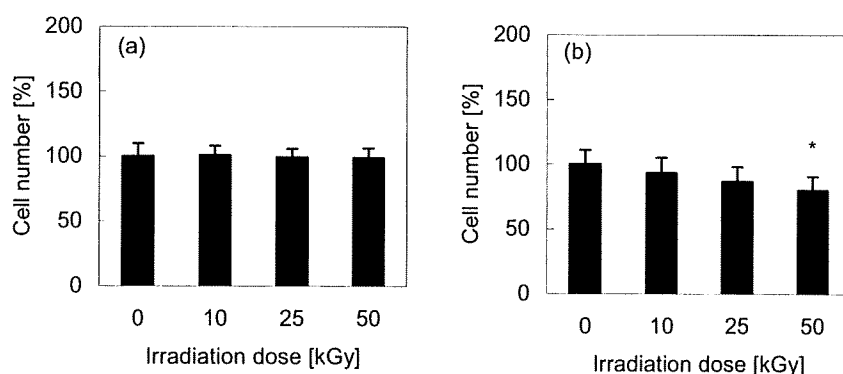


Figure 6. The cell numbers of (a) MC3T3-E1 and (b) NHOst cells cultured on the γ -irradiated PLLA sheet.

NHOst cells (Fig.7b) remarkably increased with irradiation dose. The collagen synthesis and ALP activity of MC3T3-E1 and NHOst cells also increased as same as the calcification, respectively [12, 15]. The γ -ray irradiated PLLA remarkably promoted the differentiation of osteoblasts. The γ -irradiated PLLA

hardly affected the proliferation but remarkably promoted the differentiation of osteoblasts. It was expected that the low molecular weight PLLA eluted to the medium, because the molecular weight of PLLA decreased by γ -irradiation. Otto et al. also reported when mouse osteoblastic cells were cultured with γ -irradiated PLLA wire for 48 hours, DNA content did not change, but ALP activity increased by 28% [16].

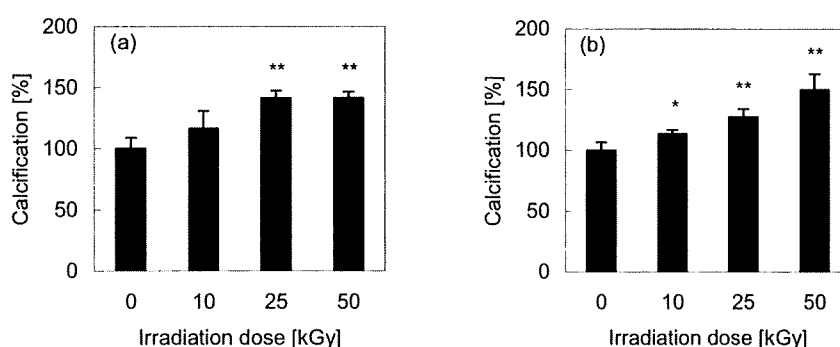


Figure 7. The calcifications of (a) MC3T3-E1 and (b) NHOst cells cultured on the γ -irradiated PLLA sheet.

Ikarashi et al. reported that heat treatment of PLLA did not affect the proliferation of MC3T3-E1 cells cultured on heat treated PLLA, but the differentiation of MC3T3-E1 cells was increased. They described that lower change in the molecular weight of PLLA was a cause of stimulation of MC3T3-E1 cells cultured on the heat treated PLLA [17].

Moreover, they reported that the low molecular weight PDLA did not affect the proliferation, but increased the differentiation of MC3T3-E1 cells. They also indicated that low molecular weight PDLA stimulated the differentiation of MC3T3-E1 cells [18]. In our recent studies, the low molecular weight PLLA enhanced the differentiation of MC3T3-E1 cells but inhibited that of NHOst cells [14, 19]. The present results, which the differentiations of MC3T3-E1 and NHOst cells both increased on the γ -irradiated PLLA sheet, would not be caused by the low molecular weight PLLA. The surface of the γ -irradiated PLLA should good influence on the differentiation of osteoblasts.

Fujibayashi et al. compared *in vivo* bone ingrowth and *in vitro* apatite formation on Na₂O-CaO-SiO₂ glasses. The quantities of newly bone formed on the glasses correlated with their apatite-forming abilities in simulated body fluid. They propose to evaluate the apatite-forming ability in order to confirm the *in vivo* bioactivity of biomaterials [20]. In our present study, the γ -irradiation enhanced the apatite-forming ability of the PLLA sheet, and then the γ -irradiated PLLA sheet promoted the differentiation of osteoblasts. The osteoblast differentiation should connect with the apatite formation on the γ -irradiated PLLA sheet.

5 Conclusions

The molecular weight of PLLA decreased with the increasing irradiation dose. In addition, the particle size distribution of PLLA wear debris shifted toward the smaller diameter size, and the mean diameter of PLLA wear debris significantly decreased, with the increasing irradiation dose. It was indicated that the lowering of the molecular weight by γ -ray irradiation caused the decrease in tensile strength of irradiated PLLA and the particle size of PLLA wear debris derived from irradiated PLLA.

The hydroxyapatite was formed on the PLLA sheet in the acellular medium, and the γ -irradiation enhanced apatite-forming ability of the PLLA. On the other hand, the γ -irradiated PLLA hardly affected the proliferation but promoted the differentiation of osteoblasts with increasing irradiation dose. It was suggested that the connection between the apatite formation and the osteoblast differentiation on the γ -irradiated PLLA sheets.

Acknowledgments

A part of this study was financially supported by the Budget for Nuclear Research of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, based on the screening counseling by the Atomic Energy Commission, and supported by Health Labour Sciences Research Grants from the Ministry of Health Labour and Welfare.

References

1. Otto T.E., Patka P., Haarman H.J.Th.M., Klein C.P.A.T., Vriesde R., 1994. Intramedullary bone formation after polylactic acid wire implantation, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 5, 407–410.
2. Yuan X., Mak A.F.T., Li J., 2001. Formation of bone-like apatite on poly(L-lactic acid) fibers by a biomimetic process, *J. Biomed. Mater. Res.* 57, 140–150.
3. Olmo N., Martin A.I., Salinas A.J., Turnay J., Vallet-Regi M., Lizarbe M.A., 2003. Bioactive sol-gel glasses with and without a hydroxycarbonate apatite layer as substrates for osteoblast cell adhesion and proliferation, *Biomaterials* 24, 3383–3393.
4. Isama K., Tsuchiya T., 2001. Change in the particle size distribution of poly(L-lactide) wear debris by γ -irradiation, *Bull. Natl. Inst. Health Sci.* 119, 61–64.
5. Reich G., 1998. Ultrasound-induced degradation of PLA and PLGA during microsphere processing: influence of formulation variables, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45, 165–171.
6. Mohr D., Wolff M., Kissel T., 1999. Gamma irradiation for terminal sterilization of 17beta-estradiol loaded poly-(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles, *J. Control. Release.* 61, 203–217.
7. Yoshioka S., Aso Y., Otsuka T., Kojima S., 1995. The effect of γ -irradiation on drug release from poly(lactide) microspheres, *Radiat. Phys. Chem.* 46, 281–285.
8. Yoshioka S., Aso Y., Kojima S., 1995. Drug release from poly(*dl*-lactide) microspheres controlled by γ -irradiation, *J. Control. Release.* 37, 263–267.
9. Otto T.E., Patka P., Haarman H.J.Th.M., Klein C.P.A.T., Vriesde R., 1994. Intramedullary bone formation after polylactic acid wire implantation, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 5, 407–410.
10. Isama K., Tsuchiya T., 2005. Osteoblast differentiation and apatite formation on gamma-irradiated PLLA sheets, *Key Eng. Mater.* 288–289, 409–412.
11. Tanahashi M., Matsuda T., 1997. Surface functional group dependence on apatite formation on self-assembled monolayers in a simulated body fluid, *J. Biomed. Mater. Res.* 34, 305–315.
12. Isama K., Tsuchiya T., 2002. Effect of γ -ray irradiated poly(L-lactide) on the differentiation of mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 13, 153–166.
13. Isama K., Matsuoka A., Haishima Y., Tsuchiya T., 2002. Proliferation and differentiation of normal human osteoblasts on dental Au-Ag-Pd casting alloy: Comparison with cytotoxicity to fibroblast L929 and V79 cells, *Mater. Trans.* 43, 3155–3159.
14. Isama K., Ikarashi Y., Tsuchiya T., 2002. Surface analysis and osteoblast function on gamma-ray irradiated poly(L-lactide), *BIO INDUSTRY* 19, 21–29.

15. Thompson G.J., Puleo D.A., Ti-6Al-4V ion solution inhibition of osteogenic cell phenotype as a function of differentiation timecourse in vitro, *Biomaterials* 17, 1949–1954.
16. Otto T.E., Nulend J.K., Patka P., Burger E.H., Haarman H.J.Th.M., 1996. Effect of (poly)-L-lactic acid on the proliferation and differentiation of primary bone cells in vitro, *J. Biomed. Mater. Res.* 32, 513–518.
17. Ikarashi Y., Tsuchiya T., Nakamura A., 2000. Effect of heat treatment of poly(L-lactide) on the response of osteoblast-like MC3T3-E1 cells, *Biomaterials* 21, 1259–1267.
18. Ikarashi Y., Tsuchiya T., Kaniwa M., Nakamura A., 2000. Activation of osteoblast-like MC3T3-E1 cell responses by poly(lactide), *Biol. Pharm. Bull.* 23, 1470–1476.
19. Isama K., Tsuchiya T., 2003. Enhancing effect of poly(L-lactide) on the differentiation of mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells, *Biomaterials* 24, 3303–3309.
20. Fujibayashi S., Neo M., Kim H.M., Kokubo T., Nakamura T., 2003. A comparative study between in vivo bone ingrowth and in vitro apatite formation on Na₂O-CaO-SiO₂ glasses, *Biomaterials* 24, 1349–1356.

ポリ乳酸プラスチック中の有機スズ化合物の分析

大嶋智子、尾崎麻子、中島晴信*、伊佐間和郎**、土屋利江**

Determination of Organotin Compounds in Polylactide Plastics by Gas Chromatography – Mass Spectrometry

Tomoko OOSHIMA, Asako OZAKI, Harunobu NAKASHIMA*, Kazuo ISAMA** and Toshie TSUCHIYA**

Abstract

Tin octylate (tin 2-ethylhexanoate) is widely used as a catalyst in the polymerization of polylactide plastics. Moreover, organotin compounds such as dibutyltin (DBT) and dioctyltin (DOT) are used as stabilizers of polyvinyl chloride. Therefore, residual organotin (butyltin, phenyltin and octyltin) compounds in polylactide plastics were simultaneously determined by gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS) after ethyl derivatization with sodium tetraethylborate (NaBEt₄). Tin octylate was detected as tetraethyltin by this method. Tin octylate level was 192 µg/g in 1 out of 4 samples of polylactide plastics. The other organotin compounds were not detected as contaminants of tin octylate in the 4 tested samples.

Key words: tin 2-ethylhexanoate, polylactide plastics, GC-MS, ethyl derivatization

I 緒言

循環型社会の構築や環境への負荷を低減するため、植物を原料とするバイオプラスチックの需要は大きくなっている。このようなプラスチックはトウモロコシなどに多く含まれているデンプンを発酵して得た乳酸を原料として開発が進められ、その重合触媒にはジブチルスズ化合物(DBT)やオクチル酸スズ等の有機スズ化合物が用いられている。ポリ乳酸プラスチックの用途としては、医用材料や食品用の容器包装プラスチック等、様々なものに応用されている。安全性を確保するために、食品衛生法では食品用容器包装のポリ乳酸プラスチックの個別規制がはじまり、D-乳酸含有量による使用制限等が行われている状況にある[1]。触媒についても、同じような観点でプラスチックへの残留量の確認が求められる。DBTの毒性については、ラット胎児に下顎裂、下唇裂、肋骨癒合など骨格奇形等の催奇形性が発生す

ることが報告されている[2]。一方、よく使用されるオクチル酸スズは、胃酸中37°Cで2-エチルヘキサノ酸に加水分解されることから、健康影響は2-エチルヘキサノ酸およびスズ(+2)で検討されたが、その安全性はプラスチックへの使用がごくわずかなことから人への影響もごくわずかと考えられ、ADIの設定には至っていない[3]。また、オクチル酸スズについては、脳由来細胞を用いた安全性評価法も検討されている[4]。しかし、プラスチック中にオクチル酸スズの残留量が多い場合には安全性に問題があると考えられ、さらに不純物として含まれる有機スズ化合物についても把握する必要がある。特に、DBTの不純物として含有するおそれのあるトリブチルスズ化合物(TBT)[5]は、トリフェニルスズ化合物(TPT)と共に世界的な海洋汚染物質として広く知られており、巻貝類へのインボセックスなどの内分泌かく乱作用が問題となっている[6,7]。本報では、ポリ乳酸プラスチック中の有機スズ化合物について、簡易で精

大阪市立環境科学研究所、〒543-0026 大阪市天王寺区東上町 8-34

Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences

8-4 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan

*大阪府立公衆衛生研究所、〒537-0025 大阪市東成区中道 1-3-69

Osaka Prefectural Institute of Public Health,

1-3-69 Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan

**国立医薬品食品衛生研究所、〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

National Institute of Health Sciences,

1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

度の高い分析法として報告される[8-11]テトラエチルホウ酸ナトリウム(NaBET₄)によるエチル誘導体化を行い、ガスクロマトグラフィー質量分析計(GC-MS)を用いて測定し、その残留実態を調査した。

II 実験方法

1) 試料

ポリ乳酸を原料とするプラスチック製品4試料を試験試料とした(Table 1)。

Table 1 Characteristics of polylactic plastics

Sample No.	Composition	Molecular weight
1	PLGA	200,000
2	PLLA	200,000
3	PLLA	200,000
4	PLLA	5,000

PLLA : poly (L-lactic acid)

PLGA : poly (lactic-co-glycolic acid)

2) 試薬

モノ、ジおよびトリブチルスズ化合物(MBT, DBT, TBT)、モノ、ジおよびトリフェニルスズ化合物(MPT, DPT, TPT)、モノ、ジおよびトリオクチルスズ化合物(MOT, DOT, TOT)の各塩化物は和光純薬製あるいは林純薬製を用いた。テトラブチルスズ(TeBT)は和光純薬製、テトラオクチルスズ(TeOT)は日東化成製、テトラフェニルスズ(TePT)は東京化成工業製を用いた。サロゲートとして用いたモノ、ジ、トリ体のブチル、フェニル、オクチルスズ化合物およびテトラブチルスズの同位体およびNaBET₄は林純薬製の環境分析用を用いた。酢酸はナカライテスク製、酢酸ナトリウムは和光純薬製のいずれも特級試薬を用いた。アセトンは関東化学製、n-ヘキサン、トルエンおよびジクロロメタンは、和光純薬製のいずれも残留農薬用を用いた。

これら有機スズ化合物は、TPTおよびTePTはトルエンを溶媒として用い、その他はn-ヘキサンを用いて、約1000 µg/mLの標準原液を作成し10 µg/mLに混合調製して添加回収用混合標準溶液とした。分析用混合標準溶液は、エチル化の必要がない各種テトラ体を混合標準溶液に加え、エチル化後にテトラ体を添加して調製した。

サロゲート混合液は、MBT-d₉、DBT-d₁₈、TBT-d₂₇、MPT-d₅、DPT-d₁₀、TPT-d₁₅、MOT-d₁₇、DOT-d₃₄、TOT-d₅₁の各塩化物同位体をアセトンで10 µg/mLに混合調製した。

内部標準溶液は、テトラブチルスズの同位体(TeBT-d₃₆)をn-ヘキサンで10 µg/mLに調製した。

酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)は、2 mol/L酢酸と2 mol/L酢酸ナトリウム水溶液を5.9:14.1の割合で混合後、pH5.0に調整した[8-10]。

4% NaBET₄水溶液は、用時調製した。

また、オクチル酸スズ(2-エチルヘキサン酸スズ)は和光純薬製を用いた。トルエンで標準原液を作製し、アセトンで希釈調製した。

なお、本試験で使用する器具等は、すべてアセトン、n-ヘキサンで洗浄したものを用いた。

3) GC-MS装置及び条件

装置; GC-MS: HP6890GCにHP5973質量分析計を装備したもの

条件; カラム: HP-5ms(30m×0.25mm×0.25 µm)、oven: 60°C(2min) $\xrightarrow{20^\circ\text{C}/\text{min}}$ 130°C $\xrightarrow{10^\circ\text{C}/\text{min}}$ 210°C $\xrightarrow{5^\circ\text{C}/\text{min}}$ 260°C $\xrightarrow{10^\circ\text{C}/\text{min}}$ 300°C(2min)、キャリアーガス: 1mL/min(定流量モード)、注入口温度: 270°C、インターフェース温度: 280°C、注入法: スプリットレス、注入量: 1 µL、イオン源温度: 230°C、イオン化エネルギー: 70eV

SIMイオン; MBT(235, 233)、MBT-d₉(244, 242)、DBT(261, 263)、DBT-d₁₈(281, 279)、TBT(263, 261)、TBT-d₂₇(318, 316)、MPT(255, 253)、MPT-d₅(260, 258)、DPT(303, 301)、DPT-d₁₀(313, 311)、TPT(351, 349)、TPT-d₁₅(366, 364)、MOT(291, 289)、MOT-d₁₇(308, 306)、DOT(375, 373)、DOT-d₃₄(409, 407)、TOT(375, 373)、TOT-d₅₁(409, 407)、TeBT(291, 289)、TeBT-d₃₆(318, 316)、TePT(351, 349)、TeOT(459, 457)、TeET(207, 205)(定量イオン、確認イオン)で示す。

4) 試験溶液の調製

50 mLの遠沈管に細切した試料0.3 gを秤量し、ジクロロメタン3 mLを加え超音波条件下で約30分間溶解した後、サロゲート混液 1mLを加え混和した。そこにアセトン15 mLおよび濃塩酸1滴を加え、超音波条件下で5分抽出した後、さらにn-ヘキサン30 mLを徐々に滴下し、ポリマーを析出させた。3000 rpmで5分間遠心分離して、上澄みを分取した。残さにアセトン:n-ヘキサン(3:7)溶液30 mLで再度5分間超音波により抽出した後、先と同様に遠心分離を行い、上澄みを合わせた。それを数mLまで減圧濃縮(40°C以下)した後、窒素パージによる溶媒除去を行った。エタノール2 mLを加え溶解し、酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液5 mLを加え50 mL遠沈管に移した。4%NaBET₄水溶液 1mLおよびn-ヘキサン2 mLを加え混和し、10分放置後、n-ヘキサン8 mLを加え10分間振とう抽出し、上澄みを分取した。さらに下層にn-ヘキサン10 mLを加え、10分振とう抽出し、静置後に分取した上澄みを合わせ濃縮した。n-ヘキサンで正確に10 mLとし、そのうちの1 mLに内部標準溶液 20 µLを添加し、GC-MSによるSIM分析を行った。

Ⅲ 結果および考察

1) 標準溶液のGC-MS分析

ヘキサン溶液中のエチル化した有機スズ化合物の混合標準溶液(1 μg/mL)のGC-MS分析によるトータルイオンクロマトグラム(TIC)をFig. 1に示した。TeBT-d₃₆を内部標準として用いた検量線は、DBT、TBT、TeBT、MPT、DPT、TPT、MOTは0.005-2.0 μg/mLの範囲でr²値が0.990-1.000の良好な直線性を示し、MBT、TeOTは0.01-2.0 μg/mLの範囲でr²値がそれぞ

れ0.999、0.995の良好な直線性を示した。DOTは0.05-2.0 μg/mLの範囲でr²値が0.988の直線性およびTOTは同範囲でr²値が0.962のおおむね良好な二次曲線を示した。よって各有機スズ化合物の定量は、この範囲で行った。また、オクチル酸スズをエチル化した時のTICおよびそのマスペクトルをFig. 2に示した。オクチル酸スズは分解されやすいといわれており、本法により分解して塩化スズとなり、NaBEt₄によりエチル化されテトラエチルスズ(TeET)として検出された。TeBT-d₃₆を内部標準として用いたTeETの検量線は1-100 μg/mL

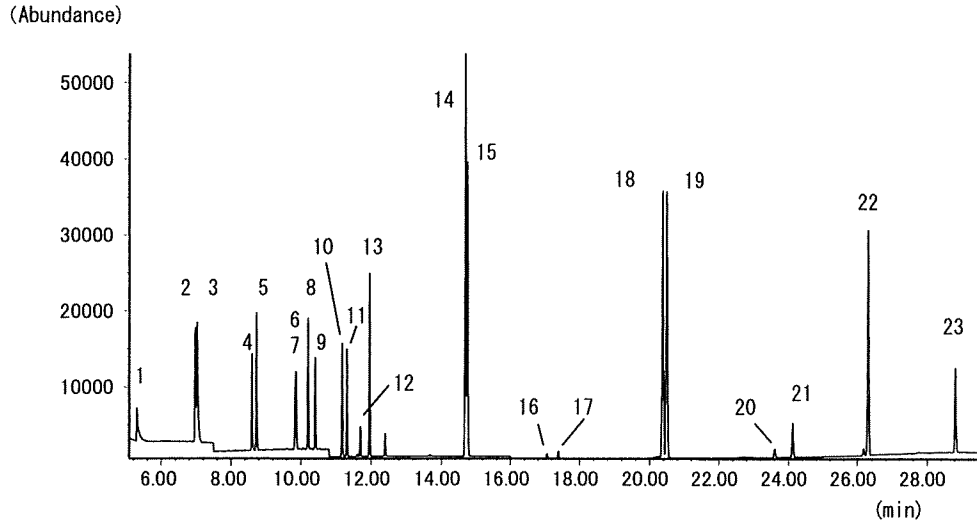


Fig. 1 Total ion chromatogram of organotin compounds and their surrogate standards by GC-MS after ethyl derivatization

1: TeET, 2: MBT-d₉, 3: MBT, 4: DBT-d₁₈, 5: DBT, 6: MPT-d₅, 7: MPT, 8: TBT-d₂₇, 9: TBT, 10: MOT-d₁₇, 11: MOT, 12: TeBT-d₃₆, 13: TeBT, 14: DPT-d₁₀, 15: DPT, 16: DOT-d₃₄, 17: DOT, 18: TPT-d₅₁, 19: TPT, 20: TOT-d₅₁, 21: TOT, 22: TePT, 23: TeOT

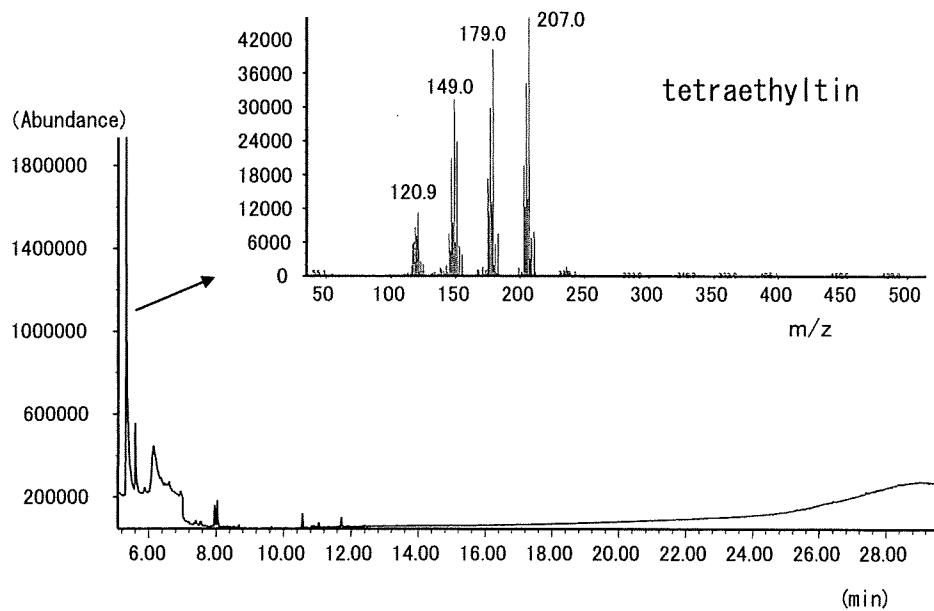


Fig. 2 Total ion chromatogram and mass spectrum of tin 2-ethylhexanoate by GC-MS after ethyl derivatization

の範囲で r^2 値が0.983の良好な直線を示したので、その範囲で定量した。

また、各標準溶液のサロゲートを内部標準として用いた検量線は、DBT、TBT、MPT、DPT、TPT、MOTは0.005-2.0 μ g/mLの範囲で、MBT、DOTは0.01-2.0 μ g/mLの範囲で、TOTは0.05-2.0 μ g/mLの範囲で r^2 値がそれぞれ0.990~1.000の良好な直線を示したので、その範囲で定量した。

2) 有機スズ化合物の抽出

プラスチック試料No.1は粉末状、No.2およびNo.4は細片であったが、No.3の粒形は1×3mmの円柱状で硬質であった。硬質のプラスチック中の添加物や残留モノマーを測定する場合、食品衛生法ではテトラヒドロフランやジクロロメタンで溶解してからエタノールやアセトンなどでポリマーを析出させた上澄を試験溶液とする[12]。六鹿らはポリ乳酸の分子量や遊離ラクチドの測定に際して、ジクロロメタンで溶解させて行った[13]。今回、ポリ乳酸を原料とするプラスチックを試料とすることから、どの試料もジクロロメタンに溶解させた後、さらに残渣から有機スズ化合物を抽出するために河村らが抽出に用いたアセトン:n-ヘキサン(3:7)による抽出[12,14]を行い、実験方法4. 試験溶液の調製に従って前処理を行った。

3) NaBET₄によるエチル化

NaBET₄によるエチル化をポリ塩化ビニル製品に適

用した大野ら[10]の方法に従い、2% NaBET₄溶液1 mLを用いたところ、本試料ではデータがばらつき、反応試薬の劣化や消費が多いと考えられた。重合触媒にオクチル酸スズが使用され製品中の残留量が134.4 μ g/gであったと報告[15]されたNo.1では、テトラエチルスズが多く検出されたが定量値はばらつく結果となった。その原因として、オクチル酸スズ含有量が多いことから、2% NaBET₄の消費が多く、データがばらついたと考えられる。底質試料に対して2% NaBET₄溶液2 mLを適用していたこと[11]、試薬の劣化を避けることを考慮し、本法では先の2倍濃度の4% NaBET₄溶液を1 mL用いることにした。

4) 添加回収試験

試料No.3に対して添加回収試験を実施した。秤量した試料をジクロロメタンで溶解したところ各標準を10 μ g添加し、混和した後、実験方法4)に従い試験溶液を調製して回収率を求めた。Table 2に、内部標準補正により得られた結果とサロゲート補正により得られた結果を比較して示した。TeBT-d₃₆による内部標準補正では、MBT、DBT、TBTのブチルスズ化合物で回収率は86.2-91.9%と良好であったが、ややばらつきが大きい結果となった。またTPT、TeOTでそれぞれ74.3、80.9%の回収率が得られた。これら5種類の有機スズ化合物では分析可能であったが、MPT、DPT、MOT、DOT、TOTの回収率は163-200%を超え、TeBTでは、35.8%と低く、TePTは検出されなかった。

Table 2 Recovery of organotin compounds from polylactic plastics

	Amounts spiked* (μ g)	Recovery (%)	
		Corrected by the internal standard	Corrected by corresponding surrogate standards
MBT	10	88.1 ± 18.5	109 ± 1.5
DBT	10	91.9 ± 29.7	104 ± 1.0
TBT	10	86.2 ± 40.9	119 ± 1.8
TeBT	10	35.8 ± 20.8	-
MPT	10	186 ± 37.5	102 ± 7.7
DPT	10	190 ± 13.5	143 ± 1.6
TPT	10	74.3 ± 6.0	218 ± 2.2
TePT	10	ND	-
MOT	10	>163	110 ± 1.4
DOT	10	>200	116 ± 0.8
TOT	10	>200	127 ± 2.0
TeOT	10	80.9 ± 6.7	-

Sample No.3 was used for the recovery examination.

Values show mean ± standard deviation. (n=3)

*: spiked in sample 0.3 g

-: not determined with surrogate standards

MBT: monobutyltin, DBT: dibutyltin, TBT: tributyltin, TeBT: tetrabutyltin, MPT: monophenyltin, DPT: diphenyltin, TPT: triphenyltin, TePT: tetraphenyltin, MOT: monoocetyltn, DOT: dioctyltin, TOT: trioctyltin, TeOT: tetraocetyltn (ethyl derivatization)

Table 3 Contents of organotin compounds in polylactic plastics corrected by the internal standard

Sample No.	Content ($\mu\text{g/g}$)												
	TeET*	MBT	DBT	TBT	TeBT	MPT	DPT	TPT	TePT	MOT	DOT	TOT	TeOT
1	192 \pm 120	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Detection limit in samples ($\mu\text{g/g}$)	3.3	0.17	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.83	0.83	0.17

*: tin 2-ethylhexanoate content calculated by subtracting blank value from TeET value

Value shows mean \pm standard deviation. (n=3)

TeET: tetraethyltin

Table 4 Contents of organotin compounds in polylactic plastics corrected by corresponding surrogate standards

Sample No.	Content ($\mu\text{g/g}$)									
	MBT	DBT	TBT	MPT	DPT	TPT	MOT	DOT	TOT	
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Detection limit in samples ($\mu\text{g/g}$)	0.17	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.17	0.83	

次に、各有機スズ化合物のサロゲート補正による回収率は、TPT以外のMBT、DBT、TBT、MPT、MOT、DOTおよびTOTで102-127%と良好で、ばらつきも小さく満足な結果が得られた (Table 2)。DPTの回収率は143%とやや大きく、TPTは218%となり添加量の約2倍の回収率を示したが、内部標準補正と比較して、サロゲート補正による結果は、TPT以外の有機スズ化合物において良好な結果が得られた。サロゲート補正によるTPTの結果は、TePTが脱フェニルしTPTとなったことにより定量値が2倍になったと計算できる。TePTが光分解してTPT、DPT等に脱フェニルすることが報告されており[16]、TPTがさらに脱フェニルした結果、DPTの回収率はやや大きくなったと推察される。

5) 試料中の有機スズ化合物

試料中の有機スズ化合物について、内部標準補正した結果を Table 3 に、サロゲート補正した結果を Table 4 に示した。Table 3, 4 に示すように、いずれもNo.1~4の試料中に、モノ〜テトラ体の4種のブチル、フェニル、オクチルスズ化合物 (全12種類) は検出されなかった。オクチルスズについては、添加回収率を求めているが、本法によりテトラエチルスズとして定量できるため、TeBT-d₃₆を内部標準として定量した結果を Table 3 に合わせて示した。その際、サロゲート化合物を含む有機スズ化合物の分解や溶剤等の試薬からわずかに由来するスズ化合物がエチル化されてもテトラエチルスズ

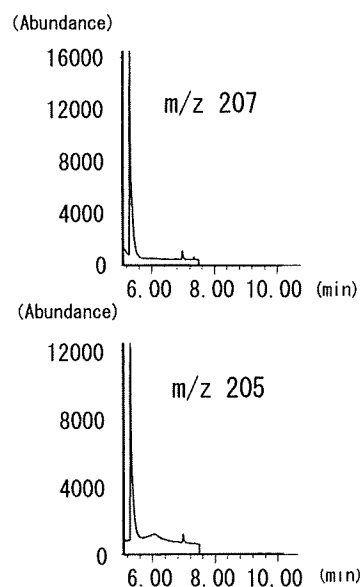


Fig 3 Mass chromatogram of sample No.1 (m/z 207, 205)

として検出されることから、ブランク値を差し引いた。その結果、No.1よりオクチルスズは192 $\mu\text{g/g}$ 検出された (Fig. 3, Table 3)。この結果は、同試料を用いてオクチルスズをトリメチルシリル (TMS) 化して残留量を測定した値と同程度であり[15]、本法による定量が可能であることが示唆された。その他の試料 (No.2, 4) からは種々の有機スズ化合物はブランクと同程度検出され、数値化できなかった。