

## 血液中のビスフェノール A(BPA)の分析(1)

研究分担者 松村 徹 いであ株式会社 環境創造研究所 副所長

### 研究要旨

血液中のビスフェノール A(BPA)の測定分析方法を検討した。同位体希釈 LC-MS/MS 法を採用し、前処理方法と組合せて検討した結果、血中 BPA の分析方法を確立できた。確立した方法を用い、ヒト血液 70 検体に適用し結果を得た。

### 研究協力者

山本 潤  
(いであ株式会社 環境創造研究所)

### A . 研究目的

ビスフェノール A(BPA)はポリカーボネート製のプラスチックを製造する際、モノマーや、エポキシ樹脂の原料として使用されている化学物質であり、摂取によりエストロゲン受容体が活性化され、エストロゲンに類似した生理作用を表すことが報告されている。低用量仮説の提唱によって注目を受けたが、ヒトに対する健康影響評価に関しては現在も諸説の報告例があり継続して研究が行われているところである。

また、近年、BPA については尿道下裂との関連性について幾つか報告がなされているが、血中濃度は極低濃度であり、試料間の有意な濃度差を観測するためには精確な測定値が必要である。

BPA の体内負荷量を評価するにはヒト血液中における濃度データが必要であるが、存在量は極低く測定分析が困難であり、現在のところ、確からしい結果を用いて議論されているとは言えない状況であることから、本研究ではヒト血液中の BPA を議論可能な濃度レベルで精確に測定する手法を開発することを目的とした。

### B . 研究方法

開発した同位体希釈-液体クロマトグラフ / タンデム型質量分析計 (ID-LC-MS/MS)をヒト血液試料 70 検体に適用した。内標準物質として、BPA-d<sub>16</sub> をクリーンアップスパイク、BPA-2,2',6,6'-d<sub>4</sub>(BPA-d<sub>4</sub>)をシリンジスパイクとして用いた。また、固相充填済み樹脂製カートリッジカラムとして ISOLUTE マルチモード (500mg/3mL, Biotage 社製; 904-0050-B)を用いた。

分析フローを図 1 に LC-MS/MS の測定条件を表 1 に示す。

### C . 研究結果

#### (1) 操作ブランク

試料 70 検体は、3 ロットにわけて分析を実施した(ロット 1: 試料 ID 1~21, ロット 2: 試料 ID 22~46, ロット 3: 試料 ID 47~70)。操作ブランク試験は各ロットについて 5 回実施した。操作ブランク試験の結果を表 2 に示す。操作ブランクの平均値は 1 回目 0.088ng/mL, 2 回目 0.038ng/mL 及び 3 回目 0.088ng/mL であり 0.1 ng/mL 未満であった。

#### (2) ヒト血液の分析

血液試料 70 検体の分析結果を表 3 に示す。なお、ロット毎のブランク試験とは別途、実試料の分析を行う前に、全操作

ブランク試験を行い、BPAの汚染が問題ないことを確認した。血液中のBPA濃度は、ND ~ 0.153ng/mL(平均値0.058ng/mL,中央値0.049ng/mL)であった。なお、表3における血液中のBPA濃度は、操作ブランク値を差し引いた値である。

分析した血液全試料について、BPA濃度分布を図2に示す。

### (3)回収率

検体の測定における各試料の回収率(クリーンアップスパイク内標準物質(BPA d-16)/シリジンスパイク内標準物質(BPA d-4)の値を用い、回収率を計算した。結果を図3に示す。全試料の回収率は71~113%の範囲であった。

### (4)装置の変動の確認

装置の変動について確認を行うため、濃度1.0ng/mLの標準溶液を測定試料3~5検体毎に測定し、その相対感度係数(RRF)を検量線作成時のRRFと比較して評価を行った。試料70検体を3回にわけて分析した各測定日別の結果を表4~6に示す。

各測定日におけるRRFは、検量線におけるRRFの±20%の範囲であった。また、各測定の平均値は、1.02、1.05及び1.01であった。

## D. 考察

本研究ではヒト血液中のBPAを議論可能な濃度レベルで精確に測定する手法を開発した。昨年度までに、固相抽出カラムを用いた前処理とそれに続く同位体希釈-液体クロマトグラフ/タンデム型質量分析計(ID-LC/MS/MS)法を検討した。さらに、血液中BPAの分析においてはブランク値の低減が最も重要であったため、試薬ブランク、個々の前処理段階におけ

るブランク、カートリッジからの溶出ブランク及び全操作ブランク、並びに前処理用カートリッジカラムのコンディショニング方法の検討を行い、最終的にブランク値を0.1ng/mL未満のレベルに安定して抑えることが可能となった。

## E. 結論

血液中のビスフェノールA(BPA)の測定分析方法を検討した。同位体希釈LC-MS/MS法を採用し、前処理方法と組合せて検討した結果、血中BPAの分析方法を確立できた。確立した方法を用い、ヒト血液70検体に適用し結果を得た。

## F. 研究発表

### 1.論文発表

なし

### 2.学会発表

- (1)山本潤,羽山真介,佐藤修之,松村徹,岸玲子,佐々木成子,宮下ちひろ.生体試料中ビスフェノールA分析の検討.第20回環境化学討論会.熊本市. July 16-18, 2011.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## 参考文献

- (1)Schönfelder G, Wittfoht W, Hopp H, Talsness CE, Paul M, Chahoud I. Parent Bisphenol A Accumulation in the Human Maternal-Fetal-Placental Unit. *Environ. Health Perspectives* 2002;110:703-707
- (2)Kuroda N, Kinoshita Y, Sun Y, Wada M, Kishikawa N, Nakashima K, Makino T, Nakazawa H. Measurement of bisphenol A levels

in human blood serum and ascitic fluid by HPLC using a fluorescent labeling reagent. *J. Pharmaceutical and Biomedical Anal.*

2003;30:1743-1749

(3)Chen M, Chang C, Shen Y, Hung J, Guo B, Chuang H, Mao I.

Quantification of prenatal exposure and maternal-fetal transfer of nonylphenol. *Chemosphere*

2008;73:239-245

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書

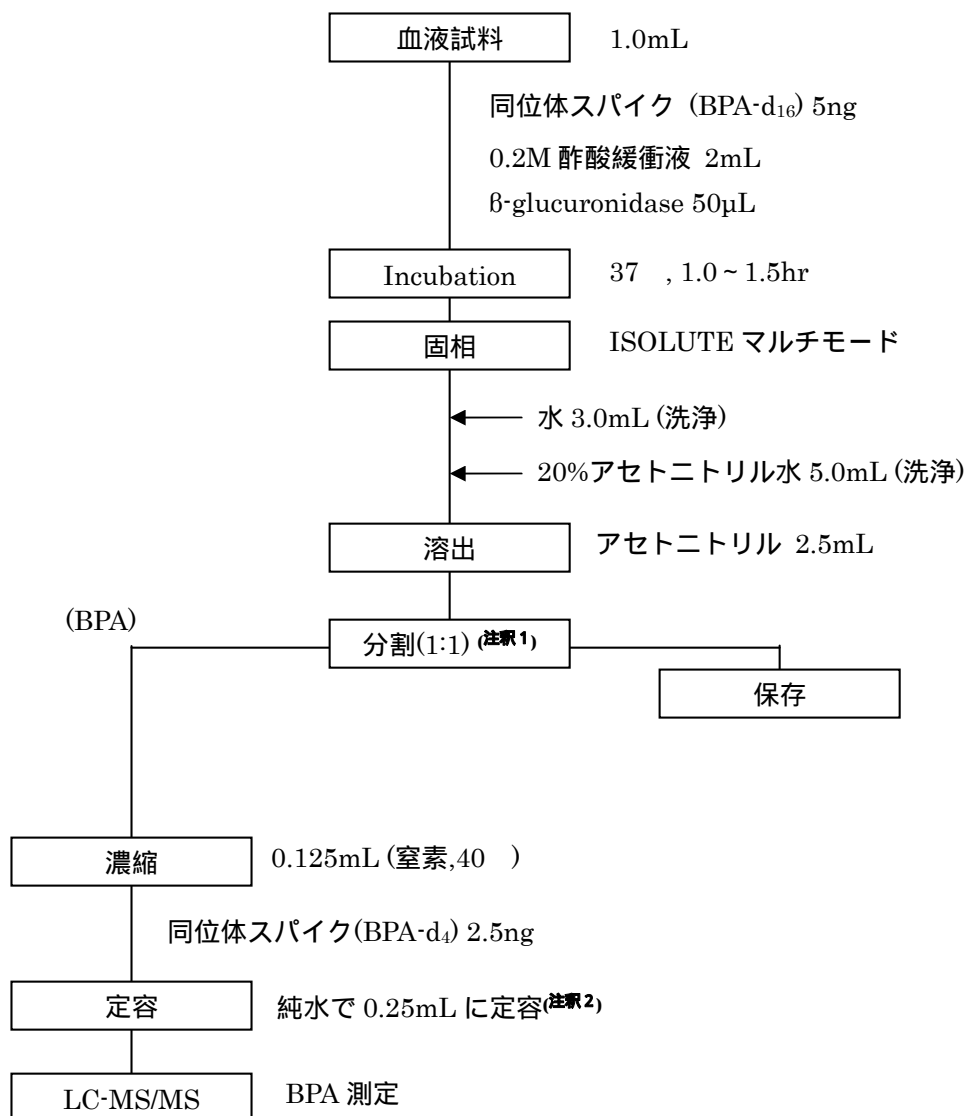


図 1. 血液中の BPA の分析フロー

(注釈 1) BPA のみの検討においては、分割操作を行っていない。

(注釈 2) BPA のみの検討においては、0.50mL に定容。したがって分割操作のありなしにかかわらず本検討における濃縮倍率は同じである。

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
 分担研究報告書

表1. BPA 分析における LC/MS/MS 測定条件

測定装置	LC : Agilent-1100 MS : API-4000 Q Trap
分析カラム	Agilent Eclipse XDB-C8 2.1×150mm,5µm
溶離液	A : 水 B : アセトニトリル
グラジエント (B)	20%(0min)→20%(1min)→100%(17min)→100%(23min)→ 20%(23.1min)→20%(31min)
注入量	20µL
カラム温度	40
モード	ESI-Negative
m/z	227.0 > 132.9(BPA) 241.0 > 142.0(BPA-d <sub>16</sub> ) 231.0 > 134.9(BPA-d <sub>4</sub> )

表2 操作ブランク試験の結果

試料名	ブランク値	ブランク値	ブランク値
	(ng/mL) 1回目	(ng/mL) 2回目	(ng/mL) 3回目
試料 1	0.086	0.041	0.093
試料 2	0.074	0.030	0.081
試料 3	0.097	0.047	0.099
試料 4	0.096	0.044	0.092
試料 5	0.090	0.030	0.074
平均 (ng/mL)	0.088	0.038	0.088
標準偏差	0.00944	0.00758	0.01014
t 値(危険率 5%、片側)	2.132	2.132	2.132
MDL (ng/mL)	0.041	0.033	0.044

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書

表3 血液中のBPA分析結果

試料 ID	血中のBPA濃度 (ng/mL) ( )	回収率(%) ( )	試料 ID	血中のBPA濃度 (ng/mL) ( )	回収率(%) ( )
試料 1	0.12	83	試料 36	0.035	83
試料 2	0.093	78	試料 37	0.071	75
試料 3	0.061	79	試料 38	0.052	89
試料 4	0.081	74	試料 39	0.046	87
試料 5	0.047	72	試料 40	0.043	76
試料 6	0.047	81	試料 41	0.063	75
試料 7	0.094	71	試料 42	0.048	76
試料 8	0.085	77	試料 43	ND	80
試料 9	0.080	83	試料 44	0.097	74
試料 10	0.12	77	試料 45	0.068	82
試料 11	0.11	77	試料 46	0.063	91
試料 12	0.072	80	試料 47	ND	79
試料 13	0.13	77	試料 48	ND	85
試料 14	0.12	80	試料 49	ND	78
試料 15	0.056	73	試料 50	ND	77
試料 16	0.048	80	試料 51	ND	82
試料 17	0.065	79	試料 52	ND	78
試料 18	0.061	88	試料 53	ND	79
試料 19	0.099	77	試料 54	ND	80
試料 20	0.091	78	試料 55	ND	79
試料 21	0.12	78	試料 56	ND	82
試料 22	ND	74	試料 57	ND	73
試料 23	0.092	89	試料 58	0.048	83
試料 24	0.044	84	試料 59	0.069	77
試料 25	ND	80	試料 60	0.081	80
試料 26	ND	79	試料 61	ND	113
試料 27	ND	80	試料 62	ND	85
試料 28	0.047	77	試料 63	0.072	85
試料 29	ND	73	試料 64	0.070	84
試料 30	0.048	77	試料 65	0.090	86
試料 31	ND	83	試料 66	0.15	90
試料 32	ND	80	試料 67	0.090	78
試料 33	ND	78	試料 68	0.054	86
試料 34	0.050	82	試料 69	0.091	84
試料 35	0.040	78	試料 70	0.14	79

備考1) 試料IDの欄は、緑色(ロット1)、黄色(ロット2)及びオレンジ色(ロット3)における分析を示す。

備考2) 報告値(血中のBPA濃度)は、有効数字2桁で記載してある。

備考3) 回収率は、クリーンアップスパイク内標準物質(BPA d-16)/シリンジスパイク内標準物質(BPA d-4)の値を用い、  
(試料液)/(標準液の平均)×100 で記載してある。

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書

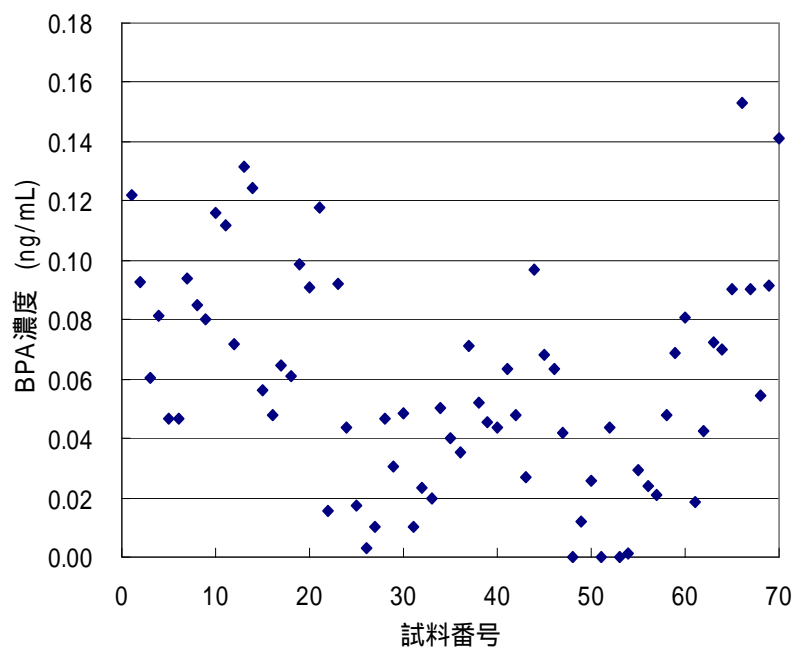


図.2 血液試料中の BPA 濃度

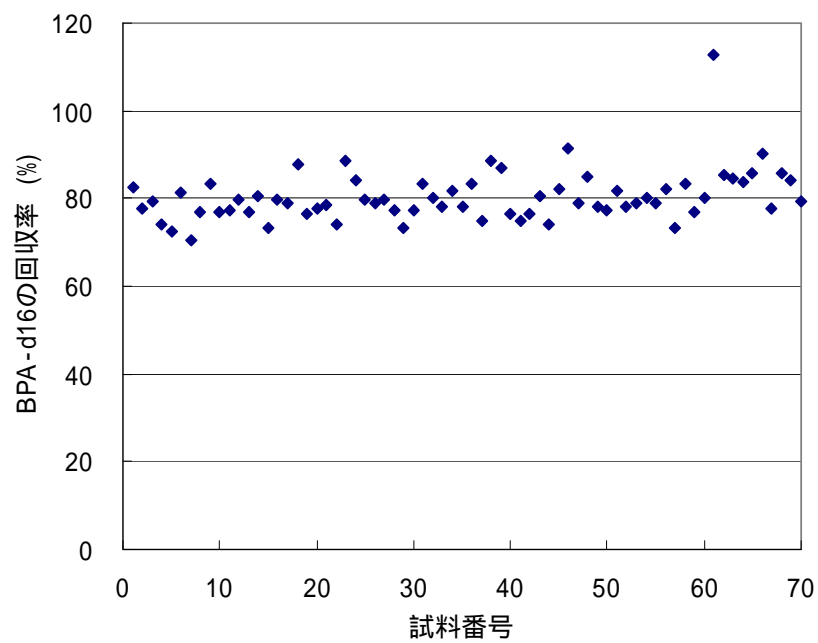


図.3 試料における内標準物質の回収率

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書

表4 装置の変動の確認(1回目の分析)

	RRF	相対比(%)( )
検量線作成時	1.03	100
Check(1回目)	1.11	107
Check(2回目)	1.08	104
Check(3回目)	1.06	103
Check(4回目)	1.03	100
Check(5回目)	0.99	96
Check(6回目)	0.96	93
Check(7回目)	0.92	89
Check(8回目)	0.98	95
平均値	1.02	99
最大値	1.11	107
最小値	0.92	89

相対比 (%) = RRF(測定した標準液の値) / RRF (検量線の平均値)

表5 装置の変動の確認(2回目の分析)

	RRF	相対比(%)( )
検量線作成時	1.05	100
Check(1回目)	1.08	103
Check(2回目)	0.99	94
Check(3回目)	1.05	100
Check(4回目)	1.06	101
Check(5回目)	1.07	102
Check(6回目)	1.05	100
Check(7回目)	1.07	102
Check(8回目)	1.03	98
Check(9回目)	1.04	99
Check(10回目)	1.05	100
平均値	1.05	100
最大値	1.08	103
最小値	0.99	94

表6 装置の変動の確認(3回目の分析)

	RRF	相対比(%)( )
検量線作成時	0.95	100
Check(1回目)	1.04	109
Check(2回目)	0.99	104
Check(3回目)	1.01	105
Check(4回目)	1.04	109
Check(5回目)	1.01	105
Check(6回目)	0.98	103
Check(7回目)	1.03	108
Check(8回目)	1.04	109
平均値	1.01	106
最大値	1.04	109
最小値	0.95	100



厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書