

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2001 - 228147

(P2001 - 228147A)

(43)公開日 平成13年8月24日(2001.8.24)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/53			G 0 1 N 33/53	G
		30/08		L
		30/88		C

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 8 数)

(21)出願番号 特願2000 - 37367(P2000 - 37367)

(22)出願日 平成12年2月16日(2000.2.16)

(71)出願人 000002174

積水化学工業株式会社

大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号

(71)出願人 597096105

株式会社 矢内原研究所

静岡県富士宮市栗倉2480番地の1

(72)発明者 大石 和之

山口県新南陽市開成町4560 積水化学工業

株式会社内

(74)代理人 100077012

弁理士 岩谷 龍

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ホルモン様作用物質測定方法

(57)【要約】

【課題】 ホルモン様作用物質を特異的に吸着し、かつ容易に脱着し、さらにホルモン様作用物質等の測定妨害物質を含有していない高分子担体を前処理に用いることにより、試料中のホルモン様作用物質を精度良く測定できる方法を提示することである。

【解決手段】 試料中のステロイドホルモン類またはホルモン様作用物質類を測定する方法において、少なくとも下記の工程を含む測定方法。

(a) 高分子担体に試料を接触させて、試料中のステロイドホルモン類またはホルモン様作用物質類を該担体に吸着させる工程、(b) ステロイドホルモン類またはホルモン様作用物質類が吸着された高分子担体と試料媒体を分離する工程、(c) 脱着媒体を高分子担体に接触させて、ステロイドホルモン類または/およびホルモン様作用物質類を脱着させる工程、(d) 脱着液中のステロイドホルモン類またはホルモン様作用物質類を免疫法またはクロマト法で測定する工程。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料中のステロイドホルモン類またはホルモン様作用物質類を測定する方法において、少なくとも下記の工程を含む測定方法。

(a) 高分子担体に試料を接触させて、試料中のステロイドホルモンまたはホルモン様作用物質類を該担体に吸着させる工程、(b) ステロイドホルモン類またはホルモン様作用物質類が吸着された高分子担体と試料媒体を分離する工程、(c) 脱着媒体を高分子担体に接触させて、ステロイドホルモン類または/およびホルモン様作用物質類を脱着させる工程、(d) 脱着液中のステロイドホルモン類またはホルモン様作用物質類を免疫法またはクロマト法で測定する工程、

【請求項2】 ステロイドホルモン類またはホルモン様作用物質が、アルキルフェノール類、ビスフェノールA、フタル酸エステル類、ダイオキシン類およびエストロゲン類からなる群から選ばれる1又は2種以上である請求項1記載の測定方法。

【請求項3】 高分子担体が、アクリル酸エステルまたは/およびメタクリル酸エステルである架橋性単量体を重合して得られる架橋重合体である請求項1または2記載の測定方法。

【請求項4】 高分子担体が、平均粒径が0.1 μ m~1cmでかつ比重が0.8~3.0である請求項1~3いずれかに記載の測定方法。

【請求項5】 免疫法が酵素免疫法である請求項1~4いずれかに記載の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、試料中のステロイドホルモン類およびホルモン様作用物質類を測定する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】環境中に排出された生物由来のステロイドホルモン類や一部の化学物質は、生体内に取り込まれるとホルモン類似作用を示すものがある。これらの化学物質は内分泌攪乱物質と呼ばれ、動物の生殖機能等に悪影響を及ぼすことがわかってきた。従ってこれらの物質の正確な測定は極めて重要である。これらのホルモン様作用物質は極めて微量であるため、簡便で高精度な測定法の確立が必須である。従来よりガスクロマトグラフィー(GC)法、液体クロマトグラフィー(HPLC)法、あるいはこれらの方法とマスペクトル(MS)分析法を組み合わせた方法、あるいは抗原抗体反応に基づく免疫法などが知られている。

【0003】これらの高精度分析法は、ほぼ同様の前処理法により測定試料が調製される。この前処理は、混入物の非常に多い環境水あるいは環境物質からの抽出水から、目的とするホルモン様作用物質を効率よく抽出し、測定の妨害となる物質を除去する目的で行われる。従っ

て測定結果は、この前処理操作に大きく影響を受ける。最も汎用されている前処理方法として、固相抽出法がある。これは高分子などの担体に試料を接触させ、測定目的の成分であるホルモン様作用物質を担体に吸着させ、他の妨害成分は洗い流して除去する。その後吸着した目的物質を別の溶媒で脱着させて、上記の測定に供する方法である。

【0004】一般に固相抽出に用いられる担体としては、スチレン-ジビニルベンゼン系の担体や2-ビニルピロリドン-ジビニルベンゼン系の担体(LC GC、15(2)、152-158、1997)、あるいは、ジビニルベンゼン-アクリル酸エステル共重合体(特開平6-258203)などが開示されている。しかしこれらの固相抽出用担体は、ホルモン様作用物質の抽出に特異的でなく、吸着能や脱着能が不十分で定量性に問題があった。また、微量なホルモン様作用物質を測定する際に妨害となる成分を溶出してしまう問題があった。これは高分子担体の原材料としてベンゼン環を有する化合物を使用していることなどに由来しており、洗浄操作などによっても極めて除去されにくい。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】以上のように、環境中に存在する微量のホルモン様作用物質を測定するためには、妨害となる成分の溶出のない前処理用担体が必要であるが、現在までにその条件を満たす技術は知られていない。本発明の目的は、ホルモン様作用物質を特異的に吸着し、かつ容易に脱着し、さらにホルモン様作用物質等の測定妨害物質を含有していない高分子担体を前処理に用いることにより、試料中のホルモン様作用物質を精度良く測定できる方法を提示することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意検討した結果、特定の高分子担体を用いれば、ホルモン様作用物質のような微量物質の測定時に妨害となるような成分を溶出せず、かつ、ホルモン様作用物質を特異的に吸着し、かつ容易に脱着できるという知見を得た。さらに検討を重ね本発明に至った。

【0007】すなわち、本発明は、(1)試料中のステロイドホルモン類またはホルモン様作用物質類を測定する方法において、少なくとも下記の工程を含む測定方法、(a) 高分子担体に試料溶液を接触させて、ステロイドホルモン類またはホルモン様作用物質類を該担体に吸着させる吸着工程、(b) ステロイドホルモン類またはホルモン様作用物質類が吸着された高分子担体と試料を分離する工程、(c) 脱着溶媒を担体に接触させて、ステロイドホルモン類またはホルモン様作用物質類を脱着させる工程、(d) 脱着液中のステロイドホルモン類またはホルモン様作用物質類を免疫法またはクロマト法で測定する工程、(2) ステロイドホルモン類またはホルモン様作用物質が、アルキルフェノール類、ビスフェ

ノールA、フタル酸エステル類、ダイオキシン類およびエストロジェン類からなる群から選ばれる1又は2種以上である前記(1)記載の測定方法、(3)高分子担体が、アクリル酸エステルまたはノおよびメタクリル酸エステルである架橋性単量体を重合して得られる架橋重合体である前記(1)または(2)記載の測定方法、(4)高分子担体が、平均粒径が0.1 μ m~1cmでかつ比重が0.8~3.0である前記(1)~(3)いずれかに記載の測定方法、および(5)免疫法が酵素免疫法である前記(1)~(4)いずれかに記載の測定方法、に関する。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明でいう「ステロイドホルモン類またはホルモン様作用物質類」とは、生物由来のステロイドホルモン類、および生体内においてホルモン類似作用が報告されている物質またはホルモン類似作用が疑われる物質(以下、まとめてホルモン様作用物質という)であり、いわゆる内分泌攪乱物質と呼ばれる物質を含む。例えば、ダイオキシン類;ポリ塩化ビフェニール類;4-t-ブチルフェノール、4-n-ヘプチルフェノール、ノニルフェノール、4-t-オクチルフェノールなどのアルキルフェノール類;ビスフェノールA;2,4-ジクロロフェノール;フタル酸ジエチルヘキシル、フタル酸ジn-ブチル、フタル酸ジエチルなどのフタル酸エステル類;アジピン酸ジエチルヘキシル;ベンゾ(a)ピレン、ベンゾフェノン、4-ニトロトルエン、スチレン、スチレン2量体、スチレン3量体などの芳香族化合物;エストラジオールなどのエストロジェン類などが挙げられる。その他、上記ホルモン様作用物質には、第26回日本環境化学会講演会予稿集(2~3頁、1998年)に記載があるような物質も含まれる。本発明の方法は、特にアルキルフェノール類、ビスフェノールA、フタル酸エステル類、ダイオキシン類、エストロジェン類について好適に適用することが可能である。

【0009】本発明方法に用いられる「高分子担体」は、アクリル酸エステルあるいはメタクリル酸エステル(以下、「アクリル酸またはメタクリル酸」を「(メタ)アクリル酸」と記す)である架橋性単量体を重合して得られる架橋重合体よりなる高分子担体が好ましい。該架橋重合体は、(メタ)アクリル酸エステルである架橋性単量体を重合開始剤の存在化において重合反応を行うことにより得られる。

【0010】本発明方法の高分子担体を構成する(メタ)アクリル酸エステルは、公知の(メタ)アクリル酸エステルが用いてよい。例えば、エチレングリコールジ(メタ)アクリレート、ジエチレングリコールジ(メタ)アクリレート、トリエチレングリコールジ(メタ)アクリレート、テトラエチレングリコールジ(メタ)アクリレート、ポリエチレングリコールジ(メタ)アクリ

レート、プロピレングリコールジ(メタ)アクリレート、ジプロピレングリコールジ(メタ)アクリレート、トリプロピレングリコールジ(メタ)アクリレート、ポリプロピレングリコールジ(メタ)アクリレート、ポリテトラメチレングリコールジ(メタ)アクリレートなどのアルケレングリコールジ(メタ)アクリレート類;トリメチロールエタントリ(メタ)アクリレート、トリメチロールプロパントリ(メタ)アクリレート、テトラメチロールプロパントリ(メタ)アクリレート、テトラメチロールメタントリ(メタ)アクリレート、テトラメチロールメタンテトラ(メタ)アクリレート、ジペンタエリスリトールヘキサ(メタ)アクリレート、ジトリメチロールプロパンテトラ(メタ)アクリレート、1,3-ブチレングリコールジ(メタ)アクリレート、1,6-ヘキサンジオールジ(メタ)アクリレート、1,9-ノナンジオールジ(メタ)アクリレート、ネオペンチルグリコールジ(メタ)アクリレート、2-ヒドロキシー-1,3-ジ(メタ)アクリロキシプロパン、2-ヒドロキシ-1-アクリロキシ-3-メタクリロキシプロパン、ウレタン(メタ)ジアクリレート、グリセロールジ(メタ)アクリレート、グリセロールアクリレートメタクリレート、1,10-ジ(メタ)アクリロキシ-4,7-ジオキサデカン-2,9-ジオール、1,11-ジ(メタ)アクリロキシ-4,8-ジオキサウンデカン-2,6,10-トリオールなどの(メタ)アクリル酸エステルの架橋性単量体が挙げられる。これらは2種以上混合して用いてもよい。

【0011】またこれらの架橋性単量体の他に、非架橋性の(メタ)アクリル酸エステルを添加してもよい。例えばメチル(メタ)アクリレート、エチル(メタ)アクリレート、プロピル(メタ)アクリレート、ブチル(メタ)アクリレート、ラウリル(メタ)アクリレート、ステアリル(メタ)アクリレートなどのアルキル(メタ)アクリレート類;ヒドロキシメチル(メタ)アクリレート、ヒドロキシエチル(メタ)アクリレート、メトキシジエチレングリコール(メタ)アクリレート、メトキシポリエチレングリコール(メタ)アクリレート、グリシジル(メタ)アクリレートなどが挙げられる。

【0012】これらの非架橋性(メタ)アクリル酸エステルを用いる場合の使用量は、上記架橋性(メタ)アクリル酸エステル100重量部に対して0~20重量部であることが好ましい。またこれらは2種以上混合して用いてもよい。

【0013】また本発明方法に用いられる高分子担体を構成する単量体としては、上記(メタ)アクリル酸エステル以外の単量体を(メタ)アクリル酸エステルに混合して用いてもよい。これらの単量体としては、下記に挙げられる単量体以外の単量体、例えばトリアリルシアヌレート、トリアリルイソシアヌレートなどが挙げられる。

【0014】(メタ)アクリル酸エステル以外の単量体を用いる場合の使用量は、(メタ)アクリル酸エステル単量体100重量部に対して0~20重量部であることが好ましい。またこれらは2種以上混合して用いてもよい。

【0015】本発明方法に用いられる高分子担体は、(メタ)アクリル酸エステル単量体のみで構成されることが好ましく、特に(メタ)アクリル酸エステルの架橋性単量体のみで構成されることがより好ましく、その中でもアルキレングリコールジ(メタ)アクリレートのみで構成されることが最も好ましい。

【0016】以下の(イ)~(ロ)の単量体群は、本発明方法に用いられる高分子担体の原材料として用いることを制限することが好ましい。

(イ)スチレン、 α -メチルスチレン、ジビニルベンゼンなどのスチレン系；エチレン、プロピレンなどのオレフィン系単量体；ブタジエンなどのジエン系単量体、フェノキシエチル(メタ)アクリレート、フェノキシエチレングリコール(メタ)アクリレート、ジメチロールトリシクロデジカンジ(メタ)アクリレート等の(メタ)アクリル酸エステルは用いることを制限することが好ましい。これらのベンゼン環を有する単量体や直鎖、環状あるいは分岐脂肪族系単量体からなる重合体は疎水性が強く、吸着されたホルモン様作用物質の脱着が困難だからである。また、これらの重合体は有機溶媒を吸着しやすいので、有機溶媒による脱着処理の際にこの有機溶媒を吸着してしまい、脱着が定量的に行われにくい。さらに、これらの原材料中の不純物質が吸着工程に悪影響を及ぼすからである。

(ロ)また(メタ)アクリル酸、イタコン酸、2-ジエチルアミノエチル(メタ)アクリレートなどのイオン交換性の官能基を有する単量体も好ましくない。これらのイオン交換基は、ホルモン様作用物質の吸着を阻害するからである。

(ハ)さらにホルモン様作用物質と類似の構造を有する単量体；例えばビスフェノールA構造を有する2,2-ビス{4-[(メタ)アクリロキシエトキシ]フェニル}プロパン、2,2-ビス{4-[(メタ)アクリロキシ・ジエトキシ]フェニル}プロパン、2,2-ビス{4-[(メタ)アクリロキシ・ポリエトキシ]フェニル}プロパン、ノニルフェノキシポリエチレングリコール(メタ)アクリレートなどは、ホルモン様作用物質の混入が考えられるので使用しない。

【0017】(イ)および(ロ)については、場合によっては、悪影響のでない範囲で添加することも可能であるが、その添加量は、上記(メタ)アクリル酸エステル単量体100重量部に対して0~10重量部であることが好ましい。(ハ)は用いない。

【0018】本発明方法に用いられる高分子担体は、上記単量体あるいは単量体混合物が重合可能な公知の重合

方法により調製することができる。好ましくは分散媒中に単量体を分散させ、重合開始剤存在下で重合する方法、例えば懸濁重合法、分散重合法、乳化重合法などの方法が挙げられる。特に懸濁重合法が簡便で好ましい。懸濁重合法で行う場合は、例えばポリビニルアルコールやポリビニルピロリドンなどの分散剤が溶解した水性分散媒に上記単量体を分散させ、重合開始剤存在下で攪拌しながら昇温することにより、重合反応を行うことができる。但し分散剤として界面活性剤を使用することは好ましくない。残存する界面活性剤は、高分子担体として測定に使用する際に溶出してくる可能性があり、さらに、高分子担体とホルモン様作用物質との相互作用を阻害するためである。一方、製造設備が複雑で重合効率が低く、重合後の溶出物発生が考えられるエネルギー線重合などは好ましくない。

【0019】重合時には、公知の添加剤を添加することもできる。例えば重合体を大孔径の多孔質体とするための多孔質化剤(相分離剤)、連鎖移動剤、pH調節剤などである。このうち多孔質化剤としては、イソアミルアルコールやオクタノールなどのアルコール類やヘキサンなどの脂肪族系炭化水素などが好都合に用いられるが、キシレンやトルエンなどの芳香族系炭化水素およびカプリン酸メチル、ラウリン酸メチル、アジピン酸ジイソブチルなどのアルキルエステル類は通常は好ましくない。これらもまた残存すると、これら自体および混入物が測定時に溶出し、測定の妨害となる可能性があるからである。

【0020】重合後、得られた架橋重合体を洗浄して乾燥することにより本発明方法に用いられる高分子担体を得られる。洗浄は、有機溶媒で複数回洗浄する必要がある。また好ましくは複数種の有機溶媒で複数回洗浄する。洗浄に使用する有機溶媒は、用いた単量体によっても異なるが、例えば、メタノール、エタノールなどのアルコール類、アセトン、ヘキサン、ジクロロエタンなどベンゼン環を含まない公知の有機溶媒が用いられる。また、本発明方法に用いられる高分子担体は、上記単量体あるいは単量体混合物から重合された重合体を原料として、公知の成形方法、例えば射出成形法、押出成形法、あるいはブロー成形法などによっても調製することができる。また、本発明に用いられる高分子担体は、その他の形状、例えばフィルム状、膜状、フィルター状など、排水と接触できる形状であればよい。さらに、該高分子担体は、上記単量体の重合体が表面層を形成する被覆構造体であってもよい。被覆されるコア部分の素材は特に制限がないが、使用環境下で形状が保持される程度の強度を有する物質で形成され、かつ、外部に疎水性物質、特にホルモン様作用物質の溶出がない物質で構成される必要がある。被覆構造体とされた場合の高分子担体の場合においても、その形状は特に制限はなく、例えば、粒子状、フィルム状、膜状、フィルター状など排水と接触

できる形状であればよい。

【0021】本発明方法に用いられる高分子担体の形状は特に制限されないが、粒子状が好ましい。またその細孔分布の制限もなく、使用環境下で形状が維持される強度を有する程度の多孔性であってもよいし、ミクロポア構造であってもよい。また発泡体であってもよい。また、粒子状である場合、平均粒径が $0.1\mu\text{m} \sim 1\text{cm}$ でかつ比重が $0.8 \sim 3.0$ であることが好ましい。これらの範囲を逸脱した場合は取扱いが困難になるためである。

【0022】本発明方法における吸着工程では、まず上記高分子担体に試料溶液を接触させ、試料中のホルモン様作用物質が高分子担体と相互作用を起こすことにより吸着される。吸着工程に供される試料溶液は、あらかじめ濃縮・抽出・洗浄などの前処理操作を行ったものでもよい。該工程は試料に高分子担体を分散させることにより行うことが好ましい。分散させる方法は特に制限がなく、高分子担体を収納した容器に試料を添加してもよいし、試料を含む容器に高分子担体を添加してもよい。また吸着工程時に攪拌を行ったり、温度制御などを行って

【0023】本発明方法における分離工程とは、吸着工程を経た試料と高分子担体を分離させる工程であり、その方法は特に制限がないが、濾過または沈降による方法が好ましい。

【0024】本発明方法における分離工程として濾過による方法を採用した場合、高分子担体を含む試料溶液を、試料溶液は通過するが高分子担体は通過しない濾過装置に導入し、高分子担体をトラップして試料溶液を通過させることにより分離を行う。濾過装置は、特に制限

【0025】本発明方法における分離工程として沈降による方法を採用した場合、試料溶液中の高分子担体を沈降させることにより、高分子担体と上清である処理済みの試料を分離する。例えば高分子担体を含む試料を静置させたり、遠心分離するという方法が挙げられる。

【0026】また本発明方法に用いられる高分子担体をカラムに収納することにより、上記吸着工程と分離工程を連続的に行うこともできる。すなわち、この方法では、まず高分子担体が充填されたカラムに、試料溶液を添加すると、カラム内において試料中のホルモン様作用物質が高分子担体に接触して吸着されるという吸着工程を経て、該ホルモン様作用物質が吸着除去された試料はカラム出口より排出されるため、分離工程も連続的に行

うことになる。

【0027】本発明方法に用いられるカラムは、高分子担体を収納する容器であるカラム筐体と、高分子担体は通過しないが試料溶液は通過するフィルターからなる、公知の構造のものが用いられる。カラム筐体は、一つ以上の流入口と、一つ以上の排出口を有し、その内部に高分子担体が収納される構造であればよく、形状、大きさは特に制限がない。密閉構造であっても開放構造であってもよい。また排出側にはフィルターが設置されているが、その構造、形状、大きさにも特に制限はない。また、流入側にも同様のフィルターを設置してもよい。カラム筐体は、金属製、樹脂製、セラミックス製、またはガラス製など公知の材質でよいが、上記ホルモン様作用物質の溶出がないものに限られる。また、フィルターは紙製、布製、金属製、樹脂製、セラミックス製、またはガラス製など公知の材質でよいが、上記ホルモン様作用物質の溶出のないものに限られる。

【0028】また試料のカラムへの流入・排出方法も特に制限はなく、送液ポンプで通液しても重力を利用して通液してもよい。さらに排出側より吸引したり、流入側より加圧してもよい。試料溶液は常に通液されていてもよいし、カラムに導入後通液を停止して吸着工程を行った後、再び通液を開始して処理済みの試料溶液を排出して分離工程を行ってもよい。

【0029】本発明における脱着工程とは、ホルモン様作用物質が吸着された高分子担体に、脱着媒体として脱着溶媒を接触させて、該ホルモン様作用物質を高分子担体より脱着させることである。脱着溶媒は、ホルモン様作用物質が溶解しやすく、高分子担体に変性しないものであれば特に制限はないが、後処理のしやすい、例えば、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコールなどのアルコール類、アセトン、メチルエチルケトンなどのケトン類、ジオキサン、ジメチルホルムアミドなどが好ましい。またこれらの混合物や水溶液、緩衝液でもよい。

【0030】これらの脱着溶媒を高分子担体に接触させる方法は特に制限がなく、高分子担体が収納された容器（カラムを含む）に脱着溶媒を添加すればよい。必要に応じて攪拌、加温などをしてよい。

【0031】本発明の測定工程においては脱着溶媒中のホルモン様作用物質を免疫法またはクロマト法で測定する。必要に応じて、脱着溶媒を高分子担体から分離して濃縮、濾過などの処理を施してもよい。本発明方法で用いられる免疫法としては、公知の原理に基づく方法またはそれに準ずる方法が採用されてよく、例えば測定対象物質の抗体や抗原を用いて抗原抗体反応を起こさせて凝集度合いを測定したり、標識抗体を用いて反応させた後、標識物質を測定する方法が挙げられる。特に標識化合物に酵素を用いた酵素免疫法が好ましい。

【0032】本発明方法で用いられるクロマト法は、ガ

スクロマトグラフィー法あるいは液体クロマトグラフィー法が好ましい。またこれらのクロマトグラフィーにマススペクトル分析装置を付属した方法でもよい。

【0033】

【実施例】以下に本発明の実施例を示す。なお、%は重量%を示す。

〔実施例1〕トリエチレングリコールジメタクリレート（新中村化学工業株式会社製）500gに、重合開始剤として過酸化ベンゾイル（キシダ化学株式会社製）1.0gを溶解した。これを4%ポリビニルアルコール水溶液2500mLに攪拌しながら分散させ、窒素雰囲気下で80℃に昇温した。80℃で24時間重合した後、内容物をイオン交換水で3回、アセトンで1回、メタノールで4回洗浄した。洗浄後乾燥して高分子担体を得た。平均粒径は30μm、比重は1.2であった。

【0034】〔実施例2〕エチレングリコールジメタクリレート（新中村化学工業株式会社製）400gおよびテトラメチロールメタントリアクリレート100gの混合物に、重合開始剤として過酸化ベンゾイル1.0gを溶解した。これを2%ポリビニルアルコール水溶液2500mLに攪拌しながら分散させ、窒素雰囲気下で80℃に昇温した。80℃で24時間重合した後、内容物をイオン交換水で3回、アセトンで1回、エタノールで4回洗浄した。洗浄後乾燥して高分子担体を得た。平均粒径は10μm、比重は1.2であった。

【0035】〔実施例3〕テトラエチレングリコールジメタクリレート（新中村化学工業株式会社製）400gに、メチルメタクリレート100g、重合開始剤として過酸化ベンゾイル1.0gを溶解した。これを1%ポリビニルアルコール水溶液2500mLに攪拌しながら分散させ、窒素雰囲気下で80℃に昇温した。80℃で24時間重合した後、内容物をイオン交換水で3回、アセトンで1回、エタノールで4回洗浄した。洗浄後乾燥して高分子担体を得た。平均粒径は100μm、比重は1.2であった。

【0036】〔比較例1〕スチレン（和光純薬株式会社製）200g及びジビニルベンゼン（キシダ化学株式会社製）300gの混合物に、重合開始剤として過酸化ベンゾイル1.0gを溶解した。これを4%ポリビニルアルコール水溶液2500mLに攪拌しながら分散させ、窒素雰囲気下で80℃に昇温した。80℃で24時間重合した後、内容物をイオン交換水で3回、アセトンで1*

*回、エタノールで4回洗浄した。洗浄後乾燥して高分子担体を得た。平均粒径は30μm、比重は1.2であった。

【0037】〔比較例2〕2,2-ビス{4-[(メタ)アクリロキシ・ジエトキシ]フェニル}プロパン（A-BPE-4：新中村化学工業株式会社製）500gに、重合開始剤として過酸化ベンゾイル1.0gを溶解した。これを4%ポリビニルアルコール水溶液2500mLに攪拌しながら分散させ、窒素雰囲気下で80℃に昇温した。80℃で24時間重合した後、内容物をイオン交換水で3回、アセトンで1回、エタノールで4回洗浄した。洗浄後乾燥して高分子担体を得た。平均粒径は30μm、比重は1.2であった。

【0038】〔比較例3〕N-ビニルピロリドン（和光純薬株式会社製）200gおよびジビニルベンゼン300gの混合物に、重合開始剤として過酸化ベンゾイル1.0gを溶解した。これを4%ポリビニルアルコール水溶液2500mLに攪拌しながら分散させ、窒素雰囲気下で80℃に昇温した。80℃で24時間重合した後、内容物をイオン交換水で3回、アセトンで1回、エタノールで4回洗浄した。洗浄後乾燥して高分子担体を得た。平均粒径は30μm、比重は1.2であった。

【0039】〔比較例4〕ジビニルベンゼン（三共化成株式会社製）100g、エチレングリコールジメタクリレート（新中村工業化学株式会社製）100g、酢酸ブチル（和光純薬株式会社製）200g、イソアミルアルコール（和光純薬株式会社製）50g、および重合開始剤としてアゾビスイソブチロニトリル（和光純薬株式会社製）1.0gの混合液を0.2%のメチルセルロース水溶液1Lに懸濁し、攪拌しながら80℃で6時間反応させた。洗浄後乾燥させて吸着剤を得た。平均粒径は60μm、比重は1.1であった。

【0040】〔試験例1〕上記実施例および比較例で調製した高分子担体からの、ホルモン様作用物質などの疎水性物質の溶出の有無を確認した。各高分子担体1gをメタノール10mLに分散させてよく攪拌した。この分散液を3000rpmで10分間遠心分離した後上清を採取し、上清を遠心エバポレータで1mLに濃縮した後、その100μLをHPLCに注入することにより、高分子担体から上清メタノール中に溶出した疎水性物質を測定した。HPLCの条件を下記に示す。また得られたクロマトグラムを図1～3に示す。

HPLC測定条件

カラム : RP-18GP (和光純薬株式会社製: 4.6 × 250mm)
 溶離液 : A液 = 0.01N塩酸:アセトニトリル = 70/30 (容量比)
 B液 = 0.01N塩酸:アセトニトリル = 30/70 (容量比)
 溶出条件: A液100%からB液100%へのリニアグラジエント(30分)

検出波長: 210nm

注入量 : 100 μL

----- 11----- 12-----

【0041】図1は、ビスフェノールA（以下、「BPA」という）およびノニルフェノール（以下、「NP」という）の標準品（いずれも和光純薬株式会社製）、図2は、実施例1の高分子担体からの溶出物を測定した結果である。図2では、BPAおよびNPの溶出位置にピークが確認されず、実施例1からの溶出は確認されなかった。実施例2および3の高分子担体も同様の結果であった。一方比較例1の高分子担体からの溶出物を測定した結果を図3に示す。NPおよびBPAの溶出位置にピークが確認されただけでなく、その他にも多くの疎水性物質の溶出が確認された。また比較例2～4の高分子担体からの溶出物を測定した結果も図3と同様に疎水性物質が多く溶出した。特に、比較例2ではBPA溶出位置に大きなピークが出現した。これは比較例2で用いた単量体（A-BPE-4）がBPA構造を含むため、BPAあるいはBPA類似構造の不純物が多く含まれ、溶出してきたものと思われる。これらのピークは高分子担体を繰り返し洗浄しても消去できなかった。

【0042】以上から、実施例1～3で得られた本発明方法に用いられる高分子担体は、担体からのホルモン類作用物質などの疎水性物質溶出がほとんどないので、ホルモン様作用物質の測定に有効である。一方、従来技術により調製した比較例1～4の高分子担体は、ホルモン様作用物質などの疎水性溶出物が多く、ホルモン様作用物質の測定には使用できない。

【0043】〔試験例2〕上記実施例および比較例で調製した高分子担体のホルモン様作用物質の吸着性能を確認した。まず実施例1の高分子担体を用いてBPAの吸着性能を確認した。BPA標準原液（和光純薬株式会社）

吸着性能試験の結果：

物質名	吸着率 (%)	
	実施例1	比較例1
ビスフェノールA	100	156
オクチルフェノール	100	69
ノニルフェノール	100	45
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	100	19
フタル酸ブチルヘキシル	99	20
フタル酸ジ-n-ブチル	99	39
ダイオキシン	100	67
β-エストラジオール	100	26

【0047】〔試験例3〕高分子担体0.1gを容量3mLのポリプロピレン製のカラムに充填した。これに各濃度のBPA標準液（0.1～2000ng/mLの10%メタノール水溶液）を添加した。次に脱着液としてメタノールを6mL通液して吸着物質を脱着した。この脱着液を遠心エバポレータで蒸発乾固させた後、ELI

*社製）からBPA 100ng/mLの10%メタノール水溶液を調製し、これに0.1gの高分子担体を分散させ、よく攪拌した。得られた分散液を3000rpmで10分間遠心分離した後上清を採取し、上清を遠心エバポレータで蒸発乾固させた後、ELISA用リン酸緩衝液に溶解して、ELISA系で測定を行った。

【0044】ELISA系での分析は、以下の手法で行った。抗BPA抗体固相化プレート（（株）矢内原研究所製）に検体50μLを添加し、さらにHRP（Horse Radish Peroxidase）標識BPA50μLを添加して室温で2時間反応させた。プレートを洗浄した後、o-フェニルジアミン（OPD）を添加して15分反応させ、492nmで吸光度を測定した。

【0045】高分子担体を用いずに同様の操作を行った場合の上清中のBPA量を100とした場合の相対比較により吸着率を求めた。結果を表1に示す。100%のBPAが吸着された。その他のホルモン様作用物質についても同様に測定を行ったところ、BPAと同様にその99%以上が吸着された（表1）。また実施例2および3において調製された高分子担体においても、実施例1の高分子担体と同様に良好な吸着率を示した。一方、比較例1では、BPA吸着率が150%以上となった。これは高分子担体自体からの溶出のためと考えられる。一方、その他の物質に対しては、いずれも70%以下と吸着率が極めて低かった。比較例2～4でも同様の結果であった。

【0046】

【表1】

SA用緩衝液に溶解して、上記と同様のELISA系で測定を行った。BPA濃度と吸光度と関係を図4に示す。本発明の方法により広範囲の濃度においてBPAが正確に測定できることがわかった。

【0048】〔発明の効果〕本発明の測定方法は、高分子担体自体からホルモン様作用物質のような微量物質の

測定時に妨害となるような成分を溶出せず、かつ、ホルモン様作用物質を特異的に吸着し、かつ容易に脱着できる高分子担体を用いることにより試料または試料を含む環境水中のステロイドホルモン類あるいはホルモン様作用物質を精度よく測定できるという効果を有す。

【図面の簡単な説明】

【図1】BPAおよびNPの標準品の溶出測定の結果を示す。

*【図2】実施例1の高分子担体からの溶出測定の結果を示す。

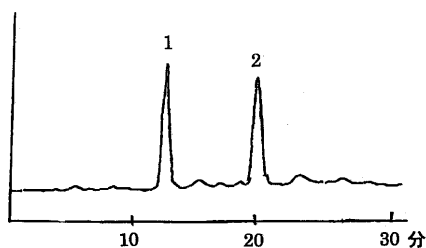
【図3】比較例1の高分子担体からの溶出測定の結果を示す。

【図4】BPA濃度と吸光度との関係を示す。

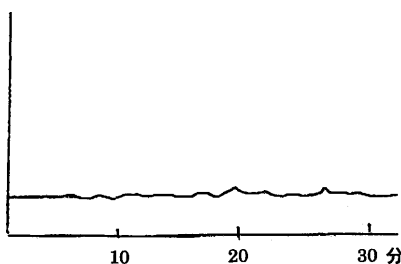
【符号の説明】

- 1 BPAの溶出ピーク
- 2 NPの溶出ピーク

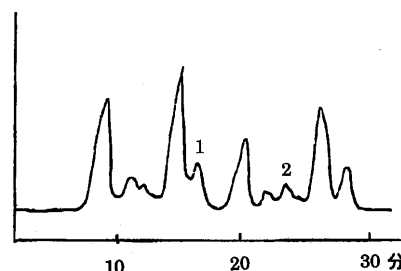
【図1】



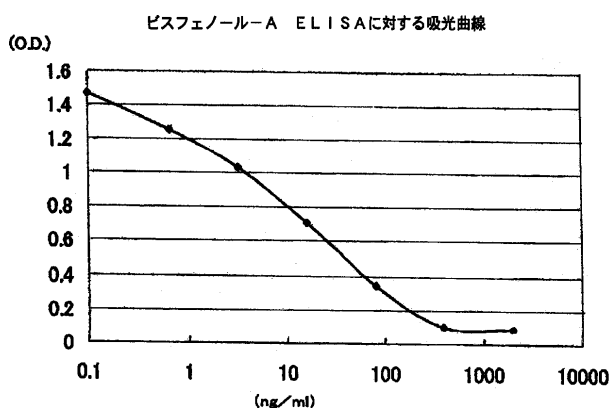
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(72)発明者 川辺 俊樹
山口県新南陽市開成町4560 積水化学工業株式会社内

(72)発明者 横井 正之
大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社内

(72)発明者 矢内原 昇
静岡県富士宮市栗倉2480番地の1 株式会社矢内原研究所

专利名称(译)	测量激素样物质的方法		
公开(公告)号	JP2001228147A	公开(公告)日	2001-08-24
申请号	JP2000037367	申请日	2000-02-16
[标]申请(专利权)人(译)	积水化学工业株式会社 株式会社 矢内原研究所		
申请(专利权)人(译)	积水化学工业株式会社 株式会社 矢内原研究所		
[标]发明人	大石和之 川辺俊樹 横井正之 矢内原昇		
发明人	大石 和之 川辺 俊樹 横井 正之 矢内原 昇		
IPC分类号	G01N33/53 G01N30/08 G01N30/88		
FI分类号	G01N33/53.G G01N30/08.L G01N30/88.C B01J20/281.G B01J20/285.S G01N30/88.E G01N30/88.X G01N30/88.101.S G01N30/88.201.G		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

[挑战] 预处理使用高分子载体，该聚合物载体特异性地吸附并容易解吸激素样作用物质，并且不含诸如激素样作用物质之类的测量干扰物质。提出一种能够准确地测量激素样作用物质的方法。一种测量样品中类固醇激素或类激素作用物质的方法，至少包括以下步骤。(a)使样品与聚合物载体接触以将样品中的类固醇激素或激素样作用物质吸附到载体上的步骤，以及(b)吸附类固醇激素或激素样作用物质的步骤 分离分子载体和样品介质的步骤，(c)使解吸介质与聚合物载体接触以解吸类固醇激素和/或类激素物质的步骤，(d)解吸溶液中的类固醇激素或者，通过免疫测定或色谱法测量激素样作用物质的步骤。

A標準原液(和光純薬株式会社*)
吸着能試験の結果:

物質名	吸着率(%)	
	実施例1	比較例1
ビスフェノールA	100	156
オクチルフェノール	100	69
ノニルフェノール	100	45
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	100	19
フタル酸ブチルヘキシル	99	20
フタル酸ジ-n-ブチル	99	39
ダイオキシン	100	67
β-エストラジオール	100	26