

# 分散固相抽出を用いる内分泌攪乱 化学物質の前濃縮法の開発

平成 30 年度  
三重大学大学院 工学研究科  
博士前期課程 分子素材工学専攻  
生物機能工学講座 417M312  
研究領域 F: 先進物質・先進材料  
分析環境化学研究室

岡田拓美

# 目次

第1章 序論 .....	4
1-1 本研究の目的 .....	5
1-2 内分泌攪乱化学物質 .....	6
1-3 吸着と脱着 .....	7
1-4 磁気固相抽出 .....	8
1-5 磁性体 .....	9
1-6 液体クロマトグラフィー .....	10
1-6-1 原理 .....	10
1-6-2 装置 .....	11
1-7 関連化学物質 .....	12
1-7-1 活性炭 .....	12
1-7-2 粘土鉱物 .....	14
1-7-3 界面活性剤 .....	16
1-7-4 ビスフェノール (BPA、BPE、BPF) .....	18
1-7-5 エストロゲン物質 .....	20
第2章 活性炭/窒素气流濃縮法を用いる HPLC 分析法によるビスフェノール類の定量 .....	21
2-1 実験 .....	22
2-1-1 使用機器 .....	22
2-1-2 実験試薬 .....	23
2-1-3 実験操作 .....	24
2-1-3-1 遠心分離法 .....	24
2-1-3-2 フミン酸による表面修飾 .....	25
2-1-3-3 塩基処理 .....	25
2-1-3-4 吸引濾過法 .....	26
2-1-4 濃縮倍率と回収率 .....	27
2-2 結果と考察 .....	28

2-2-1 遠心分離法.....	28
2-2-1-1 攪拌時間.....	28
2-2-1-2 吸着剤.....	29
2-2-1-3 表面修飾.....	30
2-2-2 吸引濾過法.....	31
2-2-2-1 懸濁法.....	31
2-2-2-2 脱着時間.....	32
2-2-2-3 試料溶液の pH.....	33
2-2-2-4 試料容量.....	34
2-2-2-5 干渉元素.....	36
2-2-2-6 窒素気流濃縮.....	38
2-2-3 検量線.....	39
2-2-4 実試料中のビスフェノール類の定量.....	40
2-2-5 考察.....	41
第3章 界面活性剤被覆磁性モンモリロナイト吸着剤による磁気固相抽出を用いた エチルエストラジオールの前濃縮.....	42
3-1 実験.....	43
3-1-1 使用機器.....	43
3-1-2 実験試薬.....	44
3-1-3 実験操作.....	45
3-1-3-1 Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /montmorillonite(MC)の調製方法.....	45
3-1-3-2 前濃縮.....	47
3-1-3-3 液液抽出.....	49
3-1-3-4 N <sub>2</sub> 気流濃縮.....	49
3-2 結果と考察.....	50
3-2-1 最適吸着剤の決定及び評価.....	50
3-2-1-1 吸着剤の種類による影響.....	50
3-2-1-2 XRD 測定.....	51

3-2-1-3 SEM, TEM 測定.....	52
3-2-1-4 EDX 分析.....	54
3-2-1-5 FTIR.....	56
3-2-1-6 BET 測定.....	57
3-2-1-7 磁気特性評価.....	60
3-2-2 最適条件の検討.....	62
3-2-2-1 試料溶液の初期 pH.....	62
3-2-2-2 界面活性剤の添加量.....	63
3-2-2-3 吸着・脱着時間による影響.....	64
3-2-2-4 Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /MC の添加量.....	66
3-2-2-5 界面活性剤の種類.....	67
3-2-2-6 脱着剤の種類.....	70
3-2-2-7 試料容量.....	72
3-2-2-8 イオン強度.....	73
3-2-2-9 干渉元素.....	74
3-2-3 さらに濃縮倍率の向上の検討.....	76
3-2-3-1 分散液液マイクロ抽出.....	76
3-2-3-2 脱着剤量による影響.....	77
3-2-3-3 N <sub>2</sub> 気流濃縮.....	78
3-2-4 検量線.....	79
3-2-5 実水試料への応用.....	80
3-2-6 考察.....	81
第4章 結論.....	82
参考文献.....	84
謝辞.....	87

# 第1章 序論

## 1-1 本研究の目的

内分泌攪乱物質の 1 つであるビスフェノール類、エチニルエストラジオールやその誘導体は、産業や農業、医薬品など広い範囲で応用される。

これらの化合物の濃度は低い( $\text{ng/L} \sim \text{g/L}$ )が、沈降物や生物中に蓄積することで、ビスフェノール類は、ヒトの男性生殖の機能障害と甲状腺ホルモン活動分裂など健康への潜在的なリスクとなり得、水生生態系の繁殖の変化や発達異常など、内分泌系を破壊する可能性がある<sup>1,2)</sup>。

そこで、環境中の内分泌攪乱物質を正確に定量することができれば、これらの問題を未然に防ぐことができると思われる。

これらの目的物質を定量する分析方法は、高速液体クロマトグラフィー法(HPLC)やガスクロマトグラフィー/質量分析法(GC-MS)があるが、GC-MS 法は装置が高価であり、水試料では有機溶媒に抽出する必要がある。HPLC 機器は、低コストと汎用性が大きいため、これらの化合物を分析するのに適している。

微量有害物質の前濃縮のための現在の技術は、溶媒抽出、固相抽出(SPE)、固相マイクロ抽出(SPME)、液相マイクロ抽出(LPME)、磁気固相抽出(MSPE)などがある。

本研究では、環境水試料内の内分泌攪乱物質の抽出および定量するための分散固相抽出技術を組み合わせ、簡便、迅速かつ高感度な方法の開発を行った。

## 1-2 内分泌攪乱化学物質

日本では、1998年5月に、環境省(庁)が発表した「環境ホルモン戦略計画 SPEED'98」にて、内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)の疑いのある67物質群(平成12年11月の見直しでは65物質群)を対象として、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策定した。あわせて、調査暫定マニュアル(水質、底質、水生生物)の作成と環境調査が行われた。

国土交通省による環境調査も実施されている。国土交通省は、内分泌攪乱化学作用が確認されたノニルフェノールなど5物質については重点調査濃度を設定し、全国の一級水系における順流最下流の環境基準点など140地点を調査地点に選定している。調査地点のうち、過去の調査で重点調査濃度を超えた地点を重点調査地点、それ以外の地点を一般地点とし、重点調査地点については毎年1回、また、一般地点については内分泌攪乱化学作用が確認された物質については3年に1回、内分泌攪乱化学作用が疑われるフタル酸ジ-2-エチルヘキシルなど3物質については6年に1回の調査を実施している。

2003年の日本国政府見解では、内分泌攪乱化学物質について、「内分泌系に影響を及ぼすことにより、生体に障害や有害な影響を引き起こす外因性の化学物質」と定義されている。

環境省は「内分泌攪乱作用は、化学物質の様々な作用の一面あるいはその他の生体への作用と組み合わせられたものとして評価することが必要である」という観点に立ち、また、環境調査及び環境リスク評価の適格化・効率化を図るために、2005年3月に、「化学物質の内分泌攪乱作用に関する環境省の今後の対応方針について—ExTEND2005—」を策定した。黒本調査の対象物質の選定に内分泌攪乱作用の観点も取り入れ、さらには植物由来のエストロゲン等の天然物等も視野に入れて、限られた調査能力・分析能力を最大限動員して継続的かつ全国的に環境実態を把握し、得られた結果は内分泌攪乱作用を含め、化学物質に関する種々の対策に幅広く有効に活用することが望まれる(日本の水環境行政)<sup>3)</sup>。

### 1-3 吸着と脱着

吸着とは、様々な相の組み合わせの相間界面で、互いに接触する物質相が界面で化学変化を起こさない場合、いずれかの相の物質、あるいはその相の中に溶解している溶質の界面における濃度が、バルク (bulk; 界面科学での物質) のそれよりも大きい場合である。界面での濃度がバルクよりも高くなる場合を正吸着と呼び、電界質溶質の濃度が気相-液相界面で低くなる場合を、負吸着と呼ぶ。ほとんどの吸着現象は正吸着であり、負吸着は電解質水溶液の場合などに見られる。

吸着される物質を吸着質、吸着する物質を吸着剤という。通常、吸着質は分子、イオンなどのように吸着剤と比較してはるかに小さい粒子を意味するが、高分子などの場合には吸着質の大きさが吸着剤と同等になる場合も存在する。

吸着量は、気相の圧力または液相や固相の溶質の濃度、および温度に依存し、その量的関係は吸着剤の基本的な性質である。吸着量を示す方法として一般的に吸着等温式が用いられる。吸着等温式とは、一定の温度下で固体に吸着される際の、吸着量と圧力 (気相) または濃度 (液相) との相関関係を表した式である。吸着等温式は吸着質と吸着剤の組み合わせによって様々な形の曲線となり、その形は固体表面の物理的・化学的状態を表す。

反対に、吸着質が界面から離れ、吸着量が減少する現象を、脱着という。実際には、界面では吸着質の分子やイオンなどは、動力学的に見ると時間的には吸着と脱着を統計的に繰り返している。吸着する量と脱着する量が、統計的に等しくなった平衡状態を、吸着平衡という。

吸着された物質を吸着の物理的・化学的条件と同一の条件で脱着させた場合、脱着量が吸着量に等しい場合を可逆吸着という。吸着剤が変化しない範囲で温度を上げても脱着量の方が少ない場合を非可逆吸着という。吸着現象には、ファンデルワールス力による物理吸着と、共有結合による化学吸着がある。一般的に、前者の場合には界面での吸着剤と吸着質の間の相互作用は弱く、可逆的に吸着できる。後者の場合には相互作用は強いため、非可逆吸着である場合が多い<sup>4)</sup>。



#### 1-4 磁気固相抽出

固相抽出(SPE; solid phase extraction)は、気体あるいは液体中の化学成分を固体によって捕捉する、前濃縮法の一つである。

固相抽出は、溶液や懸濁液に含まれる分析対象物をメンブランフィルターで濾過し、分離する。固相担体に対象物質を保持させて、別の種類の移動相を流すことで、対象物質を濃縮することができる。

磁気固相抽出法(MSPE; magnetic solid phase extraction)とは、磁気と固相吸着剤基質のような磁化できる物質を使用する手法である。磁気抽出媒体が持っている磁気特性は、外部磁場の存在によって容易に固相担体を回収でき、磁場を外すとすぐに再分散することができる。これにより遠心分離または濾過工程なしで、試料媒体から磁気抽出媒体を分離できるため、抽出手順を非常に容易にし、抽出効率を高める。

また試料調製分野においても広く注目されている。磁気抽出媒体が試料溶液中に直接分散されているので、試料処理が単純になるからである。これは、懸濁した固形物及び生物学的サンプルを含む試料に特に適している。

磁気抽出媒体の例として、シリカ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ )またはポリマー( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /ポリマー)で被覆されたマグネタイトを含む磁性材料などがある。

## 1-5 磁性体

磁性体は、磁性を帯びる事が可能な物質であり、反磁性体・常磁性体・強磁性体の3つに分けられる。

原子の中では、電子は原子核の回りのある特定の軌道に入っており、エネルギーの低い内側の軌道から順次埋めて行く。この時、同じ軌道の中でスピンの向きを逆にした2個が対を作って安定する性質があるので、互いの磁気モーメントが打ち消しあって、トータルの磁気モーメントはなくなる。しかし電子の数が奇数の場合はペアを作ることが出来ない電子が一番外側の軌道に1個余るため、原子全体として磁気モーメントを持つことになる。そこで、電子が余っている別の原子と接して、ペアを作るため、原子が集まって作られている普通の物質では、磁気モーメントは発生せず、磁性を示さない。

しかし、一部の原子では、内側の軌道が全部埋まらないままに外側の軌道に電子が入る。ペアを作らない電子を内側の軌道に持っている原子は、原子が集まった物質の中でも磁気モーメントを持つことになる。

各原子の磁気モーメントの向きがバラバラだと、全体としては磁性を持たず、これを常磁性と言う。常磁性の物質は、磁場の中に置かれると一部の磁気モーメントの向きが無理やりに揃えられ、磁石のように振舞い、磁化を持つようになる。磁場が取り除かれると、元の磁性を持たない状態に戻る。

これに対して金属原子が集まった結晶では、原子が互いに相互作用して磁気モーメントの向きが結晶の特定方向に揃えられる場合があり、物質全体としても磁化を持つようになるが、磁気モーメントの方向の揃い方によって、外に現れる磁化は大きく変わる。

強磁性は、結晶の軸の方向に磁気モーメントが揃い、逆に全ての磁気モーメントが同じ向きに揃うのではなく、右向きに揃った磁気モーメントと左向きに揃った磁気モーメントが同じだけできると、外からは全く磁化が見えない。また、逆向きの磁気モーメントが混在しているがその総量に差があり、全体として一方の向きの磁化が残るとき、これをフェリ磁性と呼ぶ。

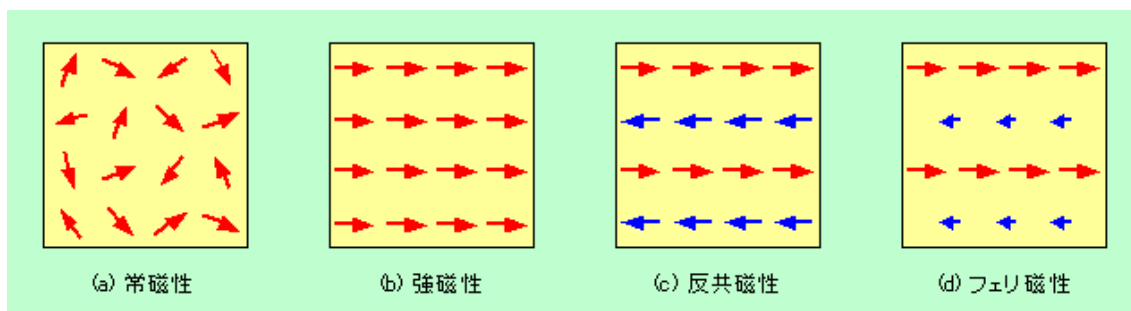


Fig.1 The type of Magnetic material.

## 1-6 液体クロマトグラフィー

### 1-6-1 原理

液体クロマトグラフィーは、固体または液体を固定相とし混合試料成分を液体の移動相で移動させ、各試料成分の吸着力の差や分配係数の差に基づく移動速度の差を利用して混合物を分離する方法である。

液体クロマトグラフィーでは試料が気体になる必要がなく、ガスクロマトグラフィーでは困難な沸点が 300℃以上の化合物の分離分析に対しても適用できることが利点である。また、ガスクロマトグラフィーでは移動相が気体であり移動相の種類に選択肢が少ないが、液体クロマトグラフィーでは移動相として多種類の溶媒が利用できるうえ、組成を連続的に変化させることが可能なため、最適な分析条件の選択が容易であることも大きな利点となっている<sup>5)</sup>。

高性能高圧送液ポンプと高機能なカラム充填剤、さらに高精度の検出器とともに高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が開発され、複雑な化合物の分離分析も迅速に行えるようになった。

## 1-6-2 装置

溶離液槽中の移動相液体は高圧送液ポンプにより  $30\sim 200 \text{ kg/cm}^2$  程度以上に加圧され、試料導入部を経た後分離カラムへと送られる。分離カラムとしては、内径  $2\sim 6 \text{ mm}$ 、長さ  $3\sim 25 \text{ cm}$  程度のカラムに  $2\sim 10 \mu\text{m}$  程度の粒径の充填剤を充填したものがよく用いられる。分離された試料は種々の検出器により検出され、データ処理部において記録される。

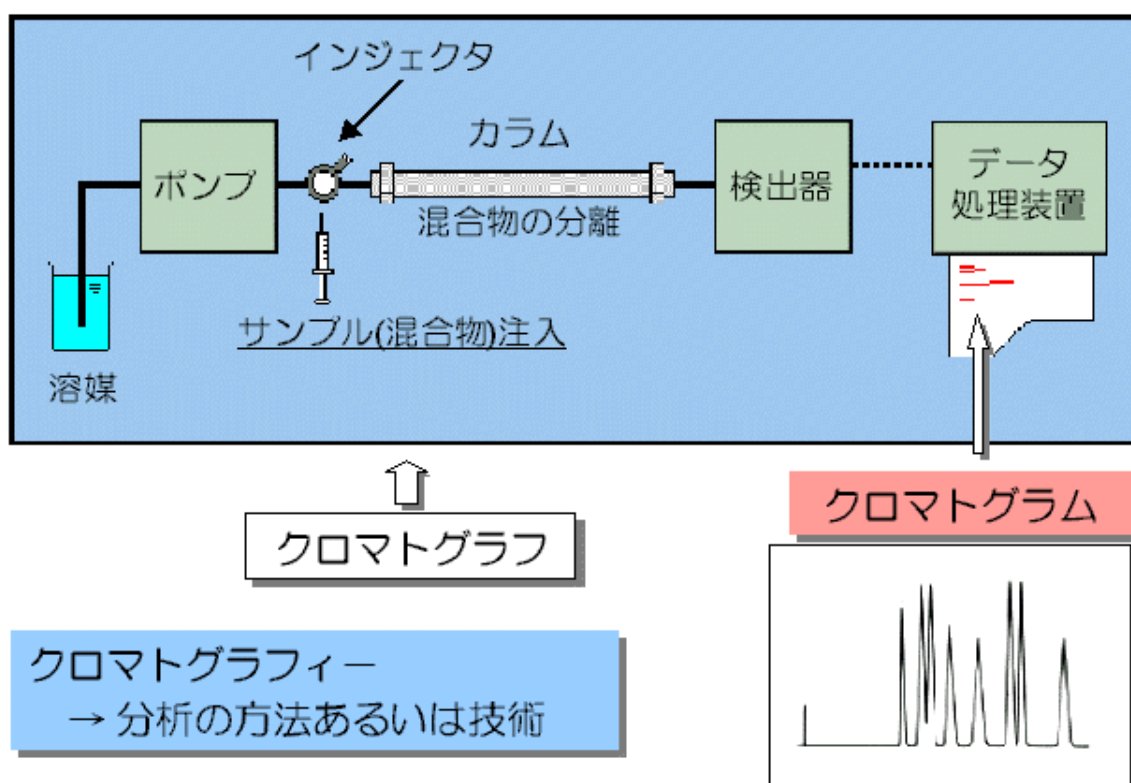


Fig.2 Device of the High-performance liquid chromatography.

## 1-7 関連化学物質

### 1-7-1 活性炭

活性炭は種々の炭素質物質を炭化、賦活（activation; 原料に細孔を生成させる過程）して製造される多孔質構造の無定形炭素である。細孔容積、孔径分布、比表面積などの細孔構造と炭素面上に存在する官能基に起因する表面特性に特異性があり、優れた吸着能、イオン交換能あるいは触媒能を有する。

活性炭は脱色、脱臭、ガス吸着、触媒などの様々な工業用途に用いられている。汎用分野での使用比率は、粒状炭素が約 6 割を占める。最近では、従来からの活性炭に各種の機能を付与した機能性活性炭の開発が進んでいる。主なものとして、抗菌活性炭、生物活性炭、分子ふるい機能を高めたガス分離精製用活性炭などがあり、従来の活性炭にない特徴を生かした用途展開が進んでいる。

活性炭は、無定形炭素の一種である。その構造中には、X 線回折によって、黒鉛様の極微結晶粒子が含まれることが確認されている。この黒鉛結晶部分は、炭素網平面の規則的な積層構造と異なり、層が乱雑に積み重なった無秩序乱層構造をとる。無定形炭素には、加熱処理によって容易に黒鉛化するものと黒鉛化しないものがある。しかし、活性炭の大きな表面積や細孔容積を満足に説明できる構造モデルはまだなく、乱層構造をとる結晶子が、 $sp^3$  混成軌道の四面体炭素による鎖状構造である非晶質炭素により、互いに架橋された構造をとっており、この非晶質部分や結晶子間の表面が吸着のサイトになると推測される。

表面構造としては、大部分が炭素で構成されているため、表面の化学的な性質は疎水性であるが、若干の親水性も兼ね備えている。これは、酸素原子が数%含まれることに起因する。酸素は、主に結晶子と結晶子の連結部の非晶質領域に有機官能基の構成原子として存在している。よく検出される官能基としては、カルボキシル基、フェノール性ヒドロキシル基、キノン形カルボニル基などがある。カルボキシル基やフェノール性ヒドロキシル基は水溶液中で弱酸性を、キノン形カルボニル基は弱塩基性を示すため、これらのサイトは酸性、塩基性化合物を吸着する。

表面官能基の種類と量は、活性炭の製造時の温度の影響を大きく受け、酸性官能基の数は賦活温度が高くなるほど減少する。塩基性官能基の量は、 $800\sim 900^{\circ}\text{C}$ で最も多く、温度の低下に伴って減少する。

活性炭の細孔は、結晶子と結晶子の隙間や連結部に存在していると考えられているが、原料、賦活法、賦活条件などによって結晶子の集合状態が変化し、細孔の形状や大きさにも変化が起こる。細孔の形状は円筒形と仮定されることが多いが、インク壺形の入口をもつもの、毛細管の形で両端が開いているもの、一端が閉じているもの、スリット状のもの、V 字形をしたものなど様々なものが存在していることが考えられる。

活性炭中の細孔分布形式の 1 つとして、マクロ孔の内壁にメソ孔が分布し、メソ孔の内壁にマイクロ孔が分布しているものがある。通常の吸着はマイクロ孔で起こるため、吸着が起こるためにはマクロ孔やメソ孔内を吸着質が拡散してこなければならず、一般的に吸着速度が遅い。よって、マイクロ孔は、比較的分子サイズの小さなものを対象とする気相吸着に適している。

本法では、ビスフェノール含有水溶液に対して活性炭を用いたが、疎水性の強い吸着剤であるため、水溶液からの吸着に適している。

溶媒が水であり、吸着剤が活性炭のような疎水性が強い物質を用いた系で起こる吸着は、疎水性吸着である。疎水性吸着とは、溶質が共有結合、水素結合、イオン結合のような強い力ではなく、ファンデルワールス力のような弱い力で吸着剤表面に引き付けられ、疎水性分子が水溶液中で不安定なために水から弾き出されるようにして吸着するような吸着を指す。対象となる吸着質は、炭化水素のような無極性分子の他に、分子の一部に炭化水素鎖のような疎水基とヒドロキシ基のような親水基を併せ持った分子がある。

活性炭の細孔構造と、吸着特性の関係はおおまかには次式で表される。

$$\text{Log } X = A_1 \times A_s + A_2 \times d_p + A_0$$

X; ある吸着質の吸着量を様々な細孔径分布をもった活性炭について測定した値

$A_s$ ; 比表面積、 $d_p$ ; 平均細孔直径 (円筒形と仮定)、 $A_0-2$ ; 定数

表面積は大きいほど、細孔径は小さいほど吸着量が多くなる。 $A_s$  は吸着サイト数に、 $d_p$  は吸着量に関係している。吸着はおもに分散力によって起こるため、細孔径の小さな吸着剤ほど強い吸着力を有することになる。

## 1-7-2 粘土鉱物

粘土鉱物とは、粘土を構成する鉱物で、主成分は層状ケイ酸塩鉱物(フィロケイ酸塩鉱物)である。金属イオン(Al、Na、Ca等)とケイ酸が連結してきたシートが、層状に形成されている。このシートの間隙に水や金属イオン、場合によっては有機物まで容易に取り込み放出することから、湿度調整やイオン交換性、触媒など、機能性材料として、生活用品をはじめ多様な分野で利用されている。また、セラミック素材や陶器の原料として利用されている。

主な粘土鉱物として、カオリナイト、モンモリロナイト、ゼオライトなどがある。本法で用いられたモンモリロナイトの構造を Fig.3 に示す。

モンモリロナイトの構造は、ナトリウムを含む Na 型とカルシウムを含む Ca 型に分類できる。主に前者は日本やアメリカ合衆国で、後者はフランスで見い出すことができる。モンモリロナイトにはいくつかの特長が挙げられる。

1. 膨潤性：モンモリロナイトの層間に水やその他の物質がインターカレーションすることにより、体積が増大する。
2. イオン交換：モンモリロナイトの層間にはナトリウムイオンやカルシウムイオンが存在し、それらは容易に他の陽イオンと交換される。
3. 乳化作用：固体粒子が油水界面に吸着することによる、ピッカリングエマルションを形成する。安定なエマルションを形成するには非イオン性界面活性剤など他の成分を共存させる必要がある。
4. チキソトロピー：力を加えると軟らかくなり、しばらくすると少し固くなる。この特徴はゲルインクボールペンなどに応用されていて、書くときは軟らかく、書いた後にそこに留まってくれるという特徴がある。

一般に、粘土の表面は負電荷が卓越しているので陽イオンが吸着し、他のイオンを含む溶液と接触させると瞬間的な速さで交換（陽イオン交換）反応が起こる。この交換可能な陽イオンの量を陽イオン交換容量(cation exchange capacity, CEC)と呼び、単位質量(100 g)あたりのミリグラム当量数(meq)で示し、モンモリロナイトの CEC は 80~150 meq/100 g である<sup>6)</sup>。

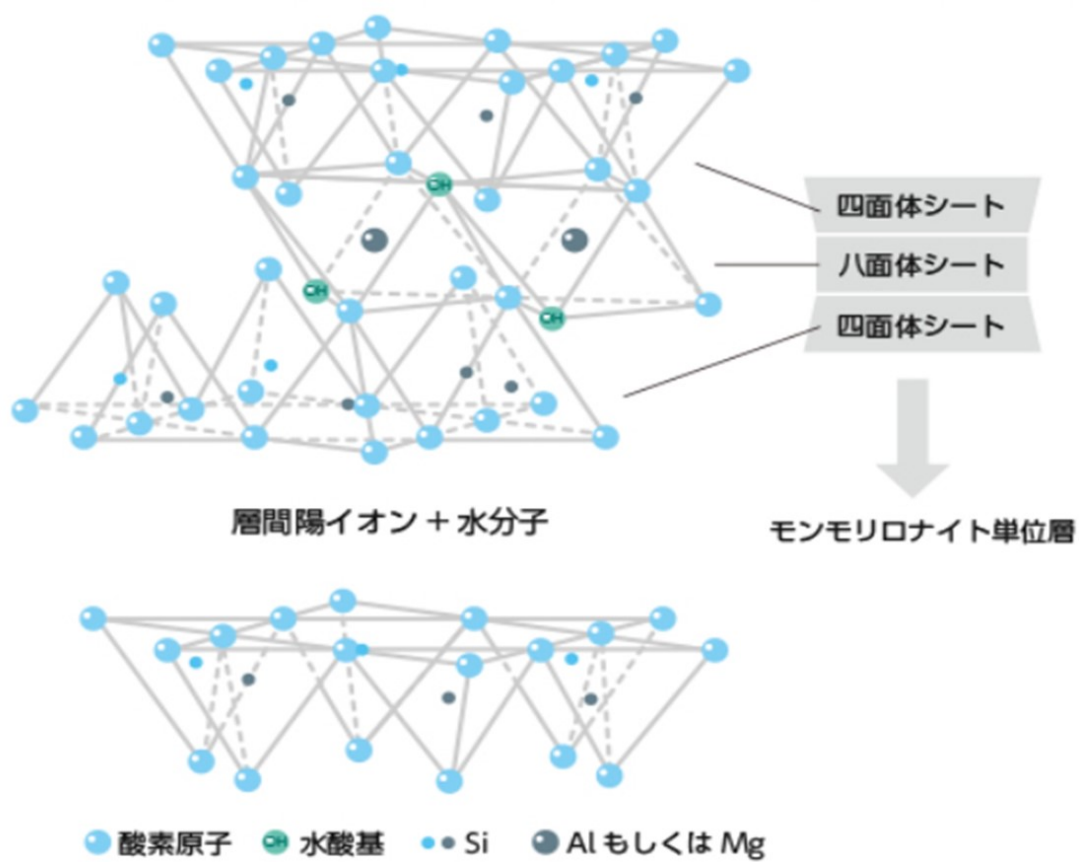


Fig.3 Structure of montmorillonite.



### 1-7-3 界面活性剤

界面活性剤とは、物質の界面に働きかけて、その性質を変化される化合物のことである。界面は日常生活および産業活動のありとあらゆるところに存在するので、界面活性剤はありとあらゆる場面に活躍の場がある。

界面活性剤の分子構造には、親水基（極性基）と疎水基（無極性基）と呼ばれる、性質の異なる基がある。親水基は水などのように極性の大きい溶媒に対して親和性が大きく、溶解性がある。しかし、鉱油などのように極性の小さい溶媒に対しては親和性がなく、不溶解性である。疎水基はこの逆の性質を示す。

親水基と疎水基は、強い種類のものであり、適当な力関係をもって界面活性剤の分子を構成している。このバランス（HLB; hydrophile-lipophile balance）によって比較的水に溶けやすいものから解けづらいものまで溶解性の異なる界面活性剤がある。

分子内に、溶媒に対して溶解性が異なる 2 種類の基を有する物質を、両溶媒性物質という。界面活性剤はその一種であり、親水基と疎水基の溶解性が大きく、均衡した両溶媒性構造であるため、他の物質の溶液とは異なった特性を示す。

界面活性剤の疎水基は、水溶液表面、油や疎水性固体の表面に吸着するが、この吸着は、通常の吸着とはメカニズムが異なる。

通常の吸着では、物質との間に何らかの引力相互作用が存在することに起因する。一方、界面活性剤分子が水溶液表面に吸着する場合は、疎水基が空気との間に引力や、水との間に斥力を働かせているわけではなく、水分子同士の凝集力の強さに関わってくる。水分子同士には、水素結合という強い凝集力（引力）が働くため、水分子にとっては、隣に炭化水素などの水素結合を形成しない相手があるより、同じ水分子が隣接するほうが安定化する。結果として、水分子が集まって疎水基を排除し、排除された疎水基は溶液や他の物質表面に吸着することになる。

ただし、疎水基同士の相互作用はファンデルワールス力であり、炭化水素基と水分子との間でもほぼ同様に働く。したがって、疎水基にとっては隣接する基が疎水基か水分子であるかは関係しない。

固—液界面への吸着がもたらす現象は、濡れと分散である。固体表面上に水滴を置いたとき、水表面、固体表面、固—液界面には、それぞれ表面張力と界面張力が存在するが、これら 2 つの力が 3 者の接触点で釣り合う。このつり合いの式は、Young の式と呼ばれる。

$$\gamma_s = \gamma_{sw} + \gamma_w \cos \theta$$

$\gamma_s$ ; 固体の界面張力、 $\gamma_w$ ; 水の界面張力、 $\gamma_{sw}$ ; 固—液界面の界面張力、 $\theta$ ; 接触角

この水滴の中に界面活性剤が溶けると、界面活性剤は水の表面および固-液界面に吸着し、これらの界面張力を低下させる。Young の式の右辺の第 2 項が小さくなり、濡れが進行する。

疎水性の粉体を水へ加えても、すぐに浮かび上がって水に混ざらない。これは、粉末粒子間に水が浸入せず、粒子を分散させられないことが原因である。粒子間隙への水の浸入を支配するのが、浸漬濡れと呼ばれる現象であり、固体の表面張力と固-液の界面張力の大きさによって決まる。

疎水性の粉体と水を混合したとき、固-液の界面張力のほうが固体の表面張力より大きいため、粒子間隙に水が侵入しない。ところが、界面活性剤が存在すると、分子中の疎水基を固体の表面に向けて吸着することで、表面を浸水化させる。結果として、固-液の界面張力が低下し、固体の表面張力のほうが大きくなり、水が粒子間隙に侵入することになる。粒子間への水の浸入は、粒子をバラバラにし、水中に分散させる働きがある。

界面活性剤の分散作用への寄与は、濡れの促進だけではなく、一度分散した粒子が再び接触し、凝集や沈殿などを防ぐ働きも担う。イオン性界面活性剤が吸着すれば、粒子間に静電的反発力が生じるため、粒子同士が付着しづらくなる。

#### 1-7-4 ビスフェノール (BPA、BPE、BPF)

ビスフェノールは、2個のヒドロキシフェニル基を有する化合物の総称で、ジフェニルメタンを基本骨格としている。ビスフェノールは総称であるが、ビスフェノール A を指すこともある。ポリカーボネート、エポキシ樹脂や様々な消費製品、医療機器、食品缶、飲料パック、接着剤、保護コーティングなどに広く使われている。

水に難溶(120 mg/L 25°C)で、アルコール、エーテル、アセトンなどの有機溶媒に可溶である。

Table 1. physical property.

	CAS number	分子量	外観
BPA	80-05-7	228.3	白色固体
BPE	2081-08-5	214.3	白色固体
BPF	620-92-8	200.2	微赤色固体

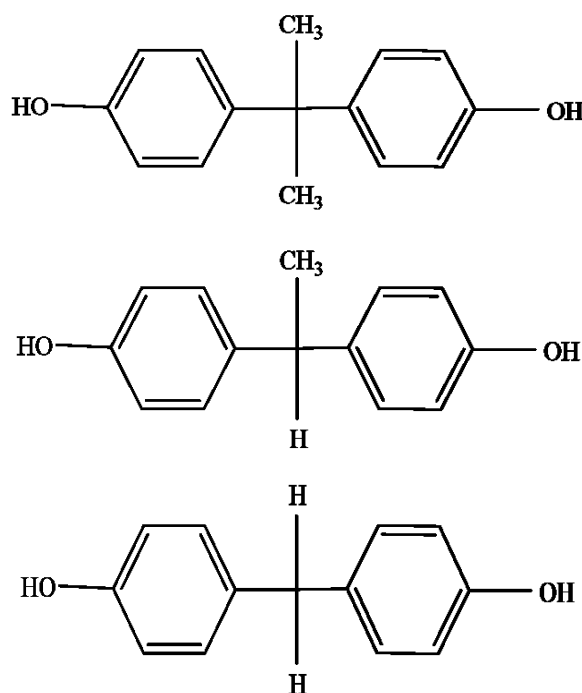


Fig.4 Structure of bisphenols (BPA, BPE, and BPF).

ビスフェノールが体内に取り込まれる主な経路の一つに、食事を通しての摂取がある。その原因としては、ポリカーボネート製の食器・容器等からビスフェノールが飲食物に移行するケースや、食品缶詰または飲料缶内面のエポキシ樹脂による防蝕塗装が施された部分からビスフェノールが飲食物に移行するケースなどが挙げられる。

ビスフェノールの安全性は、各種の毒性試験の結果に基づき評価されているが、1997年

(平成9年)頃から内分泌系への影響が懸念される物質として、社会的に関心を持たれ、これまでに内分泌系などへの影響を調べるための試験研究が数多く行われている。

こうした研究の中で、動物の胎児や子供が、従来の毒性試験により有害な影響がないとされた量に比べて、極めて低用量(2.4~10mg/kg 体重)のビスフェノールの曝露を受けると、神経や行動、前立腺への影響、思春期早発等が認められているという報告がされている<sup>7,8)</sup>。

### 1-7-5 エストロゲン物質

エストロゲンは、エストロン、エストラジオール、エストリオールの3種類からなり、ステロイドホルモン的一种である。エチニルエストラジオールは、経口避妊薬の主要成分の1つであり、その誘導体が排水を介して環境に導入される。

卵巣の顆粒膜細胞、外卵胞膜細胞、胎盤、副腎皮質、精巣で作られる。乳児期早期（1-3ヶ月）の女性は思春期並に分泌量が多く、小卵胞が出没するが、2歳から思春期を迎えるまでは分泌量が減少する。2歳から思春期を迎えるまでの分泌量は女性で0.6 pg/ml、男性で0.08 pg/mlと女性の方が高くこれが女性の思春期初来が男性より早い原因の一つとなっている。思春期に卵巣が発達し始めると共に分泌がプロゲステロンも増加し始め、第二次性徴を促進させる。更年期以降は分泌が減少する。女性の尿には、大量のエストロゲンが含まれるため、下水処理水も多量のエストロゲンを含むことになり、環境ホルモンの環境への排出が問題になったことがある。

エストラジオールはエストロンとの可逆反応によって生成される。構造式をFig.5に示す。近年、人間の尿中に含まれているエストラジオールをはじめ天然、人工女性ホルモンの環境に与える影響が問題となってきている。都市部の下水道中より17β-エストラジオール(E2)などが観測されている。特に英国では、雌雄同体化したローチ（コイ科の魚類）が1980年代前半から下水処理場の放流先となる河川で見つかりだしており、この問題が深刻となってきている。

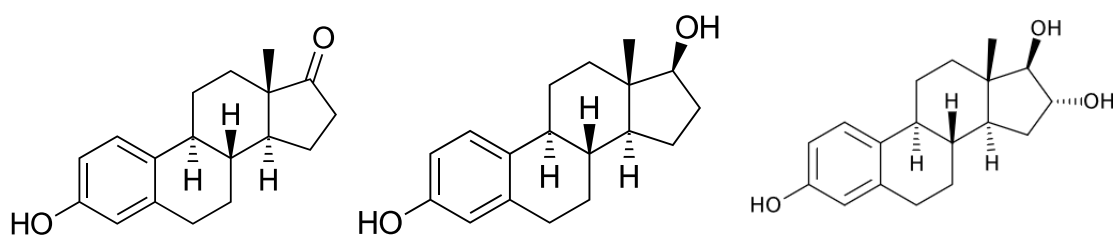


Fig.5 Structure of estron(left), estradiol(center) and estriol(right).

# 第2章

活性炭/窒素気流濃縮法を用いる  
HPLC 分析法によるビスフェノール類  
の定量

## 2-1 実験

### 2-1-1 使用機器

マグネティックスターラー	HS-360HS	(株)井内盛栄堂
分析天秤	AUT220	SHIMADZU
マイクロシリンジ	MS-GANO25	ITO Co.
メノウ乳鉢		アズワン(株)
遠心分離機	卓上小型遠心機	KUBOTA
オートクレーブ		
窒素濃縮機	PIERCE MODEL18780	Pierce Chemical Co
高速液体クロマトグラフィー	GL-7450	ジーエルサイエンス(株)

## 2-1-2 実験試薬

ビスフェノール A	$(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$	ナカライテスク(株)
ビスフェノール E	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$	和光純薬工業(株)
ビスフェノール F	$\text{HOC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$	和光純薬工業(株)
アセトニトリル	$\text{CH}_3\text{CN}$	和光純薬工業(株)
メタノール	$\text{CH}_3\text{OH}$	関東化学(株)
エタノール	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	関東化学(株)
フミン酸		
水酸化ナトリウム	$\text{NaOH}$	ナカライテスク(株)
塩化ナトリウム	$\text{NaCl}$	和光純薬工業(株)
塩化カリウム	$\text{KCl}$	ナカライテスク(株)
塩化カルシウム	$\text{CaCl}_2$	ナカライテスク(株)
塩化マグネシウム	$\text{MgCl}_2$	和光純薬工業(株)
塩化ニッケル(II)六水和物	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	ナカライテスク(株)
塩化アルミニウム六水和物	$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	ナカライテスク(株)
塩化亜鉛	$\text{ZnCl}_2$	ナカライテスク(株)
塩化リチウム	$\text{LiCl}$	
ドデシル硫酸ナトリウム	$\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$	関東化学(株)
活性炭 activated carbon	DarcoKB-G	SIGMA-ALDRICH®
黒鉛末 Graphite Powder		関東化学(株)
白鷺 CW50		武田薬品工業(株)



### 2-1-3 実験操作

#### 2-1-3-1 遠心分離法

操作手順を Fig.6 に示す。

試料溶液に活性炭 10 mg を加えて 10 分間攪拌し、吸着させた。次に、遠心分離(4000 rpm, 5 分間)し、上澄み液を捨て、残った活性炭にアセトニトリルを 1 ml 加え、15 分間攪拌させた。

再び遠心分離(4000 rpm, 5 分間)し、上澄みのアセトニトリルを濾過した後、HPLC で測定した<sup>9)</sup>。

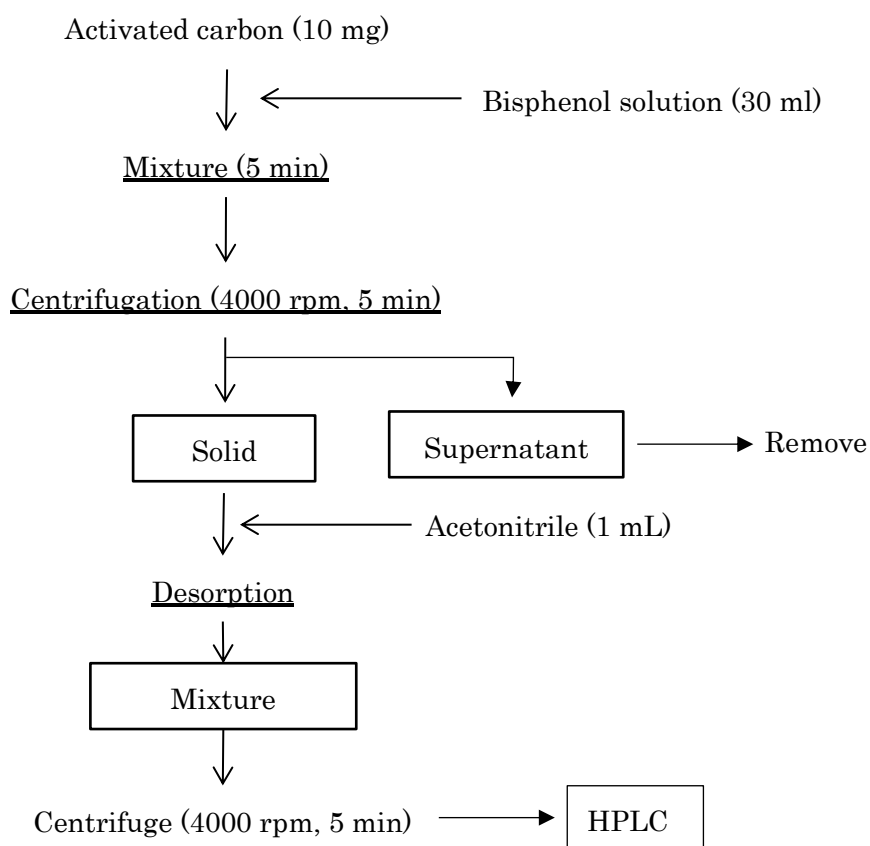


Fig.6 Flowchart of centrifuging experimental procedure.

Table 2 Experimental conditions.

Sample	Bisphenol A, E, and F (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
Sample volume	30 mL
Adsorbent	Activated carbon (Aldrich, Darco KB-G)
AC amount	10 mg
Stirring time	5 min
Desorption time	2~20 min
Analysis	High performance liquid chromatography

### 2-1-3-2 フミン酸による表面修飾

活性炭と 40 wt%フミン酸を混合し、めのう鉢ですりつぶした。  
その後、電気炉で 400°C 3h 焼成を行った。

### 2-1-3-3 塩基処理

活性炭 500 mg と NaOH (1N)10 mL を混合し、オートクレーブで 3h 110°C で加熱攪拌し、塩基処理を行った。

塩基処理された活性炭を洗浄し、上澄みを取り除いた後、乾燥させた。

#### 2-1-3-4 吸引濾過法

操作手順を Fig.7 に示す。

10 mg の活性炭を量り取り、試料溶液に加えて懸濁させ、吸着させた。この溶液を吸引濾過し、上澄み液を除去した。

フィルター上の活性炭に、脱着液を滴下し、ビスフェノール類を脱着した。

得た溶出液中に含まれるビスフェノール類は、高速液体クロマトグラフィーによって測定した。

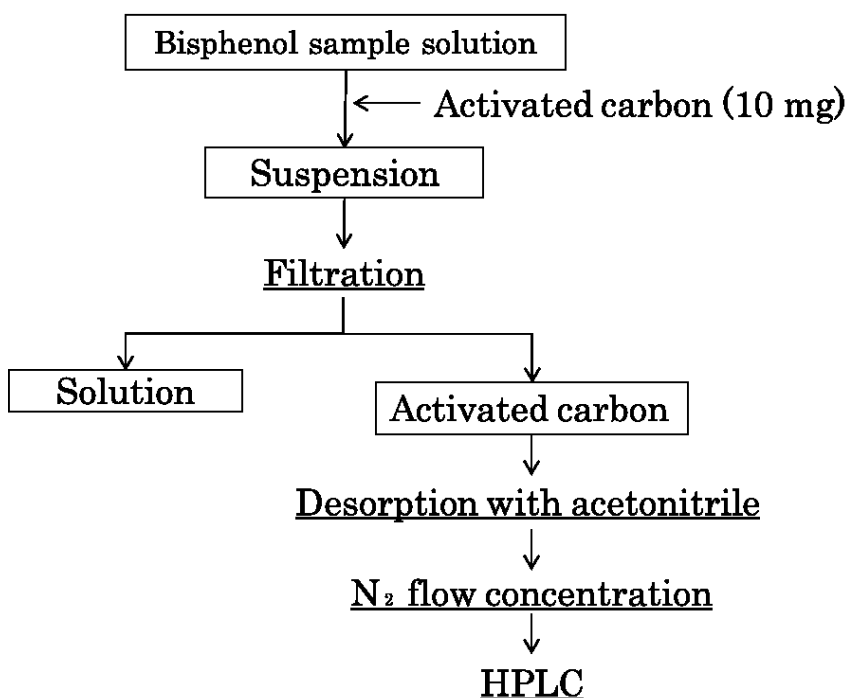


Fig.7 Flowchart of flow experimental procedure.

##### ・窒素気流濃縮

脱着液を室温で穏やかな N<sub>2</sub> 気流下で乾燥直前まで蒸発させた。

残留分は 0.2 mL のアセトニトリルで溶解させ、HPLC 分析を行った。

脱着液量は目的分析物に対して達成することができる最大の前濃縮倍率を決めるので、脱着液量は本法の感度に影響を与える。

#### 2-1-4 濃縮倍率と回収率

ビスフェノール類がどの程度濃縮されたかを示す指標として、濃縮倍率(Enrichment factor: EF)を用いる。濃縮倍率を求める式は、以下の通りである。

$$\text{Enrichment factor} = \frac{C}{C_0}$$

C: 濃縮後の溶液におけるビスフェノール濃度

C<sub>0</sub>: 濃縮前の溶液におけるビスフェノール濃度

また、試料溶液中に存在していたビスフェノール類が、吸着-濃縮過程を経て、どの程度回収されたかを示す指標として、回収率(Recovery)を用いる。これは、物質を定量する際、あらかじめ含有量が判明している標準物質を、一定量試料に添加した後で濃縮操作を行い、目的物質を定量することで、添加した物質がどれだけ回収されるかを示す指標である。回収率により、定量法の正確性の指標にもなる。回収率を求める式は、以下の通りである。

$$\text{Recovery (\%)} = \frac{\text{EF} \times V_{\text{eluent}}}{V_{\text{sample}}} \times 100$$

V<sub>eluent</sub>: 溶離剤容量、V<sub>sample</sub>: 試料容量

## 2-2 結果と考察

### 2-2-1 遠心分離法

#### 2-2-1-1 攪拌時間

攪拌時間を 5~20 min の範囲で変化させることで、攪拌時間の与える濃縮倍率への影響を調査し、最適攪拌時間を決定した。結果を Fig.8 に示す。

攪拌時間の長さは、濃縮倍率に大きな影響を与えないことが分かった。このことから、吸着剤へビスフェノール類が初期段階で素早く引き寄せられることが予測される。

したがって、作業効率の面を考慮して、最適攪拌時間は 5 min とした。

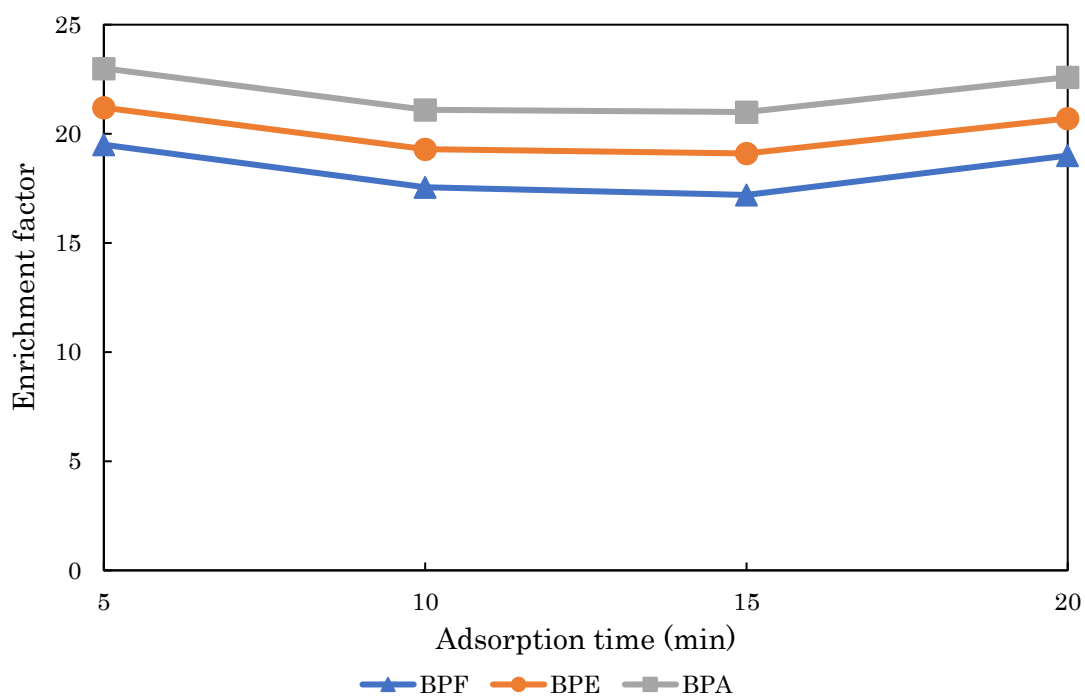


Fig.8 Effect of desorption conditions on the enrichment factor of bisphenols.

### 2-2-1-2 吸着剤

吸着剤の種類による濃縮倍率への影響を調査し、最適な吸着剤を決定した。結果を Fig.9 に示す。

Activated Carbon (SIGMA-ALDRICH DarcoKB-G)を用いた時、濃縮倍率が最も高く、良い再現性が得られた。

したがって、最適な吸着剤として、Sigma-Aldrich 社の Activated Carbon を使用した。

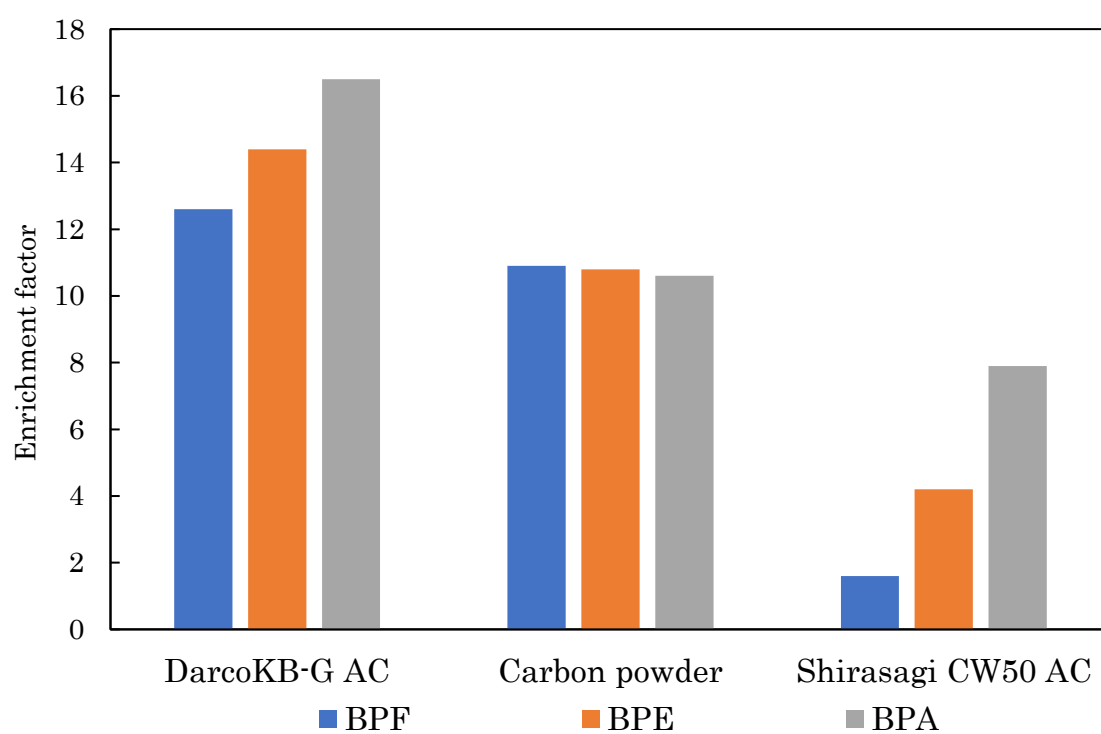


Fig.9 Effect of type of C-based adsorbent on the preconcentration of bisphenols.

### 2-2-1-3 表面修飾

吸着剤の表面修飾により、濃縮倍率の向上を図った。結果を Fig.10 に示す。フミン酸による表面修飾、塩基処理を行ったものと比較したところ、濃縮倍率に影響を与えなかった。

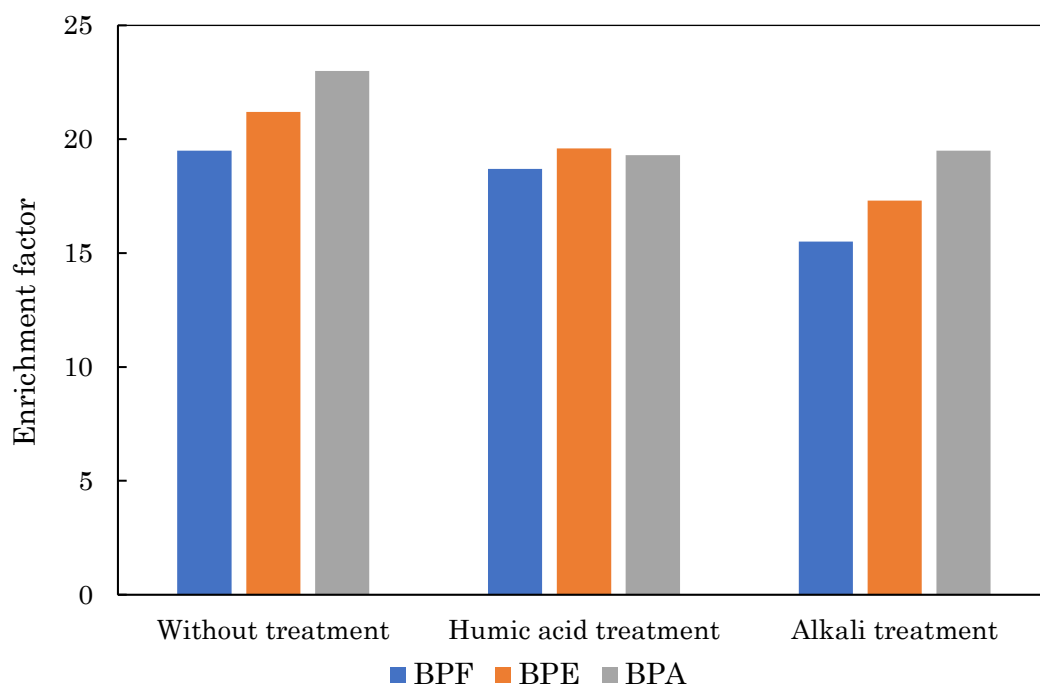


Fig.10 Effect of treatment on the enrichment factor of bisphenols.

## 2-2-2 吸引濾過法

### 2-2-2-1 懸濁法

Fig.11 に、吸着する際のカラム法と懸濁法による濃縮倍率の影響を示す。カラム法とは吸着剤をカラムに充填し、カラムに試料を注ぐ方法で、懸濁法は試料と吸着剤を懸濁させてから、カラムに注ぐ方法である。グラフより懸濁法の方が、より高い濃縮倍率が得られた。

よって、本法では懸濁法を用いた。

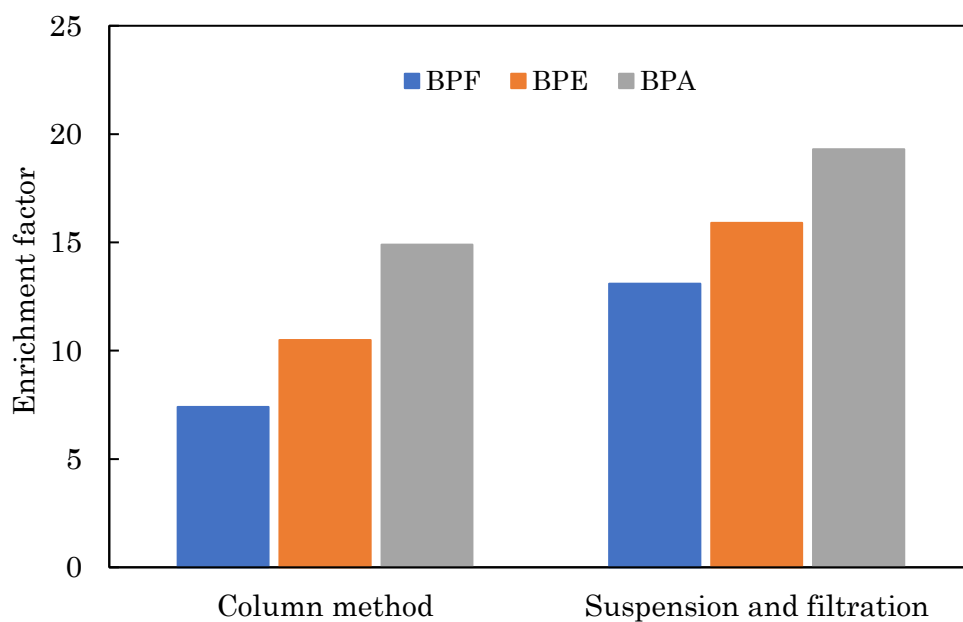


Fig.11 Comparison of column method and suspension method.



### 2-2-2-2 脱着時間

脱着時間の与える濃縮倍率への影響を調査し、最適脱着時間を決定した。結果を Fig.12 に示す。

脱着時間の長さは、濃縮倍率に影響を与えないことが分かった。このことから、脱着剤へビスフェノール類が初期段階で素早く引き寄せられることが予測される。

したがって、作業効率の面を考慮して、脱着時間なしで吸引ろ過をした。

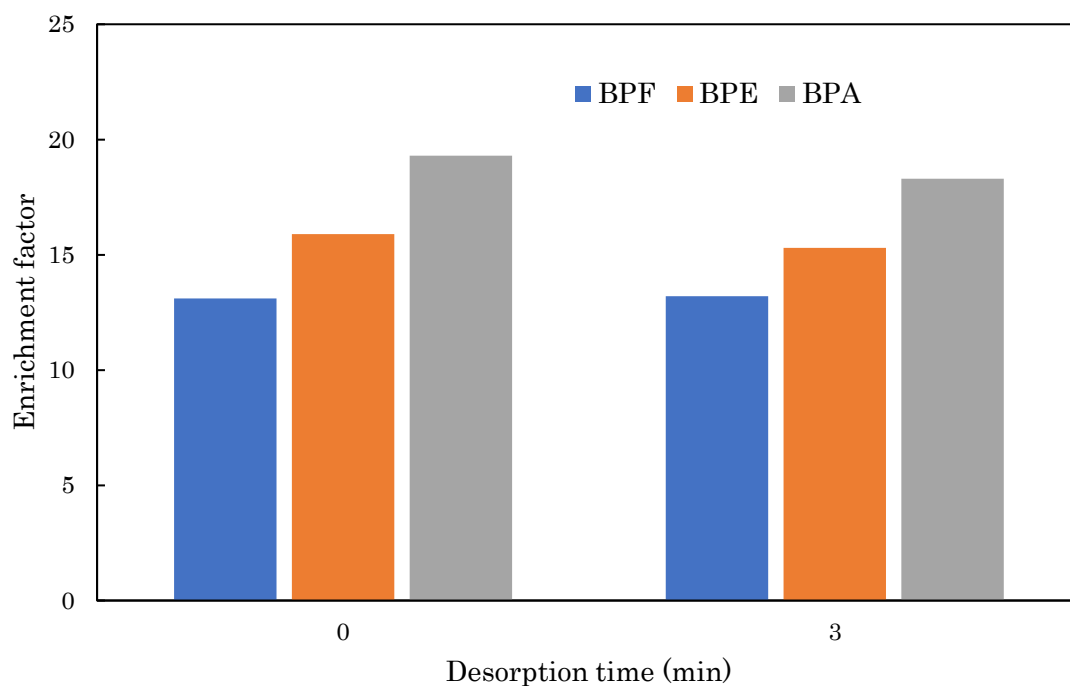


Fig.12 Effect of desorption time on the enrichment factor of bisphenols.

### 2-2-2-3 試料溶液の pH

水溶液試料の pH は、目的分析物の状態と吸着剤の表面電荷に影響するので、本法において重要な分析因子である。

0.5 ppm のビスフェノール類を含む試料溶液の初期 pH を、3~11 の範囲で調製することにより、pH が濃縮に及ぼす影響を調査し、最適 pH を決定した。結果を Fig.13 に示す。

グラフから、pH 11 のとき、濃縮倍率が低下し、pH 3~10 の範囲でビスフェノール類のより高い濃縮倍率が得られた。

一般に、水系において固体表面が加減する原因としては、固体表面に存在する解離性官能基の解離や、イオンの吸着などがある。活性炭の場合、炭素前駆体からの炭化、賦活を通じて生成する表面官能基の解離および、 $\text{H}_3\text{O}^+$  や  $\text{OH}^-$  の吸着によって荷電すると考えられている。

3~10 の pH 値の範囲では 3 つのビスフェノール類は、中性分子として存在していた。

グラフから、塩基性側に寄るとき濃縮倍率の減少がみられる。原因として、多くの活性炭は負電荷を有する。また、BPA の解離定数は  $\text{pK}_a=10.0$  付近であり、解離されていることが挙げられる(BPE,BPF も同様)。つまり、解離によりビスフェノールが負電荷となり、活性炭の負電荷と反発しあつたため、と考えられる。

以上の原因から、このような結果が得られたと考えられる。本研究では、pH 調整なしで試料溶液を用いた。

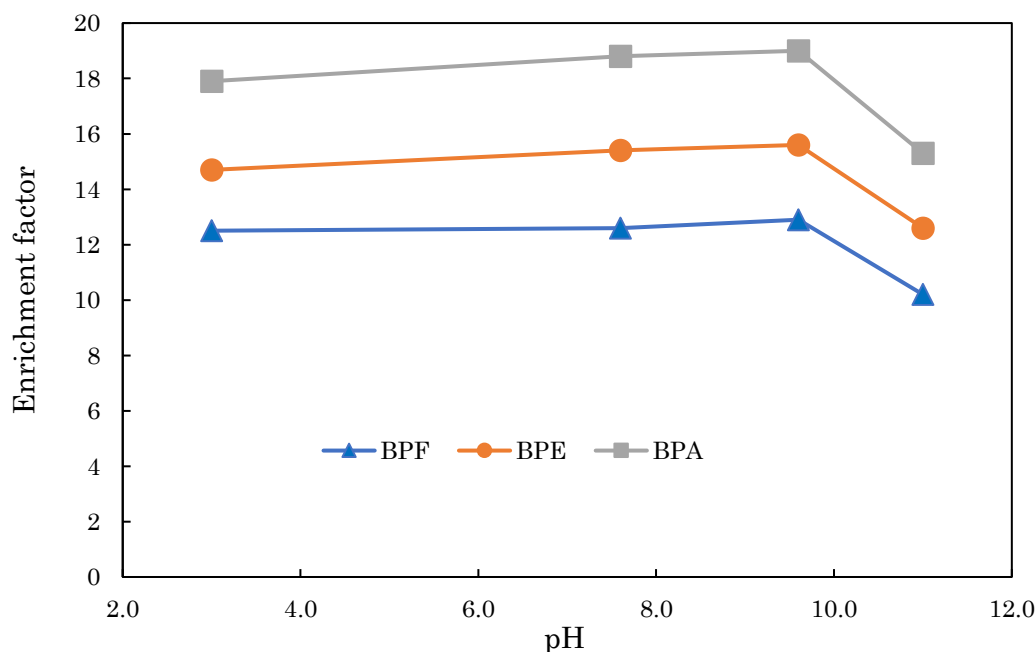


Fig.13 Effect of pH on the enrichment factor of bisphenols.

#### 2-2-2-4 試料容量

高い前濃縮倍率は、脱着剤の量を減少させる、あるいは、試料の量を増やすことで、脱着剤に対する試料の容積比を大きくすることで得られる。そこで、試料容量 30, 60, 90, 100, 200, 300 mL で変化させ、試料容量の与える濃縮倍率・回収率への影響を調査し、最適試料容量を決定した。結果を Fig.14 に示す。

試料容量を大きくしたとき、濃縮倍率も増加した。また、試料容量の大きさは回収率にあまり影響しないことが分かった。

よって本研究では、最適試料容量を 100 mL とした。

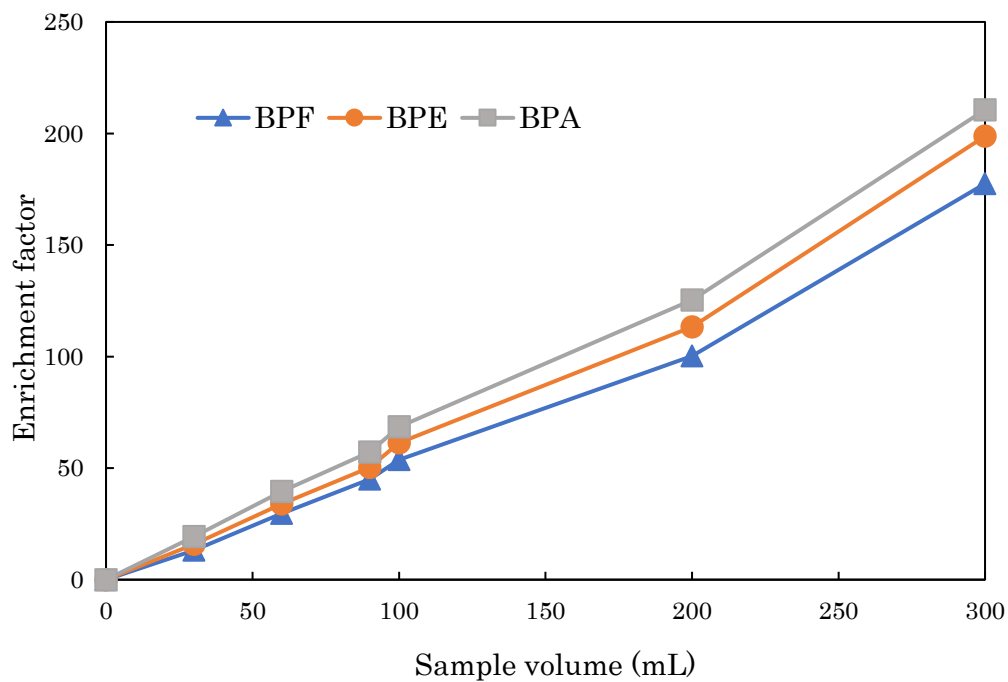


Fig.14 (a) Effect of sample volume on enrichment factor.

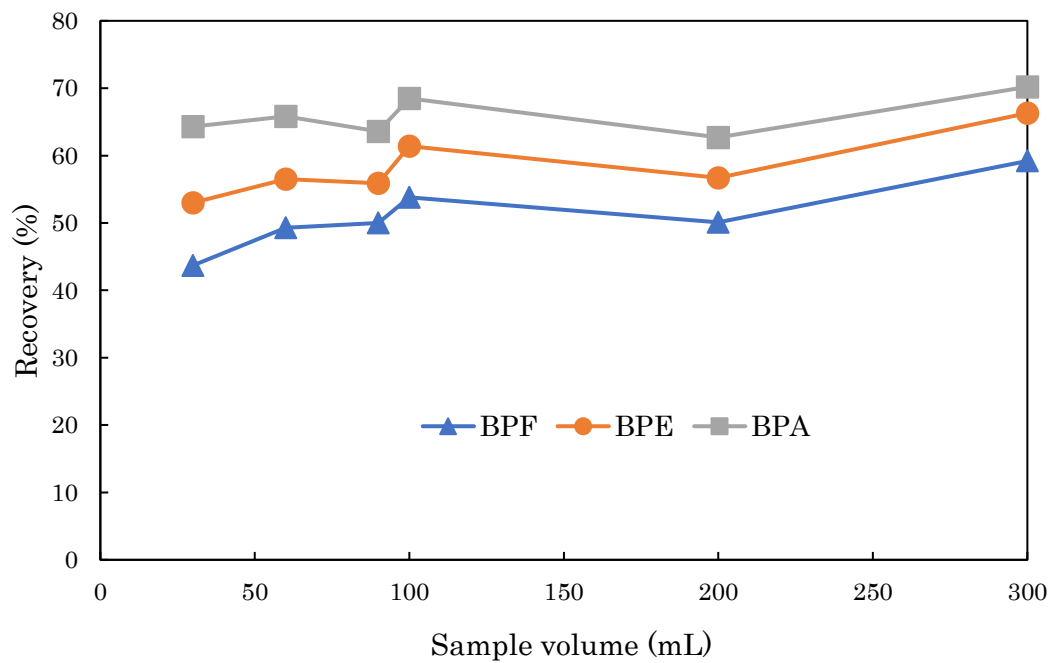


Fig.14 (b) Effect of sample volume on Recovery.

### 2-2-2-5 干渉元素

様々な無機イオンと有機物質は、BPA、BPE、BPF に対する吸着の影響があり、工業排水に含まれるので、ビスフェノール類の吸着に対する、共存イオンや天然有機物の影響を調査する必要がある。

最適条件下で、吸着剤上のビスフェノール類の吸着に対する一般的な共存イオンの影響を調査した。結果を Fig.15 に示す。0.5 ppm のビスフェノール試料を、干渉元素を添加して濃縮した結果と、干渉元素を添加せずに濃縮した結果の比を表している。

若干ばらつきが出たものの、各干渉元素は、前濃縮時の吸着能力と、その後の定量に影響を及ぼさないことが分かった。

Table 3. Effect of matrix substances on enrichment factor.

Matrix	Concn. (ppm)
Na <sup>+</sup>	500
K <sup>+</sup>	500
Ca <sup>2+</sup>	500
Mg <sup>2+</sup>	500
Ni <sup>2+</sup>	500
Al <sup>3+</sup>	500
Zn <sup>2+</sup>	500
Li <sup>+</sup>	500
methanol	500
ethanol	500
SDS	10

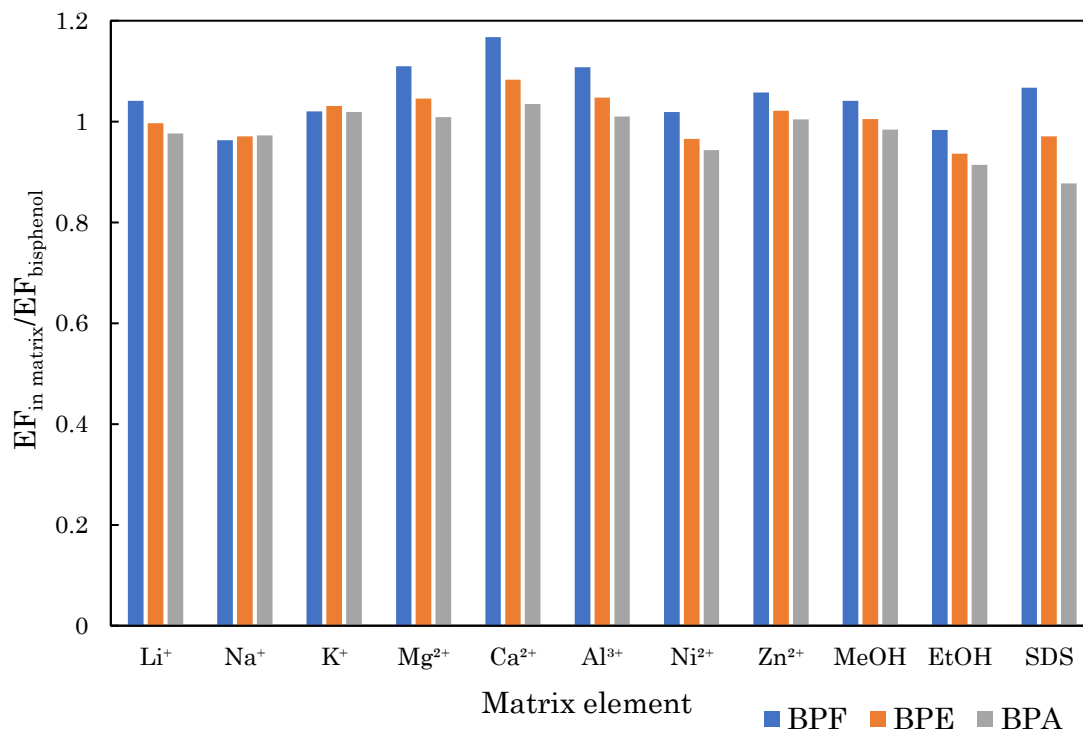


Fig.15 Effect of matrix substances on enrichment factor.

### 2-2-2-6 窒素気流濃縮

窒素気流濃縮を行うことで、最大の前濃縮倍率を決めた。結果を Fig.16 に示す。

ビスフェノールの濃度は濃縮倍率にあまり影響しないことが分かった。また、150~250倍の濃縮倍率が得られた。

これは、有機溶媒のみを蒸発させることでビスフェノールが濃縮されるためである。窒素気流濃縮を行った際、液体は完全に蒸発し、サンプル瓶には白色固体の物質が残った。この物質はビスフェノールだと考えられる。

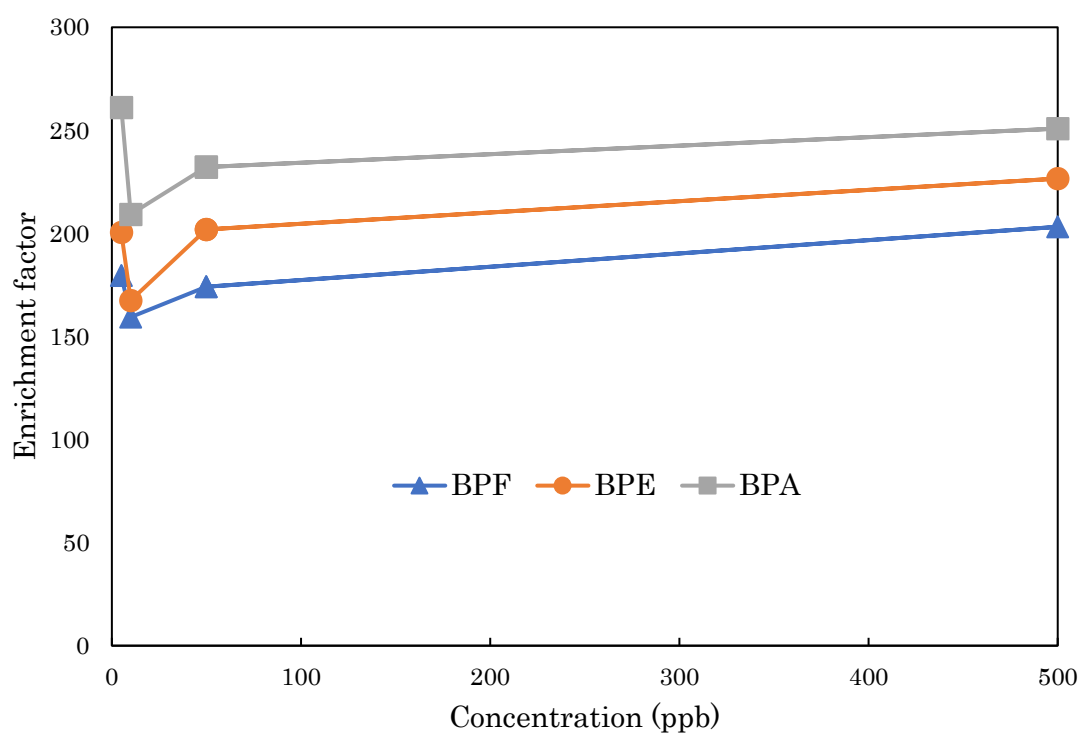


Fig.16 Effect of mild nitrogen stream on enrichment factor.

### 2-2-3 検量線

5, 10, 50, 500 ppb のビスフェノール濃度の試料溶液を用いて検量線の検討を行った。検量線の線形範囲において、その相関関数( $R^2$ )が 0.999 と、非常に良い直線性が得られた。

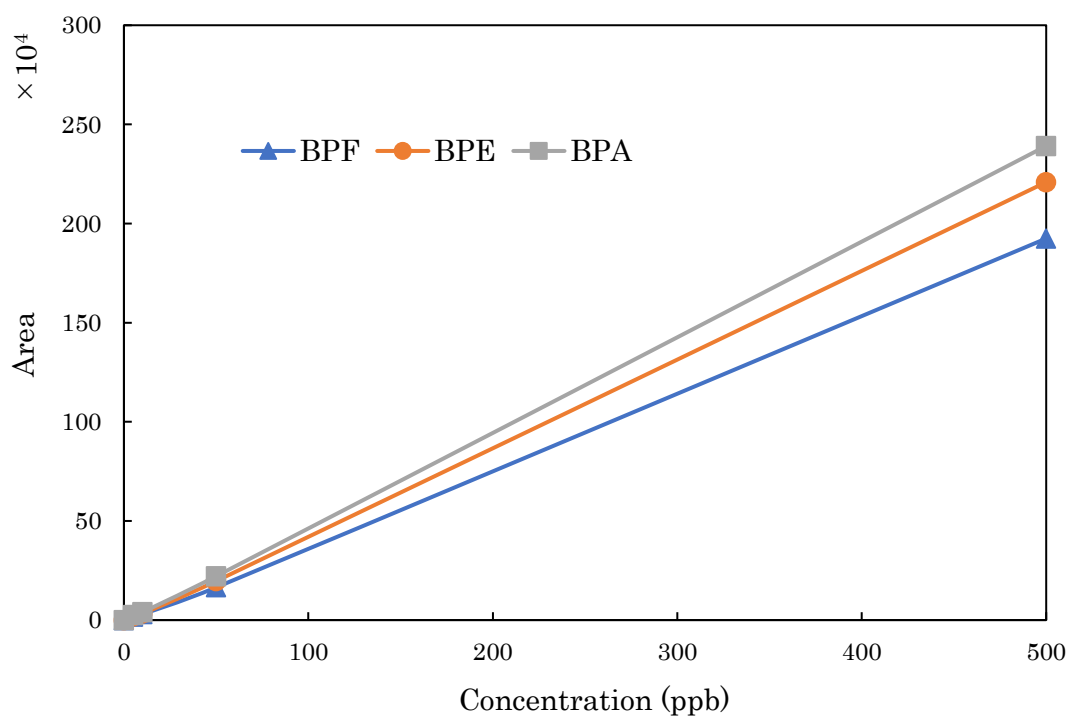


Fig.17 Calibration curve of bisphenol.



## 2-2-4 実試料中のビスフェノール類の定量

吸引濾過法について、最適化された条件下での実試料への応用を行った。実試料としては、2016年12月22日と2017年2月7日に採取した雨水を採用した。結果をTable 4に示す。

ここでのRecoveryは、どれだけ正確に定量ができたかを示す回収率である。式は以下の通りである。

$$\frac{C_{\text{found}} - C_{\text{original}}}{C_{\text{added}}} \times 100$$

$C_{\text{found}}$ : 検量線を用いて濃縮液から算出した添加後の濃度、 $C_{\text{original}}$ : 試料濃度

$C_{\text{added}}$ : 添加した既知溶液濃度

雨水について、本法を用いて正確な定量ができることが確認された。従って、本法は、雨水に対して有効であることが分かった。

Table 4. Determination of bisphenol in rain water.

Sample	Bisphenol	Concentration (ng mL <sup>-1</sup> )		
		Added	Found	Recovery (%)
River water (Dec.22)	BPA	—	N.D.	
		10.0	8.97±0.59	90
	BPE	—	N.D.	
		10.0	10.77±0.87	108
	BPF	—	N.D.	
		10.0	10.07±0.41	101
River water (Feb.7)	BPA	—	N.D.	
		10.0	9.81±0.66	98
	BPE	—	N.D.	
		10.0	9.31±0.74	93
	BPF	—	N.D.	
		10.0	11.58±0.30	116

N.D.; Not detected.

### 2-2-5 考察

反応メカニズムを Fig.18 に示した。本研究では BPA が最も濃縮倍率が高く、順に BPA, BPE, BPF となった。理由として、ビスフェノール 3 種の極性の違いが挙げられる。疎水基であるメチル基の数が、BPA は 2 つ、BPE は 1 つ存在し、BPF はメチル基を持たない。これにより、極性の大きさに差が生じたため、上記のような濃縮倍率になったのだと考えられる。

極性の大きさに関する参照を Fig.19 に示す。

また、2-2-2-3 項で述べたように、表面荷電状態が吸着に対する影響を及ぼすと考えられる。

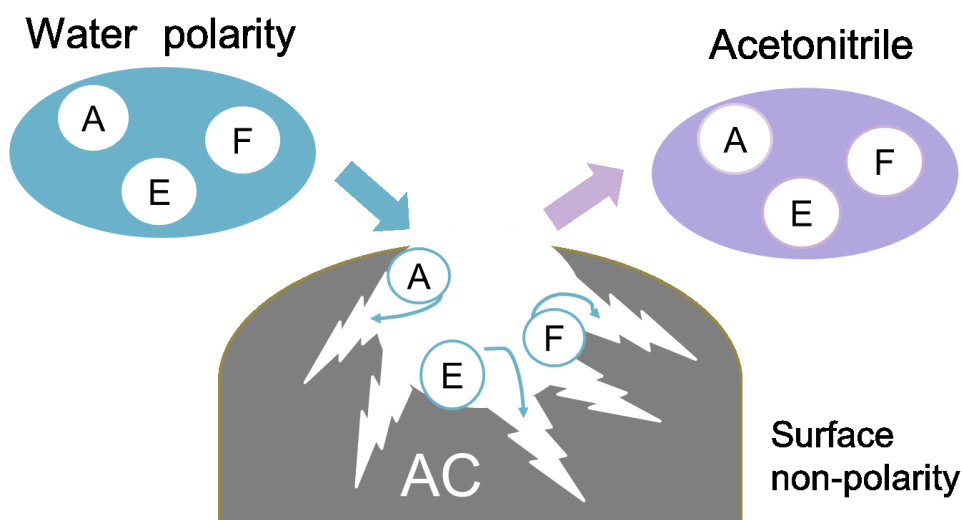


Fig.18 Mechanism of bisphenol adsorption onto AC.

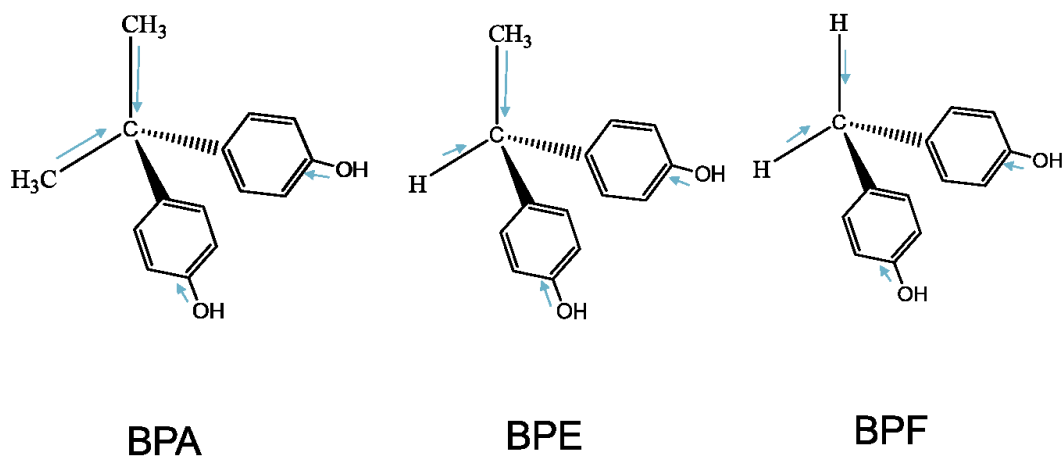


Fig.19 Polarity of bisphenols.

# 第3章

界面活性剤被覆磁性モンモリロナイト  
吸着剤による磁気固相抽出を用いたエ  
チニルエストラジオールの前濃縮

## 3-1 実験

## 3-1-1 使用機器

マグネティックスターラー	HS-360HS	(株)井内盛栄堂
化学天秤	AUT220	(株)島津製作所
マイクロシリンジ	MS-GANO25	ITO Co.
メノウ乳鉢		アズワン(株)
電気炉	Hi Cera Kiln	Nitto Kagaku Co.
ネオジウム磁石		日本磁石工業
遠心分離機	卓上小型遠心機	KUBOTA
超音波洗浄器	SUP-10	SIBATA(株)
窒素濃縮機	PIERCE MODEL 18780	Pierce Chemical Co
高速液体クロマトグラフ	GL-7450 UV	ジーエルサイエンス(株)
XRD 測定装置	Ultima IV	RIGAKU
走査型電子顕微鏡	S-4000	HITACHI
透過型電子顕微鏡	JEM1011	JEOL
FTIR 分光計	Spectrum 100	Perkin Elmer
振動試料型磁力計	VSM-5-15	東映工業株式会社
電子線プローブマイクロアナライザー(EPMA-EDX)	JXA-8530F	JEOL

## 3-1-2 実験試薬

アセトニトリル	$\text{CH}_3\text{CN}$	和光純薬工業(株)
メタノール	$\text{CH}_3\text{OH}$	関東化学(株)
エタノール	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	関東化学(株)
エチニルエストラジオール	$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_2$	ナカライテスク(株)
水酸化ナトリウム	$\text{NaOH}$	ナカライテスク(株)
塩化ナトリウム	$\text{NaCl}$	和光純薬工業(株)
塩化カルシウム	$\text{CaCl}_2$	ナカライテスク(株)
塩化マグネシウム	$\text{MgCl}_2$	和光純薬工業(株)
塩化ニッケル(II)六水和物	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	ナカライテスク(株)
塩化アルミニウム六水和物	$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	ナカライテスク(株)
塩化亜鉛	$\text{ZnCl}_2$	ナカライテスク(株)
塩化セチルピリジニウム	$\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{ClN} \cdot \text{H}_2\text{O}$	東京化成工業(株)
臭化セチルトリメチルアンモニウム	$\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$	和光純薬工業(株)
塩化ベンザルコニウム	$\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{ClN}$	ナカライテスク(株)
モンモリロナイト		ARDRICH
ゼオライト		和光純薬工業(株)
酢酸アンモニウム	$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	和光純薬工業(株)
チタン(IV)テトラブトキシド	$\text{Ti} [\text{OC}_4\text{H}_9]_4$	和光純薬工業(株)
1,1,2,2-テトラクロロエチレン	$\text{CCl}_2:\text{CCl}_2$	ナカライテスク(株)
窒素ガス	$\text{N}_2$	川瀬産業(株)
マグネタイト	$\text{Fe}_3\text{O}_4$	SIGMA-ARDRICH
蒸留水	$\text{H}_2\text{O}$	

### 3-1-3 実験操作

#### 3-1-3-1 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /montmorillonite(MC)の調製方法

$\text{Fe}_3\text{O}_4$ /MC の調製法を以下に示す。0.3 g のマグネタイトナノ粒子と 0.6 g のモンモリロナイトを測り取り、めのうですりつぶし均一化した後、電気炉で 150°C, 1.5 h 焼成することにより得た。この時の昇温速度は 2.4°C/min とした。フローチャートを Fig.20 に示す。

同様に、 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /Zeolite を調製した。

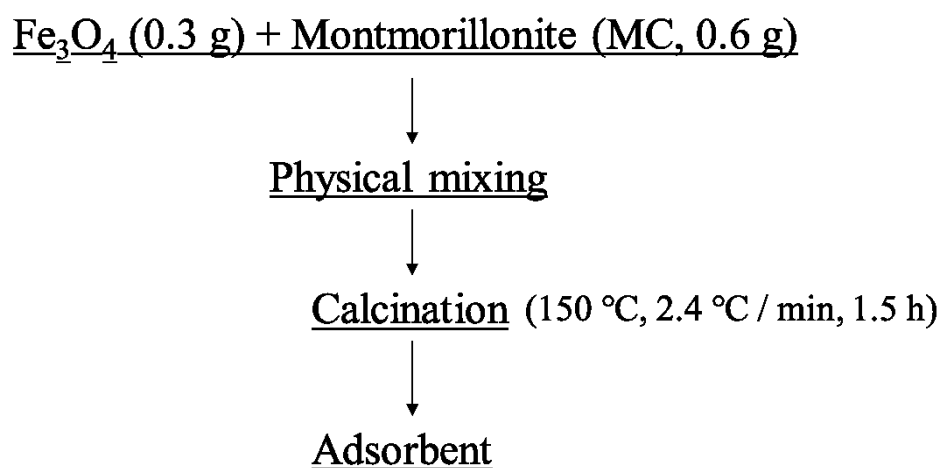


Fig.20 Preparation of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  / Montmorillonite (MC) adsorbent.

$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ も同様の手順で調製した所、 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ に  $\text{TiO}_2$ が担持しなかったため、以下の手順で、調製を行った<sup>10)</sup>。

$\text{Fe}_3\text{O}_4$  (0.5 g)を 50 mLの純水に分散させ、0.05M 酢酸アンモニウム溶液 3 mLと  $\text{Ti}(\text{OBU})_4$  4 mLを、攪拌しながら添加し、3時間攪拌した。固体沈殿物( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$  NPs)を磁石で分離し、洗浄した後、真空乾燥させた。得られた物質を  $350^\circ\text{C}$ で 2時間アニールした。

このとき最終的に得られた物質量は 1.35 g であり、0.85 g の  $\text{TiO}_2$ が被覆されていると考えられる。フローチャートを Fig.21 に示す。

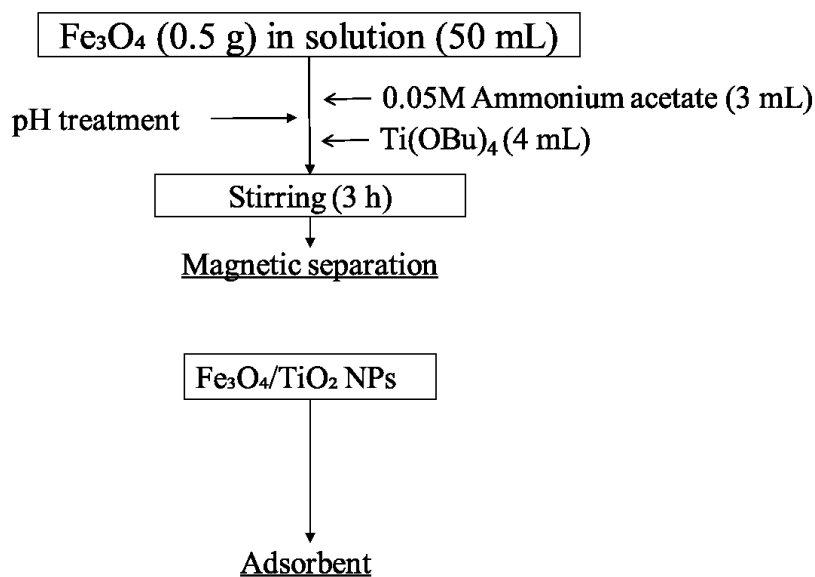


Fig.21 Preparation of  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$  adsorbent.

### 3-1-3-2 前濃縮

エチニルエストラジオール溶液の前濃縮実験により、本研究で調製したナノ磁性吸着剤の吸着能力を評価した。pH 2.0-12.0 に調整した試料溶液(0.1 ppm, 100 mL)に吸着剤 20-50 mg、カチオン界面活性剤 0-20 mg を加え、1-15 分間超音波処理した後、磁石で吸着剤を引き寄せ上澄み溶液を捨てた。

有機溶媒 2 mL を加えシェイカーで 1-10 分間攪拌した後、もう一度磁石で吸着剤を引き寄せ、脱着溶液を採取した。

採取した脱着溶液を高速液体クロマトグラフィーで測定した。フローチャートを Fig.22 に、実験初期条件を Table 5 に示す。



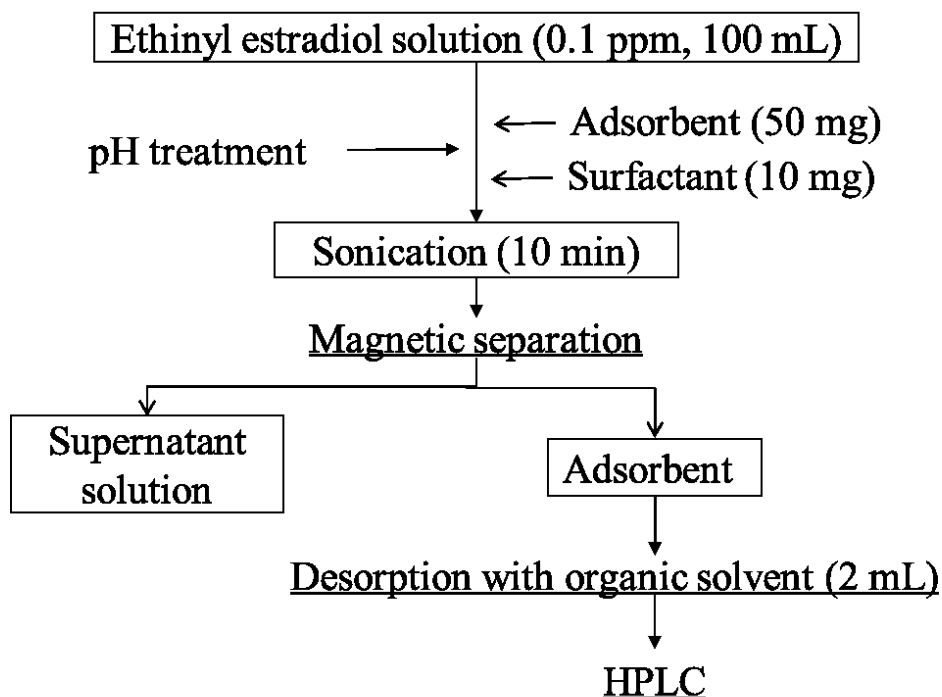


Fig.22 Flowchart of preconcentration procedures.

Table 5. Experimental conditions.

[Preconcentration]	
Sample	Ethinyl estradiol (0.1 ppm, 100 mL)
Adsorbent	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> / MC (50 mg)
Surfactant	Cetyl pyridinium chloride (CPC, 10 mg)
Desorption	Methanol (2 mL)
Analysis	High performance liquid chromatography
[HPLC analysis]	
Column	TOSOH (TSK-GEL) ODS-100V 5 μm
Eluent	Acetonitrile / water = 6 / 4
Flow rate	1.0 mL/min
Detection	276 nm
Detector	UV/Vis spectroscopic detector

### 3-1-3-3 液液抽出

液液抽出により脱着溶媒から更なる濃縮倍率の向上を試みた。以下に手順を示す。

まず、得られた濃縮液(Acetonitrile, 2 mL)に水(8 mL)と抽出溶媒(50, 500  $\mu$ L)を加え、5分間ハンドシェイクした。次に、遠心分離により、2層(水層+有機層)に分離した後、有機層を抽出し、蒸発させた。得られた吸着物にアセトニトリルを 500  $\mu$ L 注ぎ、溶解させ、HPLC で定量した<sup>11,12)</sup>。

### 3-1-3-4 N<sub>2</sub>気流濃縮

得られた濃縮液(Acetonitrile, 1 mL)から 500  $\mu$ L 分取し、穏やかな N<sub>2</sub>気流下で蒸発させた。残留分にアセトニトリル 200  $\mu$ L を注ぎ、エチニルエストラジオールを溶解し、HPLC で定量した。

## 3-2 結果と考察

### 3-2-1 最適吸着剤の決定及び評価

#### 3-2-1-1 吸着剤の種類による影響

超音波処理による吸着後、デカントした上澄み溶液の濃度を測定し、吸着剤の種類による吸着能力の影響を調査した。試料濃度 1.0 ppm, pH=11.0 の実験条件で行い、実験結果を Fig.23 に示す。

マグネタイト単体を用いた時、吸着後デカントされた上澄みからエチニルエストラジオールが約 0.5 ppm 検出されたことから、試料の吸着が完全に行われていないことが確認された。これは静電相互作用が弱く、マグネタイトにカチオン界面活性剤が十分に引き寄せられなかったと考えられる。そこで、いくつかの磁性複合体を調査したところ、 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MC}$  を用いたとき、上澄みから試料がほとんど検出されず、完全な吸着が行われたことが確認された<sup>13)</sup>。

したがって、最適な吸着剤として、 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MC}$  を使用した。

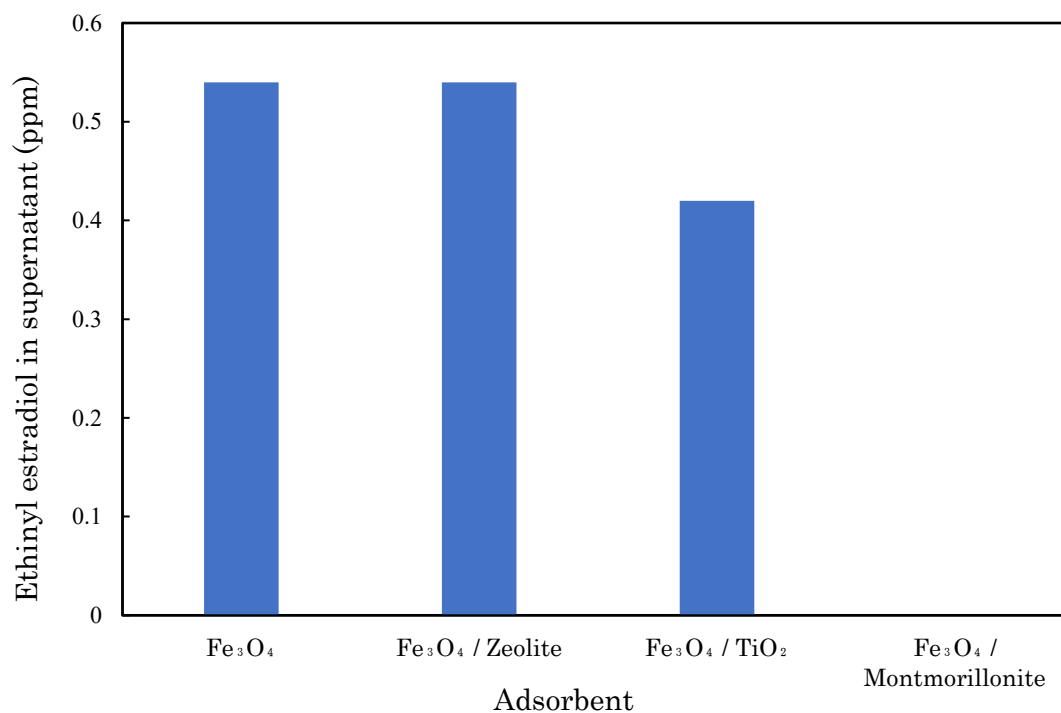


Fig.23 Effect of adsorbent type on the preconcentration of ethinyl estradiol.

### 3-2-1-2 XRD 測定

$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MC}$  試料を X 線回折法により測定した。Cu-K $\alpha$  線を用い、管電圧 40 kV、管電流 40 mA とした。Fig.24 に  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MC}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , Montmorillonite 試料の XRD 回折パターンを示す。

Fig.24 より  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MC}$  の回折パターンは、 $\text{Fe}_3\text{O}_4$  の(220), (311), (400), (440)の特長的なピークが検出され、同様に、Montmorillonite の(100), (103)のピークが検出された。このことより先述した調製法で  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MC}$  が生成できたことが確認された。

(311)面における結晶子サイズは  $2\theta=35.5^\circ$  で 61.4 nm、層間距離は 25.3 nm であった。

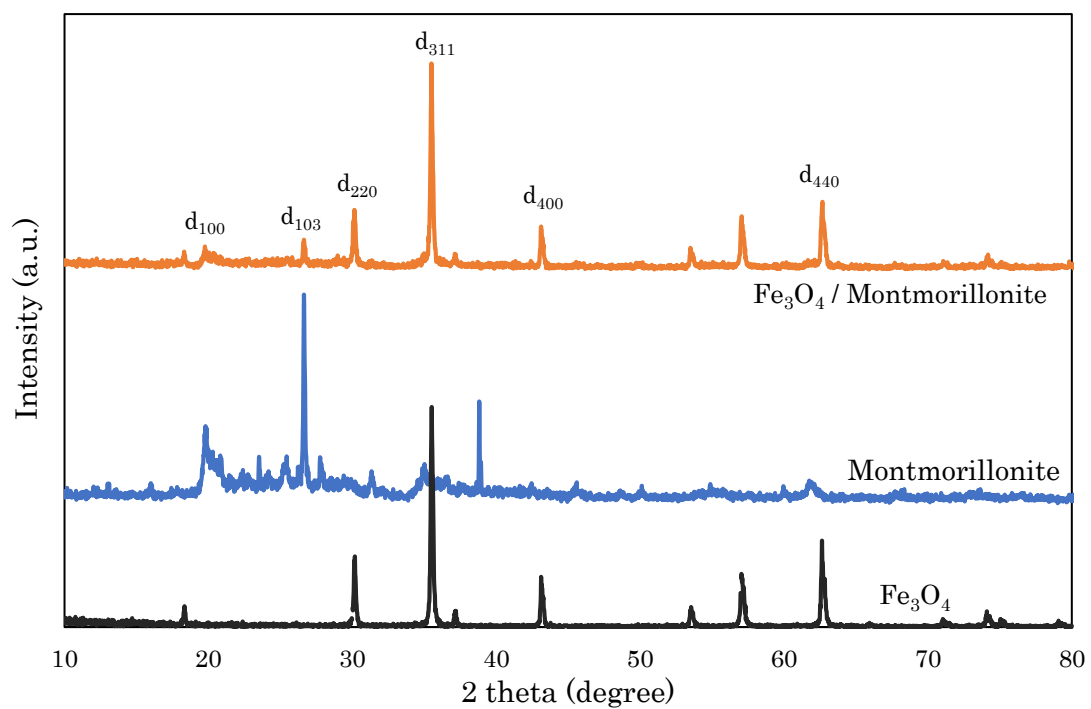


Fig.24 XRD patterns of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , MC and  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MC}$ .

### 3-2-1-3 SEM, TEM 測定

$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MC}$  試料の微細構造を確認する為に、SEM, TEM 画像から観察を行った。

Fig.25 からモンモリロナイトが薄い層状構造となり、そこにマグネタイトが付着していることが光のコントラストより観察できた。また、Fig.25(c)よりマグネタイトナノ粒子は50~70 nm であることが分かる。これはXRD 測定による結晶子サイズとほぼ同様の値であった。

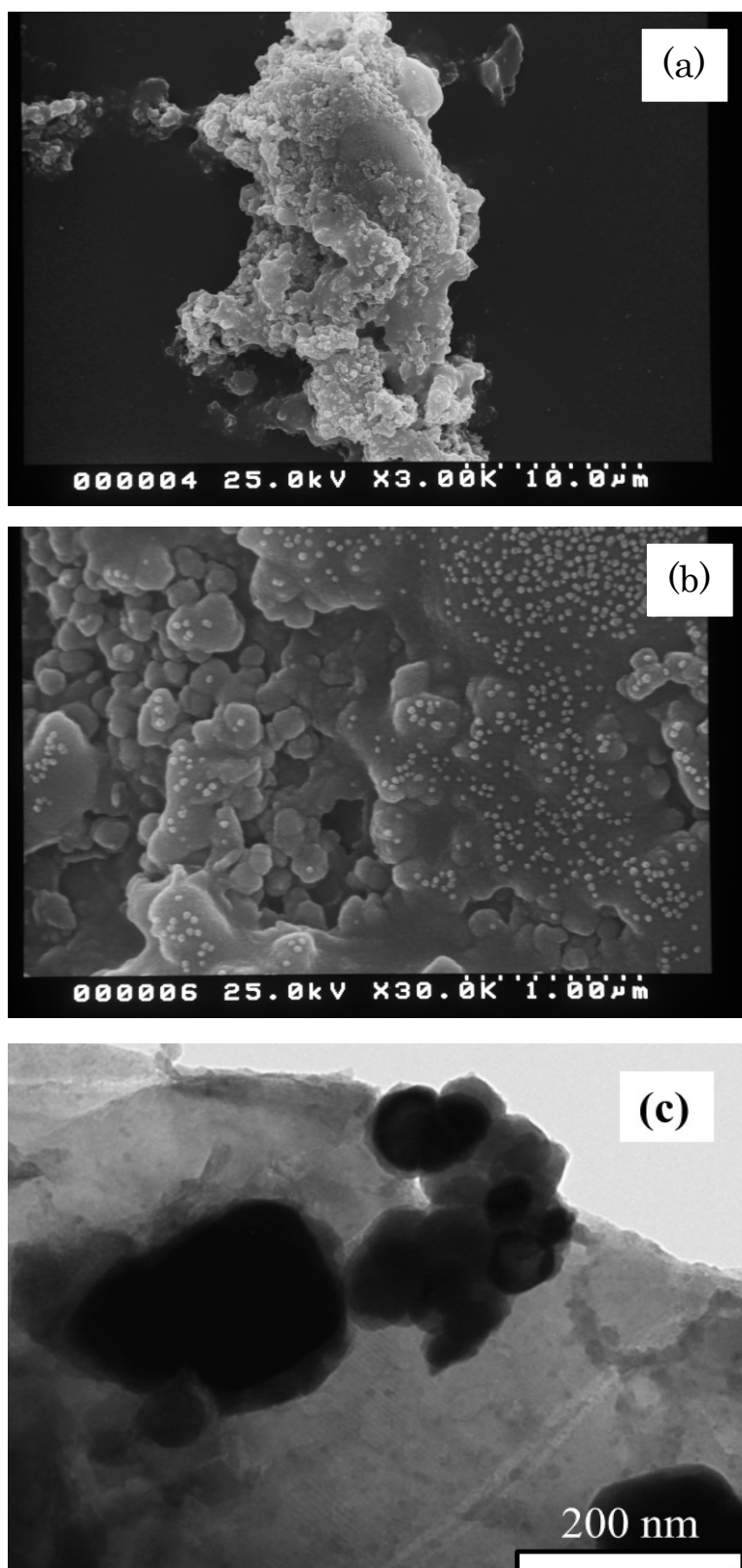


Fig.25 SEM (a,b) and TEM (c) images of  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MC}$ .

### 3-2-1-4 EDX 分析

EDX 分析により MC, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/MC 中に存在する元素を確認した。

Table 6 から Fe の存在量が増加したことが確認された。Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> : MC = 2 : 1 で混合しているため、Si, Al を含む MC 由来の元素の存在比が低くなることは、正しい結果だと言える。

Table 6. Elemental ratio of MC (left) and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> / MC (right).

Element	Mass (%)	Atom (%)	Element	Mass (%)	Atom (%)
Si	11	16.4	Si	6.3	8.8
Al	4.7	7.3	Al	2.1	3
O	27.8	72.5	O	22.8	55.6
Ca	0.9	0.9	Ca	0.4	0.4
Fe	1.7	1.2	Fe	44.8	31.3
Na	0.1	0.2	Na	0.04	0.1
Mg	0.8	1.4	Mg	0.5	0.8
Total	47	100	Total	76.9	100

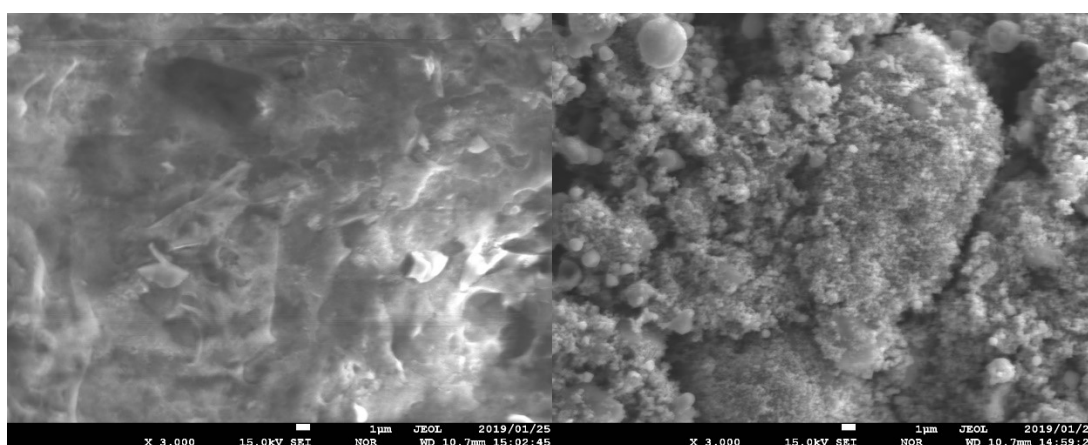


Fig.26 SEM images of MC (left) and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/MC (right).

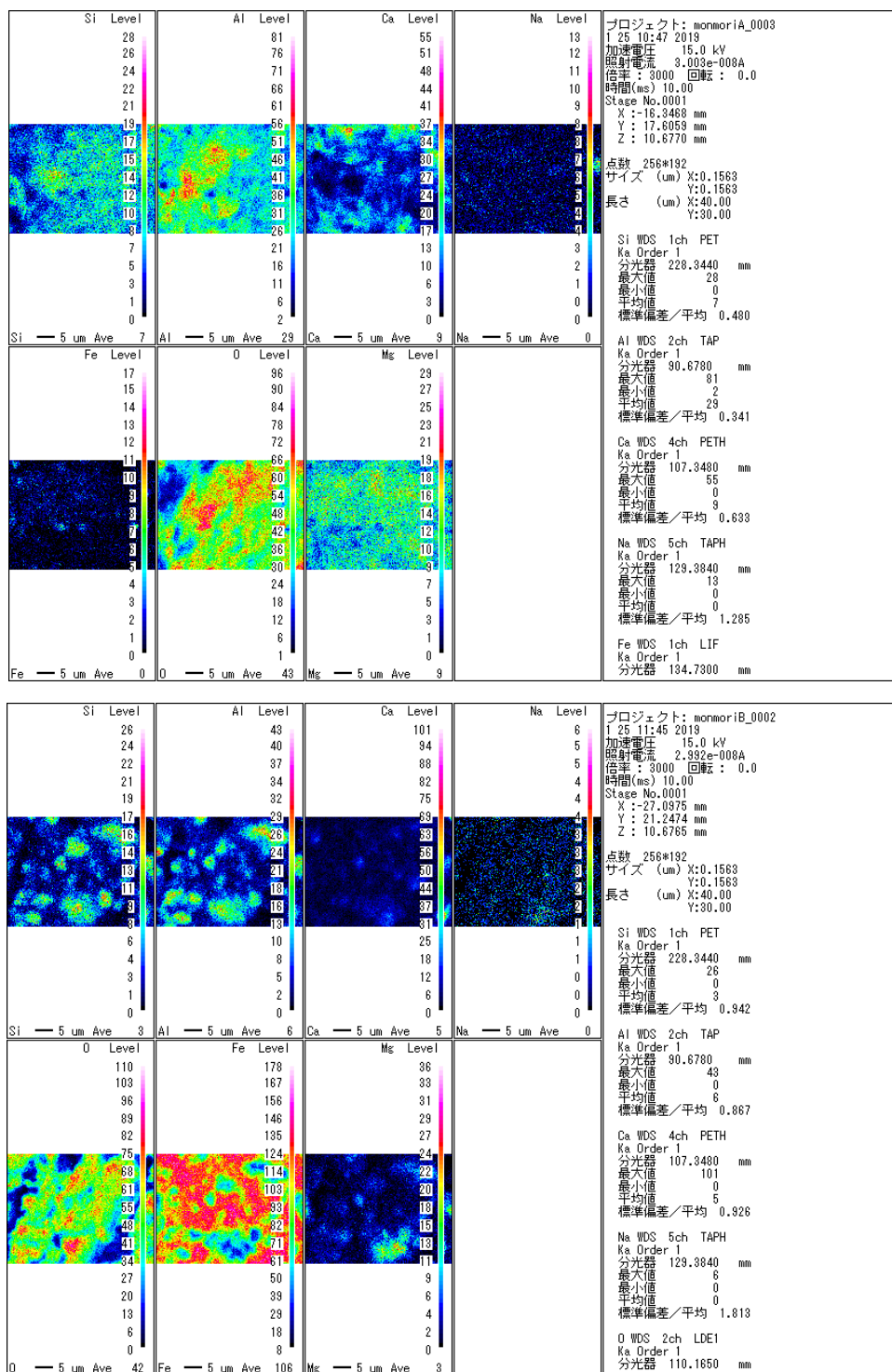


Fig.27 Elemental concentration mapping.



### 3-2-1-5 FTIR

試料の構造分析をフーリエ変換赤外分光法(FT-IR)によって行った。Fig.28に FT-IR スペクトルを示す。

- $3431\text{ cm}^{-1}$  : OH 伸縮振動
- $1633\text{ cm}^{-1}$  : Fe-O 振動
- $536\text{ cm}^{-1}$  : Fe-O 伸縮振動
- $1638\text{ cm}^{-1}$  : H-O-H 変角振動
- $3629\text{ cm}^{-1}$  : AlOH と SiOH 基の OH 伸縮振動
- $1000\text{ cm}^{-1}$  : Si-O の平面外と面内の伸縮振動

$\text{Fe}_3\text{O}_4$ , Montmorillonite それぞれの特有のピークがほぼ同じ位置にあるため、FT-IR からは  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MC}$  の生成を確認することはできなかった。

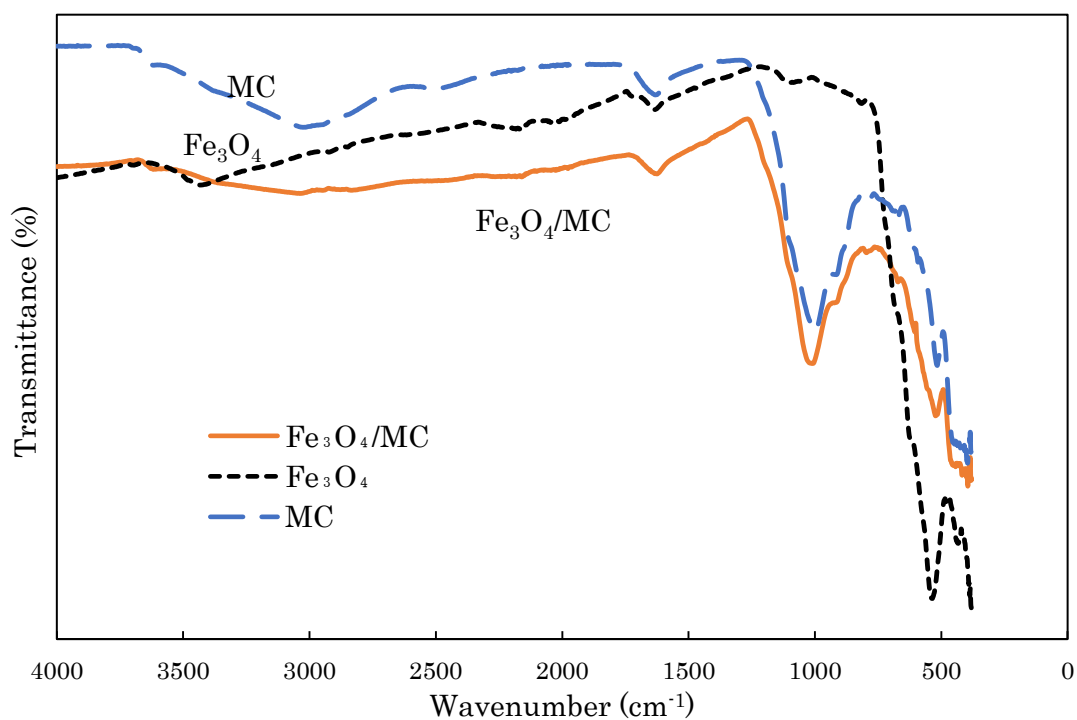


Fig.28 FT-IR spectra of MC,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , and  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MC}$ .

### 3-2-1-6 BET 測定

Brunauer–Emmett–Teller 法 (BET 法)から試料の比表面積を測定した。Fig.29 に本研究で調製した試料の  $N_2$  吸脱着等温線、Fig.30 に細孔サイズ分布(PSD)曲線をそれぞれ示し、Table 7 に比表面積、平均細孔直径、全細孔容積をまとめた。Fig.29 から全ての試料が典型的な IV 等温線であり、メソ細孔の存在を示した。 $Fe_3O_4/MC$  試料の比表面積は  $5.04 \text{ m}^2/\text{g}$ 、平均細孔直径は  $30.89 \text{ nm}$  であり、予想される比表面積よりはるかに低い値となった。

原因として、今回、 $N_2$  ガスを用いて吸脱着測定を行ったが、MC は先述した通り、薄い層状構造であり、 $N_2$  ガスが層間侵入されないため、正確な比表面積を測定できなかったとされる。

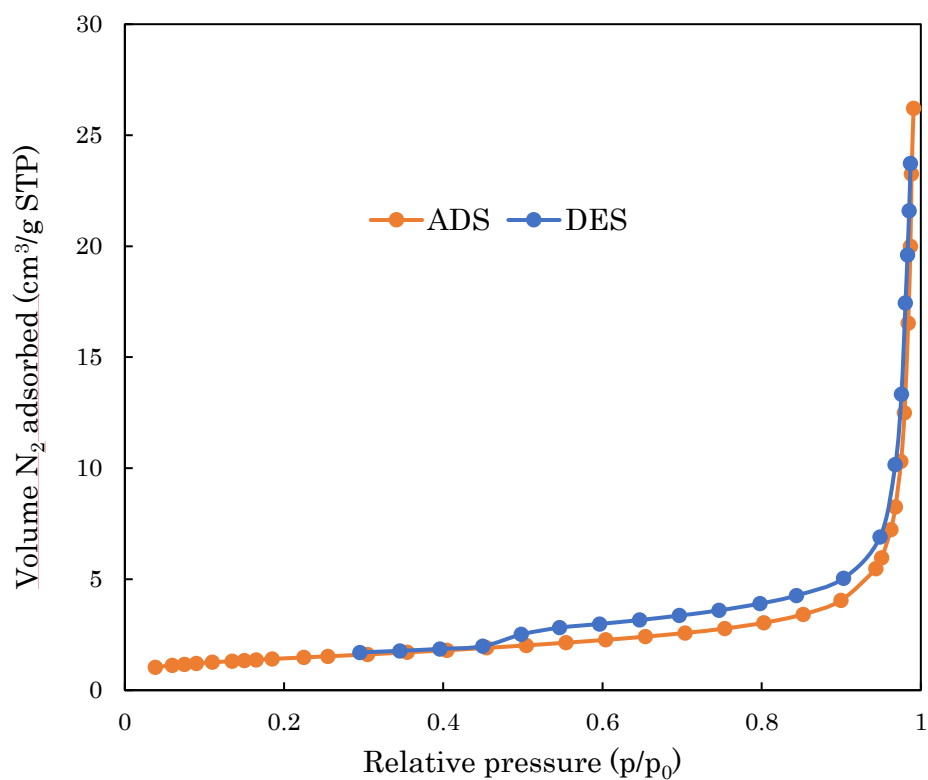


Fig.29 Nitrogen adsorption-desorption isotherms of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/MC.

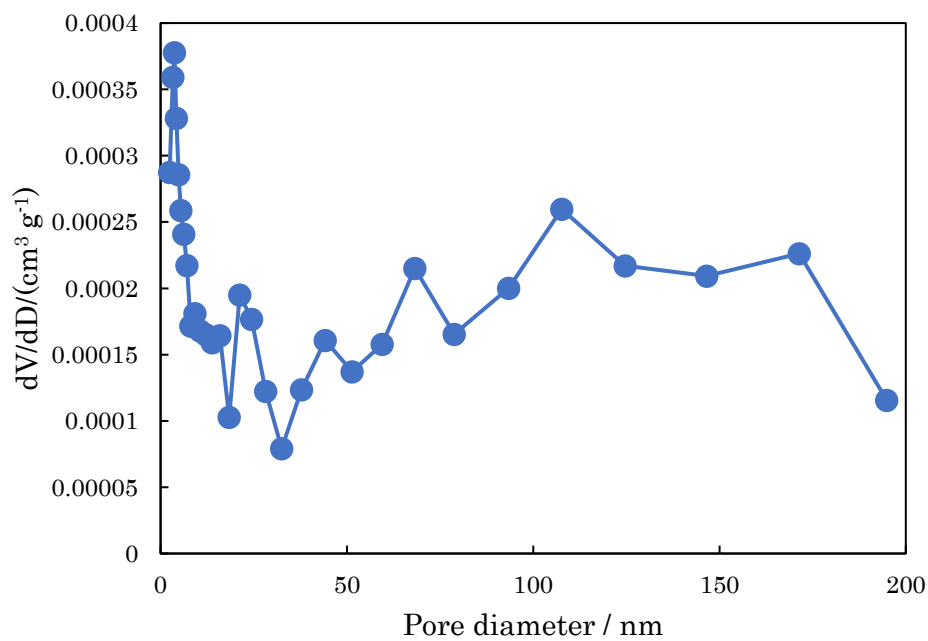


Fig.30 The corresponding pore size distribution curves of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/MC.

Table 7. Surface area and porosity of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/MC.

$V_m$ [cm <sup>3</sup> (STP) g <sup>-1</sup> ]	1.16
$a_{s,BET}$ [m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> ]	5.04
$V_p$ ( $p/p_0=0.990$ ) [cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> ]	0.039
$d_p$ [nm]	30.9

$V_m$ : monomolecular layer adsorption volume

$a_{s,BET}$ : BET specific surface area

$V_p$ : total pore volume

$d_p$ : average pore diameter

### 3-2-1-7 磁気特性評価

室温で VSM を用いて  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  および  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MC}$  の磁化曲線を測定した。結果を Fig.31 に示す。 $\text{Fe}_3\text{O}_4$  と  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MC}$  の最大飽和磁化値は、 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ :  $86.85 \text{ emu g}^{-1}$  と  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MC}$ :  $27.45 \text{ emu g}^{-1}$  であり、残留磁化は  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ :  $9.96 \text{ emu g}^{-1}$  と  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MC}$ :  $3.68 \text{ emu g}^{-1}$  と保磁力は  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ :  $136.8 \text{ Oe}$  と  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MC}$ :  $125.3 \text{ Oe}$  であり、両方が超常磁性であることを示している。

$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MC}$  の、飽和磁化の減少は、MC への  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  の担持によるものである。

しかし、この磁化は既に磁気分離のために十分である。

Table 8 において、 $H_c$  は保持力で、 $M_s$  は飽和磁化で、 $M_r$  は残留磁化である。

Stoner-Wohlfarth Model ( $M_r / M_s = 0.5$ ) によれば、残留磁化率 ( $M_r / M_s$ ) の増加は、凝集物内の不均一な磁気状態に起因している。したがって、試料中に形成されたマイクロ領域を有する  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  は、各試料の残留率がすべて 0.5 未満であるため、MC マトリックス中に相対的に普遍的に分散することができることが示唆される。

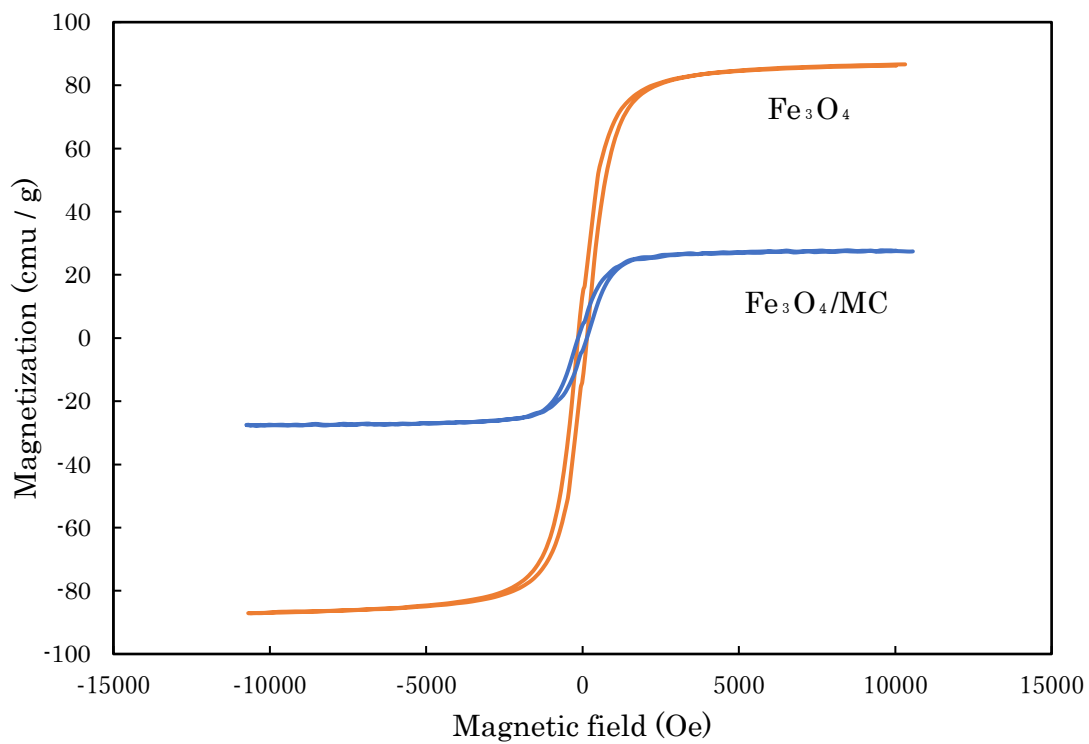


Fig.31 Magnetic hysteresis curves of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  and  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MC}$ .

Table 8.  $H_c$ ,  $M_s$ , and  $M_r$  for indicated samples.

Sample	$H_c$ (Oe)	$M_s$ ( $\text{emu g}^{-1}$ )	$M_r$ ( $\text{emu g}^{-1}$ )	$M_r/M_s$
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	136.8	86.85	9.96	0.11
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MC}$	125.3	27.45	3.68	0.13

### 3-2-2 最適条件の検討

#### 3-2-2-1 試料溶液の初期 pH

0.1 ppm のエチニルエストラジオールを含む試料溶液の初期 pH を、2~12 の範囲で調製することにより、pH が濃縮に及ぼす影響を調査し、最適 pH を決定した。結果を Fig.32 に示す。

グラフから、pH2-4 にかけて大きく上昇し、pH4 以降はゆるやかになり pH11 付近で最大収率が得られた。このことから、モンモリロナイトの等電点は pH2 付近であると考えられ、より小さい pH では吸着剤の表面に負電荷を有さなくなるためこのような結果になったと考えられる。

また、pH8.0-11.0 の範囲で上昇が見られたのは、マグネタイトの存在による影響だと考えられる。マグネタイトの等電点は pH6.5 付近であり、より大きな pH ではマグネタイトも負電荷を有することになるので、吸着能力が向上したとされる。よって本法では最適 pH を 11.0 とした<sup>14)</sup>。

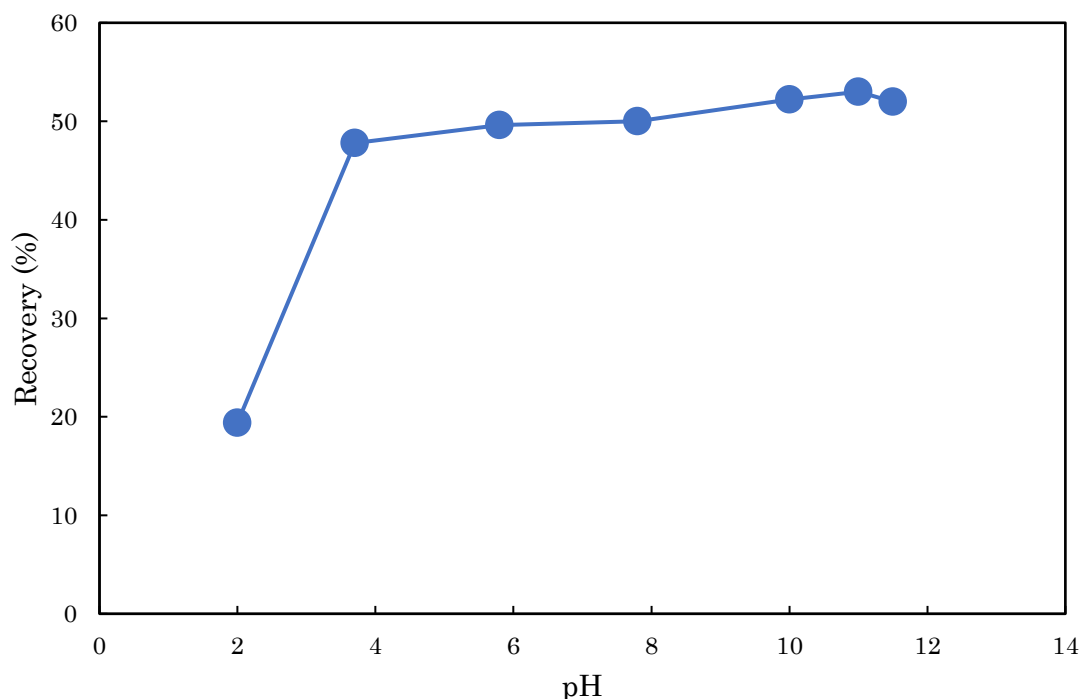


Fig.32 Effect of pH on the preconcentration of ethinyl estradiol onto  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MC}$ .

### 3-2-2-2 界面活性剤の添加量

塩化セチルピリジニウム(CPC)の添加量を変え、回収率に対する界面活性剤量の影響を調査した。

グラフより、界面活性剤なしでは吸着が行われず、10 mg のとき最大収率が得られ、過剰量では減少した。これにより界面活性剤の非存在下では、 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MC}$  は水溶液からエチニルエストラジオールを全く吸着しないことが分かる。これは、エチニルエストラジオールに対する吸着能力が低い  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MC}$  表面の親水性のためであり、疎水性相互作用による物理吸着が行われなかったことを示す。CPC 量を増加させることで、混合ヘミミセルが形成され、エチニルエストラジオールが疎水性相互作用を介して界面活性剤に吸着される。また、界面活性剤は静電相互作用を介して、 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MC}$  に吸着される。

過剰量の界面活性剤は、イオン性会合体(10 個以下の界面活性剤イオンからなるイオンミセル)を形成するため、吸着剤に引き寄せられない。そのため溶液中へのエチニルエストラジオールの再分配を引き起こし、上澄みに残ってしまうため、回収率が減少したと考えられる<sup>15)</sup>。

したがって、本研究では、最適な界面活性剤量を 10 mg とした。

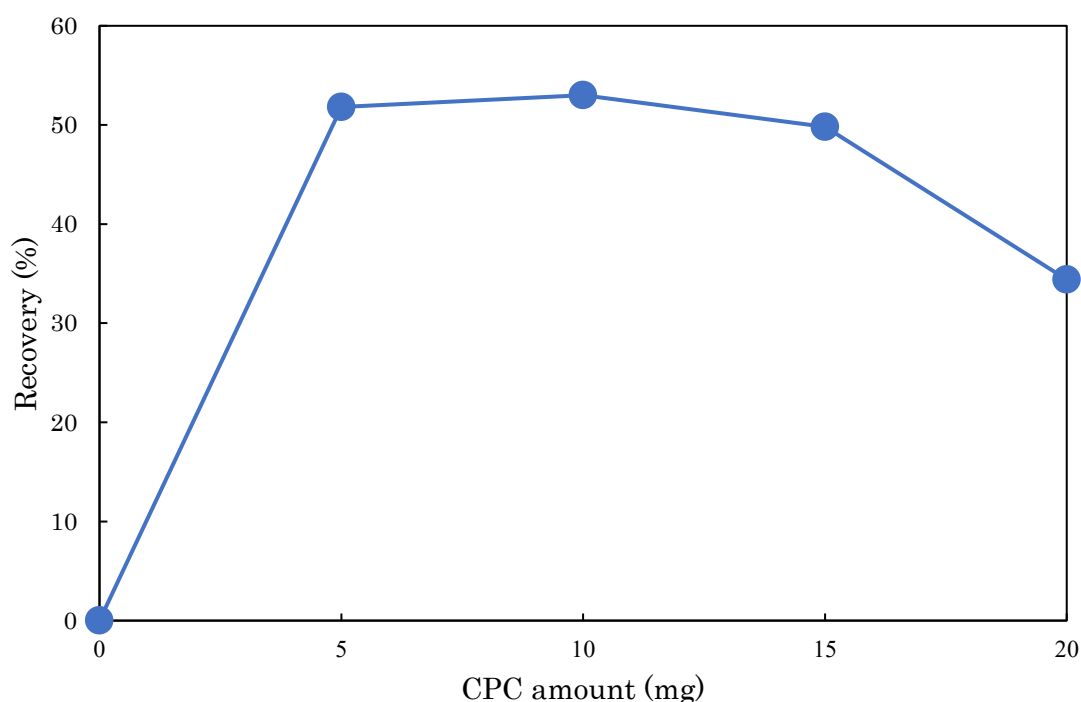


Fig.33 Effect of CPC amount on the preconcentration of ethinyl estradiol onto  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MC}$ .



### 3-2-2-3 吸着・脱着時間による影響

回収率に対する吸着時間及び脱着時間の影響を調査した。結果を Fig.34 に示す。

Fig.34(a)から吸着時間とともに回収率が増加していき、10分以降は一定になった。これより最適吸着時間を10分とした。同様に Fig.34(b)から脱着時間とともに回収率が増加し、5分以降で一定になったので、最適脱着時間を5分とし、これ以降の実験で適用した。

この結果は吸着が初期段階で迅速に達成されたことを示しており、これは主に水溶液中の吸着剤の容易な分散性のためであると考えられる。

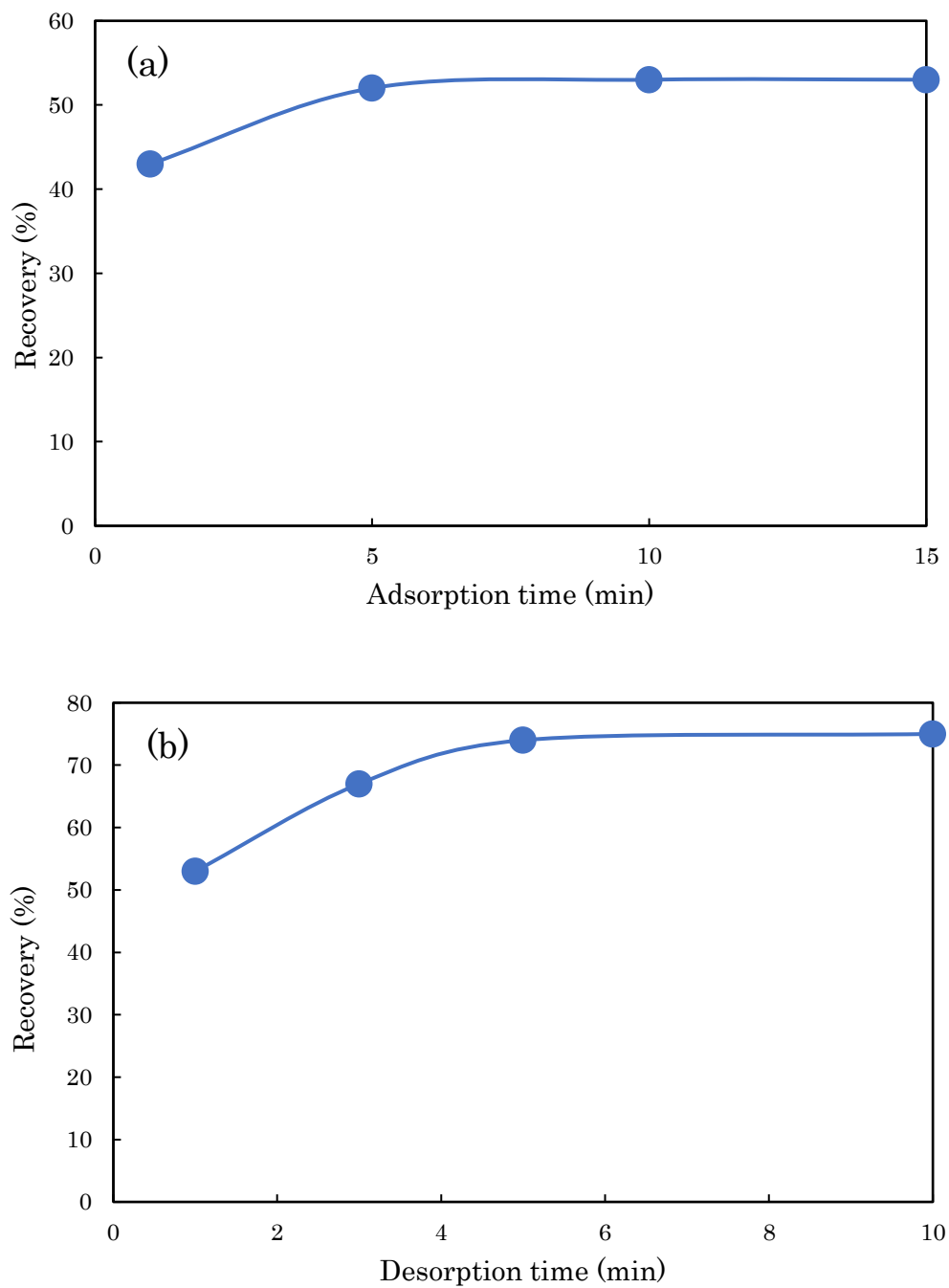


Fig.34 Effect of adsorption (a) and desorption (b) time on the preconcentration of ethinyl estradiol onto  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MC}$ .

### 3-2-2-4 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/MC の添加量

回収率に対する吸着剤量の影響を調査した。結果を Fig.35 に示す。

グラフから、吸着剤量を 30 mg まで増加した時、回収率は増加し、それ以上はほとんど変化しなかった。また、過剰量の添加は、脱着時における吸着剤の分散度が悪くなることが予想される。

以上の結果から、最適吸着剤量を 30 mg とした。

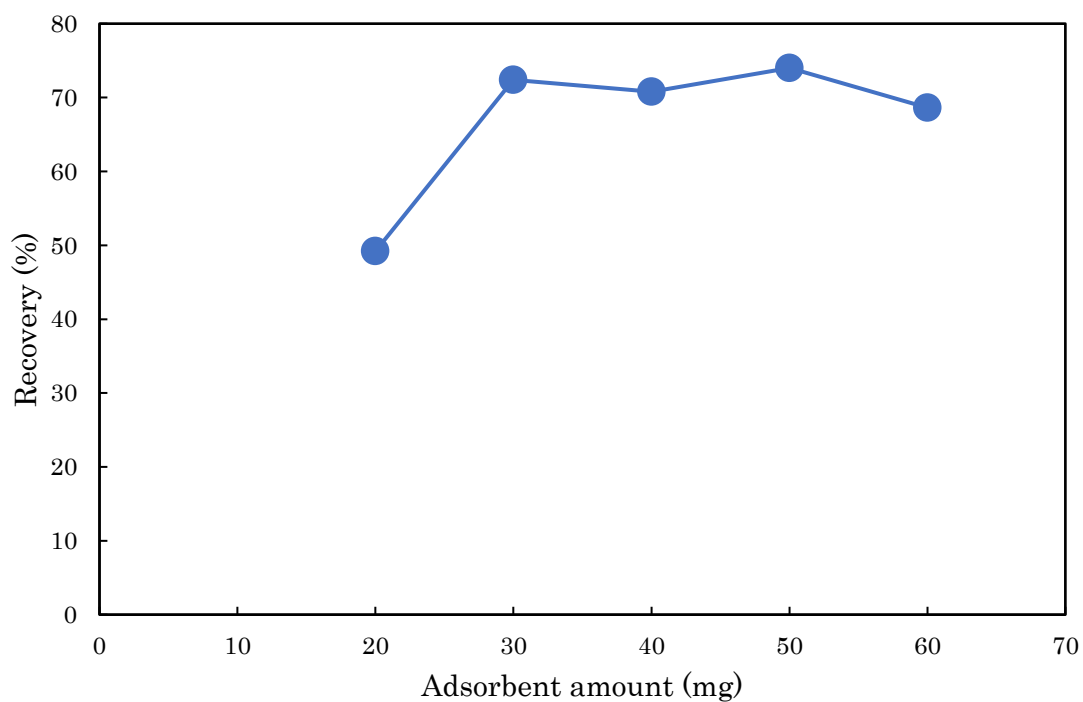


Fig.35 Effect of adsorbent amount on the preconcentration of ethinyl estradiol onto Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/MC.

### 3-2-2-5 界面活性剤の種類

塩化セチルピリジニウム(CPC)、臭化セチルトリメチルアンモニウム(CTAB)、塩化ベンザルコニウム(BC)の 3 種を比較することで、回収率に対する界面活性剤の種類による影響を調査した。結果を Fig.36 に示す。

グラフより塩化ベンザルコニウムを用いた時、最も高い回収率が得られ、順に、臭化セチルトリメチルアンモニウム、塩化セチルピリジニウムであった。よって最適な界面活性剤を塩化ベンザルコニウムとし、これ以降の実験で使用した。

界面活性剤の構造式を Fig.37 に示す。

この結果から以下のように考えられる。

界面活性剤の濃度増加につれて吸着剤表面が飽和し、飽和した後は、水中内部へと分布するようになる。塩化ベンザルコニウムは他の 2 種と比較して、臨界ミセル濃度が高く(CPC:0.9 mM, CTAB:0.92 mM, BC:2.8 mM 以上)、イオン反発によりミセルを形成しにくい。そのため、水中内部へと分布する割合が低かったと考えられる<sup>16)</sup>。

また、MC の層間陽イオンは、他の有機陽イオンとイオン交換ができ、これを有機モンモリロナイトと呼ぶ。次式により陽イオン交換容量(CEC)が算出される。

$$f = \frac{m_{cation}}{CEC \times m_{clay} \times MM_{cation} \times X}$$

CEC : MC の陽イオン交換容量(meq/100 g), f : カチオン界面活性剤が満たす CEC の割合  
 $m_{cation}$  : 界面活性剤の質量(g),  $m_{clay}$  : MC(g),  $MM_{cation}$  : カチオン界面活性剤の分子量(g/mol)  
 X : 1 当量当たりのモル数(mol/q)

MC 中の陽イオンの 100%を CPC 分子と交換する( $f=1.0$ )として、モンモリロナイトの CEC(80~150 meq/100 g)を 100 meq/100 g と仮定すると、 $m_{cation}$  は CPC: 6.08 mg, CTAB: 5.69 mg, BC: 4.96 mg と求められる。最適界面活性剤量として 10 mg を用いていることから、それぞれの値(mg)は MC のイオン交換が行われ、残りの界面活性剤は MC の表面上にヘミミセルとして静電相互作用により、引き寄せられると推測される。

分子量が大きい有機陽イオンは、交換吸着が行われやすい。本法で用いた界面活性剤では CPC>CTAB>BC の順に強く吸着される。吸着力が強いほど、脱着しにくいため、回収率は BC>CTAB>CPC の順に良い結果が得られたと考えられる。

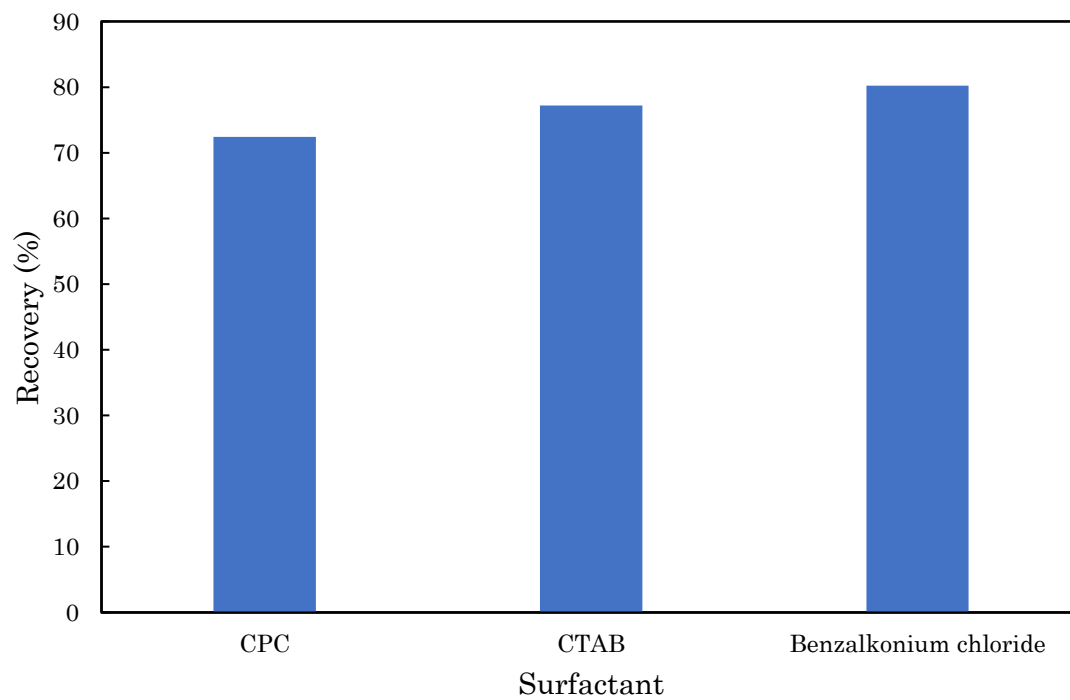


Fig.36 Effect of type of surfactant on the preconcentration of ethinyl estradiol onto  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MC}$ .

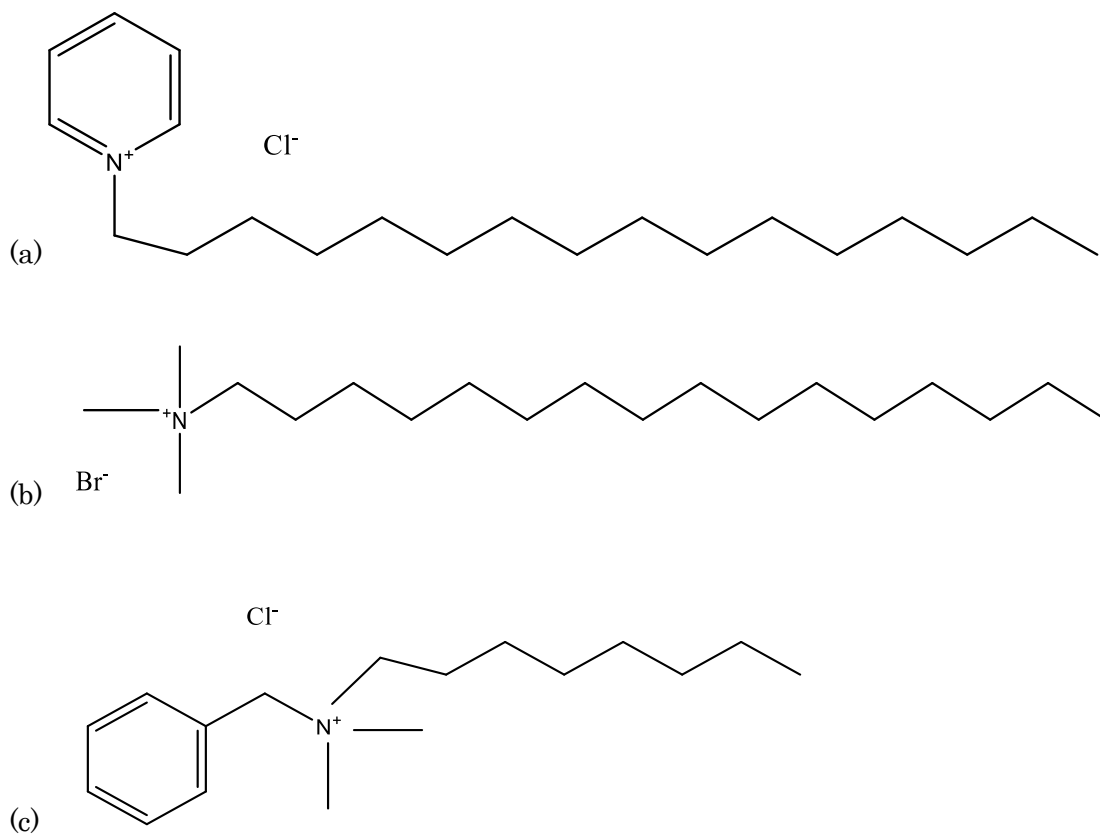


Fig.37 Structure of Cetyl pyridinium chloride (a), Cetyltrimethylammonium bromide (b) and Benzalkonium chloride (c).

### 3-2-2-6 脱着剤の種類

有機溶媒は混合ヘミミセルを破壊することが知られており、吸着剤から分析対象物を溶出するためにも使用されている。

メタノール、エタノール、アセトニトリルの脱着能力を調査するため、2 mL の各溶媒を用いて脱着を行い、比較することで、回収率に対する脱着剤の種類による影響を調査した。結果を Fig.38 に示す。

グラフよりアセトニトリルを用いた時、最大回収率を得ることができた。よって、最適脱着剤をアセトニトリルとし、これ以降の実験で使用した。

エチニルエストラジオールの有機溶媒に対する溶けやすさは、極性の大きさに影響される。溶媒の極性に関する指標  $\delta$  を Table 9 に示す。回収率がアセトニトリル > メタノール > エタノールであったことから、極性パラメータが 5.8 付近であるほど溶出しやすく、高い回収率が得られたのだと考えられる。

Table 9. Indicator on solvent polarity.

溶媒	化学式	$\delta$	P'
Ethanol	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	11.2	4.3
Methanol	CH <sub>3</sub> OH	12.9	5.1
Acetonitrile	CH <sub>3</sub> CN	11.8	5.8

$\delta$ : 溶解度パラメータ

P': Rohrschneider の極性パラメータ

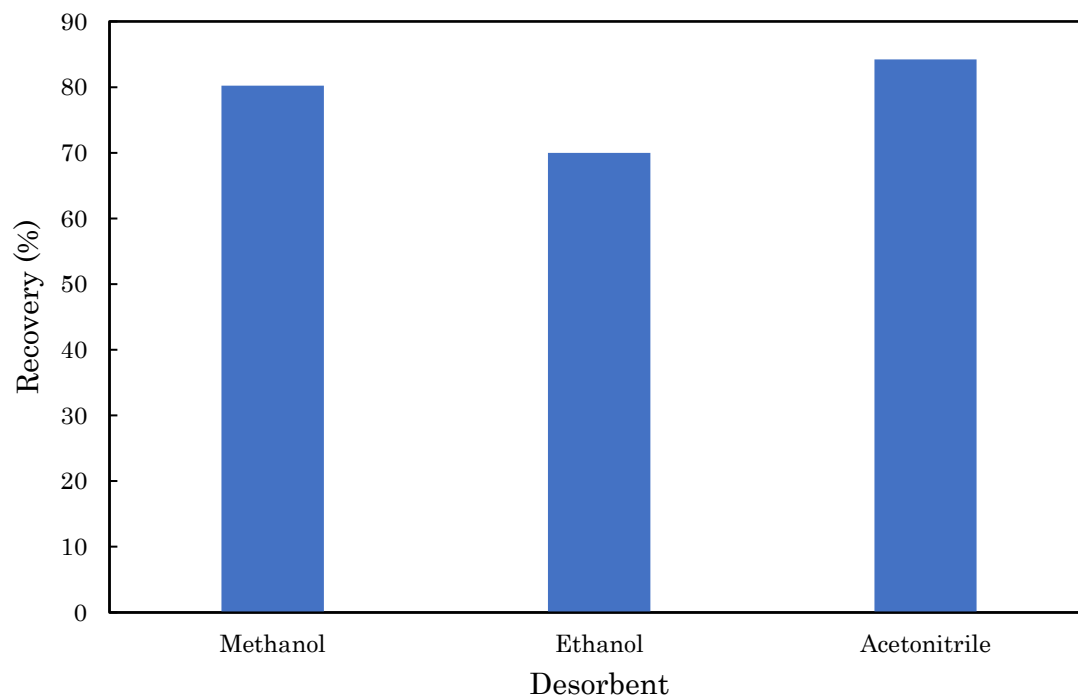


Fig.38 Effect of type of desorbent on the preconcentration of ethinyl estradiol onto  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MC}$ .



### 3-2-2-7 試料容量

試料容量の変化により濃縮倍率及び回収率にどのような影響を与えるか、調査した。

Fig.39 から、試料容量を 200 mL に増やした時、濃縮倍率はほぼ変化せず、回収率は約半分に減少した。そこで、界面活性剤を 20 mg に増やし、界面活性剤濃度を 100 mg/L にして比較した所、濃縮倍率は 73.6 倍、回収率は 73.6% であった。このことから、試料容量を大きくしたとき、界面活性剤濃度を 100 mg/L にすることで、濃縮倍率の向上が期待される。また、回収率が少し減少した原因として、1) 吸着剤が全体に拡散しなかったこと、2) 吸着剤の磁気分離が不十分で、吸着剤の一部が上澄みと共にデカントされてしまったこと、の 2 点が挙げられる。

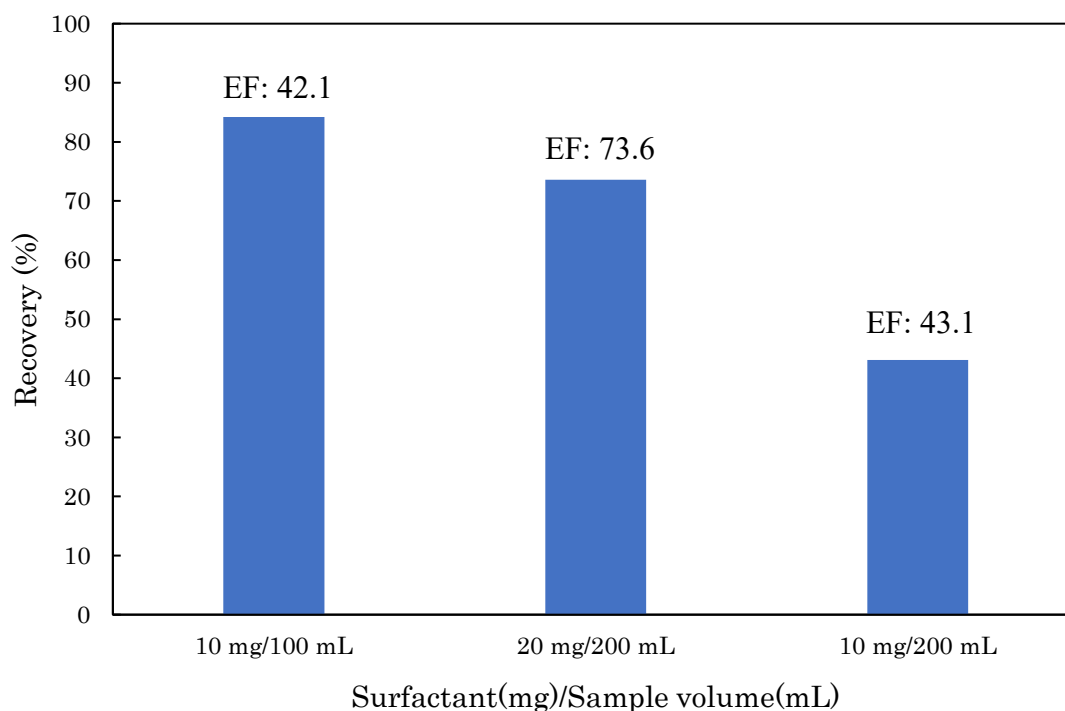


Fig.39 Effect of sample volume on the preconcentration of ethinyl estradiol onto  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MC}$ .

### 3-2-2-8 イオン強度

試料溶液中に 0～3%の NaCl を添加することで、イオン強度による回収率の影響を調査した。結果を Fig.40 に示す。

塩を添加するとやや減少が見られたものの、1～3%ではほぼ一定の値が得られた。塩を添加したものは、有機溶媒による脱着の際に、吸着剤に凝集が見られた。このことから粒子凝集による分散度の低下が原因の一つとして挙げられる。今後の実験では塩を添加せずに実験を行った。

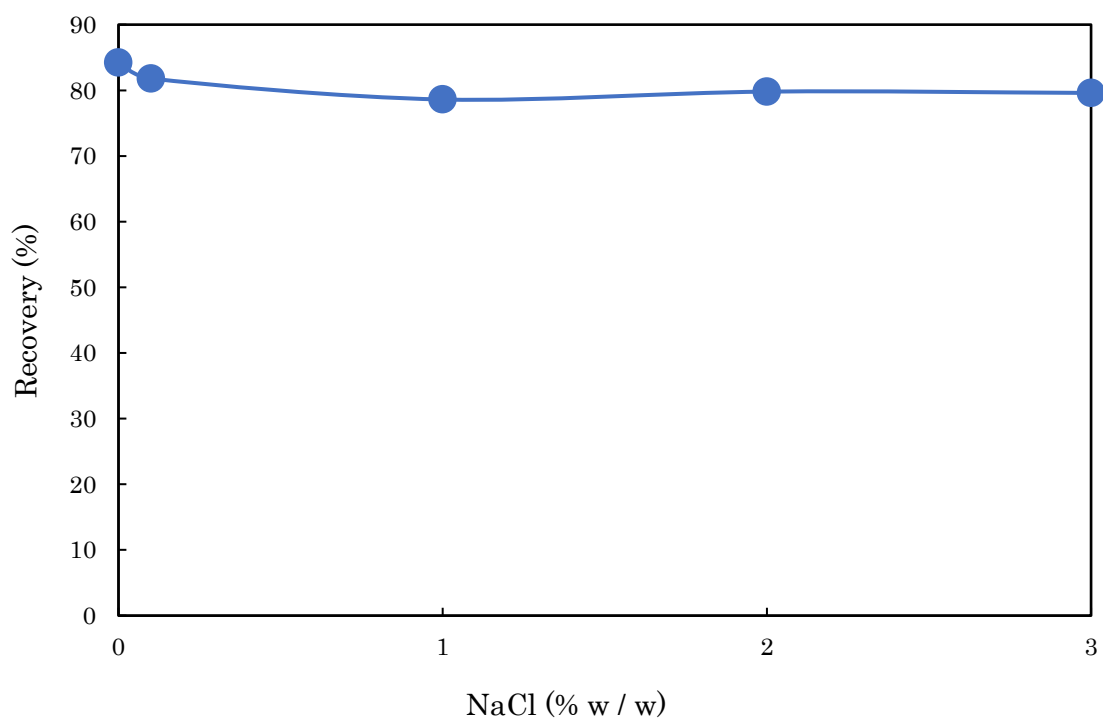


Fig.40 Effect of ionic strength on the preconcentration of ethinyl estradiol onto  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MC}$ .

### 3-2-2-9 干渉元素

様々な無機イオンと有機物質は、エチニルエストラジオールに対する吸着の影響があり、工業排水に含まれるので、エチニルエストラジオールの吸着に対する、共存イオンや天然有機物の影響を調査する必要がある。

最適条件下で、吸着剤上のエストラジオールの吸着に対する一般的な共存イオンの影響を調査した。結果を Fig.41 に示す。このグラフでは、0.1 ppm のエチニルエストラジオール試料を、干渉元素を添加して濃縮したものと、干渉元素を添加せずに濃縮したものの比を表している。

若干減少が見られたものの、各干渉元素は、前濃縮時の吸着能力と、その後の定量にあまり影響を及ぼさないことが分かった。

Table 10. Effect of matrix substances on enrichment factor.

Matrix	Concn. (ppm)
Ca <sup>2+</sup>	500
Mg <sup>2+</sup>	500
Ni <sup>2+</sup>	500
Al <sup>3+</sup>	500
Zn <sup>2+</sup>	500
MeOH	500

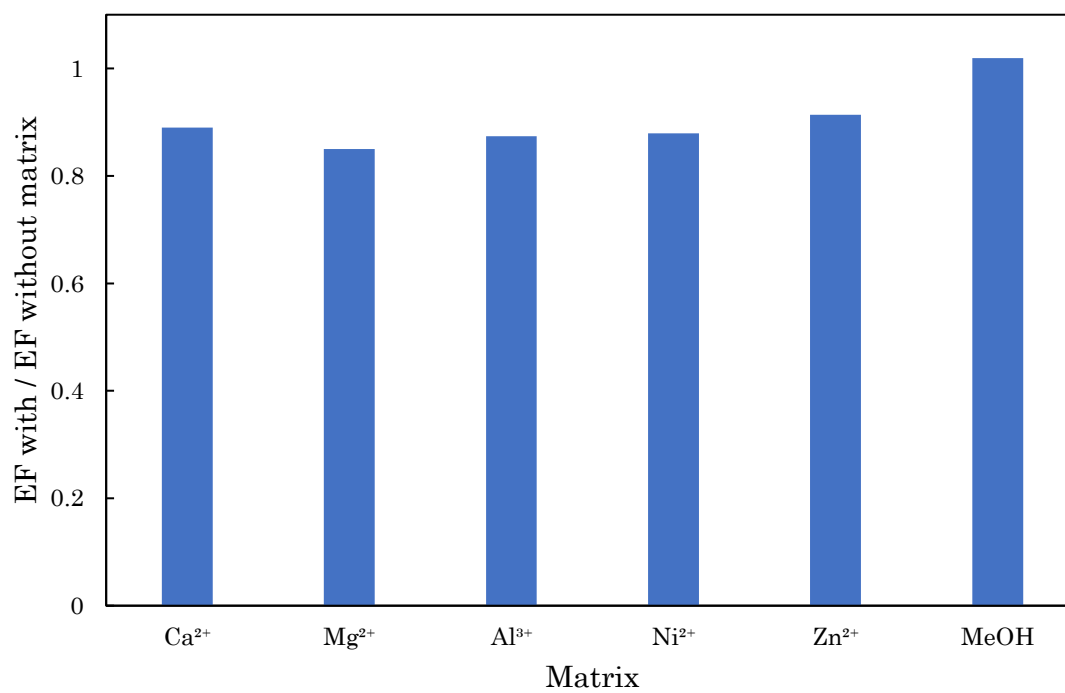


Fig.41 Effect of interfering ions on the enrichment factor of ethinyl estradiol.

### 3-2-3 さらに濃縮倍率の向上の検討

#### 3-2-3-1 分散液液マイクロ抽出

分散液液マイクロ抽出(DLLME)は、最小量の有機溶媒を使用して少量の水サンプルから高い濃縮係数を得ることができる、単純で低コストで迅速に行えるマイクロ抽出技術である。

本研究では、2種の抽出溶媒(n-hexane, tetrachloroethylene)を用いることで、濃縮倍率の向上を試みた。結果を Fig.42 に示す。

グラフから、抽出溶媒添加前の濃縮液濃度を下回り、良い結果が得られなかった。

原因として、3-2-2-6 に記した通り、極性パラメータの違いが挙げられる。n-hexane の極性パラメータは 0.117 であり、エチニルエストラジオールの抽出には不向きであったと考えられる。

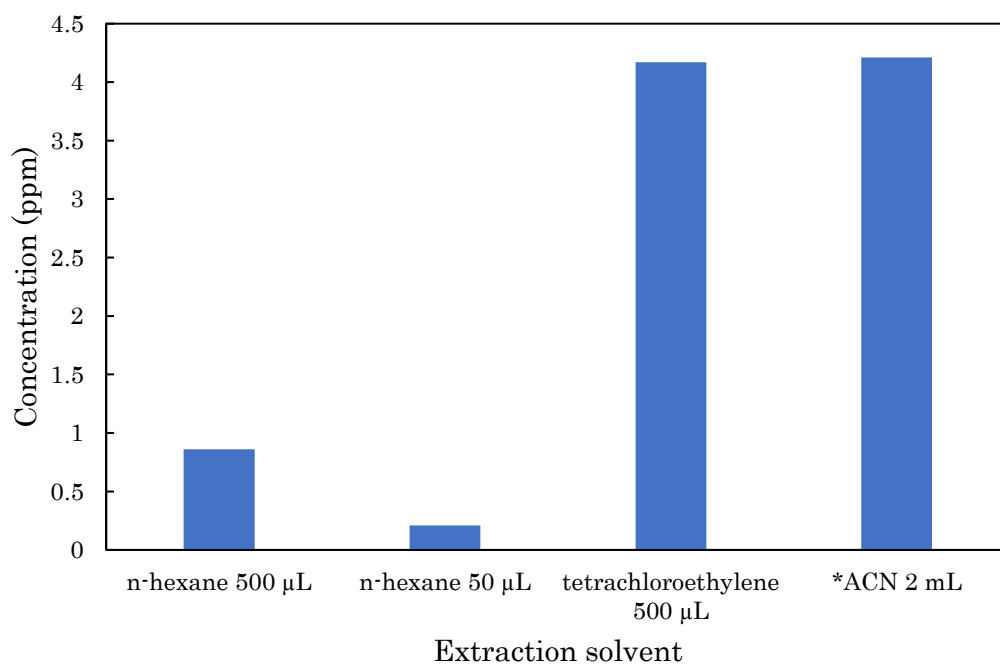


Fig.42 Effect of extraction solvent type on the preconcentration of ethinyl estradiol.

\*ACN 2 mL は抽出溶媒添加前の濃縮液濃度

### 3-2-3-2 脱着剤量による影響

脱着液量は目的分析物に対して達成することができる最大の前濃縮倍率を決めるので、脱着液量は本法の感度に影響を与える。

脱着剤のアセトニトリル量を 0.5~2.0 mL に変化させ、濃縮倍率及び回収率を調査した。結果を Fig.43 に示す。

脱着剤量を 1 mL にした時、濃縮倍率が 83.4 倍であり、約 2 倍に向上し、回収率は 83.4% と変化しなかった。0.5 mL の時、濃縮倍率は 120 倍であったが、回収率が 60% に減少した。これは、少量の脱着溶媒では吸着剤が上手く分散されず、目的物質の溶出が困難なためである。

従って、最適脱着剤量を 1 mL とした。

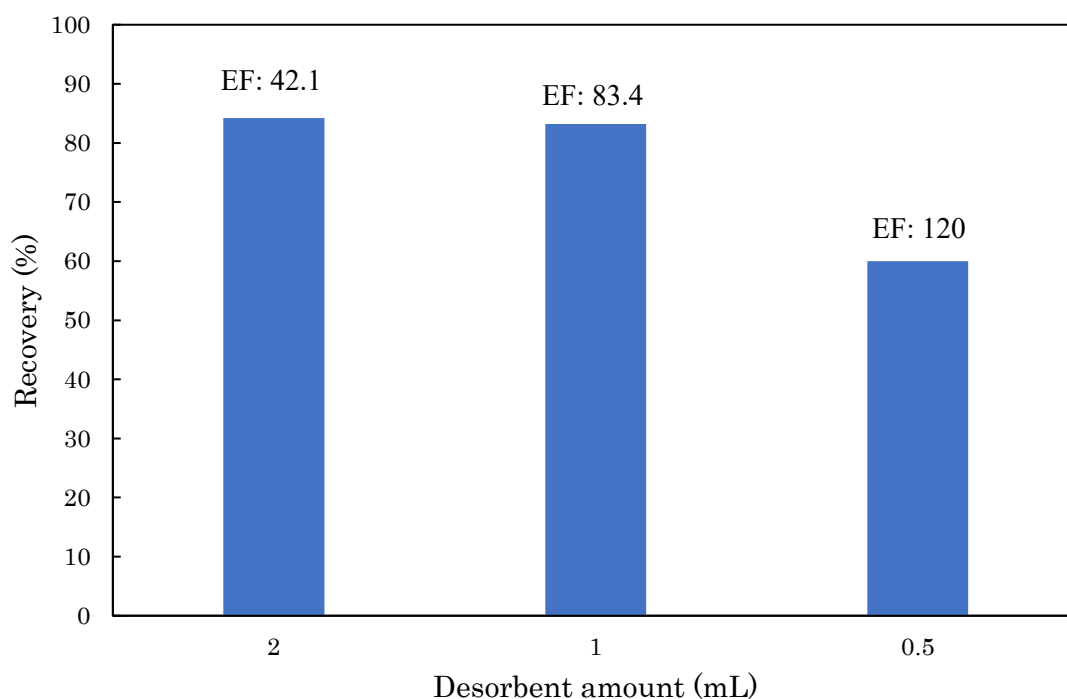


Fig.43 Effect of desorbent amount on the preconcentration of ethinyl estradiol onto  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MC}$ .

### 3-2-3-3 N<sub>2</sub> 気流濃縮

N<sub>2</sub> 気流濃縮を行った所、濃縮倍率が 135 倍、回収率が 54%であり、再現性が悪く、あまり良い結果が得られなかった。

考えられる原因として、エチニルエストラジオールの分解などによる構造変化が挙げられる。N<sub>2</sub> 気流濃縮濃縮前に定量した際、検出されるピークは 1 つのみであったが、N<sub>2</sub> 気流濃縮後の定量では、ピークが 2 つ検出された。このことから別の物質が生成されたことが予想される。またピーク位置からそれがエストロンではないかと思われる。脱着溶媒に含まれる界面活性剤などが反応を起こし、エストロンを生成したのではないかと考えられるが、反応機構などの確証を得ることはできなかった。

### 3-2-4 検量線

10~1000 ppb のエチニルエストラジオール濃度の試料溶液を用いて検量線の作製を行った。検量線の線形範囲において、その相関関数( $R^2$ )が 0.998 と、非常に良い直線性が得られた。

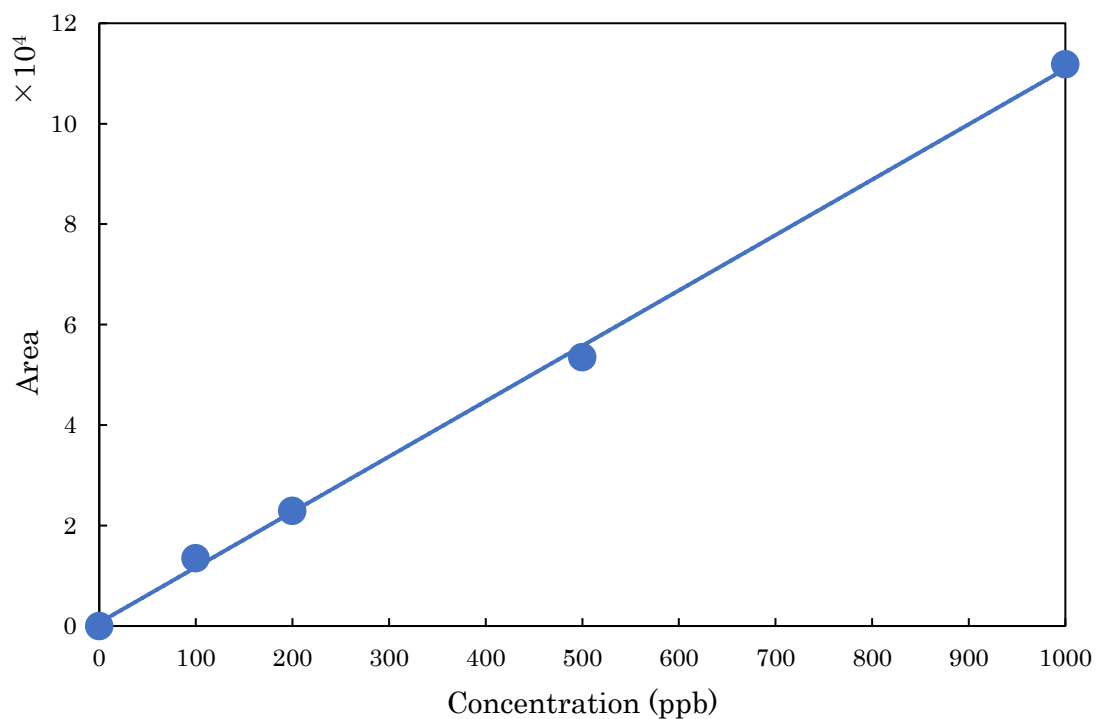


Fig.44 Calibration curve of ethinyl estradiol.



### 3-2-5 実水試料への応用

最適化された条件下で実試料への応用を行った。実試料としては、雨水と河川水を採用した。結果を Table 11 に示す。

結果より 2 種の実試料について、本法を用いて正確な定量ができることが確認された。

Table 11. Determination of ethinyl estradiol in water samples.

Sample	Concentration (ng mL <sup>-1</sup> )		
	Added	Found	Recovery (%)
Rain water	-	N.D.	
	100	106±7	106
River water	-	N.D.	
	100	119±4	119

N.D.; Not detected. (n = 3)

### 3-2-6 考察

反応メカニズムを Fig.45 に示した。

界面活性剤への有機物質の吸着は疎水性効果によるものであり、カチオン性界面活性剤は静電相互作用によって吸着剤に引き付けられ、モンモリロナイトの表面は親水性のため、界面活性剤の親水基がより吸着剤に引き寄せやすくなったと考えられる。また、吸着剤の分散性が高いほど、吸脱着が容易に行われ、良い結果が得られた。

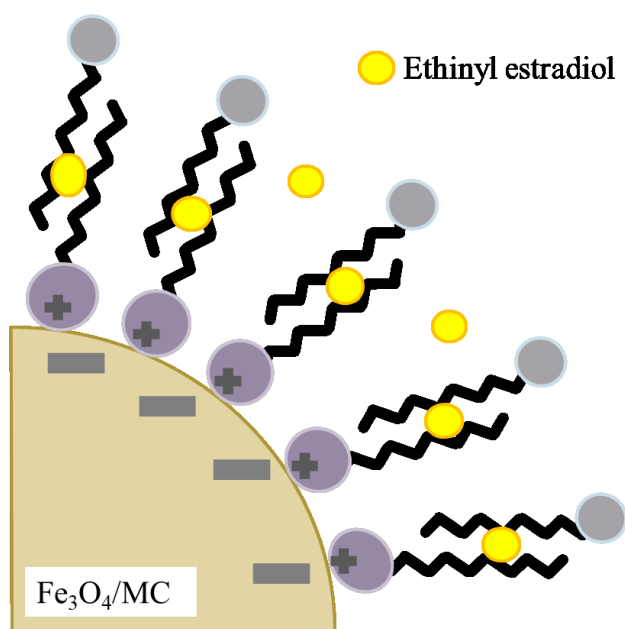


Fig.45 Reaction mechanism.

# 第 4 章 結論

全体を通して得られた結論をまとめると次のようになる。

- a) 活性炭が、ビスフェノール 3 種に対して、同時定量における選択的な分離と測定のための効果的な吸着剤として用いられた。本法における定量的で、再現性のある条件を調査し、最適化された結果、吸引濾過法で約 40%の回収率、約 200 倍の濃縮倍率を得た。

本法は物理吸着による前濃縮法であり、活性炭の高い表面積による優れた抽出能力と良好な安定性を示し、微量成分を定量するための簡便な操作、短時間、同時分離の利点を持つ分析法である。

実試料へ応用した結果、雨水の定量では満足のいく結果が得られた。

- b) 界面活性剤被覆  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MC}$  により、エチニルエストラジオールの高感度分析を行うことができた。本法における定量的で、再現性のある条件を調査し、最適化された結果、濃縮倍率 83.4 倍、回収率 83.4%の値が得られた。

干渉元素、実水試料による影響がほとんど無く、良好な選択性を有し、実試料へ応用した結果、雨水、河川水の定量では満足のいく結果が得られた。

- a) と比較して、本吸着剤は、磁気分離することができるため、従来のフィルター法より大幅に前濃縮プロセスの操作時間を短くすることができる。また回収率が高く、本法は、迅速で、安価かつ簡便で有効な手法であり、他の有機物質に対しても応用できることが期待される。

## 参考文献

- 1) María L. Scala-Benuzzi, Eduardo A. Takara, Mara Alderete, Galo J. A. A. Soler-Illia, Rudolf J. Schneider, Julio Raba, Germán A. Messina. Ethinylestradiol quantification in drinking water sources using a fluorescent paper based immunosensor. *Microchemical Journal*. Volume 141, Pages 287-293. (2018)
- 2) María L. Scala-Benuzzi, Julio Raba, Galo J. A. A. Soler-Illia, Rudolf J. Schneider, Germán A. Messina. Novel Electrochemical Paper-Based Immunocapture Assay for the Quantitative Determination of Ethinylestradiol in Water Samples. *Anal. Chem.* 90 (6), pp 4104–4111. (2018)
- 3) 日本の水環境行政 改訂版, 社団法人日本水環境学会 (2009/03/31 初版)
- 4) 吸着の科学, 近藤精一・石川達雄・安部郁夫 (1997/04/20 第5刷)
- 5) 役に立つ化学シリーズ4 分析化学, 太田清久・酒井忠雄 (2004/10/15 初版第1刷)
- 6) 土壌 CEC と保肥力 (<http://www.bsikagaku.jp/f-knowledge/knowledge18.pdf>)
- 7) ビスフェノール A 安全性研究会オフィシャルサイト (<http://bisphenol-a.gr.jp/>)
- 8) 厚生労働省 ホームページ  
(<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/kigu/topics/080707-1.html>)
- 9) L. Wang, Z. Zhang, X. Xu, D. Zhang, F. Wang, L. Zhang, Simultaneous determination of four trace level endocrine disrupting compounds in environmental samples by solid-phase microextraction coupled with HPLC, *Talanta* 142(2015)97-103
- 10) H.R. Sobhi, M. Ghambarian, M. Behbahani, A. Esrafil. Application of dispersive solid phase extraction based on a surfactant-coated titanium-based nanomagnetic sorbent for preconcentration of bisphenol A in water samples. *Journal of Chromatography A*. Volume 1518, 25-33 (2017)
- 11) S.C. Cunha. J.O. Fernandes. Quantification of free and total bisphenol A and bisphenol B in human urine by dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and heart-cutting multidimensional gas chromatography-mass spectrometry (MD-GC/MS). *Talanta*. Volume 83, Issue 1, Pages 117-125 (2010)
- 12) NourAl-Afy, Hassan Sereshti, Akram Hijazi, Hamid, Rashidi Nodeh. Determination of three tetracyclines in bovine milk using magnetic solid phase extraction in tandem with dispersive liquid-liquid microextraction coupled with HPLC. *Journal of Chromatography B*. Volume 1092, Pages 480-488. (2018)
- 13) A.D. Santos, M.F. Viante, D.J. Pochapski, A.J. Downs, C.A.P. Almeida. Enhanced removal of p-nitrophenol from aqueous media by montmorillonite clay modified with a cationic surfactant. *Journal of Hazardous Materials*. Volume 355. Pages 136-144 (2018)

- 14) Nastaran S. G., Samaneh. M. Extraction of ultratrace amounts of nelfinavir from biological samples and pharmaceutical formulations using surfactant-modified magnetite nanoparticles. *Microchemical Journal*. Volume 129. 332-338. (2016)
- 15) Z. Tang, X. Zhao, T. Zhao, H. Wang, P. Wang, F. Wu, J. P. Giesy. Magnetic Nanoparticles Interaction with Humic Acid: In the Presence of Surfactants. *Environ. Sci. Technol.* 50 (16), pp 8640–8648. (2016)
- 16) 新版界面活性剤ハンドブック, 吉田時行・進藤信一・大垣忠義・山中樹好 (1987/10 初版)
- 17) Shodex 各種溶媒の極性に関する指標 (<https://www.shodex.com/ja/dc/06/0117.html>)

## 本研究に関する論文

- 1) 活性炭吸着/窒素気流濃縮法を用いる HPLC によるビスフェノール類の定量, 岡田拓美, 勝又英之, 鈴木透, 古川真衣, 金子聡, 第 48 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会, 1K02 (2017).
- 2) Determination of Bisphenol in Environmental Samples by HPLC with Preconcentration using Activated Carbon Adsorption/Nitrogen Stream Method, Takumi Okada, Hideyuki Katsumata, Tohru Suzuki, Mai Furukawa, and Satoshi Kaneco, IUPAC 13th International Conference on Novel Materials and their Synthesis, P15 (2017).
- 3) Preconcentration with Activated Carbon Adsorption/Nitrogen Stream Method for the Determination of Bisphenol in Water Sample by HPLC, Takumi Okada, Hideyuki Katsumata, Tohru Suzuki, Mai Furukawa, and Satoshi Kaneco, The 2nd International Conference on Material and Chemical Engineering, MACE-0050 (2017).
- 4) Preconcentration of Endocrine disrupting chemical substance using dispersive solid phase extraction based on surfactant-coated nanomagnetic sorbent, Takumi Okada, Mai Furukawa, Ikki Tateishi, Hideyuki Katsumata and Satoshi Kaneco, The 8nd International Symposium for Sustainability by Engineering at MIU (IS2 EMU), FO-10 (2018).
- 5) 界面活性剤被覆ナノ磁性吸着剤による分散固相抽出を用いた有機有害物質の前濃縮, 岡田拓美, 古川真衣, 立石一希, 勝又英之, 金子聡, 日本分析化学会第 67 年会, K3004 (2018).
- 6) 界面活性剤被覆磁性モンモリロナイト吸着剤による分散固相抽出を用いる前濃縮法の開発, 岡田拓美, 古川真衣, 立石一希, 勝又英之, 金子聡, 第 49 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会, 1H05 (2018).

## 謝辞

本研究を行うにあたり、終始御指導頂きました金子聡教授、勝又英之准教授、立石一希助教、古川真衣技術員の諸先生方には多大なご協力、御指導頂き心から感謝致します。そして、研究生活でお世話になった **Jahida Binte Islam** 氏、松田隼門氏、**M2** の植本尚貴さん、加藤亮太さん、楠木りさ子さん、坂本惇平さん、辻本駿弥さん、東史哉さん、**M1** の大野一輝くん、楠滝智晴くん、小口恭介くん、中野舜也くん、平田卓也くん、松本涼希くん、学部4年生の金田浩平くん、川上志保さん、北永篤司くん、熊澤恭介くん、小林祐也くん、濱中朔弥くん、林凌矢くん、柳玄太くん、山口翔瑚くん、榊原光哉くんに深く感謝致します。最後に、学生生活を支えてくださった家族に深く感謝致します。ありがとうございました。