

水溶液系に含有する内分泌攪乱物質の濃縮と分離並びに分析

樋口 亜紺*

Analysis, Separation and Concentration of Endocrine Disruptors in Aqueous Solution

Akon HIGUCHI*

ABSTRACT : Endocrine disruptors, such as dioxin and polychlorinated biphenyl (PCB), are affecting the development and reproduction of humans and animals, and are therefore, of major concern to the environment. In this work, separation from aqueous solutions of several endocrine disruptors such as dibenzo-*p*-dioxin, diethylphthalate (DEP) and co-planar PCB (3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl, TCB) has been investigated by pervaporation. The relationship between the separation factor of endocrine disruptors and their physical properties, i.e. saturated vapor pressure (p_{vap}) and hydrophobicity ($\log P_{\text{ow}}$, octanol-water partition coefficient) was discussed. Pervaporation experiments through polydimethylsiloxane (PDMS) membranes were performed using aqueous feed solutions of several endocrine disruptors. The relationship between the separation factor of endocrine disruptors and $\log P_{\text{ow}} \cdot p_{\text{vap}}$ (ED) based on the theoretical equation showed a relative good relationship ($r = 0.883$) as theoretically predicted. We also succeeded to remove endocrine disruptors by pervaporation of sea water at Enoshima island.

Keywords : gas/mass spectroscopy, endocrine disruptor, membrane, pervaporation

(Received October 2, 2006)

1. はじめに

外因性内分泌攪乱物質(環境ホルモン)が野生動物並びに人の生殖機能を攪乱させていることが明らかとなってきた。内分泌攪乱物質は微量であっても生体内で作用する。環境中の濃度が極微量 (pptレベル) であっても、食物連鎖の過程で生体内中に濃縮されていき、人の健康への影響が心配されている¹⁻³⁾。内分泌攪乱物質は、図1に示すように、一般に芳香環を有し、かつハロゲン原子が付加されている。通常の内分泌攪乱物質は極めて疎水性であり、不揮発性である。このために、脂質や脂肪中に溶解しやすく、生体内に長期に残留する。すなわち、内分泌攪乱物質の生物濃縮が生じてしまうことが知られている。一方、内分泌攪乱物質の毒性(半数致死量)を見てみると、ダイオキシン類中最も有毒である2,3,7,8-四塩化ジベンゾダイオキシンの毒性は赤痢菌毒素程度であり、ボツリヌス菌毒素の約1/1000の毒性である(余談で

あるが、タバコに含まれているニコチンの毒性は、DDT(ジクロロジフェニルトリクロロエタン)と青酸カリの間の毒性である)¹⁾。致死量から見た内分泌攪乱物質の毒性は、それほど高くないが、生体内のエストロゲンレセプターあるいはアドレナリンレセプターに内分泌攪乱物質が結合して、生体内の内分泌系を攪乱させてしま

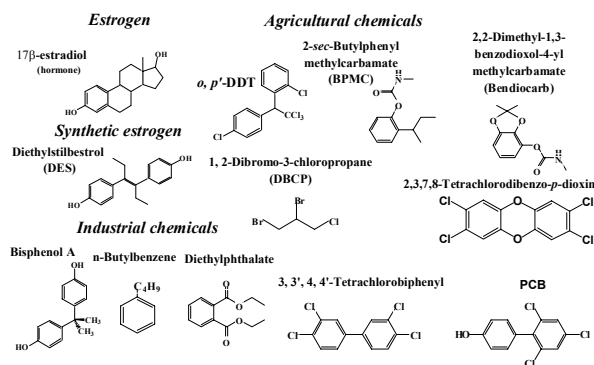


図1 様々な内分泌攪乱物質の化学構造

* : 物質生命理工学科教授 (higuchi@st.seikei.ac.jp)

い、子孫を作することを抑制してしまう効果が指摘されている。このために、内分泌攪乱物質を何らかの形で、環境中から分解あるいは除去する必要が生じてくるのである。

内分泌攪乱物質（環境ホルモン）中最も有害と言われているダイオキシン量は、ppt レベルで測定されなければならない、超微量のためにガス質量分析（GC/MS）計で直接分析することは現在のところ不可能である。現手法では、前処理段階としてジクロロメタンを用いた抽出濃縮法が用いられている。しかしながら、操作が複雑であるために、半自動的な内分泌攪乱物質濃縮法の出現が望まれていた。我々は、疎水性高分子膜を用いたパーバレーション（浸透気化）法並びに吸着法により、疎水性である内分泌攪乱物質を水溶液中から濃縮し、直接ガス質量分析計で分析するシステムを開発研究することを行っている^{1,4-10)}。

本稿では、内分泌攪乱物質中最も有毒であるダイオキシン、DDT 並びに比較的高濃度で存在する農薬に焦点を当て、モデル物質を用いてこれら内分泌攪乱物質のパーバレーション法を用いた水溶液中からの濃縮と除去の研究、さらに、海水中の内分泌攪乱物質分析を行った結果を概説する。

2. パーバレーション法の原理と装置¹⁾

パーバレーション（PV）法の原理図を図2に示す。パーバレーション法は、液相と気相（通常真空）が高分子膜により隔てられており、溶質の蒸気圧を駆動力として有機物質を高分子膜に透過させる方法である。通常の膜分離では、分子ふるい機構により物質を分離しているために、本研究のような水と内分泌攪乱物質系では、内分泌攪乱物質の方が水より分子径が大きいために、水が選択的に膜を透過する。従って、通常の膜分離法では内分泌攪乱物質を濃縮分離することは不可能である。一方、疎水性の高分子膜を用いたパーバレーション法では、内分泌攪乱物質は疎水性のために、疎水性の高分子膜に水より数万倍選択的に溶解するために、内分泌攪乱物質が選択的に膜を透過する。従って、疎水性の高分子膜を用いたパーバレーション法を用いることにより、内分泌攪乱物質を濃縮分離することが可能である。

水-有機溶媒系（本研究では内分泌攪乱物質が有機溶媒に相当）のパーバレーション実験において、有機溶媒（アルコール、トリハロメタン、ベンゼン、トルエン等）が水より優先的に透過する有機溶媒選択性膜として、これまで、ポリジメチルシロキサン膜、ポリトリメ

チルシリプロピン膜、ポリビニルエーテル膜、架橋ポリビニルエステル膜¹¹⁾ 等が報告されてきた。我々は、汎用性があるポリジメチルシロキサン（PDMS）膜を用いて、パーバレーション法による内分泌攪乱物質の分離・除去性を検討した⁴⁻⁶⁾。

使用した装置概略を図3に示す。内分泌攪乱物質の蒸気圧は、揮発性有機溶媒（VOC）に比べて、極度に低いために、パーバレーション装置における供給液温度（ T_{feed} ）、膜近傍温度（ T_{mem} ）、透過側温度（ T_{perm} ）を高

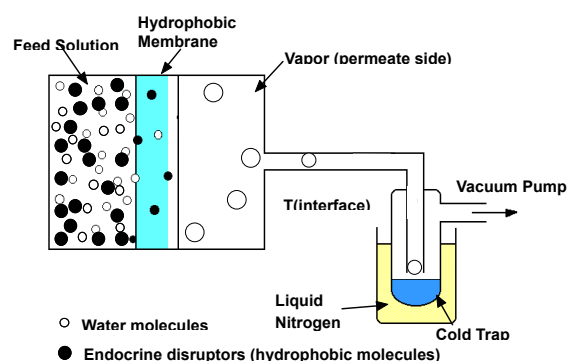


図2 パーバレーション（PV）法の原理図

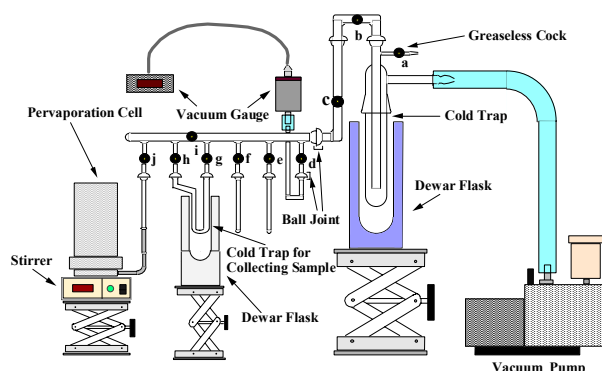


図3 内分泌攪乱物質分離用パーバレーション装置



図4 内分泌攪乱物質分離分析装置（GC/MS）

温にして、分離係数の向上をはかっている。このために、透過セル出口からバルブ g, h までの PV 真空ライン、供給セルにリボンヒーターを巻いて温度を制御している。

モデル内分泌攪乱物質（環境ホルモン）として、*n*-ブチルベンゼン（ディスプレイ用液晶物質）、1,2-ジブromo-3-クロロプロパン（農薬）、2-ブチルフェニルメチルカルバメート（カルバメート系農薬）、ジエチルフタレート（可塑剤）、ベンダイオカルブ（カルバメート系農薬）、フタル酸ジブチル、ジフェニル（PCBモデル物質）、コプラナーPCB、ジベンゾ-*p*-ダイオキシンを選択した（図1）。これらを透過物質として用いて、パーバレーション法により濃縮・分離できるかを検討した^{4,6)}。なお、これらの物質の濃度は、質量分析計により評価した（図4）。

膜を透過してきた透過蒸気をコールドトラップにて捕集することにより透過液を得た。単位透過時間当たりの透過溶液の重量を測定して透過流量（Flux, J ）を式1より求めた。

$$J \text{ (g/m}^2\text{hr)} = Q / (A \cdot \Delta t) \quad (1)$$

ここで、 Δt は透過時間、 Q は Δt 時間中に採取された透過溶液重量、 A は、パーバレーション装置中の膜面積（本実験では15.2cm²）である。

透過溶液、供給溶液の内分泌攪乱物質濃度の経時変化をガスクロマトグラフィー/質量分析計(GC/MS, 図4)により測定して、分離係数（ α ）を式2より測定した。

$$\alpha = (C_{\text{permeate}}(2) / C_{\text{permeate}}(1)) / (C_{\text{feed}}(2) / C_{\text{feed}}(1)) \quad (2)$$

ここで、 $C_{\text{feed}}(1)$ 、 $C_{\text{permeate}}(1)$ は、供給液、透過液中の透過物質のモル分率であり、1は水、2は内分泌攪乱物質を表す。本研究では、内分泌攪乱物質は、水に対して難溶性であるため、 $C_{\text{feed}}(1) = C_{\text{permeate}}(1) = 1$ と近似できるため、(2)式は、(3)式に簡略化されることが可能である。

$$\alpha = C_{\text{permeate}}(2) / C_{\text{feed}}(2) \quad (3)$$

3. 分離係数と内分泌攪乱物質の分子量との関係¹⁾

有機物質選択性である疎水性高分子膜を用いたパーバレーション法は、これまで、分子量が比較的低く、揮発性な有機化学物質の水溶液からの除去が検討されてきた。例えば、メタノール、エタノール等アルコール類、フェノール、ピリジン、クロロホルム、テトラクロロエチレン等である。テトラクロロエチレンの分子量は166であるが、蒸気圧は20mmHgと今回用いた内分泌攪乱物質に比べて極端に高い蒸気圧を有しているために、テ

ラクロロエチレンの分離係数は905と高い値が報告されている¹¹⁾。これは、テトラクロロエチレンの蒸気圧が高いために、膜を透過する駆動力も高かったためと考察される。今回の実験においては、蒸気圧0.58 mmHg (25℃)の1,2-ジブromo-3-クロロプロパン (DBCP, 分子量236)から蒸気圧が極度に低い0.0001425 mmHg (25℃)の2-*sec*-butylphenyl methylcarbamate (BPMC), 0.000005 mmHg (25℃)の2,2-dimethyl-1,3-benzodioxol-4-yl methylcarbamate (Bendiocarb), また蒸気圧0.0021 mmHg (25℃)のジエチルフタレート(DEP)など様々な内分泌攪乱物質を用いて透過実験を行った（図5参照）⁵⁾。供給液を高温にすることにより分離性が向上していたが、これは駆動力である蒸気圧を上昇させたためであると考察した。そこで、ポリジメチルシロキサン (PDMS) 膜を用いたパーバレーション法により得られた様々な内分泌攪乱物質の分離係数とその蒸気圧とオクタノールー水分

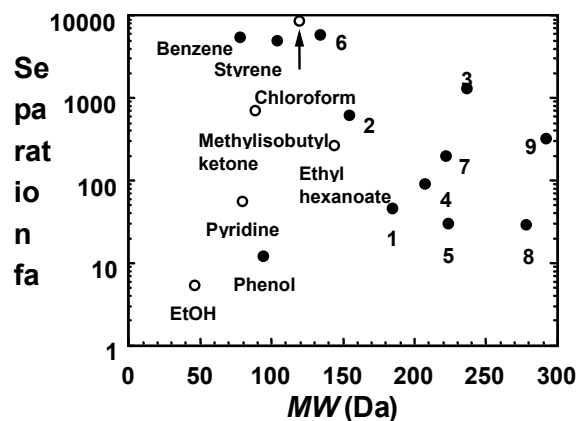


図5 パーバレーション法を用いた内分泌攪乱物質と有機物質の分離実験。その分子量と分離係数との関係。

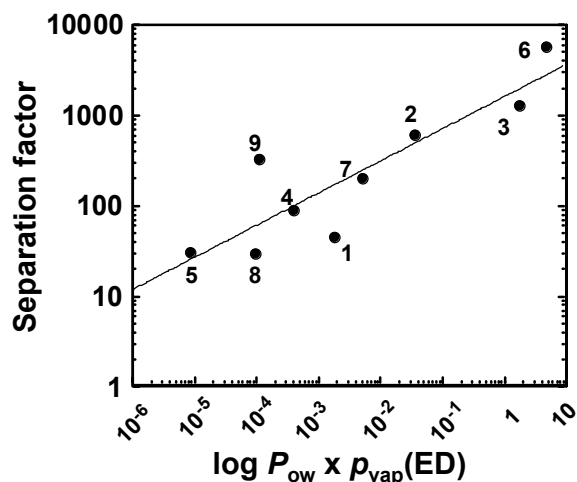


図6 ポリジメチルシロキサン (PDMS) 膜を用いたパーバレーション法により得られた様々な内分泌攪乱物質の分離係数とその蒸気圧とオクタノールー水分分配係数（ $\log P_{ow}$ ）との積の関係。

配係数 ($\log P_{ow}$) との積の関係を検討した。その結果を図 6 に示す。分子量に関係なく (図 5 参照), 駆動力である蒸気圧が高くなるにつれて分離性が向上していくことが明らかとなった。また, ダイオキシンや PCBs のモデル物質であるジベンゾー-*p*-ダイオキシンやビフェニルに関しても, パーバーパレーション法を用いることにより分離することが可能であった。さらに, コプラナー PCB に関しても 326 という高い分離係数を得ることが可能であった。

物理パラメータ (蒸気圧とオクタノール-水分配係数 ($\log P_{ow}$)) と分離係数 (α) との間の理論的關係は, 溶解拡散理論より以下のように求まる^{5,6)}。

$$\alpha \propto D(ED) \cdot \log P_{ow} \cdot p_{vap}(ED) \quad (4)$$

ここで, $D(ED)$ は内分泌攪乱物質の拡散係数, $p_{vap}(ED)$ は内分泌攪乱物質の飽和蒸気圧である。もし PDMS 膜中の内分泌攪乱物質の拡散係数が本研究において使用した内分泌攪乱物質中ではほぼ一定であると仮定する (なぜなら本研究における内分泌攪乱物質の分子量は 134-282 Da と類似しているため) ならば, 式 (5) が導かれる。

$$\alpha \propto \log P_{ow} \cdot p_{vap}(ED) \quad (5)$$

以上の結果並びに理論式より, 今後新規の内分泌攪乱物質を用いてパーバーパレーション法により透過実験を行う際には, その物質の持つ飽和蒸気圧とオクタノール-水分配係数 ($\log P_{ow}$) が分かれば, 分離性を予想することが可能であることが明らかとなった^{5,6)}。

また, 様々な内分泌攪乱物質のオクタノール-水分配係数は 1.7 (ベンダイオカルブ) から 7.1 (コプラナー PCB) の値を取るのに対して, 飽和蒸気圧は, 10^{-9} から 1 torr と 9 桁変化する。従って, 式 (5) 中の $p_{vap}(ED)$ が優先的に作用するために

$$\alpha \propto p_{vap}(ED) \quad (6)$$

となり, 分離係数は近似的に飽和蒸気圧と直線的相関関係があることが明らかとなった。

4. 海水中における有機物質並びに内分泌攪乱物質の PV 法による分析¹⁾

環境中に存在するサンプルを用いて, 実際にパーバーパレーション法が内分泌攪乱物質の除去並びに分析に有効であるかを検討した。選定した場所は神奈川県藤沢市にある引地川河口で海水を採取した。ここは以前, 荏原製作所よりダイオキシンが流出されて高濃度のダイオキシンが検出された川であることに着目して選定した。海水の採集は, プラスチックからの汚染がないようにガラ

ス製のすりがついた試料びんを用いて, 3 L 採集した。この時, 試料びんは海水で何度も共洗いして, 試料を採集する際には試料びんに空気が入らないように注意した。供給液を今回採集した海水を用いて, 供給液側の温度を 90 °C, 透過側の温度を 150 °C に設定して, パーバーパレーション法による透過実験を行った。パーバーパレーション法により得られたサンプル並びに海水の抽出液の GC/MS 分析の結果を図 7 に示す。パーバーパレーション法により得られたサンプルから検出された化学物質 (図中, ピーク番号 1-5) は各々 5.1, 5.5, 6.1, 9.5, 12.7 分に検出された。これらは香料類, 石鹸や洗剤等の芳香, 可塑剤等に使用されている化学物質 (オクタノール, 2-エチル-1-ヘキサノール, ノナノール, 2-(1-メチルプロピル)-フェノール, 1-ドデカノール) であった。海水の抽出液を GC/MS で分析した結果, フタル酸ジブチル (ピーク番号 6) 並びにフタル酸ジエチルヘキシル (ピーク番号 7) が, 各々 23.7, 39.7 分に検出された。これらは環境省が定める『内分泌攪乱作用を有すると疑われる化学物質』群に含まれている。しかしながらこれらの物質はパーバーパレーション法を用いて透過実験を行った際に得られる透過液サンプルから検出することは困難であった。少量ではあるがフタル酸ジブチルに関してはパーバーパレーション法により得られたサンプルから検出さ

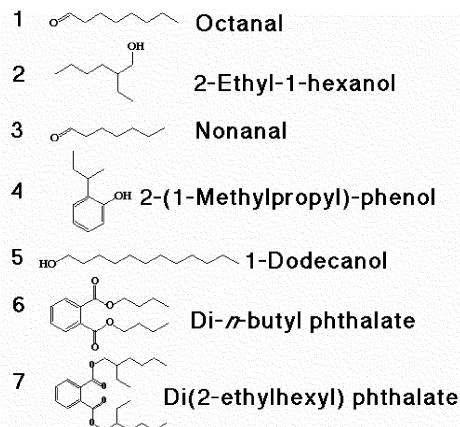
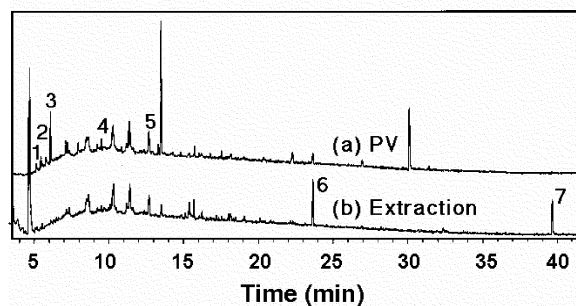


図 7 江ノ島近郊の海水の分析。海水をパーバーパレー

ション法により濃縮した後に GC/MS 分析を行った。れたが、フタル酸ジエチルヘキシルは透過液中に検出されなかった。これらの違いは化学物質が有する低い蒸気圧の為であると考察した。すなわち、フタル酸ジブチルの蒸気圧は $2.01\text{E-}5$ mmHg, フタル酸ジエチルヘキシルの蒸気圧は $7.23\text{E-}8$ mmHg であることに起因している。

以上より原液である海水を定性分析することで、パーペレーション法により如何なる化学物質が分離除去できるかを検討することが可能となった。結果として、DOP, ジブチルフタレート(DBP), そして抗酸化剤として用いられているジブチルヒドロキシトルエン(BHT)が、2003 年 3 月採取した海水から検出された。BHT は酸化防止剤として、プラスチックその他の石油化学製品の製造に使われている。海水を採取した周辺は多くの工場並びに焼却施設があり、ここからのプラスチックの焼却による大気中への放出または、塩化ビニールや酢酸ビニールなどの樹脂製品の製造の際に排出されたものではないかと考察した。

検出された可塑剤や抗酸化剤のパーペレーション法による分離性を検討するために、海水の透過実験を行った。これにより、パーペレーション法を用いることによって DOP を 90 倍濃度、DBP を 165 倍濃度に、また BHT においては 250 倍濃度までに濃縮できることを確認した。

6. むすび

環境中に存在する外因性内分泌攪乱物質(環境ホルモン)を、パーペレーション法により濃縮することにより、ガス質量分析(GC/MS)計で分析可能であることが明らかとなった。

本研究は、1999 年購入「環境ホルモン濃縮分離分析システム」を用いて遂行された。また、下記の参考文献 1), 4) -10) の 8 報の学術論文は、上記の設備装置を用いて遂行された。

参考文献

- 1) 樋口亜紺, 日本海水学会誌, **59**(4), 246-256 (2005).
- 2) T. Colborn, F. S. Vom Saal, A. M. Soto, *Environ. Health Perspect*, **101**, 378-384 (1993).
- 3) R. M. Sharpe, N. F. Skakkebaek, *Lancet*, 341, 1392-1395 (1993).
- 4) A. Higuchi, B. O. Yoon, T. Asano, K. Nakaegawa, S. Miki, M. Hara, Z. He, I. Pinna, *J. Membrane Sci.*, **198**, 311-320 (2002).
- 5) B. O. Yoon, T. Asano, K. Nakaegawa, M. Ishige, M. Hara, A. Higuchi, *ACS Symposium Series*, 876, chp. 27 (2004).
- 6) A. Higuchi, B.O. Yoon, T. Kaneko, M. Maekawa, T. Nohmi, *J. Appl. Polym. Sci.*, **94**, 1737-1742 (2004).
- 7) B. O. Yoon, T. Asano, M. Hara, A. Higuchi, *J. Membrane Sci.*, **213**, 137-144 (2003).
- 8) B.-O. Yoon, S. Koyanagi, T. Asano, M. Hara, A. Higuchi, *J. Mass Spectro. Jpn.*, **51**(1), 168-173 (2003).
- 9) 樋口亜紺, 尹富玉, 海水学会誌, **58**(1), 3-12 (2004).
- 10) A. Higuchi, E. Takayama, K. Hirai, T. Ishikawa, N. Takizawa, M. Sakurai, S. Egashira, Y. Matsuoka, S. H. Natori, *J. Appl. Polym. Sci.*, in press.
- 11) M. Hoshi, T. Saito, A. Higuchi, T. Nakagawa, *Sen-i Gakkaishi*, **47**, 644-649 (1991).