

【調査研究】

有害化学物質の環境汚染実態の解明と分析技術の開発に関する研究

—LC/MS/MSを用いた水質中ポリ-*tert*-ブチルフェノール類の同時分析法の検討—
Study for Simultaneous Analysis Method of Poly-*tert*-butyl phenols in Water by LC/MS/MS

大月史彦, 吉岡敏行, 山辺真一, 坂口浩範, 剣持堅志
Fumihiko Otsuki, Toshiyuki Yoshioka, Shinichi Yamabe, Hironori Sakaguchi,
Katashi Kenmotsu (Department of Water)

要 旨

環境試料（水質中）のポリ-*tert*-ブチルフェノール類4種の多成分同時分析法について検討した。

分析法はヘキサンで抽出後、アセトニトリルに転溶しLC/MS/MS（SRM法）で測定する方法とした。各種溶媒、バイアルセプタム等に対象物質が含まれており、これらの影響を除外するための様々な対策が必要であった。

開発した分析法では、要求感度を満足する検出下限値が得られ、回収率や保存性等の試験も良好であった。また、環境試料を分析したところ、いずれの物質も検出されなかった。

[キーワード：ポリ-*tert*-ブチルフェノール類, 一斉分析, LC/MS/MS法]

[Key words : Poly-*tert*-butyl phenols, Simultaneous Determination, LC/MS/MS]

1 はじめに

2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールは、魚毒性が強く、また難分解性有害化学物質のおそれもある物質であるが、環境に及ぼす影響等の実態はよくわかっていない。今回、当該物質が環境省の実施する化学物質環境実態調査の調査対象物質として選定され、本県に分析法の開発が委託されたことから、当該物質を含め4種類のポリ-*tert*-ブチルフェノール類について、当該調査と連携して、LC/MS/MSを用いて同時分析する方法を検討するとともに、環境試料の濃度レベルを測定したので報告する。

2 実験方法

2.1 試薬

2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノール

東京化成工業製

2,6-ジ-*tert*-ブチルフェノール

東京化成工業製

3,5-ジ-*tert*-ブチルフェノール

MP Biomedicals製（輸入元：和光純薬工業）

2,4,6-トリ-*tert*-ブチルフェノール

東京化成工業製

アスコルビン酸

試薬特級（和光純薬工業製）

無水硫酸ナトリウム

残留農薬・PCB試験用（関東化学製）

塩酸 1 mol/Lに調整済みの市販品

アセトニトリル, メタノール LC/MS用

ヘキサン 5000倍濃縮検定品

精製水 ミリポア製 Milli-Q Gradientにより調製

2.2 LC/MSの測定条件

LC/MSの測定条件を次に示す。

(LC条件)

カラム

Atlantis T3 150mm×2.1mm, 3μm (Waters製)

移動相

A (水) : B (アセトニトリル)

0~18min A : B = 30 : 70

18~18.5min A : 30→0

B : 70→100 linear gradient

18.5~27min A : B = 0 : 100

27~27.5min A : 0→30

B : 100→70 linear gradient

27.5~40min A : B = 30 : 70

流量 0.2mL/min

カラム温度 40℃

注入量 10μL

(MS条件)

使用機種 Micromass Quattro micro API
 キャピラリー電圧 3.0kV
 ソース温度 100℃
 デゾルベーション温度 500℃
 コーンガス流量 50L/hr
 デゾルベーションガス流量 600L/hr
 イオン化法
 ESI Negative (2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノール)
 ESI Negative (2,6-ジ-*tert*-ブチルフェノール)
 ESI Negative (3,5-ジ-*tert*-ブチルフェノール)
 ESI Negative (2,4,6-トリ-*tert*-ブチルフェノール)
 コーン電圧
 40V (2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノール)
 40V (2,6-ジ-*tert*-ブチルフェノール)
 40V (3,5-ジ-*tert*-ブチルフェノール)
 40V (2,4,6-トリ-*tert*-ブチルフェノール)
 コリジョンエネルギー
 20eV (2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノール)
 20eV (2,6-ジ-*tert*-ブチルフェノール)
 20eV (3,5-ジ-*tert*-ブチルフェノール)
 20eV (2,4,6-トリ-*tert*-ブチルフェノール)
 モニターイオン
 205.17>205.17 (2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノール)
 205.17>205.17 (2,6-ジ-*tert*-ブチルフェノール)
 205.17>205.17 (3,5-ジ-*tert*-ブチルフェノール)
 261.22>261.22 (2,4,6-トリ-*tert*-ブチルフェノール)

2.3 分析法

図1に示す分析法について検討した。

水質試料100mLにアスコルビン酸0.2gを添加し混合する。これを希塩酸でpH2に調整し、ヘキサン10mLを加え、5min振とう抽出する。水層を捨て、ヘキサン層に精製水10mLを加え振とう洗浄する。ヘキサン層を無水硫酸ナトリウム充填のロートを用いて濾過脱水した後、アセトニトリル10mLを加え、40℃以下で5mL以下まで濃縮し、これをアセトニトリルで10mLに定容し、試験溶液とする。

3 結果及び考察

3.1 各種条件の検討結果

3.1.1 移動相溶媒と質量分析条件の検討

移動相溶媒と質量分析条件の検討を行った結果を表1に示す。100ng/mLの2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールの標準溶液を用いて確認したところ、移動相溶媒をアセトニトリルとし、SRMで二重にフィルターをかける形の205>205の質量数の分析で、最も良好なS/N比が得られ、これを条件とした。また、205>189の質量数は対象物質からフェノールの酸素原子が外れるという、物質の構造を示す特有のピークと推測され確認イオンとして最適であると考えられた。

3.1.2 HPLC条件の検討

HPLC条件の検討を行った結果を表2と図2に示す。移動相溶媒、溶出モードを変更して各物質の分離状況と2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールのブランクを確認したところ、移動相溶媒をアセトニトリルとし、溶出モードをアイソクラティックとすることで、良好な分離とブランクが得られた。グラジエントでブランクのピークが検出されるのは、

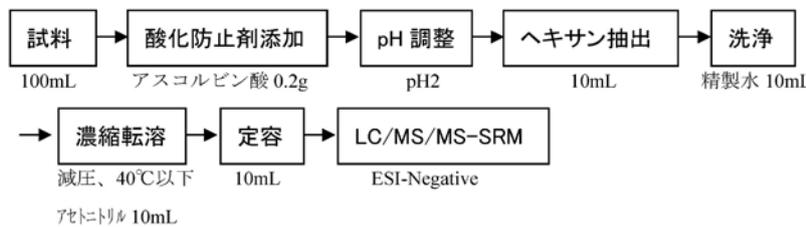


図1 分析法のフローチャート

表1 各条件における2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールのS/N比 (各最適条件化済み)

定量方法	SRM		
	SIM	205>189	205>205
モニターイオン	205	205>189	205>205
移動相溶媒	アセトニトリル	200	830
	メタノール	100	520

■は本開発での条件。

3.1.3の検討結果から、移動相溶媒中の不純物等に由来するものと考えられた。

3.1.3 ブランクの検討

各種の実験時に、2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールがブランクで検出されたため、ブランクについての検討を実施した。当該物質は酸化防止剤の中間体として、幅広いところで用いられていることから、様々な場所での汚染が想定された。

装置に標準溶液を繰り返し注入するとピーク強度が上昇したため、バイアルの蓋からの汚染を確認したところ、セプタムから汚染が起きていることがわかった。テフロン

製のセプタムを使用することにより、対処できた。結果を表3と図3、4に示す。

また、グラジエント条件でブランクから検出されたことから、溶媒からの汚染が疑われたため、ガラスの器具を用いて、溶媒をエバポレーターで100倍濃縮し確認したところ、表4のとおり、すべての溶媒から2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールが測定装置の検出限界と同程度のレベルで確認された。このため、前処理は抽出溶媒をあまり濃縮せず、かつ必要最小量を用いることとした。

表2 HPLC条件の検討結果（各物質の分離状況）

	溶出モード	グラジエント	アイソクラティック
移動相溶媒	アセトニトリル	Blank で検出、分離良好	Blank で未検出、分離良好
	メタノール	Blank で検出、分離良好	Blank で未検出、分離不良

■は本開発での条件。

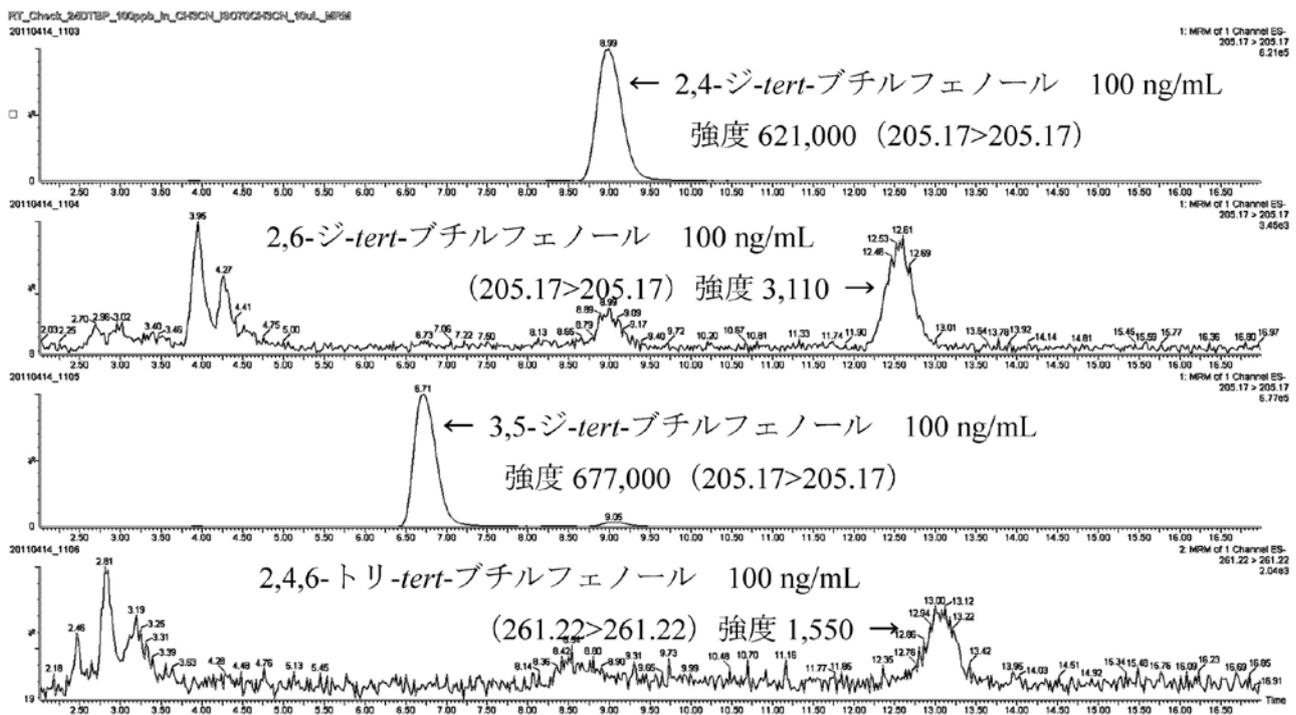


図2 各物質の分離状況と強度

表3 バイアル蓋（セプタム）からの検出状況（ng/mL）

	A社 赤色	A社 青色	A社 緑色	W社 赤色	W社 青色	W社 緑色	W社 白色	S社 黒色	S社 テフロン1	S社 テフロン2
24DTBP	25.5	19.1	36.4	25.1	32.7	21.8	40.5	12.0	ND	ND
26DTBP	10.2	ND	ND							
35DTBP	ND	ND								
246DTBP	ND	ND								

セプタムを4つに切り、5mLのアセトニトリルで3.5時間振とう抽出した上澄みを測定。

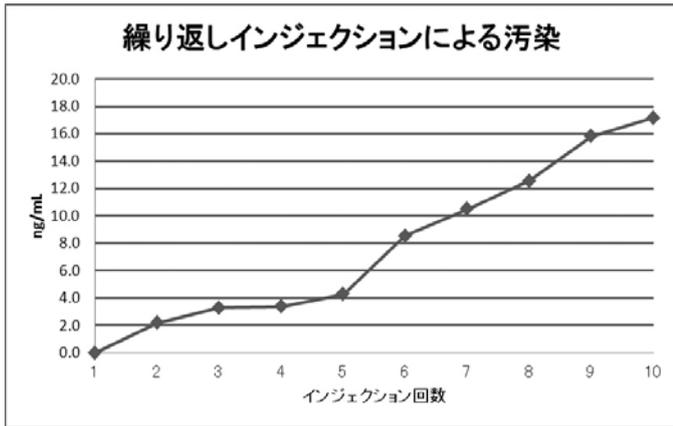


図3 繰り返しによる汚染 (W社白色蓋)

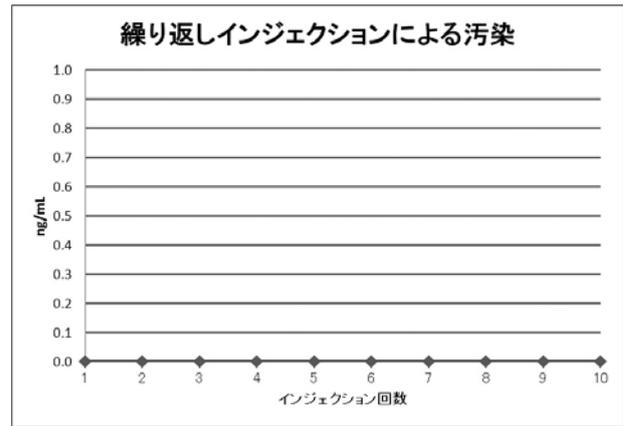


図4 繰り返しによる汚染 (S社テフロン1)

表4 溶媒からの検出状況 (ng/mL)

	W社 LC/MS CH ₃ CN Lot1	W社 LC/MS CH ₃ CN Lot2	W社 5000 CH ₃ CN	W社 5000 CH ₃ CN	W社 LC/MS CH ₃ OH	W社 5000 CH ₃ OH	K社 LC/MS CH ₃ OH	K社 5000 CH ₃ OH	W社 5000 ヘキサン	W社 5000 7ピトン
24DTBP	0.160	0.208	0.061	0.189	0.180	0.142	0.124	0.172	0.158	0.137
26DTBP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
35DTBP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
246DTBP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Sample17_4Mix_24_26_35_246TBP_in_CH3CN_ISO70CH3CN_10uL_MRM_Check_Recovery_MilliQ_BL_0p

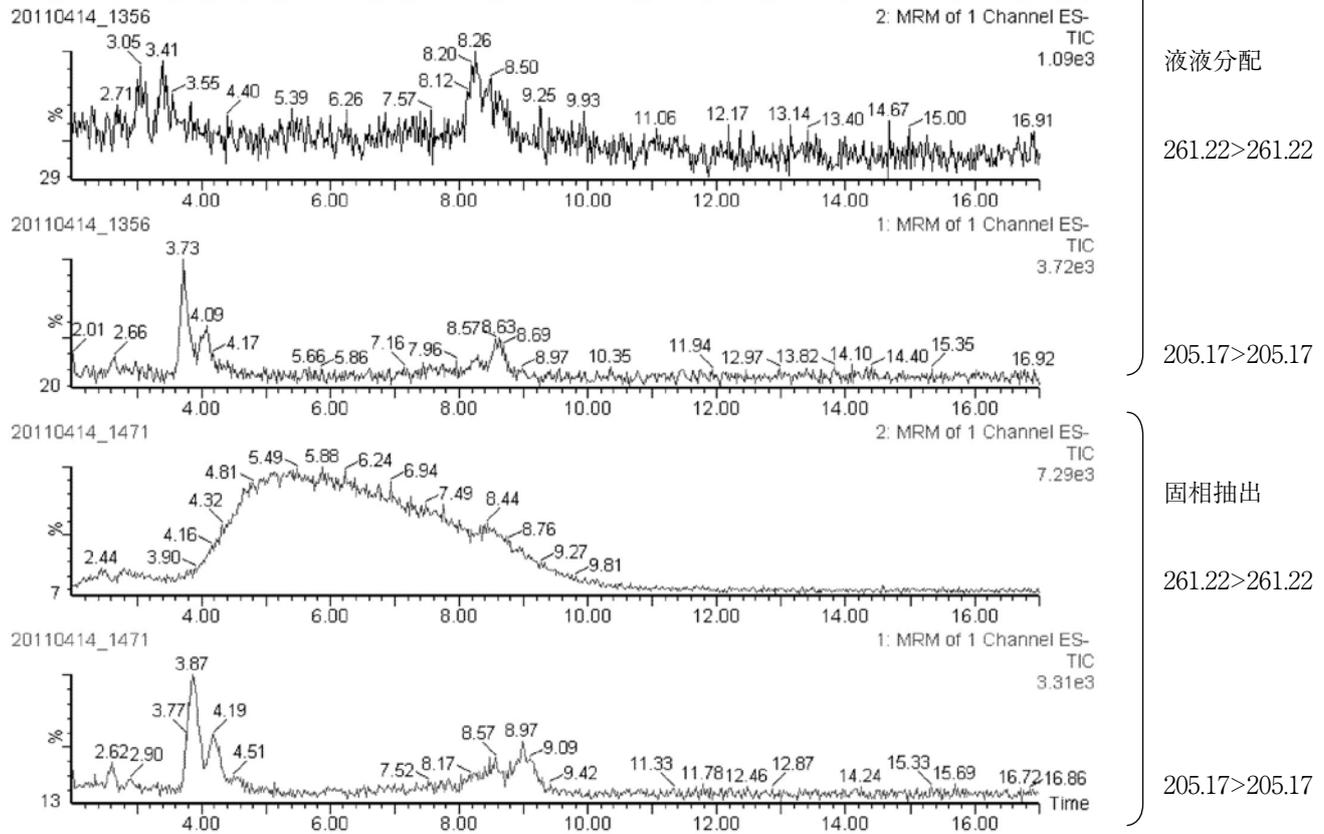


図5 液液分配と固相抽出時のブランク比較用クロマトグラム

3.1.4 前処理法の検討

前処理法は、液液分配による方法と、固相抽出による方法を検討した。いずれの方法でも回収率は良好であったが、固相抽出は図5に示すようにブランクが大きく、またプラスチック製の大容量リザーバーがブランク対策で使用できないことから操作性が悪い等の問題点があったため、液液分配を採用した。

3.2 添加回収試験結果

添加回収試験結果を表5に示す。添加回収試験には河川水として旭川水系の乙井手堰の水質試料を、海水として岡山県倉敷市水島沖の水質試料を使用した。河川水、海水と

もに良好な添加回収試験結果が得られた。

3.3 分解性スクリーニング試験結果

分解性スクリーニング試験結果を表6に示す。pHや光の有無によらず、著しい分解性は見られなかった。

3.4 保存性試験結果

保存性試験結果を表7に示す。保存性は良好であった。

3.5 環境試料の分析結果

平成23年10月に採取した河川水（旭川乙井手堰）及び海水（水島沖）から対象物質は検出されなかった。定量下限

表5 添加回収試験結果

試料名	物質名	試料量 (mL)	添加量 (ng)	試験数	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)
河川水	2,4-ジ-tert-ブチルフェノール	100	無添加	1	ND	—	—
	2,4-ジ-tert-ブチルフェノール	100	5	7	46.8	94	10.0
	3,5-ジ-tert-ブチルフェノール	100	無添加	1	ND	—	—
	3,5-ジ-tert-ブチルフェノール	100	5	7	45.7	92	5.5
海水	2,4-ジ-tert-ブチルフェノール	100	無添加	2	ND	—	—
	2,4-ジ-tert-ブチルフェノール	100	50	3	479.5	96	2.0
	3,5-ジ-tert-ブチルフェノール	100	無添加	2	ND	—	—
	3,5-ジ-tert-ブチルフェノール	100	50	3	487.8	98	2.7

2,6-ジ-tert-ブチルフェノールと2,4,6-トリ-tert-ブチルフェノールは当装置では他に比べて感度が1/100以下と著しく悪かったため添加回収試験はせず。

表6 分解性スクリーニング試験結果

物質名	pH	試験数	初期濃度 (ng/L)	1時間後の残存率(%)	7日後の残存率(%)	
					明所	暗所
2,4-ジ-tert-ブチルフェノール	5	2	500	109	90	—
	7	2	500	100	88	95
	9	2	500	98	86	—
3,5-ジ-tert-ブチルフェノール	5	2	500	105	95	—
	7	2	500	100	98	97
	9	2	500	98	92	—

※7日後の残存率は、1時間後の残存量を100とした値である。

表7 保存性試験結果

物質名	試料名	初期濃度 (ng/mL)	残存率(%)		
			1週間後	9週間後	13週間後
2,4-ジ-tert-ブチルフェノール	試料(河川水)	0.2	101	—	—
	標準溶液	1	—	—	98
	標準溶液	2	—	106	—
	標準溶液	100	—	101	99
3,5-ジ-tert-ブチルフェノール	試料(河川水)	0.2	100	—	—
	標準溶液	1	—	—	97
	標準溶液	2	—	101	—
	標準溶液	100	—	100	97

は、2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールが46.6ng/L, 3,5-ジ-*tert*-ブチルフェノールが25.1ng/Lであった。

年度化学物質分析法開発調査報告書（愛知県環境調査センター），平成21年12月，543-569，2009

4 まとめ

4種類のポリ-*tert*-ブチルフェノール類について、多成分同時分析法を検討し、次の結果を得た。

- 1) 対象物質はすべてESI Negative モードでイオン化され、SRM (MS/MS) 法による測定が有効であった。
- 2) 2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールと3,5-ジ-*tert*-ブチルフェノールは高感度測定が可能であったが、2,6-ジ-*tert*-ブチルフェノールと2,4,6-トリ-*tert*-ブチルフェノールは当装置では感度が著しく悪かったため、分離はできるものの他と同濃度レベルでの定量は困難と考えられた。
- 3) 移動相溶媒にアセトニトリル、定量方法にSRMを用いると、最も良好なS/N比を得ることができた。
- 4) 各種溶媒、バイアルセプタム等に対象物質が含まれており、これらの影響を除外するための様々な対策が必要であった。
- 5) 液液分配と固相抽出による前処理方法を検討し、いずれも回収率は良好であったが、ブランクと操作性の点から液液分配を採用した。
- 6) 添加回収試験結果は、河川水、海水ともに良好であった。
- 7) 分解性スクリーニング試験結果は、pH条件や光の有無によらず、著しい分解性は見られなかった。
- 8) 保存性試験の結果、保存性は良好であった。
- 9) 河川水（旭川乙井手堰）及び海水（水島沖）から、対象物質は検出されなかった。

なお、本研究は環境省委託の平成23年度化学物質分析法開発調査（環境省環境安全課）と連携して実施した。

文 献

- 1) 環境省総合環境政策局環境保全部環境安全課：化学物質環境汚染実態調査の手引き（平成20年度版），平成21年3月，2009
- 2) 根本了，小林麻子，高附巧，佐々木久美子，豊田正武：食品中の2,4,6-トリ-*tert*-ブチルフェノール及び関連化合物の分析，食品衛生学雑誌，42，359-366，2001
- 3) 環境省環境管理局水環境部企画課：要調査項目等調査マニュアル（水質，底質，水生生物），平成15年3月，73-83，2003
- 4) 環境省環境保健部環境安全課：平成15年度化学物質分析法開発調査報告書（兵庫県立健康環境科学研究センター），平成16年8月，96-112，2004
- 5) 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課：平成20