

水及び底質中の2-tert-ブチル-4-メトキシフェノールの分析法の検討

小 輪 瀬 勉*, 眞 木 俊 夫*

A Method for Determination of 2-tert-Butyl-4-methoxyphenol in Water and Sediment

TSUTOMU KOWASE* and TOSHIO MAKI*

Keywords : 2-tert-ブチル-4-メトキシフェノール 2-tert-butyl-4-methoxyphenol, tert-ブチルヒドロキシアニソール tert-butylhydroxyanisole. 酸化防止剤 antioxidant, ガスクロマトグラフ/質量分析法

緒 言

2-tert-ブチル-4-メトキシフェノール(以下BMPと称す, 別名: tert-ブチルヒドロキシアニソール, 図1)は, 化粧品, プラスチック類, 食品等の酸化防止剤として現在広く使用されている. 毒性についてはラット等を用いた実験において, 発育抑制, 腎臓における細尿管の変性¹⁾, 酵素阻害²⁾等の誘発, さらに内分泌かく乱作用が確認された報告³⁾がある.

今回, BMPについて環境水及び底質からのガスクロマトグラフ/質量分析計(以下GC/MSと称す)による分析法の開発を行い, 良好な結果が得られたので報告する.

実験の部

1. 試薬

BMP: メルク社製, ヘキサン, メタノール, 塩化ナトリウム, 無水硫酸ナトリウム: 残留農薬試験用, L-アスコルビン酸, 塩酸, ピロガロール, 硫酸銅: 試薬特級, ナフタレン-d₈: 和光純薬工業(株)製, グラファイトカーボンカートリッジカラム: スペルコ社製 Envi-carb (250mg) 使用前にアセトン 5 ml及びヘキサン10mlで洗浄した.

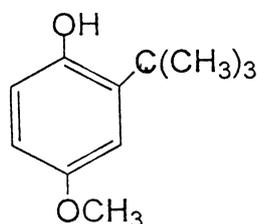


図1. 2-tert-ブチル-4-メトキシフェノール (BMP)

2. 標準液の調製

BMPをヘキサンに溶解し, 1,000 µg/ml溶液を作成し, 標準原液とした. この溶液を適宜希釈して0.05~0.2 µg/mlの濃度系列を調製し, 検量線用標準液とした.

3. 内標準液の調製

内標準液: ナフタレン-d₈100 µg/mlのヘキサン溶液 1.0mlをヘキサンで100mlとした.

4. GC/MS条件

カラム: Ultra-2, 膜厚0.52 µm, 内径0.32mm×長さ25m, カラム温度: 50 (1分保持) - 10 /分-280, 注入口: 250, トランスファーライン温度: 280, 注入法: スプリットレス, キャリアーガス流量: 1.5 ml/min (He), イオン源温度: 250, イオン化電流: 300 µA, イオン化エネルギー: 70eV, モニターイオン: BMPm/z165 (確認用137,180), ナフタレンd₈m/z136.

5. 添加回収実験

5.1 水質試料

精製水 1 Lを 2 Lの分液ロートに取り, BMP0.05 µgを添加し, L-アスコルビン酸 1 g及び試料中の濃度が3%となるよう塩化ナトリウムを加え, 完全に溶解した後, 塩酸を用いてpHを約2に調整し, ヘキサン50mlを加え, 10分間振とう抽出し, 静置後ヘキサン層を分取した. 水層に再びヘキサン50mlを加え, 同様に抽出しヘキサン層を合わせ, 無水硫酸ナトリウムで脱水した. グラスウールでろ過後, 0.2%ピロガロール/メタノール溶液(以下ピロガロールと称す, なお, この溶液は1週間毎に作り替える) 50 µlを加え, ロータリーエバポレーター

* 東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3-24-1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

を用いて40 以下で約3 mlまで濃縮した。さらに窒素気流中で溶媒がわずかに残る程度に濃縮（以下乾固と称す）し、内標準液を20 μ l 加え、ヘキサンを用いて1 mlとし、測定用試験溶液とした。この溶液1 μ l をGC/MSに注入し、シングルイオンモニター（以下SIMと称す）で測定した。なお、精製水の他に海水及び河川水試料については、各々1 Lに対して0.05 μ gを添加し回収実験を行った。

5.2 底質試料

試料20g（隅田川河口の底質を3,000 rpmで遠心分離した残渣）を500mlの丸底フラスコに取り、BMP0.16 μ gを加え4 で一晩放置した後、10%硫酸銅40ml、リン酸4 ml、アスコルビン酸2 gを加え、受器にヘキサン10 mlを入れて水蒸気蒸留を行う。

留液が150mlになるまで蒸留を行い、留液全量を300mlの分液口 - トに入れ、受器を5 mlのヘキサンで2回洗い、これを先の分液口 - トに入れ、L-アスコルビン酸0.2g、塩化ナトリウム9 g及び塩酸0.6mlを加え、10分間振とう抽出し、静置後ヘキサン層を分取した。水層に再びヘキサン10mlを加え、同様に抽出し、静置後ヘキサン層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水した。ガラスウールで過後、ピロガロール50 μ lを加え、ロータリーエバポレーターを用いて40 以下で約3 mlまで濃縮した。

さらに窒素気流中で1 mlとし、グラファイトカーボンカートリッジカラム（以下グラファイトと称す）に負荷し、容器を少量のヘキサンで洗い込み、ヘキサンで溶出し、初流から5.0mlを採取した。

この液を窒素気流中で1 ml以下とし、内標準液を20 μ l 加えヘキサンで1 mlとし、測定用試験溶液とした。

この溶液1 μ l をGC/MSに注入し、SIMで測定した。（底質試料の場合はモニターイオンm/z165において妨害が見られた場合、多少感度は低下するがm/z180で測定した）

結果及び考察

1. 水試料における抽出時のpHの影響

海水や河川水等の環境水中のBMPの抽出率に及ぼすpHの影響について検討した。すなわち精製水1 Lを塩酸及び水酸化ナトリウムでpH2 ~ 12になるように調整し、各々にBMP0.2 μ gを添加し抽出率を求めた。その結果は図2に示したようにpH2, 3で90%以上抽出され、特にpH2では振とう後のヘキサンと水層の分離が良好であった。そこで抽出はpH2で行うこととした。

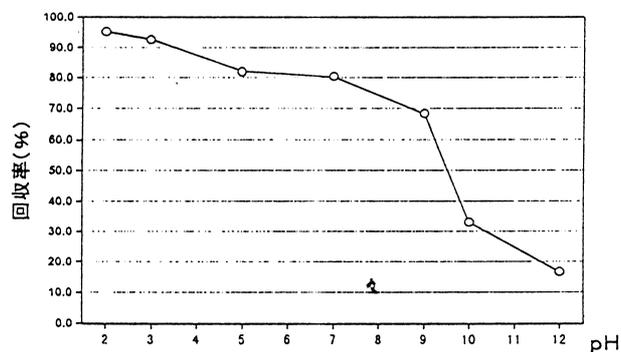


図2. pHによるBMPの抽出に及ぼす影響
添加量：0.1 μ g/L

2. 濃縮時におけるピロガロールの添加効果

BMPは濃縮操作中で分解され、回収率の低下が見られた。そこでBMPが0.1 μ g/100ml含むヘキサン溶液にピロガロール50 μ lを添加し濃縮を行った。その結果、回収率は無添加の場合64.5%であったのに対し、添加した場合は、99.4%であった。ピロガロールの添加によりBMPはほとんど分解されないことが分かった。

3. 底質試料における水蒸気蒸留条件の検討

3.1 L-アスコルビン酸の添加

0.1 μ g/20gのBMPを含む試料についてL-アスコルビン酸添加及び無添加のものをそれぞれ水蒸気蒸留を行い、回収率を検討した。その結果、回収率は添加しない場合で46.5%、添加した場合で81.5%でありL-アスコルビン酸の添加により良好な回収率が得られた。

3.2 留液量の検討

水蒸気蒸留においてBMPの蒸留状況を検討するため、留液を50mlずつ500mlまで採取し、各々BMP量を測定した。その結果、図3に示したように150mlで全量が留出することが判明した。従って水蒸気蒸留における留液の採取量は初流から150mlとした。

4. 底質試料におけるグラファイトによるクリーンアップの検討

底質試料は水蒸気蒸留後ヘキサン抽出を行ったが、

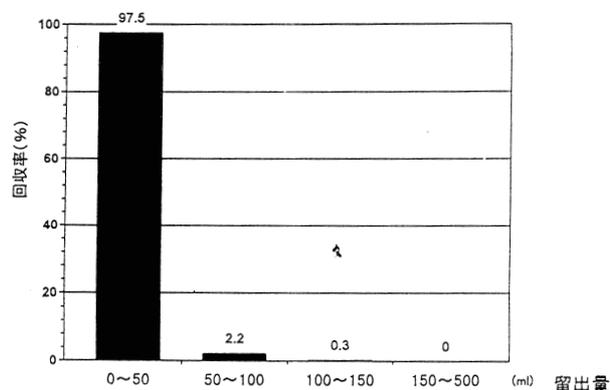


図3. BMPの水蒸気蒸留による留出
添加量：0.1 μ g/20g

GC/MS測定時に夾雑物による妨害ピークの影響を取り除くことができなかった。さらにグラファイトによる精製操作が必要であると考えられた。そこで、0.1 µg/ml BMPヘキサン溶液 1 mlをグラファイトに負荷して溶出溶媒にヘキサン 5 mlを用いて溶出し、1 mlずつのフラクションに分画して溶出した際の各々の分画のBMP溶出量を測定した。その結果は図4のような溶出分布を示し、BMPは4 mlでほぼ全量溶出することが分かった。そこでグラファイトからのヘキサン溶出液の採取料は、初流から5 mlとした。その結果、着色物質等は完全に除去することができた。

なお、その他Sep-PakPlusについて溶出溶媒として、1%アセトン含有ヘキサン及び1%酢酸エチル含有ヘキサンを用いて検討したところ、回収率は最高でも60%程度であり、クリーンアップ法としては不適当であった。

5. SIMクロマトグラム及び検量線

本法によるGS/MS条件で得られたBMP50pg及びナフトレン_d₈20pgを各々含む標準液及び内標準液のSIMクロマトグラムを図5に示した。両物質とも良好なクロマトグラムが得られた。また、BMP20~150pgの範囲における検量線を図6に示した。内標準物質ナフトレン_d₈

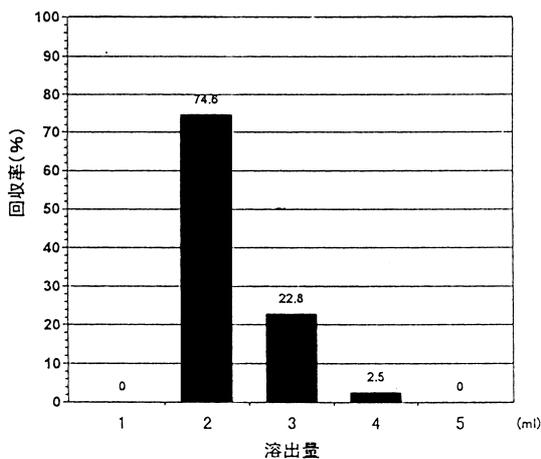


図4. BMPのグラファイトからの溶出
添加量: 0.1 µg

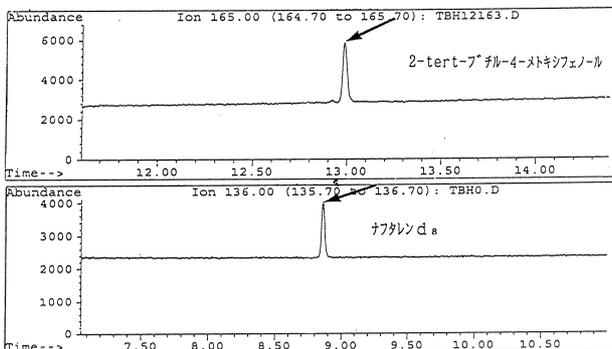


図5. BMP標準品及び内部標準品のSIMクロマトグラム
BMP: 50pg, ナフトレン_d₈: 20pg

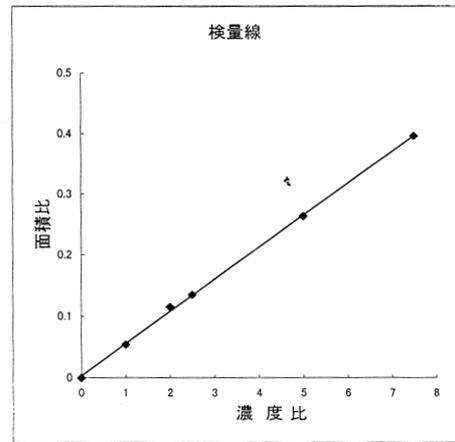


図6. BMPの検量線

表1. 添加回収実験結果

試料	試料量	添加量 (µg)	n	平均回収率 (%)	変動率 (%)
精製水	1L	0.05	4	97.7	3.14
精製水	1L	0.1	4	98.2	2.09
精製水	1L	0.2	4	97.0	3.12
河川水	1L	0.05	4	98.0	4.34
海水	1L	0.05	4	93.6	3.40
底質	20g	0.16	7	75.3	4.81

20pgに対する濃度比と面積比により検量線を作成したところ、図6に示したように良好な直線性が得られた。

6. 回収率

本試験法による水試料及び底質試料における、BMP添加回収実験結果を表1に示した。水試料では、回収率93.6~98.2%、変動率2.09~4.34%であり良好な結果が得られた。

なお、海水及び河川水等の水試料はSIMのクロマトグラム上に妨害物質は見られなかったことから、グラファイトによるクリーンアップ操作は不要であった。

また、底質における回収率は75.3%、変動率4.81%であり満足できる結果であった。

海水、河川水及び底質における分析例、及びこれらにBMPを添加した際のSIMクロマトグラムを図7, 8,

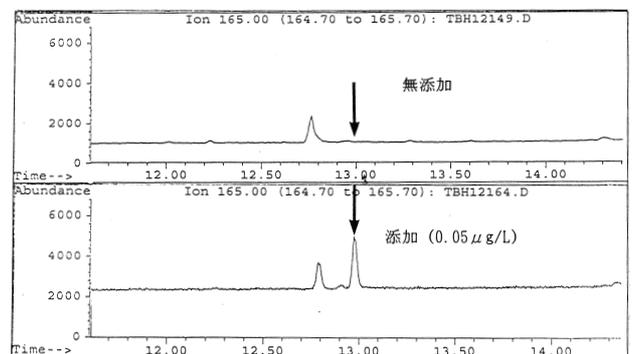


図7. 海水からのBMPのSIMクロマトグラム

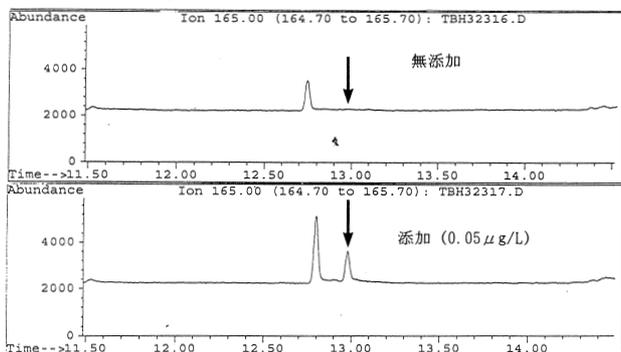


図 8 . 河川水からのBMPのSIMクロマトグラム

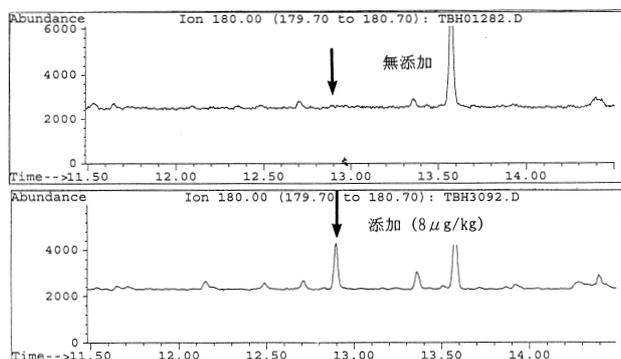


図 9 . 底質からのBMPのSIMクロマトグラム

9にそれぞれ示した。

7. 検出限界及び定量限界

本試験法の検出限界は、水試料では試料採取量を1Lとした場合で0.016 μg/L、底質では試料を20gとした場

合で0.92 μg/kg (wet)であった。また、定量限界は水試料では、試料採取量を1Lとした場合、0.056 μg/Lであった。

なお、この値は環境庁環境保健部調査室発行の「検出限界及び定量限界の算出方法」により算出したものである。

まとめ

BMPは化粧品、プラスチック類、食品等の酸化防止剤として広く使用されており、今後環境中での汚染が懸念される物質である。

そこで、BMPによる環境汚染の指標となる海水、河川水及び底質における分析法の検討を行った。その結果、水試料で0.016 μg/l、底質試料で0.92 μg/kgレベルで測定できる試験法を作製することができた。

なお、本物質は、平成12年度の環境庁化学物質環境汚染実態調査の測定対象物質であり、本法を用いて全国調査を行う予定である。

文 献

- 1) 平賀興吾, 林田志信, 市川久次, 他: 東京衛研年報, 22, 231, 1970.
- 2) Munday, R., Smith, B. and Munday, C.: *Chem. Bio. Intera ct*, 117, 241-256, 1999.
- 3) 大久保智子, 長井二三子, 鈴木孝人, 他: 日本内分泌攪乱化学物質学会第2回研究発表会要旨集, p.50, 1999.