

p-クレゾール

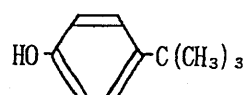
p-tert-ブチルフェノール

2,6-ジ-tert-ブチルフェノール

4-メチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノール

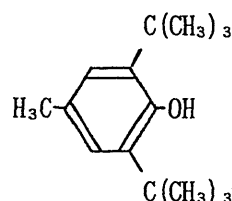
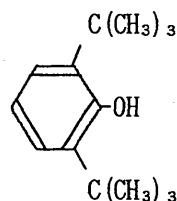
① p-クレゾール

② p-tert-ブチルフェノール



③ 2,6-ジ-tert-ブチルフェノール

④ 4-メチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノール



物質	分子量	比重	融点(℃)	沸点(℃)	log Pow	水溶解度(g/l)
①	108.1	1.0341	34.78	201.88	1.94	21.52
②	150.2	0.9081	98	237	3.27*	不溶
③	206.3	0.860	39	253	3.11*	不溶
④	220.3	1.048	71	265	5.14*	不溶

*: 実測値 (参考値)

§ 1 分析法

本分析法はジクロロメタンの代替溶媒としてペンタン-ジエチルエーテル(3:1,v/v)を使用することを特徴とする。水質試料については、塩酸酸性下ペンタン-ジエチルエーテル(3:1,v/v)で抽出し、濃縮後フロリジルカラムでクリーンアップしてキャピラリーGC/MS (SIM) により定量する。底質及び生物試料については、塩酸酸性下ペンタン-ジエチルエーテル(3:1,v/v)で抽出・濃縮後、アセトニトリルに分配し、水に溶解させて、以後水質試料と同様に操作、定量する。

試験法

【試料の採取及び保存】

水質試料の採取にあたっては、ヘッドスペースが残らないように満水にした後、密栓して冷蔵保存する。試料

採取後はできるだけ速やかに分析する。

【試料の前処理】

【水質試料】 試料200mlを分液ロートに採り（注1）、濃塩酸5mlとペンタン-ジエチルエーテル（3:1, v/v）50mlを加え、10分間振とう後静置する。有機相を分取後、水相について更に2回、ペンタン-ジエチルエーテル（3:1, v/v）50mlずつを用いて、同様の抽出操作を行う。有機相を合わせ、無水硫酸ナトリウム10gを詰めたガラスフィルターを通し、脱水する。脱水した有機相をKD濃縮器に入れ、0.1%ピロガロール/メタノール溶液（注2）0.1mlを加えて5ml以下まで常圧下で濃縮する。次いで、濃縮液をフロリジルカラムに負荷し、0.2%ジエチルアミン/ペンタン-ジエチルエーテル溶液50mlで溶出する（注3）。得られた溶出液に0.1%ピロガロール/メタノール溶液0.1ml及び内標準液0.5mlを添加し、KD濃縮器を用いて5ml程度までで常圧濃縮する（浴温55～60℃）。次いで、受器をKD濃縮器からはずし、これにスニーター管を直接取り付け0.5ml程度まで常圧濃縮する（注4）。得られた濃縮液をヘキサンで1mlに調整し試験溶液とする。

【底質及び生物試料】 底質の場合は試料10g、生物の場合は試料5gと塩化ナトリウム10g（注5）を、遠沈管に採取後、1N塩酸50mlを加えてシャフト型ホモジナイザーで5分間攪拌し均一化する。次に、ペンタン-ジエチルエーテル（3:1, v/v）50mlを加え、更に5分間攪拌・混和後、遠心分離する（注6）。上層（有機相）を分取後、下層（水相）についてはペンタン・ジエチルエーテル（3:1, v/v）50mlずつで更に2回同様に処理する。有機相を合わせ無水硫酸ナトリウム10gを詰めたガラスフィルターを通し、脱水する。脱水した有機相に0.1%ピロガロール/メタノール溶液0.1ml及びヘキサン0.5mlを加え、KD濃縮器を用いて5ml程度まで常圧濃縮する。次いで、受器をKD濃縮器からはずし、これにスニーター管を直接取り付け0.5ml程度まで常圧濃縮する。得られた濃縮液をペンタンで5mlに調整した後、ペンタン飽和アセトニトリル5mlと振り混ぜ、静置後アセトニトリル相を分取する。ペンタン相についてペンタン飽和アセトニトリル5mlずつで更に2回同様の操作を行う。アセトニトリル相を合わせて、これを精製水200mlと濃塩酸5mlの入った分液ロートに注ぎ混和後、以下水試料の場合と同様に操作する。

【空試験溶液の調製】

水質、底質及び生物試料については、それぞれの試料と同量の精製水を用い、試料の前処理法に従って操作して得られた試験溶液を、空試験溶液とする。

【標準液の調製】

4種の対象フェノール類各10mgを精秤し、アセトンで正確に100mlとして、100µg/mlの標準原液とする。内標準のフルオレン-d₁₀についても同様に100µg/mlの標準原液を調製する。検量線用の標準系列は各原液を混合し、ヘキサンで適宜希釈して0.05～0.5µg/mlの範囲で調製する。標準系列中のフルオレン-d₁₀濃度は0.2µg/mlとする。添加試験用の標準液は、対象フェノール類の標準原液4種を混合しアセトンで希釈して調製する（水質用:0.1µg/ml、底質及び生物用:1.0µg/ml）。試験溶液に内標準として添加するフルオレン-d₁₀溶液は、原液（100µg/ml）をヘキサンで希釈して0.4µg/mlに調製したものを使用する。

【測定】

GC/MS-SIM測定条件

使用機種：MS；VG TRIO-1, GC；HP-5890II

使用カラム：CHROMPACK CP-Sil 5CB（25m x 0.25mm; 0.12µm）

カラム温度：40℃（2分）、10℃/分、160℃（1分）

注入口温度：180℃

インターフェイス温度：200℃

キャリアーガス：He（カラムヘッド圧：120Pa）

注入方法：スプリットレス（パージオフ時間：1.0分）

イオン源温度：200℃

イオン化電流：150μA

モニターイオン：

- | | |
|-----------------------------|----------------------|
| ①p-クレゾール； | 107 (定量用), 108 (確認用) |
| ②p-tert-ブチルフェノール； | 135 (定量用), 150 (確認用) |
| ③2,6-ジ-tert-ブチルフェノール； | 191 (定量用), 206 (確認用) |
| ④4-メチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノール； | 205 (定量用), 220 (確認用) |
| フルオレン-d ₁₀ ； | 176 |

[検量線]

検量線用標準系列1μlをGC/MSに注入し、フルオレン-d₁₀に対する各フェノール類のピーク面積比から検量線を作成する。

[定量]

試験溶液1μlをGC/MSに注入し、各フェノール類のピーク面積と内部標準のピーク面積比から検量線により定量値を求める。

[計算]

計算値 (μg/ml, μg/g) = 検出量 (μg) / 試料量 (ml, g)

[検出限界及び定量限界]

本分析法に基づく検出限界及び定量限界を次に示す(注8)。

	試料量	検出限界	定量限界
①p-クレゾール；			
水質	200ml	0.23 (μg/l)	0.75 (μg/l)
底質	10g	28 (μg/kg)	
生物	5g	60 (μg/kg)	
②p-tert-ブチルフェノール；			
水質	200ml	0.27 (μg/l)	0.90 (μg/l)
底質	10g	34 (μg/kg)	
生物	5g	35 (μg/kg)	
③2,6-ジ-tert-ブチルフェノール；			
水質	200ml	0.21 (μg/l)	0.69 (μg/l)
底質	10g	25 (μg/kg)	
生物	5g	34 (μg/kg)	
④4-メチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノール			
水質	200ml	0.17 (μg/l)	0.55 (μg/l)
底質	10g	44 (μg/kg)	
生物	5g	50 (μg/kg)	

試薬・器具

【試薬】

p-クレゾール、p-tert-ブチルフェノール、2,6-ジ-tert-ブチルフェノール、4-メチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノール、ピロガロール、ジエチルアミン：試薬特級

アセトニトリル、ヘキサン、アセトン、無水硫酸ナトリウム、塩化ナトリウム：残留留農薬分析用

塩酸：試薬特級を等量のヘキサンで3回洗浄したもの。

フロリジル：Floridin Co.製（60-100mesh）を130℃で4時間活性化し、デシケーター中で放冷したもの。

フルオレン-d₁₀：Cambridge Isotope Lab.製

ペンタン：試薬特級をKD濃縮器を用いて再蒸留したもの

ジエチルエーテル：残留農薬分析用をKD濃縮器を用いて再蒸留したもの（注7）。

ペンタン-ジエチルエーテル（3:1, v/v）：ペンタンとジエチルエーテルを容量比（3:1）で混合したもの。

0.1%ピロガロール／メタノール溶液：ピロガロール0.1gをメタノール100mlに溶解したもの。

0.2%ジエチルアミン／ペンタン・ジエチルエーテル溶液：ジエチルアミン0.2mlをペンタン・ジエチルエーテル（10:1, v/v）に溶解したもの。

【器具】

フロリジルカラム：フロリジル3gをペンタン-ジエチルエーテル（10:1, v/v）に懸濁させ、2,3分間超音波を照射して脱気してからカラムに充填し、更にフロリジル層の上に無水硫酸ナトリウム2gを積層させる。

KD濃縮器：溶媒濃縮及び溶媒精製に使用する。

スニード管（3球）：溶媒濃縮に使用する。KD濃縮器の受器と接合できるもの。

シャフト型ホモジナイザー：底質及び生物試料の均一化及び溶媒抽出に使用する。

超音波洗浄器：フロリジルカラムに気泡が入るのを防止するための脱気処理に使用する。

クロマト管：内径1cm、長さ30cmのものを使用する。

分液ロート（500ml）：水質試料の溶媒抽出に使用する。

ガラスフィルター（G3）：無水硫酸ナトリウム10gを詰めて使用することにより、抽出溶媒を脱水する。

遠沈管：容量200mlのものを使用する。

分析法注解

注1）試料中に酸化性物質が存在すると、フェノール類（特に、2,6-ジ-tert-ブチルフェノールと4-メチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノール）は酸化され、分解してしまうので、添加回収実験を行う場合は試料採取後、ピロガロール100mgを添加する。

注2）濃縮行程での2,6-ジ-tert-ブチルフェノール及び4-メチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノールの分解を防止する目的で添加する。

注3）溶出液は50ml全量採取する。

注4）KD濃縮の前段に0.1%ピロガロール／メタノール溶液0.1mlと内標準液（フルオレン-d₁₀のヘキサン溶液）0.5mlを加えたので、浴温55～60℃でペンタン-ジエチルエーテル（3:1, v/v）を完全に留去したとき、約0.5mlが受器に残る。これによって対象フェノール類の揮散が防止できる。

注5）底質の場合は塩化ナトリウムを加えなくてよい。

注6）ホモジナイザーで攪拌・混和する際、必要なら容器を水浴で冷却する。遠心分離は3000r.p.m.で5分間行う。

注7）ジエチルエーテル中には4-メチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノールが1～3ppm程度添加されているので、再蒸留してから使用する。初留約10%と釜残約10%を廃棄する。

注8）検出限界及び定量限界は「検出限界の定め方について」（平成2年5月29日）より、以下の通り算出した。

p-クレゾール	水 質			底質 (n=7)	生物 (n=4)	
試料濃度 (μg/l)	0.5	1.0	1.5	検出限界推定値 (μg/kg)	22.5	45.0
応答値 (X)	0.670	1.416	1.910	試料濃度 (μg/kg)	100	200
標準偏差 (δR)	0.0351	0.0617	0.0910	分析値	79.5	162
検出力 (Dn)	0.0417	0.0693	0.1137	標準偏差	8.90	13.2
		0.0745		検出限界	28.0	59.9
検出限界 (D3)		0.225		95%信頼区間	17.9~61.5	38.3~132
定量限界 (D10)		0.749				
不偏分散 (Fd)		6.72				

p-tert-ブチルフェノール	水 質			底質 (n=7)	生物 (n=4)	
試料濃度 (μg/l)	0.5	1.0	1.5	検出限界推定値 (μg/kg)	27.1	54.2
応答値 (X)	0.812	1.840	2.807	試料濃度 (μg/kg)	100	200
標準偏差 (δR)	0.0805	0.109	0.115	分析値	88.2	164
検出力 (Dn)	0.0790	0.0942	0.0978	標準偏差	10.8	7.72
		0.0903		検出限界	33.9	35.1
検出限界 (D3)		0.271		95%信頼区間	21.7~74.6	22.5~77.2
定量限界 (D10)		0.903				
不偏分散 (Fd)		2.04				

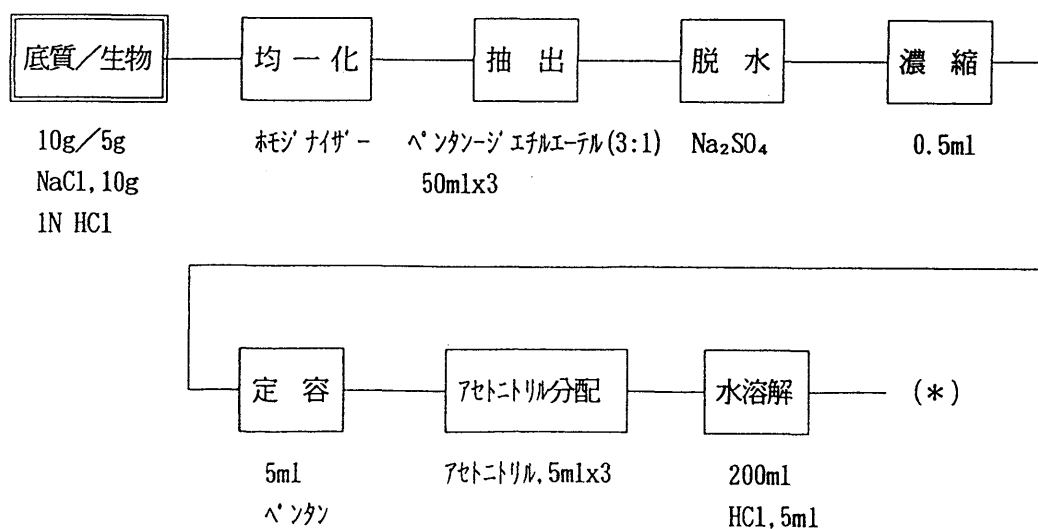
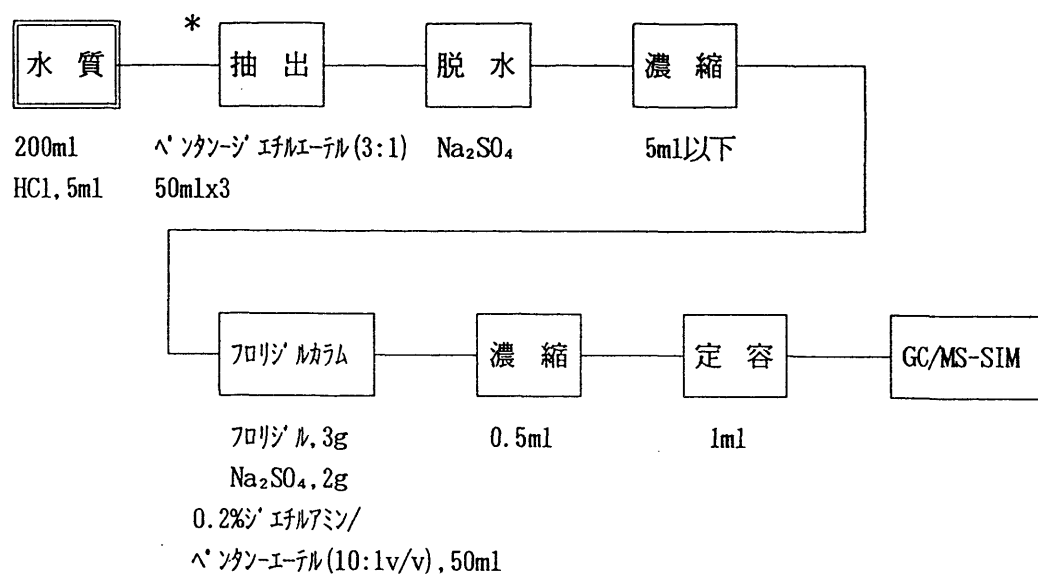
2,6-tert-ブチルフェノール	水 質			底質 (n=7)	生物 (n=4)	
試料濃度 (μg/l)	0.5	1.0	1.5	検出限界推定値 (μg/kg)	20.6	41.2
応答値 (X)	0.805	1.689	1.745	試料濃度 (μg/kg)	100	200
標準偏差 (δR)	0.0340	0.0721	0.0766	分析値	79.2	205
検出力 (Dn)	0.0336	0.0679	0.1048	標準偏差	7.84	7.38
		0.0688		検出限界	24.6	33.5
検出限界 (D3)		0.206		95%信頼区間	15.7~54.1	21.4~73.7
定量限界 (D10)		0.688				
不偏分散 (Fd)		5.07				

4-メチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノール	水 質			底質 (n=7)	生物 (n=4)	
試料濃度 (μg/l)	0.5	1.0	1.5	検出限界推定値 (μg/kg)	16.5	33.0
応答値 (X)	0.864	1.762	2.583	試料濃度 (μg/kg)	100	200
標準偏差 (δR)	0.0590	0.0392	0.0812	分析値	105.4	196
検出力 (Dn)	0.0543	0.0354	0.0750	標準偏差	13.9	15.9
		0.0549		検出限界	43.7	49.9
検出限界 (D3)		0.165		95%信頼区間	28.0~96.1	46.2~159
定量限界 (D10)		0.549				
不偏分散 (Fd)		4.29				

§2 解説

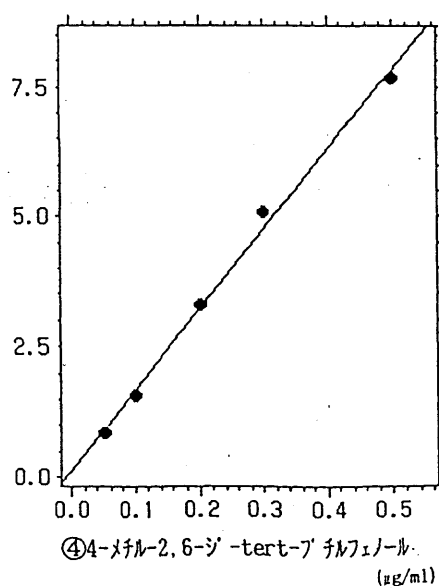
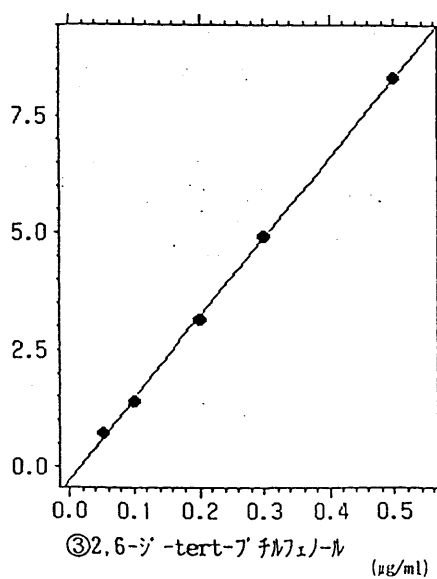
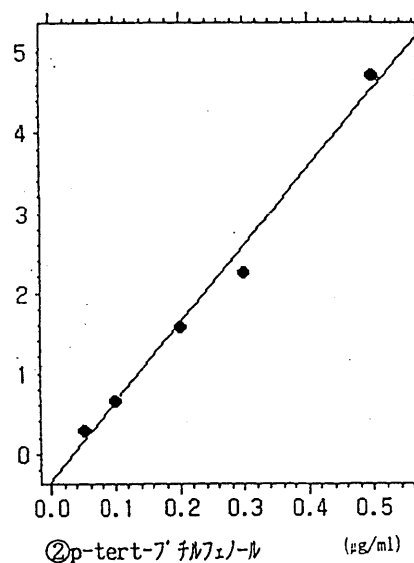
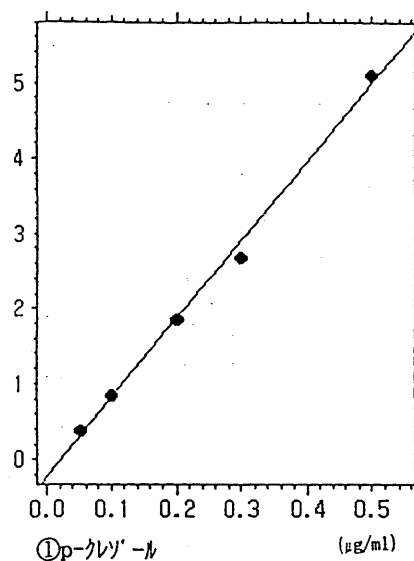
【分析法】

【フローチャート】



[分析法の検討]

1. 検量線



2. ピロガロールの添加効果

2,6-ジ-tert-ブチルフェノール及び4-メチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノールは濃縮中に分解し、回収率が低下するので、分解を防ぐ目的で、ピロガロールを添加した。表1に0.1%ピロガロール/メタノール溶液0.1mlを添加した場合と添加しなかった場合の回収率を示す。

	p-クレゾール	p-tert-ブチルフェノール	2,6-ジ-tert-ブチルフェノール	4-メチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノール
無添加	72.3%	81.5%	42.6%	31.1%
添加	95.4%	98.7%	101.2%	96.7%

3. フロリジールカラムによるクリーンアップ

溶離液としてペンタン-ジエチルエーテル(3:1, v/v)を用いた場合、2,6-ジ-tert-ブチルフェノール及び4-メチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノールは40~50mlで全量溶出するが、p-クレゾール及びp-tert-ブチルフェノールは全く溶出しなかった。そこで、ペンタン・ジエチルエーテル(10:1, v/v)にジエチルアミンを0.2vol%添加したところ、40~50mlで4種のフェノールが全量溶出した。

4. 添加回収率

対象物質	試料	試料量	添加量(μg)	回収率(%)	変動率(%)
①p-クレゾール	精製水	200ml	0.1	92.3	4.3
			0.2	88.1	3.7
			0.3	93.5	3.3
	海水	200ml	1.0	94.6	5.6
	底質	10g	1.0	79.5	11.2
	生物	5g	1.0	81.2	8.1
②p-tert-ブチルフェノール	精製水	200ml	1.0	95.2	6.4
			0.2	89.4	4.4
			0.3	96.1	3.0
	海水	200ml	1.0	93.8	8.1
	底質	10g	1.0	88.2	12.3
	生物	5g	1.0	82.1	4.7
③2,6-ジ-tert-ブチルフェノール	精製水	200ml	1.0	91.6	5.4
			0.2	82.0	4.3
			0.3	81.9	3.5
	海水	200ml	1.0	93.9	6.5
	底質	10g	1.0	79.2	9.9
	生物	5g	1.0	102.5	7.2
④4-メチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノール	精製水	200ml	1.0	103.5	4.2
			0.2	89.4	2.7
			0.3	90.2	3.5
	海水	200ml	1.0	98.2	5.6
	底質	10g	1.0	105.4	13.2
	生物	5g	1.0	98.2	8.1

5. 分解性スクリーニング

①p-クレゾール

pH	5日後		
	1時間後	暗所	光照射
5	102	103	—
7	98	103	96
9	101	102	—

②p-tert-ブチルフェノール

pH	5日後		
	1時間後	暗所	光照射
5	101	100	—
7	102	98	92
9	100	101	—

③2,6-ジ-tert-ブチルフェノール

pH	5日後		
	1時間後	暗所	光照射
5	99	100	—
7	98	70	32
9	100	81	—

④4-メチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノール

pH	5日後		
	1時間後	暗所	光照射
5	100	101	—
7	98	66	28
9	99	77	—

(初期濃度: 10 μ g/ml)

6. 対象フェノール類のマススペクトル

図1にp-クレゾール、p-tert-ブチルフェノール、2,6-ジ-tert-ブチルフェノール及び4-メチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノールのマススペクトルを示す。

7. 標準液及び分析例クロマトグラム

図2に標準物質、図3(1、2、3)に添加試料、図4(1、2、3)に無添加試料のSIMクロマトグラムを示す。

8. 実試料の分析

本分析法により東京湾の海水、底質及び生物試料について分析を行ったところ、海水からp-クレゾール、p-tert-ブチルフェノール、2,6-ジ-tert-ブチルフェノール及び4-メチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノール、底質からp-クレゾール及び4-メチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノール、生物からp-クレゾール及び4-メチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノールが検出された。

【評価】

本分析法により、環境中に存在するp-クレゾール、p-tert-ブチルフェノール、2,6-ジ-tert-ブチルフェノール及び4-メチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノールを測定することが可能である(水質:0.17~0.27 μ g/l, 底質:25~44 μ g/kg, 生物:34~60 μ g/kg)。

参考文献

- 1) 日本薬学会編: 衛生試験法注解1990, p163-470.
- 2) WHO: Environmental Health Criteria 168 (Cresols).

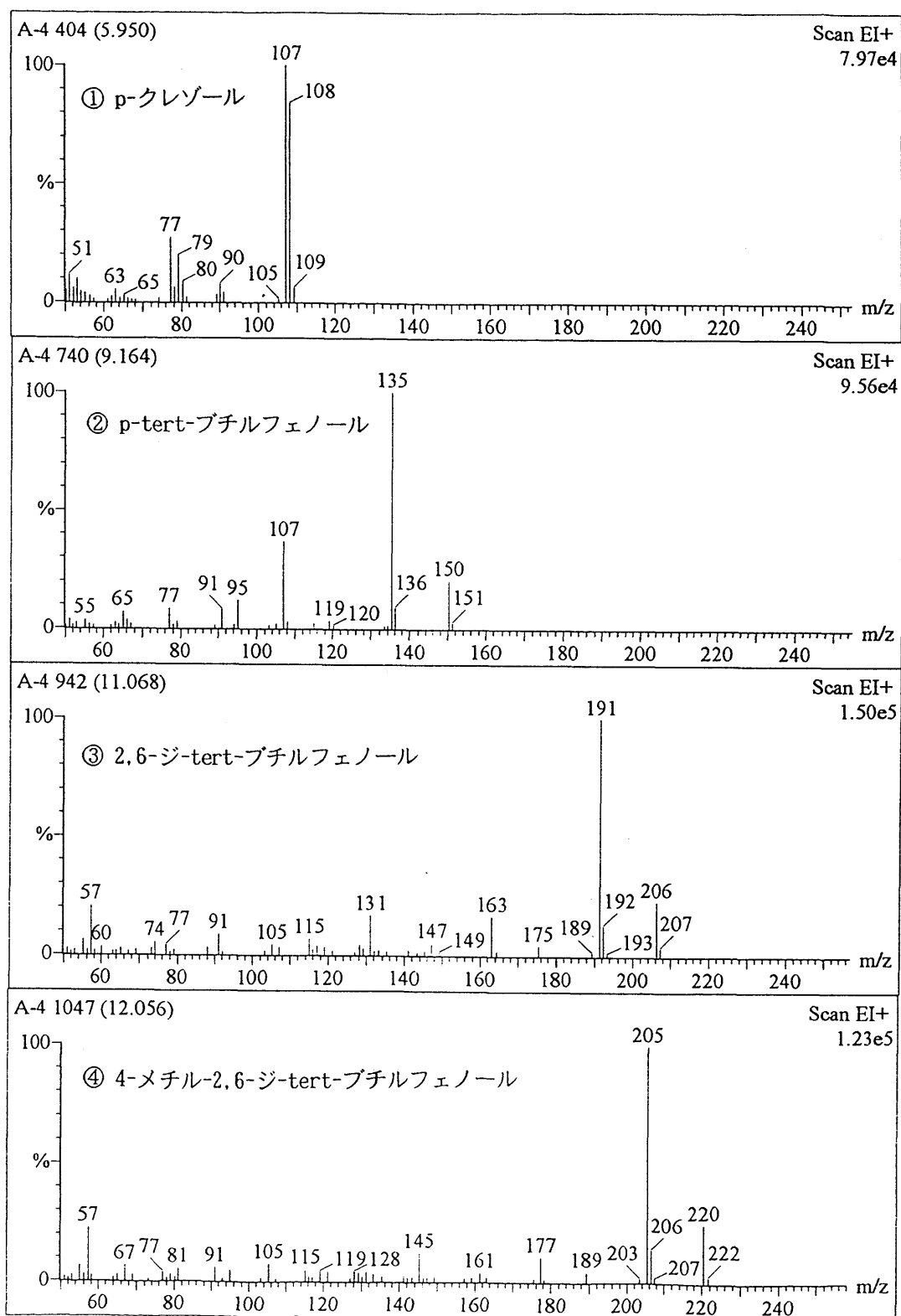


図1 対象フェノール類のマスペクトル

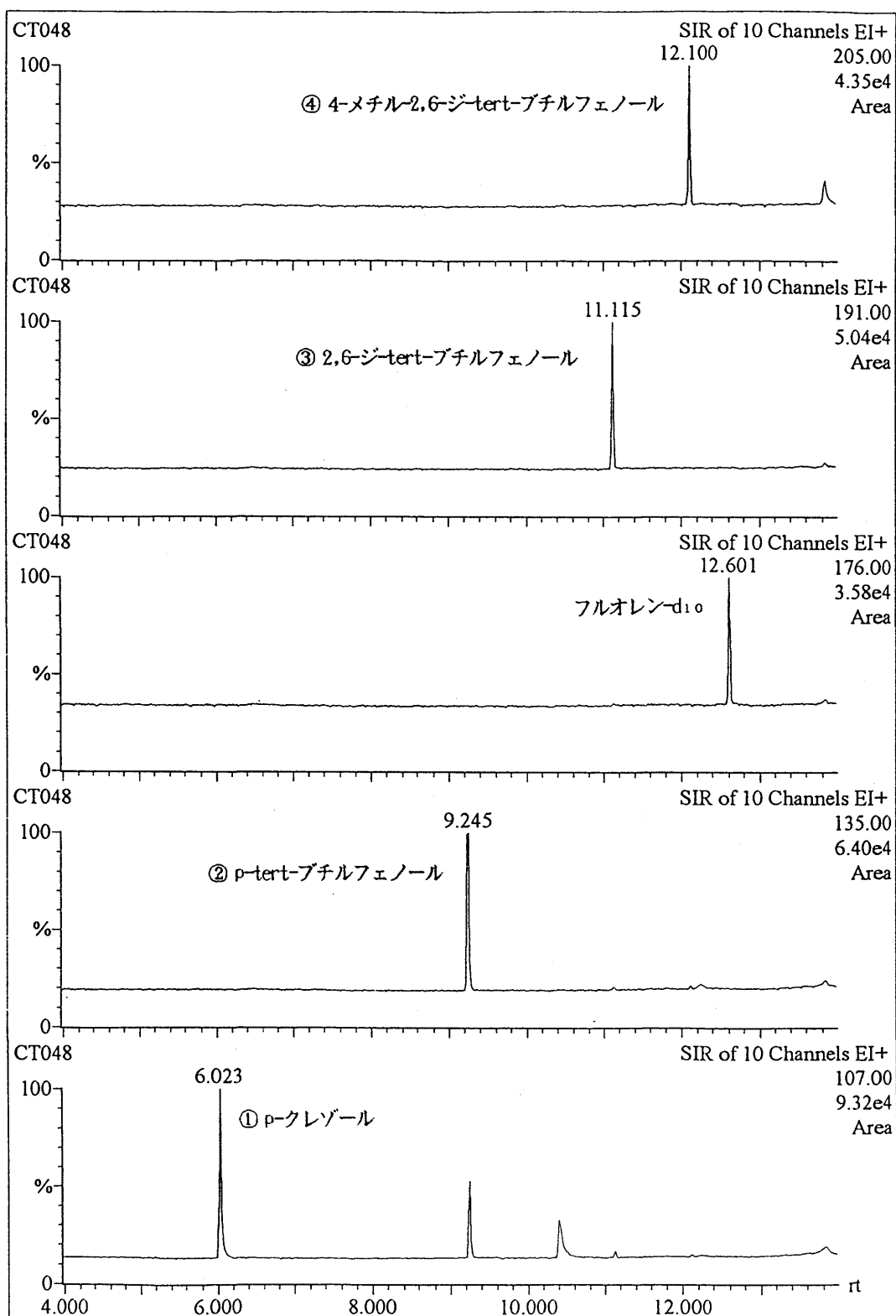


図2 標準物質のSIMクロマトグラム

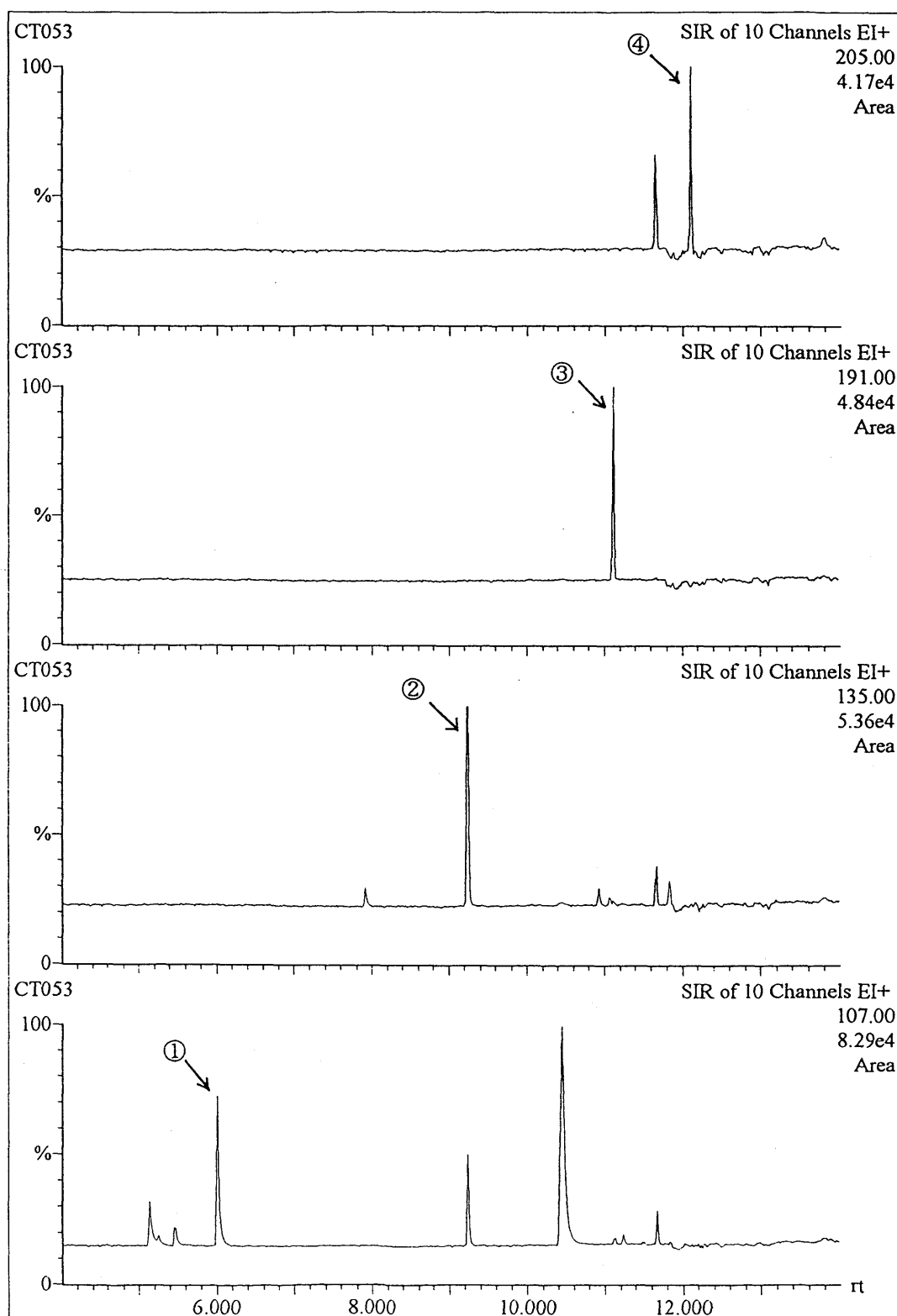


図3-1 水質試料のSIMクロマトグラム (0.2 μ g 添加)

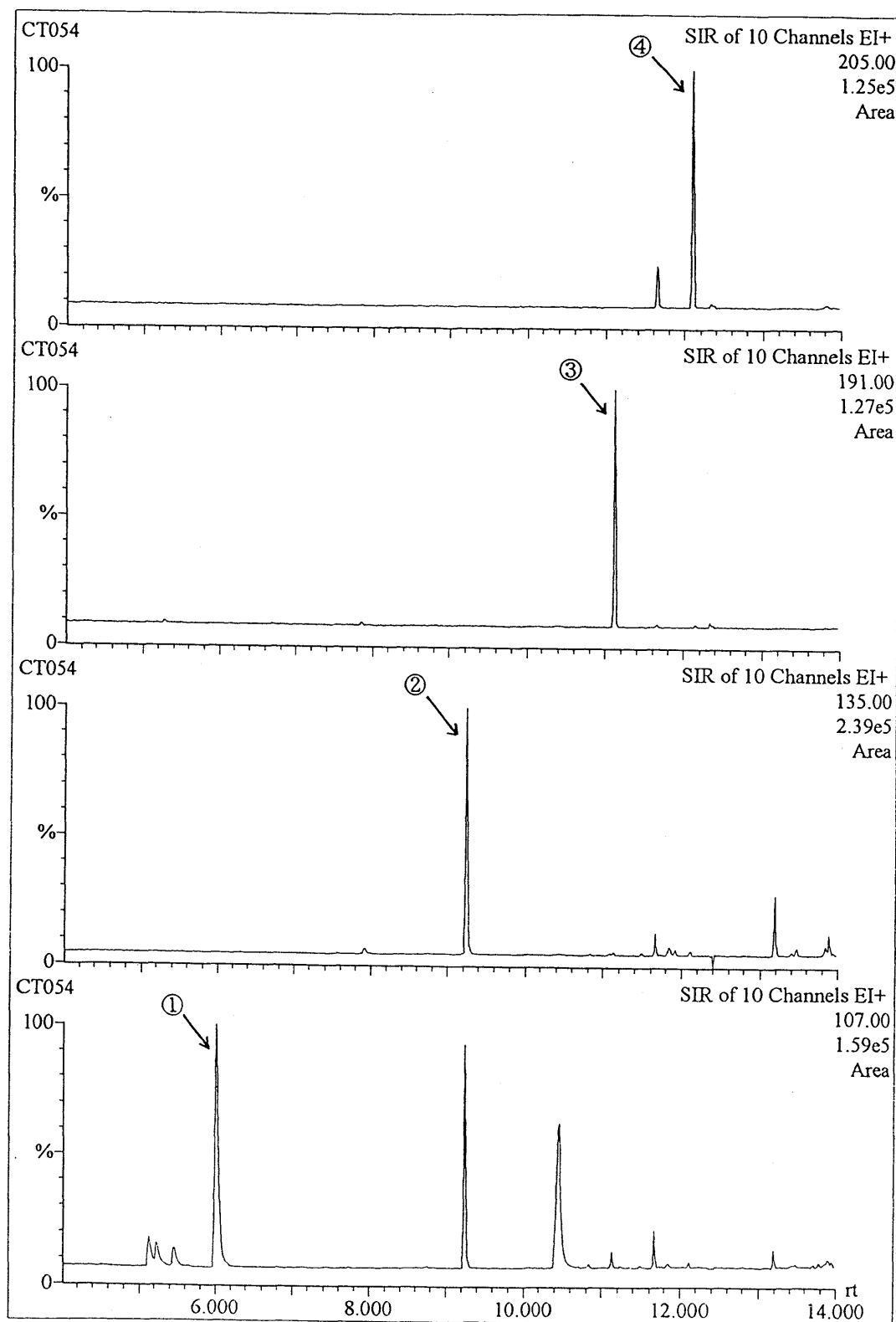


図3-2 底質試料のSIMクロマトグラム (1.0 μ g 添加)

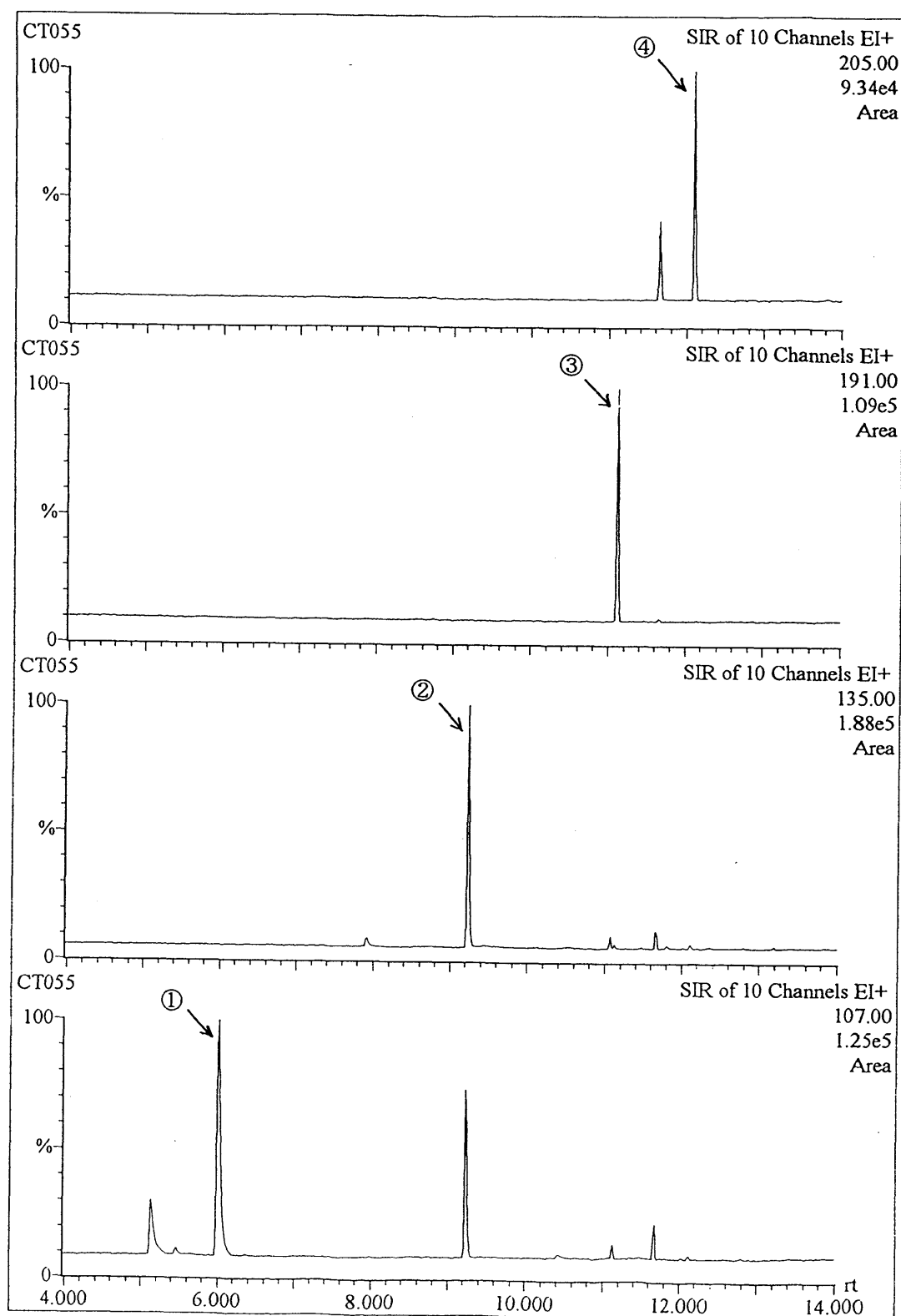


図3-3 生物試料のSIMクロマトグラム (1.0 μ g 添加)

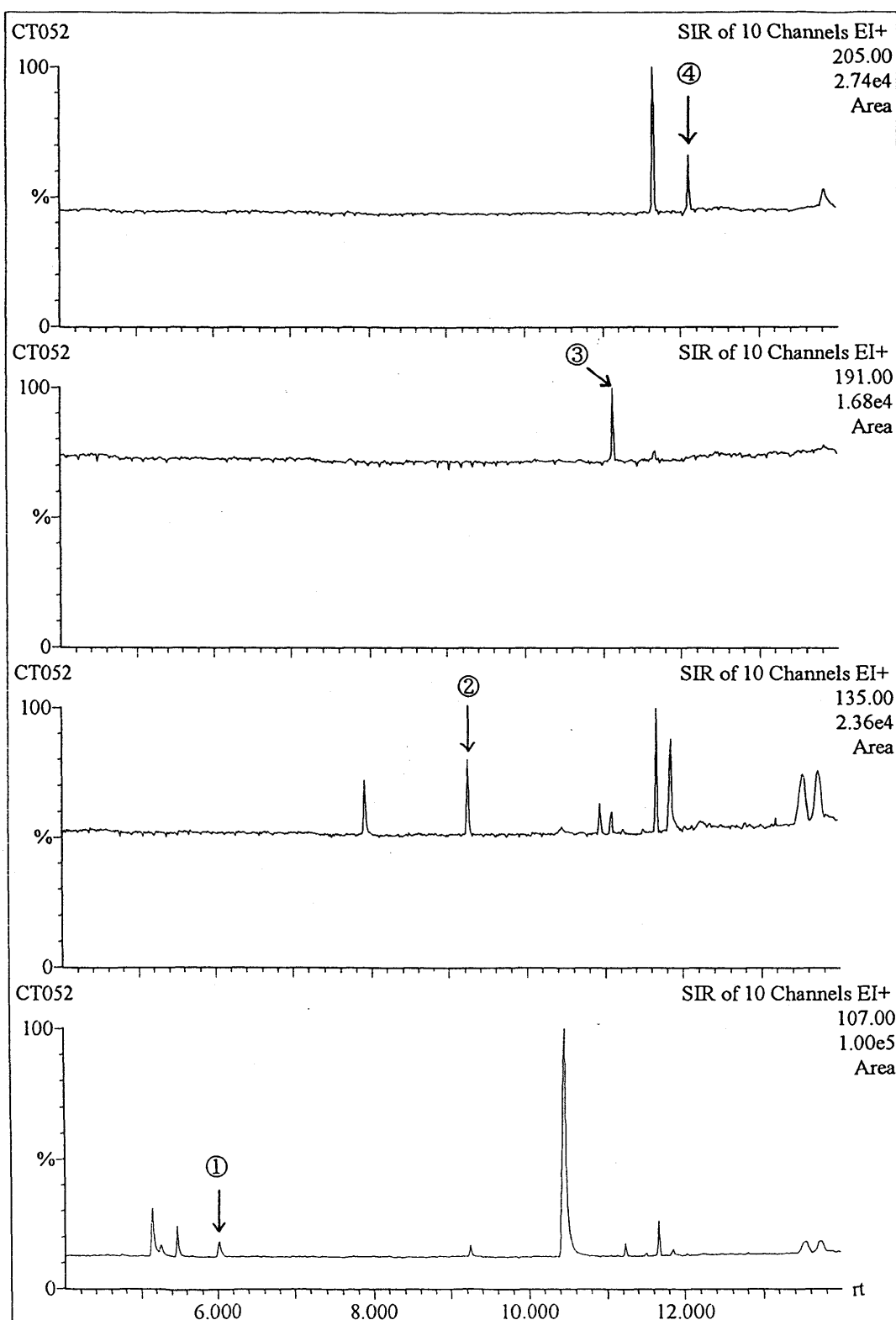


図4-1 水質試料のSIMクロマトグラム（無添加）

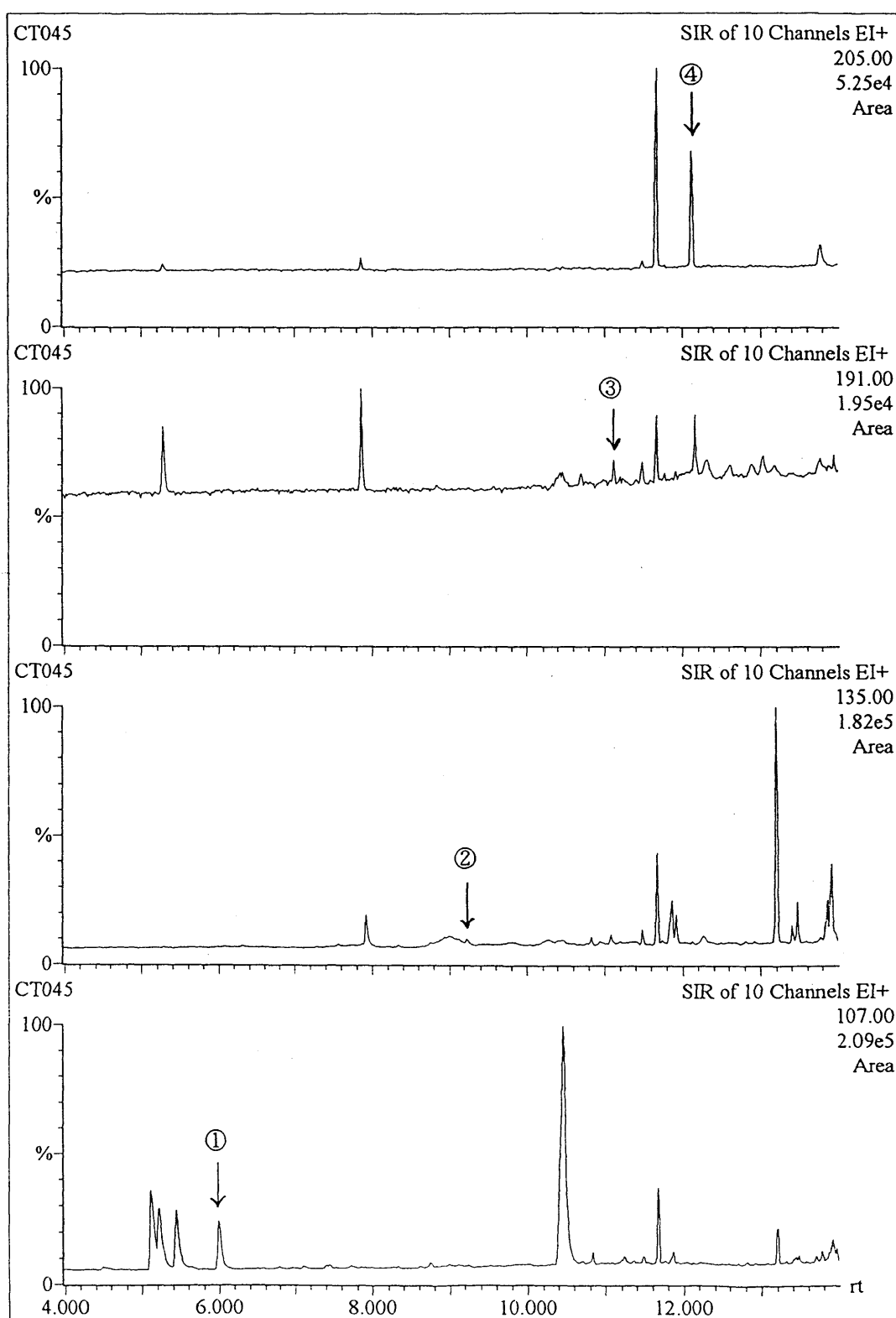


図4-2 底質試料のSIMクロマトグラム (無添加)

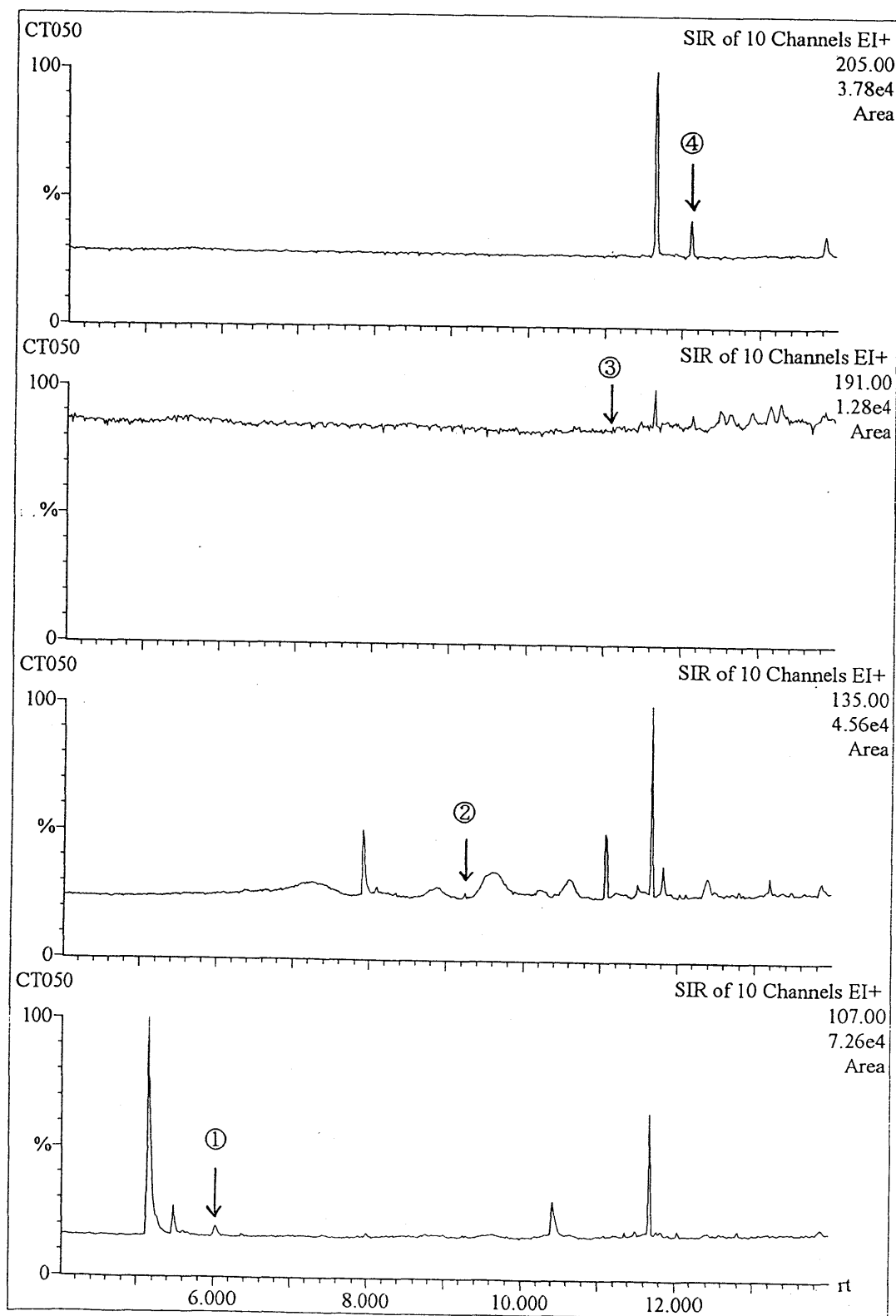


図4-3 生物試料のSIMクロマトグラム (無添加)

p-Cresol, p-tert-Butylphenol, 2,6-di-tert-Butylphenol
and 4-methyl-2,6-di-tert-Butylphenol

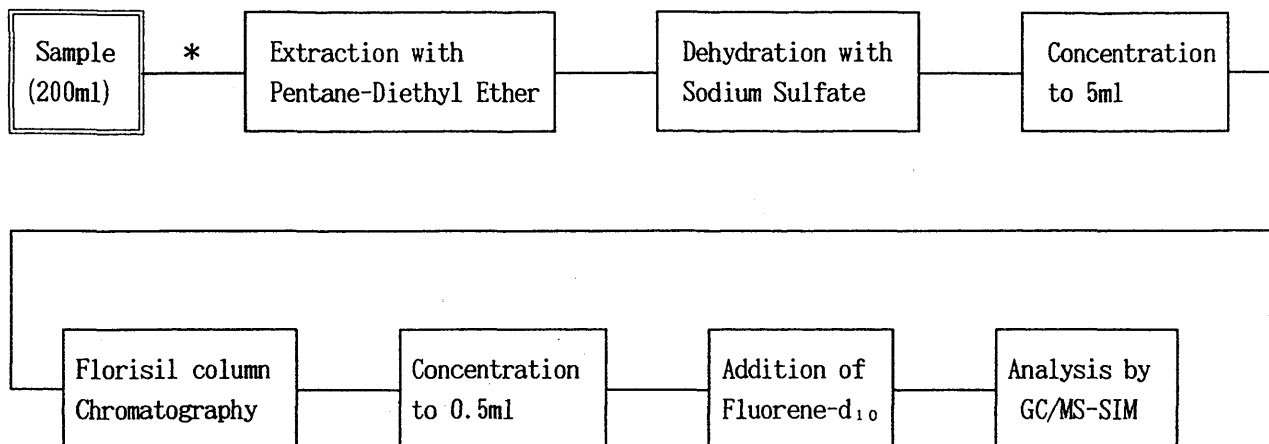
(ABSTRACT)

A water sample was extracted with pentane-diethyl ether (3:1,v/v) under the presence of hydrochloric acid. The extract was dehydrated with anhydrous sodium sulfate, and then concentrated to 5ml at atmospheric pressure in a KD concentrator, to which a small amount of pyrogallol was added previously. The concentrate was cleaned up by Florisil column chromatography using pentane-diethyl ether (10:1,v/v) containing 0.2wt.% of diethyl amine as elution solvent, and then determined by GC/MS-SIM.

A sediment and a biological samples were mixed with hydrochloric acid and sodium chloride, and homogenized with pentane-diethyl ether (3:1,v/v). After centrifuging the homogenate, organic phase obtained was dehydrated with anhydrous sodium sulfate, and then concentrated to 0.5ml at atmospheric pressure in a KD concentrator, to which pyrogallol was added previously. The concentrate was adjusted to 5ml with pentane, and partitioned by using acetonitrile saturated with pentane. The acetonitrile phase obtained was poured into the water containing hydrochloric acid. The water was extracted with pentane-diethyl ether (3:1,v/v). The extract was dehydrated with anhydrous sodium sulfate, and concentrated to 5ml at atmospheric pressure in a KD concentrator, to which pyrogallol was added previously. The concentrate was cleaned up by Florisil column chromatography, and then determined by GC/MS-SIM.

p-Cresol, p-tert-Butylphenol, 2,6-di-tert-Butylphenol and 4-methyl-2,6-di-tert-Butylphenol

[Water Sample]



[Sediment/Biological Sample]

