

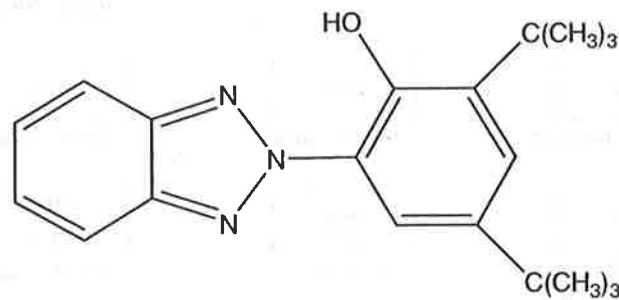
2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4,6-ジ-tert-ブチルフェノール
及び 2,4-ジ-tert-ブチル-6-(5-クロロ-2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)
フェノール

(別名 2-(3,5-ジ-tert-ブチル-2-ヒドロキシフェニル)ベンゾトリアゾール；[略称：
(DBHP)BT]及び 2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-tert-ブチルフェニル)-5-クロロベンゾト
リアゾール[略称：(DBHP)CBT])

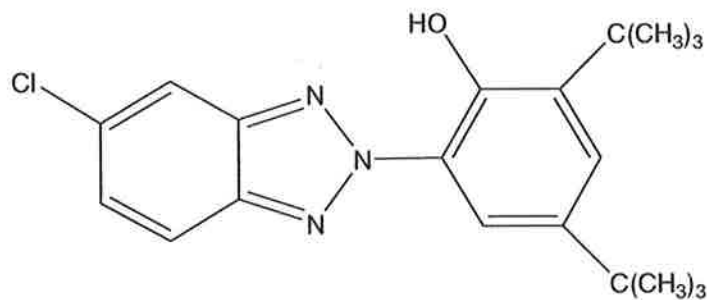
2-(2H-1,2,3-Benzotriazol-2-yl)-4,6-di-tert-butylphenol

2,4-Di-tert-butyl-6-(5-chloro-2H-1,2,3-benzotriazol-2-yl)phenol

【対象物質の構造】



(DBHP)BT [CAS 番号：3846-71-7]



(DBHP)CBT [CAS 番号：3864-99-1]

図 1. 対象物質の構造

【物理化学的性状】

物質名	分子量	融点 (°C)	蒸気圧 (mPa)	水溶解度 (g/L)	LogPow
2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4,6-ジ-tert-ブチルフェノール	323.43	152-155	1.18(20°C)	<0.01 (20°C) ¹⁾	9.3 ²⁾ 6.27 ³⁾
2,4-ジ-tert-ブチル-6-(5-クロロ-2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)フェノール	357.88	157.7	-	-	-

1)～3)はいずれも参考文献[2]より引用

- 1) ガラスビーズ法
- 2) HPLC 法
- 3) 計算値 (SRC' s LogKow Program)

【毒性、用途】

2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4,6-ジ-tert-ブチルフェノール

毒性情報 : LD50 2000mg/kg 以上 (ラット)
LC50 500mg/L 以上 (ヒメダカ)

用途 : 紫外線吸収剤

2,4-ジ-tert-ブチル-6-(5-クロロ-2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)フェノール

毒性情報 : LD50 2000mg/kg 以上 (ラット)

用途 : 紫外線吸収剤

§ 1 分析法

(1) 分析法概要

生物試料 10g を 1mol/L-KOH/EtOH を用いて加熱アルカリ分解し、ヘキサン抽出を行った後、イオン交換 (NH₂) カートリッジを用いて精製し、LC/MS(APCI-Positive) で定量する。

(2) 試薬・器具

【試薬】

2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4,6-ジ-tert-ブチルフェノール

: 和光純薬工業株式会社 (一級 含量 97.0%)

2,4-ジ-tert-ブチル-6-(5-クロロ-2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)フェノール

: 和光純薬工業株式会社 (一級 含量 97.0%)

メタノール：高速液体クロマトグラフ（HPLC）用
アセトン、ヘキサン、エタノール：残留農薬試験用
塩化ナトリウム、無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用
水酸化カリウム：特級

カートリッジ：Bond Elut Jr-NH₂ 500MG Varian 社製

石英ウール：ジーエルサイエンス社製 Fine

精製水：MILLIPORE Milli-Q gradient A-10（ブランクが検出される場合にはあらかじめヘキサンで洗浄した水を用いる）

【試薬の安定性・毒性】

2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4,6-ジ-tert-ブチルフェノール（Cas No. 3846-71-7）については「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）」に基づき、自然的作用による化学的変化を生じにくいもの（難分解性）であり、かつ、生物の体内に蓄積されやすいもの（高蓄積性）であることが判明しており、平成 16 年 9 月 22 日に第一種監視化学物質に指定されているので、取り扱いに注意する。

【器具】

平底フラスコ、冷却管、分液漏斗、ナスフラスコ、SPE 濃縮管、メスシリンダー、パスツールピペット、マニホールド

（3）分析法

【試料の採取及び保存】

環境省「化学物質環境調査における試料採取にあたっての留意事項」に従う。

【試料の前処理及び試料液の調製】

〔生物〕

湿試料 10g を平底フラスコに採取して 1mol/L-KOH/EtOH 溶液を 50mL 添加し、冷却管を装着して約 90℃のウォーターバス中で 2 時間加熱還流する。室温まで放冷したのち、10%塩化ナトリウム溶液 500mL を入れた分液ロートに移す。少量の精製水で平底フラスコの内部を数回洗い、分液ロートに加える。ヘキサン 80mL をはかり取り、その一部で平底フラスコの内部を数回洗って分液ロートに加え、残りのヘキサンを加えて 10 分振とう抽出する。ヘキサン層を分取後、水層を再度ヘキサン 80mL を加えて 10 分振とう抽出し、抽出液は先のヘキサン層と合わせ、精製水 300mL で 3 回洗浄する(注 1)。抽出液に約 10g の無水硫酸ナトリウムを加えて脱水、石英ウールを敷いた漏斗で無水硫酸ナトリウムを除去後、ロータリーエバポレーターを用いて約 1mL まで濃縮する。あらかじめヘキサン 10mL を通液した Bond Elut NH₂ Jr. カートリッジ

に濃縮液を負荷する。また、濃縮に用いたナスフラスコの内壁をヘキサン約 2mL で洗いこみながらカラムに負荷したのちヘキサン 2mL をさらに負荷して全ての溶出液をガラス製濃縮用試験管に受ける。これを窒素気流下で濃縮し、メタノールに転溶して LC/MS 試料液とする。

【空試験液の調製】

試料と同じ量の精製水を用い、【試料の前処理及び試料液の調製】の項に従って操作し、得られた試料液を空試験液とする。

【標準液の調製】

2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4,6-ジ-tert-ブチルフェノール及び 2,4-ジ-tert-ブチル-6-(5-クロロ-2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)フェノール 50mg を各々正確に秤取り、アセトン 50mL に溶解し 1000mg/L 標準原液とする。標準原液をアセトンで順次希釈し、10 mg/L 及び 0.1mg/L の混合標準溶液を作成する。

【測定】

〔LC/MS 条件〕 (注 2)

(LC) 機種 : Agilent 1100

カラム : SUMIPAX ODS-A (2mm×150mm×5 μ m)

移動相 : A : H₂O B : MeOH = 1/99

流量 : 0.2mL/min

カラム温度 : 40℃

注入量 : 50 μ L

(MS) 機種 : Agilent MSD SL

ドリフト (フラグメンター) 電圧 : (DBHP)BT;50V (DBHP)CBT;125V

キャピラリー電圧 (Vcap) : 2000V

ネブライザー : N₂ (50psi)

ドラインガス流量: N₂(4.0 L/min)

イオン化法 : APCI (+) SIM

モニターイオン:(DBHP)BT 定量用 324 確認用 325

(DBHP)CBT 定量用 358 確認用 360

※ Negative で確認する場合

(DBHP)BT 確認用 322 及び 323(DBHP)CBT 確認用 356 及び 358

〔検量線〕

標準溶液 50 μ L を LC/MS に注入し、対象物質のピーク面積を用いて検量線を作成する。

〔定量〕

試料液 50 μ L を LC/MS に注入し、ピーク面積より対象物質濃度を測定する。

〔濃度の算出〕

$$\text{生体試料中の濃度} = \text{検出量 (ng)} \times \frac{\text{前処理後の最終液量 (mL)} \times 1000}{\text{LC/MS 注入量 (}\mu\text{L)} \times \text{分析試料量 (g)}} \\ (\mu\text{g/kg-wet})$$

〔装置検出下限 (IDL)〕 (注 3)

本分析に用いた LC/MS (Agilent 1100 MSD SL) の IDL を下表に示す。

物質	IDL (ng)	試料量 (g)	最終液量 (mL)	IDL 試料換算値 (μ g/kg-wet)
(DBHP)BT	0.33	10	1	0.03
(DBHP)CBT	0.30	10	1	0.03

〔測定方法の検出下限 (MDL)、定量下限 (MQL)〕 (注 4)

本測定方法における検出下限及び定量下限を次に示す。

物質	試料量 (g)	最終液量 (mL)	検出下限値 (μ g/kg-wet)	定量下限値 (μ g/kg-wet)
(DBHP)BT	10	1	0.06	0.15
(DBHP)CBT	10	1	0.14	0.36

(注 1)

ヘキサン抽出の工程でエマルジョンが生成する場合には 20 分程度静置して分液する。ヘキサン溶液を精製水で洗浄する工程ではエマルジョンを生成しやすいので、絶対に振とうしてはいけない。分液漏斗を軽く回転させるようにゆらし、界面で緩やかに接触するように操作する。

(注 2)

LC/MS の条件は、本測定に使用した機種 (Agilent MSD SL) 特有のものである。

(注 3)

装置検出下限 (IDL) は、「化学物質環境実態調査の手引き」(平成 17 年 3 月)に従って、表 1 のとおり算出した。

(注 4)

測定方法の検出下限 (MDL) 及び定量下限 (MQL) は、「化学物質環境実態調査の手引き」(平成 17 年 3 月)により、表 2 のとおり算出した。

表 1. 装置検出下限(IDL)の算出 (Agilent 1100LC/MSD SL)

物質名	(DBHP)BT	(DBHP)CBT
試料量(g)	10	10
最終液量(mL)	1	1
注入液濃度(ng/mL)	2.5	2.5
装置注入量(μL)	50	50
結果1	2.614	2.616
結果2	2.558	2.565
結果3	2.669	2.636
結果4	2.598	2.730
結果5	2.649	2.591
結果6	2.768	2.606
結果7	2.778	2.773
平均値	2.662	2.645
標準偏差	0.0839	0.0767
IDL(ng/mL)	0.33	0.30
IDL試料換算値	0.03	0.03
S/N	33.3	31.8
CV(%)	3.15	2.90

※IDL=t(n-1, 0.05) × σ_{n-1} × 2

表 2. 測定方法の検出下限 (MDL) 及び定量下限(MQL)の算出

物質名	(DBHP)BT	(DBHP)CBT
試料量(g)	10	10
標準添加量(ng)	2.5	2.5
試料換算濃度(ng/g)	0.25	0.25
最終液量(mL)	1	1
注入液濃度(ng/mL)	2.5	2.5
装置注入量(μL)	50	50
操作ブランク平均	0	0
無添加平均(ng/g)	0.0297	0.1873
結果1(ng/g)	0.2389	0.4076
結果2(ng/g)	0.2409	0.3766
結果3(ng/g)	0.2125	0.3230
結果4(ng/g)	0.2446	0.3953
結果5(ng/g)	0.2451	0.3711
結果6(ng/g)	0.2390	0.4238
結果7(ng/g)	0.2084	0.3426
平均値(ng/g)	0.2328	0.3771
標準偏差	0.1549	0.3558
MDL (μg/kg)	0.06	0.14
MQL (μg/kg)	0.15	0.36
S/N	30.8	33.0
CV(%)	6.66	9.43

※MDL=t(n-1, 0.05) × σ_{n-1} × 2
 ※MQL=σ_{n-1} × 10

§ 2 解説

【分析法】

〔フローチャート〕

分析のフローチャートを図2に示す。

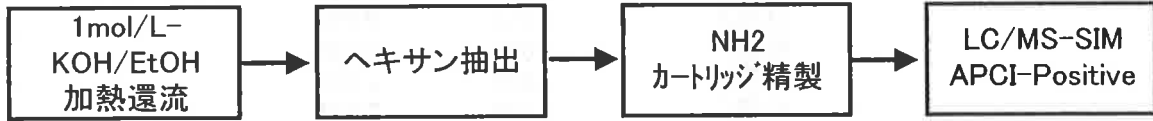


図 2. 分析フロー

〔検量線及びマススペクトル〕

検量線及びマススペクトル図等を次に示す。

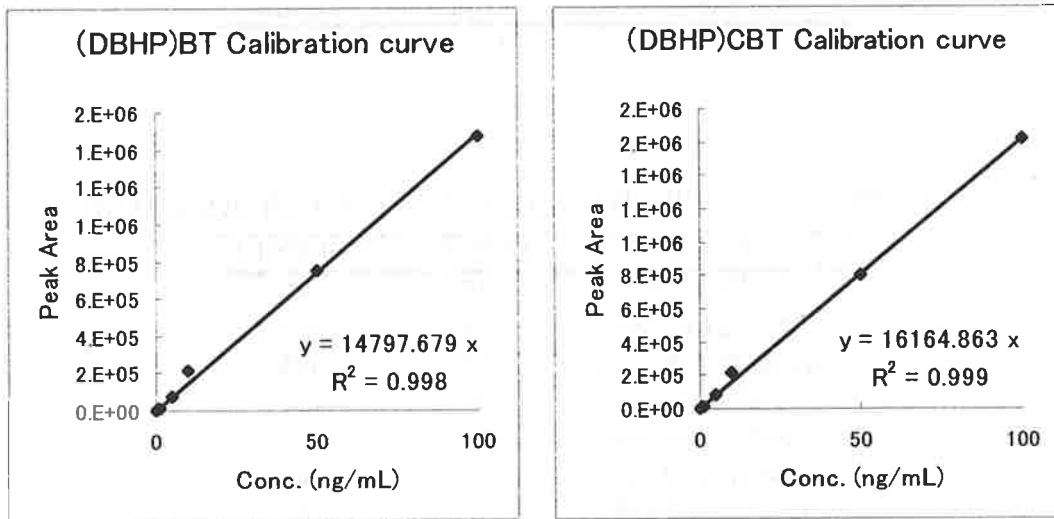


図 3. 検量線 (0.1~100ng/mL, 試料中 0.01~10 μ g/kg 相当)

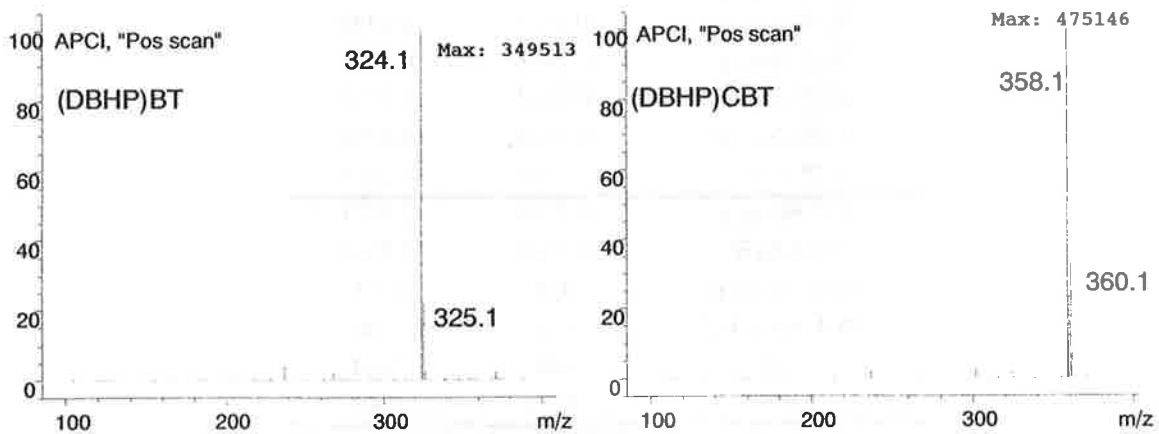


図 4. マススペクトル

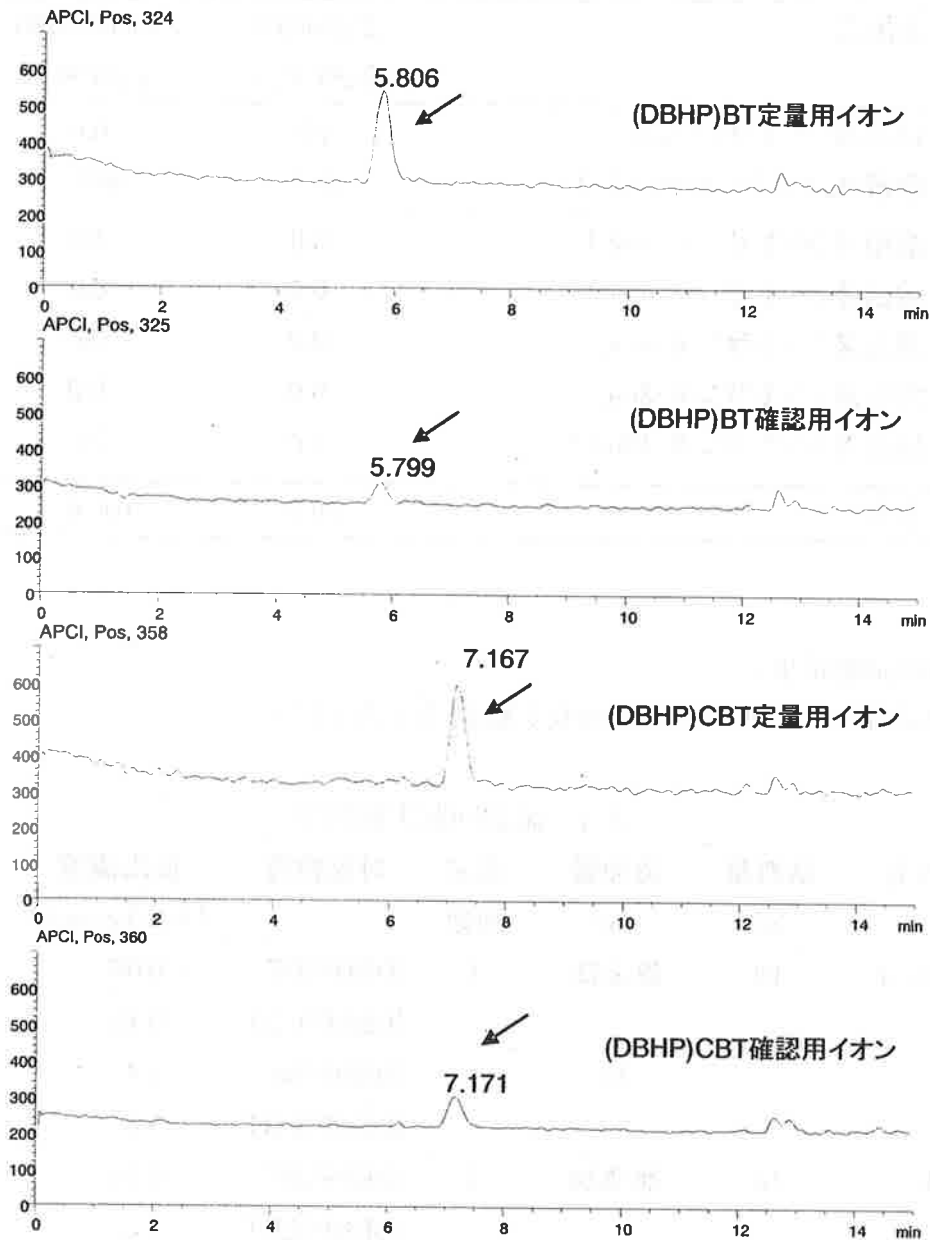


図 5. IDL 付近濃度標準溶液測定クロマトグラム
 (0.25 μ g/L, 0.025 μ g/kg-wet 試料相当)

〔NH₂ カートリッジ溶出実験結果〕

Bond Elut NH₂ Jr. カートリッジ(Varian 製)による対象物質の溶出条件について試験した結果を表 3 に示す。この結果より、カートリッジ精製に用いるヘキサン量を負荷液 1mL、容器洗浄液 2mL、溶出液 2mL 合計 5mL とした。

表 3. NH₂ カートリッジによる対象物質の分画

溶出液	(DBHP)BT (回収率;%)	(DBHP)CBT (回収率;%)
負荷液(ヘキサン 1mL)	0.0	0.0
容器洗浄液(ヘキサン 2mL)	88.2	96.1
溶出液(ヘキサン 0-2mL)	8.0	4.5
溶出液(ヘキサン 2-4mL)	0.0	0.0
溶出液(ヘキサン 4-6mL)	0.0	0.0
溶出液(ヘキサン 6-8mL)	0.0	0.0
溶出液(ヘキサン 8-10mL)	0.0	0.0
合計	96.2	100.6

[添加回収試験結果]

生物試料への標準物質添加回収実験結果を表 4 に示す。

表 4. 添加回収実験結果

試料名	試料量 (g)	添加量 (ng)	測定 回数	対象物質	検出濃度 (μ g/kg-wet)	回収率 (%)
マコカレイ	10	無添加	1	(DBHP)BT	< 0.06	-
				(DBHP)CBT	0.19	-
		15	1	(DBHP)BT	1.4	91.8
				(DBHP)CBT	1.6	92.5
スズキ	10	無添加	1	(DBHP)BT	0.51	-
				(DBHP)CBT	3.3	-
		15	1	(DBHP)BT	1.6	75.3
				(DBHP)CBT	4.6	89.3

[環境試料分析例]

マコカレイ及びスズキの測定クロマトグラムを例として示す。検出濃度は表 4 に示した。

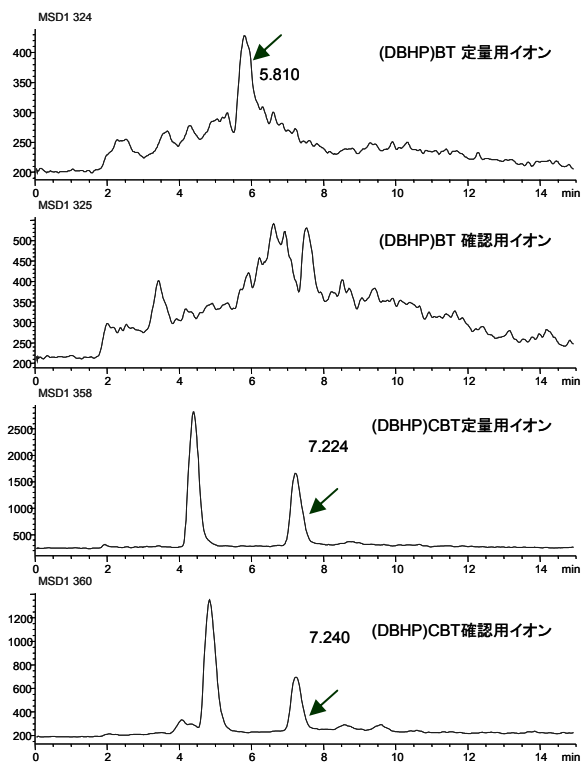


図 6. マコカレイ測定クロマトグラム(Positive)

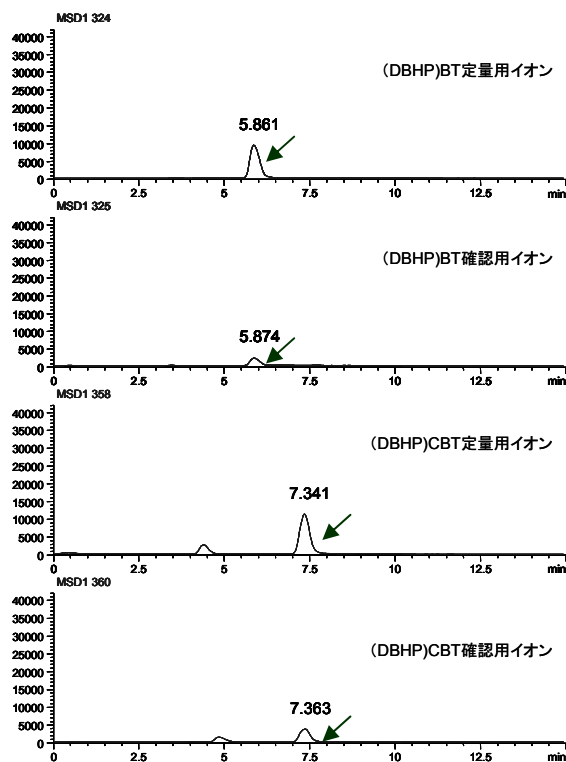


図 7. マコカレイ添加回収試験測定クロマトグラム(Positive)

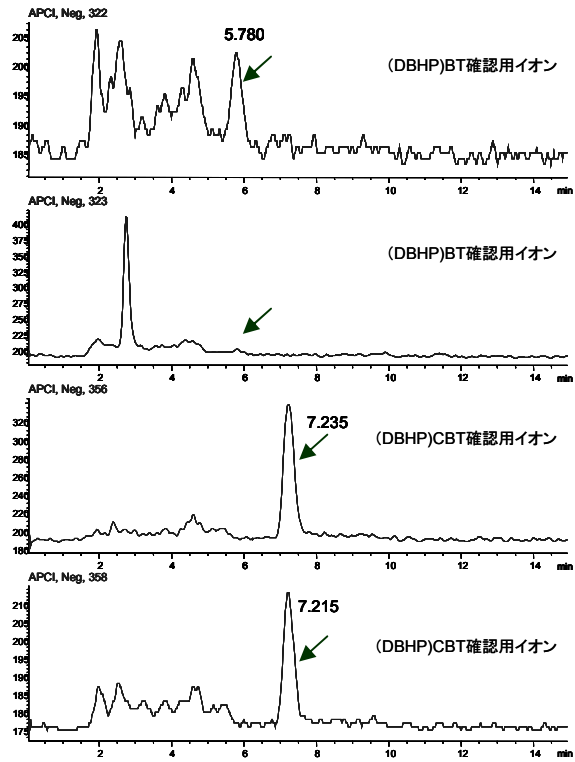


図 8. マコカレイ測定クロマトグラム(Negative, 確認用)

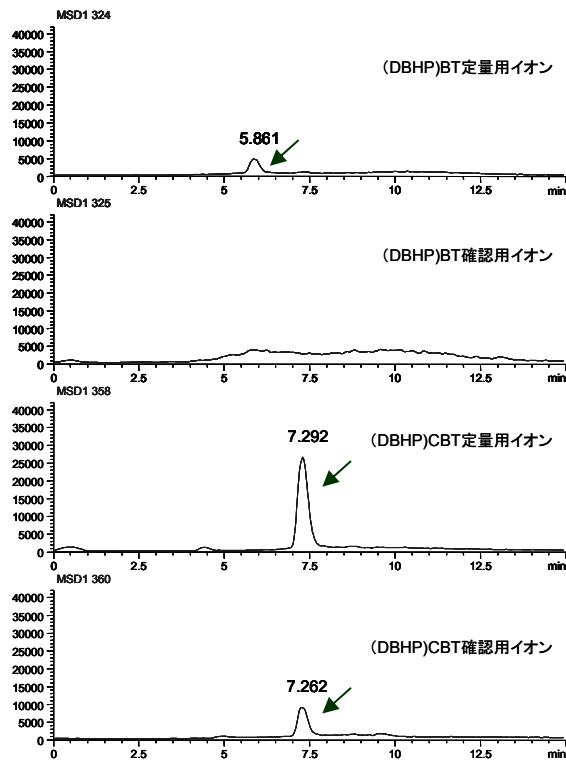


図 9. スズキ測定クロマトグラム(Positive)

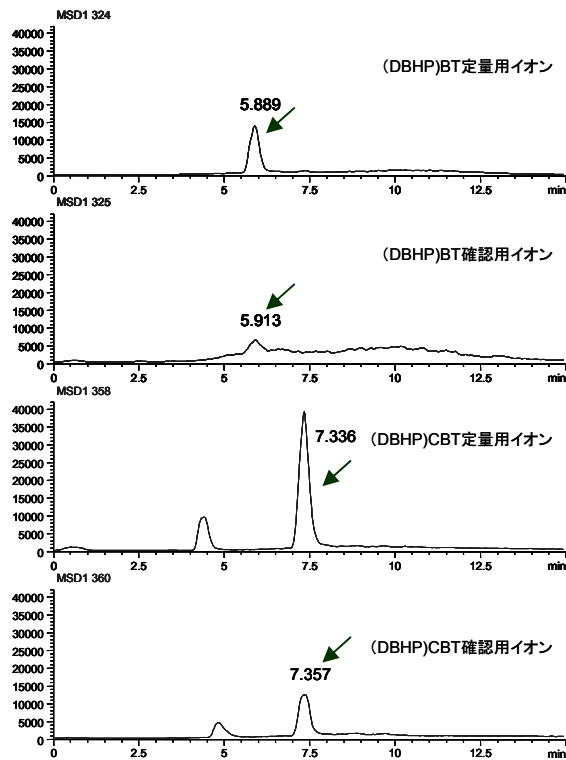


図 10. スズキ添加回収試験測定クロマトグラム(Positive)

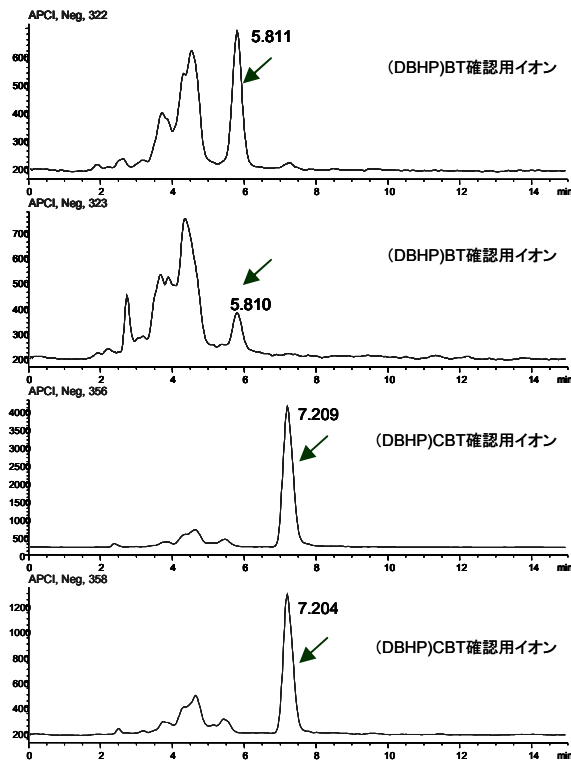


図 11. スズキ測定クロマトグラム(Negative, 確認用)

[分解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 5 に示す。【参考文献】 [1]より引用した。

表 5. 分解性スクリーニング結果

pH	初期濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1 時間放置後の 残存率(%)	5 日間放置後の残存率(%)	
			暗所	光照射
5	1	101	100	-
7	1	99	97	98
9	1	99	98	-

[参考 ; LC/MS/MS による測定条件]

LC/MS/MS を用いた場合の測定条件を以下に示した。また、その際の測定クロマトグラムと検量線を図 12 から図 14 に示した。なお、LC/MS/MS による実試料の測定は実施していない。

[LC/MS 条件] (注 5)

(LC) 機種 : SHIMADZU LC-10AD

カラム : SUMIPAX ODS-A (2mm × 150mm × 5 μm)

移動相 : A : H₂O B : MeOH = 1/99 (15min)

流量 : 0.2mL/min

カラム温度 : 40°C

注入量 : 50μL

(MS) 機種 : Applied Biosystems API4000

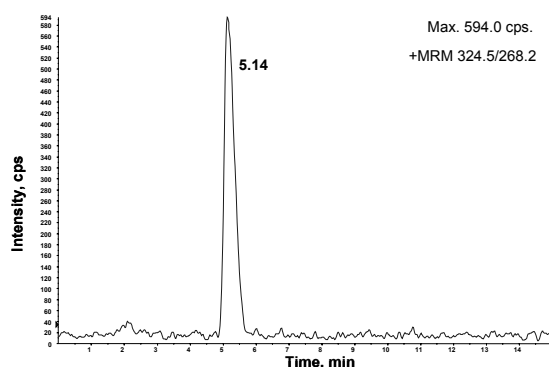
イオン化法 : APCI (+)

イオン源温度 : 700°C

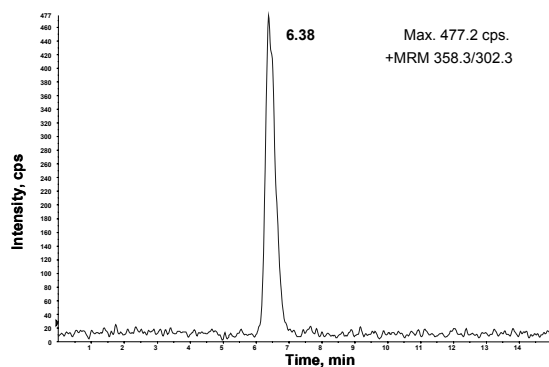
ドリフト (フラグメンター) 電圧 : (DBHP)BT;50V (DBHP)CBT;125V

モニターイオン : (DBHP)BT 定量用 324.5 / 268.2 確認用 324.5 / 211.9

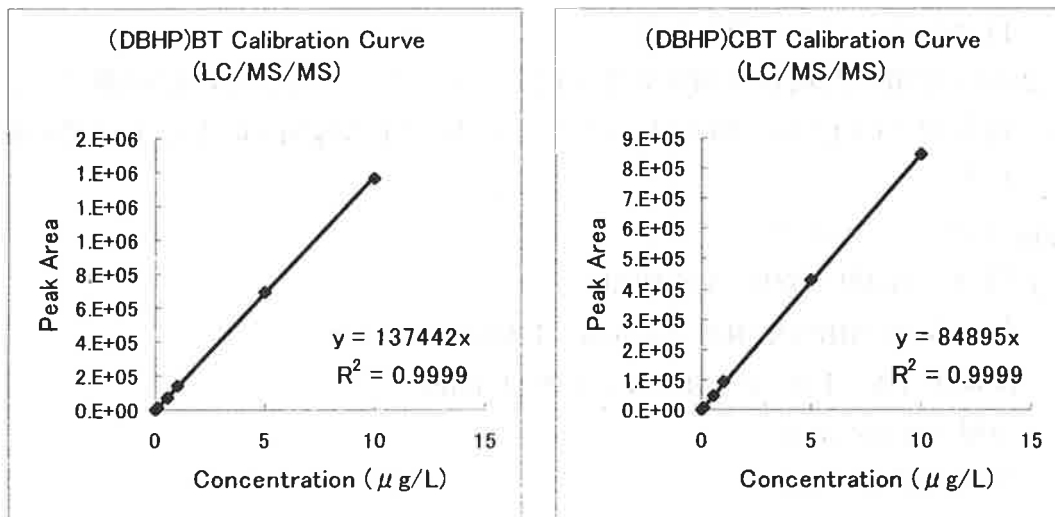
(DBHP)CBT 定量用 358.3 / 302.3 確認用 358.3 / 246.1



< 図 12. (DBHP)BT 測定クロマトグラム Std-0.1 μg/L ; LC/MS/MS >



< 図 13. (DBHP)CBT 測定クロマトグラム Std-0.1 μg/L ; LC/MS/MS >



< 図 14. LC/MS/MS にて作成した検量線 >

(注 5)

LC/MS/MS の条件は、本測定に使用した機種 (API4000) 特有のものである。

(注 6)

装置検出下限 (IDL) は、「化学物質環境実態調査の手引き」(平成 17 年 3 月) に従って、表 6 のとおり算出した。

表 6. 装置検出下限(IDL)の算出 (API4000) (注 6)

物質名	(DBHP)BT	(DBHP)CBT
試料量(g)	10	10
最終液量(mL)	1	1
注入液濃度(ng/mL)	0.5	0.5
装置注入量(μL)	50	50
結果1(ng/mL)	0.5215	0.5180
結果2(ng/mL)	0.5164	0.5157
結果3(ng/mL)	0.5129	0.5215
結果4(ng/mL)	0.5249	0.5154
結果5(ng/mL)	0.5055	0.5196
結果6(ng/mL)	0.5113	0.5169
結果7(ng/mL)	0.5137	0.5254
平均値(ng/mL)	0.5152	0.5189
標準偏差	0.0065	0.0036
IDL(ng/mL)	0.025	0.014
IDL試料換算値	0.003	0.001
S/N	36.3	28.7
CV(%)	1.26	0.69

※IDL= $t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

【評価】

本法により、生物試料中の(DBHP)BT 及び(DBHP)CBTについて各々0.15及び0.36 $\mu\text{g/kg-wet}$ レベル(MQL)の定量が可能である。

【参考文献】

- [1] 環境省環境安全課 : 平成 16 年度 化学物質分析法開発調査報告書
(2-(3,5-ジ-tert-ブチル-2-ヒドロキシフェニル)ベンゾトリアゾール; 山口県環境保健研究センター)
- [2] 環境省環境安全課 : 昭和 54 年度 化学物質分析法開発調査報告書
(2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-tert-ブチルフェニル)-5-クロロベンゾトリアゾール; 福岡県衛生公害センター)

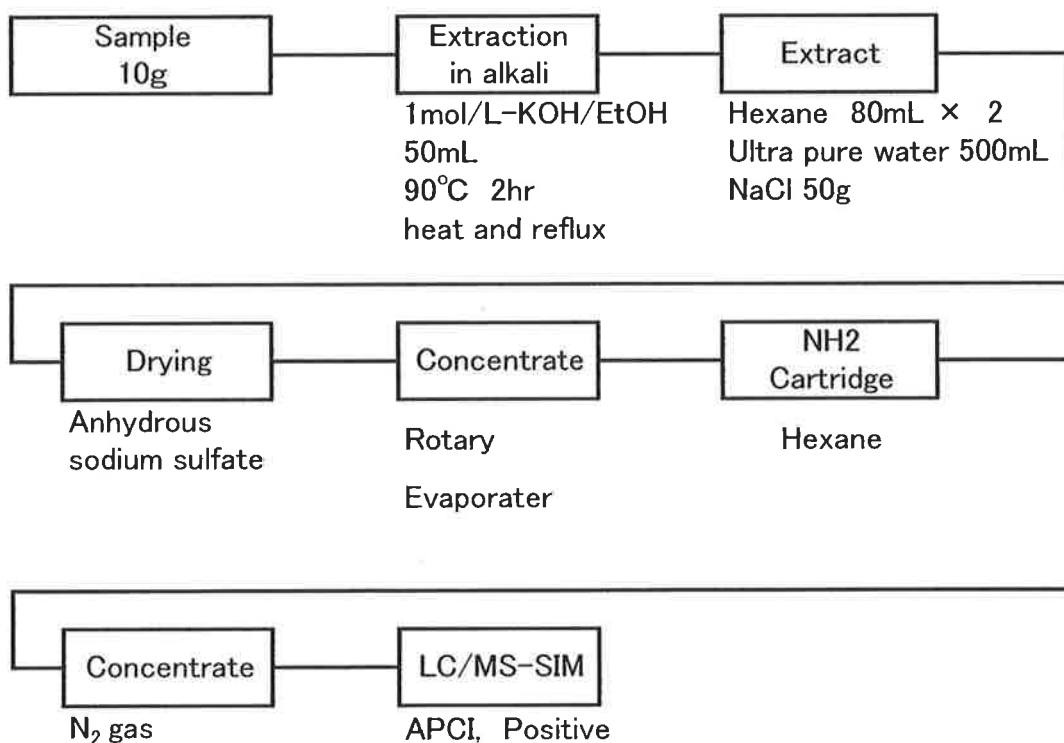
【担当者氏名・連絡先】 担当 株式会社 住化分析センター
住所 〒299-0266 千葉県袖ヶ浦市北袖 2 番地 1
TEL : 0438-63-6920 FAX : 0438-63-6921
担当者 吉田 寧子、村上 高行、村上 雅志
E-mail : yasuko.yoshida@scas.co.jp

2-(2H-1,2,3-Benzotriazol-2-yl)-4,6-di-tert-butylphenol

2,4-Di-tert-butyl-6-(5-chloro-2H-1,2,3-benzotriazol-2-yl)phenol

An analytical method was developed for the determination of 2-(2H-1,2,3-Benzotriazol-2-yl)-4,6-di-tert-butylphenol [(DBHP)BT] and 2,4-Di-tert-butyl-6-(5-chloro-2H-1,2,3-benzotriazol-2-yl)phenol [(DBHP)CBT] in biological sample by liquid- chromatography mass spectrometry (LC/MS) .

Ten grams of sample was collected into a flat bottom flask, 50mL alkali solution (1mol/L-KOH / EtOH) was added, heated (90°C) and refluxed (2hr) . The target compounds were extracted by hexane with liquid-liquid extraction (2 times), and the extract was dehydrated with anhydrous sodium sulfate. The hexane was concentrated to about 1mL, and purified by NH₂ cartridge. Then the hexane which passed NH₂ cartridge was dried by N₂ gas. One mL of methanol was added to dried substance and analyzed by LC/MS-SIM (APCI-Positive). The recoveries for flatfish (added 2.5ng/10g) were 81.8 [(DBHP)BT Av.] and 76.9% [(DBHP)CBT Av.]. Coefficient of variations were 6.66% [(DBHP)BT] and 9.43% [(DBHP)CBT], Detection Limits (MDL) were 0.06µg/kg-wet [(DBHP)BT] and 0.14g/kg-wet [(DBHP)CBT].



物質名	分析法フローチャート	備考
<p>2-(2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4,6-ジ-tert-ブチルフェノール [(DBHP)BT]</p> <p>及び</p> <p>2,4-ジ-tert-ブチル-6-(5-クロロ-2H-1,2,3-ベンゾトリアゾール-2-イル)フェノール [(DBHP)CBT]</p>	<p style="text-align: center;">分析法フローチャート</p> <pre> graph LR A[生物試料 10g] --> B[アルカリ分解 1mol/L-KOH/EtOH 50mL 90°C 2hr 加熱還流] B --> C[ヘキサン抽出 ヘキサン 80mL × 2 精製水 500mL 塩化ナトリウム50g] C --> D[脱水 無水硫酸ナトリウム] C --> E[NH2 カートリッジ ヘキサン溶出液] D --> F[濃縮 ロータリー エポレーター] E --> F F --> G[濃縮 N2ガス] G --> H[LC/MS-SIM APCI, Positive] </pre>	<p>LC/MS-SIM</p> <p>APCI, Positive</p> <p>カラム SUMIPAX ODS-A</p> <p>長さ 150mm 内径 2mm 粒径 5 μm</p> <p>検出下限 (生体) (DBHP)BT 0.06 μg/kg-wet (DBHP)CBT 0.14 μg/kg-wet</p>