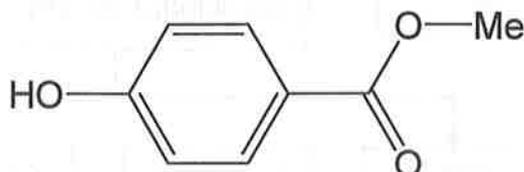


## 4-ヒドロキシ安息香酸 メチル

## Methyl 4-Hydroxybenzoate

(別名：メチルパラベン)

## 【対象物質の構造】

CAS 番号：99-76-3 分子式：C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>

## 【物理化学的性状】

分子量	沸点	蒸気圧	水溶解度	log P <sub>ow</sub>
152.15	280 °C (分解)	9.33 Pa/25 °C	2.5 mg/mL (25 °C)	1.96

独立行政法人 製品評価技術基盤機構 化学物質総合検索システムを参考にした。

## 【毒性、用途】

毒性：orl-mus LD<sub>50</sub>:>8 g/kg、orl-rbt LD<sub>50</sub>:6 g/kg、  
scu-mus LD<sub>50</sub>:1200 mg/kg、ipr-mus LD<sub>50</sub>:960 mg/kg

用途：保存料、防腐剤

Physical&amp;Theoretical Chemistry Lab.の MSDS Database を参考にした。

## § 1 分析法

## (1) 分析法の概要

水質試料 200 mL に酢酸を加えて酸性として固相カートリッジに通水し 4-ヒドロキシ安息香酸メチル(*p*-MP)を濃縮し、これをメタノールで溶出し LC/MS/MS (ESI-, SRM)法で定量をする。

## (2) 試薬・器具

## 【試薬】

4-ヒドロキシ安息香酸メチル(*p*-MP)：ビスフェノール-A-*d*<sub>16</sub>(BPA-*d*<sub>16</sub>)：CIL 社製

メタノール(LC/MS 用)：和光純薬

固相カートリッジ：Waters 社製 Oasis HLB Plus LP Extraction Cartridge

酢酸：和光純薬 LC/MS グレード

手袋：表面に *p*-MP が付着していないもの

精製水：超純水製造システム (MQ Advantage、ミリポア製) により製造された水

## 【器具】(注1)

メスシリンダー、メスフラスコ、KD 目盛付受器  
コンセントレーター、窒素ガス乾燥機

## (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。  
但し、試料に皮膚が触れないように注意する。(注2)

### 【試料の前処理及び試料液の調製】(注3)

試料水 200 mL に酢酸 120 mg を加えて 10 mM に調製し、コンディショニングした固相カートリッジ(注4)をコンセントレーターにセットし、試料を 10 mL/min で通水し抽出する。通水終了後の固相カートリッジに精製水 5 mL を通して洗浄した後、N<sub>2</sub> ガスを 5 分間通気して乾燥する。次いで 5 mL のメタノールで溶出し 20 mL 容なす型フラスコに受ける。ロータリーエバポレーター (Water Bath 30 °C) にて乾固直前まで濃縮(注5)し、メタノール:精製水=1:9 で 1 mL に転溶後、内標準として BPA-*d*<sub>14</sub> を添加して、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】

**p-MP**10.0 mg を正確に秤取り (有効数字 3 桁)、10 mL 全量フラスコに入れ、メタノールを用いて溶解し 1.00 mg/mL の標準原液とする。

**BPA-*d*<sub>16</sub>**10.0mg を正確に秤取り (有効数字 3 桁)、10 mL 全量フラスコに入れ、メタノールを用いて溶解し 1.00 mg/mL の内標準原液とする。

### 【測定】

[LC/MS 条件] (注6)

LC/MS 機種名 : Agilent 1100/API 3200

LC 機種 : Agilent 1100

カラム : Ascentis<sup>TM</sup> RP-Amide(Supelco 社製)(10 cm×2.1 mm、3 μm)

カラム温度 : 30 °C

注入量 : 10 μL

移動相 : A : 精製水 B : メタノール

0→25 min A : 90→5 B : 10→95 linear gradient

25→34 min A : B=5 : 95

34→35 min A : 5→90 B : 90→10 linear gradient

35→45 min A : B=90 : 10

流量 : 0.2 mL/min

(MS)

機種：API 3200<sup>TM</sup> LC/MS/MS システム

イオンスプレー電圧：-4500 V

ネブライザーガス：N<sub>2</sub>

ターボガス温度：700 °C

イオン化法：ESI(-)-SRM

モニターイオン：p-MP 151→92

BPA-*d*<sub>14</sub> 241→223

#### [検量線]

検量線用標準溶液は、濃度の有効数字が2桁以上かつ許容差±15%以下である事を基本とする、メタノール：精製水=1：9の溶液とし、0.1～100 ng/mLの範囲に亘る4種類以上の濃度で作成する。各濃度の標準溶液には100 ng/mLの濃度となるように内標準物質（BPA-*d*<sub>14</sub>）を添加する。

内標準物質のみを添加した溶媒ブランクを含めて、5種類以上の検量線用標準溶液10 µLをLC/MS/MSに導入して分析する。溶媒ブランク試料からは被検物質のピークが検出されない事を確認する。得られる各クロマトグラムにおいて、標準物質のピーク面積を内標準物質のピーク面積で割って得られる比を計算し、検量線の縦軸とする。分析した検量線用標準溶液に含まれる標準物質の濃度を内標準物質の濃度で割って得られる比を計算し、検量線の横軸とする。重み付けなしで、最小二乗法により、原点を通過する一次の検量線を作成し、関係式及び寄与率（*r*<sup>2</sup>）を計算する。寄与率が0.995以上であることを確認する。各測定点における濃度比の残さを計算し、測定誤差が±15%以下であることを確認する。

検量線用標準溶液調製の手順例：

（用意するもの）

器具：1 mL 全量ピペット（6本）、5 mL 全量ピペット（1本）、10 mL 全量ピペット（3本）、50 mL 全量ピペット（1本）、100 mL 全量フラスコ（11本）、p-MP 標準原液（1.00 mg/mL、1 mL 以上）、BPA-*d*<sub>14</sub> 標準原液（1.00 mg/mL、1 mL 以上）

（内標準母液の調製）

内標準（BPA-*d*<sub>14</sub>）の標準原液（1.00 mg/mL メタノール溶液）を、1 mL 全量ピペットと100 mLの全量フラスコを用いて、メタノールで希釈し、10.0 µg/mLの内標準母液を作成する。

（標準溶液の調製例）

p-MP 標準原液（1.00 mg/mL）を、1 mL 全量ピペットと100 mLの全量フラスコを用いて、メタノールで希釈し、10.0 µg/mLの標準母液-1とする。標準母液-1を、1 mL 全量ピペットと100 mLの全量フラスコを用いて、メタノールで希釈し、100. ng/mLの標準母液-2とする。標準母液-2を、1 mL 全量ピペットと100 mLの全量フラスコを用いて、メタノールで希釈し、1.00 ng/mLの標準母液-3とする。

標準母液-1を、1 mLの全量ピペットで、100 mL全量フラスコに量り取る。標準母液-2を、それぞれ1、5、10、50 mLの全量ピペットで、100 mL全量フラスコに量り取る。標準母液-3を、10 mLの全量ピペットで、100 mL全量フラスコに量り取る。続いて、10.0 µg/mLの内標準母液を、10 mLの全量ピペットを用いて、標準母液-1、2、3を入れた100 mL全量フラスコ（計7本）、及びブランク用100 mL全量フラスコに、それぞれ加える（総計8本）。メタノール：精製水=1：9を、各100

mL 全量フラスコの標線まで加え、それぞれ 0.100 ng/mL、0.500 ng/mL、1.00 ng/mL、5.00 ng/mL、10.0 ng/mL、50.0 ng/mL 及び 100. ng/mL の検量線用標準液とする。この標準液中の内標準 (BPA-*d*<sub>14</sub>) 濃度は 100. ng/mL である。

〔定量〕

試料液 10 µL を LC/MS/MS に導入して分析する。得られた被検物質のピーク面積を内標準物質のピーク面積で割った比から、検量線を基にして、被検物質濃度を内標準物質濃度で割った比 (*R*) を求める。

〔濃度の算出〕

試料水中濃度 *C* (ng/L) は次式により算出する。

$$C = R \cdot Q/V$$

*R*: 検量線から求めた被検物質濃度を内標準物質濃度で割った比

*Q*: 試料中に添加した内標準の量(ng) (= 添加する内標準の濃度 (ng/µL) × 添加する内標準の容量 (µL))

*V*: 試料水量(L)

本分析法に従った場合、以下の数値を使用する。

*Q* = 100. (ng) (= 添加する内標準の濃度(10.0 ng/µL) × 添加した内標準の容量(10.0 µL))

*V* = 0.200 (L)

即ち、

$$C = R \times 500. \text{ (ng/L)}$$

である。

〔装置検出下限(IDL)〕

本分析に用いた LC/MS(Agilent1100 /API3200)の IDL を下表に示す(注 7)。

物質	IDL(ng/mL)	試料量(mL)	最終液量(mL)	IDL 試料換算値(ng/L)
<i>p</i> -MP	0.029	200	1.0	0.15

〔測定方法の検出下限(MDL)、定量下限(MQL)〕 (注 8)

物質	試料量(mL)	最終液量(mL)	検出下限値(ng/L)	定量下限値(ng/L)
<i>p</i> -MP	200	1.0	0.25	0.64

(4) 注解(分析上の注意点等)

(注 1) ガラス器具等は、理化学用洗剤で洗浄・水洗・乾燥後、メタノールで洗浄すること。

(注 2) 試料に皮膚が触れると皮膚表面に付着していた *p*-MP が溶出し、コンタミネーションの原因になる。本物質は、市販化粧品 (主にスキンケア用品など) に使用されているおそれがあるため、コンタミネーションには十分に注意が必要である。今回の分析にあたって開封後 5 年経過した化粧品中 (パラベン含有を表示) からパーセントオーダーのメチルパラベンを検出した。

- (注 3) 手が触れたガラス器具等は *p*-MP に汚染されている可能性が高いので、試料液が触れる部位は充分メタノールで洗浄する必要がある。表面に *p*-MP が付着していない手袋を使用すると、突発的な操作ブランクの上昇を抑えることができる。
- (注 4) 固相カートリッジは 20 mL の LC/MS 用メタノールと 5 mL の精製水でコンディショニングしたものを使用する。
- (注 5) 溶出液を KD 濃縮管に取り、N<sub>2</sub> パージにて 1 mL へとメスアップを行った後に内標準を加えて測定しても良い。
- (注 6) LC/MS の条件は、本測定に使用した機種 (Agilent1100/API3200) 特有のものである。

(注7) 装置検出下限(IDL)は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成17年3月)に従って、表1のとおり算出した。

表1 装置検出下限(IDL)の算出(Agilent1100/API3200)

物質名	p-MP
試料量(mL)	200
最終液量(mL)	1.0
注入量濃度(ng/mL)	0.10
装置注入量(μL)	10
結果1(ng/mL)	0.0815
結果2(ng/mL)	0.0735
結果3(ng/mL)	0.0935
結果4(ng/mL)	0.0800
結果5(ng/mL)	0.0875
結果6(ng/mL)	0.0799
結果7(ng/mL)	0.0720
平均値(ng/mL)	0.08113
標準偏差(ng/mL)	0.0075
IDL(ng/mL)	0.029
IDL試料換算値(ng/L)	0.15
S/N	15
CV(%)	9.3

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

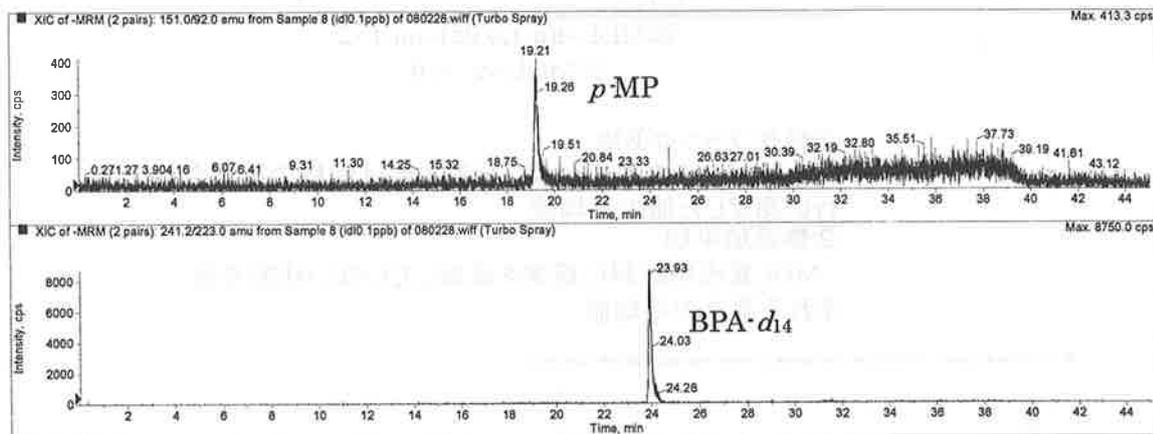


図1 IDL (0.10 ng/mL) 測定時のクロマトグラム

(注 8) 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実施の手引き」(平成 17 年 3 月)により、次のとおり算出した。

表 2 測定方法の検出下限(MDL)及び定量下限(MQL)の算出 (精製水)

物質名	p-MP
試料量(mL)	200
標準添加量(ng)	0.15
試料換算濃度(ng/L)	0.75
最終液量(mL)	1.0
注入量濃度(ng/mL)	0.15
装置注入量(μL)	10
操作ブランク平均(ng/L) <sup>①</sup>	0.268
無添加平均(ng/L) <sup>②</sup>	0.268
結果1(ng/L)	0.798
結果2(ng/L)	0.849
結果3(ng/L)	0.761
結果4(ng/L)	0.903
結果5(ng/L)	0.917
結果6(ng/L)	0.933
結果7(ng/L)	0.828
平均値(ng/L)	0.8556
標準偏差(ng/L)	0.064
MDL(ng/L)	0.25
MQL(ng/L)	0.64
S/N	30
CV(%)	7.5

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

$$\text{※MQL} = \sigma_{n-1} \times 10$$

①操作ブランク平均:

試料マトリクスのみがない状態で他は同様の操作を行い測定した値の平均値

②無添加平均:

MDL算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値

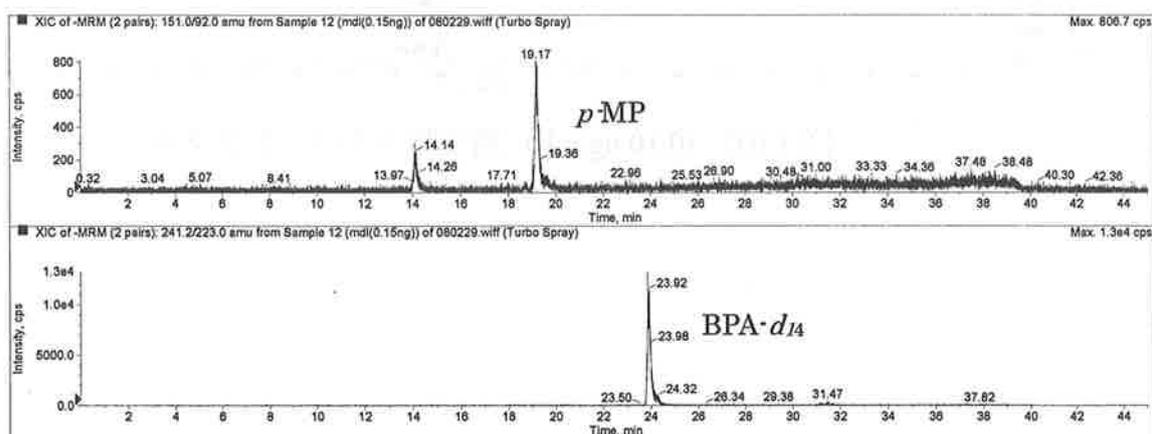


図 2 MDL 測定時(精製水 200 mL に 0.15 ng 添加)のクロマトグラム

## §2 解説

### 【分析法】

[フローチャート]

試料水 → Oasis HLB → 洗浄 → 乾燥 → 溶出 → 濃縮 → 内標添加 → LC/MS  
 200 mL,酸性 10 mL/min 精製水 N<sub>2</sub> MeOH エバポレーター ESI(-)-SRM

[検量線及びマススペクトル]

検量線及びマススペクトル等を次に示す。

[検量線]

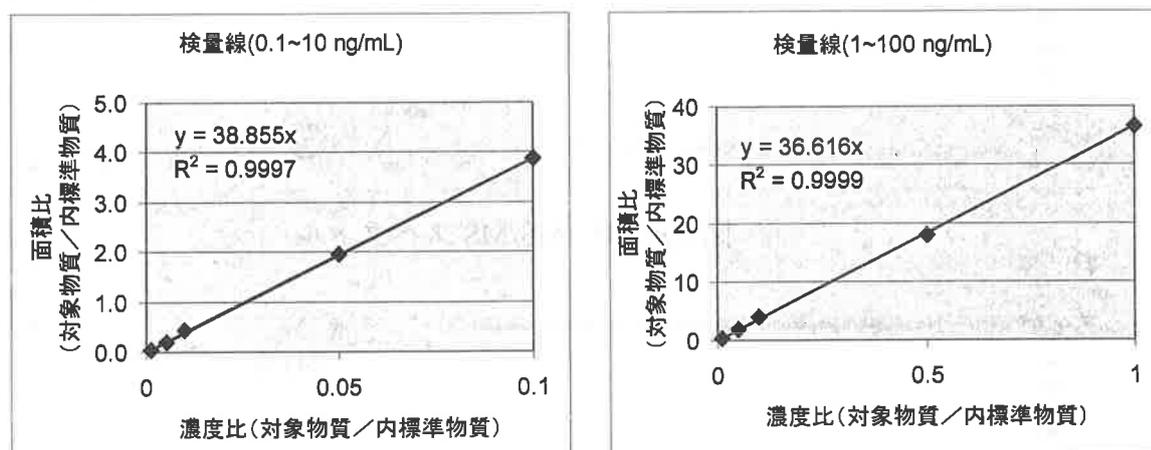


図3 検量線(内標準物質 100 ng/mL、対象物質 0.1~10 ng/mL 及び 1~100 ng/mL)

[マススペクトル]

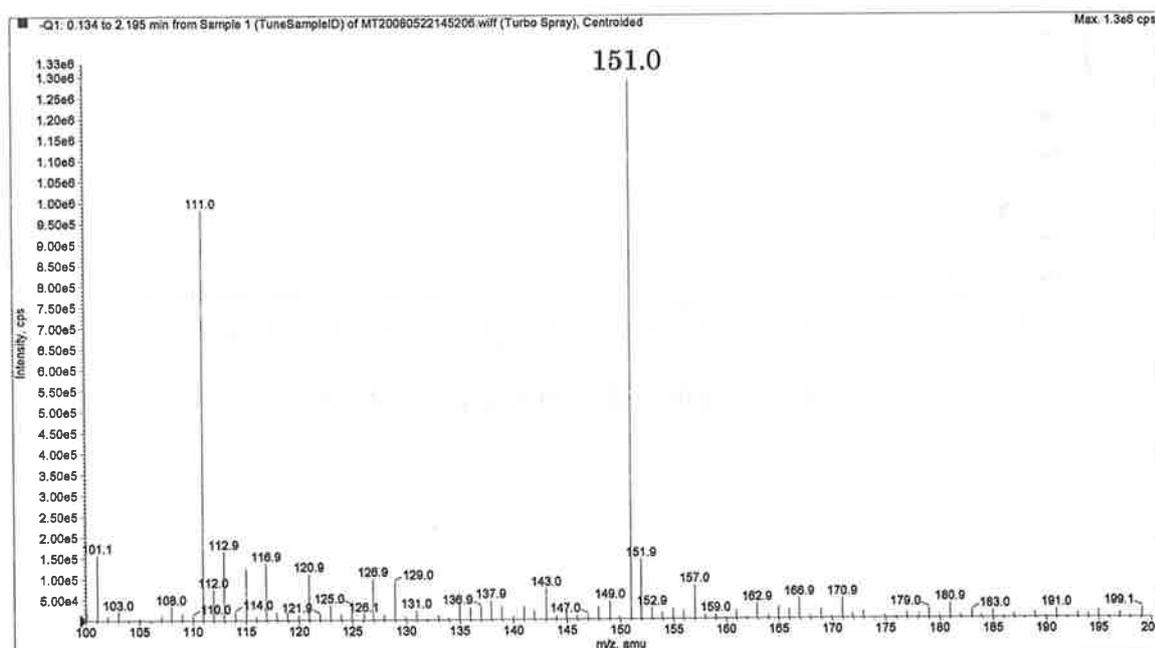


図4 p-MP MS スペクトル

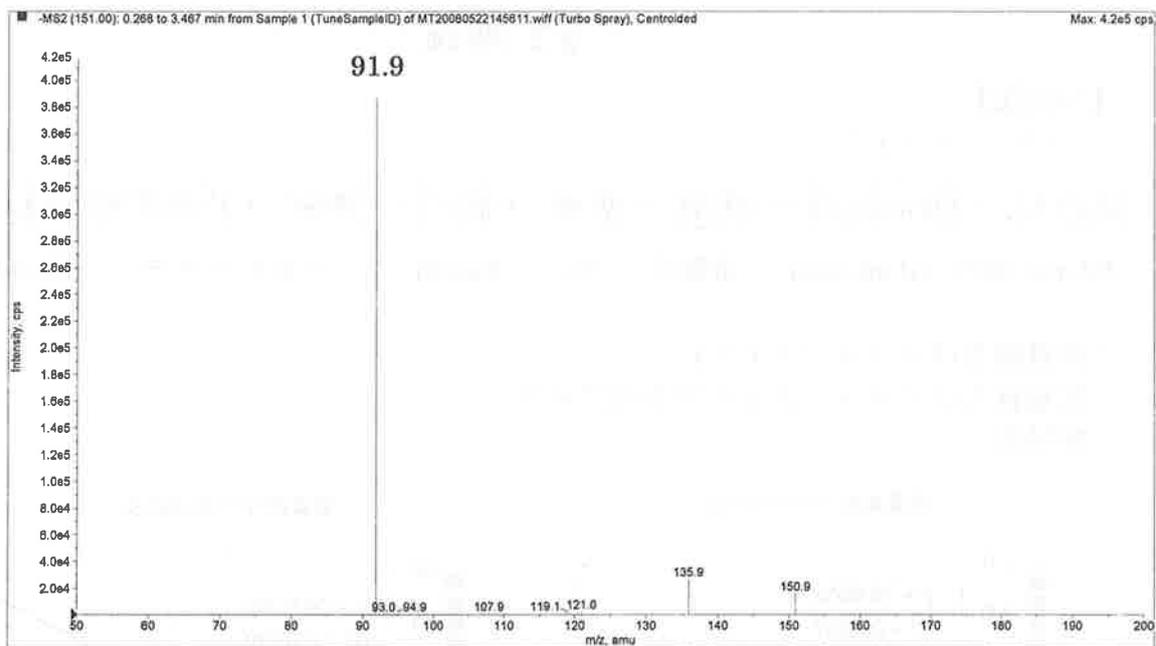


図 5 *p*-MP MS/MS スペクトル

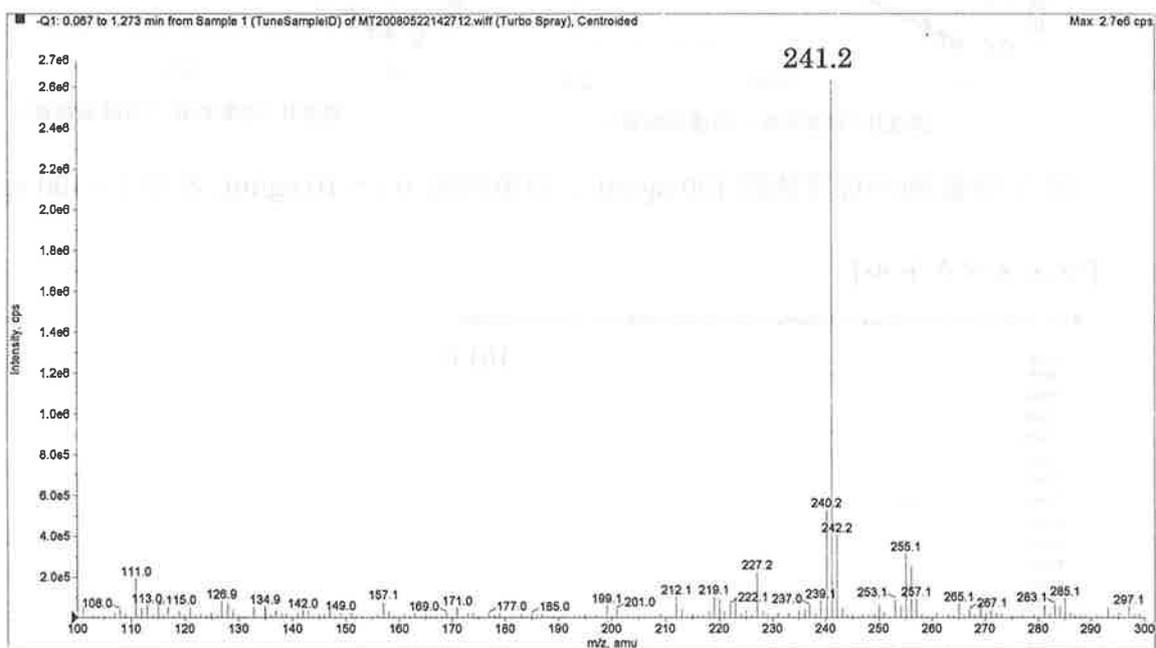


図 6 内標準物質 (BPA-*d*<sub>14</sub>) MS スペクトル

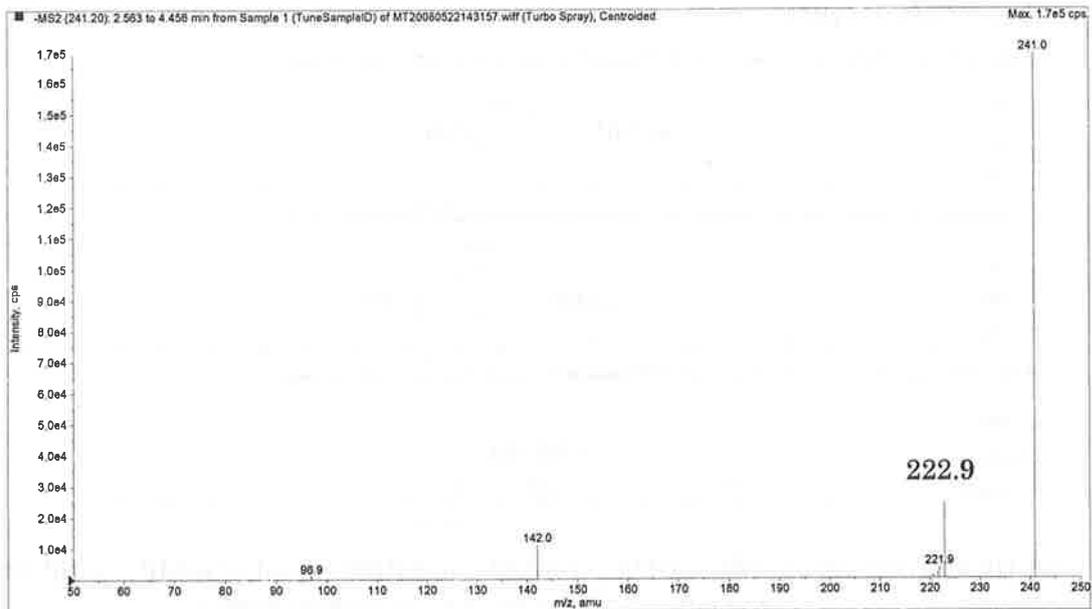


図7 内標準物質 (BPA- $d_{14}$ ) MS/MS スペクトル

[代表的なクロマトグラム]

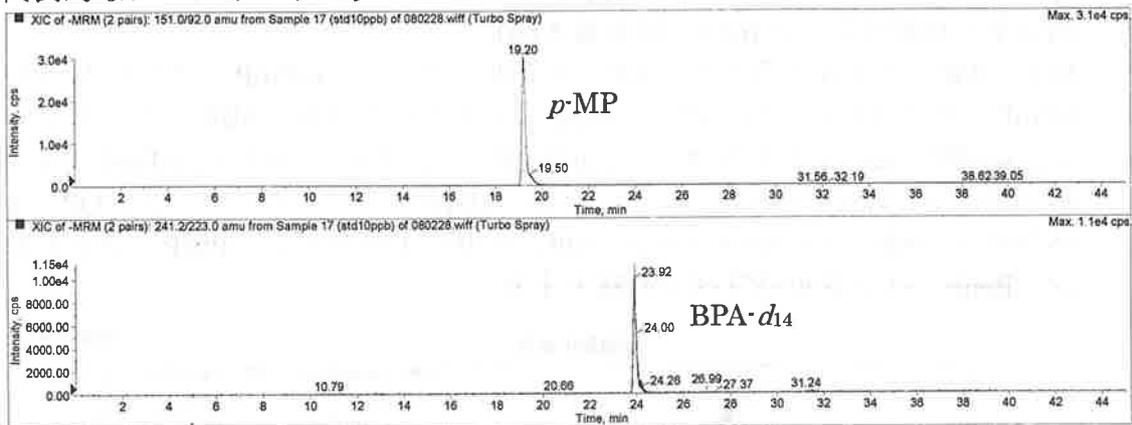


図8 検量線( $p$ -MP : 10 ng/mL / BPA- $d_{14}$  : 100 ng/mL)のクロマトグラム

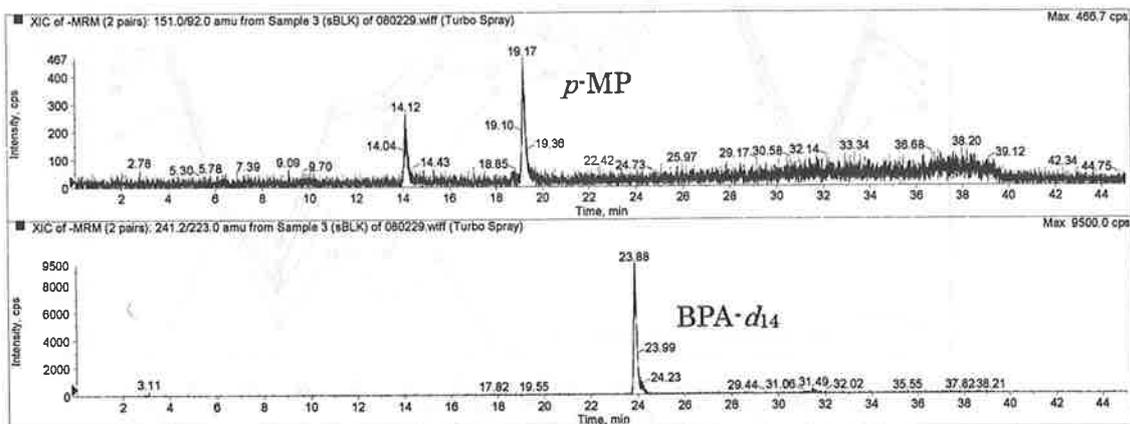


図9 操作ブランクのクロマトグラム  
わずかに検出

[構造異性体の分離]

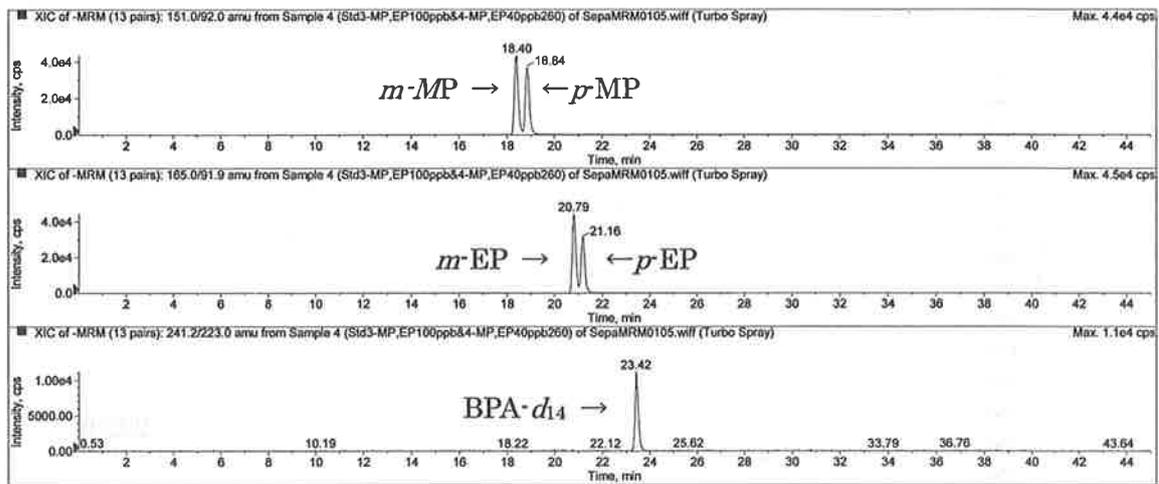


図 10 構造異性体の分離 (SRM) (*m*-MP、*m*-EP100 ng/mL/*p*-MP、*p*-EP 40 ng/mL) メタ体はパラ体に比べ 3~5 倍感度が悪い。

[抽出、クリーンアップ等の検討]

【試料の前処理及び試料液の調製】の項に従って操作し、固相カートリッジによる回収率の比較を行った(n=3、添加量 5 ng)。

但し、MP：メチルパラベン、EP：エチルパラベン、*n*-ProP：プロピルパラベン  
*i*-ProP：イソプロピルパラベン、*n*-BP：ブチルパラベン、*i*-BP：イソブチルパラベン、*sec*-BP：*sec*-ブチルパラベン、*n*-PenP：ペンチルパラベン、*i*-PenP：イソペンチルパラベン、Hex-P：ヘキシルパラベン、HepP：ヘプチルパラベン、OP：オクチルパラベン、NP：ノニルパラベン、DP：デカニルパラベン、PheP：フェニルパラベン、BenP：ベンジルパラベンの略とする。

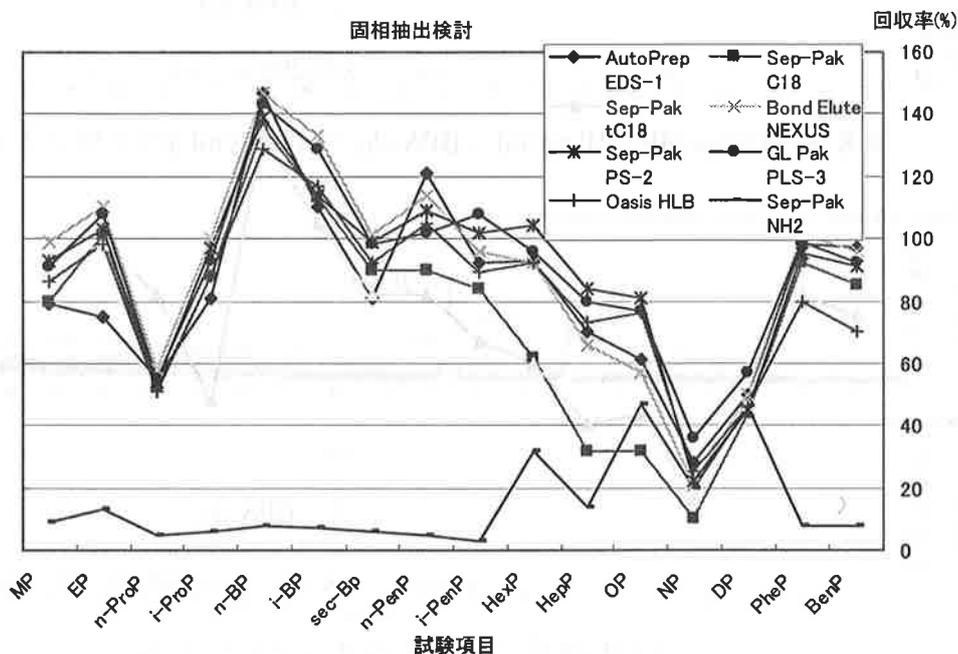


図 11 固相カートリッジによる回収率の違い

表3 固相からの回収率(%)

	Auto Prep EDS-1	Sep-Pak C18	Sep-Pak tC18	Bond Elute Nexus	Sep-Pak PS-2	GL Pak PLS-3	Waters Oasis	Sep-Pak NH2
MP	79	80	92	99	93	91	86	9
EP	75	101	98	110	103	108	98	13
<i>n</i> -ProP	55	52	82	58	54	55	51	5
<i>i</i> -ProP	81	88	48	100	97	93	88	6
<i>n</i> -BP	147	136	134	147	139	143	129	8
<i>i</i> -BP	110	113	105	133	114	129	117	7
<i>sec</i> -bp	81	90	82	101	99	98	92	6
<i>n</i> -PenP	121	90	82	114	109	102	105	5
<i>i</i> -PenP	92	84	67	96	102	108	89	3
HexP	93	62	60	92	104	96	92	32
HepP	70	32	40	66	84	80	73	14
OP	61	32	44	57	81	77	76	47
NP	28	10	16	21	22	36	25	20
DP	50	44	47	50	45	57	46	46
PheP	98	92	82	101	95	99	80	8
BenP	97	85	75	96	91	92	70	8

[低濃度添加回収試験]

精製水、河川水（紀の川）及び海水（紀の川河口）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 (mL)	添加量 (ng)	測定回数	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)
精製水	200	無添加	5	0.268	---	---
	200	0.15	7	0.856	78	7.5
	200	1.0	5	5.04	95	5.5
河川水	200	無添加	3	0.571	---	---
	200	1.0	3	5.61	101	6.0
海水	200	無添加	3	3.25	---	---
	200	1.0	3	7.95	94	4.4

[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5に示す。

表5 分解性スクリーニング試験結果

pH	初期濃度 (ng/mL)	1時間後の残存率 (%)	5日後の残存率	
			暗所 (%)	明所 (%)
5	1.0	100	100	
7	1.0	98	100	99
9	1.0	100	100	

[環境試料分析例]

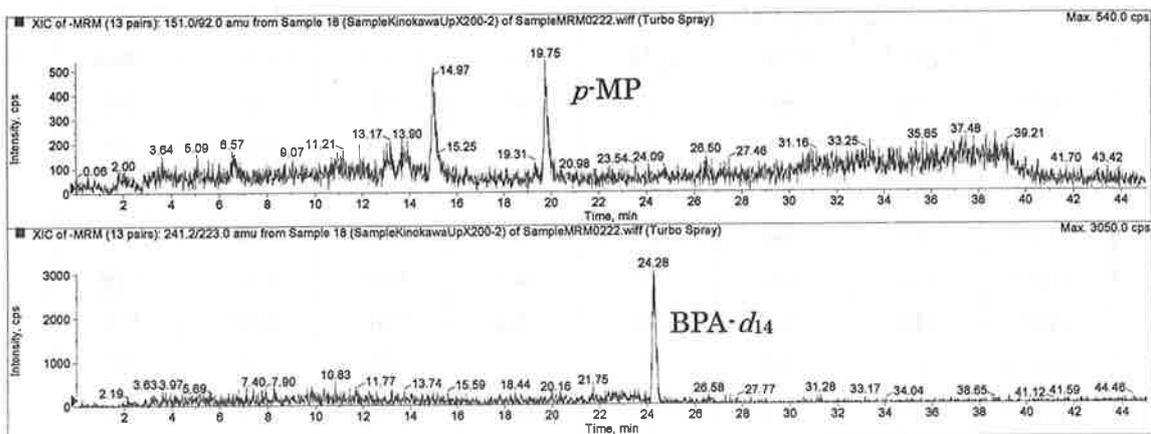


図 12 河川水（紀の川にて 0.571 ng/L 検出時）のクロマトグラム

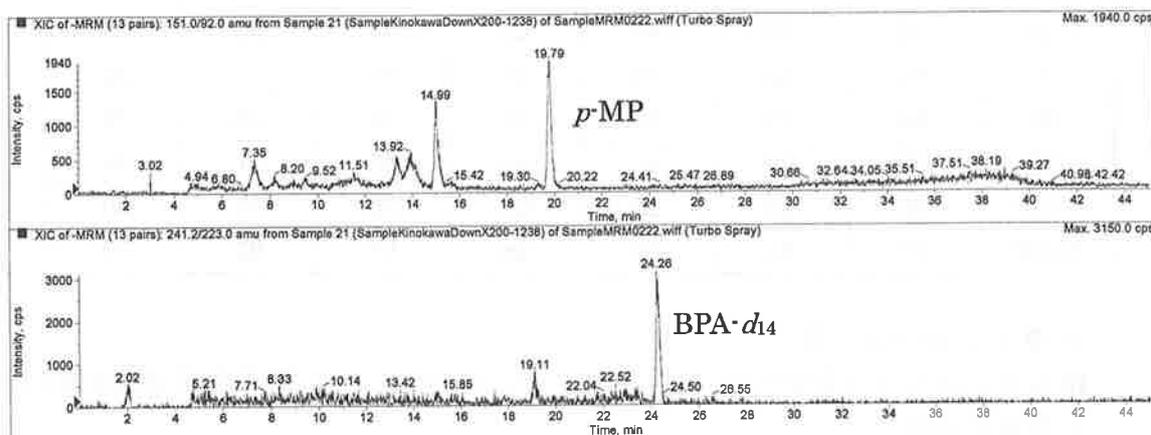


図 13. 海水（紀の川河口部にて 3.25 ng/L 検出時）のクロマトグラム  
河川水（紀の川）、海水（紀の川河口）から検出した。

[添加回収試験のクロマトグラム]

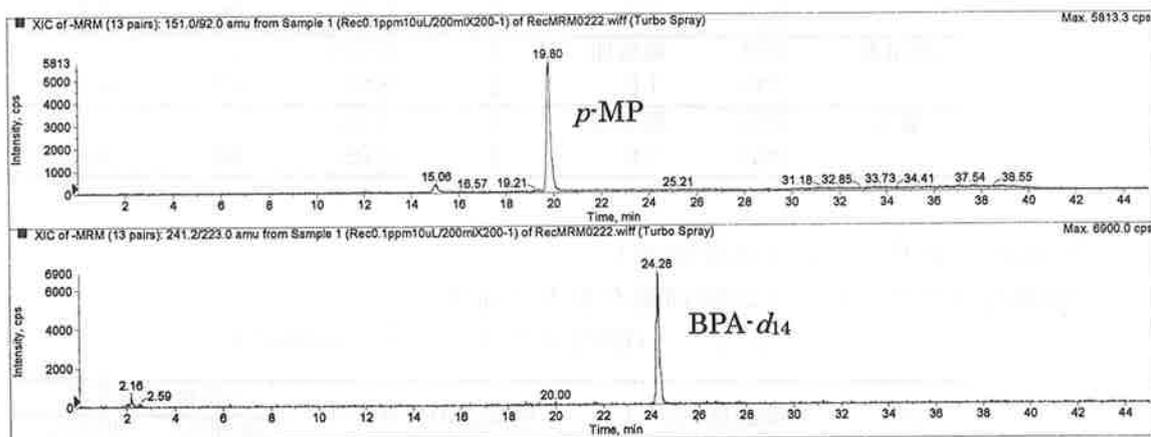


図 14 精製水 200 mL に p-MP 1.0 ng 添加したクロマトグラム

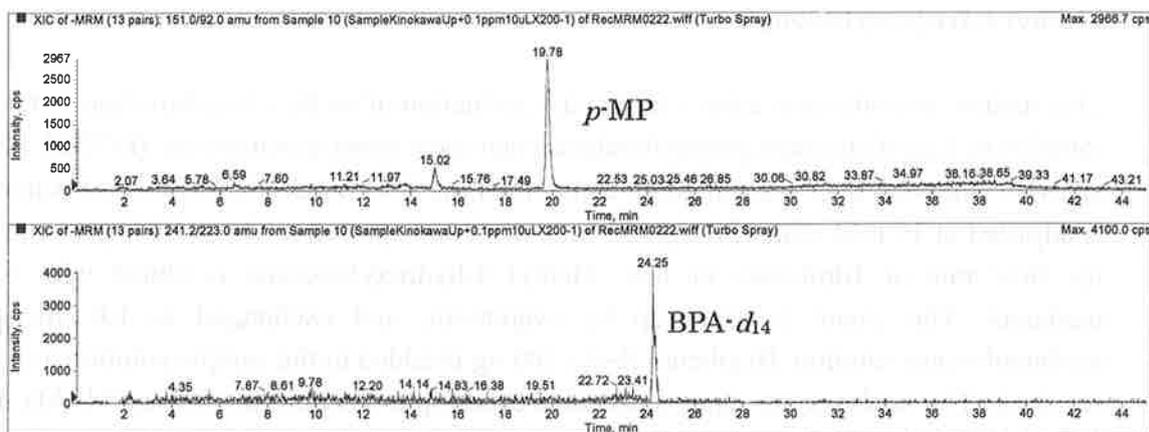


図 15 河川水（紀の川）200 mL に *p*-MP 1.0 ng 添加したクロマトグラム

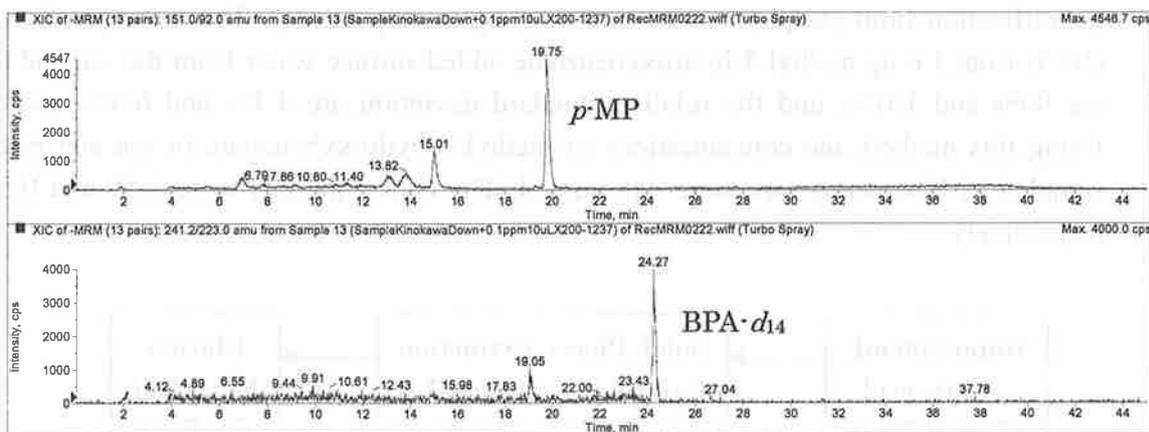


図 16 海水（紀の川）200 mL に *p*-MP 1.0 ng 添加したクロマトグラム

【評価】

本法により、水試料中 *p*-MP の 0.25 ng/L レベルの検出（0.64 ng/L レベルで定量）が可能である。

【参考文献】

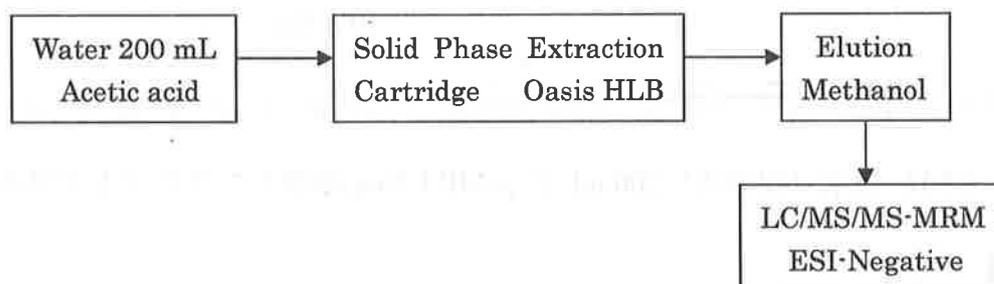
環境省環境安全課：LC/MS を用いた化学物質分析法開発マニュアル

【担当者氏名・連絡先】

担当 和歌山県環境衛生研究センター  
 住所 〒640-8272 和歌山市砂山南 3-3-45  
 TEL：073-423-9570 FAX：073-423-8798  
 担当者 高良 浩司、麓 岳文  
 E-mail：[takara\\_k0001@pref.wakayama.lg.jp](mailto:takara_k0001@pref.wakayama.lg.jp)  
[fumoto\\_t0001@pref.wakayama.lg.jp](mailto:fumoto_t0001@pref.wakayama.lg.jp)

## Methyl 4-Hydroxybenzoate

This method provides procedures for the determination of methyl 4-hydroxybenzoate in water samples by liquid chromatography/tandem quadrupole mass spectrometry (LC/MS/MS). This analysis will need to be careful about contamination. Two hundred milliliters of water sample is adjusted at 10 mM with 120 mg of acetic acid, and applied to Oasis HLB plus cartridge at the flow rate of 10mL/min or less. Methyl 4-hydroxybenzoate is eluted with 5 mL of methanol. The eluate is dried up by evaporator, and exchanged to 1.0 mL of 10% methanol-water solution. Bisphenol A-*d*<sub>14</sub> 100 ng is added to the sample solution as a internal standard. The analytes are determined in the multiple-reaction-monitoring(MRM) mode as the precursor/product ion pair of *m/z* 151/92 for methyl 4-hydroxybenzoate and *m/z* 241/223 for the internal standard bisphenol A-*d*<sub>14</sub>. The method detection limit (MDL) and the method quantification limit (MQL) is 0.25 and 0.64 ng/L, respectively. The average of recoveries (N=3) from 1.0 ng methyl 4-hydroxybenzoate added surface water from the sea and the river are 94% and 101%, and the relative standard deviation are 4.4% and 6.0%, respectively. Using this method, the concentrations of methyl 4-hydroxybenzoate in sea and river water sampled in Wakayama city were determined. The concentrations were 3.25 and 0.57 ng/L, respectively.



物質名	分析法フローチャート	備考
4-ヒドロキシ 安息香酸メチ ル	<pre>           graph LR             A["水試料 200 mL 酸性"] --&gt; B["抽出 固相カートリッジ Oasis HLB"]             B --&gt; C["洗浄 精製水"]             C --&gt; D["乾燥 N2 ガス"]             D --&gt; E["溶出 メタノール 5 mL"]             E --&gt; F["濃縮 エバポレーター"]             F --&gt; G["内標添加 BPA-d14"]             G --&gt; H["LC/MS/MS-SRM ESI, 負イオンモード"]           </pre>	LC/MS/MS-SRM 負イオン  カラム Ascentis RP-amide  長さ 100 mm  内径 2.1 mm  粒径 3 μm  検出下限 (水質) 0.25 ng/L