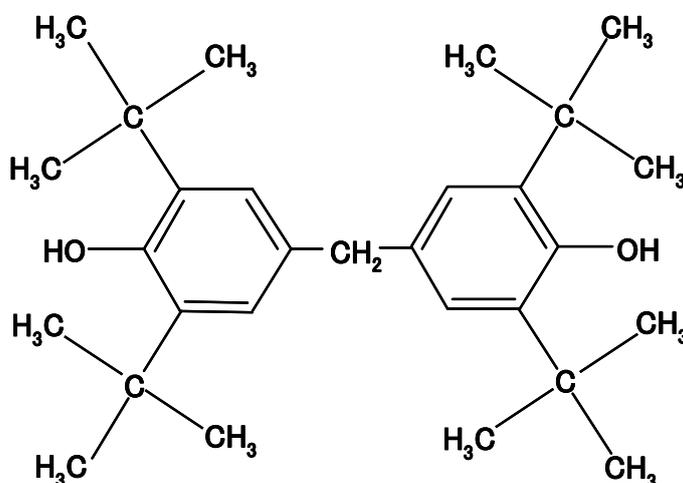


## 2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'- メチレンジフェノール

2,2',6,6'-Tetra-*tert*-butyl-4,4'-methylenediphenol

別名: 4,4'-メチレンビス [2,6-ビス (1,1-ジメチルエチル)] フェノール  
4,4'-Methylenebis[2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-Phenol]

### 【対象物質の構造】



CAS 番号: 118-82-1

分子式:  $C_{29}H_{44}O_2$

### 【物理化学的性状】

[平均分子量]	424.655
[モノアイソトピック質量]	424.3341
[沸点]	289 °C ( 40 mmHg ) <sup>1)</sup>
[融点]	154 °C <sup>1)</sup>
[比重あるいは密度]	1 g/cm <sup>3</sup> ( 25 °C ) <sup>2)</sup>
[水溶解度]	<10 mg/L ( 20 °C ) <sup>2)</sup> 0.0123 µg/L ( 25 °C ) <sup>3)</sup>
[log P <sub>ow</sub> ]	6.24 ( 20 °C ) <sup>2)</sup>
[ヘンリー定数]	3.30 × 10 <sup>-11</sup> atm・m <sup>3</sup> /mol ( 25 °C、計算値 ) <sup>4)</sup>
[蒸気圧]	< 7.5 mmHg ( 15 °C ) <sup>2)</sup>

[媒体別残留予測（フガシティーモデル等）]

LEVEL III Fugacity モデルによる媒体別分配割合<sup>5)</sup>

(%)

排出媒体	大気	水域	土壌	大気/水質/土壌
排出速度 (kg/hr・km <sup>2</sup> )	1000	1000	1000	1000 (各々)
大気	0.0	0.0	0.0	0.0
水域	0.2	1.2	0.0	0.7
土壌	85.1	0.0	99.8	46.6
底質	14.7	98.8	0.2	52.7

注) 数値は環境中で各媒体別に最終的に分配される割合を質量比として示したもの

1) Lide, CRC Handbook of Chemistry and Physics 84th Edition, CRC Press LLC (2003-2004)

2) EU, IUCLID (International Uniform Chemical Information Data Base) Data Sheet

3) 平成 18 年 10 月 既存化学物質点検（分解・蓄積）結果資料

4) Syracuse Research Corporation (SRC), HENRYWIN v3.10

(<http://www.epa.gov/oppt/exposure/pubs/episuitedi.htm> よりダウンロード)により計算された結果を示した。

5) Office of Pollution Prevention and Toxics of U.S. EPA and Syracuse Research

Corporation (SRC), Estimation Programs Interface (EPI) Suite v3.20

(<http://www.epa.gov/oppt/exposure/pubs/episuitedi.htm> よりダウンロード)により計算された結果を示した。

**【用途】**

プラスチック及び天然・合成ゴム製造時の油に添加する酸化防止剤、その他（熱伝導剤、冷却剤、潤滑剤）等

## § 1 分析法

### ( 1 ) 分析法の概要

#### 〔水質試料〕

水質試料にピロガロールと塩化ナトリウムを加え、ジクロロメタンで抽出し、脱水・濃縮後 LC/MS/MS-SRM(ESI-Positive)にて測定する。

#### 〔底質試料〕

底質試料にピロガロールを加え、メタノールで振とう及び超音波抽出する。遠心分離後、抽出液をヘキサン転溶及び分取後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、LC/MS/MS-SRM(ESI-Positive)にて測定する。

#### 〔生物試料〕

生物試料にピロガロールを加え、メタノールで振とう及び超音波抽出する。遠心分離後、抽出液をヘキサン転溶及び分取後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、LC/MS/MS-SRM(ESI-Positive)にて測定する。

### ( 2 ) 試薬・器具

#### 【試薬】

2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノール(TMDP と略す) : ALDRICH 社製 (99.0%以上) (注1)

ピロガロール、酢酸アンモニウム、塩化ナトリウム : 試薬特級 (関東化学)

ジクロロメタン、メタノール : 残留農薬分析用 (関東化学)

無水硫酸ナトリウム : 残留農薬・PCB 分析用 (関東化学)

精製水 : 純水製造装置(MILLIPORE 社製 Milli-Q A10)により精製した水。(注2)

シリカゲルカートリッジ : Sep-Pak<sup>®</sup> Plus Silica 690 mg ( Waters ) (注3)

10%ピロガロール水溶液 : ピロガロール 1 g を純水 10 mL に溶解したもの。(注4)

10%ピロガロール/メタノール溶液 : ピロガロール 1 g をメタノール 10 mL に溶解したもの。(注4)

0.1%ピロガロール/メタノール溶液 : 上記 10%ピロガロール/メタノール溶液 1 mL をメタノールで 100 mL に希釈したもの。

#### 【試薬の安全性・毒性】

目、呼吸器及び皮膚を刺激する。可燃性があるので、火気に注意する。取り扱いに際しては換気、防護具の着用等により取り扱いに十分注意する。

## 【機器・器具】

振とう機、ロータリーエバポレーター、超音波発生装置、遠心分離機、窒素ガス濃縮装置、ホモジナイザー、分液ロート(200 mL、300 mL)、メスシリンダー、ナス型フラスコ(100 mL、200 mL)、褐色ガラス製全量フラスコ、100 mL 遠沈管、10 mL スピッツ型試験管、全量ピペット、パスツールピペット、駒込ピペット、ガラスロート

## (3) 分析法

### 【試料の採取及び保存】(注5)

環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成18年3月)に従う。水質試料は採取後直ちに、試料1 Lに対し10%ピロガロール水溶液を0.1 mL加え、よく攪拌した後、出来るだけ速やかに冷暗所に保管し、前処理操作は試料採取後、速やかに行う。底質試料及び生物試料は直ちに分析出来ない場合、冷凍保管する。底質試料のふるい分けや、生物試料の調製ホモジナイズ後、直ちに出来ない場合も冷凍保管する。

### 【試料の前処理及び試験液の調製】

#### 〔水質試料〕(注6)

試料0.100 Lを200 mL分液ロートに取り、10%ピロガロール水溶液10  $\mu$ Lを加え溶解させる(注7)。次に塩化ナトリウム3 gを加えて溶解させる(注8)。ジクロロメタン50 mLを加えて、振とう機で10分間抽出し、静置後ジクロロメタン層を分取する。再び水層にジクロロメタン30 mLを加えて、同様の操作を繰り返す。ジクロロメタン層を合わせ、ガラスロートに積層した無水硫酸ナトリウムで脱水し、200 mL容ナス型フラスコで受ける。抽出液をロータリーエバポレーター(水浴40  $^{\circ}$ C以下、減圧下)で約1 mLまで濃縮する。この濃縮液を10 mLスピッツ型試験管に少量のジクロロメタンを用いて洗い込み、窒素気流下で濃縮乾固後、1 mL全量ピペットでメタノール1 mLを加えて溶解し、試験液とする。

#### 〔底質試料〕

湿泥試料(乾燥重量で5 g-dry)を遠沈管に採取し(注9)、10%ピロガロール水溶液10  $\mu$ L及びメタノール20 mLを加え、振とう機で10分間振とうした後、10分間超音波抽出を行う。その後、遠心分離(3000 rpm、10分間)を行い、上澄み液を300 mL分液ロートに分取する。残渣にメタノール20 mLを加え、同様に振とう、超音波抽出、遠心分離を行い、上澄み液を先の上澄み液に合わせる。上澄み液に3%塩化ナトリウム水溶液200 mL及びヘキサン30 mLを加え5分間振とうし、ヘキサン転溶を行う(注10)。下層を別の分液ロートに移し、ヘキサン20 mLを加え、同様に振とうを行い、ヘキサン層を合わせる。ヘキサン層をガラスロートに積層した無水硫酸ナトリウムで脱水し、100 mL容ナス型フラスコで受ける。ヘキサン抽出液をロータリーエバポレーター(水

浴 40 °C 以下、減圧下) で 30 ~ 40 mL 程度まで濃縮後、50 mL メスフラスコに移し、ヘキサンを標線まで加え十分混合する。

ヘキサン 5 mL でコンディショニングしたシリカゲルカラムカートリッジ (Sep-Pak<sup>®</sup> Plus Silica、690 mg) 上部にカラムリザーバー (Sep-Pak<sup>®</sup> リザーバー) をセットする。抽出液を 5 mL 全量ピペットで 5 mL 分取して負荷し、負荷後、カラムをヘキサン 5 mL で洗浄後、25%ジクロロメタン/ヘキサン 5 mL で溶出する。溶出液に 10%ピロガロール/メタノール溶液 10 µL を加え、窒素気流下で濃縮乾固後、1 mL 全量ピペットでメタノール 1 mL を加えて攪拌し、試験液とする。

〔生物試料〕(注 11)

ホモジナイズした生物試料 10.0 g-wet を遠沈管に採取し、10%ピロガロール水溶液 10 µL 及びメタノール 30 mL を加え、振とう機で 10 分間抽出した後、10 分間超音波抽出する。その後、遠心分離(3000 rpm、10 分間)を行い、上澄み液を 300 mL 分液ポートに分取する。残渣にメタノール 20 mL を加え、同様に振とう、超音波抽出、遠心分離を行い、上澄み液を先の上澄み液に合わせる。メタノール層を合わせ、ヘキサンを用いた転溶以降、底質試料と同様に操作し試験液とする。

【標準液の調製】(注 12)

標準物質として TMDP (ALDRICH 社製、99.0%以上) を用い、1.00 mg/mL 標準原液を作製する。

TMDP 標準原液は以下の方法で作製する。TMDP 100 mg を正確に秤取り (有効数字 3 桁) 100 mL 全量フラスコに入れ、メタノールを用いて溶解する。なお、濃度の許容誤差を 10%以下にできる他の計量器を用いてもよい。

標準原液を 0.1%ピロガロール/メタノール溶液で順次希釈し、0.1 ~ 10 ng/mL の検量線用標準液を作製する。

【測定】

〔LC/MS/MS 条件〕(注 13)

(LC 条件)

機種名 : Waters 社製 Alliance 2795

カラム : Waters 社製 XBridge Shield RP18 (2.1 mm × 150 mm、5 µm)

移動相 : A ; 2.5 mM 酢酸アンモニウム水溶液

B ; 2.5 mM 酢酸アンモニウムメタノール溶液

0 min            A : B = 30 : 70

0    10 min    A : 30    5、    B : 70    95    linear gradient

10    13 min    A : B = 5 : 95

13    18 min    A : B = 30 : 70    平衡化

流量 : 0.2 mL/min

カラム温度 : 40 °C

注入量 : 5 µL

(MS 条件)

使用機種 : Waters 社製 Quattro Premier XE

キャピラリー電圧 : 3 kV [ ESI-Positive ]

イオン源温度 : 110 °C

デゾルベーション温度 : 400 °C

コーンガス流量 : 50 L/hr

デゾルベーションガス流量 : 800 L/hr

コリジョンガス流量 : 0.2 mL/min

モニターイオン等

TMDP	コーン電圧 (V)	コリジョン エネルギー (eV)	プレカーサー イオン (m/z)	プロダクト イオン (m/z)
定量用	20	15	442.1	219.0
確認用		15	442.1	162.9

〔検量線〕

検量線用標準液は 0.1%ピロガロール/メタノール溶液とし、0.1 ~ 10 ng/mL の範囲にわたる 5 種類以上の濃度で作製する。

5 種類以上の検量線用標準液 5 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検量線の縦軸とする。分析した検量線用標準液に含まれる標準物質の濃度を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 ( $r^2$ ) を計算する。寄与率が 0.995 以上であることを確認する。各測定点における残さを計算し、測定誤差が  $\pm 15\%$  以下であることを確認する。

〔定量〕

試験液 5 µL を LC/MS/MS に注入し、得られた被検物質のピーク面積より、検量線を基にして、被検物質濃度を求める。

〔濃度の算出〕

[水質試料]

試料水中濃度  $C$  (ng/L) は次式より算出する。

$$C = (R_a - R_b) \cdot P/V$$

$R_a$  : 検量線から求めた被検物質の検液中濃度 (ng/mL)

$R_b$  : 検量線から求めたブランク試料中の被検物質の検液中濃度 (ng/mL)

$P$  : 最終液量 (mL)

$V$  : 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。

$V$  : 0.100 (L)

$P$  : 1.0 (mL)

即ち、

$$C = (R_a - R_b)1/0.100 \text{ (ng/L)}$$

である。

#### [底質試料]

試料中濃度  $C$  (ng/g-dry) は次式より算出する。

$$C = (R_a - R_b) \cdot P/V$$

$R_a$  : 検量線から求めた被検物質の検液中濃度 (ng/mL)

$R_b$  : 検量線から求めたブランク試料中の被検物質の検液中濃度 (ng/mL)

$P$  : 最終液量 (mL)

$V$  : 分取後試料量 (g-dry) 試料量 (g-dry)  $\times$  5/50

本分析法に従った場合、以下の数値を使用する。

$V$  : 0.50 (g-dry)

$P$  : 1.0 (mL)

即ち、

$$C = (R_a - R_b)1/0.5 \text{ (ng/g-dry)}$$

である。

#### [生物試料]

試料中濃度  $C$  (ng/g-wet) は次式より算出する。

$$C = (R_a - R_b) \cdot P/V$$

$R_a$  : 検量線から求めた被検物質の検液中濃度 (ng/mL)

$R_b$  : 検量線から求めたブランク試料中の被検物質の検液中濃度 (ng/mL)

$P$  : 最終液量 (mL)

$V$  : 分取後試料量 (g-wet) 試料量 (g-wet)  $\times$  分取 (5/50)

本分析法に従った場合、以下の数値を使用する。

$V$  : 1.00 (g-wet)

$P$  : 1.0 (mL)

即ち、

$$C = (R_a - R_b)1/1 \text{ (ng/g-wet)}$$

である。

[ 装置検出下限 (IDL) ]

本分析に用いた LC/MS/MS-SRM ( Waters 社製 Quattro Premier XE ) の IDL を下表に示す。(注 14)

対象試料	IDL (ng/mL)	試料量	分取	最終液量 (mL)	IDL 試料換算値
水質	0.024	0.100 (L)	1	1.0	0.24 (ng/L)
底質	0.024	5.00 (g-dry)	5/50	1.0	0.047 (ng/g-dry)
生物	0.024	10.0 (g-wet)	5/50	1.0	0.024 (ng/g-wet)

[ 測定方法の検出下限(MDL)、定量下限(MQL) ]

本測定方法における LC/MS/MS-SRM ( Waters 社製 Quattro Premier XE ) の検出下限 (MDL) 及び定量下限(MQL)を下表に示す(注 15)。

対象試料	試料量	分取	最終液量 (mL)	MDL	MQL
水質	0.100 (L)	-	1.0	1.1 (ng/L)	2.8 (ng/L)
底質	5.00 (g-dry)	5/50	1.0	0.18 (ng/g-dry)	0.47 (ng/g-dry)
生物	10.0 (g-wet)	5/50	1.0	0.11 (ng/g-wet)	0.29 (ng/g-wet)

## 注 解

(注 1)

2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノール(98.0%以上(GC)) [東京化成工業] も販売されている。

(注 2)

予めブランク試験を行い、万一被検物質が含まれている場合には、水 1 L に対し水質試料の分析にはジクロロメタン 100 mL、底質及び生物試料の分析にはヘキサン 100 mL で 2 回振とう洗浄し、被検物質を除いたものを用いる。

(注 3)

シリカゲルカラムは別メーカー製品を用いても良いが、事前にブランク、溶出条件等を確認すること。

(注 4)

10%ピロガロール水溶液、10%ピロガロール/メタノール溶液及び 1%ピロガロール/メタノール溶液は用事調製とする。

(注5)

水質試料は、採取時にピロガロールを添加し被検物質酸化を防止する。底質試料及び、生物試料は採取、調製後速やかに分析または冷凍保存し、分析時にピロガロールを添加する。

(注6)

水質試料からの抽出方法として、スチレンジビニルベンゼン系固相抽出法を検討したが、抽出後の固相カラム乾燥段階において、被検物質の酸化により十分な回収率が得られなかった(30%程度)ため、本法では液-液抽出法を採用した。なお、水質試料で夾雑物質が多く、ジクロロメタン抽出液を濃縮乾固させた際に、不揮発成分等が認められる場合は、一旦1~5 mLのヘキサンに再溶解させた後、【試料の前処理及び試験液の調製】の[底質試料]項と同様に、シリカゲルカラムを用いて精製する。

(注7)

試験操作中の被検物質酸化防止のためピロガロールを加える。試料採取時に直接試料にピロガロールを添加しているが、試料分析開始にも添加する。

(注8)

海水には塩化ナトリウムを加えなくてもよい。

(注9)

底質試料は、乾燥重量で5 g-dry 相当の湿泥状態の底質試料を分析する。なお、冷凍保管後の試料は、分析直前に解凍し、十分混合してから分析に供する。ピロガロールは試料秤量後直ちに添加する。

(注10)

メタノール抽出液からヘキサン転溶する際に、ヘキサン層にエマルジョンを生成する可能性がある。少量であれば静置によりヘキサン層を分取すればよいが、静置してもエマルジョンが消失しない場合には、メタノールを2~3 mL入れて軽く振り混ぜエマルジョンを消失させる。

(注11)

生物試料において、脂肪含量の多い試料での分析法適用確認のため【試料の前処理及び試験液の調製】の〔生物試料〕項の操作に従い、脂肪含量23.4%の生物試料(サンマ)を用いて試験した。結果は〔添加回収実験結果〕項の表7-2に示す。抽出液を5/50分取する本法において、脂肪含量20%程度の試料までは、脱脂操作を行わずに行う事が可能と判断した。なお、抽出溶媒にメタノールを用いるため、メタノール添加により試料が変性・凝固する試料については、振とう・超音波抽出前に試料にメタノールを加えた段階で、ホモジナイザーを用いたホモジナイズを行う。

(注12)

被検物質は冷暗所(4℃以下)のメタノール溶液中では半年間は安定である。

なお、ピロガロール無添加の標準液よりも添加(0.1%)の標準液の方が、LC/MS/MS測定時に被検物質のイオン強度が約1.5倍程度高くなった。試験溶液とほぼ状態を合

わせるため、標準液はピロガロール含有メタノールで作製する。

(注 13)

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

本条件では、被検物質のカラム溶出時間が安定するまで時間を要する。標準液の繰り返し測定を 5 回以上行い、溶出時間の安定を確認してから本測定を行う。

カラムの劣化に伴い溶出時間がずれることがあるが、ピーク形状が変わらず溶出時間が安定していれば使用できる。溶出時間が安定しない場合は、新しいカラムに交換する。

また、被検物質は LC シリンジ部からのキャリーオーバーが認められる。使用する装置において、洗浄溶媒にメタノールを用い、適切なシリンジ洗浄メソッドを用いる。

(注 14)

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 18 年 3 月)に従って、表 1 のとおり算出した。

表 1 水質・底質・生物試料に対する装置検出下限(IDL)の算出

物質名	TMDP		
媒体	水質	底質	生物
試料量	0.100 L	5.00 g-dry	10.0 g-wet
最終液量(mL)		1.0	
注入濃度(ng/mL)		0.10	
分取	-	5/50	5/50
装置注入量(μL)		5.0	
結果(ng/mL) test 1		0.0897	
test 2		0.100	
test 3		0.0991	
test 4		0.105	
test 5		0.101	
test 6		0.100	
test 7		0.0887	
平均値(ng/mL)		0.09764	
標準偏差(ng/mL)		0.0061	
CV (%)		6.3	
t(n-1、0.05)		1.94	
S/N		11	
IDL(ng/mL)		0.024	
IDL 試料換算値	0.24 ng/L	0.047 ng/g-dry	0.024 ng/g-wet

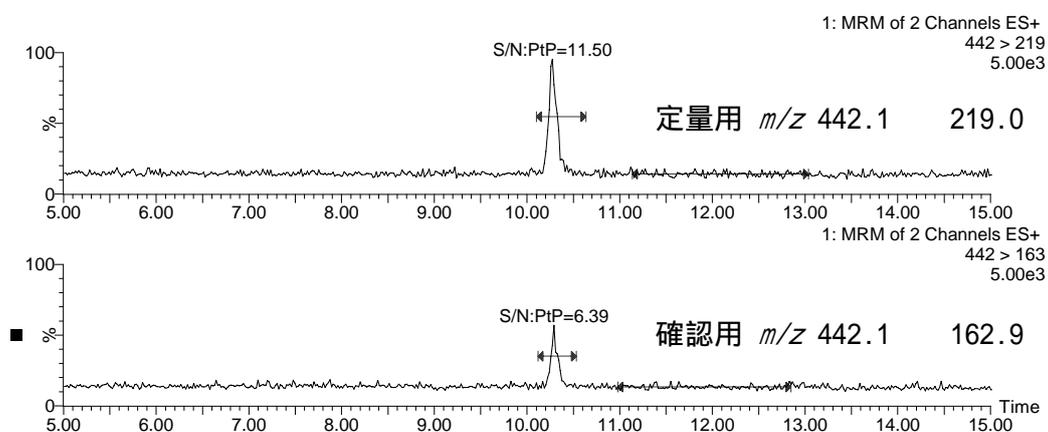


図 1 IDL 算出時の代表的なクロマトグラム(0.1 ng/mL)

(注 15)

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 18 年 3 月)により、表のとおり算出した。

表 2 水質試料に対する測定方法の検出下限(MDL)及び定量下限(MQL)の算出  
(河川水 多摩川)

物質名	TMDP
試料量(L)	0.100
標準添加量(ng)	0.25
試料換算濃度(ng/L)	2.5
最終液量(mL)	1.0
注入液濃度(ng/mL)	0.25
装置注入量(μL)	5.0
操作ブランク平均(ng/L)	< 1.1
無添加平均(ng/L)	< 1.1
結果(ng/L) test 1	2.76
test 2	3.10
test 3	2.36
test 4	3.17
test 5	2.58
test 6	2.66
test 7	2.81
平均値(ng/L)	2.777
標準偏差(ng/L)	0.28
MDL(ng/L)	1.1
MQL(ng/L)	2.8
S/N	27
CV (%)	10

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

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

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

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

なお、MDL 算出に際しては、試験開始直前に 10%ピロガロール水溶液を試料に添加混合後、標準添加して試験した。

表 3-1 底質試料に対する測定方法の検出下限(MDL)及び定量下限(MQL)の算出  
(砂状底質 多摩川、水分 33.6%)

物質名	TMDP
試料量 (g-dry)	5.00
標準添加量 (ng)	2.5
試料換算濃度 (ng/g-dry)	0.50
最終液量 (mL)	1.0
注入液濃度 (ng/mL)	0.25
分取	5/50
装置注入量 (μL)	5.0
操作ブランク平均 (ng/g-dry)	< 0.18
無添加平均 (ng/g-dry)	< 0.18
結果 (ng/g-dry) test 1	0.528
test 2	0.492
test 3	0.491
test 4	0.496
test 5	0.413
test 6	0.462
test 7	0.562
平均値 (ng/g-dry)	0.4920
標準偏差 (ng/g-dry)	0.047
MDL (ng/g-dry)	0.18
MQL (ng/g-dry)	0.47
S/N	25
CV (%)	10

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

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

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

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

なお、MDL 算出に際しては、試験開始直前に 10%ピロガロール水溶液を試料に添加混合後、標準添加して試験した。

表 3-2 底質試料に対する測定方法の検出下限(MDL)及び定量下限(MQL)の算出  
(泥状底質 大阪湾、水分 72.9 %)

物質名	TMDP
試料量(g-dry)	5.00
標準添加量(ng)	-
試料換算濃度(ng/g-dry)	-
最終液量(mL)	1.0
注入液濃度(ng/mL)	-
分取	5/50
装置注入量(μL)	5.0
操作ブランク平均(ng/g-dry)	< 0.15
無添加平均(ng/g-dry)	0.37
結果(ng/g-dry) test 1	0.438
test 2	0.368
test 3	0.379
test 4	0.372
test 5	0.320
test 6	0.329
test 7	0.370
平均値(ng/g-dry)	0.3680
標準偏差(ng/g-dry)	0.039
MDL(ng/g-dry)	0.15
MQL(ng/g-dry)	0.39
S/N	17
CV (%)	11

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

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

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

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

なお、MDL 算出に際しては、試験開始直前に 10 %ピロガロール水溶液を試料に添加混合後、標準無添加で試験した。

表 4 生物試料に対する測定方法の検出下限(MDL)及び定量下限(MQL)の算出  
(東京湾 スズキ、脂質 2.6 g/100 g)

物質名	TMDP
試料量 (g-wet)	10.0
標準添加量 (ng)	2.5
試料換算濃度 (ng/g-wet)	0.25
最終液量 (mL)	1.0
注入液濃度 (ng/mL)	0.25
分取	5/50
装置注入量 (μL)	5.0
操作ブランク平均 (ng/g-wet)	< 0.11
無添加平均 (ng/g-wet)	< 0.11
結果 (ng/g-wet) test 1	0.276
test 2	0.310
test 3	0.236
test 4	0.317
test 5	0.258
test 6	0.266
test 7	0.281
平均値 (ng/g-wet)	0.2777
標準偏差 (ng/g-wet)	0.029
MDL (ng/g-wet)	0.11
MQL (ng/g-wet)	0.29
S/N	20
CV (%)	11

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

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

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

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

なお、MDL 算出に際しては、試験開始直前に 10 %ピロガロール水溶液を試料に添加混合後、標準添加して試験した。

## §2 解説

### 【分析法】

〔フローチャート〕

[水質試料]

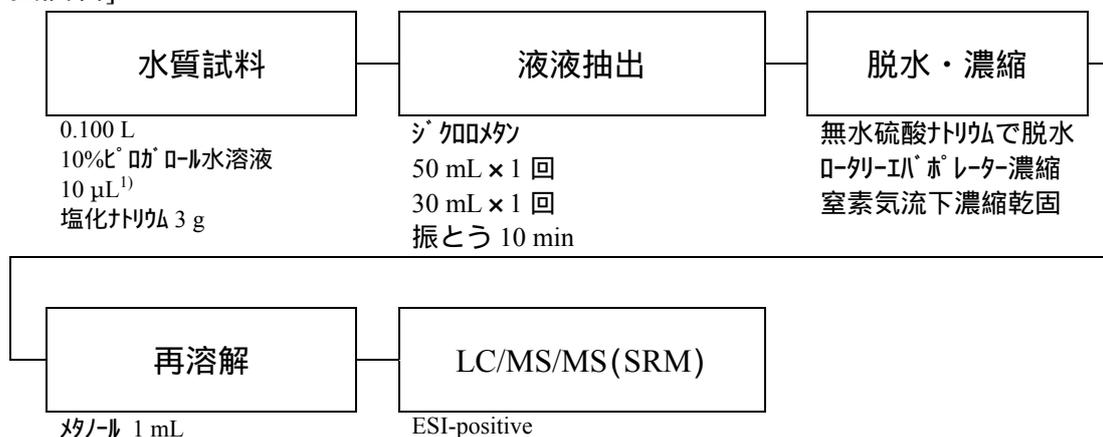


図 2-1 水質試料の分析法フローチャート

[底質試料]

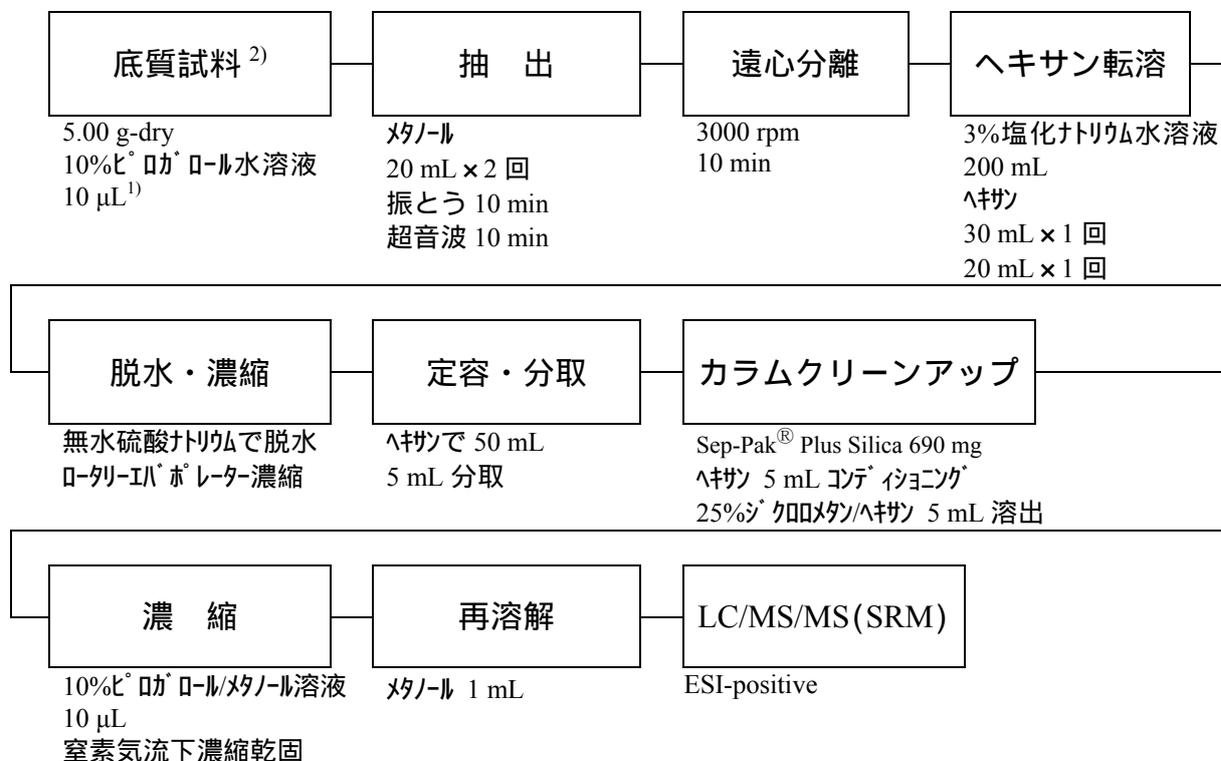


図 2-2 底質試料の分析法フローチャート

[生物試料]

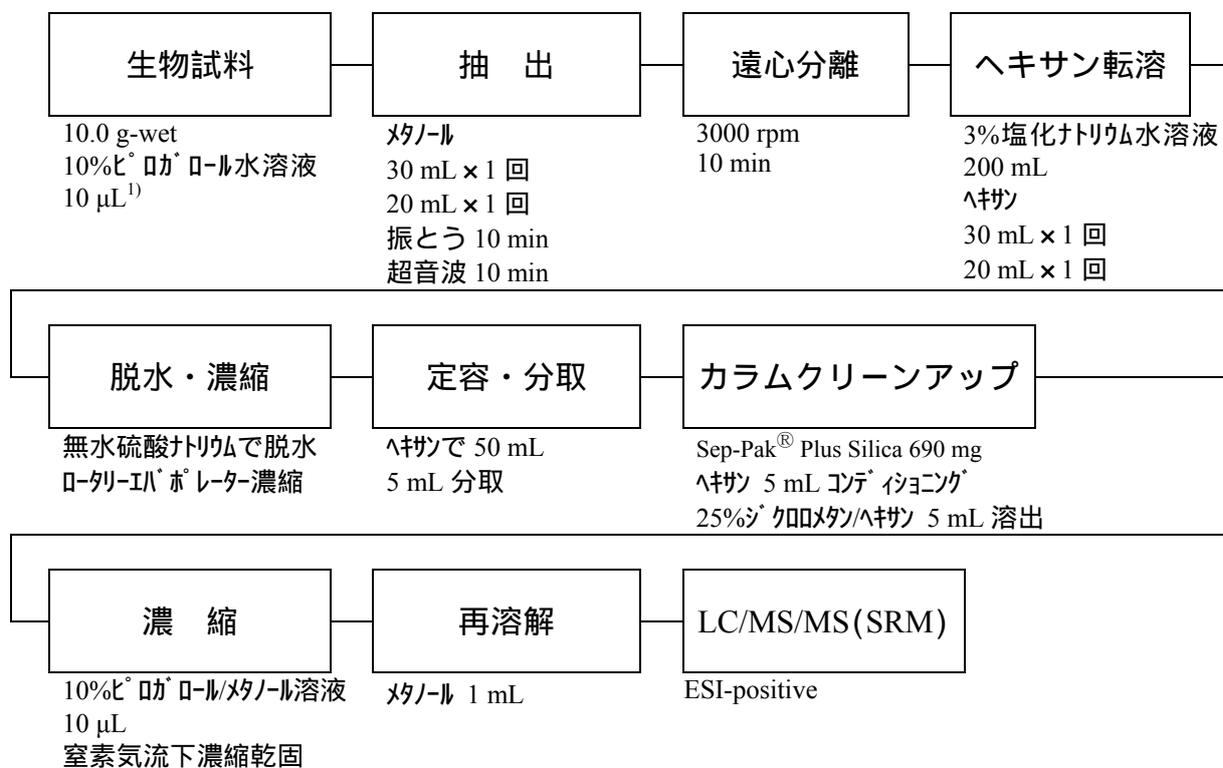


図 2-3 生物試料の分析法フローチャート

- 1) 試料秤量後に添加する。
- 2) 底質試料は、乾燥重量 5 g-dry 相当の湿泥状態で分析する。

[ 検量線 ]

検量線を図 3 に示す。

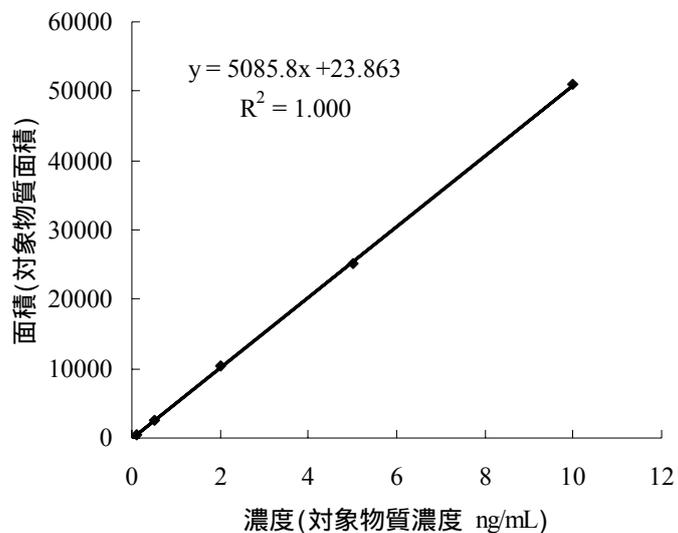


図 3 検量線 (対象物質濃度範囲 0.1 ~ 10 ng/mL)

[ マススペクトル ]

マススペクトル(プレカーサーイオン及びプロダクトイオン)を図 4 及び 5 に示す。

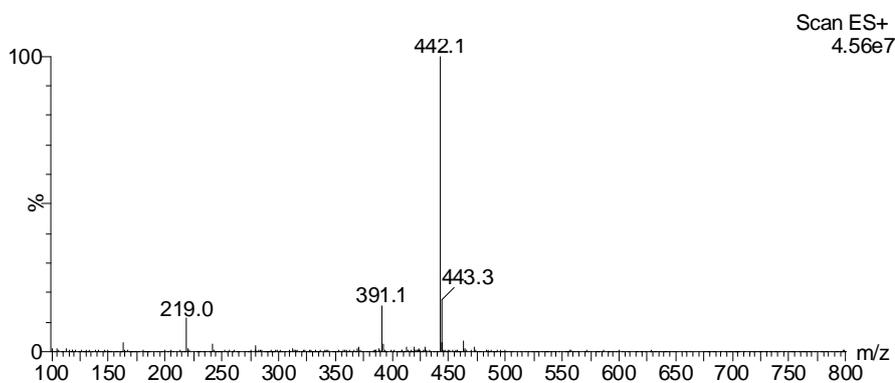


図 4 TMDP (プレカーサーイオン)

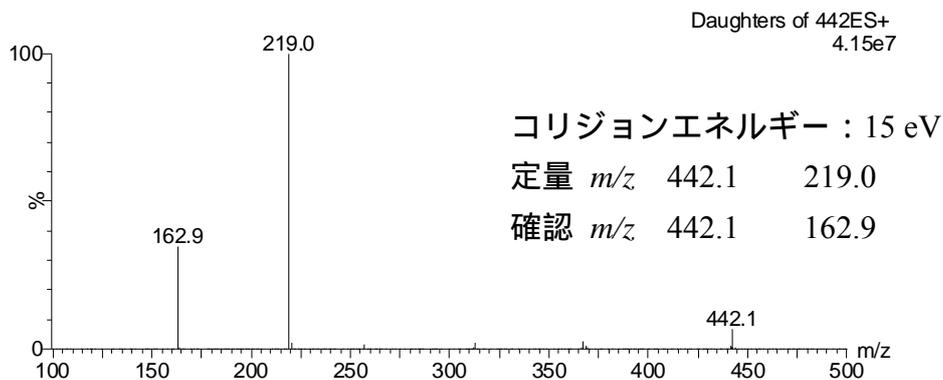


図 5 TMDP (プレカーサーイオン 442.1 に対するプロダクトイオン)

〔添加回収実験結果〕

【試料の採取及び保存】に従い採取した試料に、測定対象物質を添加し、【試料の前処理及び試験液の調製】の操作に従い、添加回収実験を試行数5回で行った。その結果を表5～7に示した。なお、大阪湾底質以外の無添加試料ではMDL以下であった。

〔水質試料〕

表 5-1 添加回収実験結果(河川水：多摩川)

物質名	試料量 (L)	添加量 (ng)	測定回数 (回)	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)
TMDP	0.100	無添加	1	ND	—	—
	0.100	3	5	30	102	1.5

なお、試料採取から1時間以内に分析着手した。

表 5-2 添加回収実験結果(海水：東京湾)

物質名	試料量 (L)	添加量 (ng)	測定回数 (回)	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	変動係数 (%)
TMDP	0.100	無添加	1	ND	—	—
	0.100	3	5	25	85	6.0

なお、試料採取から3時間以内に分析着手した。

\* 本添加回収実験では、シリカゲルカラムを用いたクリーンアップを行った。

〔底質試料〕

表 6-1 添加回収実験結果(砂状底質：多摩川 水分 33.6%)

物質名	試料量 (g-dry)	添加量 (ng)	分取	測定回数 (回)	検出濃度 (ng/g-dry)	回収率 (%)	変動係数 (%)
TMDP	5.00	無添加	5/50	1	ND	—	—
	5.00	25	5/50	5	4.8	96	5.8

なお、試料解凍開始から3時間以内に分析着手した。

表 6-2 添加回収実験結果(泥状底質：大阪湾 水分 72.9%)

物質名	試料量 (g-dry)	添加量 (ng)	分取	測定回数 (回)	検出濃度 (ng/g-dry)	回収率 (%)	変動係数 (%)
TMDP	5.00	無添加	5/50	7	0.37	—	—
	5.00	25	5/50	5	4.2	83	3.7

なお、試料解凍開始から3時間以内に分析着手した。

\* 回収率実験の検出濃度は、無添加試料の検出濃度を差引いて算出した。

〔生物試料〕

表 7-1 添加回収実験結果(東京湾スズキ 脂質 2.6 g/100 g)

物質名	試料量 (g-wet)	添加量 (ng)	分取	測定回数 (回)	検出濃度 (ng/g-wet)	回収率 (%)	変動係数 (%)
TMDP	10.0	無添加	5/50	1	ND	—	—
	10.0	25	5/50	5	2.5	101	4.6

なお、試料解凍開始から 3 時間以内に分析着手した。

表 7-2 添加回収実験結果(サンマ 脂質 23.4 g/100 g)

物質名	試料量 (g-wet)	添加量 (ng)	分取	測定回数 (回)	検出濃度 (ng/g-wet)	回収率 (%)	変動係数 (%)
TMDP	10.0	無添加	5/50	1	ND	—	—
	10.0	25	5/50	5	2.1	85	5.1

なお、試料解凍開始から 3 時間以内に分析着手した。

\* 脂肪含量の多い試料に対する分析法適用確認として、サンマを用いて試験した。

〔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 8 に示す。なお、純水をリン酸及び水酸化ナトリウムを用いて pH 調整し、調整溶液 100 mL にそれぞれ TMDP を 1000 ng 添加して試験した。なお、ピロガロール無添加で行った。

表 8 分解性スクリーニング試験結果

pH	初期濃度 (ng/mL)	1 時間経過後の残存率 (%)		
		1 時間経過後の残存率 (%)	5 日間経過後の残存率 (%) 暗所	5 日間経過後の残存率 (%) 明所
5	10	95	30	-
7	10	91	52	4
9	10	94	22	-

[ 環境試料分析例 ]

[ 水質試料 ] 河川水(多摩川)から対象物質は検出されなかった。

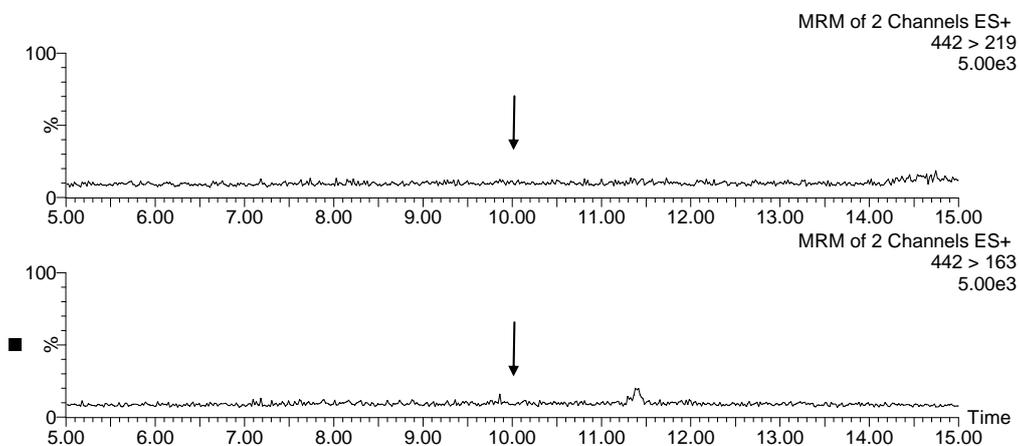


図 6-1 操作ブランクのクロマトグラム

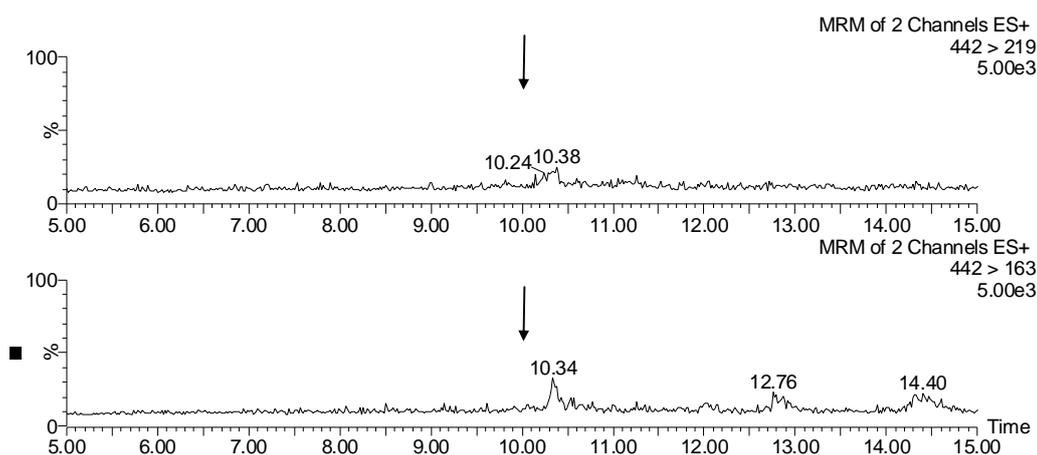


図 6-2 無添加のクロマトグラム(多摩川 河川水：無添加)

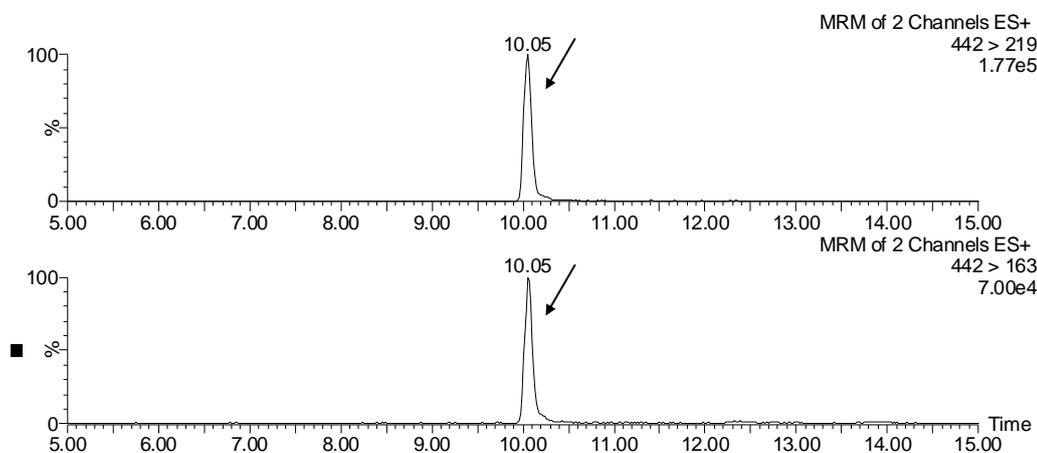


図 6-3 添加試料のクロマトグラム(多摩川 河川水：3 ng 添加)

〔水質試料〕海水(東京湾)から対象物質は検出されなかった。

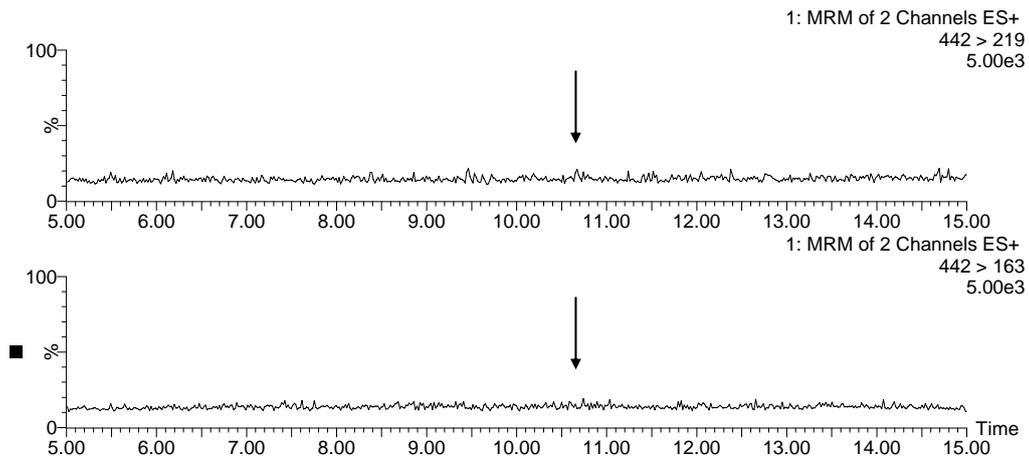


図 7-1 操作ブランクのクロマトグラム

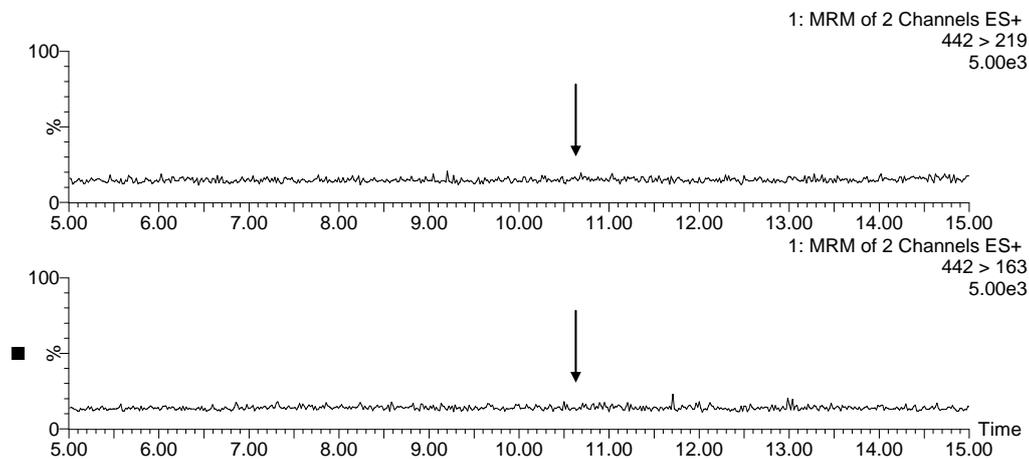


図 7-2 無添加のクロマトグラム(東京湾 海水：無添加)

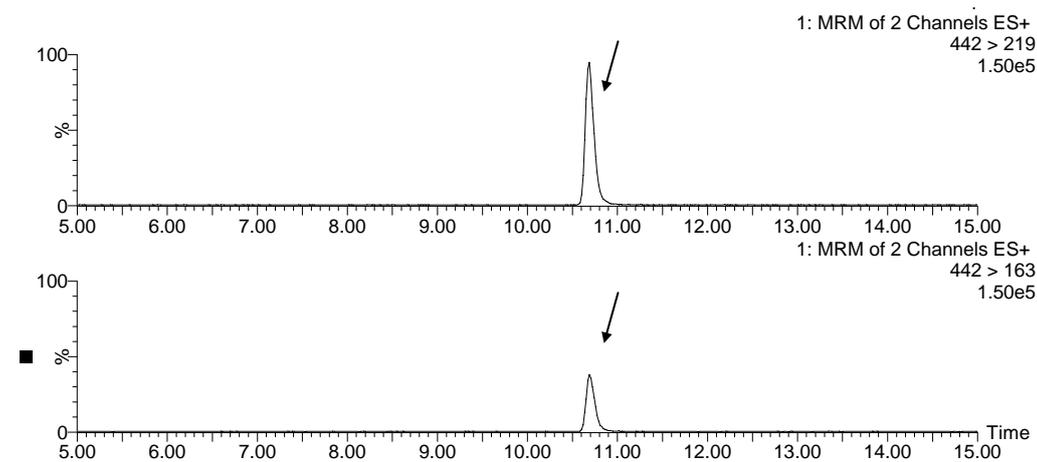


図 7-3 添加試料のクロマトグラム(東京湾 海水：3 ng 添加)

〔底質試料〕多摩川砂状底質から対象物質は検出されなかった。

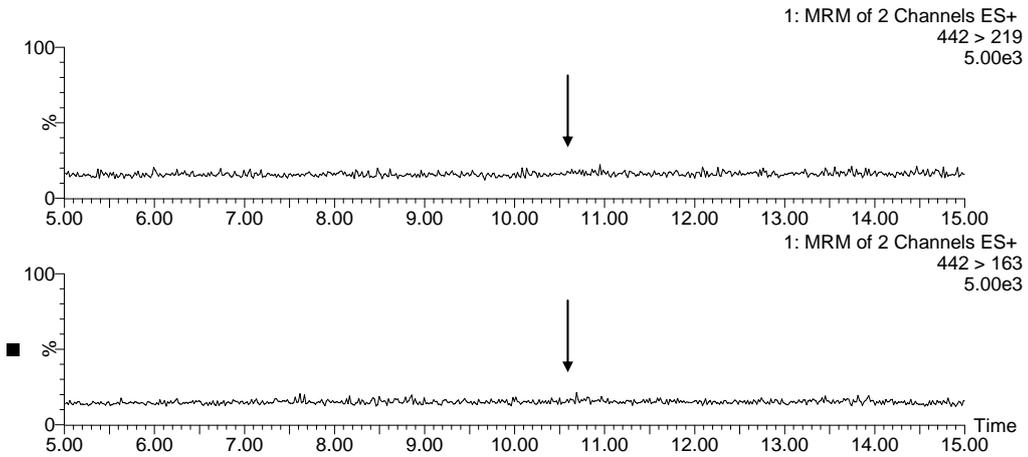


図 8-1 操作ブランクのクロマトグラム

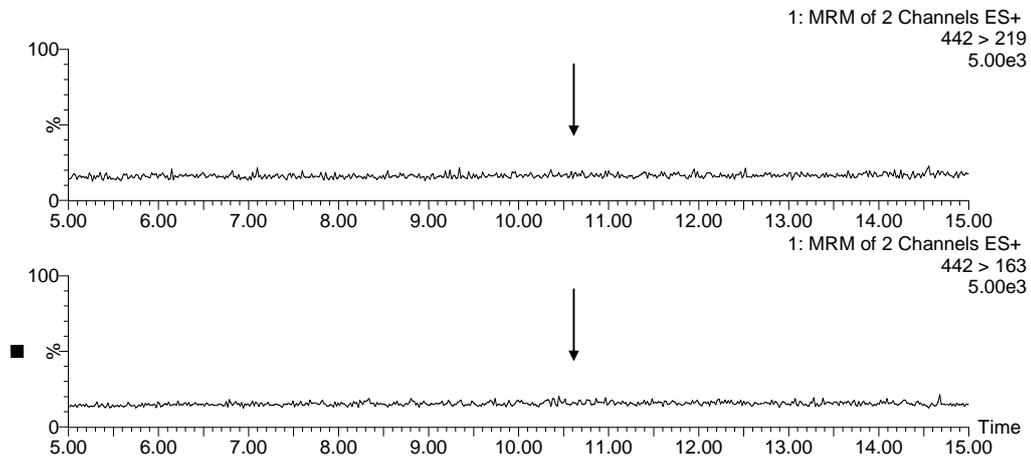


図 8-2 無添加のクロマトグラム(多摩川 底質：無添加)

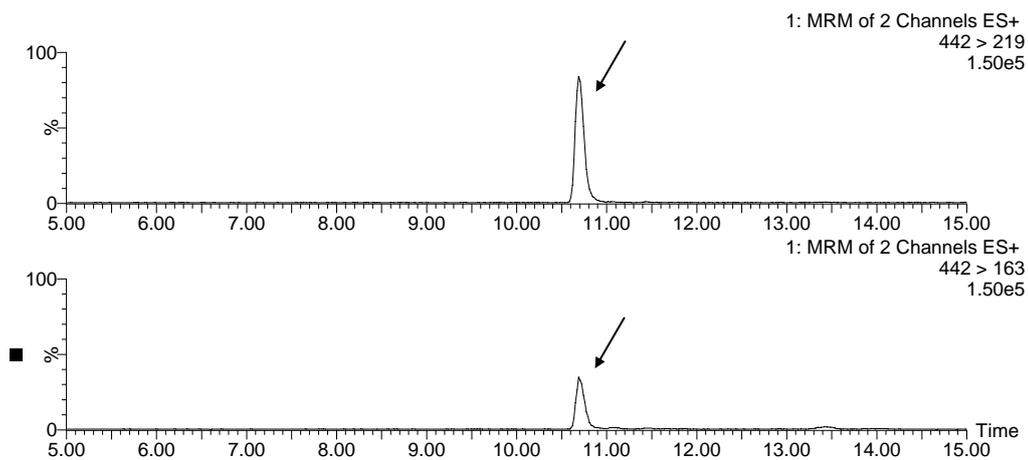


図 8-3 添加試料のクロマトグラム(多摩川 底質：25 ng 添加)

〔底質試料〕大阪湾底泥から濃度として 0.37 ng/g-dry の対象物質が検出された。

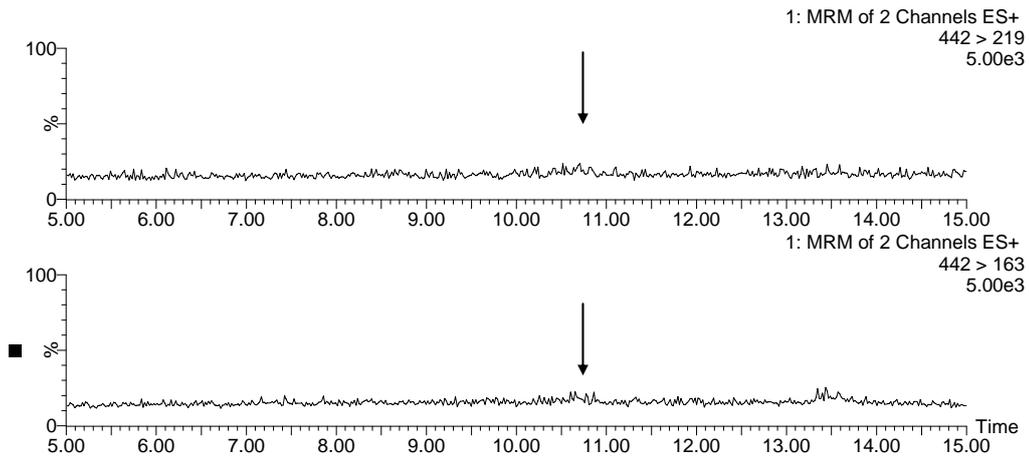


図 9-1 操作ブランクのクロマトグラム

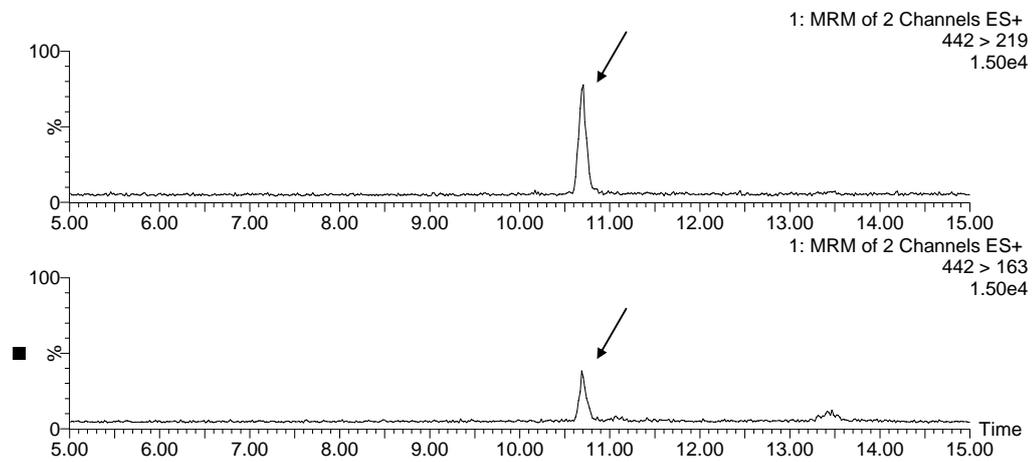


図 9-2 無添加のクロマトグラム(大阪湾 底質：無添加)

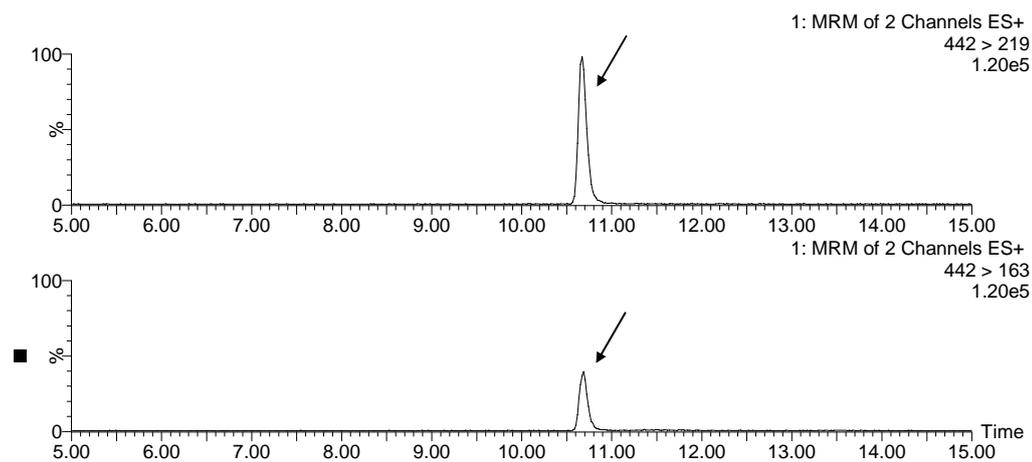


図 9-3 添加試料のクロマトグラム(大阪湾 底質：25 ng 添加)

〔生物試料〕 生物試料(スズキ)から対象物質は検出されなかった。

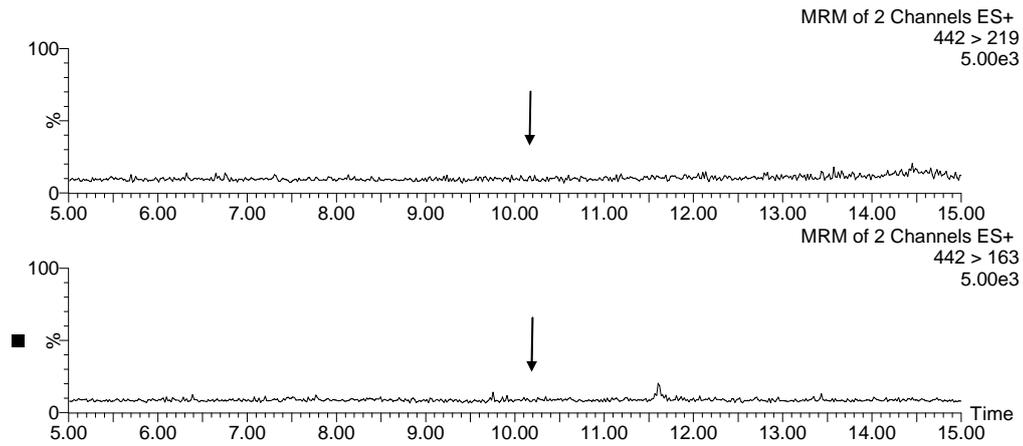


図 10-1 操作ブランクのクロマトグラム

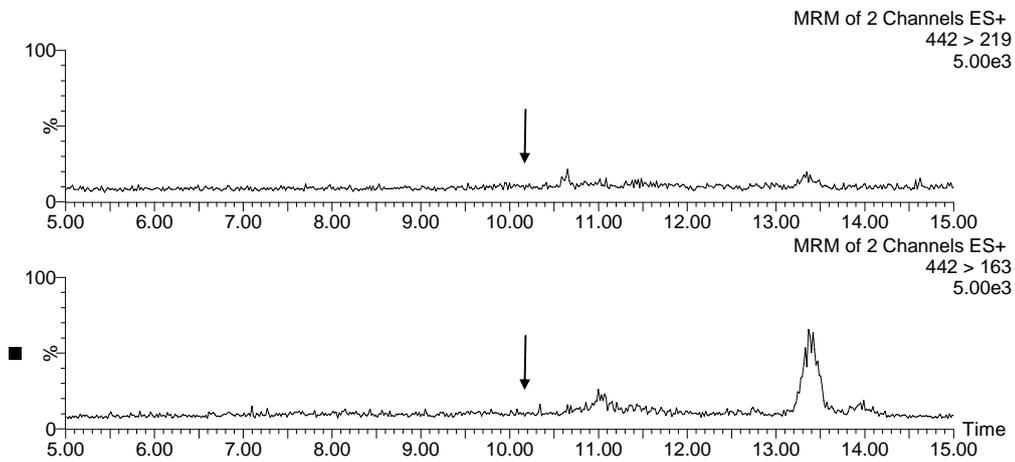


図 10-2 無添加のクロマトグラム(スズキ：無添加)

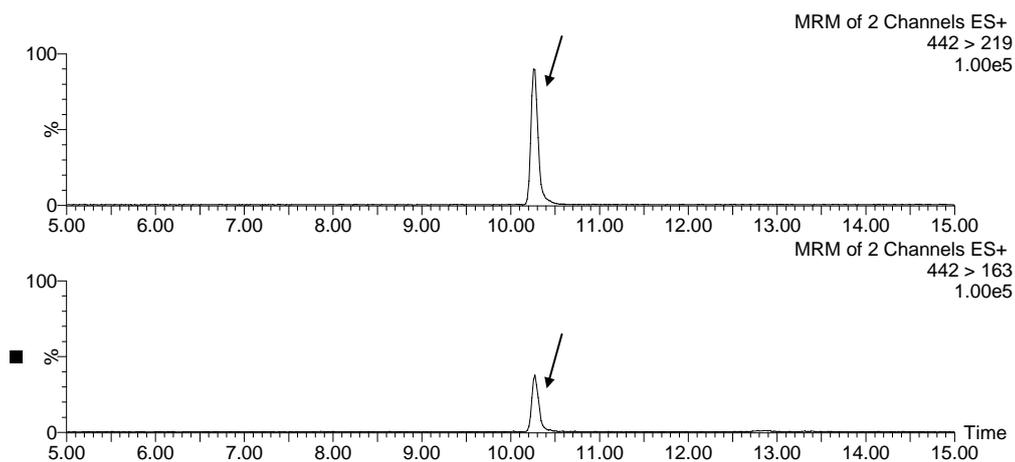


図 10-3 添加試料のクロマトグラム(スズキ：25 ng 添加)

〔生物試料〕 生物試料(サンマ)から対象物質は検出されなかった。

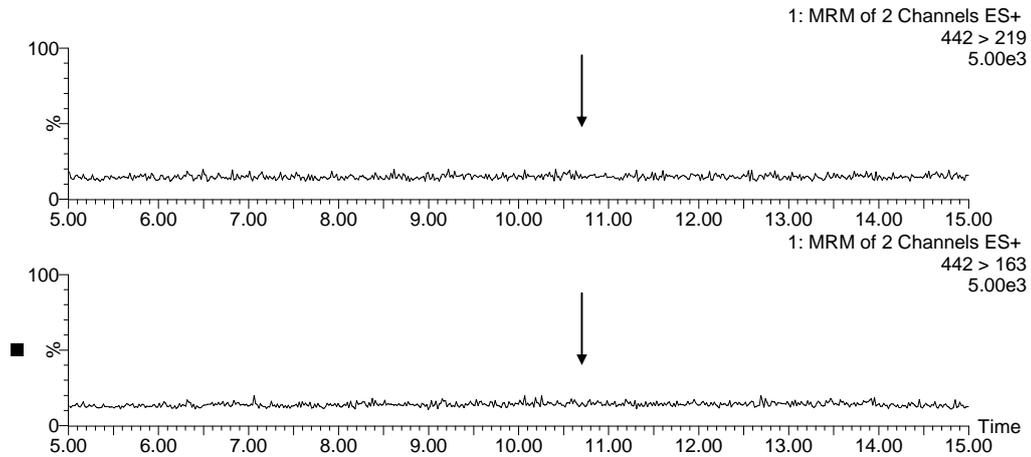


図 11-1 操作ブランクのクロマトグラム

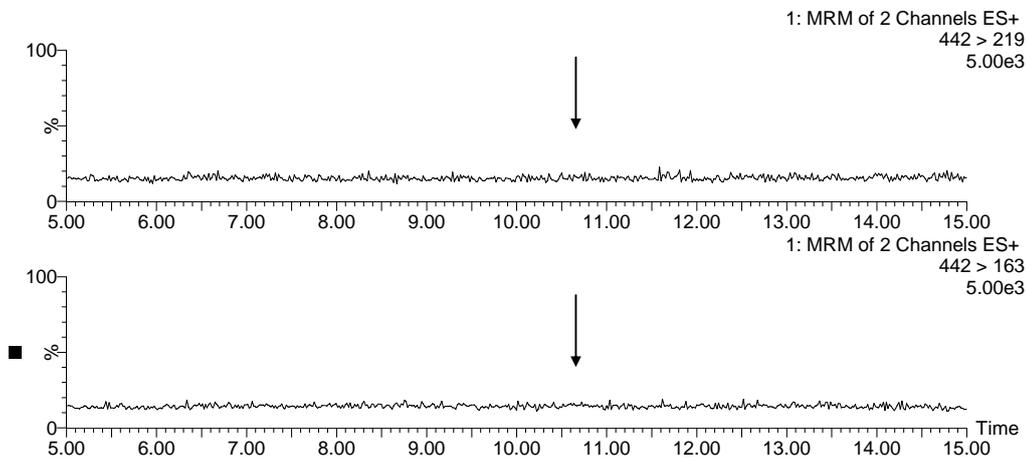


図 11-2 無添加のクロマトグラム(サンマ：無添加)

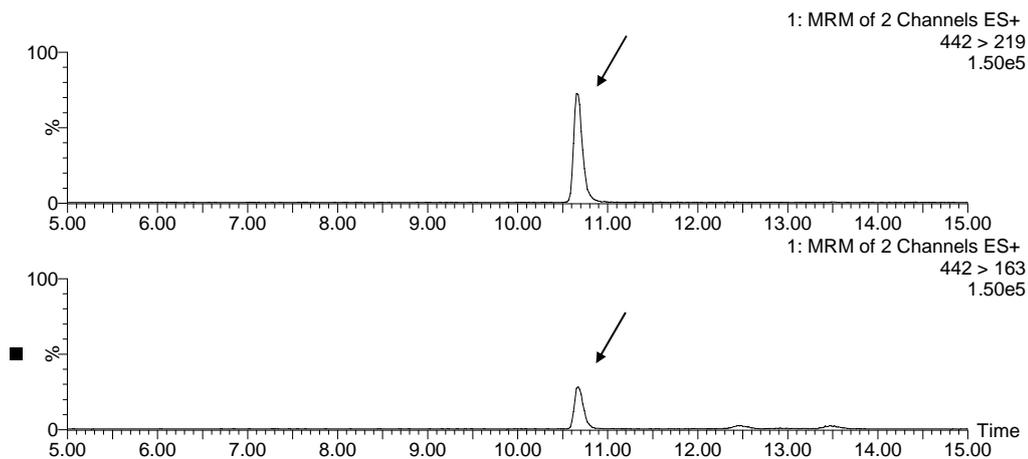


図 11-3 添加試料のクロマトグラム(サンマ：25 ng 添加)

〔マススペクトル選定検討〕

被検物質は、移動相が水及びメタノールのみでは、ESI-Positive 及び APCI-Positive ともプロトン付加イオンの生成は確認出来なかった。ESI-Negative においては、キャピラリー電圧 3 kV、コーン電圧 75 V の条件下で、脱プロトン分子[M-H]<sup>-</sup>が検出された(図 12)。プレカーサーイオン( $m/z$  423)から生成する ESI-Negative でのプロダクトイオンを図 13 に示した。

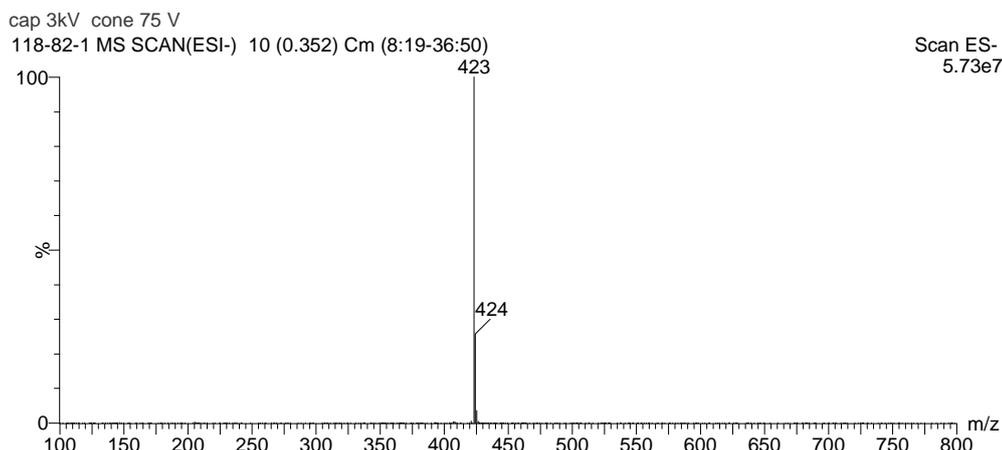


図 12 ESI-Negative でのプレカーサーイオン

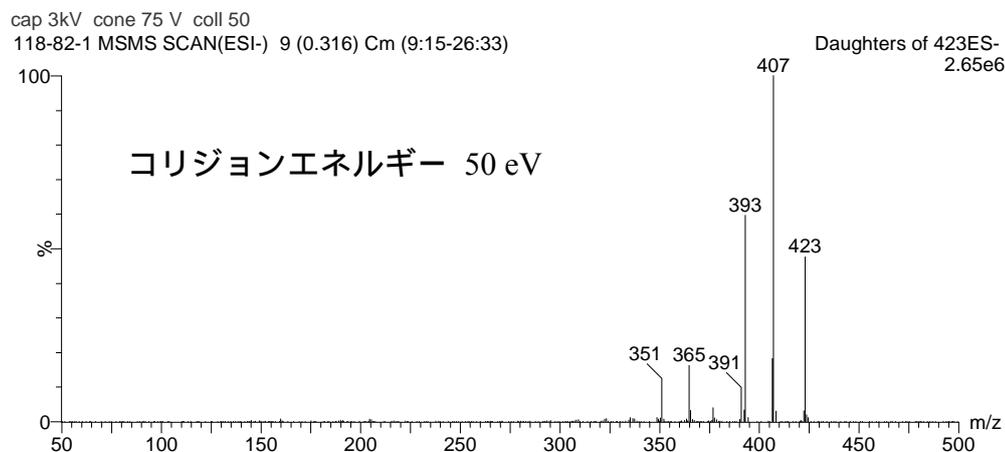


図 13 プレカーサーイオン 423 に対するプロダクトイオン

なお、移動相に酢酸アンモニウムを添加した場合、ESI-Positive 及び APCI-Positive において、アンモニウムイオンが付加したと思われるイオンが検出された(図 14)。APCI-Positive では  $m/z$  219 の生成割合が ESI-Positive の場合より多く、 $m/z$  442 のイオン強度は ESI-Positive の方が強かった。

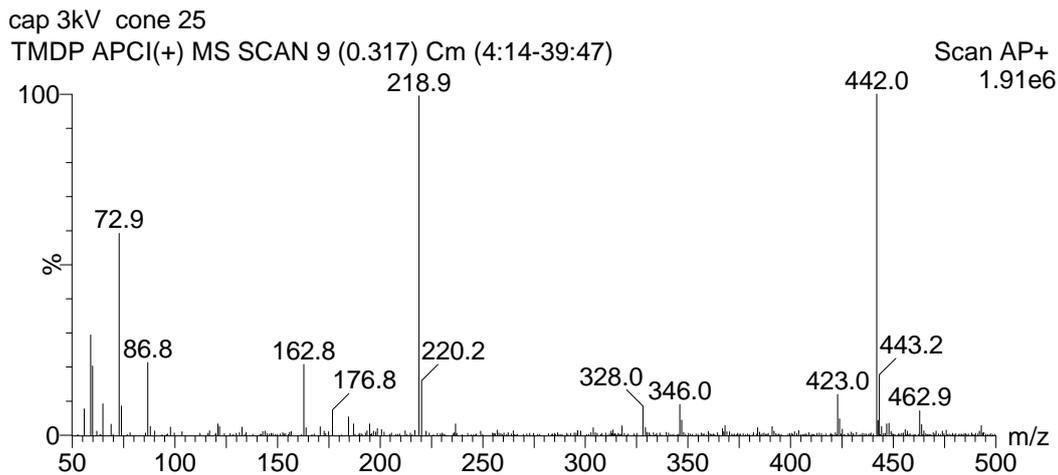


図 14 APCI-Positive でのプレカーサーイオン(酢酸アンモニウム使用)

被検物質を LC/MS/MS-SRM(ESI-Positive 及び ESI-Negative)で測定した場合、本法で使用した装置では、ESI-Positive においてアンモニウム付加イオンをプレカーサーイオンとする場合の方が S/N が良好であった。図 15-1 及び 15-2 にクロマトグラム示す。

本法では、LC/MS/MS-SRM(ESI-Positive)で移動相にアンモニア(酢酸アンモニウム)を添加した条件とした。

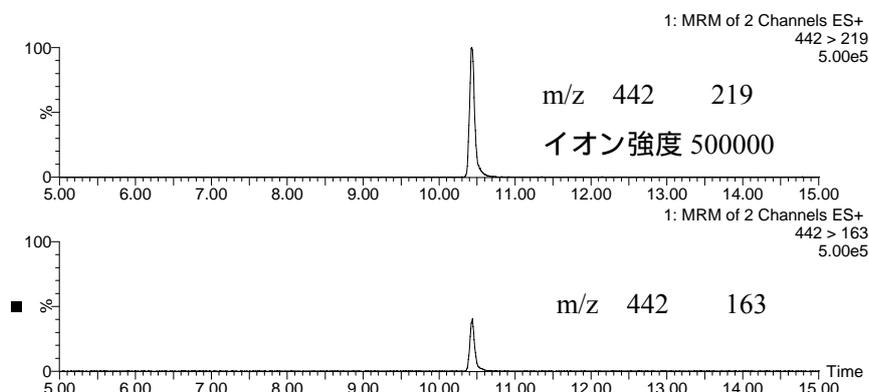


図 15-1 LC/MS/MS-SRM(ESI-Positive) 標準液 10 ng/mL のクロマトグラム

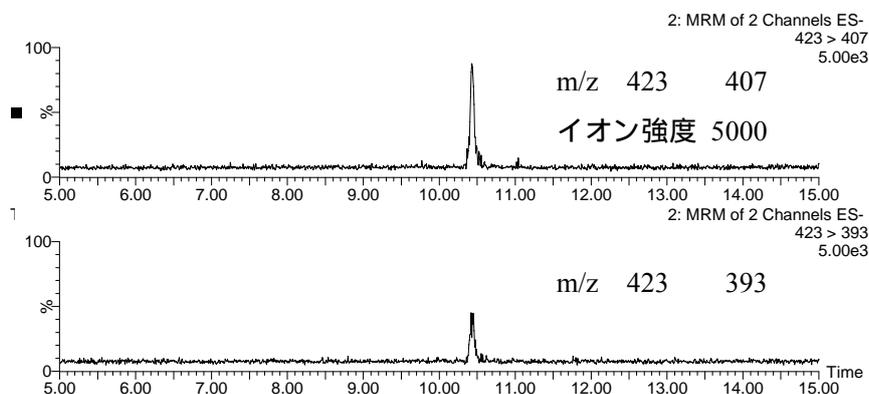


図 15-2 LC/MS/MS-SRM(ESI-Negative) 標準液 10 ng/mL のクロマトグラム

〔保存性試験〕

〔水質試料〕

採取後 1 時間以内の河川水(多摩川)100 mL にそれぞれ TMDP を 1000 ng 添加し、ピロガロール無添加と、分解抑制のため 10%ピロガロール水溶液 10  $\mu$ L を加えたものを、冷暗所(4  $^{\circ}$ C)で保存を行った。添加直後、1 時間後、24 時間後、48 時間後、72 時間及び 168 時間後に【試料の前処理及び試験液の調製】の操作に従い、保存性を検討した。

結果を図 16 に示す。ピロガロール無添加では、TMDP は 24 時間でほぼ消失していた。ピロガロール添加では、TMDP は 24 時間後 80 %程度まで下がり、48 時間以降ほぼ横這いとなった。

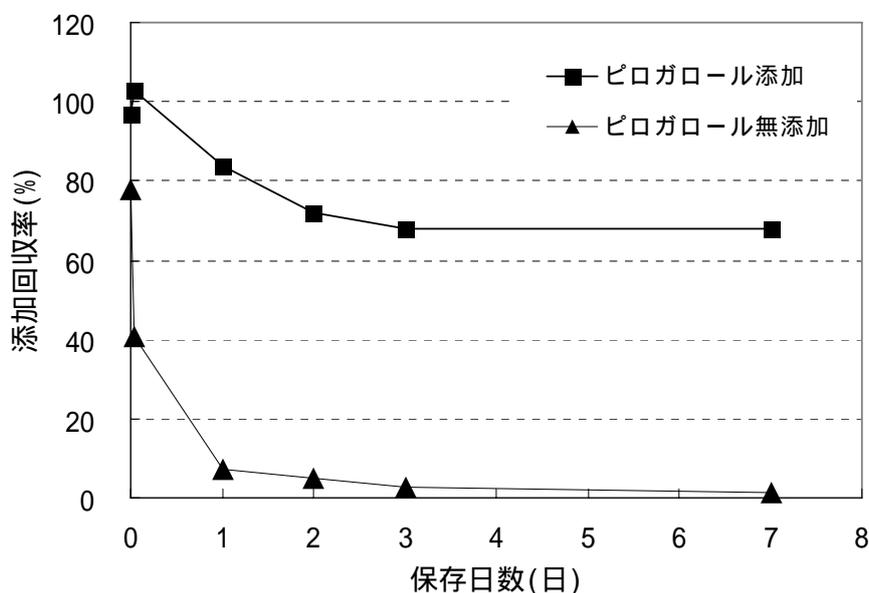


図 16 ピロガロール添加、無添加での保存安定性

### 〔シリカゲルカラムの溶出検討〕

シリカゲルカラム(Sep-Pak Plus Sillica 690 mg)の溶出条件を検討した。カラムにTMDPをヘキサンで負荷し、ヘキサン 5 mL 洗浄後、25%ジクロロメタン/ヘキサン 2 mL ずつ溶出させた。溶出結果を図 17 に示す。

ヘキサンの洗浄画分には溶出されず、25%ジクロロメタン/ヘキサン 4 mL でほぼ溶出したので、試料溶液をヘキサン負荷後、ヘキサンで洗浄、安全をみて 25 %ジクロロメタン/ヘキサン 5 mL で溶出することにした。

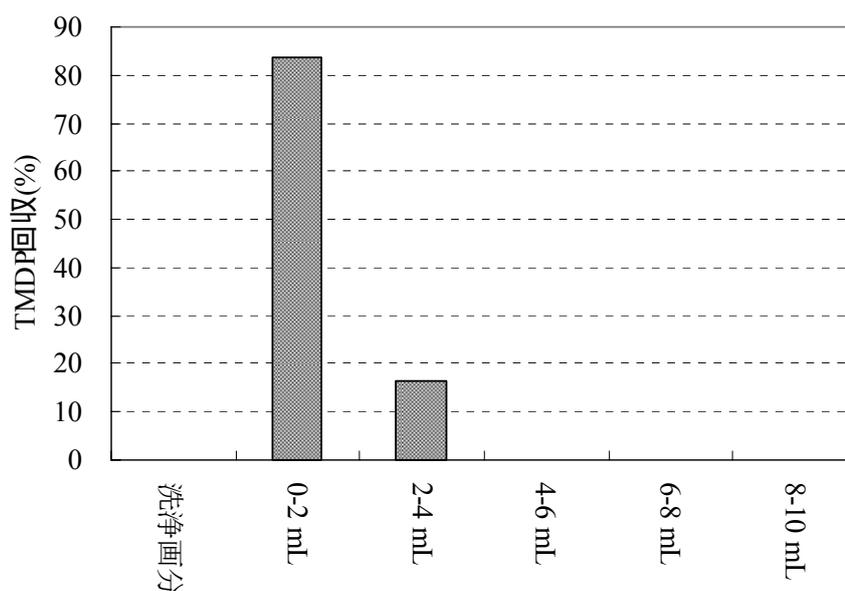


図 17 Sep-Pak Plus Sillica 溶出パターン

### 【評価】

本分析法開発で用いた LC-(タンデム四重極型)MS/MS での IDL は 0.024 ng/mL (水質試料換算濃度 0.24 ng/L、底質試料換算濃度 0.047 ng/g-dry 及び生物試料換算濃度 0.024 ng/g-wet) であり、0.1 から 10 ng/mL の濃度範囲で直線性 ( $R^2 > 0.995$ ) が確認された。液液抽出により 100 倍濃縮する水質試料分析法の MQL は 2.8 ng/L、振とう、超音波抽出後、抽出液を分取し、シリカゲルカラムで精製する底質及び生物試料分析法の MQL は、それぞれ 0.47 ng/g-dry、0.29 ng/g-wet であった。なお、河川水、海水 0.100 L (各  $n = 5$ ) に対象物質を 3 ng 添加した時の平均回収率はそれぞれ 102%及び 85%、変動係数は 1.5%及び 6.0%であった。本法で多摩川、東京湾各 1 地点で測定を行ったところ、被検物質は検出下限以下であった。砂状底質、泥状底質 5 g-dry (各  $n = 5$ ) に対象物質を 25 ng 添加した時の平均回収率はそれぞれ 96%及び 83%、変動係数は 5.8%及び 3.7%であった。本法で多摩川砂状底質、大阪湾底泥各 1 地点で測定を行ったところ、被検物質は多摩川では検出下限以下、大阪湾で 0.37  $\mu\text{g/g-dry}$  であった。また、

生物試料としてスズキ及びサンマ 10 g-wet(各 n = 5)に対象物質を 25 ng 添加した時の平均回収率はそれぞれ 101%及び 85%、変動係数は 4.6%及び 5.1%であった。本法でスズキ、サンマ各 1 試料の測定を行ったところ、被検物質は検出下限以下であった。以上の結果から、本法が環境水試料で 10 ng/L、底質試料で 1 ng/g-dry 及び生物試料で 1 ng/g-wet オーダーの TMDP の定量分析に適用できるものと判断される。

#### 【参考文献】

LC/MS を用いた化学物質分析法開発マニュアル：環境庁環境安全課  
平成 18 年度化学物質分析法開発調査報告書(6,6'-ジ-*tert*-ブチル-4,4'-ジメチル-2,2'-メチレンジフェノール)、長野県環境保全研究所、p374 ~ 386

#### 【担当者氏名・連絡先】

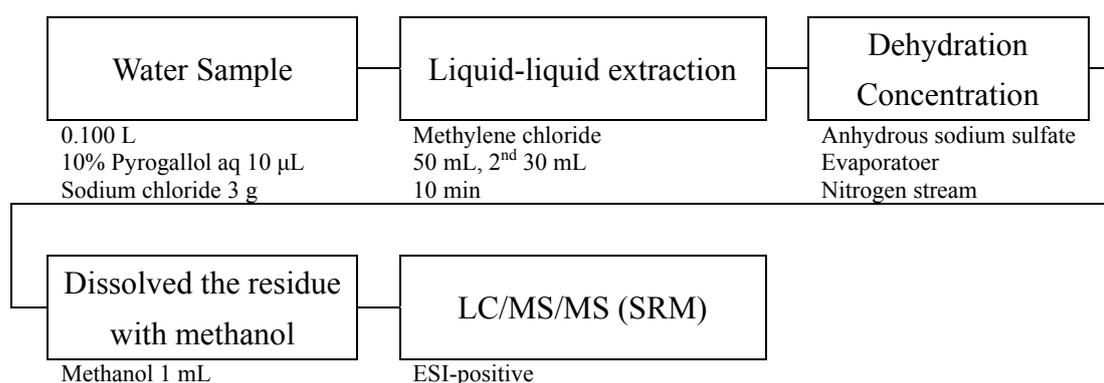
担当：財団法人 日本食品分析センター  
住所：〒206-0025 東京都多摩市永山 6-11-10  
TEL：042-372-6936 FAX：042-372-6717  
担当者：福沢栄太、野村孝一  
E-mail：fukuzawe@jfri.or.jp

## 2,2',6,6'-Tetra-*tert*-butyl-4,4'-methylenediphenol (TMDP)

This method provides procedures for the determination of TMDP in water, sediment and biological samples by liquid chromatography/tandem quadrupole mass spectrometry (LC/MS/MS).

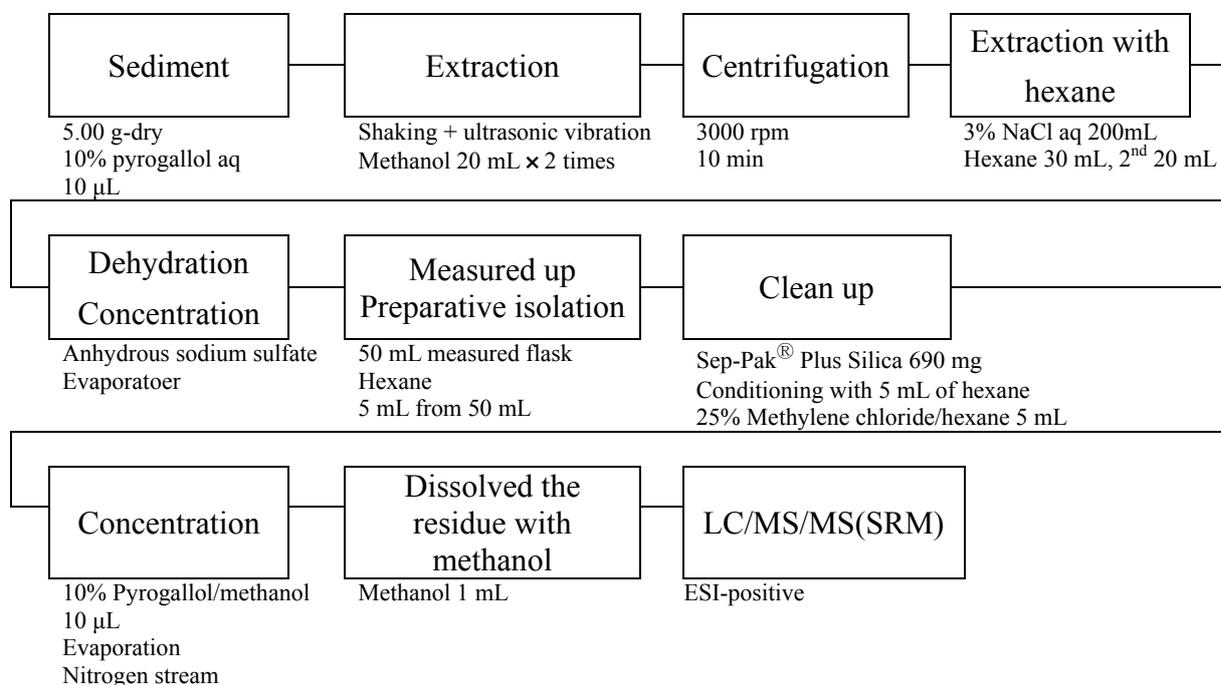
[Water sample]

TMDP is extracted from 0.100 L of water sample, which is added 10  $\mu$ L of 10% pyrogallol aqueous solution, by liquid-liquid extraction with methylene chloride. This extraction is repeated for two times. The extract is dehydrated with anhydrous sodium sulfate and concentrated to about 1 mL with rotary evaporator. This extract is dried with nitrogen stream and dissolved with 1 mL methanol. The analytes are determined in the selected-reaction-monitoring (SRM) mode. This precursor ion formula is  $[M+NH_4]^+$ . The analytes are separated by the LC and detected by a tandem mass spectrometer. Comparing the LC retention time and presence of the product  $m/z$  with the corresponding retention time and product  $m/z$  of an authentic standard identifies an individual compound. The method detection limit (MDL) and the method quantification limit (MQL) are 1.1 and 2.8 ng/L, respectively. The average of recoveries ( $N=5$ ) from 3 ng TMDP added surface water from a river is 102% and the relative standard deviation is 1.5%. And, the average of recoveries ( $N=5$ ) from 3 ng TMDP added seawater is 85% and the relative standard deviation is 6.0%. Using this method, the concentration of TMDP in river water sampled at one site in Tama River and seawater sampled at one site in Tokyo Bay were determined. The concentrations were below the MDL.



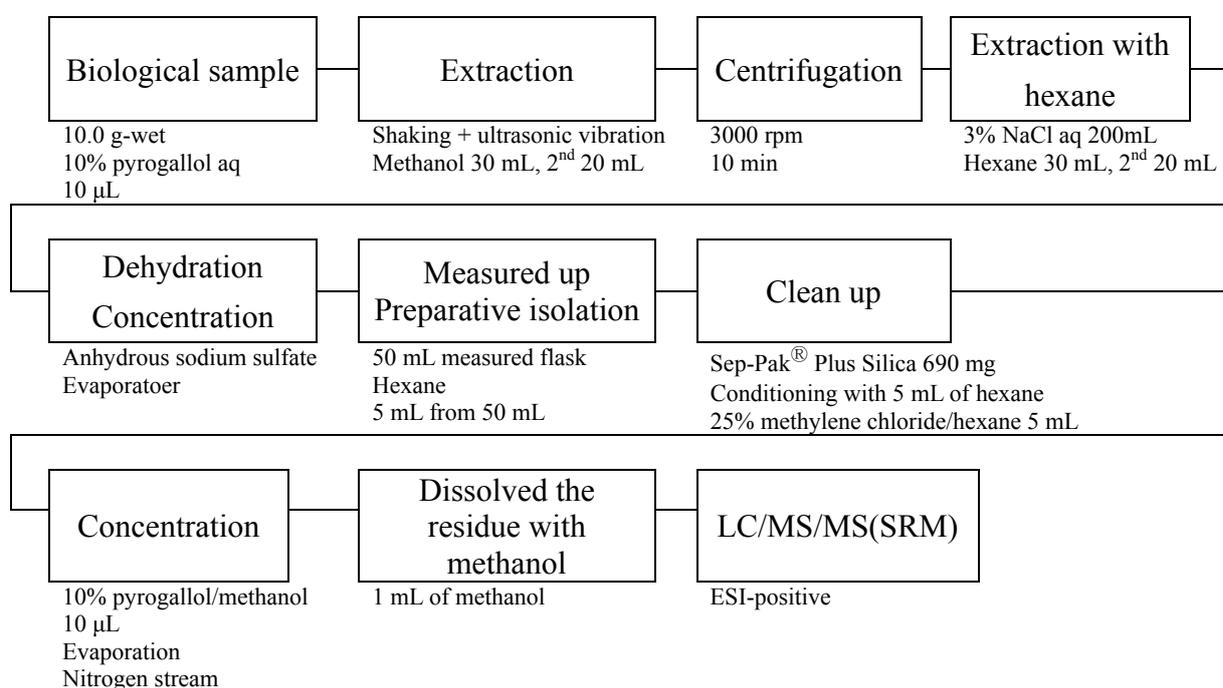
[Sediment sample]

TMDP is extracted from sediment sample (5 g-dry), which is added 10  $\mu$ L of 10% pyrogallol aqueous solution, by shaking and ultrasonic vibration with 20 mL of methanol (second extraction, 20 mL of methanol). The extract is added to 200 mL of water contained 3% sodium chloride, and then extracted with 30 mL of hexane (second extraction, 20 mL of hexane). The hexane phase is dehydrated with anhydrous sodium sulfate, and concentrated and measured up to 50 mL with hexane. Five mL of this extraction is cleaned-up by a Sep-Pak<sup>®</sup> Plus Silica cartridge. The extraction is load in the cartridge, and washed with 5 mL of hexane, and then TMDP is eluted with 5 mL of 25% methylene chloride/hexane. The eluate is concentrated to about 1 mL with evaporator, and dried with nitrogen stream and dissolved with 1 mL of methanol. The analytes are determined by LC/MS/MS. The method detection limit (MDL) and the method quantification limit (MQL) are 0.18 and 0.47 ng/g-dry, respectively. The average of recoveries (N=5) from 25 ng TMDP added sediment from a river is 96% and the relative standard deviation is 5.8%. And, the average of recoveries (N=5) from 25 ng TMDP added sediment from a bay is 83% and the relative standard deviation is 3.7%. Using this method, the concentration of TMDP in sediment sampled at one site in Tama River and sediment sampled at one site in Osaka Bay were determined. The concentration was below the MDL at Tama River. And the concentration was 0.37 ng/g-dry at Osaka Bay.



[Biological sample]

TMDP is extracted from biological sample (10 g-wet), which is added 10  $\mu$ L of 10% pyrogallol aqueous solution, by shaking and ultrasonic vibration with 30 mL of methanol (second extraction, 20 mL of methanol). The extract is added to 200 mL of water contained 3% sodium chloride, and then extracted with 30 mL of hexane (second extraction, 20 mL of hexane). The hexane phase is dehydrated with anhydrous sodium sulfate, and concentrated and measured up to 50 mL with hexane. Five mL of this extraction is cleaned-up by a Sep-Pak<sup>®</sup> Plus Silica cartridge. The extraction is load in the cartridge, and washed with 5 mL of hexane, and then TMDP is eluted with 5 mL of 25% methylene chloride/hexane. The eluate is concentrated to about 1 mL with evaporator, and dried with nitrogen stream and dissolved with 1 mL of methanol. The analytes are determined by LC/MS/MS. The method detection limit (MDL) and the method quantification limit (MQL) are 0.11 and 0.29 ng/g-wet, respectively. The average of recoveries (N=5) from 25 ng TMDP added biological sample (Japanese seaperch) is 101% and the relative standard deviation is 4.6%. And, the average of recoveries (N=5) from 25 ng TMDP added biological sample (Saury) is 85% and the relative standard deviation is 5.1%. Using this method, the concentration of TMDP in the fish (Japanese seaperch and Saury) were determined. The concentration was below the MDL.



物質名	分析法フローチャート	備考
<p>2,2',6,6'- テトラ-tert-ブチル-4,4'-メチレンジフェノール</p> <p>別名: 4,4'-メチレンビス[2,6-ビス(1,1-ジメチルエチル)フェノール]</p>	<p><b>【水質】</b></p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;"> <p style="text-align: center;"><b>水質試料</b></p> <p>0.100 L 10%ビ°ロカ°ロル水溶液 10 µL 塩化ナトリウム 3 g</p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;"> <p style="text-align: center;"><b>振とう抽出</b></p> <p>ジ°クロメタン 50 mL × 1 回 30 mL × 1 回 振とう 10 min</p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;"> <p style="text-align: center;"><b>脱水・濃縮</b></p> <p>無水硫酸ナトリウムで脱水 ロータリーエバ°ポ°レーター濃縮 窒素気流下濃縮乾固</p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;"> <p style="text-align: center;"><b>再溶解</b></p> <p>メタノール 1 mL</p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;"> <p style="text-align: center;"><b>LC/MS/MS (SRM)</b></p> <p>ESI-positive</p> </div> <p><b>【底質】</b></p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;"> <p style="text-align: center;"><b>底質試料</b></p> <p>5.00 g-dry 10%ビ°ロカ°ロル水溶液 10 µL</p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;"> <p style="text-align: center;"><b>抽出</b></p> <p>メタノール 20 mL × 2 振とう、超音波抽出 各 10 min</p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;"> <p style="text-align: center;"><b>遠心分離</b></p> <p>3000 rpm 10 min</p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;"> <p style="text-align: center;"><b>ヘキサン転溶</b></p> <p>3%NaCl 水溶液 200 mL ヘキサン 30 mL × 1 回 20 mL × 1 回</p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;"> <p style="text-align: center;"><b>脱水・濃縮</b></p> <p>無水硫酸ナトリウムで脱水 ロータリーエバ°ポ°レーター濃縮</p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;"> <p style="text-align: center;"><b>定容・分取</b></p> <p>ヘキサ°ンで 50 mL 定容 5 mL 分取</p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;"> <p style="text-align: center;"><b>クリーンアップ</b></p> <p>Sep-Pak Plus Silica 690 mg ヘキサン 5 mL コンデ°イ°ションガ° 25%ジ°クロメタン/ヘキサン 5 mL 溶出</p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;"> <p style="text-align: center;"><b>濃縮</b></p> <p>10%ビ°ロカ°ロル/メタノール溶液 10 µL ロータリーエバ°ポ°レーター濃縮 窒素気流下濃縮乾固</p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;"> <p style="text-align: center;"><b>再溶解</b></p> <p>メタノール 1 mL</p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p style="text-align: center;"><b>LC/MS/MS (SRM)</b></p> <p>ESI-positive</p> </div>	<p>分析原理： LC/MS/MS-SRM ESI-positive</p> <p>検出下限値： 【水質】(ng/L) 1.1 【底質】(ng/g-dry) 0.18 【生物】(ng/g-wet) 0.11</p> <p>分析条件： 機器 LC：Alliance2795 MS：Quattro Premier XE カラム XBridge Shield RP18 150 mm × 2.1 mm、5 µm</p>

【生物】

生物試料

10.0 g-wet  
10%ビニルアルコール水溶液 10 μL

抽出

メタノール 30 mL × 1 回  
20 mL × 1 回  
振とう、超音波抽出  
各 10 min

遠心分離

3000 rpm  
10 min

ヘキサン転溶

3%NaCl 水溶液 200 mL  
ヘキサン 30 mL × 1 回  
20 mL × 1 回

脱水・濃縮

無水硫酸ナトリウムで脱水  
ロータリーエバポレーター濃縮

定容・分取

ヘキサンので 50 mL 定容  
5 mL 分取

クリーンアップ

Sep-Pak Plus Silica 690 mg  
ヘキサン 5 mL コンテイング  
25%ジクロロメタン/ヘキサン 5 mL 溶出

濃縮

10%ビニルアルコール/メタノール溶液  
10 μL  
ロータリーエバポレーター濃縮  
窒素気流下濃縮乾固  
メタノール 1 mL 再溶解

再溶解

メタノール 1 mL

LC/MS/MS (SRM)

ESI-positive