

〔資 料〕

## 環境試料中におけるタイヤ含有酸化防止剤6PPD及び その酸化生成物6PPD-キノンの分析方法の検討

石川県保健環境センター 環境科学部 宮田 朋子・森杉 侑紀・下田 啓介  
河本 公威

### 〔和文要旨〕

6PPD及び6PPD-キノンについて、環境リスク評価や将来の規制に備える基礎資料とすることを目的として、県内の環境中における実態調査を行うにあたり分析方法を検討した。平成16年度化学物質分析法開発調査報告書（以下「白本」という。）に記載されている分析方法を改良することにより、大気試料では前処理に要する時間を短縮し、水質試料では回収率が改善した。また、大気試料及び水質試料における分析方法の検出下限値と定量下限値は、白本の分析方法と同程度かそれより低い値であった。添加回収率は、70～120%の範囲内であり良好な結果であった。本分析方法を用いれば環境試料中の実態調査に適用できると考えられた。

キーワード：6PPD, 6PPD-Q, タイヤ摩耗粉, 大気粉じん, 河川水

本稿の一部は以下で発表した。

第40回全国環境研協議会東海・近畿・北陸支部研究会 2026年1月22日 兵庫県神戸市

### 1 はじめに

6PPD (*N*-(1, 3-ジメチルブチル)-*N*' フェニル-*p*-フェニレンジアミン) は、タイヤゴムの添加剤であり、ゴムの硬化を防止し、柔軟性を維持するために不可欠な物質である。タイヤは道路との摩擦により摩耗粉が発生し、さらに、タイヤ摩耗粉に含まれる6PPDは環境中で酸化されて、6PPD-キノン (6PPD-Q) を生成すると考えられている。6PPD-Qは、2021年に北米西海岸の河川に遡上するギンザケの大量死を引き起こした原因物質として発見され<sup>1)</sup>、新たな環境汚染物質として懸念されている。

また、タイヤ摩耗粉はマイクロプラスチックという側面も持っており、環境中に排出されるマイクロプラスチックのうち、約半分がタイヤ摩耗粉によるものという

報告<sup>2)</sup>や、海洋中のマイクロプラスチック発生源の28%がタイヤ由来との報告<sup>3)</sup>がある。タイヤ摩耗粉は環境中のマイクロプラスチックの主要な発生源となっていることから、添加剤から生成する6PPD-Qの環境への影響は大きいと考えられる。

環境省では、「特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善の促進に関する法律」の指定化学物質の指定や、「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」の優先評価化学物質のリスク評価等を行うため、化学物質環境実態調査（以下「黒本調査」という。）として一般環境中における化学物質の残留状況を毎年調査している。平成17年度黒本調査の初期環境調査<sup>4)</sup>では、6PPDのみを対象として全国で調査が実施されたものの、水質は4地点中全ての地点で検出されず、また、大気は13地点中8地点で検出されているのみで調査範囲

---

Analytical Method of Tire Rubber Antioxidant 6PPD and its Transformation Product 6PPD-Quinone in Environmental Samples. by MIYATA Tomoko, MORISUGI Yuki, SIMODA Keisuke and KAWAMOTO Tomotake (Environmental Science Department, Ishikawa Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science)

Key words : 6PPD, 6PPD-Q, Tire Wear Particles, Atmospheric particulate matter, River water

は極めて限定的であり，国内における環境水や6PPD-Qの実態調査の事例は少ない。そこで，環境リスク評価や将来の規制に備える基礎資料とすることを目的として，6PPD及び6PPD-Qについて県内の環境中における実態調査を行うこととし，分析方法を検討したので報告する。

## 2 材料と方法

### 2・1 試料

分析方法検討のため，大気試料は県内に設置された大気測定局にて，ハイボリュームエアサンプラー（紀本電子工業社製または柴田科学社製）を用い，流量1200～1300L/minで24時間，石英繊維ろ紙（2500QAT-UP，PALL社製）に捕集した大気粉じんを用いた。

また，水質試料は比較的晴天が続き水質が安定している県内の河川で採水した河川水を用いた。

### 2・2 対象物質

対象物質は6PPD及び6PPD-Qとした。サロゲート内標準物質として6PPD-Q-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>を用いた。

### 2・3 標準品及び試薬

#### (1) 標準品

6PPDはAccuStandard社製を，6PPD-Q及び6PPD-Q-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>はCambridge Isotope Laboratories社製100 μg/mLアセトニトリル溶液を用いた。

6PPD10mgを正確に量り取り，アセトニトリル10mLに溶解し，1000mg/Lの標準原液を作製した。

6PPD-Q-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>の標準品をアセトニトリルで希釈し1.0 μg/mLのサロゲート内標準液を調製した。

6PPDの標準原液と6PPD-Qの標準品をアセトニトリルで順次希釈し，0.50～100ng/mLの検量線用混合標準液を調製した。また，各濃度の検量線用混合標準液には，6PPD-Q-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>が20ng/mLの濃度になるようにサロゲート内標準液を添加した。

#### (2) 試薬

アセトニトリル及びメタノールは関東化学社製のLC/MS用を，ジクロロメタンは富士フィルム和光純薬社製の残留農薬試験・PCB試験用（5000倍濃縮）を，ヘキサンは関東化学社製の残留農薬試験・PCB試験用（5000倍濃縮）を，ギ酸は関東化学社製のHPLC用を，精製水はメルク社製Elix Essential UV 5及びMilli-Q Advatage A10により調製したのものを用いた。

固相抽出カートリッジはWaters社製のOasis HLB（225mg）（以下「HLB」という。）を用いた。

### 2・4 分析方法

分析方法は6PPDを対象とした平成16年度化学物質分析法開発調査報告書<sup>5)</sup>（以下「白本」という。）に記載されている分析方法に準拠した。

#### (1) 前処理方法

#### ア 大気試料

大気試料は石英繊維ろ紙（有効捕集面積402.5cm<sup>2</sup>）の一部（10cm<sup>2</sup>，流量1300L/minで24時間に捕集した場合，吸引量として46.5m<sup>3</sup>相当）を切り出し約5mm角に裁断した後，10mLのねじ口試験管に入れ，サロゲート内標準液（1.0 μg/mL）を20 μL添加後，アセトニトリル4mLを加えた。栓を閉め20分間超音波抽出し，遠心分離（3000rpm，10分間）後，抽出液を濃縮管に移した。次に，再度ろ紙にヘキサノール：ジクロロメタン（1：1）4mLを加えて同様の操作を繰り返し，抽出液を先の濃縮管に移しアセトニトリル抽出液と合わせた。さらに，40℃以下の窒素気流下で約0.2mLまで濃縮し，アセトニトリルで1mLに定容後，孔径0.2 μmのメンブレンフィルターでろ過し試験液とした。

#### イ 水質試料

水質試料200mLにサロゲート内標準液（1.0 μg/mL）を20 μL添加し，十分混合した後，メタノール15mL，精製水20mLでコンディショニングしたHLBに10mL/minの速さで通水した。次に，HLBを精製水10mLで洗浄後，遠心分離（3000rpm，10分間）し，さらに，窒素通気により完全に固相中の水分を除去した。これをメタノール7mLで溶出し，40℃以下の窒素気流下で約0.2mLまで濃縮し，アセトニトリルで1mLに定容後，孔径0.2

表1 LC/MS/MS 測定条件（LC及びMS条件）

LC	
LC機種	Waters Alliance 2695
カラム	化学物質評価研究機構製 L-カラム ODS 2.1mm × 50mm, 3 μm
移動相	A : 0.1% ギ酸水溶液 B : 0.1% ギ酸-アセトニトリル溶液 0～1min A : B = 95 : 5 1～7min A : 95 → 0 B : 5 → 100 linear gradient 7～15min A : B = 0 : 100 15～15.1min A : 0 → 95 B : 100 → 5 linear gradient 15.1～25min A : B = 95 : 5
カラム流量	0.2mL/min
カラム温度	40℃
試料注入量	10 μL
MS	
MS機種	Waters Quattro micro API
キャピラリー電圧	3.0kV
ソース温度	120℃
デゾルベーション温度	450℃
コーンガス量	50L/Hr
デゾルベーション流量	500L/Hr
イオン化法	ESI-Positive
測定モード	SRM

表2 LC/MS/MS測定条件（コーン電圧、モニターイオン及びコリジョン電圧）

対象物質	保持時間 (min)	コーン電圧 (V)	モニターイオン（コリジョン電圧）	
			定量	定性
6PPD	8.73	25	269 > 184 (25eV)	269 > 107 (65eV)
6PPD-Q	10.62	35	299 > 241 (40eV)	299 > 187 (40eV)
6PPD-Q- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	10.62	35	305 > 247 (40eV)	305 > 193 (40eV)

表3 IDLの算出結果

対象物質	注入液濃度 (ng/mL)	最終液量 (mL)	IDL (ng/mL)	大気試料		水質試料	
				試料量 (m <sup>3</sup> )	IDL 試料換算値 (ng/m <sup>3</sup> )	試料量 (L)	IDL 試料換算値 (ng/L)
6PPD	0.5	1	0.068* (0.20)	46.5	0.0015 (0.014)	0.2	0.34 (0.20)
6PPD-Q	0.5	1	0.11*	46.5	0.0024	0.2	0.55

括弧内の数値は白本に記載された値を示す。

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

t(n-1, 0.05) : 危険率5%、自由度n-1のt値（片側） n=7の場合は1.9432

$\sigma_{n-1}$  : IDL算出のための測定値の標本標準偏差

$\mu$  mのメンブレンフィルターでろ過し試験液とした。

(2) 高速液体クロマトグラフ質量分析計（LC/MS/MS）測定

2・4(1)の試験液を表1及び表2の測定条件で測定し、サロゲート法により試験液中の濃度を求めた。

### 3 結果と考察

#### 3・1 装置検出下限値

LC/MS/MSにより最低濃度の検量線用標準液の繰り返し測定（n=7）を行い、化学物質環境実態調査実施の手引き<sup>6)</sup>（以下「手引き」という。）に従い、装置検出下限値（IDL）を算出した（表3）。いずれの対象物質も白本に記載されているIDLと同程度かそれより低い値であった。

#### 3・2 分析方法の検討

##### (1) 大気試料

白本の分析方法では、テフロンろ紙に内標準物質を添加しジクロロメタンを加え、20分間超音波抽出後、48時間以上37℃に保持して抽出することとなっている。この方法ではLC/MS/MS測定までの前処理全体としては3日間必要となる。

そこで、Zhangら<sup>7)</sup>の方法の抽出溶媒を参考とし、1回目はアセトニトリル、2回目はジクロロメタン：ヘキサン（1:1）を用いることとした。これらの溶媒を石英繊維ろ紙に加えそれぞれ20分間超音波抽出し、遠心分離後溶媒を分取した。本分析方法では、抽出に要する時間を48時間以上から約90分間に短縮することが出来た。

また、本分析方法では、内標準物質として白本の分析

方法で用いられているフタル酸ジ（2-エチルヘキシル）の安定同位体（DEHP-*d*<sub>4</sub>）と、サロゲート内標準物質として6PPD-Qの安定同位体（6PPD-Q-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>）を用いて検討した。DEHP-*d*<sub>4</sub>を内標準物質としてサロゲート内標準の回収率を算出すると、120%を超過し手引きに示された50～120%の範囲内を満たさない試料が多くみられた。そのため、内標準物質にDEHP-*d*<sub>4</sub>を用いずに、サロゲート内標準物質のみで対象物質の濃度及びサロゲート内標準の回収率を算出することとした。

今後、本県で実施している有害大気汚染物質調査で用いている石英繊維ろ紙を試料とするため、今回の分析方法の検討では、白本で用いられているテフロンろ紙ではなく石英繊維ろ紙を用いたが、操作ブランクからは対象物質は不検出であった。

##### (2) 水質試料

白本の分析方法では、固相抽出カートリッジにAgilent社製のBond Elut Jr.NEXUS（200mg）（以下「NEXUS」という。）を使用しており、水質試料をNEXUSに通水後、窒素通気により水分を除去しアセトンで溶出することとなっている。今回、まず白本に準拠した方法で添加回収試験を行ったところ、6PPD-Qの回収率は100%であったが、6PPDの回収率は22%と低かった（どちらも、サロゲート法により補正した回収率）。

そこで、固相抽出カートリッジの溶出条件について検討を行った。固相抽出カートリッジにはNEXUSと、同じくポリマー系充填剤のHLBを用いた。そして、白本の分析方法では内標準物質にDEHP-*d*<sub>4</sub>を用い固相抽出カートリッジから溶出後に添加しているが、本分析方法

では、大気試料と同様の理由でサロゲート内標準物質として6PPD-Q-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>のみを用い、試料に添加し同様に前処理を行うこととした。

水質試料200mLに対象物質を各20ng添加し、2・4(1)イに従い前処理を行った。溶出溶媒にメタノールとアセトニトリルを用い、窒素通気により水分を除去した固相抽出カートリッジからそれぞれ2mL毎に分画して溶出させた。ただし、最初の溶出は固相抽出カートリッジに溶媒が1mL程度残るため、負荷する溶媒量を3mLとした。溶出した分画液は窒素気流下で濃縮し、アセトニトリルで1mLに定容後、ろ過し試験液とした。

分画液の回収率を図1に示す。図1の回収率はサロゲート法で補正していない値であり、各分画の回収率を積算した値である。アセトニトリル溶出では6PDD-Q及び6PPD-Q-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>の9mLまでの回収率は、NEXUSで70%未満であり、HLBでは全く回収されなかった。しかし、メタノール溶出ではどちらの固相抽出カートリッジも7mLまでの回収率は、全ての対象物質で79%～95%と良好であった。

そこで、NEXUSよりも背圧が小さく操作性が良いHLBを選択し、メタノール7mLで溶出することとした。また、固相抽出カートリッジのコンディショニングは溶出量の2倍以上の量(15mL)とし、精製水を用いた操作ブランク試験は、全ての対象物質で検出下限値未満であった。

また、白本の場合は水質試料をアンモニア水でpH10に調製し、固相抽出カートリッジに通水することとなっているが、pH10とpH無調製の添加回収率を比較したところ、pHによる影響はみられず、どちらも対象物質の添加回収率は70～120%の範囲であり良好であったため、pH調整を行わずに分析に供することとした。

(3) LC/MS/MS測定

白本の分析方法は、イオン化法としてAPCI(大気圧

化学イオン化)法を用いているが、本分析方法では、ESI(エレクトロスプレーイオン化)法に変更した。また、イオン化法を変更したことに伴い、移動相を水とアセトニトリルから、0.1%ギ酸/水と0.1%ギ酸/アセトニトリルに変更した。

LC/MS/MS測定条件のうち、モニターイオン・キャピラリー電圧・コーン電圧・コリジョン電圧については、個々の標準溶液でインフュージョン分析により最適化した。

3・3 分析方法の検出下限値と定量下限値

大気試料は定量下限値付近の濃度で検出された試料を用いて、水質試料は定量下限値付近の濃度を添加した試料を用いて、繰り返し操作(n=7)を行い、手引きに従い、分析方法の検出下限値(MDL)と定量下限値(MQL)を算出した(表4)。

6PPD及び6PPD-Qのどちらも白本に記載されているMDL及びMQLと同程度かそれより低い値であった。

3・4 添加回収試験

大気試料の添加回収試験の方法は、手引きでは対象物質をろ紙に添加し、採取流量で所定量の大気を採取し、測定に供することとされている。一方、白本では、標準物質を有機溶剤に溶解して捕集材に添加する手引きの方法では、試料採取中に6PPDが分解したことにより回収されなかったとしており、さらに、標準溶液の代わりに道路粉じんを用いた結果、良好な回収率が得られたとしている。しかし、今回、各対象物質が値付けされた道路粉じん試料が入手できなかったため、簡易的に採取後の石英繊維ろ紙10cm<sup>2</sup>(46.5ml相当)に直接、標準溶液で各対象物質を10ng添加し、2・4(1)アの方法で添加回収試験(n=3)を行い、回収率、変動係数を算出した(表5)。回収率は、全ての対象物質で70～120%の範囲内であり良好であった。変動係数は、6PPDで10.7%、6PPD-Qで1.0%であった。

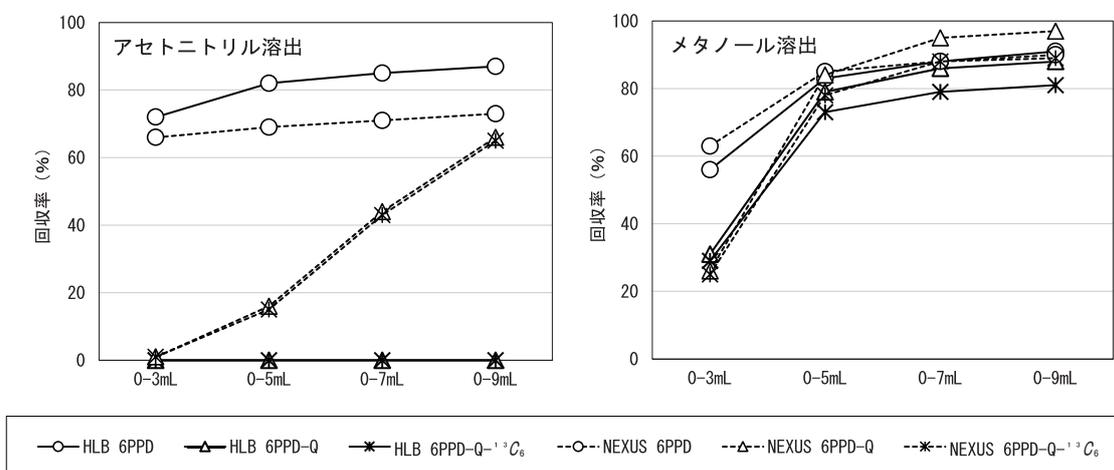


図1 固相抽出カートリッジからの溶出条件の検討

表 4 MDL 及び MQL の算出結果

対象物質	大気試料					水質試料				
	試料量 (m <sup>3</sup> )	最終液量 (mL)	試料濃度 (ng/m <sup>3</sup> )	MDL 試料換算値 (ng/m <sup>3</sup> )	MQL 試料換算値 (ng/m <sup>3</sup> )	試料量 (L)	標準添加量 (ng)	最終液量 (mL)	MDL 試料換算値 (ng/L)	MQL 試料換算値 (ng/L)
6PPD	46.5	1	0.0138	0.0044* (0.02)	0.011* (0.07)	0.2	0.50	1	0.24* (0.3)	0.61* (1.1)
6PPD-Q	46.5	1	0.0155	0.0050*	0.013*	0.2	0.50	1	0.40*	1.0*

括弧内の数値は白本に記載された値を示す。

\* : MDL=t(n-1, 0.05) × σ<sub>n-1, M</sub> × 2      MQL= σ<sub>n-1, M</sub> × 10

t(n-1, 0.05) : 危険率 5%、自由度 n-1 の t 値 (片側)    n=7 の場合は 1.9432

σ<sub>n-1, M</sub> : MDL 算出のための測定値の標本標準偏差

表 5 添加回収試験結果

対象物質	大気試料 (10ng 添加)			水質試料 (10ng 添加)		
	試料量 (m <sup>3</sup> )	回収率 (%)	変動係数 (%)	試料量 (L)	回収率 (%)	変動係数 (%)
6PPD	46.5	101	10.7	0.2	105	4.4
6PPD-Q	46.5	94	1.0	0.2	95	3.4

また、水質試料 200mL に各対象物質を 10ng 添加し、2・4(1)イの方法で添加回収試験 (n=5) を行い、回収率、変動係数を算出した (表 5)。回収率は、全ての対象物質で 70~120% の範囲内であり良好であった。変動係数は、6PPD で 4.4%、6PPD-Q で 3.4% であった。

本分析方法を用いれば、環境試料中の実態調査に適用できると考えられた。

#### 4 ま と め

6PPD 及び 6PPD-Q について、環境リスク評価や将来の規制に備える基礎資料とすることを目的として、県内の環境中における実態調査を行うにあたり分析方法を検討し、次の結果が得られた。

- (1) 本分析方法の IDL は、白本に記載されている IDL と同程度かそれより低い値であった。
- (2) 白本の分析方法を改良することにより、大気試料では前処理に要する時間を短縮し、水質試料では回収率が改善した。
- (3) 本分析方法の大気試料及び水質試料における MDL、MQL は、白本に記載されている MDL、MQL と同程度かそれより低い値であった。
- (4) 大気試料及び水質試料における添加回収率は、70~120% の範囲内であり良好な結果であった。  
大気試料及び水質試料の分析方法を確立し、本分析方法を用いれば環境試料中の実態調査に適用できると考えられた。

#### 文 献

1) Z.Tian, H.Zhao, K T.Peter, M.Gonzalez, J.Wetzel,

C.Wu, X.Hu, J.Pratt, E.Mudrock, R.Hettinger, A.E.Cortina, R.G.Biswas, F.V. C.Kock, R.Soong, A.Jenne, B.Du, F.Hou, H.He, R.Lundeen, A.Gilbreath, R.Sutton, N.L.Scholz, J.W.Davis, M.C.Dodd, A.Simpson, J.K.Mcintyre, E.P.Kolodziej: A ubiquitous tire rubber-derived chemical induces acute mortality in coho salmon, *Science*, **371**, 185-189 (2021)

2) Morten W.Ryberg, Alexis Laurent, Michael Hauschild : Mapping of Global Plastics Value Chain and Plastics Losses to the Environment, With a Particular Focus on Marine Environment 国連環境計画 (2018)

3) Boucher, J.and Friot, D.:Primary Microplastics in the Oceans, A Global Evaluation of Sources.Gland, Switzerland, IUCN. (2017)

4) 環境省環境保健部環境安全課 : 平成 18 年度版化学物質と環境, 平成 19 年 3 月

5) 環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課 : 平成 16 年度化学物質分析法開発調査報告書, 平成 17 年 3 月

6) 環境省大臣官房環境保健部環境安全課 : 化学物質環境実態調査実施の手引き (令和 2 年度版), 令和 3 年 3 月

7) Y.Zhang, C.Xu, W.Zhang, Z.Qi, Y.Song, L.Zhu, C. Dong, J.Chen, and Z.Cai : p-Phenylenediamine Antioxidants in PM<sub>2.5</sub> : The Underestimated Urban Air Pollutants, *Environ.Sci. Technol.* **56**, 6914-6921 (2022)