

オルトフェニルフェノール及びジフェニル試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

農薬等の成分である物質	分析対象化合物
オルトフェニルフェノール	オルトフェニルフェノール
	オルトフェニルフェノールナトリウム塩
ジフェニル	ジフェニル

2. 装置

蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-FL）
液体クロマトグラフ・質量分析計（LC/MS）

3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

オルトフェニルフェノール標準品 本品はオルトフェニルフェノール 99%以上を含む。

ジフェニル標準品 本品はジフェニル 99%以上を含む。

4. 試験溶液の調製

穀類の場合は、試料10.0 gを量り採り、水20 mLを加えて2時間放置する。

果実、野菜及びハーブの場合は、試料20.0 gを量り採る。

これに無水酢酸ナトリウム2 g及び無水硫酸ナトリウム30 gを加えてよく混和した後、酢酸エチル80 mLを加え、ホモジナイズする。これを遠心分離し、酢酸エチル層を採り、残留物に酢酸エチル80 mLを加えて、同様に操作する。得られた酢酸エチル層を合わせ、*n*-ブタノール5 mLを加えて、40℃以下で濃縮し、酢酸エチルを除去する。残留物をHPLC用移動相に溶かし、正確に20 mLとし、0.45 μmのメンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

オルトフェニルフェノール標準品及びジフェニル標準品各100 mgを量り、それぞれメタノール50 mLに溶解した後、HPLC用移動相を加えて100 mLとしたものを標準溶液とする。各標準溶液10 mLを採り、*n*-ブタノール25 mLを加え、HPLC用移動相を加えて100 mLとしたものを混合標準溶液とする。混合標準溶液をHPLC用移動相で希釈し、オルトフェニルフェノール及びジフェニルの0.1～8 μg/mL溶液を数点調製する。それぞれ10 μLをHPLCに注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液10 μL をHPLCに注入し、5の検量線でオルトフェニルフェノール及びジフェニルの含量を求める。

7. 確認試験

LC/MSにより確認する。

8. 測定条件

HPLC

検出器：FL（励起波長285 nm、蛍光波長325 nm）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径5 μm ） 内径4.6～6.0 mm、長さ150～250 mm

カラム温度：40°C

移動相：アセトニトリル、水及びメタノール（1：7：12）混液に10 mmol/Lになるようにドデシル硫酸ナトリウムを加えた後、リン酸でpHを2.3～2.5とする。

注入量：10 μL

保持時間の目安：オルトフェニルフェノール、ジフェニルの順に溶出する。

LC/MS

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径5 μm ） 内径3.0 mm、長さ150 mm

カラム温度：40°C

移動相：水及びメタノール混液（2：3）から（0：1）までの濃度勾配を10分間で行った後、2分間保持する。

イオン化モード：オルトフェニルフェノール APPI（-）、ジフェニル APPI（+）

主なイオン（ m/z ）：オルトフェニルフェノール 169、141、ジフェニル 154、153

保持時間の目安：オルトフェニルフェノール 7分、ジフェニル 10分

9. 定量限界

オルトフェニルフェノール：0.1 mg/kg

ジフェニル：0.2 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

オルトフェニルフェノール及びジフェニルを試料から酢酸エチルで抽出し、HPLC-FLで測定し、LC/MSで確認する方法である。

2) 注意点

- (1) 無水酢酸ナトリウムはpHを調整するために加える。グレープフルーツ、オレンジなどでは1 gの添加でpH調整できる。
- (2) 無水硫酸ナトリウムの量は試料により、適宜増量する。
- (3) *n*-ブタノールは、減圧濃縮中にジフェニルが損失するのを防ぐために加える。
- (4) 妨害が多く測定が困難な場合は、酢酸エチル層をろ紙でろ過すること、酢酸エチル層を水及び0.025 mol/L硫酸各50 mLで洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水して濃縮すること、HPLCの移動相の混合比を変えることなどにより改善できる。
- (5) オルトフェニルフェノール及びジフェニルの励起極大波長は、それぞれ290、254 nmであり、蛍光極大波長はそれぞれ315、345 nmである。

11. 参考文献

日本薬学会編「衛生試験法・注解2005」p.307-309、金原出版株式会社

12. 類型

D (厚生労働省監修「食品衛生検査指針 食品添加物編」p.117-122、p.123-124 (2003) 日本食品衛生協会。LC/MS測定条件については、N. Yoshioka, et.al., Rapid simultaneous determination of *o*-phenylphenol, diphenyl, thiabendazole, imazalil and its major metabolite in citrus fruits by liquid chromatography-mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization, Journal of Chromatography A, 1022, 145-150, 2004)