ノート

GC/MS による農産物中のジフェニルおよび
オルトフェニルフェノールの分析

(平成 20 年 2 月 28 日受理)

高橋 邦彦* 堀江 正一 広瀬 義文

Determination of Diphenyl and *o*-Phenylphenol in Agricultural Products by GC/MS

Kunihiko TAKAHASHI*, Masakazu HORIE and Yoshihumi HIROSE

Saitama Institute of Public Health: 639-1 Kamiokubo, Sakura-ku, Saitama-shi,
Saitama 338-0824, Japan; *Corresponding author

A simple determination method of diphenyl (DP) and *o*-phenylphenol (OPP) in agricultural products by GC/MS was examined. DP and OPP were extracted with ethyl acetate in the presence of anhydrous sodium sulfate. After addition of *n*-butanol, the extract solution was concentrated. Clean-up was achieved by shaking with graphitized bulk carbon (Supelclean ENVI-Carb). Addition of polyethylene glycol sharpened the OPP peak on GC/MS analysis.

The recoveries from 9 kinds of agricultural products spiked at 0.01 and 0.5 $\mu\text{g/g}$ each were mostly in the range of 70 to 120%, except for 50% recovery of OPP from barley spiked at 0.01 $\mu\text{g/g}$. The quantification limits ($S/N \geq 10$) of DP and OPP were 0.0013 and 0.005 $\mu\text{g/g}$ (0.0025 and 0.01 $\mu\text{g/g}$ in barley and soybean), respectively.

(Received February 28, 2008)

Key words: ジフェニル diphenyl; オルトフェニルフェノール *o*-phenylphenol; 農産物 agricultural product; ガスクロマトグラフィー質量分析法 GC/MS; ポリエチレングリコール polyethylene glycol

はじめに

ジフェニル (DP) およびオルトフェニルフェノール (OPP) はともにわが国では食品添加物の防かび剤として規定され、残存量は DP がグレープフルーツ、レモンおよびオレンジ類に 0.070 g/kg 未満、OPP はかんきつ類に 0.010 g/kg 以下と設定されている。また、これらは農薬としての残留基準も設定されており、DP がりんごに 2 ppm、OPP が大麦、かんしょ、にんじんなど数十種の農産物に 0.5~20 ppm の暫定基準値が設定されている。

わが国では、2006 年 5 月 29 日から食品衛生法の改正に伴い、いわゆる残留農薬等のポジティブリスト制度が導入された。これにより、残留農薬の基準値が設定されていない食品には一律基準値 (0.01 ppm) が適用されるようになった。そのため、農産物中の残留農薬の分析には 0.01 ppm 以下の定量限界が得られる分析法が必要である。

DP および OPP の試験法としては、蛍光検出器付 HPLC を用いた厚生労働省通知の個別分析法「オルトフェニルフェノール及びジフェニル試験法」*1がある。しかし、定量限界は DP が 0.2 ppm、OPP が 0.1 ppm であ

り、残留基準値が設定されていない農産物に対する一律基準値を満たしていない。

これまで HPLC、LC/MS、GC/MS を用いた DP もしくは OPP の分析法、またはその他の農薬との同時分析法が報告されているが^{1)~6)}、DP が対象物質でない^{1)~4)}、対象品がかんきつ類だけである^{2), 4)~6)}、定量限界が一律基準値を満足しない^{2), 6)}などの分析法となっている。秋山ら⁷⁾は GC/MS を用いて DP および OPP を含む 107 種農薬の定量限界 0.01 ppm を可能とするスクリーニング法を報告しているが、著者らが GC/MS で DP および OPP の標準溶液を繰り返し測定したところ、OPP のピークがブロード化し、分析が困難となる現象が生じた。

そこで今回、GC/MS による農産物の DP および OPP の簡便で高感度な分析法について検討し、GC/MS 測定における OPP のピークのブロード化を解消する方法とともに若干の知見を得たので報告する。

* 連絡先

埼玉県衛生研究所: 〒338-0824 さいたま市桜区上大久保 639-1

*1 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」平成 19 年 2 月 27 日食安発第 0227004 号 (2007)。

実験方法

1. 試料

大麦, 大豆, かんしょ, ほうれん草, キャベツ, りんご, オレンジ, たまねぎおよびセロリは埼玉県または山梨県の小売店から入手した.

2. 試薬

DP および OPP は和光純薬(株)製の残留農薬分析用標準品を用いた. 酢酸エチル, アセトンおよび無水硫酸ナトリウムは残留農薬分析用, その他の試薬は特級を用いた. グラファイトカーボン は Supelco 社製 Supelclean ENVI-Carb 120/400 (以下 ENVI-Carb とする) を使用した.

混合標準溶液の調製は次のとおりとした. DP および OPP はアセトニトリルで 1 mg/mL に調製し標準原液とした. さらに, 両標準原液を混合し, 0.5 mg/mL ポリエチレングリコール 300 (PEG) 含有アセトンで適宜希釈した.

3. 装置

GC; Agilent Technologies 社製 HP5890, MS; 日本電子(株)製 Automass System II

4. GC/MS 測定条件

GC 条件; 分析カラム: DB-5 ms (Agilent Technologies 社製, 0.25 mm i.d.×30 m, 膜厚 0.25 μ m), カラム温度: 60°C で 2 分間保持後毎分 25°C で 310°C まで昇温し 10 分間保持, 注入口温度: 250°C, 注入量: 1 μ L, 注入方式: スプリットレスモード

MS 条件; イオン源温度: 230°C, トランスファーライン温度: 250°C, イオン化エネルギー: 70 eV, イオン化モード: EI, 測定モード: SIM, モニターイオン (m/z): DP 154 (定量イオン) および 153 (確認イオン), OPP 170 (定量イオン) および 141 (確認イオン)

5. 試験溶液の調製

ふた付 200 mL 容プラスチック遠沈管に均一化した試料 20 g を採り (大麦および大豆は粉碎後 420 μ m のふるいを通した試料 10 g を採り, 水 20 mL を加えて 30 分間放置), 無水硫酸ナトリウム 30 g および酢酸エチル 80 mL を加えてホモジナイズ後, 3,500 rpm で 5 分間遠心分離し上清を得た. 残留物に酢酸エチル 40 mL を加えて振とう混合後, 3,500 rpm で 5 分間遠心分離し上清を得た (大麦および大豆は酢酸エチル 80 mL を加えて再度ホモジナイズし, 3,500 rpm で 5 分間遠心分離し上清を得た). 上清を合わせ, *n*-ブタノール 5 mL を加えて約 5 mL まで減圧濃縮後, 10 mg/mL PEG 含有アセトン 2.5 mL を加えアセトンで正確に 50 mL とし抽出液とした. 抽出液 5 mL を採り, ENVI-Carb 0.2 g を加えて約 30 秒間激しく振とう後, 0.45 μ m のメンブランフィルター (親水性 PTFE, アドバンテック社製) でろ過し, ろ液を試験溶液とした.

結果および考察

1. GC/MS 分析条件

GC/MS で DP および OPP を繰り返し測定したところ, OPP のピークがブロード化し測定が困難となった. このブロード化現象は液相の異なる分析カラム (DB-17 ms, DB-1701, DB-1 ms: いずれも Agilent Technologies 社製) に用いた場合でも同様であった. この現象を抑制しピーク形状を改善するために, GC 分析においてテーリング解消やマトリックス効果抑制の目的で使用されている PEG[®] を添加して測定したところ, OPP のピーク形状が改善された. そこで, PEG の適正量を検討するために, PEG 濃度を 0~0.5 mg/mL となるように混合標準溶液に添加して測定した. その結果, Fig. 1 に示すとおり PEG 濃度が高くなるほどピーク形状が良くなり, 0.3 mg/mL 以上で OPP はシャープなピークが得られたので, 本法では 0.5 mg/mL (PEG 絶対量として 0.5 μ g) を採用した. カラムに注入された PEG は, カラム温度を 310°C まで昇温後 10 分間保持することでカラムから除去され, 次の測定に影響を及ぼすことはなかった.

混合標準溶液を 0.5 mg/mL PEG 含有アセトンで段階的に希釈して測定した検量線は, いずれも 1 μ g/mL まで直線性を示し ($r=0.997$ 以上), 定量限界 ($S/N\geq 10$) は DP が 0.0005 μ g/mL, OPP は 0.002 μ g/mL であった.

2. 前処理法の検討

DP は蒸気圧が 1.19 Pa (25°C) と非常に高く揮発しやすい物質であり, 厚生労働省通知の個別分析法^{*1}では酢酸エチル抽出後, *n*-ブタノールをキーパーとして加えて濃縮する方法により DP の損失を防いでいる. 今回, 通知法に従い酢酸エチル抽出後, *n*-ブタノールを加えて濃縮する方法を用いた. 酢酸エチルでのホモジナイズ抽出回数について検討したところ, 2 回目のホモジナイズ操作での回収率は DP, OPP とともに 5% 以下と少なかった. そこで, 操作法簡略化のためホモジナイズ操作は 1 回とし, 2 回目の抽出操作は残留物に酢酸エチル 40 mL を加え振とうするだけとした. しかし, 大麦および大豆ではこの操作法では OPP の回収率が 60% 程度と低かったため, 酢酸エチルで 2 回ホモジナイズ操作を行うこととした.

試料の前処理法としてバルクの固相抽出充填剤による精製を検討した. クロロフィルなどの夾雑物の多いほうれん草を試料として, その抽出液に SAX, SCX, NH₂, DPA-6S (ポリアミド樹脂) および ENVI-Carb (いずれも Supelco 社製) を加え振とう後, 上清を測定したところ, SCX では OPP の保持時間付近に充填剤由来の妨害ピークが検出されたが, 他の充填剤では妨害ピークのないクロマトグラムが得られた. また, ENVI-Carb では溶液中のクロロフィルの除去効果が認められたが, それ以外の充填剤では除去効果はなかった. そこで, ENVI-Carb を使用することとし, その使用量を検討した. 試料にキャベツ抽出液を用い, その 5 mL に ENVI-Carb 0~0.8 g をそれぞれ加えて測定したところ, OPP は 0.8 g でも 80% 以上回収

Fig. 1. Improvement of peak sharpness and intensity on SIM chromatograms by PEG to standard solution

a) PEG free, b) 0.05 mg/mL PEG, c) 0.1 mg/mL PEG, d) 0.3 mg/mL PEG, e) 0.5 mg/mL PEG; Injection vol. 1 μ L

されたのに対し、DPは0.3 g以上で回収率の低下が起こり ENVI-Carb への吸着が認められた (Fig. 2)。そこで、ENVI-Carb の使用量は抽出液 5 mL につき 0.2 g とした。

3. 添加回収実験

添加回収実験は、残留基準値の設定されている作物など 9 種の農産物を選び、均一化した試料に DP および OPP を 0.01 および 0.5 μ g/g となるように添加し、約 30 分間放置した後抽出操作を行った。大麦の 0.01 μ g/g 添加で OPP の回収率が 46.7% であったほかは、いずれの添加濃度においても約 68~113% の回収率が得られ、相対標準偏差 ($n=5$) も約 15% 以内であり満足できる結果であった (Table 1)。

なお、本法を用いた試料中の DP および OPP の定量限界 ($S/N \geq 10$) は、それぞれ 0.0013 および 0.005 μ g/g (大麦および大豆はそれぞれ 0.0025 および 0.01 μ g/g) で

Fig. 2. Relationship between amount of ENVI-Carb used for clean-up and recovery

— Δ —: DP, — $\circ$ —: OPP

DP and OPP were added to the 5 mL extract solution of cabbage.

Table 1. Recoveries of diphenyl and *o*-phenylphenol from spiked samples

Sample	Added ($\mu\text{g/g}$)	Recovery (%)			
		DP		OPP	
		Mean	R.S.D.	Mean	R.S.D.
Barley	0.01	99.3	4.2	46.7	9.0
	0.5	92.7	3.8	91.9	8.5
Soybean	0.01	112.1	10.8	68.0	10.8
	0.5	90.7	7.2	102.1	5.0
Sweet potato	0.01	74.2	11.4	99.8	6.8
	0.5	88.4	9.0	83.3	10.9
Cabbage	0.01	79.6	9.7	112.7	8.5
	0.5	82.7	6.5	107.4	5.6
Spinach	0.01	77.7	15.1	87.5	14.8
	0.5	90.9	3.9	96.0	5.6
Apple	0.01	79.3	5.8	110.6	6.1
	0.5	78.8	3.0	91.6	5.3
Orange	0.01	81.3	6.5	76.2	15.1
	0.5	79.3	6.1	83.1	7.2
Onion	0.01	82.3	9.1	98.3	12.1
	0.5	72.5	5.0	92.5	3.9
Celery	0.01	71.8	5.5	82.8	2.9
	0.5	69.8	5.5	83.0	5.3

* $n=5$

あり、食品衛生法の一様残留基準に十分対応できる検査法であった。

ま と め

GC/MS による DP および OPP の分析法を検討した。無水硫酸ナトリウムを加え酢酸エチルで抽出を行い、グラファイトカーボンで精製した。GC/MS 分析での OPP のピークブロード化の改善として PEG を添加して測定した。9 種類の農産物に 0.01 および 0.5 $\mu\text{g/g}$ 添加したときの回収率は、OPP を 0.01 $\mu\text{g/g}$ 添加した大麦を除き約 70%以上が得られた。

本研究は、国立医薬品食品衛生研究所委託の平成 19 年度残留農薬等のポジティブリスト制度導入にかかる分析法開発によるものである。

文 献

- 1) Zamora, T., Hidalgo, C., López, F.J., Hernández, F. Determination of fungicide residues in fruits by coupled-column liquid chromatography. *J. Sep. Sci.*, **27**, 645–652 (2004).
- 2) Ito, Y., Goto, T., Oka, H., Matsumoto, H., Miyazaki, Y., Takahashi, N., Nakazawa, H. Simple and rapid determination of thiabendazole, imazalil, and *o*-phenylphenol in citrus fruit using flow-injection electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 861–866 (2003).
- 3) Yu, L., Schoen R., Dunkin, A., Firman, M., Cushman, H., Fontanilla, A. Determination of *o*-phenylphenol, diphenylamine, and propargite pesticide residues in selected fruits and vegetables by gas chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC Int.*, **80**, 651–656 (1997).
- 4) Kolbe, N., Andersson J. T. Simple and sensitive determination of *o*-phenylphenol in citrus fruits using gas chromatography with atomic emission or mass spectrometric detection. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 5736–5741 (2006).
- 5) Yamazaki, Y., Ninomiya, T. Determination of benomyl, diphenyl, *o*-phenylphenol, thiabendazole, chlorpyrifos, methidathion, and methyl parathion in oranges by solid-phase extraction, liquid chromatography, and gas chromatography. *J. AOAC Int.*, **82**, 1474–1478 (1999).
- 6) Yoshioka, N., Akiyama, Y., Teranishi, K., 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. *J. Chromatogr. A*, **1022**, 145–150 (2004).
- 7) Akiyama, Y., Yano, M., Mitsunashi, T., Takeda, N., Tsuji, M. Simultaneous determination of pesticides in agricultural products by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **37**, 351–362 (1996).
- 8) Okumura, T. Determination of pesticides and their oxidation products in water by capillary gas chromatography / mass spectrometry—Method for quantification by PEG co-injection with standard solution—. *Kankyo Kagaku (J. Environ. Chem.)*, **5**, 575–583 (1995).