

固相抽出法を用いた柑橘類中の防かび剤の分析

小嶋慎太郎

福岡市保健環境研究所保健科学課

Analysis of Fungicides in Citrus Fruits by Solid-phase Extraction Method

Shintaro KOJIMA

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

要約

柑橘類中の防かび剤の一斉分析において、簡便でかつ高感度な分析を目的として陽イオン交換カラムを用いた固相抽出法による前処理方法の検討を行った。3種の柑橘類について防かび剤の分析を行い、液液抽出法を用いた場合との分析結果を比較したところ、液液抽出法と同等の分析精度であることが判明した。また試料抽出液の濃縮工程を省略しながらも少量の試験溶液を調製することも可能になった。あわせて行った添加回収試験については、3種の柑橘類とも回収率が全て70～120%の範囲内であった。

Key Words : 固相抽出法 solid-phase extraction method, 柑橘類 citrus fruits, 防かび剤 fungicides, チアベンダゾール thiabendazole, イマザリル imazalil, ジフェニル diphenyl, オルトフェニルフェノール o-phenylphenol

1 はじめに

オレンジやレモンなどの柑橘類には、カビの発生や腐敗を防止することを目的として防かび剤が使用されている。日本では、チアベンダゾール(TBZ)、イマザリル(IMZ)、オルトフェニルフェノール(OPP)及びそのナトリウム塩、そしてジフェニル(DP)の4種の使用が認められており、その残存基準は柑橘類1kgあたりTBZ及びOPPが0.010g、IMZが0.0050g、DPが0.070gである¹⁾。

食品衛生検査指針食品添加物編2003にはこれら4つを一斉に分析する方法が記載されており、その前処理方法として液液抽出法を採用している²⁾。この方法は溶液の液性を変化させることで塩基性物質であるTBZ及びIMZを液相間で移動させ、有機相、水相両相に存在する夾雑物を除去することが可能な方法である。しかしながらその操作は煩雑であり、また多くの試験器具を使用するため、多くの検体を一度に分析する場合には不向きである。

前処理の操作を簡便にする方法としては、固相カラムを使用した例が数例報告されている³⁾⁻⁷⁾。そのうち今

回は蛍光発光がなく紫外吸収のみで分析を行うIMZに着目し、塩基性物質を強く保持し夾雑物の洗浄が容易な強陽イオン交換カラムを用いて防かび剤の分析を行ったので、その内容を報告する。なお、一斉分析の精度についても考慮するため、今回は4項目について分析を行った。

2 実験方法

2.1 試料

福岡市内で購入したレモン(チリ産)、オレンジ(南アフリカ産)及びグレープフルーツ(アメリカ産)を使用した。表示を確認したところ、レモン及びオレンジにはチアベンダゾール及びイマザリルの記載が、グレープフルーツにはチアベンダゾール、イマザリル及びオルトフェニルフェノールナトリウムの記載があった。

2.2 試薬等

TBZ, OPP：和光純薬製，食品添加物試験用

IMZ：和光純薬製，残留農薬試験用

DP：和光純薬製，特級

TBZ, IMZ, OPP 及び DP 標準原液：各試薬 50mg にメタノールを加え 100mL とした。(500µg/mL)

混合標準液：TBZ, IMZ, OPP, DP 標準原液を 1：1：1：5 の比で混合し，メタノールで適宜希釈した。

ドデシル硫酸ナトリウム：東京化成工業製，> 85%

1-ブタノール：和光純薬製特級

固相カラム：Inertsep SCX 1g/6mL，GL サイエンス製

2.3 高速液体クロマトグラフ装置及び分析条件

アジレント社製 1100 シリーズ

移動相：メタノール 750mL に蒸留水 250mL，ドデシル硫酸ナトリウム 2.88g を加え，溶解させた後リン酸を加え pH を 2.4 とした。

カラム：Inertsil ODS-4 4.6×150mm，粒径 5µm，GL サイエンス製

検出波長：UV230nm，FL Ex.285nm，Em.325nm

流速：1.0 mL/min

注入量：10µL

カラム温度：40

2.4 試験溶液の調製

2.4.1 試料抽出液の調製

レモン，オレンジ及びグレープフルーツをそれぞれフードプロセッサにて細切し，うち 20g を 200mL 容共栓付フラスコに採取した。そこに無水酢酸ナトリウム 5g，無水硫酸ナトリウム 50g 及び酢酸エチル 50mL を加えホモジナイズした。上清を共栓付メスフラスコに移し，残渣には酢酸エチル 40mL を加え再度ホモジナイズした。上清は 1 回目のもとの合し，その後は上清が 100mL となるまで数回酢酸エチルで残渣を洗浄し，上清に合した。上清を No.5A の濾紙で濾過したものを試料抽出液とした。

2.4.2 各方法による試料抽出液の前処理

1) 液液抽出法による前処理

試料抽出液 100mL を 300mL 容分液漏斗に移し，蒸留水 100mL を加え振とうした。水相は捨て，残った有機相に 0.05mol/L 硫酸 100mL を加え再度振とうした(A)。硫酸相は新たに用意した 300mL 容分液漏斗に移し，酢酸エチル 100mL 及び 5mol/L 水酸化ナトリウム溶液 5mL を加え再度振とうした(B)。水酸化ナトリウム相は捨て，残った 2 つの有機相 A，B をそれぞれ無水硫酸ナトリウムで脱水濾過し，それぞれナシフラスコに回収した。有機相 A

には 1-ブタノール 5mL を加え，液が 2～3mL になるまで減圧濃縮し，メタノールで 10mL にしたものを OPP 及び DP 試験溶液とした。一方有機相 B は減圧乾固し，メタノール 10mL で溶解させたものを TBZ 及び IMZ 試験溶液とした。

2) 固相抽出法による前処理

予めメタノール 5mL，酢酸エチル 5mL でコンディショニングした SCX カラムに試料抽出液 40mL を負荷した。その際カラムの先端にはナシフラスコをセットし，通過液を回収した。通過液は 1-ブタノール 1mL を加えた後減圧濃縮し，メタノールを加え 4mL としたものを OPP 及び DP 試験溶液とした。一方，SCX カラムはメタノール 10mL，蒸留水 10mL で洗浄した後，1%塩化ナトリウムを含む 75%メタノール 6 mL を負荷した。そのうち最初の 2mL は捨て，後の 4mL を TBZ 及び IMZ 試験溶液とした。

2.5 高速液体クロマトグラフによる分析

2.4 で得られた試験溶液を高速液体クロマトグラフで測定した。検量線は混合標準液を段階希釈したものを使用し，TBZ, OPP は 0.2～5µg/mL，IMZ は 0.4～10µg/mL，DP は 1～25µg/mL の濃度範囲とした。

3 結果および考察

3.1 固相抽出の溶出条件検討

試験操作をより簡便にし，かつ高感度に分析を行うため，最終試験溶液を濃縮することなくより少量にする条件を検討した。オレンジの試料抽出液に TBZ 及び IMZ をそれぞれ 0.005g/kg 相当添加し (2.4.2.2) のとおり SCX カラムに負荷，洗浄を行った。溶出液は 2mL ずつ 5 回に分けて負荷し，その 2mL ごとの試験溶液を HPLC で測定した。また，塩化ナトリウム濃度を 0.5%，0.2% に減らしたのも同様に検討を行った。(表 1 のとおり)

塩化ナトリウム濃度が 1% の場合は 3～6mL の間で TBZ 及び IMZ が溶出した。0.5% の場合は TBZ が 3～6mL で，IMZ が 5～8mL で溶出した。0.2% の場合は TBZ が 5～10mL で溶出したが，IMZ は 10mL では完全には溶出できなかった。

よって，溶出は 1%塩化ナトリウムを含む 75%メタノール 6 mL を負荷し，そのうち最初の 2mL は捨て，その後の 4mL で行うこととした。

3.2 試験結果

各前処理法による試験結果を表 2 に示した。定量下限は TBZ, IMZ, OPP を 0.0001g/kg，DP を 0.0005g/kg とし

た．固相抽出法は n=2 で試験を行った．全ての柑橘類で表示に記載された防かび剤のピークを検出したが，レモン及びオレンジの TBZ とグレープフルーツの OPP は定量下限未満であった．これらを蛍光検出器で分析したところ非常に感度が良く，定量下限に相当する標準液の濃度ではピークの S/N 比は十分大きな値であった．より低濃度領域での分析を行えることから，夾雑物の洗浄除去を行っていない SCX カラム通過液についても，順相系固相カラム等を用いてクリーンアップすることでより高感度な分析ができる可能性が示唆された．

また，2 つの前処理方法による分析値を比較してみたところ大きな差はなく，固相抽出法が現行法である液液抽出法と同等の結果を出すことが可能であると考えられた．試料抽出液を全量使用し濃縮工程を経て試験溶液を得る液液抽出法に対し，固相抽出法はその半以下の抽出量を使用し濃縮の工程なく試験溶液を得られることから，より簡便な分析法として使用できることが明らかになった．

3.3 添加回収試験

添加回収試験の結果を表 3 に示した．各項目定量下限の 10 倍量添加し，全て n=3 で試験を行った．回収率は最小で 70%，最大で 112% といずれの試験も 70～120% の

範囲の中であり，回収率は良好であった．今後は幅広い濃度範囲について検討を行い，様々な場合の検査に対応できるようにしていきたい．

文献

- 1)厚生省告示第 370 号：食品，添加物等の規格基準，昭和 34 年 12 月 28 日
- 2)厚生労働省監修：食品衛生検査指針食品添加物編 2003，112～116，日本食品衛生協会，2004
- 3)小沢秀樹，他：固相抽出法による柑橘類，バナナ及び濃縮果汁中防かび剤の系統分析法，東京衛研年報，52，78～83，2001
- 4)吉田政晴，他：固相抽出 - HPLC による柑橘類およびバナナ中のイマザリルの定量法について，日食化誌，8(1)，22～26，2001
- 5)山本圭吾，他：ミニカートリッジカラムを用いた柑橘類，バナナ中の防かび剤の簡易系統的分析，奈良県保健環境研究センター年報，40，69～72，2005
- 6)近藤貴英，他：固相抽出法を用いた柑橘類・バナナ中の防かび剤の一斉分析法について，食品衛生研究，56，59～64，2006
- 7)高井泰智，他：柑橘類・バナナ中の防かび剤の一斉分析法，和歌山県環境衛生研究センター年報，53，27～32，2007

表 1 各溶出画分の TBZ 及び IMZ 回収率(単位：%)

| NaCl(%) | 0.2 | | 0.5 | | 1.0 | |
|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | TBZ | IMZ | TBZ | IMZ | TBZ | IMZ |
| 1～2 mL | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3～4 mL | 0 | 0 | 32 | 0 | 93 | 41 |
| 5～6 mL | 32 | 0 | 72 | 101 | 14 | 64 |
| 7～8 mL | 74 | 31 | 0 | 4 | 0 | 0 |
| 9～10 mL | 2 | 60 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 計 | 108 | 91 | 104 | 105 | 107 | 105 |

表 3 添加回収試験結果(単位：%)

| | TBZ | IMZ | OPP | DP |
|--------------|-----|-----|-----|----|
| レモン | 82 | 90 | 82 | 84 |
| | 83 | 98 | 83 | 84 |
| | 84 | 102 | 85 | 86 |
| オレンジ | 80 | 75 | 84 | 90 |
| | 82 | 80 | 86 | 92 |
| | 83 | 95 | 87 | 94 |
| グレープ フルーツ | 99 | 93 | 70 | 71 |
| | 107 | 98 | 76 | 76 |
| | 112 | 111 | 77 | 77 |

表 2 各柑橘類の防かび剤分析結果(単位：g/kg)

| | レモン | | オレンジ | | グレープフルーツ | |
|------|------|--------|------|-------|----------|-------|
| | TBZ* | IMZ | TBZ* | IMZ | TBZ | IMZ |
| 液液抽出 | (-) | 0.0008 | (-) | 0.029 | 0.002 | 0.005 |
| 固相抽出 | (-) | 0.0007 | (-) | 0.026 | 0.001 | 0.006 |
| | (-) | 0.0007 | (-) | 0.026 | 0.002 | 0.006 |
| | OPP | DP | OPP | DP | OPP* | DP |
| 液液抽出 | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) |
| 固相抽出 | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) |
| | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) |

(-)：定量下限未満，*：下限以下検出