

# 高速液体クロマトグラフィーによるりんご及びなしに 残留するエトキシキンの分析法

木内 佳伸<sup>1</sup>・中村 正規<sup>2</sup>・藤本 和司<sup>1</sup>・藤本 喬<sup>1</sup>

## Analytical Method of Residual Ethoxyquin in Apples and Pears by High Performance Liquid Chromatography

Yoshinobu KIUCHI, Masanori NAKAMURA  
Kazushi FUJIMOTO and Takashi FUJIMOTO

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いりんご及びなしに残留するエトキシキン (EMQ) の分析法を検討した。

試料からの抽出及びEMQ標準溶液の調整は分析操作時におけるEMQの酸化による減衰を防止する為、0.4%アスコルビン酸含有メタノールを用いた。試料からの抽出液は、メンブランフィルター (0.45 μm) で濾過後、蛍光検出 (Ex 370 nm, Em 415 nm) によるHPLC分析を行った。HPLC分析用カラムにTSK-GEL ODS-80 TM, 移動相に50 ppmのブチルヒドロキシトルエンを含むアセトニトリル-水=9:1 (V/V) を用いた。HPLCクロマトグラム上妨害となるピークはなく、0.3 μg/gレベルでの回収率は、りんご84.7 ± 0.9% (n=5), なし87.2 ± 1.3% (n=5) であった。検出下限は、0.05 ppmであった。

Key words : エトキシキン ethoxyquin, りんご apple, なし pear  
高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography  
蛍光検出 fluorescence detection

### I はじめに

平成4年10月の厚生省告示第239号において34種の農薬について残留基準の設定が行われた。その中でエトキシキン (6-Ethoxy-1, 2-dihydro-2, 2, 4-trimethylquinoline) は、りんご及びなしの日焼け防止剤として残留基準 (3 ppm) 及び分析法 (告示法)<sup>1)</sup> が示された。その告示法を用い分析を行ったところ、添加回収実験において十分な回収率が得られず分析に時間を要した。

そこで、著者らは簡便で迅速な分析法として飼料分析基準に示された魚粉中のEMQ分析法<sup>2), 3)</sup> がりんご及びなしに適用できないか、その実用性について検討を行っ

た。

結果として若干の改良で十分適用可能という結果を得たので以下報告する。

### II 実験方法

#### 1. 試料

福岡市内流通のりんご10件及びなし17件を用いた。

#### 2. 試薬等

・エトキシキン (EMQ) :

ジーエルサイエンス(株)製 (96%)

・L-アスコルビン酸 (AsA) : キンダ化学(株)製, 特級

・ブチルヒドロキシトルエン (BHT) : 東京化成工業(株)製

・メタノール : 和光純薬工業(株)製, HPLC用

・アセトニトリル : 和光純薬工業(株)製, 残留農薬試験用

・0.45 μmメンブランフィルター :

東洋濾紙(株)製, DISMIC-25 CS

1. 福岡市衛生試験所 理化学課

2. 福岡市衛生試験所 理化学課

(現所属 福岡市下水道局管理部 水質管理課)

Table 1. Operating Conditions of HPLC

---

Column : TSK-GEL ODS-80TM 150 mm×4.6 mm i.d.
Mobile phase : Acetonitrile-H <sub>2</sub> O (9 : 1 V/V) containing 50 ppm BHT
Flow rate : 0.5 ml/min
Column temp. : Ambient
Detector (FL) : Ex 370 nm, Em 415 nm
sensitivity : GAIN×1000 or×100, ATT. 64
Sample size : 20 μl

---

- ・0.4 % AsA-メタノール : AsA 4 gをメタノール 1 lに溶解し用いた。
- ・EMQ標準原液 : EMQ 50 mgをアセトニトリル 100 mlに溶解し標準原液 (500 μg/ml) とした。(冷蔵保存)
- ・EMQ標準溶液 : EMQ標準原液を適宜 0.4 % AsA-メタノールで希釈して用いた。

### 3. 装置

- ・調理用電動ミキサー : 三洋電機(株)製, SM-K 40型
- ・振とう機 : イワキ産業(株)製, V-DX型
- ・遠心分離機 : 久保田製作所(株)製, KR-702型
- ・高速液体クロマトグラフ  
ポンプ : Waters, 510  
蛍光検出器 : Waters, 470  
インジェクター : RHEODYNE, 7725i

### 4. HPLC条件

測定条件は Table 1. に示した。

### 5. 試験溶液の調製

花おち, しん及び果梗の基部を除去した検体約 1 kgを調理用電動ミキサーで細切(ジュース状)したものを試料とした。

試料 10 gを 50 mlの遠沈管に入れ 0.4 % AsA-メタノール約 45 mlを加え 10 分間振とう後, 遠心分離 (3000 rpm, 10 min) し, 上澄み液を吸引濾過 (No.5 C) した。さらに遠心分離した残渣に 0.4 % AsA-メタノールを適量加え手で軽く振とう後, 先の吸引濾過器で濾過した。濾液を合わせ 50 mlに定容し抽出液とした。抽出液を 0.45 μmメンブランフィルターで濾過後, HPLC用試験溶液とした。

なお, 器具は全て褐色ガラス製を用いた。

### 6. 検量線の作成

EMQの濃度が 0.01 ~ 0.1 (0.01, 0.03, 0.06, 0.08, 0.1) μg/ml及びその 10 倍高濃度の 0.1 ~ 1.0 μg/

mlである標準溶液を調製し, その 20 μlを HPLC に注入した。得られたクロマトグラムよりピーク高を求め, 絶対検量線法により検量線を作成した。

## III 結果及び考察

### 1. 試験溶液及びEMQ標準溶液の調製について

魚粉中のEMQ分析法<sup>2), 3)</sup>では, 抽出溶媒やEMQ標準溶液の調整にメタノールを用いていることからメタノールを用いることにした。蛍光検出器は, UV検出器に比べ選択性が高いことからりんご及びなしからのメタノール抽出液をメンブランフィルター (0.45 μm) にかけて HPLC に注入したところEMQの保持時間付近には測定上妨害となるピークはなく濾過のみの精製で測定可能と考えられた。

しかし, EMQ添加のHPLC用試験溶液を室温で 1 日保存後HPLC分析したところピーク高が低下し, 良好な再現性が得られなかった。これは, EMQ標準溶液においても同様であった。

このピーク高の低下の原因は, EMQが酸化され他の物質に変化した為と考えられた。そこで, EMQの酸化を防止し, 測定上妨害とならない薬剤としてL-アスコルビン酸 (AsA) をメタノールに添加することにした。

メタノールにAsAを 0.4 %になるよう添加し, HPLC用試験溶液及びEMQ標準溶液を調整した。HPLC分析を行ったところクロマトグラム上妨害となるピークはなく, 同溶液を室温に 3 日間保存しても同様な結果が得られ再現性も良好であった。

加藤<sup>4)</sup>の報告によると, EMQはメタノール溶液中において光化学的変化が特異的に起こるとあることからEMQ標準原液の調整にはアセトニトリルを用い, 冷蔵保存とした。標準原液からのEMQ標準溶液は, 0.4 % AsA-メタノールで用時調整とした。

さらに, 上記理由により操作器具は全て褐色ガラス製を用いることにした。

### 2. 測定波長について

EMQ標準溶液をHPLCに注入し, EMQのピークが現れた時点でHPLCのポンプを停止させ, EMQの励起及び蛍光スペクトルを測定したところ励起スペクトルは 370 nm, 蛍光スペクトルは 415 nm付近に吸収極大を示した。公定法<sup>1)</sup>では, 励起波長 360 nm, 蛍光波長 435 nmと示されているが本実験においては励起波長 370 nm, 蛍光波長 415 nmで測定することとした。

### 3. 分離カラム及び移動相について

分離用カラムは, 東ソー(株)製 TSK-GEL ODS-80 TM (150 mm×4.6 mm i.d.) を用い, 移動相について検討した。

移動相は、HPLC用試験溶液がメタノールであることからメタノール-水系が望ましいが、EMQはメタノール-水系に対しアセトニトリル-水系の方が蛍光強度が約10倍増加する<sup>5), 6)</sup>ことからアセトニトリル-水系を用いることにした。移動相の組成は、EMQの保持時間及び夾雑物質との分離を考慮してその比率をアセトニトリル-水(9:1)とした。また、移動相に酸化防止剤であるBHTを50 ppm添加する<sup>5), 6)</sup>ことによりHPLC分析中におけるEMQの酸化による減衰(ピーク高の低下)を防止することが可能となり0.2~2 ngの低濃度域においても十分な感度及び再現性が得られた。よって移動相には50 ppmのBHTを含有するアセトニトリル-水(9:1)を用いることにした。

#### 4. 検量線

実験方法6. に述べた方法に従って検量線を作成した結果、0.2~2 ngの範囲で原点を通る直線性を示した。また、蛍光検出器の感度を切り換えることにより2~20 ngの範囲においても原点を通る直線性を示した。

#### 5. 添加回収及び検出限界

試料10 gにEMQを3  $\mu$ g (1  $\mu$ g/ml溶液3 ml)及び30  $\mu$ g (10  $\mu$ g/ml溶液3 ml)添加し、本法に従って操作し回収率を求めた。その結果をTable 2に示した。また、その時得られた標準品及び各検体のクロマトグラムをFig. 1に示した。回収率は、3及び30  $\mu$ g添加のいずれの場合においても84.7%以上でバラツキも少なく良好な結果が得られた。また、クロマトグラム上妨害となるピークもなく検出下限は0.2 ng(試料濃度として0.05  $\mu$ g/g)であった。

本法を用い福岡市内流通のりんご10件、なし17件について測定を行ったが、いずれの検体からも検出されなかった。

本法は、試料からの抽出液を濾過のみの精製で直接HPLCに注入することからHPLC分離用カラムのダメージが懸念された。しかし、今回の検討にあたり試料からのHPLC用試験溶液を約200回程度HPLCに注入したが、EMQの保持時間の変動やカラム圧の上昇、ピー

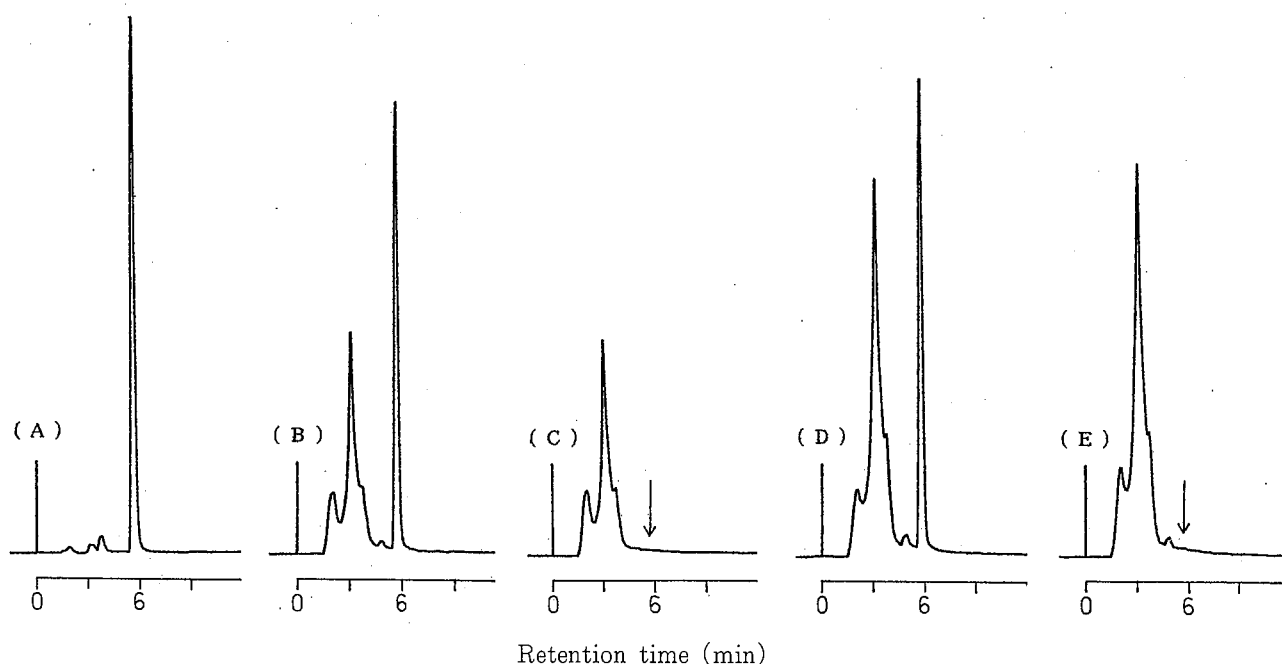


Fig. 1. Typical chromatograms of ethoxyquin standard, apple and pear.

(A) standard : 1.2 ng of ethoxyquin (EMQ)

(B) apple sample spiked with 3  $\mu$ g / 10 g of EMQ (C) blank apple sample

(D) pear sample spiked with 3  $\mu$ g / 10 g of EMQ (E) blank pear sample

HPLC operating conditions of Table 1.

Column : TSK-GEL ODS-80TM 150 mm  $\times$  4.6 mm i.d.

Mobile phase : CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (9 : 1) containing 50 ppm BHT

Flow rate : 0.5 ml/min

Column temp. : Ambient

FL-Detector : Ex 370 nm, Em 415 nm (GAIN  $\times$  1000, ATT. 64) Sample size : 20  $\mu$ l

Table 2. Recovery Rate of Ethoxyquin from Apples and Pears

Sample	Spiked ( $\mu$ g)	Recovery* (%)
apple	3	84.7 $\pm$ 0.9
	30	84.9 $\pm$ 1.1
pear	3	87.2 $\pm$ 1.3
	30	87.3 $\pm$ 0.4

\* mean  $\pm$  S.D. for 5 samples

ク割れ等のトラブルは発生しなかった。また、告示法<sup>1)</sup>に示された抽出後の酸、アルカリ転溶や濃縮操作を必要としないことから大幅な分析時間の短縮が可能となった。

これらのことから本法は、十分に実用性があると考えられた。

## 文 献

- 1) 厚生省告示第239号：平成4年10月27日付
- 2) 飼料分析基準研究会編：飼料分析基準注解（第二版），455～460，（社）日本飼料協会（東京），1987
- 3) 石黒瑛一：魚粉および油脂中に添加されたエトキシキンの定量法，畜産の研究，37（4），491～495，1983
- 4) 加藤三郎：エトキシキンのメタノール溶液中における光化学的変化について，国立衛生試験所報告，101，106～109，1983
- 5) 藤沼賢司他：香辛料中のエトキシキン分析法，食衛誌，23（1），67～72，1982
- 6) 講談社サイエンティフィク編：食品中の食品添加物分析法解説書，882～886，講談社（東京），1988