

天然添加物中のチアベンダゾール及びイマザリルの分析

飯田 憲 司*, 平田 恵 子*, 植松 洋 子*,
鈴木 公 美*, 観 照 雄**, 斉藤 和 夫*

Analysis of Thiabendazole and Imazalil in Natural Food Additives

KENJI IIDA*, KEIKO HIRATA*, YOKO UEMATSU*,
KUMI SUZUKI*, TERUO KAN** and KAZUO SAITO

Thiabendazole (TBZ) and Imazalil (IMZ) in natural food additives, such as color, antioxidant etc, were determined by HPLC. Using condition of 3 methods extraction depending on the form of natural food additives, TBZ and IMZ were extracted with ethyl acetate from the sample. After test solutions were prepared by the liquid-liquid distribution of the extract, and were analyzed by HPLC. IMZ and TBZ were detected by ultraviolet detector at 220nm, and fluorescence detector at excitation 305nm, emission 350nm, respectively.

Recoveries and coefficients of variation of TBZ and IMZ from natural food additives spiked at 0.1 µg/g of TBZ and 5.0 µg/g of IMZ were in the range of 70.8-84.5 %, 62.4 - 75.3 %, and 3.9 -9.8 %, 3.5 -13.4 %, respectively.

TBZ and IMZ in 69 samples of commercial food additive products were below the detection limits. (TBZ < 0.05 µg/g, IMZ < 1.0 µg/g)

Keywords : 天然添加物 natural food additives, チアベンダゾール thiabendazole, イマザリル imazalil, 高速液体クロマトグラフィー HPLC

緒 言

天然添加物は、消費者にとって天然物という名称から安全と考えられることもあるため、消費量は年々増加傾向にある。平成7年5月に食品衛生法が改正され、従来使用されてきた天然添加物は規格基準が整備されないまま既存添加物として引き続き販売、使用が認められているが¹⁾、すべて安全が確認されているものばかりではない。また、平成11年4月に公示された第7版食品添加物公定書には、ウコン色素やアラビアガム等60品目3製剤の天然添加物が収載され、規格が設定されたが²⁾、まだ大半の天然添加物の規格基準は整備されていないのが現状である。現在、天然添加物の安全性を確保するために各種の毒性試験や理化学試験の検討が行われている。しかし、種々の有害物質の中で農薬については今後の検討

課題とされており³⁾、天然添加物中の残留農薬の実態について報告されているものはごくわずかである⁴⁾。

我が国において、チアベンダゾール(以下TBZと略す)及びイマザリル(以下IMZと略す)は食品の防かび剤として、柑橘類とバナナにのみ使用が認められている食品添加物である²⁾。一方、両物質とも諸外国ではポストハーベスト農薬として幅広く用いられている物質であり、実際に我が国の農産物及びその加工食品の農薬検査の中で臭素や鉛及びその化合物について検出頻度の高いものである⁵⁾。天然添加物にはカカオ、コーヒー、穀類などの植物由来のものが多く⁶⁾、原料植物にTBZやIMZが使用されることが考えられ⁷⁾、製造過程においての抽出、精製法によっては残留もしくは濃縮される可能性もある。しかし、TBZ及びIMZの残留実態については他の農

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3 - 24 - 1

* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3 - 24 - 1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

** 同生活科学部

薬等と同様に調査がなされていない。そこで今回、高速液体クロマトグラフィー（以下HPLCと略す）による天然添加物中のTBZ及びIMZの分析法を検討し、市販の天然添加物製品に適用して、その含有実態を調査したので報告する。

実験方法

1. 試料

平成10～11年度にかけて添加物製造業及び卸売販売業から入手した着色料、酸化防止剤、甘味料等の天然添加物及びその製剤21品目76製品を試料とした。試料の詳細をTable 1に示した。

2. 試薬

- (1) TBZおよびIMZ：残留農薬試験用（和光純薬工業（株）製）を用いた。
- (2) ドデシル硫酸ナトリウム（以下SDSと略す）：イオンペアクロマト用（ナカライテスク（株）製）を用いた。
- (3) 無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用を用いた。
- (4) その他の試薬は特級品を用いた。

Table 1. List of Natural Food Additives

Natural Food Additives	Sample (No.)	Form	Extraction Method*
Food Color	Turmeric oleoresin (1)	powder	A
	Turmeric oleoresin (7)	Liquid	B
	Chlorophyll (5)	Liquid	B
	Dunaliella carotene (4)	Liquid	B
	Palm oil carotene (1)	Liquid	B
	Annatto extract (5)	Liquid	C
	Grape skin color (1)	powder	A
	Grape skin color (1)	Liquid	C
	Kaoliang color (3)	powder	A
	Cacao color (3)	powder	A
Antioxidant	-Oryzanol (5)	powder	B
	Tocopherol (3)	Liquid	B
	Tea extract (6)	powder	A
	Catechin (1)	powder	A
	Coffee bean extract (1)	Liquid	C
Sweetener	Licorice extract (9)	powder	A
	Powdered licorice (1)	powder	A
	Stevia extract (13)	powder	A
	Powdered stevia (1)	powder	A
Preservative	Milt protein (1)	powder	A
	-Polylysine (1)	powder	A
Others	Phytic acid (2)	Liquid	C
	Caffeine(extract)(1)	powder	A

* Applied method in scheme 1.

3. 装置

HPLC：（株）島津製作所製 LC-10シリーズ（LC-10AT型ポンプ，RF-10AXL型蛍光検出器，SPD-10AV型紫外外部吸収検出器，CBM-10A型システムコントローラー，CTO-10A型カラム恒温槽，SIL-10A型オートインジェクター）。なお，紫外外部吸収検出器，蛍光検出器の順に流路系を直列に接続して用いた。

データ処理には，CLASS-LC10クロマトデータ処理プログラム（株）島津製作所製，バージョン1.60）を用いた。

4. 標準溶液の調製

TBZ及びIMZ各々100mgをメタノールに溶解して100mlとしたものを標準原液とした。これを混合，希釈して最終濃度がTBZで0.002～0.2 µg/ml，IMZで0.1～10.0 µg/mlとなるように調製したものを標準溶液とした。

5. 試験溶液の調製

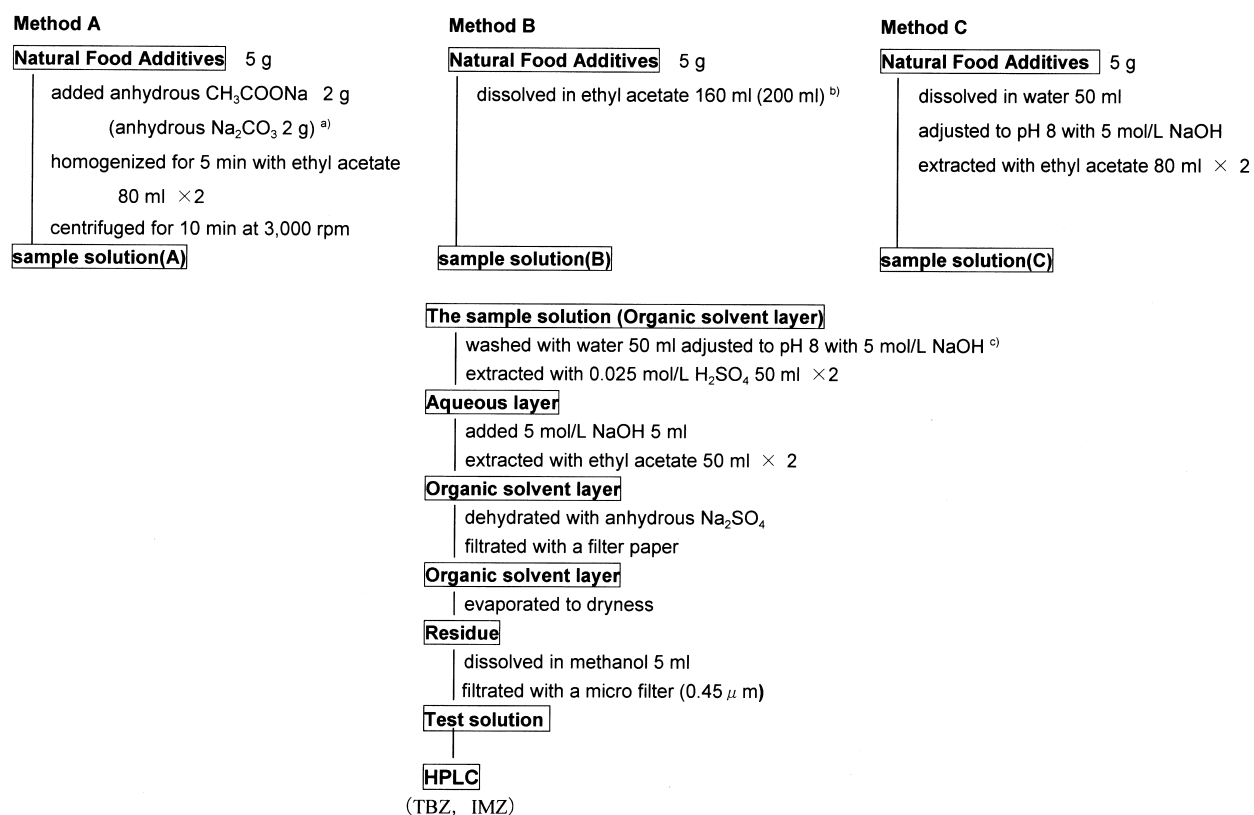
中里らの方法⁸⁾及び衛生試験法⁹⁾に準じ，以下の方法で行った。操作の概要をScheme 1に示した。なお，A法は粉末の試料，B法は酢酸エチル溶解性試料，C法は水溶性の液体試料に適用した。各試料の試料溶液調製法の分類をTable 1に示した。

A法：試料5.0gを正確に量りとり，無水酢酸ナトリウム又は無水炭酸ナトリウム2gを加え，酢酸エチル80mlを加えてホモジナイズした。これを遠沈管に採取して，3,000rpmで10分間遠心分離し，その上澄を分液ロートに移した。さらに同様の操作を繰り返し，これらを合わせ試料溶液Aとした。

B法：試料5.0gを正確に量りとり，酢酸エチル80ml（ - オリザノールは100ml）に溶解し分液ロートに移した。さらに酢酸エチル80ml（100ml）で分液ロートに洗い込み試料溶液Bとした。

C法：試料5.0gを正確に量りとり，水20mlを加え5 mol/L水酸化ナトリウム溶液でpH 8に調整した後，分液ロートに移した。さらに水30mlで洗い込んだ後，酢酸エチル80mlで2回抽出し，これらを合わせ試料溶液Cとした。

A及びB法で調製した試料溶液に水50mlを加え，次いで5 mol/L水酸化ナトリウム溶液を加えてpH試験紙でpH 8程度になっていることを確認した後，振とうして洗浄した。なお，試料溶液Cは水による洗浄操作を省略した。その後，0.025mol/L硫酸50mlで2回抽出を行った。水層を合わせ5 mol/L水酸化ナトリウム溶液5mlで中和した後，酢酸エチル50mlで2回抽出した。抽出液は無水硫酸ナトリウムで脱水，ろ過後減圧下で濃縮乾



Scheme 1. Analytical Procedure for TBZ and IMZ in Natural Food Additives

a) grape skin color, tea extract, catechin, licorice extract, powdered licorice

b) volume of ethyl acetate for α -oryzanol

c) sample solution C excepted.

固した。この残留物をメタノール 5 ml に溶解し、マイクロフィルター (0.45 μ m) でろ過したものを試験溶液とした。

6. HPLC条件

カラム: Lichrospher 100 RP-18(e) (メルク社製, 5 μ m, 4 mm i.d. \times 250 mm), 移動相: アセトニトリル - メタノール - 水 (47 : 13 : 40) 混液に最終濃度が 0.01 mol/L となるように SDS を添加し, リン酸で pH を 2.4 に調整した, 流速: 1.0 ml/min, 検出波長: TBZ - 蛍光, Ex. 305 nm, Em. 350 nm, IMZ - UV 220 nm, カラム温度: 40 $^{\circ}$ C, 注入量: 20 μ l

結果及び考察

1. 抽出方法の検討

TBZ 及び IMZ の抽出は, 中里らの方法⁸⁾ 及び衛生試験法⁹⁾ に準拠した。しかし, 天然添加物は様々な種類があり, また, 使いやすさや安定化等の目的のため食用油脂やグリセリン, プロピレングリコール等が加えられている製品もあり, 柑橘類と同様の操作法が適用できないものがあった。そこで各種の天然添加物に適用できる抽出方法について検討した。試料溶液の調製は Scheme 1

に示したように, 天然添加物製品の形状により A, B 及び C 法により行った。今回調査した試料は, Table 1 に示した方法で試料溶液を調製した。

すなわち粉末試料は, 中里らの方法に準じた A 法を用いることにし, 試料 5.0 g に無水酢酸ナトリウム 2 g を加え, 酢酸エチル 80 ml でホモジナイズした。この時, 柑橘類では無水酢酸ナトリウム 2 g で中和できたが⁸⁾, カンゾウ抽出物, チャ抽出物等では pH が低く中和できないものもあった。それらの試料に対しては無水炭酸ナトリウムを用いることにした⁹⁾。

酢酸エチルに容易に溶解する試料は, 酢酸エチルに直接溶解する B 法により試料溶液を調製した。なお, α -オリザノールでは後の水洗操作でエマルジョンを形成するものがあったので, 酢酸エチルを 200 ml に増やして溶解した。

水溶性の液体試料は, 水に溶解し 5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH 8 に調整した後, 酢酸エチルで抽出する C 法により試料溶液を調製した。

A, B 法で調製した試料溶液は, 試料由来の夾雑物を除去するため水で洗浄を行った。TBZ 及び IMZ は pH 6

~ 7 以下では水層に移行して回収率が低下するため¹⁰⁾, 5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を適量加え pH 8 とした後, 洗浄を行った.

なお, B 法で調製したデュナリエラカロテン, パーム油カロテン, クロロフィル及びウコン色素の試料溶液は酢酸エチル層と水層の境界の識別が非常に困難であったので, 分配を行える状態になるまで 1 時間以上静置した.

C 法で調製した試料溶液については, 試料溶液調製時に pH 8 程度に調整されているため, 水で洗浄するのと同様の効果が得られると考えられ, 洗浄操作は省略した.

さらに, これらの 3 法により得られた試料溶液は水洗後, 酸, アルカリを用いた液 - 液分配で各々精製し, 試験溶液を調製した. 今回調査した試料では, チャ抽出物の一部を除きすべて本抽出操作により試験溶液の調製が可能であった.

2. HPLC 条件の検討

TBZ 及び IMZ の測定条件について衛生試験法⁹⁾ 及び中里らの方法⁹⁾ を検討した. その結果, TBZ, IMZ 共に分離が良く, 試料由来の夾雑物による妨害ピークの影響もない中里らの測定条件を用いることにした. すなわちカラムには C18 カラム, 移動相にはアセトニトリル - メタノール - 水 (47:13:40) に最終濃度が 0.01 mol/L となるように SDS を加え, リン酸で pH 2.4 を用いることにした.

また, 検出波長は TBZ についてはその蛍光の極大波長である Ex. 305 nm, Em. 350 nm とし, IMZ については残留農薬の分析では IMZ の限度が 0.01 µg/g と低いため, 高

感度である 202 nm で測定しているが¹¹⁾, この条件では夾雑物による妨害ピークの影響が大きく, また検出器の安定化に時間がかかるため 220 nm で行った.

本条件によるカンゾウ抽出物のクロマトグラム (A-1, B-1) 及びカンゾウ抽出物に標準溶液を添加した時のクロマトグラム (A-2, B-2) を Fig. 1 に示した.

3. 回収率

市販の 8 品目の天然添加物製品に, TBZ が 0.1 µg/g, IMZ が 5.0 µg/g となるように標準溶液を添加し, 本法に従って操作して回収率を求めた. その結果を Table 2 に示した.

回収率及び変動係数は, TBZ で 70.8 ~ 84.5%, 3.9 ~ 9.8% であり, IMZ で 62.4 ~ 75.3%, 3.5 ~ 13.4% であった. これらの結果から, 本法は実際の試料に適用できるもの

Table 2. Recoveries of TBZ and IMZ Added to Samples

Sample	TBZ		IMZ	
	Recovery(%)	CV(%)	Recovery(%)	CV(%)
Dunaliella carotene	76.0	6.0	72.0	3.5
Annatto extract	84.0	6.1	75.3	4.0
Cacao color	73.3	3.9	62.4	12.5
Tocopherol	74.6	9.5	66.1	8.7
Coffee bean extract	70.8	9.8	69.8	7.0
Tea extract	84.5	7.7	72.7	4.8
Stevia extract	77.6	6.4	66.6	7.0
Phytic acid	79.6	7.9	65.6	13.4

n=3. Natural food additives were spiked with 0.1 µg/g of TBZ, and 5.0 µg/g of IMZ.

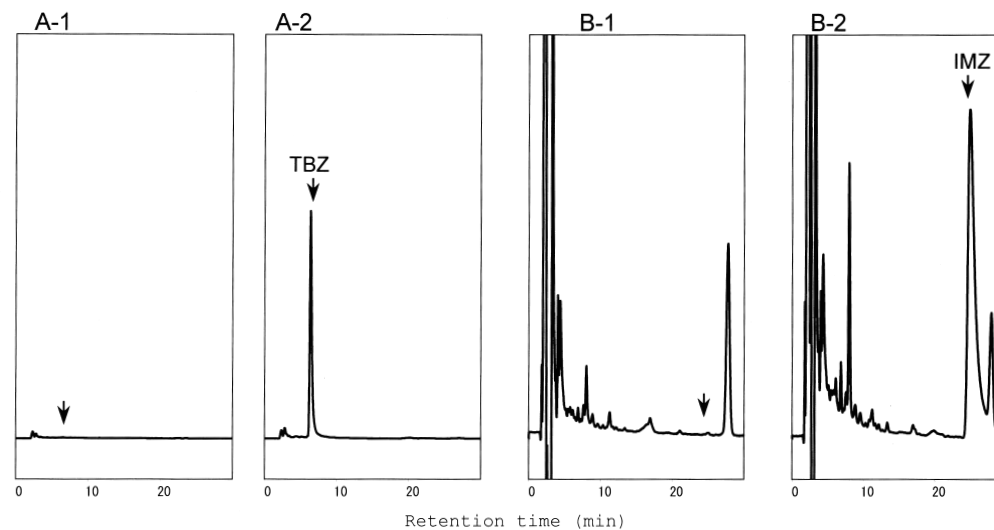


Fig. 1. High Performance Liquid Chromatograms of TBZ and IMZ in Licorice Extract

A-1: licorice extract (fluorescence), A-2: licorice extract added TBZ standard (fluorescence),

B-1: licorice extract (UV), B-2: licorice extract added IMZ standard (UV)

Operating conditions: column, Lichrospher 100RP-18 (e) (5 µm, 4mm i.d. × 250mm); mobile phase, acetonitrile - methanol - water (47:13:40, pH 2.4) containing 0.01 mol/L sodium dodecyl sulfate; flow rate, 1.0 ml/min; column temp., 40 °C; detection of TBZ with fluorometric detector (Ex. 305 nm, Em. 350 nm), detection of IMZ with UV detector (220 nm).

であると考える。

また、検出限界はTBZで0.05 µg/g, IMZで1.0 µg/gと設定した。

4. 市販添加物製品の調査結果

TBZ及びIMZは柑橘類等に防かび剤として使用される他、諸外国で様々な作物に農薬として使用されている⁷⁾。諸外国でTBZはブドウ、小麦、米、コーヒー豆等を使用され、IMZについては我が国の食品衛生法において米、小麦、じゃがいも等に残留農薬基準が定められている¹²⁾。天然添加物はこれらの農作物を原料としているものも多いため、天然添加物製品への残留が懸念されている。今回調査対象とした試料の中では、ブドウ果皮色素、カカオ色素、 α -オリザノール、生コーヒー豆抽出物、フィチン酸、カフェイン(抽出物)の6品目14製品が原料にTBZ, IMZが使用される可能性のある作物を原料とする添加物であったが、すべて検出されなかった。その他の着色料、酸化防止剤等の天然添加物を含めた20品目69製品を調査した結果においても、いずれからもTBZ及びIMZは検出されなかった。しかし、ウコン色素及びチャ抽出物の一部及びカンゾウ末等3品目7製品については、妨害ピーク等により測定不能のものもあった。今後、これらの試料の精製方法について検討する予定である。

まとめ

着色料、酸化防止剤等の天然添加物中のTBZ及びIMZの分析の検討を行い、市販の天然添加物及びその製剤の調査を行った。

- 1) 天然添加物の形状及び性状に対応して3種の抽出法を作成したところ、一部のものを除いて天然添加物試料の分析が可能であった。
- 2) 本法による回収率及び変動係数はTBZで70.8~84.5%, 3.9~9.8%であり、IMZで62.4~75.3%, 3.5~

13.4%であった。なお、本法による検出限界はTBZで0.05 µg/g, IMZで1.0 µg/gであった。

- 3) 市販の天然添加物及びその製剤20品目69製品について調査したところ、今回調査した天然添加物からTBZ及びIMZは検出されなかった。

本調査は、東京都食品環境指導センターの先行調査事業の一環として行ったものである。

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局長通知衛化第56号, 5月23日, 1996.
- 2) 第7版食品添加物公定書, 1999, 日本食品添加物協会, 東京.
- 3) 米谷民雄: 食品衛生研究, 49(586), 45-54, 1999.
- 4) 萩原輝彦, 安野哲子, 羽石奈穂子他: 東京衛研年報, 50, 193-197, 1999.
- 5) 田中俊博: 食品衛生研究, 49(587), 27-32, 1999.
- 6) 第2版既存添加物名簿及び注解リスト, 1999, 日本食品添加物協会, 東京.
- 7) 第7版食品添加物公定書解説書, 1999, 廣川書店(株), 東京.
- 8) 中里光男, 只野敬子, 小川仁志他: 衛生化学, 41, 392-397, 1995.
- 9) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解・付・追補, 1527-1531, 1995, 金原出版(株), 東京.
- 10) 小川正彦, 坂井亨, 大熊和行他: 三重衛研年報, 42, 111-117, 1996.
- 11) 農薬残留分析法研究班編: 最新農薬の残留分析法, 349-351, 1995, 中央法規出版(株), 東京.
- 12) 厚生省生活衛生局監: 食品衛生検査指針追補, 238-251, 1996, 日本食品衛生協会, 東京.