

固相抽出法による柑橘類，バナナ及び濃縮果汁中 防かび剤の簡易系統分析法

小 沢 秀 樹^{*}，広 門 雅 子^{*}，嶋 村 保 洋^{*}，中 島 和 雄^{*}
木 村 圭 介^{*}，斉 藤 和 夫^{*}

A Simple and Systematic Determination of Fungicides in Citrus Fruits, Bananas and Fruit Juice Concentrates by Solid Phase Extraction Method

Hideki OZAWA^{*}, Masako HIROKADO^{*}, Yasuhiro SHIMAMURA^{*},
Keisuke KIMURA^{*} and Kazuo SAITO^{*}

A simple and systematic analytical method for fungicides in citrus fruits, bananas and fruit juice concentrates by solid phase extraction and high performance liquid chromatography (HPLC) is described. Fungicides (*o*-phenylphenol, OPP; diphenyl, DP; thiabendazole, TBZ; and imazalil, IMZ) were extracted with ethyl acetate, and then partitioned into two groups of OPP and DP or TBZ and IMZ, by passing through a double cartridge (Mega Bond Elut Silica SI and Bond Elut Jr. ion-exchange SCX). The fraction passed through the cartridges was used for the analysis of OPP and DP. The fraction bound to the SCX cartridge was eluted with 1% sodium chloride-HPLC mobile phase (acetonitrile-methanol-0.025 mol/L sodium dodecylsulfate (45:15:40)) and was used for the analysis of TBZ and IMZ. Each fraction was analyzed by HPLC with ultraviolet and fluorescent detectors. Fungicides spiked in samples at levels of 0.01-1.0 $\mu\text{g/g}$ gave satisfactory recoveries by the proposed method.

Keywords: ボンドエルト SCX Bond Elut SCX, オルトフェニルフェノール *o*-phenylphenol, ジフェニル diphenyl, チアベンダゾール thiabendazole, イマザリル imazalil, 柑橘類 citrus fruit, バナナ banana, 濃縮果汁 fruit juice concentrate, C₁₈ファーストカラム C₁₈ fast column, 高速液体クロマトグラフィー HPLC

緒 言

現在、我が国では食品衛生法に基づき、防かび剤としてオルトフェニルフェノール (OPP), ジフェニル (DP), チアベンダゾール (TBZ) 及びイマザリル (IMZ) の4種類が許可されており、柑橘類への使用基準はそれぞれ0.010 g/kg以下, 0.070 g/kg未満, 0.010 g/kg以下, 0.0050 g/kg以下と設定されている。また、バナナ全果では、TBZ, IMZの使用基準はそれぞれ0.0030 g/kg以下, 0.0020 g/kg以下であり、バナナ果肉のTBZ使用基準は0.00040 g/kg以下となっている。このように4種防かび剤の使用基準は非常に低濃度のものから比較的高濃度のものまで幅広い値で設定されている。また、これらの防かび剤は化学的な性質も大きく異なっている。さらに分析対象である試料も柑橘類、バナナ、これらの加工品を含めると多種類のものがある。これらの状況の中で防かび剤を効率良く同時に分析できる試験法の確立が求められているが、特にルーチン分析法としては、より簡便で迅速かつ高精度の結果が得られる方法が望まれている。

著者らは、前報において濃縮果汁中の4種の防かび剤の迅速分析法を検討し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) カラムに逆相系C₁₈ファーストカラム (粒径3 μm) を用いることにより、分析時間の短縮及び移動相に用いる有機溶媒使用量を低減した方法を確認し報告した¹⁾。しかし、試験溶液調製時の酸、アルカリによる液-液分配等の操作が煩雑であるため^{1, 2)}、その調製をより簡便化する必要があった。

今回、試験溶液をより簡便に調製するために固相抽出法の適用を検討した。これまでに固相抽出法を防かび剤の分析に使用した報告は、強陽イオン交換カートリッジのSCX^{3, 4)}又はPRS^{5, 6, 7)}などがあるが、HPLCによる4種防かび剤の一斉分析へ適用した報告は見あたらないため、SCXとシリカゲルカートリッジを併用したクリーンアップ法を検討したところ良好な結果が得られたので報告する。

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科 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, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

実験方法

1. 試料

グレープフルーツ, みかん (有田), レモン (無添加) 及びバナナはいずれも市販品を用いた。レモン, オレンジ, グレープフルーツの濃縮果汁は業務用のものを用いた。

2. 試薬

(1) OPP, DP, TBZ及びIMZ標準原液: OPP, DP (和光純薬工業(株)試薬特級), TBZ (同社食品添加物試験用) 及びIMZ (同社残留農薬試験用試薬) 各100 mgを精秤し, メタノールに溶解して100 mLとした (各1 mg/mL)。

(2) OPP, DP, TBZ及びIMZ混合標準溶液: 各標準原液を必要に応じて適宜メタノールで希釈して使用した。

(3) 固相抽出カートリッジ: Bond Elut Jr. SCX (強イオン交換体500 mg, Varian社製; 以下SCXと略す) 及びMega Bond Elut SI (シリカゲル1 g, Varian社製; 以下SIと略す) は, あらかじめメタノール10 mL, 次いで酢酸エチル10 mLにより各々コンディショニングを行い, SCXの上部にSIカートリッジを連結して使用した (SI-SCXダブルカートリッジ)。

(4) 液相分離用紙: 溶媒の脱水には1PSろ紙 (シリコン処理済み, ワットマン(株)製) を用いた。

(5) 溶媒: アセトニトリル及びメタノールは和光純薬工業(株)HPLC用を用いた。

(6) pH調整液: 2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール (和光純薬工業(株)試薬特級) 200 gを水で溶解して全量を400 mLとした (0.5 g/mL)。

(7) その他の試薬: ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 及び*n*-ブタノール (*n*-BuOH) は和光純薬工業(株)試薬特級を用いた。セライトはCelite Corp.製 (No. 545) を用いた。

3. 装置

HPLC: 日本分光工業(株)PU-1580型ポンプ, UV-1570 紫外/可視部検出器, AS-950-10型インジェクター, CO-965型カラム恒温槽, 島津製作所(株)RF-535型蛍光検出器及びDGU-12A型デガッサーにより構成したものを用いた。なお, 紫外部吸収検出器と蛍光検出器は流路を直列に接続して用いた。データ処理にはJASCO BORWIN-NTクロマトデータ処理プログラム (日本分光工業(株), ver.1.5) を用いた。

4. HPLC分析条件

カラム: ファーストカラムCapcell PAK UG 120 C18 (粒径3 µm, 4.6 mm i.d. x 100 mm; 資生堂(株)), 移動相: アセトニトリル-メタノール-0.025 mol/L SDS 溶液 (りん酸でpHを2.5に調整) (45: 15: 40), 流速: 0.8 mL/min, カラム温度: 40 °C, 検出波長: (1) OPP, DP及びTBZ; 蛍光 (Ex. 285 nm, Em. 325 nm), (2) IMZ; 紫外部吸収 (220 nm), 注入量: 10 µL。

5. 試験溶液の調製

柑橘類とバナナはミキサーで細片して均一化し, その20 gをブレンダーカップにとり, pH調整液5 mL, 酢酸エチル80 mL, セライト20~25 gを加え, 10分間ホモジナイズし,

吸引ろ過した。残さは酢酸エチル100 mLで洗い込みながら吸引ろ過し, ろ液を合わせ酢酸エチル抽出液とした。

濃縮果汁はその10 gに水30 mLを加えて混和し, さらにpH調整液5 mLを加え, 前報¹⁾に従い酢酸エチル80 mLで2回振とう抽出し, 酢酸エチル抽出液とした。

これらの酢酸エチル抽出液はあらかじめメタノールと酢酸エチルでコンディショニングしたSI-SCXダブルカートリッジにリザーバー (60 mL, 日本ウォーターズ社製) を用いて負荷した。カートリッジ通過液は*n*-ブタノール2 mLを加えてから減圧濃縮した後, メタノール5 mLに溶解してOPP及びDP用試験溶液とした (フラクションA: Fr. A)。SCXカートリッジ吸着分はメタノール5 mLと次いで水10 mLで洗浄した後, 1%塩化ナトリウムを含むHPLC移動相溶液10 mLで溶出しTBZ及びIMZ用試験溶液とした (フラクションB: Fr. B) (Fig. 1)。

結果及び考察

1. 試験溶液の調製法の検討

1.1. 抽出条件: TBZ及びIMZは酸性条件下では酢酸エチルでの抽出率が著しく低下することが分かっており⁸⁾。前報では濃縮果汁のpH調整にトリスヒドロキシアミノメタンの結晶を5 g添加し使用した¹⁾。この方法をレモン等の固形試料に適応したところ, TBZ及びIMZの回収率が低く, pH調整が十分でないことが推察された。そこで, トリスヒドロキシアミノメタンにかえて, 水に易溶の2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール水溶液 (0.5 g/mL) 5 mLを用いてpHを調整をしたところ, TBZ及びIMZの回収率が格段に向上したため, 本法においては2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール水溶液でpH調整を行うことにした。

1.2. 固相抽出条件: 酢酸エチル100 mLに混合標準溶液100 µL (各10 µg) を添加し, SI-SCXダブルカートリッジに負荷したところ, カートリッジ非吸着分画からOPP, DPが定量的に回収できた。SCXカートリッジに吸着された分画は, メタノール5 mL, 次いで水10 mLで洗浄した後, 塩化ナトリウムを1% 添加したHPLC移動相溶液で溶出させたところ, 6 mLでTBZが98%以上, 4 mLでIMZが99%以上が回収できた (Fig. 2)。そこでTBZ及びIMZのSCXカートリッジからの溶出は, 溶出液10 mLで行うことにした。

次に, オレンジ濃縮果汁に0.1 µg/gになるように混合標準溶液を添加し, 本法の抽出操作により得られた酢酸エチル抽出液を用いてSIカートリッジ⁵⁾によるクリーンアップ効果を検討した (Fig. 3)。SIカートリッジを使用しないSCXカートリッジのみのクリーンアップでは, OPP, DP, IMZに対する妨害ピークは認められなかったが, TBZは試料由来の妨害ピークにより定量は不可能であった (Fig. 3-A)。そこで, SCXカートリッジ上部に充填量の異なるSIカートリッジを連結し, クリーンアップ効果を調べたところ (Fig. 3-B, C, D), 1g以上のSIカートリッジで十分なク

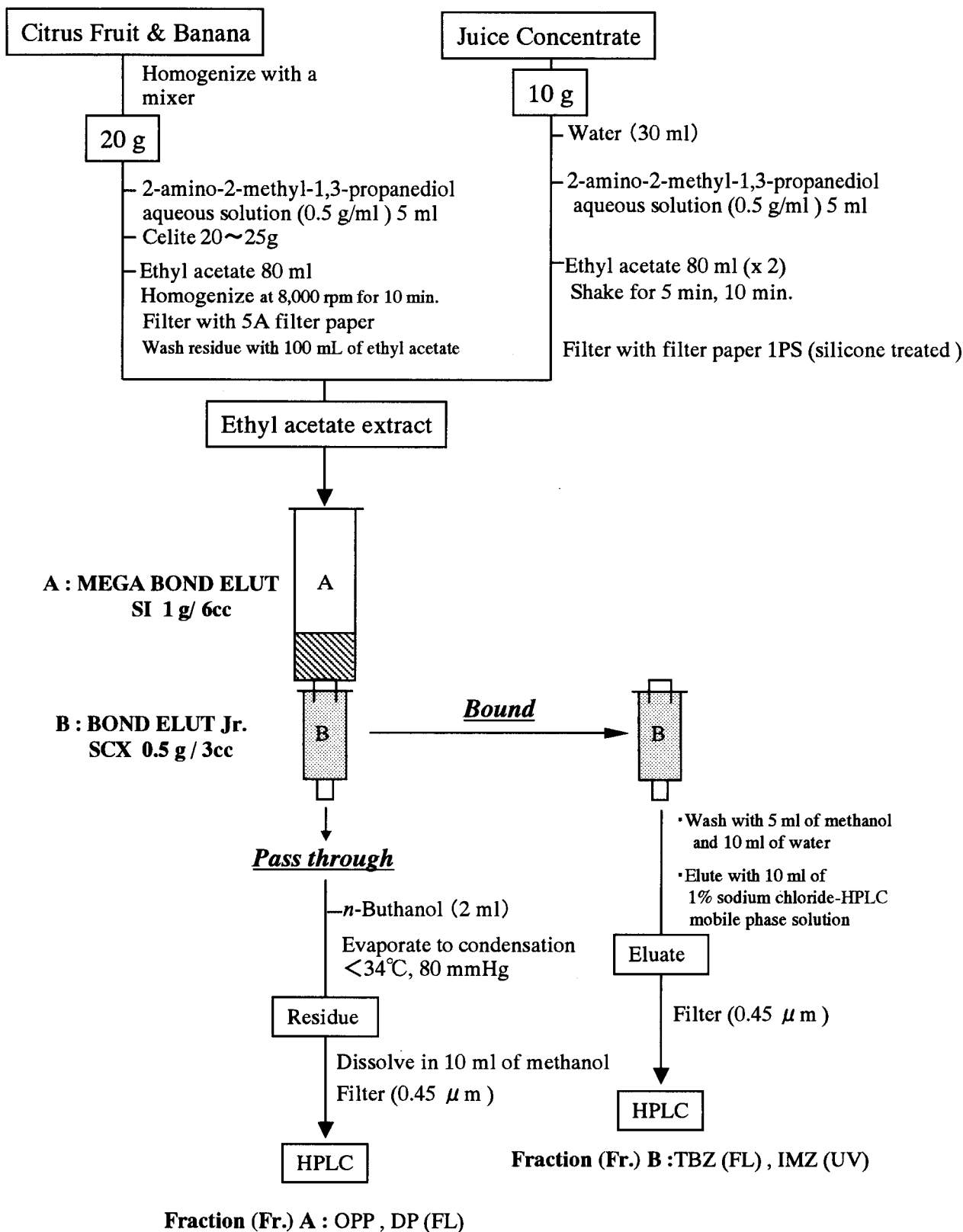


Fig. 1. Schematic Diagram for Determination of *o*-Phenylphenol (OPP), Diphenyl (DP), Thiabendazole (TBZ) and Imazalil (IMZ)

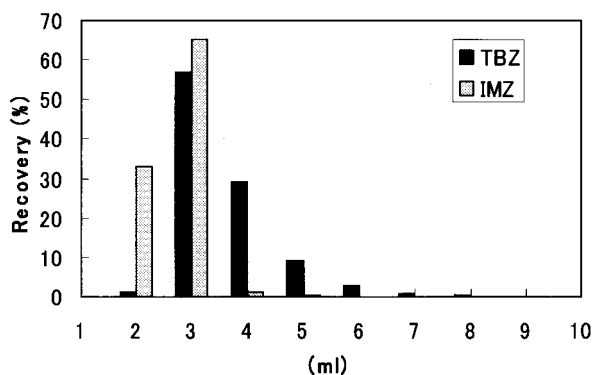


Fig. 2. Elution Profile of TBZ and IMZ with 1% Sodium Chloride-HPLC Mobile Phase from Bond Elut SCX.

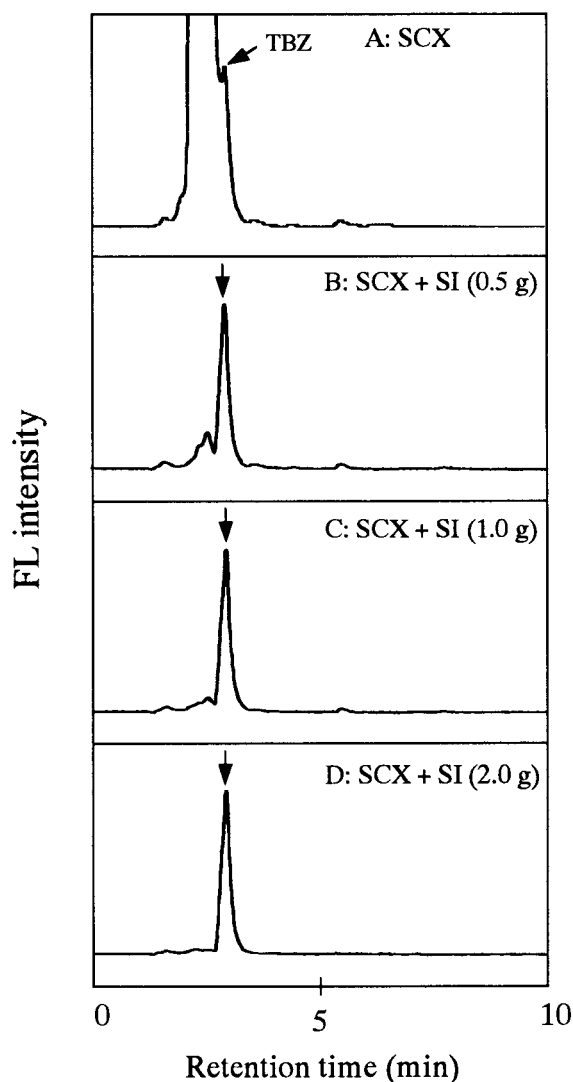


Fig. 3. Effect of the Amount of Silica Cartridge for Clean-up of Ethyl Acetate Extract Prepared from Orange Juice Concentrate

リーナップ効果のあることが分かった。以上の結果から1gのSIカートリッジを用いることにした。

2. 添加回収実験

2.1. 柑橘類：レモン（無添加）、オレンジ（みかん）、グレープフルーツを用いて添加回収試験を行った。試料20gにOPP、TBZ、DP及びIMZを各0.1 $\mu\text{g/g}$ になるように混合標準溶液を添加し、回収率を求めた（Table 1）。グレープフルーツにおいては、無添加の試料が入手できなかったため、添加時の分析値から非添加時3回の平均分析値を差し引いた値から回収率を求めた。その結果、レモンにおけるOPPの回収率が83.4%（CV：4.3%）と若干低かったが、他はおおむね90%以上の回収率を示し、CV値も5%以内と良好であった。すべての試料でHPLCクロマトグラム上においてDPに近接するピークが存在したが、1.0 $\mu\text{g/g}$ 添加時での定量値への影響は3%以下であった。レモン及びオレンジのHPLCクロマトグラムをFig. 4に示した。

2.2. パナナ：全果を用いて添加回収試験を行った。試料20gにTBZ及びIMZを各0.1 $\mu\text{g/g}$ 、あるいはTBZを0.01 $\mu\text{g/g}$ になるように混合標準溶液を添加し回収率を求めた（Table 1）。0.1 $\mu\text{g/g}$ 添加したときの回収率はTBZが86.0%（CV：3.4%）、IMZが93.9%（CV：2.8%）であった。また、TBZ 0.01 $\mu\text{g/g}$ 添加したときの回収率は83.7%（CV：4.1%）であった。

2.3. 濃縮果汁：レモン、オレンジ及びグレープフルーツの濃縮果汁を用いて添加回収試験を行った。濃縮果汁10gにOPP及びIMZを各0.1 $\mu\text{g/g}$ 、DPを1.0 $\mu\text{g/g}$ 、TBZを0.01 $\mu\text{g/g}$ になるように混合標準溶液を添加し、本法に従って回収率を求めた。回収率はTable 2に示したとおり、83.6～95.8%（CV：0.6～5.0%）と良好な結果が得られた。この結果は前報¹⁾（回収率：81.4～92.5%；CV：2.7%）と同程度の回収率を示した。

以上の結果から、SCX及びSIカートリッジを用いた本法は、前報に比べて操作も簡便で迅速に処理でき、かつ高精度に分析できる試験法と考えられる。また、レモン、グレープフルーツ、バナナに加えて濃縮果汁の広範囲の食品にも適用できるため、今後行政試験に利用できる試験法と考える。

まとめ

HPLCによる柑橘類、バナナ及び濃縮果汁中の4種防かび剤（OPP、DP、TBZ及びIMZ）の固相抽出カートリッジを利用した簡易系統分析法を検討した。試料中の4種の防かび剤はアルカリ性下で酢酸エチル抽出し、さらに、SI-SCXダブルカートリッジを使用することにより十分なクリーンアップ効果が得られ、これまでの煩雑な液-液分配法を用いずに試験溶液の調製を簡便・迅速に行うことができるようになった。本法による柑橘類、バナナ及び濃縮果汁試料における0.1 $\mu\text{g/g}$ 添加時の回収率は83.4～97.0%、CV値5.0%以下と良好な結果が得られた。また、バナナ全果を用いたTBZの0.01 $\mu\text{g/g}$ の添加回収実験においても

Table 1. Recoveries of OPP, DP, TBZ and IMZ spiked into Citrus Fruits and Bananas at the Level of 0.1 ($\mu\text{g/g}$)

Fruit	Recovery (%)			
	OPP	DP	TBZ	IMZ
Banana	-	-	83.7 (4.1)*	-
Lemon	83.4 (4.3)	93.2 (5.0)	93.4 (3.0)	95.8 (3.4)
Orange	95.0 (4.4)	89.7 (4.9)	94.4 (1.4)	97.0 (4.2)
Grape Fruit	88.4 (4.1)	90.6 (4.2)	94.6 (3.4)	95.7 (3.2)

n=6; () : CV%; - : not tested; * : spiked at 0.01 $\mu\text{g/g}$

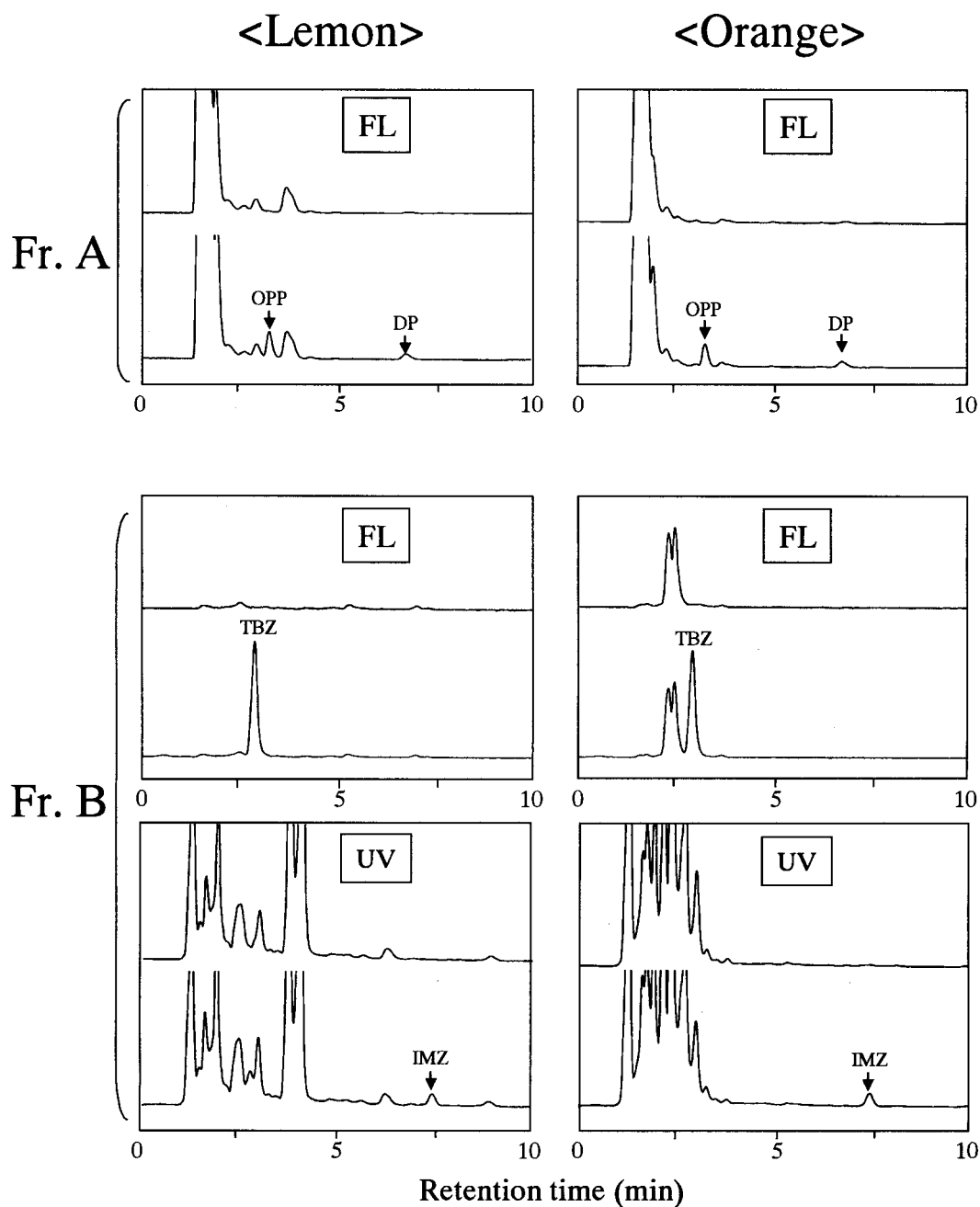


Fig. 4. HPLC Chromatograms of OPP, DP, TBZ and IMZ spiked into Orange or Lemon Fruits at the Level of 0.1 $\mu\text{g/g}$
 Upper profile: unspiked, lower profile: spiked, in each window. Tracings of UV show absorbance at 220nm, while FL record fluorescence emission at 325 nm. Fr. A, B: see Fig. 1.

Table 2. Recoveries of OPP, DP, TBZ and IMZ spiked into Fruit Juice Concentrates at the Levels of 0.1 $\mu\text{g/g}$ (OPP, IMZ), 0.01 $\mu\text{g/g}$ (TBZ) and 1.0 $\mu\text{g/g}$ (DP)

Bulk juices	Recovery (%)			
	OPP	DP	TBZ	IMZ
Lemon	95.8 (3.6)	92.4 (5.0)	89.4 (3.0)	94.3 (3.7)
Orange	88.2 (1.8)	94.8 (3.5)	84.2 (0.6)	94.1 (3.3)
Grape Fruit	88.8 (3.1)	90.2 (2.6)	83.6 (2.2)	89.5 (1.9)

n = 3; (): CV%

83.7% (CV : 4.1%) と高い回収率が得られた。したがって、本試験法は行政試験に十分適用できることがわかった。

文 献

- 1) 小沢秀樹, 広門雅子, 井部明広, 他: 東京衛研年報, 50, 119-123, 1999.
- 2) 中里光男, 只野敬子, 小川仁志, 他: 衛生化学, 41, 392-397, 1995.
- 3) Muccio, A. D., Girolimetti, S., Barbini, D. A., *et al.*: *J. Chromatography A*, 833, 61-65, 1999.
- 4) Levine, R. A., Luchtefeld, R. G., Hopper, M. L., *et al.*: *J. AOAC International*, 81, 1217-1223, 1998.
- 5) Ito, Y., Ikai, Y., Oka, H., *et al.*: *J. Chromatography A*, 810, 81-87, 1998.
- 6) Yamazaki, Y. and Ninomiya, T.: *J. AOAC International*, 82, 1474-1478, 1999.
- 7) Arenas, R. V., Rahman, H. and Johnson, N. A.,: *J. AOAC International*, 79, 579-582, 1996.
- 8) 小川正彦, 坂井 亨, 大熊和行, 他: 三重衛生年報, 42, 111-117, 1996.