

[ノート]

柑橘類中 4 種防かび剤についての簡便な一斉分析法の開発と その妥当性評価

竹中 麻希子* 吉岡 直樹 三橋 隆夫

Development of a Simple Analytical Method for the Simultaneous Determination of 4 Fungicides in Citrus Fruits and Validation of the Method

Makiko TAKENAKA*, Naoki YOSHIOKA and Takao MITSUHASHI

Life Science Division, Public Health Science Research Center, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Consumer Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan

A simple analytical method was developed for the simultaneous determination of 4 fungicides (σ -phenylphenol : OPP, diphenyl : DP, thiabendazole : TBZ, and imazalil : IMZ) in citrus fruits. The 4 fungicides were extracted with ethyl acetate and separated with a tandem-connected InertSep Slim SI and InertSep SlimJ SCX solid column. The fungicides were determined by HPLC with a fluorescence detector (OPP, DP and TBZ) or a UV detector (IMZ). Validation test of this method was performed accordance with the guideline of the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare. All fungicides were found to conform to the guideline (selectivity, recovery, repeatability and intermediate precision). These results show that this method is useful as a routine analysis for 4 fungicides in citrus fruits.

I はじめに

現在、我が国では食品衛生法に基づき、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)、イマザリル (IMZ) 及びフルジオキシニルの 5 種類が防かび剤として許可されている。兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学研究センターでは、県庁生活衛生課と連携し、これらのうちフルジオキシニルを除く 4 種防かび剤 (OPP, DP, TBZ 及び IMZ) の残留量を監視するための検査を行っている。

食品衛生法に関わる食品検査については、厚生労働省より示された「食品中に残留する農薬等に関する試験法

の妥当性評価ガイドラインについて」¹⁾に従って妥当性評価を行うことが指示されており、我々も残留農薬や動物用医薬品の項目を中心に作業を進めている。

今回、当研究センターでの柑橘類の検査に利用する目的で、4 種防かび剤の簡便な一斉分析法の開発を試みた。また、その分析法の妥当性を評価したので、結果を併せて報告する。

II 材料と方法

1. 試料

神戸市内で市販されていたオレンジ、グレープフルーツ、レモンを用いた。

2. 試薬及び試液

TBZ 及び IMZ 標準品は和光純薬工業(株)製の残留農薬試験用、OPP 及び DP 標準品は和光純薬工業(株)製の

健康科学部

*別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町 2-1-29
兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学研究センター
健康科学部 竹中 麻希子

食品添加物試験用を用いた。

各標準品約 25mg を精密に量り、メタノールに溶解し、全量を 100mL とした (標準原液：250 μ g/mL)。4 種標準原液を 10mL ずつ混合し、メタノールを加えて 50mL とした (混合標準原液：50 μ g/mL)。これをメタノールで適宜希釈し、添加回収実験用の混合標準溶液及び HPLC 用混合標準溶液とした。

酢酸エチルは和光純薬工業(株)製の残留農薬・PCB 試験用を用いた。メタノール及びアセトニトリルは、高速液体クロマトグラフ用を用いた。ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) はイオンペアクロマトグラフ用を用いた。水酸化ナトリウム、無水硫酸ナトリウム及び 1-ブタノールは、試薬特級品を用いた。

固相抽出カートリッジ：InertSep Slim SI [690mg, ジーエルサイエンス社製] (以下 SI と略す) 及び InertSep SlimJ SCX [陽イオン交換体 500mg, ジーエルサイエンス社製] (以下 SCX) を用い、SCX の上部に SI を連結して使用した (以下、SI-SCX ダブルカートリッジ)。各カートリッジは使用前に酢酸エチル 3mL でコンディショニングを行った。

3. 装置

HPLC：(株)島津製作所製 LC-10AT

ホモジナイザー：イカジャパン(株)製

ULTRA TURRAX T25 digital

振とう機：タイテック(株)製 SR-II

遠心分離機：久保田商事(株)製 KUBOTA8700

4. HPLC 分析条件

カラム：Inertsil ODS-3 (4.6mm i.d.×150mm)

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル-メタノール-0.025mol/L SDS 溶液 (りん酸で pH を 2.5 に調整) (47:13:40)

流速：1.0mL/min

検出器：蛍光検出器と紫外外部吸収検出器を直列に接続した。

測定波長：1) OPP, DP 及び TBZ；蛍光検出器 (励起波長 285nm/蛍光波長 325nm)

2) IMZ；紫外外部吸収検出器 (230nm)

注入量：10 μ L

5. 試験溶液の調製

果実 500~600g をミキサーで均一化し、その 10.0g を 50mL 遠沈管に移し、5mol/L 水酸化ナトリウム水溶液 2mL 及び酢酸エチル 15mL を加え、1 分間ホモジナイズした。ホモジナイザーの先端を酢酸エチル 10mL で洗浄

し、洗浄液及び無水硫酸ナトリウム 30g を遠沈管に加えた。10 分間振とう機で振とう抽出し、10 分間遠心分離 (2500rpm) した後、上澄液を分取した。残留物に酢酸エチル 25mL を加えて、上記と同様に振とう及び遠心分離を繰り返し、上澄液を合わせた。

SI-SCX ダブルカートリッジに上澄液の全量を負荷し、流出液を 200mL ナス型フラスコに採取した。さらにカートリッジに酢酸エチル 5mL を通過させた。通過液を先の流出液と合わせ、1-ブタノール 1mL を加えて、40℃ 以下でエバポレーターを用い、酢酸エチルを除去した。残留物をメタノールに溶解し、全量 5mL にしたものを OPP・DP 用試験溶液とした。

ダブルカートリッジを外し、下部の SCX カートリッジをメタノール 5mL と水 10mL で洗浄後、1.5%塩化ナトリウム含有移動相を流し、溶出液 5mL を TBZ と IMZ 用試験溶液とした。

6. 妥当性評価

妥当性を評価するために、以下の 3 項目について試験を行った。

6.1 選択性

防かび剤を含有しないブランク試料を用いて、HPLC 測定に妨害がないことを確認した。

6.2 真度 (回収率)

オレンジ、グレープフルーツ及びレモンに、OPP, DP, TBZ 及び IMZ を 1 μ g/g 及び 5 μ g/g の試料濃度になるように混合標準溶液を添加し、本法による回収率を求めた。

6.3 精度

試料としてオレンジを用い、OPP, DP, TBZ 及び IMZ を 1 μ g/g 及び 5 μ g/g の試料濃度で添加し、分析者 1 名が 1 日に 2 試行、5 日間の枝分かれ実験を実施した。得られた分析値を一元配置の分散分析により解析し、併行精度及び室内精度を算出した。

III 結果および考察

1. 改良法の概要

厚生労働省による通知法では、酢酸エチルを用いた抽出操作、液-液分配を用いた精製操作が採用されている。また、分析対象は、防かび剤の一斉分析ではなく、3 種 (OPP, DP, TBZ)、または 1 種 (IMZ) を対象とした別の試験法となっている。

本報では、4 種防かび剤の一斉分析及び簡便化 (溶媒量の低減、クリンアップの改良) を試みた。

1.1 抽出溶媒量の低減

酢酸エチルを用いて防かび剤を抽出する場合、TBZ 及

びIMZの抽出には、アルカリ条件下が適している。本法では、川原ら²⁾の方法に準じて水酸化ナトリウムを添加した抽出液を用いた。抽出法として多数の報告²⁻⁸⁾があるが、一般に有機溶媒の必要量が多く、さらに精製や濃縮の所要時間が長いという短所がある。このため本法では、溶媒量の低減化を試み、総量50mLの酢酸エチルを用いた抽出操作とし、通知法の1/2~1/3量とした。なお、通知法では、OPP、DP及びTBZは酢酸エチル100mLを用い、IMZは160mLを用いている。

1.2 クリンアップ

従来から、液-液分配法、または固相抽出法が利用されているが、本法では操作が簡便・迅速な後者を採用した。

カートリッジは、小沢ら⁴⁾と同様にSIとSCXを併用した。なお、4種防かび剤のうち、OPPとDPはカートリッジを通過したが、TBZ及びIMZは塩基性であるため、SCXに吸着した。SCXからの2種防かび剤の溶出には、1.5%塩化ナトリウム含有移動相5mL⁷⁾を用いた。

1.3 HPLCの移動相

小沢らの方法に準じて、アセトニトリル-メタノール-0.025mol/L SDS 溶液（りん酸でpHを2.5に調製）(47:13:40)を用いた。

2. 改良法の妥当性評価

2.1 選択性

防かび剤を含有しないブランク試料をHPLCで測定したところ、蛍光検出器を用いる場合(TBZ、OPP、DP)は、共存成分のピークは殆ど見られず、妨害を受けなかった。一方、UV検出器を用いるIMZの場合も、保持時間5分以内に幾つかのピークが認められたが、15分過ぎのIMZの測定に影響しなかった。以上のように、本法での4種防かび剤の測定では、妨害は認められなかった。

(Fig.1)

2.2 真度及び精度

オレンジ、グレープフルーツ及びレモンにおける4種防かび剤の添加回収実験の結果(真度)をTable 1に示した。2種類の添加濃度レベル(1 μ g/gと5 μ g/g)での測定結果は、OPPは84.1~99.7%、DPは87.2~104.2%、TBZは78.2~103.6%、IMZは78.9~102.3%の範囲であり、良好な値であった。

また、オレンジを用いた枝分かれ実験の結果(精度)をTable 2に示した。OPP、DP、TBZ及びIMZを1 μ g/g添加したときは、併行精度は3.4~5.1%、室内精度は5.7~9.0%であった。一方、5 μ g/gのレベルで添加したときは、併行精度は2.3~3.9%、室内精度は2.5~6.3%であり、両濃度レベルで判定基準(併行精度:10%未満、室内精度:15%未満)を満たしていた。これより、本法

の妥当性が検証され、行政検査に十分適用できることが認められた。

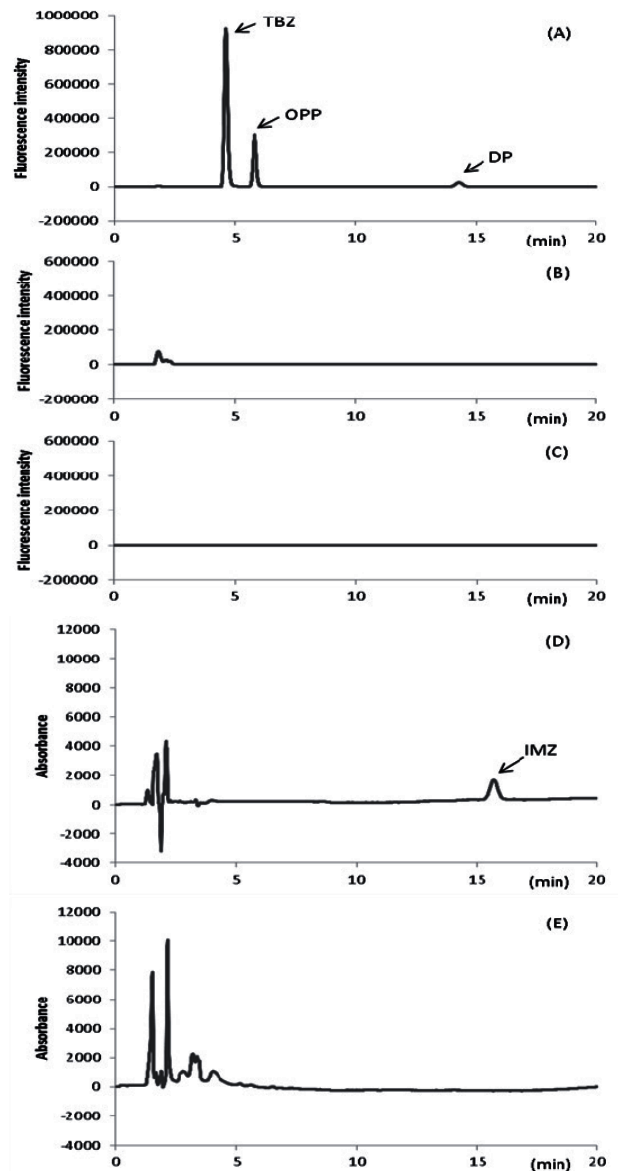


Fig.1 HPLC chromatograms of standard solution and blank solution

(A) OPP, DP and TBZ standard solution (2ppm)
 (B) blank solution of orange for OPP and DP
 (C) blank solution of orange for TBZ
 (D) IMZ standard solution (2ppm)
 (E) blank solution of orange for IMZ
 detector : (A),(B),(C) ; FL (Ex 285nm , Em 325nm) ,
 (D),(E) ; UV (230nm)

Table 1 Recoveries of OPP, DP, TBZ and IMZ from Fruit samples

Fruit	Fortified concentration ^{a)} ($\mu\text{g/g}$)	Recovery (%) ^{b)}			
		OPP	DP	TBZ	IMZ
Orange	1	86.4(8.8)	95.0(8.9)	83.9(3.5)	83.2(0.6)
	5	84.1(2.7)	87.2(3.4)	96.7(1.5)	92.0(1.4)
Grape fruit	1	98.6(6.7)	104.2(6.5)	78.2(3.2)	78.9(1.9)
	5	99.7(0.8)	94.6(0.7)	103.6(0.6)	99.6(0.8)
Lemon	1	97.8(1.0)	102.5(1.6)	97.3(1.2)	102.3(2.5)
	5	95.6(1.3)	97.2(0.8)	95.7(0.4)	97.2(0.6)

a) One ml of mix standard solution (10ppm or 50ppm) was added to 10g sample

b) n=5, ():CV%

Table 2 Validation results of 4 compounds for orange

Compound	fortified concentration ^{a)} ($\mu\text{g/g}$)	Intermediate precision	
		Repeatability ^{b)} (RSD %)	(RSD %)
OPP	1	5.1	5.7
	5	3.3	5.8
DP	1	4.9	6.9
	5	3.9	6.3
TBZ	1	4.8	8.3
	5	2.3	3.2
IMZ	1	3.4	9.0
	5	2.3	2.5
Criteria		<10	<15

a) One ml of mix standard solution (10ppm or 50ppm) was added to 10g sample

b) n=10, (2×5)

IV 結論

柑橘類中の4種防かび剤(OPP, DP, TBZ及びIMZ)の簡便な一斉分析法を開発した。従来法に比べ、1/2量程度の酢酸エチルで防かび剤を抽出し、2種の固相抽出カートリッジにより分離することで、試験溶液の調製ができた。これにより、簡便な一斉分析法が可能となった。

本法の妥当性評価を厚生労働省が示した試験法の妥当性評価ガイドラインに従って実施した結果、基準(選択性、真度および精度)に適合した。

文献

1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知:食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて,平成19年11月15日,食安発第

1115001号

- 川原章弘, 山田真記子, 加藤喜昭, 中村幹雄, 西島基弘, 伊藤誉志男:柑橘類中のジフェニル, オルトフェニルフェノール, チアベンダゾールおよびイマザリルの系統的分析, *Foods and Food Ingredients Journal of Japan*, **163**, 104-110 (1995)
- 中里光男, 只野敬子, 小川仁志, 牛山博文, 川合由華, 小林千種, 立石恭也, 田村行弘:高速液体クロマトグラフィーによる柑橘類中のイマザリル, ジフェニル, チアベンダゾール, オルトフェニルフェノール及びバナナ中のイマザリル, チアベンダゾールの分析, *衛生化学*, **41**, 392-397 (1995)
- 小沢秀樹, 広門雅子, 嶋村保洋, 中島和雄, 木村圭介, 斉藤和夫: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, *東京衛研年報*, **52**, 78-83 (2001)

- 5) 近藤貴英, 渋谷孝博: 固相抽出法を用いた柑橘類・バナナ中の防カビ剤の一斉分析法について, 食品衛生研究, **56**, 59-64 (2006)
- 6) 瀧野昭彦, 小嶋美穂子, 原田浩之, 山中直: 輸入柑橘類中の固相カラム簡易精製法を用いた防かび剤分析法について, 滋賀衛科セ所報, **41**, 58-60 (2006)
- 7) 山本圭吾, 水谷勇一, 勝井早苗, 池田憲廣, 素輪善典: 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 (2006)
- 8) 高井靖智, 久野恵子, 山東英幸: 柑橘類・バナナ中の防かび剤の一斉分析法, 和環衛研年報, **53**, 27-32 (2007)

[平成 25 年 3 月 21 日受理]