

アルミナカラムを前処理に用いたかんきつ類
およびバナナ中のチアベンダゾール、オルト
フェニルフェノール、ジフェニルの定量

Determination of Thiabendazole, o-Phenylphenol and
Diphenyl in Citrus Fruits and Banana using an
Alumina Column for Clean-up

長南 隆夫

Takao Chonan

目 的

我が国の食品衛生法では、かんきつ類にはチアベンダゾール(TBZ)、オルトフェニルフェノール(OPP)、オルトフェニルフェノールナトリウム(OPP-Na)、ジフェニル(DP)が、バナナにはTBZが、保存料として使用を認められている。これらの保存料は、カビの発生防止を目的として用いられるが、その効力はカビの種類によって異なるため、かんきつ類には3種の保存料が併用されることが多い。このため、近年、TBZ、OPP、DPの同時分析法が検討され、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)^{1~3)}、ガスクロマトグラフィー(GC)^{4,5)}による方法が報告されている。このうち、HPLCによる方法^{2,3)}は、GCによる方法^{4,5)}に比べ操作が簡便であるが、試験溶液には夾雑物が多く、さらに検討が必要と考えられる。

今回、著者は、クリーンアップにアルミナカラムクロマトグラフィーを用いる簡便な前処理法を検討し、かんきつ類およびバナナ中のTBZ、OPP、DPをHPLCで定量したので、その結果を報告する。

方 法

1. 試 料

石狩町および札幌市内の食品販売店で入手したレモン4試料、グレープフルーツ2試料、オレンジ2試料、バナナ3試料を用いた。

2. 試 薬

TBZ、OPP、OPP-Na、DPは、東京化成製試薬を標準品として用いた。アルミナは、メルク社製酸性アルミナ

(Art 1078)を用いた。有機溶媒は、試薬1級品を蒸留して用い、その他の試薬は、試薬特級品を用いた。水は、脱イオン水を用いた。

アルミナカラム：アルミナ5gを内径2cmのカラム管に乾式法で充てんする。

3. 試験溶液の調製

ホモゲナイズした試料10gをブレンダーカップに秤取り、無水酢酸ナトリウム2g、無水硫酸ナトリウム20gを加え、充分混和した後、酢酸エチル40mlを加え、ブレンダーで5分間ホモゲナイズして抽出する。抽出液を吸引ろ過し、残渣に酢酸エチル40mlを加え、同様の操作を行ない、抽出液を合わせ、アルミナカラムに負荷する。流出液をナス型フラスコにとり、さらに酢酸エチル30mlをカラムに流し、先の流出液と合わせる。この流出液を、ロータリーエバボレーターを用いて35℃で弱く吸引しながら、約2mlまで濃縮し、メタノールで10mlにメスアップして試験溶液とする。

4. 検量線

かんきつ類中の保存料の定量に用いる標準溶液は、TBZとOPP各10mg、DP70mgをメタノールに溶解して100mlとし、これを、メタノールで10、20、100、200倍に希釈して検量線を作成した。バナナ中のTBZの定量に用いる標準溶液は、TBZ10mgをメタノールに溶解して100mlとし、これを、メタノールで100、200、500、1,000倍に希釈して検量線を作成した。

定量は、ピーク面積を測定する絶対検量線法で行なった。

5. HPLCの条件

機器は、日立655型高速液体クロマトグラフ、日立F-1100

型分光蛍光検出器、島津クロマトパック C-R3A、カラムは Nucleosil 5C₁₈ (4 mm I.D.×250mm) を用いた。

分析の条件は、下記のとおりである。

(1) かんきつ類

移動相：アセトニトリル：0.05%リン酸1カリウム+0.05%リン酸2カリウム水溶液=47:53

流速：0.7ml/min

検出：蛍光検出 励起波長280nm、蛍光波長325nm
Sensitivity 2

カラム温度：40°C

注入量：10μl

(2) バナナ

移動相：メタノール：0.05%リン酸1カリウム+0.05%リン酸2カリウム水溶液=70:30

流速：0.5ml/min

検出：蛍光検出 励起波長305nm、蛍光波長350nm
Sensitivity 5

カラム温度：40°C

注入量：10μl

6. 濃縮条件の検討

100ml 容ナス型フラスコに、TBZ, OPP, DP をそれぞれ 100, 100, 700μg/ml 含むメタノール溶液0.1ml、酢酸エチル60ml を加えて、それぞれ、35, 40, 50°C の水浴中で、ロータリーエバポレーターを用いて弱く吸引しながら、(1)約2ml、(2)乾固直後まで濃縮後、メタノールで10ml にメスアップし、HPLC で残存する TBZ, OPP, DP を定量した。

結果および考察

1. 試験溶液の調製

かんきつ類およびバナナ中の TBZ, OPP, DP の簡便な試験溶液の調製法として、試料に酢酸ナトリウム（または無水リン酸2ナトリウム）、無水硫酸ナトリウムを加え、保存料を酢酸エチルで抽出し、これを濃縮して試験溶液とする方法が報告されている^{2,3)}。しかし、これらの方法による試験溶液には夾雑物が多く、中には、不溶物が多いため正確にメスアップできない試料もある。そこで、著者は、これらの方に従って抽出を行ない、その抽出液をアルミニカラムクロマトグラフィーでクリーンアップする方法を試みた。

その結果、酸性アルミニを用い、溶離液として酢酸エチルを用いると大部分の夾雑物を除去できることがわかった。この方法によるかんきつ類試験溶液のクロマトグラムは、Fig. 1に示すとおりで、この条件で試料由来の妨害ピークは認められなかった。なお、このとき、中性、塩基性アルミニカラムを用いると、TBZ 付近の妨害ピークを除去で

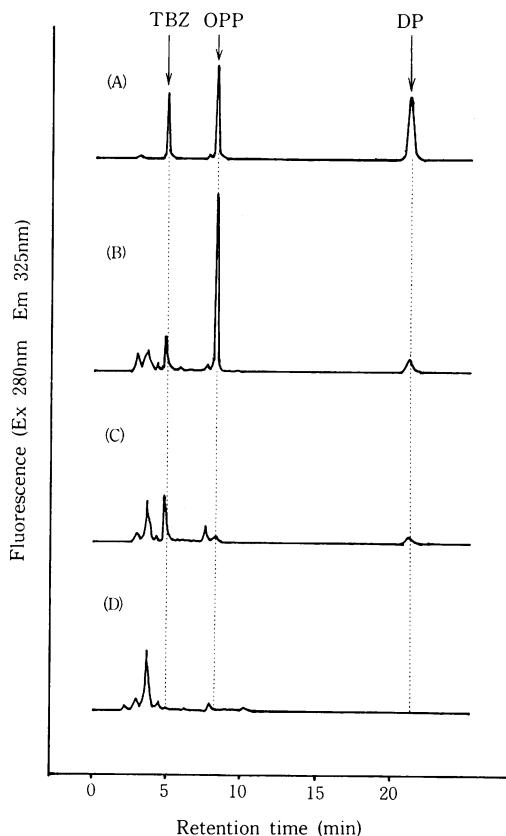


Fig. 1 High Performance Liquid Chromatograms of Thiabendazole (TBZ), O-Phenylphenol (OPP) and Diphenyl (DP)

(A) standard solution

(B) extract of lemon

(C) extract of grapefruit

(D) extract of orange

column: Nucleosil 5C₁₈ (4mm I.D. × 250mm)

mobile phase: CH₃CN-0.05% KH₂PO₄+0.05% K₂HPO₄ (47+53)

きなかった。

酸性アルミニカラムでクリーンアップした抽出液は、濃縮後、分析に供するが、3種の保存料のうち DP は揮発性が高いため、濃縮時の条件によっては定量値が低くなることが考えられる。そこで、濃縮時の水浴の温度条件について検討した。結果は、Table 1に示すとおりである。

溶媒を約 2 ml まで濃縮したときの DP の損失率は低く、いずれも 3.5% 以下であった。一方乾固直後まで濃縮したときは、水温 35, 40, 50°C における損失率が、それぞれ 3.6, 12.0, 20.0% となり、水温が高いほど損失率は増大す

Table 1 Effect of Temperature on Losses of TBZ, OPP and DP during Concentration Process

Temperature of water bath (°C)	Losses (%) ^{a)}					
	concentrated to 2 ml			concentrated to dryness		
	TBZ	OPP	DP	TBZ	OPP	DP
35	0	1.1	1.7	0	0.2	3.6
40	0	0.9	1.4	0	0	12.0
50	0.3	0.2	3.5	0.4	0.2	20.0

a): averages of 2 experiments

る傾向が認められた。なお、TBZ, OPP は、50°Cの水浴中で乾固しても損失は認められなかった。この結果から、アルミニナカラムでクリーンアップした抽出液は、安全性を考慮して35°Cの水浴中で約2 mlまで濃縮することとした。

2. HPLC 条件の検討

TBZ, OPP, DP を分離定量するための HPLC の条件として、はじめに逆相系のカラムにアルカリ性の移動相を用いる方法が検討された^{1,2)}。しかし、アルカリ性の移動相は、カラムの寿命を縮める問題点があるため、その後、ペアードイオン法を用いる酸性の移動相が報告されている³⁾。今回、著者は、逆相系の Nucleosil 5C₁₈ カラムを用いて、カラムの安定および洗浄に要する時間がペアードイオン法より短かく、かつ調製の容易な弱酸性～中性の移動相を検討した。なお、TBZ, OPP, DP の検出は、蛍光検出器（励起波長280nm、蛍光波長325nm）を用いて行なった。TBZ, OPP, DP は、Fig. 1 に示すとおり移動相にアセトニトリル：0.05% リン酸1カリウム+0.05% リン酸2カリウム水溶液=47:53を用いることにより良好な分離を示した。なお、TBZ のピークは、北田らが報告²⁾しているように、試験溶液中に酢酸エチルが残留するとテーリングが認められたため、TBZ, OPP, DP の定量は、ピーク面積を測定する方法で行なうこととした。

このとき、TBZ, OPP, DP の検量線は、それぞれ、5~100, 5~100, 35~700ng の間で原点を通る直線となり、検出限界は、TBZ と OPP が0.5ng, DP が7 ng であった。

本法では、かんきつ類の TBZ, OPP, DP 残留基準値(それぞれ、0.01, 0.01, 0.07g/kg) の1/200 (TBZ, OPP), 1/100(DP)まで検出でき、実用上充分な検出感度を有する。しかしバナナおよびバナナ果肉の TBZ 残留基準値は、それぞれ0.003, 0.0004g/kg とかんきつ類のそれに比べ低いため、バナナ中の TBZ の定量には、さらに高感度な方法が必要である。そこで、TBZ の検出感度を向上させるため、励起波長、蛍光波長を、それぞれ、305, 350nm とし、移動相にメタノール：0.05% リン酸1カリウム+0.05% リン酸

2カリウム水溶液=70:30を用いて検討した。TBZ 標準溶液およびバナナ試験溶液のクロマトグラムは Fig. 2 に示す

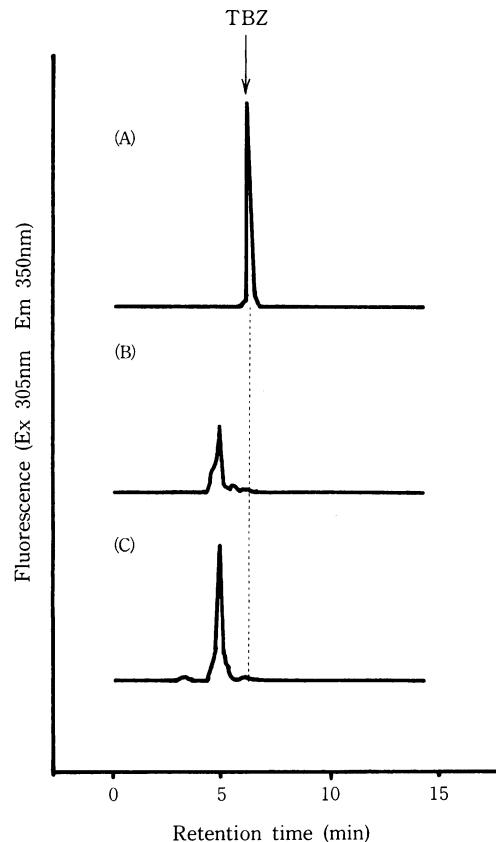


Fig. 2 High Performance Liquid Chromatograms of TBZ

(A) standard solution
(B) extract of banana (whole)
(C) extract of banana (edible portion)
column : Nucleosil 5C₁₈ (4mm I. D. x 250mm)
mobile phase : CH₃OH -0.05% KH₂PO₄ +0.05% K₂HPO₄ (70+30)

とおりであり、TBZの検量線は1~10ngの間で原点を通る直線となった。このとき、バナナの試験溶液には、TBZとほぼ同じリテンションタイムにきわめて小さい妨害ピーク(TBZ0.03ngのピーク面積にはほぼ相当)が認められたため、TBZとこのピークを分離する目的で種々の移動相を検討したが、両者の分離は困難であった。そこで定量に際しては、バナナおよびバナナ果肉のTBZ残留基準値のそれぞれ1/300、1/40に相当する0.1ngがTBZの検出限界値となるよう検出感度を調整することとした。

3. 添加回収率および再現性の検討

レモン、グレープフルーツ、オレンジに、TBZ、OPP、OPP-Na、DPを、それぞれ50、50、50、350μg、バナナ、バナナ果肉にTBZをそれぞれ15、2 μg添加して本法による回収率を求めた。結果は、Table 2に示すとおりである。

TBZ、OPP、OPP-Na、DPとも、いずれも90.8%以上の高い回収率が得られた。

つづいて、再現性を検討するため同一試料(レモン)を

用いて、本法によりこれら保存料の定量を3回行なったところ、TBZ、OPP、DPの定量値の変動係数は、それぞれ2.1、1.9、2.0%となり、再現性も良好であった。

以上の結果から、クリーンアップに酸性アルミニカラムクロマトグラフィーを用いる本法は、かんきつ類およびバナナ中のTBZ、OPP、DPを迅速に精度よく定量できることが判明した。

4. 市販かんきつ類およびバナナ中のTBZ、OPP、DPの含量

本法を用いて市販レモン、グレープフルーツ、オレンジ、バナナ中のTBZ、OPP、DPを定量した結果は、Table 3に示すとおりである。

レモンおよびグレープフルーツからTBZ、OPP、DPが検出されたが、いずれも基準値以下であった。一方、オレンジおよびバナナから、保存料は検出されなかった。なお、レモンNo.3は、「TBZ、OPP不使用、DPのみ使用」と表示されていたが、DPとともにTBZ、OPPも検出され、とく

Table 2 Recoveries of TBZ, OPP, OPP-Na and DP Added to Citrus Fruits and Banana

	Recoveries (%) ^{a)}			
	TBZ	OPP	OPP-Na	DP
Lemon	95.5±1.7	96.8±0.9	96.2±1.0	91.9±2.6
Grapefruit	92.8±1.3	94.8±1.0	96.7±0.5	90.8±0.9
Orange	94.1±1.1	98.3±1.6	96.1±0.9	95.2±2.0
Banana (whole)	91.6±1.2			
Banana (edible portion)	95.2±2.3			

a): averages±standard deviations of 3 experiments

Table 3 Analytical Results of TBZ, OPP and DP in Citrus Fruits and Banana

	Contents (mg/kg)		
	TBZ	OPP	DP
Lemon	No.1	0.9	0.9
	2	0.2	2.7
	3	0.8	2.9
	4	0.3	2.4
Grapefruit	No.1	0.7	0.1
	2	0.9	0.1
Orange	No.1	N. D.	N. D.
	2	N. D.	N. D.
Banana (whole)	No.1	N. D.	
	2	N. D.	
Banana (edible portion)		N. D.	

N. D.: not detected

にOPP含量はDP含量よりも高かった。今後、このような表示違反の根絶が望まれる。

要 約

- クリーンアップに酸性アルミナカラムクロマトグラフィーを用い、高速液体クロマトグラフィーでかんきつ類およびバナナ中のチアベントゾール(TBZ)、オルトフェニルフェノール(OPP)、ジフェニル(DP)を迅速に定量する方法を検討した。
- 本法を用いて市販かんきつ類およびバナナ中のTBZ、OPP、DPを定量したところ、レモン、グレープフルーツの全試料からTBZ、OPP、DPが検出された。
- 本法は前処理操作が簡便で、90%以上の回収率が得られ、検出限界は0.1~7 ngであることから実用的な定量法と考えられる。

文 献

- 1) 山口 敏幸他：札幌市衛研年報，8，73（1980）
- 2) 北田 善三他：食衛誌，23，21（1982）
- 3) 中里 光男他：日本食品衛生学会第49回学術講演会講演要旨集，59（1985）
- 4) 一色 賢司他：農化，54，1045（1980）
- 5) 八木 正博他：日本食品衛生学会第54回学術講演会講演要旨集，15（1987）

英 文 要 約

A high performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of thiabendazole (TBZ), o-phenylphenol (OPP) and diphenyl (DP) in citrus fruits and banana was developed. TBZ, OPP and DP were extracted with ethyl acetate from homogenized samples added anhydrous sodium acetate and anhydrous sodium sulfate. The extracts were cleaned up by an alumina column chromatography using ethyl acetate as an eluent. TBZ, OPP and DP were separated on a column packed with Nucleosil 5 C₁₈ by using acetonitrile/0.05% KH₂PO₄-0.05% K₂HPO₄ (47: 53) or methanol/0.05% KH₂PO₄-0.05% K₂HPO₄ (70: 30) as a mobile phase. TBZ, OPP and DP were detected spectrofluorometrically at an excitation wavelength of 280 or 305 nm, with emission at 325 or 350 nm. The detection limits of TBZ, OPP and DP in citrus fruits were 0.05, 0.05 and 0.7mg/kg, respectively. The recoveries of TBZ, OPP, OPP-Na and DP from citrus fruits spiked at levels of 5, 5, 5 and 35mg/kg were more

than 90.8%. The detection limit of TBZ in banana was 0.01 mg/kg. The recoveries of TBZ from banana spiked at levels of 1.5 mg/kg were more than 91.6%.

TBZ, OPP and DP were detected in all of the lemons and grapefruits at the levels of 0.2~0.9, 0.1~2.9 and 0.8~30.4 mg/kg, respectively.

Key Words : thiabendazole, o-phenylphenol, diphenyl, alumina column chromatography, citrus fruits, banana, high performance liquid chromatography