

防かび剤一斉分析法の検討

越智洋 野中勇志¹⁾ 安部留美子 山本雄三

Development of a simultaneous analysis method of fungicide

Hiroshi OCHI , Yuji NONAKA, Rumiko ABE, Yuzo YAMAMOTO

要旨

食品添加物の4種防かび剤の試験について、一斉試験法の検討を行った。抽出行程で時間を要するホモジナイズ行程をセラミックホモジナイザーを用いたキャッチャーズ法を採用することで、大幅な時間の短縮を図ることが出来た。精製工程においては、シリカゲルとフロリジルの固相カラムを直列に繋ぐことで、目的化合物付近に妨害ピークが確認されず、蛍光検出器とUV検出器を直列に繋ぎHPLCで同時に分析できることが可能となった。試験法の妥当性確認の結果から現行法と比較して回収率の大幅な改善がみられ、行政検査に十分対応できる方法であると考えられた。また、分析時間も1/3～1/4に短縮され、質量分析を使用せず、HPLCで分析可能な簡便で迅速な一斉試験法を確立することができた。

キーワード：防かび剤，キャッチャーズ，HPLC

はじめに

食品添加物の防かび剤の試験を行う場合、当研究所は4種類の防かび剤チアベンダゾール(TBZ)、オルトフェニルフェノール(OPP)、ジフェニル(DP)、イマザリル(IMZ)について公定法に準拠した標準作業書に基づいて行っている。しかしながら、本試験方法は4種類の防かび剤の使用基準の幅(0.0004g/kgから0.070g/kg)が広く、またそれぞれの化学的性質も大きく異なっているため、2種類の方法で抽出を行うことになっている¹⁾。さらに、液-液分配法が採用されているので、操作が非常に煩雑である上、2種類の測定装置を使用しなければならない。このため、多くの検査機関では、簡便で効率よく一斉分析できる試験方法が求められている。今回、4種類の防かび剤の一斉分析方法について検討を行い、良好な結果が得られたので報告する。

方法

1 抽出方法

試料5gを50mL PP製遠沈管に量り、5mol/L水酸化ナトリウム水溶液1mL、酢酸エチル15mL及び無水硫酸ナトリウム5gを加えた。さらに、セラミックホモジナイザー2個を加え、試料が均一になるように軽く手で振盪し、2000rpmで3分間遠心分離し、上澄液を分取した。残留物に5mol/L水酸化ナトリウム水溶液1mL及び酢酸エチル10mLを加えて、同様の操作を行い、上澄み液を分取し、残留物をろ紙上に広げ、少量の酢酸エチルを加え吸引ろ過し上澄液と合わせ、酢酸エチルで30mlに定容した。予め酢酸エチル10mLでコンディショニングしたSI-FL連結カートリッジ(SI:シリカゲル, FL:フロリジル)²⁾に負荷し、流出液を50mLナス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、流出液と合わせた。

衛生化学部 1)現 日南保健所

流出液に1-ブタノール1mLを加えて、40°C以下でエバポレーターを用い、酢酸エチルを除去した³⁾。残留物をメタノールに溶解し、全量を5mLとしたものを試験溶液とした。

2 分析条件及び装置

HPLC LC-20A (島津製作所製)

カラム : Mightysil RP-18 GP 150-4.6 (5 μ m)

カラム温度 : 40°C

移動相 : アセトニトリル-メタノール-水混液 (45:15:40) に 10mmol/L になるようドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を加えた後リン酸で pH を 2.5 とする。

流速 : 1.0 mL/min

検出器 : 蛍光検出器と紫外吸収検出器を直列に接続した。

検出波長 : ①OPP, DP 及び TBZ ; 蛍光検出器 (励起波長 EX285nm/蛍光波長 Em325nm)

②IMZ ; 紫外吸収検出器(230nm)

注入量 : 10 μ L

3 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価

妥当性を評価するために、平成19年11月15日付け食安発第1115001号「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」⁴⁾に従って以下の項目について試験を行った。

1) 選択性

防かび剤を検出しないブランク試料で試験を行い、HPLC測定に妨害ピークがないことを確認した。

2) 真度 (回収率)

基準値になるように調製した4種類の防かび剤の混合標準液をグレープフルーツに添加し、本法による回収率を求めた。基準値はそれぞれ、TBZ, OPPが10 μ g/g, DPが70 μ g/g, IMZが5 μ g/gである。

3) 精度

分析者1名が1日に2試行、5日間の枝分かかれ試験を実施した。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求めた。

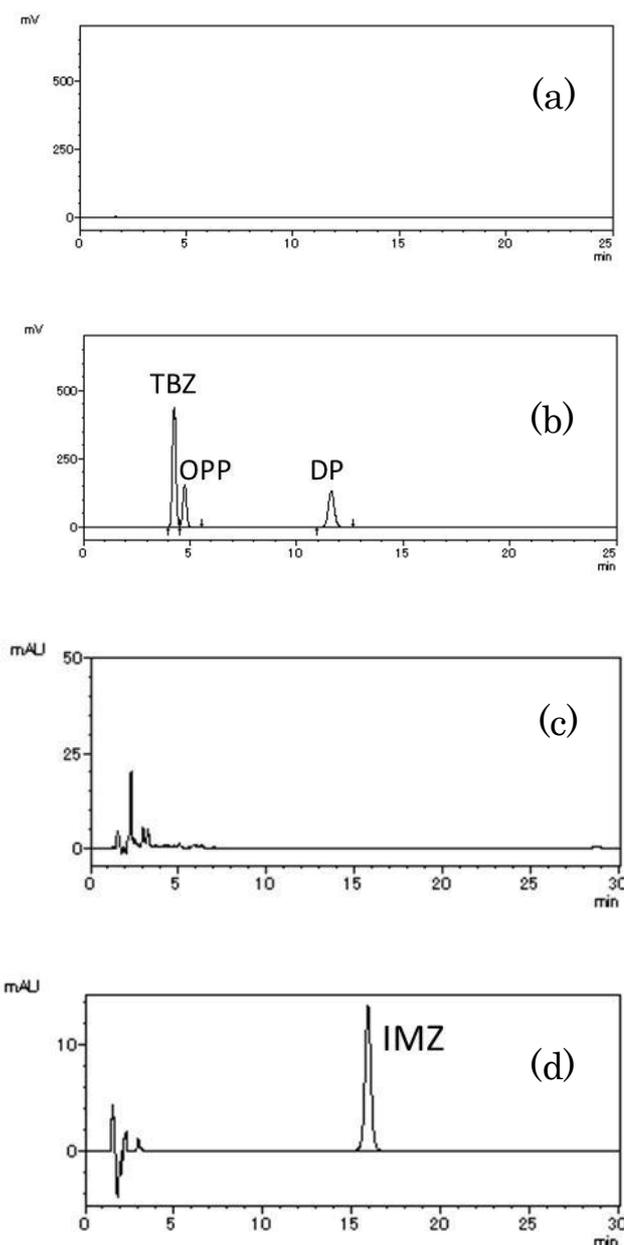


Fig.1 HPLC chromatograms of blank solution and standard solution

(a) blank solution for TBZ, OPP, DP

(FL, Ex:285nm, Em:325nm)

(b) TBZ, OPP and DP standard solution

(FL, Ex:285nm, Em:325nm)

(c) blank solution for IMZ (UV, 230nm)

(d) IMZ standard solution (UV, 230nm)

Table1 Examination results of four kinds of fungicides for grapefruits

Fungicide	Addition concentration($\mu\text{g/g}$)	Recovery (%)	Repeatability (RSD%)	Intermediate precision (RSD%)
TBZ	50	100.9	2.3	2.3
OPP	50	100.8	2.0	2.0
DP	350	82.6	3.5	8.9
IMZ	25	96.5	3.3	4.7

結果及び考察

1) 選択性

防かび剤を検出しないブランク試料をHPLCで測定した。TBZ,OPP,DPは蛍光検出器で測定し、妨害ピークは確認されなかった。また、UV検出器ではいくつかピークが確認されたが、IMZのピークに影響するものは確認されなかった。

2) 真度及び精度

試料中に基準値の濃度になるように添加した際の回収率 (n=10) は、TBZは98.0~106.0%、OPPは97.9~105.1%、DPは73.6~95.5%、IMZは91.4~103.4%の範囲であり、良好な結果が得られた。また、併行精度は2.0~3.5%、室内精度は2.0~8.9%であり、それぞれガイドラインの目標値である10%未満と15%未満を満たしていた。回収率のばらつきには、減圧濃縮する際の濃縮率と関係しており、過度の濃縮を行うとDPの回収率が下がり、濃縮が不十分だとTBZのピークが割れて定量ができなかった。濃縮液の量としては、1ml~1.5ml程度にした時にDPの回収率が高く、TBZのシングルピークが確認された。

まとめ

本試験方法では、抽出操作において試料をホモジナイズで細かく粉砕する工程に、残留農薬試験

等でも使用されるキャッチャーズ法を採用したことでホモジナイズに要する時間を1/3以下に短縮できた。また、分析装置は、質量分析を使用せず、HPLCで分析可能で、これまで2台使用していたものが1台で分析可能となり分析時間を1/2以下に短縮することができた。更に試験法の妥当性確認の結果から防かび剤試験においても有効であることが確認され、行政検査に十分対応できる方法であり、簡便で迅速な一斉試験方法を確立することができた。

文 献

- 1) 食品衛生検査指針（食品添加物編）117-126(2003)
- 2) 近藤貴英，渋谷孝博：固相抽出法を用いた柑橘類・バナナ中の防かび剤の一斉分析法について，食品衛生研究，56，No9，59-64（2006）
- 3) 竹中麻希子，吉岡直樹，三橋隆夫：柑橘類中4種防かび剤についても簡便な一斉分析法の開発とその妥当性評価，兵庫県立健康科学研究所健康科学研究センター研究報告，4，35-39，（2013）
- 4) 厚生労働省医薬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日付け食安発第1115001号