

高速液体クロマトグラフィーによる柑橘類中の残存チアベンダゾールの定量

著者	山田 哲也, 青木 晴美, 赤木 盛郎, 大川 博徳
雑誌名	三重大學農學部學術報告 = The bulletin of the Faculty of Agriculture, Mie University
巻	66
ページ	205-212
発行年	1983-03-01
その他のタイトル	Determination of Thiabendazole Residue in Citrus Fruits by High Performance Liquid Chromatography
URL	http://hdl.handle.net/10076/3413

高速液体クロマトグラフィーによる柑橘類中の残存 チアベンダゾールの定量

山田哲也・青木晴美*・赤木盛郎・大川博徳**

Determination of Thiabendazole Residue in Citrus Fruits by High Performance Liquid Chromatography

Tetsuya YAMADA, Harumi AOKI, Morio AKAKI and Hironori OHKAWA

I 緒 言

チアベンダゾール (Thiabendazole, 以下, TBZ と略す) は, 柑橘類の保存料として許可されているが, その残存量は 0.01 g/kg 以下と定められている¹⁾。

TBZ は, 柑橘類に発生する緑かび病, 軸くされ病の予防に使用され, 通常, ワックスと混合し, 収穫後の果実にスプレーするか, あるいは果実をその溶液に浸漬する方法がとられている¹⁾。

柑橘類には TBZ の他に, Diphenyl (DP) と Ortho-Phenyl Phenol (OPP) が保存料として許可されており, この3者を同時に分析することが望ましいが, TBZ と DP 及び OPP とはその化学的性質が異なり, したがって, 同一操作での分析が必ずしも好ましい結果をもたらさないと考えられる。

TBZ の分析については, 先ず, ガスクロマトグラフィーによる方法が開発されたが, 近年, 高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography, 以下, HPLC と略す) による方法も数多く報告されている²⁻⁷⁾。HPLC 法のうち, UV 検出器を用いた場合, その検出感度は蛍光法に劣るとされていたが, 今回, 高価な蛍光検出器の代りに一般的な UV 検出器を用いる TBZ の定量分析法を検討した。また, 試料からの抽出方法を改良した結果, TBZ の良好な回収率が得られたので報告する。

また, TBZ の残存量については, 今迄の報告のどれ

もが一時期の残存量であり, 季節間の変動については報告例が見当たらないので, これらの結果も併せて報告する。

II 実験方法

1. 試 料

津市内の青果小売店及びスーパーマーケットで販売されている, レモン, オレンジ, グレープフルーツを試料とした。季節ごとの TBZ の変動をみるために, 昭和56年11月を皮切りに, 冬 (57年2月), 春 (5月), 夏 (8月), ただし, レモンについては6, 7, 8月), 秋 (9月) に可能な限り産地別に購入し, -30°C で冷凍保存し, 57年8月から9月にかけて分析した。

なお, 対照として, レモンについては児玉農園 (和歌山県那賀郡粉川町) のものを, オレンジ, グレープフルーツについては三重県農業技術センター紀南柑橘センター (三重県南牟婁郡御浜町志原) のものを使用した。

2. 試 薬

TBZ: 試薬特級 (東京化成 (株))

無水リン酸二ナトリウム: 試薬特級 (和光純薬工業 (株))

無水硫酸ナトリウム, 酢酸エチル, メタノール: 試薬特級 (半井化学薬品工業 (株))

3. 装 置

ミキサー: 東芝, JC-5300W

ホモジナイザー: 日本精機 (株)

高速液体クロマトグラフ: TRI-ROTAR (日本分光工業 (株))

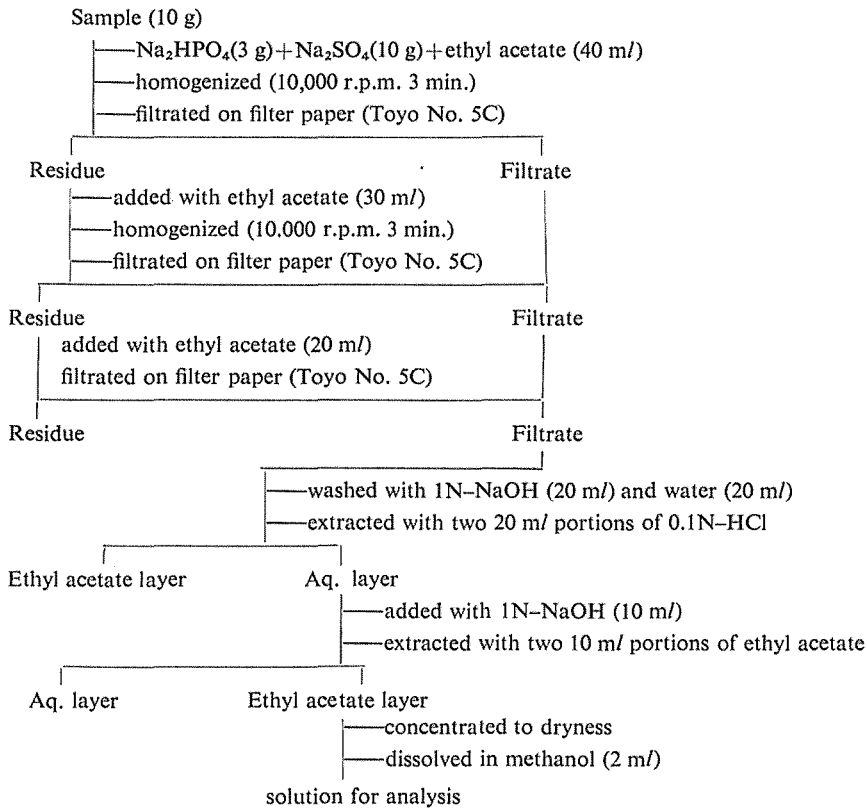
昭和57年3月10日 受理

三重大学農学部

* 三重短期大学家政科

** 三重大学教育学部

Scheme 1. Procedure for the separation of TBZ in citrus fruits.



検出器：UVIDEC-100（日本分光工業（株））

4. 試験溶液の調製

細切した試料をミキサーを用いて均一化し、北田らの方法⁶⁾と三原らの方法²⁾を併用、一部改良してTBZの抽出を行なった。

すなわち、Scheme 1 に図示したように、200 ml 容のステンレス製ブレンダーカップに均一化した試料 10 g をとり、無水リン酸二ナトリウム 3 g を加えて攪拌し、さらに無水硫酸ナトリウム 10 g を加えて攪拌した後、酢酸エチル 40 ml を加えて 10,000 r. p. m. 3 分間ホモジナイズした。スラリーを東洋濾紙 No. 5C で吸引濾過した後、残渣に酢酸エチル 30 ml を加え攪拌抽出し、再びスラリーを吸引濾過し、さらに酢酸エチル 20 ml でブレンダーカップを洗浄し、洗液を先の抽出液と合わせた。

酢酸エチル抽出液に 1 N 水酸化ナトリウム 20 ml を加えて振盪し、分液ロートに移して水酸化ナトリウム液層を除去し、次に水 20 ml で残留するアルカリ分を洗浄除

去した後、0.1 N 塩酸 20 ml で 2 回抽出する。塩酸抽出液に 1 N 水酸化ナトリウム液 10 ml を加えてアルカリ性とした後、酢酸エチル 10 ml で 2 回抽出する。ついで、抽出液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮し、蒸発乾固させ、メタノール 2 ml に溶解させて試験溶液とした。

5. HPLC による定量

試験溶液を Table 1 の条件で分析し、ピーク面積法によりあらかじめ作成した検量線より TBZ 量を求めた。

$$\begin{aligned}
 E(\text{ppm}) &= \frac{D}{1000} \times \frac{1000}{C} \times B \times \frac{1}{A} \\
 &= \frac{D}{C} \times \frac{B}{A} \\
 &= \frac{D}{5} \times \frac{2}{10} \\
 &= D \times \frac{1}{25}
 \end{aligned}
 \left(\begin{array}{l} \text{A: 試料 10 g} \\ \text{B: 注入する前の液量 2 ml} \\ \text{C: 注入量 5 } \mu\text{l} \\ \text{D: 検量線から求めた} \\ \text{成分量 mg} \end{array} \right)$$

Table 1. Determination Conditions for TBZ by HPLC.

Column	Unisil C-18 10 μ m 4.6 mm ID \times 300 mm
Eluent	methanol: 0.16 M KH_2PO_4 water (50: 50 v/v%)
Flow rate	1.0 ml/min
Pressure	60 kg/cm ²
Detector	UV(298 nm)
Chart speed	5 mm/min
Sample size	5 μ l
Range	0.01 AUF

6. 検量線の作成

Fig. 1 に示すように、TBZ をそれぞれ 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有するメタノール溶液をクロマトグラフに注入し、上記条件で TBZ のピーク面積を測定し、最小二乗法により検量線 $Y=aX+b$ を求めた。

X: 上記条件でのピーク面積 (cm^2)

Y: 試料中の TBZ 濃度 (ppm)

$$Y=1.85X-0.2$$

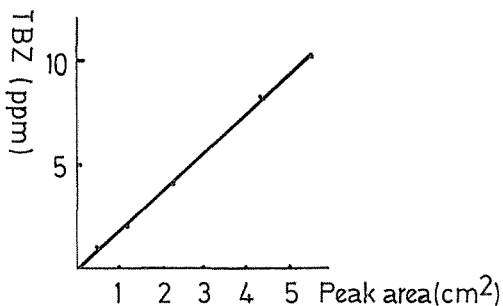


Fig. 1. Calibration curve of TBZ.

* The peak area of TBZ is measured under the condition shown in Table 1.

III 実験結果及び考察

1. 試料からの抽出方法について

試料からの抽出方法は、北田ら⁶⁾の方法と三原ら²⁾の方法を併用し、一部改良を加えた。

つまり、均一化した試料 10g に無水リン酸二ナトリウム 3g を加えて攪拌し、さらに、無水硫酸ナトリウム 10g を加えて攪拌後、酢酸エチル 40ml と 30ml で 2 回抽出し、スラリーを吸引濾過することでより良好な回収率が得られた。この方法では、酢酸エチル添加量 90 ml に対し回収量が 80~85 ml と 90% 以上であるのに対

し、三原ら²⁾の酢酸ナトリウム緩衝液を用いて抽出し、遠心分離する方法では、酢酸エチル添加量 90ml に対し回収量は 65~70ml と少なく、TBZ 回収率が低い原因であることがわかった。

上記酢酸エチル抽出液を濃縮し、フィルターで濾過した後 HPLC に注入したが、UV 検出器を用いた場合、北田ら⁶⁾の蛍光検出器による報告とは異なり、妨害物質が多いためピークの分離が悪く TBZ の定量は不可能であった。

そこで、転溶による妨害物質の除去を目的として Scheme 1 に示す操作を行なった。つまり、酢酸エチル抽出液に 0.1N 塩酸溶液を加えて攪拌して再抽出し、この水溶液に 1N 水酸化ナトリウムを加えてアルカリ性にし、再び酢酸エチル抽出を行ない、これを減圧濃縮し蒸発乾固させて一定量のメタノールに溶解させて試験溶液とした。

転溶操作を行なうことにより、レモン、オレンジでは妨害物質はほぼ消失し定量が可能となったが、グレープフルーツでは果皮、果肉共に TBZ と重なる成分ピークが存在し、定量性にいくらか問題が残っている。

なお、HPLC による測定値の変動を知るために、10 ppm TBZ 標準溶液を用いて繰返し 7 回測定した場合の変動係数は 1.2% であった。

レモン、オレンジ、グレープフルーツについて、輸入品の酢酸エチル抽出液及びこれを転溶によりクレンジアップしたものと対照(クレンジアップしたもの)についてそのクロマトグラムを Fig. 2, 3, 4 に示した。

2. 添加回収実験

1) TBZ をそれぞれ 10 ppm, 5 ppm, 2.5 ppm, 1 ppm の濃度になるように水に添加し、Scheme 1 の方法によりその回収率を求めた結果を Table 2 に示した。10

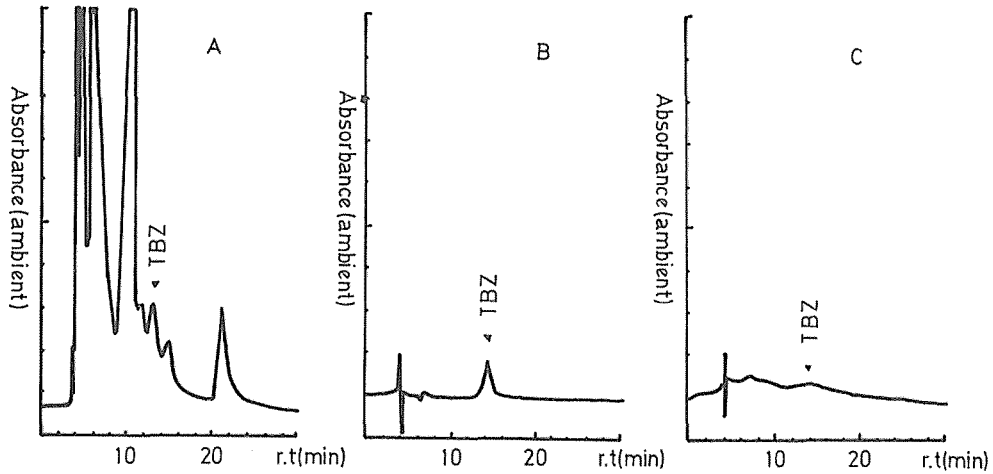


Fig. 2. High performance liquid chromatogram of lemon extract.

A: ethyl acetate extract of lemon (imported)

B: ethyl acetate extract of lemon (imported) after treatment of fractional separation

C: ethyl acetate extract of lemon (domestic) after treatment of fractional separation

* The condition of HPLC is shown in Table 1.

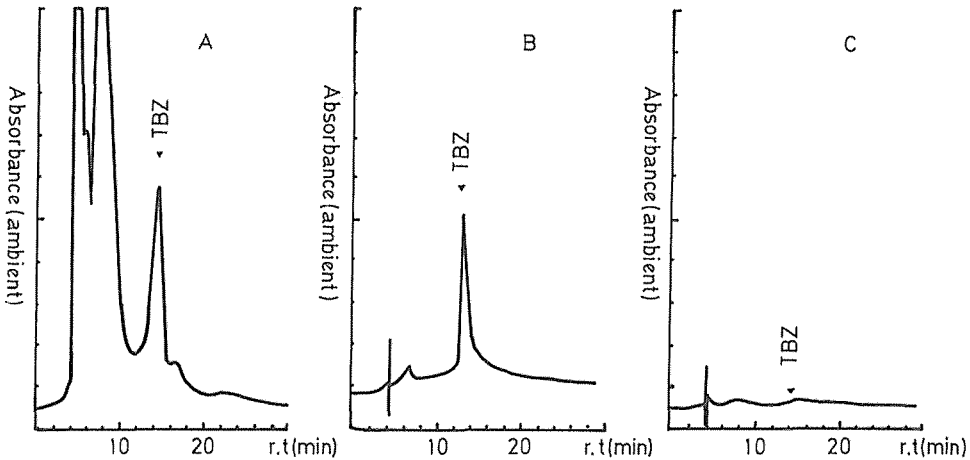


Fig. 3. High performance liquid chromatogram of orange extract.

A: ethyl acetate extract of orange (imported)

B: ethyl acetate extract of orange (imported) after treatment of fractional separation

C: ethyl acetate extract of orange (domestic) after treatment of fractional separation

* The condition of HPLC is same as Fig. 2.

ppm と 5 ppm と 2.5 ppm の場合は約100%と良好な結果を示したが、1 ppm では 109%となりやや誤差が大きくなった。

2) 次に TBZ を使用していない国産のレモン、オレンジ、グレープフルーツに 10 ppm と 1 ppm の濃度になるように TBZ を添加して Scheme 1 の方法によりそ

の回収率を求めた結果を Table 3 に示す。

グレープフルーツに 10 ppm と 1 ppm の濃度になるように TBZ を添加して Scheme 1 の方法によりその回収率を求めた結果を Table 3 に示す。

国産のレモン、オレンジについては TBZ は検出されなかったが、グレープフルーツについては TBZ と重な

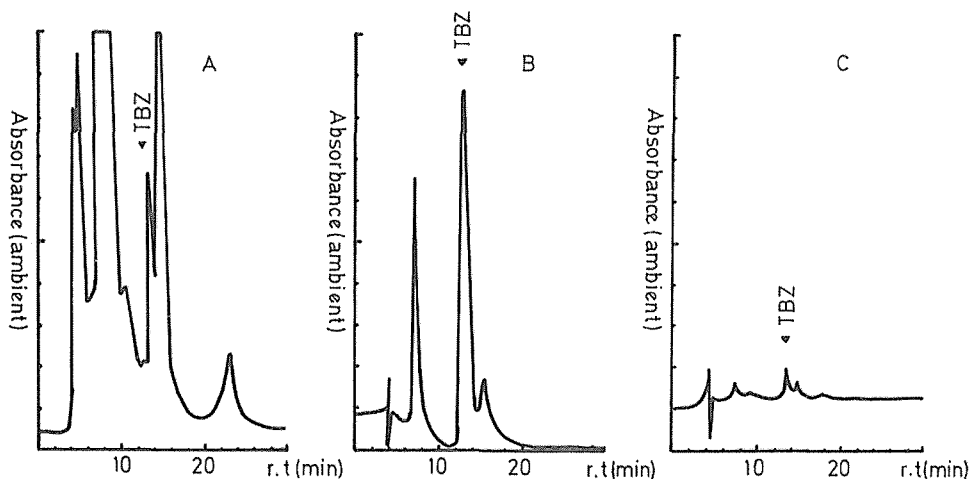


Fig. 4. High performance liquid chromatogram of grape fruit extract.

- A: ethyl acetate extract of grape fruit (imported)
- B: ethyl acetate extract of grape fruit (imported) after treatment of fractional separation
- C: ethyl acetate extract of grape fruit (domestic) after treatment of fractional separation

* The condition of HPLC is same as Fig. 2.

Table 2. Recoveries of TBZ.

Concn. (ppm)	Added (μg)	Found (μg)	Recovery (%)
10	100	99.2	99.2
5	50	51.2	102.0
2.5	25	25.0	100.0
1	10	10.9	109.0

* each TBZ solution was prepared by dilution of 0.1% TBZ methanol solution with distilled water.

Table 3. Recoveries of TBZ added to Citrus Fruits.

Sample	Added (μg)	Found (μg)	Recovery (%)
Lemon	10	9.2	92.0
	100	93.4	93.4
Orange	10	9.3	93.0
	100	101.2	101.2
Grapefruit	10	9.6	96.0
	100	112.7	112.7

* all citrus fruits used were domestic.

** ten grams of the fruit was used for each recovery test.

るピークが存在した。これは、グレープフルーツの果皮の成分として存在するものか、または農薬として使われるベンゾイミダゾール系殺菌剤のようなものが使用されていたためか明らかでない。(一般に我が国に於ても収穫前にベンレート又はトップジン等の TBZ 類縁の農薬が散布されている⁸⁾。)

また試料に 10 ppm TBZ を添加し、繰返し 7 回測定した場合の変動係数は、レモン、1.7%、オレンジ、2.1%、グレープフルーツ、4.3%であった。

なお、検出限界は 0.1 ppm であった。

$$\begin{aligned}
 L_{\text{ppm}} &= \frac{a}{1000} \times \frac{1000}{C} \times \frac{B}{A} \\
 &= \frac{a}{C} \times \frac{B}{A} \\
 &= \frac{2}{5} \times \frac{2}{10} \\
 &\approx 0.1
 \end{aligned}$$

- A: 試料 10 g
- B: 注入する前の液量 2 ml
- C: 注入量 5 μl
- a: 最小検出量 2 mg

3. 市販柑橘中の調査結果

津市内の小売店およびスーパーマーケットで販売され

Table 4. Contents of TBZ in Citrus Fruits (Whole).

Sample No.	Kind	Weight (g)	Place of production	Date of purchase	Store (initial)	TBZ (ppm)
1	Lemon	130	California	81. 11. 20	Y	ND
2		128	"	82. 2. 7	F	ND
3		130	"	5. 12	J	0.8
4		130	"	6. 15	J	ND
5		120	"	7. 13	J	ND
6		135	Florida	7. 13	S	0.2
7		190	California	8. 6	J	0.2
8		110	"	8. 6	K	1.3
9		130	Florida	8. 6	M	1.1
10		125	"	8. 6	S	0.8
11		98	California	9. 13	J	1.0
12		110	Florida	9. 15	Z	ND
13	Orange	210	California	81. 11. 20	Y	0.7
14		215	"	82. 2. 7	F	1.1
15		188	"	5. 12	J	1.3
16		240	"	8. 6	J	1.1
17		200	"	8. 6	K	2.1
18		205	Florida	8. 6	M	2.3
19		218	"	8. 6	S	2.2
20		198	California	9. 13	J	ND
21		177	Florida	9. 15	Z	6.3
22		Grapefruit	300	California	81. 11. 20	Y
23	430		"	82. 2. 7	F	ND
24	398		"	5. 12	J	ND
25	480		"	8. 6	J	3.3
26	378		"	8. 6	K	8.5
27	340		Florida	8. 6	M	4.5
28	400		"	8. 6	S	4.4
29	350		California	9. 13	J	ND
30	240		Florida	9. 15	Z	ND

ND: not detected

ているレモン、オレンジ、グレープフルーツについてTBZの残存量を調べた結果はTable 4のとおりである。いずれも最高許容濃度の10 ppmを下回っているが、レモン残存量がほとんど1 ppm以下と予想に反して少なく、オレンジ、グレープフルーツの方が比較的多く含まれていた。これは、オレンジやグレープフルーツの方が糖度が高いために腐敗しやすいことを考えるとむしろ当然といえるかもしれない。

季節ごとの変動をみると、防腐上当然のことながら冬期より夏期の方が残存量が多い。特にNo. 21のフロリ

ダ産オレンジが6.3 ppm、No. 26のカリフォルニア産グレープフルーツが8.5 ppmと非常に高い残存量を示した。しかもこのフロリダ産オレンジについては、外観的にみても輸入後相当日数が経過しているように見受けられたが、それでもなお高い数値を示したということは、店頭での露光による分解を考慮すると輸入直後にはかなりの残存量であったと推測される。

次に、これらの試料の一部について果皮と果肉に分け、それぞれ別にTBZ残存量を分析した結果をTable 5に示した。果肉と果皮の分析の結果と全体との分析結果が

Table 5. Contents of TBZ in Citrus Fruits.

Sample No.	Fruits	Part of portion	Weight (g)	TBZ (ppm)
6	Lemon	whole	135	0.2
		peel	80	0.2
		pulp	55	ND
8	Lemon	whole	190	1.3
		peel	90	2.3
		pulp	100	0.9
17	Orange	whole	200	2.1
		peel	70	2.8
		pulp	130	0.9
19	Orange	whole	218	2.2
		peel	56	3.5
		pulp	162	0.7
25	Grapefruit	whole	480	3.3
		peel	170	5.7
		pulp	310	1.1
28	Grapefruit	whole	400	4.5
		peel	110	6.5
		pulp	290	2.0

必ずしも一致しないのは、サンプリングの均一性に問題があると考えられる。果肉より果皮の残存量が多いことはもちろんであるが、オレンジやグレープフルーツなどはもちろんであるが、オレンジやグレープフルーツなど果肉を食する果物においても、この分析結果から果肉にも少なからず TBZ が残存することが明らかにされた。

果皮については、オレンジピールなどのように砂糖漬にして菓子などに使用したり、マーマレードを作る場合 TBZ の残存量が問題であり、十分な洗浄による除去が必要であると考えられる。レモンについては、果肉のみならず紅茶などには果皮も共に使用するだけにより残存量が問題視される。

効果的洗浄法の開発にはその残存量の定量法が先ず確立されなければならないが、本法はこの目的に充分応えるものであると期待される。

IV 要 約

HPLC 法による柑橘類中の TBZ の分析方法について検討した。

抽出法については、試料に無水リン酸二ナトリウムと無水硫酸ナトリウムを加えて酢酸エチルで抽出し、さらに 0.1N 塩酸で転溶、アルカリ性にして酢酸エチルに再転溶する精製法を採用することにより良好な回収率が得

られ、UV 検出器での定量が可能となった。

国産のレモン、オレンジ、グレープフルーツを用いての添加回収率は平均 96%、検出限界は 0.1 ppm であった。

また、この方法により津市内で販売されている輸入柑橘類中の TBZ の残存量と、その季節変動を調べた結果、レモンよりオレンジ、グレープフルーツの残存量が比較的多く、冬期より夏期の方が多かった。

一部の試料については果皮と果肉に分けて分析したがその結果、果肉にもかなり TBZ が残存することがわかった。

最後に国産の柑橘類を御提供頂いた本学部松島二郎教授、児玉典男氏、又種々御指導頂いた三重短期大学、長田惣衛教授に深謝いたします。

V 文 献

- 1) 日本薬学会 編：衛生試験法・注解。(1980) 金原出版
- 2) 三原 翠, 近藤龍雄, 田辺弘也：食衛誌, **14**, 179 (1973)
- 3) 外海泰秀, 佐野裕子, 伊藤誉志男, 慶田雅洋：食衛誌, **16**, 397 (1975)
- 4) 伊藤誉志男, 豊田正武, 鈴木英世, 慶田雅洋：食衛誌, **18**, 450 (1977)

- 5) 一色賢司, 津村周作, 渡辺忠雄; 農化, 54, 1045 (1980)
- 6) 北田善三, 玉瀬喜久雄, 井上雅成, 佐々木美智子, 谷川 薫: 食衛誌, 23, 21 (1982)
- 7) F. TAFURI, C. MARUCCHINI, M. PATUMI and M. BUSINELLI: *J. Agric. Food Chem.*, 28, 1150 (1980)
- 8) 後藤真康, 加藤誠哉: 残留農薬分析法 (1980) (株) ソフトサイエンス社

Summary

A simple method for determination of thiabendazole (TBZ) residue in citrus fruits by high performance liquid chromatography has been developed. TBZ is extracted with ethyl acetate in the presence of sodium phosphate dibasic and sodium sulfate. TBZ extracted is separated by fractional extraction of aqueous — ethyl acetate solvent system. The determination of TBZ is carried out by HPLC on ODS with UV detector (solvent system for elution is aqueous potassium phosphate monobasic — methanol). The recovery rates of TBZ from fortified fruits varied from 92% to 112% in the range of 1.0–10.0 mg/kg fruit. The detectable limit of TBZ by this method is 0.1 mg/kg fruit. A seasonal change of TBZ in imported citrus fruits (lemon, orange and grape fruit) is also discussed.