

高速液体クロマトグラフィーによるかんきつ類中のジフェニル、オルトフェニルフェノールおよびチアベンダゾールの同時定量法について

Simultaneous Determination of Diphenyl, o-Phenylphenol and Thiabendazole in Citrus fruits by High Performance Liquid Chromatography

山口 敏幸 白石由美子 岸 信夫
青木 襄 高杉 信男

Toshiyuki Yamaguchi, Yumiko Shiroishi, Nobuo Kishi,
Minoru Aoki and Nobuo Takasugi

要 旨

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により、かんきつ類中のジフェニル(DP)、オルトフェニルフェノール(OPP)およびチアベンダゾール(TBZ)の同時定量を行った。

DP、OPPおよびTBZを酢酸エチル(酢エチ)で抽出後アルカリ洗浄を行い、TBZを塩酸層に移したのち、DPおよびOPPを水蒸気蒸留した。次にともに酢エチに再抽出し、さらにメタノールと置換後、濃縮しHPLCに注入した。

次いで市販かんきつ類10検体について分析したところ、DPはほぼすべてから、OPP、TBZはオレンジ、レモンの一部から検出した。

1. 緒 言

かんきつ類中の保存料の分析法として比色法¹⁾、紫外部吸光光度法(UV法)²⁾³⁾およびガスクロマトグラフ法(GC法)^{2)~5)}等数多くの研究があり、最近ではHPLCの適用も試みられているが^{6)~9)}、同時定量の報告¹⁰⁾は数少ない。

そこで、我々は試料の前処理および逆相分配カラム LiChrosorb RP-8を用いたHPLCの条

件について検討し、その同時定量を行い、併せて市販かんきつ類の実態調査も行ったので報告する。

2 実験方法

2-1 試 薬

DP、OPPおよびTBZ標準品・DPは和光純薬工業(株)製のもの、OPPとTBZは東京化成工業(株)製のものそれぞれを使用した。

塩析溶液・三原¹¹⁾の方法に従って、特級無水酢酸ナトリウム 33 gと特級塩化ナトリウム200 gとを水に溶かし 1000 mlとした。

その他の試薬・すべて特級品を使用した。

2-2 装 置

高速液体クロマトグラフ：日立 638-50型(UV検出器使用)

オムニミキサー・SORVAL 社製

遠心分離機：(株)久保田製作所、KR-600 P

2-3 試料の調製および測定条件

ホモジナイズ試料 50 gに塩析溶液 50 mlを加え、酢エチ 200 mlで2回抽出する⁴⁾。

次いで約 50 mlに減圧濃縮後、TBZを分析手法

原案¹²⁾に準じ抽出する。すなわち、濃縮酢エチ層を1N-水酸化ナトリウム20mlで2回洗浄後、TBZを0.1N-塩酸20mlで2回抽出し、さらに塩酸層に1N-水酸化ナトリウム10ml、塩化ナトリウム10gを加え、酢エチ15mlで2回逆抽出する。

次にTBZ抽出後のDP, OPP含有酢エチ層に水100ml, 塩化ナトリウム60g, リン酸2mlを加え、酢エチ約20mlを入れた受器に冷却管の先端をひたし、水の留液が100mlになるまで水蒸気蒸留を行う。さらに留液を酢エチ抽出し、さきのTBZ抽出酢エチ層に合わせる。

芒硝で脱水後2mlに減圧濃縮し、さらにメタノール50mlを加え同様に2mlにした後、同液で5mlにメスアップする。その5 μ lをHPLCに注入定量した。

HPLCの測定条件の結果をTable 1に示す。

なお、カラムの充てんは、常法どおり行ったが、最終時にメタノール・水・25%アンモニア(60:39:1)で10分間送液した。

Table 1 Analytical conditions of HPLC for Determining DP, OPP and TBZ

Model	Hitachi 638-50 type
Column	LiChrosorb RP-8, 5 μ m (4mmid \times 250mm)
Mobile phase	Methanol:Water:25% Ammonia water (70:29:1)
Column temp.	Room temp.
Pressure	175 Kg/cm ²
Flow rate	0.6 ml/min
Detector	UV(240 nm)
Sensitivity	0.08 AUFS
Chart speed	5mm/min
Sample size	5 μ l

2-4 検量線

クロマトグラムのピーク高から絶対検量線法により作成した。

3. 結果と考察

3-1 前処理

3-1-1 アルカリ洗浄
分析手法原案¹²⁾ではOPPを精油定量器を用いてトルエンに捕集後、妨害成分との分離のため1N-水酸化ナトリウムで再抽出を行っている。そこで我々は最初の酢エチ抽出液から、同様に水酸化ナトリウム抽出を行ったが、OPPは抽出されず酢エチ層への残留が認められた。

一方、かんきつ類中の一般妨害成分はアルカリに溶けやすいため、酢エチ層をアルカリ洗浄することにより、ある程度それらを除くことができる。

そこで、酢エチ層をアルカリ洗浄するクリーンアップを加えた操作を行ったところ、クロマトグラム上の前段の妨害ピークが除かれ、TBZの定量を良好に行うことができた。(Fig 1)

なお、各成分はTable 2のとおり、アルカリ洗浄による損失はなかった。

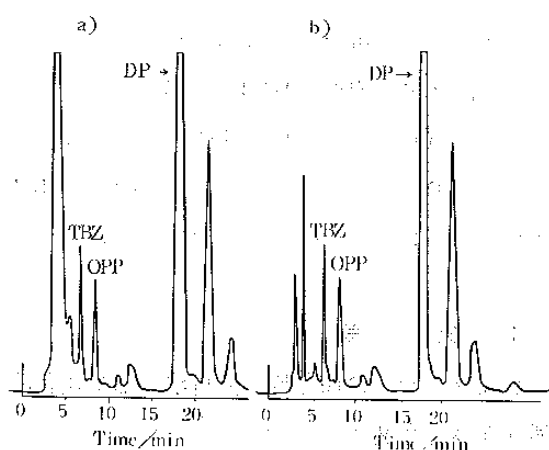


Fig 1 High performance liquid chromatograms of Grapefruit

a) Before being washed
b) After being washed

Table 2. Residues of DP, OPP, OPP-Na and TBZ in Ethyl acetate layer after being washed with Alkaline solution

Comp. \ Resi	Residue (%)	Average (%) n = 3
DP	95.0 ~ 104.0	99.8
OPP	97.0 ~ 101.6	99.0
OPP-Na	91.2 ~ 98.9	96.2
TBZ	98.0 ~ 99.0	98.3

3-1-2 DPおよびOPPの水蒸気蒸留

GCによる三成分同時分析の系統的試験法が報告¹⁰⁾されているが、それによるとDPおよびOPPを水蒸気蒸留した残液から、TBZを酢エチに抽出しており、残液の量が多いうえ、その後の操作

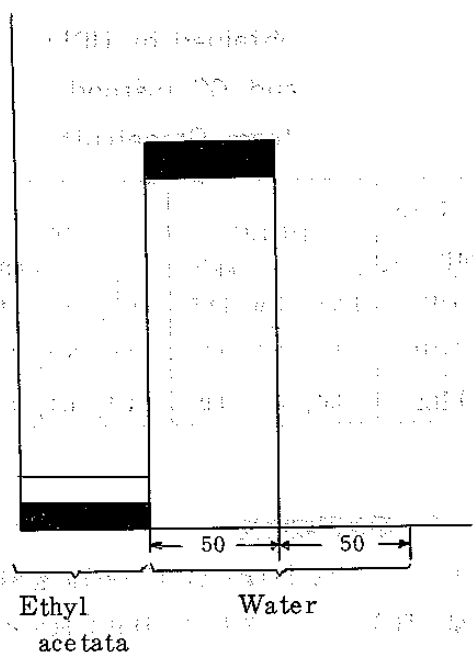


Fig. 2. Distillate patterns of DP and OPP with Steam distillation

□ : DP, ■ : OPP

も非常に煩雑である。

そこで我々はアルカリ洗浄後の酢エチ層より、あらかじめTBZを抽出し、その酢エチ層を水蒸気蒸留に付しDPとOPPを捕集することとした。その水蒸気蒸留時のDPおよびOPPの留出パターンをFig. 2に示す。

なお、それらは共に水層50 mlまでに留出したが、安全を見込んで100 mlまで採った。

3-1-3 メタノール置換

最終検液の酢エチ溶媒は、そのクロマトグラムがTBZを妨害するため、三成分に対する溶解度が良好で、UV吸収のないメタノールに置換した。

3-2 溶離液の検討

一色⁸⁾のHPLC(けい光法)によるTBZの分析では、溶離液としてメタノール:0.28%アンモニア(60:40)を用いている。その溶離液によって三成分を分析したところ、DPは溶出されなかったが、その比率を変えることにより、それらすべてを検出することができた。さらにTBZとOPPの分離状態の改善およびDPの20分以内溶出をはかるため、溶離液組成をメタノール:水:25%アンモニア(70:29:1)にした。

その溶離液によるオレンジ、グレープフルーツおよびレモンのクロマトグラムをそれぞれFig. 3に示す。

目的成分の隣接する妨害成分との分離度がすべて1以上であり、アイソクラチック溶離で、それらは20分までに溶出した。なお、オレンジの一部にOPPとの分離が1以下のものがみられたが、この場合溶離液組成のメタノールを65%に変えることにより、十分分離することができた。

3-3 同定とGC法との比較

目的成分のピークは絶対保持時間と標準添加法により同定し、本法とGC法とを比較したところ、Table 3のとおりほぼ一致した値を得た。

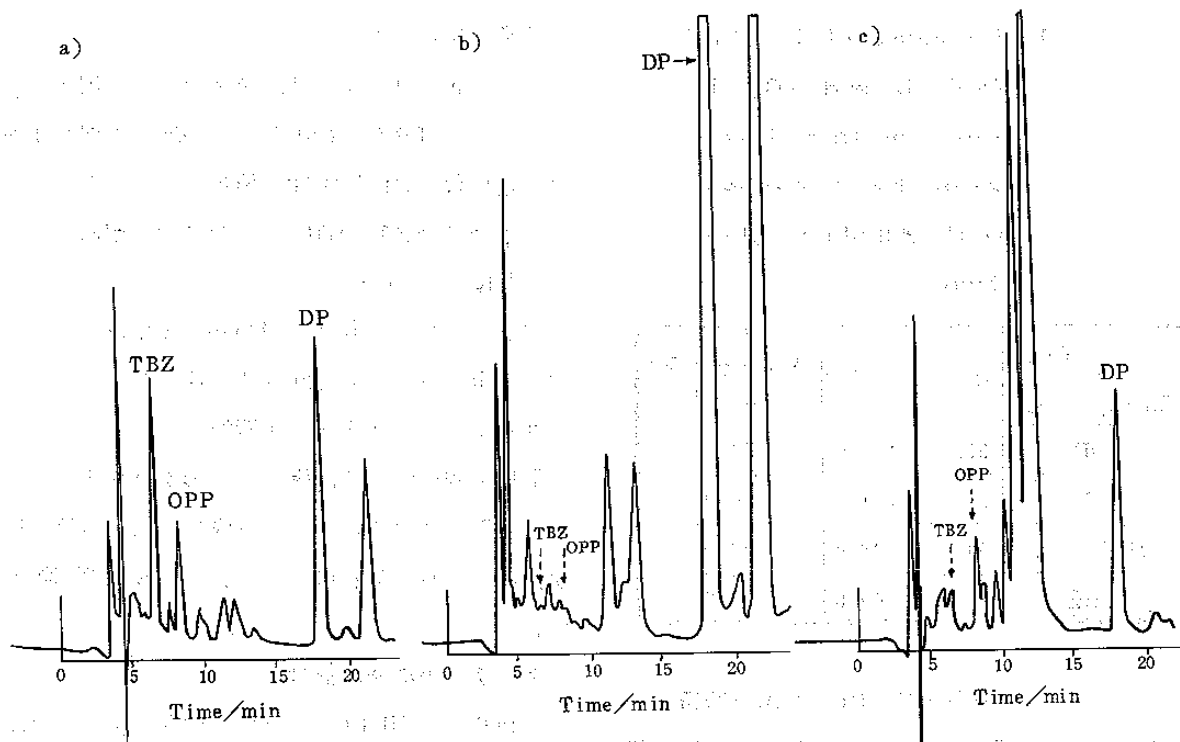


Fig. 3. High-performance liquid chromatograms of Citrus fruits
 a) Orange b) Grapefruit c) Lemon

3-4 検量線

DP, OPP および TBZ の検量線はそれぞれ Fig. 4 のとおり、5 ~ 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で良好な直線性を示した。

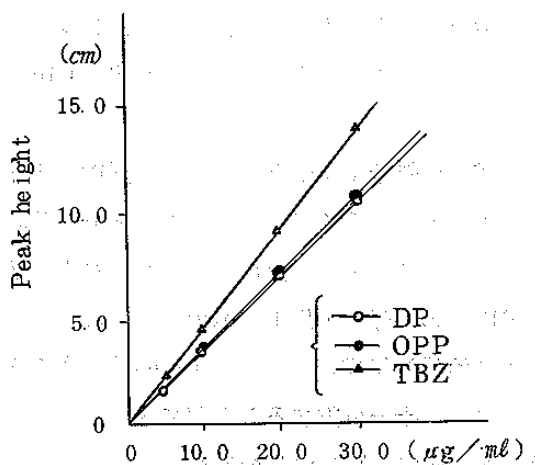


Fig. 4. Calibration curves of DP, OPP and TBZ by HPLC

Table 3. Analytical values obtained by HPLC and GC method from Grapefruit

Tech Comp.	HPLC (ppm)	GC (ppm)
DP	13.6, 13.6, 14.5	11.5, 14.5, 14.7
OPP	4.6, 4.6, 4.8	4.6, 5.2, 4.4
TBZ	4.6, 4.8, 4.9	4.4, 4.4, 4.5

3-5 添加回収実験

ホモジナイズ試料50gに各目的成分許容濃度の約半量を目安として、それぞれDP 1,500 μg (試料中 30 ppm), OPPおよびTBZ 250 μg (同 5 ppm)を添加し、回収率を求めたところ、Table 4に示すような良好な結果が得られた。

3-6 市販かんきつ類の調査結果

外国産グレープフルーツ、レモンおよびオレンジ

Table 4. Recoveries of OP, OPP and TBZ from Grape-fruit

With Comp.	Recovery (%)	Average (%) n = 3
DP	91.3 ~ 97.3	93.3
OPP	92.0 ~ 96.0	93.3
TBZ	93.0 ~ 98.0	95.7

ジ10 検体中のDP, OPPおよびTBZの測定結果をTable 5に示す。

DPは使用が広くレモンの1検体を除くすべてから検出し, 最高28.2 ppmであった。またOPPおよびTBZはそれぞれレモン, オレンジ, 計4検体の一部から検出し, 三成分とも検出したものは3検体であった。

Table 5. DP, OPP and TBZ found in Citrus fruits

Sample number	Kind	DP (ppm)	OPP (ppm)	TBZ (ppm)
1	Grapefruit	4.4	nd	nd
2	"	12.9	nd	nd
3	"	13.9	nd	nd
4	"	10.0	nd	nd
5	Lemon	14.3	0.9	0.8
6	"	2.2	nd	nd
7	"	nd	0.8	nd
8	Orange	2.6	1.1	2.0
9	"	28.2	nd	0.7
10	"	19.3	2.2	1.5

nd: not detected

detection limit: below 0.5 ppm

4. 結 語

HPLCによるかんきつ類中のDP, OPPおよびTBZの同時定量を, 逆相分配カラムLiChrosorb RP-8を用いて行った。

1) 前処理において, 酢エチ層のアルカリ洗浄を行うことにより, クロマトグラム上の前段の妨害ピークが除かれた。

2) TBZ抽出後のDP, OPPを含む酢エチ層のクリーンアップに水蒸気蒸留を行った。

3) 最終検液溶媒の酢エチはUV吸収があるため, メタノールに変えHPLCに注入した。

4) グレープフルーツにおける平均回収率は, DP, OPPともに93.3%, TBZ 95.7%であった。

5) 市販の外国産かんきつ類3種10検体についての分析結果は, DPはほぼすべてから検出され, 最高28.2 ppmであった。またOPPおよびTBZはそれぞれレモン, オレンジの一部から検出され, 三成分とも検出したものは3検体であった。

5. 文 献

- 1) Rajzman, A.: *Analyst*, **88**, 117 (1963)
- 2) 林 敏夫: *食品衛生研究*, **21**, 1215 (1971)
- 3) 林 敏夫, 加藤三郎, 渡辺晴美, 原 義知, 谷村顕雄: *食衛誌*, **13**, 78 (1972)
- 4) 外海泰秀, 佐野裕子, 伊藤誉志男, 慶田雅洋: *食衛誌*, **16**, 397 (1975)
- 5) 一色賢司, 津村周作, 渡辺忠雄: *農化誌*, **54**, 1045 (1980)
- 6) Reeder, S. K.: *J. Assoc. Offic Anal. Chem.*, **59**, 162 (1976)
- 7) 林 時司, 土屋博紀, 安達俊子, 大森裕子, 河合 聡, 大野武男: *衛生化学*, **25**, 131 (1979)
- 8) Isshiki, K., Tsumura, S., Watanabe, T.: *J. Assoc. Offic Anal. Chem.*, **63**, 747 (1980)

- 9) 中島謙一, 中川汀子, 江良至徳: 食衛誌, **22**, 233 (1981).
- 10) 中島謙一, 新谷敏朗, 井上泰彦, 江良至徳: 日本食品衛生学会第41回学術講演要旨集, p37 (1981).
- 11) 三原 翠, 近藤竜雄, 田辺弘也: 食衛誌, **14**, 179 (1973).
- 12) 厚生省環境衛生局食品化学課: 食品中, 食品添加物分析手法原案その2
- 13) 慶田雅洋, 伊藤誉志男, 豊田正武: 食品中添加物の分析法, p55, 光生館, (1980).