

固相カートリッジカラムを用いた かんきつ類中のアゾキシストロビン分析法

井部明広・日下枝里子

食生活科学科 食品衛生学研究室

Determination of Azoxystrobin in Citrus fruits using Cartridge Column Solid-Phase Extraction by HPLC

Akihiro IBE, Eriko KUSAKA

Department of Food and Health Science, Jissen Women's University

A method using cartridge column solid-phase extraction(SPE) was developed for the determination of Azoxystrobin as antifungal in lemon, orange and grapefruits by HPLC. The samples were extracted with acetonitrile and cleaned up using cartridge column SPE. Recoveries of analytes fortified at the levels of 0.001g/kg and 0.01g/kg in lemon, orange and grapefruit were examined. The mean recoveries were 89%-106%, and their relative standard deviations were 7.6-15.2%. This method is suitable to use as a simple screening test.

Key words : Azoxystrobin (アゾキシストロビン),
Cartridge column solid-phase extraction (固相抽出カートリッジカラム),
Orange (オレンジ), Lemon (レモン), Grapefruit (グレープフルーツ)

I. はじめに

農薬として諸外国で登録されているアゾキシストロビン (Azox) は、作物に対して防かびの効果があるとして、米国においてはかんきつ類に使用されている。わが国では、平成 24 年 8 月薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会添加物部会の承認を受け、平成 25 年 3 月食品添加物として指定された。使用基準はミカンを除くかんきつ類に対して 0.010g/kg を超えないこととされた。

食品中の Azox 分析法は、「食品に残留する農薬等の成分である物質の試験法について」(平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号) の通知により公定分析法として規定されている。しかし、本分析法は多種類の残留農薬を一斉に分析する方法であり、煩雑で、また、かんきつ類を含めた個々の食品に対応しているとはいえない。今回食品添加物として指定されたことから、対象食品をかんきつ類にしぼり、固相抽出カートリッジカラムを用いた簡易な分析法を検討したので報告する。

II. 実験方法

1. 試料

市販のオレンジ (米国産)、レモン (国産)、グレープフルーツ (米国産) を用いた。

2. 試薬

アゾキシストロビン標準品：和光純薬工業 (株) 残留農薬試験用を用いた。標準溶液：標準品 100mg をメタノール 100ml に溶解し (1000ppm 溶液)、さらにメタノールで適宜希釈して 10~100ppm 溶液を調製した。有機溶媒：メタノールは高速液体クロマトグラフ (HPLC) 用を、その他の分析には特級を用いた。固相抽出カートリッジカラム：GL サイエンス社製 InertSep C18/DRY (1g/3g/12mL) を用いた。使用する前にあらかじめアセトニトリル 10mL で洗浄した。

3. 装置

HPLC：ポンプ PU-2080、検出器 UV-2075、オートサンプラー AS-2055、カラムオープン CO-2060 (日本

分光社製)

4. HPLC 測定条件

カラム：Inertsil ODS-P (3 μ m, 2.1 ϕ × 150mm)

移動相：メタノール・水 (50 : 50)

流速：0.15mL/min

カラム温度：40℃

測定波長：260nm

注入量：5 μ L

5. 試験溶液の調製

細切した試料 10g をブレンダーカップにとり、アセトニトリル 50mL を加え、10,000 ~ 15,000rpm でホモジナイズ後、アセトニトリル層をろ紙ろ過し、残渣にさらにアセトニトリル 30mL を加え同様に操作してろ液を合わせ、100mL に定容した。このうち 20mL を分液ロートにとり、50%食塩溶液 (1+2) を加えて振とうし上層を分取した。分取した上層を InertSep C18/DRY カートリッジカラムに負荷した。負荷後アセトニトリル 10mL を加え溶出した。負荷溶液および溶出液を合わせて減圧下濃縮乾固した。残渣をメタノール 1.0mL で溶解しメンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

6. 添加回収実験

細切したオレンジ、レモン、グレープフルーツを試料として、それぞれに 1ppm および 10ppm となるように Azox 標準溶液を添加して、5 に従って操作し回収率を求めた。

Ⅲ. 結果及び考察

1. 公定分析法の検討

表 1 に公定分析法¹⁾ における試験溶液の調製法及びそれらに対する著者らの考案した方法を比較して示した。公定分析法は操作が煩雑で、カラムの担体など試薬の入手が困難なものもあった。そこで、特に ODS (C18) およびケイ酸マグネシウムのオープンカラムでの精製を、操作が簡便で、入手しやすい市販の C18 およびフロリジル固相抽出カートリッジカラムに変えて検討した。

表 1. 公定分析法と本法の比較

| | 公定法 | 本法 |
|--------|---|----------------------------------|
| 抽出溶媒 | ①アセトン ②酢酸エチル・ヘキサン | アセトニトリル |
| 精製カラム | (オープンカラム) ① ODS (C18) 5g ② ケイ酸マグネシウム 5g ③ シリカゲル 5g | (固相抽出カラム) InertSep C18/DRY 1g |
| 使用溶媒 | ①アセトン・ヘキサン ②酢酸エチル・ヘキサン | アセトニトリル |
| 減圧濃縮操作 | 4回 | 1回 |

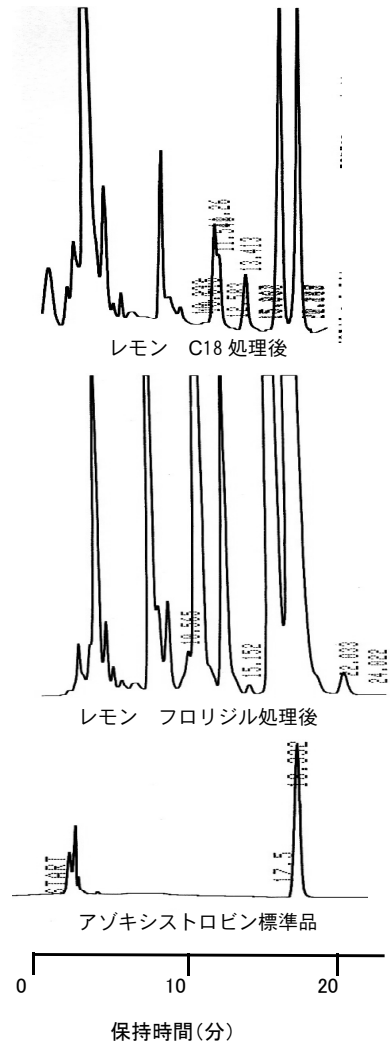


図 1. 精製カラムによる HPLC クロマトグラムの比較

— HPLC 測定条件—
 カラム：InertsilODS-3 (2.1 ϕ × 150mm)
 移動相：アセトニトリル・水 (9 : 11)
 流速：0.20mL/min
 カラム温度：40℃
 測定波長：260nm

精製に用いた固相抽出カートリッジカラム C18 カラムおよびフロリジルカラムについて、その精製効果を観察するため、標準品を添加したレモン抽出液をそれぞれのカラムに流し、効果を比較した。

図 1 にそれらの HPLC クロマトグラムを示した。レモンの抽出液においては、両者とも標準品の保持時間に妨害ピークが存在し測定ができなかった。しかし、C18 カラムとフロリジルカラムのクロマトグラムを比べると C18 カラムの方が精製効果は優れており、さらに公定法のようにこれら二つのカラムを重複して用いてもその効果は増強しないと判断された。また、フロリジルカラムによる精製は抽出溶媒を乾固後、ヘキサンに溶解して負荷するなど操作も煩雑になることから、以後 C18 カラムのみで検討を進めた。

2. HPLC の測定条件

図 1 のクロマトグラムの結果から HPLC 条件を変えることで、標準品と妨害ピークの保持時間が変化、分離可能になると考え、各種分析カラムについて検討を行った。

HPLC の分析カラムとして ODS カラムの中から、Inertsil ODS-3, および ODS-4、そして Inertsil ODS-P (GL サイエンス社製) を用いて検討を行った。C18 カートリッジカラムで精製したレモン抽出液の試験溶液を、これらの分析カラムを用いて分析をした結果、いずれのカラムも標準品と妨害ピークとは分離せず改善が見られなかった。当初、移動相にはアセトニトリル・水混液を用いた。そこで、移動相のアセトニトリルをメタノールに変えて、メタノール・水 50 : 50 の比率として各カラムで分析を行った。Inertsil ODS-P カラムでは標準品と妨害ピークとが良好に分離し定性、定量が可能となった。しかし、他のカラムでは分離できなかった。さらに同様にフロリジルカラムで生成した試験溶液を、Inertsil ODS-P カラムで分析した結果、定性、定量が可能であった。ただし、Azox 標準品のピーク検出後の保持時間にもかんきつ類成分由来の夾雑ピークが出現することから、分析時間を短縮するためには、グラジエントを用いて遅い保持時間のピークを迅速に排出することが必要となる。また、メタノール・水 (50 : 50) でレモンを分析した場合、若干妨害ピークの影響を受けるため、分析の際、標準品に近い妨害ピークの保持時間を観察して、必要に応じ

て移動相の溶媒比、特に水の割合を増やして妨害ピークとの分離をよくすることが必要であった。

3. 抽出・精製の検討

公定法では抽出溶媒としてアセトンを用いているため、今回検討した分析法でも、そのアセトン溶液を直接 HPLC に注入した。しかしながら、これによる不都合も考えられたことから、抽出溶媒を GC/MS、LC/MS による農薬等の一斉試験法¹⁾ で用いられているアセトニトリルに変えて検討した。

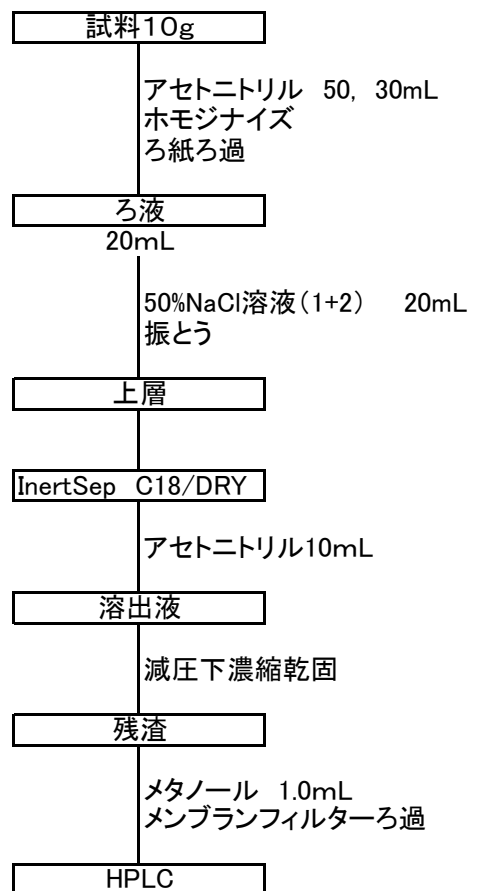


チャート 1. 食品中のアゾキシストロピン分析法

本分析法の操作手順をチャート 1 に示した。上記一斉試験法に準じて、アセトニトリルによる抽出、食塩水による塩析、そして C18 カートリッジカラムによる精製を試みた。C18 カートリッジカラムには、無

水硫酸ナトリウムが C18 固定相 GL サイエンス社製の InertSepC18/DRY と積層して充填されている。これによって塩析後のアセトニトリル抽出液を脱水操作することなしにカートリッジカラムに負荷することが可能となった。図 2 に試験溶液オレンジの添加回収実験のクロマトグラムを示した。妨害ピークともほとんど重ならず測定が可能であった。

表 2. 添加回収実験結果

| 試料 | 添加量 (ppm) | 回収率 (%) | | RSD (%) |
|----------|-----------|---------|----------|---------|
| | | n=3 | 平均値 ± SD | |
| オレンジ | 10 | 95.0 | ± 10.4 | 10.9 |
| | 1 | 104 | ± 9.5 | 9.1 |
| レモン | 10 | 94.3 | ± 7.2 | 7.6 |
| | 1 | 89.0 | ± 13.5 | 15.2 |
| グレープフルーツ | 10 | 98.8 | ± 8.6 | 8.7 |
| | 1 | 106 | ± 8.5 | 8.0 |

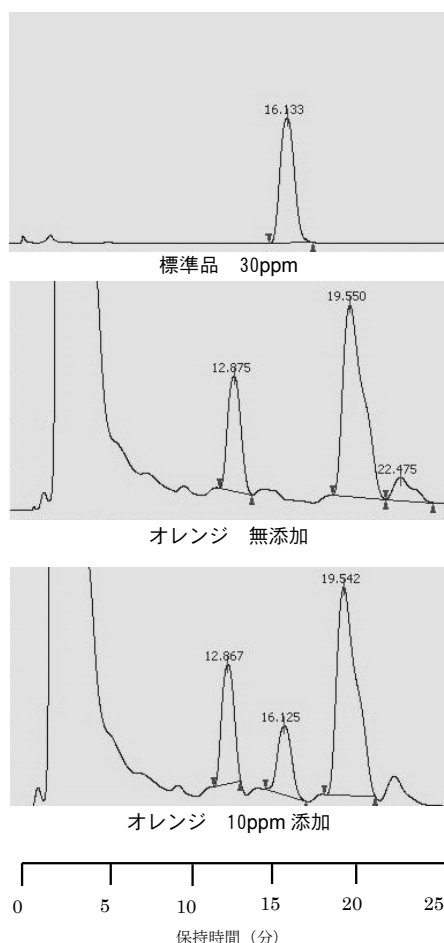


図 2. オレンジ試験溶液のクロマトグラム

4. 添加回収実験結果

表 2 には本分析法による標準品添加回収実験結果を示した。いずれも約 90%以上の回収率が得られたが、1ppm 添加では Azox のピークの前後にわずかに妨害ピークが出現し、若干回収率の精度に影響を与えたと考えられた。

また、検量線は 1ppm ~ 100ppm で直線性を示した。検出限度は試料あたり 0.2 ~ 0.3ppm (mg/kg) であった。

5. まとめ

固相抽出カートリッジカラムを用いたかんきつ類中のアゾキシストロビンの分析法を検討した。

試料からの抽出および精製法は、アセトニトリルを用いて抽出し、抽出溶液は塩析後、脱水操作することなく C18/DRY カートリッジカラムで精製し、HPLC で分析した。

HPLC 分析カラムには Inertsil ODS-P カラムを用いることで、妨害ピークとの分離が可能となった。

オレンジ、レモンおよびグレープフルーツに標準品を 1 および 10ppm 添加した際の回収率は 89~106%で、RSD は 7.6~15.2%であった。

以上の結果から、かんきつ類中の Azox の定性・定量に、本法は簡易な検査方法として使用できると考える。

参考文献

- 1) 厚生労働省：「食品に残留する農薬等の成分である物質の試験法について」通知、平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号