

短報

りんご果汁中含窒素系殺菌剤の簡易分析法

岸 美智子, 佐藤久美子, 藤巻照久

Simplified Analytical Methods of Residual Fungicides in Apple Juice

Michiko KISHI, Kumiko SATO
and Teruhisa FUJIMAKI

はじめに

近年各種のカビ毒に対する衛生上の注意が向けられている。平成15年11月には、りんごジュースおよび原料用りんご果汁等の清涼飲料水の成分規格として、カビ毒のバツリン含有量を0.50ppm未満とする基準が設定された。バツリンは、ペニシリウム属やアスペルギルス属等の真菌により生産され、バツリンの汚染率が高い農産物としてりんごが知られている。一方、我々は平成14年度に離乳食用の粉末果汁飲料の残留農薬調査を実施したところ、購入したりんご果汁1検体から殺菌剤ジフェノコナゾールを粉末中0.52ppmの濃度で検出した。検出した量は、製品の表示どおりに果汁を調製し飲用した時に体重5kgの幼児が毎日100mL飲用した場合であっても、1日許容摂取量(0.0096mg/体重kg/日)の約10%にあたる量であり、直ちに健康被害の発生を心配させるものではなかった。ジフェノコナゾールは浸透性殺菌剤で落葉果樹の黒星病や赤星病に効果があり、予防効果と治療効果の両方を有するとして使用されている。国および地方衛生研究所で検査された残留農薬調査結果報告¹⁾によると、ジフェノコナゾールは輸入農産物において検出率の高い農薬100種のうちにリストアップされている。平成12年度全国調査の輸入農産物の検査では、検査した147検体のうち2検体から検出(1.36%)されている。しかし、国産農産物および加工食品からの検出報告例はない。神奈川県では平成10年度以降、国産のもも、なし、りんご、ブドウ、トマトおよび輸入のバナナについて毎年ジフェノコナゾールの残留調査を行っているが、検出例は我々が14年度に検出したりんご加工食品における1例のみであり²⁾⁻⁵⁾、ジフェノコナゾールの検出は稀な検出例に思われた。り

んご果汁にバツリンの含有上限値が設定されたことによりバツリンの生成防除に注意が偏り、今後殺菌剤の使用が増加することが懸念されるため、殺菌剤の残留を調査する簡便な方法を検討した。

現在りんごに使用される殺菌剤は約30種(残留基準設定20種)あるが、今回はこのうちジフェノコナゾールなどの含窒素系農薬9種について、逆相ミニカートリッジカラムを用いた固相抽出法と検出に熱アルカリ型検出器を備えたガスクロマトグラフィ(GC-FTD)を組み合わせた簡易な一斉分析法を適用する場合の条件検討を行い、あわせて市場調査を行った。

方 法

1. 試料

市販のりんご果汁を用いて、分析条件の検討を行った。市場調査は平成16年4月に購入した離乳食用のりんご製品(粉末、顆粒状およびペースト状)6検体、および紙パック入りりんご果汁類(6検体)について行った。

2. 試薬および試験溶液

農薬標準品：ジフェノコナゾール、テブコナゾール、シプロコナゾールは和光純薬工業(株)製、トリアジメノール、トリフルミゾール、ヘキサコナゾールは林純薬工業(株)製、フルシラゾール、プロピコナゾール、ペンコナゾールはRiedel deHaan社製の、いずれも農薬標準品を用いた。各農薬は10mgをアセトン溶液に溶解し100mLとした溶液を標準原液とし、必要に応じて混合および希釈して用いた(標準混合溶液)。

使用溶媒：アセトン、n-ヘキサン、メタノールは和光純薬工業(株)製残留農薬分析用を、酢酸エチルは和光純薬工業(株)製特級を用いた。

添加回収試験は、標準原液から調製した9種混合標準溶液(アセトン溶液)をフラスコに採り、40以下で減圧濃縮および窒素気流の吹きつけを行いアセトンを除去した後、水又は市販のりんごジュースを加え標準品を溶かし一定量とした試料(添加回収用標準水溶液および添加回収用りんご果汁)について行った。

3. 装置

ガスクロマトグラフ：(株)島津製作所製、GC-17A、熱アルカリ型検出器(GC-FTD)

4. 分析操作

1) 逆相ミニカートリッジカラムによる抽出法の検討
メタノール5mLで洗浄後、水でコンディショニングしたODS処理シリカゲルカートリッジカラム(Waters社製、Sep-Pak Vac 6cc, C₁₈) (以下ODSミニカラム)を用いた固相抽出を検討した。添加回収用標準水溶液及び添加回収用りんご果汁5mLを負荷し、水30m

Lで洗浄した後、各溶媒10mLで溶出し窒素気流下40以下で濃縮し、1mLのアセトン溶液とし、GC-FTDで測定を行った。溶出溶媒として酢酸エチル、アセトン、メタノールおよびアセトニトリルを検討した。

2) フロリジルミニカートリッジカラムによる精製条件の検討

標準混合溶液（アセトン溶液）の溶媒を留去した後、アセトン・ヘキサン（2：18）混合液2mLに溶解し、ヘキサンでコンディショニングしたフロリジルミニカートリッジカラム（Waters社製、Sep-Pak Cartridges Plus Florijil）（以下フロリジルミニカラム）に負荷し、ヘキサン5mlおよびアセトン・ヘキサン（2：18）混合液10mLを流し負荷流出液とあわせた画分（F1）、ついでアセトン・ヘキサン（4：16）混合液、アセトン・ヘキサン（1：1）混合液及びアセトンで溶出を行い、溶出液を分取しそれぞれ40以下窒素気流下に濃縮乾固し、それぞれの画分をF2、F3、F4とする。各画分はアセトンに溶解し試験溶液としてGC-FTDで測定した。

3) 定性・定量

市場調査において試験溶液からピークが検出された場合、保持時間により定性を行い、ピーク面積から定量した。検出が疑われた場合には、試験溶液を濃縮し、質量分析器付ガスクロマトグラフィにより測定を行い、得られたマススペクトルを標準溶液のマススペクトルと比較して確認を行った。

<GC-FTD測定条件>

カラム：J & W Scientific社製、DB-5（0.25mm I.d. × 30m, 膜厚0.25 μ m）

カラム温度：50（2分間保持）- 昇温（15 /分）
-180（2分間保持）- 昇温（4 /分）
-280（20分間保持）

注入口および検出部温度：250 および280

注入量：2 μ L

キャリアーガス：ヘリウム 流速2.4 mL /分

結 果

1. ODSミニカラムからの溶出溶媒の検討結果

添加回収用標準水溶液および添加回収りんご果汁について、含窒素系殺菌剤9種のODSミニカラムへの吸着と、溶出溶媒について検討した。添加回収りんご果汁中の含窒素系殺菌剤9種約1 μ gおよび2 μ gは、ODSミニカラムに全量吸着し、酢酸エチル、アセトンおよびメタノールのいずれによっても、10mLの溶出で9種すべての殺菌剤が90%以上の良好な溶出結果を示した。またいずれの溶媒による溶出溶液においてもガスクロマトグラフ上、果汁成分による妨害は無く、9種の成分すべて検出可能

であった（図1）。溶出溶液からの水分除去が容易なアセトンで溶出操作を行い試験溶液を作成した。

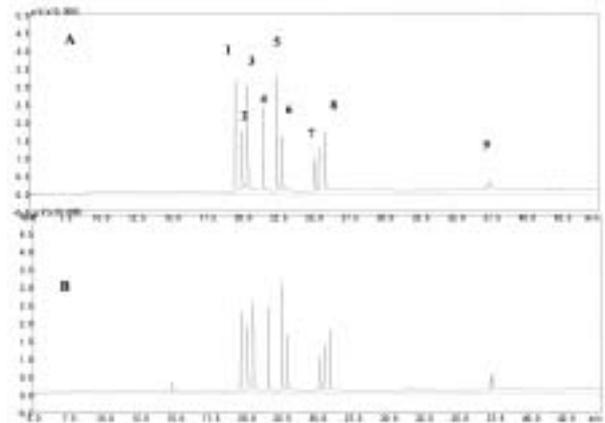


図1 含窒素系殺菌剤のガスクロマトグラフ（GC-FTD）

A：標準溶液 B：添加回収用果汁からの抽出溶液（ODSカートリッジカラムのみ）

1. ペンコナゾール 2. トリアジメノール 3. トリフルリミゾール 4. ヘキサコナゾール 5. フラシラゾール
6. シプロコナゾール 7. プロピコナゾール 8. テブコナゾール 9. ジフェノコナゾール

2. フロリジルミニカラムによる精製の条件検討結果

標準混合溶液の溶媒を除き、9種殺菌剤を各1 μ g又は2 μ g含む残留物をアセトン・ヘキサン混合溶液（2：18）2mLに溶解しフロリジルミニカラムに流し込み、ついでヘキサン5mLを流す。アセトン・ヘキサンの混合比率を変えた混合溶液およびアセトンを順次各10mLを流し、溶出画分を測定した。アセトン・ヘキサン混合溶液（2：18）ではいずれの殺菌剤も溶出せず、アセトン・ヘキサン混合溶液（4：16）およびアセトン・ヘキサン混合溶液（1：1）各10mLでほぼ全量が溶出を完了していると思われる結果であった。いずれの殺菌剤もアセトン・ヘキサン混合溶液（4：16）による溶出画分（F2）、アセトン・ヘキサン混合溶液（1：1）による溶出画分（F3）を合わせると、1 μ gの負荷で75%以上の回収が可能であった（表1）。また2 μ gの負荷ではいずれも約100%の回収が得られた。ジフェノコナゾールでは他の8種の殺菌剤の溶出状態に比較して、アセトン濃度20%では溶出がされにくいと思われる結果であった。また、添加回収りんご果汁から得られたODSミニカラムによる抽出液（試験溶液）について同様に操作したところ、標準混合溶液の場合に比較していずれの殺菌剤もそれぞれ約70%の回収があった。添加回収りんご果汁からの精製操作では、試験溶液を溶解してフロリジルミニカラムに

負荷した流出液，アセトン・ヘキサン混合溶液（4：16）10mL，アセトン・ヘキサン混合溶液（1：1）20mLを流して流出した液をすべてあわせて捕集し試験溶液としたところ，ヘキサコナゾール以外は標準混合溶液の場合の約80%まで回収率を上げることができた。ヘキサコナゾールはアセトン・ヘキサン混合溶液（2：18）への溶解性が低いことが懸念されたため，フロリジルミニカラム負荷後の試験管内をアセトン少量で洗い，溶出液にあわせたところ改善が見られた。

表1 フロリジルミニカラムからのアセトン/ヘキサン混合液による溶出

| 殺菌剤名 | 負荷量 (μg) | 負荷量に対する回収比率(%), n=3 | | | | |
|-----------|----------|---------------------|------|------|----|-------|
| | | F1 | F2 | F3 | F4 | F2+F3 |
| ベンコナゾール | 1.03 | — | 73.8 | 2.9 | — | 76.7 |
| トリアジメノール | 1.04 | — | 67.3 | 22.0 | — | 89.3 |
| トリフルミゾール | 0.91 | — | 94.0 | 3.3 | — | 97.3 |
| ヘキサコナゾール | 0.89 | — | 72.5 | 9.0 | — | 81.5 |
| フルシラゾール | 1.02 | — | 63.7 | 22.5 | — | 86.3 |
| シプロコナゾール | 1.02 | — | 55.4 | 20.1 | — | 75.5 |
| プロピコナゾール | 0.86 | — | 88.4 | 24.1 | — | 112.5 |
| テブコナゾール | 0.81 | — | 78.4 | 15.4 | — | 93.8 |
| ジフェノコナゾール | 0.8 | — | 46.3 | 65.3 | — | 115.8 |

F1:アセトン/ヘキサン混合溶液(2:18)
 F2:アセトン/ヘキサン混合溶液(4:16)
 F3:アセトン/ヘキサン混合溶液(1:1)
 F4:アセトン
 —:ピーク不検出

3. 市場調査実験

スキーム（図3）に示した分析法により2μgを添加して添加回収試験を行い，約70%の回収率が得られた。

本法により市販のりんご果汁について調査を行ったところ，平成16年4月購入の離乳食用果汁6検体および紙パック入り果汁6検体からは，9殺菌剤に該当するピークは検

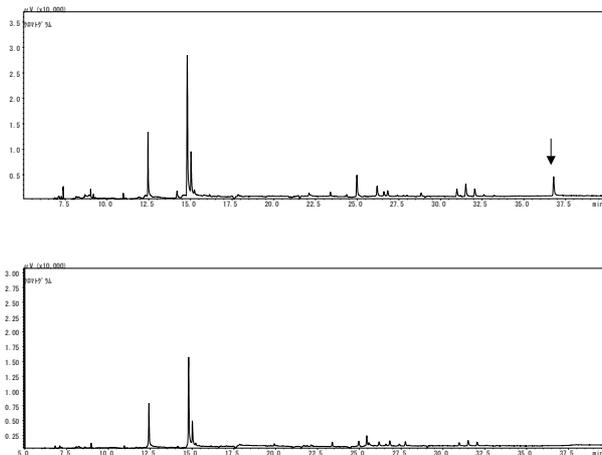


図2 調査検体のガスクロマトグラフ (GC-FTD)
 上:ジフェノコナゾール検出検体 (平成14年) 購入
 下:同一成分の検体 (平成16年購入)

出されなかった。平成14年度調査時にジフェノコナゾールを検出した検体を今回の簡易分析法により検査したところ0.36ppmの結果が得られた。平成16年度購入の同一製造会社，同一成分の製品ではジフェノコナゾールは不検出であった（図2）。しかし同社製のペースト状製品で，定量限界以下の痕跡程度ではあるがジフェノコナゾールのピークが検出された。

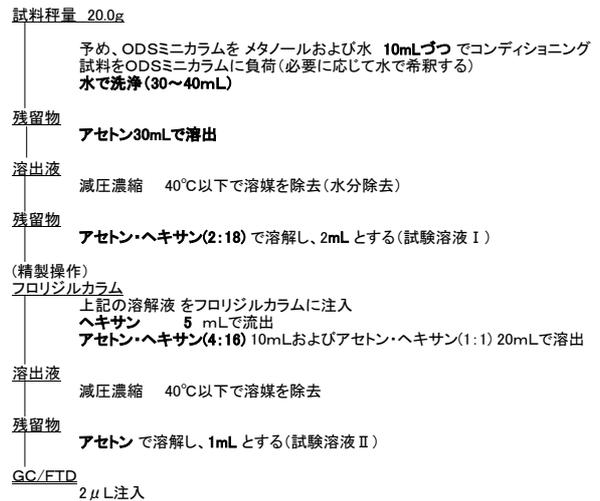


図3 含窒素系殺菌剤の簡易分析法

考 察

公定法では，多種の果実および野菜を対象とするため，抽出および精製操作は多種多様な成分の除去に対応する事を考慮して作成してある。りんご果汁を対象とする場合は，主として極性の高い妨害成分の除去を行うことで，精製操作等は簡略化ができる。また今回対象とした窒素系殺菌剤は検出器に GC-FTD を使用したため，検出成分が限定される。従ってりんご果汁のみを対象とした簡易試験に，本試験法を適用することで，溶媒使用量を減らし，操作時間の省略が可能であった。なお，市場調査を行った検体の一部に，添加回収試験における精製操作の際に，添加した標準殺菌剤が負荷溶液中に少量ながら流出する検体が認められた。分析法検討に際して用いたりんご果汁は濃縮還元100%を表示している果汁であったが，これらの検体は添加物を含有する旨の表示があった。りんご果汁中の極性の高い物質は ODSミニカラム抽出により除かれることが明らかとなったが，少量存在する夾雑物の存在はフロリジルカラムでの精製の際に溶出条件に影響があるため，検体の配合成分には注意を要する。また GC-FTD 測定において，ジフェノコナゾールは他の農薬に比べ検出感度が低い結果であった。外海らが HPLC を用いて一斉分析を行った結果ではジフェノコナゾールが特に検出感度が低い傾向は認められ

ていない⁶⁾。我々も HPLC (UV 230nm) を用いたジフェノコナゾールの検出で、GC-FTD より低い濃度での検出が可能であることを確認した。本簡易分析法によりジフェノコナゾールのピークが検出された場合に、公定法による試験とともに HPLC による定量も有用であると思われる。

国産りんごの農薬残留実態調査結果報告 (厚生労働省)¹⁾で、これまで殺菌剤で基準値を超えて検出された例はなく、衛生上問題となる状態ではないといえる。しかし、果汁飲料や粉末飲料では、製造工程に濃縮又は乾燥があり、残留した農薬が濃縮される可能性があり、農産物以上に注意が必要と思われる。りんご果汁以外の果汁についても、スクリーニング法として適用範囲を広げることができるか、また近年国産りんごについて定量可能濃度で検出されているキャプタン、ピテルタノール、ピンクロリゾン、メプロニル等の殺菌剤についても固相抽出による簡易抽出法の条件検討を進めている。

ま と め

- 1) りんご果汁中の含窒素系殺菌剤の簡易残留調査には、ODSミニカラムを用いた固相抽出法が有用である。
- 2) 平成14年8月に購入したりんご果汁製品1検体からジフェノコナゾールを検出したが、平成16年4月に購入したりんご果汁製品12検体からは今回対象とした9種の殺菌剤は検出されなかった。

(平成16年7月28日受理)

文 献

- 1) 厚生労働省医薬品局食品保健部基準課編：平成12年度食品中の残留農薬検査結果，食品衛生協会，(2002)
- 2 - 5) 神奈川県衛生部生活衛生課編：平成10年度～平成14年度の神奈川県食品衛生監視情報，(1998～2002)
- 6) 外海康秀，津村ゆかり，中村優美子，柴田 正：食品衛生学雑誌，39，13～25 (1998)