高速液体クロマトグラフィーによるバナナ中の ビテルタノール分析法

(平成6年11月8日受理)

永山敏廣* 小林麻紀* 塩田寛子*
伊藤正子* 田村康宏* 田村行弘*

Determination of Bitertanol in Banana by Liquid Chromatography

Toshihiro NAGAYAMA, Maki KOBAYASHI, Hiroko SHIODA, Masako ITO,
Yasuhiro TAMURA and Yukihiro TAMURA

(The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health:
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan)

A simple method for determination of bitertanol in banana by high performance liquid chromatography with fluorescence detection was developed. The banana sample homogenate was extracted with acetone. The crude extract was dissolved in 10% sodium chloride solution and ethyl acetate, then the ethyl acetate layer was concentrated to dryness. The residue was dissolved in *n*-hexane, and this solution was cleaned up with a Florisil[®] Cartridge. A methanol solution was analyzed by liquid chromatography. Bitertanol was detected at 325 nm (excitation at 265 nm). Recoveries at the 0.1 ppm and 0.5 ppm levels were 93% with a coefficient of variation of 3.3%, and the detection limit was 0.005 ppm in the samples.

(Received November 8, 1994)

Key words: ビテルタノール bitertanol; バナナ banana; 農産物 agricultural products; 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography; 蛍光検出 fluorescence detection

緒 言

ビテルタノール (bitertanol) は、多くの糸状菌の必須成分であるエルゴステロールの菌体内合成を阻害するトリアゾール系殺菌剤である¹⁾。我が国においても昭和61年4月に登録され、リンゴ、ナシ、モモ、イチゴなどの果樹などに広く使用されている。平成5年3月4日には厚生省告示第68号により大麦、アズキ、キュウリなど28種類の作物に0.05~3.0 ppmの基準値が設定された²⁾。

平成6年1月、輸入バナナから食品衛生法の規格基準値 (残留基準値) 0.5 ppm を超えるビテルタノールが検出され、緊急に監視する必要性が生じた。厚生省告示第68号で官報告示された試験法は、エスプロカルブ、ジェットフェンカルブ、フルトラニルなどの窒素を含む農薬の一斉分析法であり、3種類の溶出溶媒を用いたカラムクロ

マトグラフィーなど比較的複雑な操作が必要で、ビテルタノールのみを対象として迅速に分析するには不適當である³⁾。一方、登録保留基準に係わる環境庁告示の方法は単一試験法であることから、厚生省告示法に比較しカラムクロマトグラフィーが簡易であるが、転溶溶媒にジクロロメタンを使用し、また、厚生省告示の方法と同様にアルカリ熱イオン型検出器又は高感度窒素・リン検出器付きガスクロマトグラフを用いる方法であることから³⁾、試料由来の窒素含有成分による誤認に留意しなければならず、精度よく定量する上で熟練を要する。また、その他既報の試験でも、多くの場合アルカリ熱イオン型検出器又は高感度窒素・リン検出器付きガスクロマトグラフを用いている^{4)~6)}。そこで今回、選択性の高い蛍光検出器を装着した液体クロマトグラフを用いて、バナナ中のビテルタノールを簡易に精度良く分析する方法について検討した。

* 東京都立衛生研究所: 〒169 東京都新宿区百人町 3-24-1

Scheme 1. Analytical procedure for bitertanol

実験方法

1. 試薬及び標準品

1) ビテルタノール標準品: 林純薬工業(株)製 残留農薬試験用農薬標準品を用いた。

2) 添加回収試験用標準溶液: ビテルタノール標準品 50.0 mg を正確に量り、メタノールで正確に 50 ml として 1,000 µg/ml の標準原液を作製した。この標準原液 2.5 ml をメタノールで正確に 50 ml として 50 µg/ml 溶液を作製した。この溶液を必要に応じ更にメタノールで一定量に希釈した。

3) 10% 塩化ナトリウム溶液: 蒸留水約 900 ml に酢酸エチル約 100 ml を加え 1 回洗浄した水に、残留農薬分析用塩化ナトリウムを 10% になるように加え、溶解後用いた。

4) 純水: 蒸留水を Milli-Q® 超純水装置 (日本ミリポアリミテッド(株)製) により精製して用いた。

5) Sep-pak® (フロリジル): 日本ウォーターズ・リミテッド製 Sep-pak® Plus Florisil® Cartridge

6) その他の試薬: 残留農薬分析用又は高速液体クロマトグラフ用を用いた。

2. 装置

1) 液体クロマトグラフ: (株)島津製作所製 LC-6AD 型

2) 蛍光検出器: (株)島津製作所製 RF-535 型

3. 分析方法

1) 試験溶液の調製

検体 50 g にアセトン 200 ml を加え、ホモジナイザー (10,000 回転/分) で 5 分間細砕した後、ケイソウ土を 5 mm の厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトン 50 ml を加え軽くかく拌した後吸引ろ過し、ろ液を合わせ減圧下 (40°以下) でアセトンを留去した。

残留物に酢酸エチル 100 ml 及び 10% 塩化ナトリウム溶液 100 ml を加え 5 分間激しく振り混ぜた後、酢酸エチル層を分取した。水層に酢酸エチル 50 ml を加え、同様に操作した。酢酸エチル層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水した後ろ過し、減圧下で酢酸エチルを留去した。

得られた残留物に *n*-ヘキサンを加え、正確に 5 ml とした。この 1 ml を、Sep-pak® (フロリジル) に負荷し、2% アセトン-*n*-ヘキサン溶液 10 ml で洗浄した後、50% アセトン-*n*-ヘキサン溶液 20 ml で溶出した。得られた溶出液を減圧下で濃縮乾固し、メタノール 1 ml を加えて試験溶液とした。

これらの操作方法を Scheme 1 に示した。

2) HPLC 測定条件

カラム: ① COSMOSIL® C18-AR (4.6 mmφ×250 mm, ナカライテスク社製)

② SUPELCOSIL™ LC-ABZ (4.6 mmφ×150 mm, スペルコ社製)

カラム温度: 50°

移動相: ① アセトニトリル-純水 (60:40)

② メタノール-テトラヒドロフラン-純水 (40:15:45)

流速: 1.0 ml/min

検出器: 蛍光分光光度計 (励起波長: 265 nm, 蛍光波長: 325 nm)

注入量: 10 µl

結果及び考察

1. 抽出、精製方法の検討

1) 抽出方法

試料ひょう取量は、バナナ中でのビテルタノールの残留量が部位により大きく異なることから⁷⁾、単一成分の分析としてはやや多いが、サンプリング誤差を少なくするため 50 g 採取した。また、バナナからのビテルタノールの抽出は、一般に行われているアセトンによる抽出を行った。

アセトンを留去した後、転溶時に使用する転溶溶媒、及び塩化ナトリウム溶液の濃度について若干の検討を加えた。転溶溶媒は環境への汚染の少ない *n*-ヘキサン、ジエチルエーテル、酢酸エチル及びこれらの混合溶媒について検討した。10% 塩化ナトリウム溶液 100 ml にビテルタノール (10 µg/ml 標準溶液 0.5 ml) を添加し、各溶

媒 100 ml で 5 分間振とうして、1 回抽出での溶媒への転溶率を算出したところ、酢酸エチルが 93% で最も良く、次いでジエチルエーテルの 80% であった。そこで、転溶溶媒は酢酸エチルを用いることとした。

次に、転溶時に使用する塩化ナトリウムの濃度について検討を加えた。2, 5, 10% 及び飽和塩化ナトリウム溶液 100 ml にビテルタノール (10 μ g/ml 標準溶液 0.5 ml) を添加し、それぞれ酢酸エチル 100 ml, 50 ml で 2 回抽出した。その結果、ビテルタノールの抽出率は 2% 塩化ナトリウム溶液で 95%, 他はいずれも 96% 以上であった。そこで塩化ナトリウムの濃度は、有機リン系農薬も同時に抽出できる 10% 塩化ナトリウム溶液を用いることとした。

2) 精製方法

カラムクロマトグラフィーにおけるビテルタノールの溶出は充てん剤の活性度の違いなどから比較的難しく、試料からの回収率低下の大きな要因となっている。そこで今回、ビテルタノールを高率で溶出でき、かつ、精製

Fig. 1. Elution profile of bitertanol from Sep-pak® cartridge

▨: bitertanol elution in first 10 ml
▤: bitertanol elution in second 10 ml

操作を簡略化する目的で、既製のミニカートリッジカラムの利用を試みた。

ビテルタノールの精製には、厚生省告示及び環境庁告示のいずれもフロリジルカラムクロマトグラフィーを用いている^{2), 3)}。そこで、フロリジルミニカートリッジを用いて検討を加えた。

Sep-pak® (フロリジル) を用い、洗浄及び溶出溶媒に、*n*-ヘキサン、アセトン、ジエチルエーテル、酢酸エチル及びこれらの混液を用いて検討を加えた。*n*-ヘキサンではビテルタノールは全く溶出しなかった。また、ジエチルエーテルのみでは、ビテルタノールのカートリッジからの溶出率は、ジエチルエーテル 10 ml で 33%, 30 ml 流出でも 57% に過ぎなかった。そこで、酢酸エチル-ジエチルエーテル混液及びアセトン-*n*-ヘキサン混液について検討を加えた。カートリッジに保持されたビテルタノールは、酢酸エチル-ジエチルエーテル混液では

Fig. 2. Fluorescence spectra of bitertanol¹⁾

A: excitation spectrum at Em 325 nm

B: emission spectrum at Ex 265 nm

¹⁾ solvent: acetonitrile

Table 1. Elution Rate of Bitertanol from the Column

Column	Treatment		Elution rate ¹⁾ (%)
Sep-pak® FLO. ²⁾	1. 2% Acetone-hexane	10 ml	0.0
	2. 50% Acetone-hexane	20 ml	97.3± 5.7
Florisol 10 g ³⁾	1. Hexane	50 ml	0.0
	2. 15% Acetone-hexane	150 ml	72.9± 6.0
	3. Diethylether	80 ml	
Florisol 10 g ⁴⁾	1. 20% Acetone-hexane	50 ml	0.0
	2. 30% Acetone-hexane	60 ml	94.9±12.2

¹⁾ 10 ppm Standard solution 0.5 ml added.
Indicate average±S. D. of 3 determinations

²⁾ Sep-pak® Plus Florisol®

³⁾ This chromatography was notified in the tolerance for pesticide residue (announced in the official gazette gave notification of Ministry of Health and Welfare).

⁴⁾ This chromatography was notified in the standard for withholding registration (announced in the official gazette gave notification of the Environment Agency).

酢酸エチルが2%含有されると溶出し始め、酢酸エチル含有量が増加するに従い徐々に溶出率が高くなったのに比較し、アセトン-*n*-ヘキサン混液では30%以上アセトンが含有されると速やかに溶出できた (Fig. 1)。そこで、ビテルタノールの精製は、Sep-pak® (フロリジル) を用い2% アセトン-*n*-ヘキサン混液10 ml で洗浄した後、50% アセトン-*n*-ヘキサン20 ml で溶出することとした。この精製方法は、厚生省告示法及び環境庁告示法と比較し高い割合でビテルタノールを溶出できた (Table 1)。

2. HPLC 条件の検討

1) 測定波長の検討

蛍光検出器を用いたときの最適測定波長を検討した。ビテルタノールの励起波長及び蛍光波長を測定し、Fig. 2 に示した。極大波長は、図に示したアセトニトリル溶液で励起265 nm、蛍光325 nm 付近であった。この極大波長はメタノール溶液でも同様であった。

2) 移動相の検討

カラムは市販の ODS カラムを用い、移動相の検討を行った。

移動相は I. アセトニトリル-純水混液、II. メタノール-純水混液及び III. メタノール-テトラヒドロフラン (THF)-純水混液などについて検討した。ビテルタノールは不斉炭素を含む構造を有するため (Fig. 3)、標準品の注入により通常2本のピークが得られる。そこで移動相の条件として、これらピークを1本にまとめて測定できる方法を検討した。

I 混液のとき、アセトニトリルの含有量が60%以上で1本のピークが得られた。一方、II 混液では保持時間

が長く、III 混液では比較的良好に分離した2本のピークが得られた。そこで、移動相としては定量計算の容易な1本のピークとして測定できるI 混液であるアセトニトリル-純水 (60:40) を用いることとした。これらのことから、HPLC の測定条件は Table 2 に示した System I の条件で行うこととした。

3. ビテルタノールの確認

本法により、試料由来の妨害ピークなしに、測定することができた (Fig. 4)。しかし、他の農薬との誤認及び試料由来の成分との誤認なども、産地の違いなどにより生じる可能性もあることから、Table 2 に示した System II の条件で再度 HPLC を行い、ビテルタノールの2つ

Fig. 4. HPLC chromatograms of bitertanol

I: parameters given in text under HPLC operating parameters, Table 2, System I

II: parameters given in text under HPLC operating parameters, Table 2, System II

A: bitertanol residue banana extract

B: banana extract

C: bitertanol standard

Fig. 3. Structure of bitertanol

Table 2. HPLC Operating Conditions

	System I ¹⁾	System II ²⁾
Analytical column	Cosmosil® C18-AR (4.6 ϕ $\times$ 250 mm)	Spercosil™ LC-ABZ (4.6 ϕ $\times$ 150 mm)
Mobile phase	Acetonitrile-water (60:40)	Methanol-tetrahydrofran-water (40:15:45)
Column temperature	50°	
Flow rate	1.0 ml/min	
Detect wavelengths	Ex: 265 nm, Em: 325 nm	

¹⁾ For single peak analysis

²⁾ For double peaks analysis

Table 3. Recovery of Bitertanol Added to Banana

Added ¹⁾ (μ g)	Concentration in sample (ppm)	Recovery ²⁾ (%)
0.5	0.01	68 $\pm$ 2.1
5.0	0.10	94 $\pm$ 2.5
25.0	0.50	90 $\pm$ 3.2

¹⁾ Added to 50 g sample and stand for 30 min.

²⁾ Indicate average $\pm$ S. D. of 3 determinations.

のピークを確認することが望ましいと考える。

きゅうり、りんご、いちごなどバナナ以外の試料でも、本法によりほとんど妨害ピークなしにビテルタノールを測定できた。また、小麦や大豆など油脂を多く含む試料はアセトニトリル分配により脱脂した後、本法に従いほとんど妨害ピークなしにビテルタノールを測定できた。しかし、妨害ピークが非常に多く、本法のみでは確認が困難な試料の場合は、残りの *n*-ヘキサン試料溶液を更に環境庁告示のカラムクロマトグラフィーなどで精製した後、ガスクロマトグラフ-質量分析計を用いて確認することが、誤認を防ぐ上で大切であると考え。

4. 添加回収試験結果

あらかじめビテルタノールを含有していないことを確認したバナナ 50 g に、1, 10 及び 50 μ g/ml のビテルタノール標準溶液をそれぞれ 0.5 ml ずつ加え（試料中濃度 0.01, 0.10 及び 0.50 ppm に相当）、30 分放置した後、本法に従い試験を行った。3 回の試行による回収率の平均値を Table 3 に示した。

試料中添加濃度 0.01 ppm（添加量 0.5 μ g/50 g）での

回収率は 68% であったが、0.10 ppm 及び 0.50 ppm 添加時では 90% 以上であり、良好な回収結果が得られた。

なお、本法における検出限界は 0.005 ppm であった。

ま と め

ビテルタノールの簡易な分析法について検討した。

バナナ中のビテルタノールは、アセトンで抽出し酢酸エチルに転溶した後、蛍光検出器付き HPLC により、簡易に精度良く測定できた。回収率は 0.01 ppm 添加で 68%, 0.10 ppm 以上添加で 90% 以上であった。検出限界は 0.005 ppm と良好な結果であった。

本法は、簡易な操作で精度良くバナナ中のビテルタノールを測定できることから、実用上大いに役立つと考える。

文 献

- 1) 農業ハンドブック 1992 年版編集委員会編：“農業ハンドブック 1992 年版” p. 218~220 (1992) 日本植物防疫協会。
- 2) 厚生省告示第 68 号：官報（号外第 34 号）“食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件” 平成 5 年 3 月 4 日付 (1993)。
- 3) 環境庁告示第 20 号：官報（号外第 53 号）“作物残留に係る農業の登録保留基準を改正する件” 昭和 61 年 4 月 14 日付 (1986)。
- 4) 外海泰秀，津村ゆかり，中村優美子，伊藤蒼志男ら：食衛誌. **34**, 216~226 (1993)。
- 5) Mendes, M. C. S.: J. Agric. Food Chem. **33**, 557~560 (1985)。
- 6) Burden, R. S., Deas, A. H. B., Clark, T.: J. Chromatogr. **391**, 273~279 (1987)。
- 7) 永山敏廣，小林麻紀，塩田寛子，伊藤正子，田村康宏，田村行弘：食衛誌. 受理。