

Bond Elut ポリマー SCX 固相抽出と 高速液体クロマトグラフによる リンゴ果汁残留ベンゾイミダゾール系 防カビ剤の定量

アプリケーション

食品の安全

著者

Chenhao Zhai、Yun Zou
Agilent Technologies Co., Ltd.
412 Ying Lun Road
Waigaoqiao Free Trade Zone
Shanghai 200131
China

Carol Ball
Agilent Technologies, Inc.
200 Regency Forest Drive
Cary, NC 27518
USA

概要

高速液体クロマトグラフ (HPLC) と固相抽出 (SPE) 法を用いて、2 種類のリンゴ果汁残留防カビ剤 (カルベンダジムとチアベンダゾール) の抽出/定量の最適化を検討しました。実験の結果、これら化合物の抽出および定量化には、Agilent Bond Elut SCX (60 mg、3 mL) SPEを用いた前処理と、Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 カラム (4.6 mm × 100 mm、3.5 μm) を使用した HPLC との組み合わせが最適であることがわかりました。回収率は 92.1~99.4 %、相対標準偏差 (RSD) は 5 %未満、検出限界値は 4 μg/kg でした。



Agilent Technologies

はじめに

農薬はさまざまな用途で使用されていますが、使用法を誤ると植物、動物、人間の健康に害を及ぼしたり、重大な環境問題を引き起こすことがあります。防カビ剤は主に農産物のカビ被害を防ぐために使用されています。防カビ剤は全農薬使用量のほぼ 20~25 パーセントを占めています。ベンゾイミダゾール系の防カビ剤は、広範な病原菌を防除するために収穫前後の農産物処理に広く使用されている浸透性の農薬です。

農薬は土壌へ直接撒布されるか、または耕作地の作物へ噴霧され、その後、環境へ放出されます。農薬はすぐに根や葉から植物の中へ浸透し、農業排水を介して自然水へ直接入り込みます。こうした化合物の大部分は撒布後も環境中に残留し、なかには数年間消失しないものもあります。ベンゾイミダゾール系化合物の主要な成分はカルベンダジムとチアベンダゾールです(表 1)。カルベンダジムは、多くの真菌病に対する保護作用と治療作用の両方を備えています。これは、人間、動物、植物にとって有毒で、上・下水、土壌、作物、食品に長く残留する物質です。チアベンダゾールは、果物や野菜の病気(カビ、腐れ、胴枯れなど)を防除するために使用され、また、寄生虫の駆除剤としても使用されています。

リンゴ果汁からの防カビ剤の抽出には、Agilent Bond Elut SCX SPE カートリッジを使用しました。ここでは、SN/T 1753-2006 に示されているメソッドの実施法および最適化について説明し、実験の結果について検討します。

実験手法

材料と化学薬品

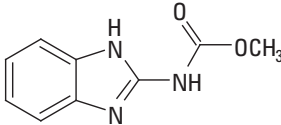
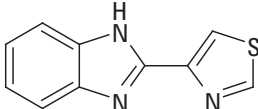
使用した試薬および溶剤は、すべて HPLC グレードまたは分析グレードのもので、防カビ剤の標準物質は、Sigma-Aldrich Trading Co. (中国上海) から購入しました。リンゴ果汁(食品)は地元のマーケットから購入しました。

リン酸緩衝液: 1.38 g のリン酸二水素ナトリウムと 1.41 g リン酸水素二ナトリウムを 1,000 mL の水に混ぜ、pH を 3.0 に調整しました。

メタノールで希釈した原液 (0.1 mg/mL) を作り、冷凍庫 (-20 °C) に保存しました。メタノールで希釈した原液から希釈標準溶液を作成しました。希釈標準溶液は、毎週作成し、4 °C で保存しなければなりません。

SPE カートリッジは Agilent Bond Elut SCX 3 mL、60 mg (p/n 5982-3236) を使用しました。分析は、可変波長検出器 (VWD) を装備した Agilent 1200 HPLC で実施しました。分析用カラムは、Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 3.5 µm 100 mm × 内径 2.1 mm (p/n 959793-902) です。アジレントの 0.45 µm ろ過膜 (p/n 5185-5836) を使用して、HPLC 分析前にサンプル溶液をろ過しました。

表 1: この実験に使用する防カビ剤

| 番号 | 名称 | pKa | Log P | 構造 |
|----|-----------------------------|------|-------|--|
| 1 | カルベンダジム CAS # 10605-21-7 | 4.48 | 1.45 |  |
| 2 | チアベンダゾール CAS # 148-78-8 | 4.7 | 2.39 |  |

HPLC 条件

カラム: ZORBAX Eclipse Plus C18 100 mm × 4.6 mm
3.5 μm (p/n 959793-902)
流量: 1.0 mL/min
注入量: 20 μL
検出波長: 288 nm
移動相: リン酸緩衝液-アセトニトリル (73:27)

サンプル前処理

リンゴ果汁を 10 g 計り、水で 100 mL に希釈し、ガラス製の攪拌棒で 1 分間混ぜます。希釈したサンプルを 250 mL の三角フラスコに移し、2 mol/L の NaOH 溶液で pH を 10 に調整します。サンプルを 2~3 本の 50 mL ポリプロピレン遠心分離管に分け、4,000 rpm で 10 分間遠心分離機にかけます。各分離管の上澄み液を 1 つのガラスビーカーに集めます。

SPE 精製

SPE の抽出手順を図 1 に示します。

Agilent Bond Elut SCX カートリッジのコンディショニングは、

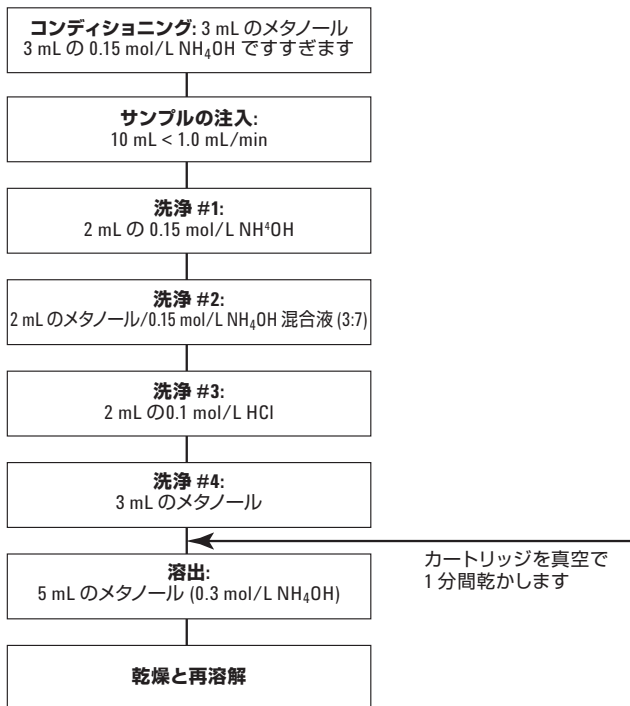


図 1: リンゴ果汁に残留した防カビ剤の SPE (固相抽出) 手順

3 mL のメタノールを重力流 (約 1 mL/min) ですすいだのち、3 mL の 0.15 mol/L NH₄OH 溶液の重力流ですすぐという形で行いました。

Bond Elut SCX カートリッジに 10 mL の上澄み液を 1 mL/min の流量で注入します。サンプルが完全に溶出したら、カートリッジを、2 mL の 0.15 mol/L NH₄OH、2 mL のメタノールと 0.15 mol/L NH₄OH の混合液 (3:7)、2 mL の 0.1 mol/L HCl、および 3 mL のメタノールで洗浄します。すべての洗浄ステップは加圧せずに行います。廃液は捨てます。カートリッジを 2.0 kPa 未満の陰圧で 1 分間乾かします。最後に、0.5 mol/L NH₄OH が含まれている 5 mL メタノールを使い、自然落下によってカートリッジからの溶出を行います。溶出液を集め、窒素を吹き付けて乾かします。乾燥後の残留物を溶かし、移動相を使用して 1 mL にします。その後、残留物を 0.45 μm のろ過膜でろ過して分析します。

結果と考察

直線性、検出限界値

原液は、異なる濃度のものを数種類用意して HPLC で分析しました。それぞれの面積と溶液濃度に基づいたテトラサイクリンについて線形回帰を計算しました。検出限界 (LOD) は、S/N 比が 2~3 の範囲内の値になる注入濃度でした。線形範囲は、25~500 μg/kg の範囲でした。直線性と LOD を表 2 に示します。

表 2: 防カビ剤の直線性と LOD

| 化合物 | 回帰式 | 相関係数 | LOD (μg/kg) |
|----------|------------------------|--------|-------------|
| カルベンダジム | $Y = 75.781x - 0.4018$ | 0.9999 | 4 |
| チアベンダゾール | $Y = 108.07x - 0.6984$ | 0.9999 | 4 |

回収率と再現性

リンゴ果汁残留防カビ剤の標準溶液について、スパイクの添加量 (25、50、100 μg/kg レベル) ごとに回収率を計算しました。添加レベルごとに分析を 6 回実行しました。ブランクと添加標準溶液 (100 μg/kg) のクロマトグラムを図 2 と図 3 に示します。回収率と再現性のデータは表 3 にまとめました。

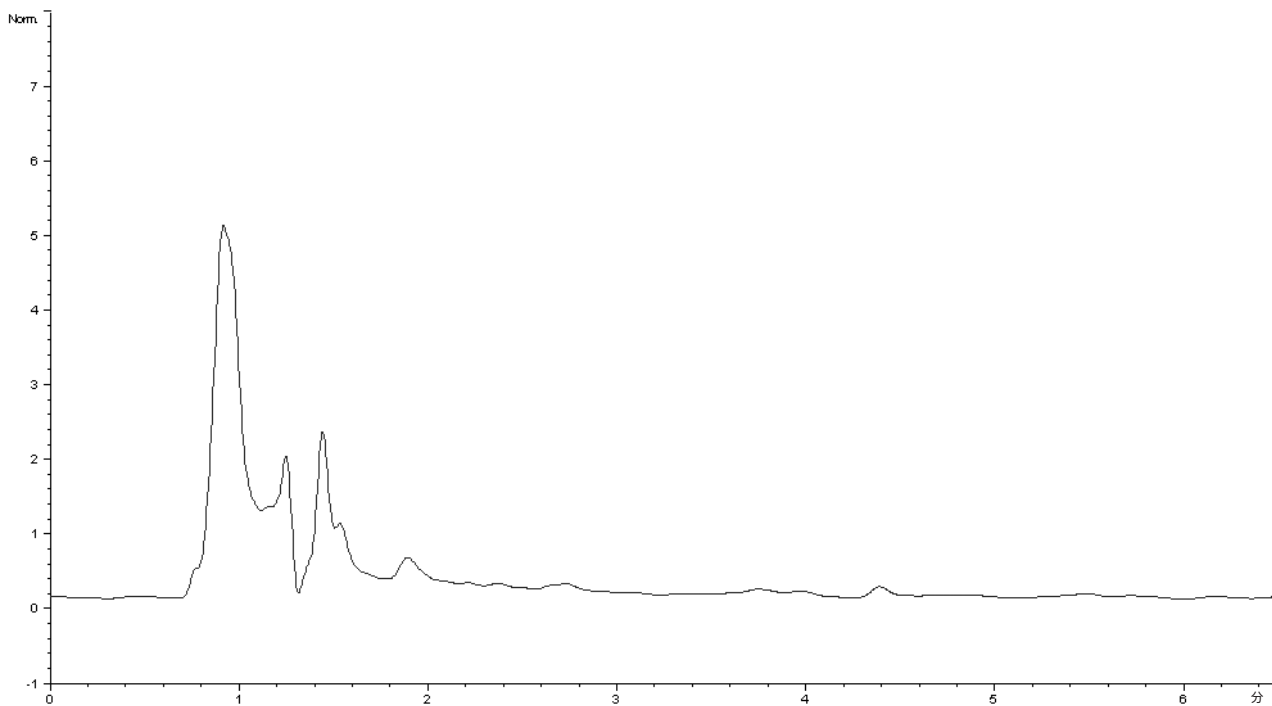


図2: ブランクのリンゴ果汁のクロマトグラム

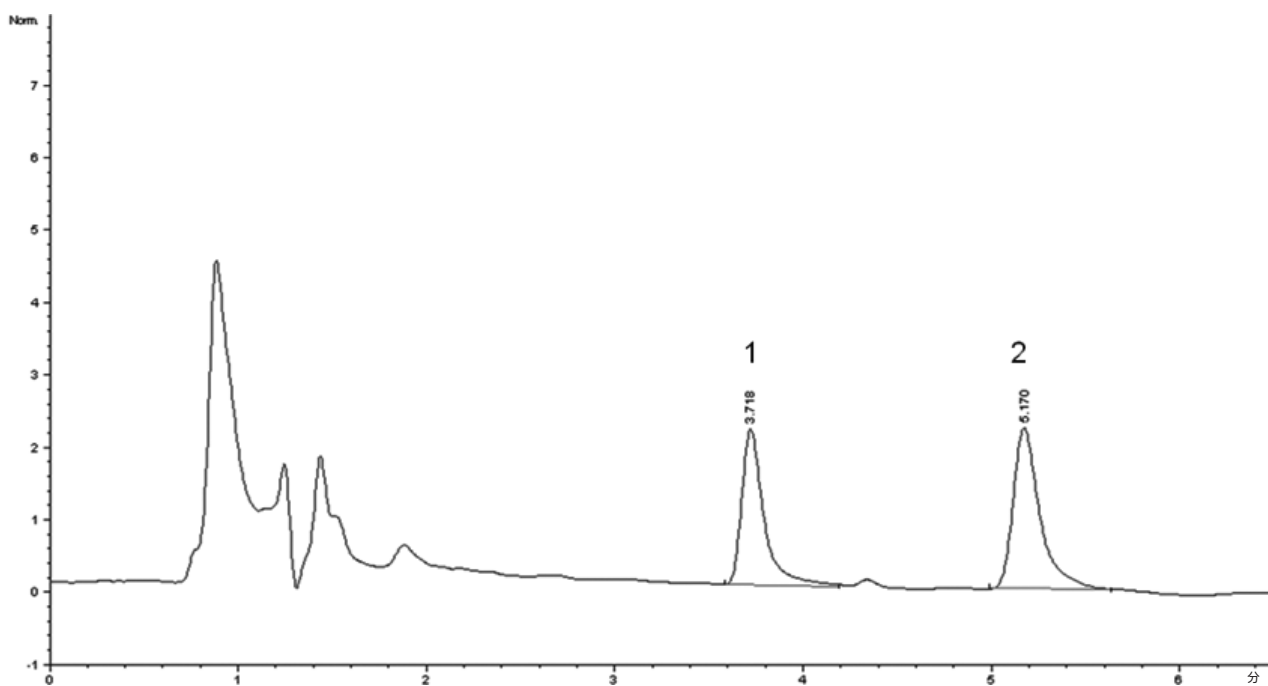


図3: 100 µg/kg のスパイクを添加したリンゴ果汁のクロマトグラム (1 - カルベンダジム、2 - チアベンダゾール)

表 3: SPE (固相抽出) によるリンゴ果汁残留防カビ剤の回収率と RSD

| 化合物 | 添加レベル ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 回収率 (%) | % RSD (n = 6) |
|----------|--------------------------------------|------------|------------------|
| カルベンダジム | 25 | 98.6 | 3.99 |
| | 50 | 99.4 | 3.24 |
| | 100 | 95.9 | 3.27 |
| チアベンダゾール | 25 | 99.0 | 2.38 |
| | 50 | 92.1 | 4.90 |
| | 100 | 93.0 | 3.79 |

結論

リンゴ果汁残留防カビ剤の精製および濃縮に関して、Agilent Bond Elut SCX は、簡単かつ効果な SPE メソッドだということが出来ます。標準溶液の回収率および再現性に関する実験結果は、リンゴ果汁の防カビ剤残留量に関する中国の法定基準を満たしていました。リンゴ果汁に含まれる不純物は、最小限の量であったため、どちらの分析対象防カビ剤にも干渉しませんでした。

参考文献

SN/T 1753-2006, Determination of thiabendazole and carbendazim residues in concentrated fruit juice for import and export – High Performance Liquid Chromatographic method.

詳細情報

Agilent Bond Elut SPE シリーズに関する詳細については、www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

アジレントの HPLC カラムに関する詳細については、www.agilent.com/chem/LCcolumns をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2008
Published in Japan
January 5, 2009
5990-3235JAJP



Agilent Technologies