

原著

## 果実中防かび剤の分析法開発及び妥当性評価

小木曾俊孝・中西加奈子・新谷依子・永島聡子・高橋浩司・平川博仙・堀就英・梶原淳睦

食品添加物として用いられている7種類の防かび剤について、一斉分析法の開発と妥当性評価を実施した。従来当所で用いていた防かび剤4種類の分析法では、7種類の一斉分析に適応できないことが明らかとなった。その原因として固相精製の溶離液に使用したトルエンが測定の妨害ピークとなるだけでなく、高沸点のトルエンを濃縮するのに時間を要するため揮発性の高い成分の回収率低下につながる事が考えられた。そこで、前処理において固相カラムを二種類併用する方法を見出し、トルエンを用いない条件で良好な精製効果を得ることに成功した。グレープフルーツとバナナを用いて開発した一斉分析法の妥当性評価を行った結果、7種類全ての防かび剤について妥当性評価の目標値に適合する結果を得ることができ、試験法の妥当性を確認することができた。

[キーワード：防かび剤、固相精製、LC-MS/MS、HPLC-FL、妥当性評価]

### 1 はじめに

柑橘類やバナナなどの果実を輸入する際、輸送手段によっては数週間という長い時間が必要となる。そのため、輸送中に発生するかびを防ぐことが重要となる。防かび剤のような収穫後の農産物に使用される農薬はポストハーベスト農薬と呼ばれ、輸入作物に限って使用が認められてい

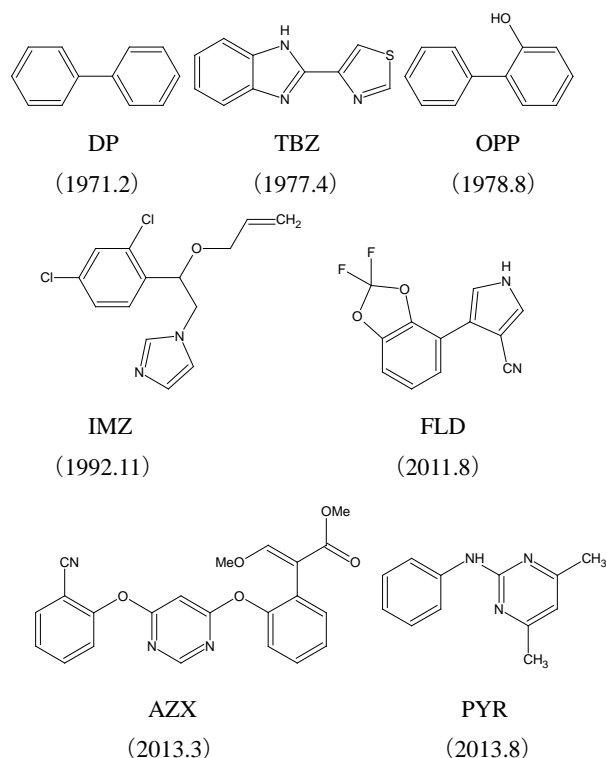


図1 防かび剤の構造

各構造式に示す日付は防かび剤としての登録年月を示す。

る。防かび剤はジフェニル (DP)、オルトフェニルフェノール (OPP)、チアベンダゾール (TBZ)、イマザリル (IMZ)、フルジオキシニル (FLD)、アゾキシストロビン (AZX)、ピリメタニル (PYR) の7種類が使用されており、国内では食品添加物としてとり扱われている (図1)。

防かび剤の試験法については7種類に対応する一斉試験法は通知されておらず、近年追加された FLD、AZX、PYR については個別試験法となっている<sup>1)</sup>。このことから、防かび剤7種類の一斉分析法を検討しその妥当性評価を実施したので結果を報告する。

### 2 研究方法

#### 2・1 試料

無農薬栽培されたグレープフルーツおよびバナナを用いた。晩白柚は分析法開発時のみ試料として用いた。

#### 2・2 標準品および試薬

DP 標準品、OPP 標準品、TBZ 標準物質、IMZ 標準物質、AZX 標準物質は和光純薬製を用いた。FLD 標準品は関東化学製、PYR 標準品は Dr. Ehrenstorfer 製を用いた。

分析においては次に示す試薬を用いた。アセトニトリル (残留農薬・PCB 試験用)、蒸留水 (ヘキサン洗浄品、残留農薬試験用)、塩化ナトリウム (残留農薬試験用)、無水硫酸ナトリウム (残留農薬・PCB 試験用) は関東化学製を用いた。水酸化カリウム (特級)、1-ブタノール (分光分析用) は和光純薬製を用いた。

固相カラムは次に示すものを用いた。InertSep NH2 (500 mg) はジーエルサイエンス製を使用し、アセトニトリル

10 mL でコンディショニングして用いた。ENVI-Carb C (100 mg) は SUPELCO 製を使用し、メタノール 2 mL でコンディショニングして用いた。

機器測定においては次に示す試薬を用いた。メタノール (LC/MS 用)、アセトニトリル (LC/MS 用)、蒸留水 (LC/MS 用) は関東化学製を用いた。酢酸アンモニウム (HPLC 用) は和光純薬製を用いた。

HPLC の移動相はアセトニトリル：水：メタノール混液 (1：7：12) に 10 mM となるようにドデシル硫酸ナトリウム (生化学用、和光純薬製) を加え、リン酸 (特級、和光純薬製) で pH を 2.3-2.5 に調製したものを用いた。

## 2・3 装置及び測定条件

測定に用いた機器および測定条件を表 1 に示す。

LC-MS/MS の測定条件は当所で行っている残留農薬一斉分析法の条件を使用し、HPLC-FL の測定条件は食品衛生検査指針<sup>1)</sup>を参考に検討した条件を使用した。表 2 には各測定成分の LC-MS/MS の MRM 条件を示す。DP は ESI 法ではイオン化が認められなかったため HPLC-FL のみで評価を行うことにした。また、OPP については MRM 条件の検討を行ったが強度の安定したプロダクトイオンが生成しなかったため、[M-H] を定量に用いた。

表 1 装置及び測定条件

### LC-MS/MS

装置：	Waters ACQUITY UPLC/Xevo™ TQ MS
カラム：	InertSustain C18, 5 µm, 2.1×150 mm
移動相：	A：5 mM 酢酸アンモニウム溶液, B：MeOH
流速：	0.2 mL/min
注入量：	5 µL
イオン化法：	ESI法
グラジエント：	B (%) 0min (15%) -1min (40%) -3min (40%) -6min (50%) -8min (55%) -17.5min (95%) -29min (95%) -30min (15%) -40min (15%)
カラム温度：	40 °C

### HPLC-FL

装置：	島津 LC-10ADVP
蛍光検出器：	島津 RF-20A
カラム：	Inertsil ODS-SP, 5 µm, 4.6×150 mm
移動相：	CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O:MeOH = 1:7:12 10 mM SDS, pH2.3-2.4
流速：	1.0 mL/min
注入量：	10 µL
測定波長：	Ex: 285 nm, Em: 325 nm
カラム温度：	40 °C

## 2・4 分析法

試料 20 g を量り取り、アセトニトリル/蒸留水 (8:2) 100 mL を加えホモジナイザーで均一化後、吸引ろ過により抽

表 2 MRM 条件

### Positive モード測定条件

農薬名	コーン電圧 (V)	定量イオン (m/z)	CE <sup>a)</sup> (V)	確認イオン (m/z)	CE <sup>a)</sup> (V)
AZX	20	404 > 372	16	404 > 344	26
PYR	35	200 > 107	25	200 > 82	25
IMZ	20	297 > 159	18	297 > 255	23
TBZ	25	202 > 175	25	202 > 131	20

### Negative モード測定条件

農薬名	コーン電圧 (V)	定量イオン (m/z)	CE <sup>a)</sup> (V)	確認イオン (m/z)	CE <sup>a)</sup> (V)
FLD	40	247 > 180	25	247 > 126	27
OPP	50	169	1	-	-

a) Collision Energy

出液と残渣に分離した。ろ液に塩化ナトリウム 10 g、1 M 水酸化カリウム水溶液約 3 mL を加え、振とう機で 5 分間振とうしアセトニトリル層と水層に分離した。水層の液性を pH 試験紙で確認し、塩基性でない場合には水酸化カリウム水溶液を追加し再度振とう機で 5 分間振とうした。アセトニトリル 20 mL で前洗浄した無水硫酸ナトリウム 30 g に試料抽出溶液のアセトニトリル層 20 mL を通し脱水し、無水硫酸ナトリウムをアセトニトリル 20 mL で洗い込んだ。脱水した溶液をエバポレーターで 2 mL 程度まで減圧濃縮した。濃縮液をアセトニトリル 10 mL でコンディショニングした InertSep NH2 に負荷し、濃縮に用いたナス型フラスコをアセトニトリル 2 mL で 3 回洗い込み、アセトニトリル 12 mL で溶出した。全ての溶出液を回収し 1-ブタノール 1 mL を加え約 1 mL まで減圧濃縮した。残渣をメタノールで 10 mL に定容し、HPLC-FL 測定用検液を作成した。また、HPLC-FL 測定用検液を 1 mL 分取し、メタノールでコンディショニングした ENVI-Carb C で精製し、溶出液を 10 mL に定容し LC-MS/MS 測定用検液を作成した (図 2)。

## 2・5 妥当性評価方法

妥当性評価は 2 種類の添加濃度 (0.5 µg/g、5.0 µg/g) について分析者 3 人が併行数 2 で 2 日間または分析者 5 人が併行数 2 で 1 日間の枝分かれ試験により実施し、真度 (回収率) 及び精度について評価を行った。

妥当性評価の目標値は「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」(以下、ガイドライン) に従い真度 (%) : 70-120、併行精度 (RSD, %) : 10>、室内精度 (RSD, %) : 15>とした<sup>2)</sup>。

また、定量に用いる検量線は LC-MS/MS 測定対象はマトリックス含有標準液を使用し、HPLC-FL 測定対象はメタノールで希釈した標準液を用いた。

表3 抽出 pH と回収率

LC-MS/MS 測定対象

農薬名	グレープフルーツ (回収率,%)			晩白柚 (回収率,%)	
	pH 4	pH 7	pH 10	pH 4	pH 10
TBZ	27.6	62.2	77.9	23.7	103.5
IMZ	64.5	79.6	106.3	59.9	104.0
PYR	73.6	92.2	94.3	80.2	103.5
AZX	62.0	71.2	110.3	76.1	79.3
OPP	107.6	86.0	102.3	88.6	94.5
FLD	98.6	128.8	107.3	93.4	104.8

HPLC-FL 測定対象

農薬名	グレープフルーツ (回収率,%)			晩白柚 (回収率,%)	
	pH 4	pH 7	pH 10	pH 4	pH 10
TBZ	41.2	80.1	95.9	36.8	92.6
OPP	58.8	102.8	118.3	58.2	95.0
DP	51.1	88.1	83.1	70.1	57.3

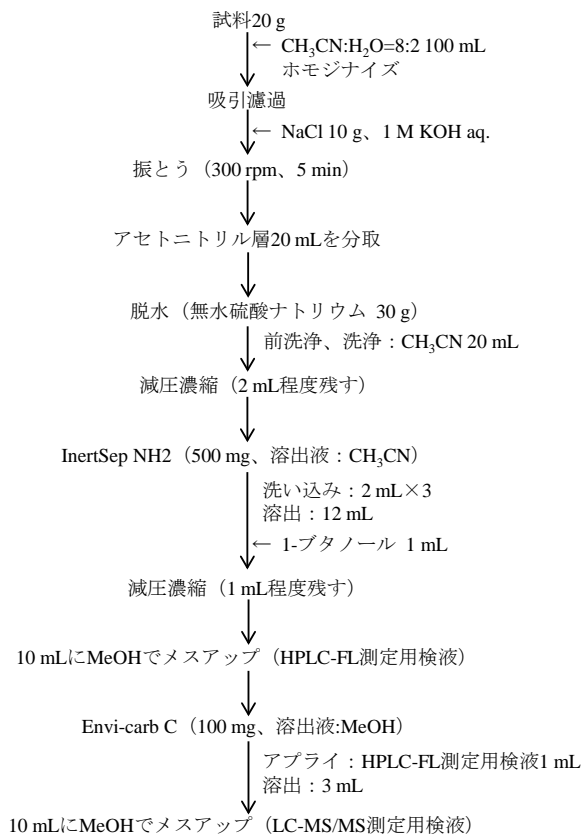


図2 分析手順

3 結果および考察

3・1 抽出 pH と回収率

分析法を検討する中で、抽出時の pH により回収率が大きく異なることが明らかとなった。そこで抽出時の pH と回収率について検討を行った (表3)。

検討は pH4 (pH 調整なし)、pH7、pH10 の3種類で行った。その結果、pH を塩基性に傾けるに従って回収率が向上することが明らかとなった。特に TBZ、IMZ、AZX は pH の影響を受けやすく、これはピリミジン環やイミダゾール環などの含窒素複素環を構造に持ち、塩基性化合物であることが要因であると考えられる。また、液性を塩基性に調整する際には作物の種類や同じ作物でも個体差の影響が有ることが明らかとなったため、大過剰の塩基を加え毎回 pH を確認する必要がある。

また、TBZ と OPP は LC-MS/MS、HPLC-FL どちらの装置でも測定可能であるため、測定結果の比較を行った。その結果、回収率に違いがみられ、原因として試料由来のマトリックス成分の影響が考えられた。

3・2 固相精製条件の検討

当所で従来用いていた固相精製法は ENVI-Carb/NH2 を使用し、アセトニトリル：トルエン混合溶媒を溶離液とし

た方法であった。従来法は精製効果が高い方法であったが、溶離液にトルエンを使用するため、図3に示すように HPLC-FL 測定時にトルエンが妨害ピークとなること、またトルエンを除去する目的で濃縮乾固すると揮発性の高い DP の回収率が大幅に低下することが問題であった。

一方で、NH2 カラムのみでの精製はトルエンを使用せずとも全ての化合物の溶出が可能であったが、色素がほとんど除去できなかった。また、ENVI-Carb/NH2 を使用しトルエンを用いない条件での精製では色素は除去できるが平面性の高い TBZ がグラファイトカーボンに強く保持され溶出しにくいことが明らかとなった。また、エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル (PSA) やオクタデシルシリル化シリカゲル (C18) などの固相精製も検討したが、いずれも色素を除去できなかった。

これらの結果から、色素を除去できるグラファイトカーボンカラムを用いて、トルエンを使用せずに精製する方法を見出す必要があると考えられた。

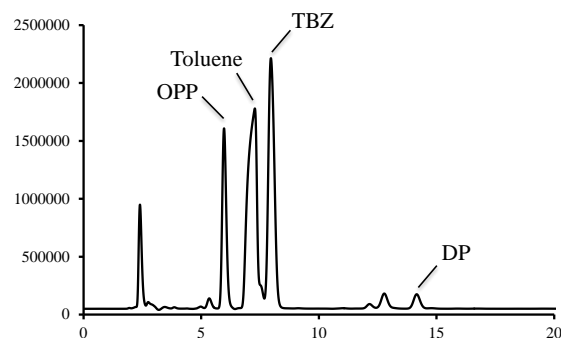


図3 精製にトルエンを用いたクロマトグラム

従来法で見出された問題点の解決策として、保持力の小さい (表面積の小さい) グラファイトカーボン (ENVI-Carb C) の使用が有効であるか検討した。InertSep NH2 のみの

精製と InertSep NH2 に続いて ENVI-Carb C で精製を行った時の回収率を表 4 に示す。

ENVI-Carb C は従来用いていた Envi-Carb/NH2 と同様に色素を除去できた。さらに、トルエンを使用することなくメタノールのみで全ての防かび剤の溶出が可能であった。

LC-MS/MS で測定した成分について回収率を比較すると若干ではあるが ENVI-Carb C を併用して精製した方が理論値に近い結果を与える傾向が見られた。また、精製度を高めることにより質量分析装置に与える負荷も軽減できると考えられた。一方で、HPLC-FL で測定した成分については ENVI-Carb C を併用しても回収率が変わらない又は若干減少することが明らかとなった。蛍光検出器は一般的に高感度であり、励起波長と蛍光波長は測定成分に合わせた波長を選択しているため選択性が高く、色素などの夾雑物が存在していても精度良く測定できたと考えられる。

これらの結果を踏まえ、NH2 のみで精製した検液を HPLC-FL 測定用検液とし、続いて ENVI-Carb C で精製した検液を LC-MS/MS 測定用検液とすることにした。

表 4 ENVI-Carb C の効果

#### LC-MS/MS 測定対象

精製法	InertSep NH2		InertSep NH2→ENVI-Carb C	
	0.5 µg/g (回収率,%)	5.0 µg/g (回収率,%)	0.5 µg/g (回収率,%)	5.0 µg/g (回収率,%)
TBZ	81.9	106.3	84.4	100.5
IMZ	94.2	110.9	103.2	106.3
PYR	94.1	106.6	102.1	98.9
AZX	80.1	104.1	89.2	101.9
OPP	98.2	95.4	101.5	91.3
FLD	107.2	106.4	108.0	107.6

#### HPLC-FL 測定対象

精製法	InertSep NH2		InertSep NH2→ENVI-Carb C	
	0.5 µg/g (回収率,%)	5.0 µg/g (回収率,%)	0.5 µg/g (回収率,%)	5.0 µg/g (回収率,%)
TBZ	91.3	90.9	82.4	92.7
OPP	111.6	94.8	105.7	97.8
DP	91.6	88.3	82.5	91.0

### 3・3 検量線

質量分析装置を用いた測定では、試料由来のマトリックスが目的成分のイオン化に影響を与えるイオンサプレッションやイオンエンハンスメントと呼ばれる現象が起こり、定量精度に影響を与えることが知られている。そこで、標準品を溶媒で希釈して調製した標準液 (std 溶液) と std 溶液にマトリックスを含有させた標準液 (M std 溶液) で定量結果に違いが表れるか確認を行った。試料としてグレープフルーツ、バナナの 2 種類の作物を用いた結果を表 5 に示す。

その結果、std 溶液、M std 溶液いずれの標準溶液を用い

ても多くの場合良好に定量できることが明らかとなった。しかし、バナナを用いて行った添加回収試験 (添加濃度 5.0 µg/g) において PYR、AZX は std 溶液で定量すると回収率がガイドラインの目標値上限 (120 %) を超過するが、M std 溶液で定量すると目標値 (70-120 %) に収まる結果が得られた。これらの結果を踏まえ、M std 溶液を用いて定量を行った方が精度の高い定量結果が得られると考えられた。

表 5 定量に与えるマトリックス効果

#### グレープフルーツ

検量線	0.5 µg/g		5.0 µg/g	
	std溶液 (回収率,%)	M std溶液 (回収率,%)	std溶液 (回収率,%)	M std溶液 (回収率,%)
TBZ	65.2	78.3	84.1	101.3
IMZ	102.5	104.1	100.6	102.1
PYR	95.2	92.3	98.7	95.7
AZX	102.2	107.6	99.6	104.9
OPP	114.7	102.7	105.6	100.3
FLD	109.8	108.1	103.0	101.4

#### バナナ

検量線	0.5 µg/g		5.0 µg/g	
	std溶液 (回収率,%)	M std溶液 (回収率,%)	std溶液 (回収率,%)	M std溶液 (回収率,%)
TBZ	78.0	75.2	75.2	75.7
IMZ	99.4	97.1	136.2	119.0
PYR	100.2	99.1	124.5	107.1
AZX	106.2	103.5	136.6	115.6
OPP	107.3	105.2	110.4	108.9
FLD	117.0	111.9	114.0	108.2

### 3・4 妥当性評価

開発した分析法の分析精度を評価するため、妥当性評価を実施した。結果を表 6 に示す。

LC-MS/MS、HPLC-FL どちらでも測定可能であった OPP、TBZ について精度の比較を行うと HPLC-FL を用いた方がいずれも精度の高い結果が得られた。これは ENVI Carb-C による精製工程がないため分析操作にともなう損失が少ないこと、また、蛍光分析法であるため質量分析装置を用いた方法で問題となるイオン化効率などが排除できたことが精度の向上に繋がったものと考えられた。これらの結果から、対象成分に適した測定法を選択することで、全ての項目で妥当性評価の目標値に適合する結果を得ることができ、本分析法の精度を確認することができた。

### 4 まとめ

本研究では防かび剤 7 種類の分析法開発と妥当性評価を実施し、以下の結果が得られた。

まず、分析法開発では、試料から防かび剤成分を抽出する際の pH が重要であり、十分な塩基性とする事で回収率が向上することが分かった。また精製では、ENVI-Carb C

を用いることで従来法の問題点であったトルエンを使用せずに精製可能な方法を見出し、色素等の影響を軽減することができた。

開発した分析法の分析精度を評価するため妥当性評価を実施した。IMZ、PYR、AZX 及び FLD は LC-MS/MS による測定対象成分とし、これら以外は HPLC-FL により測定したところ、0.5 µg/g 添加時の回収率は 74.4- 107.5 % であり、5.0 µg/g 添加時の回収率は 80.5-117.4 % であった。併行精度、室内精度についてもガイドラインの許容範囲内であり、全ての物質について妥当性評価の目標値に適合す

る結果を得た。このことから、本分析法は行政検査にも対応できる精度を有することが分かった。

#### 文献

- 1) 社団法人 日本食品衛生協会：食品衛生検査指針 残留農薬編、2003、 P132-139、P277-285、P671-676
- 2) 厚生労働省：食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について、食安発1224第1号、平成22年12月24日

表6 妥当性評価結果のまとめ

#### グレープフルーツの妥当性評価結果

使用機器	測定項目	添加濃度 0.5 µg/g			添加濃度 5.0 µg/g		
		真度 (%)	併行精度 (RSD,%)	室内精度 (RSD,%)	真度 (%)	併行精度 (RSD,%)	室内精度 (RSD,%)
LC-MS/MS	TBZ	74.3	4.8	6.5	105.8	11.0	8.5
	IMZ	91.2	3.1	9.7	103.0	3.2	3.6
	PYR	85.7	3.7	7.2	95.8	5.8	5.5
	AZX	91.5	3.6	12.2	104.8	2.5	3.4
	OPP	85.4	13.9	17.1	103.5	10.8	8.3
	FLD	92.9	3.7	9.1	102.5	4.4	4.7
HPLC-FL	OPP	103.2	6.6	10.0	94.8	2.7	3.6
	TBZ	94.8	3.9	3.6	82.7	9.6	9.7
	DP	74.4	5.6	9.7	80.5	3.6	7.5

#### バナナの妥当性評価結果

使用機器	測定項目	添加濃度 0.5 µg/g			添加濃度 5.0 µg/g		
		真度 (%)	併行精度 (RSD,%)	室内精度 (RSD,%)	真度 (%)	併行精度 (RSD,%)	室内精度 (RSD,%)
LC-MS/MS	TBZ	81.1	8.1	9.8	96.5	3.0	8.5
	IMZ	97.8	3.5	3.3	117.4	6.1	4.9
	PYR	96.3	4.4	5.6	111.2	3.7	4.4
	AZX	101.8	4.7	5.4	114.0	3.9	3.7
	OPP	104.3	7.7	7.6	100.2	8.6	6.6
	FLD	107.5	6.7	7.7	108.4	3.8	4.3
HPLC-FL	OPP	97.3	4.6	7.9	103.2	3.3	4.0
	TBZ	94.2	1.9	4.4	103.0	3.1	4.1
	DP	84.8	5.4	5.3	88.9	4.9	6.0

(英文要旨)

## **Development and Validation of Analytical Method for fungicides in fruit**

**Toshitaka KOGISO, Kanako NAKANISHI, Yoriko SHINTANI, Satoko NAGASHIMA,  
Koji TAKAHASHI, Hironori HIRAKAWA, Tsuguhide HORI, Jumboku KAJIWARA**

*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,*

*Mukaizano 39, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan*

In recent years, seven fungicides(Diphenyl, Thiabendazole, ortho-Phenylphenol, Imazalil, Fludioxonil, Azoxystrobin, Pyrimethanil) becomes analysis target. In the present study, a method was developed for simultaneous analysis of seven fungicides used on fruit. We have previously developed a method for four of these fungicides but it could not be extended to analysis of the seven fungicides. This was because our previous method used toluene as the eluent of solid-phase purification, which decreased recovery of highly volatile components because of its high boiling point and overlapped with the peaks for the other fungicides. We found that combination of two solid-phase columns for pretreatment gave satisfactory purification without using toluene. The method was validated for the simultaneous analyses of the seven fungicides on grapefruit and bananas. The developed method was valid for all seven fungicides.

[Key words ; Fungicides, Solid-phase purification, LC-MS/MS, HPLC-FL, Validation study]