

輸入果実に残留する防かび剤の一斉分析法の検討

Study on a Simple Analytical Method for Fungicides in Imported Fruits

氏家 あけみ 紙本 佳奈 上田 淳司 安永 恵
Akemi UJIKE Kana KAMIMOTO Atsushi UETA Megumi YASUNAGA

要 旨

近年、防かび剤として3物質が追加になり、合計7物質が使用可能となった。しかし追加分については各々個別の分析法で対応することになっており、測定に多くの人員と時間を要していた。そこで県内で流通している輸入果実4種類について、一斉分析法の検討を行い、妥当性評価を実施したところ、回収率、併行精度、室内精度ともに概ね良好な結果となった。今後、通常の検査業務での省力化や、緊急時の対応の迅速化に貢献できると思われる。

キーワード：輸入果実 防かび剤 イマザリル チアベンダゾール ジフェニル オルトフェニルフェノール
フルジオキシニル アゾキシストロビン ピリメタニル LC/MS/MS 一斉分析法

I はじめに

食品添加物として使用が認められている防かび剤は、長年イマザリル(IMZ)、チアベンダゾール(TBZ)、オルトフェニルフェノール(OPP)、ジフェニル(DP)の4物質であったが、最近フルジオキシニル(FI)、アゾキシストロビン(Az)、ピリメタニル(Py)が加わり7物質になった。追加になった3物質の分析法については、個別に残留農薬の通知法¹⁾を参照することになっており、非常に時間がかかっていた。そこで今回、各々性質の異なる7物質について一斉分析法を検討し、妥当性評価を実施したので結果を報告する。

II 方法

1 試料

県内で市販されていた柑橘類(グレープフルーツ、レモン、オレンジ)、バナナの4品目のうち防かび剤不使用のものを用いた。

2 試薬

(1) 標準原液：IMZ、TBZ、OPP、DP、FI、Az、Pyの各標準品を10.0mg精秤し、メタノール10mlで溶解して1000 μ g/mlとした。

(2) 添加用標準液：柑橘類については、TBZ、OPP、DP、FI、Az、Py各100 μ g/ml、IMZ 50 μ g/mlになるように標準原液を希釈混合した。バナナ(全体)については、OPP、DP、FI 0.1 μ g/ml、Py 1 μ g/ml、IMZ 20 μ g/ml、TBZ、Az 30 μ g/mlになるように、バナナ

(果肉)については、TBZ 4 μ g/mlになるように希釈混合した。各々0.5mlを試料5gに添加した。なお、添加量については、DP以外は基準値に基づいて設定した。

3 分析方法

試料5gに水5mlを加え、pH調製した後STQ法²⁾により抽出を行い、C18(1g)、GC/NH₂(500mg/500mg)ミニカラムで精製、アセトン：ヘキサン(15:85)、トルエン：アセトニトリル(1:3)で2分画に溶出した。各分画を減圧濃縮し、窒素で溶媒除去させ、メタノール3mlに溶解した。適宜希釈し、液体クロマトグラフ(HPLC)及び液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計(LC/MS/MS)で測定した。アセトン：ヘキサン分画には1-ブタノールを加えて減圧濃縮した。分析法のフローチャートを図1に示す。

4 装置及び測定条件

DPについては、HPLC(蛍光)で、IMZ、TBZ、OPP、FI、Az、PyについてはLC/MS/MSで測定した。各々の測定条件は表1、表2に示した。

III 結果

妥当性評価の目標値を表3に、結果を表4に示す。バナナ、オレンジについては、7物質全てについて、真度(回収率)、併行精度、室内精度共に良好な結果となった。レモン、グレープフルーツについてはTBZの真度が、54.9%、59.4%となり70%に届かなかったが、その他の6物質については全て良好な結果となった。

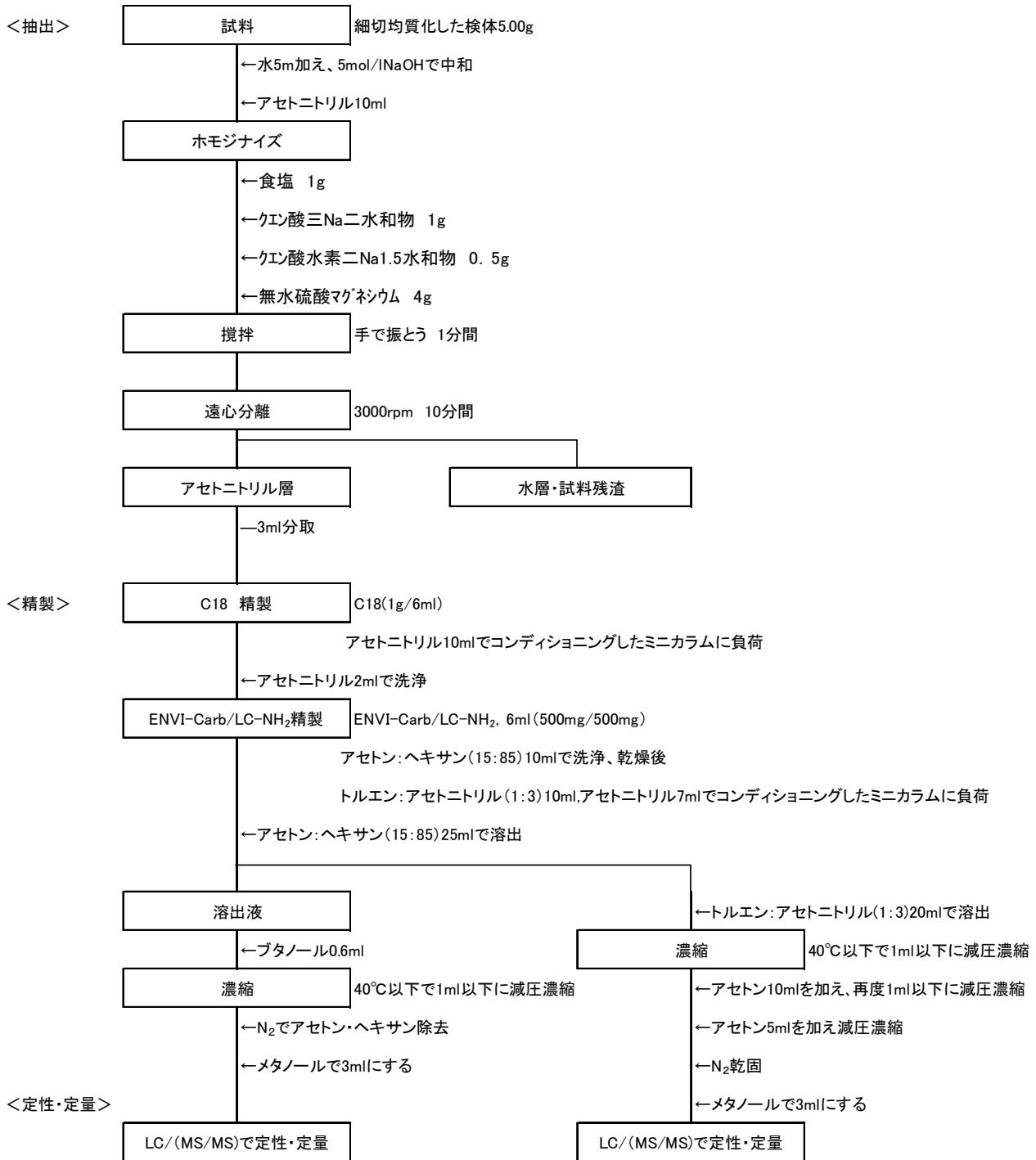


図1 分析法フローチャート

表1 HPLCの測定条件

メーカー	: 島津LC-10ADvp (紫外部吸収検出器及び蛍光検出器付き)
カラム	: Inertsil ODS-80A 5 μ m 4.6 \times 250mm
移動相	: 0.01M SDS in アセトニトリル:メタノール:水 (40:25:35) (pH2.4)
注入量	: 10 μ l
カラム温度	: 40°C
流速	: 1.0ml/min
測定波長	: UV230nm、(蛍光) Ex. 285nm Em. 325nm

表2 LC/MS/MSの測定条件

メーカー	: Waters Acquity Ultra Performance LC/MS/MS				
カラム	: ACQUITY UPLC BEH C18(1.7 μ m 2.1mm \times 100mm)				
移動相	: A:5mmol/l 酢酸アンモニウム in 水 B:5mmol/l 酢酸アンモニウム in メタノール				
グラジエント条件	: B : 10% \rightarrow 80% (5min) \rightarrow 90% (6min) \rightarrow 90% (8min) \rightarrow 10%(9min) \rightarrow STOP (11min)				
流量	: 0.3ml/min				
カラム温度	: 40 $^{\circ}$ C				
注入量	: 5 μ l				
イオン化モード	: ESI(+), ESI(-)				
MRM条件		Pre>Pro	Cone (V)	CE (V)	イオン化法
	TBZ	202>175	50	22	ESI(+)
	Az	404>372	25	15	ESI(+)
	Py	200>107	40	20	ESI(+)
	OPP	169>169	50	2	ESI(-)
	FI	247>180	50	20	ESI(-)
	IMZ	297>159	40	20	ESI(+)

表3 妥当性評価の目標値

濃度 (μ g/ml)	真度 (回収率%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
0.01<~ \leq 0.01	70~120	<25	<30
0.01<~ \leq 0.1	70~120	<15	<20
0.1<~	70~120	<10	<15

IV 考察

1 抽出方法について

以前、4物質については、東京都が開発した一斉法³⁾を参考に、酢酸エチルを使って抽出を実施していたが、今回は、pHや油分の影響を受けにくいアセトニトリル

で抽出を行った。また少量の溶媒で、塩析、脱水も同時にできるSTQ法²⁾を採用し省力化を図った。

2 測定機器について

まずHPLC(UV、蛍光)で測定を試みたが、DP、IMZ以外は、分離が不十分であったり、妨害ピークが大きく測定が困難であった。そこでLC/MS/MSによる一斉分析を検討したが、DPがESI法(APCI法)ではイオン化できず測定が困難であった。よって、DPはHPLC(蛍光)で、残りの6物質についてはLC/MS/MSで測定することにした。

3 精製方法について

一般に、防かび剤の分析には強陽イオン交換ミニカラムを用いた精製法が多く報告されているが、いずれも溶出にSDS(イオンペア剤)を含有する緩衝液が使用

表4 妥当性評価の結果

		DP	TBZ	Az	Py	OPP	FI	IMZ
オレンジ	真度(回収率%)	85.6	77.3	103.4	95.6	100.5	104.9	97.8
	併行精度(RSD%)	1.4	9.8	3.9	3.6	4.0	5.1	4.0
	室内精度(RSD%)	1.7	8.5	6.0	4.1	5.3	6.7	4.8
レモン	真度(回収率%)	87.2	54.9	102.7	97.7	95.1	99.8	96.7
	併行精度(RSD%)	1.3	8.8	2.2	2.2	2.2	2.0	2.7
	室内精度(RSD%)	2.1	14.8	2.6	2.7	1.8	1.7	4.0
グレープ フルーツ	真度(回収率%)	82.1	59.4	101.7	101.0	89.1	96.1	92.6
	併行精度(RSD%)	3.6	4.4	6.7	4.5	6.3	6.6	3.3
	室内精度(RSD%)	3.1	8.0	6.3	0.1	5.4	5.9	4.0
バナナ (全体)	真度(回収率%)	71.0	100.3	115.2	108.3	91.3	105.1	117.0
	併行精度(RSD%)	14.9	7.2	6.7	4.8	7.8	9.9	7.2
	室内精度(RSD%)	20.2	6.0	6.4	5.7	9.1	9.1	6.5
バナナ (果肉)	真度(回収率%)	-	80.1	-	-	-	-	-
	併行精度(RSD%)	-	2.9	-	-	-	-	-
	室内精度(RSD%)	-	3.6	-	-	-	-	-

されており、LC/MS/MS では測定ができない。そこで通知法¹⁾の「LC/MS による農薬等の一斉分析法 I」を参考に、C18 及び GC/NH₂ ミニカラムを用いることにした。

4 ミニカラムからの溶出溶媒について

通知法¹⁾によりトルエン:アセトニトリル(1:3)で溶出した場合、減圧濃縮の際に揮発防止のため加えた1-ブタノールがトルエンと共沸してしまい、DP、OPP の損失が大きくなった。またアセトン:ヘキサン(15:85)で溶出させると、今度は TBZ が全く溶出しなくなった。そこでまずアセトン:ヘキサン(15:85)で DP、OPP 等を溶出させ1-ブタノールを加え減圧濃縮を行い、その後トルエン:アセトニトリル(1:3)で TBZ 等を溶出させる方法を採用することにした。

V まとめ

輸入柑橘類3種とバナナについて、防かび剤7種の一斉分析について検討し、妥当性評価を実施した。DP については、HPLC(蛍光)で、他の6種については、LC/MS/MS で一斉測定した。TBZ で回収率がやや低いもの

もあったが、概ね良好な結果となった。新たに追加になった3物質 F1、Az、Py については、各々個別の分析法で実施し、分析に多くの時間を要していたが、今回検討した一斉分析法により、今後の検査業務の省力化に貢献できると思われる。

文献

- 1) 「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法」平成17年1月24日付け食安発第0124001号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知
- 2) 「残留農薬一斉分析 STQ 法」(株)アイスティサイエンス アプリケーションノート
- 3) 中里光男ら: 高速液体クロマトグラフィーによる柑橘類中のイマザリル、ジフェニル、チアベンダゾール、オルトフェニルフェノール及びバナナ中のイマザリル、チアベンダゾールの分析, 衛生化学, **41(5)**, 392-397, (1995)

Abstract

In recent years, three substances were added as fungicides, and a total of seven substances became usable. However, taking measurements took time and involved many people because, in regards to an additional substance, the measuring must be carried out respectively using individual analysis methods. Then, when the simultaneous analysis method was examined about four kinds of imported fruits which are circulating in the prefecture and validation of the results were carried out, they showed the recovery rate, repeatability, and indoor accuracy are generally good. From now on, it will seem that it can contribute to laborsaving on the usual inspection business, and speeding up of correspondences during an emergency.