

ノート

7 種防かび剤の一斉分析法についての考察

竹内 浩, 清水美緒*, 佐藤 誠**, 林 克弘, 山本昌宏, 吉村英基

A study on simultaneous determination for fungicides

Hiroshi TAKEUCHI, Mio SHIMIDZU, Makoto SATOH, Katsuhiko HAYASHI,
Masahiro YAMAMOTO and Hideki YOSHIMURA

これまでの 4 種防かび剤 (ジフェニル, オルトフェニルフェノール, チアベンダゾールおよびイマザリル) に新たに加わった 3 種防かび剤 (フルジオキシニル, アゾキシストロビンおよびピリメタニル) 計 7 物質について, HPLC-PDA および FL 法による一斉分析法を検討した. その結果, かんきつ類においてアゾキシストロビンの回収率が 70% を下回った以外は, 良好な結果となる分析法を作成した.

キーワード: 防かび剤, HPLC, フォトダイオードアレイ検出器, 蛍光検出器, 一斉分析

はじめに

かんきつ類やバナナなどの果実を輸入する際, 輸送・貯蔵中のかびの発生を防ぐ目的で食品添加物として防かび剤の使用が認められている. 我が国では, 防かび剤として最初にジフェニル (DP) が昭和 46 年に指定され, 昭和 52 年にオルトフェニルフェノール (OPP), 昭和 53 年にチアベンダゾール (TBZ), 平成 4 年にイマザリル (IMZ) が指定され, 当所でも上記 4 物質について既報¹⁾の一斉分析法を用いて検査を実施してきた. その後, 平成 23 年にフルジオキシニル (FLD), 平成 25 年にアゾキシストロビン (AZX) およびピリメタニル (PYR) が新たに指定された. これら 7 物質に対する一斉分析法は厚生労働省から通知されており, 各分析機関が独自で検討を行っている. 文献によると DP および OPP は, LC/MS(MS)のエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) では, 感度が低いために HPLC-FL で測定し, 他の成分を LC/MS(MS)で測定する分析機関が多い^{2~4)}. その他の方法として, 大阪市が OPP, DP, PYR および FLD を GC/MS で, その他 3 物質を LC/MS/MS で測定する方法を報告している⁵⁾.

今回, 平成 23 年以降に指定された 3 物質を含む防かび剤 7 物質について, HPLC-FL (蛍光検出器) および HPLC-PDA (フォトダイオードアレイ検出器) を用いた一斉分析法を検討したので報告

する.

実験方法

1. 試料

県内の小売店で市販されていた, オレンジ, グレープフルーツ, レモンおよびバナナを用いた.

2. 試薬

1) 標準試薬

OPP は和光純薬工業(株)製の食品添加物試験用, DP は同社製の残留農薬試験用, AZX および TBZ は同社製 Traceable Reference Material, IMZ, PYR および FLD は同社製 Trace Sure[®]を用いた.

2) 有機溶媒

アセトニトリルは和光純薬工業(株)製の高速液体クロマトグラフ用を用いた.

3) その他の試薬

塩化ナトリウム, くえん酸三ナトリウム二水和物, 水酸化ナトリウム, 無水硫酸マグネシウムおよびりん酸二水素カリウムは和光純薬工業(株)製特級, くえん酸水素二ナトリウム 1.5 水和物は同社製一級を用いた. IMZ の精製には, Agilent Technologies(株)製 Bond Elut C18 (500 mg) を用い, 使用前にアセトニトリル 10 mL および水 10 mL でコンディショニングを行った.

* 三重県医療保健部ライフイノベーション課

** 三重県桑名保健所

3. 標準溶液

IMZ, OPP, DP および TBZ は、約 20 mg を精密に量り、アセトニトリルに溶解し、全量を 100 mL とした。AZX, PYR および FLD は、約 10 mg を精密に量り、アセトニトリルに溶解し、全量を 100 mL とした。IMZ はアセトニトリル、その他の成分はアセトニトリル・水 (1+1) で段階的に希釈して用いた。

4. 装置および測定条件

1) HPLC-FL

液体クロマトグラフ：(株)島津製作所製 Prominence システム

蛍光検出器：同社製 RF-20A_{XS}

カラム：(一財)化学物質評価研究機構製 L-column ODS (4.6 mm i.d.×150 mm, 5 μm)

カラム槽温度：40℃

移動相 A 液：0.01 mol/L りん酸二水素カリウム試液

B 液：メタノール

流速：1.0 mL/min

(測定条件 1)

アイソクラティック条件：A : B = 48 : 52

測定波長：

チャンネル 1

TBZ：励起波長 297 nm 蛍光波長 351 nm

AZX：励起波長 280 nm 蛍光波長 325 nm

FLD：励起波長 270 nm 蛍光波長 325 nm

チャンネル 2

OPP：励起波長 286 nm 蛍光波長 345 nm

PYR：励起波長 270 nm 蛍光波長 450 nm

試料注入量：30 μL

(測定条件 2)

アイソクラティック条件：A : B = 22 : 78

測定波長：

DP：励起波長 248 nm 蛍光波長 314 nm

試料注入量：10 μL

2) HPLC-PDA

液体クロマトグラフ：(株)島津製作所製 LC-10A_{VP} システム

フォトダイオードアレイ検出器：同社製 SPD-M10A_{VP}

カラム：(一財)化学物質評価研究機構製 L-column ODS

(4.6 mm i.d.×150 mm, 5 μm)

カラム槽温度：40℃

移動相 A 液：0.01 mol/L りん酸二水素カリウム溶液

B 液：メタノール

アイソクラティック条件：A : B = 30 : 70

流速：1.0 mL/min

測定波長：230 nm

試料注入量：20 μL

5. 試験溶液の調製法

均一化した試料 5.0 g に水 5 mL および 10 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 1 mL を加えて混和し、アセトニトリル 10 mL を加えて 10 分間振とうした。これに塩化ナトリウム 1 g、くえん酸三ナトリウム二水和物 1 g、くえん酸水素二ナトリウム 1.5 水和物 0.5 g および無水硫酸マグネシウム 4 g を加えて 1 分間振とうした後、3,000 rpm で 5 分間遠心分離し、アセトニトリル層を得た。アセトニトリル層 0.5 mL を分取し、水を加えて 1 mL に定容後、15,000 rpm で 5 分間遠心分離した上澄み液を TBZ, AZX, FLD, OPP, PYR (かんきつ類のみ) および DP の試験溶液とし、HPLC-FL で測定した。バナナの PYR については、アセトニトリル層 2 mL を分取し、窒素吹付濃縮装置で 0.5 mL 以下まで濃縮した。アセトニトリルを加えて 0.5 mL とし、水を加えて 1 mL に定容後、15,000 rpm で 5 分間遠心分離した上澄み液を試験溶液とし、HPLC-FL で測定をした。

IMZ については、既報¹⁾に準拠した。すなわち、上記の 3,000 rpm で 5 分間遠心分離して得られたアセトニトリル層 5 mL を分取し、40℃以下でロータリーエバポレーターを用い、減圧乾固した。残留物にアセトニトリル・0.1 mol/L りん酸二水素カリウム (1+9) 10 mL を加え、超音波溶解し、Bond Elut C18 に全量負荷した。試料容器をアセトニトリル・0.1 mol/L りん酸二水素カリウム (1+9) 5 mL で 2 回洗浄し、その洗液もカラムに負荷した。次いで、水 5 mL およびアセトニトリル・水 (7+3) 5 mL で洗浄し、アセトニトリル・0.01 mol/L りん酸二水素カリウム (7+3) 4 mL で IMZ を溶出した。溶出液に水を加えて 5 mL に定容後、一部を 15,000 rpm で 5 分間遠心分離した。得られた上澄み液を試験溶液とし、HPLC-PDA で測定した。

結果および考察

1. 測定条件の検討

移動相および分析カラムは 4. 装置および測定条件に記載したものをを用いた。検出器について、TBZ, OPP および DP は蛍光検出器、IMZ はフォトダイオードアレイ検出器を用いた。AZX, FLD および PYR については、フォトダイオードアレイ検出器よりも夾雑成分の影響を受けにくい蛍光検出器を用いて検討した。励起波長また蛍光波長の最適化には、一方の波長を固定し他方の波長を複数条件設定することで、各成分のピーク面積値が最大となる波長をそれぞれ求め、TBZ およ

びOPPを含めた5成分同時測定可能な条件を設定した。詳細については、4.装置および測定条件に記載した。

AZX, FLD および PYR は, TBZ, OPP および DP に比べて感度が劣るため, 注入量を変更して感度を得る検討を行った。注入量 10 μL から 50 μL まで測定したところ, 20 μL では, 注入量に比例してピーク高さが改善した。30 μL では, ピーク高さは注入量に比例するほど高くはならなかったが, ピーク形状は良好であった。40 μL 以上では, 保持の弱い TBZ においてピーク形状の悪化が顕著となった。このことから DP および IMZ 以外の5成分は, 注入量 30 μL とした。

2. 添加回収試験

オレンジ, グレープフルーツ, レモンおよびバナナ (全体) に防かび剤を添加し回収試験を行った。オレンジ等のかんきつ類への防かび剤の添加量は, DP は 10 $\mu\text{g/g}$ としそれ以外は食品添加物の使用基準に基づいて設定 (TBZ, PYR, OPP, FLD および AZX : 10 $\mu\text{g/g}$, IMZ : 5 $\mu\text{g/g}$) した。バナナ (全体) への添加量は, TBZ および IMZ は食品添加物の使用基準, AZX および PYR は残留農薬基準, FLD, OPP および DP は当試験法の報告下限値に基づいて設定 (TBZ : 3 $\mu\text{g/g}$, IMZ : 2 $\mu\text{g/g}$, AZX : 3 $\mu\text{g/g}$, PYR : 0.1 $\mu\text{g/g}$, FLD : 1 $\mu\text{g/g}$, OPP および DP : 0.04 $\mu\text{g/g}$) した。添加用標準液は, 0.5 mL が添加量になるように調製した。

妥当性評価の目標値⁶⁾を表1に, 結果を表2に示す。オレンジ, グレープフルーツおよびレモンの AZX が, 62.5%, 61.0%, 65.5% となり 70% に届かなかった。オレンジ, グレープフルーツおよびレモンの AZX 以外の6物質およびバナナ (全体) の7物質については全て良好な結果となった。

表1 妥当性評価の目標値

濃度 (ppm)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
≤ 0.001	70~120	30 >	35 >
0.001 < ~ ≤ 0.01	70~120	25 >	30 >
0.01 < ~ ≤ 0.1	70~120	15 >	20 >
0.1 <	70~120	10 >	15 >

表2 妥当性評価の結果

		IMZ	TBZ	AZX	FLD	OPP	PYR	DP
オレンジ	真度 (回収率%)	77.7	86.1	62.5	88.8	90.0	87.5	78.8
	併行精度 (RSD%)	1.7	1.0	4.1	0.9	1.0	1.1	1.3
	室内精度 (RSD%)	3.1	1.0	6.8	1.5	1.2	1.3	2.2
グレープフルーツ	真度 (回収率%)	77.0	90.0	61.0	88.4	90.5	81.8	77.9
	併行精度 (RSD%)	1.6	1.5	1.7	1.5	2.1	1.5	2.3
	室内精度 (RSD%)	4.4	1.9	7.4	1.6	2.5	1.4	2.3
レモン	真度 (回収率%)	77.0	88.6	65.5	85.0	89.5	87.1	76.6
	併行精度 (RSD%)	1.4	1.5	2.5	1.4	1.6	2.2	2.7
	室内精度 (RSD%)	4.9	1.1	6.7	1.2	1.3	1.9	3.2
バナナ	真度 (回収率%)	76.8	89.8	74.5	91.4	86.0	95.3	82.5
	併行精度 (RSD%)	1.9	1.0	1.2	1.4	4.3	6.0	1.5
	室内精度 (RSD%)	2.6	1.3	5.0	1.4	5.7	11.7	4.2

まとめ

1. AZX, FLD および PYR について, HPLC-FL の励起・蛍光波長を最適化するとともに注入量を 30 μL とし, TBZ および OPP を含めた5成分同時測定可能な条件を設定した。DP については, 上記5成分に比べ脂溶性が高いため, DP 単独で測定する条件を設定した。IMZ については, 既報に従い HPLC-PDA で測定した。
2. HPLC-PDA および FL を用いて, 防かび剤7種の一斉分析について検討し, オレンジ, グレープフルーツおよびレモンのかんきつ類3種とバナナ (全体) の妥当性評価を実施した。かんきつ類において AZX の回収率が 60% 台とやや低くなったが, それ以外の6物質およびバナナ (全体) では良好な結果が得られた。

文献

- 1) 小川正彦, 坂井 亨, 大熊和行, 佐藤 誠, 志村 恭子: HPLC 法による柑橘類およびバナナ中のポストハーベスト農薬の簡易系統分析法, 三重県衛生研究所年報, **42**, 111-117 (1996).
- 2) 氏家あけみ, 紙本佳奈, 上田淳司, 安永 恵: 輸入果実に残留する防かび剤の一斉分析法の検討, 香川県環境保健研究センター所報, **13**, 58-61 (2014).
- 3) 吉岡直樹, 林 幸子, 稲田忠明: かんきつ類における7種防かび剤の迅速分析法の検討, 食品衛生学雑誌, **56**, 228-232 (2015).
- 4) 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: 果実中防かび剤の分析法開発および妥当性評価, 福岡県保健環境研究所年報, **43**, 76-81 (2016).
- 5) 佐藤 環, 宮本伊織, 角谷直哉, 山野哲夫: かんきつ類中防かび剤の迅速一斉試験法の妥当性評価, 大阪市立環境科学研究所年報, **77**, 31-35 (2015).
- 6) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知: 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