

## かんきつ類中防かび剤の迅速一斉試験法の妥当性評価

佐藤 環、宮本伊織、角谷直哉、山野哲夫

## Validation Study on a Rapid and Simultaneous Method for Determination of Fungicide in Citrus Fruits

Tamaki SATO, Iori MIYAMOTO, Naoya KAKUTANI and Tetsuo YAMANO

## Abstract

A validation study was conducted on a rapid and simultaneous method for determination of fungicide in citrus fruits. Extraction was performed by the method known as the quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS) combined with a simple clean-up step with mini solid phase columns. The extract was analyzed by means of GC-MS or LC-MS/MS. The trueness of the method of seven fungicides on levels of Maximum Residue Limit in oranges was 86-104% with satisfactory repeatability and within-laboratory reproducibility. Furthermore, it was confirmed that this method to be applicable to grapefruits and lemons.

**Key words:** validation study, fungicide, QuEChERS, GC-MS, LC-MS/MS, citrus fruits

## I 緒言

輸入かんきつ類に用いられるポストハーベスト農薬は、国内では食品添加物の防かび剤として使用が認められている。かんきつ類に使用する防かび剤には、アゾキシストロビン (AZX)、イマザリル (IMZ)、オルトフェニルフェノール (OPP)、ジフェニル (DP)、チアベンダゾール (TBZ)、ピリメタニル (PYR)、フルジオキシニル (FLD) の 7 物質がある。

防かび剤の試験法については、IMZ、OPP、DP および TBZ の 4 物質は一斉試験法[1]、AZX、PYR および FLD の 3 物質は個別に、「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」[2]を参照することになっている。また、これらの試験法には厚生労働省通知に準じた妥当性評価[3]が求められている。

当所では、防かび剤を含む残留農薬の収去検査を実施している。その中でも、輸入かんきつ類中の防かび剤の検出頻度は高いため、迅速かつ正確な一斉分析が求められる。2003 年に残留農薬の迅速一斉試験法として Anastassiades らによって開発された QuEChERS 法[4]は、操作が簡便で分析時間の短縮化を図れる点から、近年広く普及してきており、国内においても改良法が報告されている[5]。この改良法は QuEChERS 法の抽出操作にミニ固相カラムによる精製を組み合わせることで精製効果を高めた方法であり、防かび剤の迅速かつ正確な一斉分析法として有用であると考え

えられる。そこで、QuEChERS 改良法を用いた、かんきつ類中防かび剤 7 物質の迅速一斉試験法の妥当性評価を行った結果について報告する。

## II 方法

## 1) 試料

防かび剤不使用オレンジ、グレープフルーツ及びレモン 500g をそれぞれミキサーを用いて細切均一化し試料とした。

## 2) 試薬

AZX、OPP、DP および FLD 標準品は和光純薬社製、IMZ 標準品は Dr.Enrenstorfer GmbH 社製、TBZ およびフェナンスレン-d<sub>10</sub> 標準品は関東化学社製、PYR 標準品は Accu Standard 社製を用いた。

アセトニトリル(残留農薬試験用)、トルエン(残留農薬試験用)、メタノール(HPLC 用)、蒸留水(HPLC 用)、酢酸(HPLC 用)、くえん酸三ナトリウム二水和物(特級)およびくえん酸水素二ナトリウム 1.5 水和物(特級)は関東化学社製を用いた。1mol/L 酢酸アンモニウム水溶液(HPLC 用)、塩化ナトリウム(特級)、ポリエチレングリコール(PEG)平均分子量 300 および無水硫酸マグネシウム(特級)は和光純薬社製を用いた。ぎ酸(HPLC 用)はナカライテック社製を用いた。

PTFE フィルター(13mmφ, 0.45μm)はアドバンテック社製を用いた。C18(30mg)、C18(50mg)、PSA(30mg)、

GC (20mg) ミニ固相カラムはアイステイサイエンス社製を用いた。

### 3) 装置および測定条件

OPP、DP、PYR および FLD の測定はガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC-MS)、AZX、IMZ および TBZ の測定は高速液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた。測定条件を以下に示した。

#### (1) GC-MS 測定条件

GC 装置は 7890A (Agilent 社製)、MS 装置は 5975C (Agilent 社製) を用いた。

分析カラムは Agilent 社製 HP-5MS UI (30m×0.25mm, i.d.0.25μm) を用いた。昇温条件は 100°C (1min) - 25°C/min → 120°C - 10°C/min - 310°C (15min) とし、ヘリウムガス流速: 1mL/min (コンスタントフロー)、注入口温度: 280°C、トランスファーライン温度: 300°C、注入量: 2 μL (スプリットレス)、イオン化法: EI (70eV)、イオン源温度: 280°C、四重極温度: 150°C、測定モード: SIM で測定した。各成分の SIM 条件は Table 1 に示した。

Table 1 Selected monitoring ions of GC-MS

Compound	Target Ion ( <i>m/z</i> )	Qualifier Ion ( <i>m/z</i> )		
OPP	170	169	141	115
DP	154	153	152	76
PYR	198	199	200	77
FLD	248	182	154	127

#### (2) LC-MS/MS 測定条件

HPLC 装置は Acquity (Waters 社製)、MS/MS 装置は Xevo TQ (Waters 社製) を用いた。

分析カラムは CERI 社製 L-column2 ODS (2.1×150mm, φ5μm)、移動相は A 液: 5mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液、B 液: 5mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノールを使用した。グラジエント条件は A/B (%): 95/5 - 1min - 50/50 - 9min - 2/98 (2.5min) とし、流速: 0.2 mL/min、注入量: 10 μL、イオン化法: ESI (+)、キャピラリー電圧: 1.5kV、脱溶媒ガス温度: 400°C、脱溶媒流量: 1000L/hr、測定モード: MRM で測定した。各成分の MRM 条件は Table 2 に示した。

Table 2 MRM transitions of LC-MS/MS

Compound	Target Ion ( <i>m/z</i> )	Qualifier Ion ( <i>m/z</i> )
AZX	404.1>371.9	404.1>328.9
IMZ	297.0>158.6	297.0>68.7
TBZ	201.8>174.7	201.8>130.6

### 4) 試験溶液の調製

試験溶液調製のフローチャートを Fig.1 に示した。試料 10g にアセトニトリル 10mL を加え、1 分間ホモジナイズ抽出を行った。塩化ナトリウム 1g、くえん酸三ナトリウム二水和物 1g、くえん酸水素二ナトリウム 1.5 水和物 0.5g、無水硫酸マグネシウム 4g を加え 1 分間振とうし、塩析および脱水を行った後、3000rpm で 5 分間遠心分離し、アセトニトリル層を得た。

OPP、DP、PYR および FLD の精製は、C18 (50mg) カラムにアセトニトリル層 1mL を負荷し、アセトニトリル 0.2mL で溶出した。負荷液と溶出液を合わせた全溶出液にトルエン 0.4mL を加え、無水硫酸マグネシウム 0.3g で脱水しながら GC (20mg)/PSA (30mg) 連結カラムに負荷し、トルエン:アセトニトリル (1:3) 混液 0.6mL で溶出した。最後に、負荷液と溶出液を合わせた全溶出液にフェナンスレン-d10 2μg および PEG 5mg を添加し、トルエン:アセトニトリル (1:1) 混液で 20mL に定容したものを試験溶液とし GC-MS 測定を行った。

AZX、IMZ および TBZ の精製は、C18 (30mg)/PSA (30mg) 連結カラムにアセトニトリル層 1mL を負荷し、0.4% ぎ酸メタノール 1mL で溶出した。負荷液と溶出液を合わせた全溶出液に水 0.5mL を加えて C18 (50mg) に負荷し、80%メタノール 1mL で溶出した。負荷液と溶出液を合わせた全溶出液を蒸留水で 10mL に定容後、アセトニトリル:0.4% ぎ酸メタノール:80%メタノール:水 (1:1:1:7) で 20 倍希釈した。この溶液をフィルターを通したものを試験溶液とし LC-MS/MS 測定を行った。

### 5) 添加回収試験

採取した試料に、試料中濃度として 10 μg/g (IMZ は 5 μg/g) となるように標準物質を添加し、上記に従い試験溶液の調製を行った。

### 6) 定量

GC-MS の検量線用標準溶液は、トルエン:アセトニトリル混液 (1:1) を用いて 5~1000 ng/mL の範囲で調製し、PEG は 250 μg/mL、フェナンスレン-d10 は 0.1 μg/mL となるように添加した。各標準物質濃度および内部標準物質に対するピーク面積比 (内標比) から検量線を作成し定量に用いた。

LC-MS/MS の検量線用標準溶液は、アセトニトリル:0.4% ぎ酸メタノール:80%メタノール:水 (1:1:1:7) 混液を用いて 0.5~100 ng/mL (IMZ は 0.25~50 ng/mL) の範囲で調製した。各標準物質濃度およびピーク面積から検量線を作成し定量に用いた。

定量下限は、検量線の最低濃度 (S/N 比 ≥ 10) と試験溶液調製時の希釈率から、試料中濃度として 0.1μg/g (IMZ は 0.05 μg/g) とした。また、定量に用いた全てのピークについて、定量イオンと確認イオンの強

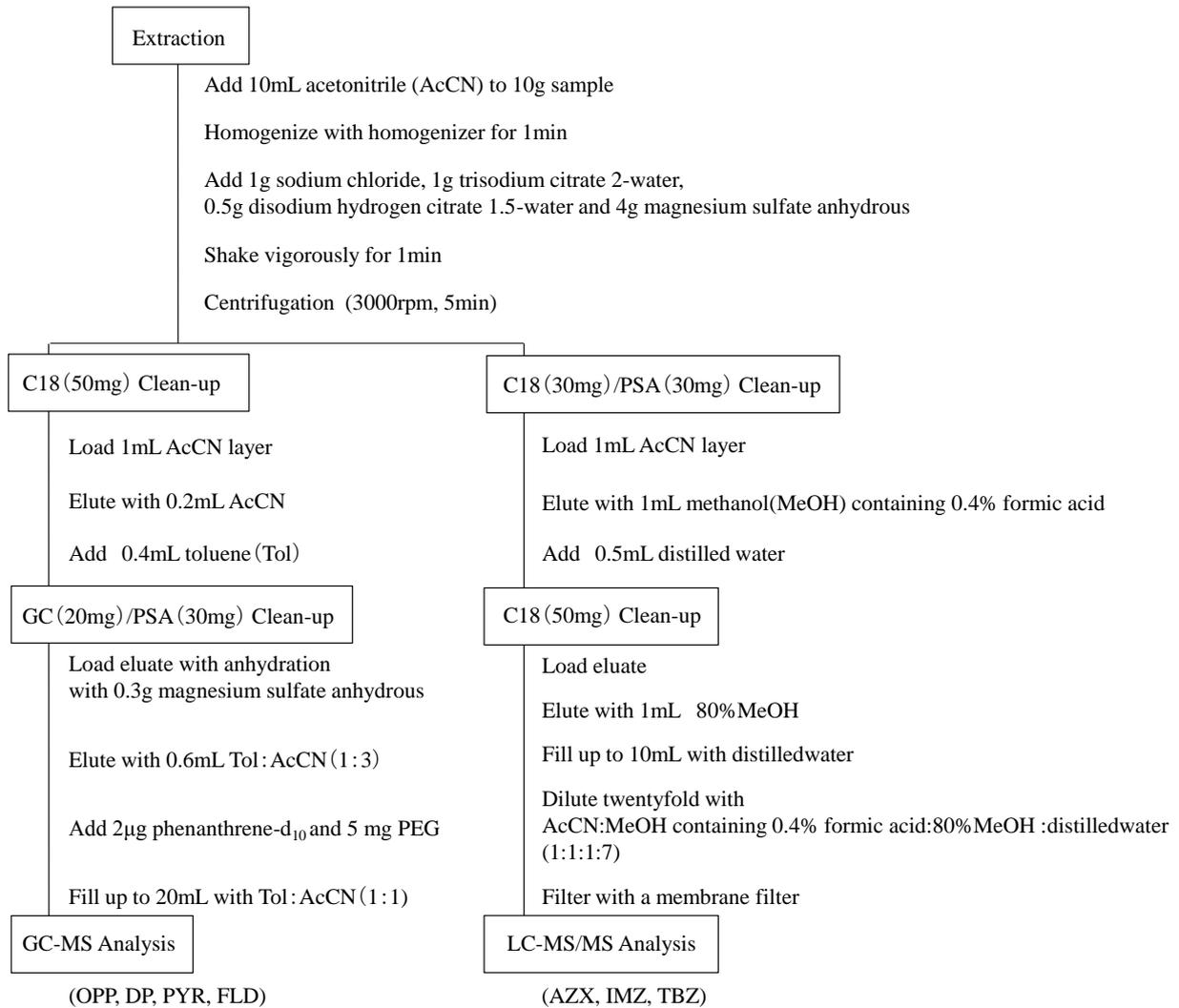


Fig.1 Analytical procedure of seven fungicides in citrus fruits

度の比率が標準溶液に対して±20%以内であることを確認した。

### 7) 妥当性評価

まず、オレンジ、グレープフルーツ、レモンのブランク試料の測定を行い、定量を妨害するピークの有無について確認した。

次に、オレンジを試料として、分析者3名が1日2併行で2日間の添加回収試験を行う枝分かれ試験を実施した。算出した添加回収率を用いて分散分析を行い、真度、併行精度および室内精度を評価した。

さらに類似の食品への適用性を評価するため、グレープフルーツおよびレモンを試料として添加回収試験を5併行で行い、真度および併行精度を評価した。

### 8) 試料マトリックスの測定への影響の確認

各物質の標準溶液(STD)の内標比(GC-MS測定物質)あるいはピーク面積(LC-MS/MS測定物質)に対する各試料マトリックス標準溶液(Matrix STD)の強度の

比率を算出し、試料マトリックスの測定への影響を確認した。確認濃度は、添加回収試験における添加濃度とした。

## III 結果及び考察

### 1) 妥当性評価

選択性を評価するため、ブランク試料を測定した際、オレンジ、グレープフルーツ、レモンいずれの試料についても測定物質に対する妨害ピークは認められなかった。

また、枝分かれ試験によるオレンジ試料の妥当性評価の結果をTable 3に示した。平均回収率は86~104%、併行精度は1.0~2.6%、室内精度は1.9~4.6%といずれも妥当性評価ガイドライン[3]の目標値である70~120%、10%未満、15%未満を満たしていた。以上のことから、本法のオレンジ中防かび剤試験法としての妥当性が確認された。

さらに、グレープフルーツ試料およびレモン試料の真度および併行精度の結果をTable 4に示した。グレー

Table 3 Validation result of the method in oranges

Compound	Trueness (%)	Repeatability (RSD%)	Within-laboratory reproducibility (RSD%)
AZX	104	2.6	3.0
IMZ	98	1.6	2.9
OPP	98	2.3	3.4
DP	97	2.5	4.1
TBZ	89	1.0	1.9
PYR	96	2.2	3.3
FLD	86	2.6	4.6

(3 analysts × 2 days, n=2)

Table 4 Trueness and repeatability estimated by recovery test in grapefruits and lemons

Compound	Grapefruits		Lemons	
	Trueness (%)	Repeatability (RSD%)	Trueness (%)	Repeatability (RSD%)
AZX	102	1.0	103	2.9
IMZ	98	0.83	104	1.5
OPP	96	0.59	96	2.0
DP	91	1.3	90	1.8
TBZ	71	1.0	99	0.46
PYR	89	1.1	87	2.2
FLD	103	1.9	95	2.6

(n=5)

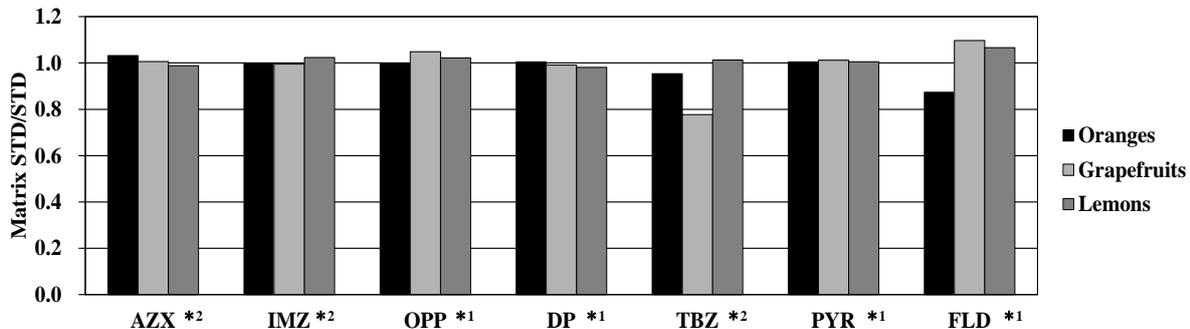


Fig.2 The intensity ratios of matrix-matched standards to standards in solvent

\*1 : GC-MS (Peak Area/Internal Standard(IS) Peak Area ratios of each standard peak area/IS peak area)

\*2 : LC-MS/MS (Peak Area ratios of each standard peak area)

プフルーツ試料において、平均回収率は 71~103%、併行精度は 0.59~1.9%であり良好な結果が得られた。レモン試料においても、平均回収率は 87~104%、併行精度は 0.46~2.9%であり良好な結果が得られた。以上より、本法のグレープフルーツおよびレモンへの適用性が示された。

## 2) 試料マトリックスの測定への影響の確認

食品試料中の目的物質を GC-MS および LC-MS/MS を用いて分析する際には、精製を行っても取り除くことができない試料由来のマトリックスの影響を受ける場合がある。試料マトリックスの影響は異常な回収率の一因となるため、その確認が不可欠である。各試料

および各測定物質について、算出した STD に対する Matrix STD の比率を Fig.2 に示した。全ての試料および測定物質について、比率は 0.78~1.1 であり、妥当性評価ガイドライン[3]における真度の目標値を比率へ換算した値(0.70~1.2)の範囲内であった。このことから、異常な回収率を引き起こす試料マトリックスの影響はないと考えられた。

#### IV まとめ

QuEChERS 改良法を用いてオレンジ中の防かび剤の妥当性評価を行った結果、全ての物質について妥当性が確認された。グレープフルーツおよびレモンについて、真度および併行精度の確認を行ったところ、良好な結果が得られ、類似の食品への適用性が示された。以上のことから、本法はかんきつ類中防かび剤の迅速かつ正確な一斉試験法として有用であると考えられた。

#### 参考文献

1) 中里光男, 只野敬子, 小川仁志, 牛山博文, 川合由華, 小林千種, 他. 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 1995; 41(5): 392-397.

- 2) 厚生労働省. 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について. 食安発第 0124001 号, 平成 17 年 1 月 24 日.
- 3) 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.
- 4) Anastassiades M, and Lehotay SJ. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. Journal of AOAC International 2003; 86(2): 412-431.
- 5) 永井雄太郎. QuEChERS を見直してみよう. 日本農薬学会誌 2012; 37(4): 362-371.