

LC-

MS/MSを利用した迅速簡便な6種類防かび剤分析法の開発

誌名	食品衛生学雑誌
ISSN	00156426
著者名	吉光,真人 上野,亮 松井,啓史 小阪田,正和 内田,耕太郎 福井,直樹 阿久津,和彦 角谷,直哉
発行元	日本食品衛生学会
巻/号	61巻4号
巻号補足	
掲載ページ	p. 143-147
発行年月	2020年8月

LC-MS/MSを利用した迅速簡便な6種類防かび剤分析法の開発

吉光真人* 上野 亮 松井啓史 小阪田正和
内田耕太郎 福井直樹 阿久津和彦 角谷直哉

Development of an LC-MS/MS-Based Rapid and Simple Analytical Method for Six Fungicides

Masato YOSHIMITSU*, Ryo UENO, Hiroshi MATSUI, Masakazu OSAKADA,
Kotaro UCHIDA, Naoki FUKUI, Kazuhiko AKUTSU and Naoya KAKUTANI

Osaka Institute of Public Health:

1-3-69 Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan;

* Corresponding author

In this study, we developed an LC-MS/MS-based rapid and simple analytical method for six fungicides; imazalil, o-phenylphenol, thiabendazole, fludioxonil, azoxystrobin and pyrimethanil, the latter three were newly approved for use after 2011. For expediting and simplification, we merged the extraction method with that of the pesticide analysis. For purification step, loading of 1 mL of sample extracts to 500 mg Oasis HLB column and elution with 8 mL of acetonitrile gave satisfactory results. The performance of the present method was confirmed for orange, grapefruit, and lemon samples fortified with the six fungicides. The results showed that the average recovery ranged from 89.7 to 100.0%, intra- and inter-assay CV% ranged from 1.5 to 5.0% and from 0.5 to 4.9%, respectively, achieving the target values of the Japanese official guideline for residual pesticide analysis. The limits of quantification of this method were determined to be 1 mg/kg for o-phenylphenol, and 0.2 mg/kg for the other five fungicides. These values were lower than their corresponding regulation values. In addition, we confirmed the usability of the present method for fungicide inspection of commercially available citrus fruits. During 2017–2019, there was no conflict between the food labeling and the fungicides detected and no fungicide with the concentration exceeding maximum residue level was detected

(Received March 3, 2020; Accepted May 22, 2020)

Key words: 防かび剤 fungicide: 高速液体クロマトグラフトンデム型質量分析計 LC-MS/MS; 柑橘類 citrus fruits

付録資料: 付録資料 (付録図 Fig. S1, 付録表 Table S1, S2, S3およびS4) はJ-STAGEの日本食品衛生学雑誌 (<http://dx.doi.org/10.3358/shokueishi-char/ja>) で閲覧できる。

結 言

防かび剤は、柑橘類をはじめとする果物類において、収穫後のかびの繁殖を抑制することを目的として使用される。特に、長期輸送される輸入柑橘類に使用されることが多い。防かび剤は農薬と異なり、収穫後に有効濃度が残留するように食品添加物として使用され、その基準値が設定されている*1。また、他の食品添加物と同様に、使用した場合には食品への表示義務がある*1。

近年では、輸入果実の種類、数量の増加や耐性菌の出現リスク¹⁾等に対応するため、防かび剤として指定されている化合物の種類が増加している。以前より防かび剤として

指定されていたイマザリル (IMZ)、オルトフェニルフェノール (OPP)、チアベンダゾール (TBZ)、ジフェニルに加え、2011年にフルジオキシニル (FLD)、2013年にアゾキシストロビン (AZX) およびピリメタニル (PYR)、2017年にプロピコナゾールがそれぞれ指定された。

柑橘類の防かび剤分析法には多数の報告^{2)~10)}がある。しかし、これらの分析法は、2011年以降に指定された防かび剤を分析対象としていない^{2)~5)}。また、抽出精製時に濃縮乾固操作を含む^{6)~8)}、あるいは複数の固相カートリッジカラムが必要^{6), 7), 9)}で操作が煩雑である。その他、防かび剤に特化した抽出法や分析カラムを使用し、汎用性が低い¹⁰⁾等の課題がある。そこでわれわれは、これらの問題解決を念頭に置き、検査業務を効率化するために残留農薬

* 連絡先 yosimitu@iph.osaka.jp

地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所: 〒537-0025 大阪市東成区中道1-3-69

*1 食品、添加物等の規格基準 (昭和34年厚生省告示第370号) 第2 添加物 (平成29年11月30日現在)

Table 1. Mass spectrometric parameters of fungicides

Compound	Ion mode	Precursor (<i>m/z</i>)	Product (<i>m/z</i>)		Cone voltage (V)		Collision energy (eV)	
			Target	Qualifier	Target	Qualifier	Target	Qualifier
AZX	+	404.1	171.9	372.0	16	16	48	16
FLD	-	247.0	126.0	179.9	4	1	30	32
IMZ	+	297.0	159.0	201.0	50	50	22	16
OPP	-	169.0	169.0	141.0	1	2	20	22
PYR	+	200.0	182.9	107.0	38	38	22	22
TBZ	+	201.8	131.0	175.0	2	2	30	24

分析法¹¹⁾と分析操作の共通化を図り、LC-MS/MSを利用して、迅速簡便な防かび剤6種類の分析法を開発したので報告する。

実験方法

1. 試料

国内で購入した柑橘類としてオレンジ、グレープフルーツ、およびレモンを実験に用いた。

2. 試薬等

アセトニトリル (残留農薬・PCB試験用)、アセトン (残留農薬・PCB試験用)、メタノール (LC/MS用)、クエン酸三ナトリウム二水和物 (特級)、酢酸アンモニウム (特級)、AZX, IMZ, FLD, OPP, PYRおよびTBZ標準品は富士フィルム和光純薬(株)製を用いた。クエン酸二ナトリウムセスキ水和物 (purum p.a., ≥99.0% (T))はSIGMA-ALDRICH製を用いた。固相カートリッジカラム Oasis HLB (充填剤量 60, 200, 500 mg)はWaters社製を用いた。精製水はMilli-Q超純水製造装置 (日本ミリポア(株))を用いて製造した。

3. 器具および機器

50 mL PP製遠心管: NUNC イージーフリップコニカル遠心チューブ (Thermo Fisher Scientific社)

フードプロセッサー: Blixer3 (robot coupe社)

ホモジナイザー: Polytron PT10-35 (KINEMATICA社)

冷却遠心分離機: Himac CR20GIII (日立工機(株))

LC: UPLC I Class (Waters社)

MS/MS: Xevo TQ-S (Waters社)

4. 分析条件

分析カラムには、ACQUITY UPLC HSS T3 (1.8 μm, 2.1×100 mm; Waters社)にプレカラム ACQUITY UPLC HSS T3 (1.8 μm, 2.1×5 mm; Waters社)を接続したものをを用いた。移動相は、(A) 0.5 mmol/L酢酸アンモニウム水溶液、(B) 0.5 mmol/L酢酸アンモニウムメタノール溶液を用いた。カラム温度は50℃、注入量は2 μL、グラジエント条件および流速は、(B) %: 40% (0 min, 0.2 mL/min)→95% (11 min)→95% (11.1 min, 0.4 mL/min)→95% (13 min)→40% (13.1 min)→40% (15 min)→40% (15.1 min, 0.2 mL/min)→40% (17 min)とした。

AZX, IMZ, PYR, TBZはイオン化法ESI+, キャピラ

リー電圧 +1,000 V, 乾燥ガス温度450℃, FLD, OPPはイオン化法ESI-, キャピラリー電圧 -2,900 V, 乾燥ガス温度450℃で分析した。MRM条件は、各化合物の標準溶液をインフュージョンし最適化した (Table 1)。

5. 検量線および定量

防かび剤6種混合アセトニトリル溶液をアセトニトリルで段階希釈した。アセトニトリル溶液をそれぞれ水で10倍希釈し、検量線用標準溶液を作成した。検量線用標準溶液を2 μL, LC-MS/MSに注入し、各化合物のピーク面積値を求め、絶対検量線法により検量線を作成した。試験溶液は試料濃度0.05 g/mLのアセトニトリル溶液を水で10倍希釈し、そのうち2 μLをLC-MS/MSに注入し、各化合物ピーク面積値から濃度を求めた。

6. 試験溶液の調製

フードプロセッサーで均一化した試料10.0 gを50 mLのPP製遠心管に精秤した。アセトニトリル20 mLを添加し、ホモジナイザーで1分間抽出した。次に塩化ナトリウム1 g, 無水硫酸マグネシウム4 g, クエン酸三ナトリウム二水和物1 gおよびクエン酸二ナトリウムセスキ水和物0.5 gを添加して1分間振とう後、遠心分離 (1,290×g, 10分間, 20℃)した。上清1 mLをあらかじめアセトニトリル8 mLでコンディショニングした充填剤量500 mgのHLBカートリッジカラムに負荷した。アセトニトリル8 mLで溶出し、溶出液をアセトニトリルで10 mLに調製した。この溶液100 μLと水900 μLを混合し、試験溶液とした (Fig. 1)。

7. 分析法の性能評価

開発した分析法について、厚生労働省通知のガイドライン^{*2} (以下, ガイドライン)に従い、選択性, 定量限界, 真度, 併行精度, および室内精度を評価した。選択性, 定量限界については, オレンジ, グレープフルーツ, およびレモンからブランク試験溶液を調製した。OPPは5 ng/mL, OPP以外の防かび剤は1 ng/mL (試料中濃度はOPP 1 mg/kg, OPP以外の防かび剤0.2 mg/kg)となるように防かび剤のアセトニトリル溶液をブランク試験溶液に添加後, 分析した。得られたクロマトグラムから分析法の選択性および定量限界を評価した。

*2 平成22年12月24日付け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」(2010)。

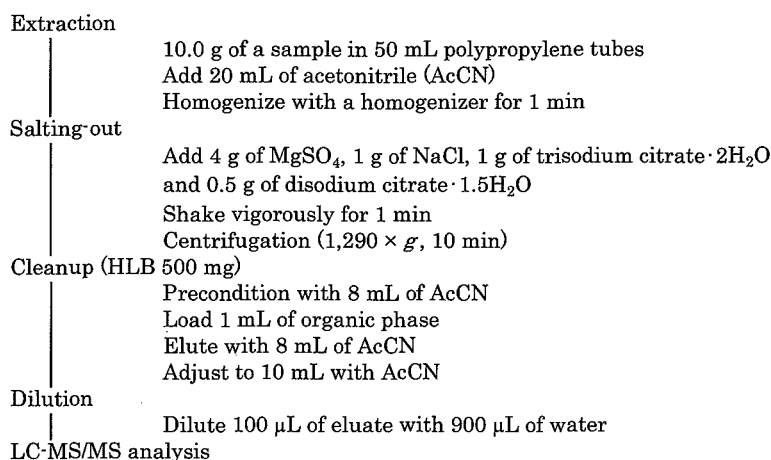


Fig. 1. Analytical procedure of fungicides residues in citrus fruits

真度, 併行精度, および室内精度を算出するために, オレンジ, グレープフルーツ, およびレモンへの防かび剤添加回収試験を, 1名の実験者が1日2併行, 5日間の実験を行う性能評価試験を実施した. 添加濃度は, IMZは0.2および5 mg/kg, OPPは1および10 mg/kg, これら以外の防かび剤は0.2および10 mg/kgとした. 得られたデータから, 一元配置分散分析を用いて室内精度, 併行精度を算出した.

結果および考察

1. LC-MS/MS分析条件の検討

検査効率化の目的で, 本分析法では, 残留農薬分析法¹¹⁾と共通の移動相およびLCカラムを用いた, 実験方法4で示した分析条件で6種類の防かび剤を一斉分析することが可能であった. 検量線は, OPP以外の防かび剤が0.25~75 ng/mL, OPPが1~100 ng/mLの範囲で R^2 が0.99以上と, 良好な直線性が認められた.

2. 前処理方法の検討

2.1. 抽出液への回収率の確認

オレンジ, グレープフルーツ, およびレモンに基準値相当の防かび剤6種類を添加し, 残留農薬分析法¹¹⁾と同じ条件で抽出した. 続いて抽出液を試料濃度0.025 g/mLとなるようにアセトニトリルで希釈後, 水で10倍希釈し, 抽出液に含まれる防かび剤を分析した (Table S1). その結果, レモンのOPP, PYR, TBZで添加量に対する抽出液への回収率が87.6~89.4%, それ以外は93.3~99.4%となった. レモンのOPP, PYR, TBZについては回収率が若干低下した. これは未精製の試験溶液に含まれる試料マトリックスのイオン化抑制によるものと考えられた.

2.2. 試料精製法の検討

柑橘類に含まれる精油成分等を除去するため, Oasis HLBカラムを用い, 最適な充填剤量を検討した (Table S2). 基準値濃度の試料からの抽出液に相当する濃度の防かび剤標準溶液を負荷した場合, 充填剤量60 mgではすべての防かび剤に対して保持が不十分であり, 一部が溶出した.

Table 2. Recovery (%) of fungicides with eluent volume
Orange

Compound	Eluent volume (mL)				
	4	8	12	16	20
AZX	99.6	100	100	100	100
FLD	81.2	100	100	100	100
IMZ	99.0	100	100	100	100
OPP	9.1	90.4	99.0	99.7	100
PYR	82.4	98.1	98.9	99.5	100
TBZ	35.6	95.1	99.6	100	100

Grapefruit

Compound	Eluent volume (mL)				
	4	8	12	16	20
AZX	99.6	100	100	100	100
FLD	83.1	99.9	100	100	100
IMZ	99.0	100	100	100	100
OPP	12.3	89.5	98.9	99.6	100
PYR	82.7	98.4	99.1	99.6	100
TBZ	40.5	95.0	99.9	100	100

Lemon

Compound	Eluent volume (mL)				
	4	8	12	16	20
AZX	99.7	100	100	100	100
FLD	84.4	99.9	100	100	100
IMZ	99.4	100	100	100	99.9
OPP	12.2	90.6	99.0	99.8	100
PYR	84.1	98.4	99.1	99.6	100
TBZ	43.0	93.8	99.8	100	100

また, 充填剤量200 mgではAZX, IMZで一部が溶出した. 一方, 充填剤量500 mgではすべての防かび剤がカラムに保持された.

オレンジ抽出液1 mLを負荷した場合, 充填剤量60および200 mgでは, カラム負荷時の流出液に抽出液由来の着色が確認された. 一方, 充填剤量500 mgでは着色が確認されなかった. 以上から, 本分析法には基準値相当の防かび剤が保持可能で, かつ抽出液由来成分の溶出が確認され

Table 3. Result of validation study

Sample	Spiked concentration (mg/kg)	Compound						
		AZX	FLD	IMZ	OPP	PYR	TBZ	
Orange	0.2* ¹	Intra-assay CV (%)	1.8	5.0	2.6	3.6	2.5	2.0
		Inter-assay CV (%)	1.8	4.9	2.6	2.3	1.7	0.5
		Recovery (%)	89.8	97.7	95.5	89.7	96.4	92.4
	10* ²	Intra-assay CV (%)	1.7	2.2	2.0	2.0	2.3	2.4
		Inter-assay CV (%)	1.0	1.4	1.1	1.3	1.9	2.4
		Recovery (%)	92.6	98.0	92.1	92.4	94.8	93.9
Grapefruit	0.2* ¹	Intra-assay CV (%)	2.5	3.4	2.2	2.5	2.2	2.5
		Inter-assay CV (%)	1.5	3.4	1.2	2.5	1.7	1.1
		Recovery (%)	95.5	97.8	95.1	90.7	99.6	93.0
	10* ²	Intra-assay CV (%)	2.0	2.6	2.2	1.6	2.0	1.7
		Inter-assay CV (%)	1.6	1.9	1.1	1.1	2.0	1.2
		Recovery (%)	97.1	97.2	91.5	92.7	98.0	92.8
Lemon	0.2* ¹	Intra-assay CV (%)	2.3	3.1	1.8	3.0	1.5	2.7
		Inter-assay CV (%)	1.8	3.1	1.2	2.3	1.3	1.2
		Recovery (%)	97.4	98.9	96.2	90.6	96.4	90.5
	10* ²	Intra-assay CV (%)	1.7	2.2	2.4	2.3	2.1	1.8
		Inter-assay CV (%)	0.7	1.2	1.0	2.3	1.1	1.3
		Recovery (%)	99.6	100.0	93.0	94.1	95.5	89.7

*¹ OPP 1 mg/kg.*² IMZ 5 mg/kg.

なかった、充填剤量500 mgのHLBカラムを採用することとした。

希釈操作のみで簡便に試験溶液の調製が可能となるように、HLBカラムからのアセトニトリルによる溶出を検討した (Table 2)。試料マトリックス等の妨害物質の溶出を少なくし、またHLBカラムを通過した溶液を定容する操作性を考慮して、測定項目のすべての防かび剤が良好に溶出する最適条件を検討した。その結果、カラムへの負荷量は抽出液1 mL、溶出はアセトニトリル8 mLとし、カラムを通過した溶液をアセトニトリルで10 mLに定容する手順が最適であった。

試料マトリックスの測定への影響を明らかにするために、溶媒標準溶液のピーク面積値に対する試料マトリックス存在下での標準溶液のピーク面積値の比率を算出したところ、0.86~1.06であった (Table S3)。オレンジにおけるAZXの基準値10 mg/kg、定量下限値0.2 mg/kgでそれぞれ0.87, 0.88, グレープフルーツにおけるPYRの基準値10 mg/kgで0.86であり、これらに試料マトリックスの影響が確認されたが、許容範囲内であると判断した。

3. 性能評価

オレンジのブランク試験溶液に、OPPが5 ng/mL、OPP以外の防かび剤が1 ng/mLの濃度となるように添加した溶液のクロマトグラムを確認したところ、S/N比は10以上を満たした (Fig. S1)。そこで、試料中OPP 1 mg/kg、OPP以外の防かび剤0.2 mg/kgを定量限界とした。また、オレンジのブランク試験溶液のクロマトグラム上には防かび剤のピークと重なる妨害ピークは観察されず、選択性は良好であった (Fig. S1)。グレープフルーツ、レモンにつ

いても同様の検討を行ったところ、オレンジと同じ定量限界の設定が可能で、選択性も良好であった。

また、すべての試料、すべての防かび剤において、添加濃度での真度、併行精度、および室内精度はガイドラインで設定された性能を満たし、本分析法の定量法としての性能に問題がないことが示された (Table 3)。

4. 実態調査

開発した分析法を2017から2019年までの防かび剤検査に適用したところ、定量限界以上の防かび剤は表示との整合性が確認された (Table S4)。また、基準値を超過する濃度の防かび剤が検出された検体はなかった。

まとめ

LC-MS/MSを用いた、柑橘類中の迅速簡便な6種類防かび剤分析法を開発した。試料からアセトニトリルを用いて防かび剤を抽出し、Oasis HLBカラムで精製した。柑橘類に対し、防かび剤の添加回収試験を実施したところ、真度は89.7から100.0%、室内精度および併行精度はそれぞれ、1.5から5.0%、0.5から4.9%となり、本分析法の定量法としての性能に問題がないことが示された。定量限界は試料中OPP 1 mg/kg、OPP以外の防かび剤0.2 mg/kgであった。

本分析法は、残留農薬分析法と抽出操作を共通化しており、検査業務を効率化できる。また、試験溶液調製まで濃縮乾固操作の必要のない迅速簡便な分析法であり、防かび剤一斉分析法として有用であると考えられた。

文献

- 1) Kinay, P., Mansour, M. F., Gabler, F. M., Margosan, D.

- A., Smilanick, J. L. Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California. *Crop Protection*, **26**, 647–656 (2007).
- 2) Yoshioka, N., Akiyama, Y., Teranishi, K. Rapid simultaneous determination of *o*-phenylphenol, diphenyl, thiabendazole, imazalil and its major metabolite in citrus fruits by liquid chromatography-mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization. *J. Chromatogr. A*, **1022**, 145–150 (2004).
 - 3) Gilbert-Lopez, B., García-Reyes, J. F., Mezcua, M., Molina-Diaz, A., Fernandez-Alba, A. R. Determination of postharvest fungicides in fruit juices by solid-phase extraction followed by liquid chromatography electrospray time-of-flight mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 10548–10556 (2007).
 - 4) Ito, Y., Goto, T., Oka, H., Matsumoto, H., Miyazaki Y. Simple and rapid Determination of thiabendazole, imazalil, and *o*-phenylphenol in citrus fruit using flow-injection electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 861–866 (2003)
 - 5) Kakimoto, Y., Takatori, S., Okihashi, M., Kajimura, K., Toriba, A., Hayakawa, K. Simple method for determination of fungicides in citrus fruits by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Anal. Methods*, **9**, 3345–3351 (2016).
 - 6) Ujike, A., Kamimoto, K., Ueta, A., Yasunaga, M. Study on a simple analytical method for fungicides in imported fruits. Kagawa-Ken Kankyo Kenkyu Center Shoho (Annual report of Kagawa Prefecture Environmental Research Center), **13**, 58–61 (2014).
 - 7) Kogiso, T., Nakanishi, K., Shintani, Y., Nagashima, S., Takahashi K., Hirakawa, H., Hori, T., Kajiwara, J. Development and validation of analytical method for fungicides in fruit. Hukuoka-Ken Hoken Kankyo Kenkyuzho Nenpo (Annual report of the Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences), **43**, 76–81 (2016).
 - 8) Nagashima, H., Hirao, A., Tokuda, U., Uruta, K. Simultaneous determination of seven kinds of fungicides in citrus fruits by gas chromatography/mass spectrometry. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **57**, 101–106 (2016).
 - 9) Sato, T., Miyamoto, I., Kakutani, N., Yamano, T. Validation study on a rapid and simultaneous method for determination of fungicide in citrus fruits. Osaka-Shirit-su Kankyo Kagaku Kenkyuzho Hokoku (Annual report of Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences), **77**, 31–35 (2015).
 - 10) Yoshioka, N., Hayashi, S., Inada, T. Rapid determination of seven fungicides in citrus fruits. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **56**, 228–232 (2015).
 - 11) Satoshi, T., Yamamoto, H., Fukui, N., Yamaguchi, S., Kitagawa, Y., Kakimoto, Y., Osakada, M., Okihashi, M., Kajimura, K., Obana, H. Validation study on a rapid multi-residue method for determination of pesticide residues in vegetables and fruits by LC-MS/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)*, **54**, 237–249 (2013).

LC-MS/MS を利用した迅速簡便な 6 種類防かび剤分析法の開発 (ノート)

吉光真人*, 上野 亮, 松井啓史, 小阪田正和,
内田耕太郎, 福井直樹, 阿久津和彦, 角谷直哉
食衛誌 61(4), 143~147(2020)

われわれは LC-MS/MS を用いた迅速簡便な 6 種類防かび剤分析法を開発した。イマザリル, *o*-フェニルフェノール, チアベンダゾールに加えて, 2011 年以降に防かび剤としての利用が認められたフルジオキシニル, アゾキシストロビン, ピリメタニルを測定対象とした。迅速かつ簡単な分析法の確立を目指し, 残留農薬分析法と抽出操作を共通化した。また, 試料からの抽出液 1 mL を充填剤量 500 mg の Oasis HLB カラムに負荷, アセトニトリル 8 mL で溶出する精製法を採用した。次いで, オレンジ, グレープフルーツ, レモンに 6 種類の防かび剤を添加して添加回収試験を行ったところ, 真度は 89.7 から 100.0%, 室内精度および併行精度はそれぞれ, 1.5 から 5.0%, 0.5 から 4.9% となり, 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目標値を達成した。定量限界は, *o*-フェニルフェノールでは 1 mg/kg, その他の防かび剤では 0.2 mg/kg となり, 防かび剤の基準値よりも低い値であった。本分析法の有用性を確認するため, 2017~2019 年に市販柑橘類の分析を行ったところ, 検出された防かび剤は表示との整合性が確認された。また, 基準値を超過する濃度の防かび剤が検出された検体はなかった。

* 地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所