

1 3 果実類に残留する防かび剤の汎用機器による一斉分析法の確立と有用性の検証

○海野 明広*¹、堀田 沙希*^{1*2}、福田 博司*¹、占部 彩花*¹、細野 加芳*¹、
鈴井 威陽*²、中山 真結*²、富田 浩嗣*¹、棚橋 高志*¹

*¹ 愛知県衛生研究所、*² 愛知県食品衛生検査所

【研究目的】

防かび剤は、果実類において貯蔵中のかびの発生を防ぐ目的で使用されるが、防かび剤の果実類への残留が食品衛生上懸念されている。果実類に使用される 8 種類の防かび剤の検査は、複数の試験法を組み合わせなければならず、その作業工程は煩雑である。本研究では、汎用機器単独で 8 種類の防かび剤を測定可能な一斉分析法を確立し、その有用性を検証する。効率化により検査が促進されれば、「食の安全・安心」の推進につながる。

【研究の必要性】

かんきつ類やバナナ等の果実類には、貯蔵中のかびの発生を防ぐ目的で収穫後に防かび剤の使用が認められている。一方で、使用された防かび剤の果実類への残留が食品衛生上懸念されており、健康被害を未然に防ぐことを目的に、防かび剤ごとに使用基準が設定され、使用基準を超える果実類が流通しないようにモニタリング検査が実施されている。

食品衛生法では、果実類に適用可能な食品添加物として 8 種類の防かび剤(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(FLU)、アゾキシストロピン(AZX)、ピリメタニル(PMN)及びプロピコナゾール(PRP))が指定されている。これらのモニタリング検査は、複数の通知試験法(厚生労働省通知)を組み合わせなければならず、その作業工程は非常に煩雑である(表 1)。

表1 通知試験法の問題点

通知試験法	対象化合物	測定機器
試験法1	TBZ,OPP,DP,	HPLC-FL
試験法2	IMZ	HPLC-UV
試験法3	FLU,PRP	GC-FTD,GC-NPD
試験法4	PMN	GC-FTD,GC-NPD
試験法5	AZX	HPLC-UV

**8種類を測定するには5つの試験法を実施する必要がある。
非常に煩雑。実施に4-5日必要。**

そのため各地方衛生研究所では業務効率の改善を目指して、一斉分析法の開発に取り組んできたが、測定対象は最大で 7 種類であり、かつそのほとんどが複数の検査機器(HPLC、

GC-MS、LC-MS/MS)を併用した手法である(香川県所報 2014 年, 岐阜県所報 2019 年、三重県所報 2018 年、兵庫県所報 2015 年等)。LC-MS/MS のような高額機器を保有しない一般的な検査施設では困難なことから、汎用機器である HPLC 単独による一斉分析法の確立が求められている。

申請者が所属する研究室では、抽出、精製、濃縮及び測定法を検討することで、HPLC 単独で 8 種類すべての防かび剤を検出可能な手法を開発してきた。本研究では、新規に開発した一斉分析法が一般的な検査施設に適用可能かどうか検証を行う。

【研究計画】

① 新規一斉分析法の適用対象の拡大

開発段階で検討したオレンジ、レモン、グレープフルーツ、バナナ以外の果実類について本分析法が適用可能かどうか検証する。輸入量の多い、パイナップル、キウイフルーツ等を候補とする。愛知県内に流通する果実類を購入し、添加回収試験を実施して適用対象を確定する。新規一斉分析法では、有機溶剤で抽出を行い、固相カラムにて精製し、HPLC-FL/UV(ODS カラム)にて分析する(図 1)。

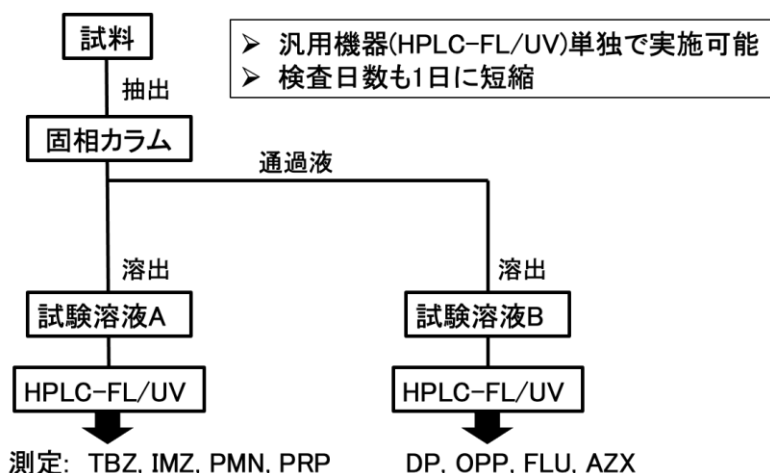


図1 汎用機器(HPLC)を用いた新規一斉分析法(8種類)の概略

② 複数の検査施設における、新規一斉分析法の有用性の検証

HPLC を保有する協力施設で、本分析法による添加回収試験を行う。8 種類の防かび剤を添加した試料、固相カラム及び ODS カラムを協力施設に配付し、本分析法に基づいて抽出、精製、測定し回収率を確認する。

【実施内容】

1. 参加施設

愛知県衛生研究所および愛知県食品衛生検査所の 2 施設が参加した。

2. 試料

令和 4 年 9 月から令和 5 年 8 月に小売店で購入した果実類(レモン、パイナップル、キウイフルーツ)を用いた。果実は、細切後フードプロセッサで均一化したものを試料とした。

3. 抽出

試料 10.0 g を 100 mL 容ポリプロピレン製遠心管にとり、有機溶媒を加え 1 分間ホモジナイズした後、遠心管を毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離し、有機溶媒層を分取した。この操作を 2 回繰り返す、分取液に有機溶媒を追加し正確に 50 mL に合わせ抽出溶液とした。

4. 精製

抽出溶液 5 mL をあらかじめコンディショニングした固相カラムに負荷した。有機溶媒および水で固相カラムを洗浄し、さらに毎分 1500 回転で 1 分間遠心分離してカラム内の水分を除去した。溶出液 A をカラムに加え、5 mL に定容して試験溶液 A とした。一方、固相カラムを通過した抽出溶液はナスフラスコに回収し、40 °C 以下で減圧濃縮し、窒素気流下で溶媒を除去した。濃縮残渣に溶出液 B を加えて超音波槽内で溶解後、5 mL に定容して試験溶液 B とした。

5. 装置及び測定条件

装置は、愛知県衛生研究所および愛知県食品衛生検査所ともに Shimadzu LC20 を用いた。HPLC カラムには ODS カラムを用い、移動相流速 0.8 mL/min、注入量 15 μ L、カラム温度 45 °C とした。移動相には有機溶媒と水を用いグラジエント条件を設定して測定した。

6. 添加回収試験

試料 10.0 g を 100 mL 容ポリプロピレン製遠心管に秤量後、各防かび剤の濃度が表 2 および表 3 になるように混合標準溶液を添加した。試料にメタノールを 1 mL 添加したものをブランク試料とした。各試料を 30 分間放置した後、上記の方法で試験溶液を調製し、HPLC にて測定した。

【結果・考察と今後の課題】

① 一斉分析法(8 種類)の適用対象の拡大

本分析法の適用対象にパイナップルとキウイフルーツを追加可能か、残留農薬等試験法開発事業実施要領に従い添加回収試験(5 併行 1 日間、基準値相当添加)を実施し、選択性、真度及び併行精度を評価した(表 2)。選択性はブランク試料と標準溶液(基準値相当)のピーク面積比で判断した。ブランク試料からわずかにピークが確認されたが、その影響は各防かび剤の標準溶液(基準値相当)のピーク面積の 10%未満であり許容範囲内だった。また、AZX を除く 7 種類の防かび剤について、真度(目標値 70-120%)と併行精度を算出したところ、パイナップルは真度 89.9~103.8%、併行精度 1.7~3.7RSD%、キウイフルーツは真度 88.2~105.6%、併行精度 2.0~5.5RSD%と同要領の評価基準(真度 70-120%、併行精度 10RSD%未満)を満たした。このことから、本分析法は防かび剤(AZX を除く 7 種類)の検査法としてパイナップルとキウイフルーツに適用可能と考えられた。一方、AZX では、併行精度はパイナップルで 2.2 RSD%、キウイフルーツで 3.9 RSD%と基準値を満たしたものの、真度はパイナップルで 61.6%、キウイフルーツで 40.9%と基準値(70-120%)を満たしておらず、抽出、精製の過程で AZX の一部を喪失したと考えられる。本分析法では AZX は固相カラムの通過液(試験溶液 B)に検出されるが、パイナップルおよびキウイフルーツの夾雑の影響

響等により一部の AZX が固相カラムに保持されてしまった可能性が考えられた。そのため、固相カラムの溶出液(試験溶液 A)についても解析したが AZX のピークは検出されなかった。これらの結果から、精製過程ではなく抽出過程で AZX を喪失している可能性が高いと考えられた。今後は、8 種類の防かび剤が検出できるよう抽出工程を改良する予定である。

表2 真度と併行精度

食品名	分析対象化合物	基準値 (g/kg)	添加濃度 (g/kg)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)
パイナップル	TBZ		0.010	101.5	1.7
	PMN		0.010	100.7	2.4
	IMA		0.0050	99.4	3.7
	OPP		0.010	103.8	2.1
	FLU	0.020	0.020	96.2	2.1
	AZX		0.010	61.6	3.1
	DP		0.070	94.2	2.0
	RPR		0.008	89.9	3.5
キウイフルーツ	TBZ		0.010	104.9	2.1
	PMN		0.010	105.6	2.5
	IMA		0.0050	104.6	3.3
	OPP		0.010	101.7	2.3
	FLU	0.020	0.020	101.7	2.3
	AZX		0.010	40.9	5.5
	DP		0.070	88.2	2.5
	RPR		0.008	97.1	2.0

② 複数の検査施設における、新規一斉分析法の有用性の検証

新規一斉分析法の有用性の検証を行うため、2 施設で、「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(文献 1)」に従い、レモンを用いた添加回収試験(2 施設 2 併行 3 日間、基準値添加)を実施した(表 3)。

表3 真度と室間精度

食品名	分析対象化合物	基準値 (g/kg)	添加濃度 (g/kg)	真度 (%)	室間精度 (RSD%)
レモン	TBZ	0.010	0.010	98.4	10.9
	PMN	0.010	0.010	92.0	11.2
	IMA	0.0050	0.0050	90.9	13.9
	OPP	0.010	0.010	94.3	10.7
	FLU	0.010	0.010	88.1	12.2
	AZX	0.010	0.010	87.4	12.8
	DP	0.070	0.070	89.8	9.3
	RPR	0.008	0.008	82.3	17.5

選択性は①と同様の手法で、許容範囲内であることを確認した。また、RPR を除く 7 種類の防かび剤について、真度と室間精度を算出したところ、真度 87.4~98.4%、室間精度 9.3~13.9RSD%であった。理化学実験においては、一般に室間精度の方が室内精度よりも値のばらつきが大きくなることが知られている(文献 2)。そのため、「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に関する質疑応答集(Q&A)(文献 3)」を根拠に、室間精度が室内精度の目標値 15 RSD%を下回る場合は、室内精度も目標を満たすと判

断される。得られた室間精度は 9.3~13.9RSD%であり、同要領の評価基準である室内精度も満たすと考えられた。これらの結果から、本分析法は防かび剤(RPRを除く7種類)の検査法として一定の有用が確認された。一方で、RPRについては、真度は82.3%と目標値(70-120%)を満たしたが、室間精度は17.5RSD%と目標値(15RSD%未満)を上回った。そのため、本研究結果からは同要領の評価基準である室内精度を満たしているか判断できなかった。今後は原因究明を行い本分析法の問題点を改善した上で、分析法の有用性の確認に取り組んでいきたい。

【参考文献】

文献 1 厚生労働省(2010)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.

文献 2 AOAC International (2002) AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals.

文献 3 厚生労働省(2011)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に関する質疑応答集(Q&A)について. 食安基発 1208 第 1 号

【経費使途明細】

使 途	金 額
○消耗品費	
果実類購入費(国産 無農薬品)	24,060 円
試薬類購入費	69,558 円
固相カラム購入費	155,342 円
HPLC カラム購入費	50,380 円
○振込手数料	660 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円