

18 GC-MS/MSによる防かび剤の一斉分析法及び前処理

条件の検討

○中村 貴憲（旧所属 京都府保健環境研究所 現所属 薬務課）

半田 典子^{*1}、井田 博之^{*1}、宇野 玲子^{*1}

^{*1} 京都府保健環境研究所

【研究目的】

食品添加物として使用基準が定められた防かび剤8物質は、かんきつ類の輸送・貯蔵中のかび発生防止のために用いられる一方、残留による健康リスクが懸念される。本研究では、これら防かび剤を対象に従来の複雑な検査法を簡便化するため、GC-MS/MSによる一斉分析法を確立し、さらに前処理法の改良による精製効果の向上を目的とする。

【研究の必要性】

当所では、府内で流通するかんきつ類を対象に、防かび剤8物質の収去検査を実施している。従来の食品衛生法に基づく検査法（以下「通知法」という。）（文献1）は、物質ごとに分析機器や前処理法が異なり、煩雑で効率性に課題がある。先行研究ではGC-MS/MSを用いた一斉分析の有効性が報告されており、本研究によりこれを応用した簡便かつ効率的な検査法を確立することは、規格基準適合性の確認精度を高め、収去検査の迅速化に寄与するものと期待される。

【研究計画】

本研究では、従来の煩雑な検査手順を改善し、防かび剤の効率的かつ高精度な検査手法の確立を目指す。そのために、通知法に基づく検査法の検証、固相抽出カラムの選定、さらにQuEChERS法の導入を通じて、検査精度と効率性の向上を図る。

1 GC-MS/MSによる一斉分析法の条件設定

防かび剤8物質の混合標準溶液を用いて測定条件を検討し、ピーク分離、感度、選択性を評価する。イオン化モードや温度プログラムなどを最適化し、分析条件を確立する。さらに確立した条件に基づき、分析法バリデーションを行う。

2 通知法準拠の前処理法による検証

かんきつ類を対象に添加回収試験を実施し、回収率や精度を評価する。さらに、5

種類の固相抽出カラムの特性を比較検討し、最適なカラムを選定する。

3 QuEChERS 法の導入と最適化

かんきつ類及びバナナを対象に QuEChERS 法を導入し、抽出条件や精製条件を検討する。効率性と精度の高い前処理法の確立を図る。

4 QuEChERS 改変法を用いた GC-MS/MS 一斉分析法の妥当性評価

最適化した前処理法 (QuEChERS 法 + 固相抽出カラム) に一斉分析の測定条件を組み合わせ、回収率、精度、再現性を総合的に評価する。

【実施内容】

1 GC-MS/MS による一斉分析法の条件設定

(1) 混合標準溶液の調製

防かび剤 (8 物質) の標準試薬をアセトンに溶解し、標準原液 (1000 µg/mL) を調製した。各標準原液 1mL をアセトン/ヘキサン混液 (1 : 1) で 10mL に定容し混合標準溶液とした。この混合標準溶液を階段希釈し、5~400ppb の範囲で計 7 点の検量線用標準溶液を調製した。

(2) 装置及び測定条件

混合標準溶液を用いて、ピーク分離、感度及び選択性等を比較検討し、表 1 に示す条件を最適化条件として決定した。この確立した条件を用いて以降の検討を実施した。

表 1 GC 及び MS/MS 測定条件

GC測定条件		MS/MS条件	
機種	Nexis GC-2030(島津製作所株式会社)	機種	GCMS-TQ8040NX(島津製作所株式会社)
カラム	Rxi-5Sil MS	測定モード	MRM
オープン温度	50°C→25°C/min→300°C(10min)	イオン化法	EI
注入口温度	250°C	検出器電圧	チューニング結果からの相対値 + 0.6kV
キャリアガス	He	インターフェイス温度	250°C
注入方法・注入量	スプリットレス・1 µL	イオン源温度	230°C

(3) 分析法バリデーション

特異性 (選択性)、直線性 (濃度範囲 5 ~ 400ppb)、再現性、定量下限値を評価した。

2 通知法準拠の前処理法による検証

(1) 試験溶液の調製

試料：グレープフルーツ 2 種 (サンタマリア、スタールビー)、レモン、オレンジ各約 1 kg をミキサーミルで細切均一化したものを試料とした。

抽出・精製：試料 20g を採取し、アセトニトリルを加え、3 分間ホモジナイズした後、吸引ろ過し 100mL に定容した。ここから 20mL を正確に採り、分液ロートに移し、塩化ナトリウム及びリン酸緩衝液を加え、10 分間振とうした。アセトニトリル層に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、ろ過して抽出液とした。抽出液 2 mL を固相カラムに注入し、アセトニトリルで溶出した。全量回収後アセトニトリルで 10mL に定

容した後、1 mL を採りブタノール 0.1mL を加えて窒素濃縮し、0.5%PEG 溶液 0.1mL を加え、アセトン/ヘキサン混液 1 : 1 で 5 mL に定容し、試験溶液とした。

(2) 添加回収試験

食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性ガイドライン（以下「ガイドライン」という。）（文献2）に従い、グレープフルーツを対象とした添加回収試験（分析者1名が1日2併行で5日間）を実施した。

(3) 固相抽出カラムの比較検討

精製工程において、①Supelclean ENVI-Carb/NH₂ (Sigma-Aldrich 社製)（※通知法で使用）、②Mega BE-C18 (Agilent 社製)、③Inert Sep MgSO₄/AL-N/VRA-PR、④Inert Sep AL-N/VRA-PR 及び⑤Inert Sep VRA-PR（以上 GL サイエンス社製）の5種を比較した。

3 QuEChERS 法の導入と最適化

(1) 試験溶液の調製

試料：グレープフルーツ2種、レモン、オレンジ、バナナ各約1kgをミキサーで細切均一化したものを試料とした。

抽出・精製：試料5gを採取し、アセトニトリル10mLを加え、セラミックホモジナイザーを使用しホモジナイズした。ここにQuEChERS Extract Pouch (Agilent 社製)を加えホモジナイズした後、遠心分離した。上澄液1mLを固相カラムに注入し、アセトニトリルで溶出した。全量回収後アセトニトリルで10mLに定容した後、1mLを採り、トルエン1mLを加えてアセトン/ヘキサン混液1:1で5mLに定容し、試験溶液とした。

(2) 一斉分析法の妥当性評価

ガイドラインに従い、グレープフルーツ及びレモンを対象とした添加回収試験（分析者3名が1日2併行で2日間）を実施した。さらに、オレンジ及びバナナを対象に5併行の添加回収試験を実施した。

【結果・考察と今後の課題】

1 GC-MS/MS による一斉分析法の条件設定

表1の測定条件において、

表2のとおり測定イオンを決定した。

分析法バリデーションの結果は、表3のとおり良好な結果が得られた。

表2 測定イオン

化合物	定量イオン		確認イオン	
	m/z	CE(V)	m/z	CE(V)
アズキシストロビン	344.1	> 329.1	16	388.1 > 345.1
イマザリル	215	> 173	6	215 > 159
オルトフェニルフェノール	170.1	> 141.1	24	141.1 > 115.1
ジフェニル	154.1	> 128.1	22	154.1 > 115.1
チアベンダゾール	201.1	> 174.1	16	174.1 > 130.1
ピリメタニル	198.1	> 118.1	28	198.1 > 183.1
フルジオキソニル	248	> 127	26	248 > 154
プロピコナゾール-I	173	> 145	16	173 > 109
プロピコナゾール-II	173	> 145	16	173 > 109

CE:コリジョンエネルギー

表3 分析法バリデーションの結果

特異性	直線性	日内再現性	日差再現性	定量下限値
SN ≥ 10 (5~400ppb)	R>0.99	CV10%未満 (n=3回)	CV10%未満 (n=3日)	5ppb

2 通知法準拠の前処理法による検証

(1) 添加回収試験

選択性、真度（回収率）、併行精度及び室内精度を評価したところ、ジフェニルの回収率が低く、併行精度及び室内精度も基準を満たさなかった。

(2) 固相抽出カラムの比較検討

②ではジフェニルとオルトフェニルフェノールの回収率が低くなり、①②は溶媒転用時の揮散が疑われた。そこで精製工程において、溶媒転用が必要ないカラム③④⑤を使用したところ回収率が改善された。③④⑤の回収率に大差はなく、安価で注入量が多く操作が便利な⑤を採用することとし、添加回収試験を実施した。結果、全項目でガイドラインの評価基準を満たした（表4）。

表4 通知法準拠の前処理法における選択性、真度（回収率）、併行精度、室内精度

物質名	添加量10μg/g、ジフェニルのみ100μg/g				添加量5μg/g			
	選択性	回収率 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	選択性	回収率 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
アゾキシストロビン		99.5	8.7	11.2		96.8	8.3	13.1
イマザリル	妨	93.3	7.2	10.8	妨	87.8	9.8	14.7
オルトフェニルフェノール	害	91.0	6.5	8.0	害	98.5	6.6	8.6
ジフェニル	ピ	93.1	6.1	12.5	ピ	101.7	5.2	6.3
チアベンダゾール	।	91.8	6.2	12.0	।	96.3	6.8	12.8
ピリメタニル	ク	91.9	7.4	10.7	ク	97.0	6.5	10.7
フルジオキソニル	な	93.1	4.4	8.6	な	91.8	7.7	12.3
プロピコナゾール-1	し	94.1	6.5	11.3	し	97.8	6.2	9.6
プロピコナゾール-2		97.4	8.0	9.8		106.6	3.9	6.0

3 QuEChERS 法の導入と最適化及び妥当性評価

グレープフルーツ及びレモンを対象とした添加回収試験では、全項目でガイドラインの評価基準を満たした（表5）。このことから、最適化したQuEChERS法はグレープフルーツ及びレモンに対する妥当性が確認された。

オレンジはブランク試料から妨害ピークが確認され、ガイドラインの目標値を満たさず選択性の評価が困難であった。その他の物質については、妨害ピークはみられず、真度80.7~93.0%、併行精度1.9~6.8RSD%とガイドラインの目標値を満たした。バナナは全ての物質について妨害ピークはみられず、真度83.9~92.5%、併行精度3.0~5.9RSD%と良好な結果が得られた。

これらの結果から、本法はかんきつ類について一定の可能性が確認されたが、マトリクスによる妨害の影響を考慮する必要がある。

表5 QuEChERS 改変法による選択性、真度（回収率）、併行精度、室内精度

物質名	添加量 ($\mu\text{g/g}$)	グレープフルーツ			レモン				
		選択性	回収率 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	選択性	回収率 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
アゾキシストロビン	10	妨	102.7	4.2	5.7	妨	104.5	1.0	4.8
イマザリル	5	害	98.1	2.5	3.8	害	99.2	2.6	3.7
オルトフェニルフェノール	10	ピ	97.2	2.1	3.4	ピ	97.8	2.5	4.6
ジフェニル	10	一	90.0	2.6	4.7	一	90.6	2.7	5.6
チアベンダゾール	10	ク	95.5	2.2	4.3	ク	93.5	2.7	3.6
ピリメタニル	10	な	95.5	2.1	3.4	な	97.2	2.4	4.4
フルジオキソニル	10	し	89.9	1.9	4.7	し	91.8	2.0	5.3
プロピコナゾール※	8		96.6	2.8	4.6		97.0	2.4	4.5

※プロピコナゾールは異性体合量値として評価した

本法はアセトニトリル抽出時のpH調整が不要かつ抽出工程が1回であるが、他の先行事例と同等の結果が得られ、実用性が確認された。

本研究で検討した検査法は、従来よりも工程数が減るため、検査時間の短縮につながり作業効率が向上した。また、有機溶剤の使用量削減による安全性の向上とコスト削減が可能となった。

今後は、本法を収去検査に適用し、産地や出荷時期等の違いによる防かび剤の使用実態調査を試みたい。

【参考文献】

- 文献1 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「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」別添の第2章一斉試験法のうち、GC/MSによる農薬等の一斉試験法（農産物）
- 文献2 平成19年11月15日食安発第1115001号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ガイドラインについて」

【経費使途明細】

○消耗品費	
①GC-MS/MS用グラファイトフェラル	7,029円
②固相抽出カラム	174,902円
③前処理法の検討に使用する試薬	61,033円
④防かび剤標準品	24,266円
⑤無農薬食品	16,170円
○振込手数料	6,600円
合計	290,000円
大同生命厚生事業団助成金	290,000円