論 文

輸入かんきつ類およびバナナの防カビ剤の分析法と残留実態調査(2015-2018年度)

南谷臣昭、廣澤智子、上保美奈、横山あかね、後藤黄太郎

要旨

かんきつ類とバナナに含まれる食品添加物の 8 種の防カビ剤(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)、フルジオキソニル(FLU)、アゾキシストロビン(AZX)、ピリメタニル(PYR)およびプロピコナゾール(PRP))を、アセトニトリルで抽出し、塩化ナトリウム飽和の 0.5 mol/L クエン酸緩衝液(pH 5.0)により塩析した後、C₁₈/PSA連結カートリッジにより精製して、LC-MS/MS と HPLC-FL により分析する手法を開発した。選択性、真度および併行精度はいずれも良好であった。この方法を用いて、市販の輸入果実 51 試料(かんきつ類 43 試料、バナナ 8 試料)に含まれる残留防カビ剤の実態調査を行ったところ、TBZ を 34 試料から、AZX を 3 試料から、PYR を 1 試料から、IMZ を 36 試料から、OPP を 2 試料から、FLU を 7 試料から検出した。DP を検出した試料はなく、全ての試料が厚生労働省の食品、添加物等の規格基準に適合していた。また、その他にもかんきつ類に高い頻度で残留する農薬として、2,4-D とピラクロストロビンがあることが分かった。かんきつ類の果皮と果実の防カビ剤の分布を調査したところ、防カビ剤は果皮に偏在しており、果皮を除去することで防カビ剤への曝露量を抑えられると考えられた。

キーワード:かんきつ類,バナナ,防カビ剤,液体クロマトグラフタンデム質量分析計(LC-MS/MS), 蛍光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ(HPLC-FL)

1 はじめに

輸入かんきつ類などの果実を輸送する際に発生するカビ(糸状菌)を防ぐ目的で使用される防カビ剤と

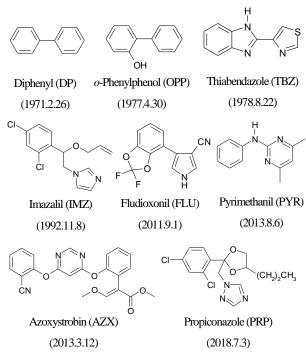


図1 防カビ剤の化学構造

2019年9月現在、食品衛生法施行規則において、食品添加物に指定されている8種類の防カビ剤. 化合物名の右かっこ内に略称、下かっこ内に指定年月日(施行日)を示した.

して、2019年9月現在、図1に示す8種類が認められている。防カビ剤は農産物の収穫後に使用する殺菌剤であり、ポストハーベスト農薬の一種である。ポストハーベスト農薬は、アメリカ等では使用が認められているが、わが国では使用が認められていない。そのため、わが国では食品安全委員会においてリスク評価が行われた防カビ剤が、薬事・食品衛生審議会の審議を経た上で食品添加物として指定され、その使用基準が定められている。

防カビ剤は、食品・添加物等の規格基準において、他の農薬と同様に食品ごとに残留基準が定められており、検疫所が定める輸入食品監視指導計画に基づくモニタリング検査が実施されている。地方衛生研究所でも、都道府県等監視指導計画に基づく流通食品等の収去検査が実施されており、岐阜県においては、残留農薬の一斉試験のために収去される年間 156 検体の農産物のうち、かんきつ類とバナナ年間 10 検体を対象として、防カビ剤の検査を追加して実施している。

防カビ剤の食品添加物への指定は、1971年のジフェニル (DP) にはじまり、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) と続き、近年フルジオキソニル (FLU)、アゾキシストロビン (AZX)、ピリメタニル (PYR) が指定された

(図1). われわれは2014年度に7種の防カビ剤を対象として、液体クロマトグラフタンデム質量分析計(LC-MS/MS)と蛍光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ(HPLC-FL)を用いた試験法を整備し、2015年度から運用を開始した。

今回,試験法開発時に得られた知見を報告するとともに,2015-2018 年度の 4 年間に実施した輸入かんきつ類とバナナに含まれる 7 種防カビ剤の実態調査の結果を報告する.2018 年 7 月に食品添加物として新規に指定された PRP は、本法により分析可能であることが分かったが、実態調査の対象に含まれていなかった。そのため、防カビ剤の検査と併行して実施した残留農薬の一斉試験から結果を抽出した。かんきつ類の検出率が高かった 2,4D とピラクロストロビンについて、残留農薬の一斉試験から抽出した結果と併せて報告する。最後に、果皮と果実に含まれる防カビ剤の分布について調査し、防カビ剤の摂取リスクについて論じた。

2 実験方法

2.1 試料

添加回収試験,定量下限の推定および試料マトリックスの測定への影響の確認には,和歌山県産のオレンジ,広島県産のレモンおよびフィリピン産のバナナを用いた.いずれも分析対象の防カビ剤が含まれていないことを確認した(以下,ブランク試料).

2.2 標準品および試薬等

AZX および IMZ は Dr. Ehrenstorfer GmbH 製の残留 農薬試験用 (純度 99.2%, 99.7%), OPP, FLU および DP は同社製の残留農薬試験用 (純度 99%以上)を用 いた. TBZ は和光純薬工業 (株) 製の食品添加物試験 用 (純度 99.0%), PYR は同社製の Tracesure (純度 98.9%), PRP は同社製の残留農薬試験用 (純度 98.0% 以上, 異性体混合物)を用いた. 標準原液は,各標準 品 20 mg を精密に量り採り,メタノールにて 20 mL に 定容して 1000 μg/mL の濃度に調製した. これを混合し て,メタノールにより希釈し,10 μg/mL の混合標準溶 液を調製して試験に用いた.

メタノールは和光純薬工業(株)製の LCMS 用, アセトニトリル,塩化ナトリウムは同社製の残留農薬 試験用,水酸化ナトリウム,リン酸水素ニカリウムは 同社製の特級,クエン酸水素ニナトリウム 1.5 水和物 は同社製の一級,セライトは同社製の No.545 を用いた. 酢酸アンモニウム, n-ブタノールは関東化学(株)製 の特級を用いた.

試験溶液の調製に用いた 0.5 mol/L クエン酸緩衝液 (pH 5.0) は, クエン酸二ナトリウム 1.5 水和物 131.5 g を正確に量り採り, 水 900 mL に溶解したのち, 20%

水酸化ナトリウム溶液でpH を 5.0 に調整し、水で正確に 1 L にして調製した. HPLC-FL の移動相に用いた 0.01 mol/L リン酸二水素カリウム溶液は、リン酸二水素カリウム 0.68 g を正確に量り採り、水に溶解して正確に 500 mL にして調製した.

試験溶液の調製に用いたオクタデシルシリル化シリカゲル(C_{18})カートリッジカラムはAgilent 社製Bond Elut LRC-C18 (500 mg), エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル (PSA) カートリッジカラムは同社製のBond Elut Jr-PSA (500 mg) を用い, 2 つのカートリッジカラムをこの順に連結して用いた (以下, C_{18} /PSA 連結カートリッジ).

2.3 装置

フードカッターは Retsch 社製グラインドミックス GM200, ホモジナイザーは (株) マイクロテック・ニチオン製のヒスコトロン NS-50 を用いた. LC-MS/MS 装置は Agilent 社製 1200LC システムに SCIEX 社製 4000QTRAP MS/MS システムを接続して用いた. HPLC-FL は島津製作所 (株) 製 LC-10Avp システムを 用いた.

2.4 試験溶液の調製

2.4.1 抽出

かんきつ類は果皮と果肉を分離し、果皮は細断し、適当な大きさに切断した果肉とともにフードプロセッサーにより粉砕、均質化して20.0gを正確に量り採った. バナナは果皮ごと適当な大きさに切断後、かんきつ類と同様に処理して20.0gを正確に量り採った. これにアセトニトリル60 mLを加えて2分間ホモジナイズした後、セライトを約1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過した. 残留物に約2 mLの水とアセトニトリル20 mLを加えて混和後、ホモジナイズし、吸引ろ過した. 得られたろ液を合せて、アセトニトリルで正確に100 mL とした.

抽出液 $4 \, \text{mL}$ を採り,塩化ナトリウム $5 \, \text{g}$, $0.5 \, \text{mol/L}$ クエン酸緩衝液($pH \, 5.0$) $10 \, \text{mL}$ およびアセトニトリル $5 \, \text{mL}$ を加え, $5 \, \text{分間振とうした}$. 静置した後,分離した水層を捨てアセトニトリル層を採った(以下,塩析).

2.4.2 精製

あらかじめアセトニトリル $10 \, \text{mL}$ を流してコンディショニングした C_{18} /PSA 連結カートリッジに,上記で得られた溶液を負荷し,さらにアセトニトリル $5 \, \text{mL}$ を注入して,全溶出液を採った.これにn-ブタノール $1 \, \text{mL}$ を加えて, $40 \, \text{CU}$ 下で濃縮し,溶媒を除去した後,メタノールにより正確に $4 \, \text{mL}$ として, $4 \, \text{mL}$ として 个 $4 \, \text{mL}$

表1 LC-MS/MS 分析の保持時間と SRM 条件

Compound	t _R ^{a)}	Precursor	Product	DP ^{b)}	CEc)
Name	(min)	ion	ion	(V)	(V)
Name	(111111)	(m/z) (m/z)		(v)	(٧)
TBZ	12.8	202	175	36	37
		202	131	36	47
AZX	15.7	404	372	71	19
		404	344	71	35
PYR	16.6	200	107	36	35
		200	82	36	37
IMZ	17.7	297	159	61	31
		297	69	61	45
PRP	17.8	342	159	101	37
		342	69	101	37
OPP	15.6	-169	-115	-50	-42
		-169	-169	-50	-5
FLU	16.1	-247	-180	-75	-40
		-247	-180	-75	-44

^{a)} t_R: Retention time; ^{b)} DP: Declustering potential; ^{c)} CE: Collision energy

試験溶液とした (0.02g 試料/mL).

2.5 測定条件

2. 5. 1 LC-MS/MS

DP以外の7種の防カビ剤はLC-MS/MS を用いて定 量した. LC 分離は Inertsil ODS-4 (内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒子径 3 μm, ジーエルサイエンス (株) 製) を用いた. LCの移動相は5mM 酢酸アンモニウム(A 液) および5 mM 酢酸アンモニウム含有メタノール溶 液 (B液) を用いた. グラジエントはB液組成15%か ら40%まで1分間で上昇させ、さらに14分間でB液 の組成を95%に上昇させ、5分間保持した後、B液組 成を 15%に戻して 10 分間平衡化した. 流速は 0.2 mL/min, 注入量は5 μL とした. MS/MS 測定は, TBZ, AZX, PYR, IMZ および PRP の 5 種の防カビ剤をエ レクトロスプレーイオン化法のポジティブモード (ESI(+)) により, OPP および FLU を ESI 法のネガ ティブモード (ESI(-)) により行った. イオンスプレ 一電圧は, ESI(+)を5.5 kV, ESI(-)を4.5 kV とし, イ オンソース温度は両極性とも 400℃として、選択反応 モニタリング (SRM) モードにより測定した. 測定に 用いたSRMトランジション条件を表1に示した.

2.5.2 HPLC-FL

DP の測定は河原らの報告 ¹⁾に従って行った. LC 分離は L-column ODS (内径 4.6 mm, 長さ 150 mm, 粒子径 5 μm, (一財) 化学物質評価研究機構製) を用い

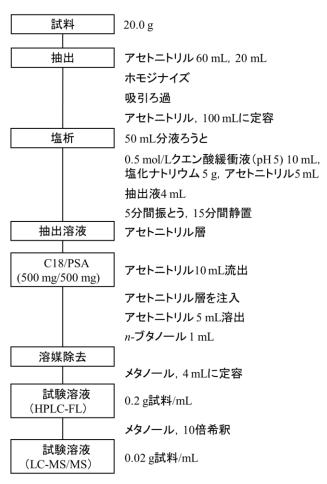


図2 操作のフローチャート

た. 移動相はメタノール・0.01 mol/L リン酸二水素カリウム溶液 (75:25) 混液を用いた. 流速は 1 mL/min, 注入量は 10 μL とした. 検出は蛍光光度計により, 励起波長は 248 nm, 蛍光波長は 313 nm とした.

2.6 定量

定量は絶対検量線法により行った. LC-MS/MS で測定した7種の防カビ剤は、混合標準溶液をメタノールで希釈し、1、2.5、5、10、25 $\mathrm{ng/mL}$ の5点を調製して検量線を作成した. HPLC-FL で測定した DP も、標準溶液をメタノールで希釈し、0.1、0.2、0.5、1 $\mathrm{\mu g/mL}$ の4点を調製して検量線を作成した.

2.7 添加回収試験

オレンジ、レモンおよびバナナのブランク試料に 1 mg/kg と 10 mg/kg の濃度となるように添加し、それぞれの濃度で 5 併行(PRP はオレンジで 1 回のみ実施)の試験を行い、真度と併行精度を求めた。試験は防カビ剤の標準溶液を添加し、30 分間放置後、2.4 試験溶液の調製に従い行った。

2.8 定量下限の推定および試料マトリックスの測定への影響の確認

オレンジ、レモン、バナナのブランク試料を、2.4試験溶液の調製に従い調製し、試料中0.1 mg/kg に相当する濃度(HPLC-FL 測定は0.2 μ g/mL、LC-MS/MS

測定は2 ng/mL) となるように標準溶液を添加して, 定量下限推定用のマトリックス標準溶液とし,クロマトグラムにおいて S/N を求めた.

マトリックス標準溶液は、添加回収試験における回収率 100%に相当する濃度(添加濃度 1 mg/kg は 20 ng/mL, 10 mg/kg は 200 ng/mL) となるように、オレンジ、レモン、バナナのブランク試料の精製後の溶液に標準溶液を添加して調製した。同濃度の溶媒標準溶液のピーク面積に対するマトリックス標準溶液のピーク面積の比を求め、試料マトリックスの測定への影響を評価した。なお、10 mg/kg 相当のマトリックス標準溶液は、メタノールでさらに 10 倍希釈 (0.002 g 試料/mL)して回収率 100%に相当する濃度が 20 ng/mL になるように調製した。

2.9 抽出条件の検討

2.9.1 pHによる抽出効率の比較

TBZ, IMZ, FLU, AZX の使用表示があったアメリカ産のレモンを粉砕, 均質化後, 20%(w/v)水酸化ナトリウム溶液を加えて中和 (pH7) した試料とpH10 超 (>pH10) とした試料を調製し, 水酸化ナトリウム溶液無添加の試料 (pH4 未満 (< pH4)) の定量値と比較してpHの違いによる防カビ剤の抽出効率を検証した.

2.9.2 塩析と PSA カートリッジの精製効果の検証

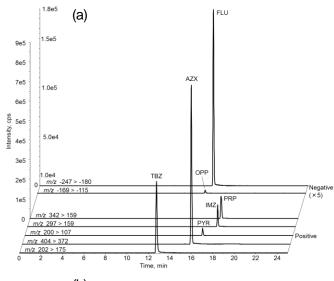
オレンジのブランク試料を用い、2.4.2 精製の工程において塩析の有無と PSA カートリッジカラムの有無の組み合わせによる合計 4 通りの操作フローにより試験溶液を調製し、ESI(+)および(-)の m/z 50-1000 における Q1 スキャンのクロマトグラムを比較して、塩析と PSA カートリッジの精製効果を検証した.

2.10 防カビ剤の実態調査

2015-2018 年度に岐阜県内の小売店から収去された輸入かんきつ類とバナナ 45 試料および岐阜県内の小売店で購入した輸入かんきつ類6試料の合計51試料に含まれる防カビ剤の残留量を調査した。51 試料の内訳は、オレンジが20 試料、グレープフルーツが11 試料、レモンが10 試料、スウィーティーが1 試料、ライムが1 試料、バナナが8 試料であった。調査品目はPRPを除く7種の防カビ剤で、定量下限値は0.1 mg/kgとした。

2.11 その他の残留農薬の実態調査

2.10 防カビ剤の実態調査の 51 試料のうち岐阜県内の小売店から収去された 45 試料について,防カビ剤の検査と同時に行った残留農薬の一斉試験の検査結果から,防カビ剤の PRP および検出率が高かった 2,4-D とピラクロストロビンの結果を抽出した. 残留農薬の一斉試験は既報 ²⁾により行い,定量下限値は PRP が 0.003 mg/kg, その他の 2 農薬は 0.005 mg/kg とした.



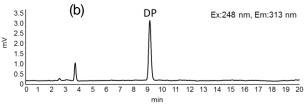


図3 分析クロマトグラム
(a) LC-MS/MS(溶媒標準溶液(20 ng/mL));
(b) HPLC-FL(溶媒標準溶液(200 ng/mL))

表2 添加回収試験の結果

Compound	Orange(%)		Lemon(%)		Banana(%)	
Name	1ppm ^{a)}	10ppm	1ppm	10ppm	1ppm	10ppm
TBZ	85(2) ^{b)}	93(2)	84(2)	88(3)	94(1)	90(3)
AZX	94(3)	98(2)	95(2)	93(3)	102(3)	99(2)
PYR	98(2)	99(1)	96(2)	94(4)	103(2)	97(4)
IMZ	86(3)	95(1)	90(2)	89(3)	92(3)	96(2)
PRP	79 ^{c)}	100	-	-	-	-
OPP	98(3)	99(3)	98(4)	92(5)	90(3)	90(2)
FLU	97(1)	97(2)	97(3)	94(3)	96(2)	94(2)
DP	90(1)	91(1)	91(1)	90(3)	87(1)	84(2)

a) 添加濃度. ppm=mg/kg; b) 数字は真度. かっこ内の数字は相対標準偏差. n=5 の併行試験の平均値と相対標準偏差を%で表示; o) 単回の測定の結果.

2.12 かんきつ類の果皮と果実の防カビ剤の分布

TBZ, IMZ の使用表示があったアメリカ産のオレンジとイスラエル産のグレープフルーツおよび TBZ, IMZ, FLU, AZX の使用表示があったアメリカ産のレモンを用い、果実全体、果皮および果肉のそれぞれに含まれる防カビ剤を定量し、果皮と果実の防カビ剤の分布状況を検証した. 定量下限値は 0.01 mg/kg とした.

表3 溶媒標準に対するマトリックス標準の比

Compound	Orange(%)		Lemon(%)		Banana(%)	
Name	1ppm ^{a)}	10ppm	1ppm	10ppm	1ppm	10ppm
TBZ	109	103	105	105	110	103
AZX	105	111	108	114	110	116
PYR	113	111	107	110	112	112
IMZ	101	120	109	120	109	126
PRP	80	97	-	-	-	-
OPP	103	98	102	105	94	109
FLU	101	98	101	101	100	103
DP ^{b)}	102	102	104	102	101	104

a) 試料中の濃度に換算した添加濃度. ppm=mg/kg; b) HPLC-FLの結果.

3 結 果

3.1 測定結果

試料中濃度 1 mg/kg に相当する各防カビ剤の分析クロマトグラムを図3に示した.

3.2 添加回収試験

オレンジ、レモン、バナナのブランク試料を用いた添加回収試験(添加濃度 $1 \, \text{mg/kg}$, $10 \, \text{mg/kg}$)の結果を表 $2 \, \text{に示した}$.

3.3 定量下限の推定および試料マトリックスの影響

オレンジのブランク試料および添加濃度 0.1 mg/kg に相当するマトリックス標準のクロマトグラムを図4 に示した。また、オレンジ、レモン、バナナのマトリックス標準の溶媒標準に対する面積の比を百分率で示した(表3).

表4 防カビ剤の使用表示があったレモンの pH による抽出効率の違い

Compound	< pH4	pH 7	>pH 10	
Name	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	
TBZ	0.44	0.58	0.52	
AZX	0.010	0.009	0.005	
IMZ	0.22	0.24	0.29	
FLU	0.72	0.72	0.62	

3.4 pH による抽出効率の違い

防カビ剤の使用表示があったレモンを用い, 抽出時のpHを変えて定量値を比較した結果を表4に示した.

3.5 塩析と PSA カートリッジの精製効果

オレンジのブランク試料を用いて、2.4.2 精製の工程において塩析の有無と PSA カートリッジカラムの有無の組み合わせによる合計4通りの操作フローにより調製した試験溶液を、LC-MS/MS の ESI(+)および(一)の両極性において Q1 スキャンで分析したクロマトグラムを図5に示した.

3.6 防カビ剤の実態調査の結果(2015-2018年度)

輸入かんきつ類の防カビ剤残留調査の結果を、オレンジとその他のかんきつ類に分けて図6に示した。データは収去(購入)した順に示した。

オレンジ 20 試料の産地の内訳は、オーストラリア産が 18 試料、アメリカ産が 2 試料であった。 20 試料全てから TBZ($0.1\sim4.1\,\mathrm{mg/kg}$)と IMZ($0.4\sim3.9\,\mathrm{mg/kg}$)の 2 種の防カビ剤が検出され、FLU が 2 試料から検出された($1.0,1.2\,\mathrm{mg/kg}$).

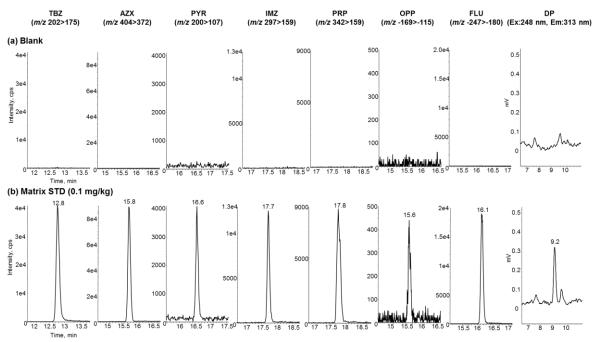


図4 オレンジのブランク試料と定量下限相当濃度のマトリックス標準溶液の分析クロマトグラム (a) ブランク試料; (b) マトリックス標準溶液(0.1 mg/kg)

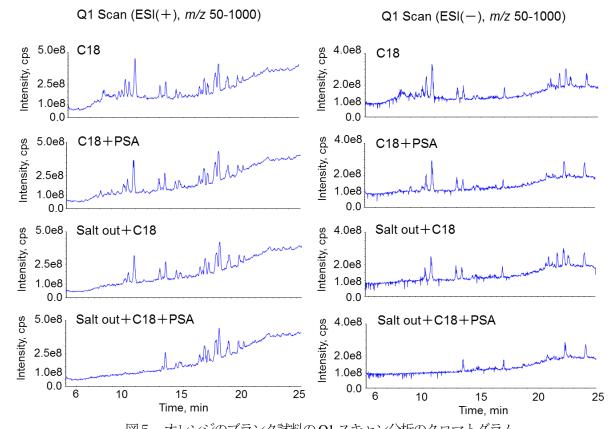
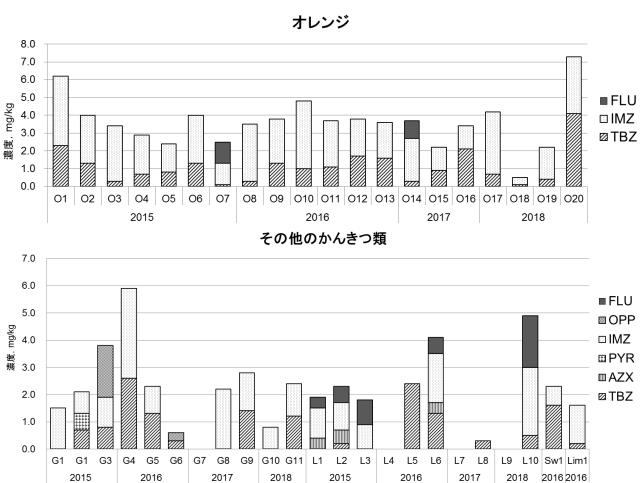


図5 オレンジのブランク試料の Q1 スキャン分析のクロマトグラム 上段: C_{18} のみ、中上段: C_{18} およびPSA、中下段: 塩析および C_{18} 、下段: 塩析、 C_{18} およびPSA

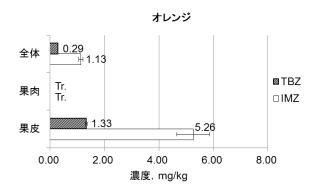


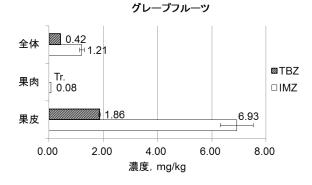
上段:オレンジ; 下段:その他のかんきつ類 O: オレンジ,G: グレープフルーツ,L: レモン,Sw: スウィーティー,Lim: ライム

実態調査の結果 (2015-2018年度)

グレープフルーツ 11 試料の産地の内訳は、南アフリカ産が7試料、アメリカ産が2試料、オーストラリア産とメキシコ産がそれぞれ1試料であった。10 試料から防カビ剤が検出され、TBZ が7 試料 (0.3~2.6 mg/kg)から、PYR が1 試料 (0.6 mg/kg)から、IMZ が9 試料 (0.8~3.3 mg/kg)から、OPP が2 試料 (0.3, 1.9 mg/kg)から検出された。

レモン10試料の産地の内訳は、アメリカ産が5試料、 チリ産が3試料、ニュージーランド産と南アフリカ産 がそれぞれ1試料ずつであった. 8試料から防カビ剤 が検出され、TBZが5試料(0.2~2.4 mg/kg)から、 AZXが3試料(0.4~0.5 mg/kg)から、IMZが5試料 (0.9~2.5 mg/kg)から、FLUが5試料(0.4~1.9 mg/kg) から検出された.





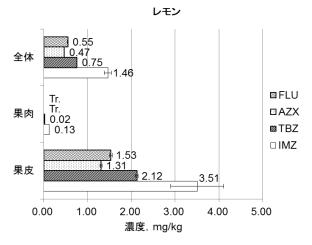


図7 かんきつ類の果皮と果実の防カビ剤の分布 上段: オレンジ,中段: グレープフルーツ,下段: レモン

スウィーティー1 試料はイスラエル産で、TBZ が 0.7 mg/kg, IMZ が 0.7 mg/kg 検出された. ライムはメキシコ産で、TBZ が 0.2 mg/kg, IMZ が 1.4 mg/kg 検出された.

バナナ8試料の産地の内訳は、フィリピン産が7試料、エクアドル産が1試料であった. 防カビ剤は検出されなかった.

DP は、かんきつ類およびバナナのいずれの試料からも検出されなかった。

3.7 PRP, 2,4-D およびピラクロストロビンの実態調査の結果(2015-2018年度)

PRP は、今回調査した収去検体 45 試料から検出されたものはなかった.

2,4-D は、オレンジ 18 試料中 3 試料 (0.008~0.066 mg/kg) から、グレープフルーツ 10 試料中 2 試料 (0.009~0.023 mg/kg) から、レモン 9 試料中 5 試料 (0.007~0.039 mg/kg) から検出され、バナナ 8 試料からは検出されなかった。

ピラクロストロビンは、グレープフルーツ 10 試料中8 試料から 0.013~0.046 mg/kg の濃度で検出され、オレンジ、レモンおよびバナナの収去検体35 試料からは検出されなかった.

3.8 かんきつ類の果皮と果実の防力ビ剤の分布

防カビ剤の使用表示があったかんきつ類の果皮と果実の防カビ剤を定量し、分布状況を調べた結果を図7に示した。定量下限値(0.01 mg/kg)未満で防カビ剤が検出された場合は図中 Tr.と記載した。

4 考 察

4.1 分析法の開発

4.1.1 測定条件の検討

1972年、林らがかんきつ類中の DP を水素炎イオン 化検出器付きガスクロマトグラフ (GC-FID) により定 量する方法を開発 3して以来、クロマトグラフィーを 分離手段とする防かび剤の分析法がいくつも報告され てきた. 特に 1978 年の TBZ の指定以後は, DP と OPP に加えて、TBZ をはじめとする塩基性の防カビ剤を同 時に分析する手法が数多く報告されてきた. 機器は GC-FID3,4をはじめ、アルカリ熱イオン化検出器付き ガスクロマトグラフ (GC-FTD) 5, ガスクロマトグラ フ質量分析計 (GC-MS) 6-10)などのガスクロマトグラ フを用いるものと、紫外分光光度型検出器付き HPLC (HPLC-UV) 6),7), 11)-23), HPLC-FL11), 13)-15), 19)-28), 33), 36), 39), 液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS) 29/33), LC-MS/MS^{9), 34)-39)}などの高速液体クロマトグラフを用 いるものの2つに大別される.測定時間の短縮のため、 クロマトグラフィーではなく、安定同位体標識化合物

を内部標準として用いたフローインジェクション MS/MS を用いた分析例 ⁴⁰⁾もあるが、近年の主流は LC-MS/MS を用いた方法である。今回われわれは、ESI プローブ付き LC-MS/MS を用いて、DP以外の7種の 防カビ剤を分析することとし、ESI 法でイオン化しない DP を HPLC-FL を用いて分析することとした.

LC-MS/MS の SRM トランジション条件は、10 ng/mL または 100 ng/mL の標準溶液をインフュージョン法によりイオン化させて最適化した。その結果、TBZ、AZX、PYR、IMZ、PRP の 5 種は ESI(+)が、OPP、FLU の 2 種は ESI(-)が適していた(表 1)。OPP は検出イオンの強度が低く、試料中 0.1 mg/kg に相当するオレンジ、レモン、バナナの各種マトリックス標準溶液の S/N は、41、59、34 であった(図 3)。その他の 6 種の防カビ剤は、同濃度でのマトリックス標準溶液の S/N が 200~9700 となり、各種マトリックスの存在下(PRP はオレンジのみ)、LC-MS/MS により測定した 7 種全ての防カビ剤で、定量下限値を 0.1 mg/kg に設定することが可能であった(図 4 (b))。また、クロマトグラム上、試料由来のマトリックスによる妨害ピークは認められず、選択性が高かった(図 4 (a))。

HPLC-FL により測定した DP は,クロマトグラム上に妨害ピークが見られた($t_R=9.8~min$)が,DP と分離しており定量に影響はなかった(図 4(a), (b)). 試料中 0.1~mg/kg に相当するオレンジ,レモン,バナナの各種マトリックス標準溶液の S/N は,16, 19, 13 となり,S/N が 10 以上となっていたため,LC-MS/MS 測定と同様に定量下限値を 0.1~mg/kg に設定することが可能であった(図 4(b)).

定量に用いた検量線は、LC-MS/MS で $1\sim25$ ng/mL の 5 点、HPLC-FL で $0.1\sim1$ µg/mL の 4 点とした.検量線の決定係数(r^2)は、いずれの防カビ剤も 0.995 以上となり、良好な結果が得られた.

4.1.2 抽出溶媒について

防カビ剤の分析に使用される抽出溶媒には、酢酸エ チル、アセトン、アセトニトリルなどがある.

酢酸エチルは防カビ剤の溶解性が優れている一方で、 試料由来のマトリックスの抽出が抑えられることから、 特に GC-FID や HPLC-UV といった選択性の低い測定 機器を用いる分析で広く使用されてきた ^{1,4,5,11,13,10,1} ^{18,20),22)}. 抽出に酢酸エチルを用いると、試料が酸性状態となるかんきつ類の場合、TBZ や IMZ などの塩基性の防カビ剤の抽出効率が低下する. そのため、抽出前の試料に水酸化ナトリウム溶液や酢酸ナトリウムなどの塩基を添加して、試料を中性~塩基性に調整することが定法とされてきた ^{4,13}. 一方で、アセトンを用いる場合は、酸性状態でも TBZ や IMZ の抽出効率は 変化しないとの報告があり ¹⁴, 試料の pH 調整を必要 としないと考えられるが, 試料由来の多くのマトリッ クスが同時に抽出されるため, 精製において工夫が必 要となる.

アセトニトリルを抽出溶媒とする代表的な残留農薬の分析法にQuEChERS 法がある 41). 抽出液から塩析によって水層を分離した後、アセトニトリル層の一部をバルク状の PSA などを用いた分散固相抽出 (dSPE)により精製する方法であり、簡易迅速な分析法として近年防カビ剤の分析法にも採用されている 33,35,37,38). アセトニトリルを使用して TBZ や IMZ を抽出する場合、試料に水酸化ナトリウム溶液などを加えて pH 調整を行う報告がある一方で 15,33,36, pH 調整しなくても良好な回収率が得られている報告もある 9,10,37,39).

今回われわれは、厚生労働省通知の「LCMS による 農薬等の一斉試験法 (通知一斉試験法) Ⅰ およびⅡ 「農 産物]」と同様に抽出を行った42. すなわち、試料20g にアセトニトリルを加えてホモジナイザーによる粉砕 抽出を2回実施し、ろ液を100 mL に定容してから、 その一部を分液ろうとを用いて塩析した.抽出時のpH 調整は行わなかったが、添加回収試験の真度が79%以 上、相対標準偏差が 5%以内と良好な結果が得られた (表2). しかし、実際に防カビ剤が使用されたレモン を用いてpH調整の効果を検証したところ,pH調整を しなかった場合 (< pH 4) の定量値は、TBZ が pH 7 に対して76%, IMZが>pH10に対して76%にとどま った. 一方で、AZX とFLUは、>pH10とするとpH7 に対して定量値がそれぞれ50%,86%と低下した.今 回の検証では、pH を中性付近にすることが最適である との結果が得られたが、他の防カビ剤を含めてさらに 検証が必要である(表4).

塩析は塩化ナトリウム飽和の 0.5 mol/L クエン酸緩 衝液 (pH 5.0) と混合して行った。液-液抽出の際の水 層のpH も回収率に影響することが知られているが³⁹、 溶媒標準溶液を用いた検討において、全ての防カビ剤 で良好な回収率となった。

4.1.3 精製カートリッジの検討

TBZ や IMZ などの塩基性の防カビ剤は、酢酸エチルで抽出した後、酸塩基分配により精製するのが一般的な方法であったが ^{1,12,13}, これに代わりシリカゲルカートリッジや陽イオン交換カートリッジなどの固相抽出 (SPE) による精製法が主流となり ^{5,16,17,19,20,22,24,25,27,28,31}, 近年は dSPE を使用して簡易、迅速に精製を行う方法が報告されている ^{8,33,35,37,38}.

今回われわれは、 C_{18} PSA 連結カートリッジを用いた SPE による精製を採用した。オレンジ、レモン、バナナの抽出液を精製したところ、 C_{18} カートリッジの上

部は黄色、PSA カートリッジの上部は黄色~褐色となり、試料由来の色素成分を除去する効果があった. しかし、オレンジやレモンでは試験溶液がわずかに黄色となり、色素を完全に除去することはできなかった.

LC-MS/MSによる定量においては、色素の除去よりも、HPLCの分離後に共溶出する試料由来のマトリックスによるイオン化促進やイオン化抑制が問題となる。これを検証するため、マトリックス標準溶液と溶媒標準溶液との面積値の比を求めた(表3). PRP 以外の防カビ剤は、1 mg/kg の添加濃度において、94~112%と良好な結果となった(表3). 10 mg/kg の添加濃度では、IMZが 120%以上となったが、その他の防カビ剤は97~116%と良好な結果となった。1 mg/kg の添加濃度の試験溶液(0.02 g 試料/mL)に対して 10 mg/kgの添加濃度の試験溶液(0.02 g 試料/mL)に対して 10 mg/kgの添加濃度の試験溶液は、試料マトリックスの濃度が1/10(0.002 g 試料/mL)であり、試料マトリックスの影響は1 mg/kg 添加の試験溶液よりも小さいため、IMZで120%以上となったのは、偶然誤差と考えられる.

塩析と PSA カートリッジの精製効果を確かめるた め、これらの有無による4通りの操作フローでQ1ス キャン測定を行い、それぞれの精製効果を確かめた. 塩析を行うことで、ESI(+)の Q1 スキャンクロマトグ ラムのベースラインは低下した. PSA カートリッジに より、ESI(+)のQ1スキャンクロマトグラムのt_R=5~ 10分のピーク強度が低下し、ESI(-)のt_R=20~23分の ピークの一部が消失した. 塩析と PSA カートリッジに よる精製を両方行うことにより、ESI(+)と ESI(-)の 両極性のクロマトグラムにおいて、t_R=10~11 分および 13分のピークが消失した (図5). 塩析と PSA カート リッジによる精製を両方行うことにより、オレンジに おいては高い精製効果が認められた.しかし, LC-MS/MS の測定対象とした防カビ剤のうち TBZ 以 外の6種が溶出するt_R=15~18分に溶出する夾雑成分 の除去が十分とは言えない.

実際PRPは、オレンジのみの結果であるが、1 mg/kg の添加回収試験の真度が79%と低く、同濃度のマトリックス標準の真度も80%と低かった。このことから、添加回収試験の真度の低下は、試料マトリックスによるイオン化抑制によるものと推測された(表2,表3). PRPの保持時間(kg)は17.8分であった。試料マトリックスの網羅的な分析結果であるESI(+)のQ1スキャンのクロマトグラムにおいて、kg=17.8分付近に強度の高いピークが見られ、この成分がPRPのイオン化抑制の原因であると考えられた(図5下段).イオン化抑制を回避するためにはさらに効果的な精製工程が望まれる.

精製後の溶媒の除去は、n-ブタノールを加えた.溶

媒標準をアセトニトリル溶液として,減圧濃縮と窒素 吹付けにより溶媒を除去したところ,n-ブタノールを 加えない場合に DP が 51%,OPP が 0%となり,回収 率が低下した. DP と OPP は蒸気圧が高く (DP:4000 mPa(20°C),OPP:900 mPa (140°C)) 43 ,減圧濃縮や 窒素の吹付けにより揮発することが知られている 7,210 . これを防ぐため,中里らの報告 13 に従い,n-ブタノールをキーパーとして加え, 40 C以下で減圧濃縮を行うことで良好な回収率が得られた.

4.2 近年の防カビ剤の検出状況と摂取リスク

4.2.1 近年の防カビ剤の検出状況

今回実施した全51 試料の実態調査の結果,分析対象 とした7種の防カビ剤はいずれも厚生労働省が定める 残留基準に適合していた.

TBZ と IMZ の 2 種は, 20 試料のオレンジ全てから検出された. グレープフルーツでは, TBZ の検出率は64% (7/11), IMZ の検出率は82% (9/11) となった. レモンでは, TBZ の検出率は50% (5/10), IMZ の検出率は50% (5/10) となった. TBZ と IMZ はオレンジでそれぞれ最大4.1 mg/kg, 3.9 mg/kg 検出され,他の防カビ剤に比べて高かった. 検出率と残留濃度の高さから, TBZ と IMZ は、わが国で近年輸入かんきつ類に使用される主な防カビ剤であると言える(図6).

食品添加物に最初に指定された DP は、今回調査した 51 試料のいずれからも検出されなかった。また、OPP はグレープフルーツの2 試料(検出率 18% (2/11)) のみからの検出にとどまった。

その他,2011 年以降に新たに指定された4種の防力 ビ剤のうち、分析対象とした AZX、PYR、FLU の3 種の防力ビ剤で、検出率、残留濃度ともに高かったの は、FLU (オレンジ検出率10%(2/20)、レモン検出率 50%(5/10))であった。続いて検出率が高かったAZX は、レモン3試料から検出された(検出率30%(3/10)). PYR はグレープフルーツ1試料のみからの検出にとど まった(検出率9%(1/11))、レモンでは、3種類以上 の防力ビ剤が残留した試料が4試料となり、他のかん きつ類より多かった(図6).

一色らが 1980 年に報告した北九州市内の輸入かんきつ類の実態調査結果 (オレンジ43 試料, グレープフルーツ 51 試料, レモン 42 試料) によると, DP の検出率は, オレンジ, グレープフルーツ, レモンいずれも 85%以上で, OPP の検出率は, オレンジで 57%, グレープフルーツで44%, レモンで65%であった.また, TBZ の検出率は, オレンジが 44%, グレープフルーツが 37%, レモンが 9%であった 4. 茶谷らが 1996 年に報告した 1993~1994 年の京都府内の輸入かんきつ類 33 試料の防カビ剤の残留実態調査によると, TBZ の検

出率は 48%, IMZ の検出率は 64%, OPP の検出率は 52%で、DP は検出されていない ¹⁴⁾. 瀧野らが 2006 年 に報告した2004年の滋賀県内の輸入かんきつ類18試 料の防カビ剤の残留実態調査においても, DP は検出 されておらず、TBZ と OPP の検出率はそれぞれ 72%、 50%であった28). 岡本らが2007年に報告した1993~ 2006 年度の大阪府内の輸入かんきつ類の防カビ剤の 残留実態調査によると、TBZの検出率は、オレンジが 64%, グレープフルーツが 78%, レモンが 15%, IMZ の検出率は、オレンジが74%、グレープフルーツが86%、 レモンが 64%, OPP の検出率は、オレンジが 18%, グ レープフルーツが 26%. レモンが 30% で、DP はオレ ンジ56 試料中1 試料のみ(検出率1.8%) から検出さ れた49. その続報で、福井らが2017年に報告した2007 ~2016年度の大阪府内の輸入かんきつ類140試料の防 カビ剤の残留実態調査によると、TBZの検出率は46%、 IMZの検出率は96%で、OPPが検出された試料はなく、 DP も全28 試料から検出されたものはなかった45.

以上の結果から、近年においては、かんきつ類の防カビ剤としてTBZとIMZが主に使用され、DPが防カビ剤として使用されることはほとんどなく、OPPは使用頻度が大幅に減少しているものと推測される.

今回分析したバナナ8試料からは、防カビ剤が検出されなかった。輸入国の偏りがあるため断定はできないが、バナナからの防カビ剤の摂取リスクは低いと言える。また、収去検体45試料のPRPについては、食品添加物に指定される以前からの残留農薬のモニタリングの検査結果において、検出された試料はなかった。

4.2.2 輸入かんきつ類に使用されるその他の農薬

輸入かんきつ類に残留することが多い殺菌剤として、TBZ や IMZ の他に、ベノミル、チオファネートメチル、カルベンダジム、プロクロラズ、ピラクロストロビンなどが知られている ^{0,29,32,34,35,40}. また、除草剤の 2,4-D は、植物調整剤として、ヘタの落下を防いで、保存期間を延ばすことを目的に使用されるとの報告もある ^{0,47}.

今回、残留農薬の一斉試験の結果から、2,4-D とピラクロストロビンの結果を抽出した. 2,4-D は、オレンジの検出率が17%(3/18)、グレープフルーツの検出率が20%(2/10)、レモンの検出率が56%(5/9)で、バナナの収去検体8試料からは検出されなかった. ピラクロストロビンは、グレープフルーツの検出率が80%(8/10)であったが、オレンジ、レモンおよびバナナの収去検体35試料からは検出されなかった.

茶谷らが 1996 年に報告した 1993~1994 年の京都府 内の輸入かんきつ類 33 試料の農薬の残留実態調査に よると, 2,4-D は輸入かんきつ類 33 試料中 10 試料か ら,0.02~0.32 mg/kg の濃度で検出された(検出率30%) とある ¹⁴⁾. 2,4-D は少なくとも 1990 年代から輸入かん きつ類に高い頻度で検出される農薬であると考えられ, われわれの調査の結果から,近年においても依然とし て輸入かんきつ類から高い頻度で検出される農薬であ ることが示唆された.

また、増田らは、2014年度に報告した残留農薬の実態調査おいて、ピラクロストロビンは2012年度から主に南アフリカ産のかんきつ類からの検出が増加していることを報告している⁴⁸. 今回の調査において、ピラクロストロビンが検出されたグレープフルーツ8試料の産地の内訳は、7試料が南アフリカ産、1試料がアメリカ産であり、不検出となったグレープフルーツはアメリカ産、メキシコ産、オーストラリア産がそれぞれ1試料であり、増田らの報告を裏付ける結果となった.

4.2.3 輸入かんきつ類の果皮と果実に分布する防力 ビ剤と摂取リスク

今回われわれは、複数の防カビ剤の使用表示があったかんきつ類を用いて、果皮と果実に分布する防カビ剤の濃度を調査した。その結果、オレンジでは、TBZと IMZの果皮中濃度に対する果肉中濃度の割合(果肉/果皮濃度比)は1%未満(定量下限値未満(Tr.))であった。グレープフルーツの果肉/果皮濃度比は、TBZが1%未満(Tr.)、IMZが1.1%であった。レモンの果肉/果皮濃度比は、IMZが3.7%、TBZが0.9%、AZXとFLUが1%未満(Tr.)であった。どのかんきつ類も防カビ剤は果皮に偏在していることが分かった(図7)。

永山らの報告 ⁴⁹において、レモン 10 試料の果肉/果 皮濃度比は、IMZ が 1.3~14%の範囲内であったが、今 回の調査においては、オレンジとグレープフルーツの IMZ はこの範囲よりも小さくなった.これは、今回用 いたレモンの果皮と果実の重量の比率が 34:66 で、オ レンジ (果皮:果実=22:78) やグレープフルーツ (果 皮:果実=20:80) に比べて果皮の割合が高かったこ とが一因であると考えられる.

その他、松本ら、木村ら、金内らが IMZ とその代謝物について調査した報告 50-52)においても、同様の結果となっている。また、田中らがグレープフルーツの実試料と模擬試料を用いて、OPP と DP の果肉/果皮濃度比を求めたところ、OPP が 3.3%、DP が 0.04%であったとしている 53)。今回われわれの調査の結果、TBZ、AZX、FLU で果肉/果皮濃度比は 1%未満となったことで、既報も含め、多くの防かび剤が果皮に偏在している状況を確認できた。

果皮を除去すれば、防カビ剤に曝露される量はかな り抑えられると考えられるが、オレンジやグレープフ ルーツでは果皮ごと切ったものを食用とすることが多 く、レモンも果皮がついた状態で料理に添えられることがあり、果皮からの汚染による摂取量の増加も否定できない。実際、防カビ剤が使用されたグレープフルーツを半分に切断して、絞り器により手作業で果汁をしぼり、搾り汁を分析したところ、果皮と同程度の防カビ剤が検出された(果皮:TBZ0.27 mg/kg、IMZ0.04 mg/kg、絞り汁:TBZ0.25 mg/kg、IMZ0.02 mg/kg)。このことから、摂取時の果皮から可食部への防カビ剤の汚染には注意が必要である。

5 まとめ

食品添加物の8種の防カビ剤を、アセトニトリルで 抽出し、塩化ナトリウム飽和の0.5 mol/Lクエン酸緩衝 液 (pH 5.0) により塩析した後、C18/PSA連結カート リッジにより精製して調製した試験溶液を、 LC-MS/MSとHPLC-FLにより分析する手法を開発し た. 各防カビ剤のクロマトグラム上に定量を妨害する ピークはなく、真度および併行精度ともに良好であっ た.

この方法を用いて、2015-2018 年度に岐阜県内で販売されていた輸入かんきつ類43試料とバナナ8試料の合計51 試料に残留する PRP 以外の7種の防力ビ剤の検査を実施したところ、TBZを34試料から、AZXを3試料から、PYRを1試料から、IMZを36試料から、OPPを2試料から、FLUを7試料から検出し、DPを検出した試料はなかった。また、51試料のうち収去検体45試料について PRPの残留農薬の一斉試験の結果を調査したところ、全て不検出であった。食品添加物として指定されているもの以外に、近年輸入かんきつ類において高い頻度で検出される農薬として、2,4-Dやピラクロストロビンがあることが分かった。

実際に防カビ剤の使用の履歴があったかんきつ類の 果皮と果実の防カビ剤の分布を調査したところ, 既報 で報じられている通り, 防カビ剤は果皮に偏在しており, 果皮を除去すれば防カビ剤に曝露される量を抑え られると考えられたが, 果皮から可食部への汚染の可 能性があり注意が必要である.

6 謝 辞

残留実態調査は、主に岐阜県健康福祉部生活衛生課の残留農薬等検査事業として実施された収去検査の結果をとりまとめたものである。収去計画を立案した本県生活衛生課の担当者と、実際の収去を行った本県の各保健所・センターの食品衛生監視員の皆様に感謝いたします。また、実験データの採取にご助力いただきました野崎尚子さんに深謝いたします。

6 文 献

- 川原章弘,山田真記子,加藤喜昭,中村幹雄,西島基弘,伊藤誉志男:柑橘類中のジフェニル,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の系統的分析,Foods Food Ingred. J., No.163, 104-110, 1995.
- 2) 永井宏幸,南谷臣昭,坂本友佳,後藤黄太郎:食品中の残留農薬調査(平成23~27年度),岐阜県保健環境研究所報,24,25-30,2016.
- 3) 林敏夫,加藤三郎,渡辺晴美,原義知,谷村顕雄: かんきつ類中のジフェニルの定量,食品衛生学雑誌,13,78-84,1972.
- 4) 一色賢司,津村周作,渡辺忠雄:かんきつ類中の ジフェニル,オルトフェニルフェノールおよびチ アベンダゾールの分析,日本農芸化学会誌,54, 1045-1050,1980.
- 5) 満野昭彦, 小嶋美穂子, 原田浩之, 山中直: フレームサーミオニック検出器付きガスクロマトグラフ(GC-FTD)を用いたイマザリル・チアベンダゾールの同時分析法について, 滋賀県衛生科学センター, 40, 88-91, 2005.
- 6) 外海泰秀, 津村ゆかり, 中村優美子, 伊藤誉志男: かんきつ果実中の収穫後使用される農薬の分析, 食品衛生学雑誌, 33, 23-30, 1992.
- 7) 久野恵子,石原理恵,新田伸子,山東英幸:柑橘 類中の防かび剤の分析法,和歌山県環境衛生研究 センター年報,50,33-37,2004.
- 8) 高橋邦彦,堀江正一,広瀬義文:GC/MS による 農産物中のジフェニルおよびオルトフェニルフ ェノールの分析,食品衛生学雑誌,49,403-406, 2008.
- 9) 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報告, 77, 31-35, 2015.
- 10) Nagashima H., Hirao A., Tokuda Y., 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.
- 11) 北田善三, 玉瀬喜久雄, 井上雅成, 佐々木美智子, 谷川薫: かんきつ類およびバナナ中のジフェニル, オルトフェニルフェノールおよびチアベンダゾールの分析, 食品衛生学雑誌, 23, 21-24, 1982.
- 12) 武田明治:食品中の食品添加物分析法について― 新規指定外添加物を中心として―, I イマザリル, 食品衛生研究, 44, 52-58, 1994.
- 13) 中里光男, 只野敬子, 小川仁志, 牛山博文, 川合

- 由華、小林千種、立石恭也、田村行弘: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、41、392-397、 1995.
- 14) 茶谷祐行,近本武次,棟久美佐子,足立透,小松 正幹:輸入かんきつ類に収穫後使用される6種農 薬の系統的分析法,食品衛生学雑誌,37,187-194, 1996.
- 15) 小川正彦, 坂井亨, 大熊和行, 佐藤誠, 志村恭子: HPLC法による柑橘類及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.
- 16) Ito Y., Ikai Y., Oka H., Hayakawa J., Kagami T.: Application of ion-exchange cartridge clean-up in food analysis I. Simultaneous determination of thiabendazole and imazalil in citrus fruit and banana using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, J. Chromatogr. A, 810, 81-87, 1998.
- 17) Muccio A. Di, Girolimetti S., Barbini D. A., Pelosi P., Generali T., Vergori L., Merulis G De, Leoneli A., Stefaneli P.: Selective clean-up applicable to aqueous acetone extracts for the determination of carbendazim and thiabendazole in fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography with UV detection, J. Chromatogr. A, 833, 61-65, 1999.
- 18) 吉田政晴, 住本建夫, 吉田綾子: 固相抽出—HPLC による柑橘類およびバナナ中のイマザリルの定量法について, 日本食品化学学会誌, 8, 22-26, 2001.
- 19) 小沢秀樹,広門雅子,嶋村保洋,中島和雄,木村 圭介,斉藤和夫:固相抽出法による柑橘類,バナナ及び濃縮果汁中防カビ剤の簡易系統分析法,東京都立衛生研究所年報,52,78-83,2001.
- 20) 山本圭吾,水谷勇一,勝井早苗,池田憲廣,素輪 善典:ミニカートリッジカラムを用いた柑橘類, バナナ中の防かび剤の簡易系統的分析,奈良県保 健環境研究センター年報,40,69-72,2005.
- 21) 高井靖智, 久野恵子, 山東英幸: 柑橘類・バナナ 中の防かび剤の一斉分析法, 和歌山県環境衛生研 究センター年報, 53, 27-32, 2007.
- 22) 竹中麻希子,吉岡直樹,三橋隆夫:柑橘類中4種 防かび剤についての簡便な一斉分析法の開発と その妥当性評価,兵庫県立健康生活科学研究所健 康科学研究センター研究報告,4,35-39,2013.

- 23) 高良浩司, 久野恵子: 柑橘類・バナナ・キウィー 中の防かび剤の一斉分析法, 和歌山県環境衛生研 究センター年報, 60, 44-52, 2014.
- 24) Arenas R. V., Rahman H., Jonson N. A.: Determination of thiabendazole residues in whole citrus fruits by liquid chromatography with fluorescence detection, J.AOAC. Int., 79, 579-582, 1996.
- 25) Levine R. A., Luchtefeld R. G, Hopper M. L., Salmon G D.: Automated method for cleanup and determination of benomyl and thiabendazole in table-ready foods, J. AOAC. Int., 81, 1217-1223, 1998.
- 26) Yamazaki Y., Ninomiya T.: Determination of benomyl, diphenyl, ο-phenylphenol, thiabendazole, chlorpyrifos, methidathion, and methyl parathion in oranges by solid-phasa extraction, liquid chromatography, and gas chromatography, J. AOAC Int., 82, 1474-1478, 1999.
- 27) Albero B., Sanchez-Brunete C., Tadeo J. L.: Determination of thiabendazole in orange juice and rind by liquid chromatography with fluorescence detection and confirmation by gas chromatography/ mass spectrometry after extraction by matrix solid-phase dispersion, J. AOAC. Int., 87, 664-670, 2004.
- 28) 瀧野昭彦, 小嶋美穂子, 原田浩之, 山中直: 輸入 柑橘類中の固相カラム簡易精製法を用いた防か び剤分析法について, 滋賀県衛生科学センター, 41, 58-60, 2006.
- 29) Fernandez M., Rodriguez R., Pico Y., Manes J.: Liquid Chromatographic-mass spectrometric determination of post-harvest fungicides in cirtus fruits, J. Chromatogr. A, 912, 301-310, 2001.
- 30) 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.
- 31) 近藤貴英, 渋谷孝博: 固相抽出法を用いた柑橘類・バナナ中の防カビ剤の一斉分析法について, 食品衛生研究, 56, 59-64, 2006.
- 32) Gilbert-Lopez B., Garcia-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.

- 33) 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.
- 34) Wang S., Xu Y., Pan C., Jiang S., Liu F.: Application of matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry to fungicide residue analysis in fruits and vagetables, Anal Bioanal Chem, 387, 673-685, 2007.
- 35) Gilbert-Lopez B., Garcia-Reyes J. F., Molina-Diaz A.: Determination of fungicide residues in baby food by liquid chromatography-ion trap tanfem mass spectrometry, Food Chem., 135, 780-786, 2012.
- 36) 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.
- 37) Rizzetti T. M., Kemmerich M., Martins M. L., Prestes O. D., Adaime M. B.: Optimization of a QuEChERS based method by means of central composite design for pesticide multiresidue determination in orange juice by UHPLC-MS/MS, Food Chem., 196, 25-33, 2016.
- 38) 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.
- 39) 小木曽俊孝, 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及び妥当性評価, 福岡県保 健環境研究所年報, 43, 76-81, 2016
- 40) Ito Y., Goto T., Oka H., Matsumoto H., Miyazaki Y.: Simple and rapid determination of thiabendazole, imazalil, o-phenylphenol in citrus fruit using flow-injection electrospray ionization tandem mass spectrometry, J. Agric. Food Chem., 51, 861-866, 2003.
- 41) Anastassiades M, Lehotay S. J.: Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce, J. AOAC Int. 86, 412-431, 2003.
- 42) 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、平成17年1月 24日、食安発第0124001号、2005.
- 43) 残留基準設定農薬データベース, 永山敏廣編, 林 純薬工業株式会社, 2013.

- 44) 岡本葉,高取聡,起橋雅浩,柿本幸子,阿久津和 彦,北川陽子,尾花裕孝,村田弘,住本建夫,田 中之雄:1993~2006 年度に実施した柑橘類中にお ける防かび剤の残留実態調査,大阪府立公衆衛生 研究所所報,45,23-28,2007.
- 45) 福井直樹,北川陽子,高取聡,柿本幸子,小阪田 正和,柿本葉,山口聡子,吉光真人,阿久津和彦, 東恵美子,梶村計志:2007~2016年度に実施した 輸入柑橘類中の防かび剤の検査結果,大阪健康安 全基盤研究所研究年報,1,41-46,2017.
- Ortelli D., Edder P., Corvi C.: Pesticide residues survey in citrus fruits, Food Addit. Contam., 22, 423-428, 2005.
- 47) 農薬残留の事典 第 3 版,植村振作,河村宏,辻 万千子著,株式会社三省堂,2006.
- 48) 増田諒子,大塚健治,富澤早苗,田村康宏,八巻 ゆみこ,増渕珠子,岩越景子,中川由紀子,佐藤 千鶴子,高野伊知郎:輸入農産物中の残留農薬実 態調査(果実類),東京都健康安全研究センター 年報,65,181-189,2014.
- 49) 永山敏廣, 小林麻紀, 塩田寛子, 伊藤正子, 田村 行弘: 果実類に使用された農薬の果皮及び果肉中 の濃度, 食品衛生学雑誌, 36, 383-392, 1995.
- 50) 松本比佐志: 柑橘類中のイマザリル及びその主代 謝物の残留実態と低温保存による濃度変化, 日本 食品化学学会誌, 7, 22-27, 2000.
- 51) 木村奈穂子,永山敏廣,高野伊知郎,小林麻紀,田村康宏,立石恭也,北山恭子,斉藤和夫:GC-FTD によるかんきつ類中のイマザリルおよびイマザリル代謝物の分析,食品衛生学雑誌,44,63-68,2003.
- 52) 金内加実, 眞木俊夫: イマザリルの柑橘類への浸透性とその代謝産物への変換, 東京聖栄大学健康 栄養学部紀要, 3, 1-6, 2011.
- 53) 田中章男, 秋山佳代, 進士ひとみ, 野原健吾, 福田磬: かんきつ類における防かび剤の衛生化学的研究, 国際学院埼玉短期大学研究紀要, 34, 21-29, 2013.

Fungicide Residues Analysis and Survey in Citrus Fruits and Bananas (2015-2018)

Tomiaki MINATANI, Tomoko HIROSAWA, Mina JOHO, Akane YOKOYAMA and Kotaro GOTO

Gifu Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences:

1-1, Naka-fudogaoka, Kakamigahara, Gifu 504-0838, Japan

Summary

A method has been developed for the simultaneous analysis of 8 fungicide residues in citrus fruits and bananas.: diphenyl(DP), *o*-phenylphenol(OPP), thiabendazole(TBZ), imazalil(IMZ), fludioxonil(FLU), azoxystrobin(AZX), pyrimethanil(PYR) and propiconazole(PRP). Samples were extracted with acetonitrile and salted out by 0.5 mol/L citrate buffer (pH 5.0) with saturated NaCl, followed by solid-phase extraction using C₁₈ and PSA tandem cartridge (C₁₈/PSA). Purified solutions were analyzed by LC-MS/MS and HPLC-FL. Each fungicide was analyzed with high selectivity and the trueness and accuracy were good. The developed method was applied to analysis of fungicide residues in 51 imported retail samples: 43 citrus fruits and 8 bananas. TBZ was detected from 34 samples, AZX from 3 samples, PYR from 1 sample, IMZ from 36 samples, OPP from 2 samples and FLU from 7 samples. DP was not detected in any sample and all of the samples were compliant with the specifications and standards for Food, Food Additives, Etc of Ministry of Health and Wealth Notification. Except for these fungicides, 2,4-D and pyraclostrobin were also frequently detected from citrus fruits. In citrus fruits, fungicides are distributed almost in peel and removal of peel is effective for the reduction of the exposure to fungicides.

Keywords: citrus fruit, banana, fungicide, LC-MS/MS, HPLC-FL