

称号及び氏名 博士(応用生命科学) 富山 有彩 (伴野 有彩)

学位授与の日付 2024年2月29日

論文名 Investigation of matrix effects on pesticides by agricultural products and compensation methods for matrix effects in the simultaneous analysis of pesticide residues using liquid chromatography-tandem mass spectrometry  
(液体クロマトグラフ質量分析計を用いた残留農薬一斉分析における作物試料によるマトリックス効果及びその補正法に関する研究)

論文審査委員 主査 谷森 紳治  
副査 秋山 康紀  
副査 藤枝 伸宇

## 論文要旨

### 序章

農薬の利用は、農作業の省力化及び作物の安定的な生産のために重要である。病害虫防除や除草などのために使用された後に作物中に残留した農薬により健康を損なうおそれがないよう、食品衛生法により作物と農薬の組み合わせごとに基準値が設定されている。したがって、これらの基準値を目安にして流通する作物について残留農薬の検査を行うことは、食の安全性確保のため重要である。残留農薬分析は多成分一斉分析として実施されることが多く、この際に作物中の正確な残留農薬分析の妨げとなるマトリックス効果 (ME) が問題となる。

本研究では、残留農薬分析で使用されることが多い液体クロマトグラフ質量分析装置 (LC-MS/MS) を用いた際の作物による ME の傾向解明及び多成分一斉分析における ME 補正法の精緻化を目的とした。第 1 章では国内の農薬使用状況の推移と作物中の残留濃度の実態についてまとめた。第 2 章では残留農薬分析法の発展とその課題についてまとめた。第 3 章では供試作物と ME の関係について解析した。第 4 章では分析対象化合物と ME との関係性を解析した。第 5 章では 4 種類の ME 補正法の多成分

一斉分析への適用可能性について検証した。

## 第1章 農薬使用状況の推移と作物中の残留濃度実態

国内の単位面積当たりの農薬使用量は、2016年の国外との比較においてはヨーロッパ諸国と比べると高く、韓国とは同程度であった。国内の農薬の生産量は、1980年には534,716 t·klであったが、2020年には234,817 t·klまで減少した。農林水産省による農家における農薬使用状況の結果報告ではこの19年間で、不適正使用のあった農家数率は平均で0.3%であった。また、厚生労働省による2009年から2020年の11年間の農薬、食品添加物及び動物医薬品（農薬等）の分析の結果報告では、サンプルからの農薬等検出率及び残留基準値を超過する農薬等検出率はいずれもほぼ横ばいであり、それぞれ0.45%及び0.008%であった。これらの結果報告に加え農薬の不適正使用及び作物残留基準値の超過の事例も報告されていることから、食の安全性確保のためには今後も継続的なモニタリング調査が必要である。

## 第2章 残留農薬分析法の発展とその課題

国内では厚生労働省により液液分配や固相抽出を用いた精製法と、LC-MS/MS等の分析機器による測定を組み合わせた残留農薬の一斉分析法が通知されている（以降、通知法とする）。また、ヨーロッパ諸国やアメリカにおいては、2003年に初めて報告がなされた分散固相抽出を利用する **QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe)** 法の改良法がガイドラインに示されている。いずれの方法においても、作物由来の夾雑物が分析対象化合物のイオン化を促進・阻害することで、分析対象化合物のピーク形状や面積が変動する現象、いわゆる **ME** が課題となっている。**ME** は、LC-MS/MSにおいてイオン源で作物由来の夾雑物が液滴の表面張力を変化させたり、液滴内での分析対象化合物の移動を阻害・促進したり、分析対象化合物とイオン化の際に競合することで生ずると報告されている。しかし、どのような作物及び分析対象化合物において **ME** が問題となりやすいのかは解明されていない。また、**ME** を補正する方法としてマトリックスマッチング法や安定同位体標識内部標準物質（以降 **SIL-IS** とする）等を用いた内部標準法などが提案されているが、マトリックスマッチング法で使用できる作物の適用範囲は不明であり、内部標準法は **SIL-IS** のコストが高いという難点がある。したがって、これらの課題改善が精確で効率的な残留農薬の一斉分析の構築及び普及のために重要である。

## 第3章 LC-MS/MSを用いた残留農薬一斉分析における作物によるMEの傾向解析

通知法による分析における、作物の違いによる **ME** の傾向を明らかにした。葉菜類3種類（こまつな、みつば及び葉ごぼう）及び果実類3種類（いちじく、ぶどう及びみかん）の作物間での97種類の分析対象化合物（82種類の農薬有効成分及び15種類の **SIL-IS**）の **ME** の比較を行ったところ、-10%以下のイオン化抑制を示した分析対象化合物の割合は、こまつな、みつば及び葉ごぼうでそれぞれ44%、45%及び40%であった。これに対して、果実類の割合はいちじく、ぶどう及びみかんでそれぞれ11%、2%及び5%であったことから、**ME** は果実類よりも葉菜類において問題となる場合が

多いことが示唆された。なお、イオン化促進は、葉菜類及び果実類の両方ともほとんどすべての分析対象化合物で生じていなかった。一方で、作物の科の違いにより ME の傾向は異なることが示唆された。そこで、3 種類の非結球アブラナ科作物間(しろな、みずな及びチンゲンサイ)で 37 種類の分析対象化合物 (SIL-IS のみを使用した) の ME の比較を行った。多重比較の結果、ME の程度は作物ごとに有意に異なっていた。ME のばらつきは、作物のサンプリングによるばらつきと測定におけるばらつきにより影響される可能性がある。そこで、25 種類の分析対象化合物の同一種類の作物間における ME のばらつきをサンプリング及び測定分散の両方で評価した。測定の標準偏差は、すべての供試作物 (こまつな、ほうれんそう、トマト及びナス) 及び分析対象化合物の組み合わせにおいて 10%未満であり、サンプリングの標準偏差は、ほうれんそう及び 2 種類の分析対象化合物の組み合わせを除いたすべての供試作物及び分析対象化合物の組み合わせにおいて 10%未満であった。また、ME の標準偏差が 5%以上であった分析対象化合物では、ME のばらつきは分析よりもサンプリングによるばらつきの影響が大きいことが示された。なお、2018 年及び 2019 年の同時期 (秋どり収穫) に同じほ場で栽培された同一品種のこまつなにおける分析対象化合物の ME を調べたところ、ほとんどの分析対象化合物において ME は栽培年により有意差はなく、その差の絶対値は最大で 26%であった。これらの結果から、同一種類の作物間において ME がばらつく要因はサンプリングによる影響が大きいことが示された。

#### 第 4 章 ME に関連する分析対象化合物の特性の探索

25 種類の分析対象化合物の分子量や推定オクタノール/水分配係数 ( $\log P_{ow}$ )、推定水溶解度、LC-MS/MS における保持時間などの物理化学的特性を抽出し、こまつな、ほうれんそう、トマト及びナスにおける ME との相関を解析した。その結果、いずれの作物においても物理化学的特性と ME との間に有意な相関は認められなかった。一方で、 $\log P_{ow}$  が 1.52 以上の分析対象化合物ではすべての作物において分析対象化合物の平均 ME は 0%から 2%であり、問題とならない程度であった。第 3 章及び第 4 章の結果から、葉菜類を対象とした  $\log P_{ow}$  が低い分析対象化合物において、ME が問題となる可能性が示唆された。さらに、内部標準法による ME 補正において、保持時間を基にした SIL-IS の選定では ME を適切に補正できない可能性が示唆された。併せて、分子量が僅かに異なる農薬と SIL-IS 間の ME の差異を調査するため、25 種類の農薬とその SIL-IS の ME の差について解析した。その結果、これらのほとんどすべての組み合わせにおいて ME 間に有意差は認められず、その差の絶対値は最大でも 8%であったことから、農薬と SIL-IS 間では ME に大きな差はないことが示された。

#### 第 5 章 ME 補正法の LC-MS/MS を用いた残留農薬分析への適用とその実用性の検証

ME の低減のため、こまつなを供試作物として希釈、精製法の改良、マトリックスマッチング法及び内部標準法を適用し、その結果を検証した。深刻なイオン化抑制 (<-20%) が生じていたほとんどの分析対象化合物において最終溶液を 5 倍希釈したところ、ME が -20%から 20%範囲内に収まった。次に、通知法に固相抽出カラムによる精製の追加や変更を行い、夾雑物の除去を試みたが、最大でも 4%の ME の低減にしか至

らなかった。また、ME の影響を無視できるまでの適切な希釈倍率が測定するまで分からないこと、ME の原因となる夾雑物が不明であることから希釈及び精製方法の追加による ME への対策は、多成分一斉分析への適用に関しては現実的でないと推察された。続いて、マトリックスマッチング法について適用範囲の限定を試みた。第 3 章で 25 種類の SIL-IS の ME のサンプリングのばらつきは 10%未満であったものの、一元配置分散分析を行った結果、20 種類の分析対象化合物において試料間で ME に有意な差が認められた。したがって、同一種類の作物であっても産地や品種が異なる場合、ME は有意にばらつく可能性があることが示された。また、ME が生じていた農薬について低濃度 (0.0025 ng/mL) の SIL-IS を最終溶液に添加することにより、低濃度域だけでなく中濃度及び高濃度 (それぞれ 0.01 及び 0.04 ng/mL) 域の分析対象農薬の回収率が改善したこと、低濃度域添加による広範囲濃度域での ME 補正の有効性が明らかとなった。さらに、試料の抽出時及び精製直前の分取した抽出液に SIL-IS を添加しても SIL-IS の回収率に有意な差は認められなかったことから、SIL-IS を精製直前の分取した抽出液にサロゲートとして添加することで使用量を削減できることが示された。なお、マトリックスマッチング法と内部標準法のいずれにしても、回帰式による残差に等分散性を満たすため重み付け検量線を用いる方が望ましいことも示された。

## 総括

本研究では、厚生労働省通知法による LC-MS/MS を用いた作物中の残留農薬の分析において、葉菜類及び log Pow の低い分析対象化合物の組み合わせで ME が問題となる可能性が示唆された。さらに、同一種類の作物間における ME のばらつきが大きくなる原因は、分析ではなくサンプリングによる影響が大きいことが明らかとなった。また、マトリックスマッチング法による ME 補正においては、試料とマトリックスマッチング用試料は同一であることが望ましいことが示唆された。さらに、内部標準法で用いる SIL-IS の使用量を削減することにより廉価に ME 補正を行える方法を提案した。以上の結果は、LC-MS/MS を用いた作物の多成分一斉分析における ME の理解及び ME に対する適切な対策を選択するために重要な知見を提供するものである。

## 審査結果の要旨

病虫害の防除や除草などのために農薬が使用された後に、作物中に残留し健康障害を起こさぬよう、作物と農薬の組み合わせごとに食品衛生法で基準値が設定されている。残留農薬分析は多成分一斉分析として実施されることが多く、作物中の正確な残留農薬分析の妨げとなるいわゆるマトリックス効果 (ME) が問題となる。本研究では、液体クロマトグラフ質量分析装置 (LC-MS/MS) を用いた際の作物による ME の傾向解明

及び多成分一斉分析における ME 補正法の精緻化を目的とした。

第 1 章では農薬使用状況の推移と作物中の残留濃度実態をまとめた。農林水産省によるとこの 19 年間で、不適正使用のあった農家数率は平均で 0.3%であった。また、厚生労働省による 2009 年から 2020 年の 11 年間の分析では、サンプルからの農薬等検出率及び残留基準値を超過する農薬等検出率はそれぞれ 0.45%及び 0.008%であった。これらに加え農薬の不適正使用及び作物残留基準値の超過の事例も報告されており、食の安全性確保のために継続的なモニタリング調査が必要であることが示された。

第 2 章では残留農薬分析法の発展とその課題をまとめた。国内では液液分配や固相抽出を用いた精製法と、LC-MS/MS 等の分析機器による測定を組み合わせた一斉分析法が通知されている。しかし、作物由来の夾雑物が分析対象化合物のイオン化を促進・阻害することで、ピーク形状や面積が変動する ME が課題となっている。ME を補正する方法としてマトリックスマッチング法や安定同位体標識内部標準物質 (SIL-IS) 等を用いた内部標準法などが提案されているが、前者は適用できる作物の範囲は不明であり、後者は SIL-IS が高価という難点がある。したがって、これらの課題改善が正確で効率的な残留農薬の一斉分析の構築及び普及のために重要であることが示された。

第 3 章では LC-MS/MS を用いた残留農薬一斉分析における作物による ME の傾向解析を行った。厚労省の通知法による分析における作物の違いによる ME の傾向を明らかにした。ME は果実類よりも葉菜類において問題となる場合が多かった。一方で、作物の科の違いにより ME の傾向は異なることが示された。多重比較の結果、ME の程度は作物ごとに有意に異なっていた。測定の標準偏差は、すべての供試作物及び分析対象化合物の組み合わせにおいて 10%未満であり、サンプリングの標準偏差は、分析対象化合物の組み合わせを除いたすべての供試作物及び分析対象化合物の組み合わせにおいて 10%未満であった。また、ME の標準偏差が 5%以上であった分析対象化合物では、ME のばらつきは分析よりもサンプリングによるばらつきの影響が大きいことが示された。これらの結果から、同一種類の作物間において ME がばらつく要因はサンプリングによる影響が大きいことが示された。

第 4 章では ME に関連する分析対象化合物の特性を探索した。25 種類の分析対象化合物の分子量やオクタノール/水分配係数 ( $\log P_{ow}$ )、水溶解度、LC-MS/MS における保持時間などの物理化学的特性を抽出し ME との相関を解析した。その結果、いずれの作物においても物理化学的特性と ME との間に有意な相関は認められなかった。また、葉菜類を対象とした  $\log P_{ow}$  が低い分析対象化合物において、ME が問題となる可能性が示唆された。さらに分子量が異なる農薬と SIL-IS 間の ME の差異を調査するため、25 種類の農薬とその SIL-IS の ME の差について解析したところ、ほとんどすべての組み合わせにおいて ME 間に有意差は認められず、農薬と SIL-IS 間では ME に大きな差はなかった。

第 5 章では ME 補正法の LC-MS/MS を用いた残留農薬分析への適用とその実用性を検証した。ME の低減のため、供試作物を希釈、精製法の改良、マトリックスマッチング法及び内部標準法を適用し、その結果を検証した。深刻なイオン化抑制 ( $<-20\%$ ) が生じたほとんどの分析対象化合物において最終溶液を 5 倍希釈したところ、ME が  $-20\%$  から  $20\%$  範囲内に収まった。続いて、マトリックスマッチング法について適用範囲の限定

を試みた。25 種類の SIL-IS の ME のサンプリングのばらつきは 10%未満であったが、一元配置分散分析を行った結果、20 種類の分析対象化合物において試料間で ME に有意な差が認められた。したがって、同一種類の作物であっても産地や品種が異なる場合、ME は有意にばらつく可能性がある。また、ME が生じていた農薬について低濃度 (0.0025 ng/mL) の SIL-IS を最終溶液に添加することにより、低濃度域だけでなく中濃度及び高濃度 (それぞれ 0.01 及び 0.04 ng/mL) 域の分析対象農薬の回収率が改善したことから、低濃度域添加による広範囲濃度域での ME 補正の有効性が明らかとなった。さらに、SIL-IS を精製直前の分取した抽出液にサロゲートとして添加することで使用量を削減できることが示された。

本研究では、LC-MS/MS を用いた作物中の残留農薬の分析において、葉菜類及び  $\log P_{ow}$  の低い分析対象化合物の組み合わせで ME が問題となる可能性が示唆された。また、マトリックスマッチング法による ME 補正においては、試料とマトリックスマッチング用試料は同一であることが望ましいことが示唆された。さらに、内部標準法で用いる SIL-IS の使用量を削減することにより廉価に ME 補正を行える方法を提案した。以上の結果は、LC-MS/MS を用いた作物の多成分一斉分析における ME の理解及び ME に対する適切な対策を選択するために重要な知見を提供するものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士 (応用生命科学) の学位を授与することを適当と認める。