

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：84410

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15493

研究課題名(和文)マトリクス効果と分配定数の類型化による農薬一斉分析でのサロゲート選択手法の構築

研究課題名(英文)Development of a Surrogate Selection Method for Simultaneous Analysis of Pesticides Based on Grouping of Matrix Effects and Distribution Coefficient

研究代表者

伴野 有彩 (Banno, Arisa)

地方独立行政法人大阪府立環境農林水産総合研究所(環境研究部、食と農の研究部及び水産研究部)・その他部局等・研究員

研究者番号：60781135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：LC-MS/MSを用いた農薬の多成分一斉分析におけるマトリクス効果(ME)については、これまで代表的な作物や科、品種間でしか比較されてこなかったが、本研究により同一の作物であっても栽培地域等によりMEが異なる可能性及び葉菜類と果実類でMEの傾向が異なることが示された。併せて、本研究はSMILES記法で示した分析対象化合物の構造情報から分子記述子を算出し、MEとの関連性を解析した初めての試みとなる。MEは試料及び分析対象化合物の組み合わせごとに異なる場合があるため、化合物の情報のみではMEの推測は難しいものの、こまつなにおいてMEと関連する可能性がある分析対象化合物の構造情報が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MEは精確な分析の妨げとなっている。安定同位体標識内部標準物質(SIL-IS)を用いた内部標準法は農薬の多成分一斉分析においてMEを補正できる有効な方法であるが、補正に適したSIL-ISを選定する科学的な手法はない。本研究は、分析対象化合物の物理化学的特性や構造情報からMEを推測する手法の構築を目的としており、本研究の成果は、食の安全安心のための精確な残留農薬分析法の構築に資する。

研究成果の概要(英文)：This study has demonstrated that the magnitude of matrix effect (ME) could be significantly different between target crops depending not only on its type but also on other factors like the cultivation area and the results also showed that the tendency of ME differs between leafy vegetables and fruits in the simultaneous analysis of pesticide residues using LC-MS/MS. In addition, this study is the first attempt to analyze the relationship between the molecular descriptors of the target analytes calculated from the structural information in SMILES notation and the ME. It is difficult to estimate the ME only from the information of the analytes since the magnitude of ME differed depending on the combination of the target crops and analytes. However, for the Komatsuna sample, the structural information of the analyte which could be related to ME was suggested.

研究分野：残留農薬分析

キーワード：残留農薬分析 マトリクス効果 LC-MS/MS 多成分一斉分析

1. 研究開始当初の背景

農薬は作物の安定生産及び農業労働の負荷軽減のために不可欠である。しかし、生産者が農薬の使用基準を順守しない場合や非意図的な事象（隣接する畝へのドリフトや後作物残留など）により農薬が残留する場合など、作物には農薬が残留基準値を超える濃度で残留する可能性がある。そこで、食の安全性調査を目的に、残留農薬の多成分一斉分析が全国で実施されている。残留農薬によるリスク管理のためには、多様なサンプル中の農薬濃度を正確に分析する技術の確立が重要である。併せて、流通網の整備普及や直売所の利用拡大にともない、多成分一斉分析には迅速性も求められている。

しかし、残留農薬分析では試料由来の分析妨害物質（夾雑物）により分析対象化合物のピーク面積が増減する現象、いわゆるマトリクス効果（Matrix effect、以後MEとする）が問題となっている。MEの低減のため、試料の前処理過程において精製工程を追加し夾雑物を除去する以外に、標準物質添加法やマトリクスマッチング法、内部標準法などMEを相殺する定量法が提案されている。特に、内部標準法は試料の最終溶液に内部標準物質を添加するという簡易な操作で、MEだけでなく機器測定時の注入量のばらつきや最終溶液の揮発等による分析誤差も補正ができるため、多様な試料を対象にした多成分一斉分析を迅速に遂行する際に最適である。内部標準物質には対象とする農薬の一部を重水素や¹³Cなどで置換した安定同位体標識内部標準物質（Stable isotope labelled-internal standard (SIL-IS)）が主に用いられる。現に、近年アメリカやヨーロッパ諸国における多成分一斉分析法として主流となったQuEChERS法でも、SIL-ISの使用が推奨されている。一方で、内部標準法では原則として目的の農薬と同等の物理化学的特性を持つSIL-ISを用いることとなっているが、市販されているSIL-ISの種類が限られているため、多成分一斉分析時には、一種類のSIL-ISでその他複数の農薬の補正を行うこととなる。しかし、多種の農薬と特定のSIL-ISの関係を科学的に検証した例はなく、現状は保持時間や構造などを参考にSIL-ISを選択しているに過ぎない¹⁾。そのため、既存のSIL-ISの中から分析対象の農薬のMEの補正に適した特定のSIL-ISを簡易に探索できる科学的な手法の構築が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、MEの補正のためのSIL-ISの科学的な選定手法の構築を目的とし、LC-MS/MSを用いた農薬の一斉分析法において、作物由来の夾雑物により引き起こされる農薬及びSIL-ISのMEの解明及び分析対象化合物の物理化学的特性とMEとの関係性を調査した。

3. 研究の方法

(1) 分析対象農薬及びSIL-ISの分析条件の確立及び物理化学的特性のデータベース化

農薬82種類及びSIL-IS37種類について、島津製作所製メソッドパッケージ（method package No. 621）及びLC-MS/MSのQ3スキャン等を用いて分析条件を検討した。37種類のSIL-ISの分析条件をTable 1に示す。分子量や沸点などの分析対象化合物の特性はPerkinElmer Informatics社製のChemDraw Professional[®]を用いて抽出した。また、分析対象化合物の構造からChemDraw Professional[®]を用いてSMILES記法の分子構造式に変換し、この構造式からRプログラムのrcdkパッケージを用いて分子記述子を得た。

(2) 葉菜類及び果実類におけるMEの比較

葉菜類3種類（こまつな、みつば、葉ごぼう）及び果実類3種類（いちじく、ぶどう、みかん）に

Table 1. LC-MS/MS parameters of the analytes. The abbreviations are as follows: Retention time (RT), molecular weight (MW) and collision energy (CE).

No.	analyte	RT (min)	MW	precursor ion	quantification ion	confirmation ion	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
1	acephate- <i>d</i> ₃	2.34	189.20	187.10	143.15	95.00	-14	-11	-13
2	dmotefuran- <i>d</i> ₃	3.04	205.23	206.35	132.15	90.10	-21	-12	-12
3	methomyl- <i>d</i> ₃	3.64	165.23	166.05	88.05	106.10	-12	-10	-13
4	nitenpyram- <i>d</i> ₃	3.72	273.74	274.20	192.15	228.20	-13	-12	-17
5	thiamethoxam- <i>d</i> ₃	3.90	294.73	295.10	184.20	214.15	-14	-22	-18
6	dimethoate- <i>d</i> ₆	3.97	235.29	236.00	205.00	131.05	-24	-10	-19
7	imidacloprid- <i>d</i> ₄	4.28	259.69	207.90	181.05	70.10	-14	-27	-30
8	thiabenzazole- ¹³ C ₆	4.43	207.20	260.30	213.10	179.25	-13	-15	-20
9	simazine- <i>d</i> ₁₀	4.45	211.72	212.20	137.10	134.15	-11	-21	-12
10	cyanazine- <i>d</i> ₅	4.48	245.73	246.15	219.15	101.10	-10	-17	-23
11	acetamiprid- <i>d</i> ₃	4.55	225.69	226.30	126.00	59.15	-11	-21	-11
12	propoxur- <i>d</i> ₃	4.72	212.26	213.15	111.05	93.05	-16	-15	-19
13	thiacloprid- <i>d</i> ₄	5.02	256.74	257.10	126.00	90.00	-26	-21	-11
14	hexazinone- <i>d</i> ₆	5.48	258.35	259.20	177.15	77.20	-10	-16	-22
15	fosthiazate- <i>d</i> ₅	5.66	288.37	288.90	233.10	104.05	-14	-12	-23
16	diethofencarb- <i>d</i> ₇	5.86	274.37	275.10	227.30	125.15	-14	-12	-25
17	fluxapyroxad- ¹³ C ₆	6.19	373.23	388.10	368.15	348.10	-15	-15	-16
18	metalaxyl- ¹³ C ₆	6.20	285.29	286.10	226.30	198.30	-15	-15	-22
19	prometryn- <i>d</i> ₇	6.21	248.40	249.30	159.25	207.30	-10	-24	-15
20	triadimefon- <i>d</i> ₄	6.39	297.78	298.20	201.25	69.15	-22	-16	-19
21	tebufenozide- <i>d</i> ₉	6.97	361.53	362.20	306.35	142.30	-14	-9	-30
22	isoprothiolane- <i>d</i> ₄	7.10	294.42	295.00	235.15	193.10	-11	-12	-21
23	iprobendos- <i>d</i> ₇	7.18	295.38	296.10	98.10	212.20	-14	-22	-15
24	imazalil- <i>d</i> ₅	7.19	302.21	302.00	46.15	69.00	-30	-36	-19
25	metolachlor- <i>d</i> ₆	7.35	289.83	290.00	258.15	182.25	-21	-16	-25
26	diazinon- <i>d</i> ₁₀	7.38	314.41	315.05	170.20	154.25	-16	-24	-16
27	mefenacet- <i>d</i> ₅	7.71	303.39	304.20	153.25	125.15	-12	-15	-14
28	thiobencarb- <i>d</i> ₁₀	7.79	267.84	268.15	125.05	89.00	-20	-21	-20
29	triflumizole- ¹³ C ₃	7.81	348.73	348.90	75.10	44.05	-13	-18	-30
30	pirimiphos-methyl- <i>d</i> ₆	7.87	311.37	312.10	164.30	108.10	-12	-24	-15
31	isoxathion- <i>d</i> ₁₀	8.20	323.37	324.05	105.05	99.00	-24	-16	-18
32	dichlorvos- <i>d</i> ₆	8.56	227.01	227.00	125.15	181.25	-12	-25	-21
33	flufenoxuron- <i>d</i> ₃	8.69	491.79	492.05	161.05	144.00	-12	-20	-15
34	chlorpyrifos- <i>d</i> ₁₀	8.93	360.64	359.90	98.90	199.00	-13	-37	-21
35	pyriproxyfen- <i>d</i> ₄	9.07	325.40	326.15	100.05	185.10	-12	-17	-21
36	pyridaben- <i>d</i> ₁₃	9.90	378.01	378.25	322.20	160.25	-14	-13	-19
37	etofenprox- <i>d</i> ₅	10.24	381.53	399.25	182.15	364.25	-16	-16	-30

おける分析対象化合物のMEを解明した。分析条件は以下の通り。

精製法：厚生労働省通知法（LC/MSによる農薬等の一斉分析法I（農作物））を参照した。供試作物のアセトニトリル抽出溶液を200 mLに定量し、80 mL分取した。この溶液を液液分配及びグラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムで精製し、減圧濃縮した。濃縮溶液を、窒素ガス気流下で乾固させた後、残留物をメタノール溶解し最終溶液とした。最終定容量は2 mL（標準区、STD group）及び10 mL（希釈区、DL group）の2種類とした。なお、最終溶液に分析対象化合物の濃度が10 µg/Lになるよう標準試薬を添加した。最終溶液及び同濃度のメタノール溶液をLC-MS/MSで測定した。測定条件：島津製作所製のLCMS-8050システム®を用いた。イオン化法はエレクトロスプレーイオン化法を用いた。インターフェイス温度は350°C、DL温度は150°C、ヒートブロック温度は300°C、CIDガス圧力は210 kPa、ネブライザーガス流量は3.0 L/min、ドラインガス及びヒーティングガス流量は3.0 L/minとした。また、カラムはPhenomenex社製のKinetex®Biphenyl（2.6µm 100×2.1mm）を用いた。なお、オープン温度は35°C、カラム流量は0.4 mL/min、注入量は1µLとした。グラジエント条件はB 液濃度 3%（0分）→10%（1分）→55%（3分）→100%（10.5分）100%（12分）→3%（12.01分）→Stop（15分）とした。移動相A 液は2 mmol/Lギ酸アンモニウム + 0.002% ギ酸in超純水、B 液は2 mmol/Lギ酸アンモニウム + 0.002% ギ酸inメタノールとした。MEは以下の式によりを算出した。

$$ME = \left(\frac{A_f}{A_s} - 1 \right) \times 100\%$$

ここでA_fは試料溶液中の分析対象化合物ピーク面積、A_sは標準溶液中の分析対象化合物ピーク面積を示す。また、MEの有無の判断基準については、標準区と希釈区のMEについて有意水準5%で検定を行い、有意差が認められた分析対象化合物に有意なMEがあったと判断した。

（3）葉菜類の産地によるMEの比較

栽培ほ場の地域が異なる非結球アブラナ科4種類（こまつな、みずな、チンゲンサイ及びしろな）における分析対象化合物のMEを調査した。なお、分析条件は（2）の通りとした。

(4) 分析対象化合物とマトリクス効果の関係性調査

(1) で得た分析対象化合物の物理化学的特性と(2) で得た作物のMEとの関係性を調べた。

4. 研究成果

(1) 分析対象化合物のMEと作物との関係性調査

葉菜類及び果実類における

MEの傾向調査：葉菜類3種類及び果実類3種類における農薬82種類及びSIL-IS15種類の分析対象化合物のMEを解析した(Fig. 1)。無添加試料から検出が認められた化合物については正確なMEの算出が難しいため関係性調査の対象外とした。標準区において葉菜類では、分析対象化合物の約16%で分析上問題となるイオン化抑制 ($ME < -20\%$)²⁾が認められた。こまつなでは94種類中16種類、みつばでは95種類中16種類、葉ご

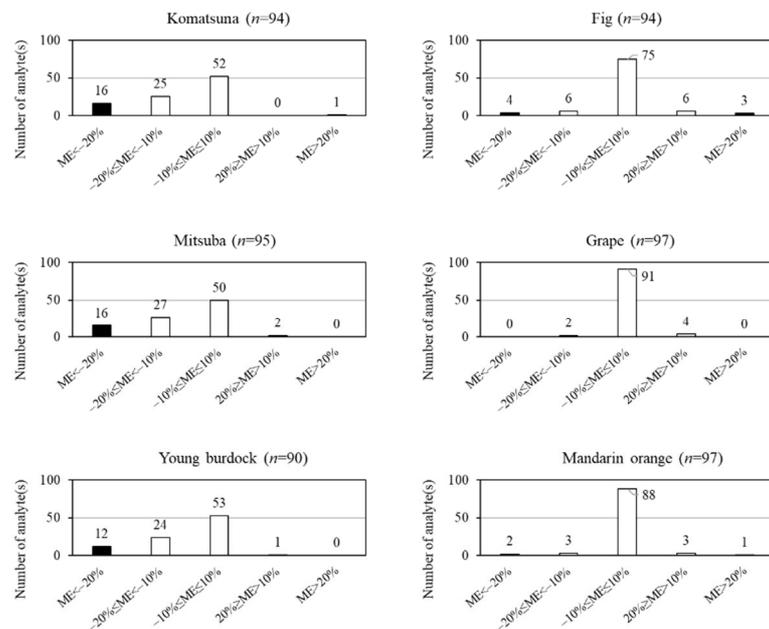


Fig. 1. Number of analytes that experienced ME in the STD group. n represents the number of analytes.

ぼうでは90種類中12種類の化合物でイオン化抑制が生じていた。一方で、分析上問題となるイオン化促進 ($ME > 20\%$)²⁾が認められた化合物は、こまつなにおいて94種類中1種類のみであった。対照的に、果実類ではいずれの作物においても分析上問題となるMEはほとんど認められなかった。イオン化抑制が生じた化合物は、いちじくでは94種類中4種類、みかんでは97種類中2種類であった。イオン化促進が生じた化合物は、いちじくでは94種類中3種類、みかんでは97種類中1種類であった。ぶどうではすべての化合物のMEは-20~20%の範囲内であった。これらの結果から、果実類と比べて葉菜類においてイオン化抑制が生じる可能性が高いことが示唆された。なお、標準区で問題となるMEが生じた化合物(こまつなで17種類、みつばで16種類、葉ごぼうで12種類、いちじくで7種類、みかん3種類)は、希釈区においてはこまつな、みつば、みかんでは全ての化合物で、葉ごぼうでは1種類以外の全ての化合物で、いちじくでは3種類以外の全ての化合物でMEが-20~20%の範囲内に収まった。このことから、ほとんどの化合物について最終溶液を5倍希釈することで問題となるMEは低減できることが示された。また、こまつな、みつば、葉ごぼうで共通してイオン化抑制が生じていた化合物は1種類のみであったことから、葉菜類間ではMEの傾向が異なることが示された。

産地によるMEの傾向調査：栽培地域の異なる作物側のMEばらつきの要因を探索するため、非結球アブラナ科作物(こまつな、しろな、チンゲンサイ、みずな)における37種類のSIL-IS(Table 1)のMEについて調査した。その結果、同じ非結球アブラナ科作物間でも作物の種類によりイオン化抑制が生じるSIL-ISは異なることが示された。また、一元配置分散分析の結果、同一作物間であっても作物の栽培地域や品種、もしくはその両方がMEのばらつきに関連している可能性が示された。

(3) 分析対象化合物の物理化学的特性とMEとの関係性調査

で得られた標準区における葉菜類のMEのうち、値が-20~20%の範囲外であり、かつ標準区と希釈区で有意差があったME(以後、Substantial MEとする)及び保持時間(RT)や分子量などの農薬の単一特性の関係性を調査した。その結果、Substantial MEと単一特性ではどの組み合わせにおいても明確な相関は認められなかった。一般的にRTはSIL-ISの選定の際に使用される特性であるが、本研究結果から、作物の多成分一斉分析においてRTのみの情報からSIL-ISを選定するとMEが適切に補正されない可能性が高いことが確認された(Fig. 2)。また、こまつなにおいてイオン化抑制が示された農薬とMEが-5~5%の範囲内、かつ、標準区及び希釈区で有意差がない(ME無し)農薬の分子記述子の平均値に有意差があったものをMEと関連のある項目として抽出し($p < 0.05$)、主成分分析を実施した。その結果、第1主成分の寄与率は72%、第2主成分の寄与率は13%、第3主成分の寄与率は6%となり、農薬の分布はFig. 3の通りとなった。第1主成分及び第2主成分の軸では、MEの有無に関するグループ分けは難しかったが、第3主成分軸では3種類の化合物においてイオン化抑制が生じるグループが認められた。第3主成分の主成分負荷量は分子記述子C4SP3が大きかったことから、第3主成分は「4つの炭素と単結合した炭素数(Singly bound carbon bound to four other carbons)」を示す変数と推察される。MEと化合物の構造情報との関係についてはさらなる解析が必要ではあるものの、MEと関連する構造情報が示されたことから、こまつなにおいて化合物の構造情報からMEの傾向が推測できる可能性が示された。

まとめ及び今後の取り組み

本研究では、LC-MS/MSを用いた多成分一斉分析において、MEに関する作物側の要因として果実類より葉菜類においてイオン化抑制が生じやすい傾向やこまつなにおいてMEと関連性のある分析対象化合物の構造情報が示されたものの、MEの補正のためのSIL-ISの科学的な選定手法の構築までには至らなかった。今後はさらなるサンプルデータを蓄積し、機械学習を用いてMEと関連性のある分析対象化合物の構造情報を利用したSIL-IS選定モデル構築を検証する。

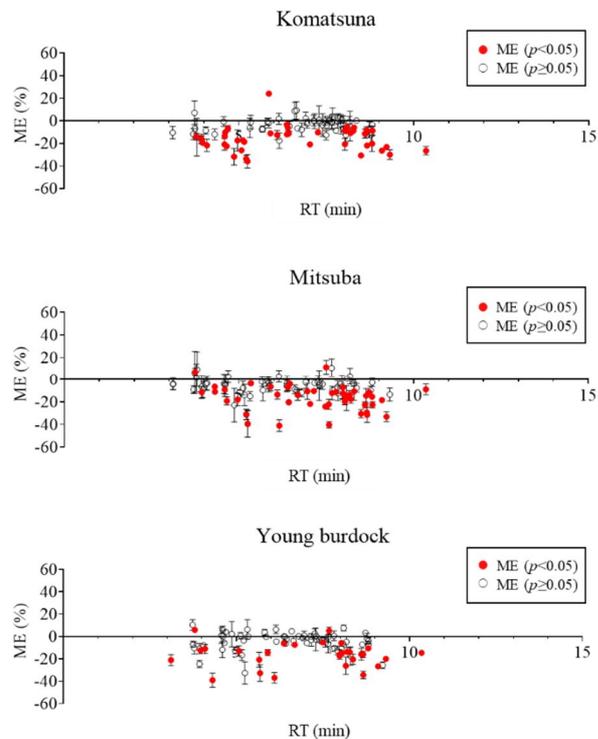


Fig. 2. Relationship between the MEs in the STD group and RT. The red plot shows substantial MEs.

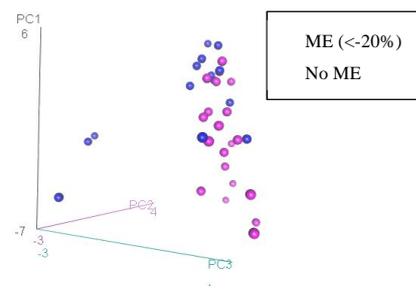


Fig. 3. Principal component analysis plot of analytes including descriptors which showed a significant difference between analytes with substantial ion suppression and no ME.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 伴野有彩、矢吹芳教、園田素啓、谷森紳治
2. 発表標題 液体クロマトグラフィータンデム質量分析を用いた農薬分析においてマトリックス効果に差異をもたらす作物側の要因解析
3. 学会等名 日本農薬学会第48回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Arisa Banno, Yoshinori Yabuki, Motohiro Sonoda, Shinji Tanimori
2. 発表標題 Difference in the magnitude of matrix effects by Asian vegetable matrices on the response value of neonicotinoid internal standards in the simultaneous analysis of pesticide residues using liquid chromatography-tandem mass spectrometry
3. 学会等名 IUPAC 15th International Congress of Crop Protection Chemistry (ICCP) 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伴野有彩
2. 発表標題 LC - MS / MSを用いた農薬の多成分一斉分析におけるマトリックス効果とサロゲート補正法の適用について
3. 学会等名 第45回農薬残留分析研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伴野有彩、矢吹芳教、園田素啓、谷森紳治
2. 発表標題 厚生労働省通知法による残留農薬分析におけるマトリックス効果に関連する農薬の物理化学的特性の探索
3. 学会等名 日本農薬学会47回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伴野有彩、矢吹芳教、園田素啓、谷森紳治
2. 発表標題 内部標準法による補正のための 安定同位体標識化合物の 保持時間及び水/オクタノール分配定数 に基づく選定手法の検討
3. 学会等名 第44回残留分析研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伴野有彩、矢吹芳教
2. 発表標題 厚生労働省通知法による残留農薬分析における葉ごぼう及びびいちじく由来のマトリックス効果の比較及び糖類のマトリックス効果に対する影響調査
3. 学会等名 日本農薬学会46回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伴野有彩、矢吹芳教
2. 発表標題 マトリックス効果は分析対象化合物のlogPowや作物種からどのような影響を受けるのかー葉ごぼう及びびいちじくを用いた検討ー
3. 学会等名 第43回残留分析研究会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------