

称号及び氏名 博士(応用生命科学) 起橋 雅浩

学位授与の日付 平成20年9月20日

論文名 農産物中の残留農薬一斉分析法の開発研究

論文審査委員  
主査 切畑 光統  
副査 宮武 和孝  
副査 太田 大策  
副査 谷森 紳治

## 論文要旨

### はじめに

農業生産において生産量と品質を維持するためには、農薬による病害虫からの防除等の作物保護を行うことが不可欠である。我が国においては、農薬は農薬取締法で厳格に規制され、いわゆるポジティブリストによって作物の種類毎に使用できる薬剤の種類が定められ、適正な使用が図られている。しかし、各国における農薬使用の法的規制は一元化されておらず、最近では輸入農産物や加工食品の残留農薬問題や、無登録農薬問題等が発生し、「食の安全、安心」に対する消費者の関心の高まりの中で大きな社会問題となっている。このような背景の中で、我が国は食品中の残留農薬の規制を大幅に強化し、現在では動物用医薬品も含めて約 800 種類の薬剤に個別の残留基準を設定するとともに、基準の無い農薬は一律基準を設けて規制している。これらのことから、農産物中の残留農薬を正確に分析し、その実態を客観的に明らかにすることは、「食の安全」を保障する重要な基盤になるものと考えられる。

農作物中の農薬の残留基準および残留分析方法は、個々の薬剤毎あるいは化学的性質に基づくグループ毎に定められている。しかし、これらの国により告示された分析方法では、一つの分析法で 1-50 種類程度の農薬しか測定できず、スクリーニング等の目的で多種類の農薬を測定対象とする場合には、非効率であり実用的なものでなかった。このため、多種類の農薬を対象とした効果的で簡易な一斉分析法の確立が強く求められている。

初期の一斉分析法に於いては、農薬グループ毎の個別の抽出操作やクリーンアップ操

作と、特定の原子に高い選択性を持つ検出器を装備したガスクロマトグラフィー（GC）による測定が主流であった。近年では、質量分析計（MS）が検出器の主流となり、これと GC や液体クロマトグラフィー（LC）を組み合わせた高感度、高分解能な機器が開発され、一斉分析に利用されている。本研究は、法的に規制されている多種類の残留農薬を対象として、簡易迅速な多成分一斉分析法の開発を目的として展開したものであり、分析の現場に於いて応用可能な前処理方法を新たに開発するとともに、GC-FPD、GC-MS、LC-MS /MS、GC-MS /MS などの最新の分析機器を用いる残留農薬の実用的な測定方法を確立した。

## 第1章 LC-MS を用いた簡易一斉分析法の開発

本章では、比較的近年に登録されたため残留実態に関する情報が少なく、個別試験法のみが確立されている 17 種類の農薬を対象に、これらの簡易一斉分析法について検討した。抽出溶媒としてアセトニトリルを使用し、塩化ナトリウム添加による塩析を行なって農薬を効率的にアセトニトリル層に移行させた。分離したアセトニトリル層を減圧濃縮、溶媒置換した後、脂肪酸等に吸着能力を持つ PSA 固相カラムでクリーンアップし、LC-MS の大気圧イオン化分析に附す一連の分析工程を確立し、17 種類の農薬の一斉分析に成功した。

## 第2章 GC-MS および GC-FPD を用いた簡易一斉分析法の開発

本章では、1 日で多検体の処理を可能とする簡便な前処理方法の開発に主眼を置いて研究を展開した。市販されている抽出やクリーンアップのための自動処理装置は、多検体処理の省力化には役立つが並行処理ができないため、検体数に比例して処理時間が増大すると云う問題点があった。そこで、自動化は行わずに小規模化を行い、簡便化の結果として並行処理数の増加を図った。すなわち、50mL の遠心管に試料 10g を量り、アセトニトリル 20mL を加えて高速ホモジナイザーで攪拌抽出を行った。その後、塩化ナトリウム 1g と硫酸マグネシウム 4g を加えて手で振盪し、さらに遠心分離することにより、残渣や試料由来の水および糖類を抽出液から分離した。この抽出液を、フラボノイドや脂肪酸を保持する PSA 固相カラムおよびカロチノイドやクロロフィルを保持する GCB 固相カラムに通塔し、さらに固相カラムに残った農薬をトルエン含有アセトニトリルで溶出してクリーンアップを行った。溶出液を濃縮して最終試験液とし、GC-FPD と GC-MS で測定を行った。この分析法では、小規模化による使用溶媒の減量化、前処理工程の単純化による時間短縮が達成された。特に、時間を必要とする濃縮操作が 1 回で済むことが大幅な迅速化と省力化に繋がり、時間当たりの処理検体数を増加させることが可能となった。しかし、前処理工程の効率化が達成されたことに伴い、分析機器による測定および同定の工程が分析作業の律速段階となり、これらの工程に多大な労力を必要とすることが明らかになってきた。本研究ではこの課題を解決するために、農薬の種類毎に選択性の高い検出器を用い、解析作業の軽減化を図った。すなわち、バックグラウンドノイズの少ない検出器（GC-FPD、GC-MS (NCI)）で測定可能な農薬を優先的に測定し、残りの農薬を GC-MS (EI) で測定した。この結果、約 160 種類の農薬の一斉分析が測定可能となった。

### 第3章 GC-MS、GC-FPD および LC-MS/MS を用いた簡易一斉分析法の開発

本章では、第2章で開発した前処理方法を応用して測定対象農薬のさらなる拡大を図った。これまでに用いた GC-MS (EI、NCI)、GC-FPD に加えて、LC-MS/MS の正負エレクトロスプレーイオン化法 (ESI+、ESI-) を検出器に採用し、約 380 種類の農薬を検討対象とした。MS/MS は、選択したイオンをさらに解裂させて二次生成イオンを測定することができる。この分子の断片化は農薬の化学構造に由来するため、MS/MS 分析では高い選択性と感度が得られることが知られている。本一斉分析法の前処理工程では、穀類や豆類の場合に夾雑物となりうるトリグリセリドの除去を目的として C18 の固相カラムを追加した。また、測定機器に GC-FPD、GC-MS、LC-MS/MS を用い、300 種類以上の農薬を分析することが可能となった。この方法は、極めて短時間で多種多様な農薬の迅速分析を可能とし、様々な果実や野菜などの農作物にも適応できることから、現在、分析機関の検査業務に実用されている。

### 第4章 トリプル四重極型 GC-MS/MS を用いた簡易一斉分析法の開発

これまで複数検出器を用いて解析労力の分散を図っていたが、抽出操作が簡略化されて測定項目が膨大になったため、分析全体に占める解析作業の比率が大幅に増加した。そこでこの章では、GC の検出器を MS/MS に一本化して測定作業の単純化に重点をおき、1 回の測定で 250 種類以上の農薬を同時分析する方法を検討した。GC-MS/MS の選択性の高さは特筆すべきものであり、第2、3章で開発した前処理方法と本章で構築した測定・解析作業で、多数の農薬の一斉分析が達成できた。添加回収試験においては良好な再現性を示し、260 種類の農薬を 10ng/g の濃度まで同時に測定することができた。第3章で開発した手法と組み合わせると、簡易な前処理方法で抽出した試料液を用い、GC で測定可能な農薬は GC-MS/MS で、LC で測定可能な農薬は LC-MS/MS でそれぞれ測定し、350 種類以上の農薬についてモニタリングが行える方法を確立した。

## 結 論

日本国内では、公的検査機関、生産者団体および消費者団体をはじめとする民間検査機関により、膨大な件数の残留農薬検査が行われており、昨今の法規制の強化や社会的関心の高まりから、その検査件数は増加の一途を辿っている。本研究で開発した残留農薬の一斉分析法は、これまでの分析法に比べて迅速、簡易であり、翌日には結果の判定が可能となった。また、抽出溶媒や使用するガラス器具が少なく、分析工程全般にわたって省力化や時間短縮が達成され、分析業務の社会的負担を軽減することに繋がった。現在、農産物や食品の安全性は、膨大な労力と社会的負担を費やす検査体制を基盤として築かれており、本研究で開発した一斉分析法は、今後、「食の安全、安心」を保障する上で極めて重要な成果であると考えられる。

## 審査結果の要旨

農薬は農産物の品質や生産性の恒常維持に不可欠な薬剤であり、農業生産における使用と食品中への残留は「農薬取締法」および「食品衛生法」によって、それぞれ規制されている。近年、農産物の残留農薬に対する法的規制が大幅に強化され、現在では、動物用医薬品も含めて約 800 種類の薬剤に対して薬剤毎の残留基準が設定されると共に、残留基準が定められていない農薬についても、別途、一律基準（0.1 ppm）が設けられ規制されている。昨今、輸入農産物や加工食品中の残留農薬を巡る問題が発生し、社会問題化する中で農産物中の残留農薬を正確に分析し、残留の実態を客観的に把握することは、食の安全や安心を保障する重要な基盤の一つになるものと考えられる。

農産物中の残留農薬に対する公定（通知）分析方法は、これまで、個々の薬剤毎あるいは化学的性質を同じくするグループ毎に定められ、一つの分析法で分析可能な農薬は最大でも 50 種程度に限定されるものであった。このため、多様な産地履歴を有する農産物中に含まれる多種類の残留農薬を対象として、スクリーニング（一次）分析等を行なう場合には、多大な労力と長時間を必要とし、公定（通知）分析方法は非効率で実用的なものではなかった。このような背景から、多種類の残留農薬を同時に、且つ簡便に分析し得る実用的な一斉分析法の開発が強く望まれている。本研究では、農産物中の多種類の残留農薬を対象とする一斉分析法の開発を目的として、残留農薬の抽出およびクリーンアップ等の効果的な前処理方法を確立すると共に、ガスクロマトグラフィー（GC）および液体クロマトグラフィー（LC）に質量分析計（MS）を組み合わせた GC-FPD、GC-MS、LC-MS/MS、GC-MC/MS 等の最新の分析機器を用いる効果的な高感度分析法を確立した。

第 1 章 では、比較的近年に登録されたため残留実態の情報が少ない 17 種類の農薬を対象とする一斉分析法を確立した。前処理工程において抽出溶媒にはアセトニトリルを使用し、塩化ナトリウム添加による塩析と水層の分離、抽出液の溶媒置換を経て、脂肪酸等に吸着能力を持つ PSA 固相カラム処理によるクリーンアップを行ない、LC-MS 大気圧イオン化分析に附して 17 種類の農薬の一斉分析に成功した。

第 2 章では、前章の結果を発展させ、短時間で多検体の前処理を可能とする実用的な抽出・クリーンアップ方法を開発した。すなわち、遠心管中の試料にアセトニトリルを加えて高速ホモジナイザーで攪拌抽出し、塩化ナトリウムと硫酸マグネシウムの添加後、遠心分離により残渣と水層を分離除去した。この抽出液を PSA 固相カラムおよび GCB 積層カラムに通塔して農薬を吸着させると共に、分析の妨げとなる夾雑物質を除き、アセトニトリル/トルエン溶出、濃縮を経て最終試験液とした。本章では、最初にバックグラウンドノイズの少ない検出器（GC-FPD、GC-MS（NCI））を用いて分析し、次いで他の農薬を GC-MS（EI）で分析する段階的な測定方法を開発した。この結果、約 160 種類の農薬の一斉分析法が測定可能となった。

第 3 章 では、第 2 章の前処理方法を応用して対象農薬のさらなる拡大を図った。ま

た、分析機器には GC-MS (EI、NCI)、GC-FPD に加えて、LC-MS/MS の正負エレクトロスプレーイオン化法 (ESI+, ESI-) を用いた。クリーンアップ工程に C18 の固相カラムを、また、検出機器に MS/MS を追加することで 300 種類以上の農薬の一斉分析法が確立された。この分析法では、分析時間の大幅な短縮、対象農薬の拡大および溶媒の減量化が達成され、様々な果実や野菜などの農産物にも適用可能な事から、公的分析機関の検査業務の現場で標準分析法として採用されている。

第 4 章においては、機器分析工程のさらなる単純化と時間短縮を目的に、検出機器を MS/MS に一本化して、1 回の測定で 250 種類以上の農薬を高感度分析する一斉分析方法を確立した。分析精度を保障する添加回収試験においては良好な再現性を示し、260 種類の農薬が 10 ng/g の濃度で同時に測定できる方法を確立した。また、本方法と第 3 章で開発した前処理法、分析方法を組み合わせることにより、350 種類以上の農薬についてモニタリングが行える一斉分析方法とシステムを構築した。

農産物や食品の安全性は、検査体制を基盤として築かれており膨大な労力と社会的コストが費やされている。本研究で開発した一斉分析法は、現在までに使用されている主要な農薬を網羅しており、実用的で汎用性に優れ、分析業務の社会的負担を軽減することに繋がる重要な成果であると考えられる。

本研究で得られた成果は、農薬化学、分析化学、環境化学、食品分析学等の分野の発展に資するものであり、本論文の審査ならびに学力確認の結果と併せて、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。