

## マトリックス成分から見た食品中残留物分析

アジレント・テクノロジー（株） 杉立 久仁代（すぎたて くによ）

### 【はじめに】

日本の高度成長期には多くの化学物質が合成され、安定で豊かな私たちの生活を支えてきた。しかしながら一方で毎日口にする食品を汚染し、人工的な化学物質を含まない食品は存在しないのではないかと思うくらい、使用されている化学物質は多岐に渡っている。食品中に含まれる化学物質は食品添加物や人工甘味料、色素など意図的に添加しているものと、環境からの汚染（ダイオキシンや PCB, フタル酸エステル類など）や残留農薬がある。中でも、世界中で使われている農薬は約 800 種類とも言われており、食品の安全を守るための分析技術の発展は著しい。

食品中の残留農薬分析は、先人たちの知恵と経験により試料や対象農薬に照準を絞った前処理方法が多く存在する。最近ではあまり使われなくなってしまうが、フロリジルやシリカゲルカラムにしても充填量や含水比率、溶出溶媒の種類からその混合比率など細かな検討が行われていた。また、硫黄を含む玉ねぎやニンニクであれば硝酸銀アルミナカラムを使用したり、お茶中のタンニン除去のために酢酸鉛処理が使われるなどしてきた。しかし、特にポジティブリスト制度施行後は、対象物質の拡大に伴い、より多くの物性に対応できる“お決まり”の前処理となっており、あまり逸脱した前処理方法は近年では用いられていない。

一方で、分析に際して“汚い”検液といった言葉が使われているが、それは、検液の色が濃い、あるいは分析したクロマトグラムの対象化合物に夾雑成分が被って見えない、リテンションタイムが大きくずれた、などから判断している。しかしながら検液中にどのような夾雑成分が含まれているのかについて、これまで分析対象とはされてこなかった。食品は多岐に渡るため、その成分を調べることは難しい、とされてきたからである。しかし、食品中の夾雑成分を調べることができれば、前処理方法の開発や評価につなげられる有用な情報が得られる。

### 【代謝物分析のアプローチ】

生命現象を理解するには、ゲノム情報、タンパク質情報、代謝物情報などを網羅的に解析する手法がありオミックス解析と言われている。中でも代謝物は何十万と存在するタンパク質と比べ数も少なく（ヒトの場合：遺伝子 25,000 個、タンパク質 50 万個以上(200 万とも)、代謝物 42,000 個(HMDB に登録されている数))、比較的低分子のため、近年発達している質量分析計などの機器を使って分析しやすい。さらに、遺伝子上に潜在的に持っている情報でも、それらが生涯の間に発現するかしないかは未知であるが、代謝物は現在の生体内の状態を“丸ごと”表わすため、種々の有用な情報が得られる可能性があり、病気の診断、

バイオエネルギー、食品など様々な分野で使用されている。この代謝物分析は生体内の代謝物を網羅的に分析するため、残留農薬分析のような精製の工程はほとんどなく、いわば非常にクルードなサンプルを測定することとなる。興味深いことに、農作物や肉、魚などの微量有機汚染物質を測定する際に妨害となっているマトリックスと呼ばれている成分は、抽出の工程で巨大分子であるタンパク質や炭水化物は除去されるため、低分子の代謝物であると考えられる。そう考えると、これまで食品の残留農薬分析上で測定できないと思われていた成分を測定する手段がありうるということになる。

### 【GC-MS を用いた代謝物分析】

代謝物は生体内で代謝されるため、水酸基やカルボキシル基、あるいはアミノ基といった代謝されやすいような官能基がついていることが多い。このような官能基を持つ代謝物を網羅的に分析するためには一般によく知られているトリメチルシリル化(TMS 化)という誘導体化を行う。(厳密には TMS 化の前にオキシム化といった処理が入る) 本来は、官能基に応じて最適な誘導体化が存在するが、アミノ酸・有機酸・糖・核酸・脂肪酸・ステロールといった種々の代謝物を網羅的に分析するため、最大公約数である TMS 化が使われている。

そこで、残留農薬分析におけるマトリックス成分を調べるため、代謝物分析の手法に従い誘導体化を行って測定した結果、種々の知見を得ることができたので報告する。

### 【マトリックス効果原因物質の探索】

残留農薬分析で最も問題になるのがマトリックス効果である。GC-MS の場合、標準溶液のレスポンスに対して検液中の農薬のレスポンスが上がる正のマトリックス効果が多い。そこで、種類の異なる作物について、通知法による前処理を行った検液について、さらに誘導体化を行って測定したところ、作物が異なっても共通の成分(モノアシルグリセロール、トコフェロール、ステロールなど)が残留することが分かった。水溶性の高いアミノ酸や糖は抽出の工程で除去され、脂肪酸は固相カラムで除去できているため、農薬と極性の近い成分や、あるいは少し極性の低い成分が残ったと考えられる。特にモノアシルグリセロールはこれまでは食品成分としては注目されてこなかったが、C14-18 を中心とした多くの種類のモノアシルグリセロールが検液中に高濃度で含まれ、これらがマトリックス効果を引き起こす主たる物質であることが分かった。さらに残留するモノアシルグリセロールの濃度によって、マトリックス効果の程度も大きく変動することが分かった。



### 【残留農薬分析法の各工程での比較】

誘導体化することで、今まで見えていなかった検液中の成分が測定できることが確認できたため、次に残留農薬分析の各工程で、どのような成分が抽出され、あるいは除去できているのかを新旧の前処理法で比較した。抽出の工程は、従来一般的に使用されていたアセトンと現在の一斉分析で主に使われているアセトニトリルとの比較、精製は従来使用されていたフロリジルカラムとシリカゲルカラム及び現在使われているグラファイトカーボン、NH<sub>2</sub>, PSA での除去効果を比較した。

その結果、アセトニトリルは脂溶性の高い代謝物の抽出効果は低いだけでなく、Log $P_{ow}$ が3.5未満になると抽出効果が落ちることも分かった。しかしアセトニトリルを用いても農薬の回収率は良好であることから、実際にはアセトニトリルで抽出効果が低下しているわけではなく、アセトンの場合、マトリックス成分の水酸基との水素結合などが働き、より多くの成分を抽出している可能性が考えられた。また精製カラムでは、マトリックス効果の原因となるモノアシルグリセロールは一定の溶媒比率でフロリジルやシリカゲルカラムで除去できるが、現在の一斉分析法で使用されているカラムではいずれを用いても除去できていないことも明らかとなった。

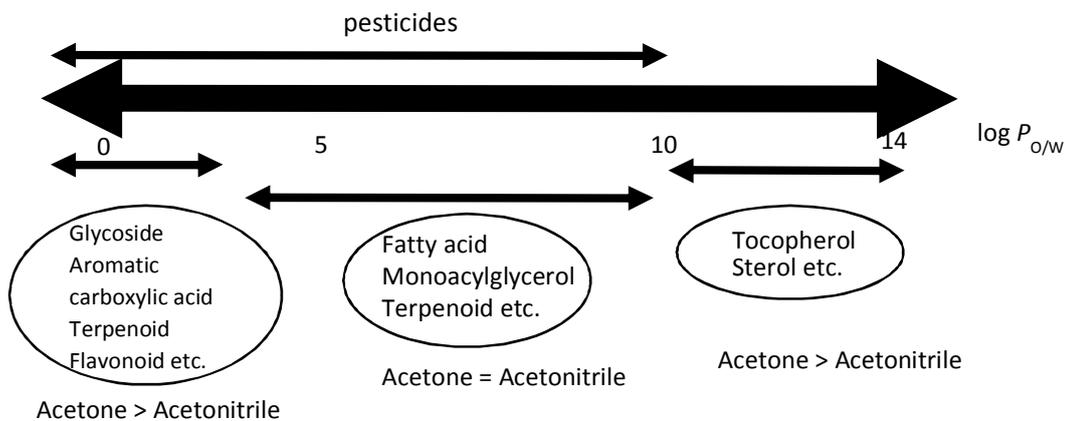


Fig. 3. Relationship between Each Components and log  $P_{ow}$

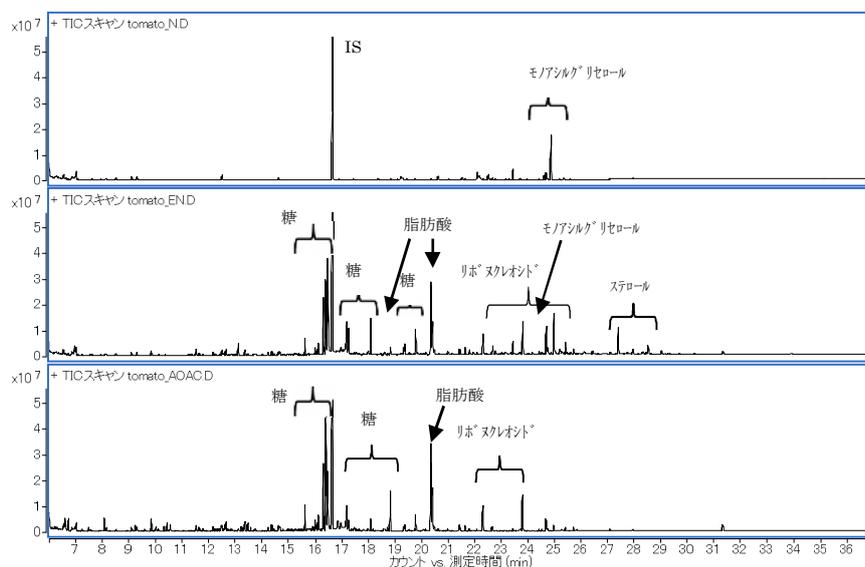
### 【通知法と QuEChERS 法の比較】

近年の残留農薬分析では一斉分析が大きな割合を占める。日本でもポジティブリスト制

度の施行に伴い、一斉分析法が示されている。海外では **QuEChERS** 法が **AOAC** 法に採用されて以来多くの注目を集め、欧米で広く使用される一斉分析の手法となった。**QuEChERS** 法は濃縮や乾固の工程を伴わず、簡単に前処理ができることから、最近日本でも注目されているが、通知法と比較して“汚い”と言われている。しかしながら、実際にどの程度精製度が異なるのかを調べた知見はない。そこで、これまでと同様の方法で誘導体化を行い比較を行った。比較的マトリックス成分が少ないとされるトマトジュース（無添加）から、難しいとされる生姜、唐辛子、ゴマなどをサンプルとした。

その結果いくつかの知見が得られた。まず、糖のように非常に水溶性の高い成分やフラボノイド化合物（カテキン類やイソフラボンなど）のように水酸基を多く持つ化合物は通知法では除去されているが、**QuEChERS** 法では十分には除去できていないことが明らかとなった。通知法の場合はサンプル抽出後に分取してから緩衝溶液を加えて塩析するが、**QuEChERS** 法では分取の工程もなく、サンプル中の水分のみを利用して（乾物の場合は膨潤のために水を添加）、塩を加えることで緩衝機能を持たせている。そのため **QuEChERS** 法の場合は塩析の際の水分量が大幅に不足していることが考えられる。また、**QuEChERS** 法では脂肪酸も多く残っていることが明らかとなった。脂肪酸は  $\text{NH}_2$  や **PSA** イオン交換機能を利用した精製だと考えられるが、**QuEChERS** 法のように単純に分散固相を入れて振とうさせるだけではその機能を十分に発揮できないことが推察された。

一方、抹茶中のカフェインや唐辛子中のカプサイシン類、ゴマ中のセサミン類、生姜中のジンゲロール類などは、含有濃度も高くどちらの方法でも除去できないことが分かった。



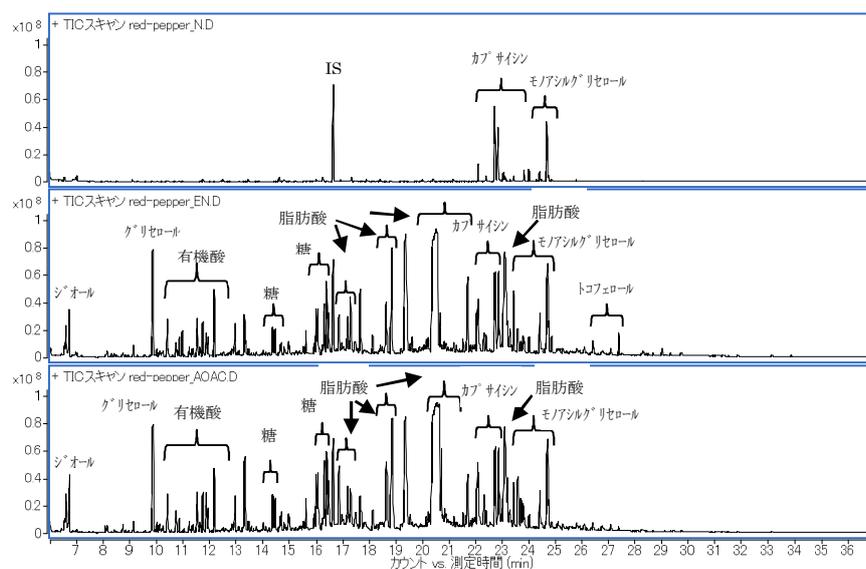


Fig. 3. 通知法と QuEChERS 法の比較例 (上：トマトジュース, 下：唐辛子)  
上段より通知法, QuEChERS 法 EN 法, QuEChERS 法 AOAC 法

#### 【まとめ】

サンプルを誘導体化することで、検液中に入っている成分を詳細に調べることができた。この手法を用いると、精製度の比較や、精製工程の見直しができるなど、有用な情報が得られることが明らかとなった。

#### 【文献】

- 1) Sugitate *et. al.* Search of components causing matrix effects on GC/MS for pesticide analysis in food. *J. Pestic. Sci.* **2012**, 37, 156-163
- 2) Sugitate *et. al.* Matrix behavior during sample preparation using metabolomics analysis in Agricultural Products. *J. Agric. Food. Chem.* **2013**, 60, 10226-10234.
- 3) Sugitate *et. al.* Difference in the matrix components by cleanup methods between the notified multiresidue pesticide analysis method in Japan and the QuEChERS method. *J. Pestic. Sci.* **2015** (in press)

