

24. 農産物中のクロロタロニルの簡便な分析法の開発

○上野 亮 (地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所)

【研究目的】

殺菌剤として用いられる農薬クロロタロニルは広く使用されているものの、現在主流の残留農薬一斉分析法では分析が困難であり、残留実態の調査が一部の機関でしか行われていない。そこで、当研究所において一斉分析法に準じた手法でクロロタロニル分析を可能にするため本研究を実施した。

【研究の必要性】

農薬は食糧生産において、その省力化や収量の増加に大きく寄与しており、現代の農業において必要不可欠のものである。

農薬の中で広く使用されているもののひとつに殺菌剤クロロタロニル(2,4,5,6-テトラクロロイソフタロニトリル)がある。クロロタロニルは多くの作物に使用され、2019年の生産量は2003.7tと国内での生産量の上位に位置している¹⁾。一方でEUでは、クロロタロニルは安全性を証明する根拠が十分でないという理由のため、2020年より使用禁止となっている²⁾。

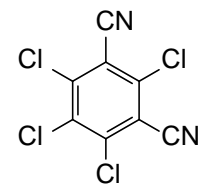


図1. クロロタロニル

わが国では食品中の残留農薬について多数の機関が実施している。しかし、国内でクロロタロニルの残留検査を行っている機関は少なく、分析件数も少ない³⁾。その理由としては、現在広く行われている残留農薬の一斉分析法では分析が難しいことが挙げられる。同法の工程の一つに固相抽出による精製があり、グラファイトカーボンブラック(GCB)や一級・二級アミン(PSA)修飾シリカゲルが汎用される。しかし、クロロタロニルはGCBに吸着されやすいため、他の農薬と同様の条件ではクロロタロニルが除去されてしまう。また、塩基性条件下でユリ科やアブラナ科作物の酵素や硫黄化合物により分解されることが報告されていることから、塩基性を示すPSAによる精製もまた適さない場合がある⁴⁾。

報告されているクロロタロニル分析法では処理途中でのクロロタロニルの分解を抑制するため、試料破碎時に酸の添加や試料の凍結が行われている⁵⁾。しかし、凍結試料の粉碎には相応の設備が必要であり、酸の添加では多量の酸を含む廃棄物が生じる。そのため、クロロタロニルの検査体制を構築する上で、特別な設備を必要としない簡便な分析法の確立が求められる。

【研究計画】

アセトニトリルによる抽出を行うクロロタロニル分析法が報告されているため抽出法の検討は行わず、精製処理に使用する固相抽出法の検討を実施し、精製法の最適化を行う。そして、その手法を用いて複数の作物に対して添加回収試験を実施し分析法の評価を行う。

試料からの抽出操作及び分析は既報⁶⁾に準じた手法で実施する。すなわち、アセトニトリルを用いたホモジナイズ抽出にて行い(図 2)、抽出液を固相抽出にて精製を行った後、GC-MS/MSにて分析する(表 1)。

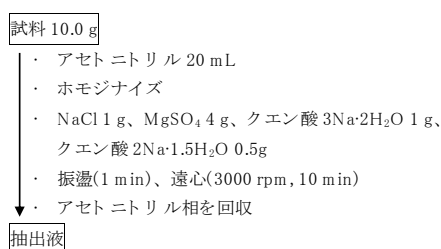


図 2. 抽出法の概要

表 1. GC-MS/MS 分析条件

| GC 部 (Agilent 7890A) | |
|----------------------|---|
| 注入法 | バルブド スプリットレス |
| 注入量 | 1 µL |
| カラム | Agilent DB-5MS (30 m, 0.25 mm, 0.25 µm) |
| カラム温度 | 50°C (1 min) → 25°C/min → 125°C → 10°C/min → 310°C (10 min) (Run time 32.5 min) |
| 移動相 | ヘリウム |
| MS 部 (Agilent 7000B) | |
| 測定モード | MRM |
| イオン化法 | EI(+) |
| イオン化エネルギー | 70 eV |
| イオン源温度 | 280°C |
| 定量イオン(m/z) | 264.0→168.0 |
| 確認イオン(m/z) | 264.0→229.0 |

【実施内容・結果】

固相抽出カラム検討

クロロタロニルを添加した野菜果実ジュースに対して既報⁶⁾と同様の精製操作、すなわち GCB/PSA カラム(Supelclean ENVI-Carb II/PSA、Merck 社製)による精製を行ったところ回収率は 23%であった。この試料にリン酸を添加することで回収率が 78%に大幅に向上したため、塩基性条件でクロロタロニルが不安定であることが示唆された。しかし、酸を加える場合 PSA による精製効果が減少すると考えられるため、他の精製カラムを検討した。

C18 カラム(Supelclean ENVI-18、Merck 社製)、HLB カラム(Oasis PRiME HLB、Waters 社製)、GCB カラム(Supelclean ENVI-Carb、Merck 社製)、FL カラム(InertSep FL、GLサイエンス(株)製)およびシリカゲル(SI)カラム(InertSep SI、GLサイエンス(株)製)について、負荷したクロロタロニルの回収を検討した。その結果 GCB、FL、SI、C18 では 78%以上回収できたが、HLB は回収率が低く実験毎の再現性も低かった(表 2)。

表 2. クロロタロニル溶出試験結果

| カラム | 溶出溶媒 | 回収率(%) |
|-----|-------------------|--------|
| GCB | アセトニトリル-トルエン(1:1) | 104 |
| C18 | アセトニトリル | 78 |
| HLB | アセトニトリル | 56 |
| FL | 酢酸エチル-ヘキサン(1:9) | 84 |
| SI | 酢酸エチル-ヘキサン(1:4) | 80 |

FL、SI、C18 について検討を進めた際に、試料抽出液を FL、SI カラムで精製する段階で、作物によってはカラムが詰まり作業効率が著しく低下する場合があった。また、夾雑成分が多く残ることによる測定結果や分析機器への悪影響が懸念されたため、GCB による精製を加えて野菜果実ジュースを用いた添加回収試験を行った。その結果、GCB+FL で

78%、GCB+SI で 80%、GCB+C18 で 90%の回収率となった。ただし、GCB+C18 については、きゅうり、ピーマンで検討した際に試料マトリックスが分析に与える影響が大きく、C18 では精製が不十分である可能性があるため候補から除外した。

FL と SI を比較するため、野菜果実ジュースを GCB+FL または GCB+SI を用いて精製した溶液を Scan モードで測定したところ、FL カラムのほうが観測されたピークが少なく、より精製されていることを示唆する結果が得られた(図 3)。このため、以降の添加回収試験は GCB と FL による精製法(図 4)を用いて実施した。

添加回収試験

本手法を用いて 9 作物と野菜果実ジュースに対してクロロタロニルの添加回収試験を実施した(表 3)。また、野菜果実ジュース、ほうれん草、大根については試料に酸を添加する方法も検討した。その結果、きゅうり、ピーマンについてはクロロタロニルの回収率が 70%を超え、本法の適用可能性が示された。また、大根については、報告されている通り試料中での分解が示唆される結果となった。

酸の添加について、大根ではリン酸を添加することにより回収率が向上したものの、未だ不十分な回収率であった。また、野菜ジュースでは酸の添加により回収率が低下した。

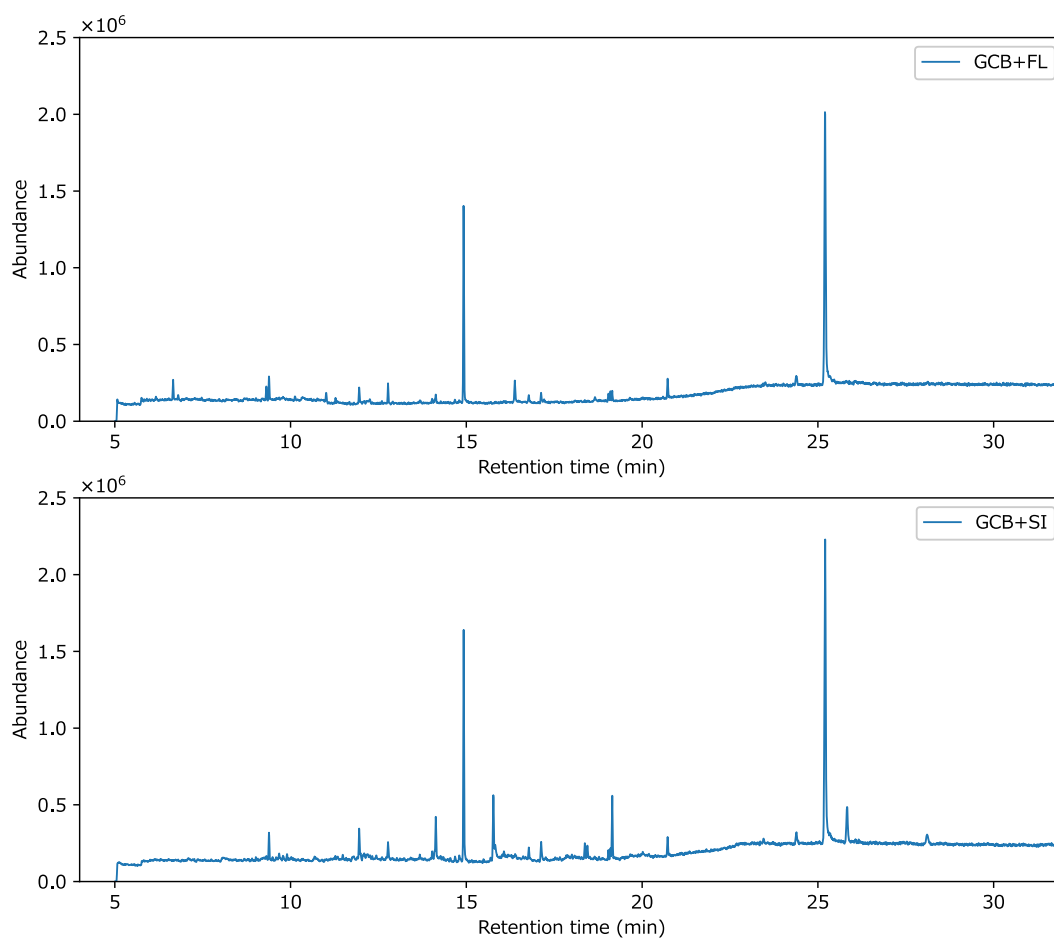


図 3. 野菜果実ジュース抽出物の MS Scan (m/z : 50–600)クロマトグラム

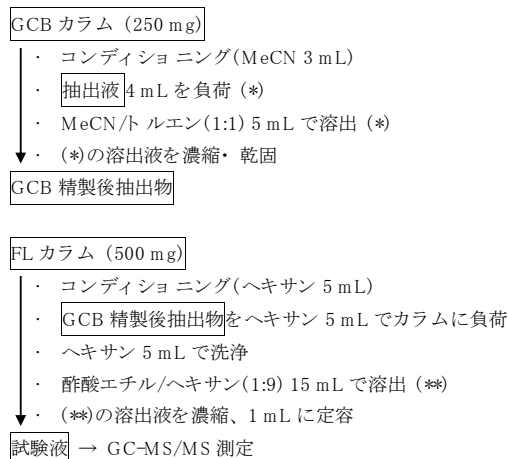


図 4. 前処理法の概要

表 3. クロロタロニル添加回収試験結果

| 試料 | 添加濃度 (ppm) | 酸の添加 | 回収率(%) |
|--------|------------|------|--------|
| なす | 0.01 | — | 66 |
| ほうれんそう | 0.01 | — | 71 |
| ほうれんそう | 0.01 | リン酸 | 70 |
| オクラ | 0.01 | — | 50 |
| オレンジ | 0.01 | — | 65 |
| りんご | 0.01 | — | 64 |
| きゅうり | 0.05 | — | 100 |
| とうもろこし | 0.05 | — | 11 |
| ピーマン | 0.05 | — | 84 |
| 大根 | 0.05 | — | 0 |
| 大根 | 0.05 | リン酸 | 20 |
| 野菜ジュース | 0.05 | — | 80 |
| 野菜ジュース | 0.05 | リン酸 | 60 |
| 野菜ジュース | 0.05 | 酢酸 | 38 |

【考察と今後の課題】

今回検討した結果では回収率が 50%~75%程度となる作物が多く、また併行精度が低くなる傾向が見られたため、精製が不十分もしくは不適切である可能性がある。検討した固相抽出カラムの多くで回収率が約 80%~90%となったため、精製を行わない方法の検討も必要だと思われる。その場合、分析機器として汚染に強い LC が適すると思われるものの、LC-MS/MS(イオン化: ESI)にて測定を試みたところクロロタロニルを観測できなかった。今後、測定例が報告されている大気圧化学イオン化法(APCI)を用いた分析を検討する。

大根ではリン酸の添加により回収率が向上したものの、クロロタロニルの分解を完全には抑制できなかった。野菜果実ジュースについても酸によって回収率が大きく異なる結果が得られているため、添加する酸やその量の検討が必要と思われる。しかし、酸による試料粉碎時の分解抑制は、試料に対して一律に酸を加えるため多量の酸廃棄物が生じる。使用する酸の量を削減するため、試料を凍結し粉碎する方法により粉碎時の分解を抑制し、分取した試料に酸を加えることで精製時の分解を抑制する手法も今後検討したい。

【参考文献】

- 1) 日本植物防疫協会『農薬要覧 2019』(2019)
- 2) European Commission, Final Renewal report for the active substance chlorothalonil. SANTE/10186/2018 Rev 1 (2019)
- 3) 厚生労働省『平成 30 年度食品中の残留農薬等検査結果』(2020)
- 4) 永井雄太郎, QuEChERS を見直してみよう. 日本農薬学会誌, 37(4), 362-371 (2012)
- 5) EU Reference Laboratories for Single Residue Methods, Modified QuEChERS-Method for the Analysis of Chlorothalonil in Fruits and Vegetables. https://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/srm/meth_QuEChERSforChlorothalonil_2010.pdf
- 6) 福井直樹, 高取聡, 山口聡子, 北川陽子, 吉光真人, 小阪田正和, 梶村計志, 尾花裕孝. 汎用マトリックス添加標準溶液を活用した野菜類および果実類中の残留農薬一斉分析法の妥当性評価. 食品衛生学雑誌, 56(4), 178-184 (2015)

【経費使途明細】

| 使 途 | 金 額 |
|--------------|---------------|
| 固相抽出カラム | 1 6 3, 8 6 2円 |
| 試薬・消耗品 | 1 1, 6 6 2円 |
| 分析機器消耗品 | 1 2 0, 8 6 8円 |
| 振込手数料 | 3, 6 0 8円 |
| 合 計 | 3 0 0, 0 0 0円 |
| 大同生命厚生事業団助成金 | 3 0 0, 0 0 0円 |