

クロピラリドの分析法

農研機構 農業環境変動研究センター
渡邊栄喜

1. はじめに

国内登録の無いクロピラリドは主にクローバーやタンポポ等の広葉雑草を枯らす選択性除草剤で、海外で飼料作物等に使用されている。クロピラリドが残留した飼料を給餌された牛が排せつしたふん尿を原料とした堆肥を施用したほ場で作物の生育障害が生じた。これまでの肥料等試験法に記載された LC-MS/MS による堆肥中クロピラリドの分析法（以下、従来法）の定量限界（LOQ）は $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ -乾物（dw）（ ng/g -dw）だが¹⁾、LOQ より低濃度においても作物によっては生育障害を引き起こす場合がある。そこで、極低濃度で生じうる作物の生育障害を未然に防ぐべく、およそ 10 倍の高感度化を図った新たな堆肥中クロピラリドの分析法を確立した。

2. 抽出法および抽出液のクリンアップ法²⁾

理論上、LC-MS/MS による定量では各分析対象成分に特徴的なイオンを選択的に検出することで、高感度分析が達成できる。しかし、堆肥等の試料は雑多なマトリクスで構成されているため、LC-MS/MS 測定の際に、これらのマトリクスが共存すると分析対象成分のイオン化に支障を来す。結果的に、分析値の信頼性が損なわれることになる。堆肥抽出液には様々なマトリクスがクロピラリドと共存するため、固相抽出（SPE）カートリッジでマトリクスをできるだけ除去し、イオン化に支障を来さない程度にクリンアップした測定用被検液を調製することが重要である。

まず、堆肥中クロピラリドの分析法の高感度化に当たって、①従来法の技術的課題の洗い出しおよび②新たな濃縮操作の追加を検討した。

従来法の抽出法ではメタノール-1 M 水酸化ナトリウム（99:1）による単回抽出が採用されてきた¹⁾。しかし、単回抽出後の抽出残渣中のクロピラリドの取りこぼしについての知見は公表されておらず、その抽出法の妥当性に疑問が残る。そこで、3 種類のクロピラリド残留牛ふん堆肥を用いて、当該抽出溶媒による抽出回数の妥当性を確認した（表 1）。抽出回数の違いによる測定値には最大 1.3 倍の開きがあり、少なくとも 2 回繰り返し抽出を行うことが妥当だと考えられた。

従来法では堆肥 0.25 g に相当する抽出液 5 mL を SPE でクリンアップした後、測定用被検液量を 5 mL としている（図 2）。つまり、堆肥中クロピラリド濃度が $10 \text{ ng}/\text{g}$ の場合、被検液中濃度は $0.5 \text{ ng}/\text{mL}$ となるため、機種によっては検出が困難となる。従って、より低濃度の残留レベルでの分析には濃縮操作が必要となる。そこで、2 回目の SPE カートリッジの溶出液にマイクロ液々抽出（マイクロ LLE）を追加した（図 2）。マイクロ LLE は、アルカリ性下で SPE 溶出液を洗浄後、6 M 硫酸酸性下でジクロロメタン相へ抽出することで、濃縮

表 1 メタノール-1 M 水酸化ナトリウム (99:1) を抽出溶媒に用いた際の抽出回数の妥当性

試料	2 回繰り返し抽出【高感度分析法】		単回抽出【従来法】	
	検出濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}-\text{dw}$)	RSD (%)	検出濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}-\text{dw}$)	RSD (%)
No. 1	21.2 ± 0.4	2.0	18.5 ± 0.3	1.6
No. 2	93.0 ± 4.2	4.5	73.2 ± 3.1	4.2
No. 3	228.9 ± 0.4	0.2	177.0 ± 5.0	2.8

$n = 5$

を可能とする方法である。従来の LLE とは異なり、少量の抽出溶媒で抽出でき、かつ、遠心分離により短時間で液々界面にエマルジョン形成することなく二相分離できる。マイクロ LLE を追加することで、抽出液 10 mL (堆肥 0.5 g 相当量) を測定用被検液量 0.2 mL まで濃縮できた (2.5 倍濃縮)。この濃縮操作を追加した方法を、クロピラリド濃度が 10 ng/g の堆肥に適用した場合、被検液中濃度は 25 ng/mL となるため、検出が容易となった。

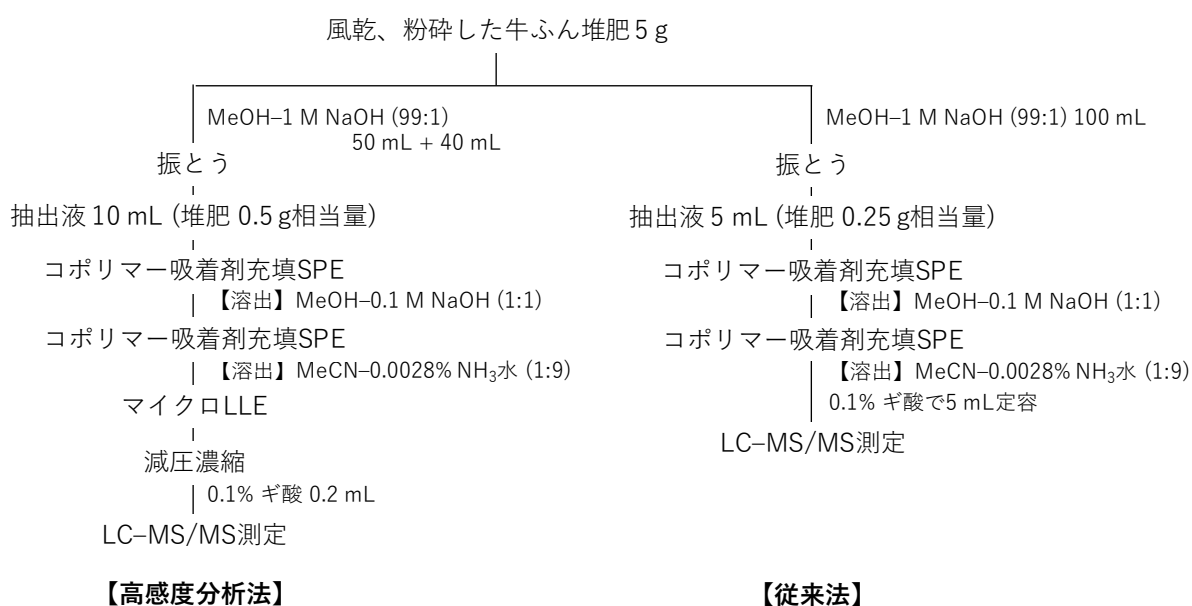


図 1 高感度分析法および従来法の操作フロー

従来法での抽出法およびクリーンアップ法を足掛かりに、マイクロ LLE を追加した高感度分析法の LC-MS/MS 測定時のイオン化への影響を確認した結果、3%のイオン化抑制が認められたが、定量上支障は無いと判断した。図 2 に高感度分析法で牛ふん堆肥試料を測定した得たクロマトグラムを示す。

抽出液中に共存する試料マトリクスの除去が不十分な場合、前述のように分析対象成分のイオン化が妨害され、信頼性の高い分析値が得られない。イオン化の妨害を補正する方法として、安定同位体標識化内標準物質の利用やマトリクス検量線法等がある。しかし、日常分析法としての運用を考慮すると、コスト面または労力面でいずれも難がある。今回、確立し

た高感度分析法では従来法の2倍量の抽出液(10 mL)を分取し、0.2 mLまで濃縮したにも関わらず、試料マトリクスに因るイオン化への影響はほぼ無視できる程度であった。それゆえ、0.1%ギ酸水溶液中で調製したクロピラリドの希釈溶液を用いた絶対検量線法による定量が可能となった。

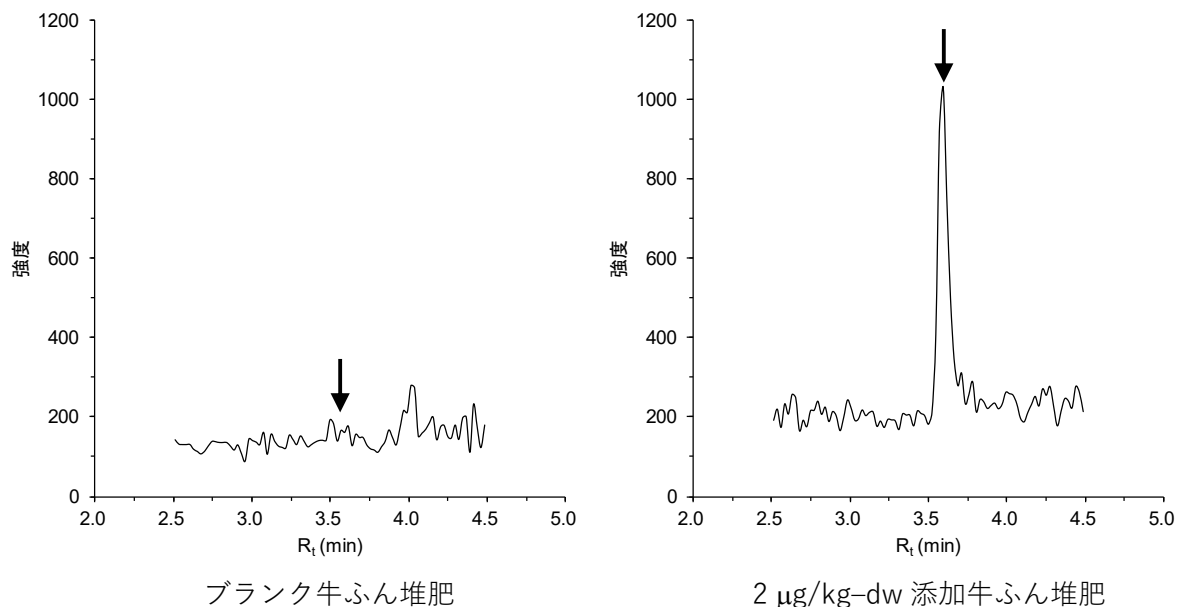


図2 牛ふん堆肥試料中クロピラリドのLC-MS/MSクロマトグラム(モニターイオン m/z 192 → 146)

3. 高感度分析法のバリデーション²⁾

確立した高感度分析法の真度の確認にクロピラリド添加牛ふん堆肥(添加濃度: 2、10 および 50 µg/kg-dw、各添加濃度 5 点併行)を、精度の確認にクロピラリドが低濃度および高濃度に残留した牛ふん堆肥をそれぞれ用いた。

平均回収率は 71–79% (RSD ≤ 5%) であり、厚生労働省が定める試験法の妥当性評価ガイドライン³⁾の真度の目標値(70–120%)を満足した。一方、日内変動(3 点併行/日)および日間変動(3 点併行/日 × 5 日間)は、それぞれ 3%以下、4%以下であり、ガイドラインの目標値を満足した。

2 µg/kg-dw 添加牛ふん堆肥試料の 7 点併行試験で得た回収濃度の標準偏差から、LOQ を 0.7 µg/kg-dw、検出限界を 0.3 µg/kg-dw と算出した。高感度分析法は従来法に比して、およそ 14 倍感度向上が図られ、本研究の目標値を達成したといえる。

9 種類のクロピラリド残留牛ふん堆肥に、高感度分析法および従来法を適用した。表 2 に示すように、双方の分析法で得た測定値は概ね同等であった。また、従来法では検出が困難な低濃度残留試料(試料 1 および 2)にも高感度分析法の適用が可能であった。一部の試料で測定値にかい離が認められたが、これは前述した抽出回数の違いに因るものと推察した。

次いで、他機関で確立した高感度分析法の適用が可能か否かを確認するため、独立行政法人農林水産消費安全技術センター(FAMIC)と共同で 6 種類のクロピラリド残留牛ふん堆肥

を用いたクロスチェック試験を実施した。その結果、FAMIC が得たクロピラリド濃度の平均値は演者の平均値の 91–111% の範囲内にあり、ほぼ同等の測定値が得られた。

表 2 クロピラリド残留牛ふん堆肥への適用

試料	【高感度分析法】		【従来法】	
	検出濃度 (µg/kg-dw)	RSD (%)	検出濃度 (µg/kg-dw)	RSD (%)
1	0.94 ± 0.1	5.6	分析せず	–
2	3.3 ± 0.3	8.1	分析せず	–
3	81.0 ± 1.7	2.0	68.8 ± 3.9	5.7
4	93.0 ± 4.2	4.5	88.1 ± 1.8	2.0
5	106.1 ± 5.4	5.1	89.4 ± 2.5	2.8
6	114.9 ± 5.7	5.0	99.8 ± 7.4	7.4
7	115.1 ± 6.6	5.7	115.8 ± 3.5	3.0
8	121.5 ± 9.7	8.0	119.9 ± 4.5	3.7
9	143.3 ± 6.9	4.8	131.3 ± 5.5	4.2

$n = 5$

4. おわりに

残留値等はある分析法によって弾き出された数値である。使用した分析法が適正なガイドライン等に基づいて、その性能が評価され、異なる分析者が、異なる試験研究機関で、異なる分析機器を使用しても、ほぼ同様の分析結果が得られる分析法であれば、弾き出されたその数値というのは妥当であると考えられる。分析法の確立に当たって、まずは現有する分析機器のパフォーマンスを理解することが重要である。とりわけ、今回の堆肥中残留クロピラリドの高感度分析法の確立に見るように、極低濃度の残留レベルを的確に分析することが要求された場合、目の前の LC-MS/MS の検出能力を照らし合わせた上で、抽出法およびクリンアップ法を組み立てる必要があった。要は高性能な分析機器を要求するのではなく、現有する分析機器を用いて求められている検出レベルを分析するために、どのような抽出法やクリンアップ法を組み立てることが必要かを考えることが肝要である。さらに、確立した分析法を標準的に利活用する、例えば公的な試験法として利活用することを想定した場合、できるだけ、抽出やクリンアップ操作は簡便で、汎用性のある理化学機器で対応できることも考慮すべきである。

確立した牛ふん堆肥中残留クロピラリドの高感度分析法はその後、FAMIC で牛ふん堆肥以外の堆肥への適用拡大の検討が進められた⁴⁾。さらに、FAMIC 主導の下、民間受託分析機関を含む 10 機関での妥当性確認 (クロスチェック試験) が実施され⁵⁾、肥料等試験法 (2018)⁶⁾ に記載されるに至った。なお、本研究で用いた LC-MS/MS の分析条件等の詳細は農研機構の技術マニュアル⁷⁾として外部に公開しているので参照されたい。

本研究は平成 28 年度農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業「堆肥中クロピラリドの

高感度分析法の開発」(28045C)で実施された研究成果を取りまとめたものである。また、クロスチェック試験は、FAMIC 肥飼料安全検査部の協力を得て実施した。

参考文献

- 1) 肥料等試験法 (2017) (独立行政法人農林水産消費安全技術センター)
http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikenho_2017.pdf#page=1
- 2) Watanabe, E., Seike, N., and Namiki, S. (2019) Highly sensitive analytical method for herbicide clopyralid residue in cattle manure compost with ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Journal of Pesticide Science*, 44:186–191
- 3) 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について (平成 22 年 12 月 24 日) (厚生労働省)
https://www.mhlw.go.jp/web/t_doc?dataId=00tb6662&dataType=1&pageNo=1
- 4) 伊藤浩平、小塚健志、青山恵介、白井裕治 (2018) 液体クロマトグラフタンデム質量分析 (LC-MS/MS) 法による堆肥等中のクロピラリドの測定—微量試験法の適用範囲拡大—、肥料研究報告、11:63–74
- 5) 伊藤浩平、小塚健志、秋元里乃、坂井田里子、大島舞弓、中村信二、白井裕治 (2018) 液体クロマトグラフタンデム質量分析 (LC-MS/MS) 法による堆肥等中のクロピラリドの測定—微量試験法の共同試験成績—、肥料研究報告、11:75–85
- 6) 肥料等試験法 (2018) (独立行政法人農林水産消費安全技術センター)
http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikenho_2018.pdf#page=1
- 7) 牛ふん堆肥中クロピラリドの高感度分析法 (参考法) (2017) (農研機構)
http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/pamphlet/tech-pamph/078229.html