

7-1 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

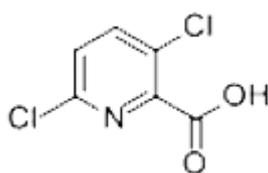
—微量試験法の適用範囲拡大—

伊藤浩平¹, 小塚健志², 青山恵介², 白井裕治²

キーワード クロピラリド, 堆肥, 汚泥発酵肥料, 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計, 微量試験法

1. はじめに

クロピラリドはカルボキシ基を有するピリジン系の農薬であり(Fig.1), クロピラリドに汚染された堆肥等を利用した場合, 植物種により生育障害等が発現することが知られている¹⁾. クロピラリドは国内では使用されていないが, 除草剤として使用されている米国, カナダ, 豪州からの輸入飼料に含まれていることがあり, 平成 28 年度に行われた調査によると, 国内の飼料中及び牛ふん堆肥中にもクロピラリドが含まれることが確認されている²⁾. また, 牛ふん堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリドの分析法としては, 平成 21 年度から平成 28 年度において八木, 顯谷, 小塚らにより液体クロマトグラフタンデム型質量分析(LC-MS/MS)法が開発及び妥当性の確認がなされ^{3~5)}, 定量下限が 10 µg/kg の試験方法として肥料等試験法に記載されている⁶⁾. しかしながら, 土壌中のクロピラリド濃度が 1 µg/kg 程度の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ことから⁷⁾より高感度な分析法が必要とされ, 平成 29 年度に農業・食品産業技術総合研究機構により定量下限 2 µg/kg 以下の「牛ふん堆肥中クロピラリドの高感度分析法」(参考法)が開発された⁸⁾.



Clopyralid

CAS No: 1702-17-6

Fig. 1 Chemical structure of clopyralid

クロピラリドは牛ふん以外の畜ふんを利用した堆肥にも含有している可能性があることから, この試験法についての適用範囲拡大が必要とされており, 当センターでは平成 29 年 11 月に農林水産省から試験法開発の依頼を受けた. そこで今回, この LC-MS/MS 法で牛ふん以外の畜ふん由来堆肥(鶏ふん堆肥, 豚ふん堆

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部(現)農薬検査部

² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

肥等)及び汚泥発酵肥料への適用範囲拡大を目的として, 単一試験室の妥当性確認として, 真度及び精度の評価, 定量下限の確認を実施したのでその概要を報告する.

2. 材料及び方法

1) 試料の収集及び調製

市販の堆肥 7 種類(鶏ふん堆肥 3 点, 豚ふん堆肥 4 点)及び汚泥発酵肥料 8 種類の計 15 種類を試験品として収集し, それぞれ 40 °C で約 60 時間乾燥した後, それぞれ粉砕機で目開き 500 µm の網ふるいを通すまで粉砕して分析用試料を調製した.

2) 装置及び器具

- (1) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(LC-MS/MS): Waters Quattro Premier XE
カラム: Waters ACQUITY UPLC HSS C18(内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒径 1.8 µm)
- (2) 振とう機: TAITEC SR-2DW
- (3) 遠心分離機: KUBOTA テーブルトップ遠心機 4000
- (4) ロータリーエバポレーター: BÜCHI R-200
- (5) カートリッジカラム: Waters Oasis PRiME HLB Plus Short Cartridge (225 mg)
- (6) 超遠心分離機: AS ONE MCD-2000
- (7) マニホールド: Waters 及び GLSciences
- (8) 試験管ミキサー: AS ONE 試験管ミキサーTRIO TM-2N

3) 試薬

- (1) 水: JIS K 0557 に規定する A3 相当の水. ただし, LC-MS/MS に導入する溶離液については A4 の水を使用した.
- (2) アセトニトリル: LC-MS 用
- (3) メタノール(抽出・クリーンアップ用): 残留農薬・PCB 試験用(5000 倍濃縮)または LC-MS 用
- (4) メタノール(溶離液用): LC-MS 用
- (5) 水酸化ナトリウム: 特級
- (6) 塩酸: 有害金属測定用
- (7) アンモニア水: 特級
- (8) ジクロロメタン: 特級
- (9) 硫酸: 有害金属測定用
- (10) ぎ酸: LC-MS 用
- (11) アンモニア溶液(0.0028 %(質量分率)): アンモニア水 0.1 mL を水 1000 mL に加えた.
- (12) クロピラリド標準液(0.1 mg/mL): クロピラリド[C₆H₃C₁₂NO₂]約 0.01 g をひょう量皿にとり, その質量を 0.1 mg の桁まで測定した後, 少量のアセトニトリルで溶かし, 全量フラスコ 100 mL に移し入れ, 標線まで同溶媒を加えた.
- (13) クロピラリド標準液(1 µg/mL): クロピラリド標準液(0.1 mg/mL)の 2 mL を全量フラスコ 200 mL にとり, 標線までアセトニトリルを加えた.
- (14) 検量線用クロピラリド標準液(100 ng/mL): 使用時にクロピラリド標準液(1 µg/mL)の 5 mL を全量

フラスコ 50 mL にとり、標線までぎ酸(1+1000)を加えた。

(15) 検量線用クロピラリド標準液(5~50 ng/mL)：検量線用クロピラリド標準液(100 ng/mL)の 2.5 mL ~25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までぎ酸(1+1000)を加えた。

(16) 検量線用クロピラリド標準液(0.5 ng/mL~2 ng/mL)：検量線用クロピラリド標準液(10 ng/mL)の 2.5 mL~10mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までぎ酸(1+1000)を加えた。

4) 試験操作

(1) 抽出

分析試料 5.00 g を量ってねじ口遠心沈殿管 100 mL に入れ、水酸化ナトリウム溶液(40 g/L)–メタノール[1 + 99]を 50 mL 加え、振とう機で 30 分間振り混ぜた。その後、遠心力約 1700×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を三角フラスコ 100 mL に移した。残留物に水酸化ナトリウム溶液(40 g/L)–メタノール[1 + 99]を 40 mL 加え、振とう機で 30 分間振り混ぜた後、遠心力約 1700×g で 5 分間遠心分離した。太首全量フラスコ 100 mL を受器として上記上澄み液をガラス繊維ろ紙をのせた桐山ロートで吸引ろ過し、続いて容器及び残留物を少量の水酸化ナトリウム溶液(40 g/L)–メタノール[1 + 99]で数回洗浄した洗液を同様に吸引ろ過した。標線まで水酸化ナトリウム溶液(40 g/L)–メタノール[1 + 99]を加えて抽出液とした。

(2) 精製 1

カートリッジカラムを予めメタノール 5 mL 及び水 5 mL で速やかに洗浄した。なす形フラスコ 100 mL をカートリッジカラムの下に置き、抽出液 10 mL をカートリッジカラムに正確に加え、速やかに液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。さらに水酸化ナトリウム溶液(0.4 g/L)–メタノール[1+1]5 mL を 2 回カートリッジカラムに加え、同様に流出させた。

(3) 精製 2

新たなカートリッジカラムを予めアセトニトリル 5 mL 及び塩酸(1+120)5 mL で速やかに洗浄した。流出液を 40 °C 以下の水浴で 5 mL 以下まで減圧濃縮した後、塩酸(1+11)3 mL を加えた。その後、濃縮した流出液をカートリッジカラムに負荷させ、速やかに液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。なす形フラスコ 100 mL を塩酸(1+120)5 mL で 2 回洗浄し、洗液を順次カートリッジに加え、次に塩酸(1+120)–アセトニトリル[9+1]5 mL 及び水 5 mL を順次カートリッジに加えて速やかに流出させた。ねじ口円錐型遠心沈殿管 10 mL をカートリッジカラムの下に置き、アンモニア溶液(0.0028 w/v%)–アセトニトリル(9+1)4 mL をカートリッジカラムに正確に加え、クロピラリドを速やかに溶出させた。

(4) 精製 3

溶出液に水酸化ナトリウム(40 g/L)0.1 mL を加え、試験管ミキサーで混合した。その後、ジクロロメタン 2 mL を加え、試験管ミキサーで 30 秒間混合し、遠心力 740×g で約 3 分間遠心分離し、下層(ジクロロメタン層)をパスツールピペットで除去する操作を 2 回繰り返した。残った水層に硫酸(1+2)0.15 mL を加え、試験管ミキサーで混合した。その後、ジクロロメタン 2 mL を加え、試験管ミキサーで 30 秒間混合し、遠心力 740×g で 3 分間遠心分離し、下層(ジクロロメタン層)をパスツールピペットでなす形フラスコ 50 mL に入れる操作を 3 回繰り返した。繰り返しの操作において、下層は同じなす形フラスコ 50 mL に加えた。これにアセトン 5 mL を加え、40 °C 以下の水浴上でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固させた。これにぎ酸(1+1000)を 1 mL 加え、超音波洗浄機を用いて超音波処理により溶解した後、共栓遠心沈殿管 1.5 mL に移して遠心力 8100×g

で5分間遠心分離した。上澄み溶液をLC-MS/MSの測定バイアルに移し試料溶液とした。

(5) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定

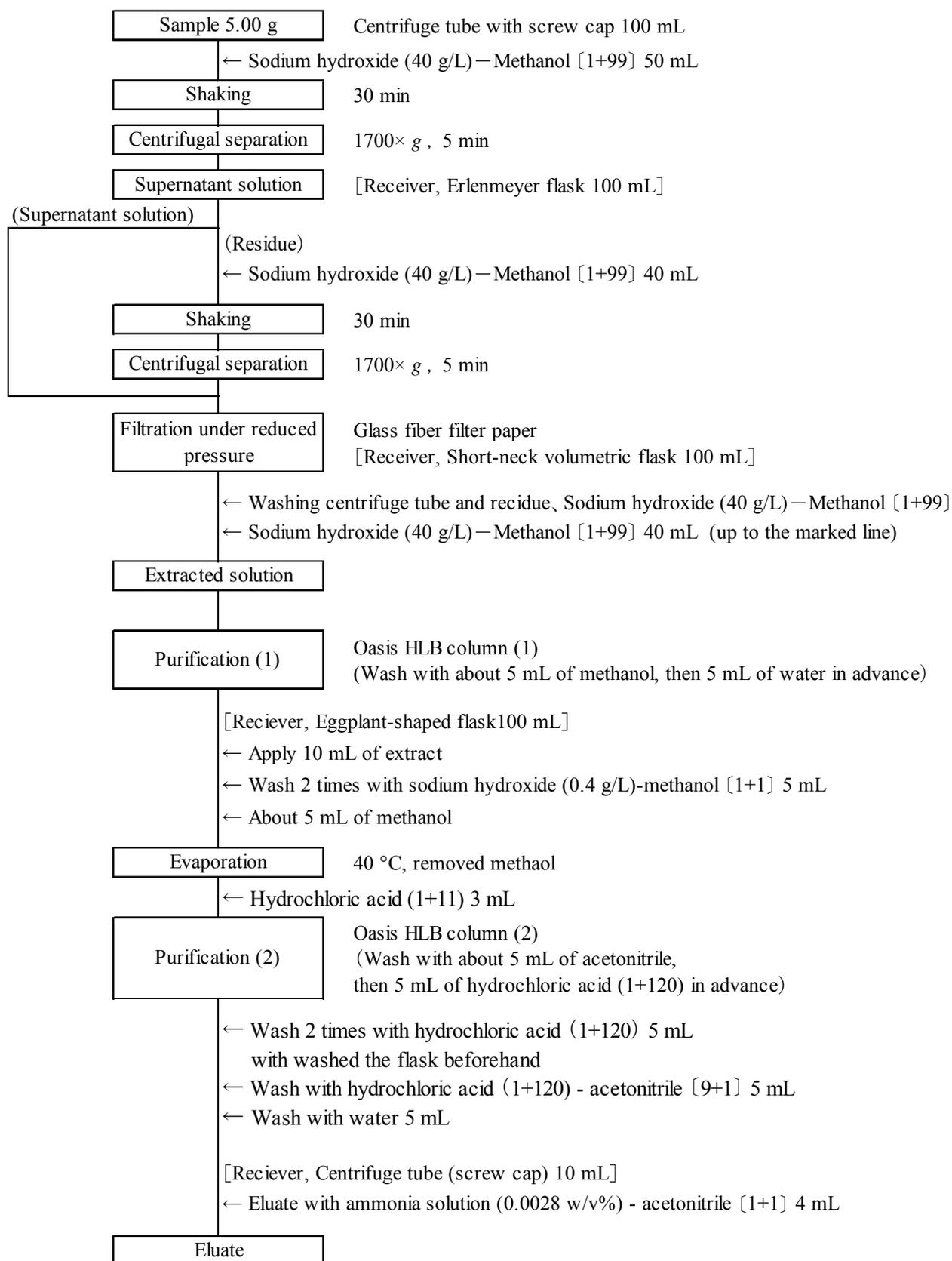
試料溶液及び検量線作成用混合標準液をLC-MS/MSに注入し、Table 1及び表Table 2の測定条件に従って選択反応検出(SRM)クロマトグラムを得た。得られたSRMクロマトグラムから各成分のピーク面積を求めて検量線を作成し、試料溶液中の各成分量を求め、分析試料中のクロピラリドの量を算出した。なお、定量法の概要をScheme 1に示した。

Table 1 Operating conditions of LC-MS/MS

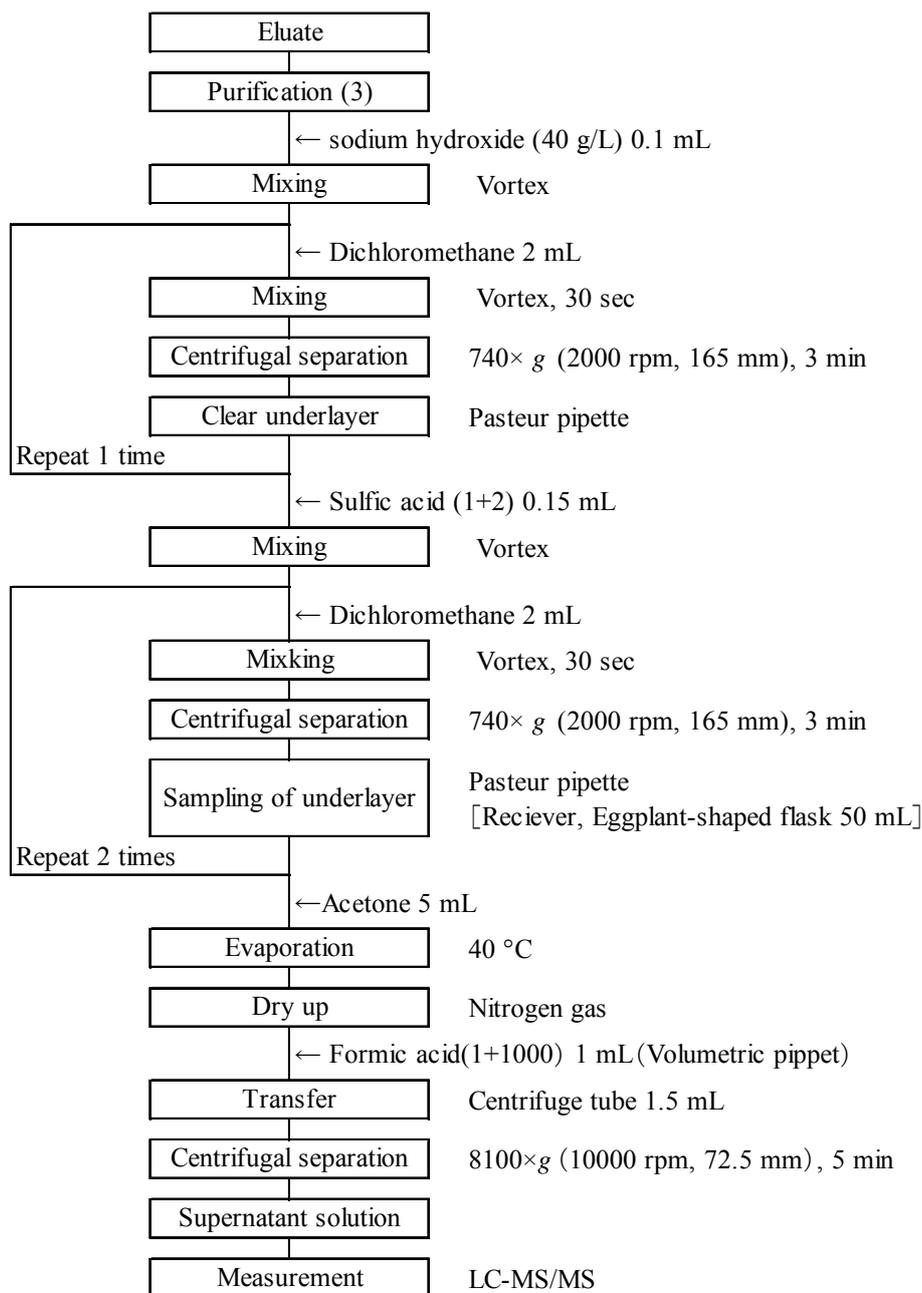
Column	Waters, ACQUITY UPLC HSS C18 (2.1 mm i.d.×100 mm, 1.8 μm)
Mobile phase	A:Formic Acid (1+1,000) B:Methanol 0 min (5 %B)→5 min (60 %B)→6 min (95 %B)→7 min (5 %B)
Flow rate	0.4 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Desolvation gas	N ₂ , 400 °C, 800 L/hour
Cone gas	Ar (50 L/hour)
Capillary voltage	1.0 kV
Ion source	120 °C

Table 2 MS/MS Parameters

Agricultural chemical	Precursor ion (m/z)	Product ion		Cone voltage (V)	Collision energy	
		for quantification (m/z)	for identification (m/z)		for quantification (eV)	for identification (eV)
Clopyralid	192	146	110	20	20	30



Scheme 1-1 Analytical procedure for clopyralid in fertilizer



Scheme 1-2 Analytical procedure for clopyralid in fertilizer

3. 結果及び考察

1) 添加回収試験による真度の評価

豚ふん堆肥、鶏ふん堆肥及び汚泥発酵肥料の3種類の肥料に、クロピラリドとしてそれぞれ 200 µg/kg, 2 µg/kg 及び 80 µg/kg 相当量添加し、十分に溶媒を揮散させた試料を調製し、本法に従って3点併行で添加回収試験を行った。各試料の結果を Table 3 に、また、添加回収試験で得られたクロマトグラムの一例を Fig.2 に示した。回収率は81.2%~94.2%であり、いずれも肥料等試験法に示されている各濃度レベルにおける真度の目標を満たしていたことから、これらの試料の分析において十分な真度を有していることが確認された。

Table 3 Result of recovery test

Sample	Content of clopyralid ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Mean recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Criteria of the trueness ^{c)} (%)
Pig manure compost	200	88.6	8.1	70~120
Poultry manure compost	2	81.2	13.0	60~125
Composted sludge fertilizer	80	94.2	3.2	70~120

a) $n = 3$

b) Relative standard deviation

c) Criteria of trueness (recovery) shown in Testing Methods for Fertilizer

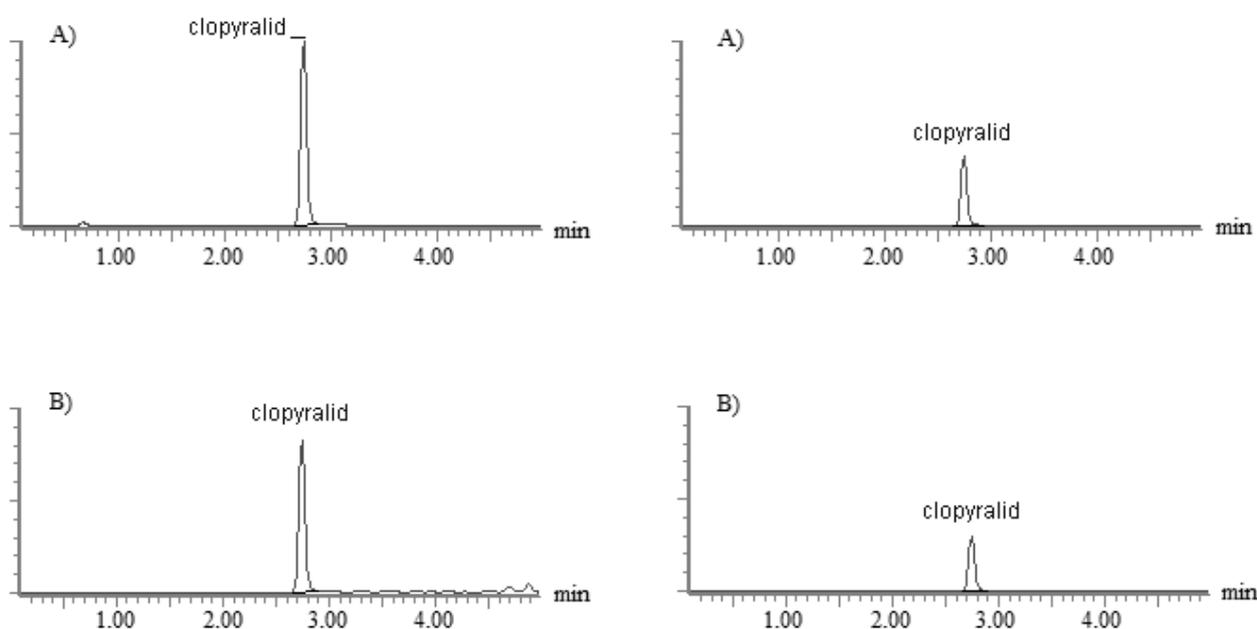


Fig.2 Chromatogram of recovery test

A) Standard solution (Clopyralid content : 0.5 ng)

B) Sample solution (Pig manure compost, clopyralid content : 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

Left figure : Product ion for quantification (192>146)

Right figure : Product ion for identification (192>110)

2) 併行精度及び中間精度の評価

併行精度及び中間精度を確認するために豚ふん堆肥及び鶏ふん堆肥について、クロピラリドとして 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及び 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量添加し、2 点併行で日を変えて 5 回試験を実施して得られた結果を Table 4 に示した。この結果から一元配置分散分析を行って得られた併行精度及び中間精度を Table 5 に示した。豚ふん堆肥及び鶏ふん堆肥の平均値は 141 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及び 1.59 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、併行相対標準偏差は 13 % 及び 10 %、中間相対標準偏差は 16 % 及び 21 % であった。いずれの相対標準偏差も肥料等試験法⁶⁾に示されている併行精度(併行相対標準偏差)及び中間精度(中間相対標準偏差)の目安の 2 倍以内であったことから、本法は十分な精度を有していることが確認された。

Table 4 Individual result of repetition test of changing the date for the precision confirmation($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Test days	Pig manure compost		Poultry manure compost	
1	129	160	1.71	1.85
2	122	146	1.84	1.42
3	132	120	1.12	1.13
4	161	184	2.02	1.84
5	112	143	1.40	1.52

Table 5 Statistical analysis of repetition test result for evaluation precision

Sample	Mean value ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Repeatability precision			Intermediate precision		
		s_r ^{b)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD_r ^{c)} (%)	$CRSD_r$ ^{d)} (%)	$s_{I(T)}$ ^{e)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	$RSD_{I(T)}$ ^{f)} (%)	$CRSD_{I(T)}$ ^{g)} (%)
Pig manure compost	141	18	13	11	23	16	18
Poultry manure compost	1.59	0.16	10	11	0.33	21	18

a) Total mean (Number of test days (5) \times Number of replicates (2))

b) Repeatability standard deviation

c) Repeatability relative standard deviation

d) Criteria of Repeatability precision (repeatability relative standard deviation)

shown in Testing Method for Fertilizer

e) Intermediate standard deviation

f) Intermediate relative standard deviation

g) Criteria of Intermediate precision (intermediate relative standard deviation)

shown in Testing Method for Fertilizer

3) 定量下限等の確認

クロピラリドとしてそれぞれ 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を含む鶏ふん堆肥及び汚泥発酵肥料を調製し、本法に従って 8 点併行で分析した。得られた分析値の標準偏差を 10 倍して定量下限を推定し、また、標準偏差を $2 \times t(n-1, 0.05)$ 倍として検出下限を推定した結果を Table 6 に示した⁹⁾。定量下限及び検出下限は、堆肥が 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及び 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、汚泥発酵肥料が 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及び 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と推定された。

Table 6 Calculated LOQ and LOD values of cropyralid ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Sample	Content of cloyralid	Mean value ^{a)}	s_r ^{b)}	LOQ ^{c)}	LOD ^{d)}
Poultry manure compost	1.00	0.67	0.09	1	0.3
Composted sludge fertilize	1.00	0.69	0.11	1	0.4

a) $n=8$

b) Standard deviation

c) Standard deviation $\times 10$; 1-digit accuracyd) Standard deviation $\times 2 \times t(n-1, 0.05)$; 1-digit accuracy

4) 流通肥料の分析による適用範囲の確認

15 点の流通肥料 (鶏ふん堆肥 3 点, 豚ふん堆肥 4 点, 汚泥発酵肥料 8 点) について, 本法に従ってクロピラリドを測定したところ, 8 点の試料でクロピラリドが検出された. 得られた結果のうち, 現物あたり試料中クロピラリド濃度を Table 7 に, また, 各試料のクロマトグラムの一例を Fig.3 に示した. 鶏ふん堆肥は検出下限未満 ~6 $\mu\text{g}/\text{kg}$. 豚ふん堆肥は 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~19 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及び汚泥発酵肥料は検出下限未満 ~11 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった. 本法による低濃度の測定は可能であったが, 一部堆肥によってはカートリッジカラムによる精製ができないものが存在した. これは, 精製 2 の操作において, 試料溶液に塩酸を添加して酸性条件にしたところで, 試料溶液中に固形物が多量に発生し, この溶液をカートリッジカラムに注入することでカラムに詰まりが生じたため, その後の操作ができなくなってしまったことによる. 堆肥や汚泥発酵肥料は, 使用される原料や材料の違い等において多種多様な製品が存在しているが, 今回のように測定できない試料も存在していることから, 前処理方法については今後更なる検討が必要と考える.

Table 7 Analysis of commercial fertilizers (actual article)

Sample No.	Sample	Content of clopyralid ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	Poultry manure compost 1	N.D. ^{a)}
2	Poultry manure compost 2	6
3	Poultry manure compost 3	3
4	Pig manure compost 1	4
5	Pig manure compost 2	6
6	Pig manure compost 3	19
7	Pig manure compost 4	- ^{b)}
8	Composted sludge fertilizer 1	N.D. ^{a)}
9	Composted sludge fertilizer 2	N.D. ^{a)}
10	Composted sludge fertilizer 3	1
11	Composted sludge fertilizer 4	8
12	Composted sludge fertilizer 5	(0.6) ^{c)}
13	Composted sludge fertilizer 6	11
14	Composted sludge fertilizer 7	N.D. ^{a)}
15	Composted sludge fertilizer 8	N.D. ^{a)}

a) Not detectable

b) Unmeasurable

c) Analytical value of higher than or equal to *LOD* and lower than *LOQ*

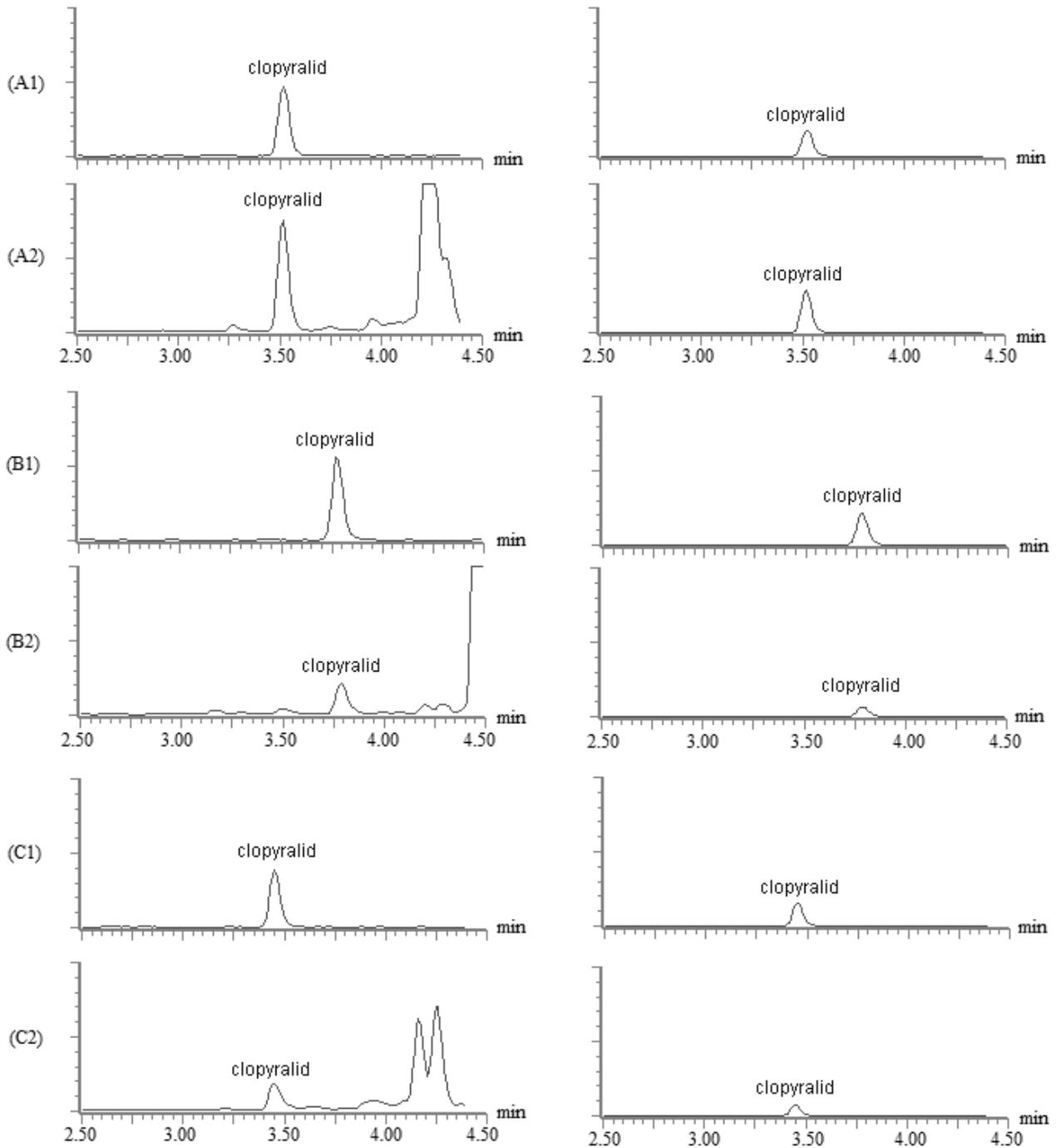


Fig.3 Chromatogram of analysis of commercial fertilizers.

(A1, B1, C1) Standard solution : 10 ng/mL

(A2) Poultry manure compost 2

(B2) Pig manure compost 3

(C2) Composted sludge fertilizer 4

Left figure : Product ion for quantification (192>146)

Right figure : Product ion for identification (192>110)

4. まとめ

LC-MS/MS を用いた高感度分析法の適用範囲拡大のために、豚ふん堆肥、鶏ふん堆肥及び汚泥発酵肥料について、単一試験室における妥当性確認試験を実施したところ、次の結果を得た。

(1) 豚ふん堆肥、鶏ふん堆肥及び汚泥発酵肥料を用い、3 点併行の添加回収試験により真度の確認を行った結果、回収率は 81.2 %～94.2 %であった。この結果は肥料等試験法に示されている各濃度レベルにおける真度の目標を満たしていた。

(2) 併行精度及び中間精度を確認するため、豚ふん堆肥及び鶏ふん堆肥を用い、2 点併行で日を変えて 5 回試験を行った結果、併行相対標準偏差は 13 %及び 10 %、中間相対標準偏差は 16 %及び 21 %であった。この結果は、肥料等試験法に示されている各濃度レベルにおける併行精度及び中間精度の目安の 2 倍以内であり、許容範囲を満たしていた。

(3) 鶏ふん堆肥及び汚泥発酵肥料を用いて定量下限等の確認を行った結果、定量下限は 1 µg/kg 程度、検出下限は 0.4 µg/kg 程度であることを確認した。

(4) 流通試料を用いて豚ふん堆肥、鶏ふん堆肥及び汚泥発酵肥料について分析を行ったところ、一部の豚ふん堆肥を除き定量は可能であった。定量のできなかった豚ふん堆肥は前処理操作の途中で問題が生じ、測定溶液の調製ができなかったためであったことから、今後更なる前処理操作の改良が必要と考える。

文 献

- 1) 飼料及び堆肥に残留する除草剤の簡易判別法と被害軽減対策マニュアル、筑波印刷情報サービスセンター協同組合
- 2) 農林水産省: 輸入飼料中及び堆肥中に含まれるクロピラリドの調査結果について
<<http://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyoclopyralid/attach/pdf/clopyralid-18.pdf>>
- 3) 八木寿治, 関根優子, 白井裕治: 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) によるたい肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリド測定, 肥料研究報告, **3**, 51～59 (2010)
- 4) 顯谷久典, 八木寿治, 橋本良美, 白井裕治: 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) 法による堆肥及び汚泥肥料中のクロピラリド, アミノピラリド及びピクロラムの測定, 肥料研究報告, **7**, 1～9 (2014)
- 5) 小塚健志, 大島舞弓, 橋本良美, 田丸直子, 白井裕治: 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) 法による堆肥及び汚泥肥料中のクロピラリド及び関連物質の測定—共同試験成績—, 平成 28 年度肥料等技術検討会資料
- 6) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター (FAMIC): 肥料等試験法
<<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub9.html>>
- 7) 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構農業環境変動研究センター: 土壌中クロピラリドのトマト, サヤエンドウ, スイートピーの初期成育に及ぼす影響・データ集
<http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/pub2016_or_later/pamphlet/tech-pamph/078226.html>
- 8) 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構農業環境変動研究センター: 牛ふん堆肥中クロピラリドの高感度分析法 (参考法)
<http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/pub2016_or_later/pamphlet/tech-pamph/078229.html>
- 9) Codex: “Guideline on Analytical Terminology”, CAC/GL 72-2009 (2009)

Validation of Microanalysis Determination of Clopyralid in Compost and Composted Sludge Fertilizer by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

Kohei ITO¹, Kenji KOZUKA², Keisuke AOYAMA², and Yuji SHIRAI²

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department
(Now) Food and Agricultural Materials Inspection Center, Agricultural Chemicals Inspection Station

² Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

A single-laboratory validation study was conducted for the microanalysis determination of clopyralid in compost and composted sludge fertilizer by liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Clopyralid was extracted with methanol under alkaline condition. The extract was purified by retention and elution with a cleanup cartridge and by extraction with dichloromethane. These purification took advantage of characteristics that the behavior of elution varies between acidity and alkaline. The clopyralid was analyzed by LC-MS/MS. As a result of 3 replicate analysis of 3 fertilizer (pig manure compost, poultry manure compost and composted sludge fertilizer) samples spiked with clopyralid at 2 µg/kg ~ 200µg/kg, the mean recoveries were 81.2 % ~ 94.2 %. Repeatability of clopyralid in 2 fertilizers (poultry manure compost and composted sludge fertilizer) were 13 % and 10 %, intermediate precision of there were 16 % and 21 %. Minimum limit of quantification of there were estimated 1 µg/kg. Those results indicated that the developed method was valid for the determination of clopyralid in compost and composted sludge fertilizer. However, preparation process of sample solution has a need for improvement, because the existence of pig manure compost which was difficult to prepare sample solution was confirmed in analysis of commercial fertilizers.

Key words clopyralid, compost, composted sludge fertilizer, LC-MS/MS, sensitive determination method

(Research Report of Fertilizer, **11**, 63~74, 2018)