8.2 クロピラリド及びその関連物質

8.2.a 高速液体クロマトグラフタンデム質量分析法（クロピラリド等 3 成分同時分析法）

（1） 概要

この試験法は堆肥及び汚泥発酵肥料に適用する。この試験法の分類は Type B であり、その記号は 8.2.a-2017 又は CLP.a-1 とする。

肥料中のクロピラリド、アミノピラリド及びピクロラムをアルカリ性下でメタノール抽出し、酸性とアルカリ性で溶出挙動が変わることを利用して、クリーンアップカートリッジを用いて精製後、高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計（LC-MS/MS）を用いて測定し、分析試料中のクロピラリド、アミノピラリド及びピクロラムを求める。なお、この試験法の性能は**備考 6** に示す。

備考 1. クロピラリド、アミノピラリド及びピクロラムの構造式は図 1 のとおりである。

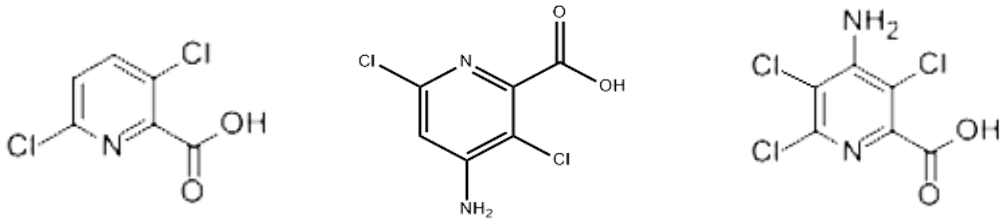


図1 クロピラリド、アミノピラリド及びピクロラムの構造式

（2） 試薬等 試薬及び水は、次による。

a） 水： JIS K 0557 に規定する A3 の水。ただし、高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計に導入する溶離液については A4 の水を使用する。

b） アセトニトリル： JIS K 8039 に規定する残留農薬・PCB 試験用（濃縮 300 以上）又は同等の品質の試薬。

c） メタノール： 高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計に規定する特級又は同等の品質の試薬。

d） メタノール： 高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計の溶離液に使用するメタノールは LC-MS 用又は同等の品質の試薬。

e） 水酸化ナトリウム： JIS K 8576 に規定する特級又は同等の品質の試薬。

f） 塩酸： JIS K 8180 に規定する特級又は同等の品質の試薬。

g） アンモニア水： JIS K 8085 に規定する 28 %（質量分率）の特級試薬又は同等の品質のもの。

h） ぎ酸： JIS K 8264 に規定する特級又は同等の品質の試薬。

i） アンモニア溶液（0.0028 %（質量分率））(1)： アンモニア水 0.1 mL を水 1000 mL に加える。

j） 各農薬標準液（100 μg/mL）(1)： クロピラリド［$C_6H_3Cl_2NO_2$］(2)、アミノピラリド［$C_6H_4Cl_2N_2O_2$］(2)及びピクロラム［$C_6H_3Cl_3N_2O_2$］(2)約 0.01 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。少量のアセトニトリルで溶かし、100 mL 全量フラスコに移し入れ、標線まで同溶媒を加える。

k） 混合標準液（100 ng/mL）(1)： 各農薬標準液（100 μg/mL）の一定量をぎ酸（1+1000）で希釈し、混合標準液（100 ng/mL）を調製する。

l） 検量線用混合標準液（5 ng/mL～50 ng/mL）(1)： 使用時に混合標準液（100 ng/mL）の 2.5 mL～25 mL を

50 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線までぎ酸(1+1000)を加える。

m) 検量線用混合標準液(0.5 ng/mL～5 ng/mL)[(1)]: 使用時に検量線用混合標準液(10 ng/mL)の 2.5 mL～25 mL を 50 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線までぎ酸(1+1000)を加える。

注(1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(2) 標準試薬が市販されている。

備考 2. クロピラリド、アミノピラリド及びピクロラムの標準試薬は富士フイルム和光純薬、関東化学及び林純薬工業より販売されている。

(3) 器具及び装置 器具及び装置は、次のとおりとする。

a) 高速液体クロマトグラフ質量分析計: JIS K 0136 に規定する高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計で次の要件を満たすもの。

1) 高速液体クロマトグラフ:

① カラム槽: カラム槽温度を 30 °C～45 °C で調節できるもの。

② カラム: 内径 2 mm～3 mm、長さ 50 mm～150 mm、粒径 1.6 μm～2.2 μm のステンレス鋼のカラム管にオクタデシル基を化学結合したシリカゲルを充てんしたもの。質量分析計仕様のもの。

2) 質量分析計:

① イオン化法: エレクトロスプレーイオン化(ESI)法

② イオン検出方式: 選択反応検出法

b) 垂直往復振り混ぜ機: フラスコ用アダプターを用いて 200 mL～300 mL 共栓三角フラスコを毎分 300 往復(振幅 40 mm)で垂直往復振り混ぜできるもの。

c) マニホールド

d) 遠心分離機: 1700×*g* で遠心分離可能なもの。

e) 高速遠心分離機: 8000×*g*～10 000×*g* で遠心分離可能なもの。

f) 濃縮器: 40 °C±2 °C に調節できるエバポレーター

g) コポリマーカートリッジカラム: ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム(200 mg)

備考 3. カラムは ACQUITY UPLC HSS C18 等の名称で市販されている。

備考 4. コポリマーカートリッジは Oasis HLB 6cc(200 mg)、Oasis PRiME HLB Plus Short Cartridge(225 mg)等の名称で市販されている。

(4) 試験操作

(4.1) 抽出 抽出は、次のとおり行う。

a) 分析試料 5 g を 1 mg の桁まではかりとり、200 mL～300 mL 共栓三角フラスコに入れる。

b) 水酸化ナトリウム溶液(40 g/L) 1 mL、メタノール 99 mL を加え[(3)]、毎分 300 往復(振幅 40 mm)で約 30 分間振り混ぜる。

c) 静置後、上澄み液を 50 mL 共栓遠心沈殿管に 50 mL 程度とる。

d) 遠心力約 1700×*g* で約 5 分間遠心分離し[(4)]、上澄み液を抽出液とする。

注(**3**) 水酸化ナトリウム溶液(40 g/L)－メタノール〔1+99〕100 mL を加えてもよい。

(**4**) 回転半径 16.5 cm 及び回転数 3000 rpm で遠心力 1700×*g* 程度となる。

備考 5. 目開き 500 μm のふるいを通過するまで粉砕して分析用試料を調製する。

(**4.2**) **クリーンアップ(1)**[5] クリーンアップ(1)は、次のとおり行う。

a) コポリマーカートリッジカラムを予めメタノール約 5 mL 及び水約 5 mL で洗浄する。

b) 100 mL なすフラスコ[6]をカートリッジカラムの下に置き、抽出液 5 mL 又は 10 mL[7]をカートリッジカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。

c) 水酸化ナトリウム溶液(0.4 g/L)－メタノール〔1+1〕約 5 mL を 2 回カートリッジカラムに加え、同様に流出させる.。

d) メタノール 5 mL を加える。

注(**5**) (**4.2**)及び(**4.3**)の操作は、必要に応じて減圧装置を用いる。

(**6**) 多検体の分析試料を前処理する場合は、液量 20 mL の溶液を入れることのできる自立形の容器を用いてもよい。この場合は、**d**)の操作に換えて、流出液を 100 mL なす形フラスコに入れ、容器をメタノール 2.5 mL で 2 回洗浄し、洗浄液を先の流出液に加える。

(**7**) Oasis HLB 6cc(200 mg)を用いた場合、抽出液 5 mL を 2 回負荷する。

(**4.3**) **クリーンアップ(2)**[5] クリーンアップ(2)は、次のとおり行う。

a) 新たなコポリマーカートリッジカラムを予めアセトニトリル約 5 mL 及び塩酸(1+120)約 5 mL で洗浄する。

b) (**4.2**)**d**)の流出液を 40 °C 以下の水浴上で 5 mL 以下まで減圧濃縮する。

c) 塩酸(1+11)3 mL を加え、カートリッジカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。

d) なすフラスコを塩酸(1+120)約 5 mL で 2 回洗浄し、洗液を順次カートリッジカラムに加える。

e) 次に、塩酸(1+120)－アセトニトリル〔9+1〕約 5 mL 及び水約 5 mL を順次カートリッジカラム加えて流出させる。

f) 5 mL 全量フラスコをカートリッジカラムの下に置き、アンモニア溶液(0.0028 %(質量分率))－アセトニトリル〔9+1〕4 mL をカートリッジカラムに加えてクロピラリド、アミノピラリド及びピクロラムを速やかに溶出させる。

g) 標線までぎ酸(1+1000)を加え[8]、1.5 mL 共栓遠心沈殿管[9]に 1.5 mL 程度とる。

h) 遠心力 8000×*g*～10 000×*g* で約 5 分間遠心分離し[10]、上澄み液を試料溶液とする。

注(**8**) 試料溶液中のクロピラリド、アミノピラリド及びピクロラム濃度が検量線の上限を超えるおそれのある場合は、流出液の一定量をぎ酸(1+1000)で希釈する。

(**9**) ポリプロピレン製等の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの。

(**10**) 回転半径 7.2 cm～8.9 cm 及び回転数 10 000 rpm で遠心力 8100×*g*～10 000×*g* 程度となる。

(**4.4**) **測定** 測定は、JIS K 0136 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計の操作方法による。

a) **高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計の測定条件** 高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計の測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

1）高速液体クロマトグラフ:

① カラム: オクタデシル基を化学結合したシリカゲルカラム(内径 2 mm～3 mm、 長さ 50 mm～150 mm、粒径 1.6 μm～2.2 μm)

② 流量: 0.2 mL/min～0.5 mL/min

③ 溶離液: A: ぎ酸(1+1000)　B: メタノール

④ グラジエント: 0 min (5 %B)→5 min (60 %B)→6 min (95 %B)→7 min (5 %B)

⑤ カラム恒温槽: 40 ℃

⑥ 注入量: 5 μL

2）質量分析計:

① イオン化法: エレクトロスプレーイオン化(ESI)法

② モード: ポジティブ

③ モニターイオン: 表 1 のとおり

表1 各農薬のモニターイオン

農薬名	質量イオン比(*m*/*z*)		
	プレカーサーイオン	プロダクトイオン(定量用)	プロダクトイオン(確認用)
クロピラリド	192	146	110
アミノピラミド	207	161	189
ピロラム	241	195	223

b）検量線の作成

1) 各検量線用混合標準液 5 μL を LC-MS/MS に注入し、クロピラリド、アミノピラリド及びピクロラムの定量用イオン(*m*/*z*)及び確認用イオン(*m*/*z*)のクロマトグラムを記録し、それぞれのピーク面積を求める。

2) クロピラリド、アミノピラリド及びピクロラムの定量用イオン(*m*/*z*)と確認用イオン(*m*/*z*)のピーク面積比又は高さ比を算出する。

3) 各検量線用混合標準液の各農薬濃度と定量用イオン(*m*/*z*)のピーク面積との検量線を作成する。

c）試料の測定

1) 試料溶液を 5 μL を **b**)**2**)～**3**)と同様に操作する[11]。

2) 検量線から測定対象物質量を求め、分析試料中の測定対象物質濃度を算出する。

注(11) 試料溶液の定量用イオン(*m*/*z*)と確認用イオン(*m*/*z*)のピーク面積比又は高さ比が、標準液のピーク面積比又は高さ比に対して±30 %程度の範囲内であることを確認する。なお、ピーク面積比又は高さ比は濃度によって異なることがある。

備考 6. 牛ふん堆肥(2 種類)、牛ふん含有汚泥発酵肥料(2 種類)及び豚ぷん含有汚泥発酵肥料(1 種類)を用いたクロピラリド、アミノピラリド及びピクロラムの添加回収試験の結果は、1000 μg/kg 、400 μg/kg 及び 40 μg/kg の添加レベルで平均回収率が 78.1 %～90.0 %、81.0 %～117.6 %及び 71.2 %～101.3 %であった。

また、試験法の妥当性確認のための共同試験の成績及び解析結果を表 2 に示す。

なお、この試験法のクロピラリド、アミノピラリド及びピクロラムの定量下限は各 10 μg/kg 程度と推定された。

表2　クロピラリド及びその関連物質試験法の妥当性確認のための共同試験成績の解析結果

農薬名	試料名	試験室数[1)]	平均値[2)] (μg/kg)	s_r[3)] (μg/kg)	RSD_r[4)] (%)	s_R[5)] (μg/kg)	RSD_R[6)] (%)
クロピラリド	堆肥1	10(0)	128	6	4.5	21	16.4
	堆肥2	10(0)	835	41	4.9	100	11.9
	汚泥発酵肥料1	9(1)	16.2	1.7	10.6	5.2	31.8
	汚泥発酵肥料2	10(0)	89.6	11.3	12.6	11.3	12.6
	汚泥発酵肥料3	10(0)	339	28	8.3	28	8.3
アミノピラリド	堆肥1	8(2)	324	15	4.5	39	12.0
	堆肥2	8(2)	21.2	5.2	24.7	6.4	30.3
	汚泥発酵肥料1	7(2)	5.4	1.4	26.2	2.2	41.2
	汚泥発酵肥料2	10(0)	701	146	20.8	263	37.6
	汚泥発酵肥料3	9(1)	59.5	8.9	15.0	16.6	28.0
ピクロラム	堆肥1	10(0)	840	50	5.9	175	20.8
	堆肥2	9(1)	37.7	3.5	9.4	10.3	27.3
	汚泥発酵肥料1	9(1)	90.2	11.1	12.3	30.3	33.5
	汚泥発酵肥料2	8(2)	341	19	5.6	67	19.8
	汚泥発酵肥料3	8(2)	182	16	8.6	56	31.0

1) 有効試験室数（外れ値を報告した試験室数）
2) 総平均値（n=有効試験室数×繰り返し数(2)）
3) 併行標準偏差
4) 併行相対標準偏差
5) 室間標準偏差
6) 室間再現標準偏差

参考文献

1） 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肥料中のクロピラリド測定, 肥料研究報告, **3**, 51~59 (2010)

2） 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）による堆肥及び汚泥肥料中のクロピラリド, アミノピラミド及びピクロラム測定, 肥料研究報告, **7**, 1~9 (2014)

3） 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発酵肥料中のクロピラリド及びその関連物質の測定　－共同試験成績－, 肥料研究報告, **10**, 61~71 (2017)

(5) クロピラリド及びその関連物質試験法フローシート 堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリド及びその関連物質の試験法のフローシートを次に示す。

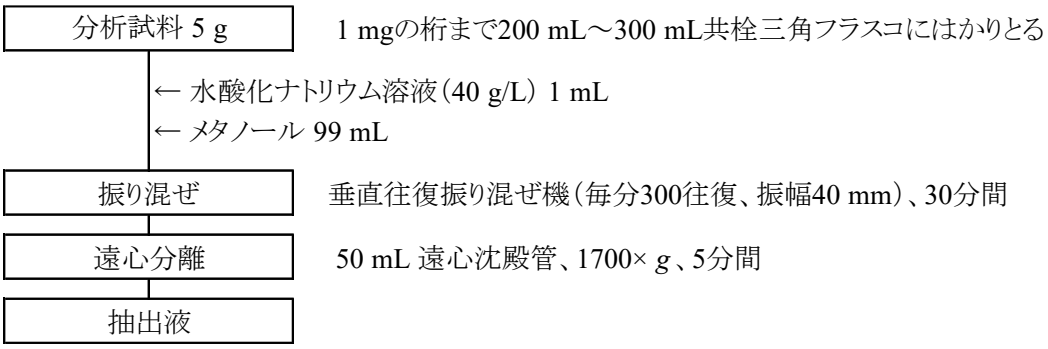


図1　堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリド及びその関連物質の試験法フローシート
(抽出操作)

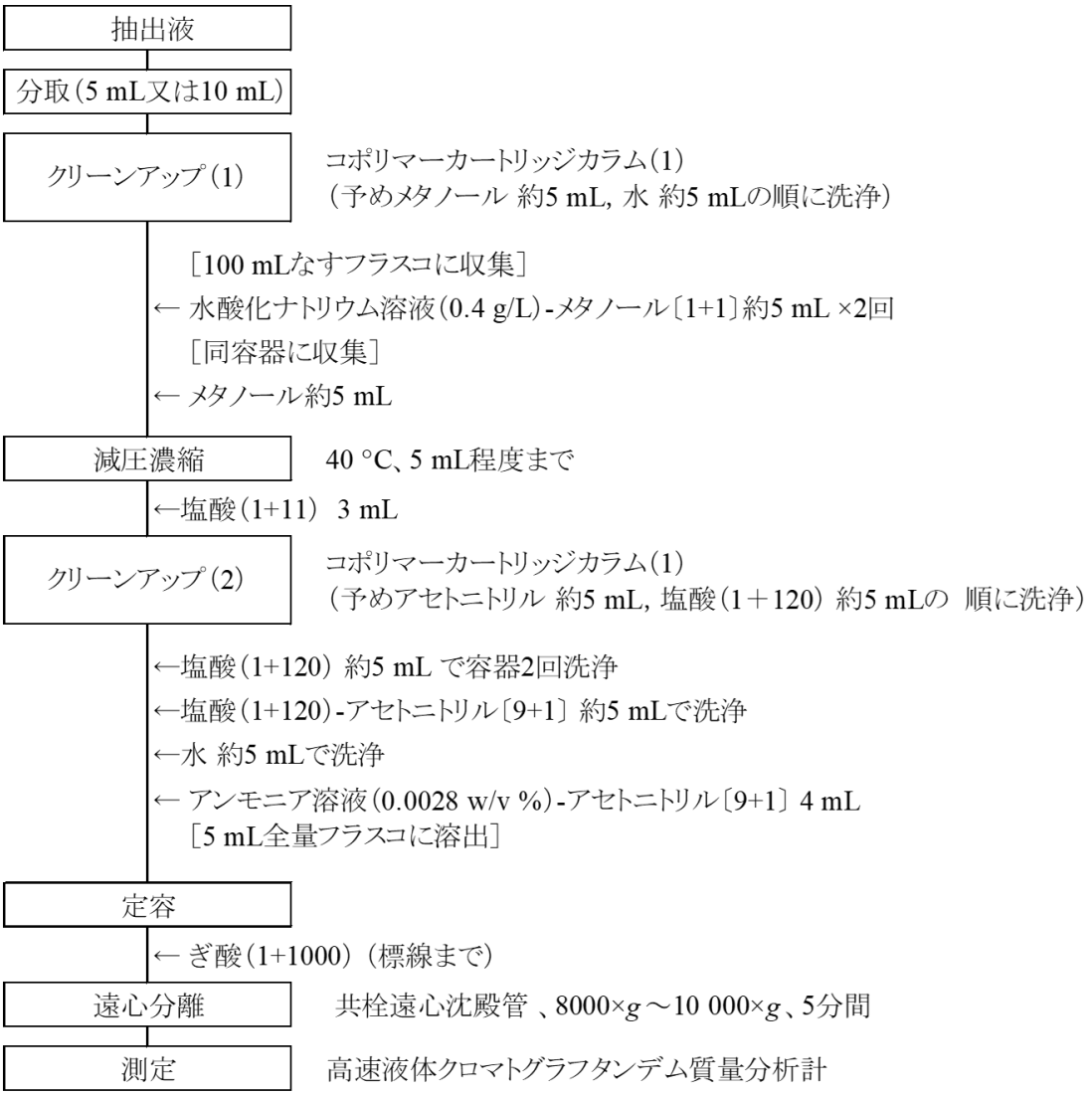
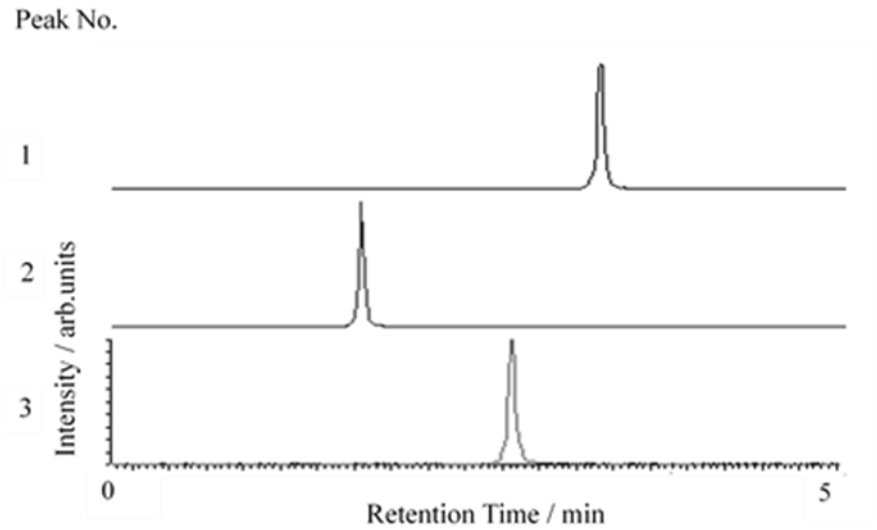


図2　堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリド及びその関連物質の試験法フローシート
(クリーンアップ(1)、クリーンアップ(2)及び測定操作)

参考 検量線用混合標準液及び試料溶液（牛ふん堆肥）の選択反応検出クロマトグラム例を次に示す。



Peak No.1: ピクロラム
No.2: アミノピラリド
No.3: クロピラリド

参考図　各農薬の SRM クロマトグラム
混合標準液（各農薬として 200 pg 相当量）

LC-MS/MS の測定条件

カラム： ACQUITY UPLC HSS C18（内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒径 1.8 μm）
流量： 0.4 mL/min
キャピラリー電圧： 1.0 kV
イオン源温度： 120 °C
デソルベーション温度： 400 °C
コーン電圧： 参考表のとおり
コリジョンエネルギー： 参考表のとおり
その他の条件は（**4.4**）**a**）LC-MS/MS の測定条件の例示のとおり

参考表　質量分析計のパラメーター

農薬名		質量電荷比 (m/z)		コーン電圧	コリジョンエネルギー
		プレカーサーイオン	プロダクトイオン	(V)	(eV)
クロピラリド	測定用	192	146	20	20
	確認用	192	110	20	30
アミノピラミド	測定用	207	161	22	22
	確認用	207	189	22	16
ピロラム	測定用	241	195	28	22
	確認用	241	223	28	16