8.2 クロピラリド及びその関連物質

8.2.b 高速液体クロマトグラフタンデム質量分析法（微量クロピラリド分析法（1））

（1） 概要

この試験法は堆肥およ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.b-2018 又は CLP.b-1 とする。

堆肥および汚泥発酵肥料中のクロピラリド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及びジクロロメタンを用いて精製後、高速液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS/MS）を用いて測定し、分析試料中のクロピラリドを求める。なお、この試験法の性能は**備考 10** に示す。

備考 1. クロピラリドの構造式は図 1 のとおりである。

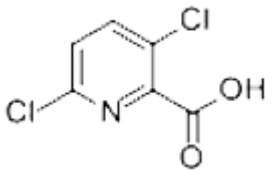


図 1 クロピラリドの構造式

（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： 残留農薬・PCB 試験用（濃縮 300 以上）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） ぎ酸： 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ぎ酸は LC-MS 用又は同等の品質の試薬。

j） ジクロロメタン： JIS K 8117 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。

k） 硫酸： JIS K 8951 に規定する特級又は同等の品質の試薬。

l） アセトン： JIS K 8040 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。

m） 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。

n） クロピラリド標準液（100 µg/mL）(1)： クロピラリド［$C_6H_3C_{12}NO_2$］(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。

o） クロピラリド標準液（100 ng/mL）(1)： クロピラリド標準液（100 µg/mL）の一定量をぎ酸（1+1000）で希釈し、

クロピラリド標準液（100 ng/mL）を調製する。

p） **検量線用クロピラリド標準液（5 ng/mL～50 ng/mL）**(1)： 使用時にクロピラリド標準液（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。

q） **検量線用クロピラリド標準液（0.5 ng/mL～5 ng/mL）**(1)： 使用時に検量線用クロピラリド標準液（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 ℃～45 ℃ 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**： 100 mL ねじ口遠心沈殿管を毎分 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**： 700×*g*～2000×*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 ℃±2 ℃ 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 又は 335 mg）

h） **ろ過器**： 減圧ろ過用漏斗（適合ろ紙径 60 mm）。

i） **カラス繊維ろ紙**： ガラス繊維製（ろ紙径 60 mm）で粒子径 0.8μm を保持できるもの。

j） **試験管ミキサー**： ボルテックスミキサー

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。

備考 5. 減圧ろ過用漏斗は桐山ロート SB-60、桐山ロート SU-60 等の名称で市販されている。

備考 6. ガラス繊維ろ紙はクラスファイバーろ紙 GFP-60 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、100 mL ねじ口遠心沈殿管[3][4]に入れる。

b) 水酸化ナトリウム溶液(40 g/L)－メタノール〔1+99〕50 mL を加え、毎分 300 往復(振幅 40 mm)で約 30 分間振り混ぜる。

c) 遠心力約 1700×*g* で約 5 分間遠心分離し[5]、上澄み液を 100 mL 三角フラスコにとる。

d) 水酸化ナトリウム溶液(40 g/L)－メタノール〔1+99〕40 mL を残留物に加え、毎分 300 往復(振幅 40 mm)でで約 30 分間振り混ぜる。

e) 遠心力約 1700×*g* で約 5 分間遠心分離する[5]。

f) 100 mL 太首全量フラスコを受器[6]とし、**c**)及び **e**)の上澄み液をカラス繊維ろ紙を乗せたろ過器で減圧ろ過する。

g) 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、洗液を先のろ過器に入れて減圧ろ過する。

h) 標線まで水酸化ナトリウム溶液(40 g/L)－メタノール〔1+99〕を加えて抽出液とする。

注(**3**) 抽出操作に用いる容器はガラス製又はポリプロピレン製で振り混ぜ機及び遠心分離機での操作を行えるもの。

(**4**) 100 mL～200 mL 共栓又はねじ口三角フラスコを用いることもできるが、この場合 **c**)及び **e**)の操作の前に懸濁液を 50 mL 共栓又はねじ口遠心沈殿管に 50 mL 程度移し入れる操作を行う。

(**5**) 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。

(**6**) 三角フラスコ等を用いることもできるが、この場合 **h**)の操作の前にろ液を 100 mL 全量フラスコに移し入れる操作を行う。

備考 7. 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)**[7] クリーンアップ(1)は、次のとおり行う。

a) 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[8]をカートリッジカラムの下に置き、抽出液 10 mL[9]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(**7**) (**4.2**)及び(**4.3**)の操作は、必要に応じて減圧装置を用いる。

(**8**) 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。

(**9**) 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)**[7] クリーンアップ(2)は、次のとおり行う。

a) 新たな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） なす形フラスコを塩酸（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て流出させる。

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） 10 mL ねじ口円錐型遠心沈殿管(10)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を溶出させる。

注（**10**） 底から 2 mL 以下の部分が円錐の形状のもの

（**4.4**） **クリーンアップ（3）** クリーンアップ（3）は、次のとおり行う。

a） （**4.3**）**f**）の溶出液に水酸化ナトリウム（40 g/L）0.1 mL を加え、試験管ミキサーで振り混ぜる。

b） ジクロロメタン 2 mL を加え、試験管ミキサーで 30 秒間振り混ぜる。

c） 遠心力約 740×*g* で約 3 分間遠心分離し(11)、下層をパスツールピペット(12)又はシリンジで除く。

d） **b**）～**c**）の操作を更に 1 回繰返す。

e） 硫酸（1+2）0.15 mL を加え、試験管ミキサーで振り混ぜる。

f） ジクロロメタン 2 mL を加え、試験管ミキサーで 30 秒間振り混ぜる(13)。

g） 遠心力約 740×*g* で約 5 分間遠心分離し(11)、下層をパスツールピペット(14)又はシリンジで 50 mL なす形フラスコに入れる。

h） **f**）～**g**）の操作を更に 2 回繰返す。ただし、下層は同じなす形フラスコに加える。

i） アセトン 5 mL を加える。

j） 40 °C 以下の水浴上でほとんど乾固するまで減圧濃縮し、窒素ガスを送って乾固させる。

k） ぎ酸（1+1000）を 1 mL を加え、1.5 mL 共栓遠心沈殿管(15)に移し入れる。

l） 遠心力 8000×*g*～10 000×*g* で約 5 分間遠心分離し(16)、上澄み液を試料溶液とする(17)。

注（**11**） 回転半径 16.5 cm 及び回転数 2000 rpm で遠心力 740×*g* 程度となる。なお、使用する 10 mL ねじ口円錐底遠心沈殿管の遠心力の許容範囲を確認すること。

（**12**） パスツールピペットを使用する場合は、**c**）～**d**）の一連操作を同じパスツールピペットを使用する。

（**13**） ジクロロメタンをよく分散させる。ジクロロメタン層が固まった状態での振り混ぜ操作ではクロピラリドの抽出効率が低下して、測定値に影響する。

（**14**） パスツールピペットを使用する場合は、**g**）～**h**）の一連操作を同じパスツールピペットを使用する。なお、**注**（**12**）で使用したパスツールピペットは使用しない。

（**15**） 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。

（**16**） 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。

（**17**） 試料溶液中のクロピラリド濃度が検量線の上限を超えるおそれのある場合は、試料溶液の一定量をぎ酸（1+1000）で希釈する。

備考 8. （**4.4**）**k**）～**l**）の操作に代えて、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター（孔径 0.5 μm 以下）でろ過、または、遠心式フィルターユニット（Ultrafree-MC PVDF membrane（0.22 μm）等）を用いて遠心ろ過し、ろ液を試料溶液としてもよい。

備考 9. 定量下限を確保するために更に濃縮が必要な場合は、**j**)の操作の濃縮物をアセトンで加えて溶かし、同溶媒で窒素濃縮管に移し入れ、窒素を送って乾固させ、ぎ酸(1+1000)を 0.2 mL を加え、遠心式フィルターユニット(Ultrafree-MC PVDF membrane(0.22 μm)等)を用いて遠心ろ過してろ液を試料溶液とする。この場合、**i**)の操作は行わない。

(**4.5**) **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質量分析計の測定条件** 高速液体クロマトグラフ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: プリカーサーイオン *m*/*z* 192

プロダクトイオン 定量用 *m*/*z* 146、確認用 *m*/*z* 110

b) **検量線の作成**

1) 各検量線用クロピラリド標準液 5 μL を高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計に注入し、クロピラリドの定量用イオン(*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[18]。

2) 検量線からクロピラリド量を求め、分析試料中のクロピラリド濃度を算出する。

注(**18**) 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 10. 牛ふん堆肥(1 種類)、を用いたクロピラリドの添加回収試験の結果は、50 μg/kg、10 μg/kg 及び 2 μg/kg の添加レベルで平均回収率が 78.9 %、78.3 %及び 71.5 %であった。また、豚ぷん堆肥(1 種類)、鶏ふん堆肥(1 種類)及び汚泥発酵肥料(1 種類)を用いたクロピラリドの添加回収試験の結果は、200 μg/kg、2 μg/kg 及び 80 μg/kg の添加レベルで平均回収率が 88.6 %、81.2 %及び 94.2 %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 1 に示す。

なお、この試験法のクロピラリドの定量下限は 2 μg/kg 程度と推定された。

表1　クロピラリド試験法の妥当性確認のための共同試験成績の解析結果

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)] (%)
牛ふん堆肥1	10(0)	128	10	7.9	15	11.4
牛ふん堆肥2	10(0)	2.28	0.35	15.3	0.40	17.6
豚ぷん堆肥	9(1)	22.5	2.3	10.3	3.4	15.3
鶏ふん堆肥	9(1)	1.20	0.06	5.0	0.14	12.0
汚泥発酵肥料	9(1)	48.1	1.2	2.5	5.6	11.6

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） 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>

2） 伊藤浩平, 小塚健志, 青山恵介, 白井裕治： 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 (2018)

3） 伊藤浩平, 小塚健志, 秋元里乃, 坂井田里子, 大島舞弓, 中村信仁, 白井裕治： 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 (2018)

(5) クロピラリド試験法フローシート 堆肥中のクロピラリドの試験法のフローシートを次に示す。

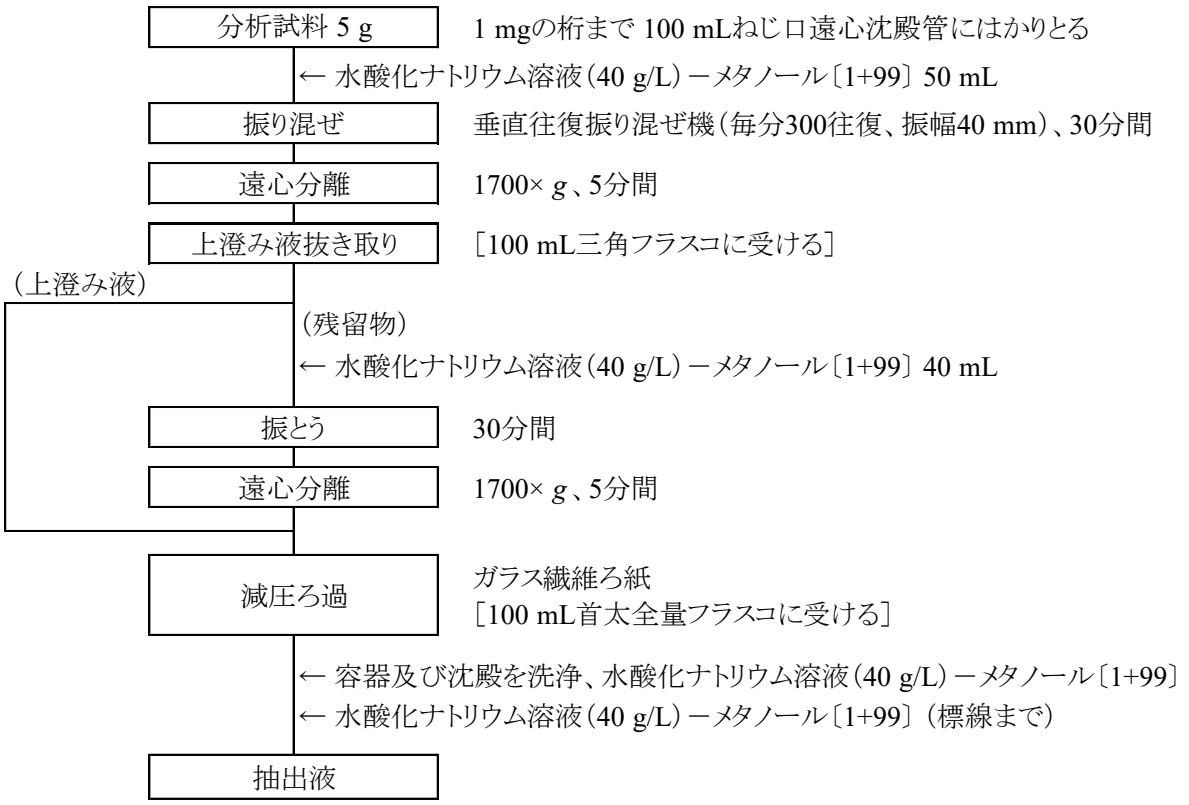


図1　堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリド試験法フローシート（抽出操作）

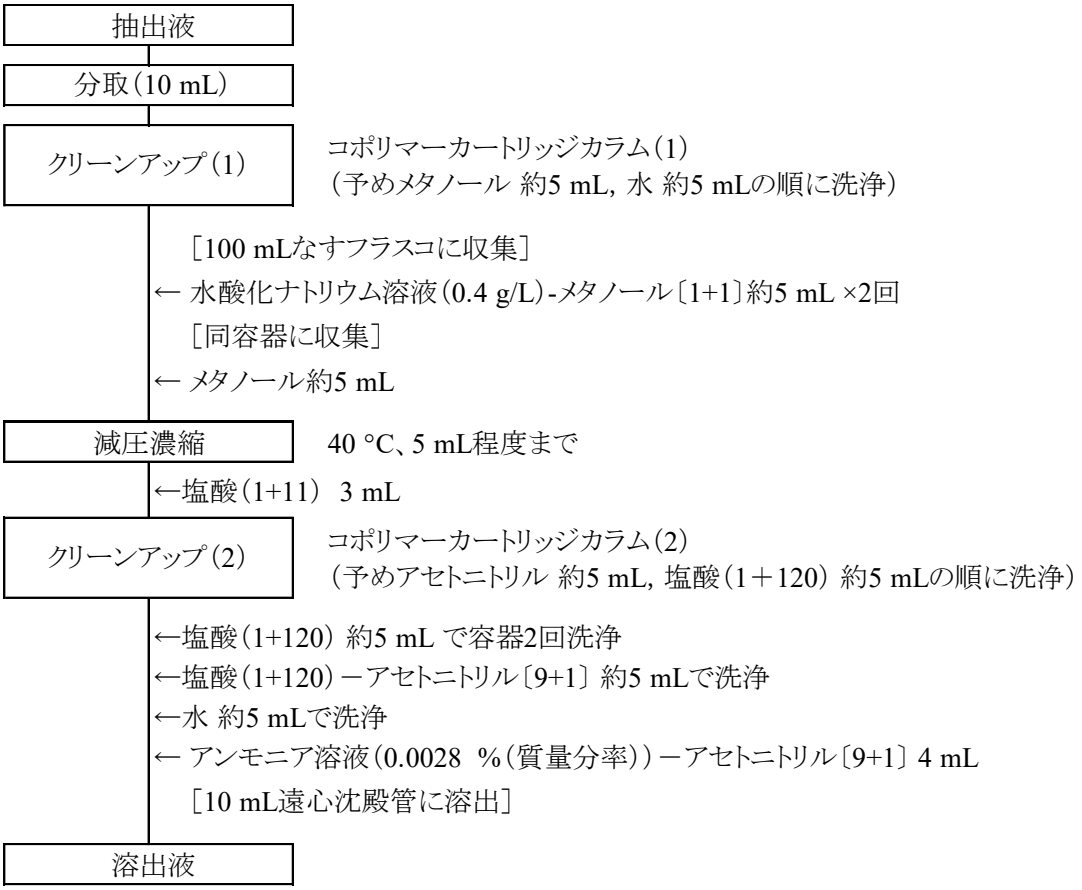


図2　堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリド試験法フローシート
（クリーンアップ（1）及びクリーンアップ（2）操作）

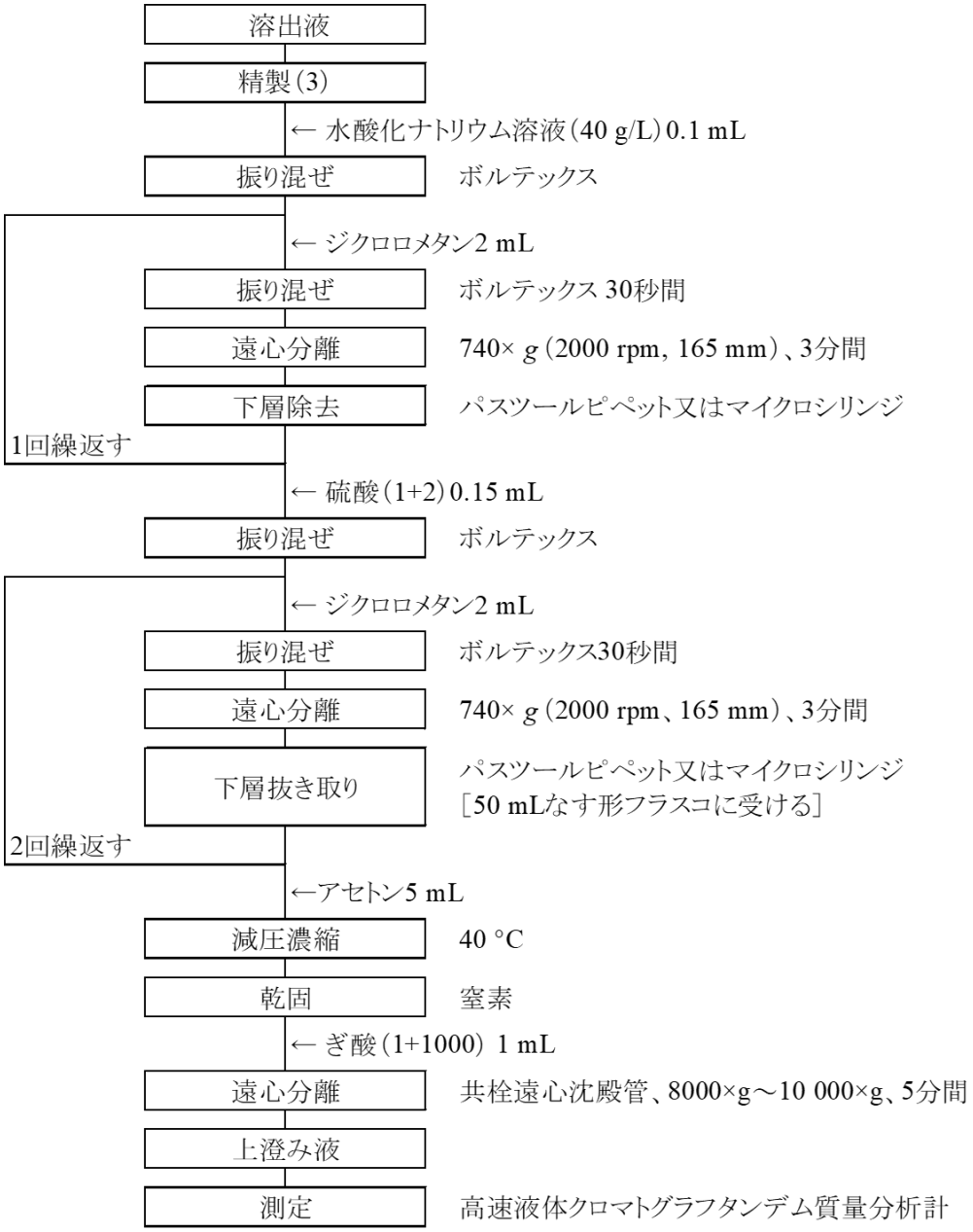
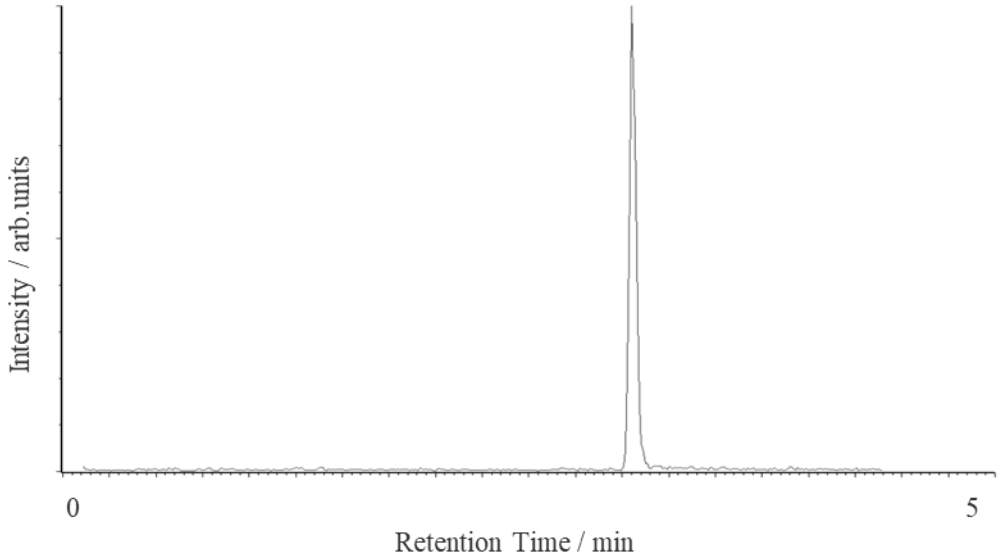


図3　堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリド試験法フローシート
(クリーンアップ(3)及び測定操作)

参考 （検量線用クロピラリド標準液）の選択反応検出クロマトグラム例を次に示す。



参考図　クロピラリドの SRM クロマトグラム
クロピラリド標準液（クロピラリドとして 100 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：　20 V
コリジョンエネルギー：　定量用　20 eV、確認用　30 eV
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