8.2 クロピラリド及びその関連物質

8.2.c 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（2））

（1） 概要

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.c-2021 又は CLP.c-2 とする。

堆肥及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、2 種類の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を求める。なお、この試験法の性能は**備考 9** 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。

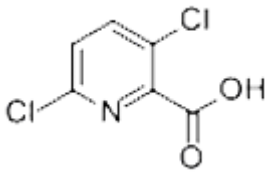


図 1 クロピラリドの構造式

（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。ただし、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は LC-MS 用又は同等の品質のものを使用する。

d） 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。

e） 塩酸： JIS K 8180 に規定する特級又は同等の品質の試薬。

f） 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。

g） ぎ酸： JIS K 8264 に規定する特級又は同等の品質の試薬。ただし、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は LC-MS 用又は同等の品質のものを使用する。

h） 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。

i） クロピラリド標準液（100 μg/mL）(1)： クロピラリド［$C_6H_3Cl_2NO_2$］(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。

j） 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。

k） 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。

l） 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**： 50 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 500 mg を注射筒 12 mL に充てんしたもの又は N 含有ビニルポリマー含有スチレンジビニルベンゼン複合ポリマー500 mg を注射筒 20 mL に充てんしたもの。

h） **ジルコニアコートシリカゲルカートリッジカラム**： ジルコニア基を被覆したシリカゲル 500 mg 注射筒 6 mL に充てんしたもの。

備考 3. カラムは ACQUITY UPLC HSS C18、ACQUITY UPLC HSS C18、ACQUITY UPLC HSS T3、InertSustain AQ-C18、Shim-pack Scepter C18-120、C18U 2B、ZORBAX Eclipse Plus 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カラムは Oasis HLB 12 cc（500 mg）、InertSep HLB FF 500 mg/20 mL 等の名称で市販されている。

備考 5. ジルコニアコートシリカゲルカートリッジカラムは HybrideSPE®-Phospholipid（500 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 2 g を 1 mg の桁まではかりとり、50 mL ねじ口遠心沈殿管(3)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〕25 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(4)、上澄み液を 200 mL なす形フラスコに移す(5)。

d） 水酸化ナトリウム溶液（40 g/L）－メタノール〔1+99〕10 mL を残留物に加え、振り混ぜる。

e） 遠心力約 1700×*g* で約 5 分間遠心分離し(4))、上澄み液を **c**）の上澄み液に加える(5)。

f） **d**）～**e**）の操作を更に 2 回実施し、なす形フラスコの接続部に付着した溶液をメタノールで洗い入れ、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**） 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。

（**5**） デカンテーションで移す。

備考 6. 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。

備考 7. （**4.2**）の操作においてコポリマーカートリッジカラムが詰まる要因を軽減するため、**c**）及び **e**）の遠心分離操作の前に、ねじ口遠心沈殿管を回転させて壁に付いた試料を落とし、上澄み液を移す又は加える操作で固形分をできるだけ入れないようにする。

（**4.2**） **クリーンアップ（1）**(6)　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） 抽出液を 40 °C 以下の水浴上で 3 mL 以下まで減圧濃縮する。

c） 塩酸（1+11）3 mL を加え、10 mL 共栓遠心沈殿管(7)（以下、10 mL 遠心沈殿管）に移し入れる(8)。

d） 遠心力約 740×*g* で約 5 分間遠心分離する(9)。

e） 上澄み液をカートリッジカラムに負荷(8)し、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。

f） なす形フラスコを塩酸（1+120）約 5 mL で洗浄し、洗液を先の 10 mL 遠心沈殿管に移し入れる(8) (10)。

g） 遠心力約 740×*g* で約 5 分間遠心分離する(9)。

h） 上澄み液及び洗液を順次カートリッジカラムに加えて流出させる。

i） f）～h）の操作を更に 1 回実施する。

j） 次に、塩酸（1+120）－アセトニトリル〔9+1〕約 10 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。

k） 10 mL 共栓試験管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〕8 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。

l） ぎ酸（1+1000）2 mL を溶出液に加え、混合する。

注（**6**） （**4.2**）及び（**4.3**）は必要に応じて減圧装置を用いるか、又は加圧する。

（**7**） ねじ口遠心沈殿管を用いてもよい。

（**8**） 使用したパスツールピペット等は、一連の操作で同じものを使用する。

（**9**） 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 遠心沈殿管の遠心力の許容範囲を確認すること。

（**10**） コポリマーカートリッジカラムが詰まる要因を軽減するため、遠心分離で生じた沈殿物をできるだけ崩さないようにする。

(**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) ジルコニアコートシリカゲルカートリッジカラムを予めアセトニトリル約 5 mL 及びぎ酸(1+1000)約 5 mL で洗浄する。

b) (**4.2**)**f**)の溶液をカートリッジカラムに負荷[6]し、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。

c) 共栓試験管をアセトニトリル 5 mL で洗浄し、洗液を同じカラムに負荷し充てん剤の上端に達するまで流出させる。

d) 50 mL なす形フラスコ[11]をカートリッジカラムの下に置き、ぎ酸－アセトニトリル〔2+98〕[12]10 mL をカートリッジカラムに加えて溶出させる。

e) 溶出液を 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。

f) ぎ酸(1+1000)4 mL を加え、1.5 mL 共栓遠心沈殿管に 1.5 mL 程度とる[13]。

g) 遠心力 8000×*g*～10 000×*g* で約 5 分間遠心分離し[14]、上澄み液を試料溶液とする[15]。

注(**11**) 多検体の分析試料を前処理する場合は、10 mL 試験管を用いてもよい。この場合は、溶出液を **e**)の操作の前に溶出液を 50 mL なす形フラスコに入れ、先の試験管をアセトニトリル 2.5 mL で 2 回洗浄し、洗浄液を先の溶出液に加える。

(**12**) 用事調製すること。1 日経過したものを使用すると測定結果に影響を及ぼす。

(**13**) 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。

(**14**) 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。

(**15**) 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. (**4.3**)**f**)～**g**)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)でろ過し、ろ液を試料溶液としてもよい。

(**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～3.0 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 °C

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[16]。

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) 各検量線用クロピラリド標準液の各クロピラリド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)1)**～**2)**と同様に操作する[17]。

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(16) 装置の感度によっては、定量用イオンを確認用イオンとし、確認用イオンを定量用イオンとしても差し支えない。

注(17) 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 9. 真度評価のため、牛ふん堆肥(5 点)、馬ふん堆肥(2 点)、豚ふん堆肥(4 点)、鶏ふん堆肥(4 点)及び汚泥発酵肥料(5 点)を用いて微量クロピラリド分析法(2)の測定値(y_i: 1.5 µg/kg～88.5 µg/kg)及び微量クロピラリド分析法(1)の測定値(x_i)を比較した結果、回帰式は $y=-0.43+1.005x$ であり、その相関係数(r)は 0.996 であった。

精度評価のため、堆肥及び汚泥発酵肥料を用いた日を変えての分析結果について、一元配置分散分析を用いて解析し、併行精度及び中間精度を算出した結果を表 1 に示す。

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 クロピラリドの日を変えた試験成績の解析結果

試料名	日数[1] T	平均値[2] (µg/kg)	併行精度 s_r[3] (µg/kg)	併行精度 RSD_r[4] (%)	中間精度 $s_{I(T)}$[5] (µg/kg)	中間精度 $RSD_{I(T)}$[6] (%)
牛ふん堆肥	5	87.2	3.6	4.1	3.6	4.1
豚ぷん堆肥	5	2.79	0.29	10.3	0.29	10.3
鶏ふん堆肥	5	20.5	0.8	3.8	3.2	15.8
汚泥発酵肥料	5	6.27	0.36	5.8	0.46	7.3

1) 2点併行分析を実施した日数
2) 平均値 (n= 日数(T)×併行数(2))
3) 併行標準偏差
4) 併行相対標準偏差
5) 中間標準偏差
6) 中間相対標準偏差

表2　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

測定方法[1]	試料名	試験室数[2]	平均値[3] (μg/kg)	s_r[4] (μg/kg)	RSD_r[5] (%)	s_R[6] (μg/kg)	RSD_R[7] (%)
m/z 146 面積	鶏ふん堆肥	11(1)	5.30	0.73	13.8	1.50	28.4
	豚ぷん堆肥	12(0)	50.3	2.8	5.6	9.1	18.0
	牛ふん堆肥1	12(0)	115	14	12.6	22	19.1
	牛ふん堆肥2	11(1)	6.67	0.44	6.5	1.48	22.1
	馬ふん堆肥	12(0)	22.6	3.2	14.1	3.4	15.0
	汚泥発酵肥料	12(0)	15.3	1.0	6.4	4.2	27.5
m/z 146 高さ	鶏ふん堆肥	11(1)	5.30	0.70	13.1	1.62	30.6
	豚ぷん堆肥	12(0)	50.6	2.6	5.1	9.9	19.6
	牛ふん堆肥1	12(0)	115	15	12.8	23	20.2
	牛ふん堆肥2	11(1)	6.53	0.49	7.5	1.45	22.2
	馬ふん堆肥	10(2)	21.7	3.3	15.3	3.3	15.3
	汚泥発酵肥料	11(1)	14.4	0.9	6.1	3.0	20.5
m/z 110 面積	鶏ふん堆肥	11(1)	5.25	0.61	11.5	1.48	28.1
	豚ぷん堆肥	12(0)	50.4	2.5	4.9	9.3	18.5
	牛ふん堆肥1	12(0)	115	14	12.2	22	19.4
	牛ふん堆肥2	11(1)	6.49	0.41	6.3	1.57	24.2
	馬ふん堆肥	10(2)	21.5	3.1	14.3	3.1	14.3
	汚泥発酵肥料	11(1)	14.4	0.8	5.6	2.8	19.2
m/z 110 高さ	鶏ふん堆肥	11(1)	5.19	0.63	12.2	1.26	24.3
	豚ぷん堆肥	12(0)	51.2	2.5	4.9	9.9	19.3
	牛ふん堆肥1	12(0)	116	15	12.6	22	19.4
	牛ふん堆肥2	11(1)	6.36	0.53	8.4	1.20	18.8
	馬ふん堆肥	10(2)	21.7	3.2	14.9	3.2	14.9
	汚泥発酵肥料	11(1)	14.5	0.8	5.8	3.0	20.4

1）上段 測定したプロダクトイオン、
　下段 クロピラリド量を算出したピークの面積または高さ
2）有効試験室数（外れ値を報告した試験室数）
3）総平均値(n=有効試験室数×試料数(2))
4）併行標準偏差
5）併行相対標準偏差
6）室間再現標準偏差
7）室間再現相対標準偏差

参考文献

1） 中村信仁, 小塚健志, 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方法の改良, 肥料研究報告, **12**, 69~83 (2019)

2） 加藤まどか, 白井裕治: 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計を用いた堆肥等中のクロピラリドの測定－精製操作の改良－, 肥料研究報告, **14**, 99~108 (2021)

3） 加藤まどか, 白井裕治: 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計を用いた堆肥等中のクロピラリドの分析－室間共同試験による妥当性確認－, 肥料研究報告, **14**, 109~122 (2021)

(5) クロピラリド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の試験法のフローシートを次に示す。

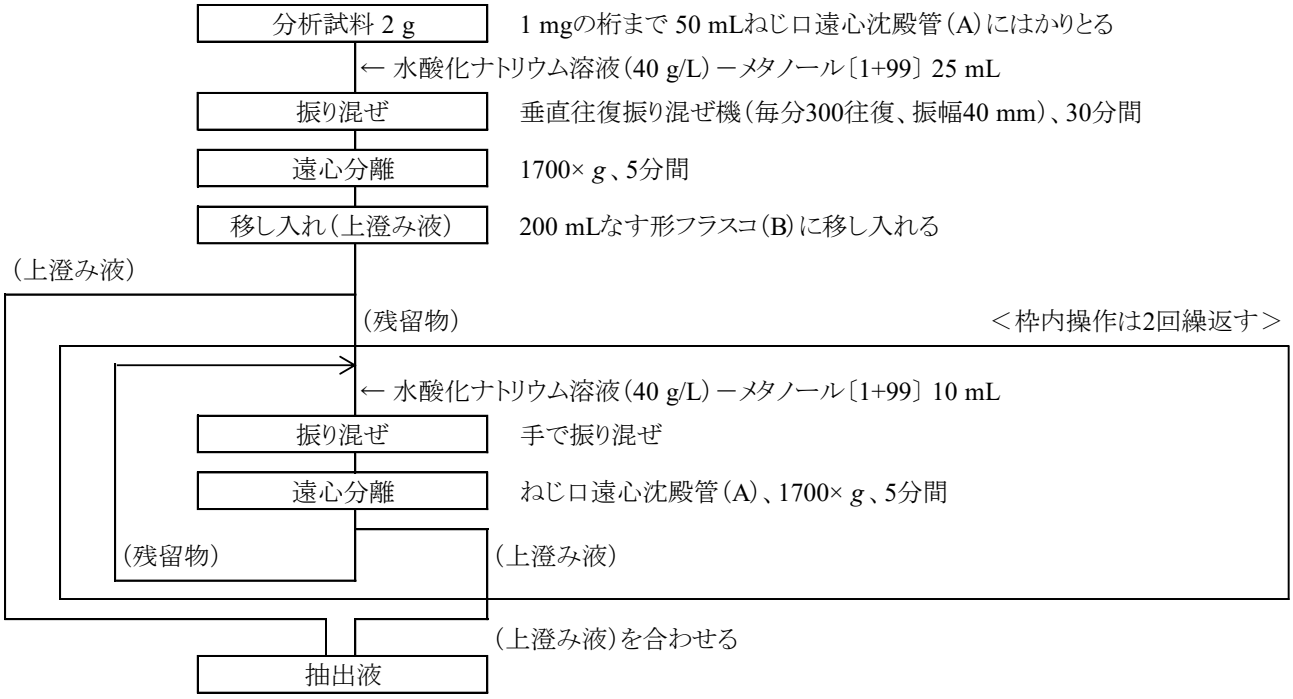


図2-1　堆肥及び汚泥肥料中のクロピラリド試験法フローシート (抽出操作)

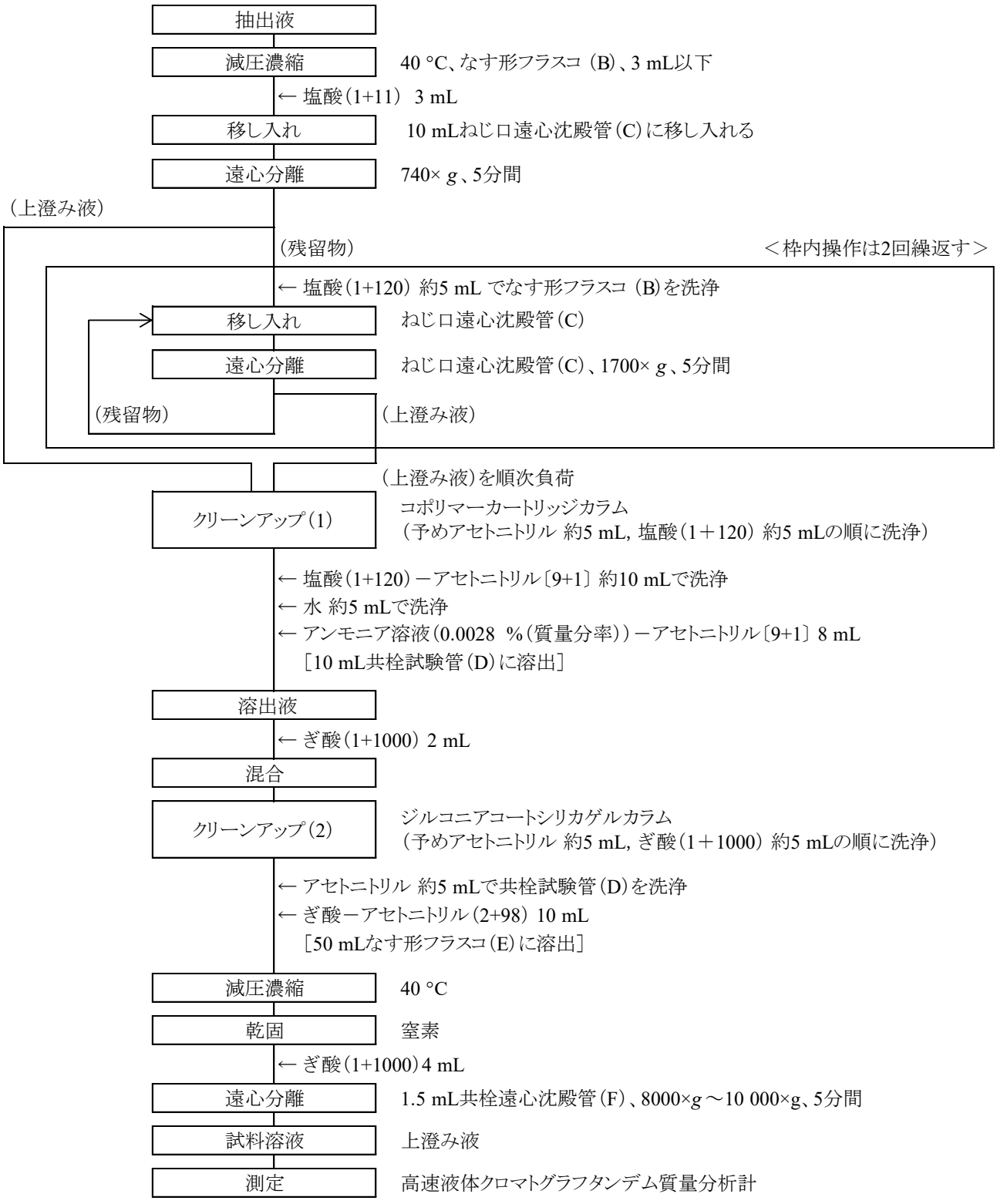
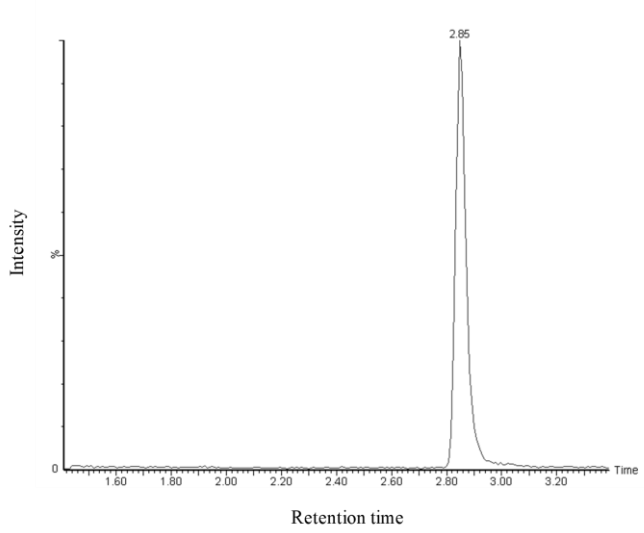


図2-2 堆肥及び汚泥肥料中のクロピラリド試験法フローシート
（クリーンアップ（1）操作、クリーンアップ（2）操作及び測定操作）

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 50 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