

9 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—

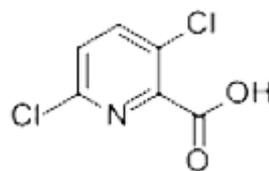
加藤まどか¹, 白井裕治¹

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, コポリマーカートリッジカラム

1. はじめに

クロピラリドは、日本では農薬としての登録はされていないが、米国、オーストラリア、カナダなどの海外で牧草や穀類の生産に使われているカルボキシ基を有するピリジン系の除草剤 (Figure 1) である。クロピラリドが含まれた堆肥等を施用すると、トマト、スイートピーなどクロピラリドに感受性が高い野菜や花の生育に影響 (生育障害) が生じる^{1, 2)}。このことから、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた堆肥等中の分析方法の開発及び改良が続けられていた^{3~6)}。しかしながら、改良された方法⁶⁾においても、抽出液中の夾雑物質がコポリマーカートリッジカラムのフィルターを目詰まりさせて精製操作を困難にする事例があった。

このことから、同様の機能を有するリザーバー容量の大きい (フィルターの表面積の大きい) コポリマーカートリッジカラムを用いて精製する方法を検討したのでその概要を報告する。



CAS No: 1702-17-6

Figure 1 Structural formula of clopyralid

2. 材料及び方法

1) 分析用試料の調製

流通する肥料の堆肥 11 銘柄 (鶏ふん堆肥 3 銘柄, 豚ふん堆肥 3 銘柄, 牛ふん堆肥 3 銘柄及び馬ふん堆肥 2 銘柄) 及び汚泥発酵肥料 3 銘柄を 40 °C で約 60~70 時間乾燥した後、それぞれ超遠心粉砕機 (Retsch ZM 200) で 500 μm のスクリーンを通過するまで粉砕し、混合して分析用試料を調製した。分析用試料は、ポリエチレン製袋に入れて輪ゴムで密閉し、直射日光を避け、常温で保存した。

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

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) 振り混ぜ機: 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) コポリマーカートリッジカラム: GL-Sciences InertSep HLB FF 500 mg/20 mL
Waters Oasis HLB 12cc (500 mg)
- (6) ジルコニアコートシリカゲルカラム: Supelco HybridSPE[®]-Phospholipid (500 mg)
- (7) 超遠心分離機: AS ONE MCD-2000
- (8) マニホールド: GL-Sciences
- (9) 試験管ミキサー: AS ONE 試験管ミキサーTRIO TM-2N

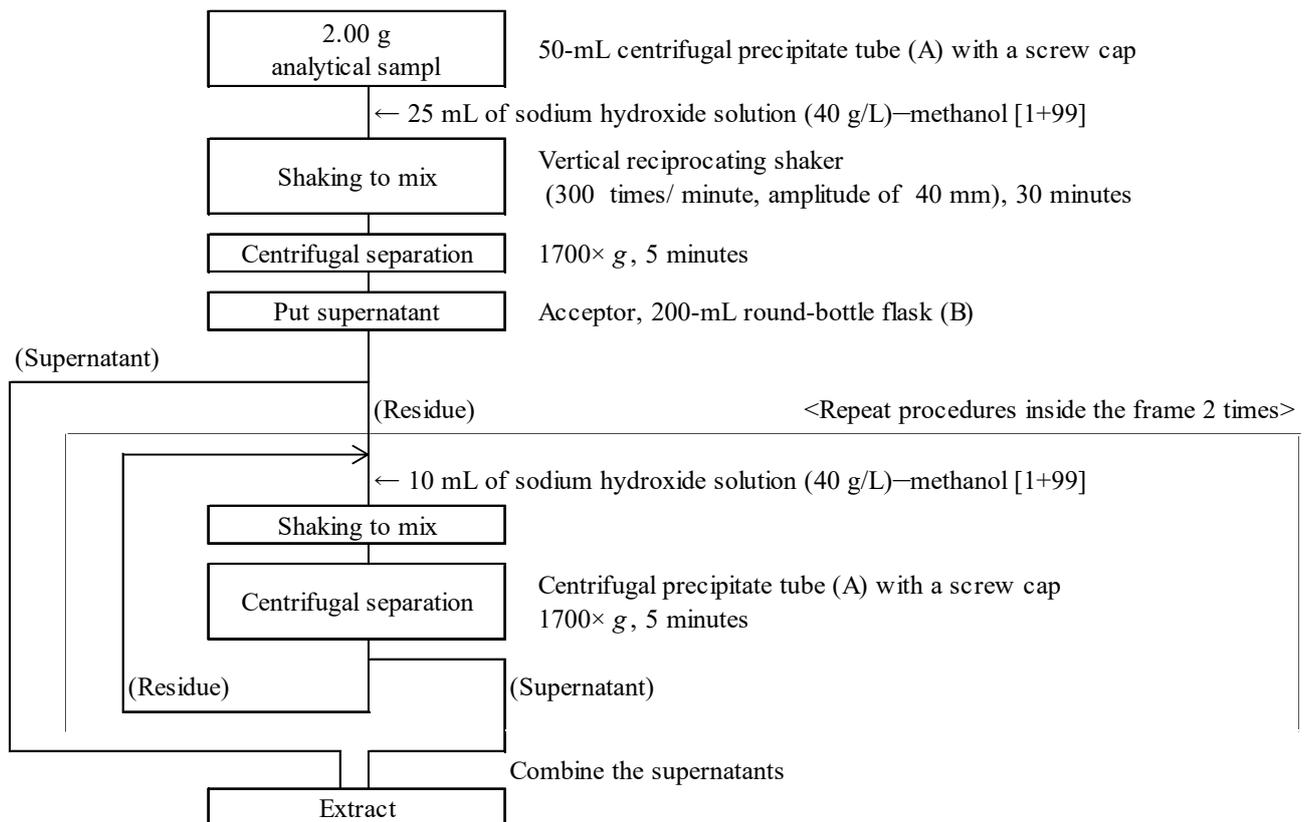
3) 試薬

- (1) 水: JIS K 0557 に規定する A3 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: JIS K 8039 残留農薬・PCB 試験用試薬 (濃縮 5000) (富士フイルム和光純薬)
- (3) メタノール (抽出・クリーンアップ用): 残留農薬・PCB 試験用試薬 (濃縮 5000) または LC-MS 用 (富士フイルム和光純薬)
- (4) メタノール (溶離液用): LC-MS 用試薬 (富士フイルム和光純薬)
- (5) 水酸化ナトリウム: JIS K 8576 特級試薬 (関東化学)
- (6) 塩酸: JIS K 8180 微量金属分析用試薬 (富士フイルム和光純薬)
- (7) アンモニア水: JIS K8085 特級試薬 (質量分率 28 %) (富士フイルム和光純薬)
- (8) ぎ酸: LC-MS 用試薬 (富士フイルム和光純薬)
- (9) クロピラリド: 残留農薬試験用試薬 (富士フイルム和光純薬)
- (10) 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 に加える.
- (11) クロピラリド標準液 (0.1 mg/mL): クロピラリド [$\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_2\text{NO}_2$] 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.
- (12) クロピラリド標準液 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 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.
- (13) 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 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.
- (14) 検量線用クロピラリド標準液 (5 ng/mL ~ 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.
- (15) 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 ~ 10 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.

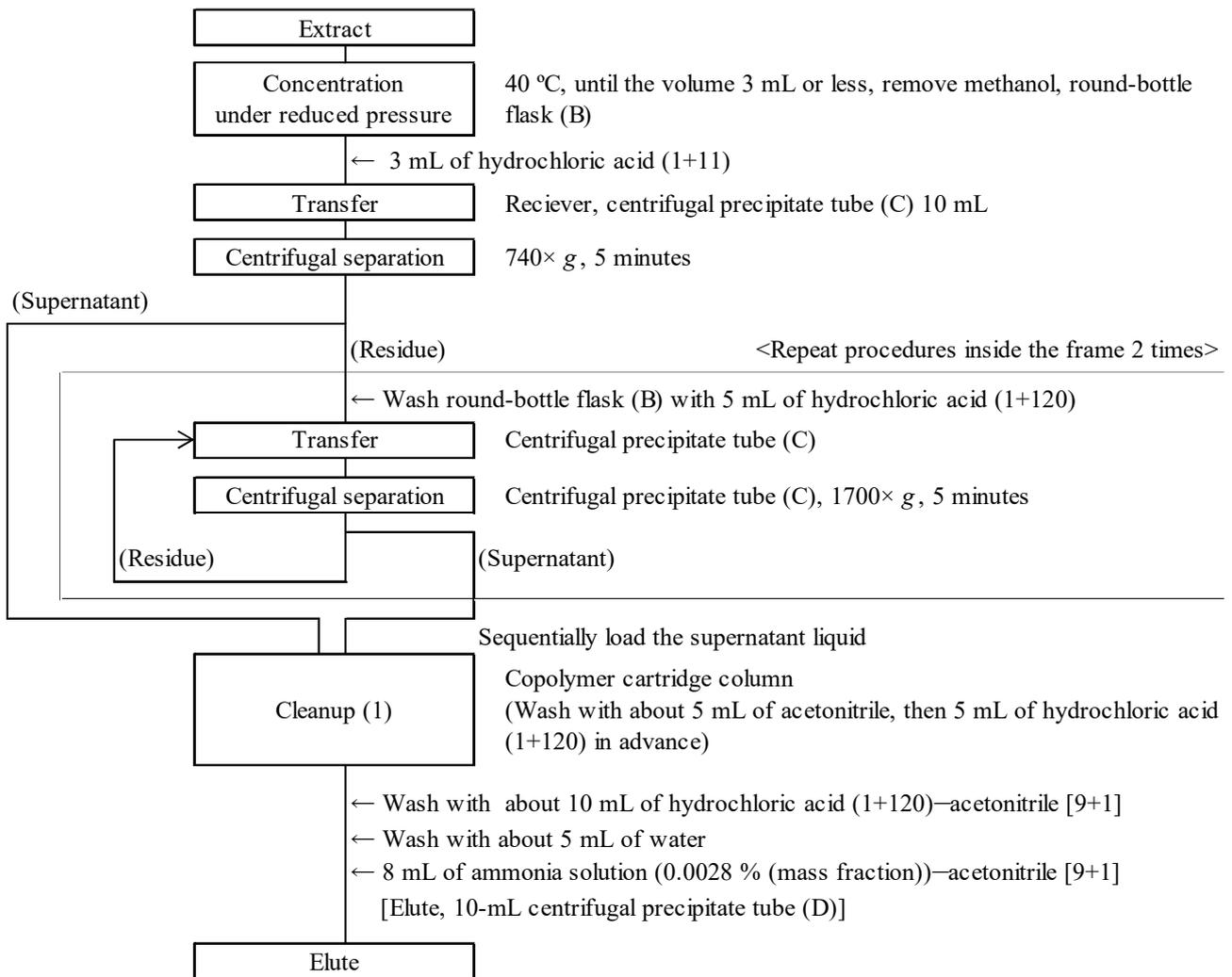
4) 試験操作

試料溶液の調製操作(抽出操作, クリーンアップ(1)操作及びクリーンアップ(2)操作)は, Scheme 1-1～Scheme 1-3 に示した. 肥料等試験法(2020)⁷⁾の 8.2.c の変更は, クリーンアップ(1)操作においてコポリマーカラムに負荷する試料溶液を遠心分離する操作を追加した(Scheme 1-2). また, コポリマーカラムとして Oasis HLB が示されていたが, InertSep HLB FFを追加した.

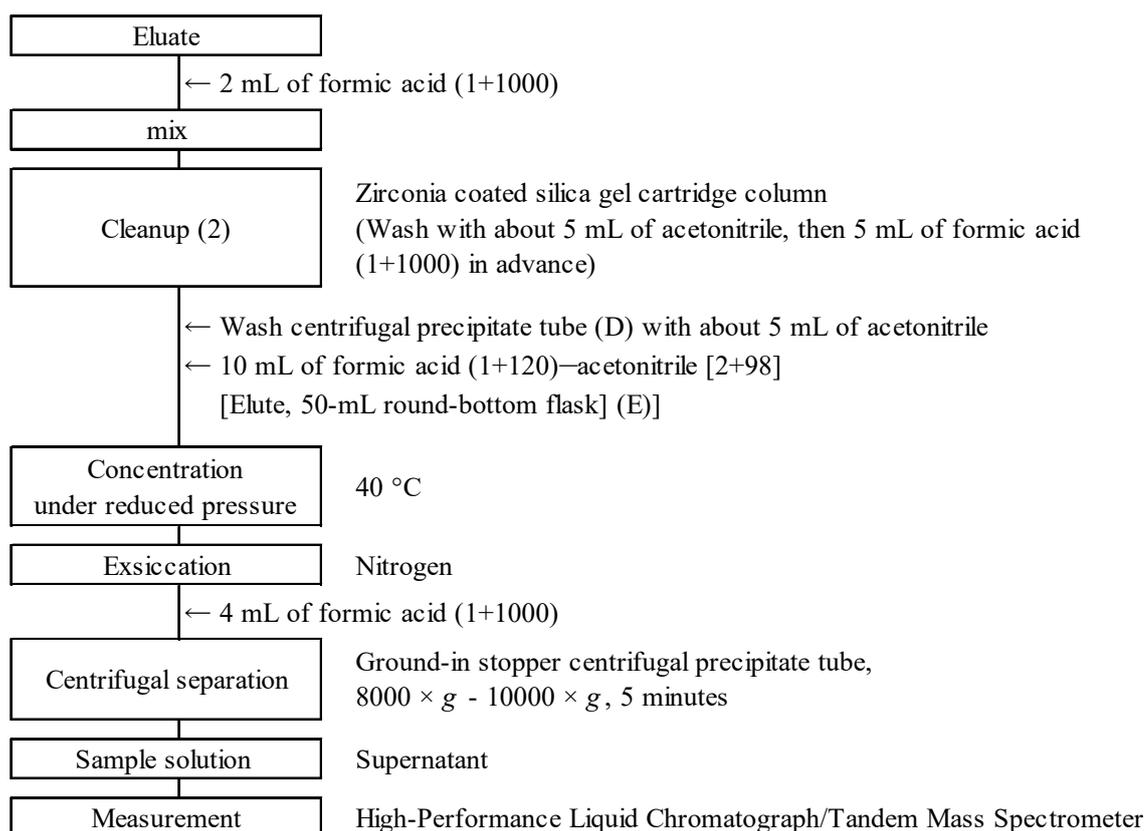
試料溶液及び検量線作成用混合標準液を LC-MS/MS に注入し, Table 1 の測定条件に従って選択反応検出(MRM)クロマトグラムを得た. 得られたMRMクロマトグラムから各成分のピーク面積を求めて検量線を作成し, 試料溶液中の各成分量を求め, 分析試料中のクロピラリドの量を算出した.



Scheme 1-1 Flow sheet for clopyralid in composts (Extraction procedure)



Scheme 1-2 Flow sheet for clopyralid in compost and composted sludge fertilizers
(Cleanup (1) procedure)



Scheme 1-3 Flow sheet for clopyralid in compost and composted sludge fertilizers
(Cleanup (2) and measurement procedure)

Table 1 Operating conditions of LC-MS/MS

[LC conditions] ACQUITY UPLC

Guard column: Inertsil ODS-SP HP (3.0 mm I.D., 10 mm L, 3 μm)

Column: Waters ACQUITY UPLC HSS C18 (2.1 mm I.D., 100 mm L, 1.8 μm)

Mobile phase: A: Formic Acid (1+1000) B: Methanol

Gradient program: 0 min (5 % B)→5 min (60 % B)→6 min (95 % B)→7 min (5 % B)
→12 min (5 % B)

Flow rate: 0.4 mL/min

Column temperature: 40 °C

Injection volume: 5 μL

[MS conditions] Quatro Premier XE

Capillary voltage: 1.0 kV

Desolvation temperature: 400 °C

Desolvation gas flow: 1000 L/h

Cone gas: 50 L/h

Cone voltage: 24 V

Source temperature: 120 °C

Precursor ion: m/z 192

Product ion for determination: m/z 146 (Collision energy 20 eV)

Product ion for validation: m/z 110 (Collision energy 30 eV)

3. 結果及び考察

堆肥等中のクロピラリドの試料溶液の調製の初期手順として、水酸化ナトリウム水溶液(40g/L)－メタノール[1+99]で抽出した後、抽出液中のメタノールをエバポレータで除いた後、塩酸(1+11)を加えている。この際、溶液の pH がアルカリ性から酸性に変化することから、酸不溶物で白濁又は沈殿が生じる。肥料等試験法⁷⁾ではこの溶液の全体をコポリマーカートリッジカラムに負荷するため、同カラムの上部のフィルターに酸不溶物が詰まり、加圧及び減圧操作を加えても試料溶液又は洗浄溶媒が流下しなくなる事例が散見された。このため、コポリマーカートリッジカラム(Oasis HLB 12cc(500 mg))に負荷する試料溶液をあらかじめ遠心分離することとした。この精製操作により目詰まりする現象は軽減されたが、減圧又は加圧する操作は必要であった。

このことから、同様の機能を有するリザーバー容量の大きい(フィルターの表面積の大きい)コポリマーカートリッジカラム(InertSep HLB FF 500 mg/20 mL)を用いて自然流下で精製する方法の真度の評価をするため、次の検討を実施した。汚泥発酵肥料にクロピラリドとして 40 µg/kg 相当量を添加した試料を用いて、InertSep HLB FF 又は Oasis HLB を用いた精製操作によりそれぞれ 4 点併行で分析した結果を Table 2-1 に示し、*F* 検定により分散を評価し、*t* 検定により平均値の差を評価した(Table 2-2)。前者及び後者のコポリマーカートリッジカラムを用いた分析値の平均値は 36.6 µg/kg 及び 75.7 µg/kg であり、それらの標準偏差は 1.7 µg/kg 及び 0.6 µg/kg であった。更に、等分散性を確認した後、平均値を比較したところ有意な差は認められなかった。また、InertSep HLB FF を用いた精製操作による分析値の平均回収率は 73.2 %であり、肥料等試験法に示されている真度の目標(70 %～120 %)を満たしていた。

2 種類のコポリマーカートリッジカラムを用いた分析結果の整合性を確認するため、方法間の比較を実施した。Oasis HLB を用いて精製し分析してクロピラリドとして 2 µg/kg 以上検出した堆肥等を用い、InertSep HLB FF を用いて精製しクロピラリドを分析し、前者の分析値に対する後者の分析値の関係を Figure 2 にプロットし、回帰直線及びその予測区間を描いた。また、各回帰直線の回帰式及びそれらの回帰係数の 95 %信頼区間並びに相関係数を Table 3 に示した。その結果、いずれのパラメータも肥料等試験法に示されている推奨基準(傾き(*b*)の 95 %信頼区間に 1, 切片(*a*)の 95 %信頼区間に 0 が含まれ、相関係数(*r*)が 0.99 以上)を満たしていた。

Table 2-1 Comparison of purification procedure with different copolymer cartridge column (μg)

	Analytical value of clopyralid ^{a)}	
	InertSep HLB FF ^{b)}	Oasis HLB ^{c)}
1	37.8	38.1
2	38.2	37.0
3	35.6	38.3
4	34.8	37.9
Mean value (<i>m</i>)	36.6	37.8
Standard deviation (<i>s</i>)	1.7	0.6
Recovery rate (Unit: %)	73.2	75.7

a) Composted sludge fertilizer spiked 50 μg/kg as clopyralid

b) Considered copolymer cartridge column

c) Conventional copolymer cartridge column

Table 2-2 Statistical analysis for evaluating trueness

		Calculated value	Critical value
<i>F</i> -test	Varyance ratio	8.17	9.28 ^{a)}
<i>t</i> -test	<i>t</i> -value	1.38	2.45 ^{b)}

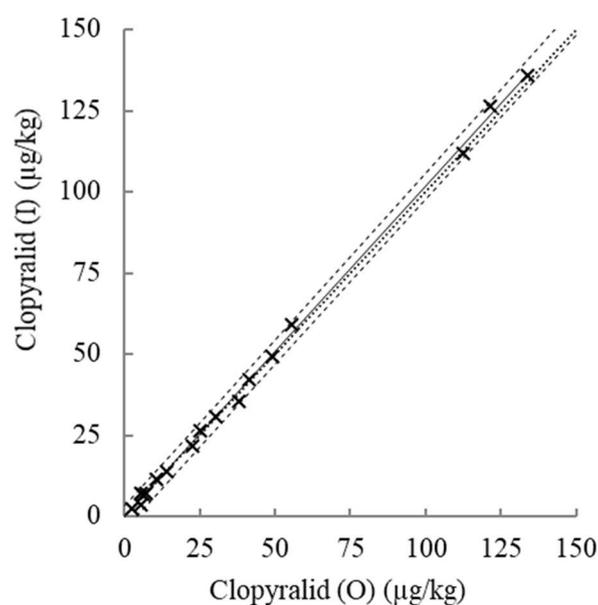
a) $F(3,3;0.05)$ b) $t(6;0.05)$ 

Figure 2 Comparison between analytical values purified with InertSep HLB FF and Oasis HLB

Clopyralid (I): Analytical values purified with InertSep HLB FF

Clopyralid (O): Analytical values purified with Oasis HLB

Solid line: Regression line, Thin line: $y=x$

Dotted lines: Upper and lower limit 95 % prediction intervals

Table 3 Evaluation of regression line for comparison of clopyralid analysis values
with two types of cartridges

Coefficient ^{a)}	Slope (<i>b</i>)	0.137
	Intercept (<i>a</i>)	0.968
	Correlation (<i>r</i>) ^{b)}	0.994
Range of slope (<i>b</i>) ^{c)d)}	Lower limit	0.911
	Upper limit	1.025
Range of intercept (<i>a</i>) ^{c)e)}	Lower limit	-0.361
	Upper limit	0.634

a) Regression equation: $y=bx+a$

b) The recommended criteria* of correlation coefficient: $r \geq 0.99$

c) The 95 % confidence interval

d) The recommended criteria* of coefficient of range of slope:

One is included in the intercept range.

e) The recommended criteria* of coefficient of range of intercept:

The origin (0) is included in the intercept range.

* The criterias shown in Testing Methods for Fertilizers (2020)

4. まとめ

堆肥等中のクロピラリドの分析方法において、精製操作の手順の一部を改良し、従来のコポリマーカートリッジ(Oasis HLB)と同様の機能を持つ InertSep HLB FF を使用する分析方法についての妥当性を単一試験室により確認したところ、次の結果が得られた。

(1) コポリマーカートリッジカラムによる精製操作で同カラムの上部のフィルターに酸不溶物が詰まる現象は、負荷する試料溶液をあらかじめ遠心分離することにより軽減された。

(2) 汚泥発酵肥料にクロピラリドとして 40 µg/kg 相当量を添加した試料を用いて、InertSep HLB FF 又は Oasis HLB を用いた精製操作によりそれぞれ 4 点併行で分析した結果、有意な差は認められなかった。

(3) Oasis HLB を用いて精製し分析してクロピラリドとして 2 µg/kg～121 µg/kg 以上検出した堆肥等を用い、InertSep HLB FF を用いて精製しクロピラリドを分析した結果を回帰分析したところ、相関係数(*r*)が 0.994 であり、両者の分析値は一致していた。

これらの結果を踏まえ、コポリマーカートリッジカラムによる精製操作において試料溶液の遠心分離操作を追加し、既存のコポリマーカートリッジカラムの他に InertSep HLB FF を含めることとし、室間共同試験⁸⁾のための試料溶液の調製操作手順を作成した。

文献

1) 農林水産省:クロピラリドが原因と疑われる生育障害の発生状況

< <https://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyo/clopyralid/attach/pdf/clopyralid-54.pdf> >

- 2) 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構:飼料及び堆肥に残留する除草剤(クロピラリド)の簡易判定法と被害軽減対策マニュアル(第2版)
< https://www.naro.go.jp/publicity_report/publication/files/clopyralid_ver2.pdf >
- 3) 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)
- 4) 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)(2017)
< https://www.naro.go.jp/publicity_report/publication/files/clopyralid_analysis_1.pdf >
- 5) 伊藤浩平, 小塚健志, 青山恵介, 白井祐治: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 ー微量試験法の適用範囲拡大ー, 肥料研究報告, **11**, 63-74 (2018)
- 6) 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法の改良, 肥料研究報告, **12**, 69-83 (2019)
- 7) 農林水産消費安全技術センター(FAMIC):肥料等試験法 (2020)
< http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikhenho_2020.pdf >
- 8) 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 ー室間共同試験による妥当性確認ー, 肥料研究報告, **14**, 109-122 (2021)

Microanalysis Determination of Clopyralid in Compost and Composted Sludge Fertilizer using Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometer (LC-MS/MS): Improvement of Purification Operation

KATO Madoka¹ and SHIRAI Yuji¹

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

The analytical methods for clopyralid in compost and composted sludge fertilizers described in Testing Methods for Fertilizers (2020) are as follows. Clopyralid was extracted with methanol under alkaline condition. We purified the extract with a copolymer cartridge column and a zirconia coated silica gel cartridge column. Clopyralid was determined using Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometer (LC-MS/MS). However, there were cases where contaminants in the extract clog the filter of the copolymer cartridge column. We improved a part of the purification operation procedure and examined the performance of InertSep HLB FF (Column size 500 mg/20 mL), which has the same function as the conventional copolymer cartridge (Oasis HLB 12cc (Column size 500 mg/12 mL)). We compared InertSep HLB FF and Oasis HLB using the analytical values purified by loading the centrifuge sample solution. As a result, the analytical values were in agreement in the range of 2 µg/kg to 121 µg/kg.

Key words clopyralid, compost, composted sludge fertilizer, LC-MS/MS, copolymer cartridge column

(Research Report of Fertilizer, 14, 99-108, 2021)