

8. その他

8.1 メラミン及びその関連物質

8.1.a ガスクロマトグラフ質量分析法

(1) 概要

この試験法は肥料に適用する。この試験法の分類は Type D であり、その記号は 8.1.a-2017 又は Mel.a-1 とする。

有機物及び無機物を含む肥料中のメラミン及びその関連物質(以下、「メラミン等」という。)をジエチルアミン-水-アセトニトリル(1+4+5)で抽出し、BSTFA-TMCS(99+1)で誘導体化した後ガスクロマトグラフ質量分析計を用いて測定し、分析試料中のメラミン等を求める。なお、この試験法の性能は備考 8 に示す。

備考 1. メラミン及びその関連物質の構造式は図 1 のとおりである。メラミンの製造過程において R₁~R₃ の-NH₂が-OH に置き換わった副産物が生ずることがある。

	R ₁	R ₂	R ₃	MW
メラミン	NH ₂	NH ₂	NH ₂	126.12
アンメリン	OH	NH ₂	NH ₂	127.10
アンメリド	OH	OH	NH ₂	128.09
シアヌル酸	OH	OH	OH	129.07

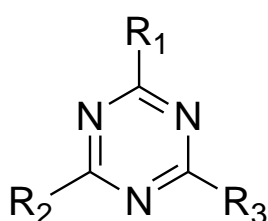


図1 メラミン及びその関連物質の構造式

(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。
- 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) **ジエチルアミン**: 特級又は同等の品質の試薬。
- d) **ピリジン(脱水)⁽¹⁾**: 純度 99.5 % (質量分率)以上及び水分 0.05 mg/mL 以下の有機合成用又は同等の品質の試薬。
- e) **誘導体化試薬⁽²⁾**: ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド-トリメチルクロロシラン(99+1)。
- f) **メラミン等標準液(0.5 mg/mL)**: メラミン[C₃H₆N₆]⁽³⁾、アンメリン[C₃H₅N₅O]⁽³⁾、アンメリド[C₃H₄N₄O₂]⁽³⁾及びシアヌル酸[C₃H₃N₃O₃]⁽³⁾約 0.05 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。少量のジエチルアミン-水(1+4)で溶かし、それぞれ 100 mL 全量フラスコに移し入れ、標線まで同溶媒を加える。
- g) **混合標準液(50 µg/mL)⁽³⁾**: 各メラミン等標準液(0.5 mg/mL) 5 mL を 50 mL 全量フラスコにとり、標線までジエチルアミン-水-アセトニトリル(1+4+5)を加える。

注(1) 開封後は、硫酸ナトリウム(無水)適量を加えて密栓して保管する。

(2) 混合された誘導体化試薬は BSTFA-TMCS(99+1)の名称で市販されている。

(3) メラミン、アンメリン、アンメリド及びシアヌル酸としてそれぞれ標準試薬が市販されている。

備考 2. BSTFA-TMCS(99+1)は SUPELCO から 1 mL のアンプルで販売されている。開封後は、その日のうちに使用する。

備考 3. メラミン、アンメリン、アンメリド及びシアヌル酸の標準試薬は富士フィルム和光純薬、関東化学及び林純薬工業より販売されている。

(3) **装置** 装置は、次のとおりとする。

a) **ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)**: JIS K 0123 に規定する GC/MS で次の要件を満たすもの。

1) **ガスクロマトグラフ**:

- ① 試料導入部: スプリットレス方式が可能なもの。
- ② キャピラリーカラム: 内径 0.25 mm~0.32 mm、長さ 30 m の溶融シリカ製のキャピラリーカラム。5 %フェニル 95 %メチルポリシロキサンを 0.25 μm 厚さでキャピラリーカラム内表面へ化学結合し、質量分析計仕様のもの。
- ③ キャリヤーガス: 純度 99.999 % (体積分率) 以上の高純度ヘリウム

2) **質量分析計**:

- ① イオン化法: 電子衝撃イオン化 (EI) 法
- ② イオン検出方式: 選択イオン検出 (SIM) 法

b) **超音波発生器**: 超音波洗浄器を用いることができる。

c) **高速遠心分離機**: 8000 $\times g$ ~ 10 000 $\times g$ で遠心分離可能なもの。

d) **濃縮器**: 70 $^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ に調節できる遠心エバポレーター

e) **水浴**: 70 $^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ に調節できるもの。

備考 4. キャピラリーカラムは DB-5ms、Rtx-5ms、HP-5ms、SLB-5ms、BPX-5、CP-Sil 8CB low Bleed/MS、TC-5HT for GC/MS 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 0.5 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) ジエチルアミン-水-アセトニトリル (1+4+5) 160 mL ~ 200 mL を加え、超音波発生器を用いて約 30 分間超音波処理する。

c) 約 1.5 mL を 1.5 mL 共栓遠心沈殿管⁽⁴⁾にとり、遠心力 8000 $\times g$ ~ 10 000 $\times g$ で約 5 分間遠心分離する⁽⁵⁾。

d) 上澄み液 1 mL を 5 mL ~ 50 mL 全量フラスコにとり、標線までジエチルアミン-水-アセトニトリル (1+4+5) を加え、抽出液とする。

注(4) ポリプロピレン製等で試験に影響しないことを確認する。

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

備考 5. 500 μm のふるいを通すまで粉砕して分析用試料を調製する。

備考 6. 分析試料 0.5 g をはかりとり、ジエチルアミン-水-アセトニトリル (1+4+5) 200 mL で抽出し、**d)** の操作で 50 倍に希釈した場合は、分析試料中のメラミン等の定量範囲は 0.2 % (質量分率) ~ 10 % (質量分率) となる。その定量範囲未満のメラミン等を測定する場合は **d)** の操作の希釈倍率を下げる。また、メラミン等の含有量がそれぞれ 10 % (質量分率) を超える場合は分析試料の採取量を減らす必要がある。

(4.2) 誘導体化 誘導体化は、次のとおり行う。

- a) 抽出液 0.2 mL を 5 mL～10 mL スクリュー栓付き試験管にとる。
- b) 試験管を濃縮器にいれ、70 °C±2 °C で減圧濃縮し、完全に溶媒を揮散させる⁽⁶⁾。
- c) ピリジン(脱水)⁽¹⁾ 0.3 mL 及び誘導体化試薬⁽²⁾ 0.2 mL を残留物に加えて混合し、栓をして密封する。
- d) 70 °C±2 °C の水浴中で約 45 分間加熱した⁽⁷⁾後、放冷し、試料溶液とする⁽⁸⁾。

注(6) 吹きつけ型濃縮機等を用いることができる。

(7) b) の操作で水分が残留した場合又は c) の操作で使用する試薬に水分が含まれていた場合は、d) に
おける誘導体化の反応が十分に進まないことがある。

(8) 必要に応じて、試料溶液を 1.5 mL 共栓遠心沈殿管⁽⁴⁾にとり、8000×g～10 000×g で約 5 分間遠心
分離する⁽⁵⁾。

(4.3) 測定 測定は、JIS K 0123 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用するガスクロマトグラ
フ質量分析計の操作方法による。

a) **ガスクロマトグラフ質量分析計の測定条件** ガス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) ガスクロマトグラフ:

- ① 試料導入方法: スプリットレス注入法(1 min)
- ② 試料導入部温度: 280 °C
- ③ キャピラリーカラム: 5 %フェニル 95 %メチルポリシロキサンをキャピラリーカラム内表面へ化学結合し
た溶融シリカ製のキャピラリーカラム(内径 0.25 mm～0.32 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm)
- ④ カラム槽温度: 100 °C(1 min)→(15 °C/min)→320 °C(3 min)
- ⑤ GC/MS 接続部温度: 250 °C
- ⑥ キャリヤーガス: ヘリウム、流量: 1.5 mL/min

2) 質量分析計:

- ① イオン化法: 電子衝撃イオン化(EI)法
- ② イオン化電圧: 70 V
- ③ イオン源温度: 230 °C
- ④ イオン検出方式: 選択イオン検出(SIM)法
- ⑤ 測定イオン: 表 1 のとおり

表1 測定対象物質のフラグメントイオン

測定対象物質	測定フラグメントイオン(m/z)				
	定量用	確認用	確認用	確認用	確認用
メラミン	342	344	327	285	213
アンメリン	328	345	343	285	214
アンメリド	344	346	329	214	198
シアヌル酸	345	347	330	215	188
DACP(I.S.)	288	289	290	273	275

b) 検量線の作成

- 1) 混合標準液(50 µg/mL) 5 mL を 50 mL 全量フラスコにとり、標線までジエチルアミン-水-アセトニトリル(1+4+5)を加え、混合標準液(5 µg/mL)とする。
- 2) 混合標準液(5 µg/mL) 1 mL~20 mL を 50 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線までジエチルアミン-水-アセトニトリル(1+4+5)を加え、混合標準液(0.1 µg/mL~2 µg/mL)とする。
- 3) 混合標準液(0.1 µg/mL~2 µg/mL)を(4.2) b)~d)の操作を行って 0.04 µg/mL~0.8 µg/mL 相当量の検量線用混合標準液とする。
- 4) 各検量線用混合標準液 1 µL を GC/MS に注入し、測定対象物質の定量用イオン(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又は高さを求める。
- 5) 各測定対象物質の定量用イオン(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。
- 6) 各検量線用混合標準液の測定対象物質濃度と定量用イオン(m/z)のピーク面積又は高さとの検量線を作成する。

c) 試料の測定

- 1) 試料溶液を 1 µL を b) 4)~5)と同様に操作する⁽⁹⁾。
- 2) 検量線から各測定対象物質量を求め、分析試料中の各測定対象物質を算出する。

注(9) 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 7. メラミン等の感度の変動が確認された場合は、次の a) 又は b)の方法により測定を行う。

- a) (4.3)c) 1)の操作で試料溶液を GC/MS に一定回数注入した後、(4.3)b) 4)~6)に従って操作し検量線を修正する。
- b) 内標準物質として 2,6-ジアミノ-4-クロロピリミジン(0.5 µg 相当量)を標準液及び試料溶液に加え、(4.2)c)~d)、(4.3)b) 4)~6)及び c) 1)と同様の操作をする。ただし、各測定対象物質と内標準物質の定量用イオン(m/z)のピーク面積比又は高さ比から検量線の作成及び分析試料中の各測定対象物質濃度を算出する。

備考 8. 大豆油かす、魚粉、魚廃物加工肥料、混合有機質肥料、配合肥料及び化成肥料におけるメラミン等の回収試験の結果は、10 % (質量分率)及び 0.2 % (質量分率)の添加レベルで平均回収率が 92.1 %~102.9 %及び 90.3 %~102.2 %であった。

なお、この試験法のメラミン等の定量下限はそれぞれ 0.01 % (質量分率)程度と推定された。

参考文献

- 1) 白井裕治, 大木 純: ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)法による肥料中のメラミン及びその関連物質の同時測定, 肥料研究報告, **1**, 114~121 (2008)

(5) **メラミン等の試験法フローシート** 肥料中のメラミン等の試験法のフローシートを次に示す。

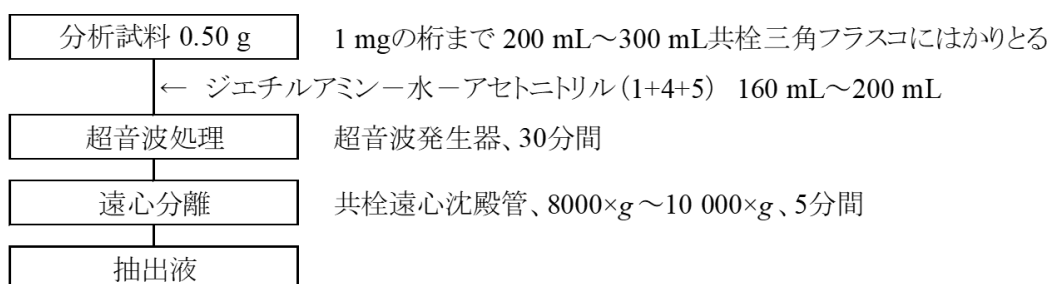


図1 肥料中のメラミン及びその関連物質の試験法フローシート(抽出操作)

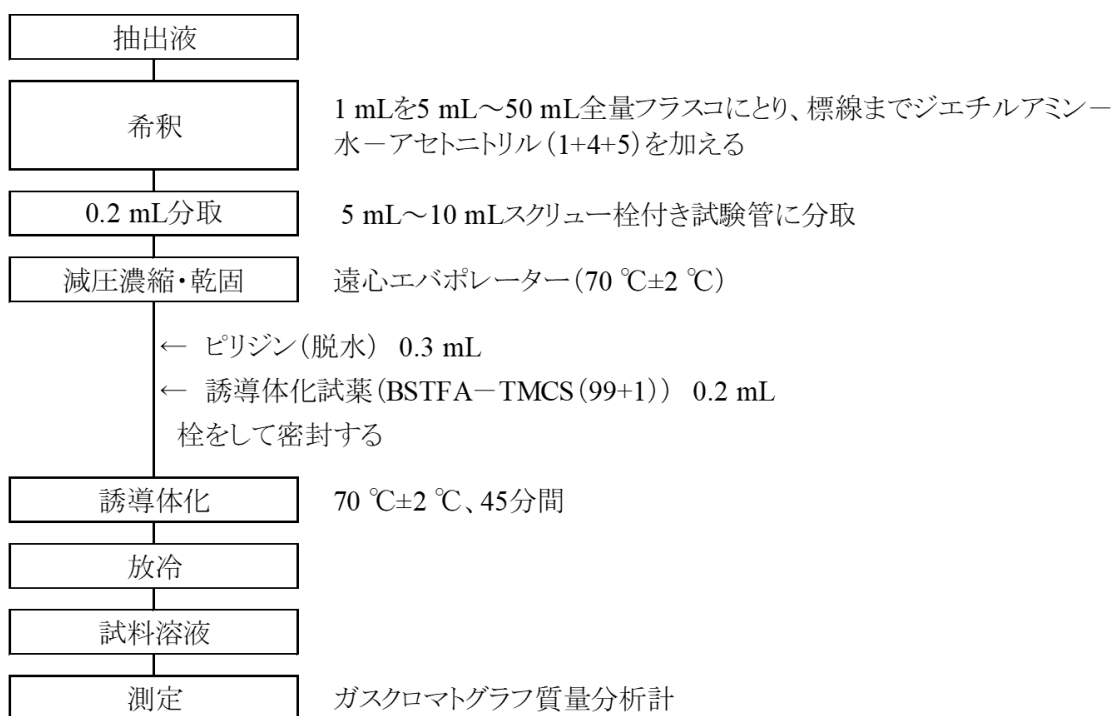


図2 肥料中のメラミン及びその関連物質の試験法フローシート(誘導体化及び測定操作)

参考 メラミン等の検量線用混合標準液の GC/MS の全イオンのクロマトグラム(TIC) 例を次に示す。

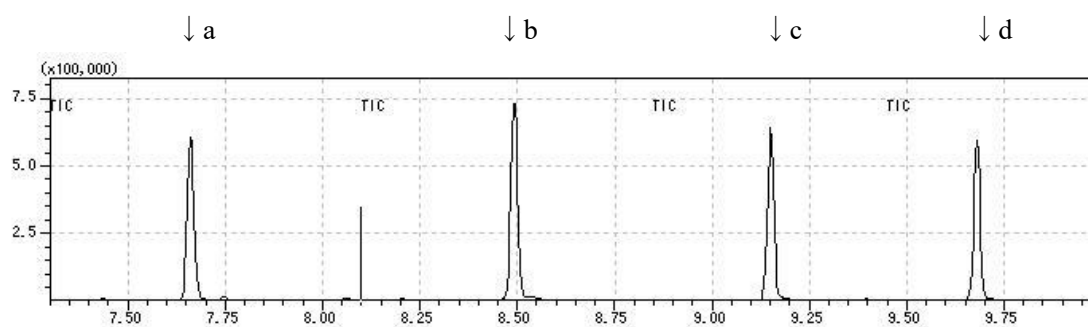


図3 メラミン及びその関連物質の GC/MS の全イオンのクロマトグラム(TIC)

GC/MS の測定条件

キャピラリーカラム: Rtx-5ms (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m)

その他の条件は (4.3) a) ガスクロマトグラフ質量分析計の測定条件の例示のとおり

各全イオンクロマトグラムのピーク名

- | | |
|----------|----------|
| a) シアヌル酸 | b) アンメリド |
| c) アンメリン | d) メラミン |

GC/MS に導入した試料及び導入量

導入した試料: メラミン及びその関連物質の検量線用混合標準液 (各 2 μ g/mL 相当量)

導入量: 1 μ L (メラミン及びその関連物質各 2 ng 相当量)

8.1.b (欠番)

8.1.c 高速液体クロマトグラフ法(有機物を含まない肥料)

(1) 概要

この試験法は有機物を含まない肥料に適用する。この試験法の分類は Type B であり、その記号は 8.1.c-2017 又は Mel.c-1 とする。

塩酸(1+15)を分析試料に加えてメラミン及びその関連物質(以下、「メラミン等」という。)を抽出し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、カルバモイル基を化学結合したシリカゲルカラムで分離し、波長 214 nm で測定し、分析試料中のメラミン等を求める。なお、この試験法の性能は備考 4 に示す。

(2) 試薬 試薬及び水は、次による。

- a) 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水。
- b) アセトニトリル: JIS K 8032 に規定する特級又は同等の品質の試薬。なお、高速液体クロマトグラフの溶離液には高速液体クロマトグラフ用試薬を使用。
- c) 塩酸: 特級又は同等の品質の試薬。
- d) リン酸塩緩衝液⁽¹⁾: JIS K 9020 に規定するりん酸水素二ナトリウム 0.237 g 及び JIS K 9009 に規定するりん酸二水素ナトリウム二水和物 0.520 g を水に溶かして 1000 mL とする⁽²⁾。高速液体クロマトグラフの溶離液に使用する場合は、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5 µm 以下)でろ過する。
- e) メラミン等標準液(0.5 mg/mL): メラミン[C₃H₆N₆]⁽³⁾、アンメリン[C₃H₅N₅O]⁽³⁾、アンメリド[C₃H₄N₄O₂]⁽³⁾及びシアヌル酸[C₃H₃N₃O₃]⁽³⁾約 0.05 g をそれぞれひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。少量の塩酸(1+15)で溶かし、それぞれ 100 mL 全量フラスコに移し入れ、標線まで同溶液を加える。
- f) 混合標準液(50 µg/mL)⁽¹⁾: 各メラミン等標準液(0.5 mg/mL) 5 mL を 50 mL 全量フラスコにとり、標線までアセトニトリル-りん酸塩緩衝液(4+1)を加える。
- g) 検量線用混合標準液(1 µg/mL~5 µg/mL): 使用時に混合標準液(50 µg/mL)の 1 mL~5 mL を 50 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線までアセトニトリル-りん酸塩緩衝液(4+1)を加える。
- h) 検量線用混合標準液(0.05 µg/mL~0.5 µg/mL): 使用時に混合標準液(1 µg/mL)の 2.5 mL~25 mL を 50 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線までアセトニトリル-りん酸塩緩衝液(4+1)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) リン酸塩緩衝液は pH 6.7±pH 0.2 となる。

(3) メラミン、アンメリン、アンメリド及びシアヌル酸としてそれぞれ標準試薬が市販されている。

備考 1. メラミン、アンメリン、アンメリド及びシアヌル酸の標準試薬は富士フィルム和光純薬、関東化学、林純薬工業及び東京化成工業より販売されている。

(3) 装置 装置は、次のとおりとする。

- a) 高速液体クロマトグラフ: JIS K 0124 に規定する高速液体クロマトグラフで次の要件を満たすもの。
 - 1) カラム: 内径 4 mm~6 mm、長さ 150 mm~250 mm のステンレス鋼のカラム管にカルバモイル基を化学結合したシリカゲルを充てんしたもの。
 - 2) カラム槽: カラム槽温度を 40 °C±1 °C で調節できるもの。
 - 3) 検出部: 吸光光度検出器で波長 214 nm 付近で測定できるもの。
- b) 超音波発生器: 超音波洗浄機を用いることができる。

- c) **遠心分離機**: $1700 \times g$ で遠心分離可能なもの。
 d) **高速遠心分離機**: $8000 \times g \sim 10\,000 \times g$ で遠心分離可能なもの。

備考 2. カラムは TSKgel Amide-80 等の名称で市販されている。メラミン、アンメリン、アンメリド及びシアヌル酸を完全に分離できることが確認されたカラムを使用すること。

(4) 試験操作

(4.1) **抽出** 抽出は、次のとおり行う。

- a) 分析試料 0.5 g を 1 mg の桁まではかりとり、200 mL 共栓三角フラスコに入れる。
- b) 塩酸(1+15) 100 mL を加え、超音波発生器を用いて約 30 分間超音波処理する。
- c) 静置後、上澄み液を 50 mL 共栓遠心沈殿管にとる。
- d) 遠心力約 $1700 \times g$ で約 5 分間遠心分離し⁽⁴⁾、上澄み液を抽出液とする。
- e) 抽出液 5 mL⁽⁵⁾を 50 mL 全量フラスコにとり、標線までアセトニトリル-りん酸塩緩衝液(4+1)を加えて希釈する。
- f) 希釈液を 1.5 mL 共栓遠心沈殿管⁽⁶⁾にとる。
- g) 遠心力 $8000 \times g \sim 10\,000 \times g$ で約 5 分間遠心分離し⁽⁷⁾、上澄み液を試料溶液とする。

注 (4) 回転半径 16.5 cm 及び回転数 3000 rpm で遠心力 $1700 \times g$ 程度となる。

(5) 試料溶液中のメラミン等の濃度が検量線の上限を超えるおそれのある場合は、上澄み液の分取量 1 mL \sim 2.5 mL とする。

(6) 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。

(7) 回転半径 7.2 cm \sim 8.9 cm 及び回転数 10 000 rpm で遠心力 $8100 \times g \sim 10\,000 \times g$ 程度となる。

備考 3. (4.1)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 μ m 以下)でろ過し、ろ液を試料溶液としてもよい。

(4.2) **測定** 測定は、JIS K 0124 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の操作方法による。

- a) **高速液体クロマトグラフの測定条件**: 高速液体クロマトグラフ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) **カラム**: カルバモイル基を化学結合したシリカゲルカラム(内径 4 mm \sim 6 mm、長さ 150 mm \sim 250 mm、粒径 5 μ m)
 - 2) **カラム槽温度**: $40 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$
 - 3) **溶離液**: アセトニトリル-りん酸塩緩衝液(4+1)
 - 4) **流量**: 1 mL/min
 - 5) **検出器**: 吸光光度検出器、測定波長 214 nm
- b) **検量線の作成**
 - 1) 各検量線用混合標準液 10 μ L を高速液体クロマトグラフに注入し、波長 214 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク面積又は高さを求める。
 - 2) 各検量線用混合標準液の濃度と波長 214 nm のピーク面積又は高さとの検量線を作成する。

c) 試料の測定

- 1) 試料溶液を 10 μ L を **b) 1)**と同様に操作する。
- 2) 検量線から各メラミン等の量を求め、分析試料中の各メラミン等を算出する。

備考 4. 石灰窒素 3 銘柄、石灰窒素入り化成肥料 1 銘柄、石灰窒素を含まない化成肥料 2 銘柄、硫酸 1 銘柄及び尿素 1 銘柄を用いて回収試験を実施した結果、メラミン等として 4 % (質量分率) 及び 0.1 % (質量分率) の濃度レベルでの回収率は 90.5 % ~ 106.3 % 及び 92.2 % ~ 107.0 % 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、この試験法の定量下限はメラミン、シアヌル酸で 0.02 % (質量分率) 程度、アンメリン、アンメリドで 0.01 % (質量分率) 程度と推定されたが、アンメリド及びシアヌル酸については、アンメリドで 0.188 % (質量分率) ~ 1.10 % (質量分率) の範囲で、シアヌル酸で 0.105 % (質量分率) ~ 1.15 % (質量分率) の範囲で十分な室間再現精度を有していた。

表1 メラミン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⁾ (%) ⁷⁾	s_r ³⁾ (%) ⁷⁾	RSD_r ⁴⁾ (%)	s_R ⁵⁾ (%) ⁷⁾	RSD_R ⁶⁾ (%)
メラミン	石灰窒素1	9(2)	2.83	0.04	1.4	0.12	4.3
	石灰窒素2	10(1)	0.391	0.003	0.8	0.023	5.8
	石灰窒素入り化成肥料	9(2)	0.845	0.019	2.2	0.036	4.2
	化成肥料	11(0)	0.198	0.005	2.6	0.012	6.2
	硫酸アンモニア	10(1)	0.0343	0.0015	4.5	0.0040	11.6
アンメリン	石灰窒素1	9(2)	1.60	0.02	1.3	0.06	3.8
	石灰窒素2	10(1)	0.105	0.001	1.3	0.002	2.3
	石灰窒素入り化成肥料	9(2)	0.629	0.027	4.3	0.023	3.7
	化成肥料	11(0)	0.195	0.004	2.1	0.009	4.5
	硫酸アンモニア	10(1)	0.0346	0.0013	3.7	0.0024	6.9
アンメリド	石灰窒素1	9(2)	1.10	0.02	2.1	0.08	7.6
	石灰窒素2	11(0)	0.361	0.008	2.2	0.023	6.5
	石灰窒素入り化成肥料	9(2)	0.188	0.004	2.2	0.014	7.5
	化成肥料	11(0)	0.718	0.028	3.9	0.052	7.2
	硫酸アンモニア	11(0)	0.0345	0.0031	8.9	0.0056	16.1
シアヌル酸	石灰窒素1	9(2)	1.15	0.06	4.8	0.09	7.7
	石灰窒素2	10(1)	0.390	0.018	4.5	0.029	7.4
	石灰窒素入り化成肥料	9(2)	0.105	0.003	2.9	0.014	13.2
	化成肥料	9(2)	0.788	0.026	3.2	0.054	6.8
	硫酸アンモニア	10(1)	0.0365	0.0015	4.2	0.0067	18.3

- 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 \times 繰返し数(2))
- 3) 併行標準偏差
- 4) 併行相対標準偏差

- 5) 室間再現標準偏差
- 6) 室間再現相対標準偏差
- 7) 質量分率

参考文献

- 1) 坂東悦子, 白井裕治: 高速液体クロマトグラフ(HPLC)法による肥料中のメラミン及びその関連物質の同時測定, 肥料研究報告, 6, 27~35 (2013)
- 2) 坂東悦子, 甲斐茂浩: 高速液体クロマトグラフ(HPLC)法による肥料中のメラミン及びその関連物質の同時測定 - 共同試験 -, 肥料研究報告, 7, 10~21 (2014)

(5) **メラミン等の試験法フローシート** 肥料中のメラミン等の試験法のフローシートを次に示す。

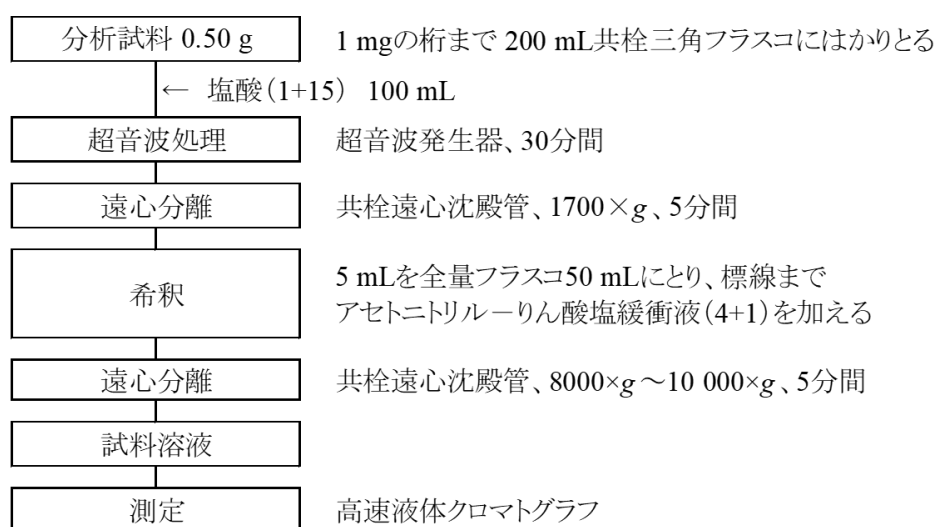
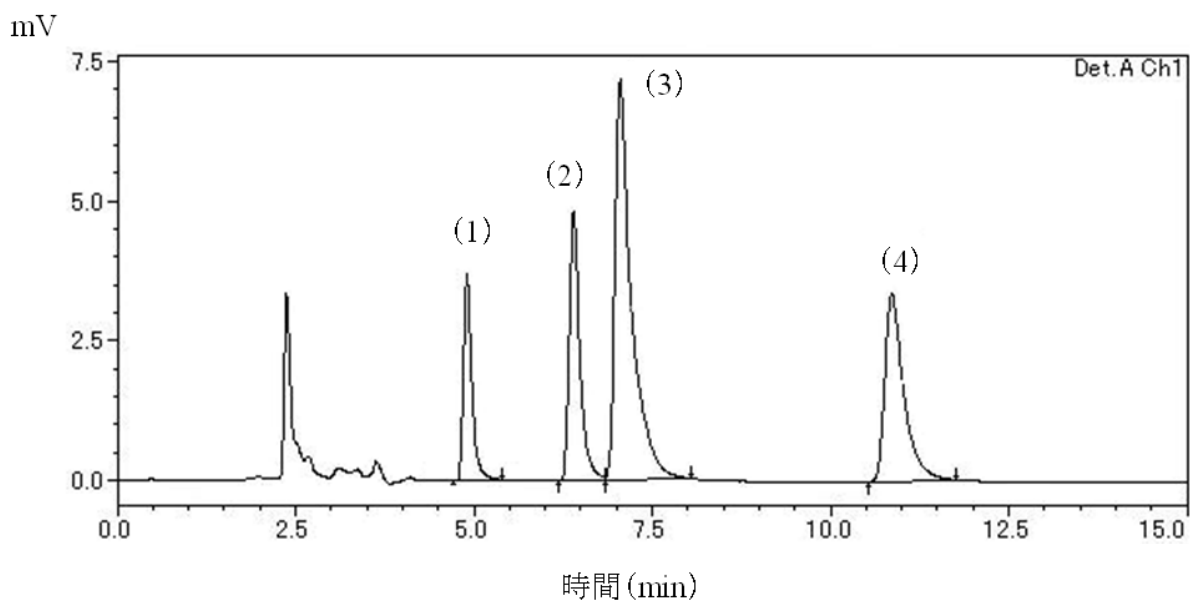


図 肥料中のメラミン及びその関連物質の試験法フローシート

参考 メラミン等の検量線用混合標準液の HPLC クロマトグラム例を次に示す。



参考図 メラミン及びその関連物質の HPLC クロマトグラム

各ピークの物質名

(1) シアヌル酸 (2) アンメリド (3) メラミン (4) アンメリン

HPLC の測定条件

カラム: TSKgel Amide-80(内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5 μ m)

メラミン及びその関連物質の検量線用混合標準液(各 10 ng 相当量(1 μ g/mL, 10 μ L))

その他の条件は(4.2 a) HPLC の測定条件の例示のとおり

8.1.d 高速液体クロマトグラフ法(有機物を含む肥料)

(1) 概要

この試験法は有機質肥料及び有機物を含む肥料に適用する。この試験法の分類は Type D であり、その記号は 8.1.d-2017 又は Mel.d-1 とする。

水を分析試料に加えてメラミンを抽出し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、カルバモイル基を化学結合したシリカゲルカラムで分離し、波長 214 nm で測定し、分析試料中のメラミンを求める。なお、ただし、メラミン関連物質であるシアヌル酸、アンメリド及びアンメリンは測定対象成分から除く。この方法の性能は備考 4 に示す。

(2) 試薬 試薬及び水は、次による。

- a) 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水。
- b) アセトニトリル: JIS K 8032 に規定する特級又は同等の品質の試薬。なお、高速液体クロマトグラフの溶離液には高速液体クロマトグラフ用試薬を使用。
- c) リン酸塩緩衝液⁽¹⁾: JIS K 9020 に規定するりん酸水素二ナトリウム 0.237 g 及び JIS K 9009 に規定するりん酸二水素ナトリウム二水和物 0.520 g を水に溶かして 1000 mL とする⁽²⁾。高速液体クロマトグラフの溶離液に使用する場合は、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5 µm 以下)でろ過する。
- d) メラミン標準液(0.5 mg/mL): メラミン[C₃H₆N₆]⁽³⁾約 0.05 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。少量の水で溶かし、全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線まで同溶液を加える。
- e) メラミン標準液(50 µg/mL)⁽¹⁾: メラミン標準液(0.5 mg/mL) 5 mL を全量フラスコに 50 mL とり、標線までアセトニトリル-りん酸塩緩衝液(82+18)を加える。
- f) 検量線用メラミン標準液(1 µg/mL~5 µg/mL): 使用時にメラミン標準液(50 µg/mL)の 1 mL~5 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までアセトニトリル-りん酸塩緩衝液(82+18)を加える。
- g) 検量線用メラミン標準液(0.05 µg/mL~0.5 µg/mL): 使用時にメラミン標準液(1 µg/mL)の 2.5 mL~25 mL を全量フラスコ 50 mL に段階的にとり、標線までアセトニトリル-りん酸塩緩衝液(82+18)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) りん酸塩緩衝液の pH は 6.7±0.2 となる。

(3) メラミンとして標準試薬が市販されている。

備考 1. メラミンの標準試薬は富士フィルム和光純薬、関東化学及び林純薬工業より販売されている。

(3) 装置 装置は、次のとおりとする。

- a) 高速液体クロマトグラフ: JIS K 0124 に規定する高速液体クロマトグラフで次の要件を満たすもの。
 - 1) カラム: 内径 4 mm~6 mm、長さ 150 mm~250 mm のステンレス鋼のカラム管にカルバモイル基を化学結合したシリカゲルを充てんしたもの。
 - 2) カラム槽: カラム槽温度を 40 °C±1 °C で調節できるもの。
 - 3) 検出部: 吸光光度検出器で波長 214 nm 付近で測定できるもの。
- b) 超音波発生器: 超音波洗浄機を用いることができる。
- c) 遠心分離機: 1700×g で遠心分離可能なもの。

d) **高速遠心分離機**: $8000\times g\sim 10\,000\times g$ で遠心分離可能なもの。

備考 2. カラムは TSKgel Amide-80 等の名称で市販されている。メラミン、アンメリン、アンメリド及びシアヌル酸を完全に分離できることが確認されたカラムを使用すること。

(4) 試験操作

(4.1) **抽出** 抽出は、次のとおり行う。

- a) 分析試料 0.5 g を 1 mg の桁まではかりとり、200 mL 共栓三角フラスコに入れる。
- b) 水 100 mL を加え、超音波発生器を用いて約 10 分間超音波処理する。
- c) 静置後、上澄み液を 50 mL 共栓遠心沈殿管にとる。
- d) 遠心力 $1700\times g$ で約 10 分間遠心分離⁽⁴⁾、上澄み液を抽出液とする。
- e) 抽出液 5 mL⁽⁵⁾ を 50 mL 全量フラスコにとり、標線までアセトニトリル-りん酸塩緩衝液(82+18)を加えて希釈する。
- f) 希釈液を¹⁾ 1.5 mL 共栓遠心沈殿管⁽⁶⁾ にとる。
- g) 遠心力 $8000\times g\sim 10\,000\times g$ で約 5 分間遠心分離⁽⁷⁾、上澄み液を試料溶液とする。

注 (4) ローター半径 16.5 cm 及び回転数 3000 rpm で遠心力 $1700\times g$ 程度となる。

(5) 試料溶液中のメラミン等の濃度が検量線の上限を超えるおそれのある場合は、上澄み液の分取量 1 mL \sim 2.5 mL とする。

(6) ポリプロピレン製の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの

(7) ローター半径 7.2 cm \sim 8.9 cm 及び回転数 10 000 rpm で遠心力 $8100\times g\sim 10\,000\times g$ 程度となる。

備考 3. (4.1)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。

(4.2) **測定** 測定は、JIS K 0124 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の操作方法による。

a) **高速液体クロマトグラフの測定条件**: 高速液体クロマトグラフ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) **カラム**: カルバモイル基を化学結合したシリカゲルカラム(内径 4 mm \sim 6 mm、長さ 150 mm \sim 250 mm、粒径 5 μm)
- 2) **カラム槽温度**: $40\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 3) **溶離液**: アセトニトリル-りん酸塩緩衝液(82+18)
- 4) **流量**: 1 mL/min
- 5) **検出器**: 吸光光度検出器、測定波長 214 nm

b) **検量線の作成**

- 1) 各検量線用メラミン標準液 10 μL を高速液体クロマトグラフに注入し、波長 214 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク面積又は高さを求める。
- 2) 各検量線用メラミン標準液の濃度と波長 214 nm のピーク面積又は高さとの検量線を作成する。

c) 試料の測定

- 1) 試料溶液を 10 μL を **b) 1)**と同様に操作する。
- 2) 検量線からメラミンの量を求め、分析試料中のメラミンを算出する。

備考 4. 真度の評価のため、なたね油かす、大豆油かす、石灰窒素有機入り化成肥料、有機入り化成肥料及び有機入り配合肥料(各 1 銘柄)を用いて添加回収試験を実施した結果、2 % (質量分率)、0.4 % (質量分率)及び0.1 % (質量分率)の添加レベルでの平均回収率はそれぞれ 94.6 %~99.8 %、92.4 %~98.5 %及び 93.1 %~98.4 %であった。

精度の評価のため、大豆油かす及び有機入り化成肥料を用いて日を変えての反復試験の試験成績について一元配置分散分析を用いて解析し、中間精度及び併行精度を算出した結果 1 を表に示す。

なお、この試験法の定量下限は 0.02 % (質量分率)程度と推定された。

表1 メラミンの日を変えての反復試験成績の解析結果

試料名	反復試験	平均値 ²⁾	s_r ⁴⁾	RSD_r ⁵⁾	$s_{I(T)}$ ⁶⁾	$RSD_{I(T)}$ ⁷⁾
	日数(T) ¹⁾	(%) ³⁾	(%) ³⁾	(%)	(%) ³⁾	(%)
大豆油かす	5	1.91	0.03	1.7	0.04	2.2
有機入り化成肥料	5	0.100	0.001	1.4	0.002	2.5

1) 2点併行試験を実施した試験日数

2) 平均値 (試験日数(T) \times 併行試験数(2))

3) 質量分率

4) 併行標準偏差

5) 併行相対標準偏差

6) 中間標準偏差

7) 中間相対標準偏差

参考文献

- 1) 船水悦子：高速液体クロマトグラフ(HPLC)法による有機質肥料及びそれを含む肥料中のメラミンの測定，肥料研究報告，**9**，33~42 (2016)

(5) **メラミン等の試験法フローシート** 肥料中のメラミン等の試験法のフローシートを次に示す。

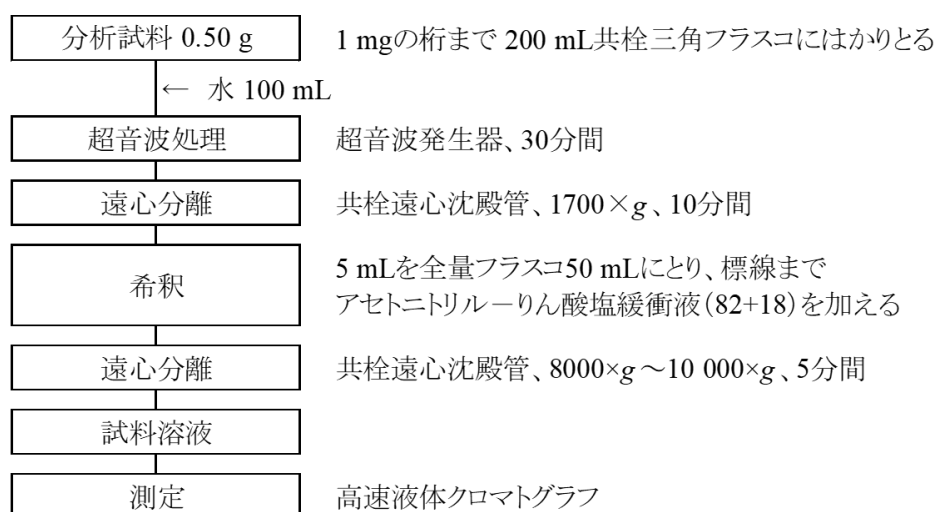
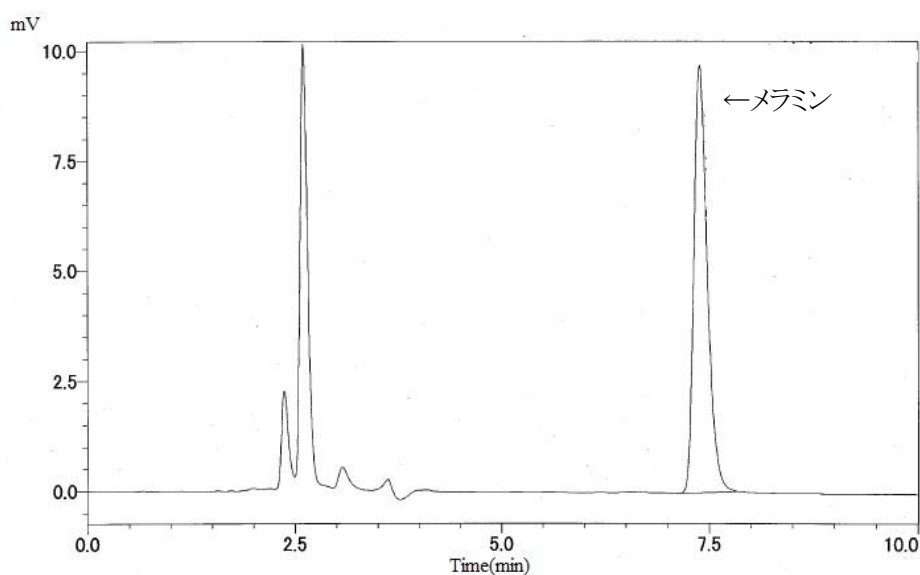


図 有機物を含む肥料中のメラミンの試験法フローシート

参考 メラミンの検量線用標準液の HPLC クロマトグラム例を次に示す。



参考図 メラミンの HPLC クロマトグラム

HPLC の測定条件

カラム: TSKgel Amide-80(内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5 μm)

メラミンの検量線用標準液(各 10 ng 相当量(1 μg/mL, 10 μL))

その他の条件は(4.2) a) HPLC の測定条件の例示のとおり

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。

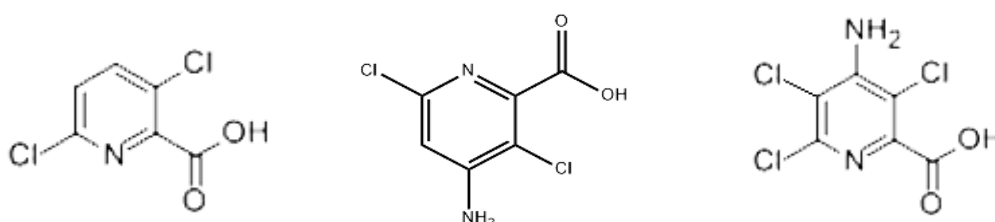


図1 クロピラリド、アミノピラリド及びピクロラムの構造式

(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(0.1 mg/mL)⁽¹⁾**: クロピラリド[C₆H₃Cl₂NO₂]⁽²⁾、アミノピラリド[C₆H₄Cl₂N₂O₂]⁽²⁾及びピクロラム[C₆H₃Cl₃N₂O₂]⁽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(0.1 mg/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ィルム和光純薬、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) **垂直往復振とう機**: フラスコ用アダプターを用いて 250 mL 全量フラスコを 300 往復/分(振幅 40 mm)で垂直往復振り混ぜさせられるもの。

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⁾、300 往復/分(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 のふるいを通して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 °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: 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
アミノピラリド	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. 牛糞堆肥(2 種類)、牛糞含有汚泥発酵肥料(2 種類)及び豚糞含有汚泥発酵肥料(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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及び 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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, アミノピラリ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の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。

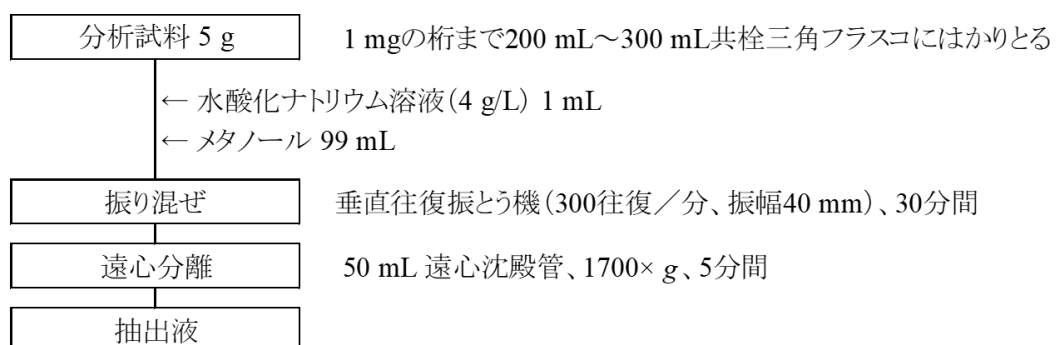


図1 堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリド及びその関連物質の試験法フローシート (抽出操作)

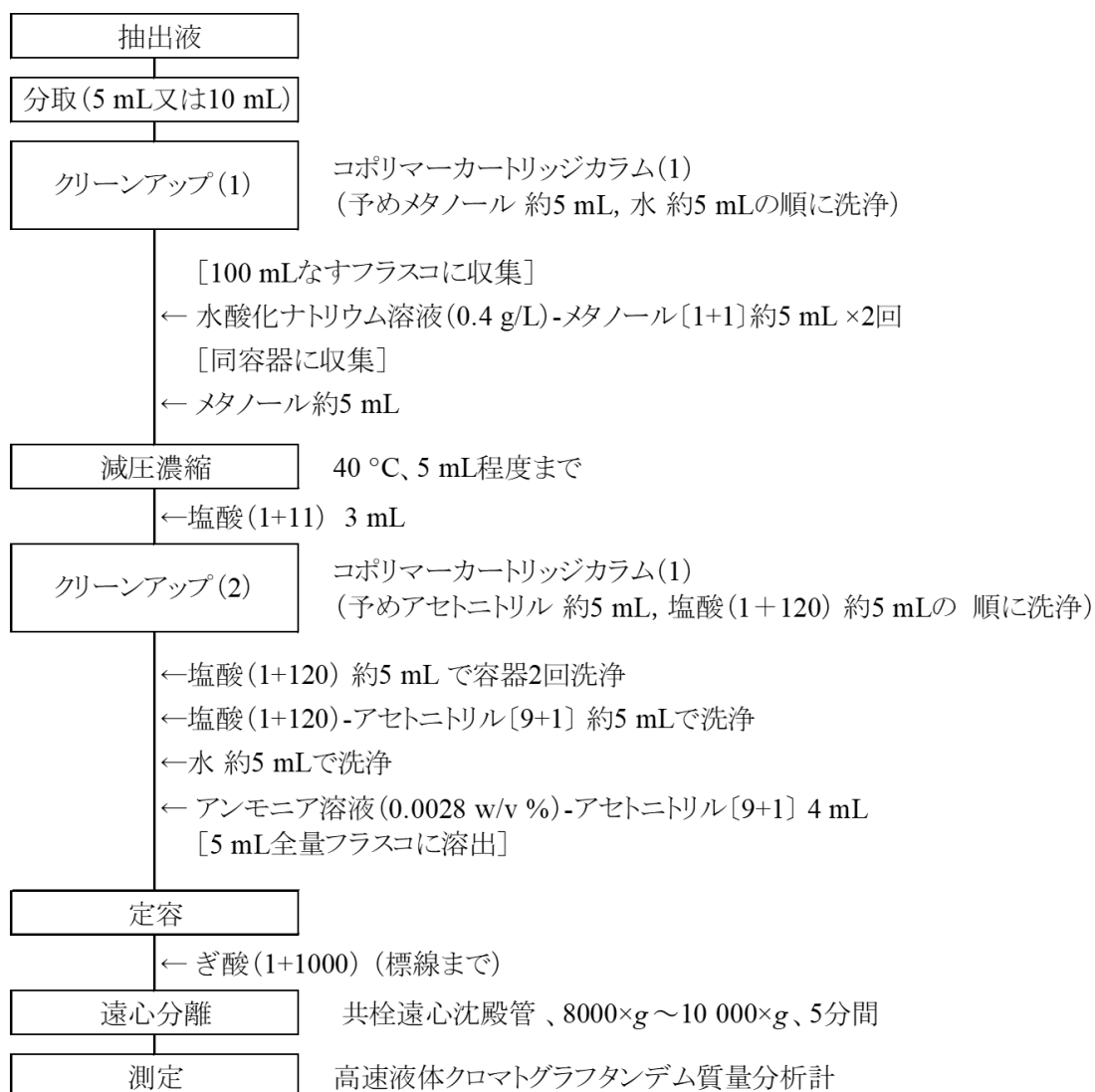
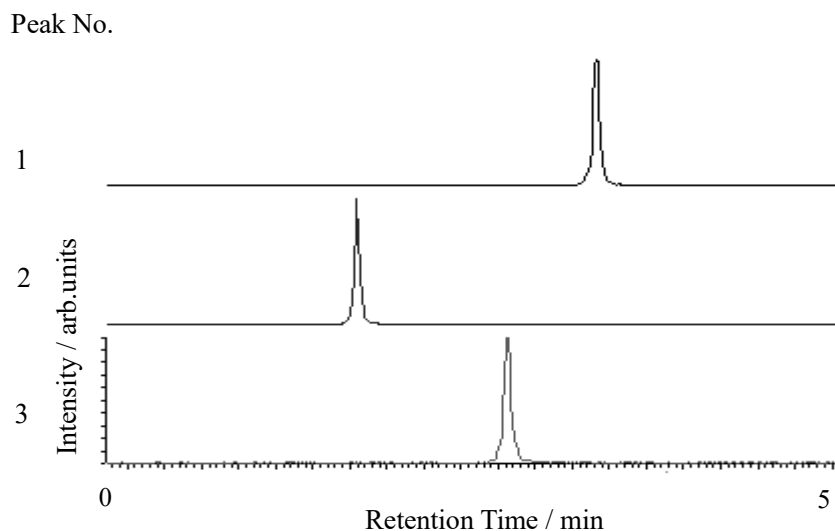


図2 堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリド及びその関連物質の試験法フローシート (クリーンアップ(1)、クリーンアップ(2)及び測定操作)

参考 検量線用混合標準液及び試料溶液(牛糞堆肥)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 (V)	コリジョン エネルギー (eV)
		プレカーサー イオン	プロダクト イオン		
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

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 8 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。

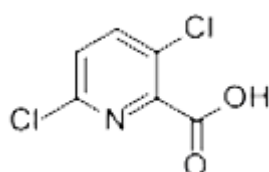


図 1 クロピラリドの構造式

(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(0.1 mg/mL)⁽¹⁾**: クロピラリド[C₆H₅C₁₂NO₂]⁽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(0.1 mg/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ィルム和光純薬、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) 垂直往復振とう機: フラスコ用アダプターを用いて 250 mL 全量フラスコを 300 往復/分(振幅 40 mm)で垂直往復振り混ぜさせられるもの。
- 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 °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 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ルート SB-60、桐山ルート 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、300 往復/分(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、300 往復/分(振幅 40 mm) 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とう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 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)⁽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に加えて流出させる。
- f) ねじ口円錐型遠心沈殿管 10 mL⁽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⁽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回繰り返す。
- 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⁽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回繰り返す。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℃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～10000×gで約5分間遠心分離⁽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10000 rpmで遠心力8100×g～10000×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 6. (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 7. 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に加えて溶か

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 °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。
- 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 8. 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、豚ふん堆肥(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
豚ふん堆肥	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) クロピラリドの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。

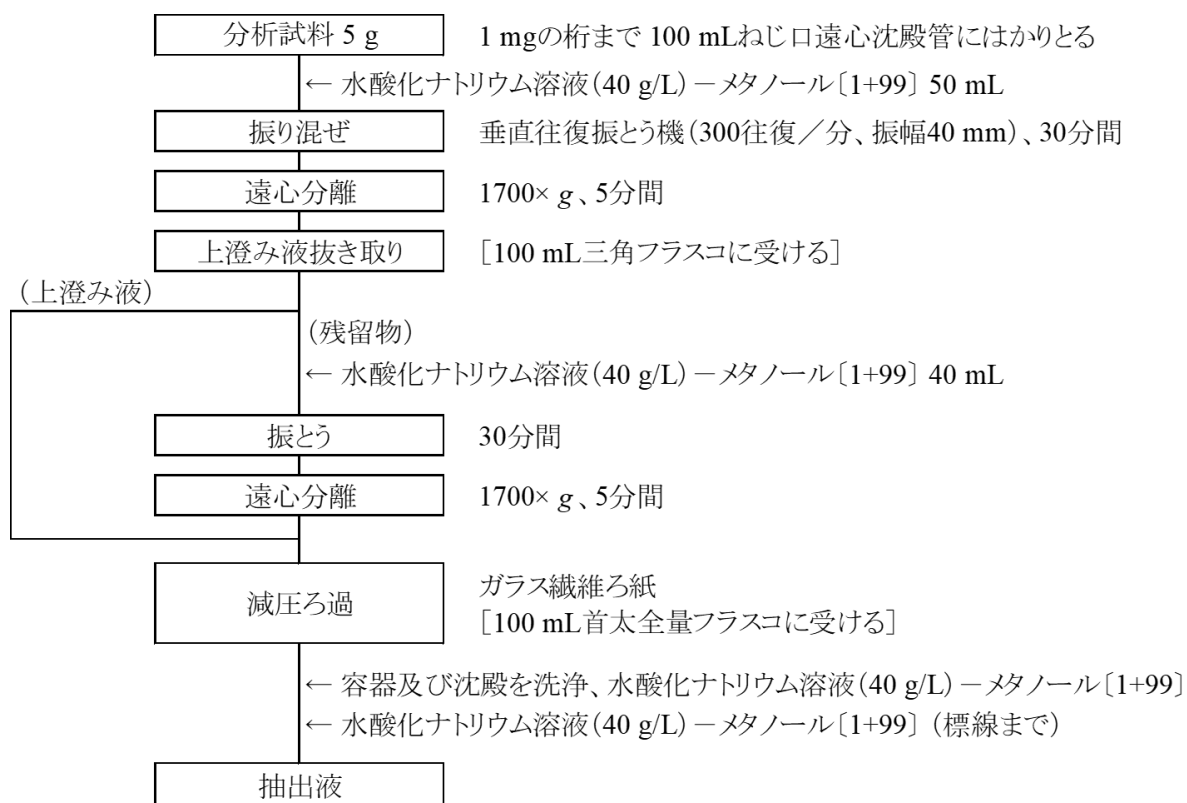


図1 堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリド試験法フローシート(抽出操作)

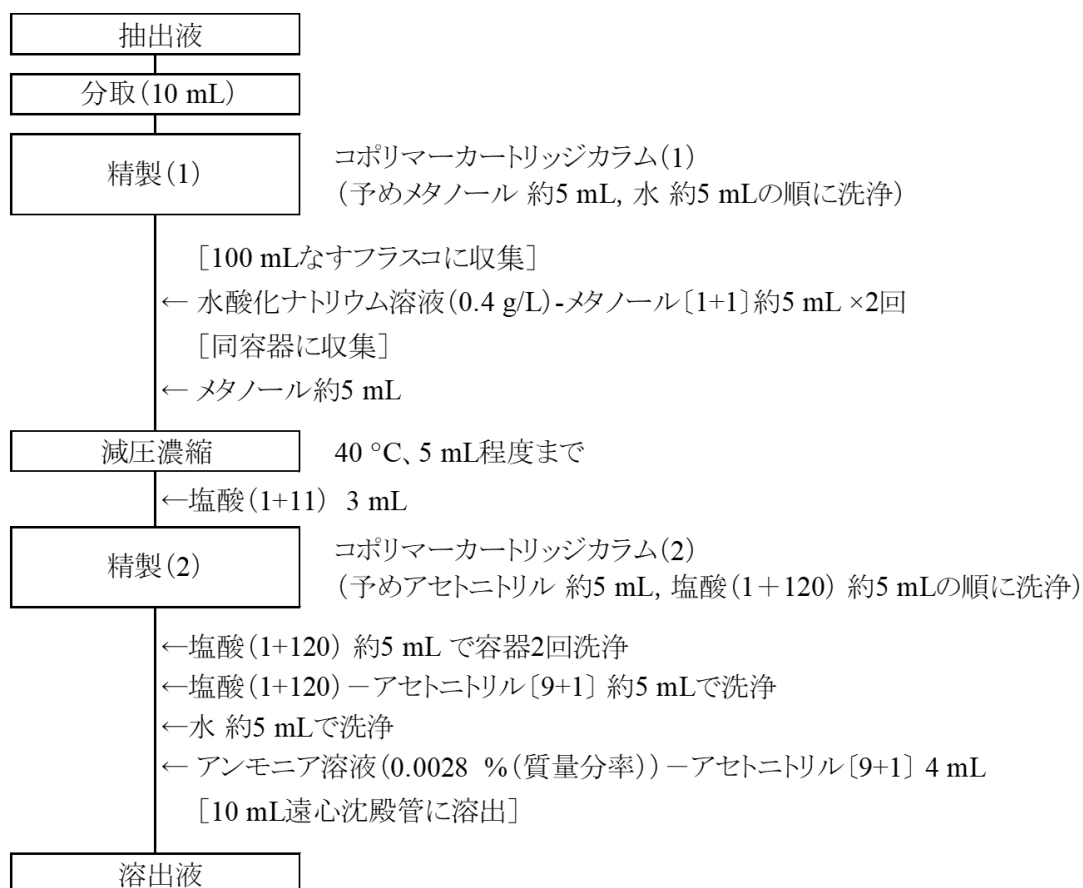


図2 堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリド試験法フローシート
(クリーンアップ(1)及びクリーンアップ(2)操作)

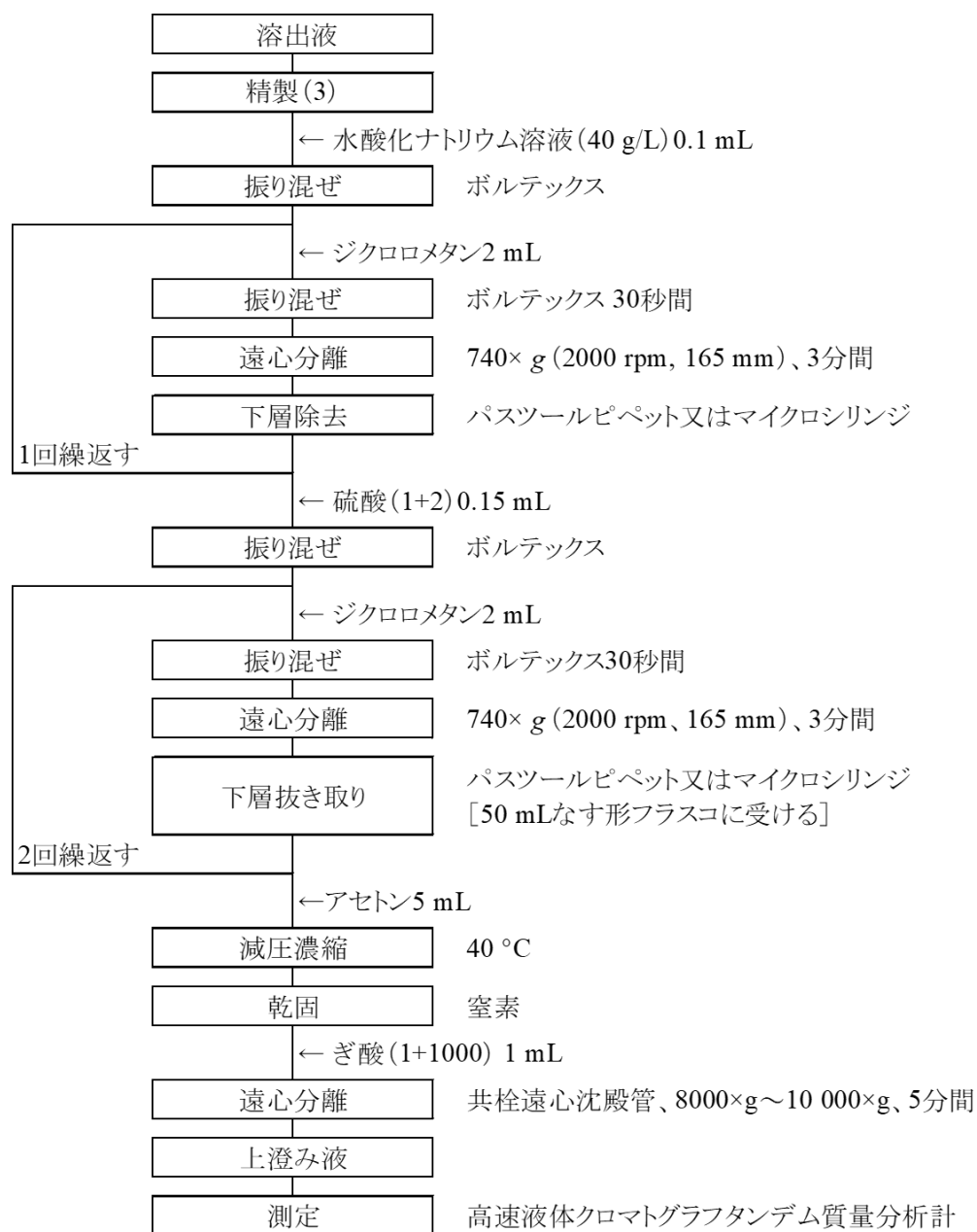
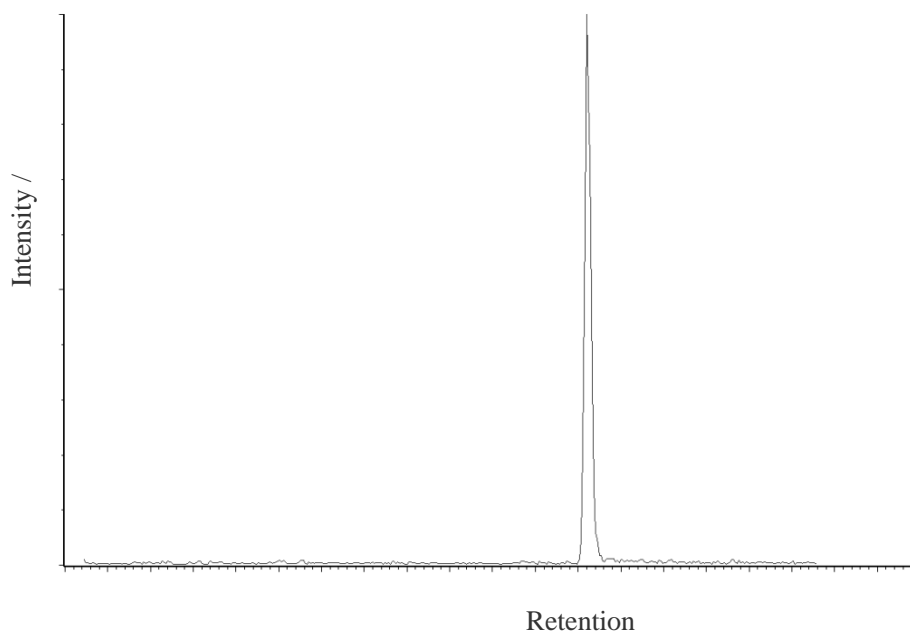


図3 堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリド試験法フローシート
(クリーンアップ(3)及び測定操作)

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 μ m)

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

コロン電圧: 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

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。

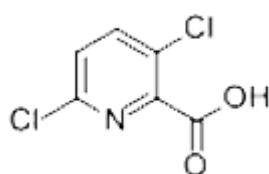


図 1 クロピラリドの構造式

(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(0.1 mg/mL)⁽¹⁾**: クロピラリド[C₆H₃Cl₂NO₂]⁽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(0.1 mg/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ィルム和光純薬、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) 垂直往復振とう機: フラスコ用アダプターを用いて全量フラスコ 250 mL を 300 往復/分(振幅 40 mm)で垂直往復振り混ぜさせられるもの。

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 °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 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)ーメタノール[1+99]25 mL を加え、300 往復/分(振幅 40 mm)で約 30 分間振り混ぜる。

- c) 遠心力約 $1700 \times g$ 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 $1700 \times g$ 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 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とう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 $1700 \times g$ 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 $740 \times g$ 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 $740 \times g$ で約 5 分間遠心分離する。
- h) 先の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⁾。
- i) 遠心力約 $740 \times g$ で約 5 分間遠心分離する⁽⁹⁾。
- j) 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。
- k) h)～j) の操作を 2 回実施する。
- l) 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。
- m) 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。
- n) 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) 使用したパストゥールピペット等は、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 $740 \times g$ 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⁽⁸⁾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]⁽⁹⁾ 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、一定量を 1.5 mL 共栓遠心沈殿管にとる⁽¹⁰⁾。
- g) 遠心力 8000×g~10 000×g で約 5 分間遠心分離し⁽¹¹⁾、上澄み液を試料溶液とする⁽¹²⁾。

注(8) 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。

(9) 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。

(10) ポリプロピレン製の共栓遠心沈殿管で測定に影響しないもの。

(11) 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。

(12) 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⁽¹³⁾。
- 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⁽¹⁴⁾。
- 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(13) 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(14) 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 $\pm 30\%$ 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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~88.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)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て日を変えての反復試験の試験成績について一元配置分散分析を用いて解析し、中間精度及び併行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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度と推定された。

表1 クロピラリドの日を変えての反復試験成績の解析結果

試料名	反復試験 日数(T) ¹⁾	平均値 ²⁾ (mg/kg)	s_r ³⁾ (mg/kg)	RSD_r ⁴⁾ (%)	$s_{I(T)}$ ⁵⁾ (mg/kg)	$RSD_{I(T)}$ ⁶⁾ (%)
牛ふん堆肥	5	87.2	3.6	4.1	3.6	4.1
豚ふん堆肥	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点併行試験を実施した試験日数

2) 平均値(試験日数(T) \times 併行試験数(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⁾ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	s_r ⁴⁾ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD_r ⁵⁾ (%)	s_R ⁶⁾ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD_R ⁷⁾ (%)
<i>m/z</i> 146 面積	鶏ふん堆肥	11(1)	5.30	0.73	13.8	1.50	28.4
	豚ふん堆肥	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
<i>m/z</i> 146 高さ	鶏ふん堆肥	11(1)	5.30	0.70	13.1	1.62	30.6
	豚ふん堆肥	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
<i>m/z</i> 110 面積	鶏ふん堆肥	11(1)	5.25	0.61	11.5	1.48	28.1
	豚ふん堆肥	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
<i>m/z</i> 110 高さ	鶏ふん堆肥	11(1)	5.19	0.63	12.2	1.26	24.3
	豚ふん堆肥	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 \times 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分析—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) **クロピラリドの試験法フローシート** 堆肥及び汚泥発酵中のクロピラリドの試験法のフローシートを次に示す。

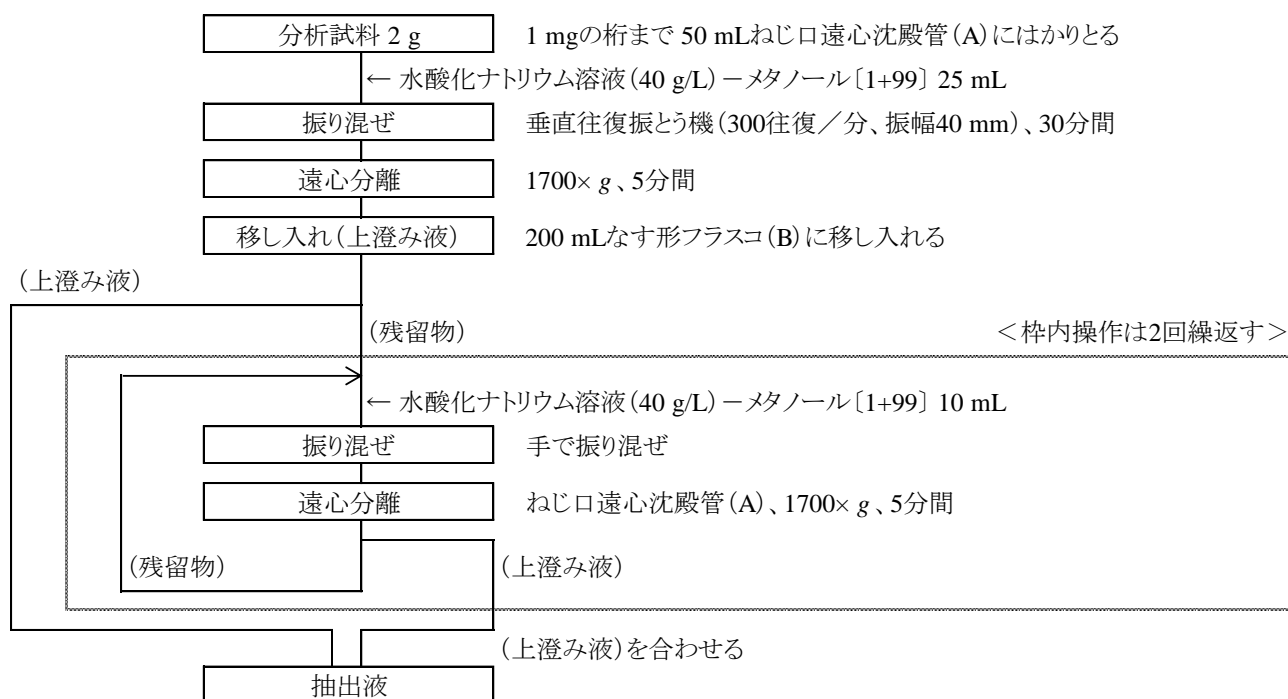


図2-1 堆肥及び汚泥肥料中のクロピラリド試験法フローシート (抽出操作)

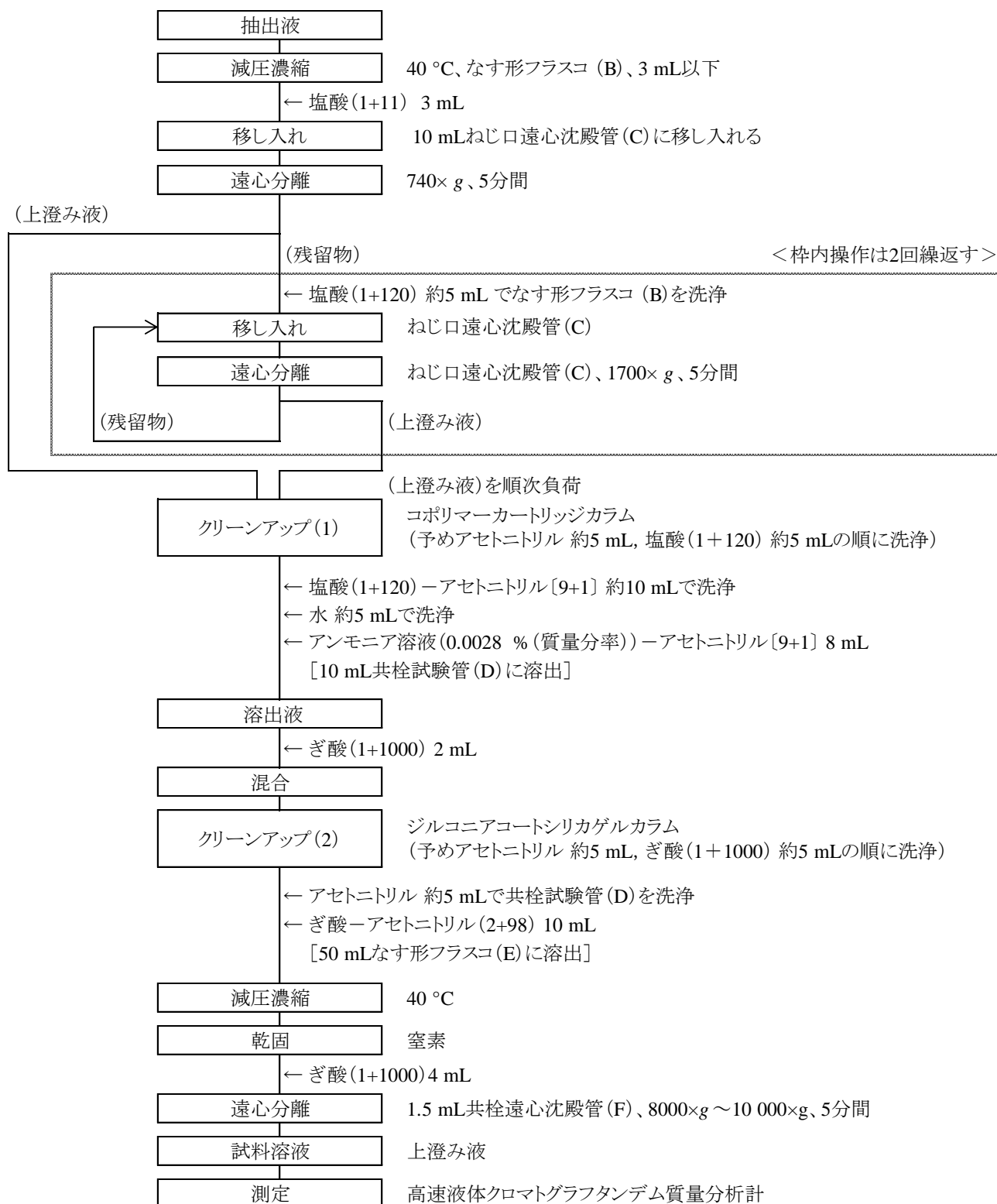
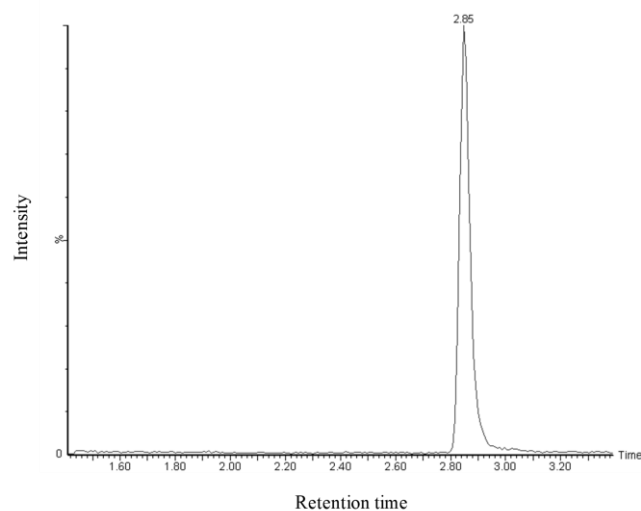


図2-2 堆肥及び汚泥肥料中のクロピラリド試験法フローシート
(クリーンアップ(1)操作、クリーンアップ(2)操作及び測定操作)

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 $^{\circ}\text{C}$

デソルベーション温度: 400 $^{\circ}\text{C}$

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