

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

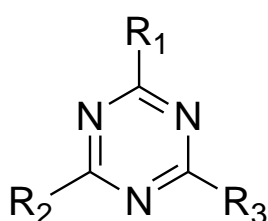


図1 メラミン及びその関連物質の構造式

(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)⁽³⁾**: 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×g~10 000×g で遠心分離可能なもの。

d) **濃縮器**: 70 °C±2 °C に調節できる遠心エバポレーター

e) **水浴**: 70 °C±2 °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×g~10 000×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×g~10 000×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濃度を求め、分析試料中の各測定対象物質濃度を算出する。

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。

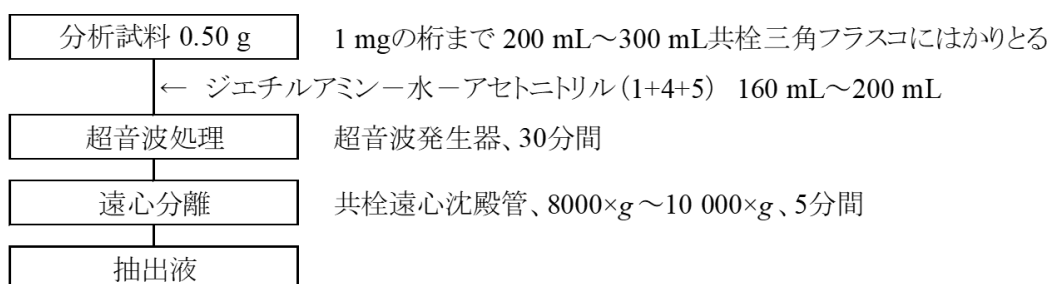


図1 肥料中のメラミン及びその関連物質の試験法フローシート(抽出操作)

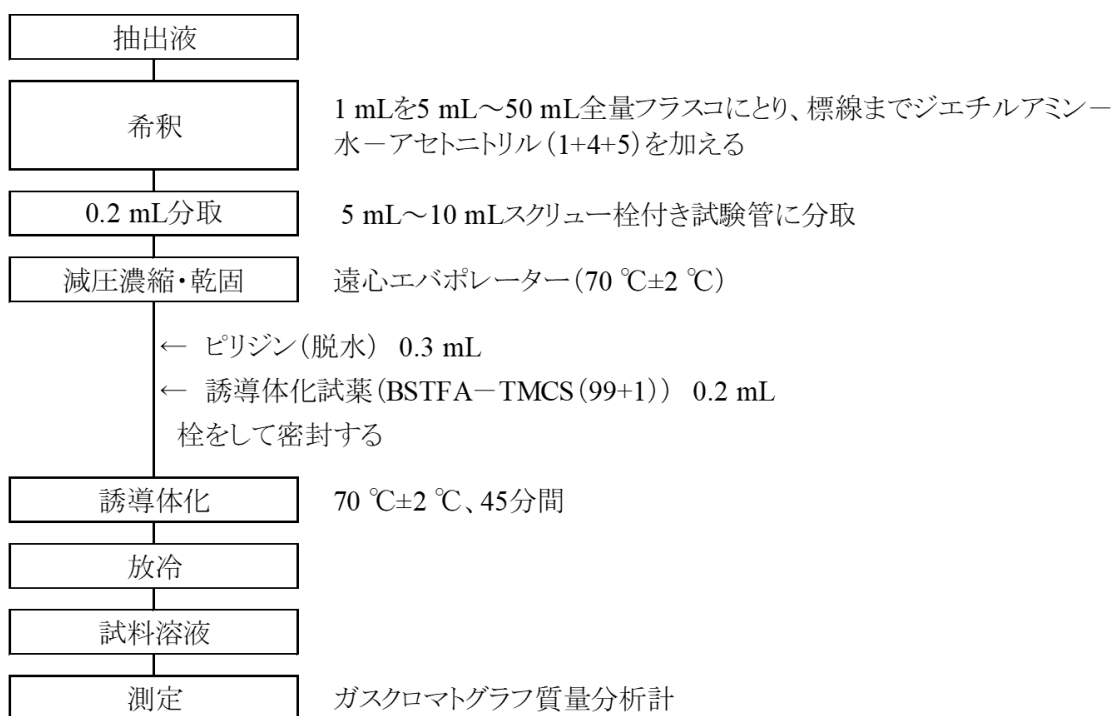


図2 肥料中のメラミン及びその関連物質の試験法フローシート(誘導体化及び測定操作)

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。

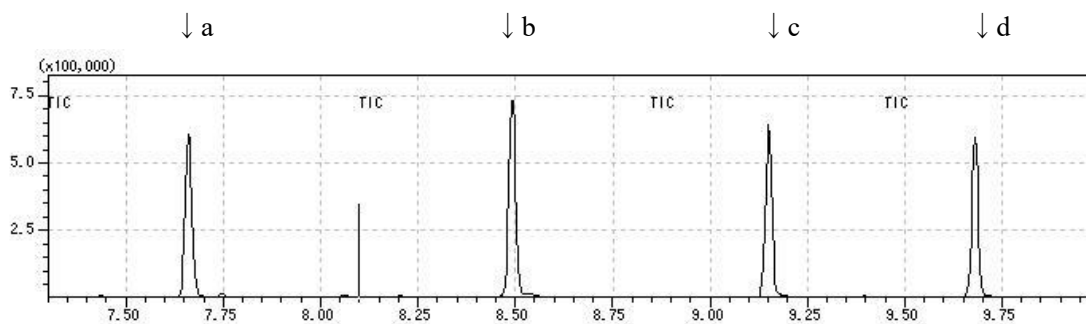


図3 メラミン及びその関連物質の GC/MS の全イオンのクロマトグラム(TIC)

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 MeI.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 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(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 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。

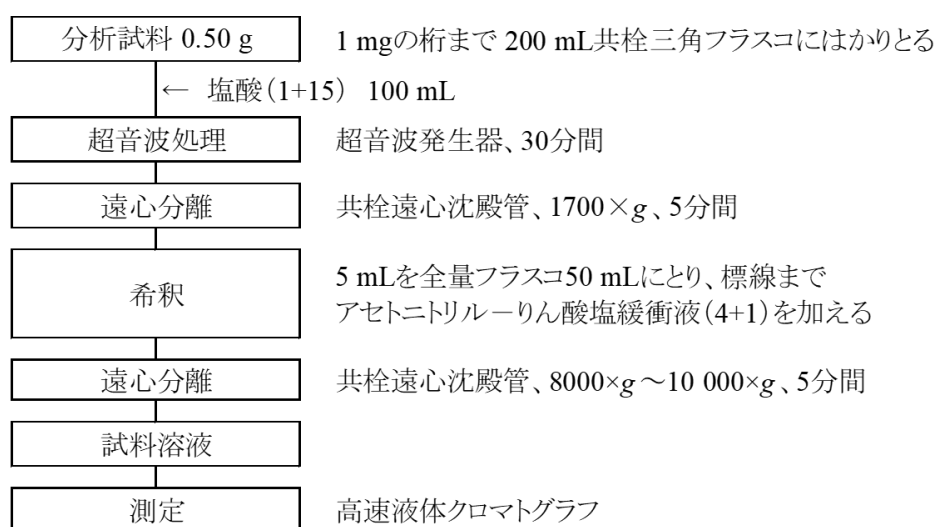
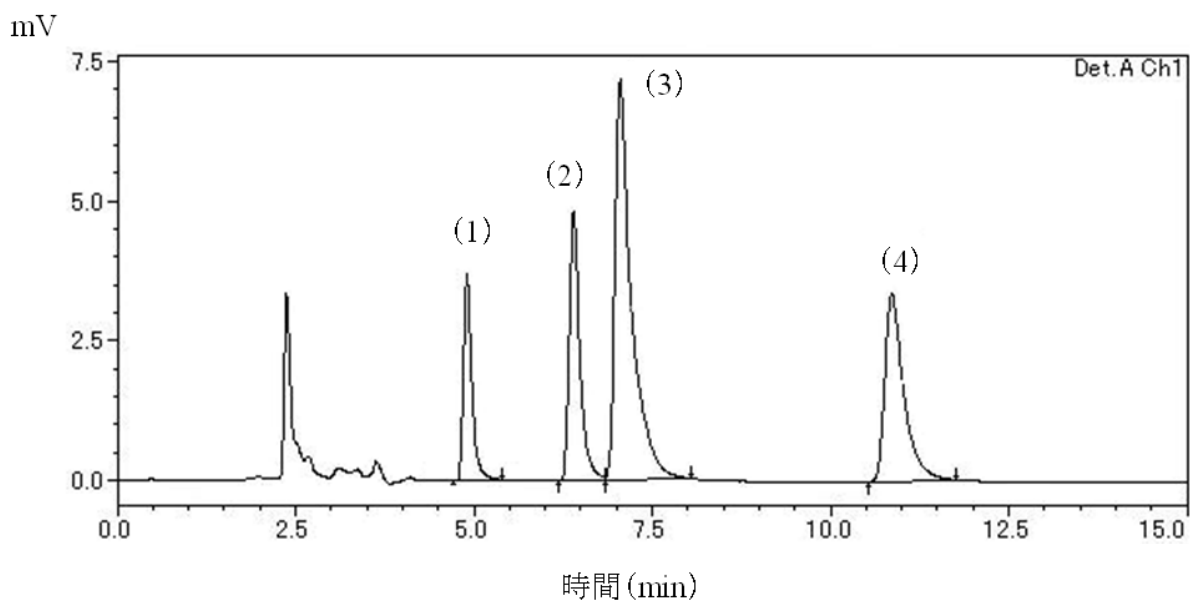


図 肥料中のメラミン及びその関連物質の試験法フローシート

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 μ L 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。

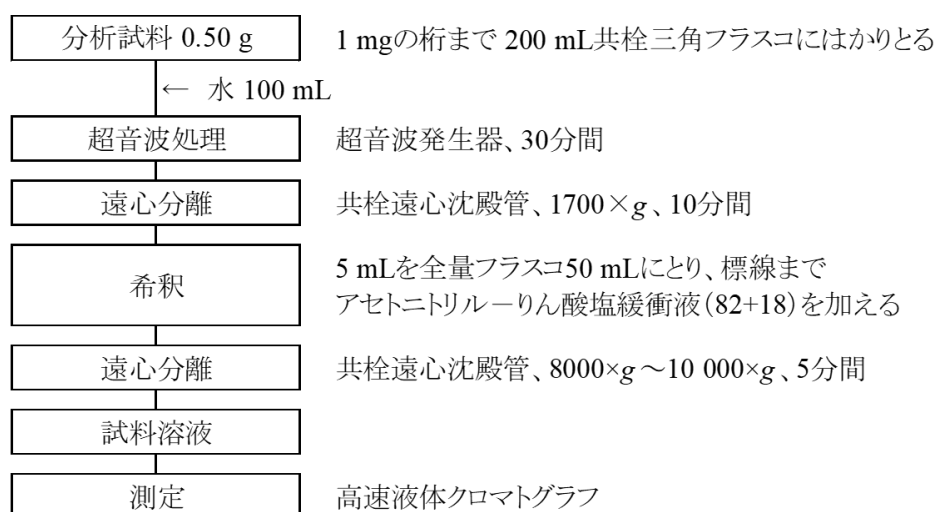
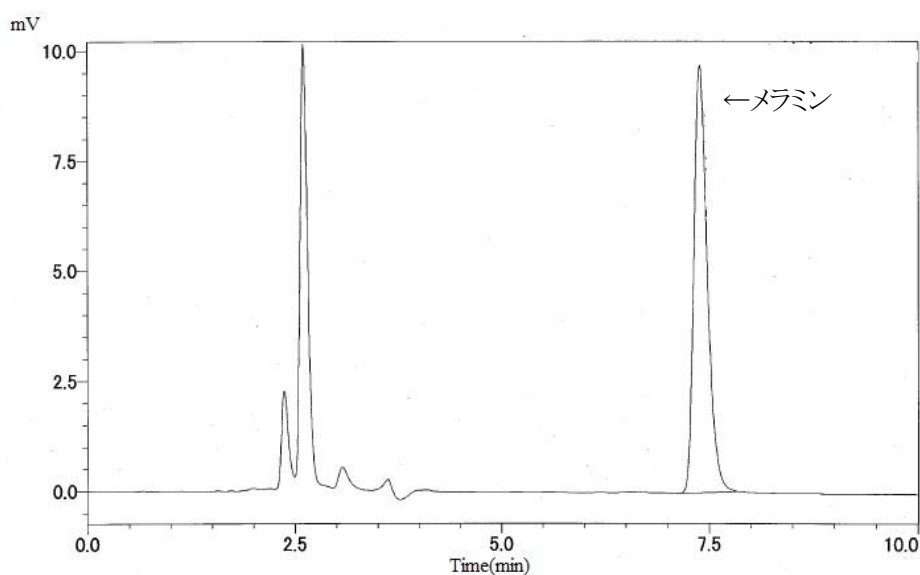


図 有機物を含む肥料中のメラミンの試験法フローシート

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。

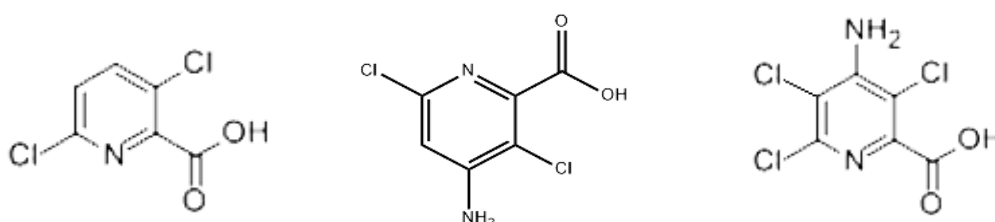


図1 クロピラリド、アミノピラリド及びピクロラムの構造式

(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。

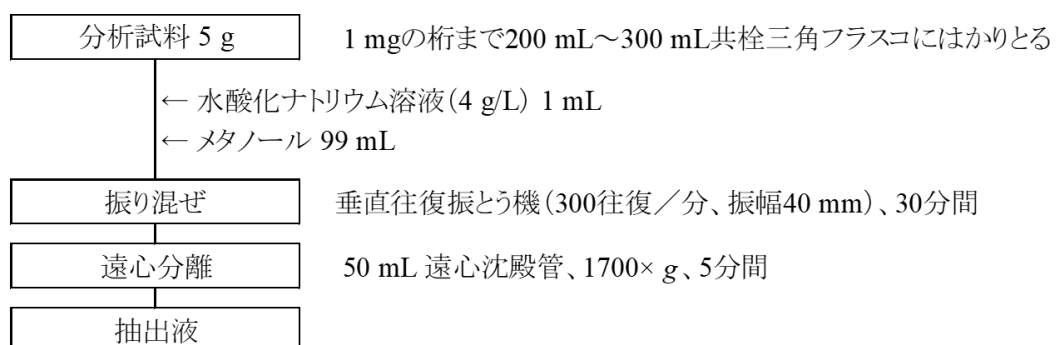


図1 堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリド及びその関連物質の試験法フローシート
(抽出操作)

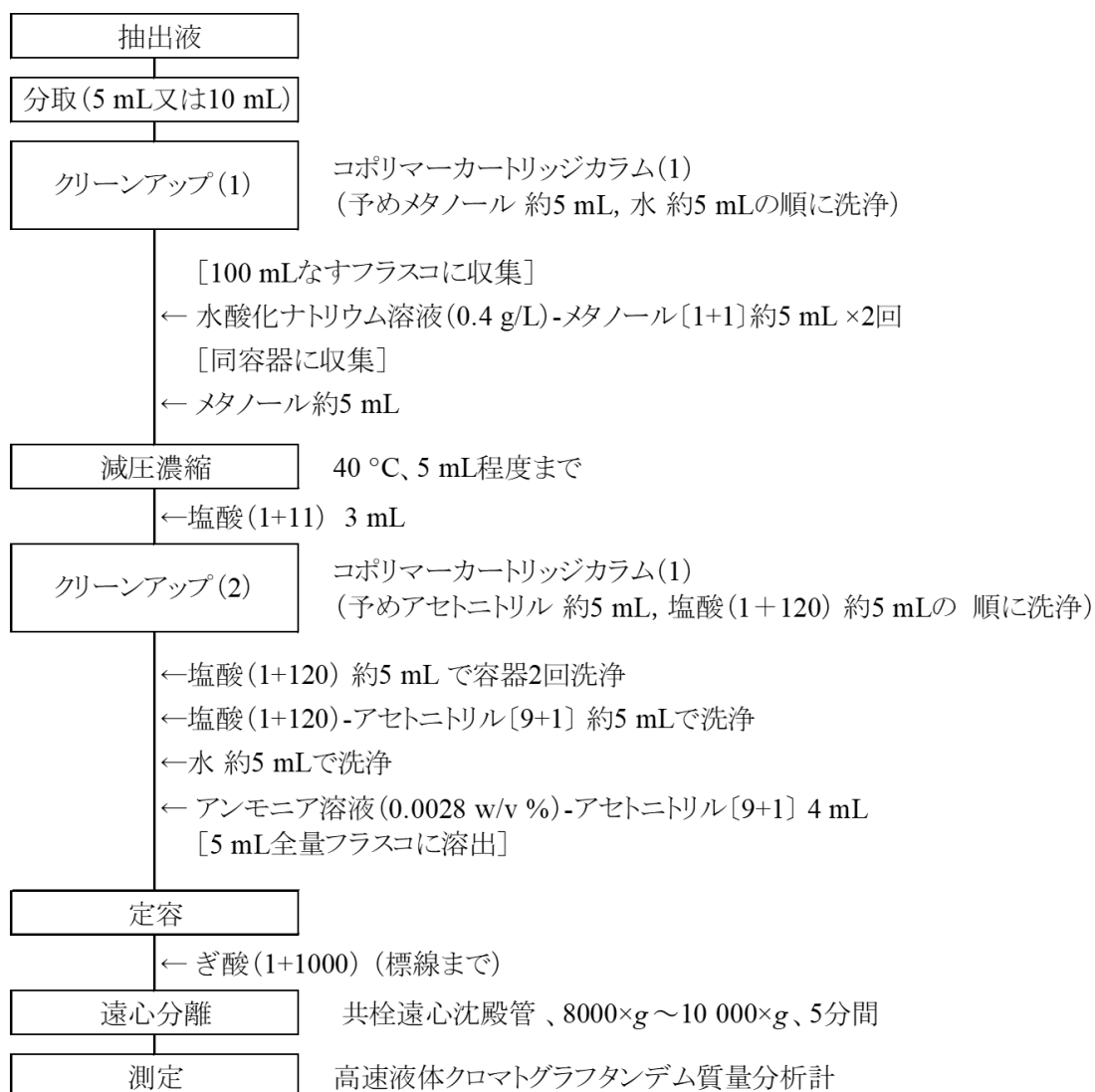
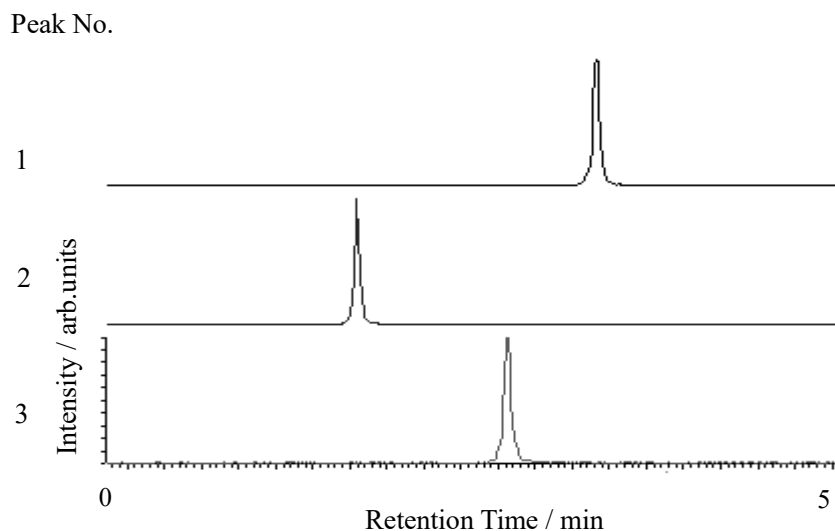


図2 堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリド及びその関連物質の試験法フローシート (クリーンアップ(1)、クリーンアップ(2)及び測定操作)

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 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 $^{\circ}$ C

デソルベーション温度: 400 $^{\circ}$ 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	プロダクト		
		イオン	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。

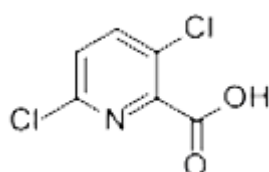


図 1 クロピラリドの構造式

(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、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)ーアセトニトリル[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)ーアセトニトリル[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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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⁾ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	s_r ³⁾ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD_r ⁴⁾ (%)	s_R ⁵⁾ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	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 \times 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。

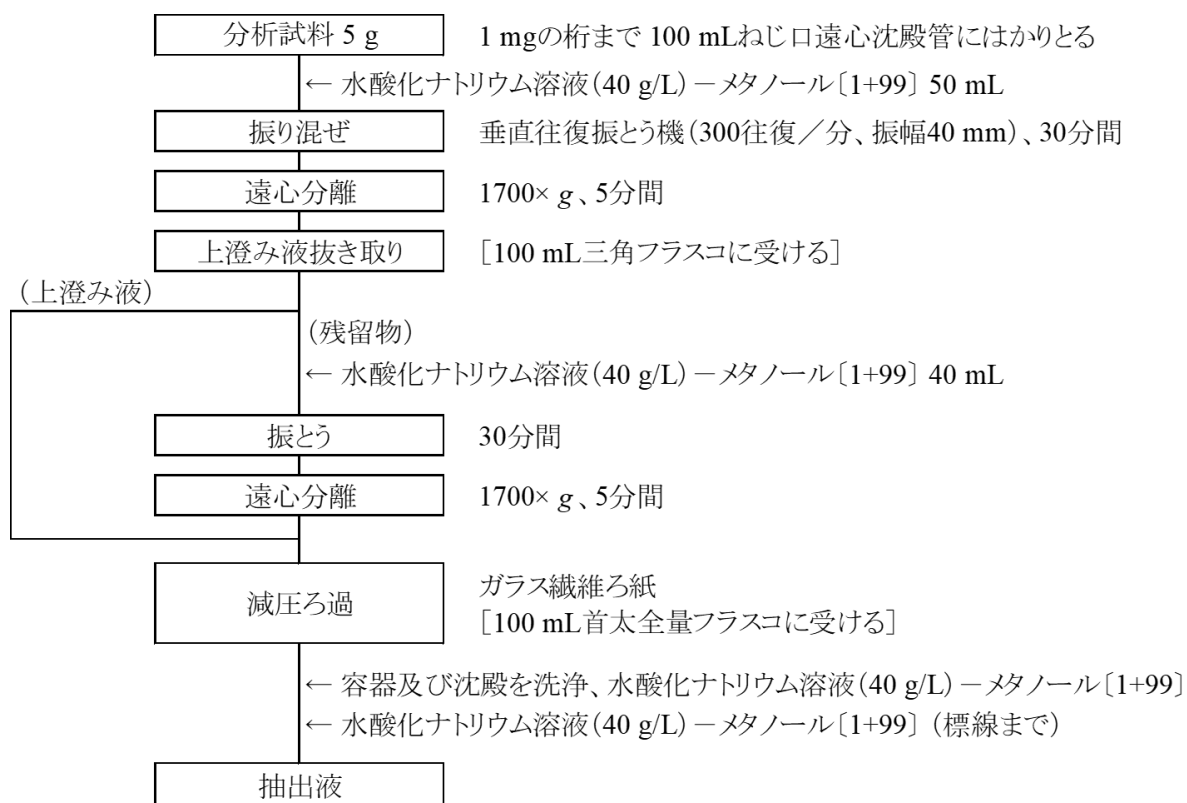


図1 堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリド試験法フローシート(抽出操作)

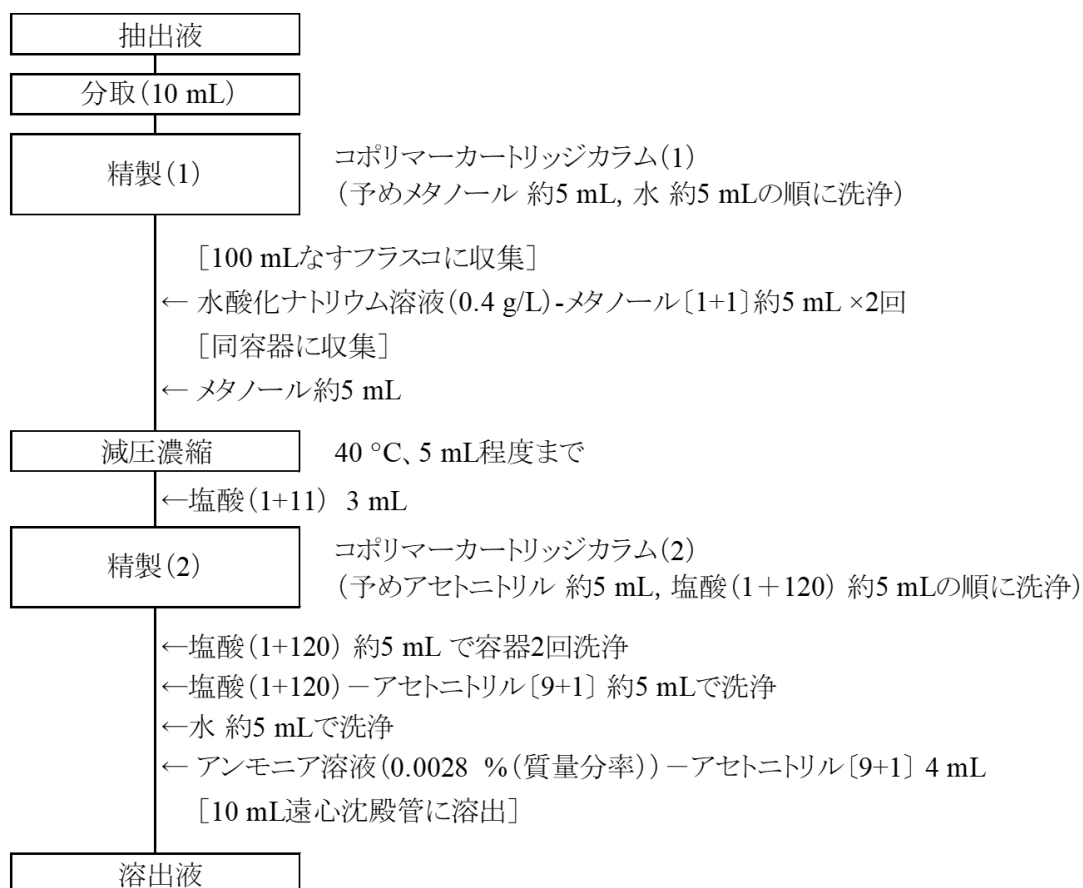


図2 堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリド試験法フローシート
(クリーンアップ(1)及びクリーンアップ(2)操作)

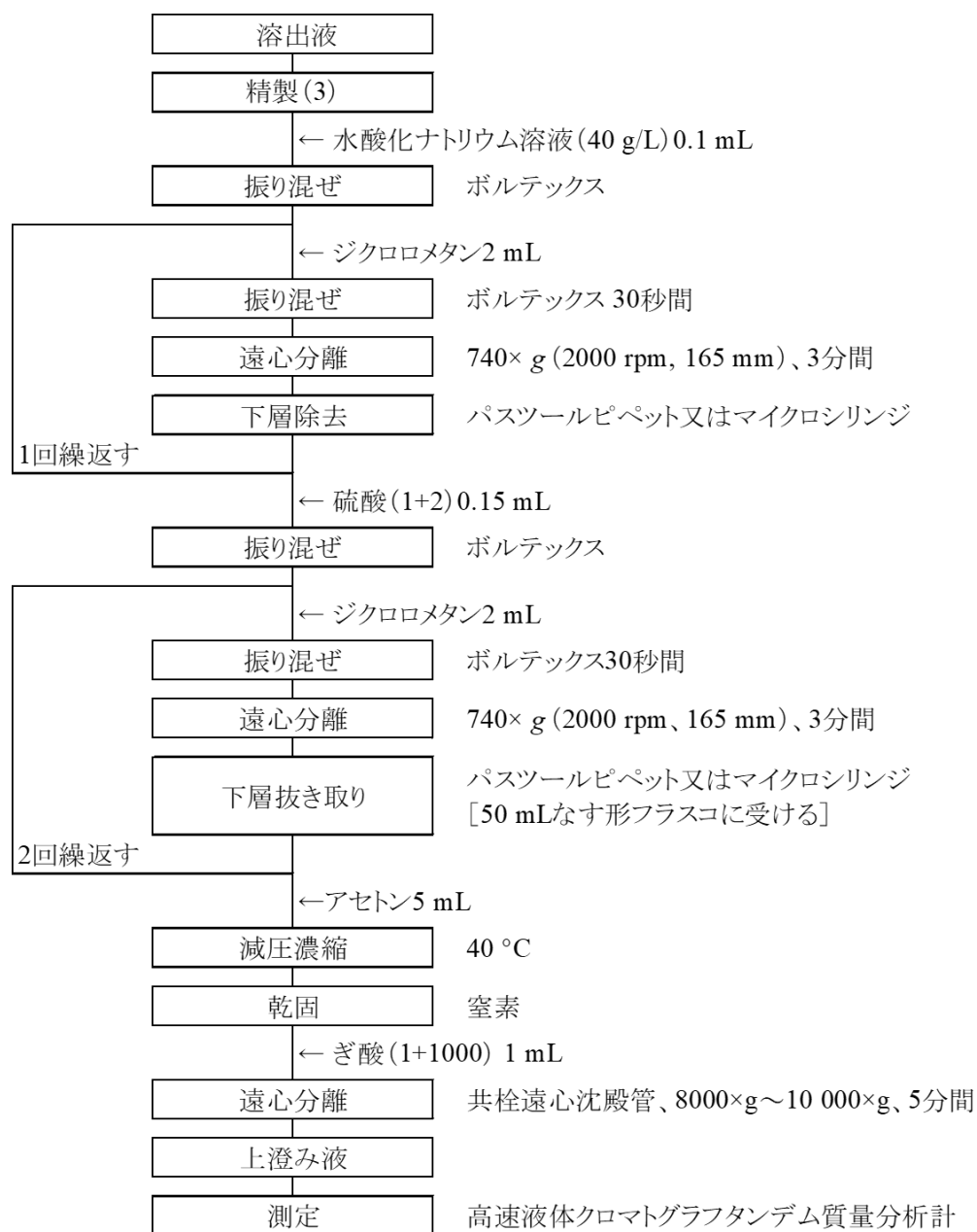
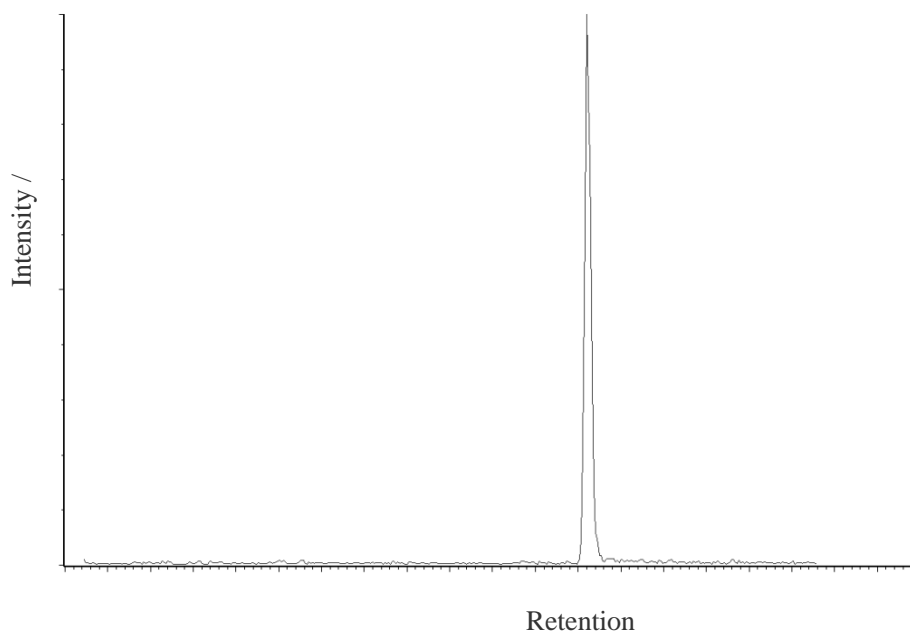


図3 堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリド試験法フローシート
(クリーンアップ(3)及び測定操作)

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 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。

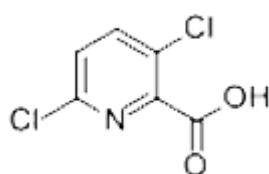


図 1 クロピラリドの構造式

(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濃度を求め、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)

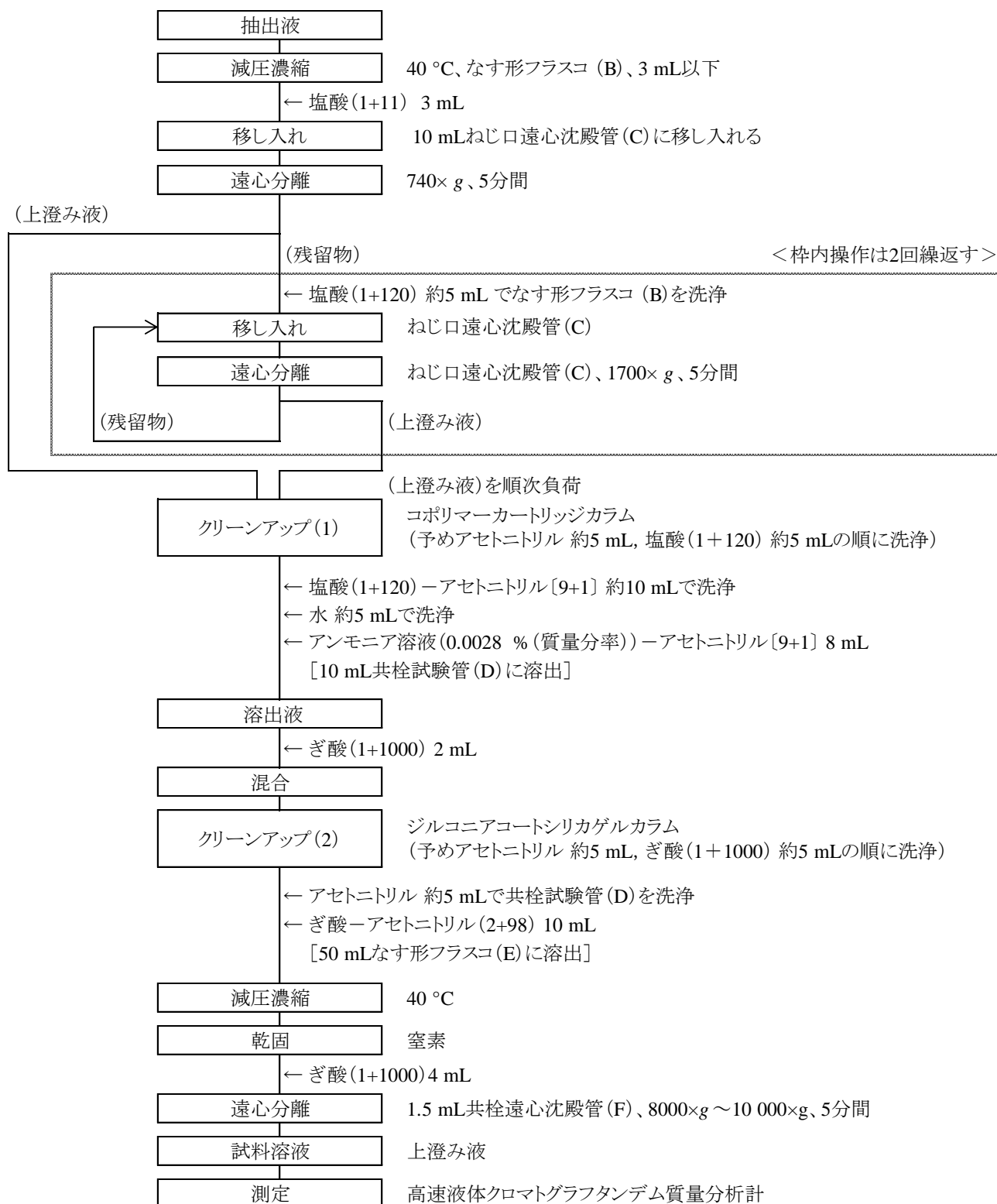
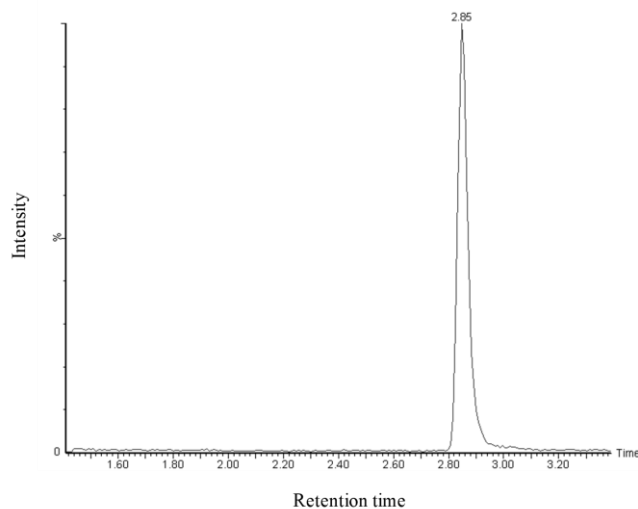


図2-2 堆肥及び汚泥肥料中のクロピラリド試験法フローシート
(クリーンアップ(1)操作、クリーンアップ(2)操作及び測定操作)

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

8.3 残留農薬(多成分)

8.3.1 残留農薬多成分分析(その1)

8.3.1.a 高速液体クロマトグラフタンデム質量分析法

(1) **分析対象化合物** アバメクチン: アバメクチン B1a、イベルメクチン: 22, 23-ジヒドロアベルメクチン B1a(別名イベルメクチン B1a)、エプリノメクチン: エプリノメクチン B1a、ロテノン: ロテノン、ピペロニルブトキシド: ピペロニルブトキシド、ピレトリン: ピレトリン I 及びピレトリン II

(2) 概要

この試験法は液状の家庭園芸用複合肥料及び液状複合肥料に適用する。この試験法の分類は Type B であり、その記号は 8.3.1.a-2017 又は AG-C-1.a-1 とする。

肥料中の各農薬をアセトニトリル及び水にて溶解・抽出し、二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、分析試料中の分析対象化合物を求める。なお、この試験法の性能は**備考 3**に示す。

(3) **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) **メタノール**: JIS K 8891 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) **酢酸エチル**: JIS K 8361 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- f) **トルエン**: JIS K 8680 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- g) **ギ酸アンモニウム**: 特級(純度 95 % (質量分率) 以上)又は同等の品質の試薬。
- h) **ギ酸アンモニウム溶液(0.1 mol/L)**⁽¹⁾: ギ酸アンモニウム 6.306 g を水 1000 mL に加える。
- i) **ギ酸アンモニウム溶液(0.1 mmol/L)**⁽¹⁾: ギ酸アンモニウム溶液(0.1 mol/L) 1 mL を水 1000 mL に加える。
- j) **ギ酸**: JIS K 8264 に規定する特級又は同等の品質の試薬。
- k) **ギ酸溶液(0.1 v/v%)**⁽¹⁾: ギ酸 1 mL を水 1000 mL に加える。
- l) **ギ酸アセトニトリル溶液(0.1 v/v%)**⁽¹⁾: ギ酸 1 mL をアセトニトリル 1000 mL に加える。
- m) **各農薬標準液(0.1 mg/mL)**⁽¹⁾: アバメクチン[C₄₈H₇₂O₁₄]⁽²⁾、イベルメクチン[C₄₈H₇₄O₁₄]⁽²⁾、エプリノメクチン[C₅₀H₇₅NO₁₄]⁽²⁾、ロテノン[C₂₃H₂₂O₆]⁽²⁾、ピペロニルブトキシド[C₁₉H₃₀O₅]⁽²⁾及びピレトリン[ピレトリン I :C₂₁H₂₈O₃ 及びピレトリン II :C₂₂H₂₈O₅]⁽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。少量のメタノールで溶かし、全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線まで同溶媒を加える(ただし、ピレトリンに関してはピレトリン I・II の含量として 0.1 mg/mL を含有する。)
- n) **混合標準液(10 µg/mL)**: 各農薬標準液 10 mL を 100 mL 全量フラスコに移し入れ、標線までメタノールを加える。
- o) **混合標準液(1000 ng/mL)**: 混合標準液(10 µg/mL) 10 mL を 100 mL 全量フラスコに移し入れ、標線までメタノールを加える。
- p) **検量線用混合標準液(50 ng/mL~500 ng/mL)**: 使用時に混合標準液(1000 ng/mL)の 2.5 mL~25 mL を 50 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線までメタノールを加える。

q) **検量線用混合標準液(5 ng/mL~50 ng/mL)**: 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、標線までメタノールを加える。

- 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 1. 各農薬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等より販売されている。

(4) **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~3.0 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⁽³⁾。

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) **超音波発生器**: 超音波洗浄器を用いることができる。

c) **濃縮器**: 40°Cまで調節できるエバポレーター

d) **多孔性けいそう土カートリッジカラム**: 多孔性けいそう土を充てんしたもの(保持容量5 mL)⁽⁴⁾

e) **グラファイトカーボン-NH₂積層カートリッジカラム**: グラファイトカーボン500 mg及びアミノプロピルシリル化シリカゲル500 mgを6 mL注射筒に積層したもの⁽⁵⁾

注(3) ACQUITY UPLC HSS C18等の名称で市販されている。

(4) Chem Elut (5 mL)等の名称で市販されている。

(5) Envi-carb/LC-NH₂ (500 mg/500 mg, 6 mL)等の名称で市販されている。

(5) **試験操作**

(5.1) **抽出** 抽出は、次のとおり行う。

a) 分析試料5.00 mL⁽⁶⁾を、10 mL 全量フラスコに入れる。

b) アセトニトリル3 mLを同全量フラスコに加え、標線まで水を加えてよく振り混ぜる。

c) 超音波発生器を用いて5分間超音波処理をし⁽⁷⁾、抽出液とする。

注(6) 試料の比重を量り測定終了後、分析試料中の対象物質濃度を算出する。

(7) 超音波処理の結果、溶液の体積が膨張することがあるので注意する。膨張の際にはしばらく常温にて放置するとよい。

備考 2. 比重(密度)の測定は10 mL 全量フラスコを電子天秤に乗せ、ゼロ合わせを行い、分析試料5.00 mLを当該フラスコに入れ、秤量値を読み取り算出することができる。

(5.2) クリーンアップ(1) クリーンアップ(1)は、次のとおり行う。

- a) 抽出液 5 mL を、多孔性けいそう土カートリッジカラムに入れ、約 5 分間保持させる。
- b) 100 mL なすフラスコを同カートリッジカラムの下に置き、酢酸エチル約 5 mL を 4 回、順次同カートリッジカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで溶出させる⁽⁸⁾。
- c) 溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固し⁽⁹⁾、アセトニトリル-トルエン(3+1) 2 mL を加えて残留物を溶かす。

注(8) 試験導入前には溶出確認をすること。

(9) 乾固させすぎると農薬が揮散するおそれがある。

(5.3) クリーンアップ(2) クリーンアップ(2)は、次のとおり行う。

- a) グラファイトカーボン-NH₂ 積層カートリッジカラムを予めアセトニトリル-トルエン(3+1)約 10 mL で洗浄する。
- b) 100 mL なすフラスコを同カートリッジカラムの下に置き、(5.2)c) の溶解液を同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) 容器をアセトニトリル-トルエン(3+1)約 5 mL で 5 回洗浄し、洗液を順次同カートリッジに加え流出させる。
- d) 流出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固し⁽¹⁰⁾、メタノール 5 mL⁽¹¹⁾を加えて残留物を溶かす。溶解液の一定量を正確にとり、メタノールで正確に 5 倍に希釈し、当該溶液を試料溶液とする。

注(10) 乾固させすぎると農薬が揮散するおそれがある。

(11) 試料溶液中の各農薬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メタノールで希釈する。

(5.4) 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: ぎ酸アンモニウム溶液(0.1 mmol/L) - ぎ酸溶液(0.1 v/v%) [1+1]
B: ぎ酸アセトニトリル溶液(0.1 v/v%)
- ④ グラジエント: 0 min (50 %B) → 15 min (95 %B) → 20 min (98%B) → 30 min (50 %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)
アバメクチンB1a	891	305	567
イベルメクチンB1a	893	307	551
エプリノメクチンB1a	915	186	298
ロテノン	395	213	192
ピペロニルブトキシド	356	177	147
ピレトリン I	329	161	133
ピレトリン II	373	161	133

b) 検量線の作成

- 1) 各検量線用混合標準液 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、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する。
- 2) 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。
- 3) 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。検量線の作成は、試料の測定時に行う。

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⁽¹²⁾。
- 2) ピーク面積又は高さから検量線より測定対象物質濃度を求め、分析試料中の測定対象物質濃度を算出する。

注(12) 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。

(5.5) 計算

次の式によって分析試料中の各農薬濃度を算出する。

$$\text{分析試料中の各農薬濃度 } (\mu\text{g/kg}) = (A \times B \times 10) / C$$

A: 検量線から求めた最終試料溶液中の各測定対象物質濃度 (ng/mL)

B: 検量線上限を超えたために最終試料溶液をさらに希釈した場合の希釈倍率

C: 分析試料における比重(密度) (g/mL)

備考 3. 液状の家庭園芸用複合肥料(3種類)、液状複合肥料(2種類)の回収試験の結果は、4000 $\mu\text{g/kg}$

及び 400 µg/kg(ただし、ピレトリンに関してはピレトリン I・II の含量として 4000 µg/kg 及び 400 µg/kg) の添加レベルで平均回収率が 77.0 %~104.5 %及び 85.6 %~107.9 %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、この試験法の各農薬の定量下限は 10 µg/kg 程度と推定された。

表2 残留農薬多成分分析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)	添加量 (µg/kg)	回収率 (%)	RSD _r ³⁾ (%)	RSD _R ⁴⁾ (%)
アバメクチン Bla	家庭園芸用複合肥料1	8(0)	286.8	333.3	86.1	13.3	14.4
	家庭園芸用複合肥料2	8(0)	358.9	416.7	86.1	13.4	14.8
	家庭園芸用複合肥料3	8(0)	425.8	500.0	85.2	8.6	11.6
	液状複合肥料1	8(0)	288.6	333.3	86.6	7.1	8.5
	液状複合肥料2	8(0)	405.5	500.0	81.1	7.1	7.2
イベルメクチン Bla	家庭園芸用複合肥料1	8(0)	298.9	333.3	89.7	14.9	15.0
	家庭園芸用複合肥料2	8(0)	382.5	416.7	91.8	14.1	19.3
	家庭園芸用複合肥料3	8(0)	431.1	500.0	86.2	9.8	10.9
	液状複合肥料1	8(0)	298.8	333.3	89.6	10.1	12.8
	液状複合肥料2	8(0)	405.2	500.0	81.0	3.8	5.8
エプリノメクチン Bla	家庭園芸用複合肥料1	8(0)	293.5	333.3	88.1	7.0	10.4
	家庭園芸用複合肥料2	8(0)	361.9	416.7	86.9	9.2	14.3
	家庭園芸用複合肥料3	8(0)	425.3	500.0	85.1	7.0	10.0
	液状複合肥料1	8(0)	277.3	333.3	83.2	9.0	12.0
	液状複合肥料2	8(0)	398.2	500.0	79.6	7.5	11.6
ロテノン	家庭園芸用複合肥料1	8(0)	276.8	333.3	83.1	5.7	7.8
	家庭園芸用複合肥料2	8(0)	353.5	416.7	84.8	9.8	12.5
	家庭園芸用複合肥料3	8(0)	426.6	500.0	85.3	6.6	8.5
	液状複合肥料1	8(0)	263.5	333.3	79.1	11.0	12.3
	液状複合肥料2	8(0)	385.2	500.0	77.0	5.7	12.1

1) 有効試験室数(外れ値を報告した試験室数)

2) 平均値(n =有効試験室数×試料数(2))

3) 併行相対標準偏差

4) 室間再現相対標準偏差

表2 (続き)

農薬名	試料名	試験 室数 ¹⁾	平均値 ²⁾ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回収率 (%)	RSD_r ³⁾ (%)	RSD_R ⁴⁾ (%)
ピペロニル ブトキシド	家庭園芸用複合肥料肥料1	8(0)	318.2	333.3	95.5	8.1	13.2
	家庭園芸用複合肥料肥料2	8(0)	395.6	416.7	94.9	8.4	13.6
	家庭園芸用複合肥料肥料3	8(0)	450.3	500.0	90.1	4.6	9.3
	液状複合肥料1	8(0)	299.7	333.3	89.9	7.4	11.0
	液状複合肥料2	8(0)	435.8	500.0	87.2	5.8	7.4
ピレトリン I	家庭園芸用複合肥料肥料1	8(0)	160.7	186.0	86.4	9.3	11.9
	家庭園芸用複合肥料肥料2	8(0)	202.2	232.5	87.0	12.6	12.8
	家庭園芸用複合肥料肥料3	8(0)	228.6	279.0	81.9	5.4	8.8
	液状複合肥料1	8(0)	158.2	186.0	85.1	6.8	10.4
	液状複合肥料2	8(0)	223.1	279.0	80.0	8.5	9.1
ピレトリン II	家庭園芸用複合肥料肥料1	8(0)	131.1	147.3	89.0	6.5	9.7
	家庭園芸用複合肥料肥料2	8(0)	163.2	184.2	88.6	10.8	13.6
	家庭園芸用複合肥料肥料3	8(0)	182.0	221.0	82.4	5.4	8.9
	液状複合肥料1	8(0)	126.2	147.3	85.7	7.8	11.4
	液状複合肥料2	8(0)	180.2	221.0	81.5	6.3	8.3

1) 有効試験室数(外れ値を報告した試験室数)

3) 併行相対標準偏差

2) 平均値(n =有効試験室数 \times 試料数(2))

4) 室間再現相対標準偏差

参考文献

- 1) 八木寿治, 山西正将, 白井裕治: 液体クロマトグラフトンデム型質量分析計(LC/MS/MS)による液状肥料中の農薬の同時測定, 肥料研究報告, **4**, 36~48 (2011)
- 2) 八木寿治, 山西正将, 白井裕治, 柴田政人: 液体クロマトグラフトンデム型質量分析計(LC-MS/MS)による液状肥料中の6種農薬の同時測定 -共同試験成績-, 肥料研究報告, **5**, 48~59 (2012)

(6) **6種農薬一斉試験法フローシート** 肥料中の6種農薬の一斉試験法のフローシートを次に示す。

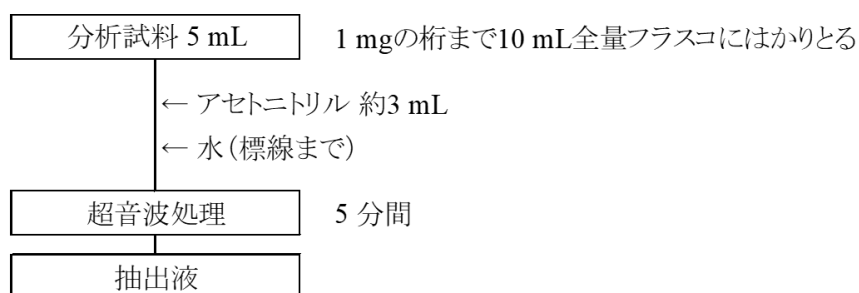


図1 肥料中の残留農薬多成分分析(その1:6種農薬の一斉試験法)フローシート(抽出操作)

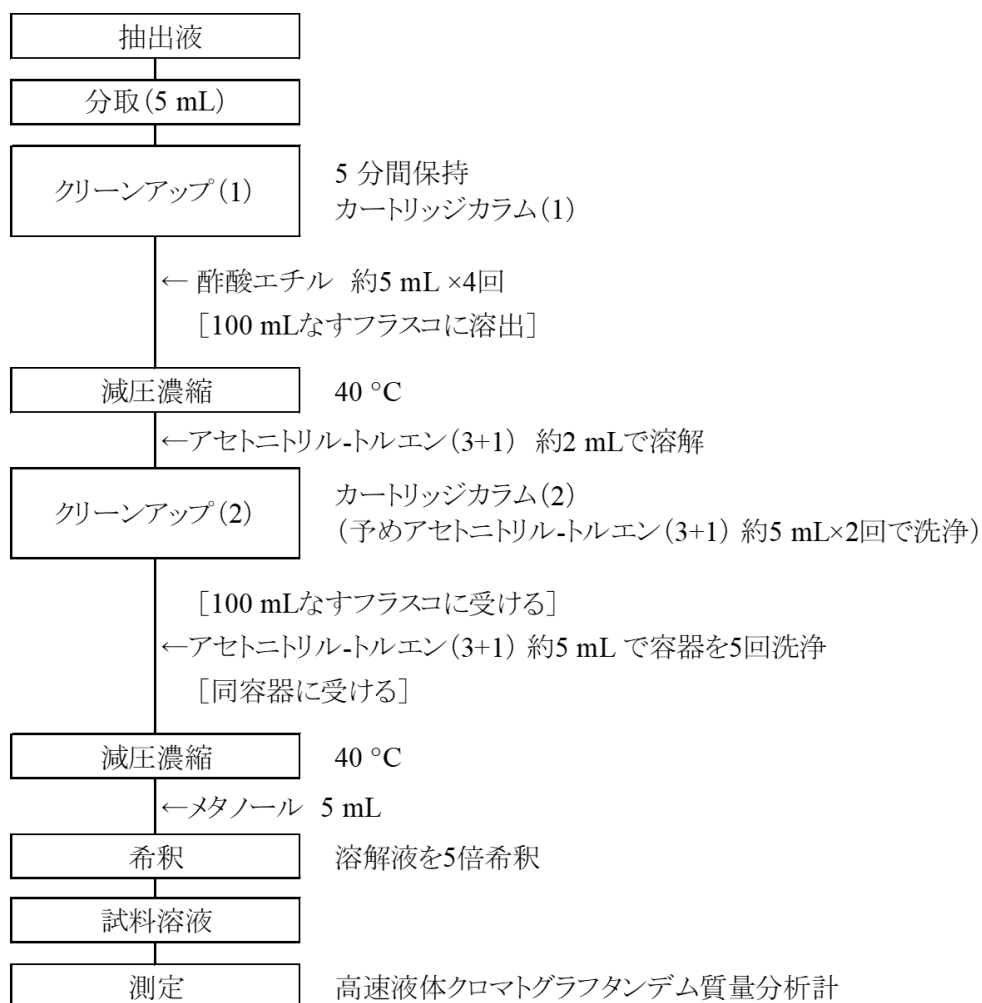
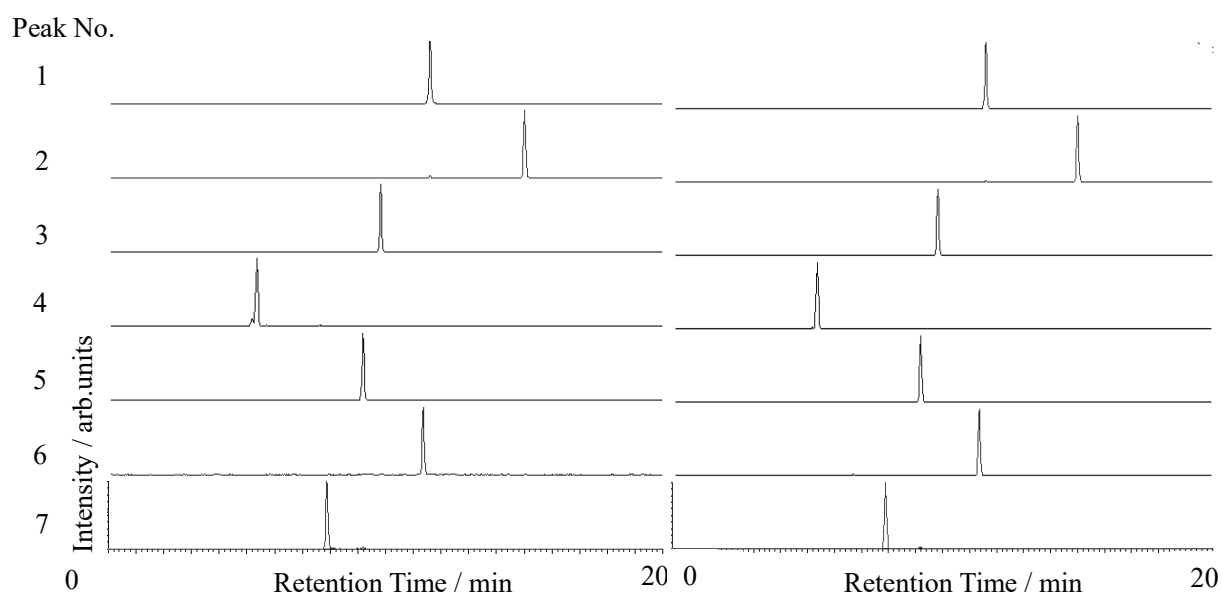


図2 肥料中の残留農薬多成分分析(その1:6種農薬の一斉試験法)フローシート
(クリーンアップ(1)、クリーンアップ(2)及び測定操作)

参考 検量線用混合標準液及び試料溶液(液状の家庭園芸用複合肥料)の選択反応検出クロマトグラム例を次に示す。



Peak No.1: アバメクチン B1a
 No.2: イベルメクチン B1a
 No.3: エプリノメクチン B1a
 No.4: ロテノン
 No.5: ピペロニルブトキシド
 No.6: ピレトリン I
 No.7: ピレトリン II

1) 混合標準液

2) 試料溶液

参考図 各農薬の選択反応検出クロマトグラム

- 1) 混合標準液(各農薬として 2,500 pg 相当量)
(ピレトリンに関してはピレトリン I・II の含量として 2,500 pg 相当量)
- 2) 試料溶液(液状の家庭園芸用複合肥料、試料中 400 μg/kg 相当量添加)
(ピレトリンに関してはピレトリン I・II の含量として 400 μg/kg 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: 0.2 mL/min

キャピラリー電圧: 3.0 kV

イオン源温度: 120 °C

デソルベーション温度: 400 °C

Curtain 電圧: 表 1 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(5.4) a) LC-MS/MS の測定条件の例示及び参考表のとおり

参考表 質量分析計のパラメーター

農薬名	質量イオン比 (m/z)			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 (定量用)	プロダクトイオン (確認用)	
アバメクチンB1a	891	305	567	20
イベルメクチンB1a	893	307	551	25
エプリノメクチンB1a	915	186	298	20
ロテノン	395	213	192	35
ピペロニルブトキシド	356	177	147	20
ピレトリン I	329	161	133	20
ピレトリン II	373	161	133	20

8.3.2 残留農薬多成分分析(その2)

8.3.2.a ガスクロマトグラフ法

(1) 分析対象化合物 β -HCH(β -BHC)、 γ -HCH(γ -BHC)、*o,p'*-DDD、*p,p'*-DDD、*o,p'*-DDE、*p,p'*-DDE、*o,p'*-DDT、*p,p'*-DDT、アルドリン、エンドリン、ディルドリン、*trans*-クロルデン、*cis*-クロルデン、*trans*-ノナクロル、*cis*-ノナクロル、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド及びヘキサクロロベンゼン

(2) 概要

この試験法は堆肥及びその原料となる糞に適用する。この試験法の分類は Type D であり、その記号は 8.3.2.a-2017 又は AG-C-2.a-1 とする。

肥料又は原料中の各農薬をアセトニトリル及び水で抽出し、多孔性けいそう土カラム、ゲル浸透クロマトグラフ及び合成けい酸マグネシウムカートリッジカラムを用いて精製後、電子捕獲検出器付きガスクロマトグラフを用いて測定し、分析試料中の分析対象化合物を求める。なお、この試験法の性能は備考 7 に示す。

(3) 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) ヘキサン: JIS K 8825 に規定する(濃縮 300 以上)又は同等の品質の試薬。
- d) 塩化ナトリウム: 残留農薬・PCB 試験用又は同等の品質の試薬。
- e) シクロヘキサン: 残留農薬・PCB 試験用(濃縮 300 以上)又は同等の品質の試薬。
- f) 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。
- g) ジエチルエーテル: JIS K 8357 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。
- h) 2,2,4-トリメチルペンタン: 高速液体クロマトグラフ用又は同等の品質の試薬。
- i) 各農薬標準液(0.2 mg/mL)⁽¹⁾: β -HCH(β -BHC) [C₆H₆Cl₆]⁽²⁾、 γ -HCH(γ -BHC) [C₆H₆Cl₆]⁽²⁾、*o,p'*-DDD [C₁₄H₁₀Cl₄]⁽²⁾、*p,p'*-DDD [C₁₄H₁₀Cl₄]⁽²⁾、*o,p'*-DDE [C₁₄H₈Cl₄]⁽²⁾、*p,p'*-DDE [C₁₄H₈Cl₄]⁽²⁾、*o,p'*-DDT [C₁₄H₉Cl₅]⁽²⁾、*p,p'*-DDT [C₁₄H₉Cl₅]⁽²⁾、アルドリン [C₁₂H₈Cl₆]⁽²⁾、エンドリン [C₁₂H₈Cl₆O]⁽²⁾、ディルドリン [C₁₂H₈Cl₆O]⁽²⁾、*trans*-クロルデン [C₁₀H₈Cl₆]⁽²⁾、*cis*-クロルデン [C₁₀H₈Cl₆]⁽²⁾、*trans*-ノナクロル [C₁₀H₅Cl₉]⁽²⁾、*cis*-ノナクロル [C₁₀H₅Cl₉]⁽²⁾、ヘプタクロル [C₁₀H₅Cl₇]⁽²⁾、ヘプタクロルエポキシド [C₁₀H₅Cl₇O]⁽²⁾ 及びヘキサクロロベンゼン [C₆Cl₆]⁽²⁾ 約 0.02 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。アセトン 20 mL 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 2,2,4-トリメチルペンタンを加える。
- j) 混合標準液(1 µg/mL)⁽¹⁾: 各農薬標準液 1 mL を 100 mL 全量フラスコに移し入れ、標線まで 2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン(4+1)を加える。
- k) 検量線用混合標準液(0.02 µg/mL~0.2 µg/mL)⁽¹⁾: 使用時に混合標準液(1 µg/mL)の 1 mL~10 mL を 50 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線まで 2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン(4+1)を加える。
- l) 検量線用混合標準液(0.005 µg/mL~0.02 µg/mL)⁽¹⁾: 使用時に混合標準液(0.1 µg/mL)の 2.5 mL~10 mL を 50 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線まで 2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン(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) 標準試薬が市販されている。

備考 1. 各農薬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等より販売されている。

(4) **器具及び装置** 器具及び装置は、次のとおりとする。

a) **ガスクロマトグラフ(GC)**: JIS K 0114 に規定する GC で次の要件を満たすもの。

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、長さ 30 m の溶融シリカ製のキャピラリーカラム。14 %シアノプロピルフェニル-86 %ジ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たもの。

3) **検出器**: 電子捕獲検出器(ECD)

b) **ゲル浸透クロマトグラフ(GPC)**: JIS K 0135 に規定する分取液体クロマトグラフで次の要件を満たすもの。なお、検出器は必要としない。

1) **試料導入部**: 試料溶液を 5 mL を注入できるもの。

2) **カラム**: 内径 20 mm、長さ 300 mm のステンレス鋼のカラム管にスチレンジビニルベンゼン共重合対系ハードゲルを充てんしたもの。

3) **ガードカラム**: 内径 20 mm、長さ 100 mm のステンレス鋼のカラム管にスチレンジビニルベンゼン共重合対系ハードゲルを充てんしたもの。

4) **分画部**: 農薬成分が溶出する画分を設定できるフラクションコレクター

c) **振とう機**

d) **濃縮器**: 40 °C まで調節できるエバポレーター

e) **ろ過器**: 減圧ろ過用漏斗(適合ろ紙径 60 mm)。

f) **多孔性けいそう土カートリッジカラム**: 多孔性けいそう土を充てんしたもの(保持容量 20 mL)。

g) **合成けい酸マグネシウムカートリッジカラム**: 合成けい酸マグネシウム 910 mg を充てんしたもの。

h) **メンブレンフィルター**: PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5 μm 以下)。

備考 2. GC 用カラムは DB-1701、Rtx-1701、SPB-1701 等の名称で市販されている。分析対象化合物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。

備考 3. GPC は、物質の分子の大きさにより GPC 用カラムの充てん剤でふるい分けられ分離した測定対象物質の画分をフラクションコレクターで収集する分取液体クロマトグラフである。GPC 用カラムは Shodex CLNpak EV-2000 AC 等の名称で市販されている。また、GPC 用ガードカラムは Shodex CLNpak EV-G AC 等の名称で市販されている。

備考 4. 減圧ろ過用漏斗は桐山漏斗 SB-60、桐山漏斗 SU-60 等の名称で市販されている。

備考 5. 多孔性けいそう土カートリッジは Chem Elut (20 mL) 等の名称で市販されている。

備考 6. 合成けい酸マグネシウムは Sep-Pak Florisil Plus Long Cartridge (910 mg) 等の名称で市販されている。

備考 7. メンブレンフィルターは HLC-DISK 25 溶媒系(孔径 0.45 μm)、DISMIC 25JP050、Millex FH(直径 25 mm、孔径 0.45 μm) 等の名称で市販されている。

(5) **試験操作**

(5.1) **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 共栓三角フラスコに入れる。

- b) アセトニトリル-水(3+1)20 mLを加えて潤す。
- c) 10分間放置後、更にアセトニトリル100 mLを加え、30分間振り混ぜる。
- d) 300 mLなす形フラスコをろ過器の下に置き、抽出液をろ紙(5種B)で減圧ろ過する。
- e) 先の三角フラスコ及び残留物を順次アセトニトリル50 mLで洗浄し、同様に減圧ろ過し、d)のろ液と合わせて抽出液とする。

(5.2) クリーンアップ(1) クリーンアップ(1)は、次のとおり行う。

- a) 抽出液を40℃以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮する。
- b) 塩化ナトリウム飽和溶液20 mLを加え、多孔性けいそう土カートリッジカラムに入れ、約5分間放置させる。
- c) 300 mLなすフラスコを同カートリッジカラムの下に置き、容器をヘキサン約20 mLで3回洗浄し、順次同カートリッジカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで溶出させる。
- d) 更にヘキサン約60 mLを同カートリッジカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで溶出させる。
- e) 溶出液を40℃以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固⁽³⁾、シクロヘキサン-アセトン(4+1)10 mLを加えて残留物を溶かす。
- f) メンブランフィルター(孔径0.5 μm以下)でろ過する。

注(3) 乾固させすぎると農薬が揮散するおそれがある。

(5.3) クリーンアップ(2) クリーンアップ(2)は、次のとおり行う。

- a) (5.2)e)のろ液5.0 mLをゲル浸透クロマトグラフに注入し、b)の操作条件により定量する各農薬が溶出する画分を100 mLなす形フラスコに分取する。
- b) **ゲル浸透クロマトグラフの操作条件**: ゲル浸透クロマトグラフの操作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**: スチレンジビニルベンゼン共重合体カラム(内径20 mm、長さ300 mm、粒径15 μm)
 - 2) **ガードカラム**: スチレンジビニルベンゼン共重合体カラム(内径20 mm、長さ100 mm、粒径15 μm)
 - 3) **溶離液**: シクロヘキサン-アセトン(4+1)
 - 4) **流量**: 5 mL/min
 - 5) **分取画分**: 70 mL~120 mL
- c) 溶出液を40℃以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固⁽³⁾、ヘキサン2 mLを加えて残留物を溶かす。

(5.4) 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) 合成けい酸マグネシウムカートリッジカラム(910 mg)をヘキサン約5 mLで洗浄する。
- b) 50 mLなすフラスコを同カートリッジカラムの下に置き、(5.3)c)の溶液を同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) 容器をヘキサン約2 mLで2回洗浄し、洗液を順次同カートリッジに加え流出させる。
- d) 更に、ヘキサノ-ジエチルエーテル(9+1)15 mLを同カートリッジに加えて各測定対象物質を溶出させる。
- e) 溶出液を40℃以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固⁽³⁾、2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン(4+1)1 mL⁽⁴⁾を加えて残留物を溶かし、試料溶液とする。

注(4) 試料溶液中の各農薬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2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン(4+1)で希釈する。

(5.4) 測定 測定は、JIS K 0114 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の操作方法による。

a) **ガスクロマトグラフの測定条件** ガス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) **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**: 250 °C
- 3) **キャピラリーカラム**: 14 %シアノプロピルフェニル-86 %ジ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、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm)
- 4) **カラム槽温度**: 60 °C(1 min)→(20 °C/min)→180 °C→(2 °C/min)→260 °C→(5 °C/min)→275 °C(1 min)
- 5) **キャリアーガス**: ヘリウム、**流量**: 1.5 mL/min
- 6) **付加ガス**: 窒素、**流量**: 60 mL/min
- 7) **検出器**: 電子捕獲検出器(ECD)
- 8) **検出器温度**: 280 °C

b) **検量線の作成**

- 1) 各検量線用混合標準液 1 μL を GC に注入し、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ピーク面積又は高さとの検量線を作成する。検量線の作成は、試料の測定時に行う。

c) **試料の測定**

- 1) 試料溶液を 1 μL を **b) 1)**と同様に操作する。
- 2) ピーク面積又は高さから検量線より測定対象物質量を求め、分析試料中の測定対象物質を算出する。

備考 8. 堆肥中の分析対象化合物の回収試験の結果は、20 μg/kg 及び 50 μg/kg の添加レベルで平均回収率が 82.1 %~118.1 %及び 62.5 %~120.2 %であった。精度の評価のため、堆肥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。なお、同時に検討した α -HCH(α -BHC)、 δ -HCH(δ -BHC)、オキシクロルデンは満足する回収率が得られなかったので分析対象化合物から外した。

なお、この試験法の各農薬の定量下限は 20 μg/kg 以下である。

表1 残留農薬多成分分析日を変えての反復試験成績の解析結果

農薬名	反復試験 日数(T) ¹⁾	平均値 ²⁾ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	s_r ³⁾ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD_r ⁴⁾ (%)	$s_{I(T)}$ ⁵⁾ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	$RSD_{I(T)}$ ⁶⁾ (%)
β -BHC	5	15.7	1.3	8.3	2.0	12.8
γ -BHC	5	14.7	1.3	8.6	1.6	10.9
ヘキサクロロベンゼン	5	15.3	1.4	9.3	2.5	16.0
ヘプタクロル	5	16.9	1.1	6.7	2.4	14.3
アルドリン	5	12.8	1.0	7.8	3.4	26.4
ヘプタクロルエポキシド(1)	5	17.8	2.0	11.1	1.6	9.0
ヘプタクロルエポキシド(2)	5	17.9	1.8	10.1	1.8	10.0
<i>trans</i> -クロルデン	5	17.6	1.7	9.9	1.9	10.8
<i>cis</i> -クロルデン	5	17.8	1.3	7.2	2.0	11.3
<i>trans</i> -ノナクロル	5	15.9	1.3	8.3	1.5	9.6
<i>cis</i> -ノナクロル	5	16.7	1.5	8.8	2.1	12.4
ディルドリン	5	16.6	1.4	8.5	2.0	11.9
エンドリン	5	17.8	1.4	7.9	1.7	9.5
<i>o,p'</i> -DDE	5	18.7	2.7	14.4	2.7	14.6
<i>p,p'</i> -DDE	5	16.8	1.6	9.8	1.8	10.9
<i>o,p'</i> -DDD	5	16.9	1.2	7.3	1.3	7.8
<i>p,p'</i> -DDD	5	16.3	1.7	10.7	1.8	10.9
<i>o,p'</i> -DDT	5	17.9	1.4	7.8	2.2	12.0
<i>p,p'</i> -DDT	5	16.6	1.4	8.1	2.2	13.0

1) 2点併行試験を実施した試験日数

2) 平均値(試験日(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

参考文献

- 1) 野崎友春: ガスクロマトグラフ(質量分析計)(GC(-MS))法による堆肥等中の塩素系農薬の測定, 肥料研究報告, **10**, 41~60 (2017)

(6) 塩素系農薬一斉試験法フローシート 肥料中の塩素系農薬の一斉試験法のフローシートを次に示す。

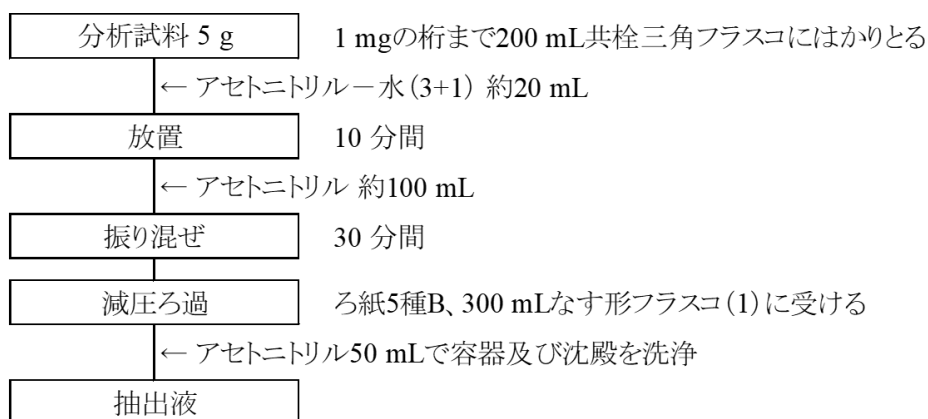


図1 肥料中の残留農薬多成分分析(その2:塩素系農薬の一斉試験法)フローシート
(抽出操作)

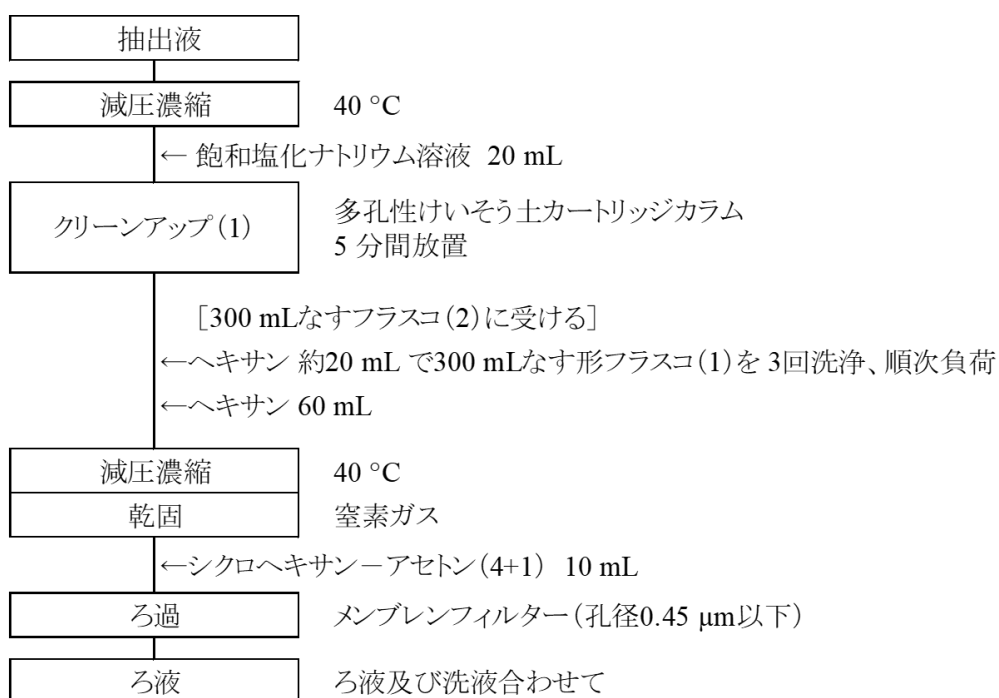


図2 肥料中の残留農薬多成分分析(その2:塩素系農薬の一斉試験法)フローシート
(クリーンアップ(1)操作)

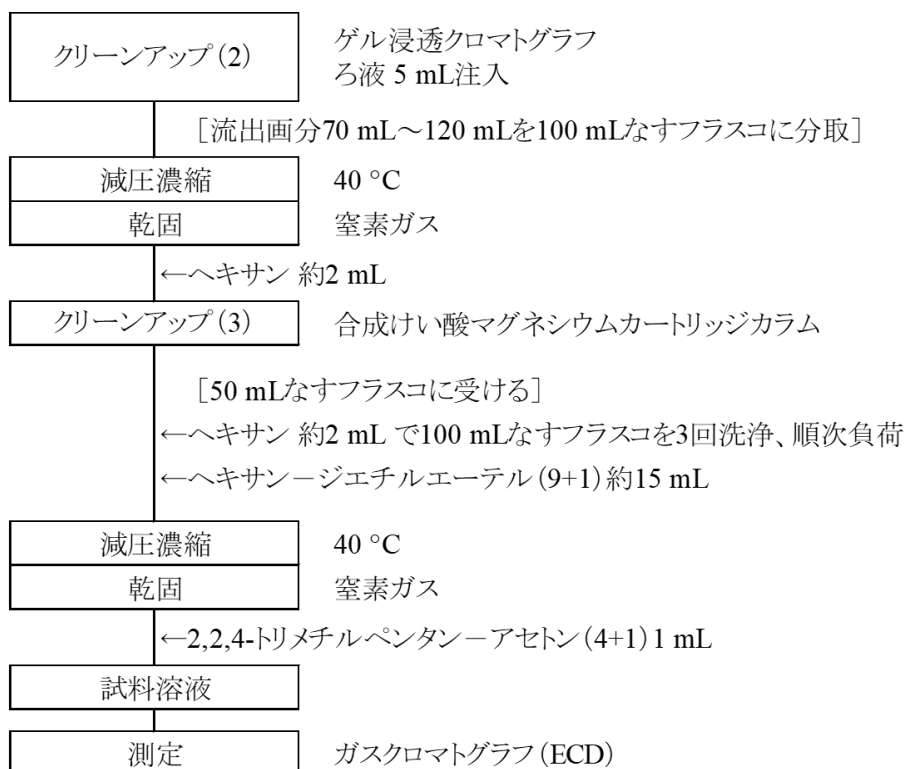


図3 肥料中の残留農薬多成分分析(その2:塩素系農薬の一斉試験法)フローシート
(クリーンアップ(2)、クリーンアップ(3)及び測定操作)

8.4 ナトリウム

8.4.a フレーム原子吸光法

(1) 概要

この試験法は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 8.4.a-2017 又は Na.a-1 とする。

分析試料を灰化及び塩酸で前処理した後、アセチレン-空気フレーム中に噴霧し、ナトリウムによる原子吸光を波長 589.0 nm 又は 589.6 nm で測定し、分析試料中のナトリウム(Na)を求める。なお、この試験法の性能は備考 3 に示す。

(2) 試薬 試薬は、次による。

- a) **塩酸**: JIS K 8180 に規定する特級試薬又は同等の品質の試薬。
- b) **ナトリウム標準液(Na 1 mg/mL)**⁽¹⁾: JIS K 8150 に規定する塩化ナトリウムを 600 °C±10 °C で約 1 時間加熱し、デシケーター中で放冷した後、2.542 g をひょう量皿にはかりとる。少量の水で溶かし、1000 mL 全量フラスコに移し入れ、標線まで水を加える。
- c) **ナトリウム標準液(Na 0.1 mg/mL)**⁽¹⁾: ナトリウム標準液(Na 1 mg/mL)の 20 mL を 200 mL 全量フラスコにとり、標線まで塩酸(1+23)を加える。
- d) **検量線用ナトリウム標準液(Na 1 µg/mL～10 µg/mL)**⁽²⁾: ナトリウム標準液(Na 0.1 mg/mL)の 2.5 mL～25 mL を 200 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線まで塩酸(1+23)を加える⁽²⁾。
- e) **検量線用空試験液**: d)の操作で使用した塩酸(1+23)⁽³⁾。

注(1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(2) バーナーヘッドを傾け感度を落とす操作ができない機種にあっては、その機種にあった希釈を行う。

(例として 0.1 µg/mL～4 µg/mL)

(3) 保存する場合は、ナトリウムが溶出しにくいポリプロピレン、PTFE 等の材質で密閉できる容器を用いる。

備考 1. (2)b)のナトリウム標準液に換えて、国家計量標準にトレーサブルな原子吸光用のナトリウム標準液(Na 0.1 mg/mL、1 mg/mL 又は 10 mg/mL)を用いることもできる。

(3) 装置 装置は、次のとおりとする。

- a) **フレーム原子吸光分析装置**: JIS K 0121 に規定する原子吸光分析装置。
 - 1) **光源部**: ナトリウム中空陰極ランプ
 - 2) **ガス**: フレーム加熱用ガス
 - ① 燃料ガス: アセチレン
 - ② 助燃ガス: 粉じん及び水分を十分に除去した空気
- b) **電気炉**: 550 °C±5 °C に調節できるもの。
- c) **ホットプレート又は砂浴**: ホットプレートは表面温度 250 °C まで調節できるもの。砂浴は、ガス量及びけい砂の量を調整し、砂浴温度を 250 °C にできるようにしたもの。

(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 トールビーカーに入れる。
- b) トールビーカーを電気炉に入れ、穏やかに加熱して炭化させる⁽⁴⁾。
- c) 550 °C±5 °C で 4 時間以上強熱して灰化させる⁽⁴⁾。
- d) 放冷後、少量の水で残留物を潤し、塩酸約 10 mL を徐々に加え、更に水を加えて約 20 mL とする。
- e) トールビーカーを時計皿で覆い、ホットプレート又は砂浴上で加熱し、約 5 分間煮沸する。
- f) 放冷後、水で 250 mL～500 mL 全量フラスコに移し入れる。
- g) 標線まで水を加える。
- h) ろ紙 3 種でろ過し、試料溶液とする。

注(4) 炭化及び灰化操作例：室温から約 250 °C まで 30 分間～1 時間で昇温した後 1 時間程度加熱し、更に 550 °C まで 1 時間～2 時間で昇温する。

備考 2. (4.1) の操作で得た試料溶液は、附属書 B に示した成分にも適用できる。

(4.2) 測定 測定は、JIS K 0121 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する原子吸光分析装置の操作方法による。

a) **原子吸光分析装置の測定条件** 原子吸光分析装置の測定条件は、以下を参考にして設定する。

分析線波長：589.0 nm 又は 589.6 nm

b) **検量線の作成**

- 1) 検量線用ナトリウム標準液及び検量線用空試験液をフレイム中に噴霧し、波長 589.0 nm 又 589.6 nm の指示値を読み取る。
- 2) 検量線用ナトリウム標準液及び検量線用空試験液のナトリウム濃度と指示値との検量線を作成する。

c) **試料の測定**

- 1) 試料溶液の一定量 (Na として 0.1 mg～1 mg 相当量)⁽⁵⁾ を 100 mL 全量フラスコにとる。
- 2) 標線まで塩酸 (1+23) を加える。
- 3) b) 1) と同様に操作して指示値を読み取る。
- 4) 検量線からナトリウム量を求め、分析試料中のナトリウム (Na) を算出する。

注(5) 注(2)の機種については、その機種に応じた一定量を採取する。

備考 3. 魚かす粉末、魚廃物加工肥料、なたね油かす及びその粉末、汚泥発酵肥料及び堆肥を用いて 3 点併行で添加回収試験を実施した結果、ナトリウムの添加濃度が 1 % (質量分率)～10 % (質量分率) の範囲で平均回収率は 97 %～103 % であった。

精度の評価のため、魚かす粉末 (塩化ナトリウム添加した試料) 及び堆肥を用いて日を変えての反復試験の試験成績を一元配置分散分析により解析し、得られた中間精度及び併行精度を表 1 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 ナトリウム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⁾ (%) ³⁾	s_r ⁴⁾ (%) ³⁾	RSD_r ⁵⁾ (%)	$s_{I(T)}$ ⁶⁾ (%) ³⁾	$RSD_{I(T)}$ ⁷⁾ (%)
魚かす粉末	5	9.08	0.06	0.6	0.09	1.0
堆肥	5	0.0973	0.0019	2.0	0.0037	3.8

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) × 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) 加藤公栄, 千田正樹, 藤田敏文: 原子吸光分析法による肥料中のナトリウムの測定, 肥料研究報告, **8**, 61~69 (2015)

- (5) **ナトリウム試験法フローシート** 肥料中のナトリウム試験法のフローシートを次に示す。

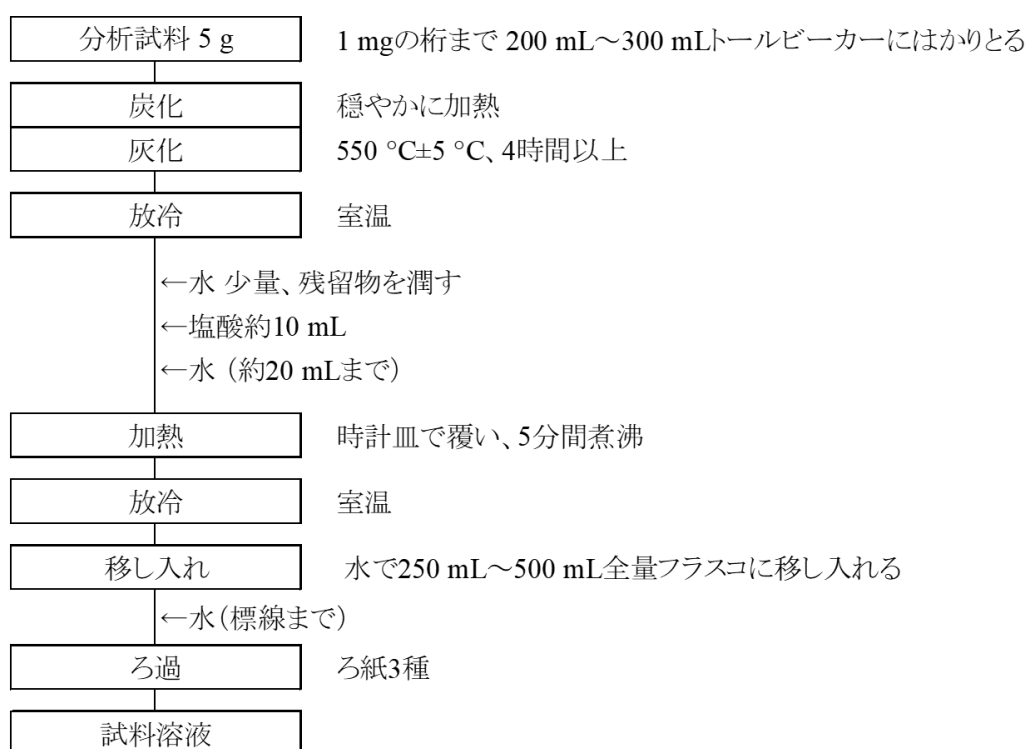


図1 肥料中のナトリウム試験法フローシート (抽出操作)

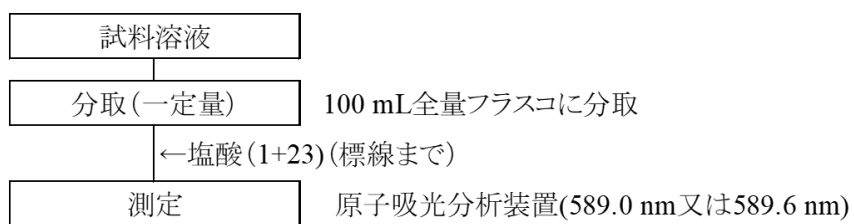


図2 肥料中のナトリウム試験法フローシート(測定操作)

8.5 グアニル尿素性窒素

8.5.a 高速液体クロマトグラフ法

(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 B であり、その記号は 8.5.a-2017 又は GU-N.a-1 とする。

分析試料に水を加えてグアニル尿素を抽出し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、弱酸性イオン交換カラムで分離し、波長 190 nm で測定し、分析試料中のグアニル尿素性窒素(GU-N)を求める。この方法の性能は備考 6 に示す。

この方法によって、ピウレット性窒素(B-N)、ジシアンジアミド性窒素(Dd-N)、尿素性窒素(U-N)及びグアニジン性窒素(Gd-N)が同時に測定できる(備考 5 参照)。

(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) リン酸二水素カリウム: JIS K 9007 に規定する特級又は同等の品質のもの。
- c) リン酸: JIS K 9005 に規定する特級又は同等の品質のもの。
- d) グアニル尿素性窒素標準液(GU-N 2 mg/mL)⁽¹⁾: グアニル尿素硫酸塩[C₄H₁₂N₈O₂·H₂SO₄]⁽²⁾ 0.540 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。少量の水を加えて溶かし、100 mL 全量フラスコに移し入れ、標線まで水を加える。
- e) グアニル尿素性窒素標準液(GU-N 200 µg/mL): グアニル尿素性窒素標準液(GU-N 2 mg/mL) 10 mL を 100 mL 全量フラスコにとり、標線まで水を加える。
- f) 検量線用グアニル尿素性窒素標準液(GU-N 50 µg/mL~100 µg/mL): グアニル尿素性窒素標準液(GU-N 200 µg/mL) 25 mL~50 mL を 100 mL 全量フラスコにとり、標線まで水を加える。
- g) 検量線用グアニル尿素性窒素標準液(GU-N 1 µg/mL~50 µg/mL): 使用時にグアニル尿素性窒素標準液(GU-N 100 µg/mL) を 1 mL~50 mL を 100 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線まで水を加える。

注(1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(2) グアニル尿素硫酸塩として 98 % (質量分率) 以上の純度の試薬が市販されている。

備考 1. グアニル尿素硫酸塩は関東化学及び東京化成工業より市販されている。

(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: 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 7.5 mm、長さ 100 mm のステンレス鋼のカラム管に粒径 5 µm~10 µm の弱酸性イオン交換樹脂を充てんしたもの。
 - 2) カラム槽: カラム槽温度を 30 °C~45 °C で調節できるもの。
 - 3) 検出器: 吸光光度検出器で波長 190 nm 付近で測定できるもの。
- b) マグネチックスターラー
- c) 高速遠心分離機: 8000×g~10 000×g で遠心分離可能なもの。

備考 2. カラムは Asahipak ES-502C 7C 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。

(4.1.1) 粉状分析用試料

- a) 分析試料 1 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、マグネチックスターラーを用いて約 10 分間かき混ぜる。
- c) 静置後、上澄み液⁽³⁾を 1.5 mL 共栓遠心沈殿管⁽⁴⁾にとる。
- d) 遠心力 $8000 \times g \sim 10\,000 \times g$ で約 5 分間遠心分離し⁽⁵⁾、上澄み液を試料溶液とする。

注 (3) 試料溶液中のグアニル尿素性窒素(GU-N)濃度が検量線の上限を超えるおそれがある場合は、上澄み液の一定量を水で希釈する。

(4) 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。

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

(4.1.2) 液状分析用試料

- a) 分析試料 1 g を 1 mg の桁まではかりとり、100 mL 全量フラスコに入れる。
- b) 水約 50 mL を加えて、振り混ぜる。
- c) 標線まで水を加え⁽⁶⁾、1.5 mL 共栓遠心沈殿管⁽⁴⁾にとる。
- d) 遠心力 $8000 \times g \sim 10\,000 \times g$ で約 5 分間遠心分離し⁽⁵⁾、上澄み液を試料溶液とする。

注 (6) 試料溶液中のグアニル尿素性窒素(GU-N)濃度が検量線の上限を超えるおそれがある場合は、定容した溶液の一定量を水で希釈する。

備考 3. (4.1.1)c)～d)又は(4.1.2)c)～d)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:** 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:** 弱酸性イオン交換樹脂カラム(内径 4.0 mm～7.5 mm、長さ 100 mm～150 mm、粒径 5 μm ～10 μm)
- 2) **カラム槽温度:** 40 $^{\circ}\text{C}$
- 3) **溶離液⁽¹⁾:** リン酸二水素カリウム 3.92 g 及びりん酸 0.12 g を水に溶かして 1000 mL とする。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。
- 4) **流量:** 0.6 mL/min
- 5) **注入量:** 10 μL
- 6) **検出器:** 吸光光度検出器、測定波長 190 nm

備考 4. 溶離液は、りん酸二水素カリウム 19.6 g 及びりん酸 0.584 g を水に溶かして 500 mL とし、冷

蔵保存し、使用時にその一定量を 10 倍に希釈し、親水性 PTFE 製のメンブレンフィルター(孔径 0.5 μm 以下)でろ過して調製してもよい。

b) 検量線の作成

- 1) 各検量線用標準液 10 μL を高速液体クロマトグラフに注入し、波長 190 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク高さを求める。
- 2) 各検量線用標準液のグアニル尿素性窒素 (GU-N) 濃度と波長 190 nm のピーク高さとの検量線を作成する。

c) 試料の測定

- 1) 試料溶液 10 μL を **b) 1)**と同様に操作する。
- 2) ピーク高さから検量線よりグアニル尿素性窒素 (GU-N) 量を求め、分析試料中のグアニル尿素性窒素 (GU-N) を算出する。

備考 5. この試験法ではビウレット性窒素 (B-N)、尿素性窒素 (U-N)、ジシアンジアミド性窒素 (Dd-N)、グアニジン性窒素 (Gd-N) 及びグアニル尿素性窒素標準液 (GU-N) の同時測定が可能である。その場合は、**5.10.a 備考 5** を参照のこと。

備考 6. 真度の評価のため、グアニル尿素肥料様調製試料 1 銘柄を用いて添加回収試験を実施した結果、36.7 % (質量分率)、35.2 % (質量分率) 及び 33.4 % (質量分率) の添加レベルでの平均回収率はそれぞれ 103.8 %、104.6 % 及び 105.6 % であった。

精度の評価のため、グアニル尿素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、この試験法の定量下限は 0.006 % (質量分率) 程度と推定された。

表1 グアニル尿素性窒素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⁾	(%)
グアニル尿素肥料	5	37.0	0.3	0.7	0.3	0.8

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

表2 グアニル尿素性窒素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⁾ (%) ³⁾	s_r ⁴⁾ (%) ³⁾	RSD_r ⁵⁾ (%)	s_R ⁶⁾ (%) ³⁾	RSD_R ⁷⁾ (%)
化成肥料1	12(0)	2.20	0.09	4.2	0.17	7.7
化成肥料2	11(1)	4.38	0.07	1.5	0.19	4.3
化成肥料3	11(1)	5.83	0.08	1.4	0.52	8.9
化成肥料4	12(0)	7.43	0.43	5.7	0.78	10.5
グアニル尿素肥料	12(0)	30.3	0.4	1.5	1.1	3.6

1) 有効試験室数(外れ値を報告した試験室数)

2) 平均値(n =有効試験室数×試料数(2))

3) 質量分率

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) 恵智正宏, 木村康晴, 白井裕治: 高速液体クロマトグラフ(HPLC)法による肥料中の尿素性窒素, ビウレット性窒素等の測定 - 単一試験室の妥当性確認 -, 肥料研究報告, **10**, 72~85 (2017)
- 2) 船木紀夫, 木村康晴: 高速液体クロマトグラフ(HPLC)法による肥料中の尿素性窒素, ビウレット性窒素等の測定 - 共同試験成績 -, 肥料研究報告, **10**, 86~100 (2017)

(5) **試験法フローシート** 肥料中のグアニル尿素性窒素試験法のフローシートを次に示す。

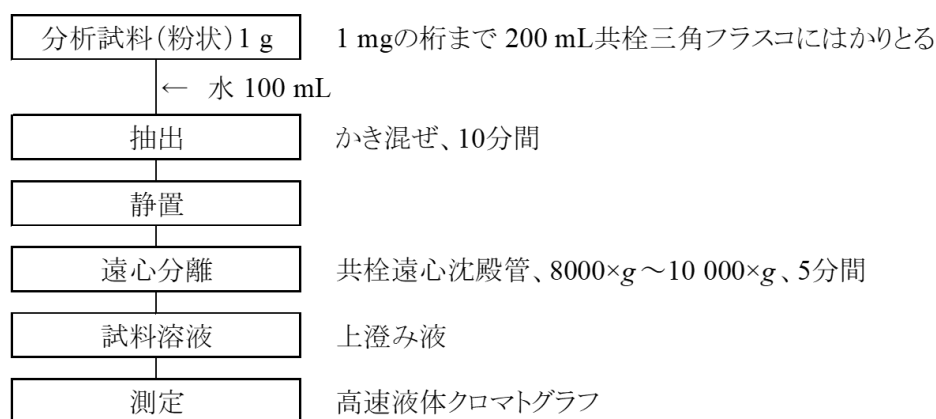


図1 肥料中のグアニル尿素性窒素試験法のフローシート(抽出操作(4.1.1)及び測定)

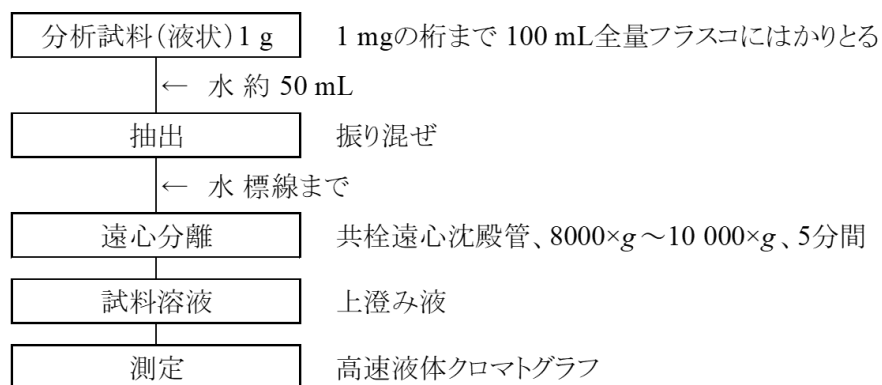
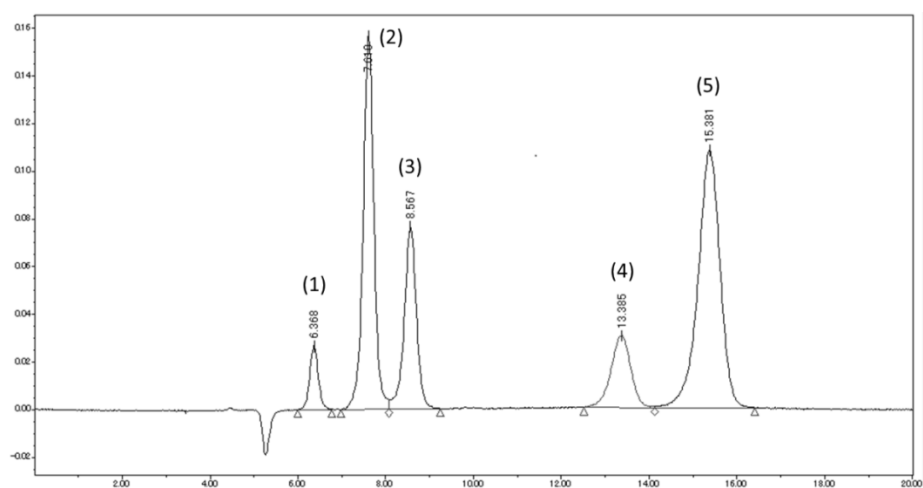


図2 肥料中のグアニル尿素性窒素試験法のフローシート(抽出操作(4.1.2)及び測定)

参考 グアニル尿素性窒素の検量線用標準液のクロマトグラム例を次に示す。



参考図 検量線用混合標準液(各 10 mg/L)の HPLC クロマトグラム

ピーク名

- (1)尿素性窒素 (2)ビウレット性窒素 (3)ジシアンジアミド性窒素
(4)グアニジン性窒素 (5)グアニル尿素性窒素

HPLC の測定条件

カラム: Asahipak ES-502C 7C(内径 7.5 mm、長さ 100 mm、粒径 9 μm)

その他の条件は(4.2) a) HPLC 測定条件の例示のとおり

8.6 尿酸

8.6.a 高速液体クロマトグラフ法

(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 8.6.a-2018 又は U-acid.a-1 とする。

分析試料にりん酸塩溶液(pH 8)を加えて尿酸を抽出し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)に導入し、マルチモード ODS(逆相+強アニオン交換+強カチオン交換+順相)カラムで分離し、波長 290 nm で測定し、分析試料中の尿酸(U-acid)を求める。この方法の性能は備考 5 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。ただし、高速液体クロマトグラフに導入する溶離液については同 A4 の水を使用する。
- b) **りん酸二水素カリウム**: JIS K 9007 に規定する試薬又は同等の品質のもの。
- c) **りん酸水素二ナトリウム**: JIS K 9020 に規定する試薬又は同等の品質のもの。
- d) **りん酸塩溶液**: りん酸二水素カリウム 9.073 g を水に溶かして 1000 mL としたもの、及びりん酸水素二ナトリウム 9.464 g を水に溶かして 1000 mL としたものを、pH 8.0±0.1 になるよう混合したものを。
- e) **炭酸リチウム溶液**: 純度 99 % (質量分率) 以上の炭酸リチウム (Li_2CO_3) 0.739 g を水に溶かして 1000 mL としたもの。
- f) **尿酸標準液 (U-acid 1 mg/mL)⁽¹⁾**: 尿酸 0.1 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。少量の炭酸リチウム溶液に溶かし、全量フラスコ 100 mL に移し入れ、標線まで炭酸リチウム溶液を加える。
- g) **検量線用尿酸標準液 (U-acid 100 µg/mL)**: 尿酸標準液 (U-acid 1 mg/mL) 10 mL を 100 mL 全量フラスコにとり、標線までりん酸塩溶液を加える。
- h) **検量線用尿酸標準液 (U-acid 10 µg/mL～50 µg/mL)**: 尿素性窒素標準液 (U-acid 100 µg/mL) 10 mL～50 mL を 100 mL 全量フラスコにとり、標線までりん酸塩溶液を加える。
- i) **検量線用尿酸標準液 (U-acid 0.1 µg/mL～5 µg/mL)**: 使用時に尿酸標準液 (U-acid 10 µg/mL) 1 mL～50 mL を 100 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線までりん酸塩溶液を加える。
- j) **酢酸アンモニウム**: JIS K 8359 に規定する試薬又は同等の品質のもの
- k) **メタノール**: 高速液体クロマトグラフ用又は同等の品質の試薬

注(1) 調製例であり、必要に応じた量を調製する。

(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**: 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 4.6 mm、長さ 250 mm のステンレス鋼のカラム管に粒径 3 µm のオクタデシル基、強酸性用イオン交換基及び強塩基性陰イオン交換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 30 °C～45 °C で調節できるもの。
 - 3) **検出器**: 吸光光度検出器で波長 290 nm 付近で測定できるもの。
- b) **水浴**: 60 °C±2 °C に調節できるもの。
- c) **マグネチックスターラー**
- 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。

備考 1. カラムは Scherzo SS-C18 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 1 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) リン酸塩溶液 100 mL を加え⁽²⁾、60 °C±2 °C の水浴中で 10 分ごとに振り混ぜながら⁽³⁾ 30 分間加熱する。
- c) 直ちにマグネチックスターラーを用いて約 10 分間かき混ぜる。
- d) 静置後、上澄み液を 15 mL 又は 50 mL 共栓遠心沈殿管⁽⁴⁾にとり、遠心力 1700×g で約 10 分間遠心分離する⁽⁵⁾。
- e) 上澄み液⁽⁶⁾を 1.5 mL 共栓遠心沈殿管⁽⁴⁾にとり、遠心力 8000×g～10 000×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 (2) 溶液を加熱するため、ガラス栓に替えてシリコン栓を用いる。

(3) 蒸気でシリコン栓が飛び易いので指で軽くシリコン栓を上から押さえながら、フラスコ内壁の水滴をできるだけ落とすように振る。なお、加熱操作前後にもこの操作を行う。

(4) 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。

(5) 回転半径 7.2 cm～8.9 cm 及び回転数 3000 rpm で遠心力 1700×g 程度となる。

(6) 試料溶液中の尿酸(U-acid)濃度が検量線の上限を超えるおそれがある場合は、上澄み液の一定量をリン酸塩溶液で希釈する。

(7) 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。

備考 2. (4.1)e)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**：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**：オクタデシル基、強酸性用イオン交換基及び強塩基性陰イオン交換基を化学結合したシリカゲルカラム(内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 3 μm)
- 2) **カラム槽温度**：40 °C
- 3) **溶離液**⁽¹⁾：酢酸アンモニウム 1.54 g を水に溶かして 1000 mL としたものを 900 mL とり、メタノール 100 mL と混合する。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。
- 4) **流量**：0.4 mL/min
- 5) **注入量**：10 μL
- 6) **検出器**：吸光光度検出器、測定波長 290 nm

備考 3. 溶離液は、酢酸アンモニウム 15.4 g を水に溶かして 1000 mL として冷蔵保存し、使用時にその一定量を 10 倍に希釈し、体積比で 1/9 のメタノールと混合後、親水性 PTFE 製のメンブレンフィル

ター(孔径 0.5 μm 以下)でろ過して調製してもよい。

b) 検量線の作成

- 1) 各検量線用標準液 10 μL を高速液体クロマトグラフに注入し、波長 290 nm のクロマトグラムを記録し、ピーク面積または高さを求める。
- 2) 各検量線用標準液の尿酸(U-acid)濃度と波長 290 nm のピーク面積または高さの検量線を作成する。

c) 試料の測定

- 1) 試料溶液 10 μL を b) 1) と同様に操作する。
- 2) ピーク面積または高さから検量線より尿酸(U-A)量を求め、分析試料中の尿酸(U-A)を算出する。

備考 4. この測定方法(Scherzo SS-C18 カラムを用いた場合)では、尿酸に加えアラントイン及びアラントイン酸を同時に測定することができる。なお、アラントイン及びアラントイン酸の検出波長は 210 nm である。

備考 5. 真度の評価のため、化成肥料、汚泥発酵肥料、混合堆肥複合肥料及び堆肥各 1 銘柄を用いて添加回収試験を実施した結果、0.1 % (質量分率)、0.01 % (質量分率) 及び 0.005 % (質量分率) の添加レベルでの平均回収率はそれぞれ 92.4 % ~ 101.8 %、85.3 % ~ 105.0 % 及び 92.5 % ~ 114.1 % であった。

精度の評価のため、化成肥料、汚泥発酵肥料、混合堆肥複合肥料及び堆肥各 1 銘柄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。

なお、この試験法の定量下限は 0.0008 % (質量分率) 程度と推定された。

表1 尿酸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⁾	(%)
化成肥料	7	0.0989	0.0006	0.6	0.0015	1.6
	7	0.0102	0.0001	0.7	0.00042	4.2
汚泥発酵肥料	7	0.0932	0.0004	0.5	0.0016	1.7
	7	0.00938	0.00009	0.9	0.00031	3.3
混合堆肥複合肥料	7	0.0924	0.0004	0.4	0.0015	1.7
	7	0.00921	0.00005	0.6	0.00032	3.5
堆肥	7	0.101	0.001	1.3	0.0029	2.8
	7	0.00966	0.00018	1.8	0.00049	5.0

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) × 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

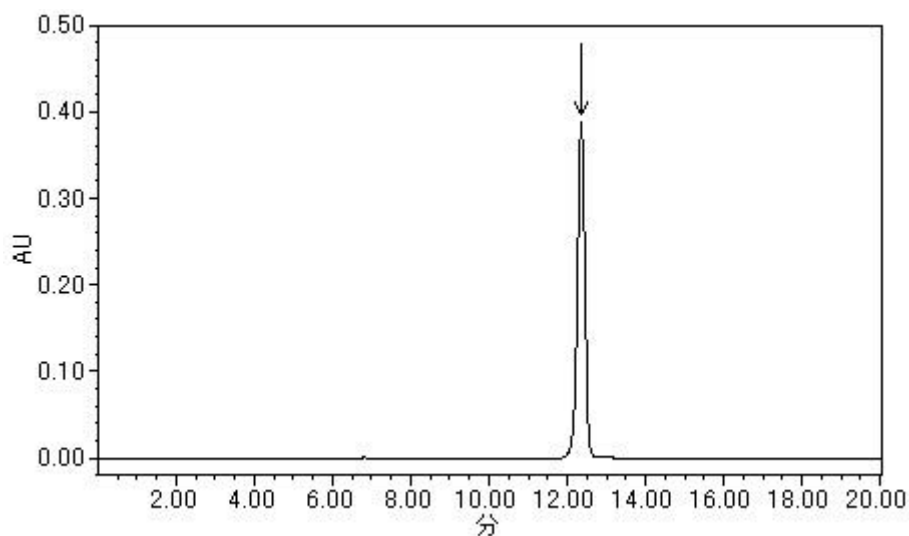
- 1) 船木紀夫: 高速液体クロマトグラフ(HPLC)法による肥料中の尿酸の測定, 肥料研究報告, **11**, 86~105 (2018)

(5) 試験法フローシート 肥料中の尿酸試験法のフローシートを次に示す。

分析試料(粉状) 1 g	1 mgの桁まで 200 mL共栓三角フラスコにはかりとる
	← リン酸塩溶液 100 mL
加熱	60 °C±2 °C、10分間ごとにふり混ぜながら30分間
抽出	かき混ぜ、10分間
遠心分離	共栓遠心沈殿管、1700×g、10分間
遠心分離	共栓遠心沈殿管、8000×g～10 000×g、5分間
試料溶液	上澄み液
測定	高速液体クロマトグラフ

図 肥料中の尿酸試験法のフローシート

参考 尿酸の検量線用標準液のクロマトグラム例を次に示す。



参考図 検量線用尿酸標準液(50 µg/mL)の HPLC クロマトグラム

ピーク名 (↓) 尿酸

HPLC の測定条件

カラム: Scherzo SS-C18(内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 3 µm)

その他の条件は(4.2) a) HPLC 測定条件の例示のとおり

8.7 有機ふっ素化合物

8.7.a 高速液体クロマトグラフタンデム質量分析法

(1) 概要

汚泥肥料等に適用する。この試験法の分類は TypeB であり、その記号は 8.7.a-2022 又は PFC.a-2 とする。

汚泥肥料等中の有機ふっ素化合物(ペルフルオロオクタンスルホン酸(以下、「PFOS」という)及びペルフルオロオクタン酸(以下、「PFOA」という))を酸性下でメタノール抽出し、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 PFOS 及び PFOA を求める。なお、この試験法の性能は備考 19 に示す。

備考 1. PFOS 及び PFOA の構造式は図 1-1 及び図 1-2 のとおりである。

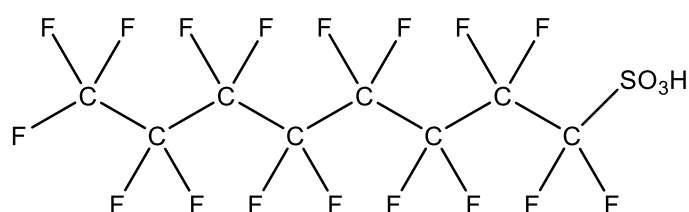


図 1-1 PFOS の構造式

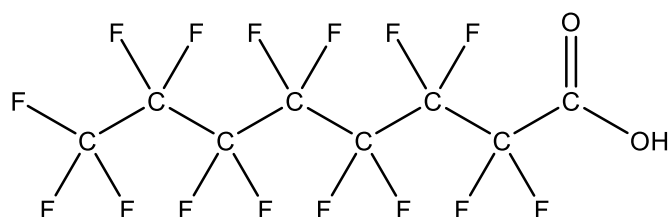


図 1-2 PFOA の構造式

(2) 試薬等 試薬及び水は、次による。

- a) 水: JIS K 0557 に規定する A4 の水。
- b) アセトニトリル: LC-MS 用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) 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。
- e) ぎ酸: JIS K 8264 に規定する 98%(質量分率)以上の特級又は同等の品質の試薬。
- f) 酢酸アンモニウム溶液(1 mol/L): 高速液体クロマトグラフ用又は同等の品質の試薬。
- g) 酢酸アンモニウム溶液(10 mmol/L)⁽¹⁾: 酢酸アンモニウム溶液(1 mol/L)10 mL に水を加えて 1000 mL とする。
- h) 溶離液: 分離条件に則した組成の溶離液を調製する。参考として附属書 D2 を示した。
- i) PFOS 標準原液: PFOS[C₈HF₁₇SO₃]の濃度及び不確かさが明らかな標準液⁽²⁾。
- j) PFOA 標準原液: PFOA[C₈HF₁₅O₂]の濃度及び不確かさが明らかな標準液⁽²⁾。
- k) PFOS 標準液(1 µg/mL)⁽¹⁾: PFOS 標準原液の一定量をメタノールで希釈し、PFOS 標準液(1 µg/mL)を調製する。
- l) PFOA 標準液(1 µg/mL)⁽¹⁾: PFOA 標準原液の一定量をメタノールで希釈し、PFOA 標準液(1 µg/mL)を

調製する。

- m) **混合標準液(100 ng/mL)**⁽¹⁾: PFOS 標準液(1 µg/mL)及び PFOA 標準液(1 µg/mL)の一定量を混合し、メタノール-水(1+1)で希釈し、混合標準液(100 ng/mL)を調製する。
- n) **混合標準液(10 ng/mL)**⁽¹⁾: 混合標準液(100 ng/mL)の一定量をメタノール-水(1+1)で希釈し、混合標準液(10 ng/mL)を調製する。
- o) **混合標準液(1 ng/mL)**⁽¹⁾: 混合標準液(10 ng/mL)の一定量をメタノール-水(1+1)で希釈し、混合標準液(1 ng/mL)を調製する。
- p) **¹³C 標識化 PFOS 内標準原液**: ¹³C₄-PFOS[C₈HF₁₇SO₃]又は ¹³C₈-PFOS[C₈HF₁₇SO₃]の濃度及び不確かさが明らかな標準液⁽²⁾。
- q) **¹³C 標識化 PFOA 内標準原液**: ¹³C₄-PFOA[C₈HF₁₅O₂]又は ¹³C₈-PFOA[C₈HF₁₅O₂]の濃度及び不確かさが明らかな標準液⁽²⁾。
- r) **¹³C 標識化 PFOS 内標準液(1 µg/mL)**⁽¹⁾: ¹³C 標識化 PFOS 内標準原液の一定量をメタノールで希釈し、PFOS 内標準液(1 µg/mL)を調製する。
- s) **¹³C 標識化 PFOA 内標準液(1 µg/mL)**⁽¹⁾: ¹³C 標識化 PFOA 内標準原液の一定量をメタノールで希釈し、PFOA 内標準液(1 µg/mL)を調製する。
- t) **¹³C 標識化混合内標準液(200 ng/mL)**⁽¹⁾: ¹³C 標識化 PFOS 内標準液(1 µg/mL)及び ¹³C 標識化 PFOA 内標準液(1 µg/mL)の一定量を混合し、メタノールで希釈し、¹³C 標識化混合内標準液(200 ng/mL)を調製する。
- u) **¹³C 標識化混合内標準液(20 ng/mL)**⁽¹⁾: ¹³C 標識化混合内標準液(200 ng/mL)の一定量をメタノール-水(1+1)で希釈し、¹³C 標識化混合内標準液(20 ng/mL)を調製する。
- v) **検量線用混合標準液(0.1 ng/mL～50 ng/mL)**⁽¹⁾: 混合標準液(100 ng/mL)の 1 mL～5 mL を全量フラスコ 20 mL に段階的にとり、¹³C 標識化混合内標準液(20 ng/mL)1 mL をそれぞれ加え、標線までメタノール-水(1+1)を加える。
混合標準液(10 ng/mL)の 1 mL～5 mL を全量フラスコ 20 mL に段階的にとり、¹³C 標識化混合内標準液(20 ng/mL)1 mL を加え、標線までメタノール-水(1+1)をそれぞれ加える。
混合標準液(1 ng/mL)の 1 mL～5 mL を全量フラスコ 20 mL に段階的にとり、¹³C 標識化混合内標準液(20 ng/mL)1 mL をそれぞれ加え、標線までメタノール-水(1+1)を加える。
- v) **分析試料添加用 ¹³C 標識化混合内標準液(20 ng/mL)**⁽¹⁾: ¹³C 標識化混合内標準液(200 ng/mL)の一定量をメタノールで希釈し、分析試料添加用 ¹³C 標識化混合内標準液(20 ng/mL)を調製する。

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. PFOS 標準原液、PFOA 標準原液、¹³C 標識化 PFOS 内標準原液及び ¹³C 標識化 PFOA 内標準原液は直鎖体が主成分のものを用いる。

備考 3. PFOS 標準原液、PFOA 標準原液、¹³C 標識化 PFOS 内標準原液及び ¹³C 標識化 PFOA 内標準原液は Wellington Laboratories 等より販売されている。ただし、Wellington Laboratories 製以外の製品を用いる場合は、室内精度を含むすべての性能パラメータを確認する必要がある。

備考 4. PFOS 標準原液及び ¹³C 標識化 PFOS 内標準原液は Na 塩又は K 塩で販売されている。PFOS の酸としての含有量は、保証書に記載されている酸としての量又は換算係数(Na 塩:0.958、K 塩:0.929)を用

いて算出する。

備考 5. 酢酸アンモニウム溶液(1 mol/L)の高速液体クロマトグラフ用は富士フィルム和光純薬及び関東化学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～3.0 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) **超音波発生器**： 超音波洗浄機を用いることができる。

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**： 7500×g～10 000×g で遠心分離可能なもの。

f) **試験管ミキサー**： ボルテックスミキサー

g) **弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラム**： 弱陰イオン交換基を結合したポリマー500 mg を注射筒 6 mL に充てんしたもの。

h) **グラファイトカーボンカートリッジカラム**： グラファイトカーボン 400 mg が充てんされたもの。

i) **ねじ口遠心沈殿管 50 mL**： ポリプロピレン製の 50 mL のねじ口試験管で遠心分離機での操作を行えるもの。

j) **ねじ口試験管 50 mL**： ポリプロピレン製の 50 mL のねじ口試験管で 50 mL に目盛のあるもの。

k) **ねじ口試験管 15 mL**： ポリプロピレン製の 15 mL のねじ口試験管。

l) **目盛付き試験管**： 7 mL～10 mL の試験管で 0.5 mL 及び 1 mL に目盛のあるもの。

m) **標準液及び試料溶液用バイアル**： ポリプロピレン製の 0.3 mL～1 mL のねじ口バイアル。

備考 6. カラムは InertSustain C18、InertSustain C18 HP、InertSustainSwift C18 HP、InertSustain AQ-C18、ACQUITY UPLC C18、ACQUITY UPLC BEH C18、Shim-pack Velox SP-C18、ZORBAX Eclipse Plus C18、Atlantis T3 等の名称で市販されている。

備考 7. 弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラムは InertSep MA-2 500 mg/6 mL、Oasis WAX 6 cc(500 mg)、Oasis WAX for PFAS Analysis 6 cc(500 mg) 等の名称で市販されている。

備考 8. グラファイトカーボンカートリッジカラムは InertSep Slim GC 400 mg 等の名称で市販されている。

備考 9. 50 mL の標線(ASTM Standard E1272 クラス A(± 0.25 mL))を有する試験管は、DigiTUBEs 等の名称で市販されている。なお、内標準液を加えているため、(4.1)f) の操作では溶液を正確に 50 mL とする必要はない。

備考 10. i)～l) の容器、全量ピペット、パスツールピペット及びピストン式ピペットのチップは、JIS K 8891 に規定するメタノールで洗浄し、メタノールを揮散させる。

備考 11. i)～k)及び m)の容器にはポリエチレン製又はポリプロピレン製ねじ蓋を用い、汚染を防ぐため四ふっ化エチレン樹脂等のパッキンは使用しない。

(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 ねじ口遠心沈殿管に入れる。
- b) 分析試料添加用 ^{13}C 標識化混合内標準液(20 ng/mL) 1 mL を加える。
- c) メタノール 15 mL 及びぎ酸 0.1 mL を加え、超音波発生器を用いて 20 分間超音波処理する。
- d) 遠心力約 $1700\times g$ で約 5 分間遠心分離⁽³⁾、上澄み液を 50 mL ねじ口試験管に移す⁽⁴⁾。
- e) c)～d)の操作を 2 回実施して上澄み液を合わせる。
- f) 50 mL の目盛までメタノールを加え、抽出液とする。
- g) 空試験として別のねじ口遠心沈殿管を用いて b)～f)の操作を実施し、空試験用抽出液を調製する。

注 (3) 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。

(4) デカンテーションで移す。

備考 12. 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⁽⁵⁾ クリーンアップは、次のとおり行う。

- a) 弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラムを予めアンモニア水⁽⁶⁾－メタノール(1+100)約 5 mL、メタノール約 5 mL 及びメタノール－水(1+1)約 5 mL で順次洗浄する。
- b) グラファイトカーボンカートリッジカラムを予めメタノール約 5 mL で洗浄する⁽⁷⁾。
- c) (4.1)f)の抽出液 5 mL を 15 mL ねじ口試験管にとり、水 5 mL を加えて振り混ぜる。
- d) c)の操作で固形分が浮遊又は沈降している場合は、遠心力約 $1700\times g$ で約 5 分間遠心分離する⁽³⁾。
- e) c)の操作後の溶液又は d)の操作で得た上澄み液を弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラムに負荷し、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。
- f) 15 mL ねじ口試験管をメタノール－水(1+1)約 5 mL で洗浄し、洗液を同じカラムに負荷し、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。
- g) メタノール約 5 mL を 2 回弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラムに加え、順次液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。
- h) b)で洗浄したグラファイトカーボンカートリッジカラムを弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラムの下に連結⁽⁸⁾する。
- i) アンモニア水⁽⁶⁾－メタノール(1+100)2 mL を加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。
- j) 目盛付き試験管をカートリッジカラムの下に置き、アンモニア水⁽⁶⁾－メタノール(1+100)4 mL をカートリッジカラムに加えて PFOS、PFOA 及びそれらの内標準物質を溶出させる。
- k) 窒素ガスを溶出液に穏やかに吹き付け、0.5 mL の目盛まで濃縮する。
- l) 水約 0.4 mL を加え、試験管ミキサーで振り混ぜる⁽⁹⁾。
- m) 更に 1 mL の目盛まで水を加え、試験管ミキサーで振り混ぜ、1.5 mL 共栓遠心沈殿管に入れる⁽¹⁰⁾。
- n) 遠心力 $7500\times g\sim 10\,000\times g$ で約 5 分間遠心分離⁽¹¹⁾、上澄み液を試料溶液とする。
- o) c)の操作の(4.1)f)の抽出液を(4.1)g)の空試験用抽出液に変えて a)～l)の操作を実施し、空試験溶液を

調製する。

注(5) c)及びd)の操作は必要に応じて減圧装置を用いるか、又は加圧する。

- (6) アンモニア濃度 28% (質量分率) のアンモニア水を用いること。
- (7) リザーバーを用いてメタノールをグラファイトカーボンカートリッジカラムに入れる。
- (8) グラファイトカーボンカートリッジカラムのリザーバーを取り外し、弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラムに直接連結する。
- (9) 析出物を溶かす。
- (10) **m)**及び**n)**の操作は必要に応じて実施する。ただし、LC-MS/MS の保護のため、可能な範囲の遠心力で遠心分離を実施することが望ましい。
- (11) 回転半径 7.2 cm～8.9 cm 及び回転数 10 000 rpm で遠心力 $8100 \times g \sim 10\,000 \times g$ 程度となる。

備考 13. (4.1)f) の抽出液、(4.1)g) の空試験用抽出液、(4.2)n) の試料溶液及び(4.2)o) の空試験溶液は安定であるので密封して常温で保存し、後日その後の操作を実施してもよい。

備考 14. c) の操作で水を加えると溶液は濁るが、固形分が浮遊又は沈降していない場合は、**e)** 以降の操作を実施しても差し支えない。

固形分が浮遊又は沈降している場合は、**d)** の操作の遠心分離を実施し、**e)** 及び **f)** の操作においては可能な範囲で固形分を弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラムに加えない。また、メタノールは、固形分を溶解するので、**g)** の操作では容器を洗浄せずに直接弱陰イオン交換ポリマーカートリッジカラムに加える。

(4.3) 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質量分析計の測定条件

測定条件の一例を附属書 D2 の表 1 に示す。実際の測定条件は使用する機器やカラム等に合わせて附属書 D2 を参考に以下の項目を設定する。

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: 酢酸アンモニウム溶液(10 mmol/L)等 B: アセトニトリル又はメタノール
- ④ グラジエント: 附属書 D2 表 1 参照
- ⑤ カラム恒温槽: 40 $^{\circ}\text{C}$ ～45 $^{\circ}\text{C}$
- 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: ネガティブ
- ③ モニターイオン: 表 1 のとおり

表1 測定対象物質及び内標準物質のモニターイオン例

化合物名	質量電荷比(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)
PFOS	499	80	99
$^{13}\text{C}_4$ -PFOS	503	80	99
$^{13}\text{C}_8$ -PFOS	507	80	99
PFOA	413	169	369
$^{13}\text{C}_4$ -PFOA	417	169	372
$^{13}\text{C}_8$ -PFOA	421	172	376

備考 15. 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は一例である。PFOS 及び PFOA には炭素鎖が直鎖状に結合したもの(以下、「直鎖体」とする。)の他に炭素鎖が分岐した構造異性体(以下、「分岐異性体」とする。)が存在する。使用するカラムで PFOS 及び PFOA の直鎖体と分岐異性体のピークを分離して測定できるように、**1)**の①～⑤の高速液体クロマトグラフの条件を設定する。また、使用する高速液体クロマトグラフ質量分析計に合わせて **2)**の①～③以外の質量分析計のパラメータを設定する。なお、プレカーサーイオン及びプロダクトイオンは質量分析計の最適化を実施して微調整してもよい。

備考 16. PFOS 及び PFOA の保持時間に相当する位置に移動相及び高速液体クロマトグラフ質量分析計由来の不純物のピークが発生する場合は、溶離液の送液ポンプと測定に供する溶液の注入口の間にディレイカラム(内径 2 mm～4.6 mm、長さ 10 mm～50 mm 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又は高純度活性炭を充てんしたもの)を装着して不純物のピークを試験液の PFOS 及び PFOA のピークから分離する等により、測定に影響しないよう対処することが望ましい。ディレイカラムは、Delay Column for PFAS、ACQUITY UPLC BEH C18、ACQUITY UPLC C18、Shim-pack XR-ODS II、ZORBAX Eclipse Plus C18、ZORBAX Eclipse XDB-C18、InertSustain AQ-C18 等の名称で市販されている。

b) 検量線の作成

- 1) 各検量線用混合標準液 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、PFOS、PFOA、 ^{13}C 標識化 PFOS 及び ^{13}C 標識化 PFOA 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) PFOS 及び PFOA の定量用イオン(m/z)のピーク面積と ^{13}C 標識化 PFOS 及び ^{13}C 標識化 PFOA の定量用イオン(m/z)のピーク面積の比を算出する。
- 3) PFOS、PFOA、 ^{13}C 標識化 PFOS 及び ^{13}C 標識化 PFOA の定量用イオン(m/z)と確認用イオン(m/z)のピーク面積の比を算出する。
- 4) 各検量線用混合標準液の PFOS 及び PFOA 濃度と **2)**で求めたピーク面積比の検量線を作成する。

c) 試料の測定

- 1) (4.2)I)の試料溶液を 5 μL を **b) 1)～3)**と同様に操作する⁽¹²⁾。
- 2) 検量線から試料溶液中の PFOS 及び PFOA 濃度を求め、分析試料中の PFOS 及び PFOA 濃度を算出する。

d) 空試験溶液の測定

- 1) (4.2 m) の空試験溶液 5 μL を b) 1) ~ 3) と同様に操作する。
- 2) 検量線から空試験溶液中の PFOS 及び PFOA 濃度を求め、検量線濃度範囲の下限(0.1 ng/mL)を下回ることを確認する。

注(12) 試料溶液の定量用イオン(m/z)と確認用イオン(m/z)のピーク面積比が、標準液のピーク面積比に対して $\pm 30\%$ 程度の範囲内であることを確認する。なお、ピーク面積比は濃度によって異なることがある。

備考 17. 分岐異性体の定量を行う場合は、PFOS 及び PFOA の分岐異性体の定量用イオン(m/z)のピーク面積と ^{13}C 標識化 PFOS 及び ^{13}C 標識化 PFOA の定量用イオン(m/z)のピーク面積の比を算出して定量する。

備考 18. d) 2) で求めた空試験溶液中の PFOS 及び PFOA 濃度が、検量線濃度範囲の下限以上の場合は、原因を調べ測定に支障がないレベルまでブランク値を低減した後、空試験溶液の調製を再度行って、再試験を行う。

備考 19. 真度評価のため、汚泥等 3 種類を用いて添加回収試験を実施した結果、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及び 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の添加レベルでの PFOS の平均回収率はそれぞれ 96.5 %~101.1 %、93.8 %~96.5 % 及び 83.3 %~102.1 % であり、PFOA の平均回収率はそれぞれ 100.4 %~107.3 %、92.3 %~96.0 % 及び 99.7 %~102.7 % であった。

精度評価のため、汚泥等 2 種類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 2 に示す。

また、室間再現精度を推定するために国際的に標準とされる共同試験を実施して得られた分析値を用いて統計解析した結果を表 3-1~3-2 に示す。共同試験では、直鎖体及びその直鎖体の含有量と分岐異性体の含有量を合計した量(表中では「含量」とする)を、PFOS については $^{13}\text{C}_4$ -PFOS 及び $^{13}\text{C}_8$ -PFOS を、PFOA については $^{13}\text{C}_4$ -PFOA 及び $^{13}\text{C}_8$ -PFOA を内標準物質として用いてそれぞれ分析した。

なお、この試験法の PFOS 及び PFOA の定量下限は 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度と推定された。

表2 有機ふっ素化合物の日を変えての反復試験成績の解析結果

化合物名	試料名	反復試験	平均値 ²⁾	s_r ³⁾	RSD_r ⁴⁾	$s_{I(T)}$ ⁵⁾	$RSD_{I(T)}$ ⁶⁾
		日数(T) ¹⁾	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	(%)	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	(%)
PFOS	汚泥 1	5	66.8	2.0	3.0	2.2	3.3
	汚泥 2	5	4.46	0.16	3.6	0.21	4.6
PFOA	汚泥 1	5	140	2	1.4	4	2.6
	汚泥 2	5	2.08	0.13	6.3	0.19	9.1

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3-1 PFOS分析試験法の妥当性確認のための室間共同試験成績の解析結果

定量方法 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⁾ (%)
PFOS 直鎖体 ¹³ C ₄ -PFOS	汚泥 A	13(0)	12.8	0.6	4.9	1.2	9.5
	汚泥 B	12(1)	49.2	0.8	1.6	2.9	6.0
	汚泥 C	13(0)	5.17	0.26	5.0	0.73	14.2
	汚泥 D	12(1)	16.6	0.9	5.5	1.7	10.2
	汚泥 E	13(0)	3.81	0.39	10.1	0.78	20.6
	乾燥菌体 F	13(0)	1.56	0.17	10.7	0.28	17.7
PFOS 含量 ¹³ C ₄ -PFOS	汚泥 A	13(0)	15.9	0.7	4.5	1.3	8.1
	汚泥 B	12(1)	59.8	1.1	1.8	4.0	6.7
	汚泥 C	13(0)	7.14	0.35	5.0	0.74	10.3
	汚泥 D	12(1)	23.4	1.2	5.1	1.9	8.2
	汚泥 E	13(0)	4.81	0.28	5.9	0.90	18.6
	乾燥菌体 F	13(0)	2.22	0.20	9.0	0.49	22.1
PFOS 直鎖体 ¹³ C ₈ -PFOS	汚泥 A	13(0)	12.8	0.6	5.0	1.0	7.8
	汚泥 B	13(0)	49.4	1.1	2.2	3.8	7.7
	汚泥 C	13(0)	5.26	0.40	7.7	0.71	13.5
	汚泥 D	13(0)	17.3	0.8	4.5	1.9	11.2
	汚泥 E	12(1)	3.82	0.23	6.1	0.53	13.9
	乾燥菌体 F	13(0)	1.61	0.18	10.9	0.27	16.7
PFOS 含量 ¹³ C ₈ -PFOS	汚泥 A	13(0)	15.8	0.7	4.4	1.4	8.6
	汚泥 B	13(0)	60.2	1.7	2.9	4.5	7.5
	汚泥 C	13(0)	7.30	0.46	6.3	0.95	13.0
	汚泥 D	12(1)	23.8	1.1	4.7	2.1	8.8
	汚泥 E	13(0)	4.93	0.19	3.8	0.77	15.6
	乾燥菌体 F	13(0)	2.28	0.26	11.3	0.47	20.6

1) 上段：測定化合物, 下段：内標準物質

2) 有効試験室数(外れ値を報告した試験室数)

3) 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

表3-2 PFOA分析試験法の妥当性確認のための室間共同試験成績の解析結果

定量方法 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⁾ (%)
PFOA 直鎖体 ¹³ C ₄ -PFOA	汚泥 A	13(0)	238	10	4.3	24	9.9
	汚泥 B	13(0)	139	5	3.7	11	7.6
	汚泥 C	13(0)	53.3	2.1	3.9	3.6	6.8
	汚泥 D	13(0)	18.9	0.5	2.8	2.0	10.4
	汚泥 E	13(0)	5.97	0.31	5.2	0.74	12.3
	乾燥菌体 F	11(2)	1.14	0.11	9.3	0.22	18.9
PFOA 含量 ¹³ C ₄ -PFOA	汚泥 A	13(0)	248	10	4.2	25	9.9
	汚泥 B	13(0)	151	6	3.8	10	6.7
	汚泥 C	13(0)	53.6	2.1	3.9	3.7	6.8
	汚泥 D	13(0)	19.6	0.6	2.9	2.1	10.8
	汚泥 E	13(0)	6.11	0.36	5.8	0.75	12.3
	乾燥菌体 F	11(2)	1.28	0.13	10.0	0.36	28.5
PFOA 直鎖体 ¹³ C ₈ -PFOA	汚泥 A	13(0)	236	10	4.3	19	7.8
	汚泥 B	13(0)	137	5	3.8	10	7.1
	汚泥 C	13(0)	53.2	2.9	5.4	4.8	9.0
	汚泥 D	13(0)	19.0	0.9	4.5	2.1	11.1
	汚泥 E	13(0)	5.87	0.28	4.8	0.77	13.1
	乾燥菌体 F	11(2)	1.13	0.09	8.0	0.21	18.7
PFOA 含量 ¹³ C ₈ -PFOA	汚泥 A	13(0)	247	11	4.3	19	7.8
	汚泥 B	13(0)	149	5	3.7	10	6.4
	汚泥 C	13(0)	53.5	2.8	5.3	4.8	8.9
	汚泥 D	13(0)	19.6	0.9	4.6	2.2	11.3
	汚泥 E	13(0)	6.03	0.31	5.1	0.78	13.0
	乾燥菌体 F	11(2)	1.29	0.15	11.4	0.34	26.6

1) 上段：測定化合物, 下段：内標準物質

2) 有効試験室数(外れ値を報告した試験室数)

3) 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) 白井裕治, 沼寄佳奈子: LC-MS/MS を用いた汚泥肥料中の PFOS 及び PFOA の分析, 肥料研究報告, 14, 123~140 (2021)

(5) 有機ふっ素化合物の試験法フローシート 汚泥肥料等中有機ふっ素化合物の試験法のフローシートを次に示す。

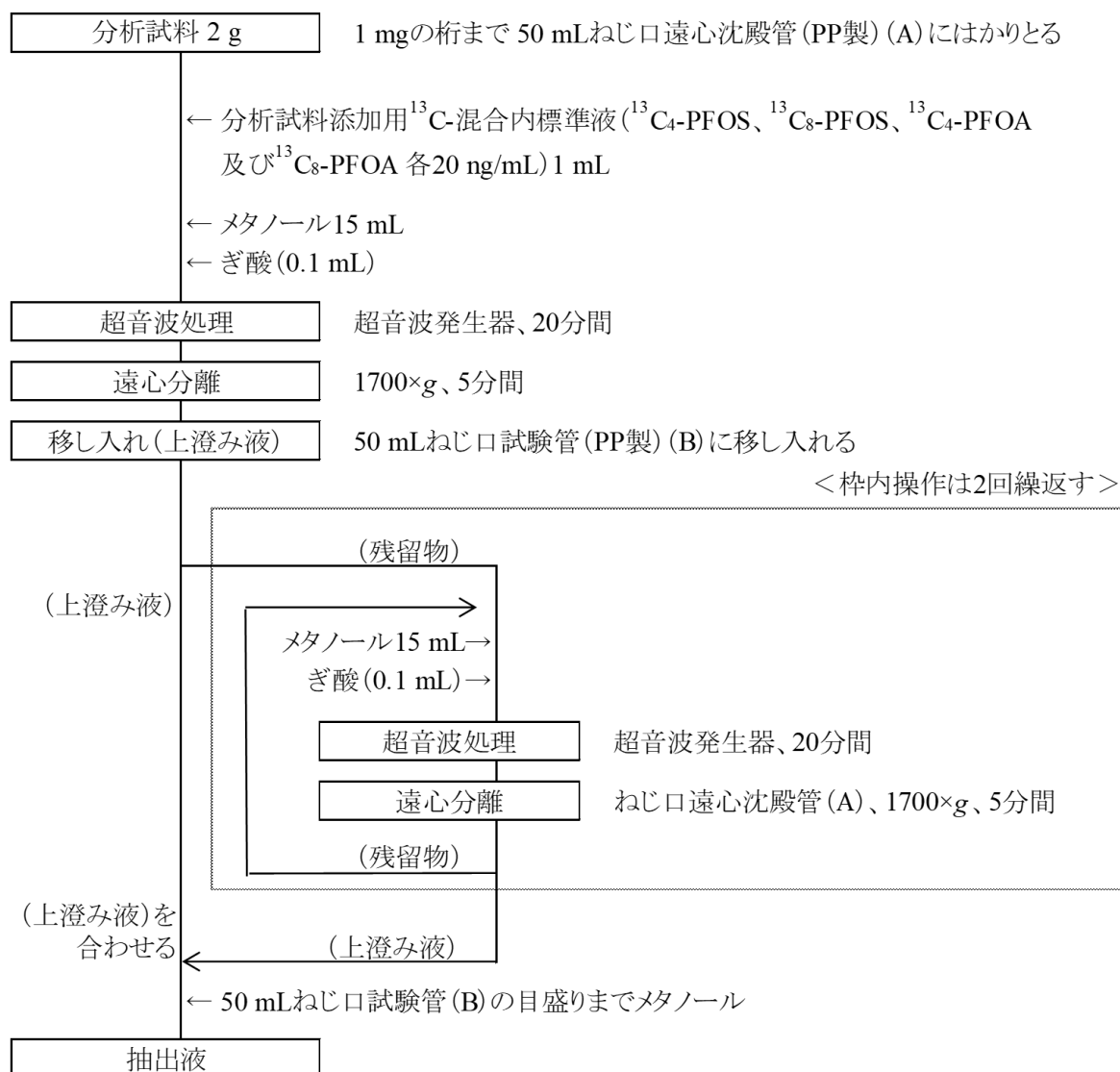


図2-1 汚泥肥料等中のPFOS及びPFOAの分析法フローシート(抽出操作)

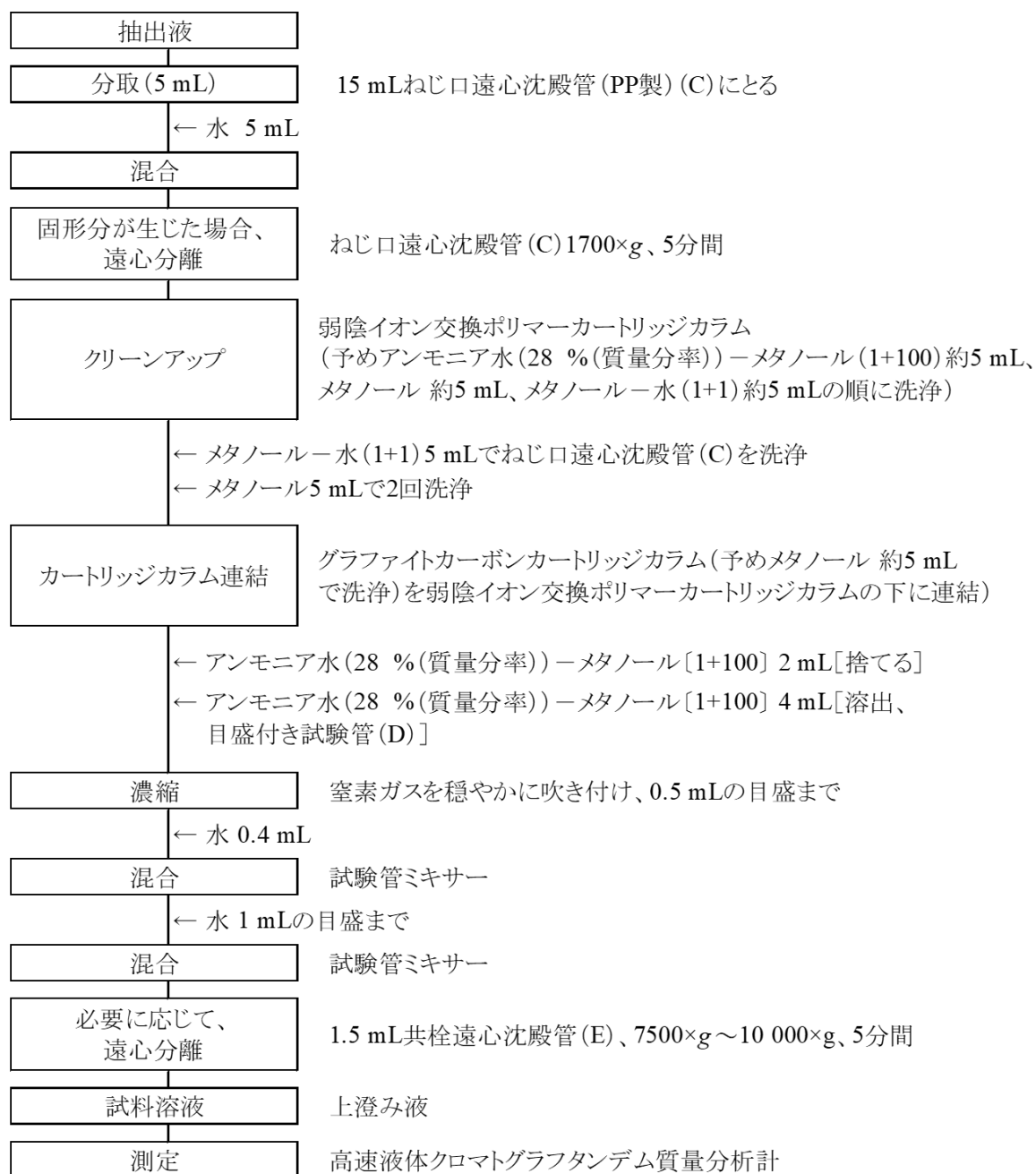
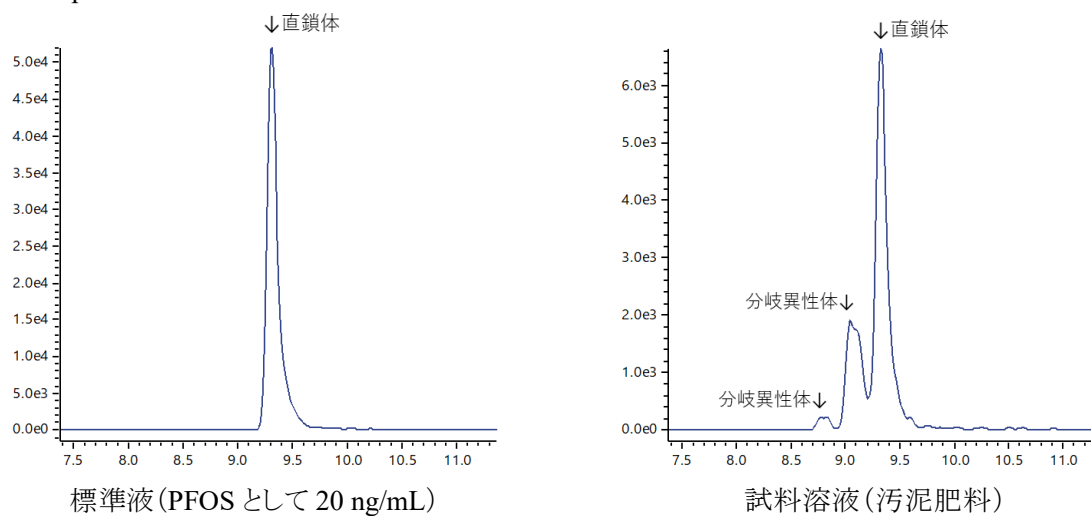
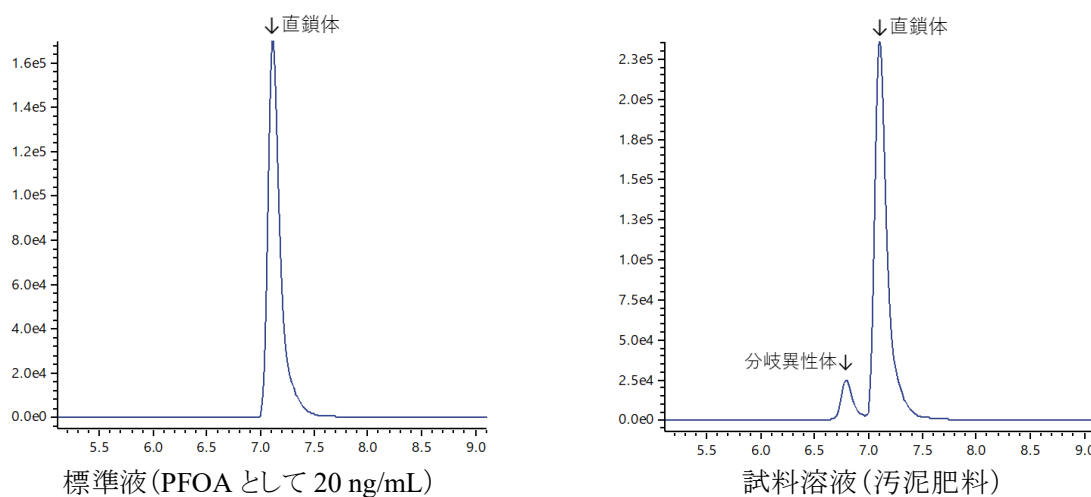


図2-2 汚泥肥料等中のPFOS及びPFOAの分析法フローシート(クリーンアップ操作及び測定操作)

参考 検量線用混合標準液及び試料溶液の定量用プロダクトイオンの多重反応モニタリング(MRM: Multiple Reaction Monitoring)クロマトグラム例を次に示す。



参考図 3-1 PFOS の MRM クロマトグラム



参考図 3-2 PFOA の MRM クロマトグラム

LC-MS/MS の測定条件

分離用カラム: InertSustain C18(内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 3 μm)

ディレイカラム: Delay column for PFAS (内径 3 mm、長さ 30 mm)

流量: 0.2 mL/min

溶離液: A: 酢酸アンモニウム溶液(10 mmol/L) B: アセトニトリル

グラジエント: 0 min (40 %B)→1.5 min (40 %B)→10 min (100 %B)→12 min (100 %B)→12.2 min (40 %B)
→20 min (40 %B)

カラム恒温槽: 40 °C

注入量: 5 μL

プローブ電圧: -1 kV

DL 温度: 200 °C

ヒートブロック温度: 300 °C

インターフェース温度: 300 °C

ネブライザーガス流量: 3 L/min

ドライイングガス流量: 5 L/min

ヒーティングガス流量: 15 L/min

参考表 最適化後の質量分析計のパラメーター

		質量電荷比 (m/z)		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	
PFOS	測定用	498.8	80.0	54.0
	確認用	498.8	98.9	44.0
¹³ C ₄ -PFOS	測定用	502.8	80.0	52.0
	確認用	502.8	98.9	45.0
¹³ C ₈ -PFOS	測定用	506.8	80.0	54.0
	確認用	506.8	99.0	46.0
PFOA	測定用	412.8	169.0	18.0
	確認用	412.8	369.0	10.0
¹³ C ₄ -PFOA	測定用	416.8	162.0	18.0
	確認用	416.8	372.0	9.0
¹³ C ₈ -PFOA	測定用	421.1	172.0	19.0
	確認用	421.1	376.0	9.0