

5 液体クロマトグラフタンデム質量分析(LC-MS/MS)法による

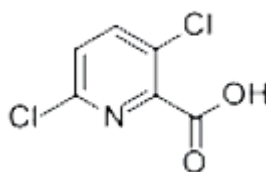
堆肥等中のクロピラリドの測定法の改良

中村信仁¹, 小塚健志², 白井裕治²

キーワード クロピラリド, 堆肥, 汚泥発酵肥料, 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計, 微量測定法

1. はじめに

クロピラリドはカルボキシル基を有するピリジン系の農薬であり(Fig. 1), クロピラリドに汚染された堆肥等を利用した場合, 植物種により生育障害等が発現することが知られている¹⁾. 国内では使用されていないが, 除草剤として使用されている米国, カナダ, 豪州からの輸入飼料に含まれていることがあり, 平成 28 年度に行われた調査によると, 国内の飼料中及び牛ふん堆肥中にもクロピラリドが含まれることが確認されている^{2a)}. さらに平成 29 年度に行われた調査では, 牛ふん堆肥中のみならず, 豚ふん, 鶏ふん等種々の家畜ふんを利用した堆肥にも含有していることが確認された^{2b)}.



Clopyralid

CAS No: 1702-17-6

Fig. 1 Chemical structure of clopyralid

牛ふん堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリドの分析法としては, 平成 21 年度から平成 28 年度において八木, 顯谷, 小塚らにより液体クロマトグラフタンデム型質量分析(LC-MS/MS)法が開発および妥当性の確認がなされ³⁻⁵⁾, 定量下限が 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の試験方法として肥料等試験法に収載されている⁶⁾. しかしながら, 土壌中のクロピラリド濃度が 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度の低濃度においても作物によっては生育障害を引き起こす場合があることから⁷⁾より高感度な分析法が必要とされ, 平成 29 年度に農業・食品産業技術総合研究機構により定量下限 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下の「牛ふん堆肥中クロピラリドの高感度分析法(参考法)」(以下「微量クロピラリド試験法」という。)が開発された⁸⁾.

クロピラリドは牛ふん以外の畜ふんを利用した堆肥にも含有している可能性があったことから, 平成 29 年度に伊藤らによって微量クロピラリド試験法の適用範囲拡大が行われたところである⁹⁾. しかしながら, その過程で精製中にカラムが目詰まりを起こし分析が困難となる堆肥があること, 工程が煩雑であること, 人体に

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部 (現) 仙台センター

² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

影響を及ぼすジクロロメタンの使用があることから、分析法の改良が必要とされた。そこで今回、これらの課題を解決するため微量クロピラリド試験法の改良を行い、単一試験室の妥当性確認を行ったのでその概要を報告する。

2. 材料及び方法

1) 試料の収集及び調製

流通肥料 20 種類(牛ふん堆肥 5 点, 馬ふん堆肥 2 点, 鶏ふん堆肥 4 点, 豚ふん堆肥 4 点及び汚泥発酵肥料 5 点)を試験品とし, それぞれ 40 °C で約 60 時間乾燥した後, それぞれ粉砕機で目開き 500 µm の網ふるいを通すまで粉砕して分析用試料を調製した。

2) 装置及び器具

- (1) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(LC-MS/MS) : Waters Quatro Premier XE
カラム: Waters ACQUITY UPLC HSS C18(内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒径 1.8 µm)
- (2) 振とう機: TAITEC SR-2DW
- (3) 遠心分離機: KUBOTA テーブルトップ遠心機 4000
- (4) ロータリーエバポレーター: BÜCHI R-200
- (5) コポリマーカートリッジカラム: Waters Oasis HLB 12cc(500 mg)
- (6) ジルコニアコートシリカゲルカラム: HybridSPE®-Phospholipid(500 mg)
- (7) 超遠心分離機: AS ONE MCD-2000
- (8) マニホールド: GL-Sciences
- (9) 試験管ミキサー: AS ONE 試験管ミキサーTRIO TM-2N

3) 試薬

- (1) 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水。ただし, LC-MS/MS に導入する溶離液については A4 の水を使用した。
- (2) アセトニトリル: JIS K 8039 残留農薬・PCB 試験用試薬(濃縮 5000)(富士フィルム和光純薬)
- (3) メタノール(抽出・クリーンアップ用): 残留農薬・PCB 試験用試薬(濃縮 5000)または LC-MS 用(富士フィルム和光純薬)
- (4) メタノール(溶離液用): LC-MS 用試薬(富士フィルム和光純薬)
- (5) 水酸化ナトリウム: JIS K 8576 特級試薬(関東化学)
- (6) 塩酸: JIS K 8180 微量金属分析用試薬(富士フィルム和光純薬)
- (7) アンモニア水: JIS K8085 特級試薬(質量分率 28 %)(富士フィルム和光純薬)
- (8) ぎ酸: LC-MS 用試薬(富士フィルム和光純薬)
- (9) クロピラリド: 残留農薬試験用試薬(富士フィルム和光純薬)
- (10) アンモニア溶液(0.0028 % (質量分率)): アンモニア水 0.1 mL を水 1000 mL に加える。
- (11) クロピラリド標準液(0.1 mg/mL): クロピラリド[C₆H₃Cl₂NO₂]約 0.01 g をひょう量皿にとり, その質量を 0.1 mg の桁まで測定した後, 少量のアセトニトリルで溶かし, 全量フラスコ 100 mL に移し入れ, 標線まで同溶媒を加えた。
- (12) クロピラリド標準液(1 µg/mL): クロピラリド標準液(0.1 mg/mL)の 2 mL を全量フラスコ 200 mL にと

り、標線までアセトニトリルを加えた。

(13) 検量線用クロピラリド標準液(100 ng/mL)： 使用時にクロピラリド標準液(1 µg/mL)の5 mLを全量フラスコ50 mLにとり、標線までぎ酸(1+1000)を加えた。

(14) 検量線用クロピラリド標準液(5 ng/mL～50 ng/mL)： 検量線用クロピラリド標準液(100 ng/mL)の2.5 mL～25 mLを全量フラスコ50 mLに段階的にとり、標線までぎ酸(1+1000)を加えた。

(15) 検量線用クロピラリド標準液(0.5 ng/mL～2 ng/mL)： 検量線用クロピラリド標準液(10 ng/mL)の2.5 mL～10 mLを全量フラスコ50 mLに段階的にとり、標線までぎ酸(1+1000)を加えた。

4) 試験操作

(1) 抽出

分析試料 2.00 g を量ってねじ口遠心沈殿管 50 mL に入れ、水酸化ナトリウム溶液(40 g/L)－メタノール[1+99]を25 mL 加え、振とう機で30分間振り混ぜた。その後、遠心力約 $1700 \times g$ で5分間遠心分離し、上澄み液を200 mL なす形フラスコに移した。残留物に水酸化ナトリウム溶液(40 g/L)－メタノール[1+99]を10 mL 加え、手振りで振り混ぜた後、遠心力約 $1700 \times g$ で5分間遠心分離した。得られた上澄み液は先に得られた上澄み液と合わせ、残留物に再び水酸化ナトリウム溶液(40 g/L)－メタノール[1 + 99]10 mL を加え、手振りで振り混ぜた後、遠心力約 $1700 \times g$ で5分間遠心分離した。先程と同様に得られた上澄み液を合わせ、全ての上澄み液を合わせた溶液を抽出液とした。

(2) 精製1

コポリマーカートリッジカラムを予めアセトニトリル5 mL及び塩酸(1+120)5 mLで速やかに洗浄した。抽出液を40 °C以下の水浴で減圧濃縮した後、塩酸(1+11)3 mLを加えた。その後、懸濁液を10 mL ねじ口試験管に移し替え、遠心力約 $740 \times g$ で5分間遠心分離した。上澄み液は洗浄したカートリッジカラムに負荷し、液面が充填剤の上端に達するまで流出させた。残留物に塩酸(1+120)5 mLを加え、試験管ミキサーで振り混ぜた後、遠心力約 $740 \times g$ で5分間遠心分離した。上澄み液をカートリッジカラムに負荷し、同様の操作を2回繰り返した後、塩酸(1+120)－アセトニトリル[9+1]10 mL及び水5 mLを順次カートリッジカラムに加えて速やかに流出させた。ねじ口試験管10 mLをカートリッジカラムの下に置き、アンモニア溶液(0.0028 w/v %)－アセトニトリル(9+1)8 mLをカートリッジカラムに正確に加え、クロピラリドを速やかに溶出させた。この溶出液にぎ酸(1+1000)2 mLを加え、混合した。

(3) 精製2

ジルコニアコートシリカゲルカラムをアセトニトリル5 mL及びぎ酸(1+1000)5 mLで速やかに洗浄した。精製1で得た混合液を洗浄したカラムに負荷し、速やかに液面が充填剤の上面に達するまで溶出させた。カラムをアセトニトリル5 mLで洗浄後、ぎ酸－アセトニトリル(2+98)10 mLでクロピラリドを50 mLなす形フラスコに溶出させた。この溶出液を40 °C以下の水浴上で減圧濃縮した後、窒素ガスを吹き付けて乾固させた。残留物に少量のぎ酸(1+1000)で溶解し、5 mL全量フラスコに数回移し替えた後、ぎ酸(1+1000)で定容した。定容した溶液の一定量をプラスチック製遠心沈殿管に入れ、遠心力約 $8100 \times g$ で5分間遠心分離した。得られた上澄み液をLC-MS/MSの測定バイアルに移し、試料溶液とした。

(4) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定

試料溶液及び検量線作成用混合標準液をLC-MS/MSに注入し、Table 1及びTable 2の測定条件に従っ

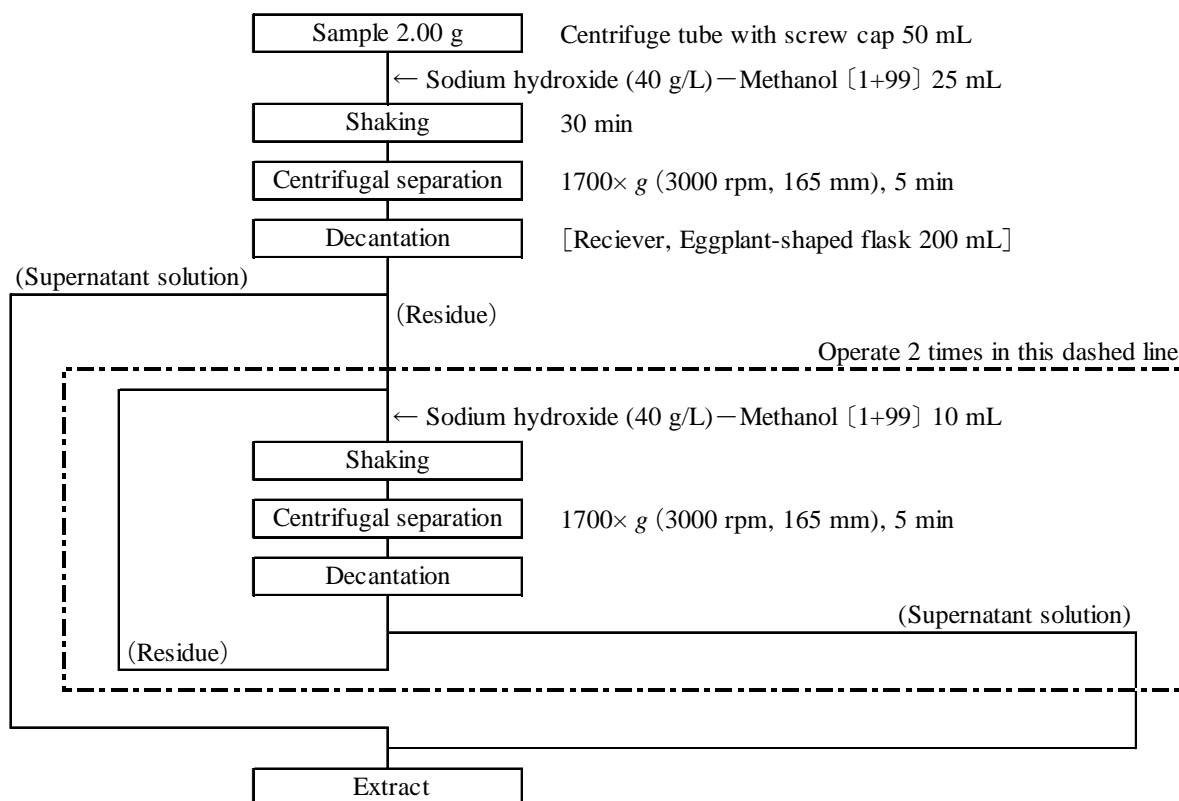
て選択反応検出 (SRM) クロマトグラムを得た。得られた SRM クロマトグラムから各成分のピーク面積を求めて検量線を作成し、試料溶液中の各成分量を求め、分析試料中のクロピラリドの量を算出した。なお、定量法の概要を Scheme 1-1~Scheme 1-3 に示した。

Table 1 Operating conditions of LC-MS/MS

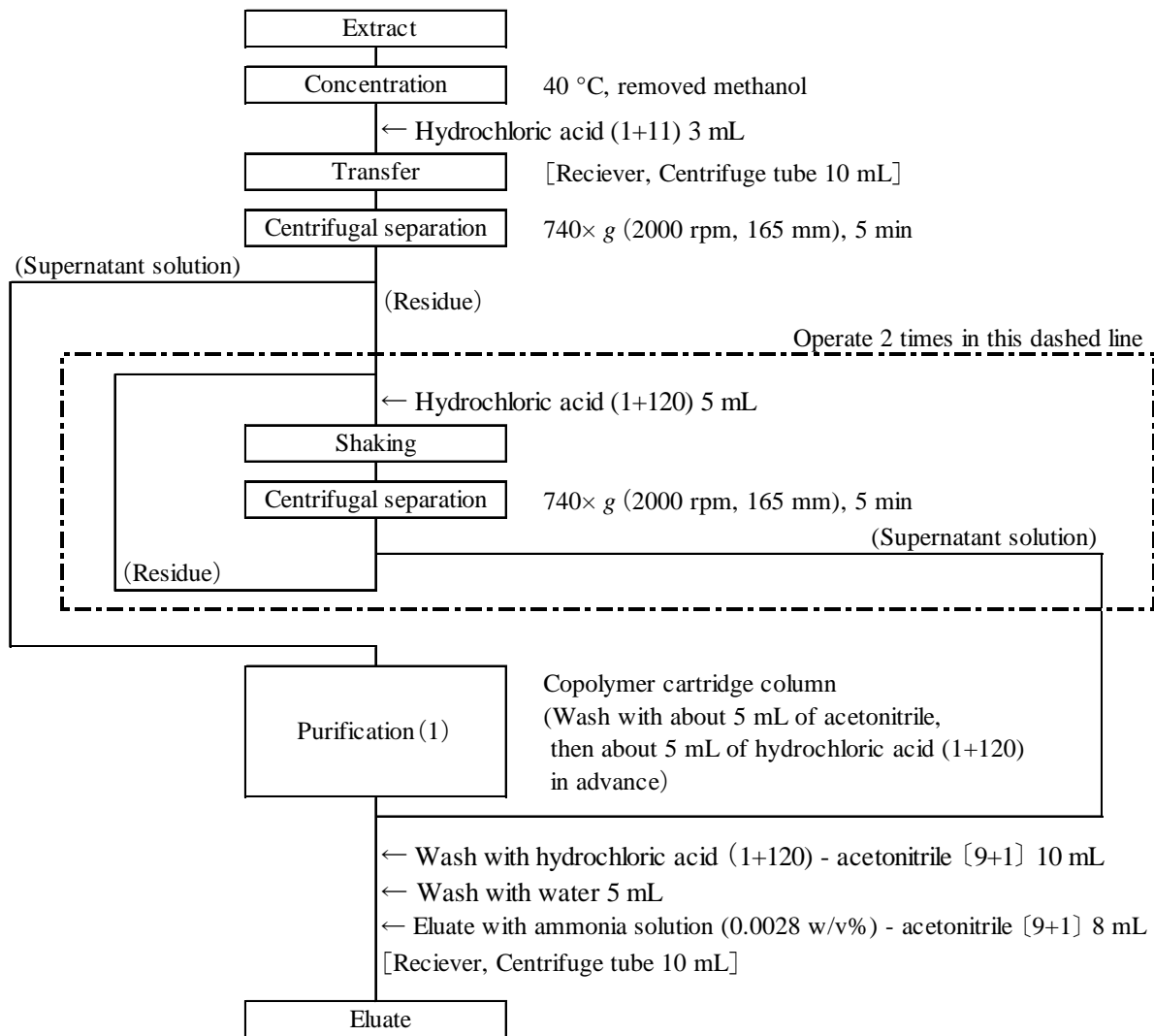
Column	Waters, ACQUITY UPLC HSS C18 (2.1 mm i.d.×100 mm, 1.8 μm)
Mobile phase	A: Formic Acid (1+1000) B: Methanol 0 min (5 % B)→5 min (60 % B)→6 min (95 % B)→7 min (5 % B)
Flow rate	0.4 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Desolvation gas	N ₂ , 400 °C, 800 L/h
Cone gas	Ar (50 L/h)
Capillary voltage	1.0 kV
Ion source	120 °C

Table 2 MS/MS Parameters

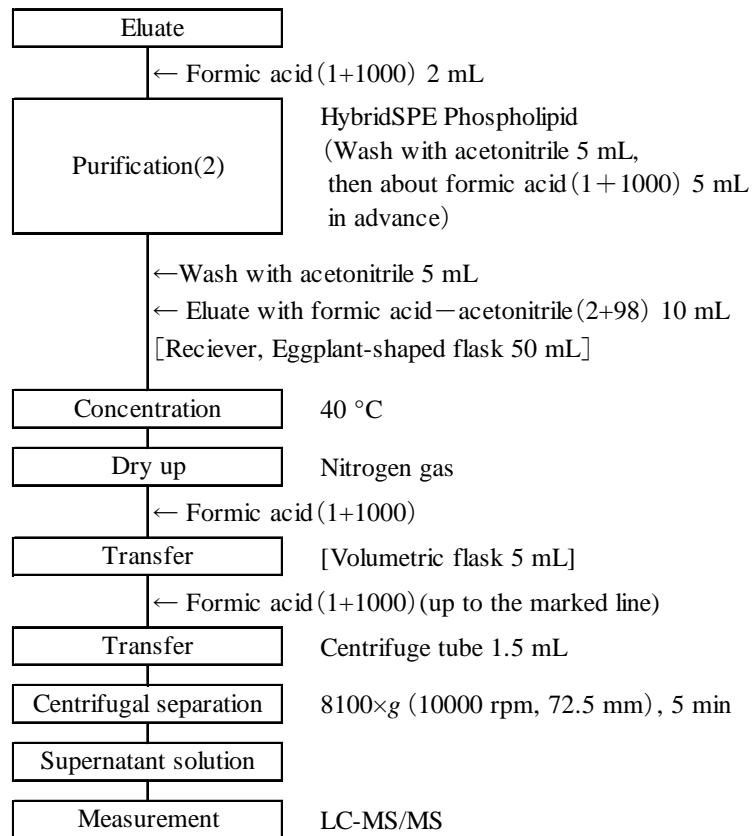
Agricultural chemical	Precursor ion (m/z)	Product ion		Cone voltage (V)	Collision energy	
		for quantification (m/z)	for identification (m/z)		for quantification (eV)	for identification (eV)
Clopyralid	192	146	110	20	20	30



Scheme 1-1 Analytical procedure for clopyralid in compost (extraction)



Scheme 1-2 Analytical procedure for clopyralid in compost (purification(1))



Scheme 1-3 Analytical procedure for clopyralid in compost (purification(2) and measurement)

3. 結果及び考察

1) カートリッジカラムの溶出画分の検討

カートリッジカラムについて溶出液の溶出画分に関する検討を行った。牛ふん堆肥、鶏ふん堆肥、豚ふん堆肥及び汚泥発酵肥料について2.の4)(1)精製1で得た溶出液に試料中濃度で200 µg/kg相当量となるように標準添加したそれぞれ検討用負荷液を2.の4)(3)精製2に従って、ギ酸-アセトニトリル(2+98)12.5 mLを加え、各2.5 mLごとの流出画分中に含まれるクロピラリドを測定した。その結果、Table 3のとおり、クロピラリドは0 mL~10 mLに溶出し、それ以降の画分への溶出は確認されなかった。また、2.の4)(2)精製1についても充填剤容量の変更に伴い、100 ng/mLとなるように調製した標準液を用いて、2 mLごとに10 mLまで分画を行った。その結果はTable 4に示したとおり、8 mLまでの画分に溶出し、それ以降の画分にはほとんど含まれていなかった。

Table 3 Elution pattern from HybridSPE[®]-Phospholipid cartridge column

Fraction volume	0-2.5 mL	2.5-5 mL	5-7.5 mL	7.5-10 mL	10-12.5 mL	Total
Sample ^{a)}	Recovery of clopyralid (%)					
Standard solution	8.3	83.4	4.8	1.0	- ^{b)}	97.5
Cattle manure compost	0.7	87.8	6.3	1.3	- ^{b)}	96.1
Pig manure compost	0.8	88.5	5.6	1.3	- ^{b)}	96.3
Poultry manure compost	4.2	83.4	4.7	1.2	- ^{b)}	93.5
Composted sludge fertilizer	1.2	85.8	6.1	1.5	0.6	95.3

a) Spiked at 200 µg/kg of clopyralid by the conversion in the sample

b) Less than 0.5 ng/mL for clopyralid in sample solution

Table 4 Elution pattern from Oasis HLB cartridge column

Fraction volume	0-2 mL	2-4 mL	4-6 mL	6-8 mL	8-10 mL	Total
Sample	Recovery of clopyralid (%)					
Standard solution ^{a)}	0.0	80.8	14.0	1.1	- ^{b)}	95.9

a) 100 ng/mL for clopyralid

b) Less than 0.5 ng/mL for clopyralid in sample solution

2) マトリックス効果の確認

分析機器におけるマトリックスによるイオン化抑制・イオン化促進効果の影響の有無に関する確認を行った。牛ふん堆肥、豚ふん堆肥、鶏ふん堆肥及び汚泥発酵肥料を 2.の 4) (1)から(3)に従い調製した溶液が 50 ng/mL となるように標準液を添加し、2.の 4) (4)にて測定した結果を Table 5 に示した。いずれの肥料においても測定値に大きな影響を与えるものではなく、本法でクロピラリドの定量が可能であることを確認した。

Table 5 Matrix effect by sample solution

	Cattle manure compost ^{a)}	Pig manure compost ^{a)}	Poultry manure compost ^{a)}	Composted sludge fertilizer ^{a)}
Recovery of clopyralid ^{b)} (%)	97.9	97.4	93.4	97.9

a) $n = 3$

b) Spiked at 50 ng/mL for clopyralid in sample solution

3) 流通肥料の分析及び方法間比較による真度の評価

20点の流通肥料における本法によるクロピラリドの分析結果を Table 6に、また、得られたクロマトグラムの一

例を Fig. 2-1 及び Fig. 2-2 に示した. なお, ブランク試料におけるクロマトグラムではクロピラリドの保持時間に重なるピークの検出は確認されなかった. また, Table 6 には同じ流通肥料における微量クロピラリド試験法による分析結果を併記し, 2 組の測定値を方法間比較した. 測定値の回帰分析を行い, 得られた結果を Fig. 3 及び Table 7 に示す. 肥料等試験法では, 切片の 95 % 信頼区間に原点が含まれ, 傾きの 95 % 信頼区間に 1 が含まれ, 相関係数が 0.99 以上であることを推奨している. 本法の切片の 95 % 信頼区間は -1.72~0.860, 傾きの 95 % 信頼区間は 0.959~1.05, かつ相関係数は 0.996 であり, 肥料等試験法で推奨されている範囲を満たすものであった. このことから, 本法は流通肥料の分析において十分な真度を有していると考えられる.

Table 6 Analysis of commercial fertilizers

(µg/kg)

Sample No.	Sample	The improved method	The existing method
1	Cattle manure compost 1	88.5	88.3
2	Cattle manure compost 2	55.3	51.9
3	Cattle manure compost 3	22.5	22.1
4	Cattle manure compost 4	5.9	5.9
5	Cattle manure compost 5	1.9	2.1
6	House manure compost 1	39.7	46.2
7	House manure compost 2	3.6	3.5
8	Pig manure compost 1	34.9	34.8
9	Pig manure compost 2	27.8	24.6
10	Pig manure compost 3	13.6	12.8
11	Pig manure compost 4	2.9	2.5
12	Poultry manure compost 1	20.4	20.1
13	Poultry manure compost 2	5.0	5.7
14	Poultry manure compost 3	2.3	2.6
15	Poultry manure compost 4	1.6	1.4
16	Composted sludge fertilizer 1	11.1	14.4
17	Composted sludge fertilizer 2	5.8	7.7
18	Composted sludge fertilizer 3	2.9	4.5
19	Composted sludge fertilizer 4	1.9	2.8
20	Composted sludge fertilizer 5	1.5	1.8

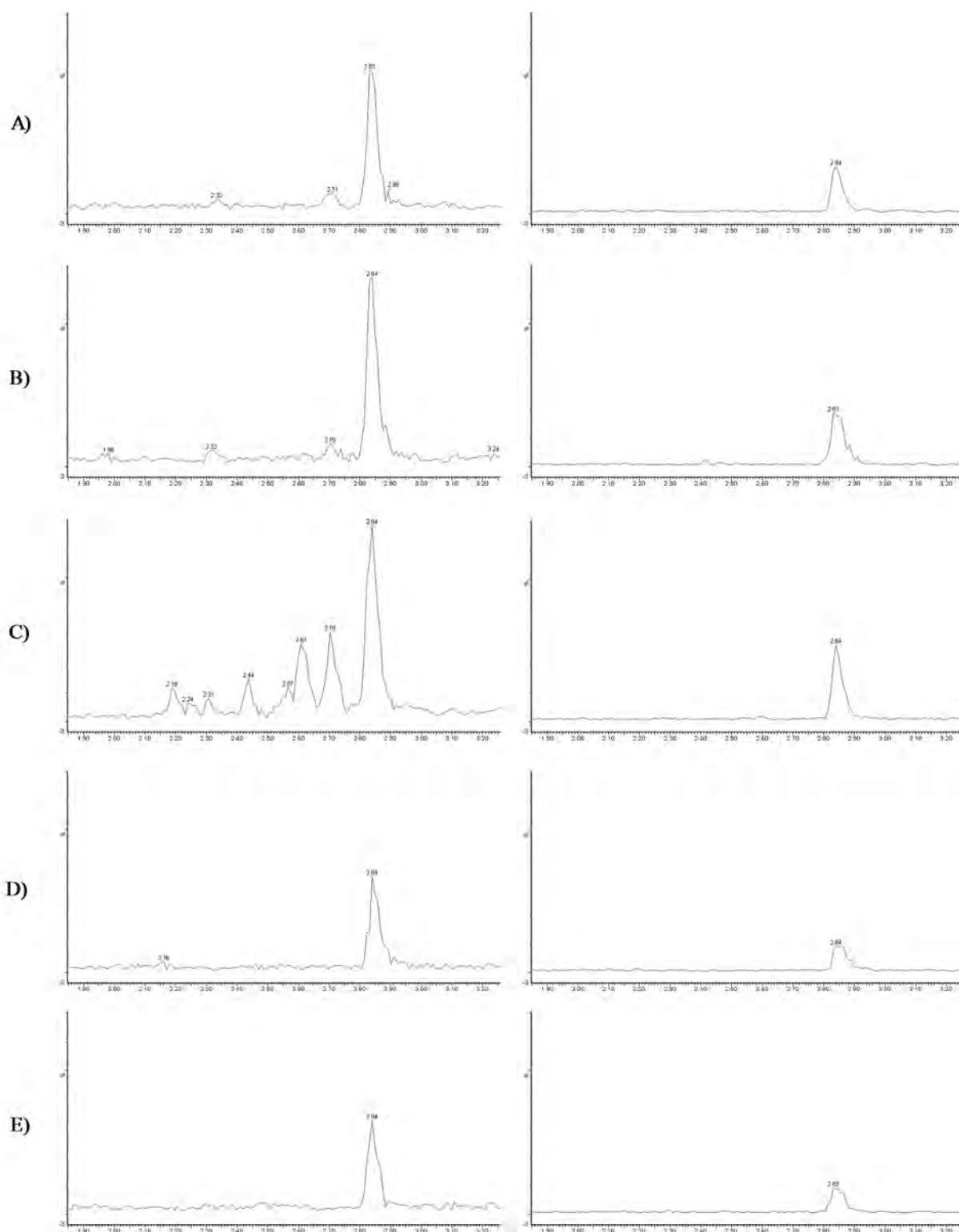


Fig. 2-1 Chromatograms obtained by analysis of commercial fertilizers

- A) Cattle manure compost (1.9 µg/kg), B) Pig manure compost (2.9 µg/kg),
C) Poultry manure compost (2.3 µg/kg), D) Composted sludge fertilizer (1.5 µg/kg),
E) Standard solution (0.5 ng/mL)

Left figure: Product ion for quantification (192>146)

Right figure: Product ion for identification (192>110)

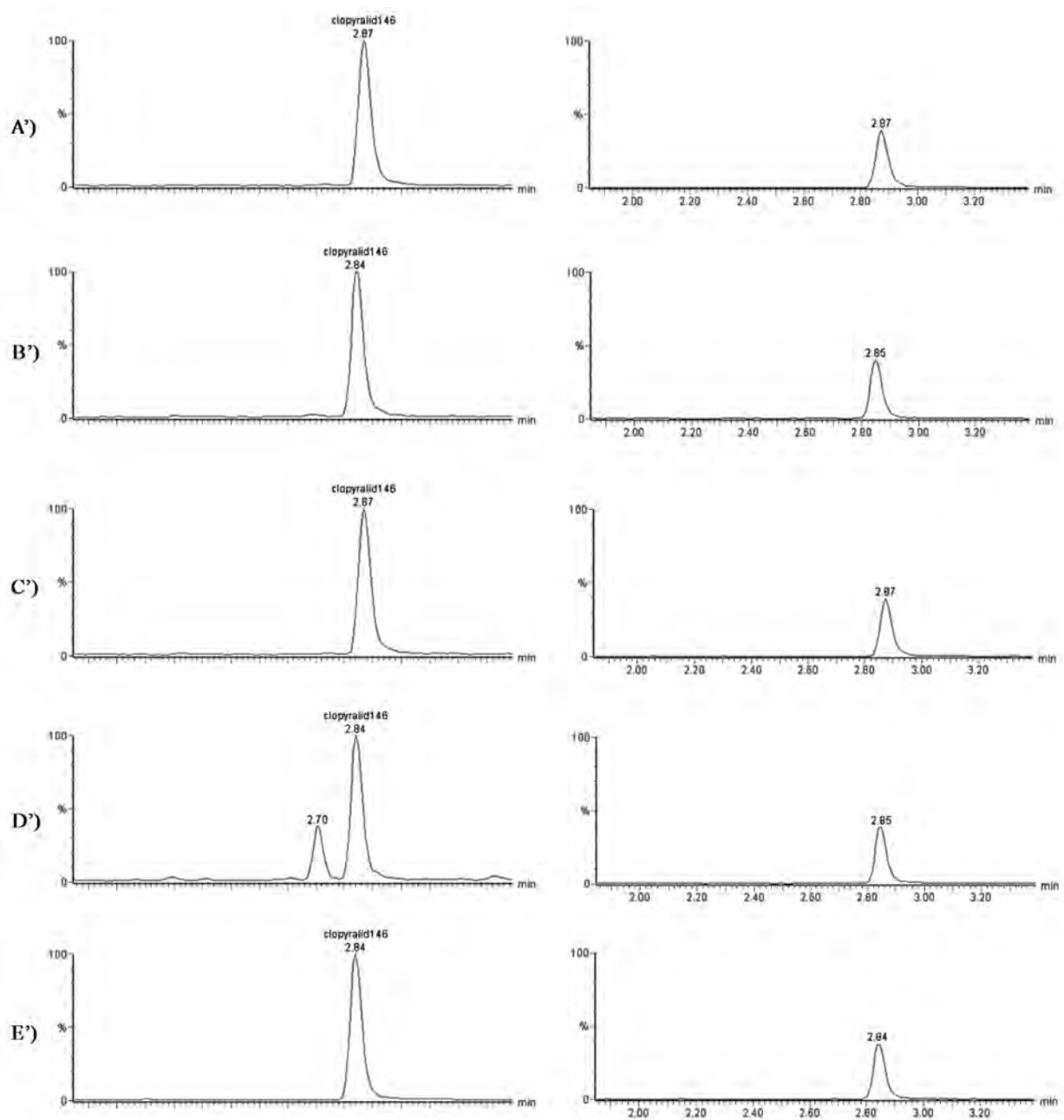


Fig. 2-2 Chromatograms obtained by analysis of commercial fertilizers

A') Cattle manure compost (22.5 μg/kg), B') Pig manure compost (27.8 μg/kg),
 C') Poultry manure compost (20.4 μg/kg), D') Composted sludge fertilizer (11.1 μg/kg),
 E') Standard solution (10 ng/mL)

Left figure: Product ion for quantification (192>146)

Right figure: Product ion for identification (192>110)

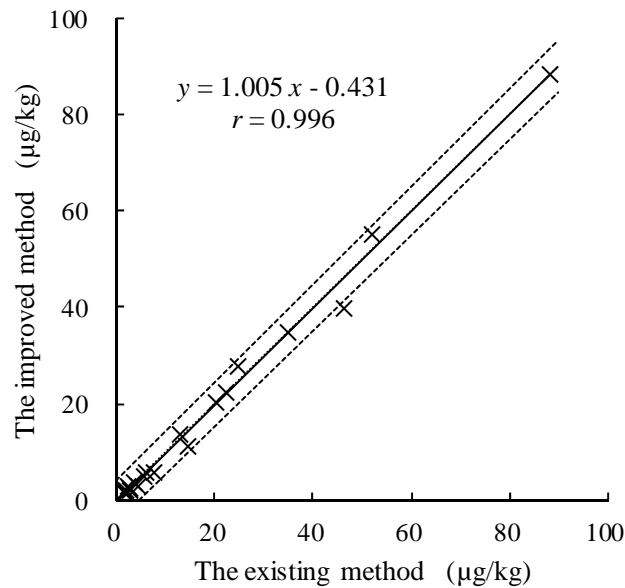


Fig. 3 Comparison between the improved method and the existing method

Heavily line: Regression line,

Dotted lines: Upper and lower limit 95 % prediction intervals,

Thin line: $y=x$

Table 7 Comparison of measured values of the improved method and the existing methods using regression equations

Correlation coefficient (r) ^{a)}	Range of slope ^{b)c)}	Range of intercept ^{b)d)}
0.996	0.959 ~ 1.05	-1.72 ~ 0.860

a) The recommended range of trueness evaluation criteria*: No less than 0.99

b) The 95% confidence interval

c) The recommended range of trueness evaluation criteria*: Inclination includes 1.

d) The recommended range of trueness evaluation criteria*: Intercept includes the origin (0).

* The criterias shown in Testing methods of Fertilizers (2018)

4) 中間精度及び併行精度の評価

併行精度及び中間精度を確認するために牛ふん堆肥、豚ふん堆肥、鶏ふん堆肥及び汚泥発酵肥料について、自然汚染試料を2点併行で日を変えて5回試験を実施して得られた結果をTable 8に示した。この結果から一元配置分散分析を行って得られた併行精度及び中間精度をTable 9に示す。それぞれの試料の平均値は牛ふん堆肥 87.2 µg/kg, 豚ふん堆肥 2.79 µg/kg, 鶏ふん堆肥 20.5 µg/kg, 汚泥発酵肥料 6.27 µg/kg であり、併行相対標準偏差は牛ふん堆肥 4.1 %, 豚ふん堆肥 10.3 %, 鶏ふん堆肥 3.8 %, 汚泥発酵肥料 5.8 %, 中間相対標準偏差は牛ふん堆肥 4.1 %, 豚ふん堆肥 10.3 %, 鶏ふん堆肥 15.8 %, 汚泥発酵肥料 7.3 %であった。いずれの相対標準偏差も肥料等試験法に示されている併行精度(併行相対標準偏差)及び中間精度(中間相対標準偏差)の目安の2倍以内であったことから、本法は十分な精度を有していることが確認された。

Table 8 Individual result of repeatability test on different days for precision confirmation ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Test days	Cattle manure compost		Pig manure compost	
	1	88.5	85.8	2.87
2	84.0	90.2	2.78	3.33
3	92.2	86.1	2.31	2.98
4	85.6	80.8	2.68	2.61
5	86.7	91.6	2.90	2.88
Test days	Poultry manure compost		Composted sludge fertilizer	
	1	23.0	24.3	5.81
2	22.4	23.4	7.04	6.37
3	16.5	15.3	6.65	6.17
4	18.8	18.7	6.31	6.38
5	21.9	20.7	5.60	5.75

Table 9 Statistical analysis of repeatability test results for precision confirmation

Sample	Mean Value ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Repeatability precision			Intermediate precision		
		s_r ^{b)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD_r ^{c)} (%)	$CRSD_r$ ^{d)} (%)	$s_{I(T)}$ ^{e)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	$RSD_{I(T)}$ ^{f)} (%)	$CRSD_{I(T)}$ ^{g)} (%)
Cattle manure compost	87.2	3.6	4.1	11	3.6	4.1	18
Pig manure compost	2.79	0.29	10.3	11	0.29	10.3	18
Poultry manure compost	20.5	0.8	3.8	11	3.2	15.8	18
Composted sludge fertilizer	6.27	0.36	5.8	11	0.46	7.3	18

a) Total mean (number of test days (5) \times number of replication (2))

b) Repeatability standard deviation

c) Repeatability relative standard deviation

d) Criteria of repeatability precision (repeatability relative standard deviation)
shown in Testing Method for Fertilizer

e) Intermediate standard deviation

f) Intermediate relative standard deviation

g) Criteria of Intermediate precision (intermediate relative standard deviation)
shown in Testing Method for Fertilizer

5) 定量下限等の推定

牛ふん堆肥、豚ふん堆肥、鶏ふん堆肥及び汚泥発酵肥料の自然汚染試料を用いて定量下限 (LOQ) 及び検出下限 (LOD) の推定を行った。その結果を Table 10 に示す。定量下限については、 SN 比が 10:1 となるピーク濃度から推定を行い、牛ふん堆肥及び鶏ふん堆肥では $1.8 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、豚ふん堆肥では $1.9 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、汚泥発酵肥料では $1.6 \mu\text{g}/\text{kg}$ と推定された。検出下限については、 SN 比が 3:1 となるピーク濃度から推定を行い、牛ふん堆肥及び豚ふん堆肥では $0.6 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、鶏ふん堆肥及び汚泥発酵肥料では $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ と推定された。

Table 10 Estimated *LOQ* and *LOD* of clopyralid

Sample	Concentration in sample solution	<i>SN</i> ratio	<i>LOQ</i> ^{a)}	<i>LOD</i> ^{b)}
	(ng/mL)		($\mu\text{g}/\text{kg}$)	($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Standard solution	0.49	9.3	1.3	0.4
Cattle manure compost	0.83	11.3	1.8	0.6
Pig manure compost	1.11	14.5	1.9	0.6
Poultry manure compost	0.96	13.3	1.8	0.5
Composted sludge fertilizer	0.56	8.8	1.6	0.5

a) The value estimated from the concentration in the sample solution whose *SN* ratio is 10 to 1

b) The value estimated from the concentration in the sample solution whose *SN* ratio is 3 to 1

4. まとめ

LC-MS/MS を用いた高感度分析法の改良を行い、牛ふん堆肥、豚ふん堆肥、鶏ふん堆肥及び汚泥発酵肥料について、単一試験室における妥当性確認試験を実施したところ、次の結果を得た。

(1) 試料中濃度が 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量となるように標準液、汚泥発酵肥料、牛ふん堆肥、鶏ふん堆肥、豚ふん堆肥を用いてジルコニアコートシリカゲルカラムの溶出画分の検討を行ったところ、ぎ酸-アセトニトリル (2+98) 10 mL までの画分に溶出していた。また、コポリマーカートリッジカラムの充填剤の増加に伴い、溶出画分を検討したところ、8 mL までの画分に溶出することが確認された。

(2) 牛ふん堆肥、豚ふん堆肥、鶏ふん堆肥及び汚泥発酵肥料を用いて、LC-MS/MS によるマトリックス効果を確認したところ、測定に大きな影響を与えるものではなかった。

(3) 流通肥料を用いて、既存の方法との比較により真度の確認を行った結果、回帰直線の切片の 95% 信頼区間は -1.72~0.860、傾きの 95% 信頼区間は 0.959~1.05、かつ相関係数は 0.996 であった。この結果は肥料等試験法に示されている回帰直線の推奨範囲を満たしていた。

(4) 併行精度及び中間精度を確認するため、牛ふん堆肥、豚ふん堆肥、鶏ふん堆肥及び汚泥発酵肥料を用いて、2 点併行で日を変えて 5 回試験を行った結果、併行相対標準偏差は牛ふん堆肥 4.1%、豚ふん堆肥 10.3%、鶏ふん堆肥 3.8%、汚泥発酵肥料 5.8%、中間相対標準偏差は牛ふん堆肥 4.1%、豚ふん堆肥 10.3%、鶏ふん堆肥 15.8%、汚泥発酵肥料 7.3% であった。この結果は、肥料等試験法に示されている各濃度レベルにおける併行精度及び中間精度の目安の 2 倍以内であり、許容範囲を満たしていた。

(5) 牛ふん堆肥、豚ふん堆肥、鶏ふん堆肥及び汚泥発酵肥料を用いて定量下限等の確認を行った結果、定量下限は 1.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度であり、検出下限は 0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度であった。

操作の煩雑さが解消され効率的に分析が行える試験法に改良した。また単一試験室での妥当性確認を行った結果、試験法として十分な性能を有していると考えられた。

文 献

- 1) 飼料及び堆肥に残留する除草剤の簡易判別法と被害軽減対策マニュアル, 筑波印刷情報サービスセンター協同組合
- 2) 農林水産省: 輸入飼料中及び堆肥中に含まれるクロピラリドの調査結果について
 - a. <<http://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyo/clopyralid/attach/pdf/clopyralid-25.pdf>>
 - b. <<http://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyo/clopyralid/attach/pdf/clopyralid-33.pdf>>
- 3) 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発酵肥料中のクロピラリド測定, 肥料研究報告, 3, 51~59(2010)
- 4) 顯谷久典, 八木寿治, 橋本良美, 白井裕治: 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(LC-MS/MS)法による堆肥及び汚泥肥料中のクロピラリド, アミノピラリド及びピクロラムの測定, 肥料研究報告, 7, 1~9(2014)
- 5) 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(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)
- 6) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター(FAMIC): 肥料等試験法(2018)
<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikhenho_2018.pdf>
- 7) 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: 土壌中クロピラリドのトマト, サヤエンドウ, スイートピーの初期成育に及ぼす影響・データ集(2009)
<http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/pub2016_or_later/pamphlet/tech-pamph/078226.html>
- 8) 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構農業環境変動研究センター: 牛ふん堆肥中クロピラリドの高感度分析法(参考法)(2017)
<http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/pub2016_or_later/pamphlet/tech-pamph/078229.html>
- 9) 伊藤浩平, 小塚健志, 青山恵介, 白井祐治: 液体クロマトグラフタンデム質量分析(LC-MS/MS)法による堆肥等中のクロピラリドの測定 - 微量試験法の適用範囲拡大 -, 肥料研究報告, 11, 63~74(2018)

Improvement of Microanalysis Determination of Clopyralid in Compost and Composted Sludge Fertilizer by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

Nobuhito NAKAMURA¹, Kenji KOZUKA² and Yuji SHIRAI²

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC), Fertilizer and Feed Inspection Department
(Now) FAMIC, Sendai Regional Center

² FAMIC, Fertilizer and Feed Inspection Department

We improved and validated simplified existing method for the microanalysis determination of clopyralid in compost and composted sludge fertilizer by liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Then, the improved method simplified the extraction and purification procedures. Clopyralid could be extracted with methanol under alkaline condition. The extract was purified by retention and elution with two kinds of cleanup cartridge. These purification took advantage of characteristics that the behavior of elution varies between acidity and alkaline. Extracted clopyralid was measured by LC-MS/MS. From the results of 20 samples tested by the improved method and the existing method, significant difference was not confirmed between the two test methods. Repeatability relative standard deviation of clopyralid in cattle manure compost, pig manure compost, poultry manure compost and composted sludge fertilizer, respectively, were 4.1 %, 10.3 %, 3.8 % and 5.8 %, and these intermediate relative standard deviation, respectively, were 4.1 %, 10.3 %, 15.8 % and 7.3 %. Minimum limit of quantification of there were estimated 2 µg/kg. Those results indicated that the improved method was valid for the determination of clopyralid in compost and composted sludge fertilizer.

Key words clopyralid, compost, composted sludge fertilizer, LC-MS/MS, microanalysis determination

(Research Report of Fertilizer, **12**, 69~83, 2019)