

6 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

八木寿治¹, 関根優子¹, 白井裕治¹

キーワード クロピラリド, たい肥, 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

1. はじめに

クロピラリドは米国のダウ・アグロサイエンスが開発した植物ホルモン系除草剤であり, 1987年に米国で認可を受け, 主として, テンサイ, 飼料作物, 小麦, 芝生の生産のため使用されている. 多くの除草剤は散布後土壤中で急速に分解されていくが, クロピラリドは非常にゆっくり分解が進行し最高14ヶ月以上残存する. このような化学的安定性のため, 当該クロピラリドが使用された畑で栽培された作物は汚染されている可能性が高く, 家畜に給与された場合, その糞尿中にも残存する. また, その排泄物から生産されたたい肥が利用された場合, 一部の作物において生育障害等が見られている. 日本においては平成17年度に牛糞たい肥を用いた農場においてクロピラリドが原因と考えられるトマトの生育障害が確認された. 牛糞たい肥中のクロピラリド含有量を把握することは作物被害を防ぐ上で重要である.

たい肥中のクロピラリドの分析としては, 新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業で開発された堆肥残留分析法マニュアル¹⁾があるが, 牛糞を原料とした汚泥発酵肥料には精製における液々抽出でエマルジョンを除去できないことから適用できなかった. 著者らは, 迅速性・簡便性の向上を視野に入れて同事業で開発された作物残留分析法マニュアル¹⁾を一部改良し, たい肥及び牛糞や豚糞を原料とした汚泥発酵肥料中のクロピラリドの測定法を検討し, 良好な成績を得たのでその概要を報告する.

なお, クロピラリドの構造式を図1に示した.

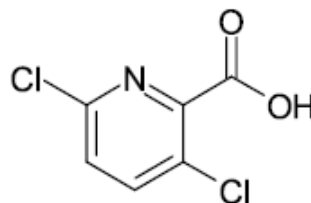


図1 クロピラリドの構造式

2. 材料および方法

1) 供試試料

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

流通しているたい肥(牛糞たい肥)及び汚泥発酵肥料(牛糞含有汚泥発酵肥料及び豚糞含有汚泥発酵肥料)を40℃で一晩風乾した後、目開き500µmのスクリーンを通過するまで粉碎し、分析用試料とした。

2) 試薬等の調製

(1) クロピラリド標準液: クロピラリド標準品(含量99%, Dr.Ehrenstorfer GmbH)10mgを正確に量って100mLの全量フラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてクロピラリド標準液を調製した(この液1mLはクロピラリド100µgを含有する。)。使用に際して、クロピラリド標準液の一定量をぎ酸-水(1+1,000)で正確に希釈し、1mL中にクロピラリドとしてそれぞれ0.5~1,000ngを含有する各クロピラリド標準液を調製した。

(2) 溶離液用メタノールはLC/MS用、標準液調製用アセトニトリルは残留農薬分析用を用いた。特記している以外の試薬については特級を用いた。

3) 器具及び装置

(1) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(LC/MS/MS): Waters Quattro Premier XE

カラム: ACQUITY UPLC HSS C18(内径2.1mm, 長さ100mm, 粒径1.8µm)

(2) 振とう機: iuch AW-1

(3) 遠心分離器: KOKUSAN H-26F

(4) ロータリーエバポレーター: BÜCHI R-200

(5) カートリッジカラム: Waters Oasis HLB 6cc(200mg)

(6) 超遠心分離器: AS ONE MCD-2000

(7) マニホールド: Waters

4) 試験操作

(1) 抽出

分析試料5.00gを正確に量って200mLの共栓三角フラスコに入れ、水酸化ナトリウム溶液(4w/v%)1mL及びメタノール99mLを加え、30分間振り混ぜた。その後、50mLの共栓遠心沈殿管に内容量を移し、3,000rpm(1,300×g)で5分間遠心分離して抽出液とした。

(2) 精製1

カートリッジカラムを予めメタノール5mL及び水5mLで速やかに洗浄した。50mLのなすフラスコをカートリッジカラムの下に置き、抽出液5mLをカートリッジカラムに正確に加え、速やかに液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。さらに水酸化ナトリウム溶液(0.04w/v%) -メタノール(1+1)5mLを2回カートリッジカラムに加え、同様に流出させた。

(3) 精製2

新たなカートリッジカラムを予めアセトニトリル5mL及び塩酸(1+120)5mLで速やかに洗浄した。流出液を40℃以下の水浴で5mL以下まで減圧濃縮した後、塩酸(1+11)3mLを加えた。その後、濃縮した流出液をカートリッジカラムに負荷させ、速やかに液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。容器を塩酸(1+120)5mLで2回洗浄し、洗液を順次カートリッジに加え、次に塩酸(1+120) -アセトニトリル(9+1)5mL及び水5mLを順次カートリッジに加えて速やかに流出させた。5mLの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 (0.0025 w/w%) - アセトニトリル (9+1) 4 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。ぎ酸-水 (1+1,000) で定容した後、プラスチック製遠心沈殿管 (容量 1.5 mL) に入れ、10,000 rpm (5,000×g) で 5 分間遠心分離し、上澄み液を試料溶液とした。

(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

試料溶液及び標準液各 5 μ L を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (以下「LC/MS/MS」という。) に注入し、表 1 の測定条件に従って選択反応検出クロマトグラム (以下「SRM クロマトグラム」という。) を得た。

表 1 LC/MS/MS 測定条件

カラム	Waters, ACQUITY UPLC HSS C18 (内径2.1 mm, 長さ100 mm, 粒径1.8 μ m)	
溶離液	A: ぎ酸-水 (1+1,000) B: メタノール	
グラジエント	0 min (5 %B) \rightarrow 5 min (60 %B) \rightarrow 6 min (95 %B) \rightarrow 7 min (5 %B)	
流速	0.4 mL/min	
カラム槽温度	40 $^{\circ}$ C	
イオン化法	エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)	
モード	ポジティブ	
デソルベーションガス	N ₂ (800 L/h)	
コーンガス	Ar (50 L/h)	
キャピラリー電圧	1.0 V	
コーン電圧	20 V	
コリジョンエネルギー	20 eV (定量) 30 eV (確認)	
イオン源温度	120 $^{\circ}$ C	
デソルベーション温度	400 $^{\circ}$ C	
プリカーサーイオン	m/z 192 (定量)	m/z 192 (確認)
プロダクトイオン	m/z 146 (定量)	m/z 110 (確認)

(5) 計算

得られた SRM クロマトグラムからクロピラリドのピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中のクロピラリド量を算出した。

なお、定量法の概要を図 2 に示した。

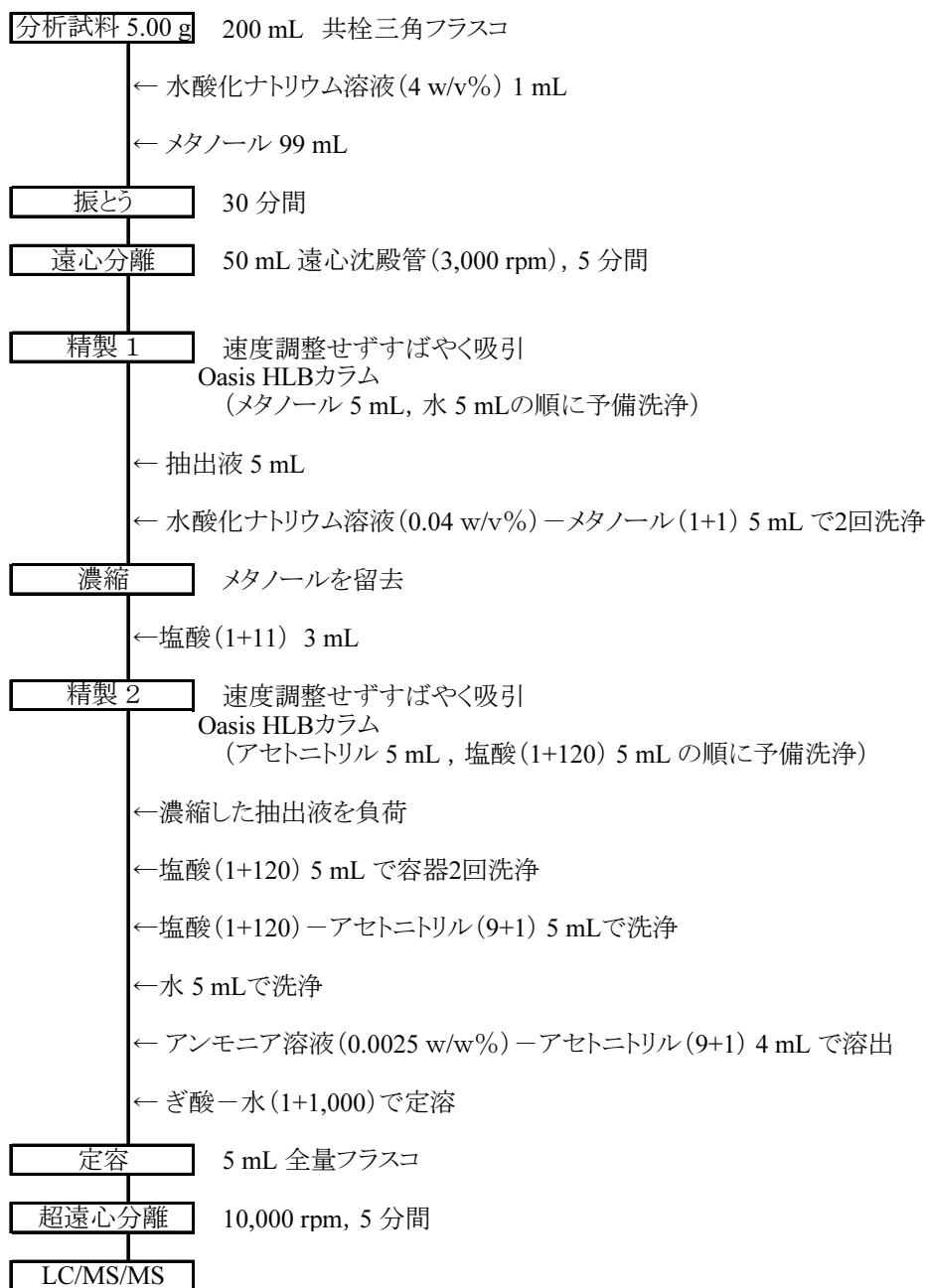


図 2 肥料中のクロピラリドの定量法フロー

3. 結果および考察

1) タンデム型質量分析計測定条件の検討

クロピラリド標準液に関して、今回の測定条件下でスキャンモードにて測定を行い、図3のマススペクトルを得た。その結果、最もイオン強度の大きい m/z 192 ($[M+H]^+$) をプリカーサーイオンとして採用することにした。

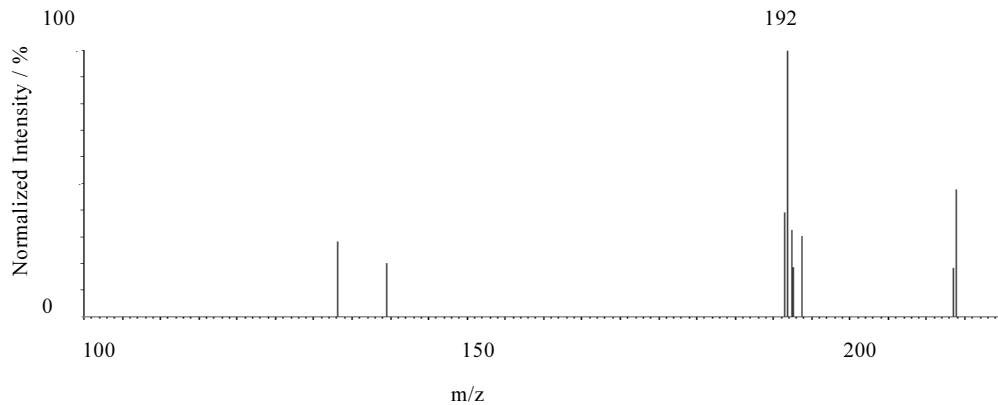


図3 クロピラリドのプリカーサーイオンのMSスペクトル

先に得られた m/z 192 をプリカーサーイオンとして、プロダクトイオンの MS スペクトルを測定した。結果を図 4 に示した。最もイオン強度の大きい m/z 146 をプロダクトイオンとして採用することにした。

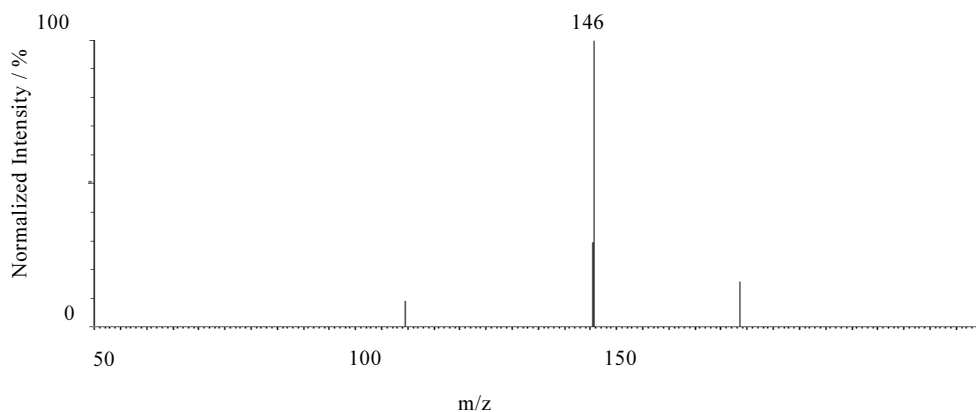


図4 クロピラリドのプロダクトイオンのMSスペクトル

2) クロピラリド標準液の希釈溶媒の検討

今回の LC/MS/MS 測定条件下における、検量線作成用のクロピラリド標準液の調製希釈溶媒の適否に関してメタノール、アセトニトリル、ぎ酸一水 (1+1,000) の 3 種類を検討した。その結果、感度及びピーク形状において、ぎ酸一水 (1+1,000) が最も良好であったため、同溶媒を採用することにした。

3) 検量線の作成

2.2) の (1) に従って調製した標準液を 5 μ L, LC/MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成した。その結果、0.0025~5 ng の範囲で直線性を示した。参考として検量線の一例を図 5 に示した。

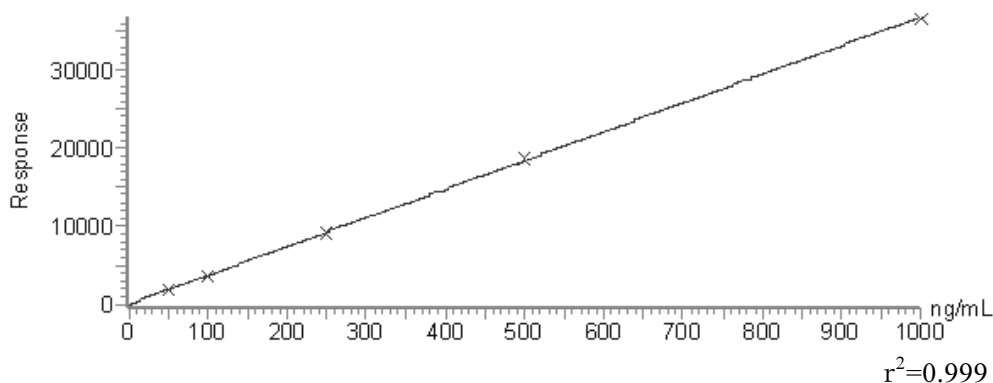


図5 クロピラリドの検量線

4) カラムカートリッジへの試料負荷量の検討

作物残留分析法マニュアルにおいては、試料採取量を10.0 gとし、抽出溶媒を100 mL加えて振とう・遠心分離後、抽出液全量を5 mL以下になるまで濃縮し、次のカートリッジ操作に供している。しかしながら、肥料に関しては、サンプル負荷量が多すぎて二回目のカートリッジ操作の際に、カートリッジ上端が目詰まりを起こす試料が見られた。このため、試料採取量を5.00 gと減らし、抽出溶媒は100 mLを用いて、その内の25 mLをカートリッジに負荷し、以降2.4)に従って、分析を行った。その結果、カートリッジの目詰まりは改善されたが、牛糞含有汚泥発酵肥料における40 µg/kg相当量のクロピラリド添加回収試験を行った際には、回収率が65%と低回収率のものが見られた。汚泥発酵肥料はマトリックスが多く、イオン化抑制効果が疑われたため、当該最終溶液を5倍希釈し測定を行った。その結果、85%に回収率の向上が認められた。このため、当該結果とカートリッジ容量の関係より、一回目のカートリッジ操作に供する抽出液量は5 mL以下になるまでの濃縮が必要なことから、試験の迅速性を考慮して振とう抽出後のカートリッジへの試料負荷量を5 mLとした。

5) マトリックスの検討

牛糞たい肥(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、本法により調製した試料溶液を5 µL, LC/MS/MSに注入し、定量を妨げるピークの有無を確認したところ、妨害ピークは認められなかった。

6) 添加回収試験

牛糞たい肥(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)に、クロピラリドとしてそれぞれ40及び400 µg/kg相当量添加し、本法に従って3点併行分析を行い、得られたその平均回収率及び併行相対標準偏差を表2に示した。クロピラリドの平均回収率は75.2~118.0%、それらの相対標準偏差(RSD)は0.5~8.5%であり、良好な回収率及び併行精度が得られた。

なお、標準液及び添加回収試験で得られた牛糞たい肥におけるSRMクロマトグラムの一例を図6に示した。

表 2 添加回収試験結果

添加量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	牛糞たい肥 1		牛糞たい肥 2		牛糞含有汚泥発 酵肥料 1		牛糞含有汚泥発 酵肥料 2		豚糞含有汚泥発 酵肥料 1	
	回収率 ^{a)}	RSD ^{b)}	回収率 ^{a)}	RSD ^{b)}	回収率 ^{a)}	RSD ^{b)}	回収率 ^{a)}	RSD ^{b)}	回収率 ^{a)}	RSD ^{b)}
400	96.5	(5.5)	106.0	(1.5)	98.8	(2.7)	97.0	(0.5)	103.2	(3.0)
40	118.0	(0.5)	106.7	(1.9)	80.7	(8.5)	75.2	(4.9)	98.2	(5.7)

a) $n=3$ の平均回収率

b) 相対標準偏差

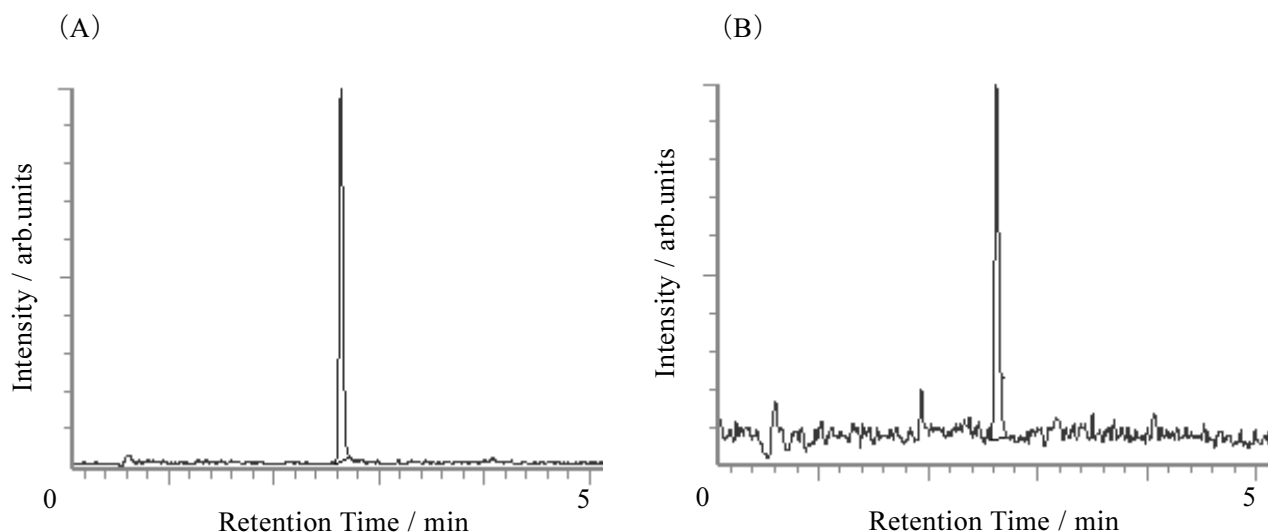


図 6 添加回収試験で得られた SRM クロマトグラムの一例

(A) 標準液(クロピラリドとして 100 μg 相当量)(B) 試料溶液(牛糞たい肥, 試料中 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量添加)

7) 定量下限及び検出下限

牛糞たい肥及び牛糞含有汚泥発酵肥料を用いて, 分析試料中のクロピラリドの含有量として 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ になるようにそれぞれ添加した 7 点併行試験を実施し, クロピラリドの定量下限及び検出下限の確認試験を行った結果を表 3 に示した. 定量下限は(標準偏差) $\times 10$, また, 検出下限は(標準偏差) $\times 2 \times t(n-1, 0.05)$ として示されるので, 本法の定量下限及び検出下限は 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度及び 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度と推定された.

表 3 肥料中のクロピラリドの定量下限の確認

試料種類	含有量 ¹⁾	Mean ²⁾	SD ³⁾	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
				定量下限 推定値 ⁴⁾	検出下限 推定値 ⁵⁾
牛糞たい肥	20	15	1.4	14	7
牛糞含有汚泥発酵肥料	20	22	0.9	9	4

1) クロピラリドの含有量

2) 7点併行試験の平均値

3) 標準偏差

4) 標準偏差 $\times 10$ 5) 標準偏差 $\times 2 \times t(n-1, 0.05)$

4. まとめ

肥料中のクロピラリドの定量法の妥当性確認のための試験を実施したところ、次の結果を得た。

- 1) ピーク面積又は高さを用いて検量線を作成したところ、クロピラリドは 0.0025~5 ng の範囲で直線性を示した。
- 2) 2種類の牛糞たい肥, 2種類の牛糞含有汚泥発酵肥料及び1種類の豚糞含有汚泥発酵肥料について本法に従ってクロピラリドの測定を実施した結果, 定量を妨害する夾雑ピークはなかった。
- 3) 2種類の牛糞たい肥, 2種類の牛糞含有汚泥発酵肥料及び1種類の豚糞含有汚泥発酵肥料についてクロピラリドの含有量が 40 µg/kg 及び 400 µg/kg になるように添加し添加回収試験を実施した結果, 平均回収率は 75.2~118.0%, その併行精度は相対標準偏差 (RSD)として 8.5% 以下であった。
- 4) 本法のたい肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリドの定量下限及び検出下限は 10 µg/kg 程度及び 5 µg/kg 程度と推定された。

これらのことから, 2009 年度肥料等技術検討会の審議を受け, 肥料等試験法 (2010) に記載された²⁾。

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, p.58~69 (2008)
- 2) 農林水産消費安全技術センター (FAMIC): 肥料等試験法 (2010)
<<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/bunseki/sub9.html>>

**Determination of Clopyralid in Fertilizer by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry
(LC/MS/MS)**

Toshiharu YAGI¹, Yuko SEKINE¹ and Yuji SHIRAI¹

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

An analytical method for determination of clopyralid in compost and sludge fermentation fertilizer by liquid chromatography electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS) was developed. Clopyralid was extracted with methanol under alkaline condition. After the extract solution was centrifuged, a part of the supernatant was purified with divinylbenzene-N-vinylpyrrolidone copolymer column, and analyzed by LC/ESI-MS/MS. The LC separation was carried out on a C18 column using solvent gradient with formic acid – water (1+1,000) and methanol as a mobile phase. The determination was performed in selected reaction monitoring (SRM) mode. As a result of 3 replicate analysis of 5 fertilizer samples (2 kinds of compost and 3 kinds of sludge fermentation fertilizer) spiked with clopyralid at 40 and 400 µg/kg. The mean recoveries and the relative standard deviations (RSD) were 75.2~118.0 % and 0.5~8.5 %, respectively. On the basis of 7 replicate measurements of spiked samples, the LOQ values were 10 µg/kg in the compost and sludge fermentation fertilizer. Those results indicated that the developed method was valid for the determination of clopyralid.

Key words clopyralid, compost, sludge fermentation fertilizer, liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS), electrospray ionization (ESI), selected reaction monitoring (SRM)

(Research Report of Fertilizer, **3**, 51~59, 2010)