

# 1 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の測定

顯谷久典<sup>1</sup>, 八木寿治<sup>2</sup>, 橋本良美<sup>2</sup>, 白井裕治<sup>2</sup>

キーワード クロピラリド, アミノピラリド, ピクロラム, 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

## 1. はじめに

クロピラリド、アミノピラリド及びピクロラムはカルボキシル基を有するピリジン系の農薬である。このうちクロピラリドは、これ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<sup>1)</sup>。一方、諸外国において堆肥中からアミノピラリドが検出され、これによるものと疑われる生育障害報告例<sup>2)</sup>があるなど、クロピラリドと類似の構造を持った植物ホルモン系除草剤であるアミノピラリド及びピクロラムはクロピラリドと同様の障害を発生させる可能性があり、これらを定量化する方法の確立は重要と考えられる。

現在、これらについて農産物等中の 2 成分もしくは 3 成分の同時測定法が開発されている<sup>3, 4)</sup>が、堆肥及び汚泥肥料中の 3 成分同時測定法の開発は確認できない。そこで、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(LC-MS/MS)による肥料中のクロピラリド定量法<sup>5)</sup>を用い、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同時定量への適用性について検討を行ったので、その概要を報告する。

なお、クロピラリド、アミノピラリド及びピクロラムの構造式を Fig. 1 に示した。

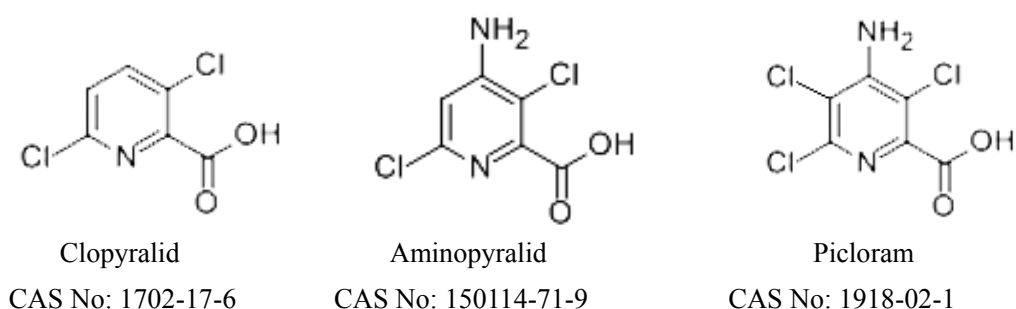


Fig. 1 Chemical structure of Clopyralid, Aminopyralid and Picloram

## 2. 材料および方法

### 1) 供試試料

市販の堆肥(牛糞堆肥)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 °C

<sup>1</sup> 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)農林水産省消費・安全局

<sup>2</sup> 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

で一晩風乾した後、目開き 500  $\mu\text{m}$  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、アミノピラリド及びピクロラム標準液：クロピラリド標準品(含量 99 %，Dr.Ehrenstorfer GmbH)，アミノピラリド標準品(含量 99 %，Dr.Ehrenstorfer GmbH)及びピクロラム標準品(含量 98 %，和光純薬工業株式会社 残留農薬試験用) 10 mg を正確に量って全量フラスコ 100 mL に入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、各標準原液を調製した(この液 1 mL は各農薬 100  $\mu\text{g}$  を含有する)。使用に際して、各標準原液の一定量をぎ酸(1+1,000)で正確に希釈し、1 mL 中に各農薬としてそれぞれ 0.5~1,000 ng を含有する混合標準液を調製した。

(2) 溶離液用メタノール：LC-MS 用試薬を用いた。

(3) 標準液調製用アセトニトリル：残留農薬分析用試薬を用いた。

(4) 特記している以外の試薬については特級を用いた。

## 3) 装置及び器具

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

カラム：Waters ACQUITY UPLC HSS C18(内径 2.1 mm，長さ 100 mm，粒径 1.8  $\mu\text{m}$ )

(2) 振とう機：iuchi AW-1

(3) 遠心分離機：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(200 mg)

(6) 超遠心分離機：AS ONE MCD-2000

(7) マニホールド：Waters

## 4) 試験操作

### (1) 抽出

分析試料 5.00 g をはかりとって共栓三角フラスコ 200 mL に入れ、水酸化ナトリウム溶液(4 w/v%) 1 mL 及びメタノール 99 mL を加え、30 分間振り混ぜた。その後、共栓遠心沈殿管 50 mL に内容量を移し、3,000 rpm (1,300 $\times$ g)で 5 分間遠心分離して上澄み液を抽出液とした。

### (2) 精製1

カートリッジカラムを予めメタノール 5 mL 及び水 5 mL で速やかに洗浄した。なすフラスコ 50 mL をカートリッジカラムの下に置き、抽出液 5 mL 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溶出させた。さらに水酸化ナトリウム溶液(0.04 w/v%) -メタノール[1+1]5 mL を 2 回カートリッジカラムに加え、同様に溶出させた。

### (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 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 5 mL 以下まで減圧濃縮した後、塩酸(1+11)3 mL を加えた。その後、濃縮した抽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)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、次に塩酸(1+120) -アセトニトリル[9+1]5 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。全量フラスコ 5 mL 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/v%) - 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、速やかに溶出させた。ぎ酸 (1+1,000) で定容した後、プラスチック製遠心沈殿管 1.5 mL に入れ、10,000 rpm (8,000×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

試料溶液及び混合標準液各 5  $\mu$ 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、Table 1 及び Table 2 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。

Table 1 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	Waters, ACQUITY UPLC HSS C18 (2.1 mm i.d.×100 mm L, 1.8 $\mu$ m particle size)
Mobile phase	A: Formic acid (1+1,000) 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 <sub>2</sub> , 400 °C, 800 L/h
Cone gas	Ar (50 L/h)
Capillary voltage	1.0 kV
Ion source	120 °C

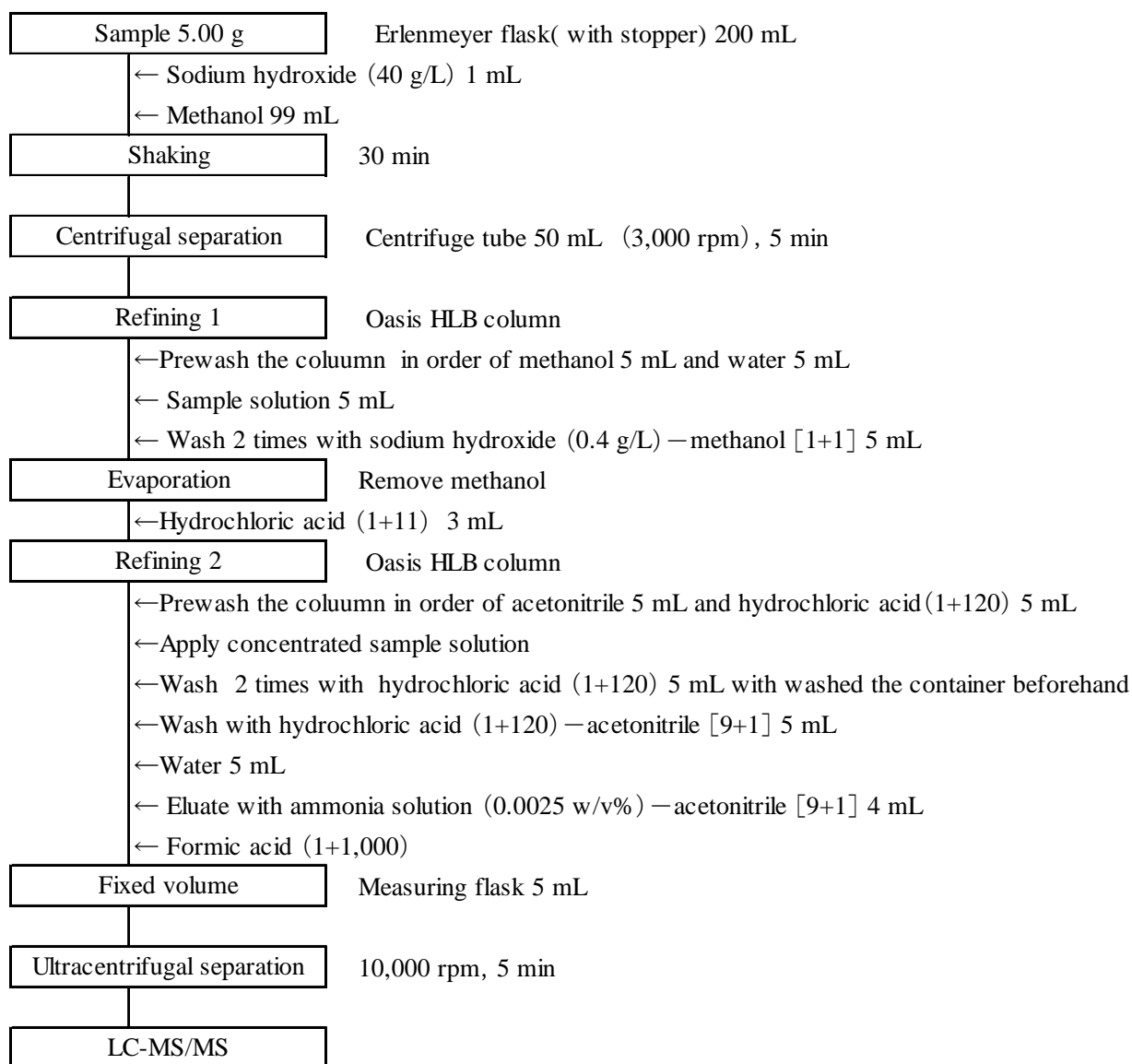
Table 2 MS/MS Parameters

Agricultural chemical	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion		Cone voltage (V)	Collision energy	
		for quantification ( <i>m/z</i> )	for identification ( <i>m/z</i> )		for quantification (eV)	for identification (eV)
Clopyralid	192	146	110	20	20	30
Aminopyralid	207	161	189	22	22	16
Picloram	241	195	223	28	22	16

#### 5) 計算

得られた SRM クロマトグラムからクロピラリド、アミノピラリド及びピクロラムのピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中の各種農薬量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for Clopyralid, Aminopyralid and Picloram in fertilizers

### 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

クロピラリドに関して、既報法<sup>5, 6)</sup>に基づき、プリカーサーイオンとして  $m/z$  192 ( $[M+H]^+$ )、プロダクトイオン(定量用)として  $m/z$  146 を採用した。また、アミノピラリド及びピクロラム標準液に関して、今回の測定条件下でスキャンモードにて測定を行った結果、アミノピラリドでは  $m/z$  207 ( $[M+H]^+$ ) 及びピクロラムでは  $m/z$  241 ( $[M+H]^+$ ) が最もイオン強度が大きく、プリカーサーイオンとして採用することにした。これらプリカーサーイオンから、プロダクトイオンの MS スペクトルを測定した。その結果、アミノピラリドでは  $m/z$  161 及びピクロラムでは  $m/z$  195 が最もイオン強度が大きく、プロダクトイオン(定量用)として採用することにした。

#### 2) 検量線の作成

2.2)の(1)に従って調製した混合標準液を 5  $\mu$ L, LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムからピー

ク面積を求めて検量線を作成した。その結果、0.5 ng/mL～100 ng/mL (0.0025 ng～0.5 ng) の範囲で直線性を示した。参考として検量線の一例を Fig. 2 に示した。

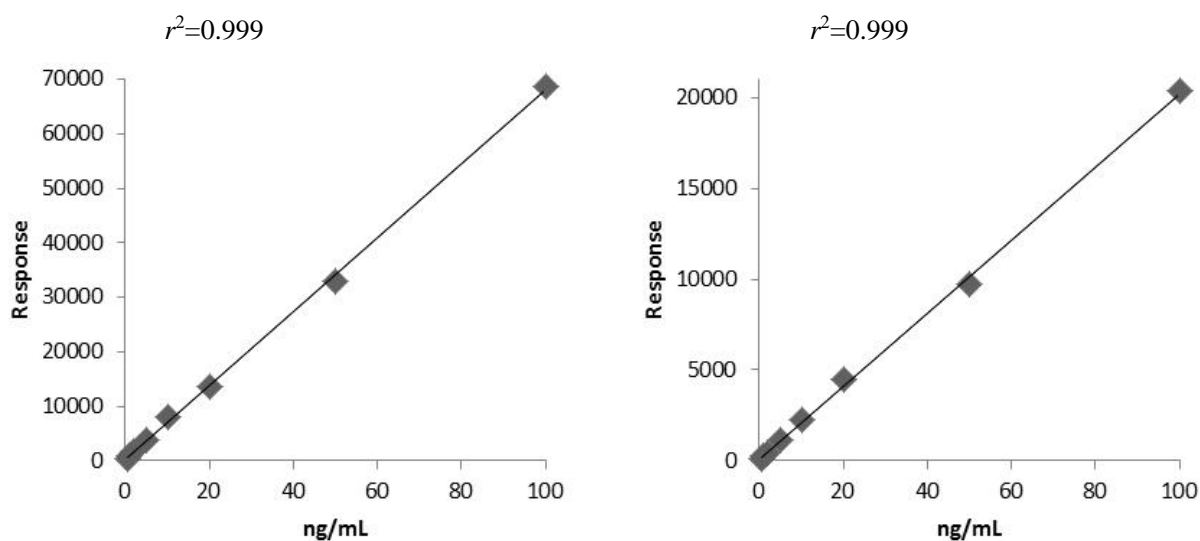


Fig. 2 Calibration curves of Aminopyralid and Picloram by their derivative peak areas in selected reaction monitoring chromatograms

### 3) マトリックスの検討

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, 本法により調製した試料溶液 5  $\mu$ L を 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, 定量を妨害するピークは認められなかった。

### 4) 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。各農薬として試料中 50  $\mu$ g/kg 相当量となるよう混合標準液を調製し, 2.4) の (3) の精製 2 に従い, アンモニア溶液 (質量分率 0.0025 w/v%) - アセトニトリル [9+1] 20mL を加え, 各 4 mL ごとの流出画分中の各農薬を測定した。その結果, Table 3 のとおり, 各農薬は 0 mL ~ 4 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。

Table 3 Elution pattern from cartridge column<sup>a)</sup>

Agricultural chemical <sup>b)</sup>	Fraction volume					Total
	0~4 mL	4~8 mL	8~12 mL	12~16 mL	16~20 mL	
Clopyralid	89	0	0	0	0	89
Aminopyralid	87	0	0	0	0	87
Picloram	96	0	0	0	0	96

a) Mean Value ( $n=3$ )b) Each Pesticide spiked at each 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in the sample

### 5) イオン化抑制・イオン化促進効果の検討

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。各農薬として 50 ng/mL を含有する混合標準液と、牛糞堆肥及び牛糞含有汚泥発酵肥料を 2.4) (1) から (3) に従い調製した溶液に各農薬として 50 ng/mL となるように混合標準液を添加した溶液とを、2.4) (4) にて測定し比較した結果は Table 4 のとおりであり、これらを Welch の  $t$  検定を有意水準 5% で行ったところ、比較対象間に有意な差は認められなかった。

Table 4 Confirmation of sensitization or desensitization effect action by sample solution

Sample	Agricultural chemical	Spiked level (ng/mL)	Recovery of standard <sup>a)</sup> (%)	Recovery of sample solution <sup>a) b)</sup> (%)
Cattle manure compost	Clopyralid	50	105.6	103.1
	Aminopyralid	50	101.5	100.8
	Picloram	50	102.7	108.2
Composted sludge fertilizer containing cattle manure	Clopyralid	50	105.6	106.6
	Aminopyralid	50	101.5	100.3
	Picloram	50	102.7	101.0

a) Mean Value ( $n=3$ )

b) Spiked standard in sample solution

### 6) 添加回収試験

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) に、クロピラリド、アミノピラリド及びピクロラムとしてそれぞれ 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  及び 1,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量添加し、一夜放置後、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 Table 5 に示した。クロピラリドの平均回収率は 74.7% ~ 114.2%、それらの併行相対標準偏差 (RSD) は 1.2% ~ 10.7%、アミノピラリドの平均回収率は 71.2% ~ 104.5%、それらの併行相対標準偏差 (RSD) は 1.1% ~ 10.2%、ピクロラムの平均回収率は 72.7% ~ 117.6%、それらの併行相対標準偏差 (RSD) は 1.1% ~ 9.2% であった。

### 7) 定量下限及び検出下限

牛糞堆肥及び牛糞含有汚泥発酵肥料を用いて、クロピラリド、アミノピラリド及びピクロラムとしてそれぞれ 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量添加し、一夜放置後、本法に従って 7 点併行試験を実施し定量下限及び検出下限の確認を行った。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 µg/kg 程度及び 5 µg/kg 程度と推定された (Table 6)。

Table 5 Accuracy result and repeatability precision

Sample	Spiked level (µg/kg)	Clopyralid		Aminopyralid		Picloram	
		Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
Cattle manure compost -1	1,000	82.8	3.2	78.3	7.3	87.9	3.7
	400	114.2	1.2	104.5	3.7	117.6	1.5
	40	95.7	2.6	83.0	3.4	75.5	5.7
Cattle manure compost -2	1,000	82.3	3.3	80.8	4.0	84.4	2.7
	400	90.1	3.8	81.0	3.3	88.7	1.1
	40	101.3	6.5	83.5	4.7	83.0	2.7
Composted sludge fertilizer containing cattle manure-1	1,000	81.9	4.9	81.6	8.7	90.0	2.4
	400	111.2	2.5	94.6	4.4	97.1	2.8
	40	86.5	10.7	71.2	2.6	82.7	9.2
Composted sludge fertilizer containing cattle manure-2	1,000	89.0	4.1	78.1	1.1	86.5	2.3
	400	81.6	5.1	94.0	1.2	99.2	3.4
	40	74.7	5.2	97.5	2.6	72.7	8.6
Composted sludge fertilizer containing pig manure	1,000	82.3	1.5	81.6	8.7	90.0	2.4
	400	91.4	4.5	95.1	2.0	105.0	3.6
	40	76.5	4.2	89.5	10.2	92.7	2.4

a) Mean Value ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation

Table 6 Calculated LOQ and LOD values

Sample	Agricultural chemical	Spiked level	(µg/kg)			
			Mean <sup>a)</sup>	$s$ <sup>b)</sup>	LOQ <sup>c)</sup>	LOD <sup>d)</sup>
Cattle manure compost	Clopyralid	20	14.9	1.3	13	5
	Aminopyralid	20	14.0	1.1	11	4
	Picloram	20	16.5	0.8	8	3
Composted sludge fertilizer containing cattle manure	Clopyralid	20	15.1	1.4	14	5
	Aminopyralid	20	14.8	1.1	11	4
	Picloram	20	18.9	1.4	14	6

a) Mean Value ( $n=7$ )

b) Standard deviation

c)  $s \times 10$

d)  $s \times 2 \times t(n-1, 0.05)$

#### 4. まとめ

肥料中のクロピラリド、アミノピラリド及びピクロラム同時定量法の妥当性を確認するため試験を実施したところ、次の結果を得た。

- 1) ピーク面積を用いて検量線を作成したところ、アミノピラリド及びピクロラムは 0.5 ng/mL～100 ng/mL (0.0025 ng～0.5 ng) の範囲で直線性を示した。
- 2) 2 種類の牛糞堆肥, 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測定を実施した結果, 定量を妨害するピークは認められなかった。
- 3) 各農薬として試料中 50 µg/kg 相当量となるよう混合標準液を調製してカートリッジカラムに負荷し、アンモニア溶液 (0.0025 w/v%) - アセトニトリル [9+1] による流出画分中の各農薬を測定したところ, 各農薬は 0 mL～4 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。
- 4) 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ついて, 各農薬として 50 ng/mL 相当量を含む混合標準液と, 牛糞堆肥及び牛糞含有汚泥発酵肥料試料調製液に各農薬として 50 ng/mL 相当量となるように混合標準液を添加した溶液とを比較した結果, 有意な差は認められなかった。
- 5) 2 種類の牛糞堆肥, 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い, クロピラリド, アミノピラリド及びピクロラムの含有量が 40 µg/kg, 400 µg/kg 及び 1,000 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 71.2 %～117.6 %, その併行精度は相対標準偏差 (RSD) として 10.7 % 以下であった。
- 6) 本法の堆肥及び汚泥発酵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。

本法は, 単一試験室による試験法の妥当性が確認されたことから, 2013 年度肥料等技術検討会の審議を受け肥料等試験法<sup>6)</sup>に参考法として記載された。

## 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) Health and Safety Executive: Aminopyralid - Results of Analysis of Contaminated Manure, Soil, and Damaged Crops  
<<http://www.pesticides.gov.uk/guidance/industries/pesticides/topics/using-pesticides/General/aminopyralid-results-of-analysis-of-contaminated-manure-soil-and-damaged-crops>>
- 3) TIAN Yingying, LIU Xingang, DONG Fengshou, XU Jun, LU Caihong: Simultaneous Determination of Aminopyralid, Clopyralid, and Picloram Residues in Vegetables and Fruits Using Ultra-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, AOAC Int, **95**, 554～559 (2012)
- 4) 杉村光永, 豊田安基江, 井原紗弥香, 松尾 健: LC-MS/MS による農産物及び畜水産物中のアミノピラリド及びクロピラリドの同時分析法の検討, 広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告, **16**, 17～29 (2008)
- 5) 八木寿治, 関根優子, 白井裕治: 液体クロマトグラフダンドム型質量分析計 (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)
- 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  
<<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub9.html>>



## Determination of Clopyralid, Aminopyralid and Picloram in Compost and Composted Sludge Fertilizer by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

Hisanori ARAYA<sup>1</sup>, Toshiharu YAGI<sup>2</sup>, Yoshimi HASHIMOTO<sup>2</sup> and Yuji SHIRAI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department  
(Now) Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Food Safety and Consumer Affairs Bureau

<sup>2</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

An analytical method for simultaneous determination of agricultural chemicals (clopyralid, aminopyralid and picloram) in cattle manure compost and composted sludge fertilizer containing pig or cattle manure by liquid chromatography electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS) was developed. The agricultural chemicals were extracted with methanol under alkaline condition. The extract were purified two times with copolymer cartridge columns on different pH conditions, and analyzed by LC/ESI-MS/MS. The LC separation was carried out on a C18 column using solvent gradient with formic acid solution (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 cattle manure compost, 2 kinds of compost sludge fertilizer containing cattle manure and 1 kind of compost sludge fertilizer containing pig or cattle manure) spiked with each agricultural chemical at 40, 400 and 1000 µg/kg, the mean recoveries and the relative standard deviations (RSD) were 71.2 ~117.6 % and 1.1~10.7 %, respectively. On the basis of 7 replicate measurements of spiked samples, the LOQ values were about 10 µg/kg as agricultural chemicals in the compost or the fertilizer. Those results indicated that the developed method was valid for the determination of these agricultural chemicals.

*Key words* clopyralid, aminopyralid, picloram, compost, composted sludge fertilizer,  
liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

(Research Report of Fertilizer, 7, 1~9, 2014)