

# 牛ふん堆肥中クロピラリドの 高感度分析法（参考法）



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

平成 29 年 11 月



## 牛ふん堆肥中クロピラリドの高感度分析法（参考法）

本分析法は牛ふん堆肥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クロピラリドの溶出挙動が変化することを利用して、固相抽出カートリッジ（コポリマーカラム）および液液溶媒抽出によりクリーンアップした後、高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計を用いて測定する方法です。

本分析法の定量下限値は  $2 \mu\text{g/kg}$  乾物（-DW）であり、従来法（「飼料及び堆肥に残留する除草剤の簡易判定法と被害軽減対策マニュアル」あるいは「肥料等試験法（2016）」掲載の分析法）より高感度な分析が可能です。

なお本分析法は独立行政法人農林水産消費安全技術センター及び当機構での室間再現精度試験により妥当性を確認しています。一般の分析機関で分析を行う場合は、事前に各機関において「肥料等試験法（2016）」に準じて分析方法の妥当性を確認してください。今後複数機関での室間再現精度試験を行い妥当性の検証をすすめる予定であり、その際分析工程の一部に変更が生じる可能性があります。また、牛ふん堆肥以外の試料（豚ふん堆肥や鶏ふん堆肥等）に適用する場合も、同様に妥当性を確認してください。

牛ふん堆肥試料 5 g-DW

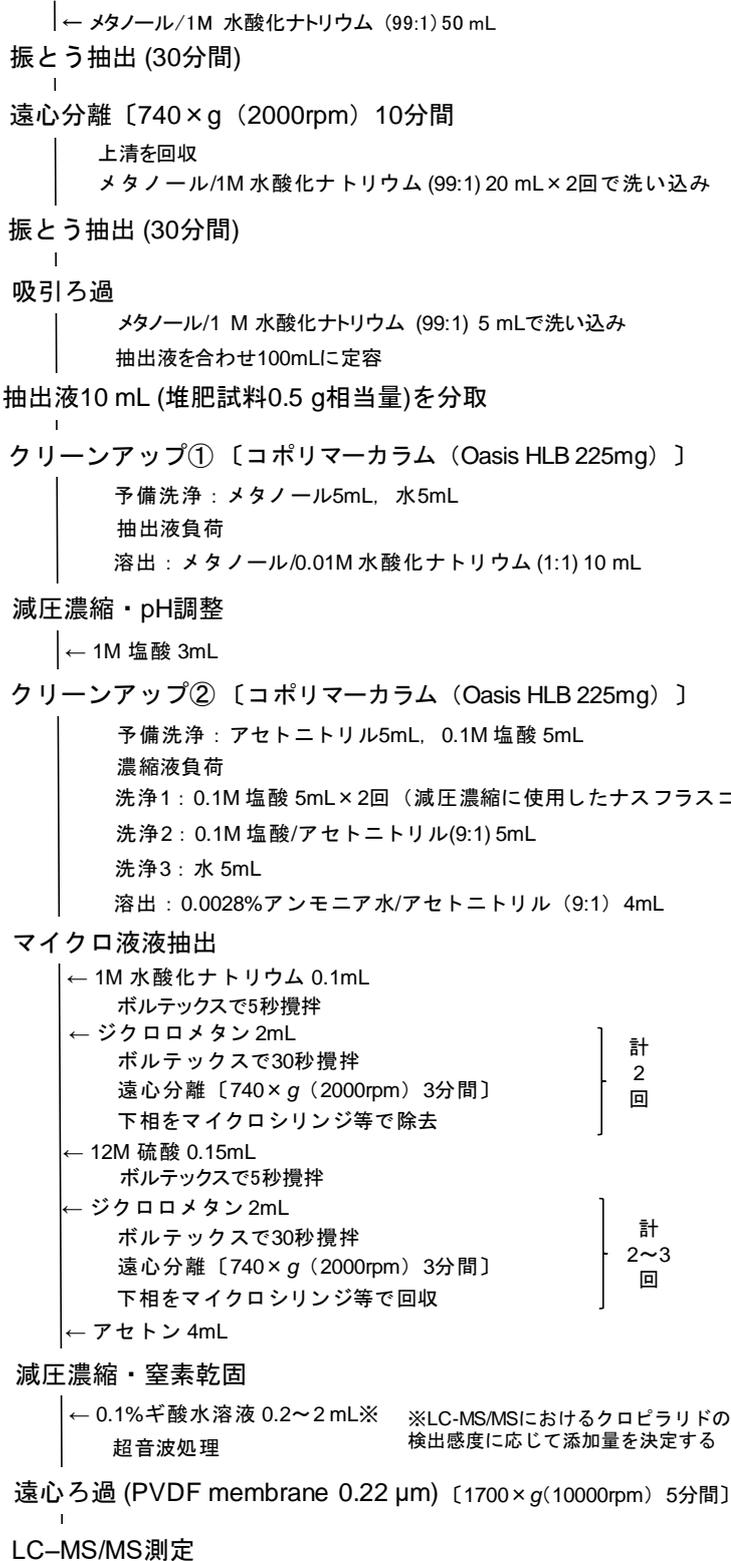


図 牛ふん堆肥中クロピラリドの高感度分析フロー

## 1. 試薬, 器具および装置

アセトニトリル, アセトン, ジクロロメタン, メタノール: 残留農薬試験用および LC/MS 測定用

アンモニア水, 塩酸, 水酸化ナトリウム, 硫酸: 特級

ギ酸: HPLC 測定用

コポリマーカートリッジ (Oasis HLB 225 mg)

ガラス繊維製ろ紙 (GFP)

遠心ろ過チューブ (PVDF membrane 0.22  $\mu\text{m}$ )

振とう機

遠心分離機

吸引ろ過装置

真空ポンプ

吸引マニホールド

純水製造装置

ロータリーエバポレーター

LC-MS/MS

## 2. 試験操作

抽出

分析試料 5 g (乾物) をネジ付三角フラスコ (200~300 mL 容) に秤量する。メタノール/1M 水酸化ナトリウム水溶液 (99 : 1) 50 mL を加え, 振とう機で約 30 分間振り混ぜる。静置後, 上澄みを 50 mL 容ガラス遠心沈殿管に移し, 2000 rpm で 10 分間遠心分離する。上清をメスフラスコ (100 mL 容) に移し, 遠心沈殿管内の残渣をメタノール/1M 水酸化ナトリウム水溶液 (99:1) 20 mL $\times$ 2 で洗浄する。洗浄液をネジ付三角フラスコに移し, 再度振とう機で約 30 分間振り混ぜる。ガラス繊維製ろ紙 (GFP) で吸引ろ過, 三角フラスコ内をメタノール/1M 水酸化ナトリウム水溶液 (99 : 1) 5 mL で洗浄し, 洗液を吸引ろ過する。ろ液および洗液をメスフラスコに移し, メタノール/1M 水酸化ナトリウム水溶液 (99 : 1) で 100 mL に定容する。

クリーンアップ①

固相抽出カートリッジ (コポリマーカラム Oasis HLB 225 mg) を予めメタノール 5 mL および水 5 mL で洗浄する。ナスフラスコ (100 mL 容) をカートリッジの下に置き, 抽出液 10 mL をホールピペット等で正確に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る。メタノール/0.01M 水酸化ナトリウム水溶液 (1 : 1) 10 mL (5 mL $\times$ 2 回) をカートリッジに負荷し, 溶出液を回収する。突沸防止のため回収した溶出液に 5 mL 程度のメタノールを加え, 液量が 5 mL 程度になるまでロータリーエバポレーターに

て 40℃の湯浴中で減圧濃縮する。次いで 1M 塩酸を 3 mL 加え、濃縮液を酸性にする。

#### クリーンアップ②

固相抽出カートリッジ (コポリマーカラム Oasis HLB 225 mg) を予めアセトニトリル 5 mL および 0.1M 塩酸 5 mL で洗浄する。濃縮液をカートリッジに負荷し、液面が充填剤の上端に達するまで流出させる。0.1M 塩酸 10mL でナスフラスコを洗い込み (5 mL×2回)、カートリッジに加え、同様に流出させる。次いで 0.1M 塩酸/アセトニトリル (9 : 1) 5 mL および水 5 mL でカートリッジを洗浄する。遠心沈殿管 (10 mL 容) をカートリッジの下に置き、0.0028w/v%アンモニア水/アセトニトリル (9 : 1) 4 mL をカートリッジに加え、溶出液を回収する。

#### マイクロ液液抽出

回収した溶出液に 1M 水酸化ナトリウム水溶液 0.1 mL を加え、ボルテックスで 5 秒程度攪拌する。ジクロロメタン 2 mL を加え、ボルテックスで 30 秒程度攪拌する。遠心分離 [740×g (2000 rpm) 3 分間] 後、下相 (ジクロロメタン相) をマイクロシリンジ等で吸い上げ、除去する。再びジクロロメタン 2 mL を加え、攪拌、遠心分離、下相の除去を同様に行う。次いで 12M 硫酸 0.15 mL を加え、ボルテックスで 5 秒程度攪拌する。ジクロロメタン 2 mL を加え、ボルテックスで 30 秒程度攪拌する。遠心分離 [740×g (2000 rpm) 3 分間] 後、下相 (ジクロロメタン相) をマイクロシリンジ等で吸い上げ、回収する。攪拌、遠心分離、下相の回収の操作を計 2~3 回行う。回収した下相をナスフラスコ (50~100 mL 容) に移し、ロータリーエバポレーターにて 40℃の湯浴中で減圧濃縮する。ナスフラスコ内をアセトン 2 mL×2 で洗い込み、これを試験管に移し窒素気流化で乾固するまで濃縮する。

#### 最終検液の調製

濃縮液を乾固させた試験管に 0.1%ギ酸水溶液 0.2~2 mL (LC-MS/MS におけるクロピラリドの検出感度に応じて添加量を決定する) を加え、超音波処理を 3 分間行い、クロピラリドを再溶解させる。これを遠心ろ過チューブ (PVDF membrane 0.22 μm) に移し、遠心分離 [1700×g (10000 rpm) 5 分間] して得られたろ液を最終検液とする。

#### 測定

測定は、高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計 (LC-MS/MS) で行う。測定条件の一例を以下に示す。下記は Micromass Quattro micro API (Waters 製) を使用した場合の測定条件である。LC-MS/MS 機種の違いによりクロピラリド分析に適する条件が異なるため、各機関が所有する LC-MS/MS の最適分析条件を見出す必要がある。

高速液体クロマトグラフ：

- ① カラム： Waters ACQUITY UPLC HSS TS (内径 2.1 mm, 長さ 50 mm, 粒径 1.8  $\mu\text{m}$ )
- ② 流量： 0.4 mL/min
- ③ 溶離液： A: 0.1%ギ酸 B: メタノール
- ④ グラジエント： 0 min (5 % B) → 2 min (5% B) → 7 min (60 % B) → 8 min (95% B) → 8.5 min (5% B) → 10 min (5% B)
- ⑤ カラム恒温槽： 40°C
- ⑥ 注入量： 5  $\mu\text{L}$

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 キャピラリー電圧： 1.0 kV
- ④ コーン電圧： 20 V
- ⑤ コリジョンエネルギー： 20 eV (定量) 30 eV (確認)
- ⑥ イオン源温度： 120 °C
- ⑦ デソルベーション温度： 400 °C
- ⑧ プリカーサーイオン： m/z 192 (定量) m/z 192 (確認)
- ⑨ プロダクトイオン： m/z 146 (定量) m/z 110 (確認)

### 3. 精度管理

検量線の作成方法，検出・定量下限値の算出方法等は，肥料等試験法（2016）に準じる。

本研究は平成 28 年度農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業「堆肥中クロピラリドの高感度分析法の開発」（課題番号 28045C）の成果によるものです。

---

平成 29 年 11 月

技術マニュアル

「牛ふん堆肥中クロピラリドの高感度分析法（参考法）」

著 者 渡邊栄喜 清家伸康

発行者 （研）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

〒305-8604 茨城県つくば市観音台 3-1-3

問い合わせ先 農研機構農業環境変動研究センター 清家伸康

Tel : 029-838-8191 E-mail : seike(at)affrc.go.jp

---