

## 10 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

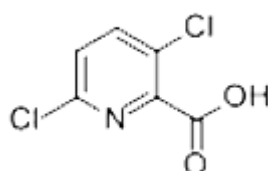
一室間共同試験による妥当性確認一

加藤まどか<sup>1</sup>, 白井裕治<sup>1</sup>

**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, 高感度試験法, 共同試験

#### 1. はじめに

クロピラリドは、日本では農薬としての登録はされていないが、米国、オーストラリア、カナダなどの海外で牧草や穀類の生産に使われているカルボキシル基を有するピリジン系の除草剤 (Figure 1) である。



CAS No: 1702-17-6

Figure 1 Structural formula of clopyralid

クロピラリドが含まれた飼料を家畜に与えると、クロピラリドは家畜のふん尿中に排せつされる。その家畜のふん尿を原料として作った堆肥等を施用すると、トマト、スイートピーなどクロピラリドに感受性が高い野菜や花の生育に影響(生育障害)が生じる<sup>1, 2)</sup>。平成 28 年度から平成 29 年度に農林水産省において実施された調査によると、国内で流通している飼料中及び家畜ふんを利用した堆肥中にクロピラリドが含まれることが確認された<sup>3, 4)</sup>。

顯谷らは液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた堆肥及び汚泥肥料中のクロピラリド及び関連物質の同時分析法を開発(定量下限 10 µg/kg 程度)した<sup>5)</sup>。その後、土壤中のクロピラリド濃度が 1 µg/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ことが報告されたことから<sup>6)</sup>、高感度な分析法が必要とされた。このことから、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 µg/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)」が開発された<sup>7)</sup>。また、同年度に伊藤らによって当分析法の牛ふん以外の畜ふんを利用した堆肥への適用範囲拡大が行われた<sup>8)</sup>。しかしながら、その試料溶液の調製操作は工程が多く、試料によっては精製に用いるカートリッジカラムが目詰まりを起こして試料溶液の調製が困難となること、「特定化学物質障害予防規則の措置対象物質」であるジクロロメタンを使用することから、平成 30 年度にこれらの課題を解決するため、中村らにより分析法の改良が行われ、単一試験室における分析法の妥当性 (SLV: Single Laboratory Validation) が確認された<sup>9)</sup>。

<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

今回、この LC-MS/MS を用いた堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリドの測定について国際的に標準とされる室間共同試験による妥当性確認 (HCV: Harmonized Collaborative Validation) 方法による評価を行うため、共通試料を用いて試験室間の再現精度を調査したので、その概要を報告する。

## 2. 材料及び方法

### 1) 共同試験用試料

市場に流通している肥料の堆肥 5 種類(牛ふん堆肥 2 種類並びに鶏ふん堆肥, 豚ふん堆肥及び馬ふん堆肥各 1 種類)及び汚泥発酵肥料 1 種類を 40 °C で約 60~70 時間乾燥した後, それぞれ粉砕機 (Retsch ZM 200) で 500  $\mu\text{m}$  のスクリーンを通過するまで粉砕して分析用試料を調製した。

共同試験用試料は, 分析用試料約 3.8 g をポリエチレン袋に入れて密封し, それぞれ 54 袋を調製した。一対のブラインド試料を提供するため, それぞれの共同試験用試料の袋にはランダムな番号を付し, 参加試験室に配付した。

(共同試験参加試験室)

- ・ 一般財団法人材料科学技術振興財団分析評価部 KB
- ・ 一般社団法人日本海事検定協会食品衛生分析センター
- ・ 一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所微量試験部農薬試験課
- ・ 株式会社環境測定サービス筑波研究所
- ・ 株式会社島津製作所秦野工場
- ・ 公益財団法人日本食品衛生協会
- ・ 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有害化学物質研究領域
- ・ ジーエルサイエンス株式会社総合技術本部カスタマーサポートセンター
- ・ 昭和電工株式会社機能性化学品事業部特殊化学品部分離精製グループ
- ・ 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肥料鑑定課
- ・ 日本環境科学株式会社事業部分分析グループ
- ・ 三浦工業株式会社環境事業本部科学分析センター

(50 音順)

### 2) 装置及び器具

LC-MS/MS, LC 用分離カラム(ガードカラムを含む), 振り混ぜ機, 遠心分離機, 高速遠心分離機, ロータリーエバポレーター, マニホールドは各試験室が保有しているものを使用した。

### 3) 試験方法

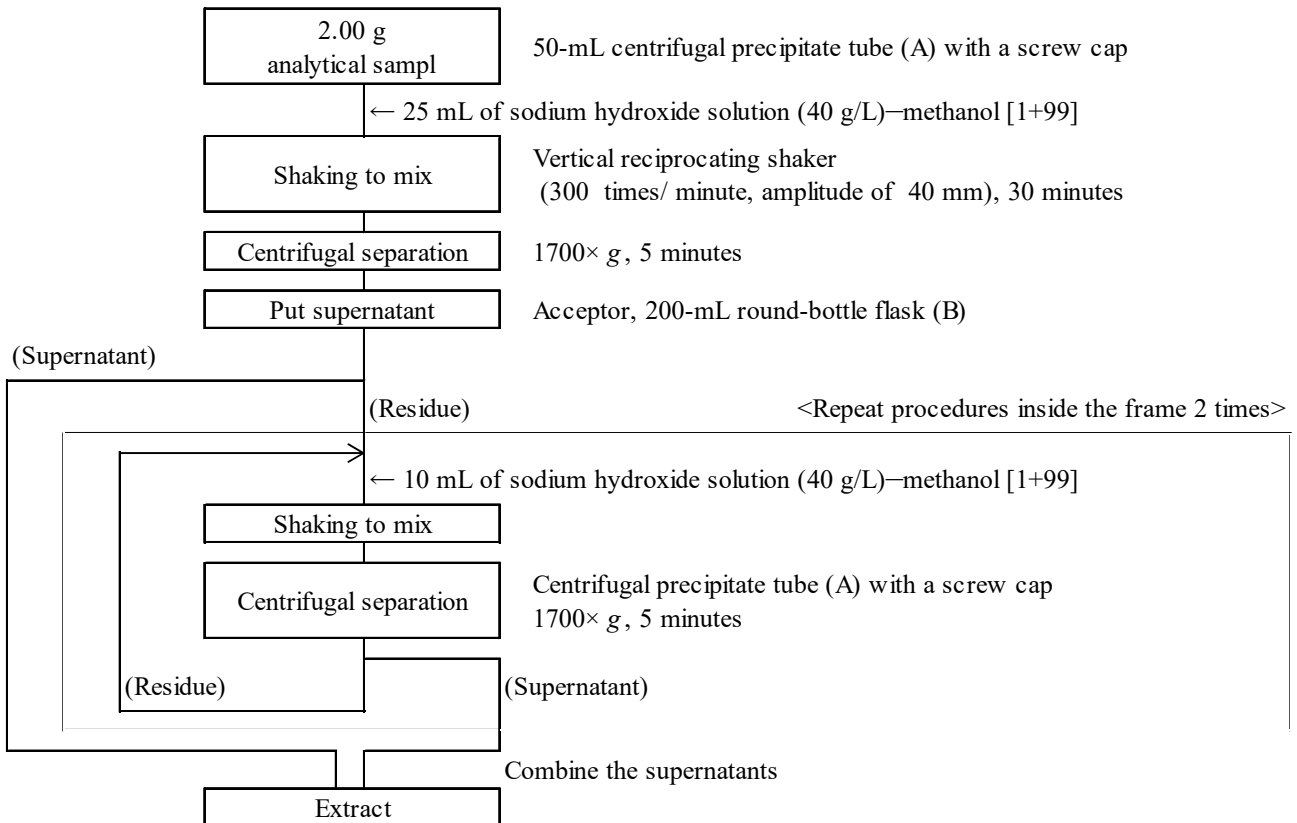
LC-MS/MS 法による堆肥及び汚泥発酵肥料中のクロピラリドの測定の性能評価のための共同試験には, 肥料等試験法<sup>10)</sup>の 8.2.c のクリーンアップ (1) を改良した方法<sup>11)</sup>を用いた。

試料溶液の調製操作(抽出操作, クリーンアップ(1)操作及びクリーンアップ(2)操作)を試験法のフローシート(Scheme 1-1~Scheme 1-3)に示した。なお, 参加試験室においてクリーンアップ(1)操作で用いるコポリマーカラムは Oasis HLB 12 cc (500 mg) 又は InertSep HLB FF 500 mg /20 mL のいずれかによった。

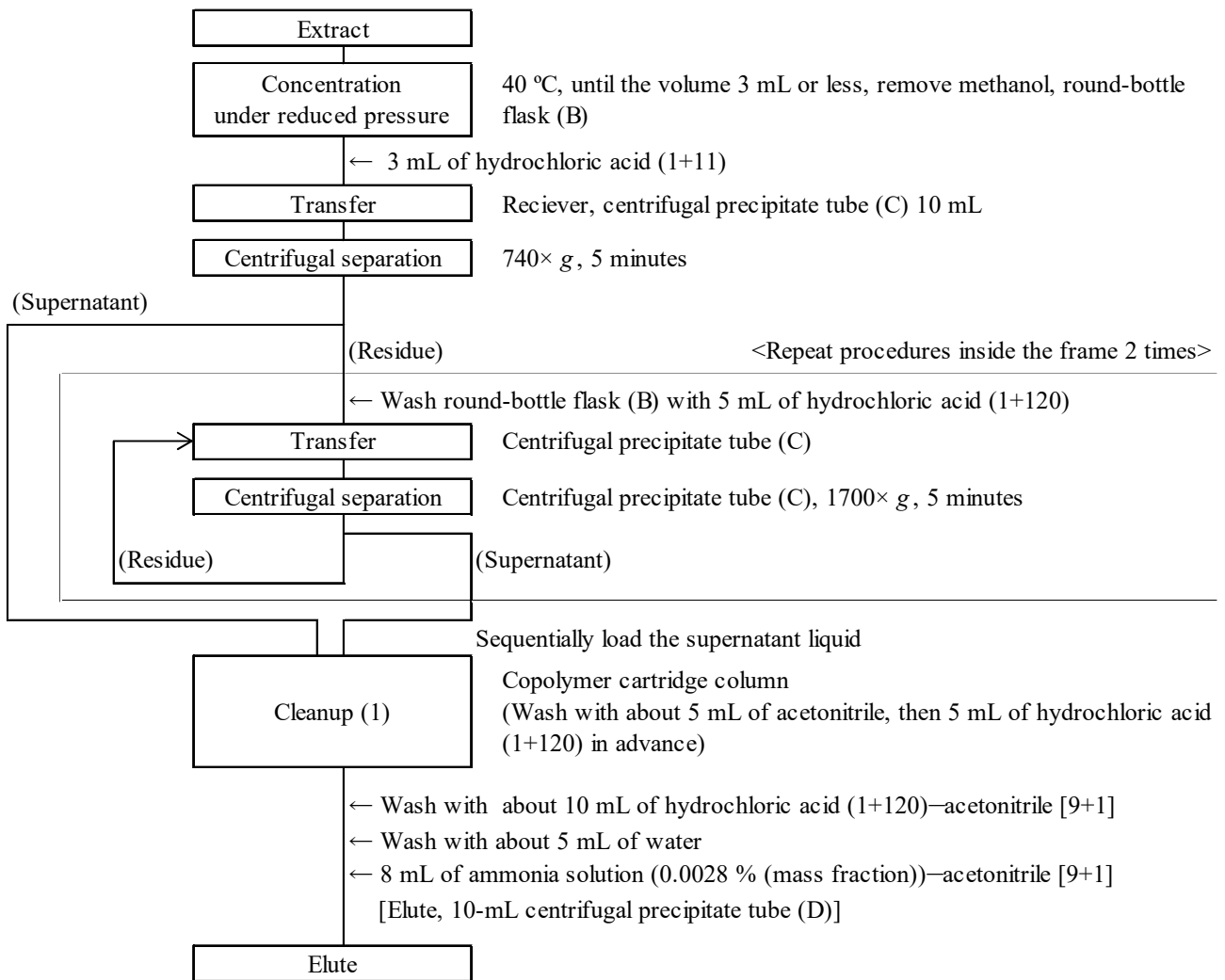
検量線用標準溶液の調製は 0.5 ng/mL, 1 ng/mL, 2 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, 50 ng/mL 及び

100 ng/mL の濃度となるように各試験室で肥料等試験法に従って実施した。

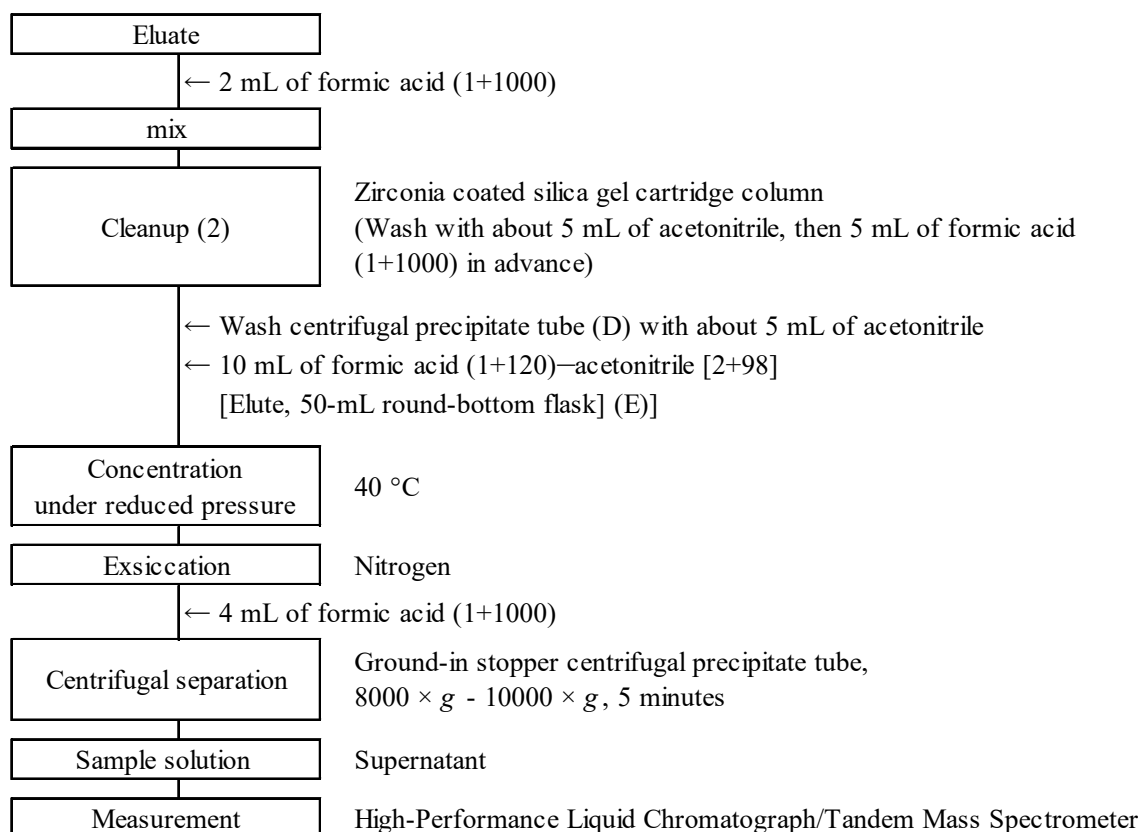
測定操作における基本的な測定条件を Table 1-1 に示したが、各試験室が保有している LC-MS/MS に適した測定条件 (Table 1-2 (一例)) に設定した。試料溶液及び検量線用標準液のプロダクトイオン ( $m/z$  146 及び  $m/z$  110) を選択反応検出 (SRM) によりそれぞれ測定した。検量線用標準液のクロピラリドのピーク面積及び高さについてそれぞれ検量線を作成した。試料溶液中の濃度が 10 ng/mL 未満の場合は 0.5 ng/mL ~ 10 ng/mL の濃度範囲の検量線を用い、10 ng/mL 以上の場合は全濃度範囲の検量線を用いて、試料溶液のクロピラリドのピーク面積及び高さから濃度を求め、それぞれの分析試料中のクロピラリドの量を算出した (Table 1-3)。



Scheme 1-1 Flow sheet for clopyralid in composts (Extraction procedure)



Scheme 1-2 Flow sheet for clopyralid in compost and composted sludge fertilizers  
(Cleanup (1) procedure)



Scheme 1-3 Flow sheet for clopyralid in compost and composted sludge fertilizers  
(Cleanup (2) and measurement procedure)

Table 1-1 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	A silica gel column to which octadecyl chemically bonds (2 mm~3 mm i.d, 50 mm~50 mm L, 1.6 μm~3.0 μm particle diameter)
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	0.2 mL/min~0.5 mL/min
Column temperature	40 °C
Injection Volume	5 μL
Ionaization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Precursor ion	<i>m/z</i> 192
Product ion (1)	<i>m/z</i> 146
Product ion (2)	<i>m/z</i> 110

Table 1-2 Example of parameter of MS/MS

Instrument	Parameter
Waters Quatro Premier XE	Capillary voltage: 1.0 kV
	Desolvation temperature: 400 °C
	Desolvation gas flow: 1000 L/h
	Cone gas: 50 L/h
	Cone voltage: 24 V
	Source temperature: 120 °C
Collision energy: ( <i>m/z</i> 146) 20 eV, ( <i>m/z</i> 110) 30 eV	
SHIMADZU LCMS-8045	Probe voltage: 0.5 kV
	DL temperature: 150 °C
	Heat block temperature: 150 °C
	Interface temperature: 400 °C
	Nebulizing gas flow: 3 L/min
	Drying gas flow: 10 L/min
	Heating gas flow: 10 L/min
	Collision energy: ( <i>m/z</i> 146) 21 eV, ( <i>m/z</i> 110) 34 eV
Agilent Technologies 6460	Drying gas temperature: 350 °C
	Drying gas flow: 10 L/min
	Sheath gas temperature: 370 °C
	Sheath gas flow: 12 L/min
	Nebulizing gas pressure: 50 psi
	Fragmentor voltage: 80 V
	Collision voltage: ( <i>m/z</i> 146) 20 V, ( <i>m/z</i> 110) 36 V

Table 1-3 Measurement operation of clopyralid

Product ion ( <i>m/z</i> ) <sup>a)</sup>		Indicated value of the peak <sup>b)</sup>
(1)	(2)	
<i>m/z</i> 146	<i>m/z</i> 110	Area
<i>m/z</i> 146	<i>m/z</i> 110	Height
<i>m/z</i> 110	<i>m/z</i> 146	Area
<i>m/z</i> 110	<i>m/z</i> 146	Height

a) Product ion that created the chromatograph

b) Indicated value of the peak used to calculate the amount  
of clopyralid

#### 4) 共同試験用試料の均質性試験

IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル<sup>12)</sup>の均質性試験に従い、それぞれの共同試験用試料から 10 試料を抜き取り、各試料につき 2 点併行で 3) に従って分析した。なお、ねじ口遠心沈殿管に計り入れる分析試料は 1.8 g とした。ただし、クロピラリド量の算出方法は、プロダクトイオン(1) *m/z* 146 の面積による。

#### 5) 共同試験

試験に参加した 12 試験室並びに使用した LC-MS/MS の型式及び LC 用分離用カラムは Table 2 のとおりであり、それぞれの試験室において送付した 12 試料について 3) に従って令和 2 年 10 月 23 日から 11 月末日まで分析することとした。なお、Table 1-3 の分析法によるそれぞれの分析結果が報告された。

Table 2 Instruments used in the collaborative study

Labs ID <sup>a)</sup>	LC-MS/MS	LC column		Copolymer cartridge for cleanup <sup>b)</sup> (Filler amount, column size)
		(Inner diameter×length, particle diameter)	(Inner diameter×length, particle diameter)	
A	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Quatro Premier XE, Waters	ACQUITY UPLC HSS C18, Waters (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)	ACQUITY UPLC HSS C18, Waters (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)	InertSep HLB FF (500 mg, 20 mL)
B	LC: Nexera, Shimadzu MS/MS: QTRAP 4000, AB SCIEX	InertSustain AQ-C18, GL Sciences (2.1 mm×100 mm, 1.9 μm)	InertSustain AQ-C18, GL Sciences (2.1 mm×100 mm, 1.9 μm)	InertSep HLB FF (500 mg, 20 mL)
C	LC: Nexera X3, Shimadzu MS/MS: LCMS-8050, Shimadzu	Shim-pack Scepter C18-120, Shimadzu (2.1 mm×100 mm, 1.9 μm)	Shim-pack Scepter C18-120, Shimadzu (2.1 mm×100 mm, 1.9 μm)	InertSep HLB FF (500 mg, 20 mL)
D	LC: Nexera, Shimadzu MS/MS: LCMS-8030 PLUS, Shimadzu	C18U 2B, Shodex (2.0 mm×50 mm, 1.9 μm)	C18U 2B, Shodex (2.0 mm×50 mm, 1.9 μm)	InertSep HLB FF (500 mg, 20 mL)
E	LC: LC: Exion LC, AB SCIEX MS/MS: API 5500+, AB SCIEX	ACQUITY UPLC BEH C18, Waters (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)	ACQUITY UPLC BEH C18, Waters (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)	Oasis HLB (500 mg, 12 mL)
F	LC: LC: Nexera XR, Shimadzu MS/MS: API 4500 QTRAP, AB SCIEX	InertSustain C18, GL Science (3.0 mm×50 mm, 2.0 μm)	InertSustain C18, GL Science (3.0 mm×50 mm, 2.0 μm)	Oasis HLB (500 mg, 12 mL)
G	LC: 1260 Infinity, Agilent MS/MS: 6460 Triple Quad LC/MS, Agilent	ZORBAX Eclipse Plus C18 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)	ZORBAX Eclipse Plus C18 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)	Oasis HLB (500 mg, 12 mL)
H	LC: 1290 Infinity, Agilent MS/MS: 6460 Triple Quad LC/MS, Agilent	InertSustain C18, GL Sciences (2.1 mm×100 mm, 3.0 μm)	InertSustain C18, GL Sciences (2.1 mm×100 mm, 3.0 μm)	Oasis HLB (500 mg, 12 mL)
I	LC: 1260 Infinity, Agilent MS/MS: QTRAP 4500, AB SCIEX	InertSustain C18, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 3.0 μm)	InertSustain C18, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 3.0 μm)	Oasis HLB (500 mg, 12 mL)
J	LC: Nexera X2, Shimadzu MS/MS: TRIPLE QUAD 6500+, AB SCIEX	ACQUITY UPLC BEH C18, Waters (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)	ACQUITY UPLC BEH C18, Waters (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)	Oasis HLB (500 mg, 12 mL)
K	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: TQD, Waters	ACQUITY UPLC HSS C18, Waters (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)	ACQUITY UPLC HSS C18, Waters (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)	Oasis HLB (500 mg, 12 mL)
L	LC: ACQUITY UPLC H Class, Waters MS/MS: Xevo TQD, Waters	ACQUITY UPLC HSS T3, Waters (2.1 mm×50 mm, 1.8 μm)	ACQUITY UPLC HSS T3, Waters (2.1 mm×50 mm, 1.8 μm)	Oasis HLB (500 mg, 12 mL)

a) Laboratory identification (In no particular order)

b) Copolymer cartridge column used in cleanup (1) operation

### 3. 結果及び考察

#### 1) 共同試験用試料の均質性確認

10 試料を 2 点併行で分析した均質性試験の成績の総平均値 ( $\bar{x}$ ) 及びその成績について一元配置分散分析から得られた統計量を用いて算出した併行標準偏差 ( $s_r$ ), 試料間標準偏差 ( $s_{bb}$ ), 併行精度を含む試料間標

標準偏差( $s_{b+r}$ )を Table 3 に示した。さらに、肥料等試験法<sup>10)</sup>に示されている室間再現精度の目安( $CRSD_R$ )及びそれらから算出(式 1)した推定室間再現標準偏差( $\hat{\sigma}_R$ )を Table 3 に示した。

均質性の判定は、IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコル<sup>12)</sup>の手順を参考に実施した。まず、分析結果の等分散性を確認するため、Cochran の検定を実施した。その結果、すべての試料において外れ値は認められなかったため、これらの分析結果について一元配置分散分析を実施した。次に、IUPAC/ISO/AOAC の技能試験プロトコルの十分に均質の判定式(式 2)を用いて均質性の判定を行った。その結果、全ての試料で判定式(式 2)を満たしていたことから、共同試験用試料として妥当な均質性を有していることを確認した。なお、参考のため、式 3 によって併行精度を含む試料間標準偏差( $s_{b+r}$ )を算出したところ、いずれの試料も $\hat{\sigma}_R$ と比較して十分に小さい値であった。

$$\hat{\sigma}_R = CRSD_R \times \bar{x}/100 \quad \dots (式 1)$$

$$s_{bb} < 0.3\sigma_p = 0.3\hat{\sigma}_R \quad \dots (式 2)$$

$$s_{b+r} = \sqrt{s_r^2 + s_{bb}^2} \quad \dots (式 3)$$

$\hat{\sigma}_R$  : 推定室間再現標準偏差

$CRSD_R$  : 肥料等試験法に示されている室間再現精度(室間再現相対標準偏差(%))の目安

$\bar{x}$  : 総平均値

$s_r$  : 併行標準偏差

$\sigma_p$  : 妥当性確認を行う目的に適合した標準偏差

$s_{bb}$  : 試料間標準偏差

$s_{b+r}$  : 併行精度を含む試料間標準偏差

Table 3 Homogeneity test result of clopyralid

Sample	No. of sample	$\bar{x}$ <sup>a)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$CRSD_R$ <sup>b)</sup> (%)	$\hat{\sigma}_R$ <sup>c)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$s_r$ <sup>d)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$0.5\hat{\sigma}_R$ <sup>e)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$s_{bb}$ <sup>f)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$0.3\hat{\sigma}_R$ <sup>g)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$s_{b+r}$ <sup>h)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Poultry manure compost	10	5.38	22	1.18	0.34	0.59	0.25	0.36	0.42
Pig manure compost	10	53.1	22	11.7	3.5	5.8	0.0	3.5	3.5
Cattle manure compost 1	10	129	22	28	3	14	1	8	3
Cattle manure compost 2	10	7.03	22	1.55	0.32	0.77	0.15	0.46	0.35
Horse manure compost	10	25.0	22	5.5	0.4	2.8	0.4	1.7	0.5
Composted sludge fertilizer	10	17.1	22	3.8	0.6	1.9	0.2	1.1	0.6

a) Grand mean value ( $n = 10 \times$  number of repetition(2) )

b) Criteria of precision for reproducibility relative standard deviation in Testing Methods for Fertilizers 2020

c) The estimated standard deviation of reproducibility calculated based on  $CRSD_R$

d) Repeatability standard deviation

e) Parameters for the determination of repeatability standard deviation ( $s_r$ )

f) Standard deviation of sample-to-sample

g) Parameters for the determination of homogeneity ( $s_{bb}$ )

h) Standard deviation of sample-to-sample include repeatability  $s_{b+r} = \sqrt{s_{bb}^2 + s_r^2}$

## 2) 共同試験成績及び外れ値検定

各試験室から報告されたそれぞれの共同試験成績を Table 4 に示した。各系列の分析試料の結果を IUPAC の共同試験プロトコル<sup>13, 14)</sup>に従って統計処理した。外れ値を検出するために Cochran の検定及び Grubbs の検定を実施した。その結果、いずれのクロピラリド量の分析法(Table 1-3)においても 12 試験室の分析結果のう



ち、プロダクトイオン  $m/z$  146 の面積での算出方法では鶏ふん堆肥で 1 試験室及び牛ふん堆肥 2 で 1 試験室が外れ値として判定され、また、その他の算出方法では鶏ふん堆肥、牛ふん堆肥 2 及び汚泥発酵肥料で各 1 試験室並びに馬ふん堆肥で各 2 試験室が外れ値として判定された。

Table 4 Individual result of clopyralid

Measurement operation <sup>a)</sup>	Lab ID <sup>b)</sup>	Poultry manure		Pig manure		Cattle manure		Cattle manure		Horse manure		Composted sludge	
		compost	compost	compost	compost	compost 1	compost 2	compost	compost	compost	compost	fertilizer	fertilizer
$m/z$ 146	A	8.24	6.96	59.0	58.2	141	140	8.57	8.32	26.5	27.2	19.0	17.7
Area	B	5.14	5.45	46.3	52.2	106	79.0	6.02	5.98	19.1	23.4	13.4	13.2
	C	14.7 <sup>c)</sup>	8.15 <sup>c)</sup>	63.0	64.8	125	143	6.35 <sup>c)</sup>	9.36 <sup>c)</sup>	18.5	27.4	18.8	19.9
	D	5.23	6.00	53.8	51.9	116	129	7.60	6.97	20.3	24.4	12.3	12.7
	E	5.08	5.52	48.2	46.1	119	121	6.44	6.14	23.0	23.7	14.1	15.0
	F	8.15	6.43	68.6	66.3	175	133	9.93	8.83	24.3	31.3	23.6	26.8
	G	4.64	5.29	43.5	44.3	104	102	7.39	6.53	22.1	21.3	12.8	13.3
	H	3.90	5.73	36.6	42.8	98.5	98.7	6.71	6.63	20.8	22.0	13.4	11.7
	I	5.47	4.54	52.3	44.0	111	86.4	6.40	6.44	22.0	17.5	14.7	14.7
	J	3.65	4.46	44.5	43.4	103	102	6.05	5.87	19.7	21.5	13.7	12.1
	K	6.42	5.44	48.9	47.6	128	90.9	6.16	6.38	26.7	19.5	16.3	17.5
	L	2.50	2.36	43.4	38.0	105	101	4.37	3.10	19.6	19.6	9.07	10.3
$m/z$ 146	A	8.53	7.44	59.2	58.8	140	137	8.24	8.52	26.8 <sup>d)</sup>	27.3 <sup>d)</sup>	19.0	17.9
Height	B	4.83	4.56	45.0	51.7	107	78.5	5.71	5.61	18.7	23.6	12.9	12.8
	C	15.1 <sup>c)</sup>	8.08 <sup>c)</sup>	65.1	67.3	127	146	6.51 <sup>c)</sup>	9.39 <sup>c)</sup>	18.6	28.6	19.3	20.2
	D	5.59	6.43	53.8	51.5	116	126	7.54	7.11	19.8	25.0	13.7	13.1
	E	5.03	5.39	47.6	45.2	119	121	6.39	5.81	22.8	23.6	14.0	15.0
	F	8.40	6.84	69.6	71.0	185	138	9.66	8.20	25.7 <sup>d)</sup>	34.2 <sup>d)</sup>	25.0 <sup>d)</sup>	29.2 <sup>d)</sup>
	G	4.43	5.11	43.0	43.7	104	102	7.27	6.28	21.7	20.9	13.0	13.7
	H	4.37	5.38	37.2	43.6	99.2	100	6.63	6.51	21.1	22.1	13.2	11.2
	I	5.91	4.37	50.4	44.1	111	88.8	6.05	6.64	22.0	18.4	15.5	14.7
	J	3.70	4.72	44.0	44.9	102	98.4	6.24	5.92	19.1	22.0	14.2	11.8
	K	5.99	4.91	49.0	47.5	126	91.4	6.00	5.95	26.6	19.9	16.0	17.2
	L	2.45	2.23	42.2	38.6	104	99.8	4.16	3.11	19.6	19.4	9.10	10.3

a) Upper column: Product ion, Lower column: Indicated value of the peak used to calculate the amount of clopyralid

b) Laboratory identification (In no particular order)

c) Outlier of Cochran test

d) Outlier of Grubbs test

Table 4 Continued

Measurement operation <sup>a)</sup>	Lab ID <sup>b)</sup>	Poultry manure		Pig manure		Cattle manure		Cattle manure		Horse manure		Composted sludge fertilizer		
		compost	compost	compost	compost	compost 1	compost 2	compost	compost	compost	compost	compost	fertilizer	
<i>m/z</i> 110 Area	A	7.99	7.03	59.2	57.8	140	140	8.00	8.17	26.9 <sup>d)</sup>	27.8 <sup>d)</sup>	18.1	18.0	
	B	4.49	4.69	47.1	52.3	106	77.6	5.73	5.61	20.2	22.8	13.2	12.8	
	C	14.4 <sup>c)</sup>	7.93 <sup>c)</sup>	63.3	65.2	123	143	6.23 <sup>c)</sup>	9.17 <sup>c)</sup>	18.0	27.1	18.8	19.9	
	D	5.92	6.89	53.3	52.3	115	125	6.98	8.02	20.5	24.9	13.0	13.3	
	E	5.10	5.71	47.5	46.1	118	121	6.21	6.13	23.0	23.0	13.9	15.2	
	F	8.25	6.63	69.8	67.6	177	137	9.91	9.20	26.3 <sup>d)</sup>	32.7 <sup>d)</sup>	25.2 <sup>d)</sup>	28.4 <sup>d)</sup>	
	G	4.44	5.06	43.6	43.4	103	101	6.89	6.12	22.0	21.2	12.6	13.2	
	H	4.38	5.17	36.5	42.9	98.0	98.9	6.41	6.38	20.7	21.9	13.1	11.2	
	I	4.88	5.54	51.1	43.7	109	85.4	6.41	6.41	21.9	18.2	14.7	15.3	
	J	3.37	4.65	44.6	42.8	102	101	6.12	5.93	19.5	21.6	13.8	12.0	
	K	5.02	4.78	48.4	50.5	130	95.7	5.09	6.18	26.3	18.5	17.0	16.3	
	L	2.69	2.85	41.8	39.5	105	101	3.70	3.25	19.2	19.2	9.42	11.2	
	<i>m/z</i> 110 Height	A	7.51	6.44	60.1	57.6	143	144	7.26	7.57	25.9 <sup>d)</sup>	28.1 <sup>d)</sup>	18.2	19.0
		B	4.62	4.48	47.2	51.9	107	77.9	5.69	5.50	19.2	23.3	13.3	12.6
C		14.9 <sup>c)</sup>	8.08 <sup>c)</sup>	65.5	68.6	126	145	6.32 <sup>c)</sup>	9.36 <sup>c)</sup>	18.3	28.0	18.9	20.1	
D		5.86	6.51	56.2	53.0	120	128	6.60	7.92	21.2	25.6	12.6	13.1	
E		5.03	6.04	47.4	47.3	118	122	6.37	6.44	22.5	23.4	14.5	15.4	
F		7.45	6.05	69.6	70.4	177	131	8.57	7.27	28.8 <sup>d)</sup>	32.7 <sup>d)</sup>	26.2 <sup>d)</sup>	30.1 <sup>d)</sup>	
G		4.41	5.04	43.2	43.3	103	102	7.05	6.15	22.0	20.9	12.7	13.6	
H		4.35	5.36	37.1	43.3	99.5	100	6.43	6.45	21.1	22.2	13.3	11.3	
I		5.41	4.92	50.5	43.5	106	85.8	6.32	6.49	22.2	18.2	15.0	15.1	
J		3.50	5.11	45.5	43.7	106	102	6.74	6.17	19.4	22.4	14.0	12.1	
K		5.24	5.20	49.4	51.1	131	96.0	5.22	6.45	26.3	19.3	17.1	17.2	
L		2.83	2.79	42.6	39.8	106	101	3.61	3.60	19.1	18.7	9.02	10.9	

### 3) 併行精度及び室間再現精度

それぞれのクロピラリド量の分析法 (Table 1-3) における外れ値を除外した試験成績より算出<sup>13, 14)</sup>した平均値, 併行標準偏差 ( $s_r$ ), 併行相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) 及び肥料等試験法<sup>10)</sup>における併行相対標準偏差 ( $CRSD_r$ )

の目安並びに室間再現標準偏差 ( $s_R$ ), 室間再現相対標準偏差 ( $RSD_R$ ) 及び肥料等試験法における室間再現相対標準偏差 ( $CRSD_R$ ) の目安を Table 5 に示した。

すべての算出方法において, クロピラリドの平均値は 5.19  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~116  $\mu\text{g}/\text{kg}$  であり, その併行標準偏差は 0.41  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~15  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 併行相対標準偏差は 4.9 %~15.3 %, 室間再現標準偏差は 1.20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~23  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 室間再現相対標準偏差は 14.3 %~30.6 %であった。

いずれの算出方法においても, 併行相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) 及び室間再現相対標準偏差 ( $RSD_R$ ) も肥料等試験法の妥当性確認の手順に示している各濃度のレベルにおける精度の許容範囲 (精度の目安の相対標準偏差の 2 倍以内) であったことから, 本法の精度は同試験法の性能評価規準の要求事項に適合していることを確認した。

Table 5 Statistical analysis of Collaborative study results

Measurement operation <sup>a)</sup>	Sample	Labs $p(q)$ <sup>b)</sup>	Mean <sup>c)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$s_r$ <sup>c)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$RSD_r$ <sup>d)</sup> (%)	$2 \times CRSD_r$ <sup>f)</sup> (%)	$s_R$ <sup>g)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$RSD_R$ <sup>h)</sup> (%)	$2 \times CRSD_R$ <sup>i)</sup> (%)
$m/z$ 146 Area	Poultry manure compost	11(1)	5.30	0.73	13.8	22	1.50	28.4	44
	Pig manure compost	12	50.3	2.8	5.6	22	9.1	18.0	44
	Cattle manure compost 1	12	115	14	12.6	22	22	19.1	44
	Cattle manure compost 2	11(1)	6.67	0.44	6.5	22	1.48	22.1	44
	Horse manure compost	12	22.6	3.2	14.1	22	3.4	15.0	44
	Composted sludge fertilizer	12	15.3	1.0	6.4	22	4.2	27.5	44
$m/z$ 146 Height	Poultry manure compost	11(1)	5.30	0.70	13.1	22	1.62	30.6	44
	Pig manure compost	12	50.6	2.6	5.1	22	9.9	19.6	44
	Cattle manure compost 1	12	115	15	12.8	22	23	20.2	44
	Cattle manure compost 2	11(1)	6.53	0.49	7.5	22	1.45	22.2	44
	Horse manure compost	10(2)	21.7	3.3	15.3	22	3.3	15.3	44
	Composted sludge fertilizer	11(1)	14.4	0.9	6.1	22	3.0	20.5	44
$m/z$ 110 Area	Poultry manure compost	11(1)	5.25	0.61	11.5	22	1.48	28.1	44
	Pig manure compost	12	50.4	2.5	4.9	22	9.3	18.5	44
	Cattle manure compost 1	12	115	14	12.2	22	22	19.4	44
	Cattle manure compost 2	11(1)	6.49	0.41	6.3	22	1.57	24.2	44
	Horse manure compost	10(2)	21.5	3.1	14.3	22	3.1	14.3	44
	Composted sludge fertilizer	11(1)	14.4	0.8	5.6	22	2.8	19.2	44
$m/z$ 110 Height	Poultry manure compost	11(1)	5.19	0.63	12.2	22	1.26	24.3	44
	Pig manure compost	12	51.2	2.5	4.9	22	9.9	19.3	44
	Cattle manure compost 1	12	116	15	12.6	22	22	19.4	44
	Cattle manure compost 2	11(1)	6.36	0.53	8.4	22	1.20	18.8	44
	Horse manure compost	10(2)	21.7	3.2	14.9	22	3.2	14.9	44
	Composted sludge fertilizer	11(1)	14.5	0.8	5.8	22	3.0	20.4	44

a) Upper column: Product ion, Lower column: Indicated value of the peak used to calculate the amount of clopyralid

b) Number of laboratories, where  $p$ =number of laboratories retained after outlier removed and  $(q)$ =number of outlier

c) Average value after excluding outliers( $n$ =The number of laboratories( $p$ ) $\times$ The number of samples(2))

d) Repeatability standard deviation

e) Repeatability relative standard deviation

f) Criteria of precision for repeatability relative standard deviation in Testing Methods for Fertilizers 2020

g) Reproducibility standard deviation

h) Reproducibility relative standard deviation

i) Criteria of precision for Reproducibility relative standard deviation in Testing Methods for Fertilizers 2020

#### 4. まとめ

12 試験室において 6 種類(12 点)の堆肥及び汚泥発酵肥料を用いて共同試験を実施し、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の測定について室間再現性の評価を行った。なお、クロピラリド量の算出方法は、プロダクトイオン( $m/z$  146 及び  $m/z$  110)並びにピーク面積及び高さについてそれぞれ実施した。その結果、クロピラリドの平均値 5.19  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~116  $\mu\text{g}/\text{kg}$  において、室間再現相対標準偏差は 14.3 %~30.6 %であった。いずれの室間再現相対標準偏差( $RSD_R$ )も肥料等試験法<sup>10)</sup>の妥当性確認の手順に示している各濃度のレベルにおける精度の目安の範囲内であることから、本法の精度はいずれの算出方法においても同試験法の性能評価規準の要求事項に適合していることが確認された。

今回検討した試験法は、すでに単一試験室による試験法の妥当性確認(SLV)がされており、さらに今回の検討で国際的に標準とされる室間共同試験による妥当性確認(HCV)が評価されたことから、この試験法の性能は肥料等試験法における性能規準の Type B (SLV 及び HCV による評価)に適合していることを確認した。

#### 謝 辞

共同試験にご協力いただきました一般財団法人材料科学技術振興財団分析評価部 KB, 一般社団法人日本海事検定協会食品衛生分析センター, 一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所微量試験部農薬試験課, 株式会社環境測定サービス筑波研究所, 株式会社島津製作所秦野工場, 公益財団法人日本食品衛生協会, 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有害化学物質研究領域, ジーエルサイエンス株式会社総合技術本部カスタマーサポートセンター, 昭和電工株式会社機能性化学品事業部特殊化学品部分離精製グループ, 日本環境科学株式会社事業部分分析グループ, 三浦工業株式会社環境事業本部科学分析センターの各位に謝意を表します。

#### 文 献

- 1) 農林水産省:クロピラリドが原因と疑われる生育障害の発生状況  
<<https://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyo/clopyralid/attach/pdf/clopyralid-54.pdf>>
- 2) 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構:飼料及び堆肥に残留する除草剤(クロピラリド)の簡易判定法と被害軽減対策マニュアル(第2版)  
<[https://www.naro.go.jp/publicity\\_report/publication/files/clopyralid\\_ver2.pdf](https://www.naro.go.jp/publicity_report/publication/files/clopyralid_ver2.pdf)>
- 3) 農林水産省:平成28年度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  
<<http://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyo/clopyralid/attach/pdf/clopyralid-25.pdf>>
- 4) 農林水産省:平成29年度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  
<<http://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyo/clopyralid/attach/pdf/clopyralid-33.pdf>>
- 5) 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)
- 6) 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](http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/pub2016_or_later/pamphlet/tech-pamph/078226.html)>

- 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:牛ふん堆肥中クロピラリドの高感度分析法(参考法)(2017)  
< [https://www.naro.go.jp/publicity\\_report/publication/files/clopyralid\\_analysis\\_1.pdf](https://www.naro.go.jp/publicity_report/publication/files/clopyralid_analysis_1.pdf) >
- 8) 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 ー微量試験法の適用範囲拡大ー, 肥料研究報告, **11**, 63-74 (2018)
- 9) 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法の改良, 肥料研究報告, **12**, 69-83 (2019)
- 10) 農林水産消費安全技術センター(FAMIC):肥料等試験法 (2020)  
< [http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikhenho\\_2020.pdf](http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikhenho_2020.pdf) >
- 11) 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 ー精製操作の改良ー, 肥料研究報告, **14**, 99-108 (2021)
- 12) Thompson, M., L. R. Ellison S., Wood, R.: The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories, *Pure & Appl. Chem.*, **78**(1), 145-196 (2006)
- 13) Horwitz, W. : Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67** (2) , 331-343 (1995)
- 14) AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis, AOAC INTERNATIONAL (2005)

## Microanalysis Determination of Clopyralid in Compost and Composted Sludge Fertilizer by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS): A Collaborative Study

KATO Madoka<sup>1</sup> and SHIRAI Yuji<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

We conducted a collaborative study to evaluate LC-MS/MS for determination of clopyralid, in compost and composted sludge fertilizer. Clopyralid was extracted with methanol under alkaline condition. The extract was purified with a copolymer cartridge column and a zirconia coated silica gel cartridge column. We analyzed the clopyralid by LC-MS/MS. We sent five samples, respectively, to 12 collaborators. They analyzed these samples as blind duplicates. The mean values and the reproducibility relative standard deviation ( $RSD_R$ ) for clopyralid were 5.19  $\mu\text{g}/\text{kg}$  - 116  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 14.3 % - 30.6 %, respectively. These results indicated that this method has an acceptable precision for determination of clopyralid. Copolymer cartridge column

*Key words* clopyralid, compost, composted sludge fertilizer, LC-MS/MS, microanalysis method, collaborative study

(Research Report of Fertilizer, **14**, 109-122, 2021)