

## 5 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－

小塚健志<sup>1</sup>, 大島舞弓<sup>1</sup>, 橋本良美<sup>1</sup>, 田丸直子<sup>1</sup>, 白井裕治<sup>1</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, 共同試験

#### 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る. このことから, 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分析法として, 液体クロマトグラフタンデム型質量分析(LC-MS/MS)法が検討され, 単一試験室における真度, 併行精度, 定量下限等を平成 25 年度に顯谷らが検討したところ, 単一試験室内における試験方法の妥当性が確認された<sup>3)</sup>.

今回, この 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, アミノピラリド及びピクロラムの測定の性能評価のため, 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.

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.

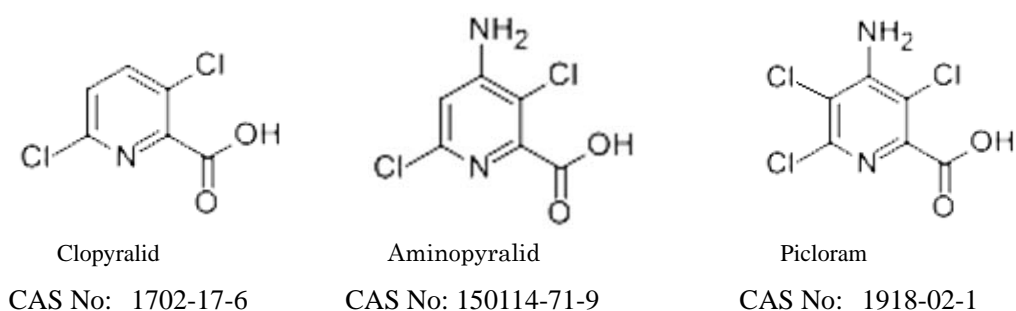


Fig.1 Chemical structural formulas of clopyralid, aminopyralid and picloram

<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

## 2. 材料及び方法

### 1) 共同試験用試料

市販されている2種類の堆肥及び3種類の汚泥発酵肥料(畜糞含有)を40℃で一昼夜乾燥した後、目開き500 µmのスクリーンを通過するまで粉砕し、よく混合して共同試験用試料とした。この内の1種類の堆肥はクロピラリドの含有が認められ、アミノピラリド及びピクロラムの含有が認められない試料であり、その他4種類の試料は対象成分の含有が認められない試料であった。そのため、共同試験参加試験室において含有しない対象成分を添加して共同試験を実施することとした。

共同試験用試料は約9gをポリエチレン袋に入れ密封してそれぞれ35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。

### 2) 添加用標準液

市販されているクロピラリド、アミノピラリド及びピクロラムをアセトニトリルに溶解した各標準液のそれぞれ一定量を混合し、アセトニトリルで希釈して5種類の濃度の添加用標準液を用意した。

添加用標準液は約1.5 mLをガラスバイアルに入れ、一対のブラインド試料を提供するため、1)の5種類の共同試験用試料と共通した番号をバイアルに付し、参加試験室に配付した。

### 3) 装置及び器具

各試験室に設置しているLC-MS/MS、振とう機、遠心分離機、高速遠心分離機、ロータリーエバポレーター及びマニホールドを使用した。

### 4) クロピラリド等の測定

#### (1) 抽出

分析試料5.00gをはか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(40 g/L) 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、1700×g(3000 rpm)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流出させた。さらに水酸化ナトリウム溶液(0.4 g/L)－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。

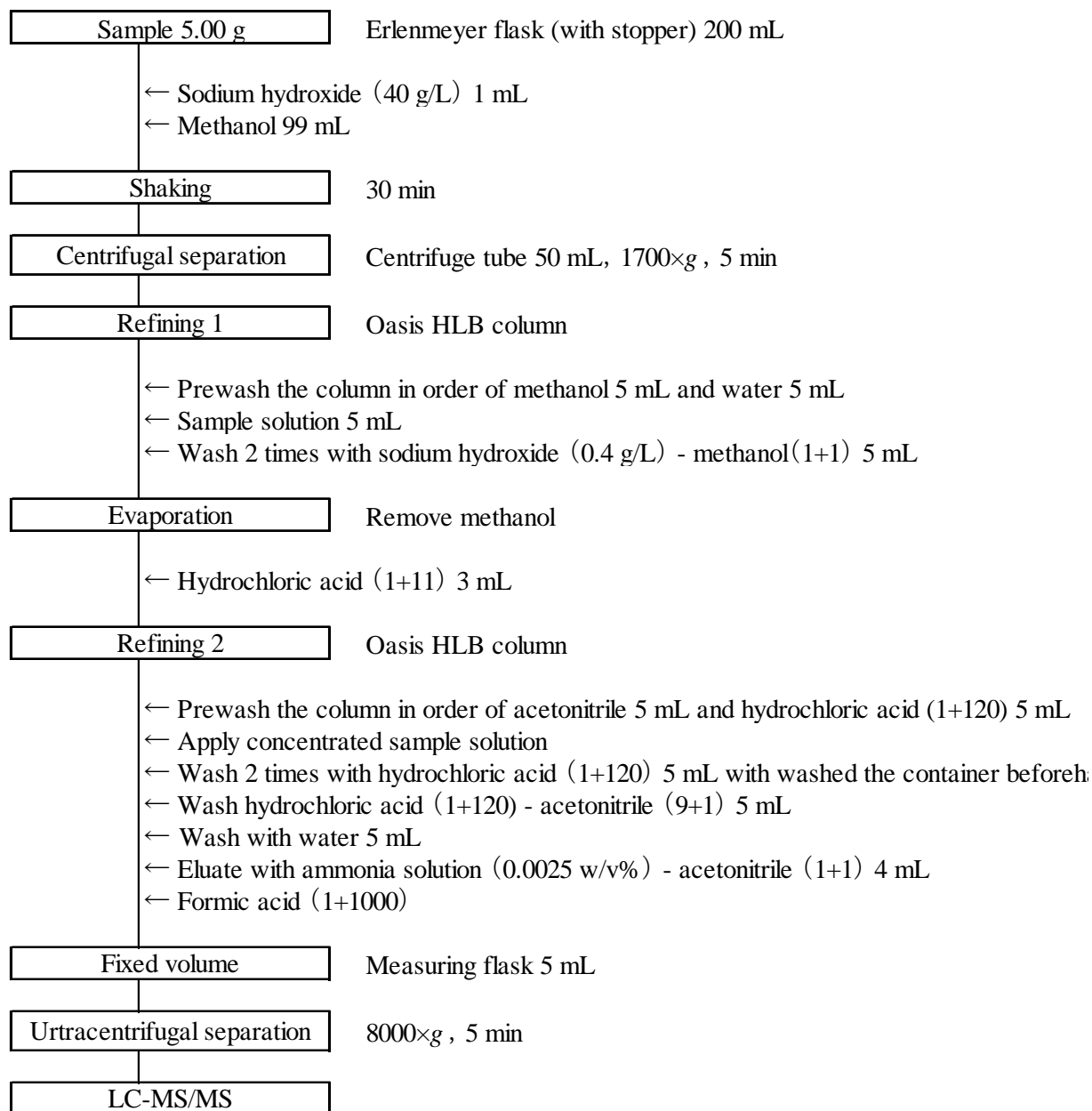
#### (3) 精製2

新たなカートリッジカラムを予めアセトニトリル5 mL及び塩酸(1+120)5 mLで速やかに洗浄した。流出液を40℃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)5 mL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)5 mL及び水5 mLを順次カートリッジ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、クロピラリド、アミノピラリド及びピクロラムを速やかに溶出させた。ぎ酸(1+1000)で定容した後、プラスチック製遠心沈殿管1.5 mLに入れ、8000×g(10000 rpm)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

試料溶液及び検量線作成用混合標準液を LC-MS/MS に注入し、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又は高さ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、アミノピラリド及びピクロラムの各量を算出した。なお、測定にあたっては、肥料等試験法 (2016) 8.2,a 項を参照して各試験室の LC-MS/MS 操作方法に従った。

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 compost and composted sludge fertilizer

### 5) 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>4)</sup>の均質性試験に従い、クロピラリドの含有が認められた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 4) に従って分析した。なお、三角フラスコにはかり入れる分析試料は 4.00 g とした。

### 6) 共同試験

試験に参加した 9 試験室と使用した LC-MS/MS は以下の通りであり、それぞれの試験室において送付した 10 試料について 4) に従って分析した。

なお、各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 1 に示した。

- ・ 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
  - ・ 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微量試験課
  - ・ 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前処理課
  - ・ 日本ウォーターズ株式会社テクノロジーセンター
  - ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター
  - ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター
  - ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター
  - ・ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター
  - ・ 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飼料鑑定第一課
  - ・ 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
- (50 音順)

Table 1 Instruments used in the collaborative study

LC-MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
LC: Nexera X2, Shimadzu	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies
MS/MS: LCMS-8050, Shimadzu	(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)
LC: Nexera X2, Shimadzu	InertSustain C18, GL Sciences
MS/MS: Triple Quad API 6500, AB SCIEX	(2.1 mm×100 mm, 2.0 μm)
LC: LC800 System, GL Sciences	InertSustain AQ-C18, GL Sciences
MS/MS: API 4000 Q TRAP, AB SCIEX	(2.1 mm×50 mm, 1.9 μm)
LC: ACQUITY UPLC H-Class, Waters	ACQUITY UPLC HSS T3, Waters
MS/MS: Xevo TQ-S micro, Waters	(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)
LC: ACQUITY UPLC, Waters	ACQUITY UPLC HSS C18, Waters
MS/MS: TQD, Waters	(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)
LC: ACQUITY UPLC, Waters	ACQUITY UPLC HSS C18, Waters
MS/MS: Quatro Premier XE, Waters	(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)
LC: ACQUITY UPLC, Waters	ACQUITY UPLC HSS C18, Waters
MS/MS: TQD, Waters	(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)
LC: ACQUITY UPLC, Waters	ACQUITY UPLC HSS C18, Waters
MS/MS: TQD, Waters	(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)

Table 1 Continue

LC-MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
LC: ACQUITY UPLC, Waters	ACQUITY UPLC HSS C18, Waters
MS/MS: TQD, Waters	(2.1 mm×100 mm, 1.8 µm)
LC: ACQUITY UPLC, Waters	ACQUITY UPLC HSS C18, Waters
MS/MS: Quatro Premier XE, Waters	(2.1 mm×100 mm, 1.8 µm)

### 3. 結果及び考察

#### 1) 共同試験用試料の均質性確認

均質性試験の試験成績について、Cochran の外れ値検定による操作した後、一元配置分散分析から得られた統計量を Table 2 に示した。この結果、 $F$  値が  $F(9, 10; 0.05)$  境界値を下回ったことから、有意水準 5 % において試料間に有意な差は認められず、共同試験に用いることができる均質性を有していることを確認した。

Table 2 Homogeneity test result of clopyralid

Sample	No. of sample <sup>a)</sup>	Mean <sup>b)</sup> (µg/kg)	$s_r$ <sup>c)</sup> (µg/kg)	$RSD_r$ <sup>d)</sup> (%)	$s_{bb}$ <sup>e)</sup> (µg/kg)	$s_{b+r}$ <sup>f)</sup> (µg/kg)	$RSD_{b+r}$ <sup>g)</sup> (%)	$F$ value <sup>h,i)</sup>
Compost 1	10 (0)	114	8	7.4	0	8	7.4	0.68

a) Number of the samples used for analysis; (0): Number of outliers

b) Grand mean value ( $n=20=10 \times$  number of repetition (2))

c) Standard deviation of repeatability

d) Relative standard deviation of repeatability

e) Standard deviation of sample-to-sample

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

g) Relative standard deviation of sample-to-sample including repeatability

h)  $F$  value calculated based on analysis of variance (ANOVA)

i)  $F$  critical value:  $F(9, 10; 0.05) = 3.02$

#### 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共同試験成績を Table 3-1～Table 3-3 に示した。各系列の試料の結果を IUPAC の共同試験プロトコル<sup>5)</sup>に従って統計処理した。なお、検量線の範囲を下回って算出された値もあるが、これらの値は除かず不検出と報告された結果のみを除いて統計処理をした。試験成績の外れ値を検定するために Cochran 検定及び Grubbs 検定を実施した。その結果、10 試験室の試験成績のうちクロピラリドについては 1 種類の試料で 1 試験室が、アミノピラリドについては 1 種類の試料で 1 試験室及び 3 種類の試料で各 2 試験室が、ピクロラムについては 2 種類の試料で各 1 試験室及び 2 種類の試料で各 2 試験室が外れ値として判定された。

Table 3-1 Individual result of clopyralid

(μg/kg)

Lab ID <sup>a)</sup>	Compost 1		Compost 2			
	A	140	153	883	890	
B	131	128	805	812		
C	94.8	113	676	692		
D	91.2	93.3	1070	977		
E	151	155	846	906		
F	125	126	797	855		
G	149	142	759	845		
H	120	121	789	722		
I	112	114	740	804		
J	148	149	895	941		

Lab ID <sup>a)</sup>	Composted sludge fertilizer 1		Composted sludge fertilizer 2		Composted sludge fertilizer 3	
	A	21.0	17.2	95.9	77.9	357
B	21.3	17.4	105	97.2	321	318
C	4.18 <sup>c)</sup>	6.83 <sup>c)</sup>	99.9	75.3	361	275
D	31.2 <sup>d)</sup>	4.67 <sup>c)d)</sup>	88.6	74.3	343	365
E	13.4	15.8	102	103	377	360
F	16.0	16.0	84.3	80.1	329	375
G	24.4	22.0	71.5	96.8	312	343
H	13.8	11.6	86.2	87.1	325	316
I	17.7	17.4	81.9	82.9	302	355
J	17.7	18.0	101	102	337	348

a) Laboratory identification

b) No detect

c) The value which was lower than the range of calibration curve

d) Outlier of Cochran test

e) Outlier of Grubbs

Table 3-2 Individual result of aminopyralid

(μg/kg)

Lab ID <sup>a)</sup>	Compost 1		Compost 2			
	A	76.4 <sup>e)</sup>	80.9 <sup>e)</sup>	9.78 <sup>c)</sup>	26.7	
B	278	274	18.5	21.8		
C	81.0 <sup>d)</sup>	229 <sup>d)</sup>	15.1	7.30 <sup>c)</sup>		
D	390	365	31.9 <sup>d)</sup>	69.3 <sup>d)</sup>		
E	337	353	24.5	27.2		
F	355	339	26.9	27.4		
G	355	344	163 <sup>d)</sup>	49.7 <sup>d)</sup>		
H	259	302	23.0	20.1		
I	314	329	15.7	23.3		
J	296	286	24.6	27.4		

a)~e) Refer to the footnote of Table 3-1

Table 3-2 Continue

Lab ID <sup>a)</sup>	Composted sludge		Composted sludge		Composted sludge	
	fertilizer 1		fertilizer 2		fertilizer 3	
A	3.52 <sup>c)</sup>	1.66 <sup>c)</sup>	200	133	22.4	42.7
B	14.5 <sup>d)</sup>	4.51 <sup>c),d)</sup>	682	546	66.8	44.2
C	N.D. <sup>b)</sup>	N.D. <sup>b)</sup>	630	595	52.5	36.2
D	6.34 <sup>c)</sup>	9.74 <sup>c)</sup>	1300	809	86.0	76.3
E	3.32 <sup>c)</sup>	4.51 <sup>c)</sup>	845	812	83.2	76.0
F	5.81 <sup>c)</sup>	8.68 <sup>c)</sup>	824	783	63.7	63.7
G	24.4 <sup>e)</sup>	23.3 <sup>e)</sup>	745	419	219 <sup>d)</sup>	139 <sup>d)</sup>
H	4.83 <sup>c)</sup>	3.12 <sup>c)</sup>	707	770	65.9	61.7
I	6.39 <sup>c)</sup>	6.49 <sup>c)</sup>	733	799	57.0	54.9
J	5.78 <sup>c)</sup>	5.26 <sup>c)</sup>	880	805	54.4	62.5

Table 3-3 Individual result of picloram

Lab ID <sup>a)</sup>	Compost 1		Compost 2	
	A	876	930	31.4
B	737	685	34.4	34.0
C	1310	1150	90.2 <sup>e)</sup>	107 <sup>e)</sup>
D	667	655	52.8	51.5
E	819	811	21.0	17.8
F	836	735	43.8	37.1
G	850	781	43.1	40.5
H	652	694	31.6	27.2
I	791	821	34.6	35.7
J	1010	990	47.8	51.2

Lab ID <sup>a)</sup>	Composted sludge		Composted sludge		Composted sludge	
	fertilizer 1		fertilizer 2		fertilizer 3	
A	71.8	68.9	330	328	161	167
B	102	67.7	325	307	152	150
C	412 <sup>d)</sup>	284 <sup>d)</sup>	724 <sup>e)</sup>	752 <sup>e)</sup>	761 <sup>d)</sup>	467 <sup>d)</sup>
D	73.0	88.3	319	267	143	133
E	105	95.8	288	291	162	159
F	80.7	95.3	355	329	165	193
G	143	158	785 <sup>d)</sup>	467 <sup>d)</sup>	432 <sup>d)</sup>	308 <sup>d)</sup>
H	50.9	37.9	287	310	157	155
I	81.7	83.4	395	354	188	204
J	105	116	490	488	286	338

a)~e) Refer to the footnote of Table 3-1

### 3) 併行精度及び室間再現精度

試験成績より算出した平均値、併行標準偏差( $s_r$ )及び併行相対標準偏差( $RSD_r$ )値並びに室間再現標準偏差( $s_R$ )及び室間再現相対標準偏差( $RSD_R$ )を Table 4-1~4-3 に示した。

クロピラリドの平均値は 16.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~835  $\mu\text{g}/\text{kg}$  であり、その併行標準偏差は1.7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~41  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、併行相

対標準偏差は 4.5 %～12.6 %，室間再現標準偏差は 5.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  及び室間再現相対標準偏差は 8.3 %～31.8 %であった。

アミノピラリドの平均値は 5.39  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～701  $\mu\text{g}/\text{kg}$  であり，その併行標準偏差は 1.41  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～146  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，併行相対標準偏差は 4.5 %～26.2 %，室間再現標準偏差は 2.22  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～263  $\mu\text{g}/\text{kg}$  及び室間再現相対標準偏差は 12.0 %～41.2 %であった。

ピクロラムの平均値は 37.7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～840  $\mu\text{g}/\text{kg}$  であり，その併行標準偏差は 3.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，併行相対標準偏差は 5.6 %～12.3 %，室間再現標準偏差は 10.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～175  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (及び室間再現相対標準偏差は 19.8 %～33.5 %であった。

クロピラリド及びピクロラムについては，今回配付した共同試験用試料(濃度範囲)で，併行相対標準偏差及び室間再現相対標準偏差が，肥料等試験法<sup>6)</sup>における試験法の妥当性確認の手順に示している各濃度レベルにおける精度の目安の 1.5 倍に概ね収まっていた。但し，1 種類の汚泥発酵肥料中のピクロラムで室間再現相対標準偏差が 33.5 %で，この精度の目安の 1.5 倍 33 %を僅かに上回っていた。

アミノピラリドについては，1 種類の堆肥及び 1 種類の汚泥発酵肥料で，併行相対標準偏差及び室間再現相対標準偏差が，肥料等試験法における試験法の妥当性確認の手順に示している各濃度レベルにおける精度の目安の 1.5 倍以内であった。しかし，1 種類の堆肥で併行相対標準偏差がこの精度の目安の 1.5 倍を超え，2 種類の汚泥発酵肥料で併行相対標準偏差及び室間再現相対標準偏差がこの精度の目安の 1.5 倍を超えていた。

Table 4-1 Statistical analysis of collaborative study results for clopyralid

Sample	Labs <sup>a)</sup> $p(q)$ <sup>a)</sup>	Mean <sup>b)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$s_r$ <sup>c)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$RSD_r$ <sup>d)</sup> (%)	$CRSD_r$ <sup>e)</sup> (%)	$s_R$ <sup>f)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$RSD_R$ <sup>g)</sup> (%)	$CRSD_R$ <sup>h)</sup> (%)
Compost 1	10(0)	128	6	4.5	11	21	16.4	22
Compost 2	10(0)	835	41	4.9	11	100	11.9	22
Composted sludge fertilizer 1	9(1)	16.2	1.7	10.6	11	5.2	31.8	22
Composted sludge fertilizer 2	10(0)	89.6	11.3	12.6	11	11.3	12.6	22
Composted sludge fertilizer 3	10(0)	339	28	8.3	11	28	8.3	22

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

b) Grand mean value of the results of duplicate sample which were reported from laboratories retained after outlier removed ( $n=p \times \text{number of samples (2)}$ )

c) Standard deviation of repeatability

d) Relative standard deviation of repeatability

e) Rough standard of relative standard deviation of repeatability in Testing Methods for Fertilizers 2016

f) Standard deviation of reproducibility

g) Relative standard deviation of reproducibility

h) Rough standard of relative standard deviation of reproducibility in Testing Methods for Fertilizers 2016



Table 4-2 Statistical analysis of collaborative study results for aminopyralid

Sample	Labs <sup>a)</sup> $p(q)^a$	Mean <sup>b)</sup> ( $\mu\text{g/kg}$ )	$s_r$ <sup>c)</sup> ( $\mu\text{g/kg}$ )	$RSD_r$ <sup>d)</sup> (%)	$CRSD_r$ <sup>e)</sup> (%)	$s_R$ <sup>f)</sup> ( $\mu\text{g/kg}$ )	$RSD_R$ <sup>g)</sup> (%)	$CRSD_R$ <sup>h)</sup> (%)
Compost 1	8(2)	324	15	4.5	11	39	12.0	22
Compost 2	8(2)	21.2	5.2	24.7	11	6.4	30.3	22
Composted sludge fertilizer 1	7(2)	5.39	1.41	26.2	11	2.22	41.2	22
Composted sludge fertilizer 2	10(0)	701	146	20.8	11	263	37.6	22
Composted sludge fertilizer 3	9(1)	59.5	8.9	15.0	11	16.6	28.0	22

a)~h) refer to the footnotes of Table 4-1

Table 4-3 Statistical analysis of collaborative study results for picloram

Sample	Labs <sup>a)</sup> $p(q)^a$	Mean <sup>b)</sup> ( $\mu\text{g/kg}$ )	$s_r$ <sup>c)</sup> ( $\mu\text{g/kg}$ )	$RSD_r$ <sup>d)</sup> (%)	$CRSD_r$ <sup>e)</sup> (%)	$s_R$ <sup>f)</sup> ( $\mu\text{g/kg}$ )	$RSD_R$ <sup>g)</sup> (%)	$CRSD_R$ <sup>h)</sup> (%)
Compost 1	10(0)	840	50	5.9	11	175	20.8	22
Compost 2	9(1)	37.7	3.5	9.4	11	10.3	27.3	22
Composted sludge fertilizer 1	9(1)	90.2	11.1	12.3	11	30.3	33.5	22
Composted sludge fertilizer 2	8(2)	341	19	5.6	11	67	19.8	22
Composted sludge fertilizer 3	8(2)	182	16	8.6	11	56	31.0	22

a)~h) refer to the footnotes of Table 4-1

#### 4) 低濃度標準液の変化

今回の共同試験は、共同試験用試料に添加用標準液を加えて実施した。添加用標準液はアセトニトリルを溶媒としてガラスバイアルに入れて参加試験室に配付した。配付した5種類の添加用標準液において各成分で最も低い濃度は、クロピラリド及びアミノピラリドが0.1  $\mu\text{g/mL}$ 、ピクロラムが0.2  $\mu\text{g/mL}$ であった。そこで、アセトニトリルを溶媒として各成分0.2  $\mu\text{g/mL}$ に調製した混合溶液をガラスバイアルに入れ一時間程度置いた後、ぎ酸(1+1000)で各2  $\text{ng/mL}$ に希釈してLC-MS/MSに注入し各成分量を求めた。このときの各成分の測定値を2  $\text{ng/mL}$ に対する百分率にしてTable 5に示した。この結果、特にアミノピラリドの量に大きな減少が認められた。

こうしたことから、配付した添加用標準液では低濃度のアミノピラリド濃度に変化があったため、最も低いアミノピラリド量の試料では併行相対標準偏差及び室間再現相対標準偏差が肥料等試験法に示している精度の目安を大きく超えたことが考えられた。

Table 5 Recoveries of standard solution in glass vial

Pesticide	Recovery <sup>a)</sup> (%)
Clopyralid	90
Aminopyralid	62
Picloram	74

a) Recovery for the concentration of preparation solution ( $n=3$ )

#### 4. まとめ

10 試験室において 5 種類(10 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及びその関連物質の測定の評価を行った。その結果、クロピラリドの平均値 17.5 µg/kg～826 µg/kg において室間再現精度(相対標準偏差)は 8.3 %～21.1 %, アミノピラリドの平均値 5.37 µg/kg～685 µg/kg において室間再現精度(相対標準偏差)は 12.0 %～45.1 %, ピクロラムの平均値 36.2 µg/kg～771 µg/kg において室間再現精度(相対標準偏差)は 10.6 %～35.6 %であった。試験室間の比較による本試験法の室間再現精度は、クロピラリドでは、全ての共通試験用試料の濃度範囲で肥料等試験法に示している精度の目安の 1.5 倍以内であり、同試験法の性能基準に適合していることが確認された。また、ピクロラムでも、全ての共通試験用試料の濃度範囲で肥料等試験法に示している精度の目安の 1.5 倍に概ね収まっていた。一方、アミノピラリドでは、1 種類の堆肥及び 1 種類の汚泥発酵肥料で肥料等試験法に示している精度の目安の 1.5 倍以内であったが、1 種類の堆肥及び 2 種類の汚泥発酵肥料で肥料等試験法に示している精度の目安の 1.5 倍を上回っており目標とする精度を確認できなかった。

#### 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) 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)
- 4) 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)
- 5) Horwitz W. : Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**(2), 331~343 (1995)
- 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/obj/shikhenho\\_2016.pdf](http://www.famic.go.jp/ffis/fert/obj/shikhenho_2016.pdf)>

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

Kenji KOZUKA<sup>1</sup>, Mayu OSHIMA<sup>1</sup>, Yoshimi HASHIMOTO<sup>1</sup>, Naoko TAMARU<sup>1</sup>, and Yuji SHIRAI<sup>1</sup>

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

A collaborative study was conducted to evaluate liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for determination of clopyralid, aminopyralid and picloram in compost and composted sludge fertilizer. Clopyralid, aminopyralid and picloram was extracted and with methanol under alkaline condition. The extract was refined with a cleanup cartridge by taking advantage of characteristics that the behavior of elution varies between acidity and alkaline. The clopyralid, aminopyralid and picloram were analyzed by LC-MS/MS. Five samples, respectively, were sent to 10 collaborators. These samples were analyzed as blind duplicates. The mean values and the reproducibility relative standard deviation ( $RSD_R$ ) for clopyralid were 17.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ~ 826  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 8.3 % ~ 21.1 %, respectively. Those for aminopyralid were 5.37  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ~ 685  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 12.0 % ~ 45.1 %, respectively. Those of picloram were 36.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ~ 771  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 10.6 % ~ 35.6 %, respectively. These results indicated that this method has an acceptable precision for determination of clopyralid, but an unacceptable precision for determination of aminopyralid in these concentration ranges.

*Key words* clopyralid, aminopyralid, picloram, compost, composted, sludge fertilizer, LC-MS/MS, collaborative study

(Research Report of Fertilizer, **10**, 61-71, 2017)