

5 穀類, 乾牧草及び稲わら中のグルホシネート, 3-メチルホスフィニコプロピオン酸及び N-アセチルグルホシネートの液体クロマトグラフトンデム型質量分析計による同時定量法

牧野 大作^{*1}, 若宮 洋市^{*1}, 榎原 良成^{*1}, 上野山 智洋^{*2}

Simultaneous Determination of Glufosinate, 3-(Methyl phosphinico) propanoic acid and N-Acetylglufosinate in grains, grass hay and rice straw by LC-MS/MS

Daisaku MAKINO^{*1}, Youichi WAKAMIYA^{*1}, Yoshinari SAKAKIBARA^{*1} and Tomohiro UENOYAMA^{*2}

(^{*1} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center

^{*2} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center

(Now Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan))

An analytical method was developed to determine levels of glufosinate (GLUF), 3-(methyl phosphinico) propanoic acid (MPPA), and N-acetylglufosinate (NAG) in feed using liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

GLUF, MPPA, and NAG were extracted with water. These compounds were then derivatized with trimethyl orthoacetate. The sample solution was purified with two types of SPE mini-columns (Sep-pak Plus NH₂ and Silica from Waters; Milford, MA, U.S.) and injected into the LC-MS/MS. LC separation was carried out on ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 µm from Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, U.S.) using 0.01 v/v % formic acid solution-acetonitrile (93:7 v/v) as a mobile phase. In MS/MS, positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Spike tests were conducted on feed ingredients. Barley was spiked with 5 or 0.5 mg/kg of GLUF and MPPA. Corn, alfalfa hay, and rice straw were spiked with the same compounds at 0.1 or 0.05 mg/kg, 15, 1.5, or 0.5 mg/kg, and 0.5 or 0.05 mg/kg, respectively. Recoveries ranged from 76.8 % to 111 % for GLUF and 71.6 % to 93.4 % for MPPA. The relative standard deviations of repeatability ($n = 3$) were not more than 19 % for GLUF and 10 % for MPPA. Subsequently, barley was spiked with 5 or 0.5 mg/kg of NAG, while corn, alfalfa hay, and rice straw were spiked with the same compound at 0.1 or 0.05 mg/kg, 15, 1.5, or 0.5 mg/kg, and 0.5 or 0.05 mg/kg, respectively. NAG recoveries ranged from 87.7 % to 116 %. The relative standard deviations of repeatability ($n = 3$) were not more than 19 % for NAG.

A collaborative study was conducted in eight laboratories, using feed ingredients spiked with GLUF, MPPA, and NAG in the following quantities: 5 mg/kg of GLUF or MPPA and 5 mg/kg of NAG for barley, and 15 mg/kg of GLUF or MPPA and 15 mg/kg of NAG for alfalfa hay.

For each compound, the resulting range of mean recovery, repeatability, and reproducibility in terms of relative standard deviations and HorRat, respectively, were 100 to 101 % and not more

^{*1} 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

^{*2} 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, 現 農林水産省消費・安全局 表示・規格課

than 6.7 %, 14 %, and 1.3 for GLUF, 91.4 to 92.8 % and not more than 10 %, 13 %, and 1.2 for MPPA, and 107 to 110 % and not more than 4.4 %, 12 %, and 1.1 for NAG.

This method was validated and established for use in the inspection of GLUF, MPPA, and NAG in grains excluding wheat, grass hay and rice straw.

Key words: glufosinate ; 3-(methyl phosphinico) propanoic acid ; *N*-acetylglufosinate ; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS) ; electrospray ionization (ESI) ; feed ; collaborative study

キーワード：グルホシネート；3-メチルホスフィニコプロピオン酸；*N*-アセチルグルホシネート；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；飼料；共同試験

1 緒 言

グルホシネート（以下アンモニウム塩を指し、「GLUF」という。）は、ヘキスト社が開発した非選択性茎葉処理型のアミノ酸系除草剤であり、植物中でグルタミン合成酵素を阻害することにより殺草活性を示す¹⁾。また、GLUFは植物中で代謝され、その主要な代謝物は、非遺伝子組換え植物中では3-メチルホスフィニコプロピオン酸（以下「MPPA」という。）、GLUF耐性遺伝子組換え植物中では*N*-アセチルグルホシネート（以下「NAG」という。）となることが知られている¹⁾。国内におけるGLUFの飼料中の基準値²⁾は、穀類はGLUF及びMPPAをGLUFに換算したもの並びにNAGをGLUFに換算したものの総和について、牧草はGLUF及びMPPAをGLUFに換算したものの和として設定されており、大麦で5 ppm、小麦0.2 ppm、とうもろこし0.1 ppm、牧草15 ppmである（平成24年12月現在）。また、飼料の有害物質の指導基準値³⁾は、稲わら中で0.5 mg/kgと設定されている。

飼料中の含リンアミノ酸系農薬の分析法は、既に飼料分析基準⁴⁾にガスクロマトグラフによる系統的分析法⁵⁾が収載されているが、この方法は操作が煩雑であり、またNAGを分析対象としていない。しかし、財団法人日本食品分析センターが「平成20年度飼料中の有害物質等残留基準を設定するための分析法開発及び家畜等への移行調査委託事業」において、飼料分析基準に収載された方法を基に、GLUF並びにその代謝物であるMPPA及びNAGを分析対象とする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。）による同時定量法⁶⁾（以下「JFRL法」という。）を開発した。このJFRL法は、GLUF及びNAGは分析操作中に誘導体化処理を行うと、同一の誘導体が生成されることからGLUFとNAGは含量で算出される⁶⁾。この他、国内でGLUF、MPPA及びNAGを分析対象とする定量法としては、ガスクロマトグラフを用いる食品を対象とした厚生労働省の試験法⁷⁾がある。この方法は、JFRL法と同様に誘導体化を行うために、GLUFとNAGは含量で算出される。

今回、飼料中のGLUF及びその代謝物（MPPA及びNAG）を分析対象とするJFRL法の飼料分析基準への適用の可否を検討したのでその概要を報告する。

参考にこれらの農薬の構造式等をFig. 1に示した。

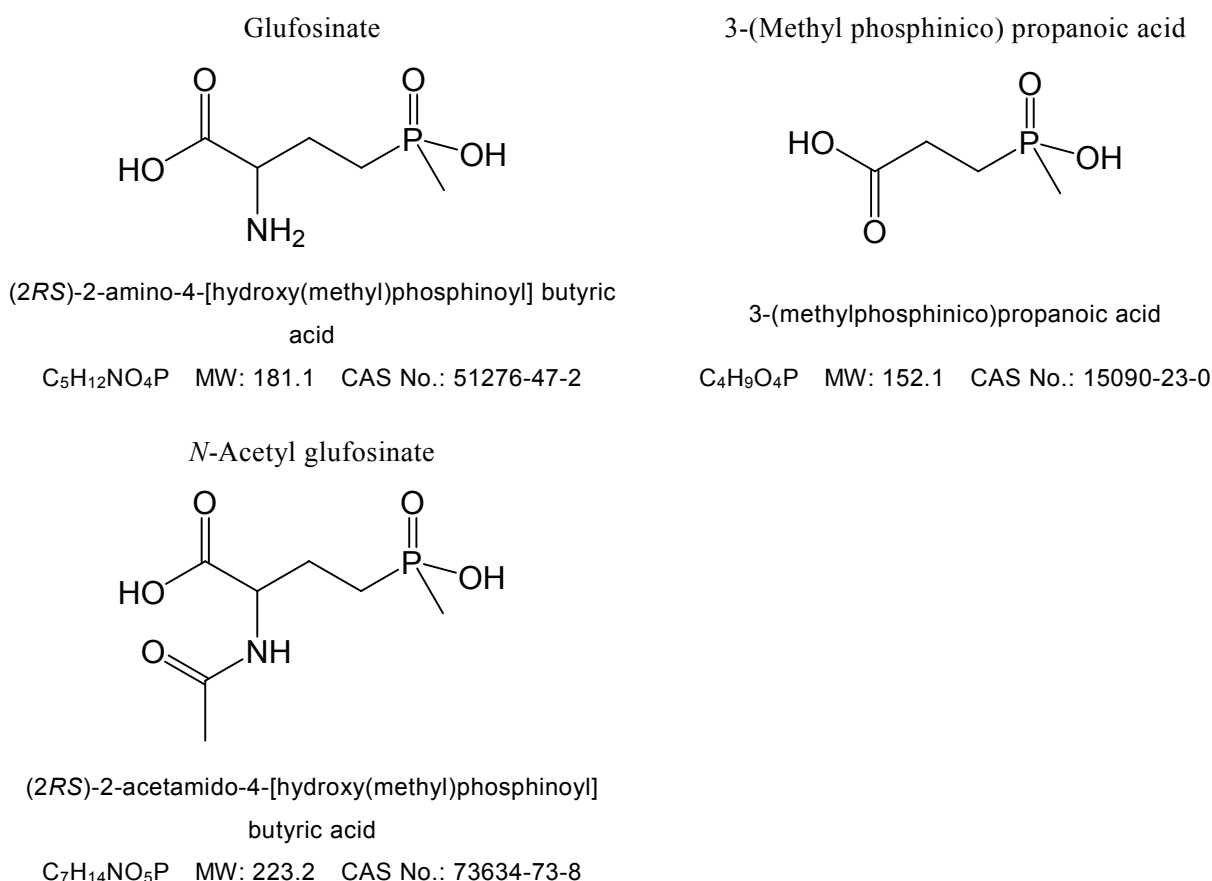


Fig. 1 Chemical structures of glufosinate, 3-(methyl phosphinico) propanoic acid and N-Acetyl glufosinate

2 実験方法

2.1 試料

大麦，とうもろこし，アルファルファ乾草及び稲わらをそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎し，供試試料とした。

2.2 試薬

1) グルホシネート標準原液

グルホシネートアンモニウム標準品（Dr. Ehrenstorfer 製，純度 97.5 %）25 mg を正確に量って 25 mL の全量フラスコに入れ，水を加えて溶かし，更に標線まで水を加えてグルホシネート標準原液を調製した（この液 1 mL は，GLUF として 1 mg ($f=0.978$) を含有する．）。

2) 3-メチルホスフィニコプロピオン酸標準原液

3-メチルホスフィニコプロピオン酸標準品（和光純薬工業製，純度 99.7 %）25 mg を正確に量って 25 mL の全量フラスコに入れ，水を加えて溶かし，更に標線まで水を加えて 3-メチルホスフィニコプロピオン酸標準原液を調製した（この液 1 mL は，MPPA として 1 mg ($f=1.00$) を含有する．）。

3) N-アセチルグルホシネート標準原液

N-アセチルグルホシネート二ナトリウム標準品（林純薬工業製，純度 99.9 %）25 mg を正確に量って 25 mL の全量フラスコに入れ，水を加えて溶かし，更に標線まで水を加えて N-アセ

チルグルホシネート標準原液を調製した（この液 1 mL は、NAG として 1 mg ($f=0.835$) を含有する。）。

4) 検量線作成用農薬混合標準原液

グルホシネート標準原液、3-メチルホスフィニコプロピオン酸標準原液の一定量を混合し、更に水で正確に希釈し、1 mL 中に GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 100 μg を含有する農薬混合標準原液を調製した。

5) 0.01 v/v% ギ酸溶液

ギ酸（試薬特級、98.0 % 以上のもの）1 mL に水を加えて 1 L とし、更にこの液 100 mL に水を加えて 1 L とした。

6) 水及びアセトニトリルは、液体クロマトグラフ用を用いた。アセトン及び酢酸エチルは、残留農薬・PCB 試験用を用いた。酢酸は、試薬特級を用いた。オルト酢酸トリメチルは、東京化成工業製（純度 98.0 % 以上）のものを用いた。

2.3 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：

液体クロマトグラフ部：Waters 製 ACQUITY UPLC System

タンデム型質量分析計部：Waters 製 ACQUITY TQ Detector

2) 振とう機：宮本理研工業製 理研式シェーカー MW-DRV

3) 遠心分離器：久保田製作所製 テーブルトップ遠心機 4000

4) ロータリーエバポレーター：BÜCHI Labortechnik 製 Rotavapor R-200（真空コントローラ V-800 付き）

5) 恒温乾燥機：いすゞ製作所製 SNH-215S（自然対流型）

6) 吸引マニホールド：Waters 製 Extraction manifold

7) アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム：Waters 製 Sep-Pak[®] Plus NH₂ カートリッジ（360 mg）にリザーバー（10 mL）を連結したもの

8) シリカゲルミニカラム：Waters 製 Sep-Pak[®] Plus Silica カートリッジ（690 mg）

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 200 mL を加えて 30 分間振り混ぜて（300 rpm）抽出した。抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ 1500 \times g（3000 rpm）で 10 分間遠心分離し、上澄み液を誘導体化に供する試料溶液とした。

2) 誘導体化

試料溶液 2 mL（乾牧草では、更に水で正確に 10 倍希釈した後、その液 2 mL）を 200 mL のなす形フラスコに正確に入れ、50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。酢酸 1 mL 及びオルト酢酸トリメチル 4 mL を加えて残留物を溶かし、密栓して 100 °C で 2 時間加熱した後放冷し、50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。

酢酸エチル 4 mL を正確に加えて残留物を溶かし、カラム処理に供する試料溶液とした。

3) カラム処理

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム（360 mg）の下にシリカゲルミニカラム（690 mg）を連結し、酢酸エチル 10 mL で洗浄した（吸引マニホールドを使用し、流速 2~3

mL/min とした。以下同じ。)

試料溶液 2 mL を連結カラムに正確に入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。更に酢酸エチル 18 mL をカラムに加え、同様に流出させた。

50 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、アセトン 10 mL をカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下して MPPA 誘導体を溶出させた。

次に、アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムをはずし、アセトン-水 (19+1) 10 mL をシリカゲルミニカラムに加えて MPPA 誘導体及び GLUF 誘導体を溶出させた。

溶出液を 50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。0.01 v/v% ギ酸溶液 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とした。

4) 標準液の誘導体化

検量線作成用農薬混合標準原液 1 mL を 200 mL のなす形フラスコに正確に入れ、50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。

酢酸 1 mL 及びオルト酢酸トリメチル 4 mL を加えて残留物を溶かし、密栓して 100 °C で 2 時間加熱した後放冷し、50 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。

0.01 v/v% ギ酸溶液 10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、更に同溶媒で正確に希釈し、1 mL 中に GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 及び 300 ng 相当量を含む各標準液を調製した。

5) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定

試料溶液及び各標準液各 5 µL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、選択反応検出クロマトグラムを得た。測定条件を Table 1 及び 2 に示した。

Table 1 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	Agilent Technologies, ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 µm)
Mobile phase	0.01 v/v% Formic acid solution - acetonitrile (93:7) (12 min) → 3 min → (5:95) (10 min) → 6 min → (93:7) (8 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Desolvation gas	N ₂ , 400 °C, 800 L/h
Cone gas	N ₂ , 50 L/h
Ion source	120 °C
Capillary voltage	3 kV

Table 2 MS/MS parameters

Target ion	Precursor (<i>m/z</i>)	Product (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
GLUF derivative	252	210	150	26	14
MPPA derivative	181	149	93	21	14

6) 計 算

得られた選択反応検出クロマトグラムから GLUF 誘導体及び MPPA 誘導体のピーク面積を求めてそれぞれ検量線を作成し、試料中の GLUF (NAG 由来を含む) 及び MPPA のそれぞれの量を算出した。

なお、MPPA を GLUF に換算して試料中の GLUF としての総和を求める場合には次式により算出した。

$$\text{試料中の GLUF 量 } (\mu\text{g/kg}) = A + B \times 1.30$$

A: 検量線から求めた試料中の GLUF (NAG 由来を含む) の濃度 ($\mu\text{g/kg}$)

B: 検量線から求めた試料中の MPPA の濃度 ($\mu\text{g/kg}$)

また、NAG のみを添加して添加回収試験を行った際の回収率 (%) の計算は、検量線から求めた GLUF の濃度 ($\mu\text{g/kg}$) を NAG の濃度 ($\mu\text{g/kg}$) に換算し、添加した NAG の濃度 ($\mu\text{g/kg}$) で除してその割合を求めることにより行った。

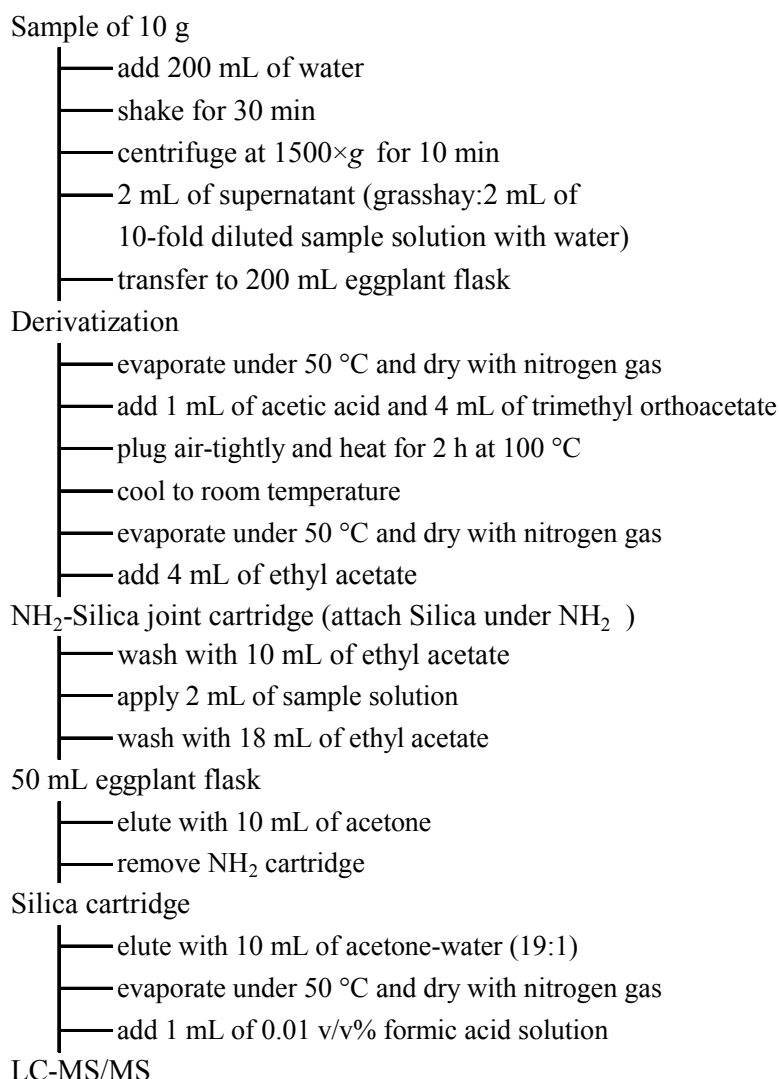
なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

2.5 小麦を対象とした食品分析センター法の改良で用いた定量法

1) 抽 出

分析試料 10.0 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 200 mL を加えた。60 °C で 2 時間静置後、30 分間振り混ぜて (300 rpm) 抽出した。抽出液を共栓遠心沈殿管に入れ 1500×g (3000 rpm) で 10 分間遠心分離し、上澄み液を誘導体化に供する試料溶液とした。

以下、2.4 の 2) から 6) に従って定量を行った。



Scheme 1 Analytical procedure for GLUF, MPPA and NAG in feed

3 結果及び考察

3.1 LC-MS/MS 測定条件の検討

JFRL 法⁶⁾では液体クロマトグラフ条件は、0.01 v/v%ギ酸溶液-アセトニトリル (93+7) によるイソクラティック溶出となっているが、山多らが愛玩動物用飼料を対象として GLUF 等の分析法を検討した際に⁸⁾、試料溶液中の夾雑成分からの影響の軽減を目的として、JFRL 法のイソクラティック溶出から、測定対象成分の溶出後にグラジエント溶出でカラムを洗浄する方法に変更していることから、筆者らも同条件で検討した。

また、質量分析条件についても、山多らの検討⁸⁾と同様にコーン電圧及びコリジョンエネルギーの当試験室で使用した機械への最適化、定量イオン及び確認イオンの一部変更を行った。

3.2 検量線

2.2 の 4)及び 2.4 の 4)に従って調製した GLUF 及び MPPA として各 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 及び 300 ng/mL 相当量の各標準液各 5 µL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、得られた選択反応検出クロマトグラムからピーク面積を用いて検量線を作成した。得られた検量線は、Fig. 2 のとおりであり、GLUF 及び MPPA で各 1~300

ng/mL 相当量（注入量として 0.005~1.5 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。

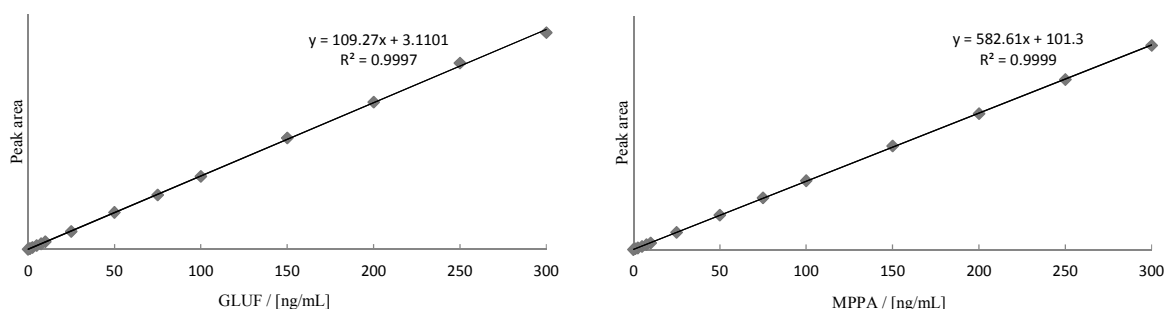


Fig. 2 Calibration curves of GLUF and MPPA by peak area

3.3 乾牧草及び小麦を対象とした JFRL 法の改良の検討について

1) 乾牧草について

乾牧草について、JFRL 法の適用の可否の検討を行ったところ、添加回収試験の結果が全体的に低回収率傾向であったことから、改善の検討を行った。

ここで、夾雑成分に由来するイオン化の障害が疑われる場合には試料溶液の希釈が有効であることが多いこと、また乾牧草の基準値は 15 ppm と比較的高濃度であり、試料溶液を希釈しても、基準値からその 1/10 程度の濃度を測定するのに支障はないと考えられることから、アルファルファ乾草に GLUF 及び MPPA として 15 mg/kg 相当量を添加した試料（最終試料溶液中で各 0.075 µg/mL 相当量）及び NAG として 15 mg/kg 相当量を添加した試料（最終試料溶液中で 0.075 µg/mL 相当量）を用いて、2.4 の 1) で得られた上澄み液を水で 10 倍に希釈した後、2.4 の 2) 以降の操作を行い、希釈操作の有効性を検討した。その結果は Table 3 のとおり良好な結果が得られたことから、乾牧草については JFRL 法を一部変更して、抽出後、水で 10 倍希釈を行う操作を追加することにした。

Table 3 Comparison of recoveries of pesticides in grass hay by dilution level of extract solutions

Pesticide	undiluted		10-fold diluted ^{c)}	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
GLUF	68.5	2.8	90.1	12
MPPA	72.5	5.1	78.6	3.2
NAG	70.6	10	93.5	8.3

a) Mean(n=3). Spiked level was 15 mg/kg in sample.

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Extract solutions were the same origin of the left column.

2) 小麦について

3 種類の小麦に GLUF 及び MPPA として 0.2 mg/kg 相当量を添加した試料（最終試料溶液中で各 0.010 µg/mL 相当量）並びに NAG として 0.2 mg/kg 相当量を添加した試料（最終試料溶液

中で 0.010 µg/mL 相当量) について、JFRL 法の適用の可否の検討を行ったところ、全ての小麦において 30~50 %程度の回収率しか得られなかった。

ここで、山多らは愛玩動物用飼料を対象とした GLUF 等の定量法の検討において⁸⁾、ウェット製品以外の愛玩動物用飼料については水を加えた後、振とう抽出前に 60 °C で 2 時間静置をすることとしていることから、筆者らも同条件で検討したが良好な結果は得られなかった。

このように、現在のところ回収率の改善方法が見つからないため、今後更に検討することとし、今回、小麦については本法の適用範囲から除外することとした。

3.4 妨害物質の検討

とうもろこし、マイロ、大麦、えん麦、ふすま、大豆油かす、乾牧草（アルファルファ乾草及びスーダングラス乾草）、稲わら、稲発酵粗飼料及び粳米を用い、本法により調製した試料溶液を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、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。

3.5 添加回収試験

2.1 で調製した大麦に GLUF 及び MPPA として 5 及び 0.5 mg/kg 相当量、とうもろこしに 0.1 及び 0.05 mg/kg 相当量、アルファルファ乾草に 15 及び 1.5 mg/kg 相当量及び稲わらに 0.5 及び 0.05 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて、本法により 3 点併行で定量し、回収率及び繰返し精度を検討した。

また、NAG については、GLUF と NAG の誘導体が同一であることから、両者が共存している場合には定量値は GLUF と NAG の含量として算出される⁹⁾。このことから NAG の添加回収試験による試験の際には NAG のみを添加して評価を行うこととし、大麦に NAG として 5 及び 0.5 mg/kg 相当量、とうもろこしに 0.1 及び 0.05 mg/kg 相当量、アルファルファ乾草に 15 及び 1.5 mg/kg 相当量及び稲わらに 0.5 及び 0.05 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて、本法により 3 点併行で定量し、回収率及び繰返し精度を検討した。

その結果を Table 4, 5 及び 6 に示した。GLUF について、大麦では平均回収率 95.5 及び 77.3 %、その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD_r) として 7.8 %以下、同様にとうもろこしでは 99.3 及び 84.5 %並びに 19 %以下、アルファルファ乾草では 90.1 及び 87.9 %並びに 13 %以下、稲わらでは 76.8 及び 84.8 %並びに 7.1 %以下であった。

MPPA について、大麦では平均回収率 87.1 及び 71.6 %、その繰返し精度は、 RSD_r として 10 %以下、とうもろこしでは 72.3 及び 79.9 %並びに 9.6 %以下、アルファルファ乾草では 78.6 及び 78.4 %並びに 10 %以下、稲わらでは 74.2 及び 90.8 %並びに 8.8 %以下であった。

NAG について、大麦では平均回収率 115 及び 99.0 %、その繰返し精度は、 RSD_r として 14 %以下、とうもろこしでは 87.7 及び 116 %並びに 19 %以下、アルファルファ乾草では 93.5 及び 97.5 %並びに 8.3 %以下、稲わらでは 94.9 及び 111 %並びに 11 %以下であった。

なお、添加回収試験で得られた選択反応検出クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

Table 4 Recoveries of GLUF

Spiked level (mg/kg)	Feed types							
	Barley		Corn		Alfalfa hay		Rice straw	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
15	-	-	-	-	90.1	13	-	-
5	95.5	4.9	-	-	-	-	-	-
1.5	-	-	-	-	87.9	10	-	-
0.5	77.3	7.8	-	-	-	-	76.8	5.0
0.1	-	-	99.3	19	-	-	-	-
0.05	-	-	84.5	5.5	-	-	84.8	7.1

a) Mean($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 5 Recoveries of MPPA

Spiked level (mg/kg)	Feed types							
	Barley		Corn		Alfalfa hay		Rice straw	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
15	-	-	-	-	78.6	3.2	-	-
5	87.1	8.3	-	-	-	-	-	-
1.5	-	-	-	-	78.4	10	-	-
0.5	71.6	10	-	-	-	-	74.2	3.1
0.1	-	-	72.3	9.6	-	-	-	-
0.05	-	-	79.9	0.9	-	-	90.8	8.8

a) Mean($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 6 Recoveries of NAG

Spiked level (mg/kg)	Feed types							
	Barley		Corn		Alfalfa hay		Rice straw	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
15	-	-	-	-	93.5	8.3	-	-
5	115	14	-	-	-	-	-	-
1.5	-	-	-	-	97.5	4.5	-	-
0.5	99.0	5.7	-	-	-	-	94.9	2.3
0.1	-	-	87.7	19	-	-	-	-
0.05	-	-	116	1.6	-	-	111	11

a) Mean($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

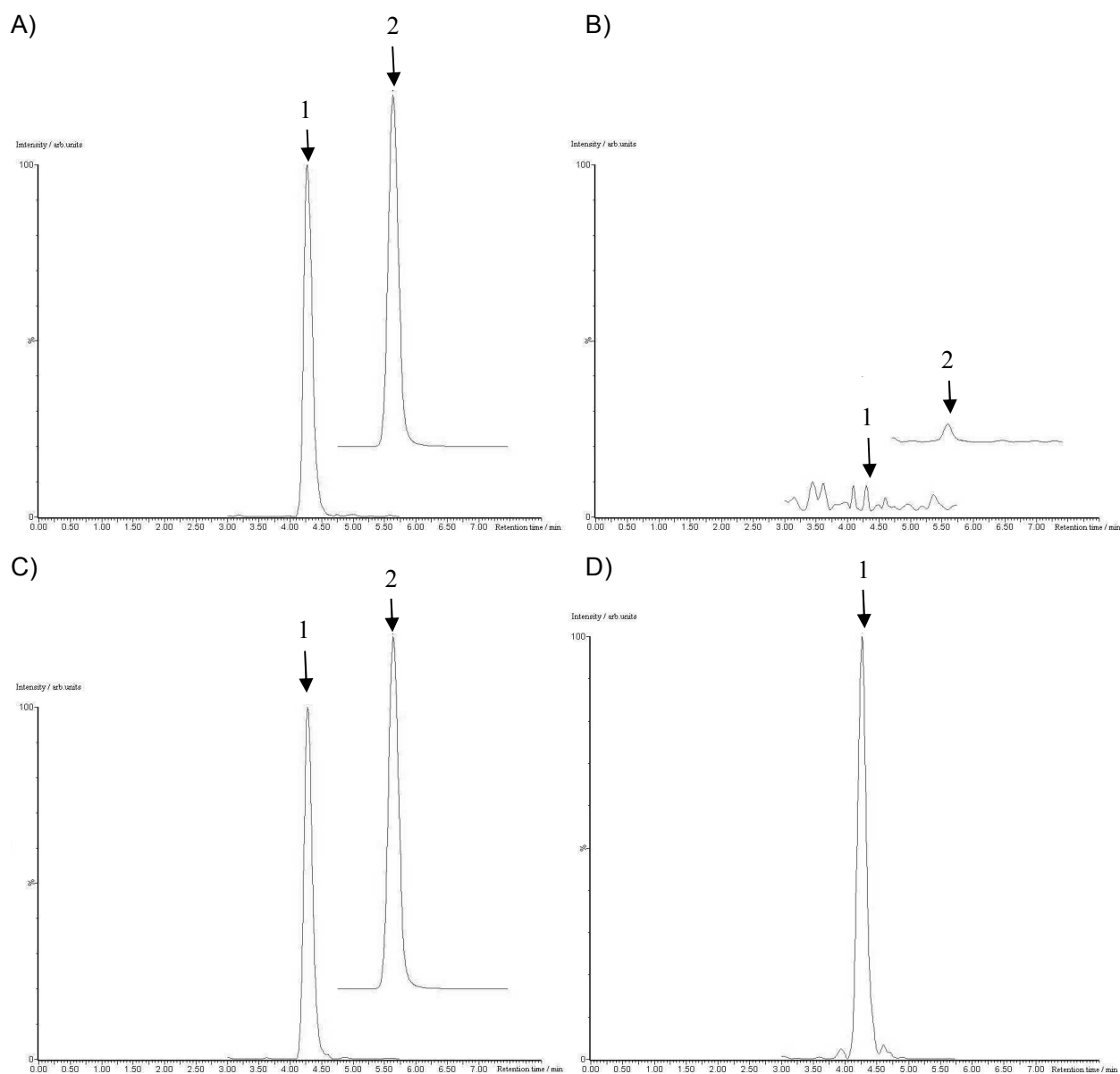


Fig. 3 Selected reaction monitoring chromatograms

(Arrows indicate the peaks of 1: GLUF derivative and 2: MPPA derivative and each peak is shown as 100 % in each segment, but the chromatogram of B) is scaled as 100 % of the lowest standard solution (1 ng/mL).)

- A) Standard solution (The concentration is 100 ng/mL for GLUF and MPPA)
- B) Blank sample solution (barley)
- C) Sample solution of barley (Spiked at 5 mg/kg of GLUF and MPPA)
- D) Sample solution of barley (Spiked at 5 mg/kg of NAG)

3.6 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、とうもろこし及びアルファルファ乾草に GLUF 及び MPPA を添加した試料並びに NAG を添加した試料について、添加回収試験により得られるピークの SN 比が 10 及び 3 となる濃度を求めた。

その結果、得られたピークの *SN* 比が 10 以上となる濃度はとうもろこしで 0.05 mg/kg 及びアルファルファ乾草で 0.5 mg/kg であった。

確認のために、とうもろこしに GLUF 及び MPPA として 0.05 mg/kg 相当量を添加した試料（最終試料溶液中で各 0.0025 µg/mL 相当量）及び NAG として 0.05 mg/kg 相当量を添加した試料（最終試料溶液中で 0.0025 µg/mL 相当量）並びにアルファルファ乾草に GLUF 及び MPPA として 0.5 mg/kg 相当量を添加した試料（最終試料溶液中で各 0.0025 µg/mL 相当量）及び NAG として 0.5 mg/kg 相当量を添加した試料（最終試料溶液中で 0.0025 µg/mL 相当量）を用いて、本法により 3 点併行分析を実施し、その平均回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果は、Table 7 のとおり、とうもろこしにおいて GLUF の平均回収率は 84.5 %、その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD_r) として 5.5 %、MPPA の平均回収率は 79.9 %、その繰返し精度は、 RSD_r として 0.9 %、NAG の平均回収率は 116 %、その繰返し精度は、 RSD_r として 1.6 % であった。アルファルファ乾草において GLUF の平均回収率は 111 %、その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD_r) として 18 %、MPPA の平均回収率は 93.4 %、その繰返し精度は、 RSD_r として 4.5 %、NAG の平均回収率は 110 %、その繰返し精度は、 RSD_r として 6.7 % であった。

また、*SN* 比が 3 となる濃度はとうもろこしで 0.02 mg/kg 及びアルファルファ乾草で 0.2 mg/kg であった。

以上の結果から、本法の定量下限は 0.05 mg/kg（乾牧草では 0.5 mg/kg）、検出下限は 0.02 mg/kg（乾牧草では 0.2 mg/kg）であった。

Table 7 Recoveries of pesticides at the level of limit of quantification

Pesticide	Spiked level (mg/kg)	Feed types			
		Corn		Alfalfa hay	
		Recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)
GLUF	0.5	-	-	111	18
	0.05	84.5	5.5	-	-
MPPA	0.5	-	-	93.4	4.5
	0.05	79.9	0.9	-	-
NAG	0.5	-	-	110	6.7
	0.05	116	1.6	-	-

a) Mean($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.7 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、共通試料による共同試験を実施した。

試料は、大麦に GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 5 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に各 50 mg を含有する混合標準液 1 mL 添加）及びアルファルファ乾草に GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 15 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に各 150 mg を含有する混合標準液 1 mL 添加）を、各試験室にて分析開始の前日に添加して調製した試料並びに大麦に NAG として 5 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 50 mg を含有する標準液 1 mL 添加）及びアルファルファ乾草に NAG として 15 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1

mL中に150 mgを含有する標準液1 mL添加)を、各試験室にて分析開始の前日に添加して調製した試料を用い、濃度非通知、かつ非明示の2点反復で実施した。参加試験室は、一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所、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、同札幌センター、同仙台センター、同名古屋センター、同神戸センター及び同福岡センター(計8試験室)であった。結果の解析については、平均回収率、繰返し精度(RSD_f)及び室間再現精度(RSD_R)を算出した。得られた RSD_R から、修正 Horwitz 式を用いて HorRat を求めた。

また、参考として、国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順^{9), 10)}を参考に、Cochran 検定、外れ値1個の Grubbs 検定及び外れ値2個の Grubbs 検定を行い、外れ値の棄却等を行った上で平均回収率、 RSD_f 、 RSD_R 及び HorRat を求めた。

結果は Table 8~10 のとおりである。GLUF については大麦及びアルファルファ乾草について、平均回収率は101及び100%、 RSD_f はそれぞれ6.7及び5.1%、 RSD_R はそれぞれ8.2及び14%、HorRat はそれぞれ0.66及び1.3であった。MPPA については大麦及びアルファルファ乾草について、平均回収率は91.4及び92.8%、 RSD_f はそれぞれ8.1及び10%、 RSD_R はそれぞれ12及び13%、HorRat はそれぞれ0.97及び1.2であった。なお、前述のとおり、参考として解析を行ったところ、アルファルファ乾草の結果において、Cochran 検定で外れ値とされるデータが認められ、そのデータを除外して平均回収率、 RSD_f 、 RSD_R 、HorRat について算出した結果は、それぞれ92.1、5.1及び12%並びに1.2であった。NAG については大麦及びアルファルファ乾草について、平均回収率は110及び107%、 RSD_f はそれぞれ3.1及び4.4%、 RSD_R はそれぞれ10及び12%、HorRat はそれぞれ0.77及び1.1であった。

参考のため、各試験室で使用した液体クロマトグラフタンデム型質量分析計の機種等を Table 11 に示した。

Table 8 Collaborative study results of GLUF

Lab. No.	Feed types			
	Barley		Alfalfa hay	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	4.44	4.73	11.5	13.0
2	4.85	4.60	16.1	15.8
3	4.76	4.94	15.9	14.6
4	5.08	5.29	15.2	13.4
5	5.67	4.65	13.1	13.5
6	5.29	5.97	18.9	19.2
7	4.76	4.97	15.5	14.4
8	5.18	5.34	14.9	15.8
Spiked level (mg/kg)	5		15	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	5.03		15.1	
Recovery ^{a)} (%)	101		100	
RSD _r ^{b)} (%)	6.7		5.1	
RSD _R ^{c)} (%)	8.2		14	
PRSD _R ^{d)} (%)	13		11	
HorRat	0.66		1.3	

a) $n = 16$

b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

d) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 9 Collaborative study results of MPPA

Lab. No.	Feed types			
	Barley		Alfalfa hay	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	4.88	5.11	17.2 ^{a)}	12.0 ^{a)}
2	4.67	5.66	14.4	12.9
3	4.21	4.35	14.1	13.0
4	4.71	4.65	13.6	12.9
5	4.12	3.13	11.2	11.4
6	4.38	4.73	14.8	15.0
7	4.32	4.32	13.7	13.1
8	4.87	5.04	17.5	15.9
Spiked level (mg/kg)	5		15	
Mean value ^{b)} (mg/kg)	4.57		13.9	
Recovery ^{b)} (%)	91.4		92.8	
RSD _r ^{c)} (%)	8.1		10	
RSD _R ^{d)} (%)	12		13	
PRSD _R ^{e)} (%)	13		11	
HorRat	0.97		1.2	

- a) If this laboratory was excluded by Cochran test, mean value (mg/kg), recovery (%), RSD_r (%), RSD_R (%), PRSD_R (%) and HorRat for alfalfa hay would be 13.8, 92.1, 5.1, 12, 11 and 1.2, respectively.
- b) $n = 16$
- c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory
- d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories
- e) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 10 Collaborative study results of NAG

Lab. No.	Feed types			
	Barley		Alfalfa hay	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	4.74	5.12	13.9	14.6
2	4.51	4.50	13.8	13.3
3	4.71	4.77	13.6	12.8
4	4.41	4.59	13.7	13.6
5	4.00	3.63	12.2	13.6
6	5.42	5.37	16.9	17.0
7	4.70	4.73	11.9	11.3
8	4.77	4.86	14.6	13.1
Spiked level (mg/kg)	5		15	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	4.57		13.4	
Recovery ^{a),b)} (%)	110		107	
RSD _r ^{c)} (%)	3.1		4.4	
RSD _R ^{d)} (%)	10		12	
PRSD _R ^{e)} (%)	13		11	
HorRat	0.77		1.1	

a) $n = 16$

b) The determined values of GLUF were converted to the concentration as NAG to calculate recovery.

c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

e) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 11 Instruments used in the collaborative study

Lab.No.	LC-MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
1	Waters Quattro premier XE	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
2	Waters ACQUITY TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
3	Waters ACQUITY TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
4	Waters ACQUITY TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
5	LC: Waters 2695 MS/MS: Waters Quattro micro API	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 3.5 µm)
6	LC: Agilent Technologies 1200 MS/MS: Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
7	LC: Agilent Technologies 1200 MS/MS: AB Sciex API-3200 Q TRAP	Kanto Chemical Mightysil RP-18 GP (2.0 mm×150 mm, 5 µm)
8	LC: Agilent Technologies 1200 MS/MS: Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 µm)

4 まとめ

穀類、乾牧草及び稲わら中に残留する GLUF, MPPA 及び NAG について、LC-MS/MS を用いた同時定量法の飼料分析基準への適用の可否について検討したところ、次の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

- 1) 検量線はそれぞれ 1~300 ng/mL 相当量（注入量として 0.005~1.5 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。
- 2) JFRL 法を用いた添加回収試験を行った結果、乾牧草については、抽出後、水で希釈する操作を JFRL 法に追加することにより適用が可能であると考えられた。小麦については本法の適用除外とすることにした。
- 3) 11 種類の飼料原料について、本法に従って選択反応検出クロマトグラムを作成したところ、定量を妨げるピークは認められなかった。
- 4) 大麦に GLUF 及び MPPA として 5 及び 0.5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各 0.25 及び 0.025 µg/mL 相当量）、とうもろこしに 0.1 及び 0.05 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各 0.005 及び 0.0025 µg/mL 相当量）、アルファルファ乾草に 15 及び 1.5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各

- 0.075 及び 0.0075 $\mu\text{g/mL}$ 相当量), 稲わらに 0.5 及び 0.05 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で各 0.025 及び 0.0025 $\mu\text{g/mL}$ 相当量) を添加した試料並びに大麦に NAG として 5 及び 0.5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.25 及び 0.025 $\mu\text{g/mL}$ 相当量), とうもろこしに 0.1 及び 0.05 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.005 及び 0.0025 $\mu\text{g/mL}$ 相当量), アルファルファ乾草に 15 及び 1.5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.075 及び 0.0075 $\mu\text{g/mL}$ 相当量), 稲わらに 0.5 及び 0.05 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.025 及び 0.0025 $\mu\text{g/mL}$ 相当量) を添加した試料を用いて, 本法により 3 点併行で定量し, 回収率及び繰返し精度を確認したところ, 良好な結果が得られた.
- 5) 本法による定量下限は GLUF, MPPA 及び NAG とともに試料中で 0.05 mg/kg (乾牧草では 0.5 mg/kg), 検出下限は 0.02 mg/kg (乾牧草では 0.2 mg/kg) であった.
- 6) 大麦に GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で各 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 相当量) 及びアルファルファ乾草に GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 15 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で各 0.075 $\mu\text{g/mL}$ 相当量) を添加した試料並びに大麦に NAG として 5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 相当量) 及びアルファルファ乾草に NAG として 15 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.075 $\mu\text{g/mL}$ 相当量) を添加した試料を用いて 8 試験室において本法に従い共同試験を実施し, 室間再現精度を確認したところ, 良好な結果を得た.

謝 辞

共同試験に参加していただいた一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター及び一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所における関係者各位に感謝の意を表します.

文 献

- 1) 食品安全委員会: グルホシネート農薬評価書 (第 2 版), 平成 24 年 3 月 (2012).
- 2) 農林省令: 飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令, 昭和 51 年 7 月 24 日, 農林省令第 35 号 (1976).
- 3) 農林水産省畜産局長通知: 飼料の有害物質の指導基準の制定について, 昭和 63 年 10 月 14 日, 63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 4) 農林水産省消費・安全局長通知: 飼料分析基準の制定について, 平成 20 年 4 月 1 日, 19 消安第 14729 号 (2008).
- 5) 白井裕治, 小野雄造, 藤原孝治, 青山幸二: ガスクロマトグラフィーによる飼料中のグリホサート, グルホシネート及び 3-メチルホスフィニコプロピオン酸の系統的定量, 飼料研究報告, 27, 13-27 (2002).
- 6) 財団法人日本食品分析センター: 平成 20 年度飼料中の有害物質等残留基準を設定するための分析法開発及び家畜等への移行調査委託事業 (飼料中の有害物質等の分析法の開発) (2008).
- 7) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知: 食品に残留する農薬, 飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について, 平成 17 年 1 月 24 日, 食安発 0124001 号 (2005).
- 8) 山多利秋, 吉村哲史: 愛玩動物用飼料中の含リンアミノ酸系農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法, 飼料研究報告, 37, 115-146 (2012).
- 9) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, Pure & appl. Chem., 67(2), 331-343 (1995).
- 10) AOAC Int., Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of

a Method of Analysis. In *Official Methods of Analysis of AOAC Int.* 19th Edition, Volume II, Gaithersburg, MD, USA (2012).