

3 穀類, 稲わら及び稲発酵粗飼料中のグリホサートの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法

牧野 大作^{*1}, 若宮 洋市^{*2}, 榊原 良成^{*3}, 船木 紀夫^{*3}

Determination of Glyphosate in Grains, Rice Straw and Whole-crop Rice Silage for Feed by LC-MS/MS

Daisaku MAKINO^{*1}, Youichi WAKAMIYA^{*2}, Yoshinari SAKAKIBARA^{*3} and Norio FUNAKI^{*3}

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

^{*2} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center
(Now Fukuoka Regional Center)

^{*3} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center)

An analytical method was developed to determine the level of glyphosate in grains, rice straw and whole-crop rice silage for feed using liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS).

Glyphosate was extracted with water. The extract was purified with two types of SPE mini-columns (Oasis HLB and plus MCX from Waters; Milford, MA, U.S.). Glyphosate was then derivatized with trimethyl orthoacetate. The sample solution was further purified with two other types of SPE mini-columns (Sep-pak Plus NH₂ and Silica from Waters) and injected into the LC-MS/MS. LC separation was carried out on an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 2.1 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 the MS/MS analysis, positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Spike tests were conducted on feed ingredients spiked with glyphosate at the levels of 20, 2, or 0.04 mg/kg (barley), 5 or 0.5 mg/kg (wheat), 1 or 0.1 mg/kg (corn), 0.2 or 0.04 mg/kg (rice straw), and 0.2 or 0.04 mg/kg (whole-crop rice silage). The resulting mean recoveries ranged from 74.2 to 102 % and the repeatability in terms of relative standard deviations (RSD_r) was not more than 13 %.

A collaborative study was conducted in ten laboratories using corn and rice straw spiked with 1 and 0.2 mg/kg of glyphosate, respectively. The mean recovery, repeatability and reproducibility in terms of relative standard deviations (RSD_r and RSD_R) and HorRat, respectively, were 98.1 %, 9.2 %, 13 % and 0.79 for corn and 92.5 %, 7.5 %, 13 % and 0.61 for rice straw

This method was validated and established for use in the inspection of glyphosate in grains, rice straw and whole-crop rice silage for feed.

^{*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, 現 名古屋センター

^{*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 福岡センター

^{*3} 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

Key words: glyphosate ; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS) ; electro spray ionization (ESI) ; feed ; collaborative study

キーワード：グリホサート；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

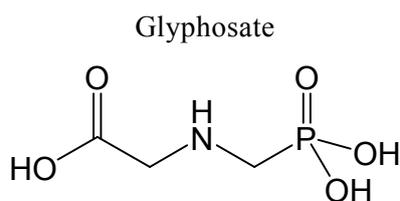
1 緒 言

グリホサートはモンサン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、たん白質合成に必須の芳香族アミノ酸の合成を阻害することにより殺草活性を発現する¹⁾。

飼料中のグリホサートの残留基準値は、農林省令²⁾において、大麦、えん麦及びマイロが 20 mg/kg, 小麦で 5 mg/kg, とうもろこしで 1 mg/kg, ライ麦で 0.2 mg/kg 並びに牧草で 120 mg/kg, また、飼料の有害物質の指導基準³⁾において、稲わら及び稲発酵粗飼料が 0.2 mg/kg と定められている。

飼料中のグリホサート等の定量法としては、一般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、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。）によるグルホシネートとの同時定量法⁴⁾（以下「JFRL 法」という。）を検討している。筆者らはこの JFRL 法を基に、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 LC-MS/MS による同時定量法（以下「グルホシネート法」という。）を既に報告し⁵⁾、飼料分析基準⁶⁾が一部改正された。今回、穀類、稲わら及び稲発酵粗飼料を対象としたグリホサートの定量法を、グルホシネート法及び山多らが愛玩動物用飼料を対象として検討したグリホサート及びグルホシネート等の定量法（以下「ペット法」という。）^{7), 8)}を基に検討したので、その概要を報告する。

参考にグリホサートの構造式等を Fig. 1 に示した。



N-(phosphonomethyl)glycine

$C_3H_8NO_3P$ MW: 169.1 CAS No.: 1071-83-6

Fig. 1 Chemical structure of glyphosate

2 実験方法

2.1 試 料

大麦、小麦、とうもろこし、アルファルファ乾草、稲わら及び稲発酵粗飼料は粉砕機でそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉砕した。

なお、稲発酵粗飼料は粉砕に先立ち、60 °C で 10 時間乾燥した後、粉砕した。

2.2 試薬

- 1) 水は超純水 (JIS K 0211 に定める 5218 の超純水) を用いた。アセトニトリル及びメタノールは、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) グリホサート標準原液
グリホサート標準品 (和光純薬工業製, 純度 99.3 %) 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リホサート標準原液を調製した (この液 1 mL は, グリホサートとして 1 mg を含有する ($f=0.993$) . .) .
- 3) 検量線作成用標準原液
グリホサート標準原液の一定量を水で正確に希釈し, 1 mL 中にグリホサートとして 100 μg を含有する検量線作成用標準原液を調製した。
- 4) 小麦添加用標準液
グリホサート標準原液の一定量をメタノール-水 (19+1) で正確に希釈し, 1 mL 中にグリホサートとして 50 及び 5 μg を含有する小麦添加用標準液を調製した。
- 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。

2.3 装置及び器具

- 1) 恒温乾燥機 : いすゞ製作所製 SNH-215S
- 2) 粉碎機 : Retsch 製 SM-2000
- 3) 乾牧草用粉碎機 : Retsch 製 ZM-200
- 4) 振とう機 : 宮本理研工業製 理研式シェーカー MW-DRV
- 5) 遠心分離器 : 久保田製作所製 テーブルトップ遠心機 4000
- 6) ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (500 mg) : Waters 製 Oasis[®] HLB カートリッジ (リザーバー容量 6 mL)
- 7) スルホン酸修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (225 mg) : Waters 製 Oasis[®] Plus MCX カートリッジ
- 8) 吸引マニホールド : Waters 製 Extraction manifold
- 9) ロータリーエバポレーター : BÜCHI Labortechnik 製 Rotavapor R-200
- 10) アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (360 mg) : Waters 製 Sep-Pak[®] Plus NH₂ カートリッジにリザーバー (10 mL) を連結したもの
- 11) シリカゲルミニカラム (690 mg) : Waters 製 Sep-Pak[®] Plus Silica カートリッジ
- 12) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 :
LC 部 : Waters 製 ACQUITY UPLC System
MS 部 : Waters 製 ACQUITY TQ Detector

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、上澄み液の一定量を水で正確に 2.5 倍に希釈し、カラム処理 I に供する試料溶液とした。

2) カラム処理 I

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (500 mg) の下にスルホン酸修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (225 mg) を連結し、メタノール 6 mL 及び水 12 mL で順次洗浄した (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。)。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、試料溶液 1 mL をミニ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。更に水 18 mL をミニカラムに加え、同様に流出させた。流出液を少量の水で 200 mL のなす形フラスコに移し、誘導体化に供する試料溶液とした。

3) 誘導体化

試料溶液を 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。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、この容器を密栓して 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 II に供する試料溶液とした。

4) カラム処理 II

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 をミニ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 をミニカラムに加え、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 をミニカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下し、グリホサート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、グリホサート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、LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

5) 標準液の誘導体化

検量線作成用標準原液 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、なす形フラスコを密栓して 100 °C で 2 時間加熱した後、放冷した。この液を、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 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 中にグリホサートとして 0.3, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 25, 50, 75, 100 及び 300 ng 相当量を含む標準液を調製した。

6) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各標準液各 5 μ L 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. 測定条件を Table 1 及び 2 に示した.

Table 1 Operating conditions of LC-MS/MS

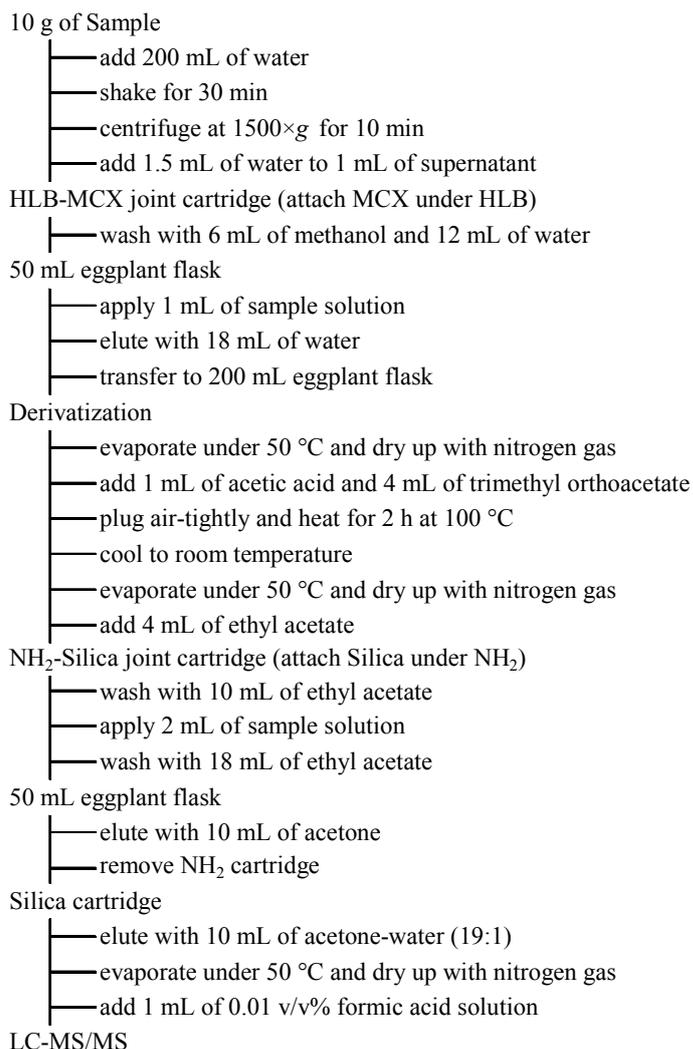
Column	Agilent Technologies, ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 μm)
Mobile phase	0.01 v/v% Formic acid solution - acetonitrile (93:7) (12 min) → 3 min → (5:95) (10 min) → 6 min → (93:7) (8 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive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

Table 2 MS/MS parameters

Target	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Qualifier ion (<i>m/z</i>)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
glyphosate derivative	254	102	152	22	17

7) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからグリホサート誘導体のピーク面積を求めて検量線を作成し, 試料中のグリホサート量を算出した. なお, 定量法の概要を Scheme 1 に示した.



Scheme 1 Analytical procedure for glyphosate

2.5 乾牧草への適用性の検討

2.4に記載の方法が乾牧草に適用できるか、次の方法により確認を行った。

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、上澄み液の一定量を水で正確に 25 倍に希釈し、カラム処理 I に供する試料溶液とした。

以下 2.4 の 2) から 7) に従い、定量した。

2.6 グルホシネート法の適用性の検討

グルホシネート法がグリホサートに適用できるか、次の方法により確認を行った。

1) 抽出

2.4 の 1) で遠心分離した後、得られた上澄み液を希釈せず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 倍希釈した後の 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、放冷した。これを、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。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 II に供する試料溶液とした。

以下 2.4 の 4) から 7) に従い、定量した。

2.7 ペット法を参考とした検討

ペット法は、内標準物質による補正を行っているが、グリホサートの内標準物質は非常に高額であること、愛玩動物用飼料ほどマトリックスが複雑でないことから、今回内標準物質の使用は採用せず、以下「1) 抽出」に記載した操作を用いて検討した。

大麦及びアルファルファ乾草を用い、グリホサートとしてそれぞれ 20 及び 120 mg/kg 相当量（最終試料溶液でそれぞれ 200 及び 60 ng/mL 相当量）を添加し、2.4（アルファルファ乾草は 2.5）に記載した方法及び以下「1) 抽出」に記載したペット法を参考にした方法により分析を実施し、グリホサートの回収率をそれぞれ求めた。また、アルファルファ乾草は、最終試料溶液の容量を 2 mL とした。

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 60 °C で 2 時間静置した後、30 分間振り混ぜて抽出した。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、上澄み液の一定量を水で正確に 2.5 倍（乾牧草では、25 倍）に希釈し、カラム処理 I に供する試料溶液とした。

以下 2.4 の 2) から 7) に従い、定量した。

3 結果及び考察

3.1 検量線

液体クロマトグラフの条件は、グルホシネート法を、質量分析計の条件は、ペット法を採用した。

2.4 の 5) に従って調製したグリホサートとして 0.3, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 25, 50, 75, 100 及び 300 ng 相当量の各標準液各 5 µL を 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、グリホサートで 0.3 ~ 300 ng/mL 相当量（注入量として 0.0015 ~ 1.5 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。

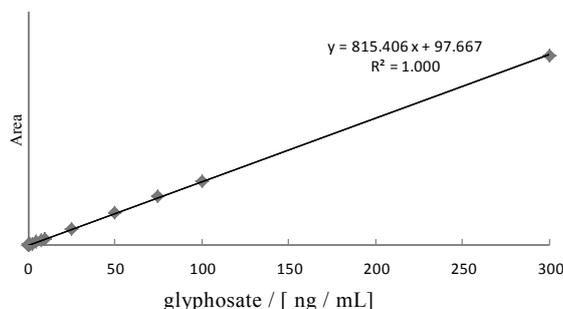


Fig. 2 Calibration curve of glyphosate by peak area

3.2 グルホシネート法の適用性の検討

グルホシネート法がグリホサートに適用できるか検討した。

ともろこし、大麦、アルファルファ乾草及び稲わらにグリホサートとしてそれぞれ 1, 20, 120 及び 0.2 mg/kg 相当量（基準値相当量、最終試料溶液でそれぞれ 50, 1000, 600 及び 10 ng/mL 相当量）を添加し、2.6 に従い、3 点併行で定量し、回収率及び繰返し精度を検討した。

その結果は Table 3 のとおり、大麦及びアルファルファ乾草において、平均回収率が 44.5 及び 60.4 % と低くなり、グリホサートに対してグルホシネート法を適用することは難しいと考えられた。

Table 3 Recovery test for glyphosate by using glufosinate method

Pesticide	Corn		Barley		Alfalfa hay		Rice straw	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)						
glyphosate	77.4	1.4	44.5	12	60.4	5.2	93.8	3.2

a) Mean ($n = 3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.3 ペット法を参考とした検討

山多ら⁷⁾はペット法の検討に際し、低回収率を改良するために、抽出前に 60 °C で 2 時間加温して抽出率を改良し、誘導体化前に更に 2.5 倍希釈した後、ミニカラム処理を追加して精製不足を改良している。そこで、グルホシネート法の試料液を更に精製するため山多らの検討の誘導体化前の希釈操作及びミニカラム処理を追加した本法及びペット法で内標準を使用しない方法を比較検討した。3.2 で低回収率となった大麦及びアルファルファ乾草を用い、2.7 に従って定量した。その結果は Table 4 のとおり、アルファルファ乾草は、いずれも良好な結果が得られなかったが、大麦はほぼ同等の良好な回収率が得られた。なお、抽出前に 60 °C で 2 時間加温する操作は効果がなかったことから、本法は、グルホシネート法に誘導体化前の 2.5 倍希釈操作及びミニカラム処理を追加した方法とした。

Table 4 Comparison of two methods

	Barley	Alfalfa hay
	Recovery ^{a)} (%)	Recovery ^{a)} (%)
This method	84.5	60.7
Method for pet food	84.6	67.7

a) $n = 1$

確認のため、大麦及びアルファルファ乾草を用い、グリホサートとしてそれぞれ 20 及び 120 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 200 及び 120 ng/mL 相当量）を添加し、本法（乾牧草については 2.5 に記載の方法）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、アルファルファ乾草は、平均回収率が 67.3 %、その繰返し精度は RSD_r として 10 % と良好な結果が得られなかったことから、乾牧草は、やはり本法の適用対象外とした。なお、大麦は、Table 6 のとおり、良好な結果が得られたことから、本法の適用対象と判断した。

3.4 小麦に対する添加回収試験の手法の検討

筆者らが検討したグルホシネート法では、小麦の添加回収試験において、試料が固結して抽出に問題があったため、小麦を適用対象から除外した⁵⁾。グリホサートを対象とした本法でも同様のことが予想されたことから、次の検討を実施した。

試料が固結する原因が、グルホシネート法では、標準原液を水で調製したことから、小麦に添加する標準液も水で調製していたことにあると考えられた。そこで、水を用いて調製した添加用標準液及び2.2の4)に従い調製した小麦添加用標準液を用い、小麦に添加する標準液組成の比較検討を実施した。

小麦に対し、これらの添加用標準液をそれぞれグリホサートとして5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で50 ng/mL 相当量）添加し、本法によるグリホサートの回収率を比較した。その結果、Table 5 のとおり回収率の改善が認められた。よって、本法は、小麦にも適用可能であると考えられた。なお、以下の検討においても、小麦に添加する標準液はメタノール水（19+1）で調製したものをを用いた。

Table 5 Examination of suitability for wheat

Kind of the solvent	Recovery ^{a)} (%)
Water	50.1
Methanol-water (19:1)	95.6

a) $n = 1$

3.5 妨害物質の検討

とうもろこし（2種類）、マイロ、大麦（3種類）、小麦（2種類）、えん麦、稲わら（2種類）、稲発酵粗飼料（2種類）及び粳米を用い、本法により調製した試料溶液をLC-MS/MSに注入し、定量を妨げるピークの有無を確認したが、妨害となるピークは認められなかった。

なお、大麦（1種類）及びマイロにおいてグリホサートと同じ保持時間にピークが確認されたため、定量イオンだけでなく、確認イオンでも定量を行ったところ、両方で定量値が一致したことからグリホサート使用による残留ピークと判断した。

3.6 添加回収試験

グリホサートとして、大麦に20、2及び0.04 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で200、20及び0.4 ng/mL 相当量）、小麦に5及び0.5 mg/kg 相当量（同50及び5 ng/mL 相当量）、とうもろこしに1及び0.1 mg/kg 相当量（同10及び1 ng/mL 相当量）、稲わらに0.2及び0.04 mg/kg 相当量（同2及び0.4 ng/mL 相当量）、稲発酵粗飼料に0.2及び0.04 mg/kg 相当量（同2及び0.4 ng/mL 相当量）を添加し、本法に従い、3点併行で定量し、回収率及び繰返し精度を検討した。

その結果は、Table 6 のとおり、平均回収率及びその繰返し精度は相対標準偏差（RSD_r）として、大麦では74.2~99.0%及び7.1%以下、小麦では80.9~92.8%及び8.0%以下、とうもろこしでは79.1~102%及び9.7%以下、稲わらでは89.0~98.7%及び13%以下、稲発酵粗飼料では88.2~93.3%及び10%以下であった。

なお、添加回収試験で得られたSRMクロマトグラムの一例をFig. 3に示した。

Table 6 Recovery test for glyphosate

Spiked level (mg/kg)	Feed types									
	Barley		Wheat		Corn		Rice straw		Whole-crop rice silage	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
20	74.2	6.8	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	80.9	7.7	-	-	-	-	-	-
2	77.5	1.1	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	79.1	7.6	-	-	-	-
0.5	-	-	92.8	8.0	-	-	-	-	-	-
0.2	-	-	-	-	-	-	98.7	11	93.3	8.2
0.1	-	-	-	-	102	9.7	-	-	-	-
0.04	99.0	7.1	-	-	-	-	89.0	13	88.2	10

a) Mean ($n = 3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

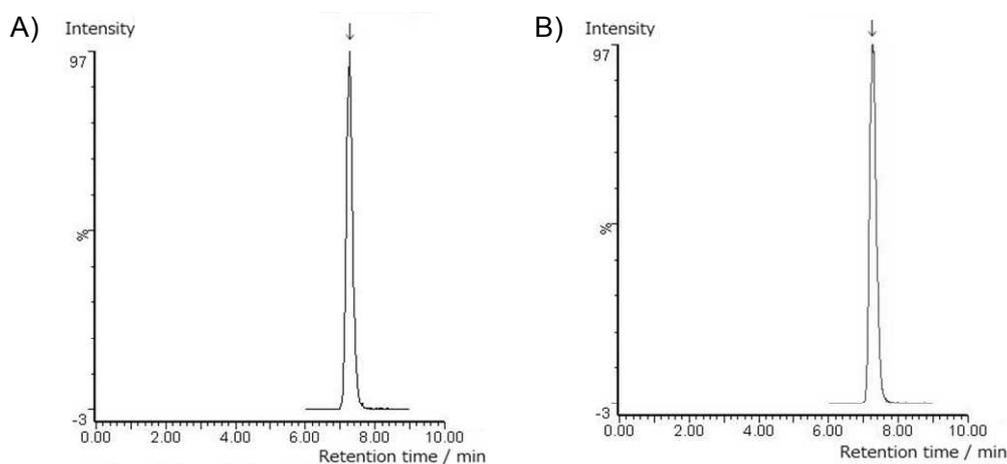


Fig. 3 Selected reaction monitoring chromatograms of glyphosate derivative

(Arrows indicate the peaks of glyphosate derivative and each peak is shown as 100 % in each segment.)

A) Standard solution (The concentration is 100 ng/mL as glyphosate .)

B) Sample solution of barley (Spiked at 20 mg/kg of glyphosate)

3.7 定量下限及び検出下限の検討

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、大麦、稲わら及び稲発酵粗飼料にグリホサートを添加した添加回収試験により得られたピークの 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 0.04 mg/kg となった。また、 SN 比が 3 となる濃度は 0.01 mg/kg となった。

なお、この定量下限濃度における回収率及び繰返し精度は、先に Table 6 に示したとおり良好であった。

以上の結果から、本法の定量下限は 0.04 mg/kg、検出下限は 0.01 mg/kg であった。

3.8 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、濃度非通知、かつ非明示の 2 点反復で共通試料による共同試験を実施した。

共通試料としては、とうもろこしにグリホサートとして 1 mg/kg 相当量 (10 g に対して 1 mL 中に 10 μ g を含有する標準液 1 mL 添加) 及び稲わらにグリホサートとして 0.2 mg/kg 相当量 (10 g に対して 1 mL 中に 2 μ g 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た。参加試験室は、協同飼料株式会社研究所、全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所、一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所、一般財団法人マイコトキシン検査協会、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 10 試験室) であった。結果の解析については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、外れ値の有無を確認した上で平均回収率、繰返し精度 (RSD_f) 及び室間再現精度 (RSD_R) を算出し、得られた RSD_R から、修正 Horwitz 式を用いて HorRat を求めた。

結果は Table 7 のとおりであった。

とうもろこし及び稲わらについて、平均回収率は 98.1 及び 92.5 %、 RSD_f は 9.2 及び 7.5 %、 RSD_R は 13 及び 13 %、HorRat は 0.79 及び 0.61 であった。

参考のため、各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 8 に示した。

Table 7 Collaborative study results of glyphosate

Lab. No.	Feed types			
	Corn		Rice straw	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.729	1.05	0.194	0.216
2	0.837	0.819	0.144	0.167
3	1.05	1.04	0.188	0.190
4	0.972	0.941	0.172	0.155
5	1.01	0.902	0.186	0.156
6	0.953	0.905	1.26 ^{b)}	0.247 ^{b)}
7	0.983	0.998	0.184	0.196
8	1.14	1.24	0.199	0.174
9	1.08	1.13	0.224	0.215
10	1.01	0.831	0.524 ^{a)}	3.32 ^{a)}
Spiked level (mg/kg)	1		0.2	
Mean value ^{c)} (mg/kg)	0.981		0.185	
Recovery ^{c)} (%)	98.1		92.5	
RSD _r ^{d)} (%)	9.2		7.5	
RSD _R ^{e)} (%)	13		13	
PRSD _R ^{f)} (%)	16		21	
HorRat	0.79		0.61	

a) Data excluded by Cochran test.

b) Data excluded by single Grubbs test.

c) Corn : $n=20$; Rice straw : $n=16$

d) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

e) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 8 Instruments used in the collaborative study

Lab.No.	LC-MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
1	LC: Waters ACQUITY UPLC	Agilent Technologies
	MS/MS: Waters Quattro premier XE	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
2	LC: Waters ACQUITY UPLC	Agilent Technologies
	MS/MS: Waters ACQUITY TQD	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
3	LC: Waters ACQUITY UPLC	Agilent Technologies
	MS/MS: Waters ACQUITY TQD	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
4	LC: Waters ACQUITY UPLC	Agilent Technologies
	MS/MS: Waters ACQUITY TQD	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
5	LC: Waters 2695	Agilent Technologies
	MS/MS: Waters Quattro micro API	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 3.5 µm)
6	LC: Agilent Technologies 1200	Agilent Technologies
	MS/MS: Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
7	LC: Shimadzu LC-20A	GL Sciences
	MS/MS: Thermo Scientific TSQ Quantum Ultra	Inertsil ODS-SP (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
8	LC: Agilent Technologies 1200	Agilent Technologies
	MS/MS: Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
9	LC: Agilent Technologies 1200	Kanto Chemical
	MS/MS: AB Sciex API-3200 Q TRAP	Mightysil RP-18 GP (2.0 mm×150 mm, 5 µm)
10	LC: Waters ACQUITY UPLC	Waters
	MS/MS: Waters ACQUITY TQD	ACQUITY UPLC® BEH C18 (2.1 mm×150 mm, 1.7 µm)

4 まとめ

穀類、稲わら及び稲発酵粗飼料中に残留するグリホサートについて、グルホシネート法及びペット法を基に、LC-MS/MSを用いた定量法の飼料分析基準への適用の可否を検討したところ、グルホシネート法にペット法の誘導体化処理前の希釈及びミニカラム処理操作を追加することで、以下の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

- 1) 検量線は、0.3 ~ 300 ng/mL 相当量（注入量として 0.0015 ~ 1.5 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。
- 2) 穀類、稲わら及び稲発酵粗飼料については良好な結果が得られた。乾牧草については良好な結果が得られず本法の適用除外とすることにした。
- 3) 本法に従って得られた SRM クロマトグラムでは、14 種類の飼料原料において定量を妨げるピ

ークは認められなかった。

- 4) 大麦にグリホサートとして 20, 2 及び 0.04 mg/kg 相当量, 小麦に 5 及び 0.5 mg/kg 相当量, とうもろこしに 1 及び 0.1 mg/kg 相当量, 稲わらに 0.2 及び 0.04 mg/kg 相当量, 稲発酵粗飼料に 0.2 及び 0.04 mg/kg 相当量を添加し, 本法に従い, 3 点併行で定量し, 回収率及び繰返し精度を検討したところ, 良好な結果が得られた。
- 5) 本法による定量下限は試料中で 0.04 mg/kg, 検出下限は 0.01 mg/kg であった。
- 6) とうもろこし及び稲わらにグリホサートとしてそれぞれ 1 及び 0.2 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて 10 試験室において本法に従い共同試験を実施したところ, 良好な結果が得られた。

謝 辞

共同試験に参加していただいた協同飼料株式会社研究所, 全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所, 一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所及び一般財団法人マイコトキシン検査協会における関係者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 社団法人日本植物防疫協会, 農薬ハンドブック 2005 年度版編集委員会編集: 農薬ハンドブック 2005 年度版.
- 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, 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) 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) (2009).
- 5) 牧野 大作, 若宮 洋市, 榊原 良成, 上野山 智洋: 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タンデム型質量分析計による同時定量法, 飼料研究報告, **38**, 89-107 (2013).
- 6) 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).
- 7) 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).
- 8) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター理事長通知: 「愛玩動物用飼料等の検査法」の制定について, 平成 21 年 9 月 1 日, 21 消技第 1764 号 (2009).
- 9) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, *Pure & appl. Chem.*, **67**(2), 331-343 (1995).
- 10) AOAC Int. (2012). Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. In *Official Methods of Analysis of AOAC Int.* 19 ed. volume II, Gaithersburg, MD, USA