

## 8 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分析法の妥当性確認

～*N*-アセチルグリホサートの穀類、稲わら及び稲発酵粗飼料への適用～

齊木 雅一\*<sup>1</sup>, 宮野谷 杏\*<sup>2</sup>

### Validation Study of Simultaneous Determination Method of Phosphorus-Containing Amino Acid-Based Pesticides in Feed by LC-MS/MS

～Application of *N*-acetylglyphosate to Grains, Rice straw and Whole-Crop Rice Silage～

Masakazu SAIKI\*<sup>1</sup> and Kyo MIYANOYA\*<sup>2</sup>

(\*<sup>1</sup> Sapporo Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center,

\*<sup>2</sup> Sapporo Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center

(Now Nagoya Regional Center))

We have made a validation study on the inclusion of grains, rice straw and whole-crop rice silage (WCRS) in the analytes of *N*-acetylglyphosate for the simultaneous determination method of phosphorus-containing amino acid-based pesticides contained in feed. The method, which uses a liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS), has been listed in the Feed Analysis Standard of Japan.

*N*-acetylglyphosate in grains, rice straw and WCRS was extracted with water, and the extracted solution was purified with two types of SPE columns (Oasis HLB and Oasis Plus MCX, Waters Co.; Milford, MA, USA). Having derivatized these compounds with trimethyl orthoacetate, the sample solution was purified with two types of SPE columns (Sep-Pak Plus NH<sub>2</sub> and Silica, Waters Co.; Milford, MA, USA), and injected into a LC-MS/MS to determine the concentration of *N*-acetylglyphosate. The LC separation was then carried out on an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 μm, Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA) with a gradient of 0.01 v/v % formic acid solution and acetonitrile as a mobile phase. In the MS/MS analysis, the positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Recovery tests were conducted on oat, barley, rice straw and WCRS. *N*-acetylglyphosate was intentionally added at the following levels: 0.04 and 20 mg/kg for oat and barley; 0.04 and 0.2 mg/kg for rice straw; and 0.02, 0.04 and 0.2 mg/kg for WCRS in original matter respectively. The resulting mean recoveries ranged from 101 % to 114 %. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD<sub>r</sub>) was less than 14 %.

This method was thus validated as useful for inspections of *N*-acetylglyphosate in grains, rice straw and WCRS.

Key words: glyphosate; *N*-acetylglyphosate; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); grains; oat; barley; rice straw; whole-crop rice silage

キーワード：グリホサート；*N*-アセチルグリホサート；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；穀類；えん麦；大麦；稲わら；稲発酵粗飼料

\*<sup>1</sup> 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

\*<sup>2</sup> 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，現 名古屋センター

## 1 緒 言

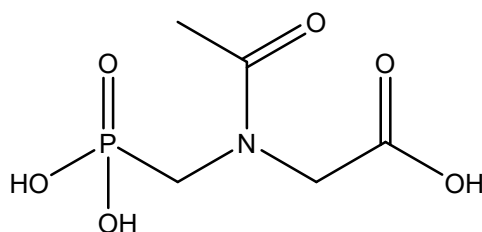
グリホサート（以下「GLYP」という．）は Monsanto Company（米国）が開発した非選択性茎葉処理型のアミノ酸系除草剤であり，たん白質合成に必須の芳香族アミノ酸の合成を阻害することにより殺草活性を示す．GLYP 耐性遺伝子組換え植物中では *N*-アセチルグリホサートに代謝されることが知られている<sup>1)</sup>．

現在，飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律<sup>2)</sup>に基づき農林水産大臣が確認した GLYP 耐性遺伝子を持つとうもろこしや大豆が飼料用として流通している．

GLYP の国内における飼料中の残留基準値<sup>3)</sup>は，大麦，えん麦及びマイロで 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 と定められている．また，農林水産省局長通知による飼料の有害物質の管理基準値<sup>4)</sup>は，稲わら及び稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という．）で 0.2 mg/kg と定められている．現在は GLYP のみが対象となっているが，基準値の見直しに当たり，*N*-アセチルグリホサートも対象に含めるよう検討されている．

そこで筆者らは，飼料分析基準<sup>5)</sup>に記載されている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分析法について，とうもろこし中の *N*-アセチルグリホサートの妥当性の確認を行い，報告したところである<sup>6)</sup>．今回，とうもろこし以外の穀類，稲わら及び WCRS 中の *N*-アセチルグリホサートの妥当性の確認を行ったのでその概要を報告する．

参考に *N*-アセチルグリホシネートの構造式等を Fig. 1 に示した．



*N*-acetylglyphosate

2-[acetyl(phosphonomethyl)amino]acetic acid

C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>6</sub>P MW: 211.1 CAS No.: 129660-96-4

Fig. 1 Chemical structures of *N*-acetylglyphosate

## 2 実験方法

### 2.1 試 料

えん麦，大麦，小麦，マイロ及び稲わらはそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎した．WCRS は 60 °C で 10 時間乾燥後，更に室内に静置して風乾した後，同様に粉碎した．

### 2.2 試 薬

1) メタノール，アセトン及び酢酸エチルは残留農薬・PCB 試験用を用いた．オルト酢酸トリメチルは東京化成工業製（純度 98.0 % 以上）を用いた．酢酸は試薬特級を用いた．アセトニトリルは LC-MS 用（関東化学製）を用いた．ギ酸は LC-MS 用（富士フィルム和光純薬製）を用いた．水は Milli-Q Advantage（Merck Millipore 製）により精製した超純水（JIS K0211 の 5218 に定義された超純水）を用いた．

## 2) GLYP 標準原液

グリホサート標準品（富士フィルム和光純薬製，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，更に標線まで同溶媒を加えて GLYP 標準原液を調製した（この液 1 mL は，GLYP として 1 mg を含有する．）．

3) *N*-アセチルグリホサート標準原液

*N*-アセチルグリホサート標準品（Tronto Research Chemicals 製，純度 97 %）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，更に標線まで同溶媒を加えて *N*-アセチルグリホサート標準原液を調製した（この液 1 mL は，*N*-アセチルグリホサートとして 1 mg を含有する．）．

## 4) 検量線作成用標準原液

GLYP 標準原液 1 mL を 10 mL の全量フラスコに入れて混合し，更に標線まで水を加えて検量線作成用標準原液を調製した（この液 1 mL は，GLYP として 100 µg を含有する．）．

## 5) 0.01 v/v% ギ酸溶液

ギ酸 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) 粉砕機：

粉砕機 1（えん麦，大麦，小麦及びマイロ用）：

ZM 200 Retsch 製（1 mm スクリーン，回転数 14000 rpm）

粉砕機 2（稲わら及び WCRS 用）：

SM 100 Retsch 製（1 mm スクリーン，回転数（仕様）1430 rpm）

## 2) 振とう機：レシプロシェーカー SR-2W タイテック製（使用時振動数 300 rpm）

3) 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：Oasis HLB カートリッジ（充てん剤量 500 mg）にリザーバー（容量 6 mL）を連結したもの Waters 製4) 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：Oasis Plus MCX カートリッジ（充てん剤量 225 mg） Waters 製5) アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム：Sep-Pak Plus NH<sub>2</sub> カートリッジ（充てん剤量 360 mg） Waters 製にリザーバー（容量 10 mL）を連結したもの

## 6) シリカゲルミニカラム：Sep-Pak Plus Silica カートリッジ（充てん剤量 690 mg） Waters 製

## 7) LC-MS/MS：

LC 部：ACQUITY UPLC Waters 製

MS 部：Quattro Premier XE Waters 製

## 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，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 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下して、溶出させた。更に、水 18 mL をミニカラムに加え、同様に溶出させた。溶出液を少量の水で 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、GLYP 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、GLYP 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

検量線作成用農薬標準原液 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 GLYP として 0.3, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 及び 300 ng 相当量を含有する標準液を調製した。

### 6) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各標準液各 5 µL を LC-MS/MS に注入し、選択反応検出（以下「SRM」という。）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 Operation conditions of LC-MS/MS

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 μm), Agilent Technologies
Mobile phase	0.01 v/v% formic acid aqueous solution – acetonitrile (93:7) (hold for 12 min) → 3 min → (5:95) (hold for 10 min) → 6 min → (93:7) (hold for 8 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Source temperature	120 °C
Desolvation gas	N <sub>2</sub> (600 L/h, 400 °C)
Cone gas	N <sub>2</sub> (50 L/h)
Capillary voltage	3.0 kV
Collision gas	Ar (0.25 mL/min)

Table 2 MS/MS parameters

Target	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
		Quantifier ( <i>m/z</i> )	Qualifier ( <i>m/z</i> )		
Glyphosate (GLYP) derivative <sup>a)</sup>	254	102	-	22	17
		-	152	22	17

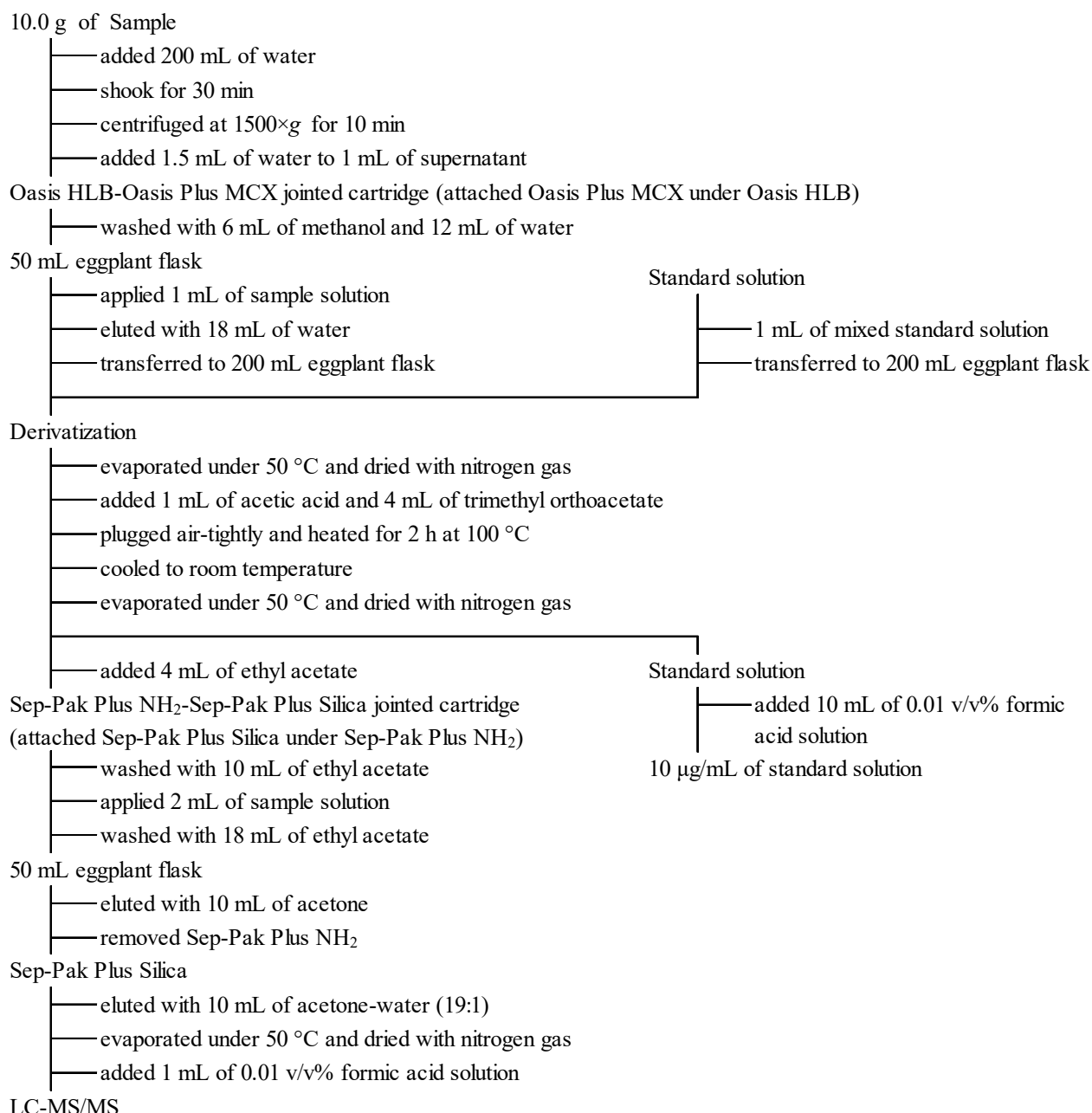
a) Derivative of GLYP and *N*-acetylglyphosate

## 7) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからピーク面積及び高さを求めて検量線を作成し、試料中の GLYP 量 (*N*-アセチルグリホサート由来を含む) を算出した。

また、2.4 の 3) の誘導体化により GLYP 及び *N*-アセチルグリホサートは GLYP 誘導体になることから、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 GLYP の濃度 (mg/kg) を *N*-アセチルグリホサートの濃度 (mg/kg) に換算し、添加した *N*-アセチルグリホサートの濃度 (mg/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。

Scheme 1 Analytical procedure for *N*-acetylglyphosate

## 2.5 添加回収試験

2.2 の 3)の *N*-アセチルグリホサート標準原液を水で正確に希釈し添加に用いた。

えん麦及び大麦に *N*-アセチルグリホサートとして 0.04 及び 20 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で GLYP として 0.32 及び 160 ng/mL 相当量），稲わらに *N*-アセチルグリホサートとして 0.04 及び 0.2 mg/kg 相当量（同 GLYP として 0.32 及び 1.6 ng/mL 相当量）並びに WCRS に原物換算して *N*-アセチルグリホサートとして 0.02, 0.04 及び 0.2 mg/kg 相当量（同 GLYP として 0.36, 0.72 及び 3.6 ng/mL 相当量）になるようにそれぞれ添加後よく混合し，一夜静置した後に本法に従って添加回収試験を実施し，平均回収率及び繰返し精度を求めた。

なお，WCRS において，添加は風乾物試料に対して *N*-アセチルグリホサートとして 0.045, 0.09 及び 0.45 mg/kg 相当量になるよう行い，原物中濃度への換算は，原物中及び風乾物中の水分

含有量を 60%及び 10%と想定して、原物（水分含有量 60%）中濃度＝風乾物（水分含有量 10%）中濃度／2.25 の式により行った。

### 3 結果及び考察

#### 3.1 妨害物質の検討

えん麦 1 検体、大麦 6 検体、小麦 3 検体、マイロ 3 検体、稲わら 1 検体及び WCRS1 検体を試料として、2.4 により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムを確認したところ、大麦 4 検体、小麦 2 検体及びマイロ 3 検体について GLYP 誘導体と同じ保持時間にピークが確認されたが、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、定量値が両者ではほぼ一致したことから残留 GLYP 又は *N*-アセチルグリホサートに由来するピークと判断され、いずれの試料においても *N*-アセチルグリホサートの定量を妨げるピークは認められなかった。

なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig.2 に示した。

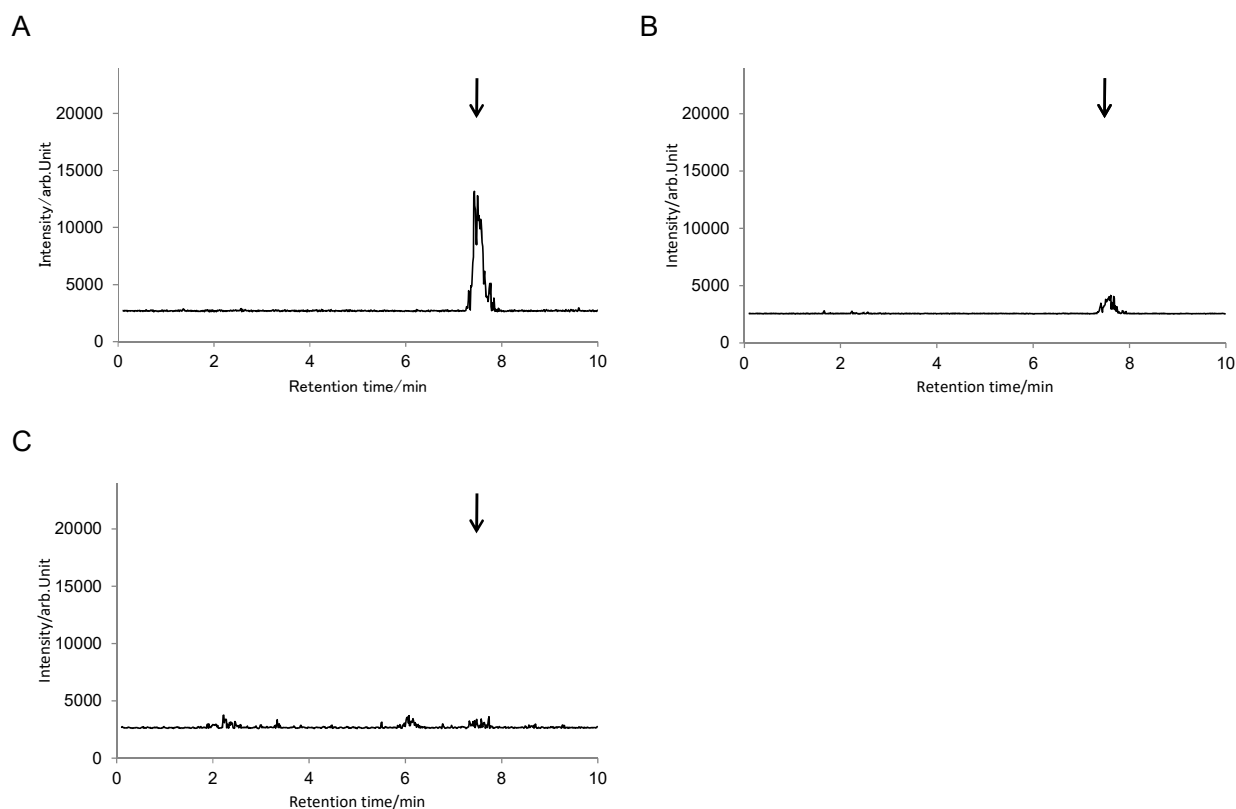


Fig.2 Typical Selected Reaction Monitoring (SRM) chromatograms of GLYP derivative in standard and blank sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrow indicates the retention time of GLYP derivative.)

A: Standard solution (0.5 ng/mL GLYP: 0.005 ng as GLYP)

B: Sample solution of oat (blank)

C: Sample solution of WCRS (blank)

### 3.2 添加回収試験

2.5により添加回収試験を実施した。その結果はTable 3のとおり、*N*-アセチルグリホサートについて、えん麦では平均回収率は104~107%，その繰返し精度は相対標準偏差（ $RSD_r$ ）として11%以下、大麦では平均回収率は101~111%， $RSD_r$ は5.3%以下、稲わらでは平均回収率は104~114%， $RSD_r$ は10%以下、WCRSでは平均回収率は101~107%， $RSD_r$ は14%以下の成績が得られ、飼料分析基準別表3の試験法の妥当性確認法ガイドライン（以下「妥当性確認法ガイドライン」という。）に定められた真度及び併行精度の目標値（真度：70%以上120%以下，精度：0.02及び0.04 mg/kgでは22%以下，0.2 mg/kgでは20%以下，20 mg/kgでは10%以下）を満たす良好な結果であった。

なお，得られたSRMクロマトグラムの一例をFig. 3に示した。

Table 3 Recoveries for *N*-acetylglyphosate

Spiked level (mg/kg as fed basis)	Oat		Barley		Rice straw		WCRS <sup>a)</sup>	
	recovery <sup>b)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>c)</sup> (%)	recovery <sup>b)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>c)</sup> (%)	recovery <sup>b)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>c)</sup> (%)	recovery <sup>b)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>c)</sup> (%)
0.02	-	-	-	-	-	-	105	10
0.04	104	11	101	4.7	104	10	101	14
0.2	-	-	-	-	114	5.0	107	9.3
20	107	6.1	111	5.3	-	-	-	-

—: Not tested

a) *N*-acetylglyphosate was spiked to air-dried WCRS samples one night prior to extraction. The spiked levels were 0.045, 0.09 and 0.45 mg/kg as air-dry basis for *N*-acetylglyphosate. The levels of *N*-acetylglyphosate as fed basis were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of WCRS samples was 60% as fed basis and 10% as air-dry basis.

The levels of *N*-acetylglyphosate as fed basis (moisture 60%)

= the levels of *N*-acetylglyphosate as air-dry basis (moisture 10%) / 2.25

b) Mean ( $n = 5$ )

c) Relative standard deviation of repeatability



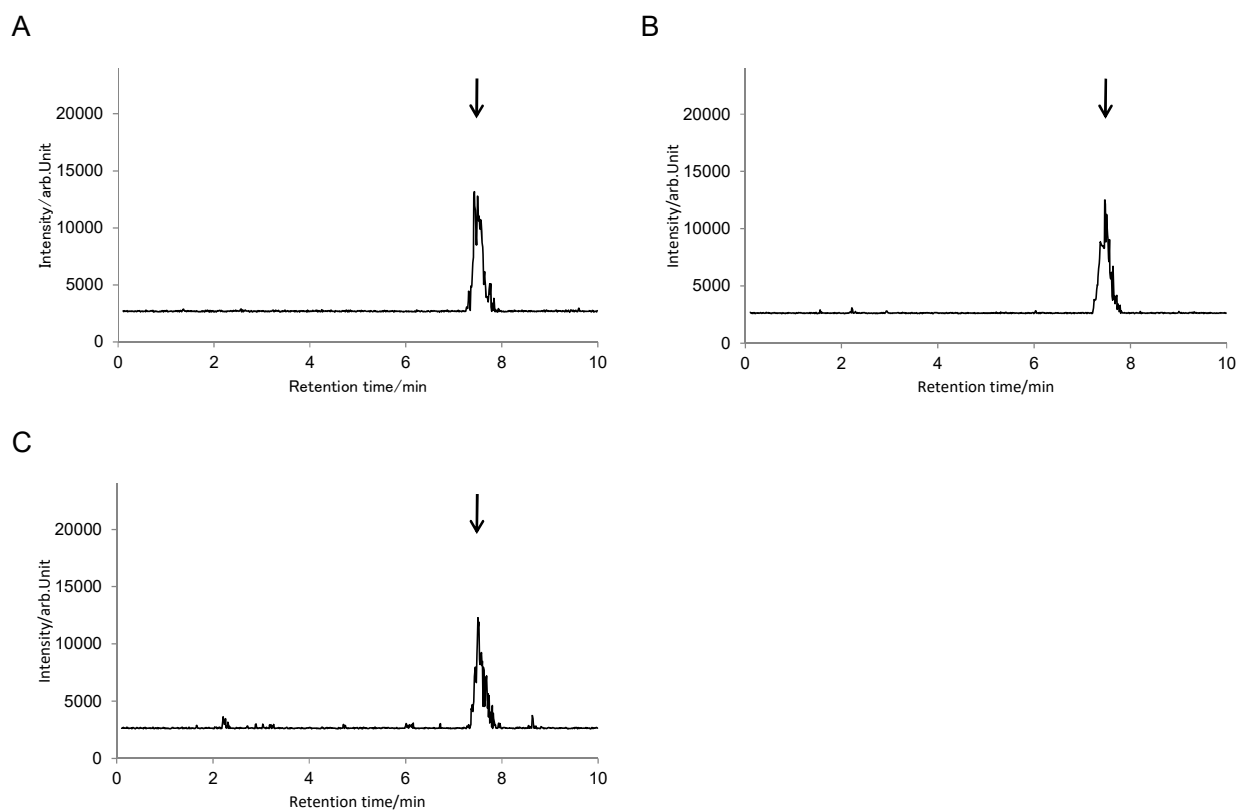


Fig. 3 Typical SRM chromatograms of GLYP derivative in standard and spiked sample solutions (LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrow indicates the retention time of GLYP derivative.)

A: Standard solution (0.5 ng/mL GLYP: 0.005 ng as GLYP)

B: Sample solution of oat (spiked at 0.04 mg/kg of *N*-acetylglufosinate (as 0.32 ng/mL as GLYP in sample solution).

C: Sample solution of WCRS (spiked at 0.04 mg/kg of *N*-acetylglufosinate (as 0.32 ng/mL as GLYP in sample solution).

### 3.3 定量下限及び検出下限

GLYP 誘導体の検量線が直線性を示した範囲、GLYP として 0.3~300 ng/mL の下端付近となる濃度（えん麦、大麦、稲わら及び WCRS 風乾物に *N*-アセチルグリホサートとして 0.04 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で GLYP として 0.32 ng/mL 相当量）の添加回収試験の結果、得られたピークの *SN* 比が 10 以上であったため、*N*-アセチルグリホサートの定量下限はえん麦、大麦、稲わら及び WCRS 風乾物で 0.04 mg/kg とした。この濃度は、えん麦及び大麦中の GLYP の基準値 20 mg/kg (*N*-アセチルグリホサートとして 25 mg/kg) に対して 1/625、稲わら中の GLYP の管理基準値 0.2 mg/kg (*N*-アセチルグリホサートとして 0.25 mg/kg) に対して 1/6、WCRS 中の GLYP の管理基準値の風乾物中換算値 0.45 mg/kg (*N*-アセチルグリホサートとして 0.56 mg/kg) に対して 1/14 であり、妥当性確認法ガイドラインに定められた基準値に対する定量下限の目標値（1/5 以下）を満たしていた。なお、Table 3 に示したとおり、当該定量下限濃度における添加回収試験結果は良好であった。

本法の検出下限を確認するため、添加回収試験により得られたピークの *SN* 比が 3 となる濃度

を求めた。その結果、検出下限はえん麦、大麦、稲わら及び WCRS 風乾物で *N*-アセチルグリホサートとして 0.01 mg/kg であり、同様に妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値 (1/10 以下) を満たしていた。

#### 4 まとめ

穀類、稲わら及び WCRS に残留する *N*-アセチルグリホサートについて、飼料分析基準に記載されている分析法の妥当性を確認したところ、以下の結果が得られ、従来の方法がそのまま適用可能であると考えられた。

- 1) 穀類、稲わら及び WCRS について、本法に従って得られたクロマトグラムには、定量を妨げるピークは認められなかった。
- 2) えん麦及び大麦に 0.04 及び 20 mg/kg 相当量、稲わらに 0.04 及び 0.2 mg/kg 相当量、WCRS に原物換算して 0.02, 0.04 及び 0.2 mg/kg 相当量を添加し、本法に従って 5 点併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。
- 3) 本法の *N*-アセチルグリホサートの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。設定した定量下限及び検出下限は、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値を満たしていた。

#### 文 献

- 1) 食品安全委員会：グリホサート農薬評価書，平成 28 年 7 月 (2016).
- 2) 飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律，昭和 28 年 4 月 11 日，法律第 35 号 (1953).
- 3) 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).
- 4) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 5) 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).
- 6) 齊木雅一，廣井利明：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分析法の妥当性確認～*N*-アセチルグリホサートの追加並びに大豆及び大豆油かすへの適用拡大～，飼料研究報告，44，136-150 (2019).