

7 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

山多 利秋^{*1}, 吉村 哲史^{*2}

Simultaneous Determination of Glyphosate, Glufosinate and their Metabolites in Pet Foods by LC-MS/MS

Toshiaki YAMATA^{*1} and Satoshi YOSHIMURA^{*2}

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

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

An analytical method was developed to determine levels of glyphosate, glufosinate and their metabolites in pet food using liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

Pet foods were spiked with glyphosate-¹³C₂, ¹⁵N. Glyphosate (GLYP), (aminomethyl) phosphonic acid (AMPA), glufosinate (GLUF) and 3-(methyl phosphinico) propionic acid (MPPA) were extracted with water. The extract was purified with two types of solid phase extraction mini columns (Oasis HLB and MCX from Waters; Milford, MA, U.S.). Then the compounds were 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. The 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. The determined value of GLYP was corrected with the recovery rate of GLYP-¹³C₂, ¹⁵N.

Spike tests were conducted on pet food. Dry dog food, dry cat food and semi-dry dog food were spiked with 1 or 15 mg/kg of GLYP, AMPA, GLUF and MPPA. Wet dog and cat food were spiked with the same compounds at 0.5 or 2.5 mg/kg and 0.5 or 3.5 mg/kg, respectively. Recoveries ranged from: 88.2 % to 102 % for GLYP, 56.1 % to 110 % for AMPA, 88.3 % to 102 % for GLUF and 81.9 % to 98.2 % for MPPA. The relative standard deviations of repeatability were not more than: 8.9 % for GLYP, 22 % for AMPA, 10 % for GLUF and 11 % for MPPA, respectively.

A collaborative study was conducted in ten laboratories using pet food spiked with GLYP, AMPA, GLUF and MPPA in the following quantities: dry dog food: 2 mg/kg of GLYP or AMPA or 5 mg/kg of GLUF or MPPA; dry cat food 15 mg/kg of GLYP or AMPA or 2 mg/kg of GLUF or MPPA; semi-dry dog food: 7 mg/kg of GLYP or AMPA or 2 mg/kg; of GLUF or MPPA; wet dog food: 1 mg/kg of GLYP or AMPA or 2.5 mg/kg and wet cat food: 3.5 of GLYP or AMPA mg/kg or 1 mg/kg of GLUF or MPPA, respectively.

^{*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 肥飼料安全検査部

^{*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

The range of mean recoveries, repeatability and reproducibility in terms of relative standard deviations and Horwitz ratio (HorRat) for each compound is reported as follows: GLYP:90.6 to 99.8 % with not more than 7.0 %, 8.7 % and 0.65; AMPA: 73.4 to 92.1 % with not more than 20 %, 24 % and 2.0; GLUF: 93.2 to 112 %, with not more than 15 %, 23 % and 1.6; and MPPA: 90.3 to 98.3 % with not more than 7.8 %, 11 % and 0.83, respectively.

This method was validated and established for use in the inspection of pet food for GLYP, GLUF and MPPA.

Key words: pet food ; glyphosate ; glufosinate ; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS) ; electrospray ionization (ESI) ; glyphosate-¹³C₂, ¹⁵N

キーワード：ペットフード；グリホサート；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；安定同位体標識グリホサート

1 緒 言

グリホサート（以下「GLYP」という。）は、モンサント社（米国）が開発した非選択性茎葉処理型除草剤である。我が国では愛玩動物用飼料（犬用及び猫用）の成分規格として、15 µg/g の基準値が設定されている¹⁾が、その定量法は確立されておらず、開発が急務となっている。

愛玩動物用飼料中の GLYP の定量法を検討するに当たり、畜産用飼料の定量法を参考とした。飼料分析基準²⁾には、ガスクロマトグラフによる系統的定量法（以下「飼料分析基準収載法」という。）がある。しかしながら、操作が煩雑であるなどの理由から、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。）を用いた比較的簡便な定量法（以下「食品分析センター法」という。）を開発した³⁾ところであり、この食品分析センター法を検討の基礎とした。

また、飼料分析基準収載法及び食品分析センター法が定量の対象としているグルホシネート（以下「GLUF」という。）及び 3-メチルホスフィニコプロピオン酸（以下「MPPA」という。）への適用についても同時に検討した。GLUF は、ヘキスト社（ドイツ）が開発した非選択性茎葉処理型除草剤であり、MPPA はその主要代謝物である。我が国では、畜産用飼料については、MPPA を含めた量として GLUF の基準値が設定されているが、愛玩動物用飼料については基準値がない。

一方、GLYP の主要代謝物であるアミノメチルホスホン酸（以下「AMPA」という。）は、残留基準に係る GLYP の定義には含まれないが、コーデックス委員会、EU 等が定める摂取量評価等に係る定義では GLYP 及び AMPA を GLYP に換算した量の総和をとることとなっている^{4, 5)}。このため、本法の AMPA への適用可能性についても確認した。

検討の結果、食品分析センター法の一部を改良することで愛玩動物用飼料中の GLYP、GLUF 及び MPPA の定量が可能であったので、その概要を報告する。

参考に GLYP、AMPA、GLUF 及び MPPA の構造式等を Fig. 1 に示した。

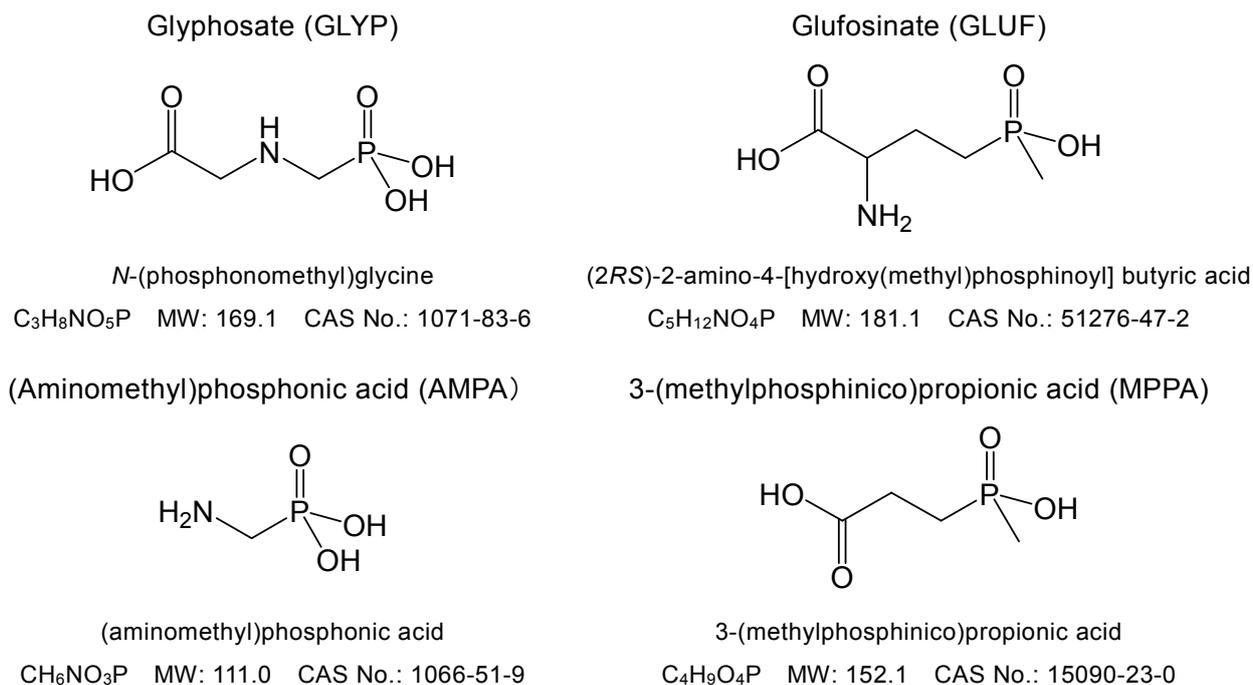


Fig. 1 Chemical structures of glyphosate, (aminomethyl)phosphonic acid, glufosinate and 3-(methylphosphinico)propionic acid

2 実験方法

2.1 試料

- 1) ドライ製品及びセミドライ製品 市販の愛玩動物用飼料を 1 mm のスクリーンを装着した遠心粉碎機で粉碎したものをを用いた。
- 2) ウェット製品 市販の愛玩動物用飼料をフードプロセッサーでペースト状にしたものをを用いた。

用いた試料の原材料の一例を Table 1 に示した。

Table 1 Examples of ingredients of pet foods used in this study

Pet food types	Ingredients
Complete and balanced dry type for adult dogs	Grains (maize, rice, wheat flour, unpolished rice, etc.), meat (chicken, etc.), plant protein, oils and fats (palm oil, soybean oil, sunflower oil, etc.), alimentary fiber (beet pulp), dehydrated protein, soybean, xylose, vegetables (carrot, tomato), green tea extracts, sodium tripolyphosphate, powdered milk, vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , C, D ₃ , E, choline, niacin, panthothenate, folic acid), minerals (Zn, K, Ca, Cl, Se, Fe, Cu, Na, Mn, I, P), amino acids (glycine, methionine, cysteine), preservative (potassium sorbate), colorant (caramel), antioxidants (mixed tocopherol, rosemary extracts), pH adjuster
Complete and balanced dry type for kitten or cats in pregnancy and lactation	Grains (corn gluten meal, wheat, cereal bran, etc.), meat (poultry by-product meal, beef by-product meal, lamb by-product meal, etc.), oils and fats (beef tallow, etc.), beans (soybean meal, etc.), dehydrated protein, fish (fish meal), tubers (potato), dairy products (powdered cheese, powdered milk), vegetables (vegetable meal), minerals (Ca, P, K, Na, Cl, Fe, Cu, Mn, Zn, I, Se, Co), vitamins (A, D, E, B ₁ , B ₂ , panthothenate, niacin, B ₆ , folic acid, B ₁₂ , choline), amino acids (taurine, methionine), colorant (food red no.2, food red no.102, food blue no.1, food yellow no.4, food yellow no.5)
Complete and balanced semi-dry type for adult dogs	Grains (maize, wheat flour, etc.), saccharides (glucose-fructose syrup, sucrose) meat (poultry by-product meal, beef by-product meal, powdered white chicken meat, etc.), animal fat, beans (defatted soybean, powdered soybean, etc.), fish (fish meal, dried small fish), brewer's yeast, powdered cellulose, vegetables (powdered spinach, powdered carrot, powdered pumpkin, etc.), powdered cheese, propylene glycol, minerals (Ca, Cl, Cu, I, K, P, Zn), emulsifier, preservative (potassium sorbate), malic acid, colorant (titanium dioxide, food red no.106, food yellow no.4, food yellow no.5, food blue no.1), vitamins (A, B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂ , D, E, K, choline, panthothenate), antioxidants (mixed tocopherol, herb extracts)
Complete and balanced wet type for adult dogs	Meat (chicken, etc.), rice, carrot, maize, plant protein, alimentary fiber, vitamins (B ₁₂ , D, E, choline, panthothenate, folic acid), minerals (Ca, Cl, K, Na, S, Zn), glycine, polysaccharide thickener, pH adjuster, colorant (ferric oxide, titanium dioxide), coloring agent (sodium nitrite)
Complete and balanced wet type for adult cats	Pork, beef, wheat gluten, chicken, sardine, powdered soybean, soybean protein, glucose, minerals, vitamins, amino acids, thickening stabilizer (processed starch), colorant (ferric oxide, caramel)

2.2 試薬

1) 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 %）0.1 g を正確に量って 100 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，GLYP として 1 mg を含有する（ $f=0.994$ ））。

2) アミノメチルホスホン酸標準原液

アミノメチルホスホン酸標準品（和光純薬工業製，純度 100.1 %）0.1 g を正確に量って 100 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アミノメチルホスホン酸標準原液を調製した（この液 1 mL は，AMPA として 1 mg を含有する（ $f=0.988$ ））。

3) 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 94.5 %) 0.05 g を正確に量って 50 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 を含有する ($f=0.895$) .) .

4) 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 %) 0.1 g を正確に量って 100 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 を含有する ($f=1.00$) .) .

5) 安定同位体元素標識グリホサート標準原液及び内標準液

グリホサート- $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}$ (以下「GLYP- $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}$ 」という.) 標準品 (Medical Isotopes 製, $^{13}\text{C}_2$ 純度 98 %, ^{15}N 純度 98 %) 3 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安定同位体元素標識グリホサート標準原液を調製した (この液 1 mL は, GLYP- $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}$ として 0.1 mg を含有する ($f=1.15$) .) .

更に, 標準原液の一定量を水で正確に希釈し, 1 mL 中に GLYP- $^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}$ として 10 μg を含有する内標準液を調製した.

6) 農薬混合標準原液

グリホサート標準原液, グルホシネート標準原液, アミノメチルホスホン酸標準原液及び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 GLYP, GLUF, AMPA 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.

7) 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.

8) 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:

LC 部: Waters 製 ACQUITY UPLC System

MS 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) 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)

8) 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

- 9) 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
- 10) シリカゲルミニカラム (690 mg) : Waters 製 Sep-Pak[®] Plus Silica カートリッジ

2.4 定量方法

1) 抽出

- i) ドライ製品及びセミドライ製品 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、内標準液 0.5 mL を正確に加えた。水 200 mL を加え、60 °C で 2 時間静置後、30 分間振り混ぜて抽出した。

抽出液の一定量を 1,600×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。

- ii) ウェット製品 分析試料 10.0 g を量って 100 mL の遠心沈殿管に入れ、内標準液 0.25 mL を正確に加えた。更に水 50 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出した後、1,600×g で 10 分間遠心分離し、上澄み液を 200 mL の全量フラスコに入れた。

遠心沈殿管内の残さに水 40 mL を加え、更に 30 分間振り混ぜて抽出した後、1,600×g で 10 分間遠心分離し、上澄み液を先の全量フラスコに加えた。更にこの操作を同様に 1 回繰り返した。

全量フラスコの標線まで水を加え、この液の一定量を 5,000×g で 5 分間遠心分離した後、上澄み液を水で正確に 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連結カラムの下に置き、ドライ製品及びセミドライ製品では試料溶液 1 mL、ウェット製品では試料溶液 2 mL を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 をカラムに加え、全量を流出させた。

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、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 GLYP 誘導体、AMPA 誘導体及び 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 2 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。

5) 標準液の誘導体化

農薬混合標準原液 1 mL 及び内標準液 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 GLYP, GLUF, AMPA 及び MPPA としてそれぞれ 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 25, 50, 75 及び 100 ng 相当量並びに GLYP-¹³C₂, ¹⁵N として 0.10, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 及び 10 ng 相当量を含む各標準液を調製した。

6) 液体クロマトグラフタンデム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 2-1 及び 2-2 に示した。

Table 2-1 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	Agilent Technologies, ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 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)
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 2-2 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)
GLYP derivative	254	102	152	22	17
GLYP- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N derivative	257	105	154	22	17
AMPA derivative	182	111	140	20	12
GLUF derivative	252	210	150	26	14
MPPA derivative	181	149	93	21	14

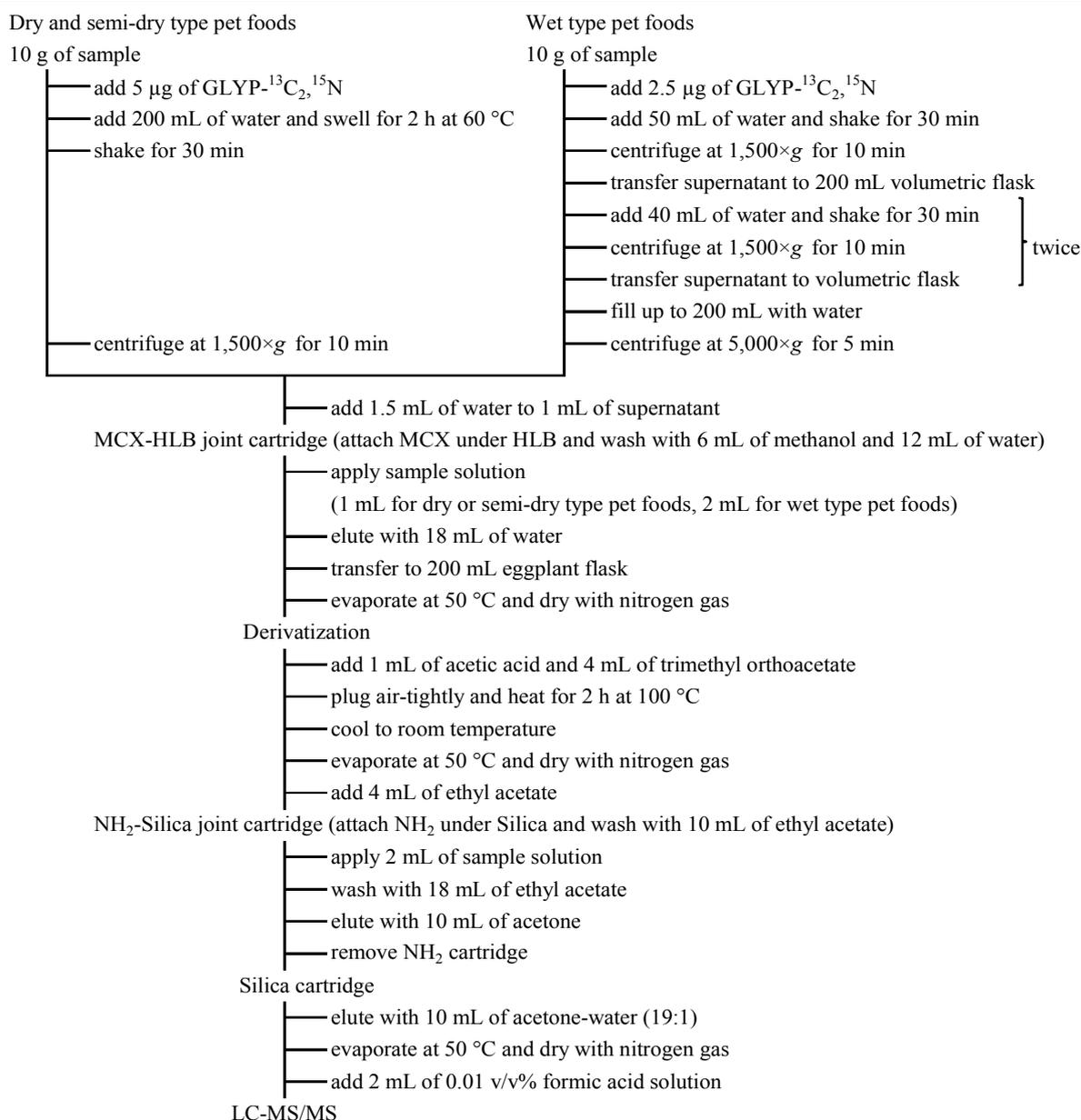
7) 計 算

得られた選択反応検出クロマトグラムから GLYP 誘導体, GLUF 誘導体, AMPA 誘導体, MPPA 誘導体及び GLYP-¹³C₂, ¹⁵N 誘導体のピーク面積を求めて検量線を作成し, 試料中の GLYP 量, GLUF 量, AMPA 量, MPPA 量及び試料溶液中の GLYP-¹³C₂, ¹⁵N 誘導体濃度を算出した.

更に下式により, GLYP-¹³C₂, ¹⁵N の回収率で補正した試料中の GLYP 量を求めた.

$$\text{試料中の GLYP 量の補正值} = \text{試料中の GLYP 量} \times 2.5 \div \text{試料溶液中の GLYP-}^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N 濃度 (ng/mL)}$$

定量法の概要を Scheme 1 に示した.



Scheme 1 Analytical procedure for GLYP, GLUF and their metabolites in pet foods

3 結果及び考察

3.1 LC-MS/MS 測定条件の検討

食品分析センター法の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であるが、試料溶液には夾雑成分が多く含まれていた (後述) ことから、念のため、測定対象物質の溶出後にグラジエント溶出でカラムを洗浄することとした。

また、質量分析条件については、コロン電圧及びコリジョンエネルギーを当試験室で使用した機種に最適化し、更に、確認イオンの一部を変更した。

3.2 食品分析センター法の適用

予備的に幼猫用ドライ製品に GLYP, GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 1 mg/kg 相当量を添加した試料を用い, 食品分析センター法に従って 3 点併行分析を行った. その結果, Table 3 のとおり, GLYP の回収率が低く, またばらつきも大きかった.

Table 3 Recovery test conducted by JFRL method

Analyte	Timing of spike	One night before analysis		Just before analysis	
	Spike level	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}
	(mg/kg)	(%)	(%)	(%)	(%)
GLUF	1	99.7	2.3	105	7.3
MPPA	1	89.0	6.7	90.6	8.0
GLYP	1	44.2	15	52.6	28

a) Mean ($n = 3$)

b) Relative standard deviations repeatability

この原因を確認するため, 同試料について, 前処理の各段階 (下記 i)~iii)) で試料溶液を 1/10 に希釈した場合の GLYP の定量値を食品分析センター法により得られた定量値 (100 %とする) と比較した. その結果は以下のとおりであり, 共存成分の影響により LC-MS/MS 測定時のイオン化阻害及び誘導体化の効率低下が起こっていることが示唆された.

- i) アミノプロピルシリル化シリカゲル/シリカゲル連結カラム処理後, LC-MS/MS による測定の前に試料溶液を 10 倍希釈 … 116 %
- ii) 誘導体化後, アミノプロピルシリル化シリカゲル/シリカゲル連結カラム処理の前に試料溶液を 10 倍希釈し, 以降の処理 … 121 %
- iii) 抽出後, 誘導体化の前に試料溶液を 10 倍希釈し, 以降の処理 … 150 %

3.3 誘導体化前のカラム精製の検討

GLYP 等はイオン解離性の農薬であるため, 飼料分析基準収載法では誘導体化の前に強塩基性陰イオン交換樹脂カラムによる精製を行っている. 食品分析センター法は, 当該操作を省略したことが利点の 1 つであるが, 共存物質の影響と思われる回収率の低下を抑制するため, カラム精製の導入を検討した.

飼料分析基準収載法で規定されている強塩基性陰イオン交換樹脂ムロマック 1×2 Cl⁻型 (ムロマチテクノス製) は, ムロマチテクノスの現行カタログに記載されていないこと及び感度の高い LC-MS/MS により測定するため試料供試量は少量でよいことから, ミニカラムを用いることとした.

予備的に陰イオン交換体ミニカラム (Varian (現 Agilent Technologies) 製 Mega Bond Elut SAX (1 g, 6 mL)) による吸着, 溶出を検討したが, 最適な条件の確立が困難であったため, 逆相モード及び陽イオン交換モードによる試料溶液の精製⁶⁾を試みた.

成犬用ドライ製品に GLYP 等として各 10 mg/kg 相当量を添加した試料 10 g に水 200 mL を加え, 30 分間振り混ぜて抽出した後, 上澄み液を水で正確に 10 倍希釈して試料溶液とした.

2 種類の逆相ミニカラム (Waters 製 Sep-Pak Plus C₁₈ (充てん剤量 360 mg) 及び Waters 製

Oasis HLB (充てん剤量 500 mg) の下にそれぞれ陽イオン交換体ミニカラム (Waters 製 Oasis Plus MCX (充てん剤量 225 mg)) を連結し、メタノール 5 mL 及び水 10 mL で順次洗浄した。

50 mL のなす形フラスコをそれぞれのカラムの下に置き、試料溶液 2 mL ずつを各カラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下して GLYP 等を流出させた。水 10 mL を各カラムに加え、同様に流出させた。

以下、2.4 の 3) の誘導体化以降の操作を行い、LC-MS/MS による測定に供した。

その結果は Table 4 のとおりであり、両性化合物である GLYP がシリカゲルベースの Sep-Pak 充てん剤に保持される可能性が認められ、ポリマー系の Oasis HLB の使用が適していると考えられた。

食品分析センター法による試料溶液及び Oasis HLB/Oasis Plus MCX 連結カラムにより精製した試料溶液のトータルイオンクロマトグラム (TIC) の例は Fig. 2 のとおりであり、当該連結カラムにより GLYP 誘導体の保持時間に現れる夾雑成分が除去され、イオン化阻害の影響が軽減されることが期待された。

なお、当該連結カラムからの GLYP 等の流出画分を確認するため、犬用ドライ製品及び猫用ドライ製品各 1 種を 2.4 の 1) の i) に従って処理し、2) のカラム処理 I において試料溶液 1 mL に GLYP, GLUF 及び MPPA として各 200 µg 相当量を加え、その後の流出液を分画して 3) の誘導体化以降の処理を行った。その結果は Table 5 のとおりであり、水 6 mL で測定対象成分のほとんどが流出していたが、念のため水 18 mL で流出させることとした。

しかし、同様の添加回収試験において、GLYP の回収率が 40 % 台となる試料 (幼犬用ドライ製品) が認められた。夾雑成分の影響は低減していると思われることから、抽出が不十分である可能性が考えられた。

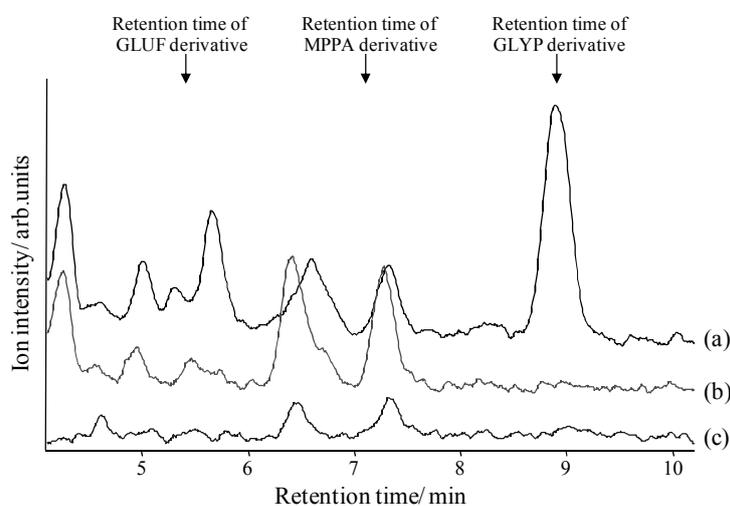
Table 4 Recovery test with two types of reverse phase - cation exchange joint column

Analyte	Reverse phase mini-column Spiked level (mg/kg)	Sep-Pak Plus C ₁₈ (360 mg)	Oasis HLB (500 mg)
		Recovery ^{a)} (%)	Recovery ^{a)} (%)
GLUF	10	92.1	98.0
MPPA	10	94.0	99.2
GLYP	10	49.0	79.1

a) $n = 1$

Table 5 Fractioning test of the effluent from Oasis HLB - Oasis MCX joint column

Pet food types	Fraction	Sample solution		
		+ 0 ~ 6 mL	6 ~ 12 mL	12 ~ 18 mL
	Analyte	Recovery ^{a)} (%)		
Dry type for dogs	GLUF	109	0.49	0.10
	MPPA	86.6	0.24	0.07
	GLYP	97.2	0.07	ND
Dry type for cats	GLUF	98.3	0.42	0.11
	MPPA	87.4	0.32	0.22
	GLYP	109	0.08	0.05

a) Mean ($n = 2$)Fig. 2 Total ion chromatograms (Scanned range: m/z 50 ~ 500)
(Baselines were shifted to distinguish them easily.)

- (a) Sample solution of dry type pet food for kitten prepared by JFRL method
 (b) Sample solution of dry type pet food for kitten prepared by JFRL method added purification with Oasis HLB - Oasis Plus MCX joint column
 (c) Standard solution

3.4 内標準物質の使用による回収率の補正

犬用ドライ製品の一部で、GLYPが低回収となる試料があり、抽出不十分の可能性が示唆されたことから、安定同位体元素で標識したGLYP- $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N を内標準物質として用い、回収率を補正することを検討した。

GLYP- $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N 標準品は5 mgで\$ 2,120と非常に高価であり、毎回の分析で多量に用いられないことから、天然同位体組成のGLYP (Native GLYP)等の標準液に対して1/10濃度の標準液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を誘導体化に供することとした。

通常の内標準法では、各検量線用標準液に一定濃度の内標準物質が含まれるように調製するため、Native GLYP及びGLYP- $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N をそれぞれ誘導体化させることとなるが、そのようにす

ると、Native GLYP 及び GLYP- $^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}$ を 1 つのなす形フラスコ内で誘導体化した場合に比べて GLYP- $^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}$ 誘導体のピーク強度が 5 ~ 10 % 低下した。微量の GLYP- $^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}$ がガラス製のなす形フラスコの器壁等に吸着された可能性が考えられ、分析値が過大評価されることから、GLYP- $^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}$ の誘導体化は、10 倍量の Native GLYP 等の存在下で行うこととし、GLYP- $^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}$ 単独の検量線を作成して試料溶液中の GLYP- $^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}$ 濃度を求め、試料中の Native GLYP 量を GLYP- $^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}$ の回収率で割って補正することとした。

3.5 検量線

2.2 の 5) に従って調製した GLYP, AMPA, GLUF 及び MPPA として各 1.0~100 ng/mL 相当量並びに GLYP- $^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}$ として 0.10~10 ng/mL 相当量の標準液各 5 μL を LC-MS/MS 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。得られた検量線の一例は、Fig. 3 の A から E までのとおりであり、GLYP, AMPA, GLUF 及び MPPA では各 1~100 $\mu\text{g/mL}$ 相当量（注入量として 5~500 ng 相当量）の範囲、GLYP- $^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}$ では 0.50~10 ng/mL 相当量（注入量として 2.5~50 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。ピーク高さを用いても同等の直線性が得られた。

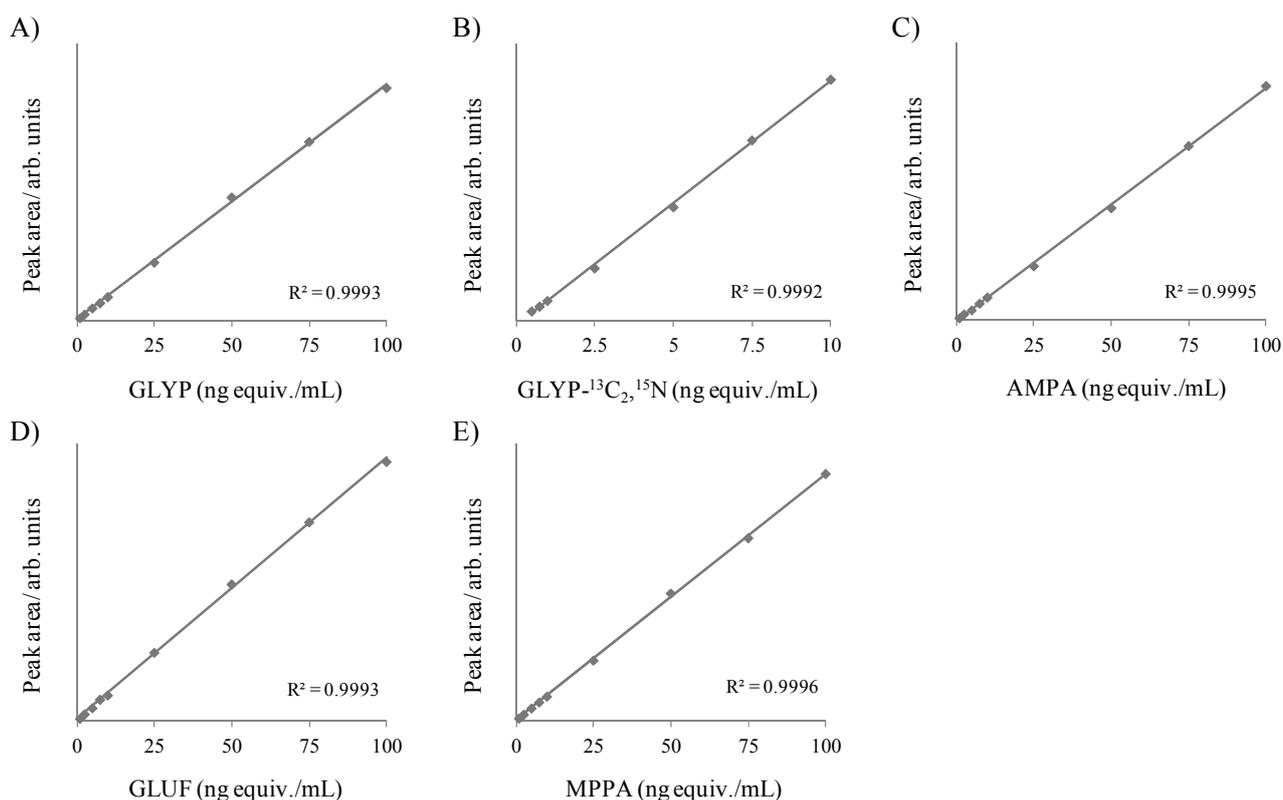


Fig. 3 Calibration curves of A) GLYP, B) GLYP- $^{13}\text{C}_2,^{15}\text{N}$, C) AMPA, D) GLUF and E) MPPA by their derivative peak areas in selected reaction monitoring chromatograms

3.6 抽出条件の検討

(1) 飼料分析基準収載法による抽出

犬用ドライ製品に GLYP, AMPA, GLUF 及び MPPA として各 1 mg/kg 相当量を添加後一夜静置した試料を用い、飼料分析基準収載法による抽出（水 200 mL を加えた後 30 分間振とう）

食品分析センター法と同じ。)を行い、その後は本法に従って添加回収試験 ($n = 5$) を実施した。

その結果は Table 6 のとおりであり、内標準物質の使用により一定の補正効果が認められたが十分ではなく、一夜静置の間に GLYP が試料に結合する等して抽出されにくくなっており、抽出法の改良を要すると推測された。

なお、AMPA は GLYP と同様に回収率が低下した。

Table 6 Recovery test of GLYP in dry type pet foods for dogs
without swelling of samples with water before extraction

Compounds		GLYP (corrected)		GLYP- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N		GLYP (raw data)	
Spiked level (mg/kg)	Replicate	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{c)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery (%)	RSD _r ^{b)} (%)
1	5	67.6	5.5	48.8	25	33.2	28

Compounds		AMPA		GLUF		MPPA	
Spiked level (mg/kg)	Replicate	Recovery (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery (%)	RSD _r ^{b)} (%)
1	5	43.3	32	96.2	11	89.0	8.0

a) Recovery correction was applied by dividing raw data by each recovery of GLYP-¹³C₂, ¹⁵N.

b) Relative standard deviations of repeatability

c) 1 µg of GLYP-¹³C₂, ¹⁵N was added to each 10 g-sample.

(2) 加熱条件等の検討

環境省が定める底質中の GLYP の分析法⁷⁾では、GLYP が底質と強固に結合していることから 80 °C で 30 分間超音波処理した後振とう抽出することとなっている。また、食品分析においても、大豆等の高たん白質の試料では、2 時間膨潤させてから抽出を行っている試験所もあるとの情報を得ていた。このため、抽出温度の検討及び膨潤と超音波処理との比較を行った。

犬用ドライ製品に GLYP 及び GLUF として 1 mg/kg 相当量を添加した後一夜静置した試料について、それぞれ 40 °C、60 °C 及び 80 °C で 2 時間膨潤させた後 30 分間振とう抽出し、その後本法に従って定量 ($n = 1$) を行ったところ、GLYP の回収率は、それぞれ 63 %、75 % 及び 79 % であった。なお、同時に添加した GLUF の回収率はそれぞれ 92 %、95 % 及び 106 % であった。一方、同試料について 80 °C の水を入れた超音波洗浄装置 (温度調節機能なし) で 30 分間超音波処理した後同様に定量 ($n = 2$) した場合、GLYP の回収率は 71 %、GLUF の回収率は 43 % に低下した。温度が高い方が抽出効率は高まる一方、試料の変性等により回収率の低下が起こった可能性が示唆された。

このことを確認するため、畜産用飼料 (とうもろこし及び幼すう育成用配合飼料) を用いて、80 °C で 1~2 時間膨潤させた後同様に定量したところ、GLYP-¹³C₂, ¹⁵N の回収率がとうもろこしで 11 %、幼すう育成用配合飼料で 47 % と大幅に低下した。70 °C でも同様に回収率の低下が見られた。原因は特定できないが、試料中のでんぷんが糊化し、測定対象成分の抽出を阻害しているのではないかと推察された。

そのため、加熱温度は 60 °C に抑えることとした。また、畜産用配合飼料を用いた予備検討

では、2 時間膨潤させた場合と 30 分間超音波処理した場合とでブランク値に相違がなかったことから、より多検体処理に適し、温度調節が確実な恒温乾燥機内で 2 時間静置して膨潤させてから振とう抽出する方法を採用した。

本法の適用性を確認するため、5 種類の犬用ドライ製品を用い、添加回収試験 ($n = 1$) を実施した。

その結果は Table 7 のとおりであり、いずれの試料においても問題のない回収率が得られた。他の 4 検体より回収率が比較的 low かった 1 検体 (試料 No. E) は、粗たん白質及び粗脂肪の高い幼犬用総合栄養食であった。参考として加温、膨潤なしで抽出した場合の回収率を併記した。

Table 7 Recovery of GLYP in several dry type pet food for dogs by two extraction methods

Sample	Extraction method	Spiked level (mg/kg)	Swelled at 60 °C for 2 h before shaking		Without swelling before shaking		Nutrients (as labelled)		
			GLYP recovery (%)	GLYP- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N recovery (%)	GLYP recovery (%)	GLYP- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N recovery (%)	Moisture less than (%)	Crude protein more than (%)	Crude fat more than (%)
A		2	86.8	61.7	67.0	88.4	10	20.0	8.0-9.75
B		2	103	72.2	92.2	78.4	10.5	23.5	8.5
C		2	102	72.6	106	57.7	9.5	22.0	12.0
D		2	95.6	74.9	58.0	82.0	10	21.5	13.0
E		2	80.2	56.2	67.9	62.7	10	28.0	18.0

(3) ウェット製品の抽出

水分含有量が高いウェット製品では、抽出液を定容する必要があり、ろ過又は遠心分離を行う必要がある。しかし、愛玩動物用飼料の水抽出液は浮遊する微粒子が多く、吸引ろ過等は不可能であったため、遠心沈殿管内で抽出を行い、遠心分離後上澄み液を全量フラスコに移す操作を繰り返すこととした。ただし、この方法でも試料溶液は澄明にならないため、カラム処理に供する前に遠心分離を追加した。

100 mL の遠心沈殿管内で抽出を行う場合、2 種類のウェット製品について試料採取量 10 g と 20 g とを比較 ($n = 1$) した結果、10 g の方が GLYP-¹³C₂, ¹⁵N の回収率が 10 % 以上高く、また、操作の支障となる抽出液表面への油膜の形成が少なかった。このため、試料採取量は 10 g とした。ウェット製品では、ドライ製品よりも定量限界を下げる必要があるため、カラム処理 I での試料溶液供試量をドライ製品の場合の 2 倍とした。

3.7 妨害物質の検討

食品分析センター法から抽出、精製方法を変更したため、改めてクロマトグラム上で定量を妨害するピークの有無について確認した。

市販の愛玩動物用飼料 (犬用ドライ製品 6 種、猫用ドライ製品 2 種、犬用セミドライ製品 2 種、犬用ウェット製品 2 種、猫用ウェット製品 2 種)、本法に従って分析を行った結果、GLYP 等の定量を妨害するピークは認められず、本法は愛玩動物用飼料等の検査法⁸⁾に係る妥当性確認における選択性の規準を満たしていた。

なお、得られた選択反応検出クロマトグラムの一例を Fig. 4 A) に示した。

3.8 添加回収試験

犬用ドライ製品、猫用ドライ製品及び犬用セミドライ製品に GLYP, AMPA, GLUF 及び MPPA として各 1 及び 15 mg/kg 相当量を添加した試料、犬用ウェット製品 (水分表示量 86 % 以

下)に GLYP, AMPA, GLUF 及び MPPA として各 0.5 及び 2.5 mg/kg 相当量 (水分 10 %に換算して 3.1 及び 16 mg/kg) 並びに猫用ウェット製品 (水分表示量 80 %以下) に GLYP, AMPA, GLUF 及び MPPA として各 0.5 及び 3.5 mg/kg 相当量 (水分 10 %に換算して 2.2 及び 16 mg/kg) を添加した試料を用いて 5 点繰返しによる添加回収試験を実施した。

試験結果及び愛玩動物用飼料等の検査法⁸⁾に係る妥当性確認における回収率及び併行精度の規準との比較した評価の概要は以下のとおりである。

なお, 得られた選択反応検出クロマトグラムの一例を Fig. 4 B)に示した。

1) GLYP GLYP の分析結果は Table 8 のとおりであり, 全ての試料, 添加区で回収率及び精度は規準の範囲内であった。

また, GLYP-¹³C₂, ¹⁵N の回収率は, 全ての試料, 添加区で 40 %を超えていた。

Table 8 Results of recovery test (GLYP)

Pet food types	Dry type for dogs			Dry type for cats		
Spiked level (mg/kg)	Recovery ^{a)} (%)	σ ^{b)} (mg/kg)	RSD _r ^{c)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	σ ^{b)} (mg/kg)	RSD _r ^{c)} (%)
1.0	101	0.064	6.4	102	0.030	2.9
15	95.3	0.75	5.3	101	0.32	2.1
GLYP- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N ^{d)}	70.6		11	91.7		4.6
Pet food types	Semi-dry type for dogs					
Spiked level (mg/kg)	Recovery ^{a)} (%)	σ ^{b)} (mg/kg)	RSD _r ^{c)} (%)			
1.0	101	0.082	8.1			
15	101	0.43	2.9			
GLYP- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N ^{d)}	98.1		4.6			
Pet food types	Wet type for dogs			Wet type for cats		
Spiked level (mg/kg)	Recovery ^{a)} (%)	σ ^{b)} (mg/kg)	RSD _r ^{c)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	σ ^{b)} (mg/kg)	RSD _r ^{c)} (%)
0.50	88.2	0.032	7.3	90.8	0.018	3.9
2.5	89.8	0.20	8.9	---	---	---
3.5	---	---	---	98.3	0.089	2.6
GLYP- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N ^{d)}	69.8		12	78.2		10

a) Mean ($n = 5$)

b) Standard deviations

c) Relative standard deviations of repeatability

d) $n = 10$. 0.5 μg of GLYP-¹³C₂, ¹⁵N was added to each 10 g-dry or -semi-dry sample.
0.25 μg of GLYP-¹³C₂, ¹⁵N was added to each 10 g-wet sample.

2) AMPA AMPA の分析結果は Table 9 のとおりであり, 犬用ドライ製品, 犬用ウェット製品及び猫用ウェット製品の低濃度添加区で回収率の目標値 (80 ~ 110 %) を下回った。また, 全体的に併行精度の RSD が他の測定対象物質より高めであり, 犬用セミドライ製品の高濃度添加区及び犬用ウェット製品の高濃度添加区で RSD の規準 (Horwitz 修正式による 15 mg/kg での PRSD = 10.6 %, 2.5 mg/kg での PRSD = 13.9 %) を超えていた。

AMPA の分析値は, 一部の試料で低回収となるなど GLYP と同様の挙動を示したため, 本

法を全ての試料に適用するためには、安定同位体で標識した内標準物質等を用いて分析値を補正する必要があると考えられた。

Table 9 Results of recovery test (AMPA)

Pet food types	Dry type for dogs			Dry type for cats		
Spiked level (mg/kg)	Recovery ^{a)} (%)	σ ^{b)} (mg/kg)	RSD _r ^{c)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	σ ^{b)} (mg/kg)	RSD _r ^{c)} (%)
1.0	58.3	0.072	12	84.2	0.13	15
15	78.8	0.87	7.4	97.8	1.2	8.4
Pet food types	Semi-dry type for dogs					
Spiked level (mg/kg)	Recovery ^{a)} (%)	σ ^{b)} (mg/kg)	RSD _r ^{c)} (%)			
1.0	95.8	0.074	7.7			
15	110	1.8	11			
Pet food types	Wet type for dogs			Wet type for cats		
Spiked level (mg/kg)	Recovery ^{a)} (%)	σ ^{b)} (mg/kg)	RSD _r ^{c)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	σ ^{b)} (mg/kg)	RSD _r ^{c)} (%)
0.50	72.9	0.039	11	56.1	0.040	14
2.5	70.8	0.381	22	---	---	---
3.5	---	---	---	83.9	0.17	5.9

a) Mean ($n = 5$)

b) Standard deviations

c) Relative standard deviations of repeatability

3) GLUF GLUF の分析結果は Table 10 のとおりであり、全ての試料、添加区で回収率及び精度は規準の範囲内であった。

Table 10 Results of recovery test (GLUF)

Pet food types	Dry type for dogs			Dry type for cats		
	Recovery ^{a)}	σ ^{b)}	RSD _r ^{c)}	Recovery ^{a)}	σ ^{b)}	RSD _r ^{c)}
Spiked level (mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)	(%)	(mg/kg)	(%)
1.0	96.5	0.053	5.5	88.3	0.020	2.3
15	96.4	1.5	10	92.2	0.33	2.4

Pet food types	Semi-dry type for dogs		
	Recovery ^{a)}	σ ^{b)}	RSD _r ^{c)}
Spiked level (mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)
1.0	102	0.076	7.5
15	100	0.36	2.4

Pet food types	Wet type for dogs			Wet type for cats		
	Recovery ^{a)}	σ ^{b)}	RSD _r ^{c)}	Recovery ^{a)}	σ ^{b)}	RSD _r ^{c)}
Spiked level (mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)	(%)	(mg/kg)	(%)
0.50	102	0.030	5.9	101	0.023	4.5
2.5	102	0.14	5.5	---	---	---
3.5	---	---	---	106	0.13	3.6

- a) Mean ($n = 5$)
b) Standard deviations
c) Relative standard deviations of repeatability

- 4) MPPA MPPA の分析結果は Table 11 のとおりであり、全ての試料、添加区で回収率及び精度は規準の範囲内であった。

Table 11 Results of recovery test (MPPA)

Pet food types	Dry type for dogs			Dry type for cats		
	Recovery ^{a)}	σ ^{b)}	RSD _r ^{c)}	Recovery ^{a)}	σ ^{b)}	RSD _r ^{c)}
Spiked level (mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)	(%)	(mg/kg)	(%)
1.0	84.0	0.061	7.3	84.8	0.049	5.8
15	95.4	0.27	1.9	88.6	0.15	1.1

Pet food types	Semi-dry type for dogs		
	Recovery ^{a)}	σ ^{b)}	RSD _r ^{c)}
Spiked level (mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)
1.0	98.2	0.091	9.3
15	91.8	0.80	5.8

Pet food types	Wet type for dogs			Wet type for cats		
	Recovery ^{a)}	σ ^{b)}	RSD _r ^{c)}	Recovery ^{a)}	σ ^{b)}	RSD _r ^{c)}
Spiked level (mg/kg)	(%)	(mg/kg)	(%)	(%)	(mg/kg)	(%)
0.50	81.9	0.015	3.7	85.0	0.036	8.5
2.5	88.1	0.25	11	---	---	---
3.5	---	---	---	91.6	0.13	3.9

- a) Mean ($n = 5$)
b) Standard deviations
c) Relative standard deviations of repeatability

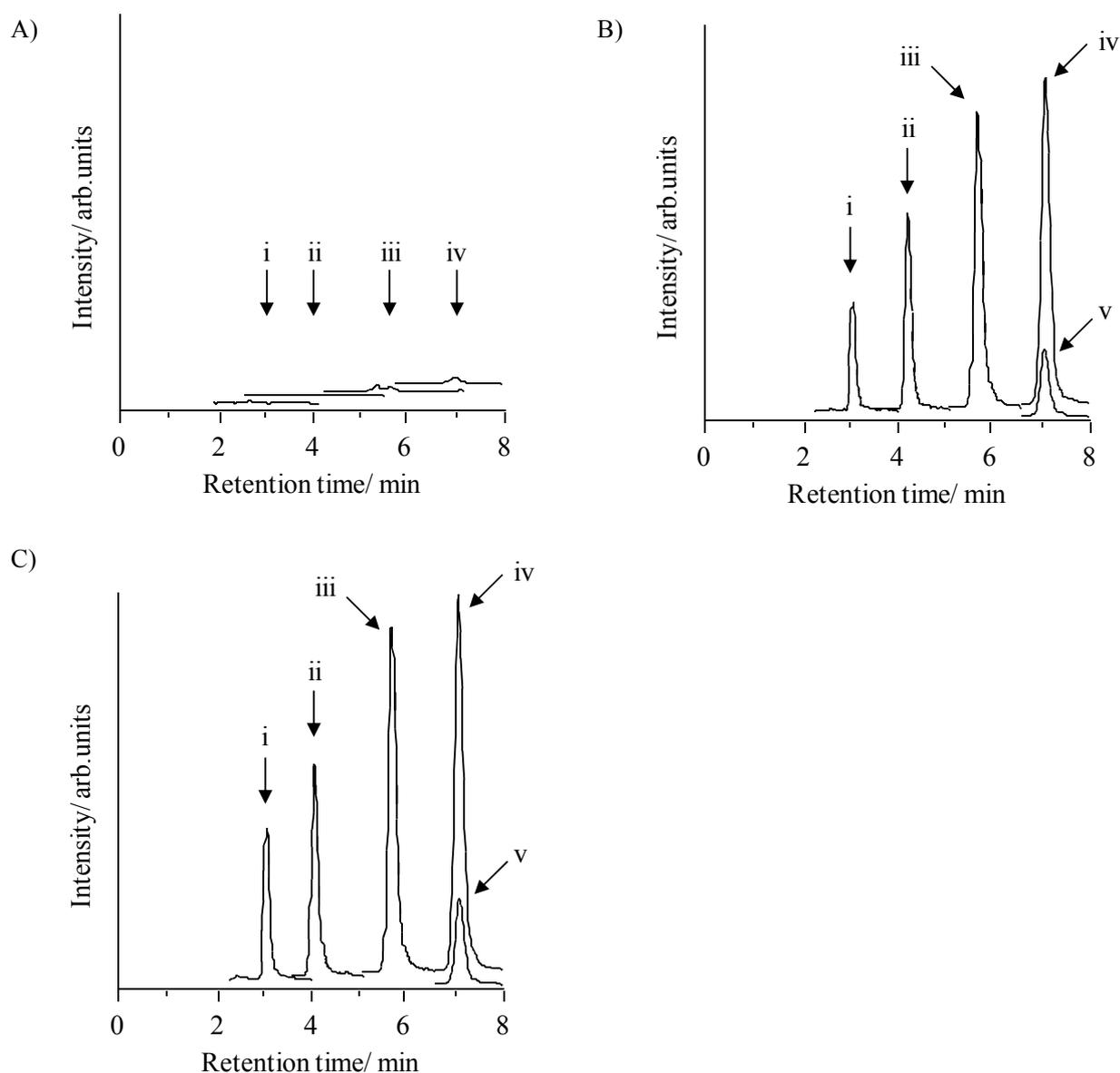


Fig. 4 Selected reaction monitoring chromatograms

(Arrows indicate peaks or retention times of i) AMPA derivative, ii) GLUF derivative, iii) MPPA derivative, iv) GLYP derivative and v) GLYP- $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N derivative, respectively.

Three graphs are drawn in the same scale.)

- A) Blank sample of dry type petfood for dogs.
B) Spiked dry type petfood for dogs (Spiked levels were 1 mg/kg for AMPA, GLUF, MPPA and GLYP, respectively.)
C) Standard solution (5 ng equivalent per milliliter for GLYP, AMPA, GLUF and MPPA, 2.5 ng equivalent per milliliter for GLYP- $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N .)

3.9 定量限界（下限）及び検出限界

本法の測定対象成分のうち愛玩動物用飼料において残留基準値が設定されているのは GLYP のみであり、その値は 15 mg/kg である。従って、目標とする定量限界（下限）及び検出限界は、

ドライ製品及びセミドライ製品でそれぞれ 3 mg/kg 以下及び 1.5 mg/kg 以下、ウェット製品（水分 90 % の場合）でそれぞれ 1.2 mg/kg 以下及び 0.8 mg/kg 以下である。

当試験室で使用した LC-MS/MS で十分な SN 比が得られる濃度を推定し、目標定量限界をドライ製品及びセミドライ製品で 1 mg/kg、ウェット製品で 0.5 mg/kg と設定した。当該濃度における添加回収試験結果は前項の Table 8 から 11 までに記載のとおりであり、GLYP、GLUF 及び MPPA について、いずれの試料においてもピークの SN 比が 10 を超え、かつ、標準偏差 (σ) の 10 倍が当該目標濃度を超えていなかった。

従って、本法の定量限界（下限）は、GLYP、GLUF 及び MPPA について、ドライ製品及びセミドライ製品で 1 mg/kg、ウェット製品で 0.5 mg/kg とした。また、検出限界は、先の標準偏差に自由度 4、片側有意水準 0.05 の Student の *t*-値の 2 倍 (= 4.26) を乗じた値を参考として、すなわち定量限界の 4.26/10 とし、それぞれ 0.4 mg/kg 及び 0.2 mg/kg とした。

3.10 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、市販の犬用ドライ製品、猫用ドライ製品、犬用セミドライ製品、犬用ウェット製品及び猫用ウェット製品に GLYP、AMPA、GLUF 及び MPPA を添加した共通試料を用い、10 試験室で共同試験を実施した。試験の概要は以下のとおりである。

i) 分析試料の調製 ドライ製品及びセミドライ製品については、遠心粉碎機で粉碎した無添加試料を送付し、各試験室において一定量を量り取った後、濃度非通知の添加用標準液（水溶液、各 1 mL）を分析開始の前日に添加して調製した。ウェット製品については、フードプロセッサでペースト状にした分析用試料を送付し、各試験室において一定量を量り取った後、濃度非通知の添加用標準液（水溶液、各 0.5 mL）を分析開始の 30 分前に添加して調製した。5 種類の試料について、非明示の 2 点反復で試験を実施した。それぞれの添加濃度は Table 12 のとおりである。

Table 12 Spiked levels of GLYP, AMPA, GLUF and MPPA in the collaborative study expressed relative to original matter

Petfood types	Moisture less than (%)	GLYP	AMPA	GLUF	MPPA
		spiked level (mg/kg)	spiked level (mg/kg)	spiked level (mg/kg)	spiked level (mg/kg)
Dry type for dogs	11	2.0	2.0	5.0	5.0
Dry type for cats	12	15	15	2.0	2.0
Semi-dry type for dogs	30	7.0	7.0	2.0	2.0
Wet type for dogs	86	1.0	1.0	2.5	2.5
Wet type for cats	80	3.5	3.5	1.0	1.0

ii) 参加試験室 財団法人日本食品分析センター 多摩研究所，全国酪農業協同組合連合会 分析センター，協同飼料株式会社 研究所，日本ハム株式会社 中央研究所，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，同福岡センター及び同神戸センター（計 10 試験室）。

iii) 試験実施期間 平成 23 年 9 月 12 日から平成 23 年 10 月 14 日まで

iv) 結果の報告 分析結果は、試料原物中濃度 (mg/kg) として有効数字 3 けたで報告させた。また、GLYP については、全ての試料について GLYP-¹³C₂, ¹⁵N の回収率で補正後の値を報告さ

せるとともに、最終試料溶液中の GLYP-¹³C₂,¹⁵N 誘導体の濃度 (ng/mL) についても参考のため報告させた。

- v) 結果の解析 IUPAC のプロトコール⁹⁾に従い、Cochran 検定、はずれ値 1 個の Grubbs 検定及びはずれ値 2 個の Grubbs 検定を行い、はずれ値の棄却等を行った上で平均回収率、繰返し精度の相対標準偏差 (RSD_f) 及び室間再現精度の相対標準偏差 (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。

結果の概要は以下のとおりである。

- 1) GLYP GLYP の各分析結果及び統計解析結果は Table 13 のとおりであり、犬用ドライ製品、猫用ドライ製品、犬用セミドライ製品、犬用ウェット製品及び猫用ウェット製品について、平均回収率 (%) はそれぞれ 95.5, 90.6, 94.9, 99.7 及び 99.8, RSD_f (%) はそれぞれ 5.4, 7.0, 5.3, 5.8 及び 4.3, RSD_R (%) はそれぞれ 8.7, 7.0, 6.9, 8.4 及び 5.5, HorRat はそれぞれ 0.60, 0.65, 0.58, 0.53 及び 0.42 であった。いずれも良好な結果であった。

なお、参考までに GLYP-¹³C₂,¹⁵N についても統計解析を行った。その結果 (表省略) は、平均回収率 (%) はそれぞれ 70.9, 84.8, 79.5, 71.6 及び 72.6, RSD_f (%) はそれぞれ 10, 11, 13, 12 及び 18, RSD_R (%) はそれぞれ 21, 17, 14, 31 及び 20, HorRat はそれぞれ 1.1, 0.91, 0.78, 1.5 及び 0.99 であった。

- 2) AMPA AMPA は、測定不能であった 1 試験室を除く 9 試験室から報告があった。各分析結果及び統計解析結果は Table 14 のとおりであり、犬用ドライ製品、猫用ドライ製品、犬用セミドライ製品、犬用ウェット製品及び猫用ウェット製品について、平均回収率 (%) はそれぞれ 73.4, 92.1, 89.9, 86.0 及び 86.1, RSD_f (%) はそれぞれ 11, 20, 12, 14 及び 18, RSD_R (%) はそれぞれ 22, 22, 21, 24 及び 22, HorRat はそれぞれ 1.5, 2.0, 1.7, 1.5 及び 1.6 であった。当試験室での添加回収試験結果と同様、犬用ドライ製品で回収率が低かった。また、繰返し精度及び室間再現精度が他の成分よりも劣っていたものの、室間再現精度の規準は満たしていた。

- 3) GLUF GLUF の各分析結果及び統計解析結果は Table 15 のとおりであり、犬用ドライ製品、猫用ドライ製品、犬用セミドライ製品、犬用ウェット製品及び猫用ウェット製品について、平均回収率 (%) はそれぞれ 98.6, 104, 112, 93.2 及び 101, RSD_f (%) はそれぞれ 11, 10, 6.4, 7.5 及び 15, RSD_R (%) はそれぞれ 15, 13, 9.4, 23 及び 21, HorRat はそれぞれ 1.2, 0.94, 0.66, 1.6 及び 1.3 であった。回収率及び繰返し精度の値が当試験室での検討結果よりやや大きい試料があったが、室間再現精度は全て良好であった。

- 4) MPPA MPPA は、測定不能であった 1 試験室を除く 9 試験室から報告があった。各分析結果及び統計解析結果は Table 16 のとおりであり、犬用ドライ製品、猫用ドライ製品、犬用セミドライ製品、犬用ウェット製品及び猫用ウェット製品について、平均回収率 (%) はそれぞれ 90.3, 97.2, 98.3, 94.1 及び 96.4, RSD_f (%) はそれぞれ 7.8, 6.2, 6.9, 7.2 及び 6.2, RSD_R (%) はそれぞれ 11, 8.6, 6.9, 9.4 及び 9.0, HorRat はそれぞれ 0.83, 0.59, 0.48, 0.67 及び 0.56 であった。いずれも良好な結果であった。

Table 13 Results of collaborative study (GLYP)

Laboratory No.	Dry type pet food for dogs (mg/kg)		Dry type pet food for cats (mg/kg)		Semi-dry type pet food for dogs (mg/kg)		Wet type pet food for dogs (mg/kg)		Wet type pet food for cats (mg/kg)	
	1.88	1.92	13.0	13.8	5.78	6.05	1.05	1.16	3.26	3.19
1	1.88	1.92	13.0	13.8	5.78	6.05	1.05	1.16	3.26	3.19
2	2.04	1.92	13.9	14.5	7.06	6.67	0.891	0.937	3.68	3.87
3	2.04	1.75	15.5	13.7	7.07	6.72	0.914	0.777	3.39	3.47
4	1.74	1.74	13.6	16.7	7.35	6.96	1.09	1.05	3.74	3.42
5	1.92	1.78	14.4	14.3	6.52	6.79	0.949	1.03	3.59	3.62
6	1.99	1.96	13.2	14.8	6.21	6.30	1.09	0.943	3.47	3.45
7	1.83	1.60	13.4	13.1	6.40	6.63	0.978	1.01	3.51	3.81
8	1.98	1.86	13.3	13.6	6.86	6.00	1.01	1.01	3.60	3.18
9	2.25	2.19	16.2 ^{b)}	18.4 ^{b)}	6.60	7.65	1.04	1.00	3.44	3.31
10	--- ^{a)}	1.89 ^{a)}	13.9	13.0	6.59	6.58	1.03	0.980	3.37	3.47
Mean value (mg/kg) ^{c)}	1.91		14.0		6.64		0.997		3.49	
Spiked level (mg/kg)	2.00		15.0		7.00		1.00		3.50	
Blank (mg/kg)	Tr.		0.4		Tr.		ND		ND	
Recovery (%)	95.5		90.6		94.9		99.7		99.8	
RSD _r ^{d)} (%)	5.4		7.0		5.3		5.8		4.3	
RSD _R ^{e)} (%)	8.7		7.0		6.9		8.4		5.5	
PRSD _R ^{f)} (%)	15		11		12		16		13	
HorRat	0.60		0.65		0.58		0.53		0.42	

a) Date excluded because of lack of counterpart in experimental disorder

b) Data excluded by single Grubbs test

c) Dry type for dogs: $n = 18$ (without laboratory No. 10); dry type for cats: $n = 18$ (without laboratory No. 9); others: $n = 20$

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 14 Results of collaborative study (AMPA)

Laboratory No.	Dry type pet food for dogs (mg/kg)		Dry type pet food for cats (mg/kg)		Semi-dry type pet food for dogs (mg/kg)		Wet type pet food for dogs (mg/kg)		Wet type pet food for cats (mg/kg)	
	---	a)	---	a)	---	a)	---	a)	---	a)
1	1.39	1.07	8.32	18.2	4.22	6.10	0.697	0.604	2.98	2.69
2	1.28	1.39	10.1	10.1	5.56	4.70	0.935	0.949	3.13	2.64
3	1.30	1.44	13.1	18.1	4.25	5.63	0.955	1.05	3.59 ^{b)}	3.36 ^{b)}
4	1.99 ^{b)}	2.07 ^{b)}	17.3	16.5	8.69	7.61	0.568	0.919	2.21	2.99
5	1.63	1.18	14.8	15.0	6.55	7.03	0.905	0.967	2.85	2.53
6	1.35	1.50	9.19	12.7	7.22	8.10	0.756	0.744	2.51	2.69
7	1.07	1.33	15.6	15.0	6.02	6.76	0.746	0.696	3.02	2.53
8	1.96 ^{b)}	1.93 ^{b)}	15.0	15.1	6.21	6.77	1.26	1.24	4.42 ^{b)}	4.03 ^{b)}
9	1.36	1.20	13.0	11.6	5.30	4.34	0.908	0.584	2.04	4.05
10	---	a)	---	a)	---	a)	---	a)	---	a)
Mean value (mg/kg) ^{c)}	1.47		13.8		6.30		0.860		3.01	
Spiked level (mg/kg)	2.00		15.0		7.00		1.00		3.50	
Blank (mg/kg)	ND		Tr.		ND		ND		Tr.	
Recovery (%)	73.4		92.1		89.9		86.0		86.1	
RSD _r ^{d)} (%)	11		20		12		14		18	
RSD _R ^{e)} (%)	22		22		21		24		22	
PRSD _R ^{f)} (%)	15		11		12		16		14	
HorRat	1.5		2.0		1.7		1.5		1.6	

a) Lack of data because of LC-MS/MS malfunctioning

b) To make valid number of laboratories not less than 8, paired Grubbs test was avoided. If these two laboratories were excluded by paired Grubbs test, recovery (%), RSD_r (%), RSD_R (%) and HorRat for dry type pet food for dogs would be 66.0, 14, 14 and 0.89, respectively, and for wet type pet food for cats, 79.3, 22, 22 and 1.6, respectively.

c) *n* = 18 (without laboratory No. 10)

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 15 Results of collaborative study (GLUF)

Laboratory No.	Dry type pet food		Semi-dry type pet food		Wet type pet food					
	for dogs (mg/kg)	for cats (mg/kg)	for dogs (mg/kg)	for dogs (mg/kg)	for dogs (mg/kg)	for cats (mg/kg)				
1	4.30	5.01	1.93	2.31	2.28	2.38	1.98	1.58	0.917	0.847
2	6.06	5.70	2.26	2.28	2.66	2.26	2.85	2.93	1.10	1.12
3	5.02	4.69	2.08	2.36	2.32	2.49	2.06	2.13	0.959	0.971
4	4.94	4.98	1.88	2.01	2.21	2.03	1.79	2.17	0.792	0.884
5	4.71	4.52	1.96	1.95	1.89	1.89	2.45	2.49	0.969	0.923
6	3.99	3.94	1.44	1.74	2.21	2.40	1.83	1.93	0.957	0.964
7	5.25	4.92	2.15	2.43	2.47	2.17	3.21	3.06	1.13	1.38
8	6.89	4.82	3.25 ^{b)}	3.23 ^{b)}	3.28 ^{b)}	3.49 ^{b)}	2.70	3.03	1.63	1.15
9	4.65	4.34	2.34	1.73	1.99	2.10	1.71	2.02	0.753	1.13
10	--- ^{a)}	4.72 ^{a)}	2.21	2.45	2.32	2.29	1.65	1.69	0.870	0.830
Mean value (mg/kg) ^{c)}		4.93		2.08		2.24		2.33		1.01
Spiked level (mg/kg)		5.00		2.00		2.00		2.50		1.00
Blank (mg/kg)		ND		ND		ND		ND		ND
Recovery (%)		98.6		104		112		93.2		101
RSD _r ^{d)} (%)		11		10		6.4		7.5		15
RSD _R ^{e)} (%)		15		13		9.4		23		21
PRSD _R ^{f)} (%)		13		14		14		14		16
HorRat		1.2		0.94		0.66		1.6		1.3

a) Date excluded because of lack of counterpart in experimental disorder

b) Data excluded by single Grubbs test

c) Dry type pet food for dogs: $n = 18$ (without laboratory No. 10); dry type pet food for cats and semi-dry type pet food for dogs: $n = 18$ (without laboratory No. 8); others: $n = 20$

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 16 Results of collaborative study (MPPA)

Laboratory No.	Dry type pet food for dogs (mg/kg)		Dry type pet food for cats (mg/kg)		Semi-dry type pet food for dogs (mg/kg)		Wet type pet food for dogs (mg/kg)		Wet type pet food for cats (mg/kg)	
	---	a)	---	a)	---	a)	---	a)	---	a)
1	4.58	4.53	1.86	2.00	1.93	1.93	2.26	2.17	0.908	0.959
2	4.99	4.77	2.01	1.91	2.11	1.74	2.03	2.11	1.03	1.08
3	4.59	4.76	2.02	2.05	1.98	2.02	2.37	2.38	0.985	0.914
4	5.28	4.76	2.09	1.86	2.19	1.91	2.21	2.29	0.923	1.03
5	4.70	4.56	1.99	1.90	1.96	1.96	2.52	2.44	0.965	0.929
6	3.40	4.27	1.62	1.76	1.86	2.15	2.78	2.42	1.10	1.13
7	3.84	4.13	1.59	1.92	2.01	1.97	2.59	2.38	0.936	0.907
8	4.63	3.84	2.21	2.09	1.93	1.97	2.39	2.17	0.970	0.830
9	5.12	4.50	1.97	2.13	1.79	1.96	2.13	2.21	0.807	0.945
10	---	a)	---	a)	---	a)	---	a)	---	a)
Mean value (mg/kg) ^{b)}	4.51		1.94		1.97		2.35		0.96	
Spiked level (mg/kg)	5.00		2.00		2.00		2.50		1.00	
Blank (mg/kg)	ND		ND		ND		ND		ND	
Recovery (%)	90.3		97.2		98.3		94.1		96.4	
RSD _r ^{c)} (%)	7.8		6.2		6.9		7.2		6.2	
RSD _R ^{d)} (%)	11		8.6		6.9		9.4		9.0	
PRSD _R ^{e)} (%)	13		14		14		14		16	
HorRat	0.83		0.59		0.48		0.67		0.56	

a) Lack of data because of LC-MS/MS malfunctioning

b) $n = 18$ (without laboratory No. 10)

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

参考のため、各試験室で用い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 17 に示した。

Table 17 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	LC-MS/MS	LC column (i.d. × length, particle size)
1	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)
2	Waters Quattro Premier XE	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
3	LC: Waters Alliance 2695 MS/MS: Micromass Quattro micro API	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	Waters ACQUITY TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
6	Waters ACQUITY TQD	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: Waters Alliance 2695 MS/MS: Waters Quattro micro	GL Science Inertsil ODS-3 (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
9	LC: Agilent Technologies 1100 MS/MS: Applied Biosystems API-2000	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
10	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

愛玩動物用飼料に残留するグリホサート等含リンアミノ酸系農薬及びその代謝物について、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（以下「本法」という。）を検討し、以下の結果を得た。

- 1) グリホサートは、犬用ドライ製品等で試料によって回収率が低下するため、内標準物質として安定同位体標識化合物を用いて分析値を補正する必要があった。また、抽出効率を高めるため、

振とう抽出の前に 60 °C で 2 時間試料を水で膨潤させる必要があった。

- 2) グリホサートの代謝物であるアミノメチルホスホン酸は、試料によってグリホサートと同様に回収率及び精度が十分でない場合があり、本法を適用するには内標準物質の使用が必要と考えられた。よって本法の分析対象化合物から除外した。
- 3) 本法により添加回収試験及び共同試験を実施した結果、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について、真度、併行精度、室間再現精度の規準を満たしており、当該 3 成分について本法の適用が可能であった。
- 4) 本法によるグリホサート、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定量限界（下限）及び検出限界は、ドライ製品及びセミドライ製品でそれぞれ試料原物中 1 mg/kg 及び 0.4 mg/kg、ウェット製品でそれぞれ試料原物中 0.5 mg/kg 及び 0.2 mg/kg であった。

謝 辞

共同試験に参加していただいた財団法人日本食品分析センター 多摩研究所、全国酪農業協同組合連合会 分析センター、協同飼料株式会社 研究所、日本ハム株式会社 中央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) 農林水産省令・環境省令：愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令，平成 21 年 4 月 28 日，農林水産省令・環境省令第 1 号 (2009).
- 2) 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).
- 3) 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).
- 4) JMPR: Pesticide residues in food - 2004, FAO Plant Production and Protection Paper, 178, 98-103 (2004).
- 5) European Food Safety Authority: Modification of the residue definition of glyphosate in genetically modified maize grain and soybeans, and in products of animal origin, EFSA Journal 2009; 7(9):1310 (2009).
- 6) 高橋 邦彦，堀江 正一，青羽 信次：HPLC による農産物中のグリホサート及びその代謝物アミノメチルホスホン酸の分析，食品衛生学雑誌，42(5)，304 (2001).
- 7) 環境省水環境部企画課：要調査項目等調査マニュアル（水質，底質，水生生物），平成 14 年 3 月.
- 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).