

技術レポート**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追加並びに大豆及び大豆油かすへの適用拡大～

齊木 雅一*, 廣井 利明*

Validation Study on Analyte Expansion of the Simultaneous Determination Method for Glyphosate, Glufosinate and its Metabolites in Feed by LC-MS/MS to Include *N*-acetylglyphosate, Soybean and Soybean Meal

Masakazu SAIKI* and Toshiaki HIROI*

(* Sapporo Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center)

We have made a validation study on the inclusion of *N*-acetylglyphosate in analyte compounds, and soybean and soybean meal in analyte samples for the simultaneous determination method of glyphosate (GLYP), glufosinate (GLUF), 3-(methyl phosphinico)propanoic acid (MPPA), *N*-acetylglyphosate and *N*-acetylglufosinate 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 corn and GLYP, GLUF, MPPA, *N*-acetylglyphosate and *N*-acetylglufosinate in soybean and soybean meal were 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 NH2 and Silica, Waters Co.; Milford, MA, USA), and injected into a LC-MS/MS to determine the concentration of these compounds. 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 corn. *N*-acetylglyphosate was intentionally added to corn at the levels of 0.04, 1 and 5 mg/kg. The resulting mean recoveries ranged from 96.0 % to 118 %. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was less than 7.1 %.

Recovery tests were also conducted on soybean and soybean meal. Soybean meal was added with 20 mg/kg of GLYP and *N*-acetylglyphosate, and 2 mg/kg of GLUF, MPPA and *N*-acetylglufosinate respectively. The resulting mean recoveries ranged from 98.0 % to 133 %. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was less than 7.1 %. Soybean was unmeasurable because it could not have been purified with column for cloudiness of its extract.

* 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

Key words: glyphosate; glufosinate; 3-(methyl phosphinico)propanoic acid; *N*-acetylgllyphosate; *N*-acetylglufosinate; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); corn; soybean; soybean meal

キーワード：グリホサート；グルホシネート；3-メチルホスフィニコプロピオン酸；*N*-アセチルグリホサート；*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；とうもろこし；大豆；大豆油かす

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¹⁾．

グルホシネート（以下「GLUF」という．）は Hoechst AG（ドイツ）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．また，GLUF 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に代謝されることが知られている．

現在，飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律²⁾に基づき農林水産大臣が確認した GLYP 耐性遺伝子及び GLUF 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³⁾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⁴⁾は，稲わら及び稲発酵粗飼料で 0.2 mg/kg と定められている．さらに，厚生労働省の食品，添加物等の規格基準⁵⁾における残留基準値は，農産物（大豆，とうもろこし及びなたね）及び畜産物については，GLYP 及び *N*-アセチルグリホサートを GLYP に換算したものの総和となっている．

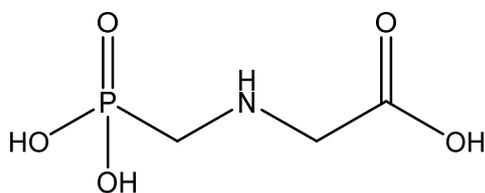
GLUF の飼料中の残留基準値は，穀類においては GLUF，MPPA を GLUF に換算したものと及び *N*-アセチルグルホシネートを GLUF に換算したものの総和として定められており，大麦で 0.5 mg/kg，小麦で 0.2 mg/kg 及びとうもろこしで 0.1 mg/kg である．また，飼料の有害物質の管理基準値は，稲わらで 0.5 mg/kg と定められている．

これら GLYP，GLUF，MPPA 及び *N*-アセチルグルホシネートの飼料中の定量法としては，飼料分析基準⁶⁾に記載された穀類，乾牧草及び稲わら中の GLUF，MPPA 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（以下「LC-MS/MS」という．）による同時定量法⁷⁾並びに穀類，稲わら及び稲発酵粗飼料中のグリホサートの LC-MS/MS による同時定量法⁸⁾がある．しかし，*N*-アセチルグリホサートについては分析法がなく，また，大豆及び大豆油かす中の GLYP，GLUF，MPPA 及び *N*-アセチルグルホシネートについても妥当性の確認を行っていない．

そこで，とうもろこしに残留する *N*-アセチルグリホサート並びに大豆及び大豆油かす中に残留する GLYP，GLUF，MPPA，*N*-アセチルグリホサート及び *N*-アセチルグルホシネートについて，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ので，その概要を報告する．

なお，飼料分析基準では，単に GLUF と記載した場合はアンモニウム塩を指すと規定されていることから，本検討内でも GLUF と記載した場合には同様の扱いとした．

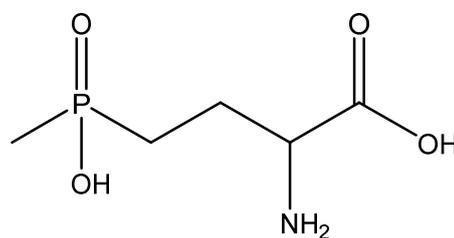
参考に GLYP, GLUF, MPPA, *N*-アセチルグリホサート及び *N*-アセチルグルホシネートの構造式等を Fig. 1 に示した.



Glyphosate (GLYP)

N-(phosphonomethyl)glycine

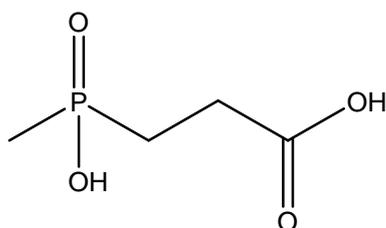
C₃H₈NO₅P MW: 169.1 CAS No.: 1071-83-6



Glufosinate (GLUF)

(2*RS*)-2-amino-4-[hydroxy(methyl)phosphinoyl]butyric acid

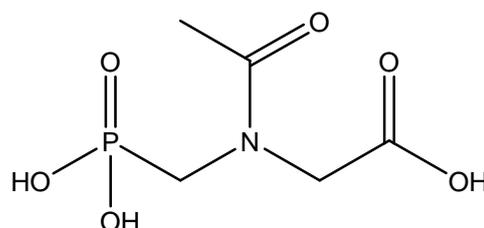
C₅H₁₂NO₄P MW: 181.1 CAS No.: 51276-47-2



3-(methylphosphinico)propionic acid (MPPA)

3-(methylphosphinico)propionic acid

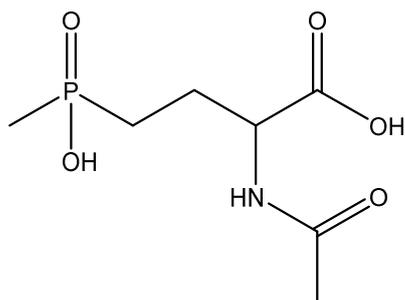
C₄H₉O₄P MW: 152.1 CAS No.: 15090-23-0



N-acetylglyphosate

2-[acetyl(phosphonomethyl)amino]acetic acid

C₅H₁₀NO₆P MW: 211.1 CAS No.: 129660-96-4



N-acetylglufosinate

(2*RS*)-2-acetamido-4-[hydroxy(methyl)phosphinoyl]butyric acid

C₇H₁₄NO₅P MW: 223.2 CAS No.: 73634-73-8

Fig. 1 Chemical structures of glyphosate (GLYP), glufosinate (GLUF), 3-(methylphosphinico)propionic acid (MPPA), *N*-acetylglyphosate and *N*-acetylglufosinate

2 実験方法

2.1 試料

大豆，大豆（加熱圧ぺん），とうもろこし及び大豆油かすはそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎した．きな粉はそのまま使用した．

2.2 試薬

1) 酢酸エチル，アセトン及びメタノールは残留農薬・PCB 試験用を用いた．アセトニトリルは液体クロマトグラフ用（関東化学製）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．ギ酸は Merck 製（純度 98 % 以上）を用いた．酢酸は試薬特級を用いた．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) GLUF 標準原液

グルホシネートアンモニウム標準品（Dr.Ehrenstorfer GmbH 製，純度 99.2 %）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 GLUF 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．）．

4) MPPA 標準原液

MPPA 標準品（富士フィルム和光純薬製，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，更に標線まで同溶媒を加えて MPPA 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．）．

5) *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．）．

6) *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ナトリウム標準品（Tronto Research Chemicals 製，純度 95 %）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*-アセチルグルホシネート標準原液を調製した（この液 1 mL は，*N*-アセチルグルホシネートとして 0.836 mg を含有する．）．

7) 検量線作成用混合標準原液

GLYP 標準原液，GLUF 標準原液及び MPPA 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混合標準原液を調製した（この液 1 mL は，GLYP，GLUF 及び MPPA として各 100 µg を含有する．）．

8) 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) 粉碎機：ZM 200 Retsch 製（1 mm スクリーン，使用時回転数 14000 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）Waters 製にリザーバー（容量 6 mL）を連結したもの
- 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 NH2 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) エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム：BOND ELUT LRC-PSA カートリッジ（充てん剤量 500 mg）Agilent Technologies 製
- 8) フロリジルミニカラム：Sep-Pak Plus Florisil カートリッジ（充てん剤量 910 mg）Waters 製
- 9) 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させ、GLYP 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、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、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、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, GLUF 及び MPPA 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 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 Operating 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 ₂ (600 L/h, 400 °C)
Cone gas	N ₂ (50 L/h)
Capillary voltage	3.0 kV
Collision gas	Ar (0.25 mL/min)

Table 2 MS/MS parameters

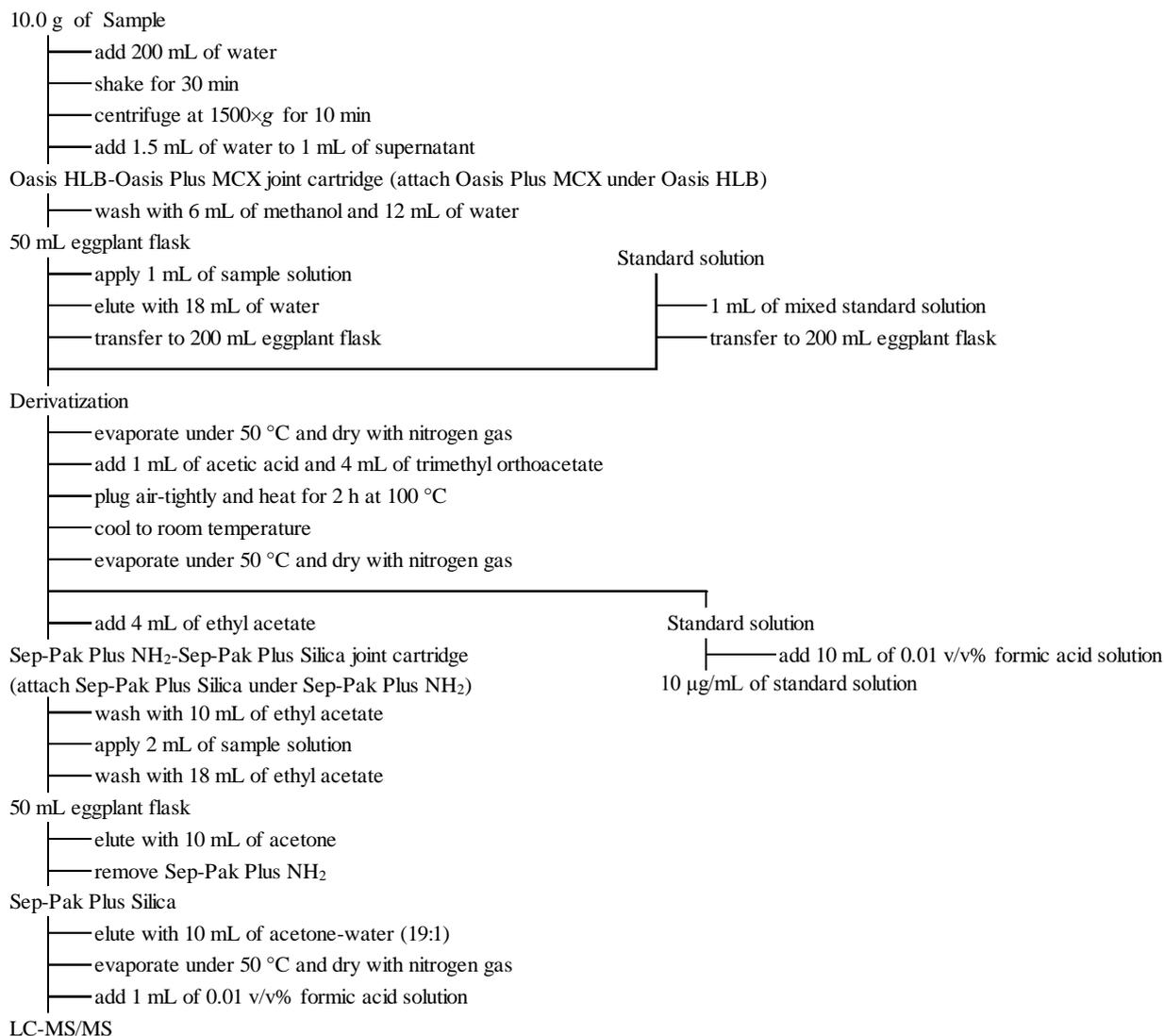
Target	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
		Quantifier (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)		
GLYP derivative	254	102	—	22	17
		—	152	22	17
GLUF derivative	252	210	—	26	14
		—	150	26	14
MPPA derivative	181	149	—	21	14
		—	93	21	14

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)、GLUF 量 (*N*-アセチルグルホシネート由来を含む) 及び MPPA 量を算出した。

また、GLYP 及び *N*-アセチルグリホサートは 2.4 の 3) の誘導体化により同一の誘導体 (以下「GLYP 誘導体」という。) に、GLUF 及び *N*-アセチルグルホシネートは 2.4 の 3) の誘導体化により同一の誘導体 (以下「GLUF 誘導体」という。) になることから、*N*-アセチルグリホサート又は *N*-アセチルグルホシネート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 GLYP 又は GLUF の濃度 (mg/kg) を *N*-アセチルグリホサート又は *N*-アセチルグルホシネートの濃度 (mg/kg) に換算し、添加した *N*-アセチルグリホサート又は *N*-アセチルグルホシネートの濃度 (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。



Scheme1 Analytical procedure for GLYP, GLUF, MPPA, *N*-acetylglyphosate and *N*-acetylglufosinate

2.5 エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムによる大豆油かすの精製の検討方法

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) を, アセトン 5 mL 及び酢酸エチル 5 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.). 2.4 の 5)により調製した 1 mL 中に GLYP, GLUF 及び MPPA として各 100 ng 相当量を含む各誘導体標準液 1 mL 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, 酢酸エチル-アセトン (18+2) 又は (17+3) 5 mL を正確に加えて溶かした. 誘導体標準液 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. 50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き, 同溶媒を加え, GLYP 誘導体, GLUF 誘導体及び MPPA 誘導体を溶出させた. 溶出液を 40 °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.

2.6 フロリジルミニカラムによる大豆油かすの精製の検討方法

フロリジルミニカラム (910 mg) を, アセトン 5 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.). 2.4 の 5)により調製した 1 mL 中に GLYP, GLUF 及び MPPA として各 100 ng 相当量を含む各誘導体標準液 1 mL 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, アセトン 5 mL を正確に加えて溶かした. 誘導体標準液 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. 50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き, アセトン 13 mL を加え, GLYP 誘導体, GLUF 誘導体及び MPPA 誘導体を溶出させた. さらに, アセトン-メタノール (17+3) を加え溶出させて, 溶出液を 40 °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.

大豆油かす 10.0 g を 2.4 の 1)から 4)により調製した試料溶液を 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, 誘導体標準液 2 mL を正確に加えて溶かした. 誘導体標準液を加えたブランク試料溶液 2 mL をミニカラムに入れ液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた. 誘導体標準液を加えたブランク試料溶液が入っていたなす形フラスコをアセトン 2 mL で 2 回洗浄し, 洗液を順次ミニカラムに加え, 同様に流出させた. 50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き, アセトン 9 mL を加え, GLYP 誘導体, GLUF 誘導体及び MPPA 誘導体を溶出させた. さらに, アセトン-メタノール (17+3) を加え溶出させて, 溶出液を 40 °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.

2.7 添加回収試験

2.2 の 5)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.

とうもろこしについて, *N*-アセチルグリホサートとして, 0.04, 1 及び 5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で GLYP として 0.32, 8 及び 40 ng/mL) 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.

3 結果及び考察

3.1 飼料分析基準の適用性の検討

とうもろこしに *N*-アセチルグリホサートとして 1 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で GLYP として 8 ng/mL 相当量) 添加した試料, 大豆及び大豆油かすに GLYP として 20 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 200 ng/mL 相当量), GLUF として 2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 20 ng/mL 相当量) 及び MPPA として 2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 20 ng/mL 相当量) 添加した試料並びに大豆油かすに *N*-アセチルグリホサートとして 20 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で GLYP として 160 ng/mL 相当量) 及び *N*-アセチルグルホシネート 2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で GLUF として 15 ng/mL 相当量) 添加した試料を用いて, 2.4 に従って検討を行った. その結果, Table 3 のとおり, とうもろこしについては, 飼料分析基準別表 3 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を満たし, 飼料分析基準の適用が見込まれた. 大豆油かすについては GLUF 及び *N*-アセチルグルホシネートの回収率

が 133 % 及び 121 % と高く、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度の目標値を満たさなかった。また、大豆、加熱圧ぺん大豆（2 検体）及びきな粉については、抽出液が白濁しており、カラム処理 I においてカラムの目詰まりが生じて以降の操作が行えなかった。

Table 3 Recoveries of GLYP, GLUF, MPPA, *N*-acetylglyphosate and *N*-acetylglufosinate

Compounds	Spiked level (mg/kg)	Corn		Soybean meal		Soybean ^{c)}
		Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	
GLYP	20	—	—	117	5.1	unmeasurable
GLUF	2	—	—	133	7.1	unmeasurable
MPPA	2	—	—	98.0	6.8	unmeasurable
<i>N</i> -Acetylglyphosate	1	118	6.8	—	—	—
	20	—	—	115	1.4	—
<i>N</i> -Acetylglufosinate	2	—	—	121	1.4	—

—: Not tested

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

c) $n = 1$

大豆油かすの GLUF 及び *N*-アセチルグルホシネートの回収率が高くなったことの原因究明のため、マトリックス効果の確認を行った。2.4 の 1) から 4) により調製した大豆油かすのブランク試料溶液に 2.4 の 5) に従って調製した GLYP 誘導体 (GLYP として 0.05 及び 20 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5 及び 200 ng/mL 相当量))、GLUF 誘導体 (GLUF として 0.05 及び 2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5 及び 20 ng/mL 相当量)) 及び MPPA 誘導体 (MPPA として 0.05 及び 2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5 及び 20 ng/mL 相当量)) をそれぞれ添加した各マトリックス標準液について、2.4 の 5) に従って調製した同濃度の GLYP、GLUF、MPPA 各誘導体標準液に対するピーク面積比を確認した。その結果、Table 4 のとおり、GLYP 誘導体の 0.05 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5 ng/mL 相当量) 及び GLUF 誘導体の 0.05 及び 2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.5 及び 20 ng/mL 相当量) においてイオン化促進が確認された。このことから、大豆及び大豆油かすについては、抽出方法又は精製方法の改良が必要であると考えられた。

Table 4 Matrix effect of soybean meal

Compounds	Concentration		Matrix effect ^{b)} (%)
	in matrix standard solution	in sample ^{a)}	
	(ng/mL)	(mg/kg)	
GLYP derivative	0.5	0.05	192
	200	20	115
GLUF derivative	0.5	0.05	159
	20	2	140
MPPA derivative	0.5	0.05	106
	20	2	98.7

$n = 1$

a) Converted from the concentration in matrix standard solution

b) Ratio of peak area of compounds in the presence of matrix to that in the absence of matrix

3.2 エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムによる大豆油かすの精製の検討
畜水産物中のグリホサート試験法⁹⁾を参考に大豆油かすの精製について検討を行った。この試験法はエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム及びフロリジルミニカラムを使用した GLYP のみの試験法であるため、GLUF 及び MPPA にも適用できるかどうかを確認した。

まず、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出を確認するため、2.5 により GLYP 誘導体、GLUF 誘導体及び MPPA 誘導体の溶出画分の確認を行った。その結果、Table 5 のとおり GLYP 誘導体及び MPPA 誘導体は酢酸エチルルーアセトン (18+2) 又は (17+3) 10 mL でほぼ 100 % 溶出したが、GLUF 誘導体は同溶媒 25 mL 加えても 80 % 以下しか溶出しなかった。このことから、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムを使用せず、フロリジルミニカラムで検討することとした。

Table 5 Elution pattern from BOND ELUT LRC-PSA

Elution solvent	Compounds	Recovery (%)				Total
		0~10 mL	10~15 mL	15~20 mL	20~25 mL	
Ethyl acetate-acetone (18:2)	GLYP derivative	95	0	0	0	95
	GLUF derivative	69	3	1	0	74
	MPPA derivative	103	0	0	0	103
Ethyl acetate-acetone (17:3)	GLYP derivative	92	0	0	0	93
	GLUF derivative	74	3	1	0	79
	MPPA derivative	94	0	0	0	94

$n = 3$

3.3 フロリジルミニカラムによる大豆油かすの精製の検討

フロリジルミニカラムからの溶出を確認するために、2.6 により操作して GLYP 誘導体、GLUF 誘導体及び MPPA 誘導体の溶出画分の確認を行った。その結果、Table 6 のとおり標準液

についてはアセトン 15 mL では溶出せず、アセトン-メタノール (17+3) 20 mL でほぼ 100 % 溶出した。しかし、大豆油かすのマトリックスを含んだ試料溶液については、アセトン 15 mL 及びアセトン-メタノール (17+3) 20 mL の溶出で GLYP 誘導体が 117 %, GLUF 誘導体が 124 % とマトリックス効果によるイオン化促進が除去できていないとみられる結果となった。

Table 6 Elution pattern from Sep-Pak Plus Florisil

Matrix	Compounds	Recovery (%)				Total
		Acetone	Acetone-methanol (17:3)			
		0~15 mL	0~10 mL	10~15 mL	15~20 mL	
None	GLYP derivative	0	92	1	0	94
	GLUF derivative	0	84	9	1	95
	MPPA derivative	0	97	2	1	99
Soybean meal	GLYP derivative	2	112	2	1	117
	GLUF derivative	0	106	15	3	124
	MPPA derivative	1	104	2	1	107

$n = 3$

3.4 妨害物質の検討

とうもろこし 2 検体を用い、本法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、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。

大豆油かす 7 検体を用い、本法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、5 検体において GLYP として 1.0~3.2 mg/kg 相当量、GLUF として 0.05~0.38 mg/kg 相当量のピークが検出された (MPPA は未測定)。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、両者がほぼ一致したため GLYP 及び GLUF の残留によるものと判断した。残りの 2 検体においては GLYP (*N*-アセチルグリホサートを含む)、GLUF (*N*-アセチルグルホシネートを含む) 及び MPPA の定量を妨げるピークは認められなかった。この 2 検体は非遺伝子組換えの大豆油かすだった。

なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した。

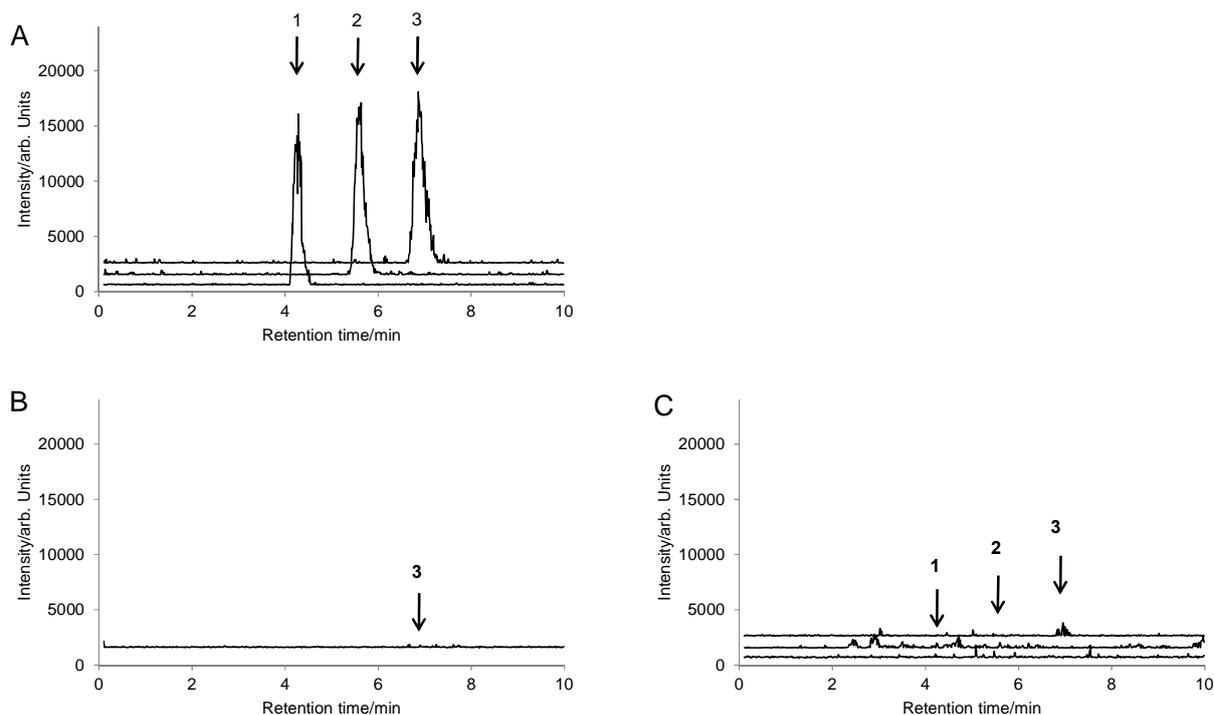


Fig. 2 Selected reaction monitoring (SRM) chromatograms of standard and blank sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrows indicate the retention times of 1: GLUF derivative, 2: MPPA derivative and 3: GLYP derivative. The baselines are shifted for display.)

A: Standard solution (1 ng/mL for GLUF, MPPA and GLYP: 0.005 ng as GLUF, MPPA and GLYP)

B: Sample solution of corn (blank)

C: Sample solution of soybean meal (blank)

3.5 添加回収試験

2.7 により添加回収試験を実施した。その結果は Table 7 のとおり、平均回収率は 96.0~118 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 7.1 %以下の成績が得られ、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 7 Recoveries for *N*-acetylglyphosate in corn

Compound	Spiked level (mg/kg)	Recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)
<i>N</i> -Acetylglyphosate	0.04	102	7.1
	1	118	6.8
	5	96.0	7.0

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

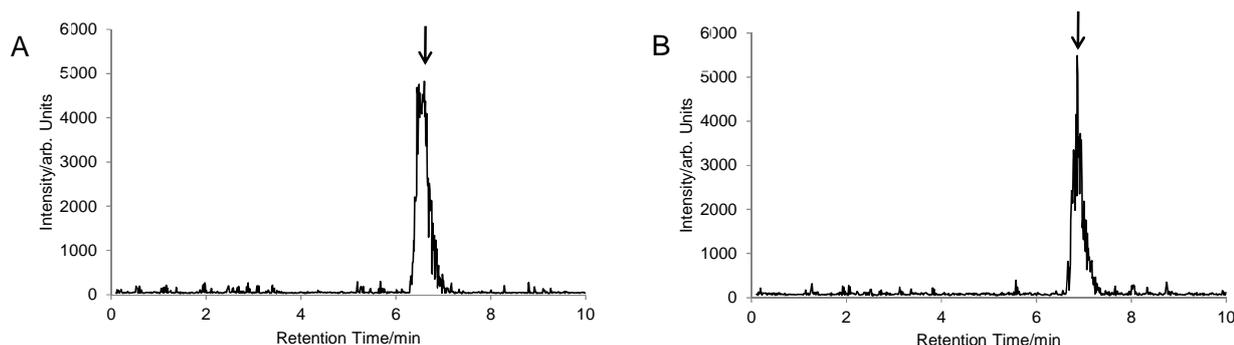


Fig. 3 SRM chromatograms on recovery test

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

A: Standard solution (0.5 ng/mL: 0.0025 ng as GLYP derivative)

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

3.6 定量下限及び検出下限の検討

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（とうもろこし中で *N*-アセチルグリホサートとして 0.04 mg/kg 相当量（最終試料溶液中濃度 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 0.04 mg/kg とした。この濃度は、GLYP のとうもろこし中の残留基準値（1 mg/kg、*N*-アセチルグリホサートとして 1.2 mg/kg）に対して 1/30 であり、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。

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 *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を満たしていた。

なお、Table 7 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。

4 まとめ

とうもろこしに残留する *N*-アセチルグリホサート並びに大豆及び大豆油かす中に残留する GLYP, GLUF, MPPA, *N*-アセチルグリホサート及び *N*-アセチルグルホシネートについて、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、とうもろこしについては、適用可能であると考えられた。また、大豆及び大豆油かすについては、抽出方法又は精製方法の改良が必要であると考えられた。

- 1) とうもろこし及び大豆油かすについて、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) とうもろこしに *N*-アセチルグリホサートとして 0.04, 1 及び 5 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) 本法のとうもろこし中の *N*-アセチルグリホサートの定量下限は 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。

- 4) 大豆，加熱圧ぺん大豆及びきな粉について，本法に従って分析を実施したところ，抽出液が白濁しカラム処理 I が行えず，測定できなかった。
- 5) 大豆油かすについて，本法に従って分析を実施したところ，マトリックス効果によるイオン化促進のため，回収率が妥当性確認法ガイドラインに定められた真度の目標値を満たさなかった。また，エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム及びフロリジルミニカラムによる精製を検討したが，マトリックス効果によるイオン化促進が除去できなかった。

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) 厚生省告示：食品，添加物等の基準規格，昭和 34 年 12 月 28 日，告示第 370 号 (1959)。
- 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) 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)。
- 8) 牧野大作，若宮洋市，榊原良成，舟木紀夫：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，飼料研究報告，**39**，30-43 (2014)。
- 9) 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)。