

5 穀類, 乾牧草, 稲わら及び稲発酵粗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

杉本 泰俊*, 船木 紀夫*, 榊原 良成*

Simultaneous Determination of Glyphosate, Glufosinate and its Metabolites in Grains, Grass Hay, Rice Straw and Whole-crop Rice Silage for Feed by LC-MS/MS

Yasutoshi SUGIMOTO*, Norio FUNAKI* and Yoshinari SAKAKIBARA*

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

An analytical method was developed to determine the levels of glyphosate, glufosinate and its metabolites (3-(methyl phosphinico) propionic acid and *N*-acetylglufosinate) in grains, grass hay, rice straw and whole-crop rice silage for feed using liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS).

Glyphosate (GLYP), glufosinate (GLUF), 3-(methyl phosphinico) propionic acid (MPPA) and *N*-acetylglufosinate (NAG) in the samples were extracted with water. The extract was purified with two types of SPE mini-columns (Oasis HLB and MCX from Waters; Milford, MA, USA). These compounds were 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 for determination of the levels of GLYP, GLUF, MPPA and NAG. 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, USA) 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.

Barley was spiked with GLYP at the levels of 20 or 0.04 mg/kg and with GLUF and MPPA at the levels of 0.5 or 0.05 mg/kg. Wheat was spiked with GLYP at the levels of 5 or 0.5 mg/kg and with GLUF and MPPA at the levels of 0.2 or 0.05 mg/kg. Corn was spiked with GLYP at the levels of 1 or 0.1 mg/kg and with GLUF and MPPA at the levels of 0.1 or 0.05 mg/kg. Alfalfa hay was spiked with GLYP at the levels of 120 or 20 mg/kg. Rice straw and whole-crop rice silage were spiked with GLYP at the levels of 0.2 or 0.04 mg/kg and spiked with GLUF and MPPA at the levels of 0.5 or 0.05 mg/kg. Spike tests were conducted on each sample, the resulting mean recoveries ranged from 78.2 to 117 % for GLYP, 84.6 to 112 % for GLUF, and 76.9 % to 117 % for MPPA. Repeatability in terms of relative standard deviations (RSD_r) were not more than 17 % for GLYP, 16 % for GLUF and 17 % for MPPA. Subsequently, barley was spiked with NAG at the levels of 0.5 or 0.05 mg/kg, while wheat, corn, rice straw and whole-crop rice silage were spiked with the same compound at 0.2 or 0.05 mg/kg, 0.1 or 0.05 mg/kg, 0.5 or 0.05 mg/kg and 0.5 or 0.05 mg/kg. The resulting mean recoveries ranged from 73.0 to 101 % and repeatability in terms of relative standard deviations (RSD_r) were not more than 19 % for NAG.

A collaborative study was conducted in ten laboratories using barley, corn, rice straw and whole-crop rice silage spiked with GLYP, GLUF and MPPA and grass hay spiked with GLYP in the following quantities: 20 mg/kg of GLYP and 0.5 mg/kg of GLUF and MPPA for barley, 1 mg/kg of GLYP and 0.1 mg/kg of GLUF and MPPA for corn, 0.2 mg/kg of GLYP and 0.5 mg/kg of GLUF and MPPA for rice straw and whole-crop rice silage, and 120 mg/kg of GLYP for alfalfa hay, respectively. For each compounds, the resulting range of mean recovery, repeatability and reproducibility in terms of relative standard deviations (RSD_r and RSD_R) and HorRat, respectively, were 75.4 % to 88.7 %, and not more than 18 %, 32 % and 2.0 for GLYP, 89.1 % to 99.3 %, and

* 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

not more than 11 %, 21 % and 0.96 for GLUF, and 86.2 % to 91.1 % and not more than 13 %, 33 % and 1.5 for MPPA.

This method was validated and established for use in the inspection of GLYP, GLUF, MPPA and NAG in grains, rice straw and whole-crop rice silage for feed, and for use in the inspection of GLYP in grass hay for feed.

Key words: glyphosate; glufosinate; 3-(methyl phosphinico) propionic acid; *N*-acetylglufosinate; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); grains; rice straw; whole-crop rice silage; grass hay; collaborative study

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；穀類；稲わら；稲発酵粗飼料；乾牧草；共同試験

1 緒 言

グリホサート（以下「GLYP」という。）はモンサント社が開発した非選択性茎葉処理型の含リン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¹⁾。また、グルホシネート（以下「GLUF」という。）はヘキスト社が開発した非選択性茎葉処理型の含リンアミノ酸系除草剤であり、植物中でグルタミン合成酵素を阻害することにより殺草活性を示す¹⁾。また、GLUF は、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。）に代謝され、GLUF 耐性遺伝子組換え植物中では *N*-アセチルグルホシネート（以下「NAG」という。）に代謝されることが知られている¹⁾。

GLYP は、国内における飼料中の農薬の残留基準値として、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²⁾。更に飼料の有害物質の指導基準値として、稲わら及び稲発酵粗飼料（以下「WCS」という。）で 0.2 mg/kg と定められている³⁾。

一方、GLUF の残留基準値は、穀類においては GLUF 及び MPPA を GLUF に換算したものと並びに NAG を GLUF に換算したものの総和として設定されており、大麦で 0.5 mg/kg、小麦 0.2 mg/kg、とうもろこし 0.1 mg/kg と定められている²⁾。更に飼料の有害物質の指導基準値は、稲わらで 0.5 mg/kg と定められている³⁾。

これら GLYP, GLUF, MPPA 及び NAG（以下「含リンアミノ酸系農薬」という。）の飼料中の定量法としては、飼料分析基準⁴⁾に記載された穀類、乾牧草及び稲わら中の GLUF, MPPA 及び NAG 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⁵⁾（以下「GLUF 法」という。）並びに穀類及び飼料用イネ中のグリホサートの LC-MS/MS による同時定量法⁶⁾（以下「GLYP 法」という。）がある。

しかし、GLUF 法は小麦が、GLYP 法は乾牧草が適用除外となっており、新たに基準値が設定されたこれらを対象とした分析法の確立が急務となっている。また、分析の効率化のため、含リンアミノ酸系農薬の同時分析法が必要とされている。

そこで筆者らは、GLYP 法を基に、穀類、乾牧草、稲わら及び WCS 中に残留する含リンアミノ酸系農薬の LC-MS/MS による同時定量法を検討したので、その概要を報告する。

なお、飼料分析基準では、単にグルホシネートと記載した場合はアンモニウム塩を指すと規定していることから、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 及び NAG の構造式等を Fig. 1 に示した.

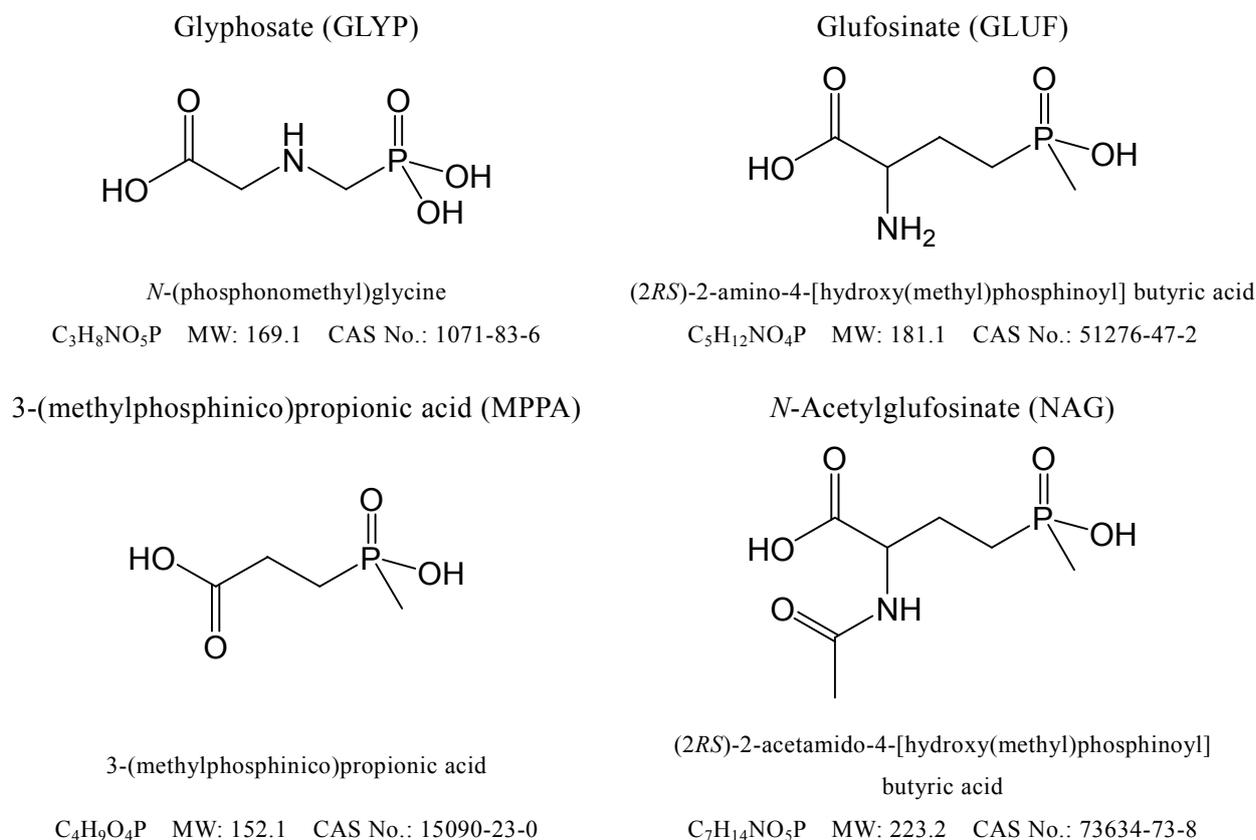


Fig. 1 Chemical structures of glyphosate (GLYP), glufosinate (GLUF), 3-(methylphosphinico)propionic acid (MPPA) and *N*-acetylglufosinate (NAG)

2 実験方法

2.1 試料

大麦, えん麦, ライ麦, 小麦, とうもろこし, マイロ, アルファルファ乾草, 稲わら及び籾米はそれぞれ 1 mm の網ふるいを通すまで粉碎した.

また, WCS については 60 °C で, 10 時間乾燥し, 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) 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. ギ酸 (98 % のもの) 及び酢酸は, 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) を用いた.

2) 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.

3) GLYP 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 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 ($f=0.993$) .) .

4) GLUF 標準原液

グルホシネートアンモニウム標準品 (Dr. Ehrenstorfer 製, 純度 97.5 %) 25 mg を正確に量って 25 mL の全量フラスコに入れ, 水を加えて溶かし, 更に標線まで水を加えて 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 ($f=0.975$) .) .

5) MPPA 標準原液

3-メチルホスフィニコプロピオン酸標準品 (和光純薬工業製, 純度 99.7 %) 25 mg を正確に量って 25 mL の全量フラスコに入れ, 水を加えて溶かし, 更に標線まで水を加えて 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 ($f=0.997$) .) .

6) NAG 標準原液

N-アセチルグルホシネート標準品 (Dr. Ehrenstorfer 製, 純度 99.9 %) 25 mg を正確に量って 25 mL の全量フラスコに入れ, 水を加えて溶かし, 更に標線まで水を加えて NAG 標準原液を調製した (この液 1 mL は, NAG として 1 mg を含有する ($f=0.999$) .) .

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 標準原液の一定量を水で正確に希釈し, 1 mL 中に GLYP, GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 100 μ g を含有する検量線作成用混合標準原液を調製した.

2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機 : ZM-200 Retsch 製 (1 mm スクリーン, 回転数 14000 rpm)
- 2) 乾牧草用粉碎機 : SM-2000 Retsch 製 (1 mm スクリーン, 回転数 835 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 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) LC-MS/MS :

LC 部 : ACQUITY UPLC System Waters 製

MS 部 : ACQUITY TQ Detector 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 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 (乾牧草は, 更に水で正確に 500 倍希釈した.) 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を連結し, メタノール 6 mL 及び水 12 mL

で順次洗浄した。

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, 流速 2~3 mL/min で吸引して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, 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の下にシリカゲルミニカラムを連結し, 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ミニカラムの下に置き, 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て各農薬を溶出させた。

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各農薬を溶出させた。

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

5) 標準液の誘導体化

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

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

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, それぞれ 0.3, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 及び 300 ng 相当量含有する標準液を調製した。

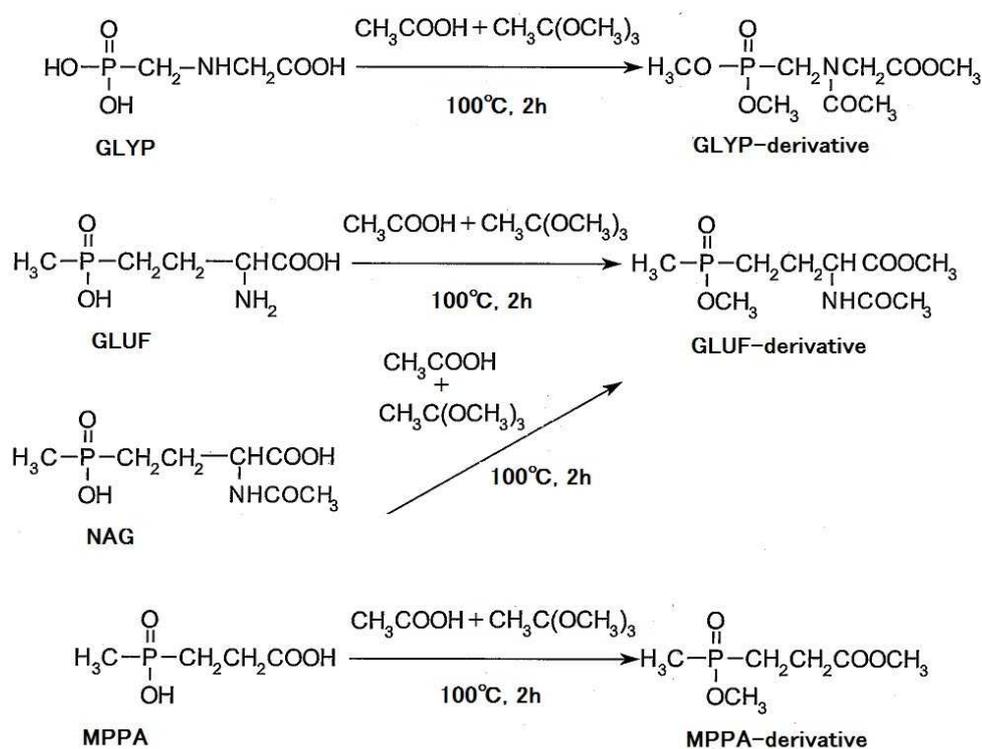


Fig. 2 Scheme of derivatization reactions of GLYP, GLUF, MPPA and NAG

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 (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	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d. \times 150 mm, 5 μm), Agilent Technologies
Mobile phase	0.01 v/v% Formic acid 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 $^\circ\text{C}$
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Ion source temperature	120 $^\circ\text{C}$
Desolvation gas temperature	400 $^\circ\text{C}$
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)
GLYP derivative	254	102	152	22	17
GLUF derivative	252	210	150	26	14
MPPA derivative	181	149	93	21	14

7) 計 算

得られた SRM クロマトグラムから GLYP 誘導体, GLUF 誘導体及び MPPA 誘導体のピーク面積を求めてそれぞれ検量線を作成し, 試料中の GLYP, GLUF (NAG 由来含む) 及び MPPA のそれぞれの量を算出した.

また, NAG のみを添加して添加回収試験を行った際の回収率 (%) の計算は, 検量線から求めた GLUF の濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) を NAG の濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) に換算し, 添加した NAG の濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) 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 Scheme1 に示した.

2.5 乾牧草への適用性の検討

アルファルファ乾草に, GLYP, GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 120 mg/kg 相当量 (GLYP の基準値相当量, 最終試料溶液でそれぞれ 2.4 ng/mL 相当量) を添加した試料を用い, 2.4 の 1) の操作に従って得られた試料溶液を水で更に 10 倍, 100 倍, 250 倍及び 500 倍に希釈し, 2.4 の 2) のカラム処理 I に供する試料溶液とした.

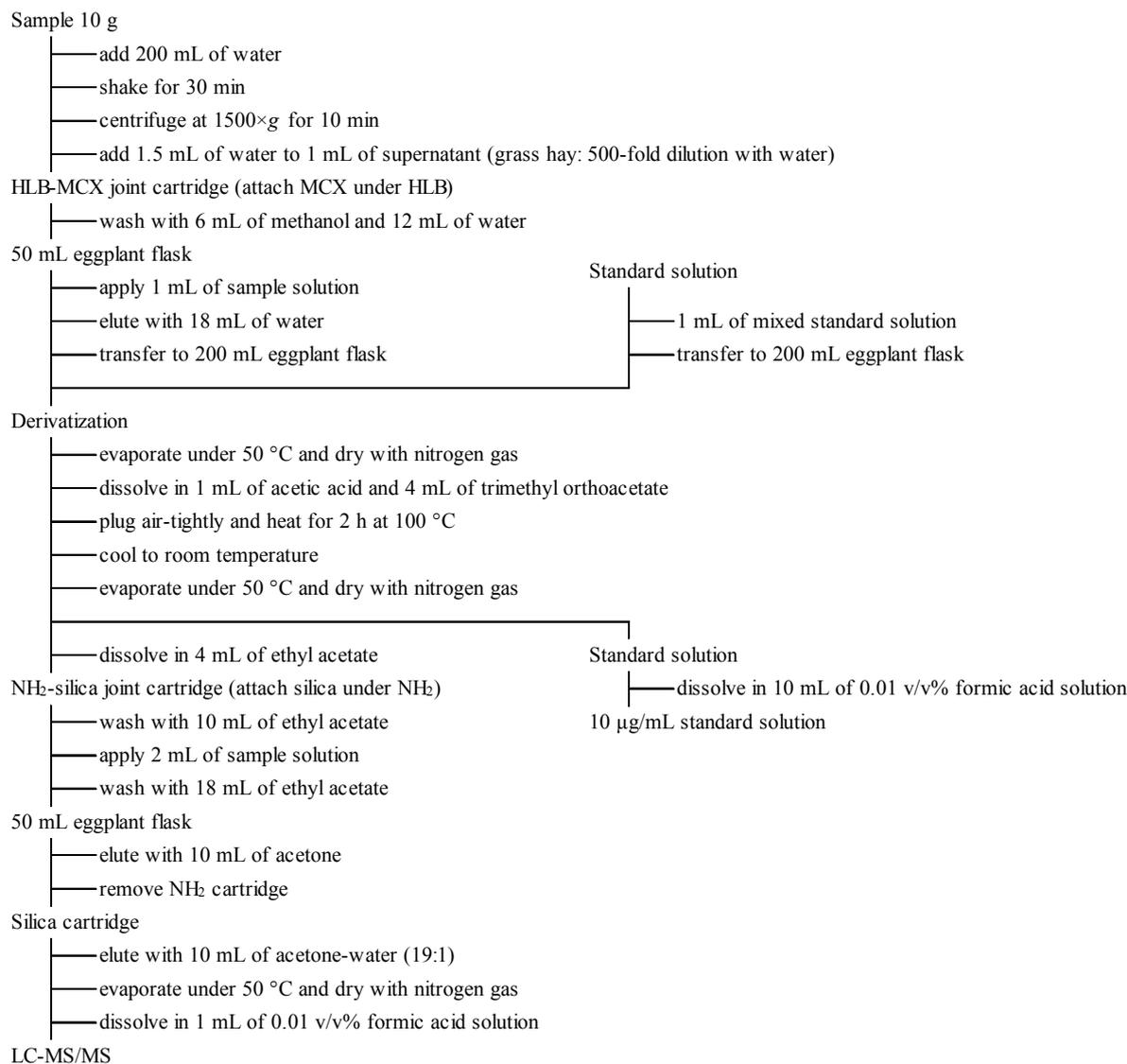
以下, 2.4 の 2)~7) に従い, 定量した.

2.6 小麦の添加回収試験の検討方法

小麦の添加回収試験に用いる含リンアミノ酸系農薬の添加用混合標準液を, 以下のとおり調製した.

2.2 の 3)~6) で調製した各含リンアミノ酸系農薬標準原液の一定量をそれぞれメタノールで正確に 20 倍希釈した. 更にこれらの液の一定量をメタノール-水 (19+1) で正確に希釈して各小麦添加用標準液を調製した.

調製した各小麦添加用標準液を小麦に添加し, 2.4 の操作に従って各含リンアミノ酸系農薬を定量した.



Scheme 1 Analytical procedure for GLYP, GLUF, MPPA and NAG in grains, grass hay, rice straw and whole-crop rice silage for feed

3 結果及び考察

3.1 検量線

2.4の5)に従って調製したGLYP、GLUF及びMPPAを含有する混合標準液各5 µLを液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、得られた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. 3のとおりでありGLYP、GLUF及びMPPAで各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。

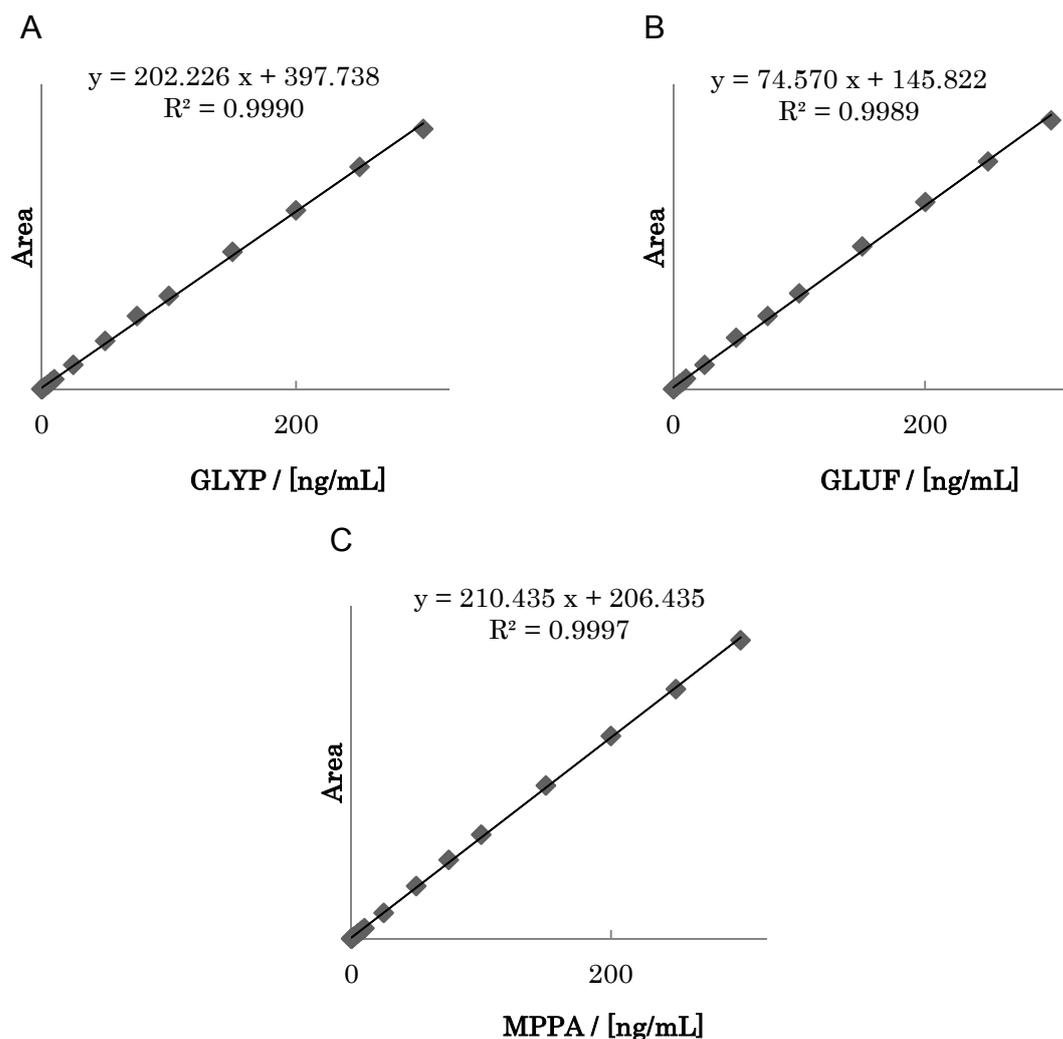


Fig. 3 Calibration curves of GLYP, GLUF and MPPA by peak area

A: GLYP; B: GLUF; C: MPPA

3.2 乾牧草及び粃米への適用性の検討

1) 乾牧草について

牧野らが検討した GLYP 法において, 良好な結果が得られなかった乾牧草は, 適用範囲から外れている. その原因としては, 夾雑物による影響で誘導体化反応や測定時のイオン化が抑制されている等の可能性が考えられた.

そこで, 乾牧草の基準値は GLYP で 120 mg/kg と比較的高濃度であり, GLUF は設定されていないことから, 夾雑物による影響を低減させる目的で, 2.5 の操作に従って抽出液に希釈操作を加え, 回収率の変動を確認することにより希釈操作の有効性を確認した.

その結果は Table 3 のとおりであり, GLYP では希釈倍率が大きくなるにつれて回収率に改善が認められ, 500 倍希釈で最もよい回収率が得られた. 一方, GLUF 及び MPPA では希釈倍率の違いによる回収率に改善は認められず, 良好な結果が得られなかった.

これらのことから, 乾牧草については, 基準値が設定されていない GLUF, MPPA 及び NAG を本検討から除外し, 基準値が設定されている GLYP のみを検討対象とすることとした.

Table 3 Comparison of recoveries of GLYP, GLUF and MPPA

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Dilution factor			
		10-fold	100-fold	250-fold	500-fold
		Recovery ^{a)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	Recovery ^{a)} (%)
GLYP	120	52.1	61.4	60.4	82.5
GLUF	120	68.5	49.0	69.9	52.4
MPPA	120	63.4	73.4	60.0	54.1

a) Mean (n=2)

2) 粃米について

粃米に GLYP として 0.2 mg/kg 相当量, GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 0.5 mg/kg 相当量を添加した試料を用い, 2.4 に従い添加回収試験を行ったところ, 粃米において GLUF 及び MPPA はそれぞれ 70 %以上の回収率が得られたが, GLYP は 50 %程度と回収率が低くなった.

GLYP の低回収率の原因は不明であり, 粃米に対しては GLYP 及び GLUF の基準値が設定されていないことから, 粃米を本検討から除外することとした.

3.3 マトリックス効果の確認

2.4 の 1)から 4)により調製した大麦, 小麦, とうもろこし, 稲わら, WCS 及びアルファルファ乾草のブランク試料溶液に 2.4 の 5)に従って調製した GLYP として, それぞれ 20, 5, 1, 0.2, 0.2 及び 120 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中でそれぞれ 200, 50, 10, 2, 2 及び 2.4 ng/mL 相当量) をそれぞれ添加した各マトリックス標準液, GLUF として, それぞれ 0.5, 0.2, 0.1, 0.5 及び 0.5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中でそれぞれ 5, 2, 1, 5 及び 5 ng/mL 相当量) をそれぞれ添加した各マトリックス標準液, MPPA として, それぞれ 0.5, 0.2, 0.1, 0.5 及び 0.5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中でそれぞれ 5, 2, 1, 5 及び 5 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 及び MPPA 標準液に対するピーク面積比を確認したところ, ピーク面積比はそれぞれ 91.1~110, 93.0~101 及び 90.5~101 %であり, 3 成分とも試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった.

3.4 妨害物質の検討

大麦 (2 検体), えん麦 (1 検体), ライ麦 (1 検体), 小麦 (2 検体), とうもろこし (2 検体), マイロ, アルファルファ乾草, 稲わら (2 検体) 及び WCS (2 検体) を用い, 本法により調製した試料溶液を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し, 定量を妨げるピークの有無を確認した. その結果, 大麦 (1 検体) 及びマイロについて GLYP 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, 定量値が両者で一致したことから残留 GLYP に由来するピークと判断され, 定量を妨げる妨害ピークはないと考えられた.

3.5 添加回収試験

2.1 で調製した大麦に GLYP として 20 及び 0.04 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 200 及び 0.4 ng/mL 相当量), 小麦に 5 及び 0.5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 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 (最終試料溶液中で 10 及び 1 ng/mL 相当量), 稲わらに

0.2 及び 0.04 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 2 及び 0.4 ng/mL 相当量），WCS に原物換算して 0.2 及び 0.04 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 4.5 及び 0.9 ng/mL 相当量），アルファルファ乾草に 120 及び 20 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 2.4 及び 0.4 ng/mL 相当量）を添加した試料を用いて，本法により 3 点併行で定量し，回収率及び繰返し精度を検討した。

大麦に GLUF 及び MPPA としてそれぞれ 0.5 及び 0.05 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 及び 0.5 ng/mL 相当量），小麦にそれぞれ 0.2 及び 0.05 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 2 及び 0.5 ng/mL 相当量），とうもろこしに 0.1 及び 0.05 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 1 及び 0.5 ng/mL 相当量），稲わらに 0.5 及び 0.05 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 及び 0.5 ng/mL 相当量），WCS に原物換算して 0.5 及び 0.05 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 11.25 及び 1.125 ng/mL 相当量）を添加した試料を用いて，本法により 3 点併行で定量し，回収率及び繰返し精度を検討した。

また，NAG については，GLUF と NAG の誘導体が同一であることから，両者が共存している場合には定量値は GLUF と NAG の含量として算出される．このことから NAG の添加回収試験による試験の際には NAG のみを添加して評価を行うこととし，大麦に NAG として 0.5 及び 0.05 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で GLUF として 4.44 及び 0.444 ng/mL 相当量），小麦に 0.2 及び 0.05 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で GLUF として 1.78 及び 0.444 ng/mL 相当量），とうもろこしに 0.1 及び 0.05 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で GLUF として 0.888 及び 0.444 ng/mL 相当量），稲わらに 0.5 及び 0.05 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で GLUF として 4.44 及び 0.444 ng/mL 相当量），WCS に原物換算して 0.5 及び 0.05 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で GLUF として 9.99 及び 0.999 ng/mL 相当量）を添加した試料を用いて，本法により 3 点併行で定量し，回収率及び繰返し精度を検討した。

その結果を Table 4, 5, 6 及び 7 に示した．GLYP について，大麦では平均回収率 82.8~117 %，その繰返し精度は，相対標準偏差 (RSD_r) として 17 %以下，同様に小麦では 85.0~86.4 %及び 7.0 %以下，とうもろこしでは 80.1~85.4 %及び 13 %以下，稲わらでは 97.3~100 %及び 14 %以下，WCS では 83.0~88.6 %及び 8.8 %以下，アルファルファ乾草では 78.2~81.4 %及び 9.4 %以下であった。

GLUF について，大麦では平均回収率 88.0~100 %，その繰返し精度は， RSD_r として 14 %以下，同様に小麦では 93.1~102 %及び 16 %以下，とうもろこしでは 103~112 %及び 14 %以下，稲わらでは 94.2~103 %及び 16 %以下，WCS では 84.6~92.7 %及び 11 %以下であった。

MPPA について，大麦では平均回収率 81.2~89.9 %，その繰返し精度は， RSD_r として 17 %以下，同様に小麦では 80.0~98.0 %及び 8.9 %以下，とうもろこしでは 85.7~108 %及び 7.0 %以下，稲わらでは 92.4~117 %及び 7.2 %以下，WCS では 76.9~91.1 %及び 10 %以下であった。

NAG について，大麦では平均回収率 89.0~101 %，その繰返し精度は， RSD_r として 19 %以下，同様に小麦では 74.1~82.2 %及び 11 %以下，とうもろこしでは 85.4~88.0 %及び 11 %以下，稲わらでは 82.4~84.4 %及び 16 %以下，WCS では 73.0~82.3 %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. 4 に示した。

Table 4 Recovery test for GLYP

Spiked level (mg/kg)	Feed types											
	Barley		Wheat		Corn		Rice straw		Whole-crop rice silage		Alfalfa hay	
	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)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
120			-		-		-		-		78.2	8.3
20	82.8	6.5	-		-		-		-		81.4	9.4
5	-		86.4	6.1	-		-		-		-	
1	-		-		80.1	7.6	-		-		-	
0.5	-		85.0	7.0	-		-		-		-	
0.2	-		-		-		97.3	4.2	88.6	8.8	-	
0.1	-		-		85.4	13	-		-		-	
0.04	117	17	-		-		100	14	83.0	7.2	-	

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 5 Recovery test for GLUF

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)} (%)
0.5	100	6.5	-		-		94.2	5.4	84.6	2.2
0.2	-		93.1	6.2	-		-		-	
0.1	-		-		112	2.6	-		-	
0.05	88.0	14	102	16	103	14	103	16	92.7	11

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 6 Recovery test for MPPA

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)} (%)
0.5	89.9	5.3	-		-		92.4	7.2	76.9	10
0.2	-		80.0	8.9	-		-		-	
0.1	-		-		85.7	7.0	-		-	
0.05	81.2	17	98.0	7.2	108	5.5	117	3.3	91.1	4.1

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 7 Recovery test for NAG

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)} (%)
0.5	89.0	7.0	–	–	–	–	82.4	13	73.0	8.3
0.2	–	–	82.2	7.4	–	–	–	–	–	–
0.1	–	–	–	–	88.0	5.3	–	–	–	–
0.05	101	19	74.1	11	85.4	11	84.4	16	82.3	10

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

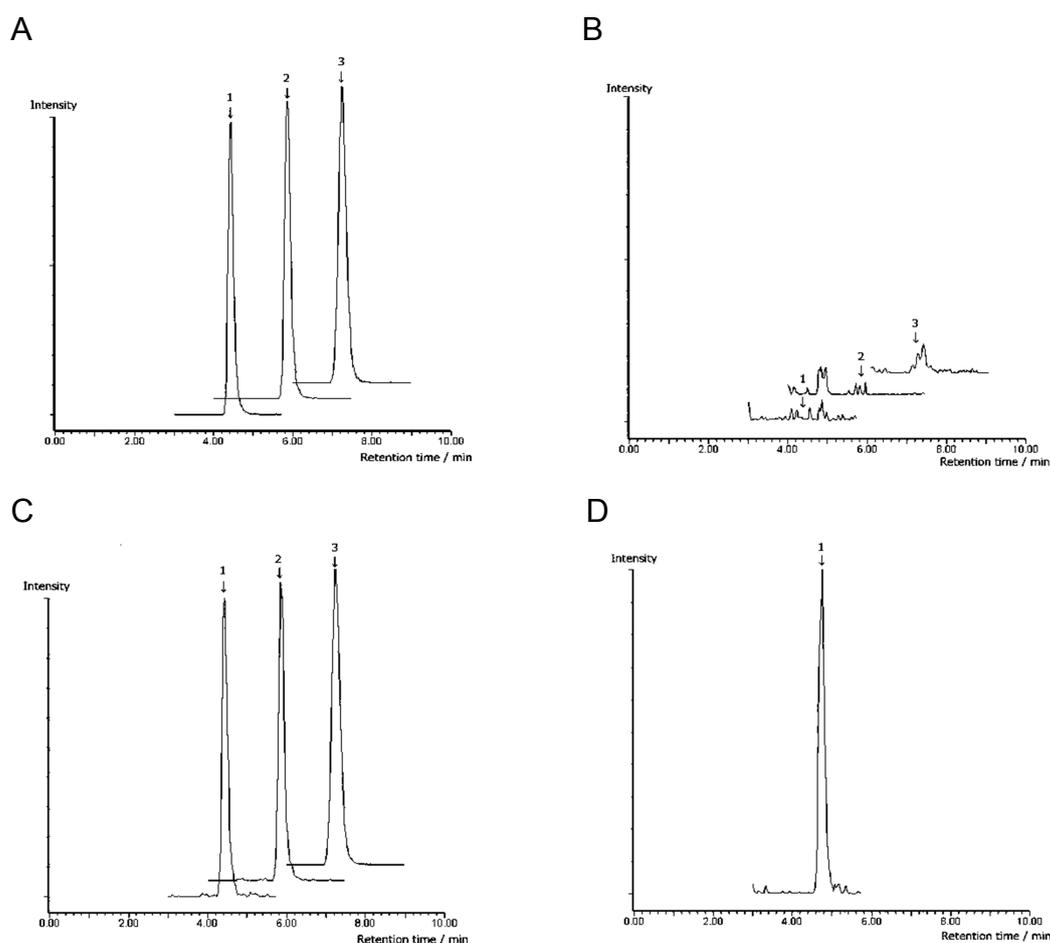


Fig. 4 Selected reaction monitoring chromatograms

(Arrows indicate the peaks or retention times of 1: GLUF derivative, 2: MPPA derivative and 3: GLYP derivative, and each peak is shown as 100 % in each segment except B, in which the peak height of the lowest standard solution (0.3 ng/mL) is to be shown as 100 %.)

A: Standard solution (The concentrations are 100 ng/mL for GLYP, GLUF and MPPA.)

B: Sample solution of barley (blank)

C: Sample solution of barley (spiked at 20 mg/kg of GLYP, 0.5 mg/kg of GLUF and MPPA)

D: Sample solution of barley (spiked at 0.5 mg/kg of NAG)

3.6 小麦の添加回収試験の検討方法

牧野らが検討した GLUF 法では、良好な添加回収試験結果が得られなかった小麦については、適用除外とされている⁵⁾。一方、GLYP 法の検討⁶⁾では、小麦の低回収率の原因は、水で調製した添加用標準液を小麦に添加したことによって粘着性の高い塊が形成されて抽出を阻害したのではないかと考え、添加用標準液の組成をメタノール-水 (19+1) に変更したところ、良好な添加回収試験結果を得ている。

そこで、本検討でも昨年度の検討方法を踏襲し、2.6 に従って添加回収試験を実施した結果、3.5 のとおり良好な結果を得ることができた。

3.7 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、大麦、小麦、稲わら、WCS (風乾物) 及びアルファルファ乾草に GLYP を添加し、添加回収試験により得られるピークの SN 比が 10 及び 3 となる濃度を求めた。その結果、SN 比が 10 となる濃度は 0.04 mg/kg (乾牧草では 20 mg/kg)、SN 比が 3 となる濃度は 0.01 mg/kg (乾牧草では 6 mg/kg) であった。

同様に、大麦、小麦、とうもろこし、稲わら及び WCS (風乾物) に GLUF 及び MPPA を添加した試料並びに NAG を添加した試料について、添加回収試験により得られるピークの SN 比が 10 及び 3 となる濃度を求めた。その結果、得られたピークの SN 比が 10 以上となる濃度は 0.05 mg/kg であった。また、SN 比が 3 となる濃度はとうもろこしで 0.02 mg/kg であった。

以上の結果から、本法の GLYP の定量下限は試料 (WCS は風乾物) 中で 0.04 mg/kg (乾牧草では 20 mg/kg)、検出下限は試料 (WCS は風乾物) 中で 0.01 mg/kg (乾牧草では 6 mg/kg) であった。GLUF、MPPA 及び NAG の定量下限は試料 (WCS は風乾物) 中でいずれも 0.05 mg/kg、検出下限は試料 (WCS は風乾物) 中でいずれも 0.02 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、大麦に GLYP として、20 mg/kg 相当量 (分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 200 µg を含有する標準液 1 mL 添加)、GLUF 及び MPPA として、それぞれ 0.5 mg/kg 相当量 (それぞれ分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に各 5 µg を含有する標準液 1 mL 添加)、とうもろこしに GLYP として、1 mg/kg 相当量 (分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 10 µg を含有する標準液 1 mL 添加)、GLUF 及び MPPA として、それぞれ 0.1 mg/kg 相当量 (それぞれ分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に各 1 µg を含有する標準液 1 mL 添加)、稲わらに GLYP として、0.2 mg/kg 相当量 (分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 2 µg を含有する標準液 1 mL 添加)、GLUF 及び MPPA として、それぞれ 0.5 mg/kg 相当量 (それぞれ分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に各 5 µg を含有する標準液 1 mL 添加)、WCS に原物換算して GLYP として、0.2 mg/kg 相当量 (分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 4.5 µg を含有する標準液 1 mL 添加)、GLUF 及び MPPA として、それぞれ 0.5 mg/kg 相当量 (それぞれ分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に各 11.25 µg を含有する標準液 1 mL 添加)、アルファルファ乾草に GLYP として、120 mg/kg 相当量 (分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 1200 µg 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⁷⁾、⁸⁾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_r) 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⁹⁾を用いて HorRat を求めた。

GLYP の結果は Table 8 のとおりであり, 大麦, とうもろこし, 稲わら, WCS 及びアルファルファ乾草について, 平均回収率は 75.4, 79.7, 88.7, 81.7 及び 77.9 %, RSD_r は 10, 5.1, 18, 12 及び 10 %, RSD_R は 22, 20, 32, 23 及び 12 %, HorRat は 2.0, 1.2, 1.6, 1.1 及び 1.5 であった。

GLUF の結果は Table 9 のとおりであり, 大麦, とうもろこし, 稲わら及び WCS について, 平均回収率は 99.3, 98.3, 96.8 及び 89.1 %, RSD_r は 11, 8.1, 6.5 及び 8.0 %, RSD_R は 15, 21, 17 及び 15 %, HorRat は 0.84, 0.96, 0.93 及び 0.85 であった。

MPPA の結果は Table 10 のとおりであり, 大麦, とうもろこし, 稲わら及び WCS について, 平均回収率は 91.1, 90.5, 91.1 及び 86.2 %, RSD_r は 10, 13, 6.3 及び 5.7 %, RSD_R は 14, 33, 13 及び 17 %, HorRat は 0.77, 1.5, 0.71 及び 0.93 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 11 に示した。

Table 8 Collaborative study results of GLYP

Laboratory No.	Feed types									
	Barley (mg/kg)		Corn (mg/kg)		Rice straw (mg/kg)		Whole-crop rice silage (mg/kg)		Alfalfa hay (mg/kg)	
1	15.2	12.6	0.872	0.854	0.160	0.240	0.163	0.154	97.7	72.0
2	18.9	18.3	0.985	0.984	0.205	0.200	0.219	0.263	114	108
3	15.3	15.2	0.747	0.755	0.181	0.226	0.170	0.156	95.5	84.1
4	19.6	15.7	1.00 ^{a)}	0.740 ^{a)}	0.186	0.245	0.170	0.166	99.1	97.3
5	14.7	12.8	0.564	0.615	0.140	0.149	0.165	0.166	88.0	92.0
6	12.2	9.07	0.548	0.640	0.0906	0.113	0.108	0.159	73.4 ^{a)}	128 ^{a)}
7	8.37	11.6	0.569	0.701	0.0889	0.0571	0.114	0.106	15.0 ^{b)}	13.4 ^{b)}
8	19.1	19.0	0.957	0.989	0.214	0.184	0.133	0.173	87.7	85.2
9	16.5	16.8	0.850	0.867	0.264	0.196	0.180	0.212	85.9	89.2
10	15.6	15.1	0.920	0.930	0.219	0.190	0.150	0.140	88.1	112.0
Spiked level (mg/kg)	20		1		0.2		0.2		120	
Mean value ^{c)} (mg/kg)	15.1		0.797		0.177		0.163		93.5	
Recovery (%)	75.4		79.7		88.7		81.7		77.9	
RSD_r ^{d)} (%)	10		5.1		18		12		10	
RSD_R ^{e)} (%)	22		20		32		23		12	
PRSD _R ^{f)} (%)	11		17		21		21		8	
HorRat	2.0		1.2		1.6		1.1		1.5	

a) Data excluded by Cochran test

b) Data excluded by single Grubbs test

c) Corn: $n=18$; Barley: $n=20$; Rice straw: $n=20$; WCS: $n=20$; Alfalfa hay: $n=16$

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 9 Collaborative study results of GLUF

Laboratory No.	Feed types							
	Barley (mg/kg)		Corn (mg/kg)		Rice straw (mg/kg)		Whole-crop rice silage (mg/kg)	
1	0.502	0.442	0.100	0.114	0.490	0.553	0.438	0.388
2	0.612	0.583	0.111	0.103	0.546	0.544	0.540	0.614
3	0.583	0.566	0.0875	0.0869	0.438	0.472	0.466	0.473
4	0.536	0.436	0.152	0.132	0.466	0.512	0.467	0.423
5	0.463	0.457	0.0815	0.0834	0.438	0.410	0.438	0.428
6	0.433	0.352	0.0642	0.0688	0.356	0.354	0.402	0.452
7	0.618	0.435	0.0883	0.0911	0.435	0.378	0.346	0.346
8	0.479	0.510	0.105	0.105	0.530	0.447	0.362	0.473
9	0.528	0.545	0.111	0.0868	0.601	0.636	0.507	0.525
10	0.440	0.407	0.0986	0.0963	0.532	0.545	0.406	0.419
Spiked level (mg/kg)	0.5		0.1		0.5		0.5	
Mean value ^{c)} (mg/kg)	0.496		0.0983		0.484		0.446	
Recovery (%)	99.3		98.3		96.8		89.1	
RSD _r ^{d)} (%)	11		8.1		6.5		8.0	
RSD _R ^{e)} (%)	15		21		17		15	
PRSD _R ^{f)} (%)	18		22		18		18	
HorRat	0.84		0.96		0.93		0.85	

- a) $n=20$
b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory
c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories
d) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 10 Collaborative study results of MPPA

Laboratory No.	Feed types							
	Barley (mg/kg)		Corn (mg/kg)		Rice straw (mg/kg)		Whole-crop rice silage (mg/kg)	
1	0.463	0.357	0.105	0.0900	0.390	0.312	0.400	0.421
2	0.581	0.550	0.109	0.101	0.452	0.449	0.574	0.586
3	0.429	0.426	0.0838	0.0849	0.551	0.495	0.393	0.409
4	0.922 ^{b)}	0.579 ^{b)}	2.43 ^{a)}	0.741 ^{a)}	0.529 ^{b)}	0.901 ^{b)}	0.376	0.382
5	0.433	0.477	0.0997	0.0881	0.409	0.434	0.347	0.347
6	0.512	0.377	0.308 ^{b)}	0.414 ^{b)}	0.422	0.420	0.393 ^{b)}	0.547 ^{b)}
7	0.416	0.375	0.0257	0.0354	0.454	0.422	0.443	0.395
8	0.521	0.502	0.107	0.142	0.488	0.481	0.440	0.506
9	0.445	0.482	0.0901	0.105	0.519	0.512	0.456	0.512
10	0.458	0.393	1.93 ^{a)}	2.58 ^{a)}	0.524	0.463	0.393	0.377
Spiked level (mg/kg)	0.5		0.1		0.5		0.5	
Mean value ^{c)} (mg/kg)	0.455		0.0905		0.455		0.431	
Recovery (%)	91.1		90.5		91.1		86.2	
RSD _r ^{d)} (%)	10		13		6.3		5.7	
RSD _R ^{e)} (%)	14		33		13		17	
PRSD _R ^{f)} (%)	18		22		18		18	
HorRat	0.77		1.5		0.71		0.93	

a) Data excluded for concern for carry-over of MPPA from standard solution

b) Data excluded by Cochran test

c) Corn: $n=14$; Barley: $n=18$; Rice straw: $n=18$; WCS: $n=18$

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 11 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	LC-MS/MS	LC column
		(i.d.×length, particle size)
1	LC: ACQUITY UPLC, Waters	XBridge C18, Waters
	MS/MS: Quattro premier XE, Waters	(2.1 mm×150 mm, 5 μm)
2	LC: ACQUITY UPLC, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
3	LC: ACQUITY UPLC, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
4	LC: 1200, Agilent Technologies	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: 6410 Triple Quad LC/MS, Agilent Technologies	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
5	LC: Shimadzu LC-20AD	Mightysil RP-18 GP, Kanto Chemical
	MS/MS: API-3200 Q TRAP, AB Sciex	(2.0 mm×150 mm, 5 μm)
6	LC: ACQUITY UPLC, Waters	ACQUITY UPLC BEH C18, Waters
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	(2.1 mm×150 mm, 1.7 μm)
7	LC: UFLC XR, Shimadzu	Inertsil ODS-SP, GL Sciences
	MS/MS: TSQ Quantam Ultra , Thermo Scientific	(2.1 mm×150 mm, 5 μm)
8	LC: LC-30AD, Shimadzu	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 3.5 μm)
9	LC: ACQUITY UPLC, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
10	LC: ACQUITY UPLC, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)

4 まとめ

穀類，乾牧草，稲わら及び WCS 中の GLYP，GLUF，MPPA 及び NAG の同時定量法として GLYP 法の適用の可否について検討したところ，以下の結果が得られ，穀類，稲わら及び WCS は適用が可能であると考えられた．また，乾牧草については，GLYP 法により抽出した後，遠心分離した試料溶液に希釈操作を追加することで以下の結果が得られ GLYP の単成分分析法としての適用が可能であると考えられた．

1) GLYP，GLUF 及び MPPA の各検量線は，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．

なお，当該検量線における各マトリックスの添加回収試験の設定濃度は，GLYP においては，大麦で 200 及び 0.4 ng/mL 相当濃度，小麦で 50 及び 5 ng/mL 相当濃度，とうもろこしで 10 及び 1 ng/mL 相当濃度，稲わらで 2 及び 0.4 ng/mL 相当濃度，WCS で 4.5 及び 0.9 ng/mL 相当濃度，

アルファルファ乾草で 2.4 及び 0.4 ng/mL 相当濃度とした。GLUF 及び MPPA においては、大麦でそれぞれ 5 及び 0.5 ng/mL 相当濃度、小麦でそれぞれ 2 及び 0.5 ng/mL 相当濃度、とうもろこしでそれぞれ 1 及び 0.5 ng/mL 相当濃度、稲わらでそれぞれ 5 及び 0.5 ng/mL 相当濃度、WCS でそれぞれ 11.25 及び 1.125 ng/mL 相当濃度とした。NAG においては、GLUF として大麦で 4.440 及び 0.444 ng/mL 相当濃度、小麦でそれぞれ 1.78 及び 0.444 ng/mL 相当濃度、とうもろこしでそれぞれ 0.888 及び 0.444 ng/mL 相当濃度、稲わらでそれぞれ 4.44 及び 0.444 ng/mL 相当濃度、WCS でそれぞれ 9.99 及び 0.999 ng/mL 相当濃度とした。

- 2) 乾牧草については、GLYP 法に対して希釈操作を追加したところ、分析対象成分が GLYP のみであれば良好な結果が得られ適用が可能であると考えられた。一方、GLUF, MPPA 及び NAG は本法の適用除外とすることにした。また、粳米については、全ての分析対象成分が本法への適用が困難であったことから、適用除外とすることにした。
- 3) 本法に従い得られる試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果、GLYP, GLUF 及び MPPA は試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。
- 4) 本法に従って得られた選択反応検出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。
- 5) 大麦, 小麦, とうもろこし, 稲わら, WCS 及びアルファルファ乾草に GLYP としてそれぞれ異なる 2 種類の濃度を添加した試料を用いて、本法により 3 点併行で定量し、回収率及び繰返し精度を検討したところ良好な結果が得られた。
- 6) 大麦, 小麦, とうもろこし, 稲わら及び WCS に GLUF, MPPA 及び NAG としてそれぞれ異なる 2 種類の濃度を添加した試料を用いて、本法により 3 点併行で定量し、回収率及び繰返し精度を検討したところ良好な結果が得られた。
- 7) 本法による GLYP の定量下限は試料中で 0.04 mg/kg (乾牧草では 20 mg/kg), 検出下限は 0.01 mg/kg (乾牧草では 6 mg/kg) であった。本法による GLUF, MPPA 及び NAG の定量下限は、いずれも試料中で 0.05 mg/kg, 検出下限は 0.02 mg/kg であった。
- 8) 大麦に GLYP として、20 mg/kg 相当量, GLUF 及び MPPA として、それぞれ 0.5 mg/kg 相当量, とうもろこしに GLYP として、1 mg/kg 相当量, GLUF 及び MPPA として、それぞれ 0.1 mg/kg 相当量, 稲わらに GLYP として、0.2 mg/kg 相当量, GLUF 及び MPPA として、それぞれ 0.5 mg/kg 相当量, WCS に GLYP として、0.2 mg/kg 相当量, GLUF 及び MPPA として、それぞれ 0.5 mg/kg 相当量, アルファルファ乾草に GLYP として、120 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) 農薬ハンドブック 2005 年版編集委員会: 農薬ハンドブック 2005 年版, 日本植物防疫協会, 631-639 (2005) (ISBN: 978-4889260991).

- 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) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安 第 14729 号 (2008).
- 5) 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) 牧野 大作，若宮 洋市，榊原 良成，船木 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).
- 7) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**(2), 331-343 (1995).
- 8) 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.
- 9) Thompson, M., Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria proficiency testing, *Analyst*, **125**, 385-386 (2000).