

4 穀類及び乾牧草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分析法の改正基準値相当濃度における妥当性確認

高橋 雄一*

Validation Study of Glyphosate Determination Method in Grains and Grass Hay by LC-MS/MS at Concentration Equivalent to the Revised Regulation Value

TAKAHASHI Yuichi*

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

We have made a validation study of glyphosate determination method in grains and grass hay at concentration equivalent to the revised regulation value. 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.

Glyphosate in grains and grass hay was extracted with water, and the extracted solution was purified with two types of solid phase extraction (SPE) columns (Oasis HLB and Oasis Plus MCX, Waters Co.; Milford, MA, USA). Having derivatized the compound with trimethyl orthoacetate, the sample solution was purified with two types of SPE columns (Sep-Pak Plus NH₂ and Silica, Waters Co.), and injected into an LC-MS/MS to determine the concentration of Glyphosate. 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 oats, barley, wheat, corn, milo, rye and klein grass hay. Glyphosate was added at the following levels: 30 mg/kg for oats, barley, wheat, milo and rye; 5 mg/kg for corn; and 500 mg/kg for klein grass hay. The resulting mean recoveries ranged from 77.5 % to 98.2 %. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was less than 6.0 %.

This method was thus validated as useful for inspections of glyphosate in grains and grass hay.

Key words: glyphosate; liquid-chromatograph tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); grains; oats; barley; wheat; corn; milo; rye; klein grass hay

キーワード: グリホサート; 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計; エレクトロスプレーイオン化法; 穀類; えん麦; 大麦; 小麦; とうもろこし; マイロ; ライ麦; クレイングラスヘイ

1 緒 言

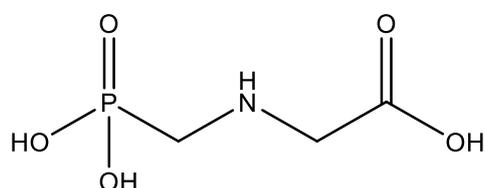
グリホサートは Monsanto Company (米国) が開発した非選択性茎葉処理型のアミノ酸系除草剤であり, 植物体内の芳香族アミノ酸の合成を阻害することにより除草効果を示す. また, グリホサート耐性遺伝子組換え植物中では *N*-アセチルグリホサートに代謝されることが知られている¹⁾. 参考にグリホサートの構造式等を Fig. 1 に示した.

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター

令和5年4月28日付けでグリホサートの飼料中の残留基準値²⁾の改正があり、えん麦、大麦及びマイロは20 mg/kgから、小麦は5 mg/kgから、ライ麦は0.2 mg/kgからいずれも30 mg/kgに、とうもろこしは1 mg/kgから5 mg/kgに、牧草は120 mg/kgから500 mg/kgに引き上げられた。しかし、これら飼料中のグリホサートの分析法で改正された基準値相当濃度の妥当性は確認されていないことから、妥当性確認が急務になっている。

飼料分析基準³⁾には飼料中のグリホサートの分析法とし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。）を用いた方法が収載されている。穀類である、えん麦、大麦、小麦、とうもろこし、マイロ及びライ麦を対象とした方法は、含リンアミノ酸系農薬の多成分同時分析法が、乾牧草を対象とした方法は、グリホサート単成分の分析法がある。両者の違いは振り混ぜ抽出後の抽出液の希釈倍率にある。前者は抽出液を2.5倍希釈してからカラム処理を行うが、後者は乾牧草の夾雑物による影響を避けるため更に500倍希釈（抽出液を1250倍希釈）してからカラム処理を行う⁴⁾。また、両者ともFig. 2に示すとおり、酢酸とオルト酢酸トリメチルを加えて加温する誘導体化を行う。これによりグリホサートの2つの水酸基及びカルボキシル基がメチル化され、イミノ基がアセチル化される。

今回、農林水産省からの要請により、LC-MS/MSを用いた穀類及び乾牧草中のグリホサートの改正基準値相当濃度における妥当性確認を実施したので、その概要を報告する。なお、とうもろこしについては、代謝物であるN-アセチルグリホサートも規制の対象とされたが、N-アセチルグリホサートについては齊木ら⁵⁾により妥当性が確認されていることから、グリホサートのみ妥当性確認を実施した。

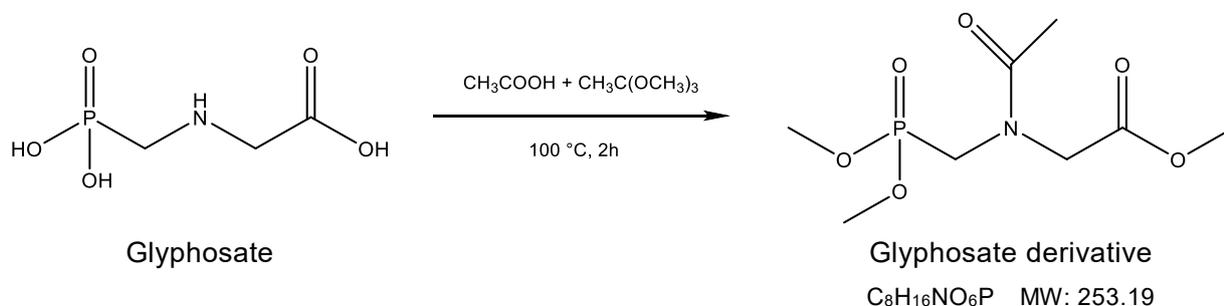


Glyphosate

N-(phosphonomethyl)glycine

C₃H₈NO₅P MW: 169.07 CAS No.: 1071-83-6

Fig. 1 Chemical structure of glyphosate



Glyphosate

Glyphosate derivative

C₈H₁₆NO₆P MW: 253.19

Fig. 2 Derivatization reaction of glyphosate

2 実験方法

2.1 試料

えん麦，大麦，小麦，とうもろこし，マイロ，ライ麦及びクレイグラスヘイはそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎し，分析用試料とした。

2.2 試薬

1) メタノール，アセトン及び酢酸エチルは残留農薬・PCB 試験用を用いた。オルト酢酸トリメチルは東京化成工業製（純度 98.0 % 以上）を用いた。酢酸は試薬特級を用いた。アセトニトリル及びギ酸は LC-MS 用（富士フイルム和光純薬製）を用いた。水は Milli-Q Advantage（Merck Millipore 製）により精製した超純水（JIS K 0211 の 5218 に定義された超純水）を用いた。

2) グリホサート標準原液

グリホサート標準品（富士フイルム和光純薬製，純度 99.0 %）25 mg を量って 25 mL の全量フラスコに入れ，水を加えて溶かし，更に標線まで水を加えてグリホサート標準原液を調製した（この液 1 mL は，グリホサートとして 1 mg を含有）。

3) 検量線作成用グリホサート標準液

グリホサート標準原液 1 mL を 10 mL の全量フラスコに入れ，標線まで水を加えて検量線作成用標準液を調製した（この液 1 mL は，グリホサートとして 100 μ g を含有）。

4) えん麦，大麦，マイロ及びライ麦添加用標準液

グリホサート標準原液の一部を水で正確に希釈し，1 mL 中にグリホサートとして 300 μ g を含有するえん麦，大麦，マイロ及びライ麦添加用標準液を調製した。

5) とうもろこし添加用標準液

グリホサート標準原液の一部を水で正確に希釈し，1 mL 中にグリホサートとして 50 μ g を含有するとうもろこし添加用標準液を調製した。

6) クレイグラスヘイ添加用標準液

グリホサート標準品（富士フイルム和光純薬製，純度 99.0 %）100 mg を量って 20 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クレイグラスヘイ添加用標準液を調製した（この液 1 mL は，グリホサートとして 5 mg を含有）。

7) 小麦添加用標準液

クレイグラスヘイ添加用標準液の一部を，牧野ら⁶⁾の報告に従いメタノール-水（19+1）で正確に希釈し，1 mL 中にグリホサートとして 300 μ g を含有する小麦添加用標準液を調製した。

8) 0.01 % (v/v) ギ酸溶液

ギ酸 1 mL に水を加えて 100 mL とし，更にこの液 10 mL に水を加えて 1 L とした。

2.3 装置及び器具

1) 粉碎機：

粉碎機 1（えん麦，大麦，小麦，とうもろこし，マイロ及びライ麦用）：

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

粉碎機 2（クレイグラスヘイ用）：

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

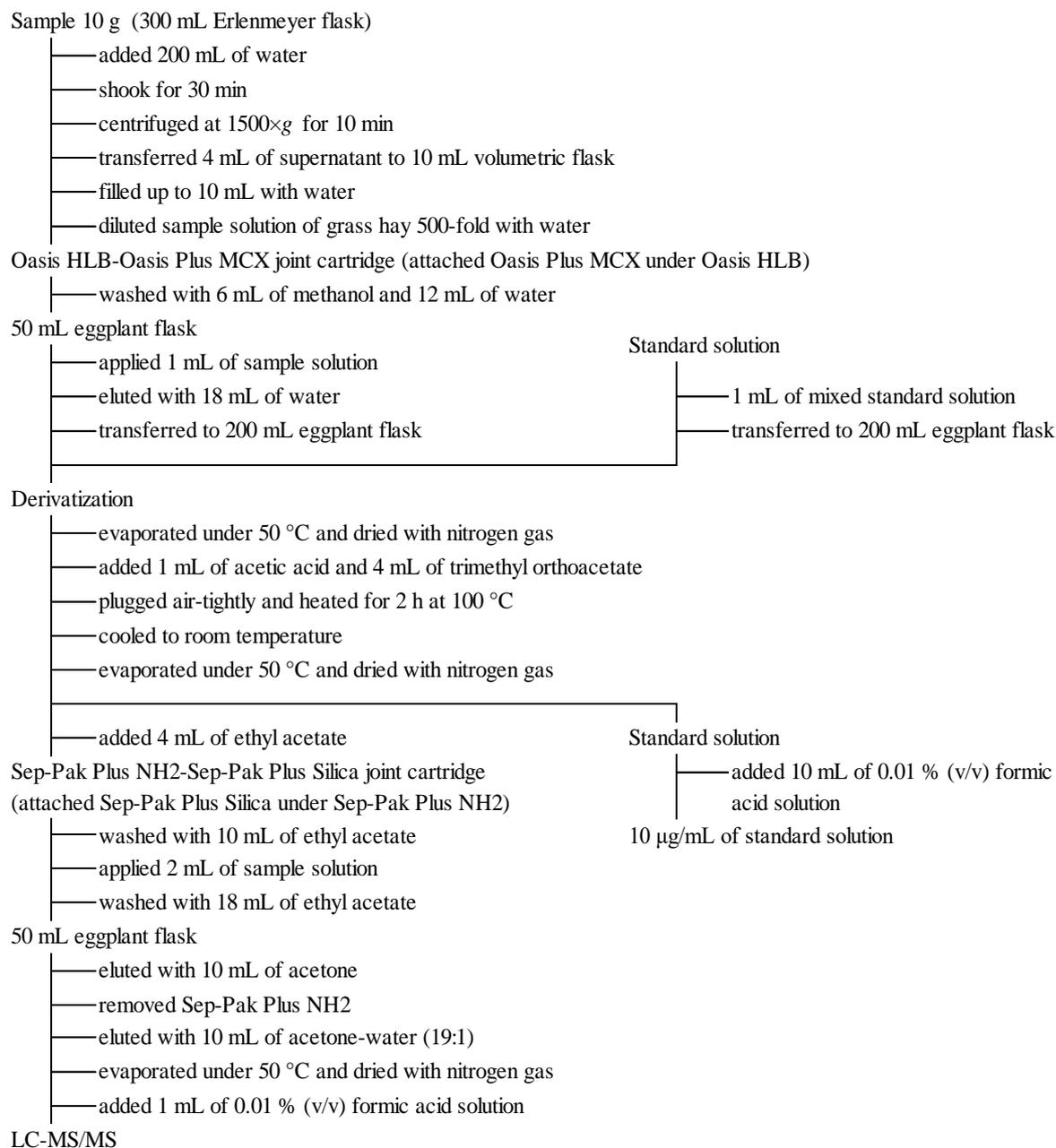
2) 振り混ぜ機：レシプロシェーカー SR-2DW タイテック製（使用時振動数 300 rpm）

- 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) LC-MS/MS :
LC 部 : ACQUITY UPLC System Waters 製
MS/MS 部 : ACQUITY TQ Detector Waters 製

2.4 定量方法

えん麦, 大麦, 小麦, とうもろこし, マイロ及びライ麦は飼料分析基準第 6 章第 3 節 5 に従い操作した. また, クレイングラスヘイは飼料分析基準第 6 章第 1 節 73.2 に従い操作した.

定量法の概要を Scheme 1 に, LC-MS/MS の測定条件を Table 1 及び 2 に示した.



Scheme 1 Analytical procedure for glyphosate

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 (800 L/h, 400 °C)
Cone gas	N ₂ (50 L/h)
Capillary voltage	3.0 kV
Collision gas	Ar (0.20 mL/min)

Table 2 MS/MS parameters

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

2.5 添加回収試験

2.2 の 4)~7) のグリホサート標準液を添加に用いた。

えん麦，大麦，小麦，マイロ及びライ麦にグリホサートとして 30 mg/kg 相当量（最終試料溶液中でグリホサートとして 300 ng/mL 相当量），とうもろこしにグリホサートとして 5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中でグリホサートとして 50 ng/mL 相当量），クレイングラスヘイにグリホサートとして 500 mg/kg 相当量（最終試料溶液中でグリホサートとして 10 ng/mL 相当量）になるようにそれぞれグリホサート標準液を添加後よく混合し，一夜静置した後に 2.4 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 添加回収試験

2.5 により添加回収試験を実施した。添加回収試験の結果は Table 3 のとおり，平均回収率は 77.5~98.2 %，その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 6.0 % 以下の成績が得られ，飼料分析基準別紙 2 の試験法の妥当性確認ガイドライン（以下「妥当性確認ガイドライン」という。）に定められた目標値（真度：70 % 以上 120 % 以下，精度：500 mg/kg では 6.2 % 以下，30 mg/kg では 9.5 % 以下，5 mg/kg では 12.5 % 以下）を満たす結果であった。

なお，得られた選択反応検出クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

Table 3 Recoveries for glyphosate in feeds

Spiked level (mg/kg)	Oats		Barley		Wheat		Corn	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
5	—	—	—	—	—	—	81.3	3.0
30	94.8	2.0	90.8	1.6	98.2	0.6	—	—
500	—	—	—	—	—	—	—	—

Spiked level (mg/kg)	Milo		Rye		Grass hay	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
5	—	—	—	—	—	—
30	85.6	1.7	77.5	4.7	—	—
500	—	—	—	—	91.5	6.0

— : Not tested

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

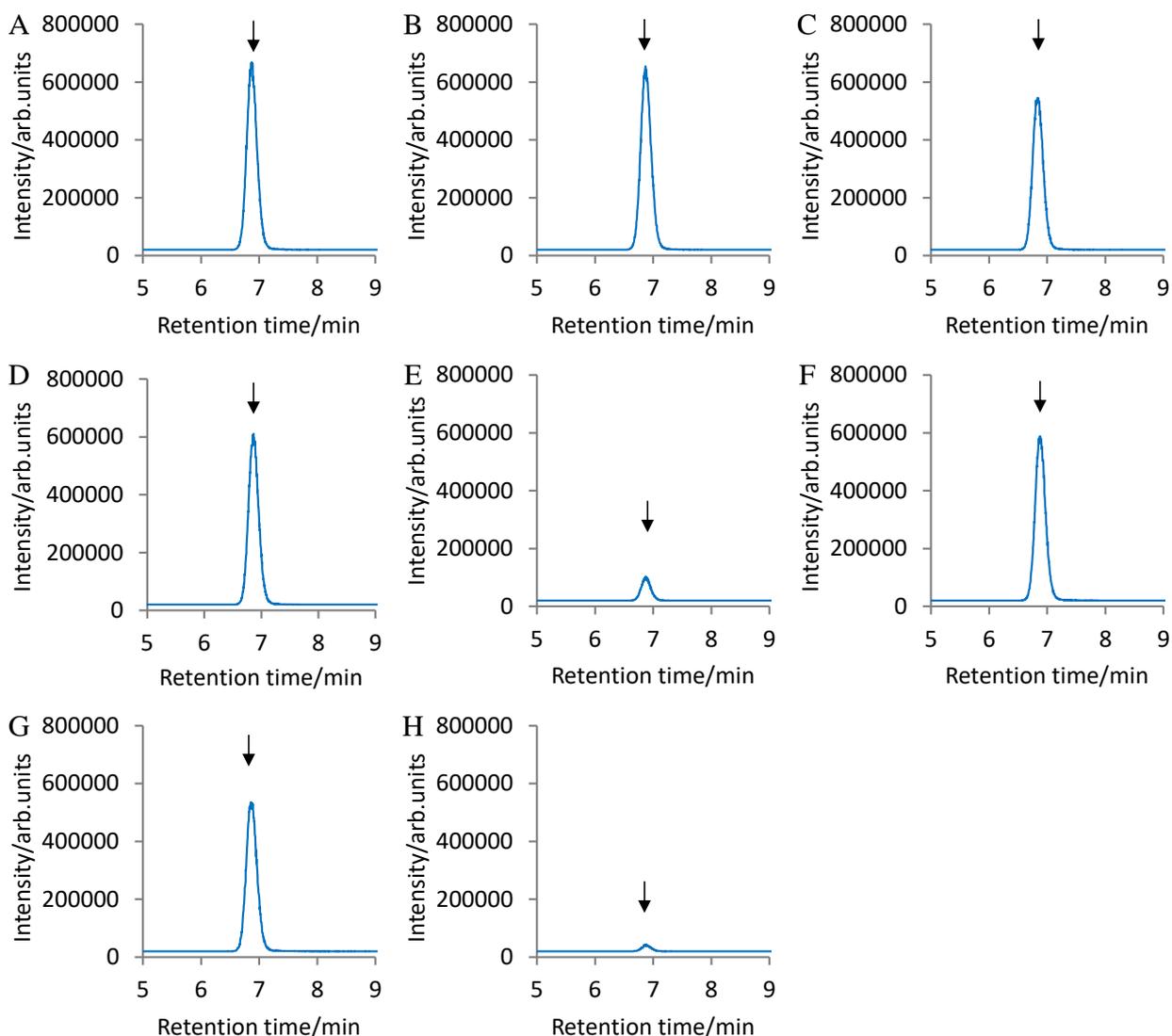


Fig. 3 Typical selected reaction monitoring chromatograms of glyphosate derivative in standard and spiked sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrows indicate the peaks of glyphosate derivative.)

A: Standard solution (300 ng/mL: 1.5 ng as injection amount)

B: Spiked sample solution of oats (spiked at 30 mg/kg of glyphosate (1.5 ng as injection amount))

C: Spiked sample solution of barley (spiked at 30 mg/kg of glyphosate (1.5 ng as injection amount))

D: Spiked sample solution of wheat (spiked at 30 mg/kg of glyphosate (1.5 ng as injection amount))

E: Spiked sample solution of corn (spiked at 5 mg/kg of glyphosate (0.25 ng as injection amount))

F: Spiked sample solution of milo (spiked at 30 mg/kg of glyphosate (1.5 ng as injection amount))

G: Spiked sample solution of rye (spiked at 30 mg/kg of glyphosate (1.5 ng as injection amount))

H: Spiked sample solution of klein grass hay (spiked at 500 mg/kg of glyphosate (0.05 ng as injection amount))

4 まとめ

穀類及び乾牧草中に残留するグリホサートについて、添加回収試験を実施したところ以下の結果が得られ、飼料分析基準に記載されている分析法の基準値相当濃度における妥当性を確認することができた。

- 1) グリホサートとして、えん麦、大麦、小麦、マイロ及びライ麦に 30 mg/kg 相当量、とうもろこしに 5 mg/kg 相当量、クレイングラスヘイに 500 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結果が得られた。

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) 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).
- 3) 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，令和 5 年 12 月 1 日，5 消安第 4714 号 (2023).
- 4) 杉本 泰俊，船木 紀夫，榊原 良成：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，飼料研究報告，40，71-90 (2015).
- 5) 齊木 雅一，廣井 利明：含リンアミノ酸系農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法の妥当性確認～*N*-アセチルグリホサートの追加並びに大豆及び大豆油かすへの適用拡大～，飼料研究報告，44，136-150 (2019).
- 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質量分析計による定量法，飼料研究報告，39，30-43 (2014).