

※本報告書は、試験法開発における検討結果をまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。
なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意ください。

平成 22 年度

残留農薬等試験法の開発

グリホサート試験法（畜水産物）

グリホサート試験法（畜水産物）の検討結果

[緒言]

1. 目的及び試験法の検討方針

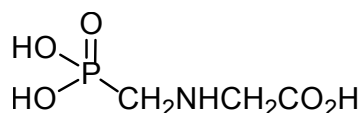
グリホサートは非選択性非ホルモン型の茎葉処理剤である。すでに厚生労働省通知試験法として個別試験法(HPLC-FL)（農産物）が示されている。施行通知〔食安発第1129001号平成17年11月29日（最終改正：平成19年5月31日）〕記載されている規制対象物質及び残留基準値案を踏まえ、試験法の開発を行った。

規制対象物質

- ・グリホサート
- ・グリホサートアンモニウム塩
- ・グリホサートイソプロピルアミン塩
- ・グリホサートトリメシウム塩
- ・グリホサートナトリウム塩

2. 分析対象化合物の構造式、物理化学的性質、基準値等に関する情報

1) 構造式及び物理化学的性質



グリホサート

化学式：C₃H₈NO₅P

分子量：169.1

化学名（IUPAC）：N-（phosphonomethyl）glycine

外 観：白色結晶

融 点：200℃で分解

蒸気圧：1.31×10⁻² mPa（25℃）

溶解性：水 10.5 g/L（pH 1.9、20℃）

アセトン、エタノール、キシレン等の主な有機溶媒にはほとんど不溶

オクタノール/水分配係数：log P_{ow}<-3.2（pH 2~5、20℃）

酸解離定数(pKa)：2.34（20℃）、5.73（20℃）、10.2（25℃）

安定性：安定

（出典：The e-Pesticide Manual 15th ed.,ver.5.0）

基準値

牛の筋肉、乳、鶏の筋肉、鶏の卵 0.1 ppm

牛の脂肪 0.5 ppm

牛の肝臓 2 ppm

魚介類（さけ目、うなぎ目） 0.3 ppm

魚介類（貝類） 3 ppm

[実験方法]

1. 試料

1) 購入先

うなぎは愛知県の業者にて、その他の試料については都内のスーパーにて購入した。

2) 試料の採取方法

- ①牛の筋肉は脂肪層を除き、細切均一化した。
- ②牛の脂肪は筋肉部を除き、細切均一化した。
- ③牛の肝臓は、全体を細切均一化した。
- ④さけは可食部（皮を含む）を細切均一化した。
- ⑤うなぎは、活鰻を使用し、頭部を除いた可食部（内臓、骨及び皮を含む）を細切均一化した。
- ⑥しじみは、貝殻を除き細切均一化した。
- ⑦牛乳は全体をよく混合して均一化した。
- ⑧鶏卵は、殻を除き卵白と卵黄を合わせてよく混合し均一化した。
- ⑨はちみつは百花蜜を使用し、加温（40℃以下）してから、よく混合して均一化した。
- ⑩鶏の筋肉は脂肪層を除き、細切均一化した。

2. 試薬・試液

1) 試薬

アセトン、酢酸エチル、ジクロロメタン、メタノール；残留農薬試験用（関東化学製）

アセトニトリル；高速液体クロマトグラフィー用（関東化学製）

塩酸；試薬特級（小宗化学薬品製）

オルト酢酸トリメチル（東京化成工業製、98%以上）

ギ酸、酢酸；特級（関東化学製）

陽イオン交換カラム樹脂；試薬特級

（精製樹脂ムロマック 50WX8 200-400 H、室町ケミカル製）

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム

（Bond Elut C18、充てん量500 mg、Varian製）

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 PSA、充てん量500 mg、Varian製）

フロリジルミニカラム

（Sep-Pak フロリジル、充てん量910 mg、Waters製）

グリホサート標準品（純度99.2%、SIGMA-ALDRICH製）

2) 標準溶液の調製方法

標準原液：グリホサート標準品25 mgを精秤し、水で溶解して500 mg/L溶液を調製した。

添加用標準溶液：グリホサート標準原液を水で希釈し、0.2、2、4、6、25、30及び40 mg/Lの濃度の標準溶液を調製した。（なお、グリホサート標準原液をアセトンで希釈した25 mg/Lも調製し、脂肪への添加用として使用した。）

検量線用標準溶液：グリホサート標準原液を水で希釈し、20 mg/Lの濃度の溶液を調製した。この1 mLを分取し、水を除いた後、酢酸1 mL及びオルト酢酸トリメチル4 mLを加え、密栓し100℃で2時間加熱する。放冷後、50℃以下で減圧濃縮し、乾固する。誘導体化物の精製は行わず、残留物を0.01%ギ酸で希釈し、0.00025、0.0005、0.001、0.0025、0.005、0.01 mg/Lの濃度の標準溶液を調製した。

3. 装置

	型式	会社
MS 装置	API-3200	AB SCIEX
LC 装置	Agilent1200	Agilent Technologies

4. 測定条件

LC 条件	
カラム	Mightysil RP-18 GP サイズ：内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm 会社：関東化学株式会社
移動相流速 (mL/min)	0.2
注入量 (μL)	4
カラム温度 (°C)	40
移動相	アセトニトリル及び0.01 vol%ギ酸 (7 : 93) 混液
MS 条件	
測定モード	MS/MS、選択反応モニタリング (SRM)
イオン化モード	ESI (+)
キャピラリ電圧 (V)	4000
ソース温度 (°C)	700
コーンガス	窒素
脱溶媒ガス	窒素 70 psi
コリジョンガス	窒素
定量イオン (m/z)	+254→102[コーン電圧：21(V)、コリジョンエネルギー：21(eV)]
定性イオン (m/z)	+254→212[コーン電圧：21(V)、コリジョンエネルギー：17(eV)]
保持時間	7.8分

5. 定量

水で調製された20 mg/L標準溶液を1 mL（グリホサート標準品20 µg）の水を除去し、ここに酢酸1 mL及びオルト酢酸トリメチル4 mLを加え、密栓し100°Cで2時間加熱する。放冷後、50°C以下で減圧濃縮し、乾固する。誘導体化物の精製は行わず、残留物を0.01%ギ酸で希釈し、0.00025、0.0005、0.001、0.0025、0.005、0.01 mg/Lの濃度の標準溶液を調製した。標準溶液4 µLをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積から絶対検量線法で検量線を作成した。試験溶液4 µLをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積と作成した検量線からグリホサートの含量を算出した。

1) 検量線の直線性 (図3)

4. の測定条件において、濃度0.00025 mg/L (0.001 ng) ~0.01 mg/L (0.04 ng) の範囲で良好な直線性を示した。

2) 標準溶液の検出感度 (図4)

定量限界相当の検出量：0.002 ng (0.0005 mg/L×4 µL) のピークのS/N比は10以上であった。

6. 試験溶液の調製

1) 試験法の分析操作

グリホサートを試料から水で抽出すると同時にジクロロメタンで精製した後、強酸性陽イオン交換カラム及びオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した。誘導体化し、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で精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認した。

① 抽出

試料10.0 g（脂肪は5.00 g）を200 mL遠心管に量り採り、水100 mL及びジクロロメタン50 mLを加え、ホモジナイズした後、毎分2,500回転で10分間遠心分離を行い、水層を200 mL容メスフラスコに採取した。残留物に水50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離した。水層を採り、先の水層に合わせた後、水を加えて正確に200 mLとした。

② 精製

a 強酸性陽イオン交換クロマトグラフィー

内径10 mm、長さ300 mmのクロマトグラフ管に、あらかじめ2 mol/L塩酸に浸し一晩放置後、水で中性まで洗浄し、次いで2 mol/L水酸化ナトリウム溶液に浸し一晩放置した後、水で中性になるまで洗浄した強酸性陽イオン交換樹脂（粒径37~74 µm）12 mLを水に懸濁したものを入れ、カラムの上端に少量の水が残る程度まで水を流出させる。このカラムに①で得られた抽出液2 mLを注入し流出液は捨てた。さらに水2 mLを注入し流出液は捨てた。次いで、水7 mLを注入し溶出液を採った。

b オクタデシルシリル化シリカゲルクロマトグラフィー

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）にメタノール及び水各5 mLを順次注入し、流出液は捨てた。このカラムに②-aで得られた溶液を注入した後、さらに水5 mLを注入し、溶出液を100 mL遠心管に採り、溶出液を50°C以下で減圧濃縮し、乾固した。

③ 誘導体化

②-bで得られた残留物に酢酸1 mLを加えて溶かし、オルト酢酸トリメチル4 mLを加え、密栓し100°Cで2時間加熱した。反応液を50°C以下で減圧濃縮し、乾固した。この残留物にアセトン及び酢酸エチル（3：17）混液5 mLを加えて溶かした。

④ グリホサート誘導体化物の精製

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の下にフロリジルミニカラムを連結し、アセトン及び酢酸エチル各5 mLを順次注入し、流出液は捨てた。このカラムに③で得られた溶液を注入した後、さらに容器をアセトン及び酢酸エチル（3：17）混液10 mLで洗いこみカラムに注入し、流出液は捨てた。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をはずし、フロリジルミニカラムにアセトン及び酢酸エチル（1：1）混液10 mLを注入し、流出液は捨てた。次いで、アセトン及びメタノール（4：1）混液10 mLを注入し、溶出液を50 mL遠心管に採り40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物を0.01 vol%ギ酸に溶解し、正確に2 mL（脂肪は1 mL）としたものを試験溶液とした。

秤 取

↓ 脂肪以外：試料10.0 g

↓ 脂肪：試料5.00 g

ジクロロメタン存在下水抽出

↓ 水100 mL及びジクロロメタン50 mLを加え、ホモジナイズ

↓ 遠心分離、水層を採る。

↓ 残留物及びジクロロメタン層に水50 mLを加え、ホモジナイズ

↓ 遠心分離、水層を採る。

↓ 水層を合わせて、水を加え、正確に200 mLとする

強酸性陽イオン交換カラムクロマトグラフィー

↓ 内径10 mm、長さ300 mmのクロマトグラフ管に、陽イオン交換樹脂12 mLを水で充てん

↓ 2 mL負荷

↓ 水2 mLで洗浄

↓ 水7 mLで溶出

オクタデシルシリル化シリカゲルクロマトグラフィー

↓ メタノール及び水各5 mLで予備洗浄

↓ 全量負荷、溶出

↓ 水5 mLで溶出

↓ 溶出液を減圧濃縮、窒素乾固

誘導体化

↓ 酢酸1 mL及びオルト酢酸トリメチル4 mL

↓ 100℃で2時間加熱

↓ 反応液を減圧濃縮、窒素乾固

↓ アセトン及び酢酸エチル（3：17）混液5 mLに溶解

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルカラム/フロリジルカラム連結

クロマトグラフィー

↓ アセトン及び酢酸エチル各5 mLで予備洗浄

↓ 全量負荷

↓ アセトン及び酢酸エチル（3：17）混液10 mLで洗浄

↓ 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はずす

↓ アセトン及び酢酸エチル（1：1）混液10 mLで洗浄

↓ アセトン及びメタノール（4：1）混液10 mLで溶出

↓ 溶出液を減圧濃縮、窒素乾固

↓ 0.01 vol%ギ酸で正確に2 mL（脂肪は1 mL）とし、試験溶液とする

LC-MS/MS定量

4 μL注入

2) 定量限界

① 脂肪以外

$$0.01 \text{ mg/kg} \left[(2 \text{ mL}/0.1 \text{ g}^{*1}) \times (0.002 \text{ ng}/4 \text{ }\mu\text{L}) \right]$$

$$*1 \quad 10.0 \text{ g} \times 2 \text{ mL}/200 \text{ mL}$$

② 脂肪

$$0.01 \text{ mg/kg} \left[(1 \text{ mL}/0.05 \text{ g}^{*1}) \times (0.002 \text{ ng}/4 \text{ }\mu\text{L}) \right]$$

$$*1 \quad 5.00 \text{ g} \times 2 \text{ mL}/200 \text{ mL}$$

7. マトリックス添加標準溶液の調製

1) 定量限界相当濃度 (定量限界の推定用)

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵及び鶏の筋肉の各ブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、0.0005 mg/L*の誘導体化物標準溶液0.5 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。 (*グリホサートとしての濃度)

2) 添加回収試験における回収率 100%相当濃度 (試料マトリックスの測定への影響用)

牛の筋肉、牛乳、鶏卵及び鶏の筋肉は試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、0.005 mg/L*の誘導体化物標準溶液0.5 mLに溶解したものを、牛の脂肪は試験溶液から0.2 mL分取し溶媒を除去した後、0.005 mg/L*の誘導体化物標準溶液1 mLに溶解したものを、牛の肝臓は試験溶液から0.5 mLを分取し溶媒を除去した後、0.005 mg/L*の誘導体化物標準溶液10 mLに溶解したものを、さけ及びうなぎは試験溶液から1 mL分取し溶媒を除去した後、0.005 mg/L*の誘導体化物標準溶液3 mLに溶解したものを、しじみは試験溶液から0.5 mLを分取し溶媒を除去した後、0.005 mg/L*の誘導体化物標準溶液15 mLに溶解したものを、はちみつは試験溶液から0.5 mLを分取し溶媒を除去した後、0.0005 mg/L*の誘導体化物標準溶液0.5 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。 (*グリホサートとしての濃度)

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

1) MS条件の検討

グリホサートを誘導体化することで、MSでの測定が可能になった。グリホサート誘導体化物のESI (+) モード測定時のマススペクトルを図1に示した。その結果から、基準ピークとして m/z 254が得られたので、グリホサート誘導体化物のプロトン付加分子 (m/z 254 $[M+H]^+$) をプリカーサーイオンとした。 m/z 254をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図2に示した。強度としては m/z 254をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンである m/z 102が一番強く、次いで m/z 74が続いたが、 m/z 74は選択性が悪かったため、選択性も考慮し、 m/z 102を定量用イオンに、また m/z 74の次に高い強度を示した m/z 212を定性用イオンとした。

グリホサート誘導体化物標準溶液 (グリホサートとして0.0005 mg/L) におけるS/NをTable1に示した。

Table1 グリホサート誘導体化物のS/N (0.0005 mg/L)

プリカーサーイオン	プロダクトイオン	イオン化モード	S/N	Area (counts)
254	102	ESI (+)	178	9517
254	212	ESI (+)	37	3581

2) LC条件の検討

分離カラムに Mightysil RP-18 GP (内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm) を用い、移動相としてアセトニトリル及び 0.01 vol%ギ酸 (7 : 93) 混液を用いて、イソクラティックの条件で検討を行ったところ、ピーク形状、分離、再現性及び感度のいずれも良好な結果が得られたので、カラムは Mightysil RP-18 GP を、移動相にはアセトニトリル及び 0.01 vol%ギ酸 (7 : 93) 混液を用いることとした。

2. 試験溶液調製法の検討

1) 抽出方法の検討

グリホサートは水への溶解度が非常に高く、その他の有機溶媒にはほとんど不溶であることから、抽出溶媒は水を選択した。水のみでの抽出では、畜水産物の固体試料において抽出溶媒と試料が十分に混和されないことからヘキサン及び酢酸エチルを同時に加えて抽出し、洗浄を行う検討を行った。その結果、一部の食品で有機溶媒層がゲル状になり、水も有機溶媒とともに一部ゲル化してしまった。上層の有機溶媒層がゲル状になってしまったため、有機溶媒層と水層の分離も困難であった。ヘキサン及び酢酸エチルの代わりにジクロロメタンを用いるとゲル化が低減され、操作性も良好であった。よって、抽出には、ジクロロメタン存在下、水で抽出する方法を採用した。

また、水で500 mg/Lの標準溶液を調製しアセトンで25 mg/Lに希釈した標準溶液を、融解させた脂肪に100 µLを添加後、冷凍庫で2時間冷やし固めたものを用いた添加回収試験と、融解させない脂肪を用いた添加回収試験を実施した結果、融解させた脂肪に添加後、一度固めた脂肪での回収率は77%であり、融解させない脂肪での添加回収率は78%であり、大きな差異はなかった。

2) 抽出液の精製

①強酸性陽イオン交換カラムクロマトグラフィー

内径10 mm、長さ300 mmのクロマトグラフ管に、あらかじめ2 mol/L水酸化ナトリウムに浸し一晩放置後、水を用いて洗液のpHが中性になるまで洗浄し、次いで2 mol/L塩酸に浸し一晩放置した後、水を用いて洗液のpHが中性になるまで洗浄した強酸性陽イオン交換樹脂（粒径37~74 µm）12 mLを水に懸濁したものを入れ、カラムの上端に少量の水が残る程度まで水を流出させた。このカラムに標準溶液2 mL（0.01 µg/mL グリホサート標準溶液（溶媒：水）1 mL+ 水1 mL）を負荷し、溶出状況をTable2に示した。負荷後、さらに水2 mLでは溶出されず、その後の水7 mLではほぼ100%が溶出され、良好な回収率が得られた。

Table 2 強酸性陽イオン交換カラムからの溶出状況 (%)

	負荷液 (2 mL)	水			合計
		0-2 mL	2-9 mL	9-11 mL	
グリホサート	0	0	104	0	104

ムロマック、50Wx8、200-400 mesh、H form 12 mL 水で充てん
供試量：グリホサート 0.1 µg

その他、ベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲルミニカラム（Bond Elut SCX、充てん量500 mg）及びトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム（Bond Elut SAX、充てん量500 mg）についても検討を行ったが、いずれのミニカラムも①強酸性陽イオン交換カラムクロマトグラフィーに比べ精製効果は劣り、試料共存下では溶出がずれてしまう傾向があったため、使用しなかった。

②オクタデシルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムをメタノール及び水各5 mLで予備洗浄した後、標準溶液7 mL (0.01 µg/mL グリホサート標準溶液 (溶媒:水) 1 mL+ 水6 mL) を負荷した。溶出状況をTable3に示した。負荷液7 mLの溶出後、水5 mLでほぼ100%が溶出され、良好な回収率が得られた。

Table 3 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況 (%)

	負荷液 (7 mL)	水		合計
		0-5 mL	5-10 mL	
グリホサート	101	0		101

Bond Elut C18、充てん量 500 mg、Varian 製
供試量：グリホサート 0.1 µg

3) 誘導体化

飼料分析基準、含リンアミノ酸系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法を参考に、誘導体化の検討を行った。飼料分析基準では100°C、2時間 (密栓) で誘導体化を行っているが、反応中に栓が飛ぶなどの危険性があるため、反応温度を下げる事が可能か検討した。結果をTable 4に示した。反応温度が60°Cでは16時間反応させても反応率がやや悪かったため、飼料分析基準と同様に100°C、2時間で誘導体化を行うこととした。なお、危険を回避するため、飛ばないように栓をクランプで固定し、栓の上にタオルを掛け、さらにその上から平板状の重りを載せた。

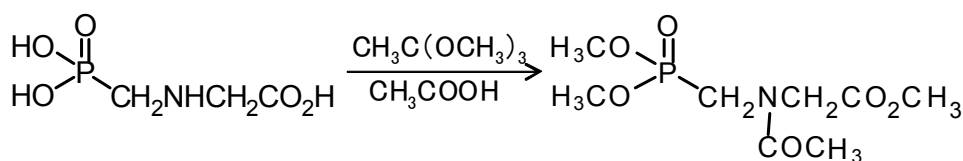


Table4 60°Cでの誘導体化率*1 (%)

反応条件	60°C			
	2 時間	3 時間	12 時間	16 時間
グリホサート	59	75	87	85

0.1 µg に酢酸 1 mL 及びオルト酢酸トリメチル 4 mL を加え各条件で誘導体化
*1 100°C、2 時間誘導体化したものを 100 とした。

4) グリホサート誘導体化物の精製

①エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルカラムによる精製

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アセトン及び酢酸エチル各5 mLで予備洗浄した後、グリホサート誘導体化物1 µg (グリホサートとして) をアセトン及び酢酸エチル (3 : 17) 混液5 mLに溶解したものを負荷した。溶出状況をTable5に示した。負荷液5 mLの溶出後、アセトン及び酢酸エチル (3 : 17) 混液10 mLでほぼ100%が溶出され、良好な回収率が得られた。

Table 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からの溶出状況 (%)

	負荷液 (5 mL)	アセトン及び酢酸エチル (3 : 17) 混液		合計
		0-10 mL	10-15 mL	
グリホサート		98	0	98

Bond Elut PSA、充てん量 500 mg、Varian 製
 供試量：グリホサート誘導体化物 1 µg (グリホサートとして)

②フロリジルミニカラムによる精製

フロリジルミニカラムをアセトン及び酢酸エチル各 5 mL で予備洗浄した後、グリホサート誘導体化物 1 µg (グリホサートとして) をアセトン及び酢酸エチル (3 : 17) 混液 5 mL に溶解したものを負荷した。溶出状況を Table 6 に示した。アセトン及び酢酸エチル (3 : 17) 混液及びアセトン及び酢酸エチル (1 : 1) 混液では溶出せず、アセトン及びメタノール (4 : 1) 混液 0-10 mL で良好な回収率が得られた。

Table 6 フロリジルミニカラムからの溶出状況 (%)

負荷液 (5 mL)	アセトン及び酢酸エチル		アセトン及びメタノール		合計
	(3 : 17)	(1 : 1)	(4 : 1)		
	0-10 mL	0-10 mL	0-10 mL	10-15 mL	
グリホサート	0	0	94	0	94

Sep-Pak フロリジル (充てん量 910 mg、Waters 製)

供試量：グリホサート誘導体化物 1 µg (グリホサートとして)

グリホサート誘導体化物はフロリジルのみだと、試料共存下では溶出がずれてしまう傾向があったため、フロリジルミニカラムの上にエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムを連結して用いることとした。

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を連結し、アセトン及び酢酸エチル各 5 mL で予備洗浄した後、グリホサート誘導体化物 1 µg (グリホサートとして) をアセトン及び酢酸エチル (3 : 17) 混液 5 mL に溶解したものを負荷した。次いでアセトン及び酢酸エチル (3 : 17) 混液 10 mL で溶出させ、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外した後、フロリジルミニカラムをアセトン及び酢酸エチル (1 : 1) 混液 10 mL で洗浄した。その後、アセトン及びメタノール (4 : 1) 混液 10 mL で溶出した時の溶出状況を Table 7 に示した。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を連結してもフロリジルの溶出状況に変わりがないことを確認した。

Table 7 エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル/フロリジル連結ミニカラムからの溶出状況 (%)

負荷液 (5 mL)	アセトン及び酢酸エチル		アセトン及びメタノール		合計
	(3 : 17)	(1 : 1)	(4 : 1)		
	0-10 mL	0-10 mL	0-10 mL	10-15 mL	
グリホサート	0	0	94	0	94

Bond Elut PSA、充てん量 500 mg、Varian 製

Sep-Pak フロリジル (充てん量 910 mg、Waters 製)

供試量：グリホサート誘導体化物 1 μ g（グリホサートとして）

3. 添加回収試験

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵及びはちみつの9品目に鶏の筋肉を加えた10品目を試料とし、[実験方法]6の分析法に従って添加回収試験を行った。なお、添加試料の調製方法は以下の通り調製した。

牛の筋肉、牛乳、鶏卵及び鶏の筋肉（添加濃度：0.1 ppm相当）：試料10.0 gに添加用標準溶液2 mg/Lを0.5 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

牛の脂肪（添加濃度：0.5 ppm相当）：融解させた試料5.00 gに添加用標準溶液25 mg/Lを0.1 mL添加しよく混合した後、2時間冷凍庫で冷やし固めた。

牛の肝臓（添加濃度：2 ppm相当）：試料10.0 gに添加用標準溶液40 mg/Lを0.5 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

さけ及びうなぎ（添加濃度：0.3 ppm相当）：試料 10.0 g に添加用標準溶液 6 mg/L を 0.5 mL 添加しよく混合した後、30 分間放置した。

しじみ（添加濃度：3 ppm相当）：試料 10.0 g に添加用標準溶液 30 mg/L を 1 mL 添加しよく混合した後、30 分間放置した。

はちみつ（添加濃度：0.01 ppm相当）：試料10.0 gに添加用標準溶液0.2 mg/Lを0.5 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

1) 選択性の評価

表1 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度 ^{*2} (ppm)	妨害ピークの許容範囲			ピーク面積(高さ) ^{*3}			選択性の評価 ^{*5}	備考	
						評価対象濃度 (ppm)	判定基準	面積又は高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 ^{*4} (b)	面積(高さ)比 (a)/(b)			
	グリホサート	牛の筋肉	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛の脂肪	0.01	0.5	0.5	基準値	0.5	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛の肝臓	0.01	2	2	基準値	2	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		さけ	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		うなぎ	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		しじみ	0.01	3	3	基準値	3	< 0.100	面積	1704	1886000	0.001	○	
		牛乳	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		鶏卵	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		鶏の筋肉	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。
 2 添加濃度と評価対象濃度が異なる場合(定量限界と基準値との関係が、『定量限界<基準値<定量限界×3』となる場合)には、『』が表示される。
 『*』が表示された分析対象化合物は、添加濃度と評価対象濃度が異なるため、別途、定量限界濃度相当のマトリックス添加標準溶液を調製して評価する。
 *3 ブランク試料及び標準溶液の順に測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)
 *4 試料中の濃度が「評価対象濃度(基準値濃度又は定量限界濃度)」相当になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)を用いる。
 ブランク試料に妨害ピークが観察されなかった場合には、標準溶液のピーク面積(高さ)は求めなくても良い。
 *5 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の判定基準に適合する場合には「○」、適合しない場合には「×」を記載する。

しじみに定量限界相当の標準溶液の1/8程度のトレースピークがあり、このピークは確認条件でも検出されたが、何れの試料においても選択性には問題はなかった。なお、しじみのブランク試料では定量限界相当の標準溶液の1/8程度のトレースピークが確認されたが、しじみの基準値3 ppmに相当するピークの1/10を遥かに下回っており、測定上、影響はないと言える。

2) 真度、精度及び定量限界の評価

表2 真度、精度及び定量限界の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 ^{*2}	検量線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N比 ^{*3}			備考	
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値		
	グリホサート	牛の筋肉	0.01	0.1	0.1	*	3780000	-180	1.000	87	94	97	89	96	93	5				#DIV/0!	
		牛の脂肪	0.01	0.5	0.5	*	3250000	720	0.999	76	87	77	78	85	81	6				#DIV/0!	
		牛の肝臓	0.01	2	2	*	2810000	233	0.999	98	83	91	85	81	88	8				#DIV/0!	
		さけ	0.01	0.3	0.3	*	2810000	233	0.999	87	89	87	86	91	88	2				#DIV/0!	
		うなぎ	0.01	0.3	0.3	*	2830000	78	0.999	87	86	74	84	72	81	9				#DIV/0!	
		しじみ	0.01	3	3	*	2830000	78	0.999	81	74	77	77	81	78	4				#DIV/0!	
		牛乳	0.01	0.1	0.1	*	2480000	-66	0.999	83	87	84	89	92	87	4				#DIV/0!	
		鶏卵	0.01	0.1	0.1	*	2480000	-66	0.999	95	76	79	73	75	80	11				#DIV/0!	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01		2900000	-81	1.000	75	79	78	71	79	76	4	47	38	43		
		鶏の筋肉	0.01	0.1	0.1	*	2900000	-81	1.000	84	89	96	92	93	91	5				#DIV/0!	

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。
 2 添加濃度が定量限界濃度と異なる場合には、『』が表示される。その場合には、S/N比の算出は不要であるが、別途、定量限界の推定を行う。
 *3 得られた回収率の中で最大値を与えるピーク(Max)及び最小値を与えるピーク(Min)のそれぞれのS/N比を求める。

真度は76~93%、併行精度は2~11%で良好な結果が得られた。また定量限界濃度の添加回収試験を行ったのはちみつの添加回収試験におけるS/N比の平均値は43であった。

3) 定量限界の推定

表3 定量限界の推定

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 ^{*2}	標準溶液濃度 ^{*3} (mg/L)	面積又は高さの別	ブランク ^{*5}	マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液			S/N比		平均値		備考
										n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	n=1	n=2	面積(高さ)比(%) ^{*6}	S/N比	
	グリホサート	牛の筋肉	0.01	0.1	0.1	*	0.0005	面積	0	9488	9105	9297	8455	8689	8562	121	128	109	125	
		牛の脂肪	0.01	0.5	0.5	*	0.0005	面積	0	8858	8665	8762	8886	8804	8845	155	157	99	156	
		牛の肝臓	0.01	2	2	*	0.0005	面積	0	9268	9480	9374	9149	8881	9015	127	134	104	131	
		さけ	0.01	0.3	0.3	*	0.0005	面積	0	8641	8921	8781	8939	8171	8555	141	123	103	132	
		うなぎ	0.01	0.3	0.3	*	0.0005	面積	0	9262	9018	9140	8451	8658	8555	130	124	107	127	
		しじみ	0.01	3	3	*	0.0005	面積	1144	9122	8940	7837	8724	8488	8606	125	151	91	138	
		牛乳	0.01	0.1	0.1	*	0.0005	面積	0	10200	9957	10079	9624	10230	9927	109	102	102	106	
		鶏卵	0.01	0.1	0.1	*	0.0005	面積	0	9169	9090	9130	8852	8888	8875	149	156	103	153	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01			面積				0						#DIV/0!	#DIV/0!	
		鶏の筋肉	0.01	0.1	0.1	*	0.0005	面積	0	8753	8711	8732	8945	8564	8755	151	151	100	151	

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。
 2 定量限界の推定を行う対象(添加濃度と定量限界濃度が異なる場合)には、『』が表示される。
 *3 試料中の濃度が定量限界相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。
 *4 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定する。(必要に応じて起爆注入を行う。)
 *5 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。
 *6 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比(%)を求める。

基準値濃度の添加回収試験を行った、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、

鶏卵及び鶏の筋肉のブランク試料の試験溶液で調製した定量限界相当濃度のマトリックス添加標準溶液と溶媒で調製した標準溶液の面積比の平均値は91~109%であった。また、マトリックス添加標準溶液のS/N比の平均値は106~156であった。

4) 試料マトリックスの影響

表4 試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 ^{*2} (mg/L)	面積又は高さの別	ブランク ^{*4}	ピーク面積(高さ) ^{*3}						備考	
									マトリックス添加標準溶液 ^{*5}			溶媒標準溶液				ピーク面積(高さ)比 ^{*6}
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
	グリホサート	牛の筋肉	0.01	0.1	0.1	0.005	面積	0	82240	90050	91145	84970	85150	85080	1.07	
		牛の脂肪	0.01	0.5	0.5	0.005	面積	0	85900	89550	87725	88950	89000	88975	0.99	
		牛の肝臓	0.01	2.	2.	0.005	面積	0	94430	93000	93715	85660	86240	85950	1.09	
		さけ	0.01	0.3	0.3	0.005	面積	0	83220	86580	84900	86230	79580	82905	1.02	
		うなぎ	0.01	0.3	0.3	0.005	面積	0	80450	85480	82965	86460	80280	83360	1.00	
		しじみ	0.01	3.	3.	0.005	面積	0	86750	86190	86470	65740	67400	68570	1.00	
		牛乳	0.01	0.1	0.1	0.005	面積	0	91310	92230	91770	95520	93500	94510	0.97	
		鶏卵	0.01	0.1	0.1	0.005	面積	0	91590	88960	90275	91200	90430	90815	0.99	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	5688	5514	5591	5566	5680	5623	0.99	
		鶏の筋肉	0.01	0.1	0.1	0.005	面積	0	87660	91550	89605	91380	91000	91190	0.98	

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

*2 添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。

*3 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

*4 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

*5 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

*6 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

添加回収試験における回収率 100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製したマトリックス添加標準溶液と溶媒で調製した標準溶液の面積比の平均値は 0.97~1.09 であった。

4. 試験法の妥当性評価

試験法の妥当性評価(真度及び精度)

No.	分析対象化合物	食品名	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度 (ppm)	測定値(ppm)					真度(%) 全平均の回収率	精度(RSD%)		備考	
					1日目	2日目	3日目	4日目	5日目		併行精度	室内精度		
	グリホサート	牛の筋肉	0.1	0.1	1回目	0.092	0.089	0.083	0.087	0.078	85	5.1	8.3	
					2回目	0.090	0.087	0.072	0.094	0.081				
		牛の脂肪	0.5	0.5	1回目	0.358	0.347	0.418	0.313	0.361	73	3.5	9.9	
					2回目	0.359	0.375	0.402	0.313	0.384				
		牛の肝臓	2.	2.	1回目	1.81	1.77	1.82	1.69	1.32	85	4.8	9.6	
					2回目	1.79	1.70	1.72	1.77	1.53				

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓を用いて試験法の妥当性評価を行った。真度は73~85%、併行精度は3.5~5.1%、室内精度は8.3~9.9%であり、試験法の妥当性評価ガイドラインの基準内であった。

[結論]

グリホサートを試料からジクロロメタン存在下、水で抽出し精製した後、強酸性陽イオン交換カラム及びオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製する。誘導體化し、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で精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を提案する。

この試験法を牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵、はちみつ及び鶏の筋肉に適用した場合、選択性は良好で何れの試料においても妨害ピークは認められず、真度は76~93%、定量限界は0.01 mg/kgが可能であることが確認できた。

[参考文献]

厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 食安発第0124001号「グリホサート試験法(農産物)」(平成17年1月24日)

飼料分析基準 含リンアミノ酸系農薬のガスクロマトグラフによる系統的分析法

図1 グリホサート誘導体化物のマススペクトル

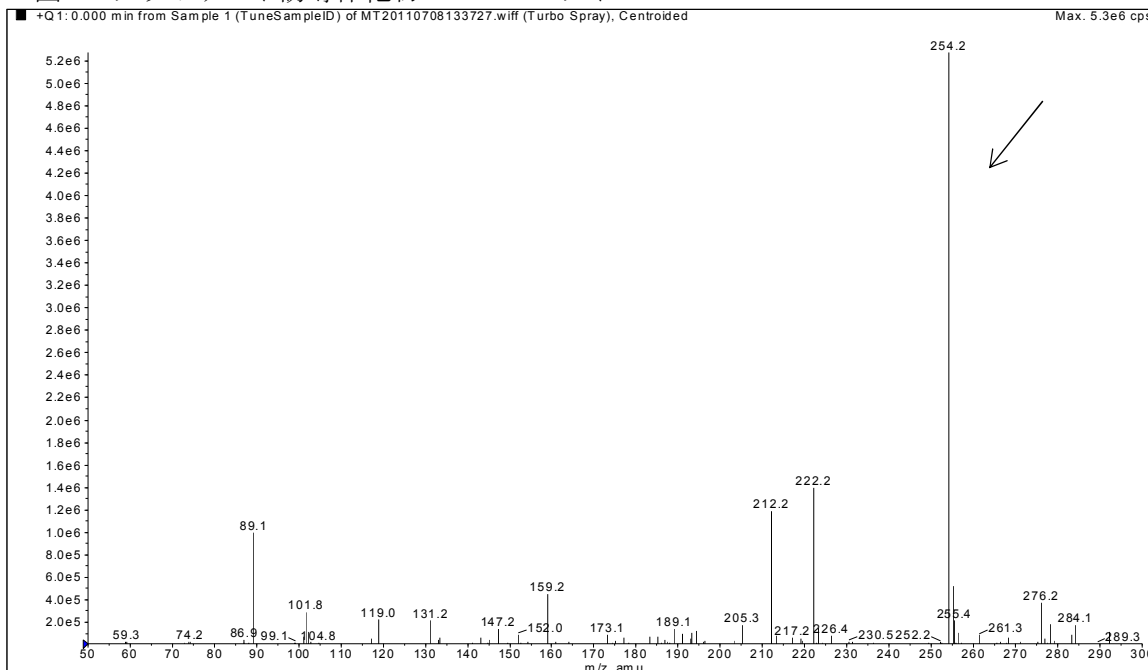


図2 グリホサート誘導体化物のプリカーサーイオン m/z 254 のプロダクトイオンスペクトル

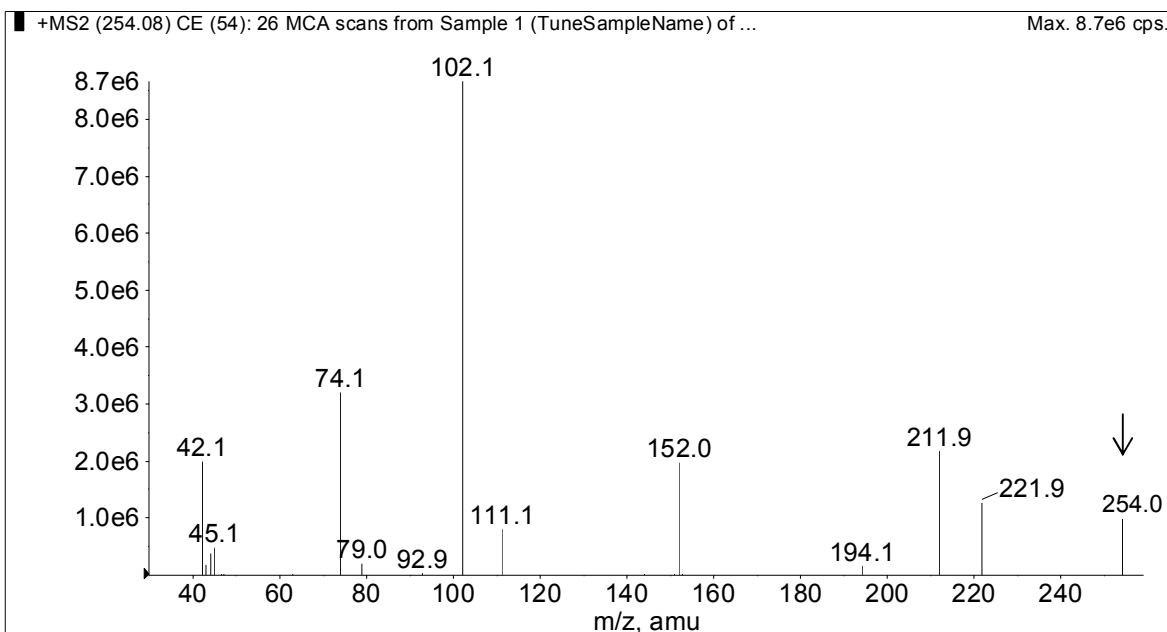
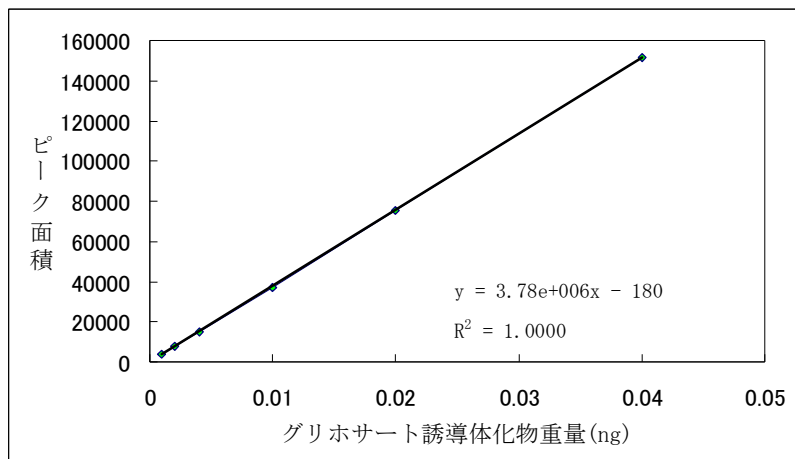


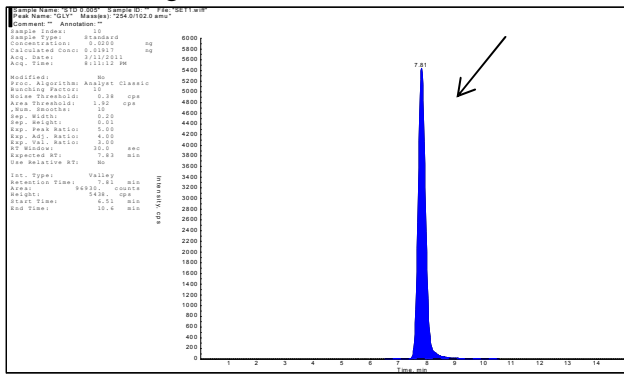
図3 グリホサート誘導体化物の検量線 (一例)



データ処理装置設定条件の一例
 機種 (メーカー) : Analyst
 (AB SCIEX製)
 ピークの定量方法 : ピーク面積法
 検量線の種類 : 最小二乗法
 検量線基準ピークの重量 : 0.001 ng~0.04 ng
 検量線傾き (a) : a=3.78e+006
 検量線切片 (b) : b=-180

図4 標準溶液のクロマトグラム (一例)

標準品0.02 ng



標準品0.002 ng (定量限界相当)

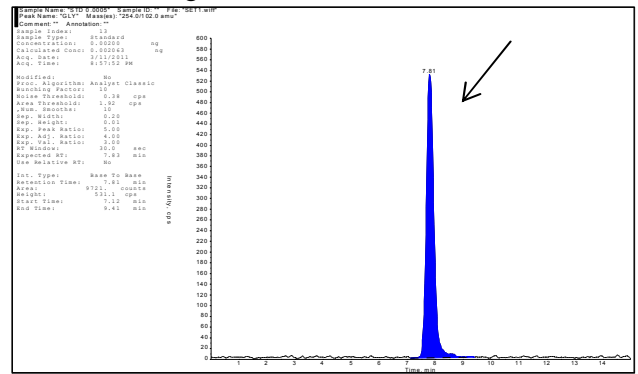
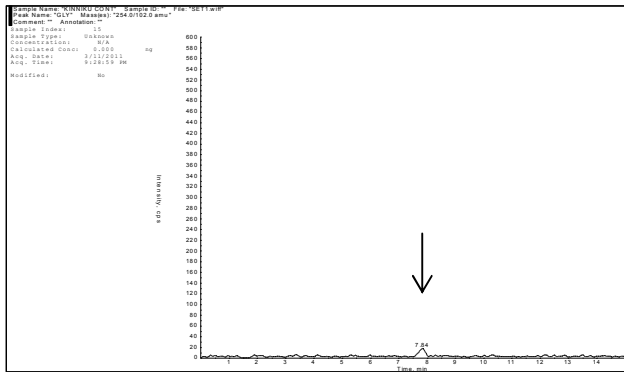
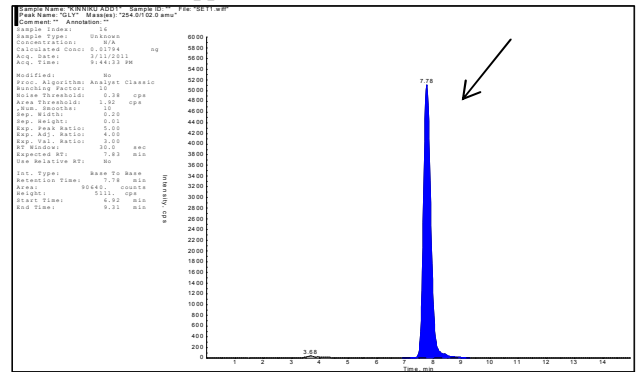


図 5-1 試料のクロマトグラム

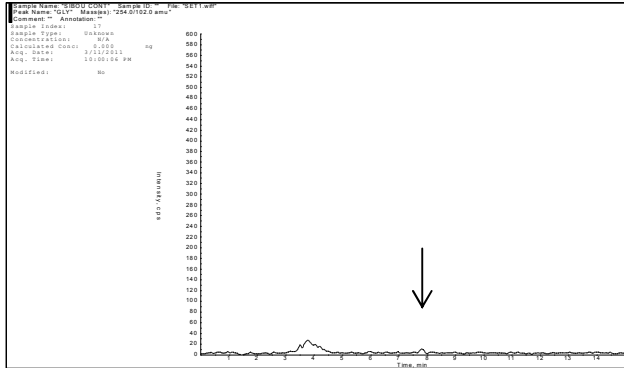
牛の筋肉 無添加



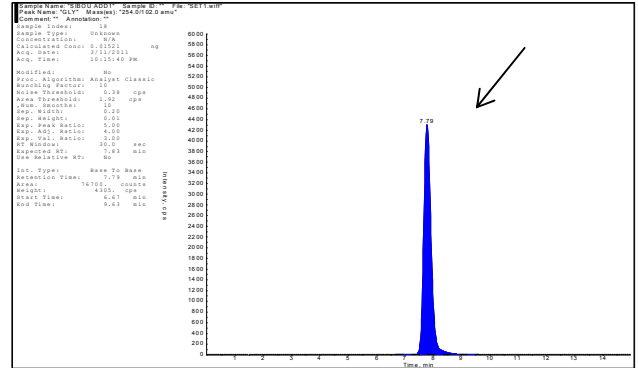
牛の筋肉 0.1 ppm 添加



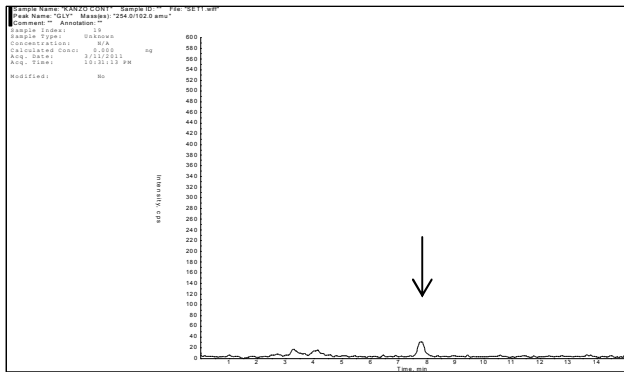
牛の脂肪 無添加



牛の脂肪 0.5 ppm 添加 5 倍希釈



牛の肝臓 無添加



牛の肝臓 2 ppm 添加 20 倍希釈

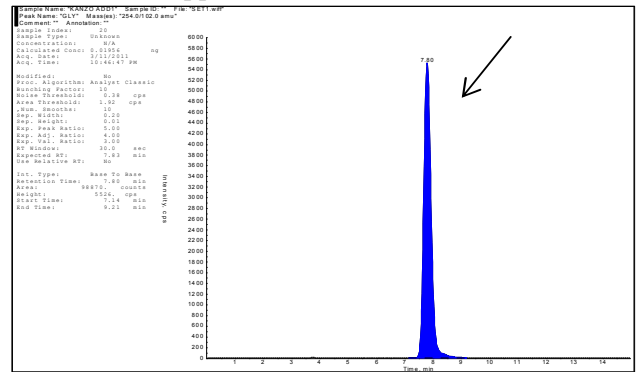
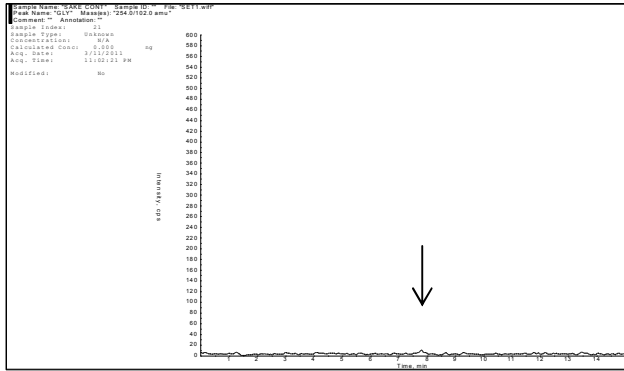
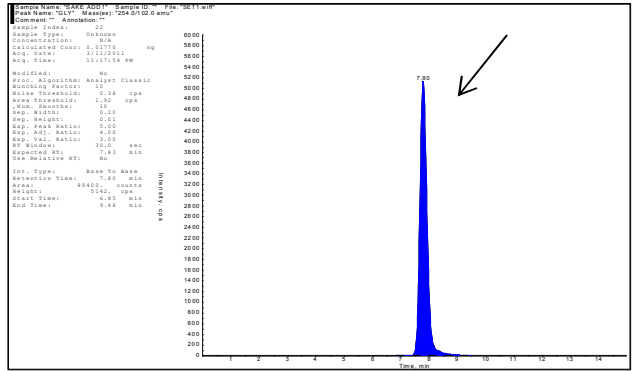


図 5-2 試料のクロマトグラム

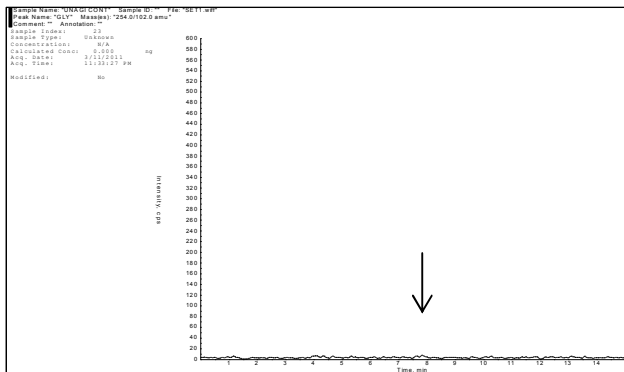
さけ 無添加



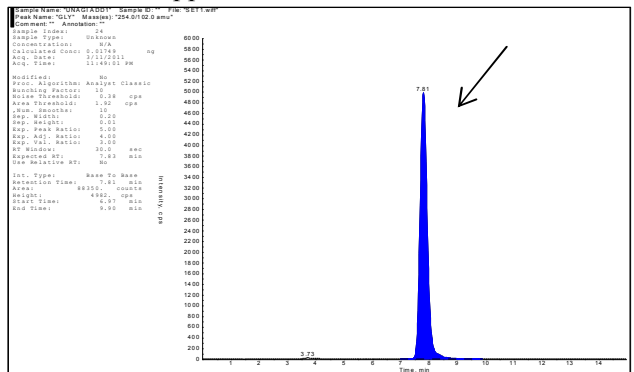
さけ 0.3 ppm 添加 3 倍希釈



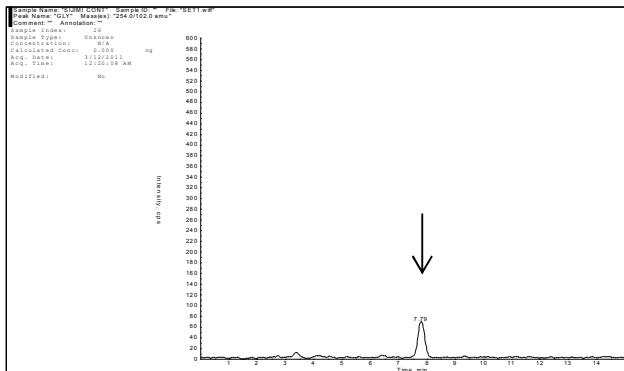
うなぎ 無添加



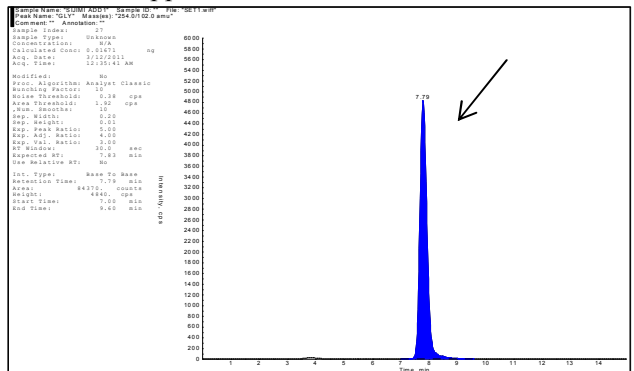
うなぎ 0.3 ppm 添加 3 倍希釈



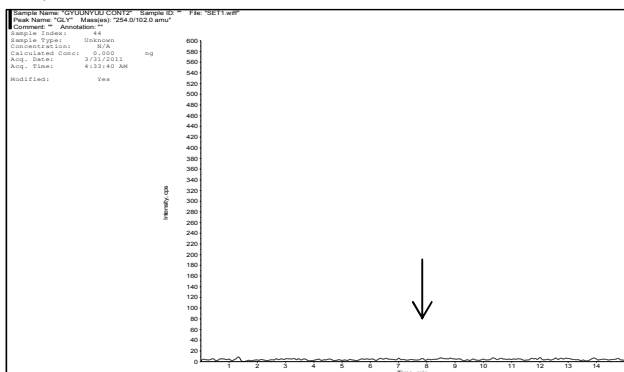
しじみ 無添加



しじみ 3 ppm 添加 30 倍希釈



牛乳 無添加



牛乳 0.1 ppm 添加

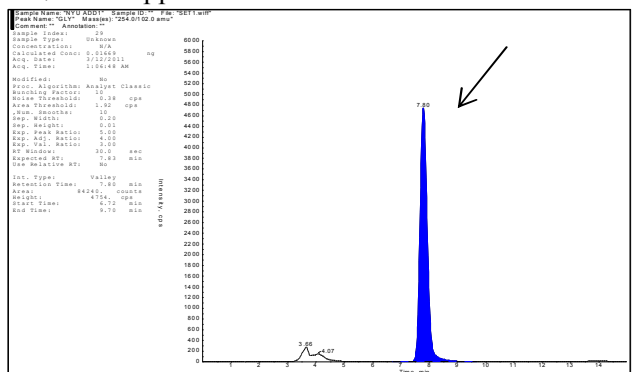
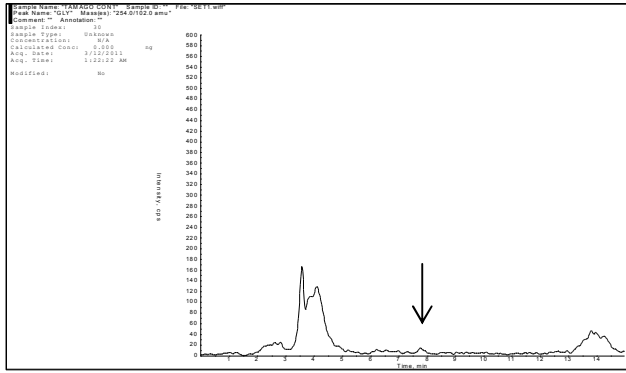
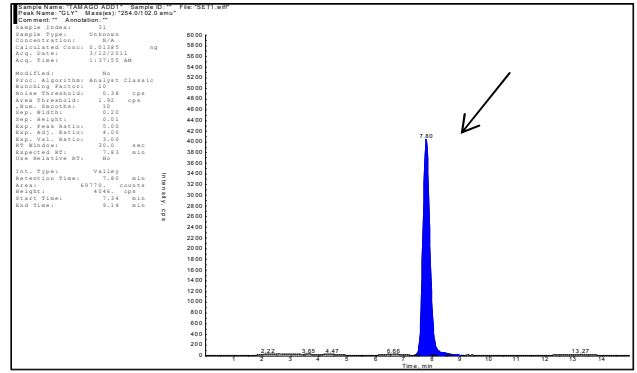


図 5-3 試料のクロマトグラム

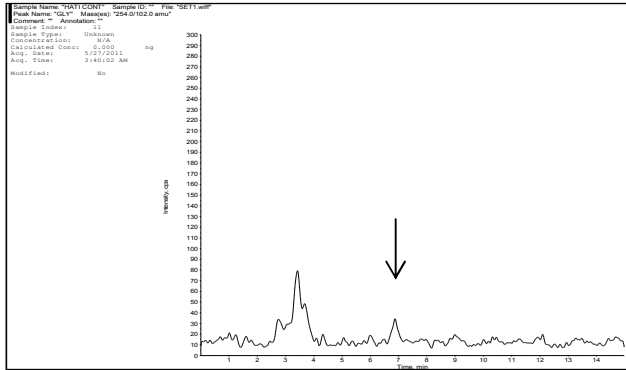
鶏卵 無添加



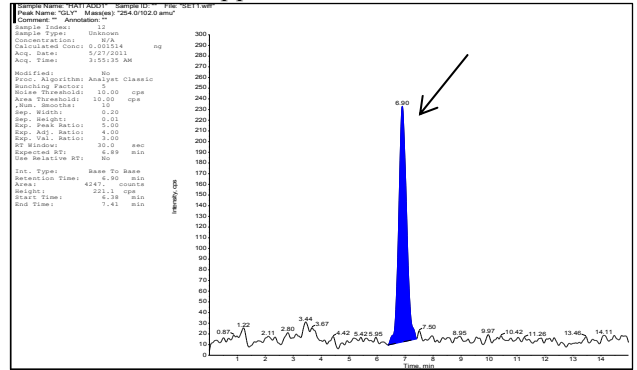
鶏卵 0.1 ppm 添加



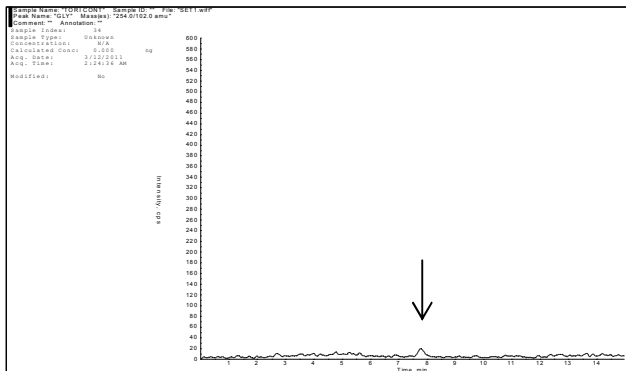
はちみつ 無添加



はちみつ 0.01 ppm 添加



鶏の筋肉 無添加



鶏の筋肉 0.1 ppm 添加

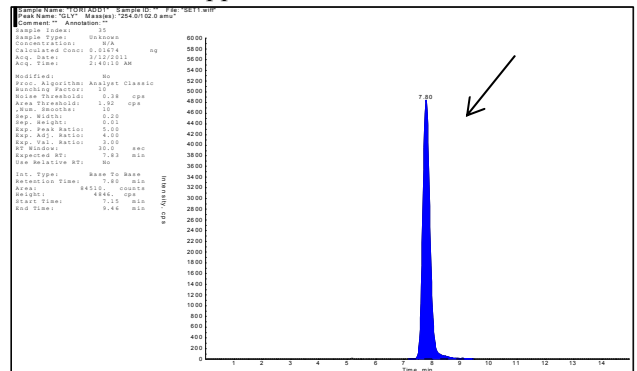
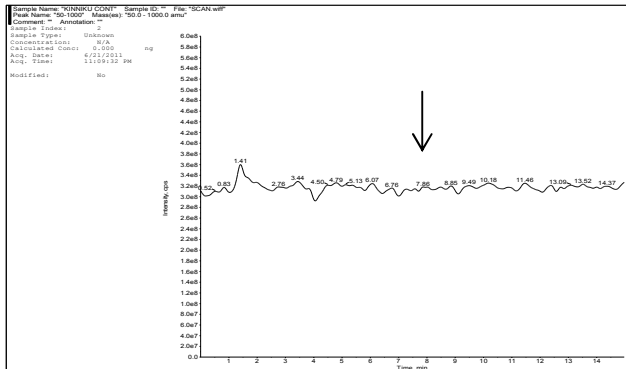


図 6-1 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム (スキャン範囲: 50~1000 amu)

牛の筋肉 無添加



牛の脂肪 無添加

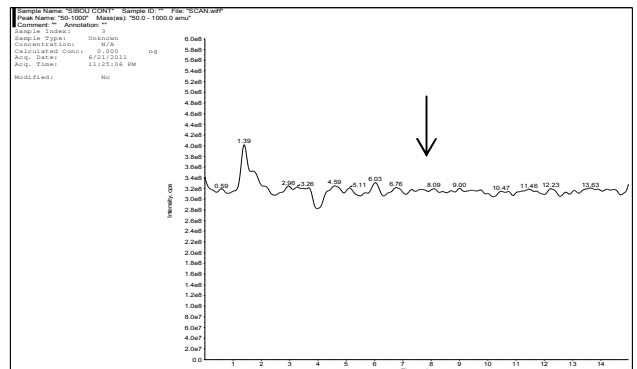
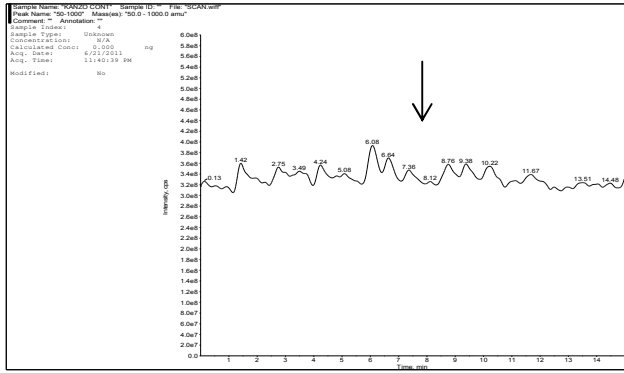
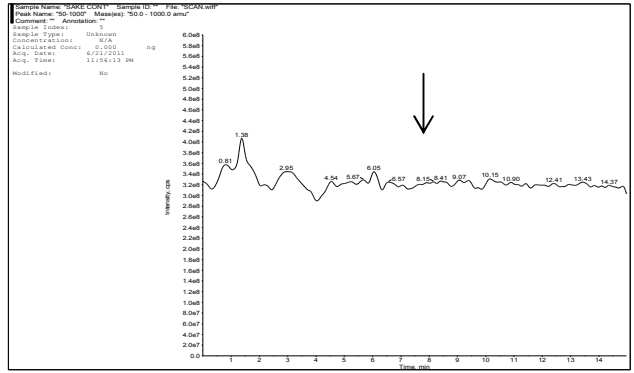


図 6-2 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム (スキャン範囲 : 50~1000 amu)

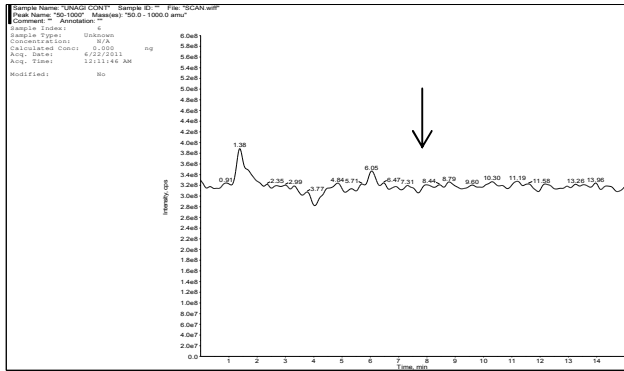
牛の肝臓 無添加



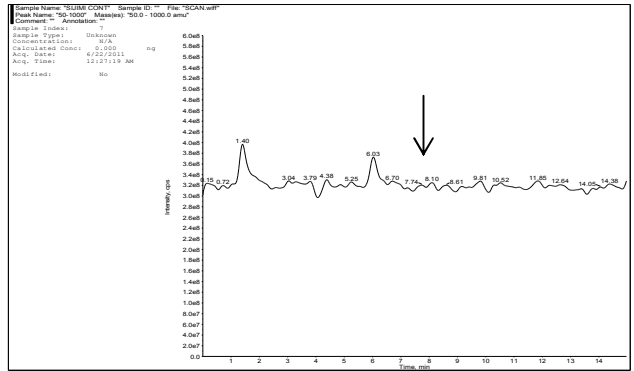
さけ 無添加



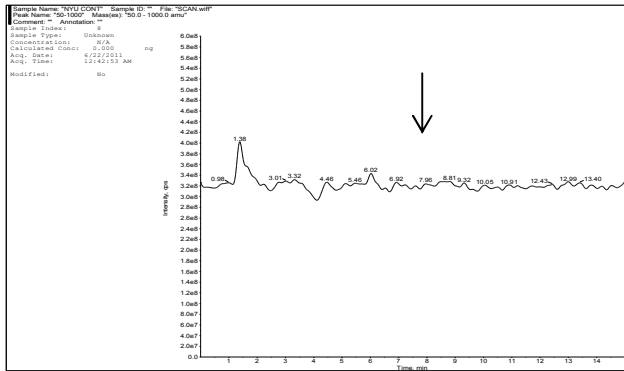
うなぎ 無添加



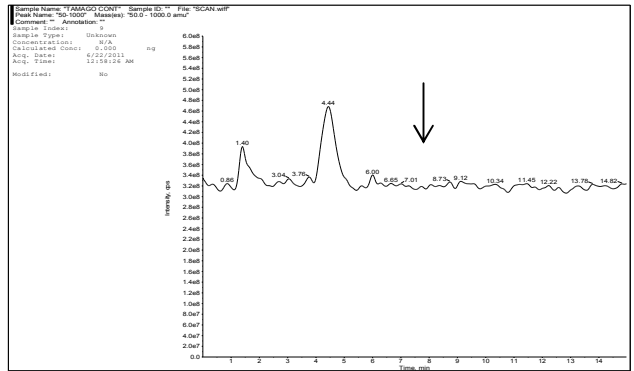
しじみ 無添加



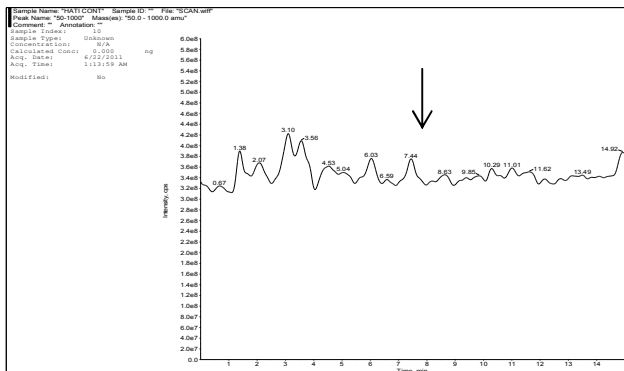
牛乳 無添加



鶏卵 無添加



はちみつ 無添加



鶏の筋肉 無添加

