

グリホサート試験法Ⅱ（農産物）

1. 分析対象化合物

グリホサート

N-アセチルグリホサート

2. 適用食品

大豆、とうもろこし（未成熟）及びなたね

3. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）

4. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

グリホサート標準品 本品はグリホサート95%以上を含む。

N-アセチルグリホサート標準品 本品は*N*-アセチルグリホサート95%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 大豆の場合

試料10.0 gに水20 mLを加え30分間放置する。これにエタノール及び水（3：2）混液100 mLを加え、ホモジナイズした後、毎分3,000回転で10分間遠心分離し、上澄液を採る。残留物にエタノール及び水（3：2）混液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、上澄液を採る。得られた上澄液を合わせ、エタノール及び水（3：2）混液を加えて正確に200 mLとする。この溶液から正確に2 mLを分取し、エタノールを加えて正確に10 mLとする。この溶液から正確に1 mLを分取し、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。

② とうもろこし（未成熟）の場合

試料20.0 gにエタノール及び水（3：2）混液100 mLを加え、ホモジナイズした後、毎分3,000回転で10分間遠心分離し、上澄液を採る。残留物にエタノール及び水（3：2）混液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、上澄液を採る。得られた上澄液を合わせ、エタノール及び水（3：2）混液を加えて正確に200 mLとする。この溶液から正確に1 mLを分取し、エタノールを加えて正確に10 mLとする。この溶液から正確に1 mLを分取し、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。

③ なたねの場合

試料10.0 gに水20 mLを加え30分間放置する。これにエタノール及び水（3：7）混液100 mLを加え、ホモジナイズした後、毎分3,000回転で10分間遠心分離し、上澄液を採る。残留物にエタノール及び水（3：7）混液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、上澄液を採る。得られた上澄液を合わせ、エタノール及び水（3：7）混液を加えて正確に200 mLとする。この溶液から正確に2 mLを分取し、エタノールを加えて正確に10 mLとする。次いで、この溶液から正確に1 mLを

分取し、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。

2) 誘導体化

1) で得られた残留物にメタノール100 µLを加えた後、酢酸2 mL及びオルト酢酸トリメチル2 mLを加え、密栓して100℃で90分間加熱する。放冷後、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に酢酸エチル2 mLを加えて溶かす。

3) 精製

グラファイトカーボンミニカラム (250 mg) に酢酸エチル10 mLを注入し、流出液は捨てる。シリカゲルミニカラム (500 mg) に酢酸エチル及びトリエチルアミン (99 : 1) 混液10 mL、酢酸エチル5 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。グラファイトカーボンミニカラムの下部にシリカゲルミニカラムを連結し、2) で得られた溶液を注入した後、酢酸エチル13 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、グラファイトカーボンミニカラムを取り外し、シリカゲルミニカラムに酢酸エチル5 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、酢酸エチル及びメタノール (7 : 3) 混液20 mLを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトニトリル及び10 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液 (1 : 9) 混液に溶かし、正確に1 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

グリホサート標準品を水に溶かして1,000 mg/Lの標準原液を調製する。標準原液をメタノールで適宜希釈した溶液を正確に100 µL分取し、酢酸2 mL及びオルト酢酸トリメチル2 mLを加え、密栓して100℃で90分間加熱する。放冷後、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトニトリル及び10 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液 (1 : 9) 混液を加えて溶かし検量線用標準原液を調製する。この検量線用標準原液をアセトニトリル及び10 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液 (1 : 9) 混液で希釈した溶液を数点調製し、それぞれLC-MS/MSに注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合、試料中0.01 mg/kgに相当する試験溶液中濃度は0.0001 mg/Lである。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線でグリホサート (*N*-アセチルグリホサートを含む。) の含量を求める。

8. 確認試験

LC-MS/MSにより確認する。

9. 測定条件

(例)

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径 3.0 mm、長さ150 mm、粒子径3 μm

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル及び10 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液（1：9）混液

イオン化モード：ESI (+)

主なイオン (*m/z*)：プリカーサーイオン 254、プロダクトイオン 102、74

注入量：5 μL

保持時間の目安：7分

10. 定量限界

0.01 mg/kg (グリホサート換算)

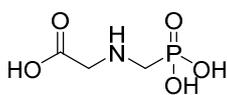
11. 留意事項

1) 試験法の概要

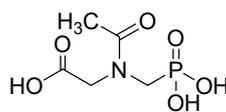
グリホサート及び*N*-アセチルグリホサートを試料から、エタノール及び水混液で抽出する。酢酸及びオルト酢酸トリメチルで誘導体化した後、グラファイトカーボンミニカラム及びシリカゲルミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。グリホサートの分析値には、グリホサート及び*N*-アセチルグリホサートが含まれる。

2) 注意点

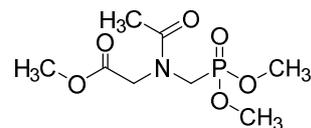
- ① 分析対象化合物は非常に極性が高い化合物であることから、抽出溶媒には水とエタノールの混液を選択した。遠心分離後の上澄液の採取の容易さと回収率を考慮し、大豆及びとうもろこし（未成熟）の場合はエタノール及び水（3：2）混液を、なたねの場合はエタノール及び水（3：7）混液を用いた。
- ② 開発時に用いた遠心分離機における毎分3,000回転は、約1,930×gである。
- ③ 誘導体化反応は密栓条件で実施するため、反応中の危険を回避するため、栓が飛ばないようにクリップ等で固定し、栓の上にタオルを掛け、さらにその上から平板状の重りを載せるなどの対処をすることが望ましい。
- ④ 本試験法の誘導体化で得られるグリホサート及び*N*-アセチルグリホサートの誘導体化物は、同一の化合物である（下図）。グリホサート標準品を用いて、誘導体化物に変換されることを確認すること。なお、誘導体化の際の100℃での加熱は、試験法開発時はブロックヒーターを用いて実施した。



グリホサート



N-アセチルグリホサート



誘導体化物

- ⑤ LC-MS/MS測定では、試料中の夾雑成分のキャリーオーバーの影響を軽減させるため、誘導体化

物が溶出した後に移動相のアセトニトリル濃度を上げてカラムを洗浄すると良い。

- ⑥ グリホサートのLC-MS/MS測定で、試験開発時に使用したイオンを以下に示す。
定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン254、プロダクトイオン102
定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン254、プロダクトイオン74
- ⑦ グリホサートの検量線用標準溶液は、200 mg/L以上ではメタノールに溶けないため水で希釈する。
- ⑧ グリホサートはガラス器具への吸着が懸念されるため、誘導体化前の操作ではポリプロピレン製の器具を用いることが望ましい。
- ⑨ とうもろこしの乾燥子実に適用する場合には大豆を参照する。
- ⑩ 試験法開発時に検討した食品：大豆、とうもろこし（未成熟）、なたね

12. 参考文献

厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生・食品安全部長通知 生食発0404第5号「グリホサート試験法（畜水産物）」（平成28年4月4日）

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）

13. 類型

C