

※本報告書は、試験法開発における検討結果を取り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下さい。

# 食品に残留する農薬等の成分である物質の 試験法開発事業報告書

## グリホサート試験法Ⅱ（農産物）

## グリホサート試験法Ⅱ（農産物）の開発検討結果

### 〔緒言〕

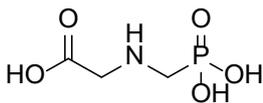
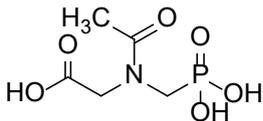
#### 1. 目的及び試験法の検討方針等

グリホサート及び *N*-アセチルグリホサートの農産物中の分析法の開発を行った。グリホサートは、モンサント社（米国）で開発されたアミノ酸系除草剤であるが、イソプロピル塩やアンモニウム塩等、原体と原体製造業者が複数存在する。作用機構として、植物体内の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSP Synthase) を阻害し、芳香族アミノ酸（フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン）及びこれらのアミノ酸を含むタンパク質や代謝産物の合成を阻害することにより作用すると考えられている。近年遺伝子組換えによる耐性植物が栽培されており、その耐性機構は、i) EPSP synthase 遺伝子を目的植物に導入し、EPSP synthase の発現量上昇、ii) 他の植物や微生物が有する glyphosate *N*-acetyltransferase (GAT) 遺伝子を目的植物に導入し、グリホサートを *N*-アセチルグリホサートに変換させることで無毒化、である。特に後者の耐性機構によって、使用したグリホサートの一部が *N*-アセチルグリホサートに変換されることから残留農薬としてグリホサートだけでなく、*N*-アセチルグリホサートの量も評価する必要が生じている。

グリホサートの分析法についてはこれまで既に、様々な機関、企業において検討されてきたが、i) 試料からの抽出にはジクロロメタンまたはクロロホルムを使用する、ii) グリホサートの極性が非常に高いため、良好な分析結果を得るために煩雑な誘導体化反応が必要であるという特徴が共通している。

本検討においては、ジクロロメタン及びクロロホルムを使用せず、グリホサート、*N*-アセチルグリホサートの両者を定量できる新たな個別試験法（案）を開発した。尚、H30 年度の基礎検討及び R01 年度の開発検討では、誘導体化せず、グリホサート、*N*-アセチルグリホサートをそれぞれ直接検出する方針で検討したが、特にグリホサートの感度、ピーク形状が向上せず不十分であったため、本報では誘導体化することとした。

#### 2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

分析対象化合物	グリホサート	<i>N</i> -アセチルグリホサート
構造式		
分子式	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>5</sub> P	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>6</sub> P
分子量	169.07	211.11
IUPAC 名	<i>N</i> -(Phosphonomethyl)-glycine	<i>N</i> -acetyl- <i>N</i> -(phosphonomethyl)-glycine
CAS No.	1071-83-6	129660-96-4
外観	白色、結晶性粉末～粉末	無色透明、液体
融点	234°C（分解）	データなし
蒸気圧	データなし	データなし
溶解性	水に溶ける。エタノール及びアセトンにほとんど溶けない。	データなし
log Pow	-10	データなし
pKa	1.22 ± 0.10	2.53 ± 0.10

〔出典：SciFinder、グリホサート標準物質安全データシート（富士フィルム和光純薬工業）〕

### 3. 基準値（定量限界目標値）

今回基準値を設定するグリホサートとは、農産物（大豆、とうもろこし及びなたねに限る。）及び畜産物にあつてはグリホサート及び N-アセチルグリホサートをグリホサートに換算したものの和をいい、農産物（大豆、とうもろこし及びなたねを除く。）にあつてはグリホサートをいう。（生食発 1217 第 2 号（令和 3 年 12 月 17 日））

#### グリホサートの基準値

食品名	残留基準値 (ppm)	食品名	残留基準値 (ppm)
米(玄米)	0.1	にら	0.2
小麦	30	アスパラガス	0.5
大麦	30	わけぎ	0.2
ライ麦	30	その他のゆり科野菜	0.2
とうもろこし	5	にんじん	0.2
そば	30	パースニップ	0.2
その他の穀類	30	パセリ	0.2
大豆	20	セロリ	0.2
小豆類	10	みつば	0.2
えんどう	5	その他のせり科野菜	0.2
そら豆	2	トマト	0.2
らっかせい	0.1	ピーマン	0.1
その他の豆類	5	なす	0.2
ばれいしょ	0.2	その他のなす科野菜	0.1
さといも類(やつがしらを含む)	0.1	きゅうり(ガーキンを含む)	0.5
かんしょ	0.2	かぼちゃ(スカッシュを含む)	0.5
やまいも(長いもをいう)	0.2	しろりり	0.2
こんにやくいも	0.1	すいか	0.5
その他のいも類	0.1	メロン類果実	0.5
てんさい	15	まくわうり	0.2
さとうきび	2	その他のうり科野菜	0.5
だいこん類(ラディッシュを含む)の根	0.2	ほうれんそう	0.2
だいこん類(ラディッシュを含む)の葉	0.2	たけのこ	0.2
かぶ類の根	0.2	オクラ	0.2
かぶ類の葉	0.2	しょうが	0.2
西洋わさび	0.2	未成熟えんどう	0.2
クレソン	0.2	未成熟いんげん	0.2
はくさい	0.2	えだまめ	0.2
キャベツ	0.2	マッシュルーム	0.2
芽キャベツ	0.2	その他の野菜	0.2
ケール	0.2	みかん	0.5
こまつな	0.2	なつみかんの果実全体	0.5
きょうな	0.2	レモン	0.5
チンゲンサイ	0.2	オレンジ(ネーブルオレンジを含む)	0.5
カリフラワー	0.2	グレープフルーツ	0.5
ブロッコリー	0.2	ライム	0.5
その他のあぶらな科野菜	0.2	その他のかんきつ類果実	0.5
ごぼう	0.2	りんご	0.2
サルシフィー	0.2	日本なし	0.2
アーティチョーク	0.2	西洋なし	0.2
チコリ	0.2	マルメロ	0.2
エンダイブ	0.2	びわ	0.2
しゅんぎく	0.2	もも	0.2
レタス(サラダ菜及びちしやを含む)	0.2	ネクタリン	0.2
その他のきく科野菜	0.2	あんず(アプリコットを含む)	0.2
たまねぎ	0.2	すもも(プルーンを含む)	0.2
ねぎ(リーキを含む)	0.2	うめ	0.2
にんにく	0.2	おうとう(チェリーを含む)	0.2

グリホサートの基準値（続き）

食品名	残留基準値 (ppm)	食品名	残留基準値 (ppm)
いちご	0.2	牛の筋肉	0.05
ラズベリー	0.2	豚の筋肉	0.05
ブラックベリー	0.2	その他の陸棲哺乳類に属する動物の筋肉	0.05
ブルーベリー	0.2	牛の脂肪	0.05
クランベリー	0.2	豚の脂肪	0.05
ハックルベリー	0.2	その他の陸棲哺乳類に属する動物の脂肪	0.05
その他のベリー類果実	0.2	牛の肝臓	5
ぶどう	0.5	豚の肝臓	0.5
かき	0.2	その他の陸棲哺乳類に属する動物の肝臓	5
バナナ	0.2	牛の腎臓	5
キウイ	0.1	豚の腎臓	0.5
パパイヤ	0.2	その他の陸棲哺乳類に属する動物の腎臓	5
アボカド	0.2	牛の食用部分	5
パイナップル	0.1	豚の食用部分	0.5
グアバ	0.2	その他の陸棲哺乳類に属する動物の食用部	5
マンゴー	0.2	乳	0.05
パッションフルーツ	0.2	鶏の筋肉	0.05
なつめやし	0.2	その他の家きんの筋肉	0.05
その他の果実	0.2	鶏の脂肪	0.05
ひまわりの種子	40	その他の家きんの脂肪	0.05
ごまの種子	40	鶏の肝臓	0.5
べにばなの種子	40	その他の家きんの肝臓	0.5
綿実	40	鶏の腎臓	0.5
なたね	30	その他の家きんの腎臓	0.5
その他のオイルシード	40	鶏の食用部分	0.5
ぎんなん	0.2	その他の家きんの食用部分	0.5
くり	1	鶏の卵	0.05
ペカン	1	その他の家きんの卵	0.05
アーモンド	1	はちみつ	0.05
くるみ	1		
その他のナッツ類	1		
茶	1		
コーヒー豆	1		
カカオ豆	0.2		
ホップ	0.1		
その他のスパイス	0.2		
その他のハーブ	0.2		

## [実験方法]

### 1. 試料

#### 1) 購入先

大豆、とうもろこし（未成熟）、なたねは、インターネットで販売されていたもの（国産）を購入した。尚、なたねは、鳥の餌として販売されていたものを購入した。又、いずれにも「遺伝子組換え食品」の表記はなかった。

#### 2) 試料の採取方法

大豆は、粉砕機を用いて 425  $\mu\text{m}$  の標準網ふるいを通るように粉砕し均一化した。

とうもろこしは外皮、ひげ及びしんを除いた種子を、細切均一化した。

なたねは、試料を粉砕機を用いて 1 mm の標準網ふるいを通るように粉砕し均一化した。なお、油分が多いため 425  $\mu\text{m}$  の標準網ふるいを通るように粉砕するのは困難だった。

### 2. 試薬・試液

#### 1) 標準品、標準原液及び標準溶液

##### ① 標準品

・グリホサート：純度 99.3%（富士フィルム和光純薬製）

・*N*-アセチルグリホサート：純度 99.31%（Toronto Research Chemicals 製）

##### ② 標準原液

グリホサート標準品 10 mg を精秤し、超純水に溶かして 1000 mg/L の標準原液を調製した。

*N*-アセチルグリホサート標準品 10 mg を精秤し、メタノールに溶かして 1000 mg/L の標準原液を調製した。

##### ③ 検量線用標準溶液

グリホサート標準品を水に溶かして 1,000 mg/L の標準原液を調製した。標準原液をメタノールで適宜希釈した溶液を正確に 100  $\mu\text{L}$  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°C で 90 分間加熱した。放冷後、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。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した。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、検量線用標準溶液とした。なお、200 mg/L 以上でメタノールに溶けにくい場合は超純水で希釈し、誘導体化前に水を濃縮、除去した。

##### ④ 添加用標準溶液

グリホサート及び *N*-アセチルグリホサートの標準原液をそれぞれ、メタノールで適宜希釈し、定量限界濃度での大豆、なたね添加回収試験用に 0.1 mg/L、とうもろこしの試験用に 0.2 mg/L の添加用標準溶液を調製した。基準値濃度での大豆の添加回収試験用には 200 mg/L、とうもろこしには 100 mg/L、なたねには 300 mg/L の添加用標準溶液を調製した。なお、200 mg/L 以上のグリホサート標準溶液はメタノールに溶けにくいため、超純水で希釈した。

#### 2) その他の試薬等

エタノール（99.5）：残留農薬・PCB 試験用（富士フィルム和光純薬製）

酢酸エチル：残留農薬・PCB 試験用（富士フィルム和光純薬製）

酢酸：精密分析用（富士フィルム和光純薬製）

オルト酢酸トリメチル：純度 98.0%（東京化成工業製）

トリエチルアミン：試薬特級（富士フィルム和光純薬製）

超純水、アセトニトリル：LC/MS 用（富士フィルム和光純薬製）

1 mol/L ギ酸アンモニウム溶液： HPLC 用（富士フイルム和光純薬製）  
 グラファイトカーボンミニカラム： Supelclean ENVI-carb（250 mg/6 mL、MERCK 製）  
 シリカゲルミニカラム： InertSep Si（500 mg/6 mL、ジーエルサイエンス製）

### 3. 装置

粉碎器： サイレントミルサー（岩谷産業（株）製）、超遠心粉碎機 ZM200（Retsch 製）  
 ホモジナイザー： POLYTRON PT3100D（KINEMATICA.CH 製）  
 ブロックヒーター：アルミブロック恒温槽 MG3100 型（東京理化工械製）  
 濃縮装置：ロータリーエバポレーター N-1100V（東京理化工械製）  
 遠心分離器： KUBOTA S700FR（久保田商事製）

#### LC-MS/MS

装置	型式	会社
LC	Acquity UPLC H-Class	Waters
MS	Xevo TQ-S micro	Waters
データ処理	Mass Lynx v4.2	Waters

### 4. 測定条件

#### LC-MS(/MS)

LC 条件	
カラム	Inertsil ODS-4 HP (3 μm), φ3.0 x 150 mm（ジーエルサイエンス製）
移動相流速 (mL/min)	0.40
注入量 (μL)	5
カラム温度 (°C)	40
移動相	A 液：10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 B 液：アセトニトリル
ステップワイズ条件	0 – 10 min: 10%B, 10 – 20 min: 75%B, 20 – 30 min: 10%B
MS 条件	
測定モード	MS/MS、SRM（選択反応検出）
イオン化モード	ESI (+)
キャピラリー電圧 (kV)	1.0
ソース温度 (°C)	150
脱溶媒温度 (°C)	600
コーンガス	窒素、50 L/hr
脱溶媒ガス	窒素、1000 L/hr
コリジョンガス	アルゴン（MS/MS の場合）
定量イオン (m/z)	254.0→101.9 [コーン電圧：42 V、コリジョンエネルギー：8 eV]
定性イオン (m/z)	254.0→73.9 [コーン電圧：42 V、コリジョンエネルギー：12 eV]
保持時間 (min)	6.65

### 5. 定量

グリホサートを誘導体化した後（誘導体化については「7. 試験溶液の調製」を参照。）、グリホサートの濃度として各添加濃度の回収率 25%相当、50%相当、75%相当、100%相当、125%相当及び 150%相当濃度の検量線作成用標準溶液（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）を調製した（表 1）。それぞれ 5 µL を LC-MS/MS に注入し、ピーク面積法により検量線を作成した。

試験溶液（0.01 g 試料/1 mL 試験溶液）5 µL を LC-MS/MS に注入し、絶対検量線法によりグリホサート（*N*-アセチルグリホサートを含む）の含量を求めた。

図 1 に、添加濃度 0.01 mg/kg（定量限界相当濃度）の場合の検量線、回帰式及び決定係数（ $R^2$ ）の一例を示す。

表 1. 添加濃度と検量線用標準溶液濃度

	添加濃度	回収率 25 – 150%相当濃度	測定に用いた検量線濃度*
定量限界濃度	0.01 ppm	0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.125, 0.15 µg/L	同左
基準値（大豆）	20 ppm	0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 mg/L	5.0, 10, 15, 20, 25, 30 µg/L
基準値（とうもろこし）	5 ppm	0.0125, 0.025, 0.0375, 0.05, 0.0625, 0.075 mg/L	同左
基準値（なたね）	30 ppm	0.075, 0.15, 0.225, 0.3, 0.375, 0.45 mg/L	0.75, 1.5, 2.25, 3.0, 3.75, 4.5 µg/L

\* 大豆（基準値濃度）の場合は試験溶液を 10 倍希釈、なたね（基準値濃度）の場合は試験溶液を 100 倍希釈して測定

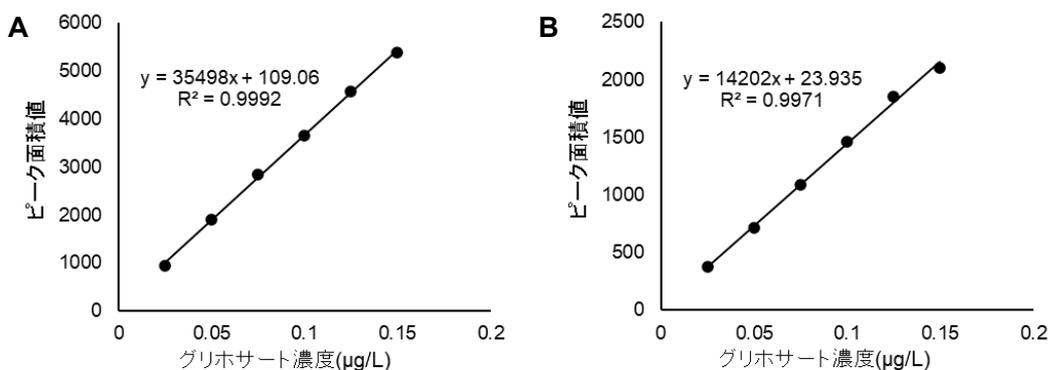


図 1 グリホサート誘導体化物の検量線の一例。

A) 測定イオン  $m/z$  254.0 > 101.9、B) 測定イオン  $m/z$  254.0 > 73.9。

## 6. 添加試料の調製

大豆及びなたね：試料 10.0 g に添加用標準溶液 1 mL を添加しよく混合した後、室温で 30 分間放置したものを添加試料とした。

とうもろこし：試料 20.0 g に添加用標準溶液 1 mL を添加しよく混合した後、室温で 30 分間放置した。

## 7. 試験溶液の調製

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した。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で定量及び確認した。

## 1) 抽出

### ① 大豆の場合

試料10.0 gを遠沈管 (PP製、250 mL) に採り、水20 mLを加え30分間放置した。

試料にエタノール及び水 (3 : 2) 混液100 mLを加え2分間ホモジナイズした後、毎分3,000回転で10分間遠心分離を行い、上澄液をPP製メスフラスコに分取した。残留物にエタノール及び水 (3 : 2) 混液50 mLを加え2分間ホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離し、上澄液を採った。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とした。この溶液から正確に2 mLをPP製メスフラスコに分取し、エタノールを加えて10 mLに定容した。

### ② とうもろこし (未成熟) の場合

試料20.0 gを遠沈管 (PP製、250 mL) 採った。

試料にエタノール及び水 (3 : 2) 混液100 mLを加え2分間ホモジナイズした後、毎分3,000回転で10分間遠心分離を行い、上澄液をPP製メスフラスコに分取した。残留物にエタノール及び水 (3 : 2) 混液50 mLを加え2分間ホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離し、上澄液を採った。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とした。この溶液から正確に1 mLをPP製メスフラスコに分取し、エタノールを加えて10 mLに定容した。

### ③ なたねの場合

試料10.0 gを遠沈管 (PP製、250 mL) に採り、水20 mLを加え30分間放置した。

試料にエタノール及び水 (3 : 7) 混液100 mLを加え2分間ホモジナイズした後、毎分3,000回転で10分間遠心分離を行い、上澄液をPP製メスフラスコに分取した。残留物にエタノール及び水 (3 : 7) 混液50 mLを加え2分間ホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離を行い、上澄液を採った。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とした。この溶液から正確に2 mLをPP製メスフラスコに分取し、エタノールを加えて10 mLに定容した。

## 2) 誘導体化

抽出液1 mLを撹合せ試験管に移し、ロータリーエバポレーターで濃縮し、溶媒を除去した。残留物にメタノール100 µLを加え、溶かした。これに酢酸2 mL、オルト酢酸トリメチル2 mLを加え、共栓をケッククリップで固定して密栓して100°Cのブロックヒーターで90分間加熱した。放冷後、ロータリーエバポレーターで濃縮し溶媒を除去した。残留物に酢酸エチル2 mLを加え、溶かした。

## 3) 精製

グラファイトカーボンミニカラム[Supelclean ENVI-carb (250 mg/6 mL)]に酢酸エチル10 mLを注入し、流出液は捨てた。シリカゲルミニカラム[InertSep Si (500 mg/6 mL)]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、各流出液は捨てた。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、誘導体化反応容器を酢酸エチル2 mLで洗い込み、その洗浄液を負荷することを2回繰り返した。酢酸エチル9 mLを注入し、流出液は捨てた後、グラファイトカーボンブラックミニカラムを取り外した。シリカゲルミニカラムに酢酸エチル5 mLを注入し、流出液は捨てた。続いて、酢酸エチル及びメタノール (7 : 3) 混液20 mLを注入し、溶出液を採り、ロータリーエバポレーターで濃縮し、溶媒を除去した。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、正確に1 mLとしたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート]

**秤取**

- ↓ 試料 (大豆及びなたね 10.0 g、とうもろこし (未成熟) 20.0 g)  
(添加用標準溶液を添加)
- ↓ 大豆、なたねは、水 20 mL を加えて室温で 30 分間放置

**抽出**

- ↓ エタノール及び水混液\* 100 mL を加え、ホモジナイズ 2 分間
- ↓ 遠心分離 (3,000 rpm、10 分間)、上澄液を採る
- ↓ 遠心分離後残渣にエタノール及び水混液\* 50 mL を加え、ホモジナイズ 2 分間
- ↓ 遠心分離 (3,000 rpm、10 分間)、上澄液を採る
- ↓ エタノール及び水混液\* を加え、200 mL に定容。
- ↓ 上の溶液から、大豆、なたねは 2 mL、とうもろこし (未成熟) は 1 mL を 10 mL メスフラスコ (PP 製) に分取  
(試料 0.1 g 相当)
- ↓ エタノールを加え 10 mL に定容し抽出液とする  
\* 大豆及びとうもろこしの場合はエタノール及び水 (3:2) 混液、なたねの場合は (3:7) 混液

**誘導体化**

- ↓ 抽出液 1 mL を撹合せ試験管に分取  
(試料 0.01 g 相当)
- ↓ ロータリーエバポレーターで溶媒を除去した後、窒素噴霧により乾固
- ↓ 残留物にメタノール 100 µL を加えて溶かす
- ↓ 酢酸 2 mL、オルト酢酸トリメチル 2 mL を添加
- ↓ 共栓をケッククリップで固定して密栓し 100°C のブロックヒーターで 90 分間加熱
- ↓ 室温で放冷
- ↓ ロータリーエバポレーターで溶媒を除去した後、窒素噴霧により乾固
- ↓ 残留物に酢酸エチル 2 mL を加えて溶かす

**精製**

- ↓ Supelclean ENVI-carb (250 mg/6 mL) に酢酸エチル 10 mL を注入し、流出液は捨てる
- ↓ InertSep Si (500 mg/6 mL) 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、流出液は捨てる
- ↓ Supelclean ENVI-carb の下に InertSep Si を連結する
- ↓ 酢酸エチルに溶かした誘導体化反応物を全量注入した後、容器を酢酸エチル 2 mL で洗い込み、その洗浄液を注入する操作を 2 回行う
- ↓ 酢酸エチル 9 mL を注入し、流出液は捨てる
- ↓ Supelclean ENVI-carb を外し、InertSep Si に酢酸エチル 5 mL を注入し、流出液は捨てる
- ↓ 酢酸エチル及びメタノール (7:3) 混液 20 mL を注入し、溶出液を採る
- ↓ ロータリーエバポレーターで溶出液を濃縮し、溶媒を除去
- ↓ 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、正確に 1 mL とする

**試験溶液**

**LC-MS/MS**

8. マトリックス添加標準溶液の調製

農薬無添加の大豆、とうもろこし及びなたねに対して、7 と同様に操作し、シリカゲルミニカラムの溶出液をロータリーエバポレーターで濃縮し、溶媒を除去した。残留物に、5 と同様に操作して調製した 100% 回収相当濃度の検量線用標準溶液を正確に 1 mL 加えて溶かし、マトリックス添加標準溶液とした。

## [結果及び考察]

### 1. 測定条件の検討

#### (1) MS条件の検討

##### ①プリカーサーイオン

グリホサート、*N*-アセチルグリホサート共に、本報告の方法で得られる誘導体化物は同一の化合物で、その分子式は $C_8H_{16}NO_6P$ 、分子量は253.19である(図2)。グリホサートの標準溶液を誘導体化し、誘導体化物を0.1%ギ酸水溶液及び0.1%ギ酸含有アセトニトリル(1:1)混液に溶かした溶液を、フローインジェクション分析した。移動相はこの時点で検討中であったLC条件の0.1%ギ酸水溶液及び0.1%ギ酸含有アセトニトリル(1:1)混液のアイソクラティックで実施した。

ESI (+) モードでスキャン測定して得たマスペクトル(図3)において、誘導体化物のプロトン付加分子( $m/z$  254.0  $[M+H]^+$ )が検出されたものの、ナトリウム付加体( $m/z$  276.1  $[M+Na]^+$ )及びグリホサートのモノメチル化体と考えられるもの( $m/z$  186.2  $[M+CH_2+H]^+$ )が強く検出された。カラムを接続して分析した際に単一ピークしか検出されなかったことから、モノメチル化体はイオン化の際に生じるフラグメントイオンと考察した。

一方、ESI (-) モードでは、誘導体化物の脱プロトン分子( $[M-H]$ )と推察されるイオン( $m/z$  252.0)は検出されなかった。

以上から、ESI (+) モードを採用し、Na付加体やイオン化で生じるフラグメントイオンの強度が、マトリックスの影響により食品によって異なる可能性があると考え、 $m/z$  254.0をプリカーサーイオンとして選択した。



図2. 分析対象化合物と誘導体化物の構造

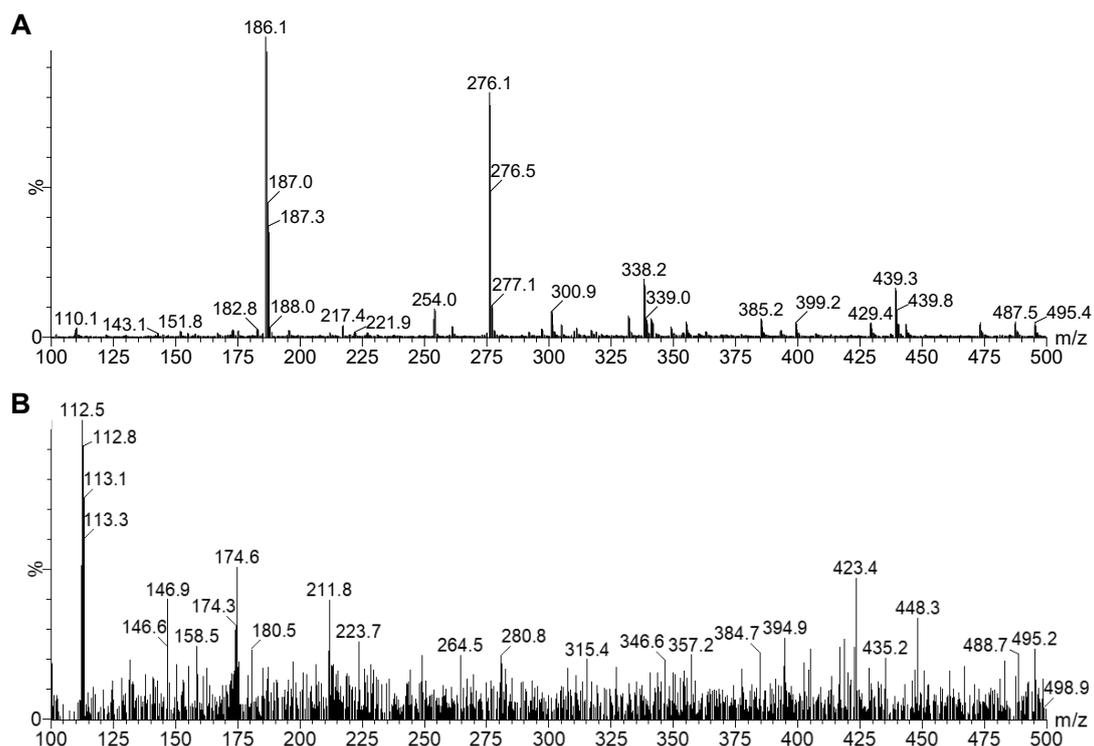


図3. スキャン測定により得られる誘導体化物のマススペクトル. A) ESI (+) モード、B) ESI (-) モード.

両モード共、100 ng/mL 相当、スキャン範囲： $m/z$  100~500、 $CV = 20 V$ .

### ② プロダクトイオン

ESI (+) モードにおいて、 $m/z$  254.0をプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャン測定を行ったところ、 $m/z$  101.9 (最適コリジョンエネルギー20 eV)、 $m/z$  73.9 (最適コリジョンエネルギー25 eV) で良好なシグナル強度が得られた (図4)。

以上から、本検討では、最も高感度に測定できた $m/z$  254.0→101.9を定量イオンとし、 $m/z$  254.0→73.9を定性イオンとして選択した。

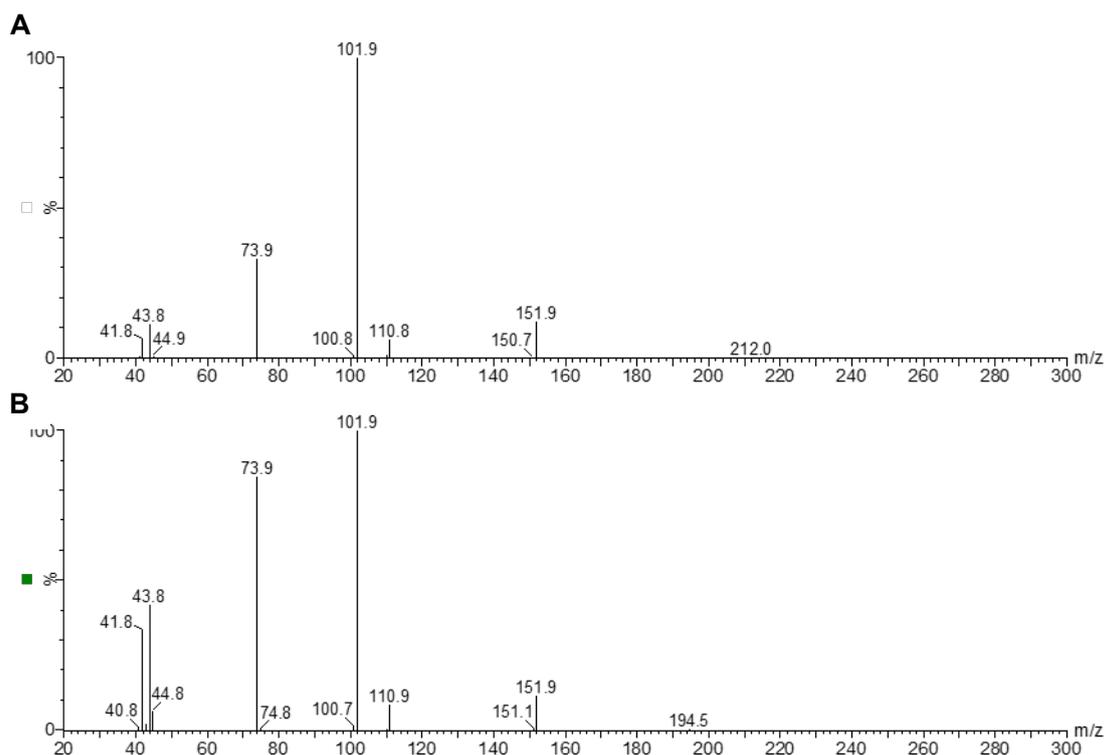


図 4. グリホサート誘導体化物のプロダクトイオンスペクトル.

A) CE = 20 eV (定量用)、B) CE = 25 eV (定性用).

A, B 共に 100 ng/mL、測定モード : ESI (+)、CV = 20 V、プリカーサーイオン :  $m/z$  254.0、

## (2) LC条件の検討

分析カラムについて、H30年度の基礎検討及びR01年度の開発検討ではグリホサート、*N*-アセチルグリホサートのそれぞれを直接検出するため、HILIC (親水性相互作用液体クロマトグラフィ) カラム及びイオン交換カラムを用いて検討行ったが、特にグリホサートのピーク形状が悪く感度も不十分であった。そのため本報では誘導体化物を検出することとし、オクタデシルシリル (ODS) 化シリカゲルカラム数種について検討した。

カラムに一般的なODS系分析カラムである Inertsil ODS-4 HP (3  $\mu$ m),  $\phi$ 3.0 x 150 mm (ジューエルサイエンス製) を用いて測定した。移動相を 10 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液及びアセトニトリル (9:1) 混液としてアイソクラティックで溶出したところ、良好なピーク形状と感度を得られたが (図5)、カラムを洗浄するため、10 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液及びアセトニトリル (9:1) 混液で10分間溶出した後、10 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液及びアセトニトリル (1:3) 混液で10分間洗浄するステップワイズの送液を採用した。

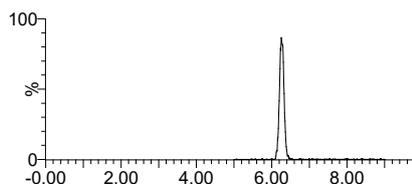


図 5. グリホサート誘導体化物の SRM クロマトグラム.

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

流速 : 0.4 mL/min

### (3) 検量線

実際の検査ではグリホサート標準品のみで検量線を作成して定量ができれば効率が良い。そのため、グリホサートから検量線を作成した場合と、*N*-アセチルグリホサートから検量線を作成した場合とで同じ検量線が得られるか検証した。

グリホサート及び *N*-アセチルグリホサートの標準溶液（グリホサートとして 1 ng/mL、10 ng/mL、100 ng/mL 及び 1000 ng/mL の 4 濃度）を調製した。各標準溶液 100 µL を正確に摺合せ試験管に分取し、酢酸 2 mL 及びオルト酢酸トリメチル 2 mL を加え、共栓をケッククリップで固定して密栓し 100°C のブロックヒーターで 90 分間加熱した。放冷後、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。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、正確に 1 mL とした。さらに、アセトニトリル及び 10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液（1 : 9）混液で 10 倍、100 倍又は 1000 倍に適宜希釈し、LC-MS/MS で分析した。誘導体化前に調製した希釈系列から得られた検量線は、グリホサート誘導体化物及び *N*-アセチルグリホサート誘導体化で同等のものが作成できた（表 1 の青枠、図 6）。また、両化合物の 1000 ng/mL 標準溶液を誘導体化した後に 10 倍、100 倍又は 1000 倍に希釈したものから作成した検量線も、同等の検量線を作成できたうえ（表 1 の赤枠）、誘導体化前に希釈しても誘導体化後に希釈しても、検量線作成に影響がないことが確認できた（図 6）。以上から、検量線は、グリホサート標準品のみを誘導体化後、希釈した溶液から作成可能と考えられる。

表 1. グリホサート及び *N*-アセチルグリホサートの誘導体化比較（n = 3）

グリホサート誘導体化					<i>N</i> -アセチルグリホサート誘導体化				
ng/mL	x 1/1000	x 1/100	x 1/10	x1	ng/mL	x 1/1000	x 1/100	x 1/10	x1
100	8,627	84,323	847,460	8,154,537	100	8,978	84,437	844,235	8,263,449
10		8,284	82,824	813,568	10		9,000	88,826	888,759
1			8,443	81,019	1			9,123	87,097
0.1				9,096	0.1				8,832

\*面積値は n = 3 の平均値。

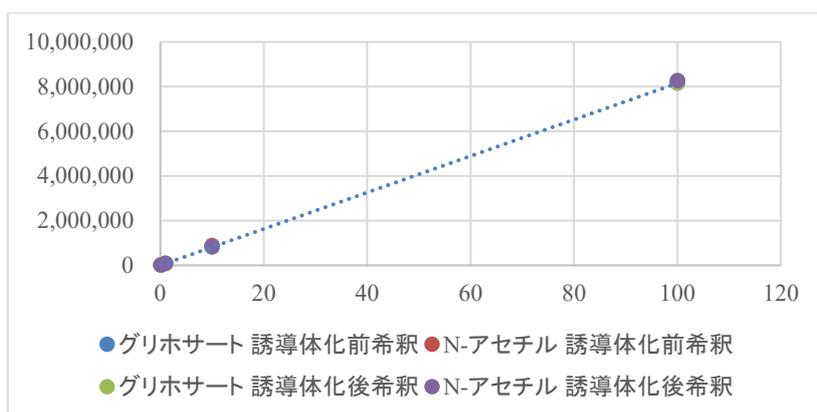


図 6. グリホサート及び *N*-アセチルグリホサート標準溶液の誘導体化比較

### (4) 定量限界

グリホサートとしての定量限界の算出結果を以下に示した。

大豆、とうもろこし及びなたね： 0.01 mg/kg

[試験溶液量 1 mL / 試験溶液中の試料量 0.01 g]

× [グリホサートの定量限界相当量 0.0005 ng / 注入量 5 µL]

## 2. 試験溶液調製法の検討

### (1) 抽出方法の検討

グリホサートは非常に極性が高い化合物であるため、既存の通知試験法（グリホサート試験法 I（農産物）及びグリホサート試験法（畜水産物））においては、抽出溶媒として水が使用されている。抽出溶媒として水を使用した場合には、一般的な条件での遠心分離において沈殿が得られ難い食品が多いことから、グリホサート試験法 I（農産物）ではクロロホルム、グリホサート試験法（畜水産物）ではジクロロメタンを共存させた状態で抽出・遠心分離が行われている。クロロホルム及びジクロロメタンは発がん性が懸念される溶媒であることから、本検討ではこれら有害試薬を使用しない抽出溶媒について検討した。

まず、水のみでの抽出を検討した。大豆10.0 gに水20 mLを加え30分間放置した後、水100 mLを加え2分間ホモジナイズし、毎分3,000回転で10分間遠心分離を行ったが、分離が不十分で上澄液を採取できなかった。ろ紙及びケイソウ土を用いてのろ過も検討したが、目詰まりした。

次に、Quppe-PO法を参考に1 vol%ギ酸含有メタノールでの抽出を検討した。大豆5.0 gに水10 mLを加え30分間放置した後、1 vol%ギ酸含有メタノール10 mLを加え2分間ホモジナイズし、毎分3,000回転で10分間遠心分離を行ったところ、概ね良好に分離し上澄液を採れたが、抽出液を濃縮する際に突沸し易く、安定した分析値が得られない可能性が高いと考え不採用とした。

続いてエタノール及び水混液での抽出を検討した（表2）。大豆10.0 gに水20 mLを加え30分間放置した後、エタノール及び水（4:1）混液100 mLを加え2分間ホモジナイズし、毎分3,000回転で10分間遠心分離を行ったところ、概ね良好に分離し上澄液を採れた。抽出液を濃縮する際も突沸し難かった。大豆にグリホサートを定量限界濃度で添加し、エタノール及び水（4:1）混液を用い、分析法フローチャートの通りに抽出、誘導體化、精製して回収率を求めたところ51%であった。エタノール及び水（3:2）混液を用いたところ回収率は84%に向上し、水の比率を高くすることでさらなる回収率の向上することが示されたが、エタノール及び水（3:7）混液では遠心分離が良好でなく、上澄液を採取する操作が困難であった。

同様に、とうもろこしとなたねについて検討した（表2）。とうもろこしの場合、エタノール及び水（3:2）混液で抽出した場合の回収率は81%であったが、エタノール及び水（3:7）混液では大豆と同様、遠心分離が不良で上澄液を採れなかった。一方、なたねの場合、エタノール及び水（3:2）混液で抽出した場合の回収率は51%であり、数回試行しても70%を上回ることがなかったが、エタノール及び水（3:7）混液を用いることで75%の回収率が得られた。

表2. エタノール及び水混液の組成とグリホサート回収率の検討

	添加濃度	エタノール/水 (4:1)	エタノール/水 (3:2)	エタノール/水 (3:7)
大豆	0.01 ppm	51%	84%	×
とうもろこし	0.01 ppm	-	81%	×
なたね	0.01 ppm	-	51%	75%

\* - は未検討。×は遠心分離不可。

次に、大豆、とうもろこし、なたねに基準値濃度のグリホサート又はN-アセチルグリホサートを添加し、エタノール及び水混液の、上記3種の組成の抽出溶媒を用いて、分析法フローチャートの方法で抽出、誘導體化、精製し、回収率を比較した（表3）。グリホサートを定量限界濃度で添加したときの結果と同様の傾向が確認されたことから、大豆及びとうもろこしの抽出にはエタノール及び水（3:2）混液を、なたねの抽出にはエタノール及び水（3:7）混液を選択した。

表 3. エタノール及び及び水混液の組成とグリホサート回収率の検討 (n = 1)

	添加濃度	グリホサート			N-アセチルグリホサート		
		(4:1)	(3:2)	(3:7)	(4:1)	(3:2)	(3:7)
大豆	20 ppm	55%	73%	-	66%	75%	-
とうもろこし	5 ppm	42%	80%	-	81%	83%	-
なたね	30 ppm	27%	58%	75%	71%	79%	84%

\* - は遠心分離不良で操作続行不能。

## (2) 誘導体化の検討

効率的な分析法の開発を目的として、当初は誘導体化せず、グリホサート及びN-アセチルグリホサートをそのままLC-MS/MSで測定する方法について検討したが、良好な測定感度が得られなかった。そのため、グリホサート及びN-アセチルグリホサートを誘導体化することとした。既存のグリホサート試験法I（農産物）においては、誘導体化試薬として9-フルオレニルメチルクロロホルマーが使用されているが、この試薬でのN-アセチルグリホサートの誘導体化は困難である。一方、グリホサート試験法（畜水産物）の誘導体化は「抽出及び精製後の残留物に酢酸1 mL及びオルト酢酸トリメチル4 mLを加え、密栓して100°Cで2時間加熱する」方法であるが、本検討における農産物の場合とは試料量やマトリックスの組成などが異なることから、誘導体化試薬量・反応時間について再検討した。

まず、誘導体化試薬である酢酸とオルト酢酸トリメチルの比率について検討した。摺合せ試験管に0.01 mg/Lのグリホサート標準溶液100 µL (1 ng)を採り、各量の酢酸及びオルト酢酸トリメチルを加え、共栓をケッククリップで固定し密栓した後、100°Cのブロックヒーターで60分間加熱した。放冷後、この溶液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去し、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1 mLとした。LC-MS/MSで測定し、生成した誘導体化物のピーク面積値を求めた(表4)。酢酸とオルト酢酸トリメチルの液量が等量、もしくはオルト酢酸トリメチルの液量が酢酸の液量よりも多い条件において、誘導体化物の生成が促進された。試料マトリックスに、酢酸及びオルト酢酸トリメチルで誘導体化される夾雑物が含まれる可能性を考慮し、酢酸2 mL及びオルト酢酸トリメチル2 mLを加えて誘導体化を行うこととした。

表 4. 誘導体化試薬の液量とグリホサート誘導体化物のピーク面積値

酢酸 (µL)	オルト酢酸 トリメチル (µL)	グリホサート 誘導体化物の ピーク面積値
200	200	12818
500	500	13909
100	300	12601
100	400	13288
300	100	8878
400	100	8111

次いで、誘導体化反応時間の検討を行った。摺合せ試験管に0.01 mg/Lのグリホサート標準溶液100 µL (1 ng)を採り、酢酸2 mL及びオルト酢酸トリメチル2 mLを加え、共栓をケッククリップで固定し密栓した後、100°Cのブロックヒーターで15、30、60、90、又は120分間加熱した。放冷後、この溶液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去し、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1 mLとした。LC-MS/MSで測定し、生成した誘導体化物のピーク面積値を求めた(図7)。誘導体化物の生成は、30分以降はほぼ平衡になることが確認された。試料マトリックスに、

酢酸及びオルト酢酸トリメチルで誘導体化される夾雑物が含まれる可能性を考慮し、90 分の加熱時間を採用した。

なお、誘導体化における温度については、グリホサート試験法（畜水産物）に記載された注意点や操作の安全性等を考慮し、グリホサート試験法（畜水産物）と同様の 100℃を採用した。

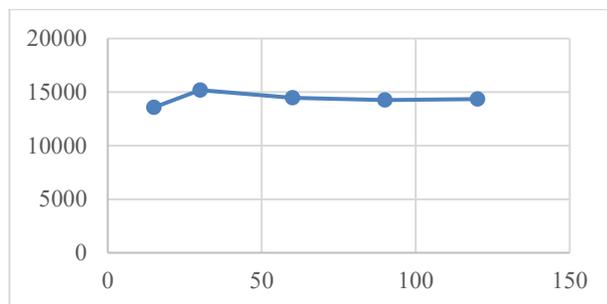


図 7. 誘導体化反応時間とグリホサート誘導体化物のピーク面積値

誘導体化条件を確定した後、グリホサートと *N*-アセチルグリホサートそれぞれについて、マトリックス存在下での誘導体化効率について検証した。

分析法フローチャートの方法で大豆、とうもろこし、なたねからブランク抽出液を調製し、抽出液 1 mL を撹合せ試験管に分取した (各食品 n=3)。ロータリーエバポレーターで濃縮し、溶媒を除去した後、基準値濃度相当となるようにグリホサート又は *N*-アセチルグリホサート標準溶液 100 µL を加えて溶かした。この溶液に酢酸 2 mL 及びオルト酢酸トリメチル 2 mL を加え、共栓をケッククリップで固定して密栓し 100℃のブロックヒーターで 90 分間加熱した。放冷後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、溶媒を除去した。残留物に酢酸エチル 2 mL を加えて溶かした。精製は分析法フローチャートの方法で実施し、LC-MS/MS 分析で測定した。また、各食品の基準値濃度相当となるようにグリホサート又は *N*-アセチルグリホサート標準溶液 100 µL を撹合せ試験管に採り、上記と同様に誘導体化、精製及び LC-MS/MS 測定を行った。溶媒標準溶液由来の誘導体化物の回収率に対する、マトリックス添加標準溶液由来の誘導体化物の回収率の比を算出した (表 5)。大豆由来のマトリックスがグリホサートの誘導体化効率を若干下げることが示唆されたものの、他は定量に大きな影響を与える可能性は低く、また、マトリックスがあってもグリホサート及び *N*-アセチルグリホサートの誘導体化効率はほぼ同等と考えられた。

表 5. マトリックス中での誘導体化効率の比較

	マトリックス / 溶媒標準 (n = 3)		
	グリホサート	<i>N</i> -アセチル	グリホサート/ <i>N</i> -アセチル
大豆	89	93	0.96
とうもろこし	95	93	1.02
なたね	99	100	0.99

### (3) カラム精製の検討

既存のグリホサート試験法 I（農産物）及びグリホサート試験法（畜水産物）においては、強酸性陽イオン交換カラムを用いて抽出液が精製されており、水を多く含む溶出液の濃縮が必須となるが、これまでの一連の検討から、水を多く含む溶液を濃縮する際に、グリホサートの回収率が低下する可能性が示唆された。また、誘導体化による測定の高感度化が可能となり、少量の抽出液を用いた場合でも定量下限の目標値である 0.01 mg/kg の濃度を十分に測定可能であったことから、抽出液の精製は実施しな

った。

誘導体化後の溶液を精製せずに測定した場合、試料によっては夾雑ピークが確認され、また、測定の際の試料マトリックスの影響も懸念されたことから、誘導体化反応後の精製について検討した。

#### ① グラファイトカーボンミニカラム

摺合せ試験管に 0.1 mg/L のグリホサート標準溶液 100 µL (10 ng) を採り、酢酸 2 mL 及びオルト酢酸トリメチル 2 mL を加え、共栓をケッククリップで固定し密栓した後、100°C のブロックヒーターで 60 分間加熱した。放冷後、この溶液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去し、残留物を酢酸エチル 2 mL に溶かした。

予め酢酸エチル 10 mL で洗浄したグラファイトカーボンミニカラム (Supelclean ENVI-Carb, 250 mg/6 mL) に、誘導体化物の溶液を全量注入した。次いで、酢酸エチル 5 mL ずつを順次注入し、各溶出液を採った。溶出液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去し、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 1 mL に溶かして LC-MS/MS で測定した。各溶出液中の誘導体化物の回収率は表 6 の通りであり、酢酸エチル 10 mL を通液することで、グラファイトカーボンミニカラムから誘導体化物を効率的に溶出可能であることが確認された。

また、グリホサートの大豆マトリックス添加標準溶液を、上と同様に誘導体化した後、グラファイトカーボンミニカラムからの溶出挙動を確認したところ、10 mL 通液することで 90.6% 回収されることが確認された。

表 6. グラファイトカーボンミニカラムからの誘導体化物の溶出挙動

試料	負荷液 +酢酸エチル 5 mL	酢酸エチル 5-10 mL	酢酸エチル 10-15 mL	合計
標準溶液	97.4	0.4	0	97.8
大豆	89.3	1.3	0	90.6

n = 2. 表中単位 : %.

#### ② シリカゲルミニカラム

摺合せ試験管に 0.1 mg/L のグリホサート標準溶液 100 µL (10 ng) を採り、酢酸 2 mL 及びオルト酢酸トリメチル 2 mL を加え、共栓をケッククリップで固定し密栓した後、100°C のブロックヒーターで 60 分間加熱した。放冷後、この溶液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去し、残留物を酢酸エチル 2 mL に溶かした。

予め酢酸エチル 10 mL で洗浄したシリカゲルミニカラム (InertSep SI, 500 mg/6 mL) に、誘導体化物の溶液全量を注入した。次いで、酢酸エチル 5 mL ずつを順次注入し、各溶出液を採った。溶出液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した後、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 1 mL に溶かして LC-MS/MS で測定した (表 7)。誘導体化物はシリカゲルに保持され、酢酸エチルで溶出しなかった。溶出液を酢酸エチル及びメタノール (7:3) 混液に変更して同様に操作したところ、10 mL で回収率 94.9% と十分に溶出可能であった。

同様に、グリホサートの大豆マトリックス添加標準溶液を誘導体化し、グラファイトカーボンミニカラムからの溶出挙動を確認したところ、10 mL で回収率 99.1% と十分に溶出可能であった (表 7)。他の食品試料マトリックスによる溶出のずれや、実際の検査の際にグルホシネート等の類似化合物との同時分析の可能性等を考慮し、酢酸エチル及びメタノール (7 : 3) 混液 20 mL で溶出することとした。

表 7. シリカゲルミニカラムからの誘導体化物の溶出挙動

誘導体化物 由来	溶出溶媒	負荷液 + 5 mL	5-10 mL	10-15 mL	15-20 mL	合計
標準溶液	酢酸エチル	0	0	0	0	0
	酢酸エチル及びメタノール (7:3)	94.2	0.7	0	0	94.9
大豆	酢酸エチル	0	0	0	0	0
	酢酸エチル及びメタノール (7:3)	89.7	9.4	0	0	99.1

n = 2. 表中単位 : %.

なお、グリホサートの類似化合物であるグルホシネートに関して、グルホシネート試験法（農産物）の開発においては、検討対象食品はとうもろこし（未成熟）、大豆、なたね、ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ、りんご、茶（抹茶及び煎茶）であった。本事業の検討対象ではないが、グリホサートについては、ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ、りんご、茶（抹茶及び煎茶）についても検討した。酢酸エチルのみでシリカゲルミニカラムを洗浄・平衡化した場合、食品によっては良好な回収率が得られなかった（りんご：66%、オレンジ：64%）。トリエチルアミンを含む酢酸エチルで予備洗浄すると改善された（りんご：80%、オレンジ：79%）ことから、シリカゲルミニカラムの予備洗浄は酢酸エチル及びトリエチルアミン（99：1）混液 10 mL を通液した後、酢酸エチル 5 mL を通液する操作とした。

### ③ ミニカラムの連結

①②の検討結果から、精製操作の効率を考え、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を連結し、以下の方法とした。

「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 を注入し洗浄・平衡化する。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 を順次注入して洗浄・平衡化する。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する。誘導体化反応の溶液を濃縮して除去し、残留物を酢酸エチル 2 mL に溶かす。この溶液を注入した後、容器を酢酸エチル 2 mL で洗い込み、その洗浄液を注入することを 2 回行う。さらに酢酸エチル 9 mL をカラムに注入し、全流出液は捨てる。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 を注入して洗浄する。続いて、酢酸エチル及びメタノール（7：3）混液 20 mL を注入し、溶出液を採る。溶出液を 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。」

この方法による溶媒標準溶液の誘導体化物の回収率は 91.8%であり、大豆マトリックス添加標準溶液の誘導体化物の回収率は 103.6%であった。

## 3. 添加回収試験

検討対象の大豆、とうもろこし（未成熟）、なたねの 3 食品を試料に用いた。

ブランク試料に添加用標準溶液 1 mL を添加、攪拌し、室温で約 30 分間放置したものを添加試料とした。

「[実験方法] 7. 試験溶液の調製」に記載した方法に従い操作し、ブランク試料及び添加試料から試験溶液を調製した。LC-MS/MS で測定し、選択性、真度、併行精度及び S/N を求めた。

### (1) 選択性

いずれの食品からも、グリホサート又は N-アセチルグリホサートに由来する妨害ピークが検出されたが、選択性の目標値を満足した（表 8）。

表 8. 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	妨害ピークの許容範囲の評価			ピーク面積 (高さ)						選択性の評価	備考	
					評価濃度 (ppm)	評価基準	面積又は高さの別	ブランク			マトリックス添加標準溶液 <sup>2</sup>					面積(高さ)比 (a)/(b)
								n=1	n=2	平均 (a)	n=1	n=2	平均 (b)			
1	グリホサート	大豆	0.01		定量限界 0.01	<0.333	面積	322	299	310	3797	3841	3819	0.088	○	
2		とうもろこし	0.01		定量限界 0.01	<0.333	面積	371	388	380	11018	10939	10978	0.036	○	
3		なたね	0.01		定量限界 0.01	<0.333	面積	438	512	475	7469	7587	7528	0.067	○	
4		大豆	0.01	20	基準値 20.	<0.100	面積	168	147	157	1987885	2096172	2042028	0.000	○	
5		とうもろこし	0.01	5	基準値 5.	<0.100	面積	1342	1290	1316	5394660	5388390	5391525	0.000	○	
6		なたね	0.01	30	基準値 30.	<0.100	面積	0	0	0	252824	259293	256058	0.000	○	
7	N-アセチルグリホサート	大豆	0.01		定量限界 0.01	<0.333	面積	353	344	348	4202	4173	4187	0.091	○	
8		とうもろこし	0.01		定量限界 0.01	<0.333	面積	242	232	237	7204	7715	7459	0.033	○	
9		なたね	0.01		定量限界 0.01	<0.333	面積	2059	2074	2067	14940	14661	14801	0.162	○	
10		大豆	0.01	20	基準値 20.	<0.100	面積	194	184	189	1619032	1855175	1737103	0.000	○	
11		とうもろこし	0.01	5	基準値 5.	<0.100	面積	124	209	167	3749040	3438002	3593521	0.000	○	
12		なたね	0.01	30	基準値 30.	<0.100	面積	0	0	0	365495	369267	367381	0.000	○	

\*大豆 (基準値濃度) の場合は試験溶液を 10 倍希釈、なたね (基準値濃度) の場合は試験溶液を 100 倍希釈して測定

(2) 真度、精度及び定量限界

基準値相当濃度のグリホサート又は N-アセチルグリホサート (グリホサートとしての濃度) を添加した試料における真度及び併行精度は

グリホサート： 真度 86.7~91.2%、併行精度 3.7~6.9%

N-アセチルグリホサート：真度 79.2~88.3%、併行精度 2.3~7.1%

であり (表 9)、真度の目標値 (70%~120%の範囲内) 及び併行精度の目標値 (添加濃度が 0.1 ppm より高い場合は 10 RSD%未満) を満足した。また、定量限界濃度における添加試料のピークの S/N の平均値は、グリホサートで 16.9~75.1、N-アセチルグリホサートで 45.3~139.7 であり、S/N $\geq$ 10 以上を満たした。

定量限界相当濃度のグリホサート又は N-アセチルグリホサート (グリホサートとしての濃度) を添加した試料における真度及び併行精度は

グリホサート： 真度 71.6~91.9%、併行精度 1.7~11.2%

N-アセチルグリホサート：真度 75.0~84.4%、併行精度 5.2~8.6%

であり (表 9)、真度の目標値 (70%~120%の範囲内) 及び併行精度の目標値 (添加濃度が 0.01 ppm よりも高く 0.1 ppm 以下の場合は 15 RSD%未満) を満足した。

表 9. 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 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価	検量線			回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N			備考
							傾き	切片	r <sup>2</sup> 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値	
1	グリホサート	大豆	0.01	20	0.01	S/N	35497622	109	0.9992	64.7	70.6	64.0	80.5	78.0	71.6	10.5	41.2	35.9	38.5	
2		とうもろこし	0.01	5	0.01	S/N	120065886	-49	0.9998	77.8	90.3	87.8	99.4	104.0	91.9	11.2	88.2	61.9	75.1	
3		なたね	0.01	30	0.01	S/N	64661914	84	0.9989	76.7	76.1	76.2	73.8	74.3	75.4	1.7	15.9	18.0	16.9	
4		大豆	0.01	20	20	—	97726205	-1939	0.9896	85.1	88.6	97.6	83.9	82.4	87.5	6.9	—	—	—	
5		とうもろこし	0.01	5	5	—	108574592	-40331	0.9997	93.8	95.9	84.4	88.7	93.0	91.2	5.0	—	—	—	
6		なたね	0.01	30	30	—	76589593	560	0.9971	81.3	88.8	86.7	89.5	86.9	86.7	3.7	—	—	—	
7	N-アセチルグリホサート	大豆	0.01	20	0.01	S/N	38681658	102	0.9984	73.4	83.9	70.2	84.2	73.1	77.0	8.6	41.7	48.9	45.3	
8		とうもろこし	0.01	5	0.01	S/N	85252114	-90	0.9860	69.3	74.2	76.4	82.5	72.7	75.0	6.6	186.4	93.0	139.7	
9		なたね	0.01	30	0.01	S/N	129104281	286	0.9999	86.8	90.8	83.4	80.9	80.1	84.4	5.2	115.8	106.3	111.0	
10		大豆	0.01	20	20	—	82049370	27563	0.9863	93.8	95.8	81.0	84.6	86.2	88.3	7.1	—	—	—	
11		とうもろこし	0.01	5	5	—	86417371	-173914	0.9865	83.7	80.8	73.3	80.9	77.0	79.2	5.1	—	—	—	
12		なたね	0.01	30	30	—	120405152	1258	1.0000	89.5	86.5	85.1	84.3	86.5	86.4	2.3	—	—	—	

\*大豆 (基準値濃度) の場合は試験溶液を 10 倍希釈、なたね (基準値濃度) の場合は試験溶液を 100 倍希釈して測定

(3) 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について検討した結果を表 10 に示した。

添加回収試験における回収率 100%相当濃度になるように調製した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比を求めた。グリホサートは基準値相当濃度で 1.01~1.14、定量限界濃度

で 0.88～1.03 であった。N-アセチルグリホサートは基準値相当濃度で 0.91～1.01、定量限界濃度で 0.90～0.99 であった。また、これらの値から算出した補正真度を表 11 に示した。グリホサートの基準値相当濃度の面積値比が若干大きい、補正真度の値から許容できると考えた。そのほかは、試料マトリックスの定量に与える影響は小さいと考えられた。

表 10. 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 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 <sup>1</sup> (mg/L)	ピーク面積(高さ) <sup>2</sup>									備考
							面積又は高さの別	ブランク <sup>3</sup>	マトリックス添加標準溶液 <sup>4</sup>			溶媒標準溶液			ピーク面積(高さ)比 <sup>5</sup>	
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
1	グリホサート	大豆	0.01	20	0.01	0.0001	面積	299	3797	3841	3520	3648	3629	3639	0.97	
2		とうもろこし	0.01	5	0.01	0.0001	面積	380	11018	10939	10599	12045	11989	12017	0.88	
3		なたね	0.01	30	0.01	0.0001	面積	475	7469	7587	7053	6552	7195	6873	1.03	
4		大豆	0.01	20	20	0.02	面積	157	1987885	2096172	2041871	1873875	1720886	1797380	1.14	
5		とうもろこし	0.01	5	5	0.05	面積	1342	5394660	5388390	5390183	5365783	5349738	5357760	1.01	
6		なたね	0.01	30	30	0.003	面積	0	252823.64	259293.34	256058	235058	233463	234260	1.09	
7	N-アセチル-グリホサート	大豆	0.01	20	0.01	0.0001	面積	344	4202	4173	3843	3922	3868	3895	0.99	
8		とうもろこし	0.01	5	0.01	0.0001	面積	237	7204	7715	7222	8194	7818	8006	0.90	
9		なたね	0.01	30	0.01	0.0001	面積	2067	14940	14661	12734	14186	13168	13677	0.93	
10		大豆	0.01	20	20	0.02	面積	189	1619032	1855175	1736915	1806089	1637250	1721670	1.01	
11		とうもろこし	0.01	5	5	0.05	面積	167	3749040	3438002	3593354	3733152	4154098	3943625	0.91	
12		なたね	0.01	30	30	0.003	面積	0	365495	369267	367381	362446	363689	363068	1.01	

\*1 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。  
 \*2 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。)  
 \*3 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。  
 \*4 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。  
 \*5 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。

表 11.補正真度

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	真度 (%)	ピーク面積比	補正真度 (%)
1	グリホサート	大豆	0.01	20	0.01	71.6	0.97	74.0
2		とうもろこし	0.01	5	0.01	91.9	0.88	104.2
3		なたね	0.01	30	0.01	75.4	1.03	73.5
4		大豆	0.01	20	20	87.5	1.14	77.1
5		とうもろこし	0.01	5	5	91.2	1.01	90.6
6		なたね	0.01	30	30	86.7	1.09	79.3
7	N-アセチル-グリホサート	大豆	0.01	20	0.01	77.0	0.99	78.0
8		とうもろこし	0.01	5	0.01	75.0	0.90	83.2
9		なたね	0.01	30	0.01	84.4	0.93	90.6
10		大豆	0.01	20	20	88.3	1.01	87.5
11		とうもろこし	0.01	5	5	79.2	0.91	86.9
12		なたね	0.01	30	30	86.4	1.01	85.4

添加回収試験における、各食品のブランク試料及び添加試料の代表的な SRM クロマトグラムを図 8～19 に、トータルイオンクロマトグラムを図 20～22 に示した。

4. その他の試験法検討に関連する事項

特になし。

5. 考察

検討の過程において、グリホサート及び N-アセチルグリホサート標準溶液をナスフラスコで濃縮してから試験管に移して誘導体化すると回収率が低かったことから、ガラス製のナスフラスコに吸着して試験管に移せていない可能性があると考えた。遠沈管やメスフラスコの材質について検討したところ、PP 製のものを使用することで回収率の低下が抑えられたため、可能な限り PP 製の容器を用いることとした。

また、グリホサート及び N-アセチルグリホサート標準溶液を摺合せ試験管で濃縮し誘導体化したところ、良好な回収率を得ることができたことから、誘導体化反応は摺合せ試験管 (TS15/25) を用い、ロー

タリーエバポレーターのトラップには試験管アダプターを用いて濃縮乾固を行った。

大豆、なたねの基準値濃度の試験溶液は、実験方法の 7. 試験溶液の調製に従うと、それぞれグリホサートとして 0.2, 0.3 mg/L となり濃度が高すぎるため、大豆は 10 倍、なたねは 100 倍に希釈して LC-MS/MS 分析した。

グリホサート又は *N*-アセチルグリホサートについて、開発した方法を用いて、大豆、とうもろこし、なたねの 3 食品の添加回収試験を行った結果、本試験法は適用可能であると判断した。

#### [結論]

農産物中のグリホサート試験法の開発として、グリホサート又は *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（大豆及びとうもろこしの場合は (3:2)、なたねの場合は (3:7)）で抽出し、希釈後、誘導体化し、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た後、LC-MS/MS で定量及び確認する方法を開発した。開発した試験法を大豆、とうもろこし及びなたねの 3 食品に適用した結果、大豆は真度 71.6~88.3%、併行精度 6.9~10.5%、とうもろこしは真度 75.0~91.9%、併行精度 5.0~11.2%、なたねは真度 75.4~86.7%、併行精度 1.7~5.2%であり、概ね良好な結果が得られた。また、定量限界として、0.01 mg/kg を設定可能であることが確認された。

#### [参考文献]

- 1) 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（畜水産物）」（平成28年4月4日）
- 2) 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）

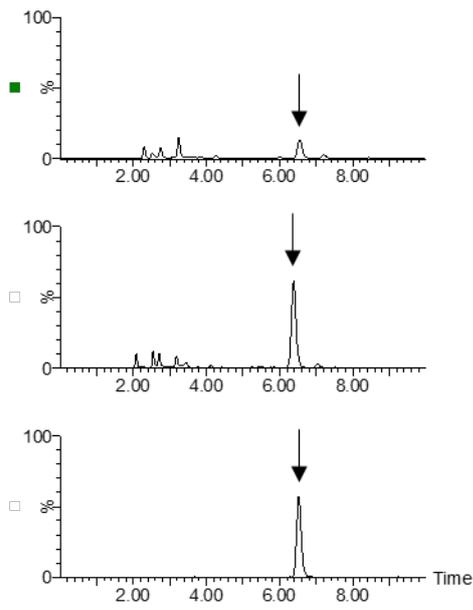


図 8. グリホサート誘導体化合物の  
SRM クロマトグラム ( $m/z$  254.0→101.9)  
大豆、定量限界濃度 (0.01 ppm)  
上からブランク試料、添加試料、標準溶液.

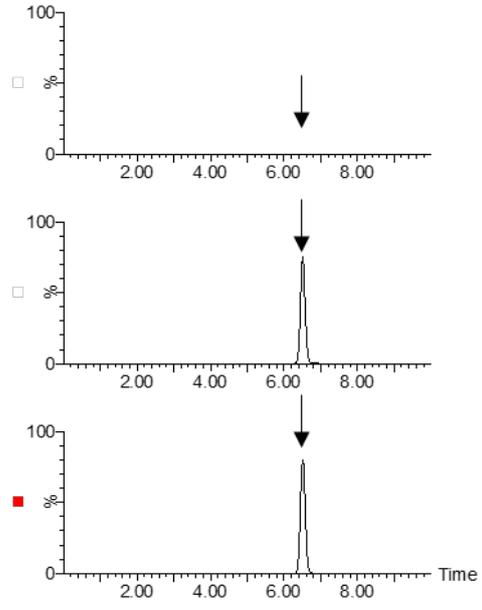


図 9. グリホサート誘導体化合物の  
SRM クロマトグラム ( $m/z$  254.0→101.9)  
大豆、基準値濃度 (20 ppm)  
上からブランク試料、添加試料、標準溶液.

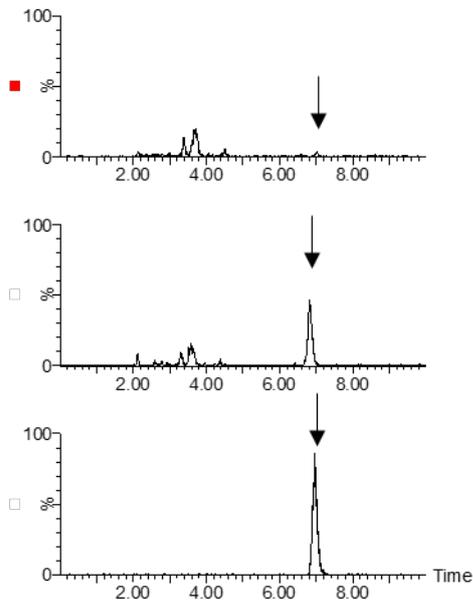


図 10. グリホサート誘導体化合物の  
SRM クロマトグラム ( $m/z$  254.0→101.9)  
とうもろこし、定量限界濃度 (0.01 ppm)  
上からブランク試料、添加試料、標準溶液.

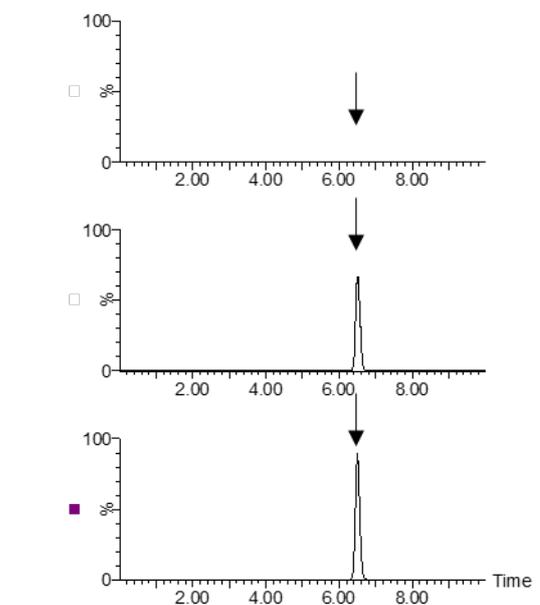


図 11. グリホサート誘導体化合物の  
SRM クロマトグラム ( $m/z$  254.0→101.9)  
とうもろこし、基準値濃度 (5.0 ppm)  
上からブランク試料、添加試料、標準溶液.

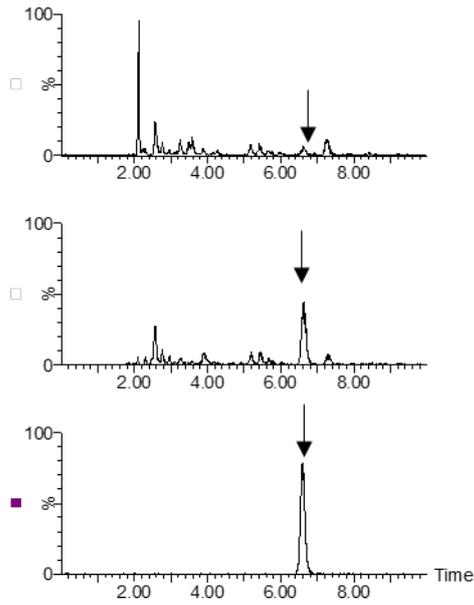


図 12. グリホサート誘導体化合物の  
SRM クロマトグラム ( $m/z$  254.0→101.9)  
なたね、定量限界濃度 (0.01 ppm)  
上からブランク試料、添加試料、標準溶液.

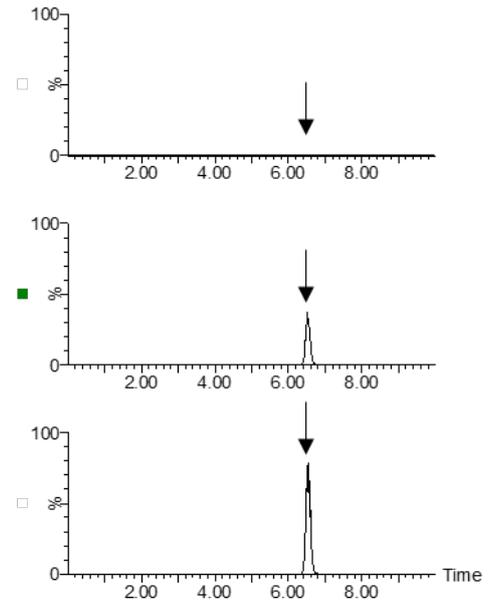


図 13. グリホサート誘導体化合物の  
SRM クロマトグラム ( $m/z$  254.0→101.9)  
なたね、基準値濃度 (30 ppm)  
上からブランク試料、添加試料、標準溶液.

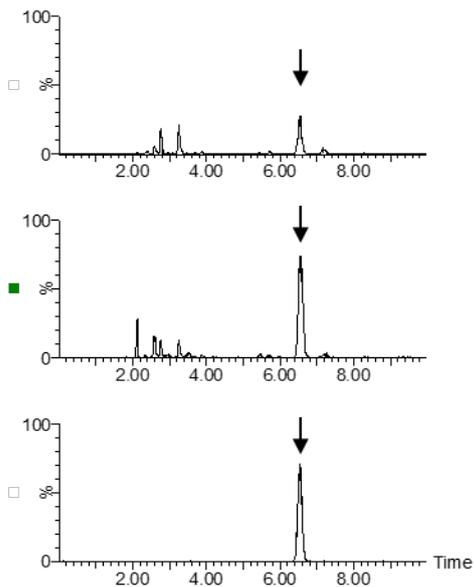


図 14. *N*-アセチルグリホサート誘導体化合物の  
SRM クロマトグラム ( $m/z$  254.0→101.9)  
大豆、定量限界濃度 (0.01 ppm)  
上からブランク試料、添加試料、標準溶液.

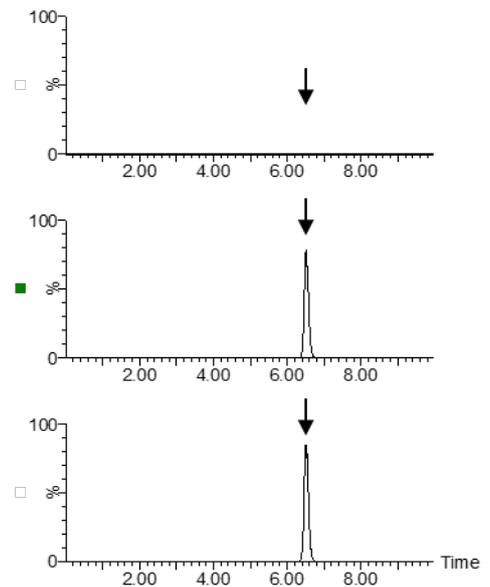


図 15. *N*-アセチルグリホサート誘導体化合物の  
SRM クロマトグラム ( $m/z$  254.0→101.9)  
大豆、基準値濃度 (20 ppm)  
上からブランク試料、添加試料、標準溶液.

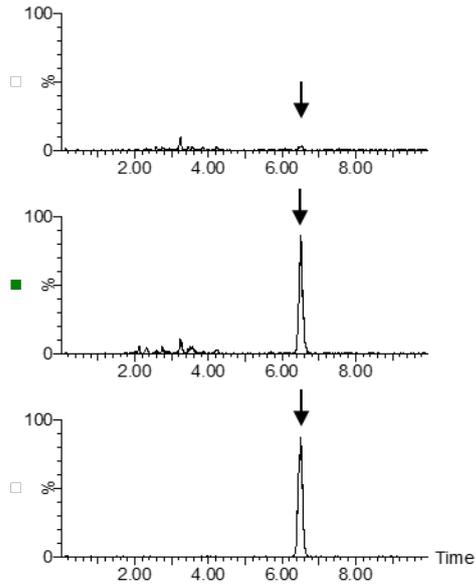


図 16. *N*-アセチルグリホサート誘導体化物の SRM クロマトグラム ( $m/z$  254.0→101.9) とうもろこし、定量限界濃度 (0.01 ppm) 上からブランク試料、添加試料、標準溶液.

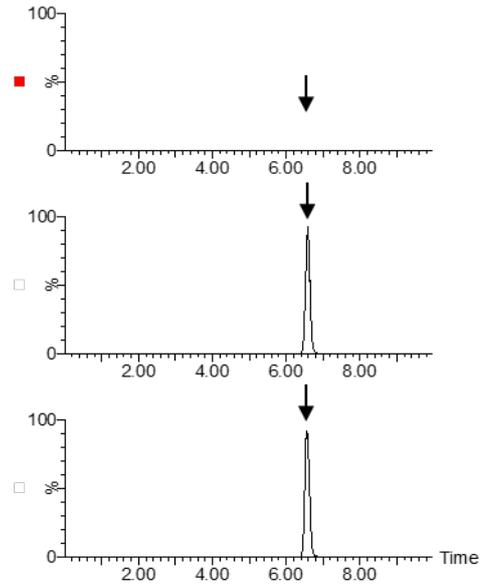


図 17. *N*-アセチルグリホサート誘導体化物の SRM クロマトグラム ( $m/z$  254.0→101.9) とうもろこし、基準値濃度 (5.0 ppm) 上からブランク試料、添加試料、標準溶液.

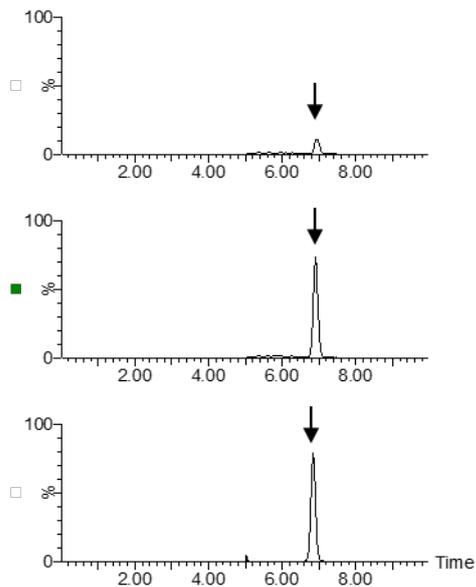


図 18. *N*-アセチルグリホサート誘導体化物の SRM クロマトグラム ( $m/z$  254.0→101.9) なたね、定量限界濃度 (0.01 ppm) 上からブランク試料、添加試料、標準溶液.

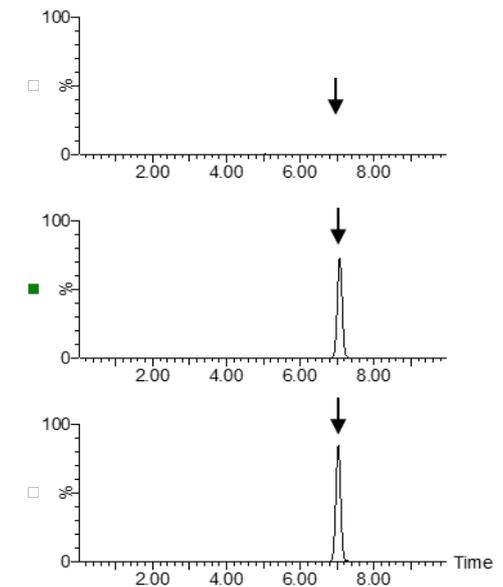


図 19. *N*-アセチルグリホサート誘導体化物の SRM クロマトグラム ( $m/z$  254.0→101.9) なたね、基準値濃度 (30 ppm) 上からブランク試料、添加試料、標準溶液.

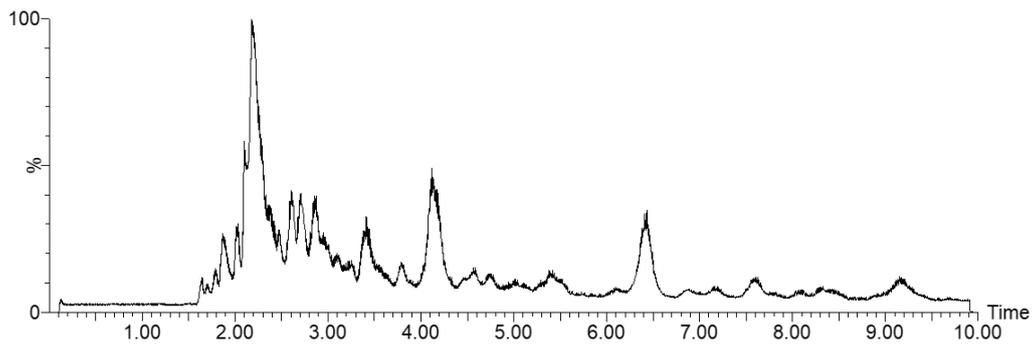


図20. トータルイオンクロマトグラム (大豆)

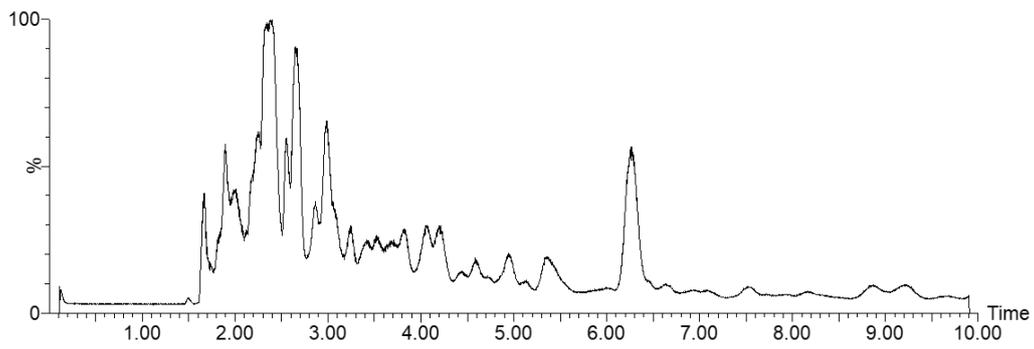


図21. トータルイオンクロマトグラム (とうもろこし)

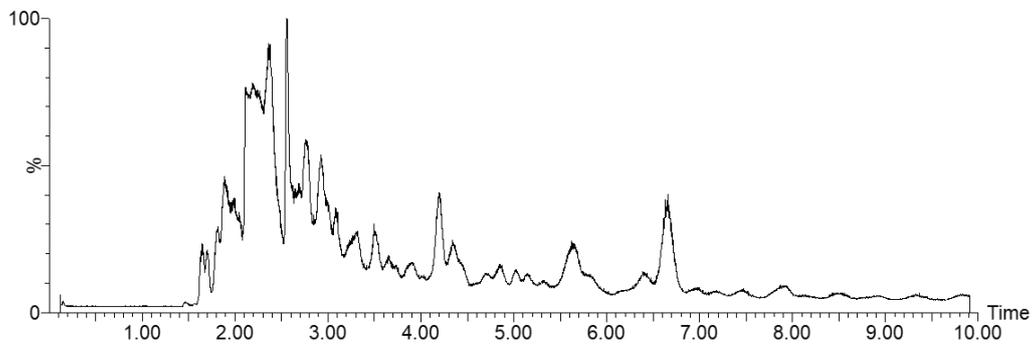


図22. トータルイオンクロマトグラム (なたね)