

グルホシネート分析法（畜産物）

1. 分析対象化合物

グルホシネート及び代謝物B（3-メチルホスフィニコプロピオン酸）

2. 装置

ガスクロマトグラフ・炎光光度検出器（GC-FPD）

3. 試薬、試液

グルホシネートアンモニウム塩	:	分析用標準品
代謝物B	:	分析用標準品
グルホシネート酸	:	分析用標準品
グルホシネートのGC分析用誘導体 ^{*1}	:	分析用標準品
代謝物BのGC分析用誘導体 ^{*2}	:	分析用標準品
オルト酢酸トリメチル（GC分析用誘導体化試薬）、酢酸エチル、酢酸メチル、トルエン、アセトン、ギ酸、酢酸、水酸化ナトリウム、ジクロロメタン、エタノール、メタノール、アンモニア水、 <i>n</i> -ヘキサン	:	特級またはそれに準じる等級
水	:	脱イオン水

*1: methyl-4-(methoxy)(methyl)phosphinoyl-2-acetamido-butyrate

*2: methyl-3-(methoxy)(methyl)phosphinoyl propionate

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 筋肉、肝臓及び腎臓の場合

均一化した試料20 gに水100 mLを加え、振とう機を用いて30分間振とうした後、分離（3,000 rpm、10分間）する、上澄液40 mLを分取しアセトン40 mLを加えて混合した後、遠心分離（3,000 rpm、10分間）する。上澄液40 mLを分取し、ロータリーエバポレーター（湯浴の設定温度：約60℃）を用いてアセトンを留去する。

② 脂肪の場合

均一化した試料20 gにジクロロメタン100 mLを加え、ホモジナイザーを用いて5分間磨砕する。これに水100 mLを加え、ホモジナイザーを用いて5分間磨砕する。この試料液約60 mLを取り遠心分離（3,000 rpm、5分間）する。

③ 乳の場合

予め、筒状の透析膜（約30 cm）を30分間水で膨潤させ、適切な方法で一端を閉じておく。均一化した試料100 mLを少量の水ですすぎながら筒状の透析膜に移した後、もう一端を閉じ、秤量した結晶皿に置く。これに水を加えて試料と水の重量を合計500 gとして、24時間放置する。

④ 全卵の場合

均一化した試料25 gにエタノール50 mLを加え、マグネティックスターラーを用いて10分間激しく攪拌する。これに水150 mLを加え、振とう機を用いて30分間振とうした後、遠心分離（3,000 rpm、10分間）する。

2) 精製-1

① 筋肉、肝臓及び腎臓の場合

予め陰イオン交換樹脂（Cl型）を脱イオン水で1時間膨潤させておき、約100 gを適切なオープンカラム（内径：約4 cm）に満たす。1 mol/L水酸化ナトリウム水溶液750 mLをカラムに流下させ、次に溶出液が中性になるまで（pH試験紙で確認する）脱イオン水を流下させる。このコンディショニング済み陰イオン交換樹脂6 gを蒸留水でオープンカラム（内径：約1.5 cm、カラム長：約30 cm）に移し、4. 1) ①で得られた溶液をカラムに注意深く注入（注入速度：3-4 mL/min）した後、次に脱イオン水100 mLを注入する。各流出液は捨てる。続いて10%ギ酸水溶液50 mLをカラムに注入し、流出液を集め、ロータリーエバポレーターで（湯浴の設定温度：約60℃）濃縮乾固した後、5～10 mLの酢酸エチルを加え、ロータリーエバポレーターで再び濃縮乾固し、水を完全に除去する。

② 脂肪の場合

予めC₁₈カラムにメタノール5 mL、次いで水5 mLを注入し、流出液を捨てる。4. 1) ②で得られた上澄液25 mLをC₁₈カラムに注入し、流出液を集める。次いで、水3 mLを注入しさせ、流出液を集める。捕集液合わせてロータリーエバポレーター（湯浴の設定温度：約60℃）で濃縮乾固した後、5～10 mLの酢酸エチルを加え、ロータリーエバポレーターで再び濃縮乾固し、水を完全に除去する。

③ 乳の場合

4. 1) ③で得られた結晶皿内の溶液30 mLをロータリーエバポレーターで濃縮乾固した後、5～10 mLの酢酸エチルを加え、ロータリーエバポレーターで再び濃縮乾固し、水を完全に除去する。

④ 全卵の場合

4. 1) ④で得られた上澄液20 mLを100 mLの分液漏斗に移す。ジクロロメタン20 mLを加え、激しく振とうした後、ジクロロメタン層を捨てる。水層にエマルジョンの形で存在するジクロロメタンを除去するために、*n*-ヘキサン

20 mLを加えて振とうする。水層をフラスコに移し、残った n -ヘキサン層を少量の水で再抽出する。 n -ヘキサン層の再抽出により得られた水層を同じフラスコに合わせ入れ、ロータリーエバポレーター（湯浴の設定温度：約60℃）で濃縮乾固した後、5～10 mLの酢酸エチルを加え、ロータリーエバポレーターで再び濃縮乾固し、水を完全に除去する。

3) 誘導体化

① 筋肉、肝臓及び腎臓の場合

4. 2) ①で得られた濃縮残渣に酢酸2 mLを加え、超音波洗浄器を用いて懸濁させる（約15分間）。この懸濁液にオルト酢酸トリメチル8 mLを添加し、再び超音波処理した後、懸濁液をマントルヒーター上で4時間加熱還流する（サンプルの固体成分が凝集するのを防ぐために一定間隔でフラスコを回転させる）。冷却後、反応液をトルエン15 mLと混合し、40℃のロータリーエバポレーターで約1 mLとなるまで濃縮する。同様に、トルエン15 mLを加えて濃縮する操作をさらに2回繰り返し、酢酸を完全に除去する。フラスコ内に残っている溶液（0.5～1.0 mL）にトルエンを加えて3 mLとし、10 mL容量の使い捨てシリンジに引き込む。続いて、フラスコを酢酸メチル5 mLで洗浄し、約2分間超音波処理する。この溶液を同じ使い捨てシリンジに引き込み、よく振り混ぜる。

② 脂肪の場合

4. 2) ②で得られた濃縮残渣に酢酸2 mLを加え、超音波洗浄器を用いて懸濁させる（約15分間）。この懸濁液にオルト酢酸トリメチル8 mLを添加し、再び超音波処理を行い、懸濁液をマントルヒーター上で4時間加熱還流する。冷却後、反応液をトルエン15 mLと混合し、40℃のロータリーエバポレーターで0.5～1 mLとなるまで濃縮する。同様に、トルエン15 mLを加えて濃縮する操作をさらに2回繰り返し、酢酸を完全に除去する。フラスコ内に残っている溶液（0.5～1.0 mL）にトルエンを加えて3 mLとし、10 mL容量の使い捨てシリンジに引き込む。続いて、フラスコを酢酸メチル5 mLで洗浄し、この溶液を同じ使い捨てシリンジに引き込み、よく振り混ぜる。

③ 乳の場合

4. 2) ③で得られた濃縮残渣に酢酸2 mLを加え、超音波洗浄器を用いて懸濁させる（約15分間）。この懸濁液にオルト酢酸トリメチル8 mLを添加し、再び超音波処理した後、懸濁液をマントルヒーター上で4時間加熱還流する。冷却後、反応液をトルエン15 mLと混合し、40℃のロータリーエバポレーターで2～3 mLとなるまで濃縮する。同様に、トルエン15 mLを加えて濃縮する操作をさらに2回繰り返し、酢酸を完全に除去する。フラスコ内に残っている溶液を超音波処理した後、必要に応じてトルエンを加えて3 mLとし、10 mL容量の使い捨てシリンジに引き込む。続いて、シリンジの針を洗浄した後、酢酸メチル5 mLを同じ使い捨てシリンジに引き込み、よく振り混ぜる。

④ 全卵の場合

4. 2) ④で得られた濃縮残渣に酢酸2 mLを加え、超音波洗浄器を用いて懸濁させる(約15分間)。この懸濁液にオルト酢酸トリメチル8 mLを添加し、再び超音波処理した後、懸濁液をマントルヒーター上で4時間加熱還流する。冷却後、反応液をトルエン15 mLと混合し、40℃のロータリーエバポレーターで0.5 mLとなるまで濃縮する。同様に、トルエン15 mLを加えて濃縮する操作をさらに2回繰り返し、酢酸を完全に除去する。フラスコ内に残っている溶液(0.5~1.0 mL)にトルエンを加えて3 mLとし、10 mL容量の使い捨てシリンジに引き込む。続いて、フラスコを酢酸メチル5 mLで洗浄し、この溶液を同じ使い捨てシリンジに引き込み、よく振り混ぜる。

4) 精製-2

① 筋肉、肝臓及び腎臓の場合

グラスウールで一端を閉じたパスツールピペットに、シリカゲル(十分に乾燥させた後に含水量が約4%となるように前処理したもの) 0.6 gを秤量し、シリカゲルカラムを作成する。これに酢酸メチル及びトルエン混液(1:1) 5 mLを注入し、流出液を捨てる。4. 3) ①で得られた溶液を、使い捨てシリンジからフィルターを介してシリカゲルカラムに移す。次に、4. 2) ①で最終的に得られたフラスコに酢酸メチル10 mLを加えて超音波洗浄器を用いて洗浄し、同じ使い捨てシリンジでシリカゲルカラムに移し、緩やかな真空下でカラムを吸引乾燥する。以上の流出液は全て捨てる。続いて、酢酸メチル及びメタノール混液(1:1) 5 mLをカラムに注入し、流出液を試験溶液とする。必要に応じて酢酸メチル及びメタノール混液(1:1)で試験溶液を希釈する。

② 脂肪の場合

グラスウールで一端を閉じたパスツールピペットに、シリカゲル(十分に乾燥させた後に含水量が約4%となるように前処理したもの) 0.6 gを秤量し、シリカゲルカラムを作成する。これに酢酸メチル及びトルエン混液(1:1) 5 mLを注入し、流出液を捨てる。4. 3) ②で得られた溶液を、使い捨てシリンジからフィルターを介してシリカゲルカラムに移す。次に、4. 2) ②で最終的に得られたフラスコに酢酸メチル10 mLを加えて超音波洗浄器を用いて洗浄し、同じ使い捨てシリンジでシリカゲルカラムに移し、緩やかな真空下でカラムを吸引乾燥する。以上の流出液は全て捨てる。続いて、酢酸メチル及びメタノール混液(1:1)をカラムに注入しさせ、流出液5 mLを目盛り付き容器に捕集し、試験溶液とする。必要に応じて酢酸メチル及びメタノール混液(1:1)で試験溶液を希釈する。

③ 乳の場合

予めSep-Pak RP 18カートリッジカラムとSep-Pakシリカゲルカートリッジカラムに酢酸メチル及びトルエン混液(5:3)を注入し、流出液を捨てる。4. 3) ②で得られた使い捨てシリンジに、フィルター、RP 18カートリッジ

カラム、シリカゲルカートリッジカラムの順で取り付け、シリンジ内の溶液を押し出し、流出液を捨てる。フィルターとRP18カートリッジカラムを廃棄し、シリカゲルカートリッジカラムを短時間吸引乾燥させる。次に、シリカゲルカートリッジに酢酸メチル10 mLを注入しさせ、流出液を廃棄し、カラムを短時間吸引乾燥させる。続いて、酢酸メチル及びメタノール（4：1）混液をカラムに注入し、流出液を試験溶液とする（事前にシリカゲルカラムの溶出挙動を確認し、溶出のために必要な溶媒量を決定する）。必要に応じて酢酸メチル及びメタノール混液（1：1）で試験溶液希釈する。

④ 全卵の場合

グラスウールで一端を閉じたパスツールピペットに、シリカゲル（十分に乾燥させた後に含水量が約4%となるように前処理したもの）0.6 gを秤量し、シリカゲルカラムを作成する。これに酢酸メチル及びトルエン混液（1：1）5 mLを注入し、流出液を捨てる。4. 3) ④で得られた溶液を、使い捨てシリンジからフィルターを介してシリカゲルカラムに移す。次に、4. 2) ④で最終的に得られたフラスコに酢酸メチル10 mLを加えて超音波洗浄器を用いて洗浄し、同じ使い捨てシリンジでシリカゲルカラムに移し、緩やかな真空下でカラムを吸引乾燥する。流出液は全て捨てる。続いて、酢酸メチル及びメタノール混液（1：1）をカラムに注入し、流出液5 mLを目盛り付き容器に捕集し、試験溶液とする。必要に応じて酢酸メチル及びメタノール混液（1：1）で試験溶液を希釈する。

5. 検量線の作成

グルホシネートのGC分析用誘導体標準品139 mg及び代謝物BのGC分析用誘導体標準品100 mgをそれぞれ秤量して50%エタノール水溶液5 mLに溶解し、酢酸メチルで定容して100 µg/mL（グルホシネート酸としての濃度）の標準溶液を調製する。調製した標準液を酢酸メチルで希釈して適切な濃度の希釈標準液を調製する。希釈標準液を酢酸メチル及びメタノール混液（1：1）で希釈して適切な濃度の検量線標準液を調製し、それぞれGC-FPDに注入し、ピーク面積法で検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液をGC-FPDに注入し、5. の検量線を用いて含量を定量する。

7. 測定条件

検出器	: FPD
カラム	: Fused silica capillary、0.25 µm Restek Carbowax 20 M (0.53 mm i.d. × 9 m, Restek製)
カラム温度	: 150°C (2分) - 39 °C/min - 240 °C (3分)
キャリアガス	: ヘリウム、線速度 28 mL/min (214 cm/sec)
温度	: 注入口 ; 225°C、検出器 ; 225°C

注入量 : 5 μ L
保持時間の目安 : 代謝物BのGC分析用誘導体 ; 0.7分
 グルホシネートのGC分析用誘導体 ; 4.3分

8. 定量限界

0.02 mg/kg (乳)
0.05 mg/kg (筋肉、脂肪、全卵)
0.10 mg/kg (肝臓、腎臓)

9. 留意事項

なし

※ 本分析法は、畜産物における家畜残留試験等において用いられた残留農薬分析法であり、新たな試験法の開発等に際して参考として下さい。なお、当該分析法をもとに開発した試験法を食品規格への適合判定のために使用する場合には、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について（平成22年12月24日薬食発1224第1号）」に従って使用する試験法の妥当性を評価する必要があります。