

第115回日本食品衛生学会学術講演会
技術セミナー 2019年10月04日

グリホサートおよびグルホシネート分析法 について



株式会社アイスティサイエンス

Beyond your Imagination

AiSTI SCIENCE

物性と構造式

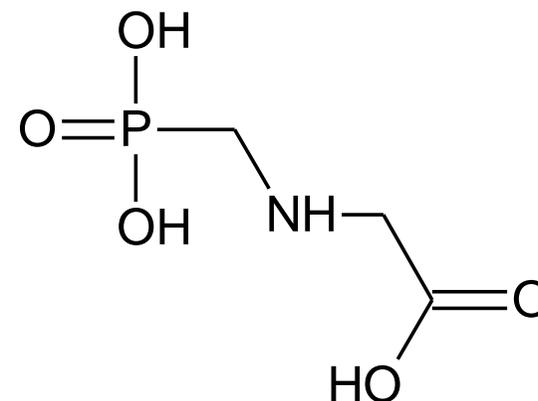
グリホサート : Glyphosate (GLY)

化学式 : $C_3H_8NO_5P$

分子量 : 169.1

LogPow = <-3.2 (pH2-5, 20°C)

pKa = 5.77 ± 0.03 、 2.18 ± 0.02 ($20 \pm 0.2^\circ C$)



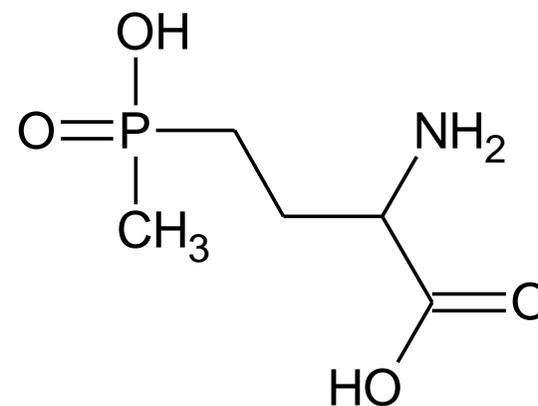
グルホシネート : Glufosinate (GLU)

化学式 : $C_5H_{12}NO_4P$

分子量 : 181.1

LogPow : アンモニウム塩 LogPow : <0.1 (pH7, 22°C)

pKa1 <2 、pKa2 <2.9 、pKa3 <9.8





全自動固相抽出装置

ST-L400

(株式会社アイスティサイエンス)



測定装置

Nexera X2 & LCMS-8045

(株式会社島津製作所)

予冷式ドライアイス凍結粉砕

★ メリット

- パウダー状に粉砕することで、試料全体が均一化できる。
- すじや繊維質が多く切断し難い試料でも粉砕可能。
- パウダー状になり試料を採取し易い。
- ドライアイスでかさ増しさせることで、少量試料の粉砕が可能。
- 水分と固形物が均一化された状態で冷凍保存できるため、再検査の際もサンプリング誤差が生じにくい。

ポイント

- 予め「容器」「試料」「使用器具」などを十分に冷却しておく。
- 試料の種類によって予冷の方法やドライアイスの量にコツがある。



～凍結粉碎をお手軽に～ 予冷式ドライアイス凍結粉碎キットのご紹介



2023年11月13日 最終版

予冷式 ドライアイス凍結粉碎キット

Pre-freezing and Cryogenic Milling with Powdered Dry Ice




AiSTI SCIENCE
株式会社 アイスティサイエンス

AiSTI SCIENCE

より均一なサンプリングを可能にする
アイスティサイエンスの
予冷式ドライアイス凍結粉碎キット

水分の多いサンプルは粉碎時に水分と固形物に分かれてしまふ→
戻りの細かいサンプルは粉碎時に広がってしまふ→
アイスティサイエンスの予冷式ドライアイス凍結粉碎キットなら、試料の粉碎で起こるこれらの問題を解決します。
凍結粉碎することで、水分も固形物も均一にサンプリングすることが可能です。

均一性

粉碎力

酵素失活

保管性



均一化された試料



凍結粉碎後の試料(パウダー状)

細小な粒子で均一な状態が実現できます。

ドライアイス

配達方式

※試料の性状に適合
凍結剤(ドライアイス)のトールペーパー
またはビニール袋にドライアイス
を充填し、真空パックを行います。
※凍結剤はドライアイス
専用容器に充填します。

製造方式

サイフォンの原理による
ドライアイスを送り出すことで、
ドライアイスが試料を均一に
冷却します。

粉碎機ラインナップ

大容量凍結粉碎機

量物から試料の
少量サンプルまで全てに対応!

容量: 3.7L
容器材質: ステンレス
回転数: 3,600rpm

ブレンダー

固い物の粉碎にオススメ

容量: 2.0L
容器材質: 特殊プラスチック
回転数: 37,000rpm

サンプル画像

粉碎可能試料

※凍結剤の性状に適合
凍結剤(ドライアイス)のトールペーパー
またはビニール袋にドライアイス
を充填し、真空パックを行います。
※凍結剤はドライアイス
専用容器に充填します。

均一化された試料



凍結粉碎後の試料(パウダー状)

細小な粒子で均一な状態が実現できます。

Point!

粉碎容器、スプーンを予め冷やす!

ドライアイス



使用する粉碎容器とスプーンなどの道具を予め冷やすことで、外気の熱
による試料の凝結を防ぎます。

予冷式ドライアイス凍結粉碎法

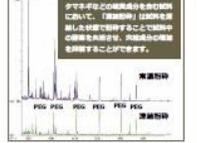
- 1 切断
- 2 箱に入る
- 3 蓋を閉じる
- 4 粉碎

凍結粉碎の成功を左右するのは「予冷」です!
予冷試料はドライアイスに包まれて凍結するまで、容器蓋の裏面に少量のドライアイスを入れます。
また、ドライアイスに包まれて凍結するまで、容器蓋の裏面に少量のドライアイスを入れます。
また、ドライアイスに包まれて凍結するまで、容器蓋の裏面に少量のドライアイスを入れます。

※凍結剤の性状に適合
凍結剤(ドライアイス)のトールペーパー
またはビニール袋にドライアイス
を充填し、真空パックを行います。
※凍結剤はドライアイス
専用容器に充填します。

※凍結剤の性状に適合
凍結剤(ドライアイス)のトールペーパー
またはビニール袋にドライアイス
を充填し、真空パックを行います。
※凍結剤はドライアイス
専用容器に充填します。

酵素の失活と夾雑成分について



少量の試料を正確に粉碎し、酵素活性を測定することで、酵素失活の程度を評価することができます。

※、タマニキラボ株式会社は凍結粉碎、SIFV法にて
分析した際のデータです。SIFV法は、

AiSTI SCIENCE

前処理 抽出フロー

水抽出&除タンパク

試料10 g (穀類2 g)

— 添加 **水15 mL** (穀類の場合 : **25 mL**)
 ★ 水分量が25 mLになるように調整
振とう抽出

— 添加 **アセトニトリル 約25 mL**
 ★ 全量が50 mLになるように調整
 振とう 1 min

静置 5 min ★ タンパク質を変性させる。

遠心分離 3500 rpm, 5 min

抽出液 50 mL (5倍希釈)

※水抽出

※除タンパク



50mL用遠沈チューブ

個別試験法（通知試験法）の抽出方法

■ グリホサート

試料20gを量り採り、水100mL及びククロホルム50mLを加え、振とう・遠心分離後、水層を分取する。残渣の沈殿に水50mLを加え、振とう・遠心分離後、水層を分取し合わせる。これをろ過後、水を加えて正確に200mLとする。

引用資料：<https://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/zanryu3/2-048.html>

■ グルホシネート

A. 穀類・豆類の場合

試料10gを量り採り、水70mLを加え、細砕後、水を加えて正確に150mLとする。

⇒ 10gを150mLで定容

B. 果実及び野菜の場合

試料20gを量り採り、ジククロメタン50mL及び水150mLを加え、振とう・遠心分離後、水層を分取する。残渣の沈殿に水50mlを加え、振とう・遠心分離後、水層を分取し合わせる。これをろ過後、水を加えて500mLとする。

引用資料：<https://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/zanryu3/2-049.html>

応用例

通知法と同じ試料採取量にしたい場合

試料20 g (穀類20 g)

添加 **水190~200 mL**

★ 全量が**200mL**になるように調整

振とう抽出

遠心分離 3500 rpm, 5 min

分取：上澄液 5 mL

添加 **アセトニトリル 約 5 mL**

★ 全量が**10 mL**になるように調整

振とう 1 min

静置 5 min ★ タンパク質を変性させる。

遠心分離 3500 rpm, 5 min

抽出液 10 mL (20倍希釈)

※水抽出



200mL用遠沈チューブ
※イメージ (写真加工しています)

※除タンパク

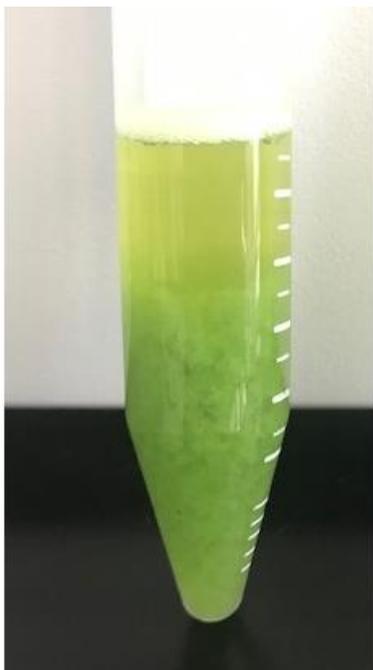


15mL用遠沈チューブ

※ 本法と希釈率が変わりますので注意。

除タンパクについて

■ 除タンパクの効果を確認するための実験



- ① 抽出液3mLにアセトニトリル3mLを加え5分放置
タンパク質が変性して析出した。



- ② 遠心分離後
※水-アセトニトリル (1/1)
変性したタンパク質が下に沈殿した。

固相抽出において、タンパク質は目詰まりの原因となったり、操作において支障をきたす。

そのタンパク質を抽出工程の段階で除去することで、固相抽出での影響を未然に防ぐことができる。

前処理 精製フロー

抽出上澄液 0.5 mL分取

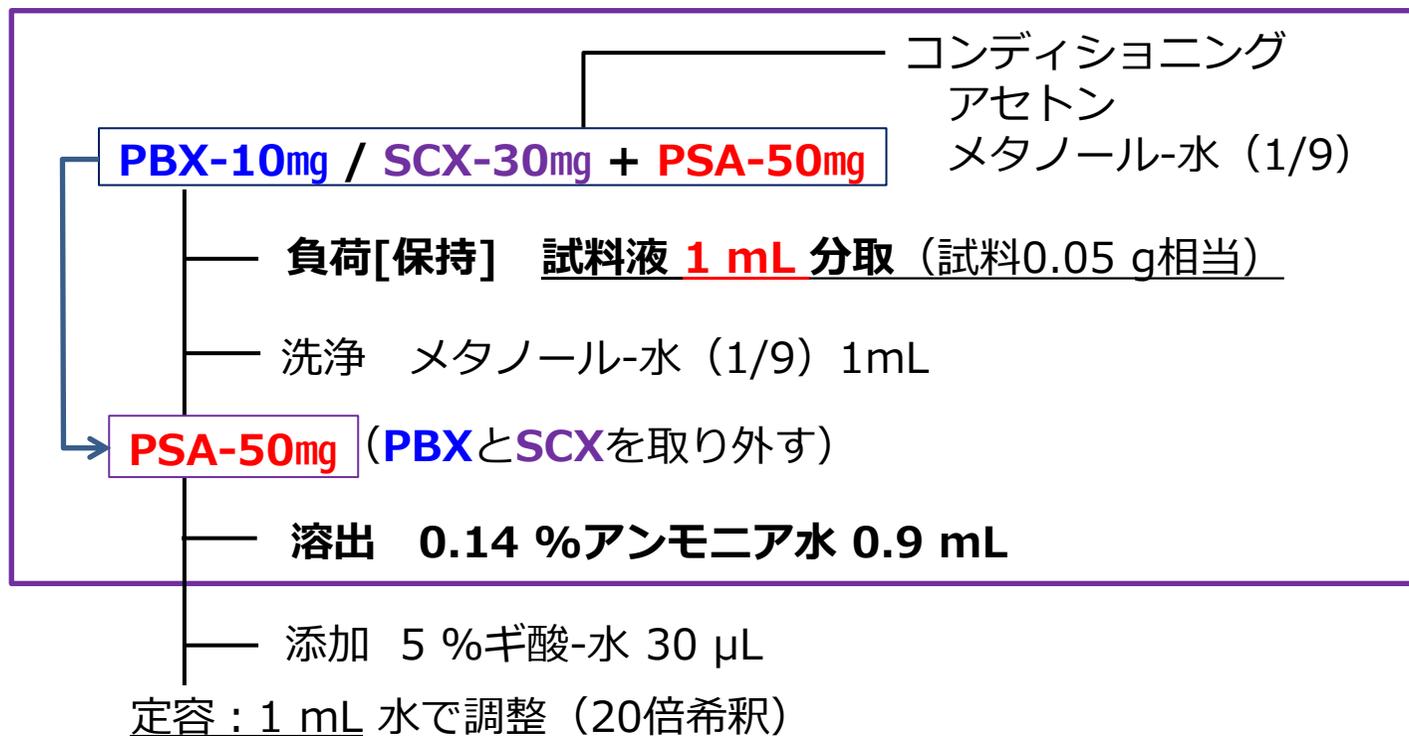
添加 **水 1.5 mL**

☞ 水を添加して、アセトニトリルの比率を下げることでPBXへの疎水性夾雑物の吸着を促進させる。

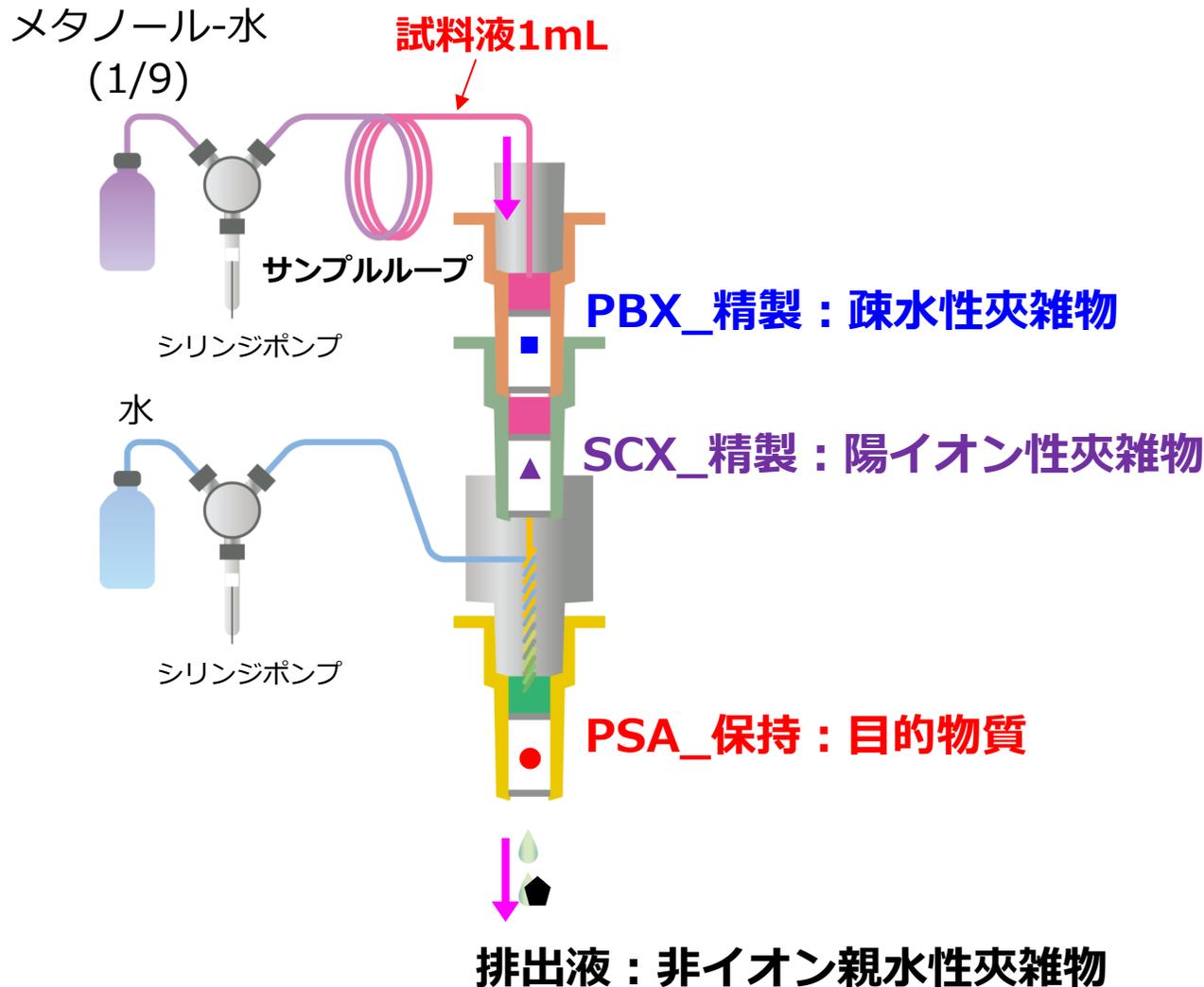


試料液 **2 mL** (20倍希釈) ※12.5%アセトニトリル-水

全自動固相抽出装置 ST-L400, 前処理時間:**11分**/検体



自動前処理工程：Step-1 精製&保持



PBX

ポリスチレンジビニルベンゼン系
HLB：疎水性相互作用

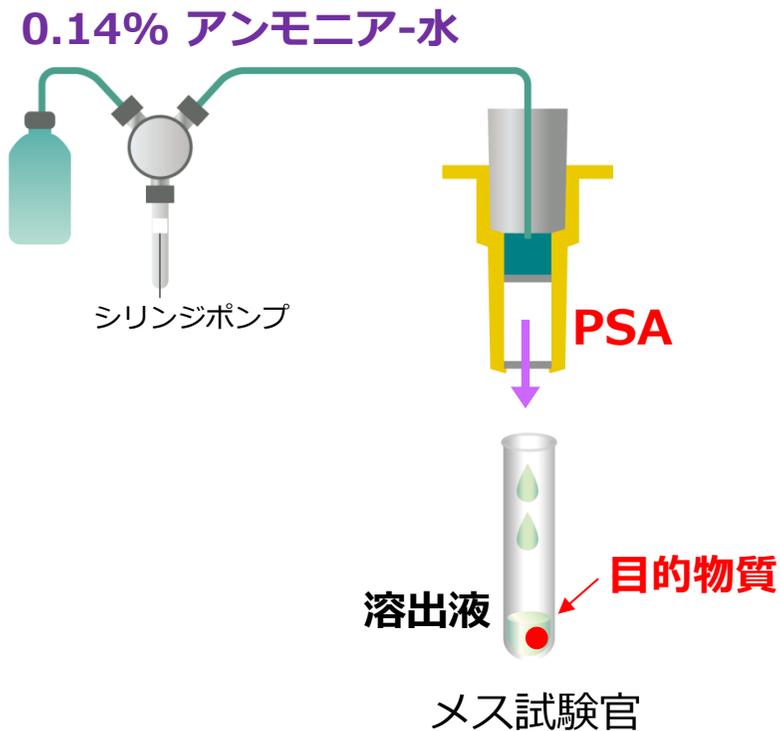
SCX

スルホン酸基 (-SO₃[⊖]) を持つ
強陽イオン交換樹脂

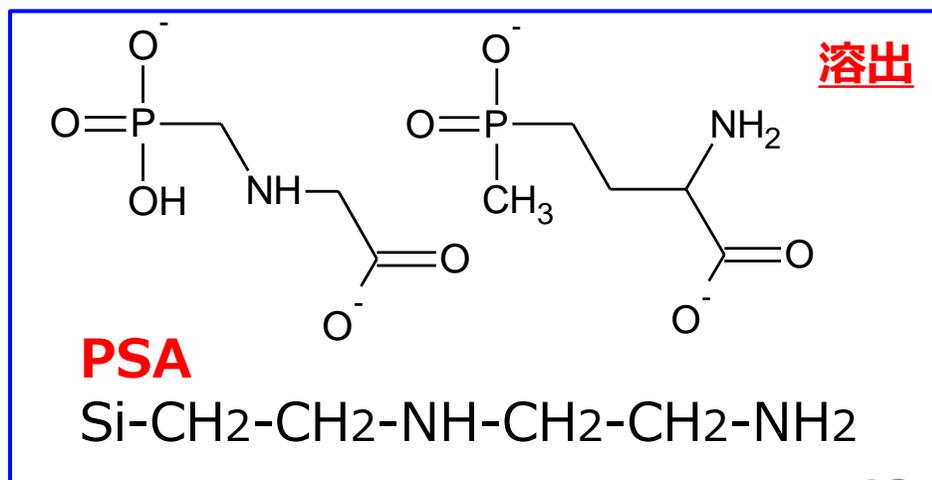
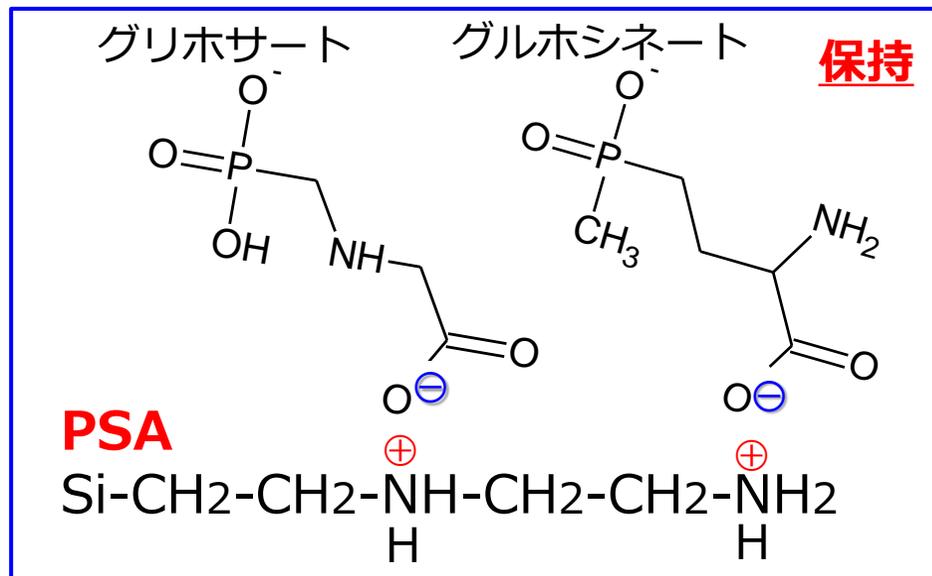
PSA

-CH₂-NH-CH₂-CH₂-NH₂を持つ
：陰イオン性物質を保持

自動前処理工程：Step-2 溶出



アンモニア水により、PSAのN基が非解離性となり、イオン交換相互作用がなくなるため目的物質が脱離する。



前処理操作写真（自動前処理の場合）



①試料採取



②水添加



振とう抽出



③水抽出後



④アセト添加



遠心分離



⑤遠心分離後



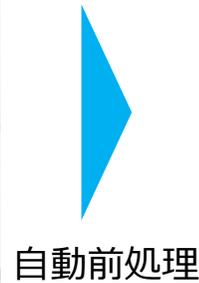
⑥抽出上澄液 1 mL分取
⑦水1.5mL添加



⑧試料液



⑨試料液とメス試験官を装置にセット



自動前処理



⑩メス試験官を取り出す



⑪1mLに定容

お試しキットの紹介 (手作業)

残留農業

グリホサート分析用お試しキット

アメリカで開発されたグリホサートは除草剤の主成分として、広く世界中で使用されています。

アイスティサイエンスではグリホサート分析のためのお試しキットをお手ごろな価格でご提供させていただきます。



	参考製品名 (単体購入時の製品名)	入数 (本キットでの入数)	参考型番 (単体購入時の型番)
①	Smart-SPE PBX-10	10個	SA-1260-010
②	Smart-SPE PSA-50	10個	SA-1120-050
③	Smart-SPE SCX-30	10個	SA-1123-030
④	Smart-SPE用アダプタ6個入	2個	SA-2020-003
⑤	ディスポーザブルPPリザーバー小セット 500本入	20本	SB-6011-005
⑥	押し出しポンプ 小青 4本入	1本	SB-4010-002
⑦	メス試験管1&2mL 共栓付 10本入	2本	SB-3011-021
⑧	遠沈管 PP製 15mL 100本入	10本	SB-3010-022
⑨	遠沈管 PP製 50mL 100本入	10本	SB-3010-009
⑩	試験管小 100本入	2本	SB-3010-001
※1	【別売】固相カートリッジ脱着器	1本	SA-2030-005

※1：固相を連結/脱着させる作業が必要になるため、お持ちでない方は別途「固相カートリッジ脱着器 (SA-2030-005：定価 13,000 円)」の購入をお勧めします。

商品名：グリホサート分析用お試しキット

入数：10検体分

型番：SS-5030-003

お試し価格：19,000円（税抜）

前処理 精製フロー（手作業の場合）



抽出上澄液 0.5 mL分取

添加 水 1.5 mL

☞ 水を添加して、アセトニトリルの比率を下げることでPBXへの疎水性夾雑物の吸着を促進させる。

試料液 2 mL（20倍希釈） ※12.5%アセトニトリル-水

コンディショニング

アセトン 2mL

メタノール-水（1/9） 2mL

PBX-10mg

SCX-30mg

PSA-50mg

負荷[保持] 試料液 1 mL 分取（試料0.05 g相当）

洗浄 メタノール-水（1/9） 1mL

PSA-50mg（PBXとSCXを取り外す）

溶出 0.14 %アンモニア水 0.9 mL

添加 5 %ギ酸-水 30 μL

定容：1 mL 水で調整（20倍希釈）

前処理操作写真（手作業）



①～⑤遠心分離後



⑥コンディショニング



⑦試料液調製



⑦試料液1mL負荷



⑧洗浄



⑨PBXとSCXを脱着器で取り外す。



⑩PSAにアンモニア水を添加してメス試験官に溶出



⑪1mLに定容

測定条件

【LC条件】

分析カラム：TSKgel SuperIC-AP（4級アミン基），（4.6 mmID × 75 mm）

移動相 A液：2 mM ギ酸アンモニウム-水

B液：0.5 % ギ酸-水

流速：0.8 mL/min

グラジエント：B.Conc 5 % (0.5 min) → 95 % (2-11 min) → 5 % (12-14 min)

注入量：5 μ L

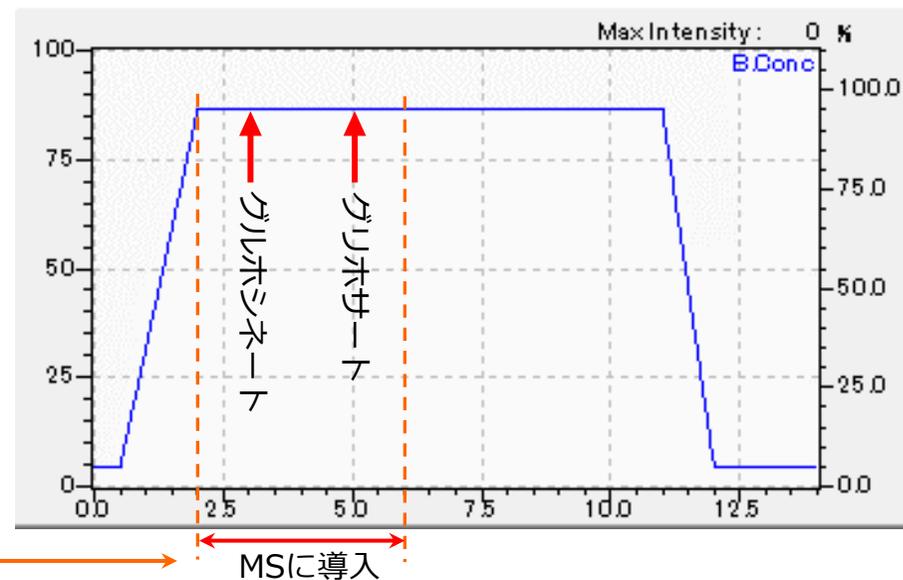
カラム温度：40 $^{\circ}$ C



材質：PEEK樹脂

	時間	ユニット	処理命令	数値
1	0.50	ポンプ	B.Conc	5
2	2.00	ポンプ	B.Conc	95
3	2.00	コントローラ	イベント	1
4	6.00	コントローラ	イベント	0
5	11.00	ポンプ	B.Conc	95
6	12.00	ポンプ	B.Conc	5
7	14.00	ポンプ	B.Conc	5
8	14.00	コントローラ	Stop	

バルブ



測定条件

【MS条件】

イオン化モード：**ESI positive**

ネブライザーガス流量：3 L/min

ドライイングガス流量：10 L/min

ヒーティングガス流量：10 L/min

インターフェース温度：400 °C

DL温度：150 °C

ヒートブロック温度：350 °C

■ MRM条件

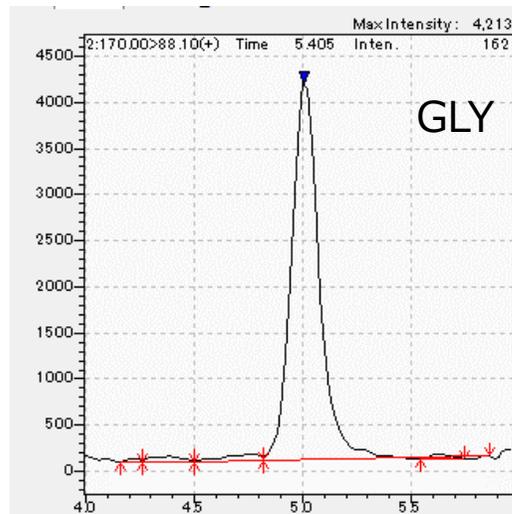
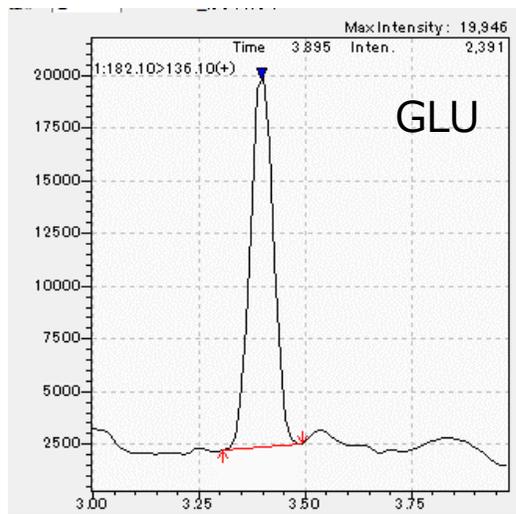
化合物名	測定時間 (min)	定量イオン	Pause Time (msec)	Dwell Time (msec)	Q1 (V)	CE	Q3 (V)
		確認イオン					
グルホシネート	3.00 - 4.00	182.10 > 136.10	1	400	-21	-15	-24
		182.10 > 119.00	1	400	-21	-21	-21
グリホサート	4.00 - 6.00	170.00 > 88.10	1	600	-17	-9	-18
		170.00 > 42.10	1	600	-17	-26	-17

添加回収試験

■ 添加回収率と再現性 (n=5) の結果

ほうれん草, 0.1 ppm 添加				大豆, 1 ppm 添加			
GLU		GLY		GLU		GLY	
回収率	RSD.	回収率	RSD.	回収率	RSD.	回収率	RSD.
100	3.0	101	3.2	102	2.2	108	1.6

単位 : %



GLU : グルホシネート
GLY : グリホサート

試料中濃度 0.1 ppm
バイアル中濃度 5 ppb相当

■ ほうれん草の添加回収試験で得られたMRMクロマトグラム

全自動固相抽出装置ST-L400による固相抽出

ST-L400による自動精製



ST-L400の主な構成

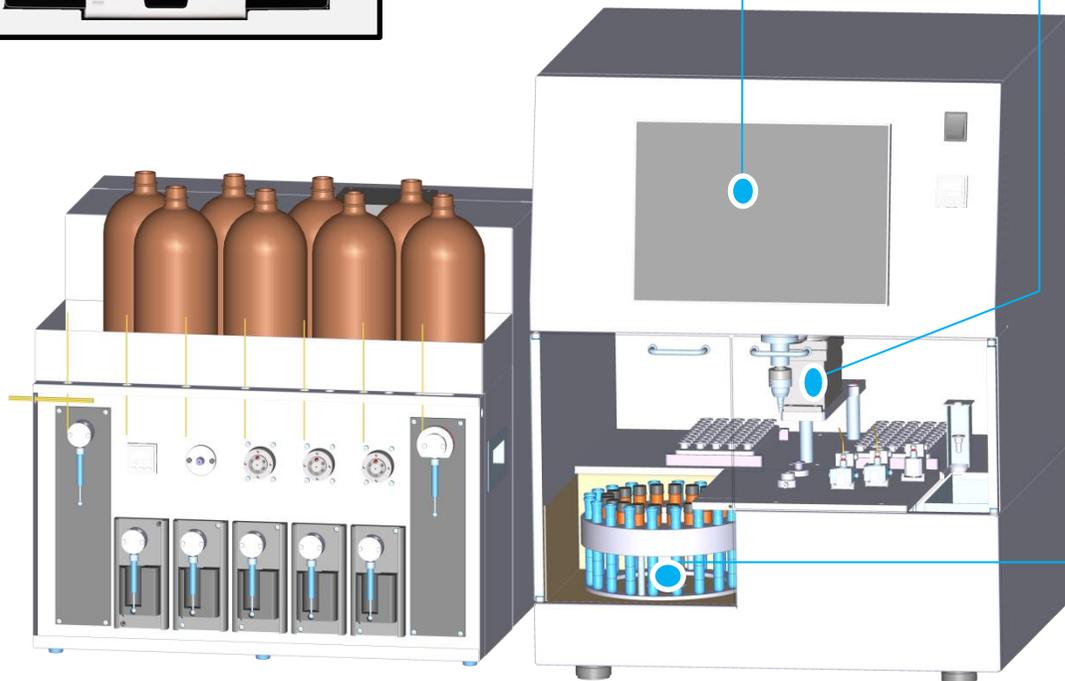
タッチパネルによる直感的な操作が可能



ロボットアームがノズルや固相カートリッジを掴み移動



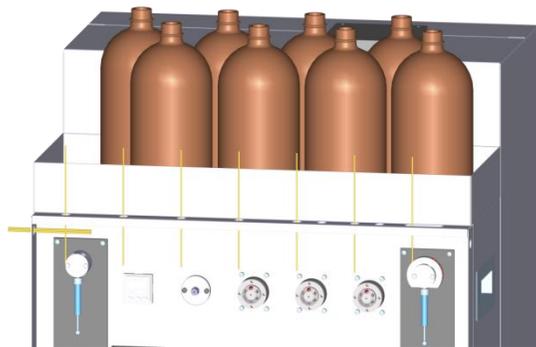
固相ミニカートリッジ
Smart-SPE
Solid Phase Extraction



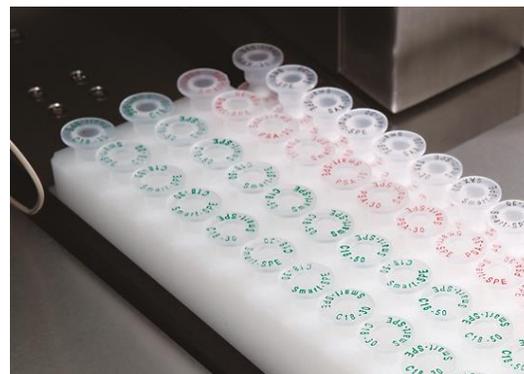
サンプルトレイ
(20検体)



ST-L400に必要な操作



①あらかじめ溶媒を準備



②固相カートリッジSmart-SPEをセット



③サンプルバイアルと試験管セット



④タッチパネルで簡単入力運転

あとは全自動固相抽出装置にお任せ！

自動化のメリット

- ルーチン分析 : 時間の有効活用
- 前処理技術の管理 : 教育、訓練、引き継ぎの効率化
- バリデーション : 再現性の向上、反復数増加による負担軽減
- メソッド開発 : 確実な再現、メソッドの記録、保存
- 分析法の共有 : 複数のラボで同じ分析結果
- 人材の有効活用 : 新技術開発に人材投入、適材適所