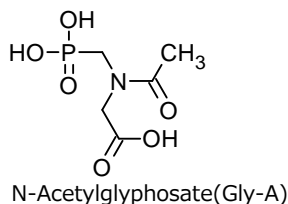
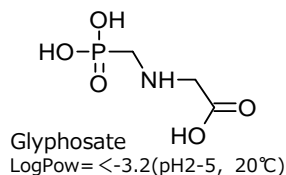


# はちみつ中のグリホサート、グルホシネート、およびそれらの代謝物の一斉分析

## はじめに

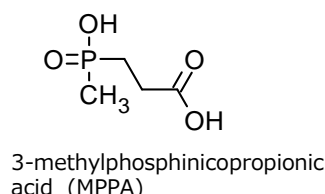
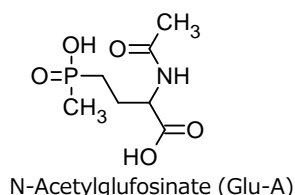
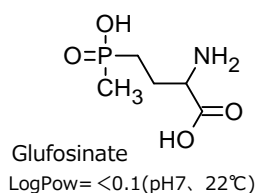
グリホサートとグルホシネートは世界で最も広く使用されている除草剤です。近年、その農業に耐性のある遺伝子組換え作物が開発され、より多く散布されるようになりました。そのため、日本を含む各国ではその代謝物を含む基準値が設定されています。本アプリケーションでは誘導体化をせずにこれらの代謝物を含む5成分の一斉分析法をご紹介します。試料には糖類を多く含む分析が難しいとされているはちみつを用いています。

## 対象化合物



### 基準値

グリホサート(はちみつ):0.05 ppm  
グルホシネート(一律基準):0.01 ppm



## 前処理フロー

### 試料採取 10 g

添加水 30 mL

手で混合

添加水 約15 mL

★ 全量が50 mLになるように調整

遠心分離 3,500 rpm, 5分

### 抽出液(50mL)

Smart-SPE C18-30mg : 精製

Smart-SPE NH2-30mg : 保持

負荷[保持] 抽出液 1 mL 分取

洗浄 0.02%酢酸水 0.5 mL

Smart-SPE NH2-30mg (C18を取り外す)

洗浄 1%酢酸水 1 mL

洗浄 0.02%酢酸水 1 mL

溶出 0.07%アンモニア水 0.9 mL

溶出液

添加 20%酢酸-0.5%クエン酸-0.2%リン酸水 50 μL

定容 : 1 mL 水で調整

## 測定条件

### 【LC/MS条件】

分析カラム: **UHPLC PEEK InertSustain Ax-C18**  
(2.1mmi.d.×100mm,5μm GLサイエンス)

移動相 A液: 2%酢酸及び0.1%酢酸\_水-アセトニトリル(3/1)

B液: 1%酢酸及び0.1%酢酸\_アセトニトリル

流速: 0.3 mL/min

グラジエント: B.Conc 95%(0-2 min)→10%(5-11 min)  
→95%(12-15 min)

注入量: 10 μL

カラム温度: 40℃

イオン化モード: ESI pos., neg.

測定モード: MRM

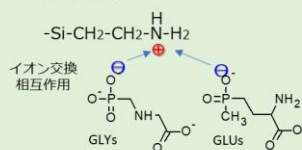


LCMS-8045(島津製作所)

### 固相NH2による保持と溶出

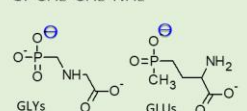
#### ■ 環境が弱酸性では保持

#### 固相 NH2



#### ■ 環境がアルカリ性では脱離(溶出)

#### -Si-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>



## 前処理のポイント

C18では色素や脂肪酸などを除去します。NH2では負に帯電したリン酸基をもつ目的成分と酸性夾雑物が保持されます。ここで糖類やアミノ酸はNH2に保持されず除去されます。NH2に保持された酸性夾雑物は酢酸水で洗浄することで除去し、目的成分はアンモニア水により溶出します。溶出液に20%酢酸-0.5%クエン酸-0.2%リン酸水を添加することにより酸性に調整します。



## Manual STQ Method

## Sample



## Information

### はちみつ

糖類: 75%  
水分: 17.6%  
脂質: 0%  
脂肪酸: 0%  
たんぱく質: 0.3%

出典: 日本食品標準成分2015年版(七訂)

## Key Word

残留農薬分析  
固相抽出

## AiSTI SCIENCE

## Product

Smart-SPE C18-30  
Smart-SPE NH2-30

## 結果と考察

### 【溶出液アンモニア水の濃度検討】

NH<sub>2</sub>カラムに保持された目的成分を溶出するために用いるアンモニア水の濃度を検討し、0.035%以上のアンモニア水で十分な回収率が得られました(図1)。

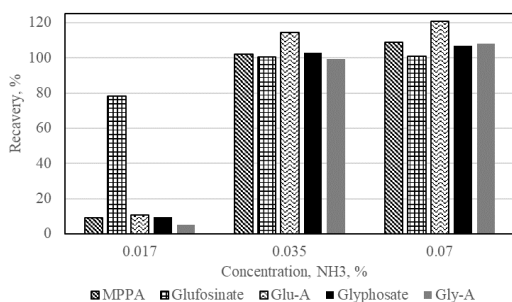


図1 溶出液のアンモニア濃度の検討

### 【精製効果の確認】

はちみつに多く含まれる糖類や有機酸の固相抽出における精製効果を調べました。糖類、有機酸の測定は固相誘導体化法を用いてGC/MSで行っています。図3にSCAN測定でのTIC(トータルイオンクロマトグラム)を示します。前処理フローに従い精製することでフルクトース、グルコース、二糖類などの糖類が除去されました(図3 A)。また目的成分を保持させたNH<sub>2</sub>を溶出前に1%酢酸水で洗浄することでグルコン酸が除去されました(図3 B)。

## 【検量線】

グリホサートとGly-Aは5-100µg/kg、の他は1-20µg/kgの5点で検量線を作成したところいずれも良好な直線性が得られました(図2)。

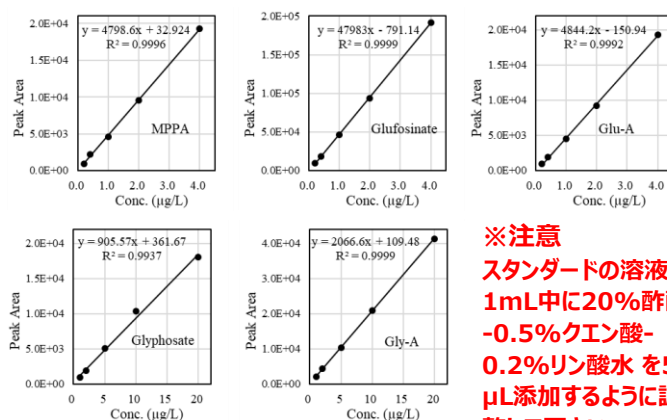


図2 検量線

### ※注意

標準の溶液は1mL中に20%酢酸-0.5%クエン酸-0.2%リン酸水を50µL添加するように調整して下さい。

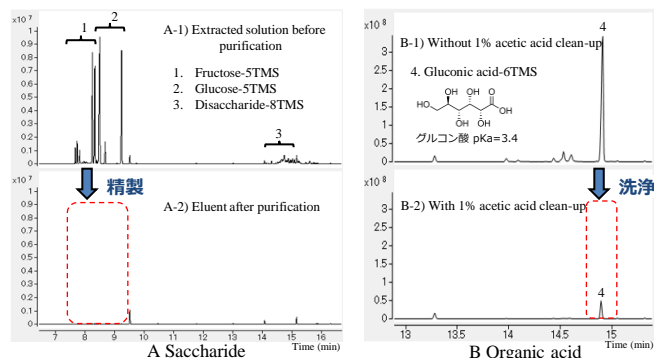


図3 固相抽出による糖類・有機酸の除去効果

### 【妥当性評価】

分析者3名が1日2回2日間で行った結果を表1に示します。5成分いずれも良好な回収率と再現性が得られました。

表1 添加回収率と再現性

No.	Analyte	Spike level µg/kg	Tsueness <sup>a</sup> %	RSD <sub>r</sub> <sup>b</sup> %	RSD <sub>wr</sub> <sup>c</sup> %
1	MPPA	5	102	2.1	6.1
2	Glufosinate	5	86	3.7	9.3
3	Glu-A	5	110	4.2	6.8
4	Glyphosate	25	106	6.5	8.5
5	Gly-A	25	104	3.3	4.2

n = 2 × 3 operators × 2 days

<sup>a</sup> Mean recovery rates

<sup>b</sup> Relative standard deviation of repeatability

<sup>c</sup> Relative standard deviation of within laboratory reproducibility

### 【市販品の市場調査】

表2 市販品における分析結果

Honey	MPPA	Glufosinate	Glu-A	Glyphosate	Gly-A
Sunflowers, Ukraine	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Acacia, China	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Lotus flower, China	N.D.	1.1	N.D.	5.5	N.D.
Canada	N.D.	2.8	1.9	26.4	N.D.
Mexico	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Japan	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
LOQ	1.0	0.2	1.0	5.0	2.0

Unit: µg/kg

## まとめ

グリホサート、グルホシネートおよびこれらの代謝物を含む5成分について誘導体化をせず同時に分析する手法を開発しました。これにより市販品からGlu-Aを検出することができ、代謝物の分析の必要性が示されるとともに、この分析法が食品中の残留農薬の分析に有用であると考えられます。

## 参考文献

Analytical Sciences <https://link.springer.com/article/10.1007/s44211-023-00288-7>

Simultaneous determination of glyphosate, glufosinate, and their metabolites in honey using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and solid-phase extraction

Ryoichi Sasano · Rie Ito · Masahiro Kusumoto · Junpei Sekizawa · Hiroshi Akiyama