

# 蜂蜜中のグリホサート、グルホシネート およびそれらの代謝物の一斉分析法



株式会社 アイスティサイエンス

Beyond your Imagination

**AiSTI SCIENCE**

# 経緯と目的

## グリホサート(Gly)やグルホシネート(Glu)は

- 海外で小麦や大豆の大規模農場での農機による収穫前に除草剤として使用されてきた。
- 近年、GlyやGluを散布しても枯れない遺伝子組換え作物（大豆、トウモロコシ）の出現により、北米などで大量に使われている。
- 食品中にはGlyやGluのみならずそれらの代謝物も残存することから、代謝物を含めた規制対象物質に変更して。

### ハチミツからグリホサート類が検出

しかしながら、グリホサート類はイオン性を伴う高極性であるため、分析が難しい。さらにハチミツは、極性の高い糖類が75%を占めており、その精製が難しい。

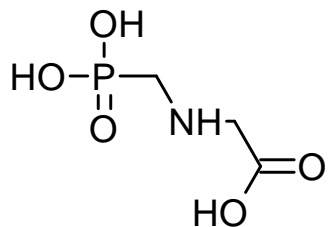
## 残留農薬基準値における代謝物を含めた規制対象物質の変更

- グリホサート
    - 大豆・とうもろこし・なたね
    - ・グリホサート
    - ・N-アセチルグリホサート
  - グルホシネート
    - 穀類・豆类・種実類
    - ・グルホシネート
    - ・3-メチルホスフィニコプロピオン酸 (MPPA)
    - ・N-アセチルグルホシネート
- 上記以外の農産物および畜産物
- ・グルホシネート
  - ・3-メチルホスフィニコプロピオン酸 (MPPA)

**目的** 本研究では、ハチミツ中のグリホサート (Gly) およびグルホシネート (Glu) とそれらの代謝物である3-メチルホスフィニコプロピオン酸(MPPA)、 N-アセチルグリホサート (Gly-A)、 N-アセチルグルホシネート (Glu-A) を含めた簡易な一斉分析法の開発を目的とした。

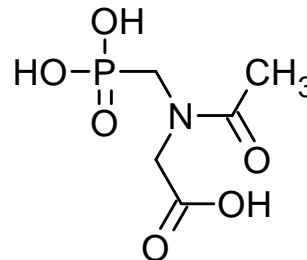
# 測定対象成分

## グリホサートとその代謝物



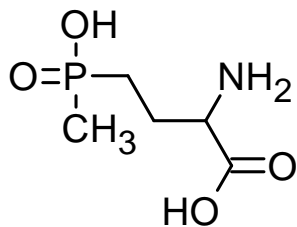
分子量 : 169.1  
 水溶解度 : 11 g/L  
 LogPow = <-3.4  
 pKa = 5.7, 2.2

■ Glyphosate ;Gly



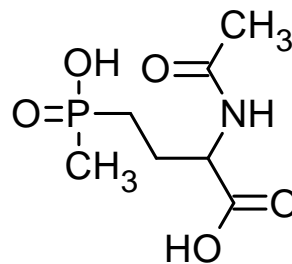
● N-Acetyl glyphosate ;Gly-A

## グルホシネートとその代謝物

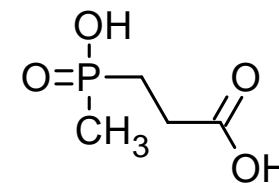


分子量 : 181.1  
 水溶解度 : 1370 g/L  
 LogPow = <-4.0  
 pKa = 9.8, 2.9, 2

■ Glufosinate ;Glu



● N-Acetyl glufosinate ;Glu-A



● MPPA  
 3-(Methylphosphinico)  
 Propionic Acid

# 前処理 フローと測定条件

ハチミツ 10 g (50 mLの遠沈チューブ)

添加水 約 30 mL

手で激しく振とう (溶解)

添加水 約15mL

(定容 : 全量が50mLになるように)

遠心 (1929 xg, 3500rpm) 5min

抽出液 50 mL (5倍希釈)

【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%ギ酸及び0.1%酢酸を含む  
水-アセトニトリル(3/1)

B液 : 1%ギ酸及び0.1%酢酸を含むアセトニトリル

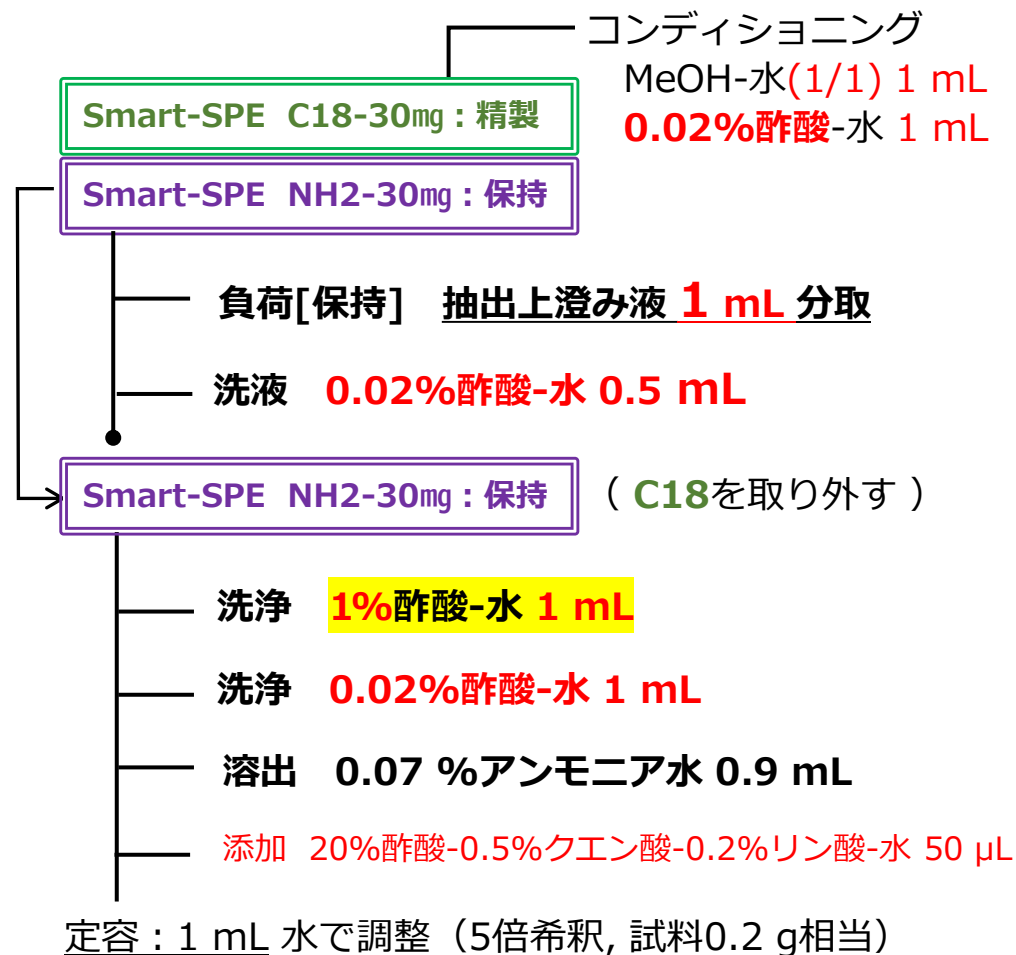
流速 : 0.3 mL/min

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

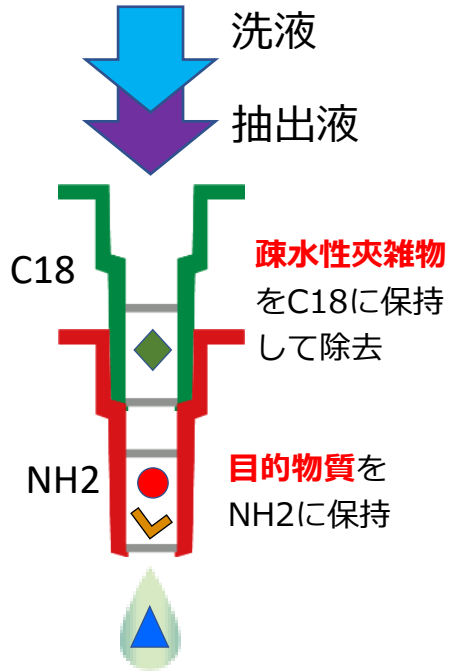
イオン化モード : ESI positive、negative

測定モード : MRM



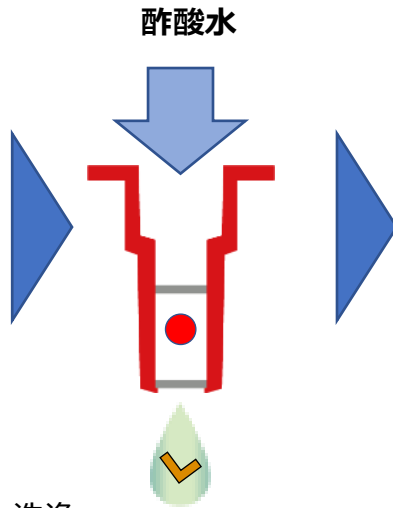
# 固相抽出工程

## ① 試料負荷/洗浄

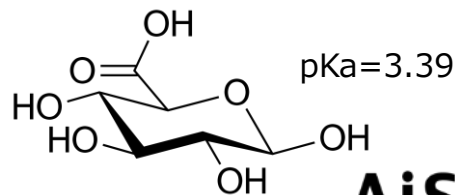


洗浄  
糖類を除去

## ② 洗浄



洗浄  
酢酸水でグルクロン酸等の有機酸類を除去



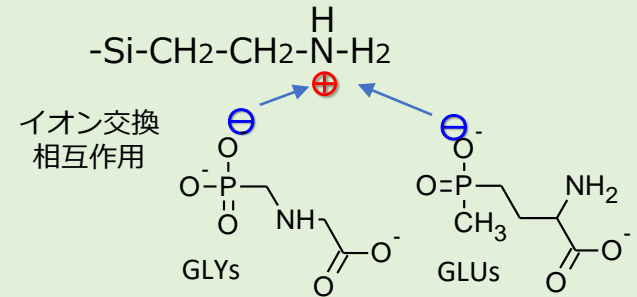
## ③ 溶出



## 固相NH2による保持と溶出

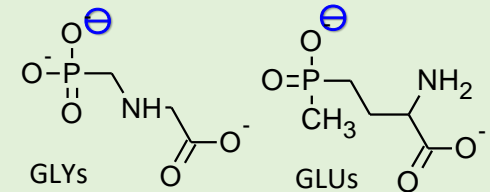
■ 環境が弱酸性では保持

固相 NH2



■ 環境がアルカリ性では脱離(溶出)

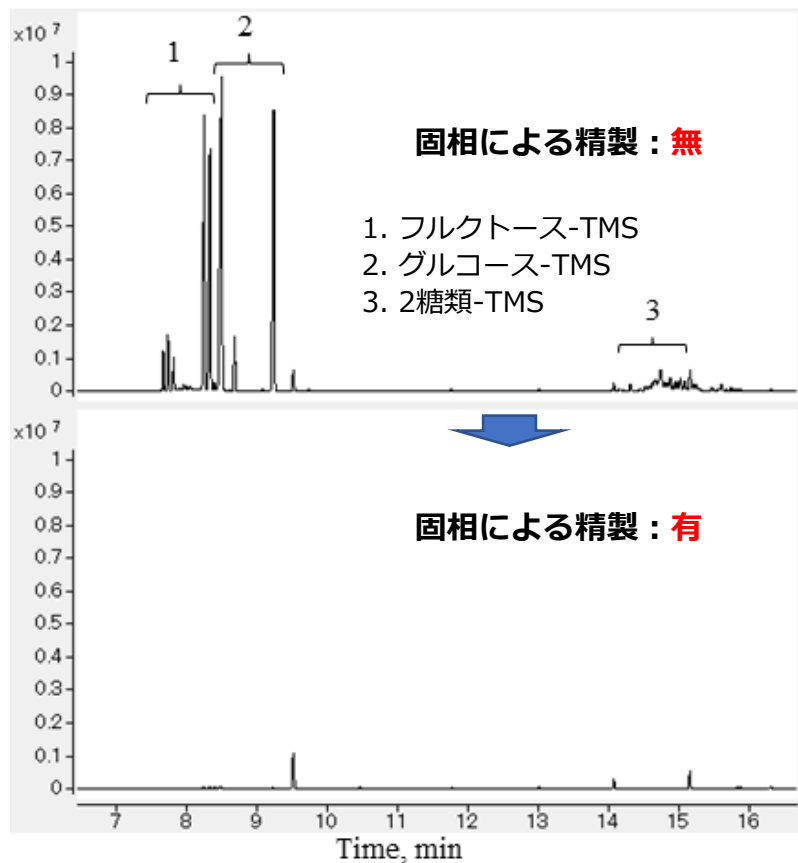
$-Si-CH_2-CH_2-NH_2$



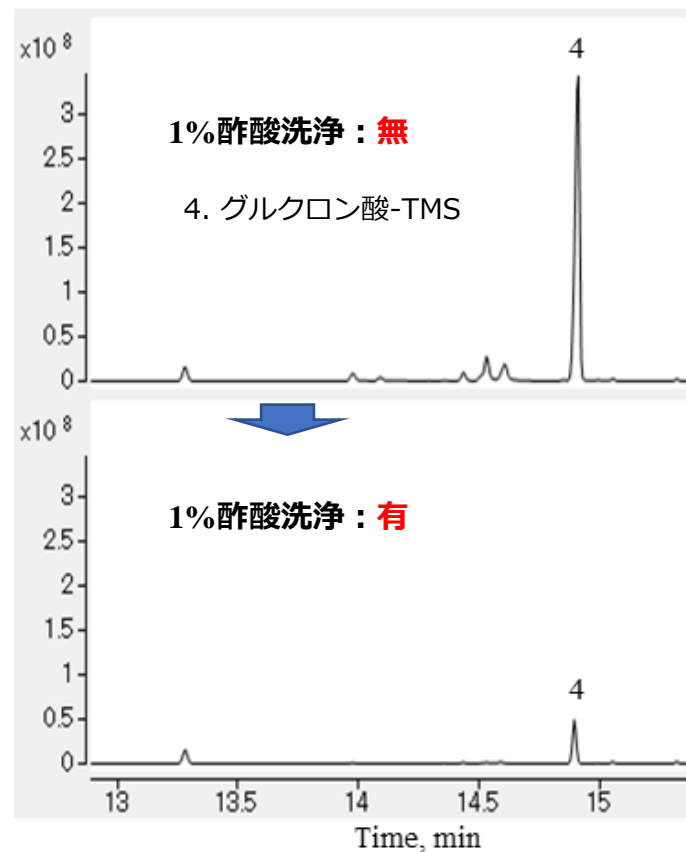
pKa=-0.58

pKa=1.86

# 固相抽出による糖類・有機酸類の除去効果



A 糖類



B 有機酸類

固相誘導体化法を用いたGC/MS-SCANトータルイオンクロマトグラム

# 各工程の条件検討

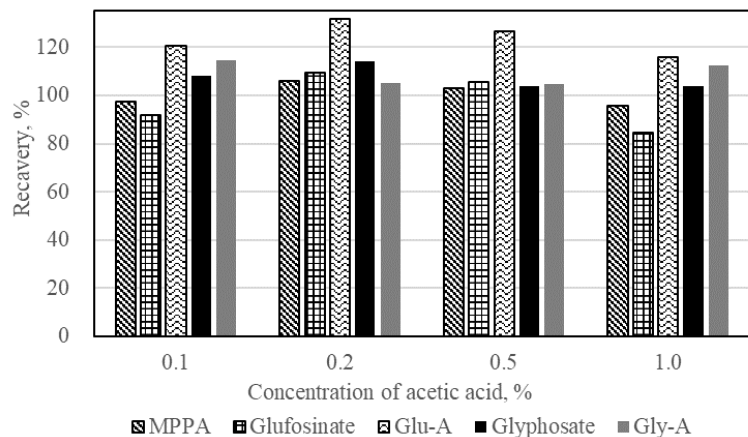


図1 洗浄溶媒の酢酸濃度と回収率の関係

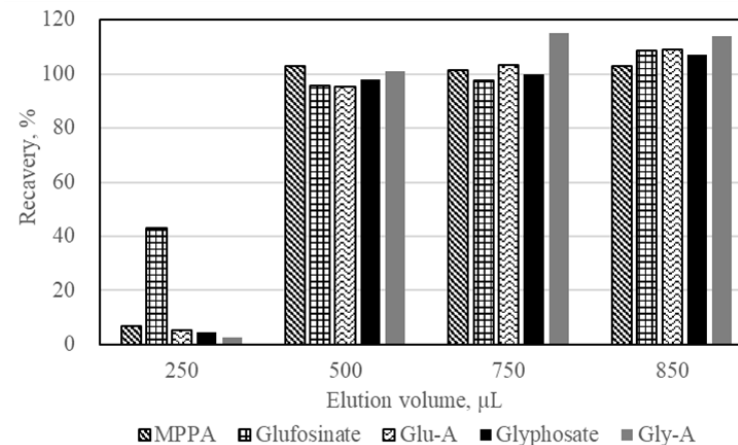


図3 溶出溶媒量と回収率の関係

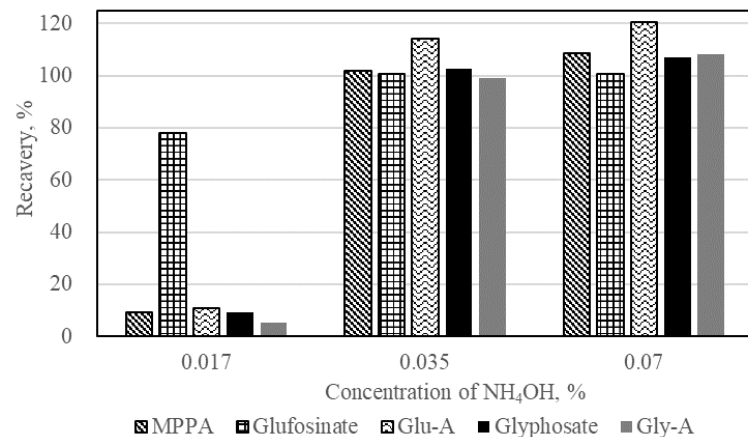


図2 溶出溶媒中NH<sub>4</sub>OH濃度と回収率の関係

表1 最終検液への添加剤と得られたピーク面積値

添加剤	MPPA	Glufosinate	Glu-A	Glyphosate	Gly-A
無	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Formic acid	1.01	0.78	1.04	<b>1.39</b>	0.98
Acetic acid	1.08	0.98	1.09	<b>1.76</b>	1.14
Citric acid	<b>1.30</b>	1.05	1.09	<b>2.03</b>	1.17
Methyl phosphate	1.03	1.03	<b>1.21</b>	<b>1.98</b>	<b>1.29</b>
Phosphate	1.10	1.06	<b>1.56</b>	<b>3.16</b>	<b>1.37</b>

ギ酸を添加することで、グルホシネートの面積値が下がったが、酢酸ではグルホシネートの面積値を維持したままグリホサートの面積値が上がった。クエン酸を加えることで、MPPAおよびグリホサートのピーク面積値が上がることが分かった。また、リン酸メチルやリン酸を添加することでGlu-AとグリホサートとGly-Aの面積値が上がった。これらの結果から、酢酸とクエン酸とリン酸を最終検液に添加することとした。

# 添加回収試験/妥当性評価/ハチミツの測定結果

Table 2 Validation results in honey

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

Table 3 Determination results of honey

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

## 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

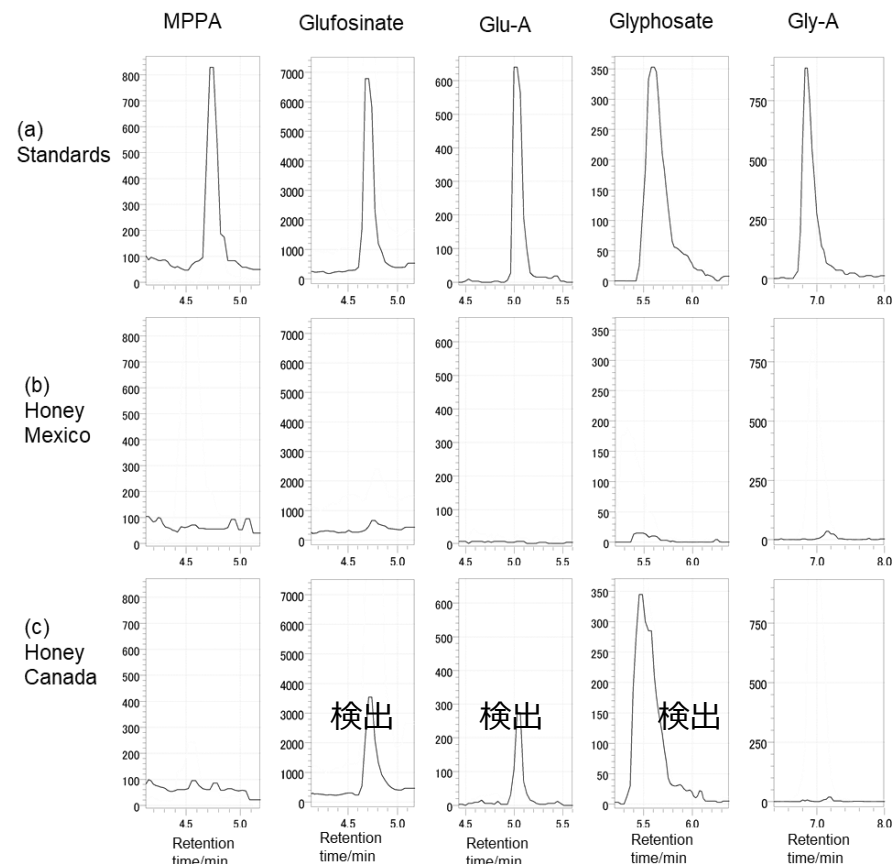


Fig. 3 MRM chromatograms of (a) standard, (b) honey produced in Mexico, and (c) honey produced in Canada.

Concentrations of standard solutions:

MPPA, glufosinate, and Glu-A at 1 μg/L; glyphosate and Gly-A at 5 μg/L