

第42回農薬残留分析研究会発表での課題に対する

グリホサート・グリホシネートの分析法の検討

中間報告_2019.12.15

中間報告_2020.01.12

中間報告_2020.02.04

佐々野僚一

丸山

検討項目

- 水抽出の検討
- 除タンパクを15mL遠沈チューブの検討
- 除タンパク時のアセトニトリルと水の比率の検討
- リザーバー上での希釈率の検討
- スタンダード溶媒の検討
- 大豆、大麦、ほうれん草を用いての多段階添加回収試験

前回の発表での課題

2. 連続測定におけるマトリックスの影響

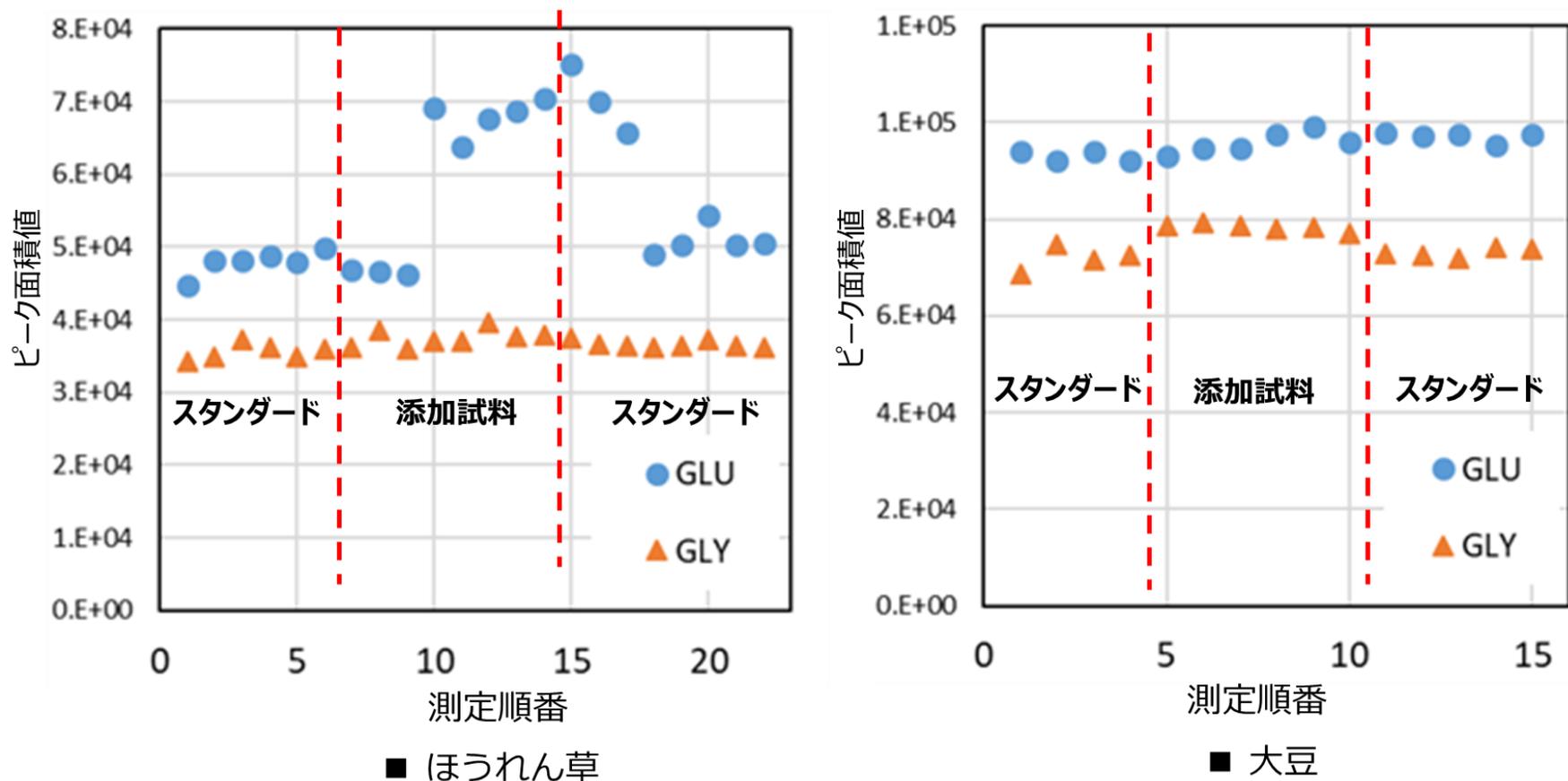
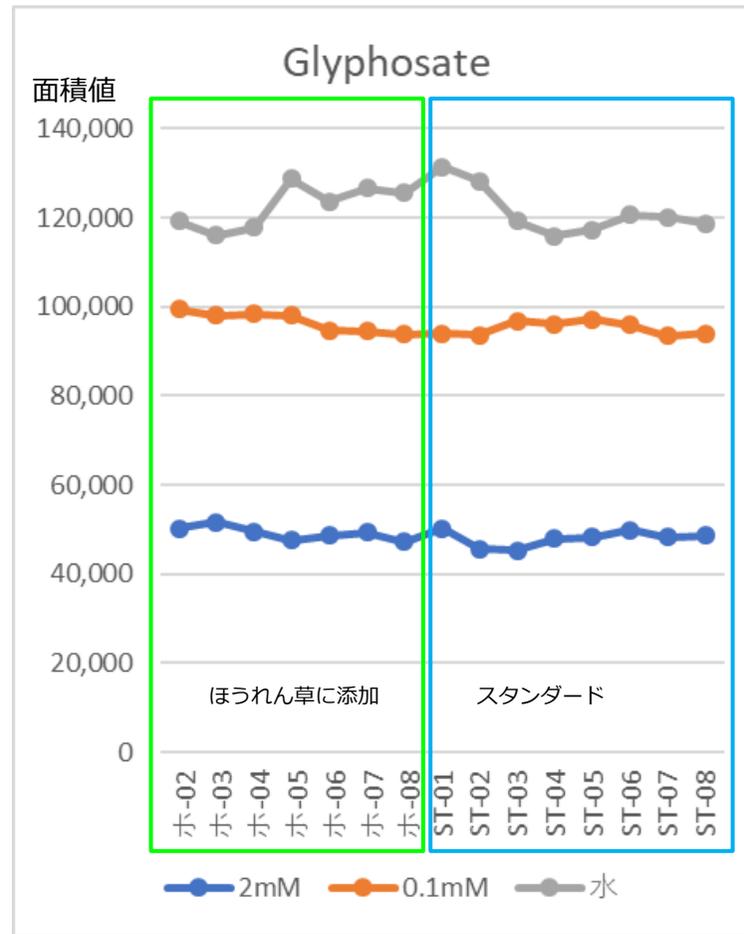
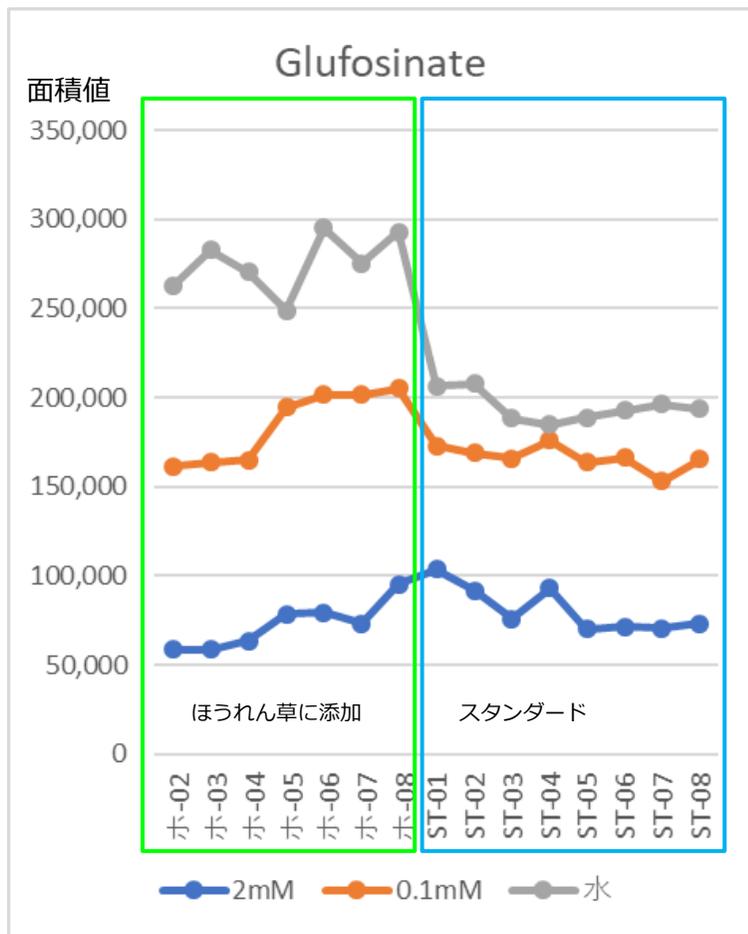


図4 連続測定におけるマトリックスの影響

HPLC移動相のギ酸アンモ濃度の検討

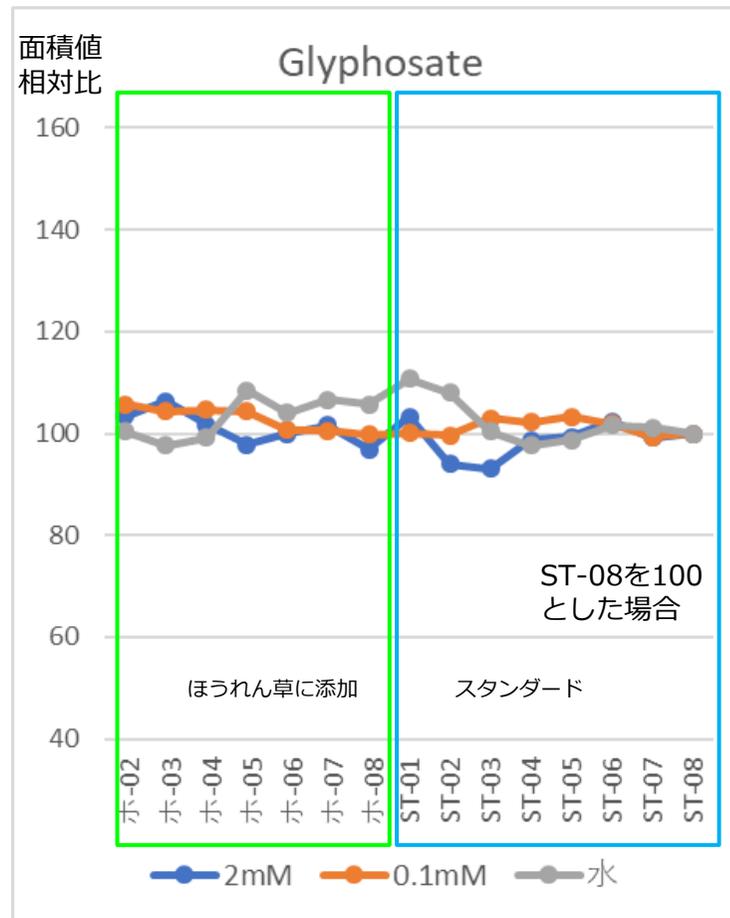
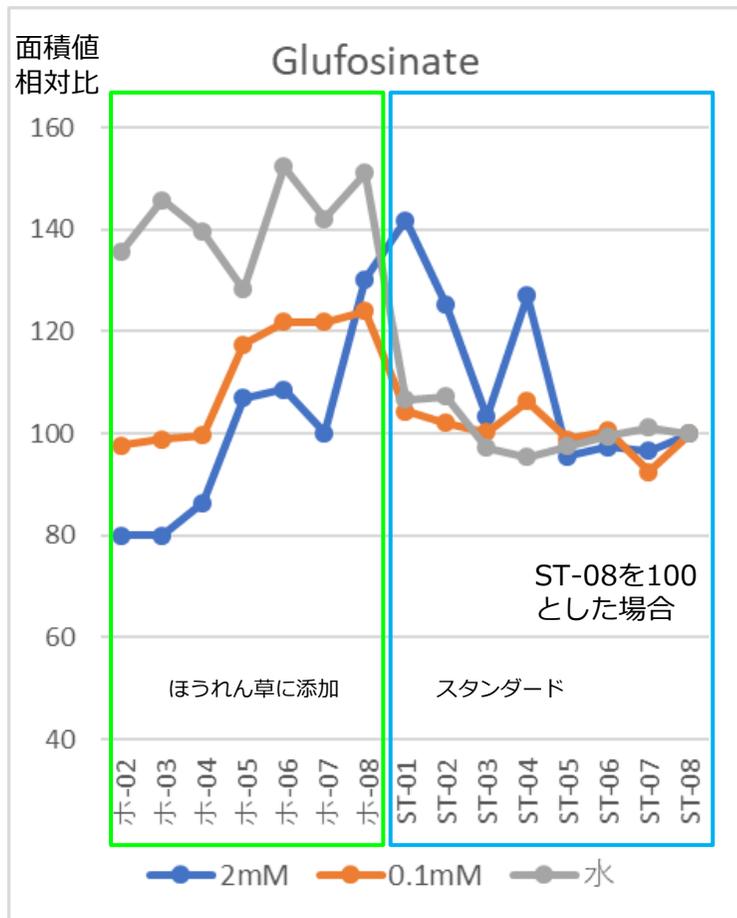
連続測定におけるHPLC移動相のギ酸アンモ濃度と面積値の関係



ギ酸アンモ濃度が高いとピーク面積値が小さくなる。

HPLC移動相のギ酸アンモ濃度の検討

連続測定におけるHPLC移動相のギ酸アンモ濃度と面積値相対比の関係



ギ酸アンモ濃度0.1mMが最も変動が小さい。

HPLC移動相のギ酸アンモ濃度の検討



【結果と考察】

HPLC移動相のギ酸アンモ濃度が高いとピーク面積値が小さくなるが、水にしてしまうとマトリックスによる連続測定値の変動が大きくなった。

【まとめ】

HPLC移動相のAはギ酸アンモ濃度を0.1mMとする。

多段階添加回収試験_191130

表 1. 多段階添加回収試験の結果

作物	ほうれん草 10g		大豆 2g		小麦 2g	
添加試料中濃度	0.1 ppm		0.5 ppm		0.5 ppm	
成分名	GLU	GLY	GLU	GLY	GLU	GLY
前処理前添加	120	111	106	108	104	63
抽出後添加	101	98	96	99	95	98
前処理後添加	91	91	95	94	95	106

(回収率：%)

小麦の前処理前添加の回収率は63%に対して抽出後添加の回収率は98%であることから、抽出工程で35%ロスしていることになる。

除タンパク溶媒の検討

除タンパク工程での溶媒において

「水25mL+アセトニトリル25mL」を「水20mL+アセトニトリル30mL」に変更して、アセトニトリルの比率を上げて、除タンパク効果を高めてみた。

表2. 添加回収試験の結果

作物	ほうれん草 10g		大豆 2g		小麦 2g	
添加試料中濃度	0.1 ppm		0.5 ppm		0.5 ppm	
成分名	GLU	GLY	GLU	GLY	GLU	GLY
前処理前添加	93	78	107	92	107	42

(回収率：%)

アセトニトリルの比率を上げることで、小麦の前処理前添加の回収率は42%となり減少した。ほうれん草のGLYも78%に減少した。

食品成分表と基準値



表1 食品成分表

可食部100g中に含まれる成分量 (g)

作物名	分類	水分	たんぱく質	でんぷん	脂質
ほうれん草	野菜類	92	2	0	0
大豆	豆類	12	34	1	19
小麦粉	穀類	14	8	73	2

表2 基準値

単位 : ppm

作物名	グルホシネート	グリホサート
ほうれん草	0.1	0.2
大豆	2	20
小麦	0.2	30

食品成分表（炭水化物）

検索結果表示切替

<input type="radio"/> 一般成分-無機質-ビタミン類-アミノ酸-脂肪酸-炭水化物-有機酸等 可食部100g	脂肪酸	<input type="radio"/> 可食部100g <input type="radio"/> 脂質1g <input type="radio"/> 脂肪酸総量100g
	アミノ酸	<input type="radio"/> 可食部100g <input type="radio"/> 基準窒素1g <input type="radio"/> たんぱく質1g
	炭水化物（利用可能炭水化物、糖アルコール）	<input checked="" type="radio"/> 可食部100g
	有機酸	<input type="radio"/> 可食部100g

• (注意) 表示される値は、可食部100gあたりに含まれる成分を表す。

食品成分	水分	単糖当量	でんぷん	ぶどう糖	果糖	ガラクトース	しょ糖	麦芽糖	乳糖	トレハロース	利用可能炭水化物計	ソルビトール	マンニトール	重量	削除	
	単位	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g		
穀類/こむぎ/【玄穀】/国産/普通		12.5	64.3	57.5	0.1	0	-	0.9	0.1	(0)	(0)	58.5	-	-	<input type="text" value="100"/>	<input type="checkbox"/>
TOTAL		12.5	64.3	57.5	0.1	0	0	0.9	0.1	0	0	58.5	0	0	100	<input checked="" type="checkbox"/>

食品成分表

食品成分	廃棄率	エネルギー	水分	たんぱく質	脂質	炭水化物	灰分	重量
	単位	%	kcal	g	g	g	g	g
穀類/こむぎ/【玄穀】/国産/普通	0	337	12.5	10.8	3.1	72.1	1.6	100

脂質は、

食品中の有機溶媒に溶ける有機化合物の総称であり、中性脂肪のほかに、リン脂質、ステロイド、ろう、脂溶性ビタミン等も含んでいる。ほとんどの食品では、脂質の大部分を中性脂肪が占める。中性脂肪のうち、自然界に最も多く存在するのは、トリアシルグリセロールである。

炭水化物は、

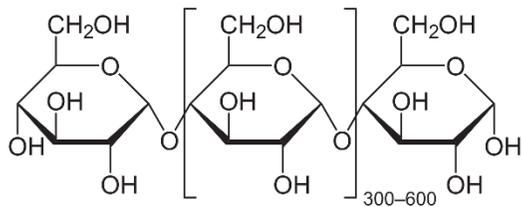
生体内で主にエネルギー源として利用される重要な成分である。炭水化物は、従来同様いわゆる「差し引き法による炭水化物」すなわち、水分、たんぱく質、脂質及び灰分の合計 (g) を100 gから差し引いた値で示した。ただし、魚介類、肉類及び卵類については、一般的に、炭水化物が微量であり、差し引き法で求めることが適当でないことから、原則として全糖の分析値に基づいた成分値とした。なお、硝酸イオン、アルコール、酢酸、ポリフェノール（タンニンを含む。）、カフェイン及びテオブロミンを比較的多く含む食品や、加熱により二酸化炭素等が多量に発生する食品については、これらの含量も差し引いて炭水化物量を求めた。炭水化物の成分値には食物繊維も含まれている。食物繊維の成分値は別項目として掲載した。

食品成分表（脂質）

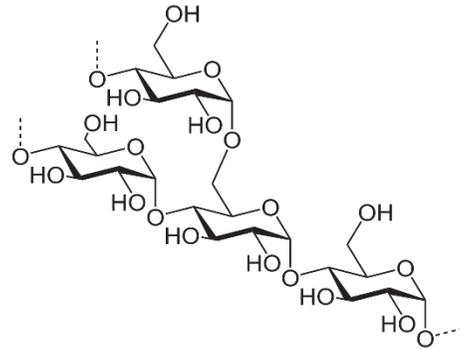
<input type="radio"/> 一般成分-無機質-ビタミン類- アミノ酸-脂肪酸-炭水化物- 有機酸等 可食部100g	脂肪酸	<input checked="" type="radio"/> 可食部100g <input type="radio"/> 脂質1g <input type="radio"/> 脂肪酸総量100g
	アミノ酸	<input type="radio"/> 可食部100g <input type="radio"/> 基準窒素1g <input type="radio"/> たんぱく質1g
	炭水化物（利用可能 炭水化物、糖アルコール）	<input type="radio"/> 可食部100g
	有機酸	<input type="radio"/> 可食部100g

• (注意) 表示される値は、可食部100gあたりに含まれる成分を表す。

食品成分	水分	脂質	脂肪酸総量	飽和脂肪酸	一価不飽和脂肪酸	多価不飽和脂肪酸	n-3系多価不飽和脂肪酸	n-6系多価不飽和脂肪酸	4:0 酪酸	6:0 ヘキサン酸	7:0 ヘプタン酸	8:0 オクタン酸	10:0 デカン酸	12:0 ラウリン酸	13:0 トリデカン酸	14:0 ミリスチン酸	15:0 ペンタデカン酸	15:0 ANT ペンタデカン酸	16:0 パルミチン酸	16:0 ISO パルミチン酸	17:0 ヘプタデカン酸	17:0 ANT ヘプタデカン酸	18:0 ステアリン酸	20:0 アラキジン酸	
	単位	g	g	g	g	g	g	g	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	
穀類/こむぎ/ [玄穀] /国産/普通		12.5	3.1	2.42	0.55	0.35	1.52	0.10	1.42	-	-	-	-	Tr	Tr	-	5	3	-	510	-	4	-	27	3



アミロース



アミロペクチン

物理的性質

アミロース・アミロペクチンともに、白色の粒粉状物質で、無味・無臭。

アミロースは熱水に溶けるが、アミロペクチンは溶けない。

天然の結晶状態にあるデンプンをβデンプンと呼び、デンプン中の糖鎖間の水素結合が破壊され糖鎖が自由になった状態のデンプンをαデンプンと呼ぶ（日本国内の呼び方で、国際的用語ではない）。これはつまり、蛋白質でいう、二次構造にあたる考え方で、αデンプンとβデンプンではフォールディングが異なるということもできる。

- デンプン（澱粉、ラテン語: amyllum、英語: starch）とは、分子式 $(C_6H_{10}O_5)_n$ の炭水化物（多糖類）で、多数のα-グルコース分子がグリコシド結合によって重合した天然高分子である。構成単位であるグルコースとは異なる性質を示す。陸上植物におけるグルコース貯蔵の一形態であり、種子や球根などに多く含まれている。
- デンプンは植物が光合成によって体内（実や根など）に貯蔵した炭水化物で、工業上はそれを精製した製品をいう[1]。デンプンの特性は起源となった植物の種類によりかなり異なる[1]。代表的なデンプンにカタクリ（市場に流通する多くの製品では馬鈴薯）を原料とする片栗粉やトウモロコシを原料とするコーンスターチなどがある[1]。
- デンプンはその構造によってアミロースとアミロペクチンに分けられる。アミロースは直鎖状の分子で、分子量が比較的小さい。アミロペクチンは枝分かれの多い分子で、分子量が比較的大きい。アミロースとアミロペクチンの性質は異なるが、デンプンの中には両者が共存している。デンプンの直鎖部分は、グルコースがα1-4結合で連なったもので、分岐は直鎖の途中からグルコースのα1-6結合による。アミロースはほとんど分岐を持たないが、アミロペクチンは、平均でグルコース残基約25個に1個の割合でα1-6結合による分枝構造をもつ（直鎖部分の長さは18~24残基、分岐間は5~8残基の間隔がある）。また、アミロースの中にはα1-6結合を持つものも少量あり、中間体と呼ばれている。なお、動物における貯蔵多糖として知られるグリコーゲンはアミロペクチンよりもはるかに分岐が多く、3残基に一回の分岐（直鎖部分の長さは12~18残基、分岐の先がさらに分岐し、網目構造をとる）となり、アミロースやアミロペクチンとは区別される。トウモロコシの種子などでもこのグリコーゲンの顆粒が存在する。

澱粉の種類と用途

		アミロース	
トウモロコシ澱粉	コーンスターチ	25%	甘味料、プリンの凝固剤、ビールの副原料、製紙の糊料
小麦澱粉	浮き粉	25%	澱剤
米澱粉		15-25%	化粧品やそばやうどんなどの打ち粉
豆類（ソラマメ、小豆）		30-35%	
馬鈴薯澱粉	（ジャガイモ）	20-25%	片栗粉
甘藷澱粉	（サツマイモ）	15-20%	
野菜類	カタクリ、ワラビ（わらびもち）、葛		

- デンプンの消化・吸収[編集]
- ヒトがデンプンを食べるとまず、[口](#)で[唾液](#)中の[消化酵素アミラーゼ](#)（唾液アミラーゼ；プチアリン）により、アミロースとアミロペクチンの α 1-4結合が不規則に切断され、[デキストリン](#)や[マルトース](#)（麦芽糖）に分解されていく。デンプンを含む食品を噛み続けると甘味が感じられるようになるのはこのためである。唾液[アミラーゼ](#)の作用は食べ物が[胃](#)に送られた後もしばらく続くが、強酸性の[胃液](#)によってアミラーゼは次第に失活する。
- 胃の内容物が[十二指腸](#)に送られると、[膵臓](#)から分泌された[膵液](#)によって中和される。そして膵液に含まれるアミラーゼ（膵アミラーゼ；アミロプシン）によりデンプンは[二糖類](#)である[マルトース](#)にまで分解される。
- マルトースはさらに[小腸](#)壁に存在する [\$\alpha\$ -グルコシダーゼ](#)（ヒトでは小腸上皮細胞に膜酵素として発現している[消化酵素](#)である。膜酵素であるのは、吸収直前に単糖に分解することで[腸内細菌](#)などに栄養を奪われにくくするためである）により最終的に[グルコース](#)（ブドウ糖）に分解され、[小腸](#)で吸収される。

糊化

デンプンを水中に懸濁し加熱すると、デンプン粒は吸水して次第に膨張する。加熱を続けると最終的にはデンプン粒が崩壊し、ゲル状に変化する。この現象を糊化（こか）という。このとき、デンプン懸濁液は白濁した状態から次第に透明になり、急激に粘度を増す。粒子が最大限吸水した時粘度が最大となり、粒子の崩壊により粘度は低下する。

老化

糊化したデンプンの溶液を冷却すると、糊液は次第に白濁し、水を遊離して不溶の状態となる。これを老化と呼ぶ[2]。デンプン糊液の老化は、水中に分散したデンプン分子が再び結晶化することにより起こる。ただし、完全にもとの状態に戻るわけではない[2]。これがデンプンを原料に含むパンなどの食品が、時間が経つと硬くなる主要な原因といえる。

2回抽出定容法



添加回収試験結果

作物	小麦 2g	
添加試料中濃度	0.5 ppm	
成分名	GLU	GLY
2回抽出定容法	99	72
従来法	92	54
<i>2回抽出/従来法</i>	<i>1.07</i>	<i>1.34</i>

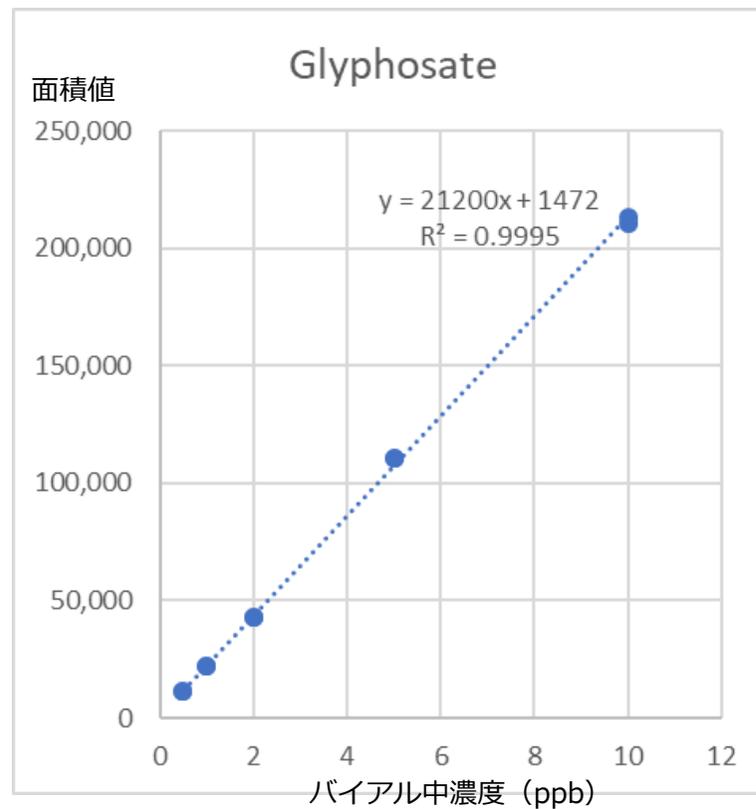
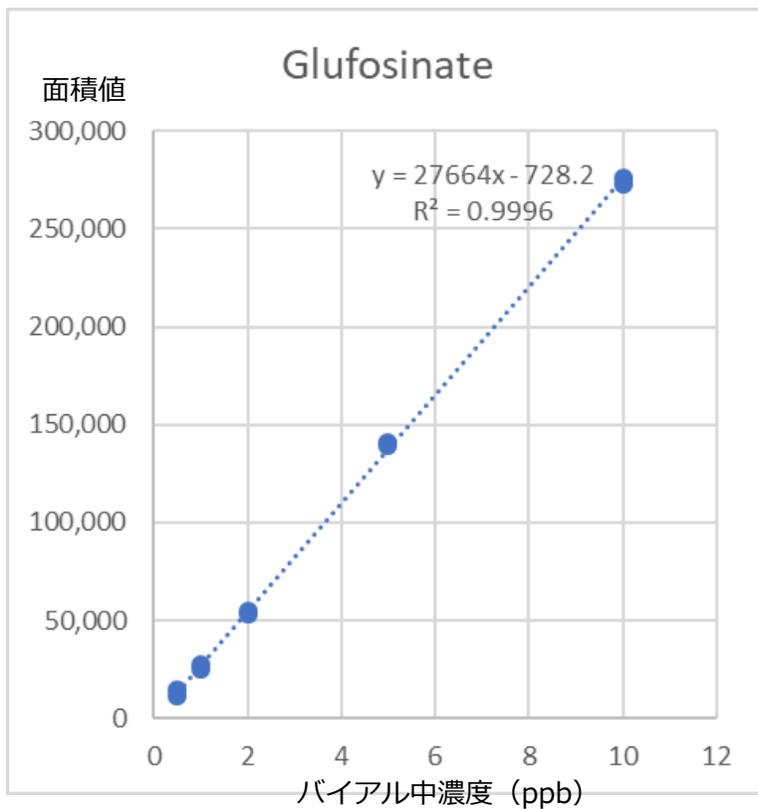
2回抽出することで回収率は若干向上したが、抽出操作が煩雑になる。

添加回収試験



試料名	No.	ほうれん草 10g		大豆 2g		小麦 1g	
		0.1 ppm		0.5 ppm		1 ppm	
		GLU	GLY	GLU	GLY	GLU	GLY
添加回収試験 抽出前添加：n=3 ピーク面積値	A01	177,335	101,666	148,452	116,552	142,018	75,756
	A02	138,569	108,106	155,022	119,145	150,190	77,909
	A03	133,603	109,426	151,092	110,246	163,880	83,355
	<i>Ave.</i>	<i>149,836</i>	<i>106,399</i>	<i>151,522</i>	<i>115,314</i>	<i>152,029</i>	<i>79,007</i>
	<i>RSD,%</i>	<i>16</i>	<i>4</i>	<i>2</i>	<i>4</i>	<i>7</i>	<i>5</i>
	<i>REC,%</i>	<i>108</i>	<i>105</i>	<i>102</i>	<i>108</i>	<i>104</i>	<i>76</i>
前処理後添加	K01	135,757	99,977	142,626	103,356	140,632	104,043
ピーク面積値	<i>REC,%</i>	<i>97</i>	<i>98</i>	<i>96</i>	<i>97</i>	<i>97</i>	<i>100</i>
スタンダード：n=3 バイアル中：4ppb ピーク面積値	S01	141,982	100,754	148,502	102,045	147,482	99,994
	S02	138,630	101,424	148,674	106,463	147,091	102,752
	S03	137,116	103,214	150,506	105,395	142,090	109,243
	<i>Ave.</i>	<i>139,243</i>	<i>101,797</i>	<i>149,227</i>	<i>104,634</i>	<i>145,554</i>	<i>103,996</i>

検量線



バイアル中濃度: 0.5, 1, 2, **5**, 10ppb

ほうれん草10g-試料中濃度換算: 0.01, 0.02, 0.04, **0.1**, 0.2ppm

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

前処理 精製フロー



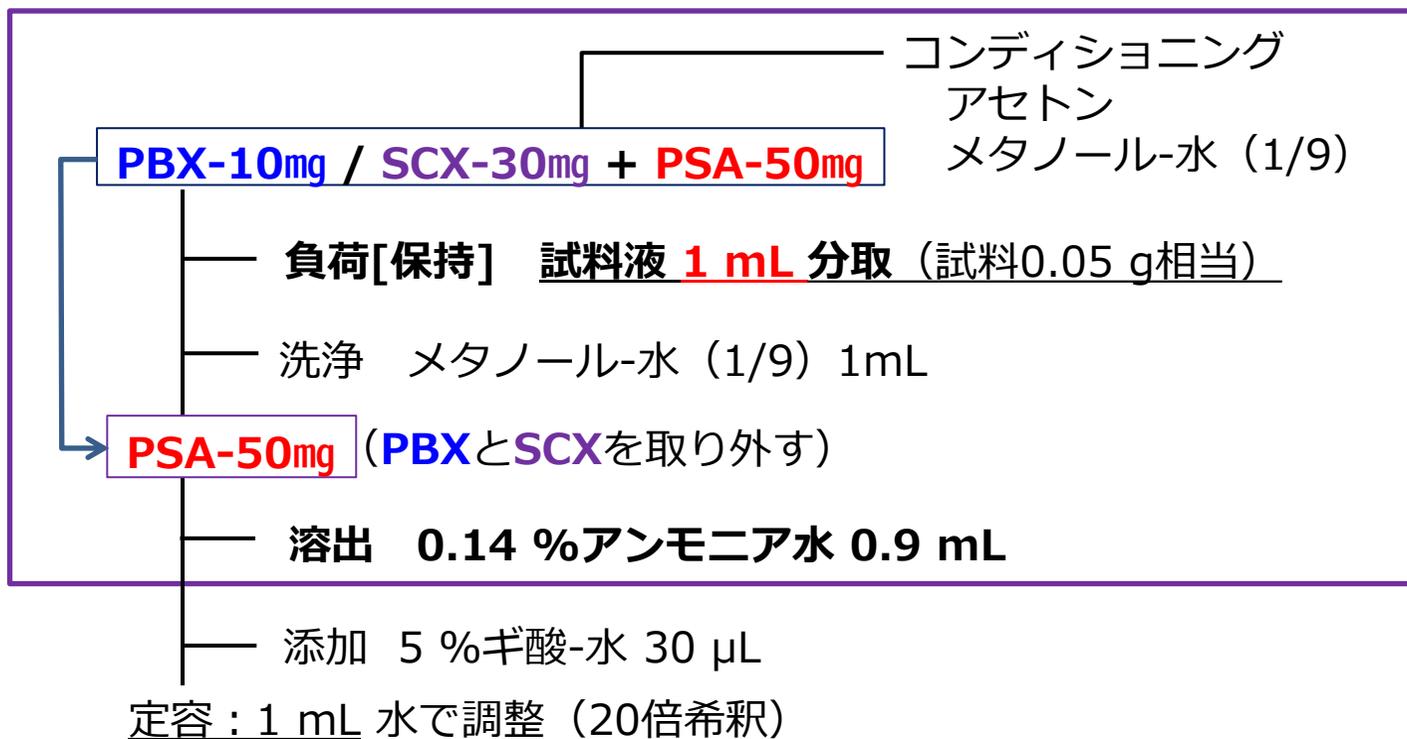
抽出上澄液 0.5 mL分取

添加 水 1.5 mL

試料液 2 mL (20倍希釈) ※12.5%アセトニトリル-水

☞ 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。

全自動固相抽出装置 ST-L400, 前処理時間: **11分**/検体



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

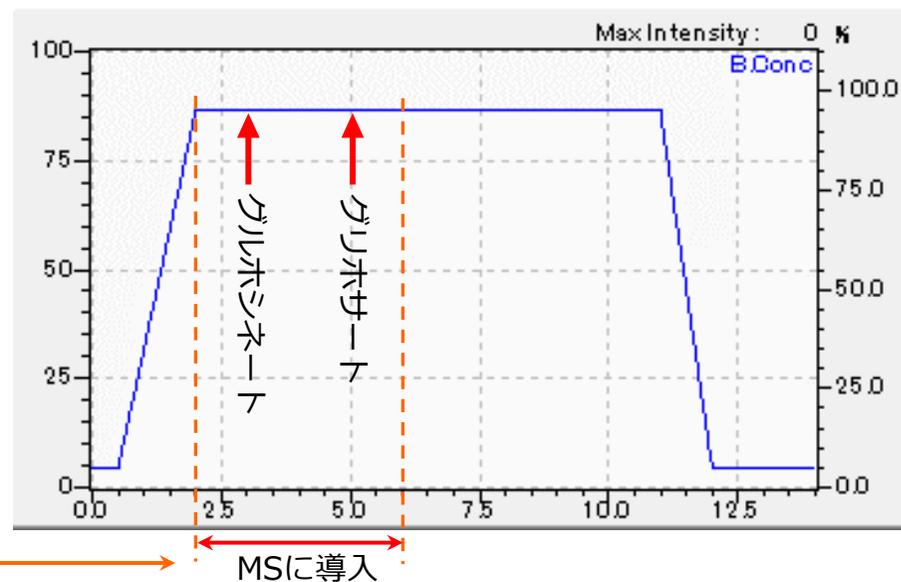
カラム温度：40 $^{\circ}$ C



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

ドラインガス流量：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

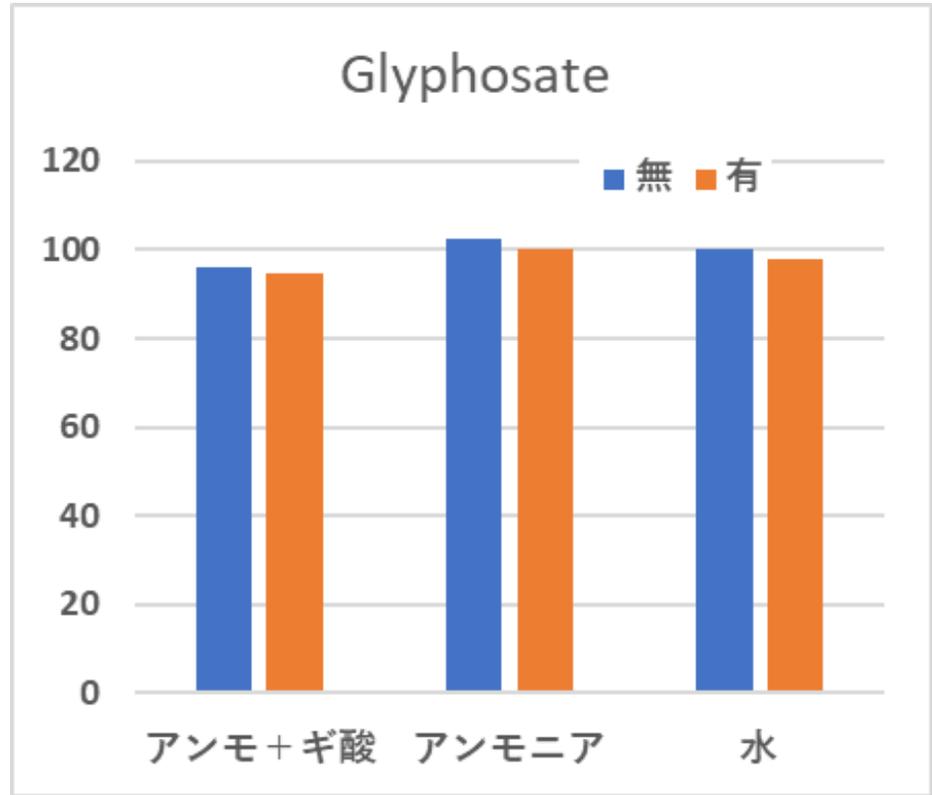
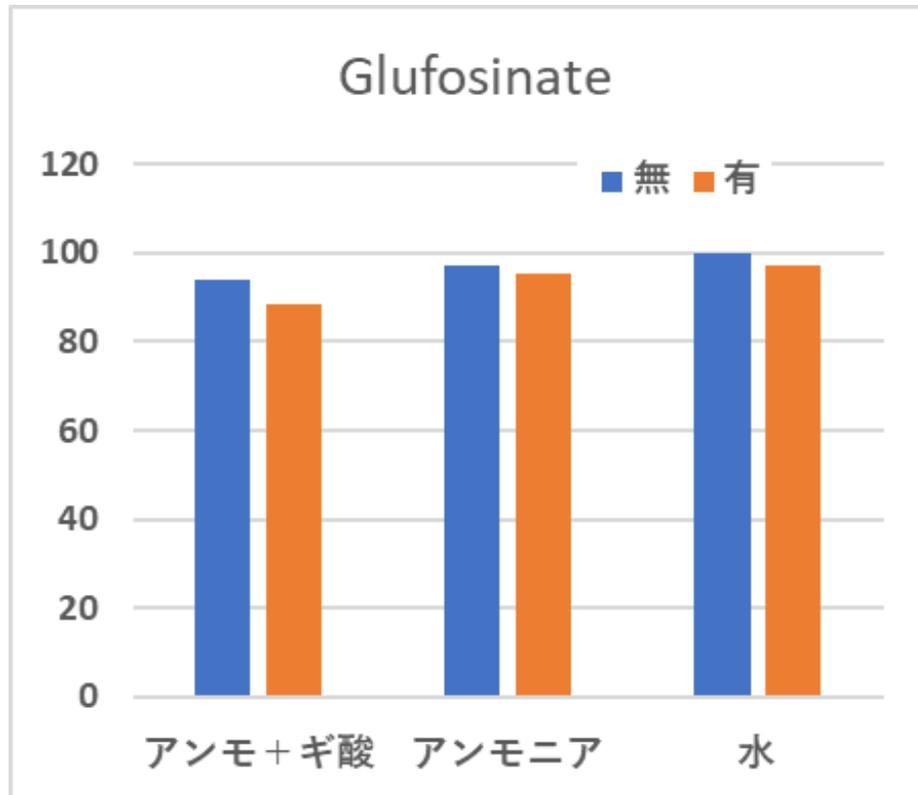
DL温度：150 °C

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

スタンダードの溶媒検討とフィルターの影響



水を100とした時の相対比 アンモニア+ギ酸 (pH4)、アンモニア (pH9)、水 (pH6)

溶媒において、大きな差はなかった。

フィルターを通して吸着等の影響はほとんどなかった。

グリホサート・グリホシネートの分析法の検討

中間報告_2020.01.12

佐々野
丸山

前回の結果



試料名	No.	ほうれん草 10g		大豆 2g		小麦 1g	
		0.1 ppm		0.5 ppm		1 ppm	
		GLU	GLY	GLU	GLY	GLU	GLY
添加回収試験 抽出前添加：n=3 ピーク面積値	A01	177,335	101,666	148,452	116,552	142,018	75,756
	A02	138,569	108,106	155,022	119,145	150,190	77,909
	A03	133,603	109,426	151,092	110,246	163,880	83,355
	<i>Ave.</i>	<i>149,836</i>	<i>106,399</i>	<i>151,522</i>	<i>115,314</i>	<i>152,029</i>	<i>79,007</i>
	<i>RSD,%</i>	<i>16</i>	<i>4</i>	<i>2</i>	<i>4</i>	<i>7</i>	<i>5</i>
	<i>REC,%</i>	<i>108</i>	<i>105</i>	<i>102</i>	<i>108</i>	<i>104</i>	<i>76</i>
前処理後添加	K01	135,757	99,977	142,626	103,356	140,632	104,043
ピーク面積値	<i>REC,%</i>	<i>97</i>	<i>98</i>	<i>96</i>	<i>97</i>	<i>97</i>	<i>100</i>
スタンダード：n=3 バイアル中：4ppb ピーク面積値	S01	141,982	100,754	148,502	102,045	147,482	99,994
	S02	138,630	101,424	148,674	106,463	147,091	102,752
	S03	137,116	103,214	150,506	105,395	142,090	109,243
	<i>Ave.</i>	<i>139,243</i>	<i>101,797</i>	<i>149,227</i>	<i>104,634</i>	<i>145,554</i>	<i>103,996</i>

小麦の回収率をもう少し上げたい。。。。

物性

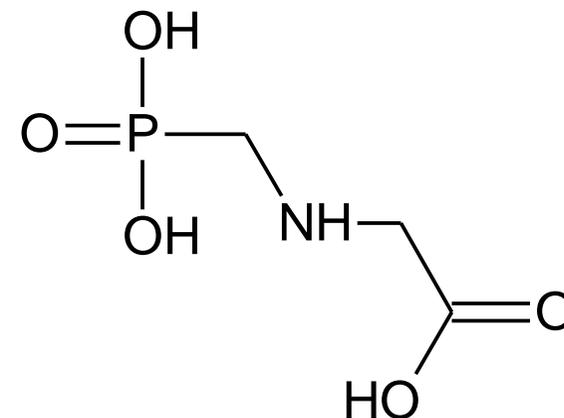
グリホサート : Glyphosate (GLY)

化学式 : $C_3H_8NO_5P$

分子量 : 169.1

LogPow = <-3.2 (pH 2-5, 20°C)

pKa = 5.77 ± 0.03 , 2.18 ± 0.02 (20 ± 0.2°C)



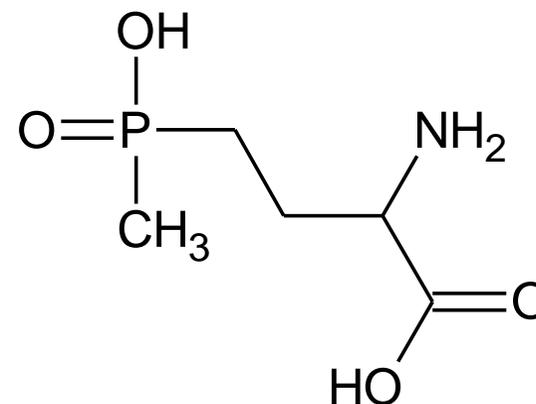
グルホシネート : Glufosinate (GLU)

化学式 : $C_5H_{12}NO_4P$

分子量 : 181.1

LogPow = <0.1 (pH 7, 22°C)

pKa1 <2 , pKa2 <2.9 , pKa3 <9.8



食品成分表と基準値



表1 食品成分表

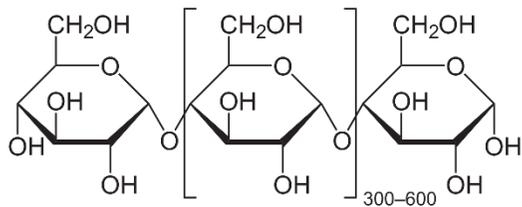
可食部100g中に含まれる成分量 (g)

作物名	分類	水分	たんぱく質	でんぷん	脂質
ほうれん草	野菜類	92	2	0	0
大豆	豆類	12	34	1	19
小麦粉	穀類	14	8	73	2

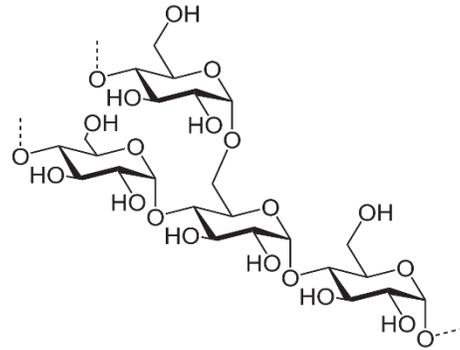
表2 基準値

単位 : ppm

作物名	グルホシネート	グリホサート
ほうれん草	0.1	0.2
大豆	2	20
小麦	0.2	30



アミロース



アミロペクチン

物理的性質

アミロース・アミロペクチンともに、白色の粒粉状物質で、無味・無臭。

アミロースは熱水に溶けるが、アミロペクチンは溶けない。

天然の結晶状態にあるデンプンをβデンプンと呼び、デンプン中の糖鎖間の水素結合が破壊され糖鎖が自由になった状態のデンプンをαデンプンと呼ぶ（日本国内の呼び方で、国際的用語ではない）。これはつまり、蛋白質でいう、二次構造にあたる考え方で、αデンプンとβデンプンではフォールディングが異なるということもできる。

- デンプン（澱粉、ラテン語: amyllum、英語: starch）とは、分子式 $(C_6H_{10}O_5)_n$ の炭水化物（多糖類）で、多数のα-グルコース分子がグリコシド結合によって重合した天然高分子である。構成単位であるグルコースとは異なる性質を示す。陸上植物におけるグルコース貯蔵の一形態であり、種子や球根などに多く含まれている。
- デンプンは植物が光合成によって体内（実や根など）に貯蔵した炭水化物で、工業上はそれを精製した製品をいう[1]。デンプンの特性は起源となった植物の種類によりかなり異なる[1]。代表的なデンプンにカタクリ（市場に流通する多くの製品では馬鈴薯）を原料とする片栗粉やトウモロコシを原料とするコーンスターチなどがある[1]。
- デンプンはその構造によってアミロースとアミロペクチンに分けられる。アミロースは直鎖状の分子で、分子量が比較的小さい。アミロペクチンは枝分かれの多い分子で、分子量が比較的大きい。アミロースとアミロペクチンの性質は異なるが、デンプンの中には両者が共存している。デンプンの直鎖部分は、グルコースがα1-4結合で連なったもので、分岐は直鎖の途中からグルコースのα1-6結合による。アミロースはほとんど分岐を持たないが、アミロペクチンは、平均でグルコース残基約25個に1個の割合でα1-6結合による分枝構造をもつ（直鎖部分の長さは18~24残基、分岐間は5~8残基の間隔がある）。また、アミロースの中にはα1-6結合を持つものも少量あり、中間体と呼ばれている。なお、動物における貯蔵多糖として知られるグリコーゲンはアミロペクチンよりもはるかに分岐が多く、3残基に一回の分岐（直鎖部分の長さは12~18残基、分岐の先がさらに分岐し、網目構造をとる）となり、アミロースやアミロペクチンとは区別される。トウモロコシの種子などでもこのグリコーゲンの顆粒が存在する。

検討項目

抽出工程で小麦粉の主成分であるデンプンにグリホサートが分配しているために抽出効率が下がっていると考えられる。そこで、抽出工程でpH調整することでグリホサートが抽出液の方に分配する条件を検討することとした。

(斎藤先生からのご助言)

■ 小麦粉の抽出工程におけるpH調整の検討

No.	添加試薬	添加量	pH
A	1N HCl	100 μ L	3.0
B	1N HCl	50 μ L	4.0
C	未処理		6.0
D	1N NaOH	50 μ L	8.5
E	1N NaOH	100 μ L	9.5

前処理 抽出フロー

水抽出&除タンパク

小麦 1 g

└─ 添加 水 25 mL

振とう

└─ **添加 HCl もしくは NaOH (pH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

pH調整による添加回収試験結果

Table 添加回収試験結果：ピーク面積値と回収率

項目	No.	GLU	GLY
ST 5ppb	1	131,152	82034
	2	129,403	84891
	3	133,343	85414
	4	134,050	86237
	5	135,248	87725
	<i>Ave.</i>	<i>132,639</i>	<i>85,260</i>
小麦-A-pH3 1N HCl: 100 μ L pH3	1	112,940	83082
	2	124,736	83850
	3	121,692	85710
	<i>Ave.</i>	<i>119,789</i>	<i>84,214</i>
	REC,%	90	99
小麦-B-pH4 1N HCl: 50 μ L pH4	1	122,038	84245
	2	119,538	84803
	3	120,910	87948
	<i>Ave.</i>	<i>120,829</i>	<i>85,665</i>
	REC,%	91	100
小麦-C-pH6 未処理 pH6	1	125,628	66389
	2	122,939	64623
	3	127,101	65249
	<i>Ave.</i>	<i>125,223</i>	<i>65,420</i>
	REC,%	94	77
小麦-E-pH8.5 1N NaOH: 50 μ L pH8.5	1	131,552	101858
	2	128,982	100136
	3	131,645	102198
	<i>Ave.</i>	<i>130,726</i>	<i>101,397</i>
	REC,%	99	119
小麦-E-pH9.5 1N NaOH: 100 μ L pH9.5	1	133,425	108381
	2	135,451	107397
	3	134,669	106184
	<i>Ave.</i>	<i>134,515</i>	<i>107,321</i>
	REC,%	101	126

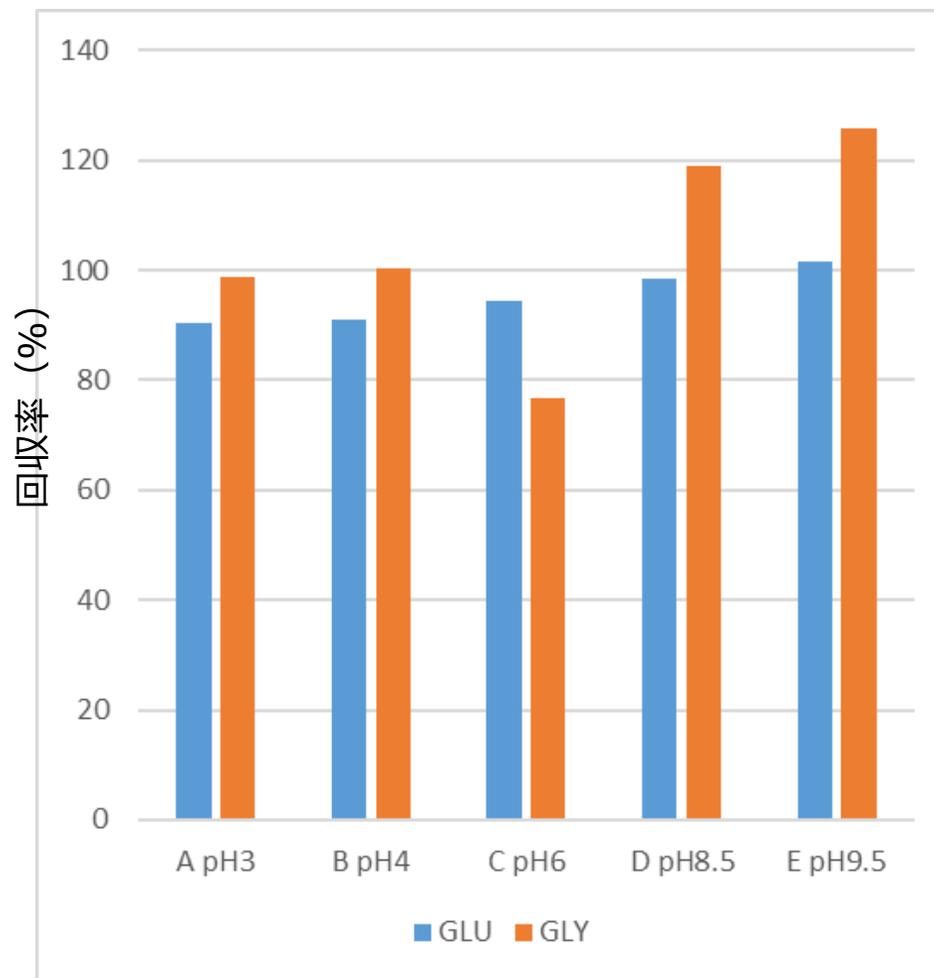


Fig. 抽出時のpH調整と回収率の関係

まとめ

- 抽出工程で酸性またはアルカリになるようにpH調整することで小麦粉でのグリホサートの回収率が向上することが分かった。

【次回】

前回の実験では抽出効率を向上させるために試料量を1gに減らしたが、次回は小麦粉の試料量を大豆と同じ**2g**として、**酸性・アルカリ抽出**での多段階添加回収率試験を行う。

グリホサート・グリホシネートの分析法の検討

中間報告_2020.02.04

佐々野
丸山

グリホサート・グリホシネートの分析法



株式会社アイスティサイエンス

Beyond your Imagination

AiSTI SCIENCE

物性

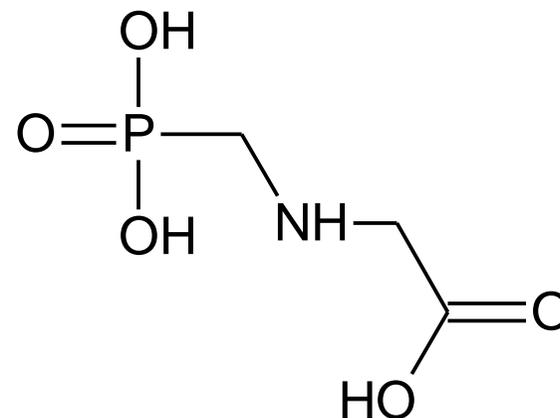
グリホサート : Glyphosate (GLY)

化学式 : $C_3H_8NO_5P$

分子量 : 169.1

LogPow = <-3.2 (pH 2-5, 20°C)

pKa = 5.77 ± 0.03 , 2.18 ± 0.02 (20 ± 0.2°C)



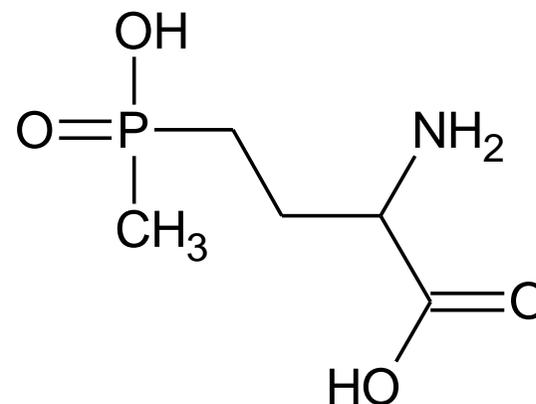
グルホシネート : Glufosinate (GLU)

化学式 : $C_5H_{12}NO_4P$

分子量 : 181.1

LogPow = <0.1 (pH 7, 22°C)

pKa1 <2 , pKa2 <2.9 , pKa3 <9.8



食品成分表と基準値



表1 食品成分表

可食部100g中に含まれる成分量 (g)

作物名	分類	水分	たんぱく質	でんぷん	脂質
ほうれん草	野菜類	92	2	0	0
大豆	豆類	12	34	1	19
小麦粉	穀類	14	8	73	2

表2 基準値

単位 : ppm

作物名	グルホシネート	グリホサート
ほうれん草	0.1	0.2
大豆	2	20
小麦	0.2	30

グリホサート・グリホシネートの分析法 (野菜や豆類の場合)



株式会社アイスティサイエンス

Beyond your Imagination

AiSTI SCIENCE

前処理 抽出フロー

水抽出&除タンパク

試料10 g (豆類2 g)

— 添加 **水15 mL** (豆類の場合：**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, 25倍希釈)

※水抽出

※除タンパク



50mL用遠沈チューブ

前処理 精製フロー



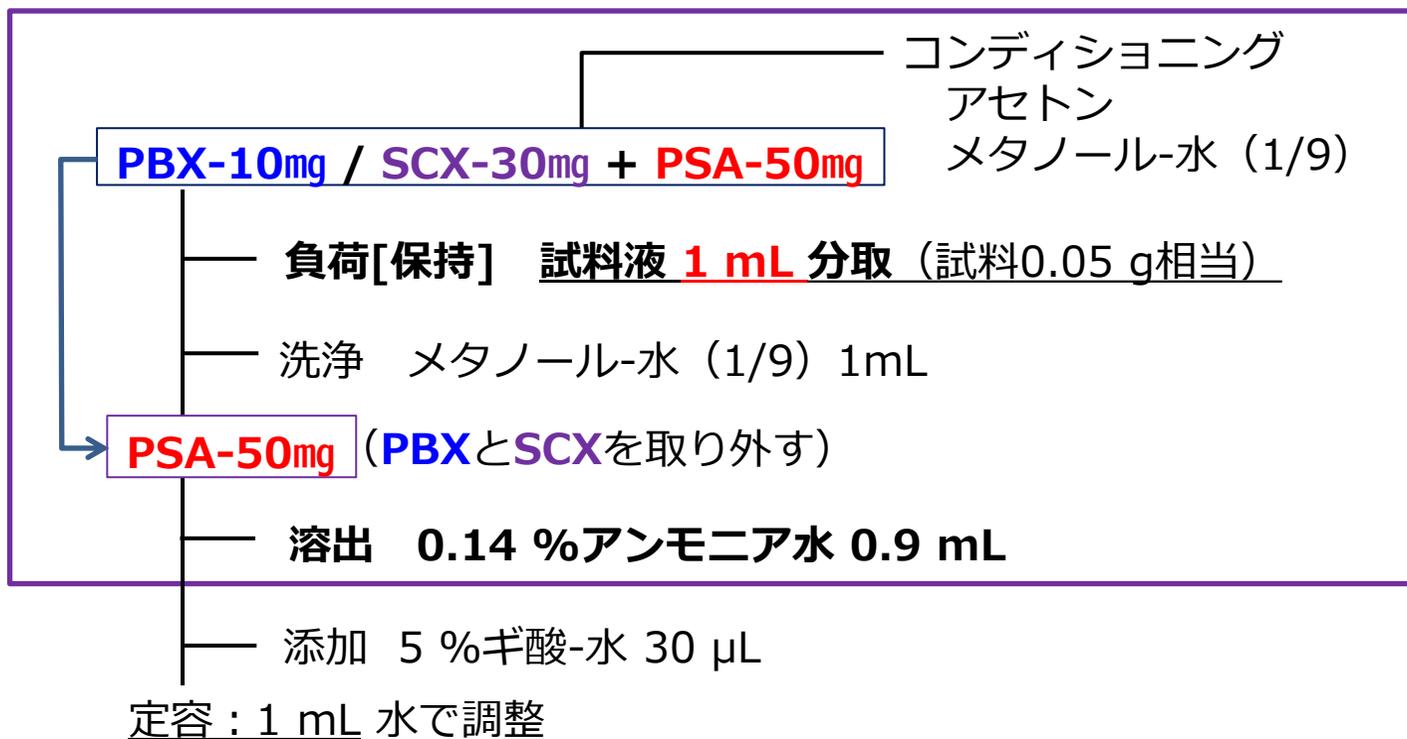
抽出上澄液 0.5 mL分取

添加 水 1.5 mL

試料液 2 mL (20倍希釈) ※12.5%アセトニトリル-水

☞ 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。

全自動固相抽出装置 ST-L400, 前処理時間: **11分**/検体



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：0.1 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) → 98 % (2-11 min) → 5 % (12-14 min)

注入量：5 μL

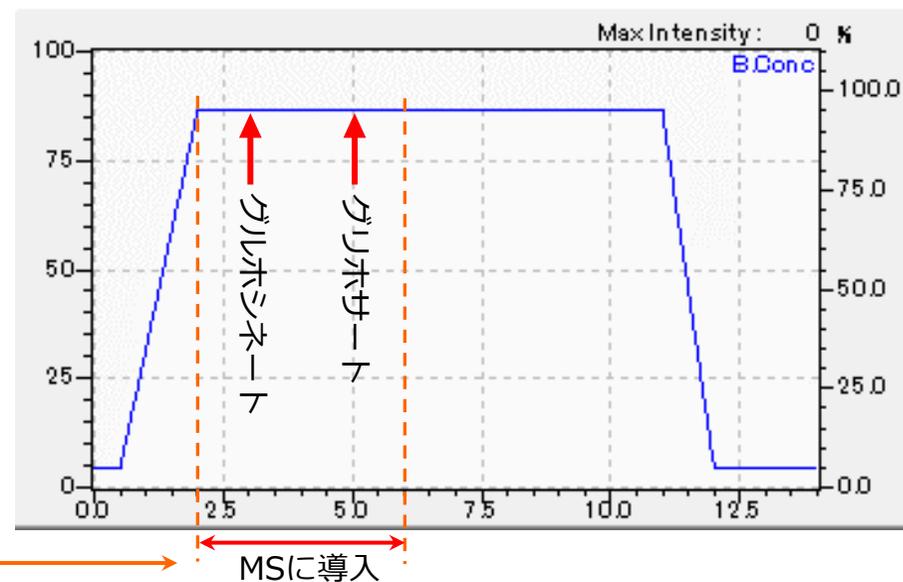
カラム温度：40 °C



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】

LC-MS/MS : LCMS-8045 (島津製作所)

イオン化モード : **ESI positive**

ネブライザーガス流量 : 3 L/min

ドラインガス流量 : 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

グリホサート・グリホシネートの分析法
(小麦粉と食パンの場合)
「デンプン」を多く含む食品の場合



株式会社アイスティサイエンス

Beyond your Imagination

AiSTI SCIENCE

食品成分表（炭水化物）

検索結果表示切替

<input type="radio"/> 一般成分-無機質-ビタミン類-アミノ酸-脂肪酸-炭水化物-有機酸等 可食部100g	脂肪酸	<input type="radio"/> 可食部100g <input type="radio"/> 脂質1g <input type="radio"/> 脂肪酸総量100g
	アミノ酸	<input type="radio"/> 可食部100g <input type="radio"/> 基準窒素1g <input type="radio"/> たんぱく質1g
	炭水化物（利用可能炭水化物、糖アルコール）	<input checked="" type="radio"/> 可食部100g
	有機酸	<input type="radio"/> 可食部100g

• (注意) 表示される値は、可食部100gあたりに含まれる成分を表す。

食品成分	水分	単糖当量	でんぷん	ぶどう糖	果糖	ガラクトース	しょ糖	麦芽糖	乳糖	トレハロース	利用可能炭水化物計	ソルビトール	マンニトール	重量	削除	
	単位	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g		
穀類/こむぎ/【玄穀】/国産/普通		12.5	64.3	57.5	0.1	0	-	0.9	0.1	(0)	(0)	58.5	-	-	<input type="text" value="100"/>	<input type="checkbox"/>
TOTAL		12.5	64.3	57.5	0.1	0	0	0.9	0.1	0	0	58.5	0	0	100	<input checked="" type="checkbox"/>

前処理 抽出フロー (小麦粉)

水抽出&除タンパク

小麦粉 1 g

— 添加 水 25 mL

手振とう 1分

— 添加 1 N NaOH 50 μ L

振とう抽出 10分

— 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 (50倍希釈)

※水抽出

※除タンパク



50mL用遠沈チューブ
 (写真はほうれんそうの場合)

前処理 抽出フロー (食パン)

水抽出&除タンパク

凍結粉砕 **食パン 2 g**

├ 添加 水 25 mL

手振とう 1分

├ **添加 1 N NaOH 50 μ L**

振とう抽出 10分

├ 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 (25倍希釈)

※水抽出

※除タンパク



50mL用遠沈チューブ
 (写真はほうれんそうの場合)

前処理 精製フロー



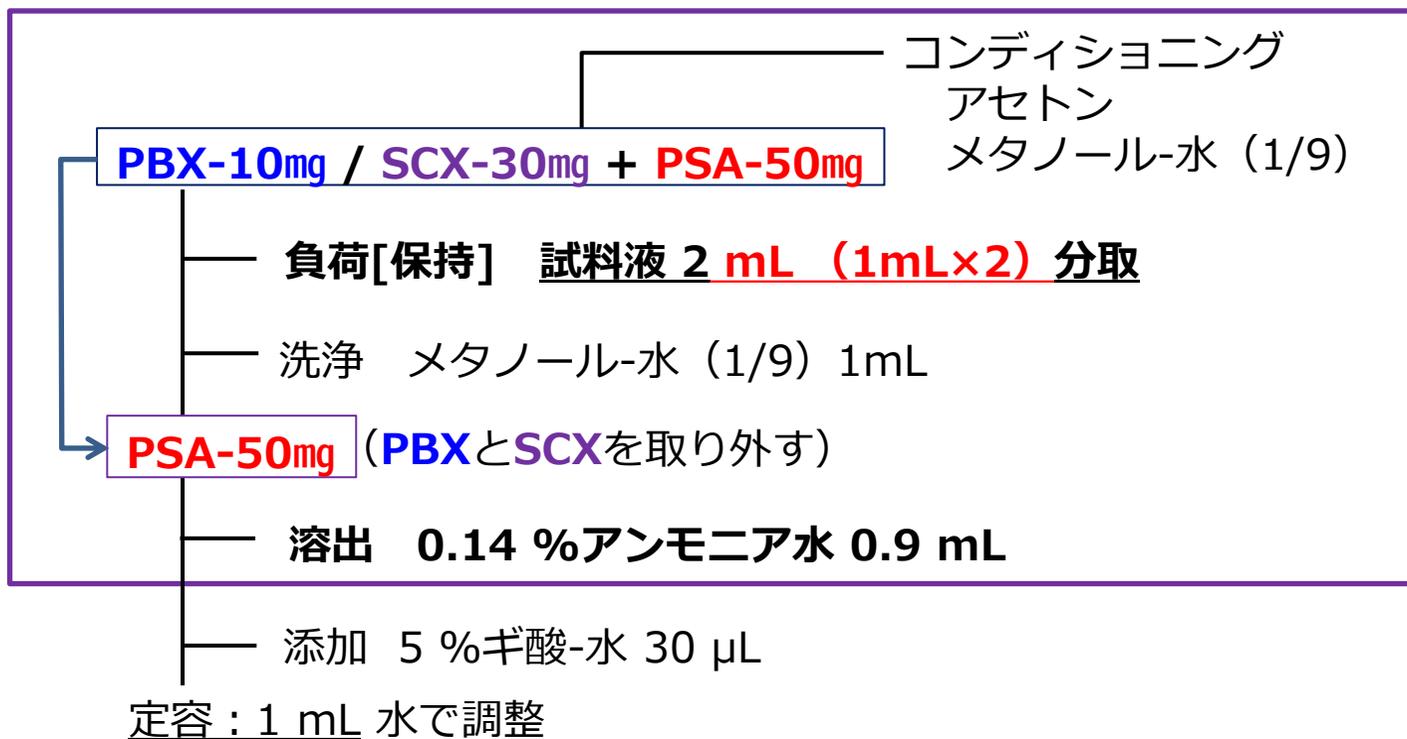
抽出上澄液 **0.75 mL**分取

添加 水**2.25 mL**

試料液 **3 mL** (抽出液 : 水 = **1:3**) ※12.5%アセトニトリル-水

☞ 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。

全自動固相抽出装置 ST-L400, 前処理時間:**11分**/検体



添加回収試験結果

	小麦	食パン
添加濃度 (ppm)	0.5	0.25
試料採取量 (g)	1.0	2.0
最終バイアル中濃度 (ppb)	5.0	5.0
グリホシネート (回収率, %)	99	97
グリホサート (回収率, %)	101	81

食パンからグリホサートが検出 0.06ppm (試料中濃度)