

グルホシネート試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

グルホシネート（D体及びL体）（代謝物Z【*N*-アセチルグルホシネート】を含む。）
代謝物B【3-メチルホスフィニコプロピオン酸】

2. 適用食品

農産物

3. 装置

穀類、豆類、種実類及びてんさいの場合は、炎光光度型検出器（リン用干渉フィルター）付きガスクロマトグラフ（GC-FPD (P)）及びガスクロマトグラフ・質量分析計（GC-MS）を用い、果実、てんさいを除く野菜及び茶の場合は、アルカリ熱イオン化検出器（GC-FTD）、GC-FPD (P)又は高感度窒素・リン検出器付きガスクロマトグラフ（GC-NPD）及びGC-MSを用いる。

4. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

カラムクロマトグラフィー用シリカゲル カラムクロマトグラフィー用に製造したシリカゲル（粒形63～200 μm）130℃で12時間以上加熱した後、デシケーター中で放冷する。これに対して水を5%加える。

グルホシネートアンモニウム標準品 本品はグルホシネートアンモニウム標準品95%以上を含む。

代謝物B標準品 本品は代謝物B 95%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 穀類、豆類、種実類及びてんさいの場合

① 抽出

穀類、豆類及び種実類の場合は、検体を420 μmの標準網ふるいを通して粉砕した後、その10.0 gを量り採る。これに水70 mLを加え、3分間細砕した後、水を加えて正確に150 mLとし、よく振り混ぜた後、静置し、水層20 mLを100 mLの分液漏斗に移す。

てんさいの場合は、検体約1 kgを精密に量り、必要に応じ適量の水を量って加え、細切均一化した後、検体20.0 gに相当する量を量り採る。これに水70 mLを加え、3分間細砕した後、水を加えて正確に150 mLとし、よく振り混ぜた後、静置し、水層20 mLを100 mLの分液漏斗に移す。

これにエーテル30 mLを加え、1分間緩やかに振り混ぜた後、静置し、エーテル層を捨てる。水層にエーテル30 mLを加え、1分間よく振り混ぜた後、静置し、水層15 mLを分取する。これに飽和酢酸鉛溶液1 mLを加え、時々振り混ぜながら5分間放置した後、毎分3,000回転で約5分間遠心分離を行い、上澄液を採る。

② 精製

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム (265 mg) の下にベンゼンスルホンプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) を、次いでその下にトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (1,000 mg) を連結する。これにアセトニトリル10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで水10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに① 抽出で得られた上澄液を注入し、水10 mLを注入し、流出液を捨てた後、スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム (265 mg) 及びベンゼンスルホンプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) を分離して捨てる。トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (1,000 mg) に酢酸及び水の混液 (1 : 1) 10 mLを注入し、溶出液をすり合わせ減圧濃縮器に採り、50℃以下で酢酸及び水を除去する。

③ 誘導体化

② 精製で得られた残留物に酢酸0.2 mL、オルト酢酸トリメチル0.8 mLを加えて溶かし、密栓をして100℃で2時間加熱した後、放冷し、窒素気流下で乾固する。この残留物にアセトンを加えて溶かし、正確に0.5 mLとして、これを試験溶液とする。

2) 果実、てんさいを除く野菜及び茶の場合

① グルホシネート試験溶液

a 抽出

果実及びてんさいを除く野菜の場合は、検体約1 kgを精密に量り、必要に応じ適量の水を量って加え、細切均一化した後、検体20.0 gに相当する量を量り採る。これにジクロロメタン50 mL及び水150 mLを加え、振とう機を用いて30分間激しく振り混ぜた後、毎分3,000回転で約5分間遠心分離を行い、上澄液を300 mLの三角フラスコに移す。沈殿に水50 mLを加え、よく振り混ぜた後、上記と同様の条件で遠心分離を行い、上澄液を上記の三角フラスコに合わせる。これをろ過し、ろ液に水を加えて500 mLとする。

抹茶の場合は、検体5.00 gを量り採る。これに水100 mLを加え、振とう機を用いて30分間激しく振り混ぜた後、毎分3,000回転で約5分間遠心分離を行い、上澄液を300 mLの三角フラスコに移す。沈殿に水50 mLを加え、よく振り混ぜた後、上記と同様の条件で遠心分離を行い、上澄液を上記の三角フラスコに合わせる。これに飽和酢酸鉛溶液4 mLを加え、時々振り混ぜながら5分間放置した後、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いて1,000 mLのナス型フラスコに吸引ろ過する。次いで水50 mLを用いて三角フラスコを洗い、

その洗液でろ紙上の残留物を洗う。洗液を上記のナス型フラスコに合わせる。これを1,000 mLの分液漏斗に移し、ジクロロメタン100 mLを加え、1分間緩やかに振り混ぜた後、静置し、ジクロロメタン層を捨てる。水層にジクロロメタン100 mLを加え、上記と同様に操作して、ジクロロメタン層を捨てる。水層に酢酸エチル100 mLを加え、1分間緩やかに振り混ぜた後、静置し、水層を採り、水を加えて500 mLとする。

抹茶以外の茶の場合は、検体10.0 gを100°Cの水600 mLに浸し、室温で5分間放置した後、ろ過し、冷後ろ液300 mLを500 mLの三角フラスコに移す。これに飽和酢酸鉛溶液4 mLを加え、時々振り混ぜながら5分間放置した後、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いて1,000 mLのナス型フラスコに吸引ろ過する。次いで水50 mLを用いて三角フラスコを洗い、その洗液でろ紙上の残留物を洗う。洗液を上記のナス型フラスコに合わせる。これを1,000 mLの分液漏斗に移し、ジクロロメタン100 mLを加え、1分間緩やかに振り混ぜた後、静置し、ジクロロメタン層を捨てる。水層にジクロロメタン100 mLを加え、上記と同様に操作して、ジクロロメタン層を捨てる。これに酢酸エチル100 mLを加え、1分間緩やかに振り混ぜた後、静置し、水層を採り、水を加えて500 mLとする。

b 誘導体化

内径15 mm、長さ300 mmのクロマトグラフ管に、強塩基性陰イオン交換樹脂（粒径149～297 μm）20 mLを水に懸濁したものを入れ、カラムの上端に少量の水が残る程度まで水を流出させる。このカラムに1 mol/L水酸化ナトリウム溶液40 mLを注入し、さらに流出液のpHが8～9になるまで水を注入する。流出液は捨てる。次いで酢酸及び水の混液（1：9）40 mLを注入し、さらに流出液のpHが5になるまで水を注入する。流出液は捨てる。続いて酢酸及び水の混液（1：1）80 mLを注入し、さらに水100 mLを注入する。流出液は捨てる。このカラムにa 抽出で得られた溶液を注入し、流出液は捨てる。次いで酢酸及び水の混液（1：9）200 mLを注入し、最初の流出液50 mLは捨て、次の溶出液150 mLをすり合わせ減圧濃縮器中に採り、50°C以下で酢酸及び水を除去する。この残留物に酢酸1 mLを、次いでオルト酢酸トリメチル4 mLを加え、100°Cで2時間加熱する。冷後これをすり合わせ減圧濃縮器中に移し、40°C以下で約1 mLに濃縮し、さらに室温で窒素を通じて乾固する。この残留物にアセトン10 mLを加えて溶かす。

c 精製

内径10 mm、長さ300 mmのクロマトグラフ管に、カラムクロマトグラフィー用シリカゲル3 gをアセトンに懸濁したものを入れ、カラムの上端に少量のアセトンが残る程度までアセトンを流出させる。このカラムにb 誘導体化で得られた溶液を注入した後、アセトン70 mLを注入し、流出液は捨てる。次いでアセトン及び水の混液（19：1）80 mLを注入し、溶出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、40°C以下でアセトン及び水を除去する。

この残留物に酢酸エチルを加えて溶かし、正確に2 mLとして、これをグルホシネート試験溶液とする。

② 代謝物B試験溶液

a 抽出

① グルホシネート試験溶液のa 抽出を準用する。

b メチル化

内径15 mm、長さ300 mmのクロマトグラフ管に、強塩基性陰イオン交換樹脂（粒径149～297 μm）20 mLを水に懸濁したものを入れ、カラムの上端に少量の水が残る程度まで水を流出させる。このカラムに1 mol/L水酸化ナトリウム溶液40 mLを注入し、さらに流出液のpHが8～9になるまで水を注入する。流出液は捨てる。次いで酢酸及び水の混液（1：9）40 mLを注入し、さらに流出液のpHが5になるまで水を注入する。流出液は捨てる。続いて酢酸及び水の混液（1：1）80 mLを注入し、さらに水100 mLを注入する。流出液は捨てる。このカラムにa 抽出で得られた溶液を注入し、流出液は捨てる。次いで酢酸及び水の混液（1：9）200 mLを注入し、さらに酢酸及び水の混液（3：7）50 mLを注入し、流出液は捨てる。続いて酢酸及び水の混液（1：1）150 mLを注入し、溶出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、50℃以下で酢酸及び水を除去する。この残留物に酢酸1 mLを、次いでオルト酢酸トリメチル4 mLを加え、100℃で2時間加熱する。冷後これをすり合わせ減圧濃縮器中に移し、40℃以下で約1 mLに濃縮し、さらに室温で窒素を通じて乾固する。この残留物にアセトン10 mLを加えて溶かす。

c 精製

内径10 mm、長さ300 mmのクロマトグラフ管に、カラムクロマトグラフィー用シリカゲル3 gをアセトンに懸濁したものを入れ、カラムの上端に少量のアセトンが残る程度までアセトンを流出させる。このカラムにb メチル化で得られた溶液を注入した後、アセトン100 mLを注入し、最初の流出液20 mLは捨て、次の溶出液80 mLをすり合わせ減圧濃縮器中に採り、40℃以下でアセトンを除去する。この残留物に酢酸エチルを加えて溶かし、正確に4 mLとして、これを代謝物B試験溶液とする。

6. 検量線の作成

1) 穀類、豆類、種実類及びてんさいの場合

グルホシネートアンモニウム及び代謝物Bの各標準品について、5. 試験溶液の調製の1) 穀類、豆類、種実類及びてんさいの場合の② 精製及び③ 誘導體化と同様に操作したものを検量線用標準溶液として、それぞれGC-FPD又はGC-MSに注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。

2) 果実、てんさいを除く野菜及び茶の場合

グルホシネートアンモニウム標準品について5. 試験溶液の調製の2) 果実、てんさいを除く野菜及び茶の場合の① グルホシネート試験溶液のb 誘導体化及びc 精製と同様に操作して得られたもの、並びに代謝物B標準品について、5. 試験溶液の調製の2) 果実、てんさいを除く野菜及び茶の場合の②代謝物B試験溶液のb メチル化及びc 精製と同様に操作して得られたものを検量線用標準溶液として、それぞれGC-FTD、GC-FPD、GC-NPD又はGC-MSに注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。

7. 定量

穀類、豆類、種実類及びてんさいの場合は、試験溶液をGC-FPD又はGC-MSに注入し、果実、てんさいを除く野菜及び茶の場合は、試験溶液をGC-FTD、GC-FPD、GC-NPD又はGC-MSに注入し、6. の検量線でグルホシネートアンモニウム（代謝物Zを含む。）及び代謝物Bの含量を求め、次式により、代謝物Z及び代謝物Bを含むグルホシネート（D体及びL体）の含量を求める。

$$\text{グルホシネート（D体及びL体）（代謝物Z及び代謝物Bを含む。）の含量（ppm）} = A \times 0.9141 + B \times 1.191$$

A：グルホシネートアンモニウム（代謝物Zを含む。）の含量（ppm）

B：代謝物Bの含量（ppm）

8. 確認試験

GC-MSにより確認する。

9. 測定条件

(例)

カラム：内径0.25 mm、長さ30 mのケイ酸ガラス製の細管に、ガスクロマトグラフィー用50%フェニルーメチルシリコンを0.25 µmの厚さでコーティングしたもの。

カラム温度：100℃で1分間保持し、その後毎分10℃で昇温し、260℃に到達後3分間保持する。

注入口温度：250℃

注入方法：スプリットレス

検出器温度：270℃

ガス流量：キャリアーガスとしてヘリウムを用いる。2-アセチルアミノ-4-[メトキシ（メチル）ホスフィノイル]プロピオナートが約14分で流出する流速に調整する。空気及び水素の流量を至適条件に調整する。

10. 定量限界

0.01 mg/kg (穀類、豆類、種実類及びてんさいにあつては0.05 mg/kg)

11. 留意事項

1) 試験法の概要

穀類、豆類、種実類及びてんさいの場合は、グルホシネート (D体及びL体) (代謝物Zを含む) 及び代謝物Bを試料から水で抽出し、エーテルで洗浄した後、飽和酢酸鉛溶液で精製する。スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム、ベンゼンスルホンプロピルシリル化シリカゲルミニカラム及びトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、オルト酢酸トリメチルで誘導体化し、GC-FPD又はGC-MSにより定量し、GC-MSで確認する方法である。

果実及びてんさいを除く野菜の場合は、グルホシネート (D体及びL体) (代謝物Zを含む) 及び代謝物Bを試料からジクロロメタン存在下水で抽出する。抹茶の場合は、試料から水で抽出し、抹茶以外の茶の場合は、試料から100℃の水で浸出し、飽和酢酸鉛溶液で精製した後、ジクロロメタン、次いで酢酸エチルで洗浄する。強塩基性陰イオン交換樹脂で精製し、オルト酢酸トリメチルで誘導体化した後、シリカゲルカラムで精製し、GC-FTD、GC-FPD、GC-NPD又はGC-MSにより定量し、GC-MSで確認する方法である。

2) 注意点

① 分析値

グルホシネートアンモニウム (代謝物Zを含む。) 及び代謝物Bのそれぞれについて定量を行い、グルホシネートアンモニウム (代謝物Zを含む。) の含量及び代謝物Bの含量にそれぞれ換算係数を乗じてグルホシネート (D体及びL体) (代謝物Z及び代謝物Bを含む。) の含量に換算し、これらの和を分析値とする。なお、グルホシネートには、グルホシネートアンモニウム塩が含まれる。

② 穀類、豆類、種実類及びてんさいを試験する際に用いるベンゼンスルホンプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) には、粒径120 µmのものを用いることが望ましい。またガスクロマトグラフ検出器に炎光光度型検出器を用いる場合は、カラムに内径0.53 mm、長さ30 m、膜厚1.0 µmのものを用いることも可能である。

12. 参考文献

なし

13. 類型

A