

食品中のグリホサート及びグルホシネートの分析法の開発

○ 佐々野 僚一^{1) 2)}、小西 賢治²⁾、渡辺 淳³⁾、伊藤 里恵¹⁾、穂山 浩¹⁾

¹⁾星薬科大学薬学部、²⁾(株) アイスティサイエンス、³⁾(株) 島津製作所



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

それゆえ、食品中の残留が懸念されており、農薬の適正な散布や食の安全の確認のためにも、食品中のGlyやGluの代謝物を含めた一斉分析が求められている。

しかしながら、これらの物質はイオン性を伴う高極性であるため、分析が難しい。

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

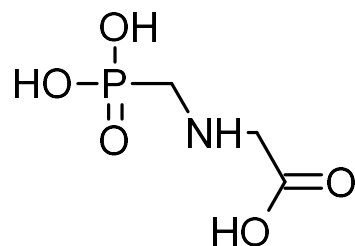
- グリホサート
大豆・とうもろこし・なたね
- ・ グリホサート
- ・ N-アセチルグリホサート
- グルホシネート
穀類・豆类・種実類
- ・ グルホシネート
- ・ 3-メチルホスフィニコプロピオン酸 (MPPA)
- ・ N-アセチルグルホシネート

目的

本研究では、食品中のグリホサート (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。

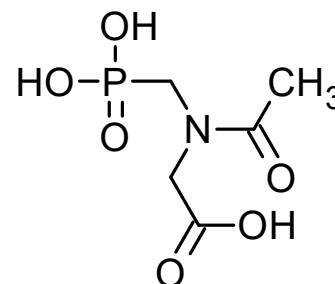
測定対象成分

グリホサートとその代謝物



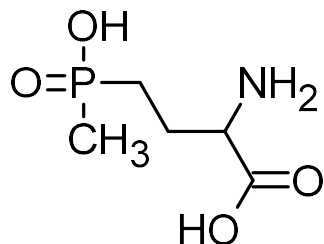
分子量 : 169.1
 水溶解度 : 11 g/L
 LogPow = <-3.4
 pKa = 5.7, 2.2

■ Glyphosate ; **Gly**



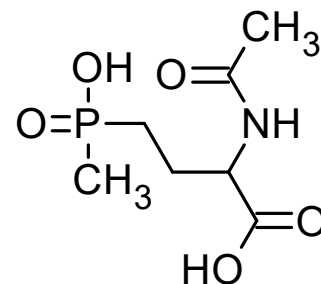
● N-Acetyl glyphosate ; **Gly-A**

グルホシネートとその代謝物

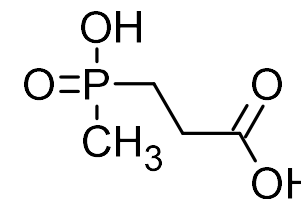


分子量 : 181.1
 水溶解度 : 1370 g/L
 LogPow = <-4.0
 pKa = 9.8, 2.9, 2

■ Glufosinate ; **Glu**



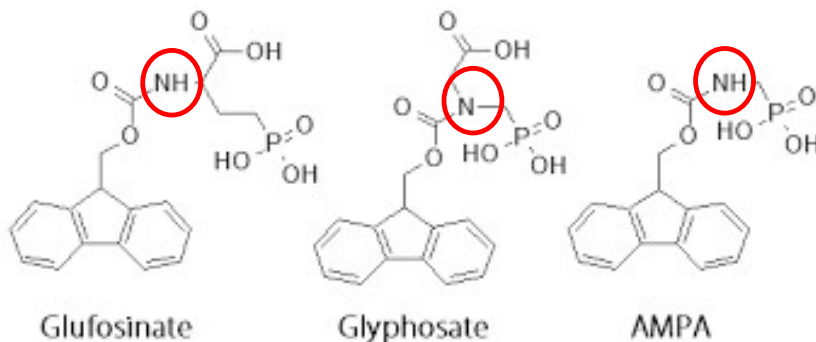
● N-Acetyl glufosinate ; **Glu-A**



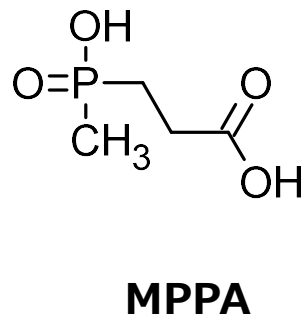
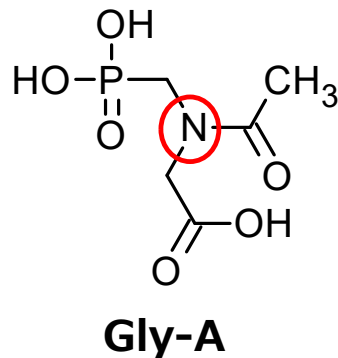
● **MPPA**
 3-(Methylphosphinico)
 Propionic Acid

FMOCによる誘導体化について

クロロギ酸9-フルオレニルメチル (FMOC) による誘導体化



一級アミンおよび二級アミンに誘導体化する。



3級アミンの「Gly-A」とアミンを持たない「MPPA」は誘導体化できない。



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)

前処理 抽出フロー

例：大豆

凍結粉碎した試料 穀類・豆類 2 g

添加 **水 25 mL**

振とう抽出 10分

添加 **アセトニトリル 約25 mL**

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



変性タンパク質

試料固形物

遠心後

参考文献

1) 佐々野ら, 第42回農薬残留分析研究会講演要旨集, P117-124, 2019

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 (100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

PBX-10mg / SCX-30mg + PSA-50mg

コンディショニング
アセトン
メタノール-水 (1/9)

負荷[保持] 試料液 **1 mL** 分取 (試料:0.01g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 10 %ギ酸-水 20 μ L

定容: 1 mL 水で調整 (100倍希釈)

※ PBX:HLB相当

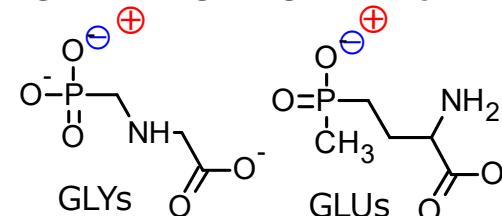
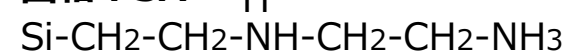
参考文献

- 永富ら、第35回農薬残留分析研究会講演要旨集, P92-97, 2012
- 小西ら、第36回農薬残留分析研究会講演要旨集, P119-124, 2013

固相PSAによる保持と溶出

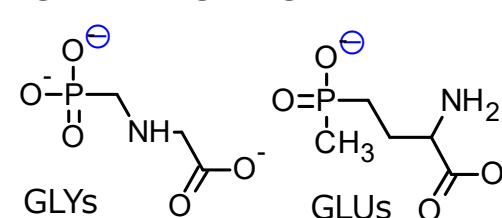
■ 環境が**中性**では**保持**

固相 PSA



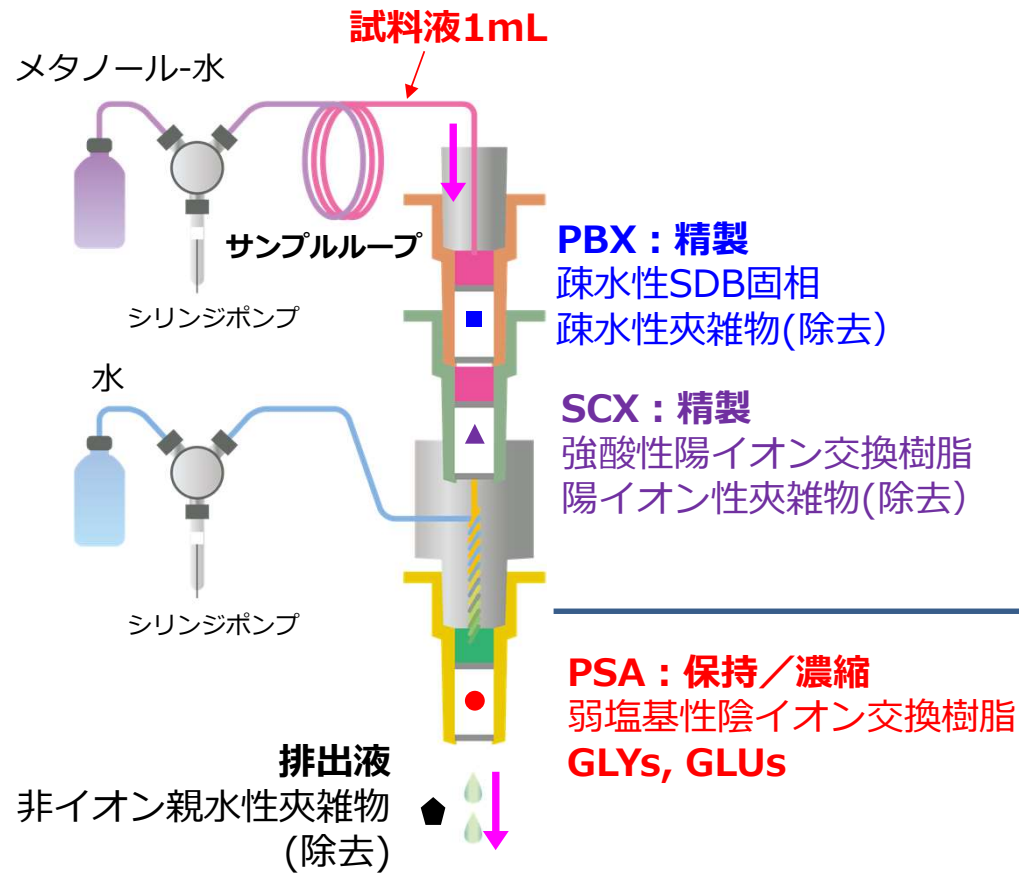
■ 環境が**アルカリ性**では**脱離(溶出)**

固相 PSA

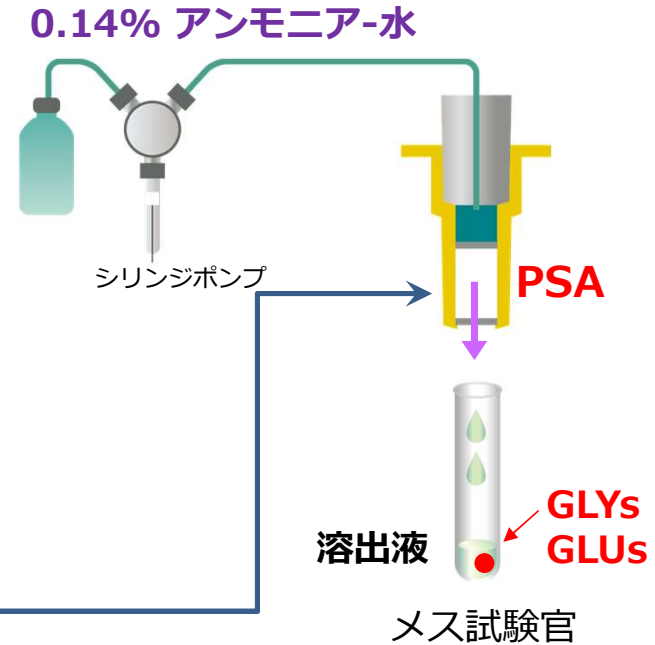


精製工程

Step1 精製&保持



Step2 溶出



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 : 1% ギ酸-アセトニトリル

B液 : 1% ギ酸-水



材質 : PEEK樹脂

グラジエント : B.Conc 5 %(1 min)→95 %(3-19 min)→5 %(20-24 min)

流速 : 0.8 mL/min

注入量 : 2~20 μ L

カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

【MS条件】

イオン化モード : **ESI Positive/Negative**

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

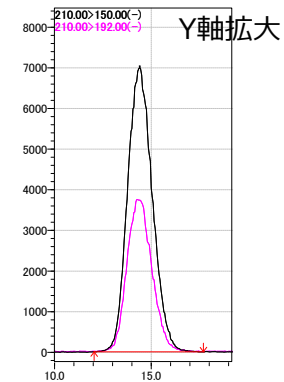
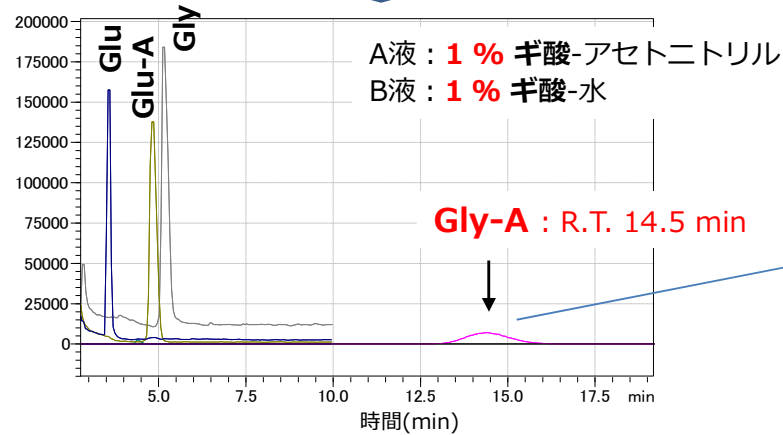
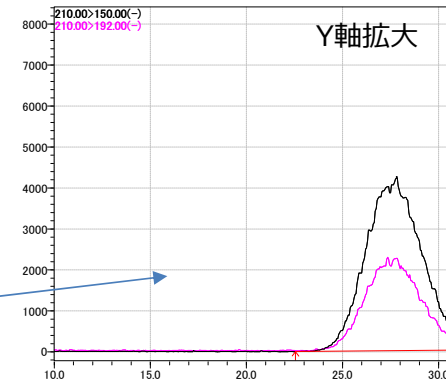
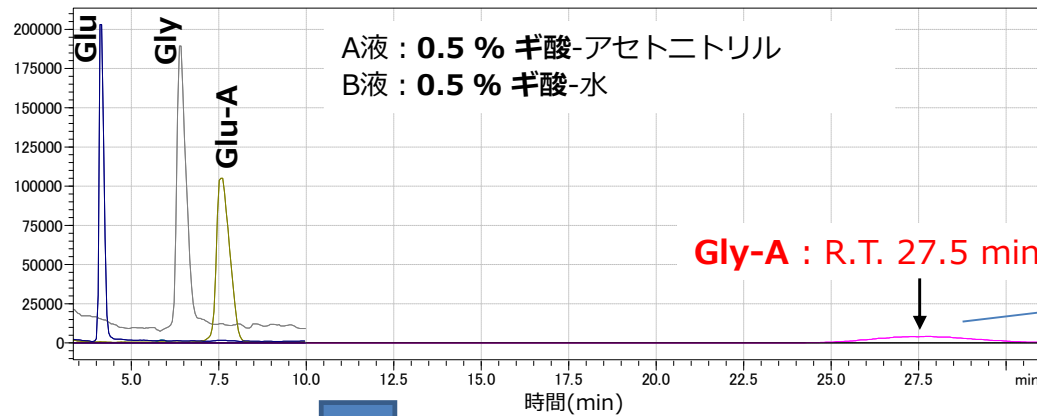
インターフェース温度 : 400 $^{\circ}$ C

DL温度 : 150 $^{\circ}$ C

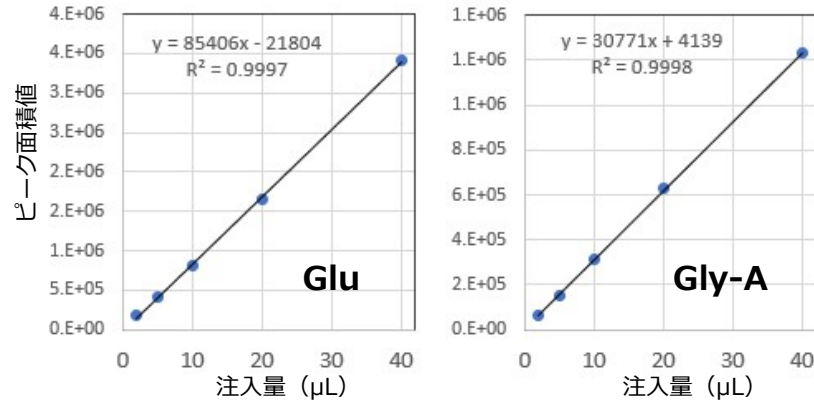
ヒートブロック温度 : 350 $^{\circ}$ C

測定条件の検討：移動相について

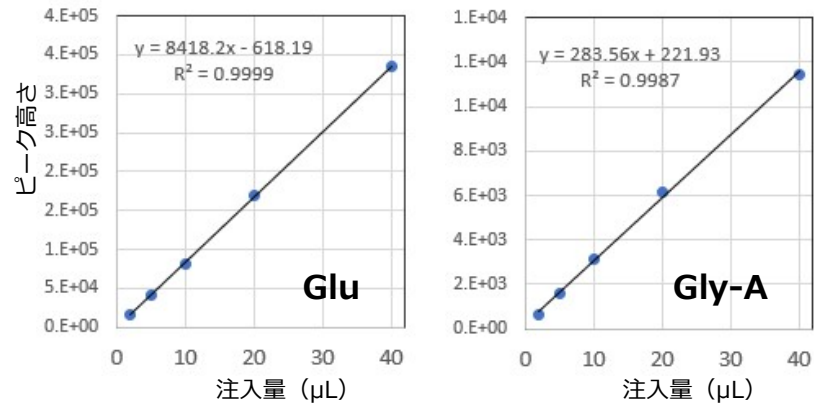
■ 移動相のギ酸濃度とMSクロマトグラム比較



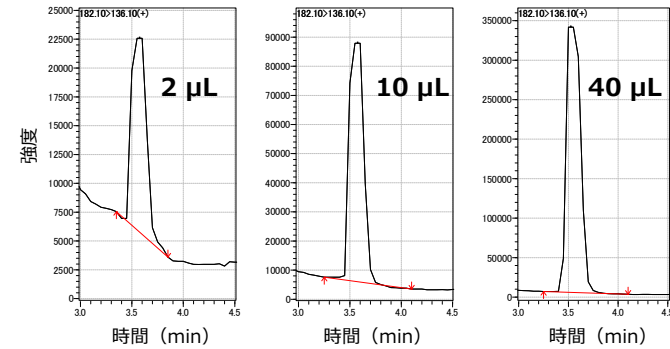
測定条件の検討：注入量について



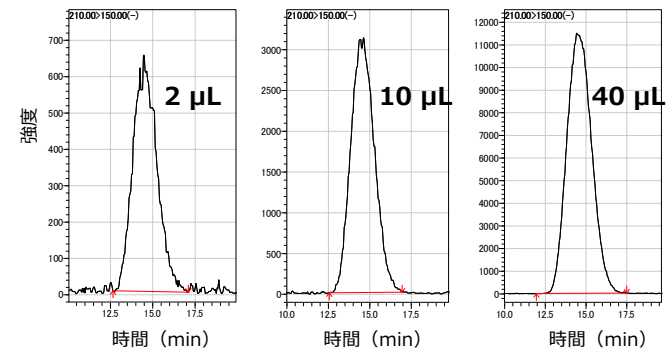
■ 注入量とピーク面積値の関係



■ 注入量とピーク高さの関係



■ Gluの注入量と定量イオンクロマトグラム



■ Gly-Aの注入量と定量イオンクロマトグラム

絶対検量線

Gly / Gly-A

バイアル中濃度 :

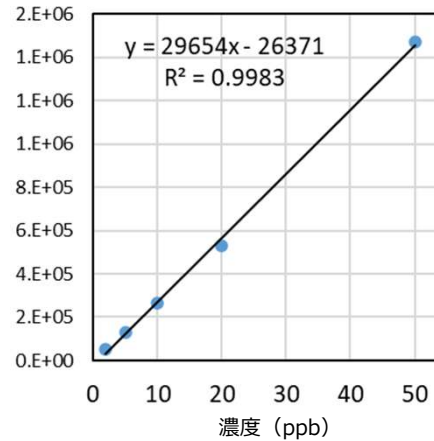
2, 5, 10, 20, 50 ppb

Glu / MPPA / Glu-A

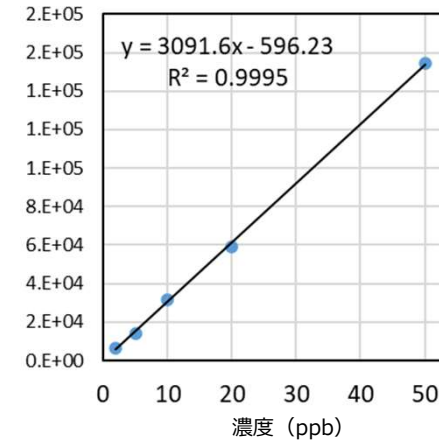
バイアル中濃度 :

0.4, 1, 2, 4, 10 ppb

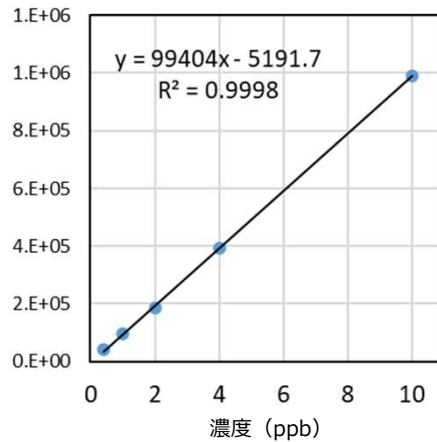
注入量 : 20 μ L



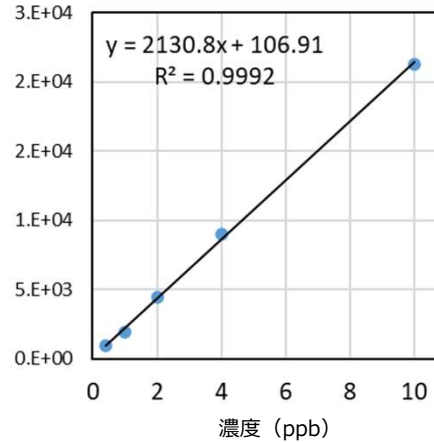
Gly



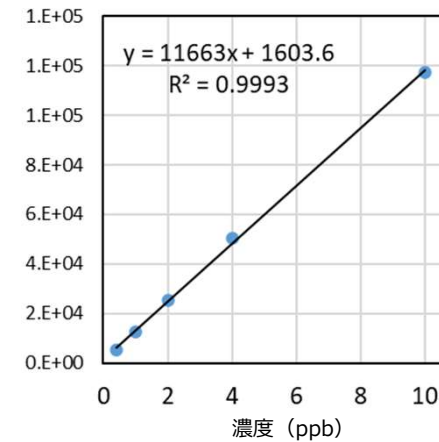
Gly-A



Glu

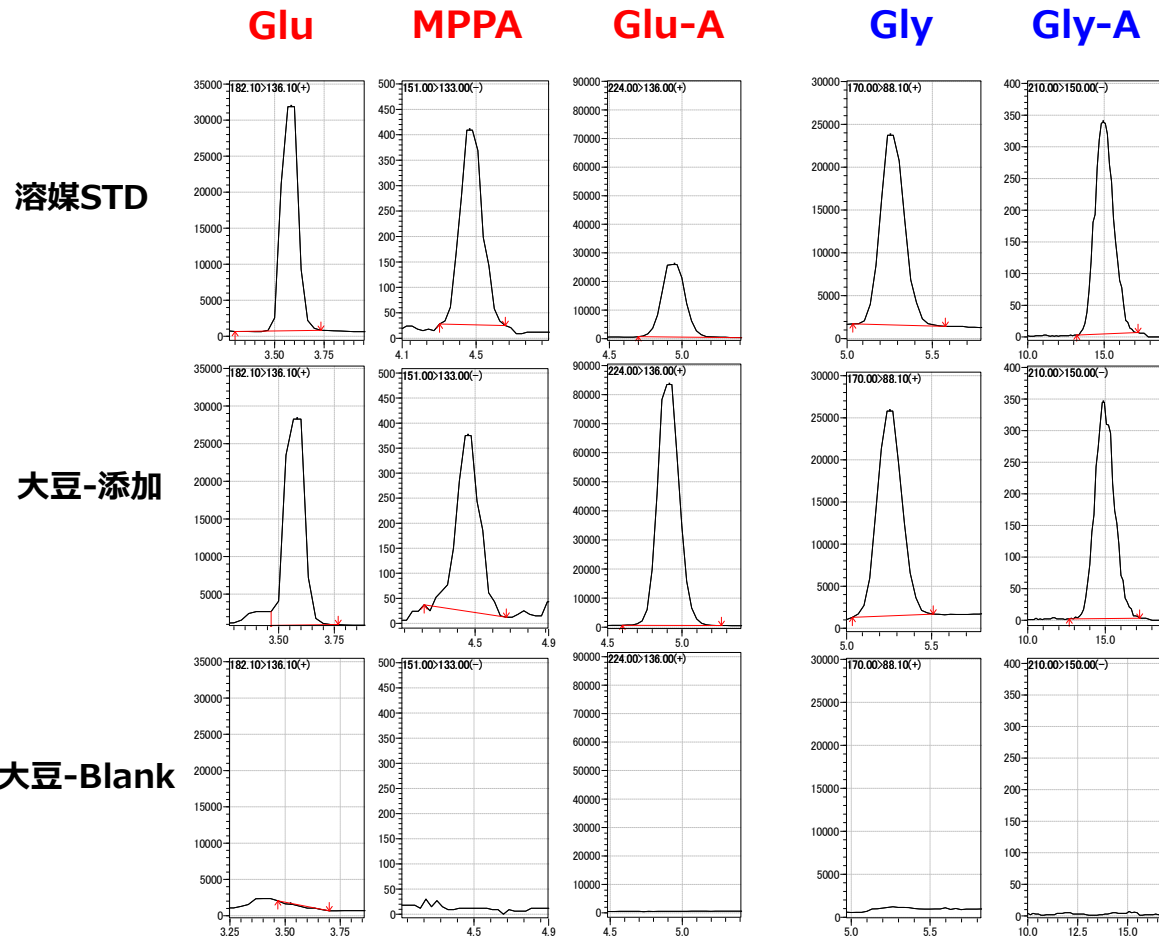


MPPA



Glu-A

MRM定量イオンクロマトグラム比較：大豆



サンプル：大豆

Glu / MPPA / Glu-A

バイアル中濃度：2 ppb

試料中添加濃度：0.2 ppm

(残留農薬基準値：2 ppm)

Gly / Gly-A

バイアル中濃度：10 ppb

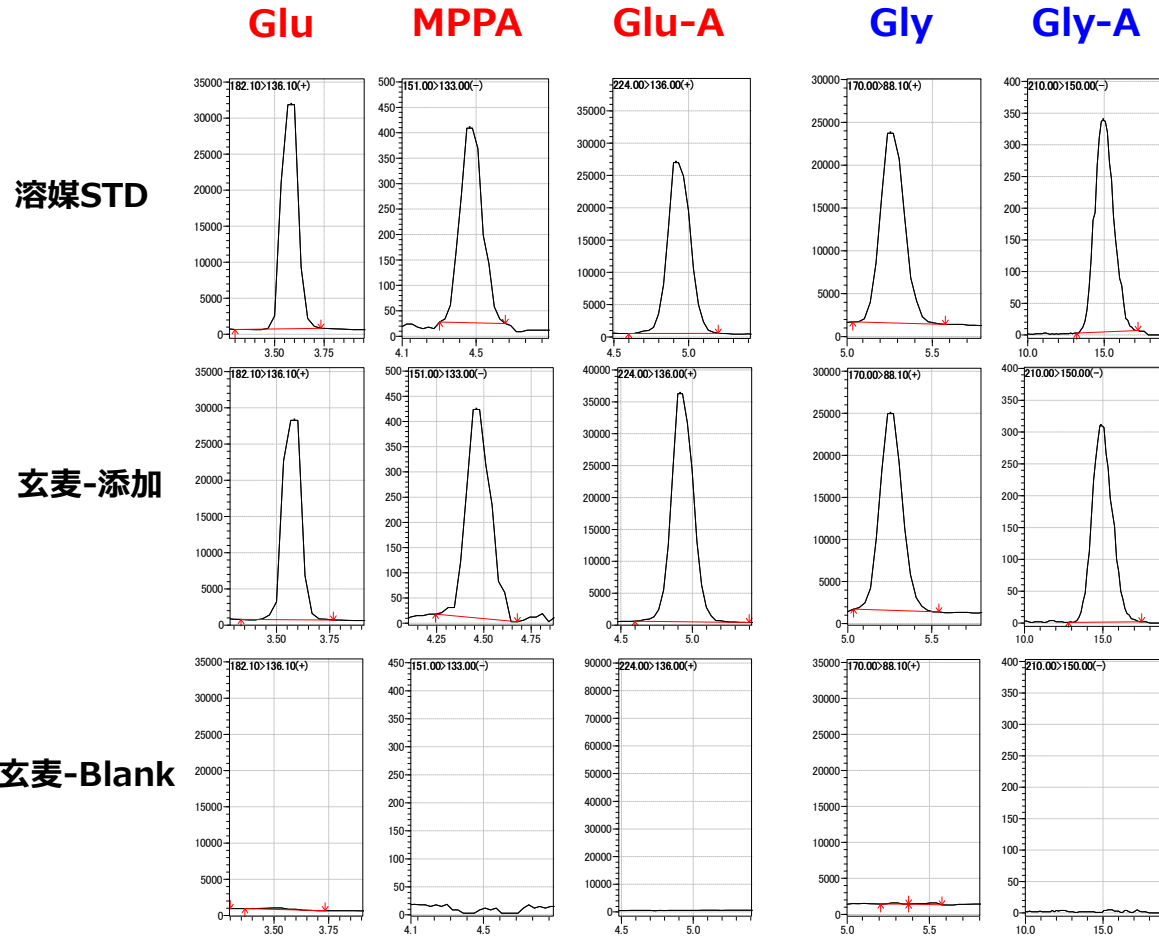
試料中添加濃度：1 ppm

(残留農薬基準値：20 ppm)

※成分毎のY軸スケール（面積値）を同一で表示

※Gly-AのみX軸スケール（時間，min）を大幅に短縮

MRM定量イオンクロマトグラム比較：玄麦



サンプル：玄麦

Glu / MPPA / Glu-A

バイアル中濃度：2 ppb

試料中添加濃度：0.2 ppm

(残留農薬基準値：0.2 ppm)

Gly / Gly-A

バイアル中濃度：10 ppb

試料中添加濃度：1 ppm

(残留農薬基準値：30 ppm)

※成分毎のY軸スケール(面積値)
を同一で表示

※Gly-AのみX軸スケール(時間,
min)を大幅に短縮して表示

添加回収試験結果：大豆

大豆の添加回収試験	農薬	Glyphosate		Glufosinate		
	基準値	20 ppm		2 ppm		
	試料中添加濃度	10 ppm		1 ppm		
	バイアル中濃度	100 ppb		10 ppb		
サンプル	測定成分	Gly	Gly-A	Glu	MPPA	Glu-A
		Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.
スタンダード (溶媒STD)	S	393,356	64,817	174,174	5,169	48,649
大豆_Blank	U	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
大豆_前処理後添加 (マトリックスSTD)	M	460,208	78,595	188,318	5,398	41,588
大豆_添加	A1	434,608	78,555	149,606	4,395	47,756
	A2	429,721	79,972	140,624	5,811	48,692
	A3	437,332	77,674	135,971	5,269	47,380
	A4	423,691	78,091	129,898	4,817	50,262
	A5	441,917	76,537	142,239	5,377	51,331
試料採取量 2 g	Ave.	433,454	78,166	139,668	5,134	49,084
	RSD, %	1.6	1.6	5.3	10.6	3.4
	回収率, %	110	121	80	99	101
	マトリックスSTD	94	99	74	95	118

試料：国産大豆

- ・ 注入量：2 μ L
- ・ グラジエント条件変更
- ・ Glu-AをNeg.に変更

※ 添加濃度を基準値の半分まで上げた。

添加回収試験結果：玄麦

試料：国産玄麦

・注入量：20 μL

玄麦の添加回収試験	農薬	Glyphosate		Glufosinate		
	基準値	30 ppm		0.2 ppm		
	試料中添加濃度	1 ppm		0.2 ppm		
	バイアル中濃度	10 ppb		2 ppb		
サンプル	測定成分	Gly	Gly-A	Glu	MPPA	Glu-A
		Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.
スタンダード (溶媒STD)	S	218,775	29,622	188,920	3,727	291,158
玄麦_Blank	U	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
玄麦_前処理後添加 (マトリックスSTD)	M	235,905	29,850	203,829	3,670	301,040
玄麦_添加 試料採取量 2 g	A1	210,355	28,129	165,706	3,519	354,144
	A2	218,973	28,021	174,626	3,784	387,005
	A3	198,380	28,341	156,234	3,185	378,519
	A4	197,104	27,701	155,274	3,136	383,588
	A5	208,164	26,492	154,594	3,273	344,115
	<i>Ave.</i>	<i>206,595</i>	<i>27,737</i>	<i>161,287</i>	<i>3,379</i>	<i>369,474</i>
	<i>RSD, %</i>	<i>4.4</i>	<i>2.6</i>	<i>5.4</i>	<i>8.0</i>	<i>5.2</i>
回収率, %	溶媒STD	94	94	85	91	127
	マトリックスSTD	88	93	79	92	123



添加回収試験結果：とうもろこし（爆裂種）

とうもろこし の添加回収試験	農薬	Glyphosate		Glufosinate		
	基準値	5 ppm		0.1 ppm		
	試料中添加濃度	1 ppm		0.1 ppm		
	バイアル中濃度	10 ppb		1 ppb		
サンプル	測定成分	Gly	Gly-A	Glu	MPPA	Glu-A
		Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.
スタンダード（溶媒STD）	S	438,852	59,368	196,063	4,427	299,444
とうもろこし_Blank	U	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
大豆_前処理後添加（マトリックスSTD）	M	448,972	71,622	195,328	4,912	317,501
とうもろこし_添加 試料採取量 2 g	A1	362,912	60,021	153,607	4,662	325,663
	A2	426,036	61,454	153,696	4,511	320,852
	A3	437,766	63,103	148,006	4,278	331,423
	A4	405,338	64,168	144,319	3,944	309,415
	A5	427,628	63,339	154,976	4,184	304,345
	Ave.	411,936	62,417	150,921	4,316	318,340
	RSD, %	7.2	2.7	3.0	6.5	3.5
回収率, %	溶媒STD	94	105	77	97	106
	マトリックスSTD	92	87	77	88	100

試料：有機栽培とうもろこし
（遺伝子組み換えでない）

・注入量：20 μL

まとめ

本研究では、食品中のGlyおよびGluとそれらの代謝物であるGly-A、MPPA、Glu-Aを含めた簡易な一斉分析法を開発した。

- 測定において、Gly-Aのリテンションタイムが極端に遅く、ピークの幅も広がり、感度不足が懸念されたが、移動相のギ酸濃度を上げることで、リテンションタイムが短縮し、ピーク強度が向上した。
- 注入量は40 μ Lに増加しても、ピーク形状を崩さずに感度を向上することができた。
- 絶対検量線法において相関係数0.998以上の良好な検量線が得られた。
- 大豆、玄麦、とうもろこしを用いて添加回収試験を行った結果、全ての分析対象物質において併行精度10%以下の良好な結果が得られた。回収率についてもいずれも良好な結果を得られた。

本法は、安定同位体標準品やマトリックス標準品を用いておらず、簡易で信頼性の高いGlyおよびGluの代謝物を含めた一斉分析を可能とした。