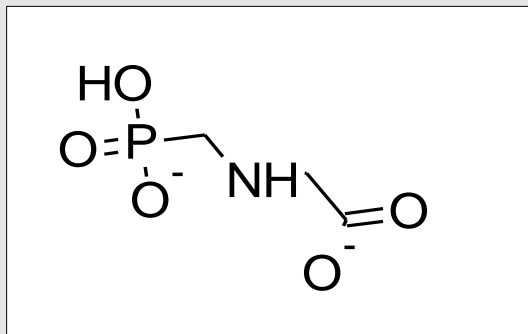


グリホサートおよびグルホシネートの 分析の自動化の検討

○小西賢治、栢木春奈、佐々野僚一
株式会社アイスティサイエンス

構造と性質



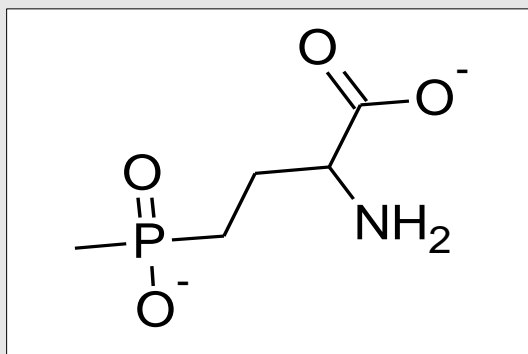
グリホサート : Glyphosate

化学式 : C₃H₈NO₅P

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

化学式 : C₅H₁₅N₂O₄P

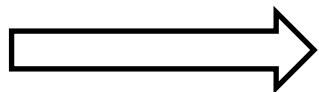
分子量 : 198.2

LogPow = < 0.1 (pH 7, 22°C)

pKa₁ < 2, pKa₂ = 2.9, pKa₃ = 9.81

始めに

- グリホサート (GLY) およびグルホシネート (GLU) は、広く使用されている農薬である。
- 両化合物は極性が極めて高く一斉分析法に適していないことから、厚生労働省より個別分析法が通知されている。
- 既存の分析法は誘導体化や強酸性陽イオン交換カラムの作成など手順が煩雑である。



前処理の自動化を検討した。

前処理フロー（抽出工程：手分析）

抽出

試料 10g (穀類 5g + 水 10mL)

メタノール-水 (1/1) 30mL

振とう 10min

遠心分離 10min

上澄み

残渣

メタノール-水 (1/1) で50mLに定容



①細切



②フードプロセッサー



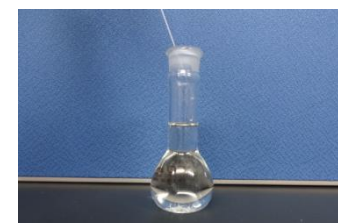
③秤量



④振とう



③遠心分離



④定容

前処理フロー（精製工程：自動化）

抽出液1mL

水1mLと混合

分取1mL

HLBi3-20

SCX-30

PSA-50

HLBとSCXを取り外す

PSA-50

洗浄 メタノール-水 (1/1) 1mL

流出液は捨てる

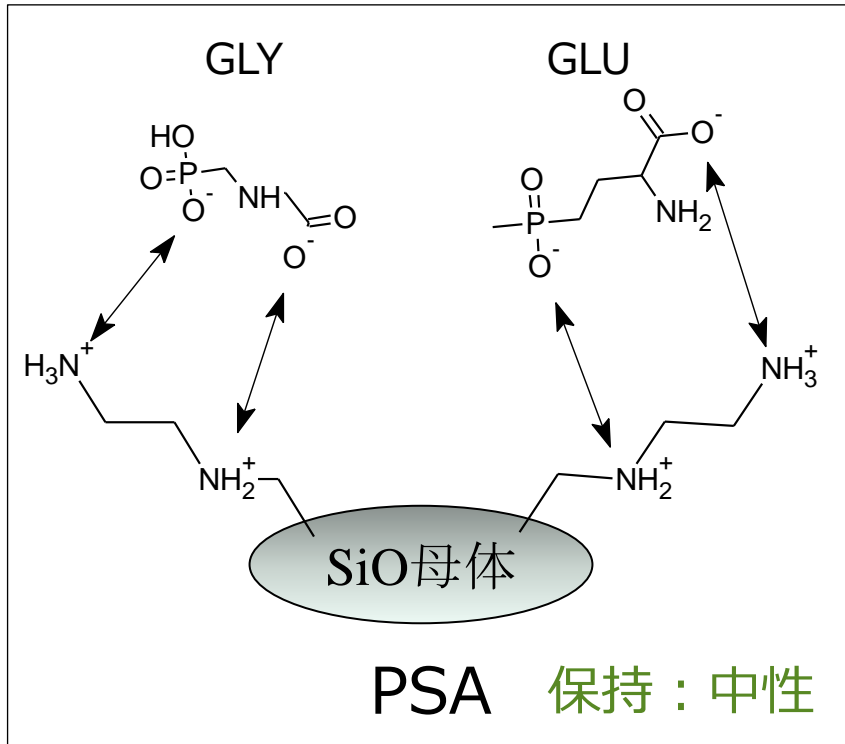
溶出 1.4%NH3水(pH9) 1mL

自動化

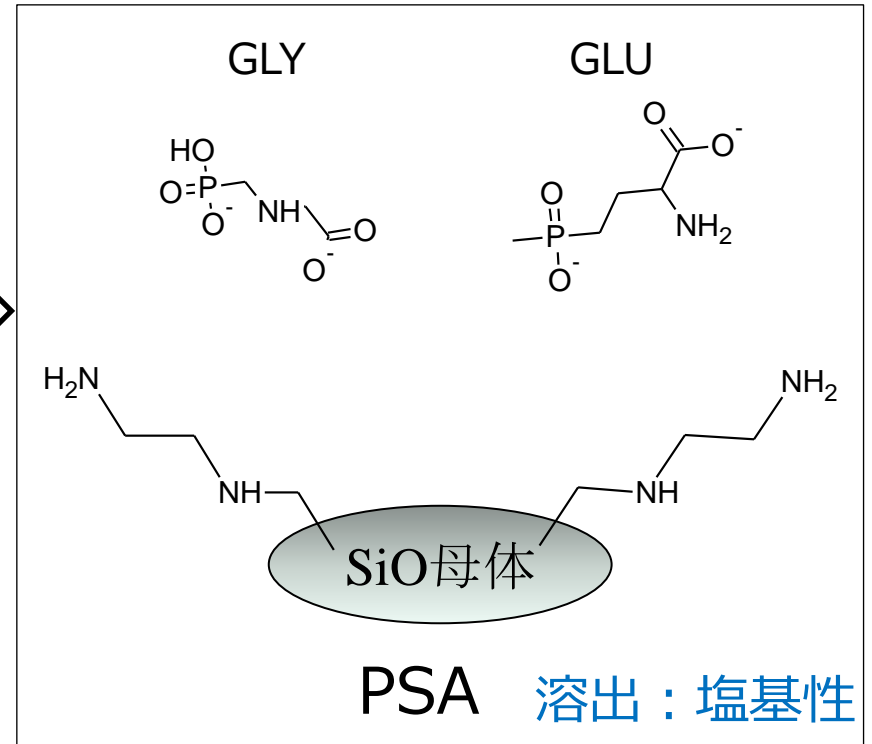
1mLにメスアップ

LC-MS/MSで測定

PSAによる保持、溶出のイメージ

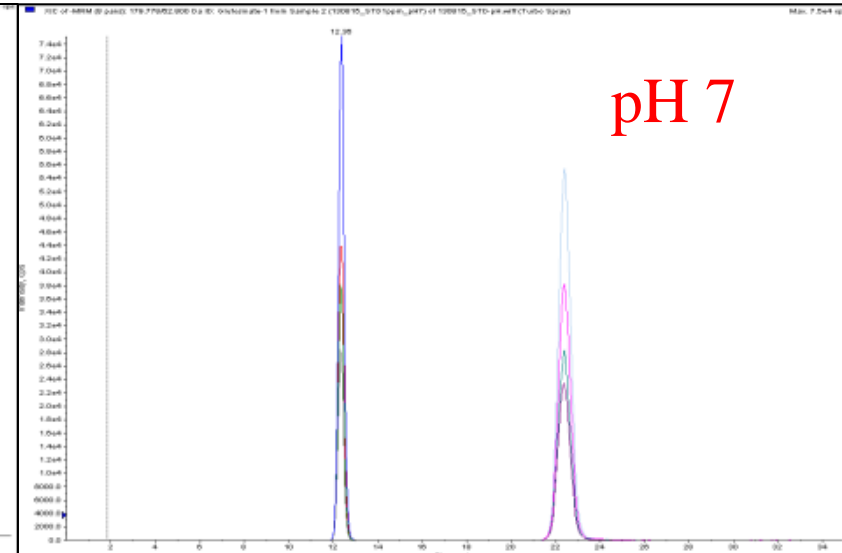
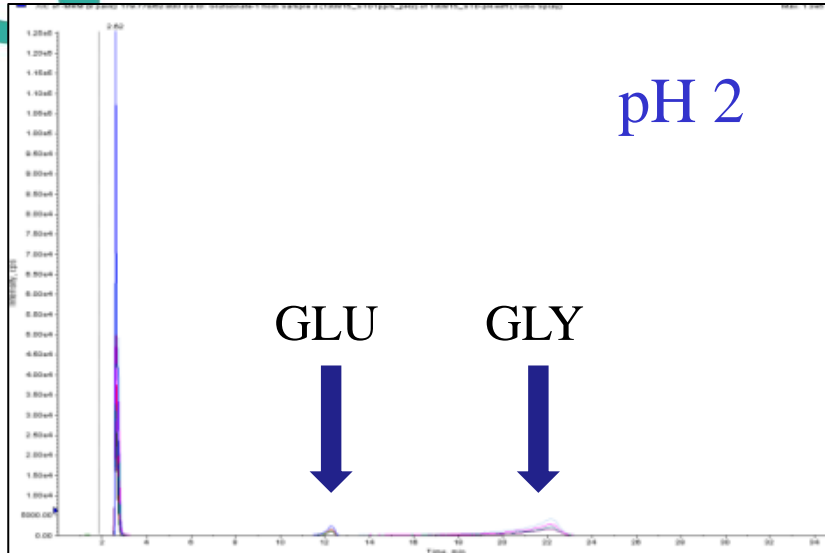


溶出

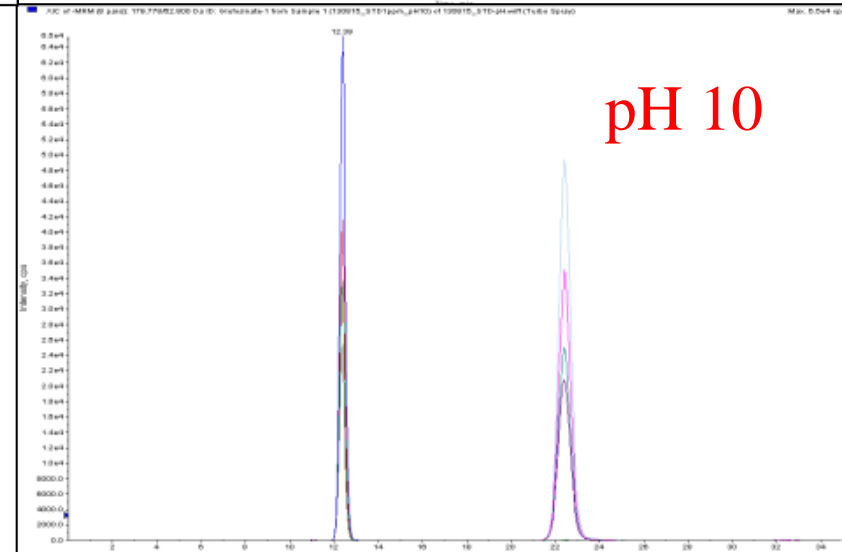


中性条件ではPSAのアミノ基が正電荷をもっているため、GLYとGLUの官能基とのイオン交換相互作用が起きる。アンモニア水(pH 9)を通液することで、PSAのアミノ基の電荷を相殺し、両成分が固相から溶出される。

最終試験液のpHによるピーク形状の変化



- 最終試験液のpHがピーク形状に与える影響を調査した。
- 酸性条件ではGLY、GLUともにピークのリーディングが見られた。
- 中性および塩基性条件ではピーク形状は良好であった。



HLB、SCXによる精製

溶媒へのスパイク試験ではPSAでの良好な保持が見られたが、マトリックス存在下では陰イオン交換相互作用による保持が機能しないことがあった。

無極性固相および陽イオン交換固相による精製を追加した。

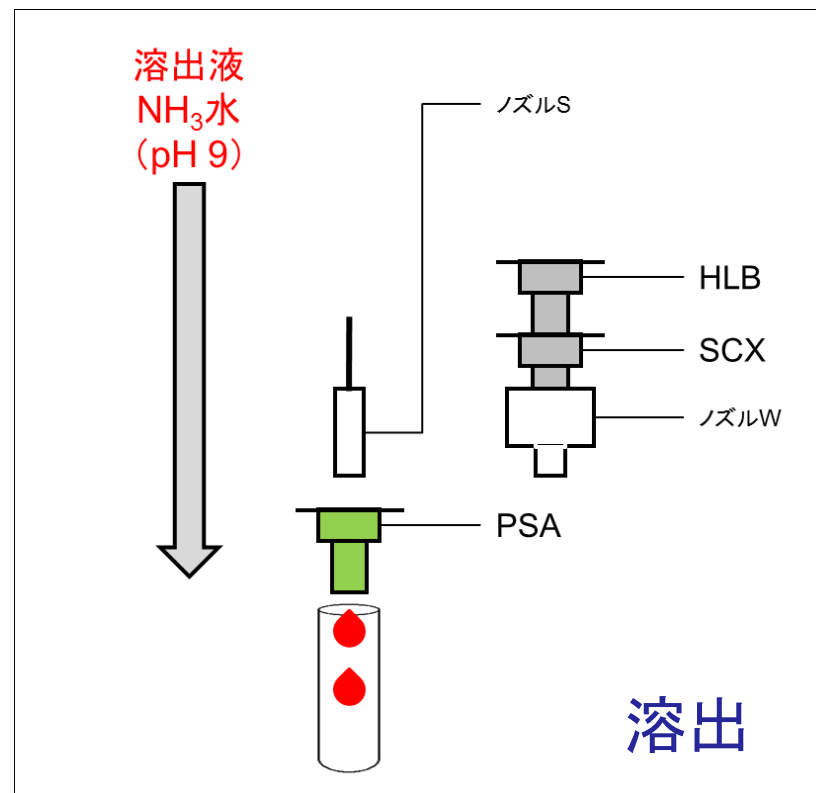
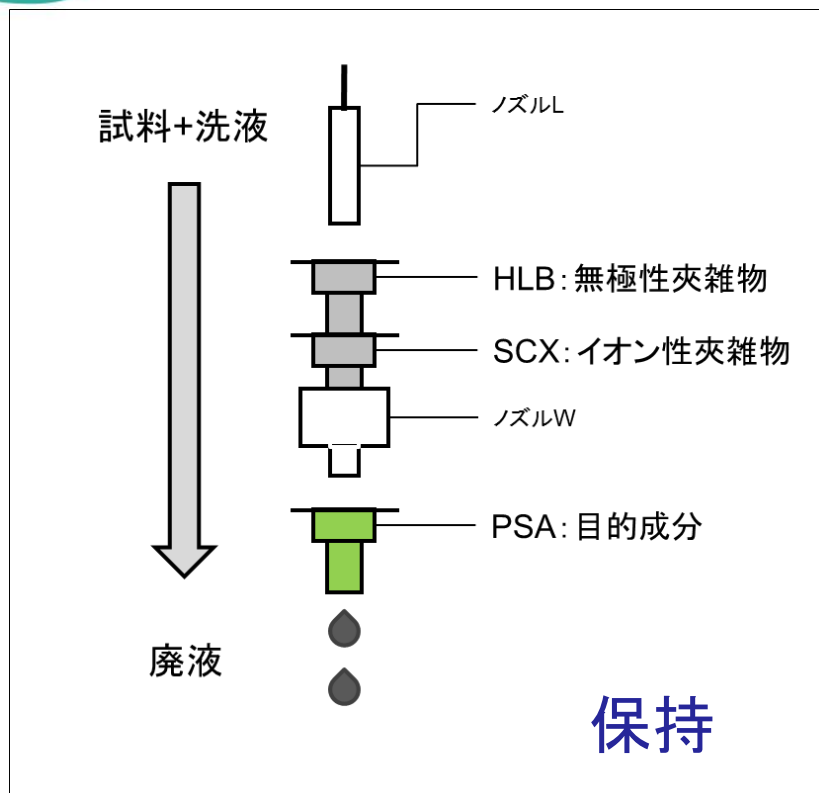
参考資料:永富氏(アサヒグループ)

抽出液への添加回収試験の結果、HLB、SCX、PSAの組み合わせが最良であると判断した。

(カッコ内は回収率)

	固相			成分	
	無極性	陽イオン	陰イオン	グリホサート	グルホシネート
①	HLB	SCX	PSA	○(106)	○(96)
②	HLB	SCX	SAX	△(133)	×(22)
③	HLB	WAX	PSA	△(51)	×(3)
④	C18	SCX	PSA	○(75)	×(4)

自動化装置による前処理のイメージ



RC (Remove and Connecting) モードを利用することで、固相ミニカラムの脱着が容易に行える。

LC内配管のリン酸コーティング

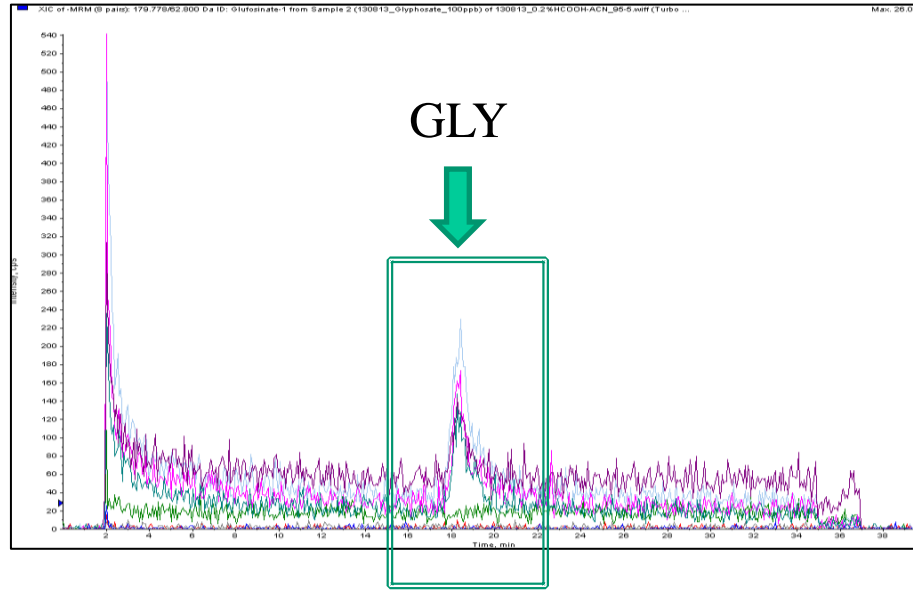
リン酸コーティング

プローブとエレクトロードを引き抜いた状態で、
 2%のリン酸を0.05mL/minで12時間通液する。
 (不揮発性のリン酸をMS部に導入しないため)

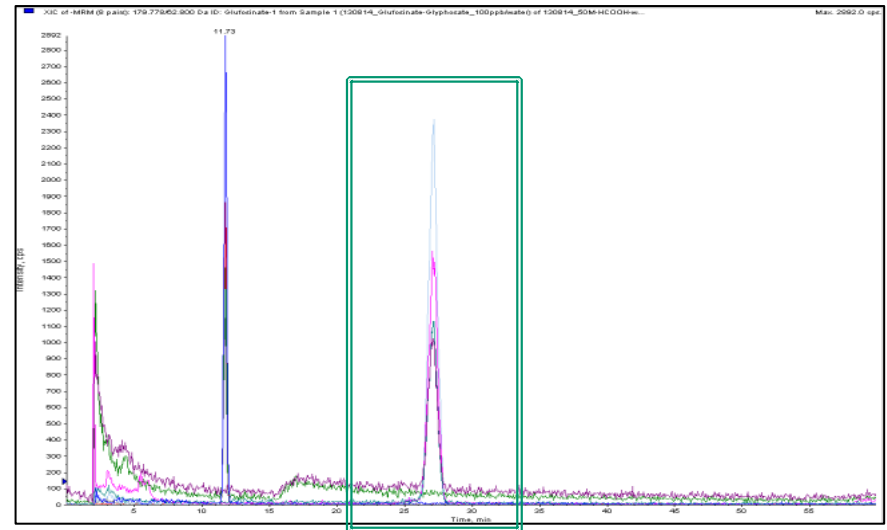
※石渡氏(ホクレン)の資料より。

弊社で分析している他の成分への影響は見られなかった。

LC内配管のリン酸コーティング



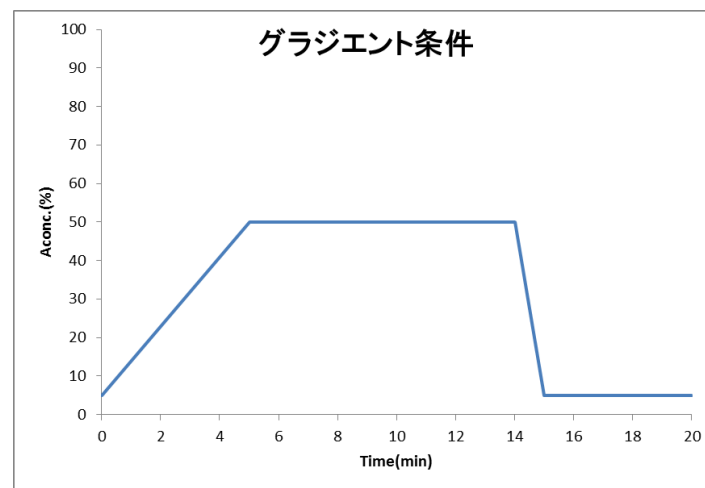
リン酸コーティング



GLYのリン酸基がLC内で吸着

測定条件

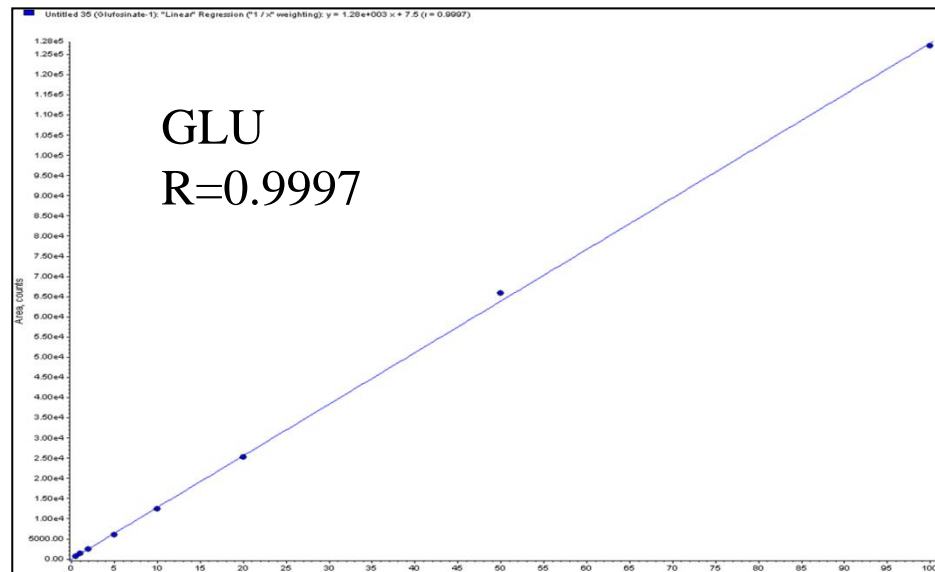
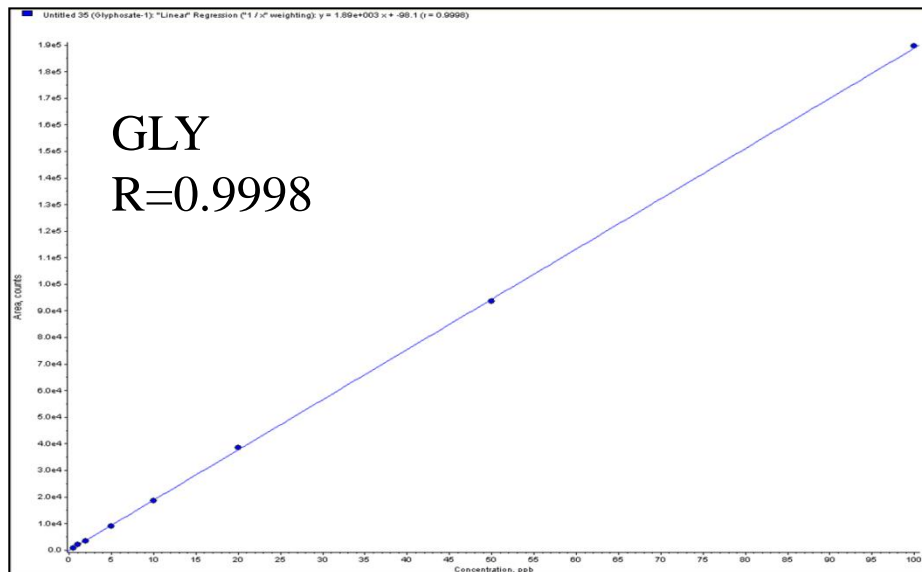
前処理 : ST-L300 (アイスティサイエンス)
 HPLC : Prominence (島津製作所)
 MS/MS : API3200 (AB Sciex)
 分析カラム : TSK gel SuperIC-AP 4.6x75mm (東ソー)
 移動相 A液 : 0.2%ギ酸水
 B液 : 超純水
 流速 : 0.8ml/min
 注入量 : 100uL
 分析時間 : 20min
 カラム温度 : 40°C
 イオン化モード : ESI Negative
 イオンスプレー電圧 : -4500V
 イオン源温度 : 350°C
 測定モード : MRM



グラジエント条件:

Time(min)	0	5	14	15	20
A(%)	5	50	50	5	5
B(%)	95	50	50	95	95

標準溶液の直線性



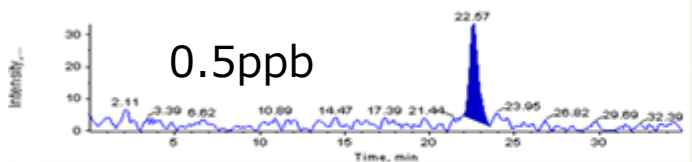
8点検量線 (0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100ppb)

Q1/Q3 : 167.771/63.000	(グリホサート)
179.778/62.800	(グルホシネート)

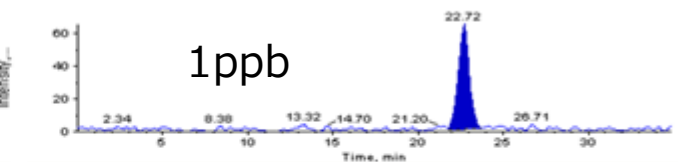
標準溶液のクロマトグラム

GLY

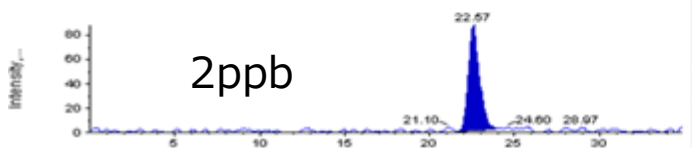
130829_STD05ppb - Glyphosate-1 (Unknown) 167.77163.000 Da - sample 1 of 32 from 130829_STD05ppb - Area: 1063.615 counts Height: 36.238 cps RT: 22.6 min



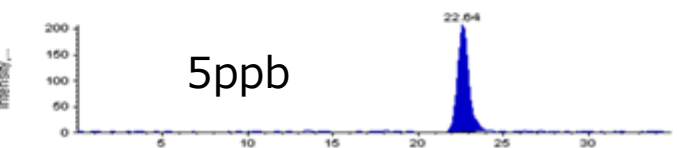
130829_STD1ppb - Glyphosate-1 (Unknown) 167.77163.000 Da - sample 2 of 32 from 130829_STD1ppb - Area: 2834.706 counts Height: 84.368 cps RT: 22.7 min



130829_STD2ppb - Glyphosate-1 (Unknown) 167.77163.000 Da - sample 3 of 32 from 130829_STD2ppb - Area: 3790.604 counts Height: 97.566 cps RT: 22.6 min

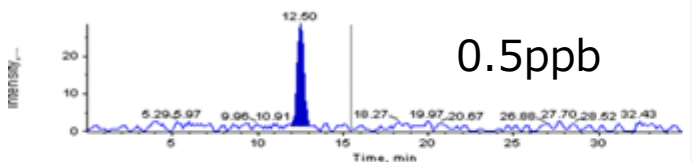


130829_STD5ppb - Glyphosate-1 (Unknown) 167.77163.000 Da - sample 4 of 32 from 130829_STD5ppb - Area: 9218.713 counts Height: 207.673 cps RT: 22.6 min

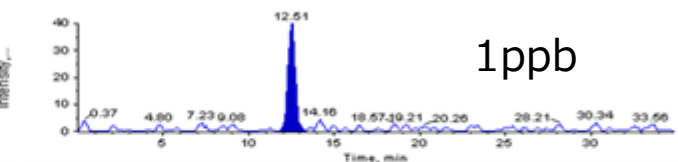


GLU

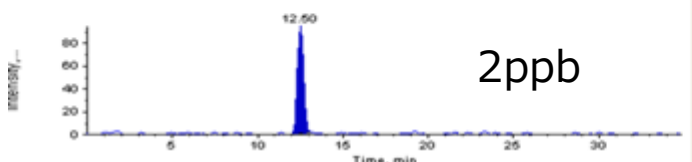
130829_STD05ppb - Glufosinate-1 (Unknown) 179.77862.800 Da - sample 1 of 32 from 130829_STD05ppb - Area: 726.270 counts Height: 27.647 cps RT: 12.5 min



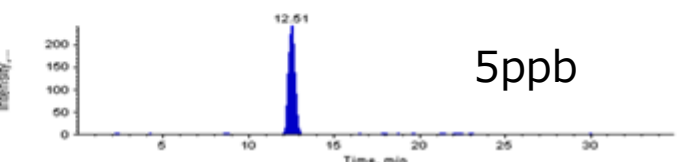
130829_STD1ppb - Glufosinate-1 (Unknown) 179.77862.800 Da - sample 2 of 32 from 130829_STD1ppb - Area: 1110.465 counts Height: 40.373 cps RT: 12.5 min



130829_STD2ppb - Glufosinate-1 (Unknown) 179.77862.800 Da - sample 3 of 32 from 130829_STD2ppb - Area: 2354.514 counts Height: 95.892 cps RT: 12.5 min



130829_STD5ppb - Glufosinate-1 (Unknown) 179.77862.800 Da - sample 4 of 32 from 130829_STD5ppb - Area: 5899.805 counts Height: 244.103 cps RT: 12.5 min



結果

n=3で測定

	リンゴ			玄米		
	添加濃度	回収率	RSD	添加濃度	回収率	RSD
	(ppm)	(%)	(%)	(ppm)	(%)	(%)
グリホサート	0.2	87.1	7.1	0.1	76.5	8.1
グルホシネート	0.2	83.6	9.5	0.3	98.0	3.4

	いんげん豆			ほうれん草		
	添加濃度	回収率	RSD	添加濃度	回収率	RSD
	(ppm)	(%)	(%)	(ppm)	(%)	(%)
グリホサート	2	75.7	3.5	0.5	99.7	9.6
グルホシネート	0.05	119.1	9.6	0.2	98.8	10.6

試料中添加濃度は各作物の基準値に準拠

まとめ

- GLYおよびGLUの前処理の自動化を検討した。
- LC内部の配管をリン酸でコーティングすることで、GLYのピーク形状が改善された。
- 固相ミニカラムPSAから目的成分をアンモニア水 (pH9) で溶出することで減圧濃縮操作の省略が可能で、直接LC-MS/MSに注入することが可能であった。