

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 -第2報-

○佐々野僚一、島三記絵、小西賢治、斎藤勲
(株式会社アイスティサイエンス)

【目的】

演者らはメタノール-水 (1/1) で抽出を行ったグリホサートおよびグルホシネートの分析法の自動化を報告したが、目的農薬の水溶性が高いことから、水抽出を行っている分析例も多く報告されている。しかしながら、水抽出のみで固相に通すと、目詰まりを起こすことがある。そこで、本研究では水抽出した後にアセトニトリルを添加して除タンパクする一連の流れの抽出法を検討した。また、測定におけるマトリックスの影響についても調査した。それらの結果を基にほうれん草と大豆を用いて添加回収試験を行い、良好な結果を得られたので報告する。

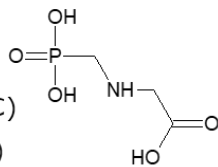
グリホサート : Glyphosate (以下 : GLY)

化学式 : C₃H₈NO₅P

分子量 : 169.1

LogPow < -3.2 (pH2-5, 20°C)

pKa = 5.77, 2.18 (20 ± 0.2°C)



グルホシネート : Glufosinate (以下 : GLU)

化学式 : C₅H₁₂NO₄P

分子量 : 181.1

LogPow : アンモニウム塩の

LogPow < 0.1 (pH7, 22°C)

pKa1 < 2, pKa2 < 2.9, pKa3 < 9.8

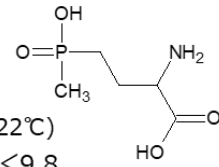


図1 前処理フロー

【方法】

1. 装置および条件

前処理装置 : 全自動固相抽出装置 ST-L400 (アイスティサイエンス)

固相カートリッジ : Smart-SPE シリーズ (アイスティサイエンス)

測定装置 : UHPLC(Nexera X2)及び LCMS-8045 (島津製作所)

【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 μL

カラム温度 : 40 °C

【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

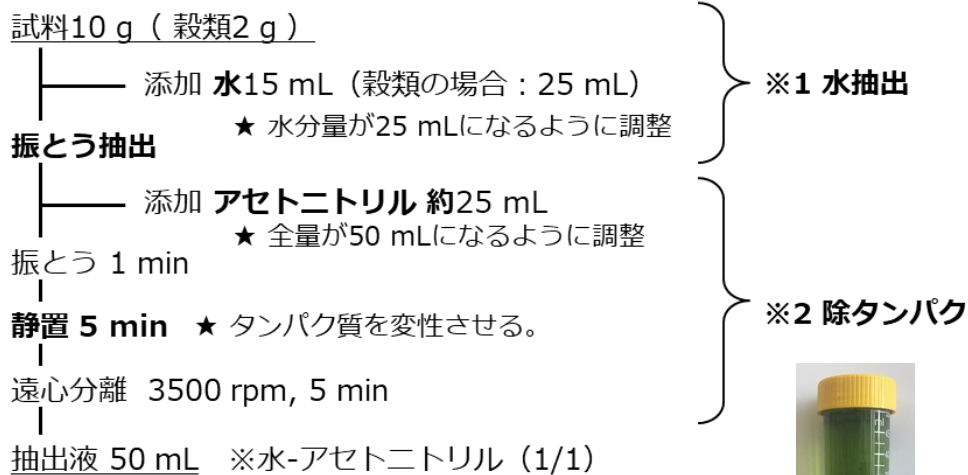
■ MRM条件

化合物名	測定時間 (min)	定量イオン
		確認イオン
グルホシネート	3.00 - 4.00	182.10 > 136.10
		182.10 > 119.00
グリホサート	4.00 - 6.00	170.00 > 88.10
		170.00 > 42.10

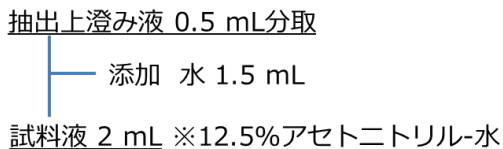
2. 実験方法

試料 10 g (穀類 2 g) を 50 mL 用の遠沈チューブに採取し、その試料の水分量と合わせて約 25 mL になるように水を添加し、振とうして水抽出 (※1) を行った。続けて、全駆量が 50 mL になるようにアセトニトリルを添加して、5 分間静置後、遠心分離し、除タンパク (※2) を行った。次にその抽出上澄み液を 0.5 mL 分取し、水を 1.5 mL 添加して試料液とし、前処理装置で精製 (詳細は前回報告: 参考資料 1)) を行った。

抽出&除タンパク



精製



抽出液 50 mL

全自動固相抽出装置 ST-L400, 前処理時間: 10分/検体

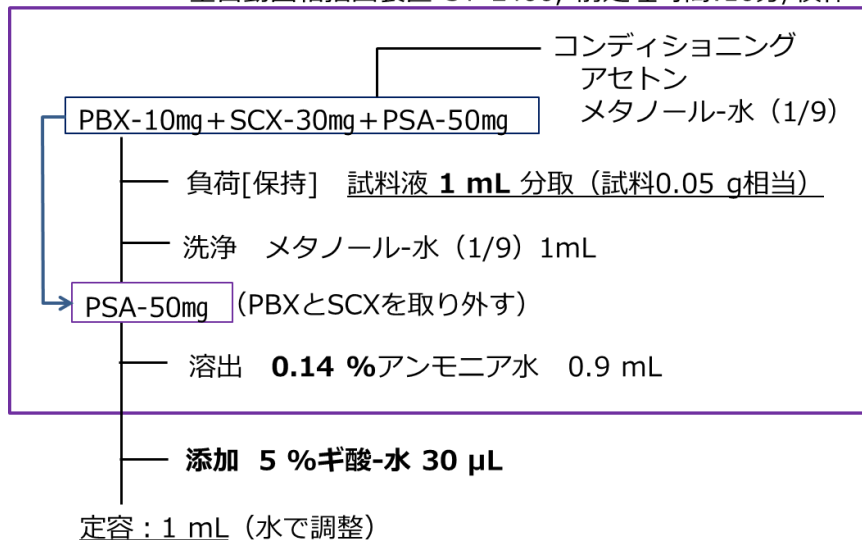
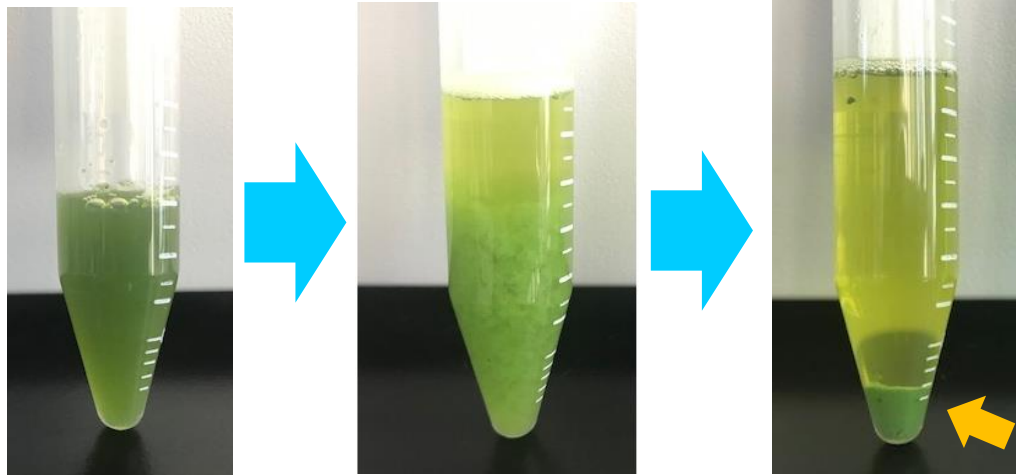


図 2 前処理フロー

【結果および考察】

1. タンパク質除去効果の確認実験

アセトニトリル添加によるタンパク除去効果を確認することを目的として、前処理フローの水抽出したところで遠心分離し試料の固形物を取り除いた。そして、その上澄み液 3mL を 15mL の遠沈チューブに分取し、アセトニトリル 3mL を加え、5 分間静置後、遠心分離した。



① 水抽出液から 3mL 分取

② アセトニトリル 3mL を加え
5 分間静置

③ 遠心分離後

図 3 前処理フロー

アセトニトリルを加えたところで、一時すると、変性したタンパク質が析出してきた（写真図 3-②）。次に遠心分離し、変性したタンパク質が下に沈殿した（写真図 3-③）。これらの結果から、アセトニトリル添加による除タンパクの効果の確認ができた。本法の場合、遠心分離により、試料の固形物と変性したタンパク質と一緒に下に沈殿していると考えられる。

2. 連続測定におけるマトリックスの影響

スタンダードと添加試料の再現性を確認するために各々を連続的に測定したところ、添加試料において数回目から急にピーク面積値が上昇しその後安定し、さらにその直後のスタンダードも高い値で推移したが、同じように数回目から元の面積値に戻るといった現象がみられた。そこで、スタンダードと添加試料を数回ずつ連続測定し、その挙動の確認を行った。その結果、ほうれん草のグルホシネートにおいて、先に述べた現象が再現された（図 4-上）。添加試料を測定し始めて、4 回目でピーク面積値が上昇し、そして、その直後のスタンダードも高いピーク面積を得るが、4 回目には元の値に戻った。これにより、添加試料に含まれている何らかのマトリックスが LC カラムからの溶出に 4 測定分わかり、その 4 測定目の溶出されるときにちょうどグルホシネートと重なり、エンハンス効果を起こして、ピーク強度が上昇しているものと考えられる。しかしながら、大豆は影響を受けておらず、ほうれん草由来のマトリックスの影響と思われる。その対策として、測定順序において試料抽出液をダミーとして 4 回以上測定し、続けて試料測定を行い、最後に検量線用のスタンダードを 3 測定内に行

う。または、マトリックス検量線を使用する。今後の課題として、マトリックスを取り除くための前処理条件の検討が挙げられる。

表 1 連続測定におけるマトリックスの影響

■ほうれん草		(面積値)	
試料名	順番	GLU	GLY
スタンダード バイアル 5ppb	1	44,798	34,305
	2	48,084	34,880
	3	48,183	37,139
	4	48,863	36,055
	5	47,860	34,960
	6	49,942	35,933
添加試料 バイアル 5ppb	7	46,884	36,175
	8	46,590	38,539
	9	46,133	35,968
	10	69,041	37,053
	11	63,703	37,022
	12	67,609	39,644
	13	68,653	37,680
	14	70,381	37,861
スタンダード バイアル 5ppb	15	75,180	37,374
	16	70,078	36,678
	17	65,650	36,313
	18	48,920	36,131
	19	50,270	36,259
	20	54,427	37,248
	21	50,287	36,444
	22	50,468	36,144
■大豆		(面積値)	
試料名	順番	GLU	GLY
スタンダード バイアル 10ppb	1	93,878	68,669
	2	91,974	74,623
	3	94,050	71,563
	4	92,157	72,343
添加試料 バイアル 10ppb	5	93,154	78,513
	6	94,712	79,190
	7	94,808	78,565
	8	97,483	77,806
	9	99,029	78,259
	10	95,903	76,937
スタンダード バイアル 10ppb	11	97,969	72,901
	12	97,303	72,592
	13	97,481	71,819
	14	95,359	74,192
	15	97,390	73,798

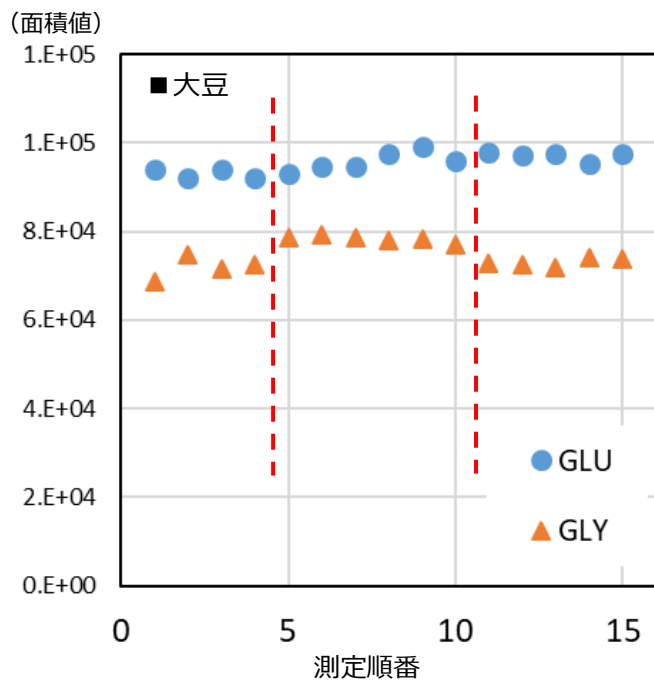
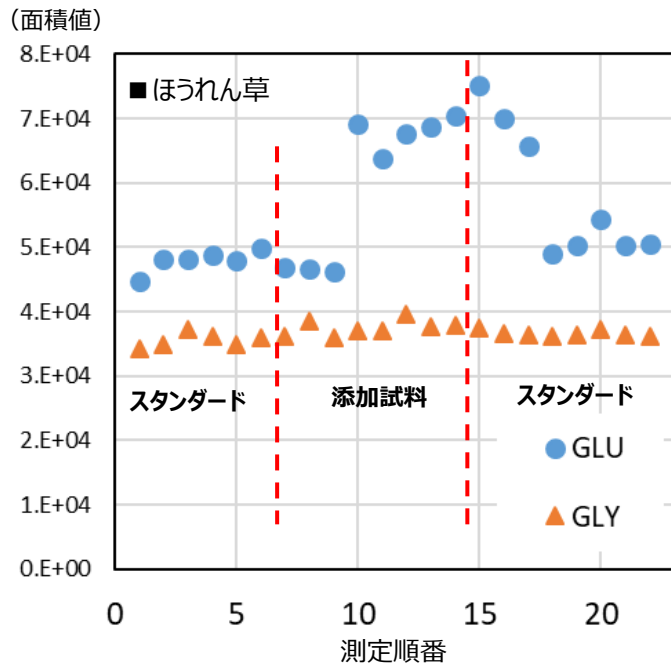


図 4 連続測定におけるマトリックスの影響
上：ほうれん草， 下：大豆

3. 多段階添加回収試験

ほうれん草と大豆を用いて多段階添加回収試験を行った。ほうれん草および大豆における基準値がほうれん草：GLY 0.2/GLU 0.1, 大豆：GLY 20/GLU 2 ppm であることから、ほうれん草：0.1ppm, 大豆：1ppm 添加することとした。添加位置は抽出前（通常の添加）、抽出後、前処理後の段階に分けて添加した。また、連続測定におけるマトリックスの影響を考慮して、測定順序は未知試料を6回連続で分析し、その最初の4回はダミーとして測定結果には入れず、続けて添加試料を測定していき、最後にスタンダードを測定した。そのピーク面積値を表2に示す。

表2 多段階添加回収試験結果（面積値）

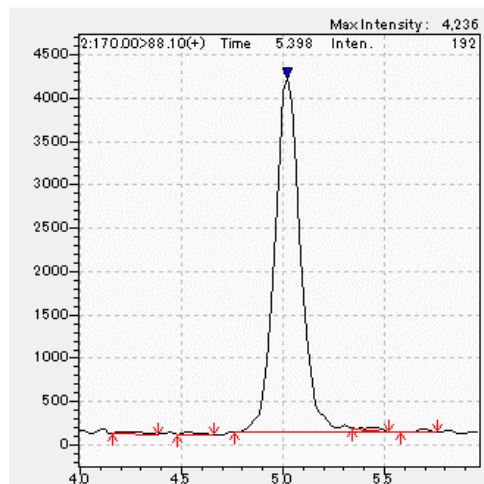
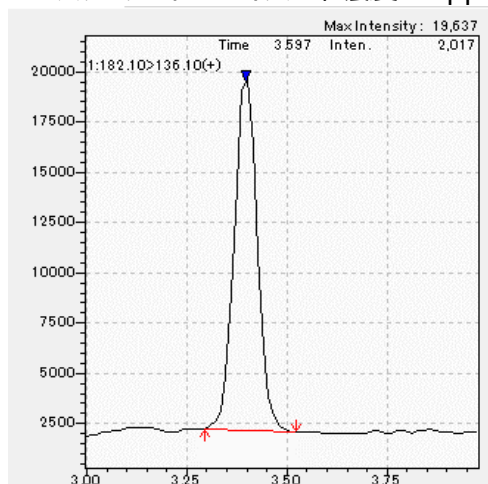
■ほうれん草 (ピーク面積値)				■大豆 (ピーク面積値)					
試料名	No.	GLU	GLY	試料名	No.	GLU	GLY		
未知試料	U1-01	-82	194	未知試料	U1-01	-176	181		
	U1-02	298	381		U1-02	8	147		
	Ave.	216	575		Ave.	-168	328		
前処理後添加 (試料中：0.1ppm) (バイアル中：5ppb)	K1-01	65,781	38,315	前処理後添加 (試料中:1ppm) (バイアル中:10ppb)	K1-01	88,160	72,520		
	K1-02	63,367	36,972		K1-02	87,320	70,425		
	Ave.	64,574	37,644		Ave.	87,740	71,473		
抽出後添加 (試料中：0.1ppm) (バイアル中：5ppb)	C1-01	57,596	36,833	抽出後添加 (試料中:1ppm) (バイアル中:10ppb)	C1-01	82,332	72,613		
	C1-02	62,797	37,173		C1-02	86,223	71,939		
	Ave.	60,197	37,003		Ave.	84,278	72,276		
添加回収試験 抽出前添加：n = 5 試料中濃度：0.1ppm (バイアル中：5ppb)	A1	67,119	36,139	添加回収試験 抽出前添加：n = 5 試料中濃度:1ppm (バイアル中:10ppb)	A1	92,564	79,514		
	A2	66,622	37,112		A2	94,579	81,385		
	A3	69,725	37,349		A3	93,280	81,201		
	A4	64,684	37,669		A4	95,624	78,931		
	A5	68,952	39,422		A5	90,239	82,037		
	Ave.	67,420	37,538		Ave.	93,257	80,614		
RSD(%)		3.0	3.2	RSD(%)		2.2	1.6		
スタンダード	S1-01	70,192	36,586	スタンダード	S1-01	90,784	74,667		
	バイアル中濃度 S1：5ppb	S1-02	64,757		37,403	バイアル中濃度 ：10ppb	S1-02	92,002	75,020
	Ave.	67,475	36,995		Ave.	91,393	74,844		
S2：2.5ppb	S2	33,304	18,245	：5ppb	S2	45,102	37,658		

表3 多段階添加回収試験結果（回収率）

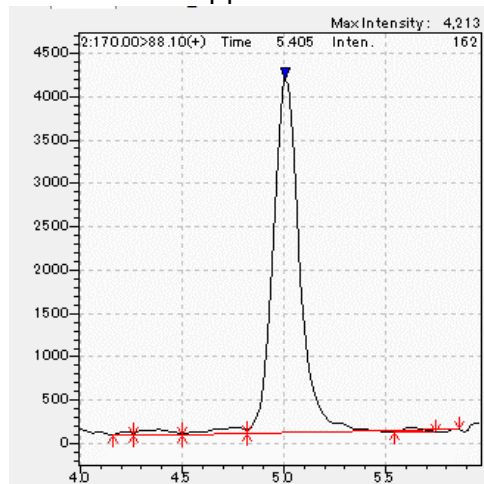
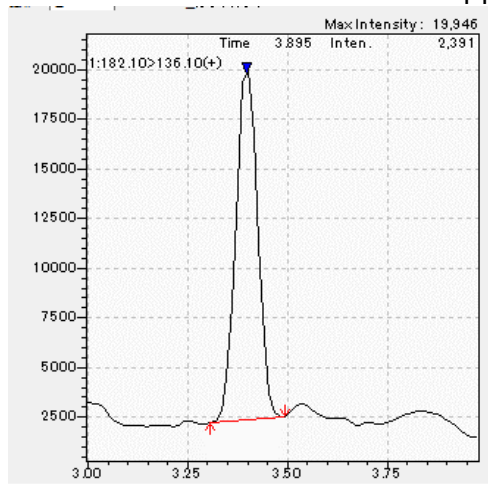
添加位置		ほうれん草, 0.1 ppm添加				大豆, 1 ppm添加			
		GLU		GLY		GLU		GLY	
		回収率	RSD	回収率	RSD	回収率	RSD	回収率	RSD
抽出前 (n = 5)	A/S	100	3.0	101	3.2	102	2.2	108	1.6
抽出後	C/S	89	—	100	—	92	—	97	—
前処理後	K/S	96	—	102	—	96	—	95	—

(単位, %)

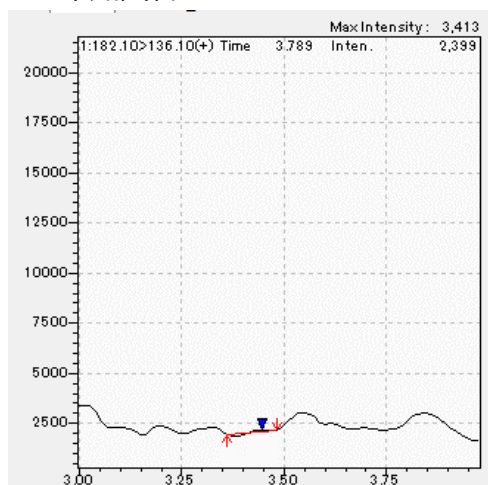
S1-01. スタンダード：バイアル中濃度 5 ppb



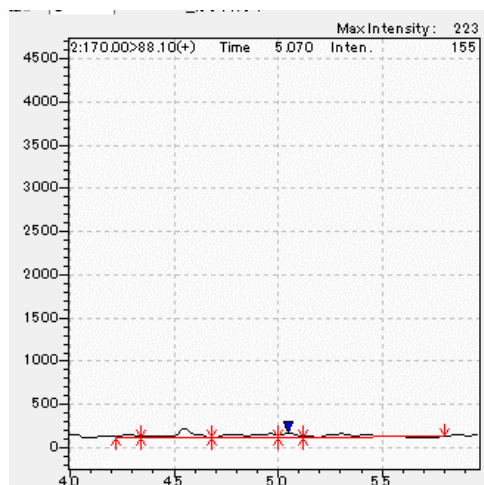
A1. 抽出前添加試料：試料中濃度 0.1 ppm, バイアル中濃度 5 ppb



U1-01. 未知試料



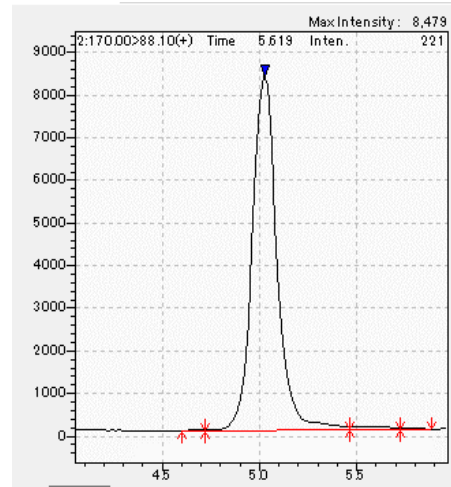
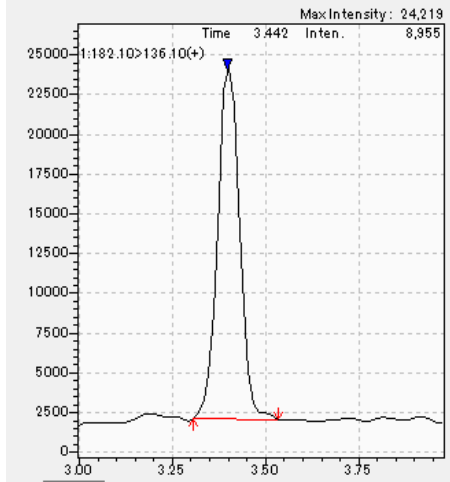
1. グルホシネート



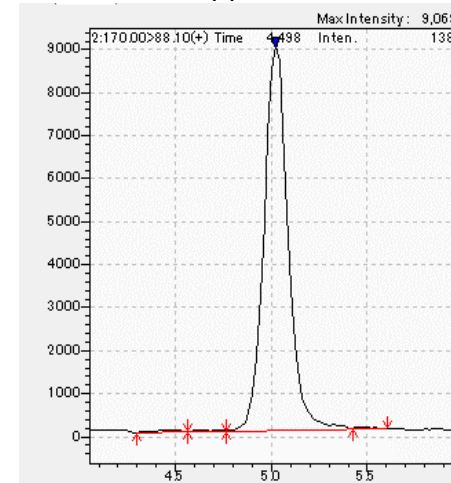
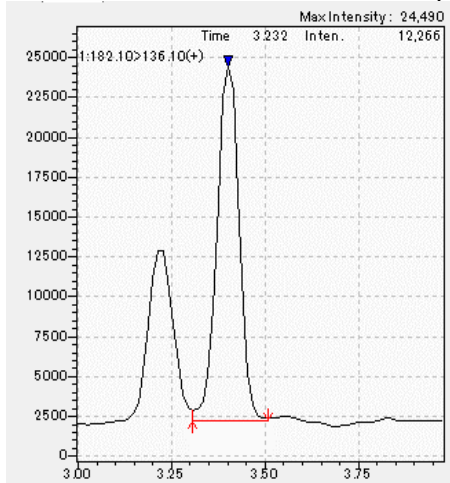
2. グリホサート

図 5 ほうれん草の添加回収試験で得られた MRM クロマトグラム

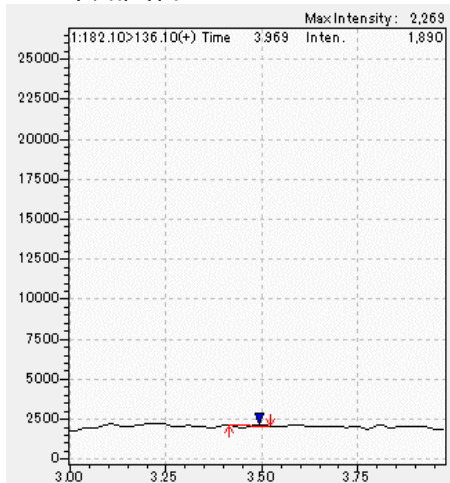
S1-01. スタンダード : バイアル中濃度 10 ppb



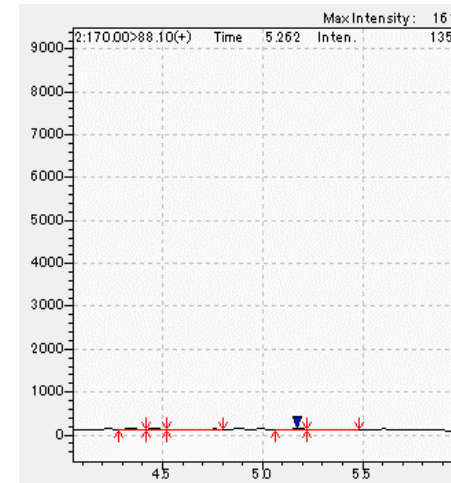
A1. 抽出前添加試料 : 試料中濃度 1 ppm, バイアル中濃度 10 ppb



U1-01. 未知試料



1. グルホシネート



2. グリホサート

図 6 大豆の添加回収試験で得られたMRMクロマトグラム

多段階添加回収試験による回収率の結果を表3に示す。ほうれん草および大豆とも良好な回収率(89~110%)と再現性(RSD:5%未満)の結果を得ることができた。また、それぞれのMRMクロマトグラム(図5,6)もきれいなピークを得ることができた。ただし、大豆の抽出前添加試料のグルホシネートのMRMクロマトグラムでは、グルホシネートの前に夾雑物ピークが検出したが、未知試料ではそのピークが存在せず、その夾雑物の有無が不明であった。

【まとめ】

グリホサートおよびグリホシネートの分析法において、水抽出した後にアセトニトリルを添加して除タンパクする一連の流れの抽出法を検討した結果、水溶性の高いグリホサートなどを効率よく抽出し、前処理に悪影響を及ぼすタンパク質を効率よく除去することがこれまでの抽出法を大きく変えることなく容易にできた。また、連続測定におけるマトリックスの影響について調査した結果、試料によっては、数回分の測定後にそのマトリックスの影響を受けて感度の変動することが分かった。現時点では、試料抽出液をダミーとして4回以上測定し続けて試料測定し、その直後にスタンダードを測定するか、マトリックス検量線を使用することで対応することとした。そして、ほうれん草と大豆を用いて本法による多段階添加回収試験を行った結果、回収率、再現性ともに良好な結果を得ることができた。

本抽出法と前処理の自動化を組み合わせることで、グリホサートおよびグリホシネートが簡便かつ精度よく分析できることが分かった。

【参考資料】

- 1) 小西賢治ほか：グリホサートおよびグリホシネートの分析の自動化の検討，第36回農薬残留分析研究会講演要旨集，P110-124

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

-第2報-

○佐々野僚一、島三記絵、小西賢治、斎藤勲（株式会社アイステイサイエンス）

【目的】

演者らはメタノール-水（1/1）で抽出を行ったグリホサートおよびグルホシネートの分析法の自動化を報告したが、目的農薬の水溶性が高いことから、水抽出を行っている分析例も多く報告されている。しかしながら、水抽出のみで固相に通すと、目詰まりを起こすことがある。そこで、本研究では水抽出した後アセトニトリルを添加して除タンパクを一連の流れの抽出法を検討した。また、測定におけるマトリックスの影響についても調査した。それらの結果を基にほうれん草と大豆を用いて添加回収試験を行い、良好な結果を得られたので報告する。

【実験方法】

凍結粉砕した試料 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）

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

コンディショニング
アセトン
メタノール-水

- PBX-10mg / SCX-30mg + PSA-50mg**
- 負荷[保持] 試料液 **1 mL** 分取（試料0.05 g相当）
- 洗浄 メタノール-水（1/9）1 mL
- 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 **5%酢酸-水 30 μL**

定容：**1 mL** 水で調整

図1 前処理フロー

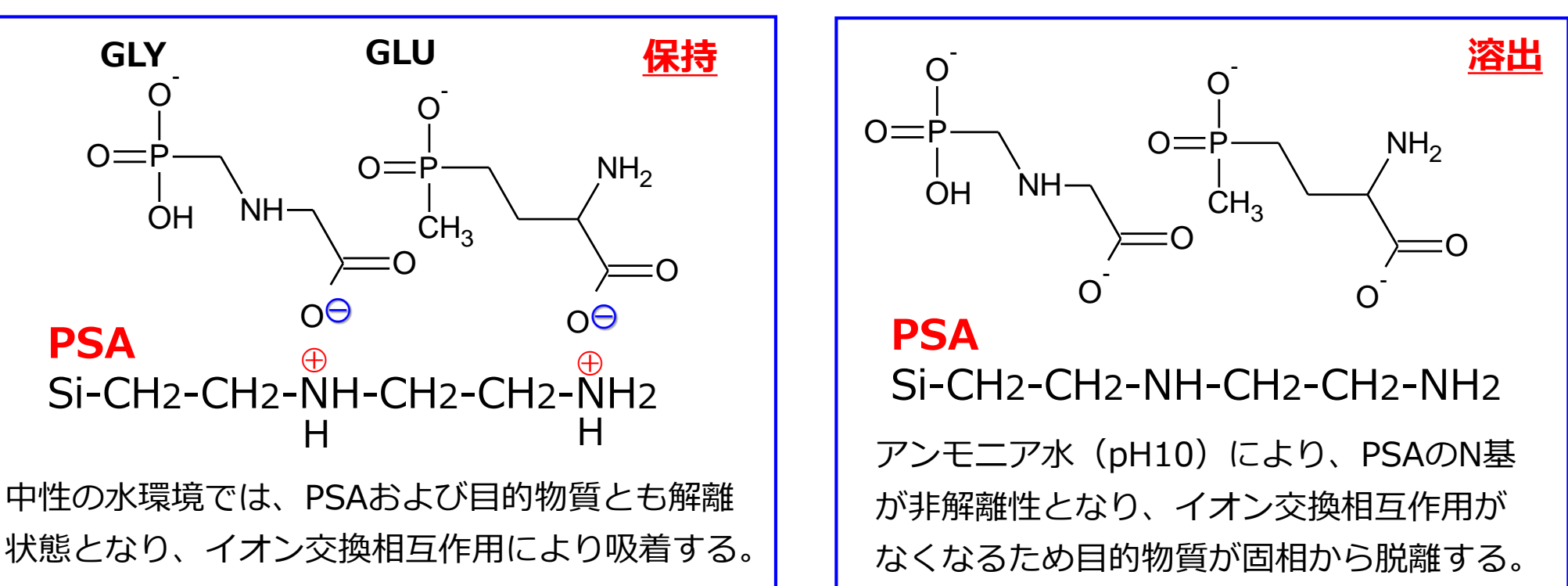
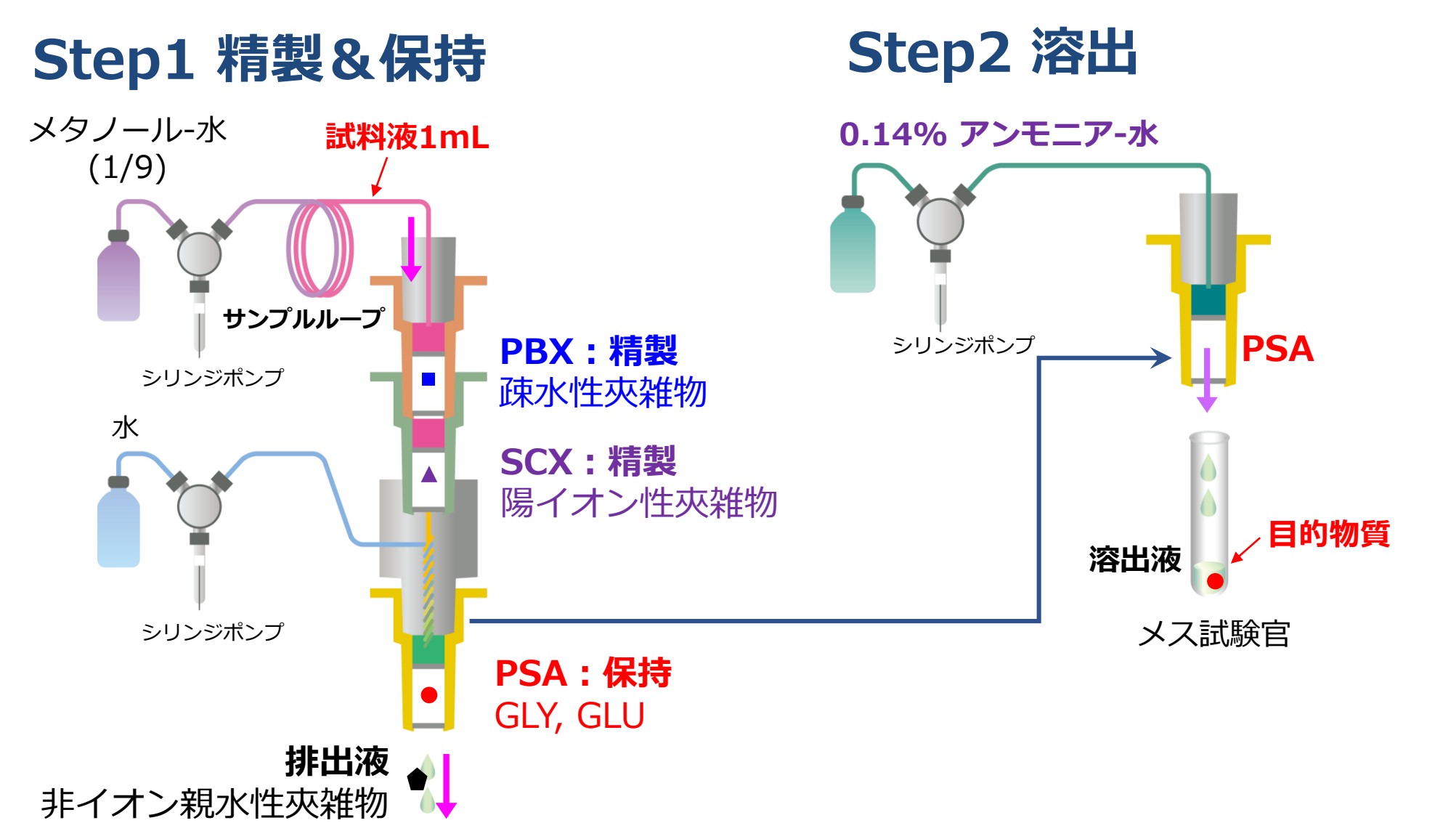
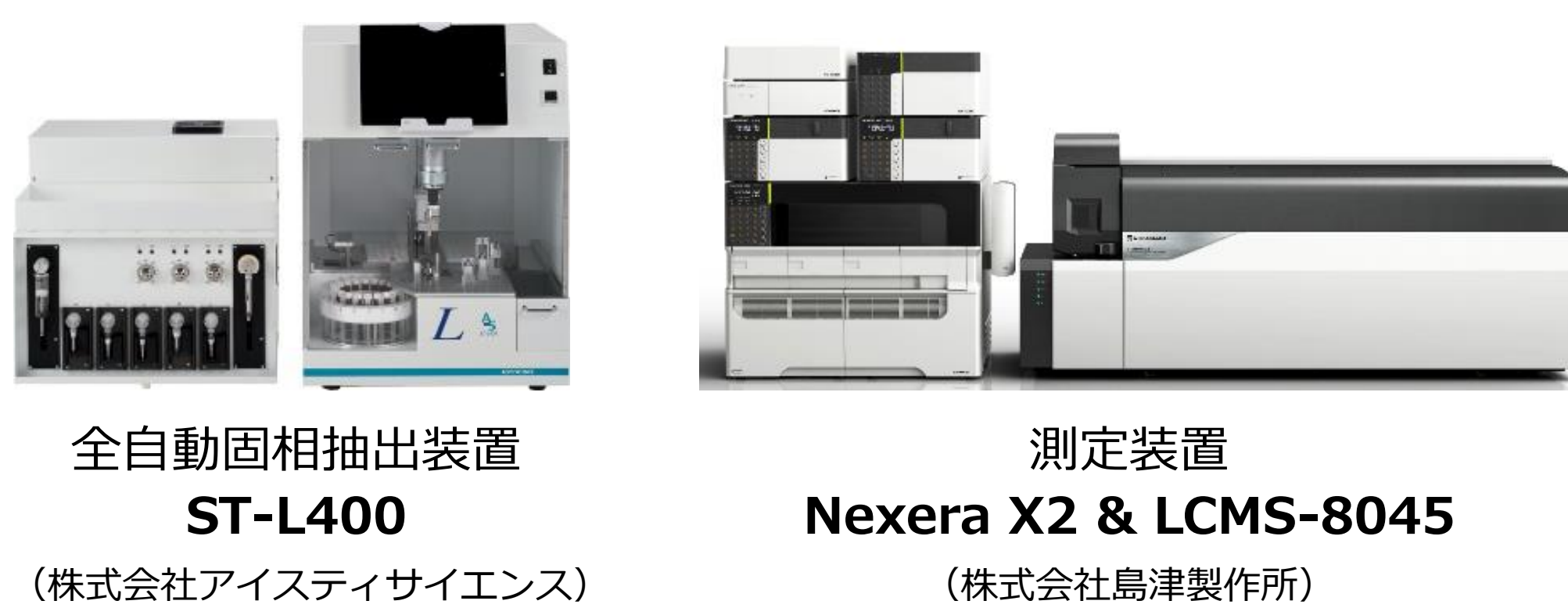
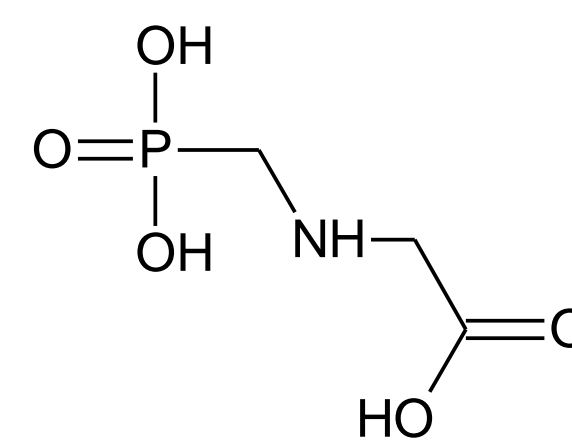


図2 自動前処理工程

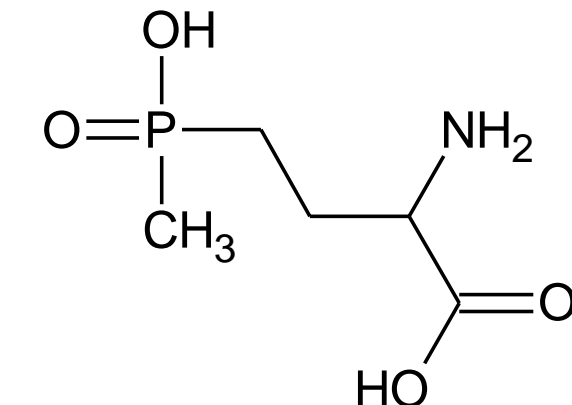
物性と構造式

グリホサート：Glyphosate (GLY)
化学式：C₃H₈NO₅P
分子量：169.1
LogPow = <-3.2 (pH2-5, 20°C)
pKa = 5.77 ± 0.03, 2.18 ± 0.02 (20 ± 0.2°C)



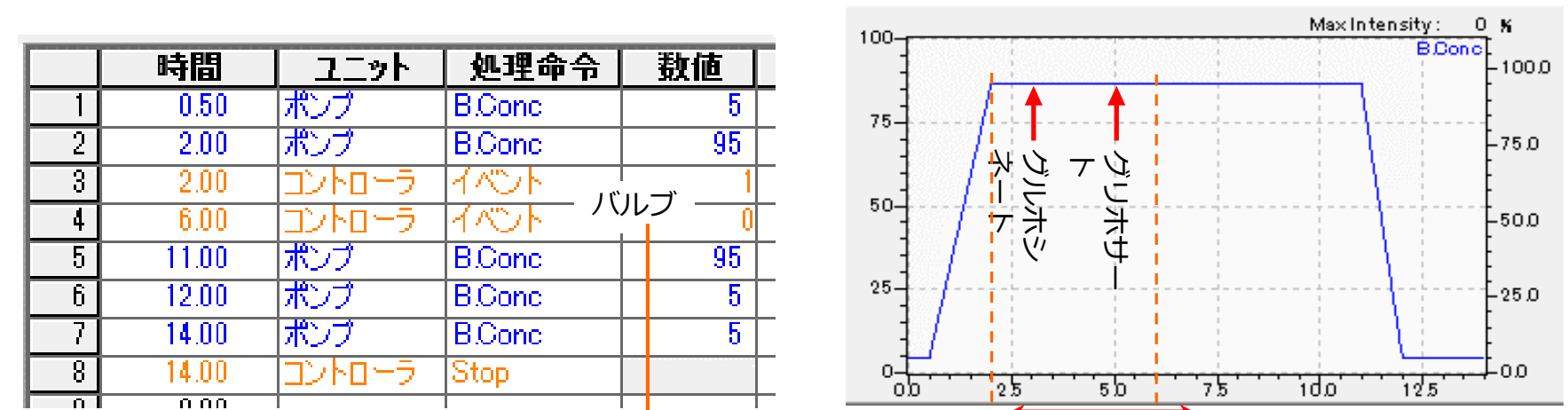
グルホシネート：Glufosinate (GLU)

化学式：C₅H₁₂NO₄P
分子量：181.1
LogPow = <0.1 (pH7, 22°C)
pKa1 < 2, pKa2 < 2.9, pKa3 < 9.8



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 酢酸アンモニウム-水
B液：0.5% 酢酸-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 μL
カラム温度：40 °C



[MS条件]

イオン化モード：**ESI positive** インターフェース温度：400 °C
ネブライザーガス流量：3 L/min DL温度：150 °C
ドライビングガス流量：10 L/min ヒートブロック温度：350 °C
ヒーティングガス流量：10 L/min

表1 MRM条件

化合物名	測定時間 (min)	定量イオン 確認イオン	Dwell T. (msec)	Q1 (V)	CE	Q3 (V)
グルホシネート	3.00 - 4.00	182.10 > 136.10 182.10 > 119.00	400	-21	-15	-24
グリホサート	4.00 - 6.00	170.00 > 88.10 170.00 > 42.10	600	-17	-9	-18

【結果と考察】

1. タンパク質除去効果の確認実験

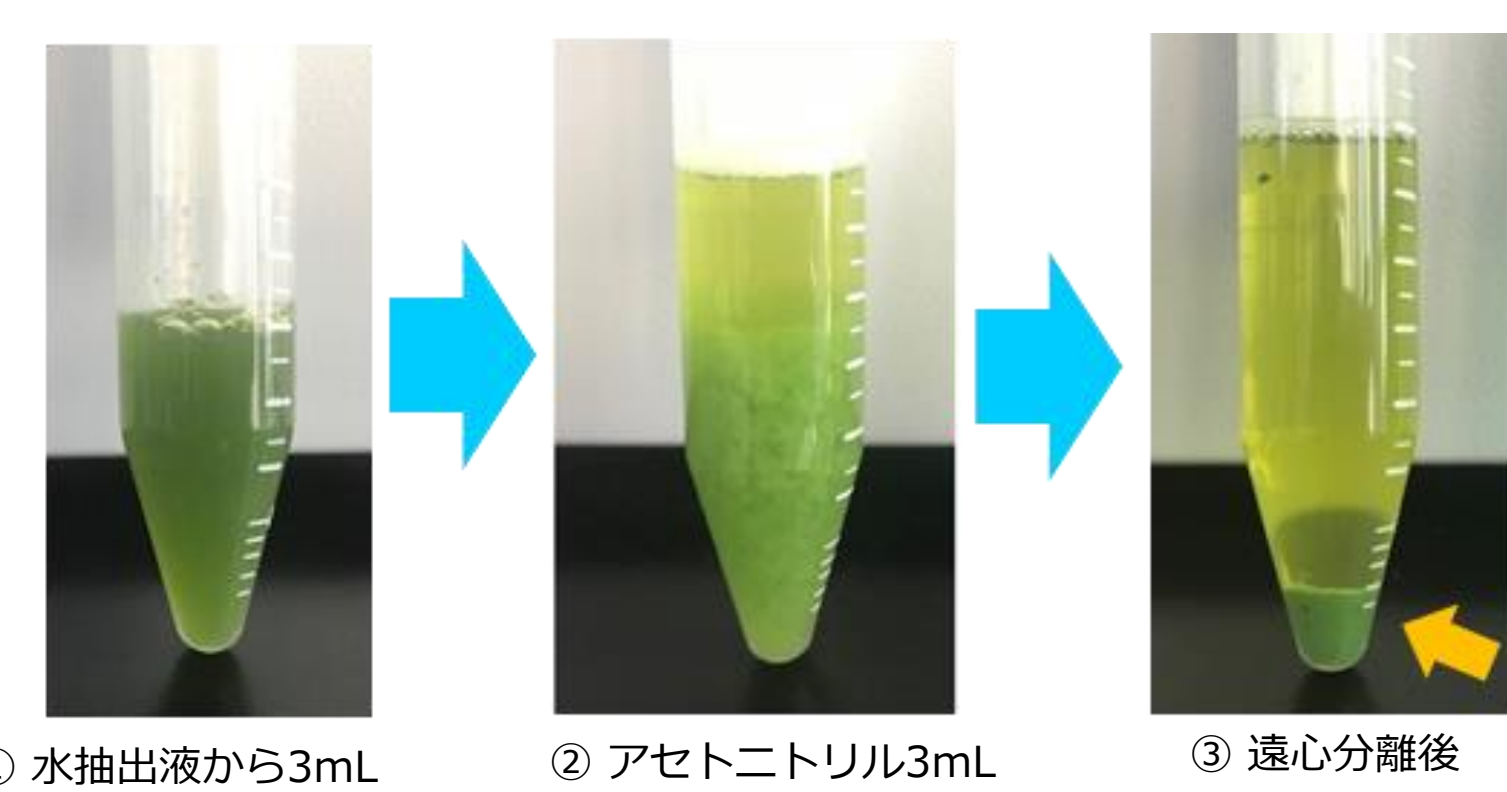


図3 タンパク質除去の効果

アセトニトリルを加えたところで、一時すると、変性したタンパク質が析出してきた。次に遠心分離し、変性したタンパク質が下に沈殿した。これらの結果から、アセトニトリル添加による除タンパクの効果の確認ができた。

2. 連続測定におけるマトリックスの影響

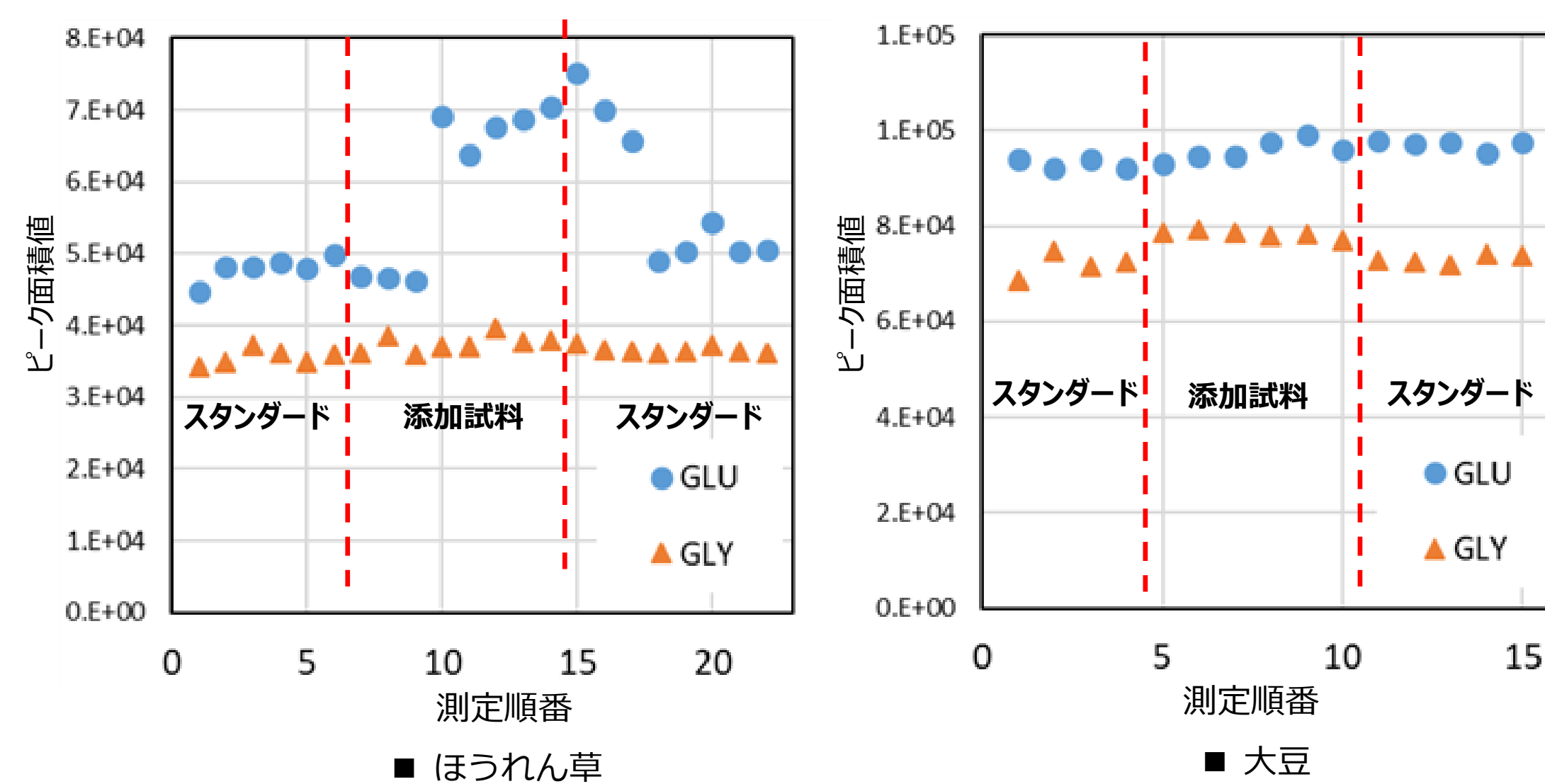


図4 連続測定におけるマトリックスの影響

スタンダードと添加試料を数回ずつ連続測定し、その挙動の確認を行った。その結果、ほうれん草のグルホシネートにおいて、添加試料を測定し始めて、4回目でピーク面積が上昇し、そして、その直後のスタンダードも高いピーク面積を得るが、4回目には元の値に戻った。これは、添加試料に含まれている何らかのマトリックスがLCカラムからの溶出に4測定分ばかり、その4測定目の溶出されるときにちょうどグルホシネートと重なり、エンハンス効果を起こして、ピーク強度が上昇しているものと考えられる。一方、大豆は影響を受けておらず、ほうれん草由来のマトリックスの影響と思われる。

その対策として、測定順序において試料抽出液をダミーとして4回以上測定し、続けて試料測定を行い、最後に検量線用のスタンダードを3測定内に行った。

3. 多段階添加回収試験

表2 多段階添加回収試験結果 (面積値)

■ ほうれん草 (ピーク面積値)				■ 大豆 (ピーク面積値)			
試料名	No.	GLU	GLY	試料名	No.	GLU	GLY
未知試料	U1-01	-82	194	未知試料	U1-01	-176	181
	U1-02	298	381		U1-02	8	147
	Ave.	216	575		Ave.	-168	328
前処理後添加	K1-01	65,781	38,315	前処理後添加	K1-01	88,160	72,520
(試料中: 0.1ppm)	K1-02	63,367	36,972	(試料中: 1ppm)	K1-02	87,320	70,425
(バイアル中: 5ppb)	Ave.	64,574	37,644	(バイアル中: 10ppb)	Ave.	87,740	71,473
抽出後添加	C1-01	57,596	36,833	抽出後添加	C1-01	82,332	72,613
(試料中: 0.1ppm)	C1-02	62,797	37,173	(試料中: 1ppm)	C1-02	86,223	71,939
(バイアル中: 5ppb)	Ave.	60,197	37,003	(バイアル中: 10ppb)	Ave.	84,278	72,276
添加回収試験	A1	67,119	36,139	添加回収試験	A1	92,564	79,514
抽出前添加: n = 5	A2	66,622	37,112	抽出前添加: n = 5	A2	94,579	81,385
試料中濃度: 0.1ppm	A3	69,725	37,349	試料中濃度: 1ppm	A3	93,280	81,201
(バイアル中: 5ppb)	A4	64,684	37,669	(バイアル中: 10ppb)	A4	95,624	78,931
	A5	68,952	39,422		A5	90,239	82,037
	Ave.	67,420	37,538		Ave.	93,257	80,614
	RSD(%)	3.0	3.2		RSD(%)	2.2	1.6
スタンダード	S1-01	70,192	36,586	スタンダード	S1-01	90,784	74,667
バイアル中濃度	S1-02	64,757	37,403	バイアル中濃度	S1-02	92,002	75,020
S1: 5ppb	Ave.	67,475	36,995	: 10ppb	Ave.	91,393	74,844
S2: 2.5ppb	S2	33,304	18,245	: 5ppb	S2	45,102	37,658

表3 多段階添加回収試験結果 (回収率)

添加位置	ほうれん草, 0.1 ppm添加	GLU		GLY		大豆, 1 ppm添加	GLU		GLY	
		回収率	RSD	回収率	RSD		回収率	RSD	回収率	RSD
抽出前 (n = 5)	A/S	100	3.0	101	3.2	102	2.2	108	1.6	
抽出後	C/S	89	-	100	-	92	-	97	-	
前処理後	K/S	96	-	102	-	96	-	95	-	

(単位, %)

ほうれん草と大豆を用いて多段階添加回収試験を行った。ほうれん草および大豆における基準値がほうれん草：GLY 0.2/GLU 0.1, 大豆：GLY 20/GLU 2 ppmであることから、ほうれん草：0.1ppm, 大豆：1ppm添加することとした。添加位置は抽出前（通常の添加）、抽出後、前処理後の段階に分けて添加した。

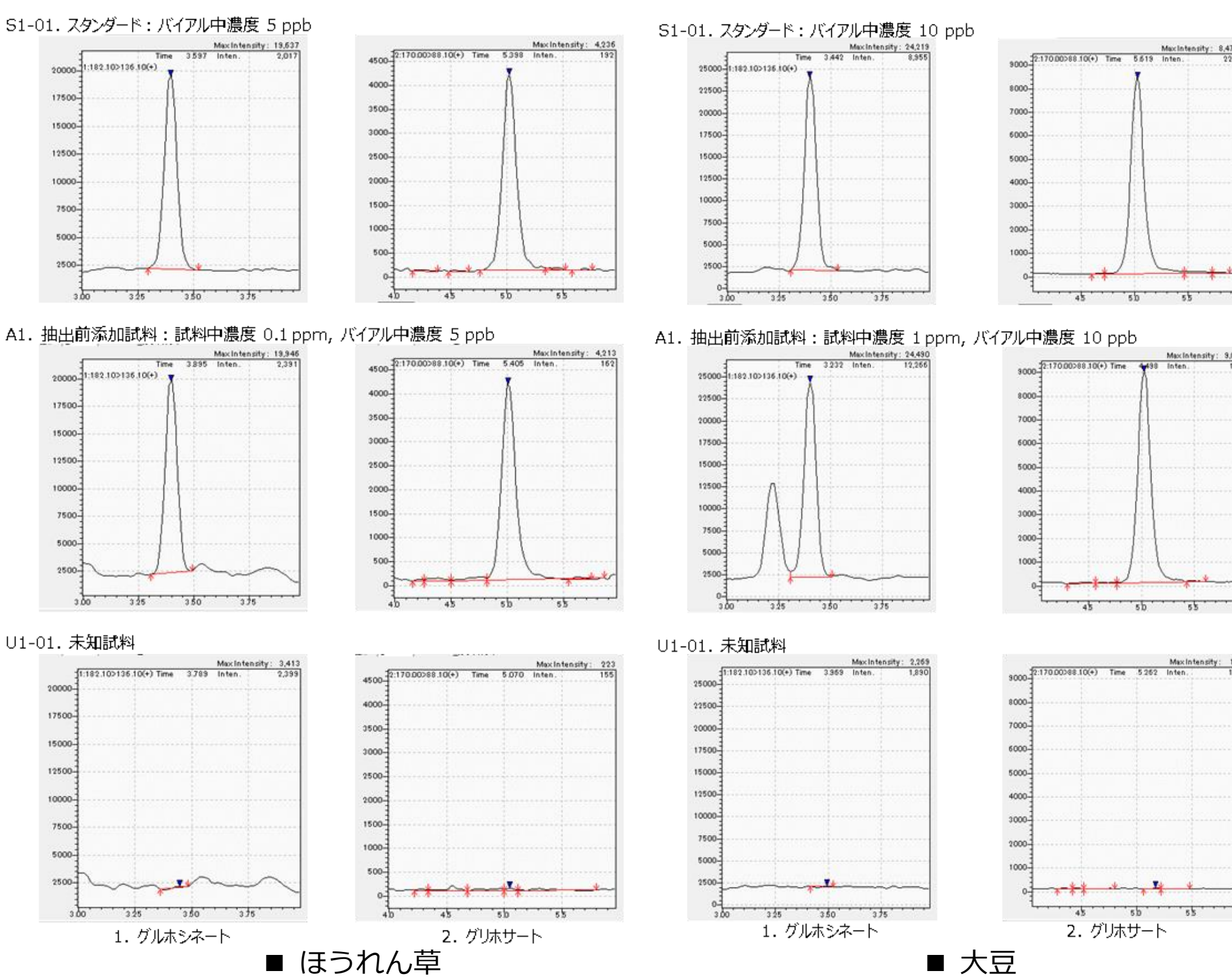


図5 添加回収試験で得られたMRMクロマトグラム

ほうれん草および大豆とも良好な回収率（89～110%）と再現性（RSD：5%未満）の結果を得ることができた。また、それぞれのMRMクロマトグラム（図5）もきれいなピークを得ることができた。

【まとめ】

グリホサートおよびグルホシネートの分析法において、水抽出した後アセトニトリルを添加して除タンパクを一連の流れの抽出法を検討した結果、水溶性の高いグリホサートなどを効率よく抽出し、前処理に悪影響を及ぼすタンパク質を効率よく除去することがこれまでの抽出法を大きく変えることなく容易にできた。また、連続測定におけるマトリックスの影響について調査した結果、試料によっては、数回分の測定後にそのマトリックスの影響を受けて感度が変動することが分かった。そこで、試料抽出液をダミーとして4回以上測定し続けて試料測定し、その直後にスタンダードを測定するか、マトリックス検量線を使用することで対応することとした。最後に、ほうれん草と大豆を用いて本法による多段階添加回収試験を行った結果、回収率、再現性ともに良好な結果を得ることができた。

本抽出法と前処理の自動化を組み合わせることで、グリホサートおよびグルホシネートが簡便かつ精度よく分析できることが分かった。