

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。

【実験方法】

凍結粉碎した試料 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

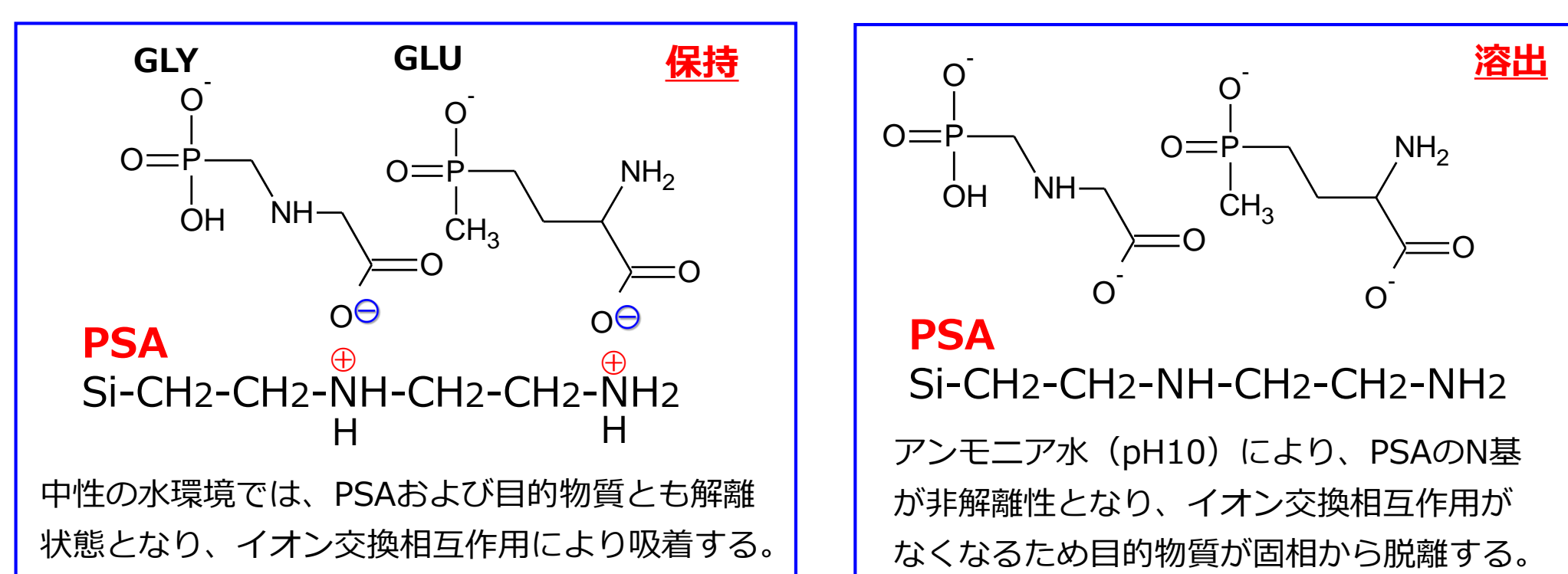
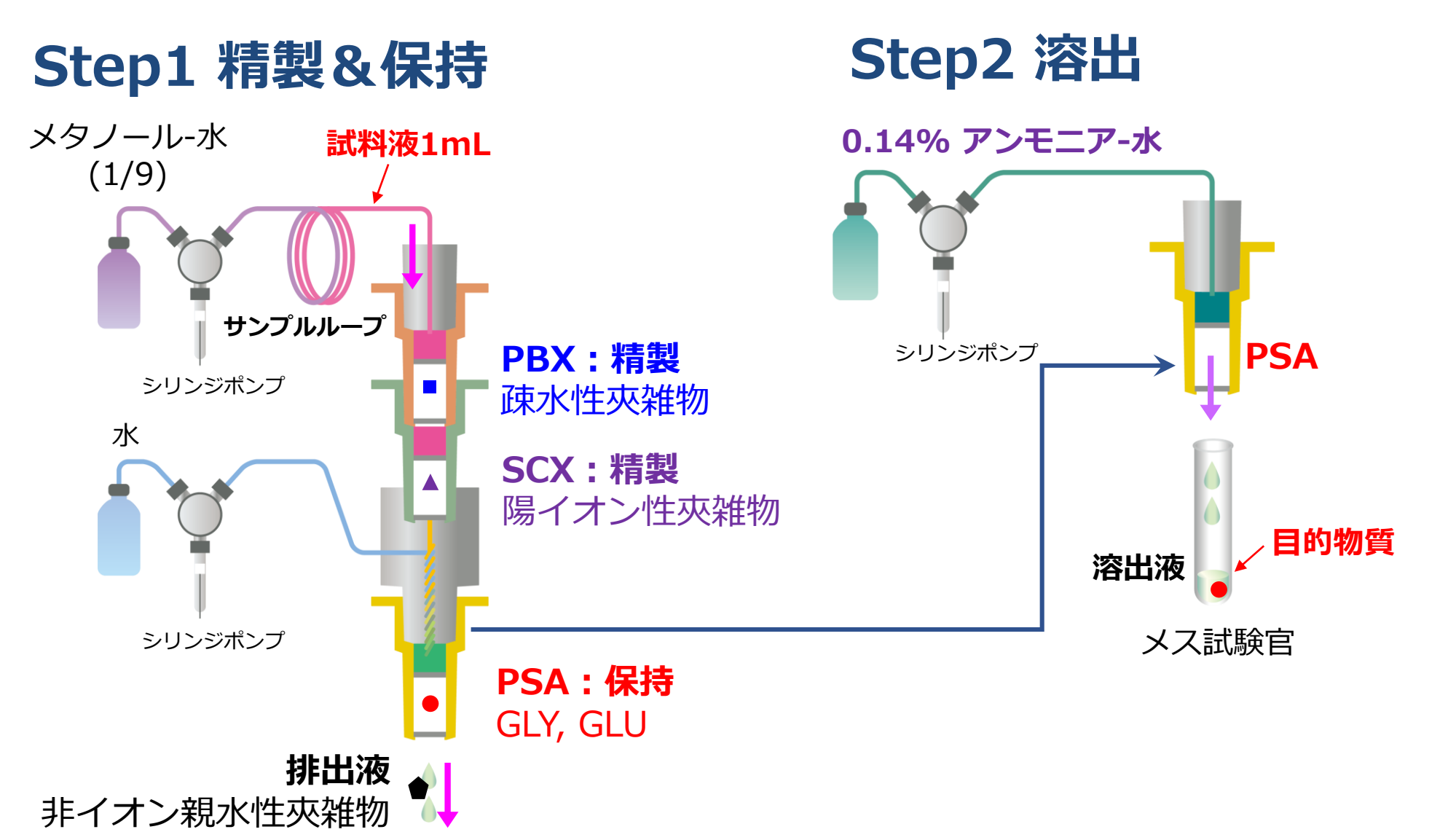
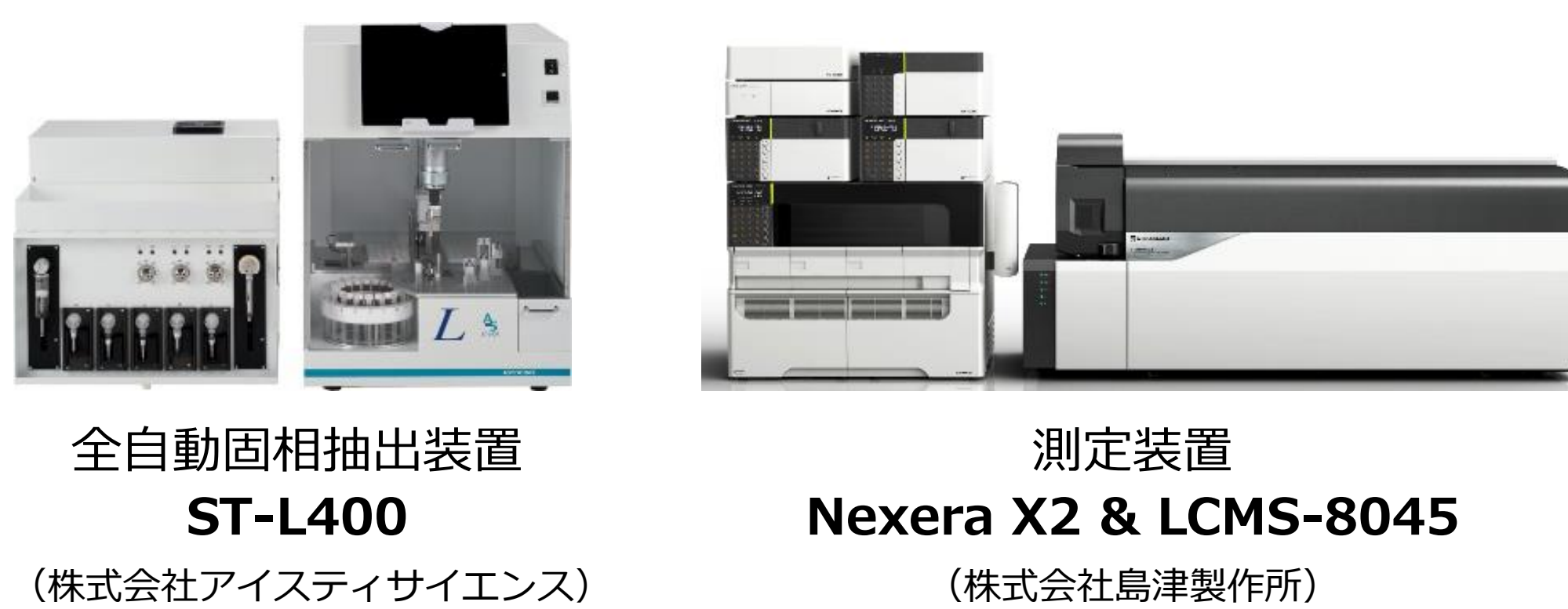


図2 自動前処理工程

【結果と考察】

1. タンパク質除去効果の確認実験

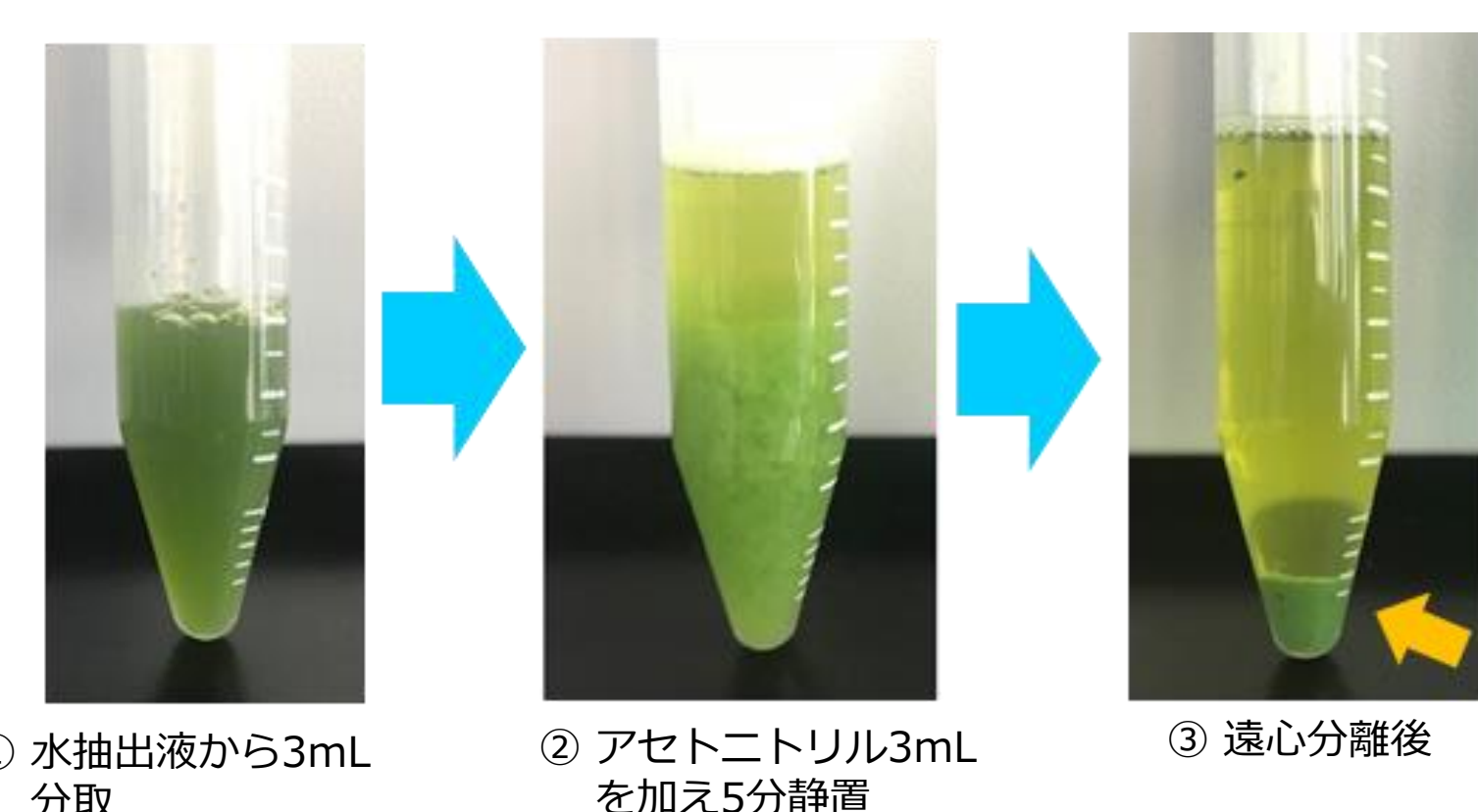


図3 タンパク質除去の効果

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

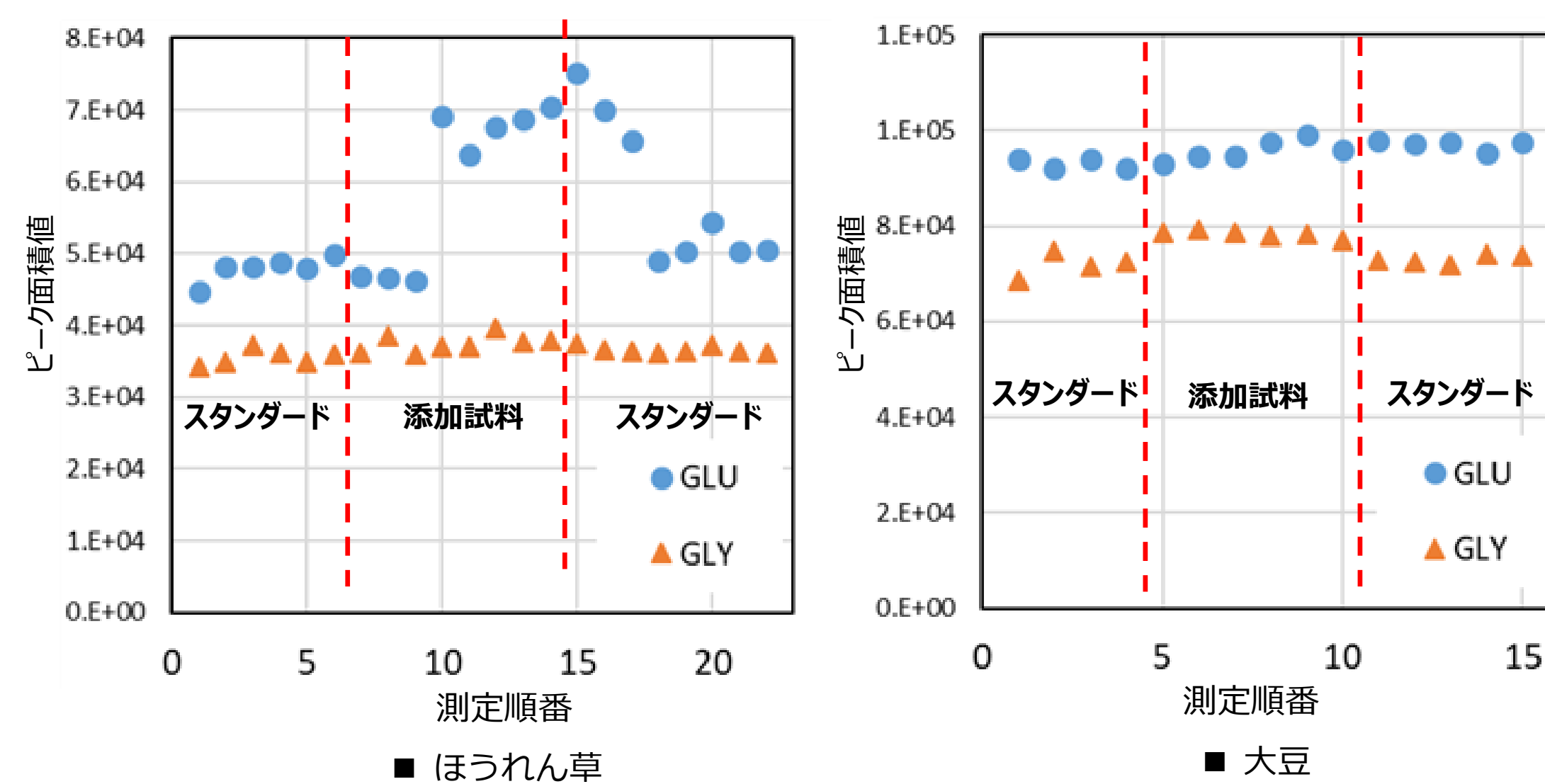
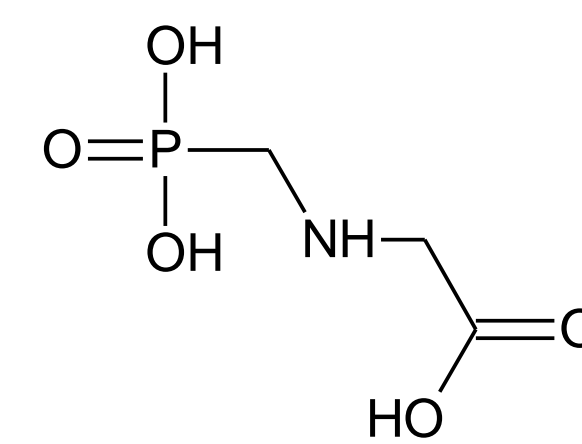


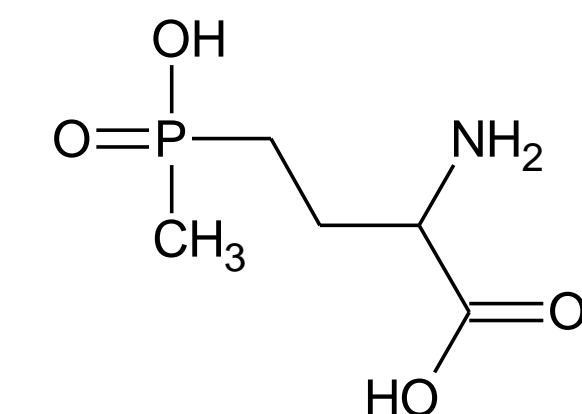
図4 連続測定におけるマトリックスの影響

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)

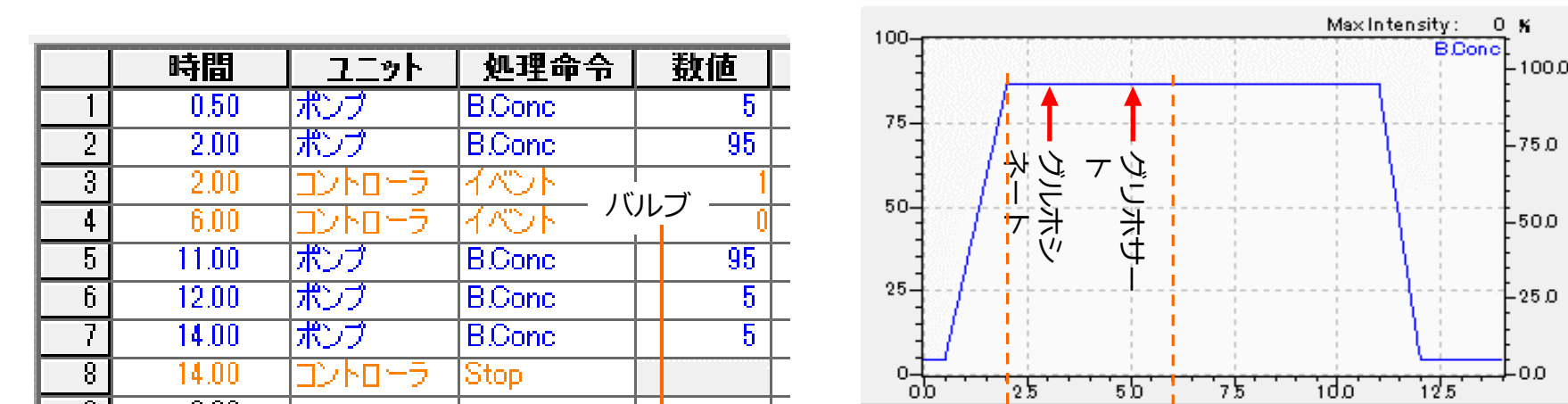


グルホシネート: Glufosinate (GLU)
化学式: C₅H₁₂NO₄P
分子量: 181.1
LogPow = <0.1 (pH7, 22°C)
pKa1 < 2, pKa2 < 2.9, pKa3 < 9.8



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	400	-21	-15	-24
		182.10 > 119.00	400	-21	-21	-21
グリホサート	4.00 - 6.00	170.00 > 88.10	600	-17	-9	-18
		170.00 > 42.10	600	-17	-26	-17

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	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)	K1-01	65,781	38,315	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)	C1-01	57,596	36,833	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	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 バイアル中濃度 S1: 5ppb S2: 2.5ppb	S1-01	70,192	36,586	S1-01	90,784	74,667	
	S1-02	64,757	37,403	S1-02	92,002	75,020	
	Ave.	67,475	36,995	Ave.	91,393	74,844	
	S2	33,304	18,245	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。

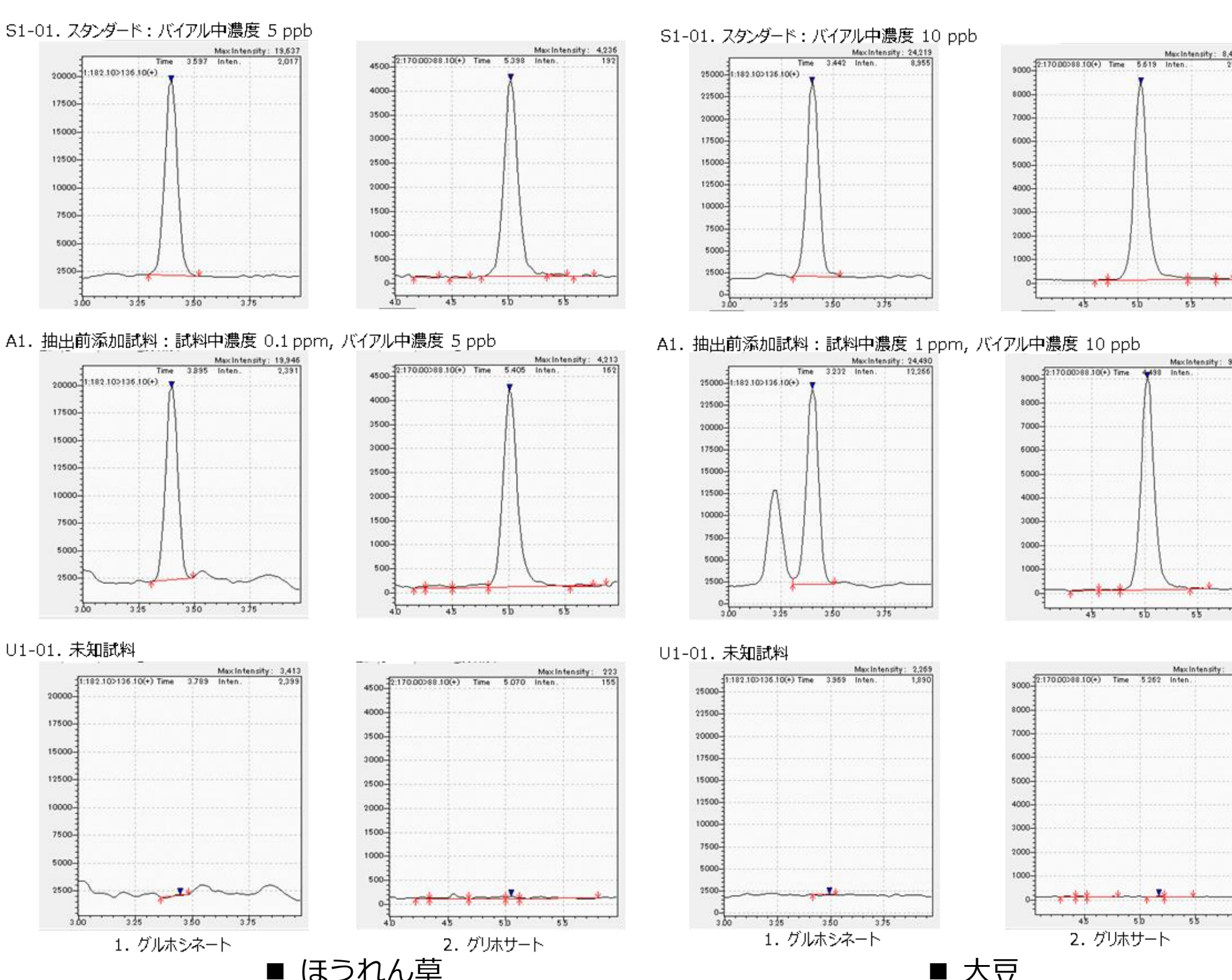


図5 添加回収試験で得られたMRMクロマトグラム

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測定分あたり、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。

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。