

日本食品化学学会第30回 2024年5月24日

オンライン固相誘導体化-LC-MS/MSによる大豆中のグリホサート、グルホシネートおよびそれら代謝物の分析法の開発

佐々野僚一^{1,2}、○亀山浩^{1,3,4}、関澤純平¹、原野幹久⁴、勝本叶香¹、斎藤勲²、
田口貴章³、堤智昭³、伊藤里恵^{1,4}、岩崎雄介^{1,4}

¹星薬科大学大学院、²（株）アイスティサイエンス、

³ 国立医薬品食品衛生研究所、⁴星薬科大学薬学部

日本食品化学学会 第30回 総会・学術大会

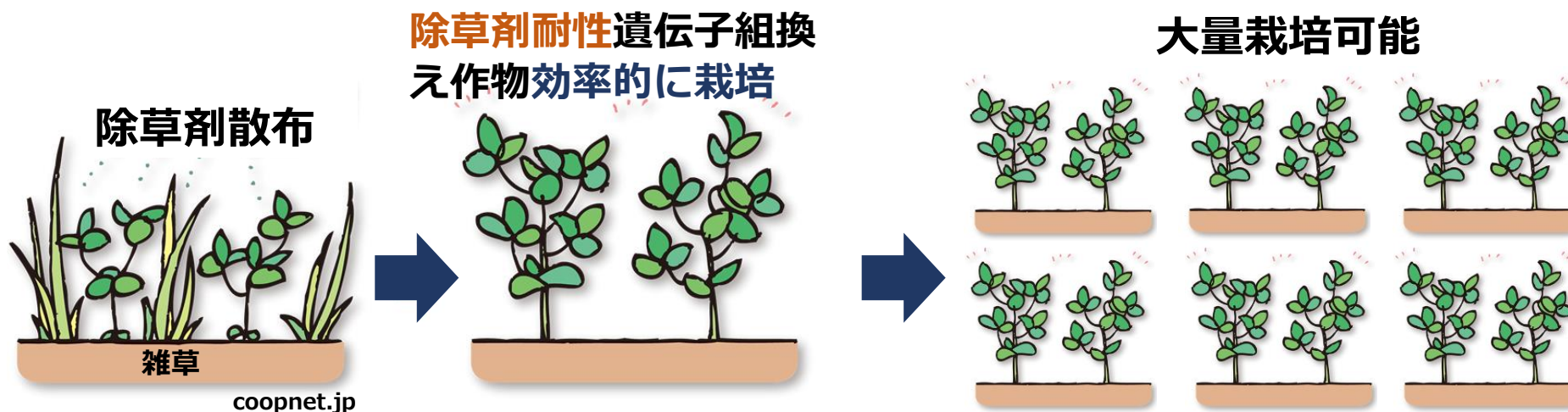
利益相反の開示

発表者名：穂山浩

私は今回の演題に関連して、
開示すべき利益相反はありません

研究背景および目的

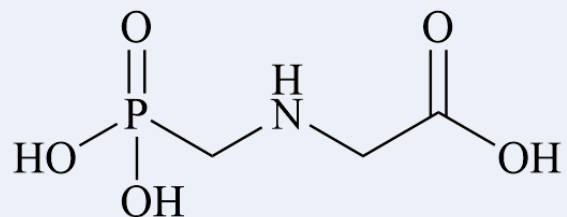
世界農業では**収穫量向上**を目的として遺伝子組換え作物の開発、栽培がされている。



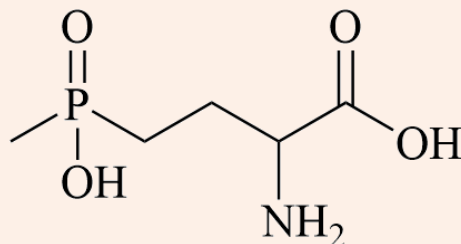
LC-MS/MSを用いた大豆中の残留除草剤の分析法の開発を行った。

測定対象物質（大豆の規制対象物質）

グリホサート、グルホシネートおよびその代謝物

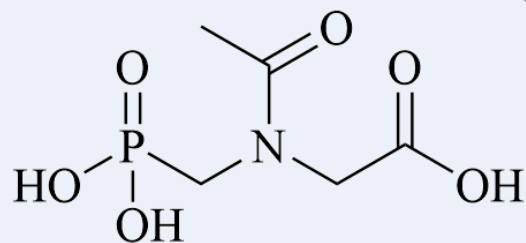


Glyphosate : Gly

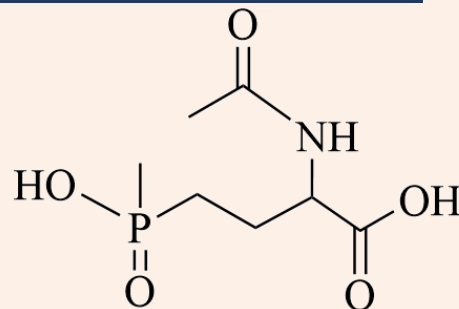


Glufosinate : Glu

組換え遺伝子の酵素によってアセチル化



N-Acetyl-glyphosate : Gly-A



N-Acetyl-glufosinate : Glu-A

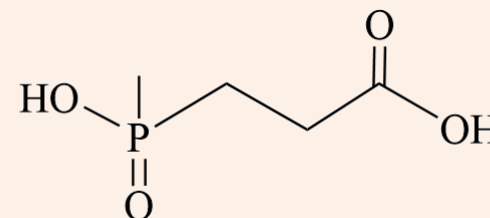
対象物質の特徴

リン酸基やカルボキシ基を持つ
→ **高極性**を示す

抽出精製で時間がかかる

イオン化効率も悪く **感度が低い**

非遺伝子組換え作物中でも代謝



3-(Methylphoshinico)propinic acid : MPPA

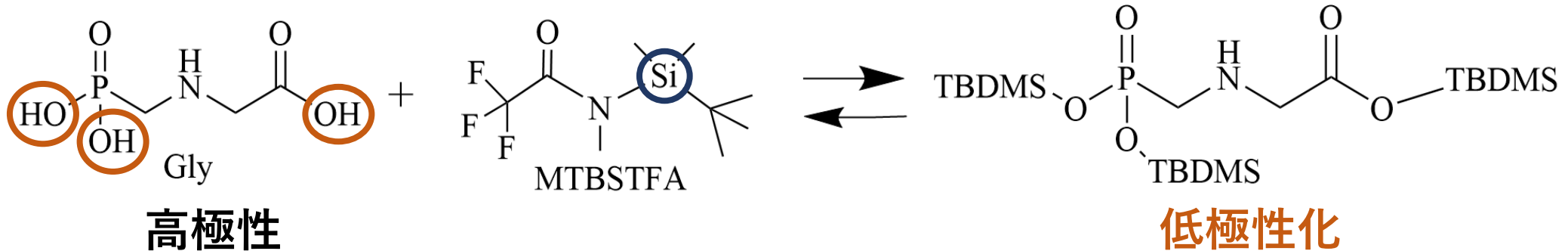
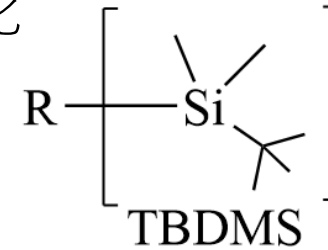
誘導体化反応

低極性化→再現性の向上、高感度化→高倍率希釈によるマトリックス低減を目指す

TBDMS (*t*-Butyldimethylsilyl) 化試薬による誘導体化

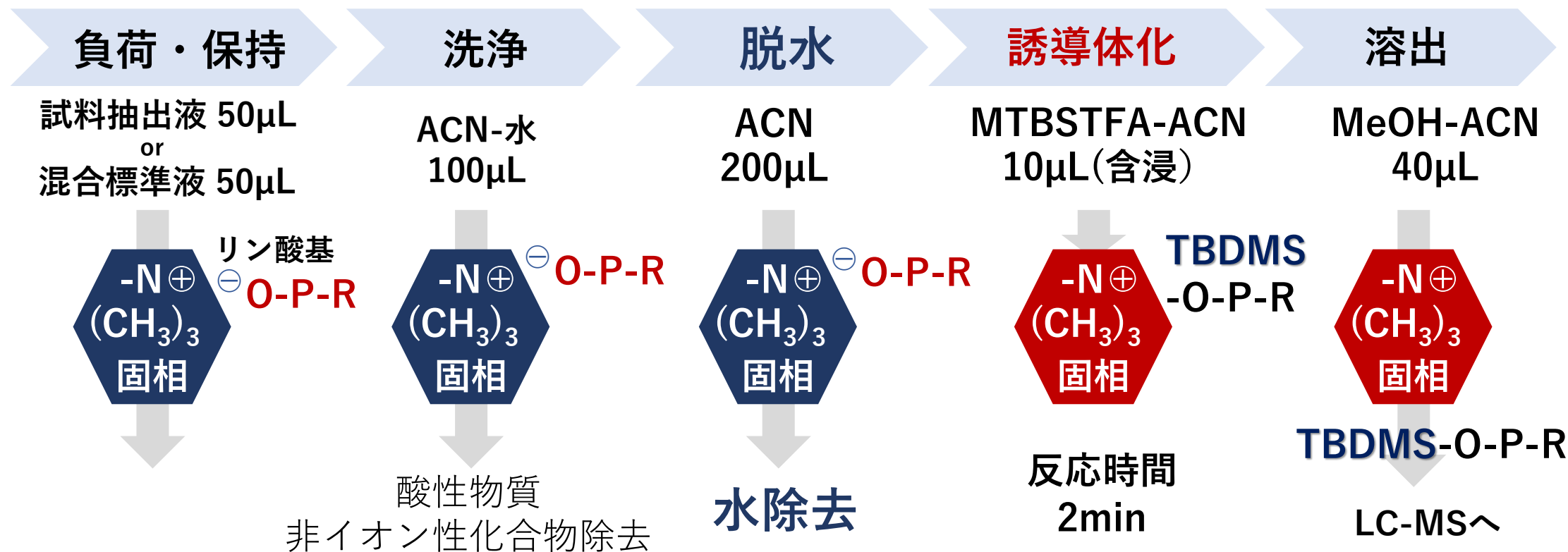
シリル化試薬の中で反応性と安定性のバランスが良い。

しかし、水や酸性条件下で加水分解を起こすため、再現性を高めるために防止する必要がある。



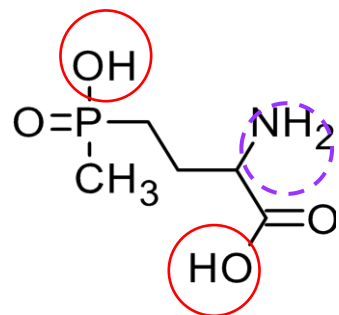
固相カートリッジ中での誘導体化により加水分解の防止と迅速化を目指した。

固相抽出による精製、誘導体化の最適条件

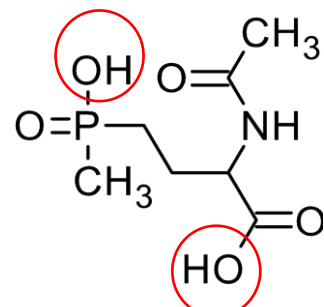


固相カートリッジ中で抽出液からの精製及び誘導体化を可能にした。

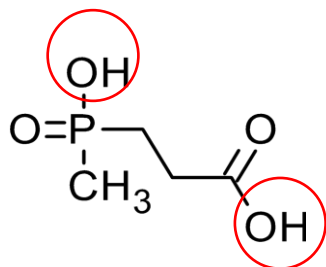
MRM(Multiple reaction monitoring)条件



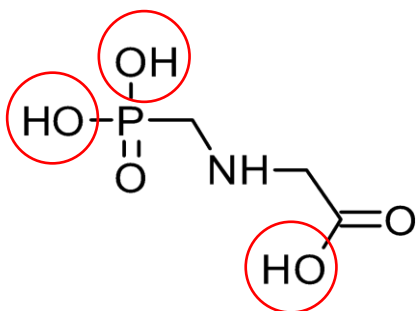
Glufosinate
-2TBDMS



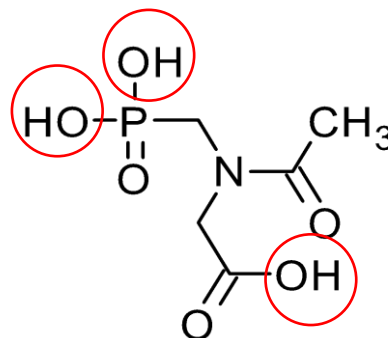
N-Acetylglufosinate
-2TBDMS



MPPA-2TBDMS



Glyphosate
-3TBDMS



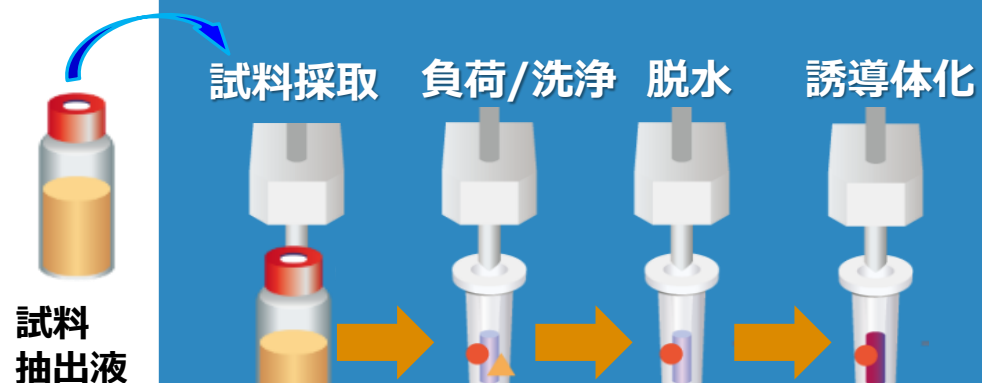
N-Acetylglyphosate
-3TBDMS

太字…定量イオン 細字…確認イオン

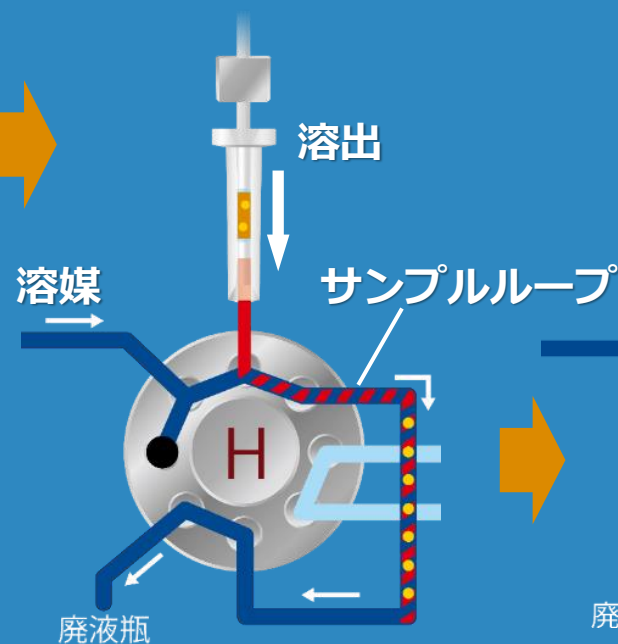
Analytes	MW	プリカーサ イオン [M+H] ⁺	プロダクト イオン
Glufosinate	409	410	195, 179
MPPA	381	382	249, 151
GluA	451	452	195, 179
Glyphosate	511	512	311, 295
GlyA	553	554	311, 352

オンライン固相誘導体化SPE-LCの工程

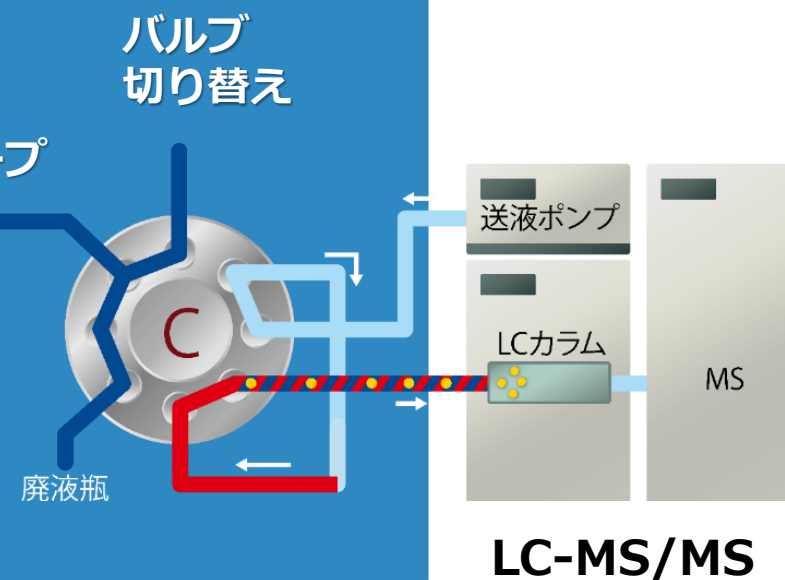
STEP 1 試料採取・負荷・誘導体化



STEP 2 溶出



STEP 3 LCへ導入



前処理フロー

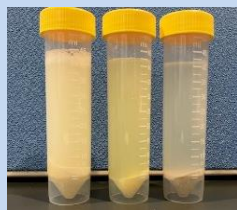
■ 試料抽出

ドライアイス凍結粉碎
大豆 2 g

— 添加 水 40 mL
振とう : 10分

遠心分離 : 5分

抽出



20倍希釈

上澄み液 : 分取 50 μ L

除タンパク

— 添加 **MeOH 950 μ L**
攪拌 : タッチミキサー



遠心分離 : 3分

400倍希釈

上澄み液 : 分取 10 μ L

希釈

— 添加 ACN-水(1/1) 980 μ L
— リン酸10ppm/クエン酸400ppm 10 μ L

試料抽出液



40000倍希釈

■ オンライン固相誘導体化SPE-LC/MS

オンライン前処理装置 : SPL-W100(アイステイサイエンス)

固相 : Flash-SPE **AXs:保持**

コンディショニング
ACN-水 (1/1)

— 負荷[保持] 試料抽出液 50 μ L



— 洗液 ACN-水 (1/1)

— 脱水 ACN

— 含浸 **1% MTBSTFA-ACN**
誘導体化反応_2 min 室温

— 溶出 MeOH-ACN(1/9)

— 混合 MeOH-ACN(5/95)

LC-MS

LC-MS/MS 測定条件

LC条件

分析カラム：InertSustain C18
(100 mm × 2.1 mm i.d., 3 μm, GL Sciences社)

カラム温度：40℃

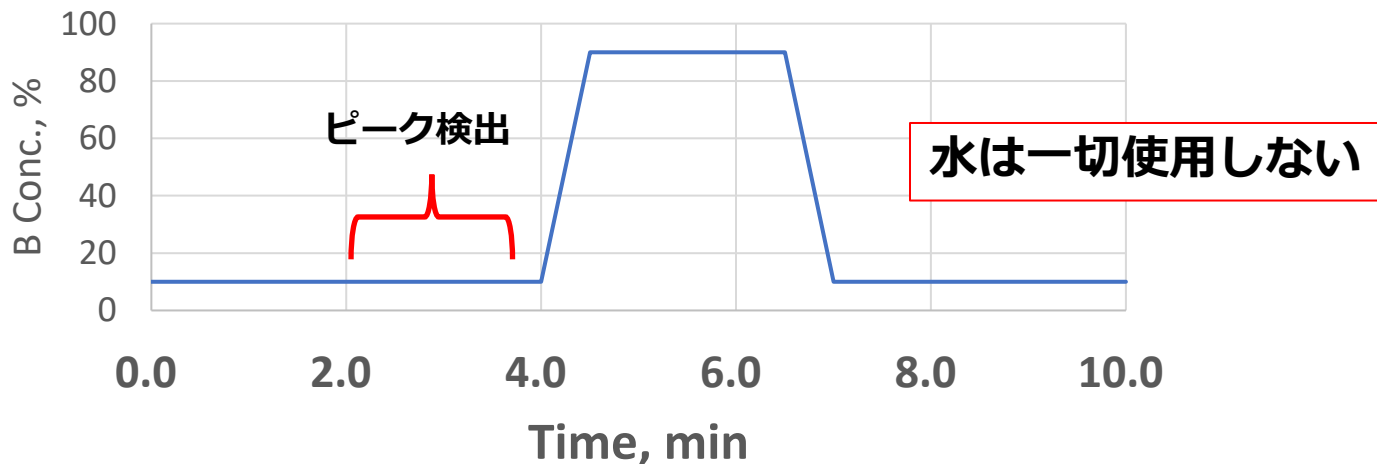
流速：0.2 mL/min

移動相 A; THF-ACN(5/95)

B; 0.2mM酢酸アンモニウム-MeOH

グラジエント

B; 10%(4min)-90%(4.5min-6.5min)-5%(7min)



MS条件

イオン化モード：ESI Positive

ネブライザーガス：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

インターフェイス温度：300 °C

DL温度：200 °C

ヒートブロック温度：350 °C

装置

オンライン固相誘導体化SPE-LC/MS

前処理装置：SPL-W100
(アイスティサイエンス社)

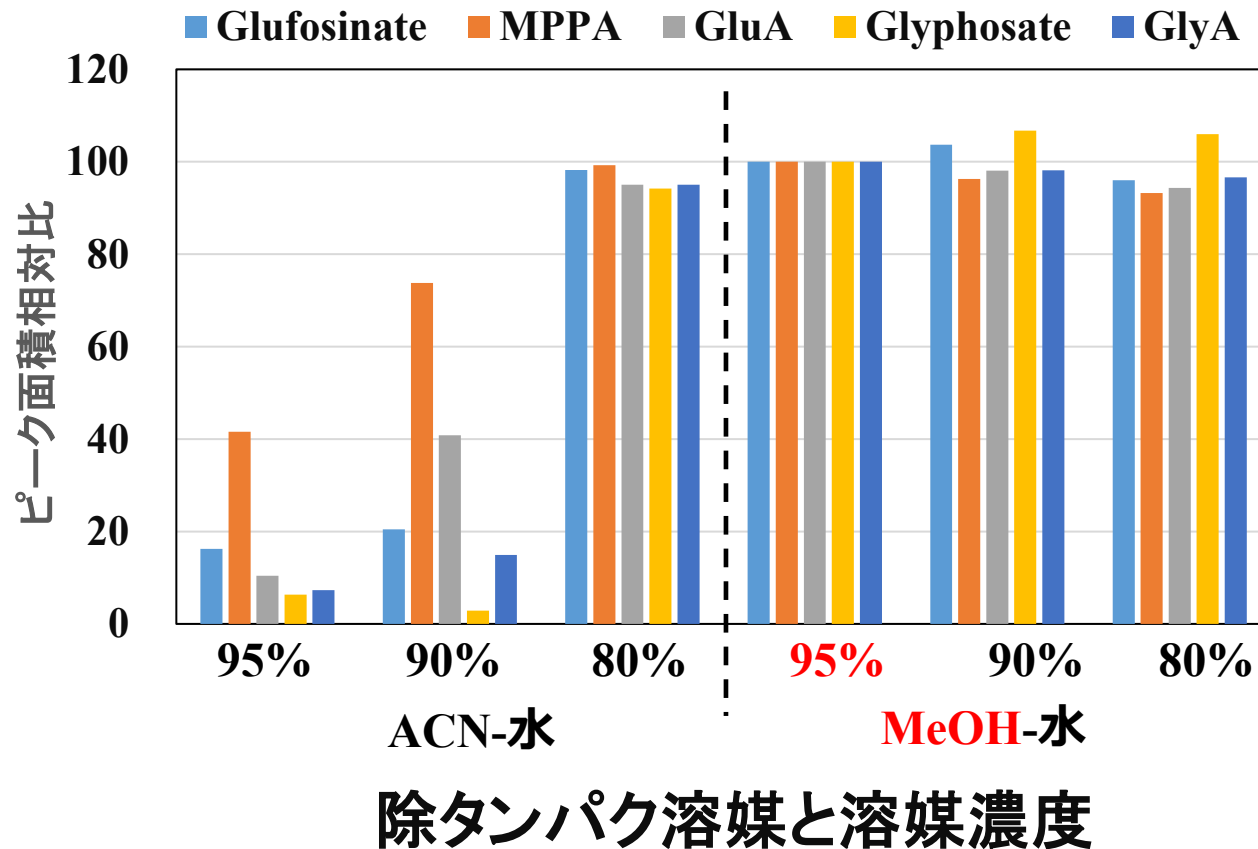
LC-MS：LC-MS 8045 (島津製作所社)



前処理装置

LC-MS

除タンパク質の溶媒濃度の検討



除タンパク質工程の条件

上澄み液：分取 50 μL

添加 **MeOH 950 μL** ← 溶媒の検討

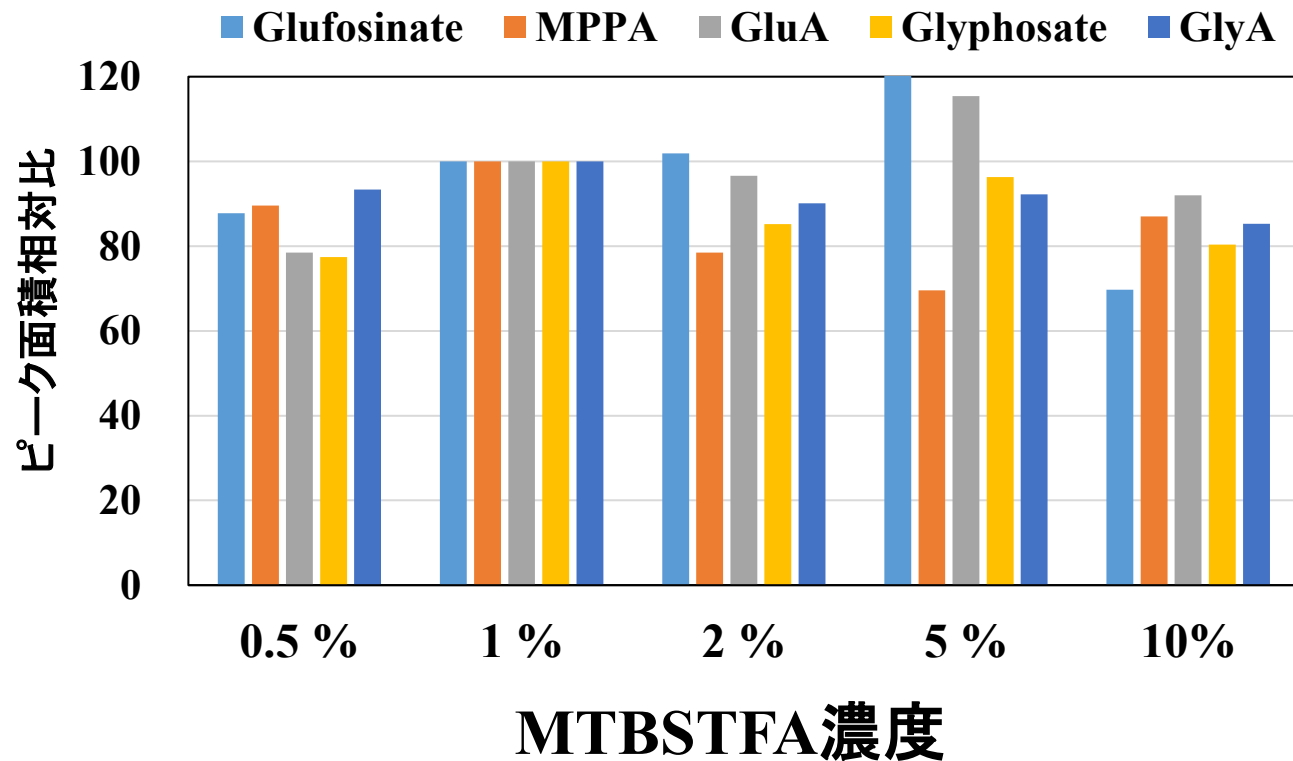
攪拌：タッチミキサー

遠心分離：3分

溶媒濃度, %	95	90	80
ACN or MeOH, μL	950	900	800
抽出上澄み液, μL	50	50	50
水添加, μL	0	50	150

95%MeOHを最適条件とした。

MTBSTFA濃度の検討



条件

誘導体化液：MTBSTFA-ACN

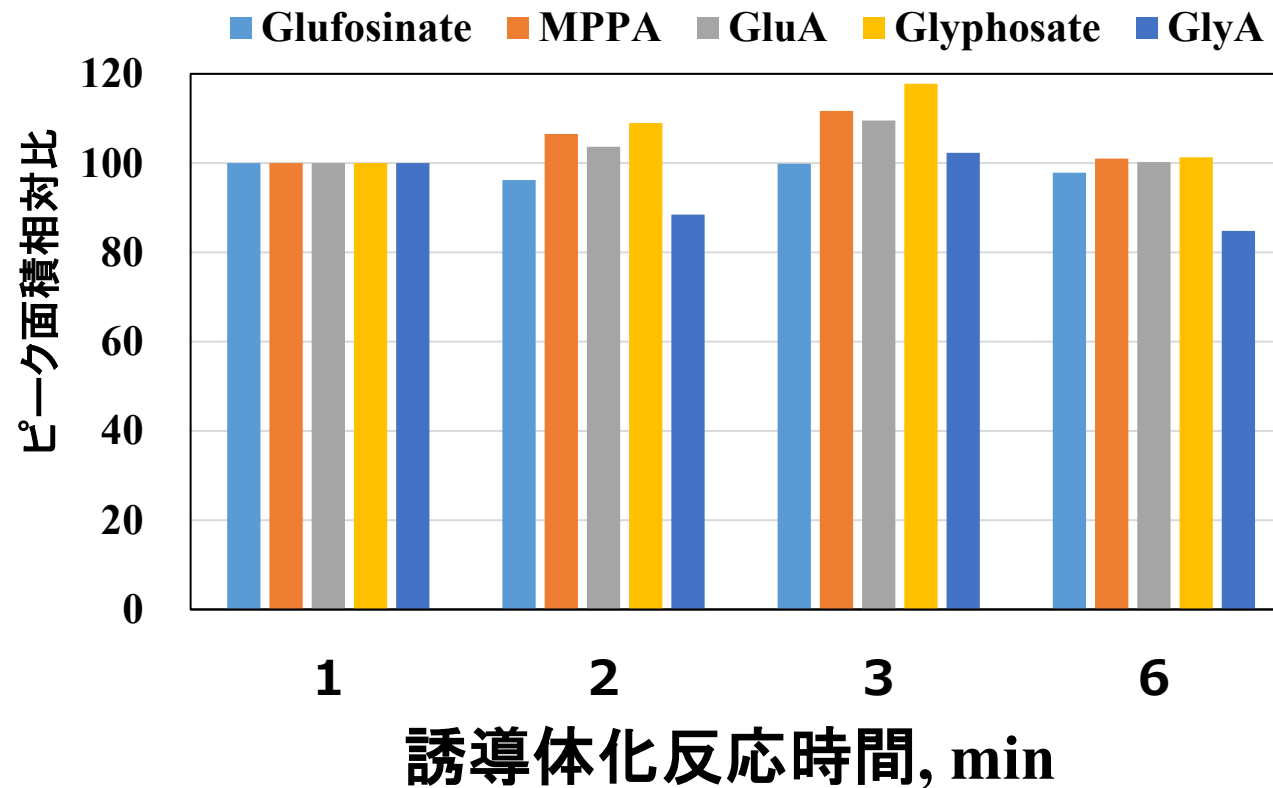
添加量：10 μ L

反応時間：2 min

固相：AXs 3mg

1%MTBSTFA-ACNを最適条件とした。

誘導体化反応時間の検討



条件

誘導体化反応時間

固相に誘導体化試薬を含侵させて
いる時間

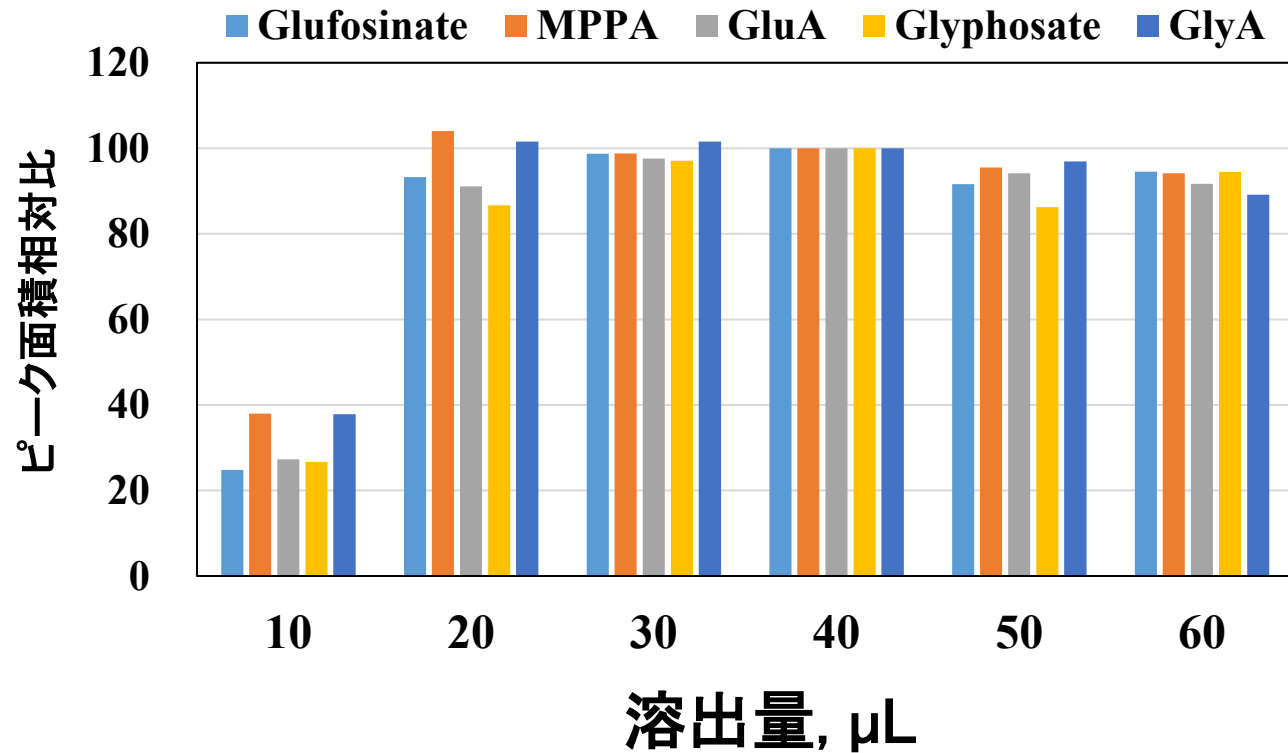
誘導体化液：1%MTBSTFA-ACN

添加量：10 μ L

固相：AXs 3mg

反応時間の最適条件は 2 min とした。

溶出量の検討



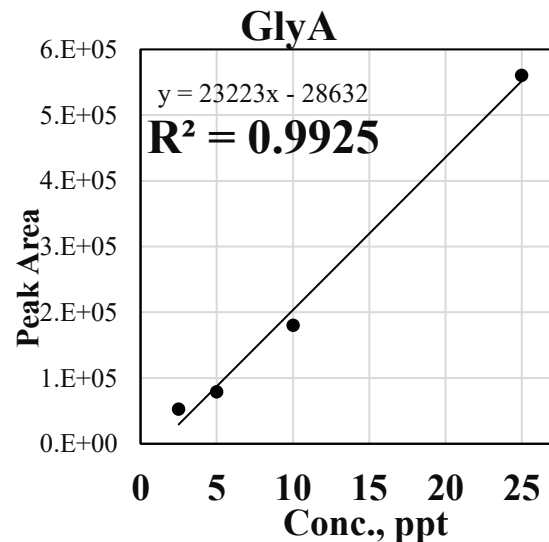
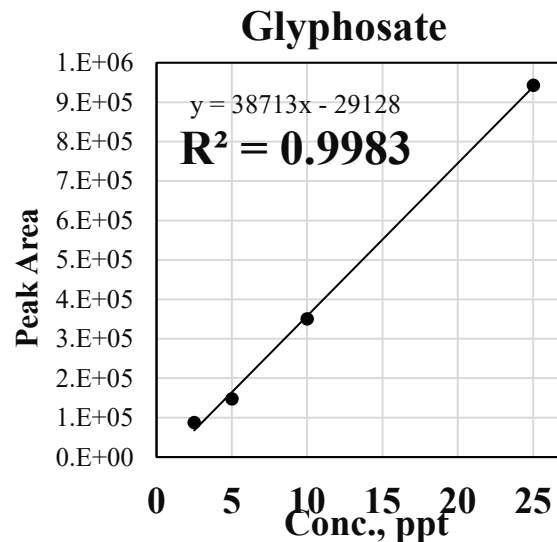
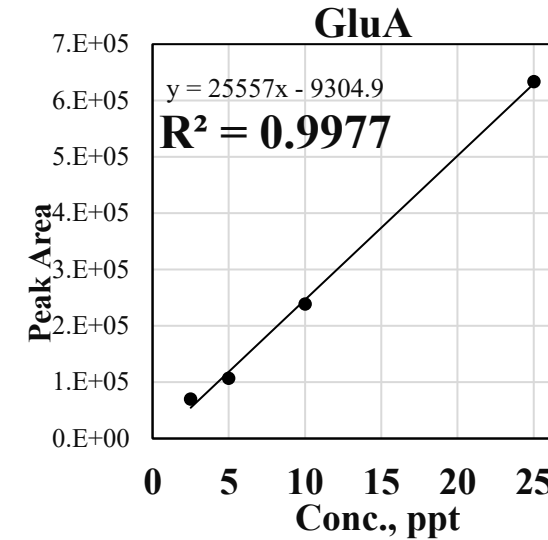
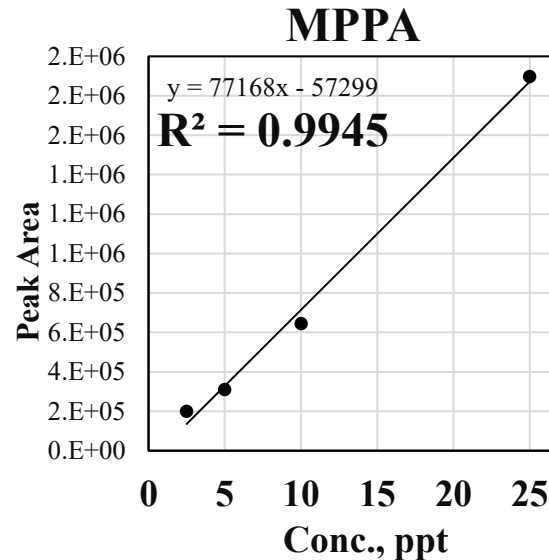
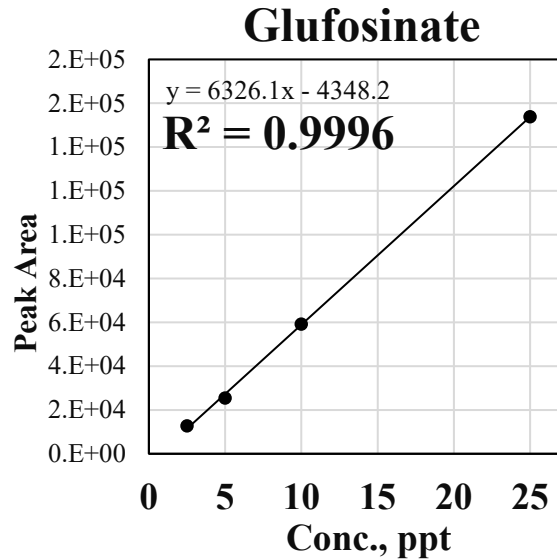
条件

固相 : AXs 3mg

溶出溶媒 : MeOH-ACN(1/9)

溶出量の最適条件は 40 μL とした。

絶対検量線



濃度範囲

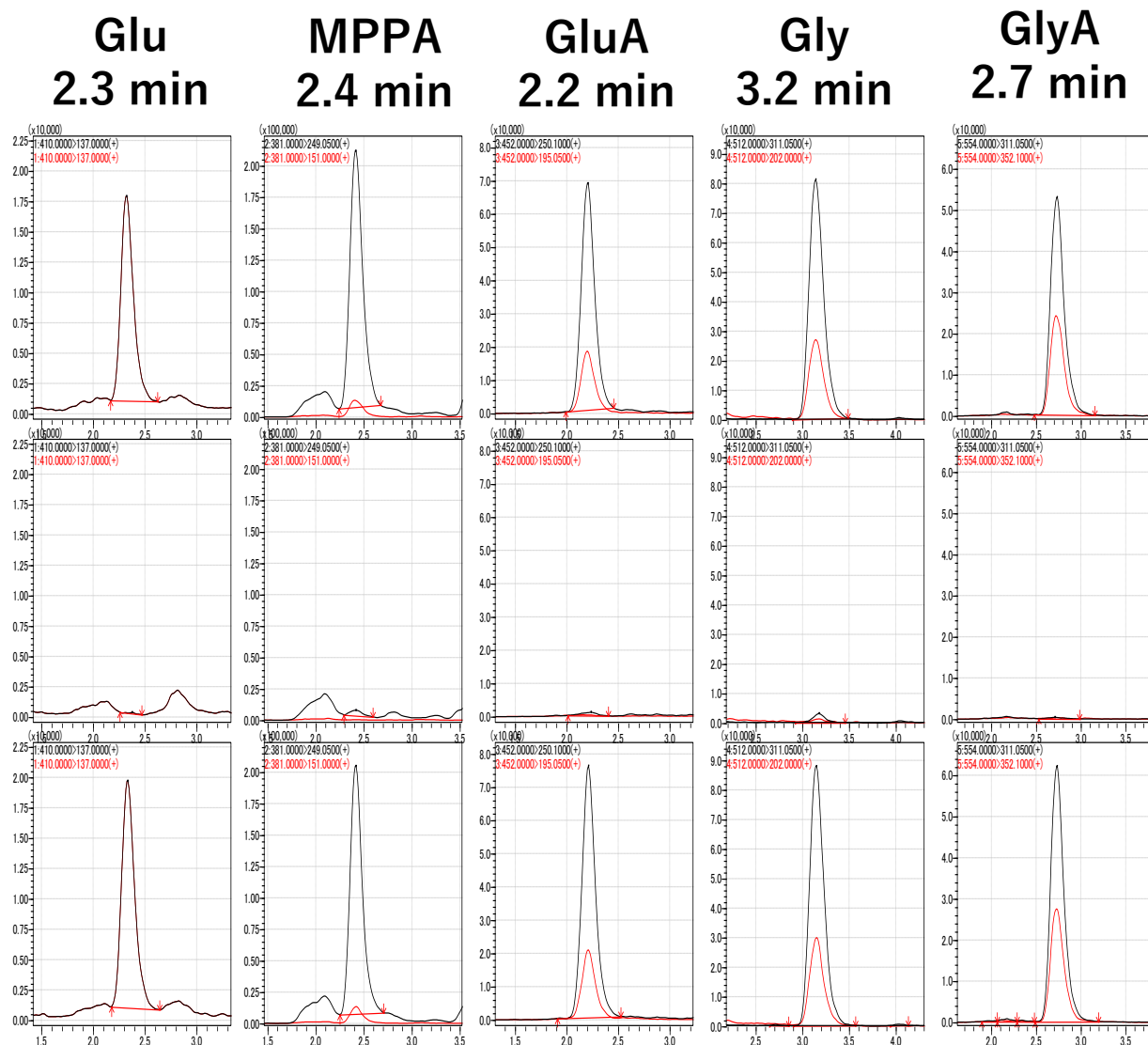
バイアル中濃度：2.5～25 ppt

試料中濃度換算：0.1～1 ppm

決定係数 (R^2)

0.992以上を示した。

定量MRMイオンクロマトグラム



Gly+Gly-A

基準値 20 mg/kg

添加濃度 各1 mg/kg

測定濃度 各0.025 µg/kg

定量下限 各0.05 mg/kg

Glu+Glu-A+MPPA

基準値 2 mg/kg

添加濃度 各 1 mg/kg

測定濃度 各0.025 µg/kg

定量下限 各 0.1 mg/kg

添加回収試験：回収率と併行精度

目標値…平均回収率 70-120%、併行精度10%未満

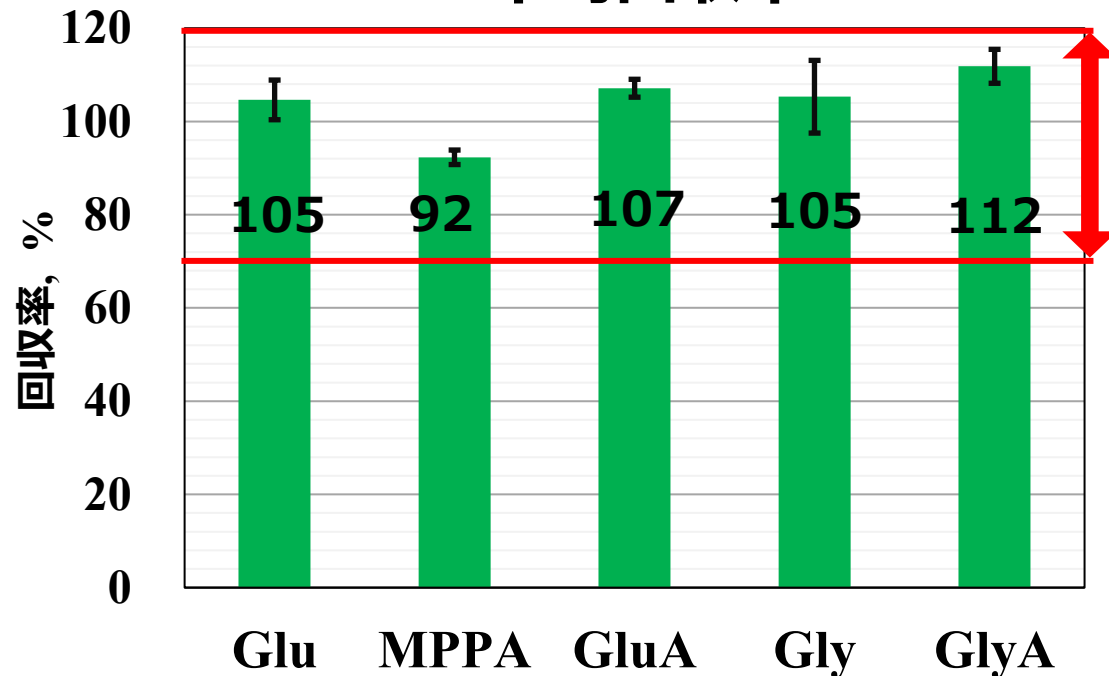
添加回収試験

試料：食用大豆（日本産）

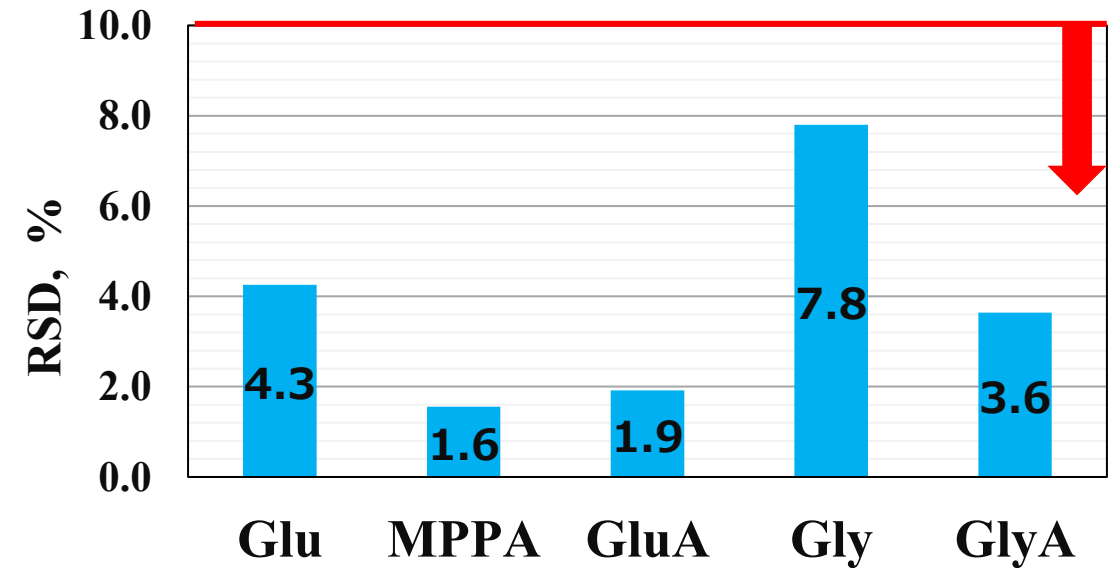
添加濃度：1 ppm

n = 6

平均回収率



併行精度



目標値に収まる結果を得たため、本分析法の妥当性が確認された。

大豆検体への適用

アメリカ産は MON89788(グリホサート耐性CP4EPSPS.) X A5547-127(グルホシネート除草剤
 体制アセチル化酵素)
 ブラジル産 GTS 40-3-2(グリホサート耐性CP4EPSPS.) MON89788(グリホサート耐性
 CP4EPSPS.)

Biol. Pharm. Bull. **43**, 1259–1266 (2020)

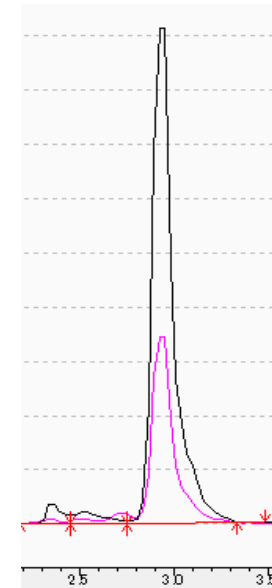
大豆定量値 (mg/kg)

外国産飼料丸大豆、大豆かすの定量値を確認した。

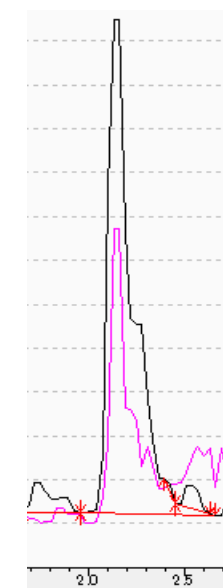
産地・特徴	Gly	Gly-A	Glu	Glu-A	MPPA
GM-1	0.97	N.D.	N.D.	2.00	N.D.
GM-2	1.50	N.D.	N.D.	1.22	N.D.
GM-3	1.25	N.D.	N.D.	1.91	N.D.
Non-GM-1	N.D.	N.D.	0.26	N.D.	N.D.
Non-GM-2	N.D.	N.D.	0.29	N.D.	N.D.
Non-GM-3	N.D.	N.D.	0.24	N.D.	N.D.
アメリカ-1	0.41	N.D.	N.D.	0.31	N.D.
アメリカ-2	0.37	N.D.	N.D.	0.57	N.D.
アメリカ-3	0.44	N.D.	N.D.	0.85	N.D.
アメリカ-4	0.36	N.D.	N.D.	0.58	N.D.
アメリカ-5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ブラジル-1	3.39	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ブラジル-2	1.05	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ブラジル-3	1.42	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
アメリカ・ ブラジル-粕	1.73	N.D.	N.D.	0.28	N.D.

飼料用大豆のクロマトグラム

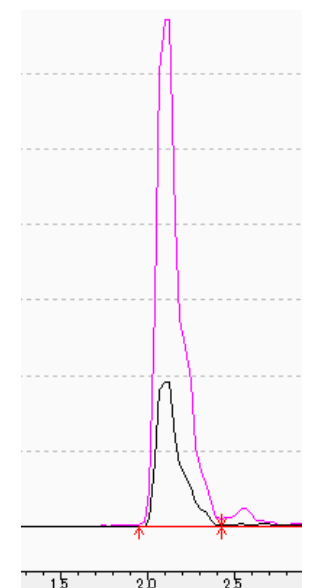
GM : Gly
512>311, 295



Non-GM : Glu
410>195, 179



GM : Glu-A
452>195, 250



Gly, Glu, Glu-Aの定量値を算出できたため、
 本法の大豆への適用性が示された。

本分析法と公定法との比較

	グリホサート類の公定法	グルホシネート類の公定法	本分析法
抽出法 (時間)	ジクロロメタン液液抽出 70分	エーテル液液抽出 30分	水抽出-除タンパク 30分
精製法・ 誘導体化	固相抽出法 30分	固相抽出後、 オルト酢酸トリエチル誘導体 化 3時間	固相誘導体化法 10分
分析条件	LC-MS/MS 20分	ガスクロマトグラフ分析 30分	LC-MS/MS 10分
分析時間	2時間	一斉分析 5時間以上 3時間以上	一斉分析で50分

前処理から
測定まで
全自動

本分析法により迅速な一斉分析を可能にした。→信頼性の検証を行う。

考察・まとめ

オンライン固相誘導体化-LC-MS/MSによる大豆中のグリホサート、グルホシネートおよびそれらの代謝物の5成分の一斉分析法を確立した。

本法は、迅速、簡便かつ信頼性のある分析法であり、基準値監視のモニタリングや、原材料の品質管理の方法として有用である。

大豆試料中から *N*-アセチルグルホシネートの定量の報告例はない。

飼料用大豆の定量結果から、

アメリカ生産大豆…CP4EPSPS導入Gly耐性 (MON89788) × アセチル化酵素導入Glu耐性 (A5547-127) ブラジル生産大豆…CP4EPSPS導入Gly耐性 (MON89788) 品種が主流になっていることが示唆された。