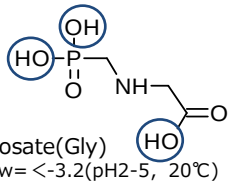
固相脱水誘導体化法（SPDhD）による グリホサート類およびその代謝物を含めた一斉分析法 ほうれんそう

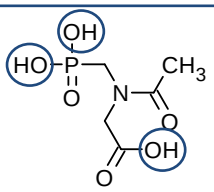
はじめに

グリホサートとグルホシネートは世界で最も広く使用されている除草剤です。近年、その農薬に耐性のある遺伝子組換え作物が開発され、より多く散布されるようになりました。そのため、日本を含む各国ではその代謝物を含む基準値が設定されています。しかし極性が極めて高いため分析時には誘導体化するのが一般的ですが煩雑さも伴います。そこで本アプリケーションでは固相誘導体化法を用いて簡便・迅速に代謝物を含む５成分の一斉分析法をご紹介します。

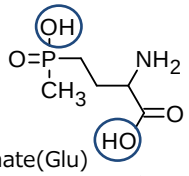
対象化合物



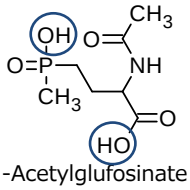
Glyphosate(Gly)
LogPow= <-3.2(pH2-5，20℃)



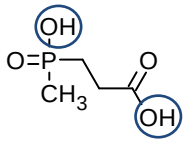
N-Acetylglyphosate(GlyA)



Glufosinate(Glu)
LogPow= <0.1(pH7、22℃)



N-Acetylglufosinate (GluA)

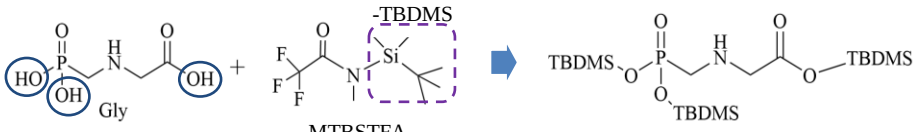


3-methylphosphinicopropionic acid （MPPA)

グリホサート類とTBDMS誘導体化

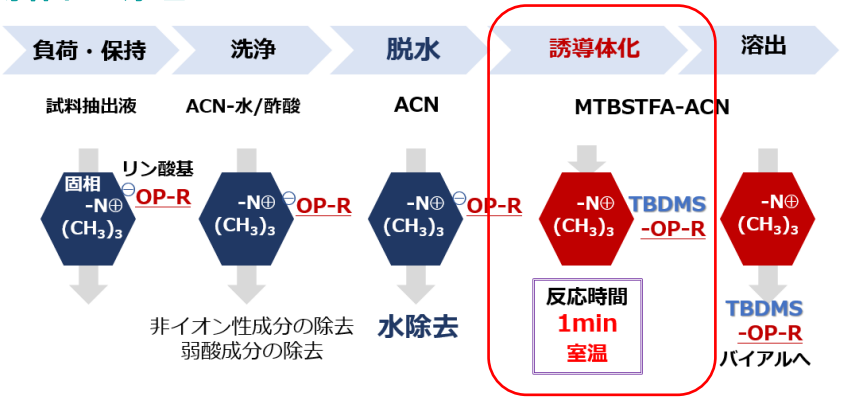
TBDMS（*t*-Butyldimethylsilyl）化により、リン酸基やカルボキシ基を誘導体化することで
グリホサート類を低極性化し、LCカラムや配管などへの吸着を抑え、測定しやすい物質に変換します。

TBDMS（*t*-Butyldimethylsilyl）化による誘導体化
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、水があると分解するため、水分に注意。



高極性　MTBSTFA　低極性化

固相誘導体化の原理



固相カートリッジ中で精製及び誘導体化を可能にした。

グリホサート類
分析キット

Sample

Information

残留農薬基準値

ほうれんそう

グリホサート 0.2 ppm

グルホシネート 0.1 ppm
グルホシネート（D体及びL体)(代謝物Z【*N*-アセチル-グルホシネート】を含む。）及び代謝物B【3-メチルホスフィニコプロピオン酸】

Key Word

残留農薬分析
固相抽出
固相誘導体化

AiSTI SCIENCE

Product

Presh-SPE AXs

株式会社アイスティサイエンス
www.aisti.co.jp
お問い合わせ先
TEL. 073-475-0033
E-Mail; as@aisti.co.jp

前処理フロー

【試料抽出】　添加濃度：0.05 ppm

ドライアイス凍結粉砕
ほうれんそう 10 g　抽出
- 添加 水 30+(10 - 試料中水分) mL
- 振とう： 10分
- 遠心分離：5分

4倍希釈

上澄み液：分取 100 µL　除タンパク
- 添加 ACN-水(4/1) 900 µL

撹拌：タッチミキサー
- 遠心分離：1分

40倍希釈

上澄み液：分取 80 µL　希釈
- 添加 ACN-水(4/1) 910 µL
- 添加 疑似マトリックス水溶液 10 µL
  リン酸 20 ppm/クエン酸 400 ppm

試料抽出液（1mL）

500倍希釈

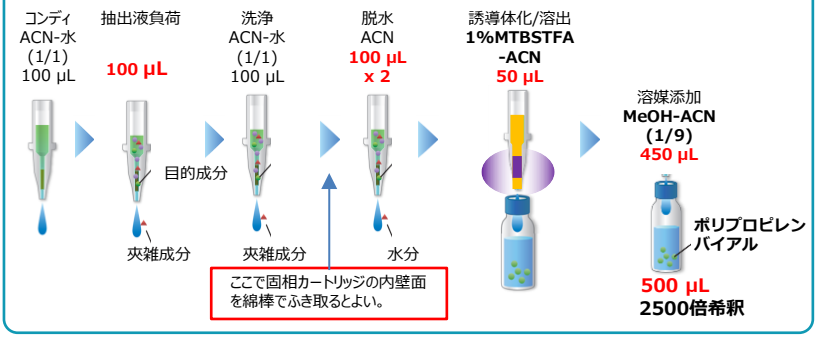
【固相誘導体化】

- コンディショニング ACN-水(1/1) 100 µL
- Presh-SPE AXs:保持
- 負荷[保持] 試料抽出液 100 µL
- 洗液 ACN-水(1/1) 100 µL
- 脱水 ACN 100 µL x2
- 溶出 1% MTBSTFA-ACN 50µL
- 混合 ACN-MeOH(9/1) 450 µL
- 定容 500 µL

2500倍希釈

バイアル中濃度：20 ppt

Presh-SPE Axs を用いた固相抽出



測定条件

【測定装置】
LC-MS 8045（島津製作所社）

【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; ACN
B; 1mM酢酸アンモニウム-MeOH
グラジエント
B; 30%(0-4min)-80%(4.5min-6.5min)
-30%(7-10min)

【MS条件】
イオン化モード：ESI Positive
ネブライザーガス：3 L/min
ドライングガス流量：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 ℃
DL温度：200 ℃
ヒートブロック温度：350 ℃

結果と考察

グリホサート、グルホシネートおよびこれらの代謝物を含む５成分の検量線、回収率を示します(図1、表1)。いずれの成分も相関係数(R^2)、回収率、RSDともに良好な結果が得られました。図2にクロマトを示します。誘導体化することで20 pptのピークも感度よく検出できました。

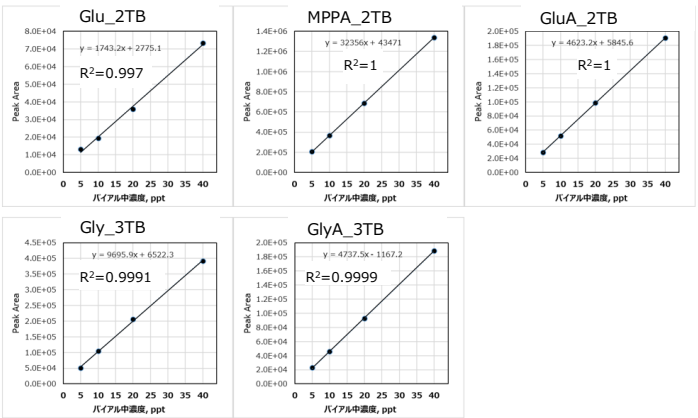


図1　検量線

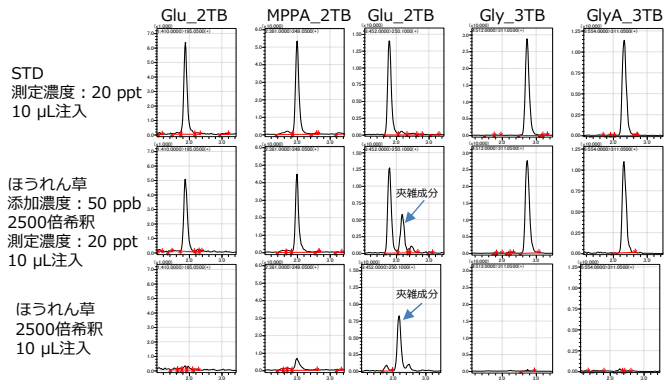


図2　ほうれんそうの定量MRMイオンクロマトグラム

表1　ほうれんそうの添加回収試験結果

	Glu-2TB	MPPA-2TB	GluA-2TB	Gly-3TB	GlyA-3TB
RSD(%)	5.2	1.9	3.7	4.2	2.1
回収率(%)	87	75	93	105	95

TB：TBDMS（*t*-Butyldimethylsilyl）

参考文献

R. Sasano, J. Sekizawa, I. Saito, M. Harano, K. Katsumoto, R. Ito, Y. Iwasaki, T. Taguchi, T. Tsutsumi, and H. Akiyama;
Simultaneous determination of glyphosate, glufosinate and their metabolites in soybeans using solid-phase analytical derivatization and LC-MS/MS determination. Food chemistry: X, 24, 101806 (2024)
https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101806