

食品中のグリホサート固相誘導体化法自動分析の検討

○小西賢治¹⁾、川上正美¹⁾、島三記絵¹⁾、佐々野僚一¹⁾、岩崎雄介²⁾、伊藤里恵²⁾、穂山浩²⁾
¹⁾株式会社アイスティサイエンス、²⁾星薬科大学薬学部

【目的】グリホサート、グルホシネートは非選択性除草剤として広く使用されているが、極性が高く、逆相カラムを用いたLC-MS/MS分析が困難である。本研究では固相脱水誘導体化法によるグリホサート、グルホシネートおよびその代謝物である3-メチルホスフィニコプロピオン酸の一斉分析法¹⁾において高速処理を目的として多検体自動固相抽出装置を用いた分析法を検討した。

【方法】市販の食品を用いて検討を行った。試料に超純水を加えて振とう抽出後、上清を分取してアセトニトリル(ACN)-水(4/1)を添加して振とう、遠心分離により除タンパクを行った。上清を分取しACN-水(4/1)で希釈、疑似マトリックス水溶液を加えた試料を多検体自動固相抽出装置ST-R100（アイスティサイエンス）および固相カートリッジSmash-SPE AXs（アイスティサイエンス）を用いて固相抽出し測定液とした。グリホサート類に含まれるリン酸基と強陰イオン交換固相AXsのイオン交換相互作用により目的物質（グリホサート類）を固相で保持させ、1%MTBSTFA含有ACNにより誘導体化させながら溶出した。ACN-メタノールの混合溶媒で希釈してLC-MS/MSにて測定した。

【結果と考察】従来の誘導体化反応には長時間の加熱・反応時間が必要で、リン酸基を誘導体化が困難などの課題があるが、本法で採用した固相脱水誘導体化法では常温かつ短時間で反応し、リン酸基の誘導体化が可能であ

った。MTBSTFAを用いることによりリン酸基やカルボキシ基をTBDMS化(図1)することでグリホサート類を低極性化し、逆相カラムでの分析が可能となり、さらにLCシステムへの吸着を抑えることができた。

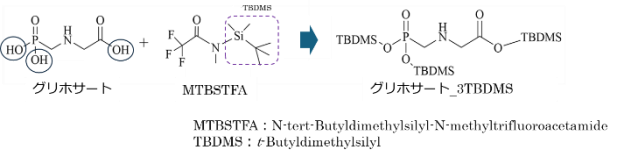


図1 グリホサートのTBDMS化反応

固相脱水誘導体化法により、簡便かつ高感度な分析が可能となる。しかしMTBSTFAによるTBDMS化物は加水分解性が高いため、固相抽出工程においては水分の除去が重要であり、操作には一定の習熟を要する。そこで、誘導体化を含む固相抽出工程を前処理装置によって自動化することにより、作業者の技量に依存せず良好な結果が得られた（表1）と推測される。

表1 ほうれんそう添加回収試験結果

ほうれんそう添加回収試験n=5 試料中濃度0.05ppm	マトリックス検量線により算出	
	平均 回収率(%)	RSD (%)
グリホサート	108	3.7
グルホシネート	123	3.5
3-メチルホスフィニコプロピオン酸	102	2.7

多検体自動固相抽出装置を用いることにより、12検体をおよそ30分で処理することができ、短時間で多数の検体を処理することが可能であった。現在、種々の食品に適用している。

参考文献1)Sasano R., et al., Food Chemistry: X 24, (2024) 101806, (<https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101806>)

A-11

食品中のグリホサート固相脱水誘導体化法 自動分析の検討

○小西賢治¹⁾，川上正美¹⁾，島 三記絵¹⁾，佐々野僚一¹⁾，岩崎雄介²⁾，
伊藤里恵²⁾，穂山 浩²⁾

1)（株）アイスティサイエンス， 2)星薬科大学

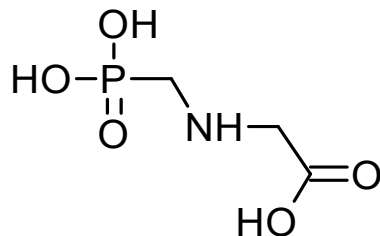


Beyond your Imagination

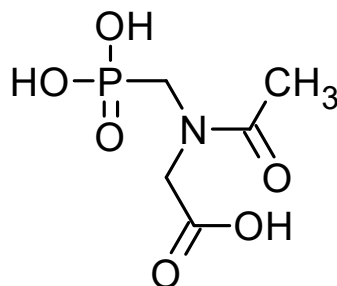
AiSTI SCIENCE

対象化合物

グリホサートとその代謝物

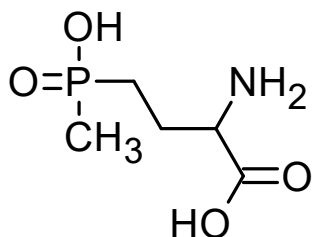


Glyphosate(Gly)
LogPow= <-3.2(pH2-5, 20℃)

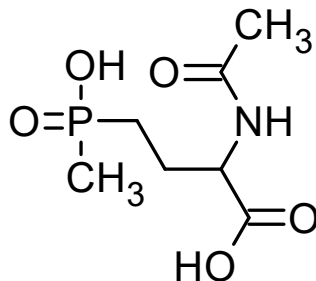


N-Acetylglyphosate(GlyA)

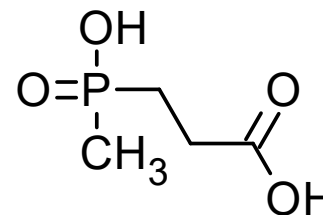
グルホシネートとその代謝物



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



N-Acetylglufosinate (GluA)



3-methylphosphinicopropionic acid (MPPA)

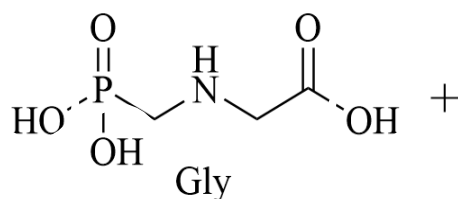
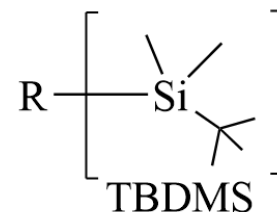
広く使用されているが逆相LC-MS/MS分析が困難

グリホサート類のTBDMS誘導体化

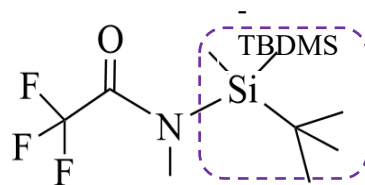
TBDMS (*t*-Butyldimethylsilyl) 化による誘導体化

シリル化試薬の中で反応性と安定性のバランスが良い。

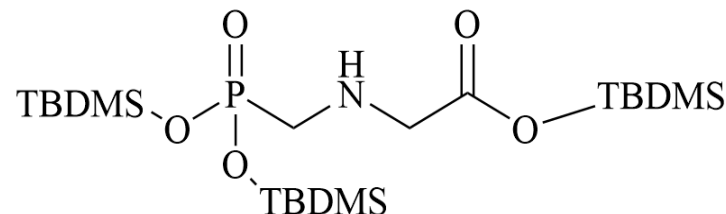
しかし、水があると**分解**するため、**水分に注意**。



高極性



MTBSTFA



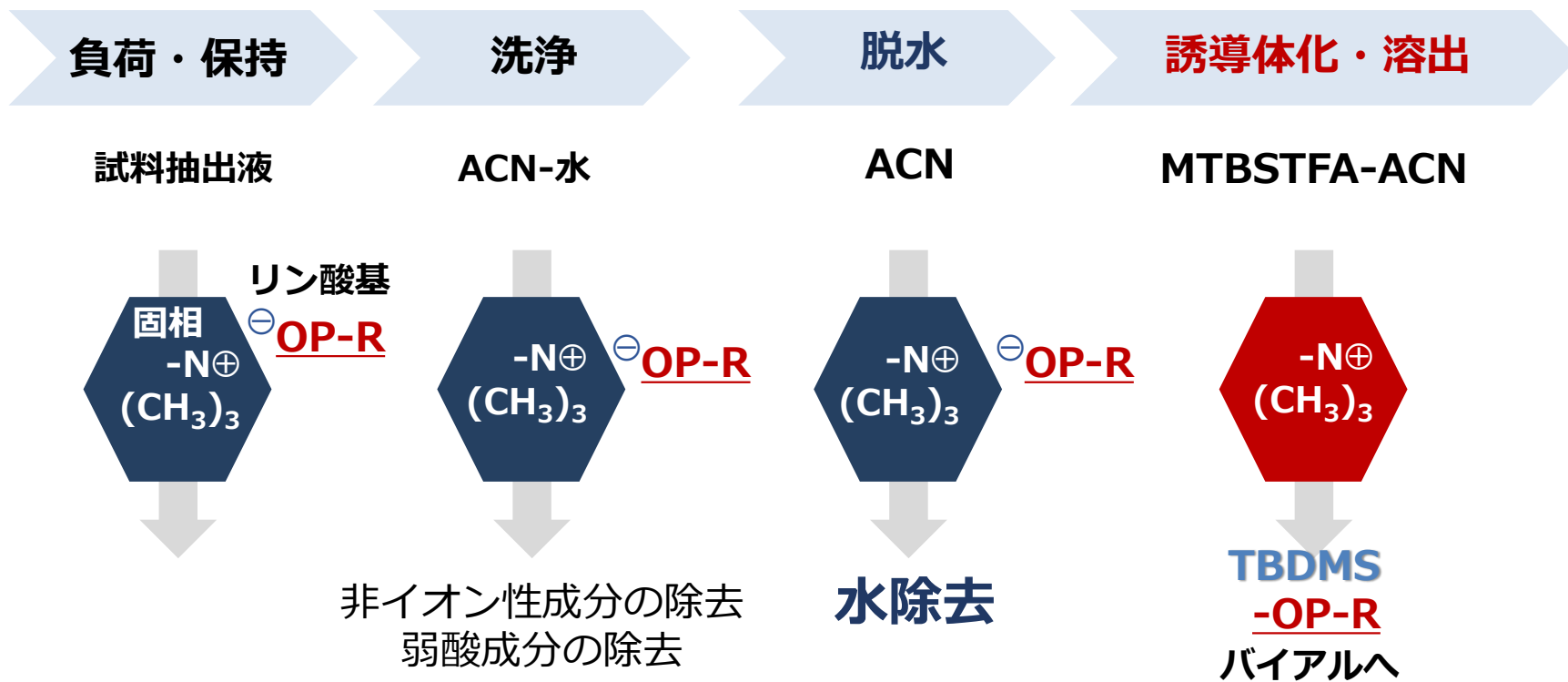
低極性化

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
低極性化し、LCカラムや配管などへの吸着を抑える。



測定しやすい
物質に変化

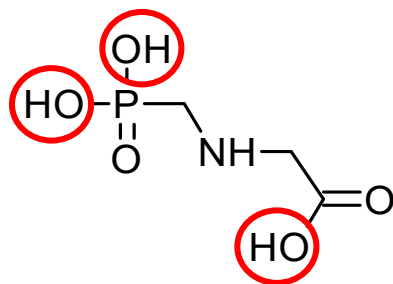
固相脱水誘導体化法の原理



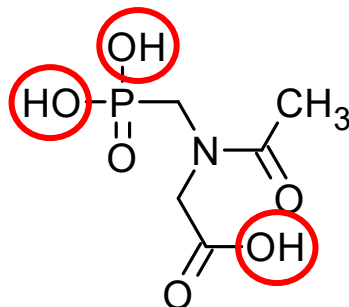
固相カートリッジ中で精製及び誘導体化

対象化合物の誘導体化

グリホサートとその代謝物



Glyphosate (Gly)
LogPow = < -3.2 (pH 2-5, 20°C)

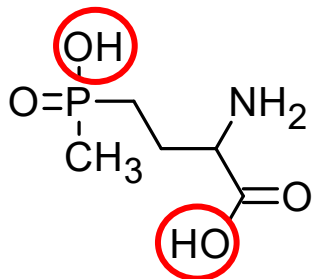


N-Acetylglyphosate (GlyA)

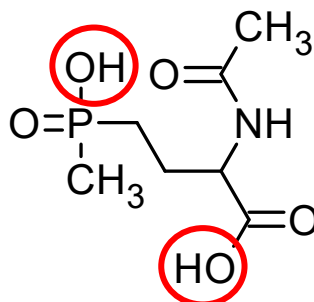
○印がTBDMS化すると
想定される位置

TBDMS : *t*-Butyldimethylsilyl

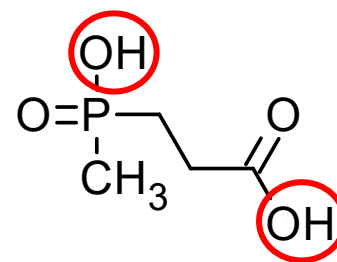
グルホシネートとその代謝物



Glufosinate (Glu)
LogPow = < 0.1 (pH 7, 22°C)



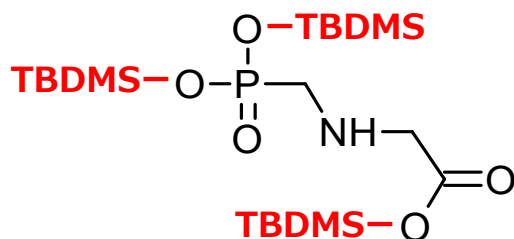
N-Acetylglufosinate (GluA)



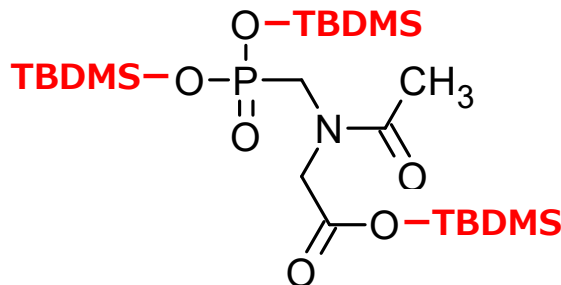
3-methylphosphinicopropionic acid (MPPA)

対象化合物の誘導体化

グリホサートとその代謝物

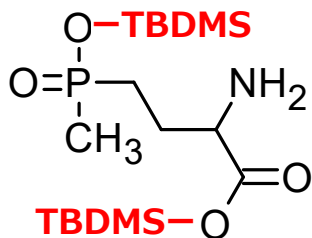


Glyphosate-3 TBDMS (Gly-3TB)

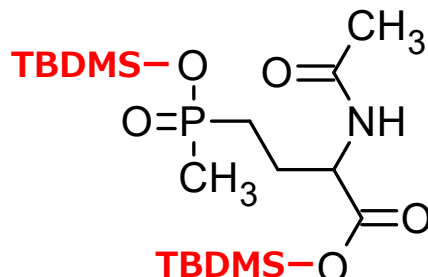


N-Acetylglyphosate-3 TBDMS (GlyA-3TB)

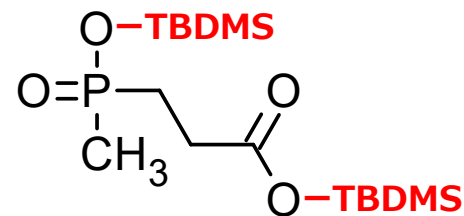
グルホシネートとその代謝物



Glufosinate-2 TBDMS (Glu-2TB)



N-Acetylglufosinate-2 TBDMS (GluA-2TB)



3-methylphosphinopropionic acid-2 TBDMS (MPPA-2TB)

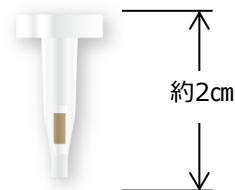
誘導体化による低極性化、高感度化

自動固相抽出装置による精製



全自動固相抽出装置
ST-R100

充填量の少ない専用固相を使用



固相ミニカートリッジ
Smash-SPE

- 特徴：
- ① **固相脱水誘導体化法**を自動化可能
 - ② 4検体同時処理による高速分析
 - ③ 少量固相による省溶媒化

前処理フロー

【試料抽出】

抽出



試料秤量 { ほうれんそう 10 g
大豆 5 g
はちみつ 10 g

— 添加 水 40-(試料中水分量) mL

振とう : 10分

— 遠心分離 : 5分

除タンパク(※)



上澄み液 : 分取 100 μ L

— 添加 アセトニトリル-水(4/1) 900 μ L

撈拌 : タッチミキサー

— 遠心分離 : 1分 ※ほうれんそう、大豆のみ

希釈



上澄み液 : 分取 80 μ L

— 添加 アセトニトリル-水(4/1) 910 μ L

— 添加 疑似マトリックス水溶液 10 μ L
リン酸 20 ppm/クエン酸 400 ppm

試料抽出液 (1mL)

【固相脱水誘導体化】

コンディショニング
ACN-水(1/1)

Smash-SPE AXs:保持

— 負荷[保持] 試料抽出液 20 μ L

— 洗液 ACN-水(1/1) 10 μ L

— 脱水 ACN 200 μ L

— 溶出 1% MTBSTFA-ACN 50 μ L

— 混合 ACN-MeOH(7/1) 150 μ L



前処理イメージ

抽出

試料秤量

水添加



振とう
10分
遠心



上清分取 ACN-水(4/1)



遠心



希釈

疑似マトリックス
リン酸
クエン酸

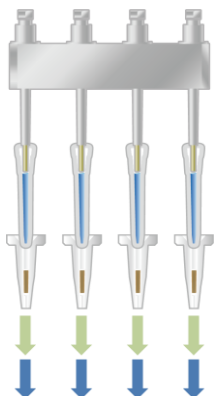
上清分取

ACN-水
(4/1)



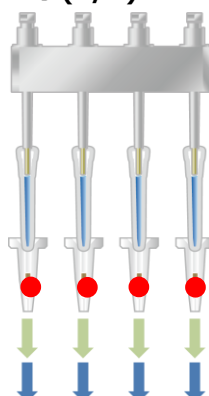
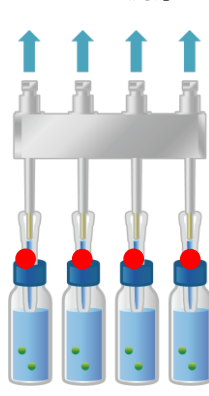
コンディショニング

ACN-水(1/1)



サンプル吸引・負荷

サンプル負荷
洗浄 ACN-水(1/1)

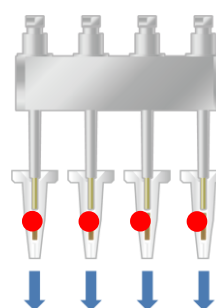


目的成分

極性夾雑成分

固相脱水

脱水 ACN



水分

誘導体化・溶出

溶出 1% MTBSTFA-ACN



目的成分
(誘導体化物)

LC-MS/MS測定条件

LC-MS 8045 (島津製作所社)

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%(4min)-80%(4.5min-6.5min)-30%(7-10min)

イオン化モード : ESI Positive

ネブライザーガス : 3 L/min

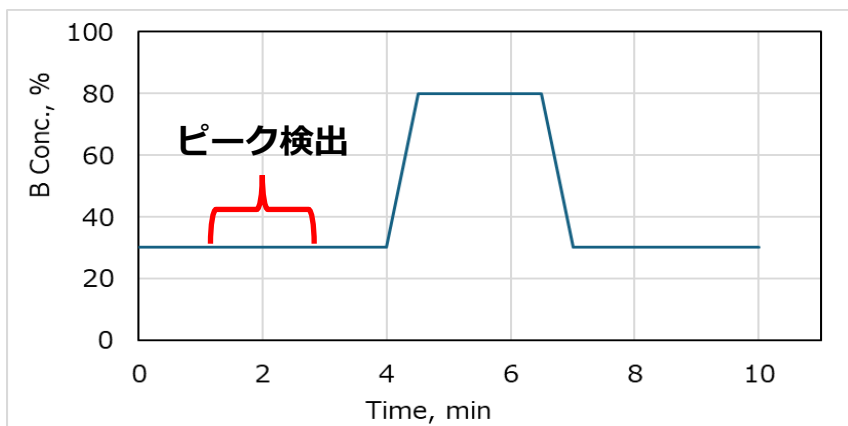
ドライグガス流量 : 10 L/min

ヒーティングガス流量 : 10 L/min

インターフェイス温度 : 300 °C

DL温度 : 200 °C

ヒートブロック温度 : 350 °C



**TBDMS化物は加水分解しやすい
ため水は使用しない**

結果

作物	添加濃度 (ppm)	グリホサート		N-アセチルグリホサート	
		回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)
ほうれんそう	0.1	102	3.7	110	4.0
大豆	0.2	89	6.8	109	10.2
はちみつ	0.025	104	8.5	107	6.8

作物	添加濃度 (ppm)	グルホシネート		N-アセチルグルホシネート		MPPA	
		回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)
ほうれんそう	0.05	84	3.5	105	3.5	106	2.7
大豆	0.1	98	3.8	99	9.7	114	6.9
はちみつ	0.005	112	5.7	104	8.2	118	9.0

良好な回収率および再現性が得られた

まとめ

- グリホサート、グルホシネートおよびそれらの代謝物を対象に固相脱水誘導体化法を導入した分析法を検討した。
- 多検体自動固相抽出装置を用いることで多数の検体を迅速に処理することが可能であった。
- 本法は生鮮・畜産試料への応用が可能であり、残留農薬分析に有効な手法と考えられる。