

食品におけるグリホサートおよびグルホシネートの分析法の検討(Ⅱ)

～ 代謝物を含めた一律基準値濃度での分析法の検討 ～

樋下勝彦, 新宅沙織, 高井靖智

Determination of analytical methods for Glyphosate and Glufosinate in foods(Ⅱ)

～ Determination of analytical methods at Uniform Limit concentration including metabolites ～

Katsuhiko Hinoshita, Saori Shintaku and Yasutomo Takai

キーワード：グリホサート, グルホシネート, 食品, 誘導体化, 代謝物, LC-MS/MS

Key Words : Glyphosate, Glufosinate, Food, derivatization, metabolite, LC-MS/MS

はじめに

アミノ酸系除草剤であるグリホサート (GLYP) 及びグルホシネート (GLUF) はそれぞれ植物体内において, GLYP からは *N*-アセチルグリホサート (*N*-GLYP) やアミノメチルリン酸 (AMPA) に, GLUF からは *N*-アセチルグルホシネート (*N*-GLUF) や3-メチルホスフィンコプロピオン酸 (MPPA) といった代謝物となることが知られており, 残留基準値は代謝物を含めたものとして設定されている (図1).

これらの成分については個別試験法^{1), 2)}が通知されているが, それぞれ異なる誘導体化・分析機器を用いることや, 極性が高く, 操作が煩雑であるため, 代謝物を含めた農産物の一律基準値濃度 (0.01 mg/kg) における一斉分析の報告はない.

一方, 当センターでは前報³⁾において FMOc 誘導体化-HPLC 蛍光検出器による GLYP, GLUF 同時分析の検討を行ったが, 代謝物である *N*-アセチル体や MPPA が分析できない, 一律基準値濃度での対応が困難である等の問題点があった. そこで今回は, 農産物における GLYP, GLUF 及び代謝物の一律基準値濃度に対応した6成分一斉分析法の確立を目的とし, 検討を行ったので報告する.

実験方法

1 試料

試料は測定対象成分が検出されなかった国産小麦粉, 国産大豆, 冷凍とうもろこし及び国産大麦を用いた. 大豆, とうもろこし, 大麦はミルを用いて粉碎し, 大豆, 大麦は 420 μm 標準網ふるいを通して分析に供した.

成分名	GLYP	<i>N</i> -GLYP	AMPA
構造式	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{HO}-\text{P}-\text{CH}_2-\text{NHCH}_2\text{COOH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{HO}-\text{P}-\text{CH}_2-\text{NCH}_2\text{COOH} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{COCH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{HO}-\text{P}-\text{CH}_2-\text{NH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$
基準値の対象	すべての農産物について対象	大豆, とうもろこし 及びなたねのみ対象	対象外
成分名	GLUF	<i>N</i> -GLUF	MPPA
構造式	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{P}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CHCOOH} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{NH}_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{P}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CHCOOH} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{NHCOCH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{P}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{COOH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$
基準値の対象	すべての農産物について対象	穀類, 豆類, 種実類 及びてんさいのみ対象	すべての農産物について対象

図1. GLYP, GLUF 及び代謝物の構造式等

2 試薬

1) 標準物質

GLYP は富士フィルム和光純薬製グリホサート標準物質を, GLUF は富士フィルム和光純薬製グルホシネートアンモニウム標準品を, AMPA は富士フィルム和光純薬製(アミノメチル)りん酸標準物質を, *N*-GLYP は Toronto Research Chemicals Inc 製 *N*-Acetyl Glyphosate を, MPPA は富士フィルム和光純薬製 3-(メチルホスフィニコ)プロピオン酸標準品を *N*-GLUF は Toronto Research Chemicals Inc 製 *N*-Acetyl Glufosinate Sodium を用いた.

各標準物質 10 mg を超純水 10 mL により調製し, 1000 mg/L の標準原液とし, 15 mL ポリプロピレン製(PP)遠沈管に保存した.

2) 溶媒及び試薬

酢酸エチル, アセトンは富士フィルム和光純薬製残留農薬・PCB 試験用を, メタノール, ギ酸は富士フィルム和光純薬製 LC/MS 用を, オルト酢酸トリメチルは東京化成工業製(純度 98 %以上)を, 酢酸, アンモニア, ギ酸アンモニウムは富士フィルム和光純薬製特級を用いた. 超純水はヴェオリア・ジェネッツ製 PURELAB Chorus で精製したものを使用した.

3) 固相抽出カラム

「PS-2 カラム」として Waters 製 Sep-Pak PS2 Plus Short Cartridge 300 mg を, 「SCX カラム」として Agilent 製 Bond Elut Jr SCX 500 mg を, 「NH₂ カラム」として Waters 製 Sep-Pak Aminopropyl Plus Short Cartridge 360 mg を, 「Si カラム」として Waters 製 Sep-Pak Silica Plus Long Cartridge 690 mg を, 「FL カラム」として Waters 製 Sep-Pak Florisil Plus Long Cartridge 910 mg を, 「Hybrid SPE カラム」として SUPELCO 製 Hybrid SPE-Phospholipid 100 mg/3 ml を使用した.

4) その他の器具

透析膜はダイアライシスマンブレン, サイズ 36 富士フィルム和光純薬(株)生化学用を, PP 遠沈管

は Labcon 製の PP 遠沈管を, 0.2 μm フィルターはメルク製マイレクスー-LG を使用した.

3 分析条件

HPLC : Agilent 製 1260 シリーズ

MS/MS : Agilent 製 6460

カラム : SUPELCO Ascentis ExpressC18

(2.1 mm×100 mm, 2.7 μm)

移動相 : A 液 0.05 % ギ酸水溶液

B 液 メタノール

グラジエント条件:A 液 97 % (0 min)→90 % (10 min)→5 % (14 min)→5 % (20 min)→97 % (20.1 min).

流速 : 0.25 mL/min カラム温度 : 40 °C

注入量 : 5 μL , 乾燥ガス : 10 mL/min, 300 °C

キャピラリー電圧 : +3000 V

シーガス温度 : 150 °C

イオン化モード : ESI(+) 測定モード : MRM

MS 条件 : 誘導体化後の各成分(OAT-)の条件について表 1 に示す.

4 試験溶液の調製

1) 抽出

均一化した試料 10.0 g を量りとり約 30 cm に切った透析膜の内部に透析内液として水 30 mL と共にいれ, 透析膜の両端を結んだ. これを透析外液として水 70 mL の入った 250 mL 遠沈管にいれ, 4 時間振とうを行い, 外液を抽出液とした.

2) カラム処理 I

(1) カラム処理 I-I

PS-2 カラムの下に SCX カラムを接続し, アセトン 6 mL, 水 10 mL でコンディショニングした. 小麦粉, 大麦はカラムの下に 100 mL ナスフラスコを置き, 抽出液 2.5 mL を負荷, 水 8 mL で溶出し, 50 °C の水浴で減圧濃縮を行い乾固させた後, 3) 誘導体化に供した. 大豆, とうもろこしはカラムの下に 50 mL ナスフラスコを置き, 抽出液 2.5 mL を同様に負荷, 水 8 mL で溶出し, 50 °C の水浴で減圧濃縮乾固を行った後, 残留物を 1 % ギ酸アンモニウム含有メタノール溶液 2 mL に溶解させ, カラム処理 I-II に供した.

(2) カラム処理 I-II

Hybrid SPE カラムを2個直列に接続し、メタノール 6 mL, 1 %ギ酸アンモニウム含有メタノール溶液 4 mL でコンディショニングした。カラム処理 I-I で処理した試験液全量をカラムに負荷し、充填剤の上端に達するまで流出させた。さらに 1 %ギ酸アンモニウム含有メタノール溶液 8 mL で 50 mL ナスフラスコを洗浄し、カラムに負荷、充填剤の上端に達するまで流出させた。その後、100 mL ナスフラスコをカラムの下に置き、アンモニア濃度が 5 %になるように調製した 25 %メタノール溶液を 20 mL 加えて測定対象成分を溶出した。これを 50 °C の水浴で減圧濃縮を行い、乾固させた後、3) 誘導体化に供した。

3) 誘導体化

カラム処理 I により得られた残留物を酢酸 0.5 mL 及びオルト酢酸トリメチル 2 mL で溶解し、この容器を密栓して約 100 °C で 2 時間加熱した後、放冷した。この液をアセトン:メタノール (6:4) 混液 10 mL を用いて 15 mL PP 遠沈管に移し替え、窒素吹付により乾固させた。これに酢酸エチル 4 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理 II に供する試験液とした。

4) カラム処理 II

NH2 カラムの下に Si カラムを連結し、アセトン 4 mL, 酢酸エチル 6 mL でコンディショニングした。これに 3) 誘導体化で得られた試験液 4 mL を負荷し液面が充填剤の上端に達するまで流出させた。さらに酢酸エチル 8 mL で 15 mL PP 遠沈管を洗浄し、カラムに負荷、充填剤の上端に達するまで流出させた後、新たな 50 mL PP 遠沈管をカラムの下に置いた。アセトン 10 mL をカラムに加え、充填剤の上端に達するまで溶出させた。その後、NH2 カラムを外し、95 %アセトン水溶液 10 mL を Si カラムに加えて全量を溶出、窒素吹付により乾固させた。

乾固した残留物に酢酸エチル 4 mL を加えて溶かし、アセトン 4 mL, 酢酸エチル 6 mL でコンデ

ィショニングした FL カラムに負荷、充填剤の上端に達するまで流出させた。これにアセトン:酢酸エチル (1:1) 混液を 6 mL 加え同様に流出させた。その後、カラムの下に 50 mL ナスフラスコを置き、アセトン:メタノール (8:2) 混液を 10 mL 加え測定対象成分を溶出させ、50 °C の水浴で減圧濃縮、乾固させた。残留物に 0.05 %ギ酸水溶液 1 mL を加えて溶解、0.2 um のフィルターを通し試験液とした。

分析フローを図 2 に示す。

表 1. 誘導体化後の各成分における MS 条件

	MS1	MS2	CE(V)	Frag(V)
OAT-GLYP	254.2	222.2	3	70
	254.2	102.2	10	70
OAT-AMPA	182.1	140.2	5	70
	182.1	111.1	15	70
OAT-GLUF	252.0	210.3	5	70
	252.0	150.2	10	70
OAT-MPPA	181.2	149.1	7	70
	181.2	93.1	17	70

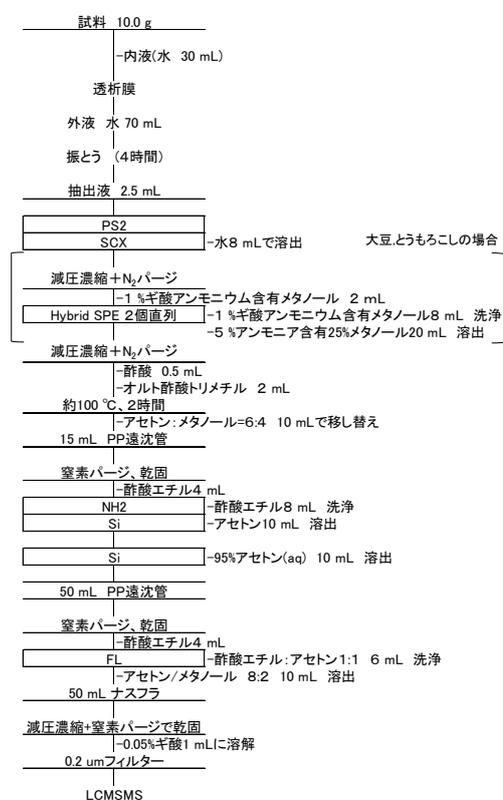


図 2. 試験溶液の調製方法

5 標準液の誘導体化

GLYP, GLUF, AMPA 及び MPPA の標準原液 1 mL をそれぞれ 100 mL のナスフラスコに入れ、50 °C の水浴で減圧濃縮した後、窒素吹付により乾固させた。これに酢酸 0.5 mL 及びオルト酢酸トリメチル 2 mL を加えて残留物を溶かし、ナスフラスコを密栓して約 100 °C で 2 時間加熱した。その後、窒素吹付により乾固させ、0.05 % ギ酸水溶液 10 mL に溶解し 100 mg/L の誘導体化標準液を作成し、適宜希釈して用いた。

なお、GLYP 及び GLUF の代謝物である *N*-GLYP 及び *N*-GLUF については誘導体化によりそれぞれ OAT-GLYP 及び OAT-GLUF となるため、添加回収率の算出には GLYP 及び GLUF の検量線を用いて算出し、分子量換算し求めた。

結果 及 び 考 察

1 分析条件の検討

1) 誘導体化方法の選択

今回分析対象とした GLYP や GLUF のような高極性化合物の分析には親水性相互作用 (HILIC) による HILIC-MS/MS 分析が報告されている⁴⁾。そこで、HILIC による検討を行ったが、機器の配管金属等への吸着がみられた。また、配管のコーティングやイオンペアを用いた分析法の検討も行ったが、吸着の改善には至らなかった。さらに、対象成分の MS 感度も良くなかったため、誘導体化を行うこととした。

前報³⁾では FMOC 誘導体化を採用したが、FMOC 誘導体化は 1 級アミン、2 級アミンを対象とするため今回分析対象とした成分すべての誘導体化はできない。そこで、農産物における GLUF 通知試験法であり、アミノ酸系除草剤一斉分析^{5), 6)}の報告例のあるオルト酢酸トリメチルによる誘導体化及び LC-MS/MS による方法を選定した。例として GLYP におけるオルト酢酸トリメチル誘導体化の反応式を図 3 に示す。

なお、GLYP, GLUF は金属やガラスへの吸着が知られており、本検討においてもガラス器具への吸着が確認されたため、減圧濃縮時以外は可能な限りポリ

プロピレン製の PP 遠沈管やマイクロピペット等を使用した。また、ガラス器具からの移し替え時はメタノール等のプロトン性極性溶媒で洗浄・転溶することとした。

2) 機器条件の検討

前報³⁾では夾雑成分による妨害ピークの影響により一律基準値濃度での分析が困難であったため、今回は高感度、高選択性を有する LC-MS/MS を用いることとした。また、効率化のためにルーチン業務で使用している機器条件をベースとして、誘導体化後の標準物質を用いて機器条件を設定したところ、図 4 に示す良好なクロマトグラムが得られた。検量線についてもすべての成分において 0.5 ug/L から 100 ug/L の間で良好な直線性が得られ、機器での吸着はみられなかった(図 5)。前報³⁾の FMOC 誘導体化ではリン酸基が残存するため、移動相をリン酸バッファーとしたが、今回のオルト酢酸トリメチル誘導体化ではリン酸基が *O*-メチル化されるため、移動相にギ酸水溶液を使用しても良好なピークが得られたと考えられる。

2 前処理方法の検討

1) 抽出方法, カラム処理 I-I

前報³⁾で検討した抽出方法およびカラム処理 I-I を *N*-アセチル体, MPPA にも適応できるか確認したところ、追加した成分も含めて 6 成分すべてにおいて良好な回収率を得ることができたため、引き続き採用することとした。

2) カラム処理 II の検討

試料に小麦粉を用いてカラム処理 I-I を行い、オルト酢酸トリメチル誘導体化したものをそのまま LC-MS/MS により測定を行ったところ、十分な回収率が得られず、マトリックス効果の影響が示唆された。そこで、誘導体化後の精製として畜水産物中の GLYP 通知試験法⁷⁾や齋木ら⁸⁾の方法を参考に誘導体化後にカラム処理 II を加えたところ、今回追加した成分も含めて 6 成分すべてにおいて良好な回収率を得ることができた。以上のことから、誘導体化後にカラム処理 II を実施することとした。

なお、誘導体化後もガラス器具を使用する事で吸着が原因と思われる若干の回収率低下があったため、極力PP製器具を使用することとした。

3) カラム処理 I-II の検討

小麦粉、大麦等についてはカラム処理 I-I、誘導体化、カラム処理 II により良好な結果が得られたが、タンパク質や脂質の多い大豆やとうもろこしではマトリックスの除去が不十分なためか、回収率の低下が見られた。マトリックス効果の確認としてブランク試料抽出液で希釈したマトリックス標準液のエリア値を、溶媒標準液のエリア値で除したものの割合 (%) を求めたところ、マトリックス標準液の感度低下が確認された(表3)。そこで、マトリックス効果低減のため、追加精製として誘導体化前にイオン交換性の SAX カラム、PSA カラムや、リン酸基を特異的に保持する Hybrid SPE カラム等による精製を検討した。その結果、Hybrid SPE カラムによる精製がマトリックス効果の低減、回収率共に良い結果となった(表3, 4)。これらのことから、大豆やとうもろこしの精製には Hybrid SPE による追加精製(カラム処理 I-II)を行う事とした。なお、当初は Hybrid SPE カラム(充填量 100 mg)により検討を行ったが、100mg では充填量不足のため、回収率が良くなかったので同カラムをタンデムに積層して充填量を増やし対処した。

3 添加回収試験

国産小麦粉、国産大豆に対して「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」に従い一律基準値濃度となるように GLYP, GLUF, AMPA 及び MPPA を添加し、分析者 2 人が 3 日間の枝分かかれ試験により添加回収試験を行った。その結果を表5に示した。真度、精度共に良好な結果を得ることができ、妥当性評価ガイドラインで示された目標値をクリアすることができた。また、代謝物である N-GLYP 及び N-GLUF は誘導体化後にそれぞれ OAT-GLYP 及び OAT-GLUF となるため、n=2 ではあるが一律基準値濃

度の添加回収試験を行った。その結果、表6に示したとおり良好な結果を得ることができた。

また、GLYP, GLUF, AMPA 及び MPPA の 4 成分について比較的高濃度(1 mg/kg)の添加回収試験(試料:小麦粉, 大豆, n=2)(図7)や、冷凍とうもろこし、国産大麦の添加回収試験(一律基準値濃度, n=2)(図8)も実施し、良好な結果が得られた。

ま と め

小麦粉、大豆における一律基準値濃度における GLYP, GLUF 及び代謝物の 6 成分一斉分析法を確立することができた。また、今回開発した分析法ではマトリックスマッチング検量線を必要とせず、溶媒標準により定量が可能となった。

小麦粉、大豆における高濃度添加の妥当性の評価及び冷凍とうもろこし、大麦における妥当性の評価ができていないため、今後、これらの評価を行うと共に、他の農産物への適応を目指していく予定である。

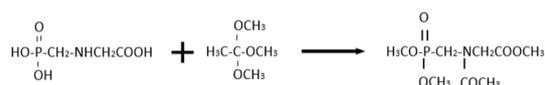


図3. GLYP におけるオルト酢酸トリメチル誘導体化反応

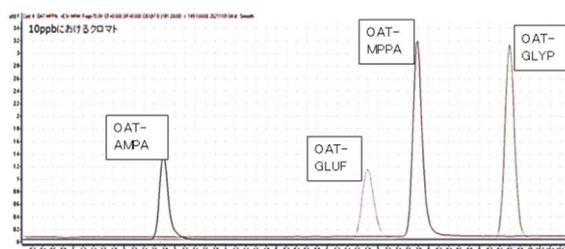


図4. 誘導体化標準液(10 ug/L)のクロマトグラム

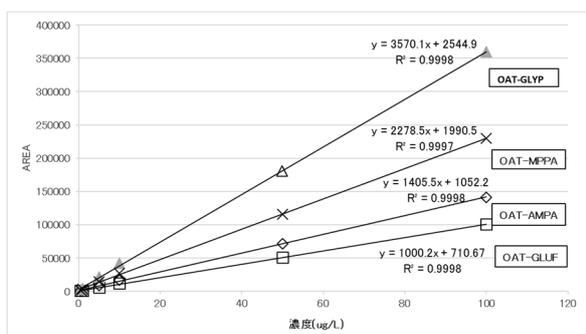


図5. 誘導体化標準液の検量線

(0.5 ug/L~100 ug/L △:GLYP, ◇:AMPA, □:GLUF, ×:MPPA)

表3. カラム処理 I-II の有無による

マトリックス効果 (%)

		GLYP	AMPA	GLUF	MPPA
カラム処理 I-II なし	大豆	62	56	95	70
	とうもろこし	65	68	102	61
カラム処理 I-II あり	大豆	100	88	98	96
	とうもろこし	92	86	106	90

表4. カラム処理 I-II 工程における大豆抽出液を用いて検討した各固相のカラム回収率 (%)

	GLYP	AMPA	GLUF	MPPA
Hybrid SPE 100 mg	116	108	44	28
Hybrid SPE 100 mg 2個直列	92	90	87	96
SAX	78	0	47	65
PSA	120	24	15	81

表5. 妥当性評価の結果

			GLYP	AMPA	GLUF	MPPA	目標値
小麦粉	室内精度	RSD%	11.0	14.3	11.3	8.8	<30
	併行精度	RSD%	11.0	10.0	11.3	7.1	<25
	真度	回収率%	71.0	80.9	87.6	81.4	70~120
大豆	室内精度	RSD%	7.3	10.9	11.8	6.3	<30
	併行精度	RSD%	7.3	10.9	11.8	5.4	<25
	真度	回収率%	93.8	90.0	86.7	90.8	70~120

表6. 小麦粉, 大豆の代謝物の添加回収試験結果 (%)

		n=2	
		N-GLYP	N-GLUF
小麦粉		73	91
大豆		99	85

表7. 小麦粉, 大豆の高濃度添加回収試験結果 (%)

		n=2			
		GLYP	AMPA	GLUF	MPPA
小麦粉(1 mg/kg)		106	76	92	98
大豆(1 mg/kg)		105	104	90	109

表8. 冷凍とうもろこし, 大麦の添加回収試験結果 (%)

		n=2			
		GLYP	AMPA	GLUF	MPPA
冷凍とうもろこし		94	93	98	77
大麦		83	73	75	80

文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 食安発 第 0124001 号「グリホサート試験法 (農産物)」 (平成 17 年 1 月 24 日)
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 食安発 第 0124001 号「グルホシネート試験法 (農産物)」 (平成 17 年 1 月 24 日)
- 3) 樋下勝彦, 他: 食品におけるグリホサートおよびグルホシネートの分析法の検討 (I), 和歌山県環境衛生研究センター年報 第 68 号 35-39(2022)
- 4) 畠山えり子, 他: LC/MS/MS を用いた加工食品中のグルホシネート及び代謝物の同時分析, 岩手県環境保健研究センター年報 第 9 号 71-76(2009)
- 5) 佐藤 満, 他: N-Acetyl, O-Methyl 誘導体化による生体試料中含リンアミノ酸系除草剤及びその代謝物の LC/MS 分析, 法科学技術 14(1) 35-43(2009)
- 6) 杉本泰俊, 他: 穀類, 乾牧草, 稲わら及び稲発酵粗飼料中の含リンアミノ酸系農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法, 飼料研究報告 Vol. 40 71-90 (2015)

- 7) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 食安発
第 0124001 号「グリホサート試験法（畜水産物）」
(平成 17 年 1 月 24 日)
- 8) 齋木雅一, 他 : 大豆及び大豆油かす中の含リンア
ミノ酸系農薬の液体クロマトグラフタンデム型質
量分析計による同時分析法の開発及び共同試験,
飼料研究報告 Vol. 44 136-150 (2019)