SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

No. C220A

LC/MS

サンプルバイアルへのイオンペア試薬添加による食品中グリホサート・グルホシネート・AMPA の新しい定量分析法

■はじめに

グリホサートとグルホシネートは除草剤として穀物や野菜作物に広く使用されている農薬です。グリホサートは、植物の機能、特に光合成に不可欠なアミノ酸前駆体の生合成系を阻害します。

2015 年に世界保健機構（WHO）は、グリホサートを人に対して発がん性の疑いのある物質に分類すると報告しました[*1]。

グリホサート、グルホシネートおよびグリホサートの代謝物である AMPA は、いずれも高極性の化合物であるため、環境中や食品中でのモニタリングは容易ではありません。現在 FMOC のような誘導体化法による分析も行われていますが、誘導体化の工程が煩雑です。そのため誘導体化せずに、陽イオン交換や親水性相互作用クロマトグラフィ（HILIC）、多孔性グラファイトカーボン、ミックスモードのカラムを用いて、食品中のグリホサートや高極性農薬を LC/MS/MS で直接分析する方法も多く報告されています。しかし、いずれの方法にも課題が残されています[*2]。

本報では、サンプルバイアルへのイオンペア試薬添加により、逆相条件での分離と定量を可能にする新しい分析法について検証を行いました。

従来のイオンペア法では、移動相に高濃度のイオンペア試薬を添加するため、イオン化競合や LC/MS/MS システムの汚染による感度低下が見られたり、装置メンテナンス頻度が増えることがあります。

今回紹介する新しい分析方法では、イオンペア試薬は使用しますが、試料バイアルにのみ添加するため、イオンペア試薬の負荷量は少量に抑えられます。イオンペア試薬を効果的に利用し、逆相条件でグリホサート、グルホシネート、AMPA を直接分析した例をご紹介します。

D. Toinon

＊1 http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/Glyphosate_2016_02_10.pdf
＊2 https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/meth_QuPPe_PO_V11(1).pdf

■方法

食品中のグリホサート、グルホシネート、AMPA をバイアルにイオンペア試薬を添加して分析しました。

この方法により逆相条件で良好な保持、分離および感度を得ることができました。

今回は、これらの成分が、果実で 50 µg/kg 以下、他のマトリクス（小麦、米、大麦）では 100 µg/kg 以下での定量が可能であるか評価を行いました。

測定機器は、島津製作所製　UHPLC Nexera™ X2 とトリプル四重極型質量分析計 LCMS™-8060 を使用しました。多重反応モニタリング（MRM）を用いたネガティブモードで測定し、HPLC および質量分析計の分析条件は表 1 に示しました。

表 1　分析条件

HPLC 条件			
Column	:	Shim-pack Scepter™ Phenyl-120 Metal Free(100 mm × 2.1 mm I.D., 3 µm) (227-31093-02)	
Mobile phase A	:	Water	
Mobile phase B	:	Acetonitrile	
Flow rate	:	0.4 mL/min	
Column temp.	:	50 ℃	
Injection volume	:	5 µL	
Gradient (min)	:	0 %B (0.0-0.2 min) - 100 %B (3.1-4.0 min) - 0 %B (4.1-7.0 min)	
MS 条件			
System	:	LCMS-8060	
Interface	:	Electrospray (ESI)	
Neb gas	:	3 L/min	
Drying gas	:	5 L/min	
Heating gas	:	15 L/min	
Desolvation line	:	300 ℃	
Heat block	:	500 ℃	
Interface	:	350 ℃	
CID	:	325 kPa	
Interface Voltage	:	-5 kV	
MRM transition	:	Glyphosate	167.9>62.9
			167.9>78.9
		AMPA	110.0>62.9
			110.0>78.8
		Glufosinate	179.9>63.0
			179.9>85.0

検量線作成

検量線作成には、市販のグリホサートとグルホシネートと AMPA の混合標準溶液と Diamylammonium acetate（DAAA）溶液を使用しました。

グリホサートを含む 20 µg/mL の混合標準溶液は、富士フィルム和光純薬製（大阪、日本）、DAAA 溶液は東京化成工業社製（東京、日本）の 0.5 mol/L 水溶液を使用しました。DAAA 溶液は、アセトニトリルで 10 倍希釈して、最終濃度 50 mmol/L に調製しました。

混合標準溶液を 1000、100、10 ng/mL 水溶液になるように調製したのち、メタノールで希釈して、0.4、1、2、4、10、20、100、200 ng/mL になるように調製しました。これらの標準溶液は、最終希釈溶液に 50 mmol/L DAAA 溶液を用いて二倍希釈して調製しました。

試料の前処理

分析試料には、小麦粉、米、大麦、みかんの 4 種の食品を用いました。これらの試料は、図 1 に示した前処理を行いました。メタノール抽出ののちにイオンペア試薬で希釈しました。米と小麦粉、大麦には 100 µg/kg、みかんには 50 µg/kg となるよう標準溶液を添加して分析試料としました。各試料で標準溶液添加で 3 回、非添加を 1 回抽出しました。

図 1　試料前処理

■結果と考察

検量線データ

標準溶液の分析により得られた MRM クロマトグラムを図 2 に示しました。バイアルにイオンペア試薬を添加することで、フェニルカラムを用いた逆相条件で各成分が良好に分離しています。図 3 に検量線を示しました。いずれの成分でも相関係数が 0.99 以上、検量点の正確さは 85 %から 115 %で良好な直線性が得られました。

定量限界

標準溶液の分析結果より、定量下限（LOQ、S/N=10）は、グルホシネート 0.1 ng/mL、AMPA 0.15 ng/mL、グリホサート 0.2 ng/mL でした。

標準添加試料の MRM クロマトグラムを図 4 に示しました。マトリクスの影響を受けることなく、ピークが検出されています（米、小麦粉、大麦は 100 µg/kg、みかんは 50 µg/kg 添加）。標準添加試料の分析結果から、定量下限値は、米、小麦粉、大麦では 100 µg/kg、みかんでは 50 µg/kg 以下と考えられます。

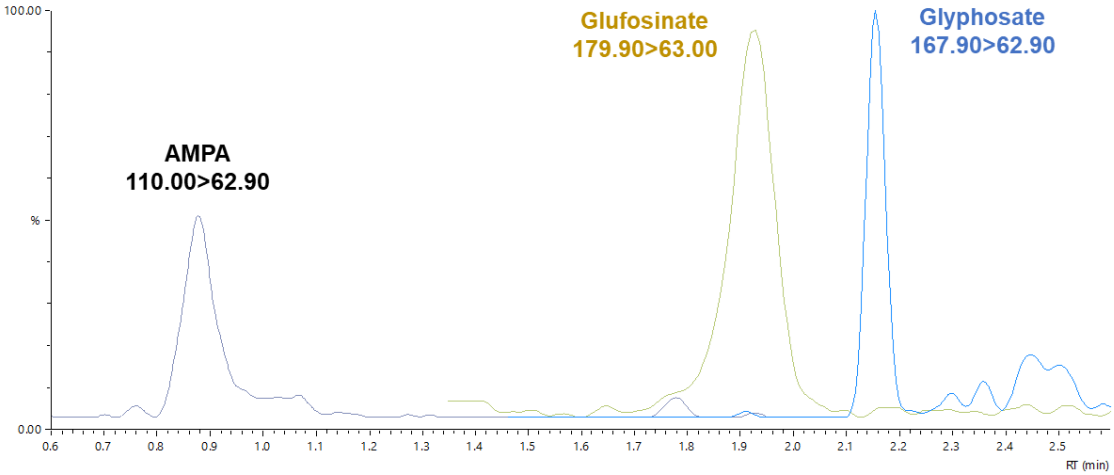
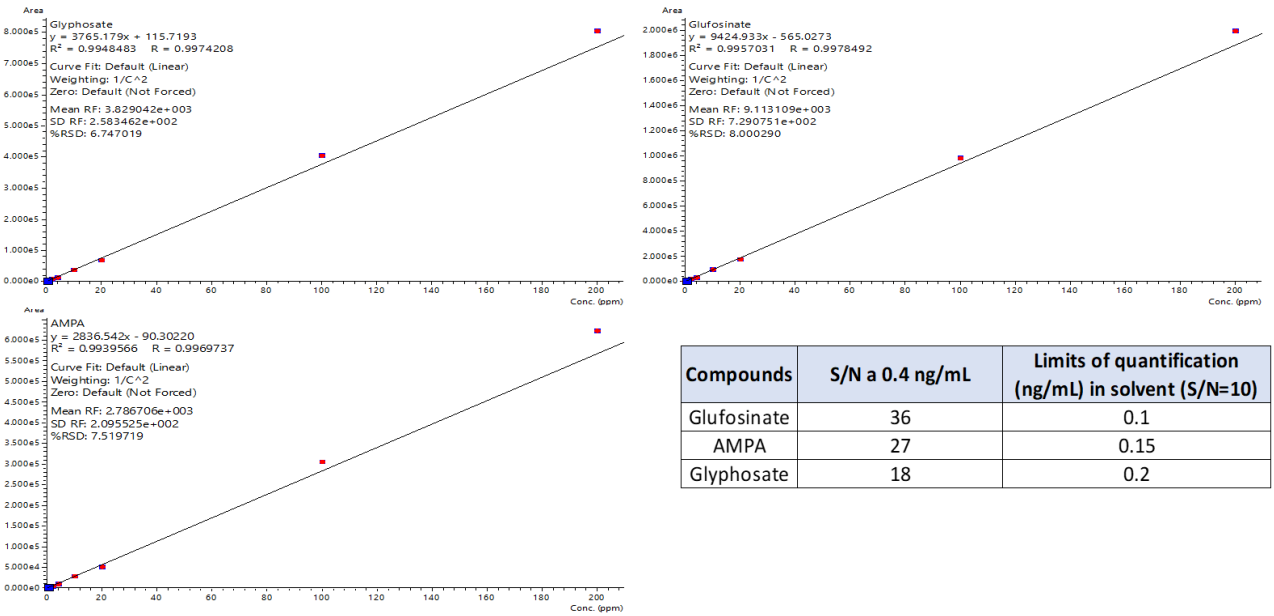


図 2　グリホサート、AMPA、グルホシネートの MRM クロマトグラム（0.40 ng/mL 標準溶液）



Compounds	S/N a 0.4 ng/mL	Limits of quantification (ng/mL) in solvent (S/N=10)
Glufosinate	36	0.1
AMPA	27	0.15
Glyphosate	18	0.2

図 3　検量線と各成分の定量下限値

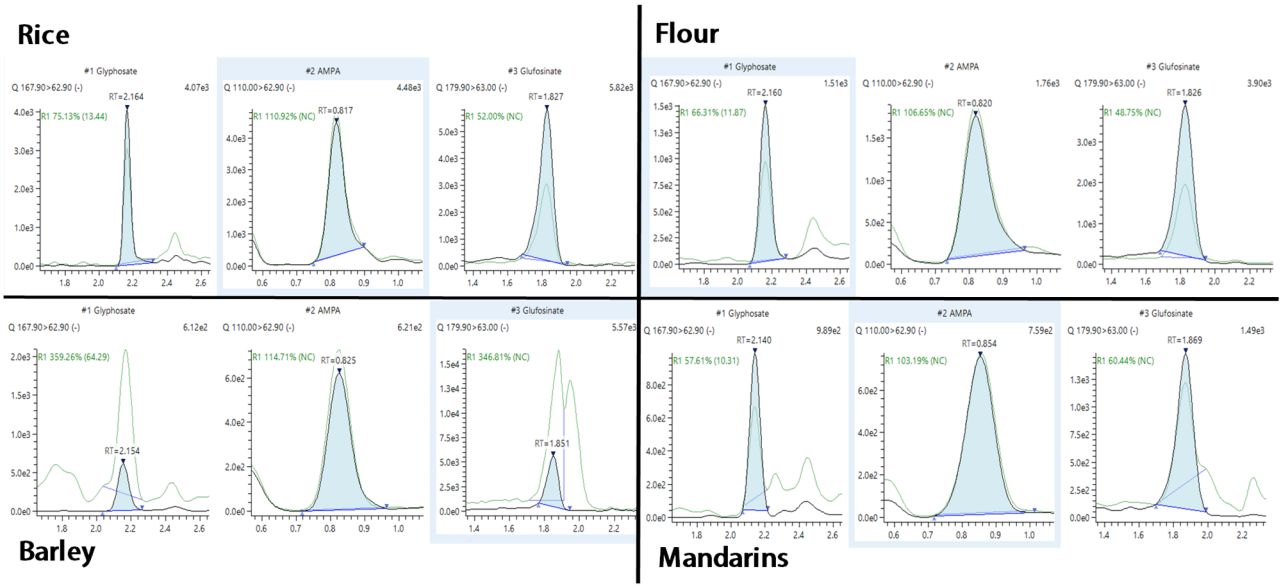


図 4　標準溶液添加による MRM クロマトグラム：米、小麦粉、大麦　100 µg/kg、みかん　50 µg/kg

回収率

回収率を評価するために、抽出前と抽出後の試料に標準溶液を添加して比較を行いました。3 回の分析結果でピーク面積値の平均値を算出しました。どの成分もマトリクスに関係なく、回収率は 80 %から 107 %でした。

再現性

小麦粉、コメ、大麦に 100 µg/kg、みかんに 50 µg/kg になるように標準溶液を添加した試料を測定（n=3）し、ピーク面積値の再現性を表 2 に示しました。すべてのマトリクスにおいて、どの成分も相対標準偏差（%RSD）は、0 %から 11 %（n=3）となりました。

表 2　マトリクス中での面積再現性

Compounds	Flour RSD (%)	Rice RSD (%)	Barley RSD (%)	Mandarins RSD (%)
Glufosinate	0	5	2	3
AMPA	8	6	11	3
Glyphosate	2	5	7	6

■まとめと結論

LCMS-8060 を用いて食品中のグリホサート、グルホシネート、AMPA の定量分析が可能でした。

イオンペア試薬をバイアル内で添加する新しい手法により、イオンペア試薬による装置汚染などの影響を受けることなく、逆相条件で良好な保持、分離、および感度が得られました。

簡単な試料前処理で 1 分析 7 分サイクルの迅速メソッドを構築しました。

今回得られた結果から、みかんで 50 µg/kg、そのほかのマトリクスでは 100 µg/kg 以下での定量分析が可能と考えられます。

本法は、再現性、回収効率ともに良好であり、堅牢性に優れた方法であることが示されました。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2020 年 7 月
A 改訂版発行：2021 年 1 月

島津コールセンター 0120-131691
(075) 813-1691

アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。

Nexera FV

オンライン分析用超高速液体クロマトグラフ

関連分野

環境

価格お問い合わせ

製品お問い合わせ

技術お問い合わせ

その他お問い合わせ