

トリプル四重極型 LC/MS/MS を用いた 食品中グリホサート、グルホシネート、 および AMPA の直接分析

グルホシネートおよびグリホサートは、非選択性除草剤で、農耕地から一般家庭まで広く使用されている農薬です。特に穀物においては、収穫の手間を減らす目的で散布するプレハーベスト農薬として使用されており、各国で農作物ごとに残留基準が設定されています。

グリホサートは土壤中や水中で代謝され、アミノメチルリン酸 (AMPA) となります。グリホサート、グルホシネートおよび AMPA は、いずれも極めて極性の高い化合物であり、HPLC や LC/MS においては逆相モードでの保持が難しく、FMOc 誘導体化による分析が一般的です。

アプリケーションニュース C181 では、誘導体化を省き、飲料水中のグリホサート・グルホシネート・AMPA を直接分析した例をご紹介しました。本報でも同様に誘導体化は省略し、穀物や果実といった固形試料を、EURL (シュツットガルト、ドイツ) にて開発された QuPPe (Quick polar Pesticides) 法にて前処理し、直接分析した例をご紹介します。

M. Kawashima

■ 各国における規制値

農薬は各国で残留基準が設定されていますが、その基準値は農作物で異なります。Codex、EU、US、日本のグリホサートの最大残留限界値 (MRL) を表 1 にまとめました。(2019 年 10 月時点)

表 1 Codex、EU、US、日本の MRL (mg/kg)

Country	Wheat	Oats	Soy bean	Grape
Codex	30	30	20	-
EU	10	20	20	0.5
US	30	30	20	0.2
Japan	30	30	20	0.5

■ 試料の前処理

試料 (小麦粉、全粒粉、オーツ麦、大豆、ブドウ) の前処理は QuPPe 法にて行いました。QuPPe 法には、一般的な食品向けと脂質やタンパク質を多く含む試料向けの 2 つの手順がありますが、本報では全ての試料を後者の方法で前処理しました。ただし、ブドウについては除タンパクの工程を省略しました。前処理のワークフローを図 1 に示しました。内部標準物質には、各化合物それぞれの安定同位体を使用しました。尚、試料の採取量は食物によって調整する軽微な変更を行いました。

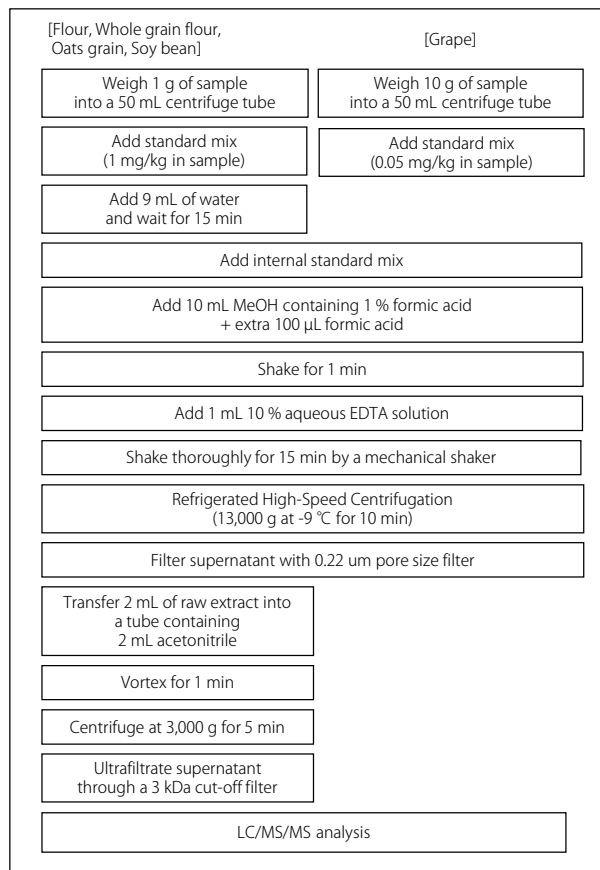


図 1 前処理のワークフロー

■ 分析条件

分析条件を表 2 および表 3 に示しました。尚、各化合物の金属吸着抑制のため、LC のオートサンブラのアウト配管は PEEK 樹脂製のものに交換しました。

表 2 LCMS 分析条件

[HPLC conditions] (Nexera™ X2)	[MS conditions] (LCMS™-8060)
Column : RESTEK Polar X (30 mm L. × 2.1 mm I.D., 2.7 µm)	Ionization : ESI (Negative mode)
Mobile phases : A) 0.5 % formic acid in H ₂ O B) 0.1 % formic acid in Acetonitrile	Probe Voltage : -3.0 kV
Gradient Program : B 60 (0-1 min) – B 5 % (2-7 min) – B 60 % (7.01-10 min)	Mode : MRM
Flow rate : 0.6 mL/min	Nebulizing gas flow : 3.0 L/min
Column Temp. : 35 °C	Drying gas flow*1 : 20.0 L/min
Injection volume : 5 µL	Heating gas flow*1 : 20.0 L/min
	DL/Heat Block Temp. : 300 °C/500 °C
	Interface Temp. : 400 °C
	CID gas : 325 kPa

*1 使用する窒素ガス供給源の出力が十分であることを確認した上で、設定値のリミッターを解除しました。

表3 MS/MSパラメータ

	Compound	Quantitative MRM transition (m/z)	Qualitative MRM transition (m/z)
Target	AMPA	110.00>78.90	110.00>62.90
	Glufosinate	180.10>62.90	180.10>85.00
	Glyphosate	168.10>63.00	168.10>78.80
	[¹³ C, ² H ₂ , ¹⁵ N]-AMPA	114.00>78.90	114.00>78.90
S	[1, 2, 3- ¹³ C ₃ , ² H ₂]-Glufosinate	183.10>62.90	183.10>85.00
	[¹³ C ₂ , ¹⁵ N]-Glyphosate	173.10>63.00	173.10>78.80

標準試料の分析結果

0.5、1、5、10、50、100 ng/mL の濃度で標準試料を調製し、6 回繰り返し分析にて直線性を確認しました。0.5 ng/mL におけるクロマトグラムおよび内部標準法により作成した検量線を図 2 に示しました。検量線は、全ての検量点が正確さ 80~120% 内かつ面積比再現性 20% 以下であることを確認の上で作成しました。全成分において、相関係数 R が 0.999 以上の良好な直線性が得られました。また、各成分の定量下限値として、標準試料の最低濃度である 0.5 ng/mL の分析結果を表 4 に示しました。

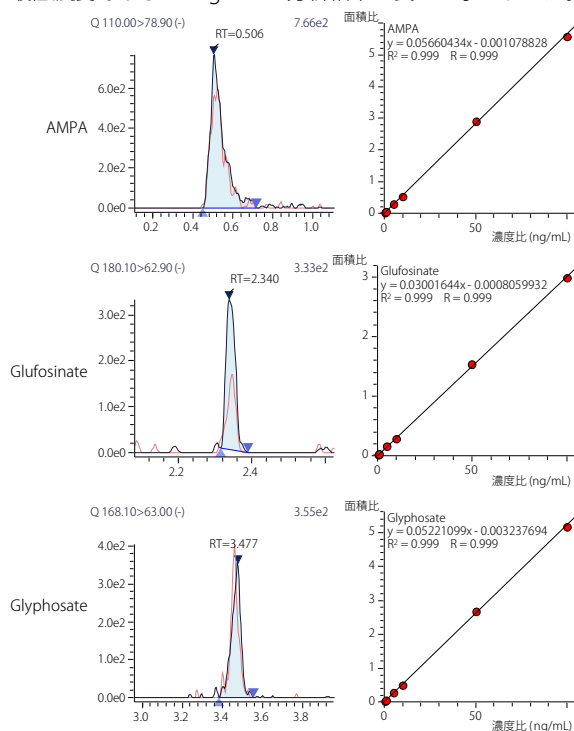


図2 0.5 ng/mL におけるクロマトグラムおよび検量線

表4 0.5 ng/mL 標準試料の分析結果

Sample	LLOD (pg)	LLOD (ng/mL)	Area %RSD	Area ratio %RSD	Accuracy (%)
AMPA	2.5	0.5	10.9 %	9.1 %	96.3 %
Glufosinate	2.5	0.5	9.4 %	9.3 %	102.6 %
Glyphosate	2.5	0.5	7.2 %	8.1 %	103.9 %

各食品の定量結果

内部標準法により各化合物を定量し、添加回収率を算出した結果を表 5 および表 6 に示しました。どの試料においても 90~100 % 内の良好な回収率が得られました。

また、代表的なクロマトグラムとして、標準試料を 1 mg/kg 添加した全粒粉とブドウのクロマトグラムを図 3 に示しました。

Nexera および LCMS は、株式会社島津製作所の日本およびその他の国における商標です。その他、本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していません。

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

島津コールセンター ☎ 0120-131691
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。

表5 各食品中の定量濃度 (mg/kg)

Sample	AMPA	Glufosinate	Glyphosate
Flour	<0.025	-	-
Whole grain flour	0.080	-	0.98
Oats grain	<0.025	-	-
Soy bean	-	-	-
Grape	-	-	-

表6 各食品の添加回収率

Sample	AMPA	Glufosinate	Glyphosate
Flour	95.1 %	94.4 %	97.4 %
Whole grain flour	94.2 %	92.4 %	96.6 %
Oats grain	94.3 %	93.9 %	92.7 %
Soy bean	91.8 %	94.0 %	95.8 %
Grape	96.0 %	94.8 %	97.3 %

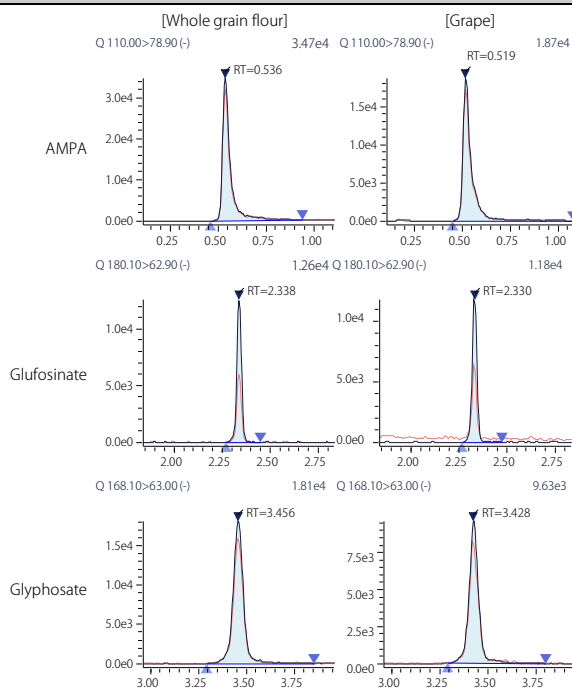


図3 標準試料 1 mg/kg を添加した全粒粉およびブドウのクロマトグラム

結論

- QuPpe 法により前処理した食品中のグリホサート、グルホシネート、AMPA の直接分析法を検討しました。
- 5 μL 注入で 0.5-100 ng/mL の範囲において良好な直線性が得られました。
- 測定した全ての食品において、良好な回収率および再現性が得られました。

<参考文献>

European Commission, QuPpe Method. <http://quppe.eu> (2019 年 7 月 10 日参照)

Commission Regulation (EU) No 441/2012 of 24 May 2012 <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:32012R0441&from=EN> (2019 年 10 月 31 日参照)

158-Glyphosate, Codex Pesticides Residues in Food Online Database. http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pesters/pesticide-detail/en/?p_id=158 (2019 年 10 月 31 日参照)

「食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件」平成 29 年厚生労働省告示第 361 号