

食品中のグリホサート, グリホシネート及びその代謝物の残留分析法



穂 山 浩

1 はじめに

農業は、国内外のリスク評価機関により安全性の閾値が決まっており、その閾値を基に環境及び食品安全で規制対象と基準値が定められている。グリホサートやグリホシネートとよばれる除草剤は、作物栽培や芝生管理を目的に世界中で広く使われている。グリホサートやグリホシネートの安全に関する紹介は省略するが、基準値の監視は非常に重要であり、そのための分析法が多く報告されてきた。北米を中心にグリホサートやグリホシネートをアセチル体にする酵素を組みこんだ除草剤耐性の遺伝子組換えの大豆、トウモロコシ、ナタネの栽培面積が増えていることから、親化合物だけでなくその代謝物についても規制対象になっている(図1)。すなわち、グリホサートはグリホサート及び*N*-アセチルグリホサートの合計量、グリホシネートは、グリホシネート、3-メチルホスフィニコプロピオン酸(MPPA)、*N*-アセチルグリホシネートの合計量が定量する必要がある。果実、野菜、大豆、牛乳等の多くの食品試料中の残留を測定する分析法は、主として液体クロマトグラフィー/質量分析法(LC/MS)やガスクロマトグラフィー/質量分析法(GC/MS)により開発されている。グリホサート

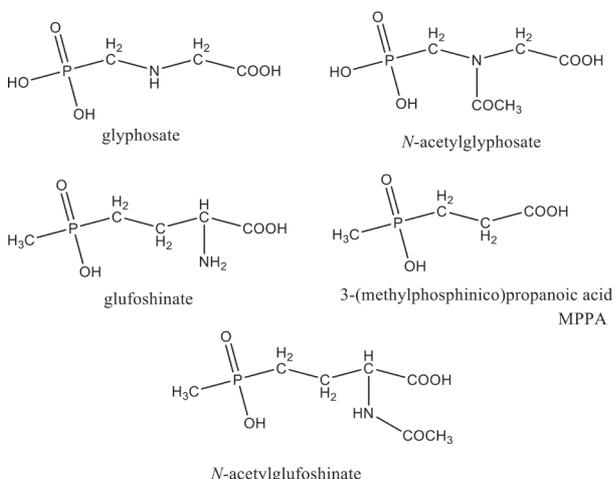


図1 食品中のグリホサート及びグリホシネートの残留規制対象物質

Residue Analytical Method for Glyphosate, Glufosinate, and Their Metabolites in Foods.

やグリホシネートは高極性のイオン化合物であることから、質量分析法で測定する際は、極性を低くして逆相HPLCで分析することとイオン化効率の向上を目的に第一級アミン、第二級アミンに反応する9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride (FMOC-Cl), dansyl chloride, および第一級アミンと反応する *o*-phthalaldehyde (OPA) を用いた誘導体化が必要である。しかしながら、代謝物である *N*-アセチルグリホサートやMPPAは第一級および第二級アミンを含まないため誘導体化が難しく、親化合物と同時に微量分析することが困難を極めている。本話題では食品試料中のグリホサートあるいはグリホシネートの分析とその問題点を紹介する。

2 Online-SPE-LC-MS/MS のグリホサートの分析

Thompson らは蜂蜜中のグリホサート、その分解物であるアミノメチルホスフォニック酸 (AMPA), 及びグリホシネートの同時分析法を報告している¹⁾。具体的には、蜂蜜溶液をFMOC-Clでプレカラム誘導体化し、オートサンプラーとカラムの間に固相抽出カートリッジを導入した online-SPE-LC-MS/MS で分析する方法である。5 mg/kg, 50 mg/kg, 150 mg/kg の添加ですべての分析対象物を95.2~105.3%で回収できている。室間精度も1.6~7.2%の範囲であった。定量限界は1 mg/kgであった。しかしながら、誘導体化や安定同位体標準物質による補正が必要であり、*N*-アセチル体は分析していない。Jansons らは、ダンシルクロライドでプレカラム誘導体化後に、前処理を行い、逆相HPLCで分離してQ-Exactive Orbitrapで精密質量を検出する分析法を確立し、牛乳、きゅうり、お粥、蜂蜜、牛腎臓、牛肝臓に適用している²⁾。FMOC-CLやダンシルクロライドは*N*-アセチル体の代謝物を誘導体化できないことから、食品中の規制対象物質を測定できない欠点がある。

3 IC-MS/MS を用いたグリホサート, グリホシネート及びそれらの代謝物の分析

Rajski ら、極性を下げる誘導体化の欠点を解決するためにイオンクロマトグラフィー(IC)とポストカラムサプレッサーを用いて溶離液の塩を酸に変換し、さらに高感度質量分析機種種の5500QTRAP(AB Sciex)と連結し、シリアル、果実及び野菜中の代謝物を含めた高極性農薬8化合物の分析法を報告している³⁾。メタノールで抽出後、水で5倍希釈するだけの前処理で、誘導体化の必要がなく、検出限界が0.01 mg/kgである。Melton らも同様の高感度質量分析機種種6500QTRAP(AB Sciex)とICを連結したIC-MS/MSを使用して適用する高極性農薬の範囲を広げ報告している⁴⁾。ICとMS/MSを連結することが必要なこと、アミノ基がないためICに保持できないことからMPPAが測定できていないこと、食品の種類の間でリテンションタイムが異なるという欠点を有している。

Nagatomi らは陰イオン交換カラムを用いたLC-MS/MSにより、ビール及び麦茶中のグリホサート、AMPA、グリホシネート、MPPA、*N*-アセチルグリホシネートの5成分の一斉分析を報告している⁵⁾。この方法はマトリックスが簡単な食品のみの適用や*N*-アセチルグリホサートが分析できない欠点はあるが、安定同位体の標準品を用いない定量が可能となっている。

表 1 Quppe 法における HPLC 分離カラムと高極性農薬の分析適用性

separation principle	Ion Chromatography	Anion Ex.	Anion Ex	Carbon	HILIC	HILIC	HILIC	HILIC
column type	AS19	AS 11	AS 11-HC	Hypercarb	Trinity Q1	a: Torus DEA/ b: APPC	Raptor PolarX	ObeliscN
ethephon	○	○	○	○	○	○	○	○
HEPA	○	○	○	○	○	○	○	○
glufosinate	○	○	○	○	○	○	○	○
N-acetyl-glufosinate	○	○	○	○	○	○	○	○
MPPA	○	○	○	○	○	○	○	○
glyphosate	○	○	○	○	○	○	○	○
AMPA	○	○	○	○	○	○	○	○
phosphonic acid	○	(○)	○	○	○	○	○	○
N-acetyl-AMPA	○	NT	○	○	○	○	NT	○
fosetyl-Al	○	—	○	○	○	○	○	(○)
maleic hydrazide	○	—	—	○	—	○	(○)	(○)
perchlorate	○	NT	—	○	○	○	○	○
chlorate	○	NT	—	○	○	○	(○)	○
bialaphos	○	NT	NT	○	○	○	○	NT
cyanuric acid	○	NT	NT	—	—	—	(○)	(○)
bromide	○	NT	NT	○	○	○	○	○
bromate	NT	NT	NT	○	NT	NT	NT	NT
N-acetyl-glyphosate	○	NT	NT	NT	(○)	○	—	○
difluoroacetic acid	○	NT	NT	NT	NT	NT	○	NT
trifluoroacetic acid	○	NT	NT	(○)	NT	NT	○	○
thiocyanate	○	NT	NT	○	NT	NT	○	NT
desmethyl-dimethoate	—	NT	NT	—	NT	NT	NT	NT

○=要件を満たした分離と感度が達成できている。NT=各条件では試験されていない。(○)=マトリックスの影響、分離不足、感度不足等の課題があるが可能と判断される。

4 HILIC カラムを用いた LC-MS/MS の分析

Lopez らは、シリアル、果実及び野菜中のグリホサート及びグリホシネートとその代謝物も含めた 14 高極性農薬の高感度質量分析による LC-MS/MS による分析法を報告している⁶⁾⁷⁾。水やメタノールで抽出・希釈することにより、マトリックス効果を最小化し、HILIC カラムである Obelisc N HILIC column で分離して LC-ESI-QTRAP-MS で高感度検出する。この分析法は、果実、野菜、シリアルの広範囲の食品で適用し、誘導体化操作が必要なく、食品毎でリテンションタイムが安定である分析を可能にしている。安定同位体を用いた内標準法を採用しているため、14 農薬において、併行精度 20 % 以下、70~120 % の回収率を有している。定量限界は 0.02~0.05 mg/kg であった。Nørskov らも生物学的試料中のグリホサート、AMPA、N-acetyl AMPA、N-アセチルグリホサートの同時分析法を報告している⁸⁾。この方法では、hypercarb カラムと低流速に特徴付けされた高感度化の microLC-MS/MS により、血液と尿試料のほか、食品試料でもアイソクラティック溶出で数分の間で、誘導体化を必要とせず農薬の分析が可能と報告されている。定量限界は血液と尿試料で 0.005 mg/kg としている。

EU では試験室の簡易方法 (EU reference laboratories single residue methods : EURL-SRM) として Quick Polar Pesticide (QuPPE) 法が報告している⁹⁾。本方法は、加工標準物質としてグリホサート安定同位体を用い、ギ酸の酸性条件メタノールで抽出後、固定相において精製し、LC-MS/MS 分析する方法である。HPLC 分離カラムと高極性農薬の分析適用性の一部を表 1 に示す。

5 結 論

食品中のグリホサート及びグリホシネートの分析法の最新の動向を中心に紹介した。依然として論文には、高価な安定同位体の標準品を用いた内標準法で測定したり、高感度質量分析機種や精密質量分析機種の LC-MS/MS を用いて簡易に測定することを主流になっている。

試験室における食品中のグリホサート及びグリホシネートのモニタリングの分析法としては、規制対象物質のすべてを誘導体化せず、簡易な前処理で、安定同位体の標準品を用いた内標準法やマトリックス検量線を用いず、高感度な機種でなく標準的機種の LC-MS/MS を用いた分析法が望まれる。

文 献

- 1) T. S. Thompson, J. P. van den Heever, R. E. Limanowk : *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.*, **36**, 434 (2019)
- 2) M. Jansons, I. Pugajeva, V. Bartkevics, H. B. Karkee : *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, **1177**, 122779 (2021).
- 3) L. Rajska, F. J. Diaz Galindo, V. Cutillas, A. R. Fernandez-Alba : *J. AOAC Int.*, **101**, 352 (2018).
- 4) L. M. Melton, M. J. Taylor, E. E. Flynn : *Food Chem.*, **298**, 125028 (2019).
- 5) Y. Nagatomi, T. Yoshioka, M. Yanagisawa, A. Uyama, N. Mochizuki : *Biosci Biotechnol Biochem.*, **77**, 2218 (2013).
- 6) S. H. Lopez, J. Dias, H. Mol, A. de Kok : *J. Chromatogr. A.*, **1625**, 461226 (2020).
- 7) S. H. López, J. Scholten, B. Kiedrowska, A. de Kok : *J Chromatogr A.*, **1594**, 93 (2019).
- 8) N. P. Nørskov, S. K. Jensen, M. T. Sørensen : *J Chromatogr A.*, **605**, 360343 (2019).
- 9) Quick Method for the Analysis of Highly Polar Pesticides in Food Involving Extraction with Acidified Methanol and LC- or IC-MS/MS Measurement, version 12, 07.23. 2021, https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmplt_article.asp?CntID=887&LabID=200&Lang=EN.



穰山 浩 (Hiroshi AKIYAMA)

星薬科大学薬学部薬品分析化学研究室 (〒142-8501 東京都品川区荏原 2-4-41)。千葉大学大学院薬学研究所博士課程修了。博士(薬学)、薬剤師免許。《現在の研究テーマ》食品中の有害物質の分析法の開発と標準化に関する研究。《主な著書》“Regulation of Food Additives in Japan” Regulation of Food Additives in Japan ACS books, Chapter 2, pp11-25 (2014)。《趣味》散歩、神社仏閣巡り、プロレス鑑賞。E-mail : h-akiyama@hoshi.ac.jp