

## 5) HILIC-MS/MS による飲料中グリホサート, グルホシネート及び代謝物

### 分析法の開発

吉田 達雄 村川 弘

#### 要 旨

除草剤グリホサート及びグルホシネートは、国内流通量が多く、入手が容易なため、飲料への混入などによる事故や事件が多い農薬である。これらの事件・事故対策のため、原因物質を迅速に定性・定量する必要があるが、グリホサート、グルホシネート及びそれらの代謝物である AMPA, MPPA は非常に極性が高いため、分析法は煩雑な操作を必要とする。そこで、今回、高極性化合物を分析可能な HILIC-MS/MS を用いることにより、これらの成分を簡易迅速に分析する方法を開発した。

**キーワード：**グリホサート, グルホシネート, AMPA, MPPA, HILIC-MS/MS

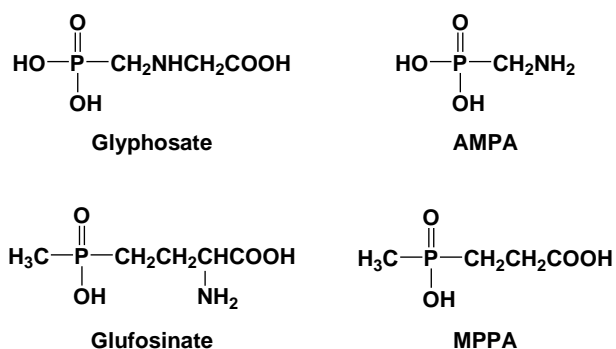
#### はじめに

含リンアミノ酸系除草剤グリホサート及びグルホシネートは、非選択性除草剤として、世界中で広く使用されている。一年生雑草から多年生雑草に対して高い防除効果を示すことから、国内においても1980年代から急速に普及してきた。流通量が多く、入手が比較的容易なため、誤飲や服用による事故や事件が多発することとなった。これらの事件・事故発生時における被害拡大防止のためには、原因を迅速に把握する必要があり、原因物質を迅速に定性・定量することのできる方法が求められる。

グリホサート及びグルホシネートは植物体内や環境中において、それぞれ代謝物aminomethylphosphonic acid (AMPA)及び3-methylphosphinicopropionic acid(MPPA)を生成する。グリホサート及びグルホシネートは代謝物も含め、極めて高極性であるため、誘導体化法を用いずにGC/MSで検出することが困難であり、HPLCにおいても良好なピーク分離や検出感度が得られにくい。そのため、これらの分析手法は、誘導体化した後にGC<sup>1),2)</sup>やLC<sup>3),4)</sup>で測定する方法や、LCで分離した後に誘導体化するポストカラム法<sup>5-7)</sup>が報告されている。これらの分析法は煩雑な前処理を必要とし、分析操作に時間を要することから迅速に分析結果を導くことが困難である。

また、高極性化合物を分離する方法として、親水性相相互作用クロマトグラフィー (HILIC) を用いる方法がある<sup>8-14)</sup>。これは、順相クロマトグラフィーの一種であり、水と有機溶媒の混合溶液と、それより高極性の固定相を用いる分離モードである。順相クロマトグラフィーには非水溶性の有機溶媒を移動相に用いることが多く、親水性の化合物の中にはこの溶媒系に溶解せず、分析できないものがあつたが、HILICは、移動相が水系であり、高極性の化合物も溶解、分離が可能である。このHILICの特性を用いることにより、高極性化合物であるグリホサート類を保持し、良好なピーク形状が得られることが考えられる。

そこで今回、飲料中に含有するグリホサート、グルホシネート及びそれらの代謝物を簡易迅速に分析する方法の開発を目的として、HILIC を用い、さらに化合物の選択性が高いLC/MS/MSを併用する分析方法を検討した。試験方法は、飲料水を試料として標準品の添加回収試験により行った。更に、実際にグリホサート及びグルホシネートを成分とする農薬製剤を飲料中に含有させた試料を作成し、これらを HILIC-MS/MS を用いて、定量を行うことにより、実試料への適用性の確認を行った。



**Fig. 1** Chemical structure of glyphosate, glufosinate, AMPA and MPPA

### 実験方法

#### 1 標準液の調製

グリホサート (glyphosate, Sigma-Aldrich, St Louis, MO), グルホシネート (glufosinate ammonium, Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan), AMPA (aminomethylphosphonic acid, Wako Pure Chemical Industries) 及び MPPA (3-methylphosphinicopropionic acid, Sigma-Aldrich) は蒸留水を用いて溶解し、それぞれ標準原液 1000 mg l<sup>-1</sup> を調製した。さらに適宜、蒸留水により希釈して標準溶液とした。

#### 2 試料の調製

飲料 5 種類 (お茶, 牛乳, オレンジジュース, コーヒー, ミネラルウォーター) に低濃度として 20 mg l<sup>-1</sup>, 高濃度として 100 mg l<sup>-1</sup> となるようにグリホサート, グルホシネート, AMPA 及び MPPA 標準品溶液をそれぞれ添加し, 添加回収試験用試料とした。

また, グリホサート及びグルホシネートを成分とする農薬製剤であるグリホサートカリウム塩液剤 (ラウンドアップマックスロード, glyphosate-potassium 48.0%, NISSAN CHEMICAL INDUSTRIES, LTD., Tokyo, Japan) 及びグルホシネート液剤 (バスタ液剤, glufosinate 18.5%, Bayer CropScience AG, Monheim, Germany) をお茶試料に添加し, 実際に農薬を混入させ, 農薬製剤 1% 含有する実試料 (グリホサートカリウム 0.48% 及びグルホシネート 0.185%) を作成した。これを実試料への分析法適用性試験用試料とした。

#### 3 HILIC-MS/MS 測定用試験溶液調製

LC/MS/MS 測定用試験溶液の調製方法を Fig. 2 に示した。2 で調製した試料 1 ml を蒸留水により, 添加回

Sample 1 mL

- make up to 1,000 – 10,000 times of the volume with distilled water
- filtrate by 0.45 µ m filter
- put into polypropylene plastic vial

LC/MS/MS

**Fig. 2** Treatments of drink samples for HILIC-MS/MS analysis.

収試験用試料は 1,000 倍, 実試料への適用性試験用試料は 10,000 倍希釈した。これを水系フィルター (GL クロマトディスク 25A, 0.45 µm, GL Sciences, Tokyo, Japan) を用いてろ過し, ポリプロピレン製バイアル (polypropylene plastic, screw-top vial, 300 µl, waters, MA) に充填したものを HILIC-MS/MS 測定用試験溶液とした。

#### 4 HILIC-MS/MS 測定条件

LC は, Waters 社製 Waters2795, MS/MS は Waters 社製 Quattro Premier を使用した。分離カラムは, スルホバタイン型の両性イオン型官能基を共有結合した Merck 社 (Darmstadt, Germany) 製 ZIC-pHILIC (長さ 150 mm, 内径 4.6 mm, 粒子径 5 µm) を用いた。試料注入量は 10 µl, カラム温度は 40°C とし, 移動相は 0.2% ギ酸-アセトニトリル (80:20), 流速は 0.5 ml min<sup>-1</sup> とした。イオン化はエレクトロスプレー (ESI) で行い, selected reaction monitoring (SRM) 測定により定量した。キャピラリー電圧は 3 / -2.5 kV, ソース温度は 120 °C, デゾルベーション温度は 350 °C, デゾルベーションガス (N<sub>2</sub>) 流量は 1,000 l h<sup>-1</sup>, コーンガス流量は 100 l h<sup>-1</sup> に設定した。なお, 検量線は, 無添加飲料試料を使用してマトリックス一致標準溶液を用いて作成した。

**Table 1** Chromatographic and MRM method parameters for glyphosate, glufosinate, AMPA and MPPA

Compound	$t_R^{a)}$ , min	Ion type	Quantification transition	Cone, V	CE <sup>b)</sup> , eV	Confirmatory transition	Cone, V	CE <sup>b)</sup> , eV
glyphosate	2.5	[M-H] <sup>-</sup>	167.86→149.74	25	10	167.86→62.07	25	25
glufosinate	4.1	[M+H] <sup>+</sup>	181.87→135.73	25	10	181.87→55.69	25	25
AMPA	2.9	[M+H] <sup>+</sup>	111.77→30.14	15	15	111.77→64.59	20	30
MPPA	2.7	[M+H] <sup>+</sup>	152.96→78.83	15	20	152.96→134.29	15	10

<sup>a)</sup>Retention time, <sup>b)</sup>collision energy

## 結果及び考察

### 1 測定条件

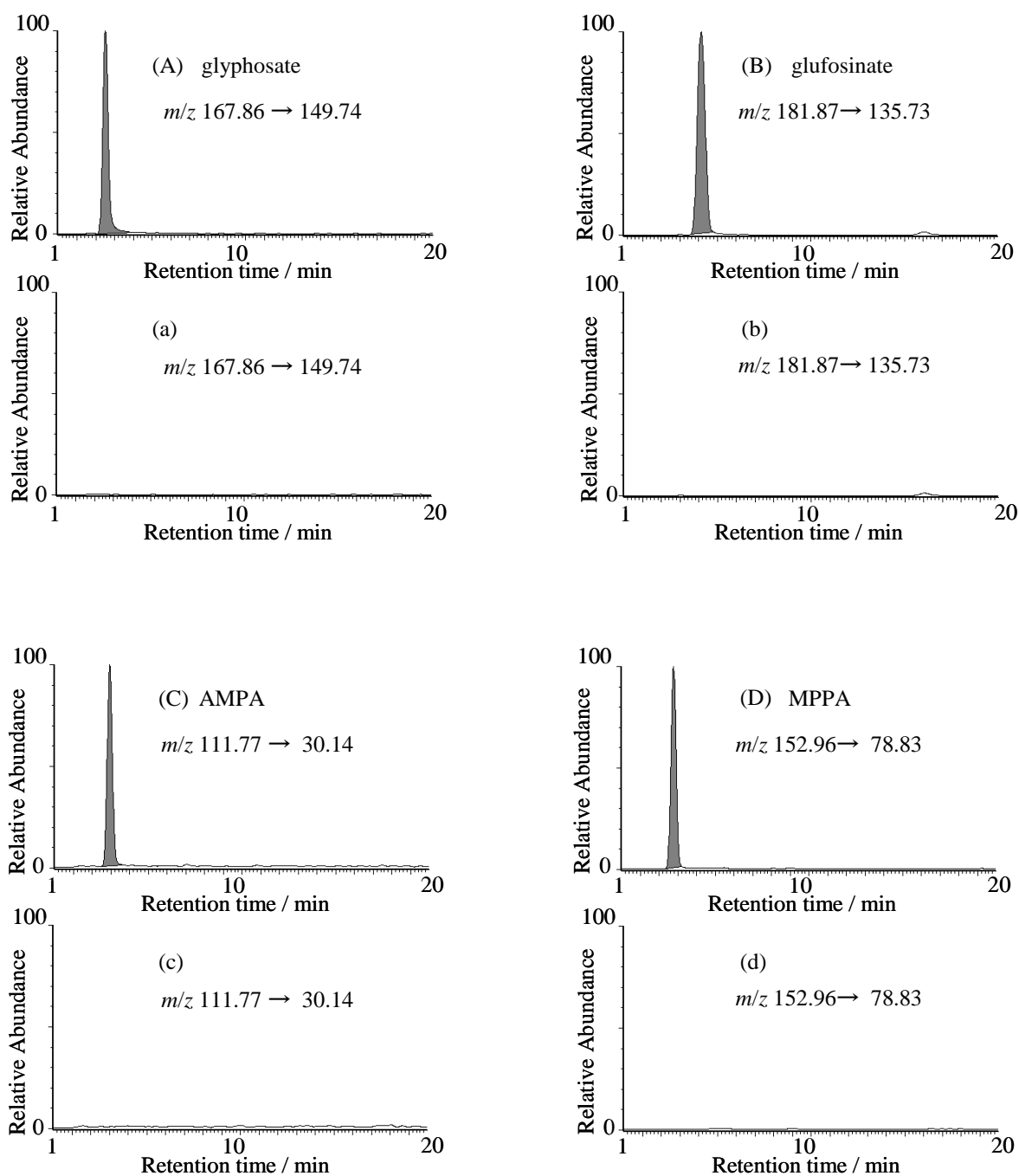
HILIC においては、移動相の一部が固定相として機能し、固定相中に水が豊富な液相が形成される<sup>15)</sup>。HILIC における目的成分の分離は、この親水性の環境と移動相との間での分配的な相互作用によって達成される。そのため、分離が、移動相から供給される水相に大きく依存してしまうため、カラムの平衡化が不十分であった場合、保持時間の変動や再現性の低下等を引き起こす。このことから、移動相については、移動相組成が一定で、カラムを十分に平衡化させることができるイソクラテック条件を用いた。また、LC/MS/MS 条件設定においては、各標準溶液 1 mg l<sup>-1</sup> をフローインジェクションにより直接 MS 部に導入し、イオン化条件を検討した結果、Table 1 に示す条件が最適となった。

飲料中グリホサート、グルホシネート、AMPA 及び MPPA の検量線については、マトリックス一致標準溶液を用いることにより 0.01~1 mg l<sup>-1</sup> (試料中濃度 10~1000 mg l<sup>-1</sup>) の範囲で良好な直線性 ( $R^2>0.999$ ) が得られた。本条件での測定により得られたクロマトグラム例を Fig. 3 に示した。カフェインを多量に含有するお茶及びコーヒー、脂質を多量に含有する牛乳、酸性試料であるオレンジジュースにおいても、良好なクロマトグラムが得られた。Signal to noise ratio (S/N) から求めた検出限界 (LOD, S/N=3) 及び定量限界 (LOQ, S/N=10) を Table 2 に示した。検出限界は、グリホサート: 0.24~0.42 mg l<sup>-1</sup>, グルホシネート: 0.06~0.08 mg l<sup>-1</sup>, AMPA: 0.62~0.94 mg l<sup>-1</sup>, MPPA: 0.09~0.14 mg l<sup>-1</sup> となった。定量限界は、グリホサート: 0.81~1.39 mg l<sup>-1</sup>, グルホシネート: 0.20~0.27 mg l<sup>-1</sup>, AMPA: 2.06~3.14 mg l<sup>-1</sup>, MPPA: 0.32~0.47 mg l<sup>-1</sup> となった。農薬として市場に流通しているグリホサート及びグルホシネート製剤は、製剤中に成分として数 10% が含有されている。これが事故等により、わずか数滴 (0.5 ml 程度) ほど飲料 (500 ml) に混入した場合、飲料中に含まれる農薬成分の濃度は、数 100 mg l<sup>-1</sup> 程度になる。また、

グリホサート及びグルホシネートの半数致死量 (LD<sub>50</sub>) は、マウスに対して、それぞれ 11,300 及び 416 mg l<sup>-1</sup> とされている<sup>16)</sup>。本分析法では、さらにこれらの濃度の 100 分の 1 が十分に測定可能であるため、多量に農薬が混入した事件事故だけではなく、微量に混入された事故事件に対しても、原因究明を行うことが可能である。また、グリホサート及びグルホシネートのどちらの農薬成分についても、代謝物をも測定可能であるので、より正確な原因究明が行えるものと考えられる。

### 2 添加回収試験結果

MS 分析においては、測定試料中に多量のマトリックスを含むと、イオン化の過程でイオンサプレッションやイオンエンハンスメントなどマトリックス効果を引き起こし、定量値に影響を与えることがある<sup>13),14),17)</sup>。HILIC-MS/MS においても、グルホシネートは約 10% のイオンエンハンスメント、グリホサート及び AMPA は約 5% のイオンサプレッションが見られた。そこで、試料の定量については、それぞれの無添加試料から調製したマトリックスマッチ標準溶液を用いて行った。標準品添加回収試験結果を Table 2 に示した。添加濃度は低濃度として 20 及び高濃度として 100 mg l<sup>-1</sup> の 2 濃度により、試行回数 6 回で実施した。20 mg l<sup>-1</sup> 添加における回収率はグリホサート: 96.9~106.7% (相対標準偏差 2.4~6.0%), グルホシネート: 95.1~103.7% (相対標準偏差 3.8~9.1%), AMPA: 92.6~105.6% (相対標準偏差 2.9~4.9%), MPPA: 97.3~102.6% (相対標準偏差 2.0~8.0%) となった。100 mg l<sup>-1</sup> 添加における回収率はグリホサート: 98.0~101.9% (相対標準偏差 1.5~3.8%), グルホシネート: 96.1~103.6% (相対標準偏差 1.8~8.9%), AMPA: 92.8~100.8% (相対標準偏差 2.0~5.0%), MPPA: 94.5~107.2% (相対標準偏差 1.3~3.1%) となった。すべての農薬成分において、低濃度 (20 mg l<sup>-1</sup>) から高濃度 (100 mg l<sup>-1</sup>) まで添加濃度の違いによる回収率の変動はなく、すべての試料について良好な回収率が得られた。お茶試料を用



**Fig. 3** Chromatograms obtained for extracts from green tea spiked with 100 mg L<sup>-1</sup> glyphosate(A), glufosinate(B), AMPA(C), and MPPA(D) and green tea extracts(a), (b), (c), and (d).

いて確認した 6 日間の日間変動(100 mg l<sup>-1</sup>, n = 1)は、グリホサート: 3.5%, グルホシネート: 7.7%, AMPA: 5.0%, MPPA: 3.4%となり、日間変動は小さいものであった。

### 3 HILIC-MS/MS の実試料への適用性試験

グリホサート及びグルホシネートを成分とする農薬製剤をお茶試料へ混入させ、この混入試料を測定する

ことで、実際に農薬が飲料へ混入した事件・事故発生時における HILIC-MS/MS の実試料への適用性の確認を行った。この実試料への適用試験結果を Table 3 に示した。農薬製剤を 1%含有した実試料(グリホサートカリウム 0.48%及びグルホシネート 0.185%)に対して回収率は、グリホサート:101%, グルホシネート:96%となり、良好な結果が得られた。農薬製剤は、農薬標

**Table 2** Performance of the analytical method for glyphosate, glufosinate, AMPA, and MPPA in drinks

Compound	Sample	Concentration/ mg L <sup>-1</sup>	Recovery		LOD / mg L <sup>-1</sup> (S/N=3)	LOQ / mg L <sup>-1</sup> (S/N=10)			
			Average and RSD/ % ( <i>n</i> = 6)						
glyphosate	Green tea	20	102.3	3.9	0.42	1.39			
		100	101.9	2.9					
	Milk	20	99.0	6.0					
		100	98.0	3.8					
	Orange juice	20	106.7	5.9					
		100	99.4	2.1					
	Coffee	20	96.9	2.4					
		100	98.2	1.7					
	Mineral water	20	97.5	3.4					
		100	99.4	1.5					
	glufosinate	Green tea	20	103.7			4.3	0.06	0.20
			100	99.1			7.2		
Milk		20	95.1	8.1					
		100	96.1	6.1					
Orange juice		20	97.5	9.1					
		100	103.6	8.9					
Coffee		20	98.7	6.4					
		100	97.4	1.8					
Mineral water		20	101.0	3.8					
		100	99.8	2.6					
AMPA		Green tea	20	101.1	3.4	0.62	2.06		
			100	100.8	5.0				
	Milk	20	92.6	2.9					
		100	99.8	3.1					
	Orange juice	20	105.6	4.9					
		100	92.8	4.5					
	Coffee	20	94.4	4.4					
		100	96.5	2.8					
	Mineral water	20	97.7	3.4					
		100	98.3	2.0					
	MPPA	Green tea	20	102.6	3.1			0.13	0.44
			100	94.5	2.7				
Milk		20	101.9	8.0					
		100	107.2	3.1					
Orange juice		20	97.3	4.2					
		100	96.4	2.1					
Coffee		20	102.1	2.0					
		100	99.4	1.3					
Mineral water		20	101.1	3.5					
		100	96.2	1.5					

**Table 3** Recoveries from tea samples which contaminated with an actual pesticide

Pesticide		Tea sample	Measurement		
Trade name	Active ingredient	Concentration <sup>a</sup> / mg L <sup>-1</sup>	Substance	Concentration / mg L <sup>-1</sup> (n = 6)	Recovery / %
Roundup Maxload	glyphosate	3900	glyphosate	3940 ± 104	101
			AMPA	—	—
Basta	glufosinate	1850	glufosinate	1770 ± 95	96
			MPPA	—	—

<sup>a</sup> The concentration of a sample which contains 1% an actual pesticide.

準品と異なり、農薬成分だけではなく、他に、界面活性剤や色素等を含有していることから、これらが分析結果へ影響を与えることが危惧される。しかし、今回、農薬製剤を含有した実試料への適用性試験についても、良好な結果が得られたことから、HILIC-MS/MSは、界面活性剤等の影響を大きく受けることが無く、実際に飲料へ農薬が混入した事件・事故発生時の原因究明に十分に適用可能であると考えられる。

#### ま と め

高極性化合物を分析可能な HILIC-MS/MS を用いることにより、飲料中のグリホサート、グルホシネート及び、それらの代謝物 AMPA、MPPA を迅速に分析する方法を開発した。添加回収試験を行った結果、すべての試料について良好な値が得られた。さらに、実際にグリホサート及びグルホシネートを有効成分とする農薬製剤を含有する実試料に対しても、良好な添加回収率が得られた。HILIC-MS/MS 法は、選択性が高い LC/MS/MS を用いて測定を行うため精製する必要がなく、非常に簡易な方法である。また、試料調製時間が、約 30 分と非常に短いため、より迅速に結果を得ることができる。そのため、農薬が混入した事件・事故の原因究明等に有用である。さらに、有機溶媒や試薬の使用量が少ないため、分析を行うことによる環境負荷に配慮できる利点もある。本法は、農薬混入等の事件・事故の健康危機管理時における飲料中のグリホサート、グルホシネート、AMPA 及び MPPA 残留量測定に対して非常に有効な手法であると考えられる。

#### 文 献

- 1) H. Kataoka, K. Horii, M. Makita : *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 195-198(1991).
- 2) H. Kataoka, S. Ryu, N. Sakiyama, M. Makita : *J. Chromatogr. A*, **726**, 253-258(1996).
- 3) 田中 健, 北田善三, 芋生眞子, 玉瀬喜久雄, 兎本文昭, 岡山明子, 佐々木美智子 : 奈良県衛生研究所報, **24**, 56-60(1989).
- 4) C. J. Miles, L. R. Wallace, H. A. Moyer : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**, 458-461(1986).
- 5) H. A. Moyer, C. J. Miles, S. J. Scherer : *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 69-72(1983).
- 6) T. E. Archer, J. D. Stokes : *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 586-588(1984).
- 7) M. J. Lovdahl, D. J. Pietrzyk : *J. Chromatogr.*, **602**, 197-204(1992).
- 8) A. J. Alpert : *J. Chromatogr.*, **499**, 177-196(1990).
- 9) 岩崎雄介, 井之上浩一, 伊藤里恵, 吉村吉博, 斉藤貢一, 中澤裕之 : 分析化学, **54**, 135-142(2005).
- 10) 池上亨, 田窪宏貴, 田中信男 : *Chromatography*, **29**, 1-6(2008).
- 11) C. Lamouroux, G. Foglia, G. Le Rouzo : *J. Chromatogr. A*, **1218**, 3022-3028(2011).
- 12) P. Jandera : *Anal. Chim. Acta*, **692**, 1-25(2011).
- 13) T. Yoshida, H. Hamada, H. Murakawa, H. Yoshimoto, T. Tobino, K. Toda : *Anal. Sci.*, **28**, 179-182(2012).
- 14) T. Yoshida, H. Murakawa, K. Toda : *J. Pestic. Sci.*, **38**, 27-32(2013).
- 15) MERCK KGaA : “A Practical Guide to HILIC”, p. 4(2008).
- 16) 金澤 純 : 農薬の環境特性と毒性データ集, 183-184, 1996, 合同出版, 東京
- 17) 小林裕子 : 分析化学, **58**, 985-997(2009).