

### 課題3 前処理と分析装置のオンライン化を目指した半自動分析法の確立

研究分担者 穂山 浩 (星薬科大学薬学部)

**研究要旨** 本研究では固相カートリッジ中での *N*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-*N*-methyltrifluoroacetamide (MTBSTFA) による簡便で迅速な誘導体化を行い、大豆中の残留グリホサート、グルホシネート、およびそれらの代謝物 *N*-アセチルグリホサート (Gly-A)、3-メチルホスフィニコプロピオン酸 (MPPA)、*N*-アセチルグルホシネート (Glu-A) を同時定量する液体クロマトグラフ-タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) を開発のための検討を行った。水抽出後にアセトニトリルで除タンパク後、AXs 固相カートリッジを用いた固相抽出で夾雑成分を除去し、イオン化阻害の影響を最小限にするように精製した。Gly、Gly-A は 0.1-2 ng/g の範囲で、Glu、Glu-A、MPPA は 0.02-0.4 ng/g の範囲で検量線を作成したところ、決定係数 ( $R^2$ ) は 0.994 以上の良好な直線性を示した。また、定量下限値は S/N 比=10 を基に Gly 類が 0.05 mg/kg、Glu 類が 0.1 mg/kg と算出した。我が国における大豆の Gly の基準値は Gly-A との総和で 20 mg/kg であり、Glu の基準値は Glu-A および MPPA と合算で 2 mg/kg である。基準値レベルの妥当性評価のため Gly 類は各 5 mg/kg、Glu 類は各 0.5 mg/kg となるように大豆へ添加し、回収率、併行精度および室内再現精度を算出した。その結果、回収率は 97-108%、併行精度は 2-5%、室内再現精度 4-9% となりガイドラインの目標値 (回収率 70-120%、併行精度 10% 未満、室内再現精度 15% 未満) を満たした。

協力研究者 伊藤里恵、岩崎雄介、関澤純平 (星薬科大学薬学部)、佐々野僚一 (星薬科大学薬学部、アシシティブサイエンス社)

#### A. 研究目的

我が国からの食品輸出促進のための食品の衛生管理手法の国際調和及びその推進のため、高極性農薬及びネオニコチノイド農薬等を対象として、抽出は QuEChERS 法等の国際的に汎用されている方法と同じ溶媒を用い、その後の精製操作を変更すると共に精製操作から LC-MS/MS 分析までをオンライン化し半自動化を検討することで、迅速、簡便で、高感度かつ高精度な残留農薬等検査法の確立を目指す。本年度は、固相カートリッジ中での *N*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-*N*-methyltrifluoroacetamide (MTBSTFA) による簡便で迅速な誘導体化を行

い、大豆中の残留グリホサート、グルホシネート、およびそれらの代謝物 *N*-アセチルグリホサート (Gly-A)、3-メチルホスフィニコプロピオン酸 (MPPA)、*N*-アセチルグルホシネート (Glu-A) を同時定量する液体クロマトグラフ-タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) を開発のための検討を行った。また開発した方法を大豆試料中のグリホサート類の分析に適用した。

#### B. 研究方法

##### 1. 使用試薬および試料

標品の Gly (98.9%)、Glu (残留農薬試験用)、MPPA (残留農薬試験用)、Gly-A は富士フィルム和光純薬社製を使用した。Glu-A はフナコシ社製を使用した。誘導体化試薬の MTBSTFA (97%) と MTBSTFA+1% TBDMS ( $\geq 95\%$ ) は Merck 社製を使用した。移動相や緩衝塩等の ACN (HPLC 用)、

MeOH (HPLC 用)、酢酸アンモニウム (特級、97%)、酢酸 (特級、99%) は富士フィルム和光純薬社製を使用した。食用丸大豆試料は北海道産、アメリカ産、カナダ産および中国産を使用した。飼料用大豆かすはアメリカ産・ブラジル産混合、カナダ産を使用し、食用加工大豆はアメリカ産を使用した。

## 2. 前処理に使用した装置および器具

1.5 mL チューブは WATSON 社製 50 mL チューブは VIORAMO 社製、50 mL チューブ用遠心分離機は KUBOTA 社製 (Model 2410) 振とう機は社製、1.5 mL チューブ用遠心分離機は eppendorf 社製 (MiniSpin) を使用した。精製に使用した固相カートリッジはすべてアイスティサイエンス社製の SPE-Presh 型を用いた。連結させる際に下側になる固相カートリッジは SPE-Flash 型を用いた。

## 3. 試薬および移動相の調製

Gly、Gly-A、Glu、Glu-A、MPPA の標準原液は、各粉末 2 mg を 10%アセトニトリル (ACN) 水溶液 2 mL に溶解し、最終濃度が 1000 mg/L となるように調製した。調製した各標準液を用いて添加回収試験用として、Gly 類 50 mg/L、Glu 類 5 mg/L となるように 10%ACN 水溶液にて混合標準液を調製した。また、条件検討用標準液として、Gly 類 50 µg/L、Glu 類 5 µg/L となるように混合標準液を調製した。酢酸アンモニウム 15.4 mg をメタノール (MeOH) 1 L に溶解して、0.2 mM 酢酸アンモニウム-MeOH を調製した。誘導体化試薬は MTBSTFA 0.1 mL と ACN 0.9 mL を混合し、10%MTBSTFA-ACN 標準液を使用した。

## 4. 測定装置および LC-MS/MS 最適条件

対象物質の分析には液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を使用した。液体クロマトグラフは島津製作所製の LC-30AD のポンプと SIL30AC のオートサンプラーを使用し、タンデム質量分析計は島津製作所製の LCMS-8060 を使用した。分析カラムには GL Sciences InertSustain C18 (150 mm×2.1 mm i.d., 3 µm) を使用した。カラム温度は 30°C に設定し、サンプルクーラー内は 4°C に設定した。移動相には 0.2 mM 酢酸アンモニウム-

MeOH を流速 0.2 mL/min で送液し、6 分間のアイソクラティック溶出によって対象物質の分離と分析を行った。MS のイオン化モードはエレクトロスプレーイオン (ESI) 化法のポジティブイオンモードで Multiple reaction monitoring (MRM) を用いて分析した。

## 5. 試料抽出の最適条件

凍結粉砕した大豆試料 1 g を 50 mL ポリプロピレン遠沈管に秤量し、5 mL の超純水を加え、5 分間振とうした。その後 50%ACN 水溶液を 5 mL 加えて全量 10 mL とし、振とう後、1930×g で 5 分間遠心分離を行った。上清 0.4 mL と ACN 0.6 mL を混合し、5 分静置後、1930×g で 5 分間遠心分離を行い除タンパクした。上清 0.025 mL と 10%ACN 水溶液 0.975 mL を混合し、試料抽出液とした。

## 6. 試料精製、標準液および固相誘導体化最適条件

固相カートリッジは Presh-AXs (第 4 級アミン) を用いた。10%ACN 水溶液 0.1 mL でコンディショニングした後に試料抽出液を 0.05 mL 負荷した。0.02%酢酸水溶液 0.1 mL で洗浄後、ACN 0.1 mL で固相中の水を取り除き、脱水を行った。脱水後、10%MTBSTFA-ACN 0.1 mL によって固相中で誘導体化を行い、事前に ACN 0.4 mL を添加したバイアルへ溶出、ボルテックスを 10 秒間行った後に LC-MS/MS にて分析を行った。標準液の誘導体化については試料抽出液の処理と同様の方法を使用して負荷、10%ACN 水溶液による洗浄、脱水、誘導体化および溶出を行い、LC-MS/MS にて分析を行った。

## 7. 統計処理

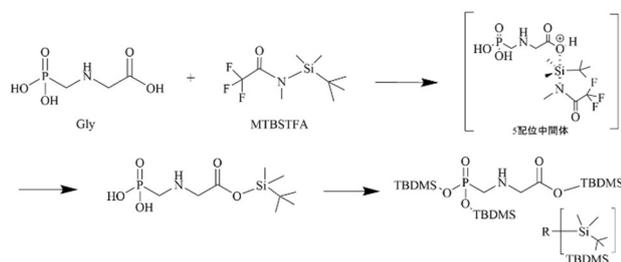
Microsoft Office and Business 2016 の Excel を用いて 2 群間の比較は t 検定、3 群間以上の比較は tukey 検定によって統計処理を行った。また、同様のソフトを用いて妥当性評価試験時の回収率から算出する併行精度および室内再現精度は一元配置分散分析により算出した。

## C. 研究結果

### 1. 固相誘導体化による LC-MS/MS 条件の最適化

#### 1-1. 固相誘導体化反応と MS 条件の検討

条件検討混合標準液を用いて、MTBSTFA 試薬によって固相誘導体化を行い、Gly 類 5 µg/L および Glu 類 0.5 µg/L に調製し、MRM 条件の最適化を行った。本研究で用いたシリル化反応はケイ素原子に OH 基上の酸素が攻撃し、5 配位の中間体を経て、酸素に *tert*-Butyldimethylsilane (TBDMS) が置換する反応である (Scheme 1)。本研究では、陰イオン交換固相カートリッジに測定対象物質を保持させた後に、脱水を行い、誘導体化試薬溶液を通すことで固相誘導体化を行うこととした。誘導体化させた各標準液をフローインジェクションにより、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法で MS に導入し、スキャンモードとプロダクトイオンスキャンモードで分析を行うことによって、誘導体化した標準液のイオン化条件の最適化を行った。ESI 法のポジティブ、ネガティブイオンモードで比較を行った結果、すべての標準液においてポジティブイオンモードで高い感度を得た。その後、誘導体化標準液のプリカーサイオン、プロダクトイオン、電圧等の最適化を行った (Table 1)。



Scheme 1 Gly と MTBSTFA との反応式

Table 1 MTBSTFA と各標準液の MRM transition

Analytes*1	MW	MRM transition	Q1 Pre Bias	CE	Q3 Pre Bias
	(誘導体化後)	Q1>Q3 *2	(V)	(V)	(V)
Gly-	511	<b>512&gt;311</b>	<b>-20</b>	<b>-25</b>	<b>-15</b>
3TBDMS		512>295	-26	-32	-14
Gly-A-	553	<b>554&gt;311</b>	<b>-20</b>	<b>-30</b>	<b>-12</b>
3TBDMS		554>352	-28	-25	-28
Glu-	409	<b>410&gt;195</b>	<b>-25</b>	<b>-35</b>	<b>-21</b>
2TBDMS		410>179	-22	-32	-21
Glu-A-	451	<b>452&gt;195</b>	<b>-14</b>	<b>-42</b>	<b>-21</b>
2TBDMS		452>250	-24	-32	-27
MPPA-	381	<b>382&gt;249</b>	<b>-14</b>	<b>-21</b>	<b>-27</b>
2TBDMS		382>151	-18	-34	-30

### 1-2. 移動相の検討

シリル化反応後の化合物は加水分解を起こすことが報告されている。このため、移動相に酸や水を入

れることなく有機溶媒のみで検討を行う必要があると考えた。条件検討用混合標準液を用いて、移動相として主に使用される MeOH および ACN を選択した時のそれぞれのピーク面積値から感度および精度を算出し、比較検討を行った。その結果、ACN は MeOH に比べて Gly、Gly-A、及び MPPA において有意に感度が高かったが、どちらも精度が良好でなかった。この結果を踏まえて、イオン化を安定させるために酢酸アンモニウムを移動相に添加することを考えた。酢酸アンモニウムは ACN に溶けないため MeOH に溶かし、酢酸アンモニウム MeOH の移動相で感度、精度、添加濃度について同様の誘導体化標準液を用いて再検討した。その結果、酢酸アンモニウムを添加することで Glu 類の感度が ACN に比べて有意に向上し、さらに精度も向上した。また、添加濃度は 0.2 mM の時に高感度を示した。感度が高く、精度が安定した 0.2 mM 酢酸アンモニウム-MeOH を移動相の最適条件とした。

### 1-3. 流速の検討

最適とした移動相の MeOH は構造中の OH 基により徐々に誘導体化標準液を分解させると考え、分解を起こさずに感度、精度共に最適な流速を検討することとした。その結果、感度および精度が安定した流速 0.2 mL/を最適条件とした。

### 1-4. LC カラムの検討

誘導体化後の標準品は高極性から低極性へと変化する。最適化した移動相は塩を除いて水を含まない 100%の MeOH であることから、保持力の高いカラムが必要であると考えた。そのため、炭素数が 23%である GL Sciences 社製の Inertsil ODS-HL (150 mm×2.1 mm i.d., 3 µm) と InertSustain C18 (150 mm×2.1 mm i.d., 3 µm) 用いて感度、精度および保持時間の比較検討を行った。その結果、HL カラムは Gly-A が有意に高い感度を示し、C18 カラムは Glu 類が有意に高い感度を示した。精度については両カラムともに良好な結果を示したが、C18 カラムは保持時間が短く移動相による分解も抑えられることやピークの形状も良好であったことから C18 カラムを最適 LC カラムとした。

## 1-5. カラムオープンおよびオートサンプラー温度の検討

シリル化反応は温度条件によって反応性や精度が変動する。90℃等の高温条件で反応させると、OH 基の他に Gly や Glu に存在する第 1 級アミンや第 2 級アミンがシリル化することが知られている。本研究では、室温条件の固相中で反応させるため、アミンへのシリル化は起こらないと考え、感度や精度に関してカラムオープンやオートサンプラーの温度検討を行った。カラムオープンの温度を 40℃に設定し、オートサンプラーの温度を 4℃と 20℃に設定した条件で比較検討を行った。その結果、4℃設定において Gly-A および MPPA において有意に高い感度を示したがどちらも精度が低い結果であった。これはカラムオープンの温度が高いことで、移動相の MeOH と誘導体化後の加水分解反応が促進し精度が低下したと推測した。そこで、カラムオープンの温度を 30℃に設定し、オートサンプラーの温度を 4℃および 20℃に設定した条件で再検討を行った。その結果、オートサンプラー温度 4℃の方が Gly、Gly-A、Glu および MPPA において有意に高い感度を示し、20℃設定の方は Glu-A において有意に高い感度を示した。また、精度においてはどちらも良好な結果を示した。このことから、感度と精度が良好なカラムオープン 30℃、オートサンプラー 4℃を最適条件とした。

## 2 高極性農薬と誘導体化試薬の反応条件の最適化

### 2-1. 誘導体化試薬の検討

シリル化反応はケイ素の置換基によって反応性や精度が変化する。ケイ素にメチル基が 3 つ結合した Trimethylsilyl (TMS) 化が最も反応しやすく、分解もしやすい。先行研究において TMS 化標品と TBDMS 化標品の MS スペクトルを比較したところ、TBDMS 化標準液の MS スペクトルの感度が高い結果を示している。仮に本研究で TMS 化試薬を用いた場合に、すでに最適化した移動相の MeOH によって分解すると推測した。このため、加水分解への安定性も考慮に入れて固相中での反応速度も高い TBDMS 化試薬を用いた。先行研究において、TBDMCS と塩基による反応によって誘導体化反応

が触媒され、反応性を高めるため、GC-MS 分析においては MTBSTFA に 1%TBDMCS が加わった試薬を用いる分析法が多く報告されている。そこで、MTBSTFA 試薬と 1%TBDMCS+MTBSTFA 試薬による反応速度や感度について検討を行った。その結果、どちらの試薬を使っても迅速に誘導体化は可能であったが、1%TBDMCS が添加されている群において Gly および Glu が分解し、感度が不十分となった。これは、誘導体化後に生成する塩化物イオンがケイ素と親和性が高いため、塩基として誘導体化後標品と反応し分解を促していると考えた。このため、MTBSTFA 試薬を最適誘導体化試薬とした。

### 2-2. 誘導体化試薬の固相カートリッジ中での反応時間と希釈溶媒の検討

MTBSTFA による固相誘導体化方法は報告されていないことから、固相中での反応時間、希釈溶媒や溶出後の時間経過による安定性を検討した。はじめに、固相カートリッジ中で誘導体化試薬液負荷後の即座に溶出する検体と 5 分放置した後に溶出する検体を比較した。その結果、固相カートリッジ中に保持している標準品と誘導体化試薬は即時に反応することが判明した。溶液負荷後の固相中で放置すると誘導体化試薬および溶媒が揮発する可能性があったため、誘導体化試薬液負荷後、即座に溶出することを最適な条件とした。次に誘導体化後に希釈する溶媒を MeOH および ACN として安定性の比較検討を行った。希釈溶媒として比較した MeOH は誘導体化してから測定する毎に低下し、誘導体化後 90 分で 0 分に比べて Gly および Gly-A において、大きな感度低下が確認された。対して、ACN は誘導体化してから 90 分経過しても安定であり、また 24 時間経過しても大きく感度は低下しなかった。この結果から、連続分析を行う場合には、希釈液は ACN を最適条件とした。

### 2-3. 誘導体化試薬濃度の検討

誘導体化試薬濃度が感度や精度に影響すると考え、溶出段階の誘導体化試薬濃度を 1、10、50%MTBSTFA-ACN 溶液に調製して、感度と精度の検討を行った。検討の結果、すべての誘導体化試薬濃度間で有意差はなく、精度についても大きな差

は見られなかった。1%MTBSTFA 溶液は Gly や Glu が他の群に比べてバラツキが大きいことや 50%MTBSTFA 溶液時の Glu 類は他の群に比べて高いが Gly 類の感度が低いため、他の群に比べて感度と精度が概ね良好な 10%溶液を最適とした。

#### 2-4. 固相誘導体化による迅速化と高感度化

従来の誘導体化法での問題点は反応時間や反応温度、溶媒除去等である。測定対象物質の従来法として、FMOC-Cl、オルト酢酸トリメチル、3,6-dimethoxy-9-phenyl-9H-carbazole-1-sulfonyl chloride

(DPCS-Cl) 等数多くの誘導体化試薬による分析法が開発されている。しかし、反応温度が高い条件が多く反応時間も長いことが課題とされている。また、オルト酢酸トリメチルによる誘導体化では減圧乾固で溶媒を除くことから溶媒除去に時間を要している。そこで、本研究の固相誘導体化によって反応温度や反応時間の比較評価を行った。その結果、本研究での固相誘導体化法によって反応時間は数秒、反応温度は室温 (25°C) で行えたことから、本分析法は従来法よりも簡便で迅速であることが明らかとなった。さらに、昨年度確立したはちみつの非誘導体化法と固相誘導体化法による感度の差を 5 µg/L 混合誘導体化標準液により評価を行ったところ、非誘導体化法と比べて Gly : 3208 倍、Gly-A : 308 倍、Glu : 3 倍、Glu-A : 75 倍、MPPA : 23 倍もの感度向上が見られたため、MTBSTFA の誘導体化によって高感度化を可能にした。

### 3. 大豆の前処理の最適化

#### 3-1. 抽出条件の検討

大豆の栄養成分はタンパク質、炭水化物、脂質で約 8.5 割を占める。その中でもタンパク質は約 40% を占め、その多くが水溶性を示すことから、目的対象物質に混在し、マトリックスとしてイオン化阻害を起こすことが考えられる。そこで、ACN による除タンパクを試みた。はじめに、凍結粉碎大豆 1 g に混合標品溶液の濃度が Gly、Gly-A: 5 µg/g、Glu、Glu-A、MPPA: 0.5 µg/g となるように添加し、室温で 30 分浸透させた。その後、超純水 10mL を加え、振とう、遠心分離 (1920×g) を各 5 分ごとに

行い水抽出した。水抽出液 0.5 mL と ACN 0.5 mL にて除タンパクを行った。除タンパク後の溶液を希釈し、AXs 固相カートリッジに通し、誘導体化を行うことで回収率 ( (標品添加検体-検体ブランク/標準液) × 100 (%) ) および併行精度 (回収率標準偏差/回収率平均 × 100 (%) ) を算出した。その結果、グリホサートおよびグルホシネートの回収率が 120% を超え、グルホシネートについては精度も若干低かった。このことから、除タンパク効率が悪いと考え、除タンパク時の ACN を 0.8 mL、超純水を 0.2 mL に変更し、同様の誘導体化方法によって回収率と併行精度を算出した。その結果、Gly の回収率が 40% まで低下してしまい、除タンパク時の ACN 量が過剰であると考えた。そこで、水抽出を 2 段階に分け、1 段階目は超純水 5 mL、2 段階目は 50%ACN 水溶液 5 mL 加えて水抽出と軽度の除タンパクを行った。その後、抽出液 0.4 mL と ACN 0.6 mL による除タンパク質を行い、同様の誘導体化法によって回収率と精度を算出した。その結果、すべての対象物質において 70-120% に収まる良好な平均回収率を示したが、個々で見ると回収率が 120% を超えている検体や併行精度も 10% に近い結果を示した。このことからタンパク質以外にイオン化に影響を与えるマトリックスが残留し、回収率や精度を低下すると考え、精製によって良好な回収率と精度の算出を目指した。

#### 3-2. 陰イオン交換型固相カートリッジの検討

目的対象物質は中性の水溶液中において、リン酸基やカルボキシ基がイオン型となり負電荷を持つ。このことから、陰イオン交換型固相カートリッジに保持させることが可能と考えたが、使用する官能基によって保持の強さやマトリックスの精製力等が異なるため固相カートリッジの検討が必要であると推測した。また、陰イオン交換官能基に加えて疎水性官能基や陽イオン交換官能基を混合で持つ固相カートリッジは目的対象物質の性質上、保持力の悪化の可能性があると考え、陰イオン交換官能基のみで構成される固相カートリッジについて誘導体化標品を用いて感度および精度の比較検討を行った。比較検討を行った固相カートリッジはシリカゲル担体にアミ

ノプロピル基 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) を結合させた NH<sub>2</sub> 固相カートリッジとポリマー担体に 4 級アミン (-N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>+</sup>) を結合させた AXs 固相カートリッジの 2 種類である。検討の結果、すべての対象物質において AXs を使用した方が NH<sub>2</sub> 使用時に比べて有意に高値を示し、精度も高くなった。この現象は、負荷の際に目的対象物質が NH<sub>2</sub> へ保持せずに溶出したと思われた。AXs 固相カートリッジ中の官能基の窒素は NH<sub>2</sub> 固相カートリッジ中の官能基の窒素よりもカチオン性が高いため測定対象物質が強く保持し、誘導体化できたと考えた。このため、シリカゲル担体の固相カートリッジを使用することは避け、感度と精度が共に良好であったポリマー担体の AXs 固相カートリッジを使用することとした。

### 3-3. 疎水性保持型固相カートリッジによる精製の検討

大豆抽出後のマトリックスには、脂質（レシチン）や不溶性食物繊維等が含まれていることから、はじめに疎水性物質除去による回収率および精度の向上を試みた。そこで、疎水性物質等を保持する C18 固相カートリッジや親水性および疎水性物質をバランスよく保持する PBX（担体：ポリスチレンジビニルベンゼン）固相カートリッジ（上側）と AXs 固相カートリッジ（下側）を連結し、上側の C18 および PBX には疎水性の夾雑物質を AXs には目的対象物質を保持させることによる回収率と併行精度を算出した。保持したマトリックスを誘導体化並びに溶出させないために、固相誘導体化や溶出を行う際には、連結している C18 および PBX を外し、固相の充填がない空の固相カートリッジを連結させ誘導体化を行った。その結果、C18-AXs（連結）および PBX-AXs で精製を行うことで回収率が低下した。原因として、C18 および PBX への対象物質の保持が考えられる。C18 はシリカゲルに炭素を 18 個結合させた構造を取り、すべてのシリカゲルに反応することはなく、シラノールとして残留している場合が多い。このため、高極性を示す対象物質がシラノールとの水素結合やイオン結合によって保持すると考えた。また、PBX については親水性物質と親和性を示すことから対象物質を保持すると

考えた。シラノール活性は酸性側で抑制できることから、負荷前のコンディショニングにおいて酢酸水溶液の添加を行ったが、回収率は依然低い状態であったため疎水性保持型固相カートリッジ以外の精製を考えた。

### 3-4. 酢酸洗浄による夾雑成分の排除

抽出後の溶液には水溶性ビタミンであるナイアシン（ニコチン酸）、パントテン酸や他の酸性物質を含んでいると考えた。これら物質は構造中に OH 基を有し、中性条件下の水溶中では負電荷を持つことから AXs 固相カートリッジにイオン結合することが考えられる。これらのマトリックスがイオン化促進や精度の低下を起こしていると考え、選択的に除去を考えた。そこで、固相カートリッジ洗浄工程で酢酸による酸洗浄を行うこととした。酢酸濃度を 0.02%、0.1% に設定し、感度と精度を検討した結果、0.1% の時に Gly 類が有意に高くなり、Glu、Glu-A は 0.02% の時に有意に高くなった。Glu 類の感度は Gly 類に比べて低いことから、感度低下を抑える目的で、0.02% 酢酸水溶液を最適条件とした。最適化した抽出、精製条件で回収率を算出したところ、回収率、併行精度共に良好な結果を示した。最適化した条件で妥当性評価試験を行うこととした。

## 4. 妥当性評価試験の実施

### 4-1. 絶対検量線法による直線性の確認

これまで LC 条件、MS 条件および誘導体化試薬について最適化を行った。最適化した方法で誘導体化標準液の段階希釈による絶対検量線を算出し、直線性の評価を行った。Gly、Gly-A は 0.1-2 μg/L の範囲で Glu、Glu-A、MPPA は 0.02-0.4 μg/L の範囲で検量線を作成し、決定係数を確認した。この結果、R<sup>2</sup>=0.994 以上の直線性を示したことから、直線性は良好と判断した。

### 4-2. マトリックス効果の検証

北海道産の無農薬大豆を用いて、マトリックス効果を算出した。マトリックス効果は一般的にブランク前処理後溶液に標準液を添加し、目的対象物質の標準液で割った値に 100 を乗じた値で算出し、その

値が 80-120%内に収まることで無視できるとされている。しかし、本研究では標準液を固相カートリッジを通して誘導体化しているため、大豆ブランク溶出後に直接添加することができない。標準品を誘導体化させ大豆ブランク中に添加することはできるが、バイアル中での誘導体化試薬濃度が大豆ブランク添加群と誘導体化標準液で差が起ることから正確に比較することが困難であると考えた。そこで、大豆ブランク抽出液および混合標準液はどちらも固相カートリッジを通して誘導体化しているため、固相カートリッジ中での影響は無視できると考えた。このため、抽出後の溶液に混合標準液を添加し、誘導体化を行ったピーク面積値を各誘導体化標準液のピーク面積値で割った値に 100 を乗じてマトリックス効果を算出した。その結果、93.1-104.7%に収まる良好な数値を示し、先行研究のマトリックス効果と比較しても良好な数値であったことから、しっかりと妨害物質を除外できると考えた。

#### 4-3. 添加回収試験の実施

最適化した方法を用いて、選択性、回収率、精度および定量限界について検討した。評価方法については、厚生労働省のガイドラインに基づき試験者 2 人、1 日 2 併行、3 日間で実施した。最適化した方法で目的対象物質を含まない大豆ブランクを測定したところ、妨害するピークは確認できず選択性は十分であると判断した。日本における大豆中の Gly の規制値は Gly-A と合算して 20 mg/L であり、Glu の規制値は Glu-A および MPPA と合算して 2 mg/L である。ガイドラインにおいては基準値もしくは基準値の半分を添加すると記載されていたため、Gly 類は各 5 mg/L、Glu 類は各 0.5 mg/L となるように大豆へ添加し、同濃度となるように調製した誘導体化標準液とのピーク面積値で回収率を算出した。得られたピークデータから回収率を算出し、その回収率を一元配置分散分析法で統計処理し、併行精度および室内再現精度を算出した。その結果、回収率、併行精度および室内再現精度共に妥当性評価ガイドラインの基準値（回収率 70-120%、併行精度 10%未満、室内再現精度 15%未満）を満たした（Table 2）。また、定量下限値は S/N 比=10 より、Gly 類

0.05 mg/L、Glu 類 0.1 mg/L と算出した。以上の結果から、本研究で開発した分析法の妥当性が確認された。

Table 2 添加回収試験（%, n=2×2 人×3 日間）

	Gly	Gly-A	Glu	Glu-A	MPPA
平均回収率	97	108	99	98	99
併行精度	5	2	4	2	5
室内再現精度	8.8	8.0	9.4	3.5	7.6

#### 4-5. 大豆への適用

開発した分析法を用いて、食用丸大豆、食用加工大豆、飼料用大豆への適用を行い、信頼性と実用性について評価を行うこととした。対象として、食用丸大豆（北海道産、アメリカ産、カナダ産、中国産）4 サンプル、食用加工大豆（アメリカ産）1 サンプル、飼料用丸大豆（アメリカ産 GM、Non-GM 各 3 サンプル、アメリカ産 5 サンプル、ブラジル産 3 サンプル）、飼料用大豆粕（アメリカ・ブラジル産混合）1 サンプルについて検量線を引き、測定を行った。その結果、食用丸大豆および加工大豆では 5 成分は検出限界未満であった。しかし、飼料用丸大豆および大豆粕ではサンプル毎に Gly、Glu および Glu-A の定量限界以上で定量でき、定量値を得た。（Table 3）。ガイドラインにおいて飼料用大豆の Gly の基準値は Gly-A との総和で 9 mg/L と定められているため、基準値を下回る結果を示した。また、日本において飼料用大豆中の Glu は基準値が定められていないため、食用大豆の基準値以上となる結果を示した。

定量結果から、アメリカで生産されている大豆は Gly 耐性 CP4EPSPS（アセチル化体を生成しない）× Glu 耐性アセチル化酵素のハイブリッド型大豆が主流となっており、ブラジルでは Gly 耐性 CP4EPSPS が主流になっていることが示唆された。さらに、飼料用大豆から Glu-A を定量した報告はない。本研究の分析法において大豆への適用性が示唆された。

Table 3 飼料用丸大豆、大豆かすの定量値 (mg/L)

産地・特徴	Gly	Gly-A	Glu	Glu-A	MPPA
GM-1	0.97	N.D.	N.D.	2.00	N.D.
GM-2	1.50	N.D.	N.D.	1.22	N.D.
GM-3	1.25	N.D.	N.D.	1.91	N.D.
Non. GM-1	N.D.	N.D.	0.26	N.D.	N.D.
Non. GM-2	N.D.	N.D.	0.29	N.D.	N.D.
Non. GM-3	N.D.	N.D.	0.24	N.D.	N.D.
アメリカ-1	0.41	N.D.	N.D.	0.31	N.D.
アメリカ-2	0.37	N.D.	N.D.	0.57	N.D.
アメリカ-3	0.44	N.D.	N.D.	0.85	N.D.
アメリカ-4	0.36	N.D.	N.D.	0.58	N.D.
アメリカ-5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ブラジル-1	3.39	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ブラジル-2	1.05	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ブラジル-3	1.42	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
アメリカ・ ブラジル-粕	1.73	N.D.	N.D.	0.28	N.D.

#### D. 考察

Gly、Glu およびその代謝物は構造中にリン酸基やカルボキシ基を持つことから高極性を示す。この性質により抽出精製に時間を要すことやイオン化効率が悪く感度が低いといった問題がある。従来法においても有害な有機溶媒や煩雑な操作が必要であった問題点があった。本研究では、MTBSTFA を用いた固相誘導体化 LC-MS/MS 法によって大豆中のグリホサート、グルホシネートおよびそれら代謝物の迅速で簡便で、有害溶媒を用いない分析法の開発を行った。本研究では移動相や LC カラム、イオン化条件等の LC-MS/MS 条件の検討、除タンパクや夾雑成分の除去等の前処理を検討し、感度や精度について最適化を行った。また、最適化した固相誘導体化法を用いることで、加水分解の防止や迅速性を向上させるとともに、測定対象物質を高極性から低極性化することで再現性の向上、高感度化を行うことで高倍率希釈によるマトリックスの大幅低減を可能にした。最適化した条件で添加回収試験を行ったところ、平均回収率 97-108%、併行精度 2-5%、室内再現精度 4-9%を示す良好な結果を示したため、本分析法の妥当性を確認した。

開発した分析法を各国の食用丸大豆、食用加工大豆および飼料用大豆に適用したところ、飼料用大豆においてサンプル毎に Gly、Glu、Glu-A の定量値を確認した。定量結果から、アメリカで生産されている大豆は CP4EPPS が導入されている Gly 耐性

×アセチル化酵素が導入されている Glu 耐性のスタック品種が主流となっており、ブラジルでは CP4EPPS 導入の Gly 耐性が主流になっていることが示唆された。さらに、飼料用大豆から Glu-A を定量した報告はない。以上のことから、本分析法の信頼性や適用性を示した。

本分析法は迅速、簡便かつ信頼性のある分析法であり、基準値監視のモニタリングや原材料の品質管理の有用的な方法として期待される。今後は定量値を確認した大豆の遺伝子解析や大豆以外の GM 作物としてトウモロコシ、ナタネ等の Gly、Glu およびそれらの代謝物の一斉分析法を開発するとともに更なる迅速化と再現性の向上を求めて全自動固相抽出-LC-MS/MS によるオンライン測定を行うことを目指している。

#### E. 結論

本研究では *N*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-*N*-methyltrifluoroacetamid (MTBSTFA) による簡便で迅速な固相誘導体化を行い、大豆中の Gly、Gly-A 及び、Glu、Glu-A、MPPA の LC-MS/MS を用いた 5 成分一斉分析法の開発を行った。また、輸入大豆飼料への適用を検討した。本分析法は迅速、簡便かつ信頼性のある分析法であり、基準値監視のモニタリングや原材料の品質管理の有用的な方法として期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Ryoichi Sasano, Rie Ito, Masahiro Kusumoto, Junpei Sekizawa, Hiroshi Akiyama: Simultaneous determination of glyphosate, glufosinate and their metabolites in honey using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and solid-phase extraction. *Anal. Sci.*, **39**, 1023-1031 (2023).
- Torii A., Seki Y., Arimoto C., Hojo N., Iijima

K., Nakamura K., Ito R., Yamakawa H., Akiyama H., Development of a simple and reliable LC-MS/MS method to simultaneously detect walnut and almond as specified in food allergen labelling regulations in processed foods, Current Research in Food Science, 2023: 6; 100444.

なし  
3. その他  
なし

3. Ryoichi Sasano, Junpei Sekizawa, Isao Saito, Mikiyama Harano, Kyoka Katsumoto, Rie Ito, Yusuke Iwasakai, Takaaki Taguchi, Tomoaki Tsutsumi, Hiroshi Akiyama: Simultaneous Determination of Glyphosate, Glufosinate and their Metabolites in Soybeans using Solid-phase Analytical Derivatization and LC-MS/MS Determination, Food Chem. X submitted.

#### 2. 学会発表

1. 佐々野 僚一、伊藤里恵、楠本真広、関澤 純平、穂山浩、LC-MS/MS による蜂蜜中のグリホサート、グルホシネートおよびそれら代謝物の分析法の開発、第9回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、令和5年9月16日
2. Hiroshi Akiyama, Yoshinari Suzuki, Tomoaki Tsutsumi, Food safety risk management in Japan, International Conference on Food Safety and 38th KoSFos Annual Meeting, 令和5年11月30日
3. 原野 幹久、佐々野 僚一、関澤 純平、勝本 叶香、伊藤 里恵、岩崎 雄介、穂山 浩、LC-MS/MS による大豆中のグリホサート、グルホシネート及びそれら代謝物の分析法の開発、日本薬学会第144年会、令和6年3月30日。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録