

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：99999
研究種目：奨励研究
研究期間：2021～2021
課題番号：21H04167
研究課題名 固相誘導体化による血液中グリホサートの新規分析法の開発

研究代表者

鈴木 雄亮 (SUZUKI, YUSUKE)

千葉県警察本部科学捜査研究所・科学捜査研究所 専門研究員

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 470,000円

研究成果の概要：ホームセンター等で容易に入手可能であり、中毒事案が散見される含リンアミノ酸系除草剤である「グリホサート」について、その摂取を証明するための新たな分析方法を開発した。グリホサートを添加したヒト血液を固相抽出カートリッジを通して固相上にグリホサートを保持させ、その状態で反応試液を通液することで、固相上で誘導体化反応（固相誘導体化）を行い、生成したものを機器分析で検出した。本法を用いることで、従来法と比較して非常に簡便かつ迅速にグリホサートを検出することができた。
固相抽出カートリッジ：プラスチック製の注射筒に固相（吸着剤）詰めたもの
誘導体化反応：目的物質に化学物質を作用させ、その性質を変化させること

研究成果の学術的意義や社会的意義

含リンアミノ酸系の除草剤グリホサートは、これを有効成分とする製品が広く流通していることから、同製品を飲食物等に故意に混入して喫食させることによる傷害事件や、誤飲による事故等が散見される。このため、犯罪捜査や救急医療の現場では、犯罪の捜査方針・治療方針の確立のため、被摂取者の血液から迅速にグリホサートを検出することが求められる。しかし、従来法には分析装置に導入するまでの操作（前処理）が非常に煩雑で長時間を要するという問題があった。本研究では「固相誘導体化」という技術を応用し、前処理に要する時間を従来法の半分程度に短縮することに成功した。本法は、薬毒物中毒事案の迅速化の一助になるものと期待される。

研究分野：分析化学

キーワード：含リンアミノ酸系除草剤 グリホサート 固相誘導体化

1. 研究の目的

薬毒物の使用が疑われる中毒事案が発生した場合、各都道府県の衛生研究所や警察の科学捜査研究所において中毒原因物質を特定するための薬毒物検査が行われる。数ある薬毒物の中でも、含リンアミノ酸系除草剤に分類されるグリホサート (GLYP) はホームセンターやドラッグストア等で容易に入手可能であるため、中毒件数も群を抜いており、GLYP は薬毒物検査において極めて重要な分析対象物質と位置付けられ、事件性が疑われる場合には、被摂取者の血液試料から GLYP を検出し、その摂取を証明する必要がある。

薬毒物検査においては、簡便さや迅速さが求められるが、GLYP はリン酸基およびアミノ酸構造を有するため非常に極性が高く、一般的な疎水性の薬毒物と比較すると、前処理 (固相抽出 (SPE) 濃縮 誘導体化反応 濃縮) が煩雑で長時間 (約 2 時間) を要し、簡便・迅速であるとは言い難い。近年、メタボロミクスの分野等において、生体試料中のアミノ酸を簡便・迅速に分析する方法として、「固相誘導体化」という技術が注目されており、アミノ酸構造を有する GLYP にも適用可能であると考えられる。本研究では「固相誘導体化」を利用した簡便かつ迅速な血液 GLYP の新規分析法の確立することを目的とした。

2. 研究成果

(1) GLYP を添加したヒト血液 (全血) を作製し、これを試料とした。

(2) GLYP を保持する固相として強塩基性アニオン交換固相を選択し、これが充填された SPE カートリッジを用いた。固相上で保持された GLYP を誘導体化するための試薬としてアミノ基の保護試薬であるクロロギ酸 9-フルオレニルメチル (FMOC-CI) を、誘導体化時の pH 調整剤として四ホウ酸ナトリウム 10 水和物を用いた。

(3) GLYP を添加した血液を超純水で希釈し、遠心分離により得られた上清をアセトニトリルおよび超純水でコンディショニングした SPE カートリッジに通液した後、超純水およびアセトニトリルでカートリッジを順次洗浄した。洗浄したカートリッジに誘導体化試薬 (FMOC-CI アセトニトリル溶液と四ホウ酸ナトリウム 10 水和物水溶液の混合液、1:1 (v/v)) を通液することで、室温下であっても固相上 FMOC-GLYP が生成することを見出した。

(4) 固相誘導体化の条件について詳細に検討したところ、FMOC-CI の濃度を 10 mg/mL、四ホウ酸ナトリウムの濃度を 1 mM、反応時間を 30 分としたとき、FMOC-GLYP が最も効率よく生成した。

(5) 固相上で生成した FMOC-GLYP は、SPE カートリッジを超純水 - アセトニトリル混合液 (1:1、v/v) およびアセトニトリルで順次洗浄した後、メタノール-トリフルオロ酢酸混合液 (100:1、v/v) で溶出した。溶出液を窒素気流下で濃縮したものについて、分離カラムとして C18 カラムを、移動相として 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液 - メタノールを用いた一般的な条件での液体クロマトグラフィー質量分析 (エレクトロスプレーイオン化法、ポジティブモード、プロダクトイオンスキャン、プリカーサーイオン m/z 392) を行ったところ、高感度に検出することができた。従来法と比較すると、前処理に要する時間は半分程度 (約 1 時間) に短縮された。また、本法の検出限界は 20 ng/mL であり、軽症者の血液でも十分に適用可能であることが示唆された。図 1 に血液試料 (GLYP : 1 μ g/mL) から得られたトータルイオンクロマトグラムを、図 2 に血液試料から検出された FMOC-GLYP のプロダクトイオンスペクトルをそれぞれ示す。

(6) 尿・血清といった全血以外の生体試料も分析対象となり得ることから、これらについて本法を適用したところ、FMOC-GLYP を検出することができ、汎用性が高いことが示された。

(7) 中毒レベル (軽症・重症・致命的) を評価するためには定量分析が必要であることから、今後、安定同位体標識グリホサートを内部標準物質とした定量分析法を検討していく予定である。

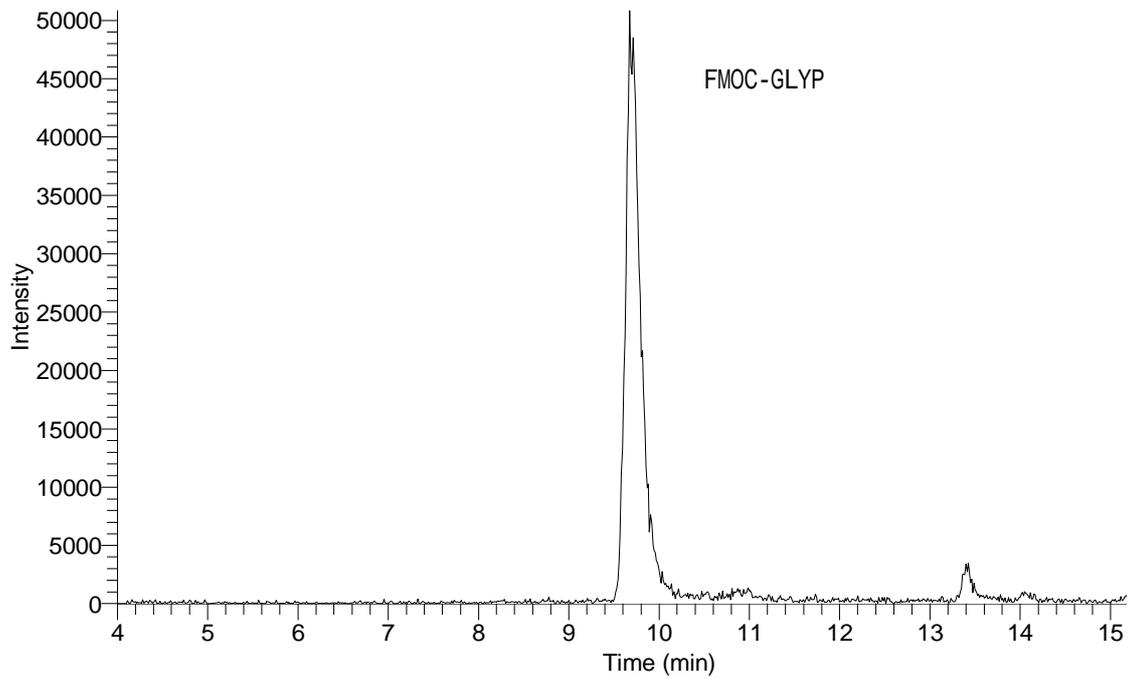


図1 血液試料 (1 $\mu\text{g/mL}$) から得られたトータルイオンクロマトグラム

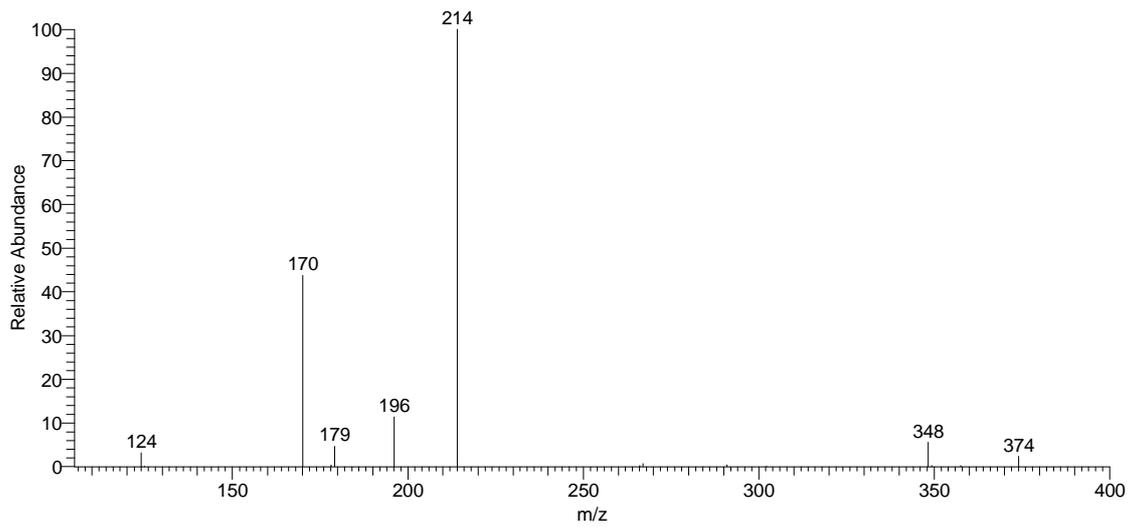


図2 血液試料から検出された FMOC-GLYP のプロダクトイオンスペクトル

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
----	--------