

食品におけるグリホサートおよびグルホシネートの分析法の検討(I)

樋下勝彦, 新宅沙織, 高井靖智

Determination of analytical methods for Glyphosate and Glufosinate in foods (I)

Katsuhiko Hinoshita, Saori Shintaku and Yasutomo Takai

キーワード：グリホサート, グルホシネート, 食品, HPLC

Key Words : Glyphosate, Glufosinate, Food, HPLC

はじめに

アミノ酸系除草剤であるグリホサート (GLYP) 及びグルホシネート (GLUF) は非選択性除草剤として幅広い農産物に登録・使用されており, 非農耕地でも広く使用されている。これらの除草剤は植物体内において, GLYP から *N*-アセチルグリホサート (*N*-GLYP) やアミノメチルリン酸 (AMPA) に, GLUF から *N*-アセチルグルホシネート (*N*-GLUF) や3-メチルホスフィニコプロピオン酸 (MPPA) といった代謝物となることが知られており, 残留基準値は代謝物を含めたものとして設定されている (図1)。

これらアミノ酸系除草剤は, 極性がきわめて高いため当センターでは残留農薬一斉分析の対象となっておらず, 現在, 対応できていない。一方, 通知試験法^{1), 2)}では GLYP, GLUF はそれぞれ異なる誘導体化・分析機器を用いて分析することとなっているため, 迅速性に欠ける。また, 食品におけるアミノ酸系除草剤の一斉分析についての報告はあるが, 報告数は少ない^{3)~5)}。

そこで当センターで対応可能な農薬の範囲を拡大するため, GLYP, GLUF および AMPA の食品における同時分析法の確立を目的とし, 検討を行ったので報告する。

実験方法

1 試料

試料は測定対象成分が検出されなかった国産小麦粉, 国産大豆, 国産大麦, 食パン, パスタ, レーズンバターロールを用いた。大豆, 大麦, 食パン, パスタ, レーズンバターロールはミルを用いて粉砕し, 分析に供した。

2 試薬

1) 標準物質

GLYP は富士フィルム和光純薬製グリホサート標準物質を, GLUF は富士フィルム和光純薬製グルホシネートアンモニウム標準品を, AMPA は富士フィルム和光純薬製 (アミノメチル) リン酸標準物質を用いた。

成分名	GLYP	<i>N</i> -GLYP	AMPA
構造式	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{HO}-\text{P}-\text{CH}_2-\text{NHCH}_2\text{COOH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{HO}-\text{P}-\text{CH}_2-\text{NCH}_2\text{COOH} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{COCH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{HO}-\text{P}-\text{CH}_2-\text{NH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$
基準値の対象	すべての農産物について対象	大豆, とうもろこし 及びなたねのみ対象	対象外
成分名	GLUF	<i>N</i> -GLUF	MPPA
構造式	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{P}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CHCOOH} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{NH}_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{P}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CHCOOH} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{NHCOCCH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{P}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{COOH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$
基準値の対象	すべての農産物について対象	穀類, 豆類, 種実類 及びてんさいのみ対象	すべての農産物について対象

図1. GLYP, GLUF 及び代謝物の構造式等

各標準物質 10 mg を超純水 10 mL により調製し、1000 mg/L の標準原液とし、15 mL ポリプロピレン製 (PP) 遠沈管に冷蔵保存した。

2) 溶媒及び試薬

酢酸エチル、りん酸は富士フィルム和光純薬製 HPLC 用を、メタノールはキンダ化学製 HPLC 用を、アセトニトリルはシグマ・アルドリッチ製 HPLC 用を、アセトンは富士フィルム和光純薬製残留農薬・PCB 試験用を、クロロギ酸 9-フルオレニルメチル (FMOC) は富士フィルム和光純薬製ペプチド合成用を、ホウ酸ナトリウムは片山化学工業製特級を、りん酸水素二ナトリウムは富士フィルム和光純薬製試薬特級を用いた。超純水はヴェオリア・ジェネッツ製 PURELAB Chorus で精製したものを使用した。

3) 固相抽出カラム

「PS-2 カラム」として Waters 製 Sep-Pak PS2 Plus Short Cartridge 300 mg を、「SCX カラム」として Agilent 製 Bond Elut Jr SCX 500 mg を使用した。

4) その他の器具

透析膜はダイアライシスマンブラン、サイズ 36 富士フィルム和光純薬 (株) 生化学用を、15 mLPP 遠沈管は Labcon 製の PP 遠沈管を、0.2 μm フィルターはメルク製マイレクス-LG を使用した。

3 分析条件

HPLC : Agilent 製 1200 シリーズ

カラム:L-column2 ODS (2.1 mm \times 100 mm, 2 μm)

移動相 : A 液 20 mM Na_2HPO_4 水溶液

(りん酸を用いて pH3.5 に調製)

B 液 アセトニトリル

グラジエント条件 : A 液 85 % (0 min) \rightarrow 85 % (3 min) \rightarrow 80 % (25 min) \rightarrow 10 % (26 min) \rightarrow 10 % (32 min) \rightarrow 85 % (33 min).

流速 : 0.5 mL/min カラム温度 : 40 $^{\circ}\text{C}$

注入量 : 1.0 μL

蛍光波長 Ex: 255 nm Em: 310 nm

4 試験溶液の調製

1) 抽出

均一化した試料 10.0 g を量りとり約 30 cm に切った透析膜の内部に透析内液として水 30 mL と共にいれ、透析膜の両端を結んだ。これを透析外液として水 70 mL の入った 250 mL 遠沈管にいれ、4 時間振とうを行い、外液を抽出液とした。

2) カラム処理

PS-2 カラムの下に SCX カラムを接続し、アセトン 6 mL、水 10 mL でコンディショニングした。50 mL ナスフラスコをカラムの下に置き、抽出液 10 mL を負荷した後、水 10 mL で溶出、50 $^{\circ}\text{C}$ の水浴で減圧濃縮を行い乾固させた。

3) 誘導体化

2) カラム処理により得られた残留物に 0.05 mol/L ホウ酸ナトリウム水溶液 10 mL を加え超音波処理により溶解させた。ここから 5 mL を 15 mLPP 遠沈管に分取し、0.1 % FMOC アセトン溶液を 2 mL 加え、手振りで振とう、室温で 20 分放置した。その後、酢酸エチル 2 mL を加え振とうし、過剰の反応試薬を除去、水層を 0.2 μm のフィルターに通し試験液とした。分析フローを図 2 に示す。

結果及び考察

1 分析条件の検討

1) 誘導体化方法の選択

GLYP, GLUF, AMPA は水道水における水質管理目標設定項目に設定され、FMOC 誘導体化による同時分析法が定められている⁶⁾。また、アミノ酸系除草剤一斉分析の報告^{3)~5)}もあることから汎用性・迅速性を有する FMOC 誘導体化-HPLC 蛍光検出器 (FL) を選択した。FMOC 誘導体化は 1 級、2 級アミンに、蛍光を有する官能基が導入できることから、GLYP, GLUF, AMPA を誘導体化できる。例として GLYP における反応式を図 3 に示す。

なお、GLYP, GLUF 等は金属やガラスへの吸着が知られており、本検討においてもガラス器具への吸着が確認されたため、減圧濃縮時以外は可能な

限り PP 製の遠沈管やマイクロピペット等を使用した。

2) 機器条件の検討

GLYP の通知試験法¹⁾や一斉分析の報告^{3)~5)}において分析カラムとして強陰イオン交換カラムである SAX 等が使用されているが、良好なピーク形状が得られなかったため、いくつかの ODS 系のカラムを検討した。その結果、L-column2 ODS においてもっとも良好なピーク形状を得ることができたため、これを選択することとした。

また、移動相として、LC-MS/MS に対応できるように揮発性のギ酸や酢酸アンモニウム等の水溶液を検討したが良好なピーク形状が得られなかった。そこで不揮発性であるがリン酸バッファーを使用したところ、図4に示したとおり良好なピーク形状となった。理由として Fmoc 誘導体化後においても分子内にリン酸基が残存することから配管金属等への吸着が考えられるが、移動相としてリン酸を使用する事で活性点がコーティングされたためピーク形状が改善したと考えられた。

また、検量線において3成分とも5 ug/L から1000 ug/L の間で良好な直線性が得られた(図5)。

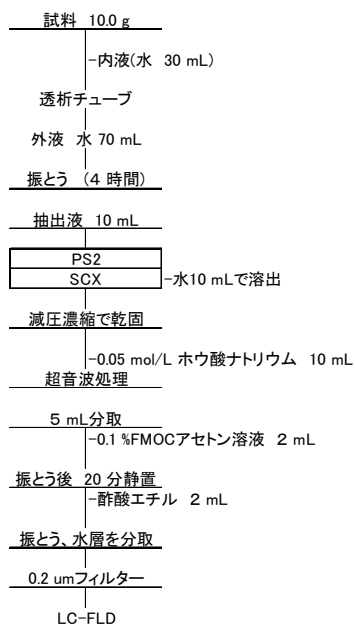


図2. 試験溶液の調製方法

2 前処理方法の検討

1) 抽出方法の検討

GLYP 通知試験法¹⁾では水/クロロホルムによる抽出となっているが、塩素系溶媒は環境へ与える影響が大きいため、避けることとした。また、有機溶媒によるタンパク質変性を試みたが、エマルジョンを形成し、十分に目的物を回収できなかった。ろ過、高速遠心分離等についても検討を行ったが、粉体の除去が不十分であり、その後の固相処理で目詰まりしてしまう結果となった。そこで、当センターの食品添加物分析法に使用している透析膜を用いた抽出を試みたところ、良好な操作性が得られたため透析膜を採用した。なお、小麦粉等の妨害成分の少ない試料であれば透析膜による精製のみで良好なクロマトグラムが得られたが、分析機器保護の観点からも固相精製を追加することとした。

また、透析時における内外液について検討したが、対象成分は水溶性が高く、有機溶媒を加えると回収率が低下したため、内外液は水 100 %とした(表1)。

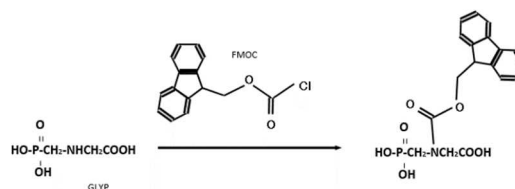


図3. GLYP の Fmoc 誘導体化反応

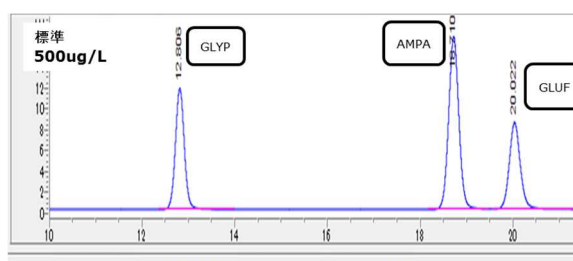


図4. Fmoc 誘導体化混合標準液(500 ug/L)のクロマトグラム

表1. 各内外液における各成分の回収率 (%)

		水	10%メタノール	30%メタノール
小麦粉	GLYP	76	65	46
	AMPA	100	100	59
	GLUF	100	95	90
大麦	GLYP	97	88	74
	AMPA	100	100	99
	GLUF	94	100	97

2) カラム処理の検討

抽出後の精製方法として GLYP, GLUF 通知試験法^{1), 2)}及び大野ら³⁾の方法を参考とし SCX, PS-2, NH₂, ODS 等による固相精製を試したところ, PS-2/SCX のタンデムカラムによる精製が妨害の除去効果が大きく, 回収率も良好であったため, PS-2/SCX によるカラム精製を行うこととした。大豆blank抽出液のカラム処理による精製効果について, クロマトグラムを図6に示す。

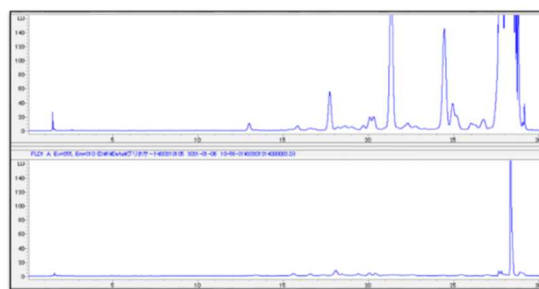


図6. 大豆blank抽出液のクロマトグラム (上: カラム処理なし, 下: PS-2/SCX)

3 添加回収試験

国産小麦粉, 国産大豆, 大麦に試料換算で 5 mg/kg となるように GLYP, GLUF, AMPA を添加し, 添加回収試験を行った。また, 小麦加工食品である食パン, パスタ, レーズンバターロールに対して 1 mg/kg となるように GLYP, GLUF, AMPA を添加し, 添加回収試験を行った。

回収率を表2に, 代表的なクロマトグラムを図7, 8に示す。なお, AMPA についてはグラジエント条件等を検討したが妨害ピークと分離することが困難であったことから, 本法において AMPA を分析対象から外すこととし, 回収率は算出しなかった。

表2. 小麦粉, 大豆, 大麦, 小麦加工食品における添加回収率(農産物は5 mg/kg, 加工食品は1 mg/kg となるように添加) (%)

		GLYP	GLUF
農産物	小麦粉	76	87
	大麦	88	96
	大豆	92	78
加工食品	食パン	87	91
	パスタ	82	89
	レーズンバターロール	93	89

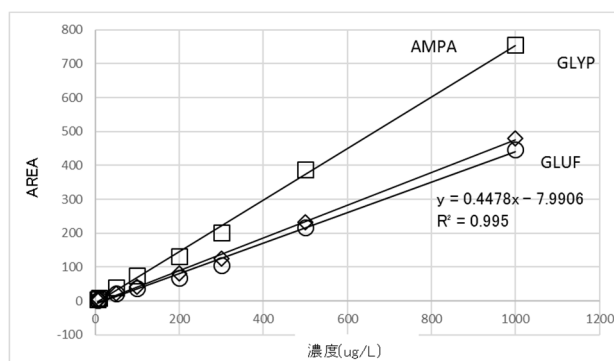


図5. FMOE 誘導体化後の各成分検量線 (5 ug/L~1000 ug/L □ : AMPA, ◇ : GLYP, ○ : GLUF)

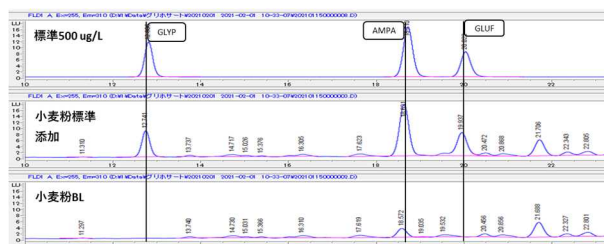


図7. 小麦粉における添加回収試験溶液のクロマトグラム(上段: 標準 500 ug/L, 中段: 試料換算で 5 mg/kg となるように添加(溶液中 500 ug/L), 下段: ブランク抽出液)

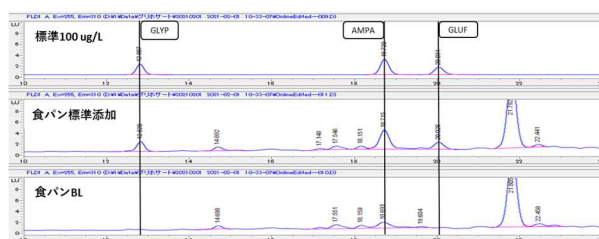


図8. 食パンにおける添加回収試験溶液のクロマトグラム(上段: 標準 100 ug/L, 中段: 試料換算で 1 mg/kg となるように添加(溶液中 100 ug/L), 下段: ブランク抽出液)

ま と め

小麦粉,大豆,大麦や小麦加工食品における GLYP, GLUF の同時分析法を確立することができた. 本法は HPLC-FL による測定であり汎用性が高く, 迅速性を有する誘導体化による方法であるため, 苦情対応や危機管理時に有用である.

しかし, 今回検討した Fmoc 誘導体化では 1 級, 2 級アミンと反応し, 誘導体化するためこれらを有しない代謝物については対応が困難であり, 残留基準値の判断はできない. また, HPLC-FL を使用していることから, 一定の特異性を有するが, 試料によっては妨害ピークとの分離が困難であり, 一律基準濃度での定量は困難であるため, 今後の検討課題である.

文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 食安発第 0124001 号「グリホサート試験法(農産物)」(平成 17 年 1 月 24 日)
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 食安発第 0124001 号「グルホシネート試験法(農産物)」(平成 17 年 1 月 24 日)
- 3) 大野智也佳, 他: HPLC による農産物中の含リンアミノ酸系除草剤の一斉分析法, 食衛誌 Vol. 40 75-79(1999)
- 4) 中川和子, 他: 蛍光検出器付高速液体クロマトグラフを用いたアミノ酸系除草剤とその代謝物の分析法, 京都市衛生環境研究所年報 No, 78 99-101(2012)
- 5) 天川映子, 他: 食品に混入されたグリホサートおよびグルホシネートの迅速分析, 東京都健康安全研究センター年報 57 235-238(2006)
- 6) 厚生労働省健康局水道課長 健水発第 1010001 号「水質管理目標設定項目の検査方法」(平成 15 年 10 月 10 日付)