

アルミナ精製による食品中グリホサートの逆相 HPLC 分析

中山恵理子 山下 智富

Purification with Alumina for Reversed-phase HPLC Analysis of Glyphosate in Foods

Eriko NAKAYAMA, and Tomohisa YAMASHITA

目的：グリホサートは世界で最も使用されている含リンアミノ酸系の非選択性除草剤である（商品名：ラウンドアップ等）。劇物ではないことからホームセンターなどで容易に入手可能であり、これまでに中毒事件・事故の原因物質として複数の報告例がある。

グリホサートは紫外吸収を持たず、蛍光発光も示さないため、通常、誘導体化した後に蛍光検出器付き HPLC により分析される。また、高極性化合物であるため、HPLC 測定に汎用される ODS カラムでは夾雑物質との分離が難しく、イオン交換系などの高価なカラムが用いられている。しかし、食品試料の場合、試験溶液に多量の夾雑物質が残ることがあり、カラムの劣化が生じる場合がある。そのため、ODS 等の比較的廉価なカラムを使用できる方が望ましいが、ODS カラムを使用するためには、通常、夾雑物質を除去する多段階の前処理操作が必要となる。そこで本研究では、廉価で汎用性の高い ODS カラムでの分離測定が可能で、より迅速で簡便な精製法・測定法を確立することを目標とした。それによって分析のスループットを向上できるだけでなく、健康危機管理の面でも有用といえる。

今回、その精製手段としてリン酸基と結合する性質を有するアルミナを利用した。この手法では、グリホサートの代謝物であるアミノメチルリン酸 (AMPA) 及び、同じく含リンアミノ酸系除草剤であるグルホシネートも併せて検出可能であり、その検討した成果を報告する。

材料及び方法：

1. 試料：牛乳、オレンジジュース、コーヒー飲料、ビール、ポタージュスープ（インスタント）、カレー（レトルト）、中華丼の具（冷凍食品）、果実ソース、醤油、焼き肉のたれ。

2. 標準品及び試薬等

標準品：グリホサート標準物質（TraceSure, 富士フイルム和光純薬(株)製）、アミノメチルりん酸標準物質（TRM, 富士フイルム和光純薬(株)製）、グルホシネートアンモニウム標準品（残留農薬試験用, 富士フイルム和光純薬(株)製）。

標準原液 (1000 mg/L)：各標準品 10 mg をメスフラスコに採取し、メタノール 5 ml 及び精製水を加えた。超音波をかけて溶解し、精製水を加えて 10 mL とした。

なお、グルホシネートはアンモニウム塩をグルホシネートの濃度に換算せずに秤取り使用した。

混合標準溶液の調製：上記の各標準原液を採取して混合し、メタノール：水 (1:1) を用いて適宜希釈し、調製した。

検量線用標準液：混合標準溶液を適宜精製水で希釈し、0.02 ～ 0.2 µg/mL の濃度に調製した。

その他の試薬：0.1% クロロギ酸 9-フルオレニルメチル（以下、FMOC）アセトニトリル溶液：FMOC（ペプチド合成用, 富士フイルム和光純薬(株)製）100 mg をアセトニトリルで溶解し、100 mL とした。

0.05 mol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 水溶液：四ほう酸ナトリウム十水和物 1.9 g（特級, 和光純薬工業(株)製）、を精製水に溶解し、100 mL とした。

内部標準液：p-トルエンスルホン酸一水和物（アミノ酸自動分析用, 和光純薬工業(株)製）10 mg を精製水に溶解し 50 mL とした（調製濃度：200 mg/L）。

40 mmol/L KH_2PO_4 溶液 (pH 2.5)：リン酸二水素カリウム（特級, 和光純薬工業(株)製）2.72 g を採取し、精製水に溶解して 500 mL としたものをリン酸で pH 2.5 に調製した。

1% ギ酸含有メタノール溶液：ギ酸（特級, 和光純薬工業(株)製）をメタノールで希釈し、調製した。

1% ギ酸水溶液：ギ酸（特級, 和光純薬工業(株)製）を精製水で希釈し、調製した。

0.0005%ギ酸水溶液：1%ギ酸を精製水で希釈し調製した。

1%炭酸ナトリウム：炭酸ナトリウム（特級，和光純薬工業(株)製）を精製水に溶解して調製した。

その他，メタノール，アセトニトリルはHPLC用を用いた。精製水は日本ミリポア（株）製の超純水装置 Milli-Q Direct 8 で精製した水を使用した。

固相抽出カラム：GLサイエンス社製 InertSep AL-N (100 mg/1 mL) は予めアセトニトリル及び0.0005%ギ酸水溶液各2 mLで順次コンディショニングして用いた。

3. 装置

HPLC 装置：Waters 製 Alliance e2695_e2475 を使用した。

ホモジナイザー：（株）日音医理化機械製作所製 ヒスコトロンを使用した。

4. 測定用試料液の調製（図1）

1) 試料からの抽出及び精製

グリホサートやグルホシネートは水への溶解性が高いが，食品中のマトリックス成分と錯形成しやすいという報告があることから [1]，抽出に際しては高極性農薬の分析法（QuPPe Method）[2] を参考にし，1%ギ酸含有メタノールと精製水の（1:1）混合溶媒を使用した。

具体的には，食品試料1 g に1%ギ酸含有メタノール溶液10 mLを加え，精製水を加えて20 mLとし，混合した。固形食品の場合は，この混合物をホモジナイザーで2分間抽出処理した。抽出液を遠心分離（6,000 rpm，5分間）した後，上清（A）を採取，精製水を加えて飲料類は10倍，加工食品は100倍に希釈し，誘導体化用試料液とした（A'）。

2) 誘導体化及び精製

誘導体化については天川らの手法 [3] 及び水道水質試験法，水質管理目標設定項目の検査方法別添 22[4] を参考にした。

誘導体化用試料液A' 0.5 mLを25 mLの有栓試験管に採取し，0.05 mol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 水溶液2 mL及び0.1% FMOC アセトニトリル溶液2.5 mLを加えて混合した。室温で20分間静置して誘導体化した後，1%ギ酸水溶液を加えて混合した。その後，精製水を加えて希釈し，約25 mLとした（B）。

予めアセトニトリル及び0.0005%ギ酸水溶液

各2 mLで順次コンディショニングした InertSep AL-N に，B全量及び，試験管の内壁を0.0005%ギ酸水溶液2 mLで洗浄した洗液も全て負荷した。

次いで，固相カラムを精製水10 mLで洗浄し，流出液は廃棄した。その後，カラム上部から1%炭酸ナトリウムを流し，溶出液5 mLを採取した（C）。

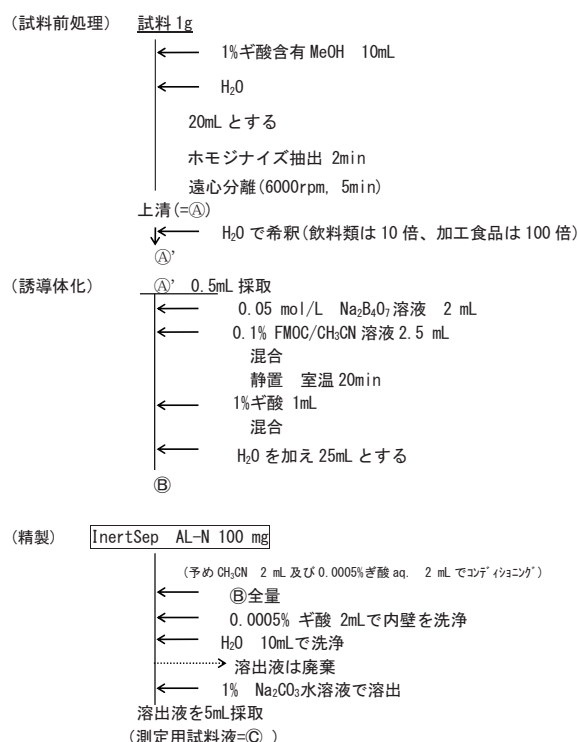


図1. 前処理法の概要

3) 測定条件

© 0.5 mLをバイアル瓶に採取し，内部標準液20 μL 及び移動相溶媒0.5 mLを加えて混合し，測定用試料液とした。

測定用試料液を10 μL 注入し，表1に示す測定条件でHPLC測定を行った。

表1. 測定条件

カラム：	SunFire C18 3.5 μm , 2.1 mm $\times$ 150 mm
移動相：	A: 40mM KH_2PO_4 (pH2.5) aq. B: CH_3CN グラジエント
流量：	0.3mL/min
	A / B = 75 / 25 $\rightarrow$ (13min) $\rightarrow$ 50 / 50 $\rightarrow$ (1min) $\rightarrow$ 30 / 70 $\rightarrow$ (1min) $\rightarrow$ 10 / 90 $\rightarrow$ (1min) $\rightarrow$ 75 / 25
測定時間：	40 min
検出波長：	ex. 268 nm, em. 315 nm
注入量：	10 μL (サンプルクーラー：4℃設定)

4) 検量線の作成

0.02 $\sim$ 0.2 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で段階的に調製した検量線用標準液を，それぞれ0.5 mL採取し，以下試料溶液と同様に2-3)の手順に従って処理し，HPLC測定を行った。

得られたピーク面積を基に検量線を作成した。

結果と考察：

1. 精製法の検討

これまでに我々は、アルミナとリン酸基の相互作用を利用した分離・分析手法を報告している [5]。

既報では、アルミナが pH に依存してリン酸基を持つ化合物を捕集および放出する性質を利用して、リン酸基を有する化合物を分離した。本研究ではこの手法を応用して、FMOC 誘導体化したグリホサート、AMPA、グルホシネートをアルミナ固相で精製することを計画した。そこで、精製に適する条件を検討するため、前準備として市販のカラムクロマトグラフ用活性アルミナ (和光純薬工業(株)製 about 45 μ m) を用い、吸着・脱離挙動を調べた。

1) 吸着条件

無機リン酸イオンの活性アルミナへの吸着は pH5 ~ 6 が最適で、pH4 ~ 7 で十分な吸着能力があるとの報告 [1,7] がある。また、共存陰イオンが、酸化金属からなる吸着材へのグリホサートの吸着を妨害すると報告されている [6]。これらの報告から、次の 2 点が前処理において重要だと判断した。

- ・吸着に適する pH 条件に調整すること
 - ・リン酸化合物のアルミナへの吸着効率を上げるため、希釈して共存成分の影響を低減化すること
- そこで、本研究では、希釈操作を前処理に含めるとともに、吸着の最適 pH 条件を探索した。

まず活性アルミナが高濃度の FMOC 誘導体化グリホサートを吸着できるか確認するため、2.5 及び 5 μ g/mL 溶液 (図 1 に示した飲料類の処理法を行った場合の試料中濃度 各々 500, 1000 μ g/g 相当) を 0.5 mL 採取し、図 1 に示した手順で FMOC 誘導体化し、1% ギ酸を加えて反応停止した。(この状態で pH4.9 程度) その中へアルミナ約 100 mg を加え、穏やかに振とうし、農薬濃度の減少の経時変化を測定した。測定結果を図 2 に示す。振とう後 5 分以内に 99% 以上のグリホサートおよび AMPA, 90% 以上のグルホシネートがアルミナに吸着された。この結果は、アルミナ 1 g は 25 μ g のグリホサートを捕集するのに充分量であることを表している。高濃度混入試料の場合であっても、試料量を調節し、グリホサートの絶対量を 25 μ g 未満にすれば対応可能といえる。

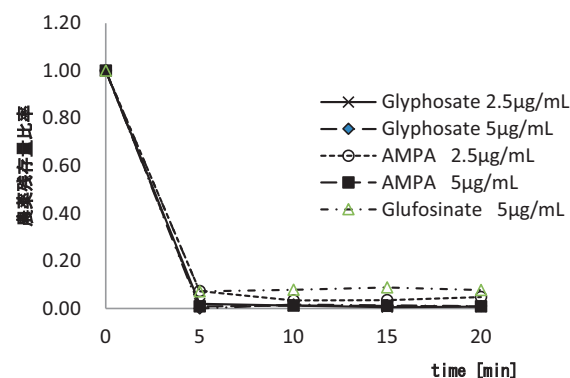


図 2. 高濃度グリホサート等の吸着による減少量経時変化

次に吸着に最適な pH 条件について検討した。試験溶液については以下の通りに調製した。グリホサート、AMPA、グルホシネートの混合標準溶液 1 μ g/mL (試料中濃度 200 μ g/g 相当) を FMOC 誘導体化。誘導体化後、反応停止のためにギ酸溶液を添加し、その後精製水で希釈して 25mL とした。その際、反応停止のためのギ酸溶液の添加量を変えることで pH を調整した。最終的に pH 値が 3.6, 4.4, 5.4, 7.3, 8.3 になるよう調整している。その結果、pH 3.6, 4.4, 5.4 では、グリホサート、AMPA、グルホシネート全て 90% 以上がアルミナに吸着された。pH7.3 ではグルホシネートの吸着率のみが低下して 10% を下回り、pH8.3 になるとさらに AMPA の吸着率も低下して 60% 程度になった。グリホサートは pH8.3 であっても 90% 以上が吸着された。(図 3)。以上の結果より、誘導体化後の溶液については pH 値が 4 ~ 5 になるように調整することとした。

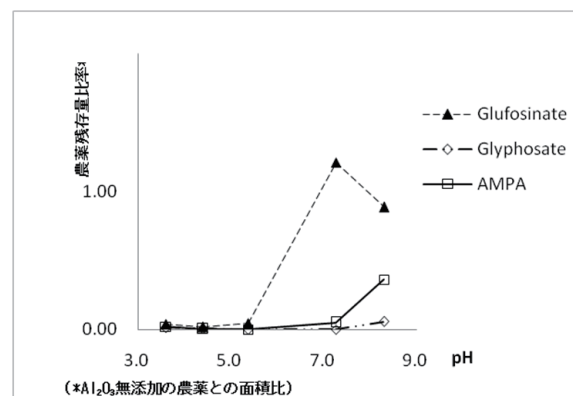


図 3. pH 値と吸着後のグリホサート、AMPA、グルホシネートの残存量比較

2) 脱離条件

グリホサート、AMPA、グルホシネートを吸着したアルミナを含む試験溶液を遠心分離後、液相

を可能な限り除去し、アルミナを残した。そこへ、pH6.2～11の範囲で段階的に調整した水溶液を加えて振とうし、水溶液中に脱離してきた対象物質の濃度を測定した。測定結果を図4に示す。pH10.2 (0.1%炭酸ナトリウム水溶液)では50%程度しか脱離されなかったが、pH11 (1%炭酸ナトリウム水溶液)とした場合には、グリホサート、AMPA、グルホシネートすべて10分で80%以上が脱離した。よって、この条件が最適であると判断し、本研究では、脱離にこの溶液濃度を採用することとした。

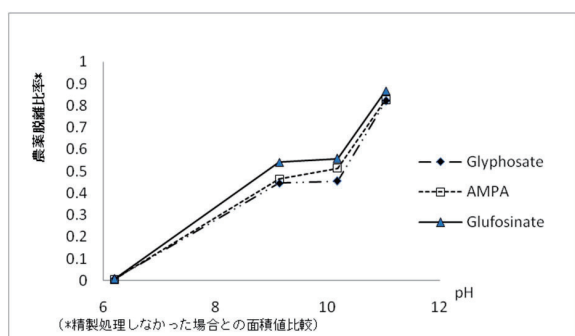


図4. pH値とグリホサート、AMPA、グルホシネートの固相からの脱離量比較

3) 固相カラム

精製処理を行うにあたり、固相のアルミナを計量して使用するよりも市販の固相カラムカートリッジを利用すれば迅速かつ操作が簡便である。そこで、1～2)で検討した条件を基に、固相カラムカートリッジでのグリホサート等の精製効率について実験を行った。

アルミナ固相は活性度によりA、B、Nの3タイプがあり、充填量も100～1000 mg以上と幅がある。Nタイプ1710 mgの固相カラムに誘導体化したグリホサート等を負荷したところ、吸着したまま回収できなかった。そこで100～500 mgの充填量のカラムについて、タイプごとの精製効率の差について、マトリックスを含まない混合標準溶液を用いて確認を行った(表2)。

その結果、充填量100～500 mgであればグリホサート等は概ね90%以上回収できるが、充填量が多くなるほど溶出されにくく、全てを回収するには多くの溶媒量が必要だった。また、充填量が多くなると、タイプA、Bの場合、アルミナ自身が酸性・アルカリ性を示すことから、pH調整が難しくなることが判明したが、充填量100 mgではほとんど差はなかった。

以上の結果を受け、充填量100 mgの固相を用いることとし、今回は中性(N)タイプのものを採用するものとした。この固相からの回収率についてオレンジジュースにグリホサート等の混合標準液を添加した試料で確認したところ、同様の結果を得ることができた。

また、図1の精製過程では精製水10 mLによる洗浄操作を加えた。その理由は、リン酸基とアルミナとの吸着は酸性から中性条件においては比較的強いことから、脱離の前に精製水で十分に洗浄することにより、測定時に妨害ピークとして現れるマトリックス成分をある程度除去することが可能であったためである。

2. 添加回収試験

他機関の報告例を参考にして検出目標濃度を設定し、添加回収試験を実施した。

天川らの報告[3]では経口急性毒性を考慮し、グリホサートとグルホシネートの同時分析における目標分析値を食品1 g当たり100 µgとしている。そこで、本法における固形食品からの検出目標値も100 µg/gとすることにした。しかし、飲料類については、100 mL以上の量を一度に摂取する場合もあることから、目標値を10 µg/gとした。

添加試験を行うにあたり、加工食品などの固体試料の場合、マトリックス成分が、AMPAやグルホシネートのピークと重なって検出される傾向が見られた。そこで、均質化処理後の試料溶液の

表2. 固相タイプと各農薬の溶出割合比較

固相タイプ	試料負荷 流出液の pH値	Glyphosate				AMPA				Glufosinate			
		全脱離量中の割合				全脱離量中の割合				全脱離量中の割合			
		画分(0-5mL)	画分(5-6mL)	画分(6-7mL)	画分(7-8mL)	画分(0-5mL)	画分(5-6mL)	画分(6-7mL)	画分(7-8mL)	画分(0-5mL)	画分(5-6mL)	画分(6-7mL)	画分(7-8mL)
AL-A 100mg	4.2	99.1	0.9	—	—	98.5	1.5	—	—	99.2	0.8	—	—
AL-A 200mg	4.3	98.3	1.7	—	—	98.1	1.9	—	—	99.2	0.8	—	—
AL-B 100mg	4.7*	99.2	0.8	—	—	98.6	1.4	—	—	99.3	0.7	—	—
AL-B 200mg	5.2*	98.9	0.8	0.3	—	98.7	0.8	0.5	—	99.5	0.4	0.1	—
AL-B 500mg	7.2*	97.1	1.7	0.6	0.6	96.2	2.0	1.1	0.7	98.1	1.1	0.5	0.3
AL-N 100mg	4.5	99.5	0.5	—	—	99.2	0.8	—	—	99.7	0.3	—	—
AL-N 200mg	4.5	99.0	1.0	—	—	98.4	1.6	—	—	99.0	1.0	—	—

*アルミナ自体の塩基性の影響が出ていると思われる。

希釈倍率を上げ、誘導体化及び精製操作を実施したところ、食品の種類によっては一部重なりがあるものの、目標濃度の検出が可能となった。

ウスターソースや焼き肉のたれなどの調味料類については除去しきれないマトリックス成分が多かったものの、食品性質上、一度に大量に摂取することは無いと思われることから、固形食品と同様の希釈倍率で試験操作を実施した。しかしながら、醤油については AMPA, グルホシネートについての 100 µg/g レベルの検出は難しく、C18 固相精製操作を加えても十分な効果が見られなかった。

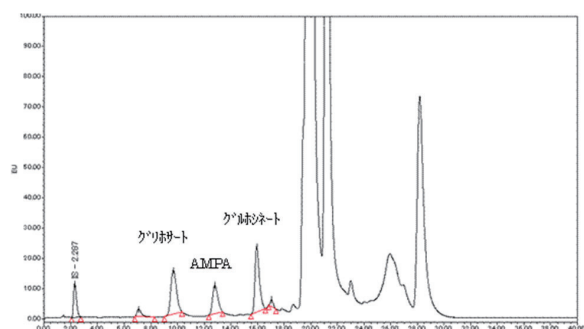


図 5. 中華丼の具に混合標準溶液を添加グリホサート, グルホシネート各 100 µg/g 相当, AMPA 40µg/g 相当検出

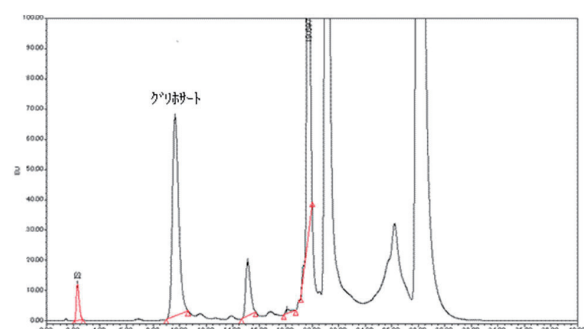


図 6. 牛乳に農薬製剤 (ラウンドアップマックスロード) を添加グリホサート 49 µg/g 相当検出

図 5, 6 に食品へグリホサート等の混合標準溶液を添加した試料のクロマトグラムの例と、実際の農薬製剤 (ラウンドアップマックスロード) を添加したクロマトグラムの例を示す。また、表 3 に食品への添加回収試験結果を示す。

食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインに準じ、飲料類, 固形食品各々について、本法の妥当性評価試験を行った。その際の添加濃度として、グリホサート, グルホシネートは検出目標濃度とした。AMPA はグリホサートの代謝物であることから、更に低濃度の検出が必要になると思われ、他の 2 種よりも低濃度の添加を行った。

2 併行 5 日間の添加試験を実施した結果、真度 [%], 併行精度 [RSD%], 室内精度 [RSD%] 全てについて妥当性評価ガイドラインの目標値を満たしていた。結果を表 4 に示す。

以上の結果から、本法は、緊急時対応の迅速分析法として有効使用できると考える。

表 3. 食品への添加回収試験結果
pH と各農薬の吸着量比較

3-1. 飲料類 (添加濃度 10 µg/g)

食品名	グリホサート	AMPA	グルホシネート
牛乳	100	84	105
オレンジジュース	94	92	98
コーヒー飲料	90	83	99
ビール	96	92	100
ホターシュ(インスタント)	90	83	99

3-2. 固形食品 (添加濃度 100 µg/g)

食品名	グリホサート	AMPA	グルホシネート
カレー(レトルト)	107	104	105
中華丼の具	93	93	96

3-3. 調味料 (添加濃度によっては検出困難なピークと重なるため、BL 値考慮)

食品名	グリホサート	AMPA	グルホシネート
ウスターソース 100 µg/g 相当	102	(96)	(90)
焼き肉のたれ 10~25 µg/g 相当	109	(91)	(135)
醤油 100 µg/g 相当	119	(105)	(153)

表 4. 妥当性評価試験結果

食品名	農薬名	添加濃度 [µg/g]	真度 [%]	併行精度 [RSD%]	室内精度 [RSD%]
コーヒー飲料	グリホサート	10	101	1.8	1.6
	AMPA	4	94	2.0	5.8
	グルホシネート	10	103	1.1	2.9
中華丼の具	グリホサート	100	104	1.2	3.5
	AMPA	40	107	1.8	5.2
	グルホシネート	100	109	2.1	3.5

文 献

1. I.Freuze, A. Jadas-Hecart, A.Royer, et al. (2007). J. Chromatogr. A, 1175, 197 – 206
2. M.Anastassiades, D.I.Kolberg, E.Eichhorn, et al. QuPPE of EURL-SRM (Version

- 9.1;2016)
3. 天川映子, 荻原 勉, 永山敏廣. (2006). 東京都健康安全研究センター年報, 57, 235 – 238
 4. 厚生労働省医薬・生活衛生局 水道課長通知. 平成 15 年 10 月 10 日付健水発第 1010001 号.
 5. T. Yamashita, S.Kodama, T. Kemmei, et al. (2009). Lab Chip, 9, 1337 – 1339
 6. D.M.Jia, C.H.Li, and A.M.Li. (2017). RSC Adv., 7, 24430 – 24437
 7. 浦野紘平. (1998). 水質汚濁研究, vol.11, 10, 19 – 23