

食品中のグリホサート分析法の開発

環境衛生科学研究所 ○柏木久輝、田中瑞希、宮城島利英、小郷沙矢香、堀池あずさ

【要旨】

グリホサートは、ラウンドアップ等の商品名で販売される非選択性のアミノ酸系除草剤で、たんぱく質合成に必要な芳香族アミノ酸の合成を阻害することによって殺草活性を発現する。国外において、グリホサート耐性を持つ遺伝子組換え作物の栽培が積極的に行われ、グリホサートを主成分とする除草剤は農場等において大量に使用されており、使用を認めている国は150か国以上存在する。国内においては、グリホサート含有除草剤は毒劇物に指定されていないため、一般家庭においても入手しやすく、出荷量も年々増加しており、過去には清涼飲料水への混入事件等も発生している。

また、本県では、食品に残留する農薬等におけるポジティブリスト制度のもと、LC-MS/MSおよびGC-MS/MSを用いて約350項目の農薬の一斉分析が可能であるが、グリホサートはグリシンの窒素原子にホスホノメチル基が置換した構造をもつ高極性な物性であるため、現行の一斉分析法の項目に含めることは困難である。加えて、食品等に含まれるグリホサートを定量するための厚生労働省公定試験法(公定法)で示された前処理方法は複雑で時間を要する。

そこで、将来的に残留基準値への適合判定が行えるよう、本研究では、まず食品中への混入事例等に対応できる分析法を検討し、若干の知見が得られたので報告する。

【方法】

1 試料

過去の混入事例や検出が懸念される食品から清涼飲料水(緑茶)、ソースおよびハチミツを選定した。さらに食品分類上、様々な特徴の食品を対象とするため、動物性たんぱく質等を多く含む牛乳、油脂を多く含むマヨネーズ、複合的な食品としてカレーを加えた計6品目を添加回収試験用試料として用いた。

2 試薬等

標準品は富士フィルム和光純薬(株)製グリホサート標準物質98.9%を用いた。標準溶液は標準品を水に溶解して20 µg/mLとし、ポリプロピレン製容器で冷凍保存した。検量線用標準液は標準溶液を水:アセトニトリル(1:1)で希釈し、0.01~0.2 µg/mLの濃度に調整した。精製カラムはジーエルサイエンス(株)製InertSep PSA(500mg/6mL)を用いた。

3 装置および測定条件

装置:蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ(Waters製 ArchHPLC)、カラム:Partisil-10 SAX 4.6 mm×250 mm, 10 µm(メルク(株)製)、カラム温度:40 °C、流速:1.0 mL/min、注入量:20 µL、移動相:(A)10 mmol/L KH₂PO₄ 緩衝液(pH2.5)、(B)CH₃CN、グラジエント条件(A:B(min)):70:30(0min)→70:30(25min)→30:70(30min)→30:70(35min)→70:30(35min)→70:30(50min)、測定波長:ex.268 nm、em.315 nm

4 前処理方法

(1) 希釈法

粉碎均一化した試料5.0 gに含水量が25 mLになるよう水を加え10分間振とう抽出した。そこにアセトニトリル25 mLを加え1分間振とう混和後、5分間静置した。遠心分離(3,000rpm, 5

分)を行い得られた抽出上澄液を 0.45 μ m フィルターでろ過し、誘導体化用溶液とした(図 1)。

(2) 精製法

アセトニトリルおよびアセトニトリル:水(1:1)10mL ずつでコンディショニングした精製カラムに(1)で得られた抽出上澄液 2 mL を注入し、カラム内の溶液を完全に除去した。その後、0.14%アンモニア水 2 mL で溶出し、得られた溶出液を 1 mL 分取し、同量のアセトニトリルを加え誘導体化用溶液とした(図 1)。

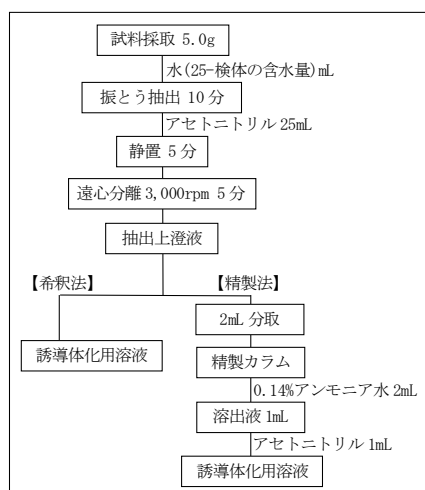


図 1 前処理方法フロー

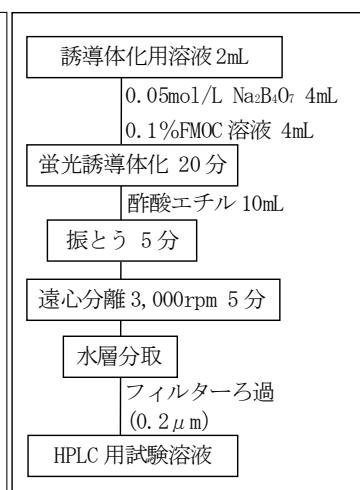


図 2 誘導体化フロー

5 誘導体化

誘導体化用溶液 2 mL に 0.05 mol/L 四ほう酸ナトリウム水溶液および 0.1%9-フルオレニルメチルクロロホルマー (FMOc) 溶液それぞれ 4 mL を加え混和後、室温で 20 分間静置(誘導体化)した。これに酢酸エチル 10 mL を加え 5 分間振とう後、遠心分離(3,000rpm, 5分)を行い得られた水層を 0.2 μ m フィルターでろ過し、HPLC 用試験溶液とした(図 2)。

【結果および考察】

1 検量線

検量線用標準液を用いて誘導体化後、グリホサート濃度が 0.01~0.2 μ g/mL の範囲で検量線を作成した結果、相関係数 0.999 以上と良好な直線性を示した。

2 誘導体化方法の検討

今回、グリホサートを FMOc 溶液により誘導体化後、HPLC-FL を用いて測定する方法について検討した。公定法においても同様の方法を用いているが、誘導体化する前に減圧濃縮、乾固が必要であり、この工程に長時間を要する。抽出溶液を乾固せずに誘導体化に進める方法を検討した結果、誘導体化用溶液に有機溶媒を混合することで、水の場合と比較して低濃度まで測定することができた。これにより当該工程を省略でき、操作の簡略化が可能になった。また、混合する有機溶媒について、メタノールとアセトニトリルの感度比較を行ったところ、面積値および S/N 比ともにアセトニトリルを用いた方が良好であり、標準液 0.1 μ g/mL においてアセトニトリルの方が S/N 比で 3.8 倍良好であった(図 3)。なお、混合比は水:アセトニトリル(1:1)とした時の S/N 比が最も良好であった。

また、誘導体化に用いる四ほう酸ナトリウム水溶液は添加量が少ないと pH を十分に調整することができず、その後の FMOc 溶液

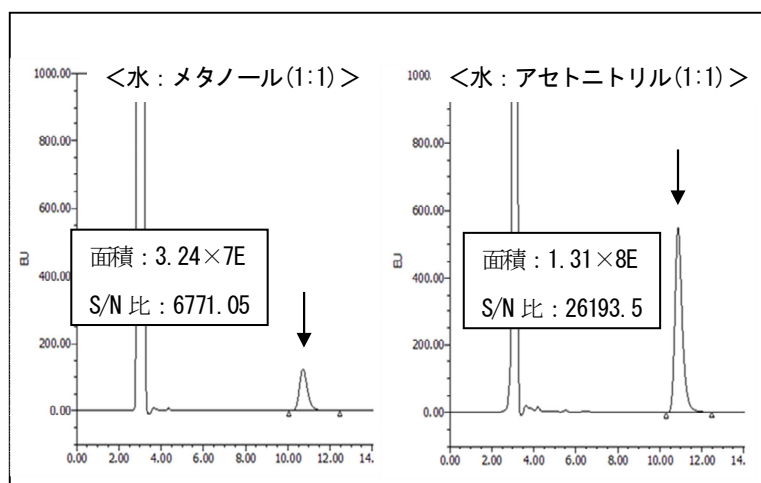


図 3 誘導体化用溶液に混合する有機溶媒の違いによる感度比較(標準液 0.1 μ g/mL)

との反応に影響するが、過量に添加するとほう酸が析出し最終溶液の採取が困難となる。このため、Fmoc 溶液および酢酸エチルと併せて最適な濃度および添加量の組合せを検討した結果、前述した方法 5 の条件で誘導体化を行うこととした。

3 前処理方法の検討

グリホサートは非常に水溶性が高いため公定法では水を用いて 2 回抽出を行っている。今回は、誘導体化方法の検討結果に加え試料中のたんぱく質除去も期待できることから、水での抽出後に同量のアセトニトリルを添加し混和するだけの 1 回抽出とした。

濃度 1.0 $\mu\text{g/g}$ となるようグリホサートを添加した試料について、希釈法を用いて前処理を行ったところ、緑茶、ハチミツ、牛乳およびマヨネーズについては良好なクロマトグラムが得られた。しかし、ソースおよびカレーでは試料注入直後から大きな夾雑ピークが出現し、グリホサートのピークと重なった。そこで、夾雑成分の除去を目的に陰イオン交換作用のある PSA

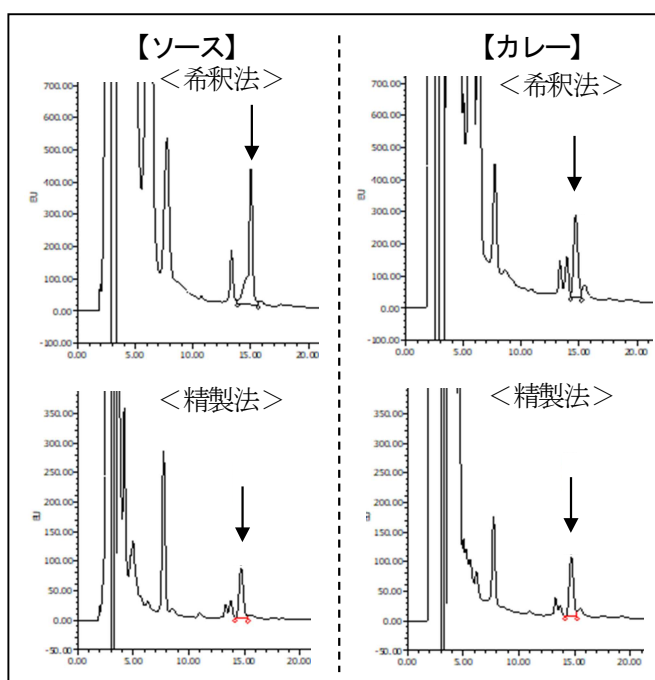


図 4 精製の有無によるクロマトグラム比較

カラムを用いた精製(精製法)を行ったところ、効率的に夾雑ピークを取り除くことができた(図 4)。これらのことから緑茶、ハチミツ、牛乳およびマヨネーズは希釈法を用いて前処理を行い、ソースおよびカレーは精製工程を追加することとした。

4 添加回収試験結果

各試料 5.0g に対して濃度 1.0 $\mu\text{g/g}$ となるようグリホサート標準溶液を添加し、本法に従って添加回収試験(n=1)を実施したところ、全ての検体において得られたグリホサートのピークは、S/N 比 ≥ 10 であり、回収率は 79%~109%と良好であった(表 1)。また、ソースおよびカレーのブランク試料において妨害ピークが検出されたがいずれもピーク面積値および高さは添加濃度に相当するピークの 1/3 未満と小さく、その他の試料については妨害ピークが検出されなかったことから選択性についても良好であることを確認した。

表 1 添加回収試験結果

	緑茶	ソース	ハチミツ	牛乳	マヨネーズ	カレー
精製の有無	無	有	無	無	無	有
回収率(%)	109	79	80	101	106	86

【まとめ】

検討した試験法は抽出操作を 1 回としたこと、減圧濃縮を必要としないこと等、公定法と比較して前処理が簡潔であり短時間で行うことが可能となった。また、添加回収試験(n=1)を行い回収率および選択性が良好であることが確認できた。今後は検体数を増やして検討した試験法の性能評価試験を行い、併行精度も含め最終的な適合判定を行う予定である。その結果は当日発表の中でお伝えする。