ノート

グルホシネート告示試験法の迅速化及び大豆とトウモロコシへの適用

(平成 13 年 11 月 26 日受理)

渡 辺 貞 夫^{*1}

Rapid Analysis of Glufosinate by Improving the Bulletin Method and Its Application to Soybean and Corn

Sadao WATANABE

(Kanagawa Prefectural Public Health Laboratory: 1-1-1, Nakao, Asahi-ku, Yokohama 241-0815, Japan)

A rapid analytical method for residues of the herbicide glufosinate [DL-homoalanin-4-yl (methyl)phosphinic acid] and its metabolite (MPPA: 3-methylphosphinopropionic acid) in soybeans and corns was developed by improving the bulletin method. Fifty mL of solution extracted with water (corresponding to 2 g of the sample) was loaded on a column packed with 5 mL of anion exchange resin, and then the trapped glufosinate and MPPA were eluted with 40 mL of 50% acetic acid. After the derivatization of glufosinate and MPPA with trimethyl orthoacetate, the derivatives were purified and separated on a silica gel cartridge column. The determination of the derivatives was performed with a GC-FPD. The detection limits for glufosinate and MPPA were 0.01 $\mu\text{g/g}$ and 0.005 $\mu\text{g/g}$, respectively. The recoveries of glufosinate from soybeans and corns were 86.3~92.0%, and those of MPPA were 86.5~95.2%.

(Received November 26, 2001)

Key words: 除草剤 herbicide; グルホシネート glufosinate; 代謝物 metabolite; 3-メチルホスフィニコプロピオン酸 3-methylphosphinopropionic acid; ガスクロマトグラフィー (FPD) GC-FPD; 大豆 soybean; トウモロコシ corn

緒 言

グルホシネートは、畑地、水田あるいは宅地などの一年生雑草、多年生雑草の除草剤として我が国で全国的に汎用されている^{1), 2)}。最近では、遺伝子組換え技術によりグルホシネートに耐性を有するトウモロコシなどがすでに商品化され、我が国にも輸入されている。食品衛生法では、グルホシネートの残留基準値が食品ごとに設けられた³⁾が、その規格基準値^{*2}は 0.10~0.50 ppm と極めて低いため高感度な測定が要求される。また同法では、植物中や土壌中の主要代謝物である 3-メチルホスフィニコプロピオン酸 (MPPA) も残留規制対象になっている。この食品衛生法の告示分析法³⁾は、水で抽出後、前処理の陰イオン交換樹脂に吸着させた MPPA 及びグルホシネートを、異なった濃度の酢酸水溶液により溶出時に別々に分画するため、その後のオルト酢酸トリメチルによる誘導体化、シリカゲルカラムによる精製を別々に行う煩雑な分析法となっている。

そこで、イオン交換樹脂カラムから MPPA 及びグルホシネートを同一画分に溶出させ、誘導体化後の精製をミニ

カートリッジカラムの使用に換え、この過程で両者を分画させることにした。また、分析に供する検体量の減量化を行った結果、告示法よりはるかに迅速な分析が可能となった。ただし、大豆及びトウモロコシのようにタンパク質含量の多い農産物⁴⁾では、抽出溶液をそのまま陰イオン交換樹脂カラムに注入するとカラム内が酸性であるため沈殿物を生じ、目詰まりを起こすことがある。

そこで今回、酢酸鉛による除タンパク操作を行った後に本改良法をそれらの農産物で検討したところ、良好な結果が得られたので報告する。

実験方法

1. 試 料

市販の大豆及びトウモロコシを用いた。

2. 試 薬

標準品: グルホシネートは、Nanogen 社製の 1,000 $\mu\text{g/mL}$ (メタノール溶液) を用いた。MPPA は、リーデル・デハーン社製 (含有量 99%) を用いた。

標準原液及び標準溶液: グルホシネートは 1,000 $\mu\text{g/mL}$ メタノール溶液を、MPPA は 10 mg を精ひょうし、メタノールで正確に 100 mL (100 $\mu\text{g/mL}$) とし、これら

^{*1} 神奈川県衛生研究所: 〒241-0815 横浜市旭区中尾 1-1-1

^{*2} 一部農産物について基準値の見直しが行われている。

の標準原液を適宜希釈して標準溶液を調製した。

強塩基性陰イオン交換樹脂: Dowex 社製 1-X2 (50~100 mesh, Cl 型) 5 mL を内径 15 mm, 長さ 21 cm のガラスフィルター付カラムに水で充てんし, 1 mol/L 水酸化ナトリウム 10 mL を流した後, 水で pH が 8~9 になるまで洗浄し, 次に 10% 酢酸溶液 10 mL を流した後, 水で pH が 5 になるまで洗浄し, 更に 50% 酢酸溶液 10 mL を流した後, 水 20 mL で洗浄して使用した。

シリカゲルミニカラムは, Waters 社製 Sep-Pak Plus シリカカートリッジ (690 mg) を 10 mL のアセトンで洗浄して用いた。

その他の試薬は残留農薬分析用あるいは相当品を用いた。

3. 装置

ガスクロマトグラフ: (株)島津製作所製 GC-17A (P フィルター装着 FPD)

4. GC-FPD 測定条件

カラム: DB-1701 (J & W 社製), 内径 0.53 mm, 長さ 30 m, 膜厚 1 μm

カラム温度: 50°C (1 min)-30°C/min-260°C (10 min)

注入口温度: 260°C

検出器温度: 280°C

キャリアーガス圧力: 30 kPa (ヘリウム)

注入量: 2 μL (スプリットレス)

5. 試験溶液の調製

5.1 抽出

試料 10 g (大豆は粉碎均一化した) に水 75 mL 及び脱脂のためクロロホルム 25 mL を加え, 3 分間ホモジナイズした。これを遠心分離し, 上清を得た。残さは水 50 mL を加えて再びホモジナイズし, 遠心分離後, 得られた上清は先の上清に合わせた。これに除タンパク剤として飽和酢酸鉛溶液 4 mL を加え, 5 分間静置後, 遠心分離し, 上清を分離後, 水を加えて 250 mL にメスアップした。

5.2 強塩基性陰イオン交換樹脂による精製

抽出した水溶液から 50 mL (大豆 2 g 相当) を分取し, 前処理済みの陰イオン交換樹脂カラムに流速 3 mL/min で通した。カラムは, 最初 10% 酢酸溶液 10 mL で洗浄し, その後 50% 酢酸溶液 40 mL でグルホシネート及び MPPA を同時に溶出させた。溶出液はロータリーエバポレーターにより 50°C 以下で乾固した。

5.3 オルト酢酸トリメチルによる誘導体化

酢酸 1 mL とオルト酢酸トリメチル 4 mL を加え, 100°C の水浴上で 2 時間還流させながら反応させた。得られた反応液は, ロータリーエバポレーターにより 40°C 以下で 1 mL まで濃縮後, 窒素気流下で乾固した。

5.4 シリカゲルミニカラムによる精製

乾固した検体にアセトン 1 mL を加え, 残さを溶かした後, シリカゲルミニカラムに負荷した。アセトン 4 mL で洗浄後, アセトン 12 mL (F1) で溶出した。更にアセトン-メタノール (8:2) 10 mL (F2) で溶出した。F1 及び

Fig. 1. Derivatives of glufosinate and MPPA by trimethyl orthoacetate

F2 を窒素気流下で乾固し, それぞれにアセトン 0.5 mL を加え, F1 は MPPA, F2 はグルホシネートの測定用試験液とした。

結果及び考察

1. GC-FPD によるグルホシネート及び MPPA 誘導体化物の測定

グルホシネート及び MPPA のオルト酢酸トリメチルによる誘導体化物の構造式を Fig. 1 に示した。誘導体化物を微極性の DB-5, 中極性の DB-17 及び DB-1701, 高極性の DB-WAX のキャピラリーカラム (30 m) に注入した。その結果, MPPA はいずれのカラムでも良好なピーク形状が得られたが, グルホシネートはカラム吸着性が強く, DB-WAX ではカラムの使用可能最高温度条件下でも検出できず, 比較したカラムの中では DB-1701 が最も良好なピーク形状を示した。

2. イオン交換カラムへの検体負荷量の検討

リンを含んだアミノ酸型のグルホシネート及び MPPA は水への溶解度が高く, 抽出を水で行うため, 大豆のようにタンパク質, アミノ酸含量が高いものでは, それらがイオン交換カラムでの精製に影響を与える。告示試験法など^{3), 5)}ではいずれも樹脂量を 20 mL あるいはそれ以上を用いているが, 樹脂量が多くなると溶離に使う酢酸量も多くなり操作性が悪くなるため, 樹脂量と検体負荷量との関係について検討を行った。内径 15 mm のカラムに樹脂 5 mL を充てんし (前処理により約 6 mL になる), これを縦に 2 本直結してグルホシネート及び MPPA の保持量の検討を行った。大豆 10 g の抽出水溶液を酢酸鉛で除タンパク処理後 250 mL に調製し, グルホシネートあるいは MPPA 100 μg/mL メタノール溶液 1 mL を添加した。この溶液から 25 mL, 50 mL 及び 100 mL を分取し, これを試験液としてイオン交換樹脂カラムへの負荷量と吸着量との関係を検討した。得られた結果を Table 1 に示した。液量が 25 mL (大豆 1 g 相当) 及び 50 mL の場合は, 添加したグルホシネート及び MPPA はカラムの 1 段目からのみ検出され, 1 段目ですべて吸着されたものと考えられた。しかし, 100 mL ではグルホシネート, MPPA いずれも 2 段目からも検出された。なお, 水に同濃度で添加した場合には, 100 mL でも 1 段目のカラム

Table 1. Recoveries of Glufosinate and MPPA from Anion Exchange Resin

Loaded volume* ¹	Recovery (%)					
	Glufosinate			MPPA		
	25 mL	50 mL	100 mL	25 mL	50 mL	100 mL
Upper column* ²	110	89.0	29.1	105	98.5	75.9
Lower column* ²	N.D.	N.D.	60.9	N.D.	N.D.	11.0

*¹ Glufosinate or MPPA (each 100 μ g) was added to 250 mL of aqueous solution extracted from 10 g of soybean, and 25 mL, 50 mL or 100 mL of the spiked solution was loaded on the column.

*² Five mL of resin was packed in a column, and two columns were connected straightly.

Fig. 2. Elution profiles of glufosinate and MPPA derivatives from a silica gel cartridge column

に吸着された。この結果から、イオン交換樹脂量は 5 mL で、大豆及びトウモロコシからの抽出液のカラム負荷量は 50 mL (大豆 2 g 相当) にすることにした。

3. シリカゲルミニカラムによる精製の検討

イオン交換カラムからの溶出液をオルト酢酸トリメチルで誘導体化し、そのまま GC-FPD 測定すると、試料由来の夾雑成分が多く測定妨害となったので、市販のミニカートリッジカラムを用いた精製を検討した。

反応後乾固し、アセトン 1 mL に溶解した大豆試料溶液をシリカゲルミニカラムに負荷した。最初にアセトン 20 mL を流し、次にアセトン-メタノール (8:2) 14 mL を流し、1 画分 2 mL で採取し、これを順に Fr1~17 とした。これらの画分についてグルホシネート及び MPPA を測定した。その結果、Fig. 2 に示したように MPPA 誘導体化物は Fr3~8 に溶出された。この溶出パターンは標準品のみの場合 Fr5 に、大豆の場合は Fr4 に最も高濃度で溶出が認められたが、Fr3~8 画分を分取することによりいずれの場合もほぼ全量回収された。溶出溶媒をアセトン-メタノール (8:2) に変えると、ただちにグルホシネート誘導体化物の溶出が Fr11 及び 12 に認められた。最初の 4 mL のアセトン画分には目的物質の溶出はなく、検体由来の夾雑物がかなりあったので、この画分は捨て、次の Fr3~8 (アセトン 12 mL) を分取することにより、

Fig. 3. GC chromatograms of glufosinate and MPPA in soybean spiked at the levels of 0.1 μ g/g After the derivatization by trimethyl orthoacetate, the solution was purified on a silica gel column by the elution of 4 mL of acetone, 12 mL of acetone (F1) and 10 mL of acetone-methanol (8:2) (F2). (A) F1, (B) F2

Table 2. Recoveries of Glufosinate and MPPA from Soybean and Corn

	Recovery (%)*	
	Glufosinate	MPPA
Soybean	86.3 $\pm$ 6.0	86.5 $\pm$ 6.4
Corn	92.0 $\pm$ 7.8	95.2 $\pm$ 7.7

Mean $\pm$ S.D. ($n=3$)

* Soybean and corn were spiked with 0.1 μ g/g and 0.2 μ g/g of the glufosinate and MPPA mixture, respectively.

MPPA 誘導体化物を分離・精製し (F1), 次にアセトン-メタノール (8:2) 10 mL でグルホシネート誘導体化物を分離・精製する (F2) ことにした。得られた溶液は窒素気流下で乾固し、アセトン 0.5 mL に溶かし、GC-FPD 用試験溶液とした。大豆に添加して得られた F1 及び F2 画分のクロマトグラム (Fig. 3) には妨害ピークがなく、トウモロコシでも良好なクロマトが得られた。

4. 検量線と検出限界

GC-FPD 測定条件で得られた検量線は、MPPA については 0.03~2 ppm まで原点を通る良好な一次回帰直線が得られた。一方、グルホシネートは濃度が増すに従って直線からわずかながらずれ、指数関数的に上昇する検量線を示した。なお、本法の検出限界はグルホシネート 0.01 ppm (告示法では 0.007 ppm), MPPA 0.005 ppm であった。

5. 添加回収率

グルホシネート及び MPPA の 10 μ g/mL の混合メタノール溶液 0.1 mL を大豆 10 g に、0.2 mL をトウモロコシ 10 g に添加し、10 分放置後に分析した結果を Table 2 に示した。回収率はグルホシネートが 86.3~92.0%, MPPA は 86.5~95.2% であった。

文 献

- 1) Uesugi, Y., Ueji, M., Koshioka, M. eds., "Saishin Nouryaku Deta Bukku", 3rd Ed., Tokyo, Sofuto Saiensu, 1997, p. 205. (ISBN 4-88171-073-7)
- 2) 日本植物防疫協会編 "農薬要覧—1998年版—" 1999, p. 342.
- 3) 厚生省告示第68号(1993) "食品, 添加物等の規格基準 (昭和34年12月厚生省告示第37号) の一部改正" 平成5年3月4日.
- 4) 科学技術庁資源調査会編 "五訂食品成分表" 東京, 女子栄養大学出版部, 2001, p. 40, 52. (ISBN 4-7895-010-9)
- 5) Ueji, M., Kobayashi, H., Nakamura, K. eds., "Zanryunoyaku Bunsekiho (Analytical Method of Pesticide Residues)", 2002-nenban, Tokyo, Sofuto Saiensu, 2001, p. 287-289. (ISBN 4-88171-097-4)