ノート

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

(平成 10 年 8 月 25 日受理)

大野智也佳^{*1} 大瀧 勝^{*1} 森 喜一^{*1}
久松由東^{*2} 中澤裕之^{*3}

Simultaneous Determination of Residual Phosphorus-Containing Amino Acid Herbicides in Agricultural Products by HPLC

Chiyaka OHNO^{*1}, Masaru OTAKI^{*1}, Yoshikazu MORI^{*1}, Yoshiharu HISAMATSU^{*2}
and Hiroyuki NAKAZAWA^{*3}

(^{*1}Ehime Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science: 8-234, Sanbancho, Matsuyama, Ehime 790-0003, Japan; ^{*2}The Institute of Public Health: 4-6-1, Shiroganedai, Minato-ku, Tokyo 108-0071, Japan; ^{*3}Hoshi University: 2-4-41, Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501, Japan)

A simple and simultaneous determination of residual phosphorus-containing amino acid herbicides such as bilanafos (BIA), glufosinate (GLU) and glyphosate (GLY) in agricultural products by HPLC with fluorescence detection was developed. The herbicides were extracted from agricultural products with water. The crude extract was cleaned up on Sep-Pak PS-2 Plus and Bakerbond spe (Sulfonic acid) cartridges, then derivatized with the fluorogenic labeling reagent, 9-fluorenylmethyl chloroformate. The herbicides were detected by measuring the fluorescence at λ_{ex} 255 nm and λ_{em} 310 nm. The recoveries of 3 herbicides spiked at 2.0 $\mu\text{g/g}$ in agricultural products were within the range of 69.7~126.8%. The detection limits were 0.02~0.04 $\mu\text{g/g}$.

(Received August 25, 1998)

Key words: 除草剤 herbicide; 含リンアミノ酸系除草剤 phosphorus-containing amino acid herbicides; ビラナホス bilanafos; グルホシネート glufosinate; グリホサート glyphosate; 蛍光誘導体化 fluorescence derivatization; 高速液体クロマトグラフィー HPLC

緒 言

農薬は農産物の生産過程において農作業の効率化, 安定供給などさまざまな目的で使用される。

このうち除草剤については, 1960 年代からパラコートが使用されていたが, 中毒事故が多発したため¹⁾, これに代わる含リンアミノ酸系除草剤が相次いで開発され, 使用されるようになった (Fig. 1)。

含リンアミノ酸系除草剤は, ホルモン型非選択性の除草剤で, 植物体内に速やかに吸収・移行して植物体を枯

死させるもので, 一年生雑草や多年生雑草などに広く使用されている²⁾。また, 1996 年から厚生省は組換え DNA 技術応用食品の安全確認を行っているが, このな

Fig. 1. Structures of phosphorus-containing amino acid herbicides

^{*1} 愛媛県立衛生環境研究所: 〒790-0003 愛媛県松山市三番町 8-234

^{*2} 国立公衆衛生院: 〒108-0071 東京都港区白金台 4-6-1

^{*3} 星薬科大学: 〒142-8501 東京都品川区荏原 2-4-41

Scheme 1. Analytical procedure for phosphorus-containing amino acid herbicides

かに除草剤（グリホサート）耐性大豆などが含まれており³⁾、これらの農産物及びその加工品中への除草剤残留に対する関心が高まっている。

含リンアミノ酸系除草剤の残留分析法については、グリホサート及びグルホシネートはHPLCを用いる方法^{4)~11)}やGCを用いる方法^{12), 13)}、ピラナホスはGCを用いる方法¹⁴⁾が報告されているが、除草剤ごとに分析方法が異なること、操作の煩雑性などの問題がある。GC/MSにより同時分析した報告¹⁵⁾があるが、高濃度な範囲であり、食品に残留する程度の低濃度レベルの分析に適用するには問題がある。

そこで、HPLCを用いて3種の含リンアミノ酸系除草剤ピラナホス、グルホシネート及びグリホサートを高感度かつ一斉に分析できる方法を検討した。

実験方法

1. 試料

市販のトマト、きゅうり、りんご及びみかんを用いた。

2. 試薬

標準品：グリホサート (GLY)、グルホシネートアンモニウム (GLU) はリーデル・デ・ヘン社製を、ピラナホスナトリウム (BIA) は明治製菓(株)からの分与品を使用した。

標準原液：標準品 25 mg を精ひょうし、水で正確に 25 mL とした (1 mg/mL)。

標準溶液：標準原液を水で適宜希釈した。

誘導体化試薬：クロロギ酸 9-フルオレニルメチル (FMOCCL) (和光純薬工業(株)製) 0.1 g をアセトンに溶解し 100 mL とした。

クリーンアップ用カートリッジ：Sep-Pak PS-2 Plus (充てん量 265 mg, ウォーターズ社製)、Bakerbond spe (スルホン酸型) (充てん量 500 mg, J. T. ベーカー社製) を、メタノール及び水各 3 mL でプレコンディショニングし使用した。

アセトニトリル、アセトン、酢酸エチルはHPLC用 (和光純薬工業(株)製) を、その他の試薬はすべて試薬特級品を使用した。

Table 1. Recovery of Bilanafos, Glufosinate and Glyphosate from Solid Extraction Cartridges¹⁾

Cartridge		Recovery (%) ²⁾		
		Bilanafos	Glufosinate	Glyphosate
Sep-Pak Plus C18 ³⁾	(125 mg)	82.3±15.2	95.6± 0.9	96.5± 2.5
Sep-Pak Plus C8 ³⁾	(125 mg)	85.7± 5.8	96.4± 1.5	85.2±18.6
Sep-Pak PS-2 Plus ³⁾	(265 mg)	95.4± 5.1	100.5± 5.0	100.5± 5.0
Sep-Pak Plus Silica ³⁾	(690 mg)	43.1±39.0	55.9±36.4	58.3±32.8
Sep-Pak Plus Florisil ³⁾	(910 mg)	85.1±12.5	79.1±13.9	75.5±17.9
Sep-Pak Vac C18 ³⁾	(500 mg)	91.4± 1.6	89.1± 1.7	88.0± 1.0
Excelpak SPE-GLF ⁴⁾	(500 mg)	95.8± 2.8	89.7± 2.2	88.1± 1.7
Supelclean ENVI-Carb ⁵⁾	(250 mg)	0	1.2± 2.1	0

¹⁾ 5 mL of standard mixture (0.2 µg/mL) was applied and eluted with water.

²⁾ Mean±S. D., *n*=3

³⁾ Waters Co.; ⁴⁾ J&W Scientific; ⁵⁾ Sigma-Aldrich Co.

Table 2. Recovery of Bilanafos, Glufosinate and Glyphosate from Cation Exchange Cartridges¹⁾

Cartridge		Recovery (%) ²⁾		
		Bilanafos	Glufosinate	Glyphosate
Bond Elut SCX ³⁾	(500 mg)	93.1±5.7	98.8±9.9	96.5±2.5
Bakerbond spe ⁴⁾	(500 mg) (Sulfonic Acid)	100.4±5.8	95.7±2.3	97.5±3.4

¹⁾ 5 mL of standard mixture (0.2 µg/mL) was applied and eluted with water.

²⁾ Mean±S. D., *n*=5

³⁾ Varian Associates, Inc.

⁴⁾ J. T. Baker

3. HPLC 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフ: 655A-11 ((株)日立製作所), 蛍光検出器 F1000 ((株)日立製作所), カラムオープン CTO-2A ((株)日立製作所), データ処理装置 833A((株)日立製作所)

カラム: Nucleosil 100-SB (内径 4.6 mm×250 mm) (ナーゲル社), 移動相: 1 mol/L リン酸-アセトニトリル-水 (5 mol/L KOH で pH 3.1 に調整) (1:4:5), 流速: 0.7 mL/min, カラム温度: 50°C, 蛍光測定波長: λ_{ex} 255 nm, λ_{em} 310 nm, 注入量: 10 µL

4. 試験溶液の調製

操作法の概要を Scheme 1 に示した。細切均一化した試料 10 g を採り、水 30 mL (2, 3 回目はそれぞれ 30, 20 mL) を加えてホモジナイズした後、遠心分離し、水相をあわせ、100 mL の定容とした。その 5 mL を分取し、Sep-Pak PS-2 Plus に負荷し、水 5 mL で溶出させた。次いで流出液を Bakerbond spe (スルホン酸型) に負荷し、水 20 mL で溶出させ、流出液を減圧濃縮し乾固した。残留物に 0.1 mol/L 四ホウ酸ナトリウム溶液 10 mL を加えて溶解し、その 5 mL に 0.1% FMOCCI アセトン溶液 2 mL を加えて蛍光誘導体化し、酢酸エチル 5 mL で過剰の反応試薬を除去し

て、試験溶液とした。

結果及び考察

1. 前処理法の検討

対象物質は水溶性で有機溶媒には不溶あるいは難溶であるので、水抽出法を検討した。告示法による GLY の分析においてはクロロホルム洗浄により夾雑物の除去を行う¹⁰⁾ が、クリーンアナリシスの観点から夾雑物の除去に酢酸エチルによる洗浄及びカートリッジを用いたクリーンアップを検討した。

酢酸エチルで洗浄した場合、試料によってエマルジョンを形成し、水相の分取に時間を要した。そこで、カートリッジを用いて、試料中の夾雑物の除去を試みた。

まず、各種のカートリッジに各物質の標準溶液 (0.2 µg/mL) 5 mL を負荷し、回収率を検討した (Table 1)。

ポリマーゲルが充てんされた Sep-Pak PS-2 Plus が最も高い回収率と優れた再現性を示した。

しかし、試料では BIA 付近の夾雑物を除くことができず、GLU, GLY の反応率も低値であったため (Fig. 2 (C)), 更にイオン交換モードのカートリッジを用いたクリーンアップ法を検討した。

BIA, GLU のピーク付近の妨害を除去する目的で陽イオン交換タイプのカートリッジ Bakerbond spe (スル

Fig. 2. HPLC chromatograms of (A) standard mixture (0.1 $\mu\text{g/mL}$), (B) spiked orange extract (2 $\mu\text{g/g}$) before and (C) after clean up with Sep-Pak PS-2 Plus and (D) after clean up with Bakerbond spe (sulfonic acid)
1 = bilanafos, 2 = glufosinate, 3 = glyphosate

ホン酸型) 及び Bond Elut SCX に各物質の標準溶液 (0.2 $\mu\text{g/mL}$) 5 mL を負荷して回収率を検討した (Table 2). 対象物質はいずれのカートリッジからも水 10 mL で全量回収された。

しかし、試料に应用した場合、BIA の溶出が遅れる場合が認められたので、流出させる水の量を 20 mL とした。

回収率及び標準偏差は両カートリッジとも良好であったが、Bakerbond spe (スルホン酸型) が夾雑物の除去に有効であったので、これを用いることとした。

このカートリッジの使用により、BIA 付近の夾雑物の影響を軽減することができ、各物質の反応率も増加した (Fig. 2).

2. 誘導体化の検討

対象物質はその構造中に紫外あるいは可視吸収を持つ原子団を持たず、また蛍光を持たないので、検出感度や選択性に劣る。そこで、分子内にアミノ基を有することから、この官能基を蛍光誘導体化し、感度・選択性を向上させて検出することを検討した。

FMOCCI は第 1 級アミン、第 2 級アミンともに室温で誘導体化できる⁵⁾ ことから、誘導体化試薬に FMOCCI を選択した。反応条件は Moya らの方法⁵⁾ に準じ、至適条件を検討した。反応溶液に 0.01 mol/L 四ホウ酸ナトリウム溶液を用い、1 mol/L ホウ酸で pH を 6.7~9.4 の範囲で変化させて、生成する誘導体の蛍光感度に及ぼす影響を検討した。

BIA 及び GLU は pH 8 以上でほぼ一定の蛍光強度を

Fig. 3. Effect of pH on the derivatization
● = bilanafos, ■ = glufosinate, ▲ = glyphosate

示したが、GLY は pH 9 以下で低下した。いずれの物質も pH 9 以上で一定であった (Fig. 3).

次に四ホウ酸ナトリウム溶液の濃度について、0.005~0.1 mol/L の範囲で誘導体の蛍光強度を検討した。0.01 mol/L 以上ではほぼ一定であった。しかし、試料に適用した場合、抽出物を低濃度の四ホウ酸ナトリウム溶液に溶解すると pH が 9 未満となるものがあり、蛍光強度にばらつきが認められるため、四ホウ酸ナトリウム溶液の濃度を 0.1 mol/L としたところ、pH を 9 以上に保持することができ、蛍光強度は一定となり安定した。

3. 移動相の検討

移動相にリン酸-アセトニトリル系を選び、リン酸濃度を一定にして、溶媒の混合比及び pH を変えて、保持時間及びピーク形状に及ぼす影響について検討した。

Table 3. Recoveries of Herbicides from Vegetable and Fruit

Sample	Recovery (%)*		
	Bilanafos	Glufosinate	Glyphosate
Tomato	93.8±11.0	92.6±5.0	97.6±4.2
Orange	91.3± 3.4	96.2±4.2	100.1±4.6
Cucumber	69.7± 3.7	100.1±7.4	97.5±5.5
Apple	93.7± 5.3	126.8±8.2	103.1±6.5

Samples were spiked with 2 µg/g of each herbicide.

*Mean±S. D., n=5

アセトニトリルの割合を増加させると、各誘導体は早く溶出したが、各物質の分離が十分でなかった。また、40% 未満では GLY が溶出しなかった。アセトニトリル濃度が 40% のとき、各誘導体が良好に分離できた。

次に移動相の pH を 1.8～3.3 の範囲で変化させて、目的物質の分離状況を検討した。pH 3～3.3 の範囲で各誘導体が良好に分離し、pH 3.1 のとき試料由来の妨害物質との分離が良好であった。

4. 測定カラムの検討

今回検討した 4 種類 (TSK-GEL ODS-80T_M, Asahi-pak ES-502N, Partisil-10 SAX, Nucleosil 100-SB) のカラムのなかでは、Nucleosil 100-SB を用いた場合に、最も良好な相互分離及びピーク形状を得た。

5. 検量線及び検出限界

各標準溶液を用いてピーク高さ法で検量線を作成したところ、GLU は 0.005～1.0 µg/mL、BIA、GLY は 0.01～2.0 µg/mL の範囲で良好な直線性が得られた。検出限界は GLU は 0.02 µg/g、BIA、GLY は 0.04 µg/g であった。

グルホシネート及びグリホサートの残留基準はそれぞれ 0.10～3.0 ppm 及び 0.10～10 ppm の範囲に設定されており、この検出限界で残留基準値は確認が可能である。

6. 添加回収実験及び市販試料の分析

市販のトマト、みかん、きゅうり及びりんごの 4 種類の試料について添加回収実験を実施したところ、69.7～126.8% の回収率が得られた。試料からはいずれの除草剤も検出されなかった (Table 3)。

ま と め

食品中に残留する含リンアミノ酸系除草剤 (BIA、GLU 及び GLY) の HPLC による多成分同時分析法について検討した。対象物質を試料から水抽出し、Sep-Pak PS-2 Plus 及び Bakerbond spe (スルホン酸型) カートリッジによりクリーンアップすることにより、前処理操作が簡便になった。また、誘導体化試薬に FMOCCI を使用して対象物質を蛍光誘導体化することにより、BIA、GLU 及び GLY を、同時に、共存物質

の影響をうけることなく分析することができた。添加回収実験を実施したところ、69.7～126.8% の回収率が得られた。検出限界は GLU は 0.02 µg/g、BIA、GLY は 0.04 µg/g であった。

本法は従来の方法に比べて迅速かつ簡便であるので、日常分析法として十分応用可能であると考えられる。

謝 辞

本研究に当たり、標準品を提供いただいた明治製菓(株)に深謝いたします。

文 献

- 1) 角田紀子: 中毒研究 8, 359～363 (1995).
- 2) 香月繁孝, 数賀山 靖, 後藤宗文: “農薬便覧第 8 版” p. 826～841 (1995) 農山漁村文化協会.
- 3) 佐原康之: 食品衛生研究 47(11), 7～16 (1997).
- 4) Burns, A. J., Tomkins, D. F.: J. Chromatogr. Sci. 17, 333～335 (1979).
- 5) Moye, H. A., Boning, A. J.: Anal. Lett. 12, 25～35 (1979).
- 6) Roseboom, H., Berkhoff, C. J.: Anal. Chem. Acta 135, 373～377 (1982).
- 7) Moye, H. A., Miles, C. J., Scherer, S. J.: J. Agric. Food Chem. 31, 69～72 (1983).
- 8) Kawai, S., Tomita, M.: J. Chromatogr. 540, 411～415 (1991).
- 9) Wigfield, Y. Y., Lanouette, M.: J. AOAC Int. 74, 842～847 (1991).
- 10) 厚生省生活衛生局長通知: “食品、添加物等の規格基準の一部改正について” 平成 4 年 10 月 27 日, 衛化第 74 号 (1992).
- 11) 阿久澤尚士, 赤岩英夫: 分析化学 46, 69～74 (1997).
- 12) Moye, H. A., Deyrup, C. L.: J. Agric. Food Chem. 32, 192～195 (1984).
- 13) 厚生省生活衛生局長通知: “食品、添加物等の規格基準の一部改正について” 平成 5 年 3 月 4 日, 衛化第 22 号 (1993).
- 14) 後藤真康, 加藤誠哉: “増補 残留農薬分析法” p. 265～268 (1987) ソフトサイエンス社.
- 15) Tsunoda, N.: J. Chromatogr. 637, 167～173 (1993).