

食品中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

天川 映子*, 荻原 勉*, 永山 敏 廣*

Rapid Determination of Glyphosate and Glufosinate mixed in Food

Eiko AMAKAWA*, Tutomu OGIWARA* and Toshihiro NAGAYAMA*

Keywords: グリホサート glyphosate, グルホシネート glufosinate, 食品 food, 迅速分析 rapid determination, 健康被害 health damage

はじめに

事故あるいは事件などにより、食品に混入された化学物質による健康被害の原因物質として、パラコートやジクワット、フェニトロチオンなど農薬類の占める割合は高い¹⁾。最近では含リンアミノ酸系除草剤のグリホサート(GSと略す)やグルホシネート(GNと略す)による事例が多く報告されるようになった^{2, 3)}。GSやGNは、パラコートやジクワットのように毒劇物に指定されていないことから、一般家庭で広く使用できる除草剤として比較的簡単に入手できるため、今後もこれらに起因する健康被害が起ることが予想される。

GSおよびGNは、それ自体では紫外吸収や蛍光を有さないため、誘導体化後HPLC、GC、GC/MSなどで測定されている⁴⁻¹¹⁾。通常は、農産物などの残留量を把握することを目的としているため、より高感度で精度の高い試験をめざし煩雑な操作が必要とされており、迅速で簡易な分析法の報告は少ない^{12, 13)}。そこで今回、急性中毒量を考慮して、より迅速で簡便にこれら農薬を同時分析する方法を検討した。

なお、農産物中のGNは、厚生労働省残留基準としては、代謝物の3-メチルフォスフィノプロピオン酸(MPPA)も合わせて測定されている⁴⁾が、今回は、健康被害発生時等を想定していることから原体であるGNおよびGSのみを分析対象とした。

実験方法

1. 試料

GSおよびGNが混入される可能性が考えられる緑茶飲料、オレンジジュース、牛乳、赤ワイン、日本酒およびカレー(レトルトカレー)の市販品を小売店より購入し、添加回収試験用試料として用いた。

2. 試薬等

標準品: GSは、ジーエルサイエンス(株)製グリホサート

(純度97%)、GNは、Riedel-de-Haen製グルホシネートアンモニウム塩(純度99%)を用いた。

標準溶液: 標準品を50 mg精秤しそれぞれ水に溶解して50 mLとしたものをポリプロピレン(PP)製容器に冷蔵保存し、適宜、水:メタノール(1:1)で希釈して用いた。なお、GNは標準品のアンモニウム塩をGNの濃度に換算せずに秤取した。

検量線用標準液: 標準溶液を水:メタノール(1:1)で希釈し、0.1~10 µg/mLの濃度に調製した。

0.05 mol/L Na₂B₄O₇溶液: Na₂B₄O₇ · 10H₂O(和光純薬製特級品)1.9 gを水に溶解し100 mLとした。

0.1%9-フルオレニルメチルクロロホルム(FMC)溶液: FMC(和光純薬製特級品)0.1 gをアセトンに溶解して100 mLとした後、冷蔵保存し用いた。

0.02 mol/L KH₂PO₄溶液(pH 2.5): KH₂PO₄ 2.72 gを水に溶解し1 Lとしたものをリン酸(1+1)でpH 2.5に調整した。

メタノール、アセトンなどその他の試薬は市販の特級品、水は精製水を用いた。

マイクロフィルター: ミリポア製JHPOW13(径13 mm, 孔径0.45 µm)又はMILLEX GP(径30 mm, 孔径0.22 µm)を使用した。

3. 装置

冷却遠心機: 佐久間製作所製M-160-IV

HPLC装置: アジレント社製1100型のポンプ、カラムオープン、オートサンプラー、蛍光検出器およびデータ処理機

4. HPLC測定条件

高橋ら⁵⁾の方法に準じた。

カラム: Partisil-10 SAX 4.6 mm i.d. x 250 mm(ジーエルサイエンス社製)、移動相: 0.02 mol/L KH₂PO₄(pH 2.5):メタノール(2:3)、流速: 1.0 mL/min、カラム温度:

* 東京都健康安全研究センター多摩支所理化学研究科 190-0023 東京都立川市柴崎町 3-16-25

* Tama Branch Institute, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-16-25, Shibasaki-cho, Tachikawa, Tokyo 190-0023 Japan

40°C, 注入量: 20 μ L, 検出波長: Ex. 255 nm, Em. 315 nm

5. 試験溶液の調製

高橋ら⁵⁾の方法に準じた。

1) 抽出 よく混和した試料から1 gを50 mL容量のPP製遠心管に秤取し, これに水:メタノール(1:1)を加え50 mLとした。蓋をして振とう機で5分間振とう抽出後, あらかじめ0°Cに冷却しておいた遠心機で遠心分離した(3,000 rpm, 5分間)。上澄液を約2 mLとり, ミクロフィルターでろ過し, ろ液を抽出液とした。

カレーのように油脂分を含む試料の場合は, 冷却遠心分離により, 上層に分離してくる油脂分を避けて上澄を採取した。また, 牛乳の場合は, 常用の径13 mm, 孔径0.45 μ mのミクロフィルターでは目づまりし, 微細な懸濁物質が除去できないため, 径30 mm, 孔径0.22 μ mのものを使用した。

2) 誘導体化 抽出液0.5 mLを10 mL容量のガラス製試験管にとり, これに0.05 mol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 溶液を2 mL加えた後, 0.1%FMC溶液を2.5 mL添加し混和後, 室温で20分間放置しGSおよびGNを誘導体化した。次いで, 酢酸エチル5 mLを加え5分間振とう後, 駒込ピペットで静かに水相を約1 mLとりミクロフィルターでろ過し, ろ液を試験溶液とした。

牛乳のように水相と有機相の分離に時間がかかる場合は, アルミホイルで試験管にふたをし, 冷却遠心分離(3,000 rpm, 5分間)後にろ過した。

3) HPLC測定 試験溶液をHPLCで測定し, ピーク面積あるいはピーク高さを用いて絶対検量線法により, 食品中のGSおよびGN含有量を算出した。

なお, 検量線は, 検量線用標準液をそれぞれ0.5 mLとり, 上記に従い誘導体化し測定して作成した。

結果及び考察

1. 抽出溶媒

水への溶解性がGSは11.6 g/L, GN>200 g/L (25°C)¹⁴⁾と高いため, 農産物中のGSやGNの抽出には, 通常, 水が用いられる。しかし, 本法では, 試料中の糖類や水溶性成分の抽出液への溶解を抑えると共に抽出液の粘度を下げ, 誘導体化に先立って行うミクロフィルターによるろ過をスムーズにするために, 水:メタノール(1:1)を用いることにした。

2. 標準溶液の保存容器および抽出用容器

GSの標準品は, 水溶液中でガラス壁に吸着しやすいと言われている⁹⁾。そこで, ガラス壁への吸着を避けるために標準溶液の保存にはPP製保存ビンを用いることにした。また, 試料から抽出する際に用いる容器としてもPP製の遠心管を用いた。PP製容器は, ガラス製のものに比べ安価で同一品をそろえやすく, また, 取り扱いやすいため作業効率を上げることができた。

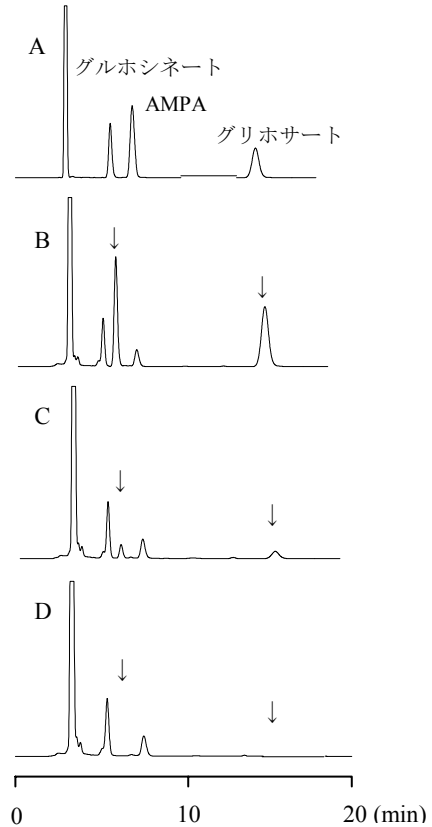


図. HPLCクロマトグラム

A:標準溶液 1 μ g/mL B:牛乳 100 μ g/g 添加
C:牛乳 10 μ g/g 添加 D:牛乳 対照
AMPA:アミノメチルホスホン酸

3. 誘導体化時の pH

大野ら⁸⁾は誘導体化の際, pH 9 以上で誘導体の蛍光強度が安定すると報告している。

そこで, 牛乳, 緑茶飲料, カレー, 赤ワイン, 日本酒およびオレンジジュースについて本法に従い抽出液を調製し, その0.5 mLをとり, これに0.05 mol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 溶液を2 mL加えた後, pHを測定した。

その結果, いずれの試料の場合もpHは9.0~9.2であった。抽出液0.5 mLは試料に換算すると0.01 gと少量のため, 最もpHの低かったオレンジジュースの場合でもpH 9.0であり, 試料中の成分が反応液のpHに大きく影響することはなかったものと考えられる。

4. 誘導体の安定性

緊急時には, 多数の試料を一度に分析する必要があることも予測される。そこで, 誘導体化してからHPLCでの測定までに時間を要す場合を想定し, 誘導体の安定性を検討した。

カレーおよび牛乳に100 μ g/gになるようにGSおよびGNを添加し, 本法に従って調製した試験溶液を冷蔵保存し

表. 市販食品を用いた添加回収試験結果

| 添加量 (µg/g) | グリホサート | | | | グルホシネート | | | |
|------------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|
| | 100 | | 10 | | 100 | | 10 | |
| | 回収率 (%) | CV (%) | 回収率 (%) | CV (%) | 回収率 (%) | CV (%) | 回収率 (%) | CV (%) |
| 茶 (浸出液) | 96.8 | 2.4 | 98.0 | 1.8 | 95.1 | 1.5 | 99.2 | 1.7 |
| 清涼飲料水 | 97.6 | 2.2 | 95.8 | 1.2 | 98.1 | 1.4 | 96.1 | 0.7 |
| 日本酒 | 99.2 | 1.6 | 98.3 | 1.7 | 100 | 1.3 | 92.4 | 2.0 |
| ワイン | 99.8 | 1.2 | 98.1 | 1.9 | 99.5 | 2.4 | 96.8 | 2.1 |
| レトルトカレー | 99.3 | 2.3 | 99.3 | 1.8 | 97.6 | 1.7 | 83.6 | 3.2 |
| 牛乳 | 94.6 | 3.5 | 99.1 | 1.6 | 98.7 | 5.0 | 76.6 | 0.7 |

n=3

(5~10 °C) 72時間の経時変化を調べた。

GSおよびGN, いずれの場合も減少は5%以内にとどまり, 誘導体は比較的安定なものであることがわかった。また, 試験溶液を冷蔵保存した場合, 無色の結晶がみられることがあったが再度マイクロフィルターでろ過したところ, ろ過前と変わらない測定値が得られた。これは, 試薬に用いた $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ が冷却により析出したものと推定される。

5. 分解物のLCクロマトグラムへの影響

GSはアミノメチルホスホン酸 (AMPA) に代謝され, また, GNは土壤中や植物体内で代謝されMPPAになる⁴⁾。これら代謝物が試料中にある場合, HPLCクロマトグラムに影響する可能性がある。そこで, これら代謝物の1 µg/mL溶液を調製し本法に従って誘導体化し, クロマトグラムへの影響について調べた。

図のAに示したように, MPPAはクロマトグラム上にピークは見られず, AMPAは保持時間7.7分にピークが見られたが, GN (6.3分) およびGS (15.9分) とは十分に分離できた。誘導体化はアミンと反応させるため, アミンを有するAMPAのみが本法の反応条件下で誘導体化されたと考える。

6. 添加回収試験

緑茶飲料, カレーなど6種の市販食品を用いて添加回収試験を行った結果を表に示した。

添加量は, 経口急性毒性を考慮してGSとGNのうち低い方の LD_{50} を参考にして決めた。マウスでのGNの LD_{50} は, 416 mg/kg, GSは11,300 mg/kg^{1,5)}であり, 毒性はGSに比べGNの方が強い。最もヒトに近いイヌでのGNの LD_{50} は, 200 mg/kgである。これを体重50 kgの人に換算した場合, 10 gに相当する。GNが混入された食品100 gを食べた場合, 食品1 g当たりの含有量は100mgである。この LD_{50} 推定値から健康被害を呈する可能性および摂食した人が高齢者や子供のように体力が普通の成人に比べ劣っている場合も考慮し, 今回は目標とする分析値を食品1 g当たり100 µgとした。従って, 添加回収試験はGSとGNをそれぞれ試料1 g当たり100 µg添加して行った。また, 1/10の試料1 g当たり10 µg添加したのものについても, 同様に添加回収試験を行った。

表に示したように100 µg/g添加した場合は, 回収率94.6~100%, CV1.2~5.0%といずれも良好な結果であった。

GN10 µg/g添加の際には, 牛乳やカレーなど油脂やたんぱく質の多い食品で回収率に若干の低下がみられたが, その他の食品ではいずれも回収率は90%以上であり, 十分に測定できることがわかった。

牛乳の抽出液は, 孔径0.22 µmのマイクロフィルターでろ過した後もわずかに白濁していたが, 問題なく誘導体化できた。また, カレーの場合は抽出液を冷却下で遠心分離することで油脂分が液面に分離した。この油脂分を避けて抽出液を採取したため, 特に脱脂操作を必要としなかった。

以上のように本法では, 誘導体化を妨害する可能性のある食品由来のたんぱく質や油脂分を, 冷却遠心分離とマイクロフィルターによるろ過の簡便な操作により除去できるため, 前処理にかかる時間と手間を大幅に短縮することが可能であった。

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に使用できると考える。

文 献

- 1) 植村振作, 河村 宏, 辻 万千子, 他: 農薬毒性の事典, 387-395, 2002, 三省堂, 東京。
- 2) 小山完二: 医学のあゆみ, **185**, 192-193, 1998。
- 3) 山下 衛, 田中淳介: 中毒研究, **8**, 383-390, 1995。
- 4) 厚生労働省監修: 食品衛生検査指針残留農薬編2003, 322-341, 日本食品衛生協会, 東京。
- 5) 高橋邦彦, 堀江正一, 青羽信次: 食衛誌, **42**, 304-308, 2001。
- 6) 高野伊知郎, 永山敏廣, 小林麻紀, 他: 食衛誌, **41**, 242-245, 2000。
- 7) Hernandez, F., Hidalgo, C., Sancho, J. V.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **83**, 728-734, 2000。
- 8) 大野智也佳, 大瀧勝, 森喜一, 他: 食衛誌, **40**, 75-79, 1999。
- 9) Stalikas, C. D., Konidari, C. N.: *J. Chromatog. A*, **907**, 1-19, 2001。

- 10) 白井祐治, 小野雄造, 藤原孝治, 他 : 飼料研究報告, **27**, 13-27, 2002.
- 11) Alferness, P. L., Wiebe, L. A. : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **84**, 823-846, 2001.
- 12) 砺波和子, 中村朋子 : 石川保環研報, **40**, 27-35, 2003.
- 13) Brown, P. M., Turnbull, G. Charman, S. , *et al*: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **88**, 204-220, 2005.
- 14) 上路雅子, 小林裕子, 中村幸二編 : 2002年版残留農薬分析法, 287-292, 2001, ソフトサイエンス社, 東京.
- 15) 金澤 純 : 農薬の環境特性と毒性データ集, 183-184, 1996, 合同出版, 東京.