

# 蛍光検出器付き HPLC による加工食品中のグリホサート定量法

中西希代子, 宮本文夫, 橋本博之, 眞壁祐樹, 長谷川康行

Determination of Glyphosate in Processed Foods by HPLC with Fluorescence Detection

Kiyoko NAKANISHI, Fumio MIYAMOTO, Hiroyuki HASHIMOTO, Yuhki MAKABE,  
and Yasuyuki HASEGAWA

## Summary

A quantitative method was developed for the determination of glyphosate [*N*-phosphonomethylglycine] in processed foods by high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection. Five grams of sample was homogenized with 95ml water, and then centrifuged at  $10,000 \times g$  for 10 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$ . The obtained supernatant was filtered through a membrane filter. After glyphosate in the filtrate was derivatized with 9-fluorenylmethylchloroformate (FMOC), the reaction product was used as the test solution of preparation method I for 10 processed foods such as milk, green tea drink and frozen Chinese dumpling. In the case of red wine and sauce as sample, the obtained supernatant described above was clean-up with *ortho*-phthalaldehyde (OPA) derivative and Bond Elut C18 cartridge. After glyphosate in the eluate was derivatized with FMOC, the reaction product was used as the test solution of preparation method II.

The recoveries of glyphosate spiked in 12 processed foods at 0.1 and 1.0  $\mu\text{g/g}$  were 82.8-112.4% and 87.9-110.6%, respectively. The quantification limit of glyphosate was 0.01  $\mu\text{g/g}$  in this method. The proposed method seems to be suitable for the determination of glyphosate in processed foods.

キーワード： グリホサート；加工食品；高速液体クロマトグラフィー；蛍光検出器；

9-フルオレニルメチルクロロホルマート (FMOC)；オルトフタルアルデヒド (OPA)；ボンドエルウト C18 カートリッジ

Keywords: glyphosate ; processed food ; HPLC;fluorescence detection ; 9-fluorenylmethylchloroformate : FMOC ;

*ortho*-phthalaldehyde : OPA ; Bond Elut C18 cartridge

## はじめに

グリホサートは含リンアミノ酸系の非選択性除草剤であり、ラウンドアップ等の商品名で販売され<sup>1)</sup>、多くの作物に用いられている。農産物等のグリホサート検査法については通知検査法 (個別試験法)<sup>2)</sup>が設けられ、多種の食品に残留基準が設定されており、その基準値は 0.05~20 ppm である<sup>3)</sup>。一方、加工食品はマトリックスの影響を受けやすく、グリホサートの分析法についての報告例数も農産物等に比べて非常に少ない。また、グリホサートはホームセンター等でも販売されているため入手が比較的容易であり、以前から農薬の中毒事故の原因物質として挙げられているが、最近では清涼飲料水への混入事件等<sup>4),5)</sup>もあり、健康危機管理の面からも注目される農薬のひとつとなった。

当研究所においても平成 20 年 4 月、清涼飲料水へのグリホサートの混入に関する相談が寄せられ、加工食品中のグリホサートの定量が必要となった。今回、市販加工食品を用いて、既報<sup>2),6)-10)</sup>を参考にしてグリホサートの定量法の検討を行い、若干の知見が得られたので報告する。

## 実験方法

### 1. 試料

市販の豆乳、オレンジジュース、牛乳、日本酒、赤ワイン、緑茶飲料、混合茶飲料、コーヒー飲料、ソース、しょうゆ、レトルトカレー、冷凍餃子および冷凍カルビ炒めの 13 種の加工食品を用いた。

### 2. 試薬および試液

1) 標準原液：関東化学(株)製グリホサート標準品を使用した。標準品 100 mg を精秤し、水で正確に 100 mL とした。(1 mg/mL)

2) 標準液：標準原液を水で適宜希釈した。

3) 0.1 mol/L および 0.05 mol/L 四ほう酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ) 溶液：0.1 mol/L  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  溶液は関東化学(株)製  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  2.01 g を水に溶解し 100 mL とした。0.05 mol/L  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  溶液は本溶液を 2 倍に希釈して調製した。

4) OPA 溶液：オルトフタルアルデヒド (OPA) および 2-メルカプトエタノールは和光純薬工業(株)製を使用した。OPA 400 mg および 2-メルカプトエタノール 200  $\mu\text{L}$  をメタノール 800  $\mu\text{L}$  に溶解し、用時調製した。

5) 0.1%FMOC 溶液: Aldrich Chemical 社製 9-フルオロニルメチルクロロホルマー (FMOC) 0.1 g をアセトンで溶解し 100 mL とした。

6) 0.02 mol/L リン酸二水素カリウム緩衝液 (pH 2.5): 関東化学(株)製リン酸二水素カリウム 13.6 g を水 800 mL に溶かし、リン酸で pH 2.5 とし、水で 1 L とした。これを用時 5 倍希釈し、リン酸で pH 2.5 に調整した。

7) メンブランフィルター: 東洋濾紙(株)製 DISMIC-25HP (PTFE, 0.45  $\mu$ m), DISMIC-13HP (PTFE, 0.45  $\mu$ m) および sartorius 社製 Minisart (1.2  $\mu$ m)。

8) 酢酸エチルおよびアセトン: 和光純薬工業(株)製、残留農薬・PCB 試験用。

9) メタノール: 和光純薬工業(株)製、LC/MS 用。

10) 固相抽出カートリッジ: Varian 社製 Bond Elut C18 (1 g/6 mL) をメタノール 5 mL、次いで水 5 mL でコンディショニングして使用した。

### 3. 装置

1) HPLC 装置: (株)島津製作所製

ポンプ: LC-10AT<sub>VP</sub>; デガッサー: DGU-14A; システムコントローラー: CBM-10A; カラムオーブン: CTO-10A<sub>VP</sub>; オートインジェクター: SIL-10AD<sub>VP</sub>; 蛍光検出器: RF-10A<sub>XL</sub>

2) 冷却遠心機: KUBOTA 5922

3) ホモジナイザー: (株)日本精機製作所製 エクセルオートホモジナイザー: ED-3

### 4. 測定条件

1) カラム: Partisil-10 SAX (4.6 mm i.d.  $\times$  250 mm, ジーエルサイエンス(株)製)

2) 移動相: 0.02 mol/L リン酸二水素カリウム緩衝液-メタノール (1:1)

3) 流速: 1.0 mL/min

4) カラム温度: 40°C

5) 注入量: 20  $\mu$ L

6) 蛍光検出波長: 励起波長 (Ex.) 270 nm, 蛍光波長 (Em.) 300 nm

### 5. 試験溶液の調製方法

1) 調製法 I (牛乳, 緑茶飲料, 冷凍餃子等 10 種の加工食品に適用する方法)

#### (1) 抽出

固形試料は粉碎均一化した試料 5 g に水 60 mL を加えて 10,000 rpm, 5 分間ホモジナイズした後、水を加えて 100 mL とし、混合したものを試料抽出液とした。液体試料は均一化した後その 5 g を採り、水を加えて 100 mL とし、混合したものを試料抽出液とした。これを 4°C, 10,000  $\times$  g にて 10 分間高速冷却遠心分離し、上澄液を径 26 mm 孔径 1.2  $\mu$ m および径 25 mm 孔径 0.45  $\mu$ m のメンブランフィルターでろ過し、試料抽出液とした。

#### (2) FMOC 誘導体化

試料抽出液 2 mL に 0.1 mol/L Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> 2 mL を加えた後、0.1%FMOC 溶液を 4 mL 添加し振とう後、20 分間静置し

た。これに酢酸エチル 10 mL を加えて 1 分間激しく振とうし、水層を分取した。また、牛乳については分離が悪かったため、3,000 rpm で 10 分間遠心分離し水層を分取した。分取した水層を径 13 mm 孔径 0.45  $\mu$ m のメンブランフィルターでろ過し、試験溶液とした。

2) 調製法 II (OPA 誘導体化を利用した赤ワインおよびソースに適用する方法)

#### (1) 抽出

試料は均一化した後その 5 g を採り、水を加えて 50 mL とし、混合した。これを 4°C, 10,000  $\times$  g にて 10 分間高速冷却遠心分離し、上澄液を試料抽出液とした。

#### (2) 精製

試料抽出液 10 mL に 0.1 mol/L Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> 9.8 mL を加えた後、OPA 溶液を 200  $\mu$ L 添加し振とう後、5 分間反応させ OPA 誘導体化した。OPA 誘導体化後、10,000  $\times$  g にて 10 分間高速冷却遠心分離した。その上澄液 5 mL を Bond Elut C18 に通し、さらに 0.1 mol/L Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> 2.5 mL で溶出させ、この全量に 0.05 mol/L Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> 溶液を加えて 10 mL とした。

#### (3) FMOC 誘導体化

溶出液 4 mL に 0.1%FMOC 溶液を 4 mL 添加して振とう後、20 分間静置した。これに酢酸エチル 10 mL を加え 1 分間激しく振とうし、水層を分取した後、径 13 mm 孔径 0.45  $\mu$ m のメンブランフィルターでろ過し、試験溶液とした。

## 結果および考察

### 1. 測定条件の検討

#### 1) 測定波長の検討

通知試験法<sup>2)</sup>では、蛍光検出波長は Ex.254 nm, Em.315 nm を使用しており、文献<sup>6,9)-11)</sup>では、Ex.255 nm, Em.315 nm, Ex.255 nm, Em.300 nm および Ex.270 nm, Em.315 nm を使用している。これらを参考にし、0.1  $\mu$ g/mL グリホサート標準液を FMOC 誘導体化したものをを用いて、Ex.255 nm, Em.315 nm, Ex.255 nm, Em.300 nm および Ex.270 nm, Em.300 nm の蛍光検出波長について比較検討を行った。その結果、Ex.255 nm, Em.315 nm および Ex.255 nm, Em.300 nm の感度に比べ、Ex.270 nm, Em.300 nm でのグリホサートの感度は約 1.4 倍であり最も高かったことから、蛍光検出波長は Ex.270 nm, Em.300 nm を用いることとした。

#### 2) 定量下限値

本法による定量下限値 (S/N $\geq$ 10) は 0.01  $\mu$ g/g であった。

### 2. 抽出方法の検討

グリホサートは水溶性の農薬であることから、試料からの抽出には抽出溶媒として水が用いられることが多い<sup>6,8), 10)</sup>。今回、水での抽出を試みたところ、抽出液が懸濁してメンブランフィルターでのろ過が困難な場合があった。この懸濁物質を除去するために抽出溶媒として水-メタノール (7:3), (1:1)<sup>9)</sup>, (1:4) 混液の使用を検討したが、除去

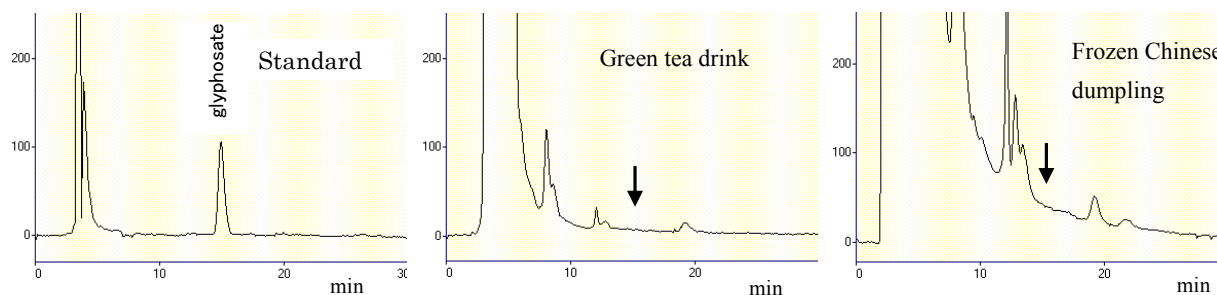


Fig. 1. HPLC chromatograms of standard solution, and test solution obtained from unspiked samples

Table 1. Recoveries of glyphosate spiked in 10 processed foods by preparation method I

Sample	Recovery (%)	
	Added 0.1 µg/g	Added 1.0 µg/g
Soybean milk	104.1	108.7
Orange juice	99.3	110.6
Milk	94.5	103.4
Sake	111.7	97.4
Green tea drink	106.2	95.5
Japanese blended tea drink	112.4	100.4
Coffee drink	106.9	99.1
Retort-pouched curry	82.8	97.4
Frozen Chinese dumpling (gyoza)	100.7	90.7
Frozen Calbee fried rice	98.6	87.9

効果は見られなかった。そこで、水抽出液を遠心分離する方法を検討したところ、室温、3,000 rpm にて 10 分間遠心分離処理では清澄な上澄液を得ることができなかったが、4°C、10,000×g にて 10 分間高速冷却遠心分離することにより油脂分や懸濁物質が除去された清澄な上澄液を得ることができた。さらに、微細な懸濁物質を径 25 mm 孔径 0.45 µm のメンブランフィルターでろ過して除去した。豆乳、牛乳およびソースについては、孔径 0.45 µm のメンブランフィルターではろ過が困難であったため、予め径 26 mm 孔径 1.2 µm のメンブランフィルターでろ過した後、再度、径 25 mm 孔径 0.45 µm のメンブランフィルターでろ過を行った。

3. 調製法 I における加工食品中のマトリックスの影響

調製法 I により 13 種の加工食品を測定した結果、赤ワイン、ソースおよびしょうゆを除く 10 種の加工食品については、グリホサートの測定を妨害するピークは検出されなかった。Fig. 1 にグリホサート標準品、および調製法 I で得られた加工食品のクロマトグラムの一部を示した。これらの試料にグリホサートを 0.1 µg/g および 1.0 µg/g となるように添加し、回収率を求めたところ、赤ワイン、ソー

スおよびしょうゆを除く 10 種の加工食品については、マトリックスの影響を受けず、良好な回収率が得られた。回収率は Table 1 に示したように、0.1 µg/g 添加の場合は 82.8 ~ 112.4%、1.0 µg/g 添加の場合は 87.9 ~ 110.6% であった。

赤ワインおよびソースについてはグリホサートのピーク付近に妨害ピークが存在し、安定した回収率が得られなかったことから、さらに検討を行った。

4. OPA 反応を利用した精製法（調製法 II）の検討

赤ワインおよびソースは調製法 I ではグリホサートのピークと妨害ピークが重なる場合があったため、妨害ピークの分離が可能な移動相条件を検討した。しかし、良好な分離条件を見出すことができなかったことから、妨害ピークそのものを減少させる方法について検討した。

大豆中のグリホサートを分析する方法として、高野らは OPA 反応後 Supelclean ENVI-Carb™ および Sep-Pak®C18 を用いて第 1 級アミンを除去する方法を報告している<sup>7)</sup>。FMOC 誘導体化は第 1 級と 2 級アミンの両方を同時に誘導体化するため、加工食品の種類によっては妨害ピークが多く存在することから、まず OPA 反応により第 1 級アミンを誘導体化し、これを固相抽出カートリッジで除去した

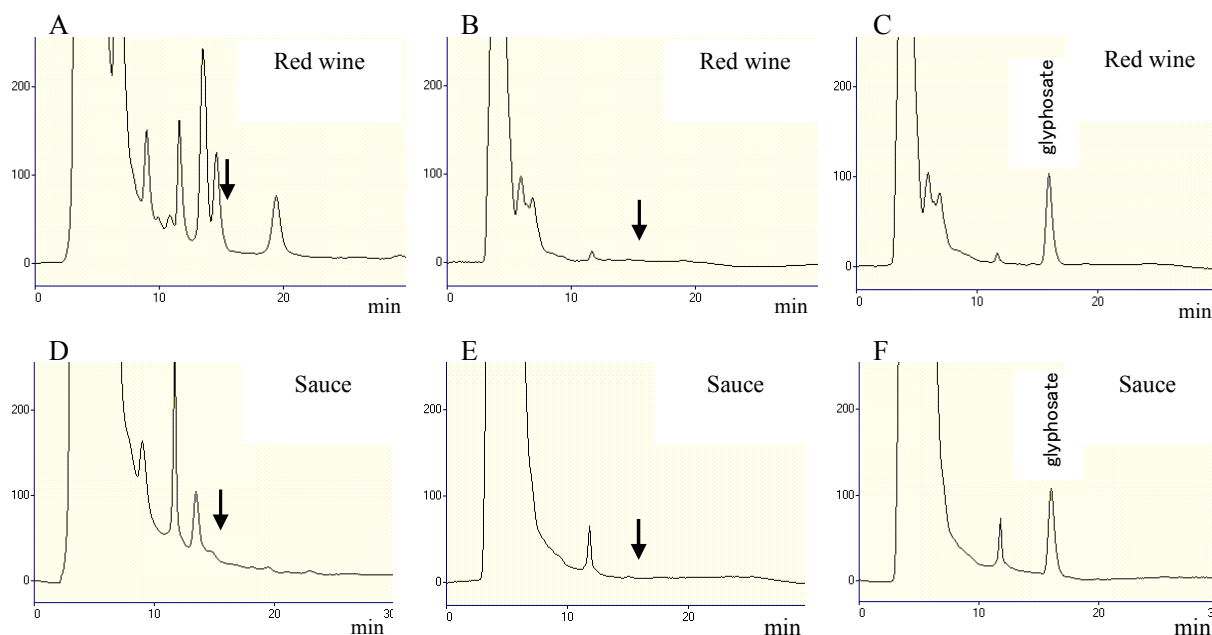


Fig. 2. HPLC chromatograms of test solution obtained from unspiked samples by preparation method I (A,D) or II (B,E) and spiked samples at levels of 1.0  $\mu\text{g/g}$  by preparation method II (C,F).

Table 2. Recoveries of glyphosate spiked in red wine and sauce by preparation method II

Sample	Recovery (%)	
	Added 0.1 $\mu\text{g/g}$	Added 1 $\mu\text{g/g}$
Red wine	101.4	102.0
Sauce	94.1	95.5

後、残存する第2級アミンのグリホサートを FMOC で誘導体化し検出する方法を検討した。固相抽出カートリッジについては、妨害物質を保持し、かつグリホサートを通過させる性質を持つ Bond Elut C18 の使用を検討した。試料にグリホサートを 10  $\mu\text{g/g}$  となるように添加し、OPA 反応させた後、Bond Elut C18 に 5 mL 荷し、0.1 mol/L  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  溶液を用い 0~2.5 mL、2.5~5 mL で溶出させ、グリホサートの溶出挙動を調べた。その結果、負荷液では 93.6%、溶出液 0~2.5 mL で 5.6%、溶出液 2.5~5 mL では 0% が回収された。負荷液と溶出液 2.5 mL で 99% 以上回収できたことから、溶出は 0.1 mol/L  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  溶液 2.5 mL で行うこととした。

本調製法を用いることにより、調製法 I に比して赤ワインおよびソースの夾雑ピークがクロマトグラム上で大幅に減少した。赤ワインとソースにおける調製法 I および II で得られたクロマトグラムを Fig. 2 に、調製法 II での添加

回収率を Table 2 に示した。

しょうゆについては調製法 I および II の他、種々検討を行ったが、妨害ピークを十分に取り除くことができず、1.0  $\mu\text{g/g}$  以下のグリホサートは定量が困難であった。しょうゆ中のグリホサートの微量定量については今後の検討課題としたい。

#### 5. 添加回収試験

緑茶飲料、冷凍餃子、ソースおよび赤ワインにグリホサートを 0.1  $\mu\text{g/g}$  および 1.0  $\mu\text{g/g}$  となるように添加し、上記調製法 I または II にて 5 試行で実施した添加回収試験の結果を Table 3 に示した。0.1  $\mu\text{g/g}$  添加における平均回収率は、92.8%~101.3% (RSD: 2.9%~5.6%)、1.0  $\mu\text{g/g}$  添加では、95.5%~102.0% (RSD: 1.1%~3.1%) であった。調製法 I、II のいずれの試験法も再現性のある良好な結果が得られた。

Table 3. Results of recovery test of glyphosate spiked in processed foods by preparation method I or II

Sample	Amount added ( $\mu\text{g/g}$ )	Recovery (%)	RSD (%)
		Mean(n=5)	
Green tea drink	0.1	92.8	5.5
(preparation method I)	1.0	100.0	1.1
Frozen Chinese dumpling	0.1	99.2	4.8
(preparation method I)	1.0	100.3	3.1
Sauce	0.1	94.1	2.9
(preparation method II)	1.0	95.5	1.5
Red wine	0.1	101.3	5.6
(preparation method II)	1.0	102.0	2.3

RSD : Relative standard deviation

### ま と め

加工食品へのグリホサートの混入等の危機管理事案に対応するため、既報を参考にして加工食品中のグリホサート定量法の検討を行った。

10種の加工食品については、水で抽出してろ過し、得られた試料抽出液をそのまま 0.1%FMOC 溶液で蛍光誘導体化する定量法（調製法 I）を用いたところ、マトリックスの影響を受けず、良好な回収率が得られた。

また、赤ワインおよびソースについては、調製法 I では妨害ピークが存在したため、妨害ピークを減少させる方法について検討した。OPA 反応により第 1 級アミンを誘導体化し、Bond Elut C18 カートリッジで精製除去し、残存する第 2 級アミンのグリホサートを FMOC で誘導体化する方法（調製法 II）により妨害ピークの少ないクロマトグラムが得られ、回収率も良好であった。

本法は回収率が良好で微量定量にも適した方法であり、加工食品へのグリホサートの混入等の事例に十分対応できる方法と考えられる。

### 文 献

- 1) 農薬ハンドブック, 東京, 社団法人日本植物防疫協会, 2005, p. 631-636. (ISBN4-88926-099-4)
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について”平成 17 年 1 月 24 日, 食安発第 0124001 号 (2005).
- 3) 厚生労働省告示第 230 号 “食品、添加物等の規格基準 (昭和 34 年 12 月厚生省告示第 370 号) の一部を改正する件”平成 17 年 4 月 27 日 (2005).
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課事務連絡, “有症苦情に係る調査について”, 平成 20 年 4 月 4 日.
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課事務連絡, “清涼飲料水の異物混入事例について”, 平成 20 年 4 月 7 日.
- 6) 高橋邦彦, 堀江正一, 青羽信次: HPLC による農産物中のグリホサート及びその代謝物アミノメチルホスホン酸の分析 (2001). 食品衛生学雑誌; **42**: 304-308
- 7) 高野伊知郎, 永山敏廣, 小林麻紀, 伊藤正子, 田村康宏, 高田千恵子, 他: ポストカラム HPLC による大豆中グリホサートの分析 (2000). 食品衛生学雑誌; **41**: 242-245
- 8) 大野智也佳, 大瀧 勝, 森 喜一, 久松由東, 中澤裕之: 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 (1999). 食品衛生学雑誌; **40**: 75-79
- 9) 天川映子, 荻原勉, 永山敏廣: 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 (2006). 東京都健康安全研究センター年報; **57**: 235-238
- 10) 田中健, 芋生眞子, 玉瀬喜久夫, 兔本文昭, 岡山明子, 大林英之, 他: けい光検出高速液体クロマトグラフィーによる果物、野菜中のグリホサート及びその分解生成物アミノメチルホスホニックアシッドの簡易定量 (1992). 食品衛生学雑誌; **33**: 125-132
- 11) 厚生労働省健康局水道課長通知 “水質基準に関する省令の制定及び水道法施行規則の一部改正等並びに水道水質管理における留意事項について”平成 15 年 10 月 10 日, 健水発第 1010001 号 (2003)