

蛍光検出器付高速液体クロマトグラフを用いたアミノ酸系除草剤とその代謝物の分析法

中川和子**, 伴竺行則*, 川上雅弘***

Method of detection by HPLC with a fluorescence detector of Amino-acid-with-phosphate group herbicide and its metabolite

Kazuko NAKAGAWA, Yukinori BANNO, Masahiro KAWAKAMI

Abstract

A rapid analysis technique of the amino-acid-with-phosphate group herbicide (glyphosate, and its metabolite, aminomethylphosphonic acid and glufosinate) was studied. The sample was purified by column with reverse phase, strong cation-exchange and weak anion-exchange column.

Three derivatized substances were separated, using the column which holds a phosphate group specifically, and the mobile phase of 100mM ammonium bicarbonate / acetonitrile, and a fluorescence detector. The recovery rate was 26-93%, and differs extremely according to the kind of sample. Refining methods and choice of more specific detector are required.

Key Words

アミノ酸系除草剤 amino-acid-with-phosphate group herbicide, 蛍光検出器 fluorescence detector,
重炭酸アンモニウム ammonium bicarbonate

1 はじめに

含リンアミノ酸系除草剤 グリホサート (GLP), グルホシネート (GLPN) は毒劇物として指定されていないためホームセンターなどで簡単に手に入りやすい。そのためいたずら等で食品混入事例が多く報告されるようになった。グリホサート及びグルホシネートは紫外外部吸収や蛍光を有さないため天川¹⁾らは、サンプルを濾過・希釈後、直接誘導体化し HPLC-蛍光検出器の条件を、長野県衛生公害研究所²⁾は液々抽出後誘導体化を行い HPLC-蛍光検出器の条件などを、また川合ら³⁾は前処理に強カチオン-逆相系ミックス固相と弱アニオン-逆相系ミックス固相を使用し HPLC-MS で誘導体化することなく測定すること方法を報告している。

今回、清涼飲料水に特化し迅速に精製し HPLC-RF (蛍光検出器) で測定する方法を検討した。なおグリホサートの代謝物であるアミノメチルホスホン酸 (AMP) の同時分析も検討した。

2 実験方法

(1) 試料

市内のスーパーで購入した茶、スポーツ飲料、オレンジジュース、缶コーヒーを使用した。

(2) 試薬及び標準品

ア グルホシネートアンモニウム塩標準品：和光純薬工業 (株) 製残留農薬試験用農薬標準品をメタノールに溶かし 350 mg · l⁻¹としたものを標準原液とし、適宜希釈して標準溶液として用いた。

イ グリホサートアンモニウム標準品：和光純薬工業 (株) 製残留農薬試験用農薬標準品をメタノールに溶かし 100 mg · l⁻¹としたものを内部標準物質として用いた。

ウ アミノメチルフォスホン酸標準品：和光純薬工業 (株) 製残留農薬試験用農薬標準品をメタノールに溶かし 100 mg · l⁻¹としたものを内部標準物質として用いた。

エ 超純水：ミリポア製超純水製造装置で製造したもの

オ オアシス WCX：日本ウォーターズ・リミテッド製 (150mg) 抽出、クリーンアップ用カラムとして用いた。

カ ポラパック Rxn RP：日本ウォーターズ・リミテッド製 (2 g) 抽出、クリーンアップ用カラムとして用いた。

キ ポラパック Rxn Cx：日本ウォーターズ・リミテッド製 (2 g) 抽出、クリーンアップ用カラムとして用いた。

ク アセトニトリル：ナカライテスク製残留農薬分析用 (濃縮 5000) 又は高速液体クロマトグラフ用を用いた。

ケ 100mM 重炭酸アンモニウム緩衝液 (pH10)：重炭酸アンモニウム (和光純薬工業株製特級) 2.713 g を蒸留水 1000 ml に溶かした溶液をアンモニア水で pH10 に調整したもの

* 京都市衛生環境研究所 生活衛生部門

** 京都市衛生環境研究所 環境部門

*** 山科区役所 保健部 衛生課

の。

コ DISMIC-1 3HP 0.45 μm PTFE フィルター (LC 試験液調製用フィルター)

サ クロロギ酸 9-フルオレニルメチル (和光純薬工業株式会社)

(3) 装置

高速液体クロマトグラフ (HPLC) : (株島津製作所製 LC-10AT 型ポンプ)

同 SCL-10A 型システムコントローラー, 同 CTO-10A 型恒温槽

同 DGO-12A デガッサー

同 SIL-10AD オートサンプラーにより構成されたものを使用した。

蛍光検出器 : RF-10

(4) HPLC 測定条件

ガードカラム : タイタスフェア Tio 4.6×10mm (5 μm) (ジーエルサイエンス社製)

分析カラム : タイタスフェア Tio 4.6×50mm (5 μm) (ジーエルサイエンス社製)

カラム温度 : 40°C

移動相及びグラジエント溶出条件

A液 : アセトニトリル/100mM 重炭酸アンモニウム水溶液 (pH10) 8 : 2

B液 : 100mM 重炭酸アンモニウム (pH10)

A液 100% の初期状態 1 分保持後, 5 分で 20%, 15 分で 100% まで B液濃度を上げる。

流速 : 0.5 ml · min⁻¹

注入量 : 30 μl

(5) 蛍光検出器条件

Ex : 270nm

Em : 315nm

定量は絶対検量線法でおこなった。

(6) 試験溶液調製法

液体試料 1 ml に蒸留水を加えて 100 ml に希釈したものを検体とした。(検体により希釈した検体を冷却, 遠心分離後, 上清を採取)

文献²⁾より強カチオン交換固相カラム, 弱アニオン交換固相カラムと其々のミックス逆相固相カラムを使用していること, 抽出・精製を兼ねることから, 充填量が多いポラパックシリーズを使用した。逆相系固相ポラパック Rxn RP とポラパック強カチオン系固相 Rxn Cx カラム (あらかじめメタノール 20 ml と精製水 20 ml でコンディショニングしたものを) を連結し通水 (5 ml · min⁻¹) し蒸留水 20 ml で洗浄したろ液を採取。そして弱アニオン系固相 WAX カラム (精製水 10 ml, メタノール 10 ml で洗浄したもの) に再び通水し蒸留水とメタノールで洗浄後, 溶出液 (28% アンモニウム / メタノール 溶液 5 : 95) 20 ml で溶出し, 45°C で溶媒を留去, 乾固する。50 mM ホウ酸塩緩衝液 2.5 ml を加え溶解しそしてクロロギ酸 2.5 ml を加えて誘導体化後, 酢酸エチル 5 ml を加えて 1 分間振とうする。水層を分取し濃縮・乾固し, 移動相で 5 ml にメスアップ後 0.45 μm PTFE フィルターでろ過したものを適当な希釈を行い試験溶液とする。

3 結果と考察

(1) HPLC 条件の検討

3 物質の最適分離のクロマトグラムを得るため表 1 に示す各種の分離カラムと移動相の条件を検討した。

条件 I は, 陰イオン交換カラムを用いて, 移動相のアセトニトリル/100mM ギ酸アンモニウム濃度比を 10%~80% の範囲で変化させて GLP, AMP, GLN の溶出挙動を見た。AMP と GLPN の保持時間が重なり分離することはできなかった。(図 1-a)

条件 II は, チタンを充填剤に使用したカラムでリン酸基を持つ物質を保持する性質がある。GLP, AMP, GLPN, 全てリン酸基をもつ物質であり保持条件 II で保持することができた。ところが, 移動相のアセトニトリル/10mM 重炭酸アンモニウム濃度比を 0%~80% の範囲で変化させてところ AMP と GLP の分離がわるく定量には不適切な条件と考えられた。(図 1-b)

条件 III では重炭酸アンモニウムの濃度を 10 倍にしたところ GLP と AMP が分離した。

以上の検討の結果, 分離を考慮して, 最終的に条件 III のカラムと重炭酸アンモニウム / アセトニトリル系の移動相を採用した。(図 1-c)

表 1 各カラムとその移動相条件

条件	カラム	メーカー	サイズ (mm)	移動相
I	イオンパック AS12A	ダイオネック	4.0 × 200	100mM 蟻酸アンモニウム (pH2.82) / アセトニトリル
II	Tio	ジーエルサイエンス	4.6 × 50	10mM 重炭酸アンモニウム / アセトニトリル
III	Tio	ジーエルサイエンス	4.6 × 50	100mM 重炭酸アンモニウム (pH10) / アセトニトリル

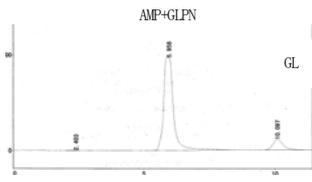


図1-a 条件I

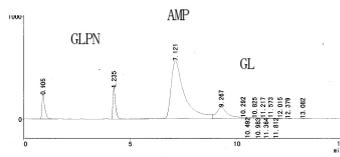


図1-b 条件II

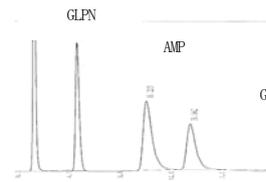


図1-c 条件III

(2) 添加回収実験

今回事故あるいは事件などにより混入されたものを迅速に測定することから、高濃度(10 μg/ml)で添加回収を行った。

検体 1ml に対して3種混合標準液 (GLP, AMP, GLPN) 各 10 μg を添加し 100 倍希釈したものを本法に従って回収実験を行った。

結果を表2にそしてお茶のクロマトグラムを図2に示す。

お茶の夾雑物と GLPN との分離が悪く更なる精製の検討もしくは特異性のある検出器を選択する必要があることがわかった。

回収率はスポーツ飲料・お茶は3物質について良好、コーラはGLP, カフェオーレはGLPNが悪かった。

表2 添加回収結果

検体名	回収率±標準偏差(%)		
	グルホシネート	AMP	グリホサート
コーラ	93±9.1	94.4±8.0	53.9±15.5
ポカリ	75.5±4.2	109.1±9.6	92.3±7.5
茶	87.0±10.0	89.7±10.6	80.4±11.4
カフェオーレ	26.1±13.1	98±3.1	77.1±4.6

n=4 添加量10 μg/1ml

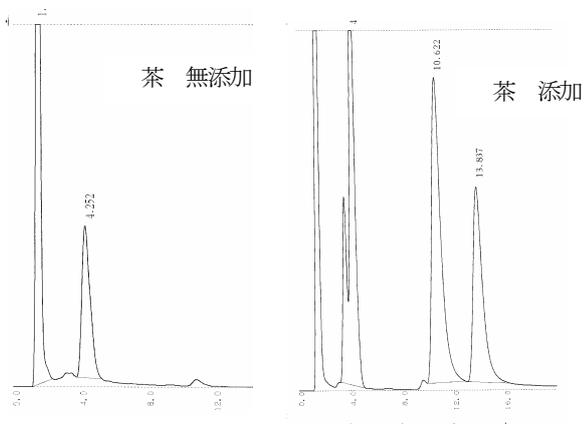


図2 お茶のクロマトグラム

4 アルカリ溶液を用いた分析の問題点

移動相 (pH=10) がアルカリ性であるということからローターシールの構成成分が溶け出しカラムを汚染、詰まらせる事態になりローターシールを耐アルカリ性仕様にする必要があった。

そして、移動相初期濃度は重炭酸アンモニウム緩衝液が 100 mM と高濃度であるため9 (アセトニトリル) : 1 (重炭酸アンモニウム) ではアセトニトリルに解けず結晶が析出するため比率が8 : 2となった。

5 まとめ

リン酸基をもつアミノ酸系除草剤と代謝物の分析と固相抽出を使用した前処理法について検討した。

- (1) 陰イオン交換カラムではAMPとGLPNが分離しなかった。
- (2) リン酸基保持に特異性を持つチタンを充填剤に使用したカラムでは 10mM重炭酸アンモニウム/アセトニトリルではAMPとGLPNの分離は不十分であったか重炭酸アンモニウムの濃度を 100mMにしたところ分離でき良好なクロマトをえることができた。
- (3) 実試料での添加回収は、検体の精製が不十分であることとして一部の検体において回収率が悪いものもあった。
- (4) アルカリの移動相を使用する場合ローターシールの成分が溶け出すため流路及びカラムを汚染する。そのため、耐アルカリ性のローターシールを使用する必要があった。
- (5) 実試料において夾雑物とGLPNとの分離が悪く、更なる精製または、他の特異性のある検出器の選択が必要と考えられた。

6 参考文献

- (1) 天川映子, 荻原勉, 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法, 東京都健康安全センター多摩市書理化学研究科年報 2006 (235-238)
- (2) 川井仁之, ゴルフ場排水中のグリホサート, グルホシネート及びホセチルの同時分析法に関する検討 (京都市衛生環境研究所No.74 (148-153))
- (3) グリホサート 長野県衛生公害研究所 環境省分析法開発 (28-38)