

．グリホサートの分析法

1 対象物質

グリホサート（図 1、表 1）は、グリシンとホスホノメチルで構成される弱い有機酸であり、農業および非農業の双方で非選択的除草剤の用途をもつ。水への溶解度は 11,600 mg/L、オクタノール/水分配係数 (logKow) は -2.8 であり、pH によってイオン種が異なる両性を示す。土壌中や水中では主にアミノメチルホスホン酸（AMPA：aminomethylphosphonic acid）に代謝される。

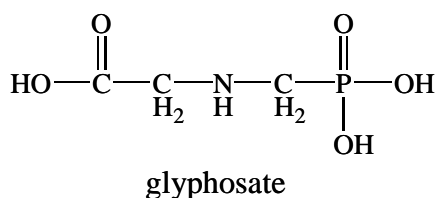


図 1 グリホサートの化学構造

表 1 対象物質

項目番号	物質名	化学名	分子式 (分子量)	CAS NO.
67	グリホサート glyphosate	<i>N</i> -(phosphonomethyl) glycine	C ₃ H ₈ NO ₅ P (169.0737)	1071-83-6

2 目標検出下限値及び定量下限値

本法が目標とする検出下限値は表 2 の通りであり、定量下限値はその 3 倍値となる。

表 2 目標とする検出下限値

物質名	水質 (μg/L)	底質 (μg/kg)
グリホサート	0.1	4

3 分析法の概要

水質および底質試料中のグリホサートの定量に適用する。分析法の概要は図 2、3 の通りである。

水試料は、ほう酸塩緩衝液で pH 9.5 に調整して 9-フルオレニルメチルクロロホルメート (FMOC-Cl) を加え蛍光誘導体化を行う。その後、硫酸で pH 1 付近として酢酸エチルで振とう抽出し、さらにホウ酸緩衝液で逆抽出して試料液を得る。試料液は高速液体クロマトグラフ (HPLC) に導入して、グリホサート-FMOC を蛍光検出する (注 1)。

底質試料は、0.6M 水酸化カリウム溶液を加えて 80 °C で 30 分間超音波処理する (注 5)。続いて、室温で 30 分間振とう抽出し、上澄み液をガラス繊維ろ紙でろ過を行う。ろ液は pH 6 に調整して、珪藻土カラムクロマトグラフィーで精製の後、水質試料と同様に誘導体化、酢酸エチル抽出、緩衝液による逆抽出操作を行い試料液を得る。

なお、本法により、代謝産物の AMPA を同時検出することができる (注 2)。

4 試薬・器具・装置

(1) 試薬

グリホサート (*N*-[phosphonomethyl]glycine): 標準物質または既知濃度の標準溶液
アセトン、酢酸エチル、アセトニトリル: 残留農薬試験用

塩化ナトリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸、硫酸、炭酸ナトリウム、四ほう酸ナトリウム、水酸化カリウム: 試薬特級または同等品

9-フルオレニルメチルクロロホルメート (クロロギ酸 9-フルオレニルメチル)
[FMOC-Cl: 9-fluorenylmethyl-chloroformate]: 2.6 g をアセトン 1 L に溶かし、0.01 mol/L のアセトン溶液に調製

ほう酸塩緩衝液 (pH 9.5): 四ほう酸ナトリウム 9.5 g と炭酸ナトリウム 10.6 g を精製水 1 L に溶解したもの

0.1 mol/L リン酸二水素カリウム緩衝液: リン酸二水素カリウム 13.6 g を精製水 800 mL に溶かし、リン酸で pH 2.5 として、精製水で 1 L としたもの

(2) 器具及び装置

ガラス器具: 硬質ガラス瓶、メスシリンダー、メスフラスコ、分液ロート、褐色目盛り付き試験管、共栓付き遠心分離管など

遠心分離器、振とう機、超音波発振器

ガラス繊維ろ紙

珪藻土カラム：(注3)

高速液体クロマトグラフ (HPLC、蛍光検出器付)

- a) カラム：内径 3～5 mm、長さ 150～250 mm のステンレス製カラムに、アミノプロピル基結合型シリカ (粒径 5～10 μm) を充填したもの、またはこれと同等の分離性能をもつもの (注4)
- b) 溶離液：0.1 mol/L リン酸二水素カリウム緩衝液とアセトニトリルを体積比で 7:3 の割合で混合し、超音波処理で十分に脱気する
- c) 蛍光検出器：励起波長 270 nm、測定波長 315 nm に設定

5 試料の採取・運搬

予めアセトン、ヘキサン等によく洗浄した容量 1 L 程度の共栓またはねじ栓つき硬質ガラス瓶を試料瓶とする。試料水は、2、3 回共洗いした後、満水に入れ、氷冷・遮光して、実験室へ持ち帰る。分析操作は可能な限り速やかに行う。やむを得ず保管が必要な場合は、1～2 日を限度として冷暗所 (4) に置く。

底質試料は、エクマンバージ型採泥器等によって表層泥 (0～10 cm) を採取し、目視できる夾雑物を除いて、硬質ガラス瓶、ポリエチレン製袋または箱等に入れ、氷冷・遮光状態で実験室へ持ち帰る。この試料は、孔径 2 mm 目の篩に通した後、20 分間の遠心分離 (3,000rpm) で間隙水を除き、均質に混合したものを分析に供する。底質試料の保存は、調製試料を -4 で凍結させる。

なお、試料採取、運搬、調製にかかわる手順等の詳細は、本マニュアルの「試料の採取、運搬、調製にかかわる一般事項」に従う。

6 試験操作

(1) 前処理

(ア) 水質試料

試料水 50 mL を 100 mL 容の分液ロートにとり、塩化ナトリウム 2.5 g、pH 9.5 のほう酸塩緩衝液 5 mL および 0.01M の FMOC-Cl アセトン溶液 10 mL を加えて振りまぜ、30 分間室温に置いて蛍光誘導体化を行う。その後、試料水に硫酸 (1+2) で pH が 1 付近になるよう調整し、酢酸エチル 40 mL を加えて 10 分間振とうする。有機層と水層が充分に分離し

た後、水層を捨て、酢酸エチル層にほう酸塩緩衝液 4 mL を加え 10 分間振り混ぜる。静置し分離後、水層をとり前処理液とする。

(イ) 底質試料

試料 10 g を 100 mL 容の共栓付き遠心分離管にとり、0.6M の水酸化カリウム溶液 40 mL を加えて 80 で 30 分間超音波処理を行う（注 5）。続いて、室温、2,500 rpm で 30 分間振とうする。その後、上澄液をガラス繊維ろ紙でろ過し、硫酸（1+1）でろ液を pH 6 付近に調整して、精製水で 60 mL に定容する。このうちの 20 mL を珪藻土カラムに負荷して 30 分間放置する。この珪藻土カラムクロマトグラフィーは、酢酸エチル 50 mL、飽和塩化ナトリウム水溶液 50 mL で順次洗浄し、さらに 5% 塩化ナトリウム含有 0.2M 水酸化カリウム溶液 20 mL で前捨てるを行った後に、同液 80 mL で被検物質を溶出させる。溶出液は pH 9.5 程度に調整後、精製水で 100 mL に定容する。このうちの 50 mL について、水質試料と同様に誘導体化、酢酸エチル抽出、緩衝液による逆抽出操作を行い前処理液を得る。

(2) 試料液の調製

水質および底質試料から得られた前処理液は、その 20 μ L を HPLC に導入する。

(3) 空試験液の調製

水質試料は精製水 50 mL を、底質試料については精製水 10 mL を用いて、試験操作の「前処理」および「試料液の調製」と同様な操作を行って得られた試験液を空試験に用いる。

(4) 添加回収試験液の調製

任意の水質試料 50 mL および底質試料 10 g に定量下限値の 5~10 倍になるよう検量線作成用標準液のアセトン溶液を加え、試験操作の「前処理」および「試料液の調製」と同様な操作を行って添加回収試験液を得る。

(5) 標準液の調製

グリホサート 100 mg を精秤し、精製水 100 mL に溶解して 1,000 μ g/L の標準原液を調製する。既知濃度の標準用液を標準原液とすることもできる。標準原液は精製水で順次希釈して、0 および 0.1~2.0 μ g/L の範囲で 5 段階以上の標準列を調製して、検量線作成用の標

準液とする。この標準液は使用の都度調製する。

(6) 測定 (注6)

(ア) HPLC 測定条件

測定条件の一例を示す。

- ・カラム：アミノプロピル基結合型シリカカラム (4.6 mm i.d. × 251 mm、5 μm)
- ・溶離液：0.1 mol/L リン酸二水素カリウム緩衝液：アセトニトリル (7:3)
- ・流速：1 mL/min
- ・カラム温度：40
- ・蛍光検出：励起波長 270 nm、測定波長 315 nm

(イ) 検量線

検量線作成用標準液の各々50 mLを100 mL容分液ロートに採り、試料の「前処理」と同様の操作で得た試料液の20 μLをHPLCへ導入し、ピーク面積またはピーク高さから検量線を作成する。

(ウ) 試料前処理液の測定

試料前処理液の20 μLをHPLCに導入し、ピーク面積またはピーク高さを求める。

7 同定、定量及び計算

(1) 同定

標準物質の保持時間との一致により同定する。

(2) 定量

試料前処理液および空試験液のピーク面積またはピーク高さから検量線によりグリホサート濃度 (μg/mL) を求め、次式により水質および底質試料中濃度に換算する。

$$C(\mu\text{g}/\text{l}, \mu\text{g}/\text{kg}) = (S_{\text{conc}} - B_{\text{conc}}) \times \frac{V_{\text{conc}}}{V_{\text{spl}}} \times 1000$$

ここで、C： 試料中のグリホサート濃度 ($\mu\text{g/L}$ 、 $\mu\text{g/kg}$)

S_{conc} ： 検量線から求めた試料液中濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

B_{conc} ： 検量線から求めた空試験液中 ($\mu\text{g/mL}$)

V_{conc} ： 試料前処理液の最終液量 (mL)

V_{spl} ： 試料量 (mL、g)

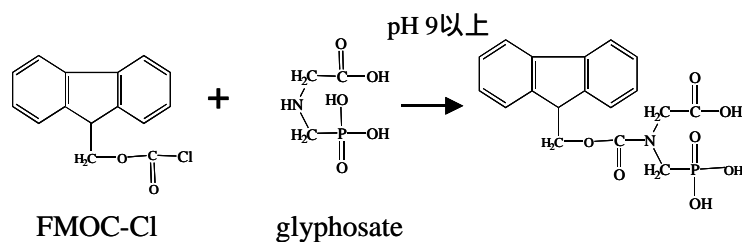
8 分析精度管理

本調査マニュアルの 章“分析精度管理”に従い、標準作業手順を設定し、器具・装置の性能評価と維持管理を徹底し、その結果を記録しなければならない。

9 注意事項

(注1) FMOC-Cl はグリホサートなどの二級アミン類と反応し、蛍光物質を生成する。

この反応は pH 9 以上で一定し、20 分程度で完了する。



(注2) 代謝産物のAMPA ($\text{CH}_6\text{NO}_3\text{P}$)もFMOC-Clによって蛍光物質を生成し、グリホサートと同時分析が可能である。検量線作成用の標準液もグリホサートと同様に調製できる。

(注3) Extrelut-20 または同等品 (備考1)

(注4) Nucleosil 100-5NH₂、Lichrospher 100NH₂などがあるが、一般にアミノプロピル基結合シリカはカラム寿命が短いため、使用後はメタノールやアセトニトリルで十分に置換しておく。

(注5) グリホサートと底質は強固に結合しているが、温度を 80 に設定することで、回収率は改善できる。

(注6) 試料前処理液のバックグラウンドが高く測定に支障がある場合は、一夜程度放置して測定する。

(備考 1)ここに示す商品は、このマニュアル使用者の便宜のために、一般に入手できるものとして例示したが、これを推奨するものではない。これと同等以上の品質、性能のものを用いてもよい。

参考文献

- 1) 月岡忠、中山隆、丸山正人：「グリホサート：平成 4 年度化学物質分析法開発調査報告書」、環境庁環境保健部環境安全課, pp28-38, 平成 5 年 6 月.
- 2) Sancho, J.V., Hidalgo, C., Hernandez, F., Lopez, F.J., Hogendoorn, E.A. and Dukman, E.: Rapid determination of glyphosate residues and its main metabolite AMPA in soil samples by liquid chromatography. *Intern. J. Environ Anal. Chem.* **62**, 53-63 (1996)
- 3) Fur, E.L., Colin, R., Charreteur, C., Dufau, C., and Peron, J. -J : Determination of glyphosate herbicide and aminomethylphosphonic acid in natural waters by liquid chromatography using pre-column fluorogenic labeling. Part 1: Direct determination at the 0.1mg/L level using FMOC, *Analusis* **28**, 813-818 (2000)

分析法フローチャート

水質試料

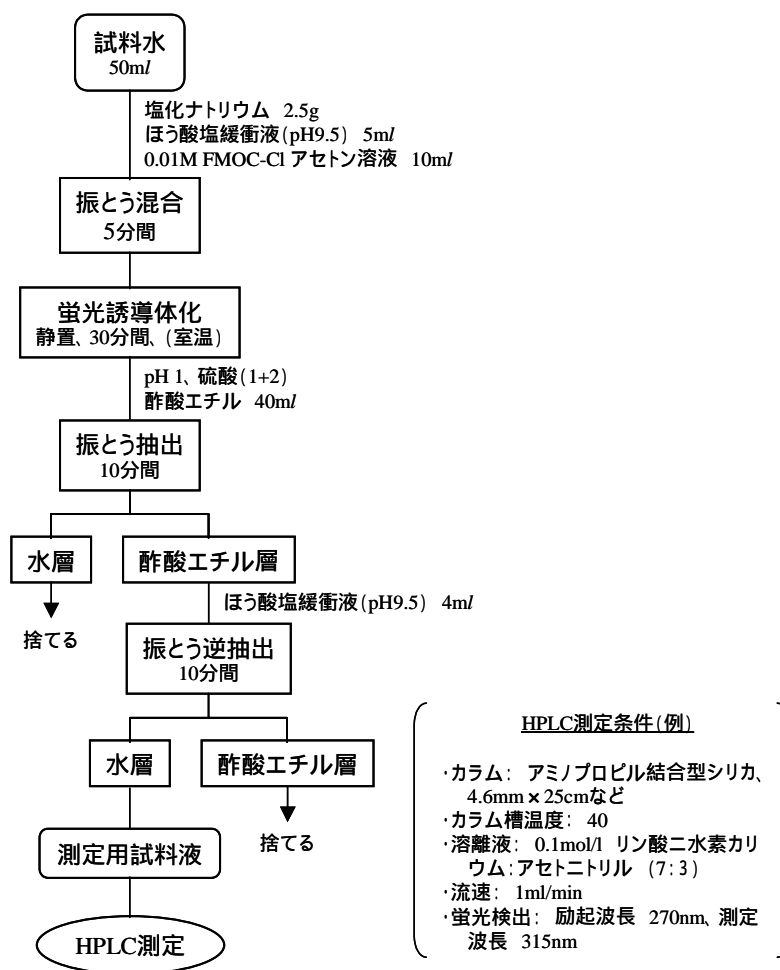


図2 グリホサートの分析操作手順(水質)

底質試料

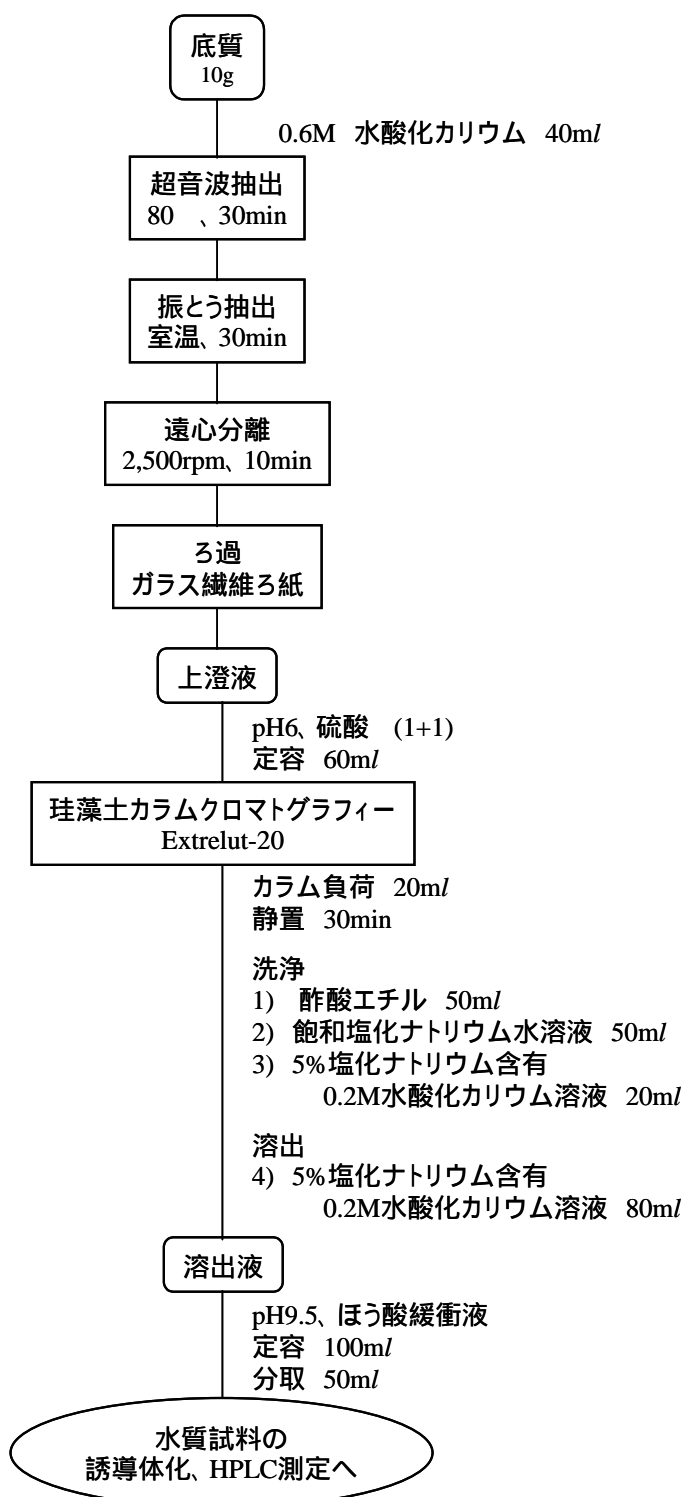


図3 グリホサートの分析操作手順（底質）