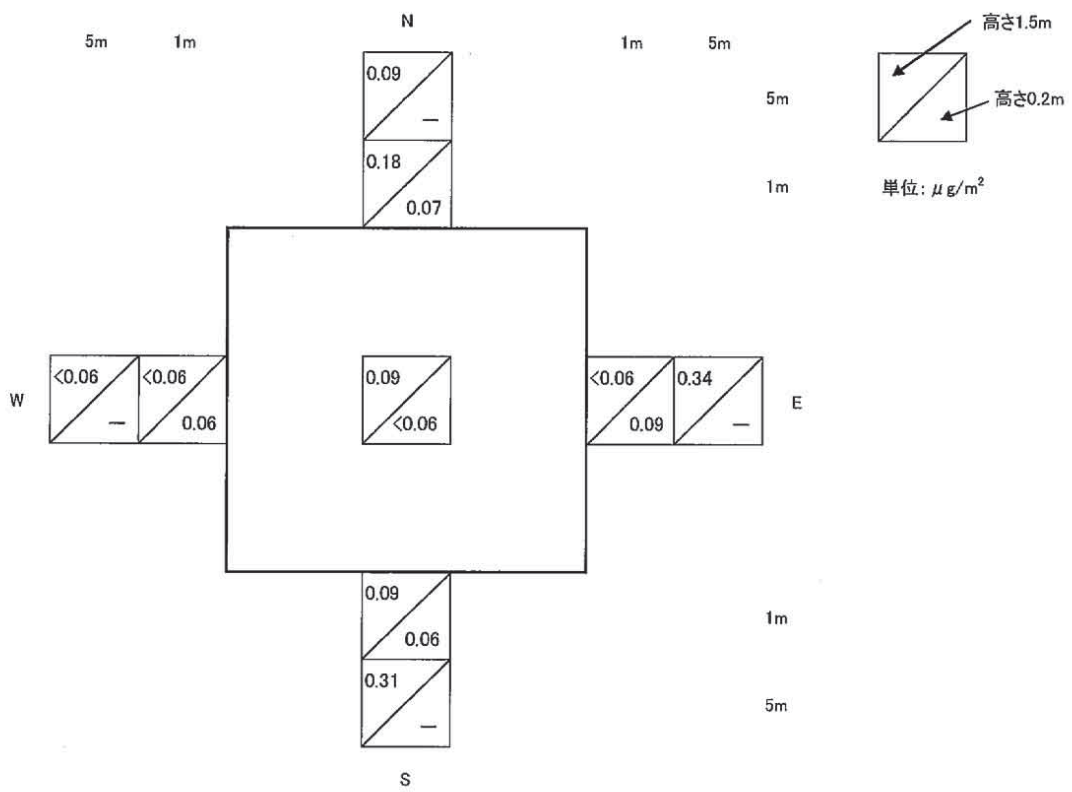


表8 気中濃度(グリホサート)の経時変化(概要)

	定量下限値以上の地点数 ／全地点数			濃度範囲 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
	散布 区域内	散布 区域外	計	
散布前日	0/2	0/4	0/6	<0.03
散布直後	1/2	8/12	9/14	<0.06~0.34
散布当日午後	1/2	6/12	7/14	<0.03~0.17
散布1日後	1/2	4/12	5/14	<0.03~0.17
散布3日後	1/2	0/12	1/14	<0.03~0.07

散布直後



散布当日午後

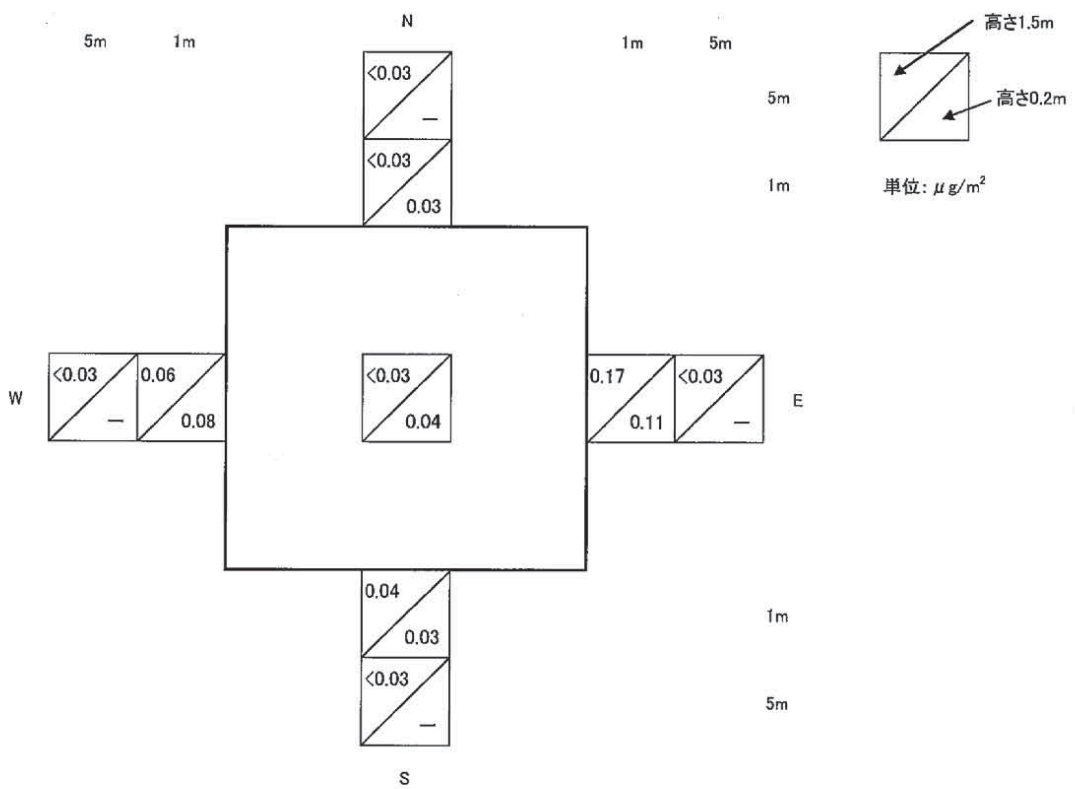
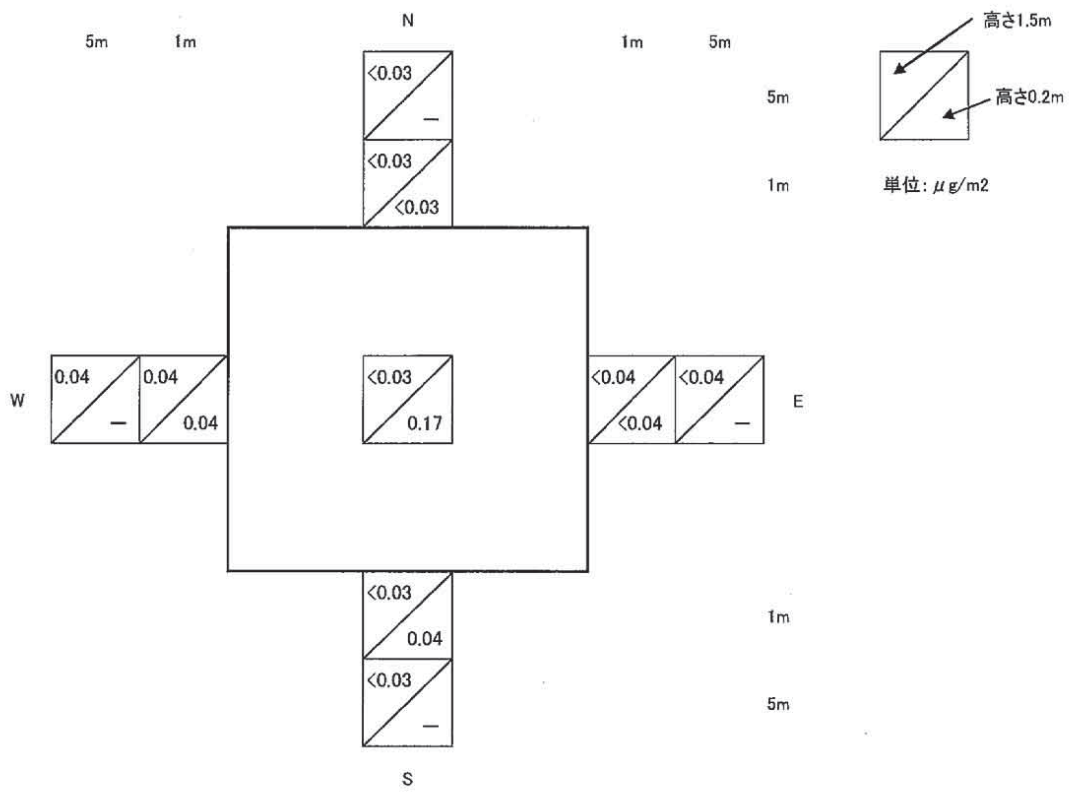


図5 各調査地点における空气中濃度(グリホサート)

散布1日後



散布3日後

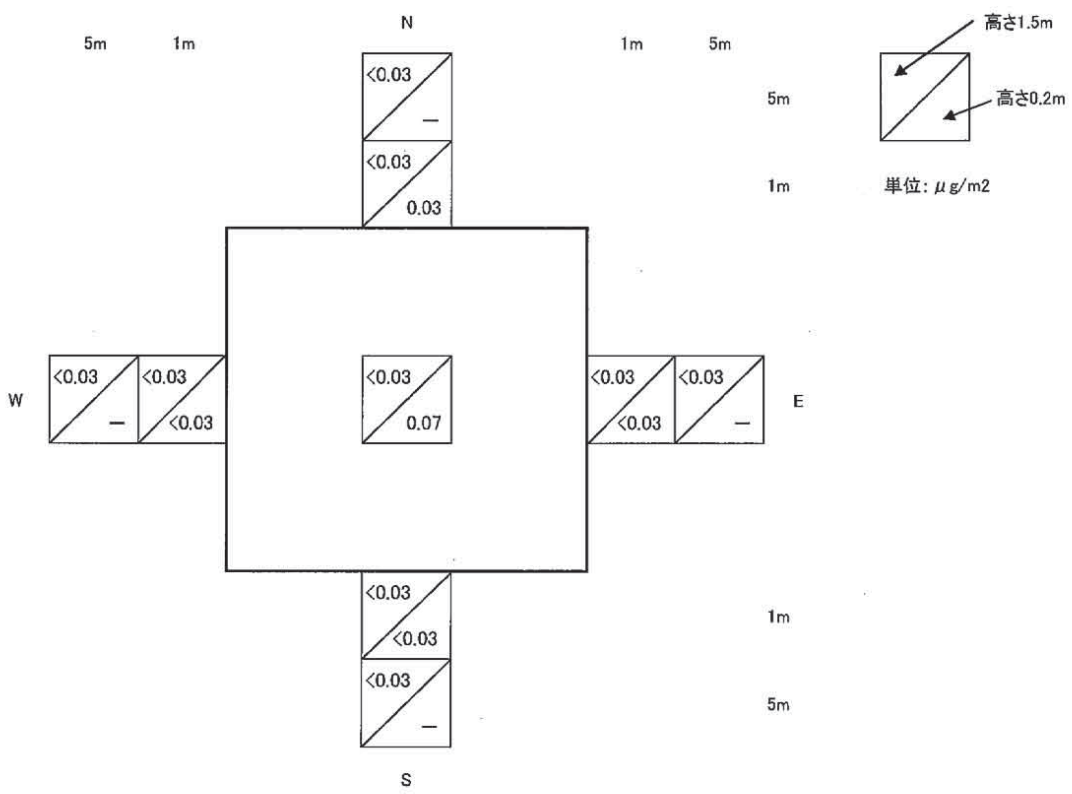
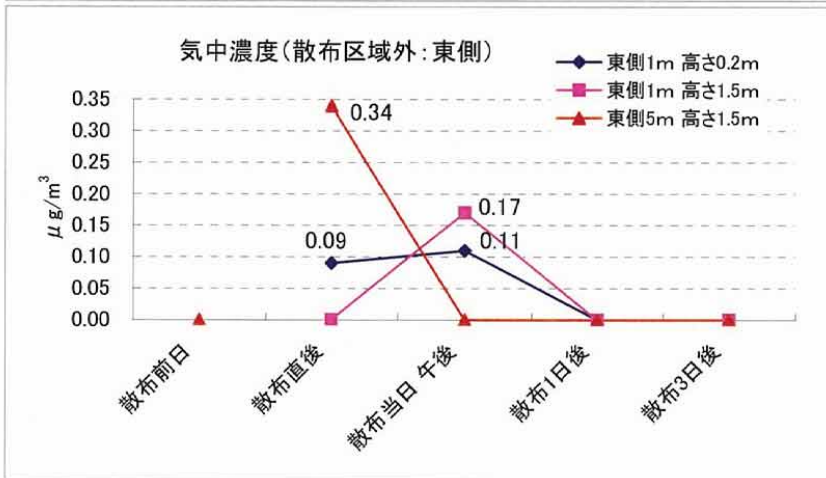
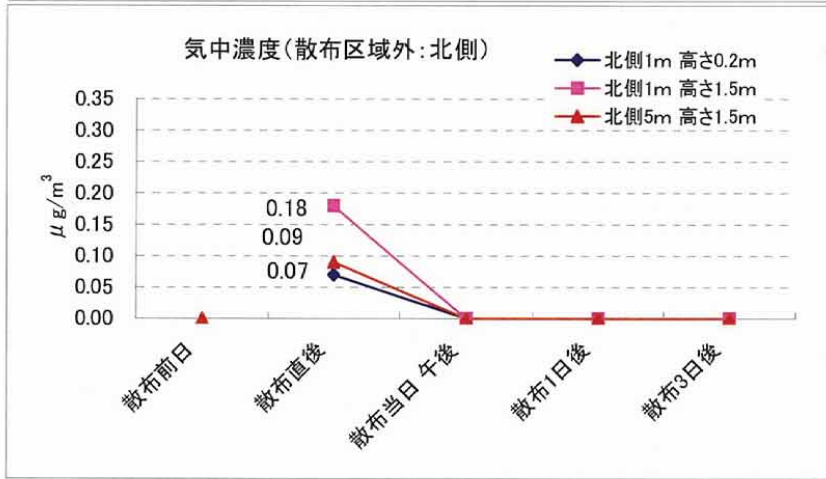
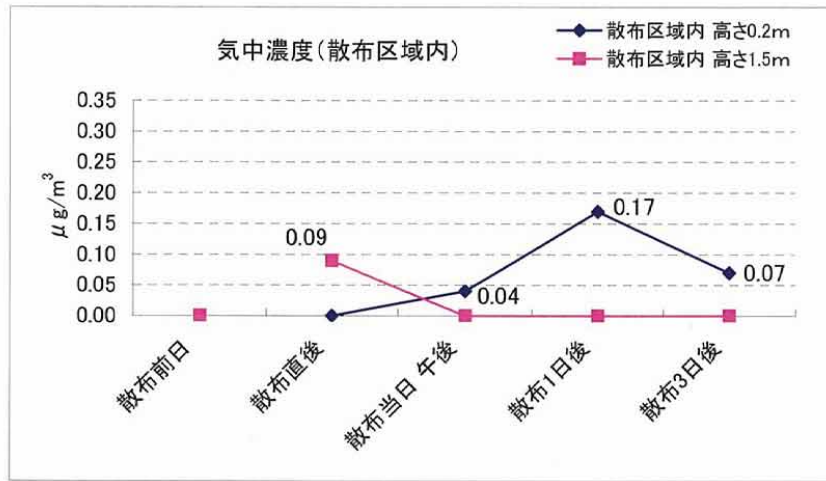
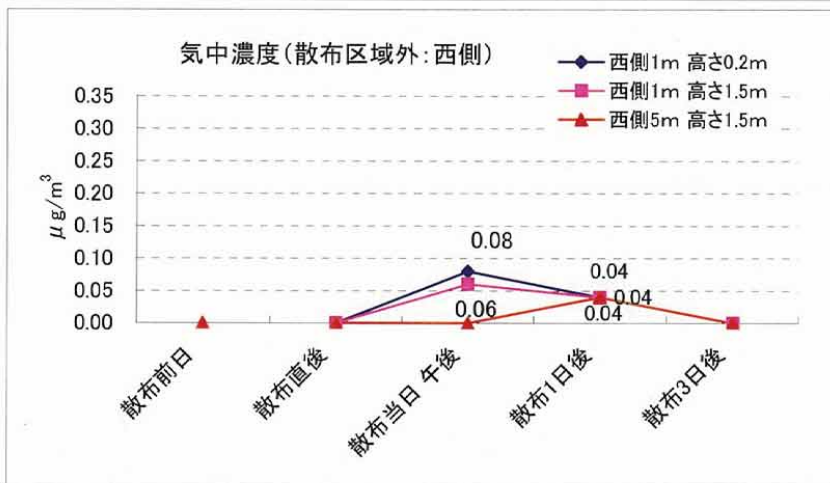
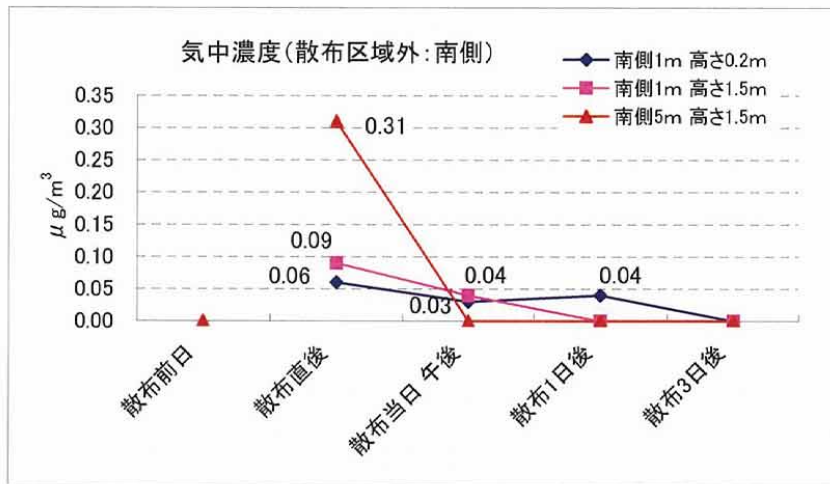


図5 各調査地点における気中濃度(グリホサート)(続き)



<散布直後>		<散布当日 午後>		<散布1日後>	
(11:22~11:35散布、11:45~12:15捕集)		(14:15~15:15捕集)		(13:05~14:05捕集)	
時間帯	風向	時間帯	風向	時間帯	風向
11:20~11:30	西北西 →	14:10~14:20	西北西 →	13:00~13:10	北東 ↙
11:30~11:40	西 →	14:20~14:30	北北西 ↙	13:10~13:20	東北東 ↖
11:40~11:50	北西 ↙	14:30~14:40	南 ↑	13:20~13:30	北 ↓
11:50~12:00	北西 ↙	14:40~14:50	東南東 ↗	13:30~13:40	北東 ↙
12:00~12:10	西 →	14:50~15:00	西北西 ↙	13:40~13:50	東北東 ↖
12:10~12:20	西 →	15:00~15:10	西北西 ↙	13:50~14:00	東北東 ↖
		15:10~15:20	西北西 ↙	14:00~14:10	東南東 ↖

図6 気中濃度(グリホサート)の経時変化



<散布直後> (11:22~11:35散布、11:45~12:15捕集)		<散布当日 午後> (14:15~15:15捕集)		<散布1日後> (13:05~14:05捕集)	
時間帯	風向	時間帯	風向	時間帯	風向
11:20~11:30	西北西 ↘	14:10~14:20	西北西 ↘	13:00~13:10	北東 ↙
11:30~11:40	西 →	14:20~14:30	北北西 ↙	13:10~13:20	東北東 ←
11:40~11:50	北西 ↙	14:30~14:40	南 ↑	13:20~13:30	北 ↓
11:50~12:00	北西 ↙	14:40~14:50	東南東 ↖	13:30~13:40	北東 ↙
12:00~12:10	西 →	14:50~15:00	西北西 ↘	13:40~13:50	東北東 ←
12:10~12:20	西 →	15:00~15:10	西北西 ↘	13:50~14:00	東北東 ←
		15:10~15:20	西北西 ↘	14:00~14:10	東南東 ↖

図6 気中濃度(グリホサート)の経時変化(続き)

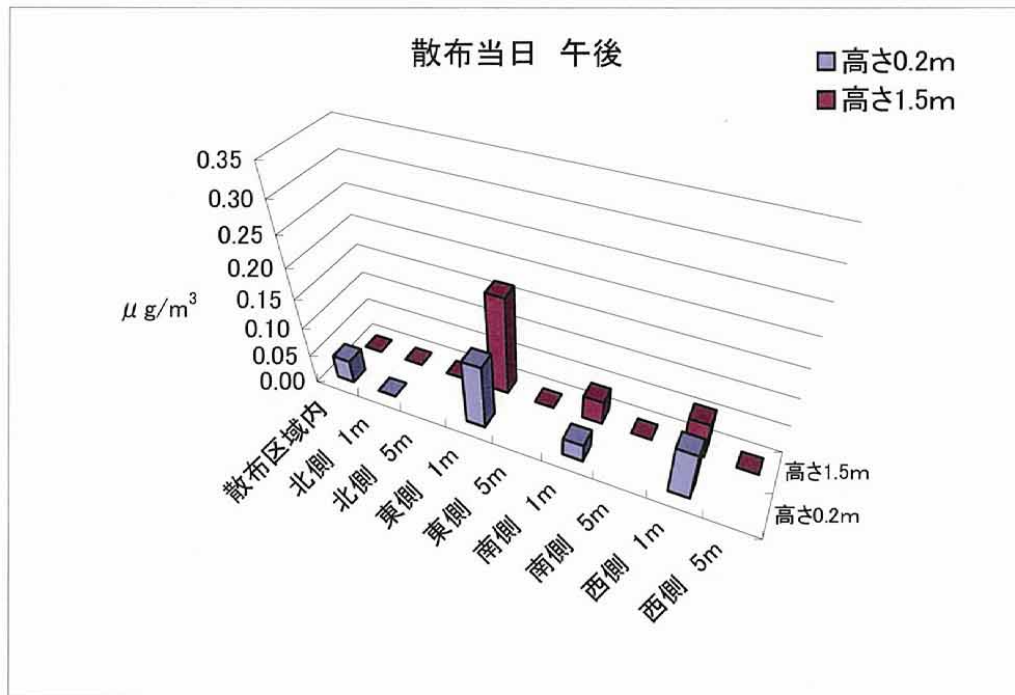
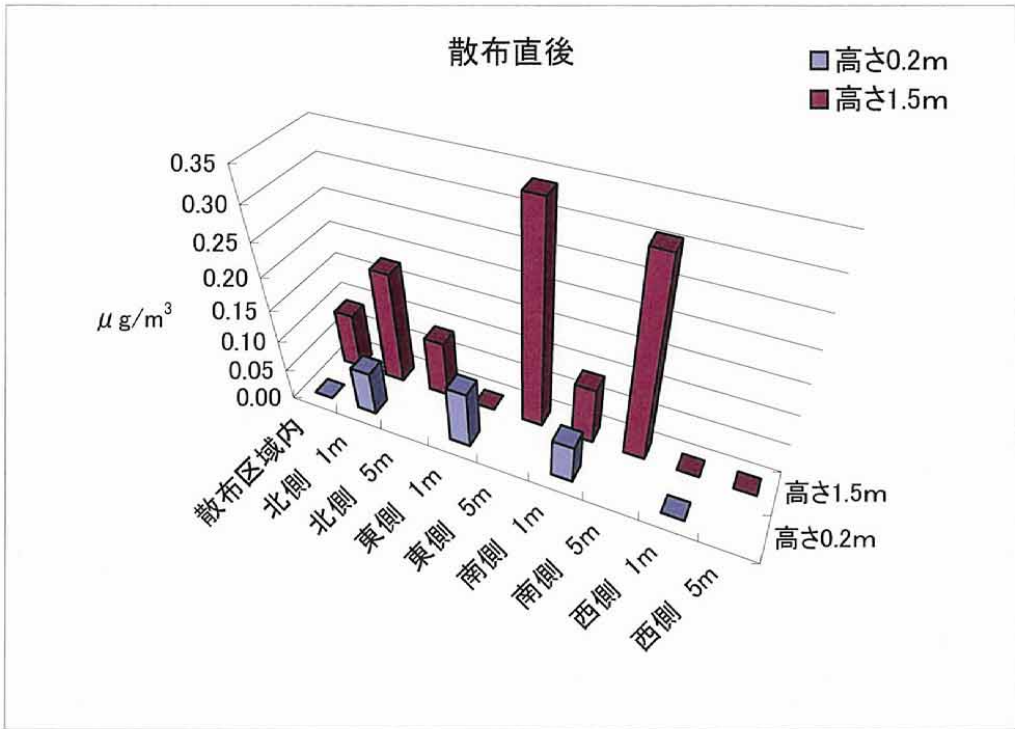


図7 地点別の空中濃度(グリホサート)

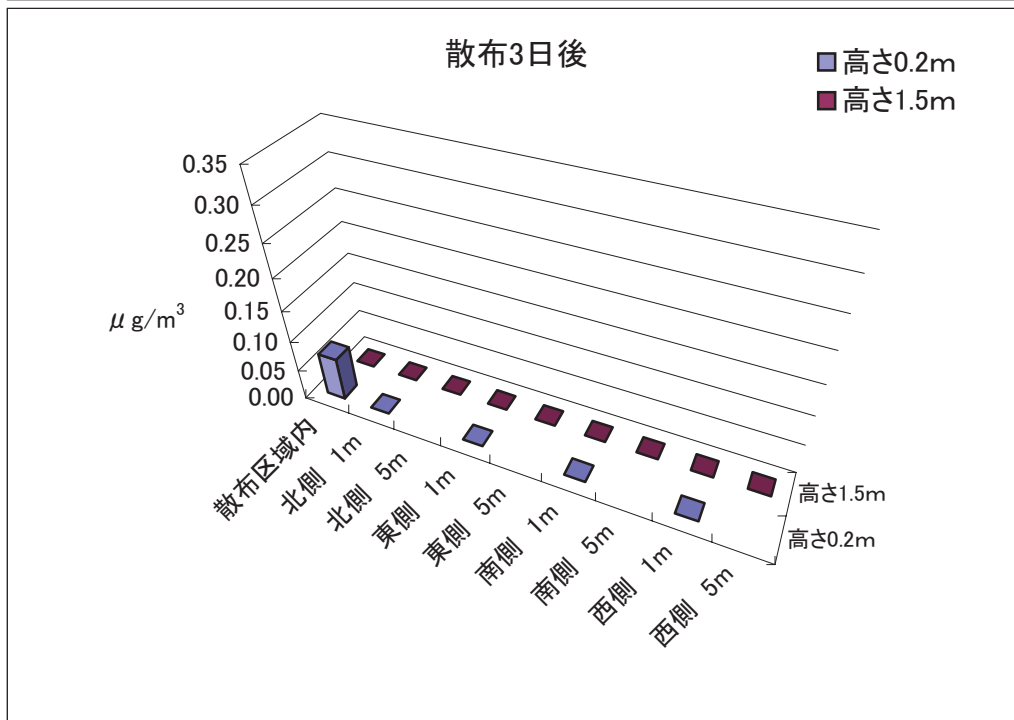
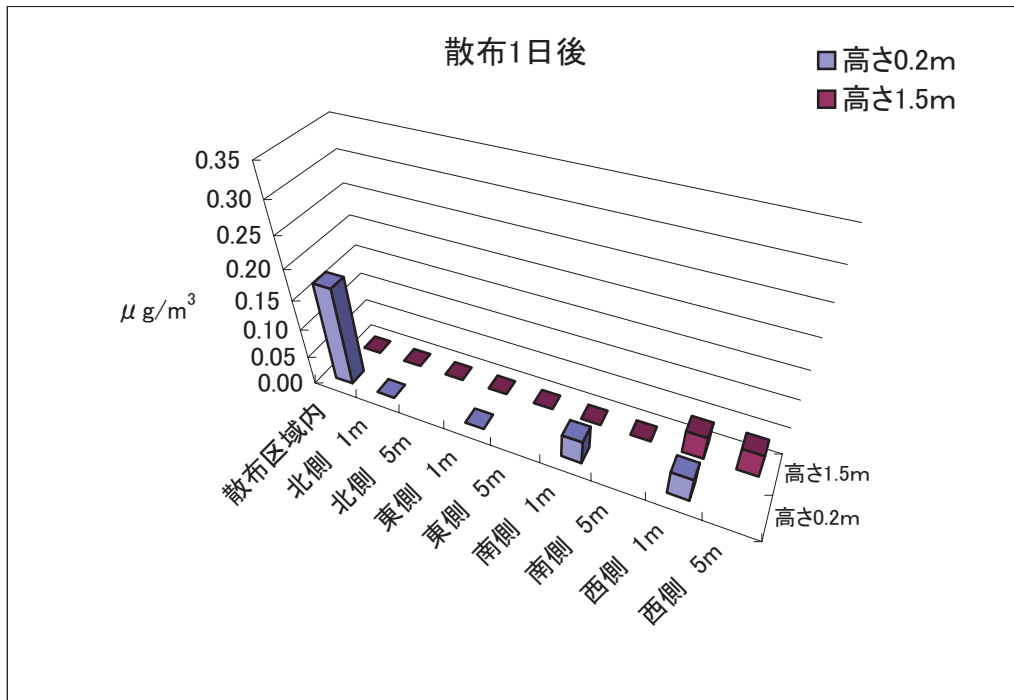


図7 地点別の気中濃度(グリホサート)(続き)

6. 土壌中濃度調査結果

区域内における土壌の採取時刻を表9に、採取土壌の「その他土壌」、「植物体」、及び「小石等」の3分画の重量及び重量比率（いずれも湿重量ベース）を表10に、外観を写真5に示した。なお、採取した土壌試料を実験室にて2mmのふるいにかけて、ふるい上から小石等を除いたもの（根など）を「植物体」とし、ふるいを通したものを「その他土壌」とした。「その他土壌」及び「植物体」を分析した。

その他土壌及び植物体のグリホサート濃度を表11及び図8に示した。

(1) その他土壌中濃度調査結果

その他土壌中濃度（乾重量ベース）は、散布前日に $0.081 \mu\text{g/g-dry}$ であったのに対し散布1日後に $0.40 \mu\text{g/g-dry}$ と増加し、散布3日後は $0.39 \mu\text{g/g-dry}$ と同等であり、散布7日後に $1.9 \mu\text{g/g-dry}$ と高い濃度を示した。その後は散布14日後に $0.86 \mu\text{g/g-dry}$ 、散布32日後に $0.40 \mu\text{g/g-dry}$ と濃度が減少した。

(2) 植物体中濃度調査結果

植物体中濃度は、散布前日に $0.20 \mu\text{g/g-dry}$ であったのに対し散布1日後に $3.2 \mu\text{g/g-dry}$ と高い濃度を示し、その後は、散布3日目に $2.6 \mu\text{g/g-dry}$ 、散布7日後に $2.8 \mu\text{g/g-dry}$ 、散布14日後に $1.2 \mu\text{g/g-dry}$ 、散布32日後に $0.82 \mu\text{g/g-dry}$ と、概ね減少傾向にあった。

(3) 考察

1) 散布7日後のグリホサート濃度増加について

散布7日後に濃度が増加した理由としては、採取当日（10月2日）の降雨（当日の、採取時までの降雨量は約20mm）により、地上の草に付着していたグリホサートが地表面に付着、及び表層土に浸透したことが考えられる。

なお、散布13日後の降雨量は調査期間中で最多（約85mm）であったが、翌日（散布14日後）の土壌中グリホサート濃度には、この降雨による濃度の増減は認められなかった。この理由として、グリホサートは高い親水性及び強い土壌吸着性を有することから、散布7日後までに地上部分から表層へのグリホサートの移行はほぼ終了し、土壌に強く吸着されていることが考えられる。

2) 散布7日後以降のグリホサート濃度の推移について

その他土壌中濃度が最も高かった散布7日後以降の濃度の推移は次のとおりであった。

- ・ 散布7日後から14日後までの7日間に濃度はほぼ半減した。
($1.9 \mu\text{g/g-dry} \rightarrow 0.86 \mu\text{g/g-dry}$)
- ・ 散布14日後から32日後までの18日間にさらにほぼ半減した。
($0.86 \mu\text{g/g-dry} \rightarrow 0.40 \mu\text{g/g-dry}$)

これは、いずれも文献²⁾³⁾に記載されているグリホサート土壌中半減期（2～3日²⁾及び16～17日³⁾）の範囲内であった。

3) 散布前日に検出されたその他土壌中グリホサートについて

散布前日に検出されたその他土壌中グリホサートについて、その土壌の履歴と同等精度の観点から、その理由を考察した。

① 散布履歴について

本調査のグリホサート散布日は平成 21 年 9 月 25 日であり、それ以前には、少なくとも 3 年間調査場所でのグリホサート散布履歴は無い。

しかし、平成 21 年 6 月にグリホサートイソプロピルアミン塩液剤（商品名：「除草剤 ワトソン グリホサート」（㈱ワトソン））が、図のように調査エリア外周付近に散布された履歴があった。

この農薬は、イオン解離すると今回散布したグリホサートアンモニウム塩液剤と同一のものとなり、グリホサートとして検出される。

このことから、散布時ミスト状となったグリホサートイソプロピルアミン塩液剤が風に乗って、調査実施場所に飛来した可能性も考えられる。

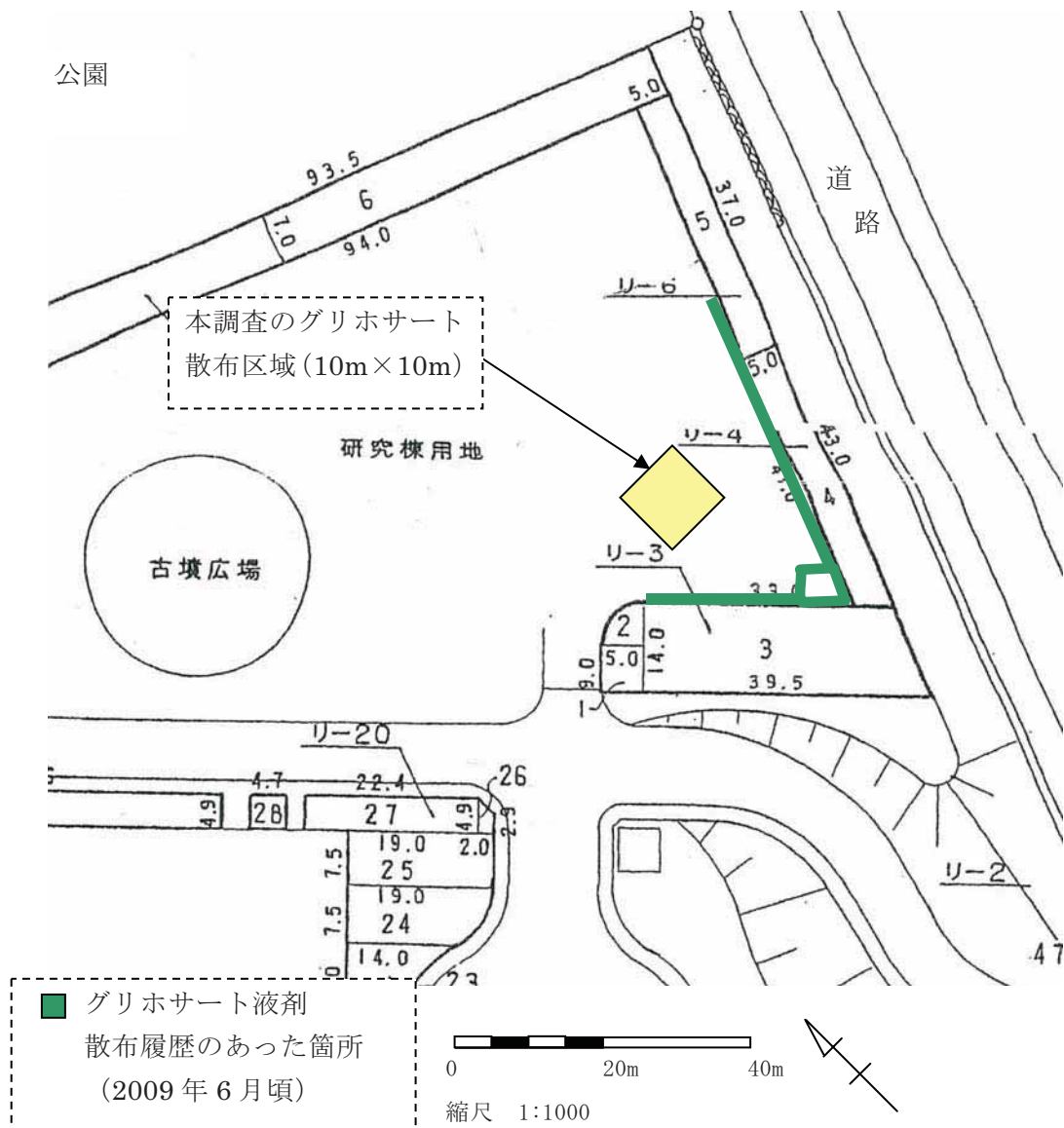


図 調査実施場所周辺のグリホサート散布履歴

② 同定精度について

定量下限値 $0.01 \mu\text{g/g-dry}$ に対して、散布前日に定性された微量のグリホサートは、 $0.08 \mu\text{g/g-dry}$ であった。

HPLC-蛍光検出器によるグリホサート分析方法は、水道水の公定法として日本国内で広く用いられているものであるが、直接土壌に散布された履歴の無いところからの検出であるため、その同定精度について、検証した。

・定量下限値について

高感度分析を行っているために、極微量の操作ブランクが認められた(カマトグラム参照)。試料換算すると、計算上 $0.004 \mu\text{g/g-dry}$ に相当するものであった。

このため、定量下限値は、この操作ブランクの問題に配慮し、その2倍程度の $0.01 \mu\text{g/g-dry}$ を定量下限値として設定した。

結果的に、操作ブランクは、土壌から検出された最低値 $0.08 \mu\text{g/g-dry}$ の $1/20$ の値であるため、定量値から操作ブランクを差し引く操作は行っていない。

また、操作ブランク値は定量値に対して、微量であるため、評価に影響していないと考えられる。

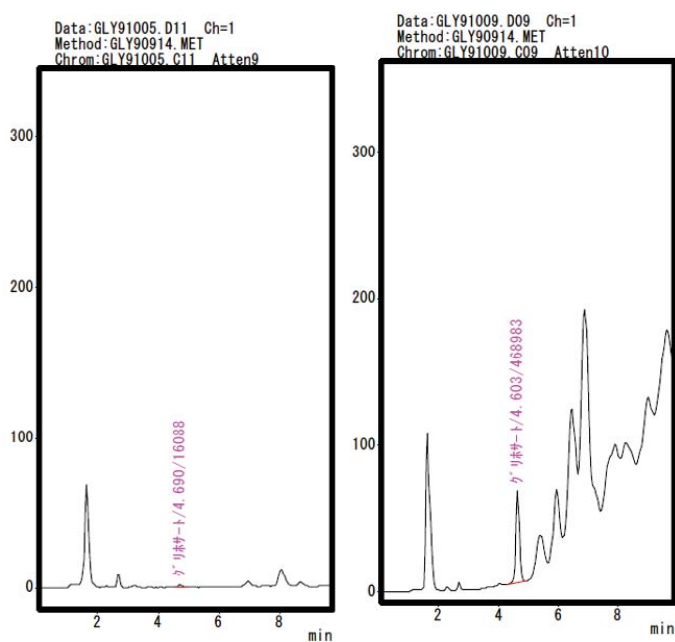


図 グリホサート（その他土壌）のクロマトグラム
(左：操作ブランク、右：散布前日)

・HPLC カラム変更による検証

定量に使用したカラムは、C8 カラムであったが、C18 カラムに変更し、異種のカラムでも同様に定性されることにより、同定精度を確かめた。

この結果、散布前日の試料クロマトグラムのように、標準品同様のリテンションタイムにピークが現れた。

このことから、クロマトグラフの手法上、C8 カラムで同定された物質は、グリホサートと考えられる。

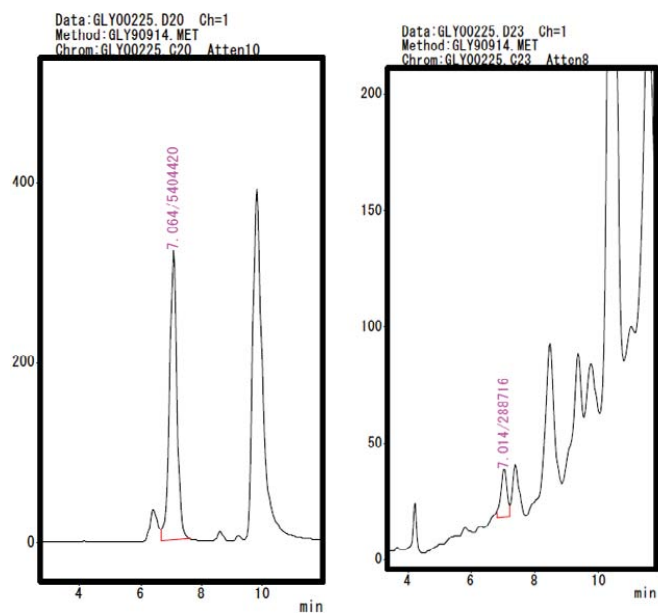


図 C18 カラムにより測定したグリホサート（その他土壌）のクロマトグラム
（左：標準品（例）、右：散布前日）



















試料名	その他土壌	植物体	小石等
9/24 散布前日	 162506 農薬飛散リスク調査 除草剤散布 前日 土壌	 162506 農薬飛散リスク調査 除草剤散布 前日 植物体	 162506 農薬飛散リスク調査 除草剤散布 前日 ふるい後残渣
9/26 散布1日後	 162506 農薬飛散リスク調査 除草剤散布 1日後 土壌	 162506 農薬飛散リスク調査 除草剤散布 1日後 植物体	 162506 農薬飛散リスク調査 除草剤散布 1日後 ふるい後残渣
9/28 散布3日後	 162506 農薬飛散リスク調査 除草剤散布 3日後 土壌	 162506 農薬飛散リスク調査 除草剤散布 3日後 植物体	 162506 農薬飛散リスク調査 除草剤散布 3日後 ふるい後残渣
10/2 散布7日後	 162506 農薬飛散リスク調査 除草剤散布 7日後 土壌	 162506 農薬飛散リスク調査 除草剤散布 7日後 植物体	 162506 農薬飛散リスク調査 除草剤散布 7日後 ふるい後残渣
10/9 散布14日後	 162506 農薬飛散リスク調査 除草剤散布 14日後 土壌	 162506 農薬飛散リスク調査 除草剤散布 14日後 植物体	 162506 農薬飛散リスク調査 除草剤散布 14日後 ふるい後残渣
10/27 散布32日後	 162506 農薬飛散リスク調査 除草剤散布 32日後 土壌	 162506 農薬飛散リスク調査 除草剤散布 32日後 植物体	 162506 農薬飛散リスク調査 除草剤散布 32日後 ふるい後残渣

写真5 土壌試料の3画分(その他土壌・植物体・小石等)の写真

表9 散布区域内における土壌の採取時刻

調査時期		土壌採取実施時刻
9/24	散布前日	14:15
9/26	散布1日後	14:40
9/28	散布3日後	14:20
10/2	散布7日後	14:10
10/9	散布14日後	14:25
10/27	散布32日後	15:00

表10 採取土壌試料の「その他土壌」、「植物体」及び「小石等」*の重量(g-wet)及び重量比率(%)

①重量(g-wet)

		採取重量(g-wet)			
		その他土壌	植物体	小石等	計
9/24	散布前日	325.3	20.9	51.8	397.9
9/26	散布1日後	412.8	13.6	106.4	532.7
9/28	散布3日後	382.1	32.3	85.4	499.7
10/2	散布7日後	391.7	32.5	84.6	508.8
10/9	散布14日後	299.1	11.6	40.3	351.0
10/27	散布32日後	571.6	17.3	161.2	750.1

②重量比率(%) (湿重量ベース)

		比率(「その他土壌」+「植物体」+「小石等」=100%)				比率(「その他土壌」+「植物体」=100%)		
		その他土壌	植物体	小石等	計	その他土壌	植物体	計
9/24	散布前日	81.8%	5.2%	13.0%	100%	94.0%	6.0%	100%
9/26	散布1日後	77.5%	2.6%	20.0%	100%	96.8%	3.2%	100%
9/28	散布3日後	76.5%	6.5%	17.1%	100%	92.2%	7.8%	100%
10/2	散布7日後	77.0%	6.4%	16.6%	100%	92.3%	7.7%	100%
10/9	散布14日後	85.2%	3.3%	11.5%	100%	96.3%	3.7%	100%
10/27	散布32日後	76.2%	2.3%	21.5%	100%	97.1%	2.9%	100%

※採取した土壌を2mm目のふるいにかけて、ふるい上に残ったものを、目視により根などの「植物体」と「小石等」に分けた。ふるいを通過したものを「その他土壌」とした。

表11 散布区域内におけるその他土壌中濃度及び植物体中濃度(グリホサート)

調査時期		濃度 ($\mu\text{g/g-wet}$)		濃度 ($\mu\text{g/g-dry}$)	
		その他土壌	植物体	その他土壌	植物体
9/24	散布前日	0.046	0.089	0.081	0.20
9/26	散布1日後	0.23	1.4	0.40	3.2
9/28	散布3日後	0.23	1.1	0.39	2.6
10/2	散布7日後	0.95	0.98	1.9	2.8
10/9	散布14日後	0.44	0.44	0.86	1.2
10/27	散布32日後	0.22	0.33	0.40	0.82

調査時期		水分含量 (%)	
		その他土壌	植物体
9/24	散布前日	42.7	56.5
9/26	散布1日後	41.0	55.6
9/28	散布3日後	42.1	55.8
10/2	散布7日後	49.7	64.6
10/9	散布14日後	48.1	63.7
10/27	散布32日後	44.2	59.0

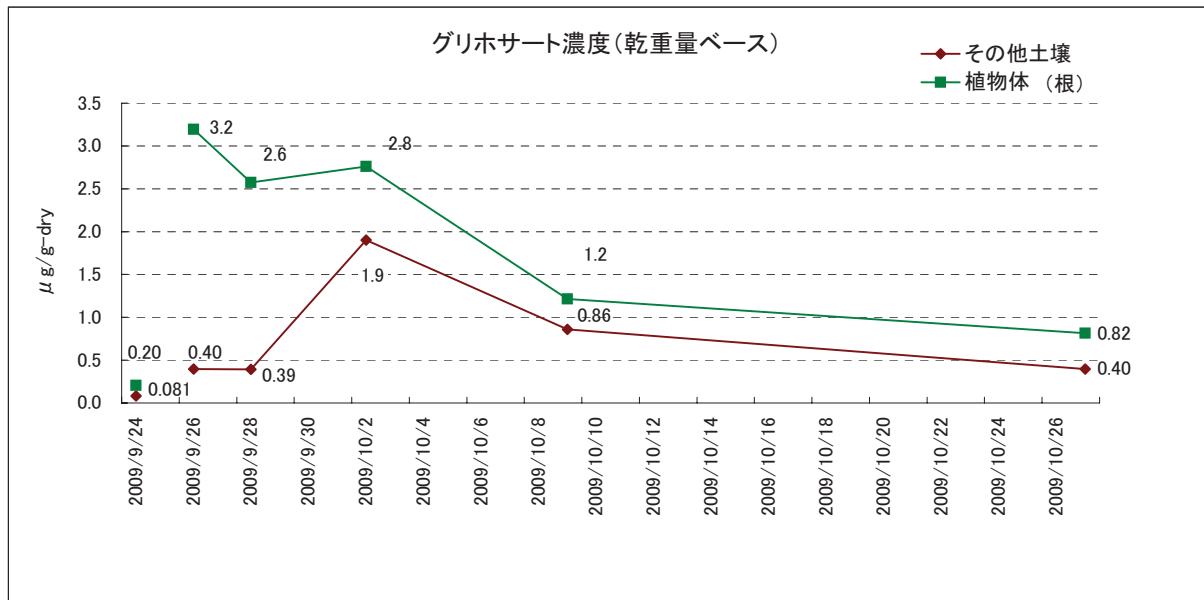
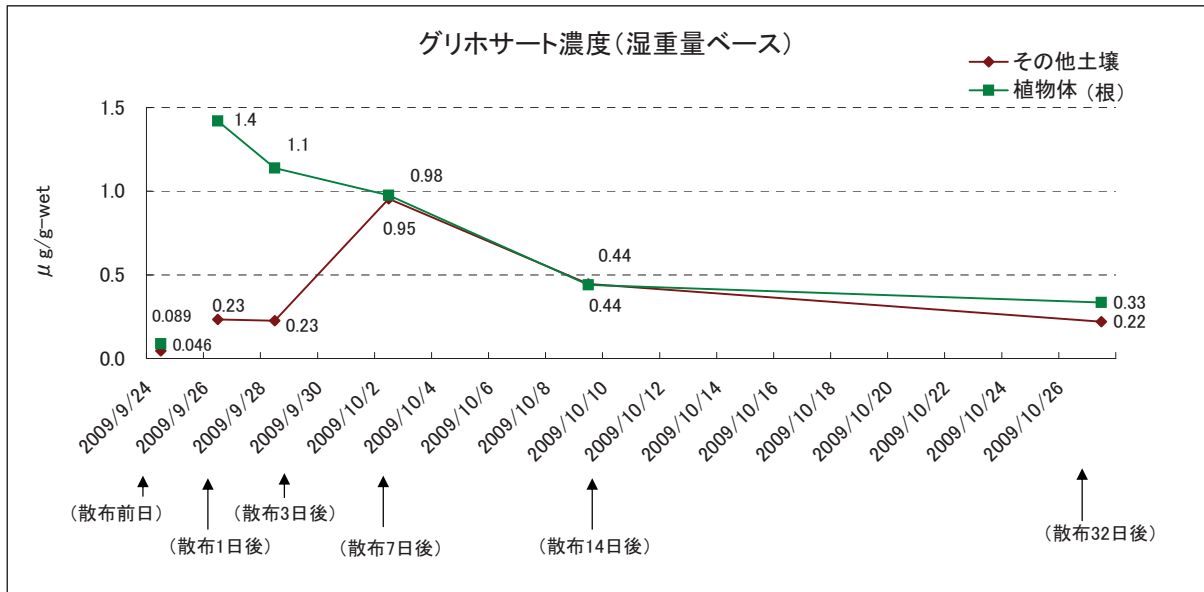
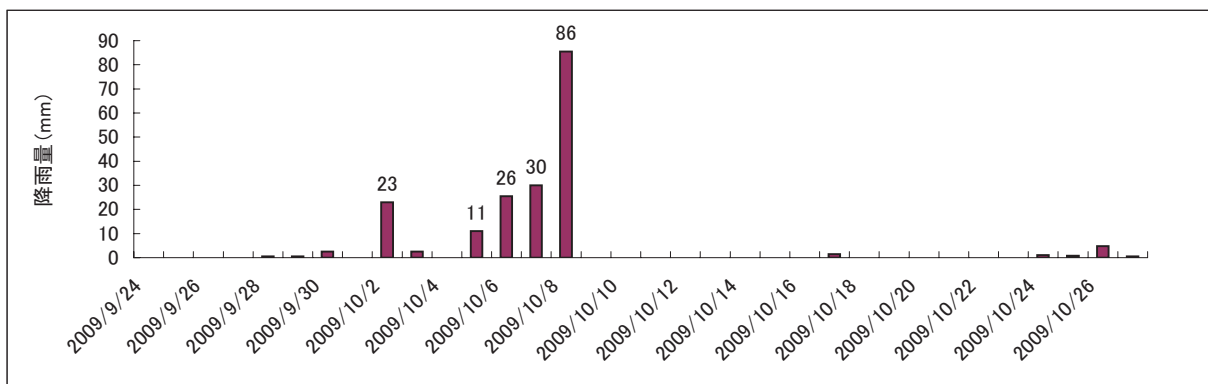


図8 散布区域内におけるその他土壌中濃度及び植物体中濃度(グリホサート)
(上:湿重量ベース、下:乾重量ベース)



参考図 調査期間中の降雨量(mm)

[まとめ]

1. 飛散量調査

感水紙を用いた飛散量調査の結果、散布区域外でもミストの飛散が確認された。感水紙の被覆面積率は、区域外 1m で 3.1~14.4%、区域外 5m で 0~0.5%、区域外 10m で 0~0.2%であった。

散布区域外で飛散が確認されたことについては、以下の理由が考えられる。

- ・通常ノズルを使用したため、粒子径（1.5MPa 時の平均粒子径 $40 \mu\text{m}^5$ ）が飛散低減ノズルと比較して小さく、飛散が起こりやすかった。

なお、平成 20 年度調査時には飛散低減ノズル（平均粒子径 $805 \mu\text{m}^4$ ）及び飛散防止カバーを使用しており、散布区域外への飛散はほとんどなかった。

- ・散布時（11:20~11:40）に風が比較的強かった（平均風速 0.9~1.8m/s、最大瞬間風速 4.5~5.4m/s）。

2. 気中濃度（グリホサート）調査

気中濃度調査の結果、散布区域外では散布 1 日後まで、散布区域内では散布 3 日後まで（調査は散布 3 日後まで実施）、グリホサートが検出された。

散布直後（散布が終了してから 10 分後に捕集を開始）には、散布区域外において散布区域内よりも高い濃度で検出された地点があった。これは、ノズルの粒子径が小さかったために散布後のミストの滞留時間が長く、また、風の影響により気中に滞留していたミストの移動が起こりやすかったために、風下側の濃度が高くなったものと推察される。

また、散布 1 日後及び散布 3 日後の検出については、

- ・草や土壌からのグリホサートの揮散
- ・草や土壌からのグリホサートを含む粉じんの飛散

の可能性が考えられるが、いずれが要因であるかを特定することはできなかった。

3. 土壌中濃度（グリホサート）調査

土壌中濃度調査の結果、グリホサートは散布後 32 日後まで検出された（調査は散布 32 日後まで実施）。

散布 7 日後に濃度が上昇したが、これは、散布 7 日後の降雨により、地上の草に付着していたグリホサートが地表面に付着、及び表層土に浸透したためであると考えられる。

また、散布 7 日後以降には、以下の通り濃度が減少した。

- ・散布 7 日後→14 日後：ほぼ半減
- ・散布 14 日後→32 日後：さらにほぼ半減

これは、いずれも文献²⁾³⁾に記載されているグリホサート土壌中半減期（2~3 日²⁾及び 16~17 日³⁾）の範囲内であった。

参考文献

- 1) 農薬ハンドブック 2005 年版（改訂新版）社団法人日本植物防疫協会 p. 631
- 2) IPCS : GLYPHOSATE, ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 159 (1994)
(<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc159.htm>)
- 3) 鍬塚昭三、山本広基：土と農薬、社団法人日本植物防疫協会（1998） p. 177

- 4) 株式会社麻場ホームページ (<http://www.asaba-mfg.co.jp/jpn/product/GRAPPER.html>)
- 5) ヤマホ工業株式会社 総合カタログ (No. 16) p. 12
(<http://www.yamaho-k.co.jp/04/>)
- 6) The Pesticide Manual 12th Edition , BRITISH CROP PROTECTION COUNCIL (2000) p. 488

別添

参考資料1：気中濃度（グリホサート）の分析方法

参考資料2：気中濃度（グリホサート）捕集方法及び分析方法の平成20年度調査との
同等性確認について

参考資料3：土壌中濃度（グリホサート）の分析方法

参考資料4：土壌中濃度（グリホサート）分析方法の平成20年度調査との同等性確認に
ついて

【参考資料1】 気中濃度（グリホサート）の分析方法

1-1 試薬及び機器

大気捕集ポンプ	: 柴田科学 MP-Σ300N、Σ500N
大気捕集管	: 13 mm (内径)
捕集管充填材	: GL Science TENAX TA (60/80mesh)
グリホサート標準品	: 和光純薬 残留農薬試験用 (純度99.9%)
アセトン	: 和光純薬 残留農薬試験用
メタノール	: 和光純薬 高速液体クロマトグラフ用
酢酸エチル	: 関東化学 残留農薬試験用
四ホウ酸ナトリウム、リン酸二水素カリウム	: 和光純薬 特級
クロロギ酸9-フルオレニルメチル	: 東京化成工業
ロータリーエバポレーター	: IWAKI REN-1000

高速液体クロマトグラフシステム

高速液体クロマトポンプ	: 島津製作所 LC-10AD
高速液体クロマトシステムコントローラー	: 島津製作所 SCL-10A
高速液体クロマトグラフオートサンプラー	: 島津製作所 SIL-10AXL
高速液体クロマトグラフカラムオープン	: 島津製作所 CTO-10AC
高速液体クロマトグラフ蛍光検出器	: 島津製作所 RF-10AXL

1-2 高速液体クロマトグラフ条件

分離カラム	: GL-Science Inertsil C8-3 φ4.6 mm×150 mm(5 μm)
移動相	: A ;0.1Mリン酸二水素カリウム緩衝液(pH2.5)/アセトニトリル(7:3) B ;水/アセトニトリル (2:8)

グラジエント :

時間 (分)	0	8	13	32
A (%)	100	100	0	0
B (%)	0	0	100	100

注入量	: 20 μL
移動相流速	: 10 mL/min
カラムオープン温度	: 40°C
検出器	: 蛍光検出器
励起波長	: 270 nm
測定波長	: 315 nm

1-3 検量線の作成

グリホサート標準品10 mg (純度100%として) を10 mL容のメスフラスコにとり、精製水で定容して1 mg/mL溶液とする。これを精製水で希釈して1、5、10、20及び50 ng/mL溶液を調製する。

それぞれを共栓付試験管に5 mLとり、1 mol/L 四ホウ酸ナトリウム溶液0.5 mLを加えて振り混ぜる。これに1% クロロギ酸9-フルオレニルメチル/アセトン溶液2.6 mLを加えた後振り混ぜ、栓をして室温で30分間静置する(誘導体化)。この溶液に酢酸エチル5 mLを加え、1分間激しく振とうし、暫時静置した後、水層を分取して試験溶液とする。

この試験溶液20 μLを前記条件に設定した高速液体クロマトグラフに注入し、縦軸にピーク面積、横軸に濃度をとり最小自乗法により検量線(図1-1)を作成する。

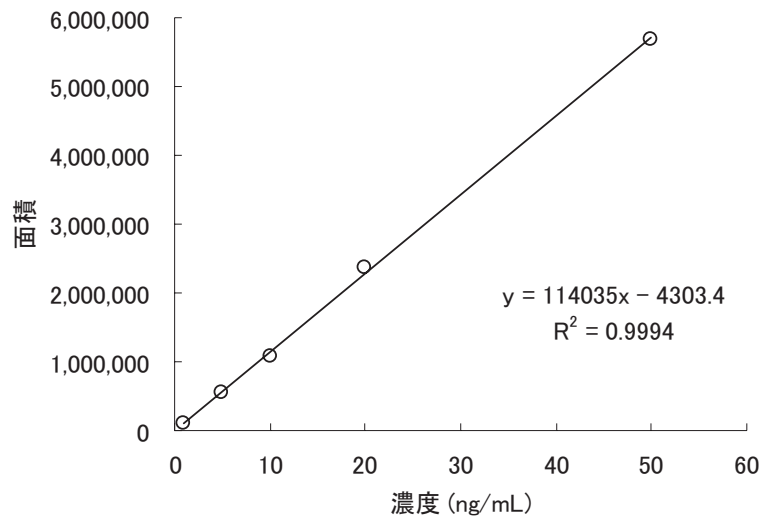


図1-1 グリホサート検量線の一例

1-4 分析操作

① 溶出

捕集管の上部から精製水1 mLを加え、約1分間充填材 (TENAX-TA) となじませる。続いて精製水4 mLを加え、気泡を抜いた後に自然落下で溶出させ、共栓付試験管にうける。

② 誘導体化

精製水を加えて5 mLとした後、1 mol/L 四ホウ酸ナトリウム 0.25 mL 及び1% クロロギ酸9-フルオレニルメチル/アセトン溶液 1.3 mLを加えて10分間振とうし、室温で30分間静置する (誘導体化)。この溶液に酢酸エチル2.5 mLを加え、5分間振とうし、暫時静置した後、水層を分取して試験溶液とする。

③ 定量

この試験溶液20 μ Lを前記条件に設定した高速液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積から検量線よりグリホサートの量を求め、濃度を算出する。

1-5 定量下限値

次の計算式をもとに定量下限値を算出する。

$$\frac{\text{定量最小量}(\mu\text{g})}{\text{LC注入量}(\text{mL})} \times \frac{\text{試料液量}(\text{mL})}{\text{大気捕集量}(\text{m}^3)} = \text{定量下限値}(\mu\text{g}/\text{m}^3)$$

試料ごとに大気捕集量が異なるため定量限界値は試料により若干異なるが、各測定物質について90Lもしくは180L吸引した場合の例を示す。

i) 大気捕集量90Lの場合

$$\frac{\frac{0.02}{1000} \mu\text{g}(\text{定量最小量}) \times 5 \text{ mL}(\text{最終液量})}{\frac{20}{1000} \text{ mL}(\text{注入量}) \times \frac{90}{1000} \text{ m}^3(\text{大気捕集量})} = 0.056 \mu\text{g}/\text{m}^3$$

$$\approx 0.06 \mu\text{g}/\text{m}^3$$

ii) 大気捕集量180Lの場合

$$\frac{\frac{0.02}{1000} \mu\text{g (定量最小量)} \times 5 \text{ mL (最終液量)}}{\frac{20}{1000} \text{ mL (注入量)} \times \frac{180}{1000} \text{ m}^3 \text{ (大気捕集量)}} = 0.028 \mu\text{g/m}^3$$
$$\doteq 0.03 \mu\text{g/m}^3$$

【参考資料2】 気中濃度（グリホサート）捕集方法及び分析方法の平成20年度調査との同等性確認について

大気中のグリホサートの捕集方法については、平成20年度調査において検討を行っており、以下の結果が得られている。

- ・TENAX-TAにより大気中のグリホサートが捕集可能であること。
- ・TENAX-TAにより捕集されたグリホサートの回収に問題がないこと。

そこで、本年度の調査では、平成20年度調査と同様の方法にて大気中のグリホサートの捕集及び分析を実施した。また、捕集方法及び分析方法の同等性の確認のため、実試料の分析に先立って、TENAX-TAによる添加回収試験を平成20年度調査と同様の方法にて実施した。

TENAX-TAによるグリホサートの添加回収試験

ポリプロピレン製シリンジにTENAX-TA（60/80mesh）0.5gを充填し、ポリエチレン製フリットで固定した後、グリホサート標準溶液（10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）10 μL を負荷した。次に、柴田科学製ミニポンプ（MP- Σ 500N）を用いて毎分2 Lの速度で30分吸引した後、グリホサートを抽出し、高速液体クロマトグラフにて分析した。

分析結果を表2-1に示す。また、クロマトグラムを図2-1、図2-2に示す。表2-1によれば、添加量に対する回収率は114%であり、平成20年度試験の回収率（109%）とほぼ同程度の回収率が得られた。

表2-1 TENAX-TAによるグリホサートの添加回収試験結果

試料量	0.06	m^3
抽出液量	5	mL
分取量	5	mL
最終液量	5	mL
標準添加量	0.1	μg
試料換算濃度	1.67	$\mu\text{g}/\text{m}^3$
操作ブランク	<0.09	$\mu\text{g}/\text{m}^3$
無添加試料	<0.09	$\mu\text{g}/\text{m}^3$
結果		
添加試料	1.89	$\mu\text{g}/\text{m}^3$
回収率		
添加試料	114	%

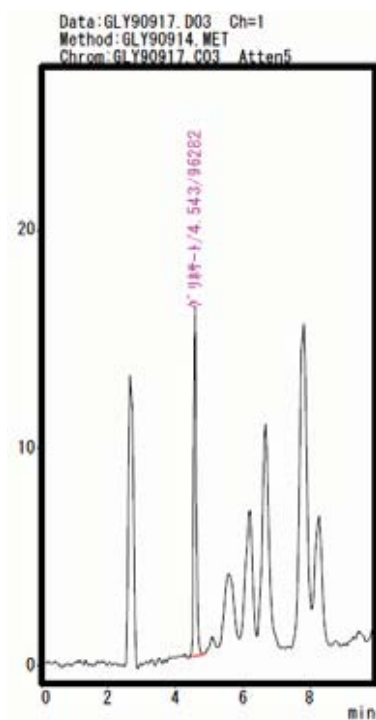


図 2-1 定量下限値 (1ng/mL) のクロマトグラム (グリホサート)
(添加回収試験時)

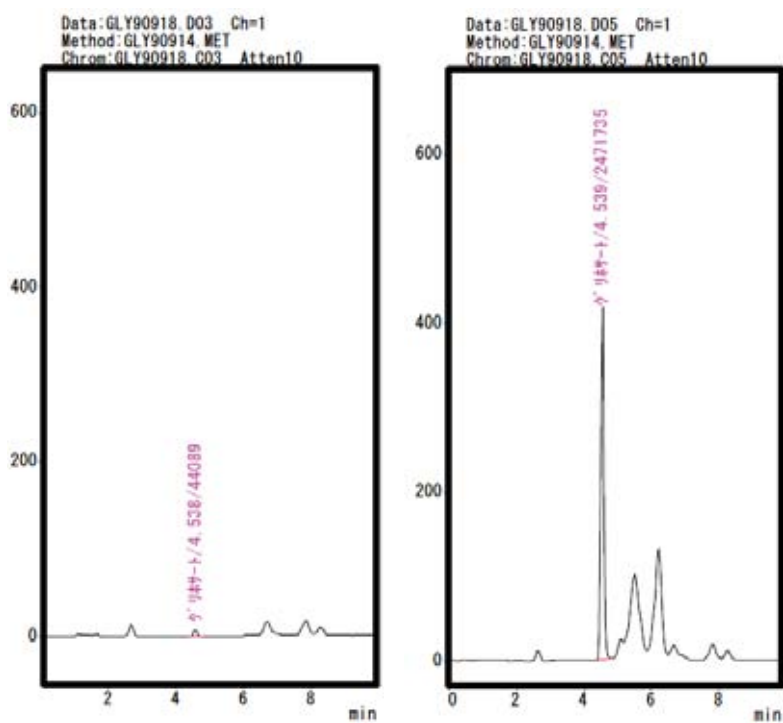


図 2-2 添加回収試験 (TENAX-TA) のクロマトグラム (グリホサート)
(左: 操作ブランク、右: 添加試料)

【参考資料3】 土壤中濃度（グリホサート）の分析方法

3-1 試薬及び機器

グリホサート標準品	: 和光純薬	残留農薬試験用（純度99.9%）
アセトン	: 和光純薬	残留農薬試験用
アンモニア水	: 和光純薬	特級
アセトニトリル	: 和光純薬	高速液体クロマトグラフ用
酢酸エチル	: 関東化学	残留農薬試験用
四ホウ酸ナトリウム、リン酸二水素カリウム	: 和光純薬	特級
クロロギ酸9-フルオレニルメチル	: 東京化成工業	
前処理用フィルタ	: GLサイエンス	クロマトディスク25A (0.45 μm)
ロータリーエバポレーター	: IWAKI	REN-1000

高速液体クロマトグラフシステム

高速液体クロマトポンプ	: 島津製作所	LC-10AD
高速液体クロマトシステムコントローラー	: 島津製作所	SCL-10A
高速液体クロマトグラフオートサンプラー	: 島津製作所	SIL-10AXL
高速液体クロマトグラフカラムオープン	: 島津製作所	CTO-10AC
高速液体クロマトグラフ蛍光検出器	: 島津製作所	RF-10AXL

3-2 高速液体クロマトグラフ条件

分離カラム	: GL-Science	Inertsil C8-3	φ4.6 mm×150 mm(5 μm)
移動相	: A	: 0.1Mリン酸二水素カリウム緩衝液(pH2.5)/アセトニトリル(7:3)	
	: B	: 水/アセトニトリル (2:8)	
グラジエント	:		

時間 (分)	0	8	13	21
A (%)	100	100	0	0
B (%)	0	0	100	100

注入量	: 20 μL
移動相流速	: 1.0 mL/min
カラムオープン温度	: 40°C
検出器	: 蛍光検出器
励起波長	: 270 nm
測定波長	: 315 nm

3-3 検量線の作成

グリホサート標準品10 mg（純度100%として）を10 mL容のメスフラスコにとり、精製水で定容して1 mg/mL溶液とする。これを精製水で希釈して0.5、1、5、10、20及び50 ng/mL溶液を調製する。

それぞれを共栓付試験管に5 mLとり、1 mol/L 四ホウ酸ナトリウム溶液0.5 mLを加えて振り混ぜる。これに1% クロロギ酸9-フルオレニルメチル/アセトン溶液2.6 mLを加えた後振り混ぜ、栓をして室温で30分間静置する（誘導体化）。この溶液に酢酸エチル5 mLを加え、1分間激しく振とうし、暫時静置した後、水層を分取して試験溶液とする。

この試験溶液20 μLを前記条件に設定した高速液体クロマトグラフに注入し、縦軸にピーク面積、横軸に濃度をとり最小自乗法により検量線（図3-1）を作成する。

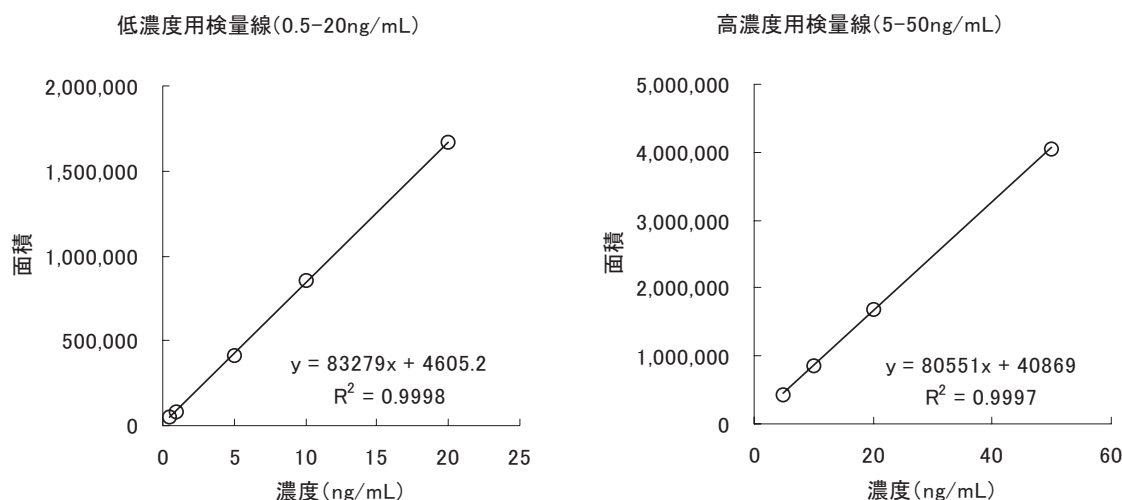


図3-1 グリホサート検量線の一例

(検量線の直線性を確保するため、試料濃度に応じて、低濃度用検量線または高濃度用検量線を用いた)

3-4 分析操作

① 前処理

実験室で、採取試料を2 mm目のふるいにかけて、ふるい上に残ったものの中から小石などを除き、これを「植物体」試料とする。ふるいを通したものを「その他土壌」試料とする。

② 抽出

試料4 g-wet及び1% アンモニア水10 mLを抽出容器に入れ、30分間超音波抽出する。洗液を遠心分離した後上澄み液を別容器に移す。残さに1% アンモニア水10 mLを加えたのち同様の操作を繰り返し、抽出液と合わせる。この抽出液に1%アンモニア水を加えて40 mLとする。

③ 誘導体化

抽出液を前処理用フィルタでろ過後、5 mLを分取し、50°C以下でロータリーエバポレーターを用いてアンモニア水を留去する。

残液を共栓付試験管に洗い移し、精製水を加えて5 mLとする。1 mol/L 四ホウ酸ナトリウム 0.25 mL、1% クロロギ酸 9-フルオレニルメチルアセトン溶液 1.3 mL及びNaCl 0.25gを加えて10分間振とうし、室温で30分間静置する（誘導体化）。

誘導体化後の溶液に硫酸を加えてpH 1とし、酢酸エチル4 mLを加え、振とう抽出を行う。酢酸エチル層に5% NaCl水溶液 1 mLを加え、硫酸を加えてpH 1とし、振とう抽出を行う。酢酸エチル層に同様の振とう抽出をさらに4回行う。酢酸エチル層に1 mol/L 四ホウ酸ナトリウム 5 mLを加えて振とうを行う。水層を分取して試験溶液とする。

④ 定量

この試験溶液20 µLを前記条件に設定した高速液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積から検量線よりグリホサートの量を求め、濃度を算出する。

3-5 定量下限値

以下の計算式により、定量下限値を算出する。

$$\frac{\frac{0.01}{1000} \mu\text{g} \quad (\text{定量最小量}) \times 40 \text{ mL (抽出液量)} \times 5 \text{ mL (最終液量)}}{\frac{20}{1000} \text{ mL (注入量)} \times 5 \text{ mL (分取液量)} \times 4 \text{ g-wet (採取試料量)}} = 0.005 \mu\text{g/g-wet}$$

【参考資料4】 土壌中濃度（グリホサート）分析方法の平成20年度調査との同等性確認について

本調査におけるグリホサート土壌中濃度の分析は、平成20年度調査と同様に、HPLC-蛍光検出法で実施した。なお本調査では、分析精度をさらに向上させるため、試料の前処理時に硫酸洗浄によるクリーンアップ工程を追加した（【参考資料3】に示す）。

実試料の分析に先立って、本調査の分析方法の平成20年度調査との同等性を、以下の手順により確認した。

① 操作ブランク試験

操作ブランク試験の結果は定量下限値（ $0.01 \mu\text{g/g-dry}$ ）未満（表4-1）であり、定量値に影響しないレベルであった。

② 添加回収試験

土壌試料（2mmのふるいを通過した「その他土壌」試料）に対し、添加回収試験を実施した。結果を表4-1に示す。また、添加回収試験時のクロマトグラムを図4-1、図4-2に示す。

表4-1によれば、添加量に対する回収率は平均75%であり、本調査の分析方法は平成20年度調査（添加回収試験の回収率：平均72%）と同等の回収率があることを確かめた。

表4-1 土壌への添加回収試験結果（操作ブランク試験結果）

試料量	10	g-dry
抽出液量	200	mL
分取量	5	mL
最終液量	5	mL
標準添加量	4	μg
試料換算濃度	0.4	$\mu\text{g/g-dry}$
操作ブランク	<0.01	$\mu\text{g/g-dry}$
その他土壌-無添加試料	0.03	$\mu\text{g/g-dry}$
結果		
その他土壌-添加試料（1回目）	0.27	$\mu\text{g/g-dry}$
その他土壌-添加試料（2回目）	0.33	$\mu\text{g/g-dry}$
回収率		
その他土壌-添加試料（1回目）	67	%
その他土壌-添加試料（2回目）	84	%
平均	75	%

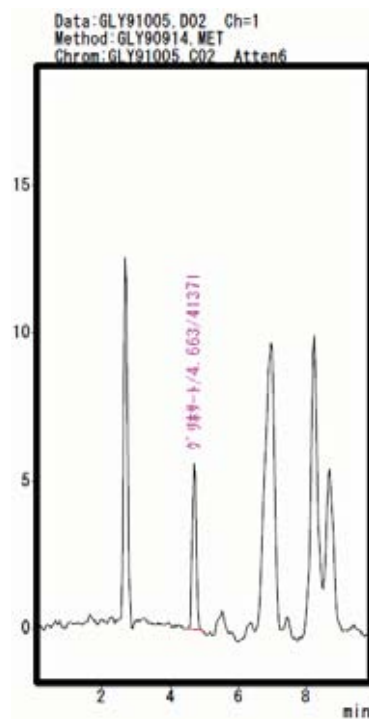


図 4-1 定量下限値 (0.5ng/mL) のクロマトグラム (グリホサート)
(添加回収試験時)

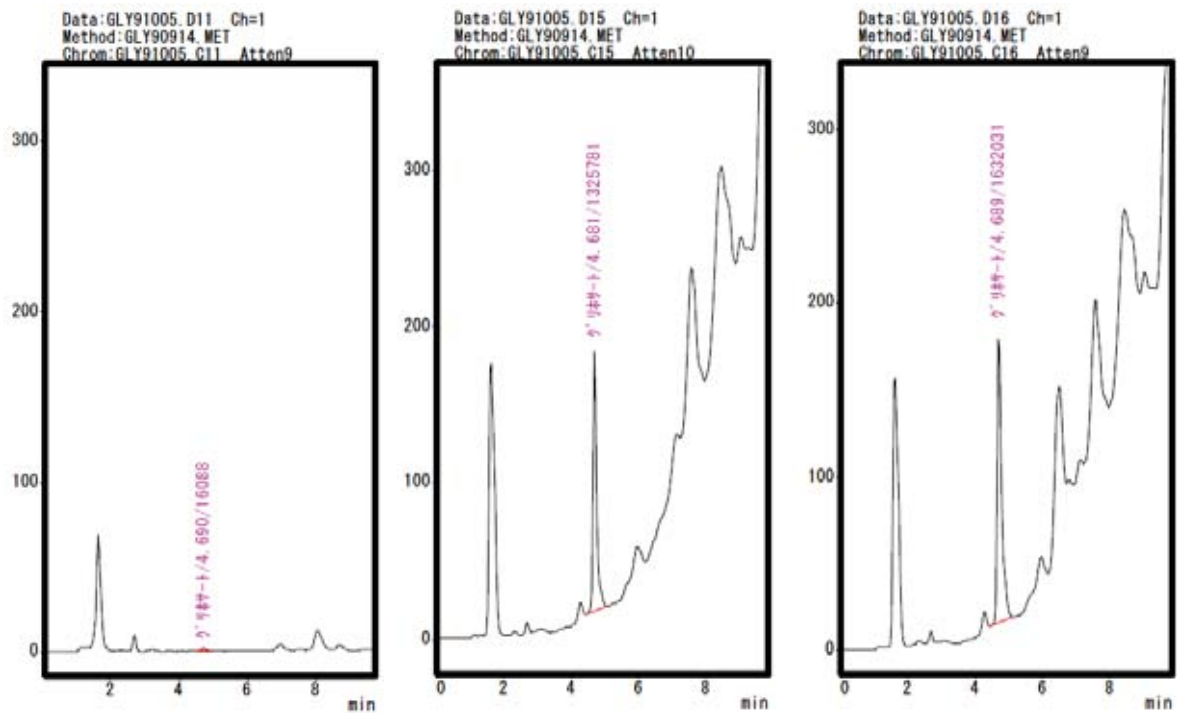


図 4-2 添加回収試験 (その他土壌) のクロマトグラム (グリホサート)
(左: 操作blank、中央: 添加試料 (1回目)、右: 添加試料 (2回目))