

グリホサート

Glyphosate

構造式



化学名：N-(phosphonomethyl) glycine

分子式：C₃H₈NO₅P

分子量：169.1

融点：230℃

水溶解度：12%

用途：除草剤

生産量：約3000t

§1. 分析法

水質試料は水中で直接蛍光誘導体化し、液液分配でクリンアップ後、高速液体クロマトグラフで定量する。底質試料は0.2M水酸化カリウム溶液を加えて超音波抽出し、珪藻土カラムでクリンアップ後、水質試料と同様に誘導体化して定量する。生体試料は水を加えポリトロンホモジナイザーで抽出後、イオン交換カートリッジと珪藻土カラムでクリンアップし、水試料と同様に誘導体化して定量する。

試験法

〔試料の採取及び保存〕

環境庁「化学物質環境調査における試料採取にあたっての留意事項」に従う。

〔試料の前処理〕

（水質試料） 試料水50mlを100mlの分液ロートにとり、塩化ナトリウム2.5g、pH9.5の緩衝溶液5mlと0.01MのFmoc-C1アセトン溶液10mlを加えて振りまぜ30分間放置する。反応液に6M硫酸0.5mlを加えpHを1付近にし、酢酸エチル40mlを加えて10分間振り混ぜる。静置し分離後、水相をすて、有機相にpH9.5の緩衝溶液4mlを加え10分間振り混ぜる。静置し分離後、水相をとり試料液とする。

（底質試料） 試料10gを共栓付き遠心分離管にとり、0.2Mの水酸化カリウム溶液40mlを加え、80℃で30分間超音波抽出し、2500rpmで10分間遠心分離後、上澄液をガラス繊維ろ紙でろ過する。ろ液のpHを希硫酸で6付近に調製後、60mlに定容する。このうちの20mlを、Extrelut-20カラムに負荷する。30分間放置後、酢酸エチル50ml、次いで飽和塩化ナトリウム溶液50mlで洗浄し、5%塩化ナトリウム含有0.2M水酸化カリウム溶液80mlで溶出させる。溶出液のpHを9.5付近に調製後、100mlに定容し、このうちの50mlをとり、水質試料と同様に誘導体化以後の操作を行い試料液とする。

（生物試料） 試料10gをとり、精製水70mlを加え、ポリトロン型ホモジナイザーで5分間抽出し、3000rpmで10分間遠心分離し、上澄液をガラス繊維ろ紙でろ過後、100mlに定容する。このうちの10mlを、陰イオン交換カートリッジに負荷し、50%のアセトニトリル溶液で洗浄後、0.5M塩化ナトリウムとアセトニトリルの等容混合液5mlで溶出させ、精製水で20mlに希釈し、Extrelut-20カラムに負荷する。以下底質と同様に、クリンアップ、誘導体化を行い試料液とする。

[空試料液の調製]

試料と同量の精製水を用いて〔試料の前処理〕の項に従った操作をして得られた試料液を空試料液とする。

[検量線作成用標準溶液の調製]

グリホサート100mgを秤取し、精製水で溶解し100mlとしたものを標準原液とする。標準原液を精製水で希釈し、0.1-1.0μg/l濃度に希釈する。

[測定]

(HPLC条件)

カラム: Nucleosil NH₂, 粒径 5μm (1)

溶離液: 0.1M KH₂PO₄ : CH₃CN (7:3)

流速: 1ml/min カラム温度: 40℃

測定波長: Ex 270nm, Em 315nm

[検量線]

検量線作成用標準液を100mlの分液ロートに50mlずつとり、(水質試料の前処理)と同様に操作して得た試料液20μlをHPLCへ注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。

[定量]

試料液20μlをHPLCへ注入し、ピーク面積またはピーク高さから検量線により定量する。(2)

[計算]

$$\text{計算値}(\mu\text{g/ml}, \mu\text{g/g}) = \text{検出量}(\mu\text{g}) \times \frac{1}{\text{試料量}(\text{ml}, \text{g})}$$

[検出限界及び定量限界]

本法に基づく検出限界値及び定量限界値を下記に示す。(3)

試料	試料量	検出限界	定量限界
水質	1000ml	0.12μg/l	0.40μg/l
底質	10g	4.0μg/kg・dry	
生物	10g	380μg/kg	

試薬・器具

[試薬]

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、水酸化カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸、炭酸ナトリウム: 試薬特級

四ほう酸ナトリウム: 試薬一級

9-フルオレニルメチル クロロフォルメート (Fmoc-Cl): 東京化成特殊用 (4)

pH9.5緩衝溶液: 四ほう酸ナトリウム 9.5g、無水炭酸ナトリウム 10.6gを精製水に溶解

し、1 lにする。

[器具]

分液ロート、褐色目盛り付き試験管、遠心分離器、共栓付き遠心分離管、超音波発振器

Extrelut-20: Merck社製

イオン交換カートリッジ: Adsorbex SAX Merck社製 (400mg) または

Bond Elut SAX Varian社製 (500mg) を1M炭酸水素ナトリウム溶液10mlを流して炭酸水素型にし、10mlの精製水で洗浄して用いた。

ホモジナイザー: ポリトロン型ホモジナイザー

HPLCカラム: Nucleosil 100-5NH₂ (GLサイエンス製)、Lichrospher 100NH₂、5 μ m (Merck社)

注 解

- (1) HPLCのNH₂カラムは逆相系で使用すると寿命が短いため、使用後はメタノールやアセトニトリルで置換しておく。
- (2) 試料処理液をただちにHPLCで定量しようとするバックグラウンドが高すぎて測定できない場合があるが、一夜放置するとバックグラウンドが下がり測定できるようになる。
- (3) 検出限界及び定量限界は「検出限界等の定め方について」(平成4年5月27日)により、次のとおり算出した。
- (4) Fmoc-Clは二級アミン類と反応し、蛍光物質を生成する。

(水質)

試料濃度 (μ g/l)	0.25	0.50	0.75
応答値 (X)	9200	18700	36800
標準偏差 (δ R)	837	787	1594
検出力 (Dn)	0.036	0.033	0.051
検出限界 (D $\times$ 3)		0.12	
定量限界 (D $\times$ 10)		0.33	
不偏分散 (Fd)		4.1	

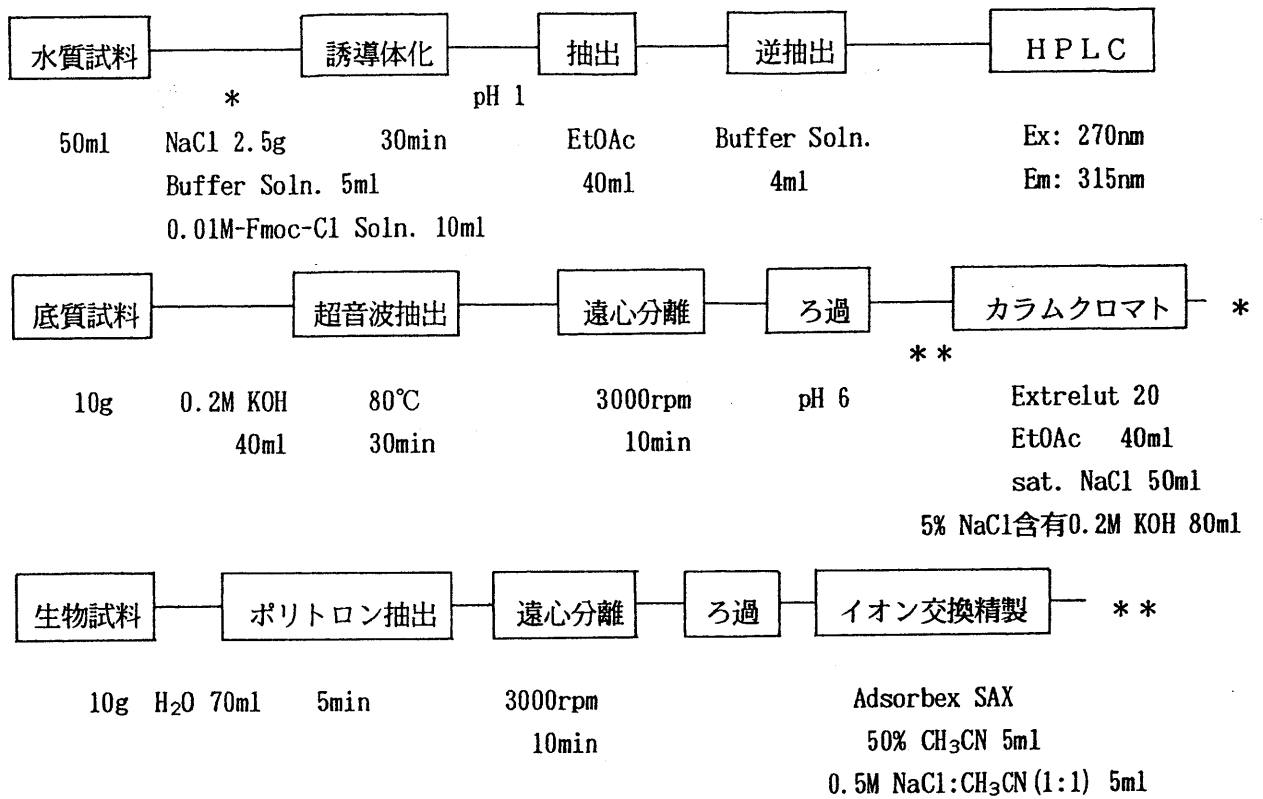
(底質・生物)

	底 質	生 物
検出限界推定値 (μ g/kg)	3.6	12
試料濃度 (μ g/kg)	50	500
分析値 (μ g/kg)	30	375
標準偏差 (δ R)	1.1	31.7
検出限界 (DL)	4.0	380
95%信頼区間	2.6-8.8	240-840

§ 2. 解 説

[分析法]

(フローチャート)



[分析法の検討]

1. 検量線

図 1 に検量線の例を示す。

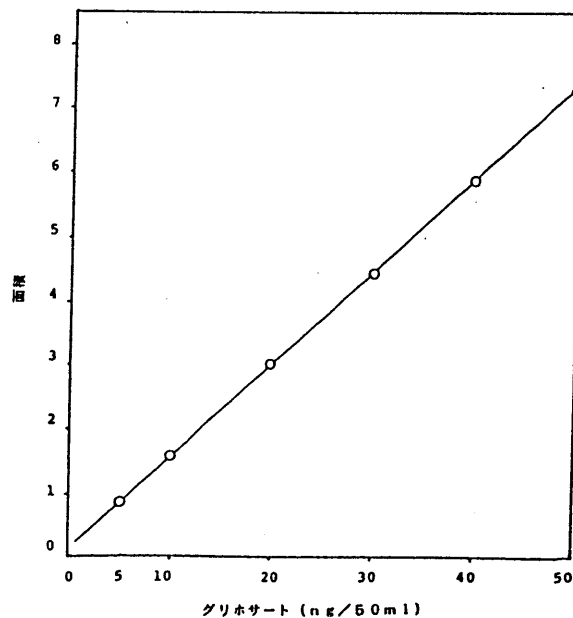


図 1 検量線

2. 低濃度添加回収実験結果

本分析法による回収実験結果を下記に示す。

試料	試料量 (ml, g)	添加量 (μ g)	回収率 (%)	変動係数 (%)
河川水	50	0.05	89.3	7.0
海水	50	0.05	96.6	3.4
底質	10	0.5	60.0	3.5
生物	10	5.0	74.9	8.4

3. 分解性スクリーニング結果

pH	1時間後	5日後	
		暗所	光照射
5	100	100	
7	100	100	100
9	100	100	

(単位 %, 初期濃度 $1\mu\text{g}/\text{ml}$)

4. 抽出溶媒の検討

水試料からグリホサートを溶媒抽出できる適当な条件が見いだせなかったため、誘導体化後溶媒で抽出することにした。

底質試料からの抽出溶媒を選定するため、底質20gにグリホサート $100\mu\text{g}$ を加え、溶媒100mlずつで30分間超音波抽出した結果を下記に示す。

	30℃	80℃
飽和水酸化カルシウム溶液	3.8	
飽和塩基性炭酸マグネシウム溶液	2.9	6.5
0.2M水酸化カリウム溶液	3.5	8.3
0.5M水酸化アンモニウム溶液	2.9	

(単位 %)

グリホサートは底質に強く吸着するため、常温では抽出率は低い、温度を80℃まであげてやることにより80%程度まで回収率を向上できた。

生物からの抽出は一般に水で抽出する方法が採用されており、本法でもこれを採用した。

5. Fmoc-Clによる反応条件の検討

(反応時間について)

グリホサート $1\mu\text{g}$ を含み、pHを9.5に調製した5%塩化ナトリウム溶液50mlに0.01M Fmoc-Cl溶液10mlを加えて反応させた時の反応時間と生成率の関係を検討した結果を図2に示す。この結果から、反応時間を30分とした。

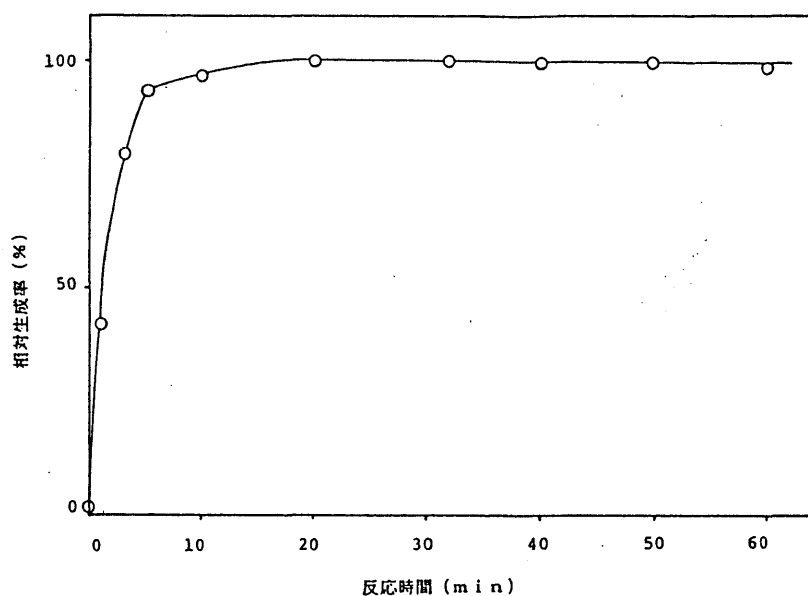


図2 反応時間と生成率の関係

(pHと生成率の関係)

上記の条件でpHを8.0-10.5の範囲で変化させ、反応時間を30分とした場合のpHと生成率の関係を検討した結果を図3に示す。グリホサートはpH9以上ではほぼ一定の生成率が得られたため、本法ではpH9.5を採用した。

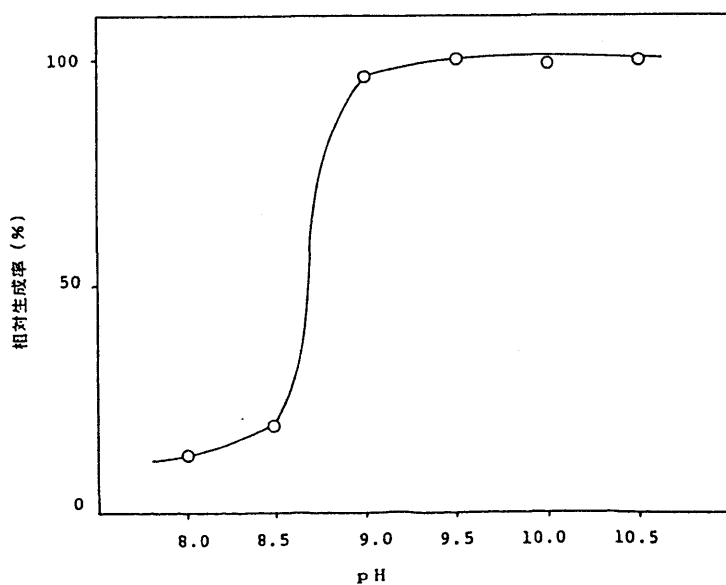


図3 pHと生成率の関係

(塩化ナトリウム濃度と生成率の関係)

上記条件で塩化ナトリウム濃度を0-30%の範囲で変化させ、塩濃度と生成率との関係を検討した結果を図4に示す。塩濃度はこの反応にほとんど影響をあたえなかったため、5%の塩化ナトリウム濃度で反応させることにした。

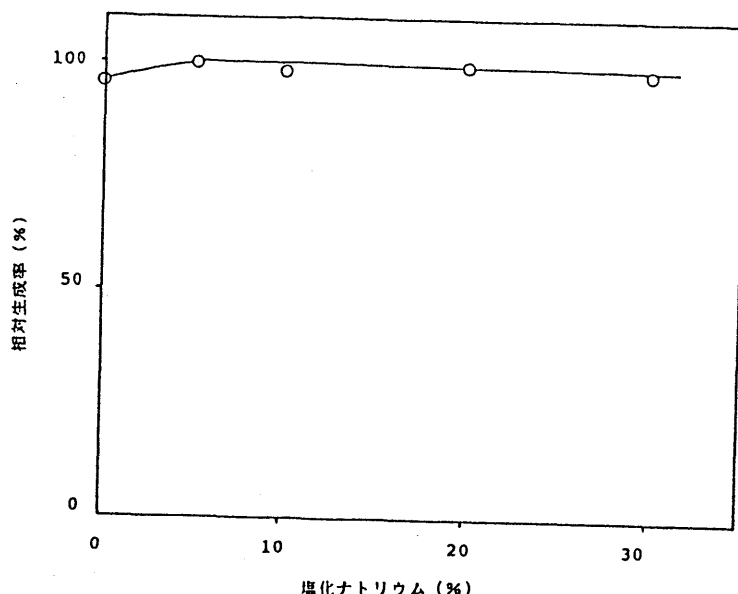


図4 塩化ナトリウム濃度と生成率の関係

その他、反応試薬である0.01M Fmoc-Cl溶液10mlでグリホサート 1mgまでは十分反応した。

6. イオン交換樹脂によるクリンアップ

魚肉を分析する場合、どうしてもイオン交換樹脂によるクリンアップが必要であり、本法ではAdsorbex SAXとBond Elut SAXの2種類のカートリッジを用いて検討した。また、Cl型では溶離しにくいため、1M炭酸水素ナトリウム溶液10mlを流して、炭酸水素型にして用いた。グリホサートをカートリッジに負荷し、50%アセトニトリル溶液5mlで洗浄後、0.5M塩化ナトリウム溶液とアセトニトリルの等容混合液1mlずつで溶出させた時の溶出パターンを図5に示す。

7. Extrelutカラムによるクリンアップ

Extrelutカラムは一般に臨床分析や食品分析に使用されており、カラムの中で液液抽出を行うもので、エマルジョンを作り易い試料に適している。グリホサートは酸性から中性溶液でExtrelutカラムに負荷すると、通常の疎水性溶媒や飽和の塩化ナトリウム溶液では全く溶出しなかったが、アルカリ溶液中で溶出が可能であった。図6はpH6.5に調製した抽出液をExtrelutカラムにのせ、30分間放置後、酢酸エチル50ml、飽和塩化ナトリウム溶液50mlで洗浄し、5%塩化ナトリウム含有0.2M水酸化カリウム溶液で溶出させた時の20mlずつのフラクションをとった結果である。本法では最初の20mlをすて、あとの80mlをとることにした。

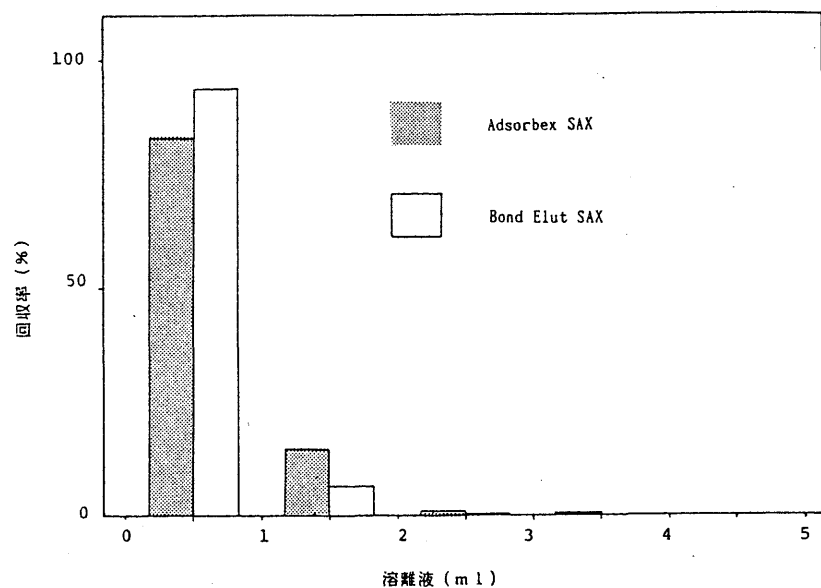


図5 イオン交換カートリッジからの溶出パターン

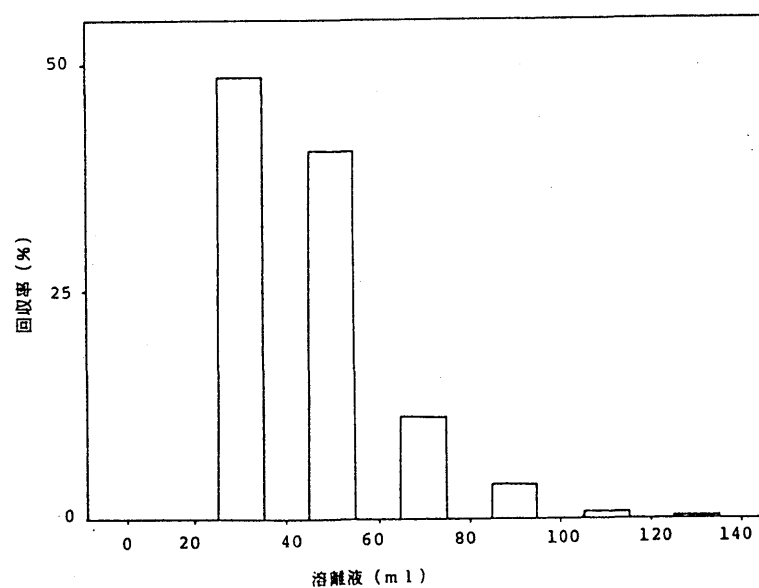


図6 Extrelutからの溶出パターン

8. 妨害物質の検討

代表的なアミノ酸の保持時間を検討した結果を下表に示す。

グリホサート	13.09	L-システイン酸	7.42
L-グルタミン酸	6.24	L-プロリン	4.53
L-アルギン	3.78	L-ヒスチジン	----
L-トリプトファン	----	L-セリン	4.35
L-スレオニン	4.30	L-ロイシン	4.15
L-アラニン	4.31	L-イソロイシン	4.13
AMPA	5.16		

(単位 min)

9. クロマトグラム

図7に標準物質のHPLCクロマトグラムを、図8、9、10に環境試料の測定例を示す。

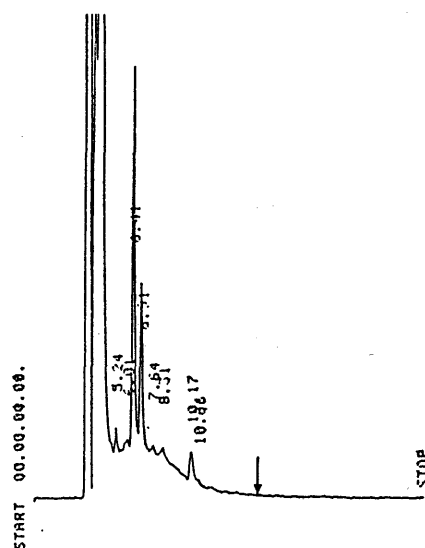
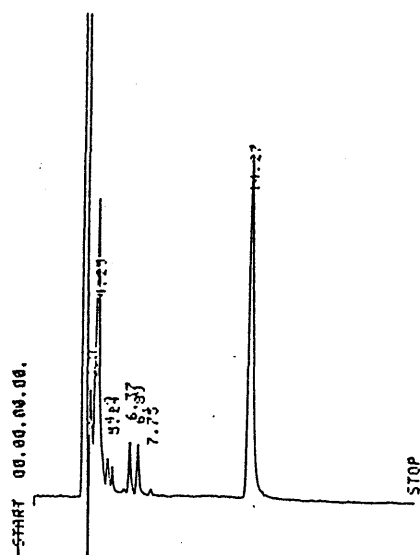


図7 グリホサートのHPLCクロマトグラム 図8 河川水のHPLCクロマトグラム

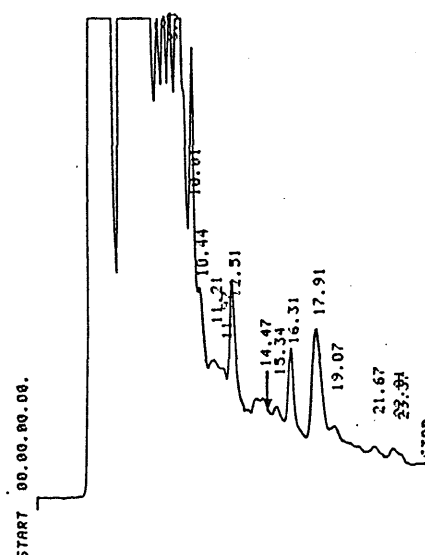
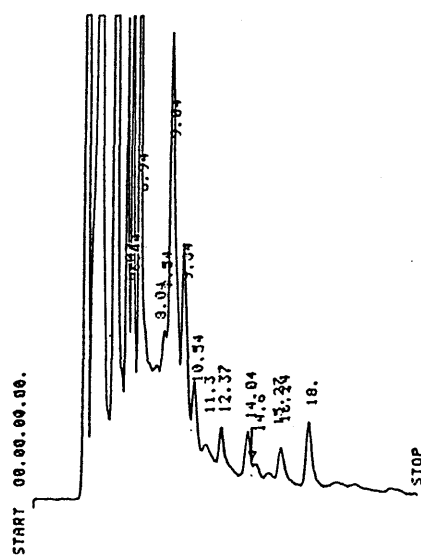


図9 東京湾底泥のHPLCクロマトグラム

図10 ウグイの肉のHPLCクロマトグラム

[評価]

本法により、水質と底質中にppbレベルで存在するグリホサートの定量が可能であるが、生物試料は妨害が多くppbレベルの分析は困難である。

参考文献

- 1) 後藤 真康、加藤 誠哉：残留農業分析法，p. 233-235，ワトサイエンス社(1987)
- 2) 化学工業日報社：11691の化学商品，p. 1410-1411(1991)
- 3) E. Heftmann：Chromatography, 5th edition, B79-B83, Elsevier(1992)
- 4) Moye, H. A., Deyrup, C. L. : J. Agric. Food Chem., 32, 192-195(1984)
- 5) Glass, Robert L. : J. Agric. Food Chem., 31, 280-282(1983)
- 6) Roseboom, H. and Berkhoff, C. J.: Anal Chem. Acta, 135, 373-377(1982)
- 7) Thompson, D. G. et al : J. Assoc. Anal. Chem., 72, 355-360(1989)
- 8) Miles, C. J. et al : J. Assoc. Off. Chem., 69, 458-461(1986)
- 9) Shevchuk, I. A. et al : Zh. Anal. Khim., 42, 328-331(1987)
- 10) Miles, C. J. and Moye, H. A. : J. Agric. Food Chem., 36, 486-491(1988)
- 11) Roy, D. N. and Konar, S. K.: J. Agric. Food Chem., 37, 441-443(1989)
- 12) Gauch, R. et al : Z. Lebensm. Unters. Forsch., 188, 36-38(1989))

担当者：月岡 忠・中山 隆・丸山 正人

分析試料送付方法

【水質試料】 ガラス瓶を試料水で2、3回共洗いした後、ヘッドスペースの残らないように入れ、梱包して送付する。

【底質及び生物試料】 均一化した試料をガラス瓶に入れ、ドライアイスで冷却した状態で梱包して送付する。

なお、使用するガラス瓶等の容器は、洗剤で洗った後、0.1N塩酸で洗浄し精製水で十分すすいでから乾燥させ、さらに少量のアセトンで洗い、アセトンを完全に除去したものをを用いる。

物質名	分析法フローチャート	備考
グリホサート	(水質) <pre> graph LR A[試料] --> B[誘導体化] B --> C[液液抽出] C --> D[液液抽出] D --> E[HPLC] </pre> 50ml NaCl EtOAc Buffer Soln. 0.01M Fmoc-Cl Soln. Buffer soln. (底質) <pre> graph LR A[試料] --> B[超音波抽出] B --> C[遠心分離] C --> D[カラムクロマト Extrelut 20] D --> E[ろ過] E --> F[イオン交換精製] F --> G[ろ過] </pre> 10g 0.2M KOH EtOAc, sat. NaCl 5% NaCl含有0.2M KOH (生物) <pre> graph LR A[試料] --> B[ポリトロン抽出] B --> C[遠心分離] C --> D[ろ過] D --> E[イオン交換精製] E --> F[ろ過] </pre> 10g H₂O 50% CH₃CN 0.5M NaCl: CH₃CN (1:1)	HPLC カラム Nucleosil NH₂, 4.6mm x 25cm, 5.0μm EX:270nm EM:315nm 検出限界 水質: 0.12 μg/l 底質: 4.0 μg/kg 生物: 380 μg/kg