

經濟部



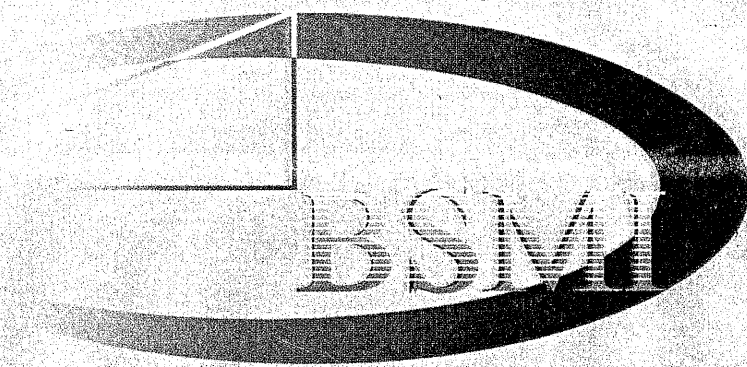
標準與檢驗 月刊

61

第六十一期

工商界必備的參考資料 消費者指南的權威刊物

九十三年元月出版



Bureau of Standards,
Metrology and Inspection

經濟部標準檢驗局 編印

蔬果中殘留嘉磷塞檢測方法一

液相層析儀/管柱後衍生/螢光偵測器法

呂文寶 / 台南分局技正
鄭振發 / 台南分局技士
賴炎樹 / 台南分局課長

一、前言

嘉磷塞 (Glyphosate) 其學名為 N-phosphonometheyl glycine。在商業上為 Kleen-up 及 Roundup 等殺草劑之主要成分，屬於廣效性接觸型殺草劑。使用後，經由植物的葉子吸收，再輸送到根部，進而達到抑制植物中特殊氨基酸合成所需“酶”的合成。其防除效果佳，是相當暢銷的殺草劑，主要用於農業上雜草與蔬菜的控制，因此在地下水及蔬果等上會有殘留之虞。嘉磷塞於土壤中平均半衰期 (half-life) 少於 60 天，其 90% 的嘉磷塞會在 6 個月內被分解成天然界存在之成分。於地下水或飲水中之平均半衰期為 2 到 10 星期，故不會一直持續存在環境中。它若經微生物分解時，主要代謝物為 AMPA (Aminomethyl phosphonic acid)，最終產物是 NH_3 及 CO_2 。目前美國環保局 (USA-EPA) 已有訂定此種殺草劑在穀物及水源的最低容許殘留標準含量。在分析方法上，嘉磷塞已發展出以 HPLC 進行定量檢測，有美國 EPA 第 547 方法，其與 1990 年 Bio-Rad 公司實驗室所發展之檢測方法相同，另外 Pickering 公司實驗室亦開發出類似的試驗方法。經同仁研究比較並針對本課(第三課)儀器現況，分局經費可支援之額度，及 HPLC 需要特有之層析管柱單價及請購所需時間 (需向美國訂購) 等問題，又加上殘留級藥品及耗材成本與品質之考量上，並為了合乎規範、迅速與經濟之需求。因此，本課歸納前述 EPA 等檢測方法之利弊，採用取長補短的方式，檢液經層析管柱分離後，以 NaOCl 取代 $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 進行衍生化反應，接以螢

光偵檢器檢測，其檢測感度可達 0.05ppm。

二、方法概要

蔬果加氯仿、稀鹽酸攪拌，離心、淨化（用 chelex 100 及 AG 1-X8 樹脂交換）過濾後，直接注入高效能液相層析儀（HPLC）中，於 55°C 下，經陽離子交換管柱及等位沖提分離後，嘉磷塞（Glyphosate）被次氯酸鈉氧化成甘胺酸（glycine），再與鄰苯二甲醛（OPA）和乙硫醇（2-mercaptoethanol）在 36°C 反應生成螢光物質（isoindile），用螢光偵測器在 340nm 之激發波長，455nm 之發射波長測其螢光強度，以求得嘉磷塞之濃度。

三、適用範圍

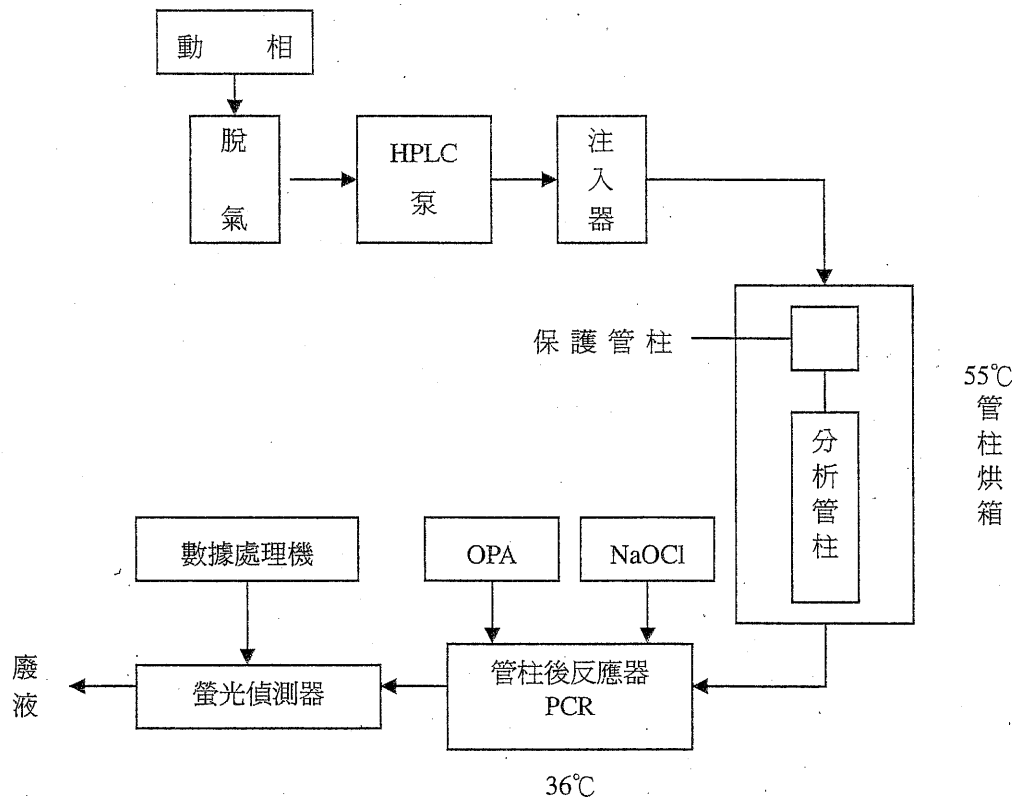
本方法適用於蔬果類中嘉磷塞之檢測，樣品 5~30g 可測至 0.05ppm，甚至樣品在 2~5g 之間也可達 0.05ppm。

四、儀器及設備

(一)儀器：

1. 分析儀器：高效能液相層析儀，利用本課目前檢驗胺基甲酸鹽農藥之島津（SHIMADZU）係列儀器如圖一能注入 20 μ L 量和在 0.4mL/min 等位沖提之泵。

圖一 液相層析儀／管柱後衍生器／螢光偵測器系統圖



2. 分析管柱：陽離子 (K⁺) 交換管柱，15 cm (長) × 4 mm (內徑) (Pickering Laboratories 或同級品)，亦可使用其他管柱如 Bio-Rad 之 Aminex A-9 之類。
3. 保護管柱：和分析管柱類似組成之管柱 2 cm (長) × 3 mm (內徑)。
4. 管柱烘箱：能保持在 55°C 恆溫或同級品。
5. 管柱後反應器 (post column reactor PCR)：能將試劑混至動相中，可以 0.3 mL/min 之流速泵入每一試劑，混合座架：1 至 2 mL 的延滯迴路，定溫於 36°C，鐵氟龍 (Teflon) 管路。
6. 螢光偵測器：能提供 340nm 激發波長，大於 455nm 發射波長。
7. 數據系統：可記錄偵測器之應答的長條紙記錄器，並能計算滯留時間和層析峰面積。

(二)設備

1. 攪拌器
2. 離心機
3. 分析天平：可精稱至 0.0001g
4. pH 計：精確至 0.01 單位
5. 濃縮瓶：250mL
6. 自動樣品注入器用瓶：附鐵氟龍墊片螺旋瓶蓋之 2mL 玻璃瓶。
7. 定量瓶：100mL
8. 刻度試管：10mL
9. 塑膠注射筒：3mL
10. 過濾膜：0.45 μ m

五、標準品與試劑

(一)標準溶液 (Standard Solution)

精確稱取嘉磷塞標準品 50mg 溶於蒸餾水使成 100mL，再以蒸餾水稀釋至 0.5~4 μ g/mL，供作標準溶液。

(二)試劑

1. 濃磷酸：分析試藥級
 2. 磷酸二氫鉀：分析試藥級
 3. Chelex 100 樹脂鈉離子：分析試藥級
- 3.1. 準備 chelex100 樹脂以鐵離子之形式：

以去離子水裝滿，每瓶沖洗 3 次，至樹脂安定後輕輕倒出，貯存在去離子水中直至使用。

- 3.2. 製備出由鈉形式樹脂吸附 Fe⁺³ chelex100 樹脂：

每 1 磅瓶裝 chelex100 樹脂分成兩瓶，每瓶用 500mL 0.05N HCl 洗 5 次，直至洗出液 pH 是酸性 (pH 2)，然後混和每瓶再以 0.01N FeCl₃ 溶液洗滌 2 次，亦使其溶液是 pH 2.0，再把二瓶樹脂裝到大的玻璃管柱中，以 2L 0.01N HCl 溶液及 1L 0.1N FeCl₃ 溶液沖洗，再用 0.01N HCl 溶液沖洗，直至 FeCl₃ 色的水不再出現，保存於去

離子水中直至使用。

4. AGI-X8 樹脂：分析試藥級

4.1. 裝備 AGI-X8 樹脂：

把 1 磅裝的 AGI-X8 樹脂分成兩瓶，每瓶用 500mL 去離子水沖洗 3 次，待樹脂安定後，去除掉粉塵物，貯存在去離子水中保存至使用。

5. 次氯酸鈉(12%)：分析試藥級

6. 硼酸：分析試藥級

7. 磷苯二甲醛 (OPA)：分析試藥級

8. 乙硫醇 (2-mercaptoethanol)：分析試藥級

9. 氫氧化鉀：分析試藥級

10. 氫氧化鈉：分析試藥級

11. 氯化鈉：分析試藥級

12. HPLC 移動相

12.1. 試劑水：在全玻璃系統蒸餾之溶劑，或是由純水製造系統製備不含有機物之去離子水。

12.2. 移動相：用 960mL 試劑水配製 0.005M 磷酸二氫鉀 (0.68g) 溶液，以濃磷酸調整 pH 至 2.0，用 0.2 μ m 濾膜過濾，使用前通氮氣以排氣。

13. 管柱後衍生反應用溶液：

13.1. 氧化液：

(1) 5%次氯酸鈉溶液：用 12%NaOCl 去配製

(2) 溶解 1.36g 磷酸二氫鉀 11.6g 氯化鈉及 0.4g 氫氧化鈉於試劑水中，再加入上述之次氯酸鈉溶液 200 μ L，用試劑水定容至 1000mL，用 0.2 μ m 濾膜過濾，使用前通氮氣以排氣。最好每天配製此溶液。注意用 NaOH 調至 pH 11.6。

13.2. OPA 反應液：

溶解 100g 硼酸及 72g 氫氧化鉀於 700mL 去離子水中充份混合後，再加入溶於 10mL 甲醇之 OPA 0.8g 和 2mL 之乙硫醇，混合後定容至 1000mL，再以 0.2 μ m 濾膜過濾並予以排氣。除非將此

反應液和大氣中之氧隔離，否則須每天配製。此反應液在大氣環境下儲存於玻璃瓶中，在 4°C 能保存長至 2 星期，且不會有顯著之背景螢光訊號的產生；在氮氣環境下可長時間保存。用 KOH 調 pH 至 10.4 ± 0.2 。

六、檢液之調製

(一) 萃取：

稱 15g 之樣品（可在 2~30g 之間依不同樣品而定），置入 400mL 的攪拌器中加入 50mL 之氯仿，再加入 150mL 0.1N HCl 溶液，攪拌 1 分鐘，倒入 250mL 離心瓶中（必要時離心之），倒出水層 100mL，移至燒杯中，再加入 250mL 去離子水稀釋，調整樣品溶液 pH 至 2.0 ± 0.4 （以 HCl 或 NaOH 溶液調整之），樣品如為大豆、堅果仁等再加入 250mL 0.01N HCl 溶液以防止絮狀物之發生，供作淨化用。

(二) 淨化：

取 2.2 cm OD×25 cm 之玻璃管柱加 5~10mL 之去離子水，裝入 15mL 之 chelex100 (Fe^{3+}) 樹脂，將萃取溶液倒入玻璃管柱中，以每秒 1 滴之速度流出，再以 50mL 去離子水清洗玻璃壁，然後再加入 100mL 0.2N HCl 溶液清洗樹脂，以最大流量讓其流出，拋棄所有流出液，關緊栓塞加 3mL 6N HCl 溶液，再調流速為 1 滴/2~3 秒，再加 4mL 6N HCl 溶液，捨棄 3~4mL 之沖出液，再加入 3×5mL 之 6N HCl 溶液，收集 3×5mL 之 6N HCl 溶液於 25mL 之刻度量筒內，再加 10mL conc. HCl 溶液入量筒讓其自行混合準備進行陰離子交換管柱。以玻璃管柱 (1.7 cm OD×22 cm) 加入 5mL 去離子水和約 7mL 的 AGI-X8 陰離子交換樹脂，先以 3×5mL 6N HCl 溶液清洗捨棄之，再將經 chelex100 樹脂處理後之溶液倒入，並以 250mL 濃縮瓶收集之，再以 6N HCl 2mL 清洗量筒倒入管柱中再加入 8mL 6N HCl 溶液，合併收集液以減壓濃縮 50~60°C，加以濃縮蒸乾，殘留物以 2mL 或 3mL 的去離子水稀釋溶解定容，以

0.45 μ m 過濾膜過濾，供作 HPLC 分析用檢液。

七、鑑別試驗及含量測定

精確量取檢液及標準溶液各 20 μ L，分別注入 HPLC 中，就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間比較鑑別之，並依標準曲線，求出檢體中嘉磷塞之含量 (ppm)：

$$\text{檢體中嘉磷塞之含量 (ppm)} = \frac{C \times V}{M} \times \frac{150}{100}$$

C ：由嘉磷塞標準曲線或波峰面積求得檢液中嘉磷塞之濃度 (μ g/ML)

V ：檢體最後經定容之體積 (mL)

M ：取樣分析檢體之重量 (g)

八、添加回收試驗

取均質蘋果檢體 30g，添加嘉磷塞標準溶液 6 μ g，攪拌均勻，靜置 1 小時，每一添加量作三重覆，同時作空白試驗，均依前述方法，調製成檢液，以液相層析儀檢測並算出回收率。

九、結果與討論

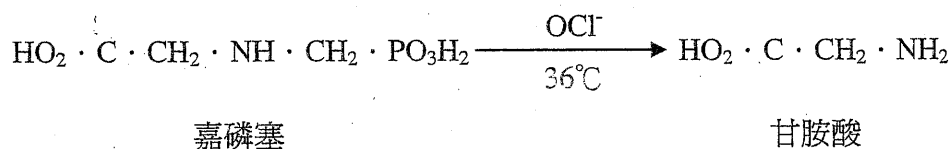
- (一) 嘉磷塞標準溶液以液相層析儀螢光檢測器可以測定出來，如圖二及標準曲線如圖三。
- (二) 管柱後衍生溶液以 NaOCl 取代 $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 以防 Ca^{++} 產生沈澱，但是此試液最好採新鮮配製。
- (三) 移動相之 Buffer solution，加裝攪拌子持續進行攪拌，可使 Retention time 更加穩定。
- (四) 以蘋果當作空白檢體及添加回收試驗如圖四、圖五，結果回收率為 83.2% 標準偏差 4.12%。

- (五)若嘉磷塞 peak 被樣品 cover 時可改變移動相 pH (1.8~2.4 之間), 及管柱烘箱之溫度 45~55°C。
- (六)衛生署已公告蔬果中嘉磷塞最低安全容許量為 0.1ppm, 本試驗之檢測感度可達 0.05ppm, 因此可作為蔬果中嘉磷塞之檢測。

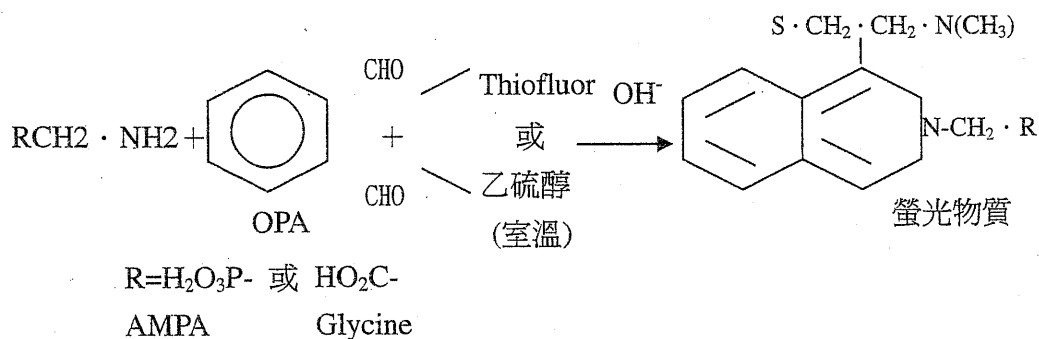
分析原理及圖解

(一)以 HPLC-OPA post-column reactor 方法分析嘉磷塞之原理如下:

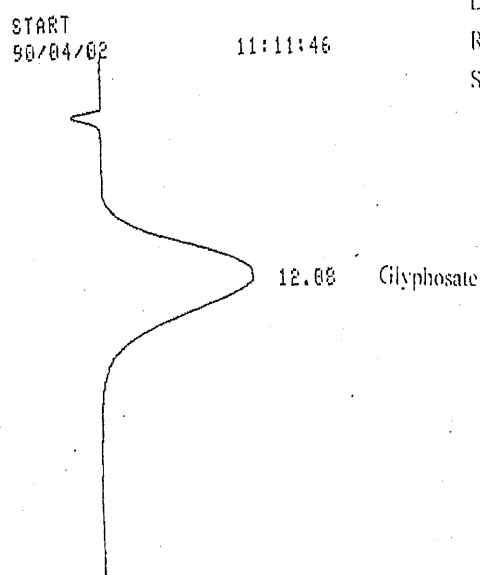
步驟一: 氧化反應 (Oxidation reaction)



步驟二: 衍生化反應 (Derivatization)



Column: Glyphosate analytical column
 Mobile phase: 0.005M KH₂PO₄ Buffer pH=2.0
 Flow Rate: 0.4mL/min
 Detector: Fluorescence EX340nm EM455nm
 Reactor: NaOClOPA
 Sample: Glyphosate 2µg/mL

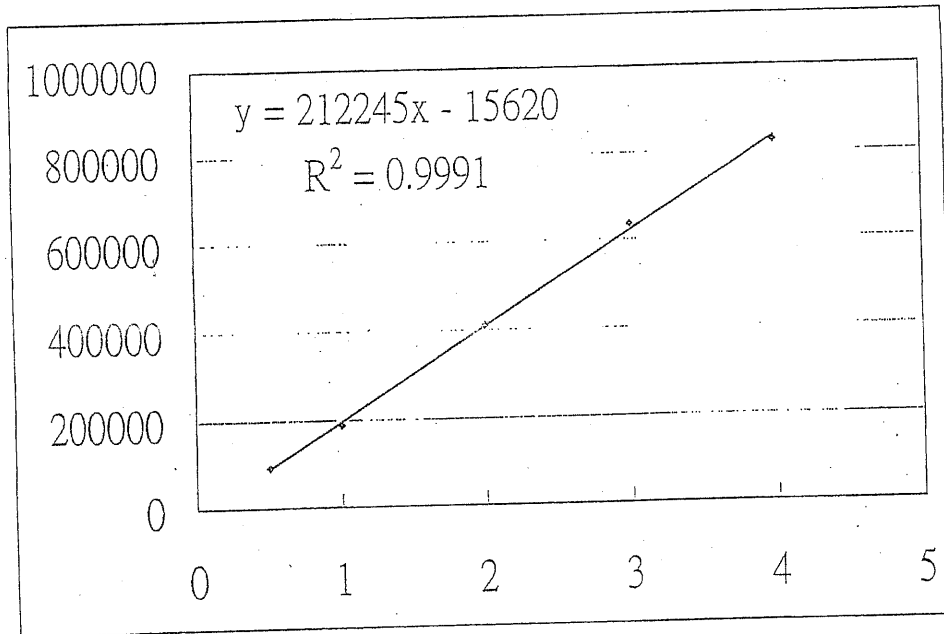


CHROMATOPAC C-R6A
 SAMPLE NO 0
 REPORT NO 246

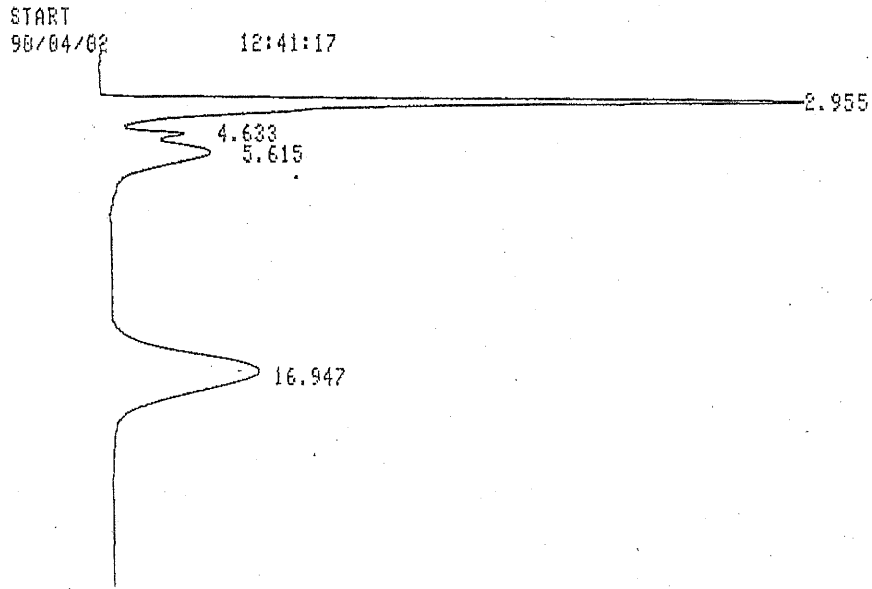
FILE 0
 METHOD 41

PKNO	TIME	AREA	NK	IDNO	CONC	NAME
1	12.08	410336			100	
TOTAL		410336			100	

圖二 嘉磷塞標準品之液相層析圖



圖三 嘉磷塞標準溶液之標準曲線(µg/mL)

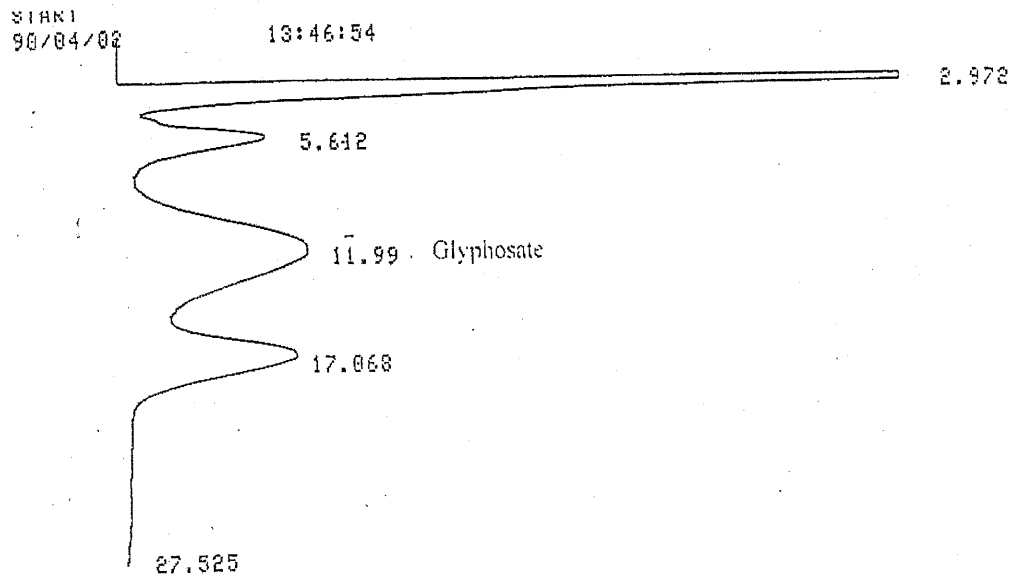


CHROMATOPAC C-R6A FILE 0
 SAMPLE NO 0 METHOD 41
 REPORT NO 249

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2.955	259515			48.6343	
2	4.633	8149			1.5272	
3	5.615	42800			8.0209	
4	16.947	223141			41.8176	
TOTAL		533605			100	

C:\STANDARD\221-25

圖四 蘋果空白檢體之液相層析圖



CHROMATOPAC C-R6A
SAMPLE NO 0
REPORT NO 251

FILE 0
METHOD 41

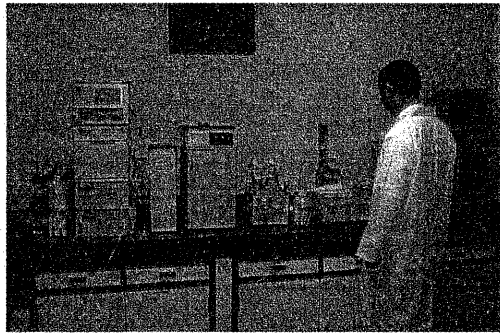
PKNO	TIME	AREA	HK	IDNO	CONC	NAME
1	2.972	524638			46.9395	
2	5.612	98158			8.7822	
3	11.99	317566			28.4127	
4	17.068	177328			15.8655	
TOTAL		1117689			100	

圖五 嘉磷塞添加 0.2ppm 於蘋果之液相層析圖

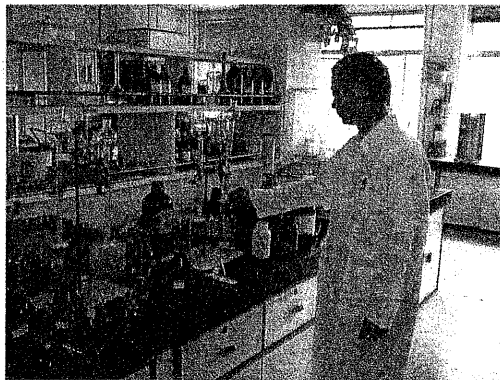
(二)樣品處理中遇到高背景干擾 (High background Interference) 時必需經過 Chelex100 (陽離子) 及 AGI-X8 (陰離子) 樹脂交換純化之其原理如下：

嘉磷塞從不同的介質中，經過以 Fe^{+3} 之型式下的 chelex100 樹脂上，被單獨溶離出來，再用 Hcl 析出而 Fe^{+3} 離子使用陰離子交換樹脂去除掉，然後濃縮至乾，以除 Hcl，樣品經純化、濃縮、定容、過濾才能上機，否則會產生許多不明波峰，徒增鑑定困擾。

(三)照片 (數位相機拍照)



本課用分析 Carbamate 之現有儀器 (HPLC-OPA system) 進行本次認養農藥嘉磷塞之研發工作。



研發人員進行配藥及樣品淨化 (Clean-up) 處理。

📖 參考文獻

1. (86)環署檢字第 53051 號 NIEA W655.50B 水中嘉磷塞檢測方法—液相層析儀/管柱後衍生/螢光偵測器法。
2. 1990 Bio-Rad Laboratories Bulletin 1591 Glyphosate Analysis.
3. 1994 Jerry R.Steinmets Analytical Method for Glyphosate and AMPA in Raw Agricultural Commodities and Their Processed Fraction.
4. Pickering Laboratories Pesticide analysis glyphosate analysis system.
5. 中國國家標準總號 13570-2 類號 N6276-2 食品中殘留農藥檢驗方法—多重殘留分析法(II)。