高速液体クロマトグラフィーによる作物中の除草剤 メトキシフェノンの残留分析法

永吉 営子, 野川 敬子, 志賀 直史

俣野 修身, 後藤 真康

残留農薬研究所

(昭和55年5月20日受理)

Determination of Methoxyphenone Residue in Crops by High-Performance Liquid Chromatography

Eiko NAGAYOSHI, Keiko NOGAWA, Naofumi SHIGA,

Osami MATANO and Shinko GOTO

Institute of Environmental Toxicology, Kodaira, Tokyo 187, Japan

Residues of methoxyphenone (NK-049) in watermelon, tomato, carrot, rice grain and rice straw were extracted with acetone and partitioned into chloroform from an aqueous solution after distillation of acetone. Chloroform was distilled and the residues were cleaned up by two steps of column chromatography. Ten gram of silica gel was used as adsorbent of the first chromatography and methoxyphenone was eluted with 100 ml of benzene containing 5% of ethyl acetate after washing with 60 ml of benzene. On the second chromatography, 2 g of alumina containing 0.1 ml of 50% silver nitrate aqueous solution was added to the column of 10 g of Florisil. Methoxyphenone was eluted with 100 ml of benzene containing 5% of ethyl ether after washing with 100 ml of benzene. Then the residue was dissolved in 1 ml of methanol and 80 μ l of the solution was injected into a high performance liquid chromatograph fitted with a stainless steel column (4.6 mm $\times$ 25 cm) packed with Jasco, SC-02. The column was eluted with methanol and water (75+25) at a flow rate of 2 ml/min. The detector was UVIDE C-100 and the wavelength was 295 nm. The liquid chromatogram was much clearer than the gas chromatogram with ECD and no interfering peaks were observed in any samples. The lower limits of detection were 0.005 ppm (watermelon, tomato, carrot, rice grain) and 0.03 ppm (rice straw), so this method was as sensitive as ECD gas chromatography. The average recoveries of methoxyphenone were 88-93%.

緒 言

メトキシフェノン (3, 3'-dimethyl-4-methoxybenzo-phenone, NK-049) は日本化薬 (株) が開発した除草剤である。本化合物の残留分析は従来 ECD ガスクロマトグラフによって行なわれてきた^{1,2)}。しかし、本化合物は ECD に感応する基をもたないため、ECD に対する感度は低く、最小検出量は 0.5 ng 程度である。したがって分析にあたって高倍率に濃縮するため天然物による妨害を受けやすい。さらに本化合物は天然成分の混在によりカラムクロマトグラフィーにおける溶出位置が大きく変

化したり、ガスクロマトグラフィーにおける感度が著しく低下する性質を有し、分析上、トラブルが少なくなかった。小林ら³⁾は先に本化合物をマスフラグメントグラフィーによって定量して良好な結果をえているが、機器の点で汎用性に乏しい。著者らはメトキシフェノンが強い紫外部吸収を有することに着目し、高速液体クロマトグラフィーを用いてスイカ・トマト・ニンジン・玄米・稲わら中のメトキシフェノンの定量を試みたところ満足すべき結果を得たので報告する。

分 析 法

1. 試薬および機器

アセトン, クロロホルム, ベンゼン, 酢酸エチル, エーテル, アセトニトリル: 特級品をガラス器具で蒸留

メタノール: 液体クロマトグラフ用

シリカゲル: メルク社製, Kieselgel 60, 70~230 メッシュ, ASTM

フロリジル: フロリジン社製, 100~200 メッシュ, 130°C で一夜活性化

アルミナ: メルク社製 (中性 Art. 7077)

メトキシフェノン (NK-049) 純品: mp 62-62.5°C, 日本化薬 (株) 提供

その他の試薬: 特級

クロマト管: 内径 1.5 cm ガラス製

高速液体クロマトグラフ: TRIROTAR (JASCO)

同検出器: UVIDEC-100

2. 高速液体クロマトグラフィーの条件

分離管: 内径 4.6 mm, 長さ 25 cm ステンレス製

充てん剤: SC-02 (JASCO) 逆相系

溶離液: メタノール+水 (75+25, v/v), 流速 2 ml/min, 液圧 80~100 kg/cm²

検出波長: 295 nm

感度: 0.64 (AUFS)

記録紙速度: 5 mm/min

3. 検量線の作成

メトキシフェノンの純品をメタノールに溶かして, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 ppm 溶液を調製する. 各溶液の 80 μ l を前記条件の高速液体クロマトグラフに注入してピークの高さを測定し検量線を作成する.

4. 分析操作

1) スイカ・トマト・ニンジン・玄米

粉碎または均一化した試料 50 g にアセトン 150 ml を加え (玄米はさらに水 50 ml を加える) 30 分間, 室温で振とうしたのち減圧濾過し, 残渣をアセトン 80 ml で洗って濾過する. 濾液を合し, アセトンを減圧留去 (浴温 40°C 以下) する. 残液に飽和食塩水 150 ml を加えクロロホルム 100 ml および 50 ml で 2 回振とう分液する. クロロホルム層を合し無水硫酸ナトリウムで脱水後, クロロホルムを減圧留去する. Kieselgel 60 10 g をベンゼンで充てんしたクロマト管に試料をベンゼン 5 ml ずつ 2 回で移す. ベンゼンを流して流出液 60 ml を捨て, 次に 5% 酢酸エチル含有ベンゼン (v/v) 100 ml を流下してメトキシフェノンを溶出し, 溶媒を減圧留去

する. クロマト管にフロリジル 10 g をベンゼンで充てんし, さらに 50% 硝酸銀溶液 1 ml をアルミナ 20 g と混合したもの 2 g を重ねる. 試料をベンゼン 5 ml ずつ 2 回でクロマト管に移し, ベンゼンを流して流出液 100 ml を捨てる. 次に 5% エーテル含有ベンゼン (v/v) 100 ml を流下してメトキシフェノンを溶出し, 溶媒を減圧留去する. 残留物をメタノール 1 ml に溶かしその 80 μ l を前記条件の高速液体クロマトグラフィーに供する.

2) 稲 わ ら

試料 10 g を玄米と同様にクロロホルムで抽出後, クロロホルムを減圧留去し, 残渣を *n*-ヘキサン 50 ml に溶かしアセトニトリル 50 ml ずつで 2 回振とう分液する. アセトニトリルを減圧留去し残渣を玄米と同様のカラムクロマトグラフィーを行なったのち高速液体クロマトグラフィーに供する.

実 験

1. 液体クロマトグラフィーの条件

メトキシフェノンの紫外外部吸収は Fig. 1 に示すとおりで, 296 nm に極大を有する. 分離管充てん剤として, JASCO の SS-05 (順相系) SN-01, SC-02 (逆相系) HP-01 (逆相系) を検討したがピークの形状および感度の点で SC-02 が最良であった. またこの充てん剤を用いたときの検出波長は 295 nm でピークの形状・感度とも良好であったので 295 nm を検出波長とした. 溶離液としてメタノール, メタノール+水, メタノール+水+緩衝液の各種を検討したがピークの形状・感度の面ではどの溶離液もほぼ同じであったが, 混在物との分離の点でメタノール+水 (75+25, v/v) が最も良好であった. この条件でのメトキシフェノンの保持時間は 7.4 分

Fig. 1 Absorbance of methoxyphenone (NK-049).

Sorbent: Methanol.

Table 1 Lower limits of detection.

	Watermelon	Tomato	Carrot	Rice grain	Rice straw
Minimum detectable amount (ng)	20	20	20	20	20
Weight of sample (g)	50	50	50	50	10
Volume of sample solution (ml)	1	1	1	1	1
Volume of injected solution (μ l)	80	80	80	80	80
Lower limit of detection (ppm)	0.005	0.005	0.005	0.005	0.03

Table 2 Results of recovery tests.

	Added amount (ppm)	Recovery (%)
Watermelon	1.0	93 $\pm$ 0
Tomato	1.0	90 $\pm$ 0.4
Carrot	1.0	90 $\pm$ 0.2
Rice grain	1.0	88 $\pm$ 2
Rice straw	1.0	88 $\pm$ 1

Fig. 2 Liquid chromatograms of crop extracts. A: control sample, B: fortified 1 ppm, C: fortified 0.005 ppm.

である。

2. クリーンアップ

混在物の除去のためシリカゲルおよびフロリジルカラムクロマトグラフィーを行なったが、硝酸銀添加アルミ

Fig. 3 Gas chromatograms of crop extracts. Minimum detectable amount: 0.5 ng, Volume of sample solution: 1 ml, Volume of injected solution: 2 μ l, Lower limit of detection: 0.005 ppm.

ナを重ねたフロリジルカラムクロマトグラフィーを行なわないと混在物が完全に除去できなかった。

3. 回収率その他

メトキシフェノンを高速液体クロマトグラフに注入してピークの高さを測定して作成した検量線は 40 ng~400 ng において原点を通る直線となった。メトキシフェノン 20 ng を注入すると明瞭なピークが認められるのでこれを最小検出量とした。これより算出した検出限界は Table 1 に示すようにスイカ・トマト・ニンジン・玄米では 0.005 ppm, 稲わらでは 0.03 ppm で ECD ガスクロマトグラフィーに劣らない感度で分析が可能である。また Fig. 2 に示すように検出限界の添加回収も十分測定可能であり, ECD ガスクロマトグラフィーにおりみられる感度の低下もみられないので十分に残留分析に応用できる。また, これらの試料にメトキシフェノンを添加して回収率を測定した結果は Table 2 のように良

Table 3 GC operating conditions.

Instrument	
Yanaco G-1800 ECD (^{63}Ni) glass (1 m $\times$ 2 mm i.d.), packed with 5% OV-225 on Gas Chrom Q (60-80 mesh)	
Temperature	
Column	200°C
Injection	270°C
Detector	270°C
Carrier gas	
Nitrogen	0.8 kg/cm ²
Chart speed	
10 mm/min	

好な結果が得られた。なお Fig. 3 にスイカおよびニンジンの試料の無処理区を ECD ガスクロマトグラフに注入したときのガスクロマトグラムを示した。ECD の操作条件は Table 3 のとおりである。図から明らかなようにこの程度のクリンアップでは ECD ガスクロマトグラ

フィーではなお多くの妨害ピークがあり、0.005 ppm での検出は不可能でさらにクリンアップを必要とする。

要 約

スイカ・トマト・ニンジン・玄米・稲わら中のメトキシフェノンをアセトンで抽出し、シリカゲルカラムおよび 50% 硝酸銀溶液+アルミナ (1+20) を重ねたフロリジルカラムクロマトグラフィーで精製したのち、295 nm を検出波長とする高速液体クロマトグラフィーで定量することを試みた。検出限界はスイカ・トマト・ニンジン・玄米で 0.005 ppm, 稲わらで 0.03 ppm, 回収率は 88% 以上であった。

引 用 文 献

- 1) 伊沢岳男・浅香四郎: 農薬誌 **4**, 61 (1979)
- 2) 環境庁告示 第 60 号 (昭和 54 年 11 月 15 日)
- 3) H. Kobayashi, O. Matano & S. Goto: *J. Pesticide Sci.* **5**, 89 (1980)