短 報

高速液体クロマトグラフィーによる ベンゾメートの残留分析法

小野 成男, 遠山 典宏

日本曹達(株)ファインケミカル研究所

(昭和55年6月26日受理)

Residue Analysis of Benzomate by High Performance Liquid Chromatography

Shigeo ONO and Norihiro TOYAMA

*Fine Chemicals Research Laboratory, Nippon Soda Co., Ltd.,
Takada, Odawara, Kanagawa 250-02, Japan*

The residue analysis of benzomate in orange and apple was investigated. Benzomate in samples was extracted with methanol and reextracted with methylene chloride. The extract was evaporated under a reduced pressure, diluted with acetonitrile and then washed with *n*-hexane. The acetonitrile phase was evaporated to dryness. The residue was dissolved in a small portion of methylene chloride and then streaked on a *tlc* plate (Merck Art. 5554). Benzomate on the plate was eluted with methanol after developing with methylene chloride. After evaporating the solvent, the residue was dissolved in 1 ml of acetonitrile and then 10 μ l of the solution was injected into a high performance liquid chromatograph fitted with a column (ϕ 4.6 mm $\times$ 25 cm) packed with Zorbax C8. The column was eluted with an acetonitrile and water mixture (8 : 2, v/v) at a flow rate of 1 ml/min. The absorbance was monitored at 254 nm with a 8 μ l flow cell. The limit of the detection using 50 g of sample was 0.04 ppm and recovery was about 80%.

緒 言

カンキツ類およびリンゴの殺ダニ剤として広範に使用されているベンゾメート (シトラゾン®)¹⁾の残留分析法としては、その有効成分 (3-chloro- α -ethoxyimino-2,6-dimethoxybenzyl benzoate) を臭化水素酸でフェノール性化合物に分解し、アゾカップリングさせて比色定量する方法をすでに発表し²⁾、これが一部改良されて環境庁告示の検査方法として発表³⁾されている。しかしこの方法は操作が繁雑であったので、著者は高速液体クロマトグラフを用いてリンゴおよびカンキツ類中のベンゾメートの残留分析を検討し、実用性のある方法を得た。

分 析 法

1. 試薬および機器

メタノール, *n*-ヘキサン, アセトニトリル: 特級試薬をそのまま使用

塩化メチレン: 抽出溶媒の場合は特級試薬をそのまま使用し, 薄層クロマトグラフィーの場合は安定剤 (メタノール) の添加していないものを使用

ベンゾメート純品: mp 71.6~72.7°C

高速液体クロマトグラフ: 島津 LC-3A

ホモジナイザー: ポリトロン, スイスキネマチカ社製

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

充填剤: Zorbax C8

溶離液: アセトニトリル+水 (8+2, v)

流速: 1 ml/min

検出器: 紫外線検出器 (254 nm, セル容量 8 μ l)

記録紙速度: 5 mm/min

3. 検量線の作成

500 ppm のベンゾメート塩化メチレン溶液を調製しこの溶液 1, 2, 3, 4 ml をそれぞれ 10 ml のメスフラスコ中に採取し、塩化メチレンで定容とする。この溶液 100 μ l を薄層プレート (シリカゲルアルミシート, 20 cm $\times$ 20 cm, メルク製 Art. 5554) に塗布し、塩化メチレンを溶媒として約 12~13 cm 展開する。UV ランプ (254 nm) で確認したベンゾメートのバンドを切り取り、15 ml の共栓試験管に入れメタノール 10 ml 中に浸漬し 10 分間放置する。薄層切片を取り出し、少量のメタノールで洗い、抽出液に合わせる。メタノール抽出液を 50 ml ナシ形フラスコ中に入れ、減圧濃縮し乾固する。乾固物を正確にアセトニトリル 1.0 ml に溶解しこの液 10 μ l を高速液体クロマトグラフに注入する。ベンゾメートのピーク高さを縦軸に、重量を横軸にとり検量線を作成する。

4. 分析操作

細切りした試料 (みかん果皮 25 g, みかん果肉 50 g, りんご 50 g) を秤り取り、メタノール 100 ml を加えてポリトロンホモジナイザーで 1 分間磨砕する。内容物を吸引濾過し残渣を 50 ml のメタノールで洗浄、濾過する。濾液を合わせ、水 150 ml, 塩化ナトリウム 5 g を加え攪拌後、数分間放置する。溶液を遠心分離し、油状分を濾別する。濾液に塩化メチレン 100 ml を加えて 5 分間振とうし、ベンゾメートを抽出する。この抽出操作を再度行なう。塩化メチレン層を合わせて液相分離濾紙を通して脱水し、塩化メチレンを減圧留去する。残渣をアセトニトリル 50 ml に溶解し、*n*-ヘキサン 25 ml で 1 分間振とうし *n*-ヘキサン層は捨てる。アセトニトリル層に水 10 ml を加え、*n*-ヘキサン 25 ml で軽く 10~20 秒ふりまぜて洗浄し、ヘキサン層はすてる。アセトニトリル層に塩化メチレン 50 ml を加えて 5 分間振とうする。分離した水を分液し、アセトニトリル・塩化メチレン層を脱水したのち、溶媒を減圧留去する。残渣を少量の塩化メチレンに溶解して全量を薄層プレートに塗布する。以下検量線の作成方法に従って操作し、検量線からベンゾメートの量を求める。

実 験

1. クリンアップ条件

環境庁告示の方法は液液分配および3回のカラムクロ

マトグラフィーにより抽出液のクリンアップを行っており、繁雑であるのでこの点を改良し、液液分配と薄層クロマトグラフィーによるクリンアップを検討した。従来の液液分配はアセトニトリルを水で希釈し、*n*-ヘキサンに転溶する方法を採用しているが、この方法ではベンゾメートがヘキサン層に移りにくいことと、かなりの植物成分が同時にヘキサン層に移るため、有効なクリンアップ法とは言いにくい。逆にアセトニトリルにわずかに水を添加し、*n*-ヘキサンでふりまぜると、かなりの植物成分がすぐに *n*-ヘキサン層に移ることがわかった。この洗浄であまり激しく、しかも長時間ふりまぜていると、一部ベンゾメートがヘキサン層へ分配されるので、軽くふりまぜることが必要である。

薄層クロマトグラフィーの条件を決定するため、メルク社製シリカゲルアルミシート (Art. 5554) と同社製アルミナガラスプレート (Art. 5713) を用い、展開溶媒としてヘキサン、アセトン、クロロホルム、塩化メチレンおよびこれらの混合溶媒について検討した結果、シリカゲルアルミシートと塩化メチレンを組み合わせた場合、植物成分とベンゾメートの分離が最もよかったので、この条件を採用した。薄層クロマトグラフィーのほかに、カラムクロマトグラフィーによるクリンアップも検討したが、アルミナ、フロリジル、シリカゲルおよび活性炭 (セライトを混合) いずれの充填剤を用いた場合でも、1 種類のカラムでは妨害は除去できず、果肉の場合で 2 種類、果皮の場合 3 種類のカラムの組合せが必要であったので採用しなかった。なお、薄層クロマトグラフィーにより 7~8% のベンゾメートの損失が認められたので検量線を作成するさいにもこの操作を入れたが、若干分析値が低くなることを無視できればこの操作を省略した検量線を使用することもできる。

2. 定量条件

ベンゾメートは溶液中でケイ光を発しなかったため、ケイ光検出器を使用することはできなかった。ベンゾメートの紫外吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。282, 292 nm の特性吸収帯の利用も考えられたが感度の点で十分でなかったため、固定波長 (254 nm) の検出器による定量も考慮して、本報では 254 nm を定量波長とした。

分離管充填剤として順相系の Lichrosorb SI-60、粒径 10 μ (内径 4 mm, 長さ 30 cm) と逆相系の Zorbax C8 (内径 4.6 mm, 長さ 25 cm) について検討した。溶離液については *n*-ヘキサン、塩化メチレン、メタノールの混合比を変えて検討したところ、塩化メチレン (安定剤としてメタノールを含まないもの) が最も良好であった。Zorbax C8 の場合、アセトニトリルと水との混合溶

Table 1 Percent recoveries of benzoate.

Sample	Sample weight (g)	Concentration (ppm)	Recovery (%)	C.V. (%)
Orange (pulp)	50	0.2	82.0, 80.2, 81.6	1.1
Orange (peel)	25	0.4	80.2, 76.8, 78.0 80.0, 78.6	1.8
Apple	50	0.2	83.2, 80.4, 82.6 84.8, 82.0	1.9

Fig. 1 Absorption spectrum of benzoate.
Benzoate: 10 ppm in *n*-hexane, cell thickness: 10 mm.

媒について検討し、アセトニトリル 80, 水 20 の割合が最も良好であった。この結果、順相系、逆相系いずれの条件でも定量は可能であったが、カラムの汚染の少ない逆相系を採用した。

3. 検出限界および添加回収率

ベンゾメート 20 ng を注入した場合、高さ約 10 mm

の明瞭なピークがクロマトグラム上に認められるので、これを最小検出量とした。試料 50 g を分析に供し、最終液量 1 ml にしてその 10 μ l を注入するので、検出限界は 0.04 ppm となる。ただし、みかん果皮は 25 g を秤取するので検出限界は 0.08 ppm となる。

環境庁告示によるベンゾメートの残留基準は 5 ppm であることから、検出限界は十分であると考えられる。Fig. 2 に無処理試料およびベンゾメートが存在する場合のクロマトグラムを示す。みかん果皮、果肉およびりんご中には定量を妨害するピークは認められなかった。ベンゾメートを添加し、上記方法に従って全操作を行ない、回収率を測定し、変動係数を計算した結果を Table 1 に示す。

要 約

リンゴおよびカンキツ中のベンゾメートを高速液体クロマトグラフィーで定量する方法を検討した。試料中のベンゾメートはメタノールで抽出し、液液分配および薄層クロマトグラフィーでクレンジングを行なったのち、高速液体クロマトグラフで定量した。リンゴおよびミカンについてこの方法を試みた結果、従来の比色法に比べて操作が簡便であることがわかった。検出限界は 0.04

Fig. 2 Examples of liquid chromatogram.

Solid line: Unfortified sample, Dotted line: Benzoate (100 ng), $\rightarrow$: Injection.

ppm, 0.5 ppm 添加の回収率は 80% 程度で, 十分に実用性のある方法と考えられた。

本実験に協力していただいた当研究所の塩谷広範君, 塚田松吾君に感謝の意を表します。

引用文献

- 1) 佐藤直夫: 農薬科学 **3** (3), 123 (1976)
- 2) 小坂璋吾・遠山典宏・田中多恵: 農薬生産技術 **22** (補), 27 (1970)
- 3) 後藤真康: 農薬誌 **3**, 169 (1978)