短 報

高速液体クロマトグラフィーによる 作物中のグアザチンの定量法

森 芳 計, 八 倉 康 二, 片 岡 安 克

大日本インキ化学工業(株)

(昭和56年9月21日受理)

High Performance Liquid Chromatographic Method for Determination of Guazatine Residues in Crops

Yoshikazu MORI, Yasuji YAGURA and Yasuki KATAOKA

*Chemicals Division, Dainippon Ink and Chemicals Co., Ltd.,
Kamisu-machi, Kashima-gun, Ibaraki 314-02, Japan*

A high performance liquid chromatographic (HPLC) method was developed for the fluorometric determination of the residue of a guanidino fungicide, guazatine [1,1'-iminodi(octamethylene)diguandine, BEFRAN®] residue in various crops. Guazatine was extracted from a crop with 2 N NaOH/MeOH containing guanidine chloride. The solution was diluted with water and guazatine was extracted with chloroform and partitioned into water containing H_2SO_4 from the chloroform solution. This acidic solution was concentrated and injected on to the HPLC which was fitted with a Zorbax ODS column. The mobile phase was a mixture of methanol, water and 25% ammonia water (30 : 69 : 1, adjusted to pH 2.5 with perchloric acid). The eluate from the column was mixed with 0.5 N NaOH and 0.15% ninhydrin to form a fluorescent product and measured with a fluorescence spectrometer. The lower limit of detection using this method was 10 ng, corresponding to 0.02 ppm in 25 g of crop. The mean recoveries of guazatine from the crops at 0.2-10 ppm level ranged between 79.2 and 99.3%.

緒 言

グアザチンの酢酸塩 [1,1'-iminodi(octamethylene)-diguandine triacetate, 商品名ベフラン®] は大日本インキ化学工業(株)が開発中の殺菌剤である。本化合物の残留分析法としては、従来アルカリによる加水分解で生ずるアミン化合物をトリフルオールアセチル誘導体¹⁾として、あるいはグアニジノ基にヘキサフルオールアセチルアセトンを用いて、ピリミジン誘導体²⁾としてガスクロマトグラフで分析する方法が報告されている。近年、高速液体クロマトグラフィーにおいて誘導体化反応を行ない、選択性や感度を大幅に増すことが可能となり、グアニジノ化合物においても、ケイ光ラベル化法による高速液体クロマトグラフィー分析が行なわれるようになってきた^{3,4)}。著者らはこうしたケイ光ラベル化法を使った高速液体クロマトグラフィーによる各種作物中のグアザチンの定量を試み、従来の方法に比べて簡易で迅速な残留分析法を確立したので報告する。

分 析 法

1. 試薬および装置

有機溶媒: 試薬特級品または残留農薬用
酢酸グアザチン純品: mp 143~144°C
塩酸グアニジン: 和光純薬製, 生化学用
ニンヒドリン: 和光純薬製, アミノ酸自動分析用
その他無機試薬: 試薬特級品
高速液体クロマトグラフ: 島津製 LC-3A
化学反応槽: 島津製 CRB-3A

Fig. 1 Flow diagram for the HPLC post-column derivatization of Guazatine.

ケイ光検出器: 島津製 RF-500LCA

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 15 cm, SUS 製

充てん剤: Zorbax ODS 5~7 μ m

分離管温度: 50°C

溶離液: メタノール: 水: 25%アンモニア水 (30:69:

1), pH 2.5 (HClO₄), 流速 0.7 ml/min

検出条件: 化学反应槽温度 55°C, 反応試薬 ① 0.5 N NaOH 流速 0.7 ml/min, ② 0.15% ニンヒドリン水溶液, 流速 0.7 ml/min, 励起波長 395 nm, ケイ光波長 500 nm, スリット幅 10 mm (励起側, ケイ光側とも), フローセル 125 μ l, 流路図を Fig. 1 に示す。

3. 検量線の作成

酢酸グアザチンの純品を水に溶かして 5 ppm の溶液を調製する。この液の 10~100 μ l を前記条件の高速液体クロマトグラフに注入し、ピーク高を測定し検量線を作成する。

4. 分析操作

1) 玄米, 大麦

粉碎した試料 25 g に塩酸グアニジン 1 g, 2 N 水酸化ナトリウム-メタノール溶液 100 ml を加え, 室温で 30 分間振とうする。上澄み液を減圧濾過し, 残渣に再び塩酸グアニジン 0.5 g, 2 N 水酸化ナトリウム-メタノール

Fig. 2 Fluorescence spectra of Guazatine.

溶液 50 ml を加え 10 分間振とうする。減圧濾過後, 残渣をメタノール 20 ml で洗い, 濾液と洗液を合わせこれに水 150 ml を加える。この溶液をクロロホルム 100 ml で 2 分間振とう抽出する操作を 3 回行なう。クロロホルム層を合わせ, 1 N 水酸化ナトリウム溶液 50 ml を加え振とう後水層は捨てる。クロロホルム層を水 40 ml + 2 N 硫酸溶液 2 ml で抽出, クロロホルム層は再び水 20 ml + 2 N 硫酸溶液 0.5 ml で抽出し, 水層を合わせる。水層を 2~3 ml まで減圧濃縮し, 酢酸ナトリウムの適量を加え pH を 3 以上に調節した後, 水で 5 ml とする。その 100 μ l を前記条件の高速液体クロマトグラフに供する。

2) 稲ワラ, 青刈り麦

細切りした試料 (稲ワラ 5 g, 青刈り麦 10 g) を玄米同様に操作する。

3) キュウリ

細切りした試料 25 g に水 25 g を加え, ホモジナイザーで 1 分間磨砕する。以下玄米と同様に操作する。

実 験

1. 定量条件

アルカリ溶液中でグアザチンとニンヒドリンとの反応によって得られるケイ光物質のケイ光スペクトル, 励起スペクトルを測定し, 極大励起波長は 395 nm 付近に, 極大ケイ光スペクトルは 500 nm 付近にあることがわかった (Fig. 2)。したがって測定は励起波長 395 nm, ケイ光波長 500 nm で行ない, 検出感度を上げるために 125 μ l のセルを使用した。

カラム充てん剤として, 逆相系の Zorbax ODS (4.6 mm $\times$ 15 cm), Lichrosorb RP-8 (4 mm $\times$ 25 cm) について検討した。溶離液にメタノール-水-アンモニア水 (30:69:1), pH 2.5 (HClO₄) を使用した場合, Zorbax

Table 1 Lower limits of detection.

	Rice		Barley		Cucumber
	Grain	Straw	Grain	Green-barley	
Sample weight(g)	25	5	25	10	25
Injection volume (μ l)	100	100	100	100	100
Limit of detection (ppm)	0.02	0.1	0.02	0.05	0.02

Table 2 Recovery of Guazatine from various crops.

Sample	Guazatine added (ppm)	Number of determinations	Mean recovery (%)	Relative standard deviation (%)
Rice grain	2	8	99.3	5.3
	0.2	2	81.2	—
Rice straw	10	8	86.5	6.6
	1	2	97.5	—
Barley grain	2	2	87.5	—
Green barley	2	2	86.1	—
Cucumber	2	2	86.4	—
	0.2	2	79.2	—

Fig. 3 Example of liquid chromatogram.

Solid line: unfortified sample, Broken line: Guazatine.

ODS がピークの形状、感度の点で優れていた。

化学反応槽における水酸化ナトリウムおよびニンヒドリンの濃度、流量、反応温度等の条件は島津製作所のグアニジン分析システムの条件に従った。

2. 抽出およびクリンアップ

抽出操作において、アルカリ性メタノールでの抽出では十分な添加回収率が得られない場合が多い。これはグアザチンのイミノ基とグアニジノ基による試料への強い吸着によるものと考えられる。グアザチンの吸着を防止し、添加回収率を向上させる目的で、塩酸グアニジンを

添加⁵⁾し良好な結果を得た。

グアザチンが強塩基性物質である点に注目して、液々分配のみで抽出液のクリンアップを行なう方法を採用したが、今回検討した作物においては妨害となるピークは認められず、また混在物によるグアザチンの保持時間の変化等も認められなかった。

3. 検出限界および回収率

酢酸グアザチン 10 ng を高速液体クロマトグラフに注入したとき、波高 6 mm の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 に示すように玄米、大麦、キュウリで 0.02 ppm、青刈り麦で 0.05 ppm、稲ワラで 0.1 ppm となり、グアザチンのガスクロマトグラフィー分析法に劣らない感度で分析ができる。

酢酸グアザチン無散布区の各作物を本法で分析したクロマトグラムは Fig. 3 に示すとおりで、定量を妨害するピークは認められなかった。

試料に酢酸グアザチンを添加して、回収率を測定した結果は Table 2 のとおりで良好な結果が得られた。

要 約

ニンヒドリンをポストカラム反応試薬として用いる高速液体クロマトグラフィー-ケイ光分析法によって、作物中のグアザチンを定量分析する方法を確立した。

本検出法は選択性が高く、試料中のグアザチンはアル

カリ性メタノールで抽出し、液々分配によるクリンアップのみで定量が可能であり、従来のガスクロマトグラフィー分析に比較して、操作が簡便であった。検出限界は0.02 ppm、添加回収率はおおむね80%以上であった。

なお、本研究を行なうにあたり、分析装置面での協力をいただいた島津製作所分析センター東久世主任に感謝します。

引用文献

- 1) J. H. Hengstmann, F. C. Falkner, J. T. Watson & J. Oates: *Anal. Chem.* **46**, 34 (1974)
- 2) H. Kobayashi, O. Matano & S. Goto: *J. Pesticide Sci.* **2**, 427 (1977)
- 3) Y. Yamamoto, A. Saito, T. Manji, K. Maeda & K. Ohta: *J. Chromatogr.* **162**, 23 (1979)
- 4) 木下俊夫・平賀やよい・高橋由美子・石田泰夫: 日本薬学会第100年会講演要旨集, p. 565, 1980
- 5) 小林裕子: 未発表