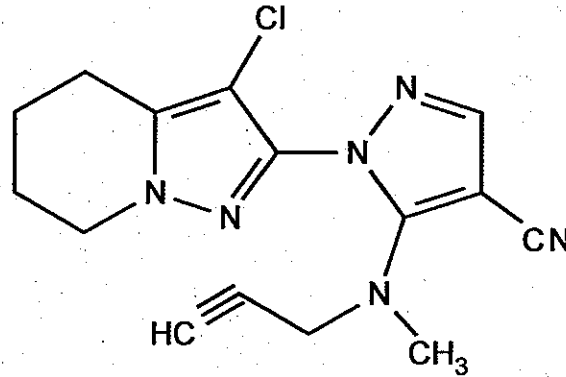


農薬登録保留基準公定分析法検討会資料(水質汚濁)

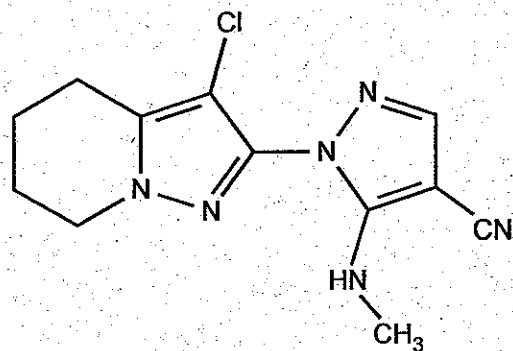
ピラクロニル(pyraclonil)

構造式



| | |
|--------------|--|
| 種類名 | ピラクロニル |
| 試験名 | YH-650(H) |
| 用途 | 除草剤 |
| 分子式 | C ₁₅ H ₁₅ ClN ₆ |
| 分子量 | 314.8 |
| 化学名(IUPAC) | 1-(3-chloro-4,5,6,7-tetrahydropyrazolo[1,5-a]pyridin-2-yl)-5-[methyl(prop-2-ynyl)amino]pyrazole-4-carbonitrile |
| 外観 | 白色粉末 |
| 融点 | 93.1~94.6 °C |
| 蒸気圧 | 1.9×10 ⁻⁷ Pa(25 °C) |
| 溶解性 | 水 50.1 mg/l(20 °C) n-ヘキサン 169 mg/l(20 °C) トルエン 158、ジクロロメタン >500、メタノール >500、 アセトン 102、酢酸エチル 211 (以上 g/l、20 °C) |
| オクタノール/水分配係数 | logPow=2.18(20 °C) |
| 安定性 | 200 °C以上で分解。pH4、7、9(50 °C)で安定。 |

変化生成物 脱メチルアセチレン体
構造式



| | |
|-----|---|
| 試験名 | M-1 |
| 分子式 | $C_{12}H_{13}ClN_6$ |
| 分子量 | 276.7 |
| 化学名 | 1-(3-chloro-4,5,6,7-tetrahydropyrazolo[1,5-a]pyridin-2-yl)-5-(methylamino)pyrazole-4-carbonitrile |
| 外観 | 類白色粉末 |
| 融点 | 178~180 °C |

出典：八洲化学工業株式会社資料

1. 概要

ピラクロニル及びその変化生成物脱メチルアセチレン体を規制対象成分とする。試料から酢酸エチル-ヘキサン混液で抽出、もしくは固相抽出カラムで抽出を行った後、ケイ酸マグネシウムミニカラムで精製し、HPLC-UVで定量する方法を提案する。

基準値案 0.1 mg/l
目標検出限界 各 0.001 mg/l

2. 提案法

2.1. 分析対象成分

ピラクロニル及び脱メチルアセチレン体

2.2. 装置

HPLC-UV

2.3. 分析操作

2.3.1. 溶媒抽出法

秤取

↓ 試料 100 ml

酢酸エチル-ヘキサン抽出

↓ 酢酸エチル-ヘキサン(1:1) 50 ml+50 ml

脱水ろ過

濃縮、乾固

ケイ酸マグネシウムミニカラム精製(充てん量 910 mg)

↓ ヘキサン-アセトン(9:1) 5 mlで予備洗浄

ヘキサン-アセトン(9:1) 5 ml×2で負荷

ヘキサン-アセトン(7:3) 5 mlで溶出

濃縮、乾固

HPLC-UV

アセトニトリル-水(1:1) 2 ml定容、20 µl注入

2.3.2. 固相抽出法

秤取

↓ 試料 100 ml

固相抽出

↓ C₁₈ミニカラム(充てん量 1 g)

予備洗浄:アセトニトリル 5 ml、水 5 ml

溶液負荷

洗浄:水 5 ml

溶出:アセトニトリル 10 ml

濃縮、乾固

ケイ酸マグネシウムミニカラム精製

↓ 2.3.1.に同じ

HPLC-UV

2.3.1.に同じ

2.4. HPLC-UV操作条件

分離管 : シリカーODS、内径 2~6 mm、長さ 15~30 cm
分離管槽温度 : 40 °C
分離液 : アセトニトリル-水(1:1)
測定波長 : 235 nm
保持時間 : 5~10分

2.5. 検量線の作成

ピラクロニル及び脱メチルアセチレン体の0.05~1 mg/1アセトニトリル-水(1:1)混合溶液を調製。各溶液の20 µlを注入し、ピーク高又はピーク面積とピラクロニル及び脱メチルアセチレン体重量から検量線を作成。

2.6. 検出限界

検出限界 : 各 0.001 mg/l
最小検出量 1 ng、最終液量 2 ml、注入量 20 µl、試料 100 ml

3. 提案法の根拠

水田水中残留分析実施例及び基礎データから提案法を作成した。

3.1. 水中残留分析実施例(平成14年度、残留農薬研究所)

分析対象成分 : ピラクロニル、脱メチルアセチレン体、メチルホルムアミド体、M-11、アミン体

検出限界 : 各 0.001 mg/l

分析法概要 :

C₁₈ミニカラム抽出(Bond Elute C₁₈)

ケイ酸マグネシウムミニカラム精製(Sep-Pak Plusフロリジル)

HPLC-UV

3.2. 作物残留分析実施例(平成16年度、残留農薬研究所)

玄米

分析対象成分 : ピラクロニル、脱メチルアセチレン体、PM-5(抱合体含む)

検出限界 : ピラクロニル 0.01 ppm

脱メチルアセチレン体、PM-5 各0.008 ppm

分析法概要 :

含水アセトニトリル抽出

C₁₈ミニカラム精製(Bond Elute C₁₈)

グラファイトカーボン/NH₂ミニカラム精製(Supelclean ENVI-Carb/NH₂)

シリカゲルミニカラム精製(Bond Elute Si)

NPD-GC

4. 検討事項

4.1. 溶媒抽出について

ピラクロニル及び脱メチルアセチレン体の酢酸エチル-ヘキサン(1:1)への抽出率を以下に示した。ピラクロニル及び脱メチルアセチレン体はヘキサンへの抽出率は低かったが、酢酸エチル-ヘキサン(1:1)へは2回の抽出操作でほぼ100%移行した。

酢酸エチル-ヘキサンでの抽出率(単位:%)

| 水層 水 100 ml | 酢酸エチル-ヘキサン(1:1) 50 ml | | 合計 |
|----------------|-----------------------|-----|----|
| | 1回目 | 2回目 | |
| ピラクロニル | 80 | 17 | 97 |
| 脱メチルアセチレン体 | 78 | 20 | 98 |

供試量: 各2 µg

4.2. 固相抽出について

ピラクロニル及び脱メチルアセチレン体のC₁₈ミニカラム及びポリスチレンミニカラムからの溶出状況を以下に示した。ピラクロニル及び脱メチルアセチレン体はいずれの条件でも良好に保持、溶出された。本提案法では固相抽出カラムにC₁₈ミニカラム、溶出溶媒にアセトニトリルを選択した。

C₁₈ミニカラムからの溶出状況(単位:%)

| 展開溶媒 | 水 100 ml | アセトニトリル | | | 合計 |
|------------|-------------|---------|---------|----------|-----|
| | | 0-5 ml | 5-10 ml | 10-15 ml | |
| ピラクロニル | — | 93 | 7 | 0 | 100 |
| 脱メチルアセチレン体 | — | 97 | 3 | 0 | 100 |

Mega Bond Elute C₁₈(1 g)使用、Lot. 0728306、供試量: 各2 µg

C₁₈ミニカラムからの溶出状況(単位:%)

| 展開溶媒 | 水 100 ml | メタノール | | | 合計 |
|------------|-------------|--------|---------|----------|-----|
| | | 0-5 ml | 5-10 ml | 10-15 ml | |
| ピラクロニル | — | 100 | 0 | 0 | 100 |
| 脱メチルアセチレン体 | — | 100 | 5 | 0 | 105 |

Mega Bond Elute C₁₈(1 g)使用、Lot. 0719406、供試量: 各2 µg

ポリスチレンミニカラムからの溶出状況(単位：%)

| 展開溶媒 | アセトニトリル | | | | 合計 |
|------------|---------|--------|---------|----------|-----|
| | 水 | 0-5 ml | 5-10 ml | 10-15 ml | |
| ピラクロニル | — | 101 | 0 | 0 | 101 |
| 脱メチルアセチレン体 | — | 102 | 0 | 0 | 102 |

Envi-chrom P(250 mg)使用、Lot. SP01898L、供試量：各2 µg

ポリスチレンミニカラムからの溶出状況(単位：%)

| 展開溶媒 | メタノール | | | | 合計 |
|------------|-------|--------|---------|----------|----|
| | 水 | 0-5 ml | 5-10 ml | 10-15 ml | |
| ピラクロニル | — | 95 | 0 | 0 | 95 |
| 脱メチルアセチレン体 | — | 90 | 6 | 0 | 96 |

Envi-chrom P(250 mg)使用、Lot. SP01898L、供試量：各2 µg

4.3. 精製について

ピラクロニル及び脱メチルアセチレン体のケイ酸マグネシウムミニカラムからの溶出状況を以下に示した。この結果から、酢酸エチル-ヘキサン(9:1)5 ml×2で負荷洗浄後、酢酸エチル-ヘキサン(7:3)5 mlで溶出を行うこととした。

ケイ酸マグネシウムミニカラムからの溶出状況(単位：%)

| 展開溶媒 | 酢酸エチル-ヘキサン | | | | 合計 |
|------------|------------|--------|--------|---------|-----|
| | (9:1) | (7:3) | | | |
| | | 5 ml×2 | 0-5 ml | 5-10 ml | |
| ピラクロニル | 0 | 99 | 0 | 0 | 99 |
| 脱メチルアセチレン体 | 0 | 99 | 1 | 0 | 100 |

Sep-Pak Plus フロリジル使用、Lot. 195637011D、供試量：各2 µg

4.4. 定量法について

水中残留分析実施例により、HPLC-UVを用いてピラクロニル及び脱メチルアセチレン体を定量した。

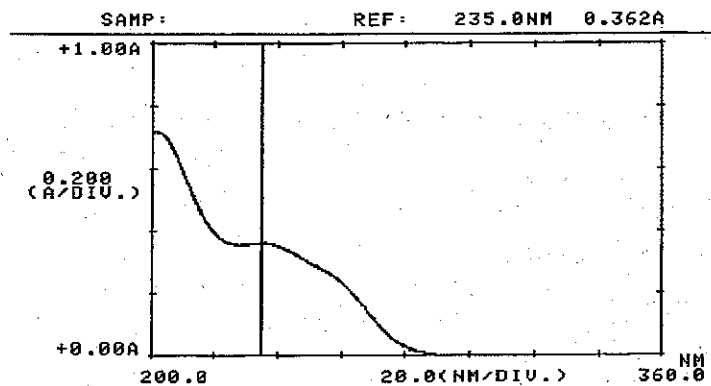
5. 基礎データ

5.1. 紫外吸収スペクトル

ピラクロニル

濃度：10 $\mu\text{g/ml}$ 、溶媒：アセトニトリル-水(1:1)

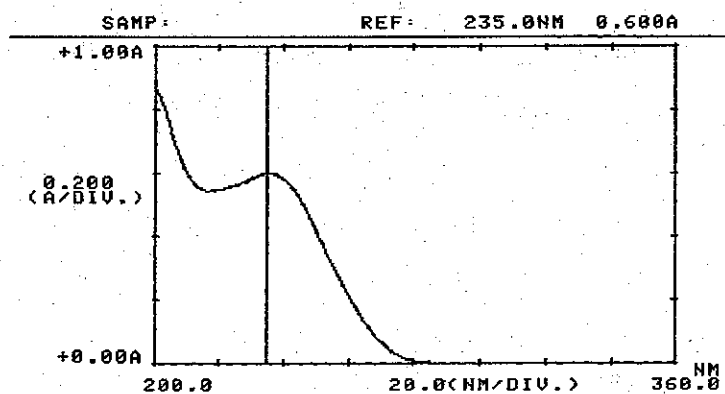
235 nmでのモル吸光係数： 1.14×10^4



脱メチルアセチレン体

濃度：10 $\mu\text{g/ml}$ 、溶媒：アセトニトリル-水(1:1)

235 nmでのモル吸光係数： 1.66×10^4



5.2. 高速液体クロマトグラフ測定条件例

分離管 : Mightysil RP-18PA(関東化学製)

内径 4.6 mm×長さ 25 cm、粒径 5 μm

溶離液 : アセトニトリル-水(1:1)

流速 : 1.0 ml/分

分離管槽温度 : 40 $^{\circ}\text{C}$

測定波長 : 235 nm

保持時間 : ピラクロニル 約8.1分、脱メチルアセチレン体 約6.7分

この条件でのクロマトグラム例を9~10頁に示した。供試試料には多摩川中流の稲城大橋付近で採水した水を用いた。

5.2. 液体クロマトグラフ・質量分析計測定条件例(参考)

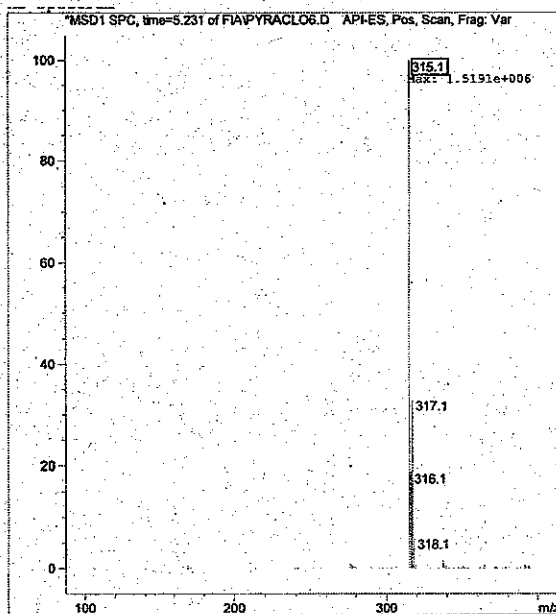
・液体クロマトグラフ部

分離管 : Mightysil RP-18 GP(関東化学製)
 内径 2.0 mm×長さ 15 cm, 粒径 5 μm
 溶離液 : 2 mmol/l酢酸アンモニウム-アセトニトリル(3:2)
 流速 : 0.2 ml/分
 分離管槽温度 : 40 °C
 保持時間 : ピラクロニル 約9.7分、脱メチルアセチレン体 約7.1分

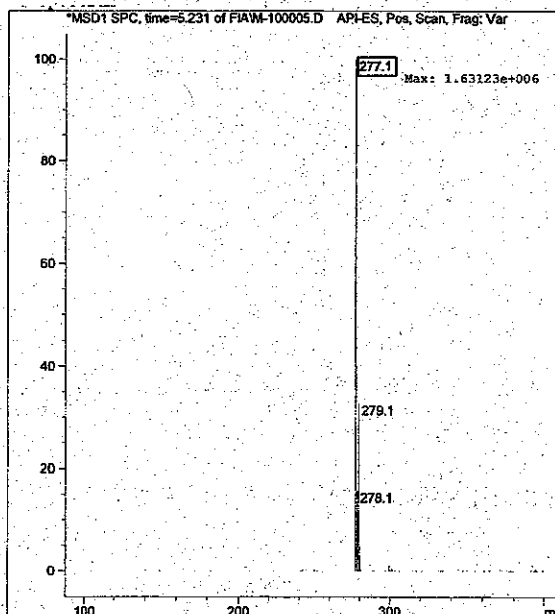
・質量分析計部

イオン化法 : ESI(正イオンモード)
 ドライングガス : 窒素(10 l/分, 350 °C)
 ネブライザー : 窒素(30 psig)
 フラグメンター電圧 : 140 V
 キャピラリー電圧 : 3500 V
 設定質量数 : ピラクロニル m/z=315.1、脱メチルアセチレン体 m/z=277.1

ピラクロニルのMSスペクトル



脱メチルアセチレン体のMSスペクトル



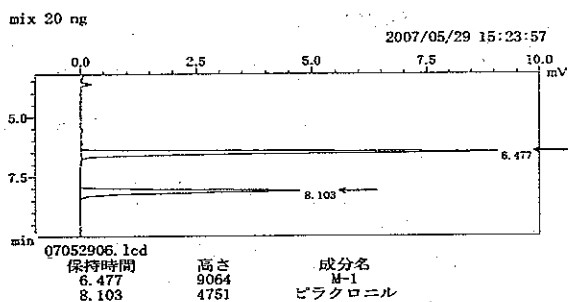
5.3. 保存中の安定性試験

ピラクロニル及び脱メチルアセチレン体の河川水中での4 °C保存安定性を調査した。河川水100 mlを三角フラスコにはかりとる。これにピラクロニル及び脱メチルアセチレン体の500 mg/lアセトニトリル溶液200 μlを同時に添加し、4 °Cに保存した。これを2.3.2.の分析法と同様に操作し、次の結果を得た。その結果、ピラクロニル及び脱メチルアセチレン体は4 °Cの河川水中で12日間安定であった。

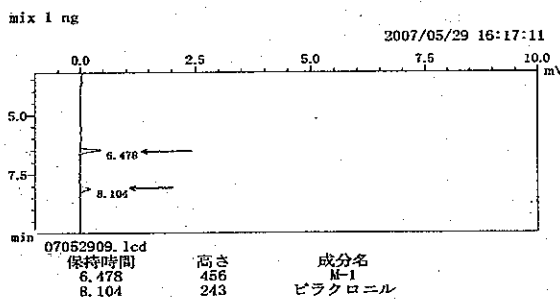
| 添加成分 | 試料 | 添加濃度 | 保存期間 | 回収率 | 平均回収率 |
|------------|--------|-------|------------------|----------|-------|
| ピラクロニル | 100 ml | 1 ppm | 12日(07/5/23~6/4) | 101%、91% | 96% |
| 脱メチルアセチレン体 | 100 ml | 1 ppm | 12日(07/5/23~6/4) | 98%、89% | 94% |

クロマトグラム例(溶媒抽出法)

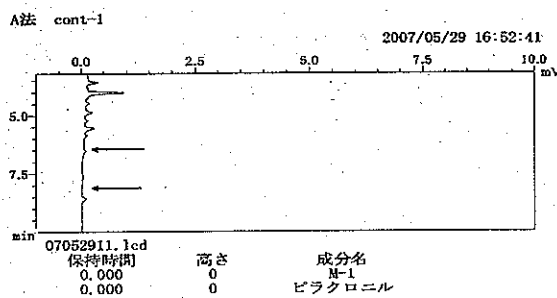
標準溶液20 ng



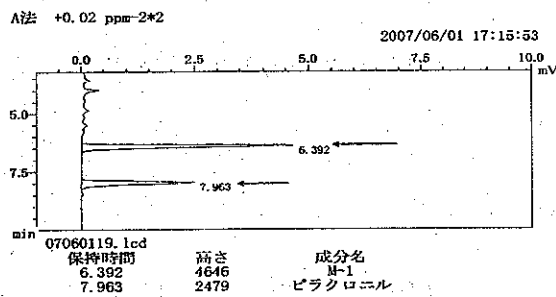
標準溶液1 ng



無添加(河川水)



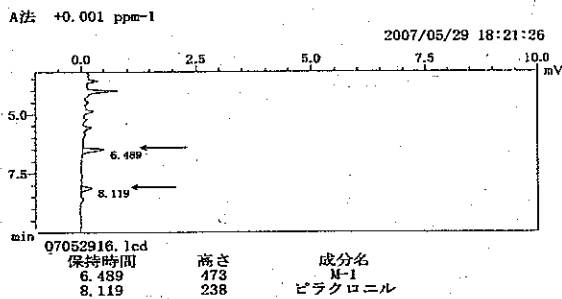
河川水0.02 mg/1添加(2倍希釈)



回収率 ピラクロニル 102 %

脱メチルアセチン体 101 %

河川水0.001 mg/1添加

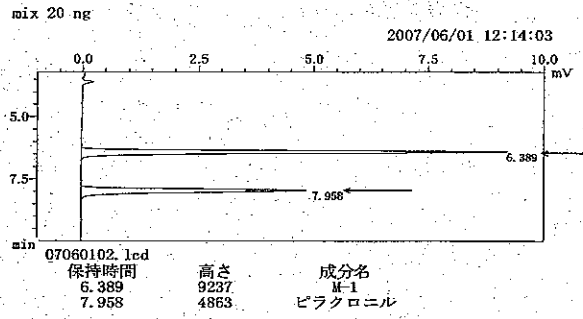


回収率 ピラクロニル 95 %

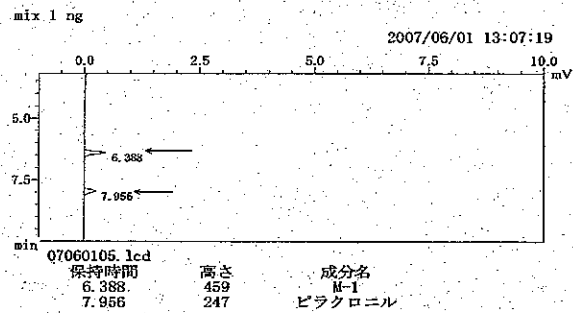
脱メチルアセチン体 104 %

クロマトグラム例(固相抽出法)

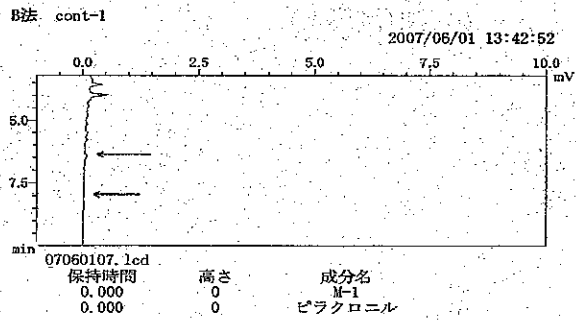
標準溶液20 ng



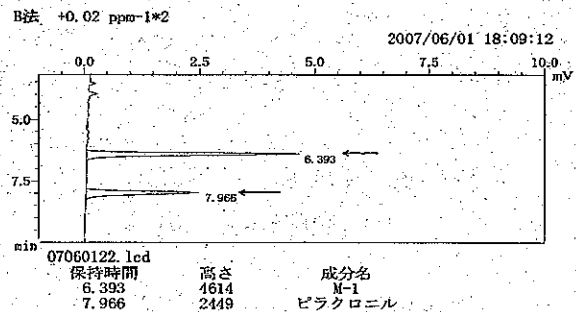
標準溶液1 ng



無添加(河川水)



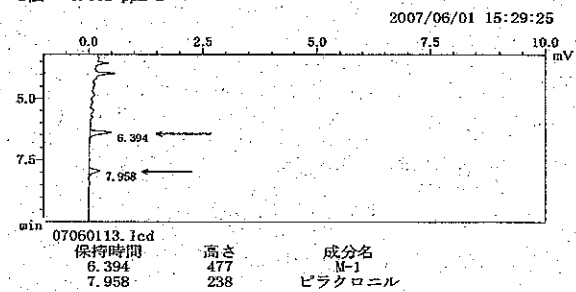
河川水0.02 mg/l添加(2倍希釈)



回収率 ピラクロニル 100 %

脱メチルセチン体 100 %

河川水0.001 mg/l添加



回収率 ピラクロニル 95 %

脱メチルセチン体 106 %