

オキシポコナゾールフマル酸塩の測定方法

(1) 装置

高速液体クロマトグラフ(紫外分光光度計)及びガスクロマトグラフ(NPD)を用いる。

(2) 試薬試液

アセトン、ヘキサン、酢酸エチル、メタノール:試薬特級又はこれと同等のもの

ポリエチレングリコール400:試薬一級

アセトン、酢酸エチル:残留農薬試験用

水、メタノール:高速液体クロマトグラフィー用

多孔性ケイソウ土カラム:内径約2 cmのカラムに20 mL保持量のカラムクロマトグラフィー用顆粒状多孔性ケイソウ土を充てんしたもの又はこれと同等の性能を有するもの

Siミニカラム:シランをシリカゲルに結合させた固相を充てんしたカラムサイズ1000mgのもの又はこれと同等の性能を有するもの

NH₂ミニカラム:アミノプロピル基をシリカゲルに結合させた固相を充てんしたカラムサイズ500mgのもの又はこれと同等の性能を有するもの

オキシポコナゾールフマル酸塩標準品

代謝物ホルミル体標準品

代謝物オキサゾリジノン標準品

(3) 試験溶液の調製

ア 濃縮

試料200 mLを800 mLのナス型フラスコに量り取り、すり合わせ減圧濃縮器を用いて40°C以下で約10~15 mLに濃縮する。これに、メタノール2mLを加え、多孔性ケイソウ土カラムに移し、酢酸エチル200mLを流下させてオキシポコナゾールフマル酸塩、ホルミル体及びオキサゾリジンを溶出する。溶出液を300mLのナス型フラスコに量り取り、すり合わせ減圧濃縮器を用いて40°C以下で約3mLに濃縮後、酢酸エチルを用いて10mLに定容する。

イ カラムクロマトグラフィー -1

先の定容液から5mL(試料100mL相当)を300 mLのナス型フラスコに量り取り、すり合わせ減圧濃縮器を用いて40°C以下で約2mLに濃縮後、窒素気流下で乾固する。残留物をアセトン-ヘキサン混液(5:95)5mLに溶解する。Siミニカラムをミニカラム吸引装置に取り付け、ヘキサン10mLで流下させてカラムを洗浄する。溶解液をアセトン-ヘキサン混液(5:95)20mLを用いてカラムに移し入れ、流下させ、流出液は捨てる。次いでアセトン-ヘキサン混液(10:90)40mLを流下させ、ホルミル体を溶出させ、200mLのナス型フラスコに受ける。更に、アセトン-ヘキサン混液(30:70)20mLを同様に流下させ、オキシポコナゾールフマル酸塩を溶出させ、別の200mLのナス型フラスコに受ける。各溶出液を減圧濃縮器を用い40°C以下の水浴で溶媒を約2mLまで濃縮し、更に窒素気流をゆるやかにふきつけ完全に揮散させる。各残留物にメタノール5mLを加えて定容し、高速液体クロマトグラフの試験溶液とする。

ウ カラムクロマトグラフィー -2

NH₂ミニカラムをミニカラム吸引装置に取り付け、酢酸エチル10mLで流下させてカラムを洗浄する。先の定容液から残りの5mL(試料100mL相当)をカラムに移し入れ、流下させた後、酢酸エチル20mLを同様に流下させ、オキサゾリジンを溶出させ、200mLのナス型フラスコに受ける。溶出液に0.1%ポリエチレングリコール400含有アセトン溶液0.5mLを加え、減圧濃縮器を用い40°C以下の水浴で約2mLまで濃縮し、更に窒素気流をゆるやかにふきつけ完全に揮散させる。残留物はアセトンを用いて5mLに定容し、ガスクロマトグラフの試験溶液とする。

(4) 測定機器の操作条件

ア 高速液体クロマトグラフ(オキシポコナゾールフマル酸塩及びホルミル体)

カラム:シリカゲルにオクタデシルシランを化学的に結合させたものを内径4.6mm、長さ15cmのステンレス管に充てんしたもの又はこれと同等の分離性能を有するものを用いる。

カラム槽温度:温度40°C

波長:220nm

溶離液:水及びメタノールの混液(30:70v/v)を流速1.0mL/min.で通液する。

感度:オキシポコナゾールフマル酸塩及びホルミル体のそれぞれ1.0ngが十分確認できるように感度を調製する。

イ ガスクロマトグラフ(オキサゾリジン)

装置:高感度窒素リン検出器(NPD)

カラム:内径0.53mm、長さ30mの溶融シリカ製の内側に(50%-トリフルオロプロピル)-メチルポリシロキサンを1.0 μ mの厚さで被覆したもの又はこれと同等の分離性能を有するものを用いる。

温度:カラム170 $^{\circ}$ C、注入口280 $^{\circ}$ C、検出器300 $^{\circ}$ C

ガス流量:キャリアーガスとしてヘリウムを用い、オキサゾリジンのピークが保持時間3~5分となるように調製するとともに水素及び空気の流量を至適条件となるように調整する。

感度:オキサゾリジンの0.05ngが十分確認できるように感度を調製する。

(5) 検量線の作成

ア 高速液体クロマトグラフ(オキシポコナゾールフマル酸塩及びホルミル体)

オキシポコナゾールフマル酸塩標準品及びホルミル体標準品のそれぞれ0.05~1.00mg/Lメタノール溶液を数点調製し、それぞれ20 μ Lを高速液体クロマトグラフに注入し、ピーク高を測定しオキシポコナゾールフマル酸塩及びホルミル体の検量線を作成する。

イ ガスクロマトグラフ(オキサゾリジン)

オキサゾリジン標準品を0.01%ポリエチレングリコール400含有アセトン溶液を用いて0.05~1.00mg/L溶液を数点調製し、これを1 μ Lガスクロマトグラフに注入し、ピーク高を測定しオキサゾリジンの検量線を作成する。

(6) 定量試験

(3)イの試験溶液から各20 μ Lを取り、高速液体クロマトグラフに注入し、(5)アの検量線によりオキシポコナゾールフマル酸塩及びホルミル体の重量を求める。一方、(3)ウの試験溶液から1 μ Lを取り、ガスクロマトグラフに注入し、(5)イの検量線によりオキサゾリジンの重量を求める。このオキシポコナゾールフマル酸塩の重量の値と、ホルミル体及びオキサゾリジン重量の値に各係数1.24及び3.65を乗じてオキシポコナゾールフマル酸塩の重量に換算したものを和し、これに基づき、試料中のオキシポコナゾールフマル酸塩の濃度を算出する。