

報 告

高速液体クロマトグラフィーによるポリオキシシンDの分析

吉岡秀俊 泉川碩雄 清宮隆治
青木一幸

1 はじめに

大気中における農薬等化学物質の測定法の検討及びフィールド調査を行っているところであるが^{1,2)}、今回、都内のゴルフ場で入手した芝用殺菌剤は、ポリオキシシンZ水和剤(科研製薬(株)製)という名称であり、その有効成分が、リゾクトニア病菌に対して高い活性を示すポリオキシシンDである。ポリオキシシンとは、土壌から分離した放線菌の一菌株によって生産される微生物起源の薬剤(農薬用抗生物質)であり、化学構造がお互いに類似する十数種の成分(ポリオキシシンA, B, C, D, L, M及びN等)によって構成される複合体で、ポリオキシシンDはその一種である。表にポリオキシシンZ水和剤及びポリオキシシンDの性状等を示した。

表 ポリオキシシンZ及びポリオキシシンDの性状等¹⁾

ポリオキシシンZの成分等	
ポリオキシシンD亜鉛塩	……2.25% (ポリオキシシンDとして2%)
鉍物質微粉、界面活性剤等	……97.75%
性状 : 淡褐色水和性粉末	
ポリオキシシンDの性質	
分子式	: $C_{17}H_{23}N_5O_{14}$
融点	: 240°C
溶解性	: 水に対して極めて溶けにくい。希酸、希アルカリに溶け易い。メタノール、アセトンにはほとんど溶けない。
安定性	: 光(紫外線)安定
pH	: 酸性中性で安定、アルカリでやや不安定。

ポリオキシシンDは有機溶剤に不溶であるため、ガスクロマトグラフィー/質量分析法(GC/MS)を適用できない。また、その構造からみて高速液体クロマトグラ

フィーが適しているが、標準試料が市販されていないため、その同定には注意を要する。

構造及び使用量(ポリオキシシンDとして約0.04g/m²)から考えて、ポリオキシシンDが環境大気中に大量に放出される可能性は少ないと思われるが、環境分析上において、今後こうした生物起源の物質、標準試料を入手できない物質、あるいはGC/MSが苦手とする物質の分析に迫られることは十分に考えられるところであるので、ここに報告する。

2 実験

(1) 標準試料

標準試料を入手できなかったため、ポリオキシシンZ水和剤47.1mgを秤取り、pH=3.00のりん酸緩衝液(移動相と同じ)50mlで抽出した液を標準として用いた。標準原液の濃度は、科研製薬の表示にしたがって、ポリオキシシンZ水和剤の2%をポリオキシシンDとした。

(2) 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)の分析条件

マルチソルベント送液システムWaters 600に、手動インジェクターWaters U6K, ODS系カラム, 紫外検出器Waters Model 481(以上ウオーターズ社製)及びインテグレート島津C-R3A(島津製作所製)を接続して用いた。

その他の条件は下記のとおりである。

カラム : UNISIL PACK 5C18-250A (4.6mm×25cm, 粒子径5µm, 形状・球, 細孔径10nm, 表面積350m²/g・ガスクロ工業製)

カラム温度 : 40°C

移動相 : 0.1M/l NaH₂PO₄にりん酸を滴下して、pH=3.00に調整した。

流量 : 1ml/min

紫外検出波長：218nm及び276nm

紫外検出器感度：0.02AUFS

なお、ポリオキシンDの同定に用いた検出器は、フォトダイオードアレイ検出器 島津 SPD-M6A（島津製作所製）である。

3 結果

(1) 分析条件の検討

ポリオキシンDは、ピリミジンヌクレオシドの一種であるウリジンを核にした構造をもっている（図1）。そこで、成書によりヌクレオシド・核酸塩基の分析例を捜したところ、TSKgei ODS-120T（25cm×4.6mm I.D., 東ソー製）カラムを使用し、移動相に0.1M NaH₂PO₄; アセトニトリル（98/2 v/v%）を用いた例があった。

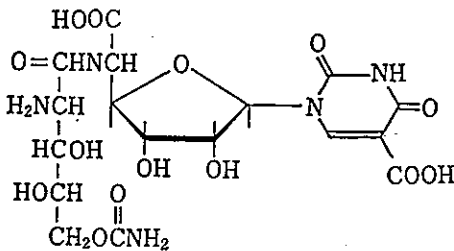


図1 ポリオキシンDの構造式

分析例のカラムに性状が近い手持ちカラムを用いて比較実験した結果から、表面積の大きなUNISIL PACK 5C 18-250Aを選択した。

移動相は、ポリオキシンDが溶けやすく、かつ安定である酸性溶液とし、さらに、測定波長付近に吸収の少ないりん酸緩衝液を用いることにした。

測定波長は、成書に記載されているポリオキシンDの紫外吸収波長218nm及び276nmを用いた。

(2) ポリオキシンDの同定

HPLCポンプにイオンクロマトグラフィー用インジェクションループ（ダイオネックス社製）、上記カラム及びフォトダイオードアレイ検出器を接続し、標準原液150μlについて3次元クロマトグラムデータを得た。なお、耐圧性が低いイオンクロマトグラフィー用インジェクションループを用いたために、移動相の流量はHPLCと違い0.6ml/minとした。また、カラム温度は室温で行った。

その結果を図2に示した。図3は、図2を上方から見た等高線（等吸光度）図及び波長276nmでのクロマトグラムである。これらによれば、図の主要ピーク1からピーク4のうち波長200nmから300nmの間に2つの明瞭な吸収をもつピークは2、3及び4であり、そのうちのピーク2が最も文献値に近い最大吸収波長を持っていることがわかる。

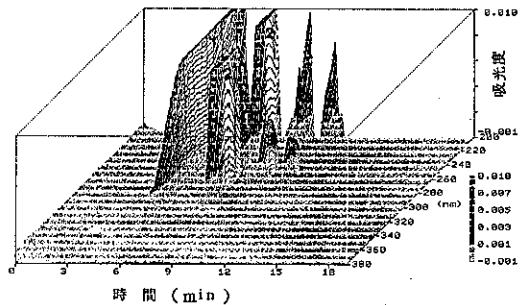


図2 ポリオキシンZ水和剤からの酸性抽出液の三次元クロマトグラム

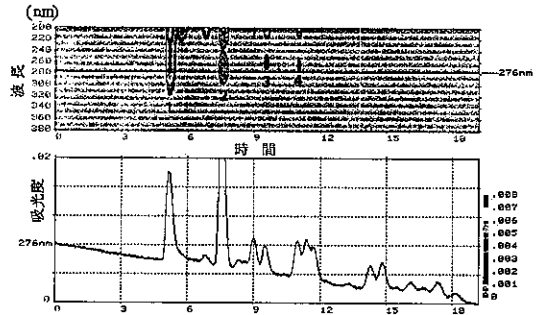


図3 ポリオキシンZ水和剤からの酸性抽出液の等高線図及びクロマトグラム

図4は、主要ピーク1～4の吸収スペクトルであり、ピーク2がポリオキシンDの最大吸収波長に約3nmのずれで一致する。なお、フォトダイオードアレイ検出器の波長をベンゼン及びナフタレンで校正したところ、2ないし3nm短波長側にずれている（図の波長軸でいえば2ないし3nm長波長側にずれている）ことを確認した。

これらのことから、主要ピーク2がポリオキシンDであると同定した。

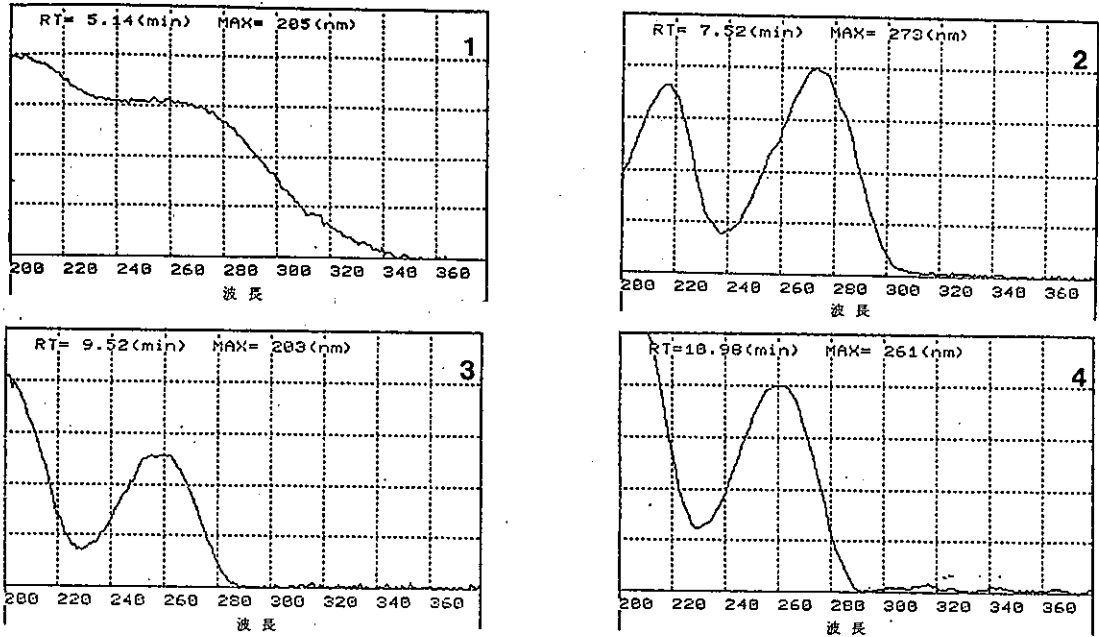


図4 主要ピークの吸収スペクトル

(3) HPLCのクロマトグラムと検量線

HPLCによる標準液のクロマトグラムの例を図5に示した。流量及びカラム温度等同定に用いた分析条件との違いはあるが、インジェクトから2.8分のピークが図2～図4のピーク1、6.5分のピークがピーク2（ポリオキシンD）に相当すると考えられる。

図6に検出波長218nm及び276nmにおける検量線を示した。

(4) ゴルフ場周辺の表層土壌の分析

1990年8月にゴルフ場直近周辺の4地点で採取した表層土壌（表面から3cmまで）の5ないし8g（乾土当り約5g）を100ml共栓付き三角フラスコに入れ、移動相25mlを添加した後、20分間超音波抽出した。抽出液をポアサイズ3.0μmのメンブレンフィルターで吸引ろ過し、ろ液をさらにポアサイズ0.45μmのフィルターに通した液の10μlをHPLCに供した。

その結果いずれの土壌とも、ポリオキシンDは定量下限（乾土当り0.8ng/g）以下であった。

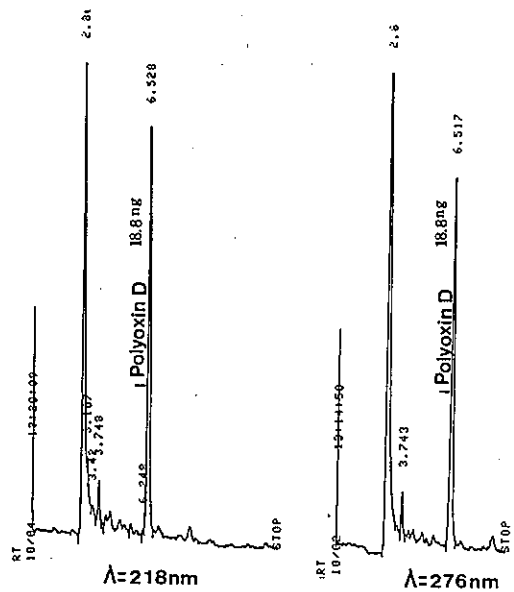


図5 HPLCによる標準液のクロマトグラム例

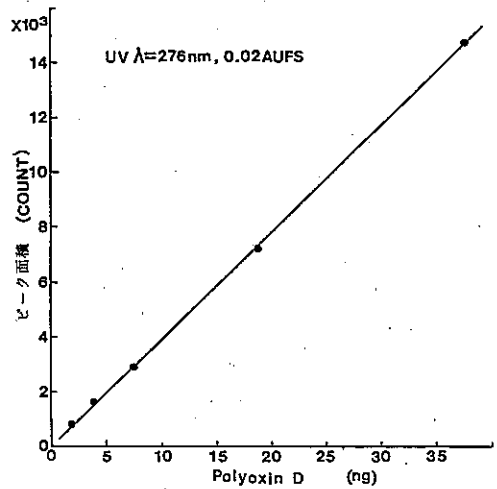
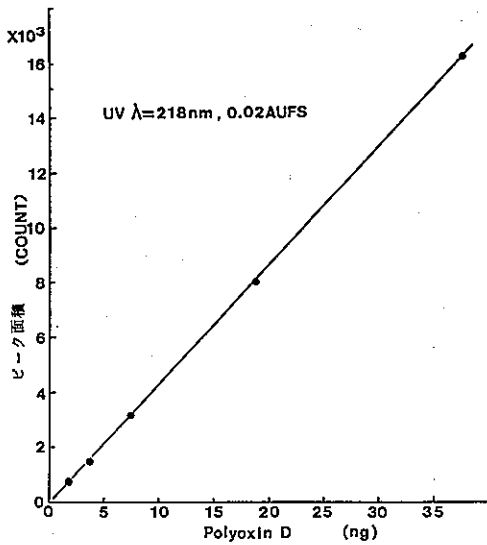


図6 検出波長218及び276nmにおける検量線

参考文献

- 1) 泉川碩雄：農業等化学物質の野外測定分析法の検討と汚染実態の把握，第31回大気汚染学会講演要旨集，p.220 (1990)。
- 2) 吉岡秀俊ら：高速液体クロマトグラフィーによる化学物質の分析—フェノール類，除草剤等10物質の分析及び大気採取方法の検討—，東京都環境科学研究所年

報1991，p.98。

- 3) 科研製薬株式会社：芝専用殺菌剤ポリオキシシズ水和剤「科研」技術資料，平成2年4月。
- 4) 日本分析化学会関東支部編：高速液体クロマトグラフィーハンドブック，丸善，p.365。
- 5) 長澤正雄，石井義男：新版農業の化学 日本化学会編 産業化学シリーズ，大日本図書，p.86。