

土壌中の6-(N-benzylamino)purineの分析

誌名	日本農薬学会誌
ISSN	03851559
著者	箭木, 昭
巻/号	9巻2号
掲載ページ	p. 299-303
発行年月	1984年5月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



土壌中の 6-(*N*-benzylamino)purine の分析

箭木 昭, 篠原録郎, 浅野 譲, 石川莞爾

クミアイ化学工業株式会社生物科学研究所

(昭和 58 年 10 月 28 日受理)

Analysis of 6-(*N*-Benzylamino)purine in Soil

Akira YAGI, Rokuro SHINOHARA, Yuzuru ASANO and Kanji ISHIKAWA

*Life Science Research Institute, Kumiai Chemical Industry Co., Ltd.,
Kikugawa-cho, Ogasagun, Shizuoka 439, Japan*

An analytical method of 6-(*N*-benzylamino)purine (BA) in soil and its persistence in soil have been studied. BA in soil was extracted with a methanol-0.05 N sodium hydroxide (3 : 1) mixture, cleaned up by partition between acidic and neutral aqueous phases and ethyl acetate phase, and determined by gas chromatography with flame ionization or N·P-flame ionization detection. Recoveries from soils fortified with more than 0.1 ppm of BA were above 70% and varied somewhat with soil. The lower determination limit was 0.05 ppm of BA in soil by flame ionization detection or 0.01 ppm by N·P-flame ionization detection. BA dissipation in 2 different kinds of soils was compared by laboratory tests. BA dissipated more rapidly in the flooded condition than in the unflooded condition in both soils. Moreover, dissipation rate varied with soil. A field test showed a typical lag period of BA dissipation. BA dissipation in soil was presumed mainly owing to soil microbiological degradation.

緒 言

6-(*N*-Benzylamino)purine (ビーエー®, 以下 BA と略す) は合成サイトカイニンの一種で, プドウ, カボチャ, 水稲, また, リンゴに施用された場合, 農作上有用な効果が認められ, 農業用植物調整剤として実用化された。これらの効果を追求するため, 植物中における BA の挙動や植物生理上の作用についてはかなり研究されてきたが, 土壌中における挙動についてはまったく研究されていない。本報では, BA の残留性を研究するため土壌中の BA の分析方法を検討し, その消長を調べた。

試 験 方 法

1. 室内試験

室内試験には兵庫県農業試験場および茨城県農業試験場の水田および畑地圃場の表土を供試した。土壌の性質は次のとおりであった。兵庫水田土壌: 沖積砂壤土, 全炭素 2.11%, pH 6.31, C.E.C. 13.0 meq/100g, 兵庫

畑土壌: 沖積砂壤土, 全炭素 1.34%, pH 7.51, C.E.C. 12.0 meq/100g, 茨城水田土壌: 火山灰軽埴土, 全炭素, 6.10%, pH 6.28, C.E.C. 32.7 meq/100g, 茨城畑土壌: 火山灰軽埴土, 全炭素 6.56%, pH 5.48, C.E.C. 30.3 meq/100g.

試験方法は農薬の土壌残留試験実施要領, 容器内試験¹⁾に従った。

2. 圃場試験

試料調製は鳥取県果樹試験場および福島県果樹試験場で行ない, 分析は当研究所で行なった。

ビーエー乳剤 (有効成分量: BA 3%) の 50 倍希釈液を 100 l/10a (鳥取), または, 150 ml/m² (福島) の割合で畑地表面に均一に散布した。経時的に土壌を採取し, 分析に供した。

供試圃場の土壌の性質は鳥取土壌が埴土の火山灰土壌で, 全炭素 5.0%, pH 6.0, C.E.C. 28 meq/100g, また, 福島土壌は埴土の洪積土壌で, 全炭素 1.2%, pH 5.7, C.E.C. 20 meq/100g であった。

3. 分析方法

1) 試薬

メタノールおよび酢酸エチル：和光純薬製残留農薬分析用，塩酸，水酸化ナトリウムならびに無水硫酸ナトリウム：試薬特級，Celite 545：John Manville 製，BA 標準品：興人製，純度 98.7%。

2) ガスクロマトグラフ使用条件

室内試験試料分析は FID 検出により行なった。

機種：島津 GC-5APE，検出器：FID，分離管：内径 3mm，長さ 0.5m の U 字型ガラス管に，Polyester FFAP を 1% 被膜した 100~120 メッシュの Chromosorb W-HP を充填したもの，温度：分離管 240°C，注入口および検出器 263°C，ガス流速：キャリアー N_2 70 ml/min， H_2 55 ml/min，空気 800 ml/min。

また，圃場試験試料分析は N-P FID 検出により行なった。

機種：Hewlett-Packard 5710A，検出器：N-P FID，分離管：内径 2mm，長さ 1 フィートのガラス管に，sp-1000 を 2% 被膜した 100~120 メッシュの Chromosorb W を充填したもの，温度：分離管 255°C，注入口および検出器 300°C，ガス流速：キャリアー He 40 ml/min， H_2 5 ml/min，空気 100 ml/min，電圧：17 V。

3) 検量線の作成

BA 標準品をメタノールに溶かし，FID 検出の場合は 25 および 50 ppm，また N-P FID 検出には 0.5 および 2 ppm 溶液を調製した。FID 検出の場合は BA として 25 から 300 ng に相当する量を，また，N-P FID 検出の場合には 0.5 から 8 ng に相当する量を 2) の条件に調整したがガスクロマトグラフに注入し，ピーク高を測定し，常法により検量線を作成した。

4) 分析操作

乾土相当量 40~50g の土壌に 0.5N 水酸化ナトリウム-メタノール混合液 (1+3, v/v) 160 ml を加え，1 夜室温に静置した。振とう機で 30 分間振とうした後，桐山漏斗 (濾紙の上に 7g の Celite 545 をのせたもの) で吸引濾過した。残渣および容器を同じ組成の混合液 150 ml で洗い，同様に濾過した。濾液を合わせ，減圧下にメタノールを留去した (水浴 48°C 以下)。残渣を水で 100 ml とし，酢酸エチル 100 ml で 2 回抽出した。抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水し，約 2 ml まで減圧下に濃縮した。土壌中の BA 残存濃度が 0.5 ppm 以上の場合には濃縮液を酢酸エチルで正確に 4 ml とし，このうちの一定量をガスクロマトグラフ分析に用いた。また，BA 残存濃度が 0.5 ppm 以下の場合，濃縮液を酢酸エチルで 100 ml とし，0.5N 塩酸 50 ml で 2 回抽

出した。塩酸層を 5N 水酸化ナトリウムで pH 6.5~7.5 としたのち，酢酸エチル 100 ml で 2 回抽出した。抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水し，約 2 ml となるまで減圧下に濃縮した。二連球でゆるやかに空気を送り，酢酸エチルを蒸発させ，残渣を 0.4 ml の酢酸エチルに溶かし，ガスクロマトグラフ分析に用いた。

実験結果および考察

1. BA の分配性

水中の BA を有機溶媒で効率よく抽出するため，pH の異なる水と有機溶媒 (酢酸エチル，クロロホルムおよびジエチルエーテル) との間の分配について検討した。BA の 40 ppm 水溶液 (pH 6) を調製し，塩酸もしくは水酸化ナトリウム溶液で Fig. 1 の pH に合わせ，等量の有機溶媒で抽出し，有機溶媒中の BA を定量した。有機層への BA の移行率 (%) と水溶液の pH との関係を図 1 に示した。

供試した 3 種類の有機溶媒への移行率は酢酸エチルが最も大きく，次いでクロロホルム，ジエチルエーテルの順となり，水溶液中の BA を抽出するには酢酸エチルがもっともよいと考えられる。また，pH 1 以下で有機溶媒への移行率がきわめて小さいことは，有機溶媒中の BA が 0.1N 以上の塩酸で逆抽出でき，精製に利用できることを示唆する。

BA の水に対する溶解度²⁾ は pH 6~8 の間でもっとも小さく，pH 4 以下および pH 11 以上で急激に増加するが，クロロホルムおよびジエチルエーテルへの移行率は水への溶解度と逆の関係を示した。

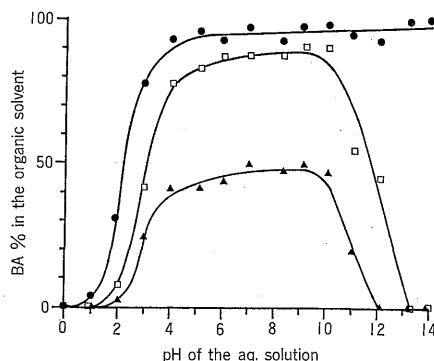


Fig. 1 Changes in the BA amount partitioned in organic solvent by the pH value.

●: ethyl acetate, □: chloroform, ▲: diethyl ether.

Table 1 Efficiency of BA extraction from soil with several solvents.

Solvent (ratio, v/v)	Recovery (%)
Methanol	55
0.1 N NaOH	83
0.5 N NaOH	103
0.5 N NaOH-Methanol (1+6)	95
" (1+3)	98
" (1+1)	95
0.1 N HCl	1
0.5 N HCl	1
2.0 N HCl	5
2.0 N HCl-Methanol (1+6)	34
" (1+3)	25
" (1+1)	10

2. 土壌からの抽出条件

植物中の BA はメタノール^{8,4)} またはエタノール⁵⁾ で抽出される。

このように、植物体中の BA の抽出溶媒についてはかなり検討されているが、土壌についてはまったく検討されていない。植物の例からみて、土壌もメタノールを主体とする溶媒がよいと考えられる。一方、BA は pK_a 10.9 で、スルホン酸樹脂に効率的に置換され⁴⁾、負電荷をもつ土壌コロイド表面に抽出条件によっては吸着されてしまう可能性がある。このため、メタノールを中心とし、BA の抽出条件を検討した。兵庫土壌 50 g に BA 1 mg を添加し、よく混合した後、Table 1 に記載した溶媒のおおの 150 ml で振とう抽出し、抽出された BA 量を測定し、えられた結果を Table 1 に示した。メタノールでは添加量の 55% が回収されたに留まり、塩酸ではほとんど回収されなかったが、水酸化ナトリウムでは 0.5 N の濃度で BA を良好に回収できた。メタノールに塩酸または水酸化ナトリウムを混合すると、前者はやはり回収率が低く、後者は混合比に関係なくほぼ同等の回収率を示した。さらに濾過操作の難易をも考慮し、0.5 N 水酸化ナトリウム-メタノール (1+3) 混合物を抽出溶媒とした。

3. クリンアップ

BA の分離・精製についてはイオン交換樹脂⁴⁾、TLC^{4,5)}、液々分配^{8,5,6)} が知られている。今回 1. で検討した pH による分配係数の差を利用した液々分配は玄米ではガスクロマトグラフィーの妨害物質を簡便に除去できた³⁾ ので、土壌抽出液にも同様の試みをしたところ不純物の大部分が除去され、FID では乾土に対し 0.05 ppm の BA が検出可能で、また、N-P FID では

0.01 ppm まで十分に検出できた。なお、今回用いた兵庫土壌では、BA 濃度が 0.5 ppm 以上のとき、アルカリ性下の酢酸エチル抽出のみで十分に定量可能であった。兵庫土壌以外の土壌でも、残留量の高い場合はクリンアップが簡略化できると考えられる。

本法では 0.01 ppm まで定量が可能と考えられるが、それ以下の濃度ではさらにクリンアップをするか、BA の検出感度の向上を図る必要がある。その後、作物中の BA の定量に用いられたアルキル化⁶⁾ は比較的容易で、ピークが鋭くなり、また感度が向上するので、この方法によれば低濃度の定量が可能と考えられる。

4. 回収率

兵庫、茨城、鳥取および福島を土壌を用いて添加試験を行い、えられた結果を Table 2 に示した。

供試した 4 種類の土壌の回収率は、0.1 ppm 以上添加した場合、70% 以上の値をえたが、今回の結果からみる限り、火山灰土壌でいくぶん回収率の低い傾向がみられた。火山灰土壌は、その主粘土鉱物は allophane で、有機物含量が大きく、また、C.E.C. も大きい。これらの性質は農薬の吸着と正の相関の大きい性質⁷⁾ であり、今回火山灰土壌で回収率のいくぶん低かった理由は土壌への BA の吸着によるものと考えられる。

5. 土壌中における消長

土壌中の BA の消長について調べるため、灌水および非灌水条件での室内試験および畑地での圃場試験を行った。

室内試験における結果は Fig. 2 に示した。なお、BA の半減に要する期間 (半減日数) を一次速度式で計算

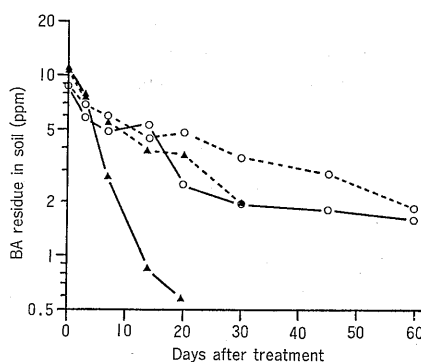


Fig. 2 Changes in the BA concentration in Ibaraki and Hyogo soils under the unflooded and the flooded conditions by laboratory tests.

Soils	Unflooded	Flooded
Ibaraki	...○...	—○—
Hyogo	...▲...	—▲—

Table 2 Recovery % of BA from soils.

Added concentration (ppm)	Soil					
	Hyogo		Ibaraki		Tottori	Fukushima
	Paddy	Upland	Paddy	Upland	Upland	Upland
Not added	n.d. ^{a)}	n.d. ^{a)}	n.d. ^{a)}	n.d. ^{a)}	n.d. ^{b)}	n.d. ^{b)}
0.1	68				80	88
	76				82	92
	78				84	98
mean	74.0				81.3	92.7
c.v.	7.2				1.1	5.0
1.0	82				80	78
	86				83	88
	88				90	92
mean	85.3				84.3	86.0
c.v.	3.6				5.1	7.2
11.0	95	95	77	77		
	104	94	80	76		
	99	94	78	76		

^{a)} below 0.05 ppm, ^{b)} below 0.01 ppm.

Table 3 The dissipation rates and the half lives of BA in soil by laboratory and field tests.

Test	Soil	Condition	Dissipation rate, $k^a)$	Half life, day	Correlation coefficient	Number of sample
Laboratory	Hyogo	Flooded	-0.1575	4.4	0.9822	5
		Unflooded	-0.0533	13.0	0.9870	6
	Ibaraki	Flooded	-0.0273	25.3	0.9093	8
		Unflooded	-0.0226	30.6	0.9807	8
Field	Tottori	Upland	-0.0632	11.0	0.9783	7
	Fukushima	Upland	-0.0304	22.8	0.9116	9
	Fukushima ^{b)}	Upland	-0.0443	15.6	0.9842	5
	(corrected)			(35.6 ^{c)})		

^{a)} $dx/dt = -kt$, where x is the concentration of BA in soil and t the time after treatment.

^{b)} Calculated from the period between 21 and 90 days after the application of BA, omitting the lag time of 20 days after the application.

^{c)} 20 (omitted) + 15.6 = 35.6.

し、Table 3 に示した。

室内試験でえられた結果を比較すると、いずれの条件下でも茨城土壌のほうが半減日数が大きかった。また、土壌条件を比較すると両土壌とも湛水条件のほうが非湛水条件よりも BA が速やかに減少した。試験条件から BA の減少は土壌微生物による分解、および化学的な分解によると考えられるが、BA はとくに還元条件下で化学変化しやすい官能基がなく、核酸関連物質のため微生物に利用されやすいと考えられ、主たる減少要因は土壌微生物による分解と推定される。

圃場試験は鳥取県果樹試験場(火山灰土壌)および福島県果樹試験場(洪積土壌)の畑地圃場にピーエー乳剤

を散布し、実施した。えられた結果は Fig. 3 に示した。散布直後に採取した土壌から 0.50 ppm (鳥取) および 0.63 ppm (福島) の BA が検出され、散布量に対し、それぞれ 76, 83% であった。Fig. 3 にみられるように、鳥取圃場では BA が散布直後より速やかに減少したのに対し、福島圃場では散布直後約 30 日間は BA があまり減少せず、30 日を過ぎてから速やかに減少した。この期間を BA 分解に関係する土壌微生物活性の誘導期間と考えれば、その後の速やかな減少が矛盾なく説明できる。さらに、この誘導現象からみれば、圃場における BA の減少に光分解、揮散、溶脱、植物による吸収分解のような要因の占める割合は小さいものと考えら

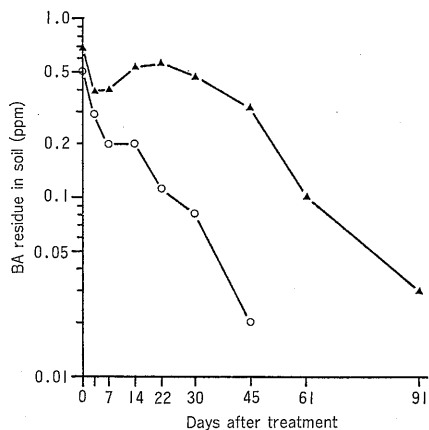


Fig. 3 Dissipation of BA in Fukushima and Tottori upland fields.

▲: Fukushima, ○: Tottori.

れる。

上述のごとく、室内試験では供試した2土壤間では半減日数にかなりの差がみられた。一方、圃場試験では誘導期の有無のため差がみられた。福島誘導期の後の減

少速度は、Table 3 に示すように、鳥取の数値にかなり近いが、一致はしなかった。Table 3 に示した非湛水条件および畑地条件の減少速度を比較しても試験の種類による差はみられず、個々の土壤による差がみられる。しかし、今回行った4種類の土壤での結果から土壤の性質と減少との関係は明確ではなかった。

引用文献

- 1) 農林水産省農薬検査所: 農薬の土壤残留試験実施に関する指針, 1979
- 2) 岡田勝彦・市野元信・荒木靖雄: 特公昭 43-6954
- 3) 篠原録郎・箭木 昭・石川莞爾: 日本農薬学会第3回大会講演要旨集, p. 222, 1978
- 4) V. W. Winkler: "Analytical Methods for Pesticides and Plant Growth Regulators," eds. by G. Zweig & J. Sherma., Vol. 10, Academic Press, New York, p. 545, 1978
- 5) A Ramina: *Plant Physiol.* **63**, 298 (1979)
- 6) 篠原録郎・大石利治・浅野 讓・永山孝三・石川莞爾・石原英助: 日本農薬学会第8回大会講演要旨集, P-5, 1983
- 7) 井上克弘: 生物と化学 **7**, 596 (1969)