報 文

除草剤アロキシジムおよび分解物の残留分析法

小野成男, 遠山典宏, 杉岡克己
時枝正則, 野村修三, 塚田松吾

日本曹達(株) ファインケミカル研究所
(昭和55年6月10日受理)

Residue Analysis of Alloxydim-sodium and Its Degradation Products

Shigeo ONO, Norihiro TOYAMA, Katsumi SUGIOKA, Masanori TOKIEDA,
Osami NOMURA and Shogo TSUKADA

*Fine Chemicals Research Laboratory, Nippon Soda Co., Ltd.,
Takada, Odawara, Kanagawa 250-02, Japan*

Residue analysis of alloxydim-sodium[sodium salt of 2-(1-allyloxyaminobutylidene)-5,5-dimethyl-4-methoxycarbonyl cyclohexane-1,3-dione] and its degraded compounds in crops and soils were investigated. As a result of the experiments by three different analytical methods, high performance liquid chromatography (HPLC), gas chromatography (GC) and ultra-violet spectrophotometry (UV), the HPLC method was found to be most suitable. Alloxydim and degraded compounds in samples were extracted with methanol. These compounds in an aqueous methanol solution were extracted separately with *n*-hexane and methylene chloride. Alloxydim in *n*-hexane was cleaned up by liquid-liquid separation. Degraded compounds in methylene chloride were subjected to thin layer chromatography. Each compound was determined by the HPLC method. The lower limit of detection for each compound was 0.01 ppm. Recoveries of alloxydim were 86-93% in crops and 85-91% in soils, and those of degraded compounds were 75-92% in crops and 87-92% in soils.

緒 言

選択性除草剤アロキシジム [sodium salt of 2-(1-allyloxyaminobutylidene)-5,5-dimethyl-4-methoxycarbonyl-cyclohexane-1,3-dione, 以下 ADS と略す] およびこの分解物である CM-I [2-(1-aminobutylidene)-5,5-dimethyl-4-methoxycarbonylcyclohexane-1,3-dione], CM-II [methyl 6,6-dimethyl-2-propyl-4-*oxo*-4,5,6,7-tetrahydrobenzoxazole-5-carboxylate] および CM-III [methyl 6,6-dimethyl-2-propyl-4-*oxo*-4,5,6,7-tetrahydrobenzoxazole-7-carboxylate] の環境中での残留量を把握するために分析法を検討した。

ADS の遊離体 AD およびこれら分解物はいずれも紫外部に吸収スペクトルを有するため、紫外吸光度法や

紫外線検出器付高速液体クロマトグラフ法での定量が可能であった。同時に電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフ法による定量法についても検討した。ADS は各種作物に使用されるため、抽出およびクリーンアップ操作はなるべく画一的な方法を考えた。

この結果、高速液体クロマトグラフ法および紫外吸光度法ではこれら4化合物の定量が可能であった。ガスクロマトグラフ法では誘導体を合成することにより、AD および CM-I の定量が可能であった。紫外吸光度法は作物、土壌の場合、妨害を受けやすく主として水系の残留分析に適用可能であったが、高速液体クロマトグラフ法およびガスクロマトグラフ法は各種作物および土壌の残留分析に十分満足できる結果が得られた。

分 析 法

1. 高速液体クロマトグラフ法

1) 試薬および機器

試薬類は特級品をそのまま使用した。ただし、高速液体クロマトグラフィーの溶離液に使用する場合は、ガラス器具を用いて蒸留した。

ADS 精製品：原体を少量のメチルアルコールに溶かし、二塩化エタンで希釈する。メチルアルコールを留去し析出した ADS を濾別する。ADS を少量のメチルエチルケトンで洗浄する。純度 99% 以上，融点 185.5°C（分解）

CM-I 精製品：精製した 2-butyloxy-5,5-dimethyl-4-methoxycarbonylcyclohexane-1,3-dione とアノニアの縮合により合成。純度 99% 以上， n_D^{25} 1.5406

CM-II 精製品：AD をエチルアルコール中で加温して合成，カラムクロマトグラフ精製。純度 99% 以上， n_D^{25} 1.5035

CM-III 精製品：AD をエチルアルコール中で加温して合成し，オキシム体で誘導して CM-II と分離する。加水分解後，カラムクロマトグラフ精製。純度 99% 以上，融点 82-83°C

これら化合物の物性値はすでに報告¹⁾されている。

高速液体クロマトグラフ：バリアン製 4200 型

同検出器：バリアン製紫外分光光度計

2) 高速液体クロマトグラフィーの条件

分離管：内径 2 mm，長さ 50 cm，ステンレス製

充填剤：マイクロバック SI-10

溶離液：0.5% メチルアルコール/塩化メチレン (AD, CM-II, III 定量用)，1.5% メチルアルコール/塩化メチレン (CM-I 定量用)

流速：0.5 ml/min

検出条件：波長 254 nm，フローセル容量 8 μ l，室温

記録紙速度：5 mm/min

3) 検量線の作成

① 土壌 500 ppm の ADS 水溶液 1, 2, 4 および 6 ml を採取し，0.1 N 塩酸 20 ml を加えて弱酸性とし，20 ml のヘキサンを加えて振とうし抽出する。さらに 2 回抽出をくり返す。抽出したヘキサン溶液を合わせて脱水し，溶媒を減圧留去する。乾固物を塩化メチレンに溶かし 100 ml メスフラスコに移し，5, 10, 20 および 30 ppm の塩化メチレン溶液を調製する。この溶液 10 μ l を高速液体クロマトグラフに注入する。ピークの高さを測定し検量線を作成する。

CM-I, II および III はそれぞれ，5, 10, 15 および

20 ppm のクロロホルム溶液を調製し，10 μ l を高速液体クロマトグラフに注入し，ピーク高さを測定し検量線を作成する。

② 作物 ADS は土壌の場合と同様に作成する。CM-I, II および III は，それぞれ 500 ppm のクロロホルム溶液 1, 2, 3 および 4 ml を 10 ml のメスフラスコ中に採取し，クロロホルムで定容とする。この溶液 100 μ l を薄層プレート（メルク社製シリカゲルアルミシート，Art. 5554）に塗布し溶媒（クロロホルム/アセトン=8/2）で 10 cm ほど展開する。それぞれの R_f の部分を切り取り，メタノール 25 ml に 10 分間浸漬し抽出する。メタノール抽出液を減圧濃縮し乾固する。乾固物を正確にクロロホルム 1.0 ml に溶解し，この溶液 10 μ l を高速液体クロマトグラフに注入し検量線を作成する。

4) 分析操作

① 土壌 乾土換算 30 g の土壌を 500 ml の三角フラスコ中に入れ，0.1 N 塩化アンモニウム溶液 20 ml，メチルアルコール 80 ml を加えて 10 分間振とうする。内容物を遠心分離（8,000 rpm）を行ない，上澄液を濾過する。残渣を再び 0.1 N 塩化アンモニウム溶液 20 ml，メチルアルコール 80 ml を加えて 10 分間振とうする。同様に遠心分離を行ない，吸引濾過する。残渣を 0.1 N 塩化アンモニウム溶液 120 ml で洗浄し吸引濾過する。濾液を合わせ塩化ナトリウム 2 g，濃塩酸 3 ml を加えて，100 ml のヘキサンで 3 回振とう抽出する。〔ヘキサン抽出後の水層は CM-I, II および III の分析に供する〕。0.1 N 水酸化ナトリウム溶液 100 ml をヘキサン抽出液に加え 5 分間振とうして AD をアルカリ層に移す。この操作をくり返す。抽出したアルカリ溶液を合わせてクロロホルム 50 ml で 3 分間振とうし洗浄する。クロロホルム層は捨てる。アルカリ溶液をヘキサン 50 ml で 3 分間振とう洗浄する。ヘキサン層は捨てる。アルカリ溶液に濃塩酸 10 ml を加え酸性とし，ヘキサン 100 ml を加えて 10 分間振とう抽出する。この操作をさらに 2 回くり返す。ヘキサン層を合わせ蒸留水 50 ml で洗浄後脱水し，減圧濃縮し，注意して乾固する。乾固物を正確に 1.0 ml のクロロホルムに溶解し，この液 10 μ l を高速液体クロマトグラフに注入し，検量線から ADS の含有量を求める。

〔CM-I, II および III の定量〕

ヘキサン抽出後のメチルアルコール溶液に 100 ml の塩化メチレンを加え 5 分間振とうし，CM-I, II および III を抽出する。この抽出操作をくり返す。塩化メチレン層を合わせ，0.1 N 水酸化ナトリウム溶液 50 ml で 1 回，蒸留水 50 ml で 1 回それぞれ洗浄し，洗浄液は捨て

Fig. 1 Flow diagram of analytical method for residues in soil.

Operating conditions of HPLC; Detector: UV (254 nm), Column: Micropak Si-10, ϕ 2 mm $\times$ 50 cm, Mobile phase: 0.5% methanol/methylene chloride (for AD, CM-II, III), 1.5% methanol/methylene chloride (for CM-I), Flow rate: 0.5 ml/min.

Fig. 2 Flow diagram of analytical method for residues in crops.

* *tlc* condition

Merck Art 5554®

Chloroform: Acetone (8 : 2)

る。塩化メチレン溶液を脱水後、減圧濃縮し乾固する。乾固物を正確に 1.0 ml のクロロホルムに溶解し、この液 10 μ l を高速液体クロマトグラフに注入し、検量線か

ら、CM-I, II および III を定量する。Fig. 1 に操作法の概要を示す。

② 作物 細切りにした野菜 100 g をブレンダー中に

秤取し、メチルアルコール 100 ml を加えて 10 分間ブレンダーで均質化する。スラリーを遠心分離 (8,000 rpm) し、吸引濾過後、残渣を 50 ml のメチルアルコールで洗浄し、この液も濾液に合わせる。水 80 ml、塩化ナトリウム約 5 g と塩酸 3 ml を加え攪拌後、数分間放置する。溶液を遠心分離し、濾過する。濾液に 100 ml のヘキサンを加え、5 分間振とうし AD を抽出する。この操作をさらに 2 回くり返す。〔抽出後の水層は CM-I, II および III の定量に供する〕。AD の定量は土壌の場合と同様に操作する。代謝物の定量は、ヘキサン抽出後の水層を 100 ml の塩化メチレンで 2 回抽出し洗浄後減圧濃縮し乾固する。乾固物を塩化メチレンに溶解し、薄層プレートに全量塗布して、以下検量線の作成方法に従って操作し含有量を求める。Fig. 2 に操作法の概要を示す。

2. ガスクロマトグラフ法

1) 試薬および機器

試薬類は特級品をそのまま使用した。ただし、四塩化炭素は特級品をガラス器具を用いて蒸留した。

ADS および CM-I 精製品は高速液体クロマトグラフ法の場合と同様である。

ガスクロマトグラフ：島津製 GC5A 型

同検出器：電子捕獲型 (^{63}Ni 使用)

2) ガスクロマトグラフィーの条件

分離管：内径 3 mm、長さ 1 m、ガラス製

充填剤：2% DC-11/クロモソルブ G, AW, DMCS, 60~80 メッシュ

温度：注入部 210°C、カラム 180°C、検出器 250°C
キャリアガス：高純度窒素、0.3 kg/cm² (AD)、0.6 kg/cm² (CM-I)

記録紙速度：10 mm/min

3) 検量線の作成

5 ppm の ADS 水溶液 1, 2, 3, 4 および 5 ml を 100 ml の分液漏斗に採取し、0.1 N 塩酸 20 ml を加えてヘキサン 20 ml で 3 回振とう抽出する。ヘキサン層を合わせ脱水し、溶媒を減圧留去する。乾固物を 5 ml の四塩化炭素に溶解し、N-クロロスクシンイミド約 50 mg と沸石を加え、10 分間加熱還流する。反応後溶媒を完全に留去し、乾固物を 25 ml のヘキサンに溶解し、10 ml の 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液、10 ml の 1 N 塩酸および 30 ml の蒸留水で順に洗浄する。洗浄液は捨てる。ヘキサン溶液を脱水し、正確に 25 ml とし、この溶液 2 μl をガスクロマトグラフに注入し検量線を作成する。

500 ppm の CM-I クロロホルム溶液 1, 2, 3, 4 および 5 ml を 10 ml のメスフラスコ中に採取し、クロロ

ホルムで定容とする。それぞれの溶液 100 μl を薄層プレート〔メルク製シリカゲルアルミシート, Art. 5554〕に塗布し、溶媒 (クロロホルム/アセトン=8/2) で展開する。CM-I のバンドを切り取り、50 ml の分液漏斗中に入れ、25 ml のクロロホルムで 2 回振とう抽出する。抽出液は濾過し減圧で濃縮し、少量になったときに 25 ml 共栓試験管に入れ乾固する。乾固物は 2 ml のヘキサンに溶解し、0.2 ml の無水トリフルオロ酢酸を加え密栓し、10 分間室温で放置する。20 ml の蒸留水を加え、25 ml のヘキサンで 2 回振とうし、CM-I 反応物をヘキサン層へ移す。ヘキサン層を 10 ml の 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液および 10 ml の蒸留水で順に洗浄する。ヘキサン溶液を脱水し、50 ml として、この液 2 μl をガスクロマトグラフに注入し検量線を作成する。

4) 分析操作

抽出および液液分配の操作は高速液体クロマトグラフ法の分析操作に従って行なう。液液分配後、検量線の作成方法に従って操作する。

3. 紫外吸収スペクトル法

1) 試薬および機器

試薬類は特級品をそのまま使用した。

ADS および分解物精製品は高速液体クロマトグラフ法の場合と同様である。

分光光度計：日立製 124 型

液体用セル：5 cm 角形石英セル

2) 検量線の作成

500 ppm の ADS 水溶液 10, 20, 30, 40 および 50 ml を 100 ml の分液漏斗に採取し、1 N 塩酸 1 ml を加えて 25 ml のクロロホルムで 2 回振とう抽出する。クロロホルム層を合わせ 100 ml メスフラスコ中に移し、クロロホルムで定容とする。この溶液 100 μl を薄層プレートに塗布し、溶媒 (クロロホルム/アセトン=8/2) で展開する。AD の R_f の部分を切り取り、25 ml の栓付試験管中に入れ正確に 20 ml のメチルアルコールを加えて薄層プレートの切片を浸漬し、密栓して 10 分間放置する。1 N 水酸化ナトリウム溶液 0.1 ml を加え、静かに混合し 5 cm 石英セルに移す。対照にはブランクの薄層プレートの切片を浸漬したメチルアルコール溶液を用い、220~340 nm の領域の吸収スペクトルを測定する。ベースライン法により検量線を作成する。

CM-I, II および III については、それぞれの 500 ppm クロロホルム溶液 1, 2, 3, 4 および 5 ml を 10 ml のメスフラスコ中に採取し、クロロホルムで定容とする。それぞれの溶液 100 μl を薄層プレートに塗布し、溶媒 (ベンゼン/酢酸エチル=10/3) で展開する。以下 ADS

の場合と同様に操作するが、水酸化ナトリウム溶液は添加しない。

3) 分析操作

抽出および液液分配の操作は高速液体クロマトグラフ法の分析操作に従って行なう。液液分配後、検量線の作成方法に従って操作する。

実 験

1. 紫外吸収スペクトル

メチルアルコール中で各化合物の紫外吸収スペクトルを測定した結果、AD は 254, 285 nm, CM-I は 253, 289 nm, CM-II は 253 nm, CM-III は 248 nm にそれぞれ極大吸収を示すことがわかった。AD は有機溶媒中では、ケト、エノール型構造による二つの吸収帯を有するが、アルカリ溶液中ではエノール型構造を有するため、287 nm に一つの極大吸収を示す。このため ADS の測定にはメチルアルコール溶液に 1N 水酸化ナトリウム溶液を 0.1 ml 添加した。紫外吸収スペクトル法で測定する場合妨害を受けやすいので、ベースライン法を採用した。各化合物の分子吸光係数は Table 1 のとおりである。

2. 高速液体クロマトグラフィーの条件

検出器として蛍光光度計の利用を検討したが、各化合物ともそのままの形ではいずれも蛍光を発しなかった。化合物の紫外吸収スペクトルの極大吸収波長はそれぞれ少しずつ異なっているが、250 nm 付近に認められたので固定波長の検出器でも使用できるように 254 nm を検出波長とした。分離管充填剤としてマイクロパック SI-10, マイクロパック CH-10, マイクロパック CN-10 (いずれもバリアンのバックドカラム) と日立ゲル #3010, #3050 を用いてピークの形状、感度および CM-II, III の分離を主として検討した結果、マイクロパック SI-10 が優れていた。水系カラムで水・メチルアルコールを溶離液とする場合、AD をメチルアルコールに溶解しておくとき経時的に異性体の生成量が増加し、ピークが二つに分かれることが認められた。マイクロパック SI-10 を充填剤とし、溶離液に 0.5% メチルアルコール/塩化メチレンを用いた場合、各化合物の保持時間 (分) は AD は 4.6, CM-I は 22.4, CM-II は 6.4, CM-III は 7.5 で CM-I がかなり遅れて溶出されることがわかったので、CM-I の溶離液としては 1.5% メチルアルコール/塩化メチレンとした。この場合、グラジエント溶出法も可能であるが、一定組成の溶液で溶出させたほうが常行的に分析する場合、再現性や分析所要時間等に有利な点が多かったので、グラジエント法は採用しなかった。この

Table 1 Molar extinction coefficient of AD & CM-I, II, III.

Compound	$\lambda_{\max}$ (nm)	ϵ	Solvent
Alloxydim	287	2.0×10^4	dil. NaOH
CM-I	253	1.5×10^4	MeOH
	289	1.6×10^4	MeOH
CM-II	253	7.2×10^3	MeOH
CM-III	248	7.2×10^3	MeOH

CM-I の溶離液では CM-II と III の分離は不十分であった。カラムはすべて室温状態とし温度の影響についてはとくに検討しなかった。Table 2 に溶離液と各化合物の保持時間を示した。

3. 抽出溶媒の検討

作物、土壌からの抽出溶媒としてメチルアルコールを使用した。メチルアルコールの代りにアセトンについても検討したがとくに優れた利点は見いだせなかった。土壌から各化合物を抽出する場合の溶媒について検討した結果 Table 3 に示すように塩化アンモニウムとメチルアルコールの混合溶媒が最も良好であったので採用した。

4. クリーンアップの検討

液液分配と薄層クロマトグラフィーによるクリーンアップを検討した。カラムクロマトグラフィーは分析対象物が多く、妨害成分も多い場合、条件の選定に長時間を要することが予想されたので、とくに検討しなかった。液液分配の検討の結果、水・メチルアルコールと塩化メチレンの場合、AD および分解物が塩化メチレン層に分配されること、水・メチルアルコールとヘキサンの場合には AD のみヘキサン層に分配されること、有機溶媒中の AD は 0.1N 水酸化ナトリウム溶液で抽出できること、有機溶媒中の CM-I は希塩酸で抽出されないことがわかった。水・メチルアルコール中の AD の抽出に塩化メチレンを用いた場合、抽出率はヘキサンよりもわずかよかったが妨害物をよけいに抽出することとアルカリ液と分配する場合ヘキサンのほうが分液が良好だったため、AD の抽出にはヘキサンを使用した。

土壌および水試料の場合は、液液分配によるクリーンアップのみで対象化合物の定量を妨害するピークは認められなかったが、作物の場合、分解物の定量を妨害するピークが認められたので、薄層クロマトグラフによるクリーンアップを検討した。薄層板は各化合物のバンドを容易に切り取ることが出来るアルミシート (メルク製シリカゲル Art. 5554) を使用した。クロロホルム/アセトン=8/2) を用いた場合分解物と妨害物の分離がよかつ

Table 2 Retention time (t_R) of AD and its decomposed compounds by HPLC.

Column	Compound	Mobile phase	t_R (min)	Resolution of CM-II & CM-III
Micropak Si-10	AD	0.5% MeOH/CH ₂ Cl ₂	4.6	1.3
	CM-I		22.4	
	CM-II		6.4	
	CM-III		7.5	
	AD	1.5% MeOH/CH ₂ Cl ₂	3.9	0.3
	CM-I		7.4	
	CM-II		4.4	
	CM-III		4.8	
Micropak CN-10	AD	50% Hexane/CH ₂ Cl ₂	2.9	1.5
	CM-I		23.4	
	CM-II		8	
	CM-III		9.8	
	AD	CH ₂ Cl ₂	1.9	0.3
	CM-I		3.8	
	CM-II		2.4	
	CM-III		2.5	
Micropak CH-10	AD	30% H ₂ O/MeOH	6.6	0
	CM-I	40% H ₂ O/MeOH	6.5	
	CM-II	"	5.5	
	CM-III	"	5.5	
Hitachi-gel #3010	AD	MeOH	8.4	0
	CM-I		4.2	
	CM-II		5.6	
	CM-III		5.6	
	AD	10% H ₂ O/MeOH + 0.2% NH ₄ OH	3.0	0
	CM-II	10% H ₂ O/MeOH	14.8	
	CM-III		14.8	
Hitachi-gel #3050	AD	50% H ₂ O/MeOH	3.4	0.23
	CM-I		8.6	
	CM-II		9.4	
	CM-III		10.0	

Table 3 Comparison of extractability from soil.

Solvent	Extractability (%)	
	ADS	CM-I, II, III
MeOH	90-95	85-95
MeOH/H ₂ O/EtOAc 2 : 2 : 1	85-90	85-90
MeOH/H ₂ O 1 : 1	85-90	90-95
0.1N NH ₄ Cl/MeOH 1 : 4	90-96	90-95

た. この溶媒系では CM-II と III の R_f は近似しているが高速液体クロマトグラフィーの場合, CM-II と III を同時に切り取り抽出し, カラムで分離する方法を採用

した. しかし, 紫外吸収スペクトル法の場合には CM-II と III の分離を完全にすることが必要であったので, ベンゼン-酢酸エチル (10 : 3) の溶媒系を用いた.

5. ガスクロマトグラフ定量用の誘導体の合成

AD および分解物はガスクロマトグラフに注入した場合, 熱により分解したり, 電子捕獲型検出器 (ECD) に対する感度が不足するため, そのままの形では残留分析に適用できなかったため, 誘導体の合成を検討した.

1) AD

ヘキサンを溶媒として無水トリフルオロ酢酸と室温で反応させて得られた誘導体はガスクロマトグラフ中で十分な感度を示さなかったことから, 熱分解しているものと推定された. アリル基に臭素を付加させることを目的として合成した誘導体もガスクロマトグラフの中で熱分

Fig. 3 Effect of reaction time on chlorination of AD.

AD: 50 μ g, NCS: 50 mg.

Fig. 4 Effect of amount of NCS on chlorination of AD.

AD: 50 μ g, Reaction time: 10 min.

解を起こした。N-ブロモスクシンイミドとの反応は定量性に乏しく、しかも生成物のガスクロマトグラムはピークの形状が悪かった。これに対して N-クロロスクシンイミド (NCS) との反応で得られた塩素付加体は、熱に安定であり ECD にも十分な感度を示した。塩素化の条件を決めるために NCS の添加量、反応時間について検討した。結果を Fig. 3 および Fig. 4 に示す。なおこの実験を甜菜葉 100 g を使用した場合でも同じ結果が得られた。これらの結果から、NCS の添加量および反応時間はとくに厳密に設定する必要はないが、本報では NCS 50 mg、反応時間 10 分とした。反応は定量的であり 0~1.0 ppm の範囲において、ADS の量とピーク面積の関係は直線が得られた。また 40 μ g の AD を用いて 6 回のくり返し実験を行なって再現性を検討した結

果、変動係数は 5.8% であり、十分実用性があることがわかった。

2) CM-I

CM-I の誘導体はいろいろ考えられるが、無水トリフルオロ酢酸 (TFAA) と反応させて得られた誘導体は ECD に対する感度も良好であったので、この他の誘導体についてはとくに検討は行なわなかった。この場合、溶媒として *n*-ヘキサン、温度は室温とし、TFAA の添加量を 0.2 ml と 0.5 ml、反応時間を 5~60 分の間で検討した結果、TFAA の量は 0.2 ml で十分であり、反応時間は 5~10 分がよかった。反応時間が 30 分以上になると、副成分を生じピークがブロードになり、濃度とピーク面積との間に直線関係が得られなくなった。以上の結果、反応条件として *n*-ヘキサン、室温、TFAA の添加量 0.2 ml、反応時間 10 分とした。反応は定量的であり、感度もきわめてよいが、定量範囲は 0.1~0.5 ppm と ADS の場合より狭かった。

3) CM-II および III

現在実用性のある誘導体を得られていないので、CM-II および III についてはガスクロマトグラフによる定量はできない。

6. 検出限界および回収率

1) 高速液体クロマトグラフ法

各化合物それぞれ 10 ng を注入したとき、ピーク高約 5 mm の明瞭なピークが認められたので、これを最小検出量とした。試料秤取量を 100 g、最終液量を 1 ml、注入量を 10 μ l とした場合、検出限界は 0.01 ppm であり、十分実用的であることがわかった。

2) ガスクロマトグラフ法

ADS および CM-I の最小検出量はそれぞれ 0.08 ng、0.04 ng であった。試料 100 g を用いて最終液量を 25 ml とし、この液 2 μ l をガスクロマトグラフに注入しているため、検出限界は ADS で 0.01 ppm、CM-I で 0.005 ppm である。

3) 紫外吸光度法

ADS を希アルカリ溶液で測定した場合、液量 15 ml で、5 cm 角形セルを使用すると 1 μ g の透過率は 95% で、明らかに吸収帯が認められたので 1 μ g を最小検出量とした。CM-I はメチルアルコール中で同様に 1 μ g を最小検出量とした。CM-II および III は吸光係数が小さいことと吸収帯が短波長側にあるため、95% の透過率を得るために 3 μ g を必要としたので、3 μ g を最小検出量とした。

土壌および作物に ADS および分解物を添加して分析し回収率 ($n=2$) を求めた結果を Table 4, 5 に示す。

Table 4 Percent recoveries of each fortified compound in soil by HPLC.

Soil	Compound	Sample weight (g)	Concentration (ppm)	Recovery* (%)
Nagano (humas volcanic ash, loam)	ADS	30	0.225	85
	CM-I	30	0.225	87
	CM-II	30	0.225	88
	CM-III	30	0.225	90
Mie (sandy loam)	ADS	30	0.225	94
	CM-I	30	0.225	90
	CM-II	30	0.225	87
	CM-III	30	0.225	90
Aichi (sandy loam)	ADS	30	0.225	88
	CM-I	30	0.225	89
	CM-II	30	0.225	92
	CM-III	30	0.225	92

* Values are the average of duplicates.

Table 5 Percent recoveries of each fortified compound in crop by HPLC.

Crop	Compound	Sample weight (g)	Concentration (ppm)	Recovery* (%)
Sugar beet (root)	ADS	100	0.2	87
	CM-I	100	0.2	82
	CM-II	100	0.2	78
	CM-III	100	0.2	78
Sugar beet (top)	ADS	100	0.2	90
	CM-I	100	0.2	92
	CM-II	100	0.2	79
	CM-III	100	0.2	84
Soybean	ADS	50	0.2	92
	CM-I	50	0.2	82
	CM-II	50	0.2	76
	CM-III	50	0.2	76
Onion	ADS	100	0.2	86
	CM-I	100	0.2	88
	CM-II	100	0.2	78
	CM-III	100	0.2	76
Potato	ADS	100	0.2	86
	CM-I	100	0.2	82
	CM-II	100	0.2	77
	CM-III	100	0.2	75
Cabbage	ADS	100	0.2	93
	CM-I	100	0.2	89
	CM-II	100	0.2	80
	CM-III	100	0.2	78
Carrot	ADS	100	0.2	91
	CM-I	100	0.2	91
	CM-II	100	0.2	80
	CM-III	100	0.2	78

* Values are the average of duplicates.

Fig. 5 Examples of liquid chromatogram.

Solid line: Unfortified sample (sugar beet top), Dotted line: Standard chemicals (200 ng),
→: Injection.

Amount of sample 100 g, final volume 1 ml; injected volume 10 μ l.

いずれの場合もだいたい満足できる回収率が得られた。
クロマトグラムの一例を Fig. 5 に示す。

考 察

新選択性除草剤アロキシジムの植物における代謝研究についてすでに報告¹⁻³⁾されている。この結果、植物体における代謝分解物はおもにアミノ体 (CM-I) でその他は少量のオキサゾール体 (CM-II および CM-III) であったのでこれらの化合物を対象とした残留分析法を研究した。分析法として高速液体クロマトグラフ法、ガスクロマトグラフ法および紫外吸光光度法についてそれぞれ検討した。これらの方法はいずれも共通して、アロキシジムの遊離体である AD と分解物 CM-I, II および III を液液分配によりまず分離し別々に定量した。土壌の場合、薄層クロマトグラフィーによるクリーンアップはとくに必要なかったが、作物の場合このクリーンアップが必要だった。もっとも、土壌の種類によっては妨害が認められることも考えられるので、その場合は、クロロホルム/アセトン (8/2) の溶媒で上記したアルミシートを使用した薄層クロマトグラフ操作が必要である。分析操作中に薄層クロマトグラフィーを行なう場合、この操作による損失を補う意味で検量線の作成にも同じ操作を入れたが、若干分析値が低くなることを無視できる場合は薄層クロマトグラフ操作を省略した検量線を使用するこ

ともできる。

高速液体クロマトグラフ法、ガスクロマトグラフ法および紫外吸光光度法の3法について比較した場合、まず紫外吸光光度法は簡便であるが、妨害も受けやすく、通常収穫期の作物や同じ時期の土壌の分析等残留量の少ない場合には適用しにくい。ADSのアルカリ溶液の吸収帯は 287 nm、CM-I はメチルアルコール中で 289 nm と比較的紫外部の長波長領域にあり分子吸光係数もそれぞれ 2.0×10^4 , 1.6×10^4 であるので、水系の残留分析や植物葉面または土壌表面に処理したアロキシジムおよび CM-I の経時変化を調べる場合には紫外吸光光度法は便利である。CM-I は特有な二つの極大吸収を 253 および 289 nm に示すので定性的にも便利である。ガスクロマトグラフ法は AD および分解物ともに熱に不安定であり、しかも ECD に対して感度が低いので誘導体の合成が必要であった。AD の塩素付加体および CM-I のトリフルオロアセチル化体はともに ECD に対してきわめて感度がよく、作物によってはさらに検出限界を下げることも可能であった。しかし CM-II および III については十分に実用性のある誘導体を合成しえなかったために、AD, CM-I, II および III の4化合物の定量を必要とする場合にはガスクロマトグラフ法は適用できない。高速液体クロマトグラフ法はガスクロマトグラフ法のように誘導体を合成する必要がなく、しかも 254 nm の固

定波長の紫外線検出器でも4化合物を定量できる利点があり検出限界も一応満足しうるものであり最も実用性の高い定量法といえる。ADは極性溶媒中でシン-アンチ型の異性体が存在するためメチルアルコールに溶解して保存した後、その液を水・メチルアルコール系を移動相とした高速液体クロマトグラフに注入すると必ず2ピークが現われる。しかし、この異性体の存在は *n*-ヘキサンや塩化メチレンのような水不溶性の有機溶媒中では認められない。すなわちアンチ型は存在しないため、本法では、吸着型カラムを使用し、少量のメチルアルコールを添加した塩化メチレンを移動相に使用した。なお、市販の塩化メチレンのなかには安定剤としてメチルアルコールを添加してあるものと添加してないものがあるため十分に注意する必要がある。

要 約

作物、土壌および水系中に残留している除草剤アロキ

シジム (ADS) およびその代謝分解物 (CM-I, II および III) の分析方法を検討した。高速液体クロマトグラフ法、ガスクロマトグラフ法および紫外吸光度法の3法を比較した結果、これら4化合物を定量するには高速液体クロマトグラフ法が最も適していた。試料中の ADS および分解物はメチルアルコールで抽出し、液液分配により ADS と分解物を分離したのち、クリーンアップしそれぞれの化合物を紫外線検出器 (254 nm) 付高速液体クロマトグラフで定量した。

引 用 文 献

- 1) Y. Soeda, K. Ishihara, I. Iwataki & H. Kamimura: *J. Pesticide Sci.* **4**, 121 (1979)
- 2) Y. Hashimoto, K. Ishihara & Y. Soeda: *J. Pesticide Sci.* **4**, 299 (1979)
- 3) Y. Hashimoto, K. Ishihara & Y. Soeda: *J. Pesticide Sci.* **4**, 375 (1979)