報 文

高速液体クロマトグラフィーによるチオファネート
メチルとその分解・代謝物の残留分析法

石 井 康 雄

農林水産省農薬検査所
(平成元年9月29日受理)Residue Analysis of Thiophanate Methyl and Its
Degradation Products and Metabolites by High
Performance Liquid Chromatography

Yasuo ISHII

*The Agricultural Chemicals Inspection Station, Ministry of Agriculture,
Forestry and Fisheries, Suzuki-cho, Kodaira 187, Japan*

A procedure for the determination of thiophanate methyl (TM) and its degradation products/metabolites in some crops is described. Residues of TM, methyl 2-benzimidazol-carbamate (MBC) and two oxygen analogues of TM (OA-1 and OA-2) were simultaneously determined by high performance liquid chromatography. A sample was first neutralized to pH 6.5–7.0 with sodium phosphate, tribasic. Compounds were extracted with methanol and partitioned into ethyl acetate. The ethyl acetate layer was washed with buffered aqueous solution (pH 6.5) to remove methanol. The ethyl acetate solution was dried and evaporated to *ca.* 10 ml. The concentrate was poured into a deactivated alumina column and eluted with ethyl acetate and methanol-water (1:1). TM and its degradation products/metabolites were eluted with aqueous methanol and partitioned into ethyl acetate. The ethyl acetate layer was dried and evaporated to dryness. The residues were dissolved in dichloromethane and injected into HPLC. Two types of normal phase columns (Nucleosil NH₂ and Partisil-10 PAC) were used with a mobile phase consisting of hexane, dichloromethane and ethanol. The minimum detectable limit with a UV detector at 254 nm was *ca.* 5 ng for TM and its degradation products/metabolites. Recovery data were obtained by fortifying tomatoes, green peppers, grapes and strawberries with TM, MBC, OA-1 and OA-2 at 0.5 ppm levels. Average recoveries of TM, MBC, OA-1 and OA-2 were 75, 104, 70 and 75%, respectively.

緒 言

チオファネートメチル(TM)は野菜、果樹等の病害の防除、稲、麦等の種子消毒等に広く使用されている殺菌剤である。TMの殺菌力は主としてその分解・代謝物であるMBC(methyl 2-benzimidazolcarbamate)によると考えられている¹⁾。TMからMBCへの変換は水中でも容易に起こり、光分解によってもMBCを生成する。また、

TMを散布した作物にはMBCが残留していることはよく知られている²⁻⁶⁾。TMの残留分析ではTMをMBCに変換させ、作物体中のMBCと合わせて、全MBCを測定し、TMに換算する方法が一般的である⁷⁻¹²⁾。MBCの測定方法として、紫外吸光光度法^{7,9,11,13)}、比色法¹⁴⁾、蛍光光度法¹⁴⁾、TLC-蛍光デンシトメトリー¹⁵⁾、ガスクロマトグラフィー^{8,16-18)}および高速液体クロマトグラフィー^{6,19-27)}が報告されている。現在多用されている分析

法は酢酸銅等とともに加熱して TM を MBC に変換して、全 MBC を測定する方法である。この変換率は、70～80% の範囲で、ほぼ一定であるが、100% 変換することはない^{11,28)}。さらに、Soeda ら⁶⁾および著者ら⁶⁾は TM の太陽光による光分解で MBC を経て分解する経路のほかに、TM の2個のイオウ原子が酸素に置換した分解物が生成することを報告した。これらの酸素置換体の酢酸銅等による閉環反応による MBC の収率は不良であり、従来の全 MBC 法では測定できない²⁹⁾。

このため、著者は TM の既存の分析法について見直しを行ない、TM とその分解・代謝物を同時に分別定量する方法を開発したので報告する。

実験方法

1. 試薬

リン酸一ナトリウム、リン酸二ナトリウム、リン酸三ナトリウム、無水硫酸ナトリウム、塩化ナトリウム、メタノール：試薬特級。

エタノール、ジクロロメタン、酢酸エチル、ヘキサン：HPLC 用溶媒。

アルミナ：クロマトグラフィー用(メルク, Art 1077), 110°C で一晩加熱活性化し、デシケーター中で放冷後、2% 相当の水を加えてよく混合する。

農薬および分解物の標準品：TM, MBC, および TM の2種類の類縁体 (OA-1 および OA-2) は日本曹達株式会社より入手した (OA-1 および OA-2 の化学構造を Fig. 1 に示す)。

2. 高速液体クロマトグラフィー

カラム：Nucleosil NH₂ (10 μm) (4.6 mm I. D. × 250 mm) および Partisil 10 PAC (2.1 mm I. D. × 250 mm)。

移動相：*n*-ヘキサン、ジクロロメタン および エタノールの混合溶媒

検出器：紫外吸収検出器 (UVD, 254 nm 波長固定型 および波長可変型)、蛍光光度検出器。

高速液体クロマトグラフ：ウォーターズ600型送液システム、島津製作所製 830 型、パリアン 8500 型。

3. 検量線の作成

TM, MBC, OA-1 および OA-2 をジクロロメタンに溶かして 0.5～10 ppm の標準溶液を調製する。この溶液を 5～20 μl の範囲で HPLC に注入して得られるクロマトグラムからピーク面積を測定し、検量線を作成する。

4. 分析操作

磨砕した試料 50～100 g を 500 ml のトルビーカーに取り、M/5 リン酸緩衝液 (pH 6.5) 50 ml を加えて、リン酸三ナトリウム飽和溶液を用いて、試料の pH を 6.5

Fig. 1 Chemical structure of standard compounds.

～7.0 に調節し、この試料に等量のメタノールを加えてホモジナイザーで3分間高速攪拌抽出した。約 1 cm の厚さにハイフロスパーセルを敷いた桐山漏斗を用いて抽出液を濾過し、漏斗内の残留物をメタノール・M/10 リン酸緩衝液 (pH 6.5) 混液 (1+1) 100 ml で洗浄した。濾液と洗液を合わせて 1 l の分液漏斗に移し、10% 塩化ナトリウム・M/10 リン酸緩衝液 300 ml および酢酸エチル 100 ml を加えて1分間振とう抽出した。酢酸エチル層を分取し、500 ml の分液漏斗に移した。この操作をさらに2回繰り返す。全酢酸エチル抽出液を合わせ、M/10 リン酸緩衝液 100 ml ずつで4回洗浄して水層を捨てた。酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで脱水し、35°C で減圧下約 10 ml まで濃縮した (このとき、乾固しないように注意)。この液をアルミナカラム (2% 含水アルミナ 40 g を酢酸エチルに懸濁させて内径 20 mm、長さ 300 mm のガラスカラムに充填し、アルミナの上に 2 cm の高さに石英砂を充填) に注入し、少量の酢酸エチルでフラスコ内を洗い、アルミナカラムに注入し、酢酸エチルを流下させた。さらに、酢酸エチルを注入して全体で 70 ml の酢酸エチルを流下させ、流出した酢酸エチルは捨てた。次に、メタノール/水 (1+1) 100 ml を用いて溶出し

Fig. 2 Typical chromatograms obtained from 50 g of green pepper.

HPLC Conditions: column, Nucleosil-NH₂ (10 μ m) 4.6 mm I. D. $\times$ 250 mm; column temperature, 40°C; detector, UV 254 nm, 0.01 AUFS; chromatogram A, mobile phase, *n*-hexane/ethanol (95: 5, v/v); chromatogram B, mobile phase, *n*-hexane/ethanol (85: 15, v/v); chromatogram C, mobile phase, linear gradient from 5% to 45% ethanol in hexane in 20 min; flow rate, 2ml/min.

A 20- μ l aliquot of the final solution (5 ml) was injected. The peaks of MBC, TM, OA-1 and OA-2 are superimposed in broken lines on the chromatograms. Peak identities: (1) 42 ng MBC, (2) 46 ng TM, (3) 46 ng OA-1, (4) 40 ng OA-2.

た。メタノール/水流出液を 200 ml の分液漏斗に移し、m/10 リン酸緩衝液 (pH 6.5) 50 ml および酢酸エチル 50 ml を加えて 1 分間振とうし、酢酸エチル層を分取し、残った水層に酢酸エチル 50 ml を加えて振とうした。この操作をさらに 1 回繰り返す、酢酸エチル抽出液を合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水し、35°C で減圧濃縮した。濃縮液を 10~20 ml の目盛り付き試験管に移し、ジクロロメタンを加えて 5~10 ml に定容とし、検液とした。

結果および考察

1. 高速液体クロマトグラフィーの操作条件

TM, MBC, OA-1 および OA-2 の HPLC による分離条件を検討した。MBC については Zipax SCX 陽イオン交換カラム^{19,20)}、ODS 系の逆相分配カラム²⁴⁻²⁷⁾あるいは Hitachi Gel 3010^{21,23)}を用いた例が報告されている。TM, OA-1 および OA-2 についてはシリカゲルカラムを用いた例が報告されている³⁰⁾。さらに、著者らは Permaphase ETH^{8,22)}、Lichrosorb-NH₂^{2,29)} および Partisil-10 PAC²⁹⁾を用いて 4 成分の分離を行なった。本実験では Nucleosil NH₂ および Partisil 10 PAC を用い

た。Nucleosil NH₂ で測定した場合の典型的なクロマトグラムを Fig. 2 に示す(操作条件は Fig. 2 の脚注に記載した)。Fig. 2 中の破線は 4 成分の溶出位置を示している。OA-2 は他の 3 成分よりかなり保持時間が長いいため移動相のエタノールの比率を大きくする必要があった。このために、グラジエント溶出を行なった。測定位置に若干の妨害ピークがみられるが、その大きさは 0.05 ppm 以下であった。また、同様に CN 型である Partisil 10 PAC についても四つの対象化合物の分離条件を検討した。保持時間は移動相がヘキサン/ジクロロメタン/エタノール=73/24/3、流速 0.81 ml/min で、MBC 2.3 min, TM 3.3 min, OA-1 4.5 min であったが、OA-2 はこの条件では保持時間が長すぎるが、移動相の組成を 67/28/5 とし、4.7 min に溶出した。このことからこれら四つの化合物の NH₂ 型カラムと CN 型カラムでの分離の様相はほぼ同じであった。

2. 抽出溶媒

TM と MBC はアルカリ性水溶液に可溶であるが、TM はアルカリ液中では不安定である。一方、酸性水溶液には MBC は易溶であるが、TM は不溶である。TM,

Table 1 Recoveries of TM and its degradation products/metabolites from fortified fruits and vegetables (50 g).

Compound	Fortification level (ppm)	Recovery (%)				
		Grape	Straw berry	Green pepper	Tomato	Average
TM	0.5	76	72	74	78	75
MBC	0.5	105	100	103	109	104
OA-1	0.5	69	66	68	75	70
OA-2	0.5	74	75	70	80	75

Table 2 Analytical results of separate 100-g green pepper samples fortified with each of TM, OA-1, OA-2 and MBC.

Fortified compound	Expected quantity (μg)	Detected quantity (μg)				
		TM	OA-1	OA-2	MBC ^{a)}	Total
TM	41.2	30.6	nd	nd	3.8	37.4 ^{b)}
OA-1	37.2	nd	22.6	nd	2.6	27.0 ^{c)}
OA-2	40.8	nd	nd	35.4	nd	35.4
MBC	40.0	nd	nd	nd	38.9	38.9

^{a)} detected with a fluorescence detector (E_{x} 285 nm, E_{m} 315 nm), ^{b)} TM+1.79 MBC, ^{c)} OA-1+1.71 MBC.

OA-1, OA-2 および MBC は中ないし強極性有機溶媒に可溶であり, MBC は pH が中性付近で水溶液から有機溶媒で抽出される⁷⁾. このため, 抽出時の試料の pH は中性付近が都合がよい. 小野ら^{7,80)} は抽出溶媒としてメタノールを, 伊藤ら^{8,11)} は酢酸エチルを抽出溶媒として用いた. 酢酸エチルは葉緑素などの色素類をよく抽出するためアルミナまたはシリカゲルカラムクロマトグラフィーでは精製が困難であった. メタノールを用いる場合もメタノール/水の比率が50/50になるように工夫することで葉緑素などの溶出を少なくすることができた. このため, 抽出時の試料の pH を 6.5~7.0 とし, 溶媒としてメタノールを用い, 洗浄時はメタノール/緩衝液 (50+50) を用いた.

3. 精製方法

精製方法としてシリカゲル TLC およびシリカゲルおよびアルミナカラムクロマトグラフィー (CC) について検討した. TLC は, ヘキサン/酢酸エチル (1+1) で展開して, 測定対象の 4 成分を相互に分離できたが, 四つのバンドは接近しているため, 個々の成分を別々に抽出することはできなかった. シリカゲル CC では TLC と同様の溶媒を用いて, TM+MBC+OA-1 と OA-2 に分けることはできたが, 試料由来の色素との分離が不十分であった. アルミナ CC ではシリカゲル CC と同じ溶媒では OA-2 はまったく溶出しない. このため, 酢酸エチル

を用いて溶出したところ, 酢酸エチル 70 ml では 4 成分ともに溶出しないが, 色素類が先に溶出し, 精製効果があった. しかし, OA-2 はアルミナに強く吸着され, 酢酸エチルでは溶出しないため, 伊藤らの方法¹¹⁾ に準じ含水メタノールを用いて溶出させた. アルミナカラムからの溶出液は淡黄色程度まで精製できた. 抽出溶媒として酢酸エチルを用いる場合およびアルミナカラムで精製が不十分な場合は GPC⁸¹⁾ が有効な精製法であった.

4. 添加回収試験

試料として, ピーマン, トマト, イチゴおよびブドウを用いて添加回収試験を行なった. 4 成分の添加回収試験の結果を Table 1 に示す. MBC の回収率が 100% を上回っているが, これは主として同時に添加した TM および OA-1 の一部が MBC に分解したことによるものと考えられる.

ピーマンを用いて, 4 成分を個々別々に添加して回収試験を実施した結果を Table 2 に示した. MBC は 97% の回収率を得, 分析操作中での損失はほとんどなかった. また, OA-2 は比較的良好な回収率を得たが, TM および OA-1 の回収率はやや低かった. このため, TM, OA-1 および OA-2 が分析操作中に MBC に変わる割合を測定したところ TM は 10%, OA-1 は 6~7% が MBC に変化した. OA-2 については MBC の生成は確認できなかった. なお, この際の MBC の測定には蛍光検出器

($E_x=285$ nm, $E_m=315$ nm) を用いた。

各成分の UVD (波長 254 nm) での最小検出量は 0.01 AUFS で 4 成分ともに 5 ng 程度は測定可能である。蛍光検出器を用いた場合、1 ng の MBC が測定可能であった。このため、本法の検出限界は、試料 50 g を取り、最終液量 5 ml とした場合、HPLC への注入量を 20 μ l の場合 0.025 ppm となるが、妨害ピークの大きさを考慮した場合 0.05 ppm となる。

チオファネートメチル水和剤を散布したピーマンを散布 2 日後に収穫して分析した結果、TM 0.2 ppm, MBC 2 ppm が検出されたが、OA-1 および OA-2 は検出限界以下であった。

以上、本法は TM とその分解代謝物の残留分析法として現行の TM の残留分析法では測定されていない成分を含めた分析法として意義がある。さらに、TM とベノミル (または MBC) は毒性学上の安全性評価に違いがあり、FAO/WHO の JMPR における ADI はそれぞれ 0.08 mg/kg³², 0.02 mg/kg³³ であるので、TM とベノミルを分別して定量することは意義のあることである。さらに、本法を用いれば従前未知であった OA-1 および OA-2 を含む 4 成分を同一のカラムを用いて分別定量できることで意義がある。しかし現行法は ADI の小さな MBC を定量することで残留農薬の濃度を規制していることから、現行の TM の残留分析法は実用上での問題はないと考える。

要 約

高速液体クロマトグラフィーを用いたチオファネートメチル (TM) とその分解・代謝物 (MBC および 2 種類の TM の酸素置換体) の残留分析法を報告した。試料の pH を 6.5~7.0 に調節し、メタノールを用いて抽出し、酢酸エチルへ転溶した。酢酸エチル層を濃縮し、アルミナカラムクロマトグラフィーで精製した。溶出は酢酸エチルおよびメタノール・水混液を用いて行なった。測定は化学結合型の NH₂ カラムと移動相としてヘキサン/エタノール混液を用い、UVD (254 nm) により行なった。検出限界は 4 成分ともに約 5 ng であった。ピーマン、トマト、イチゴおよびブドウに 0.5 ppm の濃度で 4 成分を添加して得た回収率は TM 75%, MBC 104%, OA-1 70% および OA-2 75% であった。検出限界は試料 50 g を用いた場合は 0.05 ppm であった。

本実験を行なうにあたり、分析用標準品を提供いただいた日本曹達株式会社に深く感謝する。

引 用 文 献

- 1) J. W. Vonk & A. K. Sijpesteijn: *Pestic. Sci.* **2**, 160 (1971)
- 2) Y. Soeda, S. Kosaka & T. Noguchi: *Agric. Biol. Chem.* **36**, 817 (1972)
- 3) Y. Soeda, S. Kosaka & T. Noguchi: *Agric. Biol. Chem.* **36**, 931 (1972)
- 4) K. M. Al-Adil, F. R. White, M. M. McChesney & W. W. Kolgore: *J. Agric. Food Chem.* **22**, 243 (1974)
- 5) J. R. Fleeker, H. M. Lacy, I. R. Schultz & E. C. Houkom: *J. Agric. Food Chem.* **22**, 592 (1974)
- 6) 石井康雄: 日本農薬学会第 2 回大会講演要旨集, No. 106, 1977
- 7) 小野成男・長谷川治郎・柳瀬利一郎・杉岡克己・遠山典宏: 分析化学 **24**, 750 (1975)
- 8) 伊藤善志男・豊田正武・慶田雅洋: 食衛誌 **18**, 26 (1977)
- 9) 後藤真康: 農薬誌 **3**, 315 (1978)
- 10) C. F. Aten, J. B. Bourke & R. A. Marafioti: *J. Agric. Food Chem.* **30**, 610 (1982)
- 11) H. Suzuki, Y. Tonogai, Y. Ito & M. Iwaida: *Agric. Biol. Chem.* **46**, 549 (1982)
- 12) 阪本 剛・大井明大: 農薬誌 **9**, 159 (1984)
- 13) E. R. White & W. W. Kilgore: *J. Agric. Food Chem.* **20**, 1230 (1972)
- 14) 川原哲城・石井康雄・渡辺孝弘・藤本雄一・中村広明: 農薬検査所報告, No. 11, 95 (1971)
- 15) 杵 雅雄・石井康雄・中村広明: 農薬検査所報告, No. 17, 34 (1977)
- 16) J. P. Rouchaud & J. R. Decallonne: *J. Agric. Food Chem.* **22**, 259 (1974)
- 17) G. H. Tjan & J. T. A. Jansen: *J. Assoc. Off. Chem.* **62**, 769 (1979)
- 18) S. Cline, A. Felsot & L. Wei: *J. Agric. Food Chem.* **29**, 1087 (1981)
- 19) J. J. Kirkland: *J. Agric. Food Chem.* **21**, 171 (1973)
- 20) J. J. Kirkland, R. F. Holt & H. L. Pease: *J. Agric. Food Chem.* **21**, 368 (1973)
- 21) M. Maeda & A. Tsuji: *J. Chromatogr.* **120**, 449 (1976)
- 22) 石井康雄・馬場洋子・中村広明: 農薬検査所報告, No. 16, 30 (1976)
- 23) 志賀直史・俣野修身・後藤真康: 農薬誌 **2**, 27 (1977)
- 24) M. Chiba & D. F. Veres: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **63**, 1291 (1980)
- 25) C. F. Aten, J. B. Bourke & R. A. Marafioti: *J. Agric. Food Chem.* **30**, 610 (1982)
- 26) G. Zweig & R. Gao: *Anal. Chem.* **55**, 1448 (1983)
- 27) M. Chiba & R. P. Singh: *J. Agric. Food Chem.* **34**, 108 (1986)

-
- 28) 後藤真康・加藤誠哉: 残留農薬分析法, ソフトサイエンス社, p. 185, 1980
- 29) 石井康雄・全 雅雄: 日本農薬学会第3回大会講演要旨集, No. 204, 1978
- 30) 小野成男・遠山典宏: 農薬誌 7, 363 (1982)
- 31) 石井康雄: 農薬検査所報告, No. 28, 18 (1988)
- 32) "Pesticides Residues in Food: 1977 Evaluations," Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, p. 455, 1978
- 33) "Pesticide Residues in Food—1983. The Monographs," Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, pp. 9, 89, 1985