FPD 付きガスクロマトグラフによるチオファネート メチルおよびその代謝物ならびにモノ-*sec*- ブチルアミンの定量

(昭和 51 年 6 月 18 日受理)

伊藤 誉志男* 豊田 正武* 慶田 雅洋*

Application of Gas Chromatograph Equipped with FPD for the Determination of Methyl Thiophanate, the Metabolites and Mono-*sec*-butylamine

Yoshio ITO, Masatake TOYODA and Masahiro IWAIDA

(National Institute of Hygienic Sciences, Osaka Branch: 6, Hoenzaka-cho,
Higashi-ku, Osaka)

A simultaneous detection and determination procedure of thiophanate methyl, its metabolites (methyl benzimidazole carbamate; MBC, aminobenzimidazole; AB) and mono-*sec*-butylamine; BA) were established.

These fungicides or insecticides are widely used in the cultivation of vegetables and fruits. Thiophanate methyl is known to be metabolized in plants remaining in the form of MBC and AB.

In order to elevate the detection level of these compounds, benzenesulfone derivatives of them were prepared, which were then subjected for the gas chromatographic determination by use of an FPD-gas chromatograph. Ethyl acetate was adopted as the extracting solvent of these compounds from plants. Because of the volatility of BA, it was impossible to concentrate ethyl acetate extract, and so the latter clean-up was carried out by use of alumina column chromatography (Merck Art. 1097 Aluminiumoxid standardisiert was chosen), applying ethyl acetate and methanol-water mixture (5:5) as eluant, in turn. Methanol water fraction was collected making each 15 ml as one fraction. It was confirmed that the above-mentioned compounds were eluted almost all into Fraction No. 2 of methanol-water mixture. The fraction was extracted again with ethyl acetate and, after benzenesulfonation, the derivatives were concentrated and injected into an FPD-gas chromatograph. The conditions finally adopted are as follow. Column $\phi 3$ mm $\times$ 75 cm in length packed with 1.5% SE-30 on Chromosorb G60/80, column temperature: 165°C for the detection and determination of BA and TPM (thiophanate methyl), 200°C for the detection and determination of MBC and AB.

The detection level was 0.01 ppm for BA, 0.02 ppm for AB and MBC and 0.04 ppm for TPM. Recoveries of these compounds from orange peel and cucumber were about 90% in case spiked on 0.5 ppm level, while 80~85% spiked on 0.1 ppm level.

(Received June 18, 1976)

まえがき

著者ら^{1),2)}は先にかんきつの保存料であるジフェニ

ル, オルトフェニルフェノールおよびチアベンダゾールの系統的分析法について報告した。本報では第1級および第2級アミンを含み, かんきつおよびその他の果実に繁用されているチオファネートメチルおよびその代謝物

* 国立衛生試験所大阪支所: 大阪市東区法円坂町 6

Fig. 1. Metabolic pathway of thiophanate methyl

ならびにモノ-*sec*-ブチルアミンの定量法について検討した結果を報告する。

骨格に第2級アミンを有するチオファネートメチル (TPM) は *Oidium* (*Oospora*) 属の不完全菌などに対して活性を有する殺菌剤として広く使用されている。TPM は植物体内で代謝分解され、メチルベンズイミダゾールカルバメート (MBC) となり³⁾⁻⁵⁾、MBC はさらに分解されて 2-アミノベンズイミダゾール (AB) となる^{6),7)}ことが知られている。このようにその大部分が生物体内で急速に分解されしかも代謝物がある程度植物体内に検出される農薬では、代謝物の残留分析も重要な問題となる。従来、TPM およびその代謝物の分析法としては紫外吸光光度法⁸⁾⁻¹¹⁾、けい光法¹¹⁾、ECD-ガスクロマトグラフィー¹²⁾、高速液体クロマトグラフィー¹³⁾が報告されているが、植物由来の夾雑物に影響され、回収率は低い。

骨格に第1級アミンを有するモノ-*sec*-ブチルアミン (BA) もかんきつの保存料として広く使用されているが、気化温度が低いので従来ガスクロマトグラフィー (GC) による測定は困難とされ、比色定量法¹⁴⁾が用いられているが、特異性に乏しく、回収率も低い。

本研究では TPM およびその代謝物ならびに BA をベンゼンスルホン誘導体とした後、FPD-ガスクロマトグラフを用いて測定することにより、感度、特異性および再現性の高い方法を確立することに成功したので、ここに報告する。

実験方法

1. 試薬

1) TPM: 日本曹達(株)製 (mp 177~178°); MBC: 日本曹達(株)製 (318~319°); AB: 西尾工業(株)製をメタノールから再結晶 (mp 208~210°); BA: 東京化成工業(株)製、試薬特級。

2) アルカリ性塩析溶液: Gnaegi ら⁹⁾の方法に従って調製した。

3) カラムクロマトグラフィー用アルミナ: Merck 社製 Art. 1097 Aluminiumoxid standardisiert 100 メッシュを 110° で 24 時間以上加熱して活性化したものを用いた。

4) GC 用担体はクロモソルブ G60/80、液相はシリコ

ーン SE-30 を使用した。

5) 塩化ベンゼンスルホン: 東京化成工業(株)製試薬特級を蒸留し、bp 176° の区分を使用した。

6) その他の試薬はすべて特級を用いた。

2. 装置

ガスクロマトグラフは(株)柳本製作所製 Yanaco G80-(dual) FPD を使用した。

3. 調製

1) 試料の調製: イヨカン、オレンジおよびキュウリの各3個をとり、細切りした後、その 50 g をミキサーに入れ、アルカリ性塩析溶液および酢酸エチルを加えてホモジナイズした。

2) クロマトカラムの調製: 内径 2 cm, 長さ 30 cm の活せん付きガラス管の下部に脱脂綿を詰め、酢酸エチルを満たした後、9 cm の高さまでアルミナを詰め、その上に海砂を 0.5 cm 重ねた。

3) GC 用カラムの調製: クロモソルブ G に SE-30 を 1.5% コーティングしたものを内径 0.3 cm, 長さ 75 cm のガラス管に充てんした。

4. GC の操作条件

カラム温度: 165° または 200°, 注入口温度: 240°, 流速 窒素(キャリアーガス): 25 ml/min, 水素: 0.4 kg/cm², 空気: 0.4 kg/cm²

Fig. 2. Optimum temperatures and time required for the benzenesulfonation of methyl benzimidazole carbamate (MBC), aminobenzimidazole (AB) and mono-*sec*-butylamine (BA)

Reaction condition, A: 500 µg of MBC, 50 µg of AB or 50 µg of BA in 1 ml of pyridine and 4 µl of benzenesulfonylchloride were mixed at 20~200°C for 10 min; B: 100 µg of MBC, AB or BA in 1 ml of pyridine and 4 µl of benzenesulfonylchloride were mixed at 40 or 140°C for 2.5~80 min.

実験結果

1. ベンゼンスルホン化条件の検討

アミン類のベンゼンスルホン化はピリジンなどの存在下で行う方法と水酸化ナトリウムなどの存在下で行う方法の2種類がある。

1) ピリジン中で行った場合: MBC, AB および BA のピリジン溶液 1 ml に塩化ベンゼンスルホン 4 μ l をマイクロシリンジで注入し 20~200° で反応した場合の反応至適温度および時間を FPD—GC によるピーク高さで比較し、その結果を Fig. 2A に示した。MBC および AB は 40° で十分反応するが、BA は 140° にならないと反応が完結しないことが分かった。次にそれぞれの至適温度条件下における反応時間について検討したところ、Fig. 2B のとおり、3 者ともほぼ 10 分で反応は完了することを知った。そこで、反応時間は 20 分に定めた。各至適反応時間系におけるベンゼンスルホン化反応に対する塩化ベンゼンスルホニルの混合比について検討した結果を Fig. 3 に示す。MBC, BA および AB 1 モルに対して塩化ベンゼンスルホニルはそれぞれ 640, 40 および 640 モル必要ながことが知られた。

2) 水酸化ナトリウムの存在下で行う方法: MBC,

Fig. 3. Optimum molar ratios of benzenesulfonyl chloride (BSC) to methyl benzimidazole carbamate (MBC), aminobenzimidazole (AB) and mono-*sec*-butylamine (BA) on benzenesulfonation either in the presence of pyridine or 10% NaOH

Reaction condition, A: One mole of MBC, AB or BA in 1 ml of pyridine and 40~2560 mole benzenesulfonyl chloride were mixed. The reaction mixture of MBC or BA was held at 40°C for 20 min and that of AB was heated at 140°C for 20 min; B: One mole of MBC, AB or BA in 1 ml of ethyl acetate, 24 μ l of 10% NaOH and 0.25~512 mole benzenesulfonyl chloride were mixed and shaken at room temperature for 10 min.

Fig. 4. FPD Gas chromatograms of benzene-sulfonyl derivatives of mono-*sec*-butylamine (BA), methyl benzimidazole carbamate (MBC), and thiophanate methyl (TPM)

Fig. 5. Calibration curves of mono-*sec*-butylamine (BA), aminobenzimidazole (AB), methyl benzimidazole carbamate (MBC), and thiophanate methyl (TPM)

Note. Temperature: injection port, 240°C; column, 165°C for BA and TPM injection port, 240°C; column, 200°C for MBC and AB

AB および BA の酢酸エチル溶液 1 ml に 10% 水酸化ナトリウム溶液 24 μ l および塩化ベンゼンスルホン 4 μ l をマイクロシリンジで注入し、ベンゼンスルホン化率を調べた。ただし、この反応は酢酸エチルと水の 2 相反応のため、加熱せずに室温で 10 分間振り混ぜて行った。Fig. 3 より、第 1 級アミンである AB および BA は塩化ベンゼンスルホンと 1 : 1 のモル比で反応することが知られた。第 2 級アミンの MBC でも 1 : 32 のモル比で反応は完結することから、ピリジン中の場合よりも著

しく低いモル比でよいことが分かった。また、反応の際の水酸化ナトリウム量は基質の 4 倍量で十分である。

1) の場合に比べて、水酸化ナトリウムの存在で行った場合は、室温で容易に反応することおよび塩化ベンゼンスルホンの使用量ははるかに少量で済むなどの利点があることが分かったので、以後ベンゼンスルホン化反応は試料を含む酢酸エチル溶液 1 ml に対し塩化ベンゼンスルホン 4 μ l および 10% 水酸化ナトリウム溶液 25 μ l を加え、10 分間室温で振り混ぜることに定めた。

Table 1. Recoveries of Mono-*sec*-butylamine, Methyl Benzimidazole Carbamate, Benomyl, Aminobenzimidazole, and Thiophanate Methyl Added to Citrus Fruits on Extraction with Ethyl Acetate

Spiked with 200 ppm of	Times of extraction	Quantity of solvent used (ml)			
		50	75	100	150
		Recovery (%)			
Mono- <i>sec</i> -butylamine	Once	23.5	58.1	65.4	60.5
	Twice	43.5	91.9	95.8	90.8
Methyl benzimidazole carbamate	Once	30.0	43.6	72.5	75.0
	Twice	59.5	84.4	97.8	100.0
Aminobenzimidazole	Once	28.9	40.8	75.4	76.5
	Twice	55.0	83.1	98.3	98.4
Thiophanate methyl	Once	41.1	69.5	92.6	94.3
	Twice	63.4	80.3	97.6	99.2

Note. Fifty grammes of peel of Iyokan (a kind of Valencia orange common in Japan), homogenized with 25 ml of NaCl-sodium acetate-NaOH solution, was used as the test sample.

Fig. 6. Elution curves of mono-*sec*-butylamine (BA), methyl benzimidazole carbamate (MBC), thiophanate methyl (TPM) and aminobenzimidazole (AB) by alumina column chromatography (1 fraction: 15 ml)

ベンゼンスルホン化物のガスクロマトグラムは Fig. 4 に示すとおりである。BA および TPM は 165° で、MBC および AB は 200° で良好なピークが得られた。

2. 検量線の作製

AB, BA, MBC および TPM を酢酸エチルに溶かし、 $1\sim 50\ \mu\text{g/ml}$ 溶液とし、10% 水酸化ナトリウム 25 μl および塩化ベンゼンスルホン 4 μl を加え、室温で 10 分間振り混ぜた後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、ガスクロマトグラフに注入して検量線を作製した結果を Fig. 5 に示した。BA は $1\sim 10\ \mu\text{g/ml}$, MBC, AB は $5\sim 25\ \mu\text{g/ml}$, TPM は $10\sim 50\ \mu\text{g/ml}$ で良好な直線性を示した。

3. 野菜、果実からの抽出溶剤および抽出回数の検討

TPM, MBC および AB の抽出溶剤としてこれまでにメタノール+塩酸¹³⁾、酢酸エチル^{4), 9), 10)}、ベンゼン^{8), 12)}、アセトン¹¹⁾、メタノール⁷⁾、クロロホルム+メタノール⁴⁾ および塩酸¹⁵⁾が報告されている。この中で TPM ととも

に極性の高い BA をも抽出でき、しかも水層と分離する溶剤としては酢酸エチルが最適と考え、以後酢酸エチルを用いることにした。

試料として、イヨカンの皮 50 g をとり、アルカリ性塩析溶液 25 ml を加え、さらに BA, MBC および TPM 各 10 mg を酢酸エチル 1 ml に溶かした液を添加し、ミキサーで十分摩砕混合した。酢酸エチル 50 $\sim$ 150 ml を加え、ミキサーで 5 分間摩砕した後、遠心分離して上層を採取した。酢酸エチル量と摩砕抽出回数について検討した結果は Table 1 に示すとおりである。BA, MBC および TPM は 100 ml, 2 回抽出でそれぞれ 95.8, 97.8 および 97.9% 回収されたので、これを抽出条件と定めた。

4. 精製行程の検討

微量残留量測定の場合は、野菜・果実の抽出液をベンゼンスルホン化し、濃縮して GC を行った場合に夾雑物による妨害が多く直接定量は不可能であったので、野

Scheme 1. Procedure for the separation and determination of mono-sec-butylamine and metabolites of thiophanate methyl.

* 1 fraction, 15 ml

Table 2. Recoveries of Mono-*sec*-butylamine, Methyl Benzimidazole Carbamate, Thiophanate Methyl and Aminobenzimidazole Added to either Orange Peel or Cucumber Fruit

Spiked with 0.1 or 0.5 ppm of	Orange peel		Cucumber fruit	
	0.1	0.5	0.1	0.5
Mono- <i>sec</i> -butylamine	80.0	90.1	82.1	90.3
Methyl benzimidazole carbamate	85.3	91.1	88.0	92.1
Thiophanate methyl	80.1	88.2	80.3	89.5
Aminobenzimidazole	83.6	91.0	85.7	92.4

Note. shown as % recovery

菜、果実抽出液のカラムクロマトグラフィーによる精製を試みた。各種吸着剤の中では予試験の結果活性アルミナが最適であることが分かったのでこれを用い、酢酸エチル、水-メタノールの順に 5 ml/min の速度で流下し、15 ml を 1 フラクションとして採取した。

AB 1 mg を酢酸エチル 1 ml に溶かしたものをカラムに添加し、酢酸エチル 75 ml、次に水-メタノール (9:1), (8:2) または (5:5) で溶出した結果を Fig. 6 に示した。AB は酢酸エチルまたはメタノール単独では溶出せず、水-メタノールで初めて溶出し、等量混液では 1 フラクションで 99% 溶出させることができた。この条件で MBC, TPM および BA の溶出を行った結果も Fig. 6 に示した。各 1 mg 負荷した場合にも水-メタノール (5:5) の第 2 フラクションに 100% 溶出することが分かった。そこで BA の沸点の低いことを考慮に入れて、試料の酢酸エチル抽出液を濃縮せずに直接活性アルミナカラムにかけ、酢酸エチル 20 ml で洗浄した後、水-メタノール (5:5) で溶出させることにした。大部分の着色夾雑物は酢酸エチル区分に溶出し、水-メタノールの第 2 フラクションは着色しているが、ガスクロマトグラム上では妨害はほとんど認められなかった。

5. 水-メタノールから酢酸エチルへの移行性の検討

カラムから溶出した水-メタノール混液を直接ベンゼンスルホン化した場合、反応率は著しく低かった。そこで水-メタノール (5:5) 15 ml に塩化ナトリウム 2g およびアルカリ性塩析溶液 15 ml を加え、酢酸エチル 45 ml と 10 分間振り混ぜた場合、いずれも 99% 以上酢酸エチル層へ移行することが分かった。

6. 濃縮行程の検討

抽出・精製行程では、BA の揮散を恐れて濃縮操作を行っていないが、ベンゼンスルホン誘導体とした場合には、沸点が高くなり、30 倍濃縮の際の損失は 2% 以下となることを知った。よって酢酸エチル溶液をベンゼンスルホン化した後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、40° 以下 1 ml に減圧濃縮したものについて GC を行った。

ここで最終的に確定した方法をまとめて Scheme 1 に示す。

7. 添加回収実験

農薬の残留分析法としての本法の適用性を知るため添加回収実験を行った。ここではオレンジ (夾雑物のため分析の困難なもの) およびキュウリ (分析の容易なもの) について試験した結果を示す。オレンジの皮またはキュウリ 50 g に 0.5 または 0.1 ppm の BA, MBC, TPM または AB を添加したときの回収率を Table 2 に示した。0.5 ppm レベルで約 90%, 0.1 ppm で 80~85% の回収率が得られた。なお、検出感度は BA 0.01, AB および MBC は 0.02, TPM 0.04 ppm であった。

考 察

TPM およびその植物体内の代謝生産物である MBC および AB, ならびに BA の 1 級または 2 級アミンをベンゼンスルホン化して含硫誘導体として FPD-GC により定量する方法を確立した。ベンゼンスルホン化反応は反応モル比 (Fig. 3B) および GC (Fig. 4) の結果から、BA および AB では 1 モルのベンゼンスルホン基が遊離の第 1 級のアミノ基に、MBC では 1 モルのベンゼンスルホン基がイミダゾール環に入るものと推定される。TPM についてはさらに検討が必要である。

本報告は TPM およびその代謝生産物である MBC および AB について述べているが、殺菌剤農薬として使用されるベノミルも、植物体内で容易に代謝されてその大部分が MBC となり⁹⁾、その一部はさらに分解されて AB となり^{9), 7)} 植物体内で検出されることが報告されている。したがって本法はベノミルの残留代謝物の分析にも使用可能である。またさらに本法で用いたベンゼンスルホン化反応はその他の含窒素化合物の分析にも応用できるものと考えられる。

有機塩素系および有機リン系農薬の検体からの抽出溶剤には、一般にアセトニトリルを用い、飽和食塩水で希釈後、*n*-ヘキサンで再抽出する方法がとられている^{16, 17)}。しかし BA, AB および MBC は有機塩素系および有機リン系農薬に比し極性が高く、*n*-ヘキサンへの転溶が非常に困難であるため、著者らは抽出溶剤として、極性が高くしかも水層と分離できる酢酸エチルを用い、直接抽出することにした。

また従来の方法では¹⁰⁾, 抽出溶剤を緩和な条件下で農薬の揮散防止に注意して, クデルナダニッシュ濃縮器を用いて濃縮後, カラムクロマトグラフィーを行っているが, BA は気化温度が低いため, 抽出溶剤を濃縮する前にカラムクロマトグラフィーによる精製を行い, 気化温度の高いベンゼンスルホン化物とした後に濃縮することにより BA の濃縮による損失防止に成功した。

ま と め

(1) TPM およびその植物体内代謝生産物 (MBC および AB), ならびに BA をベンゼンスルホン化した後, FPD—GC により定量する方法を確立した。

(2) 野菜および果実よりこれらの化合物を酢酸エチルで抽出し, アルミナカラムにより分別して妨害物質と分離後, ベンゼンスルホン化を行った。

(3) 本法での TPM, MBC, AB ならびに BA の野菜および果実における添加回収率は, いずれも 0.5 ppm 添加で約 90%, 0.1 ppm 添加で 80~85% であった。検出感度は BA 0.01, AB および MBC は 0.02 ppm, TPM では 0.04 ppm であった。

終りに臨み, 本研究の遂行に当たり種々御協力いただいた日本曹達(株)の有馬嘉勝氏に感謝します。

文 献

- 1) 外海泰秀, 伊藤誉志男, 慶田雅洋, 佐野裕子: 衛生化学, **21**, 235 (1975).
- 2) 外海泰秀, 佐野裕子, 伊藤誉志男, 慶田雅洋: 食衛誌, **16**, 397 (1975).
- 3) Noguchi, T., Okuma, K., Kosaka, S.: "The International Symposium on Pesticide Terminal Residue", Tel Aviv, Israel, Feb. 17 (1971).
- 4) Al-Adil, K.M., White, E.R., McChesney, M.M., Kilgore, W.W.: J. Agr. Food Chem., **22**, 242 (1974).
- 5) Fleeker, J.R., Lacy, H.M., Schultz, I.R., Houkom, E.C.: *ibid.*, **22**, 592 (1974).
- 6) Peterson, C.A., Edington, L.V.: *ibid.*, **17**, Chem., 898 (1969).
- 7) Baude, F.J., Gardiner, J.A., Han, J.C.Y.: *ibid.*, **21**, 1084 (1973).
- 8) White, E.R., Kilgore, W.W.: *ibid.*, **20**, 1230 (1972).
- 9) Gnaegi, F., Mestres, R., Tourte, J., Campo, M.: Trav. Soc. Pharm. Montpellier, **34**, 99 (1974).
- 10) Mestres, R., Tourte, J., Campo, M.: *ibid.*, **34**, 131 (1974).
- 11) Aharonson, N., Ben-Aziz, A.: J. Assoc. Offic. Anal. Chem., **56**, 1330 (1973).
- 12) Rouchaud, J.P., Decalonne, J.R.: J. Agr. Food. Chem., **22**, 259 (1974).
- 13) Kirkland, J.J., Holt, R.F., Pease, H.L.: *ibid.*, **21**, 368 (1973).
- 14) Eckert, J.W., Kolbenzen, M.J.: Nature, **194**, 888 (1962).
- 15) Kröller, E.: Deut. Lebensm. Rundsch., **71**, 112 (1975).
- 16) 日本薬学会編: "衛生試験法注解" p. 324 (1973), 金原出版.
- 17) The Association of Official Analytical Chemists: "12th Edition of Official Methods of Analysis of A.O.A.C." p. 518 (1975).