ノート

玄米中の殺菌剤テクロフタラム及びその代謝物 テクロフタラムイミドの分析

(平成9年9月16日受理)

津村ゆかり* 中村優美子*
外海泰秀* 柴田正*

Determination of the Fungicide Tecloftalam and Its Metabolite Tecloftalam-imide in Brown Rice

Yukari TSUMURA, Yumiko NAKAMURA, Yasuhide TONOGAI
and Tadashi SHIBATA

(National Institute of Health Sciences, Osaka Branch: 1-1-43, Hoenzaka,
Chuo-ku, Osaka 540-0006, Japan)

The fungicide tecloftalam and its metabolite tecloftalam-imide were individually determined. They were extracted from brown rice with acetone and re-extracted with ethyl acetate. The extract was partitioned between *n*-hexane and acetonitrile to remove oil, and then charged on a Sep-Pak Plus Florisil cartridge. Tecloftalam-imide was eluted with 50% diethyl ether-*n*-hexane and then tecloftalam was eluted with methanol. Tecloftalam-imide was determined on a gas chromatograph (GC) equipped with a capillary column DB-1 and an electron capture detector (ECD). Tecloftalam was converted into tecloftalam-imide by addition of acetic anhydride, and determined by GC-ECD. Recoveries of tecloftalam and tecloftalam-imide from rice spiked at levels of 0.2 ppm were $89.3 \pm 1.9\%$ and $82.6 \pm 1.5\%$, respectively. Detection limits were 0.01 ppm in samples.

(Received September 16, 1997)

Key words: テクロフタラム tecloftalam; 代謝物 metabolite; テクロフタラムイミド tecloftalam-imide; ガスクロマトグラフィー (ECD) GC-ECD; 農薬 pesticide; 米 rice

緒言

イネ白葉枯病殺菌剤テクロフタラム¹⁾ (Fig.1) の分析法を検討した。

白葉枯病は *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* によって引き起こされるイネの最も重大な細菌病である^{2), 3)}。テクロフタラムはこの病変に対する殺菌剤として開発され、1979年に韓国で実用化され、我が国においても昭和62年に登録された。平成8年9月2日、厚生省より食品中の残留基準値と分析法が告示された⁴⁾。

水田に散布されたテクロフタラムは、土壌中ではテトラクロロフタル酸部分において塩素原子の脱離が、イネ

植物体上ではイミド化が主に進行する⁵⁾。したがって、玄米中のテクロフタラムは親化合物及びテクロフタラムイミド (Fig. 1, 以下イミド体という) の混合物として

Fig. 1. Chemical structures of tecloftalam and tecloftalam-imide

* 国立医薬品食品衛生研究所大阪支所: 〒540-0006 大阪市中央区法円坂 1-1-43

残留する。厚生省の残留基準値はテクロフタラムとイミド体の含量として定められている。

ラットへの経口投与実験では、イミド体はほとんど未変化で糞中に排泄されるのに対し、テクロフタラムは4～6割程度吸収される⁶⁾。また急性毒性、変異原性ともイミド体よりテクロフタラムで高い¹⁾。このようにテクロフタラムとイミド体は毒性学的な性質が異なるため、正確な生体影響の評価のためには両者を分別して定量する必要がある。

テクロフタラムはカルボキシル基を有するため、そのままの形ではGCによる検出が困難である。分子内で脱水縮合反応を行い、イミド体に変換することで分析が容易になる。具体的な分析例としては、厚生省の告示法の他に、イネ葉液⁷⁾を試料とした報告及び農業登録保留基準⁸⁾の方法がある。これらはいずれもテクロフタラムとイミド体を分離せずに反応させて分析する方法であり、両者を分別定量することはできない。

著者らはテクロフタラムとイミド体をフロリジルミニカラムを用いて分別定量する試験法を作成した。その際、イミド体がガスクロマトグラフのガラスインサートに吸着する現象を見だし、対処法を示した。

なお、テクロフタラムはイネにのみ使用され、残留基準も米にのみ設定されているため、分析法検討の試料には米を用いた。

実験方法

1. 標準品

テクロフタラム（和光純薬工業(株)製）純度99.9%，約25 mgを正確に量り採り、20%メタノール/アセトンで溶解して50 mLとした。

テクロフタラムイミド（和光純薬工業(株)製）純度99.7%，約25 mgを正確に量り採り、アセトンで溶解して50 mLとした。

2. 試料

玄米は大阪市内の小売店で購入した。

3. 装置

ガスクロマトグラフ：島津GC-17A（電子捕獲型検出器付き）、AOC-17（オートインジェクター）、C-R4A（データ処理装置）

ガスクロマトグラフ-質量分析計：日本電子JMS-DX302（質量分析計）、MS GCG 06（ガスクロマトグラフ）、JMA-DA5000（データ処理装置）

4. 試薬

Sep-Pak Plus Florisil: Millipore 社製

ジアゾメタン: Aldrichの方法⁹⁾により、Diazald[®]及びミニジアザルドキットを用いて合成。

5. 試験溶液の調製

試験液の調製方法を Scheme 1 に示した。

6. 測定条件

6.1 GC-ECD条件

カラム: DB-1（内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25 μ m, J&W 社）; カラム温度: 60°Cで2分間保持し、その後毎分20°Cで昇温し、250°Cに到達後34分間保持する; 注入口温度: 250°C; 注入方式 スプリットレス; 検出器温度: 300°C; キャリヤーガス: ヘリウム 1 kg/cm²; シラン処理インサート: レステック社製スプリットレス用; 注入量: 1 μ L

6.2 GC/MS条件

カラム温度: 60°Cで2分間保持し、その後毎分16°Cで昇温し、250°Cに到達後34分間保持する; イオン化電圧: 70 eV; イオン化法: 電子衝撃(EI)法; イオン化電流: 300 μ A; イオン源温度: 250°C; スキャン範囲: m/z 50～500; スキャンスピード: 1 scan/sec; その他の条件はGC-ECDと同じ。

7. 検量線

テクロフタラム: テクロフタラム標準溶液を酢酸エチルで希釈して0.02～0.8 μ g/mLの溶液を調製し、試料液と同様に無水酢酸を加えて50°Cで20分間加温してイミド化した後 *n*-ヘキサンで抽出し、検量線用標準液とした。

イミド体: イミド体標準溶液を *n*-ヘキサンで希釈して0.02～0.8 μ g/mLとし、検量線用標準液とした。

8. 添加回収実験

蒸留水で膨潤させた試料10.0 gに、テクロフタラム又はイミド体標準液（各2 μ g/mL, アセトン）1 mLを、抽出開始の1時間前に添加した（各0.2 ppm添加）。

結果及び考察

1. GC用カラムの選択

既報^{7), 8), 10), 11)}のイミド体分析例においては、いずれも無極性カラムが採用されている。そこでまずDB-1（内径0.25 mm）による分離を試みたところ、イミド体は保持時間約37分、0.02 ngの検出限界(S/N>3)で良好に定量できた。しかし若干テーリングが見られたため、同じ内径のDB-5で分析したところ、ピーク形状はやや改善したが保持時間が長かった（約57分）。DB-17では良好なピーク形状が得られたが、更に保持時間が長く実用的でなかった（約69分）。DB-17（内径0.53 mm）を使用した場合、保持時間は短かった（約36分）がピーク形状はブロードであった。そこでカラムとしてはDB-1（内径0.25 mm）を用いることとした。

2. テクロフタラムのメチル化

テクロフタラムをGCで測定するための簡便な誘導体化法としては、メチル化とイミド化が考えられる。イミド化では分析対象の代謝物と同じ化合物に変換されるため、メチル化がより望ましい。そこでテクロフタラムの

標準液をジアゾメタンでメチル化してGC分析を試みたが、単一の生成物は得られなかった。メチル化後の試験液のガスクロマトグラムには3本のピークが出現し、その1つはマススペクトル・保持時間共イミド体標準品と一致した。別の1つはマススペクトルからメチル化生成物である methyl 3,4,5,6-tetrachloro-*N*-(2,3-dichlorophenyl)-*N*-methyl phthalamate と推定された。残る1つのピークは、可能な生成物 methyl 3,4,5,6-tetrachloro-*N*-(2,3-dichlorophenyl)phthalamate から推定されるマスパターンを示さず、構造不明であった。

テクロフタラムはカルボキシル基周辺に立体障害があるため、メチル基が導入されにくく複数の生成物が生じると考えられる。そこでメチル化は断念し、ミニカラムでテクロフタラムをイミド体と分離した後イミド化反応を行い、定量することとした。

3. イミド化反応条件の検討

テクロフタラムのイミド化反応に要する時間を検討した。Fig. 2 に示したとおり、約20分の反応時間でイミド体生成量は最大(約92%)になり、その後やや減少した。そこで反応時間は20分とした。反応の回収率が100%でないことから、テクロフタラムの定量の標準溶液としてはイミド体溶液でなくテクロフタラムを同条件

Fig. 2. Time course for formation of tecloftalam-imide from tecloftalam

でイミド化したものが適当と考えられた。なお、生成したイミド体はGC/MSで確認した。

4. 分離・精製法の検討

テクロフタラムとイミド体をフロリジルミニカラム (Sep-Pak Plus Florisil) で分離する方法を検討した。イミド体は50%ジエチルエーテル-*n*-ヘキサンで溶出するのが最適であった。テクロフタラムはアセトンでは全く溶出されず、メタノールで溶出された。Table 1 に最終的に決定した溶出条件と回収率を示した。最初に *n*-ヘキサンで洗浄し、続いて50%ジエチルエーテル-*n*-ヘキサンでイミド体を溶出し、アセトンで洗浄し、メタノールでテクロフタラムを溶出することとした。この方法によって、テクロフタラムとイミド体は相互に混入することなく完全に分離できた。

5. ピーク面積の変動

前項の条件で玄米抽出液を分画し、GCにより分析したところ、イミド体標準液のピーク面積の変動が非常に大きかった。ガラスインサートの交換後に感度が低下し、抽出液の注入後に感度が高くなる傾向があった。試みに、イミド体と同じ塩素原子数のヘキサクロロベンゼンを単独又は試験液と混合して注入したが、ピーク面積の変動はほとんど見られなかった。したがって、イミド体のピーク面積変動は、検出器が原因ではなく、インサートに吸着する等イミド体固有の問題と考えられた。カラムの交換後も感度低下は起こったが、インサートの影響の方が大きかった。

イミド体を玄米抽出液に添加したものと、同一濃度のヘキサン溶液とを交互に注入してピーク面積比の推移を調べたところ、シラン処理したガラスインサートを用いて玄米抽出液を数回〜20回程度繰り返し注入した後は0.96〜1.04の比が得られ、定量に用いることができた。未処理のインサートでは繰り返し注入の後もピーク面積比は1.5程度であった。したがって感度変化への対応としては

1. シラン処理したガラスインサートを使用する。
2. 最初の測定時には、玄米の抽出液を繰り返し注入

Table 1. Recoveries of Tecloftalam and Tecloftalam-imide from Sep-Pak Plus Florisil

No.	Eluting solvent	Volume (mL)	Recovery (%)	
			Tecloftalam	Tecloftalam-imide
①	<i>n</i> -Hexane	10	0	0
②	50% Diethyl ether- <i>n</i> -hexane	10	0	95.3
③	Acetone	10	0	0
④	Methanol	10	85.3	0
⑤	Methanol	10	2.3	0
⑥	Methanol	10	0	0

Tecloftalam (2 µg) or tecloftalam-imide (2 µg) in hexane was charged on Sep-Pak Plus Florisil cartridge and eluted with solvents ①〜⑥ continuously.

Fig. 3. Gas chromatograms of tecloftalam-imide standard and rice extract
 fraction ②: 50% diethyl ether-*n*-hexane; fraction ④: methanol
 GC conditions: column: DB-1 (0.25 mm i.d. $\times$ 30 m, 0.25 μm film thickness); oven temp.:
 60°C (2 min) $\rightarrow$ (20°C/min) $\rightarrow$ 250°C (34 min); injection temp.: 250°C; detector temp.:
 300°C; injection mode: splitless

してインサートを不活性化する。抽出液中のイミド体とヘキサン中のイミド体のピーク面積比が1に近くなったことを確認してから本測定を行う。

3. ガラスインサートの交換直後、及びGCを数日間以上停止した後に測定するときにも、2の確認を行う。

この3点が有効であった。

また、テクロフタラム及びイミド体を含まないことを確認した試料抽出液を用意すれば、標準添加法も可能である。

6. 添加回収実験

1～5の検討結果に基づき、Scheme 1に示した分析法を設定した。この試験法によって調製した試験液のクロマトグラムをFig. 3に示した。イミド体は第二画分についても第四画分についても妨害なく検出できた。

玄米にテクロフタラム又はイミド体を0.2 ppm添加して、添加回収実験を行ったところ、それぞれ $89.3 \pm 1.9\%$ (3試行), $82.6 \pm 1.5\%$ (3試行)と回収率・再現性とも良好であった。本法の検出限界は試料中0.01 ppmであった。テクロフタラムとイミド体の分析操作中の相互変換は認められなかった。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり有益な御助言を頂いた大阪府公害監視センター奥村為男先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Takahi, Y.: Jpn. Pestic. Inf. **46**, 25～30 (1985).
- 2) 中神和人, 本田建夫: 農業誌. **6**, 377～385 (1981).
- 3) Nakagami, K., Tanaka, H.: J. Pesticide Sci. **5**, 511～516 (1980).
- 4) 厚生省告示: “食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件” 平成8年9月2日, 厚生第221号 (1996).
- 5) Kirkpatrick, D., Biggs, S. R., Conway, B., Finn, C. M., Hawkins, D. R., Honda, T., Ishida, M., Powell, G. P.: J. Agric. Food Chem. **29**, 1,149～1,153 (1981).
- 6) Kirkpatrick, D., Finn, C. M., Conway, B., Hawkins, D. R., Honda, T., Ishida, M., Powell, G. P.: *ibid.* **29**, 608～614 (1981).
- 7) Nakagami, K., Tanaka, H., Yamaoka, K., Tsujino, Y.: J. Pesticide Sci. **5**, 607～609 (1980).
- 8) 農薬環境保全対策研究会編: “農薬登録保留基準 残留農薬基準ハンドブック—作物・水質残留の分析法—” p. 490～492 (1995) 化学工業日報社.
- 9) Aldrich 社編: Technical Information Bulletin, AL-180 (1990).
- 10) 後藤真康, 加藤誠哉: “増補残留農薬分析法” p. 151～152 (1987) ソフトサイエンス社.
- 11) 農薬残留分析研究班編集: “最新農薬の残留分析法”, p. 595～596 (1995) 中央法規出版.