

the relation $y=0.962x+0.0058$ and a relative coefficient of 0.949.

(Received July 4, 1975)

Keywords

Fluorophotometry

Pyridoxal

Serum acylase I activity

Serum amino acid

Serum carboxypeptidase B activity

Zn(II) ions

紫外吸光光度法によるチオファネートメチル及び分解物の残留分析*

小野成男**, 長谷川治郎, 柳瀬利一郎***, 杉岡克己, 遠山典宏**

(1975 年 5 月 16 日受理)

各種作物中のチオファネートメチル(TM)及び分解物2-メチルベンズイミダゾリルカーバメート(MBC)の残留分析を検討した。その結果、作物中よりメチルアルコールで抽出した後、両者を塩化メチレン-希塩酸-メチルアルコール溶液で液液分配し、TMは閉環反応によりMBCに変え、クリンアップ後、紫外吸光光度法で定量する方法を確立した。閉環反応は定量的でかつ再現性についても満足できる結果を得た。定量は各種作物中の妨害を画一的な方法で排除することを目的としたため、作図法を採用し、補正吸光度を求め、補正吸光度とTM(あるいはMBC)の関係線を求めて検量線を作成した。本法をそ菜、果実、穀類など広範囲の作物の残留分析に適用した場合、いずれの作物についても実用性のある検出限界及び添加回収率の結果が得られた。

1 緒 言

殺菌剤トップジンM中の有効成分であるチオファネートメチル(TM)及び分解物2-メチルベンズイミダゾリルカーバメート(MBC)の各種作物中における残留分析につき検討した。TMはそのままでは電子捕獲型検出器あるいは蛍光光度型検出器付きガスクロマトグラフによる定量は感度の点で困難であった。MBCをトリフルオル酢酸で誘導体をつくり、ガスクロマトグラフで定量する方法が報告¹⁾されているが、トップジンMがそ菜、果実、穀物など極めて広範囲な作物に使用されているため、これら各種作物中の成分が、TMをMBCの誘導体に変える反応でどのように変化するか、それらをすべて画一的な方法でクリンアップできるか、いずれの作物の場合

でも定量性が満足されるかなどについて検討するには多くの困難が予想されたので、今回はTM及びMBCを紫外吸光光度法により定量する方法について検討した。TMの紫外吸収スペクトルは余り特異性がなく幅広い形状のため、植物成分によって妨害を受けやすいが、MBCの吸収スペクトルはベンズイミダゾールの極めて特異性のある形状を示すため、植物成分の妨害が少ないことが認められた。このため、TMとMBCを分離した後、TMはMBCに変えて定量することとし、同時に、若干の植物成分が存在していてもTM及びMBCの定量を妨害しない方法について検討し、十分に実用的な残留分析法を確立した。

2 試薬及び装置

2.1 試 薬

メチルアルコール、石油エーテル、塩化メチレン、イソオクタン、クロロホルム、塩酸、塩化ナトリウム、水酸化ナトリウム、酢酸銅、水酢酸：試薬特級品

* 農薬の残留分析に関する研究(第1報)

** 日本曹達(株)ファインケミカル研究所：神奈川県小田原市高田柳町 345

*** 日本曹達(株)高岡工場：富山県高岡市向野本町 300

TM: 工業用原体をメチルアルコールから3回再結晶精製したもの, 融点: (177~178)°C

MBC: 工業用原体をジオキサンから2回再結晶精製したもの, 融点: (318~319)°C

2.2 装 置

分光光度計: 日立ダブルビーム分光光度計 124 型 50 mm 角型石英セル

遠心分離器: 久保田超高速遠心機 KR-200B (10000 rpm)

3 実験及び結果

3.1 紫外吸収スペクトル

TM 及び MBC の紫外吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。TM の吸収スペクトルは 271 nm にかなり強い ($\epsilon: 1.85 \times 10^4$) 吸収を示すが, その形状は幅広く植物成分の妨害を受けやすい。MBC の希塩酸溶液中での吸収スペクトルは極めて鋭く, 植物成分の妨害を受けにくいので TM は MBC に変えて定量することを検討した。

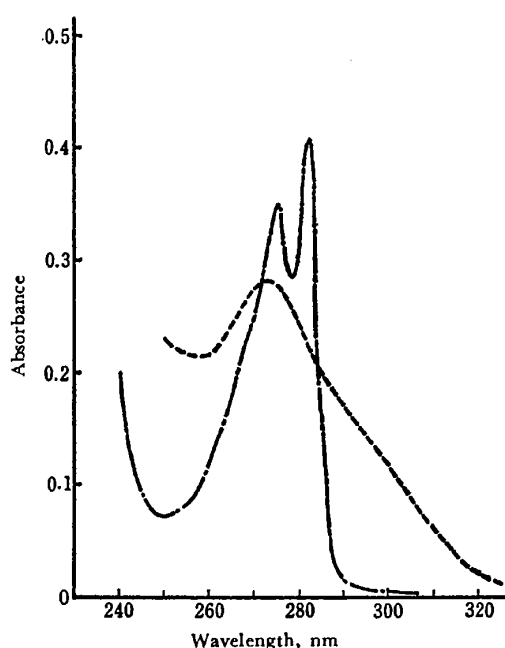
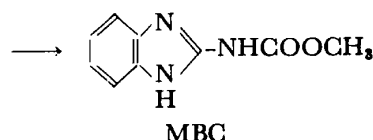
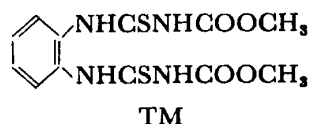


Fig. 1 Absorption spectra of TM and MBC

--- TM; — MBC; TM: 25 µg/25 ml CHCl₃;
MBC: 25 µg/25 ml 1N HCl; Cell thickness: 50mm

3.2 閉環条件の検討

TM を MBC として定量するために TM を MBC に定量的に変える閉環反応の条件を検討した。



閉環反応は次の4とおりの方法で検討した。

- i) 酢酸銅を添加した酢酸溶液中で加温する²⁾。
- ii) 硝酸銀を添加したエチルアルコール中で加温する。
- iii) 酸化カルシウムを添加したアセトニトリル中で加温する。
- iv) 水中で加温する³⁾。

これらの4方法を比較した結果, 最も短時間で反応が終わりしかも確実性のある方法は i) であったので i) の方法を採用した。500 µg 以下の TM を閉環させるために酢酸銅の添加量は (50~200) mg, 酢酸は 50% 酢酸溶液 10 ml で十分であった。加熱方法は反応液を 50 ml のナシ形フラスコあるいは 30 ml の沈降管に入れ, 沸騰石を加えて還流冷却管を付け, 電熱器上で煮沸還流させる。反応は定量的に行われ, 検量線は原点を通る直線が得られた。50 µg の TM について閉環反応の繰り返し実験 ($n=4$) を行った結果, 変動係数 5% で再現性は良好であった。

3.3 クリンアップ (clean up) の検討

TM 及び MBC はアルカリ溶液中に易溶であるため, 有機溶媒中からアルカリ溶液で定量的に抽出することが可能である。この方法は極めて有効なクリンアップであるが, TM の添加回収試験を行った場合, 回収率がばらつくことが認められた。これは TM がアルカリ溶液中で不安定であることに原因するものと考えられる。しかし, MBC のクリンアップには十分に活用できる。MBC は希塩酸に易溶であるが TM は難溶であるため TM と MBC は液液分配で分離が可能である。この外, TM 及び MBC の水-メタノール溶液は石油エーテル, イソオクタン, *n*-ヘキサンで洗浄することが可能であり, 石油エーテルなどの代わりにクロロホルム (あるいは塩化メチレン) で振とうした場合には両者ともに定量的にクロロホルム層に移すことができる。これらの結果から, メチルアルコールを植物体からの抽出溶媒として選んだ。

カラムクロマトグラフィーによるクリンアップも検討した。フロリジル, シリカゲル, アルミナを用いた結果, フロリジルが最も効果があった。フロリジルを充てんし溶出溶媒としてクロロホルムを用いた場合には植物成分をかなり除去できるが, MBC は吸着され溶出しにくい。この外にカラムクロマトグラフィーの操作中に TM の

一部が MBC に分解する場合も認められた。

薄層クロマトグラフィーに関して若干検討した結果、TM は植物成分との分離が容易であるが MBC はテーリングを起こしやすく、乾式、湿式いずれも定量には適していないことが分かった。以上の結果から、クリンアップは液液分配のみによって行うことにした。

3.4 植物成分の影響

TM 及び MBC を定量する場合、植物成分の完全な除去は困難であったので、若干の植物成分が測定液中に存在していても MBC の定量を妨害しない方法を検討した。MBC の極大吸収波長は希塩酸溶液では 282 nm であるが、植物成分も 282 nm で若干の吸光度を示すため 282 nm の吸光度から MBC を定量しようとするれば、植物成分の妨害が無視できない (Fig. 2)。又、MBC の吸収がほとんど認められない 300 nm の吸光度をベースとして 282 nm との吸光度差から MBC を定量する方法を検討したが、作物によっては植物成分の妨害が認められた。各種作物につき実験した結果、290 nm と 260 nm におけるスペクトル上の点を直線で結び、この直線上の 282 nm の吸光度 (A') とスペクトル上の 282 nm の吸光度 (A) との差 (ΔA) を補正吸光度として、 ΔA と MBC 含有量との関係線を求めて検量線とすれば、植物成分による妨害がほとんど無視できることが実験的に認められた (Fig. 3)。きゅうり、とまと、ぶどう、りんご、もも、みかん、玉ねぎ、てん菜、いちご、バナナ、米、小麦、じゃがいもについて検討した結果、植物成分の妨害は補正吸光度にして 0.01 以下であり、TM 及び MBC の定量を妨害しない。

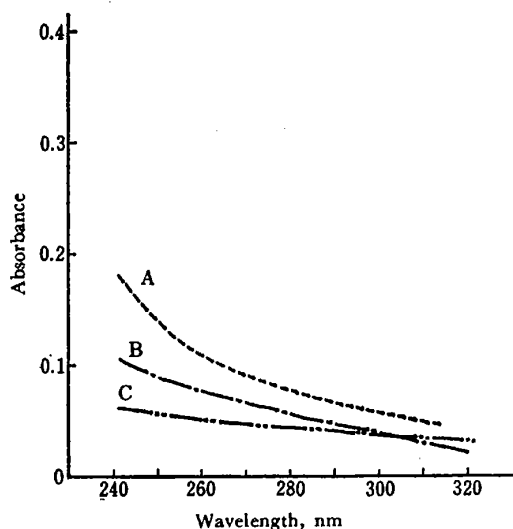


Fig. 2 Absorption spectra of the control samples

A : Strawberry; B : Grape; C : Cucumber

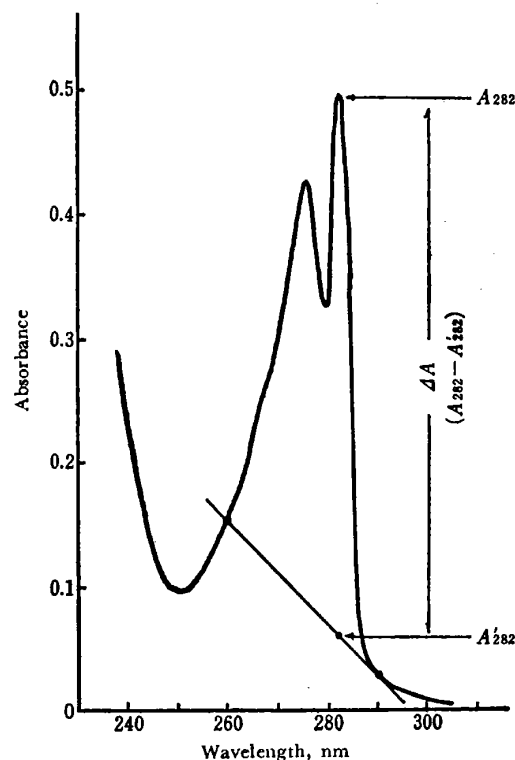


Fig. 3 The corrected absorbance (ΔA) obtained by the drawing method

4 TM 及び MBC の残留分析

4.1 検量線の作成

4.1.1 TM TM のクロロホルム溶液 (100 μ g/ml) 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 ml をそれぞれ沈降管中に採取し、クロロホルムを揮散させ、50% 酢酸溶液 10 ml、酢酸銅 (50~100) mg 及び沸騰石数個を加え、冷却管を付け 30 分間加熱還流させる。冷却後冷却管頭頂より 1 N 塩酸 10 ml を流して管壁を洗う。内容物を 100 ml 分液漏斗中に移し、20 ml の 1 N 塩酸で沈降管を洗ってこの液も分液漏斗中に入れる。10 ml のクロロホルムで 3 回洗浄しクロロホルム層は捨てる。酸性溶液を 2 N 水酸化ナトリウム溶液で中和 (pH 6.0~6.5) した後 40 ml のクロロホルムで 2 回抽出する。クロロホルム抽出液を 10 ml の水で洗浄した後、1 N 塩酸 25 ml を加えて 5 分間振とうし、塩酸層を分取し 5 cm 石英セルに入れ、(250~310) nm の領域の吸収スペクトルを記録させる。260 nm と 290 nm におけるスペクトル上の点を直線で結び、この直線上の 282 nm の吸光度を求め A' とする。吸収スペクトル上の 282 nm の吸光度を A とし、両者の差 ΔA を補正吸光度とする。補正吸光度を縦軸に、TM の量を横軸にとり検量線を作成する。

4.1.2 MBC MBC の 1 N 塩酸溶液 (100 μ g/ml) 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 ml を 100 ml の分液漏斗にそ

れぞれひょう取し, 1N 塩酸 30 ml とクロロホルム 10 ml を加えて振とうし, クロロホルム層は捨てる. 再び 10 ml のクロロホルムで洗浄後, 塩酸溶液を中和 (pH 6.0~6.5) し, 40 ml のクロロホルムで2回振とう抽出する. クロロホルム抽出液を 10 ml の水で洗浄後 1N 塩酸 25 ml で抽出し, 塩酸層を 5 cm 石英セルに入れ (250~310)nm の領域の吸収スペクトルを記録させる. 4.1.1 と同様にして, 補正吸光度を縦軸に MBC の量を横軸にとり検量線を作成する.

4.2 分析操作

4.2.1 そ菜類 試料を均質にし, 100 g 相当量をひょう取しメチルアルコール 100 ml で振とう抽出する. 遠心分離 (8000 rpm, 3 min) 後, 吸引濾過しフィルター上の残さを 60 ml のメチルアルコールで洗い濾液に合わせる. 濾液に 1% 塩化ナトリウム溶液 60 ml を加え石油エーテル-イソオクタン (6:4) 100 ml で洗浄する. 水-メタノール層に塩酸を加え, pH を 1~2 とする. 塩化メチレン 100 ml で2回振とうし TM を抽出する. 塩化メチレン抽出液を 50 ml の水で洗い, この洗液は水-メタノール層に合わせる. 塩化メチレン抽出液を液相分離濾紙で濾過し, 水分を除く (この場合, 脱水剤の使用により TM, MBC の一部が吸着されることがあるので, 脱水剤は使用しないほうがよい).

(1) TM の定量: 塩化メチレン溶液を 300 ml ナス形フラスコに移し, 酢酸 5 ml を添加しロータリーエバポレーターを用いて浴温 40°C 以下で減圧濃縮する. 20 ml 程度まで濃縮したときにいったん濃縮をやめ, 濃縮液を 50 ml ナス形フラスコ中に移し替え, 再び減圧濃縮する. 酢酸が (2~3) ml 残る程度まで濃縮した後, 浴温を 50°C まで上げて (5~10) 分濃縮を続ける. 濃縮後, ナス形フラスコ中に 50% 酢酸溶液 10 ml, 酢酸銅 (50~100) mg 及び沸騰石数個を加え, 冷却管を付けて 30 分間加熱還流させる. 室温まで冷やし, 冷却管の頭頂より 1N 塩酸 10 ml を流し管壁を洗う. 以下 4.1.1 の方法に従って TM を定量する.

(2) MBC の定量: TM 抽出後の水-メタノール相を中和 (pH 6.0~6.5) した後, 塩化メチレン 100 ml で3回抽出を繰り返す. 塩化メチレン抽出液を水 100 ml で洗浄した後, 液相分離濾紙で濾過脱水し, 約 5 ml まで減圧濃縮する. 濃縮液を 100 ml 分液漏斗中に移し, 15 ml の塩化メチレンでフラスコ内を洗い, この液も分液漏斗中に入れる. 1N 塩酸 20 ml で1回, 10 ml で1回振とう抽出して合わせ, 10 ml のクロロホルムで2回洗浄し, 以下 4.1.2 の方法に従って MBC を定量する.

4.2.2 果実類, 穀類 果肉 (あるいは全体) の場合は 4.2.1 と同様に行い, 果皮は適量の水を加え, 20 g 相当量をひょう取する. みかんの果皮中の MBC は抽出されにくいので, 上記方法で抽出後残さを更にソックスレー抽出器を用いメチルアルコールで6時間抽出した液についても分析する.

穀類は粉碎した試料 50 g に水-メチルアルコール (1:1) 200 ml を加えて振とう抽出する. 以下 4.2.1 と同様な操作を行う.

なお, 上記分析操作を行い, 吸収スペクトルを記録した結果, 妨害成分の影響で TM あるいは MBC の定量が困難な場合は次のような操作を行う.

測定液 (1N 塩酸) に 2N 水酸化ナトリウム溶液を滴加し pH を 12.5~13.0 に調節する. この液を 10 ml のクロロホルムで2回洗浄した後, pH を 6.0~6.5 に調節し, 40 ml のクロロホルムで2回抽出する. クロロホルム抽出液を 10 ml の水で洗浄した後, 1N 塩酸 25 ml で抽出し, 塩酸層の吸収スペクトルを記録する.

4.3 検出限界

TM: 吸光度の読み取り限界を 0.01 とすると, TM 約 1.6 µg に相当する. 試料を 100 g ひょう取した場合には検出限界は 0.02 ppm となる.

MBC: 吸光度の読み取り限界を 0.01 とすると, MBC 約 0.8 µg に相当する. 試料を 100 g ひょう取した場合には検出限界は 0.01 ppm となる.

4.4 添加回収試験

各種作物についての添加回収試験の結果は Table 1

Table 1 Recoveries of TM and MBC

Crops	Recovery (%)			
	TM	$\bar{x}$	MBC	$\bar{x}$
Citrus (Peel)†	76, 78, 83, 76	78	82, 87, 86, 75	82
Citrus (Pulp)	74, 78, 75, 80	77	76, 84, 89, 78	82
Tomato	88, 85, 89, 83	86	74, 78, 84, 78	78
Cucumber	80, 75, 79, 75	77	84, 80, 82, 80	82
Onion	71, 75, 73, 70	72	82, 83, 79, 80	82
Grape	75, 74, 75, 71	74	79, 82, 86, 80	84
Peach (Peel)†	75, 82, 80, 76	79	83, 80, 81, 83	82
Peach (Pulp)	80, 80, 79, 76	79	78, 74, 80, 76	77
Apple	76, 76, 78, 78	77	78, 80, 80, 80	80
Beet (Root)	74, 72, 72, 76	74	80, 72, 74, 76	76
Beet (Leaf)	75, 76, 75, 80	76	78, 82, 84, 76	80
Strawberry	74, 78, 76, 76	76	82, 84, 84, 80	82
Banana (Whole)	76, 80, 82, 84	80	86, 86, 84, 86	86
Rice†	74, 72, 72, 74	73	76, 78, 76, 75	76
Wheat†	73, 75, 74, 74	74	77, 77, 78, 75	77
Potato	76, 76, 74, 76	76	76, 80, 82, 80	80

Added amount: TM 0.5 ppm, MBC 0.25 ppm; Sample weight: 100 g, 50 g†

のとおりである。

4・5 抽出操作及び保存中の TM の MBC への分解

上記分析操作法で TM の残留分析を実施した場合、抽出操作中に TM が MBC に分解するかどうかを検討した。この結果、いずれの作物の場合でも (1~2)% 以下でほとんど分解されなかった。

又、TM を (5~10)ppm 付着させたとまと、きゅうりについて -20°C で 40 日間保存した後分析した結果、とまと、きゅうりともに MBC に分解した TM は 1% 以下であった。

終わりに、本研究に協力していただいた当社農薬残留分析関係者に深く感謝致します。

文 献

- 1) J. P. Rouchand, J. R. Decallonne : *J. Agr. Food Chem.*, **22**, 259 (1974).
- 2) H. A. Selling, J. W. Vonk, A. K. Sijpesteijn : *Chem. Ind.*, **1970**, 1625.
- 3) J. W. Vonk, A. K. Sijpesteijn : *Pest. Sci.*, **2**, 160 (1971).

☆

Residue analysis of thiophanate methyl and its degradation product by ultra violet absorption

spectrophotometry. (Study on residue analysis of pesticide. I.) Shigeo ONO, Jiro HASEGAWA, Riichiro YANASE**, Katumi SUGIOKA and Norihiro TOYAMA* (*Fine Chemical Research Laboratory, Nippon Soda Co., Ltd., 345, Takadayanagi-cho, Odawara-shi, Kanagawa; **Takaoka Plant, Nippon Soda Co., Ltd., 300, Mukainohonmachi, Takaoka-shi, Toyama)

Residue analysis for thiophanate-methyl[Dimethyl 4,4'-o-phenylene bis(3-thioallophanate)](TM) and its degradation product, 2-methyl benzimidazolyl carbamate (MBC), of various plants was studied. TM and MBC were extracted together from plants with methyl alcohol. The solution was acidified with hydrochloric acid and TM was extracted with methylene chloride; TM and MBC were satisfactorily separated from each other. TM was cyclized to MBC by refluxing with copper acetate in 50% aqueous acetic acid. After clean up, MBC was determined by ultra violet absorption spectrophotometry. The corrected absorbance method was adopted in order to avoid the interfering absorbance due to plant components. The detection limits of TM and MBC were 0.02 ppm and 0.01 ppm, respectively, when 100-g samples were used. (Received May 16, 1975)

Keywords

Thiophanate methyl decomposition products
Ultraviolet absorption spectrophotometry

ピナシアノールの溶媒抽出に対するテトラフェニルホウ酸の影響

坪内 正弘*, 酒井 忠雄**

(1975 年 5 月 29 日受理)

オニウム系色素を用いるイオン対抽出において、テトラフェニルホウ酸イオンが共存すると複雑な誤差を与えることが分かった。この原因について、キノリウム型の色素であるピナシアノールを用いて調べた。ピナシアノール陽イオンよりもテトラフェニルホウ酸イオンの濃度が低い場合には、この両者はイオン対をつくって短時間で抽出される。ところが、テトラフェニルホウ酸イオンの濃度が高くなると、たとえ過塩素酸イオンが共存しても、ピナシアノール陽イオンは短時間では抽出されなくなる。すなわち、テトラフェニルホウ酸イオンの増大とともに抽出平衡に達するまでの時間が長くなる。これは水溶液中でピナシアノール陽イオンとテトラフェニルホウ酸イオンが、1:3 のモル比からなる弱い会合錯体を形成しているためであろうと推定される。

1 緒 言

溶媒抽出法の中で、イオン対として抽出する系につい

ては、山本らの総説^{1)~3)}にあるとおり、陽イオンとしては、金属キレートを用いる場合と色素などのオニウム化合物を用いる場合とに大別される。いずれの場合にも、一般に、大きな対称性のよい 1 価イオンが比較的抽出されやすいことや、単純なイオン対抽出のみの場合には短

* 鳥取大学教養部：鳥取県鳥取市湖山町

** 岐阜歯科大学教養部：岐阜県穂積町