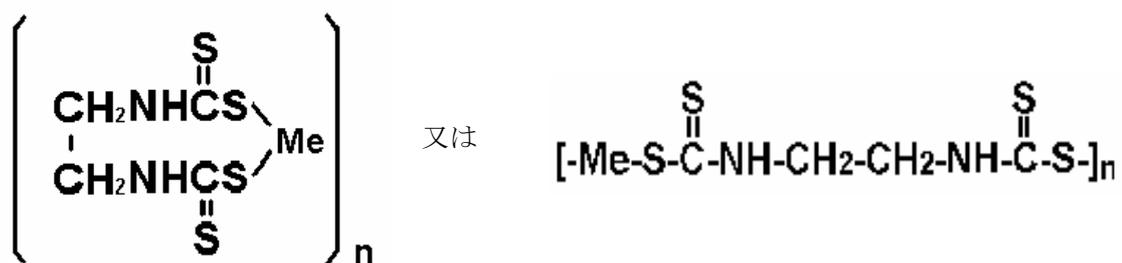


環境水中の N,N'-エチレンビスジチオカーバメート系農薬
(マネブ、ジネブ、マンゼブ) の分析
N,N'-ethylenebis(dithiocarbamate)fungicides (maneb, zineb, mancozeb)

北九州市環境科学研究所
花田喜文

構造式



Me=Mn : マネブ、Me=Zn : ジネブ、Me=Zn 及び Mn : マンゼブ

物性

物質名	マネブ	ジネブ	マンゼブ
分子式	C ₄ H ₆ MnN ₂ S ₄	C ₄ H ₆ N ₂ S ₄ Zn	—
分子量	265.29	275.76	—
融点	分解	157°C(分解)	192-194°C
水溶解度	0.16g/L	10mg/L	0.02g/L
生産量	1.682t	395t	2,556t
輸入量	原体 394t, 製剤 682t	不明	原体 1,431t, 製剤 837t
CAS 番号	12427-38-2	12122-67-7	8018-01-7
IUPAC 名	Manganese ethylenebis(dithiocarbamate)	Zinc ethylenebis(dithiocarbamate) (polymeric)	Manganese ethylenebis(dithiocarbamate)(polymeric)complex with zinc salt
溶解性	殆どの有機溶媒に不溶		

1. はじめに

エチレンビスジチオカーバメート系殺菌剤 (EBDCs) のマンゼブ、マネブ及びジネブは、野菜・果樹栽培において広範囲な病害防除効果があり、また安価で薬害が少ないことなどから、我国および諸外国で広く使用されている。我国における年間の生産および輸入量は、マンゼブが6,555t、マネブが1,046t、ジネブが416t[1]であり使用量は農薬の中でも多い方である。

殺菌剤として広範かつ多量に使用されているため、環境中における存在および残留性に関心が持たれ、EBDCsによる環境汚染状況を調査する必要性が度々指摘されてきた。また、「外因性内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について -環境ホルモン戦略 SPEED'98-」においては、マンゼブ、マネブ及びジネブの3物質を“内分泌攪乱作用を有すると疑われる物質”にあげ、環境モニタリングの必要性を述べている[2]。さらに、2000年に告示した「特定化学物質の環境への排出量の把握及び管理の改善の促進に関する法律」(PRTR法)では、これらの物質を第一種指定化学物質に指定し、環境汚染物質としての位置付けを明確にした。

しかしながら、EBDCsは熱に不安定なため、そのままでは環境中の極微量化学物質のモニタリングに汎用されているGCやGC/MSでの分析は困難である。EBDCsの分析法として、酸分解し生成する二硫化炭素やエチレンジアミンを定量する方法[3,4]、あるいは、ヨウ化メチルで誘導体化しHPLC-UVで定量する方法[5-7]が野菜などの食品試料を対象に開発されている。しかし、これらの方法を環境試料の分析に適用した場合、前者は環境中にもともと存在している二硫化炭素あるいはエチレンジアミンとの分別の問題があり、後者は検出器の選択性及び感度の面で実際の環境試料には使用し難い。従って、現在までのところ環境モニタリングに有効と思われる分析法はなく、環境調査の実施例は殆ど見当たらない。

一方、液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) は、熱的に不安定な物質や難揮発性の物質などGC/MSで分析不可能な物質を分析する新しい検出法として期待されている[8]。本研究では、前述したHPLC-UV法を参考に、水質試料中のマンゼブ、マネブ及びジネブをアルカリ性EDTAで水溶性にした後、イオン対試薬及びヨウ化メチルを用いてエチレンビスジチオカルバミン酸ジメチルエステルに誘導体化し、EBDCs総量としてLC/MSで定量する方法を開発した。

2. 分析法

2.1 試薬

マンゼブ (純度: 74.5%)、マネブ (純度: 70.5%) 及びジネブ (純度: 86.3%) の各標準品は関東化学製を、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA-2Na) は同仁化学研究所製を、硫酸水素テトラブチルアンモニウムは東京化成工業製を用いた。アセトニトリル及びクロロホルムは高速液体クロマトグラフ用、ヘキサンは残留農薬分析用、その他の試薬は全て特級規格品を用いた。なお、ヨウ化メチルは特級規格品を使用前に蒸留し精製したものをを用いた。

アルカリ性EDTA溶液は150gのEDTA-2Naを1ℓの0.8M水酸化ナトリウム溶液に溶かして調製した。

マンゼブ、マネブ、ジネブの標準液は、蒸留水1mℓ中にそれぞれ標準品1mgを含有する懸濁液とした。なお、この液は用事調製した。

2. 2 装置

実験にはWaters製高速液体クロマトグラフ(Alliance 2690) 付き四重極型質量分析装置(ZMD 4000)を用いた. 測定条件をTable 1に示す. また, 直接試料導入法を用いた質量スペクトル(電子衝撃型イオン化法, EI)の測定には日本電子製磁場型質量分析装置(JMS DX303)を使用した.

Table 1 Operating conditions for LC-MS

LC conditions (Alliance 2690)	
Column	Inertsil ODA-80A, (250mm long, 1.5mm i.d., 5 μ m ϕ)
Mobile phase	A: acetonitrile/water(4:6) B: acetonitrile
Gradient	100% A-(liner gradient 10min)-100% B (10min)
Flow	0.2 ml/min
Injection volume	2 μ l
MS conditions (ZMD4000)	
Ionization mode	negative ion-ESI
Desolvation gas	nitrogen, 400 l/h
Desolvation temperature	100 $^{\circ}$ C
Capillary voltage	3.0 kV
Cone voltage	10 V
Ion source temperature	100 $^{\circ}$ C
SIM monitor ion	m/z 268 and 267

2. 3 エチレンビスジチオカルバミン酸ジメチルエステルの合成

エチレンビスジチオカルバミン酸ジメチルエステル (EBD-dimethyl) はGustafsonら[7]の報告に従い以下の方法で合成した.

1, 2-ジアミノエタン3gを96%エタノール25mlに溶かし, 0.05M二硫化炭素/エタノール溶液を攪拌しながら加えた. 生成したペレット状の白色沈殿をガラス棒で細かく砕き, 攪拌しながらヨウ化メチル7.1gを滴下した. 0 $^{\circ}$ Cの水浴上で沈殿が少なくなるまで攪拌後, ガラス繊維ろ紙を用いて吸引ろ過した. ろ液に精製水150mlを加え, 生成した白色沈殿を吸引ろ過により回収し, 一昼夜室温で乾燥させた後, クロロホルムで二度再結晶を行った.

2. 4 試料前処理方法

水試料の前処理方法は, 食品試料中EBDCsの方法[6]を参考に以下の操作手順で行った.

試料500mlを1lの分液ロートに取り, L-システイン1g及びアルカリ性EDTA溶液200mlを加え, 10分間振とうした後, 2M塩酸でpH 7に調整した. 0.41M硫酸水素テトラブチルアンモニウム溶液10mlを加え, 0.1Mヨウ化メチル含有クロロホルム-ヘキサン(3:1)100ml及び80mlで2度振とう抽出を行った. 抽出液を合わせ, 30分間室温で静置し誘導体化を行った後, 溶媒と過剰のヨウ化メチルをロータリーエバポレーターで留去し, 残さを1mlのアセトニトリルに溶かした.

2. 5 液体クロマトグラフィー／質量分析法 (LC/MS)

誘導体化後の試料液をSep-PAK C18カートリッジを用いてクリーンアップし、正確に1mlまで濃縮した後、Table 1に示すLC-MS条件で分析した。

3. 結果と考察

3. 1 エチレンビスジチオカルバミン酸ジメチルエステルの標準品

合成で得られた白色粉状結晶の融点は105—105.5°Cであった。また、直接試料導入を用いてEIによるマススペクトルを測定した結果、m/z144, 133, 91及び86のピーク強度が強かった。これらの結果は、Marshall[9]が報告しているエチレンビスジチオカルバミン酸ナトリウムと硫化メチルを反応させて合成したEBD-dimethylの物性値と一致した。

3. 2 イオン化法の検討

LC/MS分析におけるEBD-dimethylのイオン化方法を選択するため、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) 及び大気圧イオン化法 (APCI), それぞれの正イオン及び負イオンの質量スペクトルを測定した。測定は50 μ g/ml標準溶液1 μ lをLC/MSに注入し行った。EBD-dimethylの質量スペクトルでは、正イオンではm/z 241, 負イオンではm/z 239に水素イオンが付加あるいは脱離した擬分子イオンが観測される。そこで得られた質量スペクトルからこれらの質量数のイオンピークの強度を比較した。その結果、ESI及びAPCIとも負イオンの方が正イオンより擬分子イオンのピーク強度は強く、明瞭な質量スペクトルが得られた。ESI及びAPCIによるEBD-dimethylの負イオン質量スペクトルをFig. 1に示す。ESIで擬分子イオンが質量スペクトル上で基準ピークとして観察されたため、本法では負イオンESIを選択した。

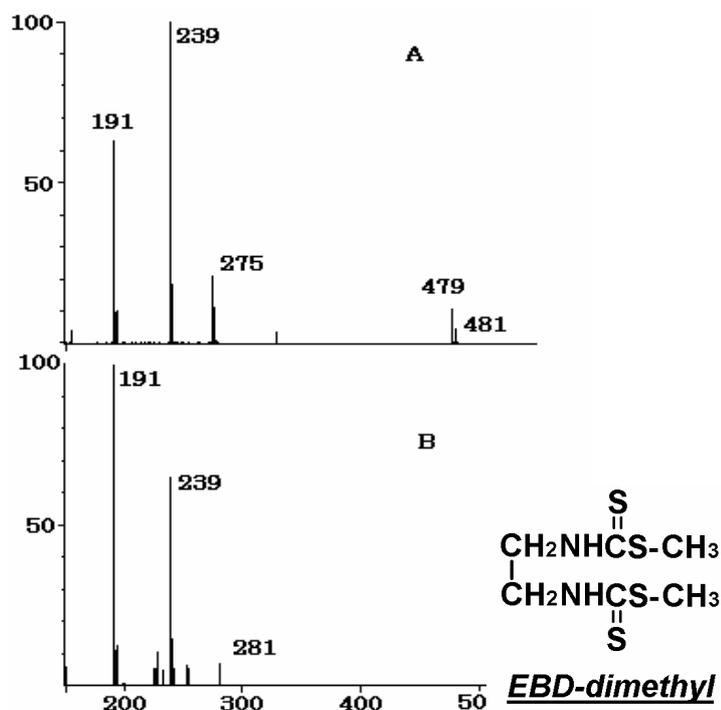


Fig.1 Negative ion mass spectra of EBD-dimethyl observed by ESI (A) and APCI (B).

3. 3 ドリフト (コーン) 電圧の検討

負イオンESIモードでドリフト (コーン) 電圧を0—40Vまで変化させ, EBD-dimethyl標準溶液の質量スペクトルを測定した. そのときの疑分子イオン m/z 239のピーク強度をFig. 2に示した. 10Vでピーク強度が最も強かったため, コーン電圧には10Vを用いた.

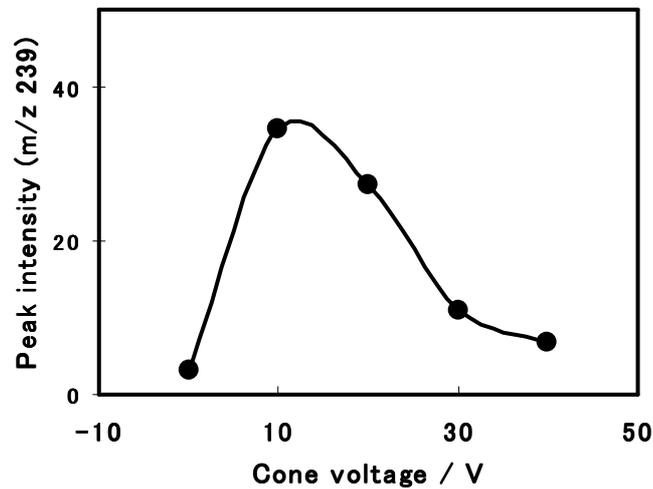


Fig.2 Effect of cone voltage on the intensity of the quasi-molecular ion, m/z 239.

3. 4 検量線及び装置検出限界

EBD-dimethyl標準溶液 0—0.5 μ g/mlをTable 1のLC/MS条件で測定した. 検量線の例をFig. 3に示す. この検量線の相関係数は0.9997であり, 良好な直線性が得られた. また, 検量線の最低濃度0.05 μ g/mlを7回繰り返し測定した結果, 標準偏差は0.010 μ g/ml (RSD=18.5%)であり, カナダ国立環境試験センターが定めている検出限界算定方法[10] (t分布を用いた危険率5%の片側検定) に従って算出した装置検出限界は0.019 μ g/mlであった. これは, 水質試料中のマンゼブ濃度に換算すると0.043 μ g/lに相当し, 環境中微量化学物質の分析に十分対応可能な濃度であった. 検量線の最低濃度 (0.05 μ g/ml) のマス chromatogramをFig. 4に示す.

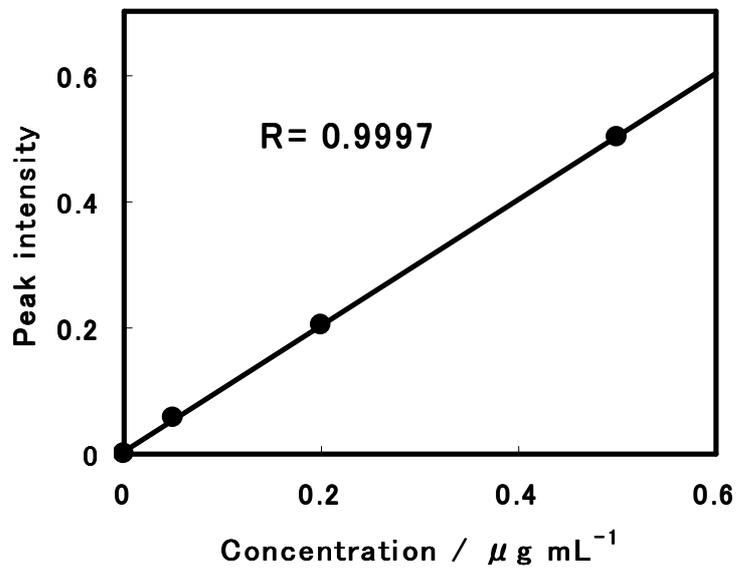


Fig.3 Example of calibration curve for EBD-dimethyl.

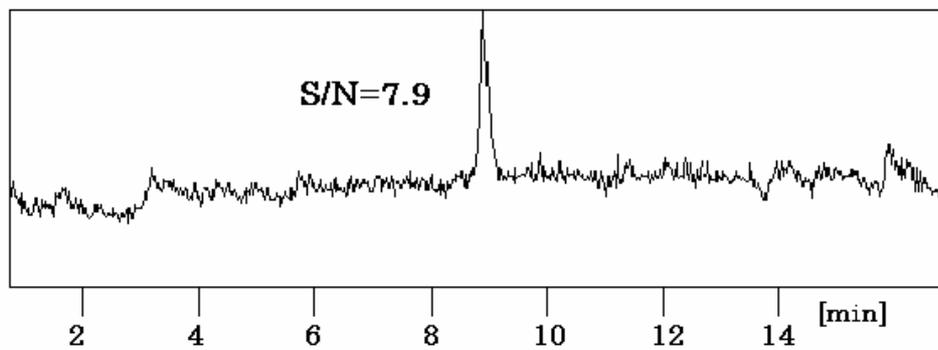


Fig.4 SIM chromatogram of EBD-dimethyl standard (0.05 $\mu\text{g/ml}$).

本法における検出限界を既報のHPLC-UV法の検出限界10–50 $\mu\text{g/l}$ [5-7]と比較した結果、本法が200倍以上低い濃度であった。このことから、LC/MSは検出限界を極低濃度に設定することができ、分析法の高感度化が可能となった。

3. 5 Sep-PAK C18カートリッジからのEBD-dimethylの溶出パターン

抽出及び誘導体化したEBD-dimethylのクリーンアップ法として、Sep-PAK C18カートリッジを検討した。Sep-PAK C18カートリッジからのEBD-dimethylの溶出パターンをFig. 5に示す。その結果、EBD-dimethylは4mlのアセトニトリルで十分溶出可能であった。

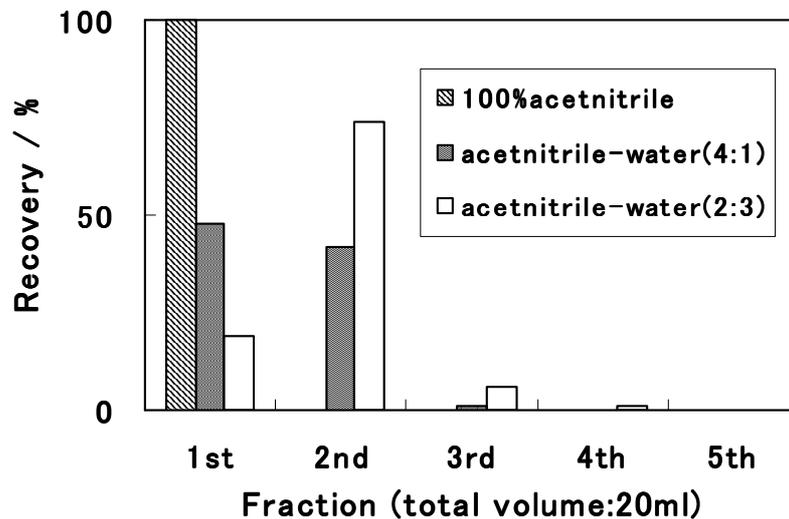


Fig.5 Fractionation of EBD-dimethyl on SEP-PAK C18 cartridge.

3. 6 物質毎の回収率

本法は、マンゼブ、マネブ及びジネブを分別せずにEBDCs総量として定量するため、各物質毎の反応率などに差がないことを確認しておく必要がある。そのため、物質毎に回収率の比較検討を行った。マンゼブ、マネブ及びジネブの各標準液1mg/mlを蒸留水で100倍に希釈し、その0.4mlを蒸留水500mlに添加した後、前述の試料前処理方法及びLC/MS測定の方法に定めた方法で分析を行った。結果をTable 2に示す。マンゼブ、マネブ及びジネブの回収率はそれぞれ84.6%、93.6%及び102%であり、物質毎の顕著な差は見られなかった。

Table 2 Comparison of recovery for manzeb, maneb and zineb

Compound (purity/%)	Added / $\mu\text{g}\ell^{-1}$	Found / $\mu\text{g}\ell^{-1}$	Recovery,%
Manzeb (74.5)	5.96	5.04	84.6
Maneb (70.5)	5.64	5.28	93.6
Zineb (86.3)	6.90	7.03	102

3. 7 低濃度添加回収試験及び実試料への適用

ジネブ標準液を $0.35 \mu\text{g}/\ell$ となるように添加した蒸留水を用いて、低濃度の添加回収試験を行った。結果をTable 3に示した。回収率は57.9–114%の範囲で、その平均回収率は79.1%と良好な値であった。しかし、繰り返し試験を6度行ったときの相対標準偏差は29.3%と若干大きい値となった。一般にダイオキシン類や環境ホルモンなどの環境中微量化学物質の分析では、複雑な操作から生じる誤差や試料中に含まれる多様な狭雑物の影響を少なくするため、サロゲート物質を用いて回収率や再現性を補正することが多い[11-13]。質量分析

法では、サロゲート物質に被検成分と類似した物理化学的性質を持つ被検成分の重水素ラベル化物や¹³C置換体を選択できるため、高い分析精度を維持できる。本法においても、これらの分析法と同様にEBDCsの重水素ラベル化物などをサロゲート物質として使用することにより、現状の相対標準偏差の値をより小さくすることが可能と考えられる。現在EBDCsの重水素ラベル化物は市販されていないため、直ちに本法にサロゲート物質による補正を組み込むことは困難であるが、今後この方法を用いることによって分析精度の向上を図ることが可能である。

実試料への適用を検討するため、北九州市内の河川から採取した試料を所定の操作に従って分析した。また、この河川水にマネブ標準液を0.28 μg/lとなるように添加し、2度回収試験を行った。結果をTable 3 及びFig. 6に示した。EBDCsは、無添加の河川水からは検出されず、添加したものは平均で0.22 μg/mlの濃度で検出された。このときの回収率は78.6%であり、蒸留水からの回収試験とほぼ同様の結果であった。このことから、本法は環境試料の分析に十分適用可能であることが示された。

Table 3 Recovery of EBDCs added to distilled water and river water

	Added / μg/l ⁻¹	Found / μg/l ⁻¹	Recovery, %
Distilled water	Zineb, 0.35	0.27 ± 0.080 ^a	79.1 (29.3 ^b)
River water	Maneb, 0.28	0.22 ^c (n=2)	78.6

a. Mean concentration ± standard deviation for six determinations. b. Coefficient of variation. c. Mean concentration for two determinations.

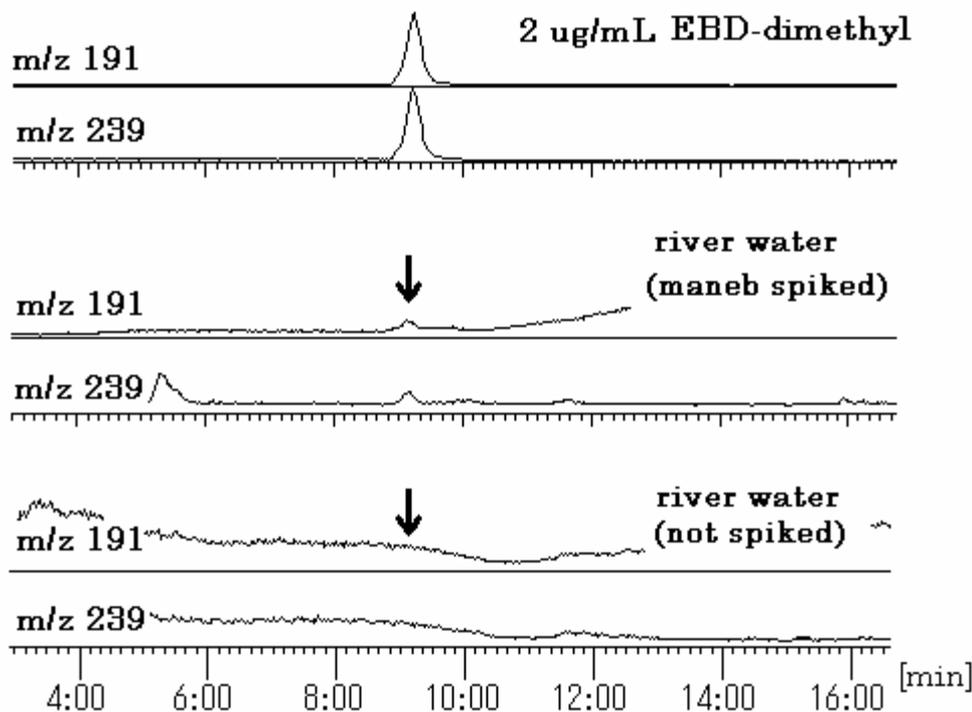


Fig.6 LC/MS-SIM chromatogram of river water samples.

4. 本章のまとめ

液体クロマトグラフィー／質量分析法 (LC/MS) を応用して環境水中に存在するN,N'-エチレンビスジチオカーバメート系殺菌剤 (EBDCs : マンゼブ, マネブ, ジネブ) の分析法を開発した。低濃度での添加回収試験では, 平均回収率79.1%及び相対標準偏差は29.3%であった。また, 標準偏差から求めた検出限界はマンゼブ換算で0.043 $\mu\text{g}/\ell$ であり, 既存のHPLC-UV法に比較し200倍以上高感度化することができた。

低濃度の添加回収試験の結果及び河川水への適用の結果から, 本法を用いることにより, 環境水中に極低濃度で存在するEBDCsを定量できることを確認した。

引用文献

1. “13599の化学商品”，化学工業日報社，東京，1999.
2. “外因性内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について -環境ホルモン戦略 SPEED’ 98-”，環境庁，1988.
3. Keppel, G. E. : Collaborative Study of the Determination of Dithiocarbamate Residues by a Modified Carbon Disulfide Evolution Method, *J. AOAC*, **54**, 528-532 (1971).
4. Newsom, W. H. : A method for Determining Ethylenebis(dithiocarbamate) Residues on Food Crops as Bis(trifluoroacetamido)ethane, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **22**, 886-889 (1974).
5. 吉沢朋子, 須釜安正, 猪俣治太郎. : 農作物中のエチレンビスジチオカーバメート剤及びエチレンチオウレアの残留について, 栃木県衛生研究所報, **14**, 73-77 (1984).
6. Gustafsson, K. H. and Fahlgren, C. H. : Determination of Dithiocarbamate Fungicides in Vegetable Foodstuffs by High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **31**, 461-463 (1983).
7. Gustafsson, K. H. and Thompson, R. A. : High-Pressure Liquid Chromatographic Determination of Fungicidal Dithiocarbamates, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **29**, 729-732 (1981).
8. “LC/MSを用いた化学物質分析法開発マニュアル”，環境庁環境安全課，2000.
9. Marshall, W. D. : Oxidation of Ethylenebis(dithiocarbamate) Fungicides and Ethylenethiuram Monosulfide to Prevent Their Subsequent Decomposition to Ethylenethiourea, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **26**, 111-115 (1978).
10. “*Manual of Analytical Method : Volume 1 Major Ions and Nutrients*”, Chapter 1 Quality Assurance/Quality Control, Canada Center for Inland Waters, The National Laboratory for Environmental Testing, Burlington, Ontario, 1998.
11. “JIS K0311 排ガス中のダイオキシン類及びコプラナーPCBの測定方法”，日本工業規格，東京，1999.
12. “JIS K0312 排水中のダイオキシン類及びコプラナーPCBの測定方法”，日本工業規格，東京，1999.
13. “環境ホルモンのモニタリング技術”，森田昌敏 監修，シーエムシー，1999.