

ジラムの水質モニタリングデータと当面のリスク管理措置の方向性について

(水産動植物の被害防止に係る登録保留基準関係)(案)

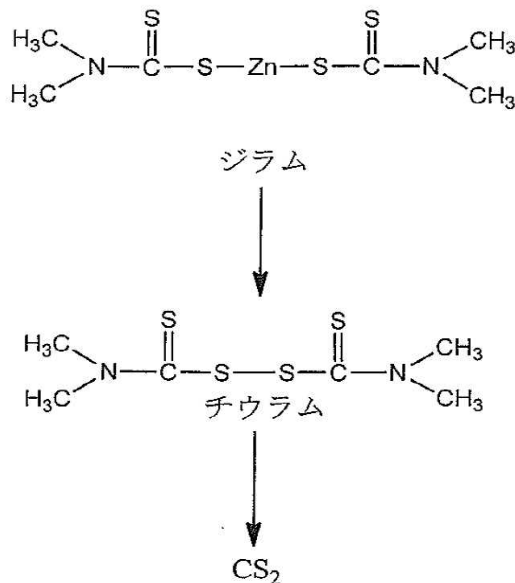
1. 経緯

ジラムについては、水産動植物被害防止に係る農薬登録保留基準値案(以下、「水産基準値案」という。)が $0.96 \mu\text{g/L}$ 、水産PECが $0.11 \mu\text{g/L}$ (非水田PEC_{Tier1})と、水産基準値案と水産PECが近接していたことから、「水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準値案と環境中予測濃度(水産PEC)が近接している場合の対応について」(平成23年10月11日中央環境審議会土壤農薬部会農薬小委員会(第27回)了承)に基づき、水質モニタリング調査データ等を確認した。その結果、ジラムを対象とした水質モニタリングデータは確認できなかった。

ジラムは水中ではチウラム、最終的に二硫化炭素まで加水分解される。また、ジラムのみを対象としている分析方法がなく、ジラム等を二硫化炭素に加熱分解して測定する方法、ジラム等をメチル化して測定する方法等がある。

これらの方法により検出される農薬、測定値の評価方法について、以下のとおり整理を行い、実環境中のモニタリング調査の実施を検討することとする。

2. 推定加水分解経路



3. 分析法について

(1) ジラム等を加熱分解して二硫化炭素として測定する方法(別紙1、旧作物残留に係る登録保留基準試験法より)

試料中のジラムを塩酸で加熱分解して二硫化炭素として測定する方法である。塩酸で加熱分解する過程においてジラムの他に、ジチオカーバメート系農薬(例えば、マンネブ(マネブ)、マンゼブ(マンコゼブ)、アンバム、プロピネブ、チウラム(チラム)、ジネブ(2005年登録失効)、チアジアジン(ミルネブ)(2012年登録失効)、ポリカーバメート(2012年登録失効))等も二硫化炭素に分解されるので、これらの農薬等由来の二硫化炭素についても合わ

せて測定される。

- (2) ジラム等をメチル化してジメチルジチオカルバミン酸メチルとして測定する方法
(別紙2、農薬等の環境残留実態調査分析法より)

試料中のジラムをヨウ化メチルでジメチルジチオカルバミン酸メチル(以下、DMDCメチルという。)にメチル化して測定する方法である。メチル化の過程において、チウラム(チラム)等についてもDMDCメチルとなるので、合わせて測定される。

4. 実環境中のモニタリング調査結果の評価方法

- (1) 測定結果が全てジラム由来であると過程して、ジラムの水産基準値と比較する方法

測定結果(3.(1)の分析法は二硫化炭素の値、3.(2)の分析法はDMDCの値)が全てジラム由来であると過程して、ジラムの水産基準値と比較する。

ジチオカーバメート系農薬のうち水産基準値が設定されているものは、ジラムを含め以下の3つであり、現状ではジラムの水産基準値が最も小さい。

農薬名	水産 PEC (µg/L)	水産基準値 (µg/L)
チウラム	0.38	10
マンネブ	0.21	18
ジラム	0.11	0.96

例) 3.(2)の分析法を用いて、DMDCメチルの検出値が0.1µg/Lの場合

$$\begin{aligned} (\text{ジラムの濃度}) &= (\text{DMDCメチルの検出値}) \times (\text{ジラムへの換算係数}) \\ &= 0.1 \times 2.26 \\ &= 0.23 \end{aligned}$$

なお、二硫化炭素やDMDCメチルに分解される他のジチオカーバメート系農薬についてジラムより小さい基準値が設定された場合は、当該基準値をモニタリング結果と比較する方法を別途検討することとする。

- (2) 使用された農薬の使用割合に基づきジラムの濃度を算出し、水産基準値と比較する方法
モニタリング調査を実施する流域における農薬の使用割合が把握出来る場合は使用実態を反映したジラムの濃度を算出し、水産基準値と比較する。

-) 各分析法において、測定される可能性のある農薬等について、測定地点に流入すると考えられる地域における使用履歴等からジラムの使用割合を推計する。
-) 各分析法における分析結果にジラムの使用割合を乗じてジラムの濃度を算出する。

例) 3.(2)の分析法を用いて、DMDCメチルの検出値が0.1µg/L、ジラムの普及率が10%、チウラムの普及率が5%の場合

$$\begin{aligned} (\text{ジラム由来のDMDCメチル濃度}) &= (\text{DMDCメチルの検出値}) \times (\text{ジラムの使用割合}) \\ &= 0.1 \times 10 / (10+5) \\ &= 0.067 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} (\text{ジラムの濃度}) &= (\text{ジラム由来のDMDCメチル濃度}) \times (\text{ジラムへの換算係数}) \\ &= 0.067 \times 2.26 \\ &= 0.15 \end{aligned}$$

参考) 二硫化炭素からのジラムへの換算係数 : 2.01
DMDCメチル からのジラムへの換算係数 : 2.26

(参考) 旧作物残留に係る登録保留基準試験法¹ より抜粋
農薬取締法第3条第1項第4号から第7号までに掲げる場合に該当するかどうかの基準を定める等の件第1号イの環境大臣の定める基準
[昭和四八・七・二四 環告四六]

2 試験法

(7) チラム及びジラムの試験法

ア 装置 炎光光度型検出器付きガスクロマトグラフ及び分解吸収装置(別図)を用いる。

イ 試薬試液

エタノール エタノール(特級)

塩酸 塩酸(特級)

硫酸 硫酸(特級)

水酸化ナトリウム 水酸化ナトリウム(特級)

塩化第一スズ 塩化第一スズ(特級)

二硫化炭素 二硫化炭素(特級)

ポラスポリマー 気体測定用ポラスポリマー(標準網フルイ149~177 μ m)

二硫化炭素標準溶液 あらかじめ、エタノールを標線付近まで入れた50mlのメスフラスコにマイクロシリンジを用いて二硫化炭素0.05gを正確にはかりとり、標線までエタノールを加えたもの

ウ 試験溶液の調製

検体100g相当の試料を分解吸収装置の分解フラスコにはかりとり、塩化第一スズ5gを加える。別に第一吸収管に6.5%水酸化ナトリウム溶液15mlを、第二吸収管に硫酸15mlを、第三吸収管にエタノール10mlを入れておく。次いで流速毎分30~60mlで吸引しながら、沸騰させた直後の1.5mol/L塩酸200mlを吸気孔から注入し、分解フラスコを加熱して、その内容を緩やかに沸騰させながら45分間反応させ、発生した二硫化炭素を第三吸収管のエタノールに吸収させる。

第三吸収管を分解吸収装置からはずし、直ちに栓をして室温に戻し、その中の溶液を試験溶液とする。

エ ガスクロマトグラフの操作条件

充てん剤 ポラスポリマーを用いる。

分離管 内径3~4mm、長さ150~200cmのガラス管を用いる。

炎光光度型検出器のフィルター イオウ用干渉フィルター(波長394nm)を用いる。

分離管槽温度 120~140

¹ http://www.env.go.jp/water/dojo/noyaku/law_data/e348kk0046.htm

試料気化室温度 220 ~ 260

検出器温度 220 ~ 260

ガス流量 キャリヤーガスとして窒素ガスを用い、二硫化炭素が約3分で流出するように流速を調整するとともに、水素ガス及び空気の流量を至適条件になるように調整する。

感度 二硫化炭素の0.4 ngが十分確認できるように感度を調整する。

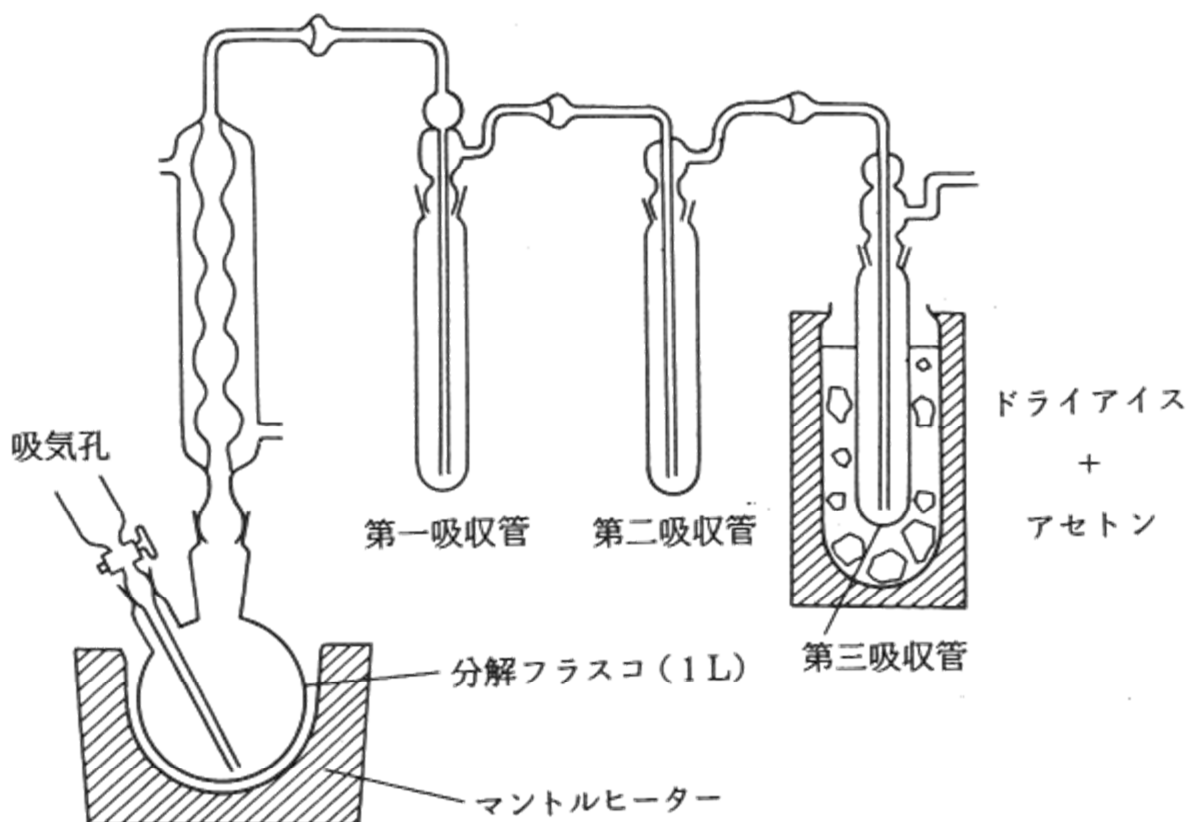
オ 検量線の作成

二硫化炭素標準溶液をエタノールで希釈し0.1 ~ 0.4 mg / Lのエタノール溶液を数点メスフラスコに調製し、このメスフラスコにガスクロマトグラフ注入用シリコンゴム栓をしてそれぞれ4 μ l ずつガスクロマトグラフに注入し、両対数方眼紙の縦軸にピーク高、横軸に重量をとつて二硫化炭素の検量線を作成する。

カ 定量試験

試験溶液から4 μ l をとり、ガスクロマトグラフに注入し、オの検量線により二硫化炭素の重量を求め、これにチラムの場合には係数1.58、ジラムの場合には係数2.01を乗じて重量に換算し、これに基づき、検体中のチラム又はジラムの濃度を算出する。

別図 吸収装置の一例



5. ジチオカルバマート系化合物分析法

5.1. 分析法の概要

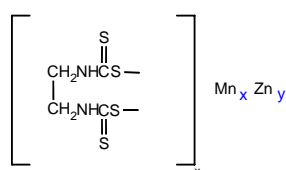
対象となる 4 種の化合物を抽出操作で誘導化しながらエチレンビスジチオカルバミン酸メチル又はジメチルジチオカルバミン酸メチルの 2 成分に収斂し、C₁₈ ミニカラム及び中性アルミナミニカラムで精製後、HPLC/UV で測定する。

対象化合物	分析操作概略	検出限界
マンネブ, マンゼブ ジネブ, ジラム	メチル化・ジクロロメタン - ヘキサン混液抽出 C ₁₈ C C 中性アルミナ C C HPLC/UV	0.2µg/L

5.2. 対象化合物の概要

1) マンゼブ(mancozeb)

構造式



化学式：(C₄H₆MnN₂S₄)_x · (Zn)_y

分子量：(265.28)_x · (65.38)_y

化学名(IUPAC)：manganese ethylenebis(dithiocarbamate) (polymeric) complex with zinc salt

物理化学的性質

外 観：灰黄色粉末

融 点：192 ~ 194 (溶融せずに分解), 蒸気圧：極小(20)

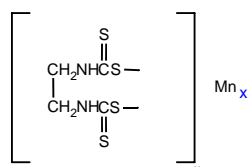
溶解性：水や大部分の一般的な有機溶媒に不溶

安定性：通常の乾燥した保存状態では安定, 熱, 湿気により徐々に分解

酸性で不安定

2) マンネブ(maneb)

構造式



化学式：(C₄H₆MnN₂S₄)_x

分子量：(265.28)_x

化学名(IUPAC)：manganese ethylenebis(dithiocarbamate) (polymeric)

物理化学的性質

外 観：黄色粉末

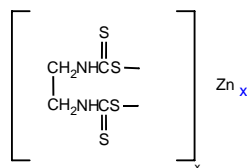
融 点：192 ~ 204 (溶融せずに分解), 蒸気圧：極小(20)

溶解性：水や大部分の一般的な有機溶媒に不溶

安定性：光に対して安定, 空気, 湿気により分解, 酸性溶液中で速やかに加水分解

3) ジネブ(zineb)

構造式



化学式：(C₄H₆N₂S₄Zn)_x

分子量：(275.8)_x

化学名(IUPAC)：zinc ethylenebis(dithiocarbamate)(polymeric)

物理化学的性質

外 観：暗黄色粉末，融 点：157 (溶融せず分解)

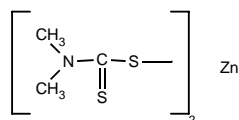
蒸気圧：<0.01 × 10⁻³Pa(20)

溶解性：水 10mg/L(室温)，大部分の一般的な有機溶媒に不溶

安定性：長期保存の場合，光，湿気，熱に不安定(安定剤により分解は抑制される)

4) ジラム(ziram)

構造式



化学式：C₆H₁₂N₂S₄Zn

分子量：305.8

化学名(IUPAC)：zinc bis(dimethyldithiocarbamate)

物理化学的性質

外 観：無色粉末，融 点：246 (240 ~ 244 ，原体)

蒸気圧：<1 × 10⁻⁹Pa(推定)

溶解性：水 0.03mg/L(20)

ジクロロメタン，二硫化炭素及び希アルカリ溶液に可溶

アセトンに可溶

エタノール及びジエチルエーテルにはほとんど溶解しない

安定性：酸性溶液中及び紫外線により分解

5.3. 分析法フローチャート

秤取

試料 200ml

ナトリウム塩の生成

- | エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム 15g, L-システイン塩酸塩 15g
- | 12mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加えて pH 9.6~10.0 に調整
- | 60分放置

メチル化及びジクロロメタン - ヘキサン抽出

- | 0.4mol/L 硫酸水素テトラブチルアンモニウム 5ml
- | 2mol/L 塩酸を加えて pH 7.5~7.8 に調整
- | 0.05mol/L ヨウ化メチル含有ジクロロメタン - ヘキサン(3:1) 70ml × 2
- | 無水硫酸ナトリウムで脱水
- | L-システイン塩酸塩 0.1g, 1%PEG・アセトン溶液 0.5ml
- | 減圧濃縮, 窒素乾固

C₁₈ C C

- | C₁₈ シリカミニカラム(例: Sep-Pak Plus C₁₈(360mg))
- | アセトニトリル及び水 5ml で予備洗浄
- | 水 10ml × 2 で負荷, 洗浄
- | アセトニトリル 5ml で負荷, 溶出

中性アルミナ C C

- | 中性アルミナミニカラム(例: Sep-Pak Plus アルミナ N(1710mg))
- | アセトニトリル 5ml で予備洗浄
- | アセトニトリル 30ml で負荷, 溶出
- | L-システイン塩酸塩 0.1g, 1%PEG・アセトン溶液 0.5ml
- | 減圧濃縮, 窒素乾固

HPLC/UV 定量

水 - アセトニトリル(7:3) 2ml 定容, 5 μ l 注入

5.4. 検量線

ジラム標準品及びマンゼブ標準品の 10mg(純度換算)を L-システイン含有エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム溶液に懸濁して, 50ml 定容とし 200 μ g/ml 溶液をそれぞれ調製する。これらを L-システイン含有エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム溶液で希釈して 2 μ g/ml 溶液をそれぞれ調製する。この 10 μ g 相当量を L-システイン含有エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム溶液 200ml を入れた 300ml の三角フラスコに分取する。これに 0.4mol/L 硫酸水素テトラブチルアンモニウム溶液 5ml を加えた後 2mol/L 塩酸を加えて pH7.5~7.8 に調整する。これを 500ml の分液漏斗に移し, 0.05mol/L ヨウ化メチル含有ジクロロメタン及びヘキサンの混液(3:1)70ml を加え, 振とう機を用いて 5 分間激しく振とうする。暫時放置後, 有機溶媒層を分取し, 残った水層に同混液 70ml を加え同様の振とう及び分取の操作を繰り返す。全有機溶媒層を 300ml の三角フラスコに合わせ, 無水硫酸ナトリウム約 100g を加えて脱水し, 直ちにろ過する。フラスコ及び無水硫酸ナトリウムをジクロロメタン及びヘキサンの混液(3:1)100ml で洗浄する。ろ液を合わせて, L-システイン塩酸塩 0.1g 及び 1%PEG・アセトン溶液 0.5ml を加えて 40 以下で約 1ml まで減圧濃縮し, 窒素ガスで乾固する。これを水及びアセトニトリルの混液(7:3)に溶解, 希釈して 0.02~0.4 μ g/ml 混合溶液を調製する。この 5 μ l

を HPLC/UV に注入し、検量線を作成する。

5.5. 検出限界

ジチオカルバマート系化合物の最小検出量及び検出限界について、表 5.1 に示した。

表 5.1 ジチオカルバマート系化合物の最小検出量と検出限界

化合物	最小検出量	検出限界
ジネブ	0.1ng	0.2µg/L
ジラム	0.1ng	0.2µg/L
マンネブ	0.1ng	0.2µg/L
マンゼブ	0.1ng	0.2µg/L

5.6. 測定機器操作条件

[条件 1]

機種(検出器) : HPLC/UV

カラム : シリカ ODS カラム

(例 : J'sphere ODS-H80 , 2.0mm × 15cm)

カラム槽温度 : 40

溶離液 : 水 - アセトニトリル(7:3)

流量 : 0.2ml/min

測定波長 : 272nm

最小検出量 : ジラム 0.1ng , エチレンビスジチオカルバマート類 0.1ng

[条件 2]

機種(検出器) : HPLC/UV

カラム : シリカ ODS カラム

(例 : TSKgel ODS-80Ts , 4.6mm × 25cm)

カラム槽温度 : 40

溶離液 : 水 - アセトニトリル(7:3)

流量 : 0.9ml/min

測定波長 : 272nm

最小検出量 : ジラム 0.1ng , エチレンビスジチオカルバマート類 0.1ng

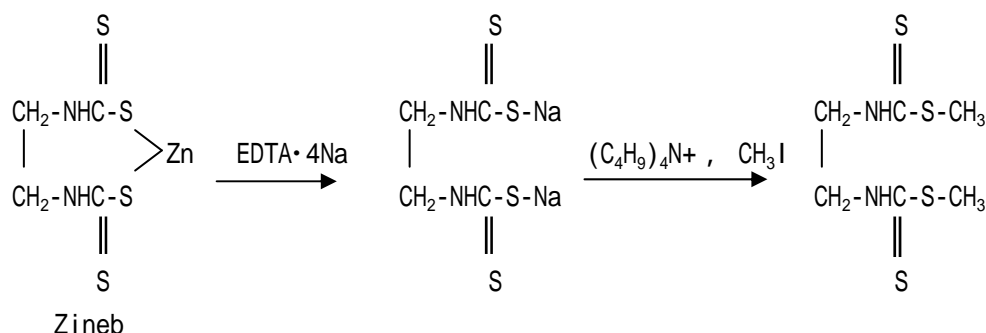
5.7. 検討事項

ジチオカルバマート系殺菌剤の環境庁告示作物試験法は、加水分解で生成する二硫化炭素を GC/FPD(S)で測定している。この分析法は、塩酸加水分解により二硫化炭素を生成する物質をすべて量り込んでしまうという欠点がある。天然成分にも塩酸加水分解で二硫化炭素を生成する物質が多数存在するため、環境試料の分析法としては適当でない。できるだけ化合物の骨格を残した分析法が、物質を同定するためにも必要条件となる。

しかしながら、このグループの化合物を直接測定する方法はない。次善の策として、できるだけ元の形を残す方法の選択が考えられる。従来から、アブラナ科植物には含硫化合物が多く、二硫化炭素法では、バックグランドが高くでてしまうため、これを避けて誘導体を調製して分析する方法がとられていた。これを参考に、対象となる 4 種の化合物を抽出操作で誘導化しながらエチレンジチオカルバミン酸メチル又はジメチルジチオカルバミン酸メチルの 2 成分に収斂し、HPLC/UV で測定する方法を用いる。

5.7.1. 分析法の原理

本分析法では、対象化合物を Na 塩とした後、ヨウ化メチルでメチル化して HPLC/UV で測定する方法であり、その原理を以下に図示した。



この分析法では、同一グループの化合物を識別することはできないが、ジラム等のジメチルジチオカルバミン酸(以下「DMDC」と略)類、マンネブ等のジエチルジチオカルバミン酸(以下「EBDC」と略)類、プロピネブ等のジプロピルジチオカルバミン酸は、分別して測定することが可能である。

5.7.2. ナトリウム塩の生成

5.3. では試料 200ml にエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム 15g 及び L-システイン塩酸塩 15g を加えているが、あらかじめ、15% L-システイン塩酸塩 + 15% エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム溶液 (10mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH 9.6 ~ 10 に調整) を 80ml 加えても良い。

5.7.3. メチル化及びメチル化物の抽出溶媒について

試料水中のジチオカルバマート系化合物のナトリウム塩を生成させた後、ヨウ化メチルでメチル化及びジクロロメタン - ヘキサン混液への抽出を同時に行う。従来法では、抽出溶媒としてクロロホルム - ヘキサン混液が用いられているが、クロロホルムの毒性及び操作性の点から考えて、これに代わる有機溶媒を使用することが望ましい。各種有機溶媒を用いた時の標準溶液の検出ピーク高を表 5.2 に示した。

表 5.2 マンゼブ及びジラムナトリウム塩のメチル化及び抽出率(相対比)

	クロロホルム・ヘキサン (3:1)	ジクロロメタン	ジクロロメタン・ヘキサン (3:1)	酢酸エチル	酢酸エチル - ヘキサン	
					(3:1)	(1:1)
EBDC ジメチル	100	84	85	20	9	7
DMDC メチル	100	81	85	81	41	14

0.05mol/L ヨウ化メチル含有有機溶媒 70ml で 2 回抽出
マンゼブ及びジラム各 1 μ g をメチル化, 10ml に定容

これらの結果より, 酢酸エチルを用いた場合 EBDC ジメチルの検出感度が低く定量が困難であった。また, ジクロロメタンを用いた場合クロロホルムと比較して検出感度が劣るが, 精製効果及び操作性を考慮し, ジクロロメタン - ヘキサン(3:1 V/V)を用いた方が望ましい。

5.7.4. C₁₈CC について

C₁₈ミニカラムからの DMDC メチル及び EBDC ジメチルの溶出状況を表 5.3 に示した。

表 5.3 C₁₈ミニカラムからの溶出状況(%)

展開溶媒	水 20ml	アセトニトリル		合計
		0-5ml	5-10ml	
EBDC ジメチル	0	91	0	91
DMDC メチル	0	95	0	95

Sep-Pak Plus C₁₈ カートリッジ使用
マンゼブ及びジラムとしての供試量: 各 1 μ g

5.7.5. 中性アルミナCC について

中性アルミナミニカラムからの DMDC メチル及び EBDC ジメチルの溶出状況を表 5.4 に示した。

表 5.4 中性アルミナミニカラムからの溶出状況(%)

展開溶媒	アセトニトリル				合計
	0-10ml	10-20ml	20-30ml	30-40ml	
EBDC ジメチル	66	31	3	0	100
DMDC メチル	93	8	0	0	101

Sep-Pak Plus アルミナ N カートリッジ使用
マンゼブ及びジラムとしての供試量: 各 1 μ g

C₁₈ミニカラムと中性アルミナミニカラムは連結して使用方法もある。詳細は 底質編に記載のジチオカルバマート系化合物分析法を参照。

5.7.6. 標準溶液について

ジチオカルバマート系化合物は一般に水溶液中では不安定であり, 標準品を水に懸濁し, 試料水と同様に誘導化を行った場合, 特に低濃度の懸濁液では定量に影響が及ぶ可能性がある。標準品をシス테인 - EDTA 溶液に直接懸濁し, 直ちに比較的安定なナトリウム塩にするという方法で定量用標準溶液を調製すると良好な結果が得られる。

EBDC ジメチルは, アセトニトリル溶液中で不安定であるが, 標準溶液及び試験溶液に L-シス테인塩酸塩を安定剤として少量加えると, 室温で 3 日間以上安定である。

5.7.7. DMDC メチル及び EBDC ジメチルの UV スペクトル

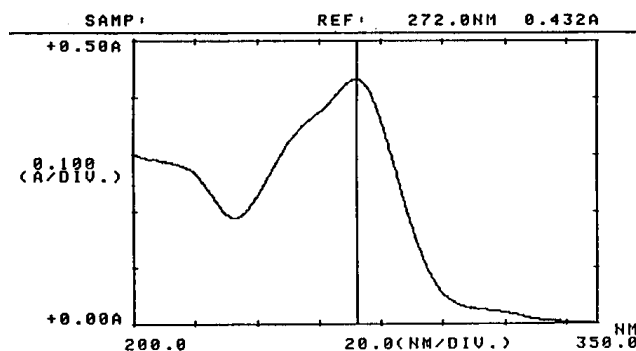


図 5.1 EBDC ジメチルの UV スペクトル

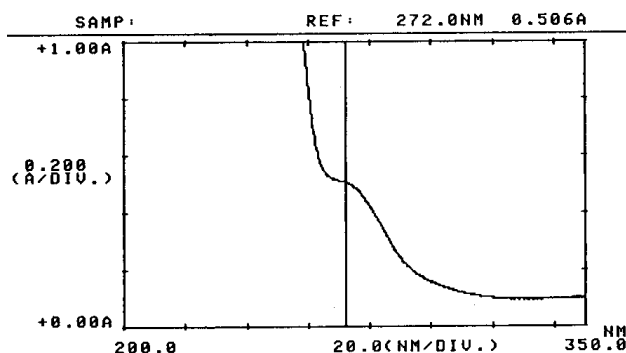


図 5.2 DMDC メチルの UV スペクトル

5.7.8. 分析法における問題点

5.7.8.1. 類似化合物との関係

5.7.1.に記載したように本分析法では、できるだけ化合物の原形をとどめて測定する方法を用いているが、直接元の化合物を測定していないため、類似構造を有した化合物が同一の誘導体を生成した場合は、分別できずにこれらの物質を測り込んでしまう。特に、ジラム(ジメチルジチオカルバミン酸)に類似する化合物が農薬として或いはゴム加硫剤として使用されている(表 5.5 参照)。従って環境試料からピークが検出した場合は、その由来を確定することが困難である。

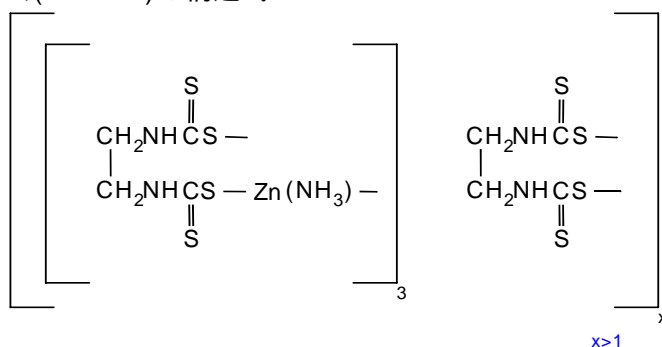
表 5.5 ジメチルジチオカルバミン酸骨格を有する化合物(出典 化学大辞典)

用途	化合物名
農薬(殺菌剤)	ファーバム (ジメチルジチオカルバミン酸鉄)
農薬(殺菌剤)	サンケル (ジメチルジチオカルバミン酸ニッケル)
農薬(殺菌剤)	チウラム (ビス(ジメチルチオカルバモイル)ジスルフィド)
ゴム加硫剤	ジメチルジチオカルバミン酸ナトリウム
ゴム加硫剤	ジメチルジチオカルバミン酸亜鉛

5.7.8.2. メチラムについて

SPEED'98 ではジチオカルバマート系化合物で内分泌攪乱作用が疑われる物質として、上記に記載した3物質の他に"メチラム"を挙げている。メチラムはマンゼブ等と同様にEBDCを構造中に持つ。しかし、マンゼブ等と同様にアルカリ性下でEBDC-Na塩とした後、ヨウ化メチルでEBDCジメチルを生成させHPLC-UVで定量する方法では、メチラム由来のEBDCジメチルのピークは検出できない。このため、本分析法ではメチラムは分析不能である。

メチラム(metiram)の構造式



化学式：C₁₆H₃₃N₁₁S₁₆Zn₃

分子量：1088.7

化学名(IUPAC)：

zinc ammoniate ethylenebis(dithiocarbamate)-poly(ethylenethiuram disulfide)

物理化学的性質

外 観：黄色粉末

融 点：約 140 (溶融せずに分解)

蒸気圧：0.01mPa 未満(20)

溶解性：水やエタノール，アセトン，ベンゼンなどの有機溶媒に不溶
ピリジンに可溶(分解)

オクタノール/水分配係数：log P = 2 (pH7)

安定性：30 で安定。吸湿性なし
強酸，強アルカリで分解

5.8. 参考文献

- Gustafsson, K.H., Thompson, R.A.: J. Agric. Food Chem. 29, 729-732(1981)
- Gustafsson, K.H., Fahlgren, C.H., : ibid. 31, 461-463(1983)
- (財)日本食品分析センター：“平成三年度ポストハーベスト農薬残留防止緊急対策事業 飼料中の残留農薬分析法の開発” p.159(1992)