

(財) 日本環境衛生センター

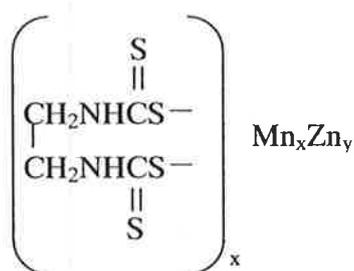
N,N'-エチレンビス(ジチオカルバミン酸)マンガンを N,N'-エチレンビス(ジチオカルバミン酸)亜鉛の錯化合物 (別名: マンコゼブ、マンゼブ)、

N,N'-エチレンビス(ジチオカルバミン酸)マンガンを (別名: マンネブ、マネブ)、

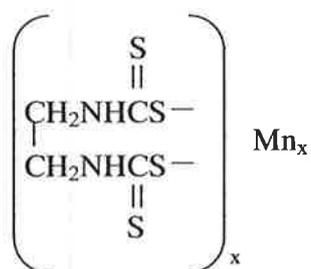
ビス(N,N'-ジメチルジチオカルバミン酸)N,N'-エチレンビス(チオカルバモイルチオ亜鉛) (別名: ポリカーバメート)

ビス(N,N'-ジメチルジチオカルバミン酸)亜鉛 (別名: ジラム)、

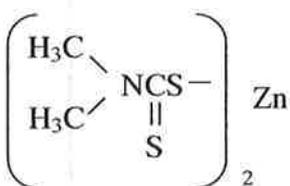
対象物質及び構造式



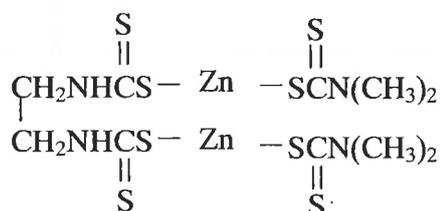
Mancozeb, Manzeb
CAS 番号 8018-01-7



Maneb
CAS 番号 12427-38-2



Ziram
CAS 番号 137-30-4



Polycarbamate
CAS 番号 64440-88-6

物性

物質名	分子量	融点 (°C)	蒸気圧 (kPa)	水溶解度 (mg/L)	LogPow
マンゼブ	(265.3)x(65.4)y	192-204	—	—	1.38 (文献値 ¹⁾)
マンネブ	(265.3)x	—	—	—	—
ジラム	305.8	250	—	—	1.23 (文献値 ²⁾)
ポリカーバメート	581.5	—	—	—	—

1) 三共アグロ株式会社 www.sankyo-agro.com/product/msds/pdf/msds_19778.pdf

2) 東京都立衛生研究所 tokyo-eiken.go.jp/topics/endocrin/page72.pdf

毒性、用途等

マンゼブ

毒性情報 : ラット経口 LD₅₀ >5000mg/kg、ラット経皮 LD₅₀ >5000mg/kg
用途 : 殺菌剤

マンネブ

毒性情報 : ラット経口 LD₅₀ 4500mg/kg、マウス経口 LD₅₀ 4500mg/kg
用途 : 殺菌剤

ジラム

毒性情報 : ラット経口 LD₅₀ 267mg/kg、
用途 : 殺菌剤

ポリカーバメート

毒性情報 : ラット経口 LD₅₀ mg/kg、
用途 : 殺菌剤

§1 分析法

(1) 分析法の概要

試料水 50mL に 5%-システイン-EDTA(5%-Cys-EDTA)溶液を加え対象物質を水溶性のナトリウム塩にする。これに 0.4M-硫酸水素テトラブチルアンモニウム水溶液(0.4M-TBA 水溶液)と 0.1M-ヨウ化メチル-クロロホルム/ヘキサン溶液を加え液/液抽出しメチル化する。抽出液をアセトニトリルに転溶し、Sep-pak C18 カートリッジ

に負荷してアセトニトリルで溶出する。アセトニトリル溶液を濃縮し、内標準物質を加え LC/MS/MS で分析する。

本分析法ではジラム以外の対象物質はエチレンビスジチオカルバミン酸ジメチル(EBDC-2Me)、ジラムはジメチルジチオカルバミン酸メチル(DMDC-Me)として測定する。誘導体化して EBDC-2Me を生成する物質は分別できないためマンネブ換算値として定量する。DMDC-Me を生成する物質についても分別できないためジラム換算値として定量する。

(2) 試薬・器具

[試薬]

マンネブ	: Ehrenstorfer 社製
マンゼブ	: Ehrenstorfer 社製
ポリカーバメート	: Ehrenstorfer 社製
ジラム	: Ehrenstorfer 社製
シマジン-d ₁₀ (100 μg/mL アセトン溶液)	: Ehrenstorfer 社製
4-(1-メチル)-オクチルフェノール-d ₅ (4-m-OP-d ₅) (1000 μg/mL ヘキサン溶液)	: 林純薬社製
システイン-HCl	: 関東化学社製試薬特級
EDTA-2Na	: 関東化学社製試薬特級
水酸化ナトリウム	: 関東化学社製試薬特級
塩酸	: 関東化学社製試薬特級
硫酸水素テトラブチルアンモニウム	: 和光純薬社製試薬特級
酢酸アンモニウム	: 関東化学社製試薬特級
ヨウ化メチル	: 関東化学社製試薬特級
クロロホルム	: 関東化学社製残留農薬試験用
ヘキサン	: 関東化学社製残留農薬試験用
アセトン	: 関東化学社製残留農薬試験用
アセトニトリル	: 関東化学社製残留農薬試験用
無水硫酸ナトリウム	: 関東化学社製残留農薬試験用
メタノール	: 関東化学社製 HPLC 用
HPLC 用蒸留水	: 関東化学社製 HPLC 用
Sep-Pak C18	: Waters 社製
精製水(ヘキサン洗浄水)	

[器具]

分液ロート
ロート
なす型フラスコ
遠沈管

(3) 分析法

【試料の採取及び保存】

環境省「化学物質環境調査における試料採取にあたっての留意事項」に従う。

【試料の前処理】

試料水 50mL を 300mL の分液ロートに採取し、5%-Cys-EDTA 溶液 5mL を加えて 10 分間振とうする。振とう後 0.6M-塩酸 3mL を加え pH7.5~7.8 に調整し、3mL の 0.4M-TBA 水溶液を加え混合する(注 1)。これに 0.1M-ヨウ化メチル-クロロホルム/ヘキサン溶液 30mL を加え 10 分間振とうし、下層の有機溶媒層を分液する。水層に再度 0.1M-ヨウ化メチル-クロロホルム/ヘキサン溶液 30mL を加え 10 分間振とうし、得られた有機溶媒層は合わせた後、無水硫酸ナトリウムを用いて脱水後、ロータリーエバポレータで 2mL 程度まで減圧濃縮する。これにアセトニトリル 20mL を加えて 2mL 程度まで再度減圧濃縮し、アセトニトリルに転溶する(注 2)。

【試料液の調製】

【試料の前処理】で得られたアセトニトリル溶液をあらかじめアセトニトリル 10mL でコンディショニングした Sep-Pak C18 カートリッジに負荷し、アセトニトリル 7mL で溶出する。この溶液を窒素気流下で 1mL に濃縮後、内標準物質として シマジン-d₁₀(1 μg/mL)及び 4-m-OP-d₅(2 μg/mL)を 10 μL 加え試料液とする。

【空試験液の調製】

精製水 50mL で【試料の前処理】及び【試料溶液の調製】の操作を行い、得られた試料液を空試験液とする。

【標準溶液の調製】

マンネブ 25mg をアセトン 25mL に懸濁させ 1mg/mL の標準原液を調製する(注 3)。ジラム 25mg をアセトン 25mL に溶解させ 1mg/mL の標準原液を調製する。それぞれの標準原液は適宜アセトンで希釈する。

【内標準溶液の調製】

シマジン-d₁₀(100 μg/mL アセトン溶液)200 μL をアセトニトリルで希釈して 10mL とし、2 μg/mL の内標準原液を調製する。4-m-OP-d₅(1000 μg/mL ヘキサン溶液)100 μL を窒素気流下で乾固直前まで濃縮し、これに 2mL のアセトンを加え再度乾固直前まで濃縮した後、アセトニトリルで 10mL とし、10 μg/mL の内標準原液を調製する。それぞれを混合しアセトニトリルで希釈してシマジン-d₁₀を 1 μg/mL、4-m-OP-d₅を 2 μg/mL の濃度となるように調製し内標準溶液とする。

【5%-Cys-EDTA 溶液の調製】

システイン-HCl と EDTA-2Na それぞれ 10g を精製水に加え、pH メータを用いて 12M-NaOH 水溶液で pH9.6~10.0 に調整し、200mL とする(注 4)。

【0.5%-Cys-EDTA 溶液の調製】

5%-Cys-EDTA 溶液を精製水で 10 倍に希釈する。

【EBDC-2Na/DMDC-Na 混合標準溶液の調製】

10 μ g/mL のマンネブ及びジラム溶液それぞれ 1mL を混合し、窒素気流下で乾固直前まで濃縮する。これに 0.5%-Cys-EDTA 溶液を加え 10mL とし、マンネブ及びジラム換算でそれぞれ 1 μ g/mL の溶液を作成する。これによりマンネブはエチレンビスジチオカルバミン酸二ナトリウム(EBDC-2Na)、ジラムはジメチルジチオカルバミン酸ナトリウム(DMDC-Na)となり水溶性の塩となる。EBDC-2Na/DMDC-Na 標準溶液は 0.5%-Cys-EDTA 溶液で適宜希釈する。

【0.1M-ヨウ化メチル-クロロホルム/ヘキサン溶液の調製】

ヨウ化メチル 0.1mol をクロロホルム 750mL で希釈し、これにヘキサン 250mL を加えて混合する。この混合溶媒は要時調製とし、ヨウ化メチルは冷暗所で保存する。

【測定】

〔LC/MS/MS 条件〕

LC 条件	機種	: Agilent 1100
	カラム	: GL サイエンス社製 Inertsil ODS-3 (50mm,2.1mm,3 μ m)
	溶離液	: A : 1mM-酢酸アンモニウム水溶液 B : メタノール
		: 0→1min B : 10→10%
		1→8min B : 10→100%
		8→18min B : 100→100%
		18→19min B : 100→10%
		19→29min B : 10→10%
	流速	: 0.2mL/min
	カラム温度	: 40°C
	注入量	: 5 μ L
MS 条件	機種	: Applied Biosystems API3000
	イオン化法	: ESI (negative) : EBDC-2Me : ESI (positive) : DMDC-Me
	イオン化電圧	: -4500V(negative) +5500V(positive)
	インターフェイス温度	: 500°C(negative) 500°C(positive)
	モード	: SRM
	モニターイオン	: Negative
		EBDC-2Me = 191/58
		4-m-OP-d ₅ = 224/123

Positive

DMDC-Me = 136/88

シマジン-d₁₀ = 221/134

〔検量線〕

精製水 50mL に EBDC-2Na/DMDC-Na 混合標準溶液を用いてマンネブ及びジラムそれぞれが 5～500ng となるように添加し、【試料の前処理】及び【試料液の調製】の操作を行い検量線用標準液とする(注 5)。

検量線用標準溶液 5μL を LC/MS/MS に注入して分析する。得られた標準物質のピーク面積と内標準物質のピーク面積の比から検量線を作成する。

〔定量〕

試料溶液 5μL を LC/MS/MS に注入して分析する。得られた標準物質のピーク面積と内標準物質のピーク面積の比を検量線と照らして定量する。

〔濃度の算出〕

試料水中の濃度 C(ng/L)は次式により算出する。なお、本法ではエチレンビスジチオカルバメート系農薬の定量はマンネブ換算値、ジメチルジチオカルバメート系農薬の定量はジラム換算値となる。

$$C(\text{ng/L}) = (W - W_b) / V$$

W : 検量線から求めた測定対象物質質量(ng)

W_b : 空試験液の測定対象物質質量(ng)

V : 試料水量(L)

〔IDL〕

装置検出下限値(IDL)は、「化学物質環境実態調査の手引き」(平成17年3月)に従い、表1のとおり算出した。

表1 IDL

	マンネブ	ジラム
試料量(L)	0.05	0.05
最終液量(mL)	1	1
注入濃度(ng/mL)	5.0	5.0
装置注入量(μ L)	5	5
結果(pg) test 1	21.95	28.80
test 2	22.20	23.45
test 3	23.15	28.70
test 4	22.90	23.80
test 5	21.20	25.60
test 6	24.85	27.30
test 7	21.55	23.50
平均値(pg)	22.5	25.9
標準偏差(pg)	1.23	2.40
c.v(%)	5.5	9.3
S/N	25.3	3.1
t(n-1,0.05)	1.9432	1.9432
IDL(pg)	4.8	9.3
IDL(ng/mL)	1.0	1.9
IDL 試料換算(ng/L)	19	37

※結果(pg)=検出濃度(ng/mL) \times 注入量(μ L)

※IDL(pg)=t(n-1,0.05) \times 標準偏差(pg) \times 2

〔MDL〕

測定方法の検出下限（MDL）及び定量下限（MQL）は、「化学物質環境実態調査の手引き」（平成17年3月）に従って、表2のとおり算出した。なお、マンネブ標準溶液は懸濁溶液であり均一に採取できないため、添加には EBDC-2Na/DMDC-Na 混合標準溶液を用いた。

表2 MDL 及び MQL

	マンネブ	ジラム
試料量(L)	0.05	0.05
標準添加量(ng)	5.0	5.0
試料換算濃度(ng/L)	100	100
最終液量(mL)	1	1
注入濃度(ng/mL)	5.0	5.0
装置注入量(μL)	5	5
ブランク平均(ng/L)	0	0
無添加平均(ng/L)	0	0
結果 (ng/L) test 1	100	97.0
test 2	104	111
test 3	79.6	105
test 4	99.8	103
test 5	96.8	118
test 6	107	114
test 7	97.4	137
平均値(ng/L)	98	112
標準偏差(ng/L)	8.80	13.0
c.v.(%)	9.0	11.6
t(n-1,0.05)	1.9432	1.9432
MDL 試料換算(ng/L)	34	51
MQL 試料換算(ng/L)	88	130

※MDL 試料換算(ng/L)=t(n-1,0.05)×標準偏差(ng/L)×2

※MQL 試料換算(ng/L)=標準偏差(ng/L)×10

(注1)

0.6M-塩酸 3mL 程度で pH7.5~7.8 の範囲内となるが、加える塩酸は精製水 50mL に 5%-Cys-EDTA 溶液 5mL を加えた溶液を用いてこの pH 範囲内になることを確認した量を加えること。

(注 2)

ロータリーエバポレータでの濃縮は 30℃以下で行う。

(注 3)

マンネブは溶解性が低く、ほとんどの有機溶媒や水に溶解しないため、アセトンに件濁させる。マンゼブ、ポリカーバメートもマンネブと同様に溶解性が低いため、使用する場合はアセトンに件濁させる。

(注 4)

12M-NaOH 水溶液は 16mL 程度でこの pH 範囲内となるが、pH を測定し、確認すること。

(注 5)

イオンペア剤の TBA 添加量により感度の変動するため、検量線は試料と同じスケールで作成し、5%-Cys-EDTA 溶液や 0.4M-TBA 水溶液は正確に量り取り加えること。

§2 解説

【分析法】

【フローチャート】

分析のフローチャートを図1に示す。

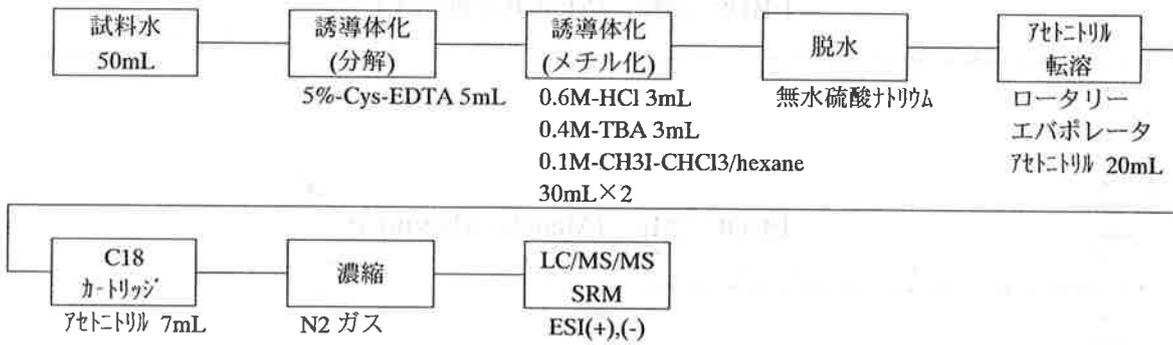
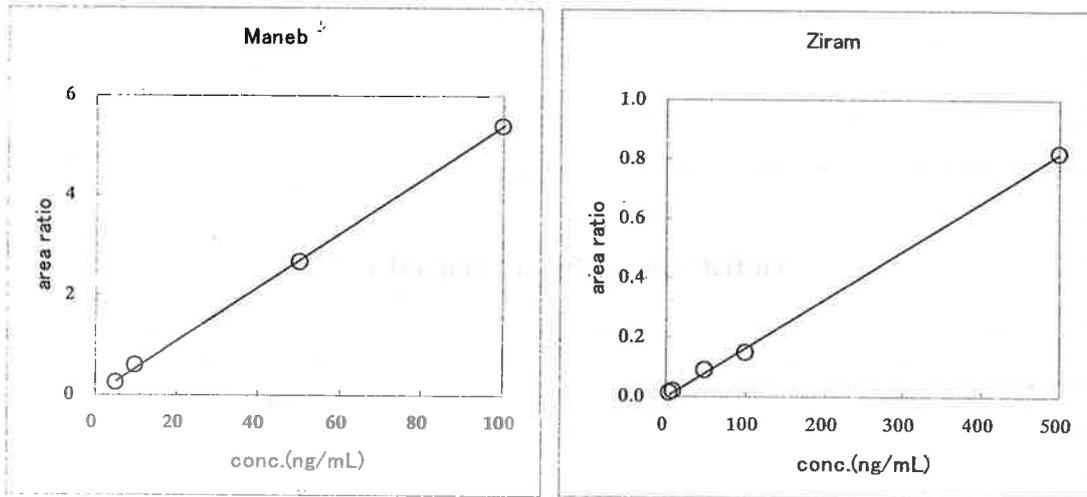


図1 分析フロー

【分析法の検討】

・検量線

マンネブ及びジラム 5~500ng/mL を誘導體化した検量線を図2に示す。



Maneb $y=0.0537x$ $r^2=0.9998$

Ziram $y=0.00163x$ $r^2=0.9998$

図2 検量線

・検量線のクロマトグラム

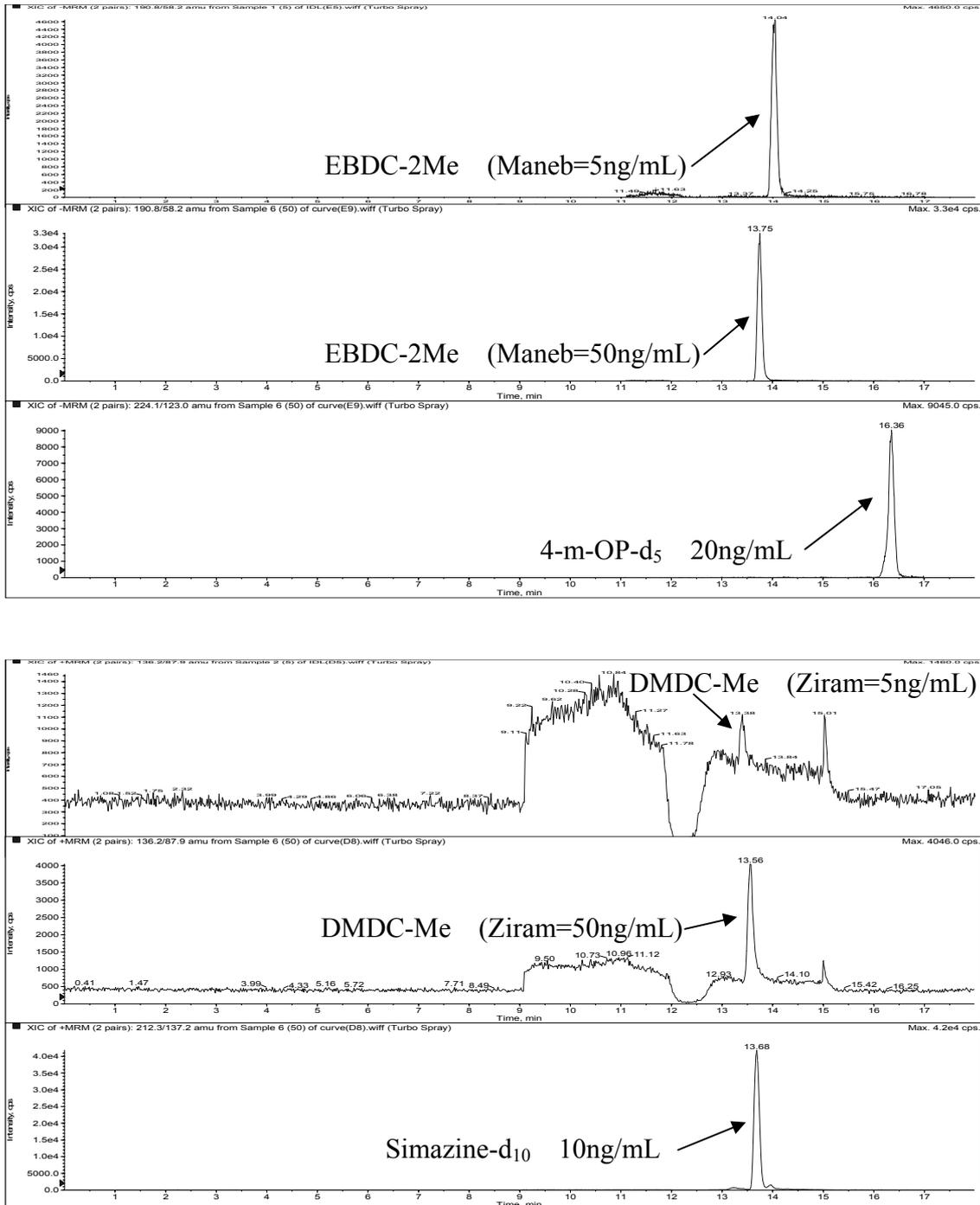


図3 検量線のクロマトグラム

・添加回収試験

河川水 50mL に EBDC-2Na/DMDC-Na 混合標準溶液を用い、マンネブ及びジラムとしてそれぞれが 70ng となるように添加し(試料換算で 1400ng/L)、【試料の前処理】及び【試料液の調製】の操作を行い、添加回収試験を行った。また、無添加の場合についても行った。結果を表 3 及び図 4 に示す。河川水中ではこれらの物質は MDL 未満であった。

表 3 添加回収試験

	マンネブ	ジラム
無添加濃度(ng/L)	<34	<52
添加量(ng)	70	70
試験水濃度(ng/L)	1400	1400
回収率(%) test 1	88	89
test 2	94	103
test 3	99	97
test 4	94	102
test 5	70	96
平均値(%)	89	97
標準偏差(%)	11.3	5.6
c.v.(%)	12.7	5.8

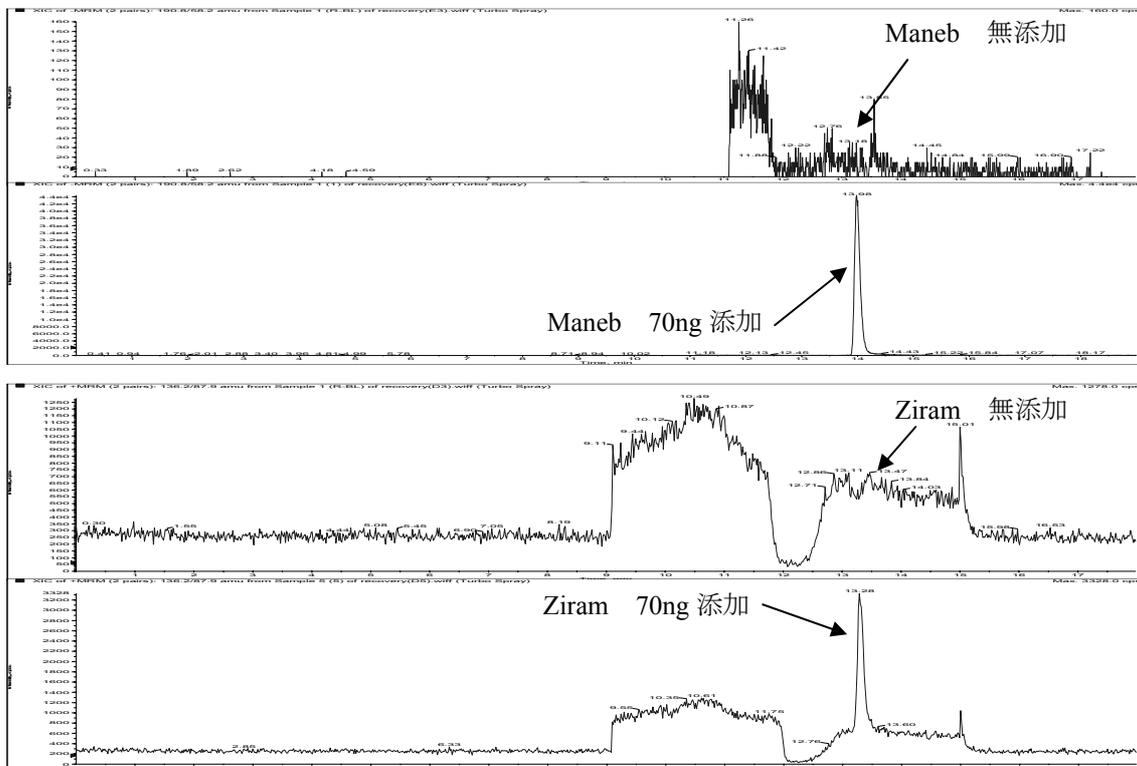


図 4 添加回収試験

【評価】

本法により、水試料中のマンゼブ、マンネブ、ポリカーバメートの 30ng/L レベル、ジラムの 50ng/L レベルの定量が可能である。

【参考文献】

環境省環境安全課 平成 11 年度 化学物質分析法開発調査報告書
(N,N'-エチレンビスジチオカーバメート系農薬 北九州市環境科学研究所)

【担当者氏名・連絡先】

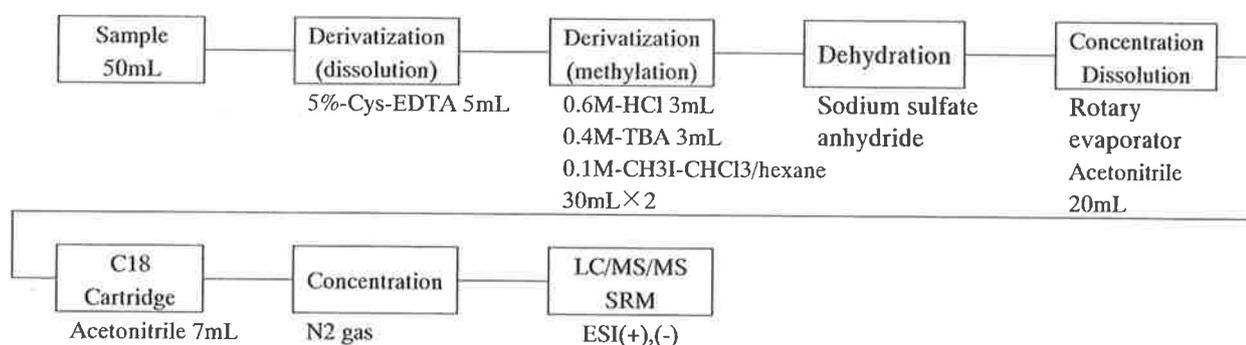
担当 : (財) 日本環境衛生センター
住所 : 〒210-0828 神奈川県川崎市川崎区四谷上町 10-6
TEL : 044-288-4905
FAX : 044-288-5232
担当者 : 佐藤信武
E-mail : sato-n@jesc.or.jp

Mancozeb, Maneb, Ziram and Polycarbamate

An analytical method for the determination of mancozeb, maneb, ziram and polycarbamate in water by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) was developed. As these compounds are insoluble in almost all of the solvent, these were decomposed and derived to ethylenebis(methyl-dithiocarbamate) (=EBDC-2Me) and methyl-dimethyldithiocarbamate (=DMDC-Me), and these derivatives were measured in this method.

For dissolution of target compounds, 5mL of 5%-L-cysteine-5%-EDTA-2Na solution (adjusted at pH9.6 to 10.0) was added into 50mL of water sample, and soluble substances, EBDC-2Na and DMDC-Na, were derived from these compounds. After 3mL of 0.4M-TBA and 30mL of 0.1M-methyl iodide/chloroform/hexane were added, the soluble substances were derived to EBDC-2Me and DMDC-Me by shaking for 10min. Then lower layer of organic solution was dehydrated by sodium sulfate anhydride, and the solvent of solution was changed into acetonitrile by evaporation. This solution was cleaned through the C18 cartridge, and the target compounds were eluted with 7mL of acetonitrile. And sample solution was concentrated by blowing nitrogen and analyzed by LC/MS/MS-SRM (ESI negative and positive).

Methodical detection limits were 34ng/L of EBDC-2Me and 51ng/L of DMDC-Me. Methodical quantification limits were 88ng/L of EBDC-2Me and 130ng/L of DMDC-Me. The recoveries from 50mL of water sample added 70ng of target compounds were 89% of EBDC-2Me and 97% of DMDC-Me (Average value).



物質名	分析法フローチャート	備考
マンゼブ、 マンネブ、 ジラム、 ポリカー バメート	<pre> graph LR A[試料水 50mL] --> B[誘導體化 (分解) 5%-Cys-EDTA 5mL] B --> C[誘導體化 (メチル化) 0.6M-HCl 3mL, 0.4M-TBA 3mL, 0.1M-CH3I -CHCl3/hexane 30mLx2] C --> D[濃縮 N2 ガス] D --> E[LC/MS/MS SRM ESI(+),(-)] A --> F[脱水 無水硫酸ナトリウム] F --> G[アセトニル 転溶 ロータリー エバポレータ アセトニル 20mL] G --> H[C18 カートリッジ アセトニル 7mL] H --> C </pre>	<p>LC/MS/MS ESI(+)</p> <p>カラム Inertsil ODS-3 長さ 50mm 内径 2.1mm 粒径 3μm</p> <p>MDL EBDC-2Me 34ng/L DMDC-Me 52ng/L</p>