

Melting Point of Thiram and its Solubility in Water. Studies on Thiram and its Related Compounds. I. Michio MURATA (Department of Microbiology, National Institute of Hygienic Sciences.) Received Jan. 23, 1961. *Bolyu-Kagaku* 26, 31, 1961 (with English résumé, 34)

5. Thiram の融点と水に対する溶解度

Thiram とその関連化合物に関する研究 第1報

村田道雄 (国立衛生試験所 衛生微生物部) 36. 1. 23 受理.

Thiram の融点 (分解温度) 測定法を検討し, 毛細管挿入溶液温度 140° , 予熱速度 $4^{\circ}\sim 8^{\circ}/\text{min}$, 昇温速度 $2^{\circ}/\text{min}$ においてもつとも精度の高い測定値を得ることが判明した. この条件で純品の融点を測定し $159^{\circ}\sim 160^{\circ}$ (decomp.) の結果を得た.

水に対する溶解度については, まず Thiram 水溶液の微量定量法を究明し, Thiram 銅カップリング化合物の最高吸収波長 $495\text{m}\mu$ により, Thiram $100\sim 500\gamma$ を含む標準溶液で作成した検量線を用いる微量定量法を考案した. 本法の回収率は 100% , 誤差 $\pm 3\%$ である. 本法を用いて Thiram の水に対する溶解度を測定し, 17.4mg/L (22°), 22.0mg/L (27°), 36.3mg/L (37°) の結果を得た. つきに, 枯草菌接種寒天培地上に Thiram のつくる阻止円 (カップ法) と濃度の関係を究明し, その溶液範囲内では濃度の対数と阻止円の直径は直線関係にあり, 微生物学的微量定量法に使用できることがわかった. 本法を用い 22° における Thiram の水に対する溶解度を測定し, 17mg/L の結論に達し, 吸収スペクトル法の結果とよく一致した.

緒 言

ジチオカルバミン酸系殺菌剤は, そのすぐれた殺菌力に加えて, 原料に比較的安価な二硫化炭素, アミン類などを用いるために, 1934年頃から果樹, 野菜, 芝生など広範囲にわたる病害防除に用いられ始め, 現在欧米においては有機合成殺菌剤の主体をしめるに至っている. Von der Kerk¹⁾ は, 汎用予防殺菌剤として, ジチオカルバミン酸系化合物より安価で強力な有機合成殺菌剤を創り出すことは至難であろうと極言している. わが国における昭和35年度に使用された殺菌剤²⁾の総額は約70億円であるが, このうちジチオカルバミン酸系化合物を主剤とする殺菌剤は15億円に達し, 水銀化合物含有殺菌剤の34億円について第2位にある.

この系統に属する殺菌剤のうち最初に発見され, いまなおその代表的立場にあるものとして, bis (dimethylthiocarbamoyl) disulfide をあげることができる. この殺菌力についての発見は1931年, Tisdal³⁾らの研究に始まり, 1943年 U.S. Patent に登録⁴⁾されている.

しかし, 実用化を急ぐあまり, まず病害防除という応用的試験が広範囲に進展したのにくらべると, 殺菌作用機構などの基礎的研究にみるべきものがなく, いまなお抽象的な仮説が提案されるにすぎない. さらに, 本剤の化学的性状に関してもなお検討を加えるべき問題が残されている.

そこで著者は, これら未知の問題のうち殺菌作用機構を解明する目的で本研究に着手し, まずその化学的性質に関して詳細なる研究を行い, 興味ある結果を得

た. 現在その生化学的研究についても実験を進めているが, 本報においては得られた化学的性状に関する知見のうち, その基礎的性質にもかかわらず未だに確定した発表のない融点 (分解温度) および水に対する溶解度について行つた研究結果を報告する.

なお, bis (dimethylthiocarbamoyl) disulfide は一名 tetramethylthiuram disulfide とも呼ばれ, TMTD あるいは TT と略されている. 1950年 American Phytopathological Society 殺菌剤命名委員会で, 一般名を Thiram⁵⁾ と制定とされているから, 本報では Thiram の用語を用いる.

I. Thiram の融点 (分解温度)

物質の確認, 純度判定の手段として重要な要素である融点に関し, 従来発表されている主だつたデータをとりまとめてみると第1表のとおりとなる.

以上の如く Thiram の融点は測定者によつてまちまちで確信しうるものがない. この理由として, 供試品純度の不整のほか, 測定方法の問題があげられる. Thiram は熱安定性の低い化合物であるため, 毛細管を硫酸浴に挿入する時の温度, 融点の下約 10°C までの予熱速度ならびにその昇温速度などが変動を与える大きな要因と考えられる. これらの点につき種々の組合せをつくり再検討をおこなつたので, その結果を報告する.

実験材料および方法

工業品 Thiram を再留精製した chloroform/methanol 混合溶剤で3回再結晶精製して材料とした.

供試品の赤外吸収スペクトルは第1図の如く 10.4μ ,

Table 1. Reported melting point of Thiram.

mp.	Remark	Author	Date
146°	Recrystallization	Brun ⁶⁾	1902
146°	from $\text{CHCl}_3/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	Cummings ⁷⁾	1928
146°	" $\text{CHCl}_3/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	Kawaoka ⁸⁾	1943
151°~156° (decomp.)	" CHCl_3	Craig ⁹⁾	1951
159°~160° (decomp.)	Technical grade	Craig ¹⁰⁾	1951
154°~156°	Recrystallization from $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	Firestone ¹¹⁾	1956
155°	" CHCl_3	Yoshida ¹²⁾	1959

Table 2. Elemental analysis of sample.

	C	H	N	S
anal. found	29.01	5.10	11.64	53.41
calcd. for $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{S}_4$	29.97	5.03	11.65	53.35

11.8 μ に key band¹¹⁾ を示し、不純物を含んでいない。

なお、参考として再留精製した chloroform 単独および chloroform/ethanol 混合溶剤より3回再結晶精製したものを併用した。

浴液温度と毛細管内供試品の熱平衡および浴液温度

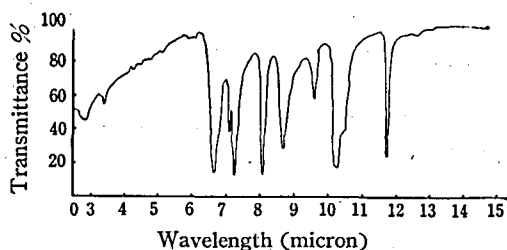


Fig. 1. Infra-red spectrum of Thiram (KBr Pellet)

と温度計の読みの関係を *o*-nitrobenzoic acid (mp. 148°), salicylic acid (mp. 159°) でチェックした。

測定は毛細管を使用し、熱媒に濃硫酸を用いた二重浴式融点測定器によった。

結 果

熱安定性の低い物質の分解程度は、温度と時間に支配されるので、挿入温度、予熱速度、融点下 10° 内昇温速度の三元組合せにより実験した結果を第3表にまとめた。

以上の結果より、挿入温度 140°、予熱速度 4°~8°/min、融点下 10° 内昇温速度 2°/min においてもつとも精度の高い測定値を得た。

この条件で Thiram の精製溶剤間の差について検討したが、いずれも 159°~160° の融点 (分解温度) を示し、Thiram の融点は 159°~160° (decomp.) の結論に達した。(未補正)

II. Thiram の水に対する溶解度

薬剤が殺菌力を発動するには、1, 2 の例外を除き、第一段階として水に溶解した状態が必要条件と考えられる。したがって、殺菌剤としての基本的性質として、水に対する溶解度をあげねばならない。

Table 3. Melting point of Thiram under different conditions.

Velocity of heating up to 10° below mp.		2°/min			4°/min		
Inserted at temp.	Velocity of pre-heating	Thiram °C(decomp.)	<i>o</i> -nitrobenzoic acid	salicylic acid	Thiram °C(decomp.)	<i>o</i> -nitrobenzoic acid	salicylic acid
60°	4°/min	150~155	148	159	153~158	148~150	159~160
	8°/min	152~155	148	159	153~159	148~149	159~160
120°	4°/min	155~157	148	159	155~159	148~149	159~160
	8°/min	155~158	148	159	156~160	148~150	159~160
140°	4°/min	159~160	148~149	159	159~161	149~151	159~161
	8°/min	159~160		159	159~162		160~161
150°		159~161		159~160	161~163		160~163

Note : The values are the lowest to the highest temp. of 3~10 examinations (without correction).

しかるに Thiram の水に対する溶解度に関し、“水に不溶¹³⁾”あるいは、“水に殆んど溶けない¹⁴⁾”という抽象的記載があるのみで、数字を示した具体的発表はなされていない。

著者は、実際薬剤が使用される場合、薬液が保管される場合、および室内殺菌試験での温度条件などを考慮して Thiram の水に対する溶解度につき若干の研究をおこなったので、その結果を報告する。

可視部吸収スペクトルによる測定

溶解度の測定法としては、飽和溶液の一定量を取りこれを蒸発乾固して残留物の重量を取り算出するのが一般におこなわれている方法であるが、Thiram の溶解度が非常に低いこと、Thiram が熱安定性の低い物質であることなどの理由により、この方法では正確な結果が得られない。

著者は、Thiram 水溶液の紫外線部吸収スペクトル¹⁵⁾を測定し、277m μ にピークを得たので、既知量 Thiram の水溶液につき 277m μ における吸光度より検量線を作成し、Thiram の定量を試みたが、検量線が原点を通過せず、直線性を示さないもので、この方法は採用できなかった。

飯島ら¹⁶⁾は工業品 Thiram の定量法として、Thiram の methanol 溶液に硫酸銅溶液、ついでチオ硫酸ナトリウム溶液、クエン酸溶液を加えて発色させ比色定量する方法を提案しているが、著者はこの方法を基本として、さらにこれに若干の改変を加えて Thiram 水溶液中の微量の Thiram 定量法を考案*し、本法を用いて溶解度の測定を試みた。

供試液の調製：融点測定に用いた純粋 Thiram 100 mg にイオン交換樹脂で精製した純水 100 ml を加え、試験温度の恒温水槽中にかくはんしながら一昼夜放置後、この上澄液を綿をつめたガラス管をとおしてホールピペットで吸上げ、試験温度における Thiram 飽和水溶液とした。

試薬：硫酸銅 0.5mol 水溶液、チオ硫酸ナトリウム 0.5mol 水溶液。

検量線の作成：融点測定に用いた純粋な Thiram 100~500 γ を含む methanol 溶液 20 ml に硫酸銅溶液 0.5 ml およびチオ硫酸ナトリウム溶液 0.5 ml を加えて発色させ（赤紫色）、最高吸収波長である 495 m μ における吸光度を測定して検量線を作成した。各濃度における吸光度を結ぶ線は完全に直線となつて原点を通過した。

操作および結果：供試液に検量線作成に用いた標準液と同比率の発色試薬を加え、さらに標準液に相当する methanol を添加して一定量とし、spectrophoto-

meter により 495m μ の吸光度を測定し、検量線に照合してその量を求めた。同法により算出した溶解度を第4表に示した。

なお、上記 Thiram 新微量定量法の分析精度は次の如きものである。

検量線は $Y = -0.004588 + 0.0005427X$

標準偏差 0.0022

誤差範囲 $\pm 3\%$

{Y: 吸光度
X: Thiram の量

Table 4. Solubility of Thiram.

Temperature ($^{\circ}$ C)	Solubility (mg/L)
22	17.4
27	22.0
37	36.3

微生物学的測定

抗生物質などの公定力価検定法¹⁷⁾として採用されているカップ法による菌発育阻止法を Thiram の微量定量法に応用し 1 mg/L~16 mg/L の間において薬液濃度の対数と阻止円の直径の間に直線関係が成立し、Thiram の微生物学的微量定量法として使用できることがわかった。なお Thiram 30mg/L, 50mg/L, 100mg/L を水にけん濁した液（疎水性のため均一なけん濁液としない）の阻止円は、1 mg/L~16 mg/L 間濃度のつくる阻止円直径を結ぶ直線上からはずれて、検量線作成に採用できなかった。この方法の原理が薬剤水溶液の寒天基質中を拡散することであるから、けん濁液濃度に阻止円直径が比例しないのは当然のことである。

操作：ペトリ皿に 1.5% ジャガイモ寒天培地を流して基底層とし、この上に、あらかじめ枯草菌 (*Bacillus subtilis*) を接種けん濁した 1.2% ジャガイモ寒天培地を流しこみ、この上に配置したステンレススチール製カップ (8 $\times$ 10mm) 中に 22 $^{\circ}$ における Thiram 飽和水溶液、この 2 倍希釈および 4 倍希釈液を注入、30 $^{\circ}$ C, 20 時間培養後の阻止円直径を測定し、同時におこなった Thiram 1 mg/L, 2 mg/L, 4 mg/L, 8 mg/L, 16 mg/L を含む標準液の阻止円直径より作製した検量線から Thiram の量を求めた。

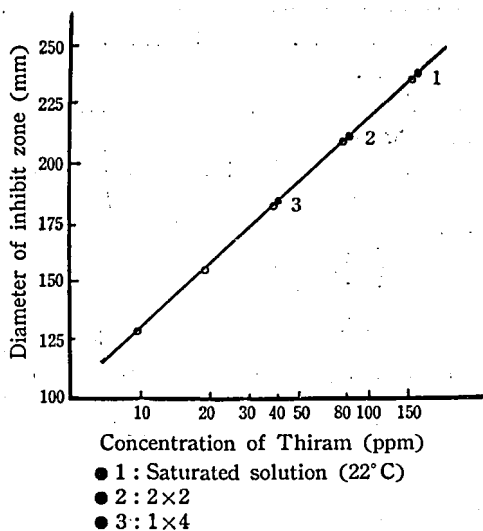
飽和液の薬液濃度 17 ppm

2 倍希釈液 8.5 ppm

4 倍希釈液 4.2 ppm

結果：第2図で明らかなごとく、22 $^{\circ}$ における Thiram の水に対する溶解度は 17 mg/L の結論に達し、この結果は可視部吸収スペクトルによる測定値とよく一致した。

* 詳細は農化誌投稿中

Fig. 2. Cylinder plate method (*Bacillus subtilis*)

摘 要

1. Thiram の融点に関して未だ確信し得る報告がないので、この点につき実験を試みた。chloroform/methanol 混合溶剤より再結晶した純品を用いて毛細管挿入温度、予熱速度、昇温速度について検討した結果、挿入温度 140°, 予熱速度 4°/min, 昇温速度 2°/min において精度の高い測定値を得ることが判明した。挿入温度 60° では昇温中に分解をとまうため 10° も低い結果を得、また融点下 10° 以内での昇温速度が 4°/min では 1°~2° 高い誤差をとまう測定値となった。

2. 140° 挿入、予熱速度 4°/min, 昇温速度 2°/min の条件で Thiram の融点 (分解温度) 159°~160° (decomp.) の測定値を得た。

3. Thiram 水溶液の微量定量法を究明し、Thiram 銅カップリング化合物の示す最高吸収波長 495mμ により、Thiram 100~500γ を含む標準溶液で作製した検量線を用いる微量定量法を考案した。本法の回収率は 100%, 誤差 ± 3% である。本法を用い Thiram の水に対する溶解度を測定し、17.4 mg/L (22°), 22mg/L (27°), 36.3mg/L (37°) の結果を得た。

4. 枯草菌接種寒天培地上において Thiram の作る阻止円は、その溶液範囲内にあつては、濃度の対数と阻止円の直径の間に直線関係が成立し、Thiram の微量定量分析に適用できることを発見した。この方法を用いて 22° における飽和水溶液中の Thiram の量を求め 17mg/L の結論に達し、3 の方法による結果とよく一致した。

終りにのぞみ、御指導を賜った京都大学井上名誉教

授ならびに御助言を得た北海道大学小幡教授、農林省農業技術研究所福永農薬科長に深謝するとともに、研究上の御教示、御協力を得た三共株式会社高峰研究所岡崎博士、農林省農薬検査所佐藤化学課長、三新化学工業株式会社河岡博士に深謝する次第である。また、本研究に対し機会を与えられた国立衛生試験所刈米所長ならびに実験に御協力いただいた倉田真菌研究室長ほか、研究室員の方々に厚くお礼申し上げる。

文 献

- 1) von der Kerk, G. J. M., *Plant Pathol., Problems Progr.* 1908~1958 280, 281 (Pub. 1959)
- 2) 農林省振興局植物防疫課資料, 昭和 35 年度農薬生産販売数量表。
- 3) Tisdale, W. H. and A. L. Fleuner, *J. Ind. Eng. Chem.*, 34, 501 (1942)
- 4) Tisdale, W. H. and I. Williams, *Disinfectant. U. S. Patent.*, 1,972,961 (1934)
- 5) Rohiver, S. A., *Phytopath.*, 40, 118 (1950)
- 6) Braun, J. V., *Ber.*, 35, 817 (1902)
- 7) Cummings, A. D. and H. E. Simmons, *Ind. Eng. Chem.*, 20, 1173 (1928)
- 8) 河岡 豊, 日本ゴム協会誌, 16, 322 (1943)
- 9) Craig, D., W. L. Davindson, A. E. June and J. G. Geile, *J. Polymer Sci.*, 6, 1 (1951)
- 10) Craig, D., A. E. June and W. L. Davindson, *Rubber Chemistry & Technology.*, 24, 254 (1951)
- 11) Firestone, D. and P. J. Vollmer, *J. Assoc. Off. Agri. Chem.*, 39, 866 (1956)
- 12) *The Merck Index of Chemicals and Drug.* 7th Ed. 1042
The Condensed Chemical Dictionary. 5th Ed. 1080 (1956)
病虫農薬辞典, 139 (1955)
有機化学ハンドブック, 1462 (1960)
- 13) 吉田寛二, 東北大学研究所報告 A, 5, 422 (1959)
- 14) 山本 亮, 新農薬研究法, 24 (1958)
太田暢人, 合成殺虫・殺菌・除草剤, 189 (1957)
- 15) Kress, K. E., *Anal. Chem.*, 23, 313 (1951)
- 16) 飯島友夫, 江口 丈, 日本ゴム協会誌, 29, 551 (1956)
- 17) 厚生省, 抗菌性物質製剤基準 (1960)
梅沢純夫, 抗菌性物質, 174 (1954)
推計学の化学及び生物学への応用, 第 2 集, 69 (1960)

Résumé

1. Due to lack of reliable report, the melting

point of Thiram has been studied closely. In the capillary method with material highly purified by recrystallization from chloroform-methanol, it has been found that the reliable melting point is obtained by inserting the capillary at 140° and pre-heating at the velocity of 4°~8° per minute. When inserted at 60° the value is lower by 10° due to decomposition during the followed heating, and with the velocity of heating of 4° per minute, above the temperature 10° below the melting point, the value accompanies error by 1~2°.

2. With the inserting temperature of 140°, the pre-heating velocity of 4°/min., and the heating velocity of 2°/min., the melting point obtained for purified Thiram has been 159~160° (decomp.).

3. A micro-determination method of Thiram in aqueous solution has been devised wherein the

calibration curve is employed with the standard solution containing 100~500 γ Thiram for 495 m μ , the maximum absorption wave-length of Thiram-Cu coupling compound. The recovery rate by this method is 100% and the error range is $\pm 3\%$. The solubilities of Thiram in water as determined by this method are as follows: 17.4 mg./l. (22°), 22 mg./l. (27°) and 36.3 mg./l. (37°).

4. It has been found that with culture of *Bacillus subtilis* on potato-dextrose agar medium the diameter of the inhibition circle by Thiram is proportional to the logarithm of the concentration, and this technique is used in micro-analysis of Thiram. By this method the amount of Thiram in the saturated solution in water at 22° has been found to be 17mg./l., the value being in good agreement with that obtained by the previous method.

The Decomposition of Thiram. Studies on Thiram and its Related Compounds. II. Michio MURATA (Department of Microbiology, National Institute of Hygienic Sciences) Received Jan. 26, 1961. *Botyu-Kagaku* 26, 35, 1961 (with English résumé, 39)

6. Thiram の経時変化 Thiram とその関連化合物に関する研究 第2報 村田道雄 (国立衛生試験所 衛生微生物部) 36. 1. 26 受理.

Thiram 100mg をガラス板上に薄膜として 20°, 50° および 100° に放置した場合の融点と重量の変化を測定し, 15日間の観察において 20° では変化をきたさなかつたが, 50° では5日目より融点の降下をともしない, 100° では1日目より融点が下り分解の起ることを知った. 減量は融点降下にとまなうことより, Thiram はそのままの形で昇華せず, 分解の結果揮発性物質を生じるために起る付随的な現象と考えられる.

15mg/L の水溶液を 30° に放置したものは5日目で2.6%, 15日目で7.3%分解し, 水との接触は分解を促進することがわかつた. 水溶液を加熱すると分解は促進され加熱時間の対数と分解率の間にはおおむね直線関係が成立する.

水溶液に糸状菌分生胞子あるいは生葉を添加することにより分解はさらに促進されることより, この場合, なんらかの生化学的反応が分解に因するものと推定される. 上層部気体の定性試験をおこない, 二硫化炭素, 硫化水素の存在を確認し, 二酸化硫黄, アミン類については確認できなかった. 分生胞子と Thiram 水溶液(15mg/L) を15日間接触させた液を凍結乾燥法で脱水して得た固形物の赤外線吸収スペクトルより, この条件において Thiram はすべて分解することを確認した.

薬剤の化学的安定性は, その製造される工程においても使用される場合においても, その使命を制する重要な要素である. 薬剤の効力評価をする場合, その供試品がはたして初期の化学構造のまま試験されたか否か, すなわち試験薬液調製時に他の化合物に変化していなかつたかということは, 極めて関心をはらうべき問題と思考される.

この点の注意と適切な処理をあやまつたため, 得られた成績に信頼性のおけぬものがあるようである. 従来発表されている Thiram の生物試験成績の中にお

いても, 前報において報告した水に対する溶解度の問題に矛盾すると思われる濃度で実験した成績, あるいは経時変化に対する問題の考慮が不足しているのではないかと疑問をいだかせるものがある.

Thiram の経時変化に関し従来報告されている主だった説をあげると, Thiram は分解して二硫化炭素と dimethyl-amine を放出すると言う Parker-Rhodes¹⁾ の仮説, 分解して硫化水素を生ずるとする MaCallams²⁾, Barrett³⁾ などの推測, Thiram と菌の接触により硫化水素の発生を認めた Cox⁴⁾, Sisler⁵⁾ の実験などがあ