

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

るが、いずれもその発生機構の説明に明確を欠き、あるいは仮説の域を出ていないものが多い。

著者はこの点に関心をもち、経時変化についての若干の研究をおこなったので、本報においては Thiram 純品を薄膜として放置した場合の変化、Thiram 水溶液を放置した時の変化、水溶液を加熱した時の変化、および水溶液を糸状菌分生孢子ならびに生葉と接触させた場合の分解についておこなった研究結果を報告する。

本文にはいるにさきだち、本研究に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樹研究室長、前田脇一氏ほか研究室員のかたがたに謝意をあらわす次第である。

実 験

1. Thiram をガラス板上に薄膜とした時の経時変化
融点測定に用いた純粋 Thiram[®] 25g を蒸留精製した chloroform 250ml に溶解し、清潔にした時計皿にこの液を 1ml ずつ分注後 chloroform を蒸発させた。この液 1ml 中には Thiram 100mg を含んでいるので各時計皿には 100mg が薄膜となつて残存することになる。しかし実際の検量では操作中の chloroform の蒸発などの原因で +0.8—1.4mg の過不足を生じたので、実験数値は測定後 100mg に補正した。これを $20^{\circ}\pm 1^{\circ}$ 、 $50^{\circ}\pm 1^{\circ}$ の恒温器および $100^{\circ}\pm 2^{\circ}$ の乾燥器中に放置して、24時間あるいは48時間ごとにその重量と融点を測定した結果は第1図のようになる。測定にはメトラ自動天秤を使用し各時3ケの平均をとつた。

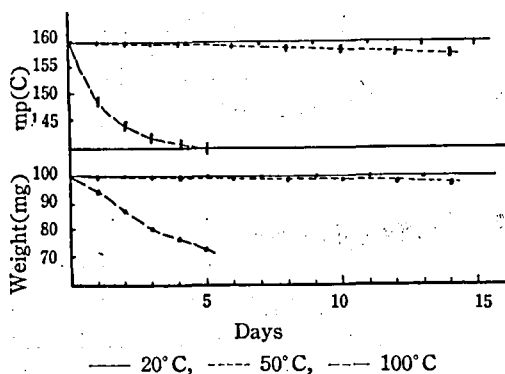


Fig. 1. Influence of various temperature on the weight and melting point of Thiram.

考察：15日間の実験において、 20° で Thiram は重量、融点ともに変化をきたさず安定である。 50° では減量は僅かであるが融点の降下を示し、 100° では24時

間後において融点降下いちじるしく、ついで減量もまた大であつた。Thiram は乾燥状態において低温では安定であるが温度の上昇とともに分解がおこなわれ揮発性分解物を生じるため減量をきたすものと思われる。

Thiram は化学変化をきたさぬまま昇華することがないのである、このことは、そのままの化学構造においてガス効果的殺菌力を期待できないことを裏書きするものと考えられる。

2. Thiram 水溶液の 30° 放置における経時変化

前実験同様の試料をイオン交換樹脂で精製した純水に溶解し、正確に 15mg/L の水溶液にしたものについて実験をおこなつた。これを $30^{\circ}\pm 1^{\circ}$ の恒温器中に放置し、5日目、15日目の Thiram 含量を銅とカップリング化合物をつくり発色させて吸光度を測り、同様に処理した標準液より作成した検量線を用いてその量を算出^①するとともに、*Bacillus subtilis* 接種培地上に Thiram のつくる阻止円による微生物学的定量^②をおこなつた結果は第1表のようになる。

Table 1. Decomposition of Thiram in aqueous solution. (30°)

	Colorimetric analysis	Microbiological assay
5 days { Value mg/L	14.6	14.5
{ Decomposition %	2.6	3.3
15 days { Value mg/L	13.9	14.1
{ Decomposition %	7.3	6.0

考察：吸光度測定による方法あるいは微生物学的定量法によつた場合においても、5日目で2.6/3.3%、15日目で6.0/7.3%の Thiram は分解している結果を得たが、これを実験1.と対比してみると Thiram は乾燥状態においては比較的安定であるが、水溶液の状態ではかなりの分解がおこなわれるものと考えられる。なお吸光度測定による定量法が、残存している Thiram そのものの定量であるのに対し、微生物学的定量法は分解生成物と Thiram の連合殺菌作用の結果があらわれるのであるから、その定量値は本実験の目的よりしては参考的意味にすぎない。

3. Thiram 水溶液の加熱による分解

実験2. 同様の Thiram 水溶液を用いて 100° における加熱時間と分解率について実験をおこなつた。

すなわち、供試液 25ml を 100ml の三角フラスコに採り瞬間的に 100° に昇温し、加熱終了時間にこれを氷冷して加熱時間を可及的正確に保つようにつとめた。加熱中の蒸発水分を補正し、残存する Thiram の量を Thiram 銅カップリング化合物の吸光度測定

微量分析法⁹⁾により求めた結果は第2表のようで加熱時間の増加とともに Thiram は急速に分解し、15分間の煮沸によりその80%を分解することがわかった。

Table 2. Decomposition of Thiram in aqueous solution by heating.

Time of heating (100°C) (min.)	Content of Thiram (ppm)	Decomposition (%)
0	15.0	0
2	10.5	30.0
5	7.4	50.6
7	6.0	60.0
10	4.5	76.6
15	3.1	79.3

横軸に時間の対数を取り分解率を識した点を結ぶと第2図のようにおおむね直線上にならび Thiram の分解が一次反応によることを示唆するような結果となつた。

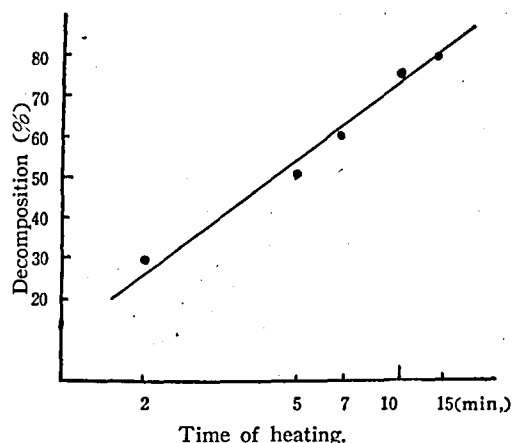


Fig. 2. Decomposition of Thiram in aqueous solution by heating.

なお、参考のため同様に処理した Thiram 水溶液について *B. subtilis* 接種培地上に Thiram のつくる阻止円による微量定量法⁹⁾を試み、2分間加熱、5分間加熱および7分間加熱において、おのおの 10.0 ppm, 7.6ppm, および 4.6ppm の値を得たが、10分間加熱、15分間加熱においては明瞭な阻止円をつくらず、また明瞭な阻止円をつくる範囲においても、2分間加熱、5分間加熱のものは吸光度測定法による結果とよく一致したが、7分間加熱のものでは大きな差異を示した。

以上の結果を考察し、著者が前報において提案した Thiram の微生物学的定量法は純粋の Thiram の定

量法としては精度の高い結果が得られるが、分解物を含む Thiram の水溶液について適用することは不適當であると云う結論を得た。

つぎに同様に処理した Thiram 水溶液について分生孢子発芽抑制試験⁷⁾をおこなつた。

最初に溶解直後の Thiram 水溶液につき、供試菌の種類選定、培養、発芽などの条件を検討した結果 *Botrytis cinerea* を Potato-Dextrose agar の試験管斜面に接種し2週間 25°C に培養後、滅菌水を入れてポリスマンで菌体を軽くなぜ浮游した分生孢子をガーゼで濾過し菌糸、培養基の破片を除き遠心沈降器を用いて滅菌水で2回洗浄したものを供試分生孢子とした。これをホブキンス液の窒素源を硫酸アンモニアで置換した栄養液 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g, MgSO_4 0.5g, K_2HPO_4 0.1g, しょ糖 10g を水 1L に溶解) にけん濁し、25°C に12時間培養したものは96~99%の整一な発芽を示した。

この系統の殺菌剤の分生孢子発芽抑制試験用供試菌として *Glomerella cingulata*, *Stemphylium sarcinaeforme*, *Sclerotinia fructicola*, *Ophiobolus miyabeanus*, *Alternaria kikuchiana*, *Aspergillus niger* などの分生孢子が使われているが、これらの菌の分生孢子につき本実験運行上の適否を検討の結果、*Aspergillus niger*, *Ophiobolus miyabeanus* の分生孢子は Thiram に対し抵抗性が強く飽和溶液においてもなお30~80%の発芽を示し、100%発芽抑制濃度は Thiram の水に対する溶解度をこえるため不適當であることがわかった。*Glomerella cingulata* の分生孢子は Thiram に対し敏感であるが、この菌は分生孢子の形成少なく、また分生孢子が酵母様の出芽をなしシュズ玉状となつて増殖するものもあるよう供試菌として採用できなかった。分生孢子発芽促進用栄養液についても検討の結果、水のみの場合および無機質を欠くしょ糖液のみでは無処理区の発芽率が悪く整一性を欠く結果となつた。

以上検討の結果、50,000/ml の割合に分生孢子をけん濁させた上記栄養液に同量の供試液を混合し、水を入れたペトリ皿中にならべた清潔なスライドガラス上に点滴し(1滴約 0.05ml, ガラス上の滴の直径約 10 mm) 25°C に12時間培養後の発芽状態を検鏡し、薬剤各濃度における発芽抑制率を算出した。発芽管の長さが分生孢子短径の半分をこえるものを発芽として算定し、各濃度の処理区抑制率は無処理区の不発芽率により補正した。

調製直後の薬液を用いて試験した結果は第3表のようで作図法により50%発芽抑制濃度を求め、0.48ppmの結果を得た。なお本試験においては Dimond¹⁰⁾, Montgomery¹¹⁾ らの云う濃度と殺菌力の逆転

Table 3. Germistatic action of Thiram.
(*Botolytis cinerea*)

Concentration (pdm)	Inhibition (%)	Concentration (ppm)	Inhibition (%)
7.5	100	0.50	67.0
5.0	100	0.30	11.1
2.5	100	0.25	2.6
1.5	100	0.20	0.1
1.2	100	0.15	0
1.0	99.2	0.10	0
0.8	95.3	0.15	0

(Bimodal curve) 現象はみられなかった。

上記加熱処理した Thiram 水溶液 (15mg/L) を精製水で 1:14 の割合に希釈し (当初の Thiram 含量が 1mg/L になる), これにつき前実験と同様の方法により *B. cinerea* の分生胞子発芽抑制試験をおこなった結果は第3図のように, おおむね吸光度測定法による結果に近い傾向を示した。しかし, この試験においても Thiram の分解物と残存する Thiram の連合作用による殺菌力 (Germistatic action) が測られたものであることを付記する。

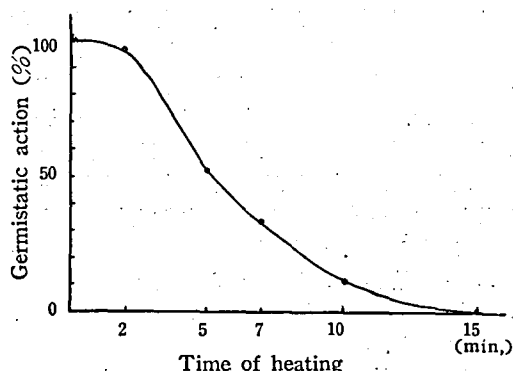


Fig. 3. Effect of the heat treatment of Thiram aqueous solution on the germistatic action.

4. Thiram 水溶液と糸状菌分生胞子および生葉の接触による Thiram の分解

2L 三角フラスコに前実験同様の Thiram 水溶液 1L を入れ, これに *Aspergillus niger* の分生胞子 (Thiram に対する抵抗力が強い) 約 10mg をけん濁したもの, ならびにシャガ (*Iris japonica*) の生葉約 5g を入れたものを密栓し 25° 恒温器中に 15 日間放置した。

開栓時, フラスコ上層空間部の気体についてガス定

Table 4. Analysis of gas from Thiram aqueous solution containing conidia and plant leaves.

	Conidia (<i>A. niger</i>)	Leaves (<i>Iris japonica</i>)
Litmus-paper test	Slightly acidic	do.
Basic-fuchsin test (SO ₂)	—	—
Pb-Acetate-paper test (H ₂ S)	+	+
Cuprous xanthate test (CS ₂)	+	+

* The gas was absorbed in abs. alc., and acidified with CH₃COOH, and then added CuSO₄.

性試験をおこない第4表のような結果を得た。

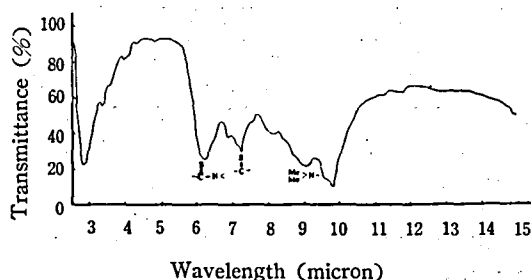
試験液を濾過し固形物を除き, なお着色物の浮游をみとめたので遠心沈降器により沈降させたが上澄液は未だ着色し吸光度測定法による定量用試料とならなかった。精製水を加え 1L に補正し, これにつき参考のため *B. subtilis* 接種培地上における阻止円の形成を試みたが, 分生胞子けん濁 Thiram 水溶液, 生葉添加 Thiram 水溶液のいずれも全く阻止円をつくらず, この方法で試験した場合殺菌力が認められなかった。

なお, 添加した *A. niger* の分生胞子は発芽せず, イリスの生葉は 4 日目位より生気を失い 10 日目位より退色帯黄しはじめたが腐敗するに至らなかった。

分生胞子をけん濁した Thiram 水溶液の遠心沈降上澄液につき凍結乾燥法により脱水をおこない微量の帯かつ色固形物を得た。これを chloroform/methanol により再結晶した帯黄色固形物につき KBr 相による赤外線吸収スペクトルの測定をおこない第4図のように Thiram の示すものと全く異なる吸収スペクトルを得た。すなわち Thiram の Key Band である 10.4μ, 11.8μ に吸収ピークをもっていない。しかし

$$\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ -\text{C}-, -\text{C}-\text{N}<, \text{CH}_3 > \text{N}- \\ \parallel \\ \text{S} \end{array}$$

の骨格振動にもとづく吸

Fig. 4. Infra-red spectrum of the solid obtained from Thiram aqueous solution suspended with conidia of *A. niger* for 15 days. (KBr pellet)

収を示し、これらの構造を分子内にもつ化合物の存在することが確認できた。

結 論

Thiram の経時変化につき種々の条件で実験した結果、乾燥状態において、低温では安定であるが高温では分解が速やかにおこなわれる。乾燥状態の場合にくらべ、水と接触（水溶液）している状態でははるかに不安定で、温度の上昇はこれを助長し、水溶液の加熱時間にともない分解は進行する。加熱時間の対数と分解率の間におおむね直線関係が成立することより、Thiram の分解は一次反応と推定される。

水溶液に糸状菌分生胞子あるいは生葉を接触させた場合、生体の関与しない条件にくらべて分解が促進されることより、なんらかの生化学的反應が分解に関与するものと考えられる。分解物の赤外線吸収スペクトル

の測定により、分解物は $\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ -\text{C}- \end{array}$, $\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{N} < \end{array}$, $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{N} < \end{array}$ の化学構造を分子中にもつものと考えられるが、これが単一物質であるか複数の物質の混合物であるか、つまびらかでない。

前報に提案した *B. subtilis* 接種培地上に Thiram のつくる阻止円より算出する微生物学的定量法は、分解物を含む試料中の Thiram の定量には適用できないと云う結論に達した。

文 献

- 1) Parker-Phodes, A. F., *Ann. Applied Biol.*, **30**, 170 (1943)
- 2) McCallams, S. E. A. and F. Welcoxon, *Contribs. Boyce Thompson Inst.*, **3**, 13 (1931)
- 3) Barrett, R. W. and J. G. Horsfall, *Connecticut Agr. Exp. Sta. Bull.*, **508**, 1 (1947)
- 4) Cox, C. E. and H. D. Sisler, *Science.*, **114**, 643 (1951)
- 5) Sisler, H. D. and C. E. Cox, *Phytopath.*, (Abstr.) **41**, 32 (1951)
- 6) 村田道雄：防虫科学, **26**, 31, (1961)
- 7) American Phytopathological Soc. Comm. Stand.

Fungicidal Test, *Phytopath.*, **37**, 354 (1947)

山本 亮：新農薬研究法, 341 (1958)

- 8) Dimond, A. E., J. G. Horsfall, J. W. Heubergger, and E. M. Stoddard, *Connecticut Agr. Exp. Sta. Bull.*, **451**, 635 (1941)
- 9) Montgomery, H. B. S. and H. Shaw, *Nature.*, **151**, 333 (1943)

Résumé

1. The changes in the melting point and weight of a film of 100mg. Thiram on glass slide have been examined at 20°, 50° and 100°. Decrease of the melting point was observed slightly by leaving at 50° for 5 days while it was remarkable at 100° for 24 hours; no changes were observed after leaving for 15 days at 20°. The results show that heat is a causative factor of the decomposition of Thiram. Loss of the weight accompanied in parallel to the decrease of the melting point indicating that decomposition accompanying vaporization took place during the heating. Thiram therefore must be decomposed without sublimation to yield some volatile substances, causing the loss of weight.

2. In aqueous solution of 15 mg./l. Thiram, 2.6% was decomposed at 30° in 5 days and 7.3% in 15 days, showing that water accelerates the decomposition. A linear relation has been found between the decomposition rate and the logarithm of heating time. The decomposition was also found to be accelerated by the presence of fungal conidia and plant leaves. Gas obtained from the decomposing Thiram contained carbon disulfide and hydrogen sulfide but not sulfur dioxide or amine.

3. The infrared spectrum of the freeze-dried solution of Thiram after leaving for 15 days with fungal conidia was different from that of pure Thiram. Decomposition of Thiram therefore is associated with some biochemical processes.