

(総括・分担・総合)研究報告書

平成11年度 輸入農産物の試験方法に関する研究
一穀類中残留有機リン系農薬の測定時における分解とその対策一

分担研究者 外海 泰秀 国立医薬品食品衛生研究所・大阪支所 食品試験部

研究要旨

穀類中のマラチオンの一部が、試料調製の際に水を加えて放置する行程で、酵素分解することを見出した。この分解は作物によって異なり、玄米、大麦、小麦の中では小麦において最も著しかった。有機リン系農薬の内、マラチオンと同様の phosphorodithioate 構造を有するフェントエートにも類似の傾向が見られたが、マラチオンほどの分解はみられなかった。またこれらの分解原因となる酵素についても調査した。

得られた結果より、厚生省告示法及び迅速分析法に記載の水膨潤後アセトンで抽出する方法では、マラチオンの正確な値は得難いと判断された。因みに、小麦にはポストハーベスト農薬としてマラチオン等の使用されることが多く、残留量並びに検出頻度も比較的高いことから、厚生省の現告示法を改良する必要があると考えられる。

【緒言】

輸入食品は消費者の嗜好の多様化、円高による海外における生産及び製造加工の増加等により、輸入件数増加し、厚生省の平成10年輸入食品監視統計では輸入件数127万件、輸入重量2,900万トンに達している。また農林水産省がの食糧需給表では、我が国の食糧自給率はカロリーベースで約40%と年々減

少してきており、輸入食品が国産食品を上回っている。これら輸入食品の安全性を確保するためには、輸入食品の検査所・検査センター等のモニタリング検査を毎年実施しようとしている。検査結果のうち、マラチオン、ホスメチル等の検出頻

度が高なっている。従って、本年度は穀類中残留農薬の検査法について検討し、その改良点などを提案した。

表 1

玄米、小麦、大麦等、穀類中の残留農薬の抽出法として、厚生省告示法¹⁾、迅速分析法²⁾や環境庁農薬登録保留基準法³⁾では、倍量の水を加え2時間放置し、試料を膨潤させた後、アセトンで抽出する方法が主流となっている。この他の抽出法としては30%含水アセトン⁴⁾やアセトニトリル⁵⁾を用いる溶媒抽出法、また液化二酸化炭素を用いる超臨界流体抽出(SFE)法^{6,7)}などがある。

著者らは小麦に残留する農薬を厚生省告示法とSFE法で測定し両者を比較したところ、告示法によるマラチオンの測定値が著しく低い結果となった。その原因を検索したところ、穀類や農薬の種類によっては、試料を膨潤させるために水を加えて放置する際に、農薬の一部が分解することが判明したため、その原因の検索と対策の検討を行った。

【実験方法】

1. 試料

輸入の玄米、小麦、大麦を用いた。

2. 試薬及び試液

マラチオン、フェントエート、クロルピリホスメチル標準品：林純薬工業(株)製

還元型及び酸化型グルタチオン：和光純薬工業(株)製

小麦胚由来グルタチオンレダクターゼ、NADPH：シグマ社製

アセトン、アセトニトリル、n-ヘキサン、エーテル：和光純薬工業(株)社製の残留農薬分析用

イソプロパノール：和光純薬工業(株)社製のHPLC用 Extrelut^R 3(1-3 mL用)：Merck社製

Sep-Pak^R C₁₈(クラシック型)：Waters社製

Sep-Pak^R フロリジル(プラス型)：Waters社製

0.5 mM EDTA含有0.1 Mリン酸緩衝液(pH7.6)

農薬標準原液：各農薬標準品をアセトンで1 mg/mLになるように調製した。

農薬標準溶液：各農薬標準原液を、用事、水で100 μg/mLになるように希釈した。

3. 装置

SFE装置：日本分光社製、
Super-201型
ガスクロマトグラフ/質量分
析計(GC/MS)：島津製作所
(株)製、GCMS-QP5050型
冷却遠心器：SIGUMA
KUBOTA 3617型
分光光度計：日立製作所
(株)製、U-3210型

4. 操作条件

1) SFE

抽出超臨界流体(CO₂)流量
：4.9 mL、
モディファイア(アセトン)
流量：0.1mL/min
圧力：300kg/cm²
抽出管温度：40℃
捕集部温度：75℃
抽出時間：20分

2) GC/MS

カラム：J&W Scientific社製、
DB-5 (0.25mm i.d. × 30m、
膜厚0.25μm)
カラム温度：50℃(1分)-25
℃/分-125℃-10℃/分-280
℃(10.5分)
注入部温度：280℃
インターフェイス温度：260
℃
イオン化電圧：1.1 kV
イオン化方法：EI

5. 残留農薬測定用試験溶 液の調製法

1) 抽出

A. 告示分析抽出法：粉
砕均一化した試料5gに水

10 mLを加え、2時間放置し
た後アセトン100及び50mL
で磨砕抽出した。ろ過して
得たる液を減圧濃縮してア
セトンを除去した。残渣に
飽和食塩水100mLを加え、
ヘキサン100及び50 mLで
振とう抽出した。ヘキサン
層を脱水後減圧濃縮して5
mLとした。

B. アセトニトリル、アセ
トンまたは30%含水アセトン
抽出法：粉碎均一化した試
料5gにアセトニトリル、ア
セトンまたは30%含水アセ
トン100及び50 mLを加え磨
砕抽出した。ろ過して得た
る液を減圧乾固し、ヘキサ
ン5mLに溶解した。

C. SFE法：粉碎均一化し
た試料5gについてSFEによ
る抽出を20分間行い、
Extrelut3 + Sep-Pak^{RC}₁₈カ
ラムに捕集した。

2) クリーンアップ

A及びBは抽出液を
Extrelut^{R3} + Sep-pak^{RC}₁₈
に負荷し、Cと共にアセトニ
トリル20mlで溶出した。溶
出液を減圧乾固し、アセト
ン/ヘキサン(1:1)20mLに溶
解した。再度Sep-Pak^Rフロ
リジルに負荷し、通過液を
捕集した。捕集液を減圧乾
固した後、アセトン2 mLに
溶解し、農薬を測定した。

3) 定量

試験溶液 2 μ L を GC/MS に注入し、農薬を定量した。

6. 小麦水抽出液による農薬の分解試験

粉碎均一化した小麦 10 g にリン酸緩衝液 100 mL を加え 3 分間磨砕した。1 時間放置後、上澄液を 40,000g で 3 分間遠心分離し、得られた溶液を 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過し、小麦水抽出液を得た。

小麦水抽出液 2 mL とマラチオンまたはフェントエート標準溶液 50 μ L (各 5 μ g) を試験管に採り、30°C で培養した。培養液 0.1 mL を経時的に採り、イソプロパノール 0.9 mL と混合した。混合液を 42,000 g で 3 分間遠心分離し、上澄液について農薬を測定した。

7. 小麦のグルタチオンレダクターゼ活性の測定

0.25 mL の小麦水抽出液及び GSSG が 0.1 mM、NADPH が 0.1 mM となるようにリン酸緩衝液で全量 1 mL に調整した試験溶液を 30°C で培養し、340nm における吸光度を経時的に測定した。ここで、1 unit は 1 分間に吸光度を 0.001 だけ変化させる酵素量とする。

8. 小麦胚由来グルタチオンレダクターゼによる農薬の分解試験

1 mL のリン酸緩衝液に NADPH が 0.75 mM となるように溶解し、107 unit の GR、2.5 μ g のマラチオンを添加して試験溶液を作成し、30°C で培養した。培養液 0.1 mL を経時的に採り、イソプロパノール 0.9 mL と混合した。混合液を 42,000g で 3 分間遠心分離し、上澄液について農薬を測定した。

【結果及び考察】

1. 小麦中残留農薬の測定値の比較

穀類中残留農薬の抽出効率を比較するため、同一検体について SFE 抽出法⁶⁾、厚生省告示法¹⁾並びに著者らの考案したアセトニトリルを用いた溶媒抽出法⁵⁾によりそれぞれ抽出した。脱脂及びクリーンアップは 3 法とも同じにして測定した結果を比較し、Fig. 1 に示した。

Fig. 1

輸入小麦 A, B, C からクロルピリホスメチル及びマラチオンが検出された。告示法によるマラチオン以外については、いずれの方法でも誤差範囲内で両農薬の類

似した測定値が得られた。しかし、アセトンを用いる告示法によるマラチオンの測定値は極端に低かった。同法では試料に倍量の水を加えて2時間膨潤させた後、アセトン抽出しているが、この膨潤中にマラチオンが酵素等により分解されたのではないかと考えられた。

2. アセトン抽出法における水の影響

この原因を確かめるために、小麦に水を加えて2時間膨潤操作をする告示法とともに、水を加えずアセトンまたは30%含水アセトンを用いて直ちに抽出した場合について測定値を比較し、その結果をFig.2に示した。

Fig. 2

小麦B中のマラチオンの値は告示法において極端に低かった。従って、試料に水を加えて放置すると、膨潤操作中にマラチオンが分解すると考えられた。また同一試料中に存在するクロルピリホスメチルにこのような現象は見られないことから、この分解現象はS=P-S構造を持つphosphorodithioate系農薬に特異的なものではないかと推察された。

3. 穀類膨潤時間による農薬回収率の変化

このことをさらに確かめるため、農薬を含まないことを確認した玄米、大麦、小麦にマラチオン、クロルピリホスメチル及びphosphorodithioate構造を有するフェントエートを添加し、水で膨潤する時間を変えて告示法によりそれぞれの回収率を測定し、その結果をFig.3に示した。なお、クロルピリホスメチル、マラチオン、フェントエートの化学構造式をFig.4に示した。

Fig.3, 4

小麦、大麦では水を加えて膨潤する時間が長いほど、マラチオンの回収率は低く、玄米ではあまり低下がみられなかった。また、芳香環を持つフェントエートについてはマラチオンに比して減少は若干少なかった。これらのことから試料によりまた農薬の種類により酵素分解に程度の差はあると思われるが、いずれにしても厚生省告示法¹⁾及び迅速分析法²⁾に示された水膨潤法ではマラチオンの正確な値は得難いと判断された。

4. 煮沸した小麦水抽出液の農薬分解能

小麦水抽出液を100℃で煮沸した場合と煮沸しない場合について、マラチオンとフェントエートの経時的分解率を測定し、その結果をFig.5に示した。

Fig.5

小麦水抽出液を煮沸した場合には両農薬とも分解しなかったが、煮沸しない場合には3.と同様に経時的に分解した。このことから、農薬の分解は酵素的であり、玄米には分解酵素が少なく、小麦、大麦には分解酵素が多いと考えられた。

5. グルタチオンレダクターゼによる農薬の分解

グルタチオンレダクターゼ(GR)はNADPH存在下に酸化型グルタチオンを還元型グルタチオンに還元する作用があり(Fig.6)、小麦中には還元型グルタチオンの多いことが知られている⁸⁾。GRやNADPHの存在下にマラチオンとフェントエートの経時的分解率を調べ、Fig.7に示した。

Fig.6, 7

GRとNADPHの共存下に両農薬は最も強い分解を示した。GRが存在しないと農薬の分解は全く見られず、NADPHが欠けると分解率が減少する傾向があった。

14.2unitのGR、0.075mMのNADPH、0.5 μ gのマラチオンを1mLのリン酸緩衝液に溶かした系に8.3 μ MのGSSGを添加したとき、マラチオンの分解阻害が見られた(Fig.8)。

Fig.8

この反応系におけるGRとNADPH濃度は結果及び考察の3.における場合よりも低くなっている。3.の系においてはGRとNADPHの濃度が高すぎるため、GSSGによるマラチオンの分解阻害は見られなかった。この結果から、過剰のGSSGはマラチオンの分解を競合的に阻害するといえる。言い換えれば、マラチオンの分解とGR活性は同じ活性サイトを持つ可能性が示唆された。

小麦水抽出液のGR活性と農薬の分解率との間には、Fig.9に示したように相関性が認められた。ここで小麦水抽出液中のGR活性はその1mL当たりのGRunitで定義される。すなわち、小

小麦水抽出液の1GRunitは吸光度0.001/分の変化と定義される。そして両者の相関係数は0.9987と非常に高い値を示した。これらのことから、小麦水抽出液によるマラチオンの分解は、主としてGRによるものであるといえる。

Fig.9

6. 小麦由来GRの各種農薬に対する分解能

phosphorodithioate構造を持つ他の有機リン系農薬について小麦水抽出液及び小麦由来GRによる分解能を調べた。Fig.10に示したジメトエート、エチルチオメトン、エチオン、メチダチオン、テルブホス、プロチオホスについて、実験方法の6.または8.の方法で分解性を検討した。その結果これらの農薬については、小麦水抽出液や小麦胚由来GRでは分解能を示さないことが分かった。このことから、GRのマラチオン等に対する分解活性は比較的高い特異性を持つことが明らかとなった。

Fig.10

7. 穀類中残留農薬抽出溶媒の新規提案

試料中の微量な農薬を有機溶媒を用いて効率よく抽出するには、溶媒の選択が重要である。植物組織中の農薬やその代謝物を抽出するにはアセトン、アセトニトリル、メタノール等の親水性溶媒が多く用いられる。アセトンは大多数の農薬をよく溶かし、抽出時の濃縮が容易であるなどの使用上便利なる点がある。アセトニトリルは油脂等の分析に多用される。AOAC法¹⁾では有機リン系や有機塩素系農薬の公定法に採用されている。メタノールはメトリブセン、ピリミカール、シジムなどの抽出に用いられるが、試料によっては抽出時のろ過が極めて困難になることがある。アセトン、アセトニトリル、メタノール及びエタノールを抽出溶媒に用い、脂肪含量の多い大豆系農薬の添加回収率を測定したところ¹⁰⁾、農薬の抽出率はおよそアセトン

タノール>アセトニトリル>メタノールの順となった。一方、大豆20gからの脂肪抽出量はアセトン2.355g>エタノール2.024g>アセトニトリル0.712g>メタノール0.494gの順であり、農薬の抽出率と大豆脂肪の抽出量とはほぼ類似した抽出様相を呈した。さらに、抽出された大豆黄色色素量についても抽出脂肪量の順と一致した。

従って、穀類からの抽出溶媒にはアセトンが最適と考えられるが、本実験結果より試料を水で膨潤するのは好ましくないことから、30%含水アセトンを用いて直ちに抽出する方法がよいと思われる。この方法では水を含んだ状態でも農薬分解酵素は活性化しないと考えられるため、馬拉チオン等の農薬も正確に測定できる結果が得られている。

【まとめ】

試料中の馬拉チオンは水を加えて放置する行程の内に一部酵素分解することを見い出した。この分解は試料によって異なり、玄米、大麦、小麦の中では小麦において最も著しかった。有

機リン系農薬の内 phosphorodithioate 構造を有するフェントエートにも類似の傾向が見られたが馬拉チオンほどの分解はみられなかった。

これらの農薬分解原因は小麦中に含まれるグルタチオンレダクターゼと考えられた。その証明として、異なる小麦間でGR活性と馬拉チオン分解活性の比較を行い両者に高い相関関係のある事を確認したり、さらにGS SGの共存で分解が阻害されることを確認した。

以上のことから、厚生省告示法及び迅速分析法に示された水膨潤後アセトンで抽出する方法では、馬拉チオン等農薬の正確な値は得難いと判断された。

【文献】

- 1) 厚生省生活衛生局監修：食品衛生検査指針追補II, p.49-64(1996), 日本食品衛生協会
- 2) 残留農薬簡易分析法開発検討委員会：食品衛生研究47(5), 27-41(1997); 47(6), 27-41(1997).
- 3) 農薬環境保全対策研究会編：農薬登録保留基準残留農薬基準ハンドブック, p.912-913(1995), 化学工業日報社

- 4) 後藤真康,加藤誠哉: 残留農薬分析法, P.19-23 (1980), ソフトサイエンス社
- 5) 糸山智子、関口幸弘、鯉口智、平原嘉親、大田光恵、木村美加、三好智子、成田美加子、長谷川眞住、宮田昌弘、鎌倉和政、前田憲二、山名孝善、外海泰秀: 食衛誌. 36, 516-524 (1995).
- 6) 吉井公彦、津村ゆかり、中村優美子、外海泰秀、柴田正: 食衛誌. 39, 184-191(1998).
- 7) 吉井公彦、津村ゆかり、中村優美子、石光進、外海泰秀、土屋鍛、木村実加、関口幸弘: 食衛誌. 40, 68-74 (1999).
- 8) Franziska Weber and Werner Grosch, Z. Lebensmittel. Unter Forch, 167, 87-92 (1978)
- 9) AOAC International: Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th Edition, 1998.
- 10) 外海泰秀、長谷川ゆかり、中村優美子、伊藤誉志男: 衛生化学, 34, 421-429(1988).

表1. 輸入穀類中残留農薬の実態調査

検体	輸入国	検出された農薬	含量(ppm)
横浜検疫所			
小麦	米国	マラチオン	0.32
		クロルピリホスメチル	0.22
小麦	米国	マラチオン	0.12
		クロルピリホスメチル	0.44
小麦	米国	マラチオン	0.52
		クロルピリホスメチル	0.39
小麦	カナダ	マラチオン	0.13
うずら豆	オーストラリア	ピリミホスメチル	0.02
神戸検疫所			
小麦	米国	マラチオン	0.14
		クロルピリホスメチル	0.75
小麦	米国	マラチオン	0.89
		クロルピリホスメチル	0.53
小麦	米国	マラチオン	0.08
		クロルピリホスメチル	0.62
小麦	カナダ	マラチオン	0.05
小麦	カナダ	マラチオン	0.04
ライ麦	ブラジル	ピリミホスメチル	0.12
とうもろこし	米国	ピリミホスメチル	0.04
大豆	米国	マラチオン	0.01
ひよこ豆	オーストラリア	ピリミホスメチル	0.01
ゴマ	メキシコ	マラチオン	0.02

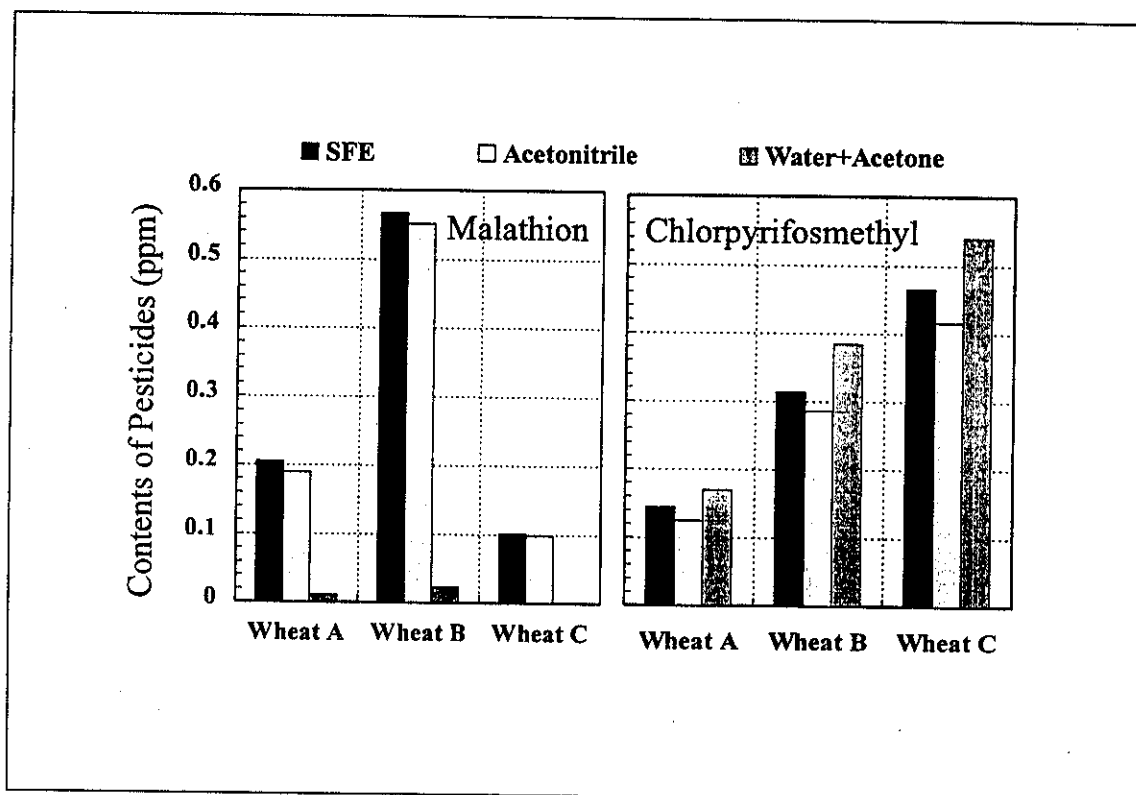


Figure 1. Comparison among values of residual pesticides obtained by three different extraction methods, with SFE, acetonitrile or acetone after additional water for swelling.

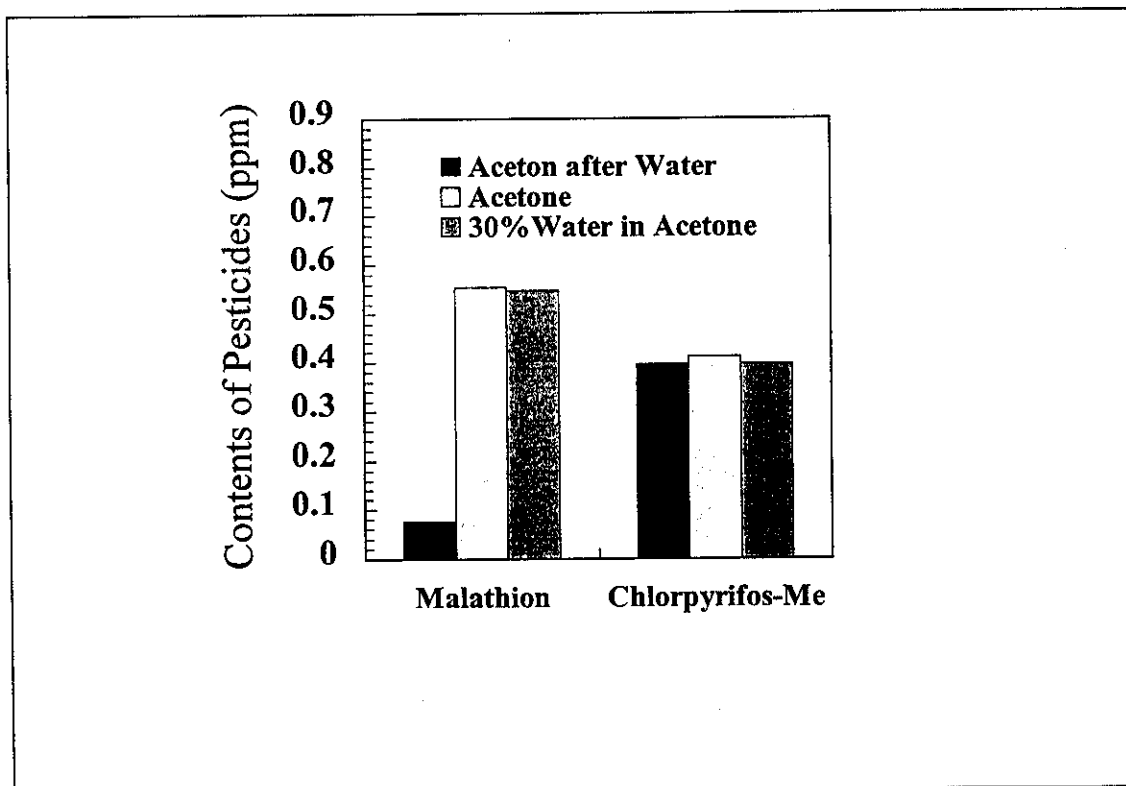


Figure 2. Comparison among values of residual pesticides obtained by three extraction methods, with acetone after additional water for swelling, with acetone or acetone containing 30% water in acetone.

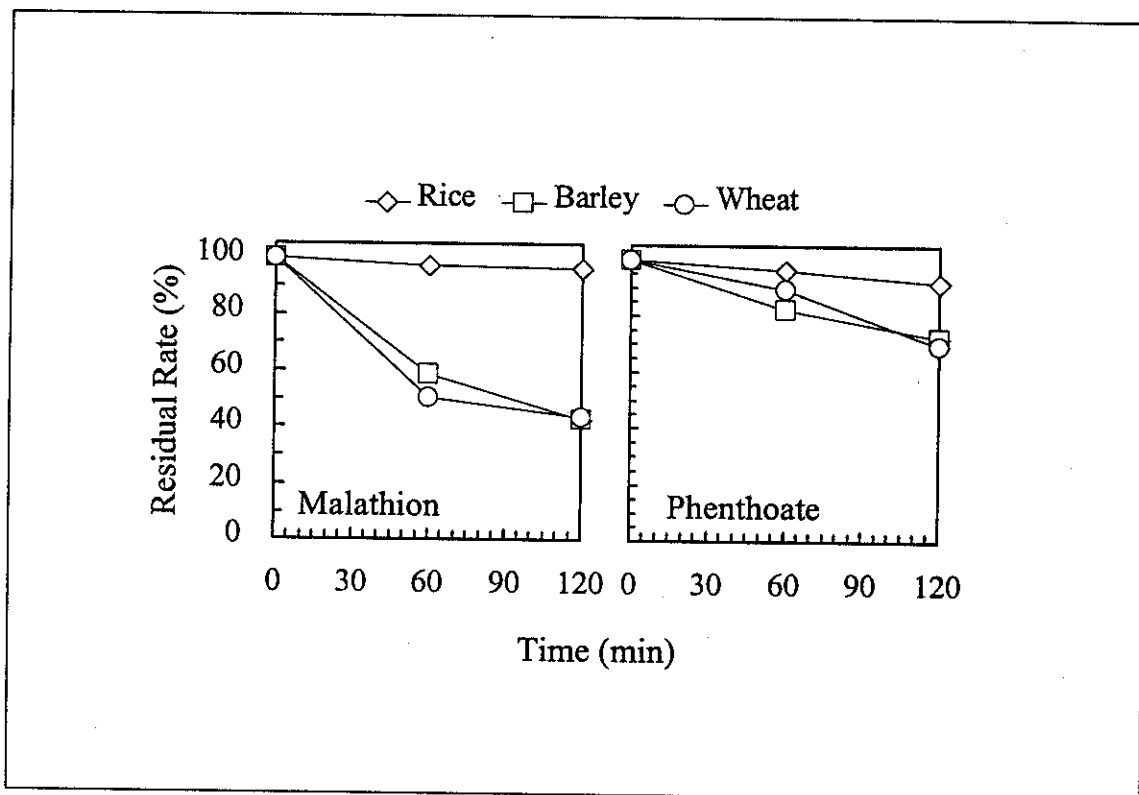


Figure 3. Degradation of malathion and phenthoate by homogenates of rice, barley and wheat.

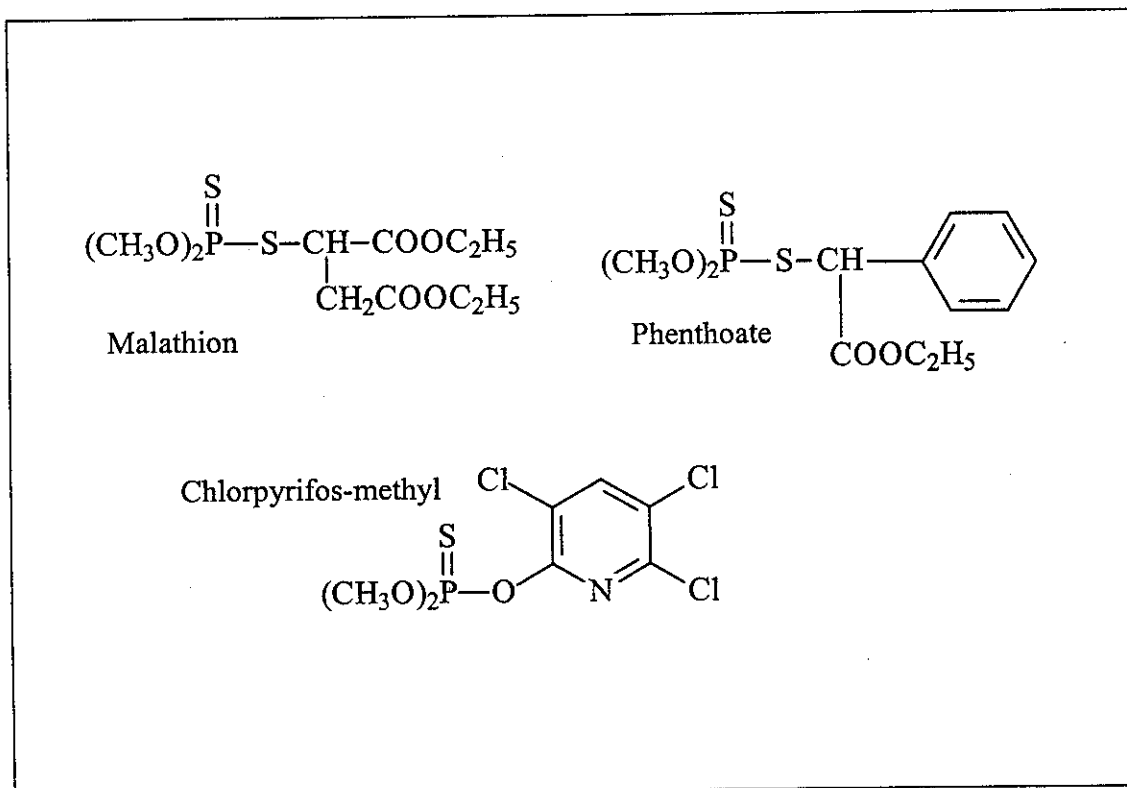


Figure. 4 Structures of Organophosphorus pesticides

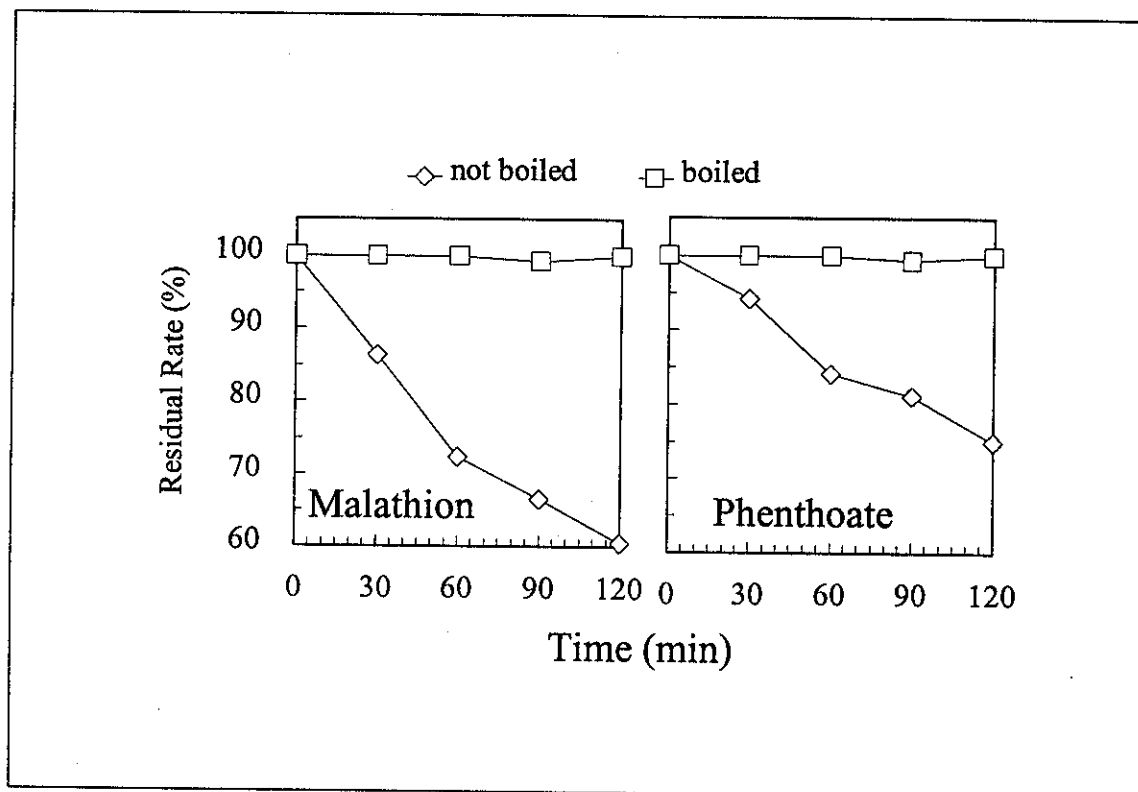


Figure 5. Effect of boiling wheat homogenate on degradation of malathion and phenthoate.

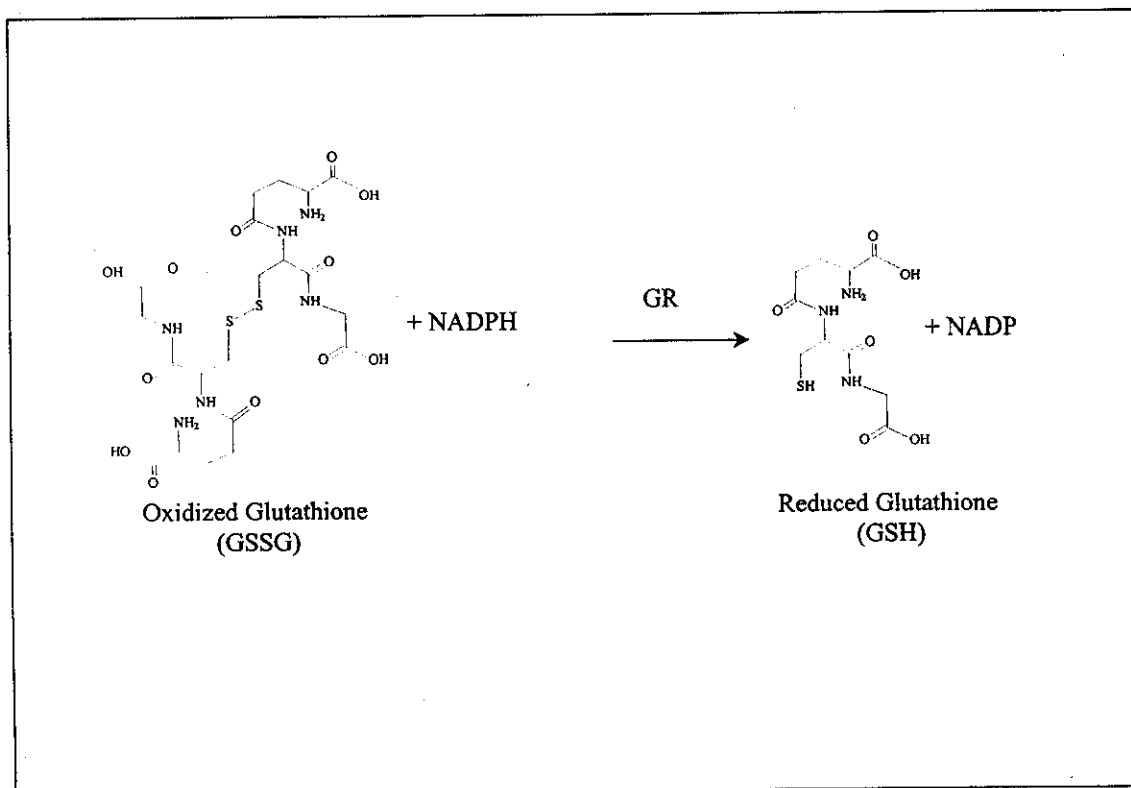


Figure 6. Reduction of GSSG to GSH by glutathione reductase

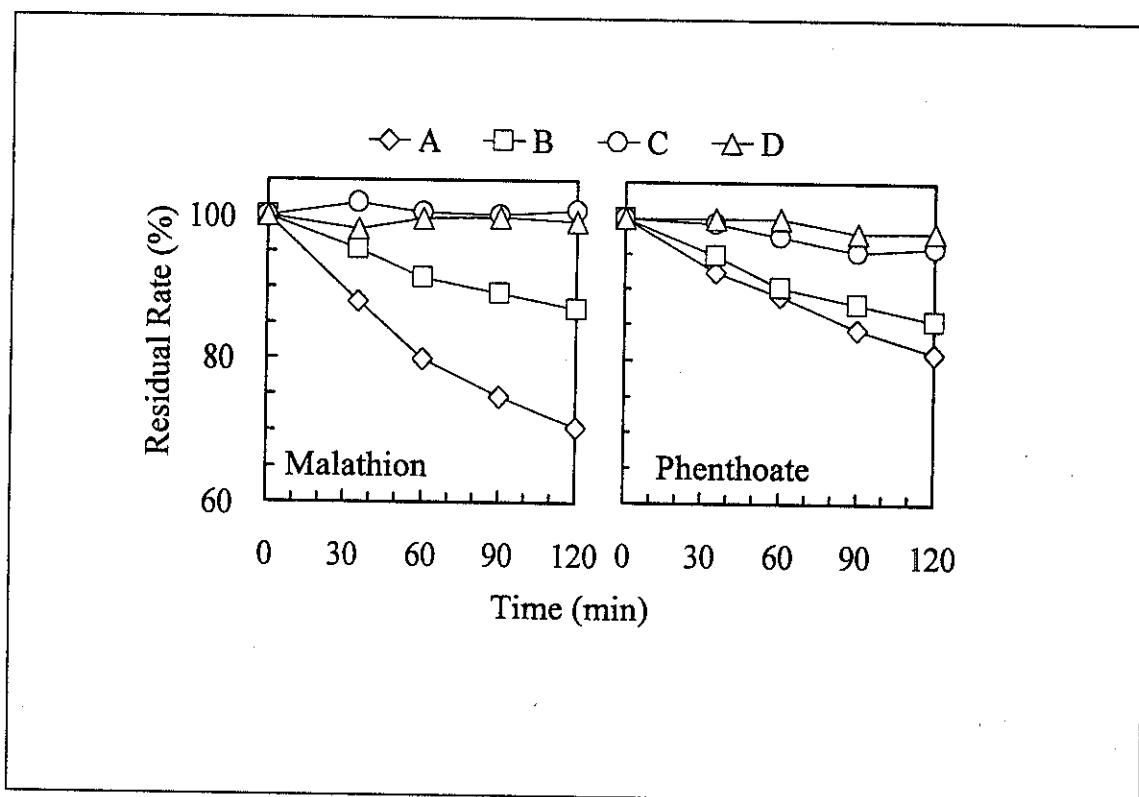


Figure 7. Degradation of malathion and phenthoate by glutathione reductase with NADPH or without NADPH.

A, Presence of GR and NADPH; B, GR alone; C, NADPH alone; D, absence of both GR and NADPH.

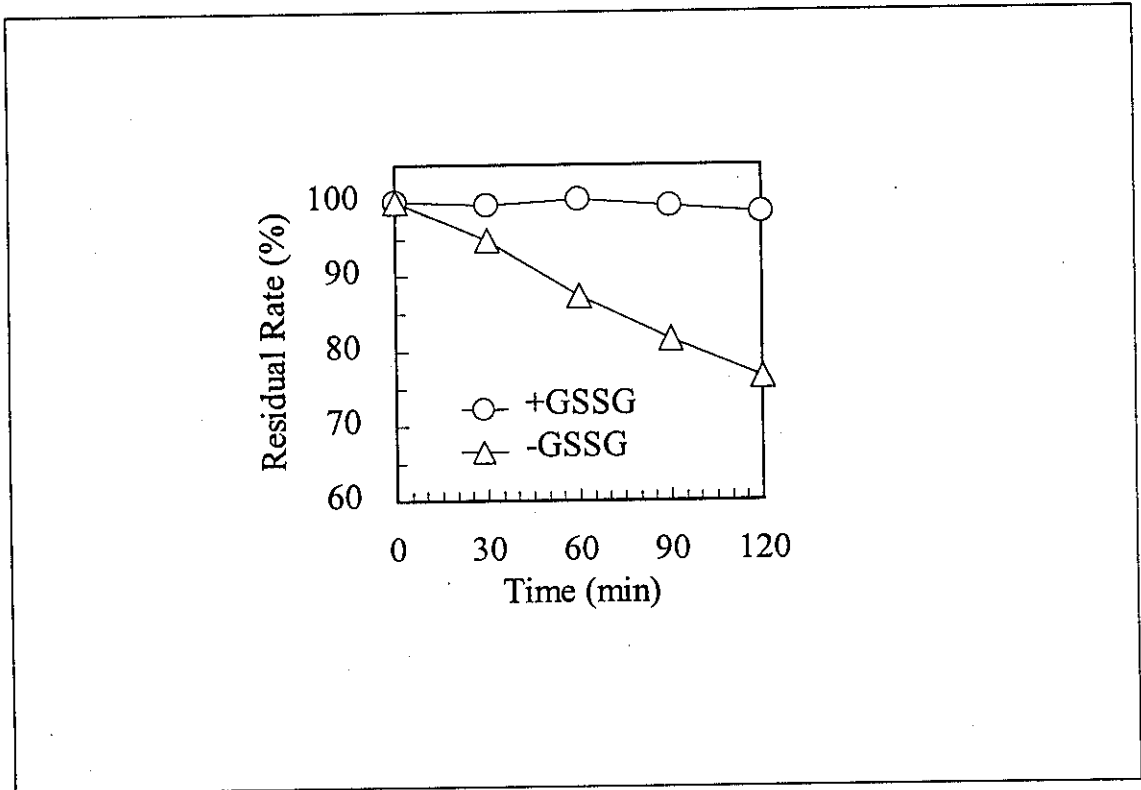


Figure 8. Inhibition of malathion degradation by oxidized glutathione

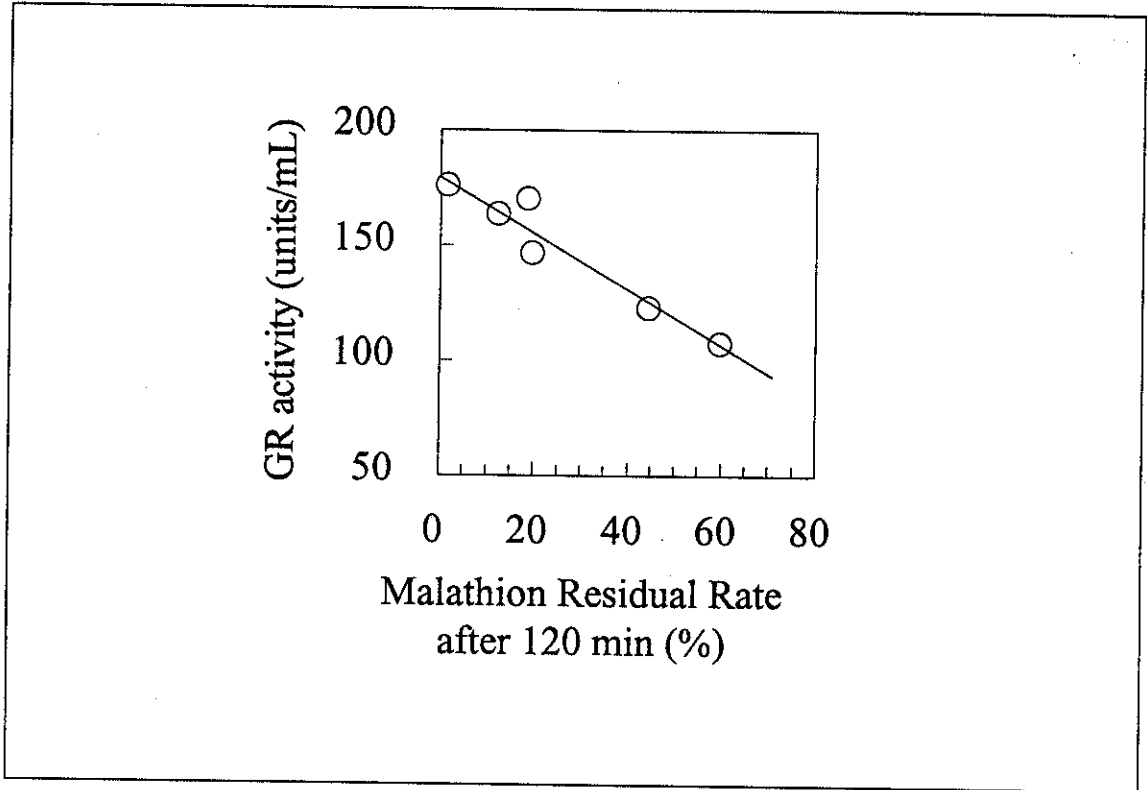


Figure 9. Relationship between malathion residual rate at incubation after 120 min and GR activity.

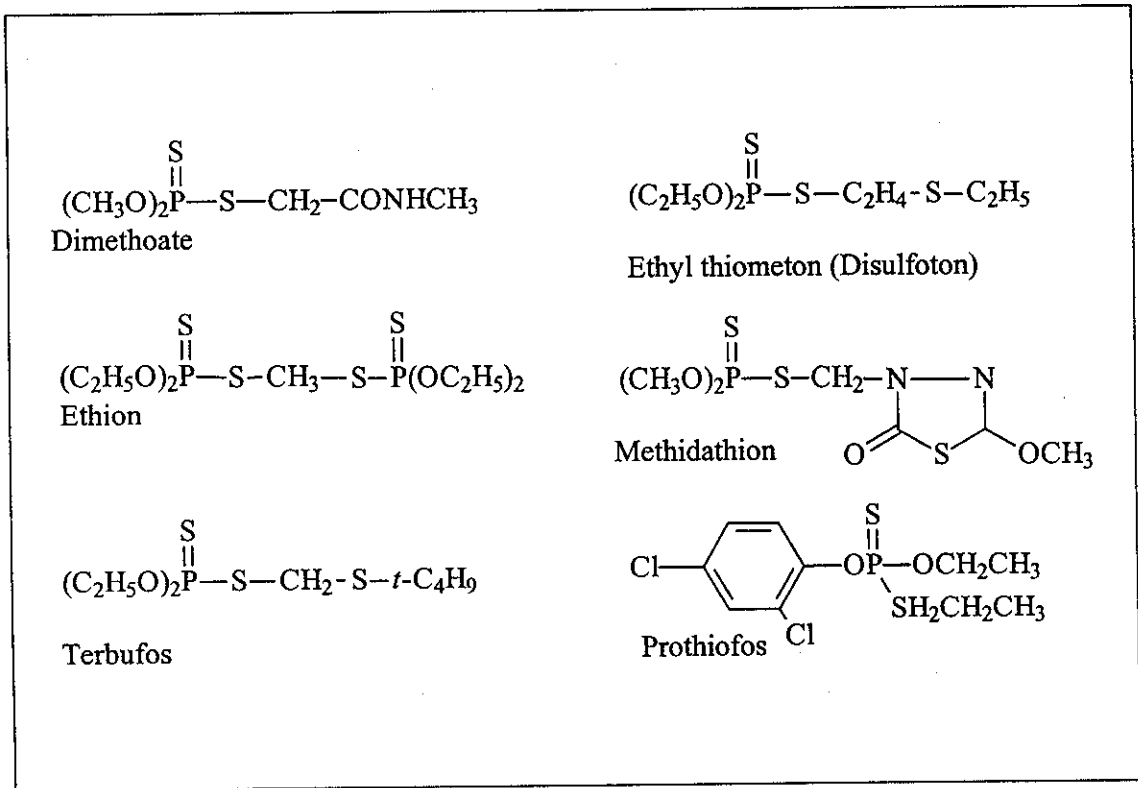


Figure 10 Structures of Phosphorodithioate pesticides