短 報

玄米および小麦試料の残留農薬分析における
抽出時の水浸漬効果坂 真智子*, 飯島和昭, 粕 由紀子, 藤田眞弘
小田中芳次, 加藤保博

財団法人残留農薬研究所化学部

(平成 18 年 3 月 30 日受付, 平成 18 年 7 月 5 日受理)

Effects of water-soaking on the extraction of
pesticide residue from powdered brown rice and
wheat samplesMachiko SAKA,* Kazuaki IJIMA, Yukiko KOMA,
Masahiro FUJITA, Yoshitsugu ODANAKA
and Yasuhiro KATO*The Institute of Environmental Toxicology*

The effects of water-soaking pre-treatment of powdered dry cereal on pesticide residue analysis in brown rice and wheat were examined. The recovery of several pesticide residues found in cereal by acetone extraction without water-soaking was as low as 6~68% of recovery after water-soaking pre-treatment for 30 min. The optimal soaking time in water was 15 to 30 min for the powdered cereal samples. The relative recovery of spiked pesticides and residual pesticides was not always parallel between the two extraction conditions, *i.e.*, acetone extraction with and without water-soaking pre-treatment. Pre-treatment produced higher measured values in many cases, but also resulted in lower values for some pesticides like malathion and diazinon. Soaking dry samples in water for 15~30 min as pre-treatment will give good residual pesticide extraction. © Pesticide Science Society of Japan

Keywords: pesticide residue analysis, water-soaking, extraction, brown rice, wheat.

緒 言

農薬の作物残留試験において、乾物試料（玄米、稲わら、小麦、大麦、大豆、茶など）の抽出の際には、20~40%に含水した極性溶媒を用いるか、試料にあらかじめ等量程度の水を加えてから極性溶媒を加え、振とう抽出することで抽出効率が向上するとされている¹⁾。環境省告示試験法²⁾、厚生労働省の以前の告示試験法³⁾および現通知法⁴⁾においては、水を添加後、2時間放置する方法が採用されている（多成分一斉分析法においては、水を添加後、15

分間放置する方法が採用されている）。しかし、分析法の迅速化の中で、2時間という水浸漬操作は分析操作上で時間的律速段階となっている。必ずしも2時間という長さが必要ではないとの見解もある¹⁾が、検証したデータの公的な報告は見当たらない。水添加操作は、特定の農薬の分析値の低下を引き起こす事例も知られている。例えば、環境省告示試験法における麦・雑穀類、豆類中のフェントエートの残留分析法では、抽出の際に水の添加操作は採用されていない^{2,5)}。

そこで、本稿において、6種の農薬を対象として玄米および小麦試料の抽出段階における水浸漬操作が、分析値に与える影響を検討した。すなわち、試料抽出段階で、アセトンのみおよび水浸漬後にアセトンを加えて抽出する方法による分析結果を比較し、さらに水浸漬放置時間についても検討し有用な結果が得られた。また、水浸漬の有無による分析結果を、添加回収試料と残留実試料で比較し、添加回収試験の実効性についても検討した。

実 験 方 法

1. 供試農薬

Table 1 に示す 6 種の農薬を対象とした。各標準品（純度 98% 以上）は和光純薬工業株式会社より購入した。

2. 供試作物および調製方法

2.1. 玄米試料

玄米〔米品種：コシヒカリ（茨城県産）〕は社団法人日本植物防疫協会で調製した。各農薬は、その登録使用条件内で最大残留量を与える条件で処理した。ただし、散布濃度は登録最大使用濃度の 5 倍量とした〔スミチオン（フェントロチオン）50.0% 乳剤, 160 倍, 150 l/10 a, 4 回処理, 21 日後収穫；デナボン（カルバリル）2.0% 粉剤, 20 kg/10 a, 5 回処理, 12 日後収穫；マラソン（マラチオン）50.0% 乳剤, 400 倍, 150 l/10 a, 5 回処理, 7 日後収穫；ダイアジノン 40.0% 乳剤, 200 倍, 150 l/10 a, 4 回処理, 21 日後収穫〕。無処理試料については、対象農薬を処理せず慣行栽培で調製した。

2.2. 小麦試料

小麦〔品種：キタカミコムギ（岩手県産）〕は社団法人日本植物防疫協会で調製し、製粉については日本穀物検定協会中央研究所で実施した。農薬処理条件は玄米試料の調製の場合と同様にした〔スミチオン（フェントロチオン）50.0% 乳剤, 1000 倍, 180 l/10 a,

Table 1. Solubility in water and partition coefficient between *n*-octanol and water ($\log P_{ow}$) of 6 investigated pesticides

Pesticides	Solubility in water (mg/l)	$\log P_{ow}$
Carbaryl	120 (20°C)	1.85
Malathion	145 (25°C)	2.75
Diazinon	60 (20°C)	3.30
Fenitrothion	14 (30°C)	3.43
Phenthoate	10 (25°C)	3.69
Etofenprox	<0.001 (25°C)	7.05

Data are quoted from the Pesticide Manual, 13th edition (2003).

* 連絡先 〒303-0043 茨城県常総市内守谷町 4321 番地
4321 Uchimoriya-machi, Joso-shi, Ibaraki 303-0043, Japan
E-mail: saka@iet.or.jp

1 回処理, 7 日後収穫; エルサン (フェントエート) 50.0% 乳剤, 1000 倍, 180 l/10 a, 4 回処理, 7 日後収穫; トレボン (エトフェンブロックス) 20.0% 乳剤, 2000 倍, 180 l/10 a, 2 回処理, 14 日後収穫]。

3. 試薬類

一般試薬および有機溶媒は特級品またはそれに準ずる等級のもの, または残留農薬試験用 (関東化学株式会社製) のものを使用した。水は, 日本ミリポア株式会社の Milli-Q 純水装置で調製した高純度水を用いた。

C₁₈ ミニカラムは Bond Elut C₁₈ 1 g/6 ml (バリアン社製) を使用した。フロリジルミニカラムは Sep-Pak フロリジルカートリッジ (ウォーターズ社製), 多孔性ケイソウ土カラムは CE1020 (バリアン社製) を使用した。

4. ガスクロマトグラフ・質量分析計 (GC/MSD)

アジレントテクノロジー社製の HP5890II (GC) および HP5971A (MSD) を用いた。カラムは HP-5ms (内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25 μ m, アジレントテクノロジー社製) を用い, カラム温度 70°C (2 分) - 10°C/分 - 280°C (22 分) の昇温として, 注入口温度は 250°C, トランスファーライン温度は 280°C, キャリヤーガス (ヘリウム) 流量は 0.9~0.4 ml/分 で実施した。注入方法はパルスドスプリットレス注入方式を採用し, 注入口圧力 30 psi (0.5 分) - 99 psi/分 - 7.9 psi で昇圧した。注入量は 1 μ l とした。イオン化方式は EI, マスフィルターはクォーツ製一体型四重極, イオン化電圧は 70 eV, イオン源温度は 175°C とし, SIM 方式 (定量イオン: フェントロチオン m/z 125, ダイアジノン m/z 137, カルバリル m/z 144, マラチオン m/z 125, フェントエート m/z 274, エトフェンブロックス m/z 163) で測定した。

5. 分析方法

全試料を 3 連で分析した。

5.1. 玄米試料

均一化した玄米 10 g を三角フラスコに量り取り, 水 20 ml を加えて直ちに, または所定の時間 (15, 30, 60, 120 分間) 室温にて放置した後, アセトン 100 ml を加え, 30 分間縦振り振とう後, ガラス繊維ろ紙を敷いた桐山ロートで吸引ろ過した。残渣をアセトン 50 ml で洗い, 洗液を合わせ, ロータリーエバポレーターを用いてアセトンを留去した。あらかじめ, アセトニトリル 5 ml および水 5 ml を流下して前処理をした C₁₈ ミニカラムに濃縮液を減圧下で流下した。水/アセトニトリル (80:20, v/v) 混液 5 ml を流下して流出液を捨て, 1 分間吸引して固相を乾燥した。その後, アセトニトリル 10 ml で溶出した。溶出液の溶媒を留去し, あらかじめ, ヘキサン 5 ml で洗浄したフロリジルミニカラムにヘキサン 5 ml で 2 回展開し, 流出液を捨てた。次にヘキサン/アセトン (90:10, v/v) 混液 30 ml で溶出した。溶出液の溶媒を留去し, アセトンに溶解し, 試料溶液とした。

5.2. 小麦試料

均一化した小麦 10 g を三角フラスコに量り取り, 水 20 ml を加えて直ちに, もしくは 120 分間室温にて放置した後, アセトン 100 ml を加え, 30 分間縦振り振とう後, ガラス繊維ろ紙を敷いた桐山ロートで吸引ろ過した。残渣をアセトン 50 ml で洗い, 洗液を合わせ, ロータリーエバポレーターを用いてアセトンを留去した。濃縮液に水 50 ml を加え, 分液漏斗に移し, 塩化ナトリウム 2.5 g およ

びヘキサン 50 ml を加え, 5 分間縦振り振とう抽出後, ヘキサン層を分取した。新たにヘキサン 50 ml を加え, 同様に振とう抽出し, ヘキサン層をまとめ, 硫酸ナトリウムを加えて脱水した。硫酸ナトリウムをろ別後, 溶媒を留去し, ヘキサン 10 ml に溶解し, 多孔性ケイソウ土カラムに移し, さらにヘキサン 5 ml で 2 回容器内を洗い, その洗液を同様に移した。5 分間放置した後, ヘキサン飽和アセトニトリル 20 ml で 3 回展開し, 溶出液を分取した。溶出液の溶媒を留去した後, あらかじめ, ヘキサン 5 ml で洗浄したフロリジルミニカラムにヘキサン 5 ml で 2 回展開し, 流出液を捨てた。次にヘキサン/アセトン (80:20, v/v) 混液 20 ml で溶出した。溶出液の溶媒を留去し, アセトンに溶解し, 試料溶液とした。

5.3. 添加回収試験

均一化した無処理試料 (玄米 10 g, 小麦 10 g) に標準品のアセトン溶液を 0.5~1.0 ml (0.1~0.5 mg/kg 相当) 均一に添加した試料 (添加回収試料) を用いて, 分析の全操作を行った。

結果および考察

1. 玄米試料

カルバリル, フェントロチオン, マラチオン, ダイアジノンを分析対象とした玄米残留実試料 (圃場での調製) を用いて, 水浸漬操作の有無と浸漬時間の分析結果への影響を比較した。すなわち, A: 水浸漬操作なし (アセトンのみによる抽出), B: 水添加後, 直ちに (B₀), 室温にて, 15 分 (B₁₅), 30 分 (B₃₀), 60 分 (B₆₀), 120 分 (B₁₂₀) 後に, アセトンを加えて抽出の 6 条件で比較した。条件 B₃₀ による分析値を 100 として, その値に対する各条件での分析値の比率を Fig. 1 に示す。その結果, 4 薬剤すべてにおいて, アセトン (A) のみでは B₃₀ による抽出率の 6~68% と低い値であった。特に, カルバリルでは水添加の効果が顕著であった。一方, 浸漬時間を比較すると, 120 分間までの浸漬では, カルバリルおよびフェントロチオンの分析値には大きな差は認められなかったが, マラチオンおよびダイアジノンでは 30 分間を境に分析値が低下する傾向が認められた。この結果から, これら薬剤においては正確な残留値を把握するためには, 水浸漬操作は必要であるが浸漬時間については 15~30 分間が適切であると示唆された。検討した薬剤数は少ないが, 現在, 告示試験法等の単成分分析法で乾物に一律に採用されている 2 時間という水添加後の放置時間は, 必ずしも最適ではないと考えられる。厚生労働省の一斉試験法 (平成 17 年 11 月 29 日通知)⁴⁾ においては, 水浸漬時間 15 分間が採用されており, 告示試験法等での水浸漬操作は検討する必要がある。

さらに, Fig. 1 の結果 (比率, A/B₃₀) の対数値と薬剤の $\log P_{ow}$ の相関を調べた。Fig. 2 に示されるとおり, 正の相関が認められた。この関係は, 試料抽出時における対象農薬のマトリックスと溶媒 (抽出溶媒) 間の挙動を説明することができる。Log P_{ow} の値が低いものは水相に移行しやすいため, 水浸漬操作によって抽出率が向上するのに対して, アセトンのみでの抽出では, 試料に残留する比率が高くなる。また, $\log P_{ow}$ の値が高くなるとともに水浸漬操作の抽出率に対する効果は低減し, アセトンのみでの抽出効率は上がることを示唆している。Log P_{ow} と水溶解性には負の相関が認められるという報告⁶⁾ からこの関係は裏づけられる。

2. 小麦試料

フェントロチオン, フェントエートおよびエトフェンブロックスの小麦実残留試料 (圃場での調製) と添加回収試料について, 比較実験を行った (水浸漬時間は 120 分, Fig. 3)。フェントロチオ

Fig. 1. Effects of soaking in water on the extractability of pesticides with acetone in incurred brown rice samples. Samples were extracted with acetone without soaking in water (A), or after soaking in water [soaked for 0 min (B₀), 15 min (B₁₅), 30 min (B₃₀), 60 min (B₆₀), 120 min (B₁₂₀) at room temperature]. Each relative recovery is shown *versus* after water soaking for 30 min (B₃₀). Asterisks indicate significant differences (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$) with the Dixon test.

ンでは、添加回収率は水浸漬操作の有無によりほとんど影響されなかったが、残留実試料の分析結果は大きく異なり、水浸漬操作を実施した方が10倍程度高い値を示した。エトフェンプロックスは添加回収試料では水浸漬操作の有無により違いが認められなかったが、残留実試料の分析結果は水浸漬の方が3割ほど高い値を示した。一方、フェントエートの添加回収率は水浸漬操作の影響を

受け低い値を示した。しかし、残留実試料において水添加は分析値に大きな影響を与えず、アセトンのみでの抽出よりも2割ほど高めの値を示した。添加回収率が低かったフェントエートはエステル構造を有し、塩基性で加水分解することが知られているが、検討した試料の水浸漬状態でのpHは中性(pH 6.8)であり、加水分解が原因ではないと考えられる。吉井ら⁵⁾は小麦試料のグルタ

Fig. 2. Relationship between $\log P_{ow}$ and $\log$ relative recovery (% $A/B_{30} \times 100$) of pesticides with acetone extraction without water-soaking from brown rice (A: carbaryl, B: malathion, C: diazinon, D: fenitrothion). Refer to Table 1 and Fig. 1.

Fig. 3. Effect of soaking in water on the extraction of pesticides from incurred and spiked wheat samples. Relative recovery of three pesticides by acetone extraction without soaking in water (A) is shown *versus* after water soaking for 120 min (B₁₂₀). Data are the means of triplicate analyses. Column: incurred wheat, black circle: spiked wheat.

チオンレダクターゼ (GR) は水浸漬によって活性を発現し、マラチオンおよびフェントエートを分解すると報告しており、この GR による分解が水浸漬処理試料で認められた低い回収率の原因と考えられ、今回検討した水浸漬時間の短縮が必要と思われた。添加回収試料と残留実試料の値の差については詳細な原因は特定できていないが、農薬の標準溶液を添加する回収試験は、残留物の実際の存在状態を必ずしも反映しておらず、水浸漬操作による残留実試料からの完全な回収率 (抽出効率) を得るためにはさらに検討が必要と思われた。

ま と め

玄米試料を用いた検討の結果、水浸漬操作時間は必ずしも 2 時間は必要ではなく、15~30 分の浸漬で良好な結果を得られた。また、水浸漬操作の効果は、 $\log P_{ow}$ が低く、水溶解性の高い農薬ほど大きかった。

水浸漬操作は概ね抽出効率を上げる方向に作用するが、農薬によっては水浸漬中に分析値が低下するものがあり、それは浸漬時間を短くすることで解消できた。

農薬の標準溶液を添加する通常の添加回収試験では、水浸漬操作による残留実試料からの抽出効率を踏まえた回収率とは異なる場合がある。しかしながら、水分含量の少ない試料 (乾物等) に

おいては正確な残留分析結果を得るために添加回収率に問題がない場合には、水浸漬操作を採用すべきであると結論される。また、対象化合物の $\log P_{ow}$ の値は、試料からの抽出効率を判断する指標の一つとして有効であった。

引 用 文 献

- 1) 後藤真康, 加藤誠哉: 残留農薬分析法, ソフトサイエンス社, pp. 19-23, 1980.
- 2) 作物残留に係る登録保留基準値の告示試験法: 環境省告示, フェントエート (平成 8 年 4 月 25 日付).
- 3) 食品, 添加物等規格基準の残留基準値の告示試験法: 昭和 34 年厚生省告示第 370 号.
- 4) 食品に残留する農薬, 飼料添加物又は動物医薬品の成分である物質の試験法: 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知, 食安発第 1129001 号 (平成 17 年 1 月 24 日付), 第 1129002 号 (平成 17 年 11 月 29 日付).
- 5) K. Yoshii, Y. Tsumura, S. Ishimitsu, Y. Tonogai and K. Nakamura: *J. Agric. Food Chem.* **48**, 2502-2505 (2000).
- 6) 日本環境協会編: 化学物質の物理化学性状測定法, 産業図書株式会社, p. 36, 1987.