米粒中の blasticidin-S の残留分析法

高木幸太郎, 小島利治, 渋谷国豊, 江幡栄一, 小泉鶴雄, 岸田 弘

(科研化学株式会社)

昭和 45 年 5 月 21 日 受 理

The Analytical Method of the Residual Blasticidin-S in Unpolished Rice-grains

By Kotaro TAKAGI, Toshiharu KOJIMA, Kunitoyo SHIBUYA,

Eiichi EBATA, Tsuruo KOIZUMI, Hiroshi KISHIDA

Kaken Chemical Co., Ltd.

For the purpose to determine the residual amount of blasticidin-S (Bla-S) in an unpolished rice cropped from rice plant which was treated with Bla-S, the extract of the unhulled rice powder from water was treated with strong acid cation-exchange resin. The eluate was evaporated to a small volume and assayed by using *Cladosporium fulvum* as a test organism. From the results by this method the analytical flow-sheet shown in this report was presented. The recovery of Bla-S by this procedure showed about 60%. In the case that the sample dose not show any inhibitory diameter by the biological assay, the residual amount of Bla-S in the sample seems to be estimated below 0.05 ppm.

(Received May 21, 1970)

緒 言

日本の稲作の最大病害であるいもち病防除薬剤として開発され卓越した効果を認められた blasticidin-S (Bla-S) は, いもち防除剤としてわが国では大きな比重を占めているので, 公衆衛生上の見地から昭和 42 年に農林省は玄米中に残留する Bla-S の調査を企図した。

Bla-S は強い毒性を示すが, 分解してアンモニアが脱離すると無毒の cytomycin⁽¹⁾ になり, 米粒中に残存する毒性を検討するには, 以下報告されている化学的分解物⁽²⁾は毒性が弱いと想定されるので, 玄米中に残留する Bla-S を定量すればよい。

また Bla-S は稲体上で次第に抗菌力を失い, 散布 4 日後には散布直後の 1/5 程度に低下し, 浸透移行量も日数の経過につれて低下し, 7 日後には 24 時間内の 1/10 になる⁽³⁾。したがって Bla-S を散布した後, 収穫された玄米でも検出される Bla-S は非常に微量であると考えられる。

われわれはなるべく感度の高い定量法を検討し, その

方法によっても検出できなかった場合には, 残留量は 0.1 ppm 以下であるとして行うことができるような定量条件の設定を本研究の目的とした。

実験材料および方法

1. 試料および試薬

(1) 澱粉分解酵素: α -Amylase の一種である Kleistase M-16 (大和化成製) を用いる。

(2) イオン交換樹脂: Dowex 50 W X-2 (100~200 mesh, Dow Chemical Co. 製) を用いる。

(3) 0.1 N アンモニア溶液: 28% アンモニア水 (Sp. Gr. 0.90) 6.75 ml を蒸留水で 1000 ml にする。

(4) Bla-S の力価試験法

(4)-1. 常用標準 Bla-S 稀釈液: 常用標準 Bla-S を乾燥 (60°C, 50 mmHg, 3 時間) した後正確に秤量し, 無菌の 1/30 M リン酸塩緩衝液 (pH 6.0) に溶解して 1000 μ g (力価)/ml の原液をつくる。この原液から 1/15 M リン酸塩緩衝液 (pH 6.0) で 2.5 μ g (力価)/ml, およびその 1/4 濃度の稀釈液をつくる。

(4)-2. 被検菌孢子浮遊液の調製: *Cladosporium fulvum*⁽³⁾ を試験管 (直径 18mm) 斜面培地に 26°C, 7 日以上培養し, これに適量の無菌水を加えて孢子浮遊液をつくり, 種層用培地約 50 ml に加える.

(4)-3. 培地組成: 種層, 基層および被検菌培養の寒天培地は次のものを用いる. 馬鈴薯 300 g を 1000 ml の水で 0.5 kg, 30 分加圧浸出する. この浸出液に蔗糖 20 g を加えて 1000 ml とする.

(4)-4. 平板の調製: 直径約 9 cm のペトリ皿に (4)-3 記載の培地 10 ml を注入し平板とする. 種層用培地をとかし 48°C 以下に保持して (4)-2 の孢子浮遊液を加え, よく混和して 4 ml 宛上記平板に重層注入する.

(4)-5. 試験法: 各試料につき平板 5 枚を使用し, 各平板の第 1, 第 2 の円筒を常用標準 2.5 μ g (力価)/ml, およびその 1/4 濃度の稀釈液でみたす. 残りの 2 個の円筒には試料原液およびその 1/4 濃度の稀釈液をみたす. 直ちに 3~6°C の冷蔵庫に納め 16~18 時間後 26°C で 24 時間培養して後, 各阻止円直径を測定する.

Fig. 1. Outline of the Stripping Procedure.

(4)-6. 力価計算: 常法による. 本方法における標準直線を Fig. 9 に示す.

2. 精製方法の検討

(1) Dowex 50 W X-2 H 形樹脂の交換容量の測定: 樹脂 10 ml を樹脂塔に充填して, 1 N 食塩水 50 ml を通過させ, 水洗した後, 洗液も合せて一定量とし, その一部をとって 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液で BTB を指示薬として滴定し, その交換容量を求める.

(2) 玄米抽出液の陽イオン量の測定: 玄米抽出液 20 ml を pH 3.0 にして Dowex 50 W X-2 H 形 10 ml に通過させ, 水洗した後, その洗液を合せたものを 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液で pH 3.0 になるまで滴定して求める.

(3) モデル試験: 玄米粉に Bla-S 塩酸塩 (Bla-S HCl) を 0.1, 0.2, 0.5 および 1.0 ppm になるように添加して, Fig. 1, 2 の操作法に従って処理し, 回収率を求める. また玄米の品種各種についても Bla-S HCl 0.1 ppm を添加し, 同様にして回収率を求める.

Fig. 2. Outline of the Cleanup Procedure.

実験結果および考察

1. 抽出方法の検討

(1) 粉碎: ハンマーミルにより 500~1000 g の市販玄米を粉碎し, その 100~200 g をとって篩別して得られた粒度分布は Fig. 3 に示すとおりで, 30 mesh 残は 1.8% であり, 篩分け, 再粉碎の必要はない. また, このときの玄米粉の回収率は約 98%, 処理能力は 6 kg/hr である.

Fig. 3. Size Distribution of Crushed-product.

(2) 抽出条件: Bla-S は水溶性物質であるから, 抽出溶媒として水を用いたが, 抽出液の Bla-S の濃度が

Fig. 4. Chemical Structure of Blasticidin-S^(4,5)

Formula $C_{17}H_{26}O_5N_8$
 $pK_a^{(6-7)}$ 2.4, 4.6, 8.0
 and 12.5

きわめて低いので直接生物検定により抽出確認の尺度とすることができない. そこで Bla-S が Fig. 4^(4,5) に示すように窒素を多く含んだ物質であることに着目して, Kjeldahl-N 量を抽出の指標とする.

(i) 濾過速度と Kjeldahl-N 量による抽出率

Fig. 5, 6 は抽出液を濾過する際の難易を示すものであり, 玄米粉 30 g に蒸留水 60 ml を加え, 温度 (30, 50°C), pH (2.0, 4.5, 6.2), Kleistase M-16 添加, 無

Fig. 5. Filtration Rate (1). (30°C, 1 hr)

●--- Distilled water, pH 2.0
 ▲--- Distilled water, pH 4.5
 ■--- Distilled water, pH 6.2
 ○--- Kleistase 1%, pH 2.0
 △--- Kleistase 1%, pH 4.5
 □--- Kleistase 1%, pH 6.2

Fig. 6. Filtration Rate (2). (50°C, 1 hr)

○--- Distilled water, pH 2.0
 △--- Distilled water, pH 4.5
 □--- Distilled water, pH 6.2
 ●--- Kleistase 1%, pH 2.0
 ▲--- Kleistase 1%, pH 4.5
 ■--- Kleistase 1%, pH 6.2

添加の各条件を組合せて 1 時間抽出した場合の濾過曲線である。

図で明らかなように Kleistase M-16 を添加した場合は濾過がきわめて早く、とくに抽出温度 50°C の場合その効果が大きく、なかでも pH 4.5 が最も速い。また Fig. 7 においても窒素抽出率の最も高いのは 50°C, pH 4.5 である。この条件では Bla-S は分解しないから、

Fig. 7. Effects of Temperature and pH on the Yield of Nitrogen.

---○--- None added Kleistase at 30°C
 —●— Added Kleistase at 30°C
 ---△--- None added Kleistase at 50°C
 —▲— Added Kleistase at 50°C

Fig. 8. Effects on the Times of the Extracting on the Yield of Nitrogen.

—●— Twice volume, three times
 —▲— Three volume, twice times
 —■— Six volume, one times

酵素を添加し、pH 4.5, 温度 50°C で抽出する。

(ii) 抽出液量と抽出回数

Fig. 8 に示すように、3 倍量の水を用いて 2 回抽出する方法が最も効果が高い。

2. 精製方法の検討

玄米からの抽出液には夾雑物が多いので、生物検定で測定できるまでに直接濃縮することはできない。そこで抽出液を精製して生物検定で Bla-S が測定できる濃度まで濃縮することが必要である。Fig. 9 は Bla-S の標準直線で、1 μ g (力価)/ml 程度の Bla-S 濃度が必要であり、検出限度を 0.05 ppm (5 μ g/100 g 玄米) とすると、抽出液約 600 ml を 5 ml (1/100~1/120) に濃縮しなければならない。

(1) 樹脂の架橋度と溶出率: Bla-S は陽イオン交換樹脂に吸着されるが、玄米抽出液の Bla-S がきわめて微量であるから、親和性が強く、しかも交換速度の速い低架橋度の強酸型樹脂である Dowex 50 W X-2, X-4 について検討した。すなわち Bla-S HCl 水溶液 (100 μ g (力価)/ml) 100 ml を両樹脂の H-形 10 ml に吸着させ水洗した後、樹脂交換容量の 2.5 倍に相当する 0.05, 0.1, 0.25 および 1.0 N アンモニア溶液を用い溶出して溶出率をしらべた。Fig. 10 にみられるように Dowex 50 W X-2 が高い溶出率を示しているのを、これを用いる。

この際、アンモニア濃度が高くなるほど溶出率が低下する。この現象の原因としてまず考えられることは、アルカリ性で Bla-S が不安定であるため、アンモニア濃度が高いほど分解が促進されることであるが、Bla-S の分解生成物である cytomycin は Bla-S と同程度の分子吸光係数 (それぞれ 274 m μ における ϵ は 13,380,

Fig. 9. The Standard Curve of Blasticidin-S by using *Cladosporium fulvum*.

Fig. 10. Effects of Degrees of Cross Linking and Concentrations of NH_4OH on the Yield of Blasticidin-S.

- Dowex 50 W X-2 H, bioassay
- Dowex 50 W X-2 H, ultra violet
- Dowex 50 W X-4 H, bioassay
- Dowex 50 W X-4 H, ultra violet

14,300⁽⁶⁾)を示すことから、もし分解によるならば吸光度と生物検定の測定値に差がなければならないが、Fig. 10に示すようにこのような差は認められないので、分解により溶出率が低下したとは考えにくい。一方、Bla-Sはその化学構造および pK_a 値から強酸型樹脂の Dowex 50 W に強い親和性を示すことは容易に推測され、この強い親和性がアンモニアで溶出する際にできる NH_4 形樹脂に、溶出した Bla-S を再び吸着させることも考えられる。別の実験で Bla-S が NH_4 形に吸着されることが認められるので、このように考えると Fig. 10 に示した実験では、溶出に用いたアンモニア溶液の量が NH_4 形に再吸着した Bla-S を樹脂から溶出するには十分でなかったと考えられる。

(2) 溶出曲線: NH_4 型樹脂に再吸着されることが溶出率低下の原因であることを明らかにするため、Bla-S が樹脂から溶出する状況をしらべた。

Bla-S HCl 水溶液 (100 μg (力価)/ml) 200 ml を Dowex 50 W X-2 H-形 20 ml に吸着させ水洗した後、0.1, 0.5 および 1.0 N のアンモニア水溶液を通液し、20 ml 宛分画して Bla-S の溶出状況を見ると Fig. 11, 12, 13 になる。

アンモニア濃度が高くなると Bla-S の最高濃度が分画の前の方に移行するが、Bla-S を十分溶出するために必要な液量はアンモニア濃度の増加に応じて減少せず、

Fig. 11. Elution Curve of 0.1 N NH_4OH .
Dowex 50 W X-2 H (20 ml) (1 tube=20 ml)
·····●····· pH, —●— ultra violet, ·····○····· bioassay.

Fig. 12. Elution Curve of 0.5 N NH_4OH .
Dowex 50 W X-2 H (20 ml) (1 tube=20 ml)
·····●····· pH, —●— ultra violet, ·····○····· bioassay.

Fig. 13. Elution Curve of 1.0 N NH_4OH .
Dowex 50 W X-2 H (20 ml) (1 tube=20 ml)
·····●····· pH, —●— ultra violet, ·····○····· bioassay.

濃縮効果が得られない。換言すれば NH_4 形に吸着された Bla-S を溶出するためにはアンモニアの濃度にかかわらずほぼ一定量の通液量が必要である。したがってア

ンモニア濃度が高い場合には溶出液のアンモニア濃度が高くなり、中和で生成する硫酸が増加し、次いで行なう濃縮で所定の液量にすることができない。以上の結果から溶出液のアンモニア濃度は 0.1 N とし、液量は樹脂容積の 20 倍とする。

(3) 通液 pH の回収率に及ぼす影響：抽出液の pH を下げ Bla-S を陽イオン化した場合の回収率に及ぼす影響をしらべた。Bla-S HCl 水溶液 (0.01 μ g (力価)/ml) 20 l を pH 1.0, 2.0 および 4.0 でそれぞれ Dowex 50 W X-2 H-形に吸着させ、水洗した後 0.1 N アンモニア水溶液で溶出した。Bla-S の回収率は pH 1.0, 2.0, 4.0 に対し、それぞれ 41.0, 73.1, 67.9% で pH 2.0 で吸着させた場合に最高の回収率を示している。玄米抽出液を pH 2.0 にすると蛋白質様の沈澱を生成し、夾雑物を除去できる利点があるので抽出液の pH を 2.0 に下げて通液する。

(4) 交換容量と陽イオン量および通液量：実験材料および方法の 2-(1), (2) に従ってしらべた。Dowex 50 W X-2 H-形の交換容量は 0.7~0.9 meq/ml で、玄米抽出液の陽イオン量は産地によって変動するが、0.018~0.024 meq/ml でほぼ 0.02 meq/ml とすると、通液量を樹脂容積の 20 倍とすれば Bla-S を完全に捕捉することができる。

(5) 塩酸濃度による溶出率の変化：Bla-S HCl 水溶液 (100 μ g (力価)/ml) 100 ml を Dowex 50 W X-2 H-形 10 ml に吸着させ、水洗した後 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 および 8 N 塩酸を通液し、Bla-S の溶出状況をしらべた。Fig. 14 に示すように、吸着された Bla-S は 2 N 以下の塩酸ではほとんど溶出されない。したがって 2 N

Fig. 14. Effects of the Concentration of HCl aq on the Yield of Blasticidin-S.

Fig. 15. Recovery Yield.

Table I. Recovery Yield of Model Test

Exp. No.	Source	Added blasticidin-S (ppm)	Recovery yield (%)
1	Chiba	0.1	70
2	Chiba	0.1	75
3	Chiba	0.1	80
4	Shizuoka	0.1	70
5	Shizuoka	0.1	75

塩酸で吸着樹脂を洗浄することにより、吸着性の弱い不純物を除去することができ、生物検定に対する阻害を防ぐことに役立つ。

(6) モデル試験：玄米粉に Bla-S を 0.1, 0.2, 0.5 および 1.0 ppm 添加して Fig. 1, 2 の方法に従って処理し、その回収率をしらべた。Fig. 15 に示すように 0.1~1.0 ppm 添加した場合 60~80% の回収率であり、また玄米の品種 5 種について Bla-S 0.1 ppm をそれぞれ添加して同様に回収率をみると、Table I に示すように 70~80% であった。

したがって生物検定値が 0.6 μ g (力価)/ml であれば本方法の回収率 (60%) を考慮して、下のように玄米中の Bla-S の濃度を推定できる。

$$\frac{0.6 \mu\text{g/ml} \times 5 \text{ ml}}{100 \text{ g} \times 0.6} = 0.05 \text{ ppm}$$

要 約

(1) Bla-S がそのままの形で残留しているものを定量することを目的とし、抽出、精製を通して Bla-S が分解しない条件を設定した。

(2) Bla-S の定量は Bla-S に選択的に感受性を有する被検菌 *Cladosporium fulvum* を用いる生物検定法によった。

(3) 玄米粉よりの抽出に当っては, Bla-S が窒素を含みかつ水溶性であることに着目して, 窒素量を測ることにより水による抽出条件を選んだ.

(4) 抽出率は3倍量の水を用い pH 4.5, 50°C とし, α -amylase (Kleistase M-16) を 1% 添加して 2 回抽出する方法が最も効果的であった.

(5) 精製にはイオン交換樹脂を用い, 溶存する Bla-S がごく微量であることから, 低架橋度で交換速度が速く親和性が強い Dowex 50 W X-2 の 100~200 mesh のものを選んだ.

(6) 抽出液の pH を 2.0 に下げ, 樹脂の交換容量と抽出液の陽イオン量から, 樹脂容積の 20 倍量を過液した.

(7) 樹脂に吸着した Bla-S は 2 N 以下の塩酸ではほとんど溶出されないので塩酸洗浄によって吸着性の弱い夾雑物だけを除去することができた.

(8) 溶出剤としてのアンモニア水溶液は, その濃度が高くなるにつれて溶出率が低下するので, 濃縮時間お

よび安定性を考慮して 0.1 N とした.

(9) モデル試験によると, 本方法の回収率は 60~80 %で, 検出限度は 0.05 ppm であった.

(10) 日本各地の玄米数点を分析した結果はすべて阻止円を示さず, 検出限度以下であった.

-
- (1) N. Tanaka, Y. Sakagami, T. Nishimura, H. Yamaki and H. Umezawa: *J. Antibiot.*, **14A**, 123 (1961).
 - (2) H. Seto, I. Yamaguchi, N. Ōtake and H. Yonehara: *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 1292 (1968).
 - (3) 見里朝正, 石井 至, 浅川 勝, 沖本陽一郎, 福永一夫: 日植病報, **24**, 302 (1959).
 - (4) H. Yonehara and N. Ōtake: *Tetrahedron Letter*, 3785 (1966).
 - (5) 大岳 望: 農化, **41**, R 1 (1967).
 - (6) N. Ōtake, S. Takeuchi, T. Endo and H. Yonehara: *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 132 (1966).
 - (7) 大岳 望: 化学と生物, **5**, 185 (1967).
 - (8) H. Yonehara, S. Takeuchi, N. Ōtake, T. Endo, Y. Sakagami and Y. Sumiki: *J. Antibiot.*, **16A**, 195 (1963).