有機リン剤の農作物への残留量の定量 について (第5報)

植物体内代謝物の定量

(昭和40年6月2日受理)

奥井 誠一* 秋山 知子*

Determination of Organophosphorus Residues in Plants (V) Metabolic Residues in Vegetables

Sei-ichi OKUI and Tomoko AKIYAMA

(Institute of Pharmacy, School of Medicine Tohoku University:
Kita-4-bancho, Sendai)

Metabolism of two systemic organophosphorus insecticides, disyston and dimethoate, was studied. It was clarified in vitro that P=S group in disyston was first oxidized to P=O group, thereafter -S- group was converted to -SO- and finally to -SO₂-. The presence of these oxidized products in the extracts of vegetables was demonstrated by residual analysis.

Metabolic fate of ³²P-labeled dimethoate was studied with field-treated onion and Walsh onion and oxygen analog was capable of obtaining from metabolite of these plants.

(Received June 2, 1965)

まえがき

農作物に散布された農薬が食品中に残留して人体に影響を与える可能性については食品衛生の立場からWHOはじめ世界各国で問題にしているところである。農作物に付着あるいは浸透した農薬が収穫期までにいろいろな自然条件により分解をうけるが、一方では植物体内で代謝をうけて変化することがアイソトープを用いた実験などにより確認されている。これらの代謝物のあるものは構造や化学的性質も明らかとなっており農薬それ自体よりもかえって毒性が増強される場合もあるという事実は注目に値するが、今回は最近の浸透性の強い農薬ダイシストン、ジメトエートの代謝物について研究を行なった。

有機リン化合物のうち thiophosphate あるいは thioether 基を有するものは植物体内で酸化されるがダイシストンはこの典型的な一つの例で、まず dithiophosphate (>P-S-) が thiophosphate (>P-S- Thiol 型)

となり、ついでその thiophosphate のまま thioether 基(-S-)が sulfoxide(-SO-)となり最終的には sulfone (-SO₂-)体となる¹⁾。植物体内のこれらの酸化作用は過酸化酵素系によると推定されているが本報告では各種酸化法のうちブロム酸化、アスコルビン酸系の酸化、Peroxidase の酸化等、化学的酸化成績体を得、実際に処理した農作物から抽出される代謝物と比較し、同時に各種農作物につきその残留量の定量も行なった。また従来農薬を散布した農作物から農薬を抽出した場合にダイシストンについては原体と異なる代謝物を薄層クロマトグラフィーで確認できたがジメトエートの場合はその抽出物について代謝物を検出できたことはなかったが、今回 ³²P ジメトエートを用いてネギからの代謝物を確認した。

実験方法および試薬

1. 有機リン化合物

- ① Disyston (O,O-Diethyl-S-ethylthioethyl phosphorodithioate) 日本特殊農薬製造株式会社による。10%乳剤を適宜、水で希釈する。
- ② Disyston P=O 体 (O,O-Diethyl-S-ethylthio-

* 東北大学医学部薬学科：仙台市北四番丁85

ethyl phosphorothioate)

- ③ Disyston $P=O$, $S \rightarrow O$ 体 (*O,O*-Diethyl-S-ethylsulfonylethyl phosphorothioate)
- ④ Disyston $P=O$, $S \rightarrow O_2$ 体 (*O,O*-Diethyl-S-ethylsulfonylethyl phosphorothioate) ②, ③, ④については各種酸化法によるダイシストン酸化体の薄層クロマトグラフィーよりの抽出物質を用いた.
- ⑤ Dimethoate(*O,O*-Dimethyl-S-(*N*-methyl carbamoyl methyl) phosphorodithioate) 住友化学株式会社より供与をうけた50%乳剤を適宜, 水で希釈する.
- ⑥ 精製 ^{32}P -Dimethoate 住友化学による.
- ⑦ Dimethoate oxon (*O,O*-Dimethyl-S-(*N*-methyl carbamoyl methyl phosphorothioate) 純度93%, 住友化学による.

2. 酵素液

乾燥人血漿 (プラスマ) (日本製薬株式会社) 160mg をクエン酸 1 ml に溶かし緩衝液で 20 ml とする.

実験方法

1. ブロム酸化法²⁾

酸化しようとする農薬の水溶液に飽和ブロム水を等量加え振とうし反応させ, 反応液をアセトンで抽出して用いる.

2. アスコルビン酸系酸化法³⁾

ワールブルグのフラスコの主室に 2 ml のリン酸緩衝液 (pH 7.2) にアスコルビン酸, 硫酸第一鉄, EDTA を溶かして入れ, さらに30%過酸化水素を 1 滴滴加し, 側室には基質(ダイシストン)を溶解した緩衝液 1 ml を入れて25°で5分間 incubate したのち, 側室のものを主室に流し込み, さらに1時間半酸素をたえず流しながら incubate する.

3. Peroxidase 酸化⁴⁾

Mason らによる方法でワサビ過酸化酵素(H. R. P.)と過酸化水素からなる過酸化酵素系酸化法による.

4. P の定量⁵⁾

Warner らの方法による.

5. 酵素阻害法⁶⁾

Hesterin による比色法を用いた. すなわち薄層クロマトグラフィーからの各抽出液 1 ml を37°に10分間保ったあと酵素液 1 ml を加え, 37°に60分間十分に接触させる. つづいて基質のアセチルコリン液 1 ml を加えてさらに37°, 40分間 incubate し, 残存したアセチルコリンを Hesterin 法により発色させ比色定量する. この系を S とし, 以上の操作のうち抽出液のかわりに蒸留水を加えた系を C, C の系に酵素液と同時にネオスチグミンを加えて酵素反応をとめた系を B, B の系にアセチルコリンを加えず, 代りに緩衝液 (pH 7.4 リン酸緩衝液) 1 ml を加えた系を A とし A 系を対照として測定したそれぞれの吸光度を So, Bo, Co とすれば残効活性度は

$(Bo - So) / (Bo - Co) \times 100(\%)$ として表わされる.

実験結果

1. ダイシストンの酸化体の研究

精製したダイシストンを用い, さきに述べたブロム酸化法, アスコルビン酸, EDTA および Peroxidase を用いる方法の3種の酸化方法でダイシストンを酸化した結果, 3 者ともほぼ同一の結果が得られた. すなわちダイシストンは3つの酸化体 that 得られ, 原体 $P=S$ 体から $P=O$ 体へ, ついで $P=O$, $S \rightarrow O$ 体, そして最終的に $P=O$, $S \rightarrow O_2$ 体を生成し, これらの4 者はシリカゲル薄層クロマトグラフィーで明らかに分離できる. 展開溶媒としてヘキサン:アセトン (4 : 1 v/v) を用いた場合は, Fig. 1 のごとく原体 I, 酸化体 II, III, IV が認められその Rf 値はそれぞれ I = 0.83, II = 0.50, III = 0.18 IV = 0.00 である. (農作物から実際抽出して残留量を定量する場合, 収穫期近くはほとんど IV, すなわち最終酸化体 $P=O$, $S \rightarrow O_2$ 体として残留するのでそれを得ることが目的の場合は展開溶媒をかえてヘキサン:アセトン (2 : 1 v/v) を用いる. その際 IV の Rf 値は 0.20 を示す.)

Fig. 1. Thin-layer chromatogram of oxidized products of disyston

- I disyston ($P=S$) *O,O*-diethyl-S-ethylthioethyl phosphorodithioate
- II $P=O$ *O,O*-diethyl-S-ethylthioethyl phosphorothioate
- III $P=O$, $S \rightarrow O$ *O,O*-diethyl-S-ethylsulfonylethyl phosphorothioate
- IV $P=O$, $S \rightarrow O_2$ *O,O*-diethyl-S-ethylsulfonylethyl phosphorothioate

この4 点に相当するシリカゲル部分を削り落しアセトン少量にて温時数回抽出する. この抽出物について P の定量と酵素阻害法を試みその結果を Table 1 に示した. この表に示すごとくダイシストンは各酸化によって酵素阻害力が増強され約 300 倍ほどに上昇することが認められた.

Table 1. Oxidized Substances of Disyston Produced by Some Oxidative Treatments and ID_{50} of Each Product for Human Plasma Cholinesterase

	Treatment	Original disyston P=S	Oxidized products		
			P=O	P=O, S→O	P=O, S→O ₂
Ratio (%)	Bromine treatment	17 (%)	64 (%)	15 (%)	4 (%)
	Ascorbic acid-Fe ²⁺	63	31	4	2
	Peroxidase oxidation	29	29	42	0
ID_{50} (M)		1.64×10^{-4}	1.75×10^{-6}	9.8×10^{-7}	5.2×10^{-7}

2. ネギによるダイシストン代謝物の消長

農作物の残留試験を行なう場合、上記の酸化成績体が実際に検出されるか否かを知るためにネギを用いてダイシストン代謝物の経時的消長をみた*。実際の方法としてはダイシストン粒剤を株当たり 0.3 g の割合で土に埋めネギを植えたのち、10日ごとに採取しほぼ収穫期近くの60日後まで追跡を行なった。各期間において採取したネギについては薄層クロマトグラフィーを利用してそれぞれPの定量と酵素阻害法を行なった。その結果をTable 2に示す。

Table 2. Appearance of Disyston and Its Metabolites in Welsh Onion (ppm)

Period of treatment (days)	Parent compound	Oxidized products		
		P=O	P=O, S→O	P=O, S→O ₂
10	2.1	0.02	0.02	0.03
10*	1.7	0.04	0.03	0.02
20	2.5	0.06	0.03	0.04
30	1.0	0.02	0.02	0.02
40	0.3	below 0.01	0.02	0.02
60	below 0.01	below 0.01	0.01	0.02

* Sample was grown on disyston-free soil for ten days after the 10-days treatment, whereas other samples were analyzed simultaneously after the treatment

以上のごとくダイシストン原体はほぼ30日以後は急速に減少するが酸化体も比較的早く検出される。処理20日後残留量はそれぞれ最も高い値を示すが処理60日後の収穫期近くにはほとんど最終酸化体である P=O, S→O₂ 体のみが認められることが明らかになった。

3. ダイシストンの農作物への残留量の定量

実際にダイシストン処理した農作物玉ネギ、パレイシヨ等につき農薬の残留量の定量を行なった。クリーンア

* この圃場試験は千葉大学園芸学部野村健一教授によって行なわれたものである

ップについては常法どおり行ない⁷⁾、それについて薄層クロマトグラフィーによって明らかに最終酸化体である P=O, S→O₂ 体のただ一つのスポットを認めることができ、またこの方法によって分離抽出されたものについて酵素阻害試験を行なった。以下実際に農場で処理収穫された二、三の残留試験結果を示す。

例 I

供試試料 パレイシヨ、男爵、昭和39年3月19日播種
供試薬剤 ダイシストン、3 kg/10 a, 6 kg/10 a, 9 kg/10 a

試験期日 昭和39年4月28日、一本仕立後株の南側の畦を削り株元に薬剤を施用した後、覆土

収穫期日 昭和39年8月22日

結 果

3 kg/10 a 代謝酸化体として (一)
6 kg/10 a " 0.08 ppm
9 kg/10 a " 0.12 ppm

例 II

供試試料 玉ネギ、昭和39年5月20日播種

供試薬剤 ダイシストン粒剤、3.6kg/10a, 5.4kg/10a, 7.2kg/10a

試験期日 昭和39年5月20日 施肥後薬剤を条施用
同日玉ネギを移植

収穫期日 昭和39年10月3日

結 果

対照区 土
3.6kg/10a } ほとんど残留を認めず
5.4kg/10a }
7.2kg/10a 代謝酸化体として 0.06 ppm

4. ジメトエートの酸化体

根のついているタマネギ、長ネギをおのおの土を盛ったビーカーに入れ一定量の ³²P ジメトエートを入れた。その後 ³²P ジメトエートがどのあたりまで浸透されたかをサーベーターで追跡し適当な高さまで浸透した6日後、根から7 cm より切り取り、常法により抽出し薄層クロマトグラフィーを利用してラジオオートグラムをとった。Fig. 2のごとく展開溶媒クロロホルム：メタノー

ル (20:1 v/v) の場合, R_f 値 0.27 の明らかに代謝物と認められる点が得られた。

Fig. 2. Radioautogram of ^{32}P -dimethoate and its metabolite

さらにこの薄層クロマトグラフィーについての P の定量とカウント数測定の結果を Table 3 に示す。

Table 3. Distribution of Radioactivity and Residue Analyses of Dimethoate in Vegetable after the 6-Days Treatment of ^{32}P -dimethoate

		C.P.M./10g wet weight	ppm
Onion	dimethoate	1616	0.67
	metabolite	285	0.12
Walsh onion	dimethoate	1470	0.04
	metabolite	124	—

Table 3 から原体と代謝物が約 6 対 1 の比率で生成されたことがわかる。この代謝物はジメトエートの植物体内代謝の主要な経路であるジメトエートの $\text{P}=\text{S}$ の部分が $\text{P}=\text{O}$ となった oxygen analog であろうと推定され、この物質を得るためにダイシストンと同様アスコルビン酸系酸化法を行なった。その酸化体の抽出物についての薄層クロマトグラフィーの結果は Fig. 3 のごとくである。

Fig. 3 の示すごとく $R_f=0.56$ のジメトエート自体以外に $R_f=0.25$ の大きなスポット、その他、小さなスポットが 3 点現われる。それぞれの抽出物について P の定量と酵素阻害を行なった結果、 $R_f=0.25$ の点が他の 4 点よ

Fig. 3. Thin-layer chromatogram of oxidized products of dimethoate by ascorbic acid- Fe^{2+} oxidation

りはるかに酵素阻害力を有し、ジメトエート原体の約 20 倍前後に酵素阻害力が增強される。ジメトエートの代謝物は各種あるが酵素阻害力が增強するのは、まず $\text{P}=\text{O}$ 体と考えられるため、 $R_f=0.25$ の部分をジメトエートの oxygen analog と推定した。その後、住友化学工業株式会社農薬研究室よりジメトエートの $\text{P}=\text{O}$ 体が入手でき、それについて薄層クロマトグラフィーを行なった結果前記の展開溶媒で確かに R_f 値の一致をみた。

5. ジメトエートの農作物への残留量の定量

ジメトエートの 5% 粒剤処理を行なった実際の農作物長ネギ、パレイショなどについて残留試験を行なった。以下二、三の残留試験結果を示す。

例 I

試験地 千葉県松戸市栗山、高安氏圃場
供試試料 ネギ、昭和39年7月21日に苗を定植
供試薬剤 ジメトエート 5% 粒剤、0.3 g/株
試験期日 昭和39年7月21日、薬剤は根際に施す

結 果

処理10日後 0.51 ppm
処理30日後 0.54 ppm
処理60日後 0.10 ppm

例 II

試験地 札幌市琴似町八軒、農林省北海道農業試験場
供試試料 パレイショ、紅丸、昭和39年4月30日播種
供試薬剤 ジメトエート 5% 粒剤、1 g/1株、2 g/1株
試験期日 播種期日に同じ。播種溝に施肥後薬剤を条播し、その上にタネイモを播き覆土
収穫期日 昭和39年10月2日

結 果

1 g 区 I	0.15 ppm
1 g 区 II	0.10 ppm
1 g 区 III	±
2 g 区 I	0.25 ppm
2 g 区 II	0.32 ppm
2 g 区 III	0.20 ppm

む す び

以上浸透性有機リン剤ダイシストンとジメトエートについて植物体内代謝物についての研究を行ない、これらが実際に農作物より検出可能であることを認めたが、これらの結果は現在問題となっている農薬の農作物への残留という立場からも当然考慮に入れなければならないと考える。しかしながら現在すべての有機リン剤についてこれらの植物体内代謝の詳細が明らかになっているとはいえない段階にあるので今後この分野の研究はさらに必要であろう。

最後にダイシストン代謝物の経時的消長の分析資料をいただいた野村健一教授、実際の農作物の分析資料をいただいた千葉大学園芸学部、北海道農業試験場、日本特殊農薬製造株式会社、住友化学工業株式会社、さらに種々実験の手伝いをされた真田敬子、横山良子、山本征子の諸氏に感謝する。なお本実験の一部は文部省科学研究費の一部を使用したもので併せて感謝の意を表する。

付 記

本研究に関連のある第1報は「法医学の実際と研究」Vol. 8, 9頁(1962)に報告され、第2報～第4報は収穫物中の有機リン剤の実際の残留量を測定した結果について口頭発表〔第2報 第17回日本薬学大会(1963), 第3報 第3回日本薬学会東北支部大会(1963), 第4報 第4回日本薬学会東北支部大会(1964)〕を行なったもので「浸透性殺虫剤に関する試験研究成果」(1960～1964: 代表者 名古屋大学 弥富喜三教授)に収載されている。

この報文の要旨は、第20回日本薬学大会(昭和40年4月7日、福岡)において発表、

文 献

- 1) R. L. Metcalf, H. T. Reynold et al.: J. Econ. Entomol. **52**, 435 (1959).
- 2) H. O. Fallscheer, J. W. Cook: J. Assoc. Offic. Agr. Chemists **39**, 691 (1956).
- 3) J. B. Knaak, M. A. Stahmann, J. E. Casida: J. Agr. Food Chem. **10**, 154 (1962).
- 4) H. S. Mason, I. Onopryenko, D. Buhler: Biochim. et Biophys. Acta **24**, 225 (1957).
- 5) P. S. Chen, T. Y. Toribara, H. Warner: Anal. Chem. **28**, 1756 (1956).
- 6) S. Hesterin: J. Bio. Chem. **180**, 249 (1949).
- 7) 厚生省薬務局編: “農薬衛生試験法”(1964).