

平成 21 年 6 月 22 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19890282
 研究課題名（和文） 米試料中農薬類のモニタリング調査

研究課題名（英文） Monitoring of pesticides in rice

研究代表者

大竹 貴光（TAKAMITSU OTAKE）

独立行政法人産業技術総合研究所・計測標準研究部門・研究員

研究者番号：60443173

研究成果の概要：一般に流通する米に含まれる農薬類 10 種のモニタリング分析を、加圧流体抽出法（PLE）を用いた方法により行った。PLE 条件は温度: 130 °C, 圧力: 10 MPa, 時間: 10 分×2 サイクルが最適であることを示し、そのときの対象農薬類の回収率は 83-109%と十分であった。この方法により米 54 試料を分析した結果、玄米 1 試料から殺菌剤 ferimzone が検出されたが、低濃度で健康等に問題がないレベルであった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,320,000	0	1,320,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：環境分析

科研費の分科・細目：公衆衛生学・健康科学

キーワード：環境分析、食品分析、農薬、モニタリング、米

1. 研究開始当初の背景

近年、食品関連の問題として、牛海綿状脳症（BSE）や食中毒、鳥インフルエンザだけでなく、偽装・不正表示や農薬混入事件などにより、一般消費者による食品の安全安心に対する関心が一層高まっている。特に食品中の農薬については、わが国において一定量を超えて農薬等が残留する食品の販売等を禁止する、いわゆる「ポジティブリスト制度」が平成 18 年 5 月に導入されたことも、関心を高める要因の 1 つとなっている。農薬は、病気や害虫などから農作物を守るため、および労働力の削減を目的として使われている

が、使用量を適切にしなければ食品に農薬が残留することもあり、それを食すことによって食品経路で農薬に曝露することが考えられ、場合によってはヒトの健康に悪影響を及ぼすこともある。

有機塩素系農薬類のような化学物質は、魚介類摂食が重要な曝露経路であることが示唆されている⁽¹⁾。したがって魚介類中の化学物質を分析し、その結果からヒトの曝露量を推定し、さらには健康影響との関連調査やリスクアセスメントを行うことが可能である。特に日本では魚介類の摂取量が多いこともあり、魚摂取に伴う化学物質曝露と健康影響

との関連が注目を集め、平成 15 年には、魚介類を通じたメチル水銀曝露による胎児への影響を考慮し、妊婦と妊娠の可能性のある女性に対し、厚生労働省から魚介類等の摂取に関する注意事項が公表された²⁾。世界的には、魚介類摂取量が比較的多い地域で、化学物質曝露と健康影響に関する疫学調査が行われており、例えば魚摂取量、及び PCBs 曝露と甲状腺ホルモンレベルへの影響が関連していることなどを示唆しているものもある³⁾。このように、食品経由の化学物質曝露とヒトへの健康影響を調査することが重要となっているが、食品や化学物質の種類という観点から考えると、食品経由の化学物質曝露について未だ十分に経口曝露評価が行われていないというのが現状である。

本研究では、米を摂取することに伴う農薬類曝露に着目した。日本における米の消費量は、魚介類と同様に多いにもかかわらず、米摂取による化学物質曝露と、健康影響の関連調査を行っている研究は、非常に限られている。そこで、日本国内の米を中心に、健康影響との関連調査の基盤となる、米摂取による農薬類の曝露量評価を行うという着想に至った。

2. 研究の目的

本申請研究では、将来的に食品経由の農薬類曝露量評価を行うための下地として、国内を中心とする米試料中の農薬類の濃度レベルをモニタリングすることを目的とし、研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 米試料

国内の米店から、54 試料を購入した。このうち、52 試料が国内産（産地は全国にわたるよう選択）、2 試料が外国産であり、33 試料が玄米、21 試料が白米であった。試料は購入後、ミキサー（Mixer B-400; BÜCHI Laboratory Equipment）により粉碎し、分析するまで-20℃で保管した。

(2) 試薬

標準品として、農薬混合標準液（No. 26, 関東化学株式会社）及び ferimzone (Dr. Ehrenstorfer GmbH) を用い、この中から日本で使用量が多いとされる 10 種の農薬をモニタリング分析の対象とした。すなわち、chlorpyrifos, EPN, etofenprox, fenitrothion, fenobucarb, ferimzone, fthalide, isoprothiolane, malathion, mepronil を対象とした。内標準物質には fenitrothion-d₆ (Dr. Ehrenstorfer GmbH), シリンジスパイクには isoprothiolane-d₄ (林純薬工業株式会社) を用いた。検量線用の標準液は、上記の農薬類、内標準物質、シリンジスパイクを混合し

て調製した。

その他、アセトニトリル、ヘキサン、酢酸エチル、トルエン（以上、残留農薬試験・PCB 試験用・5000 倍濃縮）、無水硫酸ナトリウム（残留農薬試験・PCB 試験用）、塩化ナトリウム（特級）を用いた。

(3) 米中農薬類の分析

① 抽出と精製

米試料約 5 g を加圧流体抽出 (PLE) 用のセル (11 mL) に取り、適量の無水硫酸ナトリウムを加えて混合し、この試料に内標準物質を添加した。これを PLE システム (ASE 200; Dionex) にセットし、溶媒にアセトニトリルを用いて 130℃（回収率の検討では 40, 80, 130, 150℃）, 10 MPa, 10 分×2 サイクルの条件で抽出を行った。

抽出液を分液漏斗に移し、塩化ナトリウム (7.0 g), アセトニトリル飽和ヘキサン (50 mL) と共に 15 分間振とうした。下層（アセトニトリル層）を回収し、上層（ヘキサン層）はアセトニトリル 50 mL と共に再度 15 分間振とうした。回収したアセトニトリル層を無水硫酸ナトリウムで脱水し、ろ過を行ってから、ロータリーエバポレーターと窒素ガスにより溶媒を蒸発、乾固させた。この試料に、トルエン/酢酸エチル (1:4, v/v) 5 mL を添加し、固相抽出 (SPE) カートリッジにより精製した。SPE カートリッジにはグラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム (500 mg/500 mg, ENVI-Carb/LC-NH₂, Supelco) を用い、トルエン/酢酸エチル (1:4, v/v) 10 mL を流した後に試料を添加し、25 mL のトルエン/酢酸エチル (1:4, v/v) で溶出を行った。この試料の溶媒をロータリーエバポレーターと窒素ガスにより蒸発、乾固させ、シリンジスパイクを 0.2 mL 加えて試験溶液とした。

② GC/MS による農薬類測定

①により得られた試料中の農薬類は、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS, GC: Hewlett-Packard (HP) 6890, MS: HP5975) により測定した。測定は、カラムに DB-5MS（長さ: 30 m, 内径: 0.25 mm; Agilent Technologies) を用い、オンカラムモード（注入量: 0.5 μL）で行った。キャリアガスにはヘリウム (1.0 mL/min.) を用い、注入口温度は oven track mode とした。カラム温度は、次のようにセットした: 50℃ (2 分) → 20℃/min → 180℃ (5 分) → 3.0℃/min → 300℃ (3 分)。定性は scan モード (m/z 50~450)、定量は SIM モードで行い、モニターイオンは次の通りであった（下線のイオンを定量に用いた）。: chlorpyrifos: 197, 258; EPN: 157, 169; etofenprox: 163, 135; fenitrothion: 277, 125; fenitrothion-d₆: 283, 131; fenobucarb:

121, 150; ferimzone: 239, 132; fthalide: 243, 272; isoprothiolane: 162, 290; isoprothiolane-d₄: 166, 294; malathion: 173, 158; mepronil: 119, 91

③ 添加回収率試験

農薬混合標準液の約 0.2, 0.02 μg を米試料に添加して行った。ここで用いた米試料は、ブランク試験により対象農薬類が検出されないことを確認した後に、回収率試験に使用した。分析は、(3)①、②と同様に行った。

4. 研究成果

本研究では、米試料中の農薬類モニタリングに必要な簡便かつ精確な分析法の検討を行い(下記(1)~(3))、それをモニタリングに適用した(下記(4))。これらの結果を示す。

(1) 検量線、検出下限、定量下限

測定対象とした各農薬 10 種に対する検量線の直線性を確認するため、標準液を段階的に希釈、調製したものを GC/MS で測定した。結果を表 1 に示す。これより、検量線の相関係数は 0.996 以上と良好であった。また、標準液の濃度が 0.1 $\mu\text{g/g}$ のときの併行精度を求め、相対標準偏差 (Relative Standard Deviation, RSD) を計算した結果、0.4-3.4 % と良好であった (n = 4)。装置の定量下限 (Instrumental Quantification Limit, IQL), 及び装置の検出下限 (Instrumental Detection Limit, IDL) も表 1 に示した。

表 1 検量線の直線性、装置の定量下限・検出下限、Method Quantification Limit, Method Detection Limit

pesticide	correlation coefficient, r	RSD at	IQL	IDL	MQL	MDL
		0.1 $\mu\text{g/g}$	(pg)	(pg)	(ng/g)	(ng/g)
chlorpyrifos	0.9979	0.7	16	5.3	1.2	0.4
EPN	0.9989	1.3	12	4.0	1.2	0.4
etofenprox	0.9963	1.2	12	4.0	1.2	0.4
fenitrothion	0.9993	2.5	24	7.9	2.1	0.7
fenobucarb	0.9984	0.7	6.0	2.0	0.6	0.2
ferimzone	0.9996	3.4	24	7.9	2.4	0.8
fthalide	0.9975	1.0	16	5.3	1.5	0.5
isoprothiolane	0.9984	0.6	6.0	2.0	0.6	0.2
malathion	0.9976	0.6	12	4.0	0.9	0.3
mepronil	0.9977	0.4	8.4	2.8	0.9	0.3

(標準液濃度が 0.1 $\mu\text{g/g}$ のときの併行精度は Relative Standard Deviation (RSD) で示した(n = 4); IQL はシグナル・ノイズ比 (S/N) = 10, IDL は S/N = 3 と定義した。)

(2) Method Quantification Limit, Method Detection Limit

本研究における Method Quantification Limit (MQL), Method Detection Limit

(MDL) を表 1 に示した。MDL は実試料中から検出できる測定対象農薬類の最小濃度とし、供試料量 (5 g)、前処理後の試料最終液量 (0.2 mL)、各対象農薬類の回収率、GC-MS 試料注入量 (0.5 μL)、IDL から求めた。また、MQL は MDL を 3 倍することで求めた。表 1 の MQL, MDL の結果より、本研究で行った PLE を用いた方法は、十分な感度で米試料中の残留農薬分析に適用できることを示した。

(3) PLE 条件の最適化と添加回収率試験

① PLE 条件の最適化

食品中の農薬類分析においては、ポジティブリストにおける分析法でも使用されていることから、抽出にホモジナイズ法が適用されることが多い。一方で、近年は様々な抽出法が開発されており、その中の 1 つに PLE がある。PLE は高温高压を利用した方法で、効率的な抽出を可能としているが、農薬によっては高温で分解する可能性があり、また米試料中の農薬類分析に適用された例がほとんどないことから⁴⁾、検討が必要であった。

本研究でモニタリング対象となっている 10 農薬のうち、etofenprox, fenitrothion, fthalide, isoprothiolane の 4 種については、既往の研究において、すでに PLE 条件を確立した⁵⁾。そこで、本研究では他 6 種 (chlorpyrifos, EPN, fenobucarb, ferimzone, malathion, mepronil) の農薬類に対する PLE 条件の検討を行ったが、ここでは抽出率と農薬類の分解にもっとも大きく影響する温度のみの検討を行い、抽出溶媒、時間、サイクル数などは、既往の研究に従った⁶⁾。検討は、対象農薬類各 0.02 μg を、農薬類が検出されないと確認されたブランク米試料に添加することによって行った。結果を図 1 に示す。

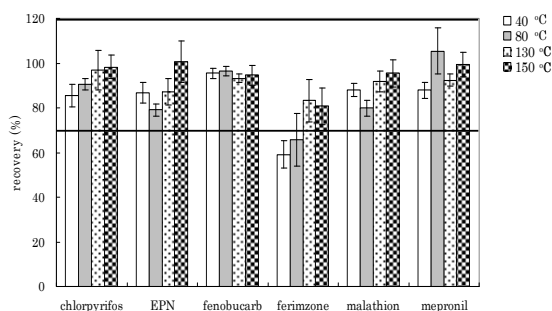


図 1 対象農薬類 6 種に対する PLE 温度条件の検討

(棒グラフは平均値、エラーバーは標準偏差 SD を示す; 図中の横線はポジティブリスト法で評価され、十分と判断された回収率の範囲 70-120%を示す; n = 5)

現在、ポジティブリストにおける方法では70-120%の間に回収率がおさまっていれば、分析上特に問題ないとされている。図1を見ると、ほとんどの温度条件で十分な回収率が得られたものの、ferimzoneの40, 80℃で不十分な結果となった。したがって、対象農薬類を一斉分析するためには、40, 80℃では不十分であり、130または150℃で抽出する必要がある。しかし、不必要に高温で抽出することにより、目的物質以外もより多く抽出されてしまい、場合によっては分析の妨害物質となってしまうことが考えられる。さらに、130と150℃の間には、有意差は見られなかった(一元配置分散分析, analysis of variance (ANOVA))。そこで、本研究では130℃を最適な抽出温度とした。これは、モニタリング対象物質のうち、既往の研究で検討された4種と同じ抽出温度であった。

② 添加回収率試験

(3)の①で最適化したPLE条件である130℃により、添加回収試験を実施した。目的農薬類の添加量は2段階とし、0.2 μg及び0.02 μgとした。結果を表2に示す。

表2 PLE130℃における添加回収試験結果

pesticide	spiked amount: 0.2 μg		spiked amount: 0.02 μg	
	Mean ± SD (%)	RSD (%)	Mean ± SD (%)	RSD (%)
chlorpyrifos	92 ± 1	1.3	97 ± 9	9.0
EPN	109 ± 6	5.2	87 ± 6	6.8
fenobucarb	91 ± 2	2.3	93 ± 2	2.1
ferimzone	84 ± 5	6.1	83 ± 10	11
malathion	90 ± 2	2.7	92 ± 5	4.9
mepronil	106 ± 4	3.9	92 ± 3	3.1

(n = 5)

表2より、回収率は0.2 μg添加のとき84-109%、0.02 μg添加のとき83-97%となり、高濃度、低濃度ともに十分な結果が得られた。このときの併行精度をRSDであらわすと、0.2 μg添加のとき1.3-6.1%、0.02 μg添加のとき2.1-11%となり、PLEを用いた方法を米試料の分析に適用するには十分な精度であることも示した。これらの結果より、(3)①の結果と合わせ、後述する(4)で示すモニタリング分析を130℃で行うこととした。

これまで多く使われてきたホモジナイズを用いた分析法では、溶媒使用量が多く(約100 mL)、操作が煩雑であるという問題点があった。本研究で検討したPLEを用いた方法は、より少ない溶媒使用量で抽出ができ(約30 mL)、自動化も可能である。実験の結果から、正確な定量も可能であることから、ルーチン分析法の1つとしてモニタリング等

にも十分適用できると考えられる。

(4) 米中農薬類モニタリング

市販の米54試料における農薬類分析を行った。その結果、玄米1試料よりferimzoneが検出され(164 ng/g)、他の53試料からは対象農薬類は検出されなかった。Ferimzoneはイネのいもち病などに高い防除効果を示す殺菌剤である⁽⁶⁾。分析結果より、一日の一人当たりの米摂取量を184.6 gとすると⁽⁷⁾、ferimzoneへの一日曝露量は: 164 ng/g × 184.6 g = 30274 ng となる。一方で、ferimzoneのラットにおける慢性毒性と発がん性に対する無毒性量(no-observed-adverse-effect-level, NOAEL)に基づき、一日許容摂取量(Acceptable Daily Intake, ADI) 19 μg/kg/dayが示唆されており⁽⁸⁾、平均体重を64 kgと仮定⁽⁹⁾すると、ADIは1.2 mg/dayと計算できる。これより、上記した本研究の結果を考慮すると、ADIの約2.5%に相当することになり、これはADIに比べて十分に低い値であることがわかる。

本研究におけるモニタリング調査は、試料及び対象農薬類の数が限られており、食品摂取を通じた農薬類経口曝露と健康影響の関係を調査するためには、さらなる研究が必要であると考えられる。

(5) まとめ

本研究では、簡便かつ正確なPLEを用いた分析法により、54種の米試料に含まれる農薬10種の濃度レベルをモニタリングできた。既往の研究において、米試料中農薬類をモニタリングしている例は少なく、今後、米を摂取することによる農薬類の曝露量調査を行う上で貴重なデータの1つとなるであろう。また将来的には、さらに試料数を増やし、農薬類曝露と健康影響の関連調査をしていくことも必要だと考えられる。

●参考文献

- (1) Moysich, K. B. et al., *Am. J. Ind. Med.*, 2002, 41, 102-110.
- (2) 厚生労働省, 水銀を含有する魚介類等の摂取に関する注意事項, 2003, <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2003/06/s0603-3.html>
- (3) Persky, V. et al., *Environ. Health. Perspect.*, 2001, 109, 1275-1283.
- (4) Cho, S.-K. et al., *Biomed. Chromatogr.*, 2007, 21, 602-609.
- (5) Otake, T. et al., *J. Environ. Sci. Health Part B-Pestic. Contam. Agric. Wastes.*, 2008, 43, 390-394.
- (6) 松浦一穂ら, *J. Pesticide Sci.*, 1994, 19, S197-S207
- (7) 農林水産省, 食料需給表, 2007, <http://www.maff.go.jp/j/zyukyu/fbs/index.html>
- (8) 食品安全委員会, (案) 農薬評価書 フェリムゾン, 2008, <http://www.fsc.go.jp/iinkai/i-dai257/dai257>

kai-siryou2-2.pdf (9) International
Commission on Radiological Protection,
Report of the Task Group on Reference
Man; Pergamon Press, Publication No.23:
Oxford, UK, 1974.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① 大竹貴光、青柳嘉枝、鎗田孝、
Multiresidue Analysis and Monitoring
of Pesticides in Rice by Pressurized
Liquid Extraction、J. Environ. Sci.
Health Part B- Pestic. Contam. Agric.
Wastes、in press (Vol. B44, No. 5 (ペー
ジ未定) に掲載予定)、査読有

[学会発表] (計 1 件)

- ① 大竹貴光、青柳嘉枝、松尾真由美、伊藤
信靖、鎗田孝、Evaluation of Pressurized
Liquid Extraction for the Analysis of
Eight Pesticides in Unpolished Rice, 4th
Pan Pacific Conference On Pesticide
Science (Honolulu, Hawaii)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大竹 貴光 (OTAKE TAKAMITSU)
独立行政法人産業技術総合研究所・計測標
準研究部門・研究員
研究者番号：60443173

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし