

## ばれいしょ由来デンプンによる農薬の吸着とその糊化を利用した抽出

### Adsorption of Pesticides by Potato Starch and Utilizing Starch Gelatinization for Extraction of Pesticides Adsorbed to Potato Starch

岡部 亮 柿本洋一郎 青柳 光敏

Ryo OKABE, Youichiro KAKIMOTO and Mitsutoshi AOYAGI

**Key words :** potato starch (ばれいしょ由来デンプン) ; pesticide (農薬) ; adsorption (吸着) ; extraction (抽出) ; gelatinization (糊化)

#### 緒 言

我々は道内に流通する輸入農産加工食品中の残留農薬検査を行っており、ばれいしょ由来デンプン (potato starch : 以下 PS とする) も検査対象としている<sup>1)</sup>。検査では、PS のように含水率の低い乾燥試料の場合、農薬の抽出効率向上のため、試料に水を加えて浸漬を行った後にアセトニトリルなどの溶媒を加えて抽出を行っている。しかしながら、PS を用いた添加回収試験において、水浸漬が特定の農薬に対して回収率の低下を引き起こす事例が認められた。我々は、この原因として、回収率の低下した農薬におけるオクタノール/水分分配係数 ( $\log P_{ow}$ ) の値が 2.5~3.99 であり、疎水性が比較的高かったことから、浸漬水がキャリアー溶媒となり、農薬が疎水性相互作用で PS に吸着されたことを報告している<sup>2)</sup>。

このようなデンプンによる農薬吸着に関して、農薬の親水性及び疎水性に着目した研究報告は見られなかったことから、我々は、これらの物性と PS による吸着量の関係、また、吸着された農薬の抽出方法について注目した。

そこで本稿では、 $\log P_{ow}$  の値が -0.55~6.37 と幅広く異なる 10 種類の農薬を用いて、水中からの PS への各農薬の吸着量と  $\log P_{ow}$  の関係について検討した。また、農薬を吸着させた後に水分を除去した PS (Pesticides-Adsorbed PS : 以下 PAPS とする) を試料として、吸着された農薬を抽出する方法についても検討した。その結果、疎水性の高い農薬ほど PS への吸着量が多い傾向が認められ、また、吸着された農薬はデンプンを糊化させることで効率的に抽出することが可能であったので、以下に詳細を述べる。

#### 方 法

##### 1. 澱粉

PS は富士フィルム和光純薬(株)製の一級を用いた。

##### 2. 対象農薬

検討対象とした 10 種類の農薬を表 1 に示す。

##### 3. 試薬

農薬標準品：富士フィルム和光純薬(株)製の残留農薬試験用を用いた。

標準原液：各農薬の標準品 25 mg を精密に秤量し、アセトンに溶解して 500 mg/L の濃度で調製した。

農薬混合標準溶液：各農薬の標準原液を混合した後、アセトンで希釈し、30 mg/L の濃度で調製した。

検量線作成用標準溶液：農薬混合標準溶液をメタノールで希釈し、0.000375~0.015 mg/L の濃度で調製した。

試薬及び溶媒：試薬類はいずれも関東化学(株)製または富士フィルム和光純薬(株)製を用いた。アセトニトリル及びアセトンは残留農薬・PCB 試験用を、試験溶液調製に使用した水は高速液体クロマトグラフィー用を、液体クロマトグラフータンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) による測定に使用した水及びメタノールは LC-MS 用を、酢酸アンモニウムは試薬特級を用いた。

##### 4. 装置

ホモジナイザーは IKA Laboratory Technology 社製ウルトララックス T 25 デジタルにシャフトジェネレーター S 25 N-18 G を装着し、使用した。恒温器はヤマト科学(株)製 DF-62 を用いた。LC-MS/MS の LC 部は(株)島津製作所製 Prominence 高圧グラジエントシステムを、MS/MS 部は(株)島津製作所製 LCMS-8050 を用いた。

##### 5. LC-MS/MS の測定条件

###### 1) LC 条件

カラムはジーエルサイエンス(株)製 Inertsil ODS-4 (2.1 × 150 mm、3 μm) を用いた。カラム温度は 40℃、移動相は 5 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液 (A 液) 及び 5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液 (B 液)、流量は 0.2 mL/min、グラジエント条件は B 液 10% (0 分)→B 液

表1 分析対象化合物とMS/MS測定条件

農薬名	定量イオン		CE	定性イオン		CE
	<i>m/z</i>			<i>m/z</i>		
ジノテフラン	203.0	> 129.1	13	203.0	> 113.1	12
チアメトキサム	292.0	> 211.1	13	292.0	> 181.0	24
チアクロプリド	253.1	> 126.1	22	253.1	> 90.1	38
メタラキシル	280.0	> 220.0	14	280.0	> 192.1	19
アゾキシストロビン	404.2	> 344.1	26	404.2	> 372.1	16
ボスカリド	342.9	> 307.0	20	342.9	> 140.0	21
シアゾファミド	325.1	> 108.0	16	325.1	> 261.0	10
ピラクロストロビン	390.1	> 194.1	15	390.1	> 163.1	27
チオベンカルブ	257.9	> 125.0	18	257.9	> 89.0	49
ピリダベン	365.0	> 147.2	27	365.0	> 309.2	12

CE : Collision Energy (V)

95% (20分)→B液 95% (30分)、注入量は2  $\mu$ Lとした。

## 2) MS/MS条件

イオン化法はESI (ポジティブモード)、測定モードは多重反応モニタリング (MRM) とした。脱溶媒管 (DL) 温度は250℃、ヒートブロック温度は400℃、ネブライザーガス流量は3.0 L/min、ドライガス流量は10.0 L/min、ヒータリングガス流量は10.0 L/min、インターフェイス温度は300℃、インターフェイス電圧は6 kVに設定した。また、各農薬の定量イオン及び定性イオンを表1に示す。

## 6. PAPSの調製

## 1) 調製

三角フラスコにPSを50.0 g量り採り、水100 mLを加えて懸濁させた後、30 mg/Lの農薬混合標準溶液1 mLを加えて25℃で適宜かくはんしながら60分間浸漬を行った後、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物をバットに移し入れ、1日間室温で放置して自然乾燥したものを均一化し、PAPSとした。

## 2) 吸着率

6. の1) 調製の吸引ろ過で得られたろ液をアセトニトリルで500 mLに定容し、「PS添加ろ液」とした。また、三角フラスコにPSを加えずに、6. の1) 調製と同様の操作を行い、得られたろ液を「PS未添加ろ液」とした。両ろ液中の農薬をLC-MS/MSで測定し、以下の式からPSへの吸着率を算出した。本試験は2併行で実施し、その平均値で結果を算出した。

$$\text{吸着率 (\%)} = [(A_{\text{未添加}} - A_{\text{添加}}) / A_{\text{未添加}}] \times 100$$

$A_{\text{未添加}}$  : PS未添加ろ液中の各農薬のピーク面積

$A_{\text{添加}}$  : PS添加ろ液中の各農薬のピーク面積

## 7. PS及びPAPSの固形分率

PS及びPAPSを1.00 g量り採り、105℃の恒温器で4時間乾燥し、以下の式から固形分率を求めた。本試験は3併行で実施し、平均値で結果を算出した。

$$\text{固形分率 (\%)} = (W_{\text{乾燥後}} / W_{\text{乾燥前}}) \times 100$$

$W_{\text{乾燥後}}$  : 乾燥後の重量 (g)

$W_{\text{乾燥前}}$  : 乾燥前の重量 (g)

## 8. 試験溶液調製法

PAPSを2.0 g量り採り、以下の1)～4)の方法に従って、試験溶液を調製した。

## 1) A法

試料にアセトニトリル50 mLを加えてホモジナイズした後、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトニトリル20 mLを加えてホモジナイズした後、吸引ろ過した。ろ液を合わせて100 mLに定容し、試験溶液とした。

## 2) B法

試料に水20 mLを加えて、30分間放置した。アセトニトリル50 mLを加えてホモジナイズした後、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトニトリル20 mLを加えてホモジナイズした後、吸引ろ過した。ろ液を合わせて100 mLに定容し、試験溶液とした。

## 3) C法

試料に水20 mLとアセトニトリル50 mLの混合溶媒を加えてホモジナイズした後、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトニトリル20 mLを加えてホモジナイズした後、吸引ろ過した。ろ液を合わせて100 mLに定容し、試験溶液とした。

## 4) D法

試料に水20 mLを加えて、沸騰水浴中で1分30秒間かくはんしながら加熱した後、室温まで放冷した。ここにアセトニトリル50 mLを加えてホモジナイズした後、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトニトリル20 mLを加えてホモジナイズした後、吸引ろ過した。ろ液を合わせて100 mLに定容し、試験溶液とした。

## 9. 定量

検量線は、検量線作成用標準溶液をLC-MS/MSで測定して得られたピーク面積から作成した。同様に試験溶液をLC-MS/MSで測定し、得られたピーク面積を用いて絶対検量線法により農薬を定量した。

## 10. 抽出率

A、B、C及びD法による各農薬の抽出率は以下の式から算出した。

$$\text{抽出率 (\%)} = (Q/q) \times 100$$

Q : PAPS 中の各農薬の定量値 (mg/kg)

q : PAPS 中の各農薬の推定含有量 (mg/kg)

Q は以下の式から算出した。

$$Q = (C \times 0.1) / 0.002$$

C : PAPS から調製した試験溶液中の各農薬の濃度 (mg/L)

0.1 : 最終検体量 (L)

0.002 : 試料採取量 (kg)

q は以下の式から算出した。

$$q = (0.03 \times \alpha / 100) / w$$

0.03 : 農薬の添加量 (mg)

$\alpha$  : 吸着率 (%)

w : 50 g の PS に相当する PAPS 重量 (kg)

w は以下の式から算出した。

$$w = 0.05 \times (S_{PS} / S_{PAPS})$$

0.05 : PAPS の調製で用いた PS 重量 (kg)

$S_{PS}$  : PS の固形分率 (%)

$S_{PAPS}$  : PAPS の固形分率 (%)

## 結果及び考察

### 1. PS による農薬吸着

PS に水を加えて懸濁させた後、 $\log P_{ow}$  の値  $-0.55 \sim 6.37$  の 10 種類の農薬を添加することで、PS による農薬の吸着試験を行い、各農薬の吸着量について、その添加量に対する比率として吸着率を求めて比較を行った。農薬添加後の浸漬時間は、全農薬において 60 分以降で吸着率の大きな変動が認められなかったことから、60 分間とした。

吸着試験によって得られた PS による各農薬の吸着率と  $\log P_{ow}$ <sup>3)</sup> の関係を図 1 に示す。相関係数は 0.844 であり、疎水性の高い農薬ほど PS による吸着量が多い傾向が認められた。デンプンのグルコース鎖の CH 基及び CH<sub>2</sub> 基は疎水性であり<sup>4)</sup>、デンプンに通常 70~80% 含まれる分岐状グルコース鎖であるアミロペクチンは二重らせんを形成することで疎水性を画的に高めることが報告されている<sup>5)</sup>。従って、疎水性の高い農薬ほどデンプン粒のグルコース鎖間に疎水性相互作用により吸着されやすいと考えられた。

### 2. PAPS からの農薬の抽出

PAPS 中に吸着されている農薬の抽出法について検討した。すなわち、アセトニトリルを加えてホモジナイズを行う方法 (A 法)、PAPS を水で浸漬後にアセトニトリルを加えてホモジナイズを行う方法 (B 法)、含水アセトニトリルを加えてホモジナイズを行う方法 (C 法) 及び PAPS を加熱糊化させた後にアセトニトリルを加えてホモジナイズを行う方法 (D 法) による分析結果を比較した。

実験方法の 10、抽出率に示した方法を用いて計算した各試験溶液調製法による抽出率を表 2 に示す。なお、計算に際しては、PS 及び PAPS の固形分率がそれぞれ 83.7% 及び 79.9% であったため、PS 重量 50.0 g に相当する PAPS 重量を 52.4 g とし、PAPS 中の各農薬の定量値を求めた。

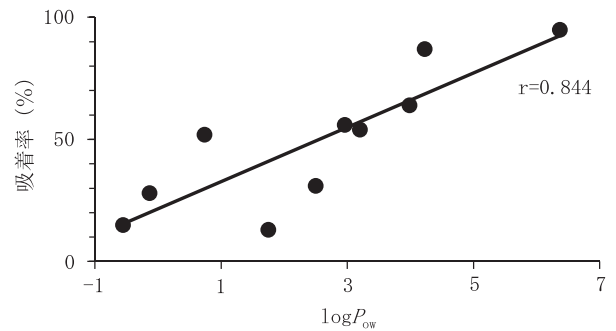


図 1 農薬の  $\log P_{ow}$  と PS による吸着率の関係

また、D 法では PAPS の採取量が多いとホモジナイザーで均一に磨砕することが困難であったため、今回の検討では、すべての試験溶液調製法において試料採取量を 2.0 g とした。

#### 1) A、B 及び C 法を用いた検討

$\log P_{ow}$  の値が  $-0.55 \sim 0.74$  のジノテフラン、チアメトキサム及びチアクロプリドの抽出率は、アセトニトリルのみで抽出を行った A 法では 4.9~6.8% と低かったが、水浸漬を行った B 法では 88.0~105.3%、含水アセトニトリルを用いた C 法では 78.4~101.6% と大きく向上した。前報の PS を用いた添加回収試験においても、水浸漬は上述した農薬の回収率向上に寄与しており<sup>2)</sup>、今回の PAPS からの抽出結果は前報と概ね同様であった。ジノテフラン、チアメトキサム及びチアクロプリドにはニトロイミンあるいはシアノイミンのような水素結合受容体として作用する官能基が含まれているため<sup>6)</sup>、これらの農薬は PS のグルコース残基の OH 基に水素結合で吸着されていると考えられた。そのため、非プロトン性溶媒であるアセトニトリルのみの抽出では、アセトニトリルが水素結合供与体として作用せず、水素結合による吸着相互作用を打ち消すことができなかったと考えられた。一方、PS と農薬の双方に対して水素結合が可能な水を抽出時に加えたことで、PS と農薬の水素結合による吸着相互作用を打ち消すことが可能となったと考えられた。

$\log P_{ow}$  の値が 1.75 のメトラキシルは、A、B 及び C 法のいずれでも抽出率に大きな差は認められず、96.7~113.0% の良好な抽出率が得られた。メトラキシルは、PS に対する吸着実験でも低い吸着率であったことから、もともと PS には吸着されにくく、アセトニトリルに抽出されやすかったと考えられた。

$\log P_{ow}$  の値が 2.5~6.37 の 6 種類の農薬では、A 法による抽出率は 21.1~99.6% と幅広い値が得られた。アゾキシストロビン、ピラクロストロビン及びピリダベンは A 法ではそれぞれ 99.6%、82.8% 及び 55.6% の抽出率が得られたが、B 法ではそれぞれ 70.6%、64.3% 及び 34.5% に低下した。一方、C 法では B 法のような抽出率低下は認められなかった。ボスカリド及びチオベンカルブについては、A 法による抽出率はそれぞれ 21.1% 及び 25.8% と

表2 PAPSからの10種類農薬の抽出結果

農薬名	log $P_{ow}$	抽出率*			
		A法	B法	C法	D法
ジノテフラン	-0.55	6.8±3.1	105.3±6.3	101.6±6.4	111.6±2.7
チアメトキサム	-0.13	6.1±2.8	95.7±6.2	85.0±4.0	107.6±2.5
チアクロプリド	0.74	4.9±2.0	88.0±7.1	78.4±3.0	100.6±3.3
メタラキシル	1.75	96.7±2.1	99.6±4.9	113.0±1.7	116.7±2.4
アゾキシストロビン	2.5	99.6±2.2	70.6±5.9	90.9±2.3	97.5±3.6
ボスカリド	2.96	21.1±1.8	62.7±4.9	53.4±2.4	94.9±2.2
シアゾファミド	3.2	59.9±2.9	65.2±2.8	82.0±3.4	93.7±1.4
ピラクロストロビン	3.99	82.8±3.6	64.3±3.0	97.6±1.7	98.2±3.5
チオベンカルブ	4.23	25.8±2.6	55.5±3.7	59.9±3.1	90.6±1.9
ピリダベン	6.37	55.6±1.7	34.5±2.3	61.3±1.3	88.8±0.8

\*：平均値±標準偏差（試行数 3 回）

log $P_{ow}$ ：オクタノール/水分係数

A法：PAPS にアセトニトリルを加えてホモジナイズ抽出を行った。

B法：PAPS に水を加えて混合し、30分間放置後にアセトニトリルを加えてホモジナイズ抽出を行った。

C法：PAPS に含水アセトニトリルを加えてホモジナイズ抽出を行った。

D法：PAPS に加水し、加熱糊化させた後にアセトニトリルを加えてホモジナイズ抽出を行った。

低かったが、B法ではそれぞれ62.7%及び55.5%に向上し、C法でも同程度の抽出率が得られた。シアゾファミドは、A法とB法の抽出率がともに60%程度と低く、C法のみにおいて82.0%の良好な抽出率が得られた。

上述した6種類の農薬は、log $P_{ow}$ の値が-0.55~0.74の3種類の農薬と比べて、アセトニトリルのみでも比較的高い抽出率が得られた。一方、水浸漬による抽出効果は限定的かつ不十分であり、農薬により抽出率の低下が認められた。これらの結果は、6種類の農薬とPSの吸着相互作用において、水素結合の寄与が少ないことを示唆しており、これらの農薬が疎水性相互作用によりPSに吸着される可能性を支持するものであった。含水アセトニトリルを用いることで、比較的多くの農薬で良好な抽出率が得られたが、ボスカリド、チオベンカルブ及びピリダベンの抽出率は最大60%程度であり、十分に抽出されなかったことから、これらの農薬についてはデンプン粒のグルコース鎖間に取り込まれるなど、抽出されにくい状態であったと考えられた。

## 2) D法を用いた検討

A、B及びC法のいずれの方法を用いても十分に抽出されなかったボスカリド、チオベンカルブ及びピリダベンをPAPSから抽出するために、デンプン粒を糊化させてから抽出を行う方法（D法）について検討した。加水したPSを沸騰水浴中にかくはんしながら加熱したところ、1分30秒間で透明なゲル状に変化して糊化した。そこで、沸騰水浴中で加熱することによる農薬の消失を検討するため、農薬混合標準溶液を添加した水2mLを試験管に加え、これを2分間沸騰水浴中に放置した後、各農薬の残存量を確認した。その結果、10種類の全農薬において顕著な消失は認められなかったことから、糊化は沸騰水浴中で1分30秒間加熱する方法で行った。

D法による10種類の農薬の抽出率は88.8~116.7%であり、すべての農薬においてA、B及びC法のいずれの方法よりも高い抽出率が得られた。特に、ボスカリド、チオベンカルブ及びピリダベンの抽出率はそれぞれ94.9%、90.6%及び88.8%とA、B及びC法に比べて大きく向上した。

デンプン粒はグルコース鎖同士の水素結合により、冷水中ではほとんど膨潤しないが、水素結合が切断されるような加熱条件下では不可逆的に膨潤する<sup>7)</sup>。そのため、水浸漬により十分に抽出されなかった上記3種類の農薬は、PSのグルコース鎖間に吸着されており、抽出されにくい状態であったが、糊化させることにより抽出されやすい状態になったと考えられた。また、糊化によりアミロペクチンの二重らせん構造もほどけるため<sup>8)</sup>、デンプンの疎水性が低下し、農薬との疎水性相互作用が減少したことが、抽出率向上に寄与した可能性も考えられた。

以上の結果から、PSは疎水性の高い農薬を多く吸着する傾向が認められた。PSに吸着された農薬のうち、親水性農薬は水浸漬や含水アセトニトリルの使用により容易に抽出可能であったが、疎水性農薬の中には、PSに強く吸着され、十分に抽出されないものが認められた。そのような農薬の抽出には、PSを加熱糊化させることで、PSの構造を変化させた後に抽出を行う方法が非常に有効であった。

## 文 献

- 1) 青柳光敏, 新山和人, 若森吉広: 2003~2008年度, 輸入農産加工食品中の残留農薬について. 道衛研所報, **59**, 47-52 (2009)
- 2) 岡部 亮, 柿本洋一郎, 青柳光敏: デンプン中の農薬分析における抽出時の水浸漬操作の影響. 道衛研所報, **69**, 47-50 (2019)
- 3) MacBean C ed.: The pesticide manual sixteenth edition. BCPC, Hampshire, 2012
- 4) 矢野由起, 謝名堂昌信: 糖の親水性と疎水性. 食物学会誌, **49**, 1-14 (1994)
- 5) 中村保典: デンプンメタボリックエンジニアリング. 化学と生物, **44**(3), 155-162 (2006)
- 6) 下村 勝: ネオニコチノイド系殺虫剤の選択性に関する分子機構の解明. 日農薬誌, **30**(3), 239-245 (2005)
- 7) 山田 博: デンプンの老化. 紙パ技協誌, **41**(2), 133-141 (1987)
- 8) 藤田直子: 澱粉変異体米の解析と利用. 化学と生物, **51**(6), 400-407 (2013)