

# 果実中残留農薬試験における 「妥当性評価不適」を起こす要因の検討

山本敬男 溝呂木彩加\* 小泉美樹 小林浩

Examination of Factors that Causes “Invalidity Evaluation” in Pesticide Residue Test in Fruits

Takao YAMAMOTO, Sayaka MIZOROGI\*, Miki KOIZUMI and Hiroshi KOBAYASHI

キーワード：残留農薬、妥当性評価、酵素

山梨県内で生産される主な農産物は、ぶどう、もも、すももなどの果実類である。これら農産物中の残留農薬試験は、検査精度を確保するために試験法の妥当性評価が行われ、それぞれの農薬の回収率や日間変動などがガイドラインの基準を満たすことが要求される。ガイドラインの基準を満たした農薬のみが試験可能な農薬として、検査結果が行政に報告される。

従来は 254 項目について検査を実施し、219 項目の結果を報告していた。今回、残留農薬試験法の妥当性評価を実施した結果、妥当性評価に適合した農薬は、ぶどう 179 項目、もも 157 項目、すもも 156 項目となり、妥当性評価不適合となった農薬は検出されても報告値として行政に還元出来なくなった。

果実類は農薬の検出率が高く、平成 26 年度から 28 年度の 3 年間で、ぶどう 56 検体から 23 項目の農薬を検出したが、報告可能な農薬は 17 項目だった。同様に、もも 39 検体から 14 項目、すもも 30 検体から 17 項目の農薬が検出されたが、報告可能な農薬はそれぞれ 5 項目、11 項目であった。このように、果実類では妥当性評価不適の農薬が比較的多い。

野菜類と試験工程状況を比較すると、農薬抽出工程において、フィルターろ過の際に目詰まりにより多くの時間を費やしていることが多い。この傾向はももなどでも観察され、これら果実類に多量に含有される糖タンパク類、有機物（タンニン、ポリフェノール）類の影響が強いと推定された。

そこで、県内で生産される農産物のうち、特に果実類（ぶどう等）に着目し、酵素による夾雑物の分解を行い、妥当性評価結果の改善を試みると共に、「妥当性評価不適」を起こす要因について検討を行ったので報告する。

## 調査方法

\*現 中北保健福祉事務所

## 1 検討対象試料及び酵素

試料は、ぶどう、もも、すももを使用した。これらは、収去検査時にホモジナイズ後冷凍保存したもので、保存期間が過ぎ、残留農薬の検出が少なかったものを選択して使用した。

夾雑物を分解する為に用いた酵素は、セルラーゼ、ペクチナーゼ、アミラーゼ、タンナーゼを検討対象とした。セルラーゼは MP Biomedicals 社製、ペクチナーゼは SIGMA-ALDRICH 社製、 $\alpha$ -アミラーゼは和光純薬工業株式会社製の化学用、タンナーゼは和光純薬工業株式会社製の生化学用をそれぞれ使用した。

残留農薬の前処理に使用する試薬等は既報<sup>1)</sup>に従った。

## 2 酵素の添加量等の検討

### (1) 酵素の添加量及び反応時間の検討と濾過の操作性

酵素の添加量と反応時間等の検討は、セルラーゼを使用した。セルラーゼは 1g を秤取り 10mL の精製水に溶かして使用した。試料は前述のぶどう、もも、すももを使用した。

これらの試料を 20g 秤取り、酵素を試料量の 0.01% から 0.2% になるように段階的に添加したのち 40°C で 24 時間反応させ、試料の状態を観察した。観察後、アセトニトリル 50mL を加えて 5 分間振盪して濾過操作を行い、濾過操作の操作性を確認した。

### (2) 有機溶媒の酵素への影響

試料はももを使用し、酵素は前述のセルラーゼ溶液を使用した。試料に加える有機溶媒はアセトニトリル 1mL、アセトン：ヘキサン = 1 : 1 mL とした。

試料 20g に有機溶媒を加えた直後に酵素を試料量の 0.2% となるように加えたものを対照とし、溶媒を加えてから 30 分ごとに 2 時間後まで放置した後に酵素を加え、40°C で 24 時間反応させた。

### 3 妥当性評価

試料に添加した農薬と分析条件については、既報<sup>1)</sup>に従った。

ホモジナイズした試料 20g に、試料中で 0.01  $\mu\text{g/g}$  および 0.1  $\mu\text{g/g}$  となるように混合標準液を添加して良く混合し、30 分～1 時間放置して標準混合液の有機溶媒を揮散させた後、酵素溶液を添加混合して、40°Cで一晩インキュベーター中に放置した。その後、告示法に基づいて試料溶液の調製を行い、同一の試料を 1 日 2 併行、5 日間実施する方法で枝分かれ試験を行った。得られた結果から、農薬 254 項目それぞれの添加濃度について真度、併行精度、室内精度を計算し、酵素を用いないで行った妥当性評価結果と比較した。

## 結果と考察

### 1 分解酵素について

#### (1) 酵素の添加量および反応時間

夾雑物を分解するための酵素は、セルラーゼ、ペクチナーゼ、 $\alpha$ -アミラーゼ、タンナーゼの 4 種類を選択した。

セルラーゼは、植物組織中のセルロースを  $\beta$  グルコースに加水分解<sup>2)</sup>する。至適 pH は 5、至適温度は 45°C<sup>3)</sup>である。ペクチナーゼは、植物組織中に含まれる複合多糖類であるペクチンを加水分解する酵素である。至適 pH は 2.5～6、至適温度は 40～60°C<sup>4)</sup>である。 $\alpha$ -アミラーゼは、デンプンを加水分解<sup>2, 5)</sup>する。至適 pH は 5、至適温度は 55°C<sup>6)</sup>である。タンナーゼは、タンニン類のエステル結合を加水分解<sup>7)</sup>する。

今回選択した酵素は、いずれも植物中の高分子を低分子化合物に加水分解する作用を持っている。酵素は至適 pH、至適温度を有するが、選択した酵素はいずれも至適 pH が 5 前後、至適温度は 40～60°Cであった。また、試料に添加する酵素の量は、いずれの酵素も試料重量に対して 0.01%から 0.1%を添加すれば効果が発生することが確認されている。

今回検討した試料の pH は、ぶどうが pH3 前後、ももが pH4 前後、すももが pH2.5 前後であった。ペクチナーゼを除くと至適 pH より低い値であったが、酵素が失活するレベルではなかった。

酵素の添加量と反応時間を確認するため、セルラーゼを用いて検討したところ、いずれの試料も 0.05%添加で試料がさらさらの状態となり酵素により分解されていることが確認され、それ以上の濃度を添加した場合でも反応状態に差は見られなかった。また、反応開始から 2 時間経過以後は試料の状態に大きな変化は見られなかった。

この結果から酵素の添加量は 0.05%以上あれば良い事が判ったが、なるべく簡便な処理とするため pH 調整等の

処理は行わないこと、また、試料の pH が至適 pH より低いこと等から、添加量を増量し試料量の 0.2%とした。反応時間については 2 時間以上反応させれば良いが、実際の検査の場合は検体搬入が通常午後になり、その後ホモジナイズして計量となることから、計量後酵素を添加する事を想定して一晩反応させることとした。

#### (2) 酵素の添加量と濾過操作の操作性

果実類は野菜類と比べて糖類の含有量が高く、試料の粘調性が高い。このことが、抽出時の濾過操作時に濾紙を目詰まりさせ、濾過操作に時間がかかると共に、分析結果のバラツキの原因となると考えられた。

酵素添加により濾過操作の操作性が改善されるか検討を試みたところ、いずれの試料も濾過操作の操作性は改善せず、かえって悪化する場合もあった。試料自体は酵素の作用により粘性が失われて流動性が高い状態となっていたが、アセトニトリルを加えて振盪した際に、試料中の水分がアセトニトリルに移行して粘調性が増した。このため、酵素を添加しないときよりも濾紙が目詰まりしやすくなった。

これは、セルラーゼが植物組織中のセルロースを加水分解し短い糖鎖が生じたが、アセトニトリルによって試料中の水分が奪われ、溶解できなくなった短い糖鎖により粘調性が増したものと考えられた。

#### (3) 有機溶媒の酵素への影響

残留農薬の前処理に酵素を用いて妥当性評価を行いその効果を見る際に、添加する農薬標準液の有機溶媒が酵素活性に与える影響が問題となる。妥当性評価を行う際、0.1ppm 添加の試料を作成するには、試料 20g に農薬標準液を 2mL 添加する必要がある。このため、2mL の有機溶媒が酵素に与える影響を確認した。

有機溶媒添加直後から 2 時間後まで、30 分ごとに酵素添加して反応を見た結果、有機溶媒添加直後でも酵素による試料の分解が確認された。また、有機溶媒添加後 2 時間放置との差も認められなかった。このことから、2mL 程度の有機溶媒では酵素活性への影響は無いことが確認できた。妥当性評価ガイドライン<sup>8)</sup>では、標準液添加後 30 分程度放置することとされているため、この放置時間を利用して溶媒を揮散させることとした。

## 2 妥当性評価について

#### (1) 酵素による評価結果の改善状況

酵素処理により妥当性評価結果の改善を試みた結果を表 1 に示した。各酵素ともに試料量の 0.2%となるように添加し、添加後 40°Cで一晩反応させた。対照として、酵素を添加せずに 40°Cで一晩加温したものを加温のみとした。また、酵素添加、加温ともにせず、従来の方法で前処理を行ったものを通常とした。

表1 妥当性評価適合項目数一覧

	通常	加温のみ	セルラーゼ*	ペクチナーゼ*	アミラーゼ*	タンナーゼ*
ぶどう	179	94	125	148	81	74
もも	157	198	193	95	185	184
すもも	156	187	189	198	183	167

ぶどうは、いずれの酵素を添加しても通常処理よりも妥当性評価結果は改善せず、加温のみでも同様であった。ももは、ペクチナーゼ以外の酵素を添加した時に妥当性評価結果が改善するとともに、加温のみでも改善した。すももは、いずれの酵素を用いても通常処理よりも妥当性評価結果が改善するとともに、加温のみでも改善した。

全体的に加温のみの結果と、酵素を添加した時の結果が似たような結果となった。果実中にはもともと今回添加した酵素が含まれているため、ホモジナイズした試料を加温しただけでも含有される酵素が働き、酵素を添加したときと同様な結果となったと考えられた。その結果、今回使用した酵素による妥当性評価結果の改善効果を明確にすることは困難と考えられた。また、今回検討した酵素では、妥当性評価不適を起こす要因の特定には至らなかった。

(2) 検出された農薬の改善状況

通常処理で実際に検出された農薬のうち、それぞれの処理で報告可能な農薬数、すなわち、妥当性評価に適合する農薬数がどのように改善されたかを表2に示した。

ぶどうは、ペクチナーゼ添加以外は報告数の改善は見られなかった。ももは、検出された農薬についてみるとすべてにおいて大幅な改善が見られた。また、すももについては、すべてにおいて改善が認められるとともに、加温のみよりも、酵素を添加した方が結果が改善していたため、すももから検出された農薬については添加した酵素の効果が認められた。

次いで、表3から表5に、それぞれの果実から検出さ

表2 検出された農薬の改善状況

	検出した農薬数	報告可能な農薬数					
		通常	加温のみ	セルラーゼ*	ペクチナーゼ*	アミラーゼ*	タンナーゼ*
ぶどう	23 →	17	11	15	17	10	8
もも	14 →	5	12	11	10	10	11
すもも	17 →	11	12	14	16	13	14

検出した農薬数は、平成26年度から28年度の合計

表3 妥当性評価の改善状況(ぶどう)

	通常	加温のみ	セルラーゼ	ペクチナーゼ	アミラーゼ	タンナーゼ
アクリナトリン	×	×	×	×	×	○
イミダクロプリド	○	×	○	○	○	○
エトフェンプロックス	○	○	○	○	○	×
オキサジキシル	○	○	○	○	×	○
クレソキシムメチル	×	×	×	×	×	×
クロチアニジン	×	○	○	○	○	○
クロルピリホス	○	×	○	○	○	×
クロルフェナピル	×	○	×	×	×	×
シアゾファミド	×	×	×	×	×	×
ジエトフェンカルブ	○	○	○	×	○	×
シプロジニル	○	×	○	○	×	×
ダイアジノン	○	×	×	×	×	×
テブコナゾール	○	×	○	○	×	×
テブフェニラド	○	×	×	○	○	×
デルタメトリン及びトラロメトリン	×	○	×	○	×	○
トリアジメホン	○	○	○	○	×	×
フェントロチオン	○	○	○	○	○	○
フェンピロキシメート	○	×	○	○	○	×
フェンブコナゾール	○	×	○	○	×	×
フルジオキソニル	○	×	○	○	×	×
メタラキシル及びメフェノキサム	○	○	×	×	○	○
ベルメトリン	○	○	○	○	○	○
メチダチオン	○	○	○	○	×	×

○：妥当性評価適合 ×：不適合 網掛けは報告されなかった農薬

表4 妥当性評価の改善状況(もも)

	通常	加温のみ	セルラーゼ	ペクチナーゼ	アミラーゼ	タンナーゼ
アクリナトリン	×	×	×	○	×	×
アセタミプリド	×	×	×	×	×	×
イミダクロプリド	×	○	○	○	○	○
クレソキシムメチル	○	○	○	○	○	○
クロチアニジン	×	○	×	○	×	○
クロルピリホス	○	○	○	○	○	○
スピノサド	×	○	○	○	○	×
チアクロプリド	×	○	○	○	×	○
テブコナゾール	○	○	○	○	○	○
フェンピロキシメート	×	○	○	○	○	○
フェンブコナゾール	○	○	○	×	○	○
プロプロフェジン	×	○	○	×	○	○
フルフェノクスロン	×	○	○	○	○	○
メチダチオン	○	○	○	×	○	○

○：妥当性評価適合 ×：不適合 網掛けは報告されなかった農薬

表5 妥当性評価の改善状況(すもも)

	通常	加温のみ	セルラーゼ	ペクチナーゼ	アミラーゼ	タンナーゼ
アセタミプリド	×	×	○	○	×	×
イミダクロプリド	×	○	○	○	○	○
エトフェンプロックス	×	×	○	○	○	○
クレソキシムメチル	○	○	○	○	○	○
クロルピリホス	×	○	○	○	○	○
シプロジニル	○	○	○	○	○	○
スピノサド	○	○	○	○	×	○
チアクロプリド	○	○	○	○	○	○
テブコナゾール	○	○	○	○	○	○
デルタメトリン及びトラロメトリン	×	○	×	×	○	○
ピフェントリン	○	○	○	○	○	○
フェンブコナゾール	○	×	○	○	×	×
プロプロフェジン	×	×	×	○	○	○
ヘキサコナゾール	×	○	×	○	×	×
ベルメトリン	○	○	○	○	○	○
メバニピリム	○	×	○	○	○	○
メチダチオン	○	○	○	○	○	○

○：妥当性評価適合 ×：不適合 網掛けは報告されなかった農薬

れた農薬の内訳と、それぞれの処理による妥当性評価の適合状況を示した。

個々の農薬の改善状況を見ると、同じ農薬であっても残留していた果実の種類と酵素処理等の種類との組み合わせによって改善状況は異なっており、特に規則性は見

出せなかった。ただし、表3のダイアジノンは通常処理では妥当性評価に適合していたが、加温のみからタンナーゼ添加まで、すべての処理で妥当性評価不適合となった。いずれの場合も真度が大きく低下していたため、酵素によって農薬が分解されたために不適合となったと考えられた。ダイアジノンは通常処理の真度は0.01ppm、0.1ppmともに約80%と良好な結果が得られていたが、酵素処理を加えると、いずれの場合も60%を下回る真度しか得られなかった。ダイアジノンのほかにも、酵素の影響を受けて分解したため真度が低下したと見られる農薬がいくつか確認された。このため、酵素処理を行う場合には、酵素の影響により分解する農薬をあらかじめ確認しておく必要がある。

### 3 ぶどうの結果について

ぶどうの結果について、加温のみの結果がもも、すももと異なりかなり悪化したこと、酵素を添加した方が評価結果が悪化していたこと、添加した酵素の効果がそれほど大きくないと考えられることから、実験に用いたぶどうの品種の違いにより、評価結果に差が出たのではないかと考えられた。表6に各実験の結果と使用したぶどうの品種を示した。

本来ならば実験に用いるぶどうは統一すべきであるが、農薬が検出されないものを選択して使用したため、異なった品種を用いざるを得なかった。ぶどうは、もも、すももと異なり、サンプル中の果皮の割合が非常に高く、品種によっては種子も含有している。果皮の割合が大きくなる粒の小さな品種や、種子のある品種で妥当性評価結果が悪くなっていたことから、ぶどう中の果皮と種子に含まれる成分が妥当性評価不適合を起こす要因の一つではないかと考えられた。

表6 評価結果とぶどうの品種

	通常	加温のみ	セルラーゼ	ペクチナーゼ	アミラーゼ	タンナーゼ
適合項目数	179	94	125	148	81	74
ぶどう品種	巨峰	デラ 甲州	巨峰 ピオーネ	甲斐路 甲州	甲斐路	デラ 甲州

デラと巨峰は種子なし。他は種子あり。

## まとめ

酵素を使用して夾雑物の低減を図り、妥当性評価結果の改善と妥当性評価不適合を起こす要因の検討を試みた。

その結果、ぶどうは今回検討したいずれの酵素でも評価結果は改善出来なかった。ももは、ペクチナーゼ以外の酵素を使用することにより、適合項目数が大幅に増加したが、加温のみでも同様の結果となった。すももは今回検討したいずれの酵素でも評価結果を改善することが出来たが、やはり加温のみでも同様の結果となった。このことから、今回使用した酵素による妥当性評価結果の改善効果は明確にはならなかったが、果実中に存在する酵素も含めて、酵素による前処理によって、ぶどう以外では妥当性評価結果を改善することが出来た。

しかし、妥当性評価不適合を起こす要因の特定には至らなかった。

また、農薬の中には添加した酵素や果実中に存在する酵素により分解するものが確認されたため、酵素処理をする場合には、あらかじめ影響を受ける農薬を確認しておく必要があるとともに、ぶどうは品種によって妥当性表結果が異なる可能性が示唆された。

## 参考文献

- 1) 山本敬男ら：農産物残留農薬一斉分析法の妥当性評価結果とその課題について、山梨県衛生環境研究所年報 58, 42-55 (2014)
- 2) 国際生化学連合酵素委員会：酵素名・酵素反応記号一覧, 113 (1963)
- 3) 細貝祐太郎, 中澤裕之, 西島基弘：食品衛生化学物質辞典, 632 (2000)
- 4) 細貝祐太郎, 中澤裕之, 西島基弘：食品衛生化学物質辞典, 639 (2000)
- 5) 岩見公和：食物・栄養化学シリーズ 16 生化学, 64-68 (1987)
- 6) 細貝祐太郎, 中澤裕之, 西島基弘：食品衛生化学物質辞典, 620 (2000)
- 7) 国際生化学連合酵素委員会：酵素名・酵素反応記号一覧, 109 (1963)
- 8) 平成22年12月24日付け食安発1224第1号 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について