

報 文

磨碎均質化した果実・そ菜中における Captafol の分解

奴田原誠克, 山本公昭

高知県農林技術研究所農薬残留研究室
(昭和52年8月19日受理)

Decomposition of Residual Captafol in Homogenized Preparations of Fruits and Vegetables

Masakatsu NUTAHARA and Masaaki YAMAMOTO

*The Kochi Prefectural Institute of Agricultural and Forest Science,
Ino, Kochi 781-21, Japan*

During the course of analyses of fungicide residue, it was found that captafol (*N*-[1, 1, 2, 2-tetrachloroethylthio]-4-cyclohexene-1, 2-dicarboximide) was decomposed in homogenized preparations of vegetables and fruits. Captafol was rapidly decomposed in homogenized Japanese radish roots, spinach, and cucumber fruits. When added at 1 ppm level, almost all the compound disappeared within 10 min. Fast decomposition occurred also in cabbage, muskmelon, satsuma orange peel, greenpepper fruit, potato tuber, and onion. Relatively slow decomposition was found in strawberry, tomato, apple, and orange; half lives being 60 min or more. Among 13 vegetables and fruits tested, there was a good linear relationship between pH value of the homogenized preparations and their decomposition activities. As pH value of preparations becomes higher, the decomposition activity increases. The similar pH-decomposition rate relationship was observed within a series of the cucumber fruit juice adjusted the pH from 3.0 to 7.5. The decomposition activity in the cucumber juice was dialysable and heat-stable, and the decomposition rate increased with an increase in temperature. These results suggest that the decomposition reaction is non-enzymatic, and that plant constituents with low molecular weight participate in this reaction. An additional evidence was that the decomposition occurred in aqueous solution of thiol reagents such as glutathione (reduced) and cysteine, like in the cucumber juice. For preventing the decomposition of captafol, the addition of acetonitrile, hydrochloric acid or masking reagents of thiol group such as trichloroacetic acid, to vegetables and fruits prior to homogenization was effective. Three related fungicides, captan, folpet, and dichlone also were rapidly decomposed in homogenized cucumber fruit.

緒 言

食品中の残留農薬が社会問題化して、早くも10年の歳月が流れようとしている。この間、わが国では膨大な数の残留分析が行なわれ、そのデータは環境保全や農薬の適正使用のために利用されてきた。ところが、その調査や研究は緊急を要するものが多かっただけに、分析法

の検討や日常業務などに追われ、分析試料の保存法に関する研究は必要であるといわれながらも、ほとんど着手されていなかった。この保存法に関する研究は、Kawarariによる総説で紹介されているが、この中でもわれわれの日常業務に利用できる情報はきわめて少ない。

現在実施されている農産物の残留分析用試料の保存法は、検体をミキサーで細切均質化し、その一部をガラス

容器に入れ、分析当日まで -20°C 以下で凍結するのが一般的である。著者ら²⁾はトマトについてこの方法で保存した場合の10農薬の安定性を調査したところ、captafol がとくに不安定であることを知った。また、平松ら³⁾も captafol と化学構造のよく似た captan がダイコンの均質化試料中で不安定であることを報告している。

そこで、各種農産物の均質化試料中における captafol の分解速度を調査し、残留分析用試料の保存に当たってとくに注意を要する農産物を指摘するとともに、その分解防止対策を確立するため若干の分解原因の解析実験を行った。

実験材料および方法

1. 供試農産物

イチゴ(春香)、トマト(東光)、リンゴ(紅玉)、キュウリ(久留米落合H型)およびミカン(南柑4号)の果肉は水を添加せずそのままミキサーで均質化した。ミカン果皮、タマネギ(貝塚早生)、ジャガイモ(うんぜん)、ピーマン(新さきがけみどり)、メロン(しらゆき)、キャベツ(大御所)、ハウレンソウ(禹城)およびダイコン(阿波晩生)の根は同量の水を添加し均質化した。全農産物とも均質化直後の新鮮なものを供試した。

2. 供試農薬

captafol および captan は和光純薬製標準農薬を、folpet はフォルペット水和剤を、dichlone はマルキノンをおおの 50 ppm アセトン溶液としてその 0.2 ml を試料に添加した。

3. 試薬および装置

有機溶媒類は試薬特級品を全ガラス製蒸留器で蒸留したものを、透析膜は和光純薬製透析用のセロファンチューブ(30/32インチ)を用いた。その他は市販の試薬特級品を用いた。還元型グルタチオンおよびシステイン塩酸塩溶液は使用ごとに調製した。ガスクロマトグラフ装置は島津 GC-5AI (ECD, ^{63}Ni) を用いた。

4. ガスクロマトグラフ条件

カラム: シリコン SE-52+QF-1(1.5%+1.5%)/
ガスクロム Q 80~100 メッシュ, 3 mm ×
1.5 m

温度: 注入口 230°C , カラム 190°C , 検出器
 250°C

キャリアガス流量: 窒素 120 ml/min

エレクトロメーター: $10^2 \text{ M}\Omega \times 0.08 \text{ V}$

チャートスピード: 10 mm/min

保持時間: captafol 2.5 min, captan 1.0 min, folpet
1.6 min, dichlone 0.6 min

5. 農薬分解能の測定

農産物の均質化試料 10 g に農薬 10 μg を添加 (1 ppm に相当) し、20 または 30°C の湯浴中で一定時間反応させたのち、アセトニトリル 200 ml を添加して反応を止め、農薬の残存量を Fig. 1 の方法で定量した。そして添加量を 100 として残存率あるいは分解率を求め、

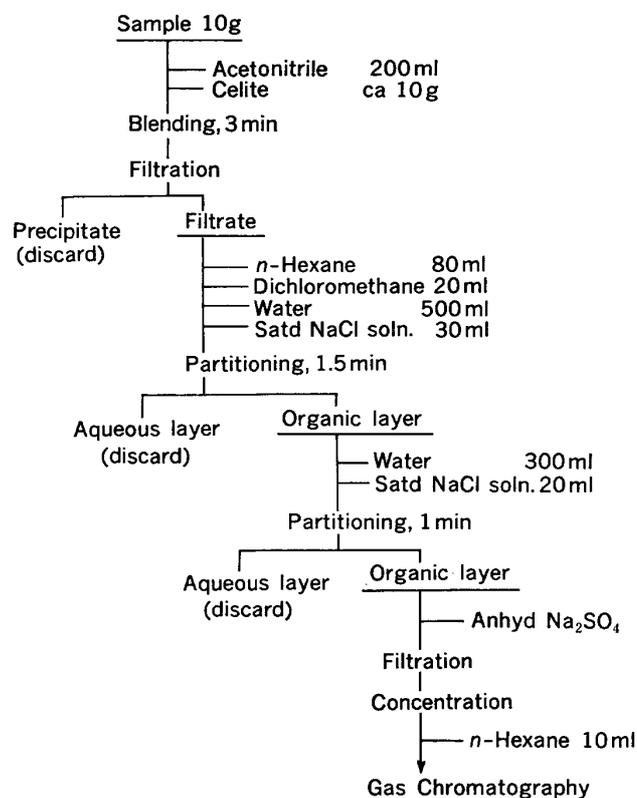


Fig. 1 Method for the determination of four fungicides.

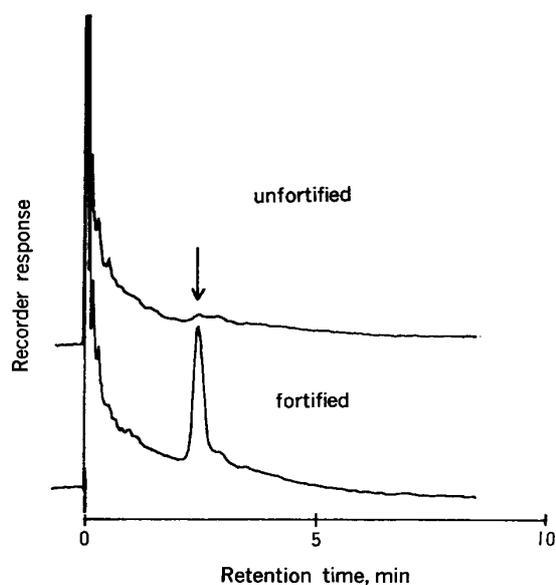


Fig. 2 Gas chromatograms of captafol extracted from cucumber.

これから分解速度や分解能を比較した。なお分解原因の解析実験用のキュウリ試料は、分解能の低下を防ぐため均質化後すぐに2規定塩酸でpH 3.0に調整し、反応直前に2規定カセイソーダでpH 6.0とした。ガスクロマトグラムの一例をFig. 2に示した。

実験結果

1. 農産物別にみた分解速度の比較

13種の農産物の均質化試料を用いて、20°Cにおけるcaptafolの分解速度を比較し、その結果をFig. 3に示した。それによると、ダイコン(根)、ホウレンソウ、キュウリ、キャベツおよびメロンの分解能が大であり、とくにダイコン、ホウレンソウおよびキュウリ中では、数分間で大部分が分解された。これらは残留分析用の試料の均質化操作や保存に際して、とくに注意を要する農産物である。これらに次いで、ミカン(果皮)、ピーマン、ジャガイモおよびタマネギ中で不安定であり、ミカン(果肉)、トマト、リンゴおよびイチゴ中では比較的安定であった。これらの分解速度と農産物の均質化試料のpHとの間には相関が認められ、pHの高いものほど分解が速く、低くなるに従って遅くなる傾向があり、pH

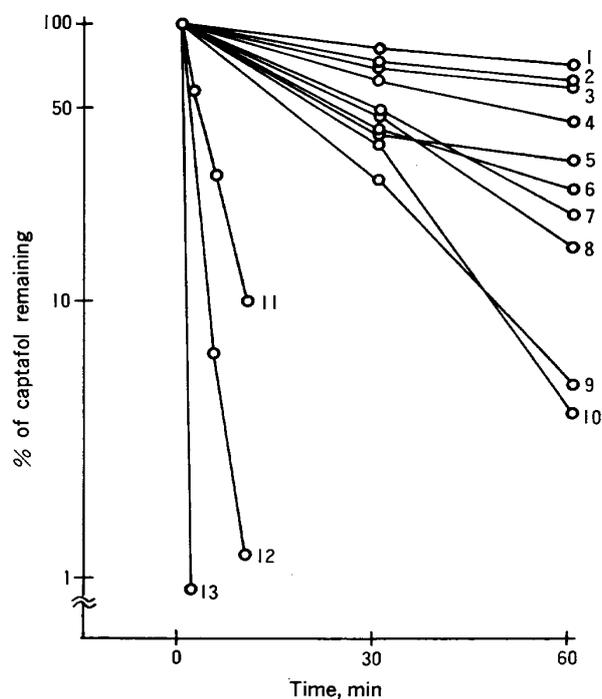


Fig. 3 Decomposition rates of captafol in homogenized fruits and vegetables at 20°C.

1. Strawberry, 2. Tomato, 3. Apple, 4. Satsuma orange (Flesh), 5. Onion, 6. Potato, 7. Greenpepper, 8. Satsuma orange (Peel), 9. Muskmelon, 10. Cabbage, 11. Cucumber, 12. Spinach, 13. Japanese radish

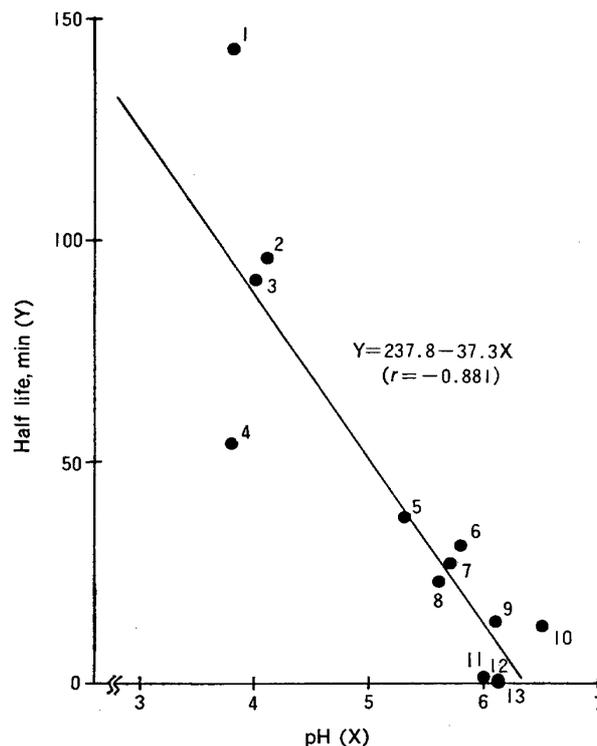


Fig. 4 Relationship between decomposition rates of captafol and pH of homogenized fruits and vegetables.

Numerical orders correspond to those of Fig. 3.

と分解速度(半減期)の回帰式を求めたところ、その相関係数(r)は -0.881 であった(Fig. 4)。

2. 均質化操作中の農薬の分解

captafolのような不安定な農薬は、分析操作以前のミキサーによる試料の均質化中にかなり多量が分解されることが予想された。そこで、均質化操作(約1分間)中の分解を測定するとともに、引き続いて起こる均質化試料中の分解も調査し、Fig. 5に示した。それによると、均質化操作中の分解速度が、その後の放置中の速度よりも速く、キュウリでは均質化操作だけで添加量の92%が分解し、10分後にはほとんどが消失してしまった。ミカン(果皮)、およびピーマンでも程度の差こそあれ、ほぼ同様の傾向がみられた。

3. 均質化試料の分解能の経時変化

キュウリを均質化し、しばらく放置すると分解能がしだいに低下する傾向がみられたため、分解能の経時変化を調べた。キュウリをミキサーで均質化したのち、0, 30, 60および120分後にcaptafolを添加し、おのおの30°Cで5分間反応させた結果、分解能はほぼ指数関数的に低下することがわかった(Fig. 6)。

4. 分解の原因に関する検討

captafolの分解の原因を検討するため、おもにキュウ

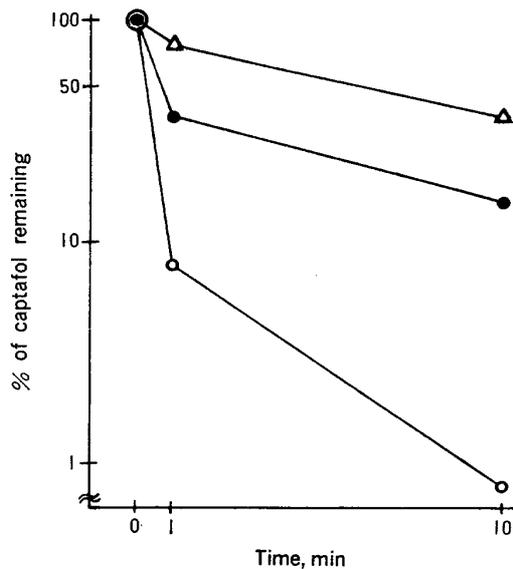


Fig. 5 Decomposition rates of captafol in fruits and vegetables during homogenization (for 1 min) and thereafter at 30°C.

Δ Greenpepper, ● Satsuma orange (Flesh), ○ Cucumber

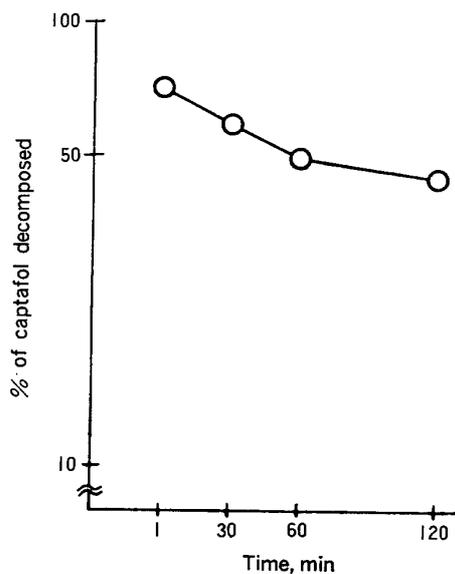


Fig. 6 Reduction of decomposition activity in cucumber after homogenization.

Reactions were carried out for 5 minutes at 30°C.

りの均質化試料の濾液を用いて以下の実験を行なった。

1) 透 析

キュウリをミキサーで均質化し、桐山ロートで吸引濾過後、濾液を遠心分離 (8000 rpm, 5 min, 0°C) した。この上澄液を塩酸で pH 3.0 に調整し、その 40 ml を 2~5°C で 24 時間透析した。透析外液は 0.005 M 塩酸-酢酸ソーダ緩衝液 (pH 3.0) 4 l であった。透析内液および外液 (100 倍濃縮液) に captafol を添加し、その分

Table 1 Effect of dialysis on decomposition of captafol and captan in cucumber.

Sample	Condition of reaction		% decomposition	
	Temp. (°C)	Time (min)	captafol	captan
Inner soln.	30	30	37	62
Outer soln.	30	30	99	100
Not dialyzed soln.	30	5	100	100

解率を測定した結果 Table 1 に示したように活性の多くが外液にあった。また外液の分解能を透析前の濾液のそれと比較するとかなりの低下がみられ活性物質は不安定な物質であることが推測された。なお透析の内外液による captan の分解率を調べたところ、captafol の場合とほぼ同様な結果が得られた。

2) 熱 処 理

透析実験に用いたのと同じ pH 3.0 に調整したキュウリ濾液を、100°C で 10 分間加熱処理後、沈殿物を濾過し、濾液を pH 6.0 に調整して captafol を添加し、30°C で反応させた。加熱処理により分解能の低下はみられたが、この処理のみではまだ完全には失活しなかった (Table 2)。

Table 2 Effect of heating on decomposition of captafol in cucumber.

Sample	Reaction time (min)	% decomposition
Heated soln.*	10	45
	30	60
Not heated soln.	10	57
	30	88

* Treated for 10 minutes at 100°C.

3) 反 応 温 度

キュウリ濾液中での分解率を 0, 15, 30, 45 および 60°C で測定した結果、温度が高くなるに従って大きくなり、酵素反応でみられる至適温度は観察できなかった (Fig. 7)。

4) 反 応 pH

分解能の大きいものの代表としてキュウリを、小さいものの代表としてトマトを選び、濾液の pH を変え captafol の分解率を測定した。その結果、Fig. 8 に示したように分解率は pH が低くなるに従って小さくなり、高くなるに従って大きくなることが明らかになった。

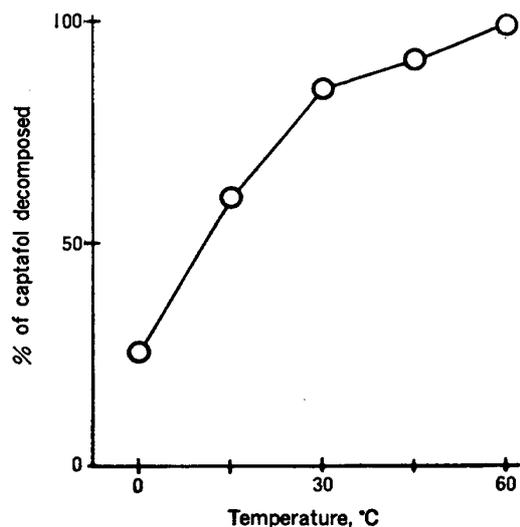


Fig. 7 Effect of temperature on decomposition of captafol in homogenized cucumber.

Reactions were carried out for 3 minutes.

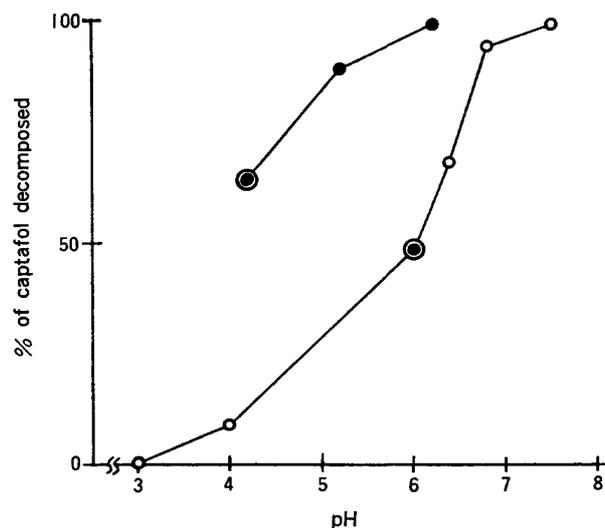


Fig. 8 Effect of pH on decomposition of captafol in homogenized cucumber and tomato.

○ Cucumber (for 3 min at 10°C), ● Tomato (for 30 min at 30°C), ⊙ Original pH of cucumber and tomato.

5) チオール化合物の分解能

前述の実験の結果等から推定して、分解の主因をなすものとしてチオール化合物が考えられた。そこで植物体中の低分子チオール化合物の大部分を占めると考えられる還元型グルタチオン (GSH) とシステイン塩酸塩 (CySH) を、さらに無機チオール化合物としてチオ硫酸ソーダを選び、分解能を調べた。おのおの化合物の濃度は captafol のモル濃度の 10 倍とし、30°C で 10 分間反応させた。その結果、GSH と CySH は予想どおりほぼ同等の分解能を有していたが、チオ硫酸ソーダではほ

Table 3 Decomposition of captafol in aqueous solution of thiol compounds.

Compound	% decomposition
Glutathione (reduced)	64
Cysteine	66
Na ₂ S ₂ O ₃	7
None	3

The mol concentration of thiol compounds was ten times as captafol. Reactions were carried out for 10 minutes at 30°C.

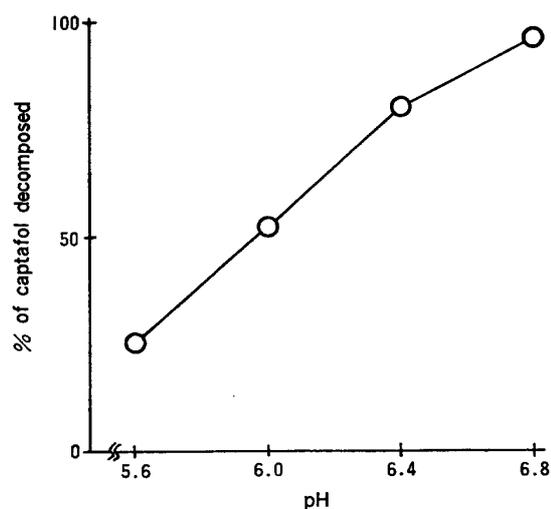


Fig. 9 Effect of pH on decomposition of captafol in glutathione (reduced) solution.

Reactions were carried out for 5 minutes at 30°C.

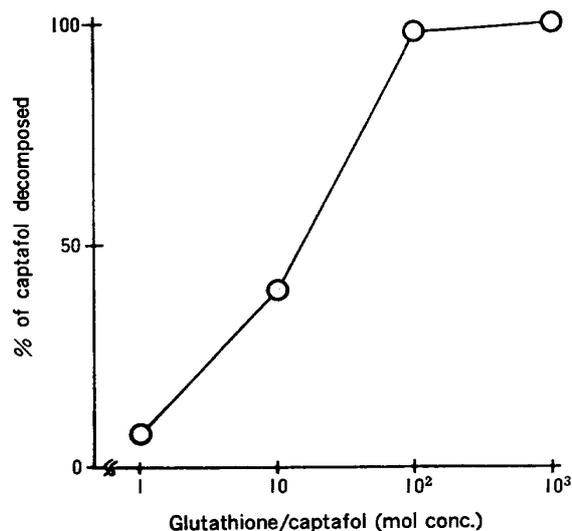


Fig. 10 Relationship between glutathione (reduced) concentration and decomposition of captafol.

Reactions were carried out for 5 minutes at 30°C.

とんど分解しなかった (Table 3). また GSH を種々の pH の緩衝液に溶解し, captafol の分解率を測定した結果, Fig. 9 に示したように pH が高くなるに従って分解率も増大し, Fig. 8 のキュウリおよびトマト濾液の結果と一致した. さらに captafol に対する GSH の量を変えて分解率を測定した結果, GSH 濃度を高めるに従って captafol の分解率が増大し, captafol のモル濃度の 100 倍にすると, 30°C 5 分間でほとんどが分解された (Fig. 10).

5. その他の不安定農薬

captafol の類縁化合物である captan, dichlone および folpet をキュウリ均質化試料中に 1 ppm 相当量添加し, これらの安定性を調べた. 三つの殺菌剤とも captafol と同様に非常に不安定であり, 注意を要することがわかった (Table 4).

Table 4 Decomposition of fungicides in homogenized cucumber.

Fungicide	% decomposition
Captan	100
Folpet	82
Dichlone	100

Reactions were carried out for 10 minutes at 30°C.

6. 分解防止対策

これまでの結果から, captafol の分解を防止するためには, 農産物中の活性成分と農薬が遭遇する前に何らかの予防策を講じる必要が生じてきた. そこで, キュウリの均質化試料に数種の試薬を添加し, その効果を調べた結果, トリクロル酢酸, モノヨード酢酸, 塩酸およびアセトニトリル添加が分解反応を阻止するのに有効であることを知った (Table 5).

Table 5 Effect of various reagents on decomposition of captafol in homogenized cucumber.

Additive	Concentration (M)	% decomposition at 30°C	
		10 min	21 hr
CCl ₃ COOH	2 × 10 ⁻¹	4	21
	2 × 10 ⁻²	33	
CH ₂ ICOOH	2 × 10 ⁻¹	10	
	2 × 10 ⁻²	28	
HCl	adjusted to pH 3	5	
CH ₃ CN	100 ml/ cucumber 100 g	7	94
None	—	90	

考 察

現在登録されている適用作物から得られた農産物の均質化試料中における captafol の安定性を調べた結果, ダイコン, ホウレンソウ, キュウリ, キャベツおよびメロンでとくに不安定であった. これらの農産物の captafol の残留分析を行なう場合には, 試料の均質化操作や保存について十分な注意が必要である. これまで, これらの点にはあまり注意が払われていなかったことを考えあわせると, 安全使用基準が適正であるかどうか, すなわち残留性のデータに誤まりがなかったかどうか, 試料保存の面から再検討を要するように思われた.

農産物中での captafol の分解速度とその均質化試料の pH との間には相関があり, pH の高いものほど分解速度が速い傾向がみられた. このことより, 農産物の均質化試料の pH を測定することによって, captafol の安定性をほぼ推察できると考えた.

一方, 均質化操作中や保存中に captafol が著しく分解することが確認されたことは, 残留分析法で従来から実施されている添加回収試験法が適当でないことを示した. すなわち, 均質化後の試料に農薬を添加し, ただちに抽出操作に移り, 回収率を求めるという従来の方法では, 均質化操作中や保存中における分解量はまったくチェックできないことになる. そこで今後は, 均質化操作前に農薬を添加して回収率を求め, その分析法の是非を問うべきであろう.

分解活性物質の推定のため, キュウリ均質化試料の濾液の透析を行なった結果, 透析外液に活性物質の大部分が移行したため, その物質は, セロファンチューブの濾過分子量限界 (1 ~ 2 万) より小さい比較的 low molecular weight の物質であることがわかり, 分解の主反応は, 酵素的なものというよりはむしろ化学的のものであることが示唆された. また, 100°C, 10 分間の加熱処理によっても分解能は完全には失活しないばかりか, 反応における至適温度や至適 pH も確認できず, 酵素反応が主反応である可能性をより小さくした. この活性は, 低 pH では比較的小さく, pH が高くなるに従って大きくなった. pH と反応性の関係は, 農産物別にみた captafol の分解速度の比較実験における pH と分解速度の関係と一致した.

以上のことより, 酢酸フェニル水銀の解毒^{4,5)}や, captan の分解^{6,7)}の原因物質であるチオール化合物が captafol の分解に関与していると推定し, 植物体中の低分子チオール化合物の大部分を占める GSH と CySH を用いて検討したところ, これらが captafol を分解する能力を有することを確認した. さらに, これらのチオール化

化合物の反応性は、農産物中の活性物質の pH に対する依存性とも一致したため、これらの低分子のチオール化合物が分解活性物質の主体をなすものであると考えた。そ菜類中の GSH 量は小川⁹⁾がヨード法により定量しているが、その分析値と、今回報告した農産物別にみた captafol の分解速度との相関は低かった。これは、植物体中の GSH 量が採取時期、新鮮度および品種などにより変動する^{9,10)}ことや、小川の分析法に若干の問題点がある¹¹⁾ことも一因かも知れないが、著者らは GSH の分解力が pH に大きく依存していることが相関の低い主因であり、同一 pH の下で農産物間の分解速度を比較すれば高い相関が得られるものと考えている。なお、小川の分析値によれば、ほとんどの農産物中には captafol (1 ppm) の 100 倍以上の濃度で GSH が存在していることになる。

captafol の類縁化合物である captan, dichlone および folpet も同様の分解反応を示し、これらの残留分析を目的とする試料の保存の際も十分な注意が必要であろう。

試料の保存法としては、均質化しないでそのままの形で冷凍保存する方法もあり、サヤインゲンでの captan の残留量は 8 カ月間もほとんど減少しなかったという報告¹²⁾があるが、この保存法でも分析時には均質化操作を行なう必要があり、分解防止対策とはならない。そこで、キュウリ均質化試料に数種の試薬を添加して検討したところ、分解防止対策としては、トリクロル酢酸またはモノヨード酢酸の添加によるチオール基の隠蔽、塩酸の添加による pH の低下、さらにはアセトニトリル添加による分解反応の阻止が有効な方法であることを知った。一方、平松ら¹³⁾もダイコンの captan 残留分析に当たって、均質化操作前にモノヨード酢酸等のチオール基阻害剤を添加することが分解防止に有効であったと報じている。

要 約

captafol が農産物の残留分析用の均質化試料中で不安定であることを確認し、とくに注意を要する農産物を指摘するとともに、その分解防止対策の確立のため分解原因の検討も行なった。

均質化試料中の captafol の分解速度を比較した結果、ダイコン、ハウレンソウ、キュウリおよびキャベツでの分解速度が大で、ミカン (果皮)、ピーマン、ジャガイ

モおよびタマネギがこれらに次ぎ、ミカン (果肉)、トマト、リンゴおよびイチゴでは比較的安定であった。これらの均質化試料の pH と captafol の分解速度との間に高い相関が認められたので、農産物の均質化試料の pH を測定することによって、その試料中の captafol の安定性をおおむね推察することが可能と思われた。透析、熱処理および反応温度等の検討をした結果、分解の主反応は酵素的なものというよりはむしろ植物成分による化学反応であると推察された。そこで、チオール化合物がその主因をなすと推定し、還元型グルタチオンとシステイン塩酸塩が同様の分解能を有することを確認した。また、類縁化合物である captan, dichlone および folpet もキュウリ均質化試料中では不安定であった。これらの分解を防止する対策としては、有機溶媒で均質化するか、均質化前に酸またはチオール基隠蔽剤を添加する方法が有効と考えられた。

本研究を行なうに当たり、ご助言をいただいた農林省農業技術研究所の山田忠男氏に深謝の意を表します。

本研究の概要は 1977 年 3 月 日本農薬学会 第 2 回大会に報告した。

引用文献

- 1) N. S. Kwar, G. C. de Batista & F. A. Gunther: *Residue Rev.* **48**, 45 (1973)
- 2) 奴田原誠克・山本公昭: 高知農林研報 **9**, 11 (1977)
- 3) 平松禮治・古谷扶美枝: 第 1 回日本農薬学会講演要旨集 (1976)
- 4) 山田忠男: 日植病報 **29**, 6 (1964)
- 5) 山田忠男: 日植病報 **29**, 11 (1964)
- 6) R. J. Lukens & H. D. Sisler: *Phytopathology* **48**, 235 (1958)
- 7) R. H. Daines, R. J. Lukens, E. Brennan & I. A. Leone: *Phytopathology* **47**, 567 (1957)
- 8) 小川政禧: 日本農芸化学会誌 **14**, 65 (1938)
- 9) 永井康豊・舟橋三郎: 日本農芸化学会誌 **34**, 1036 (1960)
- 10) 片井喜太郎: 日本農芸化学会誌 **18**, 379 (1942)
- 11) 藤田秋治: 日本農芸化学会誌 **15**, 397 (1939)
- 12) P. Koivistoinen, A. Karinpaa, M. Kononen & P. Roine: *J. Agric. Food Chem.* **13**, 468 (1965)
- 13) 平松禮治・古谷扶美枝: 第 2 回日本農薬学会講演要旨集 (1977)