

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4553181号
(P4553181)

(45) 発行日 平成22年9月29日(2010.9.29)

(24) 登録日 平成22年7月23日(2010.7.23)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 Q 1/46

(2006.01)

C 12 Q 1/46

C 12 Q 1/48

(2006.01)

C 12 Q 1/48

G 01 N 33/15

(2006.01)

G 01 N 33/15

Z

C

請求項の数 1 (全 9 頁)

(21) 出願番号

特願2004-89137 (P2004-89137)

(22) 出願日

平成16年3月25日 (2004.3.25)

(65) 公開番号

特開2005-270008 (P2005-270008A)

(43) 公開日

平成17年10月6日 (2005.10.6)

審査請求日

平成19年3月13日 (2007.3.13)

(73) 特許権者 000001812

株式会社サタケ

東京都千代田区外神田4丁目7番2号

(73) 特許権者 502069167

加藤 純一

広島県東広島市西条町田口東子2862-

42 エステート国重B202

(72) 発明者 江盛 貴之

東京都千代田区外神田四丁目7番地2号

株式会社サタケ内

(72) 発明者 梶山 剛志郎

東京都千代田区外神田四丁目7番地2号

株式会社サタケ内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 残留農薬分析方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

あらかじめ誘導化反応の妨害となる金属イオンの影響を緩和するため、金属イオンに対して高い錯生成能を有するキレート剤であるEDTAを被検試料に添加して、還元型グルタチオンと金属イオンとの反応物の生成を阻止し、次いで、被検試料中のカルボスルファン、フラチオカルブ及びベンフラカルブからなるカルボフラン誘導体又はアラニカルブ及びチオジカルブからなるメソミル誘導体を、グルタチオン転移酵素の触媒作用により還元型グルタチオンと反応させて30分以上放置し、コリンエステラーゼ阻害能の大きなカルボフラン又はメソミルに変換し、該変換されたカルボフラン又はメソミルを、さらにコリンエステラーゼ及びコリンオキシダーゼと反応させて60分間以上放置し、変化するコリンエステラーゼ活性より被検体中に含まれる新規系統のカーバメート系農薬を検出することを特徴とする残留農薬分析方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、米などの穀物に残留する農薬の分析方法に関するもので、特に、新規な系統のカーバメート系農薬を高感度に検出することができる残留農薬分析方法に関する。

【背景技術】

【0002】

従来、本発明者らは、簡便に有機リン系農薬とカーバメート系農薬とを同時に検出する

ことが可能な残留農薬検出方法を提案している（特許文献1参照）。

【0003】

このものは、検出対象のサンプルをカルボキシルエステラーゼとコリンエステラーゼとを含む混合溶液中で反応させ、反応後の溶液を用いてカルボキシルエステラーゼ特異基質とコリンエステラーゼ特異基質とを加水分解し、基質の加水分解生成物に発色試薬を添加して発色させるか、又は、加水分解生成物自身が発色する基質を使用して発色させ、複数波長のスペクトル変化測定を同時に測定することで、サンプル中の有機リン系農薬群とカーバメート系農薬群とを分別して同時に検出するものである。

【0004】

この構成により、カルボキシルエステラーゼ特異基質及びコリンエステラーゼ特異基質を加水分解し、複数の波長を同時に照射して経時変化の測定が行える分光光度計を使用して、両基質の分解に起因する吸収を同時に検出し、演算処理により各酵素触媒反応の反応速度を算出し、この反応速度変化からサンプル中の有機リン系農薬とカーバメート系農薬とを分別的に検出するので、簡便に有機リン系農薬とカーバメート系農薬とを同時に分別することができる。

【0005】

しかしながら、上記のものは有機リン系農薬群とカーバメート系農薬群とを分別して検出できるものの、農薬の種類によっては酵素阻害を起こしにくく、分析精度が不足するカーバメート系農薬がある。

【0006】

ところで、カーバメート系の殺虫剤は、害虫などの神経系を司るコリンエステラーゼの働きを低下し、殺虫作用を示すことが知られている。古くより登録されたカーバメート系殺虫剤は、即効性はあるが、持続性がないことが問題であった。さらに、1970年代後半、防除害虫体内で前記カーバメート系殺虫剤に対する耐性菌の発現による効能低下によりその改良が望まれていた。そこで、1980年代以降、前記問題をかんがみて、カルボフラン類縁体（ベンダイオカルブ）、カルボフラン誘導体（カルボスルファン、フラチオカルブ、ベンフラカルブ）、メソミル誘導体（チオジカルブ、アラニカルブ）の6成分が新規な系統のカーバメート系農薬として登録された。

【0007】

前記新規な系統のカーバメート系農薬のうち、ベンダイオカルブ以外は、散布後、自然界での代謝によりコリンエステラーゼ阻害能の大きなカルボフラン、又はメソミルに変換し、徐々に効能を示すように開発された農薬である。

【0008】

前記新規な系統のカーバメート系農薬のうち、カルボフラン誘導体は、コリンエステラーゼ阻害能が大きいカルボフランにスルフィド結合で他の構成する分子が結合した（カルボフラン-S-R）構造であり、メソミル誘導体も同様に（メソミル-S-R）構造となっている。これらは散布後、自然界での代謝を受け、徐々にカルボフランやメソミルに変換され、殺虫作用を示すように作られた農薬である。つまり、該カルボフラン誘導体、メソミル誘導体はコリンエステラーゼ阻害能が小さく残留基準値に対して十分な検出感度を得られなかった。

【0009】

【特許文献1】特開2003-298号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は上記問題点にかんがみ、被検試料中に含まれる新規な系統のカーバメート系農薬を高感度に検出することが可能な残留農薬分析方法を提供することを技術的課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

10

20

30

40

50

上記課題を解決するため請求項 1 記載の発明では、あらかじめ誘導化反応の妨害となる金属イオンの影響を緩和するため、金属イオンに対して高い錯生成能を有するキレート剤であるEDTAを被検試料に添加して、還元型グルタチオンと金属イオンとの反応物の生成を阻止し、次いで、被検試料中のカルボスルファン、フラチオカルブ及びベンフラカルブからなるカルボフラン誘導体又はアラニカルブ及びチオジカルブからなるメソミル誘導体を、グルタチオン転移酵素の触媒作用により還元型グルタチオンと反応させて30分以上放置し、コリンエステラーゼ阻害能の大きなカルボフラン又はメソミルに変換し、該変換されたカルボフラン又はメソミルを、さらにコリンエステラーゼ及びコリンオキシダーゼと反応させて60分間以上放置し、変化するコリンエステラーゼ活性より被検体中に含まれる新規系統のカーバメート系農薬を検出する、という技術的手段を講じた。

10

【発明の効果】

【0013】

以上のように本発明によれば、被検試料中に含まれるカルボフラン誘導体又はメソミル誘導体を誘導化することにより、コリンエステラーゼに対する阻害能が大きな物質に変換し、これをコリンエステラーゼと反応させて検出するので、コリンエステラーゼ阻害能が小さく残留基準値に対して十分な検出感度を得られなかった該カルボフラン誘導体又はメソミル誘導体であっても、十分な検出感度をもって検出することが可能となる。

【0014】

また、金属に対して高い錯生成能を有するキレート剤を添加した後、前記新規な系統のカーバメート系農薬の変換を行い、これをコリンエステラーゼと反応させて検出するので、該新規な系統のカーバメート系農薬の円滑な誘導化が行われ、残留基準値に対して十分な精度で検出することが可能となる。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

以下、本発明を実施するための最良の形態を説明する。まず、本発明の残留農薬分析方法は図1の模式図で表される。

【0016】

図1において、まず、破線囲み箇所(Iの箇所)を説明する。カルボフラン誘導体(Cf-S-R)(1)を、グルタチオン転移酵素(GST)(3)の触媒により、還元型グルタチオン(GSH)(2)と反応させると、カルボフラン誘導体(Cf-S-R)(1)は、カルボフラン(Cf)(4)に変換する。この誘導化反応で酸化型グルタチオン(GS-S-R)(5)が副生成する。

30

【0017】

次に、一点鎖線囲み箇所(IIの箇所)を説明する。この反応は、被検試料中に含まれる金属イオンMⁿ⁺(6)の前記誘導化反応に使用する還元型グルタチオン(GSH)(2)への影響を緩和することを目的とする。前記誘導化反応を行う前に、以下の反応を行う。被検試料中に含まれる金属イオンMⁿ⁺(6)に、金属イオンに対して高い錯生成能を有するキレート剤L(8)を添加することで、誘導化反応に影響しないMⁿ⁺·L(9)が生成する。該反応により、金属イオンMⁿ⁺(6)と還元型グルタチオン(GSH)(2)との反応物GS M(7)の生成が抑止される。これにより、前記誘導化反応に使用する還元型グルタチオン(GSH)(2)への影響の緩和が可能となる。

40

【0018】

前記グルタチオン転移酵素(GST)(3)は、還元型グルタチオン(GSH)(2)を反応基質とし、カルボフラン誘導体又は、メソミル誘導体を、それぞれカルボフランとメソミルに変換する触媒作用がある。

【0019】

前記作用は以下の反応式となる。

【化1】



農薬名	R	10
カルボスルファン	$-\text{N}[(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3]_2$	
ベンフラカルブ	$-\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	
フラチオカルブ	$-\text{NCO}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ CH_3	

【化2】

20



農薬名	R	30
アラニカルブ	$\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{N}(\text{H}_2)-(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}$	
チオジカルブ	$\text{H}_3\text{C}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{SCH}_3$	

【0020】

40

この効果として、カルボフラン誘導体をコリンエステラーゼ阻害能が大きなカルボフランに変換でき、高感度な検出が可能となる。また、メソミル誘導体も同様に、コリンエステラーゼ阻害能が大きなメソミルに変換でき、高感度な検出が可能となる。

【0021】

また、前記キレート剤L(8)は、誘導化反応を行う前に被検試料中に添加することで、誘導化反応を妨げる金属イオン M^{n+} (6)を誘導化反応に影響しない $M^{n+} \cdot L$ (9)にし、還元型グルタチオン(GSH)(2)と金属イオン M^{n+} (6)との反応物GSM(7)の生成を抑止する作用がある。

【0022】

前記作用は以下の反応式となる。

50

【化3】



+

10



20

【0023】

この効果として、被検試料中に含まれる金属イオン M^{n+} (6) の誘導化反応に使用する還元型グルタチオン (GSH) (2)への影響が緩和され、誘導化反応を円滑に進めることが可能となった。

【実施例1】

【0024】

この実施例では、カルボスルファンの誘導化の確認をした(図2参照)。カルボフラン誘導体であるカルボスルファンを種々濃度含む0.02M Mes緩衝液(pH6.0)の組成からなる溶液10mL中に、該溶液中での濃度で $5 \times 10^{-5}M$ の還元型グルタチオン(GSH)と、同0.025U/mLのグルタチオン転移酵素(GST)とを添加して、30分間以上放置しカルボスルファンから、カルボフランへの変換を行った。

30

【0025】

次に、前記の放置後の溶液に、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.6)及び0.2M塩化カリウムとの組成からなる溶液10mLを加え20mLの溶液とし、該溶液に溶液中での濃度で0.01U/mLコリンエステラーゼと、同0.5U/mLコリンオキシダーゼとを添加し、前記還元型グルタチオンとグルタチオン転移酵素により変換された物質との接触を60分間以上放置することにより行った。

30

【0026】

接触のため放置した後の前記溶液のコリンエステラーゼに対する阻害能を調べるため、該溶液中での濃度で $2 \times 10^{-4}M$ アセチルコリンを添加し、生成する過酸化水素を測定した。カルボスルファンを添加していない溶液を比較の対照とし、種々濃度カルボスルファンを添加した溶液中での過酸化水素による信号とを比較した。カルボスルファンの検量線を図3に示す。

40

【0027】

図3は横軸に農薬濃度、縦軸に阻害信号をとり、印はカルボスルファン標準品を還元型グルタチオン(GSH)と、グルタチオン転移酵素により変換した検量線であり、印は該変換をしていないカルボスルファン標準品の検量線であり、印はカルボフラン標準品の検量線である。図3より、該変換をしていないカルボスルファン標準品(印)は阻害能が小さいが、該変換をしたカルボスルファン標準品(印)は、カルボフラン標準品の検量線(印)と同等であり、カルボスルファン1分子からカルボフラン1分子の誘導化が

50

確認できた。

【実施例2】

【0028】

この実施例では、玄米においてカルボフラン誘導体であるベンフラカルブの分析が可能であるかを、ベンフラカルブを玄米に添加し回収することで確認した。まず、玄米を粉碎し、粉碎米を25g秤量し、該粉碎米25gに対して20ppbのベンフラカルブを添加した。そして、該粉碎米25gに水25mLと、アセトニトリル50mLを加え、振とう機を使用し農薬の抽出を行った（ステップ1）。

【0029】

次に、前記の抽出をした液中の雑多な夾雑物を除くため吸引ろ過を行った。該ろ過により10分けられたろ液をとり、該ろ液中の水溶性の夾雑物と金属イオンを除くため、液々分配を行った。該液々分配は、あらかじめ分液漏斗に飽和食塩濃度の1Mリン酸緩衝液(pH7.0)を15mLと、食塩5g、50mM EDTA 1mLとを投入しておき、該ろ液を加えて振とう後、しばらく放置し有機層、水層の2層に分かれるまで待ち、有機層を分取した。該液々分配により水溶性の夾雑物は、リン酸緩衝液からなる水層中に移動し、金属イオンはEDTAと錯体を生成し水層中に移動させることで、除去した（ステップ2-1）。

【0030】

そして前記有機層の液から親油性の夾雑物を除く（脱脂する）ため、ODS(オクタデシルシリカケル)カラム処理を行い、その他の夾雑物の粗精選として硫酸ナトリウムシリカゲルの入ったカラムで処理した。該処理からの液を減圧乾固し、溶媒を留去した（ステップ2-2）。20

【0031】

さらに、シリカゲルカラムで精製を行った。前記減圧乾固後の残渣に、酢酸エチルとヘキサンが3:97で混合された溶媒5mLを該残渣に加えて溶解し、この溶液をシリカゲルカラムに展開し、該溶液中の夾雑物、農薬をシリカゲルに吸着させた。その後、酢酸エチルとヘキサンが3:7で混合された溶媒20mLで展開し、シリカゲルに吸着した農薬を溶離した。該展開した2種類の混合溶媒をまとめて減圧乾固し、溶媒を留去した。該減圧乾固後の残渣は、0.02M Mes緩衝液(pH6.0)の組成からなる溶液12.5mLに転溶した。（ステップ2-3）。

【0032】

前記転溶した溶液12.5mLのうち2mL採取し、0.02M Mes緩衝液(pH6.0)の組成からなる溶液8mLと合わせて10mLとし、被検試料とした。該被検試料にカルボフラン誘導体であるベンフラカルブを種々濃度添加した（ステップ3-1）。

【0033】

前記の被検試料中で還元型グルタチオンとグルタチオン転移酵素によるベンフラカルブのカルボフランへの変換を行う前に、金属イオンに対して高い錯生成能を有するキレート剤であるEDTAを該被検試料中での濃度で0.5mM添加することで、該被検試料中に含まれる該変換を行う際の妨害物質である金属イオンの影響を緩和した。その後、該被検試料中での濃度で 5×10^{-5} Mの還元型グルタチオンと、同0.025U/mLのグルタチオン転移酵素とを添加して、30分間以上放置しベンフラカルブから、カルボフランへの変換を行った（ステップ3-2）。40

【0034】

次に、前記放置後の被検試料に実施例1の場合と同様の溶液、コリンエステラーゼ、コリノキシダーゼを添加し、接触を60分間以上の放置で行った（ステップ3-3）。

【0035】

その後、接触のため放置した後の前記被検試料に実施例1の場合と同様のアセチルコリンを添加し、生成する過酸化水素を測定した。実施例1の農薬を添加していない溶液を比較の対照とし、種々濃度ベンフラカルブを添加した被検試料中での過酸化水素による信号を比較した。被検試料中（玄米）におけるベンフラカルブの検量線を図5に示す。

【0036】

50

20

30

40

図5は、横軸に農薬濃度、縦軸に阻害信号をとり、印は前述の実施例1と同様の方法で作成したベンフラカルブ標準品を還元型グルタチオンと、グルタチオン転移酵素により変換した検量線であり、印は玄米にベンフラカルブ20ppb濃度添加して回収した被検試料中に、さらに、種々濃度のベンフラカルブを添加し還元型グルタチオンと、グルタチオン転移酵素により変換した検量線である。図5より、の傾きがの傾きと同等なことから、被検試料中(玄米)での誘導化が可能であることが分かった。また、の検量線の横軸との交点がほぼ約-20ppbとなっていることから、粉碎後すぐに添加したベンフラカルブの回収も確認できた。よって、該被検試料(玄米)中のベンフラカルブの分析は、残留農薬基準値0.2ppmに対しても、十分な検出感度をもって検出することが可能であると確認できた。

10

【産業上の利用可能性】

【0037】

本発明は、米などの穀物に残留する残留農薬の検出や、野菜や果物などの農産物に残留する残留農薬の検出に応用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】カルボフラン誘導体のカルボフランへの誘導化及び、誘導化の妨害物となる金属イオンの影響を緩和する反応を示す模式図である。

【図2】カルボスルファンの誘導化の工程図である。

【図3】還元型グルタチオンとグルタチオン転移酵素により変換されたカルボスルファンの検量線である。

20

【図4】玄米においてベンフラカルブの分析を行う工程図である。

【図5】被検試料中(玄米)においてのベンフラカルブ検量線である。

【符号の説明】

【0039】

1 カルボフラン誘導体 (C f - S - R)

2 還元型グルタチオン (G S H)

3 グルタチオン転移酵素 (G S T)

4 カルボフラン (C f)

5 酸化型グルタチオン (G S - S - R)

30

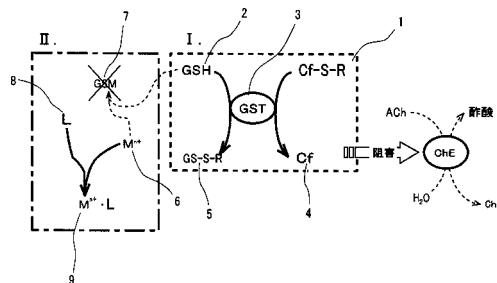
6 金属イオン (M ⁿ⁺)

7 還元型グルタチオンと金属イオンの反応物 (G S M)

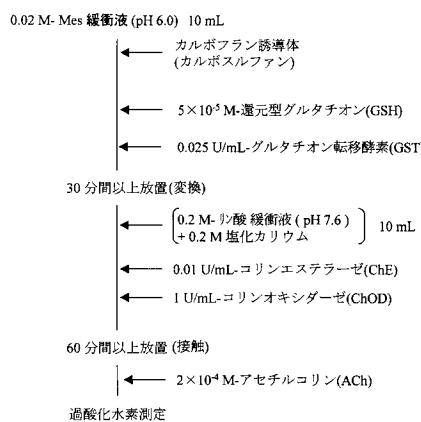
8 キレート剤 (L)

9 金属イオンとキレート剤との錯体 (M ⁿ⁺ · L)

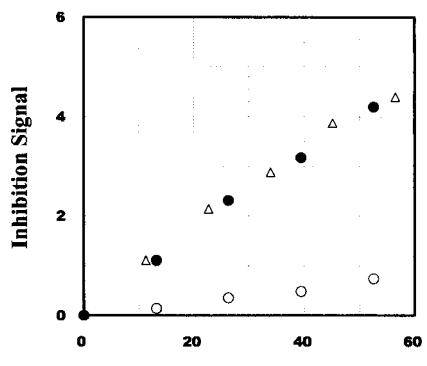
【図1】



【 図 2 】

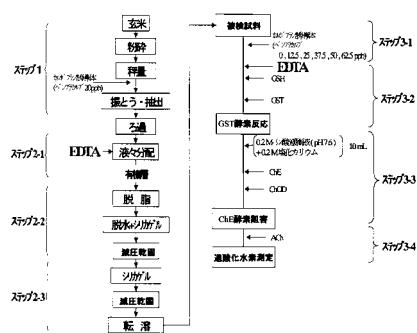


【 図 3 】

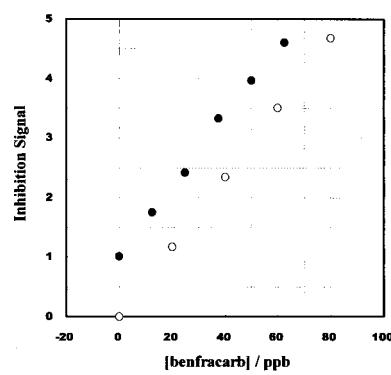


- : カルボスルファン GSTあり GSHあり
- : カルボスルファン GSTなし GSHなし
- △ : カルボフラン

〔 4 〕



〔 図 5 〕



- : ベンフラカルブ²を20ppb添加し回収した被検試料中(米)のベンフラカルブ検量線
- : ベンフラカルブ検量線

フロントページの続き

(72)発明者 加藤 純一

広島県東広島市西条町田口東子2862番地42号 B202

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 特開2002-330800 (JP, A)

特開2003-000298 (JP, A)

特開2000-97926 (JP, A)

特開平9-107992 (JP, A)

Analytical Sciences, 2003, Vol.19, pp.1605-1610

Chemical Research in Toxicology, 1991, Vol.4, No.2, pp.131-140

蛋白質核酸酵素 臨時増刊号 グルタチオン研究のエポック, 1988, Vol.33, No.9, pp.1423-1428

蛋白質核酸酵素 臨時増刊号 グルタチオン研究のエポック, 1988, Vol.33, No.9, pp.1513-1521

雑草研究, 2003, Vol.48, No.1-2, pp.17-23

宮城県保健環境センター年報, 2002, Vol.20, pp.138-140

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00 - 1/70

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

PubMed