

は東京化成製、phosphorus pentasulfide と  $\alpha$ -bromosuccinic acid はアルドリッチ製、sodium methoxide、elemental sulfur は和光純薬工業製を用いた（合成法は参考文献 3 から 6 参照）。

malathion  $\alpha$ -monocarboxylic acid 及び malathion  $\beta$ -monocarboxylic acid は、斎藤勲博士（愛知県衛生研究所）より分与された。

### ②試液

pH7.6 リン酸緩衝液：0.2M リン酸水素二ナトリウム-水酸化ナトリウム（0.5mM エチレンジアミン四酢酸ナトリウムを含む）

pH10 リン酸緩衝液：0.2M リン酸水素二ナトリウム-水酸化ナトリウム

マラチオン溶液：3.426 mg/ml になるようにアセトンで溶解して製した。

### ③装置

液体クロマトグラフ装置及び LC/MS 装置は、それぞれ島津製作所製 Class LC-10VP シリーズ及び LC-MS QP-8000 型を用い、後者は ESI（ネガティブ）モードで測定した。

液体シンチレーションカウンターは、Aloka 社の LSC-5100 を用いた。

### ④液体クロマトグラフ及び LC/MS 条件

条件 1 分析カラム：和光純薬工業製 Wakosil-II 3C18RS (2 mm diameters × 150 mm)、総流量：0.2ml/min、移動相：A アセトニトリル及び B 水、注入量：20  $\mu$ l、カラム温度：40°C、測定波長：254nm

条件 2 分析カラム：和光純薬工業製 Wakosil-II 3C18RS (2 mm diameters × 150 mm)、総流量：0.2ml/min、移動相：A アセトニトリル及び B 40mM 酢酸アンモニウム水溶液、注入量：20  $\mu$ l、カラム温度：40°C、測定波長：254nm

Time(min)	%B
Initial	100
15	0
25	0
26	100
30	Stop

LC/MS は以下の条件で行った。

測定モード	ESI（ネガティブ）
ドラインガス流量	4.5L/min（窒素）
CDL 温度	230°C
CDL 電圧	-4.5kV
プローブ電圧	20V
デフレクター電圧	-20V

また、測定した m/z は、以下のとおりである。

測定対象化合物	m/z
Malathion	315
Desmethyl malathion	315
malathion acid potassium salt	273, 259
Desmethyl malathion acid sodium salt	259
Potassium O,O'-dimethyl phosphorodithioate	157, 141
Potassium O,O'-dimethyl phosphorothioate	141
malathion $\alpha$ -monocarboxylic acid	297
malathion $\beta$ -monocarboxylic acid	157
Maleic acid	115

Malic acid	133, 275
Succinic acid	117
Mercaptosuccinic acid	148, 297

#### ⑤ラベル化マラチオンによる分解物の分画

1.5mL のエッペンドルフチューブに GR 90mg をとり、1ml の pH7.6 リン酸緩衝液を加えて溶解し、遠心分離して沈殿物を取り除いた。この上清 0.75ml とり、7.3 $\mu$ l の [<sup>14</sup>C]マラチオン溶液を添加して 30°C で反応させ、経時的に 100 $\mu$ l ずつ取り、これに 100 $\mu$ l のイソプロパノールを添加し、遠心分離して沈殿物を取り除いた。各試料を HPLC を用い、条件 1 で分離して 1 分ごとに 2.0 mL のエッペンドルフチューブに分取し、各画分に液体シンチレーション用カクテル剤を添加し C-DPM を測定した。これらのフラクションのうち、放射能が認められた画分を HPLC を用いて条件 2 でさらに分離して、得られた各画分の C-DPM (Carbon14-degradation per minute) を上と同様に測定した。

#### ⑥非ラベル化マラチオンによる分解物の同定と経時変化

1.5mL のエッペンドルフチューブに GR 90mg を取り、1ml の pH7.6 緩衝液を加えて溶解し、遠心分離して沈殿物を取り除いた。更に、LC/MS 分析で妨害となる低分子物質を取り除くために、限外ろ過を行った。膜上の残留物を取り 1ml に定容した後、この 0.75ml をとり、7.3 $\mu$ l のマラチオン溶液を添加して 30°C で反応させ、経時的に 100 $\mu$ l ずつ取り、これに 100 $\mu$ l のイソプロパノールを添加し、LC/MS を用い、条件 1 で測定した。

### C. 研究結果

#### ①ラベル化マラチオン分解物の溶出画分

GR によるマラチオンの分解反応 4 時間後の反応液を、HPLC 条件 1 で分取した各フラクションの放射能を測定した結果を図 2 に示す。第 3 (<sup>14</sup>C でラベル化された未知の分解物であり、以下 A と定義する。)、第 8 (同様に、以下 B と定義する。) と第 16 (マラチオン) フラクションの放射能が特に高かった。経時的に見ると、マラチオン由来の放射能の減少とともに、第 8 と第 3 フラクションの放射能が増加した(図 3)。図 2 で分取した第 3 及び第 8 フラクションを、さらに、条件 2 で分取すると、A は第 8 フラクションに(図 4)、B は第 10 フラクションに(図 5)それぞれ、放射能が認められた。

#### ②非ラベル化マラチオン分解物の同定と経時的増減

分解物の同定は、LC/MS 測定における保持時間と特徴的な m/z を、参照物質と比較して行った。また、LC 条件 1 での LC/MS での経時変化を図 6 に示す。マラチオンの減少に反比例して、Maleic acid (m/z=115、RT=1.2 分)、Malic acid (m/z=115、RT=2.8min、図 3 における第 3 画分相当)、及び malathion  $\beta$ -monocarboxylic acid (m/z=141, 157、RT=7.8) と Desmethyl malathion (m/z=315 RT=7.7) (図 3 における第 8 画分相当) が増加した。

### D. 考察

RI 実験の結果から、分解物の保持時間に相当する物質の検索を LC/MS を用いた非 RI 実験でおこなった。その結果、保持時間が条件 1 の 7.9 分 (B に相当) の m/z=141, 157 と 7.7 分の m/z=315 に相当する物質は、malathion  $\beta$ -monocarboxylic acid と Desmethyl malathion であることが判明した。また、LC/MS を用いた正確な定量は、困難であることから、おおよその量しか判断できないが、malathion  $\beta$ -monocarboxylic acid の方が主生成物であることが示唆された。

図 3 における A は LC 条件 1 での保持時間から、malic acid ではないかと考えられたが、LC 条件 2 では RI を用いた際の実験結果と RT が一致しなかったため、malic acid 以外の物質と考えられた。A は、B に相当する desmethyl malathion あるいは malathion  $\beta$ -monocarboxylic acid よりも水溶性が増していることから、これら B がさらに代謝されたものと推定される。

以上の結果より明らかになった小麦酵素によるマラチオンの代謝経路を図7に示した。

## E. 結論

小麦に含まれるマラチオンを食品衛生法に基づく告示法に従って測定した場合、その測定値が小麦中の酵素によって実際の存在量に比べて著しく低く見積もられる現象における主たる分解物が malathion  $\beta$ -monocarboxylic acid と desmethyl malathion あることが示唆された。今後は、第3画分における分解物の同定、並びにこれら代謝物の毒性評価の調査、公定法の改良などが必要であろう。また、今回用いた GR はクルードな製品であるため、さらに精製度の高い酵素での確認が必要であると考えられる。

## F. 参考文献

- 1) Davidson PP, Dietary fat alteration of plasma cholinesterase response to malathion. Toxicology, 5, 113-115, 1975.
- 2) Yoshii, K., Tsumura, Y., Ishimitsu, S., Tonogai, Y. and Nakamuro, K.: Degradation of Malathion and Phenthoate by Glutathione Reductase in Wheat Germ, J. Agric. Food Chem., 48, 2502-2505 (2000)
- 3) Hirose, M. et.al., Botyu Kagaku, 36, 43(1971)
- 4) Fletcher et.al., J. Amer. Chem. Soc., 72, 2461(1950)
- 5) Foss et.al., Chem. Abs., 41, 1599g (1947)
- 6) Dennis Y., Arc. Env. Cont. Toxicol., 5, 63-86(1976)

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 吉井公彦, 外海泰秀, 津村ゆかり, 中村優美子, 柴田正: 超臨界流体抽出及び HPLC による穀類中 15 種農薬の一斉分析法の検討食衛誌, 39, 184-191(1998)
- 2) 吉井公彦, 津村ゆかり, 中村優美子, 石光進, 外海泰秀, 土屋鍛, 木村実加, 関口幸弘: 超臨界流体抽出及び GC, HPLC による穀類中残留農薬の多成分一斉分析法, 40, 68-74(1999)
- 3) Yoshii, K., Okada, M., Tsumura, Y., Ishimitsu, S. and Tonogai, Y, Supercritical Fluid Extraction of Ten Chloracetanilide Pesticides and Pymrinobac-methyl in crops: comparison with the Japanese Bulletin method, J. AOAC Int., 82, 1239-1245 (1999)
- 4) Yoshii, K., Tsumura, Y., Ishimitsu, S., Tonogai, Y. and Nakamuro, K.: Degradation of Malathion and Phenthoate by Glutathione Reductase in Wheat Germ, J. Agric. Food Chem., 48, 2502-2505 (2000)

### 2. 学会発表

- 1) 吉井公彦, 外海泰秀, 津村ゆかり, 中村優美子, 柴田正: 超臨界流体抽出 (SFE)-HPLC による穀類中残留農薬の一斉分析法 (1), 日本食品衛生学会第 74 回学術講演会(1997.10)
- 2) 外海泰秀, 吉井公彦, 津村ゆかり, 中村優美子, 柴田正: 超臨界流体抽出 (SFE)-GC(GC/MS)による穀類中残留農薬の一斉分析法 (2), 日本食品衛生学会第 74 回学術講演会(1997.10)
- 3) Yoshii, K., Tonogai, Y., Tsumura, Y., Nakamura, Y. and Shibata, T.: Studies on Determination of 18 Pesticides in Cereals by SFE and HPLC, 10th California Pesticide Residue Workshop (1998.3)
- 4) 吉井公彦, 外海泰秀, 津村ゆかり, 中村優美子, 柴田正: 穀類中に残留する有機リン系農薬の抽出時における分解, 日本食品衛生学会第 75 回学術講演会(1998.5)
- 5) 吉井公彦, 津村ゆかり, 中村優美子, 外海康秀: 穀類中に残留する有機リン系農薬の抽出時における分解(2), 日本食品衛生学会第 76 回学術講演会(1998.10)

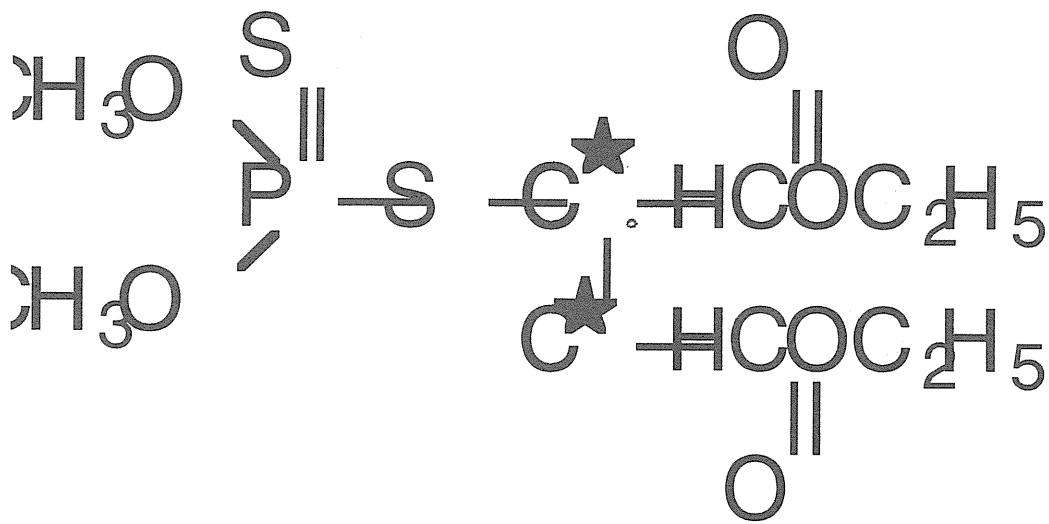


図1 使用した $[^{14}\text{C}]$ マラチオンの構造式

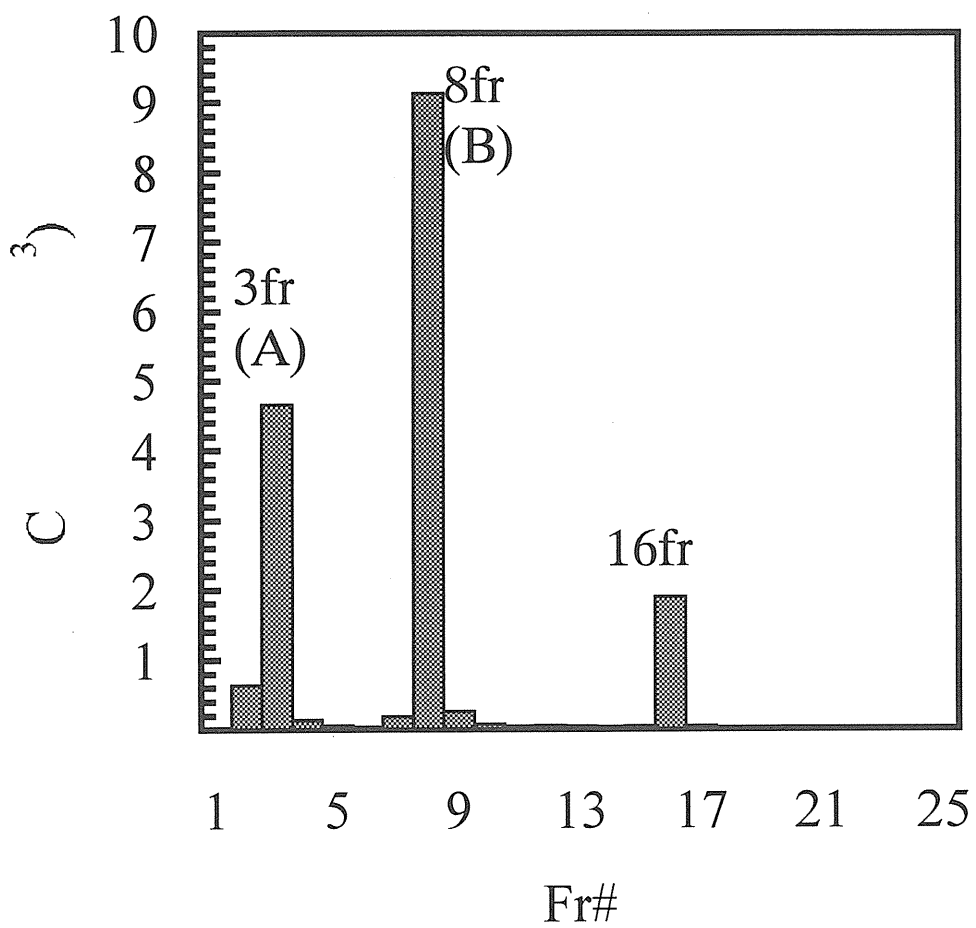


図 2 反応開始 4 時間後の反応物の各画分における放射能

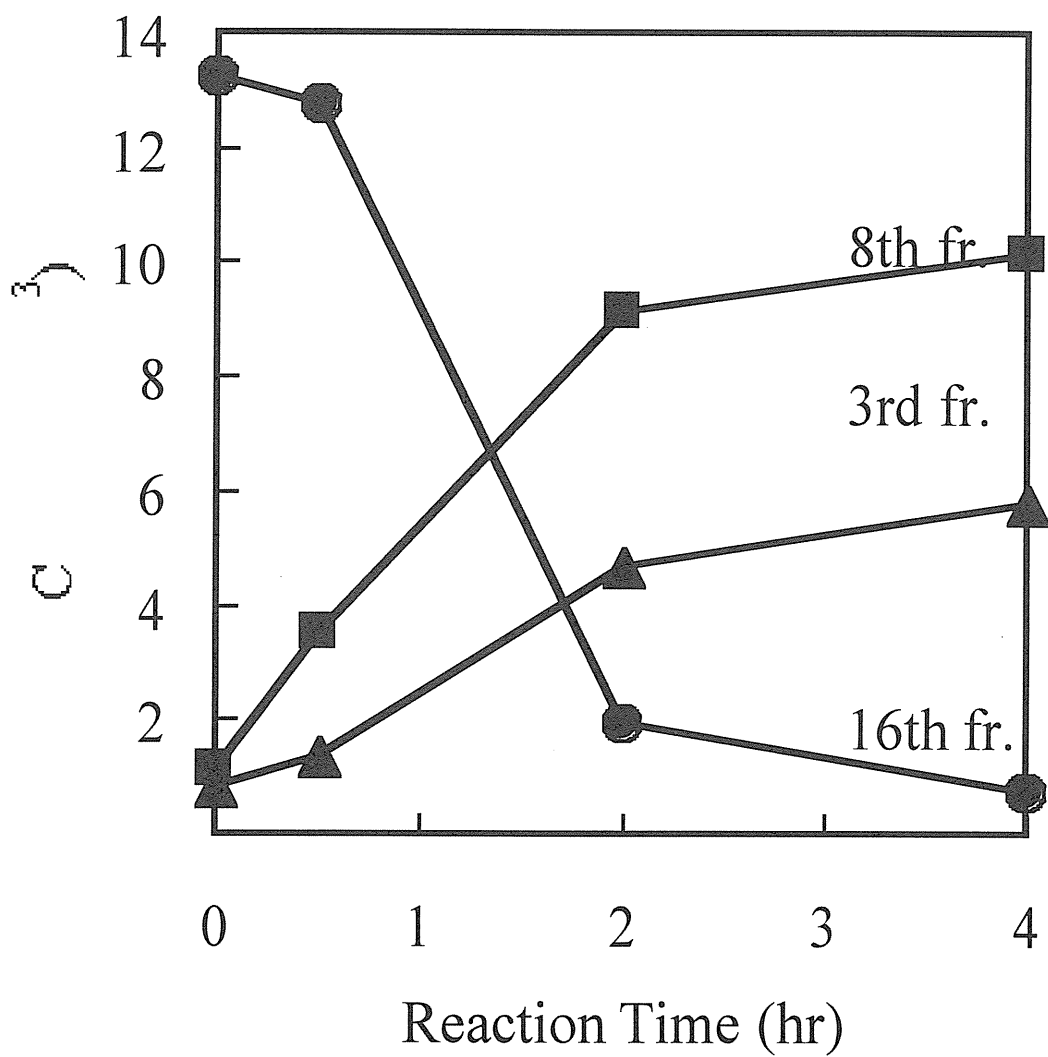


図3 ラベル化マラチオンを小麦酵素で分解した反応物の高放射能画分の経時的変化

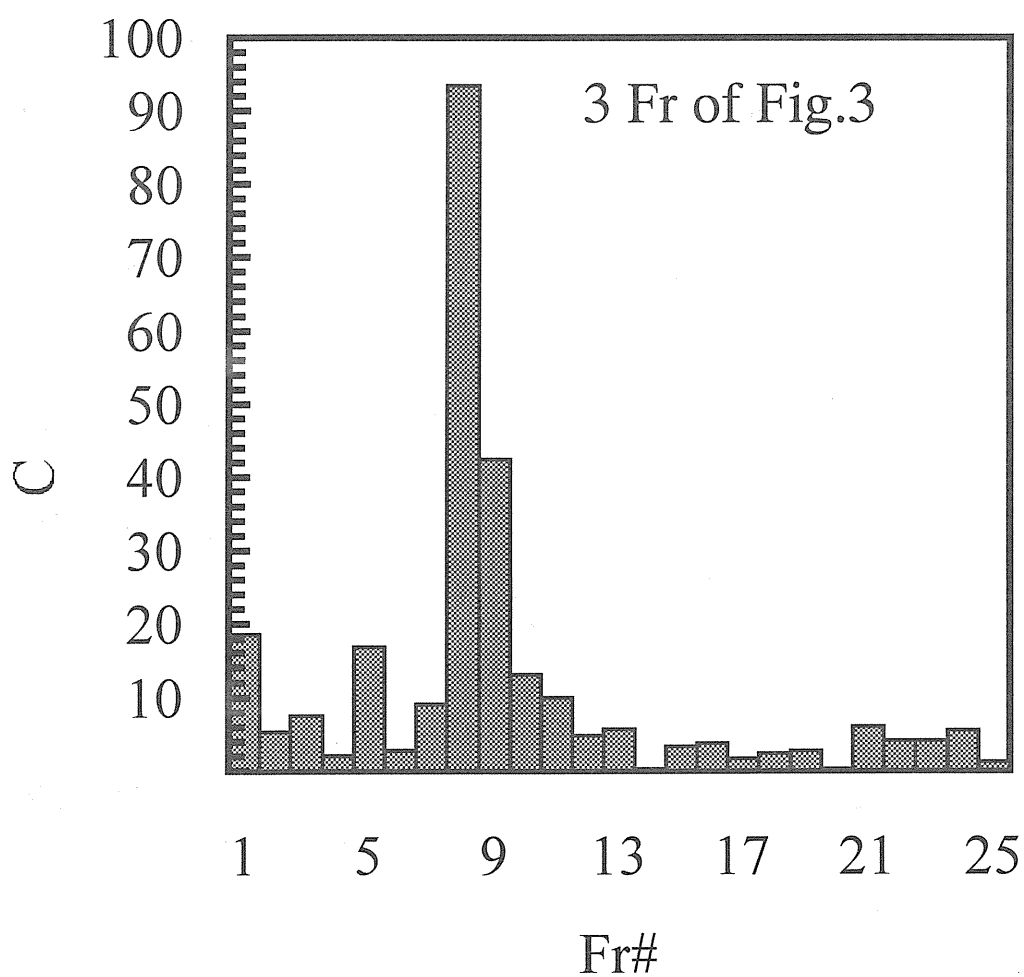


図4 図2のAをHPLC条件2でさらに分画した場合の各画分の放射能

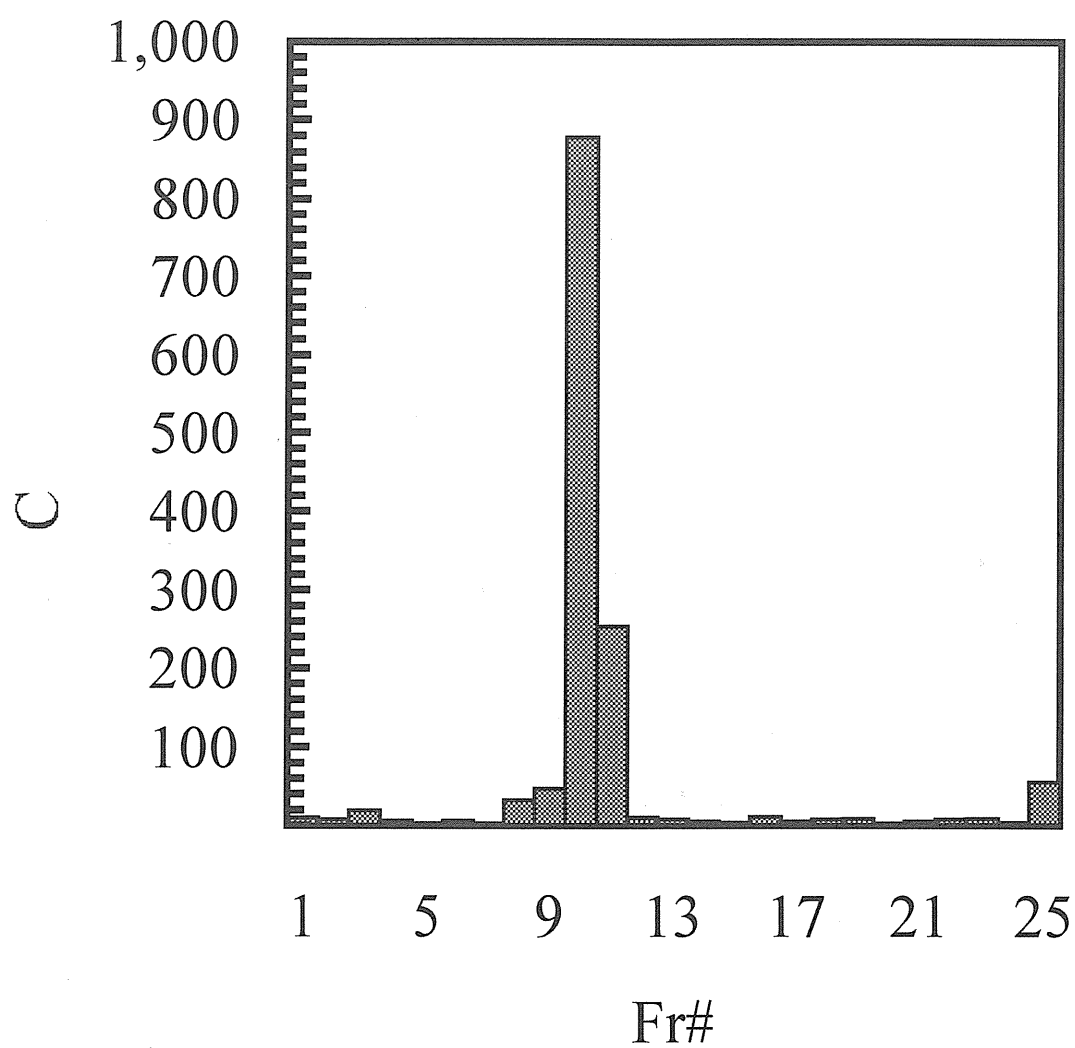


図5 図3のBをHPLC条件2でさらに分画した場合の各画分の放射能



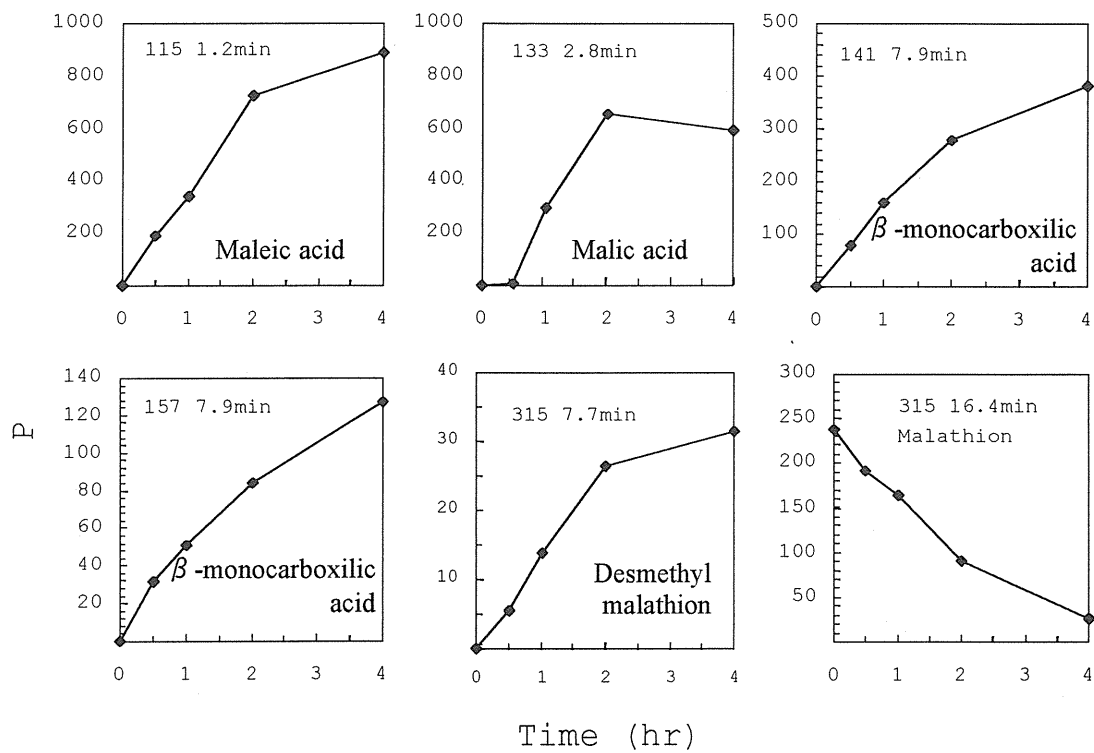


図6 非ラベル化マラチオンのLC/MSによる分解物の同定とその量の経時変化

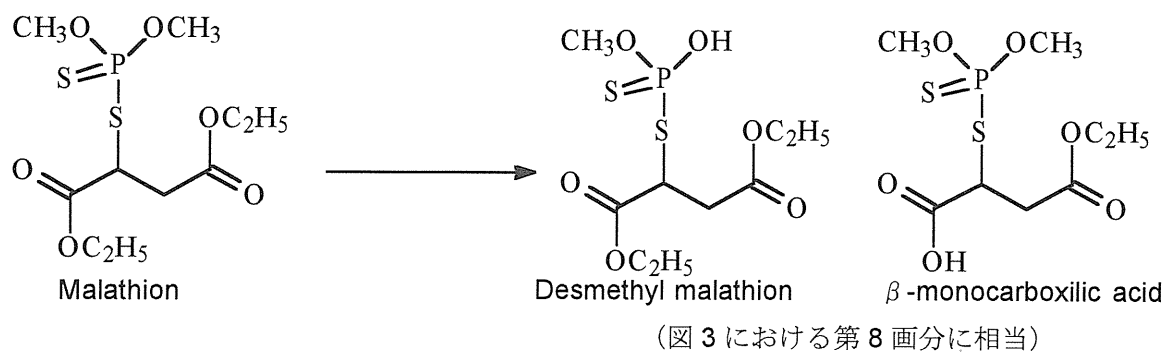


図 7 予測される小麦酵素によるマラチオンの分解経路

