

件を考慮して、トリエチルアミン-ギ酸緩衝液を選択した。

トリエチルアミン及びギ酸の各試液を pH メーターで測定しながら適宜混和し、容易かつ正確に pH4、5 及び 6 の緩衝液を作製した。

## 2) 加熱器具の検討

加水分解処理を行うための器具について検討した。

共栓ナス型フラスコにジムロート冷却管を装着してマントルヒーター上で加熱したところ、温度制御がうまくできなかった。そこで、加熱用容器として共栓試験管を用い、密栓してアルミ製ヒートブロック上で加熱した。その結果、温度は制御できるものの、内圧が上昇し、試験液の一部が漏れ・揮散するなどして液量に変化したことから、農薬本体や加熱生成物も損失している可能性が示唆された。

機密性が高く、耐圧性に優れ、アルミ製ヒートブロックで加熱処理できる加熱用容器について調査したところ、化学反应用ガラスバイアル及びアミノ酸分析用加水分解試験管などが候補に挙がった。これら容器

を比較検討し、今回は、ヒートブロック上での操作性がより優れたアミノ酸分析用加水分解試験管（以下、バキュームチューブと称す）を採用することとした。

## 3) 加熱処理方法

それぞれのバキュームチューブに、pH4、5、及び6となるように調整したトリエチルアミン-ギ酸緩衝液 1mL を入れ、これにマラチオン 1.0mg/mL アセトン標準溶液 10 $\mu$ L をそれぞれ加えた。加熱により加圧破損しないように、容器内をアスピレーターで減圧した後、密栓し、アルミブロック中で表 1 の条件に従い、各 pH の緩衝液それぞれを 90 $^{\circ}$ C20 分、100 $^{\circ}$ C60 分及び 120 $^{\circ}$ C20 分加熱した（図 2）。放冷後、バキュームチューブ内の溶液を 10 $\mu$ L ずつ採り、これにアセトン 40 $\mu$ L、メタノール 40 $\mu$ L を加え、それぞれ GC/MS、LC/TOF-MS で測定した。

表 1. 加水分解条件

温度 ( $^{\circ}$ C)	時間 (分)	pH	代表的な調理プロセスの例
90	20	4	低温殺菌
100	60	5	ベーキング、醸造、煮沸
120	20	6	殺菌*

\* 高圧下の閉鎖系（例：オートクレーブまたはこれに相当するもの）

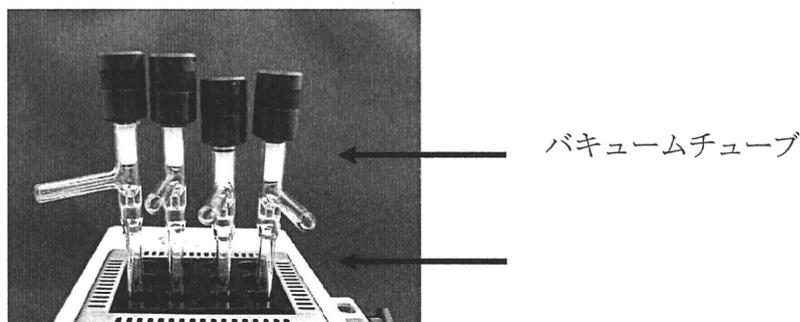


図 2. 加熱装置及びバキュームチューブ

アルミ製ヒートブロック

### <GC/MS 条件>

装置: Agilent 6890/6973 (Agilent 社製)  
カラム: DB-5MS (内径 0.25mm、膜厚 0.25 $\mu$ m、長さ 30m) (Agilent 社製)  
カラム温度: 50 $^{\circ}$ C (1分)  $\rightarrow$  25 $^{\circ}$ C/分  $\rightarrow$  125 $^{\circ}$ C  $\rightarrow$  10 $^{\circ}$ C/分  $\rightarrow$  300 $^{\circ}$ C の段階的昇温プログラム  
〔GC/MS による農薬等の一斉試験法〕(平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」別添) に記載されている条件]  
インターフェイス温度: 280 $^{\circ}$ C  
イオン化モード: EI (70eV)  
測定モード: スキャン ( $m/z$  50~550)

### <LC/TOF-MS 条件>

装置: UPLC ACQuity-Xevo QTofMS (Waters 社製)  
カラム: ACQuity UPLC BEH C18 (内径 2.1mm、膜厚 1.7 $\mu$ m、長さ 100mm) (Waters 社製)  
カラム温度: 40 $^{\circ}$ C  
移動相: A 液 メタノール-水=90:10、B 液 メタノール-水=10:90 の混合溶液  
グラジエント条件: A:B=90:10 (0分)  $\rightarrow$  A:B=0:100 (10分)  $\rightarrow$  A:B=90:10 (10.1分)  $\rightarrow$  A:B=90:10 (15分)  
流速: 0.2mL/min  
イオン化法: ESI(+)  
イオン源温度: 120 $^{\circ}$ C  
キャピラリー電圧: 3.0kV  
サンプルコーン電圧: 20.0V  
コーンガス: N<sub>2</sub>、50L/hr  
乾燥ガス: N<sub>2</sub>、1000L/hr  
スキャン範囲:  $m/z$  50~1000  
リファレンスマス:  $m/z$  556.2771 [M+H]<sup>+</sup> 及び  $m/z$  278.1141 (Leucin enkephalin、Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu、C<sub>28</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>、200pg/ $\mu$ L)

## 2. 結果及び考察

### 1) 加熱による液性の変化

各加熱条件下で処理した後の pH は、いずれの処理条件下においても加熱前とほぼ同じであった(表 2)。従って、加熱時における pH は、処理時間内を通して維持されており、今回の試験結果から、当該 pH に

おける加熱処理の影響を考察できることが確認された。

表 2. 試験溶液の反応前後の pH 変化

加熱条件	pH	
	処理前	処理後
90 $^{\circ}$ C 20 分	4.0	4.0
100 $^{\circ}$ C 60 分	5.0	5.0
120 $^{\circ}$ C 20 分	6.0	6.2

### 2) マラチオンの減衰

加熱試験を各条件下でそれぞれ 3 回ずつ繰り返し、得られた MS クロマトグラム (TIC) から、マラチオン濃度を算出した(図 3)。

湿式条件下、いずれの加熱処理においても、マラチオンの減衰が認められた。減衰の程度は、120 $^{\circ}$ C 20 分 (pH6) 及び 100 $^{\circ}$ C 60 分 (pH5) で 4 割程度であり、90 $^{\circ}$ C 20 分 (pH4) では 1 割未満であり(表 3)、pH の影響より温度及び時間の影響が大きく現れる傾向が見られた。

表 3. 加熱処理によるマラチオンの減衰 (処理前のマラチオン量を 1.00 とした場合)

加熱条件	残存率
90 $^{\circ}$ C 20 分 (pH4)	0.947
100 $^{\circ}$ C 60 分 (pH5)	0.619
120 $^{\circ}$ C 20 分 (pH6)	0.582

### 3) GC/MS による加熱分解生成物の検索

標準溶液と加熱処理後の試験溶液から得られた MS クロマトグラム (TIC) を比較し、新たに出現若しくは面積が大きく増加したピークを検索した。

その結果、保持時間 6.1 分付近のピークが捕捉された(図 3-1 及び図 4-1)。この物質の MS スペクトル(図 3-2 及び図 4-2)は、

$m/z$  127 にベースピーク、 $m/z$  99 に主フラグメントピークが認められ、マラチオンのチオリン酸エステル部位が加水分解したものと推察された。

NIST ライブラリーにより検索したところ、その他のフラグメントピークも含めてフマル酸ジエチル ( $C_8H_{12}O_4$ ) とよく類似したパターンであることが判明した。そこで、フマル酸ジエチル標準品のスペクトルを測定し、両者を比較したところ、保持時間及び MS スペクトルが完全に一致した (図 5)。以上から、この物質はマラチオンの加水分解生成物のひとつであるフマル酸ジエチルと同定した。本物質の生成量は、 $90^{\circ}C$ 20 分 (pH4) 加熱時を 1.00 とした場合、 $120^{\circ}C$ 20 分 (pH6) 加熱時 1.11、 $110^{\circ}C$ 60 分 (pH5) 加熱時 1.22 であり、マラチオンの減衰状況に類似して、pH の影響は比較的小さく、温度上昇、時間経過とともに増大する傾向が窺われた (表 4、図 6)。

表4. フマル酸ジエチルの生成率  
( $90^{\circ}C$ 20 分(pH4)を 1.00 とした場合)

加熱条件	生成率
$90^{\circ}C$ 20 分 (pH4)	1.00
$100^{\circ}C$ 60 分 (pH5)	1.22
$120^{\circ}C$ 20 分 (pH6)	1.11

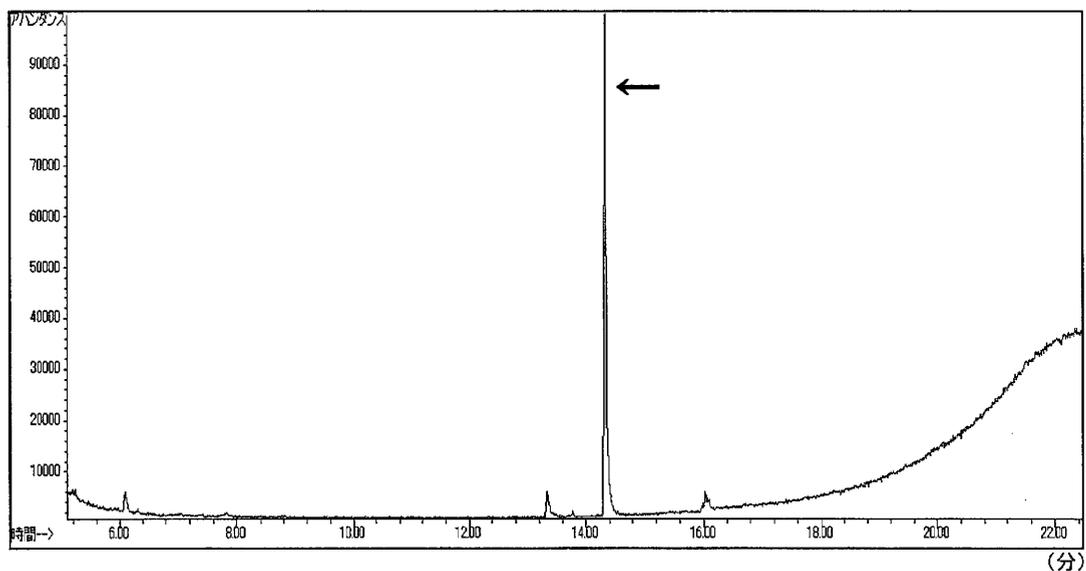


図 3-1. マラチオン標準品の GC-MS クロマトグラム (TIC)

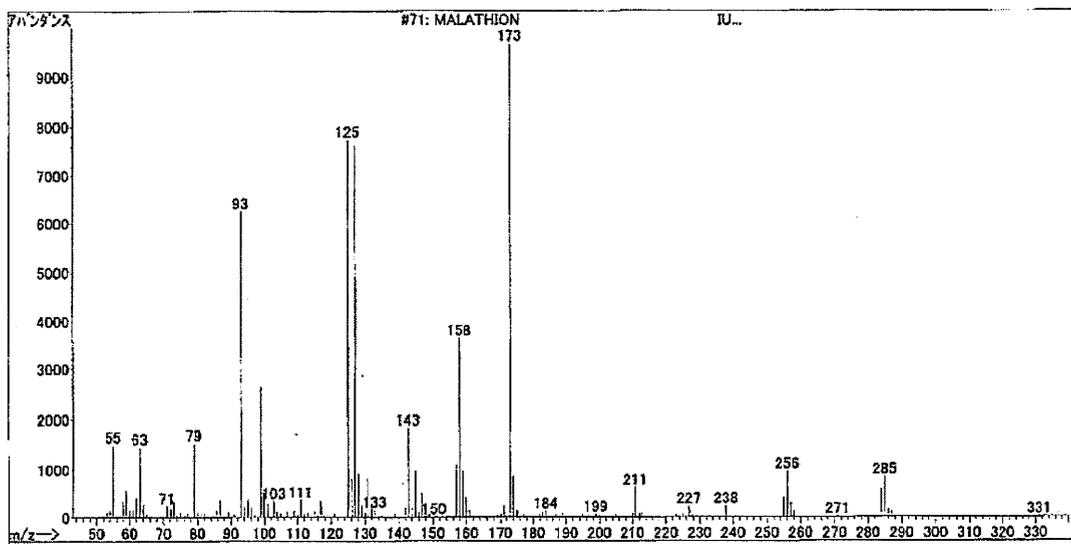


図 3-2. マラチオン標準品の MS スペクトル

化学名 Dithiophosphoric acid *O*, *O*-dimethyl-*S*-[1, 2di(ethoxycarbonyl)ethyl]ester  
 CAS No. 121-75-5  
 構造式

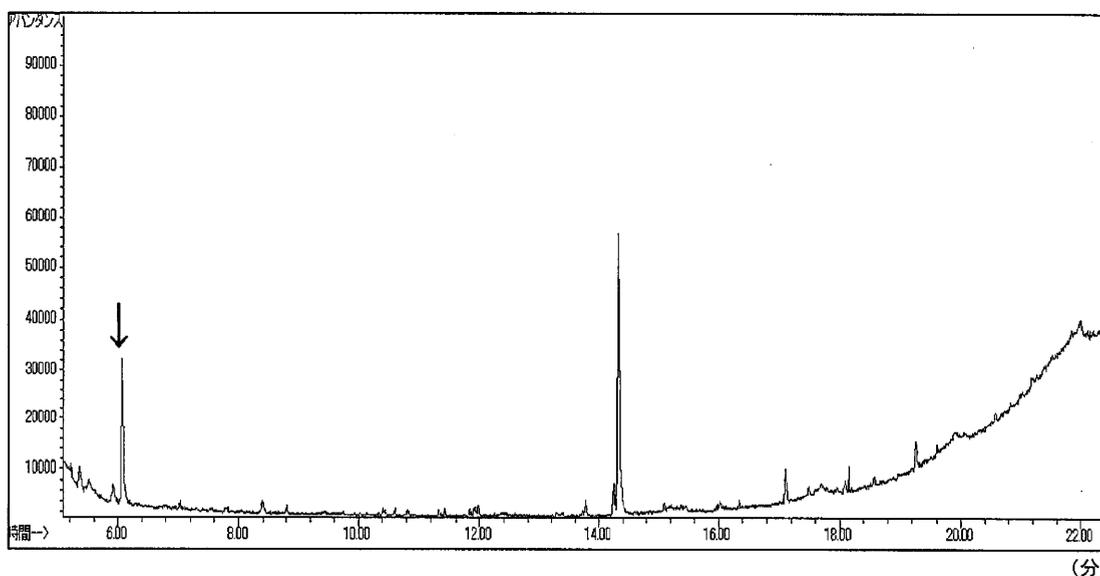
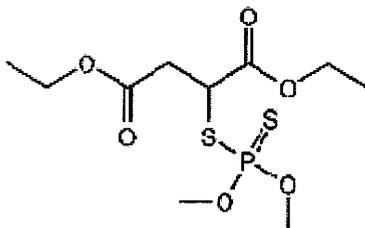


図 4-1. マラチオンを 100°C60 分で加熱処理したときの MS クロマトグラム(TIC)

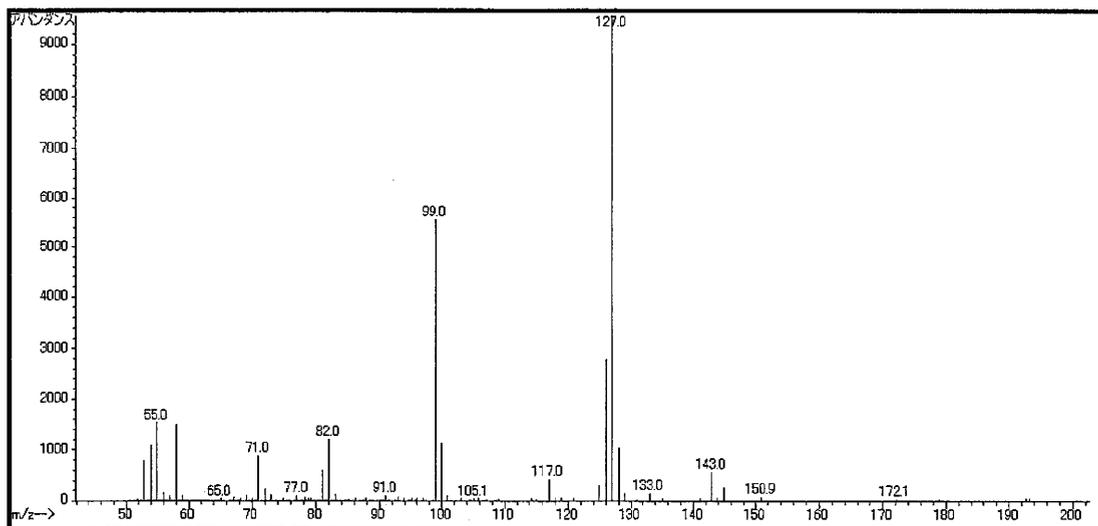


図 4-2. 保持時間 6.1 分のピークの MS スペクトル

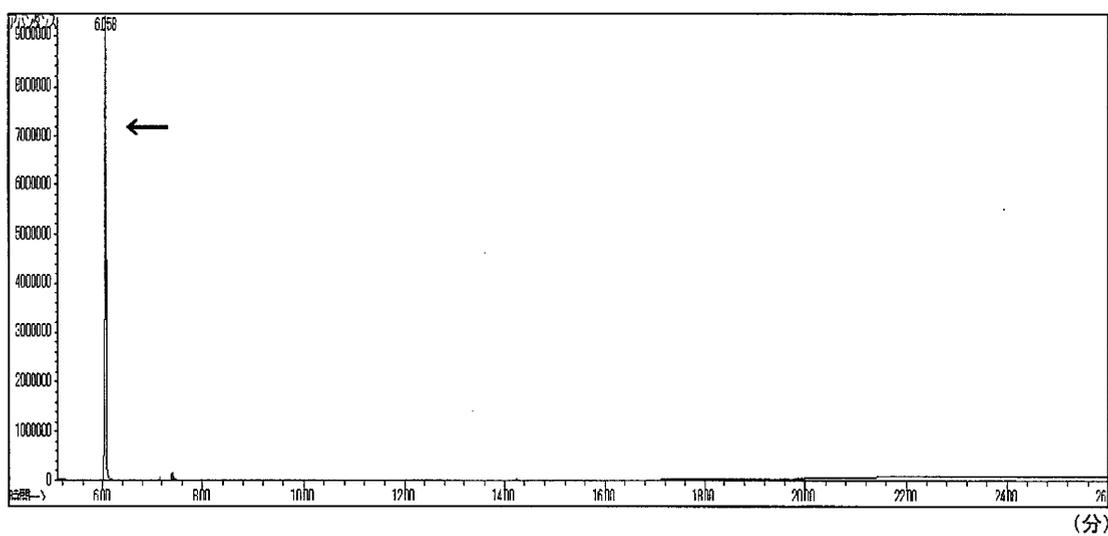


図 5-1. フマル酸ジエチル標準品の GC-MS クロマトグラム(TIC)

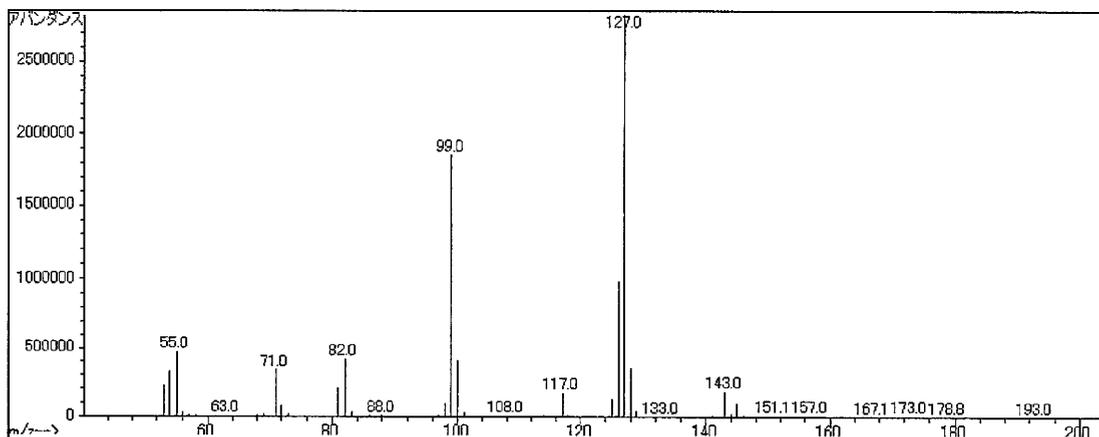


図 5-2. フマル酸ジエチルの GC-MS スペクトル

化学名 2-Butenedioic acid, diethyl ester, (E)-

CAS No. 623-91-6

構造式

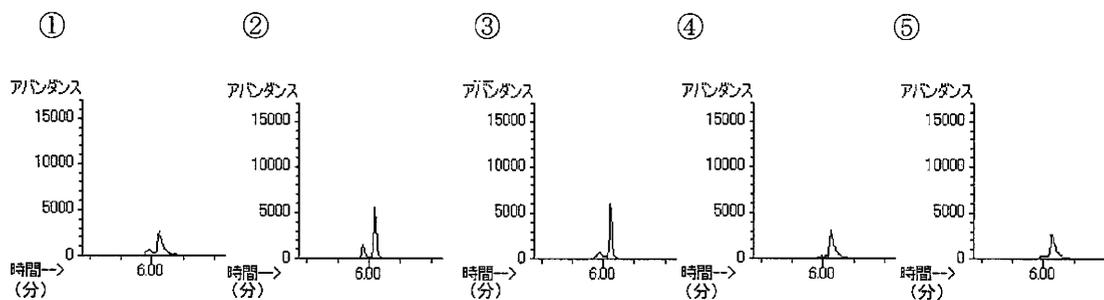
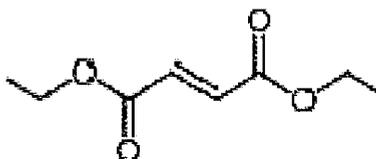


図 6. フマル酸ジエチルのイオンクロマトグラム ( $m/z$ : 127)

- ①標準品 (2ppm アセトン溶液)、②標準品 (2ppm 相当調製液)、  
 ③90°C 20 分加熱時、④100°C 60 分加熱時、⑤120°C 20 分加熱時

#### 4) LC/TOF-MS による加熱分解生成物の検索

今年度は、水溶性の高い分解生成物を捕捉するため、新たに LC/TOF-MS を導入し、処理後の溶液を測定して、分解生成物を検索した。3) と同様に、標準溶液と加熱処理後の試験溶液から得られた MS クロマトグラム (TIC) を比較し、新たに出現若しくは面積が大きく増加したピークを検索した。

LC/TOF-MS においては、保持時間 2.9 分付近にマラチオン分解物と疑われるピークが出現した (図 7 及び 8)。そこで、当該ピークから得られた MS スペクトルについて、TOF-MS による構造解析を試みた。リファレンスマスを指標とした高分解モード

で測定しところ、親イオンのプロトン付加イオン  $m/z$  207.0680 が得られた。計算値 207.0691 ( $C_8H_{15}O_4S$ ,  $M+H^+$ ) から分子式は  $C_8H_{14}O_4S$  が導かれた。これを満たす化合物を検索したところ、メルカプトこはく酸ジエチルが高い確率で一致し、本物質をメルカプトこはく酸ジエチルと推定した (図 8-2)。

本物質は、微量であったこと、安定したピーク形状が得られなかったこと、標準品が入手できなかったことから、確実な同定には至らなかった。また、標準品がなく定量ができなかったため、加熱条件の違いによる生成量比較は行っていない。

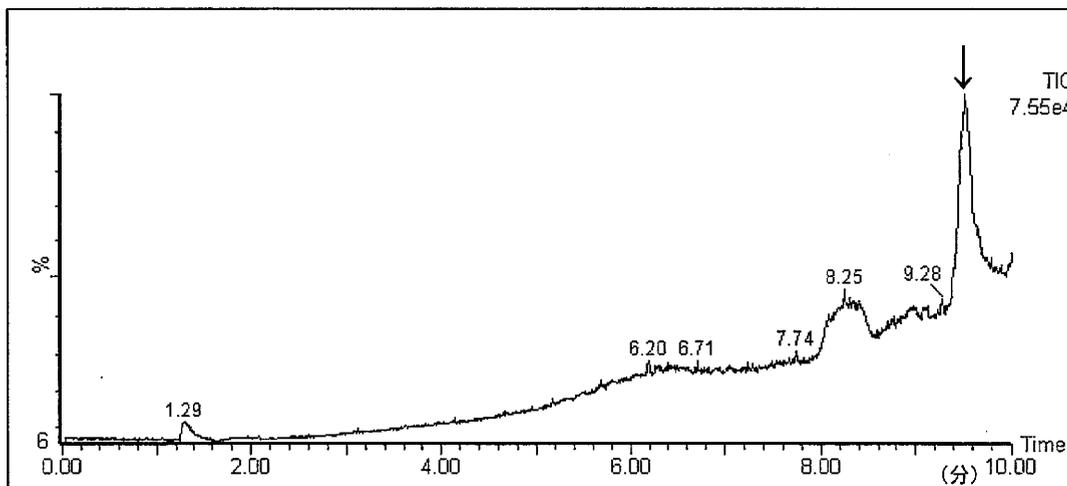


図 7-1. マラチオン標準品の LC-MS クロマトグラム (TIC)

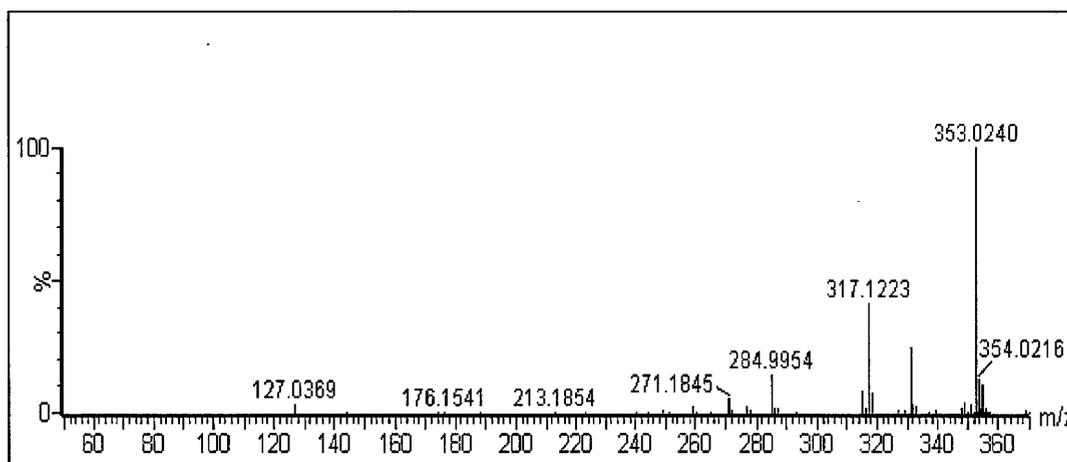


図 7-2. マラチオン標準品の LC-MS スペクトル

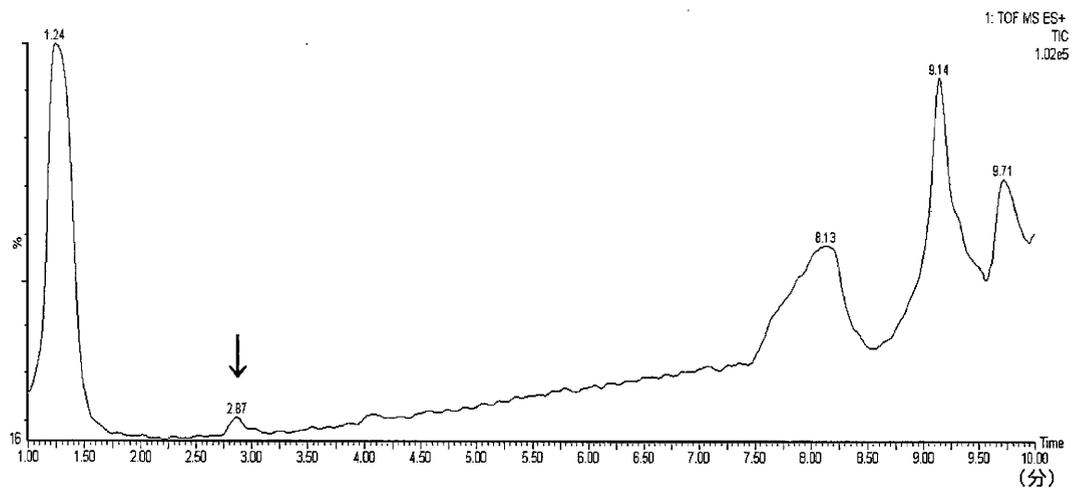


図 8-1. マラチオンを 100°C60 分加熱処理したときの LC-MS クロマトグラム (TIC)

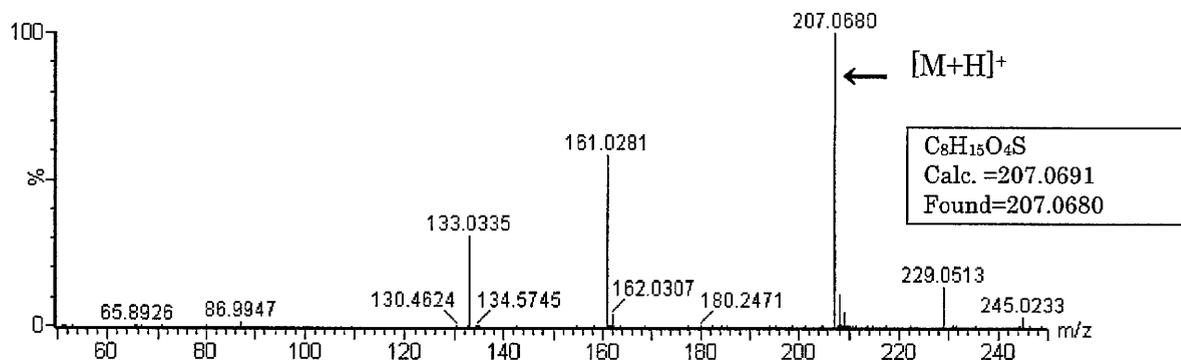
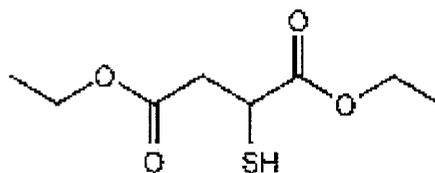


図 8-2. 保持時間 2.8 分のピークの LC-MS スペクトル

化学名 Butanedioic acid、mercapto-, diethyl ester

CAS No. 23060-14-2

構造式



以上のように、今年度実施した湿式条件下の加熱分解実験では、水の存在に起因すると思われる加水分解物のエステル体であるフマル酸ジエチル及びメルカプトこはく酸ジエチルが得られた。一方、平成21年度に実施した乾式条件下の加熱分解実験では、熱に起因するメチル基転移を伴う分解生成物である *O*、*S*、*S*-トリメチルリン酸ジチオエートが捕捉されている。

水の存在の有無により生成物が異なる可能性が示され、代表的なモデル条件の要件に留意する必要があると考えられた。食品の種類は多く、その調理方法もさまざまである。加熱分解実験に当たっては、条件によって生成物が異なることから、調理加工時の状況に近づけることが肝要であることを示唆する結果であった。

なお、マラチオンの分解については、これまでも環境中の分解<sup>1~2)</sup>あるいは食品中の酵素による分解<sup>3)</sup>

について報告がある(図9)。いずれにおいても *O*、*S*、*S*-トリメチルリン酸ジチオエートは示されておらず、また、今回新たに得られた化合物は、これらで報告されている分解物に含まれているものの、チオコハク酸、ホスホロリン酸 *O*、*O*-ジメチル及びマラオキソンなどは今回の加熱条件では検出できず、これら分解物群を網羅するものではなかった。すなわち、環境中あるいは異なる反応条件下で生成する化合物がそのまま今回の加熱調理を前提とした条件下で見出されているわけではなく、加熱分解条件によって生成物のパターンは異なることが推察された。このことは、今年度採用した本実験系が、調理加工による食品中農薬の減衰、分解状況をより正確に推察するための方法となり得ることを示している。

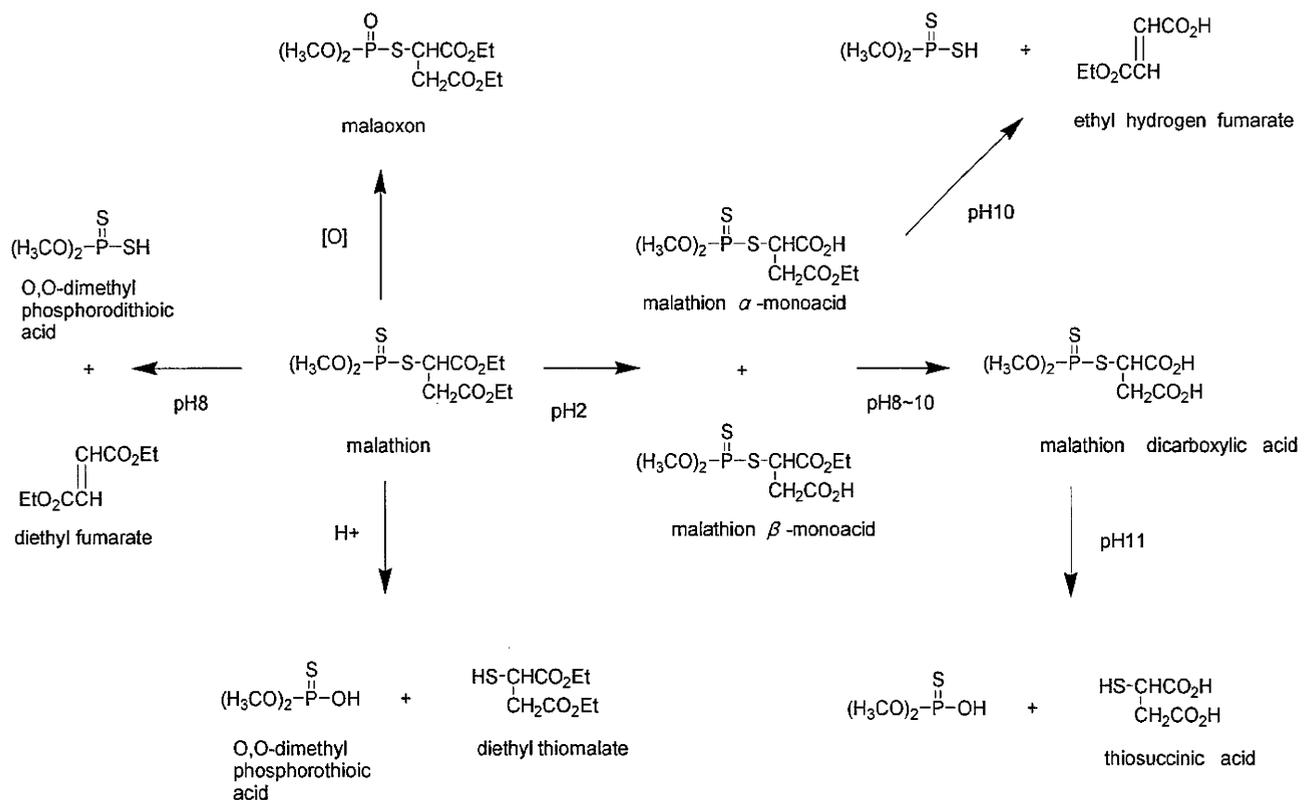


図9. マラチオンの分解及び代謝経路<sup>1~3)</sup>

### 3. 今後の予定

LC/TOF-MSにより捕捉されたメルカプトこはく酸ジエチルについては、標準品が入手できなかったこともあるが、生成量が少なく、3通りの加熱条件による生成状況の差を定量的に把握するに至らなかった。そこで、次年度は、処理試料量を増やして、分解物生成状況について精査する予定である。

さらに、これまでに得られた生成物や生成状況を比較することによって、調理加工時における生成パターンを把握する。マラチオン以外にも水溶性の異なる有機リン系農薬やその他の農薬について、同様の手法で加熱分解物を捕捉できるか検討を加えていきたい。

今後、さらに事例数を重ね、知見を整理体系化することで本実験系を「食品の加工調理過程における農薬減衰を忠実に再現する有効な手段」として確立し、「調理加工過程での分解状況、分解生成物を把握するモデル実験系の構築」を試みる。

マラチオンの分解に関する引用文献

1) Wolfe, N.I., Zepp, R.G., Baughman, G.L., and Gordon, J.A., Kinetic investigation of malathion degradation in water, Bull. Environ. Cont. Tox., 1975, 13(6), 707-713.

2) Wolfe, N. I., Zepp, R.G., Gordon, J.A., and Baughman, G.L., Kinetic chemical degradation of malathion in water, Environ. Sci. Technol., 1977,

11(1), 88-93.

3) Yoshii, K., Tonogai, Y., Katakawa, J., Ueno, H., and Nakamuro, K., Kinetic analysis for hydrolysis of malathion by carboxylesterase in wheat kernels, J. of Health Sci., 2007, 53 (5), 507-513.

1) Wolfe, N.I., Zepp, R.G., Baughman, G.L., and Gordon, J.A., Kinetic investigation of malathion degradation in water, Bull. Environ. Cont. Tox., 1975, 13(6), 707-713.

2) Wolfe, N. I., Zepp, R.G., Gordon, J.A., and Baughman, G.L., Kinetic chemical degradation of malathion in water, Environ. Sci. Technol., 1977, 11(1), 88-93.

3) Yoshii, K., Tonogai, Y., Katakawa, J., Ueno, H., and Nakamuro, K., Kinetic analysis for hydrolysis of malathion by carboxylesterase in wheat kernels, J. of Health Sci., 2007, 53 (5), 507-513.

## Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	雑誌名	巻号	頁	出版年
	該当なし				

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷り

該当なし

