

201131014A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

食品中残留農薬のリスク管理手法の精密化と国際化対応に関する研究

平成23年度総括・分担研究報告書

研究代表者

財団法人残留農薬研究所 加藤保博

平成24年(2012年)5月

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

食品中残留農薬のリスク管理手法の精密化と国際化対応に関する研究

平成23年度総括・分担研究報告書

研究代表者

財団法人 残留農薬研究所 加藤保博

平成24年(2012年)5月

目次

I. 総括研究報告

食品中残留農薬のリスク管理手法の精密化と国際化 対応に関する研究	1
-------------------------------------	---

II. 分担研究報告

1 残留基準適用部位・分析部位の比較研究	33
1 a リスク管理手法の精密化に関する文献調査	65
2 統計手法を用いる最大残留量の算定手法	75
2 a Codex 食品分類の改定及び代表製品の選抜原則:文献調査	91
3 調理加工に伴う分解生成物のリスク管理手法に関する研究: 調理加工における農薬分解物	131
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	153
IV. 研究成果の刊行物・別刷	154

厚生労働科学研究費補助金食品の安全確保推進研究事業

I. 平成 23 年度総括研究報告書

食品中残留農薬のリスク管理手法の精密化と
国際化対応に関する研究

研究代表者 加藤保博

(財団法人残留農薬研究所)

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

平成 23 年度総括研究報告書

食品中残留農薬のリスク管理手法の精密化と国際化対応に関する研究

代表研究者 加藤保博 財団法人残留農薬研究所 常務理事

研究要旨

残留農薬を含んだ食品を摂取する場合を考慮し、ヒトへの健康影響リスクをより適切に管理する観点から、以下の研究を行った。【課題1】：農産物における残留基準の適用部位及び検査部位には我国固有のものもあり、これを国際的な標準に対応させるのに必要な換算係数など基礎的知見を得る。昨年度までに、最大使用条件に対応した作物残留試験を5種農薬で行い、核果類及び仁果類のりんごと日本なしについて、国際標準(全果実)による残留値と国内基準(芯及び花落ちを除く可食部)による値とを比較した。今年度は、洋なしについて調査を行ったほか、未成熟とうもろこしについて、穂における残留農薬の分布を調べた。洋なしと日本なしを区別する必要はなく、りんご、日本なし、洋なしでは、国際基準に基づく残留濃度測定値は、国内基準による測定値と同等から2倍の範囲(りんご0.8-2.0倍、日本なし0.8-1.2倍、西洋なし1.1-1.3倍)であった。未成熟とうもろこしは、種子よりも穂軸で残留濃度が高い例が認められた。花柱に高濃度で残留する例もあり、花柱の扱いに留意すべきとした。【課題2】EU及びNAFTAで採用され、国際機関でも採用が検討されている統計手法を用いた残留基準値(MRL)算定法を国内作物残留試験データで比較検討する。昨年度までに、2種葉菜で、各5種及び4種農薬の最大使用条件又はこれに準ずる条件での作物残留試験を毎年8県で行い、2年で各16例の試験データを得た。残留濃度が現行MRLを超える例も認められた。残留濃度の分布を特定の分布型に適切に分類するには、更に多くの試験例数が必要であった。昨年公表されたOECD法は、分布型に依存しない手法であり、試験例数の少ない我国には最も適当と期待された。今年度は、OECD法に注目し、3例~5例の少数例の場合について、16例で得た最高残留濃度(HR)未満の不適切なMRL案を与える確率を算定したほか、現行の我国の経験則で算定した標準的MRL案と比較検討し、OECD法を少数例の試験に適用する場合の留意点に纏めた。【課題3】食品の加工に伴って生じる分解物を把握するモデル実験系を構築し、分解物のリスク管理手法を検討する。これまでに、公開資料から食品の調理加工に伴う農薬の加熱時における分解物の知見を収集した外、10種農薬で乾式熱分解を検討した。OECDの化学物質試験指針#507『加工製品中における残留農薬の性質-高温加水分解』を翻訳し、同指針の条件(90-120℃、pH4-6の3条件)を基に、モデル実験系と加熱加水分解装置を作成し、マラチオンで試験条件を検討した。今年度はマラチオンの外、3農薬での検証を加え、分解物をGC-MS又はLC-MS(及びLC-MS/MS)で検出及び同定し、標準品で定量する試験法案に纏めた。その外、【課題1a】及び【課題2a】として、食品中残留農薬の暴露量評価に米国で導入されている精密化因子、農作物の農薬処理率について、Codexの食品及び飼料分類表の改定と代表製品の選抜原則について、文献調査した。

研究分担者

飯島和昭 財団法人残留農薬研究所化学
部残留第1研究室長
永山敏廣 東京都健康安全研究センター
食品化学部長
加藤保博 財団法人残留農薬研究所
常務理事

A. 研究目的

食品中の残留農薬のリスク管理については、(1)国際的に流通する農産物で、残留基準の適用部位や検査部位、食品分類がわが国固有のものとなっている場合もあり、リスク管理上、整合性を欠くとの指摘もされている。(2)残留基準値は、GAPに対応した作物残留性試験（作残試験）から推定される最大残留量に基づいて設定される。国内の農産物については、現在、試験例数が少ないことから、経験則を基に基準値が設定されているが、農薬登録制度の改正に伴い、必要な試験例数が今後増えると予想される。また、試験例数の多い海外作残試験の審査の機会も増えつつあることから、これらに対応した最大残留量の算定手法が必要となる。この最大残留量の推定および残留基準の設定はEUおよび米国・カナダ（NAFTA）では統計手法を用いて行なっており、近年では国際基準の設定にもNAFTA法が参照されるようになった。OECDで同法の改良が検討されており、JMPRによれば、完成後はNAFTA法に代わってOECD法が国際基準設定に参照される。(3)インポートトレランスの申請で海外作残試験の審査の機会が増えつつあることから、これに対応したより精密な暴露量の評価が必要となるケースが増えてきており、海外で採用されている暴露量評価手法で有効な情報を収集・整理し、対応できるようにしておくことが望まれる。(5)多くの農産物は何らかの加工を経て喫食される。

加熱等を伴う加工によって食品中の残留農薬の一部は分解するが、その実態は明確でなく、分解物のリスク管理の方策は定まっていない。

以上の状況に対応して、残留農薬を含んだ食品を摂取する場合を考慮し、ヒトへの健康影響リスクをより適切に管理する観点から、次の研究を行うこととした。

課題-1（分担研究1）では、国際的に流通する農産物を主体にして、残留基準値の適用部位と検査部位を国際的な標準に対応させるために、作残試験の実施を含め、必要な基礎データを収集する。また、最終年度は、インポートトレランス設定における暴露量評価を精密化する評価法についての情報の収集も行い、整理する。

昨年度までに、前者課題について、国際基準（FAOの基準）と国内慣行（農薬取締法および食品衛生法による方法）を比較し、両法で分析部位が異なる農産品と相違点を整理したほか、びわ以外の核果類と仁果類について、作物残留試験等を行い、両法による残留濃度測定値を比較検討して国内の既存残留データを国際基準に対応する残留値に換算する係数を算定した。今年度は、日本なしと形態の異なる仁果類である洋なしについて、昨年度までの日本なし及びりんごと同様な調査を行ったほか、補足として、裂果によるりんご果実内の残留農薬の分布に対する影響を検討した。その他、未成熟とうもろこしについて、作物残留試験を行い、穂における残留農薬の分布を調査し、国内基準と国際基準による残留測定値への影響を評価した。

上記の外、課題1aとして、食品中残留農薬の暴露量評価の際に、米国で採用されているが日本では採用されていないパラメーターの1つである、農作物の当該農薬処理率の適用について文献調査した。

課題-2 (分担研究 2) では、最大残留量を作残試験から統計学的に推定し、残留基準値 (MRL) を設定する手法の比較と検証を、国内農業慣行に従って農薬施用した作残試験データを用いて行う。

H21 年度と 22 年度で、前者の検討に使用する残留量データベースとするため、H21 年度と 22 年度に、各 8 県の試験圃場で、ほうれんそう (施設栽培) とはくさい (露地栽培) についての作物残留試験を、それぞれ 4 種及び 5 種の農薬で実施し、各作物、農薬あたり計 16 例の最大残留量のデータを得た。

これまでに、EU 及び NAFTA で採用されている手法による MRL 案との比較検討を行ったほか、残留値の分布を特定の分布型 (正規分布/対数正規分布) に分類するには更に多くの試験例数が必要と判断した。NAFTA 及び EU の手法を踏まえた新手法が OECD から提案され、昨年(2011 年)公表されたことから、今年度は OECD の手法を中心に、その特徴等及びこれを試験例数の少ない我国で採用する場合の留意点を検討した。

その外、課題 2a として、Codex の食品及び飼料分類表の改定とグループ MRL 設定における代表製品の選抜原則の設定状況について、文献調査した。

課題-3 (分担研究 3) では、食品の加工に伴って生成される分解生成物を把握するモデル実験系を構築する。代表的な事例について、分解生成物の把握を試み、調理加工にかかわるリスク管理手法の指針案に纏め、加工食品の喫食に伴う健康影響リスクを判断するための基礎資料とする。

昨年度までに、公開資料から食品の調理加工等に基づく農薬の加熱時における分解物の知見を収集して整理したほか、OECD の化学物質試験指針 #507「加工製品中にお

ける残留農薬の性質・高温加水分解」を翻訳した。また、10 種農薬の乾式加熱分解実験を行った。昨年度からは、湿式加熱分解を検討することとして、OECD の上記試験指針が食品加工における代表的な加熱加水分解条件とした 3 条件で試験するための加熱加水分解装置を試作し、試験条件をマラチオンで検討した。今年度は、これまでに構築した試験法をマラチオン以外の農薬 3 種で更に検証し、分解物を把握するための試験法案に纏めた。

B. 研究方法

分担研究 1

1. 西洋なしにおける作物残留性調査

西洋なし (品種; シルバーベル) で国内慣行 (花落ち及び芯を除く) と国際標準 (果梗を除いた全果実) の両者に従った作物残留性調査を行った。

1.1. 供試農薬

H21 年度及び 22 年度と同様、市販の 5 種農薬製剤 (ナリア水和剤, アドマイヤー顆粒水和剤, サンリット水和剤, カスケード乳剤, フェニックス顆粒水和剤) を新規購入し、国内慣行に従い散布した。

1.2. 圃場試験

試料調製は、社団法人日本植物防疫協会に委託し、山梨県の 1 圃場で調製した。

1.3. 試薬、装置

前年度と同等品 (試薬) または同じものを使用した。

1.4. 試料調製

前年度と同じであり、果梗を除去した西洋なし果実を縦に 4 等分したものから、任意の対角の 2 切片をそれぞれ、芯+花落ち部 (「除去部」) と残部 (「可食部」) に分け、それぞれを試料とした。また、残りの対角の 2 切片を「全果実」試料とした。処理区では全 30 個の果実から得た上記の全試料を分析に供した。

1.5. 標準溶液の調製及び分析操作

前年度と同じで、ミキサーで摩砕均一化した試料からアセトニトリルで抽出し、C18 ミニカラムで精製したのち、LC-MS/MS に注入し、ピーク面積に基づく絶対検量線法で、次の分析対象化合物を定量した：イミダクロプリド、シメコナゾール、ピラクロストロビン、フルフェノクスロン、フルベンジアミド、ボスカリド。

2. 未成熟とうもろこしにおける作物残留性調査

未成熟とうもろこしでの作物残留性調査を行い、穂軸（芯）、種子、花柱（ひげ）及び外皮における残留農薬の分布実態を調査した。

2.1. 供試農薬

次の5種の市販農薬薬剤を購入し、国内慣行に従い散布した：モスピラン水溶剤、トレボン乳剤、マトリックフロアブル、リゾレックス水和剤、オルトラン水溶剤。

2.2. 圃場試験

社団法人日本植物防疫協会に委託し、茨城県及び千葉県でとうもろこし試料（穂）を調製した。

2.3. 試薬

検討対象とした6種農薬成分（アセタミプリド、エトフェンプロックス、クロマフェノジド、トルクロホスメチル、アセフェート及びメタミドホス）の各標準品は市販の高純度品（99.1%以上）を使用した。

一般試薬及び有機溶媒は特級品、残留農薬試験用又はそれに準ずる等級のものを使用した。水は、日本ミリポア・リミテッド製の Milli-Q 純水製造装置で調製した高純度水を用いた。グラファイトカーボンミニカラムはジーエルサイエンス製の InertSep GC (0.5 g/6 mL) を使用した。ポリマー系ミニカラムはジーエルサイエンス製の InertSep PLS-2 (1 g/6 mL) を使用した。PSA ミニカラムはジーエルサイエンス製の

InertSep SlimJ PSA (500 mg) を使用した。フィルターユニットは Millipore 製の Millex-LG を使用した。

2.4. 装置

台秤：FG-60KBM（エー・アンド・デイ製）。ミキサー：ロボクープ BLIXER-5Plus（エフ・エム・アイ製）（外皮、種子及び芯分析時）、グラインドミックス GM-200（レッチェ製）（ひげ分析時）。LC-MS/MS システム（Agilent 製、1200 シリーズ高速液体クロマトグラフ、6460 タンデム四重極質量分析計、Masshunter ワークステーション）。PTV-GC-MSD システム（Agilent Technologies 製、6890N ガスクロマトグラフ、5973 inert 四重極型質量分析計、ChemStation ワークステーション及び ATAS GL 製、Focus オートインジェクター、Optic 3 試料導入装置）

2.5. 試料調製

試料は、外皮及びひげを取り除き、種子を芯から削り取り、外皮、ひげ、種子及び芯に分別した。外皮及び芯は細切後、無作為に取った試料の一部、ひげは細切した全量、種子は全量から無作為に取った試料の一部をそれぞれ密閉容器に入れて凍結保存（-20℃）した。分析直前にミキサーで均一化した。

2.6. 標準溶液の調製

各標準品をそれぞれ別々のメスフラスコに量り取り、アセトニトリルに溶解して定容として、200 mg/L の各標準原液を調製した。これらの標準原液の一定量を合わせ、アセトニトリルで希釈して各農薬 10 mg/L 濃度の混合標準溶液を調製した。

2.7. 分析操作（図 1-1）

2.7.1. 抽出

芯、種子及び外皮は均一化試料 20.0 g にアセトン 100 mL を加え、30 分間振とうした。ひげは均一化試料 10.0 g にアセトン 70 mL を加え、ホモジナイザーで磨砕抽出し、

シャフトに付着した試料をアセトン 30 mL で洗浄後、洗浄液を合わせ、30 分間振とうした。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣をアセトン 50 mL で洗い、同様にろ過した。ろ液を合せアセトンを加えて 200 mL 定容とした。

2.7.2. アセタミプリド及びクロマフェノジドの分析

2.7.2.1. グラファイトカーボンミニカラム精製

グラファイトカーボンミニカラムにアセトニトリル及び水を順次 5 mL ずつ流下し前処理した。抽出液 1 mL (ひげは 2 mL, 試料 0.1 g 相当) に水 10 mL を加え混合した後、前処理済のグラファイトカーボンミニカラムに流下した。さらに、アセトニトリル/水(20:80, v/v)混液 10 mL で容器内を洗浄し、これをグラファイトカーボンミニカラム移して流下し、その流出液を捨てた。さらに、アセトニトリル/水(80:20, v/v)混液 10 mL を流下し、溶出液を分取した。

2.7.2.2. 定量

グラファイトカーボンミニカラム溶出液をアセトニトリル/水(80:20, v/v)混液で 10 mL 定容 (必要に応じて同混液で希釈) し、シリンジフィルターを用いてろ過後、第 4.7.5 項で示す操作条件の LC-MS/MS に注入してピーク面積を求め、検量線より各農薬成分の重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

2.7.3. エトフェンプロックス及びトルクロホスメチルの分析

2.7.3.1. グラファイトカーボンミニカラム精製

グラファイトカーボンミニカラムにアセトニトリル/トルエン(75:25, v/v)混液、アセトニトリル及び水を順次 5 mL ずつ流下し前処理した。抽出液 5 mL (ひげは 10 mL, 試料 0.5 g 相当) に水 5 mL を加え混合した後、前処理済のグラファイトカーボンミニ

カラムに流下した。さらに、アセトニトリル/水(80:20, v/v)混液 10 mL で容器内を洗浄し、これをグラファイトカーボンミニカラム移して流下し、その流出液を捨て、1 分間吸引乾燥した。アセトニトリル/トルエン(75:25, v/v)混液 20 mL を流下し、溶出液を取り、40℃以下の水浴中で減圧濃縮し、最後は窒素気流下で溶媒を留去した。

2.7.3.2. 定量

残留物を適量のアセトンで溶解し、第 3.7.6 項で示す操作条件の PTV-GC-MS に注入してピーク面積を求め、検量線より各農薬成分の重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

2.7.4. アセフェート及びメタミドホスの分析

2.7.4.1. PSA ミニカラム連結ポリマー系ミニカラム精製

ポリマー系ミニカラムの溶出口に PSA ミニカラムを連結し、アセトニトリル及び水を順次 5 mL ずつ流下し前処理し、PSA ミニカラムを取り外した。抽出液 10 mL (ひげは 20 mL, 試料 1 g 相当) に水 5 mL を加え減圧濃縮し、溶媒を留去した後、前処理済のポリマー系ミニカラムに流下し、その流出液を捨てた。ポリマー系ミニカラムの溶出口に PSA ミニカラムを再び連結し、アセトニトリル/水(40:60, v/v)混液 10 mL で容器内を洗浄し、これを PSA ミニカラム連結ポリマー系ミニカラム移して流下し、溶出液を分取した。

2.7.4.2. 定量

PSA ミニカラム連結ポリマー系ミニカラム溶出液を水で 20 mL 定容 (必要に応じてアセトニトリル/水(20:80, v/v)混液で希釈) し、第 4.7.7 項で示す操作条件の LC-MS/MS に注入してピーク面積を求め、検量線より各農薬成分の重量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

2.7.5. LC-MS/MS の操作条件 (アセタミブ

リド及びクロマフェノジド測定時)

2.7.5.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム：ZORBAX Eclipse Plus C18 1.8 μm (2.1 mm i.d.×100 mm, Agilent 製)。移動相：アセトニトリル/5 mmol 酢酸アンモニウム [20:80 (1 min)・4 min・90:10, v/v]。流速：0.3 mL/min。カラム温度：40°C。注入量：5 μL 。

2.7.5.2. 質量分析計

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)，乾燥ガス温度：300°C，乾燥ガス流量：5 L/min，ネブライザー圧力：45 psi，シースガス温度：400°C，シースガス流量：11 L/min，イオン導入電圧：3500 V，コリジョンガス：窒素，イオン検出法：MRM 法 (各農薬成分のモニタリングイオン，フラグメンタ電圧及びコリジョン電圧は表 3 を参照)

2.7.6. PTV-GC-MS の操作条件 (エトフェンプロックス及びトルクロホスメチル測定時)

2.7.6.1. PTV 注入/ガスクロマトグラフ

プレカラム：不活性化処理フェーズドシリカカラム，30 cm×0.53 mm i.d. (ジーエルサイエンス製)。カラム：HP-5ms (Agilent 製)，内径 0.25 mm，長さ 30 m，膜厚 0.25 μm 。カラム昇温条件：70°C・20°C/min・300°C (3.5 min)。注入方式：アトカラム注入法 (溶媒排気時間 1.5 min)。注入量：マトリックス検量線；10 μL (ブランク試料溶液 5 μL + 混合標準溶液 5 μL)，分析試料；5 μL 。注入口温度：66°C (1.5 min)・5°C/sec・250°C。スプリット流量：20 mL/min。キャリアー：高純度ヘリウム，1 mL/min 定流量。

2.7.6.2. 質量分析計

イオン化方式：電子衝撃法 (EI)。加速電圧：70 eV。インターフェース温度：300°C。イオン源温度：230°C。定量測定モード：選択イオン検出法 (SIM，各農薬成分の定量及び参照用のモニタリングイオ

ンは下表参照)

検討対象農薬名	分子量	保持時間 (分)	定量用イオン (m/z)	参照用イオン (m/z)	備考
エトフェンプロックス	376.5	12.9	163.0	376.0	芯，子実及び外皮用
			376.0	163.0	花柱用
トルクロホスメチル	301.1	8.7	265.0	125.0	

2.7.7. LC-MS/MS の操作条件 (アセフェート及びメタミドホス測定時)

2.7.7.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム：Atlantis dC18 3 μm (2.1 mm i.d.×150 mm, waters 製)。移動相：アセトニトリル/5 mmol 酢酸アンモニウム [2:98(4 min)・4 min・50:50, v/v]。流速：0.3 mL/min。カラム温度：40°C。注入量：2 μL 。

2.7.7.2. 質量分析計

イオン化法：エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)，乾燥ガス温度：350°C，乾燥ガス流量：10 L/min，ネブライザー圧力：45 psi，シースガス温度：400°C，シースガス流量：12 L/min，イオン導入電圧：2000 V，コリジョンガス：窒素，イオン検出法：MRM 法 (各農薬成分のモニタリングイオン，フラグメンタ電圧及びコリジョン電圧は下表参照)

検討対象農薬名	分子量	保持時間 (分)	プリカーサイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	フラグメンタ電圧 (V)	コリジョン電圧 (eV)	測定モード
アセタミプリド	222.7	3.2	223.0	126.1	100	15	+
アセフェート	183.2	5.5	184.0	143.1	50	1	+
クロマフェノジド	394.5	5.4	395.2	175.1	100	10	+
メタミドホス	141.1	3.5	142.0	94.1	50	10	+

2.7.8. 検量線の作成

アセタミプリド及びクロマフェノジドの各標準原液をそれぞれ一定量取り，アセトニトリル/水(80:20, v/v)混液で希釈して各成分の濃度が 0.00005, 0.0001, 0.0004, 0.001 及び 0.002 mg/L の検量線用の混合標準溶液を調製した。その混合標準溶液を第 4.7.5 項の操作条件の LC-MS/MS に注入し，各農薬成分の MRM クロマトグラムを解析してピーク面積値を求めた。また，エトフ

エンプロックス及びトルクロホスメチルの各標準原液をそれぞれ一定量取り、アセトンで希釈して各成分の濃度が 0.001, 0.002, 0.008, 0.02 及び 0.04 mg/L の検量線用の混合標準溶液を調製した。その混合標準溶液を第 2.7.6 項の操作条件の PTV-GC-MS でブランク試料溶液と 5 µL ずつ連続注入（ブランク試料→混合標準溶液の順）し、PTV-GC 注入口内で混合してマトリックス標準溶液とした。得られた各農薬成分の SIM クロマトグラムを解析してピーク面積値を求めた。さらに、アセフェート及びメタミドホスの各標準原液をそれぞれ一定量取り、アセトニトリル/水(20:80, v/v)混液で希釈して各成分の濃度が 0.00025, 0.0005, 0.002, 0.005 及び 0.01 mg/L の検量線用の混合標準溶液を調製した。その混合標準溶液を第 2.7.7 項の操作条件の LC-MS/MS に注入し、各農薬成分の MRM クロマトグラムを解析してピーク面積値を求めた。各農薬の重量を横軸に、同ピーク面積値を縦軸にとり、絶対検量線法により各検量線を作成した。

2.7.9. 保存安定性の確認

均一化した芯、種子及び外皮の無処理試料 20 g を 200 mL 容の三角フラスコにはかりとり、2 mg/L 混合標準溶液 1 mL 及び 2 mg/L メタミドホス標準溶液 1 mL をそれぞれ別々に添加して -20°C に保存した。全試料の分析終了後、実試料と同様に分析して残存率を求めた。なお、ひげは得られた無処理試料が少量であったため、保存安定性の確認は実施しなかった。

3. 内部裂果の有無における農薬残留分布の影響調査

前年度の本研究におけるりんご（山梨ほ場、品種；ふじ）の残余試料を用いて、目視で内部裂果が確認できない試料（非裂果試料）と確認できる試料（裂果試料）に分け、それぞれを部位別分析し、残留農薬の

分布実態を調査した。

試料は、目視により非裂果試料と内部裂果試料に分別した。各々を縦に 4 分割以上したものから対角の 2 つを取り合わせ、果肉及び果皮（可食部）、果梗の基部（除去部・上部）と、花落及び芯（除去部・下部）の 3 つに分別し、それぞれ細切した。なお、内部裂果試料は得られた量が少ないため、全試料を使用した。それらの一部を無作為に取り、密閉容器に入れて凍結保存（-20°C）した。分析直前にミキサーで均一化し、前年度と同一法で分析した。

分担研究 2

1. 作物残留試験データの作成

社団法人日本植物防疫協会に委託し、各 5 種及び 4 種の市販農薬を最大使用条件（最小希釈倍率、最大散布量、最大処理回数、最短 PHI）またはそれに準じた条件（ほうれんそうにおける農薬 6）で散布処理した露地栽培はくさい及び施設栽培ほうれんそうを、毎年 8 県の試験圃場で 2 年間かけて調製した。均一化した試料をアセトニトリルまたはアセトンで振とう抽出し、抽出液を C18 ミニカラム、グラフィアトカーボンミニカラム、または両ミニカラムを組み合わせ精製し、GC-MS, LC-MS, または LC-MS/MS 法を定量法とする個別分析法で各試料を分析した。各分析法は当研究用に開発したものであり、事前に妥当性を確認した。各農薬・農産物あたり 16 例の作物残留試験データを集積し、これを解析に使用した。

2. 残留データの解析

OECD の手法による最大残留量の算定には OECD の MRL カルキュレーター（エクセルスプレッドシート：47241282、白書：ENV/JM/MONO（2011）2、マニュアル：ENV/JM/MONO（2011）3）を参考にして、マイクロソフト社のエクセル 2010 の関数

を利用して算出した。16例の試験データから抽出した3例、4例、5例の試験データの組み合わせ、それぞれ、560組、1820組、4366組のデータベースは、マニュアルで作成した。

分担研究3

密封による加圧下と開封状態での常圧下とで、加水分解パターンに違いが生じるかを昨年度検討したマラチオンを用いて検討した。また、物理化学的性状の異なるクロルピリホス、アセフェート及びシペルメトリンの3農薬について昨年度作成した方法で農薬の分解ならびに生成する分解物の捕捉を試みた。

1. 熱分解実験

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）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、これに各農薬標準品 1.0mg/mL アセトン標準溶液 10 μ 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、各 pH の緩衝液それぞれを下表の条件で加熱した。また、開封状態下の試験ではナス型フラスコに、上記と同様にして緩衝液及びマラチオン標準品を加え、これをジムロート型冷却管に装着し、湯浴で 90 $^{\circ}$ C 20分及び 100 $^{\circ}$ C 60分加熱したのち放冷した。

温度 (°C)	時間 (分)	pH	代表的調理プロセスの例
90	20	4	低温殺菌
100	60	5	ベーキング、醸造、煮沸
120	20	6	殺菌*

2. 分解物等の分析

法冷後の容器内の溶液を 10 μ L ずつ採り、これにアセトン 40 μ L、メタノール 40 μ L を加え、それぞれ GC/MS、LC/MS で測定した。

<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 μ 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/MS/MS 条件>

装置: LC; UPLC ACQuity (Waters 社製)
 MS/MS; API 4000QTRAP (AB Sciex 社製)
 カラム: ACQuity UPLC BEH C18 (内径 2.1mm、膜厚 1.7 μ m、長さ 100mm) (Waters 社製)
 カラム温度: 40 $^{\circ}$ C
 移動相: A 液 0.1%ギ酸含有メタノール、B 液 0.1%ギ酸水溶液
 グラジエント条件: A:B=10:90 (0分) \rightarrow A:B=90:10 (5分) \rightarrow A:B=90:10 (8分)
 注入量: 5 μ L
 流速: 0.2mL/min
 イオン化法: ESI(+)
 イオン源温度: 400 $^{\circ}$ C
 イオン化電圧: 4.0kV
 測定モード: スキャン (m/z 50~550)

C. 結果及び考察

分担研究 1

1. 西洋なしの作物残留性調査結果

1.1. 分析法の妥当性確認

6種農薬を可食部（果肉及び果皮）、除去部（花落ち及び芯）及び全果実の3種部位別試料に0.01~0.5 mg/kg濃度添加して算出した平均回収率（n=3）は82~115%の範囲で、それらの標準偏差パーセントは9.5%以下と良好であった。又、無処理区の実験結果は全て定量限界未満（<0.01 mg/kg）であった。クロマトグラム上に分析を妨害する夾雑ピークは認められなかった。

1.2. 保存安定性の確認

各試料における保存安定性を確認した。保存期間は60日間であった。保存安定性試料での平均残存率（n=2）は、84~104%の範囲であり、いずれの農薬においても保存期間中の安定性に問題は認められなかった。

1.3. 処理区試料における残留値

西洋なしの処理区試料分析部位の平均残留地（n=2）ならびに、分析部位を国際標準（全果実）及び国内慣行（花落ち及び芯を除く可食部）とした場合の比率（全果実/可食部）を換算係数として算出した（表1-1）。

換算係数の変動は1.07~1.30（フルフェノクスロン~ボスカリド）であった。西洋なしにおける6農薬の平均値は1.19であり、この値は本事業において過去2年間で得た仁果類のデータ（りんご4種、日本なし1種）の平均値1.19（0.80~2.00）と非常に近い結果であった。しかしながら、H21-23年度の結果から、花落ち、芯及び果梗の基部の除去による影響は圃場間での差が大きいことが確認されている。また、各農産物を比較すると形状や表面の様子の違いがあり、実残留値では差が見られたが、換算係数つまり残留農薬の分布にはあまり相違がみられなかった。

全果実での残留値を、全果実を分析部位として求めた場合（国際標準方式）と、可食部と除去部に分別して求めた部位別試料重量及び残留値から算出した場合の変動は、

99~118%（フルフェノクスロン~ボスカリド）の範囲で、概ね一致することが確認された。昨年度までのりんごや日本なしのデータとも併せ、仁果類農産物における部位別分析の結果から全果実の残留値が推定可能であった。

2. 未成熟とうもろこしの作物残留性調査結果

2.1. 分析法の妥当性確認

6種農薬を芯、種子、ひげ及び外皮の4種部位別試料に0.01~40 mg/kg濃度添加して算出した平均回収率（n=3）は74~108%の範囲で、それらの標準偏差パーセント（RSD）も7.3%以下と良好であった。又、すべての無処理区試料の実験結果は定量限界未満（<0.01 mg/kg）であり、それらのクロマトグラム上に分析を妨害する夾雑ピークは認められなかった。

2.2. 保存安定性の確認

各試料における保存安定性を確認した。保存期間は茨城試料で76日間、千葉試料で88日間であった。保存安定性試料での平均残存率（n=2）はアセタミプリド89~100%、アセフェート90~96%、エトフェンプロックス95~104%、クロマフェノジド82~94%、トルクロホスメチル74~100%、メタミドホス20~30%であり、メタミドホスの保存期間中の消失が認められたが、その他の農薬では保存期間中の安定性に問題は認められなかった。

2.3. 処理区試料における残留値

分析対象農薬は散布した5種薬剤の各有効成分に加え、アセフェートの代謝物メタミドホスを含めた6化合物とした。ただし、前項に記載したように、メタミドホスについては保存期間中の安定性が確認できなかったため、結果の評価対象から除外した。

処理区試料の平均残留値（n=2）、及び残留値と試料重量から算出した部位別の残留量、ならびに試料全体の残留量の比率（部

位別／試料全体)、部位別の重量比及び分布率をまとめた(表 1-2)。

芯ではアセタミプリド及びアセフェートが検出され、種子ではアセフェートのみが検出された。トルクロホスメチルは茨城試料ではひげのみ検出され、千葉試料では外皮のみで検出された。その他の農薬はひげ及び外皮で検出された。

2 圃場間の 5 農薬において、芯には最大 3% (茨城・アセフェート)、種子には最大 6% (茨城・アセフェート)、ひげには 1% ~100% (茨城試料では 45~100%, 千葉試料では 1~4%), 外皮には 0~100% (茨城試料では 0~46%, 千葉試料では 94~100%) が分布していた。重量としては 80% 以上を占める芯及び種子には数パーセント程度しか分布していなかった。アセフェートならびにアセタミプリドでは芯の残留値がより外側にある種子よりも僅かではあるが高く、これらの浸透移行性が見受けられ、芯の取り扱いが残留値に影響を及ぼすことが示唆された。また、ひげ及び外皮における残留農薬の分布は圃場により大きな違いが見られ、茨城試料では主にひげに分布し、千葉試料では主に外皮に分布していた。これは散布処理とその際の農産物の生育時期の差(ひげの広がり具合等)によるものと推察される。

国内慣行の分析対象部位である種子と、残留値と各部位の重量から算出した「芯+種子」、「芯+種子+ひげ」における残留値ならびに分布率を表 1-3 に示す。「芯+種子」、「芯+種子+ひげ」は諸外国における分析対象部位を想定したものであり、芯が残留値に与える影響を確認した。また、ひげについては分析対象として定義されておらず、その取り扱いが残留値に与える影響についても確認した。「芯+種子」で残留値を推定した場合、アセタミプリドは種子のみでは定量限界未満であったが、定量限界程度

(0.01 mg/kg) 検出されることが推測され、アセフェートでは種子のみ残留値から変動はなかったが検出されると推測された。「芯+種子+ひげ」で残留値を推定した場合、茨城試料ではトリクロホスメチルでは定量限界未満であったが、その他の農薬では 0.24 ~0.69 mg/kg 相当検出されると推測され、千葉試料ではアセタミプリドとアセフェートでそれぞれ 0.02, 0.06 mg/kg 相当検出され、それ以外は定量限界未満と推測された。この場合、茨城試料のアセタミプリドならびにクロマフェノジドでは基準値(それぞれ、0.2 及び 0.05ppm) を超えており、ひげが残留値に与える影響は大きく、その取り扱いに注意を払うべきであり、分析対象としての定義の必要性が示唆された。

3. 農薬残留分布に対する内部裂果の影響

3.1. 各分析部位における残留値

部位別分析処理区りんご試料の平均残留値(n=2)を非裂果試料と裂果試料に分けてまとめた(図 1-2)。

非裂果試料と裂果試料の間で、可食部中残留濃度に差は認められず、裂果試料／非裂果試料の残留値の比率は平均 0.92 であった。除去部・上部においては、6 種農薬全てで非裂果試料の方が残留値は高く、裂果試料／非裂果試料の残留値の比率は平均 0.36 であった。除去部・下部においては除去部・上部とは反して 6 種農薬全てで裂果試料の方が残留値は高く、裂果試料／非裂果試料の残留値の比率は平均 1.39 であった。以上のことから、りんごの場合、果実の肥大により生じた裂果により、果梗の基部に溜まっていた農薬が果実内部に浸透し、農薬の残留分布に影響を与えた可能性があることが考えられた。但し、重量の大きい可食部や全果実で換算した時の残留値への影響は小さく、最終的な残留評価に大きな影響を与える可能性は低いと示唆された。

まとめ

- ・西洋なし：同じ仁果類であるりんごや日本なしとは形状が異なるが、国内慣行の分析部位（可食部のみ）から、国際基準の分析部位（全果実）への換算係数 1.0～1.3 は、りんごや日本なしと同程度（0.8～2.0、平均 1.2）であることから、仁科類の分析部位の国際標準への移行において、農薬の使用法が同じであれば、西洋なしをりんごや日本なしと区別して取り扱う必要は無いと考えられた。
- ・未成熟とうもろこし：一部の農薬が花柱（ひげ）に特異的に存在することが確認され、その取扱いが残留性評価に与える影響が大きいと推察された。とうもろこしのひげの取り扱いについては、我国の現行試験指針ならびに国際標準のいずれにおいても不明瞭であり、早急に両者においてとうもろこしの分析部位を明確に定義することが必要と考えられる。
- ・りんご果実中の残留農薬の分布に対する内部裂果の影響：試料の肥大等に伴う内部裂果は、試料中の残留農薬の分布、特に重量の小さな除去部内の分布が顕著に異なったが、国内慣行における可食部中濃度、国際標準における全果実中の濃度に関しては著しく大きな影響を与える可能性は低いと示唆された。

分担研究 1 a

米国 EPA が農産品由来の農薬暴露量解析で利用している Qualitative Usage Analysis (QUA) と称される農薬使用量の定量解析ツールを用いた解析例を示し、試算方法、中でも作物処理率 (PCT; Percent of Crop Treated) の意義とその算出法に重点をおいた紹介がなされた。

分担研究 2

1. 残留濃度と OECD-MRL

OECD 法は、残留データの最高濃度 (HR) と、 $\text{平均値} + 4 \cdot \text{SD}$ 、 $3 \cdot \text{CF} \cdot \text{平均値}$ の内、最も高い値を最大残留量とし、これを原則、1 桁 (1.5×10^n を除く) に丸め、残留基準値等級に当てはめて MRL 案とする。CF は、データの中で LOQ 未満の測定値が占める比率であり、今回の試験では、LOQ 未満の測定値は無く、CF は全て 1 であった。また、 $\text{平均値} + 4 \cdot \text{SD}$ が MRL となる場合も $3 \cdot \text{平均値}$ が MRL となる場合のいずれもがあった。MRL の等級は、1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10 とその 1/10、1/100、または 10 倍である。丸めは、原則切り上げであるが、最大残留値とそれに最も近い基準値等級との差が、最大残留量と 1 段高い基準値等級との差の 1/10 未満の場合は、切り捨てられる。上記原則で算定される各農作物および農薬あたり 16 例の残留データ (表 2-1) から算定される OECD 法による MRL は、表 2-2 のようになる。以下は全て、この 16 例のデータとの比較で得た結果である。

2. 不適切 MRL を導く割合

16 例のデータベースから任意に抽出した 3 例のデータに基づく OECD 法による MRL の分布をまとめた。

MRL の分布は様々であり、16 例試験による MRL は 3 例の試験の結果を基にした MRL の分布の最高頻度と一致する場合もあれば大きくずれる場合もあった。表 2-3 及び図 2-1 に纏めたように、3 例データに基づく MRL の 1/5 から 1/2 は、16 例データに基づく MRL よりも低い MRL となった。測定値の HR 未満の MRL は、農薬製品のラベルに表示された使用基準を守って農薬を使用しても MRL を超える残留量となるような MRL であり、不適切な MRL となる。16 例のデータの HR 未満の不適切な MRL

を与える割合は、低いもの (<5% : はくさい農薬 4 及びほうれんそうの農薬 1、4、6) がある一方、はくさいの農薬 2 及び 3 のように約 20% の高比率で不適切 MRL を与えるというものも認められた。

試験例数とこの不適切 MRL の発生比率との関係を見るため、試験例数を 3 例から 5 例まで増やして検討した (表 2-3)。試験例数を増やすことによって、不適切 MRL が導かれる比率は低減したが、5 例でも 10% 近くが不適切 MRL となる場合があった (はくさい、農薬 2)。国内登録で特に生産量の多い農産物に求められる試験例数 6 例の組合せは、調べていないが、3 例から 5 例までの減少傾向からは 6 例となっても 5 例の場合よりも顕著には減らないと推測される。

3. 現行方式による MRL と OECD 方式の比較

MRL の分布と不適切 MRL の発生頻度を指標にして、現行の日本方式の MRL 算定法と OECD の方式とを比較した。

両方式は、経験則を基にしているか統計手法に基づいているかの違いに加えて、基準値等級にも違いがあり、OECD の基準値等級 (表 2-5) には、日本に無い基準値等級 (0.15、1.5、15 及び 4、6、8、 9×10^m) が設定されており、両者を単純には比較できない。例えば、OECD 方式の最大残留量 1.2 ppm は OECD の MRL 等級 (“OECD-MRL”) では 1.5 ppm となるが、日本の MRL 等級 (“OECD-MTL(jpn)”) では 2 ppm となる。また、同様に 0.71 ppm は、OECD の MRL 等級では 0.8 ppm であるが、日本の等級では 1 ppm となる。そこで、OECD の最大残留量を日本の現行 MRL 等級に当てはめたデータ (OECD-MRL(jpn)) でも、MRL の分布と不適切 MRL (n 例データによる $MRL < 16$ 例データの HR) を与える頻度を比較した。また、

現行の基準値について、方法の項に記載したように、標準 MRL (“MHLW-MRL (標準)”) と最大 MRL (“MHLW-MRL(最大)”) の 2 通りを算定した。図 2-1 と表 2-4 は 3 例の試験例数で調べたその結果である。

OECD の MRL 等級を日本の等級に対応させた OECD-MRL(jpn) の分布は、約半数の例で、元の MRL 分布とは異なる分布となった。同 OECD-MRL(jpn) の分布は、はくさいでは、全例とも現行の標準 MRL の分布よりも高濃度側に高頻度の分布となったが、最大 MRL の分布とは 5 例中 4 例 (農薬 1, 2, 3 及び 4) で、ほぼ一致した。ほうれんそうでも、OECD-MRL(jpn) は、現行最大 MRL の分布よりも高濃度側に高頻度で分布した。

上記の結果を反映して、不適切 MRL を与える割合は、1 例 (ほうれんそう、農薬 1) を除いて、OECD 法と現行最大 MRL 法とで概ね同等であった (表 2-4)。一方、現行標準 MRL 法は、不適切な MRL を与える割合が極めて高く、OECD 法に比べても高かった。なお、OECD 法による不適切 MRL の発生割合は、OECD の基準値等級を日本の基準値等級にした場合もほとんど変わらなかった。

まとめ

- OECD の MRL 算定手法を国内で実施した作物残留試験データを用いて検証した。
- OECD の MRL 算定手法には、日本、Codex、EU とも、また、NAFTA とも異なる独自の MRL 等級が含まれている。
- 農薬及び作物当たり 16 例のデータから抽出した 3 例の試験例に対して、国内現行標準法は 16 例の HR よりも低い不適切な MRL を高い確率で導く。
- 一方、国内の最大法は、より大きな MRL を与え、不適切な MRL を与える確率は

顕著に下がり、許容可能なレベルとなる。

- ・ OECD 法による結果は、国内の最大法の結果と同等か、少し低めとなる。
- ・ 不適切 MRL を与える割合は、試験例数が増えれば低減するが、その低減効果は 4 例を 5 例にする場合よりも、3 例を 4 例にする場合の方が高い。
- ・ 上述のように、OECD 法は、現行の国内標準方法に比べてより適切な最大残留量の推定と MRL を導く。しかし、農薬登録制度改定後の農薬登録に要求される試験例数は「特に生鮮量の多い」農産物でも 6 例(以上)であって、最大残留量の高い精度で推定するには十分な例数ではない。
- ・ 3 例など極少数例のデータでは、不適切 MRL を無視できない確率で与えるリスクがあることから、導入に際しては、MRL 設定は専門家による総合判断を優先させ、OECD 法はその補助に使うのが望ましいと思われる。
- ・ また、OECD 法は現状よりも大きな残留基準値を提示することになるため、暴露量の評価を更に精密にすることが一層重要になろう。

分担研究 2 a Codex の食品及び飼料分類改定と代表製品の選抜原則：文献調査

Codex の HP から改定案など関連する公開資料を収集した。2012 年 4 月までの段階で、食品及び飼料分類に関しては、野菜類、食用花と熱帯及び亜熱帯果実を除く果実類、熱帯及び亜熱帯果実、ナッツ類、ハーブ及びスパイスについての改定案が公表されている。グループ MRL 設定における代表製品の選定については、原則とガイダンスが決定され、果実類と野菜類での例が公表されている。それらは Codex 規格作成手続きの最終段階に近

いものも初期の段階に留まっているものもある。

分担研究 3

1. 密封による加圧下と開封状態による常圧下における加水分解パターン

マラチオン標準品を開封状態で 90℃20 分及び 100℃60 分で加熱処理を行い、標準溶液と加熱処理後の試験溶液から得られた GC/MS 及び LC/MS のトータルイオンクロマトグラム (TIC) から、加熱による生成物の検索を行った。なお、120℃20 分による加熱条件の検討は、開封状態の常圧下では条件設定ができないため、検討を行っていない。

いずれの加熱処理においても、密封による加圧下で生成が確認されたフマル酸ジエチル及びメルカプトコハク酸ジエチルが、開封状態下でも同様に確認された。その他の分解生成物は確認することはできなかった。また、各条件下におけるフマル酸ジエチルの生成量を GC/MS における $m/z127$ のイオンクロマトグラムから導いた面積値から比較したところ、温度上昇とともに生成量は増大し、その生成量は開封状態及び密封状態の間で大きな違いはなかった(図 3-1)。

なお、加熱処理後の GC/MS トータルイオンクロマトグラムで保持時間 21.1 分に、LC/MS トータルイオンクロマトグラムで保持時間 2.27 分、2.79 分、2.93 分に見られた未知ピークについて各種ライブラリによる検索を試みたが、マラチオンに結びつく情報は得られなかった。マラチオン以外の夾雑物に起因する物質であることも考えられるが、今後さらに検討を加える必要がある。

2. クロルピリホス、アセフェート及びシペルメトリンにおける加熱時の分解ならびに生成する分解物の捕捉

物理化学的性状の異なるアセフェート、クロルピリホス及びシペルメトリンについて検討を行った(表 3-1)。標準溶液と加熱処理後の試験溶液を GC-MS 及び LC-MS で測定し、それから得られた MS (TIC) クロマトグラムを比較し、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。

① アセフェート

GC マスクロマトグラム (m/z : 136) から、各加熱条件下のアセフェート濃度を算出した。90°C20 分 (pH4) 及び 100°C60 分 (pH5) ではほとんど減衰が見られず、120°C20 分 (pH6) で 2 割程度であった(表 3-2)。熱による分解が 100°C 以下では起きにくいことが示唆された。

アセフェートはメタミドホスに分解することが知られているが、いずれの加熱条件下でもメタミドホスの生成は認められなかった。また、新たな分解生成物を捕捉することもできなかった。(図 3-2)

② クロルピリホス

GC マスクロマトグラム (m/z : 197) から、各加熱条件下のクロルピリホス濃度を算出した。90°C20 分 (pH4) 及び 100°C60 分 (pH5) で 8 割程度、120°C20 分 (pH6) で 9 割程度の減衰が見られた(表 3-2)。マラチオンなど他の農薬と比較し、減衰の程度が大きく、さらに低い温度においても大きな減衰が見られたことから、熱による分解が容易に起こることが示唆された。

クロルピリホスは 3,5,6-トリクロロ-2-ピリジノール (TCP) に分解することが知られている¹⁾。この物質の標準品を入手し、GC/MS で測定したところ、ピークが検出できず測定が困難であった。この物質の測定法としては、*N*-メチル-*N*-*tert*-ブチルジメチルシリルトリフルオトアセトアミド (MTBSTFA) などで誘導体化を行った後、GC/MS で測定するなどの例が報告されている²⁾。この方法は操作が煩雑なため、

LC/MS/MS を用いて簡易に測定できる方法を検討した。標準品をポジティブモードで測定したところ、親イオンのプロトン付加イオンである m/z 200.1 を確認することができた。さらに、このプロダクトイオン m/z 108.500 を測定したところ、保持時間 5.2 分付近にピークを確認することができた(図 3-3, 3-4)。LC/MS/MS を用いて容易に高感度分析が可能となったことから、この条件で加熱処理後の試験溶液を測定したところ、すべての試験溶液から TCP が検出された。その生成量は、イオン交換水にクロルピリホスを加えた加熱未処理溶液における TCP 量を 1 とした場合、90°C20 分 (pH4) で 58, 100°C60 分 (pH5) で 147, 120°C20 分 (pH6) で 230 と加熱とともに生成量は増大し(表 3-2)。さらに、他の分解生成物の捕捉を試みたが、確認することはできなかった。

なお、加熱処理後の GC/MS トータルイオンクロマトグラムで保持時間 17.9 分及び 21.1 分に見られた未知ピークについて各種ライブラリによる検索を試みたが、クロルピリホスに結びつく情報は得られなかった。一方、保持時間 21.1 分のピーク (ピーク *2) から得られた MS スペクトルは、マラチオンにおける未知ピークから得られたスペクトルとほぼ一致していた。マラチオンの場合と同様、クロルピリホス以外の夾雑物に起因する物質であることも考えられるが、今後さらに検討を加える必要がある。

TCP は LD₅₀794mg/kg 体重 (経口, マウス) であり、クロルピリホス (LD₅₀64mg/kg, 経口, マウス) に比べ、急性毒性が低い。しかし、加熱により容易に生成されることから、大量摂取による安全性評価が必要となる可能性が示唆された。

③ ペルメトリン

GC マスクロマトグラム (m/z : 163) から、各加熱条件下のシペルメトリン濃度を算出

した。90°C20分 (pH4) で5割程度、100°C60分 (pH5) で6割程度、120°C20分 (pH6) で8割程度の減衰が見られた (表 3-2)。

シペルメトリンは塩素酸塩などの酸化剤存在下において、210°C15分の加熱で3-フェノキシベンジルアルデヒド、3-フェノキシベンジルアセトニトリルなどに分解し、塩素酸塩非存在下ではこれら物質はほとんど生成されないという報告例がある。今回行った加熱条件下では、いずれの条件でもこれら物質は検出できなかった。また、他の分解生成物を捕捉することもできなかった (図 3-5)。

なお、加熱処理後の GC/MS トータルイオンクロマトグラムで保持時間 7.02、8.81、16.0 及び 17.9 分に見られた未知ピークについて各種ライブラリによる検索を試みたが、シペルメトリンに結びつく情報は得られなかった。一方、保持時間 17.9 分のピーク (ピーク *4) から得られた MS スペクトルは、クロロピリホスにおける未知ピークから得られたスペクトルとほぼ一致していた。マラチオン及びクロロピリホスの場合と同様、シペルメトリン以外の夾雑物に起因する物質であることも考えられるが、今後さらに検討を加える必要がある。

分解経路の解明及び分解生成物の確認に ¹⁴C などの放射性同位体を標識化合物として利用することで、加熱により生成したすべての化合物の所在を明らかにできる可能性が高い。しかし、放射性同位体の利用は適切な標識化合物の作成及び特殊な施設の確保を要するなど、実施が困難な場合がある。今回の検討では、広く一般施設で実施できるように、市販の標準品を用いて検討を加えた。各種溶媒に不溶な生成物は感知困難なこと、由来の不明なピークが出現する場合があることなど、まだ解決しなければな

らない問題は残されているものの、GC-MS 及び LC-MS を用いることで、広範囲な化合物の検索が期待できる。

まとめ

1. 本検討により得られた結果
 - a. 生鮮品は、加熱調理されて喫食されることも多いが、農薬の摂取を考える上で、加熱加工時における農薬残存状況や分解生成物の把握などが重要な要因となる。
 - b. 農薬を 90~150°C で加熱したところ、加熱温度、加熱時間の増加に伴い、残存量が低下した。
 - c. GC-FPD 及び GC-MS から得られたデータを解析し、分解生成物を簡易に検索したところ、未同定の化合物及び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'-トリメチルホスホロジチオエートと推測される化合物が見出された。
 - d. 加熱加工後に残存する農薬を評価するための試験手法について、OECD によるガイドラインが作成されている。

本ガイドラインでは、加熱時における生成物の検討に、放射性同位元素標識体を用いて加水分解試験を実施する。加水分解試験は、代表的な条件を利用する。本試験には、食品成分を含めることを義務づけない。

代表的な加熱加工条件

温度 (°C)	時間 (分)	pH	代表的なプロセス
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)

- e. d. に準拠したマラチオンの水存在下における加熱分解実験では、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コ

はく酸ジエチルが得られた。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。

- f. クロルピリホスの加熱実験では 3, 5, 6-トリクロロ-2-ピリジノールが捕捉され、またアセフェート及びシペルメトリンでは本条件下での分解生成物の捕捉はできなかった。
- g. 供試した全ての農薬で加熱に伴う減衰が認められた。100°C60分 (pH5) の加熱条件では、クロルピリホスは約 8 割減衰したが、アセフェートはほとんど減衰しないなど、農薬により減衰状況は大きく異なっていた。
- h. 本加熱条件は、加熱調理加工による食品中残留農薬の減衰、分解状況及び分解生成物の把握に有効であることが示され、今後この手法を用いて、様々な農薬に対してこれらの把握を進めることにより、加工食品の喫食に伴う健康影響リスクを判断する基礎データとしての活用が期待される。
- i. ^{14}C などの放射性同位体を標識化合物として利用することなく、市販の標準品を用いて分解生成物の検索を試みたところ、由来の不明なピークが出現する場合があることなど、まだ解決しなければならない問題は残されているものの、GC-MS 及び LC-MS を用いることで、広範囲な化合物の検索が期待できる。

2. 調理加工工程における農薬分解生成物確認のためのモデル実験手法の提案

a. 加熱処理方法

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、これに農薬標準品 1.0mg/mL アセトン標準溶液 10 μL をそれぞれ加える。容器内をアスピレーターで減圧

した後、密栓し、各温度に調整したアルミブロック中でそれぞれ 90°C20 分間、100°C 60 分間及び 120°C20 分間加熱する。放冷後、容器内の溶液を 10 μL ずつ採り、これにアセトン 40 μL 、メタノール 40 μL を加え、それぞれ GC-MS(/MS), LC-MS(/MS) で測定する。

b. 測定条件の例

<GC-MS(/MS)条件の例>

装置：GC-MS または GC-MS/MS

カラム：5%フェニル-メチルシリコン (内径 0.25mm, 膜厚 0.25 μm , 長さ 30m)

カラム温度：50°C (1分) \rightarrow 25°C/分 \rightarrow 125°C \rightarrow 10°C/分 \rightarrow 300°C (10分)

インターフェイス温度：280°C

イオン化モード：EI (70eV)

測定モード：スキャン (m/z 50~550)

<LC-MS(/MS)条件の例>

装置：LC-MS または LC-MS/MS

カラム：C18 (内径 2.1mm, 膜厚 1.7 μm , 長さ 100mm)

カラム温度：40°C

移動相：A液 0.1%ギ酸含有メタノール, B液 0.1%ギ酸水溶液

グラジエント条件：A:B=10:90 (0分) \rightarrow A:B=90:10 (5分) \rightarrow A:B=90:10 (8分)

注入量：5 μL

流速：0.2mL/min

イオン化法：ESI(+)

イオン源温度：400°C

イオン化電圧：4.0kV

測定モード：スキャン (m/z 50~550)

c. 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、新たに出現もしくは面積が大きく増加したピークを検索する。選定したピークの MS スペクトルを NIST または Willy 等のライブラリにより検索する。原体とライブラリ検索結果等から、得られたピークの物質を類推し、その標準品を入手する。同条