

図 7. 加熱試験によるフマル酸ジエチルの生成量

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 2)。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。

表 2. 調査対象農薬の主な物理化学的性状

農薬名	オクタノール・水分配係数 (LogPow)	水溶解度 (mg/L)	蒸気圧 (mPa)
マラチオン	2.75	145	5.3
アセフェート	-0.89	790000	0.226
クロルピリホス	4.7	1.4	2.7
シペルメトリン	6.6	0.004	0.00020

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°C 20 分 (pH4) 及び 100°C 60 分 (pH5) ではほとんど減衰が見られず、120°C 20 分 (pH6) で 2 割程度であった (表 3)。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 7, 8)

表 3. 加熱処理によるアセフェートの減衰
(処理前のアセフェート量を 1.00 とした場合)

加熱条件	残存率
90°C20 分 (pH4)	0.989
100°C60 分 (pH5)	0.983
120°C20 分 (pH6)	0.800

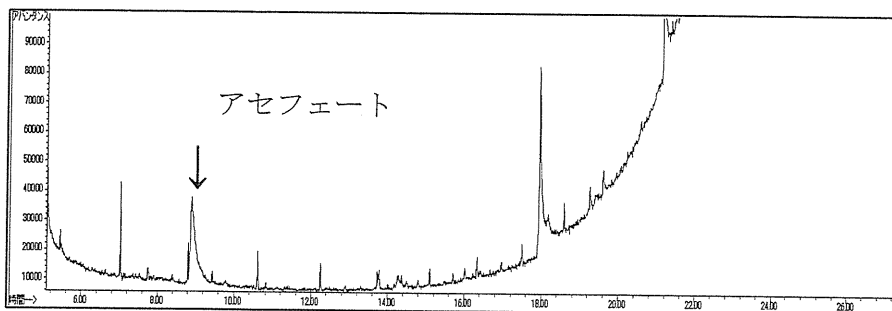


図 7-1. アセフェート加熱処理前の GC/MS トータルイオンクロマトグラム

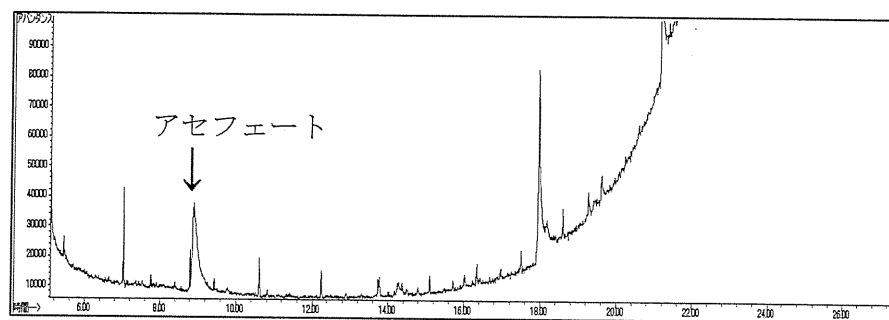


図 7-2. アセフェート加熱処理後の GC/MS トータルイオンクロマトグラム
(100°C60 分 pH5)

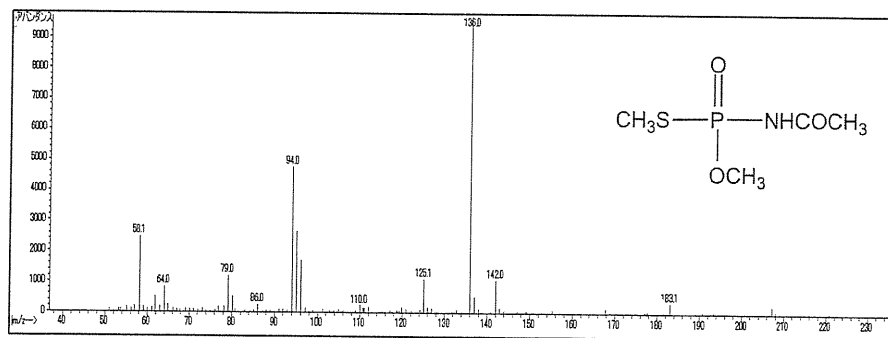


図 7-3. アセフェートの GC/MS スペクトル
化学名 *O,S*-dimethyl acethylphosphoramidothioate
CAS No. 30560-19-1

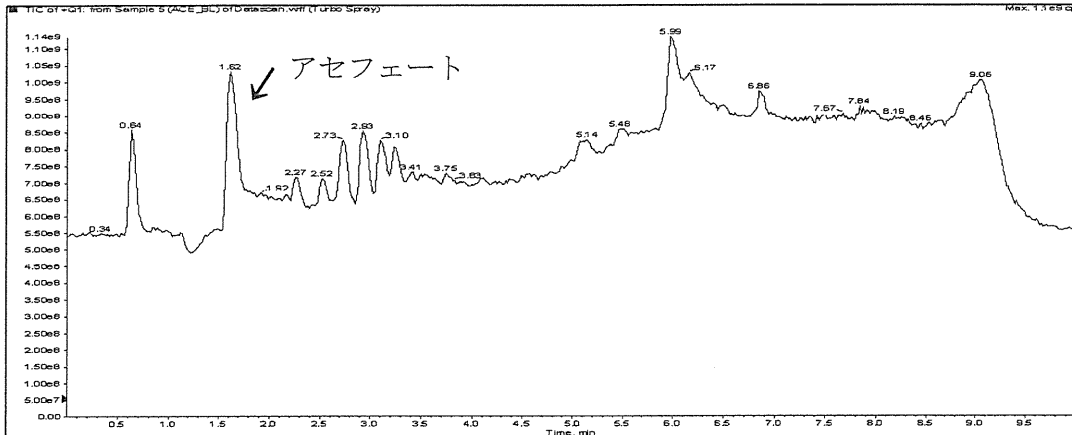


図 8-1. アセフェート加熱処理前の LC/MS トータルイオンクロマトグラム

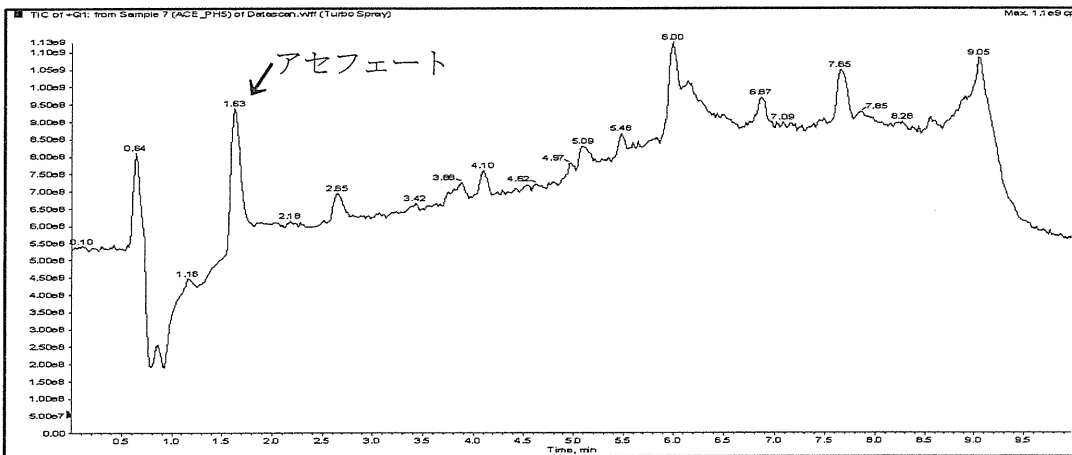


図 8-2. アセフェート加熱処理後の LC/MS トータルイオンクロマトグラム (100°C60分 pH5)

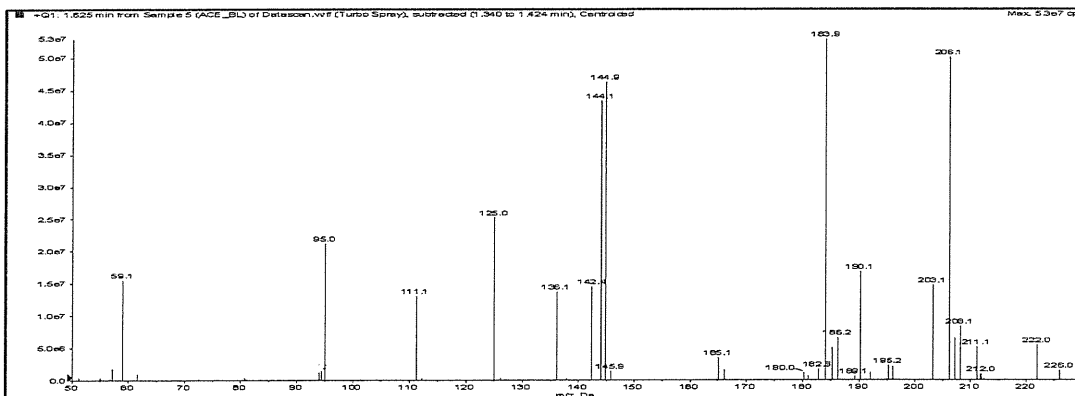


図 8-3. アセフェートの LC/MS スペクトル

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4)。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。

表4. 加熱処理によるクロルピリホスの減衰(処理前のクロルピリホス量を1.00とした場合)

加熱条件	残存率
90°C20分(pH4)	0.243
100°C60分(pH5)	0.160
120°C20分(pH6)	0.087

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 $m/z200.1$ を確認することができた。さらに、このプロダクトイオン $m/z108.500$ 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。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た(表5)。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(図9, 10)。

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(図9-4)。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。

表5. クロルピリホスの加熱処理によるTCPの生成(ブランク溶液を1とした場合)

加熱条件	生成量
90°C20分(pH4)	58
100°C60分(pH5)	147
120°C20分(pH6)	230

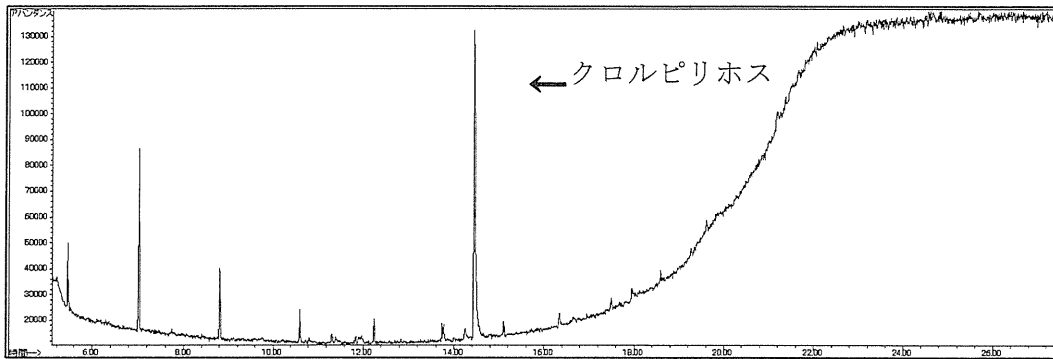


図 9-1. クロルピリホス加熱処理前の GC/MS トータルイオンクロマトグラム

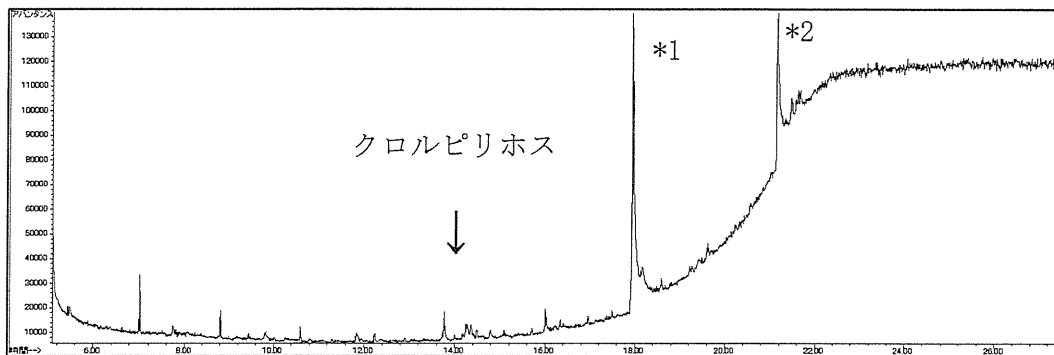


図 9-2. クロルピリホス加熱処理後の GC/MS トータルイオンクロマトグラム
(100°C60分 pH5)

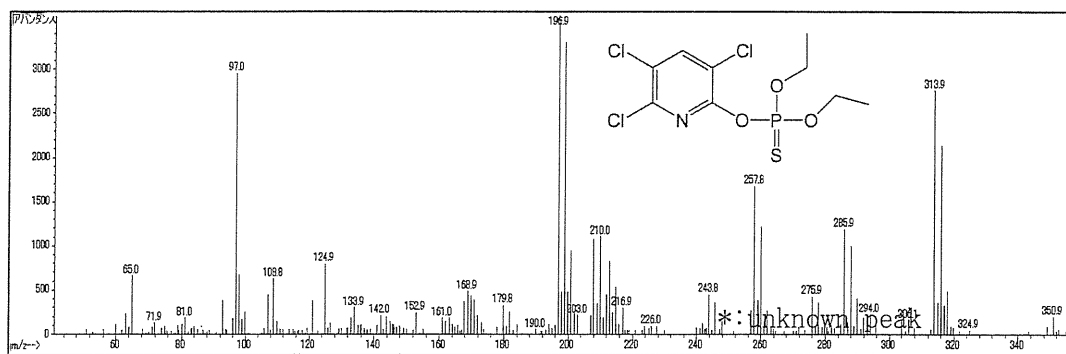


図 9-3. クロルピリホスの GC/MS スペクトル
化学名 *O,O*-diethyl *O*-3,5,6-trichloro-2-pyridinyl phosphorothioate
CAS No. 2921-88-2

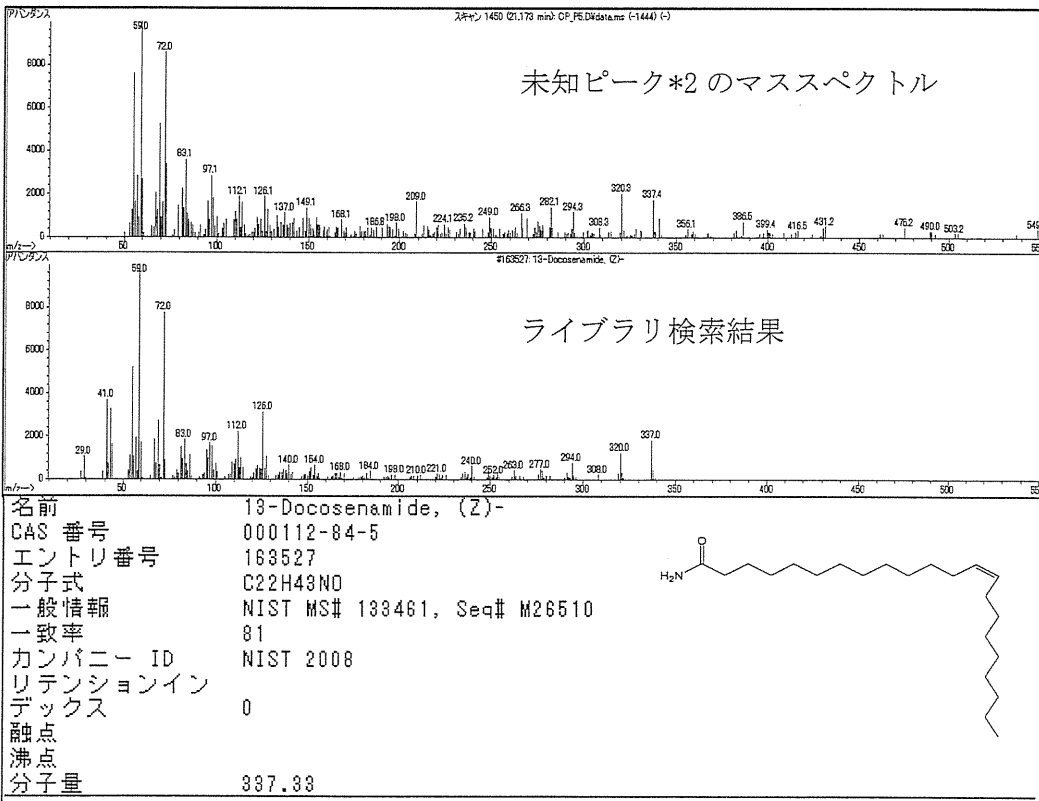
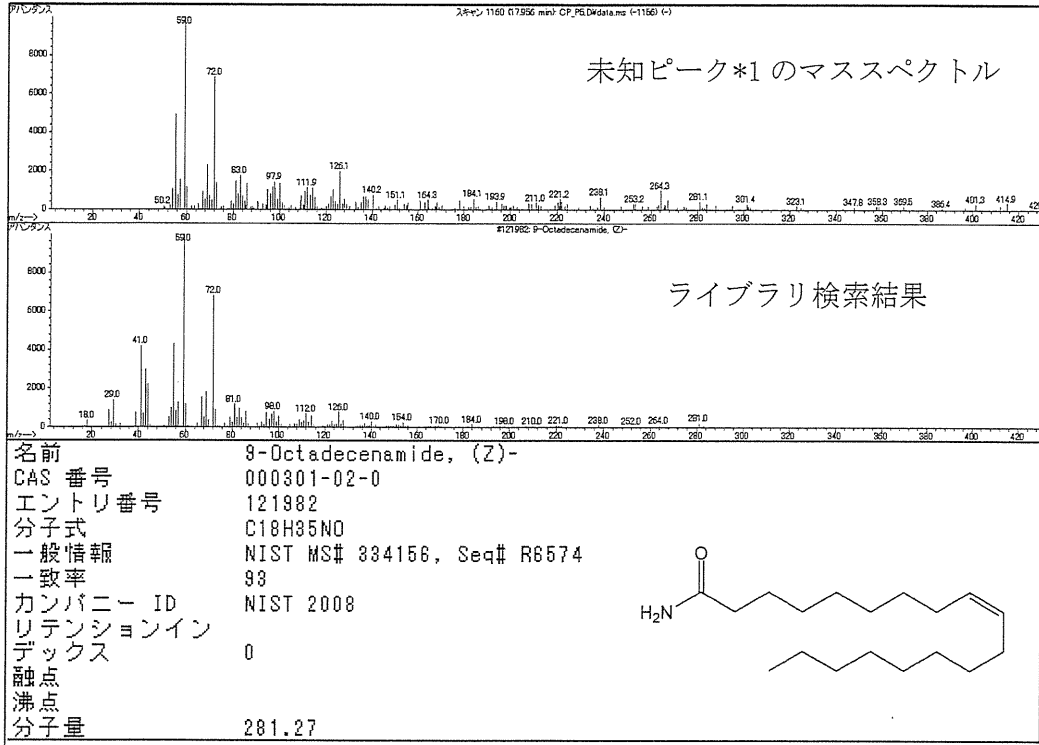


図 9-4. クロルピリホス加熱処理後の GC/MS トータルイオンクロマトグラム (100°C60 分 pH5) で出現した未知ピークのマスペクトルとライブラリ検索結果

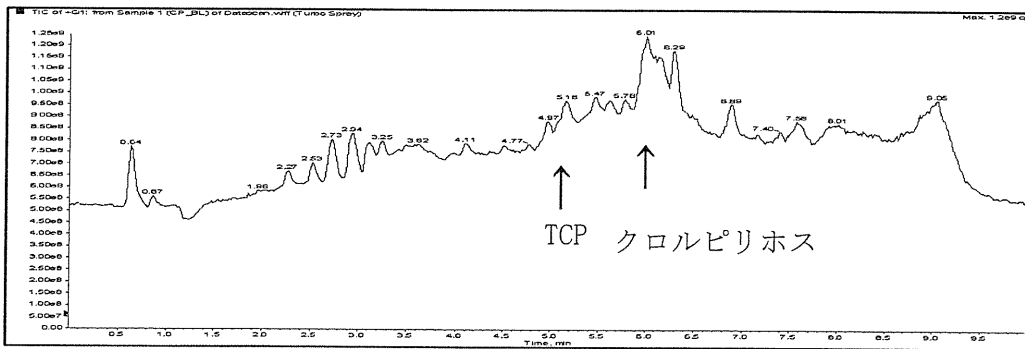


図 10-1. クロルピリホス加熱処理前の LC/MS トータルイオンクロマトグラム

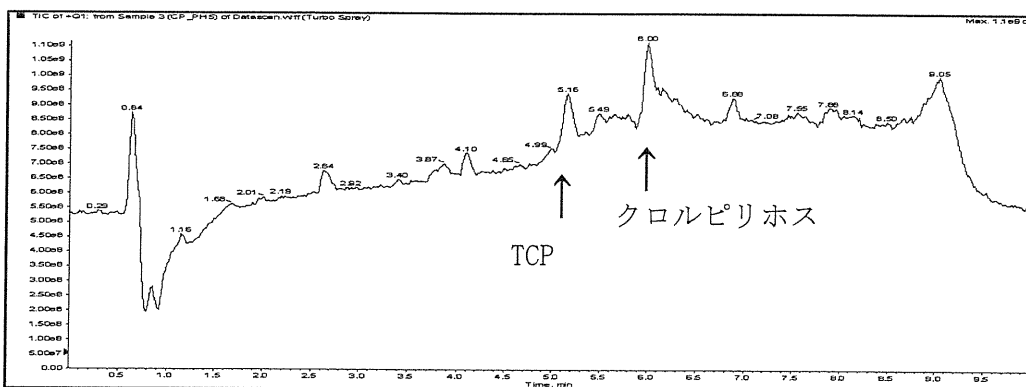


図 10-2. クロルピリホス加熱処理後の LC/MS トータルイオンクロマトグラム (100°C60分 pH5)

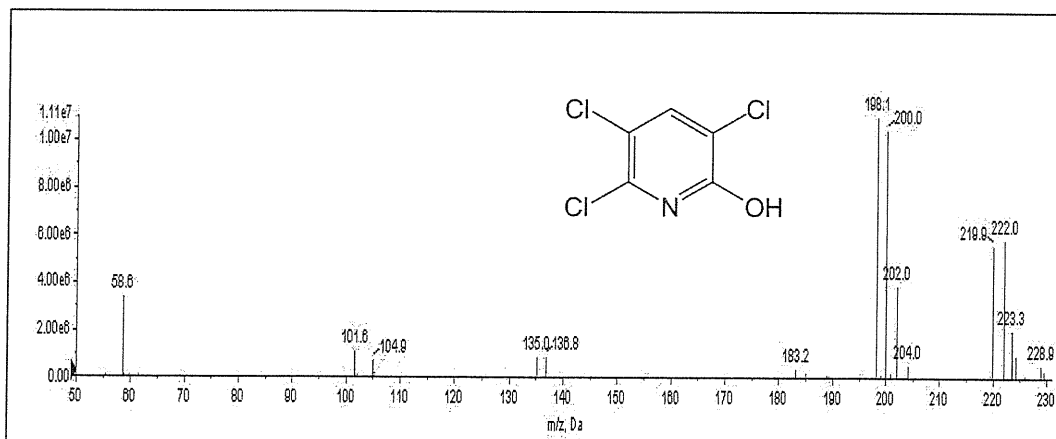


図 10-3. TCP の LC/MS クロマトグラム

化学名 3,5,6-trichloro-2-pyridinol

CAS No. 6515-38-4

③シペルメトリン

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°C
60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6)。

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℃15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(図11)。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12)。

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(図12-4)。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、クロル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ル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。

表6. 加熱処理によるシペルメトリンの減衰(処理前のシペルメトリン量を1.00とした場合)

加熱条件	残存率
90℃20分(pH4)	0.534
100℃60分(pH5)	0.413
120℃20分(pH6)	0.225

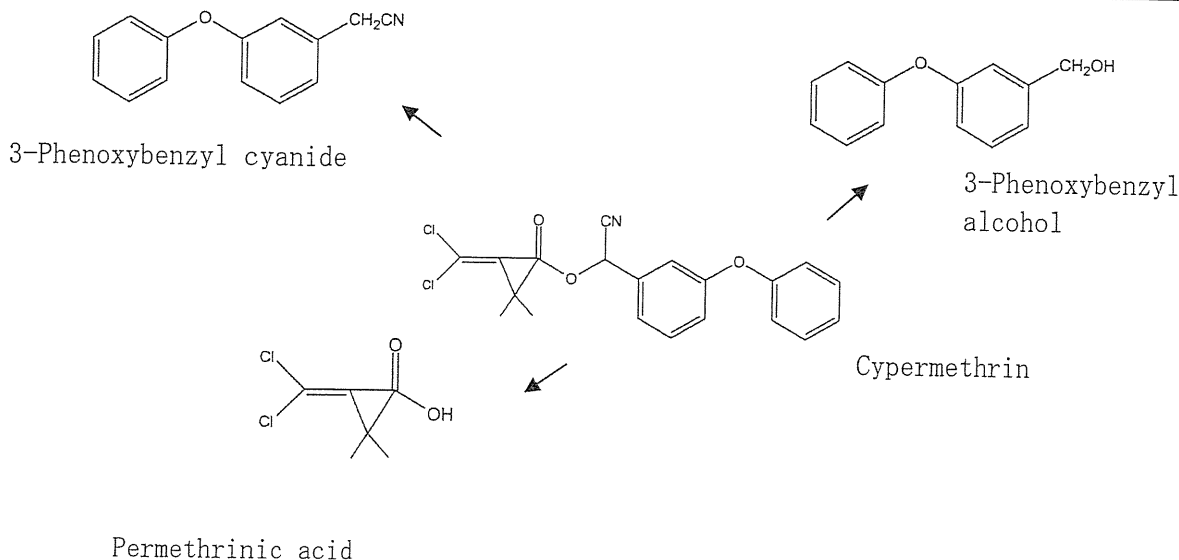


図11. シペルメトリンの分解経路(210℃・塩素酸塩存在下)

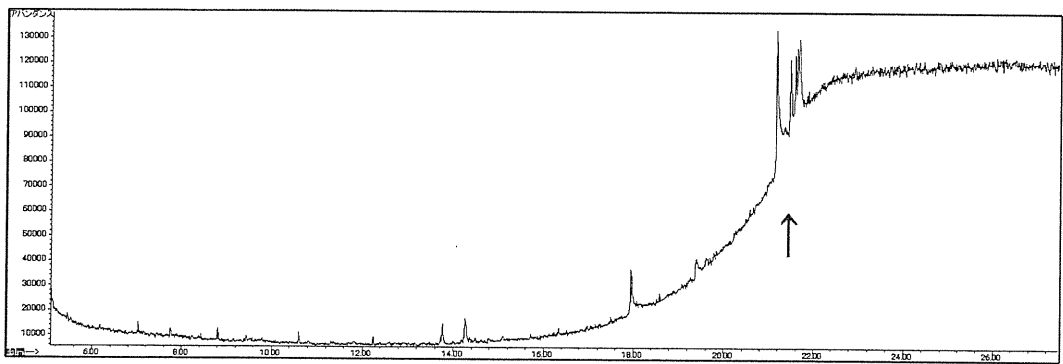
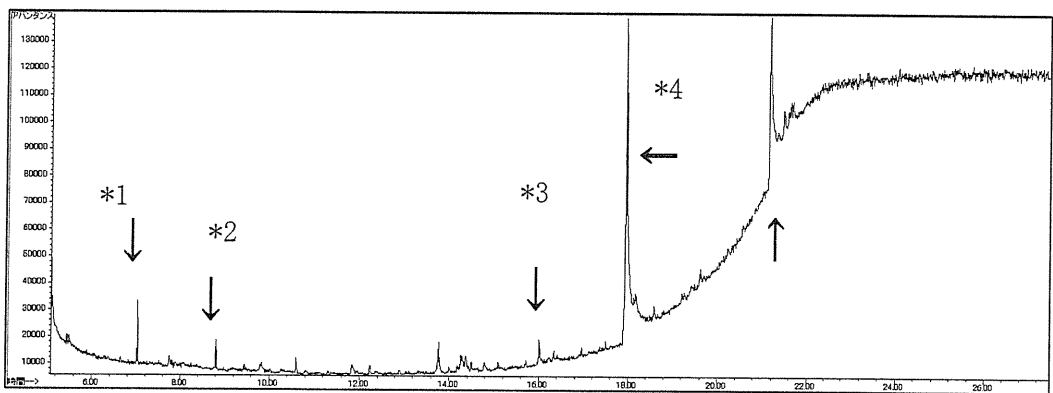


図 12-1. シペルメトリン加熱処理前の GC/MS トータルイオンクロマトグラム



*: unknown peak

図 12-2. シペルメトリン加熱処理後の GC/MS トータルイオンクロマトグラム (100°C60 分 pH5)

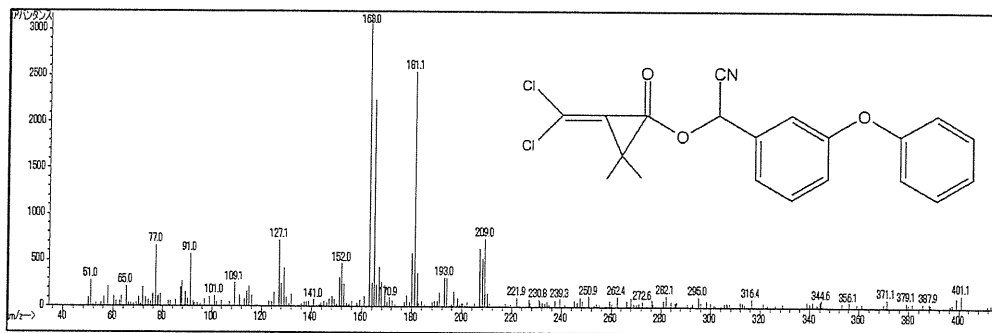


図 12-3. シペルメトリンの GC/MS スペクトル

化学名

(RS)- α -cyano-3-phenoxybenzyl (1RS, 3RS; 1RS, 3SR)-3-(2,2-dichlorovinyl)-
2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate

CAS No. 52315-07-8

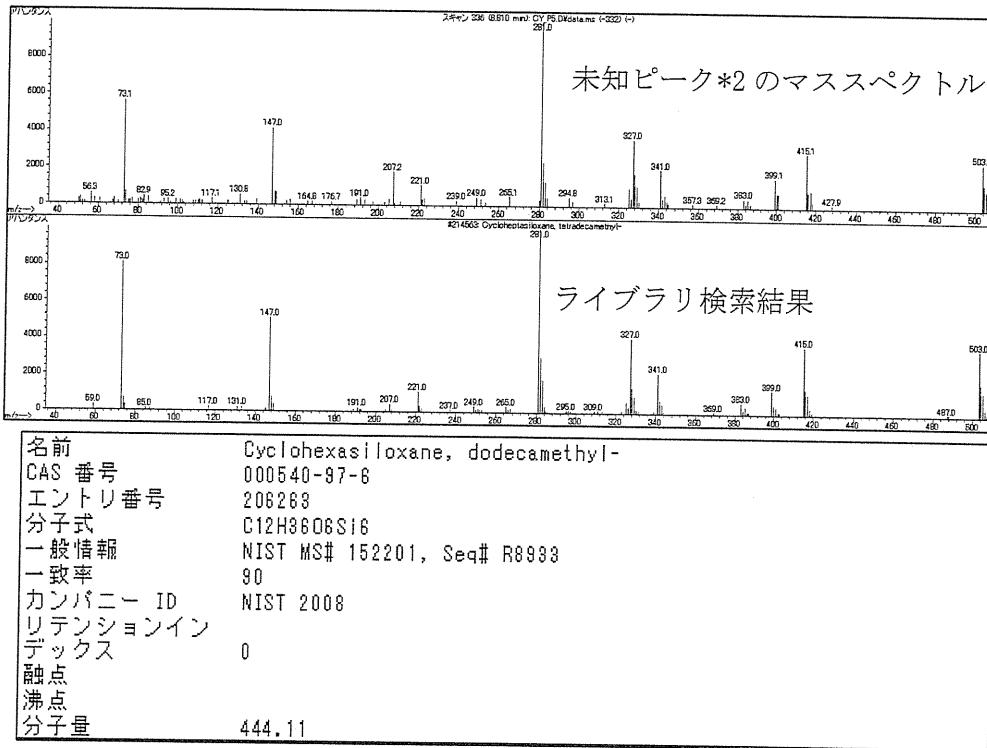
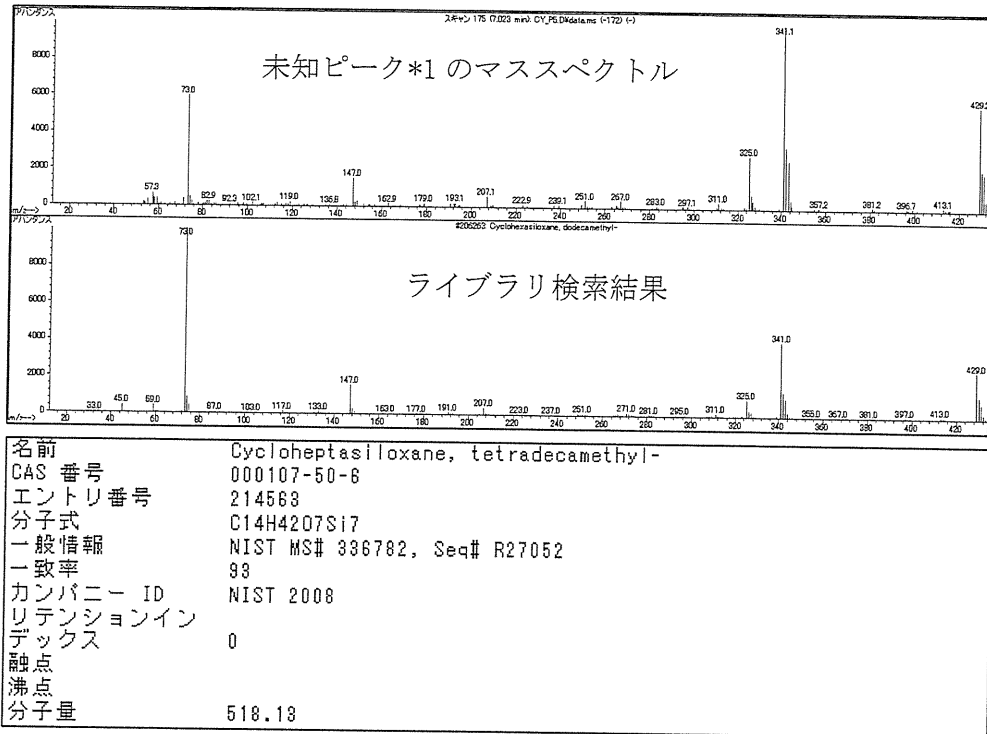
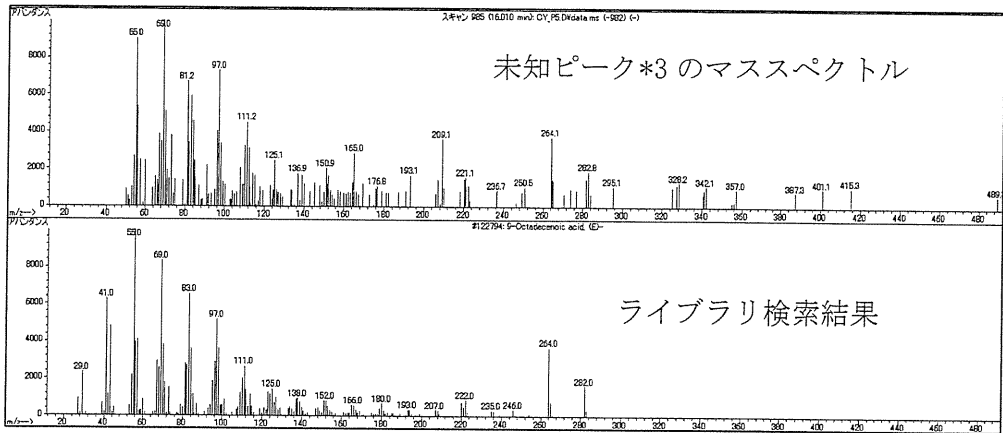
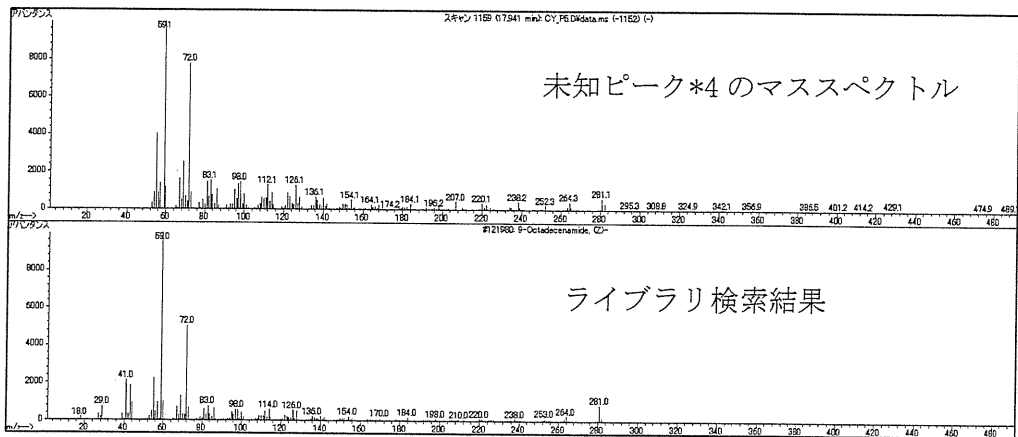


図 12-4 (続く). クロルピリホス加熱処理後の GC/MS トータルイオンクロマトグラム (100°C60 分 pH5) で出現した未知ピークのマスペクトルとライブラリ検索結果



名前	9-Octadecenoic acid, (E)-
CAS 番号	000112-79-8
エントリ番号	122794
分子式	C18H34O2
一般情報	NIST MS# 164242, Seq# R4513
一致率	86
カンパニー ID	NIST 2008
リテンションインデックス	0
融点	
沸点	
分子量	282.26



名前	9-Octadecenamide, (Z)-
CAS 番号	000301-02-0
エントリ番号	121980
分子式	C18H35NO
一般情報	NIST MS# 229466, Seq# M26513
一致率	60
カンパニー ID	NIST 2008
リテンションインデックス	0
融点	
沸点	
分子量	281.27

12-4(続き). クロルピリホス加熱処理後の GC/MS トータルイオンクロマトグラム (100°C60分 pH5) で出現した未知ピークのマススペクトルとライブラリ検索結果

D. 結論

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。

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こ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. クロロ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、クロロピリホスは約 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. 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 10µL 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°C 20 分間、100°C 60 分間及び 120°C 20 分間加熱する。放冷後、容器内の溶液を 10µL ずつ採り、これにアセトン 40µL、メタノール 40µL 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 0.25µm，長さ 30m）

カラム温度：50°C（1分）→25°C/分→125°C→10°C/分→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 1.7µm，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）→
A:B=90:10（5分）→A:B=90:10（8分）

注入量：5µL 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。同条件下における両者の保持時間、MS スペクトル等を比較し、完全に一致したとき、当該物質の可能性が非常に高い。

E. 参考文献

1) Tomlin C, The Pesticide Manual: A World Compendium, 14th edition, Incorporating the Agrochemicals Handbook. The British Crop Protection Council, Farnham, Surrey, UK, and the Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK(2006).

2) Y.Ling, H.Wang, and W.Yong, et al., Food Control., 2011, 22, 54-58.

3) Gonzalez Audino P., Licastro SA and Zerba E., Thermal decomposition and isomerization of cis-permethrin and b-cypermethrin in the solid phase, Pest Manag Sci., 2001, 58, 183-189.

F. 健康危険情報.

なし

G. 研究発表

「調理加工に伴うマラチオンの分解」、田中康宏、小林麻紀、大塚健治、富澤早苗、木下輝明、上條恭子、岩越景子、佐藤千鶴子、永山敏廣、高野伊知郎：第 102 回日本食品衛生学会学術講演会、秋田市（2011 年 9 月）

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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