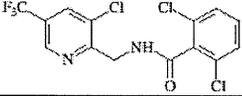
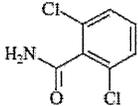
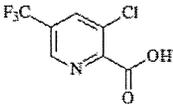


関するデータを収集し、整理した。その結果、4 農薬について、調理加工あるいは高温下での保存に伴い生成される加水分解物に関する事例が収集できた。

・フルオピコリド (Fluopicolide)

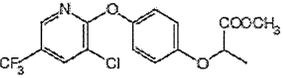
赤ぶどうからワインを作製した時に 2,6-dichlorobenzamide が 0.01 ~ 0.03 mg/kg , 3-chloro-5-trifluoromethyl-pyridine-2-carboxylic acid (C<sub>7</sub>H<sub>3</sub>ClF<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>, MW=225.6) が 0.02~0.07 mg/kg 見出された。また、白ぶどうからワインを作

製したときは、2,6-dichlorobenzamide が <0.01 ~ 0.01 mg/kg , 3-chloro-5-trifluoromethyl-pyridine-2-carboxylic acid が <0.01~0.01 mg/kg 見出された。トマトを加工したときは、ピューレで 2,6-dichlorobenzamide が 0.02 mg/kg, 3-chloro-5-trifluoromethyl-pyridine-2-carboxylic acid が 0.01 mg/kg, ペーストで 3-chloro-5-trifluoromethyl-pyridine-2-carboxylic acid が 0.011 mg/kg 見出された事例が報告されている。

原体	農薬名	フルオピコリド (Fluopicolide)
	化学名	2,6-dichloro-N-[[3-chloro-5-(trifluoromethyl)-2-pyridinyl]methyl]benzamide
	CAS No.	239110-15-7
	構造式	
分解物	化学名	2,6-dichlorobenzamide
	CAS No.	2008-58-4
	構造式	
	化学名	3-chloro-5-trifluoromethyl-pyridine-2-carboxylic acid
	CAS No.	80194-18-9
	構造式	

・ハロキシホップ P メチル (Haloxypop-P-methyl)

主な加水分解物として、haloxypop-P 酸が示されている。

原体	農薬名	haloxypop-P-methyl
	化学名	methyl (R)-2-[4-[3-chloro-5-(trifluoromethyl)-2-pyridyloxy]phenoxy]propionate
	CAS No.	72619-32-0
	構造式	
分解物	化学名	(R)-2-[4-[3-chloro-5-(trifluoromethyl)-2-pyridyloxy]phenoxy]propionic acid (Haloxypop-P)
	CAS No.	95977-29-0

	構造式	
原体	農薬名	metaflumizone
	化学名	(EZ)-2'-[2-(4-cyanophenyl)-1-(a,a,a-trifluoro-m-tolyl)ethylidene]-4-(trifluoromethoxy)carbanilohydrazide
	CAS No.	139968-49-3
	構造式	
分解物	化学名	4-[2-oxo-2-[3-(trifluoromethyl)phenyl]ethyl]benzonnitrile
	CAS No.	146653-56-7
	構造式	
原体	農薬名	spirodiclofen
	化学名	3-(2,4-dichlorophenyl)-2-oxo-1-oxaspiro[4.5]dec-3-en-4-yl 2,2-dimethylbutyrate
	CAS No.	148477-71-8
	構造式	
分解物	化学名	4-hydroxy-3-mesityl-1-oxaspiro(4,4)non-3-en-2-one (spirodiclofen-enol)
	CAS No.	148476-30-6
	構造式	

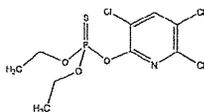
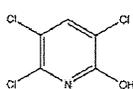
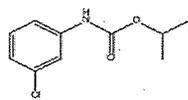
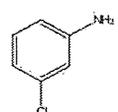
・ メタフルミゾン (Metaflumizone)  
 主な加水分解物として、4-[2-oxo-2-[3-(trifluoromethyl)phenyl]ethyl]benzonnitrile が示されている。

・ スピロジクロフェン (Spirodiclofen)  
 主な加水分解物として、spirodiclofen-enol が示されている。  
 a-2. 学術雑誌等に提示された調理加工にかかわる農薬加熱分解物の例

・ クロルピリホス (chlorpyrifos)  
 肉の調理における分解物として、3,5,6-Trichloro-2-pyridinol ができる可能性が示唆されている<sup>2)</sup>。

・ クロルプロファム (chlorpropham)  
 ばれいしょでポテトフライあるいはベイクトポテトを作製する条件下で、*m*-クロロアニリン (*m*-chloroaniline) の生成が確認された。特に皮付きばれいしょを高温で加熱調理したときに残存する可能性が示唆さ

れた<sup>3)</sup>。

原体	農薬名	chlorpyrifos
	化学名	O,O-Diethyl-O-(3,5,6-trichloro-2-pyridyl)phosphorothioate
	CAS No.	2921-88-2
	構造式	
分解物	化学名	3,5,6-trichloro-2-pyridinol
	CAS No.	6515-38-4
	構造式	
	原体	農薬名
化学名		Isopropyl 3-chlorocarbanilate
CAS No.		101-21-3
構造式		
分解物	化学名	3-chloroaniline (m-chloroaniline, 1-amino-3-chlorobenzene)
	CAS No.	108-42-9
	構造式	

#### b. 農薬の加熱分解物の検索

農薬が残留した食品を加熱調理したとき、残留農薬も同時に加熱され、その一部が分解されて、農薬原体とともに加熱生成物が残存する可能性がある。

農薬の加熱生成物の検索方法について、OECD のテストガイドライン（後述：C. c. の項を参照）では、放射性同位元素標識体を用いた食品成分が混在しない条件下での代表的な 3 工程における加水分解試験が提示されている。放射性同位元素の使用、販売、賃貸、廃棄その他の取扱い及びこれによって汚染されたものの廃棄等については、放射性同位元素等による放射線障害の防止に関する法律（昭和 32 年 6 月 10 日法律第 167 号）に基づき厳しく規制されており、一般の施設では取り扱うことができな

い。そこで、放射性同位元素標識体を用いずに、より簡易に生成物を検索する手法の検討を試みた。

##### b-1. 検討農薬の選択

日本に輸入あるいは国内に流通されている生鮮農産物における残留事例が多く報告されている農薬について検討を加えることとした。厚生労働省がとりまとめ公表した農産物中の残留実態事例を参考にした。

平成 22 年 3 月 31 日現在公表された調査結果のうち最も新しい結果である、平成 16 年度農産物中の残留農薬検査結果（平成 20 年 12 月 24 日厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課「農産物中の残留農薬検査結果等の公表について」：<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iya>

ku/syoku-anzen/zanryu2/dl/081224-1a.pdf) では、国産農産物及び輸入農産物において検出割合の高い農薬として述べ 35 農薬が提示されている。これら農薬の中から、GC を用いて測定でき、かつ、現在も広く

使用されている農薬を中心に、有機リン系農薬や窒素含有農薬など、表 3 に示した 10 種類の農薬を選択した。

表 3. 加熱分解調査実施農薬

農薬名	CAS No.	用途	種類
アセフェート	acephate	殺虫剤	有機リン系
キノキシフェン	quinoxifen	殺菌剤	キノリン系
クレソキシムメチル	kresoxim-methyl	殺菌剤	メトキシアクリレート系
クロルピリホス	chlorpyrifos	殺虫剤	有機リン系
テトラコナゾール	tetraconazole	殺菌剤	トリアゾール系
テブフェンピラド	tebufenpyrad	殺ダニ剤	ピラゾール系
トリアジメノール	triadimenol	殺菌剤	トリアゾール系
トリフルミゾール	triflumizole	殺菌剤	イミダゾール系
ホスメット	phosmet	殺虫剤	有機リン系
馬拉チオン	malathion	殺虫剤	有機リン系

#### b-2. 試験方法

平成 21 年度は、予備試験として、加熱による農薬の揮散等による減衰及び加熱分解物の捕捉を試みた。

10 種類の農薬について、各 1.0 mg/L の混合アセトン溶液を作製し、これを共栓試験管に 1.0 mL ずつ採り、それぞれ溶媒を通風除去した。有栓及び無栓の状態ではアルミブロックを用いて 90~150°C で 5~60 分間加熱 (表 4) した。放冷後アセトン 1.0 mL を加え、GC-FPD、GC-FTD 及び GC-MS で測定した。なお、GC クロマトグラムのピーク形状を向上させるため、GC 注入試験料溶液は 0.02% ポリエチレングリコール (PEG)・ヘキサン溶液とした。

表 4. 加熱温度及び時間

温度(°C)	時間(分)
90	20
100	10
	30

	60
120	10
	20
150	5
	10

〈GC 条件〉

GC-FPD

装置：GC2010 ((株)島津製作所製)

カラム：DB-200 (Agilent 社製) 内径 0.53 mm, 膜厚 1.0 µm, 長さ 15 m  
カラム温度：100°C (1 分) - 20°C/分 → 150°C - 8°C/分 → 300°C

GC-FTD

装置：GC2010 ((株)島津製作所製)

カラム：DB-5MS (Agilent 社製) 内径 0.25mm, 膜厚 0.25 µm, 長さ 30m  
カラム温度：50°C (2 分) - 20°C/分 → 150°C - 6°C/分 → 300°C

GC-MS

装置：6890/5973 (Agilent 社製)

カラム：DB-5MS (Agilent 社製) 内径

0.25 mm, 膜厚 0.25  $\mu$ m, 長さ 30 m  
 カラム温度: 50°C (1分)  $\rightarrow$  25°C/分  $\rightarrow$  125°C  $\rightarrow$  10°C/分  $\rightarrow$  300°C  
 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)

1) 加熱による減衰  
 加熱試験を各温度及び時間の条件下で 2 回繰り返す, それぞれ有機リン系農薬は GC-FPD, その他の農薬は GC-FTD を用いて供試農薬の濃度を測定した。それらの平均値を求め, 表 5 にまとめた。

b-3. 結果および考察

表 5. 加熱に伴う農薬の減衰

農薬名	栓	残存量 ( $\mu$ g/mL)*								
		90°C	100°C				120°C		150°C	
		20分	10分	30分	60分	10分	20分	5分	10分	
アセフェート	無	0.561	0.413	0.146	0.190	0.189	0.080	0.081	0.037	
	有	0.630	0.512	0.161	0.122	0.177	0.166	0.032	0.016	
キノキシフェン	無	1.08	1.41	0.709	0.315	0.640	ND**	ND	ND	
	有	1.22	1.26	1.01	0.218	0.745	0.237	ND	ND	
クレソキシムメチル	無	0.909	0.617	0.534	0.498	0.372	0.125	ND	ND	
	有	0.918	0.822	0.699	0.552	0.457	0.419	ND	ND	
クロルピリホス	無	0.417	0.233	0.026	0.020	0.037	0.013	0.060	0.011	
	有	0.570	0.297	0.131	0.037	0.081	0.173	0.011	0.014	
テトラコナゾール	無	0.731	0.864	0.683	0.459	0.365	0.158	0.142	0.080	
	有	0.883	0.653	0.492	0.347	0.375	0.335	0.073	0.111	
テブフェンピラド	無	0.988	0.963	0.972	0.921	0.892	0.576	0.143	ND	
	有	1.01	0.961	0.962	0.935	0.840	0.693	0.166	0.240	
トリアジメノール	無	1.11	1.24	0.742	0.653	0.578	0.261	0.171	0.063	
	有	1.14	1.14	0.704	0.448	0.508	0.365	0.256	0.139	
トリフルミゾール	無	0.735	0.743	0.707	0.261	0.433	0.129	0.170	0.081	
	有	0.790	0.674	0.447	0.164	0.348	0.257	0.084	0.105	
ホスメット	無	0.812	0.736	0.507	0.446	0.448	0.233	0.127	0.045	
	有	0.893	0.868	0.518	0.433	0.593	0.335	0.062	0.029	
マラチオン	無	0.685	0.418	0.076	0.070	0.052	0.014	0.088	0.009	
	有	0.775	0.437	0.148	0.068	0.082	0.164	0.007	0.010	

\* 各条件下で 2 回試験し, その平均値を示した(減衰のないときは 1  $\mu$ g/mL となる.)。

\*\* ND: 検出しない。

今回は, 加熱時に, アンブル封入などの密封状態とせず, 一般的な共栓試験管を用いて試験した。残存量に, 栓の有無による大きな差は見られなかったが, 摺り合わせ部分で多少の気体の出入りはあり得ることに起因すると思われた。

90°C20 分間の加熱で, アセフェート, クロルピリホス, テトラコナゾール, トリフルミゾール, ホスメット及びマラチオンの残存量が減少した。クレソキシムメチルは,

100°C10 分以上, キノキシフェン及びトリアジメノールは 100°C30 分以上の加熱で急速に減衰が進み, テブフェンピラドは 120°C 以上で減衰した。また, キノキシフェン及びクレソキシムメチルは, 150°C ではほとんど残存していなかった。

加熱温度の違いによる残存量は, 100, 120, 150°C で 10 分間加熱したときの残存量で比較すると, 加熱温度が高くなるにしたがい減少割合が大きくなる傾向が見られた。

2) 加熱分解物の検索

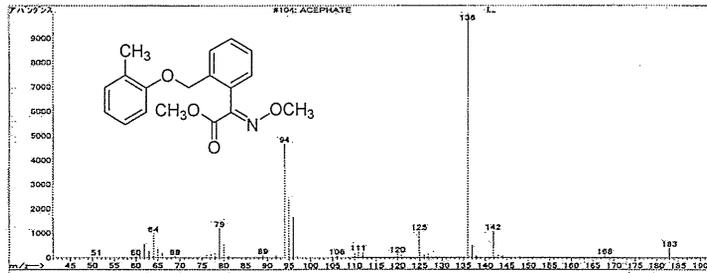
① 供試農薬の MS スペクトル

今回、農薬の加熱で生成される物質の検索を、クロマトグラムにおける新たなピー

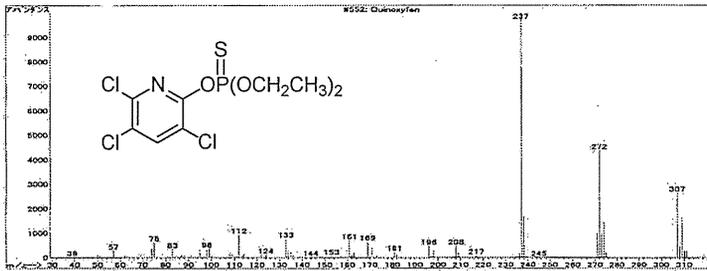
クの出現及びその MS スペクトルによる同定を試みた。今回試験に供した各農薬の MS スペクトルを図 1 に示した。

図 1. 供試農薬の MS スペクトル

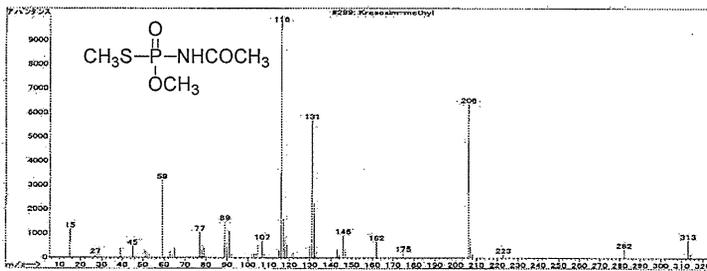
アセフェート



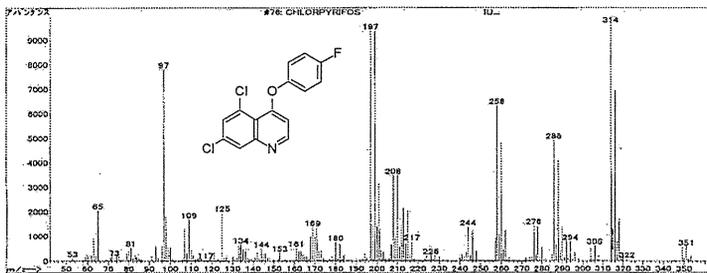
キノキシフェン



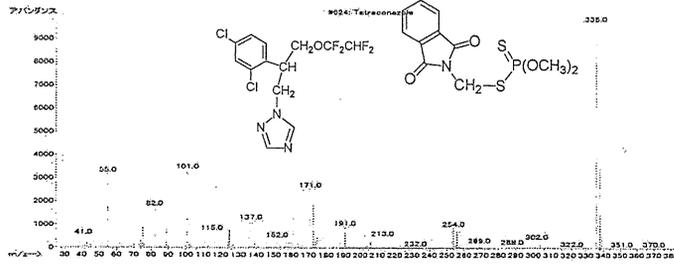
クレソキシムメチル



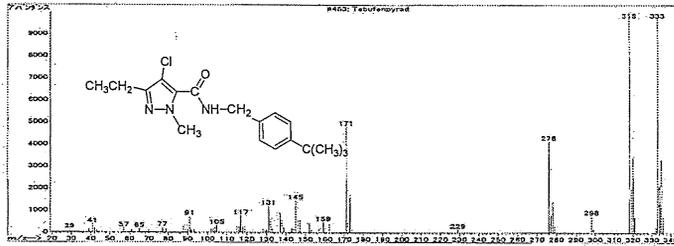
クロルピリホス



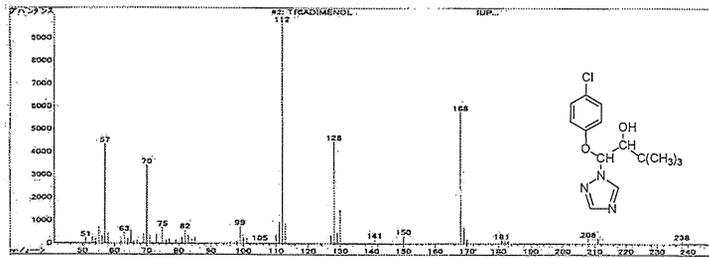
テトラコナゾール



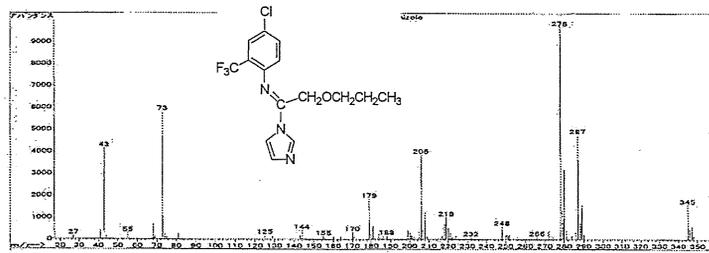
テブフェンピラド



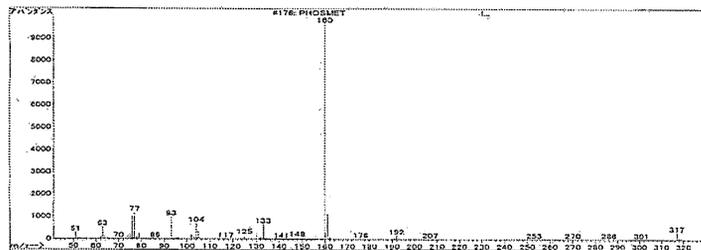
トリアジメノール



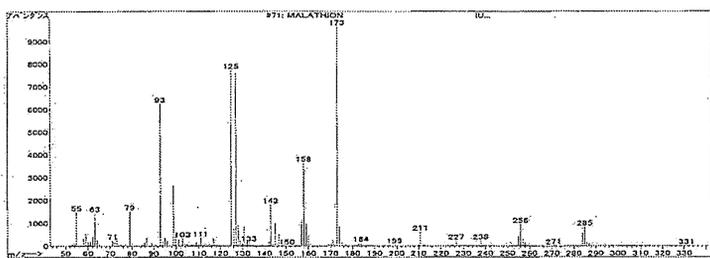
トリフルミゾール



ホスメット



## マラチオン



### ② MS クロマトグラムの比較

加熱処理後の試験溶液から得られた MS クロマトグラムを、加熱前の試験溶液（混合標準溶液）の MS クロマトグラムと比較し、新たなピークの有無を基に分解生成物の検索を試みた。試験溶液中に PEG が含まれているため、多くの試薬由来のピークが見られたものの、クロマトグラムを拡大して検討を加えたところ、加熱処理した試験溶液では、保持時間 11.3 分に未知ピークが観察された（図 2）。

本ピークの MS スペクトルを図 3 に示した。

機器に装備された NIST の MS ライブラリーからは特に推測される化合物は得られなかった。しかし、 $m/z$  168 と 170, 237 と 239, 295 と 297 など塩素を有する化合物であることが示唆され、今回検討した農薬のうち、クロルピリホス、テトラコナゾール、トリフルミゾールなど塩素を含む構造を有する農薬に由来している可能性が推測される。今後検討を加え、同定を試みる。

一方、加熱時の減衰は、有機リン系農薬において比較的大きく観察された。そこで、

マラチオンなどジメチルホスホロチオエート型の構造を有する有機リン系農薬で多く認められる  $m/z$  125 を有する化合物の有無を見たところ、有栓下で加熱処理した試験溶液のデータにおいて、保持時間 7.3 分付近に分解生成物の存在が疑われた。マラチオンに加熱処理した試験溶液の GC-FPD と加熱処理前後の GC-MS 測定における保持時間 7.3 分付近のピークに相当したことから、この MS スペクトルを測定し、ライブラリーによる検索を試みた。その結果、O, S, S-トリメチルホスホロジチオエート（O, S, S-trimethyl phosphorodithioate, 「OSS-TMP」と略記）であることが推察された（図 5）。ジメチルホスホロチオエート型の有機リン系農薬の加熱に伴い生成される可能性が高いと推測する。

図 2. 加熱処理後の試験溶液から検出された未知ピークの例

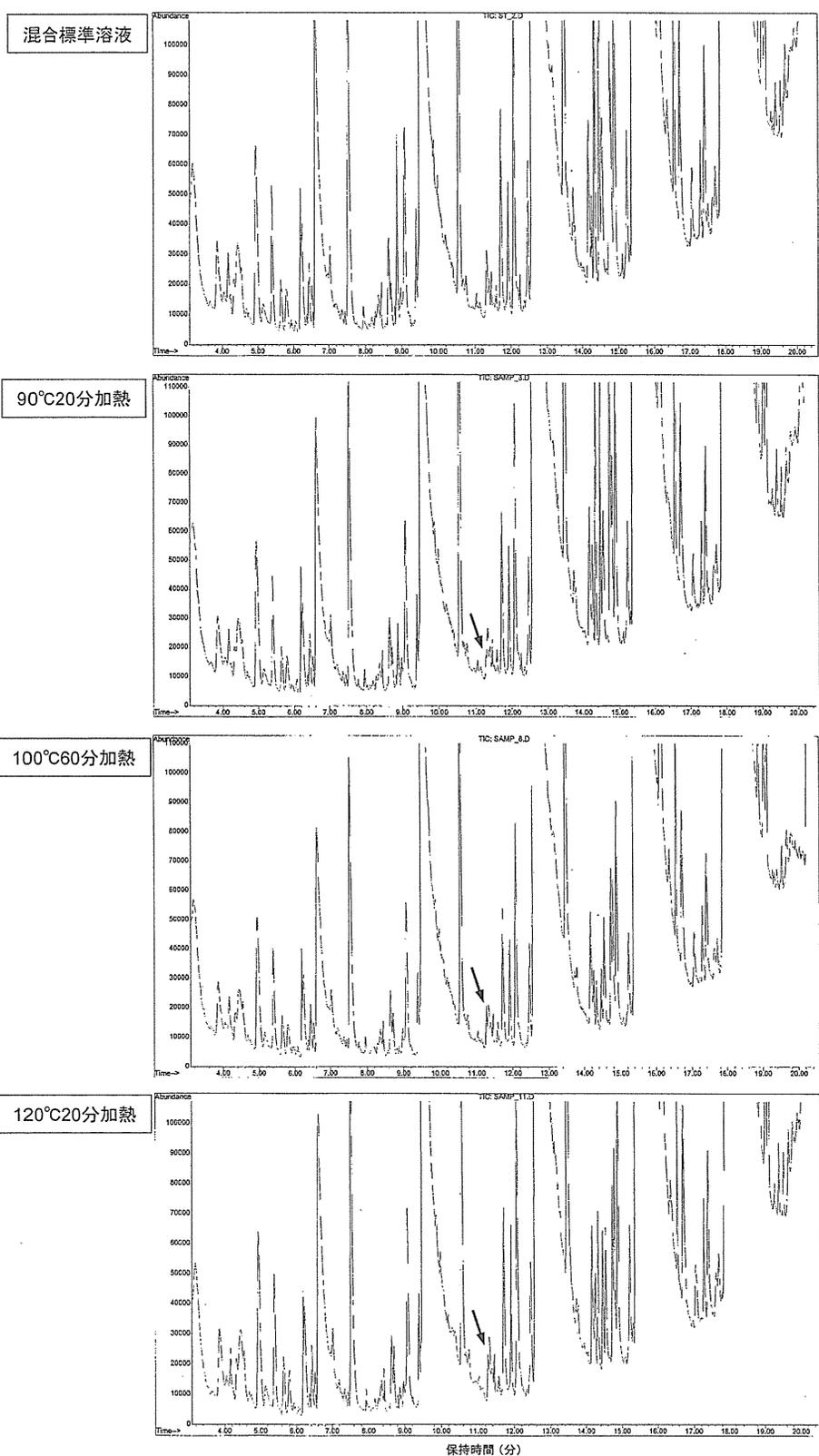
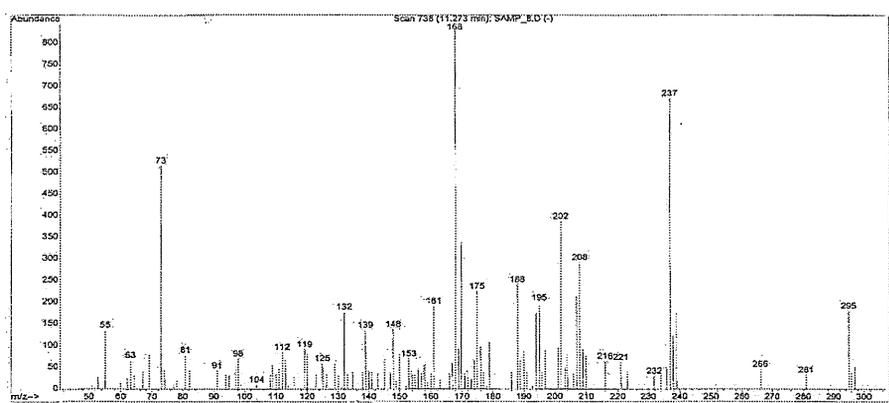


図 3. 加熱処理により得られた未知ピークの MS スペクトル



10 種類の農薬混合標準液を加熱した後の OSS-TMP の検出状況 ( $m/z$  125 の MS クロマトグラムから導いた面積値から作図) をまとめ、図 6 に示した。OSS-TMP は、主に有栓下  $100^{\circ}\text{C}$  以上で加熱した試験溶液で観察された。無栓状態ではほとんど検出されないこと、有栓状態であっても、加熱条件に伴う検出量の大きな増大が特に見られなかったことから、比較的揮散されやすいと推察された。

OSS-TMP は、 $\text{LD}_{50}$   $70\sim 120\text{mg}/\text{kg}$  体重 (経

口, マウス) (Croner-i CHEM BANK : <http://www.croner.co.uk>) であり、マラチオン ( $\text{LD}_{50}$   $775\sim 3320\text{mg}/\text{kg}$  体重: 経口, マウス) <sup>4)</sup> に比べ急性毒性が強い。また、マラチオンとの共存によりマラチオンの毒性を相乗的に増加するともいわれている <sup>5)</sup>。マラチオンの不純物としてはほとんど存在しないとされる <sup>5)</sup> が、食品の加熱調理後に、加熱生成物として食品中にマラチオンとともに残存した場合、その安全性評価が必要となる可能性が示唆される。

図 4. マラチオンを加熱処理 ( $150^{\circ}\text{C}$  10 分) した後の GC クロマトグラム

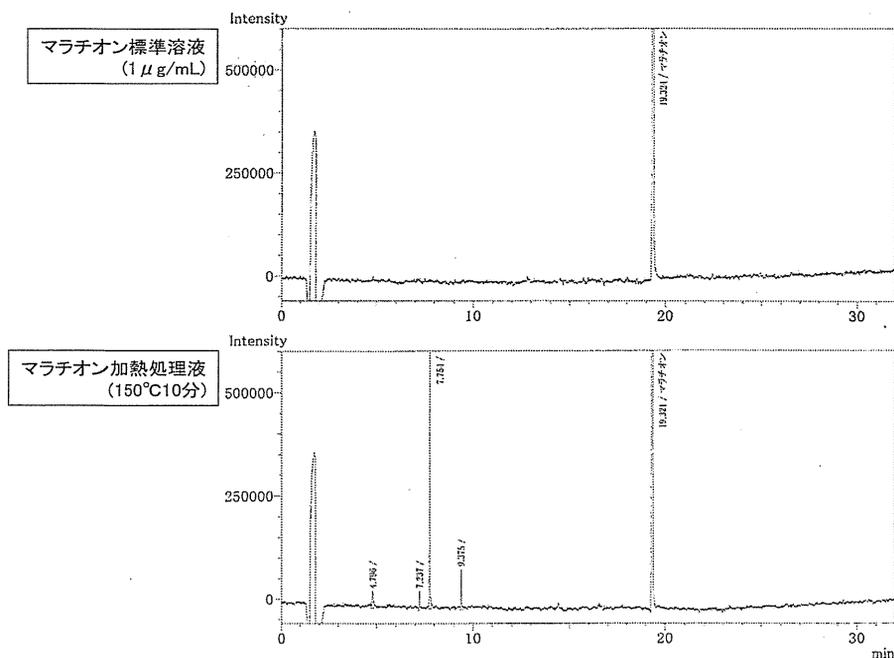


図 5. マラチオン加熱処理により生成したピークの MS スペクトル及びライブラリー検索結果

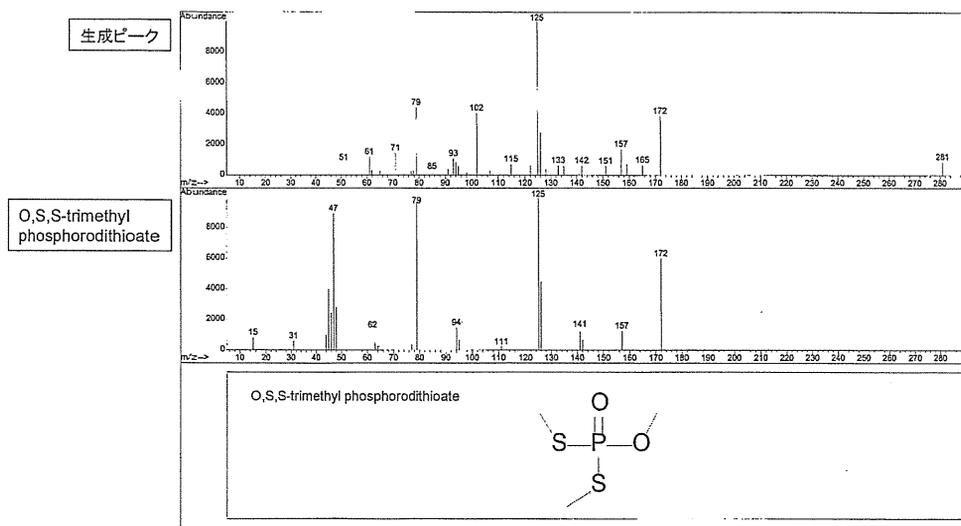
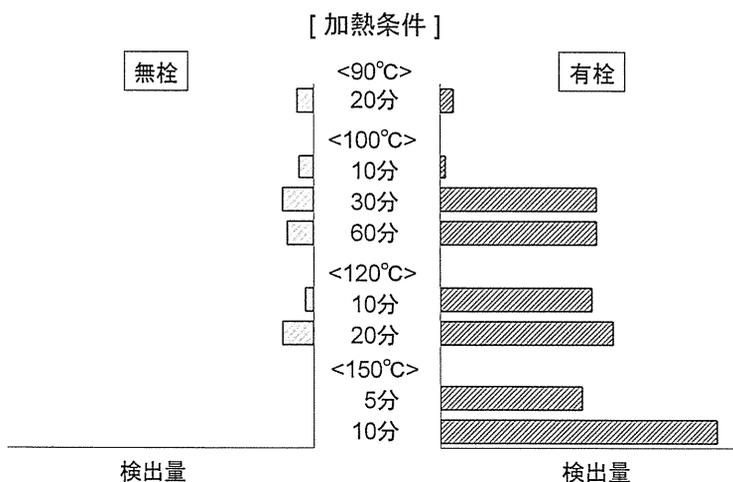


図 6. 加熱試験における O, S, S-TMP の検出事例



※ m/z 125 の MS クロマトグラムにおけるピーク面積から作図した (n=2).

c. 経済協力開発機構 (OECD) の化学物質テストガイドラインによる分解生成物検索に関する指針

○ 加工製品中における残留農薬の性質—高温加水分解

「OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS, Nature of the Pesticide Residues in Processed Commodities - High Temperature

Hydrolysis」<sup>6)</sup>を翻訳した。その概要を以下に示す。

本ガイドラインは、分解産物の同定及び生成量を把握することを目的として、加水分解条件下における当該成分の分解経路を予測するためのモデル実験の実施方法について示す。

- ・一般的な考慮事項  
広く利用されている加工技術の代表的な

例として、水中での野菜、豆類および穀類の調理、果実保存食品の調製、果汁の調製、食用油の調製、アルコール飲料（特にビールおよびワインの調製）、パンの調製、インスタント麺の調製、野菜・食肉および魚のフライ、牛乳および野菜の発酵などの操作が含まれる。単純な物理的手順（製粉、加圧成形など）は、加工中に温度変化がなければ残留物の性質に影響を及ぼさないと仮定される。

多くの加工操作中に残留物の性質に最も影響を及ぼしそうなパラメータまたは要素は加水分解である。加熱のようなプロセスにおける分解メカニズムは、主に単純な加水分解（温度、時間および pH を特色とす

る）のみとなる。

食品由来の物質自体は加工手順（pH を除く）に大きな影響を及ぼさないため、ガイドラインではこれらのモデル試験中に製品を含めることを義務づけていない。

・加水分解条件

種々加工操作の典型的な条件を表 6 に示す。前述の代表的な加工技術の大部分はこれらの条件の範囲内に含まれる。

表 6 の内容からさらに条件を画一化して、代表的な 3 つの加水分解条件を策定した（表 7）。重要な加工操作について加水分解の影響を検討するためには、必要に応じてこれらの条件を利用する。

表 6. 食品加工における典型的な操作条件<sup>6)</sup>

加工の種類	重要な操作	温度 (°C)	時間 (分)	pH
野菜, 穀類の調理	煮沸	100 <sup>1)</sup>	15~50 <sup>2)</sup>	4.5~7
果実保存食品	低温殺菌	90~95 <sup>3)</sup>	1~20 <sup>4)</sup>	3~4.5
野菜保存食品	殺菌	118~125 <sup>5)</sup>	5~20 <sup>6)</sup>	4.5~7
果汁	低温殺菌	82~90 <sup>7)</sup>	1~2 <sup>8)</sup>	3~4.5
油	精製	190~270 <sup>9)</sup>	20~360 <sup>10)</sup>	6~7
ビール	醸造	100	60~120	4.1~4.7
赤ワイン <sup>11)</sup>	ブドウマッシュの加熱	60	2 <sup>12)</sup>	2.8~3.8
パン	ベーキング	100~120 <sup>13)</sup>	20~40 <sup>14)</sup>	4~6
インスタント麺	蒸煮および乾燥 (フライまたは温風による)	100 140~150 (フライ) >80 (温風)	1~2 1~2 (フライ) 120 (温風)	9 <sup>15)</sup>

- 1) 調理中の野菜の内部温度
- 2) 野菜または穀類が100°Cに保たれる時間
- 3) 低温殺菌中の果実保存食品の内部温度
- 4) 果実保存食品が90~95°Cに保たれる時間
- 5) 殺菌中の野菜保存食品の内部温度
- 6) 野菜保存食品が118~125°Cに保たれる時間
- 7) 低温殺菌中の果汁の内部温度
- 8) 果汁が82~90°Cに保たれる時間
- 9) 精製中の脱臭温度
- 10) 脱臭時間
- 11) 白ワインは加熱されない
- 12) その後、急速冷却されるか、ゆっくりと（終夜）冷却される
- 13) 20~40分間のパンの内部および表面温度
- 14) パンの内部および表面が100~120に保たれる時間
- 15) 小麦粉は0.1~0.6%のかん水（20%K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>および3.3%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>を含むアルカリ性の水）でこねられる

表 7. 代表的な加水分解条件<sup>6)</sup>

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

\* 高压下の閉鎖系 (例: オートクレーブまたはこれに相当するもの)

#### ・試験方法

考えられる分解経路の解明および分解生成物の定量には、標識化合物を利用する。加水分解産物は不溶性である可能性があり、溶液中で沈殿または反応容器の側面に付着する可能性があることに留意する。

標識化する位置を選択する際には、安定な位置が選択されたことが保証されなければならない。放射性同位体としては <sup>14</sup>C が望ましいが、分子内に炭素がないとき、あるいは不安定な炭素鎖しかなければ <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S やその他の放射性同位体が適切となることもある。水との水素交換の可能性があるため、標識として <sup>3</sup>H を用いることは許容されない。

代表的な 3 つの加水分解条件をすべて検討しなければならない。試験溶液の pH を少なくとも ±0.1 の精度で確認しなければならない。試験における水溶性の活性成分の濃度として 1.0 mg/L が提案されている。水溶性の低い物質の場合のみ、溶媒の使用が推奨される。溶媒の量は 1% を上回ってはならず、溶媒が加水分解プロセスを妨げてはならない。試験中は試験溶液の温度をそれぞれに必要な温度の ±5°C の範囲内で維持することが重要である。オートクレーブまたはこれに類似する装置を用いる試験では、高温へのずれが許容される。

2. 水存在下 (以下、湿条件下と称す) における加熱処理による農薬の分解ならびに生成する分解物の捕捉

#### a. 試験方法

放射性同位元素標識体を用いずに、より簡易に生成物を検索する手法を試みた。検討対象農薬として、乾条件下の加熱試験で

比較的大きく減少の見られたマラチオンを用いた。

湿条件下での加熱実験系は OECD の化学物質テストガイドライン (OECD Guideline : Test No.507) に示された分解生成物検索に関する指針を参考にした。食品の種々加工操作下の典型的な条件を画一化し、代表的な 3 つの加水分解条件で実施した (表 8)。

#### 1) pH 調整用緩衝液の検討

規定された pH 条件下で処理した試験溶液を直接 LC/MS/MS で測定することを考慮し、適切な揮発性緩衝液の作製を試みた。

緩衝液は、揮発性物質の組み合わせで構成することとした。酢酸-ギ酸、ピリジン-ギ酸、トリエチルアミン-ギ酸、トリエチルアミン-酢酸、コリジン-酢酸、アンモニア-ギ酸、アンモニア-酢酸、モノエタノールアミン-塩酸、炭酸アンモニウム-アンモニアなどの組み合わせが考えられた。これらのうちの確かな pH を得ることができ、また、取り扱いやすさや強い臭気を有さないなどの要件を考慮して、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、試験液の一部が漏え

い・揮散するなどして液量が変化したことから、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げられた。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

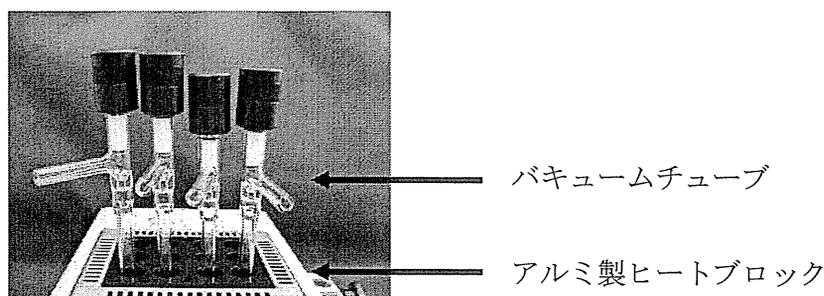
それぞれのバキュームチューブに、pH4, 5, 及び6 となるように調整したトリエチルアミン-ギ酸緩衝液 1mL を入れ、これにマラチオン 1.0mg/mL アセトン標準溶液 10 $\mu$ L をそれぞれ加えた。加熱により加圧破損しないように、容器内をアスピレーターで減圧した後、密栓し、アルミブロック中で表 8 の条件に従い、各 pH の緩衝液それぞれを 90 $^{\circ}$ C 20 分、100 $^{\circ}$ C 60 分及び 120 $^{\circ}$ C 20 分加熱した（図 7）。放冷後、バキュームチューブ内の溶液を 10 $\mu$ L ずつ採り、これにアセトン 40 $\mu$ 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 8. 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 7. 加熱装置及びバキュームチューブ



#### <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℃

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) → A:B=0:100 (10 分) → A:B=90:10 (10.1 分)

→A:B=90:10 (15 分)

流速：0.2mL/min

イオン化法：ESI(+)

イオン源温度：120℃

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/μL)

## b. 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 9)。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、本試験結果から、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 9. 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℃20 分	4.0	4.0
100℃60 分	5.0	5.0
120℃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 8)。

湿条件下、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℃20 分 (pH6) 及び 100℃60 分 (pH5) で 4 割程度であり、90℃20 分 (pH4)

では 1 割未満であり (表 10)、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 10. 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℃20 分 (pH4)	0.947
100℃60 分 (pH5)	0.619
120℃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 8-1 及び図 9-1)。この物質の MS スペクトル (図 8-2 及び図 9-2) 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<sub>8</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>) 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 10)。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℃20 分 (pH4) 加熱時を 1.00 とした場合、120℃20 分 (pH6) 加熱時 1.11、110℃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 11, 図 11)。

表 11. フマル酸ジエチルの生成率  
(90°C20分(pH4)を1.00とした場合)

加熱条件	生成率
90°C20分(pH4)	1.00
100°C60分(pH5)	1.22
120°C20分(pH6)	1.11

図 8-1. マラチオン標準品の GC-MS クロマトグラム(TIC)

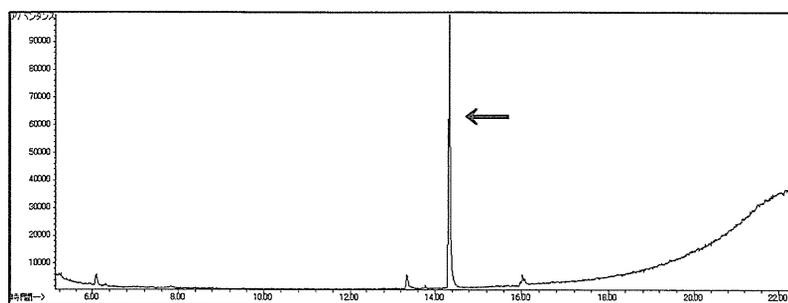
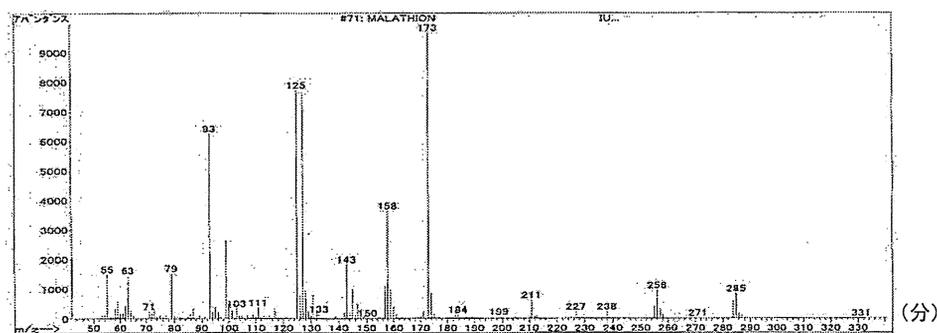


図 8-2. マラチオン標準品の GC-MS スペクトル



一般名 Malathion

化学名 Dithiophosphoric acid *O,O*-dimethyl-*S*-[1,2-di(ethoxycarbonyl)-ethyl]ester

CAS No. 121-75-5

構造式

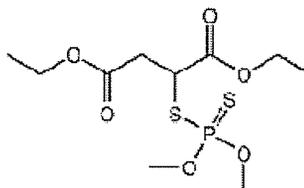


図 9-1. マラチオンを 100°C60 分で加熱処理したときの GC-MS クロマトグラム(TIC)

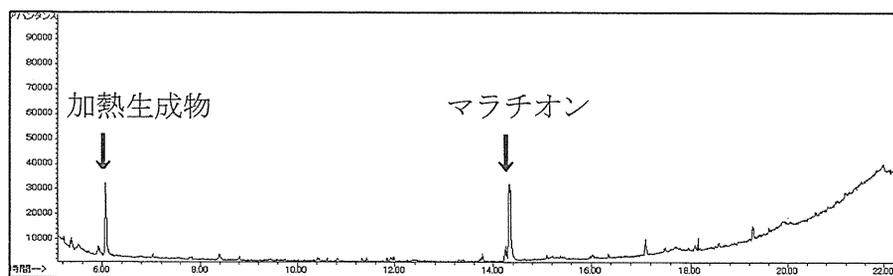
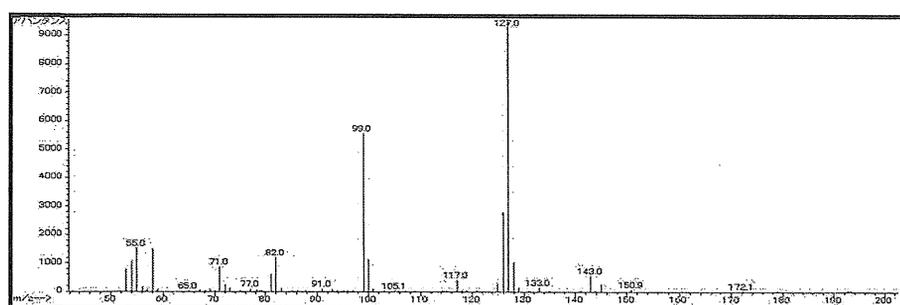
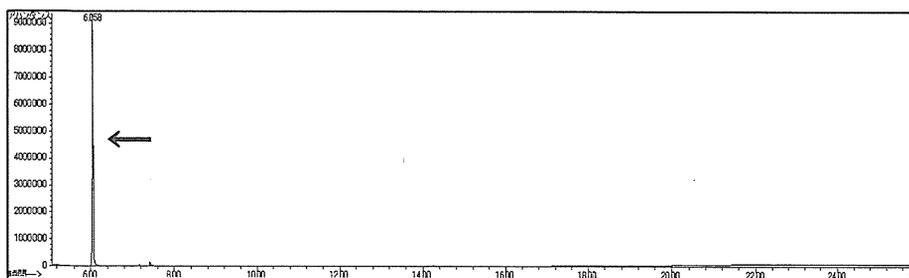


図 9-2. 保持時間 6.1 分のピークの GC-MS スペクトル



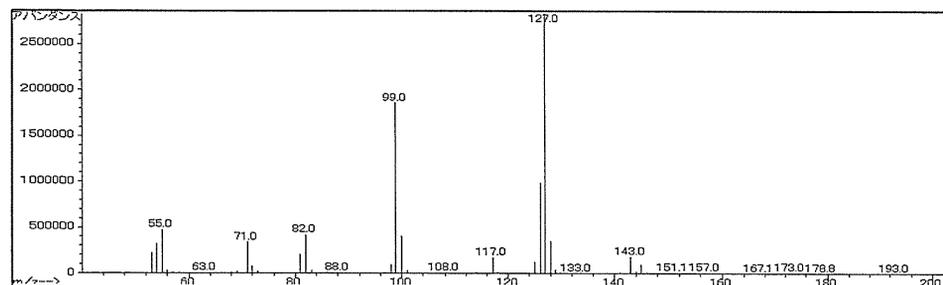
(分)

図 10-1. フマル酸ジエチル標準品の GC-MS クロマトグラム(TIC)



(分)

図 10-2. フマル酸ジエチルの GC-MS スペクトル



一般名 フマル酸ジエチル

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

CAS No. 623-91-6

構造式

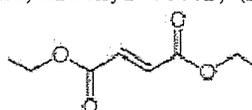
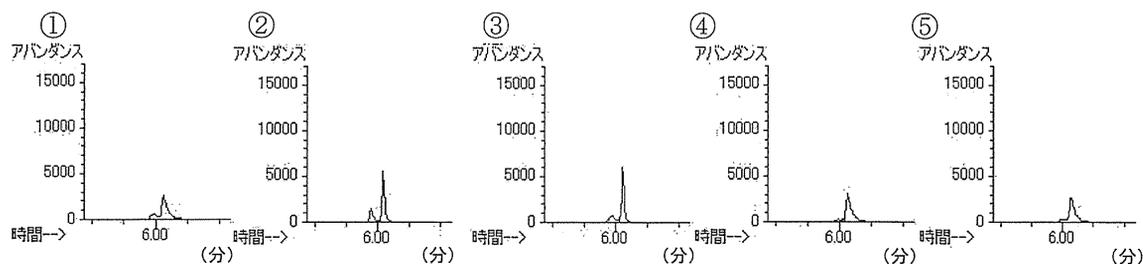


図 11. フマル酸ジエチルの GC-MS イオンクロマトグラム ( $m/z$ : 127)



①標準品(2ppm アセトン溶液), ②標準品(2ppm 相当調製液),  
③90°C20 分加熱時, ④100°C60 分加熱時, ⑤120°C20 分加熱時

4) LC/TOF-MS による加熱分解生成物の検索

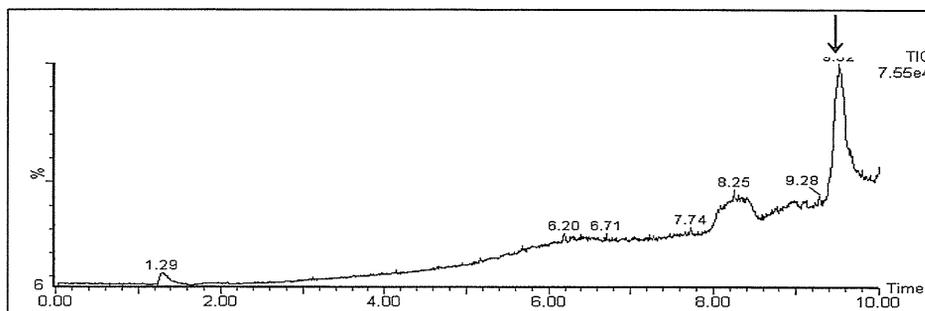
水溶性の高い分解生成物を捕捉するため、新たに LC/TOF-MS を導入し、処理後の溶液を測定して、分解生成物を検索した。3) と同様に、標準溶液と加熱処理後の試験溶液から得られた MS クロマトグラム (TIC) を比較し、新たに出現若しくは面積が大きく増加したピークを検索した。

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 12 及び 13)。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 13-2)。

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 12-1. マラチオン標準品の LC-MS クロマトグラム (TIC).



(分)

図 12-2. マラチオン標準品の LC-MS スペクトル

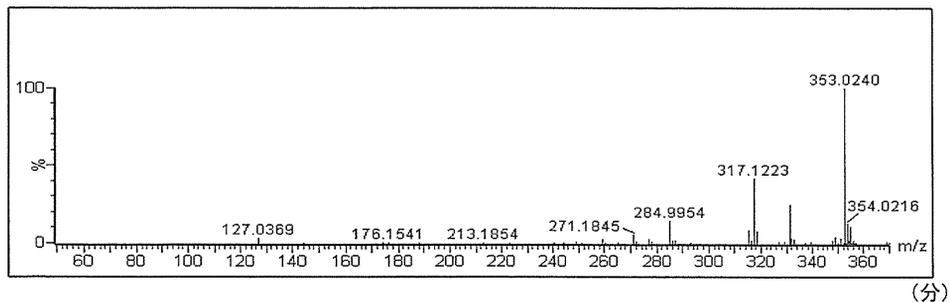


図 13-1. マラチオンを 100°C60 分加熱処理したときの LC-MS クロマトグラム (TIC)

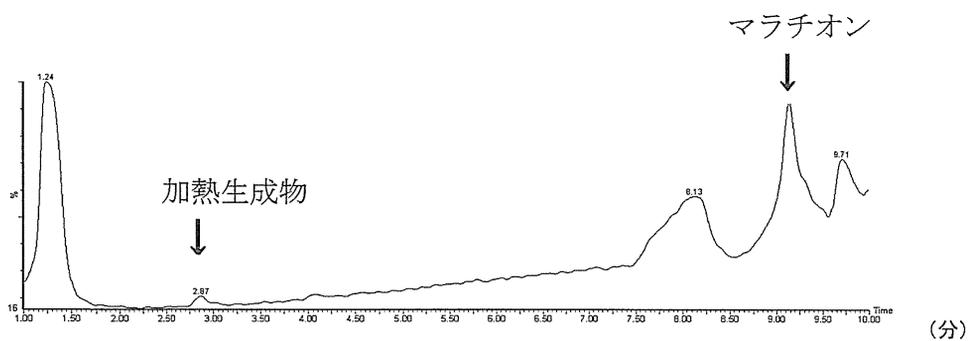
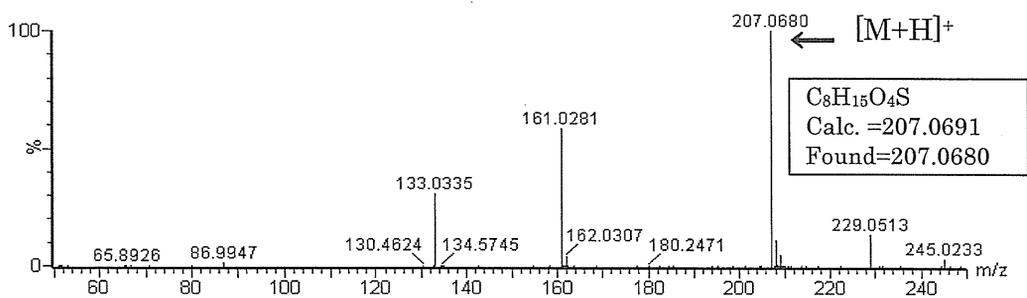
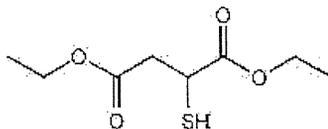


図 13-2. 保持時間 2.8 分のピークの LC-MS スペクトル



一般名 メルカプトこはく酸ジエチル  
 化学名 Butanedioic acid, mercapto-, diethyl ester  
 CAS No. 23060-14-2  
 構造式



以上のように、湿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、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>7-9)</sup>あるいは食品中の酵素による分解<sup>9)</sup>について報告がある(図14)。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本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、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。

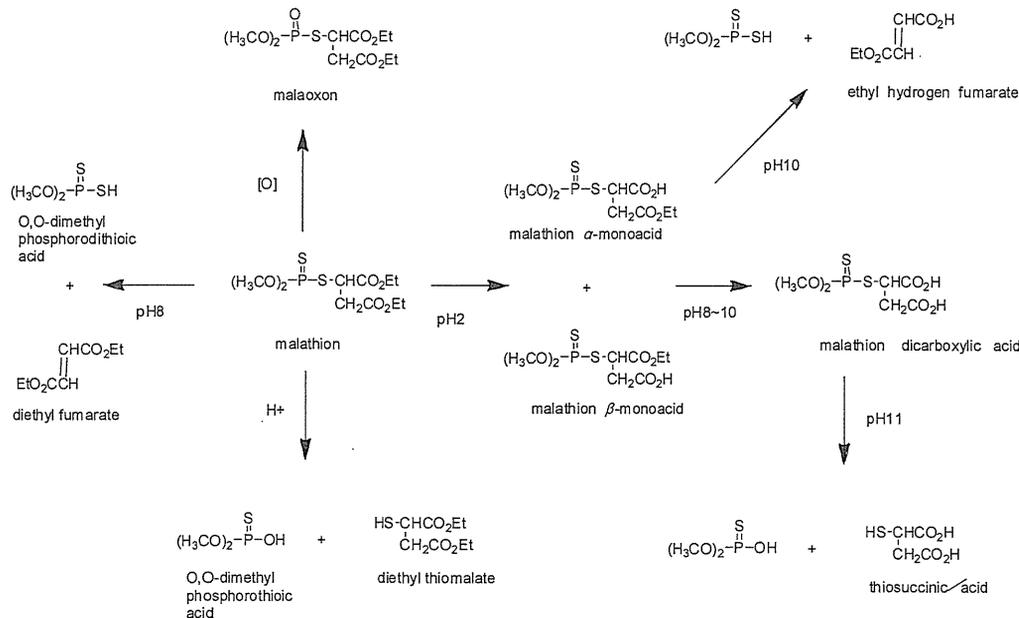


図14. マラチオンの分解及び代謝経路<sup>7-9)</sup>