

機関番号：21401
 研究種目：新学術領域研究（研究課題提案型）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20200023
 研究課題名（和文） 安定同位体比を利用した残留農薬の起源推定の研究
 研究課題名（英文） Source Identification of pesticides using stable isotope
 研究代表者
 川島 洋人（KAWASHIMA HIROTO）
 秋田県立大学・システム科学技術学部・助教
 研究者番号：60381331

研究成果の概要（和文）：

毒入り冷凍餃子で話題になったメタミドホスの日本産/中国産の異同識別を行った。メタミドホスの高精度、高確度分析のために、燃焼炉内の各種充填剤の試験を行った結果、ニッケル、白金担持の酸化銅を用いることで高精度分析が可能になった。また、燃焼炉から IRMS にかけてのラインに液体窒素を用いたクライオフォーカスシステムを導入することで低濃度領域での測定が可能になった。最終的には、炭素安定同位体比を使うことで、中国産のメタミドホスは日本の一種の試薬と近い値であることがわかった。

研究成果の概要（英文）：

I researched Japan/China identification of methamidophos as bothered “poisoned gyoza”. For high precision and accuracy, the many reagents in combustion tube were tested. As the results, the copper oxide with nickel and platinum was selected. In addition, I installed cryofocusing system using liquid nitrogen between combustion and IRMS and can analyze low concentration of methamidophos. Finally, Chinese methamidophos pesticide is very closed to a methamidophos reagent bought in Japan by using $\delta^{13}C$.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
2009年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2010年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
総計	25,600,000	7,680,000	33,280,000

研究分野：環境鑑識学

科研費の分科・細目：社会・安全システム科学，社会システム工学等

キーワード：環境鑑識学，農薬，安定同位体比，異同識別，分析化学

1. 研究開始当初の背景

(1) 農薬の異同識別について

日本の食料自給率は約 40% と他の先進国と比較して低く、多くの輸入食品に頼っている。今後はさらにグローバル化が進み、食品の流通は益々活発化していくことは想像に難くない。

2008年、中国産冷凍餃子に日本では未登録の有機リン系殺虫剤であるメタミドホスが混入する事件が勃発し、都道府県の科学捜査

研究所や警察庁管轄の科学警察研究所等によって、様々な調査が行われた。しかし、調査は難航し、時を経て、日中の政治問題へと移行し、2010年には天洋食品元臨時職員である呂月庭容疑者が逮捕され、事件は幕引きされた。最終的には多くの被害者（死亡者はいない）を出したと共に、数年間という長期に渡って（現在も続いていると思われるが）、中国産の冷凍食品の多大な風評被害が生じた。

もし科学的な解明がもっと迅速かつ正確に行われれば、このような事態にはならなかっただろうと想像するが、現在までのところ、農薬を区分する方法は薬物指紋法（不純物同定法）のみであり、その方法には、(1) 農薬自体を測定対象としていないこと、(2) そもそも不純物がない場合や後から混入した場合に識別が困難である、などの欠点がある。本研究では農薬自体に含まれる軽元素の安定同位体比(今回は炭素安定同位体比($\delta^{13}\text{C}$))を測定する新たな異同識別法の開発を目指した。

(2) 安定同位体比を用いた応用

近年、様々な前処理装置(ガスクロマトグラフ、元素分析計等)と安定同位体比質量分析計が融合し、多様な分野に応用事例が、国内外で活発に行われ始めている。マリファナや大麻、覚せい剤などの流通経路の推定などの鑑識分野や、ドーピング試験などのスポーツ科学分野など、安定同位体比の応用が実用レベルで開始し始めている。本研究では農薬に含まれる炭素安定同位体比を測定し、商品の識別などを行い、農薬のトレーサビリティ法を開発することを試みる。

農薬類はホームセンター等で容易に入手が可能であるため、犯罪者やテロリストにとっては格好の手段となり得る。本研究によって、精度が高いトレーサビリティ法が開発されれば、犯罪の抑止力となることが期待される。さらに、近年では農薬として登録されていない天然植物抽出液なる農薬疑義資材から農薬が検出された事例など、身近に問題が起き始めており、様々な農薬を対象にすることは重要である。

2. 研究の目的

本研究で目的としたのは、毒入り冷凍餃子で話題になったメタミドホスの高精度分析法を開発し、異同識別することである。メタミドホスは非常に分解性が高く、また硫黄成分等の複雑な夾雑物が多いことなど、安定同位体比測定において特有の問題があるため、それらを解決するために、酸化炉充填剤の決定や、クライオフォーカシングシステムの導入を試みた。さらにメタミドホス以外に、秋田県内でよく使用されている様々な農薬類の測定法の開発を行った。

3. 研究の方法

(1) 対象農薬について

日本で入手可能なメタミドホス試薬7種類(和光純薬工業株式会社製、シグマアルドリッチ社製、ジーエルサイエンス社製 Ultra Scientific, Inc., Chem Service, Inc., Dr. Ehrenstorfer GmbH, Ipochem Co., Ltd.)を購入し、中国産のメタミドホス農薬(MTD600, Jiahua import & chemicals Co., Ltd.)を東京農業大学客員教授の本山直樹教授より、譲り受けた。それらメタミドホスをアセトンより希釈した。

また、輸入時に違反件数が多い、全国、秋

田県で使用量の多い8種類の農薬(カフェンストール、シハロホップブチル、ジメチエート、トリフルラリン、フサライド、プロベナゾール、DBN、TPN;すべて和光純薬工業社製)についても同様にアセトンより希釈した。

(2) GC/C/IRMS について

ガスクロマトグラフ(Agilent社製、HP7890N)と燃焼炉(IsoPrime社製、GC5 Mk1)、安定同位体比質量分析計(IsoPrime社製、IsoPrime)が融合した装置(GC/C/IRMS)を用いて測定を行った。標準試薬は国際標準試薬であるNBS19(IAEA, $\delta^{13}\text{C}=1.95\text{‰}$)を用いた。分析方法等はここでは紙面の都合により割愛する。

(3) 酸化炉充填剤の決定

通常、IsoPrimeの酸化炉は石英管に棒状の酸化銅(CuO)が詰められたものを使用するが、メタミドホスを測定した場合、測定回数ごとに $\delta^{13}\text{C}$ (‰)が徐々に重くなるという現象がおきた。その理由としては、メタミドホス成分中にある硫黄等の不純物が炉内の酸化剤に付着し、燃焼を妨げていることが考えられた。そこで本研究では空の石英管(600mm×6mmOD×0.5mmID)に各種の酸化剤(棒状は酸化銅(白金1%、ニッケル1%含有)と酸化ニッケル、粒状(0.2~0.5mm)は酸化銅(白金1%、ニッケル1%含有)及びタングステン、酸化ニッケル)を充填して最も精度と確度が高い酸化剤を選定した。

(4) クライオフォーカシングシステムの導入

メタミドホスは非常に分解しやすく、GC/C/IRMSのみの測定では得られるピーク形状がリーディング等を起こしてしまうため、分析精度が落ちてしまう。

そこで本研究では、GC/C/IRMSに液体窒素を使ったクライオフォーカシング装置(Brech Buhler社製、Cold Trap 9000)を接続し、条件検討を行った。通常のクライオフォーカシングの導入場所とは異なり、本研究ではメタミドホスがカラムで分離されて酸化剤にて燃焼した後にフォーカシングを試みた。

(5) EA/IRMSによる $\delta^{13}\text{C}$ (‰)の測定

バルク(全量)の測定が可能なメタミドホス試薬5種とその他の農薬8種をEA/IRMSで測定し、GC/C/IRMSと比較を行った。

4. 研究成果

(1) 酸化炉充填剤の決定

3(3)でも述べたように、純正の燃焼炉(酸化銅のみ)では回数を増やすごとに $\delta^{13}\text{C}$ が数‰程度徐々に重くなる傾向があり、200~300回程度(測定している農薬によって炉のライフタイムは異なる。メタミドホスを連続測定している場合はという意味。)から分析精度は悪くなった。また純正と同様に棒状の酸化銅(白金1%、ニッケル1%含有)においても数‰程度重くなる傾向があった。粒状の

酸化ニッケルは、徐々に重くなる現象はなかったものの、若干ばらつきが大きかった。その他にも、粉末のタングステンや酸化ニッケルも試験したが、粉末であったためすぐに燃焼炉が閉塞してしまった。これらの原因としては、メタミドホスに含有している硫黄成分などが充填剤表面に残るなど、燃焼を妨げていることが示唆された。

最終的には、粒状の酸化銅（白金 1%、ニッケル 1% 含有）が標準偏差（1 σ ）で 0.1‰ から 0.5‰ 程度となり、最も精度が高く、測定回数も 800 回から 1000 回程度まで安定していること（上記と同意）がわかった。以後、この充填剤を使うことに決定した。

(2) GC/C/IRMS による測定結果

クライオフォーカスを用いた結果、クロマトグラムのピーク形状に大幅な改善が見られた（図 1 参照）。

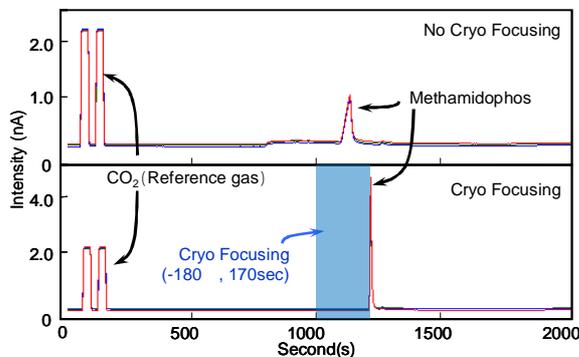


図 1. クライオフォーカスによるピーク形状改善（上のクロマトグラムが通常の測定で、下がクライオフォーカスあり）

次にクライオフォーカスによってどの程度、感度が向上するか、濃度と $\delta^{13}\text{C}$ の関係を調べた（図 2 参照）。一般的に安定同位体比は濃度（ピーク面積）が濃い（大きい）ほど、 $\delta^{13}\text{C}$ の測定精度が高く、安定した結果を示す。

結果は、予想通り、濃度が濃いほど、 $\delta^{13}\text{C}$ は安定した結果を示した。また、メタミドホスにおいては、通常の分析の場合は濃度が低いほど $\delta^{13}\text{C}$ は重くなったが、クライオフォーカスがある場合は逆の傾向を示した。またピーク面積が約 7nAs から 10nAs 程度（濃度としては約 500ppm 程度）の時、クライオフォーカスありの方が、通常の分析よりも $\delta^{13}\text{C}$ は 0.7‰ 程度、平均値に近く、感度が向上した。

メタミドホス以外の農薬ではフサライド、TPN で同様の試験をしたが、フサライドにおいては、通常の分析よりも数倍程度、大幅に感度が向上した（図 3 参照）。TPN においては大きな違いはなかった。他の農薬については今後試験していく予定である。

また本研究では、クライオフォーカスシステムを自動化することも可能になり、以後、

すべての測定で実施することにした。なお、4 (1) の結果もすべてクライオフォーカスありの結果である。

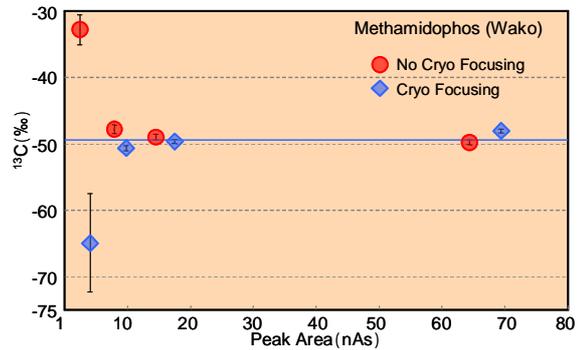


図 2. メタミドホスのピーク面積と測定精度

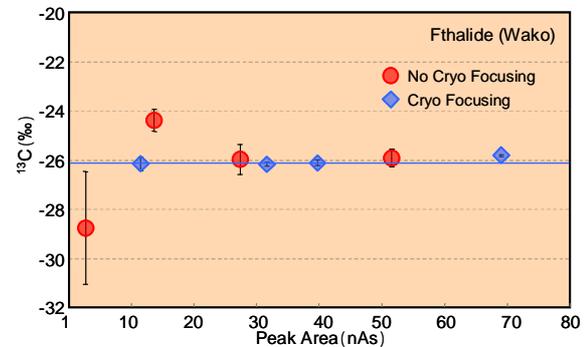


図 3. フサライドのピーク面積と測定精度

(3) メタミドホスの測定結果

4 (1), 4 (2) の改善から、まず国内産のメタミドホス試薬 7 種を測定した（図 4 参照）。

その結果は、同じメタミドホスでも $\delta^{13}\text{C}$ は大きな差（-49.23‰ から -31.90‰）があることがわかった。また繰り返し分析の標準偏差は 0.09‰ から 0.72‰ と高精度分析が可能であった。同じメタミドホスにおいて生じているこのような大きな差は、メタミドホスの製法の違いや原材料の違いによって生じているのではないかと考えられた。

また、そのうちバルクで測定可能な国内産のメタミドホス 4 種類をそれぞれ EA/IRMS で測定したが、EA/IRMS と GC/C/IRMS の差は 1‰ 以下と問題とならない程度の差であった。

次に、中国産メタミドホス農薬を測定した。中国産メタミドホス農薬（MTD600, Jiahua import & chemicals Co., Ltd.）は -44.31‰ (S.D., 0.11‰) となり、今回測定した 7 種の試薬と比較すると、GL サイエンスの GL1021 (-44.29‰ (S.D., 0.09‰)) と非常に近い値となることがわかった。

(4) その他の農薬の測定結果

本研究ではメタミドホス以外に8種の農薬類の測定を行った。その結果、どの農薬も高精度で分析することが可能になった(図5参照)

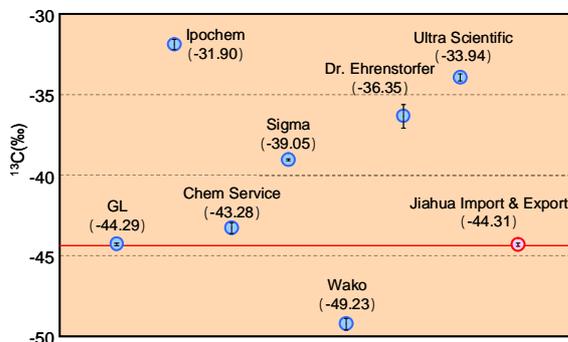


図4. メタミドホス測定結果(プロットの中の線は標準偏差(1σ)を示す)

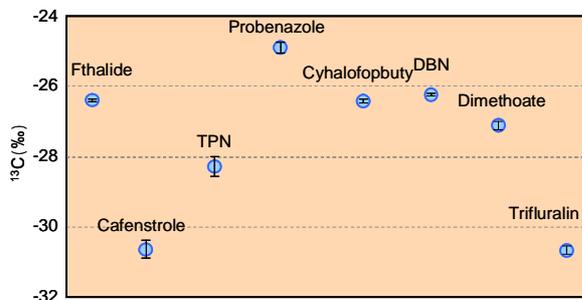


図4. 8種の農薬の測定結果(プロットの中の線は標準偏差(1σ)を示す)

(5) メタミドホスの結果からいえること

今回、冷凍餃子のメタミドホス中の $\delta^{13}\text{C}$ は測定していないが、もし測定することが出来れば、今回のメタミドホス試薬・農薬の $\delta^{13}\text{C}$ の大きな違いを利用して、特定することが出来るかもしれない。ただし、もし冷凍餃子のメタミドホスが、Jiahua import & chemicals Co., Ltd.の中国産メタミドホス農薬(MTD600)やジーエルサイエンスのメタミドホス試薬(GL1021)と近い値(-44.2~44.3‰程度)を取った場合は、どちらが原因であるか、判断するのは難しくなる。しかし、日本での農薬類の購入は購入履歴が確保されているため、履歴を調査すれば一つの判断材料にはなる。

(6) 課題とさらなる研究の進展

生物分解や光分解などによって安定同位体は分別する可能性があるため、さらに調査を進める必要がある。

また、今回、 $\delta^{13}\text{C}$ のみで高精度分析や異同識別を行ったが、メタミドホスには水素も窒素も含有しているため、 δD や $\delta^{15}\text{N}$ も測定す

ることが可能である。これらの安定同位体比を高精度で分析が可能になれば、さらに多次元での解析が可能になる。そうすることで、さらに正確な異同識別が可能になると思われる。

5. まとめ

本研究では、まず新たな酸化炉を作成し、安定した高精度分析が可能になった。特に、メタミドホスのように硫黄成分などを含んだサンプルには有効な酸化炉であった。次にクライオフォーカシング技術の適用によって、ピーク形状を大幅に改善した。その結果、若干であるが感度が向上した。また、メタミドホス以外の農薬にはさらに感度向上を行うことが出来た。今後は、分解性が高くピークがテーリングなどを行ってしまう試薬に適用できる可能性がある。

またメタミドホスを高精度で分析することが出来た。その結果、メタミドホスの $\delta^{13}\text{C}$ は試薬メーカーによって非常に幅を持った値を持つことがわかった。さらに、中国産のメタミドホス農薬と日本の一部の農薬試薬が非常に近い値を持つことがわかった。現在までのところ、冷凍餃子のメタミドホスは測定していないが、もし測定すれば異同識別が可能であることがわかった。

6. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Hiroto Kawashima, Yasuhiro Katayama (2010), Source Evaluation of Diazinon using Stable Carbon Isotope Ratio, Environmental Forensics, vol.11, pp.363-371, 査読あり

[学会発表](計3件)

Asakura Isao, Hiroto Kawashima (2011), Source identification of methamidophos by using carbon isotope Ratio, Abstract of International Environmental Forensics 2011 conference, Cambridge, U.K, 査読なし

Isao Asakura, Hiroto Kawashima (2011), Source identification of pesticides by using GC/C/IRMS and cryofocusing system, Abstract of ASITA-Advances in Stable Isotope Techniques and Applications, Kingston, Canada, 査読なし

浅倉功, 川島洋人(2011), メタミドホス中の炭素安定同位体比の高精度分析方法の確立と異同識別, 日本法科学技術学会, 東京, 査読なし

[その他]

ホームページ等

<http://www.akita-pu.ac.jp/stic/souran/scholar/detail.php?id=208>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川島 洋人 (KAWASHIMA HIROTO)

秋田県立大学・システム科学技術学部・助教

研究者番号：60381331