

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：21401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24681034

研究課題名(和文)安定同位体比による農薬類の危機管理体制の確立

研究課題名(英文)Crisis management system for 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年問題視される農薬疑義資材中に含まれるシベルメトリンの起源推定を試みた。シベルメトリン中の炭素安定同位体比(^{13}C)(‰)を測定したところ、4種の農薬疑義資材はほぼ同じ値となり、これらは同一の起源であることが疑われた。近年の無農薬食品の推進から、農薬嫌疑資材は今後、さらに大きな問題になる可能性もある。

さらに、最近開発されたLC/IRMSを用いて、5種の農薬類、6種の糖、10種のアミノ酸、2種のカフェインの ^{13}C を分析した。窒素が含有していない成分においては、高精度・高確度に分析が可能であることがわかった。しかし、窒素を含有している場合、何らかの理由で高精度分析は難しいことがわかった。

研究成果の概要(英文)：We obtained samples of four NPEFs that were contaminated with the synthetic pyrethroid cypermethrin, and we used GC/IRMS to determine the stable carbon isotope ratios (^{13}C) for the cypermethrin in the four NPEF samples, as well as in ten cypermethrin reagents and two commercial pesticide formulations. The ^{13}C values (\pm standard deviation) of the 16 cypermethrin samples ranged from $-28.3 \pm 0.2\text{‰}$ to $-24.5 \pm 0.2\text{‰}$. The four NPEFs showed similar ^{13}C values (-26.8‰ to -27.3‰), suggesting that the cypermethrin in all the samples came from the same source (either the same chemical reaction or the same primary material).

In addition, we analysed ^{13}C of 5 pesticides, 6 sugar, 10 amino acid and 2 caffeine samples using direct injection mode and online LC/IRMS mode. In this study, the ion chromatography system was coupled with IRMS instrument.

研究分野：環境鑑識学

キーワード：環境鑑識学 異同識別 分析化学 安定同位体比 農薬疑義資材

1. 研究開始当初の背景

(1) 農薬混入事件について

2008年に勃発した中国産冷凍餃子のメタミドホス混入事件や、2013年にはアクリフーズ群馬工場で製造された冷凍食品のコロッケやピザへの有機リン系殺虫剤マラチオン混入事件など、手軽に入手しやすい農薬類の混入事件は後を絶たない。従来、農薬類の同定を行うためには、生成過程などで生じた不純物を利用した薬物指紋法により行われてきたが、対象となる農薬そのものを測定しているわけではないため、農薬自体を識別する方法が必要である。

(2) 安定同位体比を使った異同識別

近年、ガスクロマトグラフと安定同位体比質量分析計(GC/IRMS)や液体クロマトグラフと安定同位体比質量分析計(LC/IRMS)の融合・実用化が行われた。その結果、個別化合物中の炭素や水素等の安定同位体比の測定が可能となり、地球化学や鑑識学分野において応用研究が世界中で活発に行われている。鑑識学分野の応用事例を紐解けば、欧米の警察機関(米国連邦警察(FBI)、英国防科学技術研究所(DSTL)等)、大学等ではマリファナやコカインや、靴底爆弾の流通経路の推定を行っており、そのどれもが特長的な結果を示している。しかし、農薬類を対象とした鑑識学的な応用事例は、国内外でほとんどないのが現状である。

(3) 農薬疑義資材とその問題点

さらに、近年、環境保全型農業が推進されたことにより、有機農業に対する関心が高まってきた。その結果、農薬に代わる防除資材として「天然植物抽出液」等の名称で呼ばれる資材が登場した。これら資材は、農薬と同様に植物や害虫に対し生理活性が認められるが、農薬として登録されていないということから、安全性や有効成分の検証が行われず流通している。1994年には、本山直樹千葉大学名誉教授によって、10種の植物からなる抽出液と称し販売されていた「夢草」に合成ピレスロイド系殺虫剤の、シペルメトリンが混入されていたことが明らかにされた。それ以降も、防除活性が認められた資材を分析すると、例外なく農薬が混入されていたことが報告されており、「碧露」、「健草源・天」、「ナスグリーン」からは夢草と同様に、シペルメトリンが混入されていたことが明らかとされた。

また2008年には、鹿児島県のブランド野菜であるカラーピーマンから、無登録農薬であるピペロニルブトキシドが検出され、原因究明までに1億円の損害を被った。後に、生産者が農薬ではなく、土壌活性剤としてニームオイルを使用していたことが判明したが、有機農業に対する懸念を露呈する形となった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、農薬疑義資材を本山名誉教授より譲り受け、農薬疑義資材中に含まれるシペルメトリン中の炭素安定同位体比($\delta^{13}\text{C}$)(‰)を測定することで異同識別を行うことを目的とした。安定同位体比は生産地や生成過程によって特徴を示すことが既に証明されており、農薬疑義資材の異同識別を行う有効な指標となると考えられる。

また、近年開発されたLC/IRMSを導入し、これら装置を用いて、農薬中の $\delta^{13}\text{C}$ の測定を行った。また、LC/IRMSはまだ新規な分析装置であるため、農薬だけでなく、アミノ酸、糖、カフェインを使って、各種分析方法の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) GC/IRMSを用いた農薬疑義資材中の炭素安定同位体比の測定

国内外のシペルメトリン試薬10種(国内1種、国外9種(アメリカ、カナダ、イギリス、イスラエル、そのうち2種は活性の高い α -シペルメトリン)、シペルメトリンが有効成分の農薬として登録・販売されているアグロスリン乳剤・水和剤2種(住友化学社製)、農薬疑義資材4種(夢草、碧露、健草源・天、ナスグリーン)をそれぞれアセトンに溶解し測定に用いた。また、アグロスリン乳剤及び水和剤のシペルメトリン有効成分は6%であり、農薬疑義資材のシペルメトリン有効成分は夢草2.0%、碧露3.4%、健草源・天1.4%、ナスグリーン1.5%となっている。

ガスクロマトグラフ(GC、アジレント社製、7890N)と燃焼炉(Combustion、アイソプライム社製、GC5 Mk1)、安定同位体比質量分析計(IRMS、アイソプライム社製 IsoPrime IRMS)が融合した装置を用いて測定を行った。また農薬類は分解しやすく、GC/IRMS オンカラムのみの測定では困難である。そこで、GC/IRMSにクライオフォーカス装置(Brech Buhler社製、Cold Trap 9000)を接続したものをを用いて測定を行った。測定は、試料をガスクロマトグラフの注入口に注入し、キャピラリーカラムへと移動し個別化合物に分離される。次に分離された化合物は燃焼炉で、850°Cで燃焼酸化され CO_2 となる。 CO_2 はイオン源内部でイオン化され、質量数44、45、46で検出される。その後、炭素安定同位体比($\delta^{13}\text{C}$)が算出される。本研究ではピーク形状を向上させるために、燃焼酸化された後に液体窒素を使ってクライオフォーカシングした。

なお、同位体比は(1)式によって表される。ここでは炭素安定同位体比の場合を記載する。

$$\delta^{13}\text{C}(\text{‰}) = ((R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}}) - 1) \times 1000 \quad (1)$$

ここで、 R_{sample} と R_{standard} はそれぞれ試料と国際標準物質であり、例えば、炭素の場合は白亜紀 Peedee 層ベルムナイト炭酸塩

(Peedee Belemnite , PDB , $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}=0.011180$) に対する千分率 (%) で表せられる。

また, EA/IRMS により, 測定が可能な固形状のシベルメトリン試薬の $\delta^{13}\text{C}$ (‰) のバルク (全量) の測定を行い, GC/IRMS の測定結果との検証を行った。また, GC/IRMS では, 標準が存在しないため, フサライド試薬 (和光純薬工業社製) を working standard とした。

(2) LC/IRMS を用いた炭素安定同位体比の測定

対象農薬試薬としては, 水溶性である 5 種の農薬 (アセタミプリド, グリホシネート, オキサミル, アセフェート, グリホサート) を選定した。また, 6 種の糖 (D(+) - グルコース, D(+) - キシロース, D(+) - ガラクトース, D(+) - マンノース, スクロース, D(-) - フルクトース), 10 種のアミノ酸 (L - アラニン (3 種), L - ヒスチジン (3 種), L - ロイシン, L - バリン, グリシン (2 種)), 2 種のカフェイン (2 種) を選定した。これらの試薬は, 和光純薬工業社製, SI サイエンス社製, IAEA の試薬を用いた。

分析は, 湿式燃焼部 (LC, アイソプライム社製 Liquiface) と同位体比質量分析計 (IRMS, アイソプライム社製 IsoPrime IRMS) が融合した装置を用いて測定を行った。また, 分離を行うため, イオンクロマトグラフ (IC, サーモフィッシャーサイエンティフィック社製 ICS-1000) を湿式燃焼部の前に流路及び電気信号共に融合させた。

測定の流れとしては, 移動相 (水 100%) に酸化剤 (ペルオキシ二硫酸ナトリウム, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$), リン酸などの緩衝液が添加され, Liquiface 内部を通過する。そこに液シリンジを用いてサンプルが (もしくは, イオンクロマトグラフを経由し) 導入される。サンプルは, 90°C の燃焼炉において試料に含まれる有機炭素が完全に湿式酸化し, 二酸化炭素に変換されて溶液中に保持される。溶液は空冷にて冷やされたのち, ガス交換膜においてヘリウムガスに二酸化炭素が分配される。ここで移動相を含む試薬はすべて廃液として除かれる。ヘリウムガスに移動した二酸化炭素相には水分が含まれるため, Nafion で水分をヘリウムとともに除去し, オープンスプリットを通して IRMS に運ばれ, 同位体測定が行われることになる。

4 . 研究成果

(1) クライオフォーカス導入結果

クライオフォーカスを行った結果, クロマトグラムピーク形状に大幅な改善が見られた (図 1)。クライオフォーカスを行う前は標準偏差が 1.61 ‰ だったのに対し, クライオフォーカス導入後は標準偏差が 0.16 ‰ となり, 高精度でシベルメトリンを測定することが可能となった。

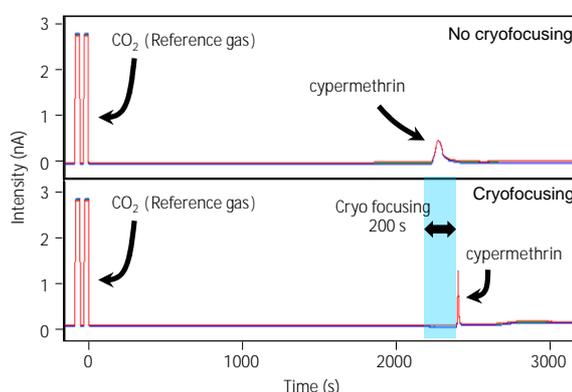


図 1. クライオフォーカスによるクロマトグラムの変化 (上図はクライオ無し)

(2) EA/IRMS と GC/IRMS による $\delta^{13}\text{C}$ (‰) の検証

EA/IRMS によって測定可能なシベルメトリン試薬 4 種を測定し, GC/IRMS の測定結果と比較・検証を行った (表 1)。測定の結果, 最大でも 0.60 ‰ 程度の差となり, 高精度・高精度な分析となった。

表 1: EA/IRMS と GC/IRMS による $\delta^{13}\text{C}$ (‰) の検証

試薬名	EA		GC	
	$\delta^{13}\text{C}$	S.D.	$\delta^{13}\text{C}$	S.D.
Wako039	-26.2	0.1	-25.6	0.2
P-548N	-28.4	0.2	-28.3	0.2
P-225N	-27.5	0.1	-27.1	0.2
FL45806	-28.6	0.0	-28.1	0.1

(3) シベルメトリンの反応後の同位体分別
各分解試験を行った結果, 標準偏差にやばらつきが見られる測定もあったが, どの条件下においても $\delta^{13}\text{C}$ の大きな変化 (< 1 ‰) は見られなかった (表 2)。このことから, シベルメトリンは保存方法の違いによる同位体分別がおこらないと考えられる。

表 2: 各分解試験結果 (‰)

試験内容	夢草 (-26.9)		碧露 (-26.8)	
	$\delta^{13}\text{C}$	S.D.	$\delta^{13}\text{C}$	S.D.
相変化	-27.1	0.6	-27.1	0.9
光反応	-27.5	0.3	-27.2	0.7
生物分解	-26.2	0.5	-27.3	0.1

(4) シベルメトリンの異同識別

シベルメトリンの炭素安定同位体比を測定した結果, $-28.3 \pm 0.2 ‰ \sim -24.5 \pm 0.2 ‰$ と幅広い結果となった (図 2)。特にシベルメトリン試薬は異なる値になることがわかった。4 種の農薬疑義資材 (夢草, 碧露, 健草源・天, ナースグリーン) は, ほぼ同じ値となり, 別の会社で販売されていたにも関わらず, 同一の起源のシベルメトリンであることが疑われた。

先行研究では、ハンガリーの農薬会社で製造されたシベルメトリンが、農薬疑義資材に使用された可能性が示唆されていた。しかし、日本で購入が可能なアグロスリン剤と、農薬疑義資材の同位体比が近い値となった。活性の高い α -シベルメトリンが、アグロスリン剤や農薬疑義資材と異なる値となった。分解試験においても、大きな同位体比の変化が見られないという結果となった。以上の3点のみから考慮すると、入手可能なアグロスリン剤が農薬疑義資材に使用された可能性も疑われた。アグロスリン剤のシベルメトリンは有効成分が6%だが、疑義資材は、それ以下の1.4%~3.4%程度の有効成分しか含有されておらず、アグロスリン剤を数倍に希釈し、数倍の値段で販売してきたことが疑われた。ただし、今回混入が示唆されているハンガリー産のシベルメトリンの測定を行うことができなかったため、今後はこれら農薬を入手し、測定する必要がある。

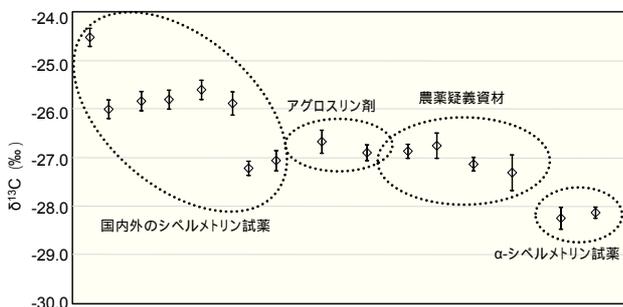


図2. シベルメトリン測定結果

(5) LC/IRMS (手動によるマニュアルの測定)の結果について

対象農薬としては、5種の農薬試薬をLC/IRMSにて測定を行った(マニュアル測定、リン酸添加なし)。5種の農薬の $\delta^{13}\text{C}$ の結果は、 -41.0‰ (オキサミル)~ -28.7‰ (グリホサート)となった。また、糖、アミノ酸、カフェインの結果は、 -35.5‰ (グリシン)~ -9.5‰ (D(+)-キシロース)と幅が広い結果となった。

また、標準偏差(1SD)は平均、最小、最大、それぞれ 0.1‰ 、 0.1‰ 、 0.3‰ となった。通常、LC/IRMSの標準偏差(1SD)は $\delta^{13}\text{C}$ においては 0.3‰ 、EA/IRMS、GC/IRMSにおいては 0.2‰ 程度であり、本研究の結果は非常に安定した結果であることがわかった。

なお、国際標準としては $\delta^{13}\text{C}$ の値が決まったCaffeine (IAEA-600, $-27.771 \pm 0.043\text{‰}$)、Graphite (USGS24, $-16.049 \pm 0.035\text{‰}$)、Cellulose (IAEA-CH-3, $-24.724 \pm 0.041\text{‰}$)を用いた。LC/IRMSの場合は適切な国際標準がないため、まずEA/IRMSでこれらの国際標準を測定した。次に、ダブルアンカー法より得た直線を用いて、すべてのサンプルの値を決めた。なお、ダブルアンカー法の決定係数は、 $R^2=1.00$ となった。

(6) LC/IRMS (イオンクロマトグラフとの連結によるオート測定)の結果について

イオンクロマトグラフによる連結による結果は、アミノ酸、カフェインを使って測定した(リン酸添加なし)。それらの結果は、標準偏差(1SD)は平均、最小、最大、それぞれ 0.4‰ 、 0.1‰ 、 0.8‰ となった。マニュアルによる方法に比べて、若干、精度が悪くなることがわかった。

(7) EA/IRMS との比較(リン酸添加の有無)

マニュアル測定(リン酸添加なし)の6種の糖、10種のアミノ酸の結果をEA/IRMSと比較すると、糖においては平均で 0.4‰ の違いがあり、アミノ酸においては 1.5‰ であった(図3)。また、2種のカフェインにおいては 6.6‰ もの違いがあった。今回、対象とした糖には窒素成分が含まれていなかったが、アミノ酸、カフェインにおいては、11~29%程度、窒素が含有している。これら成分に含まれる窒素が、湿式燃焼の際に N_2O となり、EAと異なる値になることが疑われている。このことから、本研究におけるアミノ酸、カフェインにおいても、EA/IRMSと異なっていると考えられた。

リン酸の有無をマニュアル測定にて6種類の糖、10種類のアミノ酸を用いてリン酸添加の有無について実験した。その結果、リン酸添加の有無によって同位体比に違いはなく、ほぼ同じ値であることがわかった。

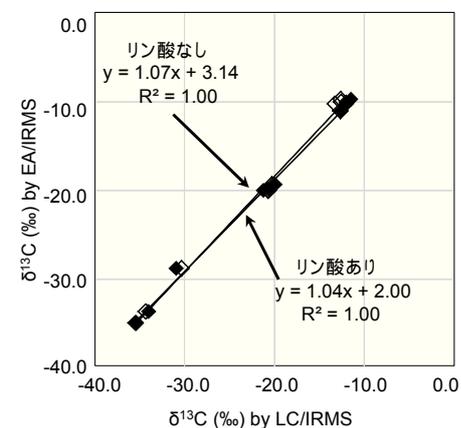
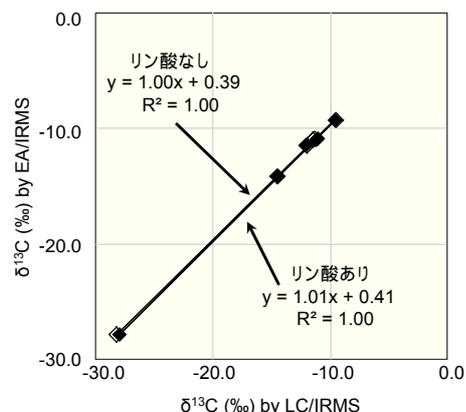


図3. EA/IRMSとLC/IRMS(マニュアル測定)の結果について(上が糖、下がアミノ酸)

また、イオンクロマトグラフを用いたオート測定にて、10種類のアミノ酸を用いてリン酸添加の有無について実験した。その結果、リン酸を添加することで、LC/IRMSはEA/IRMSに近くなることがわかった(図4)。イオンクロマトグラフにおける溶離液として四ホウ酸ナトリウム・十水和物が用いられているが、リン酸を入れることで酸性下にて燃烧することが可能になると考えられた。しかし、前述したように、アミノ酸には窒素成分が含まれているため、リン酸添加においても高確度な分析は出来なかった。

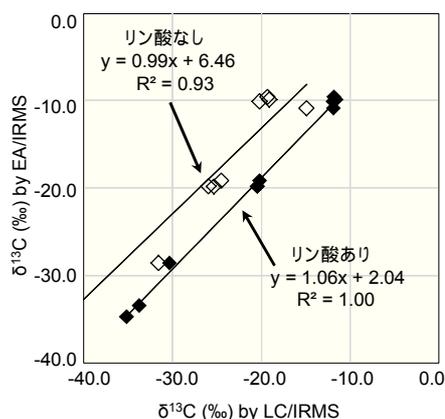


図4. EA/IRMSとLC/IRMS(オート測定)の結果について(アミノ酸)

(8) LC/IRMSとEA/IRMSの違いの調査、還元炉をつけた試み

前述したように成分に窒素が入っている場合、湿式酸化にて N_2O が生成するため、EA/IRMSとの結果が異なるとの疑いがあるが、実際に本当に N_2O が原因なのか調査した。実験は、湿式酸化した後に、細いセラミック管にCuワイヤーを入れ、 $650^{\circ}C$ で還元するシステムを導入した。このシステムにより、 N_2O は N_2 に還元され、 CO_2 とはピークが異なるため、もし、 N_2O の生成があれば、値はEA/IRMSとLC/IRMSと近づくはずである。これらは上記のアミノ酸、カフェインを用いて実験した。

結果は、還元炉を入れないシステムと入れたシステムではピークエリアも7%以下の違いで、同位体比も0.19‰以下の違いであり、ほとんど変わらない結果となった。さらに、Isoprime上のソフトウェアにて、検出ピークを44から28(N_2)にして、IRMSへのキャピラリーカラムを液体窒素に浸し、 CO_2 の流れを止めて、窒素のピークを検出する方法も試みたが、IRMSにてピークは検出されなかった。これらのことから、当初予測していた N_2O の生成は考え難く、別の原因より、違いが生じたと思われる。

5. 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)

(1) Hiroto Kawashima (2015), The measurement of stable carbon isotope ratios of eight methamidophos samples, Journal of Forensics Science, in press, 査読有

〔学会発表〕(計3件)

(1) Nana Suto, Hiroto Kawashima (2014.12), The stable isotope fingerprinting technique for agricultural pesticide, AGU fall meeting, San Francisco, USA

(2) Hiroto Kawashima, Takuro Kariya (2013.9), Use of stable carbon isotope ratios to determine the source of cypermethrin in so-called natural plant extract formulations used for organic farming, Abstract of 5th FIRMS network conference, pp.67-68, Montreal, Canada

(3) Hiroto Kawashima (2013.6), Stable Carbon Isotope Ratio of Chinese Methamidophos using Cryo-GC/C/IRMS, Abstract of ISOTOPRS 2013, pp.79, Sopot, Poland

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