

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月17日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H02980

研究課題名(和文) 安定同位体比を用いた農薬混入事件への危機管理対応の構築

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・准教授

研究者番号：60381331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：2000年代後半になり、高極性(水溶性)かつ不揮発性の個別成分ごとの安定同位体比の新たな分析手法として液体クロマトグラフ/安定同位体比質量分析計(LC/IRMS)が実用化されはじめた。しかし、LC/IRMSは、非常に取扱いが難しく、安定した分析ができる研究機関は国内外でほとんどないのが現状である。そこで、本研究では大きく3つの研究を行った。まず1つ目は、LC/IRMSにおける高精度・高確度分析法の開発を行った。2つ目は、はちみつ中の糖類と有機酸を分析し、偽和判定と成分間の関係性を調査した。3つ目は、LC/IRMSを用いた農薬類の分析法の確立を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、既存のLC/IRMSに新たにポストカラム法を追加し、また、装置内部の多くの部品類も新たにした分析装置を開発した。その結果、高精度と高精度な分析が可能となり、今後は、多様な成分に応用され始めていくと考えている。また、実際に本装置を用いて、市販で販売されている116個のはちみつのうち、近年開発された国際的な判別基準を用いると、39個が何らかの疑いのあるはちみつであり、77個が純粋なはちみつであると識別された。今のところ、国内ではこのような測定事例はないが、今後はさらに活発に研究が進むことが予測され、はちみつ類などの真贋が問われるのではないかと考えている。

研究成果の概要(英文)：Liquid chromatography/isotope ratio mass spectrometry (LC/IRMS) has been used to authenticate and trace products such as honey, wine, and lemon juice, and compounds such as caffeine and pesticides. However, LC/IRMS has several disadvantages, including the high cost of the CO₂ membrane and blocking by solidified sodium persulfate. Here, I conducted as follows 3 points. Firstly, I developed an improved system for determining carbon isotope ratios by LC/IRMS with the post-column pump. Secondly, stable carbon isotope ratios for glucose, fructose, disaccharides, trisaccharides, and organic acids in 116 commercial honey samples were measured by the LC/IRMS with the post-column pump. On the basis of EA/IRMS and LC/IRMS authenticity criteria, 39 of the samples were judged to have been adulterated. Thirdly, I analyzed 6 pesticides by the LC/IRMS with the post-column pump.

研究分野：環境動態解析

キーワード：危機管理 鑑識学 輸入食品 残留農薬 環境分析 安定同位体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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だけでなく、2013年年末には冷凍食品のコロッケやピザから有機リン系殺虫剤のマラチオンが検出される事件が勃発するなど、簡単に入手可能な農薬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、証拠としては不十分であると言わざるを得ない。研究代表者は、ガスクロマトグラフ/安定同位体比質量分析計(GC/IRMS)を用いて、農薬そのものに含まれる安定同位体比を測定することで、その結果、原因不明の殺虫剤ダイアジノンや、冷凍餃子農薬混入事件のメタミドホスの異同識別に応用することが出来た。しかし、確立した分析方法では揮発性が高く、安定した農薬類しか測定できないため、水溶性が高く、熱に不安定な農薬類の高精度分析は不可能な状態である。最近では多くの農薬は分解性の高いものが開発、販売されており、例えば、モスピラン(商品名)・殺虫剤(アセタミプリド)やオルトラン(商品名)・殺虫剤(アセフェート)等は販売流通量が多いにも関わらず、分析が困難である。

2000年代の後半、液体クロマトグラフ/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、水溶性が高く、熱に不安定な個別成分の炭素安定同位体比が測定可能になった。現在、様々な分野において応用研究が世界中で活発に進みつつあるが、装置の安定性や個々の部品類の価格や不安定さ等課題は多い。現在のグローバル化した世界において、食品の流通は益々活発になっており、またテロリストにとっても農薬は容易に入手しやすい劇毒物であるため、様々な農薬類の異同識別法の確立は重要な意味を持つ。

2. 研究の目的

本研究では、近年開発されたLC/IRMSを用いて、販売流通量が多く、水溶性が高い農薬類の炭素安定同位体比の高精度分析法を確立することを目標に、現在あるLC/IRMSの多くの課題解決もはちみつ等の食品類を通して行いたいと考えた。

3. 研究の方法

分析標準として、D-(+)-グルコース、D-(-)-フルクトース、スクロース、D-(+)-ガラクトース、D-(+)-マンノース、 α -L-(+)ラムノース、D-(+)-ラフィノース、D-(+)-マルトース、D-(+)-キシロース、ラクトースを和光純薬工業にて購入した。また、市販のはちみつを日本、ドイツ、ニュージーランドの116個(17か国)はちみつを収集した。これらは、ネット通販やスーパー、養蜂場から購入した。日本(34個)、スペインとイタリア(13個ずつ)、フランス、ニュージーランド(10個ずつ)、中国(9つ)、カナダ、EU諸国、ハンガリー(4個ずつ)、アルゼンチン、オーストラリア、ブルガリア、キューバ、メキシコ、ルーマニア、台湾、アメリカ(それぞれ1個ずつ)、その他(7個)の計116個のはちみつを収集した。

農薬類は、オキサミル、ジメトエート、アセフェート、アセタミプリド、ジカンバ、ダゾメット、パラコート、グリフォサート、グリフォシネートを和光純薬工業にて購入した。

本研究ではLCシステムをLiquiFace装置(Isoprime社製)を介してIRMS装置(Isoprime社製)に結合した。HPLCは、島津製作所社製のカラムポンプ(LC-10ADvp)、酸化ポンプ(LC-10ADvp)、ポストカラムポンプ(LC-10ADvp)、オートサンプラー(SIL-10ADvp)、UV検出器から構成された。IRMSとデータ解析はMicrosoft Windows XP Professional、HPLCはWindows 7 Ultimateにて制御した。それぞれ、IonVantage NT software(ver. 1.5.4.0., Isoprime)とLCsolution(ver. 1.25, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)を使用した。測定の流れ

としては、移動相にペルオキシ二硫酸ナトリウム ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$) とリン酸 (H_2PO_4) が添加され、Liquiface 内部を通過する。そこにシリンジを用いてサンプルが導入される。サンプルは、 100°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。

なお、同位体比は (1) 式によって表される。

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

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 層ベラムナイト炭酸塩 (Peedee Belemnite, PDB, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}=0.011180$) に対する千分率 (‰) で表せられる LC/IRMS においては、スクロース (IAEA-CH-6, $\delta^{13}\text{C} = -10.449\text{‰}$) を国際原子力機関から入手し、他に 3 つの内部標準を用いたダブルアンカー法により計算した。内部標準は、EA/IRMS から得られたグルコース ($\delta^{13}\text{C} = -10.9\text{‰}$)、フルクトース ($\delta^{13}\text{C} = -11.5\text{‰}$)、ガラクトース ($\delta^{13}\text{C} = -27.8\text{‰}$) を用いた。分析の安定性の確認として、同位体標準 (グルコース, $\delta^{13}\text{C} = -10.9\text{‰}$) を 9 サンプルごと 1 回分析した。

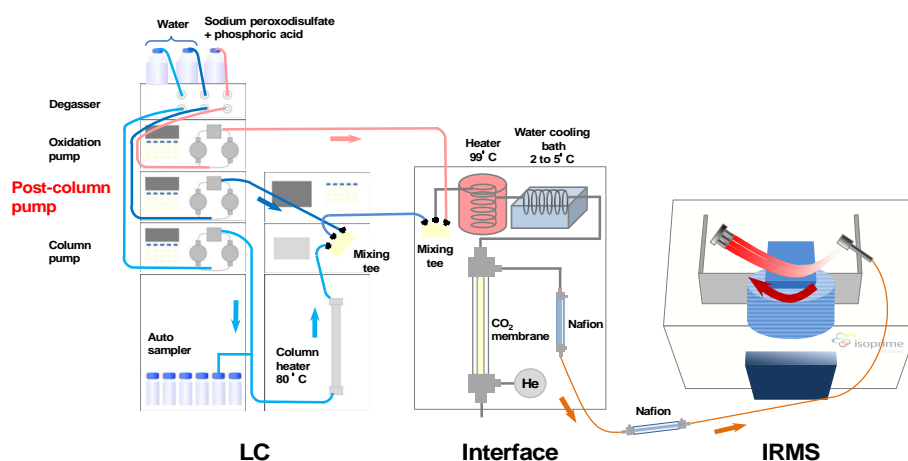


図 1 本研究で使用した LC/IRMS 概略図

4. 研究成果

(1) ポストカラム法による LC/IRMS における各種試験

酸化剤の流量を決定するために、グルコース (-10.9‰ , 2000ppm) を対象に ($0.1 \sim 0.5\text{mL}/\text{min}$) に変化させ試験した (図 2A 参照)。カラム流量とポストカラム流量はそれぞれ $0.5\text{mL}/\text{min}$, $0.3\text{mL}/\text{min}$ で試験した。酸化剤流量が $0.3\text{mL}/\text{min}$ 場合では、精度 ($<0.3\text{‰}$)、確度 ($<0.4\text{‰}$) で安定していた。カラム流量と酸化剤流量はそれぞれ $0.4\text{mL}/\text{min}$, $0.5\text{mL}/\text{min}$ にて試験した (図 2B 参照)。ポストカラム流量が $0.2\text{mL}/\text{min}$ 以下の場合には、精度と確度はそれぞれ $1.5 \sim 4.3\text{‰}$, $0.7 \sim 1.7\text{‰}$ であり不安定であった。ポストカラム流量が、 $0.3 \sim 0.7\text{mL}/\text{min}$ では、精度と確度はそれぞれ $0.1 \sim 0.8\text{‰}$ と $0.1 \sim 0.5\text{‰}$ であり、非常に安定していました。ポストカラム法による安定性の違いは、 CO_2 膜内の総流量 (カラム流量+酸化剤流量+ポストカラム流量) が影響を受けたためであると思われる。総流量が $1.2\text{mL}/\text{min}$ 以上では、 CO_2 膜の外側のヘリウム流量が安定しベースラインも安定したと考えられる。カラム流量を $0.1 \sim 0.7\text{mL}/\text{min}$ に変化させ、総流量は $1.5\text{mL}/\text{min}$ に維持されるようにポストカラム流量を調整した。グルコースとカラム流速におい

て、精度と確度はこれらの条件下で 0.0~0.2‰, 0.0~0.6‰であった。総流量が 1.5mL/min に維持し、カラム流量は 0.1~0.7mL/min に任意に変更することが出来た(図 2C 参照)。6 つの糖試薬(マルトース, ラクトース, ラフィノース, マンノース, キシロース, ラムノース)を EA/IRMS と LC/IRMS にて分析した。傾きが 0.926 であり, 高い相関係数 (> 0.995, 4.9) であった(図 2D 参照)。

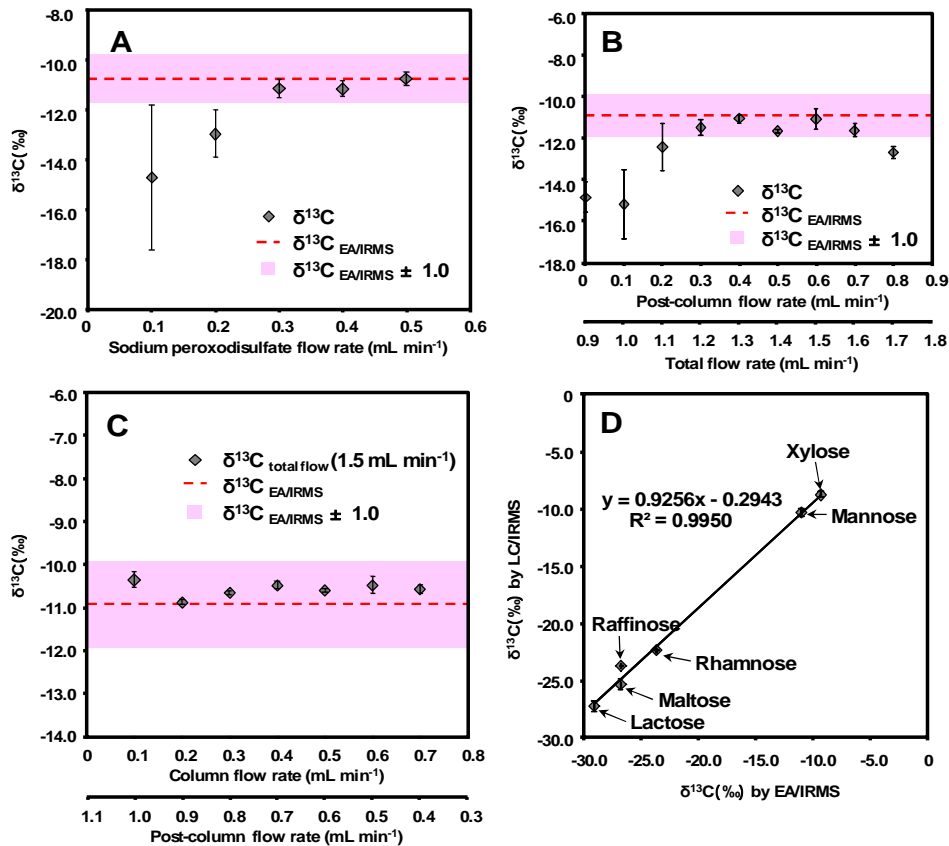


図 2 LC/IRMS の各種の試験 (A, B, C はグルコース). A: ペルオキシ二硫酸ナトリウム+リン酸流量 (0.1~0.5 mL/min) を変化させた図, B: ポストカラム流量 (0.0~0.8mL/min) を変化させた図, C: カラム流量 (0.1~0.7mL/min) を変化させた図, D: 6 つの糖試薬の EA/IRMS と LC/IRMS の相関図。

(2) はちみつ中の糖類および有機酸の炭素安定同位体比分析と偽装識別

116 個のはちみつサンプルについて, グルコース, フルクトース, 二糖類, 三糖類, 有機酸の $\delta^{13}\text{C}$ 値は, それぞれ $-28.8 \sim -19.7\text{‰}$, $-28.4 \sim -21.3\text{‰}$, $-30.2 \sim -20.2\text{‰}$, $-30.5 \sim -16.2\text{‰}$, $-33.6 \sim -24.3\text{‰}$ でした。この研究の結果に基づいて, 我々は, Elflein and Raezke¹ に基づき, $\Delta\delta^{13}\text{C}$ (フルクトース - グルコース) $> \pm 1.0\text{‰}$, $\Delta\delta^{13}\text{C}$ max (全ての測定された成分間の最大差) $> \pm 2.1$ の識別基準を用いた。これより, 116 個のうち 38 個が偽物のはちみつと判断された。本研究では, 全サンプルの 30%以上が EA/IRMS と LC/IRMS の識別基準により偽物のはちみつとして識別された。これは, 他文献と比較しても同様の結果となっていた。連続 3 回測定の標準偏差は 0.7‰以内であった。本研究のグルコースとフルクトースは, 以前に報告された文献と比較しても範囲内であった¹⁻³。また, はちみつ中の二糖では, $-28.2 \sim -22.5\text{‰}$ ¹, $-27.87 \sim -23.70\text{‰}$ ³ と報告されており本研究と近い範囲であった。三糖は, 唯一 Elflein and Raezke¹ により, $-27.5 \sim -22.6\text{‰}$ であると報告されており, 本研究でも同様な範囲であった。グルコン酸は $-33.6 \sim -26.5\text{‰}$ の範囲でした (平均: $-29.5 \pm 1.3\text{‰}$)。連続 3 回測定の標準偏差は 0.6‰以内でした。我々の知る限りでは, LC/IRMS を用いたのはちみつ中の有機酸の最初の報告であ

る。糖類と比較して、有機酸は全体的に軽い傾向にあった。Daniele, et al. ⁴でも、本研究と同様の結果となっていた。地理的起源における重要な特徴は特に見つからなかった。

(3) LC/IRMS を用いた 9 種の農薬類の炭素安定同位体分析

HPLC カラムは、Inter Sustain AQ-C18 (GL サイエンス社製)、PRP-X400 (Hamilton 社製)、HyperCarb (Thermo Fisher Scientific) を試験した。最も 1 つのカラムで多くの農薬分析が可能であったのが、Inter Sustain AQ-C18 であった。農薬類は、アセフェート、パラコート、グリフォサート、グリフォシネートの 4 成分を高精度に同時分析が可能であった。これらの農薬類を LC/IRMS で分析した結果と EA/IRMS で分析した結果と比較したところ、決定係数で $R^2 = 0.99$ となり、高確度な分析も可能であることがわかった。

< 引用文献 >

1. Elflein L, Raezke KP. Improved detection of honey adulteration by measuring differences between $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ stable carbon isotope ratios of protein and sugar compounds with a combination of elemental analyzer - Isotope ratio mass spectrometry and liquid chromatography - Isotope ratio mass spectrometry ($\delta^{13}\text{C}$ -EA/LC-IRMS). *Apidologie* 2008;39:574-587.
2. Cabañero AI, Recio JL, Rupérez M. Liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry: A new perspective on honey adulteration detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006;54:9719-9727.
3. Dong H, Xiao K, Xian Y, Wu Y. Authenticity determination of honeys with non-extractable proteins by means of elemental analyzer (EA) and liquid chromatography (LC) coupled to isotope ratio mass spectroscopy (IRMS). *Food Chemistry* 2018;240:717-724.
4. Daniele G, Maitre D, Casabianca H. Identification, quantification and carbon stable isotopes determinations of organic acids in monofloral honeys. A powerful tool for botanical and authenticity control. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2012;26:1993-1998.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

Hiroto Kawashima, Momoka Suto, Nana Suto (2019), Stable carbon isotope ratios for organic acids in commercial honey samples, *Food Chemistry*, vol.289, pp.49-55, 査読有, doi:10.1016/j.foodchem.2019.03.053

川島洋人 (2019), 安定同位体比を用いた食品の産地識別と偽和判定の研究動向, *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan*, vol.67, pp.86-91, 査読有, doi:10.5702/massspec.S19-17

Hiroto Kawashima, Momoka Suto, Nana Suto (2018), Determination of carbon isotope ratios for honey samples by means of a liquid chromatography/isotope ratio mass spectrometry system coupled with a post column pump, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol.32, pp.1271-1279, 査読有, doi:10.1002/rcm.8170

Nana Suto, Hiroto Kawashima (2018), Online wet oxidation/isotope ratio mass spectrometry method for determination of stable carbon isotope ratios of water-soluble organic carbon in particulate matter, Rapid Communications in Mass Spectrometry, vol.32, pp.1668-1674 , 査読有 , doi: 10.1002/rcm.8240

川島洋人 (2018), 安定同位体比を用いた環境中化学物質の起源推定の研究 - 最近の農薬類の安定同位体比を用いた研究動向 - , 日本農薬学会誌, vol.43(2), pp.131-132 , 査読有 , doi:10.1584/jpestics.W18-40

Nana Suto, Hiroto Kawashima (2017), Classification of nine malathion emulsion samples by using carbon isotope ratios and the ratio of organic solvents, Science & Justice, vol.57, pp.1-5 , 査読有 , doi:10.1016/j.scijus.2016.10.009

Hiroto Kawashima, Takuro Kariya (2017), Use of stable carbon isotope ratios to determine the source of cypermethrin in so-called natural plant extract formulations used for organic farming, Isotopes in Environmental and Health Studies, vol.53, pp.70-79 , 査読有 , doi:10.1080/10256016.2016.1164697

Hiroto Kawashima (2015), The measurement of stable carbon isotope ratios of eight methamidophos samples, Journal of Forensics Science, vol 60, pp. 1360-1364 , 査読有 , doi:10.1111/1556-4029.12825

Nana Suto, Hiroto Kawashima (2015), Stable carbon isotope ratio for sugar, amino acid, and caffeine by liquid chromatography/isotope ratio mass spectrometry, Procedia Earth and Planetary Science, vol.13, pp.181-184 , 査読有 , doi:10.1016/j.proeps.2015.07.042

[学会発表](計7件)

須藤百香, 川島洋人, 須藤菜那 (2018), ポストカラム-LC/IRMS を用いたはちみつの化学成分の炭素安定同位体比分析, 第66回質量分析総合討論会

川島洋人, 須藤百香 (2017), はちみつに含まれる化学成分の炭素安定同位体比分析, 第65回質量分析総合討論会

Hiroto Kawashima, Nana Suto (2016), Classification of nine malathion emulsion samples by using carbon isotope ratios and the ratio of organic solvents, ANZFSS Symposium 2016 & 6th FIRMS Network Conference

Hiroto Kawashima, Nana Suto (2016), Analysis of sugar, amino acid, and caffeine ¹³C by using liquid chromatography/isotope ratio mass spectrometry, Joint European Stable Isotopes User Meeting

須藤菜那, 川島洋人 (2016), LC/IRMSによる糖, アミノ酸, カフェインの炭素安定同位体比測定法の改良, 第65回日本分析化学会

川島洋人, 須藤菜那 (2016), 炭素安定同位体比を用いたマラソン乳剤の異同識別, 第29回日本リスク研究学会年次大会

川島洋人, 刈谷拓朗 (2016), 炭素安定同位体比を用いた有機農業用資材に含まれるシベルメトリンの異同識別, 第64回質量分析総合討論会

[その他]

環境鑑識学研究室ホームページ; <http://www.akita-pu.ac.jp/system/mse/sac/kawa/index.html>