

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：21401
研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）
研究期間：2017～2020
課題番号：16KK0015
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（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Crisis management to pesticide contamination using stable isotope ratio
(Fostering Joint International Research)

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） 12,000,000円
渡航期間： 8ヶ月

研究成果の概要（和文）：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。しかし、LC/IRMSを用いた農薬類を対象とした応用事例は、世界でまだ行われておらず、安定同位体比測定における特有の課題を考慮した基礎的実験から調査する必要がある。本研究では、ドイツのデュースブルクエッセン大学に訪問し、農薬類の分析等を進めることが出来た。2次元LC/IRMSの開発を行ってはちみつ中の有機酸類の安定同位体比を分析し、日本酒の糖類、アルコール類の安定同位体比を分析し、新たな識別基準を開発することが出来た。また、LC/IRMSを用いて農薬類の安定同位体比を分析することが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ドイツのデュースブルクエッセン大学に訪問し、多くの情報交換を行って、LC/IRMSの様々な開発を行うことが出来た。学術的にも、2D-LC/IRMSを世界で初めて開発することが出来、分離不可能であったはちみつ中の有機酸の炭素安定同位体比を高精度に分析することが出来た。また、日本酒中のグルコース、エタノールの炭素安定同位体比を分析し、純米酒、吟醸酒、普通酒の識別基準を確立することが出来た。これらは、今後、消費者にとっても重要な知見になったと推察された。また、LC/IRMSを用いて農薬類の安定同位体比も実施することが出来、今後、農薬類を使った事件等の場合は応用可能であると考えている。

研究成果の概要（英文）：Liquid chromatography/Isotope Ratio Mass Spectrometry (LC/IRMS) has been developed. However, the applications for pesticides etc. using LC/IRMS have not yet been conducted. Therefore, it is necessary to investigate from basic experiments. In this study, we were able to develop the two-dimensional LC/IRMS, analyze the stable isotope ratios of organic acids in honey, analyze the stable isotope ratios of glucose and ethanol in sake, and develop new identification criteria. In addition, we were able to analyze the stable isotope ratios of pesticides using LC/IRMS.

研究分野：環境動態解析

キーワード：安定同位体 鑑識学 食品分析 農薬分析

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の多くの課題解決を実施し、応用研究としてはちみつ、日本酒の食品類の成分中の安定同位体比分析を実施した。また、二次元LC/IRMS(2D-LC/IRMS)の開発も行い、通常では分析不可能な成分の安定同位体比分析を実施した。

3. 研究の方法

市販のはちみつを日本、ドイツ、ニュージーランドの25種類のはちみつを収集した。日本酒は40種類を購入した。また、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、グリフォシネートと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(Elementar社製)を介してIRMS装置(Elementar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。また、2D-LC/IRMS法の概略図を図1に示す。1次元カラムより炭水化物と有機酸を分離し、その後、2次元目カラムにて有機酸を成分ごとに分離した。

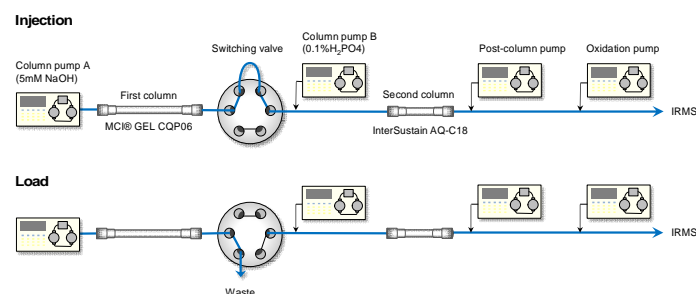


図1 2D-LCの概略図。2次元目のカラムへサンプルが導入される時と(上図)、2次元目のカラムにて成分が分離する時(下図)の状態を表す。

4. 研究成果

(1) 二次元 LC/IRMS の開発及びはちみつの有機酸の炭素安定同位体比分析

2D-LC/IRMS を用いてはちみつを模擬したサンプルを用いて有機酸類の測定を行ったところ、グルコン酸、マロン酸、クエン酸の精度は $<0.3\%$ と高精度に分析することが可能であった。また 2D-LC/IRMS 法を用いた有機酸の精度は 300 から 2,000ppm の範囲で $<0.5\%$ であった。

確立した 2D-LC/IRMS を用いて、25 つのはちみつにおけるグルコン酸を分析した。グルコン酸は -31.7% ～ -28.5% であった（平均値： $-30.0 \pm 0.7\%$ ）。以前に測定していたグルコースの炭素安定同位体比は、グルコン酸の間にわずかに強い相関があった（ $R = 0.61$ ）。グルコン酸は、グルコースオキシダーゼという酵素よりグルコースからグルコン酸への変換することが示唆されたため、本研究のわずかに強い相関関係があったと推測された。

(2) 日本酒のエタノール、グルコースの炭素安定同位体比分析

純米酒のエタノール、グルコースの炭素安定同位体比は、それぞれ -28.7 ～ -27.6% 、 -29.4 ～ -25.3% であった。吟醸酒のエタノール、グルコースの炭素安定同位体比は、それぞれ -26.4 ～ -24.2% 、 -29.0 ～ -25.9% であった。普通酒のエタノール、グルコースの炭素安定同位体比は、 -26.1 ～ -20.4% 、 -29.2 ～ -17.5% であった。醸造アルコールは主に C4 植物由来であるため、純米酒よりも吟醸酒、普通酒のエタノールの炭素安定同位体比が重くなったのは、C4 植物由来の醸造アルコールが添加されたためであると考えられる。また、いくつかの普通酒のグルコースの炭素安定同位体比が、他のサンプルよりも炭素安定同位体比が重くなったのは、

C4 植物由来の糖類の添加による影響だと考えられた。実際にそれらの日本酒のラベルには糖類の添加が記載されていた。これより、エタノールの炭素安定同位体比が -26.3% を超える場合、C4 植物から作られた醸造アルコールが添加されていると結論付けられた。またグルコースの炭素安定同位体比が -21.9% より重い場合、日本酒に糖類が添加されたと結論付けられた。また、醸造アルコールを純米酒に添加することで、アルコール自体の醸

造アルコールの割合を算出した。その結果、吟醸酒では 13.2～27.8%（平均値： $21.3 \pm 4.1\%$ ）で、普通酒では 15.7～53.5%（平均値： $33.4 \pm 13.1\%$ ）であった。

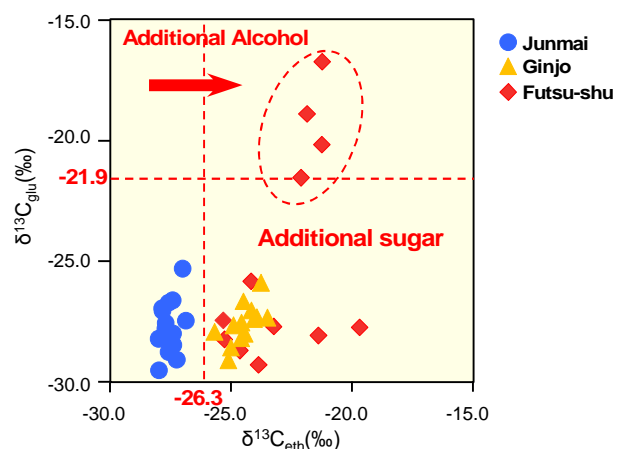


図2 日本酒中のグルコース、エタノールの炭素安定同位体比

(3) LC/IRMS を用いた 9 種の農薬類の炭素安定同位体比分析

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。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suto Momoka, Kawashima Hiroto, Nakamura Yasunori	4. 巻 13
2. 論文標題 Determination of Organic Acids in Honey by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Food Analytical Methods	6. 最初と最後の頁 2249 ~ 2257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12161-020-01845-w	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suto Momoka, Kawashima Hiroto	4. 巻 413
2. 論文標題 Carbon isotope ratio of organic acids in sake and wine by solid-phase extraction combined with LC/IRMS	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical and Bioanalytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 355 ~ 363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00216-020-03003-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suto Momoka, Kawashima Hiroto	4. 巻 9
2. 論文標題 Compound Specific Carbon Isotope Analysis in Sake by LC/IRMS and Brewers' Alcohol Proportion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-54162-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suto Momoka, Kawashima Hiroto, Suto Nana	4. 巻 1608
2. 論文標題 Heart-cutting two-dimensional liquid chromatography combined with isotope ratio mass spectrometry for the determination of stable carbon isotope ratios of gluconic acid in honey	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography A	6. 最初と最後の頁 460421 ~ 460421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chroma.2019.460421	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 川島洋人	4. 巻 67
2. 論文標題 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	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan	6. 最初と最後の頁 86 ~ 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5702/massspec.S19-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawashima Hiroto, Suto Momoka, Suto Nana	4. 巻 289
2. 論文標題 Stable carbon isotope ratios for organic acids in commercial honey samples	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 49 ~ 55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.foodchem.2019.03.053	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 川島洋人	4. 巻 43
2. 論文標題 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?	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Pesticide Science	6. 最初と最後の頁 131 ~ 132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1584/jpestics.W18-40	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiroto Kawashima, Momoka Suto, Nana Suto	4. 巻 32
2. 論文標題 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	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Rapid Communications in Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 1271-1279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rcm.8170	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nana Suto, Hiroto Kawashima	4. 巻 32
2. 論文標題 Online wet oxidation/isotope ratio mass spectrometry method for determination of stable carbon isotope ratios of water-soluble organic carbon in particulate matter	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Rapid Communications in Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 1668-1674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rcm.8240	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 須藤百香, 武田恭, 川島洋人
2. 発表標題 秋田県産の日本酒中のエタノール, グルコースの炭素安定同位体比分析
3. 学会等名 第80回分析化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 須藤百香, 川島洋人
2. 発表標題 安定した液体クロマトグラフ/安定同位体比質量分析計の改良とはちみつ中の有機成分の高精度分析
3. 学会等名 第80回分析化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 須藤百香, 武田恭, 川島洋人
2. 発表標題 LC/IRMSを用いた日本酒の純米酒, 吟醸酒, 普通酒の識別方法の開発
3. 学会等名 第68回質量分析総合討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nana Suto, Hiroto Kawashima
2. 発表標題 Stable carbon isotope ratio measurement of water-soluble organic aerosol using online wet oxidation/isotope ratio mass spectrometry
3. 学会等名 7th FIRMS Network Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Momoka Suto, Hiroto Kawashima, Nana Suto
2. 発表標題 Stable carbon isotope ratios for carbohydrates and organic acids in commercial honey samples
3. 学会等名 7th FIRMS Network Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Momoka Suto, Hiroto Kawashima
2. 発表標題 Determination of carbon stable isotope ratios of ethanol and glucose in sake
3. 学会等名 7th FIRMS Network Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川島洋人
2. 発表標題 近年の個別化合物の安定同位体測定について～環境分野，食品分野などを例に～
3. 学会等名 独立行政法人産業技術総合研究所安全科学研究部門発表会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroto Kawashima
2. 発表標題 Source identification for pollution in various environment using stable isotope
3. 学会等名 Joint International Symposium on Sustainable Development and Environmental issues (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須藤百香, 川島洋人, 須藤菜那
2. 発表標題 ハートカット二次元液体クロマトグラフィー (2D-LC法) を用いたはちみつ中のグルコン酸の炭素安定同位体比分析
3. 学会等名 第67回質量分析総合討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須藤百香, 川島洋人, 須藤菜那
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第66回質量分析総合討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川島洋人, 須藤百香
2. 発表標題 はちみつに含まれる化学成分の炭素安定同位体比分析
3. 学会等名 第65回質量分析総合討論会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

「純米，本醸造 識別法確立」，読売新聞（秋田版），2020年1月
秋田県立大学システム科学技術学部 環境鑑識学研究室HP
<http://www.akita-pu.ac.jp/system/mse/sac/kawa/index.html>
秋田県立大学 研究者総覧 川島洋人
<http://www.akita-pu.ac.jp/stic/souran/scholar/detail.php?id=208>
RESOLUTION OIV-OENO 479-2017
<http://www.oiv.int/public/medias/5363/oiv-oeno-479-2017-en.pdf>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	シュミット トーステン (Schmidt Torsten)	デュースブルグエッセン大学・理学部化学科・教授	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
ドイツ	デュースブルグエッセン大学		