

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H03393

研究課題名(和文) 水溶性農薬類の窒素安定同位体比の分析法の開発及び異同識別

研究課題名(英文) Development of analytical method of nitrogen stable isotope ratio of water-soluble pesticides

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) 12,100,000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、二次元LC/IRMSを開発し、はちみつ中の有機酸の測定を行った。2つ目は、日本酒のエタノール、糖類、有機酸の測定を行った。3つ目は、LC/IRMSを用いた農薬類の分析法の確立を行い、窒素安定同位体比分析を試みた。

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に二次元LCを追加し、今まで測定できなかった成分中の安定同位体比分析が可能になった。さらに、固相抽出法を使い、夾雑成分の除去を行い、ターゲットとする成分中の安定同位体比分析を行った。また、日本酒のアルコール類、糖類、有機酸類の安定同位体比を分析することで、普通酒、醸造酒の区分や酒造りの区分を行うことが可能になった。これらは、学術的にも大きな進展になると共に、日本酒の偽装を防止予防も可能になるなど社会的意義も大きいと思われる。

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 a two-dimensional LC/IRMS and measured organic acids in honey. Secondly, I measured ethanol, sugars, and organic acids in sake. Thirdly, I established an analytical method for pesticides using LC/IRMS and attempted nitrogen stable isotope ratio analysis.

研究分野：環境動態解析

キーワード：安定同位体 環境鑑識 食品分析 農薬分析

様式 C-19、F-19-1、Z-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、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。研究代表者は、近年開発された液体クロマトグラフ/安定同位体比質量分析計 (LC/IRMS) を部品一つひとつから見直し、安定した装置に改良することが出来た。本研究では、さらに発展させ、炭素安定同位体比だけでなく窒素安定同位体比も対象を広げて、水溶性農薬及び水溶性有機物の分析法を確立したいと考えた。

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

25種類 (日本、ドイツ、ニュージーランド産) の市販のはちみつを購入した。日本酒は49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 (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。

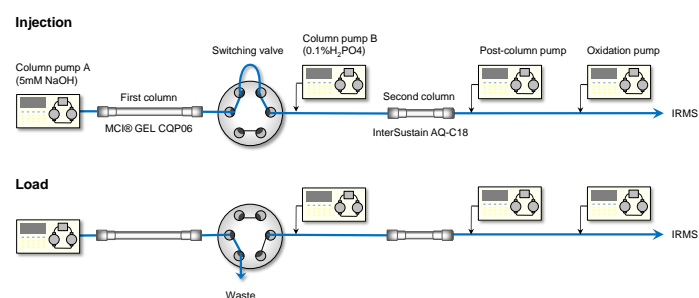


図1 2D-LCの概略図。2次元目のカラムへサンプルが導入される時と (上図)、2次元目のカラムにて成分が分離する時 (下図) の状態を表す。

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 $<0.3\text{‰}$ 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 $<0.5\text{‰}$ であった。

確立した 2D-LC/IRMS を用いて、25 種類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： $-30.0 \pm 0.7\text{‰}$ ）。以前に測定していたグルコースの炭素安定同位体比とグルコン酸との間にわずかに強い相関があった（ $R = 0.61$ ）。これは、グルコン酸がグルコースオキシターゼという酵素によりグルコースから生成されるためであり、安定同位体の視点からもグルコン酸の生成メカニズムの裏付けされた。

(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（図 2）。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。

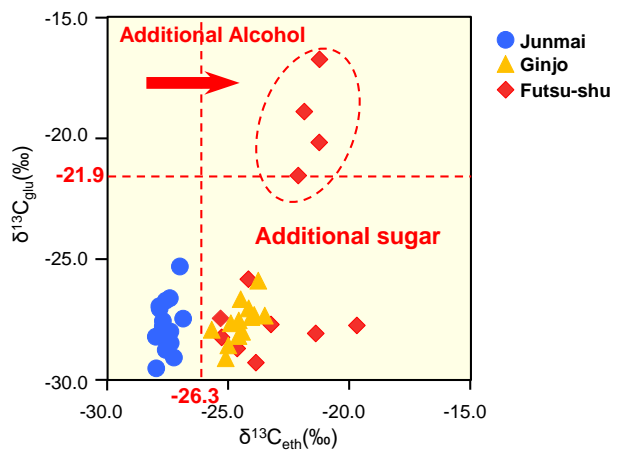


図 2 日本酒中のグルコース、エタノールの炭素安定同位体比

また、実際に純米酒に C4 植物由来の醸造アルコールを添加し、吟醸酒、普通酒における醸造アルコールの添加割合を算出した。その結果、吟醸酒では 13.2～27.8%（平均値：21.3 ± 4.1%）で、普通酒では 15.7～53.5%（平均値：33.4 ± 13.1%）であった。

(3) 日本酒の有機酸の炭素安定同位体比分析

49 種類の日本酒において、リンゴ酸、乳酸、コハク酸の炭素安定同位体比を測定した。初めに、乳酸の $\delta^{13}C$ 値は、 -27.9 ～ -17.3‰ （平均値： $-22.5 \pm 3.5\text{‰}$ ）であった。日本酒の醸造方法には、生酛系酒母と速醸系酒母の 2 種類がある。生酛系酒母は自然に乳酸菌が産生する乳酸を利用し殺菌を行う方法である。一方で、速醸系酒母は、酒母において細菌の増殖を抑制する方法として醸造用乳酸を人工的に添加する方法である。本研究では、28 種類の速醸系の日本酒における乳酸の $\delta^{13}C$ 値は、 -27.9 ～ -17.3‰ （平均値： $-20.2 \pm 2.5\text{‰}$ ）、21 種類の生酛系においては -27.9 ～ -20.4‰ （平均値： $-25.6 \pm 2.1\text{‰}$ ）であった（図 3）。乳酸の $\delta^{13}C$ 値は、生酛系の日本酒よりも速醸系の日本酒の方が 5.4‰重く、有意な差が確認された（ $p < 0.05$ ）。

速醸系の日本酒に使用される醸造用乳酸には、大きく分けて発酵由来と化学合成由来の2つの醸造用乳酸がある。発酵由来によって生成される醸造用乳酸の原料は、主にサトウキビ等のC4植物が挙げられる。化学合成由来は、原油由来の化学合成により生成されている。本研究で分析した醸造用乳酸の $\delta^{13}\text{C}$ は、発酵由来では、 $-10.31 \pm 0.06\text{‰}$ 、化学合成由来では $-29.31 \pm 0.14\text{‰}$ であった。発酵由来と化学合成由来の醸造用乳酸には有意差が見られた ($p < 0.001$)。これより、上記で示したように乳酸の炭素安定同位体比が、生酏系の日本酒よりも速醸系の日本酒の方が有意に重かったのは発酵由来の醸造用乳酸が使われていることが推察された。この結果から、 $\delta^{13}\text{C}$ を使うことで、製造過程を識別可能であることがわかった。

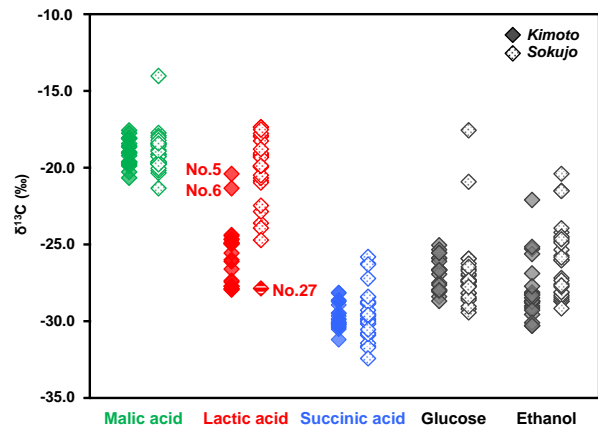


図3 日本酒中の有機酸の炭素安定同位体比

(4) LC/IRMS を用いた 9 種の農薬類の炭素・窒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 (Thremo Fisher Scientific 社製) を試験した。最も多くの農薬の同時分析が可能であったのは、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、グリフォンネートの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。また、窒素安定同位体比を測定のために、装置内部の部品類の再選定や、還元炉の設置など、様々な基礎実験を実施してきたが、LC/IRMS の骨格である湿式酸化では窒素成分は窒素ガスにはならず、高確度・高精度な窒素安定同位体比の分析は難しいことがわかった。そのため、別の燃焼方法等が必須であることが推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Suto Momoka, Kawashima Hiroto	4. 巻 381
2. 論文標題 Discrimination for sake brewing methods by compound specific isotope analysis and formation mechanism of organic acids in sake	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 132295 ~ 132295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.foodchem.2022.132295	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 Nana, Kawashima Hiroto	4. 巻 21
2. 論文標題 Measurement report: Source characteristics of water-soluble organic carbon in PM _{2.5} at two sites in Japan, as assessed by long-term observation and stable carbon isotope ratio	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Atmospheric Chemistry and Physics	6. 最初と最後の頁 11815 ~ 11828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5194/acp-21-11815-2021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yasunori Nakamura, Masami Ono, Momoka Suto, Hiroto Kawashima	4. 巻 251
2. 論文標題 Analysis of malto-oligosaccharides and related metabolites in rice endosperm during development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Planta	6. 最初と最後の頁 8 page
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00425-020-03401-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Momoka Suto, Hiroto Kawashima, Yasunori Nakamura	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 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Momoka Suto, Hiroto Kawashima	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 2021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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	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 Hiroto Kawashima, Momoka Suto, Nana Suto	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 Momoka Suto, Hiroto Kawashima, Nana Suto	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
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 Momoka Suto, Hiroto Kawashima	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 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 -

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 日本農薬学会誌	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 川島洋人
2. 発表標題 安定同位体比を用いた環境中有害化学物質の発生源解析と食品の異同識別
3. 学会等名 日本質量分析学会 同位体比部会2021（招待講演）
4. 発表年 2021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 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, 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 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
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
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
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 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 Nana Suto, Hiroto Kawashima
2. 発表標題 Online wet oxidation/isotope ratio mass spectrometry method for determination of stable carbon isotope ratios of water-soluble organic carbon in PM2.5
3. 学会等名 AGU fall meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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.aki ta-pu.ac.jp/system/mse/sac/kawa/index.html>

「純米，本醸造 識別法確立」，読売新聞（秋田版），2020年1月

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------