

厚生労働科学研究費補助金  
食品の安全確保推進研究事業

GCIRMS及びLCIRMSを利用した農薬類の安定同位体比の  
高精度分析方法の確立に関する研究

平成26年度 総括研究報告書

研究代表者 川島 洋人

平成27(2015)年 3月

## 目 次

### I. 総括研究報告

GCIRMS及びLCIRMSを利用した農薬類の安定同位体比の  
高精度分析方法の確立に関する研究  
川島 洋人（公立大学法人 秋田県立大学）

----- 1

## GCIRMS及びLCIRMSを利用した農薬類の安定同位体比の 高精度分析方法の確立に関する研究

研究代表者 川島 洋人 公立大学法人秋田県立大学

研究要旨：近年，食品流通が活発になり，食品流通過程での食の安全確保は極めて重要な課題である。特に輸入食品では，平成 24 年度は届出件数が約 220 万件となり，ここ 10 年で届出件数が 50 万件も急増している。さらに，農薬管理のために 2006 年度からポジティブリスト制度により，違反件数は制度前に比べて増加している。近年，元素分析計，ガスクロマトグラフィー，液体クロマトグラフと安定同位体比質量分析計（それぞれ，EA/IRMS，GC/IRMS，LC/IRMS）の融合・実用化が行われ，応用研究が世界中で活発に行われている。しかし，農薬類を対象とした鑑識学的な応用事例はほとんど行われていないのが現状である。LC/IRMS は，2004 年に Krummen らによって開発され，液体中のアミノ酸，糖などの生体成分中の炭素安定同位体比を測定することが可能になってきている。本年度は，TCEA/IRMS を用いた農薬中の水素安定同位体比（ $\delta D$ ）の測定及び，LC/IRMS を用いた農薬中の（ $\delta^{13}C$ ）の測定を行った。農薬の異同識別を通して，農薬のトレーサビリティを迅速かつ高精度に確保することは，国民の食の安全を保障するうえでは必須である。

TCEA/IRMS を用いて 11 種類の農薬の  $\delta D$  の高精度・高確度分析が可能になった。ただし，メモリー効果があるため，安定した分析のためには，測定は 5 回行うが，最初の 2 回はデータ棄却する必要があることがわかった。また，熱分解炉内部のグラッシーカーボンには，サンプル量で 20mg 程度で  $\delta D$  は不安定になるため，頻繁に新たなグラッシーカーボンに交換する必要があることがわかった。LC/IRMS を用いて 5 種の農薬類の  $\delta^{13}C$  の高精度分析が可能になった。LC/IRMS と EA/IRMS を比較したところ，ほぼ同じ結果であったものの，一部の農薬は 1～3‰ 程度，LC/IRMS の方が軽い値であることがわかった。原因はいくつか検討したものの不明であった。また，測定を繰り返すことで，ピークに大きなノイズが生じた。試行錯誤した結果，空冷式の冷却から，水冷式に変更し，数°C 付近まで下げることで，このような大きなノイズ発生を抑えることが出来た。

これらの上記の技術を用いることで，今後は，犯罪などで使われる農薬混入事件等の解決を進めていきたい。

## A . 研究目的

近年、食品流通が活発になり、食品流通過程での食の安全確保は極めて重要な課題である。特に輸入食品では、平成 24 年度は届出件数が約 220 万件、届出重量は約 3200 万トンとなっている<sup>1)</sup>。ここ 10 年で届出件数が 50 万件も急増している状況にある。日本では輸入食品の増加に伴い、農薬管理のため、2006 年度からポジティブリスト制度が導入された。これまでは、残留基準がない農薬については農薬等が残留していても基本的に販売禁止等の規制はなかった。しかし、制度の導入により、残留基準がない農薬についても、一定量 (0.01ppm) の農薬が含まれる食品は流通を原則禁止することになった<sup>2)</sup>。輸入食品の増加やポジティブリスト制度等によって、違反件数は増加の一途を辿っており (平成 24 年度は 191 件)、国民の食の安全をどう保障するのかは、我が国にとって最重要な課題である。

また、農薬が事件に使われる事例も起きている。特に、食品に農薬を混入させる事件が近年増加している。2008 年に中国産冷凍餃子による中毒事件が発生した<sup>3)</sup>。JT フーズが輸入し、日本生活協同組合連合会が販売した中国産の冷凍餃子 (天洋食品) を喫食した千葉県千葉市、市川市、兵庫県高砂市の計 10 名が下痢や嘔吐などの中毒症状を訴えた事件である。関係機関の捜査により、当該食品の包材や嘔吐物中の餃子から、有機リン系殺虫剤のメタミドホスが検出された。日本の科学警察研究所では従来の、生成過程などでできた不純物を測定する薬物指紋法により分析を行ったが、この分析方法は、不純物は濃度が薄いため、正確に測定できているか疑わしい、農薬自体を測定対象としていな

いこと、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、などの問題があり、証拠として不十分であるといわざるを得ないと考えられる。

近年、元素分析計、ガスクロマトグラフィー、液体クロマトグラフと安定同位体比質量分析計 (それぞれ、EA/IRMS、GC/IRMS、LC/IRMS) の融合・実用化が行われ、応用研究が世界中で活発に行われている。しかし、農薬類を対象とした鑑識学的な応用事例はほとんど行われていないのが現状である。LC/IRMS は 2004 年に Krummen らによって開発され、液体中のアミノ酸、糖などの生体成分中の炭素安定同位体比を測定することが可能になってきている<sup>4)</sup>。その後 2010 年に Morrison らによって Liquiface (Isoprime 社製) が開発されており<sup>5)</sup>、本研究ではこの装置を使用した。

本年度は、TCEA/IRMS を用いた農薬中の水素安定同位体比 ( $\delta D$ ) の測定及び、LC/IRMS を用いた農薬中の ( $\delta^{13}C$ ) の測定を行った。農薬の異同識別を通して、農薬のトレーサビリティを迅速かつ高精度に確保することは、国民の食の安全を保障するうえでは必須である。

## B . 研究方法

(1) TCEA/IRMS を用いた農薬中水素安定同位体比の分析方法の確立

対象農薬試薬としては、秋田県内で使用量が多く、また輸入時の違反件数が多い成分を考慮し 11 種 (ジメピペレート、BPMC、ピリプチカルブ、シハロホップブチル、カフェンストロール、トリフルラリン、プロベナゾール、ピリダフェンチオン、ジメトエート、ピラゾキシフェン、クロルピリホスメチル) を選定した (表 1)。

測定は熱分解型元素分析計 (TC, Isoprime 社製 Euro vector) と安定同位体比質量分析計 (IRMS, Isoprime 社製 IsoPrime IRMS) が融合した装置を用いた (TCEA/IRMS) (図 1, 2 参照)。熱分解炉として、グラッシーカーボンチューブにグラッシーカーボンチップを詰めた。測定条件は、作成した熱分解炉を 1270°C, パックドカラムを 100°C, ヘリウムキャリアーガスを 110mL/min, ヘリウムパージガスを 80mL/min とした。測定の前に、Stability テスト (1SD で 0.2‰以内になれば問題なし) と、H<sub>3</sub><sup>+</sup>Factor のチェックを行った (10 以下になれば問題なし) (図 3 参照)。サンプルは、水素量が数 µg ~ 数十 µg を銀カップに詰める。測定は 3 回ずつ行った。

なお、同位体比は (1) 式によって表される。

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

ここで、R<sub>sample</sub> と R<sub>standard</sub> はそれぞれ試料と国際標準物質であり、例えば、水素の場合は、標準平均海水 (Standard Mean Ocean Waters, SMOW, D/H=0.00015576) に対する千分率 (‰) で表せられる。

(2) LC/IRMS を用いた農薬中炭素安定同位体比の分析方法の確立

対象農薬試薬としては、水溶性である 5 種の (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 (表 2)。

測定は湿式燃焼部 (LC, Isoprime 社製 Liquiface) と同位体比質量分析計 (IRMS, IsoPrime 社製 IsoPrime IRMS) が融合した装置を用いて測定を行った (図 4, 5 参照)。

測定の流れとしては、移動相 (水 100%) に酸化剤 (ペルオキソ二硫酸ナトリウム, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), 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。

## C. 研究結果・考察

(1) EA/IRMS による農薬中の水素安定同位体比の測定結果

対象農薬としては、11 種の農薬試薬を TCEA/IRMS にて測定を行った。ジメピペレート測定時のクロマトグラムを図 6 に示した。

11 種の農薬の δD の結果は、-203.5‰ (ジメピペレート) ~ -14.9‰ (ピラゾキシフェン) と幅広い結果であった。また、標準偏差 (1SD) は平均, 最小, 最大, それぞれ 1.3‰, 0.2‰, 3.8‰ となり、高精度な測定であった (表 3)。

国際標準としては δD の値が決まった Polyethylene (IAEA-CH-7, -100.3 ± 2.0‰), Indian Human Hair (USGS43, -50.3 ± 2.8‰), Tibetan Human Hair (USGS42, -78.5 ± 2.3‰) を用いた。これらの結果より、ダブルアンカー法を用いて算出した。ダブルアンカー法の決定係数は、R<sup>2</sup>=1.00 となった。

なお、本研究における  $\delta D$  は、若干のメモリー効果が見られた。分析の際の待ち時間を長くしても改善されず、最終的には、測定は 5 回測定するが、最初の 2 回はデータが安定するまでの期間だとし棄却することで安定した分析方法となった。

また、熱分解炉内部のグラッシーカーボンはサンプル量で 20mg 程度で  $\delta D$  は不安定になるため、頻繁に新たなグラッシーカーボンに交換する必要があることがわかった。

## (2) LC/IRMS による農薬中の炭素安定同位体比の測定結果

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。アセタミプリド測定時のクロマトグラムを図 7 に示した。

5 種の農薬の  $\delta^{13}C$  の結果は、 $-41.0\%$  (オキサミル)  $\sim -28.7\%$  (グリホサート) となった。また、標準偏差 (1SD) は平均、最小、最大、それぞれ  $0.1\%$ 、 $0.1\%$ 、 $0.2\%$  となった (表 4)。通常、LC/IRMS の標準偏差 (1SD) は  $\delta^{13}C$  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。

国際標準としては  $\delta^{13}C$  の値が決まった Caffeine (IAEA-600,  $-27.771 \pm 0.043\%$ )、Graphite (USGS24,  $-16.049 \pm 0.035\%$ )、Cellulose (IAEA-CH-3,  $-24.724 \pm 0.041\%$ ) 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および LC/IRMS にて測定可能ないくつかのワーキングスタンダードを測定した。次に、ダブルアンカー法を用いて、それらすべてのサンプルの値を決めた。最後に、それら値の決まった

LC/IRMS ワーキングスタンダードを基準として、未知サンプルの結果を算出した。なお、ダブルアンカー法の決定係数は、 $R^2=1.00$  となった。

現在までのところ LC/IRMS において国際標準物質から未知サンプルの値の決まった算出方法がない。そのため、今後はより正確な値決め手法を他の研究者などと相談して決める必要がある。

## (3) EA/IRMS と LC/IRMS との比較

5 種の農薬の  $\delta^{13}C$  の結果は、 $-38.6\%$  (オキサミル)  $\sim -27.1\%$  (グリホサート) となった。また、標準偏差 (1SD) は平均、最小、最大、それぞれ  $0.2\%$ 、 $0.1\%$ 、 $0.4\%$  となった (表 5)。

LC/IRMS と EA/IRMS を比較した図を図 8 に示した。この結果より、傾きは 1.08、切片は 0.74、決定係数は 0.98 となり、EA とほぼ同じ結果であったものの、一部の農薬は 1~3% 程度、LC/IRMS の方が軽い値であることがわかった。原因として、成分に含まれる窒素が、湿式燃焼の際に  $N_2O$  が生成されるために EA と異なる値になることが疑われている。今回の農薬においても、窒素が全体の量に比して多い農薬の場合 (例えば、アセタミプリドは EA/IRMS と LC/IRMS の差が最も大きく、 $3.2\%$ )、そのようなことが起きている可能性が示唆された (原因についてさらに調査し、それらは後述する)。

(4) LC/IRMS による農薬中の炭素安定同位体比の測定について、いくつかの項目を検討した。以下に示す。

- 感度を高めるために、湿式酸化の燃焼温度を

90°C から 100°C にて実験した。対象物質は、アミノ酸やカフェインであるアラニン（SI Science 社製）、ヒスチジン（SI Science 社製）、グリシン（和光純薬工業社製）、ロイシン（和光純薬工業社製）、バリン（和光純薬工業社製）、カフェイン（和光純薬工業社製）を用いて実験した。

その結果、同位体比は温度を上昇させたとしても、その差は 0.5%以内となり、また標準偏差も全く変わらなかった。そのため、温度の変化は、同位体比にほぼ関係ないことがわかった。また、ピークエリアは 1% ~ 12% 程度、上昇したものの、燃焼温度は感度上昇のためには、大きな効果はないことがわかった。

- 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、実際に本当にそれら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（ニラコ社製）を入れ、650°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/IMS 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、ほぼ同一の結果になった。また、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を用いて  $CO_2$  の流れ

を止めて、窒素のピークを検出ようと試みたが、IRMS にてピークは検出されなかった。このため、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。

- 測定を繰り返しているとピークに大きなノイズが生じた。ベースラインに大きくノイズが生じるため、装置は使えない状況になってしまうなど問題が発生した（図 9 参照）。

試行錯誤した結果、湿式酸化した後の冷却が空冷であるために、液体中の温度が下がっておらず、その結果、ナフィオンの効果が下がりがり、IRMS に水分が導入されてしまっていることが疑われた。そこで、空冷式の冷却から、水冷式に変更し、数°C 付近まで下げることで、このような大きなノイズ発生を抑えることが出来た。

## D . 結論

TCEA/IRMSを用いて11種類の農薬の $\delta D$ の高精度・高確度分析が可能になった。ただし、メモリー効果があるため、安定した分析のためには、測定は5回行うが、最初の2回はデータ棄却する必要があることがわかった。また、熱分解炉内部のグラッシーカーボンには、サンプル量で20mg程度で $\delta D$ は不安定になるため、頻繁に新たなグラッシーカーボンに交換する必要があることがわかった。

LC/IRMSを用いて5種の農薬類の $\delta^{13}C$ の高精度分析が可能になった。LC/IRMSとEA/IRMSを比較したところ、ほぼ同じ結果であったものの、一部の農薬は1~3%程度、LC/IRMSの方が軽い値であることがわかった。原因はいくつか検討したものの不明であった。また、測定を繰り返すことで、ピークに大きなノイズが生じた。試行錯誤した結果、空冷式の冷却から、水冷式に変更し、数°C付近まで下げることで、このような大きなノイズ発生を抑えることが出来た。

上記の技術を用いることで、今後、犯罪などで使われる農薬混入事件等の解決を進めていきたい。

## 参考文献

- 1) 厚生労働省, 2013, 平成 24 年度輸入食品監視指導計画に基づく監視指導結果
- 2) 厚生労働省, 2006, 食品に残留する農薬等に関する新しい制度(ポジティブリスト制度)について
- 3) 金子毅, 2010, 中国製冷凍餃子からの毒性物質の検出(犯罪捜査における化学鑑定役割), 日本法中毒学会, vol. 29, pp. 26-27
- 4) Krummen, M, Hilker, A.W, Juchelka, D, Duhr, A., Schlüter, H.-J, Pesch, R., 2004, A new concept for isotope ratio monitoring

liquid chromatography/mass spectrometry, Rapid Communications in Mass Spectrometry, vol. 18, pp. 2260-2266

- 5) Morrison, D.J., Taylor, K., Preston, T., 2010, Strong anion-exchange liquid chromatography coupled with isotope ratio mass spectrometry using a Lquiface interface, Rapid Communications in Mass Spectrometry, vol. 24, pp. 1755-1762

## E . 健康危険情報

なし

## F . 研究発表

### 1. 論文発表

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

### 2. 学会発表

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

## G . 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



図 1. TCEA/IRMS の写真

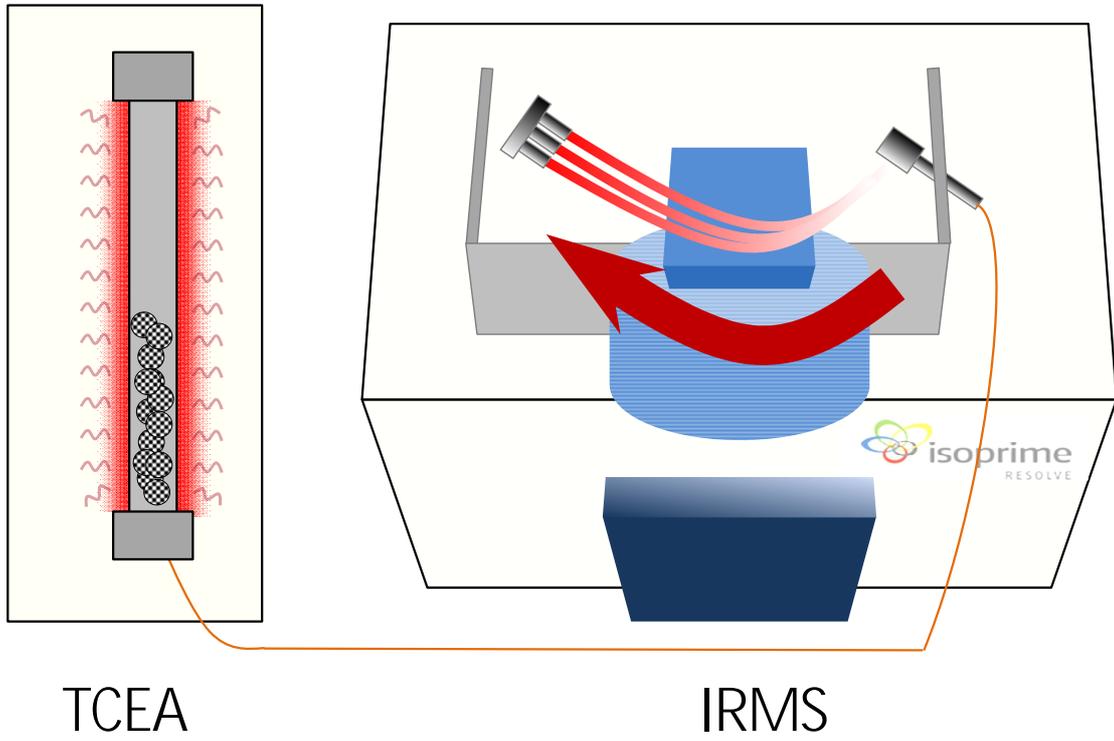


図 2. TCEA/IRMS の流路図

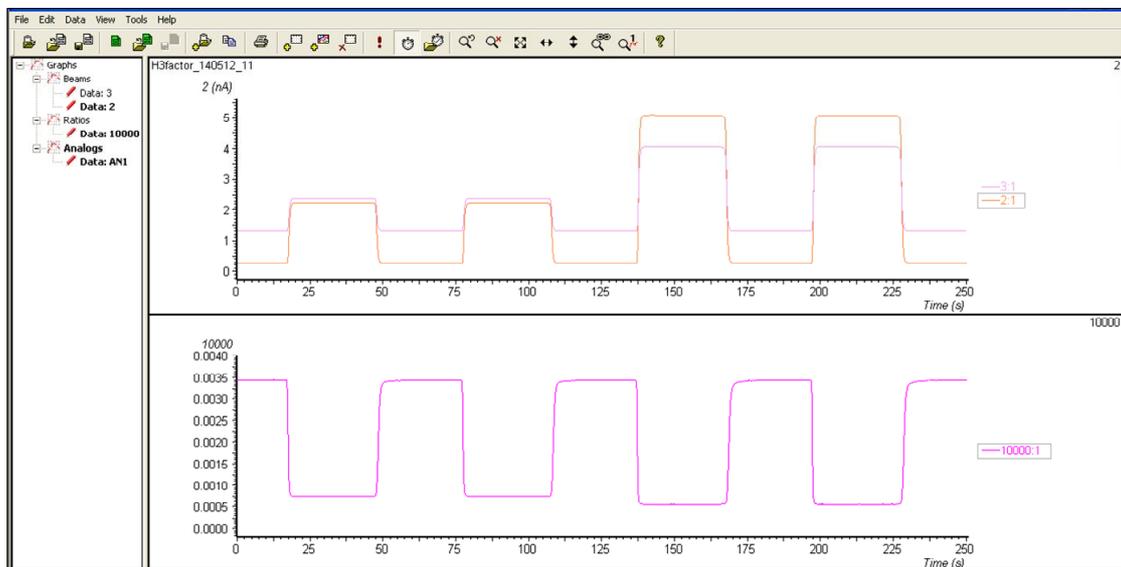
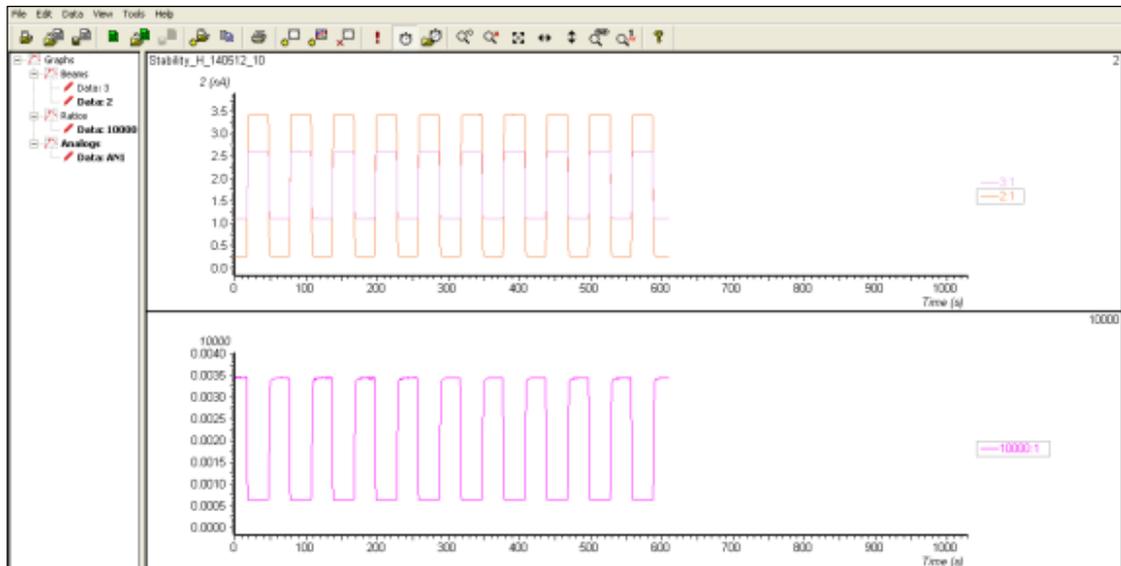


図 3. Stability テスト (上), H3+ファクターの結果について (下)



図 4. LC/IRMS の写真

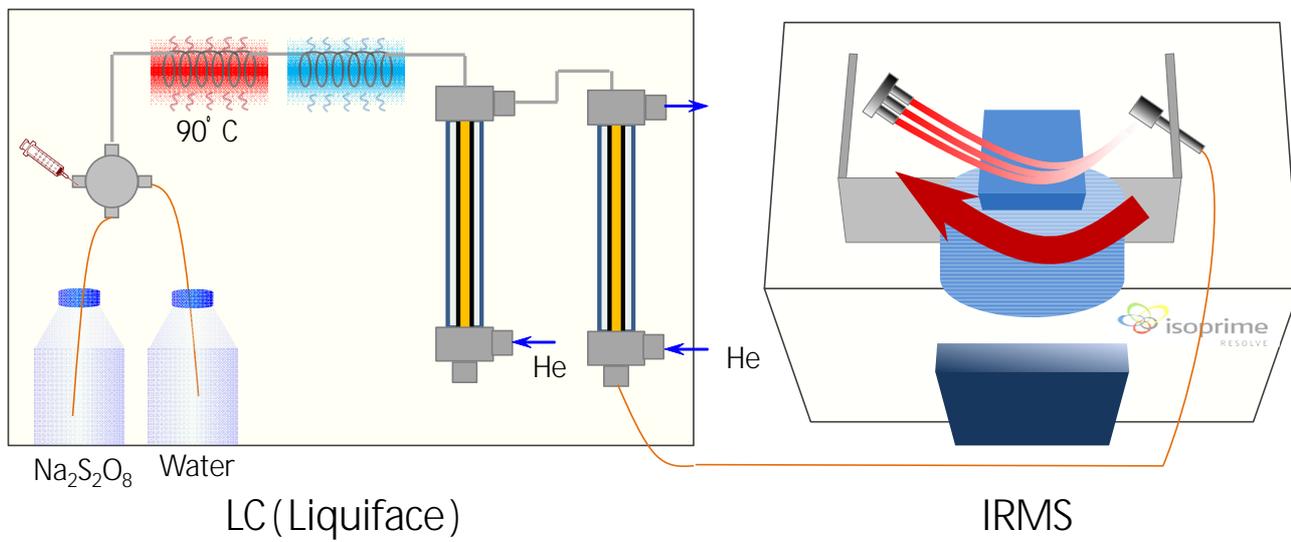


図 5. LC/IRMS の流路図

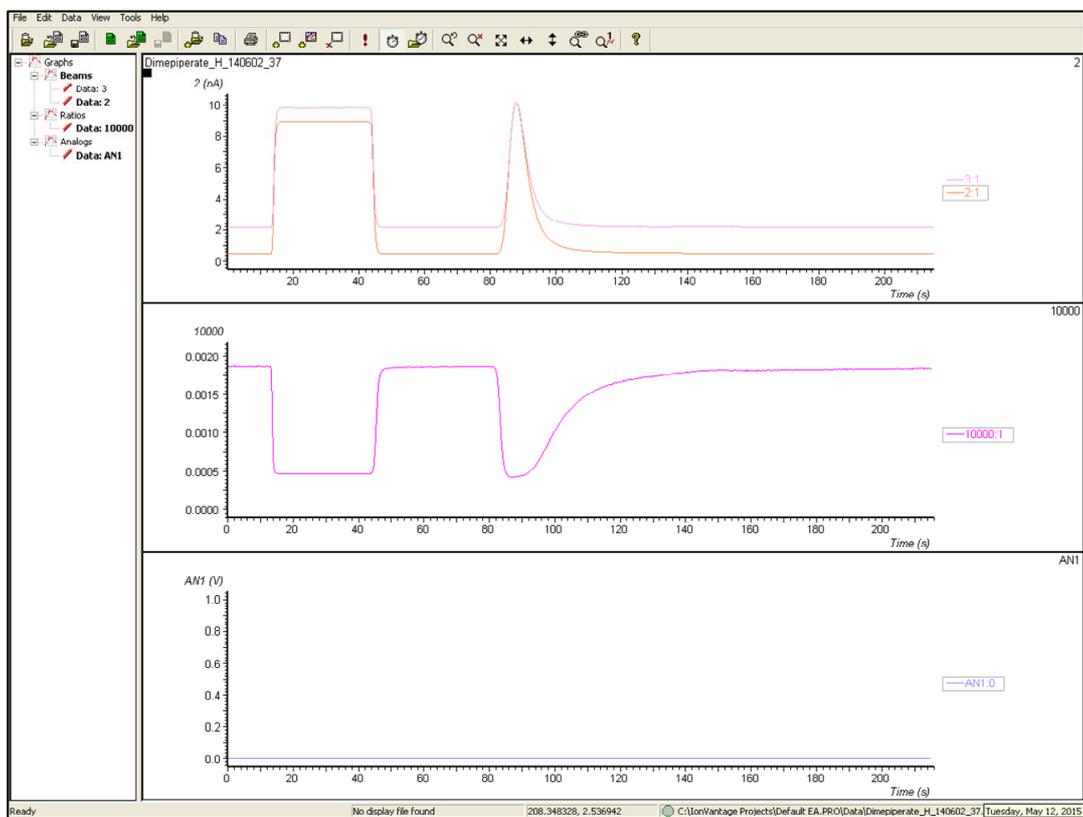


図 6. TCEA/IRMS のクロマト (ジメピペレート)

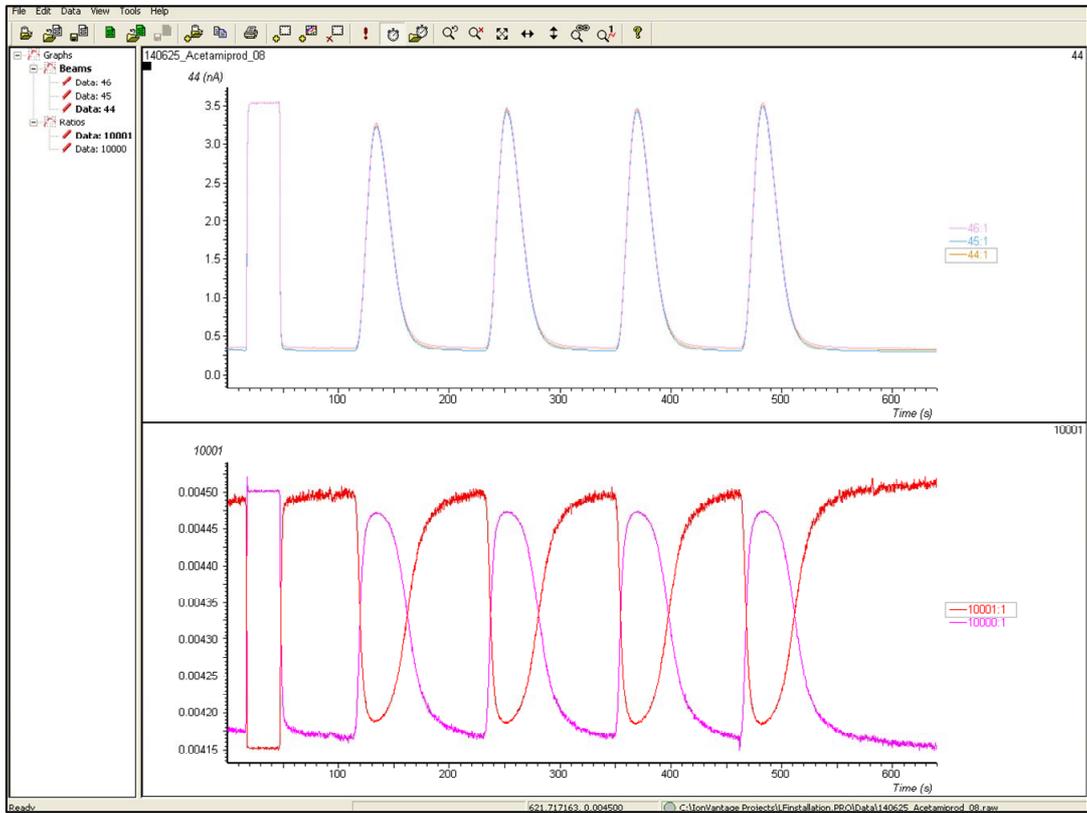


図 7. LC/IRMS のクロマト (アセタミプリド)

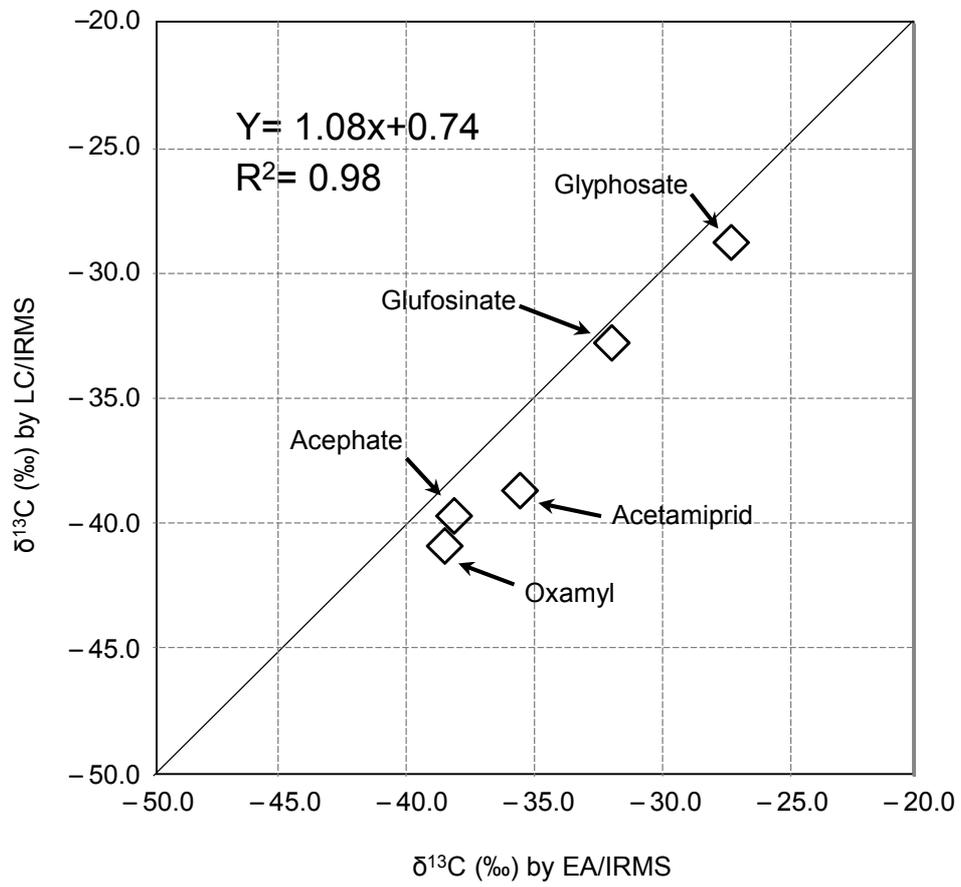


図 8. LC/IRMS と EA/IRMS の比較

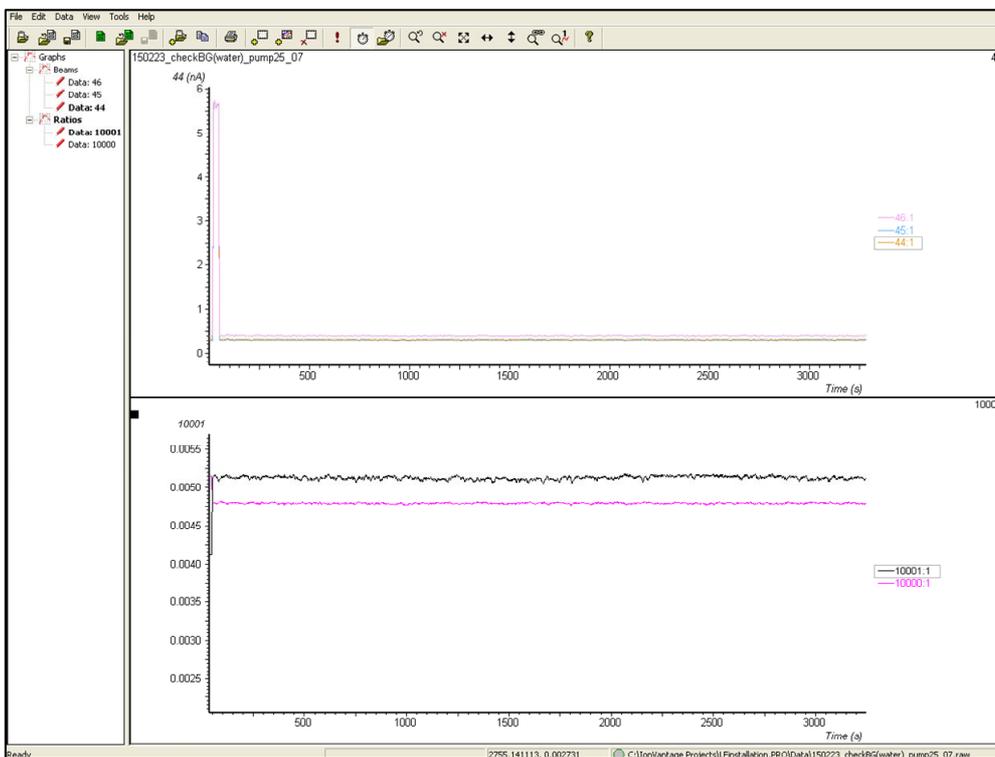
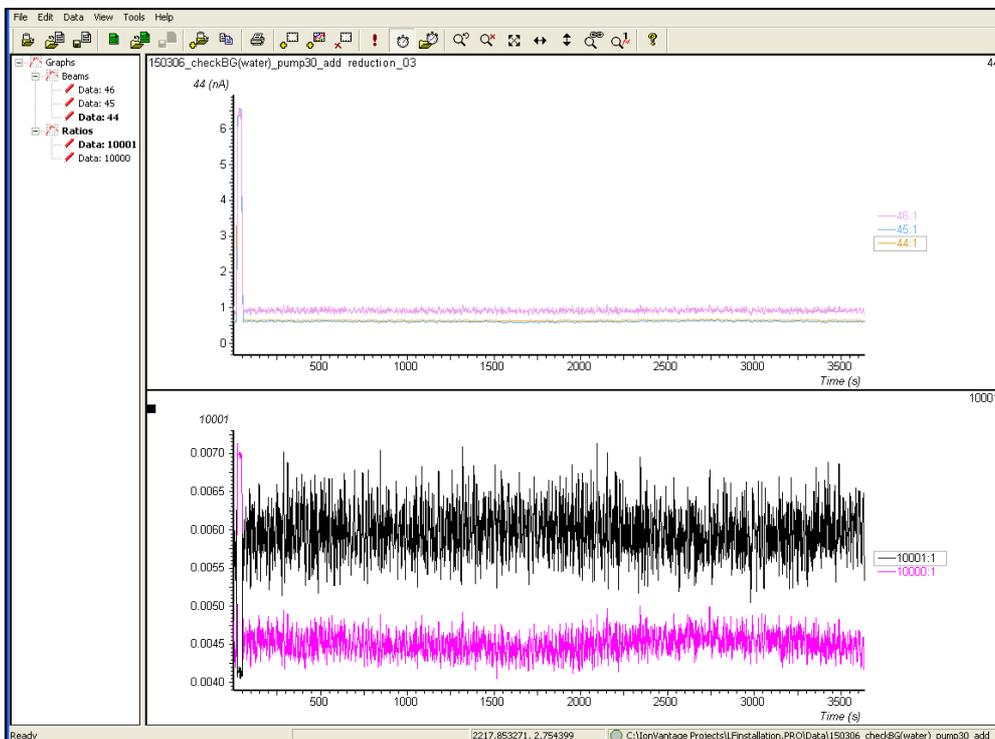


図 9. 不安定なベースライン (上), 冷却後のベースライン (下)

表 1. TCEA/IRMS の測定対象農薬一覧（農薬要覧，2013）

試薬名	分子式	分子量	種類	詳細
ジメピペレート	$C_{15}H_{21}NOS$	263.40	除草	チオカーバメート系
BPMC(フェノブカルブ)	$C_{12}H_{17}NO_2$	207.27	殺虫	カーバメート系
ピリブチカルブ	$C_{18}H_{22}N_2O_2S$	330.44	除草	カーバメート系
シハ口ホップブチル	$C_{20}H_{20}FNO_4$	357.38	除草	フェノキシ酸系
カフェンストロール	$C_{16}H_{22}N_4O_3S$	350.44	除草	トリアゾール系
トリフルラリン	$C_{13}H_{16}F_3N_3O_4$	335.28	除草	ジニトロアニリン系
プロベナゾール	$C_{10}H_9NO_3S$	223.25	殺菌	その他の合成
ピリダフェンチオン	$C_{14}H_{17}N_2O_4PS$	340.34	殺虫	有機リン系
ジメトエート	$C_5H_{12}NO_3PS_2$	229.26	殺虫	有機リン系
ピラゾキシフェン	$C_{20}H_{16}Cl_3N_2O_3$	438.70	除草	ダイアゾール系
クロルピリホスメチル	$C_7H_7Cl_3NO_3PS$	322.53	殺虫	有機リン系

表 2. LC/IRMS の測定対象農薬一覧（農薬要覧，2013）

試薬名	分子式	分子量	種類	詳細
アセタミプリド	$C_{10}H_{11}ClN_4$	222.68	殺虫	ネオニコチノイド系
グリホシネート	$C_5H_{15}N_2O_4P$	198.20	除草	アミノ酸系
オキサミル	$C_7H_{13}N_3O_3S$	219.30	殺虫	カーバメート系
アセフェート	$C_4H_{10}NO_3PS$	183.20	殺虫	有機リン系
グリホサート	$C_3H_8NO_5P$	169.10	除草	アミノ酸系

表 3. 12 種類の農薬類の  $\delta D$  (‰)

試薬名	分子式	$\delta D$ (‰)	S.D. (‰)
ジメピペレート	$C_{15}H_{21}NOS$	-203.5	1.7
BPMC (フェノブカルブ)	$C_{12}H_{17}NO_2$	-92.7	0.7
ピリプチカルブ	$C_{18}H_{22}N_2O_2S$	-84.8	2.3
シハロホップブチル	$C_{20}H_{20}FNO_4$	-82.5	0.6
カフェンストロール	$C_{16}H_{22}N_4O_3S$	-137.1	1.1
トリフルラリン	$C_{13}H_{16}F_3N_3O_4$	-191.2	1.2
プロベナゾール	$C_{10}H_9NO_3S$	-40.0	0.5
ピリダフェンチオン	$C_{14}H_{17}N_2O_4PS$	-122.1	1.1
ジメトエート	$C_5H_{12}NO_3PS_2$	-142.0	0.2
ピラゾキシフェン	$C_{20}H_{16}Cl_3N_2O_3$	-14.9	1.0
クロルピリホスメチル	$C_7H_7Cl_3NO_3PS$	-156.8	3.8

表 4. LC/IRMS による 5 種類の農薬類の  $\delta^{13}\text{C}$  (‰)

試薬名	分子式	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	S.D. (‰)
アセタミプリド	$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{ClN}_4$	-38.7	0.10
グリホシネート	$\text{C}_5\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_4\text{P}$	-32.8	0.07
オキサミル	$\text{C}_7\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$	-41.0	0.08
アセフェート	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{NO}_3\text{PS}$	-39.7	0.21
グリホサート	$\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$	-28.7	0.11

表 5. EA/IRMS による 5 種類の農薬類の  $\delta^{13}\text{C}$  (‰)

試薬名	分子式	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	S.D. (‰)
アセタミプリド	$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{ClN}_4$	-35.5	0.3
グリホシネート	$\text{C}_5\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_4\text{P}$	-31.9	0.3
オキサミル	$\text{C}_7\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$	-38.6	0.1
アセフェート	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{NO}_3\text{PS}$	-38.1	0.2
グリホサート	$\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$	-27.1	0.4

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hiroto Kawas hima	The measurement of st able carbon isotope rat ios of eight methamido phos samples	Journal of F orensics Scie nce	in press		2015