

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25年度～26年度 総合研究報告書

研究代表者 川島 洋人

平成27(2015)年 3月

## 目 次

### I. 総合研究報告

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。さらに，2013 年 12 月 29 日には，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から有機リン系殺虫剤の農薬マラチオンが検出される事件が勃発した。会社の給与や待遇の悪さを理由に農薬を混入させたと報道もあり，2008 年に起きた中国産冷凍餃子事件と酷似していることがわかった。

近年，元素分析計（熱分解），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（TCEA）/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。

そこで本研究では，25 年度においては，GC/IRMS を用いて農薬中の炭素安定同位体比（ $\delta^{13}\text{C}$ ）の測定を行った。また，分解性の高い農薬にも対応できるようにクライオオフィーカシング技術を融合させ，異なる農薬を混合させてひとつのピークとして検出させる試験を行った。さらに，上記で示した農薬混入事件で使用されたと考えられるマロン乳剤の異同識別を行った。26 年度においては，TCEA/IRMS を用いて農薬中の水素安定同位体比（ $\delta\text{D}$ ）の測定及び，LC/IRMS を用いた農薬中の  $\delta^{13}\text{C}$  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。

25年度においては、各種分析法（GC/C/IRMS オンカラム測定，GC/C/IRMS クライオフォーシング測定）において高精度分析方法を確立することができた。また、分解性の高い農薬にも対応できるよう、クライオフォーシング技術を用いて分解したものをすべて一つにトラップして検出することが可能となった。実環境では微生物分解や化学反応を伴う分解で大きな同位体分別が生じる可能性があるため、その場合にクライオ技術は有効な手法になる可能性が高いと考えられる。2013年12月29日に起きたアクリフーズ群馬工場でのマラチオン混入事件においては、市販されているマラソン乳剤は、有効成分マラチオンの原体が同じ場合でも、一緒に含まれている有機溶剤の $\delta^{13}\text{C}$ から商品の異同識別が可能だと示された。

26年度においては、TCEA/IRMSを用いて11種類の農薬の $\delta\text{D}$ 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回を行うが、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は、サンプル量で20mg程度で $\delta\text{D}$ は不安定になるため、頻り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 $\delta^{13}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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。

これらの本研究で得た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。

2013 年 12 月 29 日にアクリフーズ群馬工場で製造された冷凍食品のコロケやピザから有機リン系殺虫剤の農薬マラチオンが検出される事件が勃発した。コロケの衣からは 2 万 6 千 ppm という高濃度のマラチオンが検出された<sup>4)</sup>。群馬県警は、何者かによる意図的な農薬混入の可能性を視野に入れて捜査を続けていたが、2014 年 1 月 25 日に偽計業務妨害容疑で群馬工場の契約社員を逮捕した (事件の経緯を表 1 に示した)。会社の給与や待遇の悪さを理由に農薬を混入させており、2008 年に起きた中国産冷凍餃子事件と酷似していることがわかった。これらは簡単に入手可能な農薬を使った意図的な食品テロである。今回の事件で使用されたと考えられるマラソン乳剤 (マラチオン 50%含有) は、殺虫剤として広く流通しているもので、事件で使用された乳剤の異同識別を行うことは非常に重要な意味を持つ。今後、農薬混入の具体的な手法や場所等が明らかになると思われる。このような問題は国内外を問わず起こり、国家間の問題にもなりかねない。更に農薬類はテロリストでも入手が容易なため、確実な対応策や、管理体制が必要となってくると考えられる。

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>5)</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>6)</sup>、本研究ではこの装置を使用した。

そこで本研究では、25 年度において、GC/IRMS を用いて農薬中の炭素安定同位体比 ( $\delta^{13}\text{C}$ ) の測定を行った。また、分解性の高い農薬にも対応できるようにクライオフィーカシング技術を融合させ、異なる農薬を混合させてひとつのピークとして検出させる試験を行った。さらに、上記で示した農薬混入事件で使用されたと考えられるマラソン乳剤の異同識別を行った。26 年度において、TCEA/IRMS を用いた農薬中の水素安定同位体比 ( $\delta\text{D}$ ) の測定及び、LC/IRMS を用いた農薬中の ( $\delta^{13}\text{C}$ ) 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) GC/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、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 12 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, 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, クロルピリホスメチル, フサライド, DBN, TPN) を選定した (表 2)。

ガスクロマトグラフ (GC, Agilent 社製, 7890N) と燃焼炉 (Combustion, IsoPrime 社製, GC5 Mk1), 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。また農薬類は分解しやすく, GC/C/IRMS オンカラムのみの測定では困難である。そこで, GC/C/IRMS にクライオフィーカシング装置 (Brecht Buhler 社製, Cold Trap 9000) を接続したものをを用いて測定を行った (図 1)。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  $\text{CO}_2$  となる。 $\text{CO}_2$  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,  $\delta^{13}\text{C}$  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ィーカシングした。

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,  $R_{\text{sample}}$  と  $R_{\text{standard}}$  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,  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}=0.011180$ ), 水素の場合は標準平均海水 (Standard Mean Ocean Waters, SMOW,  $\text{D}/\text{H}=0.00015576$ ) に対する千分率 (‰) で表せられる。

(2) マラソン乳剤の異同識別の研究

マラソン乳剤については, 入手可能な乳剤 7 種類 9 商品を選定した (表 3)。これらは国内で流通しているマラソン乳剤の約 97% を占める (表 4)。1 と 2 は登録番号が同じだが, 容量が違うもの。4 と 5 は同一の商品であるが, ロット番号の違いを見るために用意した。マラソン

乳剤の原体は平成 18 年までは国内で原体生産が行われていたが、それ以降はすべて住友化学がデンマークのケミノバ社から輸入して、国内に流通させている。なお、すべてのマラソン乳剤は原体をマラチオン、有機溶剤としてキシレン、エチルベンゼンを混合させて販売している。

分析は(1)と同様のGC/IRMSにて実施した。

### (3) 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, シハ口ホップブチル, 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 2)。

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 2, 3 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、パッキンカラムを 100°C、ヘリウムキャリアーガス流量を 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、 $H_3^+$ Factor のチェックを行った(10 以下になれば問題なし)(図 4 参照)。サンプルは、水素量で数  $\mu\text{g}$  ~ 数十  $\mu\text{g}$  を銀カップに詰める。測定は 3 回ずつ行った。

### (4) 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 5)。

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 5, 6 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,  $Na_2S_2O_8$ ), 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 と GC/C/IRMS の検証

12種の農薬試薬をGC/C/IRMS オンカラム法、クライオ法にて測定を行った。濃度ごとのEA/IRMS とGC/C/IRMS を図 7 に示した。オンカラム測定 500ppm, 1000ppm では平均標準偏差それぞれ 0.2%, 0.1%と高精度で分析することができた。また、EA/IRMS の結果に近い値で測定できており、決定係数がそれぞれ 0.86, 0.94 となった。オンカラム測定法で農薬を測定した

事例は世界的にもほとんどなく、初めての結果である。しかし、濃度が薄い100ppmでは、精度のよい分析は不可能であることがわかった。

### (2) クライオフォーカスシステムの導入

燃焼後にCO<sub>2</sub>になった農薬類を液体窒素にてフォーカスする技術(クライオフォーカス)を用いた。その結果、テーリングしているクロマトグラムのピーク形状を大幅に改善すること(例として図8上)、ピークが二つに分かれてしまったものすべてをトラップすること(図8下)ができた。

クライオ測定 100ppm では平均標準偏差が0.7‰、500ppmでは0.3‰と500ppmでは高精度に分析することができた。また、EA/IRMSで測定した $\delta^{13}\text{C}$ とそれぞれ比較すると、100ppmでは決定係数が0.43、500ppmでは0.87となり、500ppmになるとEA/IRMSの結果に近づき高精度に測定できた(図9)。オンカラム測定とクライオフォーカス測定では結果はほとんど同じであったが、物質によってクライオフォーカス測定のほうが有効であることがわかった。

### (3) クライオフォーカシング技術の応用

二種類の農薬 1000ppm を以下のA~Dの4通りに混合させて、クライオフォーカシング技術ですべてトラップさせて、一つのピークとして検出させる実験を行った。混合液はそれぞれ1000ppmの溶液を1:1で混ぜ合わせたので、それぞれのEA/IRMSの結果から理論値を求めた。

A: トリフルラリン(-30.3‰)とクロルピリホスメチル(-36.2‰)

B: クロルピリホスメチル(-36.2‰)とTPN(-27.0‰)

C: クロルピリホスメチル(-36.2‰)とピリダフェンチオン(-25.8‰)

D: ジメピペレート(-29.6‰)とピリダフェンチオン(-25.8‰)

( )の中は理論値計算に用いたEA/IRMSの値

クロルピリホスメチルとピリダフェンチオン(パターンC)を混合させた液をオンカラムで測定した時のクロマトを図10に示した。先に、クロルピリホスメチルが検出されて、続いてピリダフェンチオンが検出されている。この混合液を一つのクロマトとして検出させるために、二つの農薬が検出される時間帯にクライオフォーカシングを320秒間行った。二つの農薬を一つのピークとして検出することができた。

例えば、クロルピリホスメチル(EA:-36.2‰)とTPN(EA:-27.0‰)を混ぜた実験の場合、理論値は-31.6‰となる。実際に測定値は-31.7‰となり、理論値とほぼ同じ値が得られた。結果は、4パターンの内2つは0.2‰以内の差となり高確度な測定が可能だった。農薬は分解性が高いものが多いため、たとえ分解したとしてもクライオフォーカス技術によってピークが一つに得られ高精度に測定することが可能であることが推察された。

### (4) 低濃度域測定に向けた検討項目

以下、低濃度測定を行うためにいくつかの項目を検討した。以下に示す。

- Turning Fileを変更することで、どの程度感度が上昇するか比較した。通常使用したTurning FileをA、感度を高くしたものをBとした。まず、同じリファレンスガス 2psi



を IRMS へ導入したところ、A のファイルでは  $3.3E-09nA$ 、B のファイルでは  $16.0E-09nA$  となり、リファレンスガスと比較したところ 4.8 倍以上のエリアが出ることを確認できた。しかし、感度が良すぎるため、ベースラインが上昇してしまう欠点があることがわかった。またベースラインが上がるため、精度も悪くなることもわかった。一概にエリアを上昇させることだけでは、感度の上昇にはつながらないということがわかった。

- クライオフォーカシング時には、ベースとして溶出される溶媒のアセトンを引き出す必要がある。そのため、低濃度域を測定するためには溶媒の量を最小限に抑えることが求められる。そこで通常使用しているアセトン以外のメタノール、アセトニトリル、ジクロロメタン、シクロヘキサン、ヘキサンの各溶媒を検討した。各溶媒のベースラインとしては、ベースが一番低いものはシクロヘキサンとヘキサンであった。12 物質のうちヘキサンに溶解しそうなフサライドとピリプチカルブ（それぞれの溶解度は  $0.00946g/L$  と  $335g/L$ ）であった。結果は、フサライドは低濃度域であるため測定出来ず、ピリプチカルブのみではワーキングスタンダードであるフサライドが測定出来ないため、校正出来ず、同位体比の算出が不可能であった。また、実際にはヘキサンでは、農薬類の溶解が困難なものが多く、ほとんどすべての農薬を溶かすことができるアセトンを使用した分析に適していることがわかった。

- クライオフォーカスする場合、試薬や溶媒であるアセトンを注入しなくても、極微小のピークが出てきてしまう。これらはヘリウム中に含まれる極微量の不純物やキャピラリーカラム内部の液相の溶出だと考えられている。そこで、ヘリウムのラインを GC に入れる前に液体窒素で冷やすことで不純物を取り除き、ピーク（ベースライン）を小さく保つ実験を行った。その結果、GC に入れる前に液体窒素でヘリウムを冷やしても、ベースの出方が大きく減少することはなかった。よって、ヘリウムのラインを冷やすことはあまり効果がないと考えられた。
- 燃焼効率を上げるため、ガスクロマトグラフに連結してある燃焼炉の furnace を  $850^{\circ}C$  から  $950^{\circ}C$  に温度を上げて試験を行った。フサライド  $1000ppm$  を  $850^{\circ}C$  で測定した場合と  $950^{\circ}C$  で測定した場合を比較すると、それぞれエリアが  $5.7E-08As$ 、 $6.4E-08As$  という結果となり、若干、エリアの上昇が見られた。また、温度を上げて同位体比に変動はなかった。エリアは 10% 程上昇したが、燃焼炉の温度を上げて、大きな効果は見込めないことが確認できた。
- 装置の構成上、酸化炉にヘリウムを若干流すことで、安定的な流量を確保している。酸化炉の排気ベントの部分をセプタムで閉じると、希釈を妨げることが可能になると考え、試験を行った。通常、酸化炉の中のヘリウムは  $1.6psi$  の圧力であるが、ガスクロの昇温が上がるとともに、圧力も上昇してガスクロの最高温度の時には  $11psi$  まで上昇すること

が確認された。ベントを開けた場合は、エリアが  $1.7E-08As$ 、ベントを閉じた場合は  $7.4E-08As$  となり、エリアが約 4.4 倍上昇することがわかった。また、酸化炉に流れているヘリウムの圧力を 0 の状態で分析を開始すると、FID と MS との圧力のバランスが崩れて、リファレンスガスを入れた後すぐにアセトンが MS に入ってきてしまう。この時もガス口の昇温とともに圧力が 10psi まで上がる現象が見られた。炉のベントを閉じるとエリアが上昇することが分かったが、ガス口の昇温と共に炉の中のヘリウムの圧力が変化してしまうため、サンプルにどの程度影響するのか、今後検討していく必要がある。

#### (5) マラソン乳剤中のマラチオンの測定結果

マラソン乳剤中に含まれるマラチオン(50%)の  $\delta^{13}C$  測定を行った。9 サンプルの  $\delta^{13}C$  は  $-30.6\text{‰}$  ~  $-29.5\text{‰}$  とほぼ 1‰ の幅に収まっており、また分析はそれぞれ 3 回測定で標準偏差 (1SD) が 0.1% 以内となり、実際に販売している乳剤において高精度に分析することが出来た(表 6)。また、商品ごとに有意な差は見られなかった。よって、マラチオンの  $\delta^{13}C$  では商品の異同識別は困難であった。実際に、問い合わせ調査を行ったところ、国内で流通しているすべてのマラソン乳剤中のマラチオン原体は住友化学がデンマークのケミノバ社から輸入しており、その後、国内の各メーカーで製剤化している。そのため、マラチオンの  $\delta^{13}C$  がほぼ同じ値になることは矛盾しない結果となった。

#### (6) 乳剤中エチルベンゼン、キシレンの結果

(5)のように乳剤に含まれている農薬有効成

分の原体が同じだった場合には商品ごとの識別は不可能になってしまう。そこで、乳剤に農薬有効成分と共に含まれている有機溶剤の  $\delta^{13}C$  を測定して、マラソン乳剤の商品識別を行うこととした。マラソン乳剤中には有効成分マラチオン 50%のほかに、エチルベンゼンとキシレンが含まれている。今回使用したカラム (Equirity-1, Supelco 社製) では m-キシレンと p-キシレンのピークを分けることができないため、このキシレンは m-キシレンと、p-キシレンの両方を指している。もし、m-キシレンと p-キシレンを綺麗に分離したい場合には光学異性体を分離することのできるキラルカラムというカラムを使用する必要がある。本研究では便宜的に、異性体の区分はせずに、キシレンと表記することにした。

乳剤中のエチルベンゼンの  $\delta^{13}C$  は  $-28.2\text{‰}$  ~  $-20.8\text{‰}$ 、キシレンの  $\delta^{13}C$  は  $-28.7$  ~  $-25.2\text{‰}$  であった(表 7, 図 11)。乳剤の種類によってエチルベンゼンやキシレンの  $\delta^{13}C$  には大きな違いがあることがわかった。それぞれ測定の前平均標準偏差は 0.2‰, 0.1‰ であり、高精度に分析することが出来た。

また、エチルベンゼントキシレンが入れている比にも注目した。1, 7 はキシレンのほうがエチルベンゼンよりも 2 倍多く入れられていた。また、6 と 8 はエチルベンゼンがキシレンよりも 1.5 倍多く入れられていて。他のサンプルについては、エチルベンゼンがキシレンよりも 2 倍以上多く入れられていた。つまり、エチルベンゼンとキシレンの比率も同位体比と共に重要な指標になりそうだと考えられた。実際に、マラチオンが混入していたミックスピザからはエチルベンゼン (6ppm)、キシレン (3ppm)

が検出されている。このような場合に、エチルベンゼンとキシレンの比率を使用すれば、混入された乳剤を絞り込むことが可能だと考えられる。

最終的には、エチルベンゼンは  $\delta^{13}\text{C}$  の値から A と B・C に分けられ、比率から B と C が分けられる。例えば A の 3.日産化学工業は乳剤の製造を住友化学に委託しているため、1.の住友化学 (500mL) と同じに分類になっており、矛盾しない結果となった。

#### (6) TCEA/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 12 に示した。

11 種の農薬の  $\delta\text{D}$  の結果は、 $-203.5\text{‰}$  (ジメピペレート)  $\sim -14.9\text{‰}$  (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  $1.3\text{‰}$ 、 $0.2\text{‰}$ 、 $3.8\text{‰}$  となり、高精度な測定であった (表 8)。

国際標準としては  $\delta\text{D}$  の値が決まった Polyethylene (IAEA-CH-7,  $-100.3 \pm 2.0\text{‰}$ )、Indian Human Hair (USGS43,  $-50.3 \pm 2.8\text{‰}$ )、Tibetan Human Hair (USGS42,  $-78.5 \pm 2.3\text{‰}$ ) 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、 $R^2=1.00$  となった。

なお、本研究における  $\delta\text{D}$  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  $\delta\text{D}$  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。

#### (7) 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 13 に示した。

5 種の農薬の  $\delta^{13}\text{C}$  の結果は、 $-41.0\text{‰}$  (オキサミル)  $\sim -28.7\text{‰}$  (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  $0.1\text{‰}$ 、 $0.1\text{‰}$ 、 $0.2\text{‰}$  となった (表 9)。通常、LC/IRMS の標準偏差 (1SD) は  $\delta^{13}\text{C}$  においては  $0.3\text{‰}$ 、EA/IRMS、GC/IRMS においては  $0.2\text{‰}$  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  $\delta^{13}\text{C}$  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。

#### (8) EA/IRMS と LC/IRMS との比較

5種の農薬の  $\delta^{13}\text{C}$  の結果は、 $-38.6\text{‰}$  (オキサミル)  $\sim -27.1\text{‰}$  (グリホサート) となった(表10)。また、標準偏差(1SD)は平均, 最小, 最大, それぞれ  $0.2\text{‰}$ ,  $0.1\text{‰}$ ,  $0.4\text{‰}$  となった。

LC/IRMS と EA/IRMS を比較した図を図14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  $\text{N}_2\text{O}$  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,  $3.2\text{‰}$ ), 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)。

(9) 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  $90^\circ\text{C}$  から  $100^\circ\text{C}$  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  $0.5\text{‰}$  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, 同位体比には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  $\text{N}_2\text{O}$  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,  $650^\circ\text{C}$  で還元するシステムを導入した。このシステムにより,  $\text{N}_2\text{O}$  は  $\text{N}_2$  に還元され,  $\text{CO}_2$  とはピークが異なるため, もし,  $\text{N}_2\text{O}$  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エリアも7%以下の違いで, 同位体比も  $0.19\text{‰}$  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 ( $\text{N}_2$ ) にして, IRMS へのキャピラリーカラムを液体窒素を用いて  $\text{CO}_2$  の流れを止めて, 窒素のピークを検出しようと試みたが, 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  $\text{N}_2\text{O}$  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 15 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、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によって、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

各種分析法（EA/IRMS、GC/C/IRMSオンカラム測定、GC/C/IRMSクライオフォーカシング測定）において高精度分析方法を確立することができた。また、分解性の高い農薬にも対応できるよう、クライオフォーカシング技術を用いて分解したものをすべて一つにトラップして検出することが可能となった。実環境では微生物分解や化学反応を伴う分解で大きな同位体分別が生じる可能性があるため、その場合にクライオ技術は有効な手法になる可能性高いと考えられる。

マラソン乳剤の測定では、有効成分マラチオンの原体が同じ場合でも、一緒に含まれている有機溶剤の $\delta^{13}\text{C}$ から商品の異同識別が可能だと示された。

TCEA/IRMSを用いて11種類の農薬の $\delta\text{D}$ 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回測定するが、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、サンプル量で20mg程度

で $\delta\text{D}$ 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 $\delta^{13}\text{C}$ 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によって、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の役割)、日本法中毒学会、vol. 29、pp. 26-27
- 4) アクリフーズ、2013、群馬工場生産品における農薬検出について
- 5) 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
- 6) Morrison, D.J., Taylor, K., Preston, T., 2010, Strong anion-exchange liquid

chromatography coupled with isotope ratio mass spectrometry using a Liquiface interface, Rapid Communications in Mass Spectrometry, vol. 24, pp. 1755-1762

3. その他  
なし

## **E . 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) 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, Montreal, pp.67-68, Canada

(2) Hiroto Kawashima (2013.6), Stable Carbon Isotope Ratio of Chinese Methamidophos using Cryo-GC/C/IRMS, Abstract of ISOTOPRS 2013, page 79, Sopot, Prand

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

## **F . 知的所有権の取得状況**

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

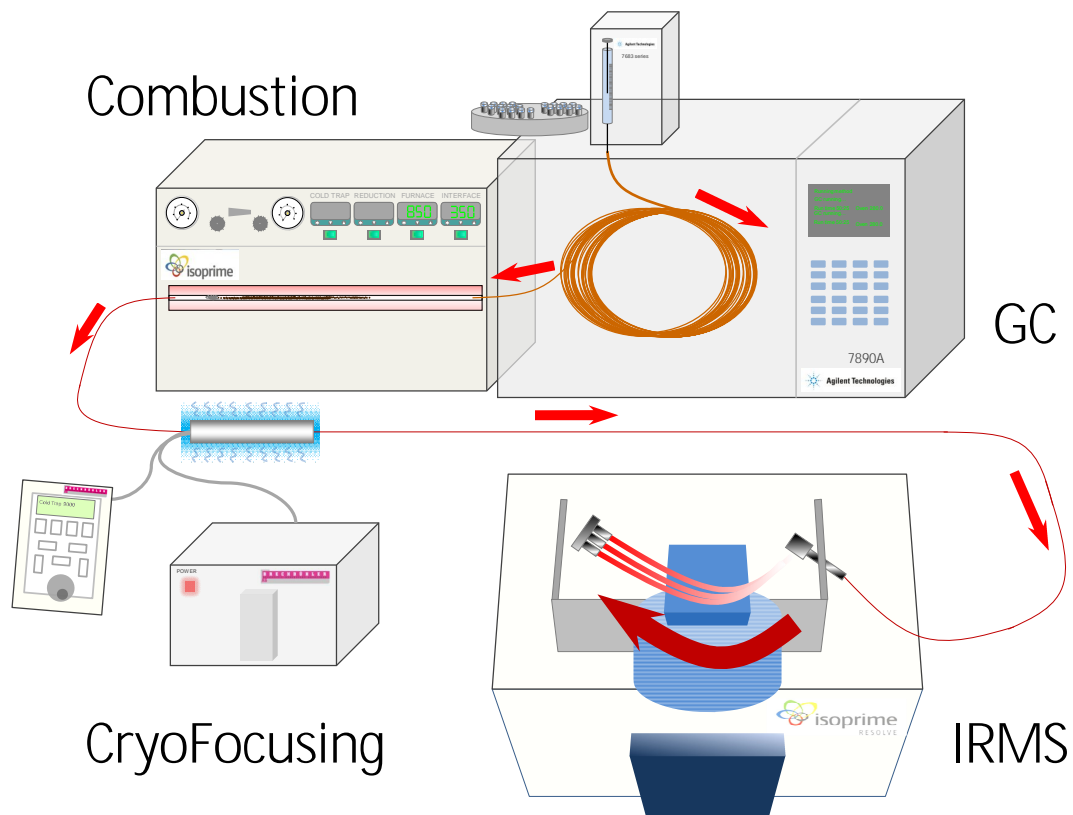


図 1. GC/IRMS 全体のフロー



図 2. TCEA/IRMS の写真



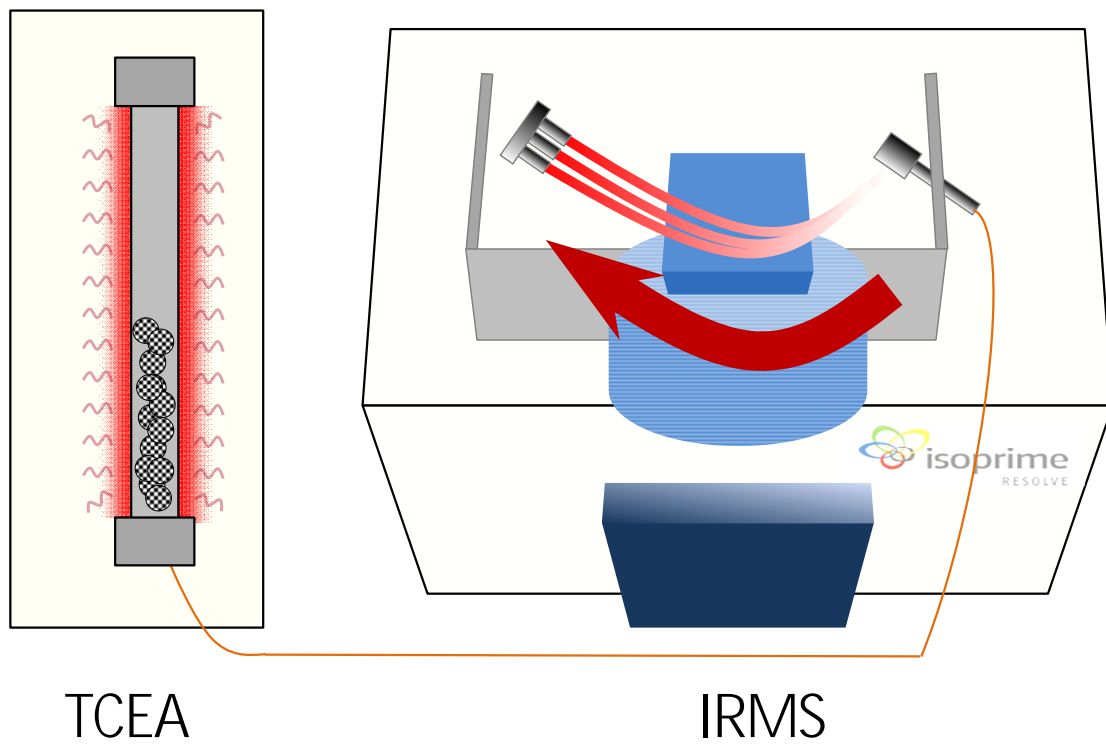


図 3. TCEA/IRMS の流路図

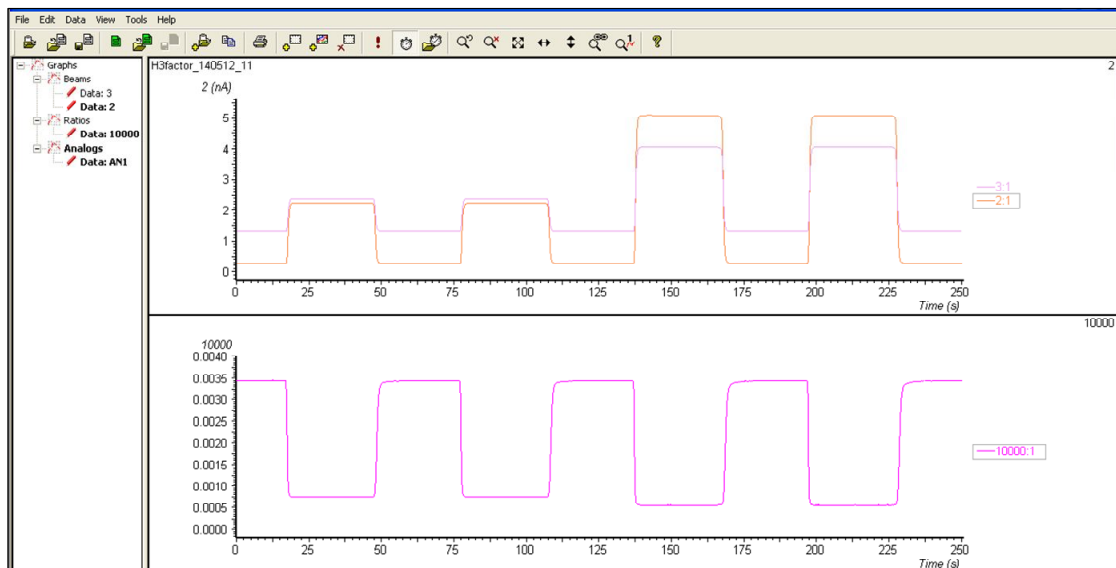
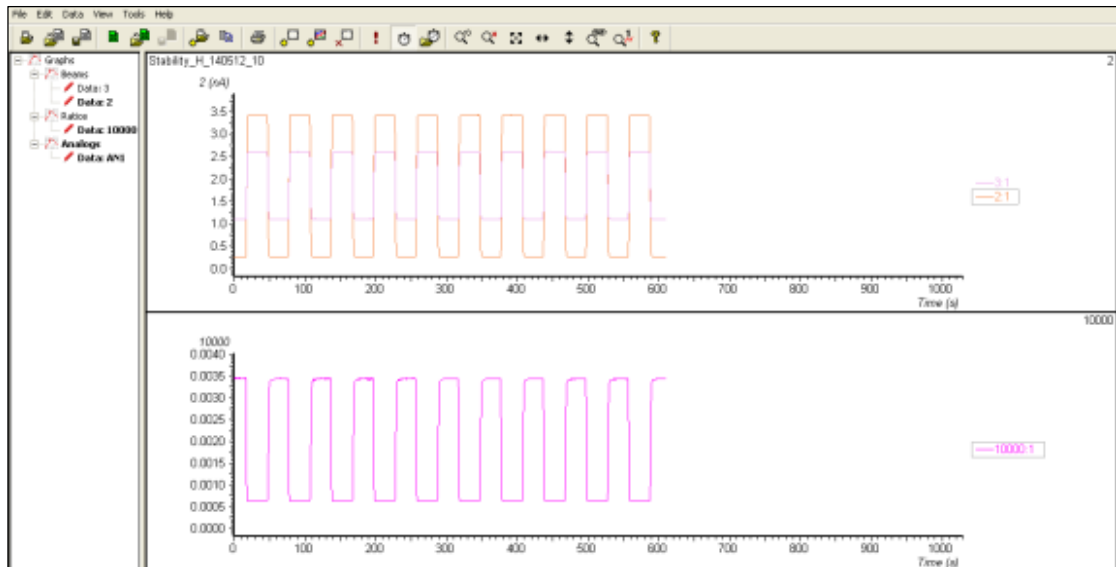


図 4. Stability テスト (上), H3+ファクターの結果について (下)



図 5. LC/IRMS の写真

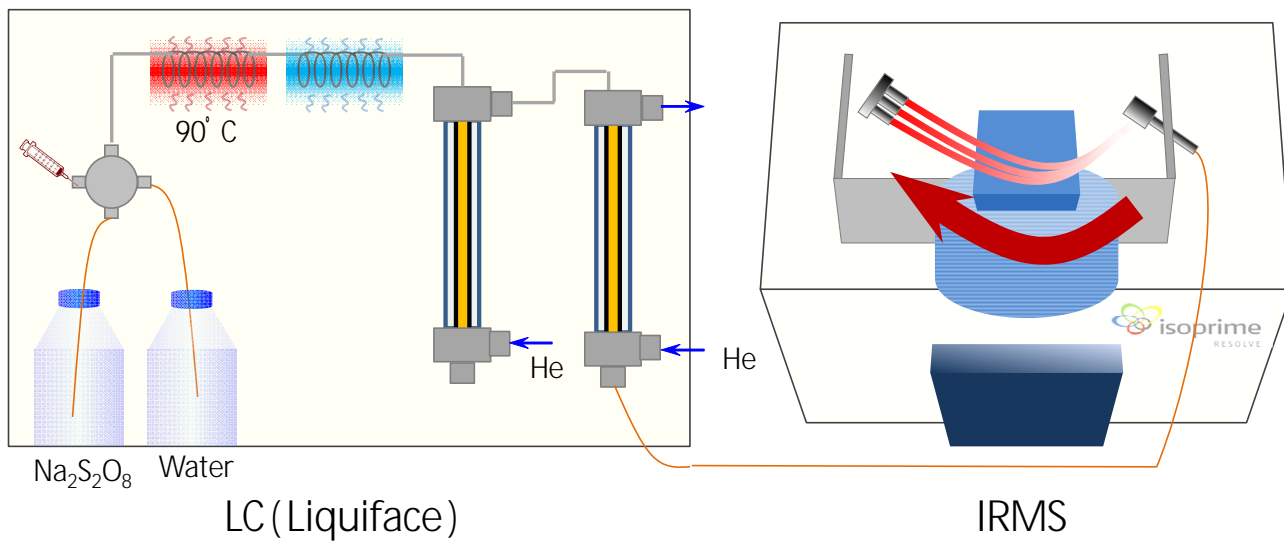


図 6. LC/IRMS の流路図

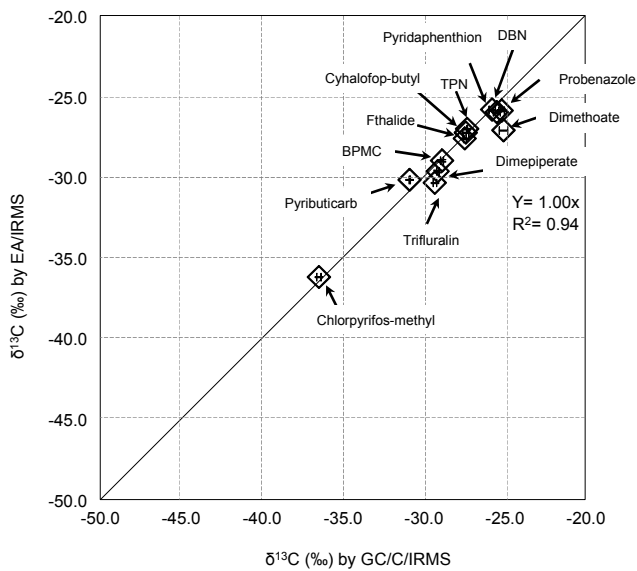
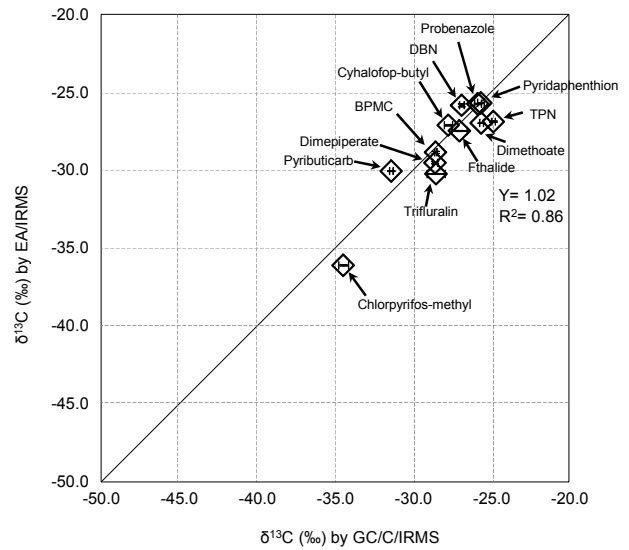
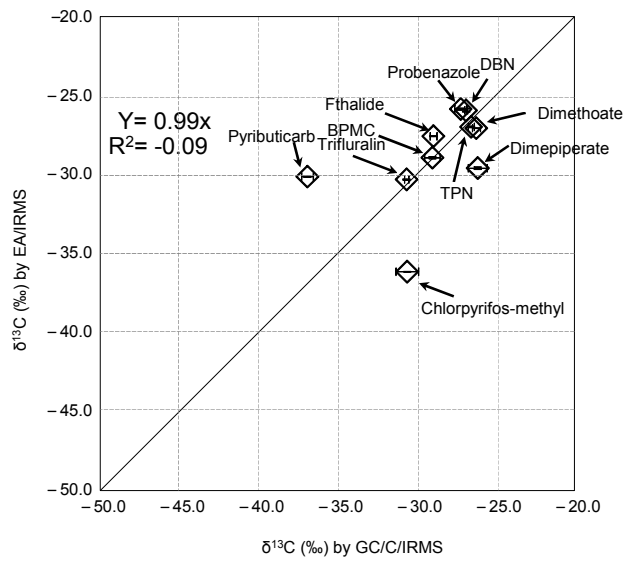


図 7. オンカラム測定結果と EA/IRMS の  $\delta^{13}\text{C}$  (左上から 100ppm , 500ppm , 1000ppm )

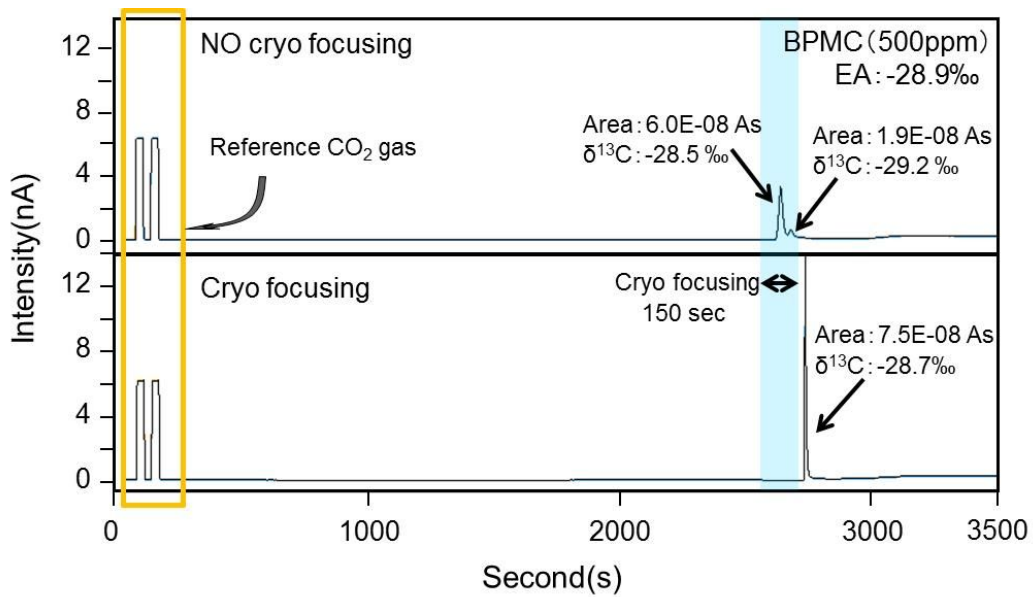
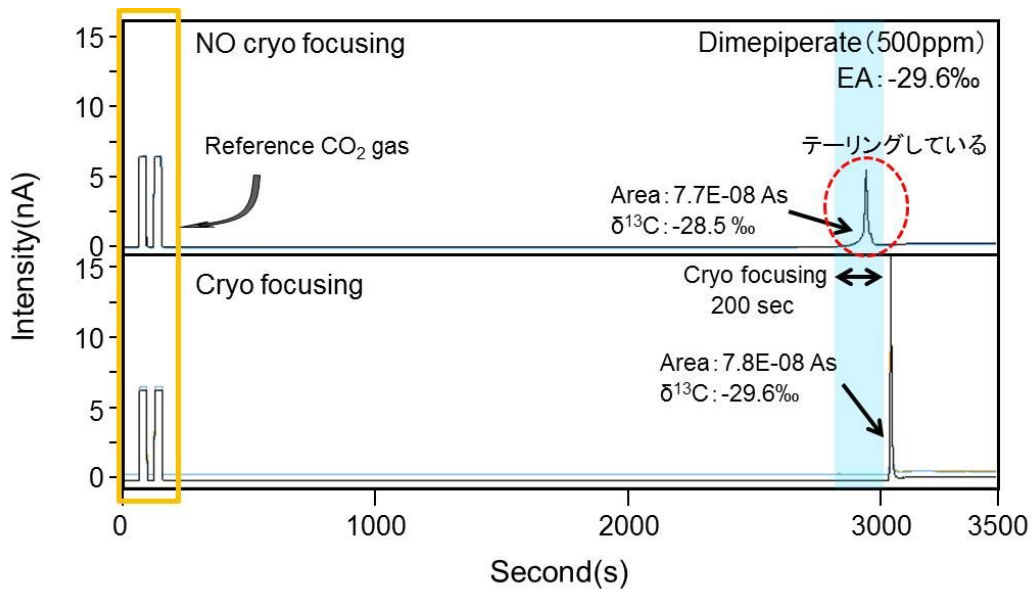


図 8. クライオフォーカシング時のクロマト

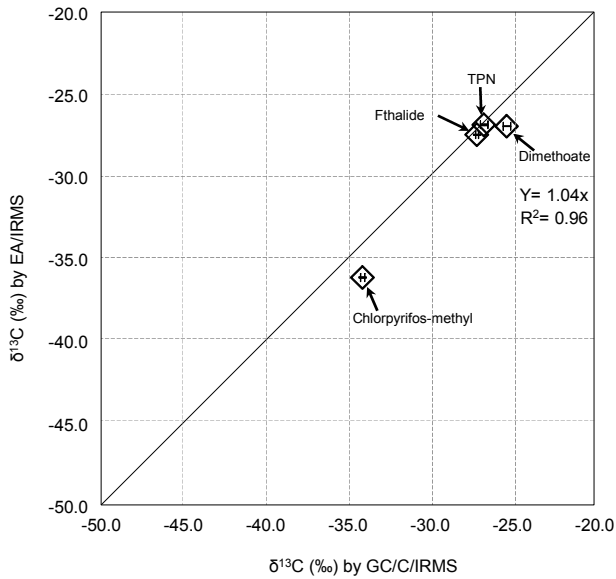
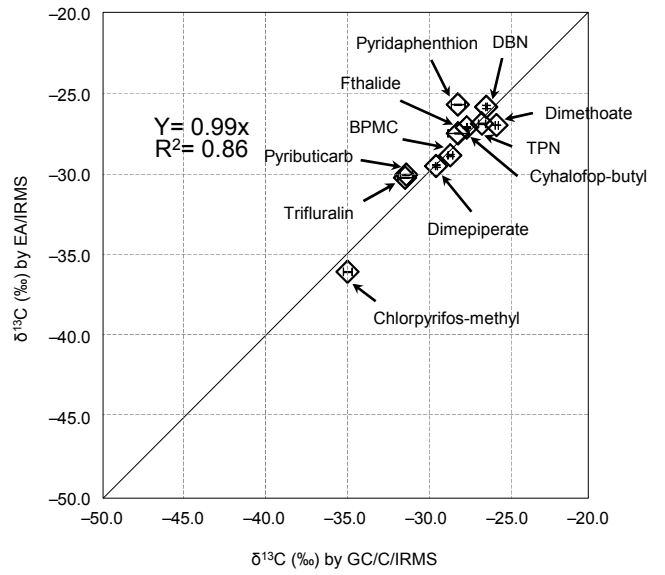
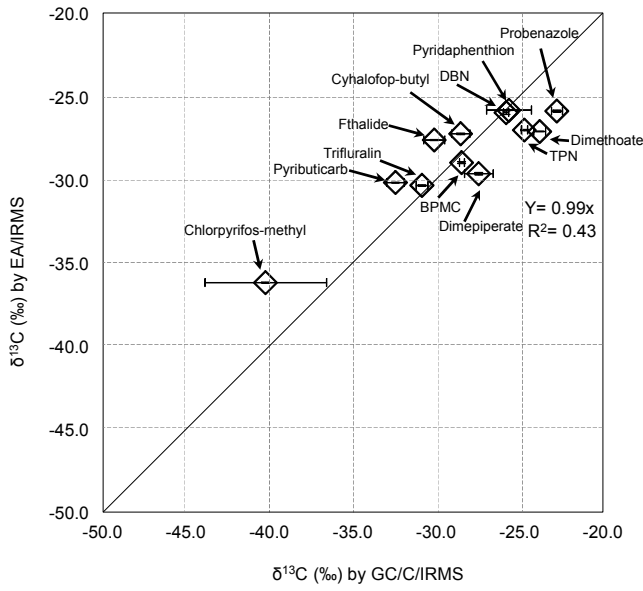


図 9. クライオ測定結果と EA/IRMS の  $\delta^{13}\text{C}$  (左上から 100ppm , 500ppm , 1000ppm )

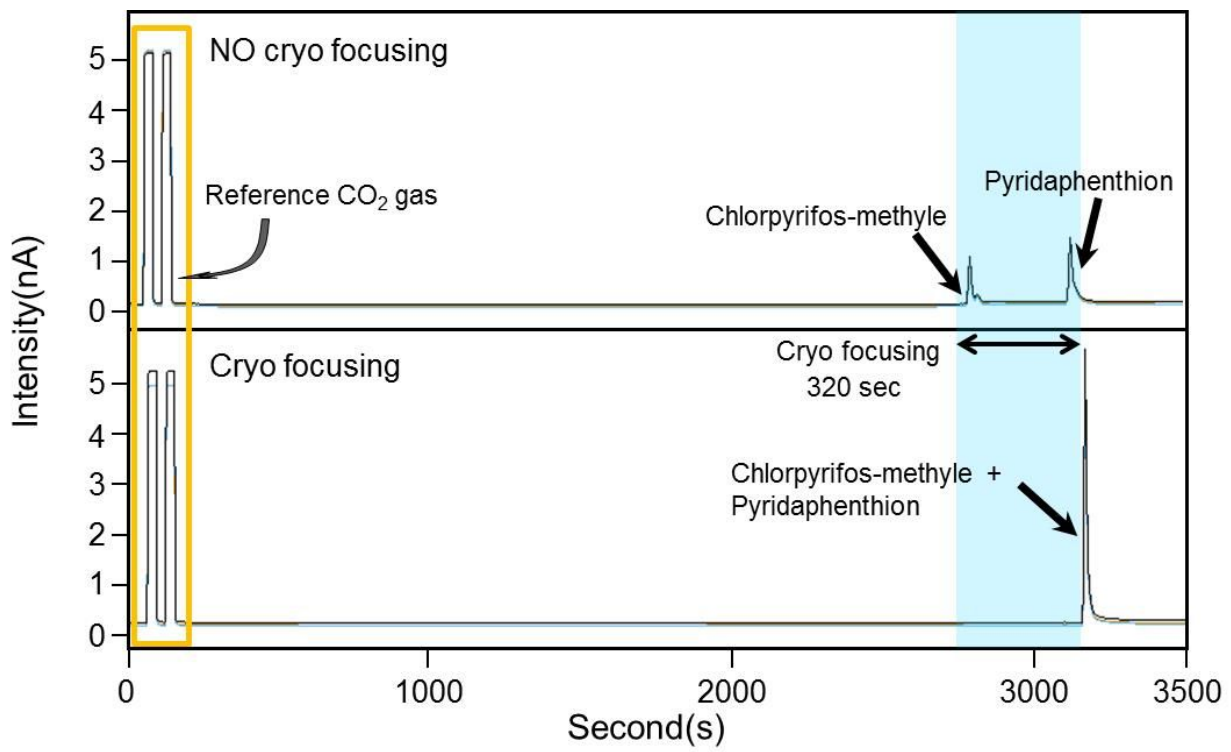


図 10. クロルピリホスメチルとピリダフェンチオンの混合液  
 (上) オンカラム測定 , (下) クライオフォーカシング測定



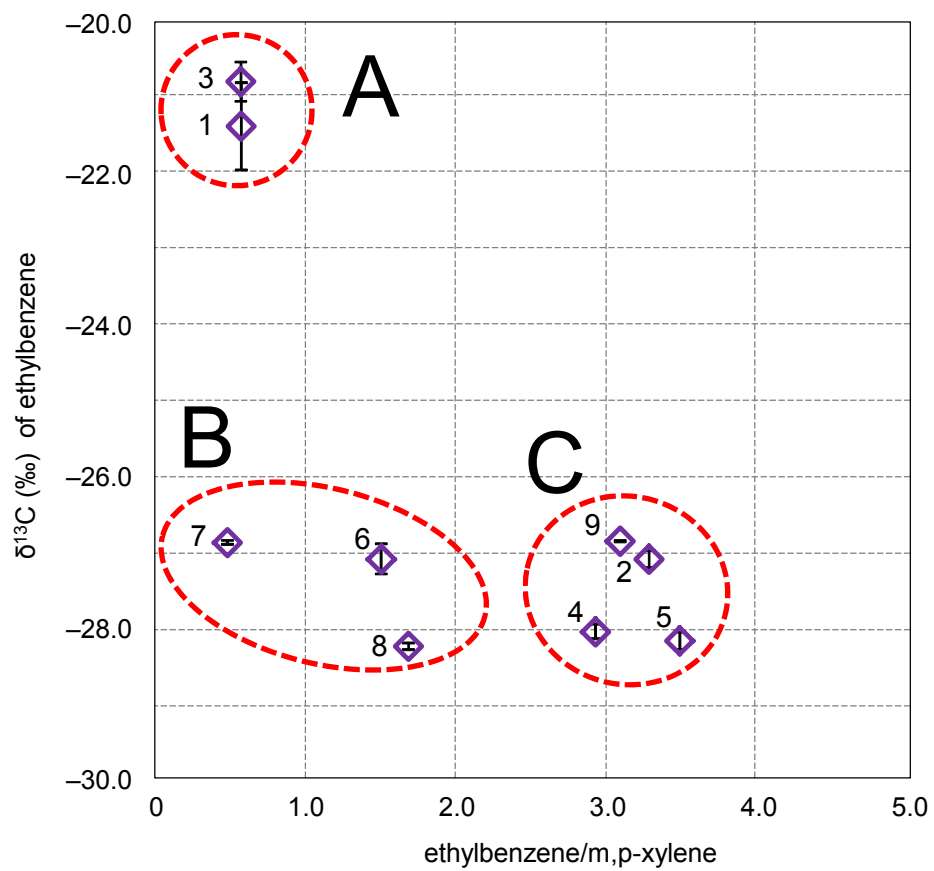
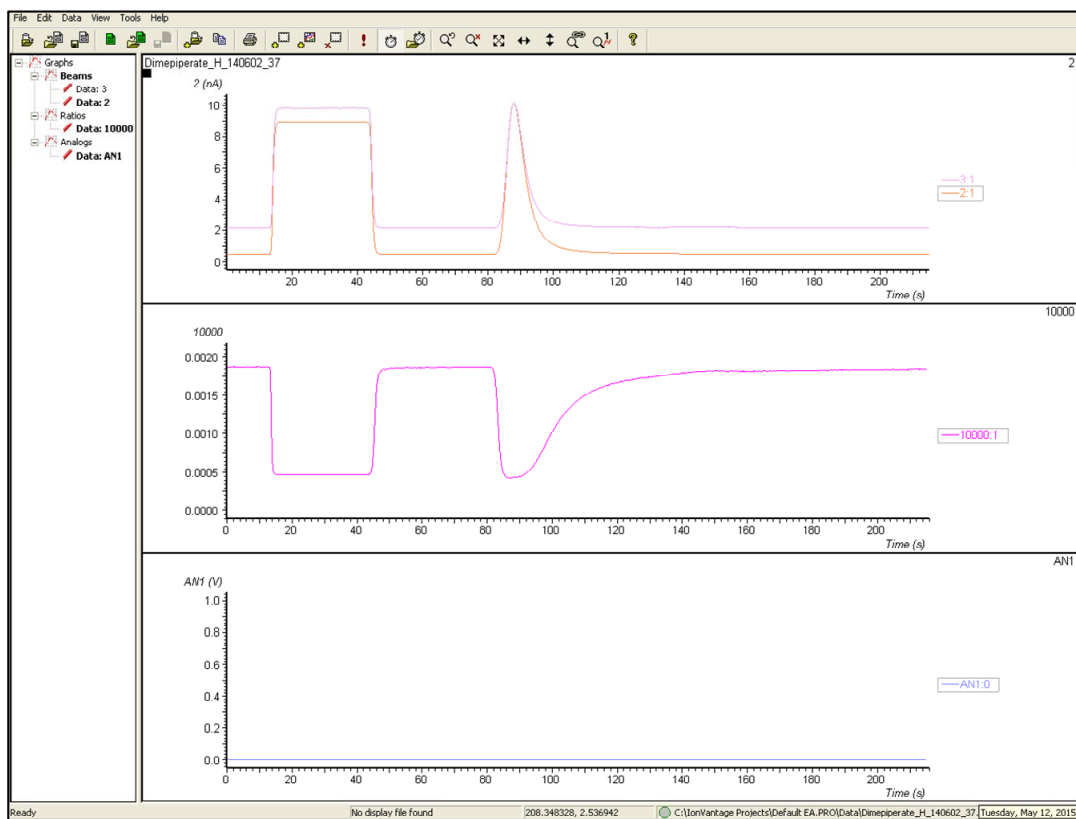


図 11. マラソン乳剤中のエチルベンゼンの  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) とエチルベンゼン/キシレン比



⊠ 12. TCEA/IRMS のクロマト (ジメピペレート)

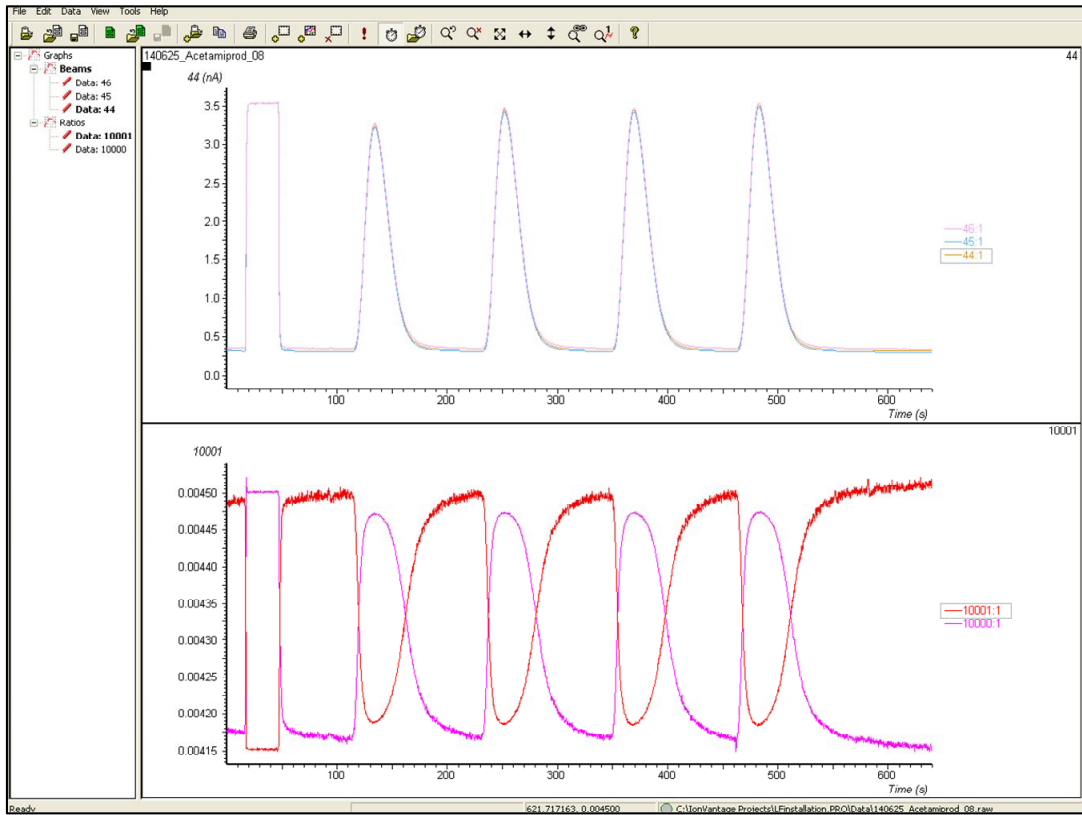


図 13. LC/IRMS のクロマト (アセタミプリド)

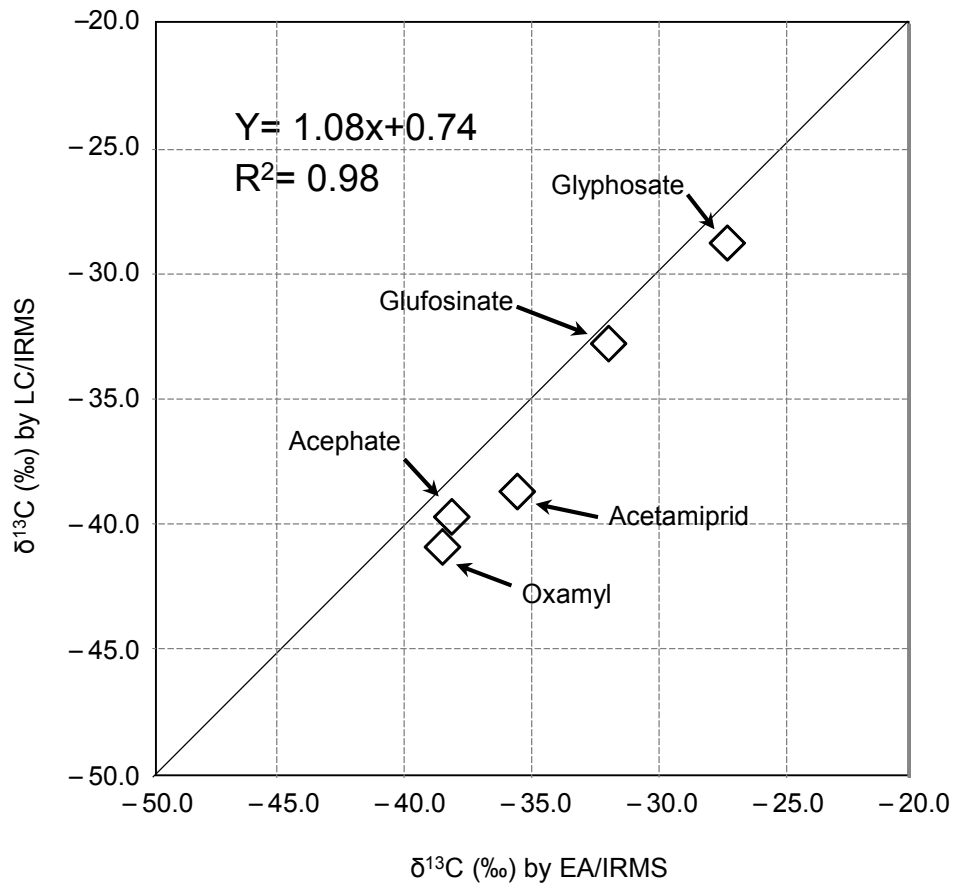


図 14. LC/IRMS と EA/IRMS の比較

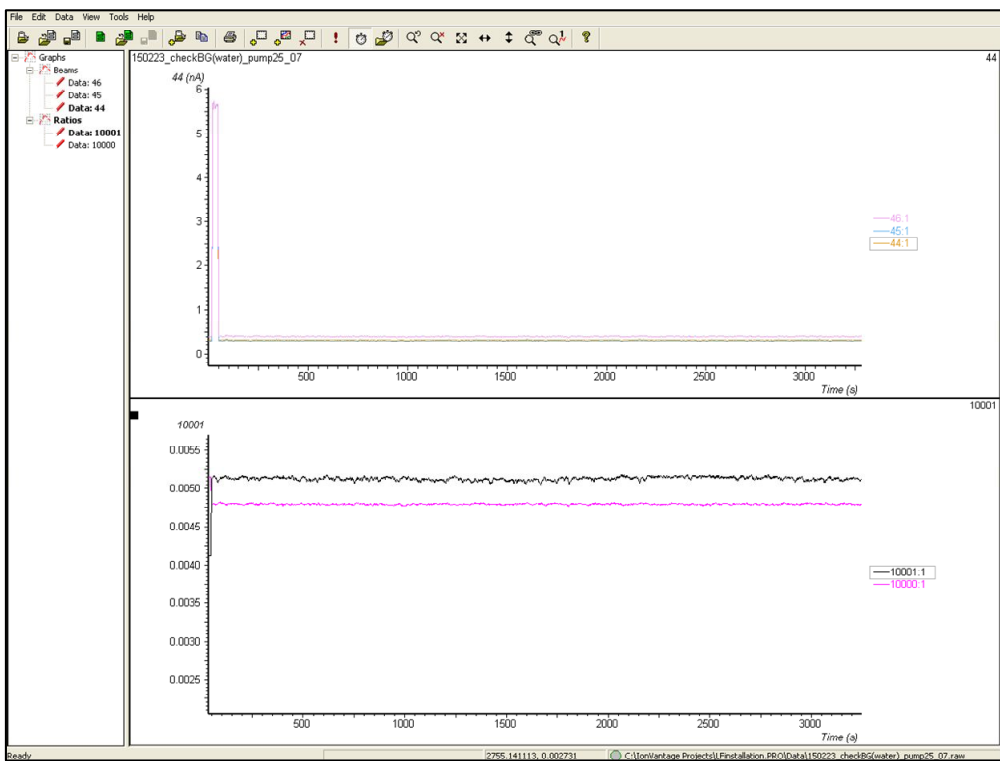
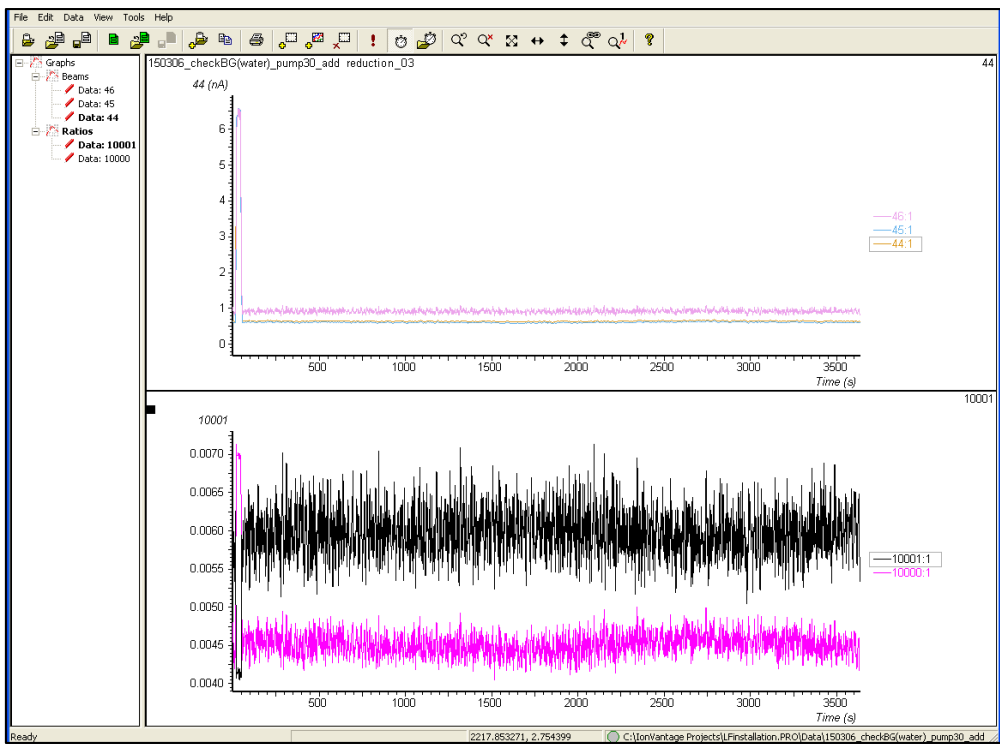


図 15. 不安定なベースライン (上), 冷却後のベースライン (下)

表 1. 冷凍食品農薬混入事件の時系列

2013年11月13日	アクリフーズ群馬工場生産のミックスピザから、石油・機械のような匂いがすると苦情
12月4日	臭気成分の特定を目的として、外部検査機関に臭気分析定性検査を依頼  定性分析の結果「酢酸エチル、エチルベンゼン、キシレン、他3物質」が検出。塗料・農薬等の溶媒に使用されていることを認識
12月17日	農薬付着の可能性否定を目的として、追加の残留農薬検査（150項目）分析を依頼
12月25日	定量分析の結果から、酢酸エチル検出なし、エチルベンゼン（6ppm）、キシレン（3ppm）が検出
12月27日	残留農薬検査からマラチオン 2,200ppm が検出された
12月29日	アクリフーズが冷凍食品からマラチオンが検出されたことを公表。90商品約640万個を自主回収
12月30日	群馬県が群馬工場に立ち入り調査
12月31日	厚生労働省の指導を受けたマルハニチロが、最高濃度のコロッケについて子供が8分の1個食べると腹痛などを起こす可能性があるとして毒性を訂正
2014年1月4日	群馬工場の従業員への聞き取り調査を開始
2014年1月7日	コロッケの衣部分から 26,000ppm のマラチオンが検出されていたことが判明
2014年1月10日	農薬混入により業務を妨害されたとして、群馬工場が被害届を提出
2014年1月25日	偽計業務妨害容疑で群馬工場の契約社員阿部利樹（49）容疑者を逮捕

表2. 測定対象農薬一覧（農薬ハンドブック，2005）

試薬名	分子式	分子量	種類	詳細
ジメピペレート	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> NOS	263.40	除草	チオカーバメート系
BPMC（フェノブカルブ）	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>2</sub>	207.27	殺虫	カーバメート系
ピリブチカルブ	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	330.44	除草	カーバメート系
シハ口ホップブチル	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> FNO <sub>4</sub>	357.38	除草	フェノキシ酸系
カフェンストロール	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S	350.44	除草	トリアゾール系
トリフルラリン	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	335.28	除草	ジニトロアニリン系
プロベナゾール	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub> S	223.25	殺菌	その他の合成
ピリダフェンチオン	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> PS	340.34	殺虫	有機リン系
ジメトエート	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	229.26	殺虫	有機リン系
ピラゾキシフェン	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	438.70	除草	ダイアゾール系
クロルピリホスメチル	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS	322.53	殺虫	有機リン系
フサライド	C <sub>8</sub> H <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	271.91	殺菌	メラニン生合成阻害剤
DBN（ジクロベニル）	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub>	152	除草	ニトリル系
TPN（クロロタロニル）	C <sub>6</sub> Cl <sub>4</sub> (CN) <sub>2</sub>	265.91	殺菌	その他の合成

表 3. 測定対象マラソン乳剤の一覧（農薬要覧，2013）

	乳剤名	販売元	農薬登録	容量 ( mL )
1	マラソン乳剤	住友化学	20737	500
2	マラソン乳剤	住友化学	20737	100
3	日産マラソン乳剤	日産化学工業	22628	500
4	家庭園芸用マラソン乳剤	住友化学園芸	21940	100
5	家庭園芸用マラソン乳剤	住友化学園芸	21940	100
6	ホクコーマラソン	北興化学工業	2300	500
7	日農マラソン乳剤	日本農薬	2280	500
8	家庭園芸用キングマラソン乳剤 50	白元	19602	100
9	サンケイマラソン乳剤	琉球産経	12266	500



表 4. マラソン乳剤の生産量，出荷量について（農薬要覧，2013）

企業名	生産数量(トン)	出荷数量(トン)
住友化学	100.5	109.4
日産化学工業	30	25
住友化学園芸	27.4	30.5
北興化学工業	10.1	12.2
日本農薬	8.2	7.7
キング化学（白元）	6.3	6
協友アグリ	5	4.5
第一農薬	2.7	2.5
サンケイ化学	1.2	1.3
琉球産経	0.9	1.1
合計	192.3	200.2

表 5. 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 6. マラソン乳剤中のマラチオンの  $\delta^{13}\text{C}$  (‰)

	乳剤名	販売元	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	S.D. (‰)
1	マラソン乳剤	住友化学	-29.66	0.03
2	マラソン乳剤	住友化学	-29.92	0.08
3	日産マラソン乳剤	日産化学工業	-29.63	0.07
4	家庭園芸用マラソン乳剤	住友化学園芸	-29.89	0.08
5	家庭園芸用マラソン乳剤	住友化学園芸	-30.63	0.07
6	ホクコーマラソン	北興化学工業	-29.54	0.02
7	日農マラソン乳剤	日本農薬	-29.88	0.07
8	家庭園芸用 キングマラソン乳剤 50	キング化学	-29.73	0.06
9	サンケイマラソン乳剤	琉球産経	-30.44	0.06

表 7. マラソン乳剤中のエチルベンゼンとキシレンの  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) と Ethyl/Xyl の比率

	乳剤名	販売元	Ethylbenzene	Xylene	E/X
1	マラソン乳剤	住友化学	-21.42±0.57	-25.82±0.11	0.61
2	マラソン乳剤	住友化学	-27.06±0.11	-28.42±0.02	3.29
3	日産マラソン乳剤	日産化学工業	-20.84±0.26	-25.15±0.03	0.61
4	家庭園芸用マラソン乳剤	住友化学園芸	-28.01±0.10	-27.71±0.02	2.94
5	家庭園芸用マラソン乳剤	住友化学園芸	-28.13±0.11	-28.60±0.06	3.49
6	ホクコーマラソン	北興化学工業	-27.06±0.20	-28.69±0.68	1.53
7	日農マラソン乳剤	日本農薬	-26.85±0.03	-26.89±0.03	0.52
8	家庭園芸用 キングマラソン乳剤 50	キング化学	-28.20±0.04	-28.26±0.18	1.71
9	サンケイマラソン乳剤	琉球産経	-26.83±0.01	-25.36±0.03	3.10

表 8. 11 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
ピリブチカルブ	$C_{18}H_{22}N_2O_2S$	-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 9. 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 10. 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