

<平成26年度助成>

生体成分の炭素安定同位体比を用いた 食品の産地判別

川島洋人

(秋田県立大学システム科学技術学部)

1. はじめに

2000年に『農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律』(JAS法)の改正により、すべての生鮮食品に対して原産地表示が義務付けられた。また、加工食品の原料原産地表示対象品目の拡大、流通過程での表示義務化、外食産業における原材料の原産地表示のように、食品及びその原材料に対して原産地を表示する流れが拡大している。しかし、中国産を国産と偽装する事件だけでなく、2013年10月には阪急ホテル系列のレストランによる食材偽装の問題も勃発するなど、あとを絶たない。さらに我が国は環太平洋戦略的経済連携(TPP)協定に加入するなど、国民の食の安全の確保や国内ブランド食品を守る意味から、食品の産地判別技術は最重要な課題となっている。

産地判別するための方法として、近年、安定同位体比の利用が活発に利用され始めている。生物の安定同位体比は、その生物が育ってきた環境要因を反映するため、今まで識別不可能であった食品や産地偽装が多い食品を中心に利用され始めている。特に欧州では、2000年代の後半にはTrace (Tracing the origin of food) Projectを立ち上げ、様々な食品の安定同位体比のデータベースを公表し始めている。例えば、小麦粉、ワイン、米などの農産物や、牛肉、バター、チーズなどの畜産物など応用範囲は非常に広い。しかし、これらの安定同位体比の分析は、バルク分析(個別成分ではなく、全炭素や全窒素の分析)であるため、一部の食品では識別が出来ず、さらに情報量を得

るためには個別成分中の同位体分析(Compound Specific Isotope Analysis)が必要である。

2000年代の後半、液体クロマトグラフィ/安定同位体比質量分析計(LC/IRMS)の融合・実用化が行われた¹⁾。その結果、揮発性が低く、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。今まで分析が困難であった生体を構成する成分の糖¹⁻³⁾、アミノ酸^{4,5)}、アルコール^{6,7)}、農薬⁸⁾の分析が可能になりつつある。これらの情報は産地判別のための有力なツールになる可能性がある。そこで本研究では、LC/IRMSの基本的な分析方法から見直し、アミノ酸、糖に含まれる炭素安定同位体比の高精度分析法を確立し、起源推定方法を確立することを目的とした。

2. 実験方法

対象物質としては、以下のアミノ酸(10種類)、糖(6種類)、カフェイン(2種類)の試薬類を分析した。アミノ酸としては、ヒスチジン(SIサイエンス社製)、アラニン(SIサイエンス社製)、ヒスチジン(和光純薬工業社製、100g)、アラニン(和光純薬工業社製、100g)、グリシン(和光純薬工業社製、100g)、バリン(和光純薬工業社製、25g)、ロイシン(和光純薬工業社製、25g)、アラニン(和光純薬工業社製、25g)、ヒスチジン(和光純薬工業社製、25g)、グリシン(和光純薬工業社製、25g)、糖としては、グルコース(和光純薬工業社製、25g)、キシロース(和光純薬工業社製、25g)、ガラクトース(和光純薬工業社製、25g)、マンノース(和光純薬工業社製、25g)、スクロース(和光純薬工業

社製、25g)、フルクトース(和光純薬工業社製、25g)、カフェインとしては、カフェイン(和光純薬工業社製)、カフェイン(IAEA)を分析した。

また、海外産の糖として、日本(8種類)、マレーシア産(2種類)、バングラデシュ(1種)、タイ(1種類)を収集した。日本産としては白砂糖(日新製糖社製)、グラニュー糖(日新製糖社製)、カップシュガー(日新製糖社製)、スリムアップシュガー(味の素社製)、パルスweet(味の素社製)、シュガーカット(浅田飴社製)、脳に速攻ぶどう糖(パールエース社製)、粉黒糖(美味安心社製)、マレーシアとしてはパルスweet(味の素社製)、白砂糖(不明)、バングラディッシュとしては白砂糖(不明)、タイとしては砂糖(Mitr Phol社製)を分析した。

分析は湿式燃焼部(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1, 2参照)。

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、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$)、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、100℃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(サンプル分析は水冷に変更)、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。

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



図1. LC/IRMSの写真

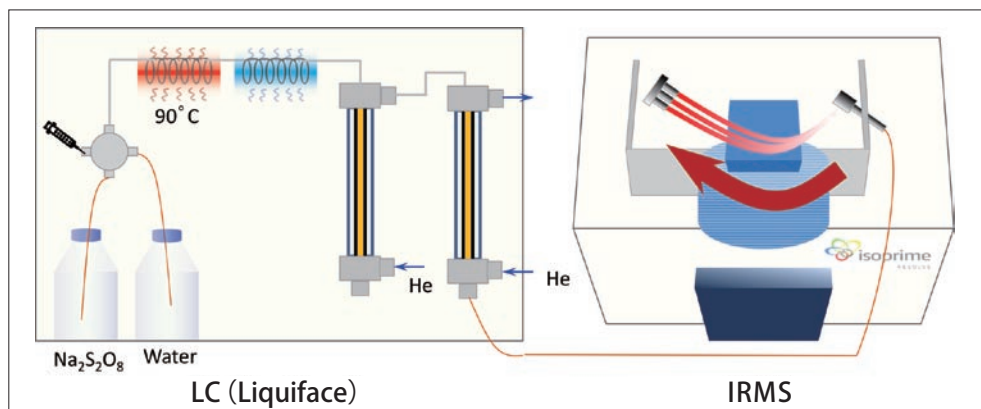


図2. LC/IRMSの流路図

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層ベルムナイト炭酸塩 (Peedee Belemnite, PDB, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}=0.011180$) に対する千分率(‰)で表せられる。また、国際標準としては $\delta^{13}\text{C}$ (‰)の値が決まったCaffeine (IAEA-600, $-27.771 \pm 0.043\%$)、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を測定した。次に、ダブルアンカー法より得た直線を用いて、すべてのサンプルの値を決めた。なお、ダブルアンカー法の決定係数は、 $R^2=1.00$ となった。LC/IRMSの基礎試験として、燃焼の温度変更(90℃, 100℃)、冷却システムの導入(空冷から水冷の導入)、還元路の導入、低濃度試験、リン酸有無の効果も行った。

3. 結果考察

3.1 低濃度試験の結果(糖3種で試験)

低濃度領域を試験するために、3種の糖(ガラクトース、グルコース、マンノース)を対象に3nmolCから67nmolCの絶対量の範囲で試験を行った。その結果、ガラクトース、グルコース、マンノースは、それぞれ、 $-27.93\% \sim -26.37\%$ (標準偏差(1SD) $<0.34\%$)、 $-10.91\% \sim -10.45\%$ (1SD $<0.38\%$)、 $-11.78\% \sim -10.55\%$ (1SD $<0.36\%$)となった。低濃度領域としては、EA/IRMSとの差が0.3%と考えれば、ガラクトース、グルコース、マンノースは、約17nmolC、約3nmolC、約7nmolCまで測定可能であることがわかった。

3.2 アミノ酸(10種類)、糖(6種類)、カフェイン(2種類)のEAとLCの比較検討

リン酸の有無を確認するために、マニュアル測定にて6種の糖を試験した。EA/IRMSとLC/IRMSとの相関図において(図3参照)、傾き1.0、

切片が0.4、決定係数1.0となり、リン酸の有無は関係なく、またEA/IRMSともほぼ同一の結果が得られた。

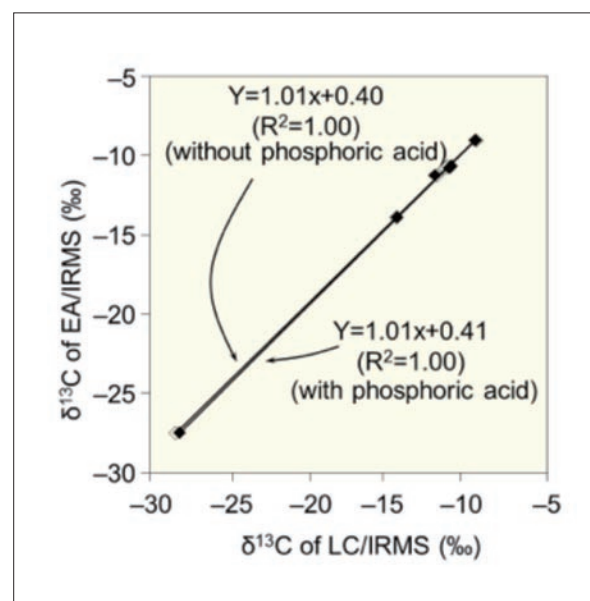


図3. 6種の糖のEA/IRMSとLC/IRMSとの相関図

10種のアミノ酸においては、マニュアル測定(リン酸有無)、オート測定(リン酸有)はEA/IRMSとLC/IRMSは誤差は約2%程度であったが、オート測定(リン酸無)に関しては10%と大きな差があった(図4参照)。その理由としては、イオンクロマトグラフの溶離液は四ホウ酸ナトリウム・十水和物であり、塩基性溶離液(pH=9)であったため、ペルオキソ二硫酸ナトリウムによる湿式酸化の燃焼効率が落ちてしまったことが原因だと考えられた。また、糖と異なり、マニュアル測定においても、誤差が生じたのは、アミノ酸には窒素が含有しており、燃焼の際に N_2O が生じてしまい、誤差を生んでいると考えられた。

2種のカフェインにおいては、マニュアル測定(リン酸有無)、オート測定(リン酸有無)はEA/IRMSとLC/IRMSは約7%もの差があった。アミノ酸においては窒素含有率は平均で約19%であったが、カフェインは約30%程度と大きく、窒素による影響がさらに顕著になったと考えられた。

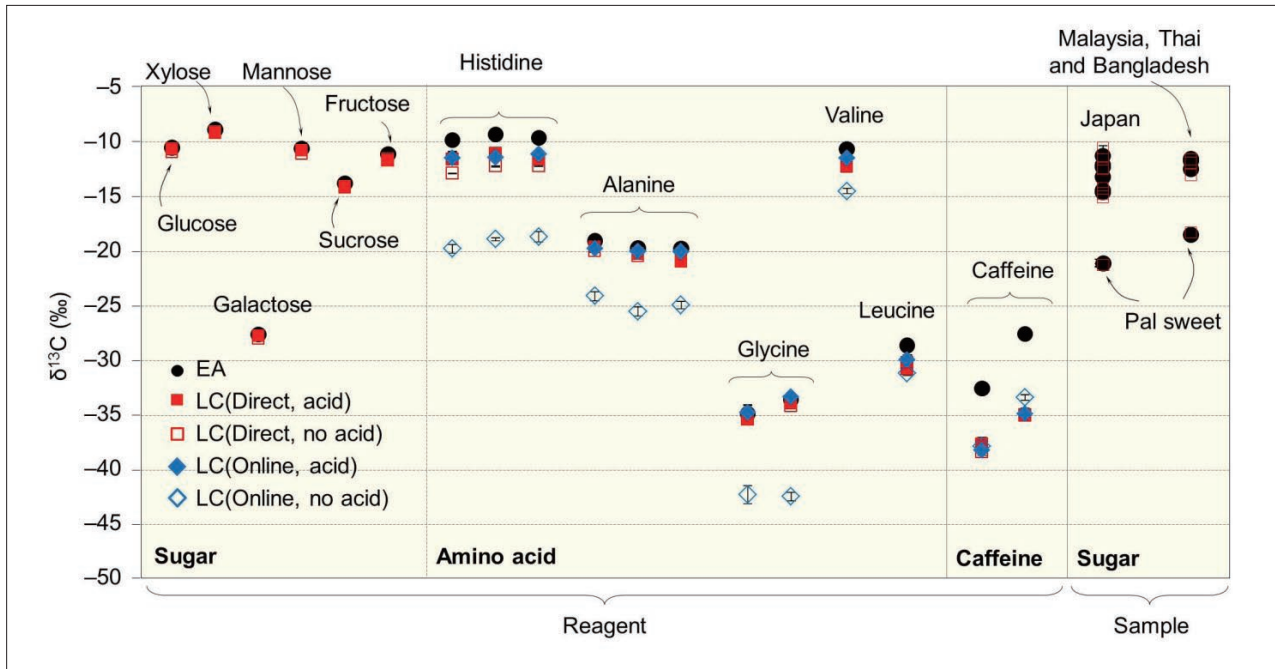


図 4. 糖(6種類)、アミノ酸(10種類)、カフェイン(2種類)の測定結果

3.3 日本(8種類)、マレーシア産(2種類)、バン
グラデシュ(1種類)、タイ(1種類)の糖に
ついての結果(表1参照)

国内産の糖(8種類)の結果は-21.27% ~ -10.66%となり、1SDは< 0.22%であることがわかった。また、海外産の糖(4種類)の結果は-18.35% ~ -11.71%となり、1SDは< 0.23%であることがわかった。通常の白糖においては国内産も海外産も-10.66% ~ -15.13%の範囲に

入っており、またアミノ酸を使った糖においては-21.27% ~ -18.51%と白糖とは異なる結果であることがわかった。植物由来の糖とアミノ酸由来の糖とは異なる結果となり、識別可能であることがわかった。さらに、今回はバルク(全体)の測定であったが、今後はさらに成分を分離して同位体比を測定することで、より明確に識別できる可能性があることがわかった。

表 1 国内産、海外産の糖の結果

sample	Country	EA/IRMS	LC/IRMS	EA-LC
1 White sugar	Japan	-14.65 ± 0.11	-14.78 ± 0.01	0.13
2 Caster sugar	Japan	-14.52 ± 0.16	-15.13 ± 0.02	0.62
3 Cup sugar	Japan	-14.62 ± 0.13	-14.32 ± 0.17	-0.30
4 Slim sugar	Japan	-13.28 ± 0.38	-12.45 ± 0.04	-0.83
5 Pal sweet	Japan	-21.10 ± 0.37	-21.27 ± 0.12	0.18
6 Sugar cut	Japan	-12.38 ± 0.01	-12.55 ± 0.12	0.17
7 Grape sugar	Japan	-11.38 ± 0.05	-10.66 ± 0.22	-0.72
8 Brown sugar	Japan	-12.22 ± 0.11	-11.71 ± 0.21	-0.51
9 Pal sweet	Malaysia	-18.51 ± 0.07	-18.35 ± 0.23	-0.16
10 White sugar	Malaysia	-11.85 ± 0.12	-11.71 ± 0.15	-0.13
11 White sugar	Bangladesh	-11.63 ± 0.09	-12.02 ± 0.08	0.39
12 White sugar	Thai	-12.55 ± 0.12	-13.13 ± 0.05	0.58

3.4 その他の実施項目

感度を高めるために、湿式酸化の燃焼温度を90℃から100℃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、ヒスチジン、グリシン、ロイシン、バリン、カフェインを用いて実験した。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。

また、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ワイヤー(ニラコ社製)を入れ、650℃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、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 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た。

また、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。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℃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。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、貴重な研究助成を賜りました公益財団法人浦上食品・食文化振興財団及び関係者の皆様に御礼を申し上げます。また、本研究のデータは修士課程2年の須藤菜那さんによって実施されました。ここに御礼申し上げます。

文 献

- 1) Krummen M, Hilker AW, Juchelka D, Duhr A, Schlüter HJ, Pesch R. A new concept for isotope ratio monitoring liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004; **18**: 2260-2266.
- 2) Cabañero AI, Recio JL, Rupérez M. Liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry: a new perspective on honey adulteration detection. *J Agric Food Chem* 2006; **54**: 9719-9727.
- 3) Morrison DJ, Taylor K, Preston T. Strong anion-exchange liquid chromatography coupled with isotope ratio mass spectrometry using a Liqueface interface. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2010; **24**: 1755-1762.
- 4) McCullagh JS, Juchelka D, Hedges RE. Analysis of amino acid ^{13}C abundance from human and faunal bone collagen using liquid chromatography/isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006; **20**: 2761-2768.
- 5) Godin JP, Breuillé D, Obléd C, Papet I, Schierbeek H, Hopfgartner G, Fay LB. Liquid and gas chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry for the determination of ^{13}C -valine isotopic ratios in complex biological samples. *J Mass Spectrom* 2008; **43**: 1334-1343.
- 6) Cabañero AI, Recio JL, Rupérez M. Isotope ratio mass spectrometry coupled to liquid and gas chromatography for wine ethanol characterization. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2008; **22**: 3111-3118.
- 7) Cabañero AI, Recio JL, Rupérez M. Simultaneous stable carbon isotopic analysis of wine glycerol and ethanol by liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 2010; **58**: 722-728.
- 8) Kujawinski DM, Wolbert JB, Zhang L, Jochmann MA, Widory D, Baran N, Schmidt TC. Carbon isotope ratio measurements of glyphosate and AMPA by liquid

chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry.
Anal Bioanal Chem 2013; **405**: 2869-2878.

Identification for sugar and amino acid using LC/IRMS

Hiroto Kawashima

Systems Science & Technology, Akita Prefectural University

In 2004, liquid chromatography coupled with isotope ratio mass spectrometry (LC/IRMS) has been developed, which allows the measurement of stable carbon isotope ($\delta^{13}\text{C}$) composition of highly polar and non-volatile analyses without the need for derivatization. The interface is based on a wet oxidation of organic compounds in aqueous solution to produce CO_2 gas, and separate CO_2 from the liquid phase. Today, LC/IRMS system has been used for various compounds e.g., sugar, amino acid, alcohol and pesticide. Stable isotope analysis has proved to be a powerful tool for source apportionment of various compounds. However, the research of precision and accuracy for LC/IRMS were very limited until now. In addition, the potential effect of including nitrogen has not been investigated.

In this study, firstly, accuracy and precision in this method were investigated in the concentration range of Galactose, Glucose and Mannose from 3 to 67nmolC. Secondly, we measured sugar (6), amino acid (10) and caffeine (2) reagents using direct injection mode. We compared direct injection mode with EA/IRMS. Finally, we measured amino acid and caffeine reagents using online LC/IRMS mode. Furthermore, we collected 12 sugar samples in Japan, Malaysia, Thai and Bangladesh. The $\delta^{13}\text{C}$ of 12 sugar samples were compared direct injection mode with EA/IRMS.

The accuracy for Galactose and Glucose $<0.38\text{‰}$ were over 16nmolC and 3nmolC, respectively. The dates were sufficiently to be compared with the existed papers. The determination coefficient and intercept for 6 sugar reagents between EA/IRMS and LC/IRMS were approximately 1.0 and 0.4 (with or without phosphoric acid), respectively. The standard deviation for 6 sugar reagents were $<0.14\text{‰}$. The accuracy and precision seemed to be high for direct injection.

For amino acid reagents, there were large differences between EA/IRMS and online LC/IRMS in no phosphoric acid, from 2.54‰ to 9.93‰. The eluent used for ICS1000 is 5mM sodium tetraborate decahydrate (pH=9.51). Thus, when the phosphoric acid was not added, the oxidation potential of sodium peroxodisulfate was decreasing. For caffeine reagents, the differences of 2 caffeine reagents between EA/IRMS and all LC/IRMS measurements (direct injection and online LC/IRMS with or without phosphoric acid) were ranged from 5.09‰ to 7.45‰. The caffeine was alkalinity in aqueous solution and high nitrogen contents (29%). The difference reason may be considered incomplete combustion by e.g. alkalinity and produced N_2O . The $\delta^{13}\text{C}$ of 12 samples ranged from -21.27‰ (Pal sweet, JPN) to -10.66‰ (Grape sugar, JPN) and the S.D. is within 0.23‰. The samples were categorized two groups of $\delta^{13}\text{C}$ values: one between -10.66 and -15.13‰ derived from plant sugar, and the other between -18.35 and -21.27‰ derived from amino acid (Pal sweet). We can identify different source.