安定同位体比分析を用いた酒類原料の起源推定技術について

レストランなどで食材の誤表示問題が発生し、食品の表示に再び世間の注目が集まったのは記憶に新しい。酒類についても原材料の適正表示は法令遵守の観点のみならず、商品に対する消費者の信頼性確保のためにも重要な事項であり、酒類業者は自社が販売している製品の真正性を確保する必要がある。本稿では酒類の必須成分であるエタノールの安定同位体比を新たに開発した方法で分析した酒類原料の期限推定技術について解説して頂いたので、参考にして頂きたい。

和 佐 野 成 亮¹・服 部 良 太²

1. はじめに

近年、事実と異なる産地や原材料を表示するなど食品偽装事件が続発しており、お客様の「食の安全・安心」への関心が増大している。食品偽装は、健康影響の有無にかかわらずお客様の信頼を失墜させる重大な事案であり、トレサビリティーを確保することは食品産業界にとって重要なことである。そのため、食品のトレサビリティーを確保するために科学的根拠に基づいた偽和判別技術が求められており、食品の起源判別技術として多元素分析やDNA分析と並んで軽元素安定同位体比分析が注目されている。

軽元素安定同位体比は、起源植物の情報だけでなく、その生育環境などの情報も保存していることから食品の起源推定技術として使用されており、例えば水素・酸素安定同位体比によるストレート果汁と濃縮還元果汁の判別^{1), 2)}や炭素安定同位体比による果汁、蜂蜜への糖添加判別^{3), 4), 5)}などが報告されている。また複数の軽元素安定同位体比を組み合わせることによる産地判別も検討されており、米や牛肉など様々な農畜産物について報告^{6), 7), 8), 9), 10)}がある。さらに、欧州では炭素・酸素安定同位体比のデータベースによるワインの真性評価¹¹⁾など、酒類の起源推定技術としても広く

使用されている^{12), 13), 14), 15), 16)}。ここでは、安定同位体比分析を用いた酒類原料の起源推定技術について紹介する。

2. 酒類における安定同位体比について

有機化合物を構成する水素や炭素などの軽元素は複数の安定同位体で構成されており、自然界においてはほぼ一定の比率で存在している（水素であれば¹Hが99.986%、Dが0.015%、炭素であれば¹²Cが98.892%、¹³Cが1.108%）。一方で、実際には自然界で起こる物理的・化学的変化の過程において、化合物の安定同位体比は変化し、僅かに違いが生じている（同位体比分別）。

安定同位体比の値は、国際的に認証された標準物質（水素、酸素には標準平均海水、炭素には米国南カロライナ州 Pee Dee 層ベレムナイト炭酸塩を用いる）を元に算出され、次式に示した標準試料に対する同位体比の千分率偏差 δ (‰) で表される。

$$\delta X (\text{‰}) = [(R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}}) - 1] \times 1000 \quad (X = \text{D}, {}^{13}\text{C}, {}^{18}\text{O} \text{ など})$$

なお、 R_{sample} は試料の同位体比（水素であればD/H、炭素であれば¹³C/¹²C）を、 R_{standard} は標準物質における同位体比を示している。

Analysis of Stable Isotope Ratio for Discrimination of Origin of Ethanol

¹ Nariaki WASANO (Central Laboratories for key technologies, Research and Development Division, Kirin Company, Limited)

² Ryota HATTORI (Planning Section, Quality Assurance Department, Kirin Company, Limited)

植物は光合成回路の違いから、C3、C4、CAM植物の3つに大別され、それぞれ異なる炭素安定同位体比を持っている^{17), 18), 19), 20)}。これは大気中のCO₂を固定化する経路が異なるためであり、大部分の植物が属するC3植物は¹²Cを含むCO₂を固定化しやすいため、C4植物と比較して軽い炭素安定同位体比($\delta^{13}\text{C}$ の値が小さい、以下同様)であることが知られている。

C3植物にはワインの原料となるブドウやウイスキーの原料となる麦などが含まれており、これらの植物に含まれる糖の炭素安定同位体比は-28~-23%の値を持っている。C4植物には、一般的に安価な酒類原料として使用されるトウモロコシやサトウキビが属しており、-16~-8%程度の炭素安定同位体比を持っている。また、CAM植物にはテキサラの原料となるリュウゼツランなどが属しており、炭素安定同位体比としては-18~-12%とC4植物に似た値を示す。

酒類飲料に含まれるエタノールは、酵母の代謝によって原料植物の糖(グルコース)からピルビン酸を経て生成される。発酵に利用されるグルコースは原料植物に依存した炭素安定同位体比を持つが、この値はエタノールに代謝された後もほとんど変化しないことが知られている¹¹⁾。そのため、エタノールの炭素安定同位体比を測定することで、その原料植物を推定することが可能になる。例えば、ワインやモルトウイスキーに含まれるエタノール(-28~-23%)は、サトウキビやトウモロコシから製造したエタノール(-18~-12%)よりも軽い同位体比を持っているため、炭素安定同位体比によって両者を容易に識別することができる。また、発酵によってつくられた植物由来エタノールとナフサを原料として化学合成されたエタノールも水素・酸素安定同位体比によって識別可能である²¹⁾。

3. エタノールの安定同位体比分析法について

従来、起源推定等に用いられる安定同位体比分析は、主にサンプル全体を酸化、もしくは燃焼させることで得られる全物質レベル(バルクレベル)での測定だったが、1990年代になると、ガスクロマトグラフィー(Gas chromatography, GC)を接続した安定同位体比質量分析計(Isotope Ratio Mass Spectrometry, IRMS)の実用化によって、様々な揮発性成分における分子レベルでの安定同位体比分析が比較的容易に分析可能になった。更に近年は、IRMSや位置特異的天

然同位体分別核磁気共鳴分析法(Site Specific Natural Isotope Fractionation Studied by Nuclear Magnetic Resonance, SNIF-NMR)を用いて分子内レベルでの同位体比測定もおこなわれており、更に詳細な起源推定が期待されている。ここでは酒類飲料に含まれるエタノールのバルクレベルでの分析、分子レベルでの分析、分子内レベルでの分析について説明する。

バルクレベルでの分析について—バルクレベルでの測定を行う場合、炭素安定同位体比はElemental Analyzer(EA)-IRMS、水素・酸素安定同位体比はTemperature Conversion(TC)/EA-IRMSを用いることで測定が可能である。これらの装置は、有機物を960℃の酸化炉に導入して発生したCO₂から炭素安定同位体比を、1050℃の燃焼炉で発生したH₂とCOからそれぞれ水素、酸素安定同位体比を測定するシステムである。

酒類飲料中にはエタノール以外にも様々な成分が含まれている。ビールやワインなどの醸造酒であればエタノールの他に糖類やアミノ酸など様々な物質が含まれている。また、蒸留酒であっても様々な香気成分や多量の水が含まれており、酒類飲料のバルク分析ではエタノールの正確な同位体比を知ることは出来ない。そのため、エタノールの安定同位体比を正確にEA-IRMSやTC/EA-IRMSで測定するためには、蒸留によるエタノールの精製を行う必要がある^{5), 22), 23), 24)}。しかしながら、蒸留の操作は非常に煩雑であり、蒸留が不十分であれば同位体分別が生じ、正確な値が得られないことが知られている^{23), 24)}。

一方で、純度の高い醸造用アルコールや工業用アルコールであればバルク分析でも得られる値はエタノールの水素・炭素安定同位体比とほぼ一致する。そのため、炭素安定同位体比でC3植物由来とC4植物由来を区別することができ、水素安定同位体比の値から植物由来エタノールと合成エタノールを区別することができる²¹⁾(水素安定同位体比は水の影響を受けるため注意が必要である)。また、焼酎のような蒸留酒においては、炭素を含む成分の大部分がエタノールであるため炭素安定同位体比から、同様に原料植物種の推定を行うことが出来る。一方で、水素・酸素安定同位体比は酒類に含まれる水の影響を強く受けてしまうため、精製を行わずにエタノールの値を分析することはできない。しかし、水の水素・酸素安定同位体比は緯度や

標高、海からの距離など地理的影響を受けるため、酒類に含まれる水の安定同位体比は製造された産地情報を持つことが報告されている^{2), 25)}。

分子レベルでの分析について一先に述べたように現在は分子レベルでの安定同位体比分析を可能にするためにGC-IRMSが開発されている^{26), 27)}。GC-IRMSを用いることで蒸留を要せずに酒類中のエタノールの安定同位体比を分析することが可能であり、実際にワインやテキーラなどの分析においても使用されている^{12), 13), 28)}。我々は、このGC-IRMSと固相マイクロ抽出法(Solid-Phase Microextraction, SPME)法を組み合わせることで迅速、且つ簡便に酒類中のエタノールの炭素・水素安定同位体比が分析可能となることを報告している²⁹⁾。具体的には飽和食塩水に希釈した酒類サンプルをバイアルに密閉し、SPME ファイバーをヘッドスペース部分に挿入することで揮発性成分を吸着させてGCに導入する方法である^{29), 30)}。システムの略図は第1図に示した。

SPMEを用いた手法では、精製して得られたエタノールをEA-IRMSやTC/EA-IRMSで分析するのと同様の情報を簡単な前処理(希釈)のみで得ることが出来る。また、バイアルに入れるサンプルは0.1mM程度の濃度で分析が可能のため、微量のエタノールを含む食品や飲料にも適用が可能である。一方で、SPMEを用いた場合は同位体分別に注意が必要である。SPME抽出時間を変化させて炭素安定同位体比を測定した結果を第2図に示した。抽出時間が長くなるほど測定値は真値に近づいていくが、ある地点で同

位体比は一定となり、抽出時間を長くしても真値と一致することはなかった。これは、SPMEでの抽出過程で同位体比分別が起きていること、つまり軽い同位体比を持つエタノールからSPMEファイバーに吸着されていること示している。ただし、この同位体比分別は抽出時間などの条件が同じであれば一定であるため、値が既知の標準物質を用いて分別係数を決定することで校正が可能である。なお、本分析法を用いて起源が既知のエタノールサンプルを分析した結果を第3図に示した。C4植物はC3植物よりも重い炭素安定同位体比を持っており、植物原料を発酵したエタノール

第2図 SPMEにおける抽出時間とエタノール炭素安定同位体比の関係

第1図 SPME-GC-C/TCIRMSの概略図

第3図 起源既知のエタノールにおける水素・炭素安定同位体比分析結果

ルは合成エタノールよりも軽い水素安定同位体比を持っている。そのため、本分析法を用いることで、迅速に酒類原料を推定することが可能である。

分子内炭素安定同位体比分析について—これまで述べてきた分子レベルの炭素安定同位体比分析は、分子が持つ複数の炭素をまとめて測定する手法である。これに対して分子内炭素安定同位体比分析は、分子内の特定位置に存在する炭素の同位体比を、他の炭素とは別けて分析する方法である。分子内安定同位体比を分析する方法として、確度・精度について議論はあるものの SNIF-NMR が従来用いられてきた^{31), 32)}。一方で、IRMS を用いた分子内炭素安定同位体比の測定においては、正確な分析値を得ることが期待できる反面、化学的・物理的反応を用いた前処理によって目的の炭素ごとに分解することが必要であった^{33), 34), 35)}。更に、分解の精度が悪い場合、分解工程において不測の同位体分別が起きる懸念があるため、正確な分析のためには安定した分解反応を行うことが重要である。

エタノールはメチル基とメチレン基、二つの炭素を持っており、メチル基の炭素はグルコースの C1 と C6 の位置の炭素を、メチレン基の炭素は C2 と C5 の位置の炭素を反映している。解糖系回路においては、グルコースからピルビン酸が生成される過程で生じる同位体分別の程度は僅かであることが報告されており³⁶⁾、エタノールに含まれる 2 つの炭素安定同位体比を別々に測定することができれば、原料植物に含まれる糖の炭素安定同位体分布を明らかにすることに繋がると考

えられる。糖の分子内同位体比分布を正確に測定した報告例は殆どなく、エタノールの分子内同位体比を測定することで、これまで区別が困難だった C4 植物と CAM 植物の違いなど原料植物種についてより詳細な情報が得られる可能性を秘めていると考えている。

我々は正確なエタノールの炭素安定同位体比の測定を可能にするために HS-SPME-GC-Pyrolysis-GC-IRMS を用いた分析法を報告している³³⁾。熱分解によってエタノールを直接メチル基とメチレン基に分離することを試みたが、エタノールの直接熱分解では安定したフラグメントを生成することができなかった。一方で、酢酸の熱分解法による分子内炭素安定同位体比分析について報告³⁵⁾があることから、本分析法ではエタノールを酢酸に酸化し、生成した酢酸を GC に導入する手法とした^{33), 37)}。酢酸はファーストカラムで分離され、1000℃に設定した燃焼炉で CH₄ と CO₂ に分解される。生成したガスはセカンドカラムで分離され、940℃に設定した酸化炉を通り質量分析計で同位体比を測定する。なお、燃焼炉で生じた CO₂ がエタノールのメチレン基の炭素を反映している。システムの概略図は第4図に示した。

本分析法を用いて起源が既知のエタノールサンプルを測定したデータを第5図に示した。C4 植物と C3 植物は、エタノール全体の炭素安定同位体比を比較することで区別できるが、CAM 植物の炭素安定同位体比は C4 植物の範囲内であることから、両者を区別することは出来ない。分子内炭素安定同位体比では、

第4図 HS-SPME-GC-Pyrolysis-GC-C-IRMS の概略図

第5図 起源既知のエタノールにおける分子内炭素安定同位体比分析結果

C4 植物におけるメチレン基とメチル基の差は $-1.78 \sim -2.08\%$ であるのに対し、CAM 植物におけるメチレン基とメチル基の差は 8.88% と C4 植物と比較して大きな値を示しており、両者を区別できる可能性が示唆された。また、C4 植物であるトウモロコシとサトウキビ由来エタノールの炭素安定同位体比を比較しても

両者に違いは見られないが、トウモロコシ由来エタノールにおけるメチレン基とメチル基の差は $-1.78 \sim -0.80\%$ であるのに対してサトウキビ由来エタノールでは $1.00 \sim 2.06\%$ と大きな差を示した。このことから、分子内炭素安定同位体比分析によって、C4 植物内でも植物種の違いによって識別できる可能性が示唆された。

更に、C3 植物由来のエタノールはメチレン基がメチル基よりも重い値をとるのに対して、合成エタノールではメチル基の方がメチレン基よりも重い値を示すなど、従来の分子レベル炭素安定同位体比では不可能であったより詳細な分類ができる可能性が示唆された。ただし、これらの値はまだサンプル数が少ないため更に分析サンプルを増やしての考察が必要である。

4. おわりに

これまでに網羅的な分子内炭素安定同位体比のデータは存在しておらず、今後様々な酒類について分子内同位体比のデータベースを構築することで、これまで困難であった酒類原料の識別、より正確な真性評価を実現できる可能性がある。

今回紹介したように安定同位体比分析は酒類原料の起源推定技術として有効な手法であり、技術開発を通して食の安全・安心、品質の向上に貢献できるものと考えている。

¹ キリン株式会社 R&D 本部 基盤技術研究所

² キリン株式会社 品質保証部 企画担当

参考文献

- 1) J. Koziat, A. Rossmann, GJ. Martin, P. Johnson, *Anal. Chim. Acta*, 1995, **302**, 29
- 2) Giovanni Calderone, Glaude Guillou, *Food Chemistry*, 2008, **106**, 1399
- 3) Gilles G. Martin, Valerie Hanote, Michele Lees, Yves-Loic Martin, *Journal of AOAC International*, 1996, **79**, 62
- 4) Martin G. G., Hanote V., Lees M., Martin Y. -L., *J. AOAC Int.*, 1996, **79**, 62
- 5) Eric Jamin, Frederique Martin, Gilles G. Martin, *J. AOAC Int.*, 2004, **87**, 621
- 6) Simon Kelly, Malcolm Baxter, Stephen Chapman, Christopher Rhodes, John Dennis, Paul Brereton, *Eur. Food Res. Technol.*, 2002, **214**, 72
- 7) Yaeko Suzuki, Yoshito Chikaraishi, Nanako O. Ogawa, Naohiko Ohkouchi, Takashi Korenaga, *Food Chemistry*, 2008, **109**, 470
- 8) M. Boner, H. Forstel, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, **378**, 301
- 9) F. Camin, L. Bontempo, K. Heinrich, M. Horacek, S. D. Kelly, C. Schlicht, F. Thomas, F. J. Monahan, J. Hoogewerff, A. Rossmann, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, **389**, 309
- 10) Simon Kelly, Karl Heaton, Jurian Hoogewerff, *Trends in Food Science & Technology*, 2005, **16**, 555
- 11) Olivier Bréas, Fabiano Reniero, Giorgio Serrini, Prof. G. J. Martin Sponsor Referees, A. Rossmann, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1994, **8**, 967
- 12) Blanca O. Aguilar-Cisneros, Mercedes G. Lopez, Elke Richling, Frank Heckel, Peter Schreier, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 7520
- 13) C. Bauer-Christoph, N. Christoph, B. O. Aguilar-Cisneros, M. G. López, E. Richling, A. Rossmann, *Eur. Food Res. Technol.*, 2003, **217**, 438
- 14) I. G. Parker, S. D. Kelly, M. Sharman, M. J. Dennis, D. Howieb, *Food Chemistry*, 1998, **63**, 423
- 15) Claudia Bauer-Christoph, Helmut Wachter, Norbert Christoph, Andreas Roßmann, Ludwig Adam, *Z Lebensm Unters Forsch A*, 1997, **204**, 445
- 16) G. Calderone, M. Holland, F. Reniero, C. Gullou, An overview of isotope analysis for the control of alcoholic drinks and spirits, European Commission Joint Research Centre, 2005
- 17) M D Hatch, and C R Slack, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 1970, **21**, 141
- 18) Tom Whelana, W. M. Sacketta, *Plant Physiol.*, 1973, **51**, 1051
- 19) Margaret M. Bender, I. Rouhani, H. M. Vines, C. C. Black Jr., *Plant Physiol.*, 1973, **52**, 427
- 20) P. Denies, handbook of Environmental Geochemistry, Vol1, *Elsevier*, P. 394.
- 21) Keiko Ishida-Fujii, Shingo Goto, Ryu Umemura, Keita Yamada, Michikatsu Sato, Naohiro Yishida, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2005, **69**, 2193
- 22) Eric Jamin, Régis Guérin, Mélinda Rétif, Michèle Lees, Gérard J. Martin, *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 5202
- 23) Claudia Monsallier-Bitea, Eric Jamin, Michèle Lees, Ben-Li Zhang, Gérard J. Martin, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 279
- 24) Ron Baudler, Ludwig Adam, Andreas Rossmann, Giuseppe Versini, Karl-Heinz Engel, J.

- Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 864
- 25) 伊豆英恵, 橋口知一, 堀井幸江, 須藤茂俊, 松丸克己, *BUNSEKI KAGAKU*, 2012, **61**, 643
- 26) Alex L. Sessions, *J. Sep. Sci.*, 2006, **29**, 1946
- 27) 力石嘉人, 大場康弘, *Res. Org. Geochem.*, 2008, **23**, 99
- 28) Ana I. Cabanero, Jose L. Recio, Mercedes Ruperez, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2008, **22**, 3111
- 29) Ryota Hattori, Keita Yamada, Kaori Hasegawa, Yumi Ishikawa, Yuji Ito, Yuji Sakamoto, Naohiro Yoshida, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2008, **22**, 3410
- 30) Ryota Hattori, Keita Yamada, Hiroki Shibata, Satoshi Hirano, Osamu Tajima, Naohiro Yoshida, *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 7115
- 31) Elsa Caytan, Eliot P. Botosoa, Virginie Silvestre, Richard J. Robins, Serge Akoka, Gerald S. Remaud, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 8266
- 32) Alexis Gilbert, Ryota Hattori, Virginie Silvestre, Nariaki Wasano, Serge Akoka, Satoshi Hirano, Keita Yamada, Naohiro Yoshida, *Talanta*, **2012**; 99, 1035
- 33) Andreas Rossmann, Maria Butzenlechner, Hanns-Ludwig Schmidt, *Plant Physiol.*, 1991, 96, 609
- 34) Dana A. Krueger, Harold W. Krueger, *Biomed. Mass Spectrom.*, 1984, **11**, 472
- 35) Keita Yamada, Misato Tanaka, Fumiko Nakagawa, Naohiro Yoshida, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2002, 16, 1059
- 36) Philip H. Abelson, T. C. Hoering, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1961, **47**, 623
- 37) Ryota Hattori, Keita Yamada, Makiko Kikuchi, Satoshi Hirano, Naohiro Yoshida, *J. Agric. Food Chem.*, 2011, **59**, 9049
-