

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：32619

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K20639

研究課題名（和文）有機溶媒の利用を可能とする革新的2次元LC/IRMSの開発

研究課題名（英文）Development of two-dimensional LC/IRMS for organic solvents

研究代表者

川島 洋人（Kawashima, Hiroto）

芝浦工業大学・システム理工学部・教授

研究者番号：60381331

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,900,000円

研究成果の概要（和文）：2004年、湿式燃焼法を利用した水溶性成分の炭素安定同位体比の高精度分析が可能な液体クロマトグラフ/安定同位体比質量分析計（LC/IRMS）が開発、商品化された。本研究では、LC/IRMSの装置をさらに革新的に発展させ、溶離液に有機溶媒を使用することが出来る装置開発を目的とした。結果は、1次元目カラムと2次元目カラムを組み合わせることにより、LC/IRMSにおいて複数の水溶性ビタミンの分離・分析が可能であると考えられた。有機溶媒が使用可能になることで、今まで分析が難しかった複雑な成分や幅広い分野において応用が可能になると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既存のLC/IRMSでは、 ^{13}C は二酸化炭素の状態での分析のため、炭素を含んだ有機溶媒は今まで全く使用できなかったが、2次元LC/IRMSを利用することで有機溶媒の使用が出来る可能性を示すことが出来た。一般的に、HPLCやLC/MSでは溶離液は水ではなく、有機溶媒の使用が想定されているため、多様なLCカラム（順相、逆相、イオン交換等）を選択できるようになり、疎水性の農薬類、核酸、アミノ酸、脂肪酸、ビタミン、医薬品等まで対象成分が飛躍的に広がることが予想される。

研究成果の概要（英文）：In 2004, a liquid chromatograph/stable isotope ratio mass spectrometer (LC/IRMS) was developed and commercialized for the high-precision analysis of carbon stable isotope ratios of water-soluble components using a wet combustion method. The objective of this study was to develop a more innovative LC/IRMS instrument capable of utilizing organic solvents as eluents. The results suggest that LC/IRMS can separate and analyze multiple water-soluble vitamins by combining first and second dimensional columns. The availability of organic solvents will expand the utility of LC/IRMS across various fields and for analyzing complex components that have been challenging to analyze previously.

研究分野：環境科学

キーワード：LC/IRMS 安定同位体 炭素安定同位体 有機溶媒 食品

1. 研究開発当初の背景

2004年、Thermo Fisher Scientific社の技術者によって、湿式燃焼法を利用した水溶性成分の炭素安定同位体比の高精度分析が可能な液体クロマトグラフ/安定同位体比質量分析計(LC/IRMS)が開発、商品化された。その結果、ワインのエタノール、飲料のカフェイン、チョコレート バニリン、はちみつに含まれる糖類、チューインガムのキシリトールなどの食品偽装を見分ける応用研究等が現在、海外では報告され始めている。しかし、装置の制約として、溶離液が水のみしか使用することが出来ないために、対象物質は水溶性成分に限られることや、炭素安定同位体($\delta^{13}\text{C}$)のみを対象元素としていることなど、未だに多くの課題があった。

2. 研究の目的

本研究では、LC/IRMSの装置をさらに革新的に発展させ、溶離液に有機溶媒を使用することが出来る装置開発を目的とした。既存のLC/IRMSでは、 $\delta^{13}\text{C}$ は二酸化炭素の状態で分析するため、炭素を含んだ有機溶媒は今まで全く使用できなかったが、2次元LC/IRMSを利用することで有機溶媒の使用が出来る可能性がある。一般的に、HPLCやLC/MSでは溶離液は水ではなく、有機溶媒の使用が想定されているため、多様なLCカラム(順相、逆相、イオン交換等)を選択できるようになり、疎水性の農薬類、核酸、アミノ酸、脂肪酸、ビタミン、医薬品等まで対象成分が飛躍的に広がることが予想される。

3. 研究の方法

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。LCシステムは、カラムポンプA(1次元目カラム)、カラムポンプB(2次元目カラム)、ポストカラムポンプ、酸化ポンプの4台のポンプ(LC-10ADvp)とオートサンプラー(SIL-10ADvp)、デガッサー(DGU-14A)、UV検出器(SPD-10Advp)、高圧流路切り替えバルブ(FCV-12AH)から構成された。HPLCカラムは、PRP-AQUA(クロマニックテクノロジーズ社製)、SB-802HQ(Shodex社製)、AcclaimC-30(Thermo Fisher Scientific社製)、PolarAvantage(Thermo Fisher Scientific社製)、Poroshell120(Agilent Technologies社製)を使用した。対象成分としては、ビタミン類としてL-(+)-アスコルビン酸標準品、チアミン塩酸塩、葉酸、ニコチンアミド、リボフラビンを富士フィルム和光純薬株式会社にて購入した。

4. 研究成果

(1) 1次元目カラムにおける糖類・ビタミン類の分析

本研究では、1次元目カラムにおいて水溶性ビタミンの分離を試験した。対象成分は、水溶性ビタミン類(L-(+)-アスコルビン酸標準品、チアミン塩酸塩、葉酸、ニコチンアミド、リボフラビン)とした。試験したLCカラムは、逆相モードカラムのAcclaimC-30(Thermo

Fisher Scientific 社製), Polar Advantage (Thremo Fisher Scientific 社製), Poroshell120 (Agilent Technology 社製) とした。検出器には、PDA 検出器 (SPD-10Advp) を用いた。

成分の検出・同時分析が可能であったのは、AcclaimC-30 と Polar Advantage であった。AcclaimC-30 カラム (溶離液: CH₃CN/H₂O=60/40) を用いると、リボフラビンとニコチアミドは分離が可能であると考えられる (表 1, 図 1 (a))。また、Polar Advantage カラム (溶離液: CH₃CN/H₂O=60/40+0.05%リン酸) では、チアミンとニコチンアミドが分離可能であると考えられた (表 1, 図 1 (b))。

表 1: 各カラム・溶離液におけるリテンションタイム (min)

	AcclaimC-30	AcclaimC-30	Polar Advantage
試薬名/溶離液	CH ₃ CN/H ₂ O=60/40	CH ₃ CN/H ₂ O=60/40 +0.05%リン酸	CH ₃ CN/H ₂ O=60/40 +0.05%リン酸
L-(+)-アスコルビン酸	6.5	6.5	5.5
チアミン塩酸塩	5	5	4.5
葉酸	5	6	5.5
ニコチンアミド	7	6	5.5
リボフラビン	5	6.5	5.5

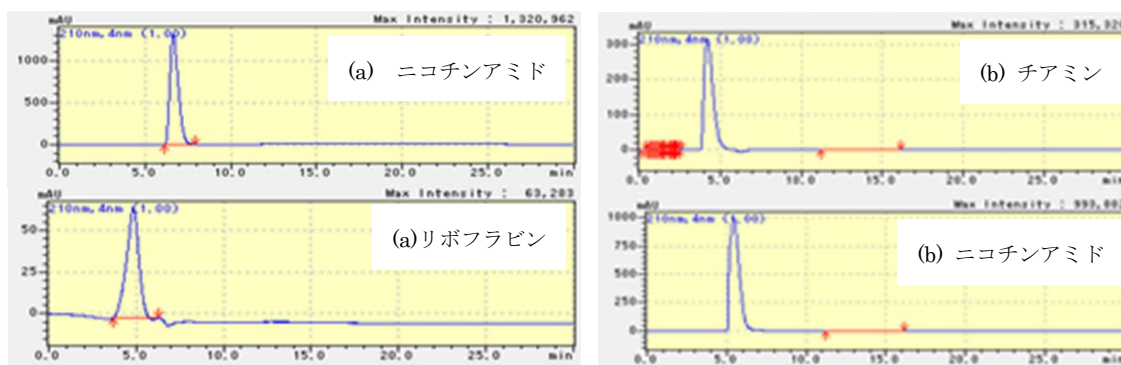


図 1: (a)カラム: AcclaimC-30、溶離液: CH₃CN/H₂O=60/40、流量: 0.5mL/min

(b) カラム: Polar Advantage、溶離液: CH₃CN/H₂O=60/40+0.05%リン酸、流量: 0.5mL/min

(2) 2次元目カラムにおける対象成分と有機溶媒の分離

2次元目カラムでは、1次元目カラムにて分離された対象成分が切り替えバルブを通り2次元目カラムに導入され、対象成分と有機溶媒を分離する。2次元目カラムとして試験したLCカラムは、逆相モードのPRP-AQUA (クロマニックテクノロジー社製)、サイズ排除モードのSB-802HQ (Shodex 社製) とした。LC/IRMS に、有機溶媒が入ると大きなダメージとなるため、本研究では有機溶媒と目的成分をバイアル内で混合して模擬的に試験を

行った。対象物質は、上記の試験と同様に水溶性ビタミンの L-(+)-アスコルビン酸標準品、チアミン塩酸塩、葉酸、ニコチンアミド、リボフラビンとした。結果は、PRP-AQUA カラムを用いると、チアミン塩酸塩、ニコチンアミドはエタノールと分析が可能であった(図 2)。葉酸は、検出は可能であったがリテンションタイムが近いため完全に分離することは困難であった。L-(+)-アスコルビン酸標準品、リボフラビンは、検出不可もしくは分離不可であった。以上より、検出可能であったチアミン塩酸塩、ニコチンアミドにおいては原理的には有機溶媒を用いて LC/IRMS にて分析可能であると考えられた。

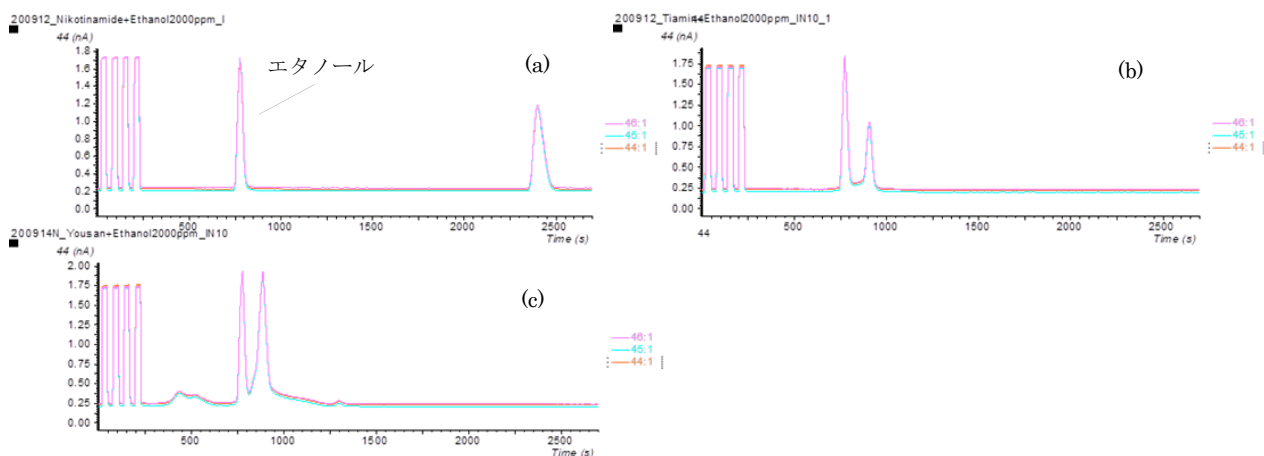


図 2 : (a) ニコチンアミドとエタノールの混合サンプル (各 2000ppm), (b) チアミンとエタノールの混合サンプル(各 2000ppm), (c) 葉酸とエタノールの混合サンプル(各 2000ppm)

本研究により、1次元目カラム (AcclaimC-30、Polar Advantage) と2次元目カラム (PRP-AQUA カラム) を組み合わせることにより、LC/IRMS において複数の水溶性ビタミンの分離・分析が可能であると考えられた。有機溶媒が使用可能になることで、今まで分析が難しかった複雑な成分や幅広い分野において応用が可能になると考えられる。一方で、1・2次元目カラムともに完全な分離が必要なことや水に溶けない脂溶性成分の分析など、現在においても多くの課題があることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3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 Nana Suto, Hiroto Kawashima	4. 巻 21
2. 論文標題 Measurement report: Source characteristics of water-soluble organic carbon in PM2.5 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 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
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 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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kohei Sasaki, Hiroto Kawashima
2. 発表標題 Determination of carbon stable isotope ratios of free amino acids in commercial soy sauce samples
3. 学会等名 8th Conference of the Forensic Isotope Ratio Mass Spectrometry Network (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川島洋人
2. 発表標題 大気環境分野における有害物質の炭素、窒素安定同位体比の最新の分析法及び発生源解析の研究
3. 学会等名 大気環境学会年会, 酸性雨分科会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

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

〔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.akita-pu.ac.jp/system/mse/sac/kawa/index.html>

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