

高速液体クロマトグラフィーによるぶどう酒中の ソルビン酸(SOA)の分析

久保田 寿々代

現在ぶどう酒中の SOA の分析法としては、厚生省環境衛生局食品化学課編、食品中の添加物分析法¹⁾による水蒸気蒸留後紫外外部吸収測定による法、および水蒸気蒸留した留液を溶媒抽出してガスクロマトグラフィー(GC)で測定する法、その他豊田²⁾の改良 TBS 法などが用いられている。しかしこれらの方法はいずれも操作が煩雑であり、UV法はぶどう酒中の紫外外部吸収を有する妨害成分により若干の吸収測定値を示すといわれ³⁾、GC法は多量の溶媒の使用と、操作行程中のロスで回収率に難点があり、また改良 TBS 法はぶどう酒中に含まれる SO₂ による呈色妨害等が問題であり、殊更微量の SOA の定量法としては必ずしも適当であると思われない。筆者は今回高速液体クロマトグラフィー (HSLC) によるぶどう酒中の SOA の定量法^{3-5,7)}を検討し、ルーチンにおけるスクリーニングの方法として、操作が簡便で分析時間が著しく短縮され精度的にもすぐれており、更に従来の GC 法では検出不可能な 3 ppm 以下の SOA も定量出来る利点を見出した。通常は食品に対する SOA の使用量あるいはその殺菌効果などから勘案して 3 ppm 以下の微量の SOA について論ずる必要性はないと考えられるが、たまたま某県で本県産のぶどう酒から微量の SOA が検出され、表示違反として摘発されたことから、県産ぶどう酒中の SOA 含量の実態を把握する目的で行ったものである。

実験方法

1. 装置および試薬

高速液体クロマトグラフ：島津 Du pont 製 LC-2F 型
検出器：島津製作所 SPD-1
カラム：Du pont 社 Zipax SAX (0.5m×2.1mm id)
pH メーター：堀場 M-7 型
マイクロシリンジ：オーストラリア製 10 μ l
移動相：0.01Mリン酸一ナトリウム+0.01M硝酸ナトリウム(pH4.5)
標準液：和光純薬試薬特級のソルビン酸で調製

2. 試料の前処理

透明なものはそのまま、混濁試料はろ過して透明とし、SOA 含量の多いものは適宜10~20倍希釈した。

3. HSLCによる定性、定量

標準溶液のピーク保持時間と導入試料のピーク保持時間により定性を行うと共に、標準溶液のピーク高による検量線から、絶対検量線法で試料中の含有量を算出した。

実験結果および考察

1. 測定条件の設定

HSLC における分離分析に最も重要なカラムは、McCalla³⁾、高槻⁴⁾の強陰イオン交換樹脂系の Zipax SAX を使用し、移動相として高槻⁴⁾の 0.01Mリン酸一ナトリウム緩衝液を用い、イオン強度を 0.01M硝酸ナトリウムで調整した。イオン交換クロマトグラフィーでは移動相の pH が分離に関して大きく影響するため、pHを 9.0⁷⁾ のアルカリ性域と 4.5⁴⁾ の酸性域で検討したところ、高槻⁴⁾の報告と同様 4.5 が適当な保持時間 (1.9分) を示し、SOA のピークが完全に分離できたので pH は 4.5 と設定した。またイオン強度は硝酸ナトリ

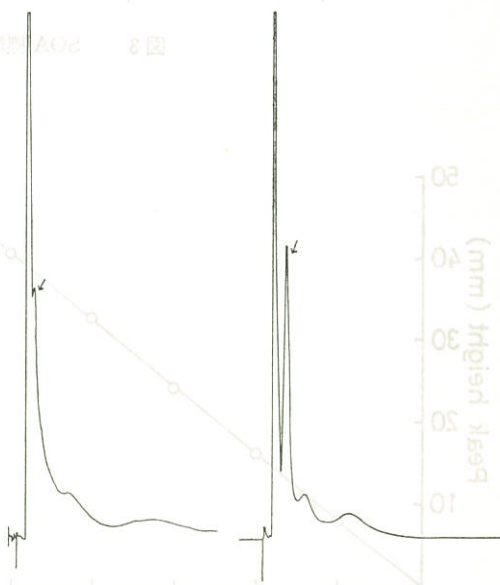


図1 ぶどう酒中の SOA 移動相 pH 9.0
イオン強度調整液 0.02M NaNO₃

図2 ぶどう酒中の SOA 移動相 pH 4.5
イオン強度調整液 0.01M NaNO₃

ウム濃度を0.01Mと0.02Mに調整して保持時間の影響をみたところ、これも高槻ら⁴⁾の報告と同様に低濃度の方が分離が良好であった。pHとイオン強度がぶどう酒中のSOAピーク保持時間におよぼす影響を図1、図2に示した。以上により設定したHSLCの測定条件を表1に示した。

2. 検量線の作成

高槻ら⁴⁾はSOA 5~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で良好な直線が得られたと報告しているが、今回筆者は更に微量の1~5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるような14%アルコール溶液(ぶどう酒のアルコール濃度)を作り、その10 μl ずつを注入して得られたクロマトグラムのピーク高で検量線を作成した。図3に標準溶液のクロマトグラムを示した。またその検量線は図4の如く原点を通る良好な直線が得られた。

表1 HSLCの分析条件

Column :	Zipax SAX (ϕ 2.1 mm \times 0.5 m)
Column temp. :	Room temperature
Detector :	UV 254 nm
Eluent :	0.01 M NaH_2PO_4 + 0.01 M NaNO_3 (pH 4.5)
Pressure :	45 kg/cm^2
Flow rate :	1 ml/min .
Sensitivity :	0.08 AUFS
Chart speed :	5 mm/min .
Sample size :	10 μl

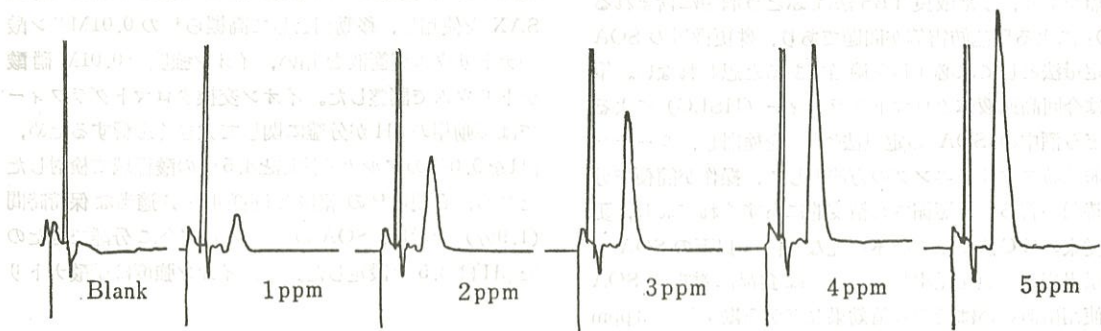


図3 SOA標準液のクロマトグラム

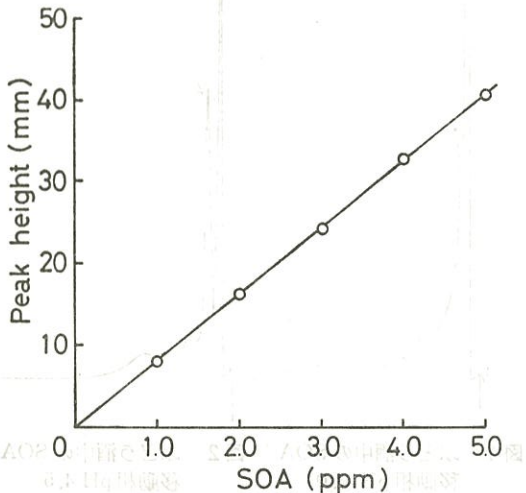


図4 SOAの検量線

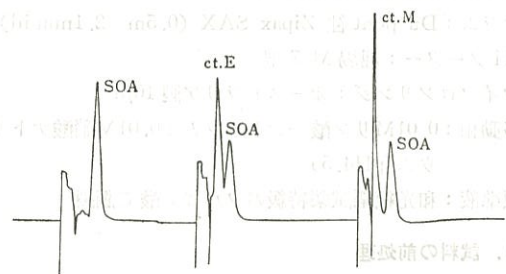


図5 SOAとクロトン酸エステルのクロマトグラム

3. 共存物質の影響

ぶどう酒を前処理なしで直接 HSLC に導入するため水溶性の多種多様な共存物質の影響を考慮する必要がある。

上田ら⁵⁾の報告では食品中の 0.1% 以上の食塩、5% 以上の砂糖は SOA ピークを妨害するとしている。ぶどう酒の場合食塩や砂糖は添加されていないが、天然色素その他種々のぶどう成分、SO₂ などが含まれており、これらが溶離してそのピークのリーディングやテーリングで SOA のピークが妨害されるのではないかと考えられたが、図 2 に示す如く SOA の分離は良好でほとんど影響ないものと思われる。またぶどう酒中には種々の芳香成分が含まれており、ぶどう酒の SOA を UV 吸収で測定する場合の吸収誤差の原因となるといわれている²⁾。今回はぶどう酒中の種々の芳香成分のうち、特にぶどう特有の芳香成分といわれ SOA と類似の構造をもつクロトン酸 (CH₃CH=CHCOOH) のエステル類⁶⁾が SOA のピークと重なり増大するのではないかと考えられたので、クロトン酸メチルおよびエチルについて検討したところ図 5 に示す如く SOA より保持時間が短かく完全に分離して妨害にならないことを確認した。

表 2 HSLC によるぶどう酒中の SOA 分析結果

単位: ppm

198	2.0	0.25	nd	nd
195	2.0	0.25	nd	nd
115	1.6	0.25	nd	nd
106	1.5	0.25	nd	nd
102	1.2	0.20	nd	nd
100	1.0	0.20	nd	nd
96	0.75	0.20	nd	nd
96	0.60	0.20	nd	nd
93	0.50	0.20	nd	nd
90	0.50	0.20	nd	nd
69	0.50	0.20	nd	nd
13	0.40	0.20	nd	nd
3.0	0.30	0.20	nd	nd
2.8	0.30	0.20	nd	nd
2.6	0.30	0.20	nd	
2.2	0.30	0.20	nd	

nd: 不検出

4. 添加回収試験

SOA を検出しないぶどう酒 100ml に SOA 100 μg, 300 μg ずつを添加し回収率を求めた結果 98%, 102% と良好な回収率を示した。

5. ぶどう酒中の SOA の定量

山梨県内で製造されたぶどう酒 78 検体について HSLC 法で分析した結果を表 2 に示した。定量限界は 0.2ppm と非常に高感度であった。78 検体中 10ppm 以上のもの 12 検体、定量限界の 0.2ppm から 3ppm までのもの 36 検体、定量限界以下のものが 30 検体であった。

ま と め

強陰イオン交換カラム Zipax SAX を用い、pH 4.5 の 0.01M リン酸一ナトリウム + 0.01M 硝酸ナトリウムを移動相とする高速液体クロマトグラフィーで、ぶどう酒中の SOA が従来法のような煩雑な前処理なしに、種々の共存物質の妨害もなく、98% 以上の良好な回収率で定性、定量できた。県産ぶどう酒 78 検体中の SOA を HSLC 法で定量した結果の定量値は、従来の GC 法の定量値より概して高い値を示した。これは前処理なしで直接定量するため、操作行程中のロスがないからであると考えられる。また従来の GC 法では定量不可能な 3ppm 以下の微量の SOA も定量することが出来、ピーク保持時間も 1.9 分と短かく、多試料の SOA のスクリーニング法としては極めてすぐれていると考える。

文 献

- 1) 厚生省: 食品中の添加物分析法 第 1 集 (1976)
- 2) 豊田正武ら: 食衛誌 17, 320~325 (1976)
- 3) McCalla M. A., Mark F. G. and Kipp W. H.: J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 60, 71~72 (1977)
- 4) 高槻圭悟, 加藤玲子, 堺 敬一: 宮城衛研年報 昭和 50 年度, 94~104 (1976)
- 5) 上田雅彦, 間崎真典: 食衛誌 18, 278~282 (1977)
- 6) 塩野香料: 商報 200, 9 (1978)
- 7) 島津製作所: デュポン液体クロマトグラフ資料集 Data Sheet No. 6