

紫外吸収検出法を用いた高速液体クロマトグラフィーによる有機酸分析のためのワイン試料の前処理

横塚 弘毅・松土 俊秀・櫛田 忠衛

Pretreatment of Wines with Charcoal for Determination of Organic Acids by High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection

KOKI YOKOTSUKA, TOSHIHIDE MATSUDO, and TADAE KUSHIDA

Laboratory of Wine Chemistry, The Institute of Enology and Viticulture, Yamanashi University, Kofu 400

A method for pretreatment of wines with charcoal was studied to determine organic acids by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. Wines were adjusted to pH 7.5 for complete recovery of organic acids from charcoal. The wine samples were treated with activated, acid-washed charcoal to remove ultraviolet absorption materials, and subjected to high performance liquid chromatography. When the method was applied to determination of organic acids in white and red wines, wine components did not affect the determination and the values obtained were reproducible.

有機酸の分離定量法としては、ガスクロマトグラフィー^{1,2)}、シリカゲル分配クロマトグラフィー^{3,4)}、陰イオン交換クロマトグラフィー^{5,6)}などが用いられてきた。ガスクロマトグラフィーでは、不揮発性有機酸を揮発性の誘導体に変えるための処理が必要であり、シリカゲルクロマトグラフィーでは、1回の分析にかなりの時間がかかり連続分析も難しい。陰イオン交換クロマトグラフィーは、試料の前処理も全く必要としないか、非常に簡単な前処理で十分で定量性も良く、またカルボン酸に特異的に反応する試薬^{6,7,8)}を用いたポストラベル法による検出系を組込んだ分析装置、カルボン酸分析計(東京理化)や有機酸分析計(東洋曹達)が市販され、より正確な分析値が得られるよう

になった。しかし、検出系のフローダイアグラムが複雑で、試薬調製に時間がかかり、保守や操作が複雑で、その上分析装置が高価である。

一方、ポンプ部、分離カラム、紫外吸収検出器、レコーダーよりなる汎用、簡易型の高速液体クロマトグラフは比較的安価で、操作、保守共にし易いため、その普及はめざましく、有機酸分析にもしばしば用いられている。しかし紫外吸収検出器による定量は、標準試料では成功しても、実際の試料、例えばぶどう果汁や紫外吸収物質を含む試料では適用困難な場合が多い。

そこで、本論文では、紫外吸収法を用いた高速液体クロマトグラフィーによる有機酸の定量分析を可能にするためには、有機酸以外の紫外吸収物質を除去することが必要であるので、これを目的とした試料の前処理を検討したので報告する。

*Chemical Studies on Coloring and Flavoring Substances in Japanese Grapes and Wines (XIX)

Table 1. Composition of Koshu and Riesling white wines, and Muscat Bailey A and Cabernet Sauvignon red wines (1982).

Wines	Extract (%)	Alcohol (% volume)	pH	Total acid (g/100ml, as tartaric acid)	Volatile acid (g/100ml, as acetic acid)	Reducing sugar (g/100ml, as glucose)	Total phenol (mg/l, as gallic acid)
Koshu	4.8	11.5	3.09	0.69	0.07	1.22	372
Riesling	4.4	11.4	3.30	0.71	0.06	1.03	289
Muscat Bailey A	3.0	13.7	3.45	0.73	0.02	0.12	944
Cabernet Sauvignon	3.2	11.8	3.71	0.74	0.04	0.10	882

実験方法

標準有機酸溶液 有機酸は全て市販特級試薬を用いた。クエン酸、酒石酸各500mg、リンゴ酸、コハク酸、酢酸、乳酸各1gを水に溶かし1lとしたものを標準有機酸溶液とした。

活性炭 活性炭は次のように前処理して用いた。クロマトグラフ用活性炭(和光)を水洗後、0.1N塩酸中に懸濁し3時間煮沸した。室温で冷却し、ブフナーロ斗上で水洗、汙過した。活性炭は1/1,000M EDTA 溶液中に懸濁し30分間攪拌しブフナーロ斗上で水洗、汉過し、加熱乾燥して活性化した。

ワイン 当研究施設付属育種試験地で1982年に収穫した甲州、リースリング、マスカットベリーA、カベルネソービニオンぶどうを用い、ワイン試験工場で常法通り試醸した2種の白ワイン、2種の赤ワインを用いた。ワインの分析は、国税庁所定分析法注解⁹⁾および *Methods for Analysis of Musts and Wines*¹⁰⁾ に書かれている方法によった。結果はTable 1に示した。

装置と操作 有機酸の分離装置に用いた装置は、島津高速液体クロマトグラフ、ポンプユニット LC-4A、紫外分光光度計 SPD-2AS、データ処理装置、クロマトパック C-RIA および島津ゲルSCR101Hカラム(0.8×30cm)である。試料はミリポアフィルター(ゲルマン、0.45μm)で汉過後、汉液の50μlを協和精密製オートサンプラー KMT-60を用いてカラムに添加し、カラム温度50℃、流速0.5ml/min、0.1%リン酸で溶出した。有機酸の検出は210nmで行った。

結果及び考察

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)でぶどう果汁やワイン中の有機酸を分離定量する際最も問題となることは、分離に用いるカラム充填剤の選択と検出法である。標準有機酸試料では分離定量に成功しても、実際の試料では有機酸以外の多くのワイン成分が存在するために、分離、定量共に失敗する場合がある。すなわち、このような試料を HPLC 用イオン交換ゲルやゲル汉過剤を用いて分析した時、いくつかのワイン成分、特にフェノール類がカラムに吸着し溶離剤で溶出できずに分離効率を著しく低下させるだけでなく、しばしば数十試料を分析しただけでカラムが劣化し、分析不能となった。また、フェノールをはじめとする多くの紫外吸収物質が存在し、これらの物質が有機酸と重なって溶出するため、これらの種類と濃度によって有機酸の分析値が変化し、特に赤ワイン中の有機酸の分析を紫外吸収法で行うことは困難であった。

そこで、フェノール成分を分析試料から除去することを第1の目的として活性炭処理を行った。カベルネソービニオン赤ワインと甲州白ワインを各々水で1/10に希釈後、0.2%~2%となるように活性炭を加え、室温でゆるやかに攪拌した。これを東洋汉紙No.5Cで汉過後、汉液のフェノール量を前に述べた方法¹¹⁾で定量した。2つのワイン中のポリフェノールは1%の活性炭処理で完全に除去された(Fig. 1)。

しかし、試料のpHが低いと活性炭処理によって有機酸はかなり損失した。標準有機酸溶液の活性炭処理前後に、試料のpHを3から9まで0.1N KOHまたは0.1N HClで調整したものを、紫外吸収検出法(210nm)を用いたHPLCで分析し、各々の有機酸

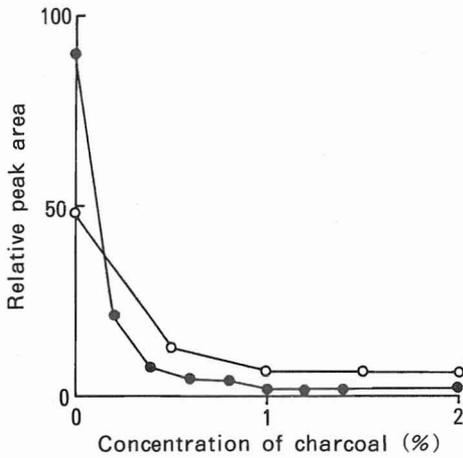


Fig. 1. Removal of phenols from Koshu wine (-○-○-) and Cabernet Sauvignon wine (-●-●-) by treatment with charcoal.

Koshu and Cabernet Sauvignon wines were diluted 10-fold with distilled water. To each diluted wine, charcoal was added to give a final concentration of 0.2 % to 2 %. The mixture was gently stirred for 30 min and filtered through a Toyo No. 5c filter paper. Total phenol content in the filtrate was determined by the method described previously.¹¹⁾

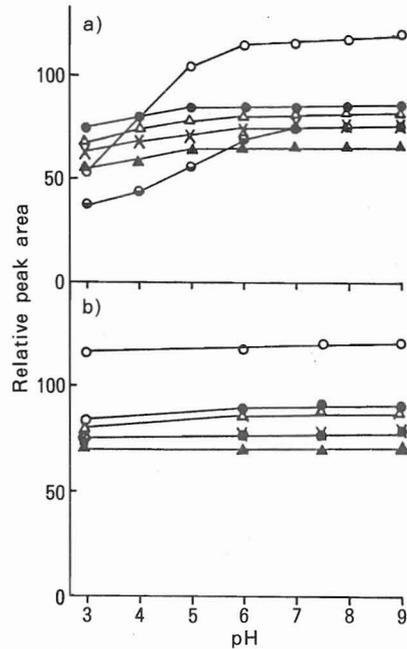


Fig. 2. Effect of pH on recovery of standard organic acids on treatment with charcoal.

In (a), the standard solutions containing citric acid (0.05 %), tartaric acid (0.05 %), malic acid (0.1 %), acetic acid (0.1 %), succinic acid (0.1 %), and lactic acid (0.1 %) were prepared at different pHs from 3.0 to 9.0. To the sample solution, charcoal was added to give a final concentration of 1 %. The mixture was stirred for 30 min and filtered through a Toyo No. 5c filter paper. Organic acids in the filtrate was analyzed by high performance liquid chromatography.

In (b), the standard solution was adjusted to pH 7.5 and treated with charcoal (1 %) as described above. The filtrates were adjusted to pHs from 3 to 9. Each filtrate was analyzed for organic acids by high performance liquid chromatography.

The procedure for high performance liquid chromatography is described in Fig.5. Citric acid, -○-○-; Tartaric acid, -●-●-; Malic acid, -△-△-; Acetic acid, -×-×-; Succinic acid, -●-●-; Lactic acid, -▲-▲-.

ピークの相対的面積を比較した結果をFig.2に示した。Fig2 (a) では、pHを3から9に調整した標準有機酸溶液を活性炭(1%)処理後、濾過した濾液を試料とした、(b)ではpH7.5とした標準溶液を活性炭処理し濾過後、濾液をpH3から7としたものを試料とした。活性炭処理前にpH7以下に調整した標準溶液は活性炭処理によって有機酸を損失し、特にクエン酸とコハク酸は著しく回収率が悪い。これに対し、活性炭処理前にpH7.5とした有機酸溶液の定量値は、処理後にpHを酸性としても、pH7.5の有機酸溶液の定量値とあまり変わらない。活性炭処理をしなければ有機酸溶液のpHがいくつであっても定量値は一定であった。これらのことは、活性炭処理の際にpHを中性とすること、つまり全ての有機酸を塩の形にすれば活性炭処理による損失は全くないことが分った。

Fig.3は、甲州ワインと標準有機酸を含む溶液(pH7.5)に0.5~2.0%となるように活性炭を加え、

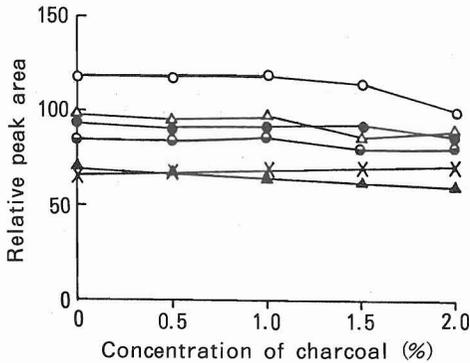


Fig. 3. Treatment of a mixture of Koshu wine and a standard solution of organic acids with charcoal.

Koshu wine, 2.5 ml, was mixed with 6.5 ml of a standard solution (citric acid, 0.05%, tartaric acid 0.05%, malic acid, 0.1%, acetic acid, 0.1%, succinic acid, 0.1%, and lactic acid, 0.1%) and 16 ml of distilled water. To the sample solution, charcoal was added to give the final concentrations from 0.2% to 2.0%. The mixture was gently stirred at room temperature for 30 min and filtered through a Toyo No. 5c filter paper, and the filtrate was subjected to high performance liquid chromatography described in Fig. 5. Citric acid, -○-○-; Tartaric acid, -●-●-; Malic acid, -△-△-; Acetic acid, -×-×-, Succinic acid, -◐-◐-; Lactic acid, -▲-▲-.

その濾液中の有機酸をHPLCで分析し、結果を各有機酸ピークの相対的面積比で示したものである。値は、ワインと有機酸を含む試料の各有機酸の分析値から、ワインのみを含む試料の分析値を差し引いたものである。活性炭量が1%までは、活性炭処理をしていない試料（活性炭量0%）の各有機酸の定量値とほぼ同一となったが、1%を越えると徐々に各有機酸の定量値は減少した。

以上の結果に基づき、以下の操作で標準曲線を作成した。甲州ワイン2.5mlといろいろな濃度の標準有機酸溶液を混合し、水で25 mlとしたものを試料とした。これらを0.1N NaOHでpH7.5とした後、1%に

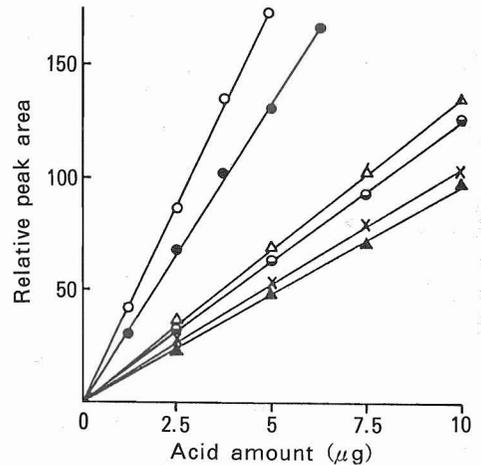


Fig. 4. Standard curves of organic acids.

Koshu wine, 2.5 ml, was mixed with various volumes of a standard solution of organic acids (citric acid 0.05%, tartaric acid 0.05%, malic acid, 0.1%, acetic acid 0.1%, succinic acid 0.1%, and lactic acid 0.1%) and the mixture was diluted to 25 ml with distilled water.

The diluted Koshu wine was prepared by mixing 2.5 ml of Koshu wine with 22.5 ml of distilled water.

The diluted wine was filtered through a membrane filter (Gelman, 0.45 μm in pore size) before chromatography.

The diluted wine and the above diluted wine containing standard organic acids of various concentrations were separately analyzed for organic acids by high performance liquid chromatography described in Fig. 5. Relative peak area of each organic acid was estimated from the difference between the value for the diluted wine containing organic acids and that for only the diluted wine.

Citric acid, -○-○-; Tartaric acid, -●-●-; Malic acid, -△-△-; Acetic acid, -×-×-; Succinic acid, -◐-◐-; Lactic acid, -▲-▲-.

Table 2. Organic acid analysis of a mixture of a standard solution of organic acids and Koshu, Riesling, Muscat Bailey A, or Cabernet Sauvignon wine.

Organic acids	Relative peak area of organic acids				
	Standard	A	B	C	D
Citric acid	100	108	100	112	92
Tartaric acid	100	100	108	110	98
Malic acid	100	104	97	109	106
Acetic acid	100	106	106	110	99
Succinic acid	100	99	106	93	107
Lactic acid	100	92	101	94	97

A standard solution of organic acids (citric acid 0.05 %, tartaric acid 0.05 %, malic acid 0.1 %, acetic acid 0.1 %, succinic acid 0.1 %, and lactic acid 0.1 %) 6.5 ml, was mixed with 2.5 ml of each wine (Koshu, A; Riesling, B; Muscat Bailey A, C; or Cabernet Sauvignon, D) and 16 ml of water. To each sample solution, charcoal was added to give a final concentration of 1 %. The mixture was gently stirred for 30 min and filtered through a Toyo No. 5c filter paper. Organic acids in the filtrate were determined by high performance liquid chromatography described in Fig. 5.

なるように活性炭を加え30分間ゆるやかに攪拌後東洋濾紙No.5cを用いて濾過した。別に2.5mlの甲州ワインを水で25 mlとし上のようにpH調整、活性炭処理を行った。これらの試料をHPLCで分析し、2種の試料の各有機酸ピークの面積の差を求めた。この差は分析に供した標準有機酸量を示すと同時に、この条件下における有機酸の分離定量に及ぼすワイン成分の影響をも加味した結果である。Fig.4は各々の有機酸量の相対的ピーク面積と有機酸量との関係と示したものである。6種の有機酸について、有機酸量とピーク面積との間には直線関係があった。

Table 2はFig.4と同様な分析を4種のワイン、甲州ワイン、リースリングワイン、マスカットベリーAワイン、カベルネソービニオンワインの各々と標準有機酸溶液とを混合した試料について行ったものである。混合試料をpH7.5に調整後、1%活性炭処理をしたものをHPLCで分析して得た値から、同様な前処理をした標準有機酸を含まない各々のワイン中の有機酸分析値を引いた差、すなわち、混合した標準有機酸の測定値がTable 2に示されている。混合した各々の有機酸の相対量を100とした時、4種の混合試料中の有機酸の相対量はいずれも100に近い値となり、

赤ワインでも上のような試料の前処理を行えば、紫外吸収法を用いたHPLCで十分に有機酸分析が可能となった。

Fig. 5は、甲州ワイン、マスカットベリーAワイン及び標準有機酸溶液をpH7.5に0.1N NaOHで調整し、1%活性炭処理した試料を島津ゲルSCR 101で分離し、210nmで検出した有機酸のクロマトグラフである。ワインを試料とした時、活性炭処理をしないと有機酸以外のワイン成分が有機酸のピークと重なって溶出し、特に赤ワインでは、クエン酸、酒石酸及びクエン酸の前に溶出するフェノールと考えられる大きなピークが存在するため、實際上これらの有機酸の定量は困難である。しかし、ワインをpH調整後に活性炭処理をすれば、ベースラインも一定となり、また隣り合っている有機酸ピークの分離度や分離効率が著しく向上し、かつこの前処理による有機酸の損失は全く認められない。

従って、本法によって分析試料を前処理すれば、有機酸のカルボキシル基の紫外吸収を検出に利用したHPLCによって、ぶどう果汁やワインのごとく多量の複雑な有機酸以外の成分を含むジュースや醸造品の有機酸分析が可能となっただけでなく、また他の検出

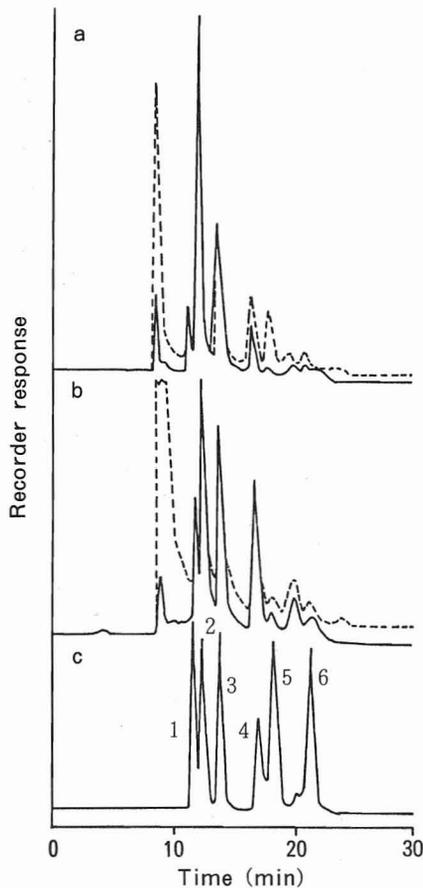


Fig. 5. Chromatograms of organic acids in Koshu wine (a), Muscat Bailey A wine (b), and a standard solution (c).

The curves represented by dotted lines are the chromatograms of organic acids in Koshu and Muscat Bailey A wines which were not treated with charcoal. They were diluted 5-fold with distilled water and filtered through a membrane filter (Gelman, $0.45 \mu\text{m}$ in pore size).

The curves represented by solid lines are the chromatograms of Koshu wine and Muscat Bailey A wine, which were adjusted to pH 7.5 and treated with charcoal, and a standard solution of organic acids (1: citric acid 0.05%, 2: tartaric acid 0.05%, 3: malic acid 0.1%, 6: acetic acid 0.1%, 4: succinic acid 0.1%, and 5: lactic acid 0.1%)

Koshu wine (Muscat Bailey A wine) was diluted 5-fold with distilled water and the diluted wine was adjusted to pH 7.5 with 0.1 N NaOH. To this, charcoal was added to give a final concentration of 1%. The mixture was stirred at room temperature for 30 min with a magnetic stirrer and filtered through a Toyo No. 5c filter. Each filtrate ($50 \mu\text{l}$) was applied to a column of Shimadzu Gel SCR 101 H ($0.8 \times 30 \text{ cm}$). Organic acids were eluted with 0.1% phosphoric acid solution at a flow rate of 0.5 ml/min at 50°C . For detection of organic acids, the absorbance of the effluent was read at 210 nm.

法を利用したHPLCでの有機酸分析をする際の試料の前処理法としても有効であると考えられる。

要 約

有機酸の検出に210nmでの紫外吸収を、分離にゲル濾過剤を利用した高速液体クロマトグラフィーによってワイン中の有機酸を分析するために次のようなワインの前処理を行った。ワインのpHを7.5とし、1%となるように活性炭を加えて攪拌後、濾紙で濾過し、得られた濾液を試料とすれば、ワイン中の有機酸を最も簡単な分離法、検出法を用いた高速液体クロマトグラフィーで分析できた。

文 献

- 1) Quin, L.D., Hobbs, M.E.: *Anal. Chem.*, **30**, 1400 (1958).
- 2) 山下市二, 田村太郎, 吉川誠次, 鈴木重治: *Japan Analyst*, **22**, 1334 (1973).
- 3) Bulen, W. A., Varner, J. F., Burrell, R. C.: *Anal. Chem.*, **24**, 187 (1952).
- 4) Marvel, C. S., Rands, R. D.: *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 2642 (1950).
- 5) Jandera, P., Churacek, J.: *J. Chromatogr.*, **86**, 351 (1973).
- 6) Nakajima, M., Ozawa, Y.: *J. Chromatogr.*, **123**, 129 (1976).
- 7) 特公昭57-34502
- 8) 島津善美, 渡辺正澄: 醸協, **76**, 418 (1981).
- 9) 注解編集委員会編: 国税庁所定分析法注解. 日本醸造協会, 東京 (1974).

- 10) Americe, M. A., Ough, C. S. : *Methods for Analysis of Musts and Wines*, John Wiley & Sons, Inc., New York, Chichester, Brisbane and Toronto (1980).
- 11) Yokotsuka, K., Matsudo T., Amemiya, S., Nozaki, K., Tanaka, W., Kushida, T. : *J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ.*, 17, 65 (1982).

(昭和58・8・31受付)