

## ノ ー ト

## 紫外吸収法と指示薬発色法の同時検出を用いた高速液体クロマトグラフィーによるワイン中の有機酸分析\*

横塚弘毅・松土俊秀・西野なか子

## Analysis of Organic Acids in Wines by High Performance Liquid Chromatography using a Continuous-Flow, Dual Spectrophotometric Detection System

KOKI YOKOTSUKA, TOSHIHIDE MATSUDO, and NAKAKO NISHINO

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

Organic acids in 11 Koshu white wines and 11 Muscat Bailey A red wines produced in different years were analyzed by continuous-flow high performance liquid chromatography (HPLC). Two spectrophotometric detection methods were used in sequence, the first measuring ultraviolet absorbance at 210 nm and the second, after development with bromocresol purple, measuring visible absorbance at 430 nm. The wines were treated with 1 % charcoal at pH 7.5 prior to HPLC.

It was not possible to analyze succinic acid using ultraviolet absorption at 210 nm as the detection method. This was due to the presence of unknown substances in the wine which were also absorbed at 210 nm and eluted in the same position as succinic acid. Similarly, using bromocresol purple, experimental values for malic acid were also fairly lowered due to unknown substances in the wine which were eluted in the same position as malic acid and may have interfered with color development with the malic acid. However, the experimental values obtained by these two detection methods for organic acids other than succinic acid and malic acid were not considerably different.

ワインのフレーバー、安定性あるいは品質に影響する最も重要な成分の一つは有機酸である。有機酸はブドウの熟度を示す一つの因子であり、またワインの酸味、タンパク質の安定性、酒石酸カリウムの沈澱、赤ワインの色素安定性などに深く関連している。従ってブドウやワイン中の有機酸を定量する多くの方法が報告され、最近では、クロマトグラフィー、特に高速液

体クロマトグラフィー (HPLC) による方法が、有機酸を微量で、簡便にかつ正確に定量できる有力な手段として注目されている。

HPLC によって有機酸を分析する時、210 nm 付近のカルボキシル基の吸収<sup>1)</sup>を利用するか、あるいは反応系などを応用した選択的検出法<sup>2,3)</sup> (ポストカラム法) で検出することが行われている。前者は夾雑物によって検出が妨害されることが多く、後者は有機酸のみに選択的に反応する発色試薬がなく、また分析装置が複雑で操作に困難を伴うことが多い、

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

著者らは、先に紫外吸収法を用いたワイン中の有機酸分析について報告したが<sup>1)</sup>、この分析結果と先に述べた反応系などを応用した選択的検出法を用いて得られた結果とを比較するには、比較すべき2種の検出システムを同一のクロマト系内に組み込み、同時に有機酸を定量する必要がある。そこで、ここでは紫外吸収法で分離カラムから溶出した有機酸を定量すると同時に、指示薬発色法による検出を試み、両検出法を比較した。

### 実験方法

**装置** 本実験で使用した装置の概要を Fig. 1 に示すクロマトグラフィーは、島津 SCR 101 H ゲルを充填した 0.8 X 30 cm のステンレススチールカラム (Fig. 1 中(6)) を用い、このカラムを 53°C の恒温槽 (島津 CTO-2A, (5)) に置いた。試料 20  $\mu$ l はオートサンプラー (協和 KSST-60, Fig. 1 中(4)) を用いて添加した。溶出液用ポンプ (0.4 ml/min, Fig. 1 中(2)) は島津 LC-3 A, 反応試薬送液用ポンプ (0.4 ml/min, Fig. 1 中(9)) は島津 LC 4 A を用いた。有機酸は島津 SPD 2 AS 紫外部吸収検出器 (210 nm), (Fig. 1 中(7)) と島津 SPD-1 可視部吸収検出器 (430 nm), (Fig. 1 中(8)) を用いて検出し、溶出図の作成及び出現した各ピークの面積の算出は島津クロマトバック CR 2 AX (INP-R 2 A) (Fig. 1 中(15)) で行った。反応管と送液管は内径 0.5 mm, ダンパーは 0.1 mm, また ミキシング用には 0.3 mm のステンレススチール管を使用した。

**溶出と反応試薬** 有機酸の SCR 101 カラムからの溶出には 0.02% 過塩素酸を用いた。指示薬発色法を用いた分析においてはブロムクレゾールパープル (BCP) 指示薬 (BCP 0.0002 モルと酸性亜リン酸ナトリウム 0.008 モルを含む水溶液)<sup>2)</sup> と反応後、430 nm の吸光度を測定することにより有機酸を検出した。

**ワインの前処理** ワインの活性炭による前処理は前報<sup>1)</sup>と同様に行った。

### 結果及び考察

Table 1 は 6 種の標準有機酸、各 20  $\mu$ g を HPLC で分離し 210 nm で検出後 (UV 法)、更に BCP で発色し、430 nm で検出 (指示薬発色法) することによって得られるクロマトグラム上の各有機酸のピーク面積を比較したものである。また Fig. 2 はこれらの標準有機酸

のクロマトグラムの一例を示したものである。Fig. 3 の 6 種の有機酸の検量線に見られるように、各有機酸 40  $\mu$ g までは原点を通る良好な直線性が得られた。

Table 1 では、酒石酸 25  $\mu$ g を含む水溶液を前処理なしで HPLC で分析し、得られたピーク面積を 1 とした時の相対値として表してある。UV 法で測定した時には、酒石酸のピーク面積と比べると、他の五つの有機酸の相対ピーク面積はかなり低いが、指示薬発色法で測定すると、乳酸を除いては、酒石酸のピーク面積と他の有機酸のそれらとは、ほぼ等しい。この標準有機酸混合液を pH 7.5 とした後に、活性炭 (1% 添加) で処理した時と、pH 無調整で活性炭処理した時とでは、どちらの検出法で測定しても、pH を調整しないと、ピーク面積は著しく小さくなった。これらのことから、以後は、ワイン試料を pH 7.5 に 0.1 N 水酸化ナトリウムで調節し、1% になるように活性炭を加えて混合後、ろ過し、そのろ液を HPLC 用試料とした。Table 2 は標準有機酸とワインを混合した試料を HPLC で分析し、UV 法と指示薬発色法を比較検討した結果である。表中、混合液 (各標準有機酸(A)とワイン中の各有機酸(B)より成る) の各有機酸の分析値(C)から各標準有機酸の分析値(A)を差し引いた値(C-A)は、ワイン中の各有機酸の分析値と一致するはずである。しかし、UV 法では、コハク酸、乳酸、酢酸の分析値、特にコハク酸の値が非常に異なり、一方指示薬発色法では、リンゴ酸と乳酸の分析値が異なっている。

Table 3 と Table 4 は、それぞれ 1975 年から 1985 年の甲州白テールワインとマスカットベリー A 赤テールワインの有機酸分析を UV 法と指示薬発色法を用いた HPLC 法で行った結果である。甲州ワインの有機酸を指示薬発色法で検出するとクエン酸と酒石酸のピークが重なった多くのクロマトグラムが得られた。しかし、UV 法では、何れの有機酸のピークも重ならなかった。酒石酸の値は、UV 法と指示薬発色法の何れの方法で測定しても大きな差はないが、リンゴ酸とコハク酸の値には非常に大きな差が見られた。また、乳酸と酢酸にも大きな差が認められた (Table 3)。

白ワインで得られたと同様な傾向が赤ワインの有機酸を分析した結果にも認められた (Table 4)。

Table 5 は、上記の白及び赤ワインの pH と滴定酸度 (全酸) を示したものである。既に知られているように各ワインの pH と滴定酸度あるいはこれらの値と

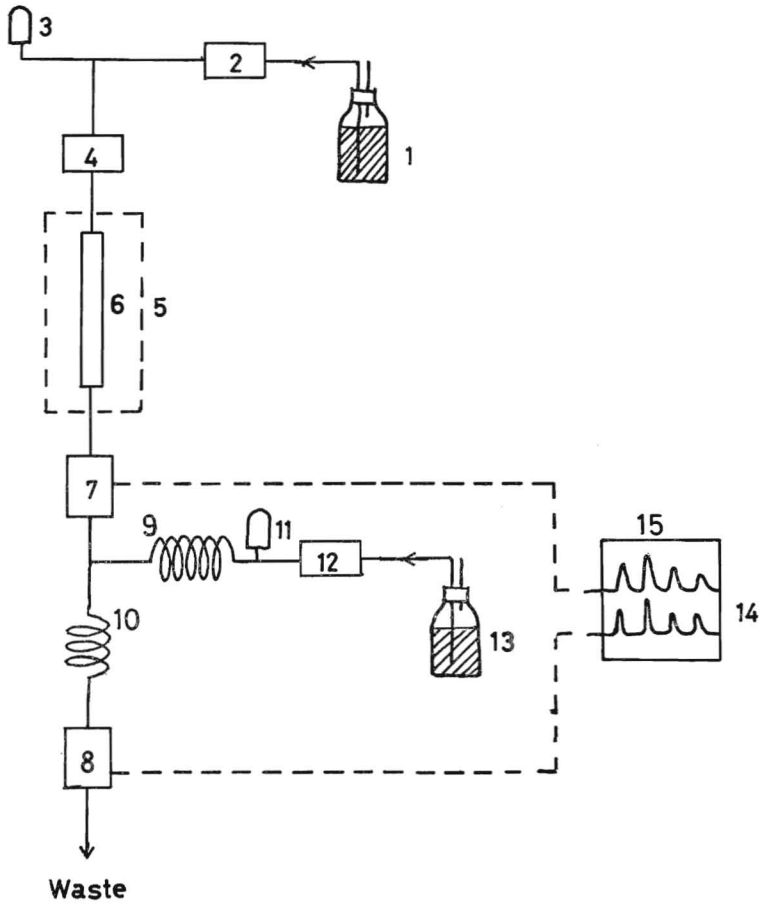


Fig. 1. Flow diagram of the system for organic acid chromatography. 1) eluent reservoir (0.02% perchloric acid, 2) eluent pump (flow rate, 0.4 ml/min), 3) pulse damper, 4) autosampler, 5) oolumn oven (53°C), 6) chromatographic column (4 mm X 15 cm, Shimadzu gel SCR 101H), 7) spectrophotometer (210 nm), 8) spectrophotometer (430 nm), 9) mixing coil (0.3 mm X 1 m), 10) back pressing coil (0.1 mm X 2 m), 11) pulse damper, 12) reagent pump (flow rate, 0.4 ml/min), 13) reagent reservoir (aqueous solution containing 0.0002 M bromocresol purple and 0.008 M acid sodium phosphite), 14) recording computer.

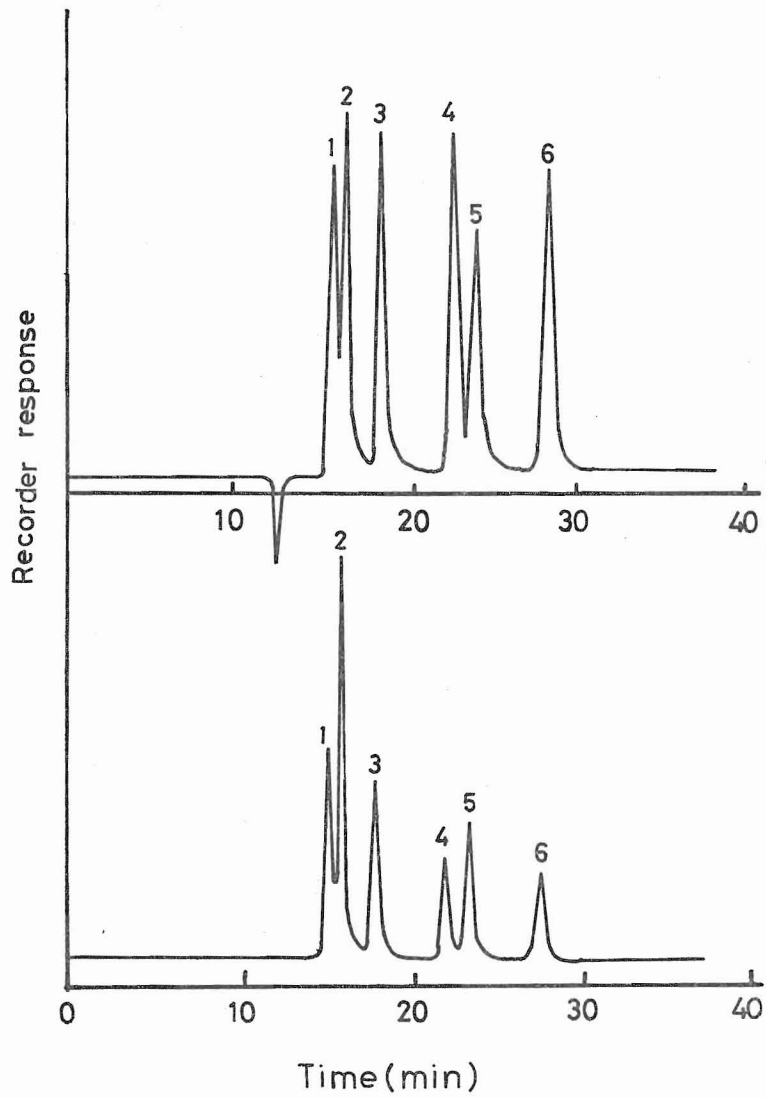


Fig. 2. Typical chromatogram of a standard mixture of organic acids (25  $\mu$ g of each organic acid). Chromatographic conditions are given in Fig. 1 and text.

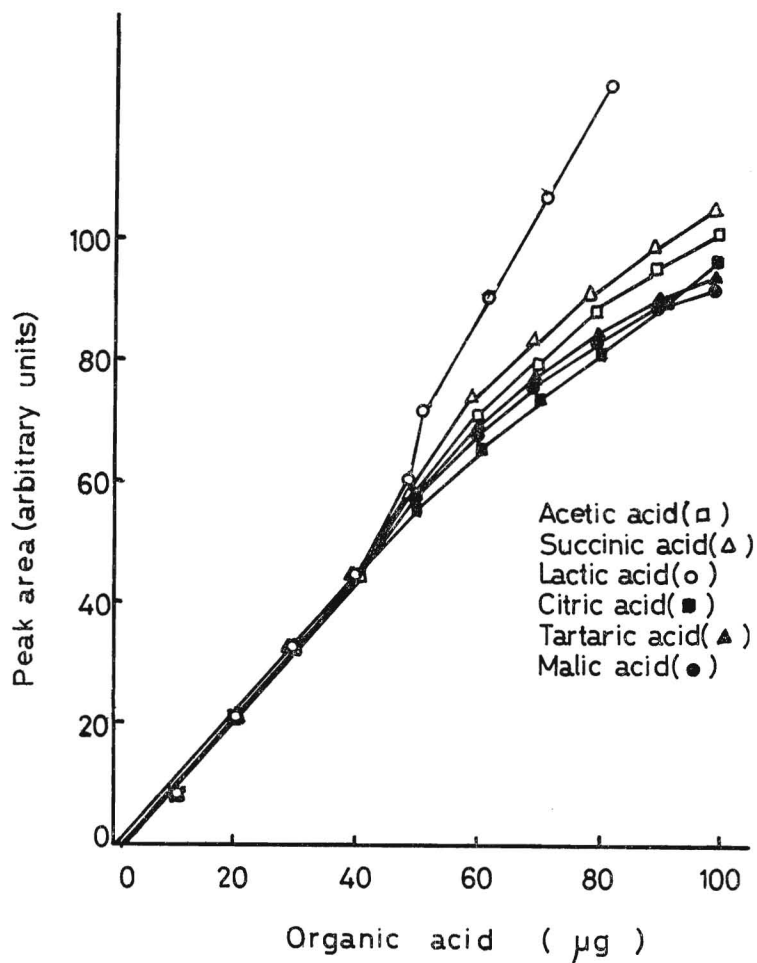


Fig. 3. Standard curves of organic acids.

Organic acids were detected by the method using development with bromocresol purple.

Table 1. Charcoal treatment of standard organic acid solution.

| Standard organic acids                       | Control<br>(No treatment charcoal)<br>(Expressed as tartaric acid) | pH when treated with charcoal |        |
|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------|--------|
|                                              |                                                                    | No pH adjustment              | pH 7.5 |
| Ultraviolet (210 nm)                         |                                                                    |                               |        |
| Tartaric acid                                | 1.000                                                              | 0.877                         | 1.036  |
| Malic acid                                   | 0.484                                                              | 0.415                         | 0.503  |
| Citric acid                                  | 0.538                                                              | 0.272                         | 0.556  |
| Lactic acid                                  | 0.295                                                              | 0.215                         | 0.287  |
| Acetic acid                                  | 0.347                                                              | 0.326                         | 0.368  |
| Succinic acid                                | 0.337                                                              | 0.215                         | 0.344  |
| Development with bromocresol purple (430 nm) |                                                                    |                               |        |
| Tartaric acid                                | 1.000                                                              | 0.835                         | 1.011  |
| Malic acid                                   | 1.016                                                              | 0.857                         | 1.022  |
| Citric acid                                  | 0.867                                                              | 0.419                         | 0.861  |
| Lactic acid                                  | 0.570                                                              | 0.540                         | 0.553  |
| Acetic acid                                  | 1.214                                                              | 1.196                         | 1.247  |
| Succinic acid                                | 1.093                                                              | 0.755                         | 1.126  |

A standard mixture of 20  $\mu\text{g}$  of each organic acid was treated with charcoal at pH 7.5 according to the method described by Yokotsuka et al<sup>1)</sup>. The values are expressed as relative peak areas where the peak area for 20  $\mu\text{g}$  tartaric acid is set at 1.0.

Table 2. Analysis of organic acids in Koshu white wine as detected by ultraviolet absorption and, after development with bromocresol purple, visible absorption.

|                                              | Peak area (Arbitrary units)                            |                                  |            |                   |
|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------------|------------|-------------------|
|                                              | A<br>Standard organic acids<br>(10 $\mu\text{g}$ each) | B<br>Wine<br>(10 $\mu\text{l}$ ) | C<br>A + B | C - A             |
| Ultraviolet (210 nm)                         |                                                        |                                  |            | ( $\times 1000$ ) |
| Citric acid                                  | 116                                                    | 22                               | 137        | 21                |
| Tartaric acid                                | 216                                                    | 605                              | 822        | 606               |
| Malic acid                                   | 105                                                    | 242                              | 336        | 231               |
| Succinic acid                                | 72                                                     | 96                               | 98         | 26                |
| Lactic acid                                  | 62                                                     | 6                                | 65         | 3                 |
| Acetic acid                                  | 84                                                     | 19                               | 97         | 13                |
| Development with bromocresol purple (430 nm) |                                                        |                                  |            | ( $\times 1000$ ) |
| Citric acid                                  | 162                                                    | 43                               | 203        | 41                |
| Tartaric acid                                | 191                                                    | 619                              | 803        | 612               |
| Malic acid                                   | 193                                                    | 453                              | 618        | 425               |
| Succinic acid                                | 212                                                    | 60                               | 273        | 61                |
| Lactic acid                                  | 104                                                    | 17                               | 113        | 9                 |
| Acetic acid                                  | 235                                                    | 64                               | 306        | 17                |



Table 3. Analysis of organic acids in white table wines from Koshu grapes.

| Year of production                           | Citric acid | Tartaric acid | Malic acid | Succinic acid | Lactic acid | Acetic acid | Total |
|----------------------------------------------|-------------|---------------|------------|---------------|-------------|-------------|-------|
| Ultraviolet (210 nm)                         |             |               |            |               |             |             |       |
|                                              | (g/100 ml)  |               |            |               |             |             |       |
| 1975                                         | 0.074       | 0.199         | 0.339      | 0.450         | 0.035       | 0.013       | 1.150 |
| 1976                                         | 0.036       | 0.221         | 0.259      | 0.149         | 0.016       | 0.047       | 0.778 |
| 1977                                         | 0.041       | 0.255         | 0.243      | 0.196         | 0.035       | 0.046       | 0.796 |
| 1978                                         | 0.042       | 0.251         | 0.179      | 0.142         | 0.023       | 0.033       | 0.680 |
| 1979                                         | 0.007       | 0.231         | 0.155      | 0.146         | 0.027       | 0.056       | 0.592 |
| 1980                                         | 0.008       | 0.231         | 0.248      | 0.122         | 0.008       | 0.043       | 0.660 |
| 1981                                         | 0.013       | 0.296         | 0.246      | 0.118         | 0.016       | 0.032       | 0.721 |
| 1982                                         | 0.038       | 0.269         | 0.210      | 0.121         | 0.014       | 0.040       | 0.692 |
| 1983                                         | 0.040       | 0.255         | 0.194      | 0.117         | 0.036       | 0.078       | 0.720 |
| 1984                                         | 0.036       | 0.316         | 0.147      | 0.109         | 0.005       | 0.032       | 0.645 |
| 1985                                         | 0.040       | 0.246         | 0.270      | 0.140         | 0.012       | 0.045       | 0.763 |
| Development with dromocresol purple (430 nm) |             |               |            |               |             |             |       |
|                                              | (g/100 ml)  |               |            |               |             |             |       |
| 1975                                         | —           | 0.250*        | 0.111      | 0.045         | 0.033       | 0.024       | 0.440 |
| 1976                                         | 0.029       | 0.200         | 0.140      | 0.065         | 0.005       | 0.027       | 0.461 |
| 1977                                         | 0.035       | 0.208         | 0.140      | 0.071         | 0.013       | 0.027       | 0.494 |
| 1978                                         | 0.035       | 0.228         | 0.088      | 0.046         | 0.006       | 0.023       | 0.426 |
| 1979                                         | —           | 0.233*        | 0.107      | 0.054         | 0.016       | 0.043       | 0.452 |
| 1980                                         | —           | 0.242*        | 0.148      | 0.039         | 0.009       | 0.039       | 0.477 |
| 1981                                         | 0.030       | 0.285         | 0.214      | 0.030         | 0.007       | 0.035       | 0.601 |
| 1982                                         | —           | 0.277*        | 0.205      | 0.038         | 0.016       | 0.041       | 0.577 |
| 1983                                         | —           | 0.257*        | 0.177      | 0.277         | 0.031       | 0.066       | 0.538 |
| 1984                                         | 0.030       | 0.299         | 0.149      | 0.037         | 0.007       | 0.029       | 0.551 |
| 1985                                         | 0.031       | 0.221         | 0.144      | 0.056         | 0.006       | 0.028       | 0.486 |

\* These values also included citric acid.

Table 4. Analysis of organic acids in red table wines from Muscat Bailey A grapes.

| Year of production                           | Citric acid | Tartaric | Malic acid | Succinic acid | Lactic acid | Acetic acid | Total |
|----------------------------------------------|-------------|----------|------------|---------------|-------------|-------------|-------|
| Ultraviolet (210 nm)                         |             |          |            |               |             |             |       |
|                                              | (g/100 mL)  |          |            |               |             |             |       |
| 1975                                         | 0.074       | 0.199    | 0.339      | 0.450         | 0.075       | 0.013       | 1.150 |
| 1976                                         | 0.080       | 0.203    | 0.436      | 0.554         | 0.062       | 0.015       | 1.135 |
| 1977                                         | 0.047       | 0.168    | 0.181      | 0.443         | 0.155       | 0.013       | 0.964 |
| 1978                                         | 0.040       | 0.180    | 0.304      | 0.376         | 0.024       | 0.018       | 0.942 |
| 1979                                         | 0.012       | 0.140    | 0.051      | 0.289         | 0.343       | 0.044       | 0.879 |
| 1980                                         | 0.047       | 0.152    | 0.312      | 0.440         | 0.042       | 0.017       | 0.980 |
| 1981                                         | 0.037       | 0.146    | 0.067      | 0.411         | 0.359       | 0.032       | 1.022 |
| 1982                                         | 0.049       | 0.187    | 0.320      | 0.341         | 0.037       | 0.010       | 0.914 |
| 1983                                         | 0.027       | 0.197    | 0.241      | 0.348         | 0.078       | 0.023       | 0.914 |
| 1984                                         | 0.079       | 0.221    | 0.325      | 0.428         | 0.074       | 0.018       | 1.145 |
| 1985                                         | 0.000       | 0.227    | 0.068      | 0.330         | 0.270       | 0.040       | 0.935 |
| Development with bromocresol purple (430 nm) |             |          |            |               |             |             |       |
|                                              | (g/100 mL)  |          |            |               |             |             |       |
| 1975                                         | 0.066       | 0.181    | 0.241      | 0.095         | 0.059       | 0.021       | 0.661 |
| 1976                                         | 0.068       | 0.176    | 0.312      | 0.074         | 0.038       | 0.020       | 0.688 |
| 1977                                         | 0.061       | 0.180    | 0.140      | 0.091         | 0.160       | 0.021       | 0.653 |
| 1978                                         | 0.046       | 0.198    | 0.265      | 0.082         | 0.038       | 0.026       | 0.675 |
| 1979                                         | 0.006       | 0.201    | 0.012      | 0.117         | 0.355       | 0.046       | 0.731 |
| 1980                                         | 0.057       | 0.199    | 0.289      | 0.110         | 0.043       | 0.024       | 0.722 |
| 1981                                         | 0.045       | 0.166    | 0.020      | 0.090         | 0.382       | 0.035       | 0.738 |
| 1982                                         | 0.054       | 0.224    | 0.303      | 0.059         | 0.038       | 0.017       | 0.695 |
| 1983                                         | 0.034       | 0.224    | 0.214      | 0.073         | 0.073       | 0.030       | 0.678 |
| 1984                                         | 0.071       | 0.193    | 0.222      | 0.121         | 0.046       | 0.029       | 0.682 |
| 1985                                         | 0.000       | 0.233    | 0.000      | 0.074         | 0.250       | 0.043       | 0.600 |



Table 5. Titratable acidity and pH of white table wines from Koshu grapes and red table wines from Muscat Bailey A grapes.

| Year of production | White wines                           |      | Red wines                             |      |
|--------------------|---------------------------------------|------|---------------------------------------|------|
|                    | Titratable acidity (as tartaric acid) | pH   | Titratable acidity (as tartaric acid) | pH   |
|                    | (g/100 mL)                            |      |                                       |      |
| 1975               | 0.574                                 | 3.19 | 0.610                                 | 3.79 |
| 1976               | 0.582                                 | 3.21 | 0.653                                 | 3.70 |
| 1977               | 0.584                                 | 3.25 | 0.578                                 | 3.85 |
| 1978               | 0.522                                 | 3.26 | 0.629                                 | 3.85 |
| 1979               | 0.520                                 | 3.31 | 0.559                                 | 3.88 |
| 1980               | 0.609                                 | 3.18 | 0.715                                 | 3.62 |
| 1981               | 0.794                                 | 3.07 | 0.601                                 | 3.76 |
| 1982               | 0.704                                 | 3.06 | 0.701                                 | 3.51 |
| 1983               | 0.614                                 | 3.14 | 0.608                                 | 3.66 |
| 1984               | 0.622                                 | 3.08 | 0.700                                 | 3.56 |
| 1985               | 0.525                                 | 3.28 | 0.482                                 | 3.87 |

各有機酸量との間には有意の関連性は見られなかった。

以上の結果、この SCR 101 カラムでワイン中の有機酸を分離すると、リンゴ酸とコハク酸の溶出ピークと同じ位置に有機酸以外のワイン成分が溶出し、指示薬発色法を用いた時にはリンゴ酸の発色を妨害し、UV法を用いた時にはコハク酸と共に検出され、コハク酸量を著しく高めることが明らかとなった。従ってワイン有機酸の分析に関する限りどちらの検出方法も満足いくものでなく、2つの検出法で同時に定量し、2種のデータを組み合わせて有機酸を定量すれば、より一層信頼性の高い分析値を得ることができる。単一の検出方法で有機酸を分析するためには、有機酸と選択的に反応する新しい試薬を見出すかあるいはより分離に優れたカラム担体を開発する必要があると思われる。

## 要 約

11年間にわたって製造した甲州白ワインとマスカット・ベリーA赤ワイン、計22点の有機酸を高速液体クロマトグラフィーによって分析した。2種の有機酸検出法が同じクロマト系内で連続して用いられた。すな

わち、有機酸は、初めに紫外外部吸収法 (210 nm) により、次いでブロムクレゾールパープルを用いた指示薬発色法 (430 nm) で定量した。ワインは高速液体クロマトグラフィーの前に、pH7.5に調整後、活性炭 (1%) 処理した。

検出法として、紫外吸収法を用いた時には、コハク酸を定量することはできなかった。これはコハク酸と同じ位置に溶出する他のワイン成分が 210 nm の高い吸収を持つからであると推定された。同様に、指示薬発色法を用いた時には、リンゴ酸がかなり低く定量された。これはリンゴ酸と同じ位置に溶出する他のワイン成分がブロムクレゾールパープルとリンゴ酸との反応を妨げるためと考えられた。しかし、コハク酸とリンゴ酸以外の有機酸の分析値の間には大きな相違は認められなかった。

## 文 献

- 1) 横塚弘毅, 松土俊秀, 榎田忠衛: 山梨大発研報告 **18**, 7 (1983),
- 2) 江頭 暁: *Japan Analyst*, **15**, 1356 (1965).
- 3) 特公 昭 57-34502  
(1986. 10. 14 受理)