

HPLC による果実酒中のソルビン酸定量方法の検討

後藤 奈美・橋爪 克己

A determination method of sorbate in wine using HPLC

Nami GOTO, and Katsumi HASHIZUME

緒 言

保存料のソルビン酸及びソルビン酸カリウムの使用は食品衛生法で種々の食品に認められており、果実酒への使用量は 0.20 g/kg 以下と定められている。現在、国税庁所定分析法（以下、所定法）に採用されているソルビン酸の定量方法は、減圧乾固、水蒸気蒸留及び比色を組み合わせた方法で、有害な重クロム酸カリウムを使用する上、多検体の分析には非常に時間がかかるという問題がある。衛生試験法では、水蒸気蒸留後に HPLC で定量する方法を採用しているが、果実酒のような液体試料の場合は水蒸気蒸留を省略できると考えられるため、所定法改定作業にあたり、果実酒

類を対象とした分析法を検討した。

方 法

表 1 に示す 1) から 4) の方法を検討し、カラムなどの分析条件は、問題がない限り衛生試験法に従うこととした。

結果及び考察

(1) カラムと移動相 衛生試験法に採用され、各種分析に広く用いられている ODS カラム（今回は TSK Gel ODS-80Ts, 4.6mm×250mm, 東ソー株式会社）を使用することにした。移動相は、1) と 4) を比較したところ 1) の方がソルビン酸の溶出が早いので、1) を採用することが望ま

表 1 HPLC によるソルビン酸分析法の比較

	1)	2)	3)	4)
出 典	衛生試験法・注解, 食品添加物試験法	柳田ら, 醸協, 85, 750-754 (1990)	峯ら, 食衛誌, 26, 61-94 (1985)	酒類製造者実施例
カ ラ ム	ODS, 4.0~6.0mm × 150~250mm	DEVOLSIL NH2-5, 4.6mm × 150mm	ODS, 8mm × 100mm	ODS, 3~4mm × 75~150mm
移 動 相	メタノール:アセトニトリル:5mM, pH 4.0 クエン酸バッファー = 1:2:7	10mM リン酸2水素1カリウム:アセトニトリル = 1:3	メタノール:水:pH 4.0 50 mM クエン酸バッファー = 4:5:1	(0.1% トリエチルアミン, 0.1% トリフルオロ酢酸):アセトニトリル = 3:1
流 速	1.0mL/min	1.0mL/min	1.0mL/min	0.35~0.7mL/min
検出波長	230nm	268nm	230nm	240nm
内部標準	なし	なし	o-トルイル酸	なし
前 処 理	水蒸気蒸留	Sep Pak CN 処理	なし	なし
そ の 他	安息香酸, ソルビン酸, デヒドロ酢酸の定量法	ワインの総アスコルビン酸, 総エリソルビン酸, ソルビン酸の定量法	ワインのソルビン酸及び安息香酸の定量法	ワインのソルビン酸の定量法

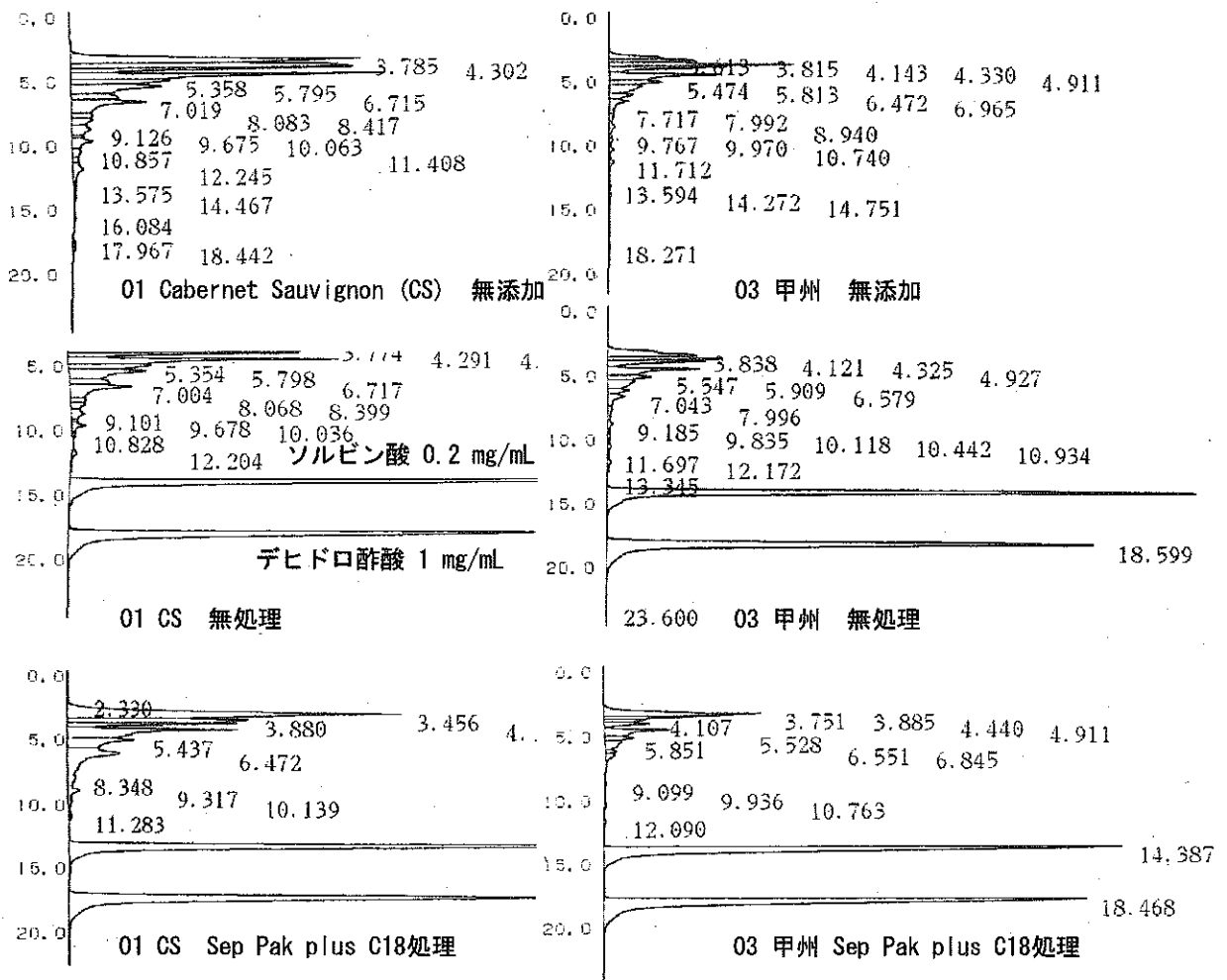


図1 ソルビン酸及びデヒドロ酢酸（内部標準）添加ワインのクロマトグラム検出波長，240nm

しいと考えられた。流速は 0.75~1.0mL/min（圧力がカラムの使用限界を超えない程度）で、今回は 0.75mL/min として検討した。この条件で、ワイン中の検出波長に吸収のある成分は、ソルビン酸より前に溶出し、ソルビン酸や次で検討した内部標準と重なるピークは認められなかった（図1）。

(2) 内部標準（図2）及び検出波長 3）で内部標準として使用されているo-トルイル酸、及び1）でソルビン酸と同時に定量され、果実酒への使用が認められていないデヒドロ酢酸を検討した。吸収極大は、ソルビン酸；254nm, o-トルイル酸；233nm, デヒドロ酢酸；231nmであるため、どちらを内部標準にした場合でも検出波長は240nm 付近が適当と考えられた。溶出時間は、o-



図2 ソルビン酸及び内部標準物質の構造式

トルイル酸が若干早い、ほぼ同程度であった。3）の 2 mg/mL o-トルイル酸 40% エタノール溶液を1/10添加する条件では、ソルビン酸の最大使用量 0.2mg/mL のピーク面積の1/4程度であったが、o-トルイル酸はアルカリ液にも溶解性が低く、高濃度の内部標準液の調製は難しいと考えられた。デヒドロ酢酸はアルカリ液に容易に溶解し、高濃度液の調製が可能であったため、0.2mg/mL ソルビン酸と同程度のピーク面積となる

ソルビン酸濃度 (mg/L)

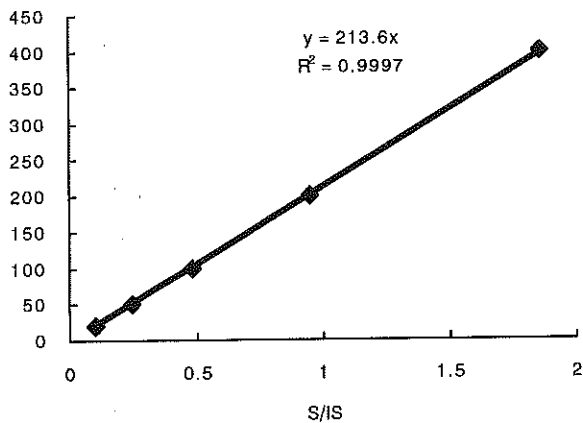


図3 HPLCによるソルビン酸の検量線

1mg/mL (×10液を1/10添加) を内部標準とすることにした。サンプル量は 10μL とし、この条件で作成した検量線 (図 3) は、少なくとも 400mg/L (最大使用量の約 2 倍) まで直線性を示した。なお、果実酒類にデヒドロ酢酸が混和されているなど、デヒドロ酢酸を内部標準とする方法に問題がある場合は、o-トルイル酸を内部標準に用いることができる。

(3) サンプルの前処理方法 使用したワインサンプルは前処理をしなくても分析可能であった。また、ソルビン酸は通常、残糖分のある白ワインに使用されるが、赤ワインを多検体分析する場合には、ポリフェノールなどの成分がカラムに吸着する可能性も考えられるため、前処理方法を検討

した。

ポリフェノール吸着剤として使用される PVPP (0.5 g / 10mL) と、2) で用いられた固相抽出カラム Sep Pak plus CN, 及び HPLC カラムと同素材の固相抽出カラム Sep Pak plus C18 (ともに Waters) を検討した Sep Pak plus C18 は、2) の報告どおり酸性条件ではソルビン酸を吸着し、ソルビン酸/デヒドロ酢酸が減少した。PVPP も同様であった。酸性条件では、ソルビン酸が解離せず、疎水性が高くなるためカラムに吸着されると考え、試料を中和する (ソルビン酸などを解離させる) と Sep Pak plus C18 への吸着は認められなかった。Sep Pak plus CN は酸性条件でも中和後も吸着は認められなかった (表 2)。

Sep Pak plus CN, C18 処理及び無処理の赤ワインの 280nm の吸収を比較すると、Sep Pak plus CN, C18 処理でやや減少した (表 3)。C18 処理の方が A280 の減少がやや大きく、また、カラムと同素材であることから、Sep Pak plus C18 を使用することとした。ワインを用いた分析でも、Sep Pak plus C18 処理が分析値には影響を及ぼさないことが確認された (表 4)。中和後、サン

表3 ワインの固相抽出処理前後の A280

	無処理	CN	C18
02MBA	0.823	0.717	0.692
01CS	0.624	0.596	0.590

ワインを中和、固相抽出処理、1/100希釈後の吸光度

表2 標準溶液を用いた前処理方法の検討

		ソルビン酸 (S)	デヒドロ酢酸 (IS)	S/IS
pH3.6	無処理	7721343	8559356	0.90
	PVPP	6486506	8734440	0.74
	Sep Pak plus CN	7753858	8528150	0.91
	Sep Pak plus C18	2156357	2846226	0.76
pH7.6	無処理	9751448	10270407	0.95
	PVPP	8879116	6406461	1.39
	Sep Pak plus CN	8304736	9252976	0.90
	Sep Pak plus C18	8782596	9393218	0.93

ソルビン酸 0.2g/L, デヒドロ酢酸 1g/L, アルコール 13% 溶液の分析値はピーク面積

表4 ワインに添加したソルビン酸の分析結果

		ソルビン酸 (S)	デヒドロ酢酸 (IS)	S/IS
02Ch	無処理	7459776	7920964	0.94
02Ch	C18*	7431928	7890809	0.94
03甲州	無処理	6965631	7343874	0.95
03甲州	C18	7013091	7488126	0.94
02MBA	無処理	8103269	7942797	1.02
02MBA	C18	7453843	7751659	0.96
02MBA	1/2C18**	3574961	3711844	0.96
01CS	無処理	7367354	7848016	0.94
01CS	C18	7644279	8183287	0.93

* ワインを中和後, Sep Pak plus C18 処理

** ワインを中和後, 1/2 希釈して Sep Pak plus C18 処理

プルを水で1/2希釈してアルコール度数を下げる
とさらに吸光度の減少が大きくなった(図4)。
従って, 赤ワイン等で前処理が望ましい場合は,
内部標準を添加して中和, 1/2希釈後, カラムと
同素材の Sep Pak plus C18 を通して吸着画分を
除く方法が適当と考えられた。

以上の検討結果から, 次の果実酒類のソルビン
酸定量法を設定した。なお, 厳密に食品衛生法上
問題がないかを検討する際には, 衛生試験法に従
った分析が必要である。

カラム: ODS, 4~6 mm × 150~250mm

移動相: メタノール: アセトニトリル: 5 mM,
pH 4.0クエン酸バッファー = 1:2:7

クエン酸バッファーは, クエン酸・1水和物 7.0
g とクエン酸三ナトリウム・二水和物 6.0 g を
水に溶かして 1000mL とした×10溶液を, 用時
10倍希釈し, 1.0µm のメンブランフィルターでろ
過する。

流速: 0.75~1.0mL/min (圧力がカラムの使用限
界を超えない程度)

検出波長: 240nm

分析温度: 室温

内部標準: 1 g デヒドロ酢酸を 8 mL 程度の 1N
NaOH に溶解し, 100mL にフィルアップしたも
の (10mg/mL 溶液) を試料に1/10添加し, 10µl
を分析に供する。この条件で, 少なくともソルビ
ン酸 400mg/L までソルビン酸濃度とソルビン酸
/デヒドロ酢酸の面積比が直線性を示す。

試料の前処理: 必要な場合は, 試料に内部標準を
添加後, 中和し, アルコール度数を下げるため約
2倍に希釈して, メタノールでコンディショニン
グした後, 水で平衡化した Sep Pak plus C18 カ
ラム, または同等の固相抽出カラムを通し, はじ
めの水を含んだ溶出液約 2 mL を除いた溶出液
(素通り画分) を 1 mL 程度を分析試料とする。
その他は, 一般的な HPLC の取り扱い方に従う。

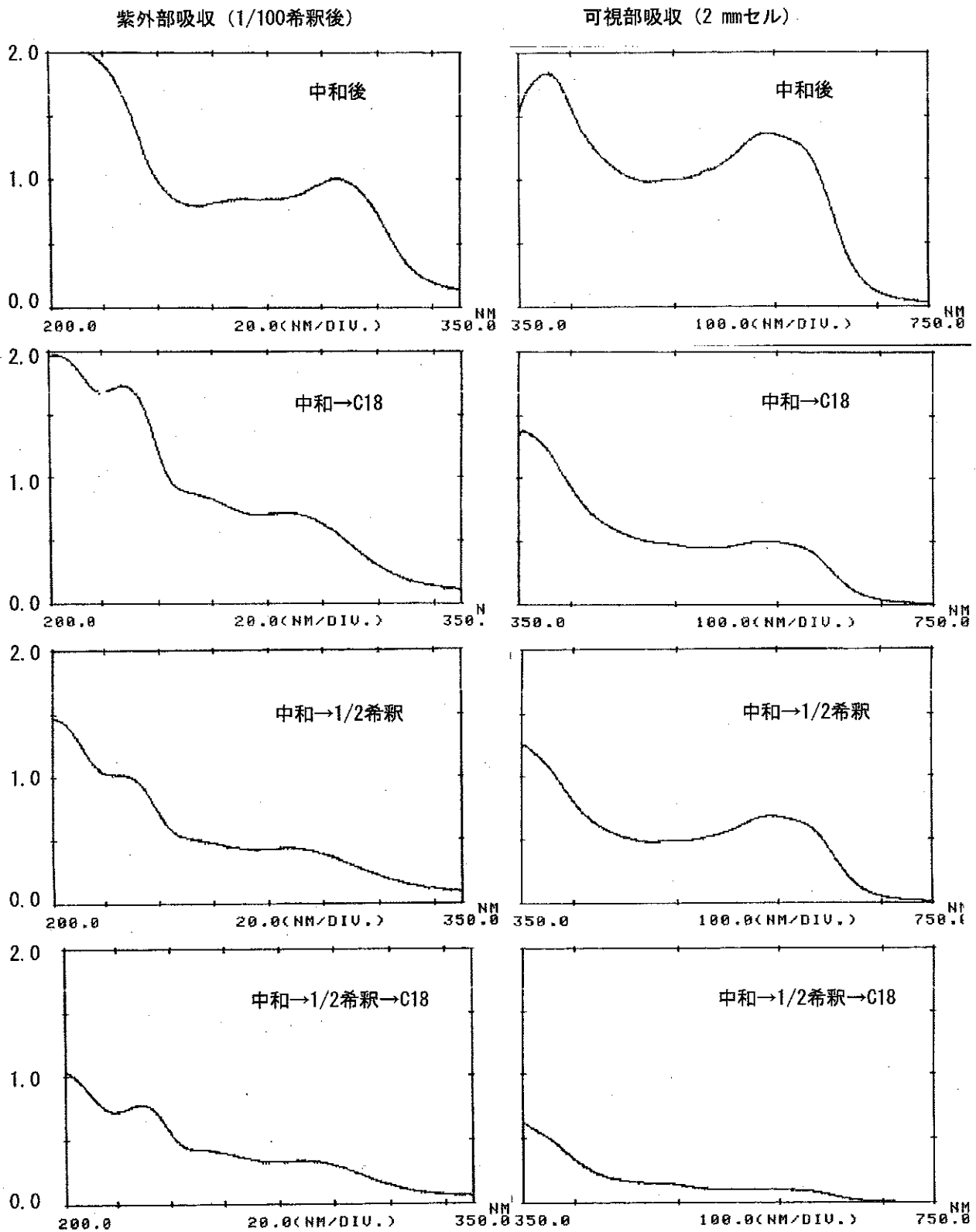


図4 Sep Pak plus C18 処理後の吸光度の変化 使用ワインは2002年産マスカット・ベリーA