ワイン中のカルバミン酸エチルの定量法

戸 塚 昭・高橋利郎・北野一好

(国税庁醸造試験所)

昭和62年12月1日受理

Analytical Method for the Determination of Ethylcarbamate in Wine

Akira TOTSUKA, Toshiro TAKAHASHI and Kazuyoshi KITANO

(National Research Institute of Brewing, 2-6-30 Takinogawa, Kita-ku, Tctyo 114)

A method for determining ethyl carbamate (CAE) in wine was devised by modifying the method of Bertrand *et al.* Samples were extracted with diethyl ether, and the extracts were evaporated *in vacuo* after dehydration with sodium sulfate. Concentrates were dissolved in ethyl acetate, and analyzed by gas chromatography. The extraction with diethyl ether was better than chloroform-extraction for preparing samples for gas chromatography. CAE showed a distinct peak and gave good recovery on gas chromatographic analysis. The lower limit of detection of CAE by the method was *ca* 10 $\mu\text{g/l}$. and the lower limit of determination was 20 $\mu\text{l/l}$.

Key words: ワイン・カルバミン酸エチル・定量法

緒 言

酒類中のカルバミン酸エチル (CAE) の分析法としてクロロホルム抽出を基本とし、ガスクロマトグラフィーに供する方法¹⁾が設定されている。ワイン中の CAE の分析にこの分析法を適用したところ、CAE とリテンションタイムの近いピーク成分を数多く含有するため、往々にして真実の値よりも大きな値を CAE 含有量として認知する危険性があった。ワイン中の CAE の分析法としては溶媒抽出-GC 法が報告されている²⁻⁵⁾。BERTRAND⁶⁾らはジエチルエーテル抽出を基本とし、ガスクロマトグラフィーに供する方法⁶⁾をワインおよびブランデー中の CAE 定量法として提唱している。

われわれは CAE の抽出効率が良好な BERTRAND⁶⁾らの方法を参考として、ワイン中の CAE のジエチルエーテルによる抽出などの操作方法を検討し、ガスクロマトグラムの分離を確実とし、分析精度の向上を成し得たので報告する。

実験方法

1. 試薬 いずれも和光純薬(株)試薬特級の規格のものをを用いた。
2. ガスクロマトグラフィー 島津 GC-9A を用い

た。カラムはガスクロマト工業(株) PEG-20 M (I. D. 0.25 mm×f. t. 0.3 μm ×50 m) キャピラリーカラムを用いた。

3. ガスクロマトグラフィー分析条件 He: 0.9 ml/min, 1.65 kg/cm² (スプリット比 1:100), H₂: 0.5 kg/cm², Air: 0.5 kg/cm, 検出器温度: 200°C, Range: 10⁰, 記録計: 島津クロマトパック C-R 3A, Atten.: 2², 検体注入量: 3 μl 。

結果および考察

1. ジエチルエーテルによる CAE の抽出

ワイン 200 ml をビーカーにとり、pH 計を用いて 1 N-NaOH 溶液により pH 6.5 に調整した。つぎに 1 l 容スキーヴ型分液ロート (テフロンコック使用) に試料を移し、ジエチルエーテル 150 ml および内部標準としてアニリン (100 mg/l)-エタノール溶液 1 ml を加え、5 分間振とう抽出を行った。

この際、赤ワインでは試料と溶媒の界面にエマルジョンを形成することがあるが、白ワインではそのような事例はなかった。エマルジョンを形成しやすい赤ワインにおいても、分液ロートに入れたあと溶媒とワインを 1 時間以上なじませてから振とう操作に移行すると、エマルジョンの形成を防止し得ることが多かった。これは他の

果実酒類についても観察された。

なお、ブランデーでは、アルコール分 40～43 度で抽出したときに、エマルジョンを形成することもあるが、水で 2 倍に希釈するとエマルジョンの形成を防止することが可能であった。

下層の水層を分離し、再度ジエチルエーテル 150 ml で振とう抽出を行い、下層については三度ジエチルエーテル 150 ml で振とう抽出を行った。上層の溶媒層はすべて液層分離用紙 (Whatman-1 PS) を用いてろ過し、500 ml 容透明すりあわせ三角フラスコに受け、適量の硫酸ナトリウムを添加して脱水し、エーテル画分とした。

BERTRAND らの方法では、オクタノール-3 およびアニリンを内部標準とし含むワイン 10 ml にジエチルエーテル 40 ml とリン酸水素ナトリウム 2 g を加え、2 分間攪拌後硫酸ナトリウム 40 g を加えて 5 分間経過後溶媒層を分離している。ワイン中の CAE 濃度は低いことから、われわれは試料量を多くするとともに、pH を当初調整することにより抽出効率の向上を図った。また、液層分離用紙を採用することにより、硫酸ナトリウムの使用量を低減した。なお、オクタノール-3 は、われわれのガスクロマトグラフィの条件では CAE のリテンションタイム 39.5 分から離れた 14.4 分付近に出現するので、内部標準としては採用しなかった。

2. 濃縮操作

エーテル画分をロータリー・エバポレーターを用いて 20℃ 前後で、ワインについては約 20 ml まで濃縮した。クロロホルムによる抽出法ではクロロホルムの除去・濃縮に、グデルナ・ダニッシュ濃縮器を用いる必要があるが、本法では抽出溶媒がジエチルエーテルであるため、20℃ 前後で溶媒の留去が可能であり、ロータリー・エバポレーターを用いても CAE の損失は認めなかった。

なお、硫酸ナトリウムでは完全に脱水することはできなかった。また、ジエチルエーテルにエタノールが溶解するため、ロータリー・エバポレーターで濃縮した時点で、水とエタノールが濃縮フラスコ内に残留した。ワインでは 200 ml の試料を処理したときに 10～20 ml 程度、ブランデーでは 100 ml の試料で 30～50 ml 程度、おのおの留去できなかったが、この時点で濃縮を停止した。

次にエアポンプを用いてフラスコ内にきわめて温和に空気を吹きつけ、30～35℃ でさらに 1 ml 以下まで濃縮を行った。ロータリー・エバポレーターによる濃縮の際に 35℃ まで水槽温度を上昇させると CAE の損失を生じたが、エアポンプによる温和な空気の吹きつけではその危険はなかった。この場合、エタノールは除去されても水が残留し 1 ml 以下まで濃縮が困難な事例があった。

Fig. 1 Effect of column temperature for determination of CAE

Column held at 120℃ for 30 min, programmed at 10℃/min to 200℃ and held 10 min.

Other conditions were same as the foatnetes of Fig. 2. Same sample was used in Fig. 2.

その際には酢酸エチルまたはジエチルエーテルを少量加え、水層から CAE の再抽出を数回実施し、必要に応じて 1 ml 以下まで濃縮し、最終的には酢酸エチルにより 1 ml に定容とした。なお、BERTRAND らの報告では具体的な濃縮方法の記述はないが、最終的に 0.5 ml に定容にしている。

3. ガスクロマトグラフィ分析条件

ワイン中の CAE の定量が困難な理由の一つに、ワインには中性付近で、有機溶媒に抽出される成分がきわめて多く含有されていることが挙げられる。そのため、カラム温度の設定においても、例えば他の酒類で行われているように当初から 120℃ で 30 分保持し、リテンションタイム 26.6 分の CAE を確認後、残留成分の追い出しのために 10℃/min で昇温し、さらに 200℃ で 10 分間保持するという方法では、Fig. 1 に示すようリテンションタイム 26.317 分の大きなピークのスロープの肩にかかり、明確なピークとして把握できなかった。

そこで、カラム温度を 100℃ に設定し、検体注入と同時に 0.5℃/min で昇温し、125℃ に到達した後に残留成分の追い出しのために 10℃/min でさらに昇温し、最終的に 200℃、10 分間保持する方法にしたところ、CAE のリテンションタイムは 39.5 分付近となり、他のピークから完全に分離した (Fig. 2)。なお、当該ピークは GC-MS により CAE のピークであることを確認した。

Fig. 2 Gas chromatogram of neutral fraction extracted by diethylether

GC: Shimadzu GC-9 A
 Recorder: Shimadzu Chromatopac-C-R 3 A, Atten. 2²
 Conditions: LD. 0.25 mm x f. t. 0.3 µm x 50 m PEG-20 M fused silica capillary column; carrier gas He 0.9 ml/min (split ratio 1:100); Detector temp. 200°C, Range 10⁰
 Column temp. was raised from 100°C at 125°C at 0.5°C/min and programmed at 10°C/min to 200°C and held.
 Confirmation of identity was carried out by GC-MS.

Fig. 3 Enlargement of Chromatogram near the peak of CAE (1)

Fig. 4 Enlargement of chromatogram near the peak of CAE (2)

The lower limit of determination of CAE was ca 20 µg/l with this method's conditions.

今回設定した条件で分析したクロマトグラムについて、CAEのリテンションタイム付近をとりあげて比較したものが Fig. 3 であり、きわめて良好な分離結果を示した。

4. 検出限界、定量限界および回収率の検討

本法のガスクロマトグラフィおよびクロマトパックの設定条件では検出限界は 10 µg/l であった。また、定量限界は 20 µg/l であった。なお、初発の検体量を 200 ml から 400 ml に増し、最終的に 1 ml 定容とすることにより、定量限界を 10 µg/l とすることができる。更に、CAE を含有しない赤ワインに CAE を 100 µg/l となる

ように添加し、7回にわたる繰り返し試験を行ったところ $104 \pm 2.6 \mu\text{g/l}$ となり、本法がきわめて有効な定量法であることが明らかとなった。

以上の結果から、ワイン中の CAE 定量法としては、クロロホルム抽出を基本とする方法よりも、本法を採用することによって、つぎのような利点が認められた。

1) クロロホルム抽出法ではエマルジョンを生じやすいため、溶媒層の回収に遠心分離などの処理を必要とするが、本法ではその必要はなかった。

2) 抽出後の溶媒層の濃縮に、クロロホルム抽出法ではグデルナ・ダニッシュ濃縮装置を必要とするが、本法ではロータリー・エバポレーターにより容易に濃縮ができた。

3) クロロホルム抽出法ではサンプルの調製の最終段階までに、二回の濃縮操作を必要としたが、本法では一回の操作で済み、きわめて効率的であった。

4) 本法ではフロリジルカラムによる試料の精製操作を省略することができた。

5) ガスクロマトグラフにおいて、CAE と他の物質のピークを明確に分離することができた。

要 約

ワイン中のカルバミン酸エチル (CAE) の分析法を

設定した。

(1) BERTRAND らの設定した ジエチルエーテル抽出による方法を参考として検体を調製し、ガスクロマトグラフィに供する方法を検討した。

(2) ワインにおいては、クロロホルム抽出よりも本法の方が、検体の調製が容易であった。

(3) 検出限界 $10 \mu\text{g/l}$ 、定量限度 $20 \mu\text{g/l}$ であり、回収率も良好であった。

(4) ガスクロマトグラムにおいて、CAE と他の物質のピークを明確に分離することができた。

文 献

- 1) 原 昌道, 高橋康次郎, 吉沢淑: 醸協, 83, (1) 64 (1988)
- 2) B. BAILEY, D. NORTH, D. MYATT and J. F. LAWRENCE: *J. Chromatogr.*, 369, 199 (1986)
- 3) M. J. DENNIS, N. HOWARTH, R. C. MASSEY, I. PARKER, M. SCOTTER and J. R. STARTIN: *J. Chromatogr.*, 369, 193 (1986)
- 4) R. C. HALL: *J. Chromatogr. Sci.*, 12, 152 (1974)
- 5) G. GAETANO and M. MATTA: *Bulletin de l' O. I. V.*, 60, 671 (1987)
- 6) A. BERTRAND, R. TRIQUET-PISSARD: *Connaissance Vigne Vin*, 20, 131 (1986)