高速液体クロマトグラフィーによるワイン中の総アスコルビン酸, 総エリソルビン酸, ソルビン酸の同時迅速定量法

柳田 顕郎・橋本 昭洋・黄木 信夫
(ニッカウキスキー〈株〉生産技術研究所)

平成 2 年 6 月 27 日受理

A Method of Simultaneous Rapid Determination for Total Ascorbate, Total Erythorbate and Sorbic Acid in Wine by High Performance Liquid Chromatography

Akio YANAGIDA, Akihiro HASHIMOTO and Nobuo OUKI
(Institute for Production Research and Development Nikka Whisky Distilling Co.
Ltd., 967, Aza-Matsuyama, Masuo, Kashiwa-shi, Chiba, 277, Japan)

A method of simultaneous rapid determination for total ascorbate, total erythorbate and sorbic acid in wine was developed by using high performance liquid chromatography (HPLC) with ultra-violet (UV) detection.

Wine sample which contained each additive was treated with a Sep-pak CN cartridge, and then dehydroascorbic acid (DHAA) and dehydroerythorbic acid (DHEA) in flow-through fraction were reduced by dithiothreitol (DTT) to ascorbic acid (AA) and erythorbic acid (EA), respectively. The reduction was completed in 15 min at room temperature. The resulting total AA, total EA and sorbic acid (SA) in this fraction were resolved on a DEVELOSIL-NH₂ column, and detected by UV (268 nm) absorption. The detection limits of these additives in wine were 3 mg/kg. The coefficients of variation (n=5) were 2.8% for total AA (50 ppm), 2.0% for total EA (50 ppm) and 3.5% for SA (50 ppm) in spiked wine.

Key words: アスコルビン酸・高速液体クロマトグラフィー・ワイン

緒 言

食品中のアスコルビン酸 (AA) の定量に関しては、インドフェノール滴定法¹⁾やヒドラジン比色法¹⁾などが一般に用いられているが、1) 共存物質の妨害を受けやすい、2) 操作がやや複雑という欠点があるため、近年では高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いたより迅速かつ感度・選択性を向上させた手法が発達してきている。

HPLC 法では、当初 AA とその酸化型であるデヒドロアスコルビン酸 (DHAA) を分離して定量する手段^{2~4)}が選択されたが、紫外外部吸収 (UV) で同時検出する際の DHAA の感度が非常に悪いため、現在では 1) AA を酸化剤で DHAA に転換した後、プレまたはポストカラムの段階で DHAA を蛍光誘導体化して蛍光検出する方法^{5~10)}、2) DHAA を還元剤で AA に転換した後、AA を UV 検出する方法^{11~14)}、の 2 通りの定量手段

が主流となっている。1) の方法は非常に高感度である反面、誘導体化に伴う操作・装置の必要性という点において 2) より迅速性・一般性に欠ける。2) の方法は 1) より検出感度は劣るが簡便・迅速である。

HPLC 法ではまた、AA とその立体異性体であるエリソルビン酸 (EA) を分離し、同時定量することが可能である^{7,10,12,15)}。この場合、酸化あるいは還元処理を行ってやることで、AA⇌DHAA の場合と全く同様に還元型 (EA)⇌酸化型 (DHEA) の転換が起こるため、総 AA と総 EA が同時定量できる。

以上、概説の測定手段の向上に伴い、今日では非常に多岐にわたる食品試料中の AA, EA の定量が行われている。一方、ワインの AA 分析に関しては O. I. V. (Office International de la Vigne et du Vin) による方法¹⁶⁾やドイツにおける公定法¹⁷⁾などが一般的かつ権威ある方法とされているが、これら公定法は先述のインドフェノール滴定法を採用しており、HPLC 法による分析例

は未だ報告されていないのが現状である。我が国では平成元年2月20日の酒税法施行規則改正により果実酒へのAAの添加(酸化防止剤)が認められたこと、ならびに平成3年7月1日以降に製造される製品については食品添加物の新表示が義務付けられること、などを考慮するとワイン中のAA, EAの簡便な定量法を確立することは重要かつ急務であると考えられる。

以上の観点を踏まえつつ、さらにAAとEAの極大吸収波長($\lambda_{\max}=268\text{ nm}$)がワインの保存料に使用されるソルビン酸(SA)の極大吸収波長($\lambda_{\max}=254\text{ nm}$)と接近していることに着目し、今回、HPLC/UV検出法によるワイン中の総AA, 総EAならびにSAの同時迅速定量法を確立したので以下に報告する。

実験方法

1. 試薬ならびに試液

エリソルビン酸, ソルビン酸カリウム, リン酸2水素1カリウム, リン酸1水素2カリウム: 関東化学(株)製 特級品

アスコルビン酸, ジチオスレイトール(DTT), 高速液体クロマトグラフィー用アセトニトリル: MERCK社製

デヒドロアスコルビン酸: ALDRICH 社製

水: NANOPURE II (BARNSTEAD 社製) 精製超純水

10 mM DTT 含有還元試液: 10 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)とアセトニトリルを1:3の比率で混合し全量を100 mlとした後, DTT 0.154 gを同溶液で溶解し試液とした。本試液は0.45 μm のフィルターで濾過し, 氷点下で保存した。

2. 装置ならびに器材

高速液体クロマトグラフ: Waters 社製 600 マルチソルベント送液システム,

注入装置: Waters 社製 712 WISP サンプルプロセッサ

UV/VIS 検出器: 相馬光学(株)製 S-3702

インテグレーター: Waters 社製 741 データモジュール

Sep-pak C₁₈, CN, accell CM カートリッジ: Waters 社製

メンブランフィルター: 東洋濾紙(株)製, DISMIC-25 cs, 0.45 μm

3. 試験溶液の調製

クリーンアップ: あらかじめメタノール, 蒸留水名10 ml, あるいは蒸留水10 ml (accell CMの場合)でコンディショニングされたSep-pakカートリッジに, ワ

イン試料5 mlをゆっくり通過させた。この際, 溶出してくる最初の2.5 mlを捨てて残りを分取し, 0.45 μm のフィルターを通過させて微粒子を除いた。

還元操作: クリーンアップした試料の0.5 mlを分取し, さらに10 mM DTT 含有還元試液1 mlを加えてよく攪はんした。混合液を15分間放置した後, 試験溶液としてHPLC分析に供した。

4. HPLCによる定量

試験溶液15 μl をHPLCに導入してピーク面積を求め, あらかじめ作成した検量線から総AA, 総EAならびにSAの濃度を算出した。

HPLC条件は以下のとおりとした。

分離カラム: 野村化学(株)製 DEVELOSIL NH₂-5 (4.6 mm ϕ ×150 mm)

移動相溶媒: 10 mM リン酸2水素1カリウム-アセトニトリル (1:3)

カラム温度: 30°C

流速: 1.0 ml/min

検出波長: 268 nm

実験結果および考察

1. 移動相組成

AA, EA, SAの各濃度を50 ppmとして調製した標準溶液(溶媒: 移動相溶媒)を用いて, 各成分がクロマトグラム上において分離されるようなHPLCの移動相条件を検討した結果, 10 mM リン酸2水素1カリウム-アセトニトリル(1:3)の組成でFig. 1に示したような良好な分離が得られた。

2. DTTによる還元効果の確認

本法では各成分の検出方法にUVを採用したため, あらかじめ試料中のDHAAをAAに, またDHEAを

Fig. 1 Chromatogram of standard ascorbic acid (AA), erythorbic acid (EA) and sorbic acid (SA).

EA に還元した後に総 AA, 総 EA 量を定量する手段が有効となる。還元試薬としてはホモシステイン^{11,13,14)}あるいは DTT^{12,18)} の使用例が報告されているが、後者の方が移動相溶媒に対する溶解性が非常によかったため、今回は DTT を用いて還元を行った。

還元操作は「実験方法」に示したとおりとしたが、実際に DHAA から AA への還元が行われるかどうかについて、DHAA と AA の各濃度を 50 ppm として調製した標準溶液(溶媒：移動相溶媒)を用いて確認した結果を Fig. 2 に示す。Fig. 2 a に示したように、DHAA は 268 nm ではほとんど吸収を持たない。一方 DHAA と AA の等量混合物について、上記の還元操作を行った場合と行わなかった場合とで、試料を HPLC に導入して比較した結果、未処理試料(Fig. 2 b)に比べて還元処理試料(Fig. 2 c)では AA のピーク面積が 1.97 倍に増大したことから、実際に DHAA から AA への還元がほぼ完全に達成されていることが確認できた。

なお、このとき還元試液中の DTT が吸収を持たないことは別途確認した。

また、今回は DHAA から AA への還元についてのみ確認したが、過去の報告¹²⁾も併せて考慮し、今回の操作で DHEA から EA への還元も同様に達成されるものと判断した。

3. Sep-pak カートリッジの選択

本法では、ワイン試料中の色素やその他の夾雑物の除去による分離カラムの負担減少を目的として、Sep-pak カートリッジによるクリーンアップを検討した。

過去の報告では、食品中の AA 分析の際に Sep-pak C₁₈(オクタデシル基)カートリッジに試料を素通りさせることでクリーンアップを行っている例^{3,4,10,13,15)}が多々見受けられる。しかしながら本法では分析対象が 3 成

分であるため、まず最適の Sep-pak を選択・決定する必要がある。その際の十分条件としては、目的の 3 成分は吸着しないが、3 成分以外の夾雑物は吸着・除去する性質を持つものでなければならない。そこで C₁₈ の他に CN(シアノプロピル基)、acell CM(カルボキシメチル基)の 3 種類の Sep-pak についてクリーンアップ効果を比較検討した。まず、AA, EA, SA の 3 成分を全く含有しない赤ワインに、濃度が 100 ppm となるように各成分を添加した標準溶液を調製した。次に、「実験方法」に示した操作どおりに各 Sep-pak によるクリーンアップと還元処理を行った後、HPLC に導入し、各 Sep-pak 処理が試験溶液中の各成分濃度に及ぼす効果について比較した。結果を Table 1 に示す。AA と EA はいずれの Sep-pak にも吸着されずに溶出したが、SA は Sep-pak C₁₈ にほとんど吸着された。すなわち本法では Sep-pak C₁₈ は使用に適さないことが判明した。

一方、Sep-pak CN ならびに acell CM の比較では、クロマトグラム上ではほとんど差異は認められなかったが、目視的には前者のほうがより多くの色素や共雑成分を吸着除去していると判断できたため、以降の実際のワイン試料のクリーンアップには Sep-pak CN を採用することとした。

Table 1 Concentration of each additive in flow-through fraction after Sep-pak treatment.

Sep-pak	concentration (ppm)		
	AA	EA	SA
C ₁₈	98.3	98.2	11.2
CN	103.1	101.7	97.3
acell CM	98.9	100.2	99.2

* Concentration of each additive before Sep-pak treatment is 100 ppm, respectively.

Fig. 2 Effect of reduction from dehydroascorbic acid (DHAA) to AA by 10 mM dithiothreitol (DTT).

- a : Chromatogram of DHAA standard (50 ppm)
b : Chromatogram of DHAA and AA standard (50 ppm, respectively)
c : Chromatogram of b after reduction by 10 mM DTT

Fig. 3 Calibration curves of AA (□), EA (△), and SA (○).

Table 2 The contents of total AA, total EA and SA in imported wines.

No.	country* ¹ (wine type* ²)	Total AA	Total EA	SA	No.	country* ¹ (wine type* ²)	Total AA	Total EA	SA	No.	country* ¹ (wine type* ²)	Total AA	Total EA	SA
1	F(W)	30.6			11	F(R)	28.7			21	G(W)			111.7
2	F(W)	25.0			12	F(RS)			155.4	22	A(W)	12.9	76.5	
3	F(W)	17.5			13	F(RS)			124.2	23	P(W)			90.0
4	F(W)	10.1		108.0	14	F(S)	32.4			24	C(W)			158.5
5	F(W)		4.8	9.7	15	F(S)	17.8			25	C(W)			151.5
6	F(W)			145.4	16	G(W)			156.2	26	C(W)			92.0
7	F(W)			132.9	17	G(W)			151.4	27	C(R)			166.3
8	F(W)			128.1	18	G(W)			142.6	28	C(R)			71.0
9	F(W)			118.4	19	G(W)			136.3	29	C(RS)			66.4
10	F(W)			7.7	20	G(W)			131.1	30	C(B)			166.8

*¹ F: France, G: Germany, A: Austria, P: Portugal, C: California, U.S.A.*² W: White type, R: Red type: RS: Rose type, B: Blush type, S: Sparkling type

4. 検量線の作成

AA, EA, SA の3成分を全く含有しない赤ワインに、濃度が 5, 50, 100 ならびに 150 ppm (mg/kg) となるように各成分を添加した標準溶液を調製した。続いて、各標準溶液に対し試料と同様の操作でクリーンアップならびに還元処理を行った後、それぞれ HPLC へ導入し、ピーク面積法により検量線を作成したところ、5 ppm から 150 ppm の間で Fig. 3 に示したとおり良好な直線性が得られた。

5. 分析精度と定量限界

本法では、試料調製に際して 1) Sep-pak CN によるクリーンアップ時の各成分の濃度減少がほとんどないこと、2) DTT による還元がほぼ完全に行われていることを前述のとおり確認した。さらに検量線を、赤ワインに各成分の既知量を添加した標準溶液を試料と同様に Sep-pak CN 処理、DTT 還元を行ってから作成したので、本法に関してはあらためて添加回収率を求める必要はないものと判断した。

なお、赤ワインに各成分を 50 ppm 添加した標準溶液を用いて分析精度を検討した結果、5 回の繰り返し測定で定量値の変動係数は AA が 2.7%, EA が 2.0%, SA が 3.5% であった。

また本条件に基づく HPLC の検出限界は AA, EA が 2 ppm, SA が 1 ppm であり、定量限界はいずれも 3 ppm であった。本法は蛍光法⁵⁻¹⁰⁾と比べると感度的に劣るのが欠点であるが、ワインや食品中の添加物分析の目的で適用する場合、十分な測定感度を有していると判断できる。

6. 市販試料への応用

本法を市販ワイン（輸入品）試料に適用し総 AA, 総 EA ならびに SA の分析を試みた。その結果、今回測定した 95 製品中 30 製品から 3 成分のいずれかが検出された。この 30 製品の分析結果を Table 2 に示した。また、その代表的なクロマトグラムを Fig. 4 に示した。

30 製品中 AA が検出されたのは 8 製品であり、これらの製品では AA が酸化防止の用途で添加されている可能性がある。EA は 2 製品から検出され、そのうち 1 製品は 76.5 ppm と高含量であった。SA は 23 製品から検出されたが、我が国の最大使用基準である 200 ppm を超えて添加されているような製品は見あたらなかった。

なお、本法による測定の前処理の際に、DTT による還元処理を行わずに HPLC 測定することで、試料中の還元型の AA, EA のみを検出検定することが可能である。この場合、さらに通常の還元処理を行って得られた総 AA あるいは総 EA の定量値から還元型 AA あるいは還元型 EA の値を差し引くことで、DHAA あるいは DHEA の値も算出できる。Table 2 に示したワインのうち、AA あるいは EA が検出された製品について上記の追試・計算を行い、総 AA 量に対する還元型 AA と DHAA の量および割合、ならびに総 EA 量に対する還元型 EA と DHEA の量および割合を求めた。結果を Table 3 に示した。

これより、若干の例外は認められるものの、ワイン中において AA ならびに EA は大部分が還元型で存在することがわかった。

要 約

HPLC/UV 検出法によるワイン中の総 AA, 総 EA ならびに SA の同時迅速定量法を確立した。ワイン試料を Sep-pak CN カートリッジに素通りさせてクリーンアップした後、DTT による還元処理を行うことで試料中の DHAA と DHEA をそれぞれ UV 吸収を持つ AA と EA へと転換した。この試料を HPLC へ導入し、AA, EA, SA の3成分をクロマト分離してそれぞれのピーク面積を測定することで同時定量を行った。本法の検出限界は AA, EA が 2 ppm, SA が 1 ppm で、定量限界は AA, EA, SA のいずれも 3 ppm であった。また、各成

Fig. 4 Chromatogram of market wine.

a : An example of french wine (rose type) which contained SA

b : example of austrian wine (white type) which contained AA and EA

Table 3 Contents of reduced and oxidized forms of AA and EA in imported wines.

No.	country*1 (wine type*2)	AA (ppm)	DHAA (ppm)	% of AA in total AA	EA (ppm)	DHEA (ppm)	% of EA in total EA
1	F(W)	28.9	1.7	94.4			
2	F(W)	15.4	9.6	61.6			
3	F(W)	15.1	2.4	86.3			
4	F(W)	7.4	2.7	73.3			
5	F(W)				4.7	0.1	97.9
11	F(R)	25.9	2.8	90.2			
14	F(S)	30.5	1.9	94.1			
15	F(S)	17.0	0.8	95.5			
22	A(W)	12.2	0.7	94.6	71.3	5.2	93.2

*1 F : France, A : Austria

*2 W : White type, R : Red type, S : Sparkling type

分の定量値の変動係数は 2.0~3.5% であり、良好な再現性を示した。さらに本法を市販輸入ワインに適用した結果、ワインにおける酸化防止剤 (AA, EA) の使用状況に関する新たな知見を得ることができた。

本研究遂行にあたり、有益なる御助言をいただきました国税庁醸造試験所第3研究室長戸塚昭博士に深謝致します。

文 献

- 1) 岩尾裕之, 高居百合子 (編): ビタミンの分析 p.83, 講談社 (1972)
- 2) R. C. ROSE, D. L. NAHRWOLD : *Anal. Biochem.*, **114**, 140 (1981)
- 3) J. W. FINLEY, E. DUANG : *J. Chromatogr.*, **207**, 449 (1981)
- 4) P. WIMALASIRI, R. B. H. WILLS : *J. Chromatogr.*, **256**, 368 (1983)
- 5) R. W. KEATING, P. R. HADDAD : *J. Chromatogr.*, **245**, 249 (1982)
- 6) J. T. VANDERSLICE, D. J. HIGGS : *J. Chromatogr. Sci.*, **22**, 485 (1984)
- 7) A. J. SPEEK, J. SCHRIJVER, W. H. P. SCHREURS : *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 352 (1984)
- 8) B. KACEM, M. R. MARSHALL, R. F. MATTHEWS,

J. F. GREGORY : *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 271 (1986)

- 9) A. LOPEZ-ANAYA, M. MAYERSOHN : *Clin. Chem.*, **33**, 1874 (1987)
- 10) 林 弘道, 宮川あし子 : 食衛誌, **31**, (1) 44 (1990)
- 11) D. B. DENNISON, T. G. BRAWLEY, G. L. K. HUNTER : *J. Agric. Food Chem.*, **29**, 927 (1981)
- 12) L. W. DONER, K. B. HICKS : *Anal. Biochem.*, **115**, 225 (1981)
- 13) D. E. GOODNEY : *J. Chem. Ed.*, **64**, 187 (1987)
- 14) C. LAVIGNE, J. A. ZOE : *J. Chromatogr.*, **410**, 201 (1987)
- 15) 北田 善三, 玉瀬喜久雄, 佐々木美智子, 山添 胖 : 日食工誌, **36**, 62 (1989)
- 16) *Extrait du Codex œnologique international de l'O.I.V.*, P.31, Office International de la Vigne et du Vin, Paris (1978)
- 17) E. VOGT, H. BIEBER : *Weinchemie und Wien-analyse*, p.338, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart (1970)
- 18) H.-J. KIM : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**, (4) 681 (1989)