イオンクロマトグラフィーによるワイン中の フェロシアン化物の分析

(平成3年7月15日受理)

義平 邦利^{*1} 合田 幸広^{*1,*2} 橋本 恭介^{*1,*3}
山崎 壮^{*1} 山田 隆^{*1}

Analysis of Ferrocyanide in Wine by Ion Chromatography

Kunitoshi YOSHIHIRA^{*1}, Yukihiro GODA^{*1,*2}, Kyosuke HASHIMOTO^{*1,*3},
Takeshi YAMAZAKI^{*1} and Takashi YAMADA^{*1}

(^{*1}National Institute of Hygienic Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, Japan;

^{*2}To whom correspondence should be addressed; ^{*3}Moji Center for Quality

Control and Consumer Service: Moji-kowan Godou Bldg., 1-3-10,

Nishikaigan, Moji-ku, Kitakyushu, Japan)

An ion chromatographic method was developed for the determination of ferrocyanide in wine. Hydrogen cyanide, which was produced from ferrocyanide by heating and addition of 10% sulfuric acid (3 ml) to wine (30 ml), was entrained by nitrogen gas into a trapping solution containing 0.1 N sodium hydroxide. A modified Rankine apparatus was used. Then the trapped solution was directly subjected to ion chromatography with electrochemical detection.

The cyanide ion derived from ferrocyanide was separated under basic solvent conditions (4 mM ethylenediamine, 20 mM sodium bicarbonate and 100 mM sodium hydroxide) on a column of Tosoh DEAE-5PW Glass at a flow rate of 1.2 ml/min at 40°C. It was detected by a Tosoh EC-8000 detector with a silver working electrode at 0 mV (determination limit: 0.5 ppb as cyanide anion). The recoveries of various amounts of ferrocyanide (50~1,000 ng/ml calculated as Na₄Fe(CN)₆ in wine) added to white and red wine were 88~130%. The presence of additional Na₂SO₃ (688 µg/ml wine) did not interfere with the measurement of the recoveries.

The described method is very sensitive (determination limit: 1 ng/ml calculated as Na₄Fe(CN)₆ in wine), so that the background level of cyanide (less than 5 ppb as cyanide anion in the trapped solution) could be observed in various kinds of wine bottled in Japan. Since a trace of cyanide was also detected in musts for wines, it is likely that the cyanide in wine is naturally occurring.

(Received July 15, 1991)

Key words: ワイン wine; フェロシアン化物 ferrocyanide; 改良ランキン法 modified Rankine method; イオンクロマトグラフィー ion chromatography

緒 言

フェロシアン化物は、ワイン中の鉄分などを除去し、

清澄化する目的でフランス、イタリアなどヨーロッパ諸国を中心に添加物として使用が認められている。一方、我が国では、その使用は認められておらず、輸入ワインにフェロシアン化物が混入していた場合、これを感度よく検出する方法が必要となる。フェロシアン化物の ADI は WHO によると、ナトリウム塩として 0~0.025 mg/

^{*1} 国立衛生試験所: 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

^{*2} 連絡先

^{*3} 現、門司農林水産消費センター: 北九州市門司区西海岸 1-3-10 門司港湾合同庁舎

kg/day で、体重 50 kg の人が、1 日、250 ml のワインを摂取すると考えると、最低限 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ワインの定量限界をもつ検出法が必要となる。さらに安全率、分析の精度、簡便さなどを考慮すると、フェロシアン化物として、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ワイン以下の定量限界を有する分析法が望ましい。

これまでに報告されているワイン中のフェロシアン化物の分析方法には、AOAC 法¹⁾があるが、フェロシアン錯体をシアンイオンまで分解した後、シアン検出紙の発色で定量を行う方法であり、限度試験には良いが精度の高い分析方法とはいえない。また、フェロシアンイオンの電気伝導度や紫外外部吸収を検出に利用したイオンクロマトグラフィー(IC)による直接分析²⁾は、感度の面で問題がある。一方、シアンイオンの分析方法として、ピリジン・ピラゾロン法、4-ピリジナルボン酸・ピラゾロン法、イオン電極法があり³⁾、水蒸気蒸留や、改良ランキン法と組み合わせることで本目的に応用可能であるが、これらも感度の面で問題がある。そこで著者らは、上述の定量限界を満足させるワイン中のフェロシアン化物の分析法を開発する目的で実験を行い、改良ランキン法により、フェロシアン化物を硫酸酸性下で熱分解させ、銀電極を使用した電気化学検出 IC により、生じたシアンイオンを検出する間接的な方法で、良好な結果を得たので報告する。

実験方法

1. 試料

フェロシアン化物無添加の国産ワイン（無添加ワイン）は、赤、白それぞれ同一製造業者のものを厚生省食品化学課を通じて入手した。ワイン醸造用ぶどう果汁は、山梨県産の赤系品種、白系品種各 1 試料を厚生省食品化学課を通じて入手した。国内で製品化された市販ワイン 9 社 22 種（赤 8 種、白 11 種、ロゼ 3 種）は、すべて東京都渋谷区内の同一百貨店で購入した。

2. 試薬及び標準液

フェロシアン化カリウム、シアン化カリウム、水酸化ナトリウム、エチレンジアミンは、和光純薬工業(株)製特級品を用いた。炭酸ナトリウムは、旭硝子(株)製日本工業規格標準試薬を用いた。水は、すべて Milli-Q（日本ミリポア(株)）により蒸留水を純水まで精製したものをを用いた。

シアンイオン標準液は、シアン化カリウム 250.3 mg を水に溶かして 100 ml としたものをを用い、4°に保存した。

3. 改良ランキン法

試料 30 ml を改良ランキン装置⁴⁾の蒸留フラスコに入れ、シアン遊離剤として 10% 硫酸 3 ml を加え、0.2~0.3 L/min の流速で窒素を通気しながら、フラスコを加熱する。受器には、改良ランキン装置の梨型フラスコの代わりに、約 25 ml の 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液を入

れた 50 ml のネスラー管を用い、受器にガスを導入する導入管先には硝子製焼結フィルターを取り付けた。一定時間通気後、受器をとりはずし、少量の 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液で導入管と焼結フィルターを洗い、その洗液と受器中の水溶液を合わせ、さらに 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液を受器中の水溶液に加え、正確に 30 ml とし IC 試料溶液とした。

4. 機器

IC 装置は、(株)東ソー製 CCPD ポンプ（樹脂加工仕様）に、電気化学検出器として同社製 EC-8000（参照電極：銀/塩化銀、作用電極：銀）を接続して用いた。また IC の恒温槽としては(株)東ソー製 CO-8000 を用い、記録計は(株)島津製作所製 R-112 を用いた。

5. IC 条件

分析カラムは、東ソー製 DEAE-5PW (7.5 cm×8.0 mm i.d.) Glass を用いた。溶離液としては、4 mM エチレンジアミン、20 mM 炭酸ナトリウム及び 10 mM 水酸化ナトリウムを含む水溶液を用いた。さらに、シアンイオンと金属との接触をさけるため、過剰量の IC 試料溶液を、テフロン製のニードルポートクリーナー（レオダイン 7125 インジェクションバルブ用）を取り付けたテフロンシリンジで、テフロン製の 100 μl のサンプルループにオーバーフローさせて注入し、流速 1.2 ml/min、温度 40°、印加電圧 0 mV で測定を行った。

6. 検量線の作成

シアンイオン標準液を定量的に希釈して検量線用シアンイオン溶液 (0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 50, 100, 200, 300, 500, 1,000 ng/ml) を作製した。これらを IC に供し、ピーク高さ法により、低濃度 (0.5~10 ng/ml) と高濃度 (10~1,000 ng/ml) に分けて検量線を作成した。

7. 改良ランキン法の通気時間の検討

赤の無添加ワインに、ナトリウム塩に換算して 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるようにフェロシアン化カリウムを加え、実験方法 3 に従い、通気時間をそれぞれ、5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 分に変化させ、ついで実験方法 5 に従って、遊離シアン量を測定した。

8. 添加回収実験

8.1 フェロシアン化物のみ添加した場合

赤、白の無添加ワインに、フェロシアン化ナトリウムとして 50, 100, 200, 400, 1,000 ng/ml の濃度になるようにフェロシアン化カリウムを加え、通気時間 30 分の条件で、実験方法 3 に従い試料溶液を調製し、ついで 5 に従い IC を行った。また空試験も同様に行った。

8.2 二酸化イオウ及びフェロシアン化物を添加した場合

赤、白の無添加ワインに、二酸化イオウとして 350 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ワインとなるように亜硫酸ナトリウムを添加し、さらに実験方法 8.1 と同様にフェロシアン化カリウムを加え、通気時間 30 分の条件で、実験方法 3 に従い試料

溶液を調製し、ついで5に従いICを行った。また、空試験も同様に行った。

9. ワイン醸造用ぶどう果汁及び、市販ワイン中のシアン化物の測定

通気時間30分の条件で、実験方法3に従い試料溶液を調製し、ついで5に従いICを行った。

結果及び考察

1. IC測定条件

ICによるシアンイオンの分離様式としては、イオン交換型^{5),6)}、イオン排除型⁷⁾が、検出法としては、電気伝導度検出法⁸⁾と電気化学検出法^{5),7)}がある。これらの検出法と分離形式の組合せのうち、安価で取扱いの簡便なシングルポンプノンスプレッサー型ICで、上記の定量限界を満足させる分析方法を検討したところ、イオン交換型カラムに電気化学検出法を組合わせたものが、特に検出感度の面で優れていることが判明した。また、この組合せであれば、強アルカリ条件での試料導入及び分析が可能であり、酸性でシアン化水素となり、それゆえ、危険なシアンイオンを、特別な注意なく取扱うことができる点でも好ましいものと考えられた。

次に、強アルカリ条件で使用可能なカラム及び、シアンイオン検出に必要な作用電極である銀電極⁵⁾の電位などを検討した。その結果、ポリマーベースのカラムと最低電位(0 mV)でバックグラウンド電流が最小の実験方法5で述べた条件で、広い測定範囲で良好にシアンイオンを検出(保持時間: 9.5分, 検出限界: 0.5 ng/ml (S/N>3)) できることが判明した。また本条件では、電気化学的に活性⁵⁾でワイン由来の妨害物イオンとなる可能性のある亜硫酸イオン⁷⁾は検出されなかった。一般に亜硫酸イオンは、シアンイオンと比べ、強く陰イオン交換カラムに保持されることが知られており⁵⁾、注入された同イオンが検出されない原因は、電気化学的なものより、むしろカラムへの吸着によるものと思われる。

2. 検量線の作成

電気化学検出法は、高感度であるだけでなく、定量測定範囲が広いことも特徴である。本法では、この長所を生かし、さらに微量での定量精度をあげる目的で、微量分析用の低濃度検量線(0.5~10 ng/ml, 通常グラフ)と、通常分析用の検量線(10~1,000 ng/ml, 両対数グラフ)をそれぞれ作成した。その結果、両検量線とも良好な直線関係を持つ検量線が得られた。

3. 改良ランキン法の通気時間の検討

次に、得られた検量線を基に、フェロシアン化カリウムを添加した赤の無添加ワインを用いて、改良ランキン法の通気時間とシアンイオンの回収率の関係について検討を行った。なお、フェロシアン化物は、ナトリウム塩としてADIが定められており、その値との比較を容易にするため、本論文では添加したフェロシアン化物質量は、フェロシアン化ナトリウムに換算することにした。

Fig. 1. Recovery of HCN from wine by entrainment with nitrogen gas

HCN was produced from additional ferrocyanide (30 µg as $\text{Na}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$) by heating and addition of 10% sulfuric acid (3 ml) to wine (30 ml).

Table 1. Recoveries of Ferrocyanide Added to Wines

Added cyanide* ¹ (ng/ml wine)	Recoveries (%)			
	(+) SO_3^{2-} * ³		(-) SO_3^{2-}	
	Red	White	red	White
50	105	99	109	105
100	102	92	98	107
200	105	83	122	130
400	99	100	111	103
1000	89	90	96	88

*¹ $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ was added to each wine. Values represent the concentrations calculated as $\text{Na}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$.

*² Each value is the mean of two determinations.

*³ Na_2SO_3 (688 µg/ml wine) was added to each wine.

その結果、Fig. 1 に示すように20分以降で、ほぼ100%の回収率が得られたので以後、通気時間は30分として実験を行うことにした。

4. 添加回収実験

広い範囲での添加回収率を検討するため、フェロシアン化物のADIを参考にして、5種の濃度条件でフェロシアン化カリウムを赤、白2種の無添加ワインに添加して、回収実験を行った。また、ワイン中にはフェロシアン化物と比較して比較的多量に亜硫酸が含まれている可能性があり⁸⁾、この亜硫酸がランキン法での蒸留結果や、カラムからの溶出結果に影響を与える可能性が考えられた。そこで、亜硫酸塩類のワインに対する使用限度である、二酸化イオウとして350 µg/mlの亜硫酸ナトリウムを加えた場合のフェロシアン化物の添加回収率につい

Fig. 2. Ion chromatogram of the distillate of $K_4Fe(CN)_6$ ($1 \mu g$ as $Na_4Fe(CN)_6$) added red wine (1 ml)

ても、同様に検討を行った。

その結果、Table 1 に示したように、赤ワインか白ワインか、添加したフェロシアン化物濃度、亜硫酸添加の有無に関係なく、83~130%の添加回収率を示した。本法の定量限界は、ワイン 1 ml あたりフェロシアン化ナトリウムとして 1 ng であり、この値は当初目標とした値を十分に上回るもので、以上の結果より本法を用いて、ワイン中のフェロシアン化物が問題なく検出、定量できるものと考えられる。

また無添加ワインのみの空試験の結果、定量限界程度の微量のシアンイオンが観測された。さらに Fig. 2 は、ワイン 1 ml あたり 1,000 ng のフェロシアン化物を加えた赤ワイン蒸留物のイオンクロマトグラムであるが、シアンイオン（保持時間：9.5 分）と分離は良好であり、7.4 分にワイン由来の未知ピークが観測された。このピークは、赤白ワインを問わずほぼ一定量観測された。さらに亜硫酸イオンを添加した場合には、ピーク高さは、ほぼ 2 倍となった。保持時間及び電気化学的反応性から、硫化物イオン (HS^-) と推定されるが、シアンイオンの定量には影響を及ぼさない。

5. ワイン醸造用ぶどう果汁中のシアン化物の分析

4 の空試験で、フェロシアン化物無添加のワインにおいても、本法により若干量のシアンイオンが検出された。そこで、このシアンイオンの由来を検討する目的で、このワインの原材料であるワイン醸造用ぶどう果汁をとりよせ、4 と同様の分析法で果汁中のシアン化物の分析を行った。その結果、赤系品種からは 6 ng/ml の、白系品種からは、1.5 ng/ml のシアンイオンが検出され、無

Table 2. Cyanide Contents in Various Wines

Sample	Kind	CN ⁻ (ng/ml)
A-1	White	2.6
A-2	Red	1.4
B-1	White	trace* ²
B-2	Red	trace* ²
C-1	White	4.7
C-2	Red	2.3
C-3	Rose	1.1
D-1	White	0.7
D-2	Red	0.6
E-1	White	trace* ²
E-2	Red	1.4
F-1	White	1.4
G-1	White	trace* ²
G-2	White	trace* ²
H-1	White	trace* ²
H-2	Red	3.2
I-1	White	2.8
I-2	Red	1.4
I-3	Rose	1.8
I-4	White	0.9
I-5	Red	1.3
I-6	Rose	trace* ²

*¹ Expressed as the concentration of cyanide anion (CN⁻) in the distillate obtained by modified Rankine method.

*² Less than 0.5 ng/ml

添加ワインより検出されたシアンイオンは原料ぶどう由来である可能性が高いことが明らかとなった。

6. 市販国産ワイン中のシアン化物の分析

これまでの実験で明らかにしたように、原料自体にシアン化物が含まれていると、高感度分析である本法では、微量であっても最終的にシアンイオンが検出され、それをワインに添加されたフェロシアン化物由来と誤認する可能性が生じる。そこで、国産ワインについて、本法で測定されるシアンイオン量の実態を明らかにすることにした。

市販ワイン 9 社 22 種中の本法で測定されたシアンイオン量を Table 2 に示した。なお表中の A, B, C などの記号はワイン販売業者ごとに付けたものである。測定を行ったワインのうち、赤、白、ロゼに関係なくすべてのワインでシアンイオンの保持時間にピークが観測された。そのうち 15 試料が、定量限界以上のシアンイオンを含んでいることが明らかとなり、最大含量はワイン中の濃度に換算して 4.7 ng/ml であった。この結果を前述のワイン醸造用ぶどう果汁のものと比較すると、含有量はほぼ等しく、これら検出されたシアンイオンは、すべて天然由来と推察された。また、これらのシアンイオンがすべてシアン化水素由来としても、ワイン自体の安全

Table 3. Comparison between the Cyanide Contents in Domestic Wines and Those in Partially Domestic Wines

Cyanide contents* (ng/ml)	Number of wines	
	Domestic	Partially domestic
0 ~0.5>	6	1
0.5~1.5>	7	1
1.5~2.5>	0	3
2.5~3.5>	1	2
3.5~4.5>	0	0
4.5~	0	1

* Expressed as the concentration of cyanide anion in the distillate obtained by modified Rankine method.

性には問題ないものと考えられた⁹⁾。さらに同一業者の赤白2種で比較すると、検出されたシアンイオンが白の方が多いものが4社、赤が3社となり、ワイン中のシアン化物含量はワインの赤白とは関係しない可能性が高いことが明らかとなった。

国内で製品化されるワインには、すべて国産のぶどうを用いて作られるものと、バルク輸入した外国産ワインを国産のものと混合した上で製品化されたものと2種類あることが知られている。そこで、原料の違いによるワイン中のシアン化物量についてまとめ、その傾向について検討した(Table 3)。その結果、国内産のぶどうだけを用いたワインの方が、バルク輸入したワインを混合して作られるものよりワイン中のシアン化物含量が低い傾向が見られた。国内産の原料ぶどうとバルク輸入したワインの原料ぶどうは、品種が異なっている可能性が高く、これらの違いは、原料ぶどうの品種の差に由来する

かもしれない。

結 語

ワイン中のフェロシアン化物の定量分析法の検討を行い、改良ランキン法に電気化学検出ノンサプレッサー型ICを組み合わせることで、ワイン中のフェロシアン化ナトリウム(Na塩)として、ADIを考慮した定量目標値0.1 µg/mlを十分に上回る1 ng/mlの定量限界を持つ方法を開発した。また、本法を用いて、国産ワイン中に天然由来と考えられる微量のシアン化物が含まれていることを明らかにした。

なお、本研究の一部は、日本食品衛生学会第56回学術講演会(1988年11月、静岡)で発表した。

文 献

- 1) Helrich, K. ed.: "Official Methods of Analysis of the AOAC", 15th Ed., Vol. 2, p. 749 (1990), Association of Official Analytical Chemists.
- 2) 日本分析化学会編: "イオンクロマトグラフィー", p. 95, p. 143 (1988), 共立出版.
- 3) 日本薬学会編: "衛生試験法・注解 1990", p. 1,092~1,095 (1990), 金原出版.
- 4) 日本薬学会編: 同上, p. 475 (1990), 金原出版.
- 5) Rocklin, R. D., Johnson, E. L.: Anal. Chem. **55**, 4~7 (1983).
- 6) 日本分析化学会編: "イオンクロマトグラフィー", p. 141 (1988), 共立出版.
- 7) Okada, T., Kuwamoto, T.: Anal. Chem. **57**, 829~833 (1985).
- 8) 宮本文夫, 佐伯政信, 原田基夫: 食衛誌. **29**, 227~234 (1988).
- 9) Conn, E. E.: "Toxicants Occuring Naturally in Foods", p. 299~308 (1973), National Academy of Sciences, Washington D.C.