

[連載講座]

クロマトグラフィーによるワイン及び
ワイン成分分析 (2)

山梨大学工学部化学生物工学科
鈴木 義 仁

3. ワイン分析のための高速液体クロマトグラフィー

特徴

- ・ 溶媒に溶解する化合物はHPLC分析の対象となる。
- ・ 不安定な化合物や溶液状態にある化合物の分析ができる。
- ・ 対象となる化合物の性質にもとずいて様々な分離法が採用される。
- ・ HPLCカラムは高性能のカラム効率を持つ。
- ・ 検出器は選択的ものが、高感度で使用される。
- ・ 多成分の分離や・成分の分取が可能。

3. 1. 液体クロマトグラフィー:

液体クロマトグラフィーは移動相に液体を用いるクロマトグラフィーの総称である。さらに、固定相の状態や種類によってペーパークロマトグラフィー (PC)、薄層クロマトグラフィー (TLC)、カラムクロマトグラフィー (LC)、中空キャピラリークロマトグラフィー (CLC) に分類される。

さらに、固定相の性質即ち分離機構による分類では、吸着クロマトグラフィー (LSC)、分配クロマトグラフィー (LLC)、ゲルクロマトグラフィー (GPC)、イオン交換クロマトグラフィー (IC)、とも呼ばれ、その応用分野は広範囲、多岐にわたっている。

クロマトグラフィーの歴史は1900年代に Tswett に始まり、1952年 Martin がノーベル賞を授賞してクロマトグラフ分析法としての価値をたかめ、クロマトグラフィーが混合物、多成分の一斉分析、迅速分析の適用可能な方法として脚光を浴びた。1970年代になり、従来のPC、LC、イオン交換クロマトグラフィーは全く新しい機能を持つ分析方法 (HPLC) として生まれ変わった。

本稿では、高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromato-

graphy、HPLC)を主体に記載する。

*脚注 前講座は (ASEV-Reports, 3, No. 1, pp 2 - 11 (1992))

1. クロマトグラフィーとは
2. ワイン分析のためのガスクロマトグラフィーについての記載

3. 2. 装置

液体クロマトグラフィーの装置の各部分について以下に記載する。装置の概略を図1に示した。

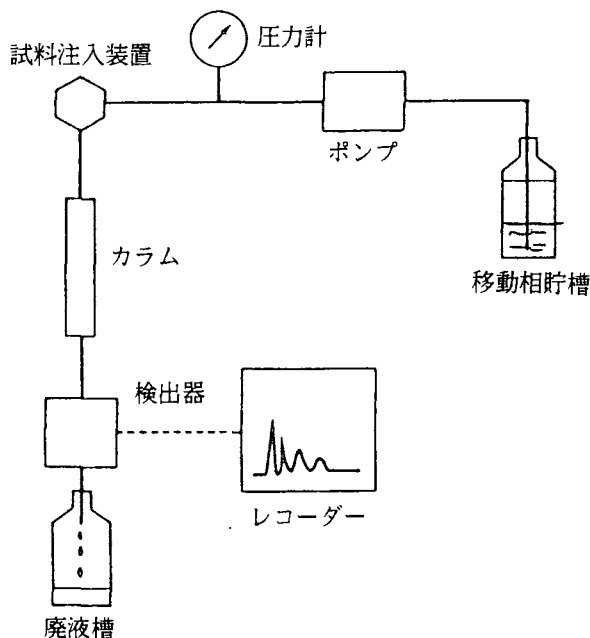


図1 装置概図

1) 送液と注入口

高圧送液の可能なポンプには各種のものが市販されている。ピストン・プランジャーポンプが最も一般的に普及している。移動相は溶媒タンクより、フィルターを経て注入口、カラムに送られる。カラム中の充填物が細粒 (3 ~ 10 μm) のために、ポンプはかなりの高圧の吐出圧力が必要になる。現在では1,000気圧程度の吐出圧のポンプが市販されている。注入口はステンレス・ループを用いて、試料を注入する。また、マイクロシリンジ (ミクロの注射器) で試料の任意量を採取して、カラムに注入する。

2) カラム

カラム固定相：HPLCには吸着、分配、イオン交換、ゲル浸透、分子ふるい、光学活性親和力その他分子形態、等による溶液中での移動過程に伴う分子相互間の移動差を分離機能として利用しているので、固定相の種類は多彩である。
一般的な固定相の相互作用を表1に示した。

クロマトグラフィー系	疎水性相互作用	π-π相互作用	水素結合	電荷相互作用	ファンデルワールス力
逆相クロマトグラフィー	◎				○
吸着系クロマトグラフィー		◎	◎		○
イオンクロマトグラフィー	○	○		◎	○
ゲルクロマトグラフィー					◎

◎ 主な寄与 ○ 付随的な寄与

表1 固定相の相互作用

表1より、分離に寄与している機構が考察できる。これらの溶質に作用する相互作用はいくつか相互に働いているので、簡単ではない。広く利用されている固定相充填剤は、作用基を基材に化学結合させている。
逆相分配系の固定相のODSはシリカ表面にアルキル基を化学結合させたもので、アルキル基の結合は次のような反応によってシリカ担体に導入され、充填剤が合成される。

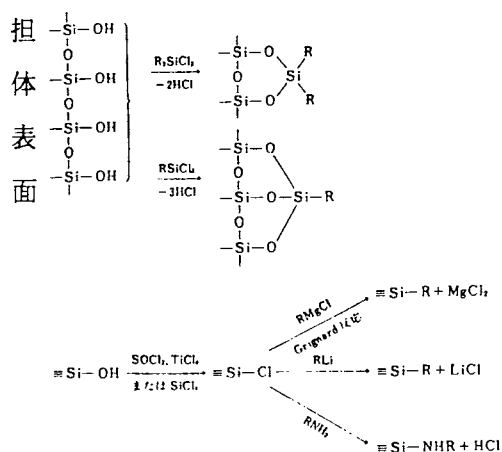


図2 アルキル鎖固定相の合成

カラムの選択：アルキル基鎖などの疎水性による分離はODSカラムを用いて逆相分配系が、官能基などの差による分離は極性カラム（シアノ基、アミノ基固定相）を用いて、順相系のクロマトグラフィーを行う。有機酸やイオン性化合物は低交換容量のイオン交換カラムを用いて、イオンクロマトグラフィーを行う。分子量など分子サイズによる分離はゲルクロマトグラフィーを行う。

試料が極性が大きすぎて、分離困難のときは誘導体化などの前処理を行ってから、クロマトグラフィーのモードを選択するとよい。カラムの選択については文献や実例を参考にすることをお奨めする。

3) 検出器

検出器については選択性 Selectivity、感度 Sensitivity、直線性 Linearity と精度 Precision 等で性能を判定する。

検出器の感度についての最も簡単で有効な表し方は、試料の注入量に対して検出器のシグナル出力をプロットした時の直線の傾きより求める。LC検出器の精度は検出器の直線領域内で、注入を繰り返してクロマトグラムを測定し、ピーク面積と注入量との直線関係より求める。通常は標準偏差の測定値に対する百分率、即ち変動係数 (C. V, %) として表す。正確さは理論的な応答との偏差であり、いくつかの標準溶液を注入したときのピーク面積測定値の変差より求める。

この他、溶離成分についての同定のしやすさ、溶離液に対する制約、検出系として構成するときの利便さ、構成部品の供給と安定性、価格を考慮して選定する。

以下に主な検出器について記載する。

a) 紫外・可視検出器 (UV・VIS-Detector)

可視部や紫外部の光の吸収を測定する検出器で市販のHPLCの約75%を占めている。基本的にこの検出器では光子を吸収して原子や分子の電子遷移状態が励起状態へ昇位する確率を測定するのである。従って、吸収量は分子や原子の吸収断面積が大きさ、試料分子の濃度、検出器の光路長に比例する。一方、電子遷移状態のエネルギーは量子化されたエネルギーとして $\Delta E = h\nu$ で波数或は波長として測定される。

LCの検出器としては上で述べた一般的な事項以外に波長精度 (バンド幅) や検出器内でのバンドひろがり (空体積)、ベースラインのドリフト (安定性)、温度効果、耐圧性、安全性などに注意を払う必要がある。

市販されているUV検出器は大別すると、①波長固定のUV検出器 ②波長可変のUV検出器 (分光光度計タイプのもので波長のスキャンニングも可能) ③多波長検出器 (紫外-可視領域の10 nm 間隔で多検出素子を用いて測定) ④その他がある。

b) 蛍光検出器 (Fluorescence Detector)

蛍光スペクトルは選択性、感度、特異性という点で3つの特徴を持っている。測定法を選択すると蛍光分極、2光子励起蛍光、蛍光二色性、などの特異的な測定方法として利用できる。蛍光検出器は暗電流下で放射される蛍光を測定するため吸収法に比べて3倍も感度が向上する。

$$I_f = 2.303 \Phi_f I_0 \epsilon b c \quad (1)$$

式(1)のように蛍光強度は入射する光の強度 I_0 に比例する。 Φ_f は量子効率、 ϵ はモル吸光度である。

c) 電気化学検出器 (Electrochemical Detector)

ECDは容易に酸化/還元ができる化合物に対して適用され、超微量の検出ができる。酸化性化合物で0.1 pmolまで検出が可能である。還元性化合物では溶存酸素のため検出限界は1桁少ない。電極表面で分析物は酸化され、電子を放出する。得られる電流は電圧に変換されて、クロマトグラムとして描かれる。酸化・還元反応は電位を選ぶことで選択的に検出できる。

d) 屈折率検出器 (Refractive Index Detector)

RI検出器は濃度変化に対応する屈折率測定する非破壊形の検出器である。移動相の選択が重要であるが、どんな化合物にも応答するため、検出感度は低いが有用な検出器の1つである。

RI検出器で注意することは

①移動相の組成が変わると屈折率が変化するため、溶離液濃度や組成変化が起こらないような分析条件が設定される。組成変化の要因は2成分、3成分系の移動相やカラムより溶出物、試料よりの汚染、溶媒の分解、溶存ガス濃度の変化等に敏感なので実験中を通して一定に保つようしなければならない。脱ガスした移動相溶媒を放置すると、空気が溶解するのでベースラインがドリフトする。屈折率は温度や大気圧の変化にも影響し変動する。

②温度や圧力によって屈折率は変化するため、移動相の流速を一定にする必要がある。流速の変化はセル内の温度変化を引き起こす。

e) 伝導度検出器 (Conductivity Detector)

一对の電極を溶離液中に置き、これに交流電圧を印加して、抵抗を測定する。抵抗の測定は加えた電圧と電流よりオームの法則により求める。抵抗の逆数が電導度である。温度によって抵抗は変わるので検出器の温度制御が検出感度に影響する。また、溶離液の流速や、濃度変化、溶存空気、など溶液の電気抵抗に影響をしますので分析条件を一定とすることが高感度検出を可能とする。

電導度は電極表面積や電極間距離に比例し、電圧に反比例する。LC検出器として、1.5 μ lの微小体積のものが市販されている。水溶液中の各種イオンや有機酸は数ppbレベルの濃度検出ができる。イオンクロマトグラフィーにおける主要な検出器である。

f) その他、水素炎イオン化検出器 (FID) や質量検出器 (Mass Spectrometric Detector) などがある。

3. 3. 定性と定量分析:

【定性分析】クロマトグラムを測定し、未知のピークについては、①標準化合物の保持時間を同一条件で比較 ②標準化合物を試料溶液に添加し、未知ピークのみがピーク面積増加することを確認 ③ピーク成分を採取してスペクトル (IR, MS, UV) を測定 ④推定した化合物を誘導体化してから再クロマトグラフィー ⑤カラムを変える、移動相を変える等の分析条件を変えてクロマトグラフィー

【定量分析】定量目的の成分については、試料を正確に秤り、内部標準物の一定量を添加した後、計量器中で溶媒に溶解する。適宜、計量器を用いて希釈したのち、その溶液の小量をHPLCの注入口より注入する。あらかじめ、内部標準物と目的成分との既知混合溶液を作製し、クロマトグラフィーを行って検量線を作成しておく。この検量線図を用い

て、目的成分の定量分析する。定量成分が数種類のときは、各成分に付いて検量線図を作成する。検量線はクロマトグラフィーのピーク面積を求めるか、ピーク高さと目的成分の既知重量とをプロットする。
 検量線の一例を図3に示す。

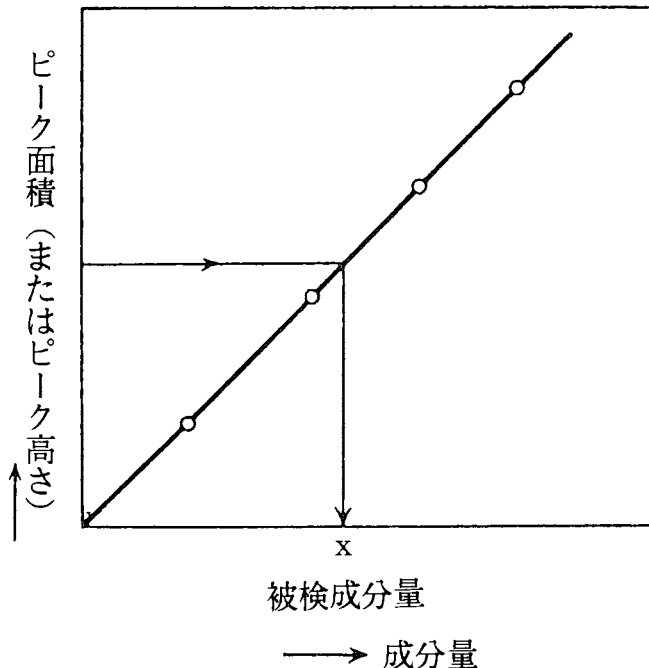


図3 検量線図

3. 4. 微量分析と誘導体化：

目的成分をカラムの前後で試薬と反応させて、検出の応答性を改善することが可能である。この誘導体化は溶離成分が検出器に対して、応答性が無い、または低い場合に行われ、目的成分のみが直接検出できる。

誘導体化は次の様に分類される。(図4)

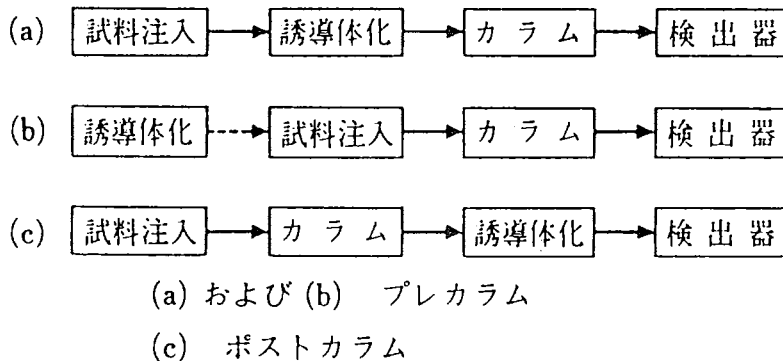


図4 クロマトグラフ系での誘導体化

最も一般的な誘導体化試薬を表2に示す。

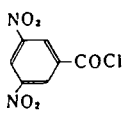
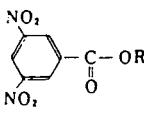
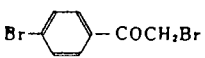
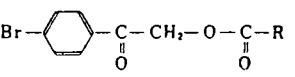
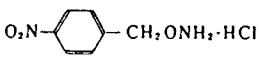
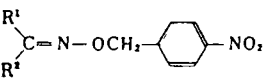
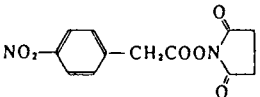
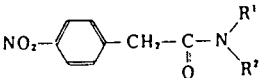
官能基	反応試薬	誘導体
水酸基 (-OH)	3,5-ジニトロベンゾイルクロリド (DNBC) 	3,5-ジニトロベンゾエート 
カルボキシル基 (-COOH)	p-ブロモフェナシルブロミド 	p-ブロモフェナシルエステル 
カルボニル基 (>C=O)	O-p-ニトロベンジルヒドロキシル アミン塩基塩 (NBHA) 	p-ニトロベンジロキシム 
アミノ基 (RR'NH)	N-スクシニミイジル-p-ニトロフェ ニルアセテート (SNPA) 	p-ニトロフェニルアセトアミド 

表2 反応試薬と誘導体

表2 (C) の誘導体化法の利点は、

- ①反応条件に制約がない。
- ②カラムに反応試薬が過剰に注入されない。
- ③反応試薬が少量でよく、貴重な試薬の使用もできる。
- ④共存する妨害物質がの除去できる。
- ⑤目的成分のみが検出される
- ⑥選択的な検出であり、定性や定量分析が容易。

3. 5. 応用例

1) ワイン中の有機酸のHPLC

【HPLC】カラム：陰イオン交換樹脂（基材ポリメタクリレート，球状10μm，-N+R₃，交換容量0.060 meq/g）で、性能な陰イオンクロマトグラフィー用として開発・発売されている。

装置：電導度検出器付きのイオンクロマトアナライザー（横河電機製、IC-100）、カラム温度は40℃、溶離液用の脱気装置としてはユニフロー製のDEGASYS DG-1200を使用した。溶離液は2.5mMフタル酸水素カリウム、流速1.6ml/min、データは横河LC-100システムを用いてクロマトグラムを処理した。試料は0.8μmフィルター（ミリポア社）で濾過してのち、定量分析の際には100μlのループインジェクターを使用して注入した。

【結果】本方法で各種の飲料食品中の有機酸の直接分析が可能である。ピーク面積法を用いた検量線より試料中に含まれた有機酸の含有量 (ppm) を算出した結果を表3に示す。

表3 The determination results (ppm) of various samples

compound	red wine n=4	white wine n=4	Japanese sake 1 n=5	Japanese sake 2 n=5	apple juice n=3	arange juice n=3	grapefruit juice n=3
Acetic	706.0	387.1	1962	1099	932.7	1433	1484
Lactic	307.5	331.7	489.3	899.5	212.7	67.19	58.71
Pyroglutamic	407.5	295.3	379.3	558.6	535.9	374.4	640.2
Succinic	599.9	1062	577.6	379.4			
Malonic	3.53						
Malic	2777	3497	393.0	215.9	3942	1005	879.6
Citric	329.3	492.1	87.35	63.16	190.1	14811	31799
Tartaric	2674	1524					

2) 高速液体クロマトグラフィーによる脂肪酸の分析 (誘導体化)

【誘導体化法】ぶどう種子 (乾燥) をエーテル抽出し、抽出物に酒精カリを加えて、鹼化する。共存する不鹼化物を抽出除去した後、微酸性としてから、p-Bromophenacyl bromide のエタノール溶液を加え、60°Cで20分加温してエステル化する。生成したエステルを抽出したのち、HPLCを行う。エステル化に際して、触媒として18-クラウンエーテルを用いると迅速、定量的にp-ブロムフェナシルエステルとなる。このエステルはUV検出器で高感度に検出されるので、微量分析が可能となる。

【HPLC】カラムはODS-シリカ充填したカラム (I. D. : 4.6mm, 15 cm.)、移動相: 85%-アセトニトリル-水、流速: 1.0 ml/min., 検出器: UV、285 nm., カラム温度: 室温で行う。

【結果】標準物についてのクロマトグラムの一例を図5に示す。

ラベル化による脂肪酸の分離

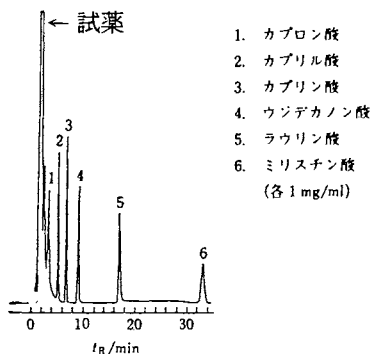


図5 標準脂肪酸のクロマトグラム

3) ワイン中のカルボニル化合物のHPLC

【誘導体化】ワインの1～5 ml. を採取し、これに2,4-Dinitrophenyl hydrazine の塩酸水溶液を加え、60℃に10分温める。反応後、分液ロートに移し入れ、ベンゼンとふりまぜ、生成物をベンゼン相に抽出する。抽出液はそのまま、HPLC分析を行う。

【HPLC】カラムはODS-シリカ充填したカラム (I. D. : 4.6mm, 15 cm.)、移動相：80%-アセトニトリル-水、または85%-メタノール-水流速：1.0 ml/min., 検出器：UV、254nm., カラム温度：室温

【結果】本方法でワイン中に存在するカルボニル化合物のみのクロマトグラムが得られる。あらかじめ、予想されるアセトアルデヒド、アセトン、などの化合物より誘導体の標準物を合成し、検量線を作成しておくこと、各微量成分について、定量分析ができる。

次回（最終稿）は

クロマトグラフィーによるワイン及びワイン成分分析（3）

4. 超臨界クロマトグラフィー

5. クロマトグラフィーによるワイン及びワイン成分分析の進歩
(予定)
