

## 固相マイクロ抽出ーガスクロマトグラフィー／ 質量分析法によるノンアルコールビール中のエタノールの定量

木村健太郎\*, 隅野 隆永\*, 甲田 正人\*, 氏原 覚\*

### Determination of Ethanol in Non-Alcoholic Beers by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography/ Mass Spectrometry

Kentaro KIMURA\*, Takanaga SUMINO\*, Masahito KOTA\* and Satoru UJIHARA\*

\*Osaka Customs Laboratory

4-10-3, Chikko, Minato-ku, Osaka 552-0021 Japan

A combination of solid-phase microextraction headspace sampling and gas chromatography/mass spectrometry (SPME-GC/MS) was used to determine the alcoholic strengths of samples containing 0.1 to 1.0 vol% of ethanol, and the analytical conditions were optimized. For samples containing carbonic acid, one drop of 10N-NaOH was added to remove the carbonic acid, and the decline in ethanol recovery rate due to carbon dioxide could be successfully prevented. SPME-GC/MS was used to determine the alcoholic strengths of distilled and non-distilled non-alcoholic beers, and the results were compared with those obtained by conventional gas chromatography of distilled beers. The differences between the results obtained by SPME-GC/MS without distillation and those by GC were as small as +0.1% to +0.8%. The error of SPME-GC/MS itself was evaluated to be within  $\pm 0.3\%$ , and the coefficient of variation of all the analysis values was less than 1.0%. Therefore, SPME-GC/MS is sufficiently practical in terms of accuracy and precision. Furthermore, since distillation is not required, low-alcoholic beverages can be analyzed more rapidly than by the conventional method.

## 1. 緒 言

2002年6月の道路交通法の改正により、酒気帯び運転と判断されるアルコール体内保有濃度の基準値が引き下げられるとともに、飲酒運転の罰則が強化されたことを受けて、ビールに代わる飲料としてノンアルコールビールが脚光を浴び、その需要が急増している。この需要増大を契機に、大手国内ビールメーカーも相次いでノンアルコールビールの新製品を販売し始めたが、依然、店頭に並ぶ輸入品の品数は豊富である。

ノンアルコールビールとは、“ノンアルコール”と呼ばれるものの、実際には1 vol%未満のアルコールを含有している麦芽飲料である。従って、酒税法適用外の飲料であるが、一般消費者は、ノンアルコールビールをアルコール分が完全にゼロの飲料と誤認する恐れがあることから、最近では“ノンアルコールビール”という名称の代わりに、“ビール風味飲料”といった名称が用いられつつある。

関税率表では、20℃において、アルコール分を0.5 vol%を超えて含有するビールは、“ビール”として税番第2203.00号（統計細分000）に分類され、アルコール分が0.5 vol%以下のビールは、“その他のアルコールを含有しない飲料”として税番第2202.90号（統計細分200）に分類される。なお、関税率は後者の方がより高く設定されている。したがって、輸入ノンアルコールビールを適正な税番に分類するためには、そのアルコール分の定量が重要となる。

低濃度アルコール飲料のアルコール分の定量に関して、現在税関において採用されている方法は、試料を蒸留した後、その留出液についてガスクロマトグラフィー（GC）によりエタノールを定量するというものである。しかし、従来法は、蒸留によるアルコール分の減失を防ぐため細心の注意が必要であること、また、蒸留に約40分もの時間を要するという難点がある。

そこで、今回、蒸留過程を省略できる迅速なエタノール定量法として、固相マイクロ抽出（Solid-Phase Microextraction (SPME)）ヘッドスペースサンプリング<sup>1)~3)</sup>とガスクロマトグ



ラフィー／質量分析法（GC/MS）を組み合わせた方法を検討した。その方法とは、①試料バイアルを気相/液相平衡状態に達するまで温め、②ヘッドスペース部分にある揮発成分をSPMEファイバーで定量的に抽出し、③ファイバーをGC/MSの注入口にて加熱脱着をして抽出成分を導入、分析するものである（以下、SPME-GC/MS法と表す）。

本報では、SPME-GC/MS法で低濃度のエタノールを定量する条件を最適化し、実際のノンアルコールビール中のエタノールの定量に応用するとともに、従来のGC法による結果と比較して、SPME-GC/MS法の有効性を検証したのでここに報告する。

## 2. 実 験

### 2. 1 分析試料

ノンアルコールビール（輸入品3検体、国産品2検体）

### 2. 2 試 薬

エタノール（キシダ化学製・特級試薬min99.5vol%）

1-プロパノール（キシダ化学製・特級試薬99.5%）

水酸化ナトリウム（NaOH）（キシダ化学製・特級試薬96%）

蒸留水（キシダ化学製・HPLC用）

ソーダ水（市販品）

### 2. 3 分析装置及び測定条件

#### 2. 3. 1 密度測定

装置：振動式密度計DMA48（ANTON PAAR社製）

#### 2. 3. 2 GC法

装置：HP6890（Agilent社製）

検出器：FID（310℃）

カラム：HP-5（0.318mm i. d. ×30m, 膜厚0.25 μm）

オープン温度：40℃（2.5分）→20℃/分→150℃

注入口：300℃、スプリット（20：1）

キャリアーガス：He, 圧力12.81psi

#### 2. 3. 3 SPME-GC/MS法

##### (1) SPMEの条件

オートインジェクター	：AOC-5000（島津製作所）
SPMEファイバー	：85 μm Polyacrylate Coating（SUPELCO社製）
予熱温度及び時間	：40℃，7分
抽出方法及び時間	：Head Space sampling，3分
脱着時間	：10秒
ファイバー空焼き時間	：2分
バイアルサイズ	：10ml（22.5mm×46mm）
試料採取量	：6ml
セブタム付きバイアルキャップ	：BV200189（ACHROMA社製）

##### (2) GC/MSの条件

装置：GCMS-QP2010（島津製作所製）

注入口	：300℃，スプリット（50：1）
注入口ライナ	：SPMEライナGC-17A（島津GLC）
注入口セブタム	：GLCこまち薄緑色（島津GLC）
カラム	：DB-5（0.25mm i. d. ×30m, 膜厚0.25 μm）
オープン温度	：40℃（2.5分）
インターフェース温度	：250℃
イオン源温度	：210℃
キャリアーガス	：He, 圧力34.2kPa
検出イオン	：m/z = 45.0（エタノール），59.0（1-プロパノール）

### 2. 4 実験方法

#### 2. 4. 1 標準液の調製

##### (1) 10wt%エタノール標準溶液

エタノール約10gと蒸留水約90gをよく混和して得られる水溶液について、振動式密度計で15℃における密度を測定し、国際アルコール表4)を用いて重量濃度を求めた。これを10wt%エタノール標準溶液とした。

##### (2) 内標準液

1-プロパノール約10gを蒸留水約90gで希釈し、これを内標準液とした。

#### 2. 4. 2 GC法（従来法）におけるアルコール分減失の検証

##### (1) ガス抜きによるアルコール分の減失

3本の100ml容メスフラスコに、それぞれ10wt%エタノール標準溶液1.0g, 4.0g, 8.0gを正確に量り取り、さらにソーダ水を80ml加え、液が溢れ出ないように注意しながら、穏やかに5分間振とうしてガス抜きをした。その後、各メスフラスコに蒸留水を加えて100mlに定容し、さらに5分間超音波でガス抜きをした。これらの水溶液に内標準液を2mlずつ添加し、GC法により、エタノールの回収率を求めた。（参考：室温を20℃として、ガス抜きによるアルコール分の減失がないと仮定するならば、これら3つの水溶液のアルコール分は、100mlに定容された段階で、それぞれ0.13, 0.51, 1.0vol%と計算できる。ただし、無水エタノールの20℃における密度<sup>4)</sup>0.78924を用いた。）

##### (2) 蒸留によるアルコール分の減失

3本の100ml容メスフラスコに、それぞれ10wt%エタノール標準溶液1.0g, 4.0g, 8.0gを精秤し、蒸留水を加えて100mlに定容したものを検液とした。

各濃度の検液を500ml容丸底フラスコに移し、蒸留水100mlでメスフラスコ内を十分に洗浄した。洗液は先の丸底フラスコ内の検液と合わせた。この丸底フラスコ内に少量の沸石を加え、冷却管を付け、冷却水を流しながら直接蒸留法により蒸留を行った。なお、留出液の受器には、先に検液調製の際に用いたメスフラスコを使用し、可能な限りアルコール分の減失を抑えるため、蒸留の最中は受器を氷水で冷却した。留出液が約90mlになった時に蒸留を止め、室温に戻るまで放置した。蒸留された検液に内標準液を2mlずつ添加して、蒸留水で100mlに定容し、



GC法によりエタノールの回収率を求めた。

#### 2. 4. 3 SPME-GC/MS法における最適条件の探究

##### (1) SPMEの条件の最適化

一般に、SPMEの条件は、対象とする化合物の種類やその濃度範囲によって異なり、適宜その条件を最適化する必要がある。今回は、比較的低分子量で極性が高いエタノールを分析対象とするため、SPMEファイバーは極性の高いPolyacrylateでコーティングされたものを選択し、予め300℃で3時間コンディショニングしたものを使用した<sup>5),6)</sup>。ファイバー脱着温度すなわちGC/MS注入口温度については、できるだけ短時間で脱着を済ませた方が望ましいため（理由は後述する）、このSPMEファイバーの使用上限温度に近い300℃とした。また、サンプルバイアル内が気相/液相平衡状態に達するまでの時間を節約し、エタノールを適度な蒸気圧でヘッドスペース内に気化させるため、バイアルの予熱温度は40℃に設定した。定量分析には内標準法を採用し、GC/MSにおいてエタノールと十分に分離可能で、かつ最もエタノールに物性が近い1-プロパノールを内標準物質として選択した。

SPMEにおける予熱、抽出及び脱着の時間について、その最適条件を検証するため、2. 3. 3に示したSPME-GC/MSの条件をベースに、“予熱時間”、“抽出時間”、及び“脱着時間”のそれぞれを段階的に変化させて、0.51vol%エタノール水溶液（内標準物質として1-プロパノールを約0.2%含む）を測定し、エタノールと内標準物質のピーク面積比を求めた。

なお、SPME-GC/MS法では、原則として、内標準物質を含む検液6mlをSPME用10mlバイアルに採取し、セブタム付きバイアルキャップで固く栓をしたものを分析に供した。繰り返し測定の回数は5回とし、5本のバイアルを用いて各々1回ずつ測定した。

##### (2) 最適条件による検量線の作成

4本の100ml容メスフラスコに、それぞれ10wt%エタノール標準溶液1.0g, 3.3g, 5.6g, 8.0gを精秤し、蒸留水を加えて100mlに定容した。この時の室温を20℃とすると、これらのエタノール水溶液のアルコール分は、それぞれ、0.13, 0.42, 0.71, 1.0vol%となる。これらの水溶液に内標準液を2mlずつ添加して、最適化されたSPME-GC/MSの条件（2. 3. 3参照）で測定し、検量線を作成した。

##### (3) 溶存二酸化炭素（CO<sub>2</sub>）がエタノール回収率に及ぼす影響

予めよく振とうしてガス抜きをし、さらに超音波で5分間脱気したソーダ水を溶媒として、2. 4. 2（2）前段と同様の手順で、アルコール分を0.13, 0.51, 1.0vol%含むソーダ水100mlを調製した。これらの水溶液に内標準液を2mlずつ添加して、SPME-GC/MSにより、エタノールの回収率を求めた。

##### (4) 溶存CO<sub>2</sub>の影響を回避する方法の検討

###### a. 高極性カラムを使用した場合

先の実験で使用した0.13vol%のエタノールを含有する脱気済みソーダ水（内標準物質も含む）を検液とし、2. 3. 3に示したSPME-GC/MSの条件の一部を以下のように変更して、エタノールの回収率を求めた。

#### SPME

脱着時間：20秒

#### GC/MS

注入口：250℃

カラム：DB-WAX (0.25mm i. d. × 30m, 膜厚0.25 μm)

オープン温度：80℃（3.2分）

##### b. 超音波によりCO<sub>2</sub>を徹底除去した場合

予めよく振とうしてガス抜きしたソーダ水について、さらに超音波で脱気を続けた時の溶存CO<sub>2</sub>の経時変化を、SPME-GC/MSによりモニタリングした。

##### c. 塩基添加によりCO<sub>2</sub>を液相にトラップした場合

2. 4. 3（3）で調製したエタノールを含有する脱気済みソーダ水6mlをSPMEバイアルに採取した後、バイアルキャップで栓をする前に、10N-NaOHを1滴添加することでCO<sub>2</sub>を液相にトラップした。同じく、検量線用溶液についても、10N-NaOHを1滴添加した。これらの水溶液について、SPME-GC/MSによる測定を行い、エタノール含有脱気済みソーダ水のエタノール回収率を求めた。

##### (5) 塩基添加によるエタノールの相対感度の変化

0.13, 0.51, 1.0vol%エタノール水溶液（内標準物質として1-プロパノールを約0.2%含む）の各々について、SPMEバイアルに採取した後、バイアルキャップで栓をする前に、10N-NaOHを1滴添加したものを用意した。同じく、1N-NaOHを1滴添加したのも用意し、これらをSPME-GC/MSにより測定して、エタノールと内標準物質のピーク面積比を求めた。

#### 2. 4. 4 ノンアルコールビール中のエタノールの定量： 従来法とSPME-GC/MS法の比較検討

前処理として、ノンアルコールビール350mlを1L容共栓付き三角フラスコに採り、少しずつガスを抜きながら、手に圧が感じられなくなるまでよく振とうし、さらに5分間超音波で脱気した。ガス抜きをしたノンアルコールビールを、2本の100ml容メスフラスコに、標線を僅かに超える程度まで採取し、20℃恒温水槽中で液温が20℃になるまで放置した。その後、標線を超える部分を除去し、各々を100mlに定容して得られたものを検液A・Bとし、以下の実験に供した。

##### (1) 蒸留を省略したエタノールの定量法（SPME-GC/MS）

検液Aに内標準液2mlを加え、この溶液6mlをSPMEバイアルに採取した後、バイアルキャップで栓をする前に、10N-NaOHを1滴添加することでCO<sub>2</sub>を液相にトラップしたものについて、SPME-GC/MSにより、エタノールを定量した。なお、検量線用溶液についても、同様に10N-NaOHを1滴添加したものを使用した。

エタノールと内標準物質との面積比と重量比の関係から、検液100ml中に含まれるエタノールの重量 $W_{\text{EtOH}}$ が求められるが、これを20℃における無水エタノールの密度0.78924で除することで、検液に含まれるエタノールの容量濃度を算出できる。

$$\text{検液の20℃における容量濃度 (vol\%)} = W_{\text{EtOH}} / 0.78924$$

##### (2) 蒸留過程を経るエタノールの定量法（GC, SPME-GC/MS）

検液Bを2. 4. 2（2）に示した方法で蒸留し、その留出液



について、GC法とSPME-GC/MS法の両方によりエタノールを定量した。

### 3. 結果と考察

#### 3. 1 GC法（従来法）におけるアルコール分減失の検証

今回の研究目的の一つは、従来の蒸留過程を含むエタノール定量法と、蒸留過程を省略してエタノールを定量するSPME-GC/MS法を比較することにある。従って、まず始めに、従来法の過程において、どれだけのアルコール分が減失するかを調べる必要がある。

##### 3. 1. 1 ガス抜きによるアルコール分の減失

0.13～1.0vol%のエタノールを含有するソーダ水について、ガス抜きをして、エタノールの回収率を求めた結果をTable 1に示す。回収率はいずれの濃度においてもほぼ100%に近く、ガス抜きによるアルコール分の減失は0.6%未満と、無視できる程度であった。

Table 1 Recovery of ethanol from degassed ethanol-containing soda water, as determined by GC method.

Concentration (vol%)	Recovery (%)
0.13	100.04 (0.10)
0.51	99.41 (0.07)
1.01	99.68 (0.04)

The values in parentheses are coefficient of variation when determined by GC (n = 5).

##### 3. 1. 2 蒸留によるアルコール分の減失

0.13～1.0vol%のエタノール水溶液について、蒸留した後、エタノールの回収率を求めた結果をTable 2に示す。回収率は低濃度側で最も低くなり、蒸留によるアルコール分の減失は0.2～1.8%であるという結果が得られた。

Table 2 Recovery of ethanol from distilled ethanol aqueous solutions as determined by GC method.

Concentration (vol%)	Recovery (%)
0.13	98.16 (0.06)
0.51	99.81 (0.02)
1.01	99.29 (0.01)

The values in parentheses are coefficient of variation when determined by GC (n = 5).

#### 3. 2 SPME-GC/MS法における最適条件の探究

##### 3. 2. 1 SPMEの条件の最適化

“予熱時間”、“抽出時間”、及び“脱着時間”のそれぞれを段階的に変化させて、SPME-GC/MSにより、エタノールと内標準物質のピーク面積比を測定した結果を、それぞれ、Fig. 1, 2, 3に示す。予熱時間については、7分以降でピーク面積比が一定となり、バイアル内が気相/液相平衡状態に達した。(Fig. 1)。抽出時間については、3分付近でピーク面積比の変動が最小になった (Fig. 2)。また、脱着時間については、10～30秒の3点で変動係数が0.9%と大した変動は無かったが、60～120秒の3点は変動係数が1.6%となった (Fig. 3)。このことから、脱着はなるべく短時間で済ませることが、分析値の変動係数を低くするポイントと考え、脱着時間は10秒が適当であると判断した。

以上の結果から、SPMEの条件は、2. 3. 3 (1) に示したものが最適と考えられる。(参考：今回使用したオートインジェクタは、5本までのSPMEバイアルを一度に予熱することができる恒温槽を有するため、予熱時間7分をもってバイアルを1本ずつ予熱する必要はない。)

##### 3. 2. 2 最適条件による検量線の作成

0.13, 0.42, 0.71, 1.0vol%のエタノール水溶液を用いて検量

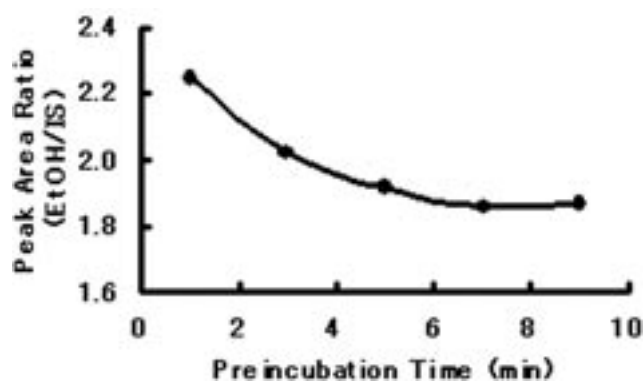


Fig. 1 Relationship between the preincubation time of SPME vial and the peak area ratio of ethanol to the internal standard, as determined by SPME-GC/MS.

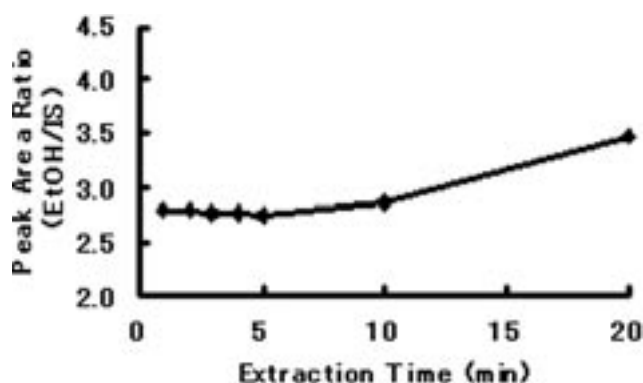


Fig. 2 Relationship between extraction time and the peak area ratio of ethanol to the internal standard, as determined by SPME-GC/MS.



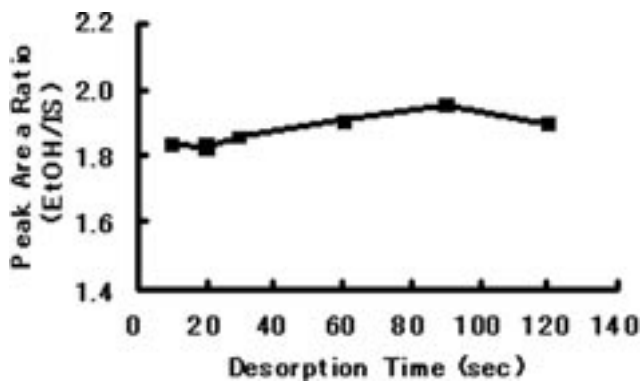


Fig. 3 Relationship between desorption time of SPME fiber and the peak area ratio of ethanol to the internal standard, as determined by SPME-GC/MS.

線を作成した結果、相関係数0.9998の良好な直線性を示した (Fig. 4)。また、各濃度における変動係数は、いずれも1.0%未満であった (各々、0.47, 0.80, 0.53, 0.55%)。

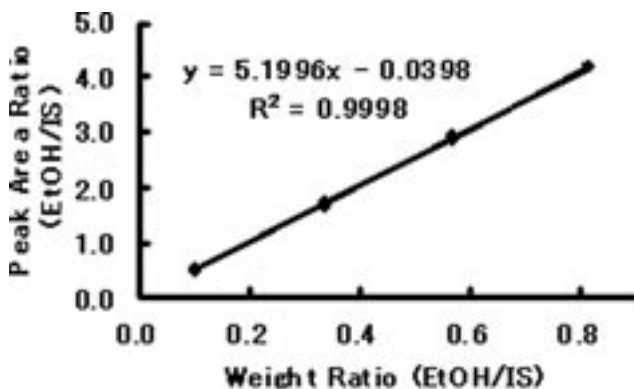


Fig. 4 Calibration curve obtained by SPME-GC/MS.

### 3. 2. 3 溶存CO<sub>2</sub>がエタノール回収率に及ぼす影響

ノンアルコールビール中のエタノールを定量する際には、通常、その前処理としてガス抜き操作を実施するが、実際には比較的多量のCO<sub>2</sub>が検体中に残留している。従って、SPME-GC/MS法において、試料中に溶存しているこのようなCO<sub>2</sub>がエタノールの定量値にどのような影響を及ぼすのかを検証するため、まず、濃度既知のエタノールを含有する脱気済みソーダ水を模擬試料として用いて、そのエタノール回収率を求めた (Table 3)。その結果、特に低濃度側で、回収率の低下が顕著となった。

この原因に関して、0.13vol%のエタノールを含有する脱気済みソーダ水を測定したときのイオンクロマトグラム (m/z=45.0) を見ると、エタノールのピークのすぐ手前に<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>のシグナルが現れることが分かった (Fig. 5 (a))。さらに、0.13vol%エタノール水溶液と脱気済みソーダ水を個別に測定し、得られたイオンクロマトグラム (m/z=45.0) を重ね合わせたものがFig. 5 (b) である。この図とFig. 5 (a) を照らし合わせると、<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>の

Table 3 Recovery of ethanol from degassed ethanol-containing soda water, as determined by SPME-GC/MS.

Concentration (vol%)	Recovery (%)
0.13	93.41 (0.69)
0.51	99.34 (0.68)
1.01	99.53 (0.67)

The values in parentheses are coefficient of variation (n = 5).

ブロードピークの裾野が部分的にエタノールのピークと重なっているため、エタノールのピークの立ち上がり方が変化していることがわかる。このピーク形状の変化により、エタノールの真のピーク面積値が得られないことが、エタノール回収率の低下をもたらした原因の一つと考えられる。

そこで、低濃度におけるエタノール定量値を真の値に近づけるために、①高極性カラムを用いてエタノールと<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>のピークを分離する方法、②超音波によりCO<sub>2</sub>を徹底的に除去する方法、③塩基添加によりCO<sub>2</sub>を液相にトラップする方法を、以下のように検討した。

### 3. 2. 4 溶存CO<sub>2</sub>の影響を回避する方法の検討

#### (1) 高極性カラムを使用した場合

3. 2. 3の結果だけから判断すれば、GC/MSのカラムを高極性のものに交換し、エタノールと<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>のピークを完全に分離すれば、エタノールのピーク形状に関する問題は解決されるものと考えられる。そこで、SPME-GC/MSの条件の一部を、2. 4. 3 (4) a.で示したように変更し、0.13vol%のエタノールを含有する脱気済みソーダ水について、エタノールの回収率を求めた。なお、ここで使用したカラム (DB-WAX) の使用上限温度は250℃であるため、脱着温度 (GC/MS注入口温度) を300℃から250℃に変更し、その代わりに脱着時間を10秒から20秒と長くした。

その結果、Fig. 6に示すように、エタノールと<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>のピークを完全に分離することができた。しかし、エタノール回収率は97.78% (変動係数0.84%) となり、DB-5カラムを用いた場合の回収率93.41%に比べて若干改善されたものの、やはり100%に満たなかった。

このように、CO<sub>2</sub>の存在下でエタノール回収率が低下する根本的な原因は、SPMEファイバー表面において、CO<sub>2</sub>とエタノールの吸着が競合しているためと考えられる。事実、SPMEにおいて、パーセントのオーダーで溶液中に存在する低分子量化合物が、分析対象物の吸着を妨害し、その回収率を低下させることが知られている (競合・置換効果<sup>7)</sup>)。今回の場合は、原理的に内部標準物質に対しても競合・置換効果が生じていると考えられるが、より低分子量のエタノールがその影響をより強く受けているものと推定される。



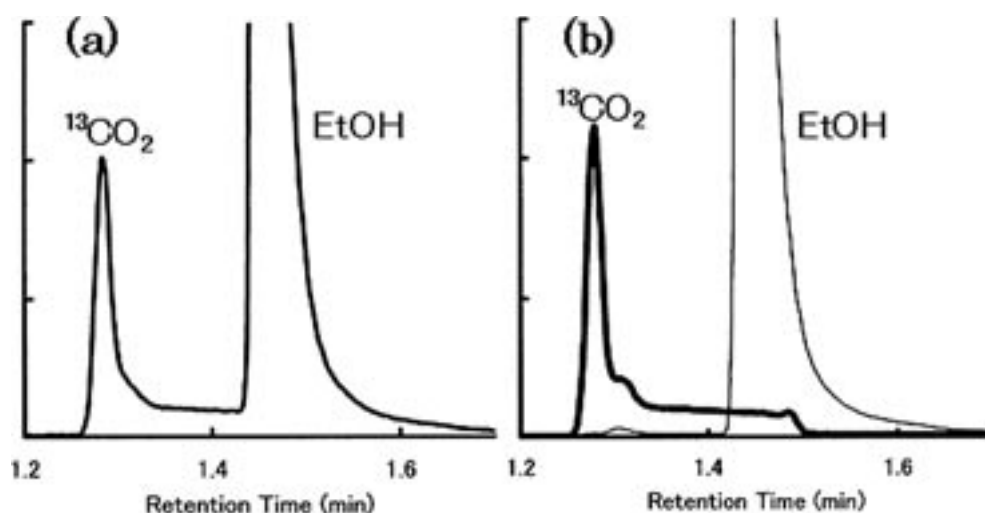


Fig. 5 Ion chromatograms monitored at  $m/z = 45$ ; (a) degassed soda water containing 0.13vol% of ethanol, (b) degassed soda water (bold line) and aqueous solution containing 0.13vol% of ethanol (thin line).

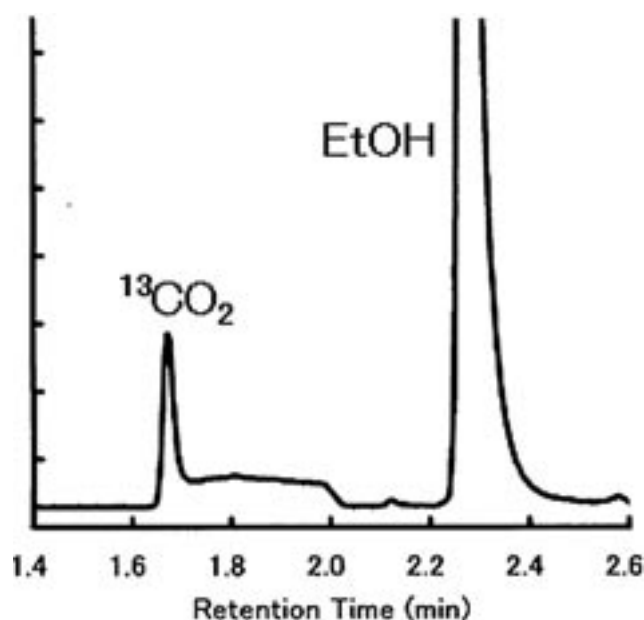


Fig. 6 Ion chromatogram ( $m/z = 45.0$ ) of degassed soda water containing 0.13vol% of ethanol, obtained by using DB-WAX as GC/MS column.

## (2) 超音波により $\text{CO}_2$ を徹底除去した場合

$\text{CO}_2$ によるエタノール回収率の低下を防ぐためには、やはり、 $\text{CO}_2$ とエタノールのピークを完全に分離することに労力を費やすよりも、検液に溶存する $\text{CO}_2$ を除去することが重要と考えられる。 $\text{CO}_2$ を除去する一つの方法として、超音波による脱気時間をかけることが考えられる。

予めよく振とうしてガス抜きしたソーダ水について、さらに超音波で脱気し続けた時の溶存 $\text{CO}_2$ 量の経時変化をFig. 7に示す。この結果から、超音波により脱気することは非常に効率が悪いことがわかる。従って、超音波による脱気は5分程度に留めるべきと判断した。

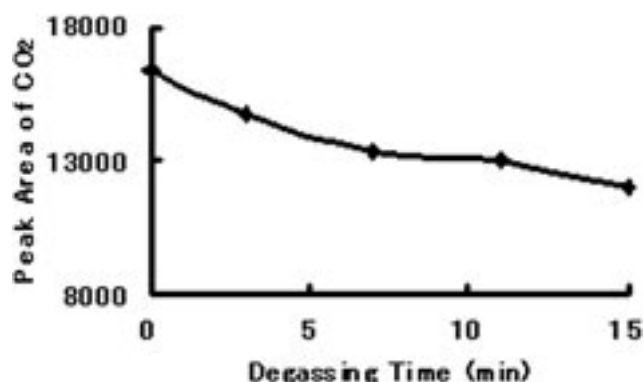


Fig. 7 Change in the amount of carbon dioxide in the soda water previously thoroughly shaken for degassing, with the lapse of ultrasonic degassing time.

## (3) 塩基添加により $\text{CO}_2$ を液相にトラップした場合

$\text{CO}_2$ を除去するもう一つ的手段として、検液に塩基を添加し、 $\text{CO}_2$ を炭酸塩として液相に固定してしまう方法が考えられる。濃度既知のエタノールを含有する脱気済みソーダ水 6 mlを採取したSPMEバイアルに、10N-NaOHを1滴添加することで $\text{CO}_2$ を液相にトラップし、エタノールの回収率を求めた結果をTable 4に示す。いずれの濃度においても、回収率はほぼ100%となり、 $\text{CO}_2$ による回収率の低下は効果的に改善された。また、塩基添加していないものと塩基添加したもののイオンクロマトグラムを比較しても、 $\text{CO}_2$ が効果的に除去されていることがわかる (Fig. 8)。

上記の結果から、ノンアルコールビール中のエタノールをSPME-GC/MSにより定量する場合、まず前処理の段階で検体を従来の方法により脱気し、さらに10N-NaOHを1滴添加して、 $\text{CO}_2$ を液相にトラップさせることが非常に重要であると考えられる。



Table 4 Recovery of ethanol from degassed ethanol-containing soda water with one drop of 10N-NaOH added, as determined by SPME-GC/MS.

Concentration (vol%)	Recovery (%)
0.13	100.43 (0.71)
0.51	100.17 (0.46)
1.01	100.47 (0.63)

The values in parentheses are coefficient of variation (n = 5).

### 3. 2. 5 塩基添加によるエタノールの相対感度の変化

前段で述べたように、塩基を添加してCO<sub>2</sub>を液相にトラップすることにより、エタノールの回収率はほぼ100%となったが、厳密に言えば、その回収率は理論値よりも最大0.5%大きくなっている。後述するように、SPME-GC/MS法自体の誤差が±0.3%未満であることを考慮すると、今回の理論値からの偏差は、単純な誤差以外に別の要因があるものと考えられる。その決定的な要因は、塩基添加により、検液と検量線用溶液に水酸化物イオン濃度の差が生じていることである（pHはそれぞれ約11、約13となる）。

ところで、検液のエタノール回収率が約0.5%理論値を上回るということは、他に原因が無いと仮定するならば、検量線用溶液のエタノールの相対感度が検液のものに比べて約0.5%低くなっていることを意味している。従って、水酸化物イオン濃度の違いにより、実際にエタノールの相対感度に0.5%程度の違いが

現れるのかを検証する必要がある。そこで、先の検液と検量線用溶液のpHの違いを、濃度既知のエタノール水溶液と適当な濃度のNaOH水溶液を用いて再現し、両者間に生じるエタノール相対感度の差を調べることにした。

内標準物質を含む濃度既知のエタノール水溶液 6 mlに 1 N-NaOHを 1 滴添加すると、pHが約11になり、先述の検液のpHを再現できることがわかった。そこで、内標準物質を含む濃度既知のエタノール水溶液 6 mlに、10N-NaOHを 1 滴添加した場合（pH約13）と 1 N-NaOHを 1 滴添加した場合（pH約11）の両方について、SPME-GC/MSにより測定した結果をTable 5に示す。予想どおり、いずれの濃度においても、10N-NaOHを 1 滴添加してpHを約13とした方、すなわち水酸化物イオン濃度がより高い方が、エタノールの相対感度が0.2～0.5%だけ低くなることがわかった。

このように、水酸化物イオン濃度が高くなるとエタノールの相対感度が低下するという現象は、エタノールと内標準物質 1-プロパノールの酸解離指数の違いに由来するものと考えられる。従って、塩基添加により検液中のCO<sub>2</sub>をトラップする場合、酸解離指数がエタノールのものと極端に異なる内部標準を使用すると、回収率の理論値からの偏差もさらに大きくなると予想される。このことから、今回、内部標準物質として、エタノールに最も物性が近い 1-プロパノールを選択したことは、結果的に偏差を最小にすることに導いたと言える。

### 3. 2. 6 ノンアルコールビール中のエタノールの定量：従来法とSPME-GC/MS法の比較検討

5種類のノンアルコールビールのアルコール分について、蒸留せずしてSPME-GC/MSにより定量した結果と、蒸留後、GC法とSPME-GC/MS法の両方で定量した結果をまとめたものが

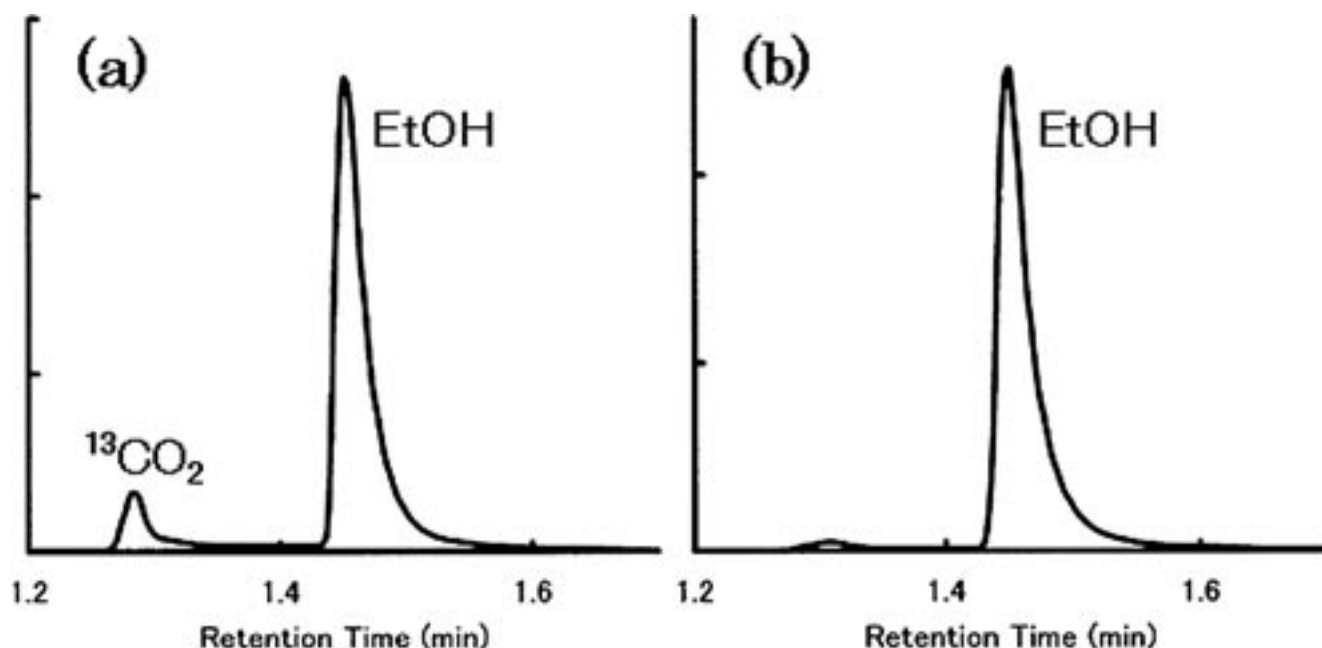


Fig. 8 Ion chromatograms monitored at  $m/z = 45$ ; (a) degassed soda water containing 0.13vol% of ethanol, (b) degassed soda water containing 0.13vol% of ethanol with one drop of 10N-NaOH added.



Table 5 Differences in the relative sensitivity of ethanol to the internal standard between ethanol aqueous solution with one drop of 10N-NaOH added and ethanol aqueous solution with one drop of 1N-NaOH added, as determined by SPME-GC/MS.

Concentration (vol%)	Peak Area Ratio (EtOH/IS)			
	Added 10N-NaOH		Added 1N-NaOH	
0.13	0.611	(0.64)	0.613	(0.51)
0.51	2.080	(0.55)	2.091	(0.25)
1.01	4.211	(0.28)	4.218	(0.54)

The values in parentheses are coefficient of variation. (n = 5)

Table 6 Determined alcoholic strength of non-alcoholic beers

Sample	Alcoholic Strength Indicated	Alcoholic Strength Determined (vol%)		
		Before Distillation	After Distillation	
		SPME-GC/MS	GC	SPME-GC/MS
A †	Less than 0.9%	0.8612 (0.22)	0.8607 (0.04)	0.8604 (0.48)
B †	Less than 0.5%	0.4433 (0.95)	0.4401 (0.02)	0.4412 (0.77)
C ‡	Less than 0.5%	0.4486 (0.67)	0.4474 (0.02)	0.4486 (0.32)
D †	Less than 0.4%	0.4452 (0.91)	0.4438 (0.09)	0.4426 (0.80)
E ‡	0.2%	0.1733 (0.45)	0.1720 (0.14)	0.1718 (0.42)

† and ‡ represent imported and domestic, respectively. The values in parentheses are coefficient of variation. (n = 5)

Table 6である。

この表において、GC法による定量結果、すなわち従来法による定量結果を基準とすると、蒸留後SPME-GC/MS法で得られた結果は、ほぼGC法と変わらない結果となった。関税分類上、最も重要となるアルコール分0.5vol%付近における定量値の違いは、僅か±0.3%未満に過ぎず、これがSPME-GC/MS法そのものの誤差と考えられる。次に、蒸留せずしてSPME-GC/MSにより定量した結果とGC法による結果を比較すると、前者の方が0.1%～0.8%大きい値が得られ、特に一番低濃度側でその違

いが最大となった。この違いについては、

- ① 蒸留によるアルコール分の減失が0.2～1.8%であること
- ② 塩基添加により生じる偏差が+0.5%未満であること
- ③ SPME-GC/MS法自体の誤差が±0.3%未満であること

以上の3点から予想される範囲内である。従って、ノンアルコールビールを蒸留せずして、そのアルコール分をSPME-GC/MSにより定量する方法は、精度・正確さの点で十分実用的と言える。また、SPME-GC/MS法は、試料の蒸留を省略できるため、分析作業の大幅な迅速化につながると結論付けられる。

#### 4. 要 約

固相マイクロ抽出 (Solid-Phase Microextraction) ヘッドスペースサンプリングとガスクロマトグラフィー／質量分析法 (GC/MS) を組み合わせた方法 (SPME-GC/MS) を、0.1～1.0vol%のエタノールを含有する試料のアルコール分定量に応用し、その分析条件を最適化した。炭酸を含む試料については、10N-NaOHを1滴添加し、CO<sub>2</sub>を炭酸塩として液相にトラップすることで、CO<sub>2</sub>によるエタノール回収率の低下を防ぐことができた。蒸留前後のノンアルコールビールのアルコール分をSPME-GC/MSにより定量し、蒸留過程を経る従来のガスクロマトグラフィーによる定量結果と比較した。蒸留せずSPME-GC/MSにより得られた結果とGC法による結果の違いは僅か+0.1%～+0.8%であった。また、SPME-GC/MS法そのものの誤差は±0.3%未満と評価され、分析値はいずれも、その変動係数が1.0%未満となった。従って、SPME-GC/MS法は精度・正確さの点で十分実用的と認められ、また、蒸留を省略できるため、従来法よりもさらに迅速な低濃度アルコール飲料の分析が可能となった。

#### 文 献

- 1) VARIAN, Inc.: Combi PAL SPME Manual, 1-32 (1999)
- 2) SUPELCO: Bulletin 925B (2001)
- 3) SUPELCO: The Reporter, 14 (5) (1995)
- 4) 国際法定計量機関 (OIML) : 国際アルコール表 (1972)
- 5) K. Kadokami, K. Sato, T. Iwamura and Y. Hanada: *Bunseki Kagaku*, **45**, 1013-1018 (1996)
- 6) VARIAN, Inc.: Combi PAL SPME Manual, 81-83 (1999)
- 7) GERSTEL GmbH & Co. KG: AppNote No.4 (2002)