

ノート

果実酒中の有機酸，アミノ酸の分析

石川 順一^{*}，松崎 隆一^{*}，印出 進^{*}，平木 利一^{**}，笹谷 隆^{**}

Analysis of Organic Acids and Amino Acids in Fruit Wines

Junichi ISHIKAWA^{*}, Ryuichi MATSUZAKI^{*}, Susumu INDE^{*},
Toshikazu HIRAKI^{**} and Takashi SASATANI^{**}

^{*}Tokyo Customs Laboratory

5-5-30 Konan, Minato-ku, Tokyo, 108-8469 Japan

^{**}Central Customs Laboratory, Ministry of Finance
531 Iwase, Matsudo-shi, Chiba, 271-0076 Japan

We examined organic acids and amino acids in fruit wines using High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Capillary Electrophoresis (CE) and Automated Amino Acid Analyzer. The HPLC separation was performed on a 7.8mmI.D.×300mm Excelpak CHA-E11 (column temperature : 55 °C) with a mixed mobile phase of 0.1% Phosphoric acid and Methanol (90 : 10) at a flow rate of 0.75ml/min. The CE separation was performed on a 75 μmI.D.×72cm Fused Silica Capillary with an organic acid buffer kit at a voltage of 25kV (Negative polarity).

It was found that the contents of tartaric acid and proline might be useful indexes for the discrimination between grape wines and the other fruit wines.

1. 緒 言

近年のワインブームにより、日本国内には多種多量の果実酒（ワイン等）が輸入され流通している。これらの輸入果実酒の中で、ぶどう酒類は第 22.04 項、アロマタイズドワインとして知られているベルモット等は第 22.05 項、その他の発酵酒は第 22.06 項に分類されており、関税率表上の取り扱いが異なっている。したがってこれらを税表分類するに際し、それぞれの違いを判別する必要がある。

すでに、尾本氏らによりイオンクロマトグラフィーを用いたワイン中の有機酸の分析¹⁾が報告されているが、今回は、有機酸の分析を税関分析に配備されている高速液体クロマトグラフィーを用いて行い、更に測定時間が短く操作性の容易なことで知られるキャピラリー電気泳動についても検討した。また、果実酒の味を決定する重要な成分のひとつである遊離アミノ酸についてもアミノ酸自動分析装置を用いて分析を行った。これらについて幾つかの知見が得られたので報告する。

2. 実 験

2.1 分析試料

国内で市販されている輸入果実酒 (Table 1)。

ぶどうを原料とする試料：白ワイン、赤ワイン、アロマタイズドワイン等

その他の試料：フルーツワイン、リキュール等

(アロマタイズドワインとは、ぶどう酒に薬草、香辛料、色素などを加えて作るフレーバーワインのこと、ベルモット、アペリアティフ、サングリアなどが知られている。)

2.2 試 薬

D(-)酒石酸（和光・一級）

ぐえん酸（和光・特級）

L(-)りんご酸（和光・特級）

塩素酸カリウム（純正・一級）

有機酸分析用緩衝溶液キット (HEWLETT PACKARD 社
製 : HP8500-6785)

2.3 分析装置及び測定条件

2.3.1 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

* 東京税関業務部 〒108-8469 東京都港区港南 5-5-30

** 大蔵省関税中央分析所 〒271-0076 千葉県松戸市岩瀬 531

Table 1 Samples : Grape Wines, Other Fruit Wines and Liqueurs

	試料	種類	備考
ぶどう酒 (Grape Wine)	白ワイン.1(ドイツ産)	白ワイン	
	白ワイン.2(ドイツ産)	白ワイン	
	赤ワイン.1イタリア産	赤ワイン	
	赤ワイン.2フランス産	赤ワイン	
	赤ワイン.3スペイン産	赤ワイン	
ぶどうを原料とする果実酒	桂花酒(Hwei Hua Cheew)	中国酒(果実酒)	白ワインにキンモクセイの花びらのエキスをブレンドしたもの
	桂花蜜酒	中国酒(果実酒)	白ワインにキンモクセイの花びらのエキスをブレンドしたもの
	桂花蜜酒-蘭紅	中国酒(果実酒)	桂花蜜酒に赤ワインをブレンドしたもの
	スマホン酒	中国酒(蜜酒)	白ワインにスマホンの芋頭のエキスを配合したもの
	アベリティフワイン.1	アロマタイズドワイン	白ワインにバニラ・シナモン・フルーツ、シトラス果汁をミックスしたもの
	アベリティフワイン.2	アロマタイズドワイン	白ワインにカシス(黒すぐり)をブレンドしたもの
	サングリア	アロマタイズドワイン	赤ワインにシャラス・ジュースをミックスしたもの
	ベルモット.1	アロマタイズドワイン	ワインにハーブ、スパイス、スピリッツをミックスしたもの
	ベルモット.2	アロマタイズドワイン	ワインにハーブ、スパイス、スピリッツをミックス、オレンジの風味をもたせたもの
	ベルモット.3	アロマタイズドワイン	白ワインをベースに香草、薬草を配合、スピリッツを加えたもの
	ベルモット.4	アロマタイズドワイン	白ワインをベースに香草、薬草を配合、スピリッツを加えたもの
フルーツワイン (Fruit Wine)	荔枝酒(LYCHEE WINE)	フルーツワイン	
	杏子酒(APRICOT WINE)	フルーツワイン	
	櫻桃酒(CHERRIES WINE)	フルーツワイン	
	CIDRY	フルーツワイン	りんご100%の微発泡性ワイン
	フルーツワイン(MIX)	フルーツワイン	バナナ、アブリコット、キューイー、マンゴー、グアバ、オレンジ、パイナップル、アップル、レモン、バニラ・シナモン・フルーツを原料としたフルーツワイン
リキュール etc (Liqueur, etc)	グレームード・カシス	リキュール	黒スグリの葉をアルコールなどに漬漬す、砂糖を加えたもの
	パルフェ・タムール	リキュール	熟成する際に薔薇や菖蒲類を追加したもの
	蜂蜜(ふくらしゆ)	中国酒(蜂蜜酒)	蜂蜜、米、小麦、豆、とうもろこしを原料とした蜂蜜酒
	まいからい酒	中国酒(鈎吻酒)	白酒をベースにまいからい花を加えたもの

装 置 : HP1090 (HEWLETT PACKARD)

カラム : Excelpak CHA-E11 7.8mmI.D. × 300mm (横河
アナリティカルシステムズ)

移動相 : 0.1%りん酸 : メタノール = 90:10

流 量 : 0.75ml/min

カラム温度 : 55

検出器 : UV210nm

酒石酸標準溶液の調製 : 酒石酸 0.6g を 100ml に定容し酒石
酸標準溶液とする。試料の調製 : 分析試料を 0.45 μm のメンブランフィルターで
ろ過し試料とする。

2.3.2 キャピラリー電気泳動装置 (C E)

装 置 : HP3D CE (HEWLETT PACKARD)

キャピラリー : Fused Silica Capillary (75 μmI.D. × 72cm)

泳動緩衝溶液 : 有機酸分析用緩衝溶液 (HP)

試料注入方法 : 加圧法 (50.0mbar × 20sec)

泳動電圧 : 25.0KV (ネガティブ)

検出器 : UV200nm

酒石酸標準溶液の調製 : 酒石酸 0.4g を 100ml に定容し酒
石酸標準溶液とする。内部標準溶液の調製 : 塩素酸カリウム 0.3g を 100ml に定
容し内部標準溶液とする。試料の調製 : 分析試料 5ml と内部標準溶液 5ml を混合後
200ml に定容し, 0.45 μm のメンブランフィ
ルターでろ過し試料とする。

2.3.3 アミノ酸自動分析装置

装 置 : JLC500V (日本電子)

測定原理 : 試料をカラムに注入し pH の異なる数種類の
展開液 (バッファー) により分離する。分離されたアミノ酸にニンヒドリン試薬を加え発色
させ, 440nm と 570nm の可視光で検出する。試料の調製 : 分析試料とクエン酸ナトリウムバッファー
(pH2.2) を 1:1 の容量比で混合し, 0.45
μm のメンブランフィルターでろ過し試料と
する。

3. 結果及び考察

3.1 高速液体クロマトグラフィーによる有機酸の分析

果実酒中の有機酸について分析を行った結果の主なものとして
白ワイン, ベルモット, シードルのクロマトグラムを示す
(Fig.1)。6 分から 12 分の間にくえん酸, 酒石酸, りんご酸
などの有機酸のピークが認められる。報告のとおりぶどうを原
料とする果実酒は酒石酸を含んでいるが, ぶどうを原料としな
い果実酒は酒石酸をほとんど含んでいないことから, 酒石酸の
含有量に特徴的な差があることが確認できた。酒石酸を定量す
るため検量線を作成した。検量線は, 酒石酸標準溶液および酒石酸標準溶液を 2, 4, 8 倍
希釈したものを用いて, 測定の度にピーク面積と濃度との関係
を求め作成したところ直線性の高い検量線を得ることが出来た
(Fig.2)。分析試料中の酒石酸の定量値, 標準偏差および変動係数を示す
(Table 2)。なお定量値は, 5 回測定の平均値を用いている。
定量結果より, ぶどう酒には酒石酸が約 0.2g/100ml 以上含ま
れるのに対し, アロマタイズドワインでは, 約 0.1g/100ml 程度
と少ない傾向が認められた。以上より, ぶどうを原料とする果実酒か否かの分析におい
て, 溶液中の酒石酸の含有量の分析が有効であることが確かめ
られた。

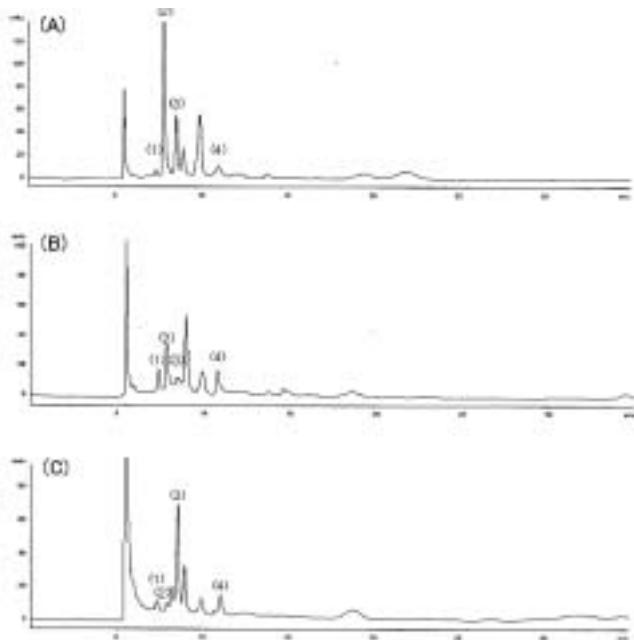


Fig.1 Chromatogram of sample by HPLC method

- (A) White Wine.2 (B) Vermouth.1 (C) CIDRY
 (1) Citric acid (2) Tartaric acid
 (3) Malic acid (4) Lactic acid

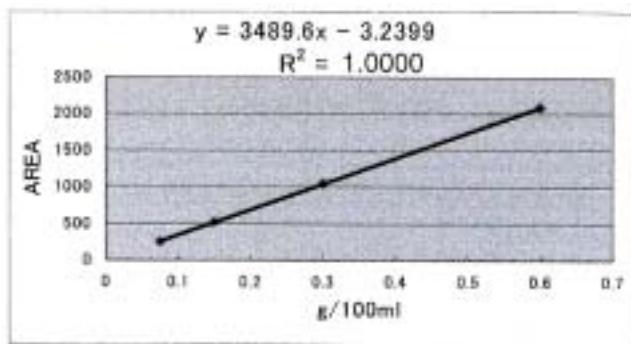


Fig.2 Calibration curve of Tartaric acid by HPLC method

3.2 キャピラリー電気泳動を用いた有機酸の分析

高速液体クロマトグラフィーと同一試料について、キャピラリー電気泳動を用いても分析を行った(Fig.3)。市販の有機酸分析用キットを用いることにより、泳動緩衝溶液の調製の必要もなく非常に簡便に測定を行うことが出来た。測定時間は10分と短時間で、かつ酒石酸、りんご酸、くえん酸などの有機酸のピークの分離が良好であり、加えて有機酸以外にいくつかの陰イオンも検出される。キャピラリー電気泳動により酒石酸の定量を行い高速液体クロマトグラフィーの値と比較した。また、キャピラリー電気泳動は、高速液体クロマトグラフィーと異なり試料の注入に加圧法を用いているので注入量の再現性に問題

Table 2 Composition of Tartaric acid in sample by HPLC method

試料	酒石酸含有量 (g/100ml)	標準偏差	変動係数
白ワイン1(ドイツ産)	0.282	0.00533	1.892
白ワイン2(ドイツ産)	0.350	0.02114	6.042
赤ワイン1(イタリア産)	0.222	0.00350	1.578
赤ワイン2(フランス産)	0.172	0.00368	2.141
赤ワイン3(スペイン産)	0.218	0.00333	1.529
桂花酒(Kuei Hua Chiew)	0.103	0.00166	1.805
桂花陳酒	0.108	0.00279	2.593
桂花陳酒-蘭紅	0.120	0.00373	3.107
スッポン酒	0.121	0.00298	2.451
アベリティフワイン1	0.124	0.00194	1.559
アベリティフワイン2	0.123	0.00288	2.342
サングリア	0.204	0.00516	2.531
ベルモット1	0.090	0.00190	2.107
ベルモット2	0.109	0.00728	6.688
ベルモット3	0.115	0.00200	1.746
ベルモット4	0.113	0.00295	2.608
荔枝酒(LYCHEE WINE)	trace	—	—
杏子酒(APRICOT WINE)	trace	—	—
櫻桃酒(CHERRIES WINE)	0.026	0.00118	4.591
CIDRY	0.015	0.00186	12.733
フルーツワイン(MDX)	trace	—	—
クレーム・ド・カシス	trace	—	—
パルフェ・タムール	trace	—	—
汾酒(ふんしゅ)	trace	—	—
まいかいろ酒	trace	—	—

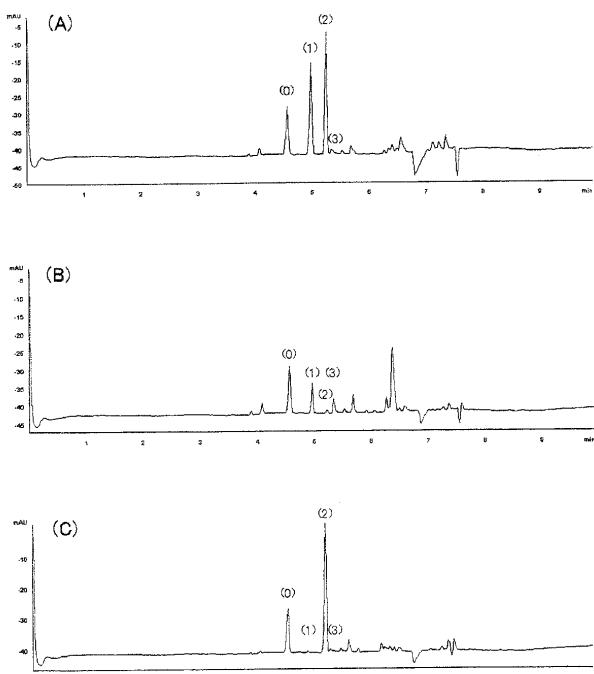


Fig.3 Electropherogram of sample by CE method
 (A) White Wine.2 (B) Vermouth.1 (C) CIDRY
 (0) Internal standard (1) Tartaric acid
 (2) Malic acid (3) Citric acid

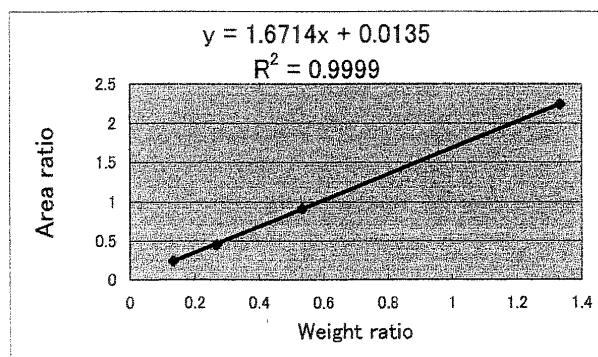


Fig.4 Calibration curve of Tartaric acid by CE method

があるので、今回は内部標準法を用いて検討した。内部標準物質として、各有機酸のピークとの影響がなく酒石酸の前に移動時間を持つ塩素酸カリウムの塩素酸イオンを用いた。

検量線は、酒石酸標準溶液と内部標準溶液を 0.5 : 5.0 , 1.0 : 5.0 , 2.0 : 5.0 , 5.0 : 5.0 の割合で混合後 200ml に定容したものについて、酒石酸と酒石酸カリウムの重量比と酒石酸と塩素酸イオンの面積比を用いて作成したところ、直線性の高い検量線を得ることが出来た (Fig.4)。この検量線を用いた分析試料中の酒石酸の定量値、標準偏差および変動係数を示す (Table 3)。なお各定量値は、5 回測定の平均値を用いている。

Table 2 の高速液体クロマトグラフィーによる定量値と比較し

Table 3 Composition of Tartaric acid in sample by CE method

試料	酒石酸含有量 (g/100ml)	標準偏差	変動係数
白ワイン1(ドイツ産)	0.255	0.01526	1.066
白ワイン2(ドイツ産)	0.323	0.02708	1.495
赤ワイン1(イタリア産)	0.202	0.19977	1.753
赤ワイン2(フランス産)	0.120	0.01747	2.568
赤ワイン3(スペイン産)	0.188	0.00797	0.750
桂花酒(Kuei Hua Chiew)	0.117	0.01209	1.822
桂花陳酒	0.115	0.01098	1.584
桂花陳酒-蘭紅	0.117	0.00819	1.604
スッポン酒	0.117	0.00650	0.975
アベリティフワイン1	0.135	0.01178	1.539
アベリティフワイン2	0.131	0.01769	2.373
サングリア	0.205	0.00917	0.792
ベルモット1	0.091	0.01192	2.294
ベルモット2	0.110	0.00690	1.099
ベルモット3	0.117	0.01188	1.786
ベルモット4	0.116	0.00362	0.551
荔枝酒(LYCHEE WINE)	trace	—	—
杏子酒(APRICOT WINE)	trace	—	—
櫻桃酒(CHERRIES WINE)	0.031	0.00398	2.140
CIDRY	trace	—	—
フルーツワイン(MEX)	trace	—	—
クレーム・ド・カシス	trace	—	—
バルフェ・タムール	trace	—	—
汾酒(ふんしゅ)	trace	—	—
まいがいいろ酒	trace	—	—

てみると、同様の傾向を示すが、一部低い値を示した。

3.3 アミノ酸自動分析装置を用いた遊離アミノ酸の分析

果実酒中の遊離アミノ酸について分析を行った結果のうち、主なものとして白ワインとライチワインのクロマトグラムを示す(Fig.5)。各2本のクロマトグラムは、上のクロマトグラムが440nmで測定しておりアミノ酸のうち特にプロリンを検出している。下のクロマトグラムが570nmで測定しておりプロリン以外のアミノ酸について検出している。クロマトグラムより、ぶどうを原料とする果実酒には、プロリンが豊富に含まれていることがわかった。プロリンの含有量と検出している遊離アミノ酸の総量および遊離アミノ酸に対するプロリンの割合を示す(Table 4)。

この結果より、ぶどうを原料とする果実酒には、プロリンを100μg/ml以上と多量に含まれていることが確認された。特に赤ワインには500μg/ml以上と多量に含んでいる傾向も認められる。さらにプロリンと遊離アミノ酸の総量を比較したところ、ぶどうを原料とする果実酒では、プロリンの遊離アミノ酸の総量に対する組成が約40~60%であった。ただし、赤ワインではそれ以上の値を示し中には90%になるものもあった。また、ぶどうを原料としない果実酒では、アミノ酸を豊富に含むものと含まないものがあり、特になんらかの傾向は認められない。

以上より、ぶどうを原料とする果実酒か否かの分析において、

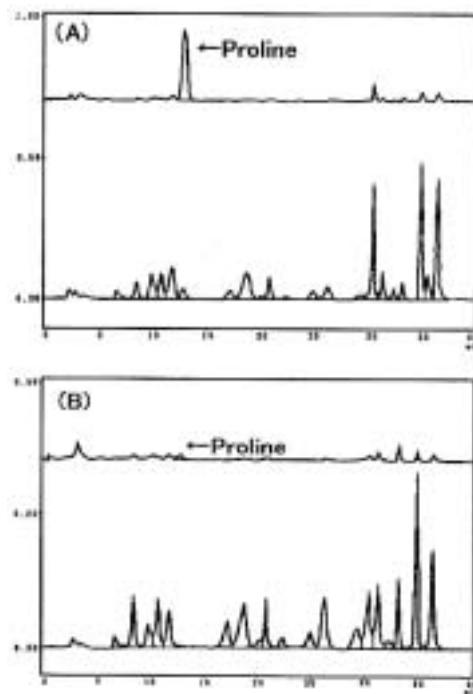


Fig.5 Chromatogram of sample by Amino acid analysis method
(A) White Wine.1 (B) Lychee Wine

Table 4 Composition of Proline in sample by Amino acid analysis method

試料	プロリン含有 (μg/ml)	遊離アミノ酸総量	組成(プロリン/ 遊離アミノ酸総量)
白ワイン1(ドイツ産)	344.4	780.4	0.44
白ワイン2(ドイツ産)	229.0	508.3	0.45
赤ワイン1(イタリア産)	607.1	788.6	0.77
赤ワイン2(フランス産)	1363.5	1509.3	0.90
赤ワイン3(スペイン産)	790.7	1273.1	0.62
桂花酒(Kwei Hua Chiew)	94.8	185.9	0.51
桂花陳酒	118.5	217.4	0.54
桂花陳酒-蘭紅	200.7	374.1	0.54
スッポン酒	278.9	576.5	0.48
アペリティフワイン1	111.2	194.2	0.57
アペリティフワイン2	266.2	636.2	0.42
サンギリア	358.3	610.9	0.59
ベルモット1	315.2	509.1	0.62
ベルモット2	222.7	348.1	0.64
ベルモット3	184.8	372.4	0.50
ベルモット4	223.0	373.5	0.60
荔枝酒(LYCHEE WINE)	15.0	398.8	0.04
杏子酒(APRICOT WINE)	8.8	63.1	0.14
櫻桃酒(CHERRIES WINE)	18.8	33.7	0.56
CIDRY	9.5	41.7	0.23
フルーツワイン(MIX)	52.4	291.2	0.18
クレーム・ド・カシス	6.2	104.9	0.06
パルフェ・タムール	0.5	2.6	0.19
汾酒(ふんしゅ)	0.0	0.0	—
まいいかいろ酒	0.1	1.8	0.06

溶液中の遊離アミノ酸の組成分析，特にプロリンの分析が有効であると考えられる。

4. 要 約

果実酒の有機酸，アミノ酸を高速液体クロマトグラフィー，キャピラリー電気泳動及びアミノ酸自動分析装置を用いて分析し，次の事が認められた。

(1) 果実酒において，くえん酸，酒石酸，りんご酸等の有機酸が検出され，ぶどうを原料とする果実酒では，酒石酸の

含有量に特徴があることが確認された。

(2) 遊離アミノ酸のうちプロリンの含有量，およびプロリンの遊離アミノ酸の総量に対する組成を求めたところぶどうを原料とする果実酒で，次のような特徴をもつことがわかった。

プロリンの含有量が $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上である。プロリンの遊離アミノ酸の総量に対する組成が，40~60%である。

以上の分析結果より，果実酒がぶどうを原料としているか否かの分析において，酒石酸，遊離アミノ酸中のプロリンの分析が有効であることが判明した。

文 献

- 1) 尾本 薫，白井 正澄，大野 幸雄：関税中央分析所報，25，59 - 63 (1985)
- 2) 第6回キャピラリー電気泳動セミナー・テキスト（横河アナリティカルシステムズ(株)）
- 3) 世界の名酒辞典'99（講談社）