

焼酎に含まれる成分の分析

松脇洋平*, 山口達彦*, 大嶽秀之**, 古田幹男*, 倉嶋直樹***, 朝長洋祐***

Analysis of Additives in Imported Shochu

Yohei MATSUWAKI*, Tatsuhiko YAMAGUCHI*, Hideyuki OTAKE**,
Mikio FURUTA* and Naoki KURASHIMA***, Hirosuke TOMONAGA***

*Nagoya Customs Laboratory

2-3-12, Irifune, Minato-ku, Nagoya, Aichi 455-0032 Japan

**Chubu Airport Branch Customs

1-1, Centrair, Tokoname-shi, Aichi-ken 479-0881 Japan

***Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

Under the Japanese Liquor Tax Law, additives are not allowed in "Shochu" except sucrose, citric acid, tartaric acid and artificial coloring (Food Yellow Nos. 4 and 5). When imported Shochu contains some unapproved additives, it is classified under "spirits" to which a higher tax rate is applied under the abovementioned law and so it is necessary for classification to identify additives in imported Shochu. Likely additives to Shochu produced abroad include sweeteners (stevioside, sorbitol, etc.) and a seasoning (amino acid). To identify them, the conventional method is time-consuming as some specific ingredients must be considered individually. Therefore, simultaneous identification of additives contained in Shochu was attempted by the LC/MS method. Some standard reagents (amino acid, oligosaccharides, sugar alcohols, etc.) were measured by LC/MS under two different conditions and chromatograms and spectrums specific to the respective conditions were obtained. Based on these results, some additives in samples were separated and identified successfully. Ingredients whose peaks overlap or which are hard to be detected due to the effect of impurities when examined by the conventional method, were also capable of being identified from their spectra obtained by LC/MS.

1. 緒 言

昨今、消費者の嗜好の変化に伴い焼酎に人気が集まっているところであるが、その影響から韓国等から様々な銘柄の焼酎が輸入されるようになった。

現行の酒税法に規定されている“しょうちゅう”に対して添加が認められているものは、砂糖、酒石酸、くえん酸及び合成着色料（食用黄色4号及び食用黄色5号）のみであり、それ以外のものが添加されている場合はより高税率な“スピリッツ”に分類される。外国ではいわゆる焼酎に属するものでも、日本ではスピリッツに分類されてしまう場合があるため、焼酎中の添加物の同定を行うことは酒税法分類上重要性が高い。

外国産焼酎に添加されるものとして、甘味料（ステビオシド、ソルビトール等）、調味料（アミノ酸）等が考えられるが、従来は、いくつかの特定の成分に着目して個別に分析を行なっている。その分析手法としては、薄層クロマトグラフィー（TLC）、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）及びキャピラリー電気泳動法（CE）など多岐にわたり、しかも、それぞれの分析法でも検出対象ごとに分析条件が異なるため、分析には時間と手間を要する。

そこで今回、HPLC の検出器として質量分析装置を用いた LC/MS 法を利用し、外国産焼酎に含まれる各種成分の同定を試み、いくつかの有用な知見が得られたので報告する。

* 名古屋税関業務部 〒455-0032 愛知県名古屋市港区入船2-3-12

** 中部空港税関支署 〒479-0881 愛知県常滑市セントレア1-1

*** 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉6-3-5

2. 実験

2.1 試料及び標準試薬

輸入品焼酎4種（試料①～④：国内市販品）
 グルコース、フルクトース、スクロース、マルトース及びソルビトール（片山化学工業㈱製）
 マルトトリオース、マルトテトラオース及びステビオシド（和光純薬工業㈱製）
 マルトペンタオース（㈱YMS 製）
 アミノ酸20種（㈱味の素タカラコーポレーション製）

2.2 分析装置及び分析条件

2.2.1 高速液体クロマトグラフ（HPLC）

装置：LC-2000Plus（日本分光㈱製）

条件(1) カラム：Develosil RPAQUEOUS (4.6mmI.D.×250mm)

移動相：A) 5mM ギ酸
 B) 5mM ギ酸（アセトニトリル/水=90/10）
 %B 0-20% 20min

流速：0.6ml/min

カラム温度：40°C

注入量：10 μl

(2) カラム：Shodex Asahipak NH2P-50 4E
 (4.6mmI.D.×250mm)

移動相：5mM ギ酸（アセトニトリル/水=75/25）

流速：1.0ml/min

カラム温度：40°C

注入量：10 μl

2.2.2 質量分析装置（MS）

装置：Q-ToF micro (micromass 社製)

イオン化：ESI ポジティブ

コーン電圧：50V

キャピラリー電圧：3000V

ソースプロック温度：150°C

脱溶媒温度：130°C

スキャンレンジ：50-1000m/z

2.3 実験方法

2.3.1 試料の調製

試料①～④をそれぞれ100ml 採取し、ロータリーエバポレーターにて濃縮乾固し、その濃縮物を水10ml に溶解させ、これを測定試料とした。

2.3.2 標準試薬及び試料の測定

標準試薬の500ppm 水溶液及び2.3.1で調製した試料を、2.2.1の2種の条件についてそれぞれ LC/MS により測定した。

3. 結果及び考察

3.1 標準試薬の測定結果

LC/MS での分離・同定における LC の分離条件は、アミノ酸や糖の一般的な分離条件を参考とし、移動相にギ酸を加えて MS 検出に適するように調製した。

条件(1)におけるアスパラギンのトータルイオンクロマトグラム及びマススペクトルを Fig.1 に示す。アスパラギンの分子量 132 に対して、プラス1の質量電荷比をもったプロトン付加体のピークが強く現れていることが確認できる。このように ESI (エレクトロスプレーイオン化法) を用いると、複雑なフラグメントイオンがほとんど生成しないのが特徴であり、他のアミノ酸 19種についても同様にプロトン付加体のピークが強く現れていることが確認された。

次に、条件(2)におけるステビオシドのトータルイオンクロマトグラム及びマススペクトルを Fig.2 に示す。分子量 804 に対してプラス23の質量電荷比をもつナトリウム付加体のピークが強く検出されていることが確認できる。

このように、今回の MS の条件下では、アミノ酸についてはプロトン付加体、その他の化合物についてはナトリウム付加体が主ピークとして現れることが確認できた。

条件(1)及び(2)における標準試薬の分離・同定結果を Table 1 に示す。

Table 1 Detection of each standard reagents using LC/MS under two conditions

Standard reagent	Condition.		Standard reagent	Condition		Standard reagent	Condition	
	(1)	(2)		(1)	(2)		(1)	(2)
Glucose	○	○	Ala	○	○	Thr	○	○
Fructose	○	○	Val	○	○	Cys	○	×
Sucrose	○	○	Leu	○	○	Gln	○	○
Maltose	○	○	Ile	○	○	Asn	○	○
Maltotriose	○	○	Pro	○	○	Tyr	○	○
Maltotetraose	○	○	Phe	○	○	Lys	○	○
Maltopentaose	○	○	Trp	○	○	Arg	○	○
Sorbitol	○	○	Met	○	○	His	○	○
Stevioside	×	○	Gly	○	○	Asp	○	×
			Ser	○	○	Glu	○	×

○ : Succeeded in detection

× : Failed in detection

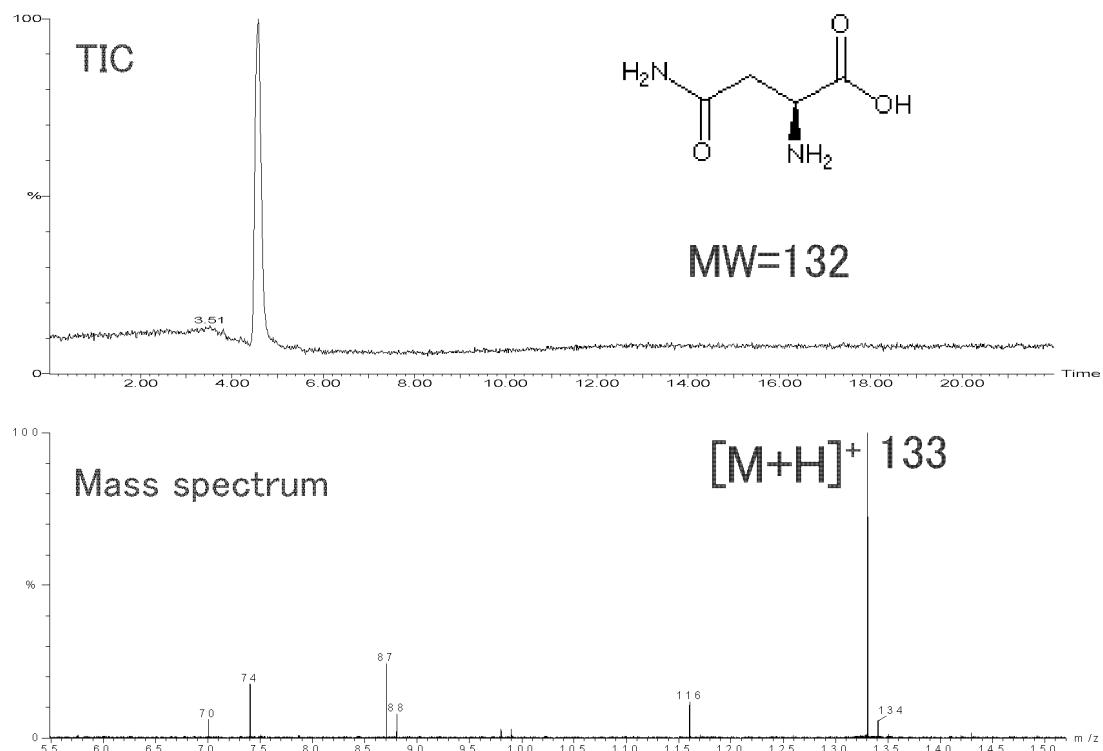


Fig.1 TIC and Mass spectrum of Asparagine under condition (1)

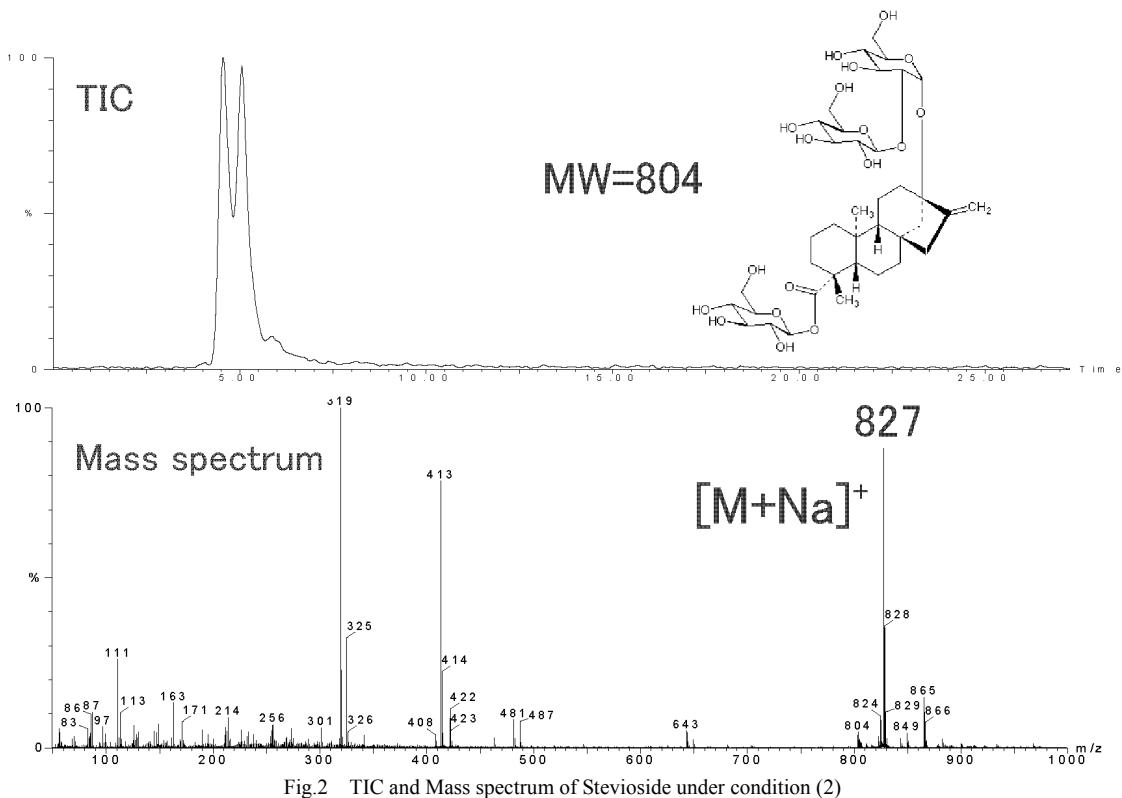


Fig.2 TIC and Mass spectrum of Stevioside under condition (2)

3. 2 試料の測定結果

2. 3. 1で調製した試料①についてのトータルイオンクロマトグラムを Fig.3に示し、それぞれの条件下でのトータルイオンクロマトグラムに対するマスクロマトグラムを Fig.4及びFig.5に示す。

このマスクロマトグラムは、トータルイオンクロマトグラムからアミノ酸については分子量プラス1、その他の化合物については分子量プラス23の質量電荷比の値をもつもののみをそれぞれ選択して表示させたものである。

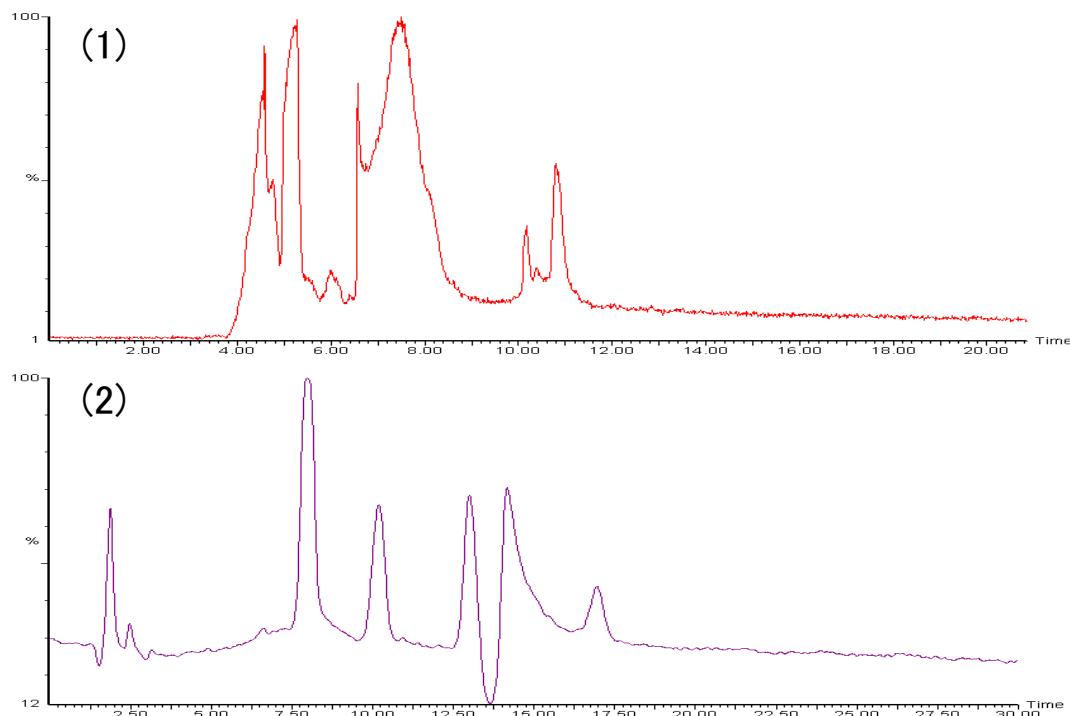


Fig.3 TIC of Sample ① under condition (1) and (2)

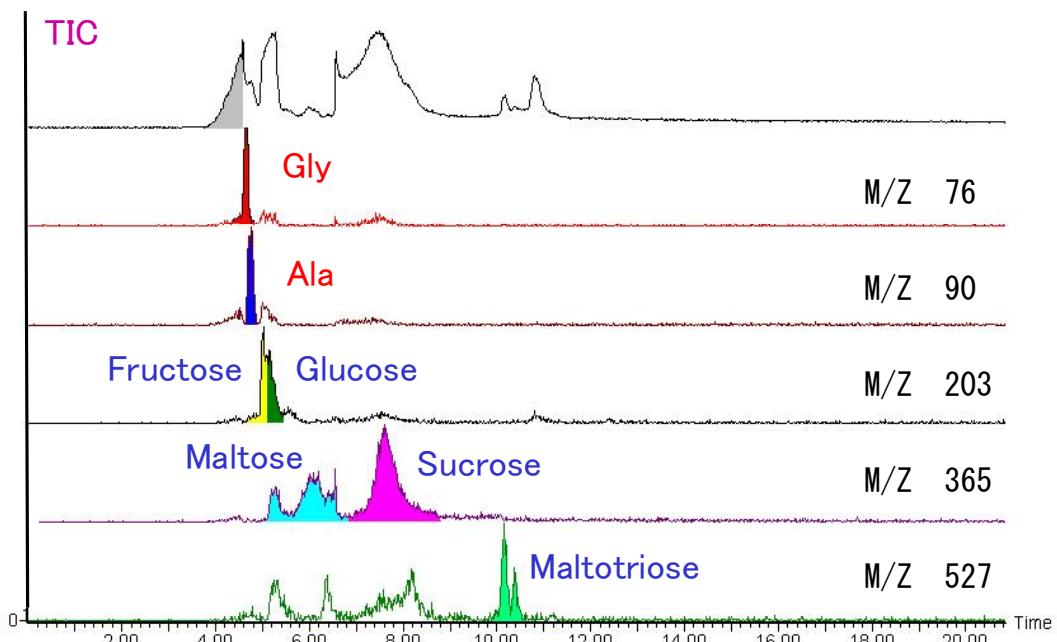


Fig.4 Mass chromatograms of Sample ① described by each m/z values under condition (1)

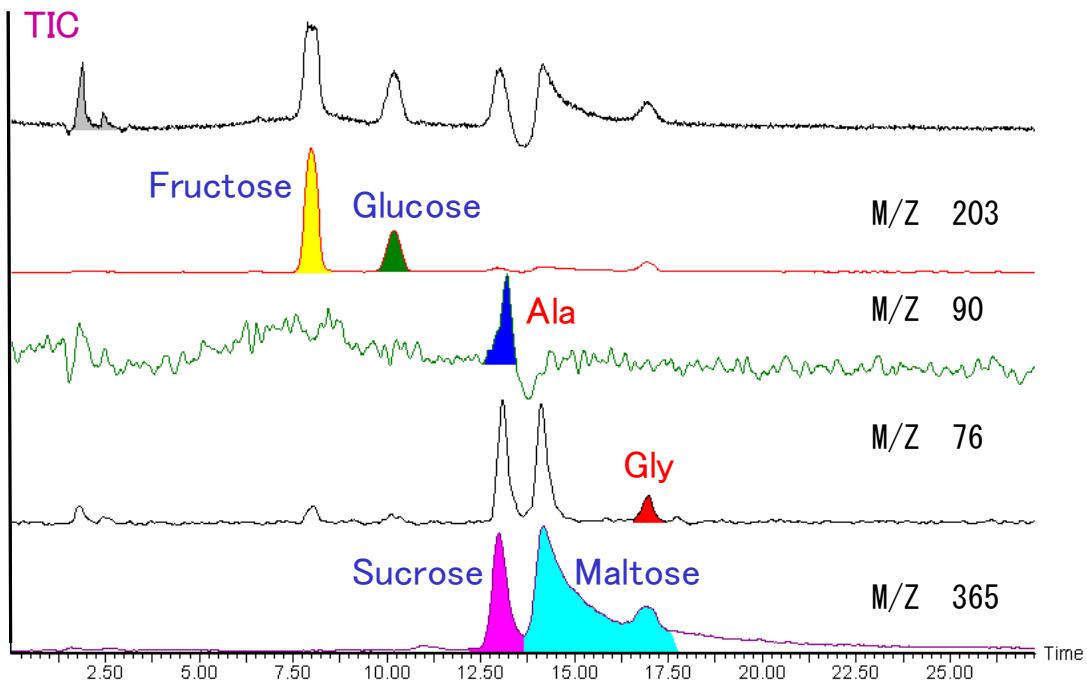


Fig.5 Mass chromatograms of Sample ① described by each m/z values under condition (2)

この結果を踏まえて、試料①について LC/MS により検出された添加物の一覧を、従来法によるそれらの添加物の検出結果と併せて Table 2に示す。少糖類の条件下での TLC では、スクロースとマルトースのスポット位置が隣り合っているため、今回の試料①のように両者の濃度格差が大きな場合、両者を一度に検出することは困難（濃度の低いマルトースを基準にスポットの

濃さを調整すると、濃度の高いスクロースのスポットが重なってしまうため）であるが、LC/MS では両者の分離・同定が可能であった。また、アミノ酸に関しては、試料中の含有濃度が低いため、検出器として RID を使用した HPLC では、夾雜物の影響によりピークが認識されず検出は困難であるが、検出器として MS を用いることで検出が可能となった。

Table 2 Additives of Sample ① detected by LC/MS

Additives (Not approved)	LC/MS		Current Method		
	(1)	(2)	TLC	HPLC	Amino acid Automatic Analyzer
Gly	○	○	○	×	○
Ala	○	○	○	×	○
Fructose	○	○	○	○	
Glucose	○	○	○	○	
Maltose	○	○	×	△	
Maltotriose	○	×	×	×	

○ : Succeeded in detection

△ : Slightly detected

× : Failed in detection

同様に調製した試料②～④についての検出結果を Table 3～5 に示す。

Table 3において、試料②に含まれているアミノ酸（グリシン及びトレオニン）は、アミノ酸自動分析装置では検出されたが LC/MS では検出されなかった。これは、試料②のアミノ酸含有濃度がその試料中の他の成分に比べて極端に低く、今回の試料の濃度調整ではその検出限界未満であったためと考えられる。

一方のアミノ酸自動分析装置は、アミノ酸だけに照準を絞って濃度調整をおこなったため検出が可能であった。

その他の成分については、従来法と比較しても遜色のない良好な検出結果が得られている。分析手法を組み合わせたり、ひとつつの手法でも条件を変えて検出する必要のあった従来法と比較して、単一の分析手法で一齊に検出できるという点で今回の LC/MS 法は優れていると考えられる。

Table 3 Additives of Sample ② detected by LC/MS

Additives (Not approved)	LC/MS (1) (2)		Current Method		
			TLC	HPLC	Amino acid Automatic Analyzer
Gly	×	×	○	×	○
Thr	×	×	×	×	○
Fructose	○	○	○	○	
Glucose	○	○	○	○	
Maltose	○	○	△	△	
Maltotriose	○	×			
Maltotetraose	○	×			
Sorbitol	○	○	○	○	
Stevioside	×	○	○	○	

○ : Succeeded in detection

△ : Slightly detected

× : Failed in detection

Table 4 Additives of Sample ③ detected by LC/MS

Additives (Not approved)	LC/MS (1) (2)		Current Method		
			TLC	HPLC	Amino acid Automatic Analyzer
Gly	○	×	○	×	○
Fructose	○	○	○	○	
Glucose	○	○	○	○	
Maltose	○	○	△	△	
Maltotriose	○	×			
Maltotetraose	○	×			
Stevioside	×	○	○	○	

○ : Succeeded in detection

△ : Slightly detected

× : Failed in detection

Table 5 Additives of Sample ④ detected by LC/MS

Additives (Not approved)	LC/MS		Current Method		
	(1)	(2)	TLC	HPLC	Amino acid Automatic Analyzer
Amino acid	×	×	×	×	×
Fructose	○	○	○	○	
Glucose	○	○	○	○	
Maltose	○	○	{}	○	
Maltotriose	○	○		○	
Maltotetraose	○	○		○	
Maltopentaose	○	×		○	

○ : Succeeded in detection × : Failed in detection

4. 要 約

いくつかの標準試薬（アミノ酸、少糖類及び糖アルコール等）をふたつの条件で LC/MS により測定し、それぞれのクロマトグラム及びスペクトルを得た。その結果をもとにして、試料中のいくつかの添加物の分離・同定に成功した。従来法ではピークが重なっていたり、夾雑物の影響により検出困難であった成分も、LC/MS により得られたスペクトルを標準試薬のそれと比較することで同定が可能であった。また、検出結果は総じて良好で、添加物の一斉検出という面において、今回の LC/MS 法は従来法より優れていると考えられる。

文 献

- 1) 水田完, 梅田寛, 原幸美, 村上孝之, 山崎光廣, 印出進: 関税中央分析所報, **43**, 15 (2003).
- 2) 野村科学株式会社: DEVELOSIL TECHNICAL REPORT 017.