

[連載講座]

# クロマトグラフィーによるワイン 及びワイン成分の分析

山梨大学工学部化学生物工学科  
鈴木 義 仁

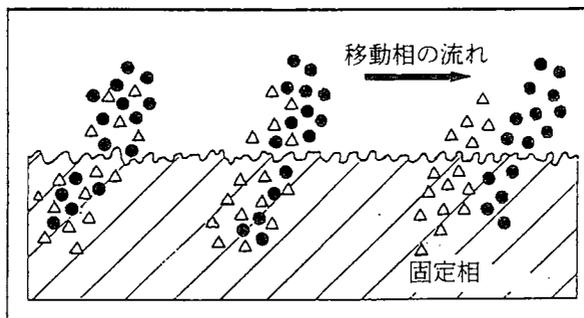
クロマトグラフィーは長足の進歩をみた。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) はガスクロマトグラフィー (GC) の相補手法としてではなく、高性能な分析手法として確立された。また、新しい方法として超臨界クロマトグラフィー (SFC) が登場した。クロマトグラフィーの応用分野はますます拡大しており、組成分析をはじめ、微量成分の検出や定量分析に重要性を増している。

ワインなどの関連分野でもクロマトグラフィーは一般化した分析方法となっている。本稿では、クロマトグラフィーの最近における性能をもとに、ワイン分析に応用する際の実際的な使用に際しての基礎として記載する。

## 1. クロマトグラフィーとは

### 1.1. 原理

クロマトグラフィーは連続している動的な分離過程である。クロマトグラフ系は全く混合しない二つの相から構成される。一つは、移動相であり、通常は気体か、液体である。他の一つは停滞している相、すなわち固定相である。分析する試料は移動相と共に固定相中を移動する。この系内でそれぞれの成分が、二相間で分配されれば、成分を分離することができる。



図・1 クロマトグラフィーの分離過程

固定相中に分配される成分はゆっくり移動し、次第に遅れていく(△)、一方、固定相にとどまる時間の短い成分は、迅速に移動する(●)。この様な分離過程が十分に長く連続すると、それぞれの成分は全く純粋な一つの成分となる。このときの成分量はピーク面積となるから、クロマトグラフィーではどんな混合物や複雑な組成の試料でも分析するときは純粋な成分として検出される。従って、定量精度は他の方法に比較すると優れている。高性能な分離過程が達成されると多成分の一斉分析ができることになる。

## 1.2. クロマトグラフィーの分類

クロマトグラフィーの分類を表1に示す。

表1は移動相の種類と分離機構による大まかな分類である。

HPLCは表1のように、移動相に液体を用いるクロマトグラフィーの総称であって、GCと対比して分類される。即ち、移動相が気体のときGCと呼ぶ。GCとHPLCの両者の特長や差異は移動相の性質が大きく依存する。

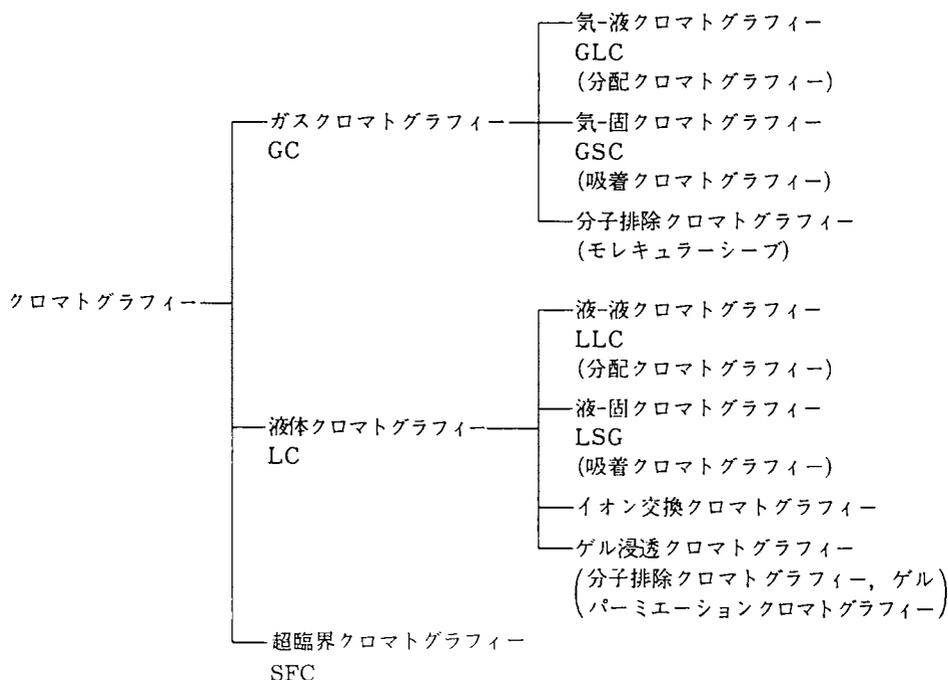
特にHPLCでは移動相が分離に関与する。

また、固定相の性質即ち分離機構による名称としてイオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、分配クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィーにも分類される。

さらに、化学的な分離力によらないものとして、遠心力を利用する円心クロマトグラフィー、粒子の沈降を利用する沈澱クロマトグラフィー、電位勾配を利用する導電クロマトグラフィー、などにも分類されるクロマトグラフィーもある。

本稿では、GCとHPLCを主体に記載する。

表1 クロマトグラフィーの分類



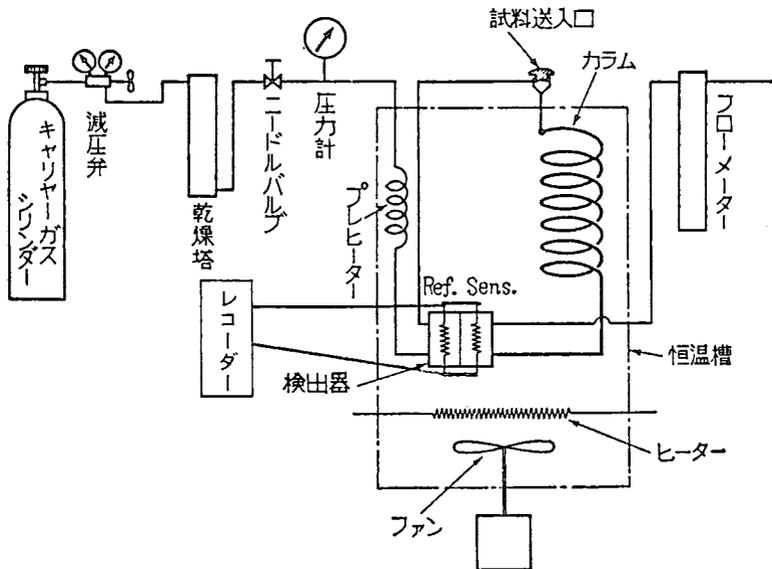
## 2. ワイン分析のためのガスクロマトグラフィー

### 特徴

- ◎GC は揮発成分の分析に威力がある。
- ◎ワイン中の香気成分や揮発成分、低沸点成分の一斉分析が可能である。
- ◎GC ではカラム温度を分析成分の沸点と100℃前後の温度に設定すれば容易に分析できる。
- ◎FID 検出器は殆どの成分が高感度で検出できる。ただし、水や無機成分は検出できない。
- ◎TCD 検出器を使用する。試料量は気体で1 mL、液体で $\mu$ Lで十分である。

### 2.1. 装置

最近の市販クロマトグラフ装置は次のパーツから構成されている。これらのパーツは機種によって異なるが、基本的な構成はほとんど同じである。(図2)



図・2 装置の基本構成

#### キャリヤーガス

キャリヤーガスはボンベから供給される。検出器用ガスもボンベからである。ガスクロに用いるガスとしてはキャリヤーガス用（ヘリウム、窒素および水素）と検出器用として、FIDのガス（水素および空気）が用いられ、これらは普通ガスボンベやガス発生器（水素）から供給される。

キャリアーガスは粘度の低いガスが望ましい。粘度の効果はカラムが長くなると顕著である。粘度は水素、窒素、ヘリウム、アルゴンの順で大きくなる。キャリアーガスの純度は重要で、十分精製されているガスを使用する。水や酸素を含むガスは固定相に致命的なダメージを与え、使用中にカラムが劣化する。

### 注入口

試料を導入する場所で、注入方法も試料の種類、量およびカラムの種類によって異なる。数種注入口が用意されている。最も広く用いられる注入口は充填カラム用とキャピラリーカラム用のものがある。

### 恒温槽

恒温槽内にはカラムが取り付けられており、カラムはここで特定の分析温度に保たれる。カラム温度はガスクロマトグラフィーにとってきわめて重要なファクターであるため、温度の調節は極めて正確に行う。そのため恒温槽は、特定の分析温度を保つことが出来るように設計されている。恒温槽では温度の不安定が起こってはならないし、温度の上昇、下降をすばやく行うことが出来ることなどが求められる。

### 検出器

カラム中で分析（分離）された成分を検出するパーツである。どのような成分にも応答する検出器は万能検出器といえる。最も万能な検出器は熱伝導度型検出器（TCD）である。水素炎イオン化検出器（FID）は有機物についての万能検出器といって良い。特殊な検出器はある特定の化合物に反応するもので、電子捕獲型検出器（ECD）および炎光検出器（FPD）が良く知られている。

検出器には正確な応答、優れた再現性、および応答の直線性などについて、きびしい精度が求められる。これは GC における試料量が一般に少ないためである。検出器からの電気信号は増幅器（アンプ）を経由して記録計やデータシステムに伝えられる。

### 記録計

時間に対しての信号が描かれ、その結果クロマトグラムが得られる。データシステムでは検出器の信号を多角的に取り扱うことが出来る。データシステムは計算能力が優れていることも特徴の一つである。

## 2.2. 実際操作

### 2.2.1. カラムの選択

カラムは分離を行う GC の中心をなすものであるから、カラムに関する各種パラメータに対して知識を持つことが必要である。

固定相カラムには

固体固定相カラム（GSC）

液体固定相カラム（GLC）

がある。

GSCには吸着クロマトグラフィーと分子ふるいクロマトグラフィーの2つの方法があ

る。クロモソルブ100は架橋した芳香族系の樹脂で、特に水溶液中の低沸点成分の分析に適す。ポラパックはクロモソルブともによく用いられる。Tenax は極性化合物の分離に広く用いられる。Tenax は極めて熱安定性で優れているので、高沸点化合物の分析に適す。GLCの充填カラム内には固体の粉体（担体）上に、薄い層として固定されており、コーティング剤と云われている。

液体の固定相には多くの条件が要求される。

- ①極性と分析される試料の溶解性：GLC法における分離過程は、分配機作に基づいている。極性が溶解度（極性化合物は極性溶媒に良く溶解し、非極性溶媒には溶解しない。また非極性化合物については、その逆である。）について重要なパラメータとなるので、極性が固定相の重要な性質といえる。
- ②低い蒸気圧：GCは高温で分析が行われる。従って、固定相は使用する温度で蒸気圧が充分小さいことが求められる。揮発し易い固定相はブリーディング（カラムからの液相の揮発）が顕著である。
- ③固定相に用いられる物質は、化学的に熱安定性を持つ必要がある。また、固定相に用いる物質には、温度によって変化しないものを用いる。

## 2.2.2. 液体固定相の種類

一般的なものを次に示す。

非極性固定相

Apiezon、Dexsil、SE-30、CP-Sil5、OV-1、Squalane、CP-Sil-8、OV-17

中間極性

Carbowax 20M、OV-225、VCON50、CP-Wax51、Triton、Silar-CP

極性

FFAP、OV-275、セバコニトリル、CP-Sil88、Silar9

固定相の選択：種々のものから最もふさわしい固定相を選ぶことはそう簡単ではない。試料成分と固定相の極性を一致させることが重要で、試料分子の性質が、固定相の性質に大変似ていると、保持挙動に対し充分な相互作用が出る。

実際の固定相の選択は、この基準によって判断されている。

## 2.2.3. 固定相の量

固定相の種類のみでなく固定相量も重要な選択の基準である。固定相の量は分解能に対して大きな効果を持つ。

①固定相量は試料分子の保持（ $k'$  値）に影響する。

固定相量が多くなれば  $k'$  値も大きくなる。固定相量の増加による  $k'$  値の増加は、分解能を示す式で示される分離結果に+の効果を持つ。

②固定相量は系全体の効率に影響する。

より多くの固定相が存在すれば、ピークのブロード化にかかわる  $C_s$  項への寄与が大きくなる。それ故、より固定相量が多ければ、通常はピークのブロード化が起こり分解能は悪くなる。

③揮発成分には固定相量の大きい充填剤を選ぶべきである。

分解能に対する利点 ( $k'$  値の増加による) は系の効率の損失を埋め合わせる事になる。

④高沸点化合物には固定相量はできるだけ少ない方がよい。すなわち効率を下げることである。

#### 2.2.4. カラムのコンディショニングと保管

十分にコンディショニングされたカラムは良い分析を行うには不可欠である。使用後のカラムは汚れているのでコンディショニングを行うことが大切である。

コンディショニングは次の要領で行われる。

①カラムを恒温槽中にいれカラムの入口をインジェクターに接続する。

②検出器側は開放しキャリアガスを流す。こうすることによって検出器の汚染を防止できる。もし毒物や危険物がカラム内にあるときにはカラム出口を水素炎検出器へ接続することを薦める。これによってその成分は燃焼される。この方法は他の形式の検出器で行っては意味がない。

③キャリアガスは通常の1/2流量としキャリアガスに水素を用いているときには、常に水素炎検出器に接続しておかなければならない。こうすることで、爆発を防ぎ安全に取り扱うことができる。

④恒温層の温度は分析温度より20℃程度高く設定する。しかしカラムの最高使用温度を超えてはならない。保管：カラムを保管するときには、カラム内に空気が入らないように注意する。特に周囲が高温にならないよう充分注意する。これは充填剤の多くは酸素によって劣化するためである。空気の混入を防ぐためにカラムの両端はふさいでおく。

#### 2.2.5. カラム温度

恒温槽はガスクロマトグラフの基本的な部分であり、恒温槽の中にはカラムが入っており、ここで成分の分離が行われる。

カラム温度 (=恒温槽の温度) は室温より約20℃以上高め設定する。

この温度で試料成分は気化されていなければならない。設定温度よりも、如何にカラム温度が一定に保たれるかが重要である。カラム温度を高くすると、成分の固定相中での保持時間は減少する効果が生ずる。この結果、保持時間が短縮される。保持時間と容量比 ( $k'$ )、容量比 ( $k'$ ) と分離能の関係から、保持時間が短くなれば分離能は減少する。逆にカラム温度を低くすると分離能は向上する。

このことからクロマトグラフではカラム温度を高くするより低くする方がよいといえる。あまりカラム温度を下げすぎると問題が起こってくる。例えば、カラム中での成分の液化、液体の固定相の凝縮、平衡に対する妨害等が生ずる。さらに分析時間は長くなる。

$k'$  値はカラム温度が20℃低下すると2倍になる。このことは、分析時間も約2倍長くなることを示唆している。分析時間を短くするのであれば、恒温槽の温度を高く設定すればよい。

実際には試料成分が完全に分離され、かつ、分析時間ができるだけ短くなるようにカラム温度 (恒温槽の温度) を設定することになる。

実際に恒温槽設定温度 (TOVEN) は各々の分析によって異なるが、特に試料の沸点に依存する。一般に、操作温度はGLCで

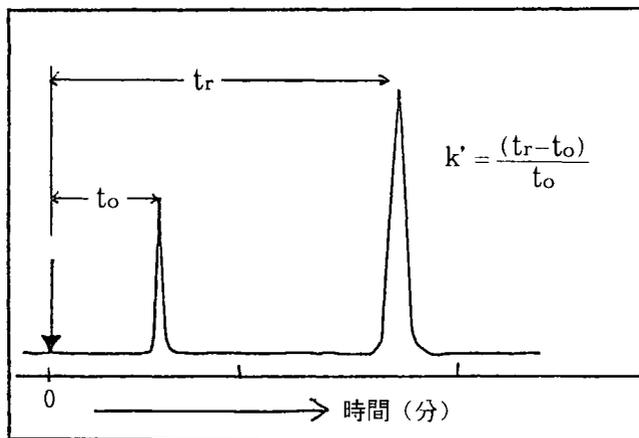


図3  $k'$  値の求め方

$t_r$  : 成分の保持時間

$t_0$  : カラムに保持されない成分

BP-100℃ < TOVEN < BP

で示される。この温度範囲では  $k'$  値は、 $1 < k' < 50$  になると推定される。

$k'$  値は試料成分と固定相との相互作用、および固定相量に依存する。

試料と固定相間の相互作用は“likes - like”似たもの同志の考え方が適用できる。分析成分が固定相と類似していれば相互作用は強くなり  $k'$  値は大きくなる。また、固定相量が多ければ  $k'$  値は大きくなる。従って、固定相液体の担持量の低いカラムに比べて担持量の高いカラムは、カラム温度を高く設定する必要がある。

## 2.2.6. 試料の注入法

試料の注入は分析結果に対して最も大きな問題になる。

マイクロシリンジは試料溶液で洗浄する。試料溶液を吸い上げ、次いで押し出す。数回繰り返しプランジャーと針先を洗浄する。

汚れは針先の開口部、硝子筒、針の根元などに付着することが多い。針の外側に付着した液体（試料）はクリーニングティッシュを用いて吸い取る。

Hot needle injection と云われる注入法では分析に及ぼす悪影響を防ぐことが出来る。まず、マイクロシリンジに試料溶液を吸入する。プランジャーを注入量の目盛りまで押し込む。針に付着した溶液を拭った後、プランジャーを引き上げて針の中の試料をガラス筒に移す。針を注入口に刺し、プランジャーを押し込むまで数秒待つ。この間に針は加熱される。いっきにプランジャーを押し込む。針の中に試料の残りがあれば pre-evaporation が起こり二重注入となり悪影響がでる。

## 2.3. 効果的な使用のために

### 2.3.1. 昇温GC

試料成分の沸点が幅広く分布している場合には、カラム温度を上昇させながら GC を行う。初期の成分（=低沸点成分）の分離が多少低下するが、カラム温度を上げることに

よって、分析時間が短縮され、試料成分の沸点が幅広く分布している試料の分析が可能となる。

昇温分析法には次の3つの要点がある。

- ・初期温度は最も揮発性のよい成分が分離される温度である。このカラム温度は低沸点の成分の沸点よりも低く設定する。
- ・最終のカラム温度では最も高沸点成分が充分分離し、カラムより流出しなければならない。最終温度は試料中に存在する高沸点成分の沸点に近い温度を設定する。
- ・初期温度から最終温度までの到達時間と昇温プロファイルには直線、多次元曲線、凸型および凹型がある。直線的な温度勾配では時間毎の温度変化は一定となる。この昇温プロファイルは成分の沸点が理想的に分布している混合物、すなわち同族体間 (homologous) の分析に広く用いられている。

多次元曲線に従う昇温プロファイルは時間当りの温度変化を様々に変えることによって設定することが出来る。凹型の昇温プロファイルでは分析時間が長くなると温度変化の割合が増加する。このプロファイルは類似の低沸点成分が多く存在し、この中に沸点が幅広く分布した高沸点成分が存在するときに用いられる。

### 2.3.2. キャピラリーGC

充填カラムとならんで、キャピラリーカラムもガスクロマトグラフィーでは広く用いられている。キャピラリーカラムは段数が非常に高く、分解能が優れている。ここではキャピラリーGCの要点を記載する。

キャピラリーカラムは内径の違いによって

narrow bore	: 0.2 mm
medium bore	: 0.35 mm
mega bore	: 0.5 mm

に分類されている。

キャピラリーカラムの固定相はカラムの内壁で、「担体」は存在しない。それ故、これらのカラムはWCOT: Wall Coated Open Tubular Columnと呼ばれている。他のタイプには固定相の薄膜がカラムの内壁に塗布されたPLOT: Porous Layer Open Tubularカラムがある。固定相量は内壁の層(膜)の厚さで表される。膜厚は、液膜で $0.1 \sim 0.5 \mu\text{m}$ 、固体で $5.0 \sim 50 \mu\text{m}$ である。移動相と固定相の体積比はphase ratio  $\beta$ で示される。

◎カラム長: キャピラリーカラムは中空の開放管であるので、キャリアーガスに対する抵抗は小さい。従って充填カラムと比較して、大変長いカラムを使用することが出来る。

カラム長は100mに達するものもあるが、10, 25および50m程度のカラムが一般的である。

◎固定相: 充填カラムと本質的には同じである。実際には、固定相の種類は比較的少ない。

カラム効率は極めて高く、分解能が良いために、キャピラリーカラムにはnon-polar (非極性)、medium-polar (中間極性) およびpolar (極性) の3種類を備えるだけでよい。

◎カラム材質: 溶融シリカで作られており、溶融シリカは純粋な $\text{SiO}_2$ または石英ガラスから製造される。溶融シリカのカラムはキズやまげ力に対しては脆いので、カラムの外壁をポリイミドでコーティングされた黄色もしくは茶色のカラムである。溶融シリカのコーティング材のポリイミドには耐熱温度から、最高使用温度は $350 \sim 450^\circ\text{C}$ までである。

- ◎キャピラリーカラムの性質：キャピラリーカラムは重要な特徴として、高い効率を持ち、優れた分離能（分解能）を示す。ピークの形は時としてスパイク状になる。ピークのブロード化はC項によるのみで極めて小さい。カラムは中空管であるので圧力低下が少なく、カラム長を長くできる。
- ◎Split Injection：試料注入は Split Injection System または Splitter が使用される。試料は気化され、隙間（スプリット）から大部分を排出される。排出されずに残った試料がカラムへと運ばれるのである。スプリット比はカラムの口径でさまる。narrow bore キャピラリーカラムで 1 : 250 程度、wide bore キャピラリーカラムでは 1 : 5 程度に設定される。

## 2. 4. 実際試料のGC

### 2. 4. 1. 内標準を用いるシェリー酒中のエタノールの定量分析（キャピラリーカラムを使用する例）

試料に内標準の既知量を添加してGCを行い、標準物のピークと成分ピークとを比較して定量をする。この方法を「内部標準法」という。内標準法は定量性に優れ、試料の調製や、試料の注入の際に生ずる誤差を考えなくて良い。

内標準ピークは、分析する成分ピークと十分に離れているほか、検出器の応答が、標準物と成分の間で異なるので、標準物と各種濃度の混合物を調製して検量線（応答性ファクター）を求めることが必要になる。応答性ファクターは標準物と試料（それぞれ同量）のピーク面積を比較した結果から求める。

内標準にプロパノールを使用する例について記載する。

カラム：10m×0.53mm、溶融シリカ、WCOT CP-Wax 52 CB, df=2.0μm、キャリアガス：窒素、0.3bar、恒温槽温度：80℃、注入口温度：250℃、検出器：FID、水素=20ml/min、空気=200ml/min、チャートスピード：0.5mm/sec、標準既知混合物：エタノール-プロパノール、注入量：0.2μl。

#### 操作手順

1. 各種濃度の既知エタノール水溶液に一定量のプロパノールを添加する。各濃度溶液を2回ずつ注入し、プロパノールのピーク面積に対するエタノールのピーク面積をエタノール濃度の関数としてプロット（検量線）する。
2. メスフラスコにピペットでシェリー酒の一定量を正確に計りとり、内標準のプロパノールを正確に加える。純水をメスフラスコの標線まで注ぐ。この試料を2回GCに注入する。  
プロパノールとの面積比を求め、検量線よりエタノール濃度を求める。

### 2. 4. 2. ワイン中の微量のメタノールの定量（充填カラムを使用する例）

#### 操作条件

カラム：ポラパックQS（内径2mm、2m）は使用前に210℃で24hrエイジングする。カラム温度：115℃、キャリアガス：40ml/min注入口、検出器温度はいずれも210℃、

検出器：FID

検量線：試薬特級メタノールの1000mgを蒸留水1 Lに溶かす。これより、ピペットでそれぞれ0, 5, 10, 20, 50mlを採取してメスフラスコで100mlとする。GCに注入し、各濃度のピーク高さを求める。(ピーク高さによる検量線：絶対法)

次いで、ワインを直接注入する。メタノールのピーク高さを求め、検量線より定量する。

(注意)

1. ワインの前処理はしないため、カラムや注入口が汚染される。使用後は200℃でキャリアガスを流し、カラムを再生させる。注入口のガラスインサートを交換する。
2. アルコール類を分離・定量する場合には、ポラパックQS 以外にカーボワックス1500やポラパックQなどの中間極性の固定相カラムが使用される。