

極性基導入型逆相型カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による塩蔵しょうが中の酢酸の定量法

鐵岡 浩平*, 中野 匡*, 廣瀬 達也*, 甲田 正人*

Quantitative analysis for acetic acid in salted ginger and ginger preserved in brine by high performance liquid chromatography using a reversed phase column with embedded polar groups

Kouhei TETSUOKA*, Tadashi NAKANO*, Tatsuya HIROSE* and Masahito KOTA*

*Osaka Customs Laboratory

4-11-28, Nankohigashi, Suminoe-ku, Osaka 559-0031 Japan

At present in Customs laboratories, quantitative analysis for acetic acid in salted ginger and ginger preserved in brine by HPLC is generally carried out by using an ion-exclusion column. In this study, we examined a quantitative analysis for acetic acid in salted ginger and ginger preserved in brine by HPLC using a reversed phase column with embedded polar groups. We found that it was possible to do the quantitative analysis with succinic acid as the internal standard. In our proposed method, analytical abilities of the linearity, repeatability and accuracy were shown to be good. We found that the repeatability of the proposed method was higher than that of the present method.

1. 緒 言

塩蔵（塩水漬）のしょうがは、紅しょうがの原料等として輸入されているが、酢酸により調製されているものも多く見受けられる。

塩蔵（塩水漬）しょうがは、国内分類例規 0910.11、0910.12 又は 2001.90「塩蔵（塩水漬）しょうがの関税分類について」の規定により、塩分の多寡に関わりなく、酢酸の含有量が 0.5%以上のものは関税率表第 20.01 項に、0.5%未満のものは関税率表第 09.10 項に分類され、両者には税率格差が生じている。

現在、税関分析においては、HPLC による塩蔵しょうがの酢酸の定量分析として、イオン排除型カラムを用いた絶対検量線法（現行法）が採用されている。また、イオン排除型カラムを用いた内標準法による分析も検討されている¹⁾。しかし、これらの方法では、十分な精度と短時間分析を同時に満たすことは難しい。

本研究では、HPLC による塩蔵しょうがの酢酸の定量分析として、極性基導入型逆相型カラムを用いて内標準法による定量分析を検討すると共に、現行法と精度の比較を行った。

2. 実 験

2.1 試料及び試薬

しょうが（国内産 3 種類、中国産 1 種類、いずれも市販品）、塩水漬しょうが（輸入品）、酢酸、こはく酸、りん酸二水素カリウム、りん酸、くえん酸一水和物、DL-リンゴ酸、フマル酸、O-フタル酸、L(+)-アスコルビン酸、乳酸（以上、キシダ化学 試薬特級）、プロピオン酸（東京化成工業 試薬特級）、蒸留水（キシダ化学 HPLC 用）、塩化ナトリウム、L(+)-酒石酸、ソルビン酸カリウム（以上、キシダ化学 試薬 1 級）、アセトニトリル（Honeywell HPLC 用）

2.2 分析装置及び分析条件

2.2.1 極性基導入型逆相型カラム法

装置：高速液体クロマトグラフ LC-2000（日本分光）

検出器：フォトダイオードアレイ検出器

カラム：Synergi 4 μ Hydro-RP（250 $\times$ 4.6mm）（Phenomenex）

ガードカラム：Synergi 4 μ Hydro-RP（4 $\times$ 3.0mm）（Phenomenex）

カラム温度：22 $^{\circ}$ C

移動相：20mM りん酸二水素カリウム水溶液

流速：0.7ml/min

注入量：20 μ l

* 大阪税関業務部分析部門 〒559-0031 大阪府大阪市住之江区南港東 4-11-28

2.2.2 イオン排除型カラム法（現行法）

装置：高速液体クロマトグラフ LC-2000（日本分光）
検出器：フォトダイオードアレイ検出器（検出波長 210nm）
カラム：Shim-Pack SCR-102H（300×7.9mm）（島津製作所）
ガードカラム：Hydrosphere C18（250×4.6mm）（YMC）
カラム温度：50℃
移動相：過塩素酸酸性水溶液（蒸留水 3l+60%過塩素酸 6ml）
流速：0.5ml/min
注入量：20 μ l

2.3 実験方法

2.3.1 試薬調製

標準酢酸液：酢酸 1000mg を 200ml 容メスフラスコに正確に量り採り、水を加えて定容した。
内標準液：こはく酸 500mg をピーカーに量り採り、少量の熱水に溶解し、放冷したのち全量を 200ml 容メスフラスコに流し入れ、水を加えて定容した。

2.3.2 HPLC 分析条件の検討

2.3.2(1) 内標準物質、移動相の pH の検討

ミキサーで粉碎した塩水漬しょうが（輸入品）を均一に攪拌し、その約 5g を 200ml 容共栓付き三角フラスコにとり、水 100ml を加えて 1 時間攪拌し、その上澄み液を孔径 0.45 μ m のフィルターでろ過したものを 2.2.1 の分析条件で測定し、内標準物質の選択及び移動相である 20mM りん酸二水素カリウム水溶液にりん酸を加えて移動相の最適な pH を検討した。

2.3.2(2) 検出波長の検討

酢酸の分析では、そのカルボキシル基から、検出波長は一般的に極大吸収波長である 210nm が用いられる。しかし、しょうがを直接分析するためには、夾雑成分による妨害やベースラインの安定性を考慮する必要があることから、ミキサーで粉碎したしょうが（国内産、市販品）を均一に攪拌し、その約 5g を 200ml 容共栓付き三角フラスコにとり、塩化ナトリウム約 1.5g と水 100ml を加えて 1 時間攪拌し、その上澄み液を孔径 0.45 μ m のフィルターでろ過したものを 2.2.1 の分析条件で測定し、検出波長を検討した。

2.3.3 分離の確認

2.3.3(1) 各種しょうがとの分離の確認

ミキサーで粉碎したしょうが（国内産 3 種類、中国産 1 種類、いずれも市販品）を均一に攪拌し、それぞれ約 5g を 200ml 容共栓付き三角フラスコにとり、塩化ナトリウム約 1.5g と水 100ml を加えて 1 時間攪拌し、その上澄み液を孔径 0.45 μ m のフィルターでろ過したものを 2.2.1 の分析条件で測定した。

2.3.3(2) 酢酸以外の食品添加物成分との分離の確認

100ml 容メスフラスコに、アスコルビン酸、くえん酸、酒石酸及びソルビン酸カリウムをそれぞれ 10mg ずつ量り採り、標準酢酸液 5ml 及び内標準液 10ml を加え、水を加えて定容した。また、別の 100ml 容メスフラスコに、乳酸 10mg を量り採り、標準酢酸液 5ml を加え、水を加えて定容した。調製した水溶液を 2.2.1 の分析条件で測定し、酢酸と内標準物質が、しょうがの調製に使用

される可能性のあるアスコルビン酸、くえん酸、酒石酸、乳酸及びソルビン酸カリウムと分離するかを確認した。

2.3.4 検量線の直線性の確認

標準酢酸液 3ml、4ml、5ml、6ml 及び 7ml をそれぞれ 100ml 容メスフラスコに量り採り、それぞれに内標準液 10ml を加え、水で定容したものを検量線用溶液として 2.2.1 の分析条件で測定した。

得られたクロマトグラムから、酢酸と内標準物質の重量比に対する酢酸と内標準物質のピーク面積比をプロットし、得られた検量線の直線性を確認した。

2.3.5 併行精度の確認

ミキサーで粉碎した塩水漬しょうが（輸入品）を均一に攪拌し、その約 5g を 200ml 容共栓付き三角フラスコにとり、水 90ml 及び内標準液 10ml を加えて 1 時間攪拌し、その上澄み液を孔径 0.45 μ m のフィルターでろ過したものを 9 検体調製し、2.2.1 の分析条件で測定した。得られたクロマトグラムから、酢酸のピーク面積と内標準物質のピーク面積との比を求め、そのピーク面積比の相対標準偏差を算出した。

現行法の場合は、同様に採取した塩水漬しょうがについて、水 90ml を加えて 1 時間攪拌し、その全量を No.2 のろ紙でろ過した。ろ紙上の残さは水でよく洗い、洗液はろ液と合わせて 100ml 容メスフラスコに移し入れ、水を加えて定容した。その溶液を孔径 0.45 μ m のフィルターでろ過したものを 9 検体調製し、2.2.2 の分析条件で測定した。得られたクロマトグラムから、酢酸のピーク面積を用いて酢酸のピーク面積値の相対標準偏差を算出した。

2.3.6 添加回収率の確認

ミキサーで粉碎したしょうが（国内産、市販品）を均一に攪拌し、その約 5g を 200ml 容共栓付き三角フラスコにとり、塩化ナトリウム約 1.5g と水 50ml を加えて、1 時間攪拌し、その全量を No.2 のろ紙でろ過した。ろ紙上の残さは水でよく洗い、洗液はろ液と合わせて 100ml 容メスフラスコに移し入れた。これらを 9 検体併行して調製し、標準酢酸液 3ml、5ml 及び 7ml を 3 検体ずつ正確に加え、さらに 9 検体全てに内標準液 10ml を正確に加え、水を加えて定容した。定容したものを孔径 0.45 μ m のフィルターでろ過し、2.2.1 の分析条件で測定した。なお、標準酢酸液 3、5 及び 7ml を加えた検液は、しょうが中の酢酸濃度が 0.3%、0.5% 及び 0.7% の試料を上記の前処理方法で調製したものにそれぞれ相当する。酢酸濃度を求めるための検量線は、2.3.4 で作成したものを用いた。また、添加回収率を真度とした。

2.3.7 抽出法の検討

しょうがに浸み込んでいる酢酸の抽出方法を検討した。ミキサーで粉碎した塩水漬しょうが（輸入品）を均一に攪拌し、その約 5g を 200ml 容共栓付き三角フラスコにとり、水 90ml 及び内標準液 10ml を加えたものを複数個調製し、マグネチックスターラーで 1 時間攪拌、2 時間攪拌、3 時間攪拌及び攪拌せず一晩放置（15 時間）の 4 通りの抽出条件で酢酸を抽出した。それぞれの上澄み液を孔径 0.45 μ m のフィルターでろ過し、検体とした。抽出方法の異なるものをそれぞれ 5 検体ずつ調製し、2.2.1 の分析条件で測定して、酢酸の抽出量を確認した。

3. 結果及び考察

3.1 HPLC 分析条件の検討

3.1.1 内標準物質、移動相の pH の検討

20mM リン酸二水素カリウム水溶液 (pH2.9) を移動相として、2.2.1 の条件で塩水漬しょうが（輸入品）の水抽出液及び 5 種類の有機酸（DL-リンゴ酸、フマル酸、こはく酸、プロピオン酸、O-フタル酸）の保持時間を確認し、内標準物質を検討した。また 8 種類の有機酸（しゅう酸、酒石酸、グリコール酸、ぎ酸、ピルビン酸、マロン酸、マレイン酸、くえん酸）については文献²⁾に記載のそれらの保持時間を基に検討した。検討した全ての有機酸は酢酸とは分離すると考えられたが、塩水漬しょうが（輸入品）の水抽出液に見られるピークと分離したものはこはく酸のみであった。ただし、この条件では、こはく酸のピークの近傍のピークがテーリングしたため、酢酸の定量に影響がでる恐れがあったことから移動相の pH を変更し、適切に分離する条件を検討した。

移動相を 20mM リン酸二水素カリウム水溶液 (pH2.7) に変更し、測定したクロマトグラムを Fig.1 に示す。この場合、酢酸とこはく酸ともに、塩水漬しょうが（輸入品）の水抽出液に見られるピーク群のいずれとも十分に分離していた。

移動相 20mM リン酸二水素カリウム水溶液 (pH2.5) を用いた場合、塩水漬しょうが（輸入品）の水抽出液に見られる一部のピークが、酢酸とこはく酸のピークの両方に近接していたため、この pH においては酢酸の定量分析には不適当と判断した。

以上の結果から、移動相は 20mM リン酸二水素カリウム水溶液 (pH2.7)、内標準物質はこはく酸を選択した。なお、この移動相では酢酸の保持時間は 8.6 分、こはく酸の保持時間は 15.2 分であった。

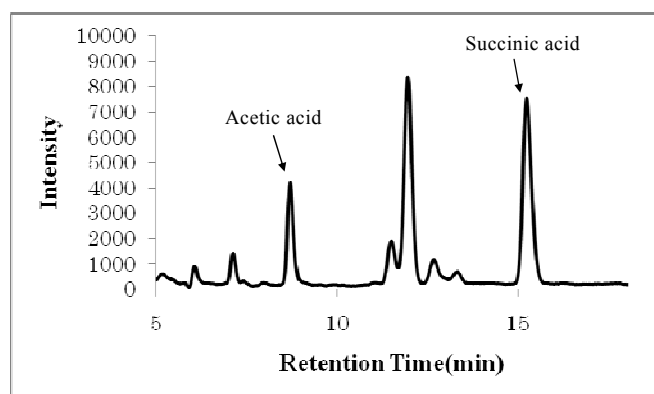


Fig.1 Liquid chromatogram of water extract from salted ginger (imported sample), added with succinic acid (mobile phase: 20 mM potassium dihydrogenphosphate solution (pH 2.7))

3.1.2 検出波長の検討

2.3.2 (2) のクロマトグラム（検出波長：210nm 及び 220nm）を Fig.2 に示す。その結果、検出波長 220nm は検出波長 210nm と比べて、酢酸の保持時間 8.6 分及びこはく酸の保持時間 15.2 分 (Fig.1 参照) 付近のベースラインが安定していること及びしょうが由来の夾雑成分が弱く検出されることから、検出波長は 220nm を選択した。

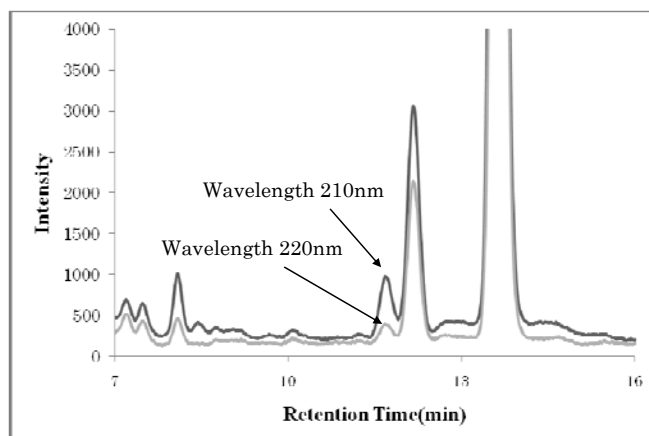


Fig.2 Liquid chromatogram of brine extract of fresh ginger (brine: approx. 1.5% NaCl sol.)

3.2 分離の確認

3.2.1 各種しょうがとの分離の確認

2.3.3 (1) に従い、しょうがの違い（産地又は品種）により酢酸及びこはく酸の検出ピークに妨害となるピークが存在するかを確認した。しょうがの違いにより、各成分の検出ピーク強度は異なっていたが、酢酸及びこはく酸の検出ピークに妨害となるピークは存在しなかった。また、しょうが由来成分の最後のピークは 40 分前後に見られた (Fig.3) ことから、試料の分析時間は 50 分とした。

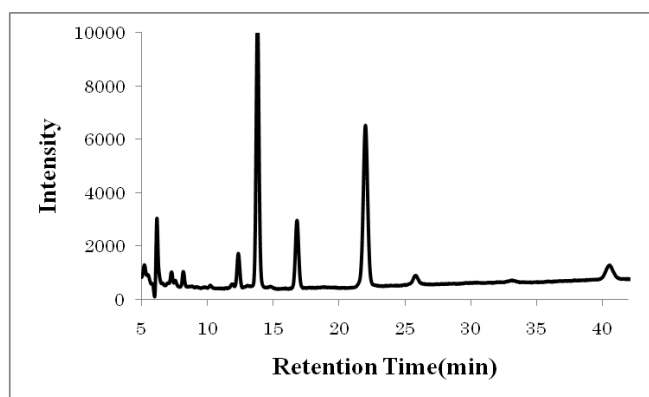


Fig.3 Liquid chromatogram of water extract of fresh ginger

3.2.2 酢酸以外の食品添加物成分との分離の確認

2.3.3 (2) のクロマトグラムを Fig.4 及び 5 に示す。酢酸及びこはく酸ともに、アスコルビン酸、くえん酸、乳酸及び酒石酸との分離が可能であった。ソルビン酸カリウムについては、溶出されなかった。低極性物質であるためガードカラムに吸着されていると考えられる。

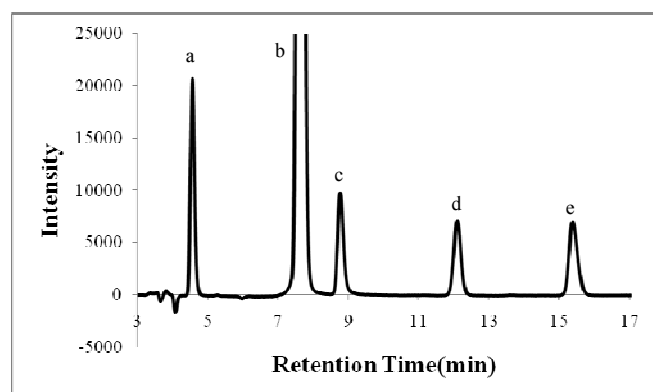


Fig.4 Liquid chromatogram of a mixture of five organic acids
a) tartaric acid, b) ascorbic acid, c) acetic acid, d) citric acid, e) succinic acid
a, b, and d = 100 mg/l, c and e = 250 mg/l

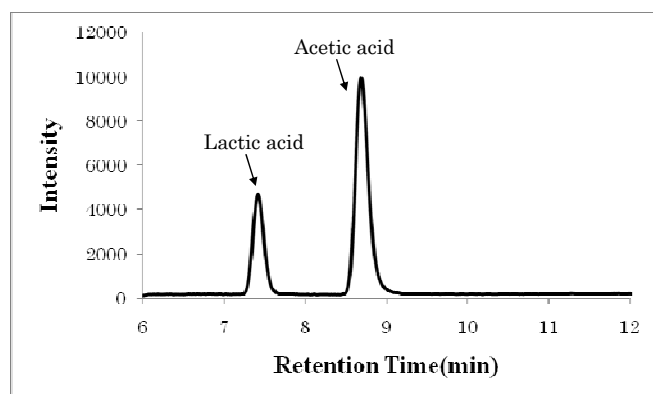


Fig.5 Liquid chromatogram of a mixture of acetic acid and lactic acid
lactic acid = 100 mg/l, acetic acid = 250 mg/l

3.3 検量線の直線性の確認

2.3.4 に従って調製した検量線用溶液の酢酸の濃度範囲は 150mg/l~350mg/l である。この酢酸の濃度範囲は、しょうが中の酢酸濃度 0.3%~0.7%の試料を 2.3.5 の方法で調製した場合に相当する。得られた検量線を Fig.6 に示す。今回測定した濃度範囲では、相関係数 0.9998 で原点付近を通る良好な直線性を示した。

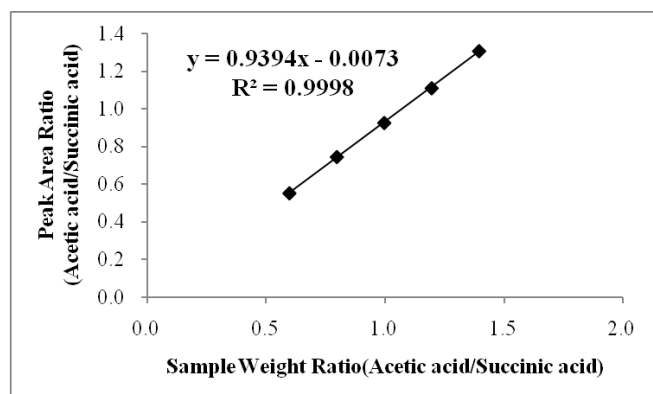


Fig.6 Calibration curve for determining acetic acid, obtained from standard solutions (acetic acid and succinic acid)

3.4 併行精度の確認

極性基導入型逆相型カラム法の酢酸のピーク面積と内標準物質のピーク面積との比の相対標準偏差は 0.45% で、イオン排除型カラム法 (現行法) の酢酸のピーク面積値の相対標準偏差は 3.65% であった。現行法と比較するとより良い結果が得られた。

3.5 添加回収率の確認

2.3.6 の結果を Table1 に示す。いずれの酢酸濃度 (0.3%、0.5% 及び 0.7%) でも回収率 100% 付近であり良好であった。

Table1 Results of recovery test (acetic acid content: 0.3, 0.5 and 0.7%)

Added acetic acid (%)	Measured Value (% n=3)	Recovery (%)	S.D. (%)
0.3	0.302	100.7	0.3
0.5	0.497	99.5	0.8
0.7	0.702	100.3	0.6

3.6 抽出法の検討

2.3.7 に従い測定した抽出方法と酢酸の検出量の関係を Fig.7 に示す。1 時間攪拌抽出では、しょうがに浸み込んだ酢酸を完全に抽出できていないと考えられた。攪拌抽出に関しては 2 時間以上の攪拌抽出が適当であり、一晩放置 (15 時間) でも 2 時間の攪拌抽出と同等の抽出が可能であると考えられた。

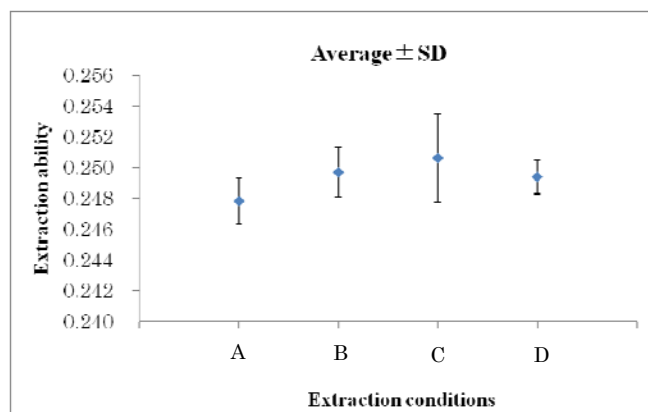


Fig.7 Extraction abilities of acetic acid from imported ginger under four different conditions

The scale of the Y axis indicates the peak area ratio of "acetic acid" and "succinic acid." The peak areas of "acetic acid" and "succinic acid" were measured by HPLC, under the fixed condition of 5 grams of sample. The conditions for water extraction of acetic acid from a ginger sample were A) agitating for 1 hour, B) agitating for 2 hours, C) agitating for 3 hours, and D) leaving overnight, respectively.

4. 要 約

極性基導入型逆相型カラムを用いた HPLC による塩蔵しょうが中の酢酸の定量分析を検討した。本研究で用いた極性基導入型逆相型カラム（移動相：20mM リン酸二水素カリウム水溶液

(pH2.7)) では、こはく酸を用いた内標準法による定量分析が可能であり、その直線性、併行精度及び真度（添加回収率）は、いずれも良好な結果であった。また、塩蔵しょうが中の酢酸の抽出法に関する知見が得られた。

文 献

- 1) 斎藤義和，河嶋優美，松本啓嗣，山崎幸彦：関税中央分析所報，**51**，17（2011）
- 2) C18（ODS）で困った時の逆相カラムガイド（株式会社島津ジーエルシー）