

高速液体クロマトグラフィーによる塩蔵（塩水漬） しょうが中の酢酸の定量分析

斎藤 義和*, 河嶋 優美**, 松本 啓嗣**, 赤崎 哲也**

Quantitative analysis of acetic acid in salted ginger (ginger preserved in brine) by high performance liquid chromatography

Yoshikazu SAITO*, Yuumi KAWASHIMA**, Yoshitsugu MATSUMOTO**
and Tetsuya AKASAKI**

*Hakodate Customs Laboratory

24-4, Kaigan-cho, Hakodate, Hokkaido 040-8561 Japan

**Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

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

A high performance liquid chromatography method with UV detection (210 nm) was used for the quantitative analysis of acetic acid in salted ginger (ginger preserved in brine). Chromatographic separation was carried out in an amino column, Asahipak NH2P-50 4E (4.6 mm × 250 mm; Shodex) at 40°C, with mobile phase composition of Tris-HCl buffer (100 mM, pH 7.2) / acetonitrile = 35 / 65, at a flow rate of 1.0 ml/min. In this condition, acetic acid, internal standard (glycolic acid) and sample matrix were separated. The generated calibration curve showed good linearity ($R^2 = 0.9999$) in the range of 0.2–0.8% acetic acid content. In the determination of samples containing acetic acid of 0.5%, the recovery varied from 96.1 to 100.7% (mean 98.2%, $N = 12$) and the repeatability was 1.5% (RSD, degree of freedom = 5). These results suggest that the proposed method is valid for determining acetic acid in salted ginger. However, the following issues still remain: (1) extraction of analyte and preparation of sample are not optimized, and (2) the reproducibility has not yet been investigated.

1. 緒 言

関税率表において塩蔵しょうがは、国内分類例規 0910.11、0910.12 又は 2001.90 「1. 塩蔵（塩水漬）しょうがの関税分類について」の規定により、酢酸の含有量が全重量の 0.5%以上のものは第 2001.90 号に、0.5%未満のものは、第 0910.11 号又は第 0910.12 号に分類される。これらは所属区分ごとに関税率が異なることから、塩蔵（塩水漬）しょうが中の酢酸の含有量を正確に測定することが必要とされる。

これまでも税関分析研究発表会や関税中央分析所報において、様々な塩蔵しょうが中の酢酸の定量分析法が検討されており、キャピラリー電気泳動（以下、CE という。）法、イオン排除カラムを用いた高速液体クロマトグラフ（以下、HPLC という。）法及び酵素法が提案されている^{1),2)}。しかしながら、CE 法については装置が未配備の税関が多い点、HPLC 法については、提案された方法では、試料中の大量のナトリウムイオンにより分離カラムの

劣化が早く、かつ分析に長時間を要する点、酵素法については使用する試薬キットが高価である点など、いずれの分析法も課題を残しており、現状では、全国の税関で統一的に実施されるべき分析法の開発には至っていない。

近年、有機酸を含む高極性化合物を HPLC で分離する手法として、親水性相互作用クロマトグラフィー（以下、HILIC という。）が注目されている。HILIC カラムには、固定相の官能基の種類によっていくつもの種類があるが、そのひとつとしてアミノカラムが挙げられる³⁾。アミノカラムは糖の分離に有効であることが広く知られており、税関分析法 No.108 「菓子類のしょ糖の定量分析法」に採用されていることから、全国の税関に広く配備されている。このことから、同カラムを使用すれば低コストで導入可能な分析法を開発できる。

そこで本研究では、アミノカラムを用いた HPLC による塩蔵しょうが中の酢酸の定量分析法を検討したので報告する。

* 函館税関業務部 〒040-8561 北海道函館市海岸町 24-4

** 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 試料および試薬

2.1.1 試料

ブランク試料：市販の国産しょうがの皮を剥き、3 mm 程度の厚さにスライスしたものの約 400 g に対して、1 l の塩水（塩化ナトリウム約 200 g/l 及びくえん酸一水和物約 10 g/l）の割合で調製し、3 週間漬けたもの。

酢酸添加試料：300 ml 容ビーカーに酢酸 0.75 g を正確に量り取り、そこに食品用ミキサーを用いて微細化したブランク試料中のしょうが片を加え、合計重量を 150 g にして、全体が均一になるようによく混合した後、フィルムで密閉し室温下で 6 時間程度放置したもの。これは、酢酸含有率 0.5% の塩蔵しょうがを想定している。

しょうが調製品：紅しょうが（1 種類）、甘酢漬しょうが（2 種類）及び新しょうが（1 種類）（いずれも市販品）

2.1.2 試薬

酢酸（和光純薬、試薬特級）

グリコール酸（和光純薬、和光一級）

アセトニトリル（関東化学、HPLC 用）

2-アミノ-2 ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール（トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン）（以下、トリスという。）（和光純薬、試薬特級）

塩酸（和光純薬、試薬特級）

2.1.3 試薬の調製

トリス緩衝液：トリス 12.11 g に蒸留水約 500 ml を加えて溶かし、約 0.1 mol/l 塩酸を加えて、20℃における pH を 7.2 に調整した後、蒸留水で 1 l に定容したトリス塩酸緩衝液。トリスの最終濃度は 100 mmol/l である。

酢酸標準溶液：酢酸 0.4 g を正確に秤量し、トリス緩衝液で 100 ml に定容したもの。

内標準溶液：グリコール酸 2.5 g を正確に秤量し、トリス緩衝液で 500 ml に定容したもの。

2.2 分析装置及び条件

HPLC：LC-2000 Plus series（日本分光）

カラム：Asahipak NH2P-50 4E（昭和電工）

ガードカラム：NH2P-50 4A（昭和電工）

検出方法：紫外吸光検出（波長：210 nm）

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル/トリス緩衝液 = 65/35

流量：1 ml/min

注入量：10 μ l

解析ソフト：JASCO-BORWIN Version 1.50

2.3 実験方法

2.3.1 試料検液の調製

2.1.1 の酢酸添加試料をよく混合して全体を均一にした後、その 10 g を 100 ml 容三角フラスコに正確に量り取り、2.1.2 の内標準

溶液 10 ml をホールピペットで添加し、更に 2.1.2 のトリス緩衝液 40 ml をメスシリンダーを用いて加えた後、フィルムで密閉して約 30 分間振とうし、酢酸を抽出した。得られた抽出液を孔径 0.45 μ m の前処理用フィルターユニット（東洋濾紙製）を用いてろ過したものを試料検液とした。

また、2.1.1 のブランク試料については、試料中のしょうが片を食品用ミキサーで微細化した後、上記と同様の調製を行い、ブランク試料検液を得た。

2.3.2 検量線の作成及び酢酸の定量

2.1.2 の酢酸標準溶液から 5、10、15 及び 20 ml をホールピペットでそれぞれ 100 ml 三角フラスコに量り取り、更に 2.1.2 の内標準溶液 10 ml をホールピペットで添加し、フラスコの標線を目安に最終液量が 50 ml となるように 2.1.2 のトリス緩衝液を加えたものを検量線用検液として、それぞれの検液を 3 回ずつ測定した。

得られた検量線用検液のクロマトグラムから求めた酢酸と内標準のピーク面積比の平均値と、検液中の酢酸と内標準の重量比の関係をプロットし、最小二乗法により得た回帰直線を酢酸定量用の検量線とした。この検量線は、酢酸含有率約 0.2–0.8% の試料 10 g を秤量し、2.3.1 に従い前処理したものに対応可能である。

分析試料のクロマトグラムから酢酸と内標準のピーク面積比を求め、上記の検量線を用いて酢酸と内標準の重量比を算出した。得られた重量比と試料溶液に添加した内標準の重量から酢酸重量を求め、試料（塩蔵しょうが）中の酢酸濃度（重量%）を算出した。

3. 結果及び考察

3.1 分析条件の検討

3.1.1 緩衝液の検討

アミノカラムを使用した有機酸の分析において、HILIC モードによる保持と併せて起る弱陰イオン交換³⁾による保持を生かすためには、1) 移動相中の酢酸がほぼイオン化しており、かつ 2) 移動相を通過した際に、カラム基材に結合したアミノ基ができるだけ多くイオン化している条件が適当と考えられる。この 2 点を満たすため、緩衝液の pH を酢酸の pKa 値+2 程度（pH6.7 程度）に調整することとした^{4)–6)}。

また、HILIC モードでは、移動相として水又は緩衝液と有機溶媒（多くの場合はアセトニトリル）の混合溶液を用いるが、緩衝液を使用する場合は、塩類の析出を防ぐために、有機溶媒に対して高い溶解性を示すものが多い³⁾。

以上の移動相に求められる液性及び使用する緩衝液の条件を考慮し、本研究ではトリス塩酸緩衝液を選択した。この緩衝液は温度による pH 変化が大きいことから（Fig. 1 参照）、測定温度である 40℃での移動相溶媒の pH が設定した pH 6.7 程度となるように、液温 20℃の条件下で pH7.2 に調整した。

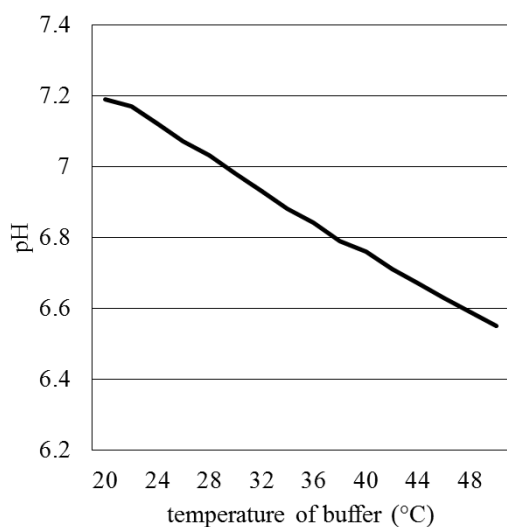


Fig.1 Influence of buffer temperature upon the pH of 100 mM-Tris-HCl buffer

3.1.2 分離の確認

ブランク試料及び酢酸添加試料それぞれ約10gをトリス緩衝液50mlで抽出した検液の測定結果から、酢酸、塩化ナトリウム及びくえん酸からなる塩水で調製した塩蔵しょうがについては、今回検討した分析条件で、その酢酸を特異的に検出可能であることが確認できた。また、酢酸及びグリコール酸を含有する標準溶液の測定結果並びにブランク試料の測定結果から、内標準であるグリコール酸は、同分析条件において、酢酸及びしょうが由来の成分のいずれとも分離検出可能であることが確認された (Fig. 2)。

一方で、今回検討した分析条件では、ブランク試料調製時に添加したくえん酸や、しょうが中に含まれることが知られているりんご酸⁷⁾のピークが確認できなかった。イオン交換モードによる有機酸の分析においては、有機酸のイオン半径やイオン価数によってカラムによる保持挙動が変わり、多くの有機酸を分離するにはグラジエント溶出法が必要とされる⁸⁾が、この実験結果から、HILICモードとイオン交換モードの組み合わせである本法においても同様の保持挙動が確認されたと言える。すなわち、今回検討した移動相組成では、ジカルボン酸及びトリカルボン酸である上記の2つの物質は、使用したカラムによる保持が強すぎると考えられる。更に、しょうがにはジカルボン酸であるフマル酸も約0.01%含まれている⁷⁾が、今回検討した分析条件では、上記2つの有機酸と同様にピークとして確認できないと考えられる。

これらのことから、今回検討した分析条件では、塩蔵しょうがの分析においていくつかの物質がカラムに強く保持されることとなる。しかし、これらの物質は、移動相の組成を変えない限り溶出されないか、あるいは溶出されるとしても長時間にわたりごく微量ずつ溶出され、酢酸の定量結果に影響を与えないと考えられることから、本研究ではグラジエント溶出法などの対策を取らずに連続測定を実施した。

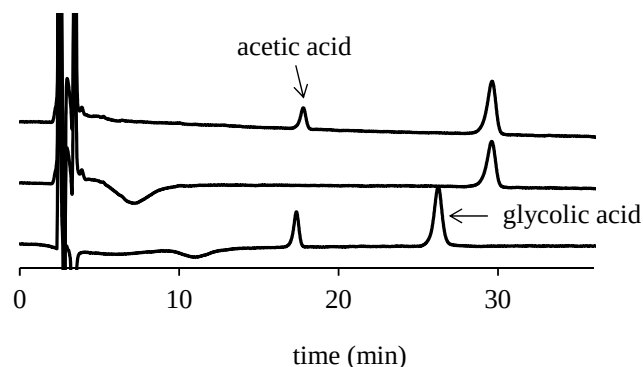


Fig.2 Chromatograms of A: a salted ginger sample containing acetic acid of 0.5%, B: a salted ginger not containing acetic acid (blank sample) and C: standard solution (acetic acid and glycolic acid), obtained under the following condition : Asahipak NH2P-50 4E (4.6 mm × 250 mm; Shodex) at 40 degrees Celsius, with mobile phase composition of Tris-HCl buffer (100 mM, pH7.2) / acetonitrile = 35 / 65, at a flow rate of 1.0 ml/min. Both acetic acid and glycolic acid (internal standard) were separated from matrix derived from the original ginger.

3.1.3 分析法の応用範囲の検討

今回検討した分析法は、分析対象として、食塩、酢酸及びくえん酸からなる塩水に漬け込んだ塩蔵しょうがを想定しているが、将来的に本法が、想定した塩蔵しょうが以外の酢酸含有しょうが調製品の分析に応用される可能性がある。このことから、2.1.1に挙げた、異なった調味液を使用した4種類の市販のしょうが調製品について、検討した分析条件におけるマトリックス由来成分、酢酸及び内標準の分離状況を確認した。

それぞれのしょうが調製品から、しょうが片約10gを取り出し、食品用ミキサーにより微細化した後、トリス緩衝液50mlで抽出した検液のクロマトグラムと、酢酸及びグリコール酸を含有する標準溶液のクロマトグラムを比較した結果 (Fig. 3) から、いずれの市販のしょうが調製品においても、酢酸を特異的に検出し、内標準としてグリコール酸が使用可能と考えられる。

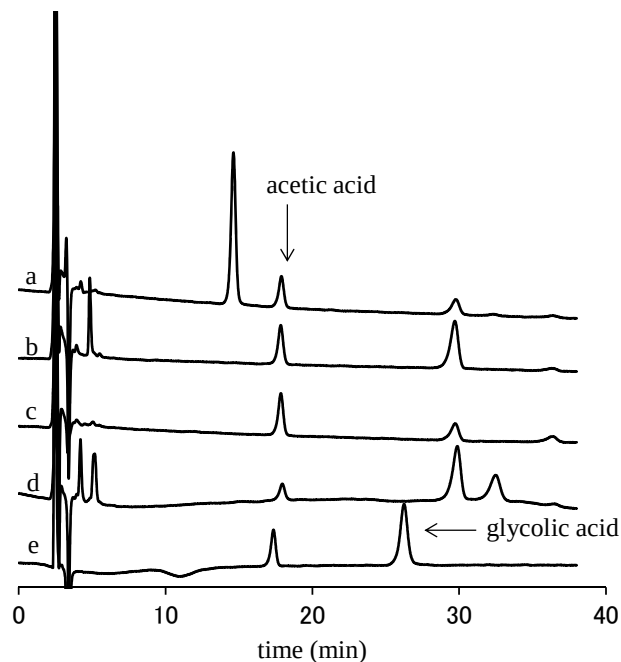


Fig. 3 Chromatograms of ginger preparations and standard solution obtained under the same condition as that of Fig. 2
a) amazu syoga 1, b) amazu syoga 2, c) beni syoga, d) shin syoga and e) standard solution containing acetic acid and internal standard, glycolic acid.

3.2 分析法の性能評価

今回検討した分析法の性能評価は、酢酸添加試料を用いた添加回収試験の結果を評価することによって行った。

3.2.1 検量線の評価

添加回収試験に際して、2.3.2 の手順に従い作成した検量線を Fig. 4 に示す。 $R^2=0.9999$ で原点付近を通る回帰直線が得られたことから、直線性は良好であると言える。

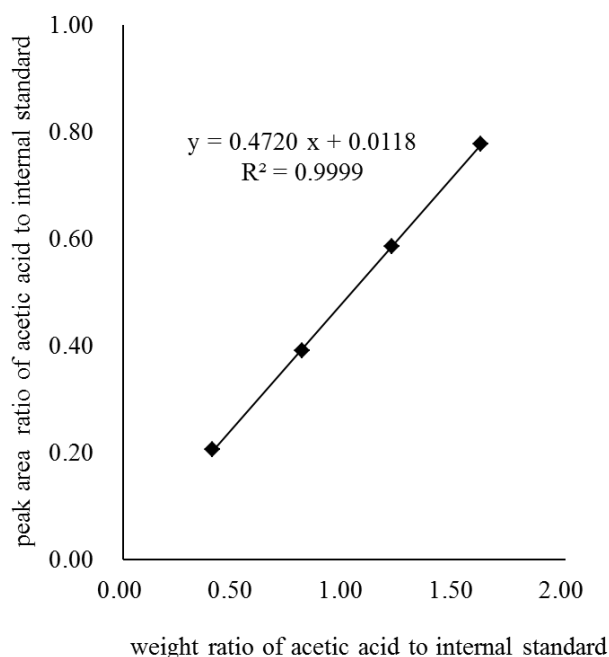


Fig. 4 Calibration curve for quantitative analysis of acetic acid, generated using standard acetic acid solutions

3.2.2 真度及び精度の評価

添加回収試験は、2.1.1 の酢酸添加試料から 6 検体の試料検液を調製し、それぞれ 2 回ずつ測定することにより行った。試験結果並びにそれらから算出した平均回収率及び併行精度を Table 1 に示す。なお、併行精度については、分析法の全操作を繰り返して測定した際の精度として提示するため、一元配置分散分析 (Table 2) によりサンプル間及びサンプル内の分散を求め、それらから算出した。

AOAC International による分析法バリデーションのガイドライン⁹⁾ (以下、ガイドラインという) には、分析種の濃度ごとに回収率の限度の一例を示しており、0.1% の分析種の定量分析においては回収率 90–108%、1% においては回収率 92–105% となっている。今回の測定では 0.5% の酢酸の定量分析において回収率 96.1–100.7% であったため、ガイドラインにおける回収率のついでどの基準も満足していることになる。

また、このガイドラインには、相対標準偏差で表した併行精度の目安として、

$$\text{併行精度(RSD, \%)} = C^{-0.15} \quad (C: \text{分析種の質量分率})$$

という式により算出した値を挙げている。これによると含有率 0.5% の酢酸の定量分析において、併行精度は 2.2% が目安というこ

とになり、本研究で得られた併行精度はこれを下回っていた。

更に、分散分析の結果から、サンプル間の変動要因によるばらつきがサンプル内のものよりかなり大きいことが確認できた。これは抽出工程に、より大きい誤差要因があったことを示している。具体的には、粉碎した試料片のサイズがばらついていて、サイズの大きいものからの抽出が不十分であった可能性が第一に考えられる。この場合、この誤差は試料の微細化においてより細かく粉碎すること、抽出時間を延ばすこと等により改善される可能性がある。

また、今回実施した計 12 回の連続測定においては、定量結果の大きな変動や、測定値の増減傾向が見受けられなかったことから、3.1.2 に示したカラムに吸着された物質による影響はなかったものと考えられる。

Table 1 Results of recovery test, mean recovery and repeatability

	samples	measurements	
		1	2
recovery (%)	1	98.8	97.9
	2	99.0	97.5
	3	98.2	97.6
	4	100.7	100.6
	5	97.8	97.7
	6	96.2	96.1
mean recovery (%)		98.2	
repeatability (RSD, %)		1.5	

Mean recovery is the mean of 12 measured values. Repeatability is the precision of measured values obtained from 6 replicates of the whole procedure of the method, calculated from the variance 'between samples' and 'within samples' mentioned in Table 2; the degree of freedom is 5.

Table 2 One-way ANOVA results from recoveries of Table 1

	SS	df	MS
between samples	21.56491	5	4.31298
within samples	1.81399	6	0.30233
total	23.37891	11	

SS: sum of squares, variation

df: degree of freedom

MS: mean square, variance

3.3 考察

3.3.1 抽出方法の最適化

3.2.2 で示した通り、今回実施した抽出操作が測定値のばらつきに大きく寄与しており、試料からの酢酸の抽出が不十分であった可能性が示唆されたことから、抽出時間を延ばすか、加温抽出¹⁰⁾ または超音波抽出等を検討し、抽出方法を改良することが今後の課題とされた。

3.3.2 カラムに吸着する物質への対応

3.1.2 で示した通り、ジカルボン酸及びトリカルボン酸は、今回検討した分析条件では、分離カラムに強く吸着されることが確認された。今回実施した食塩、酢酸及びくえん酸からなる塩水に漬け込んだ塩蔵しょうがを対象とした 12 検体の連続分析では、得られた定量結果には大きな変動は見られなかったが、これらの吸着物質 (ジカルボン酸及びトリカルボン酸) がより多くカラム内に

蓄積された場合には、定量結果に影響が出る可能性が十分にある。カラムの取扱説明書によれば、これらの吸着物質をカラムから完全に溶出させるためには、強アルカリ水溶液によるカラム洗浄が必要とされているが、頻繁なカラム洗浄はカラムの性能劣化を早めることになる。よって、試料検液からこれらの吸着物質を選択的に除去するための前処理工程を加えることが望ましいと思われる。

3.3.3 再現性の評価

アミノカラムは、カルボニル化合物の非可逆的吸着や、固定相の自己分解を起こすことが知られている³⁾。すなわち、劣化しやすいカラムであると言える。このことから、特に使用履歴の異なるカラム間では分離や定量性能の再現性に乏しい可能性がある。カラムを異なるロット又は使用履歴のものに変更した際の試験室内再現性及び試験室間再現性は、今後、十分に注意して検討されるべきであろう。

4. 要 約

アミノカラムを使用し、親水性相互作用（HILIC モード）を利用した HPLC による塩蔵しょうが中の酢酸の定量分析法を検討した。塩水に漬込んだしょうが及びそれに酢酸を添加したものを試料として、またグリコール酸を内標準として分離条件を検討し、しょうが由来成分、酢酸及び内標準の分離検出が確認された。更に、添加回収試験を通じて、検討した分析法の定量性能の評価を実施したところ、検量線の直線性、真度及び精度から定量分析法として使用できる可能性が示唆された。しかしながら、抽出操作を含めた試料の前処理方法を更に検討する必要がある点や、ロット及び使用履歴の異なるカラム間における当該分析法の再現性が未検討である点が課題点として残された。

文 献

- 1) 廣瀬達也，隅野隆永，井上純：関税中央分析所報，**41**，1(2001)
- 2) 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)
- 3) 池上亨，田窪宏貴，田中信男：Chromatography，**29(2)**，1(2008)
- 4) 一般財団法人化学物質評価研究機構ホームページ：“LC Technical Report Vol.12 解離性物質分析のコツ”
(http://www.cerij.or.jp/service/09_chromatography/technical_report/technical_report_12.pdf)
- 5) 昭和電工株式会社ホームページ：“テクニカルレポート アミノ基の遊離型比と理論段数”(<http://www.shodex.com/japanese/dc030234.html>)
- 6) 大木道則，大沢利昭，田中元治，千原秀昭：“化学大辞典”，P.842(1989)，（東京化学同人）
- 7) 山田篤司，山内孝之，藤田卓，森田幸博，石田智美，藤原守，立石洋暢，木村康晴，岡本勝利，福元雅代，津村明宏：農林水産消費者センター調査研究報告，**24**，11(2000)
- 8) 株式会社島津製作所ホームページ：“LCTalk54 号 INTRO 改訂版 有機酸の分析法”
(<http://www.an.shimadzu.co.jp/hplc/support/lib/lctalk/54/54intro.htm>)
- 9) AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals (2002)
- 10) 日本食品科学工業会，新・食品分析法編集委員会：“新・食品分析法”，P.587(1996)，（光琳）