

## 魚卵中の塩分の定量方法について（第 2 報）

川崎 久美子\*, 大類 仁\*, 榎本 康敬\*, 笹谷 隆\*

### Study on the Quantitative Analysis of Salt in Roes (fish eggs) (the second report)

Kumiko KAWASAKI\*, Hitoshi ORUI\*, Yasuyuki ENOMOTO\* and Takashi SASATANI\*

\*Tokyo Customs Laboratory 2-7-11, Aomi, Koto-ku, Tokyo 135-8615 Japan

In the Customs Tariff Schedule, roes are classified differently depending on their salt content, and there is a difference in their tariff rate. This also affects the control of goods as import quota (IQ) items based on their salt content; therefore, it is necessary to accurately quantitatively analyze the salt contents in roes. In our previous study, we studied extraction methods and reported that it was possible to quickly determine the salt content in roes by the water extraction method. This time, based on our detailed studies focusing on cod roe, we found the following: (1) There are no significant differences in measured salt content between the water extraction method and the homogenization method, (2) In the case of the water extraction method, it is recommended to shake the solution for more than 5 minutes, and (3) Deproteinizing treatment affected the measured salt content values by the potentiometric titration method but had no impact on the salt content value measured by anion chromatography.

### 1. 緒 言

魚卵は、塩分の含有量等によって関税率表における分類及び税率が異なり、また、輸入割当 (IQ) 対象品目の該否にも影響するため、塩分の正確な定量が求められている。

前回の研究では、魚卵を 550℃ (4 時間) で乾式灰化すると、塩素が揮散するため、乾式灰化法では塩分を正確に定量できないことを確認した他、魚卵を水に浸し、塩分を浸出させた後、電位差滴定装置により塩化物イオン量を測定することで、迅速に塩分を定量できることを示唆する結果を示した<sup>1)</sup>。しかしながら、水で魚卵中の塩分を浸出させる方法と魚卵をホモジナイズして塩分を抽出する方法では、試料の塩分濃度 1.7~5.2%の範囲で 0.1%程度の差が認められ、これらが有意差であるか未検討であった。また、夾雑物及び添加物の影響についても確認していない。

そこで、本研究では、魚卵中の塩分を正確に定量する最適な分析条件を検討するため、塩分の含有量が IQ の該否に関係するたらこに限定し、上記の 2 種類の塩分抽出方法で得られる塩分の測定値に有意差があるか確認した他、除たんぱく処理による影響、添加物が塩分測定に及ぼす影響等を確認したので報告する。

### 2. 実 験

#### 2.1 試料

市販品のたらこ (Table 1 参照)。各試料は、購入後、卵巣膜を除去し、卵を潰さないようにかき混ぜて均質にした。

Table 1 List of cod roe samples used in this study

| sample               | origin             | additives                                                                                                                                                                                                                                                         |
|----------------------|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A1<br>A2<br>A3<br>A4 | Russia or<br>U.S.A | salt, dextrin, protein hydrolysate, yeast extract, sugar, edible vegetable fat, fish extract powder, seasoning (inorganic salt, etc.), trehalose, sorbitol, antioxidant (vitamin C), coloring (red 102, yellow 5, red 3), enzyme, coloring agent (sodium nitrite) |
| B1<br>B2<br>B3       | Russia             | salt, maltose, seasoning (amino acid, etc.), antioxidant (vitamin C), niacin, enzyme, coloring (red 102, red 3, yellow 5), coloring agent (sodium nitrite)                                                                                                        |
| C                    | Japan              | -                                                                                                                                                                                                                                                                 |

Samples "A1, A2, A3 and A4" and "B1, B2 and B3" are respectively the same goods but purchased on different days.

#### 2.2 試薬

- (1) 塩化ナトリウム (関東化学, 特級, min 99.5%)
  - ・脱塩したたらこに塩分を添加する際に使用
  - ・また、確認試験において使用する塩化ナトリウム溶液を調製

\* 東京税関業務部 〒135-8615 東京都江東区青海 2-7-11

するために使用（2.4.7 参照）

- (2) 塩化ナトリウム（和光純薬工業，容量分析用標準物質，99.98 ± 0.01%）

・塩分を定量するための標準溶液を調製するために使用

- (3) 消泡剤：KM72F（信越化学工業，食品工業用）

- (4) 硫酸亜鉛七水和物（純正化学，特級）

・硫酸亜鉛七水和物 2 g を純水に溶かし 100 mL に定容し，除たんぱく剤 X とした。

- (5) 水酸化バリウム八水和物（和光純薬工業，特級）

・水酸化バリウム八水和物 1.8 g を純水に溶かし 100 mL に定容し，除たんぱく剤 Y とした。

- (6) L(+)-グルタミン酸水素ナトリウム一水和物（和光純薬工業，特級）

## 2.3 分析装置及び条件

### 2.3.1 電位差滴定法

装置：自動滴定装置 GT-200 型（三菱化学アナリテック）

滴定液：0.1 mol/L 硝酸銀水溶液

測定イオン：塩化物イオン

サンプル容器：プラスチック製

### 2.3.2 イオンクロマトグラフィー

装置：イオンクロマトグラフ IC-2010（東ソー）

検出器：電気伝導度検出器

サプレッサ：ゲル交換型

<測定条件① 陰イオン分析モード>

カラム：TSKgel SuperIC-AnionHS（東ソー）

サプレッサゲル：TSKsuppress IC-A（東ソー）

溶離液：炭酸水素ナトリウム 3.8 mM

炭酸ナトリウム 3.0 mM

流速：1.5 mL/min

注入量：10 µL

温度：40 °C

測定イオン：塩化物イオン

<測定条件② 陽イオン分析モード>

カラム：TSKgel SuperIC-CationHS（東ソー）

サプレッサゲル：TSKsuppress IC-C（東ソー）

溶離液：メタンスルホン酸 3.0 mM

18-クラウン-6-エーテル 0.4 mM

ヒスチジン 0.2 mM

流速：0.7 mL/min

注入量：10 µL

温度：40 °C

測定イオン：ナトリウムイオン

## 2.4 実験方法

### 2.4.1 脱塩した分析試料（たらこ）の作成

約 150 g のたらこ試料を 1 L 容三角フラスコに取り，これに約 500 mL の純水を加え，30 分間振とうした後，ざるにあけて水を切った．この操作を 4 回繰り返した後，付着した水分をキムタオ

ルで拭き取った．これについて，2.4.2(2)のホモジナイズ法により試料溶液を調製し，2.4.4(2)の陰イオンクロマトグラフィーの方法において，希釈操作は行わずに塩分測定を行い，塩分が 0.010%以下であることを確認した．

### 2.4.2 試料溶液の調製方法

#### 2.4.2 (1) 水抽出法

100 mL 容メスフラスコに試料を 6 g 量り取り，約 60 mL の超純水を加えた（又は，200 mL 容メスフラスコに試料 11.2 g を採取し，120 mL の超純水を加えた）．これを振とう機で毎分約 190 回，30 分間振とうした後，消泡剤を 2 滴加え，超純水で定容し，ろ過した．

#### 2.4.2 (2) ホモジナイズ法

ビーカーに試料を 6 g 量り取り，これに少量の超純水を加えて 20 mL 容のガラスホモジナイザーに移し入れ，ホモジナイズした．これを 100 mL 容メスフラスコに移し入れ，消泡剤を 2 滴加えた後，超純水で定容し，ろ過した．

### 2.4.3 除たんぱく操作

水抽出法により試料溶液を調製する際，メスフラスコに超純水を加えて定容する前の段階で，除たんぱく剤 X を 10 mL 加えて混合し，更に除たんぱく剤 Y を 10 mL 加えて混合することでたんぱく質を沈殿させ，その後 100 mL に定容し，ろ過により沈殿したたんぱく質を除去した．試料溶液を 200 mL 調製する場合には，除たんぱく剤の量をそれぞれ 2 倍にした．

### 2.4.4 塩分の測定

#### 2.4.4 (1) 電位差滴定法

容量分析用標準物質の塩化ナトリウムを用いて塩化ナトリウム標準液を調製し，電位差滴定法により塩化物イオンの測定を行い，塩分に換算して検量線（1 点検量）を作成した．

電位差滴定における 0.1 mol/L 硝酸銀水溶液の滴定量が 10 mL 付近となるように，適量の試料溶液を分取し，超純水で希釈した後，測定を行った．得られた滴定値から検量線を用いて塩分に換算した．

#### 2.4.4 (2) イオンクロマトグラフィー

試料溶液を超純水で 20 倍又は 200 倍に希釈し，0.45 µm のメンブレンフィルターでろ過したものを検液とした．陰イオン分析及び陽イオン分析では，予め標準物質を用いて検量線（6 点検量）を作成した後，それぞれ検液中の塩化物イオン及びナトリウムイオンを測定した．得られた塩化物イオン量及びナトリウムイオン量の各々から塩分（塩化ナトリウム当量）に換算した．

### 2.4.5 水抽出法における振とう時間の検討

Sample A1 を用い，水抽出法における振とう時間を，0，5，10，20，30 分間，1 時間及び 2 時間に变化させて塩分抽出を行い，2 時間振とうした場合の塩分の値を基準として，各振とう時間の塩分の値との間で t 検定<sup>2),3)</sup>を行い，塩分抽出のために必要な時間を確認した．t 検定は有意水準 5%（以下同じ）で行った．

### 2.4.6 水抽出法及びホモジナイズ法の比較

Sample A2 を用いて 2.4.1 の方法で作成した脱塩済のたらこを三角フラスコに取り，重量比で 1：10 になるように 5%塩化ナトリウム溶液を加え，4 時間浸漬した（4 時間以上置いても塩分は増加

しないことを確認した)。これをざるにあけて液をきり、キムタオルで水分を拭き取り、塩分濃度を調整した試料を用意した。

この試料について、2.4.2 (1)の水抽出法及び2.4.2 (2)のホモジナイズ法でそれぞれ試料溶液を調製し、電位差滴定法及び陰イオンクロマトグラフィーにより塩分を求め、それらの値について t 検定を行った。

#### 2.4.7 除たんぱく処理の影響についての確認

2.4 g/L の塩化ナトリウム溶液について、電位差滴定法及び陰イオンクロマトグラフィーにより塩化物イオン量を測定し、両測定法で得られた塩分の値に有意差が無いことを確認した。

次に、除たんぱく操作を行って調製した 2.4 g/L の塩化ナトリウム溶液について、電位差滴定法により塩分を測定し、除たんぱく操作を行っていない場合の塩分との間で、t 検定を行った。

更に、sample B1 について水抽出法による操作を行い、除たんぱく処理を行った場合と行わない場合について、電位差滴定法及び陰イオンクロマトグラフィーにより塩分を測定し、t 検定を行うことで除たんぱく処理の影響を確認した。なお、各測定法における検量線は 3 点検量で作成した。

#### 2.4.8 たらこの塩分測定におけるナトリウムイオンを含む添加物の影響についての確認

グルタミン酸ナトリウムを用いて、魚卵の塩分の定量におけるナトリウムイオンを含む添加物の影響を確認した。

Sample A3 を用いて 2.4.1 の方法で作成した脱塩済のたらこを三角フラスコに取り、重量比で 1 : 10 となるように浸漬液 (5%塩化ナトリウム、1.2%L(+)-グルタミン酸水素ナトリウム一水和物溶液) を加え、4 時間浸漬した。また、Sample B2 を用いて 2.4.1 の方法で作成した脱塩済みのたらこを別の三角フラスコに取り、重量比で 1 : 10 となるように 5%塩化ナトリウム溶液を加え、4 時間浸漬したものを用意した。各々をざるにあけて液をきり、キムタオルで水分を拭き取ったものを試料とした。

これらの試料を用いて、水抽出法により試料溶液を調製し、陽イオンクロマトグラフィー及び陰イオンクロマトグラフィーによりナトリウムイオン及び塩化物イオンを測定し、それぞれの値から塩分に換算した。

#### 2.4.9 陽・陰イオンクロマトグラフィーによるたらこの塩分の定量

Sample A4、sample B3 及び sample C の 3 種類のたらこ試料について、水抽出法により試料溶液を調製し、陽イオンクロマトグラフィー及び陰イオンクロマトグラフィーによりナトリウムイオン及び塩化物イオンをそれぞれ測定し、各測定値を塩分に換算した。

### 3. 結果及び考察

#### 3.1 水抽出法の振とう時間の検討

2.4.5 により確認した、水抽出法における振とう時間と塩分測定値の関係を Table 2 に示す。

Table 2 Effect of shaking time on the water extraction method

| shaking time | n | average of salt content (% , w/w) | standard deviation | t-test |
|--------------|---|-----------------------------------|--------------------|--------|
| 0 min        | 5 | 3.72                              | 0.008              | △      |
| 5 min        | 5 | 3.76                              | 0.015              | ○      |
| 10 min       | 5 | 3.77                              | 0.058              | ○      |
| 20 min       | 5 | 3.73                              | 0.040              | ○      |
| 30 min       | 5 | 3.76                              | 0.020              | ○      |
| 1 h          | 5 | 3.76                              | 0.048              | ○      |
| 2 h          | 5 | 3.77                              | 0.024              | -      |

The sample A1 was used for this experiment. The t-test was conducted between the data for shaking time of 2 hour and the other. Circle(○) and triangle(△) mean no significant difference and significant difference, respectively.

2 時間振とうした場合の塩分測定値を基準に、各振とう時間における塩分測定値との間で t 検定を行った結果、振とう時間を 5 分間以上とった場合、塩分の測定値に有意差は無かった。たらこの卵が水中で分散した状態であれば、振とう時間は 5 分間で十分であることが確認された。

#### 3.2 たらこ試料からの塩分の抽出方法の比較

2.4.6 により、水抽出法及びホモジナイズ法で調製した各試料溶液について、電位差滴定法により測定した結果を Table 3 に示す。水抽出法とホモジナイズ法の間で塩分の測定値に有意差は認められなかった。

Table 3 Results of potentiometric titration for the determination of salt in roe samples prepared by two different extraction methods

| extraction method       | n | average of salt content (% , w/w) | standard deviation | t-test |
|-------------------------|---|-----------------------------------|--------------------|--------|
| homogenization method   | 5 | 4.10                              | 0.012              | ○      |
| water extraction method | 5 | 4.09                              | 0.023              |        |

The sample A2 was used for this experiment. Circle(○) means no significant difference.

また、陰イオンクロマトグラフィーにおいても、水抽出法とホモジナイズ法の間で塩分の測定値に有意差は認められなかった。

たらこの場合、試料溶液の調製は、より簡便な水抽出法で調製するのが良い。特に、検体数が多い場合には、ホモジナイズ法よりも迅速に調製を行うことが可能である。

#### 3.3 除たんぱく処理の影響

2.4.7 により、たらこの塩分測定における除たんぱく処理の影響を確認した。

塩化ナトリウム溶液 (2.4 g/L) 調製時に除たんぱく操作を行った場合について、電位差滴定法による塩分の測定への影響を確認したところ、除たんぱく操作の有無で結果に有意差は見られなかった (Table 4)。したがって、塩化ナトリウム溶液については、除たんぱく操作により塩化物イオンの共沈は起こっていないと考えられる。

Table 4 Effect of deproteinizing treatment on the determination of salt in an NaCl solution through potentiometric titration

|                              | n | matching degree of theoretical and measured values (%) | standard deviation | t-test |
|------------------------------|---|--------------------------------------------------------|--------------------|--------|
| without deproteinizing agent | 5 | 99.78                                                  | 0.488              | ○      |
| with deproteinizing agent    | 5 | 99.27                                                  | 0.696              |        |

Circle(○) means no significant difference.

次に、たらこ試料（sample B1）から水抽出法で得た試料溶液について、除たんぱく処理の有無で、電位差滴定法及び陰イオンクロマトグラフィーにより得られる塩分の測定値に影響があるか確認した結果を Table 5 に示す。

Table 5 Effect of deproteinizing treatment on the determination of salt in roe samples with potentiometric titration or anion chromatography

| measurement method       | deproteinizing | n | average of salt content (% w/w) | standard deviation |
|--------------------------|----------------|---|---------------------------------|--------------------|
| potentiometric titration | no             | 5 | 4.14                            | 0.022              |
| potentiometric titration | yes            | 5 | 4.09                            | 0.015              |
| anion chromatography     | no             | 5 | 4.12                            | 0.056              |
| anion chromatography     | yes            | 5 | 4.11                            | 0.017              |

The sample B1 was used for this experiment.

陰イオンクロマトグラフィーによる塩分の測定では、除たんぱく処理の有無により、測定値の標準偏差に有意差があったため t 検定を行うことはできなかったが、塩分の値の差は 0.01% と非常に小さかった。この結果から、塩化物イオンは、除たんぱく処理によりたんぱく質と共沈していないと考えた。

一方で、電位差滴定法では t 検定の結果、除たんぱく処理を行わなかった場合の塩分測定値は、除たんぱく処理を行った場合よりも有意に高い値となったことから、検液中に混在するたんぱく質が電位差滴定法による塩化物イオンの定量に影響を与えている可能性が認められた。

### 3.4 ナトリウムイオンを含む添加物が共存する場合の影響

2.4.8 に記載の方法で、たらこの塩分測定におけるナトリウムを含む添加物の影響を確認した結果を Table 6 に示す。

Table 6 Effect of the addition of sodium glutamate on the determination of salt in roe samples through ion chromatography

|                          | n | average of salt content (% w/w) calculated from: |                     | (a)/(b) |
|--------------------------|---|--------------------------------------------------|---------------------|---------|
|                          |   | (a) Na <sup>+</sup>                              | (b) Cl <sup>-</sup> |         |
|                          |   |                                                  |                     |         |
| without sodium glutamate | 5 | 4.10                                             | 4.05                | 1.01    |
| with sodium glutamate    | 5 | 4.27                                             | 3.92                | 1.09    |

Deproteinizing treatment was not carried out for the test solutions.

グルタミン酸ナトリウムの添加により、ナトリウムイオンの測

定量から換算した塩分の値は、塩化物イオンの測定量から換算した塩分の値と比較して 9% 程度高い数値を示した。浸漬液について、加えたグルタミン酸ナトリウムのナトリウムイオンの量を理論的に塩分に換算したとき、塩化ナトリウムの量に対する比率は 0.07 であることから、この増加量は、グルタミン酸ナトリウムの添加量にほぼ整合的と言える。

一方で、グルタミン酸ナトリウムの添加により、ナトリウムイオンの測定量から換算した塩分の値は 0.17% 増加したが、塩化物イオンの測定量から換算した塩分の値は 0.13% 減少しており、この理由は不明である。

### 3.5 ナトリウムイオン及び塩化物イオンから換算した塩分の値

3 種類のたらこ試料について、2.4.9 により塩分を測定した結果を Table 7 に示す。

Table 7 Results of the determination of salt in cod roe samples through ion chromatography

| sample | n | average of salt content (% w/w) calculated from: |                 |
|--------|---|--------------------------------------------------|-----------------|
|        |   | Na <sup>+</sup>                                  | Cl <sup>-</sup> |
| A4     | 3 | 2.82                                             | 3.64            |
| B3     | 3 | 5.84                                             | 4.65            |
| C      | 3 | 0.31                                             | 0.37            |

Deproteinizing treatment was not carried out for the test solutions.

Sample A4 については、塩化物イオンから換算した塩分の方が 0.82% 高い値となった。添加物（Table 1 参照）には、例えば、無機塩類の他、たんぱく質分解物に残留する中和で生じた塩など、塩素を含有する可能性のあるものが含まれており、これらの影響と考えられる。

Sample B3 ではナトリウムイオンの量から換算した塩分の方が 1.19% 高い値となった。添加物にアミノ酸等とあり、アミノ酸のナトリウム塩が加えられている可能性がある。また、着色料や亜硝酸ナトリウムにもナトリウムイオンが含まれる。これらの添加物由来のナトリウムイオンによりナトリウム量が高く定量され、結果として塩分が高い値となったと考えられる。

Sample C は添加物が加えられていない生たらこであるが、ナトリウムイオンから換算した塩分の値は 0.31%，塩化物イオンから換算した塩分の値は 0.37% であり、両者の差は 0.06% と小さかった。

加えられる添加物の種類により、ナトリウムイオン量から換算した塩分が高くなる場合や、塩化物イオン量から換算した塩分が高くなる場合があることが認められ、どのような添加物が加えられているかにより、どちらのイオンから塩分を算出すべきか、また、加えられた添加物の量に相当する塩分の値を減ずる等、考慮が必要である。

#### 4. 要 約

本研究では、たらこについて、塩分の最適な分析条件の検討を行った。

試料溶液の調製方法として、水抽出法とホモジナイズ法を比較したところ、簡便かつ迅速な水抽出法が適用可能であることが統計的に示唆され、たらこの卵の粒が分散していれば、水抽出における振とう時間は5分間で十分であることが分かった。

水抽出法で調製した試料溶液について、電位差滴定法による塩化物イオン量から塩分を定量する場合、除たんぱく処理を行わないと測定値が高めになることが確認された。陰イオンクロマトグラフィーにより塩分を測定する場合には、除たんぱく処理の有無は塩分の測定値に影響を及ぼさなかった。

様々な添加物を含むたらこの場合は、添加物中のナトリウムイオンや塩化物イオンが塩分の測定値に影響を及ぼすことから、慎重な対応を要することが確認された。

#### 文 献

- 1) 川崎 久美子, 大類 仁, 村上 孝之, 山崎 光廣: 関税中央分析所報, **56**, 5 (2016).
- 2) R.A.デイ, Jr.・A.L.アンダーウッド: “定量分析化学”, P.23(1971), (培風館).
- 3) J.C.Miller, J.N.Miller: “データのとり方とまとめ方”, P47(1991), (共立出版株式会社).