

HPLC による有機酸の一斉定量分析法の検討

小川 浩史*, 菅野 達朗*, 大類 仁*

Simultaneous Quantitative Analytical Method of Organic Acids by HPLC

OGAWA Hirofumi*, KANNO Tatsuro* and ORUI Hitoshi*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance 6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba, 277-0882 Japan

Since organic acids do not have specific absorption wavelengths in the UV-visible region, quantitative analysis of organic acids by HPLC is performed by methods such as the post-column method, which has the drawback of requiring dedicated equipment. In this study, an analysis method using on-column complexation with metal ions was investigated as a simultaneous quantitative analytical method of organic acids by HPLC using general-purpose equipment. As a result, good recovery rates for malic acid, lactic acid, and citric acid spiked into pollack roe could be obtained by pretreatment with a strongly acidic cation exchange resin.

1. 緒 言

有機酸は果実や野菜等の食品中に含有され、主に酸味を示す原因物質である。また有機酸は、酸味料や酸化防止剤、保存料などの食品添加物としても用いられている。

関税率表において、有機酸の含有量によって関税分類が異なるものが複数存在する。例えば、たらこについては、有機酸をはじめとする塩以外の調味料の含有量の合計の割合が国内分類例規に規定されている基準以上の場合、調製されたものとして第 16 類に分類される一方、調製されていないものについては、輸入割当の対象である第 3 類に分類される。つまりたらこの関税分類においては、含有する有機酸をはじめとする塩以外の調味料について定量分析を実施し、その含有量の合計を求めることが重要である。このため、これらの有機酸を一斉に定量可能な分析法が望まれている。

有機酸を一斉に定量する分析法としては、ブチルエステル化によるガスクロマトグラフィーを利用した分析法¹⁾や、ポストカラム法を用いた高速液体クロマトグラフィー（以下「HPLC」という）による分析法²⁾などが報告されている。特に HPLC による分析法は、操作が簡単で前処理が容易なことから広く食品の有機酸分析に利用されている³⁾。ポストカラム法では、有機酸をカラムで分離した後、pH 指示薬である BTB 溶液と混合することにより可視吸収（波長 440 nm）で検出を行うため、夾雑成分の影響を受けずに、複数の有機酸を同時分析できる一方で、分析装置の構成が複雑であり、またポストカラム法用の装置が必要となるといった問題がある。

そのため、汎用的な HPLC を用いた分析法として、紫外吸収（波長 220 nm）で検出を行う HPLC による分析法についての検討が行われてきたが、ポストカラム法と比べて検出感度が低く、夾雑成分の影響を受けやすいという課題があった⁴⁾。

そこで本研究では、汎用的な機器を用いて、より高感度で有機酸を検出できる分析法として、金属イオンとのオンカラム錯形成反応を利用した HPLC による有機酸の一斉定量分析法⁵⁾について検討を行った。この分析法は金属イオンに有機酸が配位してできる錯体が波長 240 nm に吸収極大を持つことを利用して、金属イオンが溶解した移動相を用いることで、オンカラムで有機酸と金属イオンを反応させ、有機酸を波長 240 nm で選択的かつ高感度に検出する方法である。今回、たらこの調製に使用されることのある有機酸 7 種（グルコン酸、酒石酸、リンゴ酸、乳酸、酢酸、くえん酸及びコハク酸）について、分析条件の検討や検液調製法の検討を行った後、たらこへの各有機酸の添加回収試験を実施したので、その結果を報告する。

2. 実 験

2.1 試薬、試料及び器具

2.1.1 試薬

酒石酸、リンゴ酸、乳酸リチウム、酢酸ナトリウム、くえん酸一水和物、コハク酸、濃硫酸、0.1 N 硫酸、ゲンチアナバイオレット B（以上、富士フイルム和光純薬）、グルコン酸ナトリウム（林純薬工業）、2-ヒドロキシイソ酪酸（東京化成工業）、硫酸銅五水和物（ナカライテスク）、60%過塩素酸（関東化学）

2.1.2 試料

市販品のたらこ 3 種（塩たらこ 2 種、辛子明太子 1 種）（Table 1 参照）。

* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

Table 1 List of pollack roe samples used in this study

| Sample | Additives |
|--------|--|
| A | Salt, seasoning(amino acid, etc.), trehalose, alcohol, antioxidant(vitamin C), niacin, sweetener(stevia), coloring agent(sodium nitrile), enzyme |
| B | Salt, seasoning(amino acid, etc.), antioxidant(vitamin C), niacin, enzyme, coloring(red 102, yellow 5, red 3), coloring agent(sodium nitrile) |
| C | Fermented seasoning, salt, chili pepper, bonito flavor seasoning, seasoning(amino acid, etc.), sweetener(sorbitol), antioxidant(vitamin C), niacin, enzyme, coloring agent(sodium nitrile) |

2.1.3 器具

陽イオン交換カートリッジ：TOYOPAK IC-SPM（東ソー）（直前にイオン交換水約 20 mL を通液してから使用）

2.2 装置及び分析条件

装置：高速液体クロマトグラフ LC-20AD（島津製作所）
 検出器：PDA 検出器 SPD-M40（島津製作所）
 検出波長：UV 240 nm
 カラム：Sunniest RP-AQUA 4.6 mm i.d.×250 mm, 粒径 5 μm （クロマニックテクノロジーズ）
 カラム温度：30 $^{\circ}\text{C}$
 移動相：A mM 硫酸銅 + B mM 硫酸水溶液（①A=10, B=2.5
 ②A=10, B=5 ③A=5, B=2.5）
 流速：1 mL/min
 注入量：①10 μL , ②2 μL

2.3 試薬の調製

移動相（10 mM 硫酸銅+2.5 mM 硫酸）：1000 mL 容メスフラスコに硫酸銅五水和物 2.49 g（5 mM 硫酸銅の場合は半量）を量り取り、約 500 mL の蒸留水（以下「水」という）に溶解させ、0.1 N 硫酸 50 mL（5 mM 硫酸の場合は倍量）を加えてから水で定容した。

5%過塩素酸水溶液（除たんぱく剤）：100 mL 容メスフラスコに 60%過塩素酸水溶液 8.3 mL を採り、水で定容した。

ゲンチアナバイオレット B 水溶液（pH 指示薬（変色域：pH 0.0–2.0））：ゲンチアナバイオレット B 約 0.1 g を水 100 mL に溶解し、さらに水で 10 倍希釈して使用した。

約 6 N 硫酸：濃硫酸を水で約 6 倍に希釈した。

内標準物質溶液：200 mL 容メスフラスコに 2-ヒドロキシシソ酸 4 g を量り取り、水で定容した。

添加用有機酸標準溶液：100 mL 容メスフラスコに各有機酸試薬 2 g を量り取り、水で定容した。

2.4 実験

2.4.1 移動相の検討

2.4.1(1) 標準有機酸検液の調製

各有機酸試薬約 0.2 g を水 100 mL に溶解した。その溶液 1 mL を LC バイアルに採り、ゲンチアナバイオレット B 水溶液を 1 滴滴下した後、検液の色が紫色から水色に変化するまで 6 N 硫酸を滴下した。この操作は検液の pH が移動相の pH（約 2.4–2.6）よりも塩基性だと有機酸のピーク形状等に影響があったことから、検液の pH を酸性に調整するために実施した。

2.4.1(2) 硫酸銅及び硫酸濃度の検討

2.4.1(1)で調製した検液を 2.2 の移動相①–③を用いて測定し、移動相に用いる硫酸銅及び硫酸の濃度について検討した。

2.4.2 たらこ由来の夾雑成分の確認

たらこ A（卵巣膜を除去したもの）10 g を 50 mL 容メスフラスコに量り取り、水約 25 mL と 5%過塩素酸水溶液 5 mL を加えて攪拌した後、水で定容し、孔径 0.45 μm のメンブレンフィルターでろ過した。このろ液を 2.4.1(1)と同様な手順で pH 調整した後、2.2 の分析条件（移動相及び注入量は①）で測定した。

2.4.3 たらこ由来の夾雑成分の除去方法の検討

たらこ由来の夾雑成分の除去方法として、強酸性陽イオン交換樹脂による処理を検討した。2.4.2 の調製手順において、メンブレンフィルターによるろ過の段階で、代わりにメンブレンフィルターを取り付けた陽イオン交換カートリッジに検液 1 mL を通液し、そのろ液を 2.2 の分析条件（移動相及び注入量は①）で測定した。陽イオン交換カートリッジに通液することで、検液の pH は移動相よりも酸性に変化していたことから、検液の pH 調整は行わなかった。

2.4.4 たらこへの添加回収試験

2.4.4(1) 検量線の作成

200 mL 容メスフラスコに各有機酸試薬 1 g を量り取り、水で定容し、検量線用標準溶液とした。この検量線用標準溶液 5 mL, 10 mL, 20 mL 及び 30 mL をそれぞれ異なる 50 mL 容メスフラスコに正確に分取し、次いで内標準物質溶液 5 mL ずつ正確に加えてから水で定容した。この検液を 2.4.1(1)の手順で pH 調整したものを高濃度側検量線用検液(0.5–3 mg/mL)とした。さらに検量線用標準溶液を水で 10 倍希釈した溶液 10 mL, 20 mL 及び 30 mL をそれぞれ異なる 50 mL 容メスフラスコに正確に分取し、次いで内標準物質溶液 5 mL ずつ正確に加えてから水で定容した。この検液を 2.4.1(1)の手順で pH 調整したものを低濃度側検量線用検液(0.1–0.3 mg/mL)とした。これらの検量線用検液を 2.2 の分析条件（移動相は①、注入量は①及び②）で 3 回ずつ測定し、検量線を作成した。

2.4.4(2) たらこへの添加回収試験

たらこ（卵巣膜を除去したもの）10 g を 50 mL 容メスフラスコに量り取り、水約 25 mL と 5%過塩素酸水溶液 5 mL を加えて攪拌した後、内標準物質溶液 5 mL を正確に加えた。標準未添加検液については、そのまま水で定容し、標準添加検液については添加用有機酸標準液 5 mL を正確に加えてから水で定容した。これらの検液 1 mL を、メンブレンフィルターを取り付けた陽イオン

交換カートリッジに通液し、そのろ液を 2.2 の分析条件（移動相は①，注入量は①及び②）で 3 回ずつ測定し、添加回収率を求めた。

3. 結果及び考察

3.1 移動相の検討

各分析条件で得られたクロマトグラムを Fig. 1 に示す。いずれの分析条件でも各有機酸のピーク分離度は 1.5 以上であり、完全分離している⁶⁾。また硫酸銅濃度を増加すると、各有機酸のピーク面積が増大し、酢酸及びコハク酸以外のピークは保持時間が短くなる傾向を示した。一方硫酸濃度を増加すると、各有機酸のピーク面積が減少し、保持時間が長くなる傾向を示した。酢酸及びコハク酸の検出感度が他の有機酸と比べて低く、なおかつ硫酸銅濃度による保持時間への影響が少なかった理由は、酢酸及びコハク酸が銅イオンと錯体を形成しにくいからだと考えられる。今回

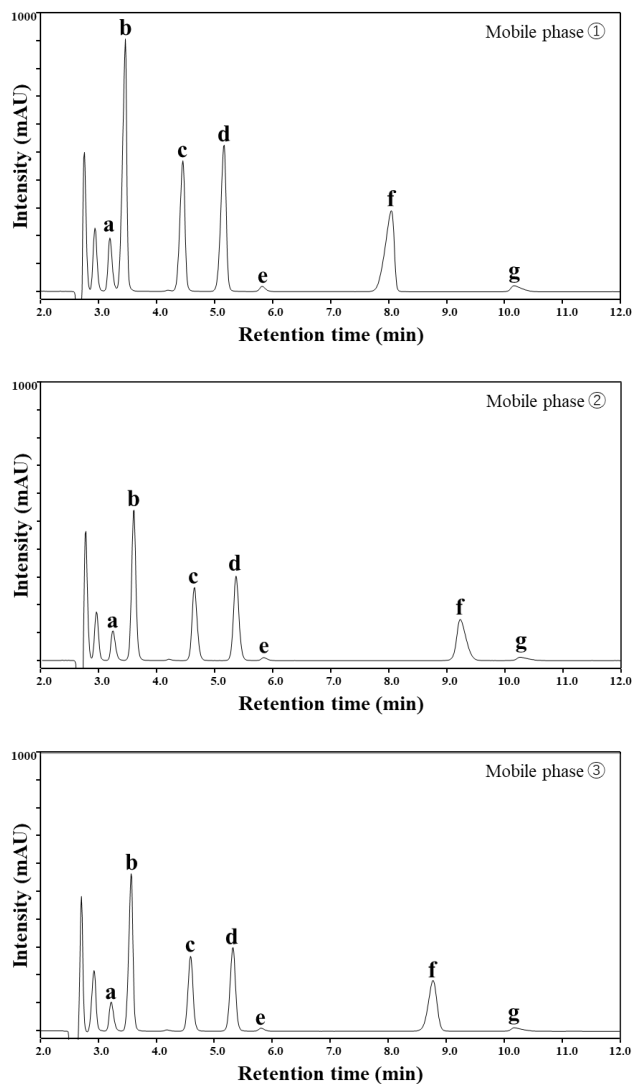


Fig.1 Chromatograms of organic acids (a: gluconic acid, b: tartaric acid, c: malic acid, d: lactic acid, e: acetic acid, f: citric acid, g: succinic acid)

検討した移動相のうち、もっとも良い検出感度が得られた移動相①を、最適条件として以降の実験を行った。

3.2 たらこ由来の夾雑成分の確認

たらこ A 検液のクロマトグラムを Fig. 2 に示す。いずれのたらこ検液についても、多くの夾雑成分のピークが検出されており、各有機酸と保持時間が重なっているピークや保持時間が近接しており定量分析を妨害し得るピークが存在する。これらの夾雑成分ピークは主にたらこ中のアミノ酸に由来するものと考えられる。通常アミノ酸は波長 240 nm 近辺に強い吸収帯を持たないが、アミノ酸も有機酸同様に金属イオンに配位し錯体を形成することで、波長 240 nm で高感度に検出されるようになったと考えられる⁹⁾。

3.3 たらこ由来の夾雑成分の除去方法の検討

3.2 の結果を踏まえ、たらこ中の有機酸をより正確に定量するために、たらこ検液中のアミノ酸を除去する方法を検討することとした。川井による報告⁷⁾を参考にして、2.4.3 の手順で陽イオン交換カートリッジによる処理を行ったたらこ A 検液のクロマトグラムを Fig. 3 に示す。未処理の検液のクロマトグラム (Fig. 2) と比較して、多くの夾雑成分のピークが検出されなくなった。ただしグルコン酸及び酒石酸が検出される保持時間 3.1–3.5 分については、陽イオン交換カートリッジで除去できないアミノ酸以外の夾雑成分に由来するピークが検出されていると考えられることから、グルコン酸及び酒石酸のたらこへの添加回収試験は実施しなかった。

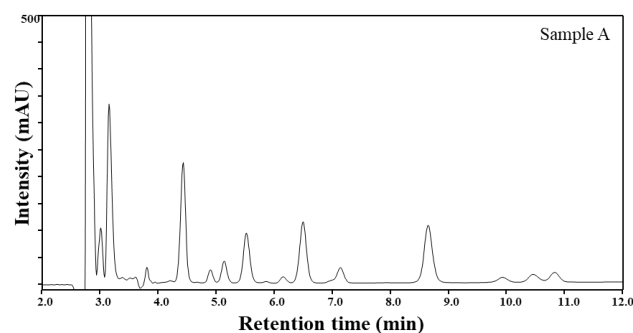


Fig. 2 Chromatogram of pollack roe (sample A)

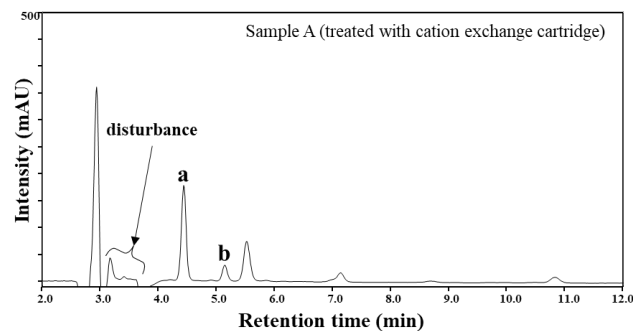


Fig.3 Chromatogram of pollack roe (sample A) treated with cation exchange cartridge (a: malic acid, b: lactic acid)

3.4 たらこへの添加回収試験

3.4.1 検量線の作成

検出感度の低い酢酸及びコハク酸については高濃度側検量線用検液を注入量 10 μL で測定したデータを用いて検量線を作成した。また検出感度の高いリンゴ酸、乳酸及びくえん酸については、注入量 10 μL だけでなく注入量 2 μL で測定したデータを用いた検量線も作成した。各有機酸の検量線の相関係数を Table 2 に示す。いずれの検量線も相関係数 0.999 以上という良好な直線性を示した。ただし検出感度の高いリンゴ酸、乳酸及びくえん酸については、注入量 10 μL と比較して注入量 2 μL の方が、相関係数 0.9999 以上というより良好な直線性を示した。このことから、カラム中に注入される有機酸量が過剰だと、検量線の直線性に影響があると考えられ、特に検出感度の高いリンゴ酸、乳酸及びくえん酸については、良好な直線性の検量線を得るために注入量や検量線用検液の濃度を調整する必要があると考えられる。検出感度の低い酢酸及びコハク酸については、注入量や検液濃度を下げるとピーク面積の再現性が悪化してしまうため、検量線の直線性の向上は困難だった。

Table 2 Correlation coefficients(r) of calibration curves of organic acids

| | Injection volume | Correlation coefficient (r) | Concentration range (mg/mL) |
|---------------|------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Malic acid | 10 μL | 0.99979 | 0.1–3 |
| | 2 μL | 0.99998 | |
| Lactic acid | 10 μL | 0.99978 | |
| | 2 μL | 0.99997 | |
| Citric acid | 10 μL | 0.99994 | 0.5–3 |
| | 2 μL | 0.99999 | |
| Acetic acid | 10 μL | 0.99993 | |
| Succinic acid | 10 μL | 0.99991 | |

3.4.2 たらこへの添加回収試験

各たらこへの添加回収試験の結果及び各検液のクロマトグラム（注入量は①）を Table 3 及び Fig. 4–6 に示す。リンゴ酸、乳酸及びくえん酸の添加回収率は 97.2–104.5 % (RSD = 0.02–1.25 %, $n=3$) と良好な結果となった。ただし、乳酸及びくえん酸については、今回使用したサンプルではいずれも添加回収率が低め（乳酸）もしくは高め（くえん酸）になっていることから、より多くのサンプルを用いて添加回収試験を実施する必要があると考えられる。また乳酸及びくえん酸の添加回収率に誤差が生じる要因としては、陽イオン交換カートリッジによる処理の際に有機酸及び内標準物質の一部がカートリッジに吸着されてしまっている可能性が考えられることから、検液に続けて水を陽イオン交換カートリッジに通液することで、添加回収率が改善する可能性が考えられる⁸⁾。一方で酢酸及びコハク酸の添加回収率は 88.1–103.6 %

(RSD = 1.05–2.95 %, $n=3$) とリンゴ酸、乳酸及びくえん酸と比べてばらつきの大きい結果となった。これは検出感度が低いため、今回調製した検液濃度だとピーク面積の再現性が低い (RSD = 1 % 以上, $n=3$) ためだと考えられる。そのため、たらこ中の酢酸及びコハク酸を正確に定量するためにはより高濃度の検液を調製する必要があると考えられるが、高濃度の検液では除去すべきアミノ酸の濃度も増加することから、今回実施した 2.4.3 の手順ではアミノ酸を除去しきれない可能性なども考えられるため、さらなる検討が必要である。

4. 要 約

本研究では、金属イオンとのオンカラム錯形成反応を利用した HPLC により、たらこ調製品中の有機酸を一斉に定量する分析法について検討した。その結果、有機酸 7 種を完全分離しかつ良好な検出感度が得られる移動相を決定した。またリンゴ酸、乳酸及びくえん酸については、強酸性陽イオン交換樹脂による前処理を含む検液調製法を用いることで、たらこへの添加回収試験において良好な回収率を得ることができた。それ以外の有機酸については、今回検討した分析法では検出感度や夾雑成分の問題で正確な定量分析は困難だと考えられたことから、さらなる検討が必要である。

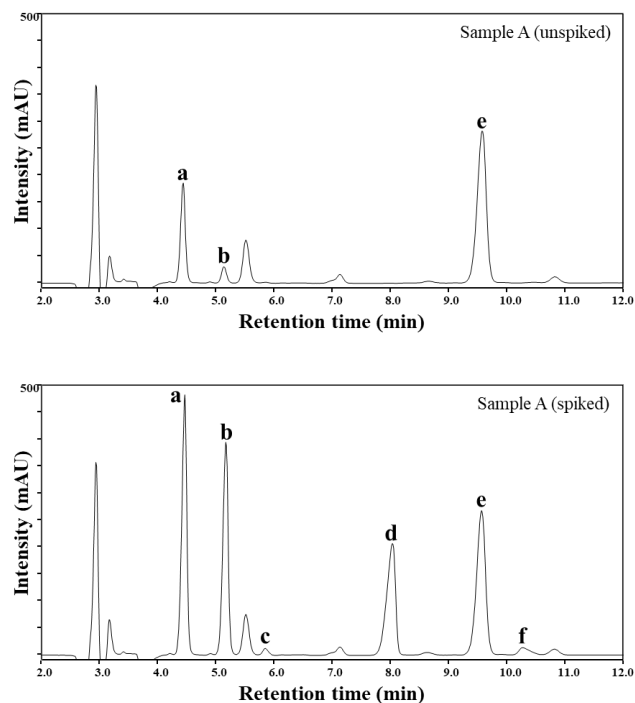


Fig.4 Chromatograms of sample A (a: malic acid, b: lactic acid, c: acetic acid, d: citric acid, e: 2-hydroxyisobutyric acid (internal standard), f: succinic acid)

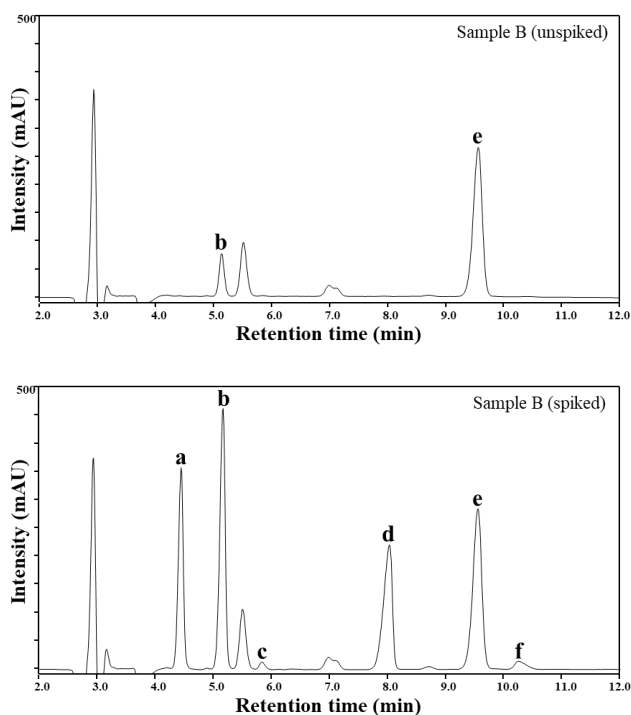


Fig.5 Chromatograms of sample B (a: malic acid, b: lactic acid, c: acetic acid, d: citric acid, e: 2-hydroxyisobutyric acid (internal standard), f: succinic acid)

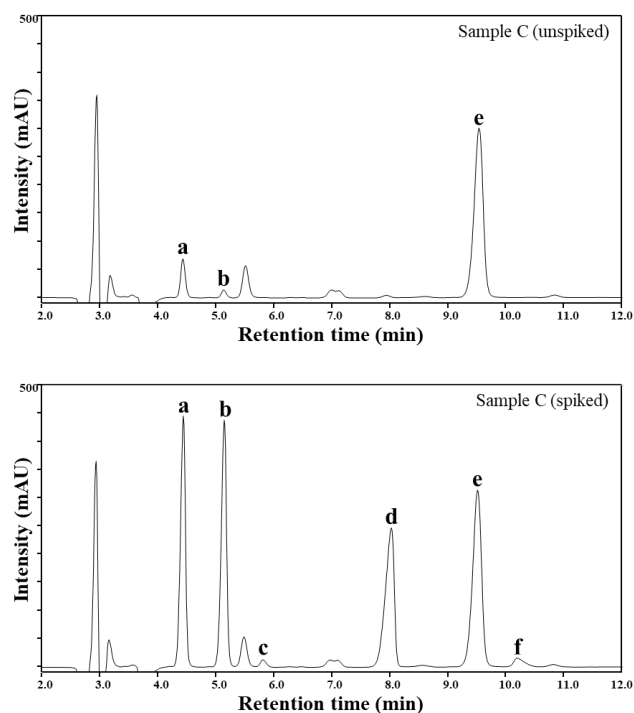


Fig.6 Chromatograms of sample C (a: malic acid, b: lactic acid, c: acetic acid, d: citric acid, e: 2-hydroxyisobutyric acid (internal standard), f: succinic acid)

Table 3 Recovery of organic acids from pollack roe

| Sample | Malic acid | | Lactic acid | | Citric acid | | Acetic acid | | Succinic acid | |
|--------|-------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|---------------|--------|
| | Recovery(%) | RSD(%) | Recovery(%) | RSD(%) | Recovery(%) | RSD(%) | Recovery(%) | RSD(%) | Recovery(%) | RSD(%) |
| A | 100.4 | 0.75 | 99.0 | 0.45 | 101.2 | 0.25 | 88.1 | 1.44 | 103.6 | 2.86 |
| B | 100.2 | 0.76 | 99.0 | 0.29 | 103.1 | 0.02 | 88.8 | 1.05 | 99.6 | 1.93 |
| C | 98.8 | 1.25 | 97.2 | 0.58 | 104.5 | 0.23 | 99.6 | 2.95 | 90.6 | 1.42 |

文 献

- 1) 山下市二, 田村太郎, 吉川誠次, 鈴木重治: 分析化学, **22**, 1334 (1973).
- 2) 厚生労働省: 食品中の食品添加物分析法.
- 3) 日本食品科学工学会 新・食品分析法編集委員会: “新・食品分析法”, P.588 (1996), (光琳).
- 4) 浅野沙也佳, 加藤真美, 立川敦生, 竹内孝幸, 松本啓嗣: 関税中央分析所報, **61**, 73 (2021).
- 5) 健名智子, 小玉修嗣: 分析化学, **68**, 581 (2019).
- 6) 日本薬局方解説書編集委員会: “第十六改正日本薬局方 条文と注釈”, P.88 (2011), (廣川書店)
- 7) 川井信子: 生活衛生, **26**, 228 (1982).
- 8) 増田靖子, 徳島將光, 五十嵐智大, 松本啓嗣: 関税中央分析所報, **60**, 11 (2020).