

報 文

細管式等速電気泳動法による不揮発性有機酸の分析

川 端 省 三^{*}, 出 来 三 男^{**}

細管式等速電気泳動法により、不揮発性有機酸の同時分離及び定量の検討を行った。緩衝剤を加えて pH3.1~8.8 に調製した 5 種の 0.01M 塩酸をリーディング溶液として泳動を行い、有機酸の PU 値を求めた。pH3.1 の緩衝液で、フマル酸、アスコルビン酸、酒石酸、りんご酸、こはく酸及び乳酸を同時に分離することができた。他の条件では、pH5.1 でフマル酸と酒石酸、pH6.0 でくえん酸とりんご酸、pH8.0 でりんご酸とこはく酸を分離した。pH8.8 ではフマル酸、酒石酸及びりんご酸は同じ電位勾配を示すため分離できなかった。しゅう酸と乳酸は、多くの場合、混合ゾーンを作るが、pH8.8 で分離できた。

有機酸の 0.1% 水溶液について、注入量とゾーン幅から検量線の作成を行ったところ、pH5.1~8.8 の範囲で良好な直線関係が得られた。また、この方法を実際試料に応用し、良好な結果を得た。

1 緒 言

有機酸は多くの食品中に含まれ、重要な味覚を構成しているが、果実や醸酵生産品にとくに多く含まれている。関税率表では、果汁は第 20・07 号に分類されるが、天然に存在するよりも多い量の有機酸が添加されたものはこの号から除外する取扱いとなっている。一般的の食品においても、その栄養や風味を増すために有機酸の添加がしばしば行われ、これらの有機酸の定性、定量が必要とされる。

脂肪酸の分析はガスクロマトグラフィーによって比較的容易に行うことができるが、植物体中に含まれる TCA サイクルメンバーのオキシ酸、ジカルボン酸のような不揮発性有機酸は、ペーパークロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィーによる定性分析が行われている。しかしこれらの方法は、しばしば定性的な判別が困難であったり、取扱いが煩雑であるなどの難点がある。

最近、イオン性物質の新しい分離手段として、細管式等速電気泳動法（以下 CITP と略記）が注目されて

いるが、この方法の利点は、試料の特別な前処理を行うことなく、分離物質の定性、定量が可能なことである^{1),2)}。

有機酸の CITP による分離については、Everaerts ら³⁾による各種の電解液を用いた場合の分離性状の研究や、Hoeven ら⁴⁾、あるいは、Bocek ら⁵⁾による酢酸などの揮発性有機酸及び乳酸の分離及び定量についての報告がある。また、Bocek ら⁶⁾は Krebs cycle の有機酸類の同時分離を行っているが、その定量については検討していない。

ここでは、CITP 法を用いて、不揮発性有機酸のうち、しゅう酸、フマル酸、酒石酸、くえん酸、りんご酸、こはく酸、乳酸及びアスコルビン酸の分離条件を検討し、一部の有機酸については、検量線の作成を試みたので報告する。また、りんご果汁及びみかん果汁中の有機酸の分離も試みた。

2 実 験

2・1 試 薬

しゅう酸、酒石酸、くえん酸、りんご酸、乳酸、アスコルビン酸、L-アラニン、L-ヒスチジン、アメジオール、トリス、メチルセルロース、グルタミン酸、

* 大蔵省関税中央分析所 271 千葉県松戸市岩瀬 531

** 大蔵省関税局企画課 100 東京都千代田区霞ヶ関 3-1-1

PVA 2000, アミノカプロン酸はいずれも和光純薬工業製の試薬特級を用いた。フマル酸及びこはく酸は東京化成工業製のものを用いた。

2・2 装 置

島津細管式等速電気泳動装置 : IP 1B型(島津製作所製)

電位こう配検出器 : PGD 1型(同上)

カウンターフロー装置 : CTF 1型(同上)

2・3 分析条件

泳動管 : 内径 0.57 mm × 長さ 20 cm (PTFE 製)

泳動電流 : 25 ~ 100 μ A
恒温そう温度 : 20

2・4 電解液

使用した電解液を Table 1 に示す。リーディング溶液には 0.01M の塩酸を用いたが、有機酸の移動度はリーディング溶液の pH によって変化するので⁶⁾、グルタミン酸やアラニンなどの緩衝剤を加え、pH3.1 から pH8.8 までの 5 種の pH の溶液を調製した。ターミナルイオンには易動度の遅いものを選び、一部のものは pH を調節した。これらの電解液の選択にあたっては、Everaerts らの報告^{7),8)}を参考にした。

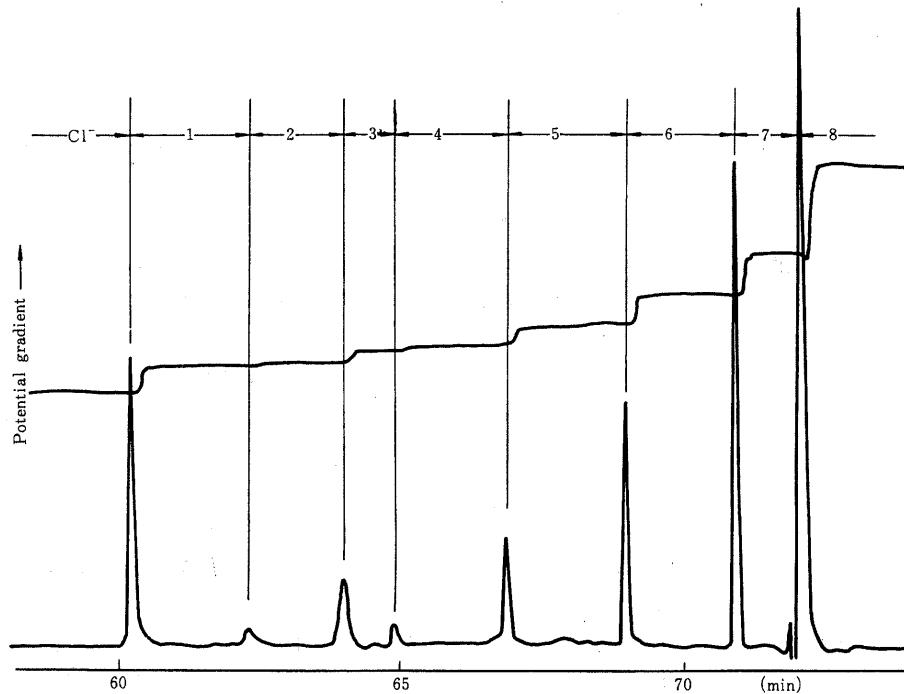


Fig. 1 Electropherogram of a mixture of some acids

1 : Fumarate, 2 : tartarate, 3 : citrate, 4 : malate, 5 : lactate
6 : succinate, 7 : ascorbate, 8 : caproate.

Electrolyte system : system 1, see Table 1. Concentration of each acid : 0.014%. Injected volume : 10 μ l. Driving current : 25 μ A.
Counter flow : 200 μ l/hr, 30 min.

Table 1 Electrolyte systems used in this study

No.	Leading electrolyte		Terminal electrolyte	
	Contents	pH	Contents	pH
1	0.01M-HCl, β -Alanine, Triton X-100	3.0	0.01M-Caproic acid	3.48
2	0.01M-HCl, L-Histidine, Triton X-100	5.1	0.01M-Glutamic acid	3.41
3	0.01M-HCl, Amediol, PVA-2000	6.0	0.01M- β -Alanine, Ba(OH) ₂	10.0
4	0.01M-HCl, Tris, Methyl cellulose	8.0	0.01M- ϵ -Aminocaprylic acid, Ba(OH) ₂	10.9
5	0.01M-HCl, Tris, Methyl cellulose	8.8	0.01M- β -Alanine, Ba(OH) ₂	9.5

Triton X 100 (0.1%), PVA 2000 (0.5%), メチルセルロース (0.5%)などの水溶性高分子は分離ゾーンをシャープにする目的で添加した⁹⁾。

3 結果及び考察

3・1 標準有機酸の分離

Fig. 1 にフマル酸、酒石酸、くえん酸、りんご酸、乳酸、こはく酸及びアスコルビン酸の 0.014% 水溶液を 10 μl 注入したときの分離図を示す。Fig. 1 では、pH 3.1 のリーディング溶液を用いているが、この条件では、各有機酸はそれぞれ異なった電位こう配(以下 PG と略記)を示し、その微分線(以下 diff.PG と略記)も明瞭である。

しゅう酸を含む標準混合溶液では、しゅう酸を単独で注入したときの PG ゾーンを示さず、乳酸が混在する場合には、乳酸に相当する PG 線が乱れを示すことから、しゅう酸と乳酸は混合ゾーンを作ることがわかった²⁾。この現象は電解液 2, 3 及び 4 を用いたときにも認められたが、電解液 5 を用いて泳動した場合には、Fig. 2 に示したように、しゅう酸及び乳酸を相互に分離することができた。

また、Fig. 1 ではカウンターフローを用いているが、フマル酸と酒石酸、くえん酸とりんご酸の PG 値は互いに接近しており、カウンターフローを用いない場合や、泳動電流 100 μA 以上では、分離ゾーンが明瞭に現われなかつた。

Table 2 に、Table 1 の電解液を用い、各有機酸を単独で注入したときの PU 値¹⁰⁾を示す。PU 値は、分離イオンの易動度の相対的大きさを、リーディングイオンとターミナルイオンを内部標準として表わしたものであり、分離したイオンの定性的指標となるもの

Table 2 PU values obtained under various conditions

Acid	Electrolyte systems (pH)	1	2	3	4	5
		(3.0)	(5.1)	(6.0)	(8.0)	(8.8)
Oxalic acid		0.06	0.12	0.09	0.04	0.01
Fumaric acid		0.15	0.24	0.25	0.21	0.05
Tartaric acid		0.16	0.25	0.26	0.23	0.05
Citric acid		0.21	0.36	0.28	0.13	0.03
Malic acid		0.24	0.34	0.28	0.27	0.05
Succinic acid		0.47	0.44	0.33	0.27	0.06
Lactic acid		0.30	0.65	0.66	0.68	0.12
Ascorbic acid		0.59	—	—	—	0.21

である。

Table 2 から分るように、PU 値はアルカリ側で非常に小さい値を示し、弱电解質である有機酸の特徴を示している。また、前述のように、PU 値が 0.01 程度の差のものは泳動条件によっては明瞭な分離ゾーンを示さない場合がある。アスコルビン酸は、電解液 2, 3 及び 4 を用いた場合、ターミナルイオンより易動度が小さく、ゾーンを全く示さなかった。

3・2 検量線

しゅう酸、フマル酸、酒石酸、りんご酸、アスコルビン酸及びこはく酸について、Table 1 の電解液を用いて検量線の作成を試みた。

各有機酸の 0.1% 水溶液を調製し、マイクロシリジを用いて、1, 2, 3, 4 及び 5 μl を 3 回ずつ注入して、100 μA で泳動させ、ゾーンの長さを測定した。ゾーンの長さは、チャート上の微分ピーク間距離をノ

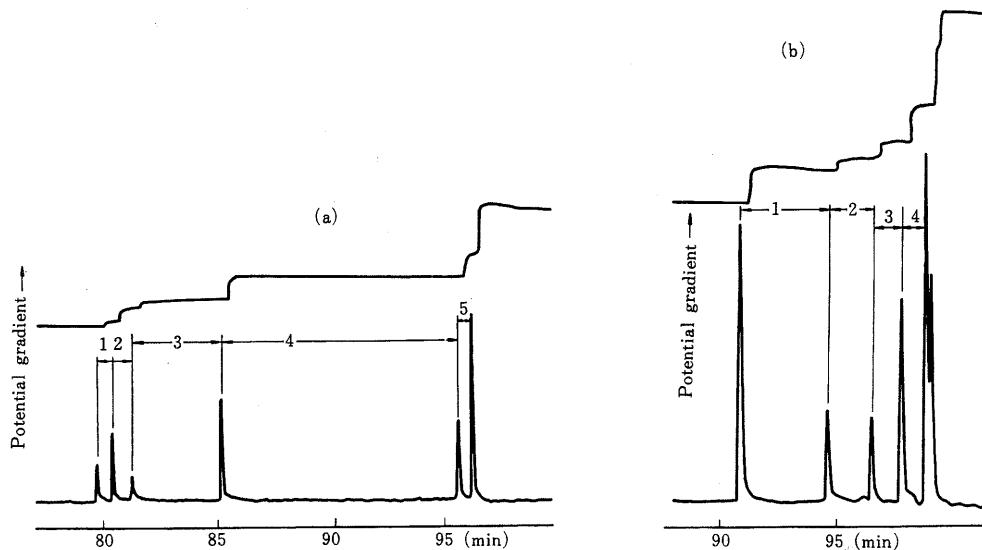


Fig. 2 Electropherograms of a mixture of some acids

(a) 1 : Oxalate, 2 : fumarate, 3 : tartarate, succinate, malate, 4 : CO_3^{2-} , 5 : lactate.

(b) 1 : Fumarate, tartarate, 2 : malate, citrate, 3 : succinate, 4 : lactate.

Electrolyte systems : (a) system 5, (b) system 3, see Table 1. Concentration of each acid : 0.2×10^{-3} mol. Injected volume : $3 \mu\ell$. Counter flow : (a) $100 \mu\ell/\text{hr}$, 30min, (b) $200 \mu\ell/\text{hr}$, 20min. Driving current : $50 \mu\text{A}$.

ギスを用いて測定した。ゾーンの長さと注入量から作成した検量線を Fig. 3 に示した。

CITP 法では試料の注入量及び試料の濃度にかかわらず、試料イオンは一定濃度に濃縮されることが、Kohlraush の式によって示され²⁾、ゾーンの長さは試料イオン量に比例するものと考えられている。

注入量とゾーンの長さとの関係を、各回帰直線について一元配置法による分散分析法を行って検討し、切片についても検定を行って Table 3 に示した。いずれの場合も F 検定値は、5 % 有意水準における F 値よりも小さく、注入量とゾーンの長さとの間には直線関係があるものと認められた。切片の t 検定値は、電解液 1 を用いた pH3.1 の条件では、5 % 有意水準の t 値より大きく、検量線は原点を通らない傾向がみられたが、他の条件では、原点を通る直線関係が得られた。

pH3.1 で原点を通る直線関係が得られないことの原因は明らかでないが、pH3.1 のように pH の低い溶液

中では、有機酸の解離が抑えられ、注入した有機酸のすべてがイオンとして挙動しないことが考えられる。

一方、回帰からの偏差は、注入量 $3 \mu\text{g}$ に対して、変動係数として 3 ~ 5 % であり、同じ注入量における繰り返し精度の変動係数は 1 ~ 2 % であった。

以上の結果から、リーディング溶液が pH3.1 の条件下では、良好な検量線は得られないが、他の条件では、原点を通る検量線を得ることができた。

3・3 果汁の分析

Fig. 4 及び Fig. 5 に、みかん果汁及びりんご果汁の有機酸を分離した図を示した。それぞれの果汁は市販の果実の果汁を、遠心分離してパルプ質を除去したのち、水で 4 倍に希釈して検体とした。

みかん果汁の有機酸は 10 本のゾーン、りんごの場合は 7 本のゾーンが観察される。多量成分は、みかんでは、くえん酸、りんごではりんご酸であり、これらの

報文 細管式等速電気泳動法による不揮発性有機酸の分析

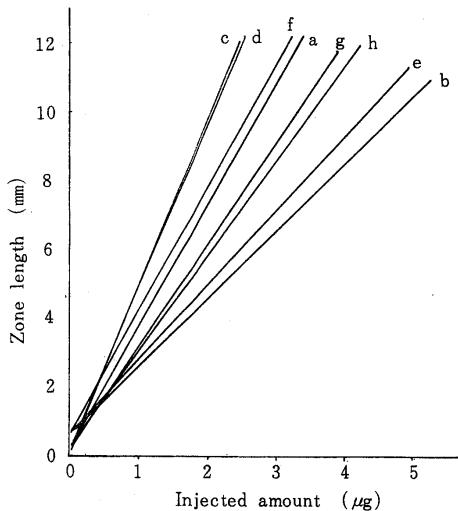


Fig. 3 Calibration curves

a~h are the same as cited in Table 3.

Electrolyte system: see Table 1.

Chart speed: 100 mm/min. Driving current: 100 μA.

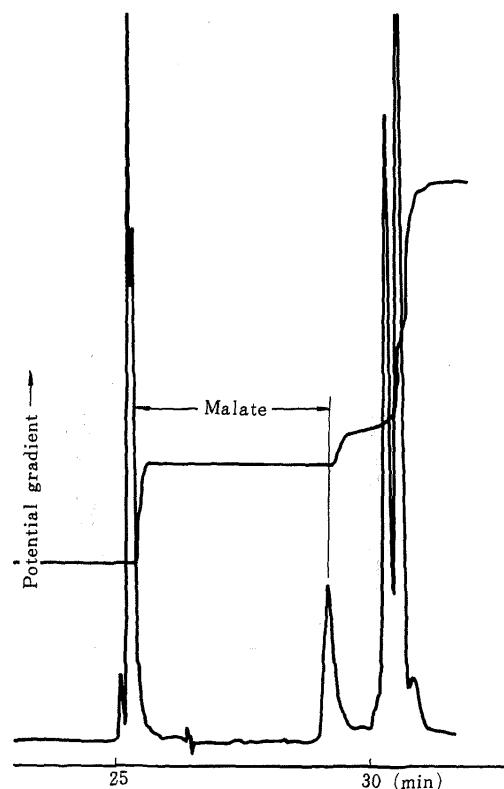


Fig. 4 Electropherogram of apple juice

Fresh apple juice was diluted four times with water. Electrolyte: system 1, see Table 1.

Driving current: 50 μA. Counter flow: 200 μl/hr, 20 min. Injected volume: 10 μl.

Table 3 Test of regression lines

No.	Acid	E. system*	Regression line	σ	r **	F-test***	t-test****
a	Citric acid	5 (pH 8.8)	$Y = 3.5833X \times 0.2150$	0.533	0.99456	1.25	1.10
b	〃	1 (3.1)	$Y = 1.9830X \times 0.6300$	0.259	0.99861	1.12	6.71
c	Fumaric acid	5 (8.8)	$Y = 4.9250X \times 0.0917$	0.692	0.99575	1.76	0.36
d	Oxalic acid	4 (8.0)	$Y = 4.6850X \times 0.4417$	0.738	0.99466	1.92	1.63
e	Ascorbic acid	1 (3.1)	$Y = 2.1767X \times 0.7300$	0.278	0.99468	0.49	7.16
f	Succinic acid	1 (3.1)	$Y = 3.5833X \times 0.6617$	0.264	0.99800	0.59	6.84
g	Malic acid	2 (5.0)	$Y = 3.0350X \times 0.0655$	0.243	0.99851	0.33	0.73
h	Tartaric acid	3 (6.0)	$Y = 3.4013X \times 0.0765$	0.263	0.99671	0.49	0.51

* Electrolyte system, see Table 1, ** Coefficient of correlation,

*** $F_{10}^3 = 3.71$ ($P = 0.05$), **** $t_a = a/\sigma_a$, $t_0 (10; 0.05) = 2.23$

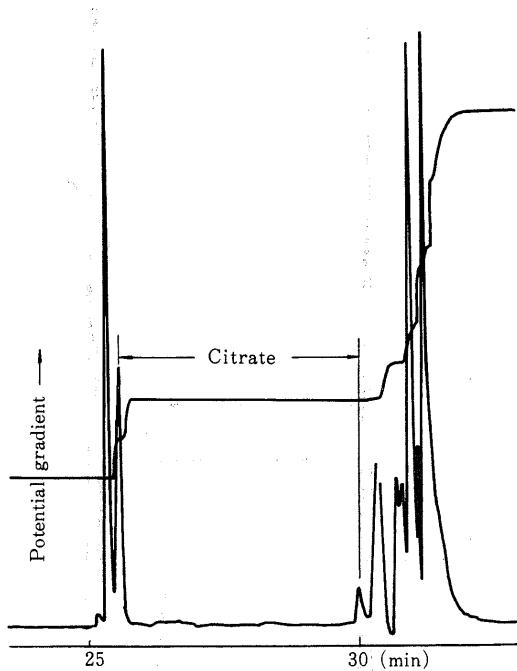


Fig. 5 Electropherogram of orange (unshu) juice

Fresh orange juice was diluted four times with water.

Electrolyte : system 1, see Table 1. Driving

current : 50 μ A. Counter flow : 200 μ l/hr.

Injected volume : 10 μ l.

等速電気泳動図のゾーン幅から、検量線を用いて、各有机酸の含有量を知ることができるが、泳動図のパターンを比較することによって、未知果汁の原料の推定、あるいは、醸酵を行った果汁か否かの判別の可能性もある。

4 総 括

等速電気泳動法を用いて、不揮発性有機酸の分離条件、定量条件の検討を行った。混合有機酸の同時分離には、リーディング溶液として 0.01M 塩酸 (pH3.1), ターミナル溶液として 0.01M カプロン酸を用いて、良好な分離を行うことができた。各種の電解液を用いて、注入量とゾーン幅から検量線を作成し、一部のものを除いて、良好な直線関係が得られ、実際試料の分離定量に応用できることを示した。

文 献

- 1) F.M.Everaerts : *J. Chromatogr.*, **91**, 823 (1974).
- 2) 宮崎浩, 加藤和夫 : 第1回島津細管式等速電気泳動講座(応用編), (1977).
- 3) F.M.Everaerts, J.L.Beckers and Th.P.E.M.Verhagen : *J. Chromatogr. Library*, Vol.6, (1976).
- 4) J.S. van der Hoeven, H.C.M.Franken, P.J.M.Camp and C.W.Dellebarre : *Appl. Environ Microbiol.*, **35**, 17 (1978).
- 5) P.Bocek, S.Povelk, K.Grigelova, M.Deml and J.Janak : *J. Chromatogr.*, **154**, 356 (1978).
- 6) P.Bocek, K.Lekova, M.Deml and J.Janak : *J. Chromatogr.*, **117**, 97 (1976).
- 7) F.M.Everaerts and Th.P.E.M.Verhagen : *J. Chromatogr.*, **91**, 837 (1974).
- 8) F.M.Everaerts, M.Geurts, F.E.D.M.mickers and Th.P.E.M.Verhagen : *J. Chromatogr.*, **119**, 129 (1976).
- 9) 塩見恭代, 秋山純一 : 分析化学, **26**, 697 (1977).
- 10) H.Miyazaki and K.Katho : *J. Chromatogr.*, **119**, 369 (1976).

Analysis of Unvolatile Organic Acids by Capillary Tube Isotachophoresis

Shozo KAWABATA* and Mitsuo DEKI**

* Central Customs Laboratory, Ministry of Finance,
531, Iwase, Matsudo - shi, Chiba - ken, 271 Japan

** Planning and Duty Section of Customs and Tariff Bureau, Ministry of Finance,
3 - 1 - 1, Kasumigaseki, Chiyoda - ku, Tokyo, 100 Japan

By the technique of capillary tube isotachophoresis, the simultaneous separation of unvolatile organic acids was investigated.

The apparatus used in this investigation was the Shimadzu IP - 1B isotachophoretic analyser, equipped with a PGD - 1 potential gradient detector and a counter flow attachment. The analysis was performed in a 20 cm Teflon tube with 0.57 mm I.D. The tube was kept at a constant temperature of 20 °C.

The leading electrolytes used were five solutions of 0.01M - HC1 buffered at pH 3.1, 5.0, 6.0, 8.0 and 8.8. The terminal electrolytes used were 0.01M - caproic acid, 0.01M - glutamic acid, 0.01M - - alanine and 0.01M - - aminocaproic acid. Triton X - 100 (0.1%), PVA - 200, or methyl cellulose were added to the leading electrolyte to sharpen zone boundaries.

The PU values of eight unvolatile acids, namely, fumaric acid, oxalic acid, ascorbic acid, tartaric acid, malic acid, succinic acid, citric acid and lactic acid, were measured under the various conditions of the above electrolytes.

These acids were separated simultaneously by the use of pH 3.1 leading electrolyte, except oxalic acid and lactic acid could not be separated by the use of pH 3.1 leading electrolyte. However, oxalic acid and lactic acid could be separated by the use of pH 8.8 leading electrolyte.

The calibration lines for amount of acid vs. the lengths their zones were examined. The lines were satisfactorily linear. The deviation in the slope of the lines was less than 5 %.

The acids in the lemon juice and the orange juice were analysed satisfactorily.

Received Aug. 31, 1978