

キャピラリー電気泳動による酢酸・塩分の同時定量分析

廣瀬 達也*，隅野 隆永*，井上 純*

Simultaneous Determination of Acetic Acid and Salinity by Capillary Electrophoresis

Tatsuya HIROSE*, Takanaga SUMINO*, and Jun INOUE*

*Osaka Customs Laboratory

4-10-3, Chikko, Minato-ku, Osaka 552-0021 Japan

At present in Customs laboratories, the acetic acid of ginger and Japanese apricots (ume) respectively preserved with salt or in salt water are determined by means of gas chromatography (GC) and high performance liquid chromatography (HPLC), and the salinity is determined by means of ion chromatography (IC) and Mohr's method. In recent years, food analysis techniques using capillary electrophoretic (CE) instruments have progressed significantly, and determination accuracy has been greatly improved. Basic Anion Buffer (produced by Agilent Technologies) has also been developed as an electrophoretic fluid that allows simultaneous analysis of inorganic anions, organic acids, amino acids and saccharides. So, the acetic acid contents and salinities in ginger and Japanese apricots preserved with salt or in salt water were simultaneously analyzed using CE. This paper reports the results.

1. 緒 言

塩蔵・塩水漬けのしょうがや梅は、紅しょうがや梅干の原料等として多く輸入されているが、酢酸により調製されているもの多く見受けられ、その分類については、塩分及び酢酸含有率により、実行関税率表上異なるものとなる。

塩蔵・塩水漬けのしょうがについては、酢酸含有率が、0.5%以上であれば塩分に関係なく、実行関税率表税番第2001.90号-250に分類されるが、酢酸含有率が0.5%未満の場合は塩分により分類されることとなり、塩分13%以上であれば、税番第0910.10号-100に、塩分13%未満の場合には、小売り用の容器入りか否かで税番第0910.10号-210または0910.10号-239に分類される。

また、塩蔵・塩水漬けの梅については、酢酸含有率が、0.5%以上であれば塩分に関係なく、実行関税率表税番第2001.90号-290に分類されるが、酢酸含有率が0.5%未満の場合は塩分により分類されることとなり、塩分15%超であれば、税番第0812.90号-490に、塩分15%以下の場合には、税番第0809.40号-000に分類され、それぞれに税率格差が生じることとなる。

現在、税関分析においては、酢酸の定量法としてガスクロマトグラフィー（以下 GC と略記する）法や高速液体クロマトグ

ラフィー（以下HPLCと略記する）法が採用されているが、何れの方法も1検体につき約40分の分析時間を必要とし、迅速な方法とは言い難い面を有している。また、塩分の定量については、モール法や自動電位差滴定法が採用されているが、モール法は塩化物イオン以外のハロゲンの存在による影響を受ける他、滴定終了の判断に個人差を有する為に個人的誤差が大きいことが知られており、自動電位差滴定法については、自動化され、時間短縮効果は大きいが、モール法同様に塩化銀を含む廃液の処理問題が残されている（モール法ではさらにその廃液はクロムを含有する）。

ところで、キャピラリー電気泳動（以下 CE と略記する）による分析技術は、近年著しい発展が見られ、定量性も向上している。無機陰イオン・有機酸・アミノ酸・糖類の一斉分析が可能な泳動液である Basic Anion Buffer（Agilent Technologies 社製）（以下 BAB と略記する）のようなものも開発された。^{1,2)}

CE は使用する泳動液量も少量で、有害廃液も出ないか若しくは極少量と考えられるなど、現行法と比較してその利点は多い。そこで今回、塩蔵・塩水漬けのしょうがや梅中の酢酸及び塩分の同時定量分析について、CE による検討を行い、良好な結果がえられたので報告する。

* 大阪税関業務部 〒552-0021 大阪府大阪市港区築港4-10-3

2. 実験

2.1 分析試料

塩水漬けしょうが輸入品
塩水漬け梅輸入品

2.2 試薬

塩化ナトリウム（和光純薬・容量分析用標準）
酢酸（キシダ化学・非水滴定用）
0.1N 硝酸銀水溶液（キシダ化学・容量分析用）
アジピン酸、マレイン酸、マロン酸、クエン酸、ほう酸、リンゴ酸（キング化学・特級）
乳酸、磷酸、酒石酸、フッ化ナトリウム、硝酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、臭化カリウム（キシダ化学・1級）
プロピオン酸（東京化成・特級）

2.3 分析装置及び測定条件

2.3.1 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）装置

装置：LC10システム（島津製作所製）
カラム：Shim-pack SCR-102H 8mmI.D. × 300mm
移動相：過塩素酸酸性水溶液
(HPLC 用蒸留水31に60%過塩素酸を6ml 添加)
流量：0.5ml/min
カラム温度：50
検出器：UV 検出器
検出波長：210nm

2.3.2 キャピラリー電気泳動（CE）装置

装置：HP3D CE（Hewlett Packard 社製）
キャピラリー：Fused Silica 50 μmI.D. × 72cm
泳動液：Organic Acids Buffer (Agilent Technologies 社製)
Basic Anion Buffer (Agilent Technologies 社製)
試料注入法：加圧法（50mbar, 4sec）
印可電圧：25kv ネガティブ
キャピラリー温度：20
検出器：Diode - array（紫外吸収検出器）
検出波長：190nm ~ 600nm

2.4 実験方法

2.4.1 CE の泳動液及び検出波長の検討

今回使用した CE 装置には、幾つかの標準分析キットが用意されているが、塩化物イオン、酢酸イオンの何れの陰イオンをも分離可能な泳動液として、Organic Acids Buffer（以下 OAB と略記する）、BAB の 2 種類の泳動液を使用して幾つかの既知濃度の酢酸・塩化ナトリウム混合水溶液の分析を行い、その分離性能等について比較検討した。これら 2 種類の泳動液には、何れにも紫外吸収を持つ物質が添加されており、塩化物イオンのように本来紫外吸収を持たないイオンを負のピークとして検出するものである。

2.4.2 CE による分析可能濃度の検討

幾つかの既知濃度の酢酸・塩化ナトリウム混合水溶液の分析を行って、分析可能な濃度範囲について検討するとともに、定

量の為の適当なサンプル重量及び希釈率について検討した。

2.4.3 CE による定量のための内部標準物質の検討

CE による定量において内部標準法（以下 ISTD 法と略記する）に使用するために適した内部標準物質（以下 IS 物質と略記する）の選択を行った。

2.4.4 既知濃度標準水溶液の酢酸及び塩分の定量

幾つかの既知濃度の酢酸・塩化ナトリウム混合水溶液（IS 物質を添加したもの）の分析を行い、CE による絶対検量線法（以下 ESTD 法と略記する）及び ISTD 法での定量結果と従来法による定量結果との比較検討を行った。定量の検討における繰返し回数はすべて 9 回である（n=9）。

2.4.5 実サンプル中の酢酸及び塩分の定量

実際のサンプルを分析し、CE による ESTD 法、CE による ISTD 法、従来法の各定量結果について比較検討を行った。定量の検討における繰返し回数はすべて 9 回である（n=9）。

3. 結果及び考察

3.1 CE の泳動液及び検出波長の検討

既知濃度の酢酸・塩化ナトリウム混合水溶液（各 100ppm 含有）を、OAB を使用して分析したところ、測定波長 190nm ~ 600nm のうち、塩化物イオン、酢酸イオンによるピークが見られるのは 200nm ~ 300nm で、幾つかの吸収帯でのエレクトロフェログラムを Fig.1 に示す。酢酸イオンのピーク形状は良好であるが、塩化物イオンのピーク形状が不良である。さらに 10 倍希釈した溶液について分析したものも同様のピーク形状であり、良好なピーク形状は得られなかった。その他に、各 500ppm 含有するものや各 1000ppm 含有するものについても分析してみたが、それらでは、酢酸イオン、塩化物イオンの何れもピークの先割れ等、ピーク形状不良となり、分析不可能なことから、OAB は、今回の分析には適さないと考えられた。

そこで、BAB による分析を試みた。幾つかの糖類（ぶどう糖、ショ糖、乳糖、ソルビトール）を含んだ既知濃度の酢酸・塩化ナトリウム混合水溶液（各 1000ppm 含有）を分析した結果を Fig.2 に示す。この泳動液は、糖分析用のものであるが、塩化物イオン、酢酸イオン、糖類がうまく分離されている。塩化物イオン、酢酸イオンによるピークが見られるのは 200nm ~ 300nm で、210nm 付近及び 270nm 付近の 2箇所で強いピークがみられた。糖分析用キットの使用説明書³⁾では、Signal=350/20nm、Reference=275/10nm（以下 波長条件 1 とする）を検出波長として使用することと記載されているが、より大きいピークの見られる 210nm 付近を用いることの可否検討のため、Signal=350/20nm、Reference=210/10nm（以下 波長条件 2 とする）についても検出波長として用いることとした。Fig. 3 は、両検出波長条件によるエレクトロフェログラムであるが、どちらの条件でも、ピーク形状や分離は良好であった。

3.2 CE による分析可能濃度の検討（波長条件 1 を使用）

実際の塩蔵・塩水漬のしょうがや梅の輸入サンプルの分析を想定してみると、酢酸を 0.5%，塩分を 15% 含有するサンプル 5g を採取して 200ml に定容したものを検液としたと仮定して、そ

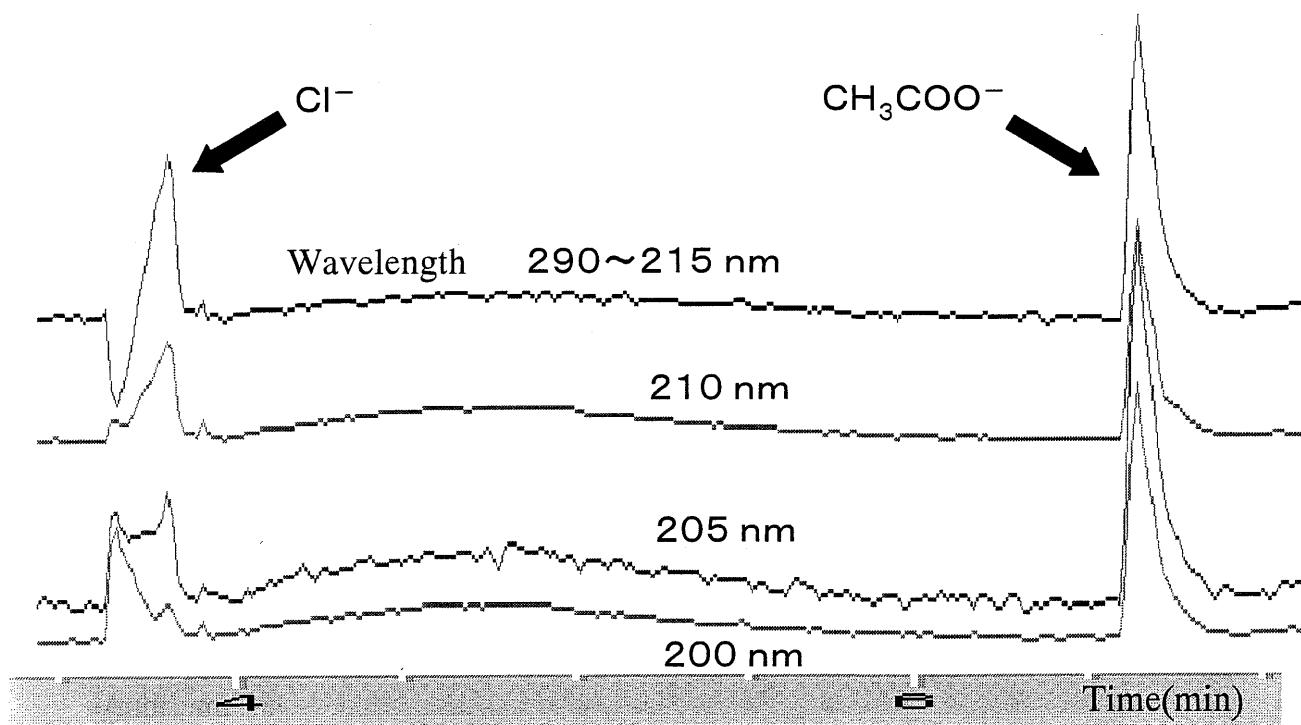


Fig. 1 Electropherograms of standard solution by CE using OAB
100 ppm each as contents of NaCl and CH_3COOH

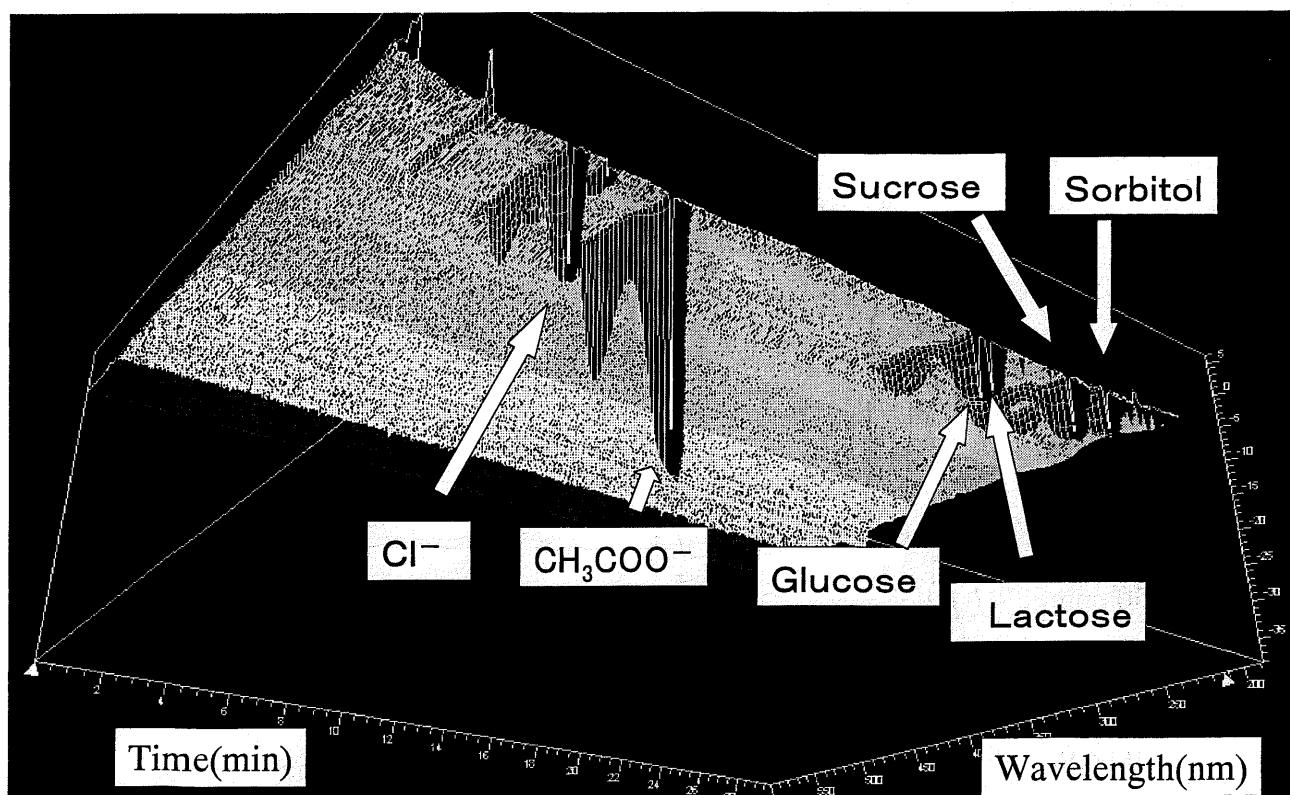


Fig. 2 3-D Electropherograms of standard solution by CE using BAB
1000 ppm each as contents of NaCl, CH_3COOH and saccharides

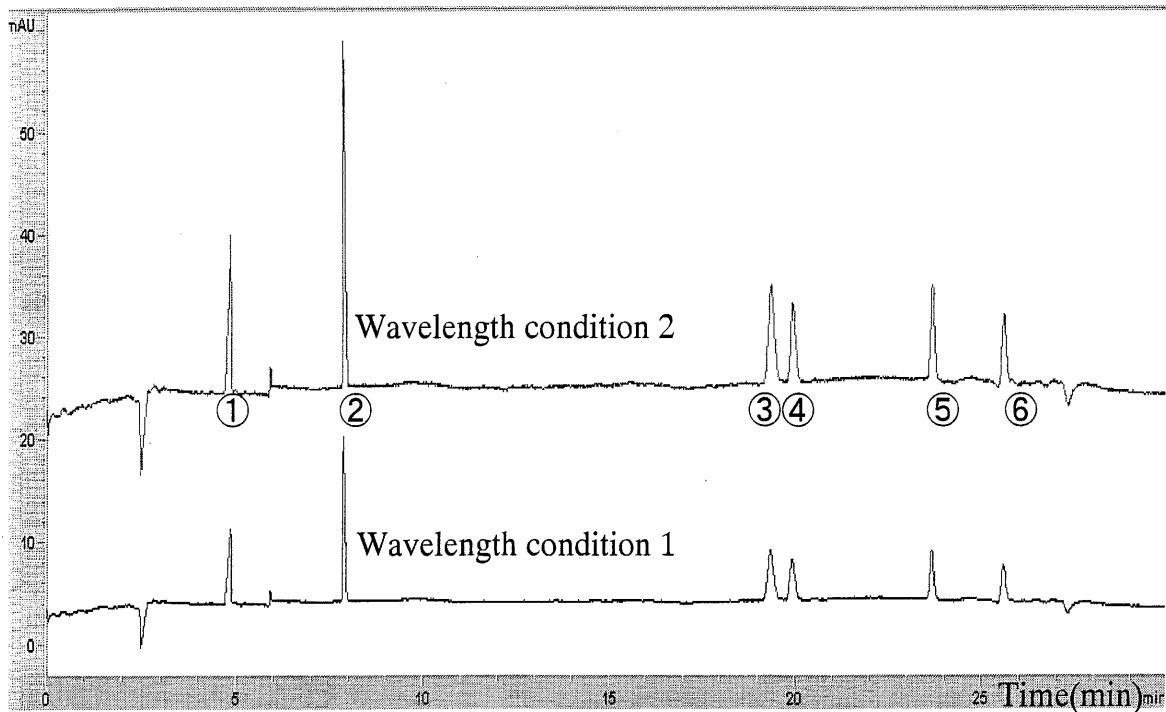


Fig. 3 Electropherograms of standard solution by CE using BAB
 Cl CH₃COO Glucose Lactose Sucrose Solbitol

の検液中の酢酸濃度は125ppm、塩分は3750ppmとなる。BABを使用した定量分析において、これらの濃度で分析可能か検討するため、既知濃度の酢酸・塩化ナトリウム混合水溶液（濃度比1:0.1）による分析を行った結果をFig.4に示す。塩分300ppm(1.2%)から7500ppm(30%)まで、酢酸30ppm(0.12%)か

ら750ppm(3%)までの範囲でピーク形状に特段問題はなく、従って上記調製法で良いものと考えられる（ppm表示横の括弧書き%数字は上記サンプル調製をした場合の各々の含有率%を表す）。

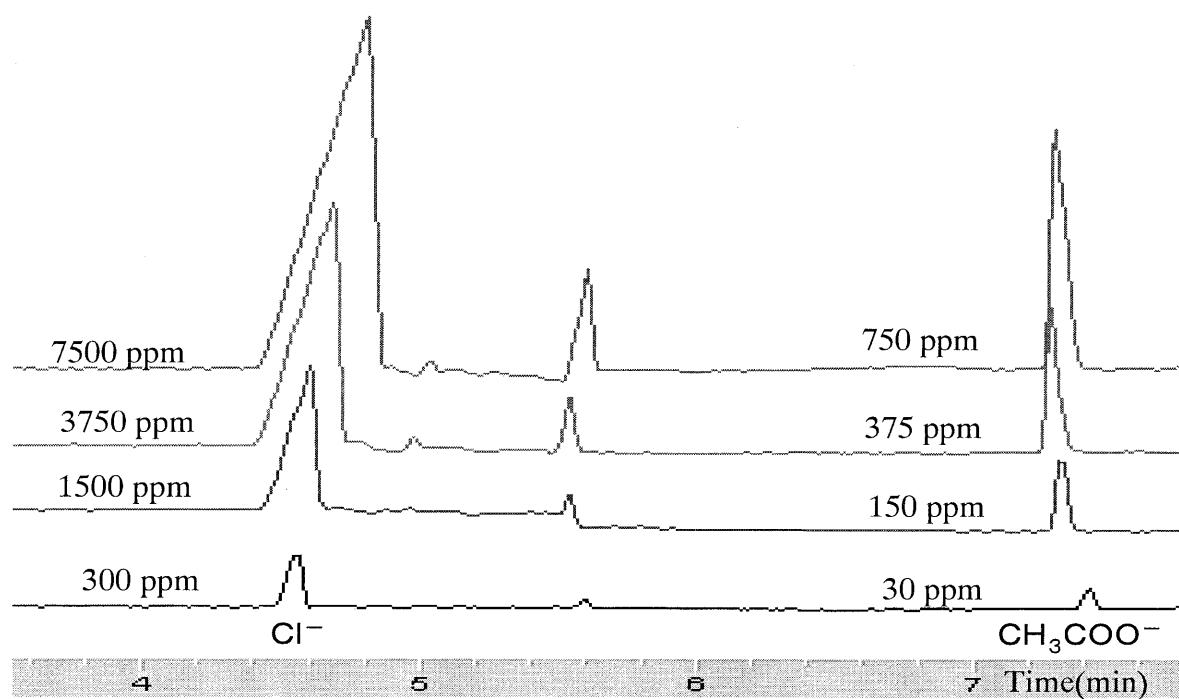


Fig. 4 Electropherograms of standard solution by CE using BAB

3.3 CEによる定量のためのIS物質の検討

IS物質の候補として、16種類の水溶性物質（アジピン酸、マレイン酸、マロン酸、クエン酸、硼酸、リンゴ酸、乳酸、焼酸、酒石酸、弗化ナトリウム、硝酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、臭化カリウム、プロピオン酸）を水に溶かして200ppmとし、波長条件1を検出波長として分析した結果をFig.5に示す。また、Fig.6は、塩水漬けしょうが輸入品及び塩水漬け梅輸入品の分析結果と一部のものに

ついて比較したものである。その結果、塩水漬けしょうが輸入品及び塩水漬け梅輸入品に見られるピークと重ならず、且つピーク形状のよいものとして、アジピン酸をIS物質として選択、使用することとした。

Fig.7は、波長条件1、波長条件2でのアジピン酸の分析結果であるが、どちらでも、ピーク形状は良好である。

また、その濃度は、3.1.2で記載したサンプル調製による酢酸濃度よりもやや濃い程度の200ppmとした。

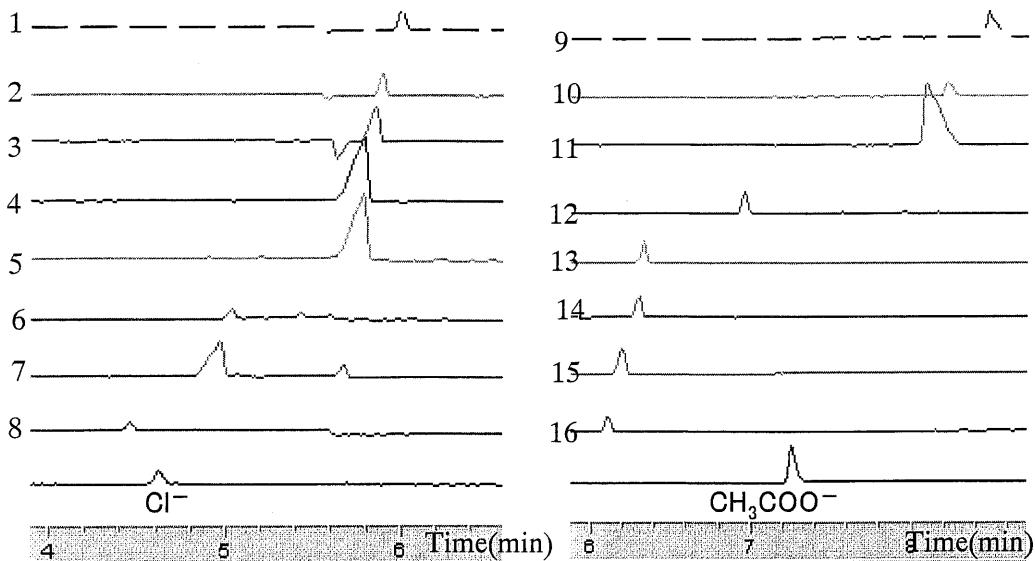


Fig. 5 Electropherograms of standard solution by CE using BAB Examination of the IS material (each 200 ppm solution)
 1.Maleate 2. F^- (NaF) 3.Malate 4. SO_4^{2-} (Na_2SO_4) 5. CO_3^{2-} (Na_2CO_3) 6. SO_3^{2-} (Na_2SO_3) 7. NO_3^- (NaNO_3) 8. Br^- (KBr)
 9.Borate 10.Lactate 11.Propionate 12.Adipate 13.Malonate 14.Tartarate 15.Phosphate 16.Citrate

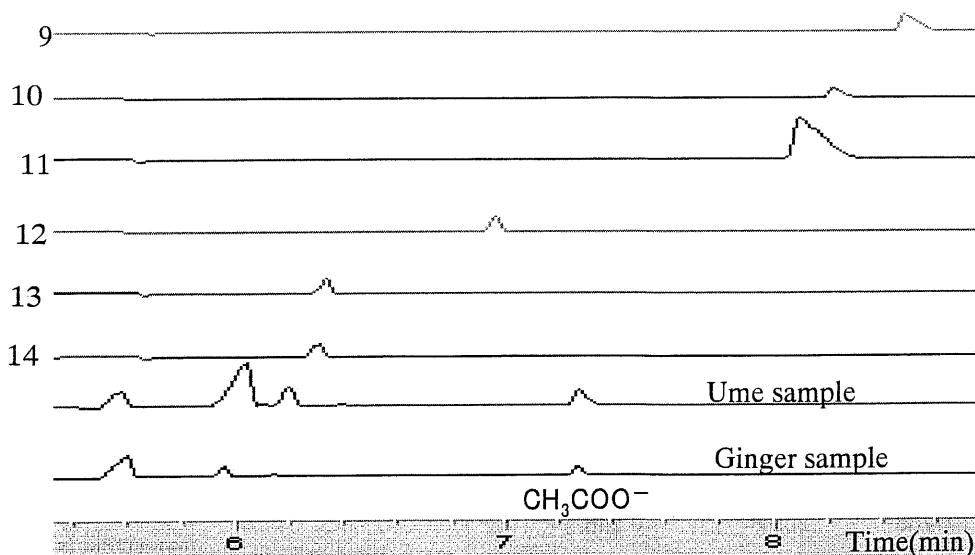


Fig. 6 Electropherograms of standard solutions by CE using BAB Comparison of some IS materials and samples
 9.Borate 10.Lactate 11.Propionate 12.Adipate 13.Malonate 14.Tartarate

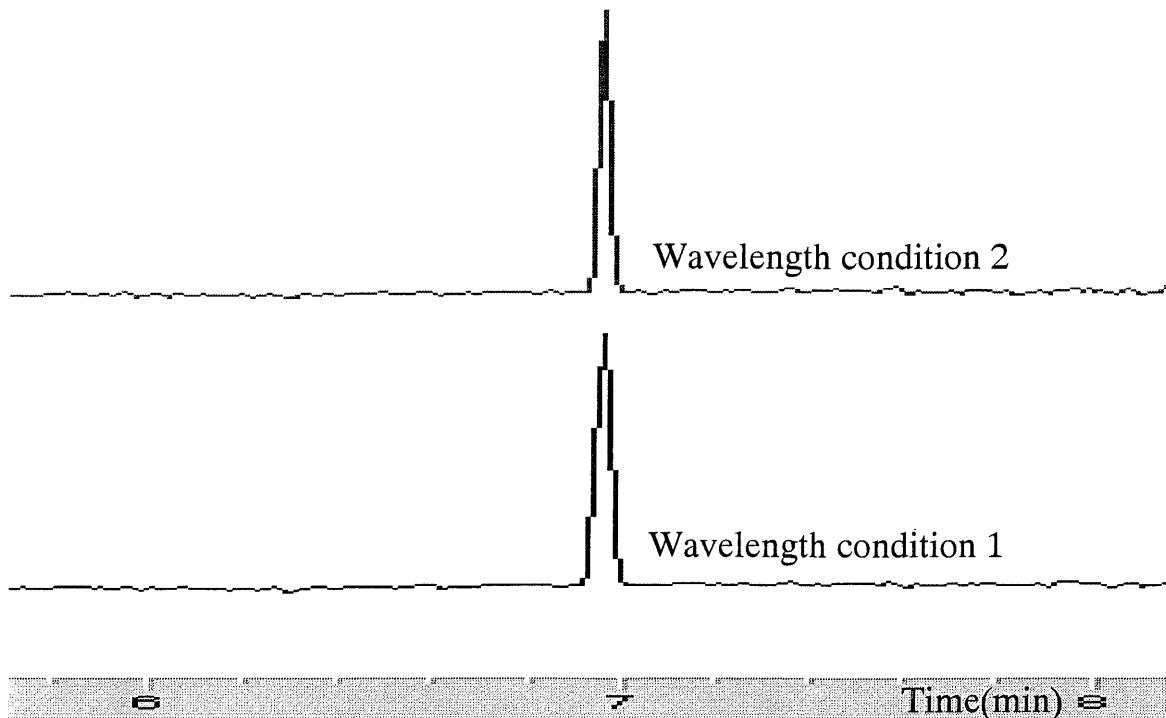


Fig. 7 Electropherograms of Adipate by CE using BAB (200 ppm solution)

3.4 既知濃度標準水溶液の酢酸及び塩分の定量

従来の HPLC による酢酸の定量 (ESTD 法) 結果を Table 1 に、その検量線を Fig.8 に示す。分析条件は 2.3.1 に記載したとおりである。変動係数が 0.2% から 0.4% 位までと、非常に良好な繰返し精度が得られ、またその検量線の直線性も高いものである。そして Table 2 は、従来行っているモール法による塩分の定量結果である。繰返し精度は、変動係数が 1.2% から 1.7% と良好である。

次に、CE による分析結果であるが、Table 3 は酢酸の定量結果であり、Table 4 は塩分の定量結果である。何れにおいても、波長条件 2 の場合、定量法にかかわらず低濃度の定量において操作における変動係数が数 % 以上と大きくなり、定量には不適切であることがわかる。

Table 1 Determination results of standard acetate solution by HPLC (ESTD) method

concentration (ppm)	area average	standard deviation	coefficient of variation(%)
785	526009	1613	0.307
392.5	262654	742.9	0.283
157	104733	259.8	0.248
31.4	20688.0	53.81	0.260

波長条件 1 における酢酸の定量については、従来の HPLC 法のように変動係数 1% 以下の繰返し精度を求めるに ESTD 法は、変動係数が 1.2% から 1.7% であることから除外されることとなり、ISTD 法が適切となる。Fig.9 は波長条件 1 での ISTD 法による検量線であるが、良好な直線性が得られている。

また、波長条件 1 における塩分の定量については、ESTD 法では、従来のモール法とよく似た変動係数範囲であり、ISTD 法では、変動係数が 0.7% から 1.2% とほぼ良好な結果となった。Fig.10 は波長条件 1 での ISTD 法による検量線であるが、良好な直線性が得られている。

従って、両成分の定量は、波長条件 1 による ISTD 法 (IS としてアジピン酸を使用) によることが適切との結果が得られた。

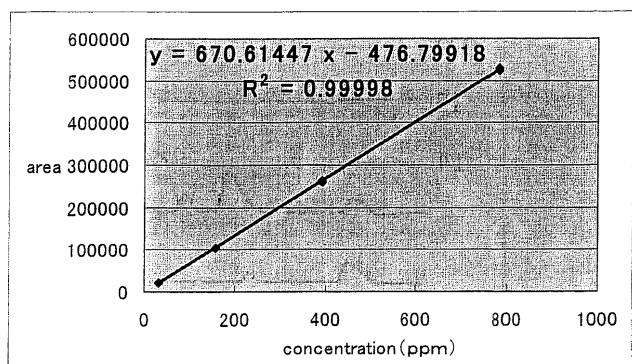


Fig. 8 Calibration curve of standard acetate solutions by HPLC (ESTD) method

Table 2 Determination results of standard NaCl solutions by Mohr's method

concentration (ppm)	quantitative result(ppm)	standard deviation	coefficient of variation(%)
7510	7556.1	97.05	1.284
3755	3765.7	57.64	1.531
1502	1529.2	24.71	1.616
300.4	319.7	4.744	1.484

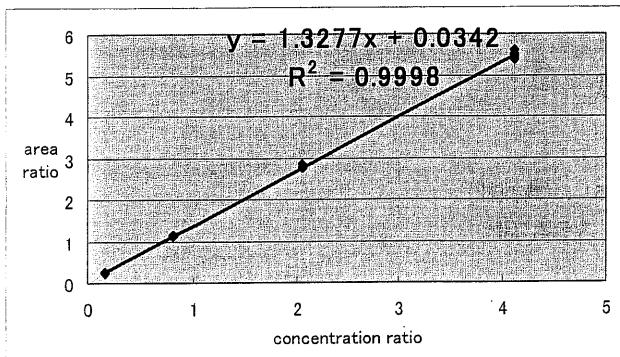


Fig.9 Calibration curve of standard acetate solution by CE method using BAB(wavelength condition 1,ISTD method)

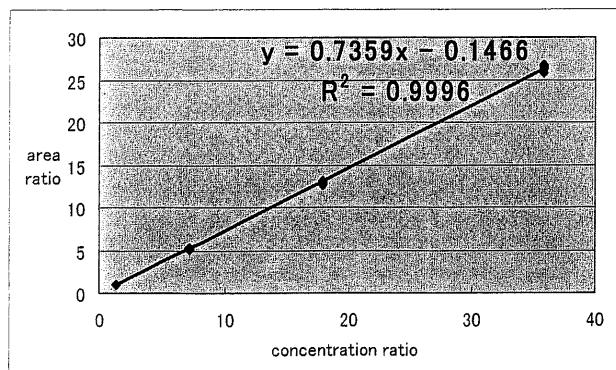


Fig.10 Calibration curve of standard NaCl solutions by CE method using BAB(wavelength condition 1,ISTD method)

3.5 実サンプル中の酢酸及び塩分の定量

ここまで実験結果から、CEによる酢酸及び塩分の同時定量分析について、BABを用いた波長条件1によるISTD法（ISとしてアジピン酸を使用）が適切であると考えられる。そこで、実際の塩水漬けしょうが輸入品、塩水漬け梅輸入品の分析を行い、従来法と比較した。サンプル採取量については3.1.2で検討したように、おろし金ですりおろしたものを5gとり、IS物質を200ppmになるように加えて200mlに定容、その後一晩放置し

Table 3 Determination results of standard acetate solutions by CE method using BAB

method	concentration (ppm)	standard deviation		coefficient of variation	
		wavelength condition 2	wavelength condition 1	wavelength condition 2	wavelength condition 1
ESTD	862.8	1.987	0.762	1.738 %	1.350 %
	431.4	0.806	0.444	1.487 %	1.611 %
	172.3	0.573	0.138	2.532 %	1.218 %
	34.5	0.203	0.031	4.269 %	1.286 %
ISTD	862.8	0.098	0.053	1.761 %	0.960 %
	431.4	0.028	0.025	0.986 %	0.887 %
	172.3	0.028	0.010	2.360 %	0.882 %
	34.5	0.011	0.002	4.250 %	0.784 %

Table 4 Determination results of standard NaCl solutions by CE method using BAB

method	concentration (ppm)	standard deviation		coefficient of variation	
		wavelength condition 2	wavelength condition 1	wavelength condition 2	wavelength condition 1
ESTD	7522	10.20	3.796	1.877 %	1.402 %
	3761	4.114	1.579	1.626 %	1.240 %
	1504	3.043	0.675	3.042 %	1.311 %
	300.9	0.853	0.140	4.325 %	1.386 %
ISTD	7522	0.437	0.299	1.651 %	1.137 %
	3761	0.177	0.101	1.327 %	0.786 %
	1504	0.106	0.041	2.064 %	0.800 %
	300.9	0.034	0.009	3.245 %	0.875 %

たものをろ過し、そのろ液を検体として分析を行った。

各5検体分析し、その結果をTable 5 及びTable 6 に示す。従来法と比べて 酢酸含有率及び塩分の定量値に特に大きな差は見られず 繰返し精度も従来法同様若しくはそれ以上に良い結果が得られた。

Table 5 Determination results of salted ginger

sample	concentration of acetate (coefficient of variation %)		concentration of Nacl (coefficient of variation %)	
	HPLC method	CE method	Mohr's method	CE method
a	0.295 % (0.471)	0.295 % (0.895)	25.20 % (1.960)	25.24 % (0.691)
	(0.710)	(0.770)	(1.476)	(0.974)
b	0.363 % (0.569)	0.365 % (1.046)	23.18 % (1.345)	23.20 % (1.048)
	(0.184 % (0.644)	0.185 % (0.644)	16.24 % (1.697)	16.26 % (0.577)
d	0.173 % (0.644)	0.171 % (0.644)	18.33 % (1.697)	18.27 % (0.577)
	not contain	not contain	22.95 % (1.353)	22.92 % (0.424)

Table 6 Determination results of salted ume

sample	concentration of acetate (coefficient of variation %)		concentration of NaCl (coefficient of variation %)	
	HPLC method	CE method	Mohr's method	CE method
a	0.361 % (0.717)	0.365 % (0.989)	21.86 % (1.644)	21.83 % (0.667)
b	0.535 % (0.457)	0.534 % (0.930)	19.31 % (1.788)	19.23 % (0.964)
c	0.356 % (0.497)	0.356 % (0.796)	19.35 % (1.987)	19.06 % (0.784)
d	0.519 % (0.664)	0.518 % (0.813)	23.07 % (1.799)	23.07 % (0.968)
e	0.453 % (0.837)	0.451 % (1.062)	28.17 % (1.157)	27.99 % (0.924)

4. 要 約

塩水漬けのしょうがや梅に含まれている酢酸及び塩分の定量において、従来の分析法と CE を使用した分析法を比較した場合、CE での分析条件を、BAB を用いた波長条件1による ISTD 法 (IS としてアジピン酸を使用)とした時、塩分の定量については、従来のモール法以上の定量性が得られ、酢酸の定量についても、従来の HPLC による ESTD 法とほぼ同様の定量性が得られるなど良好な結果となった。

また、両成分の同時定量が可能、分析時間が短縮される、有害廃液(クロム、銀イオン含有廃液)もでないなど、有用性が確認された。

文 献

- 1) T.Soga, G.Ross : *J.Chromatogr.A*, 837, 231 (1999)
- 2) 本田進、寺部茂：“キャピラリー電気泳動 基礎と実際”，P.82 (1995), (講談社)
- 3) キャピラリー電気泳動用糖分析取扱説明書 (横河アナリティカルシステムズ(株))