

塩蔵しょうがにおける酢酸の定量分析法

斎藤 義和*, 河嶋 優美*, 松本 啓嗣*, 山崎 幸彦*

Quantitative analysis for acetic acid in salted ginger and ginger preserved in brine

Yoshikazu SAITO*, Yuumi KAWASHIMA*,
Yoshitsugu MATSUMOTO* and Yukihiko YAMAZAKI*

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

Salted ginger and ginger preserved in brine are classified in different HS codes, depending on the content of acetic acid. In this study, we pickled ginger samples in various seasoning liquids of known acetic acid content for a certain period, and determined the contents of acetic acid both in the seasoning liquids and in the ginger samples, by the following three methods: A) high-performance liquid chromatography (HPLC) using an ion-exclusion column with o-phthalic acid as internal standard, B) gas chromatography (GC) using a capillary column with 1-pentyl alcohol as internal standard, after methanol extraction of acetic acid, and C) enzymatic method using an acetic acid assay kit. We calculated the recoveries of acetic acid from the seasoning liquids under various analytical conditions, and also compared the acetic acid contents in the seasoning liquids and in the ginger samples. As a result, the HPLC method and the enzymatic method showed better recoveries than the GC method, in the determination of the acetic acid content in the seasoning liquid. For determining the acetic acid content in the ginger samples, the HPLC method was the most stable in the three methods.

1. 緒 言

塩蔵しょうがについては、国内分類例規 0910.10 又は 2001.90「塩蔵（塩水漬）しょうがの関税分類」の規定により、酢酸の含有量が全重量の 0.5%以上のものは関税率表第 20.01 項に分類され、0.5%未満の場合一時的な保存処理をしたものは第 09.10 項に、その他の調製をしたものは第 20.08 項に分類され、税率格差が生じることとなる。

税関における塩蔵しょうが中の酢酸の定量分析には、①塩蔵しょうが中の酢酸を水で抽出したあと内標準物質として 1-ペンタノールを加え、バックドカラム（充填剤：DEGS）を使用したガスクロマトグラフ法（以下、「GC 法」という。）により分析する方法、②塩蔵しょうが中の酢酸を水で抽出し、高速液体クロマトグラフ法（以下、「HPLC 法」という。）により絶対検量線法を用いて分析する方法及び③市販の酢酸定量用キットを使用した酵素法（以下、「酵素法」という。）により分析する方法が用いられている。また、過去にキャピラリー電気泳動法による分析法も検討されている¹⁾。

これらの分析法について、全ての税関で統一された定量分析法の確立を目指した場合、キャピラリー電気泳動法は限られた税関

にしか装置が配備されていないことから、不適當である。GC 法については、現在、税関に配備されているガスクロマトグラフはキャピラリーカラムを使用するものが主流になっているが、パックドカラムを使用する際の分析条件をそのままキャピラリーカラムに準用可能か否かを検討した報告、具体的には抽出溶媒である水がキャピラリーカラムの分離能に与える影響の報告等、がない。HPLC 法については、全ての税関で実施可能であるが、絶対検量線法より精度の高い内標準法による定量分析条件を検討することが望ましいと考える。

本研究では、HPLC 法については o-フタル酸を内標準物質とした定量分析条件の検討を行い、GC 法についてはメタノールを抽出溶媒²⁾、1-ペンタノールを内標準物質として、キャピラリーカラムを使用した定量分析条件の検討を行った。さらに従来法のひとつである、酵素法による定量分析を併せて行い、これら 3 つの方法の結果を比較したので報告する。

2. 実 験

2.1 試料及び試薬

しょうが（市販品、国内産）、酢酸、塩化ナトリウム、くえん酸一水和物、o-フタル酸、メタノール、1-ペンタノール、硫酸ナ

* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

トリウム（以上、和光純薬工業 試薬特級）、60%過塩素酸（和光純薬工業 有害金属測定用）、F-キット酢酸（ロシュ・ダイアグノスティックス）

2.2 装置及び分析条件

2.2.1 高速液体クロマトグラフ

装置：Alliance e2695（Waters）
カラム：Shim-Pack SCR-102H 7.9 mm I.D.×300 mm（島津）
ガードカラム：Shim-Pack SCR-102H(G)（島津）
カラム温度：60℃
移動相：過塩素酸酸性水溶液
（超純水 3 l に 60%過塩素酸を 6 ml 添加）
流量：0.5 ml/min
検出器：2998 フォトダイオードアレイ検出器（Waters）
測定波長 210 nm
注入量：20 µl

2.2.2 ガスクロマトグラフ

本研究では 6 種類の分析条件を設定した。各条件の共通事項及び使用カラムのスペックは以下の通りである。これら以外の項目については Table 1 に示す。

装置：Agilent 6890N（Agilent）
検出器：水素炎イオン化型検出器
キャリアガス：ヘリウム
カラム：HP-INNOWax 30m×0.25mm i.d.、膜厚 0.25 µm（Agilent）
DB-WAX 30m×0.25mm i.d.、膜厚 0.25 µm（Agilent）
以下、各条件を「条件（Table 1 における番号）」という（例えば、条件(1)）。

Table 1 Parameters of GC methods used in this study

method		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
column		HP-INNOWax		DB-WAX			
initial temp. (°C)		35	80	35	100	80	100
initial time (min)		5	1	5	15	1	15
ramp 1	rate (°C/min)	5	20	5	-	20	-
	final temp. (°C)	120	120	150	-	120	-
	final time (min)	1	1	3	-	1	-
	rate (°C/min)	-	10	-	-	10	-
ramp 2	final temp. (°C)	-	160	-	-	160	-
	final time (min)	-	2	-	-	2	-
post run		250°C					
		5min					
inlet temperature (°C)		220	260	220		260	
split ratio		25:1	20:1	50:1		20:1	
injection volume (µl)		1	0.5	1		0.5	
flow (ml/min, constant flow)		1.5	1.9	1.5		1.9	
detector temperature (°C)		280	260	280		260	

2.2.3 紫外・可視分光光度計

装置：UV-2550（島津）
測定波長：340 nm

2.3 測定用試料の調製

はじめにしょうがの水分を測定した。次に、塩蔵しょうがに多量に含まれる塩分や、食品添加物として頻繁に使用されるくえん酸が、酢酸の定量分析に与える影響を確認するため、下記の通り調味液を 9 種類、それぞれ 1 l ずつ調製し、その一部を用いて密度を測定した。残りの調味液と薄くスライスしたしょうがを密閉容器に入れ、3 週間漬込んだ。

試料 1・10：酢酸 0.3%溶液
試料 2・11：酢酸 0.3%+塩化ナトリウム 20%溶液
試料 3・12：酢酸 0.3%+くえん酸 1%溶液
試料 4・13：酢酸 0.5%溶液
試料 5・14：酢酸 0.5%+塩化ナトリウム 20%溶液
試料 6・15：酢酸 0.5%+くえん酸 1%溶液
試料 7・16：酢酸 0.7%溶液
試料 8・17：酢酸 0.7%+塩化ナトリウム 20%溶液
試料 9・18：酢酸 0.7%+くえん酸 1%溶液

漬込み後において、しょうがの水分と調味液が完全に混合していると仮定すると、漬込み後の調味液の酢酸含有率は、漬込み前の調味液重量としょうがの水分重量の和に対する調味液中の酢酸重量の割合で表されるので、以下の式により求めた。

$$A=100CV/(1000DV+0.01MW)$$

ただし、

A：調味液の酢酸含有率（%）
C：漬込み前の調味液の酢酸濃度（g/l）
V：漬込みに使用した調味液量（l）
D：漬込み前の調味液の 20℃における密度（g/cm³）
W：しょうがの水分（%）
M：漬込みに使用したしょうがの重量（g）

測定したしょうがの水分及び漬込み前の調味液の密度並びに算出された漬込み後の調味液の酢酸含有率を Table 2 に示す。

Table 2 Results of calculation for the theoretical values of acetic acid contents in prepared seasoning liquids

sample	C (g/l)	V (l)	M (g)	W (%)	D (g/cm ³)	A (%)
1	3.0142	0.9900	73.5443	94.6	0.99903	0.282
2	3.0121	0.9900	72.9327	94.6	1.12305	0.253
3	3.0386	0.9900	72.9752	94.6	0.99952	0.284
4	5.0099	0.9900	72.2659	93.8	0.99893	0.469
5	5.0438	0.9900	71.9290	94.6	1.12363	0.423
6	5.0136	0.9900	71.3283	94.6	1.00008	0.469
7	7.0136	0.9900	73.5331	94.6	0.99998	0.655
8	7.0154	0.9900	72.0095	94.6	1.12435	0.588
9	7.0276	0.9900	70.8311	94.6	1.00027	0.658
10	3.0039	0.9900	81.6529	94.2	0.99865	0.279
11	3.0078	0.9900	80.7860	94.2	1.12990	0.249
12	3.0057	0.9900	81.2667	94.2	0.99907	0.279
13	5.0112	0.9900	80.8283	94.2	0.99894	0.466
14	5.0326	0.9900	81.0680	94.2	1.13063	0.417
15	5.0099	0.9900	80.9531	94.2	0.99936	0.465
16	7.0027	0.9900	80.9601	94.2	0.99922	0.651
17	7.0128	0.9900	81.5675	94.2	1.13051	0.580
18	7.0450	0.9900	81.9442	94.2	0.99958	0.654

A: the calculated acetic acid content in the seasoning liquid (%), C: the concentration of acetic acid in the seasoning liquid before pickling (g/l), V: the volume of the seasoning liquid used for pickling (l), D: the density of the seasoning liquid at 20℃ before pickling (g/cm³), W: the moisture of ginger sample (%), M: the weight of ginger sample used for pickling (g)

また、漬込み後におけるしょうがの酢酸含有率は、しょうがの固形分(脱水)重量としょうがに浸み込んでいる調味液重量の和に対する、しょうがに浸み込んでいる調味液中の酢酸重量の割合で表される。つまり、ある重量の試料を考えた際、調味液は試料中すべてが酢酸水溶液であるのに対し、しょうがは試料中に酢酸を含まない固形分が含まれるということとなる。よって、しょうがの酢酸含有率は、そのしょうがを漬込んである調味液の酢酸含有率よりも常に低くなると考えられる。

さらに、今回使用した漬込み前のしょうがの固形分の重量割合は、Table 1 の水分から求められる通り、ほぼ一定である。よって調味液の密度が同程度であれば、漬込み後のしょうがの固形分重量割合も、ほぼ一定になる。つまり高濃度の塩化ナトリウムを含む試料 2、5、8、11、14 及び 17 を除くしょうがについては、漬込み後の固形分重量割合がほぼ同じとなる。結果として、これらのしょうがの酢酸含有率とそれらが漬込んである調味液の酢酸含有率とを比較した際、各試料間で同程度の減少率が観察されると予測される。

また、試料 2、5、8、11、14 及び 17 のしょうがについては調味液の密度がこれら以外のものと比較して大きくなり、単位重量中の固形分の割合が小さくなるため、上記の固形分による酢酸含有率の差は小さくなると予測される。

2.4 実験

2.4.1 HPLC 法

2.4.1(1) 試薬調製

標準酢酸液：酢酸 400 mg を 200 ml 容メスフラスコに正確に量り採り、水を加えて定容した。

内標準原液： α -フタル酸 200 mg を 250 ml 容メスフラスコに量り採り、約 60℃ の少量の水に溶解し、放冷したのち水を加えて定容した。

内標準液：内標準原液 25 ml を 500 ml 容メスフラスコに量り採り、水を加えて定容した。

2.4.1(2) 分離の確認

ミキサーで粉碎した市販の国内産しょうが約 5 g に水 50 ml を加え、1 時間攪拌抽出したものをしょうが抽出溶液とした。また、50 ml 容メスフラスコに標準酢酸溶液 15 ml 及び内標準液 10 ml を量り採り水で定容したものを標準・内標準混合溶液とした。さらに、アスコルビン酸、くえん酸、酒石酸及びソルビン酸がそれぞれ 0.1 mg/ml になるように調製した水溶液を有機酸溶液とした。しょうが抽出溶液、標準・内標準混合溶液及び有機酸溶液を 2.2.1 の条件でそれぞれ測定し、酢酸及び内標準物質がその他の成分と分離して検出されるかを確認した。なお、しょうが抽出溶液については孔径 0.45 μm のフィルターでろ過したものを測定した。

2.4.1(3) 検量線の直線性の確認

標準酢酸液 5 ml、10 ml、15 ml、20 ml 及び 25 ml をそれぞれ 50 ml 容メスフラスコに量り採り、それぞれに内標準液 10 ml を加え、水で定容したものを検量線用溶液として、2.2.1 の条件でそれぞれ繰り返し (3 回) 測定した。得られたクロマトグラムから、各検量線用溶液ごとに酢酸のピーク面積 (Aa) と内標準物質のピーク

面積 (Ma) との比 (Aa/Ma) の平均値を求めた。この値に対する、各検量線用溶液中に含まれる酢酸重量をプロットし、検量線の直線性を確認した。

2.4.1(4) 繰り返し性の確認

ミキサーで粉碎した試料 9 のしょうが約 5 g に水 40 ml 及び内標準液 10 ml を加えて 1 時間攪拌抽出した溶液を 2.2.1 の条件で繰り返し (5 回) 測定した。なお、同溶液は孔径 0.45 μm のフィルターでろ過したものを測定した。得られたクロマトグラムから酢酸のピーク面積 (Aa) と内標準物質のピーク面積 (Ma) との比 (Aa/Ma) を求め、その相対標準偏差を算出した。

2.4.1(5) 試料測定及び測定結果の評価

試料測定及び測定結果の評価は以下の通り行った。

- ① 試料 1-9 の調味液を測定試料として、それぞれ 5 g を 50 ml 容メスフラスコに精秤し、内標準液 10 ml を加えたのち水で定容したものを試料検液とした。それらを 2.2.1 の条件でそれぞれ繰り返し (3 回) 測定した。なお、試料検液は孔径 0.45 μm のフィルターでろ過したものを測定した。得られたクロマトグラムから、各試料検液ごとに酢酸のピーク面積 (Aa) と内標準物質のピーク面積 (Ma) との比 (Aa/Ma) の平均値を求め、2.4.1(3) の要領で作成した検量線を用いて、各試料検液中の酢酸の重量 (Aw) を求め、各測定試料の酢酸含有率を次式により算出した。

$$A=100Aw/S$$

ただし、

A：測定試料の酢酸含有率 (%)

Aw：検量線より求めた試料検液中の酢酸重量 (g)

S：測定試料の採取量 (g)

得られた酢酸含有率を 2.3 の計算値と比較し、回収率を求めた。

- ② 試料 1-9 のしょうがを測定試料として、それぞれミキサーで粉碎した測定試料 5 g を 100ml 容三角フラスコに精秤し、水 40 ml 及び内標準液 10 ml を加えて 1 時間攪拌抽出したものを試料検液とし、①の調味液と同様に酢酸含有率を算出した。得られた酢酸含有率について調味液の酢酸含有率と比較した。
- ③ 試料 10-18 の調味液及びしょうがをそれぞれ測定試料として、酢酸濃度が倍になるように試料検液を調製した。すなわち、調味液については 25 ml 容メスフラスコを使用し、しょうがについては加える水の容量を 15 ml とした。これらの試料検液について、①及び②と同様に酢酸含有率の算出、回収率の計算及び調味液としょうがの酢酸含有率の比較を行った。

2.4.2 GC 法

2.4.2(1) 試薬調製

標準酢酸液：酢酸 400 mg を 200 ml 容メスフラスコに正確に量り採り、メタノールを加えて定容した。

内標準液：1-ペンタノール 500 mg を 500 ml 容メスフラスコに正確に量り採り、メタノールを加えて定容した。

2.4.2(2) 分離の確認

ミキサーで粉碎した市販の国内産しょうが約 5 g にメタノール 50 ml を加え、1 時間攪拌抽出した液をしょうが抽出溶液とした。また、50 ml 容メスフラスコに標準酢酸溶液 15 ml 及び内標準液 10 ml を量り採り、メタノールで定容したものを標準・内標準混

合溶液とした。さらに、アスコルビン酸、くえん酸、酒石酸、ソルビン酸及びグルタミン酸がそれぞれ 0.1 mg/ml になるように調製した水溶液を有機酸溶液とした。しょうが抽出溶液、標準・内標準混合溶液及び有機酸溶液を 2.2.2 の条件(1)、(3)及び(4)でそれぞれ測定し、酢酸及び内標準物質がその他の成分と分離して検出されるかを確認した。なお、しょうが抽出溶液については、約 5 ml を 13.5 ml 容スクリー管瓶へ移し入れ、約 8 g の硫酸ナトリウムを加えてよくふり混ぜ脱水して、これを孔径 0.45 μm のフィルターでろ過したものを測定した。

さらに、上記のしょうが抽出液、標準・内標準混合溶液及び有機酸溶液において溶媒をメタノールから水に変更したものを、2.2.2 の条件(2)、(5)及び(6)でそれぞれ測定し、酢酸及び内標準物質がその他の成分と分離して検出されるかを確認した。

2.4.2(3) 検量線の直線性の確認

標準酢酸液 5 ml、10 ml、15 ml、20 ml 及び 25 ml をそれぞれ 50 ml 容メスフラスコに量り取り、それぞれに内標準液 10 ml を加え、メタノールで定容したものを検量線用溶液として、2.2.2 の条件(1)でそれぞれ繰り返し (3 回) 測定した。得られたクロマトグラムから、各検量線用溶液ごとに酢酸のピーク面積 (Aa) と内標準物質のピーク面積 (Ma) との比 (Aa/Ma) の平均値を求めた。この値に対する、各検量線用溶液中に含まれる酢酸重量をプロットし、検量線の直線性を確認した。

2.4.2(4) 繰り返し性の確認

ミキサーで粉碎した試料 9 のしょうがが約 5 g にメタノール 40 ml 及び内標準液 10 ml を加えて 1 時間攪拌抽出した溶液を 2.2.2 の条件(1)で繰り返し (5 回) 測定した。なお、同溶液は約 5 ml を 13.5 ml 容スクリー管瓶へ移し入れ、約 8 g の硫酸ナトリウムを加えてよくふり混ぜ脱水したのち、孔径 0.45 μm のフィルターでろ過したものを測定した。得られたクロマトグラムから酢酸のピーク面積 (Aa) と内標準物質のピーク面積 (Ma) との比 (Aa/Ma) を求め、その相対標準偏差を算出した。

さらに、ミキサーで粉碎した試料 18 のしょうがが約 5 g に水 40 ml 及び内標準液 10 ml を加えて 1 時間攪拌抽出した溶液を、2.2.2 の条件(2)で上記の試料 9 と同様に測定し、相対標準偏差を求めた。なお、同溶液は孔径 0.45 μm のフィルターでろ過したものを測定した。

2.4.2(5) 試料測定及び測定結果の評価

試料測定及び測定結果の評価は以下の通り行った。

- ① 試料 10-18 の調味液を測定試料として、それぞれ 5 g を 50 ml 容メスフラスコに精秤し、内標準液 10 ml を加えたのちメタノールで定容したものを試料検液とした。それらを 2.2.2 の条件(1)でそれぞれ繰り返し (3 回) 測定した。なお、試料検液は約 5 ml を 13.5 ml 容スクリー管瓶へ移し入れ、約 8 g の硫酸ナトリウムを加えてよくふり混ぜ脱水したのち、孔径 0.45 μm のフィルターでろ過したものを測定した。得られたクロマトグラムから、各試料検液ごとに酢酸のピーク面積 (Aa) と内標準物質のピーク面積 (Ma) との比 (Aa/Ma) の平均値を求め、2.4.2(3)の要領で作成した検量線を用いて、各試料検液中の酢酸の重量 (Aw) を求め、各測定試料の酢酸含有率を次式により算出した。

$$A=100Aw/S$$

ただし、

A : 測定試料の酢酸含有率 (%)

Aw : 検量線より求めた試料検液中の酢酸重量 (g)

S : 測定試料の採取量 (g)

得られた酢酸含有率を 2.3 の計算値と比較し、回収率を求めた。

- ② 試料 10-18 のしょうがを測定試料として、それぞれミキサーで粉碎した測定試料 5 g を 100 ml 容三角フラスコに精秤し、メタノール 40 ml 及び内標準液 10 ml を加えて 1 時間攪拌抽出したものを試料検液とし、①の調味液と同様に酢酸含有率を算出した。得られた酢酸含有率について調味液の酢酸含有率と比較した。

2.4.3 酵素法

2.4.3(1) 試薬調製

標準酢酸液 : 酢酸 400 mg を 250 ml 容メスフラスコに正確に量り取り、水を加えて定容した。

2.4.3(2) 検量線の直線性の確認

標準酢酸液 5 ml、10 ml、15 ml 及び 20 ml をそれぞれ 200 ml 容メスフラスコに量り取り、水で定容したものを検量線用検液として、試薬キットの説明書に従って試薬を添加し、紫外・可視分光光度計による吸光度の測定を行い、各検量線用検液の酢酸濃度 (Ac) に対する一連の操作で得られた吸光度差 (ΔE) をプロットし、検量線の直線性を確認した。

2.4.3(3) 繰り返し性の確認

標準酢酸液 5 ml、10 ml 及び 15 ml をそれぞれ 200 ml 容メスフラスコに量り取り、水で定容したものを繰り返し性の確認における検量線用検液とした。また、ミキサーで粉碎した試料 9 のしょうがが約 1.5 g を 100 ml 容メスフラスコに精秤し、水で定容したのち攪拌しながら 1 時間抽出したものを、試料検液とした。検量線用検液及び試料検液 (5 回測定分) について、試薬キットの説明書に従って試薬を添加し、それぞれ吸光度の測定を行った。なお、試料検液は No.2 のろ紙でろ過したものを測定した。得られた吸光度をもとに検量線を作成し、試料検液の酢酸濃度を求め、その相対標準偏差を算出した。

2.4.3(4) 試料測定及び測定結果の評価

試料測定及び測定結果の評価は以下の通り行った。

- ① 試料 10-18 の調味液を測定試料として、いずれも 2 検体ずつを、それぞれ 100 ml 容メスフラスコに精秤し、水で定容したものを試料検液とした。試料採取量は、調味液 10-12 については 3 g、13-15 については 2 g、16-18 については 1.5 g とした。この試料検液を 9 組 (2 試料 4 検体ずつ) に分けて、各組の試料検液及び 2.4.3(2)と同様に調製した検量線用検液について、試薬キットの説明書に従って試薬を添加し、吸光度の測定を行った。すなわち、ブランク 1 検体、検量線用検液 4 検体及び試料検液 4 検体の計 9 検体を 1 回の測定の対象とした。得られた吸光度をもとに検量線を作成し、各試料検液の酢酸濃度 (Ac) を求め、測定試料の酢酸含有率を次式により算出した。

$$A=10Ac/S$$

ただし、

A : 測定試料の酢酸含有率 (%)

A c : 検量線より求めた試料検液の酢酸濃度 (g/l)

S : 測定試料の採取量 (g)

測定試料の酢酸含有率は 2 検体の平均値とし、2.3 の計算値と比較し、回収率を求めた。

② 試料 10-18 のしょうがを測定試料として、ミキサーで粉碎し、各測定試料 2 検体ずつを 100 ml 容メスフラスコに精秤して、水で定容したのち攪拌しながら 1 時間抽出したものを、試料検液とした。試料採取量は、試料 10-12 については 3 g、13-15 につ

いては 2 g 及び 16-18 については 1.5 g とした。この試料検液について①と同様に測定試料の酢酸含有率を算出した。なお、試料検液は No.2 のろ紙でろ過したものを測定した。

得られた酢酸含有率について調味液の酢酸含有率と比較した。

3. 結果及び考察

2.4.1(5)、2.4.2(5)及び 2.4.3(4)における定量結果及び各法の分析時間を Table 3 に示す。

Table 3 Analysis results of the acetic acid content in various samples by the three methods and the required time for each analysis

sample	A theoretical value of acetic acid content in the seasoning liquid (%)	HPLC method			GC method			enzymatic method		
		B1 seasoning liquid	C1 ginger sample	B1-C1	B2 seasoning liquid	C2 ginger sample	C2-A	B3 seasoning liquid	C3 ginger sample	B3-C3
		content of Acetic acid (%)			content of Acetic acid (%)			content of Acetic acid (%)		
		recovery(%)	-	ratio of B1-C1 to B1(%)	recovery(%)	-	-	recovery(%)	-	ratio of B3-C3 to B3(%)
1	0.282	0.276	0.261	-0.015	-	-	-	-	-	-
		97.9	-	-5.4	-	-	-	-	-	-
2	0.253	0.250	0.233	-0.017	-	-	-	-	-	-
		98.8	-	-6.8	-	-	-	-	-	-
3	0.284	0.287	0.263	-0.024	-	-	-	-	-	-
		101.1	-	-8.4	-	-	-	-	-	-
4	0.469	0.458	0.428	-0.016	-	-	-	-	-	-
		97.7	-	-3.5	-	-	-	-	-	-
5	0.423	0.417	0.392	-0.025	-	-	-	-	-	-
		98.6	-	-6.0	-	-	-	-	-	-
6	0.469	0.467	0.443	-0.024	-	-	-	-	-	-
		96.6	-	-5.1	-	-	-	-	-	-
7	0.655	0.651	0.618	-0.033	-	-	-	-	-	-
		99.4	-	-5.1	-	-	-	-	-	-
8	0.588	0.582	0.551	-0.031	-	-	-	-	-	-
		99.0	-	-5.3	-	-	-	-	-	-
9	0.658	0.653	0.618	-0.035	-	-	-	-	-	-
		99.2	-	-5.4	-	-	-	-	-	-
10	0.279	0.274	0.260	-0.014	0.290	0.296	+0.017	0.276	0.268	-0.008
		98.2	-	-5.1	103.9	-	-	98.9	-	-2.9
11	0.249	0.246	0.234	-0.012	0.273	0.259	+0.010	0.251	0.246	-0.005
		98.8	-	-4.9	109.6	-	-	100.8	-	-2.0
12	0.279	0.275	0.261	-0.014	0.305	0.295	+0.016	0.280	0.272	-0.008
		98.6	-	-5.1	109.3	-	-	100.4	-	-2.9
13	0.466	0.459	0.436	-0.023	0.485	0.472	+0.006	0.462	0.450	-0.012
		98.5	-	-5.0	104.1	-	-	99.1	-	-2.6
14	0.417	0.412	0.396	-0.016	0.445	0.432	+0.015	0.411	0.417	+0.006
		98.8	-	-3.9	106.7	-	-	98.6	-	+1.5
15	0.465	0.458	0.437	-0.021	0.503	0.482	+0.017	0.466	0.442	-0.024
		98.5	-	-4.6	108.2	-	-	100.2	-	-5.2
16	0.651	0.644	0.614	-0.030	0.686	0.658	+0.007	0.657	0.644	-0.013
		98.9	-	-4.7	105.4	-	-	100.9	-	-2.0
17	0.580	0.577	0.554	-0.023	0.605	0.597	+0.017	0.581	0.573	-0.008
		99.5	-	-4.0	104.3	-	-	100.2	-	-1.4
18	0.654	0.645	0.613	-0.032	0.689	0.663	+0.009	0.657	0.629	-0.028
		98.6	-	-5.0	105.4	-	-	100.5	-	-4.3
Analysis time to create calibration curve (h)		10			6.25			<1		
Analysis time per one sample (h)		2			0.75			<1		

3.1 HPLC 法

3.1.1 分離の確認

今回検討した条件で、酢酸及び内標準物質が良好なピーク形状で検出され、かつしょうが由来成分、アスコルビン酸、くえん酸、酒石酸及びソルビン酸の分離が可能であった。しょうがに含まれる低極性物質由来と考えられるピークやソルビン酸のピークは 70-90 分に検出された (Fig.1, 2)。よって試料の分析時間は 110 分とするのが適当であると考えられる。

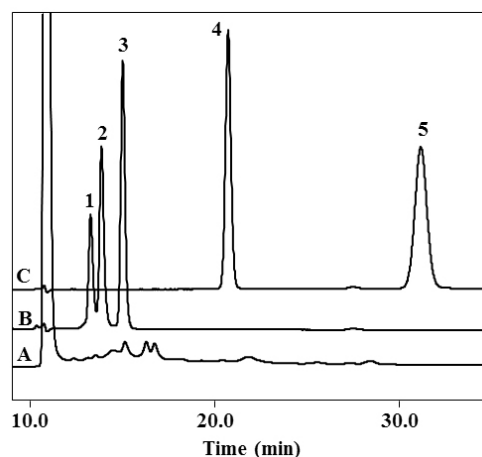


Fig.1 Liquid chromatograms of A) extract from a fresh ginger sample, B) mixture of citric acid, tartaric acid and ascorbic acid and C) standard solution 1: Citric acid, 2: Tartaric acid, 3: Ascorbic acid, 4: Acetic acid, 5: o-Phthalic acid

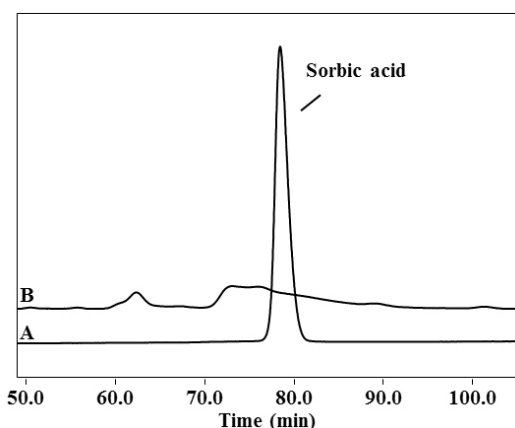


Fig.2 Liquid chromatograms of A) sorbic acid, B) extract from a fresh ginger sample

3.1.2 検量線の直線性の確認

2.4.1(3)にて得られた検量線を Fig.3 に示す。今回測定した濃度範囲では相関係数0.9999で原点付近を通る良好な直線性を示した。

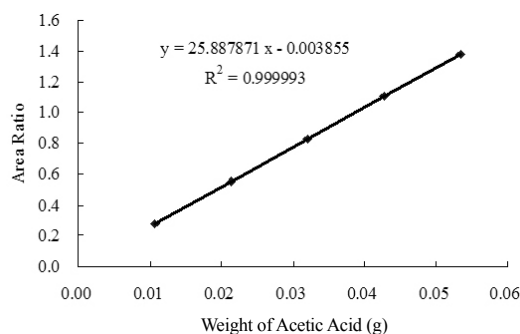


Fig.3 Calibration curve of standard acetic acid solution by HPLC method

3.1.3 繰り返し性の確認

2.4.1(4)の結果を Table 4 に示す。相対標準偏差は0.17%であり、良好な繰り返し性を示した。

Table 4 Repeatability of HPLC method

Aa/Ma	RSD(n=5)
0.8047	0.17%
0.8010	
0.8020	
0.8022	
0.8031	

3.1.4 試料測定及び測定結果の評価

Table 3 に示すように、回収率は97.7-101.1%とおおむね良好であり、酢酸濃度や食塩・くえん酸の存在による影響は見られなかった。また、試料調製法の違いによる結果の差は見られなかった。

調味液としょうがの酢酸含有率の測定値を比較すると、いずれの試料についても調味液の方がしょうがよりも高くなった。加えて、試料 10、12、13、15、16 及び 18 における調味液の酢酸含有率からしょうがの酢酸含有率を引いた値を調味液の酢酸含有率で

除した値は-5.1~-4.6%であり、いずれもほぼ一定値で安定していた。さらに、試料 11、14 及び 17 のしょうがの酢酸含有率について、同じ酢酸濃度の調味液に漬込んだ他の試料に比べて（例えば試料 11 については試料 10 及び 12 と比べて）、調味液の酢酸含有率と比較したときの減少率が小さかった。これらのことから、2.3 に述べた現象が、ある程度の傾向として観察されたとと言える。これらの傾向は試料 1-9 のしょうがにおいては観察されなかったことから、試料 10-18 のしょうがの調製法、すなわち試料検液の酢酸濃度が、酢酸含有率0.5%の測定試料を想定した場合に1mg/ml程度になるように調製する方法がより安定した結果を得られる調製法であると言える。

3.2 GC 法

3.2.1 分離の確認

条件(1)及び(2)については、酢酸及び内標準物質が良好なピーク形状で検出され、かつしょうが由来成分、アスコルビン酸、くえん酸、酒石酸、ソルビン酸及びグルタミン酸との分離が可能であった (Fig.4 及び 5)。なお、アスコルビン酸、くえん酸、酒石酸、ソルビン酸及びグルタミン酸については、いずれもポストランにて溶出され、定量分析に影響を及ぼさないことがわかった。

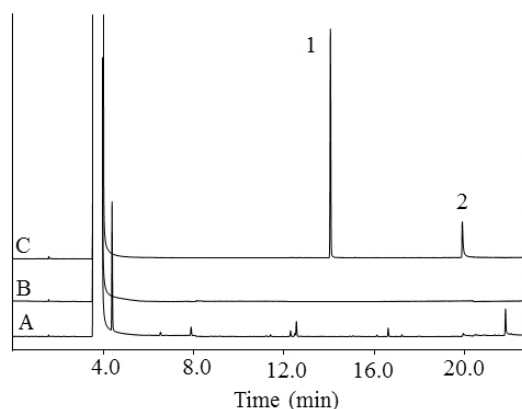


Fig.4 Gas chromatograms of A) extract from a fresh ginger sample, B) mixture of citric acid, tartaric acid, ascorbic acid, sorbic acid and glutamic acid and C) standard solution (1: 1-Pentyl alcohol, 2: acetic acid), under the condition of method (1) described in Table 1

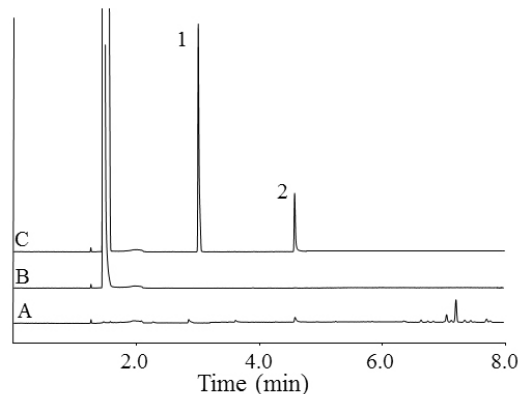


Fig.5 Gas chromatograms of A) extract from a fresh ginger sample, B) mixture of citric acid, tartaric acid, ascorbic acid, sorbic acid and glutamic acid, and C) standard solution (1: 1-Pentyl alcohol, 2: acetic acid), under the condition of method (2) described in Table 1

条件(3)-(6)については、酢酸のピークのテーリングが確認された (Fig.6 - 9)。このことから、今回検討した条件の中では、メタノール及び水のいずれの溶媒を使用する場合も分離カラムとして HP-INNOWax を使用した方がより良い結果が得られると判断した。

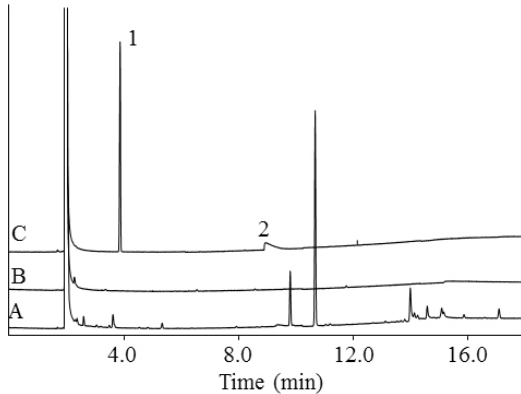


Fig.6 Gas chromatograms of A) extract from a fresh ginger sample, B) mixture of citric acid, tartaric acid, ascorbic acid, sorbic acid and glutamic acid, and C) standard solution (1: 1-Pentyl alcohol, 2: acetic acid), under the condition of method (3) described in Table 1

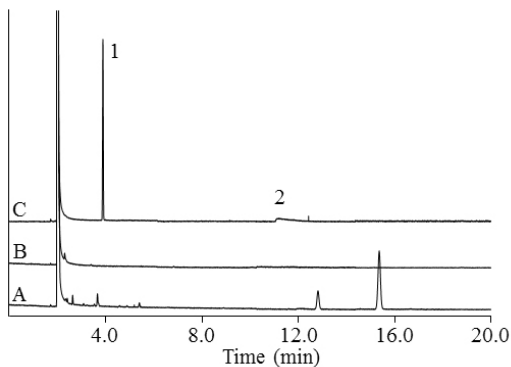


Fig.7 Gas chromatograms of A) extract from a fresh ginger sample, B) mixture of citric acid, tartaric acid, ascorbic acid, sorbic acid and glutamic acid, and C) standard solution (1: 1-Pentyl alcohol, 2: acetic acid), under the condition of method (4) described in Table 1

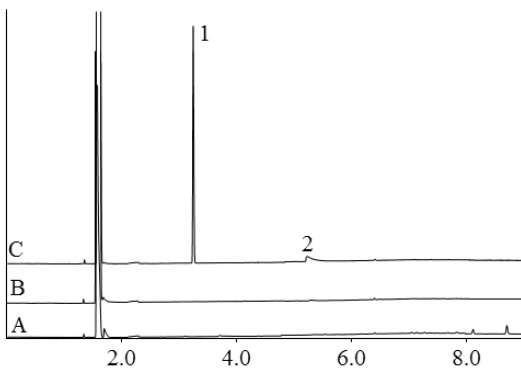


Fig.8 Gas chromatograms of A) extract from a fresh ginger sample, B) mixture of citric acid, tartaric acid, ascorbic acid, sorbic acid and glutamic acid, and C) standard solution (1: 1-Pentyl alcohol, 2: acetic acid), under the condition of method (5) described in Table 1

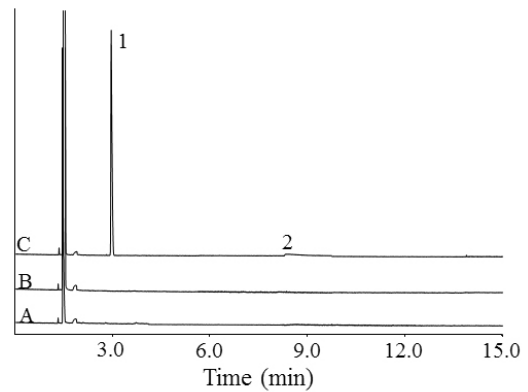


Fig.9 Gas chromatograms of A) extract from a fresh ginger sample, B) mixture of citric acid, tartaric acid, ascorbic acid, sorbic acid and glutamic acid, and C) standard solution (1: 1-Pentyl alcohol, 2: acetic acid), under the condition of method (6) described in Table 1

3.2.2 検量線の直線性の確認

2.4.2 (3)の結果を Fig.10 に示す。今回測定した濃度範囲では相関係数 0.9999 で原点付近を通る良好な直線性を示した。

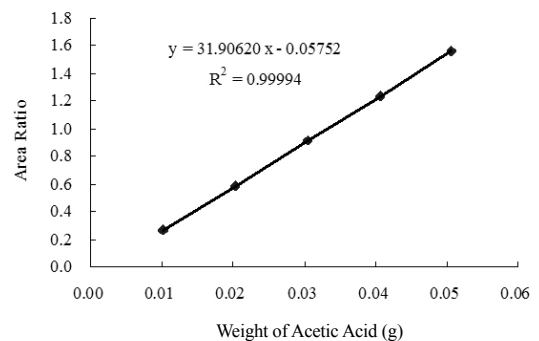


Fig.10 Calibration curve of standard acetic acid solution by GC method

3.2.3 繰り返し性の確認

2.4.2 (4)の結果を Table 5 に示す。相対標準偏差はメタノールを溶媒とした条件(1)については 0.66% であり、良好な繰り返し性を示した。一方、水を溶媒とした条件(2)については 5.57% であり、定量分析に用いる方法としては注入毎の検出値のばらつきが大きすぎると判断した。

Table 5 Repeatability of GC methods

Method	Aa/Ma	RSD(n=5)
(1)	1.0062	0.66%
	1.0136	
	1.0246	
	1.0162	
	1.0174	
(2)	0.9646	5.57%
	1.0318	
	1.0456	
	0.9418	
	0.9229	

3.2.4 試料測定及び測定結果の評価

Table 3 に示すように、回収率 103.9 - 109.6% といずれの試料の調味液も計算値よりも高い数値となり、かつ回収率の変動が大きかった。また、変動の大小に酢酸濃度や食塩・くえん酸の存在による影響は見られなかった。

調味液としょうがの酢酸含有率の比較において、本来ならば調味液の方がしょうがよりも酢酸含有率が高くなるはずだが、調味液の酢酸含有率の計算値と測定されたしょうがの酢酸含有率を比較すると、いずれの試料も数値が逆転しており、しょうがの酢酸含有率のほうが高くなっている。

以上から、調味液、しょうがのいずれについても本来の数値よりもプラス方向にやや大きい誤差が出ると言える。よって今回検討した GC 法では、塩蔵しょうがにおける酢酸の定量分析が困難であると言える。

なお、検量線の直線性は良好であり、繰り返し性も良好であったことから、回収率の変動の原因は、今回用いた試料検液調製法にあると推定される。

3.3 酵素法

3.3.1 検量線の直線性の確認

2.4.3 (2) の結果を Fig.11 に示す。今回測定した濃度範囲では相関係数 0.9999 で原点付近を通る良好な直線性を示した。

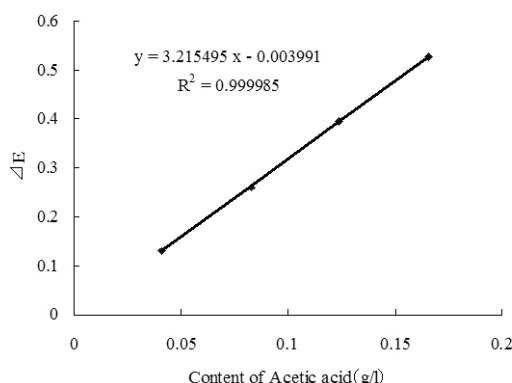


Fig.11 Calibration curve of standard acetic acid solution by enzymatic method

3.3.2 繰り返し性の確認

2.4.3 (3) の結果を Table 6 に示す。相対標準偏差は 0.30% であり、良好な繰り返し性を示した。

Table 6 Repeatability of enzymatic method

Concentration of Acetic acid (g/l)	RSD(n=5)
0.6552	0.30%
0.6582	
0.6552	
0.6527	
0.6552	

3.3.3 試料測定及び測定結果の評価

Table 3 に示すように、調味液の測定における回収率は 98.9 - 100.9% とおおむね良好であり、酢酸濃度や食塩・くえん酸の存在による影響は見られなかった。

また、調味液としょうがの酢酸含有率の比較において、試料 14 を除いて、しょうがの酢酸含有率が調味液を下回り、予測された通りの結果となった。しかしながら、調味液と比較した際のしょうがの酢酸含有率の減少率に 2.3 で述べたような一定の傾向は見られなかった。

3.4 各法の比較

Table 3 に示すように、HPLC 法及び酵素法による調味液については、塩化ナトリウムやくえん酸の影響を受けることなく概ね良好な回収率を示し、繰り返し性も優れていた。また、調味液としょうがの酢酸含有率を比較すると、HPLC 法による分析結果は 2.3 で述べたような、予測される傾向を示した。しかしながら、酵素法による分析結果は一つの試料において調味液としょうがの酢酸含有率の大小が逆転しており、また調味液と比較した際のしょうがの酢酸含有率の減少率に HPLC 法に見られるような傾向が見られなかった。これらのことから、HPLC 法と酵素法はいずれも酢酸含有率の測定においてある程度の有用性があるが、しょうがの分析においては、今回検討した分析法では酵素法よりも HPLC 法の方が安定した結果が得られると考えられる。

一方、GC 法については、本研究で採用した分析方法では回収率がプラスに大きく変動し、また調味液としょうがの酢酸含有率の比較においても一定の傾向が見られず、現段階で塩蔵しょうがにおける酢酸の定量分析に用いるのは困難である。

ところで、今回、有用性が認められた二つの方法はその分析時間やコストについて以下のような問題がある。

まず HPLC 法に使用したイオン排除型カラムは、しょうがに含まれる低極性物質やソルビン酸を強く保持するため、試料 1 測定あたり 110 分程度という長時間の測定が必要となる。さらに同カラムは、試料溶液に含まれる塩化ナトリウムにより急激に劣化してしまうため、頻繁にガードカラムを交換する必要があるが、分析カラム、ガードカラム共に非常に高価である。一方、酵素法は分析時間が短いものの、試薬キットの使用期限が最初の試薬調製から 1 ヶ月と短いので、処理件数に関わらず試薬キットを買い換える必要があり、かつ試薬廃棄の問題も生じる。また、同法では酵素反応の時間を一定にする必要があるが、その時間内に作業を行うために一度の測定で可能な検体数は、ブランク、検量線用検液、試料検液を併せて 10 検体程度が限界である。

今後は、HPLC 法における、低極性物質を短時間で溶出させることができ、かつ分析カラム、ガードカラム共に劣化がしにくい逆相型カラムによる分離条件の検討や、GC 法における試料検液調製法を検討する必要がある。

4. 要 約

調製した調味液に、市販の国内産しょうがを3週間漬け込み、輸入塩蔵しょうがに見立てた試料を作成した。このしょうが及び調味液について、 α -フタル酸を内標準物質としてイオン排除型カラムを用いた HPLC 法、メタノールを抽出溶媒とし、1-ペンタノールを内標準物質としてキャピラリーカラム (HP-INNOWax) を用いた GC 法及び試薬キットを用いた酵素法により分析を行い、検量線の直線性の確認、繰り返し性の確認、回収率試験を行った。

いずれの分析法でも、検量線は原点付近を通過する相関係数 0.9999 以上の直線となり、繰り返し性も良好であった。HPLC 法及び酵素法による、調味液を用いた回収率試験結果はおおむね良好であり、しょうがの酢酸含有率の測定においては、HPLC 法の方が安定した結果を得られた。一方、これら二つの方法と比較して、今回検討した GC 法は、酢酸の定量精度が劣っており、塩蔵しょうがにおける酢酸の定量分析に用いることは困難だと考えられる。

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) 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).