

しょうが調製品からの酢酸の抽出方法及び抽出した酢酸の高速液体クロマトグラフィーによる測定方法の検討

斎藤 義和*, 栢島 紋子**, 大田 朋規**, 赤崎 哲也**

Detailed study on the extraction of acetic acid from ginger preparations and determination of the extracted acetic acid with HPLC

Yoshikazu SAITO*, Ayako MATSUSHIMA**, Tomoki OTA**, and Tetsuya AKASAKI**

*Hakodate Customs Laboratory

24-4, Kaigan-cho, Hakodate, Hokkaido 040-8561 Japan

**Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

In this study, the efficiencies in extracting acetic acid from ginger preparations under various conditions were investigated, and the condition of a HPLC method for determining the extracted acetic acid was optimized. Chromatographic separation was carried out in a polar endcapped ODS column, Synergi 4 μ Hydro-RP 80A 250 \times 4.6 mm (phenomenex) at 40°C, with mobile phase composition of 20 mM potassium dihydrogenphosphate / 85% phosphoric acid = 1000 / 0.6, at a flow rate of 0.7 ml/min. The analytical condition in which acrylic acid was used as an internal standard was most suitable for the examined samples. In this condition, extracting by the four methods of leaving to stand, shaking, heating and ultrasonication was examined; extracting by slowly shaking for one hour at room temperature was found to be the most useful among these methods. Using this extracting method, validation for quantitative analysis of acetic acid with a recovery test was carried out. The generated calibration curve showed good linearity ($R^2 > 0.9999$) in the range of 0.05–1.0% acetic acid content. When determining samples to which 0.5% acetic acid was added, the recovery varied from 97.7 to 98.6% (mean 98.6%, $N = 6$) and the repeatability was 0.4% (RSD, degree of freedom = 5).

1. 緒 言

国内分類例規 0910.11、0910.12 又は 2001.90「1. 塩蔵（塩水漬）しょうがの関税分類について」の規定に該当するしょうが調製品は、酢酸の含有量が全重量の 0.5% 以上のものは関税率表第 2001.90 号（基本税率 12%；特惠税率 9%）に、0.5%未満の場合、第 0910.11 号又は第 0910.12 号（協定税率 2.5～9%）に分類され、税率格差が生じることから、酢酸の含有量を正確に測定することが必要とされる。

著者らは、これまでに高速液体クロマトグラフ（以下、HPLC とする）を用いたしょうが調製品中の酢酸の定量分析法を検討し、イオン排除クロマトグラフィー及び親水性相互作用クロマトグラフィーでの研究成果を税関分析研究発表会や関税中央分析所報で報告している^{1) 2)}が、前者は測定に長時間に要し、試料中の塩化ナトリウムによりカラムが劣化すること、後者は乳酸と酢酸の分

離が不十分であること、等の課題を残しており、全国の税関で統一的に実施されるべき分析法の開発には至っていない。

最近、鐵岡ら³⁾は、本件について極性基導入型分離カラムを用いた HPLC 法の有用性を報告している。この分離カラムは、著者らが報告した分析法に用いたカラムと比較して、酢酸の分離、短時間分析、取扱いの容易さの面で優れているが、報告された分析条件はカラム温度を 22°C と低めに設定しており、カラム冷却装置を有しない HPLC では実施できない。このため、より一般化された方法にすることが望ましい。

他方、しょうが調製品中の酢酸を正確に定量するためには、HPLC 法による目的成分（酢酸）の分離・測定条件が適切であることに加えて、分析試料から酢酸を確実に抽出することが重要となるが、既報には抽出方法についての言及は少なく、更なる検討の余地があるものと考えられる。

そこで著者らは、本研究において上記の極性基導入型分離カラ

* 函館税関業務部 〒040-8561 北海道函館市海岸町 24-4

** 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

ムを用いた HPLC 法の条件をより一般化したものにすると共に、定量分析に最適なしょうが調製品からの酢酸の抽出法の検討を行い、酢酸の定量分析法として確立することを目的とした。

2. 実 験

2.1 試料および試薬

2.1.1 試 料

ブランク試料：市販の生鮮しょうがの皮を剥き、フードプロセッサーを用いてパルプ状になるまで粉碎したもの 84 g に、塩化ナトリウム 15 g 及びくえん酸一水和物 1 g を加えて混合したもの。

模擬試料：皮を剥き、約 5 mm 角に細断した市販の生鮮しょうが約 500g を、約 2 l の酢酸を含む塩水（酢酸 6.00 g/l、くえん酸一水和物 10.00 g/l、塩化ナトリウム 180.00 g/l）に漬けたもの。数日に 1 度、計 4 回塩水の入替えを行った。なお、上記のとおり調製した塩水は 20℃における密度が約 1.12 g/cm³ であり、酢酸分が約 0.5%、塩分が約 16% となる。

2.1.2 試 薬

酢酸（和光純薬、試薬特級）

アクリル酸（和光純薬、試薬特級）

りん酸二水素カリウム（和光純薬、試薬特級）

りん酸（和光純薬、試薬特級）

2.1.3 試薬の調製

移動相用りん酸緩衝液：りん酸二水素カリウム 2.73 g に純水を加えて、1 l に定容した水溶液（20 mM りん酸二水素カリウム水溶液）に、りん酸 600 µl を添加したもの

検体添加用りん酸緩衝液：りん酸二水素カリウム 2.73 g に純水を加えて、100 ml に定容した水溶液（200 mM りん酸二水素カリウム水溶液）に、りん酸 600 µl を添加したもの

酢酸標準溶液：酢酸 0.25 g を正確に秤量し、純水で 200 ml に定容したもの

内標準原液：アクリル酸 0.25 g を正確に秤量し、純水で 100 ml に定容したもの

内標準溶液：内標準原液 5 ml をホールピペットで量り取り、純水で 200 ml に定容したもの

除たんぱく剤 A 液：硫酸亜鉛七水和物を 20 g を純水に溶かし 1 l としたもの

除たんぱく剤 B 液：水酸化バリウム八水和物 18 g を純水に溶かし 1 l としたもの

2.2 HPLC 法の条件

2.2.1 提案された方法（鐵岡ら³⁾の条件に従った。）

HPLC : LC-2000 Plus series（日本分光）

カラム : Synergi 4µ Hydro-RP 80A, 250 × 4.6mm (phenomenex)

ガードカラム : Synergi 4µ Hydro-RP 80A, 4 × 3.0mm (phenomenex)

検出方法 : 紫外吸光検出（波長 : 220 nm）

カラム温度 : 22℃

移動相 : 20 mM りん酸二水素カリウム水溶液にりん酸を加えて pH2.7 に調整したもの

流量 : 0.7 ml/min

注入量 : 20 µl

解析ソフト : JASCO-BORWIN Version 1.50

2.2.2 新規法

2.2.1 の方法から、以下の項目について変更したもの

検出方法 : 紫外吸光検出（波長 : 210 nm）

カラム温度 : 40℃

移動相 : 2.1.3 に記載の移動相用りん酸緩衝液

2.3 実験方法

2.3.1 分析条件の検討

2.3.1(1) 提案された分離条件³⁾の検証

2.2.1 の条件で、しょうが抽出液及び約 0.25 mg/ml 酢酸水溶液を測定し、クロマトグラムを比較した。

しょうが抽出液は、フードプロセッサーで粉碎した生鮮しょうが約 5 g を 200 ml コニカルビーカーに量り取り、約 100 ml の純水を加え、1 時間振とうして得られた抽出液を、孔径 0.45 µm のフィルターユニット（東洋濾紙製）を用いてろ過することで得た。

2.3.1(2) 除たんぱく操作による夾雑物除去方法の検討

フードプロセッサーで粉碎した生鮮しょうが約 5 g を 200 ml コニカルビーカーに量り取り、約 50 ml の純水を加えたものを 4 検体準備した。それぞれに除たんぱく剤 A 液及び B 液を駒込ピペットで 5、10、15、20 ml ずつ加え、更に純水を加えて最終液量を約 100 ml としたものを 1 時間振とうした。

振とう後、しばらく静置した抽出液の濁り具合を目視で観察し、除たんぱく操作による清澄効果の程度を観察した。また、孔径 0.45 µm のフィルターユニット（東洋濾紙製）と試料前処理用カートリッジ（TOYOPAK IC-SP、東ソー（株）製）を連結したものに通液（以下、「カートリッジ処理」とする）したものと及び約 0.25 mg/ml 酢酸水溶液を 2.2.1 の条件で測定し、クロマトグラムを比較した。

2.3.1(3) 検出波長の変更

鐵岡ら³⁾が使用した検出波長（220 nm）及び 210 nm で、フードプロセッサーで粉碎した生鮮しょうが約 5 g を 200 ml コニカルビーカーに量り取り、約 50 ml の純水を加えたものに除たんぱく剤 A 液及び B 液を駒込ピペットで各 15 ml ずつ加え、更に純水を加えて最終液量を約 100 ml とし、1 時間振とうした液体をカートリッジ処理したものと及び約 0.25 mg/ml 酢酸水溶液を測定し、得られたクロマトグラムを比較した。また、上記の 2 種類の波長におけるそれぞれの酢酸のピークの S/N 比を比較した。S/N 比の算出は、装置に付属の解析ソフトの機能を用いて行った。

2.3.1(4) カラム温度の変更及び内標準の検討

2.2.1 の提案された方法から検出波長を 210 nm に、カラム温度を 40℃に変更した条件で、2.3.1(3)と同様の検体を測定し、しょうが由来成分と酢酸の分離を確認した。また内標準を選定するために、約 0.25 mg/ml こはく酸水溶液、約 6.25 µg/ml アクリル酸水溶液、約 0.5 mg/ml メトキシ酢酸及び約 0.5 mg/ml エトキシ酢酸を同じ条件で測定し、しょうが由来成分及び酢酸との分離を確認した。

2.3.1(5) 移動相の調製の簡素化の検討

20 mM リン酸二水素カリウム水溶液 1 l に 500、550、600 及び 650 µl のりん酸を添加した移動相 (pH2.61-2.73) を調製した。2.2.1 の提案された方法から検出波長を 210 nm に、カラム温度を 40℃ に変更し、それぞれの移動相を用いた条件で、2.3.1(3)と同様の検体及び約 6.25 µg/ml アクリル酸水溶液を測定し、得られたクロマトグラムを比較した。

2.3.1(6) 食品に添加される可能性のある有機酸との分離確認

約 0.25 mg/ml 酢酸水溶液、約 6.25 µg/ml アクリル酸水溶液、約 0.25 mg/ml 乳酸水溶液、約 0.05 mg/ml 酒石酸水溶液、約 0.1 mg/ml りんご酸水溶液、約 0.1 mg/ml くえん酸水溶液を 2.2.2 の新規法で測定し、得られたクロマトグラムを比較した。

2.3.1(7) カラム温度変化に対する頑健性の確認

2.2.2 の新規法において、カラム温度を 38、40 及び 41℃ と変化させて、それぞれの条件で 2.3.1(5)と同様の検体及び約 0.1 mg/ml くえん酸水溶液を測定し、得られたクロマトグラムを比較した。

2.3.2 サンプル採取量及びカートリッジからの溶出量の検討

2.1.3 の酢酸標準液 10 ml 及び内標準溶液 5 ml を、ホールピペットで 100 ml 容メスフラスコに量り取り、純水で定容したものを試料とした。同溶液を試料前処理用カートリッジに通液し、溶出液 7ml を約 1 ml ずつ分取し検体とした。それぞれの検体を 2.2.2 の新規法の条件で 3 回ずつ測定し、酢酸/内標準のピーク面積比の平均を求めた。カートリッジ処理していない試料も同様に測定し、得られたピーク面積比の平均値を求めた。これらのピーク面積比を比較し、カートリッジからの溶出量が測定結果に及ぼす影響を調べた。

また、2.1.1 のブランク試料について、その 5 g 及び 2.5 g を 200 ml 容コニカルビーカーに別々に量り取り、それぞれに純水を約 50 ml 加えた後、除たんぱく剤 A 液及び B 液を前者には 15 ml ずつ、後者には 7.5 ml ずつ添加した。更に純水を加えて液量を約 100 ml とし、1 時間振とうすることで抽出液を得た。各抽出液をカートリッジ処理し、溶出液を 1 ml ずつ分取して検体とした。得られた検体のうち、カートリッジから溶出した最初の 1 ml を除き、2.2.2 の新規法の条件で測定して各クロマトグラムを得た。同じ条件で、前述の酢酸及び内標準を含む水溶液を測定し、カートリッジ溶出液の各分画のクロマトグラムと比較し、酢酸及び内標準の測定に影響を及ぼすことが由来成分の溶出の有無を確認した。

2.3.3 検液の安定性の確認

ブランク試料約 2.5 g を 200 ml 容コニカルビーカーに量り取り、2.1.3 の酢酸標準液を 10 ml、純水を約 50 ml、除たんぱく剤 A 液及び B 液をそれぞれ 7.5 ml 及び内標準溶液を 5 ml 添加し、容器の標線を目安に液量を 100 ml となるように純水を加えたものを 1 時間振とうした。得られた抽出液をカートリッジ処理し、溶出液のうち最初の 2 ml を 10 ml 容メスシリンダーで計量・廃棄し、次の 0.5 ml をバイアルの標線を目安に量り取ったものを検体として、2.2.2 の新規法の条件で 1 時間おきに計 8 回測定し、検体調製後の時間経過による酢酸/内標準のピーク面積比の変化を調べた。

また、上記と同様にして得たカートリッジ処理済のもの 2 検体に、それぞれ 2.1.3 の検体添加用りん酸緩衝液を 50 µl 及び 100 µl

添加したものについても 1 時間おきに計 8 回測定し、検体調製後の時間経過による酢酸/内標準のピーク面積比の変化を調べた。

2.3.4 検量線の直線性の確認

2.1.2 の酢酸標準溶液 1、2、5、10、15 及び 20 ml をホールピペットでそれぞれ 100 ml 容メスフラスコに量り取り、更に 2.1.2 の内標準溶液 5 ml をホールピペットで添加し、純水で定容したものを約 0.5 ml ずつバイアルに移し、2.1.3 の検体添加用りん酸緩衝液を 100 µl 添加したものの検量線用検体とした。

それぞれの検体を、2.2.2 の新規法の条件で 3 回ずつ測定した。得られたクロマトグラムから求めた酢酸/内標準のピーク面積比の平均値と、検液中の酢酸と内標準の重量比の関係をプロットし、最小二乗法により得た回帰直線を酢酸定量用の検量線として、直線性を評価した。

2.3.5 抽出方法の検討

2.3.5(1) 静置及び振とうによる抽出時間が定量結果に与える影響

ブランク試料をガーゼで包み、固く絞って得られた液体分 2.5 g を 200 ml コニカルビーカーに量り取り、2.1.3 の酢酸標準液を 10 ml、純水を約 50 ml、除たんぱく剤 A 液及び B 液をそれぞれ 7.5 ml 及び内標準溶液を 5 ml 添加し、容器の標線を目安に液量を 100 ml となるように純水を加え混合したものを静置した。混合直後、混合後 1、2、3 及び 4 時間経過後に軽く振り混ぜて 5 ml ずつ分取した。分取した液体をカートリッジ処理し、溶出液のうち最初の 2 ml を 10 ml 容メスシリンダーで計量・廃棄し、次の 0.5 ml をバイアルの標線を目安に量り取り、2.1.3 の検体添加用りん酸緩衝液を 100 µl 添加した（溶出液分取以降の操作の操作を、以下では検体調製とする）ものを検体として、2.2.2 の新規法の条件で測定し、静置時間による酢酸/内標準のピーク面積比の変化を調べた。

また、上記と同様の条件で 4 時間振とうして得られた検体について、振とう時間による酢酸/内標準のピーク面積比の変化を調べた。

2.3.5(2) 超音波を用いた抽出が定量結果に与える影響

2.3.5(1)と同様に各種調製試薬を加え混合して得られた液体について、15 分間超音波洗浄機内で超音波振とうした。混合直後、及び超音波照射下で 5、10 及び 15 分間振とうした抽出液を 5 ml ずつ分取した。分取した液体をカートリッジ処理後、検体調製したものについて、2.2.2 の条件で測定し、超音波振とう時間による酢酸/内標準のピーク面積比の変化を調べた。

2.3.5(3) 加温抽出が定量結果に与える影響

2.3.5(1)と同様にして得られた液体を、30、40、60 及び 80℃ の水浴中で 30 分及び 1 時間静置したものの一部をカートリッジ処理後、検体調製したものを 2.2.2 の条件で測定し、抽出時の温度による酢酸/内標準のピーク面積比の変化を調べた。

また、2.1.3 の酢酸標準液 10 ml 及び内標準溶液 5 ml をホールピペットで 200 ml 容コニカルビーカーに量り取り、純水で約 100 ml とした液体をホットスターラーで緩やかに攪拌しながら加温した。液温が 20、30、40、50、60、70、80℃ となった時に少量ずつバイアルに分取し、それぞれを 2.2.2 の条件で測定することにより、液温による酢酸/内標準のピーク面積比の変化を調べた。

2.3.5(4) 効率的な抽出法及び時間の検討

2.1.1 の模擬試料をフードプロセッサーでパルプ状になるまで

念入りに粉碎したものを 200 ml 容コニカルビーカーに 2.5 g 精秤し、約 50 ml の純水を加えて分散させた後、除たんぱく剤 A 液及び B 液を 7.5 ml ずつ駒込ピペットで、内標準液 5 ml をホールピペットで加え、容器の標線を目安に液量を 100 ml とした後、穏やかに攪拌して混合したものを 2 時間静置して、試料から酢酸を抽出した。静置開始直後並びに 0.5、1、1.5 及び 2 時間経過時に抽出溶液から約 5 ml を分取し、それぞれをカートリッジ処理後、検体調製したものを 2.2.2 の条件で測定し、酢酸/内標準のピーク面積比を得た。この実験は 3 回繰り返し実施した。

また、2.1.1 の模擬試料をフードプロセッサーでパルプ状になるまで念入りに粉碎したものを 200 ml 容コニカルビーカーに 2.5 g 精秤し、約 50 ml の純水を加え分散させた後、除たんぱく剤 A 液及び B 液を 7.5 ml ずつ駒込ピペットで加え、容器の標線を目安に液量を 75 ml としたものを 9 検体準備し、これらを 3 検体ずつ 3 グループに分け、0.5、1 及び 1.5 時間緩やかに振とうして、試料から酢酸を抽出した。振とう後に内標準液 5 ml をホールピペットで加え、容器の標線を目安に純水を加えて液量を 100 ml とし、カートリッジ処理後、検体調製したものを 2.2.2 の条件で測定し、酢酸/内標準のピーク面積比を得た。

2.3.4 と同様の手順で得られた検量線及び上記の各結果を基に、抽出法、抽出時間ごとに得られた結果（試料中の酢酸含有率）を比較した。また、2.1.1 の模擬試料の内部に浸透している液体分は、漬込んでいる塩水で完全に置換されており、両者の酢酸含有率は等しいと仮定し、試料中の酢酸含有率のおおよその値（以下、予測値とする）を以下の式で算出し、抽出効率を検討する際の対照とした。

$$\text{試料中酢酸含有率(\%)} = \frac{\text{塩水の酢酸含有率(\%)} \times (100 - \text{試料中の不溶性固形分(\%)})}{100}$$

なお、塩水の酢酸含有率は、塩水約 2.5 g を 200 ml コニカルビーカーに精秤し、約 50 ml の純水を加え分散させた後、除たんぱく剤 A 液及び B 液を 7.5 ml ずつ駒込ピペットで、内標準液 5 ml をホールピペットで加え、容器の標線を目安に液量を 100 ml としたものの一部を分取し、カートリッジ処理後、検体調製したものを 2.2.2 の条件で測定することにより得た。

また、試料中の不溶性固形分は、AOAC Official Method 911.02⁴⁾に従って求めた。

2.3.5(5) 真度及び精度の確認

2.1.1 のブランク試料 2.5 g を 200 ml 容コニカルビーカーに量り取り、2.1.2 の酢酸標準溶液 10 ml をホールピペットで添加し、約 50 ml の水を加え分散させた後、除たんぱく剤 A 液及び B 液を 7.5 ml ずつ加え、純水を加えて容器の標線を目安に液量を 75 ml としたものを、1 時間緩やかに振とうして酢酸を抽出した。振とう後に内標準液 5 ml をホールピペットで加え、容器の標線を目安に純水を加えて液量を 100 ml とし、その一部をカートリッジ処理後、検体調製したものを 2.2.2 の条件で測定し、酢酸/内標準のピーク面積比を得た。本測定は 6 回繰り返し実施した。

2.3.4 と同様に作成した検量線を用いて、6 個の抽出液の酢酸含有量を算出し、添加回収率、その平均値及びその相対標準偏差を

求め、定量性能の評価を行った。

3. 結果及び考察

3.1 分析条件の検討

3.1.1 提案された分離条件の検証

鐵岡ら³⁾は、2.2.1 の条件で、酢酸のピークとしょうが由来の成分のピークが分離できると報告しているが、今回使用したしょうが試料では、これらのピークを重ね、報告されたような分離を再現することができなかった (Fig 1)。また、酢酸と重なるピークに加え、酢酸の保持時間とそれほど差のないピークが多く確認され、カラム温度や移動相組成といった装置の分析条件の変更のみでは酢酸を分離検出するのは困難と考えられた。よって、試料前処理による夾雑物除去方法を検討することとした。

3.1.2 除たんぱく操作による夾雑物除去方法の検討

硫酸亜鉛水溶液及び水酸化バリウム水溶液を用いた除たんぱく操作及び陽イオン交換樹脂への通液によって、酢酸のピークと重なるしょうが由来成分が除去されることが確認された (Fig 1)。この効果は、検討した除たんぱく剤の添加量 (5-20 ml) のすべてで確認された。また、抽出液の清澄が明瞭に確認されたのは、除たんぱく剤を 15 ml 又は 20 ml ずつ加えた時であった。

他方、除たんぱく剤を多く加えると、未反応の亜鉛イオンあるいはバリウムイオンが抽出液中に多く存在することとなり、試料前処理用カートリッジに充填された陽イオン交換樹脂が飽和しやすくなるため、添加量は少ない方が良く考えられる。

よって、除たんぱく剤の添加量は、夾雑物の除去作用があり、かつ清澄効果が確認された条件のうち、最少である 15 ml ずつの添加が、検討した条件では最も有効と判断し、以降の実験に採用した。

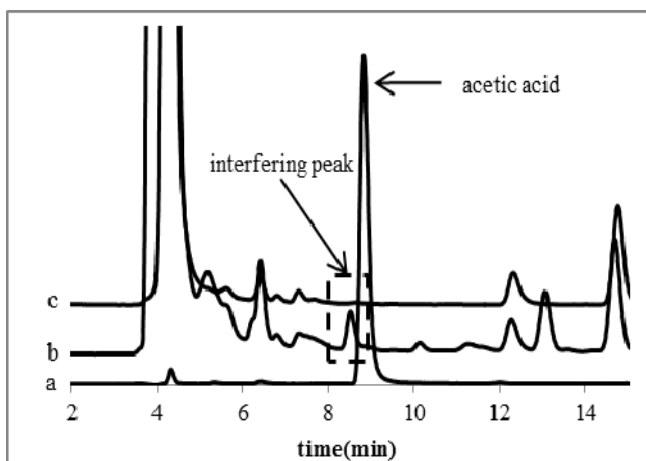


Fig.1 Chromatograms of a: acetic acid solution, b: fresh ginger extract, and c: fresh ginger extract deproteinized by adding 15 ml of 20 g/l zinc sulfate heptahydrate solution and 18 g/l barium hydroxide octahydrate solution per 5 g of ginger sample and treated with a sample preparation cartridge (TOYOPAK IC-SP M, TOSOH), obtained under the following conditions: Synergi 4μ Hydro-RP 80A 250 × 4.6 mm (phenomenex) at 22°C, with mobile phase of 20 mM potassium dihydrogenphosphate after adjusting its pH to 2.7 with phosphoric acid, flow rate of 0.7 ml/min and detected with UV (220 nm).

3.1.3 検出波長の検討

酢酸を紫外分光法で検出する際は、極大吸収波長である 210 nm を用いるのが一般的だが、鐵岡ら³⁾は、ベースラインの安定及び夾雑成分に対する検出感度を下げることがを優先し、220 nm を選択していた。一方、本研究では、除たんぱく操作を加えることで夾雑成分が除去されたことから、210 nm を選択しても十分なベースラインの安定性及び酢酸と夾雑成分との分離が確認された。また、検出波長を変更することにより、酢酸のピークの S/N 比が約 1.5 倍に上昇することを確認した。よって以降の実験では測定波長を 210 nm とすることとした。

3.1.4 カラム温度の変更及び内標準の検討

鐵岡ら³⁾はカラム温度を 22℃ に設定しており、室温によっては、カラム冷却装置を有しない HPLC では実施できない条件であったが、本実験では、除たんぱくとカートリッジ処理により、より一般的なカラム温度条件である 40℃ でも、しょうが由来成分と酢酸を分離検出可能であることが確認された。

また、内標準として検討した各物質の分離等については、以下の通りであった。

メトキシ酢酸：しょうが由来成分との分離検出ができなかった。

エトキシ酢酸：しょうが由来成分と分離検出は可能であるが、保持時間が約 25 分と長かった。

こはく酸：しょうが由来成分と分離検出は可能であるが、除たんぱく操作により除去されることが確認された。

アクリル酸：しょうが由来成分と分離検出は可能であり、保持時間も適当で、除たんぱく操作の影響は見られなかった。

以上より、以降の実験ではカラム温度を 40℃ とし、内標準物質としてアクリル酸を採用することとした。

カラム温度 40℃ の条件で測定したしょうが抽出液、酢酸および検討した内標準候補のクロマトグラムを Fig. 2 に示す。

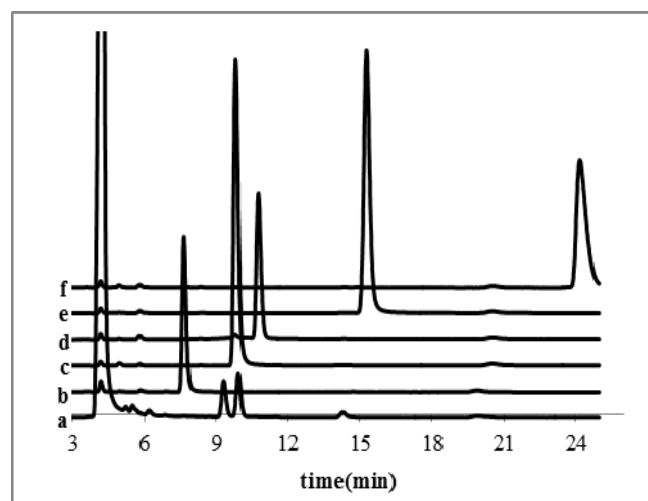


Fig.2 Chromatograms of a: fresh ginger extract (deproteinized), b: acetic acid solution, c: methoxy acetic acid solution, d: succinic acid, e: acrylic acid and f: ethoxy acetic acid, obtained under the same conditions as in Fig. 1 except the detection wave-length was 210 nm and the column temperature was 40℃.

3.1.5 移動相調製の簡素化の検討

鐵岡ら³⁾は、20 mM リン酸二水素カリウム水溶液に少量のりん酸を加えて pH を 2.7 に調整する方法を採用していたが、ルーチン分析を考慮し、pH 計を用いずに移動相を調製できるように、りん酸の添加量を予め固定することを検討した。上記の pH 調整には、経験則的に 20 mM リン酸二水素カリウム水溶液 1 l につき、550-600 μ l のりん酸を要することが判明していた。本実験では、20 mM リン酸二水素カリウム水溶液 1 l に添加するりん酸の量を 500、550、600 及び 650 μ l で変化させたが、クロマトグラムに大きな変化は見られなかった。なお、この際の pH の範囲は 2.61-2.73 であった。

$\pm 50 \mu$ l 程度の添加量の誤差を許容できるならば、添加するりん酸の僅かな計量誤差や濃度誤差は十分カバーされるものと考え、以降の実験では 20 mM リン酸二水素カリウム水溶液 1 l につき、600 μ l のりん酸を添加したものを移動相とすることとした。

3.1.6 食品に添加される可能性のある有機酸との分離確認

これまでの検討結果から得られた 2.2.2 の新規法の条件(カラム温度:40℃, 移動相: 20 mM リン酸二水素カリウム水溶液/りん酸=1000/0.6 (≒pH2.7), 検出波長:210 nm)で、酢酸及び内標準(アクリル酸)が、食品に含まれる代表的な有機酸である乳酸、酒石酸、りんご酸及びくえん酸と分離検出されることが確認された(Fig.3)。これにより、本研究で検討したしょうが調製品以外にも、最終調製品である漬物などにも応用できる可能性が高いことが示された。一方で、しょうが以外の野菜等に由来する成分については本研究では検討していないため、この分離条件をそれらの調製品に応用する際には、事前に詳細な調査が必要である。

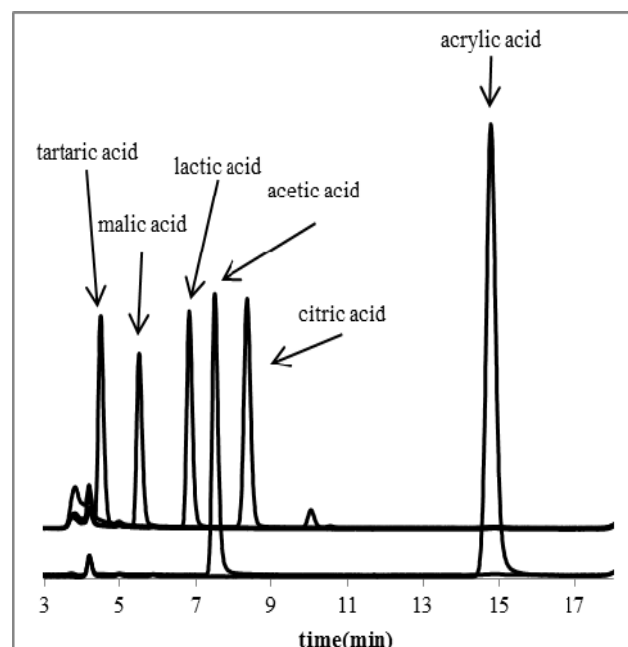


Fig.3 Chromatograms of acetic acid, acrylic acid, tartaric acid, lactic acid and citric acid, obtained under the same conditions as in Fig. 2 except mobile phase: 20 mM potassium dihydrogenphosphate / 85% phosphoric acid = 1000 / 0.6 (pH 2.7).

3.1.7 カラム温度変化に対する頑健性の確認

新規法のカラム温度変化に対する頑健性を確認するために、しょうが由来成分及び主な分析対象になると考えられる塩蔵しょうがに頻繁に含まれるくえん酸と、酢酸及び内標準が分離可能か確認した。結果として、38℃及び41℃の条件でも分離が可能であり、設定温度-2℃～+1℃の範囲でカラム温度変化に対する頑健性を有することが確認された。ただし、38℃の条件ではアクリル酸と直前のピークの保持時間が近くなり、41℃の条件では酢酸のピークとその直後に溶出するくえん酸のピークとの保持時間が近くなることから、これら以上の温度変化は、酢酸の定量に影響が出る可能性があると思料される。

3.2 サンプル採取量及びカートリッジからの溶出量の検討

酢酸及び内標準を含む水溶液をカートリッジ処理し、分取した溶出液から得た酢酸/内標準のピーク面積比を、カートリッジ未処理時のものと比較したところ、カートリッジから溶出する最初の1 ml は、酢酸/アクリル酸の溶出量の比が実際の値よりも高くなることが確認された (Table 1)。よって、カートリッジ溶出液のうち少なくとも最初の1 ml を除く必要があると判断した。

また、ブランク試料を5 g 採取した検液では、1 ml ずつ分取したカートリッジ溶出液のうち、2-3 ml 以降の分画でしょうが由来の夾雑物が溶出しており、酢酸の分離検出に影響することが確認された。これは、試料に大量に添加した塩化ナトリウム由来のナトリウムイオンによりカートリッジのイオン交換容量が飽和してしまい、しょうが由来成分が保持されなくなったためと考えられる。従って、このサンプル採取量では、酢酸の定量分析に供することのできる分画を十分に採取できないと考えられた。

そこで、カートリッジのイオン交換樹脂の飽和をできるだけ抑えられるように、サンプル採取量を2.5 g に減らして溶液中の陽イオン濃度を小さくする方法を検討した。この結果、カートリッジ溶出液の3-4 ml の分画でも、しょうが由来の夾雑物がほとんど検出されなくなった。このことから、このサンプル量ならば、酢酸の定量分析に供することのできる分画を十分に採取できると判断した。なお、4-5 ml 以降の分画では夾雑物が強く検出された (Fig.4)。

以上の結果から、安定して良好な定量を得るために、サンプル採取量は2.5 g とし、カートリッジ溶出液のうち、最初の2 ml を廃棄し、その後の0.5 ml を測定する方法を採用した。

Table 1 Changes in the acetic acid / acrylic acid peaks ratio against the elution volume from an ion-exchange cartridge.

fractions	recovery(%)
0-1 ml	106.8
1-2 ml	100.1
2-3 ml	100.2
3-4 ml	100.1
4-5 ml	99.8
5-6 ml	100.3
6-7 ml	99.9

Recovery (%) indicates the percentages of the acetic acid / acrylic acid peaks ratio for sample fractions from an ion-exchange cartridge against that of the original sample solution.

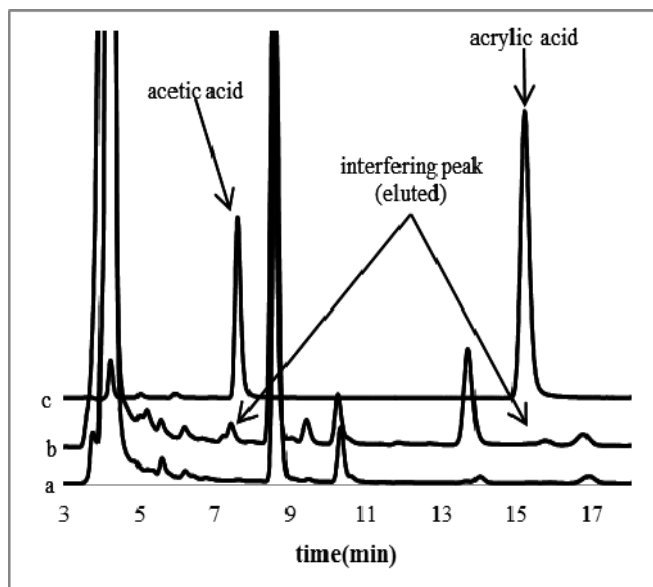


Fig.4 Chromatograms of a: extract of 2.5 g of salted ginger (containing 15% salt and 1% citric acid) deproteinized by adding 7.5 ml each of two identical solutions and treated in the same way as in Fig. 2, and collecting 2-3 ml of the elution, b: extract prepared in the same way as "a" and collecting 4-5 ml of the elution, and c: acetic acid and acrylic acid solution, obtained under the same conditions as in Fig. 3.

3.3 検液の安定性の確認

カートリッジ溶出液をそのまま放置すると、酢酸/アクリル酸のピーク面積比が時間経過にたがひ、上昇する傾向が確認された。調製直後のピーク面積比を100 %とすると、7 時間経過後には、101.8 %まで上昇した。これは、試料中に大量に含まれる塩化ナトリウムに由来するナトリウムイオンが、カートリッジ処理によって水素イオンに交換され、検液中の塩化水素濃度が上昇したことにより、アクリル酸の二重結合への塩化水素の付加反応が促進⁵⁾され、アクリル酸が減少したためと考察される。実際に、カートリッジからの溶出液の pH を pH 試験紙で確認したところ、通液前は弱酸性であったのに対し、通液後は pH1 程度であり、強い塩酸性であることが示唆された。

この付加反応は、水素イオンが二重結合を攻撃することで起こるものであるから、カートリッジ処理後に緩衝液を添加して pH を調整し、反応を抑える方法を検討した。緩衝液の種類や pH は、分離への影響が出ないように、移動相用りん酸緩衝液と併せ、2.1.3 の検体添加用りん酸緩衝液とした。この緩衝液は、移動相の10 倍の濃度であり、バイアルに量り取った0.5 ml のカートリッジ溶出液に対し、50 µl 添加した時に移動相と同程度の濃度となる。この割合で検体添加用りん酸緩衝液をカートリッジ溶出液に添加した場合、調製直後の酢酸/アクリル酸のピーク面積比を100 %とすると、3 時間経過後に100.9%となり以降同程度で推移した。このことから、未処理と比較するとアクリル酸の減少が抑えられるものの、不十分であることが示唆された。

そこで、検体添加用りん酸緩衝液の添加量を増やし、カートリッジ溶出液0.5 ml に対し、100 µl とした場合を検証した。すると酢酸/アクリル酸のピーク面積比が時間ごとに上昇・下降する傾向

は見られず、調製直後のピーク面積比を 100 % とすると、99.5-100 % の間で安定的に推移することが確認された。よって、以降の実験では検液 0.5 ml に 100 μ l の検体添加用りん酸緩衝液を添加することとした。

未処理時、50 μ l 添加時及び 100 μ l 添加時の酢酸/内標準のピーク面積比の時間経過による推移を Fig. 5 に示す。

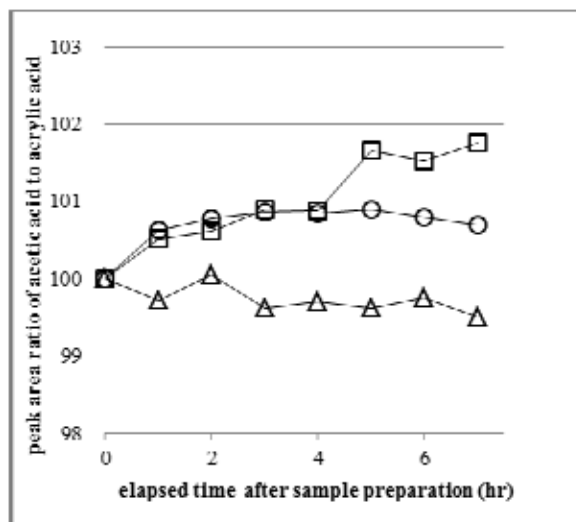


Fig.5 Effect of time elapsed after completion of sample preparation on acetic acid / internal standard (acrylic acid) peak area ratio. The test portion was an extract of salted ginger (containing 15% salt and 1% citric acid) with acetic acid added, prepared in the same way as in Fig. 4 and collecting 2-2.5 ml of elution and adding Δ : 100 μ l of buffer solution, 200 mM potassium dihydrogenphosphate / 85% phosphoric acid = 100 / 0.6, \circ : 50 μ l, or \square : nothing. HPLC conditions were the same as in Fig. 3. Each peak area ratio is the percentage of that measured just after completion of sample preparation.

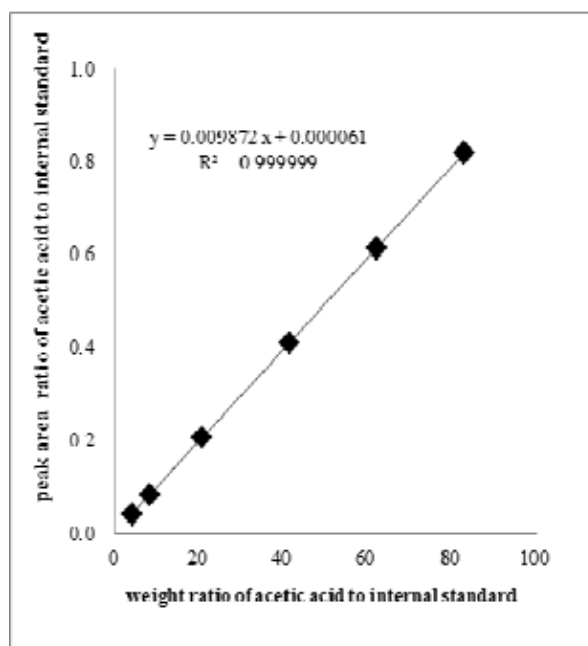


Fig.6 Calibration curve for quantitative analysis of acetic acid, generated using standard acetic acid solutions.

3.4 検量線の直線性の確認

2.3.4 に従って作成した検量線は、 $R^2 > 0.9999$ で原点付近を通る良好な直線性が確認された (Fig. 6)。この検量線の範囲は、酢酸含有率 0.05-1.0% の試料 2.5 g を 2.3.3 の方法で前処理したものに対応する。

3.5 抽出方法の検討

3.5.1 静置及び振とうによる抽出時間が測定結果に与える影響

しょうが抽出液に酢酸を添加した混合液について、調製直後に得られた検体の酢酸/内標準のピーク面積比を基準とすると、1-4 時間静置した場合に測定されるピーク面積比は約 99.5-100 % の値となり、振とうした場合には、100-100.5 % となった (Fig. 7)。今回の試料では、いずれの場合も、4 時間程度までは、抽出時間が結果に与える影響は小さかった。

実験結果を 100 % より小さくする要因は酢酸の減少、大きくする要因は、アクリル酸の減少と考えられる。すなわち静置するのみで酢酸は僅かながら揮発することが示された。一方、振とうした場合は静置した場合以上の酢酸が揮発すると考えられるが、結果としては 100 % を超えており、アクリル酸の減少が酢酸の揮発を上回ったものと考えられる。アクリル酸は酸素の存在下で容易に重合する物質であることから⁶⁾、振とうして抽出液と空気との接触が増えたことでアクリル酸が化学変化し、減少したことが示唆された。

以上より、振とう・攪拌して酢酸の抽出を行う場合は、内標準の添加は振とう・攪拌後にするのが望ましいと考えられる。また、酢酸の揮発を抑えるために、振とう・攪拌する場合はできる限り緩やかに行うことが望ましいと考えられる。

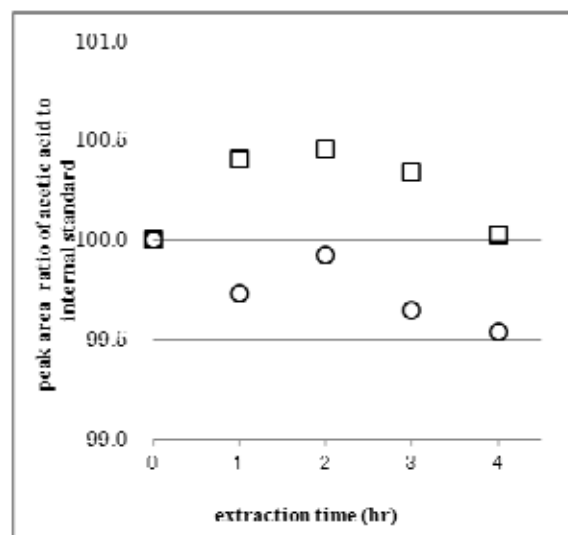


Fig.7 Effect of extraction time on acetic acid / internal standard (acrylic acid) peak area ratio. The test portion was a mixture of salted ginger juice obtained by filtering salted ginger in the same way as in Fig. 4 and acetic acid solution, prepared in the same way as in Fig. 4, and left to stand (\circ) or shaken (\square) for 4 hours, and collecting of 2-2.5 ml of the elution from the sample preparation cartridge in each hour and adding 100 μ l of buffer as shown in Fig. 5. HPLC conditions were the same as in Fig. 3. Each peak area ratio is the percentage of that of the test portion obtained from the sample solution before leaving to stand or shaking.

3.5.2 超音波を用いた抽出が測定結果に与える影響

超音波照射下で酢酸の抽出を行うと、短時間で酢酸/内標準のピーク面積比が減少することが確認された。具体的には超音波照射する前の酢酸/内標準のピーク面積比を基準とすると、5分、0.6%、15分で1.0%のピーク面積比の減少が確認された (Fig. 8)。

これは、3.5.1で見られた酢酸の揮発が、抽出液の超音波振とうによって大きく促進されたためと考えられる。そのため超音波を用いる抽出は、酢酸の正確な定量には向かないと判断した。

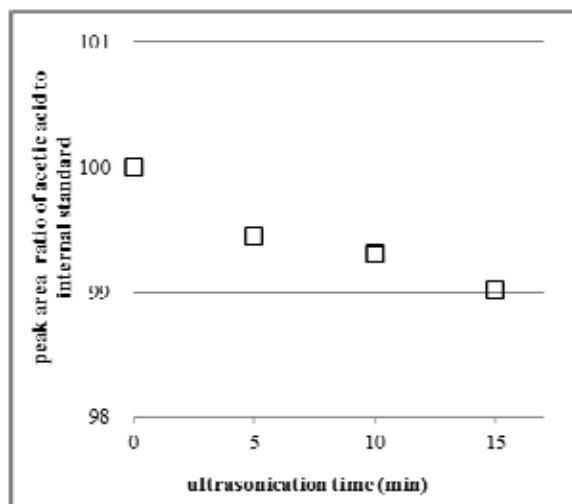


Fig.8 Ultrasonication effects to sample solution, presented by the acetic acid / internal standard (acrylic acid) peak area ratio. The test portion was the solutions prepared in the same way as in Fig. 7, leaving to stand in ultrasonic cleaner and measured in the same way as in Fig. 7. Each peak area ratio is represented as the percentage against that of the test portion obtained from the original sample solution.

3.5.3 加温抽出が測定結果に与える影響

しょうが由来のマトリックスを含む検体を一定時間加温した際の酢酸/内標準のピーク面積比を観測すると、大きい順に 30℃、80℃、60℃、40℃で加熱した場合となった (Fig. 9)。また、30分経過時のピーク面積比は、1時間経過時のピーク面積比と加温前のピーク面積比の中間程度であり、加熱時間に比例して酢酸/内標準のピーク面積比が増加あるいは減少していることが確認された (Fig. 9)。

標準溶液を加温した場合には、酢酸/内標準のピーク面積比の不規則変動が確認された。すなわち、30℃の時にピーク面積比が最大となり、40℃の時に急降下して最小となり、以降温度の上昇につれて少しずつピーク面積が上昇した (Fig. 10)。

以上のように加温によって、酢酸の揮発やアクリル酸の化学変化が起こり、それらが複雑に組み合わりながら酢酸/内標準のピーク面積比が変動することが示唆されたため、抽出時の加温は正確な定量には向かないと判断した。ただし、3.5.1に示したとおり、室温 (約 20℃) では、時間経過に対して酢酸/内標準のピーク面積比は安定的に推移するため、抽出時を低温下で行う必要はないと考えられる。

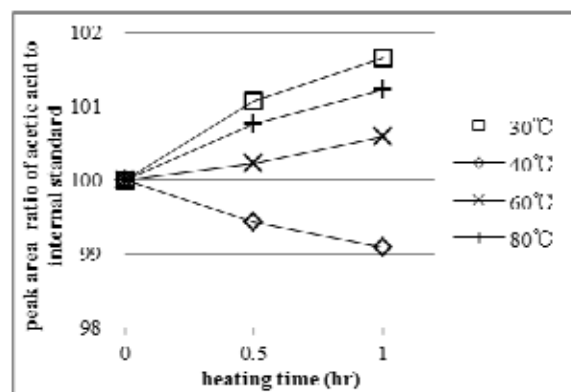


Fig.9 Effect of heating on acetic acid / internal standard (acrylic acid) peak area ratio. The test portion was solutions prepared in the same way as in Fig. 7, leaving to stand in a constant-temperature bath and measured in the same way as in Fig. 7. Each peak area ratio is represented as the percentage against that of the test portion obtained from the sample solution before heating.

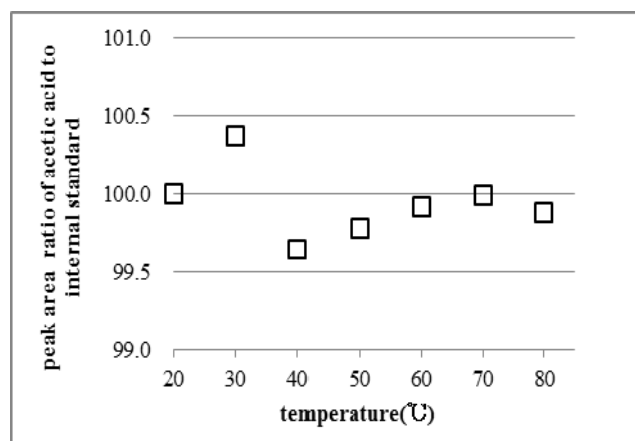


Fig.10 Effect of temperature that sample solution reached on acetic acid / internal standard (acrylic acid) peak area ratio. Test portions were parted from a standard acetic acid and acrylic acid solution on a hot plate when its temperature reached 20, 30, 40, 50, 60, 70, and measured in the same way as in Fig. 7. Each peak area ratio is the percentage of that of the test portion obtained from the sample solution at 20°C.

3.5.4 効率的な抽出法及び時間の検討

2.1.1の模擬試料について、3.5.1-3の結果から妥当と考えられた静置及び緩やかな振とうによる抽出を行い、3.3までに得られた最適条件で酢酸を定量した (Fig. 11)。

試料を調製し抽出する前の段階でほぼ予測値に近い量の酢酸が浸出していることが確認された。また、静置による抽出の場合、結果のばらつきが1時間以上の抽出で小さくなることが確認され、振とう抽出の場合、1時間の抽出で結果のばらつきが最小になった。以上より、静置、振とういずれの場合も、1時間の抽出時間が適当と判断した。

今回の実験では迅速な抽出をめざし、試料をパルプ状になるまで念入りに粉碎したため、静置条件でも1時間で十分な抽出量を実現できたが、粉碎が不十分な場合は、抽出が不十分になる可能性もある。よって抽出方法としては、緩やかな振とうによる抽出を採用した方が、より確実、かつ効率的であると判断した。

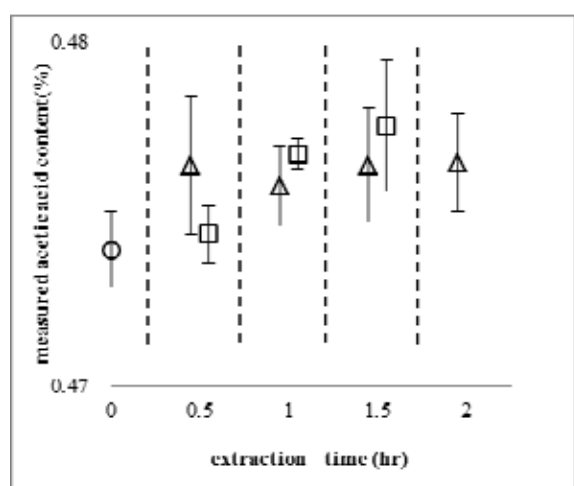


Fig.11 Result of quantitative analysis of salted ginger containing acetic acid (0.48%, estimated) for different times and techniques of extracting acetic acid, \triangle : adding the internal standard first and leaving to stand for 0.5-2 hours, \square : slowly shaking for 0.5-1.5 hours and adding the internal standard after extracting acetic acid, and \circ : just mixing the sample solution after adding the prepared reagents.

3.5.5 真度及び精度の確認

実験 2.3.5(4)においては、予測値の計算の元となる塩水中の酢酸含有率の測定に、試料を測定したのと同じ HPLC 法を採用しているため、抽出作業以外で真度に影響を与える可能性のある作業、例えば除たんぱく操作やカートリッジ処理など、が定量結果に与える影響を評価できない。そこで、それらを含めた分析手順全体の性能評価を目的として添加回収試験を実施した。

なお、試料はブランク試料に酢酸水溶液を添加したもので、酢酸含有率 0.5%相当である。また、抽出方法としては、3.5.4 で効率的と判断した 1 時間の緩やかな振とうを採用し、試料前処理も 3.5.4 の実験に用いたものと同様とした。

併行条件で 6 回繰り返し測定したところ、回収率は 97.7–98.6 %、平均は 98.0 % と良好な回収率となった。また、併行精度は、0.4 % (相対標準偏差、自由度=5) であり、高い精度を有する分析法であることが示された (Table 2)。

回収率については、3.5.4 の予測値と実測値から計算される数値以下となるが、これは抽出以外の作業において回収率を減少させる要因があることを示唆する。今回の研究では、しょうが由来マトリックス存在下においては、除たんぱく操作前後あるいはカートリッジ処理前後の酢酸やアクリル酸の濃度変化を確認していな

いため、例えば、除たんぱく剤中の金属イオンやマトリックス成分と酢酸との錯体形成⁷⁾の可能性や、カートリッジ処理によってそれらが除去される可能性などを否定できない。しょうが調製品においては上記のとおり良好な回収率となるが、しょうが以外の野菜等に含まれる酢酸の測定時に回収率が大きく増減する場合は、より詳細にこれらの点を検討すべきと考える。

Table 2 Results of recovery test for our developed quantitative analysis method for acetic acid in salted ginger samples under the optimized conditions.

	samples	results
recovery (%)	1	97.7
	2	97.7
	3	98.5
	4	97.7
	5	97.8
	6	98.6
mean recovery (%)		98.0
repeatability (RSD, %)		0.4

4. 要 約

極性基でエンドキャッピングを施した ODS カラムを使用した HPLC によるしょうが調製品中の酢酸の定量分析法を検討した。試料の前処理として、抽出時に硫酸亜鉛及び水酸化バリウムの水溶液を用いた除たんぱく操作を行い、抽出液を陽イオン交換樹脂を充填した試料前処理カートリッジに通液後、緩衝液で検液の pH を調整する方法を採用した。この前処理により、カラム温度 40℃ で、しょうが由来成分と酢酸の分離が可能となった。内標準としてはアクリル酸が最も適当であった。また、粉碎した試料からの酢酸の抽出法として、静置、攪拌、加温及び超音波抽出を検討した結果、最も適当と思われる抽出方法は、緩やかな振とう抽出を 1 時間行うことであり、その後に内標準であるアクリル酸を添加するのが正確な定量分析のために有効であると確認された。この分析条件において、検量線は原点付近を通る良好な直線性を示し ($R^2 > 0.9999$)、添加回収試験では良好な回収率 (97.7–98.6 %、平均 98.0 % (n=6)) 及び併行精度 (0.4%、相対標準偏差、自由度=5) を示した。今後、しょうが以外の野菜の調製品で酢酸の定量分析が必要となり得るものについても、野菜由来成分と酢酸及び内標準との分離や妥当な回収率が確認できれば、応用可能な分析法と考えられる。

文 献

- 1) 斎藤義和, 河嶋優美, 松本啓嗣, 山崎幸彦: 関税中央分析所報, **51**, 17 (2011)
- 2) 斎藤義和, 河嶋優美, 松本啓嗣, 赤崎哲也: 関税中央分析所報, **52**, 55 (2012)
- 3) 鐵岡浩平, 中野匡, 廣瀬達也, 甲田正人: 関税中央分析所報, **52**, 25 (2012)
- 4) AOAC Official Method 911.02, Solids (Insoluble) in Canned Vegetables (1911)
- 5) 大木道則, 大沢利昭, 田中元治, 千原秀昭編: “化学大辞典”, P.568 (1989), (東京化学同人)
- 6) 大木道則, 大沢利昭, 田中元治, 千原秀昭編: “化学大辞典”, P.15 (1989), (東京化学同人)
- 7) 大木道則, 大沢利昭, 田中元治, 千原秀昭編: “化学大辞典”, P.29 (1989), (東京化学同人)