

ポストカラム法を用いた高速液体クロマトグラフィー（HPLC） によるしょうが中の酢酸の定量分析

竹元 賢治*, 五十嵐 智大*, 片山 貴之*

Quantitative analysis of acetic acid in ginger by high-performance liquid chromatography (HPLC) with the post-column method.

Kenji TAKEMOTO*, Tomohiro IGARASHI* and Takayuki KATAYAMA*

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

Salted ginger and ginger preserved in brine are classified differently in the Customs Tariff Schedule depending on the content of acetic acid. In this study, we examined a quantitative analysis of acetic acid in salted ginger and ginger preserved in brine by post-column HPLC for high accuracy. As a result of measuring 9 organic acids—tartaric acid, malic acid, lactic acid, acetic acid, citric acid, fumaric acid, succinic acid, acrylic acid and propionic acid—by the post-column method and direct detection method, the post-column method showed better peak separation and slightly higher acetic acid sensitivity. The generated calibration curve showed good linearity ($R^2 > 0.999$) in the range of 10 ng/mL to 1.5 mg/mL acetic acid solution. The recovery rate was 99.9 to 100.1% in the determination of acetic acid in the pseudo sample of salted ginger (containing 13% salt and 1% citric acid). In the determination of acetic acid in the simulated sample and imported sample of salted ginger, the measured value mostly corresponded with the predicted value calculated from the addition amount and the value obtained by the direct detection method. These results indicate that high-accuracy quantitative analysis of acetic acid is possible using the post-column HPLC method.

1. 緒 言

関税率表において塩蔵しょうがは、国内分類例規 0910.11, 0910.12 または 2001.90「1. 塩蔵（塩水漬）しょうがの関税分類について」の規定により、酢酸の含有量が全重量の 0.5%以上のものは第 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%）に分類される。酢酸の含有率により税率格差が生じることから、酢酸の含有量を正確に定量する必要がある。

しょうが調製品中の酢酸の定量法については、近年、ガスクロマトグラフィー（GC）または高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いた方法が関税中央分析所報に報告されているが、分析に長時間を要する点、または測定精度が望まれる水準に達していない点など、課題を残している^{1)~5)}。HPLC を用いた方法では、極性基導入型分離カラムを用いて酢酸を分離し、210 nm 付近の波長における吸収で直接検出する方法（直接検出法）が報告されている^{4),5)}。しかし、210 nm 付近の吸収による直接検出法では、試料中の有機酸以外の夾雑成分も検出されるため選択性が低く、しょうが調製品中の夾雑成分と酢酸のピークが分離しないこともある⁶⁾。

一方、ポストカラム法を用いた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）では、pH 指示薬としてプロモチモールブルー（BTB）を用い、有機酸による pH 指示薬の色変化を利用した検出により、高い選択性、精度及び再現性が認められる報告がなされている^{6),7)}。

本研究では、ポストカラム法を用いた HPLC において、BTB の色変化を利用した検出方法により、しょうが中の酢酸の定量分析が可能か検討したので報告する。

2. 実 験

2.1 試 料

生しょうが：市販品（2 検体）

擬似試料：酢酸を含む塩水を添加した生しょうが（2 検体）

模擬試料：酢酸を含む塩水に漬けた生しょうが（1 検体）

輸入品：輸入申告されたしょうが調製品（2 検体）

2.2 試 薬

2.2.1 標準有機酸溶液用試薬

* 財務省関税中央分析所 〒272-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

L(+)-酒石酸, L(+)-乳酸, 酢酸, くえん酸一水和物, フマル酸, こはく酸, アクリル酸, プロピオン酸 (以上, 和光純薬工業 (株) 製)

L(-)-りんご酸: 東京化成工業 (株) 製

2.2.2 塩水

塩化ナトリウム, くえん酸一水和物, 酢酸 (以上, 和光純薬工業 (株) 製)

2.2.3 HPLC用試薬

りん酸, りん酸二水素カリウム, りん酸水素二ナトリウム十二水和物 (以上, 和光純薬工業 (株) 製)

プロモチモールブルー (BTB): 純正化学 (株) 製

2.3 装置及び分析条件

装置	: HPLC「1260 Infinity II」(Agilent Technologies社製) オートサンブラ「G7129A」, バイナリポンプ「G7112B」, アイソクラティックポンプ「G7110B」を装備したもの.
分離カラム	: Synergi 4 μ Hydro-RP 80A, 250 $\times$ 4.6 mm I.D., 4 μ m (Phenomenex社製)
ガードカラム	: Security Guard Cartridge C18, 4.0 $\times$ 3.0 mm I.D. (Phenomenex社製)
検出器	: ダイオードアレイ検出器「G7117C」(Agilent Technologies社製)
検出波長	: ポストカラム法, VIS 440 nm (参照波長VIS 560 nm) 直接検出法, UV 210 nm
溶離液	: 30 mM りん酸カリウム緩衝溶液 pH2.6
反応液	: 0.1 mM BTB + 15 mM りん酸水素二ナトリウム pH8.8
移動相流速	: 0.6 mL/min
反応液流速	: 0.6 mL/min
カラム温度	: 40 $^{\circ}$ C
注入量	: 20 μ L

2.4 実験

2.4.1 各種溶液の調製

標準有機酸溶液: 酒石酸, L(-)-リンゴ酸, 乳酸, 酢酸, くえん酸一水和物, フマル酸, こはく酸, アクリル酸及びプロピオン酸について, それぞれ100 mgを量り取り, 水で100 mLに定容したもの

標準酢酸溶液: 酢酸2.50 gを量り取り, 水で250 mLに定容したもの (10 mg/mL)

塩水: 酢酸6.00 g, くえん酸一水和物10.0 g及び塩化ナトリウム180 gを量り取り, 水で1,000 mLに定容したもの

内標準溶液: こはく酸1.4 gを量り取り, 水で200 mLに定容したもの
HPLC用溶離液: りん酸二水素カリウム2.86 g及びりん酸600 μ Lを量り取り, 水で1,000 mLに定容したもの

HPLC用反応液: BTB 62 mg及びりん酸水素二ナトリウム十二水和物5.37 gを量り取り, 水で1,000 mLに定容したもの

2.4.2 ブランク試料の調製

皮を剥き, ミキサーで細かく粉砕した生しょうが10 gを量り取り, 水で100 mLに定容した. 定容したものをよく混合し, 約1時間放置し

たのち, 上澄みを5 mL採取し, 0.45 μ mメンブレンフィルターでろ過したものを検体とした.

2.4.3 擬似試料の調製

皮を剥き, ミキサーで細かく粉砕した生しょうが10 gを量り取り, 水で100 mL容メスフラスコに移し入れ, 塩化ナトリウム1.6 g, くえん酸一水和物0.1 g, 酢酸50 mg (擬似試料1) または100 mg (擬似試料2) を加え, 内標準溶液10 mLをホールピペットで加えたのち, 水を加えて定容した. 定容したものをよく混合し, 約1時間放置したのち, 上澄みを5 mL採取し, 0.45 μ mメンブレンフィルターでろ過したものを検体とした.

2.4.4 模擬試料の調製

皮を剥き, 約5 mm角に細断した生しょうが100 gを, 2.4.1の塩水400 mLに漬けた後, 4~5日に1度, 計4回塩水を交換した. 漬けた生しょうがをミキサーで細かく粉砕したもの5 gを量り取り, 水で100 mL容メスフラスコに移し入れ, 内標準溶液10 mLをホールピペットで加えたのち, 水を加えて定容した. 定容したものをよく混合し, 約1時間放置したのち, 上澄みを5 mL採取し, 0.45 μ mメンブレンフィルターでろ過したものを検体とした.

2.4.5 輸入品の調製

ミキサーで細かく粉砕した輸入品1を5 g, 輸入品2を10 g量り取り, それぞれ水で100 mL容メスフラスコに移し入れ, 内標準溶液10 mLをホールピペットで加えたのち, 水を加えて定容した. 定容したものをよく混合し, 約1時間放置したのち, 上澄みを5 mL採取し, 0.45 μ mメンブレンフィルターでろ過したものを検体とした.

2.4.6 検量線の作成及び直線性の評価

2.4.1の標準酢酸溶液から2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40及び50 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, 内標準溶液10 mLをホールピペットで加えたのち, 水を加えて定容した (酢酸濃度0.2 mg/mL~5 mg/mL).

次に, 2.4.1の標準酢酸溶液から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, 水を加えて定容したものを作成し, 希釈液1とした. 希釈液1から2, 4, 6, 8, 10, 15, 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, 内標準溶液10 mLをホールピペットで加えたのち, 水を加えて定容した (酢酸濃度10 ng/mL~100 ng/mL)

更に, 上記の希釈液1から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, 水を加えて定容したものを作成し, 希釈液2とした. 希釈液2から2, 5, 10, 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, 内標準溶液10 mLをホールピペットで加えたのち, 水を加えて定容した (酢酸濃度0.5 ng/mL~5 ng/mL).

上記の定容したものをそれぞれよく混合したのち, 上澄みを5 mL採取し, 0.45 μ mメンブレンフィルターでろ過したものを検体とした. それぞれの検体を2.3の条件で測定して得られたクロマトグラムから求めた酢酸と内標準のピーク面積比と検体中の酢酸の重量から検量線を作成した. 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.

2.4.7 静置及び振とう時間が測定時間に与える影響

ミキサーで細かく粉砕した輸入品2を10 g量り取り, 水50 mLを用いて100 mL容メスフラスコに移し入れ, 混合した. 混合後, 30分, 1

時間、2時間振とうしたもの及び振とうせず1時間、一晚静置したものの5通りの抽出条件で酢酸を抽出した。それぞれの上澄みを5 mL採取し、0.45 μm メンブレンフィルターでろ過したものを検体とした。抽出方法の異なるものを2.3の条件で測定して、酢酸の抽出量を比較した。

3. 結果及び考察

3.1 標準有機酸溶液のクロマトグラムの比較

2.4.1で調製した標準有機酸溶液（各1 mg/mL）を2.3の条件で測定して、ポストカラム法及び直接検出法で得られたクロマトグラムをFig. 1に示す。

ポストカラム法及び直接検出法において、全ての有機酸のピークを検出するまでにかかる時間は24分であった。酢酸のピークにおいては、ポストカラム法の方が直接検出法よりも感度が高かった。また、フマル酸とこはく酸のピークの分離もポストカラム法の方が良好であった。一方、直接検出法では有機酸の種類により感度が大きく異なり、特にフマル酸及びアクリル酸の感度が高かった。これは、分子内に二重結合をもつ有機酸は、UV 210 nmの吸光係数が大きいと考えられる⁸⁾。

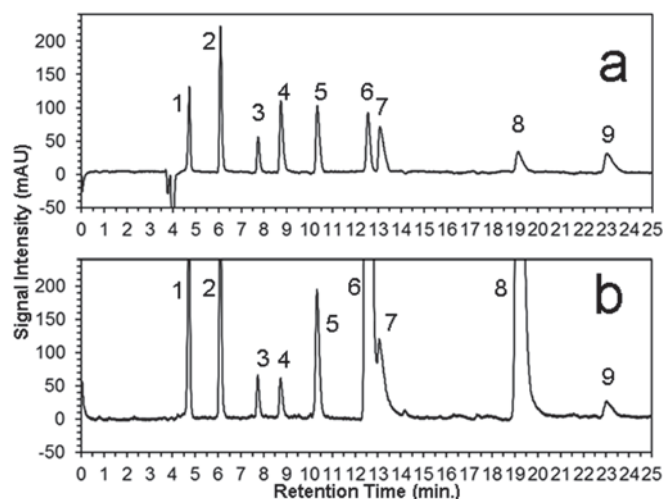


Fig. 1 Comparison of separation between post-column method and direct detection method. Chromatograms were monitored as follows : a, detected at 440 nm by post-column method using BTB; b, direct detection at 210 nm. The samples were 1 mg/mL each and numbered as follows : 1, tartaric acid; 2, malic acid; 3, lactic acid; 4, acetic acid; 5, citric acid; 6, fumaric acid; 7, succinic acid; 8, acrylic acid; 9, propionic acid

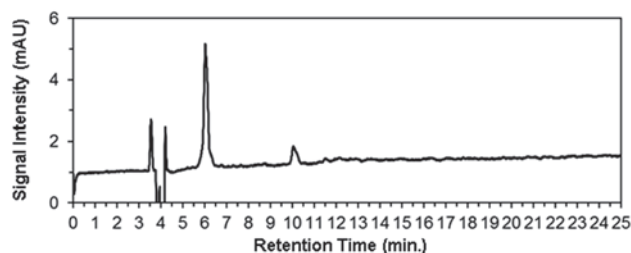


Fig. 2 HPLC chromatogram of fresh ginger extracted with water and filtrated. The sample concentration was 100 mg/mL.

3.2 内標準物質の検討

2.4.2で調製したブランク試料溶液（100 mg/mL）を2.3の条件で測定して、ポストカラム法で得られたクロマトグラムをFig. 2に示す。酢酸、乳酸、フマル酸、こはく酸、アクリル酸、プロピオン酸の検出ピークに妨害となるピークは存在しなかった。これらの物質のうち、保持時間が適当であること及び野菜調製品に添加物として使用される可能性が低いと考えられることから、こはく酸を内標準物質として用いた。

3.3 標準酢酸溶液による検量線作成及び定量限界、検出限界の確認

2.4.6で調製した検量線用溶液のうち、酢酸濃度が2.5~10 ng/mLの検体のクロマトグラムをFig. 3に示す。酢酸濃度が10 ng/mLの溶液では、酢酸のピークについて、対称性が良いものであったが、5.0 ng/mL及び2.5 ng/mLの溶液では、非対称のものであった。また、1.0 ng/mLの溶液では酢酸のピークが検出されなかった。このことから、酢酸の最小検出濃度は2.5 ng/mL程度、定量下限は10 ng/mL程度と考えられる。これは、しょうが調製品10 gについて、2.4.5の方法で調製した場合、最小検出濃度が0.0025%、定量下限が0.01%に相当する。

2.4.6で調製した検量線用溶液のうち、酢酸濃度が1.5~5.0 mg/mLの濃度範囲で作成した検量線をFig. 4に示す。相関係数が0.987となり、直線が得られなかった。また、酢酸濃度が2.0 mg/mLより高い検体のクロマトグラムでは、酢酸のピークが飽和し、非対称のものであった。

2.4.6で調製した検量線用溶液のうち、酢酸濃度が10 ng/mL~1.5 mg/mLの検体を用いて作成した検量線は、相関係数0.9997で原点付近を通る良好な直線性を示した (Fig. 5)。従って、10 ng/mL~1.5 mg/mLの範囲において、しょうが調製品の定量が可能であると考えられる。

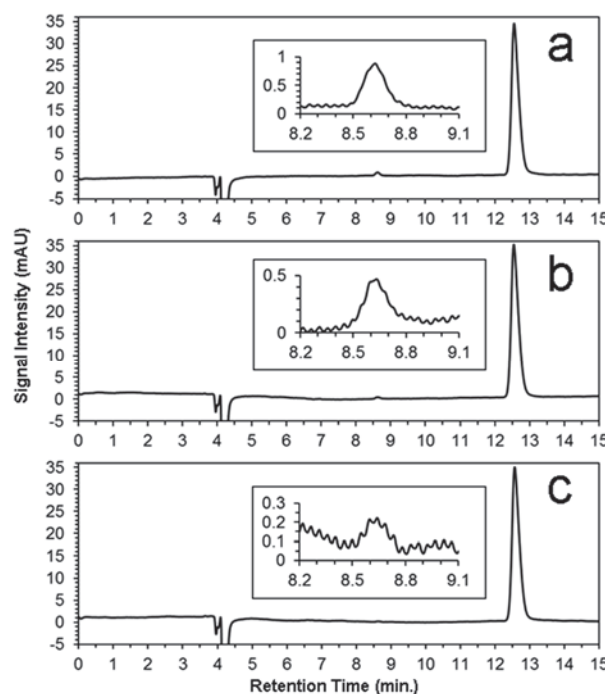


Fig. 3 HPLC chromatograms of sensitivity test for the acetic acid standards. Inset shows the expanded region of the chromatogram with retention time of 8.2~9.1 min. Acetic acid concentration was a, 10 ng/mL; b, 5 ng/mL; c, 2.5 ng/mL.

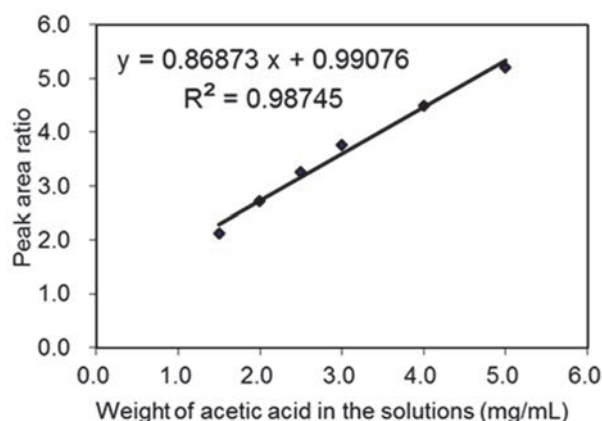


Fig. 4 Calibration curve of acetic acid in the range of 1.5–5.0 mg/mL solution.

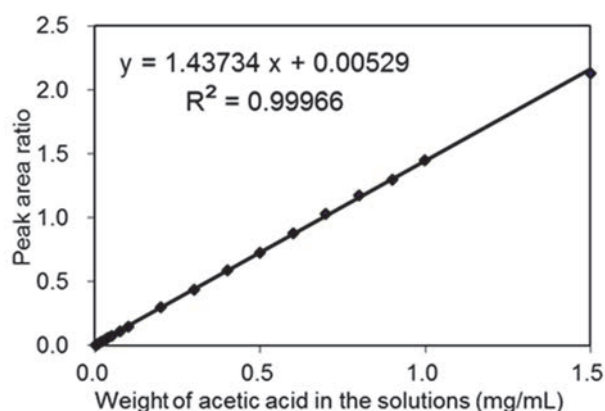


Fig. 5 Calibration curve of acetic acid in the range of 10 ng/mL to 1.5 mg/mL solution.

3.4 擬似試料の測定による添加回収率の確認

2.4.3で調製した擬似試料1及び擬似試料2を2.3の条件でポストカラム法により測定した。調製からの全操作を擬似試料1は9回、擬似試料2は7回行い、それぞれ3回の測定値から酢酸の回収率を求めた (Table 1)。擬似試料1 (酢酸濃度0.5%) 及び擬似試料2 (酢酸濃度1.0%) において、回収率はそれぞれ99.9%及び100.1%であり、再現性 (相対標準偏差) も良好であった。

Table 1 Mean recovery and percentage of relative standard deviation (RSD) data for acetic acid obtained in the pseudo sample of salted ginger (containing 13% salt and 1% citric acid).

Sample type	Sample No.	Number of samples	Added (%)	Found (%)	Recovery (%)	RSD (%)
Pseudo sample	1	9	0.5185	0.5191	99.9	0.71
Pseudo sample	2	7	1.025	1.024	100.1	0.96

3.5 模擬試料の測定における予測値との比較

2.4.4で調製した模擬試料を2.3の条件でポストカラム法により測定した。調製からの全操作を9回行い、それぞれ3回の測定値から酢酸の定量値を求めた (Table 2)。なお、模擬試料中の酢酸含有率の予測値は、以下の式を用いて算出した。

酢酸含有率(%; 予測値)

$$= \text{塩水の酢酸含有率}(\%) \times (100 - \text{不溶性固形分}(\%))/100$$

塩水の酢酸含有率は、2.3の条件でポストカラム法により測定し、3回の測定値の平均値から得た。不溶性固形分は、AOAC Official Method 911.02に従って求めた。

模擬試料のポストカラム法での定量値と予測値を比較したところ、定量値は0.501%、上記の方法で求めた予測値は0.505%であり、回収率は99.1%と良好であった。

Table 2 Mean recovery and percentage of relative standard deviation (RSD) data for acetic acid obtained in the simulation sample of salted ginger.

Sample type	Number of samples	Predicted (%)	Found (%)	Recovery (%)	RSD (%)
Simulation sample	9	0.5051	0.5011	99.2	0.71

3.6 輸入品の測定におけるポストカラム法と直接検出法の比較

2.4.5で調製した輸入品1及び輸入品2を2.3の条件でポストカラム法により測定した。調製からの全操作を輸入品1は9回、輸入品2は15回行い、それぞれ3回の測定値から定量値を求め、直接検出法で得られた定量値と比較した (Table 3)。

輸入品1のポストカラム法での定量値が0.187%、直接検出法での定量値が0.2%であった。また、輸入品2のポストカラム法での定量値が1.026%、直接検出法での定量値が1.1%であった。直接検出法での定量値は、輸入品1及び輸入品2共に2017年に測定したものであり、長期間の保管により酢酸が揮発し、ポストカラム法での定量値が若干低くなったと考えられる。

Table 3 Comparison of acetic acid values obtained by post-column method and direct detection method in imported samples of salted ginger. The values of the direct detection method were obtained in 2017.

Sample type	Sample No.	Number of samples	Post-column method (%)	RSD (%)	Direct detection method (%)
Imported sample	1	9	0.1871	1.60	0.2
Imported sample	2	15	1.026	0.91	1.1

3.7 静置及び振とう時間が測定時間に与える影響

2.4.7の方法で調製した輸入品2を2.3の条件でポストカラム法により測定した。調製からの全操作を各抽出方法で3回行い、それぞれ3回の測定値から得られた定量値を比較した (Table 4)。それぞれの抽出方法での定量値は1.020%~1.029%であり、どの抽出方法でも大きな差異はなかった。従って、しょうがからの酢酸の抽出は、抽出が簡便である30分以上のゆるやかな振とう、または1時間以上の静置のいずれの方法でも可能であると考えられる。

Table 4 Comparison of acetic acid values obtained by post-column method with different extraction methods.

Sample type	Sample No.	Number of samples	Extraction method	Found (%)	RSD (%)
Imported sample	1	3	Slowly shaking for 0.5 hour.	1.029	1.16
Imported sample	2	3	Slowly shaking for 1.0 hour.	1.024	1.27
Imported sample	3	3	Slowly shaking for 2.0 hours.	1.026	1.16
Imported sample	4	3	Leaving to stand for 1 hour.	1.029	0.18
Imported sample	5	3	Stay overnight.	1.020	0.75

4. 要 約

ポストカラム法を用いたHPLCによりしょうが中の酢酸の定量分析法を検討した。有機酸9種をポストカラム法及び直接検出法で測定した結果、ポストカラム法の方がピークの分離が良好で、酢酸の感度も若干高かった。検量線は、10 ng/mL~1.5 mg/mLの範囲で良好な直線性を示した($R^2 > 0.999$)。定量下限である10 ng/mLは、試料中の酢酸含有量0.01%に相当する。しょうがの擬似試料中の酢酸の定量において、回収率は良好であった。また、模擬試料及び輸入品中の酢酸の定量において得られた定量値は、添加量から算出した予測値または他の手法による分析値とほぼ一致した。以上のことから、ポストカラム法を用いたHPLCにより、高精度の酢酸の定量が可能であることが判明した。

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, **52**, 55(2012).
- 3) 北島章光, 松本啓嗣, 河嶋優美, 赤崎哲也, 刈嘉寿: 関税中央分析所報, **52**, 37(2012).
- 4) 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).
- 5) 斎藤義和, 松島紋子, 大田朋樹, 赤崎哲也: 関税中央分析所報, **53**, 51(2013).
- 6) 鈴木忍: 「第11章 調味料」, “食品衛生検査指針—食品添加物編—”, P.296(2003), (日本食品衛生協会)。
- 7) 佐々木翠, 石川晶子, 鈴木裕志, 中川裕章: 分析化学, **59**, 247(2010).
- 8) (株) 島津製作所: “LC talk Vol. 94”, P.5(2015).
- 9) AOAC Official Method 911.02, Solids (Insoluble) in Canned Vegetables (1911)