

# 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた 果汁中の有機酸の定量分析法について

浅野 沙也佳\*, 加藤 真実\*, 立川 敦生\*, 竹内 孝幸\*, 松本 啓嗣\*\*

## Quantitative Analysis of Organic Acid in Fruit Juice by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

ASANO Sayaka\*, KATO Mami\*, TACHIKAWA Atsuo\*, TAKEUCHI Takayuki\* and MATSUMOTO Yoshitsugu\*\*

\*Nagoya Customs Laboratory, 2-3-12, Irifune, Minato-ku, Nagoya, Aichi, 455-8535 Japan

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

The content of organic acid is generally measured by the neutralization titration method; however this method cannot analyze the composition of organic acid. In this study, the content of organic acid in fruit juice and concentrated juice drink by HPLC was examined. Conditions for separation of tartaric acid, malic acid and citric acid were established, enabling the simultaneous analysis of multiple organic acids. Compared to the neutralization titration method, the acid content by HPLC was higher than that by the neutralization titration method not only due to the free acid but also due to the combined acid content measured by HPLC.

## 1. 緒 言

有機酸は果実や野菜に含有され、主に酸味を呈する。また食品工業においては、酸味料や酸化防止剤、抗菌剤などとして多くの食品に添加されるため、有機酸の含有量は風味や保存性の指標となる。

関税率表では、有機酸の含有量によって関税分類が変わるものが複数あり、例えば果汁は第 20.09 項に分類されるが、国内分類例規に記載されている総酸量の基準値を超えるものはこの項から除外される。また、果汁から脱色・脱酸等の工程を経て濃縮した物品には香気や酸味がないものがあり、これらは果汁本来の性格を失っているものとして第 20.09 項には分類されない。このような製品の分類の決定には果実本来の特性を有しているかが判断基準となる。国内分類例規で総酸量の基準が定められているものは限定的で、多くは基準がないため、有機酸を個別に定量し、果実が天然に含有している量と比較することが必要である。よって有機酸の総酸量だけでなく組成を分析し、それぞれの有機酸を定量することは関税分類において非常に有用となる。

従来、有機酸の総酸量の測定には中和滴定法が用いられている<sup>1)</sup>が、中和滴定法では有機酸の組成を測定することはできない。また、食品中の有機酸の分析法として、ポストカラム法を用いた高速液体クロマトグラフィー（以下「HPLC」という。）が報告されている<sup>2)</sup>。ポストカラム法では、有機酸をカラムで分離し、pH 指示薬である BTB 溶液と混合させて可視吸収波長を検出するため、夾雑物の影響を受けず、複数の有機酸を同時に分析することがで

きる。さらに装置内で反応を行うため、煩雑な前処理が不要である。一方、ポストカラムシステムは装置が複雑となるため、対応が難しいという問題がある。

そこで本研究では、ポストカラム法を用いない HPLC による有機酸の定量分析法を検討した。国内分類例規において総酸量の基準値が定められているぶどう、りんご及びオレンジを試料とし、果汁中に含まれる有機酸量を測定した。そして、従来の分析法である中和滴定法と比較したので報告する。

## 2. 実 験

### 2.1 試薬及び試料

#### 2.1.1 試薬

くえん酸、りん酸二水素ナトリウム二水和物、アセトニトリル、D(-)-フルクトース、L(+)-アスコルビン酸、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム液（以上、富士フィルム和光純薬製（旧和光純薬工業製を含む））

エチレフリン塩酸塩（東京化成工業製）

スクロース（関東化学製）

りん酸、D(+)-グルコース（以上、シグマアルドリッチジャパン製）

酒石酸、L(-)-りんご酸（以上、片山化学工業製）

#### 2.1.2 試料

ぶどう、りんご、オレンジ（ネーブル）、ぶどう濃縮還元ジュース、りんご濃縮還元ジュース、オレンジ濃縮還元ジュース（市

\* 名古屋税関業務部 〒455-8535 愛知県名古屋市中区入船 2-3-12

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

販品)

## 2.2 装置及び測定条件

### 2.2.1 高速液体クロマトグラフ

装置	: LC-20 システム (島津製作所製)
検出器	: フォトダイオードアレイ紫外可視検出器
カラム	: Sunniest RP-AQUA (4.6 mm×250 mm) 粒径 5 µm (クロマニックテクノロジー製)
検出波長	: UV 220 nm
溶離液 A	: 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.1)
溶離液 B	: 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液:アセトニトリル=4:1
グラジエント条件	: Table 1 の通り

Table 1 Gradient condition of mobile phase

Time (min)	%B
0	0
2	0
22	50.0
27	50.0
27.01	0
42	0

流速	: 1.0 mL/min
カラム温度	: 30°C
注入量	: 10 µL

### 2.2.2 電位差自動滴定装置

装置	: GT-200 (三菱化学アナリテック (現日東精工アナリテック) 製)
電極	: ダブルジャンクション型参照電極 (GTRE10B), ガラス電極 (GTPH1B)

## 2.3 実験方法

### 2.3.1 有機酸の分離条件及び内部標準物質の検討

#### 2.3.1 (1) 試料溶液の調製

100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.1) : 1000 mL 容メスフラスコにりん酸二水素ナトリウム二水和物 7.8 g を量り取り, 約 500 mL の水に溶解させ, リン酸 3.4 mL をマイクロピペットで加え, 水で定容したもの

標準試薬溶液: それぞれ異なる 20 mL バイアルに酒石酸, リンゴ酸, くえん酸, アスコルビン酸及びエチレフリン塩酸塩をそれぞれ約 20 mg 量り取って水を約 10 mL 加えて溶解させ, マイクロピペットで約 100 µL ずつ分取し, 水を加えて約 1 mL としたもの

#### 2.3.1 (2) 有機酸の分離条件及び内部標準物質の検討

2.3.1(1)で調製した標準試薬溶液を 2.2.1 の条件で測定した。

### 2.3.2 検量線の作成及び直線性の評価

#### 2.3.2 (1) 検量線用溶液の調製

検量線用酒石酸溶液: 100 mL 容メスフラスコに酒石酸 500 mg

を正確に量り取り, 水で定容したもの

検量線用酒石酸希釈液: 50 mL 容メスフラスコに検量線用酒石酸溶液 10 mL をホールピペットで加え, 水で定容したもの

検量線用りんご酸溶液: 100 mL 容メスフラスコに L(-)-りんご酸 500 mg を正確に量り取り, 水で定容したもの

検量線用りんご酸希釈液: 50 mL 容メスフラスコに検量線用りんご酸溶液 10 mL をホールピペットで加え, 水で定容したもの

検量線用くえん酸溶液: 100 mL 容メスフラスコにくえん酸 500 mg を正確に量り取り, 水で定容したもの

検量線用くえん酸希釈液: 50 mL 容メスフラスコに検量線用くえん酸溶液 10 mL をホールピペットで加え, 水で定容したもの

内部標準溶液: 500 mL 容メスフラスコにエチレフリン塩酸塩 500 mg を量り取り, 水で定容したもの

#### 2.3.2 (2) 検量線の作成 (0.01–0.15 mg/mL)

2.3.2 (1)で調製した検量線用酒石酸, リンゴ酸及びくえん酸希釈液 1, 3, 5, 7, 10, 15 mL をそれぞれ異なる 100 mL 容メスフラスコにホールピペットで分取した。さらに内部標準溶液 10 mL をホールピペットで加え, 水で定容したものを検量線用検液とした。この検液を 2.2.1 の条件でそれぞれ 3 回測定した。

#### 2.3.2 (3) 検量線の作成 (0.25–1 mg/mL)

2.3.2 (1)で調製した検量線用酒石酸, リンゴ酸及びくえん酸溶液 5, 10, 15, 20 mL をそれぞれ異なる 100 mL 容メスフラスコにホールピペットで分取した。さらに内部標準溶液 10 mL をホールピペットで加え, 水で定容したものを検量線用検液とした。この検液を 2.2.1 の条件でそれぞれ 3 回測定した。

### 2.3.3 標準試薬溶液における回収試験

#### 2.3.3 (1) 標準試薬溶液の調製

ぶどう, リンゴ及びオレンジ標準試薬溶液: それぞれ異なる 50 mL 容メスフラスコに, Table 2 に示す通りに有機酸及び糖を量り取り, 水で定容したもの。なお, 各物質の含有割合はぶどう, リンゴ及びオレンジ果実の成分割合と同一とした<sup>3)</sup>。

Table 2 Components of grape, apple and orange standard solution

Standard solution	Added components (mg)						
	Tar	Mal	Cit	Glu	Fru	Suc	Asc
Grape	100	50	-	1,800	1,700	-	-
Apple	-	100	-	280	1,200	1,000	-
Orange	-	10	100	240	260	500	10

(Tar: Tartaric acid, Mal: Malic acid, Cit: Citric acid, Glu: Glucose, Fru: Fructose, Suc: Sucrose, Asc: Ascorbic acid)

#### 2.3.3 (2) 標準試薬溶液における回収試験

2.3.3 (1)で調製したぶどう, リンゴ及びオレンジ標準試薬溶液 20 mL をそれぞれ異なる 100 mL 容メスフラスコにホールピペットで分取した。さらに内部標準溶液 10 mL をホールピペットで加え, 水で定容したものを検液とした。この検液を 2.2.1 の条件でそれぞれ 3 回測定した。

### 2.3.4 果汁及び濃縮還元ジュースにおける添加回収試験

#### 2.3.4 (1) 試料及び添加用溶液の調製

果汁：市販のぶどう，りんご及びオレンジ（ネーブル）について，それぞれ皮，芯及び種があるものはこれらを取り除き，ミキサーで粉碎，又は果汁絞り器で絞り出した試料をガーゼで濾したもの

添加用酒石酸溶液：100 mL 容メスフラスコに酒石酸 200 mg を正確に量り取り，水で定容したもの

添加用りんご酸溶液：200 mL 容メスフラスコに L(-)-りんご酸 250 mg を正確に量り取り，水で定容したもの

添加用くえん酸溶液：200 mL 容メスフラスコにくえん酸 400 mg を正確に量り取り，水で定容したもの

#### 2.3.4 (2) 果汁及び濃縮還元ジュースにおける添加回収試験

2.3.4 (1)で調製した果汁 5 g 又は市販の濃縮還元ジュース 5 mL をそれぞれ異なる 100 mL 容メスフラスコに正確に量り取り，Table 3 に示すとおりに添加用酒石酸，りんご酸又はくえん酸溶液を加えた．さらに内部標準溶液 10 mL をホールピペットで加え，水で定容したものを 1 時間静置した．溶液の上澄みを孔径 0.22  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターで濾過したものを検液とした．この検液を 2.2.1 の条件でそれぞれ 3 回測定した．

Table 3 The addition amount to sample for spike and recovery test

Fruit juice or concentrated juice drink	Added organic acid solution	Addition amount (Final concentration (w/v%))		
		1	2	3
Apple	Tartaric acid	5 mL	10 mL	15 mL
		(0.01%)	(0.02%)	(0.03%)
Orange	Malic acid	10 mL	20 mL	30 mL
		(0.0125%)	(0.025%)	(0.0375%)
Grape	Citric acid	10 mL	20 mL	30 mL
		(0.02%)	(0.04%)	(0.06%)

### 2.3.5 中和滴定法との比較

#### 2.3.5 (1) HPLC による総酸量の測定

市販のぶどう，りんご及びオレンジ濃縮還元ジュース 5 mL をそれぞれ異なる 100 mL 容メスフラスコにホールピペットで分取した．さらに内部標準溶液 10 mL をホールピペットで加え，水で定容したものを 1 時間静置した．溶液の上澄みを孔径 0.22  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターで濾過したものを検液とした．この検液を 2.2.1 の条件でそれぞれ 3 回測定した．

#### 2.3.5 (2) 中和滴定法による総酸量の測定

市販のぶどう，りんご及びオレンジ濃縮還元ジュース 5 mL をそれぞれ異なる 200 mL ビーカーにホールピペットで分取した．さらに水 95 mL をメスシリンダーで量り取って加えたものをそれぞれ 3 検体調製し，スターラーで 1 時間攪拌したものを検液とした．この検液を果実飲料の日本農林規格<sup>1)</sup>に従って電位差自動滴定装置により滴定した．空試験として，水 100 mL をメスシリンダーで量り取り，200 mL ビーカーに入れたものを同様に滴定する

ことでブランクを求めた．

## 3. 結果及び考察

### 3.1 有機酸の分離条件及び内部標準物質の検討

2.3.1(1)で調製した標準試薬溶液について，2.2.1 の条件で測定した結果を Fig. 1 に示す．内部標準物質として検討したエチレフリン塩酸塩は，有機酸との分離が良好であったため，内部標準物質として採用することとした．

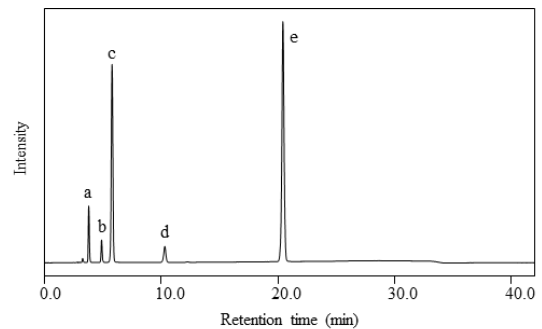
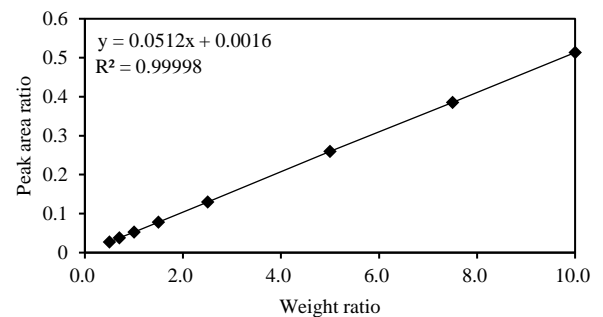


Fig. 1 Chromatogram of tartaric acid, malic acid, citric acid, ascorbic acid and etilefrin (a: Tartaric acid, b: Malic acid, c: Ascorbic acid, d: Citric acid, e: Etilefrin)

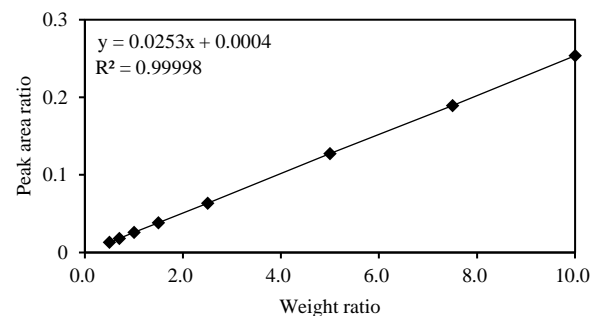
### 3.2 検量線の作成及び直線性の評価

2.3.2 で作成した検量線を Fig. 2 に示す．相関係数 0.9999 以上で原点付近を通る良好な直線性を示した．

(a)



(b)



(c)

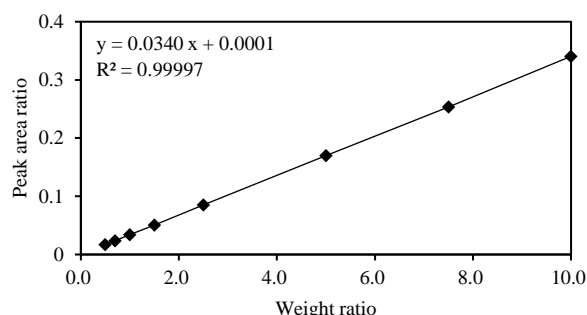


Fig. 2 Calibration curves of (a) tartaric acid, (b) malic acid and (c) citric acid

### 3.3 標準試薬溶液における回収試験の結果

2.3.3 で調製した検液をそれぞれ 3 回繰り返し測定し、有機酸の回収率を求めた結果を Table 4 に示す。回収率は 99.7% から 100.8% となり、相対標準偏差も 0.35% 以下とおおむね良好な結果が得られた。

Table 4 Recovery of organic acid added in grape, apple and orange standard solution

Standard solution	Added organic acid	Recovery (%)	RSD (%)
Grape	Tartaric acid	99.8	0.19
	Malic acid	100.7	0.35
Apple	Malic acid	100.8	0.32
Orange	Malic acid	99.7	0.22
	Citric acid	99.7	0.31

### 3.4 添加回収試験の結果

2.3.4 で調製した溶液をそれぞれ 3 回繰り返し測定し、りんご果汁及びりんご濃縮還元ジュースに添加した酒石酸、オレンジ果汁及びオレンジ濃縮還元ジュースに添加したりんご酸並びにぶどう果汁及びぶどう濃縮還元ジュースに添加したくえん酸の回収率を求めた結果を Table 5 に示す。なお、りんご由来の夾雑成分ピークと酒石酸の保持時間が重複するため、この夾雑成分を酒石酸とみなし、酒石酸の検量線を用いて夾雑成分のピーク面積値から酒石酸の量として換算し、添加後の酒石酸量から減算することで回収率を求めた。

その結果、添加量が多いほど良好な結果が得られた。りんご果汁に添加した酒石酸の回収率が若干大きくなったものの、果実の

有機酸含有量の個体差によるばらつきを考慮すると特段問題ないと思料される。

### 3.5 中和滴定法との比較

2.3.5 において、HPLC 及び中和滴定法によって求めた総酸量を Table 6 に示す。なお、HPLC による総酸量は、HPLC で酒石酸、りんご酸及びくえん酸の含有量を算出し、それぞれの濃縮還元ジュースに含有されるアスコルビン酸量<sup>3)</sup>を加算した。そして、算出した総酸量を国内分類規第 20.09 項に記載されているとおり、ぶどう濃縮還元ジュースは酒石酸に、りんご濃縮還元ジュースはりんご酸に、オレンジ濃縮還元ジュースはくえん酸に換算した。中和滴定法による総酸量は、それぞれの濃縮還元ジュースの滴定値を、ぶどう濃縮還元ジュースは酒石酸量に、りんご濃縮還元ジュースはりんご酸量に、オレンジ濃縮還元ジュースはくえん酸量に換算した。

HPLC 及び中和滴定法により算出した総酸量を比較すると、ぶどう濃縮還元ジュースでは HPLC による定量値と中和滴定法による定量値の間に有意差はなかったが、りんご及びオレンジ濃縮還元ジュースでは HPLC による定量値の方が大きくなり、特にオレンジ濃縮還元ジュースで顕著であった。この原因のひとつとして、測定の対象としている酸が異なることが考えられる。果汁中には遊離酸と結合酸が存在する<sup>4)</sup>が、HPLC では分離液を pH 2.1 としているため分析時には結合酸が遊離し、遊離酸だけでなく結合酸も含めて測定していると考えられる<sup>5)</sup>。しかし、中和滴定法では遊離酸のみを測定しているため、HPLC により算出した総酸量より小さくなったと考えられる。

## 4. 要 約

本研究では HPLC により果汁に含まれる有機酸の定量分析法を検討した。その結果、果汁及び濃縮還元ジュースに含まれる有機酸を分離でき、組成の分析が可能であった。しかし酸味の要因となる遊離有機酸<sup>6)</sup>のみの測定には向かないが、遊離酸と結合酸の総和である有機酸の定量分析が可能であると考えられる。また、低濃度領域での再現性に問題があり、微量に含まれる有機酸の分析は困難であった。今後、遊離酸のみをより高感度に測定するために、試料の前処理や抽出法等の検討が必要であるが、他の果物や野菜を含む広範囲の食品中の有機酸を定量する分析法としての応用が期待できる。

Table 5 Recovery of (a) tartaric acid, (b) malic acid and (c) citric acid added in fruit juice and concentrated juice drink

(a)

sample	10.0 mg added		20.0 mg added		30.0 mg added	
	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
Apple fruit juice	104.2	3.69	103.5	0.34	102.0	0.02
Apple concentrated juice drink	101.7	0.55	100.7	0.87	99.9	0.42

(b)

sample	12.5 mg added		25.0 mg added		37.5 mg added	
	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
Orange fruit juice	101.7	1.16	102.1	0.21	99.7	0.76
Orange concentrated juice drink	98.9	0.20	99.4	0.38	100.2	0.44

(c)

sample	20.0 mg added		40.0 mg added		60.0 mg added	
	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
Grape fruit juice	101.8	0.16	100.8	0.19	100.5	0.28
Grape concentrated juice drink	102.1	0.44	100.9	0.30	101.0	0.15

Table 6 Total acid content measured by HPLC and the neutralization titration method

Concentrated juice drink	HPLC								Neutralization titration	
	Tartaric acid (mg/5 mL)	RSD (%)	Malic acid (mg/5 mL)	RSD (%)	Citric acid (mg/5 mL)	RSD (%)	Ascorbic acid <sup>3)</sup> (mg/5 mL)	Total acid (mg/5 mL)	Total acid (mg/5 mL)	RSD (%)
Grape	5.6	0.88	5.8	0.60	0.6	-	-	12.6	13.0	0.85
Apple	-	-	17.7	0.37	-	-	0.1	17.7	13.7	0.39
Orange	-	-	8.3	0.55	40.1	0.06	1.6	53.4	33.0	0.24

## 文 献

- 1) 農林水産省：果実飲料の日本農林規格
- 2) 新 食品分析ハンドブック (2000) (菅原龍幸)
- 3) 日本食品標準成分表2015年版（七訂）(2015) (文部科学省)
- 4) 藤原孝之，磯崎真英，小西信幸，坂倉元，日本食品科学工学会誌，**47**，227 (2000)
- 5) 余小林，徐歩前，沢村正義，園芸学会雑誌，**73**，293 (2004)
- 6) 八巻良和，園芸学会雑誌，**56**，457 (1988)