

吸光度検出イオンクロマトグラフィーによる有機酸の一斉分析
——溶離液切り換えによる清涼飲料水中の酸味料分析¹⁾

山本 敦,^a 松永明信,^a 牧野正雄,^a
早川和一,^b 宮崎元一^b
富山県衛生研究所,^a 金沢大学薬学部^b

**Simultaneous Determination of Organic Acids by Photometric
Ion Chromatography—Analysis of Sour-Taste Agents
in Soft Drinks by Eluent Exchange**

ATSUSHI YAMAMOTO,^a AKINOBU MATSUNAGA,^a MASAO MAKINO,^a
KAZUICHI HAYAKAWA^b and MOTOICHI MIYAZAKI^b
*Toyama Institute of Health,^a 17-1 Nakataikoyama, Kosugimachi,
Toyama 939-03, Japan and Faculty of Pharmaceutical
Sciences, Kanazawa University,^b 13-1 Takara-
machi, Kanazawa 920, Japan*

(Received November 17, 1986)

A method for the simultaneous determination of organic acids was investigated by photometric ion chromatography by using two different eluents. A 4.6 mm i.d. × 25 cm stainless column packed with MCI GEL SCA 01 (Mitsubishi Chemical Ind., Ltd.) was used as a separator column. Sample was injected into this column previously equilibrated with 1 mM citraconic acid at pH 6.8. After elution of monobasic organic acids, the eluent was exchanged to a stronger one, 1 mM *m*-sulfo benzoic acid at pH 6.8. Dibasic organic acids were eluted before the column reequilibration with the secondary eluent. On the other hand, tribasic organic acids such as citric acid were eluted with the secondary eluent. To prevent the base line disorder due to the eluent exchange, the determination at 254 nm was performed. Because this wave length is an isosbestic point of the two eluents.

Sour-taste agents in soft drinks could be analysed directly after dilution of samples.

Keywords—photometric ion chromatography; eluent exchange; isosbestic point; organic acid; sour-taste agent; soft drink

緒 言

クエン酸、酒石酸等の有機酸は、各種加工食品へ主に酸味、制菌の目的で使用されている。また発酵食品中にも多くの有機酸が含まれており、これら食品中の有機酸含有量を把握することは、食品衛生上あるいは製品管理上重要なことである。

従来、これらの有機酸分析は、ガスクロマトグラフ (GC) 法,²⁾ 酵素法,³⁾ 高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法^{3,4)} 等により行われている。しかし GC 法は前処理が繁雑であり、また酵素法は特定の酸のみを精度よく分析するには有効な方法であるが、各種有機酸の一斉分析に

は適さない。一方 HPLC 法では、種々の充填剤、種々の検出法による有機酸の一斉分析例は数多く報告されている。

最近、著者らは吸光度検出イオンクロマトグラフィー (PIC) により、UV 検出器を用いた HPLC で有機酸が分析できることを報告した。⁵⁾ しかしこの方法では分析感度を上げるために溶離液の pH を高くして有機酸を解離させる必要がある。このように完全解離させた場合、イオン交換モードではその塩基数により保持時間が大きく異なり、アイソクラテックな条件での一斉分析は困難となる。一般にこのような物質の一斉分析には溶離液

のグラジエント分析⁶⁾ が用いられている。しかし PIC はカラムからの溶出液の吸光度の変化により、イオン性物質の溶出を検出する方法であるため、溶離液の濃度を大きく変化させるグラジエント分析は困難である。他の一斉分析法としては、イオン交換容量の異なる2種類の分離カラムを用いるカラムスイッチング法⁷⁾ あるいは溶出力の異なる2種類の溶離液を用い、その切り換えにより分析する方法⁸⁾ 等がある。今回は後者の方法により、PIC での有機酸一斉分析の条件を検討し、更に清涼飲料水に酸味料として使用されている有機酸の一斉分析に適用できたので報告する。

実験方法

1. 試料 市販の清涼飲料水を購入し、試験に供した。

2. 試薬 シトラコン酸は半井化学薬品特級品を、*m*-スルホ安息香酸ナトリウムは関東化学製品を用いた。その他の試薬は試薬特級品を用いた。

3. HPLC 装置 装置は LC-4A 型ポンプ(島津製作所)、ルーブインジェクター(レオダイン 7125型)、SPD-2A 型 UV 検出器(島津製作所)、分析カラムとして MCI GEL SCA01 陰イオン交換樹脂(粒子径 10 μm 、三菱化成工業)を 4.6 mm i.d. \times 25 cm のステンレスカラムにスラリー法で充填したものを組み合わせて構成した。またカラム温度は UC-65 型恒温水槽(東京理化学器械)とウォータージャケットを用いて調整した。

4. HPLC 条件 溶離液として A 液; 1 mM シトラコン酸溶液 (pH 6.8), B 液; 1 mM スルホ安息香酸溶液 (pH 6.8), C 液; 10 mM シトラコン酸溶液の 3 液を用意し、次のように送液した。分析開始時から 10 分までは A 液、その後 70 分までは B 液を用いて分析を行った。分析終了後 C 液を 30 分間送液してカラムの再平衡化を行い、再び A 液に戻した。開始時から 110-120 分後に次の分析を行った。

カラム温度は 30°C, 流速 1.2 ml/min, 検出感度 0.08 a.u.f.s., 試料注入量 30 μl , 検出波長は 254 nm で行った。

結果及び考察

1. 分析カラムの検討

本法による有機酸の一斉分析では、分析時間を短くするために、イオン交換容量が小さく、しかも有機酸の分離に優れたカラムが必要である。分析カラムとしてシリカ系 Zipax SAX (Du Pont), ポリスチレン系 MCI GEL SCA 01 及びポリメタクリレート系樹脂カラム TSK gel IC-Anion-PW (東洋曹達工業) を検討した。

PIC で有機酸の高感度分析を行うためには有機酸を完

全解離させる必要がある。⁹⁾ このような条件で、疎水性な分配を受けることのないシリカゲルや親水性ポリメタクリレート担体のカラムを用いた場合、塩基数の等しい有機酸間の分離は不十分であった。そこで分析カラムとしてはポリスチレン系の MCI GEL SCA 01 を充填したものをを用いた。

2. 溶離液の検討

本法は、溶出力の弱い溶離液で平衡化されたカラムに試料注入後、溶出力の強い溶離液に切り換え、カラムの対イオンが第二の溶離液の溶質で置換(平衡化)される前に一及び二塩基性有機酸を溶出させる。一方三塩基性有機酸は、強い第二の溶離液により平衡化後に溶出させるという考え方に基づくものである (Fig. 1)。したがって 2 種類の溶離液としては、一及び二塩基酸を分離よく溶出させる第一の溶離液と、カラムの平衡化後に三塩基酸を溶出させる溶出力の強い第二の溶離液を用いればよいことになる。今回三塩基酸としては、対象が食品成分であることからクエン酸だけを検討した。

Fig. 2 は今回用いた分析カラムでの、種々の溶離液による有機酸の溶出位置を示したものである。溶出力の弱い溶離液としてソルビン酸や *p*-アニス酸のようなモノカルボン酸を用いた場合、二塩基酸は溶出されない。また *m*-スルホ安息香酸やトリメシク酸のような溶出力の

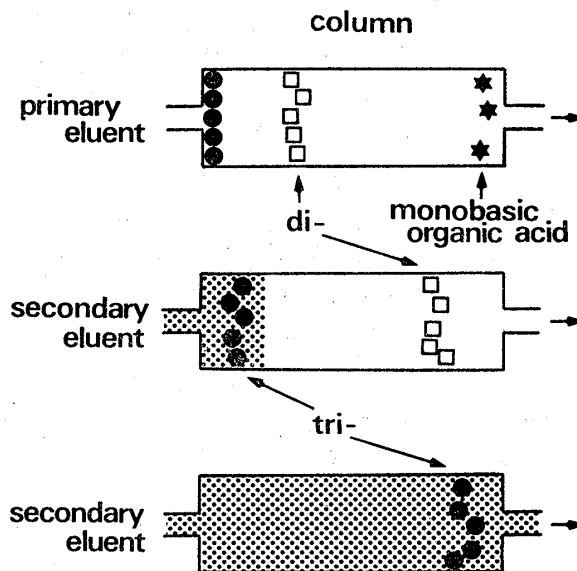


Fig. 1. Principle of Separation for the Mixture of Organic Acids Having Various Retention Times by Using Two Different Eluents

Primary eluent: an eluent having weak eluting power such as weak acid.

Secondary eluent: an eluent having strong eluting power such as strong acid.

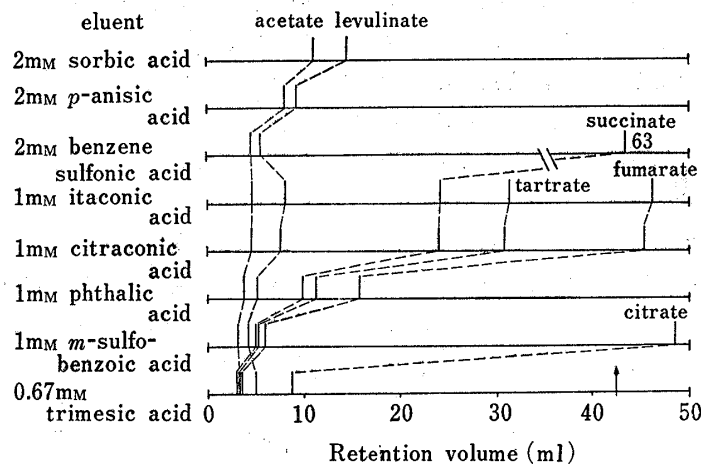


Fig. 2. Retention Volumes of Organic Acids Using Various Eluents on MCI GEL SCA01 Column

↑: ion exchange capacity of separator column.

強い酸では、一及び二塩基酸の分離は不十分となる。そこで溶出力の弱い第一の溶離液としては脂肪族のジカルボン酸を用いることとした。

一方溶出力の強い溶離液として *m*-スルホ安息香酸を用いれば、三塩基酸のクエン酸はこの *m*-スルホ安息香酸によるカラムの平衡化終了後直ちに溶出される。ところでこの分析カラムのイオン交換容量は約 0.084 meqであったため、1 mM の *m*-スルホ安息香酸に切り換えた場合、カラムが *m*-スルホ安息香酸で平衡化されるのに 35分程要する。この時間内に二塩基酸まで溶出させるためには、溶離液の切り換えは一塩基酸が溶出した後に行えばよいことが Fig. 2 より推測される。

ここで溶離液を切り換えることにより、ベースラインが変化しないようにするためには、検出波長として 2 種類の溶離液の等吸収点を選ぶ必要がある。Fig. 3 に一及び二塩基酸の分離に使用可能な溶離液としてのイタコン酸、シトラコン酸、並びに溶出力の強い溶離液としての *m*-スルホ安息香酸の UV スペクトルを示した。これより溶離液として等吸収点を有するシトラコン酸と *m*-スルホ安息香酸が適当であると考えられた。

3. カラム温度の影響

イオン交換モードでは、一般にカラム温度の上昇に伴い、拡散が促進されることにより、ピークの形状が改善されるといわれている。⁹⁾ また温度変化は有機酸の酸解離定数にも影響を及ぼし、その溶出位置も変化するものと考えられる。Fig. 4 はカラム温度が有機酸の分離に及ぼす影響を調べたものである。温度上昇と共に各有機酸ピークの理論段数は高くなっていったが、逆に溶出位置は接近し、全体として有機酸の分離は良くならなかつ

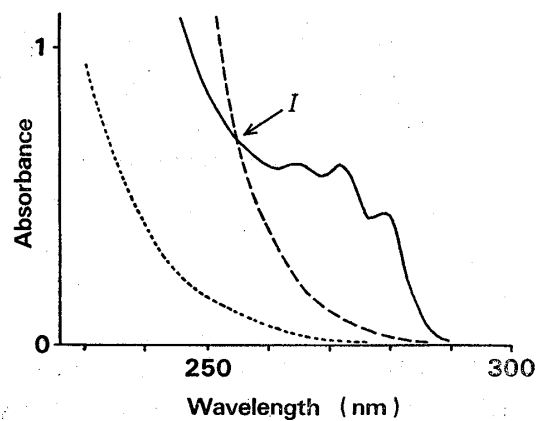


Fig. 3. Absorption Spectra of Eluents

---: 1 mM of citraconic acid,: 1 mM of itaconic acid, —: 1 mM of *m*-sulfo-benzoic acid. I: isosbestic point.

た。そこでカラム温度は 30°C で分析を行うこととした。

その他の測定条件は、有機酸の分析感度や測定時間を考慮し、既報⁹⁾を参考に実験方法 3 の通りに定めた。

4. 標準クロマトグラムと定量性

PIC は、 pK_a が小さく UV 吸収を持たない塩基数の等しい酸に対しては、等モル濃度で面積の等しい負のピークを与える。¹⁰⁾ しかし有機酸は pK_a が大きく、UV 吸収を有するものもあり、ピークの大きさは試料により異なる。Fig. 5 に本法での有機酸の標準クロマトグラムを示した。これは記録計の極性を逆にして得られたもので、フマル酸は 254 nm で大きな吸収を有するために、負のピークとして現れた。また 15—19 分と 50—52 分にそれぞれ溶離液の切り換えによるベースラインの乱れが生じたが、これらはいずれも有機酸分析の妨げとはならな

TABLE I. Reproducibility of Determination of Organic Acids in the Standard Solution

| | Retention time (min) | | | | |
|-----------|----------------------|-----------|----------|----------|---------|
| | Gluconate | Succinate | Malonate | Fumarate | Citrate |
| 1 | 3.11 | 24.2 | 30.2 | 45.5 | 64.3 |
| 2 | 3.11 | 24.1 | 30.3 | 45.6 | 63.8 |
| 3 | 3.12 | 24.9 | 30.5 | 45.7 | 63.6 |
| 4 | 3.12 | 24.5 | 30.4 | 45.6 | 63.7 |
| 5 | 3.12 | 24.3 | 30.3 | 45.7 | 64.1 |
| \bar{x} | 3.116 | 24.40 | 30.34 | 45.62 | 63.90 |
| C.V.(%) | 0.2 | 1.3 | 0.4 | 0.2 | 0.5 |

HPLC conditions were the same as given in Fig. 5.

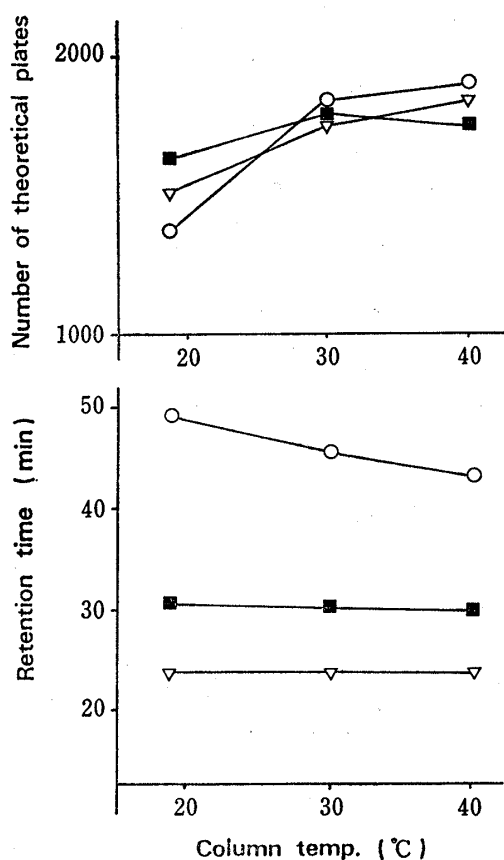


Fig. 4. Effect of Column Temperature on the Resolution of Chromatogram

—○—: fumarate, —■—: malonate, —▽—: succinate.

かった。

そこで本法での定量はピーク高、あるいは谷の深さによった。ピーク高さによる検量線では、酢酸で 2×10^{-6} — 3×10^{-4} M, コハク酸, 酒石酸で 2×10^{-5} — 3×10^{-3} M, フマル酸, クエン酸で 10^{-4} — 5×10^{-3} M の範囲で直線性が見られた。また検出限界 ($S/N=3$) は、酢酸で 0.05 $\mu\text{g/ml}$, コハク酸, 酒石酸で 0.5 $\mu\text{g/ml}$, フマル酸で 2 $\mu\text{g/ml}$, クエン酸で 7 $\mu\text{g/ml}$ であった。

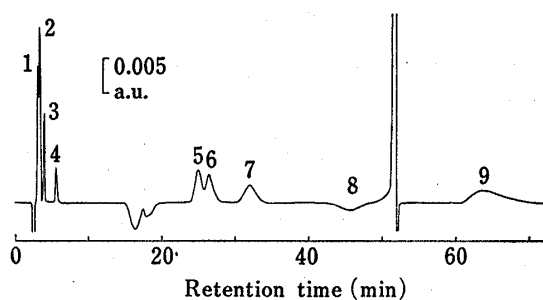


Fig. 5. Chromatogram of Nine Organic Acids in the Standard Solution

Peaks: 1, acetate (0.5 mM); 2, formate (0.5 mM); 3, propionate (0.5 mM); 4, levulinic acid (0.5 mM); 5, succinate (1 mM); 6, malate (1 mM); 7, tartrate (1 mM); 8, fumarate (1 mM); 9, citrate (3 mM).

HPLC conditions: column, MCI GEL SCA01 (4.6 mm i.d. \times 250 mm); sample size, 10 μl ; flow rate, 1.2 ml/min; eluents, (1) 1 mM citraconic acid (pH 6.8), (2) 1 mM *m*-sulfo-benzoic acid (pH 6.8), (1) was exchanged to (2) at 10 min after sample injection; detector, 254 nm (0.08 a.u.f.s.); column temperature, 30°C.

5. 分析の再現性

分析カラムは1回の分析終了毎にシトラコン酸により再平衡化しなければならない。この再平衡化が十分でないとは分析の精度に影響を与える。再平衡化は 10 mM シトラコン酸溶液を30分間流して行い、各々の有機酸のクロマトグラムでの保持比の繰り返し再現性を求めた (Table I)。変動係数はいずれも 2% 以下で、分析カラムの再平衡化はこの条件で十分であった。したがって本法における有機酸分析では1回の分析に約2時間要することになる。

6. 実試料への応用

現在我が国で、酸味料として使用許可されている有機酸はクエン酸等9種類である。これら有機酸は独自の酸味を有し、その組み合わせによって清涼飲料水に独特の酸味を持たせている。¹¹⁾

そこで実試料分析への応用として、清涼飲料水中の酸味料の分析を試みた。試料は水酸化ナトリウム溶液中で中

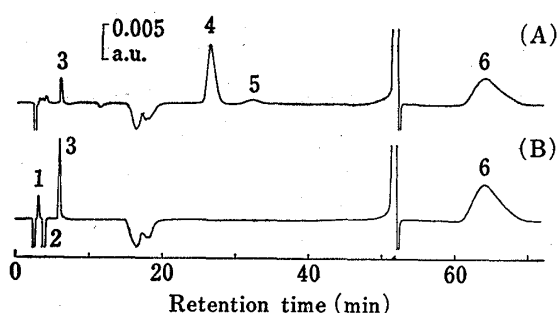


Fig. 6. Chromatograms of Organic Acids Contained in Grape Juice (A) and Sports Drink (B)

Peaks: 1, lactate; 2, ascorbate; 3, chloride; 4, malate; 5, tartrate; 6, citrate.

HPLC conditions: sample size, 30 μ l; others, same as in Fig. 5.

和した後、水で10倍に希釈し直接注入した。これらのクロマトグラム例を Fig. 6 に示した。果汁入りグレープジュースからはリンゴ酸が 1.23 g/kg, 酒石酸が 0.13 g/kg, クエン酸が 1.16 g/kg 検出された。天然のグレープ果汁中には0.2—0.4%のほぼ同量のリンゴ酸と酒石酸が

存在するが、クエン酸は存在しないことが報告されており,¹²⁾ この製品には酸味料としてリンゴ酸とクエン酸が使用されているものと推定された。スポーツドリンクからは乳酸が 0.08 g/kg, クエン酸が 1.71 g/kg 検出された。

以上のように本法では、液体食品の酸味料の一斉分析が可能であったが、有機酸はこれ以外にも種々の食品添加物あるいは発酵成分として各種食品中に含まれており、応用範囲は広がるものと考えられる。

ま と め

2種類の溶離液を用いた吸光度検出イオンクロマトグラフィーによる有機酸の一斉分析法を確立した。溶離液はシトラコン酸と *m*-スルホ安息香酸を用い、その切り換えにより一塩基酸から三塩基酸までの分析が可能であった。溶離液切り換えに伴うベースラインの乱れを防ぐため、検出波長にはこれら溶離液の等吸収点である 254 nm を選んだ。そして本法を清涼飲料水に適用し、酸味料として用いられた有機酸の分析を行った。

引用文献及び注

- 1) 本研究の要旨は日本薬学会第104年々会, 千葉, 1986年4月において発表。
- 2) J.N. Mollica, M.F. Morselli, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **67**, 1125 (1984); T. Tsuda, H. Nakanishi, T. Morita, J. Takebayashi, *ibid.*, **68**, 902 (1985).
- 3) C. Kanbe, Y. Ozawa, T. Sakasai, *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 863 (1977).
- 4) 星野洋右, 斎藤浩子, 及川紀久雄, *分析化学*, **32**, 273 (1938); S.-L. Yen-Chen, C.-T. Hsu, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 618 (1985); D.H. Picha, *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 743 (1985).
- 5) 吉田育世, 早川和一, 宮崎元一, *衛生化学*, **31**, 317 (1985).
- 6) J.G. Tarter, *Anal. Chem.*, **56**, 1264 (1984).
- 7) 吉田育世, 早川和一, 宮崎元一, *日本化学会誌*, 1046 (1986).
- 8) L.J. Holcombe, B.F. Jones, E.E. Ellsworth, F.B. Meserole, "Ion Chromatographic Analysis of Environmental Pollutants," Vol. 2, ed. by J.D. Mulik, E. Sawicki, Ann Arbor Science Publishers, Inc., Michigan, 1979, pp.401—413.
- 9) 波多野博行, 堀 正剛, 六鹿宗治, 村上文子, "液体クロマトグラフィーとその応用," 講談社, 東京, 1974, pp.139—147.
- 10) D.R. Jenke, *Anal. Chem.*, **56**, 2468 (1984).
- 11) 藤本雄一, *食品衛生研究*, **36**, 9 (1986).
- 12) 川井信子, 中山行穂, 岡崎邦夫, *食衛誌*, **24**, 333 (1983).