

高速液体クロマトグラフィーによる飲料缶詰中の有機酸の分析

森 大蔵・岩本 喜伴

High Performance Liquid Chromatographic Determination of Organic Acids in Canned Drinks

Daizo Mori and Yoshitomo Iwamoto

Organic acids in canned drinks were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with a UV detector (210 nm). A stainless steel column (4.9 × 250 mm) was packed with Shimazugel SCR-101H. The mobile phase was water (pH 2.1 with perchloric acid).

The determination of organic acids was interfered with ascorbic acids (AsA) and sugars (sucrose, glucose and fructose). AsA was eliminated by oxidizing it with 2,6-dichloroindophenol sodium and sugars by treating the samples with Amberlight IR-45 (OH-form).

The reproducibility of the analytical values was satisfactory, i.e., the coefficients of variation for citric and malic acids was 2.1% and 2.6%, respectively.

The recovery of citric, malic and pyroglutamic acids ranged from 99.1 to 107.0%, 97.0% to 103.1% and 98.5% to 101.1%, respectively.

The organic acids in seven samples of canned drinks were analyzed by using this method (HPLC).

The data with this method is as follows : Citric acid 320.4 mg%, malic acid 7.5 mg% and pyroglutamic acid 3.2 mg% in canned orange drink with 10% juice ; citric acid 560.1 mg%, malic acid 35.2 mg% and pyroglutamic acid 13.7 mg% in canned orange drink with 50% juice; citric acid 773.9 mg%, malic acid 100.1 mg% and pyroglutamic acid 14.4 mg% in canned orange juice ; malic acid 350.0 mg% and citric acid 22.6 mg% in canned apple juice ; malic acid 474.2 mg%, tartaric acid 165.5 mg%, pyroglutamic acid 80.2 mg% and citric acid 13.9 mg% in canned grape juice ; citric acid 350.3 mg%, pyroglutamic acid 113.9 mg% and malic acid 95.4 mg% in canned vegetable juice ; citric acid 255.5 mg%, pyroglutamic acid 39.2 mg% and malic acid 39.9 mg% in canned tomato juice.

果汁は色・香・味などに、それぞれ特徴を持っているが、味のうちでは酸味が特にその果汁の個性を現わしている。果汁飲料中の有機酸は原果汁を希釈して製造する関係上、それに含有する有機酸以外に食品添加物として許可されている有機酸が酸味料として添加される。

また、有機酸はその種類によっては缶内面腐食に関与する¹⁻³⁾ものもある、それゆえ、果汁飲料中の有機酸組成を調べることは味との関係をまた缶内面腐食との関係を明らかにするために重要である。

従来、食品中の有機酸の定量は、シリカゲルカラムクロマトグラフ法やガスクロマトグラフ法で行なわれているが、いずれの方法も操作が煩雑で分析時間も長時間要していた。最近カルボン酸分析計及びHPLCによる有機酸の定量法が報告されている⁴⁻⁶⁾。本報では高速液体クロマトグラフ(HPLC)を用いて、飲料缶詰中の有機酸を測定する方法について検討したので報告する。

実験方法

1. HPLCによる有機酸の測定条件

表1に液体クロマトグラフの測定条件を示す。

2. 試料の調整

遠心分離或いはろ紙でろ過した試料を弱塩

基性陰イオン交換樹脂アンバーライトIR-45(OH型)に通し、2Nアンモニア水で溶出し、溶出液を濃縮した後、水で定容とし、 0.45μ のフィルターでろ過してHPLCにかけた。

Table 1 High performance liquid chromatographic method for determination of organic acids

Apparatus	: Shimazu high performance liquid chromatograph Model LC-3A
Detector	: Shimazu UV spectrophotometer Model SPD-2A Wave-length 210 nm
Column	: Shimazugel SCR-101H (7.9mm×25cm)
Column temperature	: Room temperature
Mobil phase	: Distilled water (pH 2.1 with HClO_4)
	Flow rate 0.5 ml/min.
Integrator	: Shimazu Chromatopac C-RIA

結果及び考察

1. HPLCによる有機酸の分別

Coppola ら⁶⁾は μ Bondapak/C18のカラムで、移動相に pH 2.4の2% KH_2PO_4 (リン酸でpH調整)を用い、クランベリージュース中の有機酸を測定しているが、本実験では、カラムにシマズゲルSCR-101Hを、移動相に pH2.1の酸性水 (HClO_4 でpH調整)を用いた。

図1に食品中に含まれる代表的な有機酸のクロマトグラムを、図2に食品中に含まれると考えら

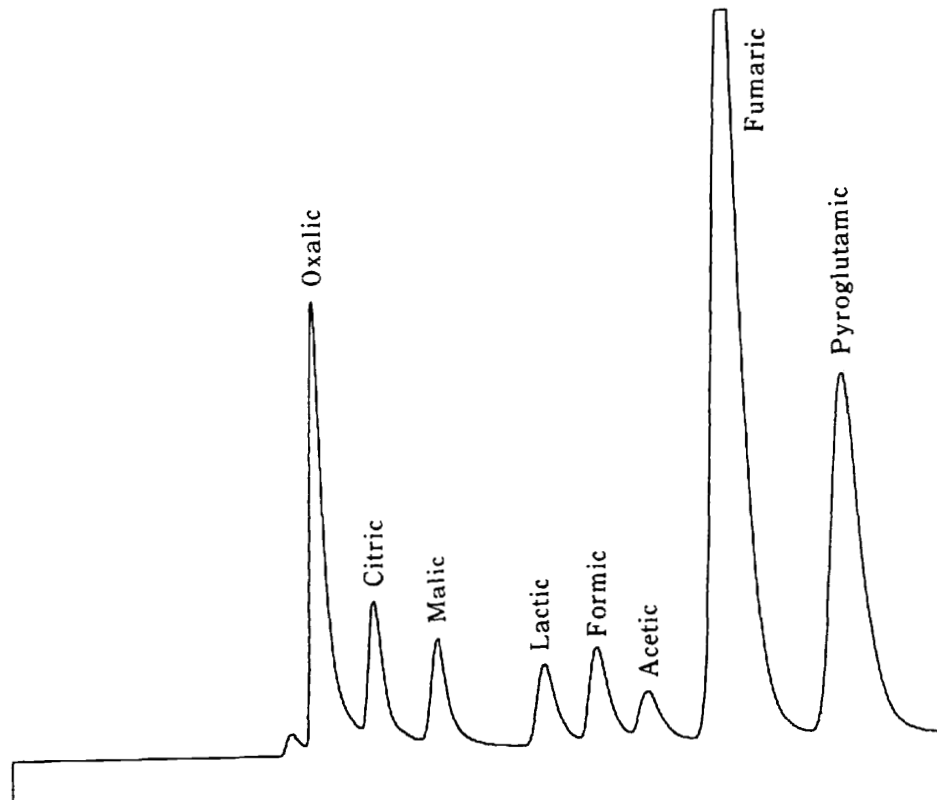


Fig.1 HPLC chromatogram of authentic organic acids

れる有機酸18種と変敗など微生物によって生成される有機酸4種の計22種の有機酸の溶出位置を示した。

図2からわかるように、 k' (キャパシティーファクター)の接近しているプロピオン酸とレブリン酸、乳酸・コハク酸とグリコール酸、マレイン酸・ α -ケトグルタル酸と酒石酸は表1の条件では分別出来なかった。しかし、乳酸とコハク酸はカラム温度を50°Cにすることにより分別出来た。

2. 糖類の影響

飲料缶詰中には10%以上の糖が含まれているので、その影響を調べたのが図3である。

飲料缶詰中に多く含まれる糖としてシュクロース、グルコース及びフラクトースの2%溶

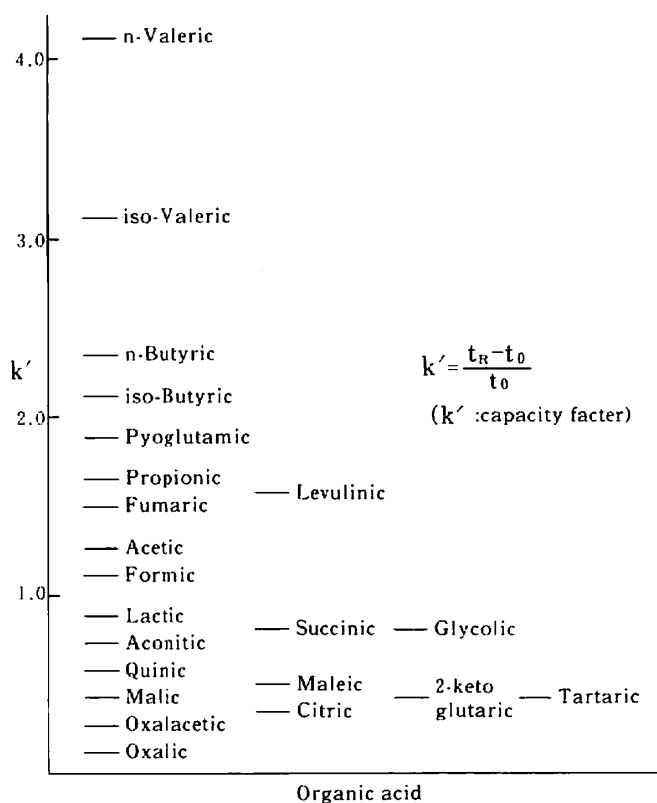


Fig.2 Fractionation of organic acids with HPLC

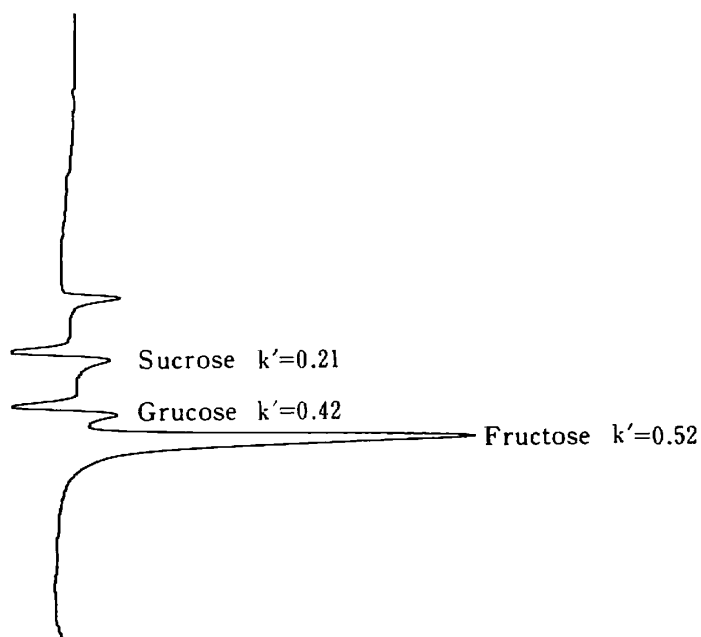


Fig.3 HPLC chromatogram of 2% sucrose, glucose and fructose.

液をHPLCにかけた結果、 $k'0.21$ 付近にシュクロース、 $k'0.42$ 付近にグルコースの負と正のピークが、 $k'0.52$ 付近にフラクトースの正のピークが現れ、オキザル酢酸、クエン酸、マレイン酸、 α -ケトグルタル酸、酒石酸、及びリンゴ酸の測定に影響をおよぼすことが明らかになった。

3. アスコルビン酸 (AsA) の影響

飲料缶詰中には、みかん果汁のように原料中に高濃度のAsAが含まれている以外に、添加物としてAsAを添加しているものが多いので、その影響を調べた結果は図4に示した。

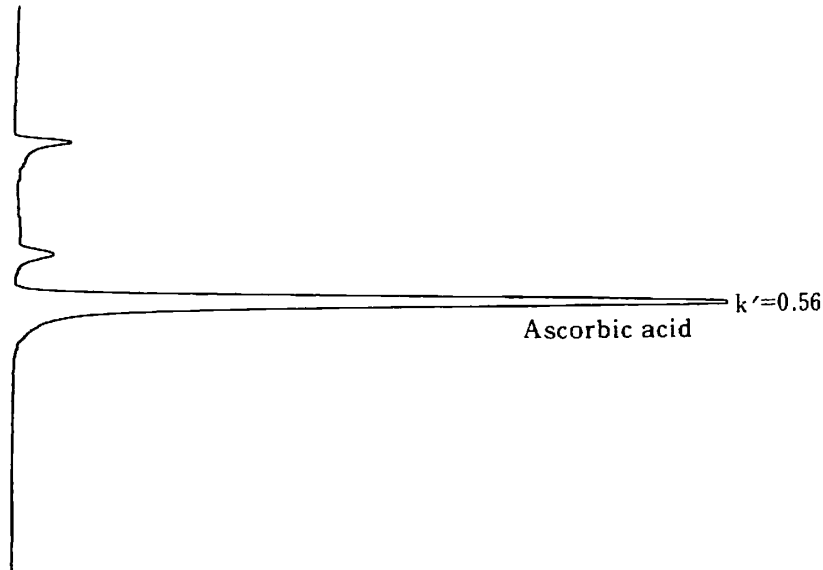


Fig.4 HPLC chromatogram of 50 mg % ascorbic acids

AsAのピークは、 $k'0.56$ 付近に現れ、リンゴ酸の測定に影響することが認められた。

4. 飲料缶詰中の有機酸の測定方法

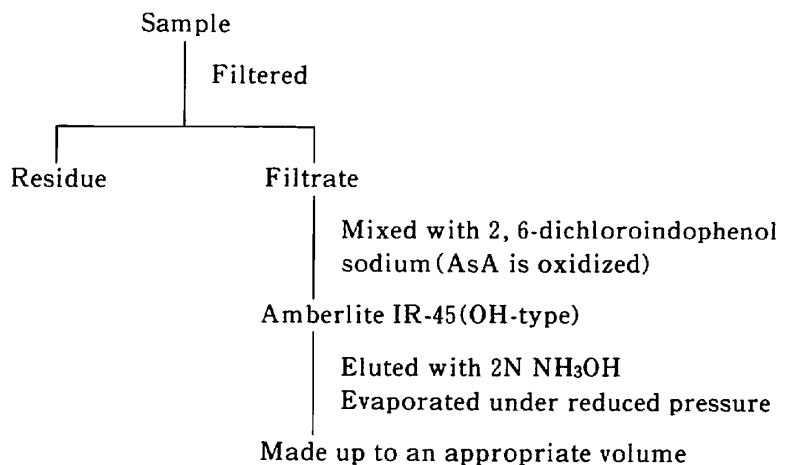
飲料缶詰中の原料に由来する有機酸はNa等の塩になっているものもあるが、酸味に影響があるのは遊離の酸であるので、本実験では遊離の有機酸を測定した。

表2に測定のための前処理法を示した。

AsAが $k'0.56$ 付近にピークを示すので、2,6-ジクロロインドフェノールナトリウムで酸化させ、また、糖の影響があるので弱塩基性陰イオン交換樹脂アンバーライトIR-45(OH型)を通し糖を除いてHPLCで有機酸を定量した。

全酸を測定する場合は、試料をアンバーライトIR-45で処理する前に強酸性陽イオン交換樹脂アンバーライトIR-120(H型)を通すことにより正確に測定出来る。

Table 2 Procedure for the determination of organic acids in canned drinks by HPLC



5. 再現精度

HPLC法の精度を知るためリンゴドリンクの同一試料を6回繰返し測定した結果表3に示したように、クエン酸は319.5~323.4mg%で平均322.4mg%であり、標準偏差6.8mg、変動係数2.1%であった。リンゴ酸は、104.9~108.4mg%で平均106.4mg%であり、標準偏差2.7mg、変動係数2.6%といずれも変動係数3%以下と満足すべき再現性が得られた。

Table 3 Reproducibility of the analytical value

	Citric acid	Malic acid
1	322.9 mg%	104.9 mg%
2	323.4	105.2
3	323.4	106.2
4	322.3	107.2
5	319.5	106.9
6	323.0	108.4
Average	322.4	106.4
Standard deviation	6.8 mg	2.7 mg
Coefficient of variation	2.1 %	2.6 %

6. 回収試験

トマトジュース、野菜ジュース及びオレンジジュースにクエン酸、リンゴ酸並びにピログルタミン酸を100mg/100ml添加し、オレンジドリンクに、クエン酸並びにピログルタミン酸を20mg/100ml添加して回収率を求めた、その結果は表4に示したようにクエン酸は、99.1~107%、リンゴ酸

Table 4 Recovery of organic acids added in canned drinks

Canned drink	Content of organic acids in sample (mg%)	Organic acids added (mg/100ml)	Total organic acids (mg%)	recovery (%)
		Citric acid		
Tomato juice	524.0	100	623.1	99.1
Vegetable juice	436.3	100	540.9	104.6
Orange juice	881.6	100	986.0	104.4
Orange drink	540.2	20	561.6	107.0
		Malic acid		
Tomato juice	39.5	100	142.6	103.1
Vegetable juice	317.3	100	414.3	97.0
Orange juice	102.3	100	203.4	101.1
		Pyroglutamic acid		
Tomato juice	137.1	100	238.2	101.1
Vegetable juice	137.4	100	237.3	99.9
Orange juice	11.7	100	111.0	99.3
Orange drink	1.9	20	21.6	98.5

は、97.0~103.1%、ピログルタミン酸は、98.5~101.1%で、いずれの有機酸も満足すべき回収率が得られた。

7. HPLC法とシリカゲルカラム法との比較

有機酸の定量方法についてシリカゲルカラム法とHPLC法の比較をオレンジドリンク（10%、20%果汁入）及びリンゴドリンク（10%果汁入）の同一試料で行った。その結果は表5に示したようにいずれの試料にもクエン酸とリンゴ酸が検出され、HPLC法ではオレンジドリンクにこれら有機酸の他に微量のピログルタミン酸が検出され、両法ともほぼ同値が得られた。

Table 5 Determination of organic acids in canned orange and apple drinks with HPLC and Silicagel methods

Organic acid	Orange drink (10%)*		Orange drink (20%)**		Apple drink (10%)*	
	HPLC method	Silica Gel method	HPLC method	Silica Gel method	HPLC method	Silica Gel method
Citric	237.5 mg%	217.1 mg%	360.4 mg%	369.2 mg%	93.5 mg%	94.7 mg%
Malic	6.7	7.0	14.7	13.2	169.8	169.7
Pyroglutamic	1.9	0	2.5	0	0	0
Total	246.1	224.0	377.6	382.4	263.3	264.4

* canned drink with 10 % juice

** canned drink with 20 % juice

8. 市販飲料缶詰中の有機酸の分析

以上の結果、有機酸の測定法としてHPLC法は充分満足出来たので、市販の飲料缶詰について有機酸を測定した。その結果を表6に示す。

Table 6 Contents of organic acids in some canned drinks with HPLC (mg%)

Canned drink \ acids	Citric	Malic	Tartaric	Pyroglutamic	Total
10 % Orange drink*	320.4	7.5	0	3.2	331.1
50 % Orange drink**	560.1	35.2	0	13.7	609.0
Orange juice	773.9	100.1	0	14.4	888.4
Apple juice	22.6	350.0	0	Tr.	372.6
Grape juice	13.9	474.2	165.5	80.2	733.8
Vegetable juice	350.3	95.4	0	113.9	559.6
Tomato juice	255.5	39.9	0	39.2	334.6

* canned orange drink with 10 % juice

** canned orange drink with 50 % juice

温州みかん、リンゴ及びブドウ果実の有機酸として森ら⁷⁾は、温州みかんではクエン酸が大部分で、少量のリンゴ酸が、リンゴ（紅玉）ではリンゴ酸が大部分で、少量のギ酸が、ブドウ（ローズシオター）ではリンゴ酸が60%、酒石酸が30%で、少量のクエン酸が存在していると報告している。また榎田も⁸⁾ブドウ果実の有機酸として、リンゴ酸、酒石酸が主で、少量のクエン酸も存在すると報告している。

本実験で測定した10%果汁入、50%果汁入及び、オレンジジュース缶詰の有機酸は、クエン酸が大部分で、その他少量のリンゴ酸とピログルタミン酸が検出され、10%、50%果汁入ドリンク缶詰の酸味料として添加された有機酸はクエン酸のみと考えられる。

リンゴジュース缶詰の有機酸は、リンゴ酸が大部分で、少量のクエン酸も検出された。

ブドウジュース缶詰の有機酸は、リンゴ酸、酒石酸の順に多く、少量のクエン酸も検出された。また、ピログルタミン酸が80mg%とかなり多く検出された。

野菜ジュース及びトマトジュース缶詰の有機酸は、クエン酸が多く、リンゴ酸とピログルタミン酸が同じ程度検出された。

リンゴジュース缶詰を除いて、測定した6種の飲料缶詰でピログルタミン酸が検出され、特に、野菜ジュース及びトマトジュース缶詰で多かった。このピログルタミン酸について、Riceら⁹⁾は、生のトマト果実には存在しないが、トマトジュース缶詰中にかなり多く存在し、貯蔵中に増加することを見出している。その原因はグルタミン或いはグルタミン酸から加熱殺菌及び貯蔵中に生成す

るためであると報告している。

要 約

飲料缶詰中の有機酸をHPLCで測定する方法について検討した結果、遊離酸のみ測定する場合、2,6-ジクロロインドフェノールナトリウムでAsAを酸化させ、弱塩基性陰イオン交換樹脂アンバーライトIR-45(OH型)で処理することにより、AsA及び糖類の妨害が除去出来、再現精度、回収率試験とも満足すべき結果が得られ、飲料缶詰中の有機酸の測定に充分応用出来た。

この方法で飲料缶詰中の有機酸を測定した結果、オレンジドリンク及びオレンジジュース缶詰の有機酸は大部分がクエン酸で、少量のリンゴ酸とピログルタミン酸が含まれていた。

リンゴジュース缶詰では、大部分がリンゴ酸で、少量のクエン酸が含まれていた。

ブドウジュース缶詰では、リンゴ酸が主要酸であり、酒石酸、ピログルタミン酸と少量のクエン酸も含まれていた。

野菜ジュース及びトマトジュース缶詰では、クエン酸が主要酸であり、リンゴ酸とピログルタミン酸が同じ程度含まれていた。

文 献

- 1) 柿崎興一, 森 光国: 缶詰時報, 48, (7), 73 (1969).
- 2) R.H.Lueck and H.T.Blair: Canner, 66, (5), 23 (1928).
- 3) 小松美博, 佐久間彦弥, 山野善正: 日本缶詰協会第14回技術大会発表要旨 (1965).
- 4) 島田保子: 調理科学, 10 (4), 248 (1977).
- 5) 福家洋子, 松岡博厚: 日食工誌, 29, 642 (1982).
- 6) E.D.Coppola, E.C.Conrad and R.Cotter: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 61, (6), 1490 (1978).
- 7) 森 健, 村岡信雄, 蓆 花雄: 日食工誌, 14, (5), 187 (1967).
- 8) 楠田忠衛: 農技研誌, 3, 198 (1956).
- 9) A.C.Rice and C.S.Pederson: Food Reseach, 19, 106 (1954).