

# 食品中の有機酸分析法の検討

バイオ系チーム 田中 秀典, 清野 珠美, 和田 潤, 廣岡 青央

## 要 旨

有機酸は、食品の風味や保存性に大きく影響を与える成分であり、その種類と含有量を迅速に測定することは食品の開発や品質管理において大変重要である。本研究では、液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) を用いた前処理無しの有機酸一斉分析法を検討した。検討の結果、標準有機酸だけでなく、他の様々な物質を含有している実試料においても試料の特別な前処理無く簡便、迅速、一斉に有機酸の定量分析を行うことが可能となった。本分析法が食品等に含まれる有機酸を簡便に分析・評価する方法として有用であることが示唆された。

## 1. はじめに

有機酸は、食品において主に酸味を示す有機化合物であるが、リンゴ酸は爽やかな酸味を、酒石酸は渋みのある刺激的な酸味を呈するなど、有機酸の種類によって味に特性がある<sup>1,2)</sup>。そのため、例えば清酒において酸度が同じであっても有機酸組成が異なると風味が大きく異なってくる。また、有機酸は抗菌作用を示し食品の保存性に大きく寄与するが、その種類によって作用を示す pH や濃度が異なってくる<sup>3,4)</sup>。したがって、清酒を始めとする食品全般において、有機酸の種類、および含有量や比率を分析することは製品開発や品質管理において大変重要である。また、食品は状態も常に一定、均一でないものも多く、品質変化が早いこと、製造および品質管理において、分析時間が短く、一度に多数の成分を分析できることは重要である。中でも、発酵食品は製造中に刻々と品質が変化するため、その発酵を制御し一定の製品を作るには、分析結果を製造工程に迅速にフィードバックすることが特に求められる。

一般的な有機酸の分析方法として酵素法が挙げられるが、一斉分析ができないデメリットがある。研究所保有技術であるガスクロマトグラフィ (GC) による有機酸分析では、清酒中に含まれるピルビン酸、乳酸、コハク酸、リンゴ酸、クエン酸、フマル酸の一斉分析が可能である。また、GC は装置が安価であることや、分解能が極めて高いことがメリットとして挙げられる。しかし、前処理の工程が複数存在すること、それに伴って時間がかかることや回収効率に影響が出ることなどのデメリットがある。近年の高速液体クロマトグラフィ (HPLC) では、前処理無しに分離・一斉検出できるが、一部分離できない有機酸やアミノ酸等の夾雑物によって、また移動相によるバックグラウンドの上昇によって定量できない成分

が存在する。

液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) は、HPLC 部分で分離した物質を MS 部分でイオン化し、質量電荷比 ( $m/z$ ) を検出する装置である。そのため、成分の分離が不十分で保持時間が同じであったとしても、目的成分の  $m/z$  を追跡することによって個々の有機酸を分離して定量することが可能となる。LC-MS はデメリットとして装置が高価であるが、メリットとして前処理無しに目的成分を選択性高く高感度に一斉分析が可能である<sup>5)</sup>。また、前処理無しに分析を行うため、測定試料中に存在する有機酸以外のアミノ酸や核酸等の有用物質の一斉分析にも期待ができる。そこで、今回は、従来の有機酸分析法の問題点を改善する方法として LC-MS を用いた分析法を検討したので報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 標準有機酸混合溶液の調製

酒石酸、リンゴ酸、コハク酸、マレイン酸は、各種有機酸を蒸留水に溶解させて 1,000 ppm 溶液を調製した。ピルビン酸、乳酸、クエン酸、フマル酸は、それぞれピルビン酸ナトリウム、乳酸リチウム、クエン酸三ナトリウム・二水和物、フマル酸二ナトリウムを用いて 1,000 ppm 溶液を調製した。各種溶液は 4℃ で保存した。使用時はギ酸 (終濃度 0.1%) を用いて希釈し、0.1, 0.5, 1, 5, 10, 100 ppm の標準有機酸混合溶液をそれぞれ調製した。この溶液に内部標準としてメチルコハク酸溶液 (終濃度 10 ppm) を加えて分析に供した。

### 2.2 実試料の調製

実試料として、乳酸菌培養液上清試料、酵母培養液上清試料、及び清酒試料を用いた。乳酸菌培養液上清試料

表1 LC-MS分析条件

LC条件	
カラム	Discovery HS F5カラム (100×4.6mm, 5 μm, Supelco)
カラム温度	40°C
流速	0.3 mL/min
移動相A	0.1%ギ酸
移動相B	0.1%ギ酸・80%アセトニトリル
溶出グラジエント	0-10 min B 0-55% 10-20 min B 100% 20-30 min B 0%
注入量	5 μL
MS条件	
イオン化	ESI, Negative, MRMモード
MRMトランジション	表2参照

表2 各有機酸のMRMトランジションと検量線の直線性

	MRM トランジション (m/z)	保持時間 (min)	検量線	
			濃度範囲 (ppm)	決定係数 (r <sup>2</sup> )
酒石酸	149 > 87	4.3	0.1-100	0.9983
リンゴ酸	133 > 115	5.7	0.1-100	0.9992
ピルビン酸	87 > 43	6.1	0.1-100	0.9997
乳酸	89 > 43	6.7	0.1-100	0.9982
クエン酸	191 > 111	8.1	0.1-100	0.9953
コハク酸	117 > 73	8.4	0.1-5	0.9983
フマル酸	115 > 71	8.6	0.1-5	0.9997
マレイン酸	115 > 71	8.9	0.1-10	0.9954
メチルコハク酸	131 > 87	9.5	—	—

は、研究所が保有する乳酸菌ライブラリー<sup>6,7)</sup>の中から、予備試験によって特徴的な性質を示した乳酸菌3株をMRS培地 (Difco) で培養して調製した。乳酸菌の培養は、1 mL MRS培地に乳酸菌を1白金耳植菌し、3日間30°Cで静置培養した。培養液を遠心分離して得た培養液上清を0.1%ギ酸で100倍および200倍に希釈し、0.45 μmのフィルターによりろ過したものを試料とした。酵母培養液上清試料は、研究所が酒造会社に分譲している清酒酵母である「京の琴」をYPD培地で培養して調製した。酵母の植菌及びそれに続く操作は、乳酸菌培養上清試料の調製と同様に行った。清酒試料は、市販の清酒2つを0.1%ギ酸で200倍希釈し、0.45 μmのフィルターによりろ過した。これらの溶液に内部標準としてメチルコハク酸溶液 (終濃度10 ppm) を加えて分析に供した。

### 2.3 LC-MSによる有機酸定量

LC-MSはACQUITY TQD (Waters) を用いた。各有機酸のm/zとそのプロダクトイオンのm/zの組み合わせ (MRMトランジション) の決定には、Masslynxソフトウェア (Waters) のIntelliStart機能を用いた。その際のMS検出はエレクトロスプレーイオン化 (ESI), Negativeモードで行った。各有機酸は、Discovery HS F5カラム (100×4.6 mm, 5 μm, Supelco) で成分分離後<sup>5)</sup>, MRMモー

ドにより検出し、ピーク面積を求めた。分析条件を表1に示す。

実試料中の有機酸の定量は、標準有機酸のピーク面積から求めた検量線を基に算出した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 標準有機酸の検量線の作成

本実験で用いた有機酸8種はDiscovery HS F5カラムとLC-MSシステムを用いることで、全て分離検出できた (図1)。フマル酸とマレイン酸はシス-トランス異性体であり、本システムにおけるMRMトランジションが同値になった (表2)。そのため、LCでの分離によりピークは2つに分かれているが、MSでのMRMモードによる測定において同一のチャンネルでの検出になったと考えられる。

表2に示す通り、検量線の決定係数 (相関係数の2乗, r<sup>2</sup>) は、酒石酸, リンゴ酸, ピルビン酸, 乳酸, クエン酸において0.1-100 ppmの濃度範囲で、マレイン酸において0.1-10 ppmの範囲で、コハク酸, フマル酸において0.1-5 ppmの範囲で0.995以上であった。なお、酒石酸, リンゴ酸, ピルビン酸, 乳酸, クエン酸は0.1-10 ppmの範囲では0.999以上であった。したがって、これらの濃度範囲において、有機酸8種の検量線作成と精密な定

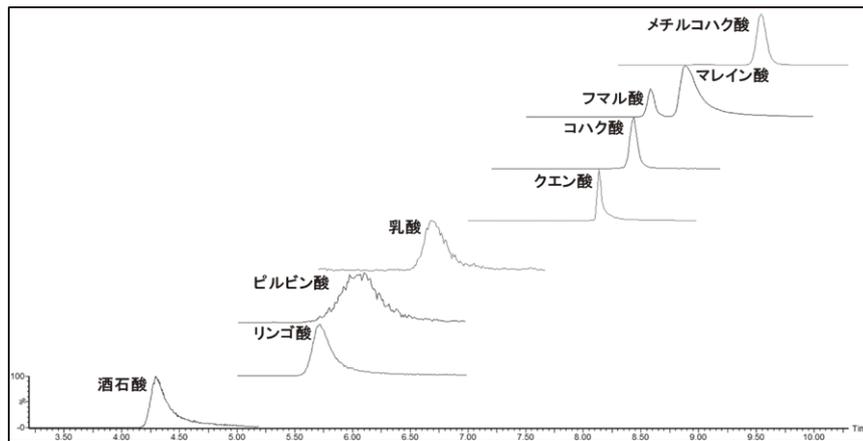


図1 有機酸混合標準溶液のマスクロマトグラム (10 ppm)

表3 実試料の有機酸分析結果 (単位: ppm)

	乳酸菌培養液上清試料				酵母培養液上清試料		清酒試料	
	F307	F2103	F2803	MRS培地	京の琴	YPD培地	清酒①	清酒②
酒石酸	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
リンゴ酸	$3.85 \times 10$	$3.60 \times 10$	$1.20 \times 10^2$	$3.73 \times 10$	$2.01 \times 10$	9.80	$1.39 \times 10^2$	$3.03 \times 10^2$
ビルビン酸	$2.78 \times 10$	$2.26 \times 10$	$1.19 \times 10^2$	$2.06 \times 10$	$2.08 \times 10$	$1.22 \times 10$	n.d.	$1.35 \times 10^2$
乳酸	$7.22 \times 10^3$	$6.41 \times 10^3$	$1.34 \times 10^4$	$1.53 \times 10^2$	$3.46 \times 10$	$2.34 \times 10$	$2.53 \times 10^2$	$4.50 \times 10^2$
クエン酸	$2.43 \times 10^3$	n.d.	$8.97 \times 10^2$	$2.54 \times 10^3$	$2.81 \times 10$	$3.51 \times 10$	$9.77 \times 10$	$7.58 \times 10$
コハク酸	$9.60 \times 10$	$8.42 \times 10$	$1.59 \times 10^2$	$8.08 \times 10$	$1.32 \times 10^2$	$5.63 \times 10$	$3.21 \times 10^2$	$3.81 \times 10^2$
フマル酸	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
マレイン酸	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

※n.d.: not detected

量分析が可能であることが示された。

### 3.2 実試料の有機酸定量分析

実試料として乳酸菌培養液上清試料、酵母培養液上清試料、及び清酒試料を用い、有機酸の定量分析を行った結果を表3に示す。いずれの試料も定量を行うことができた。

乳酸菌培養液上清試料では、用いた菌株によって各有機酸の量が顕著に異なることがわかった。菌株の特徴を評価するにあたって、クエン酸についてはMRS培地含有量からの減少量を分解能力とし、他の有機酸はMRS培地含有量からの増加量を生成能力とする。F307株は、リンゴ酸、ビルビン酸、コハク酸の生成能力とクエン酸分解能力は低く、MRS培地中の量とあまり差はない一方、F2103株はクエン酸分解能力が極めて高く、検出ができない量まで減少していた。F2803株はクエン酸の大半を分解し、リンゴ酸、ビルビン酸、乳酸、コハク酸の生成能力は極めて高かった。3株に共通して、乳酸の生成能力は極めて高く、酒石酸、フマル酸、マレイン酸の生成は見られなかった。

次に、酵母培養液上清試料では、「京の琴」の特性である、リンゴ酸と比べてコハク酸を極めて多く生成するという特徴を確認することができた。なお、酒石酸、フマル酸、マレイン酸は検出されなかった。

清酒試料においても有機酸の組成、含有量が大きく異なることがわかった。清酒①はリンゴ酸よりコハク酸が多く、清酒②はリンゴ酸とコハク酸は同程度の量であった。また、ビルビン酸は清酒①で検出されなかったが、清酒②では検出された。どちらの清酒においても、クエン酸の量に大きな差は無く、酒石酸、フマル酸、マレイン酸は検出されなかった。この清酒①は、「京の琴」が使用されたものであり、前述の酵母の特徴が清酒に反映されていることが確認できた。今回全ての試料で検出されなかった酒石酸は、ブドウに多く含まれる有機酸であるため、今後ワイン等を分析する際には本定量法が活用できるものと考えられる。

研究所では、昭和30年代より分譲している清酒酵母を、また分譲酵母以外にも香气生成や有機酸生成に特性を有する酵母を多数保有し、保管している<sup>8)</sup>。この保管菌株を基に特徴的な新酵母を開発する際、特性把握のた

めに数多くの菌株が生成する様々な有機酸を分析する必要がある。その際、簡便、迅速、一斉に定量分析が行えることが求められる。また、このことは酵母だけに留まらず、近年重点的に収集した500株以上もの乳酸菌で構成される研究所保有の乳酸菌ライブラリー<sup>9)</sup>にも当てはまる。京都市の事業所に乳酸菌ライブラリーを提供し、発酵食品製造に利用いただく際、食品の風味や保存性に大きく関わる有機酸の生成能力の特徴は極めて重要な因子になると考えられる。また、清酒や乳酸発酵食品に限らず、食品全般においても、製品開発や品質管理のために有機酸の種類、および含有量や比率を迅速に把握することは大変重要である。以上より、食品などに含まれる様々な有機酸を簡便に、迅速に、一斉に定量分析可能な本分析法は大変有意義な方法であると言える。

#### 4. まとめ

今回検討したLC-MSを用いた分析法により、標準有機酸だけでなく、他の様々な物質を含有している実試料においても試料の特別な前処理無く簡便に、迅速に、有機酸の一斉定量分析を行うことが可能となった。また、GCを用いた方法では分析できなかった酒石酸やマレイン酸についてもLC-MSを用いることで分析可能となった。食品には様々な有機酸が含まれており、その種類によって風味や保存性を大きく左右するため、製品開発や品質管理の観点から食品中の有機酸の種類、および含有量や比率を迅速に把握することは大変重要である。今後、より多くの種類の有機酸や、有機酸以外にも機能性アミノ酸等の有用物質をも一斉に分析できるように検討を進める予定である。

#### 参考文献

- 1) 日本醸造協会 編, “醸造物の成分”, 日本醸造協会 (1999).
- 2) 有手友嗣 他: 石川県農林総合研究センター農業試験場研究報告, 31, p.17 (2015).
- 3) 山本泰 他: 日食工誌, 31, p.525 (1984).
- 4) 松田敏生 他: 日食工誌, 41, p.687 (1994).
- 5) H. Yoshida *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, 55, 551 (2007).
- 6) 和田潤 他: 京都市産業技術研究所研究報告, No. 5, p.87 (2015).
- 7) 和田潤: 酒研会報, No.55, p.9 (2016).
- 8) 廣岡青央 他: 京都市産業技術研究所研究報告,

No.4, p.97 (2014).

- 9) 和田潤 他: 京都市産業技術研究所研究報告, No.9, p.61 (2019).