

技術報告

塩の添加物分析 食塩中のグルタミン酸ナトリウムの定量

古賀明洋・新野 靖

要 旨

塩の添加物であるグルタミン酸ナトリウムの定量法として、HPLC 法及び、銅塩法を検討した結果、両方法とも食塩中のグルタミン酸ナトリウム分析への適用が示された。しかし、銅塩法は有機酸によるプラス誤差が見られ、有機酸が添加されている食塩の分析には、HPLC 法を用いなければならない。なお、銅塩法は測定が短時間ですむ利点もあり、試料中の添加物及び、試料点数に応じて操作方法を選択する必要がある。

1. 緒 言

グルタミン酸ナトリウムの分析については、目的成分の分離定量が可能な HPLC 法（高速液体クロマトグラフ法）が主流であり^{1,2)}、多種のアミノ酸やその他の有機酸が一緒に添加されている特殊製法塩の分析には有効な手段である。本報では HPLC 法の中でも、前処理が容易である日本 Waters 社の AccQ · Tag (アキュタグ) アミノ酸分析法について検討した。

また、グルタミン酸ナトリウム一種だけ添加されている特殊用塩の分析においては、HPLC 法では測定時間が長く、汎用性に欠けるという問題点がある。そこで、別法として吸光光度法を検討した。吸光光度法は、食塩中の個々のアミノ酸定量分析法としての適用は見られないが、ニンヒドリン法³⁾や銅塩法がトータルアミノ酸の定性分析法として用いられている。これらの方法は、グルタミン酸ナトリウムに限った分析であれば、定量分析法として適用できる可能性がある。本報では、銅塩法により生成された錯体を吸光光度法により測定し、塩中のグルタミン酸ナトリウムを定量する方法について検討し、以下の知見を得たので報告する。

2. HPLC 法誘導体化と銅塩法の錯体形成反応

本報で用いられる HPLC 法 (AccQ · Tag アミノ酸分析法) は、Waters 社製の試薬を用いて、試料溶液の誘導体化を行う必要がある。銅塩法においては、アミノ酸と銅 (II) との錯体形成に伴う発色における吸光度を測定する。

2.1 HPLC 法誘導体化反応⁴⁾

AccQ · Tag アミノ酸分析法は、誘導体化試薬として AQC (N-Hydroxysuccinimidyl-6-Aminoquinolinyl Carbamate) を使用し、Fig. 1 に示す反応によりアミノ酸

の誘導体化を行う。また、未反応の AQC は Fig. 2 のように反応する。

この誘導体化試薬は、未反応の AQC が蛍光のない NHS と、AQC-アミノ酸とは吸収波長の異なる AMQ とに加水分解されるため、誘導体化試薬によるピーク妨害が起らぬことが特長である。

2.2 銅塩法^{5,6,7)}

銅塩法は、pH 9~9.1 でアミノ酸に銅 (II) を加えると、Fig. 3⁸⁾ に示す反応によって青色の錯体が生成されるので、これを 230 nm 又は 630 nm で測定する方法である。230 nm での測定については、生成した錯体自体の紫外外部吸収を測定し、630 nm は錯体の色を測定する。

Fig. 4 および Fig. 5 に示すように、グルタミン酸ナトリウムは銅 (II) と反応して 630 nm および 230 nm 付近に錯体の新たな吸収ピークを示す。感度は 230 nm 付近の方が高いが、230 nm 付近には炭酸イオンの吸収ピークが存在し、炭酸塩が共存する塩を分析する場合、酸処理後煮沸する操作が必要となる。しかし、630 nm では炭酸イオンの影響はないので、炭酸塩を酸で溶解させればよい。また、硝酸イオン、臭化物イオンおよび添加物として共存することがある有機酸などは測定波長付近に吸収を持つなど、230 nm の測定には問題点が多く考えられることから、630 nm における測定を検討することとした。

3. 方 法

3.1 HPLC 法

誘導体化試薬及び、溶離液は Waters 社製の製品を用いた。マイクロピペットを用いて、検液 20 μ l をバイアルビンに入れた。これに AccQ · Fluor Borate Buffer (Waters 社製) 170 μ l を加え、VORTEX GENIE でよ

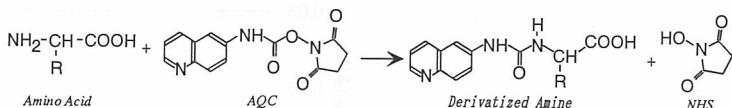


Fig. 1 誘導体化反応式

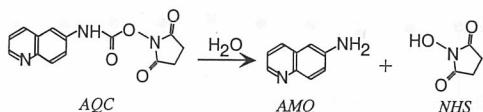


Fig. 2 未反応 AQC の加水分解

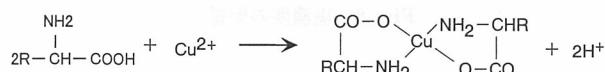


Fig. 3 アミノ酸と銅との錯体形成

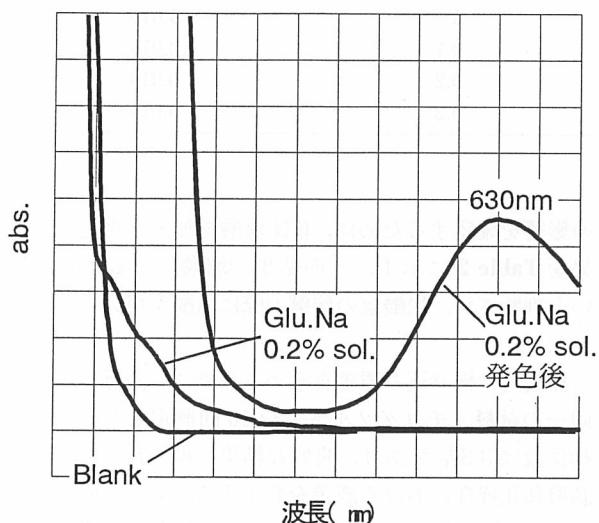


Fig. 4 630 nm 付近の吸収曲線

く攪拌した。さらに、AccQ·Fluor reagent (同社製)を 10 μ l 加えて攪拌し、約 1 分間静置して誘導体化を行った。HPLC の条件を Table 1 のように設定し、HPLC 法によって測定した。検量線の直線性を確認し、塩化ナトリウム濃度や酸による影響を検討した。

3.2 銅塩法

以下に従って試薬の調製を行った。

- ① グルタミン酸ナトリウム標準溶液 (1 %)
グルタミン酸ナトリウム・一水和物 5.0 g を正しくはかりとり、水に溶かして 500 ml に定容した。
- ② 塩化銅 (II) 溶液
塩化銅 (II)・二水和物 2.72 g を水に溶かして 100 ml とした。
- ③ 緩衝溶液

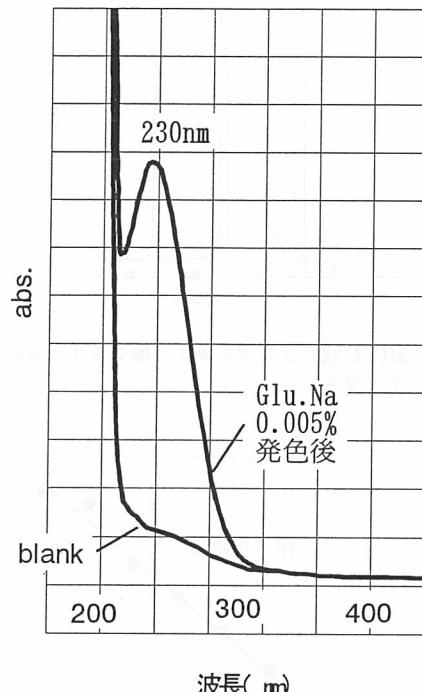


Fig. 5 230 nm 付近の吸収曲線

Table 1 HPLC 法測定条件

Column	AccQ·Tag Amino Acid Analysis Column
Flow rate	1 ml/min
UV	254 nm
Injection Volume	10 μ l
Temperature	37°C
Eluent	AccQ·Flour Eluent A 10% 溶液 + acetonitrile (2%)

リン酸水素二ナトリウム無水和物 6.45 g、水酸化ナトリウム 0.72 g、塩酸 0.83 ml 及び四ホウ酸ナトリウム 5.72 g を水に溶かして 200 ml とした。

試験管に検液 10 ml をとり、塩化銅 (II)・二水和物溶液 1 ml と緩衝溶液 3 ml を加えて振り混ぜ、10 分間放置後ろ紙 5C でろ過し、ろ液の 630 nm の吸光度を測定した。検量線の直線性を確認し、塩化ナトリウム濃度や酸による影響を検討した。

4. 結果及び考察

4.1 HPLC 法

HPLC 法によるクロマトグラムを Fig. 6 に示す。妨

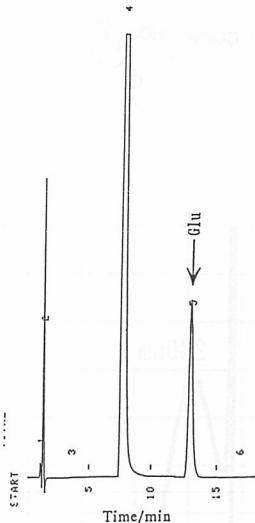


Fig. 6 HPLC 法によるグルタミン酸ナトリウムのクロマトグラム

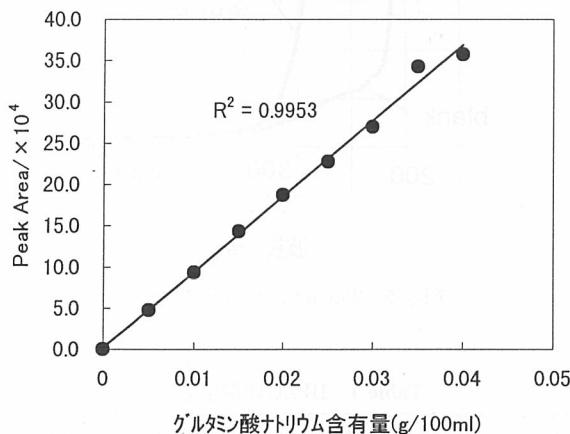


Fig. 7 HPLC 法検量線

害ピークの影響もなく、良好なピークであることが確認された。グルタミン酸ナトリウム水溶液 ($0\text{ g}/100\text{ mL}$ ~ $0.04\text{ g}/100\text{ mL}$) を用いて、グルタミン酸ナトリウム含有量と Peak Area の関係をプロットし、作成した検量線を Fig. 7 に示す。直線性は良好であり、HPLC 法によるグルタミン酸ナトリウムの分析が可能であると判断した。次に、塩化ナトリウム濃度と Peak Area の関係を Fig. 8 に示す。塩化ナトリウム濃度変化に伴った Peak Area の変化は見られず、塩化ナトリウムの影響はないと判断される。

グルタミン酸ナトリウムが添加されている塩で、「アシオ」以外は殆ど炭酸カルシウム、炭酸マグネシウムが一緒に添加されている。これらの成分が添加されている場合、酸を加えて溶かしてから測定するため、誘導体化及び HPLC 測定時に影響を及ぼす可能性がある。こ

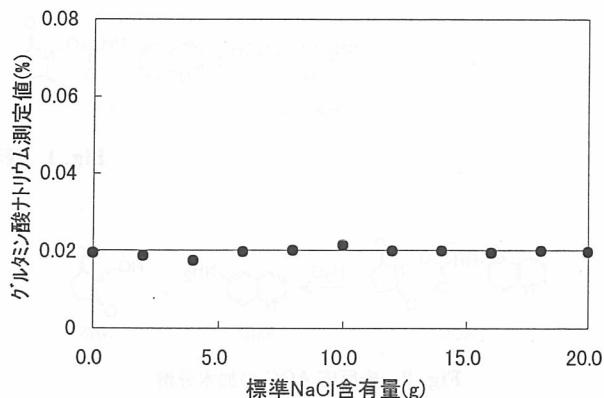


Fig. 8 塩濃度の影響

Table 2 HPLC 法の塩酸による影響

試料溶液中の 6 N-HCl 含有量(%)	Glu · Na 測定値(%)
0	0.010
0.1	0.010
0.2	0.010
0.3	0.010

の影響を確認するために、6 N 塩酸を加えて測定した結果を Table 2 に示す。この結果、塩酸による影響は無いと判断され、炭酸塩の溶解の際に塩酸を用いることとした。

測定時の繰り返し誤差を求めるために、誘導体化した同一の試料「チヨダソルト」を 10 回測定した結果、変動係数は 3.8% であり、良好な結果が得られた。また、誘導体化操作における誤差を判定するために、同一試料で 10 回誘導体化を行い、測定した結果、変動係数は 4.1% であり、良好な結果であった。

4.2 銅塩法

銅塩法の検討結果を次に示す。グルタミン酸ナトリウム 0.20% 水溶液に塩化ナトリウムを 0%, 2%, 10% および 20% 添加し、これらの溶液について発色操作を行い、630 nm における吸光度を比較した。結果を Fig. 9 に示す。塩化ナトリウム濃度が高くなるに従い吸光度は高くなる傾向にあり、塩化ナトリウム 20% 溶液で約 5% のプラス誤差を生じた。そこで、塩化ナトリウムの影響による誤差を除くため、検量線溶液に検液と同濃度の塩化ナトリウムを加えることとした。また、塩化ナトリウム 2% および 20% の検量線を Fig. 10 に示す。両線とも直線性は良好であった。

次に塩酸による測定値への影響を検討した。塩酸を加えた場合の緩衝溶液量と発色時の pH を Table 3 に示す。先記の方法である緩衝溶液 3 mL では、発色時の pH が下がるために吸光度はわずかではあるが低くなっ

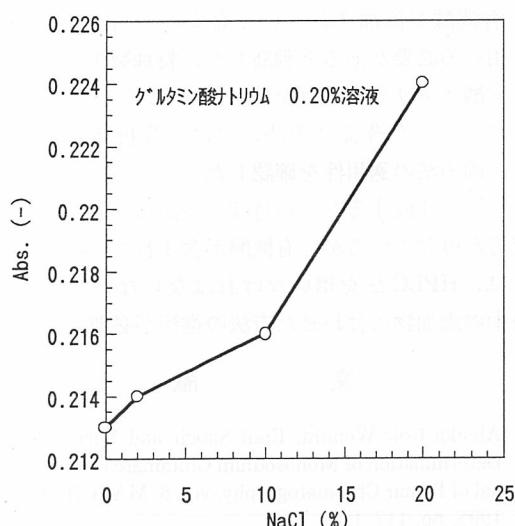


Fig. 9 銅塩法における塩濃度の影響

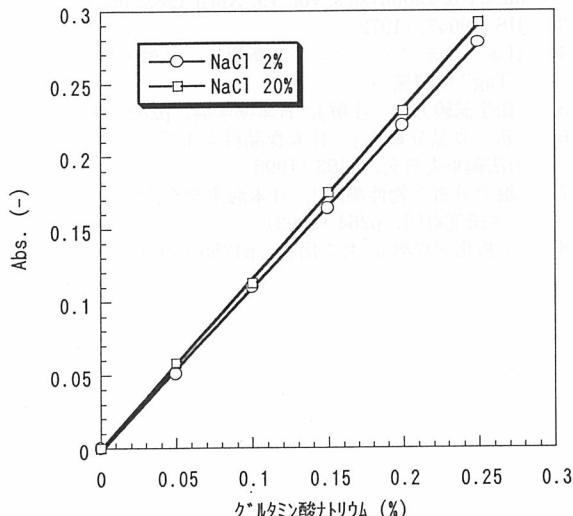


Fig. 10 銅塩法検量線

たが、これは緩衝溶液使用量を増加させることにより防止できる。Table 3 の結果から塩酸を加える場合の緩衝溶液の使用量を 5 ml とした。

塩基性炭酸マグネシウムを加えたグルタミン酸ナトリウム 0.20% 溶液に、6 N 塩酸 0.5 ml を加えて溶解させた。この検液を 10 ml 採取し、緩衝溶液を 5 ml 加えて発色させ、グルタミン酸ナトリウムの回収率を求めた結果、回収率は 98.5% と良好であった。なお、炭酸塩が共存する塩の場合、酸を加えずに懸濁状態で操作しても回収率は 100% であるので、酸添加の操作は省略できるが、固体で存在する添加物の体積差があるので、酸添加の方法を基本とした。

繰り返し精度について、「アジシオ」の検液を用いて 10 回繰り返し測定を行った結果、測定値の変動係数は

Table 3 緩衝溶液添加量の検討

酸添加量/ml	緩衝溶液量/ml	pH	吸光度
0	3	8.9	0.195
0.5	3	8.1	0.187
0.5	4	8.5	0.193
0.5	5	8.8	0.197

Table 4 特殊用塩中のグルタミン酸ナトリウムの測定結果

試 料	表示値 (%)	HPLC 法測定値 (%)	銅塩法測定値 (%)
チジシオ	10.0	10.29	10.26
チヨダソルト	0.5	0.49	0.44
エンリッチ	1.0	0.79	1.13

0.61% と良好であった。

4.3 特殊製法塩の分析

試料として、「アジシオ」(グルタミン酸ナトリウム含有量表示値 : 10%), 「チヨダソルト」(同 : 0.5%), 「エンリッチ」(同 : 1.0%) を用いた。炭酸塩が添加されているものに関しては、6 N 塩酸 0.5 ml を加えて溶解し、検液を調製した。HPLC 法及び銅塩法によりグルタミン酸ナトリウム量を測定し、結果を Table 4 に示す。両方法とも表示値とほぼ一致したが、「エンリッチ」の測定値に差が見られた。これは「エンリッチ」の添加物として含まれているクエン酸の影響であると推定し、クエン酸の影響を確認した。

HPLC 法に関しては、Fig. 1 の誘導体化反応式からも理解できるように、有機酸の影響は考えられず、実際に測定値にも影響は見られなかった。そこで、銅塩法に関する試験を行った。クエン酸カルシウムを 0.5% 相当添加した塩についてグルタミン酸ナトリウム 0.20% の回収率を求めた結果、塩酸を加えてクエン酸カルシウムを溶かした場合 121%，塩酸を加えない場合 109% とプラス誤差が生じた。そこで吸収曲線を求めた結果、Fig. 11 のようにクエン酸が含まれると最大吸収波長 740 nm の吸収ピークが発生し、630 nm 付近でも吸収があることが示された。これは、銅-グルタミン酸錯体以外の成分（クエン酸-銅錯体と推定される）が生成されたためと考えられる。したがって、クエン酸が含まれる試料については、本法によるグルタミン酸ナトリウムの定量は不可能である。このような塩(例「エンリッチ」)の場合、分離定量法である HPLC 法を用いる必要がある。

5. 要 約

塩の添加物であるグルタミン酸ナトリウムの定量法として、HPLC 法及び、銅塩法について検討した。その

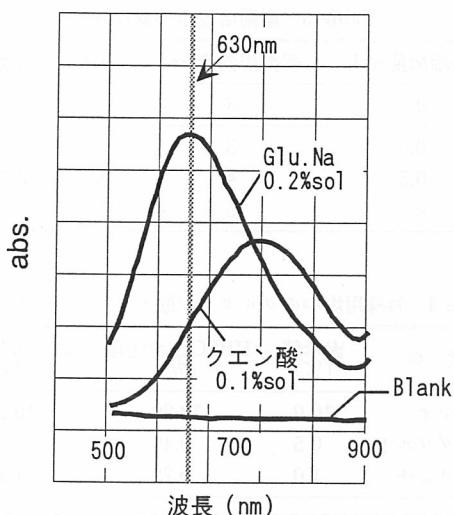


Fig. 11 クエン酸の影響

結果、HPLC 法においては、塩濃度、酸による影響がなく、検量線の直線性及び、繰り返し精度も良好であり、食塩中のグルタミン酸ナトリウム分析への適用性が示された。また、銅塩法では、塩濃度による影響が見られたが、標準溶液中に塩化ナトリウムを加えることにより回避した。なお、検量線の直線性や繰り返し精度は良好であり、食塩中のグルタミン酸ナトリウム分析への適用が示された。しかし、有機酸によるプラス誤差が見ら

れ、有機酸が添加されている食塩の分析には、HPLC 法を用いる必要があると判断した。特殊製法塩中のグルタミン酸ナトリウム分析を行った結果、「アシソ」「チヨダソルト」の先記 2 方法における分析結果はほぼ一致し、両方法の適用性を確認した。

操作性を比較すると、短時間で多試料の測定が可能な銅塩法が優れているが、有機酸が含まれている試料に関しては、HPLC 法を用いなければならない。従って、試料中の添加物に合わせた方法の選択が必要である。

文 献

- 1) Alenka Golc-Wondra, Emil Skocir and Mirko Prosek, Determination of Monosodium Glutamate in Food, Journal of Planar Chromatography, vol. 8, MARCH/APRIL, 1995, pp. 117-121
- 2) R GOPALAKRISHNA and B NAGARAJAN, A Sensitive Method for Ornithine Transaminase Assay Involving Estimation of Glutamate, Indian Journal of Biochemistry & Biophysics, vol. 19, April 1982, pp. 124-126
- 3) JIS K9047, (1972)
- 4) 日本ミリボアリミテッド, 新規アミノ酸分析法“AccQ · Tag” の開発
- 5) 「衛生試験方法・注解」, 日本薬学会, p281 (1990)
- 6) 「新・食品分析法」, 日本食品科学工学会, 新食品分析方法編集委員会, p493 (1996)
- 7) 「塩の分析と物性測定」, 日本海水学会(財)ソルトサイエンス研究財団, p264 (1992)
- 8) 「分析化学辞典」, 共立出版, p1285 (1971)

Abstract

Analysis Method for the Salt Additive Determination of Gulutamic Acid in the Table Salt

Akihiro KOGA and Yasushi NIINO

We studied the utility of HPLC and the copper salt method for measuring L-glutamic acid concentration in table salt. We found that the two methods were applicable for this measurement. However, when using the copper salt method, an error appears due to the presence of organic acid in talbe salt. Consequently, for measuring the concentration of L-glutamic acid in table salt containing organic acid, HPLC must be used. The copper salt method can be accomplished in a short time; therefore, use of either one of the two methods will depend on the type of additives present in table salt or number of samples inuestigated.