

アルシアンブルー染色液によるこんにゃく粉調製品中のカラギーナンの識別及び定量

松井真水美*, 吉村仁太郎*, 庄司 光葉**, 岩崎 智子*, 鈴木 稔*

Identification and determination of carrageenan in mixtures of konjac powder and carrageenan by an Alcian Blue staining method

Mayumi MATSUI*, Shintaro YOSHIMURA*, Mitsuha SHOJI**, Tomoko IWASAKI* and Minoru SUZUKI*

*Yokohama Customs Laboratory

2-1-10, Shin-urashima-cho, Kanagawa-ku, Yokohama, Kanagawa 221-0031 Japan

**Present address: Yokohama Customs

1-1, Kaigandori, Naka-ku, Yokohama, Kanagawa 231-8401 Japan

In the tariff classification of konjac preparations, separate taxation is applied when konjac powder is separated by simple processes such as sieve analysis. When not separated, the konjac property as a whole is considered for the classification. The separation of konjac powder is confirmed by observing each sieve fraction with a polarizing microscope. However, in the case of mixtures of carrageenan and konjac powder, it is difficult to discriminate between the two based on their polarization properties. Therefore, in this study, we used a staining method with Alcian Blue dye, which has affinity for the sulfate group of carrageenan, for the microscopic identification of carrageenan in a mixture of carrageenan and konjac powder. As a result, the optimum condition of the Alcian Blue staining reagent for the microscopic observation was the concentration of 0.05% (w/v), in 50% ethanol, at pH 0.2 (adjusted by HCl). Furthermore, our colorimetric analysis with Alcian Blue dye was sufficient for the quantitative determination of the carrageenan in mixtures of carrageenan and konjac powder.

1. 緒 言

加工食品の増粘安定剤やゲル化剤として、こんにゃく粉とカラギーナンの混合物が輸入される事例があるが、この混合物の税表分類にあたっては、こんにゃく粉とカラギーナンの分離が可能か否かで税番が異なる。こんにゃく粉とカラギーナンの分離が簡単な操作により可能な場合には分離課税となるが、分離が不可能な場合は、こんにゃくの特性を有するか否かにより分類が決定される。

現在、分離が可能か否かを判断する方法の一つとして、当該混合物をふるいにかけ、偏光顕微鏡により分離物中のこんにゃくの有無の確認を行っているが、こんにゃく粉の粒径が小さい場合等、カラギーナンとこんにゃく粉の識別は困難である。

そこで、硫酸基と結合する特性があるアルシアンブルー染色液を使用して硫酸基を持つカラギーナンを特異的に染色し、ふるい試験における分離物中のカラギーナン含有の有無についての簡便な識別法を開発するとともに、同染色液を用いた比色法による当

該混合物中のカラギーナンの定量法についても検討を行った。

2. 実 験

2.1 試料及び試薬

2.1.1 試料

輸入品 A (こんにゃく粉・カラギーナン【25:75】混合物)

輸入品 B (こんにゃく粉・カラギーナン【25:75】混合物)

輸入品 C (こんにゃく粉・カラギーナン・ブドウ糖【38:40:22】混合物)

こんにゃく粉 A (輸入品 A の原料)

こんにゃく粉 B (輸入品 B の原料)

こんにゃく粉 C (輸入品 C の原料)

カラギーナン A (輸入品 A の原料)

カラギーナン B (輸入品 B の原料)

カラギーナン C (輸入品 C の原料)

ブドウ糖 C (輸入品 C の原料)

* 横浜税関業務部

〒221-0031 神奈川県横浜市神奈川区新浦島町 2-1-10

** 現在所属 横浜税関業務部

〒231-8401 神奈川県横浜市中区海岸通 1-1

混合試料 A (こんにゃく粉 A とカラギーナン A を 45.0 : 55.0 に混合したもの)

混合試料 B (こんにゃく粉 B とカラギーナン B を 24.9 : 75.1 に混合したもの)

2.1.2 試薬

アルシアノブルー-8GX (メルク)、 κ -カラギーナン (和光純薬)、 λ -カラギーナン (和光純薬)、カラギーナンナトリウム (和光純薬)、 ι -カラギーナン (東京化成工業)、カラギーナン (シグマ-アルドリッヂ)、塩酸 (和光純薬、特級)、エタノール (和光純薬、特級)、リン酸二水素ナトリウム二水和物 (和光純薬、特級)、ガラクトース (和光純薬、特級)、ソルビトール (和光純薬、一級)

2.2 分析装置

生物顕微鏡 BX50 (OLYMPUS) (顕微鏡デジタルカメラ DP20)

紫外・可視分光光度計 Agilent8453 (Agilent)

吸光セル (光路長1mm×光路幅10mm×高さ45mm) (東京硝子器械)

1mm セル用スペーサ (Agilent)

冷却卓上遠心機 H-3R (コクサン)

微量高速冷却遠心機 MX-301 (トミー精工)

高速液体クロマトグラフ Agilent 1200 Series (Agilent)

マッフル炉 FP-31 (ヤマト科学)

2.3 試薬の調製

2.3.1 顕微鏡観察用アルシアノブルー染色液の調製

50 % (v/v) エタノール水溶液に塩酸を加え、pH 0.2 に調整したもの 20 ml に、アルシアノブルー-8GX 0.01 g を溶解し、ろ紙 (No.5B) でろ過後、3,000 rpm で 15 分間遠心分離後の上澄み液を使用して、0.05 % (w/v)、pH 0.2、50 % (v/v) エタノール水溶液の条件でアルシアノブルー染色液を作成した。

また同様の方法で、アルシアノブルー-8GX 0.004 g、0.02 g (アルシアノブルー染色液濃度 0.02 %、0.10 %)、pH (0.2、0.6、1.0)、エタノール割合 (30 % (v/v)、50 % (v/v)、70 % (v/v)) と条件の異なる染色液を調製した。

2.3.2 定量用アルシアノブルー染色液(濃度 0.6 %、0.8 %、1.0 %、1.2 %)の調製^{1)~2)}

アルシアノブルー-8GX (0.30 g) 及びリン酸二水素ナトリウム二水和物 0.895 g を 50 ml 容メスフラスコに量りとり、塩酸 2.1 ml を加え、超純水で定容したものを、ろ紙 (No.5B) でろ過後、更に 3,000 rpm で 15 分間遠心分離し、その上澄み液を 0.6 % (w/v) アルシアノブルー染色液とした。

同様に、アルシアノブルー-8GX (0.40 g、0.50 g、0.60 g) に対応した各種濃度アルシアノブルー染色液 (0.8 % (w/v)、1.0 % (w/v)、1.2 % (w/v)) も調製した。

2.4 アルシアノブルー染色液による顕微鏡観察

2.4.1 顕微鏡観察用アルシアノブルー染色液の条件の検討

輸入品 A~C について、アルシアノブルー染色液濃度、pH 及びエタノール割合の異なる 2.3.1 で調製した種々のアルシアノブルー染色液を直接滴下し、生物顕微鏡により観察を行い、顕微鏡観

察でこんにゃく粉とカラギーナンを識別しやすい条件を検討した。

2.4.2 試料の顕微鏡観察

輸入品、原料こんにゃく、原料カラギーナン及び原料ブドウ糖それぞれに、2.4.1 で検討した条件で調製したアルシアノブルー染色液を直接滴下し、生物顕微鏡により観察を行った。

2.4.3 各種カラギーナン試薬のアルシアノブルー染色液による顕微鏡観察

市販されているカラギーナン試薬 5 種 (κ -カラギーナン、 ι -カラギーナン、 λ -カラギーナン、カラギーナン、カラギーナンナトリウム) を使用し、2.4.2 と同様の方法でエタノール割合の異なるアルシアノブルー染色液による顕微鏡観察を行った。

2.5 比色法によるカラギーナンの定量^{1)~3)}

2.5.1 混合試料 A の定量

こんにゃく粉 A とカラギーナン A を混合し、カラギーナン濃度が 40.0 %、49.9 %、54.9 %、59.9 %、及び 70.1 % となる 5 つの混合物を作成した。これら混合物 100 mg を精秤し、超純水で 100 ml 容メスフラスコに定容した。その 1 ml をマイクロピペットで分取したものに、2.3.2 の 0.8 % アルシアノブルー染色液 0.2 ml を加え、20 分間静置した。その後、10,000 rpm で 20 分間遠心分離した上澄み液を、分光光度計により光路長 1 mm の吸光セルを使用して波長 605 nm における吸光度を測定し、吸光度とカラギーナン濃度の検量線を作成した。

また、2.1.1 の混合試料 A 100 mg をそれぞれ量りとり、超純水で 100 ml 容メスフラスコに定容し、その 1 ml をマイクロピペットで分取したものに、0.8 % アルシアノブルー染色液を 0.2 ml 添加したものを 5 個作成して測定を行い、同時に作成した検量線を用いて定量し、その平均を求めた。同様の操作を 5 回行い (合計 5 × 5 回 (25 回) 測定)、検量線も 5 検体分を測定するごとに、新しい検量線を作成した。

2.5.2 輸入品 B 及び混合試料 B の定量

こんにゃく粉 B とカラギーナン B を混合し、カラギーナン濃度が 59.7 %、69.9 %、75.0 %、80.1 %、及び 90.0 % となる 5 つの混合物を作成した。これら混合物 100 mg を精秤し、超純水で 200 ml 容メスフラスコに定容した。この 1 ml をマイクロピペットで分取したものに、2.3.2 の 0.6 % アルシアノブルー染色液 0.2 ml を加え、20 分間静置したものを、2.5.1 と同様の操作を行い、検量線を作成した。

また、2.1.1 の輸入品 B 及び混合試料 B 100 mg を量りとり、超純水で 200 ml 容メスフラスコに定容し、その 1 ml をマイクロピペットで分取したものに、0.6 % アルシアノブルー染色液を 0.2 ml 添加したものを 5 個作成して測定を行い、同時に作成した検量線を用いて定量し、その平均を求めた。同様の操作を 5 回行い (合計 5 × 5 回 (25 回) 測定)、検量線も 5 検体分を測定するごとに、新しい検量線を作成した。

2.5.3 HPLC 法及び灰分法を用いた輸入品 B の定量

中村ら⁴⁾の方法に従い、輸入品 B 及び原料カラギーナンを加水分解後、カラム : Shodex SUGAR SPO810 (8.0 mm × 300 mm)、移動相 : H₂O、流速 : 1.0 ml/min、恒温槽温度 : 80°C、検出 : 示差屈

折率検出器 (40°C)、注入量: 10 μ l、内標準物質: ソルビトールの条件でHPLC法によりガラクトースを分離・定量した。その後、原料カラギーナンB及び輸入品Bに含まれているガラクトースの含有量を求め、輸入品Bにおけるカラギーナン含有量を算出した。

また、灰分法として、こんにゃく粉の灰分量が4%程度に対し、カラギーナンの灰分量が33%程度と大きく異なることを利用し、こんにゃく粉BとカラギーナンB及び輸入品Bを550°Cで3時間燃焼した後の灰分量から輸入品Bのカラギーナン含有量を算出した。

2.5.4 定量用アルシアンブルー染色液濃度及びカラギーナン濃度の検討

カラギーナンBを使用し、水及びカラギーナン水溶液4種(26.4 mg/100 ml、51.4 mg/100 ml、74.1 mg/100 ml、100.5 mg/100 ml) 各1 mlをマイクロビペットで分取したものの、2.3.2の定量用アルシアンブルー染色液0.2 mlを加え、2.5.1の方法により検量線を作成した。定量用アルシアンブルー染色液の濃度は4種類(0.6%、0.8%、1.0%、1.2%)を使用し、各染色液濃度による検量線を作成し、アルシアンブルー染色液濃度とカラギーナン濃度の最適測定条件を検討した。

3. 結果及び考察

3.1 顕微鏡観察

3.1.1 顕微鏡観察用アルシアンブルー染色液の条件の検討結果

エタノール割合を変えながら顕微鏡観察をしたところ、水溶液ではこんにゃく粉が膨潤するため観察が困難となり、30%エタノール水溶液でも染色状態は良好であるが、こんにゃく粉の一部に膨潤が見られた。一方、70%エタノール水溶液では、こんにゃく粉の膨潤が見られないものの、アルシアンブルーの染色度合いが低かったことから、顕微鏡観察には不適当であった。これらの結果に対し、50%エタノール水溶液を使用した場合では、こんにゃく粉に膨潤が見られず染色状態も良好であった。

更に、アルシアンブルー染色液濃度は、0.05%が試料にこの染色液を直接滴下して顕微鏡で観察する際に、肉眼で識別しやすい染色液濃度であり、pHについては、佐藤ら³⁾のとおりpH 0.2が最も染色の度合いが高かったことから、顕微鏡観察用アルシアンブルー染色液は、0.05%濃度、50%エタノール水溶液、pH 0.2の条件で作成したものを使用することとした。

3.1.2 試料の顕微鏡観察結果

3.1.1の条件で作成したアルシアンブルー染色液を用いた輸入品A~C及び原料の顕微鏡観察結果をPhoto. 1~3に示した。写真左から原料こんにゃく粉、原料カラギーナン、輸入品である。

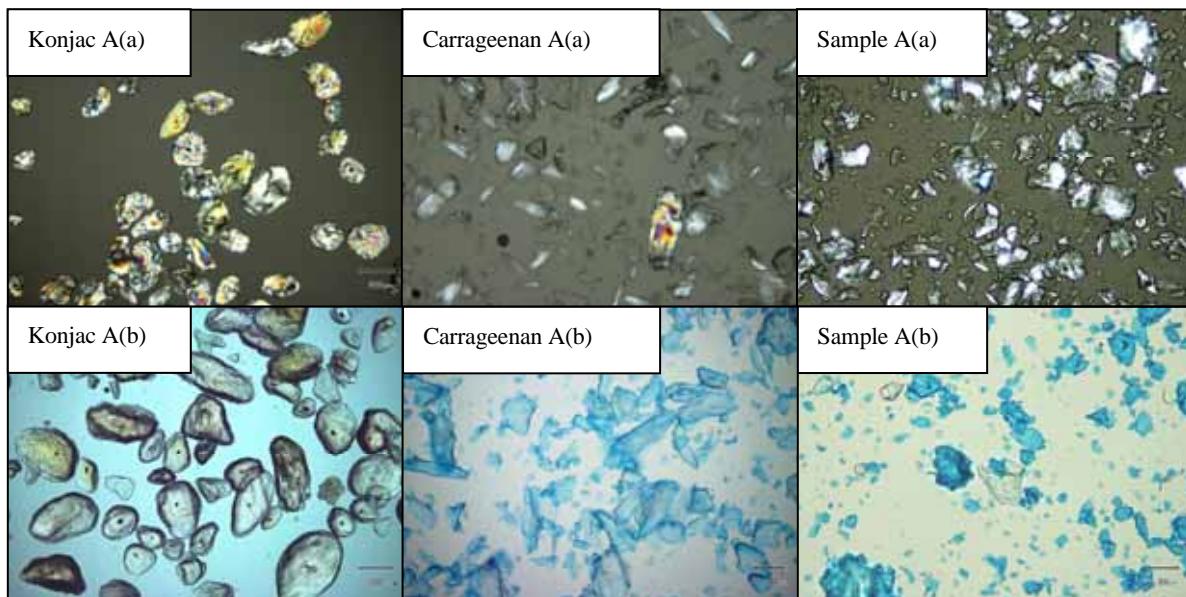


Photo. 1 Photomicrograph of konjac A(x116), carrageenan A(x290) and sample A(x580)
(a) Polarization, (b) Alcian Blue

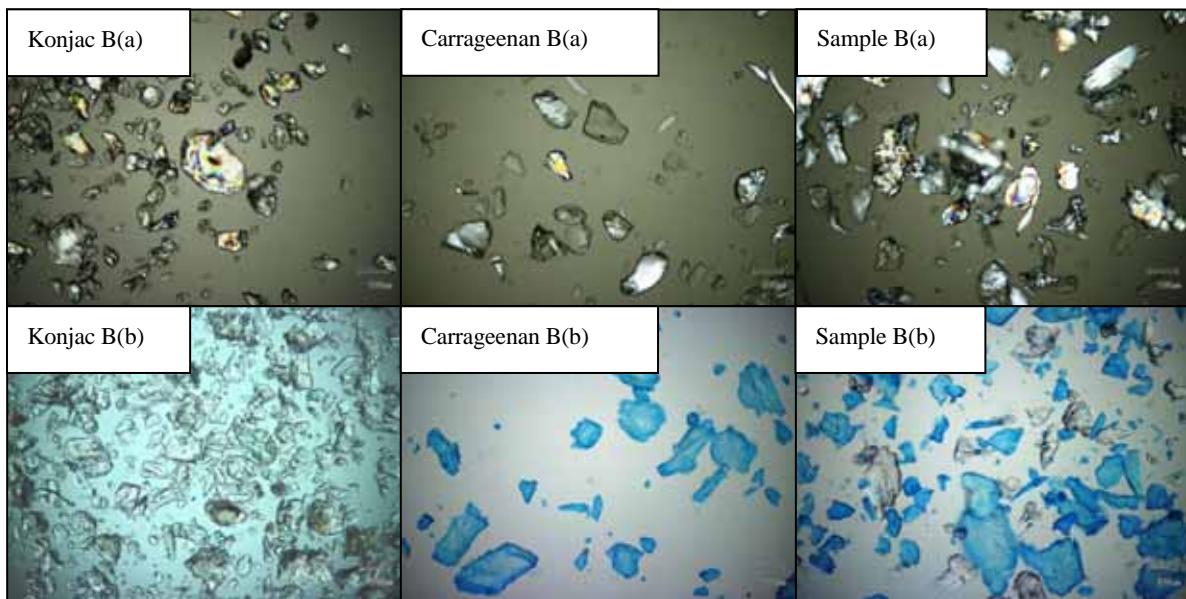
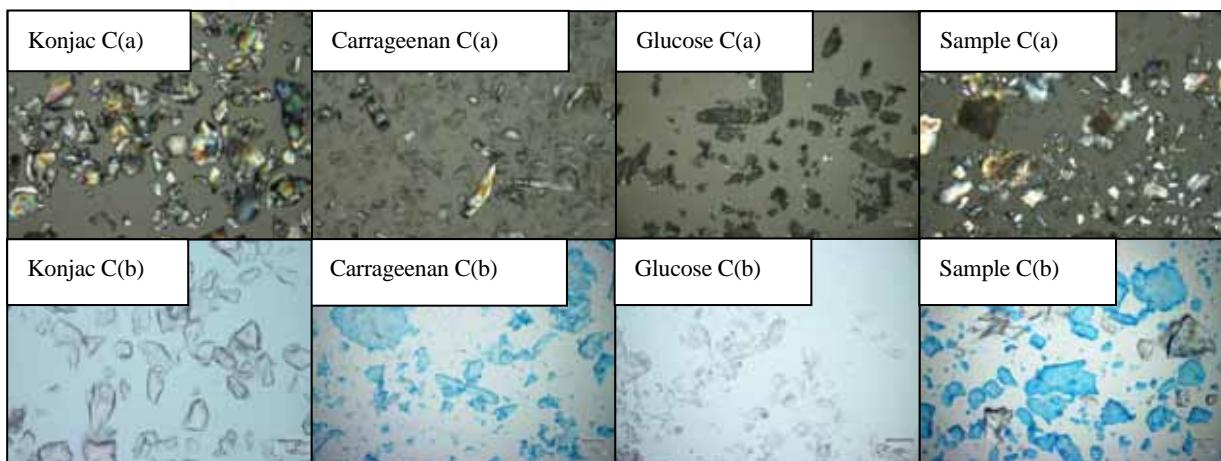


Photo. 2 Photomicrograph of konjac B (×290), carrageenan B (×290) and sample B (×290)
 (a) Polarization, (b) Alcian Blue



こんにゃく粉及びブドウ糖は、いずれもアルシアンブルー染色液では染色されず、カラギーナンは青く染色された様子が観察され、輸入品 A～C のいずれにおいても 3.1.1 の条件で作成したアルシアンブルー染色液を用いて顕微鏡観察を行うことにより、こんにゃく粉調製品中に含まれるカラギーナンを簡便に識別することが可能となった。

3.1.3 各種カラギーナン試薬のアルシアンブルー染色液による顕微鏡観察結果

市販のカラギーナン試薬について、3.1.1 で決定したアルシアンブルー染色液を用いて顕微鏡観察を行ったところ、 κ -カラギーナンのみ青く染色され、その他のカラギーナンは溶解した。次に、アルシアンブルー染色液のエタノール割合を 70 % に変更したところ、 κ -カラギーナンのほか、 ι -カラギーナン及びカラギーナンについても、アルシアンブルー染色液による発色に少し時間を要するものの青く染色された様子が観察された。しかし、 λ -カラ

ギーナン、カラギーナナトリウムについては、この条件を用いても 50 % エタノール水溶液と同様に溶解する結果となり (Table 1)、水に溶けやすい性質を持つカラギーナン試薬においては、3.1.1 の条件で作成したアルシアンブルー染色液では適用できないものがあった。

Table 1 Alcian Blue staining test for standard of carrageenan samples under different conditions

	0.05 % Alcian Blue, pH 0.2	
	50 % Ethanol	70 % Ethanol
κ -Carrageenan	Stained	Stained
ι -Carrageenan	Dissolution	Stained
λ -Carrageenan	Dissolution	Dissolution
Carrageenan	Dissolution	Stained
Carrageenan Sodium	Dissolution	Dissolution

カラギーナンは、硫酸基の含有量の違いで κ 、 ι 、 λ に分かれ、 λ が一番多く硫酸基を含むために、より水に溶けやすい性質がある。また、カラギーナンにはナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩があり、水の溶解性は、ナトリウム塩が水に溶けやすい性質がある⁵⁾ため、このような結果になったものと考えられる。

3.2 比色法によるカラギーナンの定量

3.2.1 混合試料 A の定量結果

混合試料 A を定量するために、各カラギーナン濃度の検量線用試料 5 検体（カラギーナン濃度約 40–70 %）について、この上澄み液の吸光度とカラギーナン濃度をプロットして作成した検量線の一例を Fig. 1 に示したが、得られた検量線は良好な直線性（相関係数 0.99 以上）を示した。

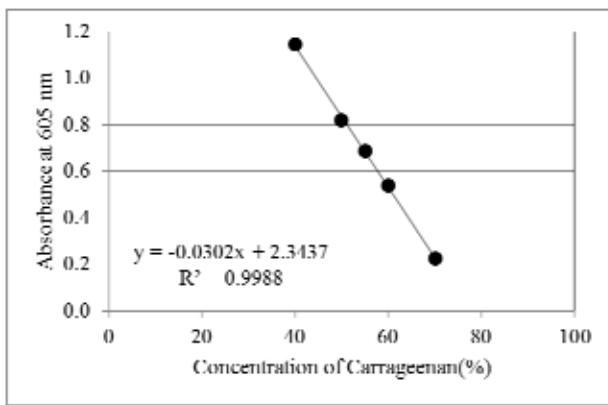


Fig. 1 Calibration curve of carrageenan content (0.8 % Alcian Blue)

この結果、混合試料 A の回収率は 99.6 %、変動係数は 0.345 % と良好な定量結果が得られた (Table 2)。

3.2.2 輸入品 B 及び混合試料 B の定量結果

輸入品 B 及び混合試料 B を定量するために、各カラギーナン濃度の検量線用試料 5 検体（カラギーナン濃度約 60–90%）について、この上澄み液の吸光度とカラギーナン濃度をプロットして作成した検量線の一例を Fig. 2 に示したが、得られた検量線は良好な直線性（相関係数 0.99 以上）を示した。

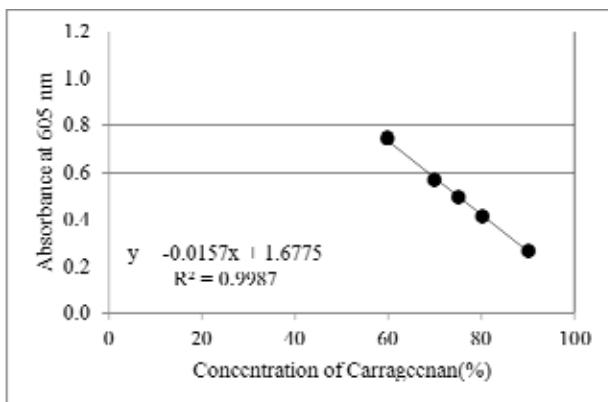


Fig. 2 Calibration curve of carrageenan content (0.6 % Alcian Blue)

輸入品 B 及び混合試料 B について、3.2.1 と同様の方法で測定し、定量した結果を Table 3 に示した。

Table 2 Carrageenan content in the model sample A, determined by the Alcian Blue photometric method

Model Sample A (the carrageenan content : 55.0%)		
	Carrageenan content (%)	Recovery(%)
	Measured values	Average
1	53.7	
2	54.4	
3	55.2	54.6
4	54.8	
5	54.9	
6	54.0	
7	55.1	
8	55.1	54.9
9	54.7	
10	55.5	
11	54.2	
12	55.0	
13	54.7	55.1
14	54.7	
15	56.7	
16	53.8	
17	54.5	
18	55.1	54.8
19	54.0	
20	56.3	
21	54.7	
22	54.6	
23	54.3	54.6
24	54.6	
25	54.8	
Ave.		54.8 %
SD		0.189
CV		0.345 %

Table 3 Carrageenan contents in the model sample B and sample B, determined by the Alcian Blue photometric method

Model Sample B (the carrageenan content: 75.1%)			Sample B	
	Carrageenan(%)	Recovery(%)	Carrageenan(%)	
	measured values	Average	measured values	Average
1	73.0	73.7	74.8	74.7
2	73.6		72.6	
3	73.6		73.3	
4	74.7		75.2	
5	73.5		77.8	
6	74.6	75.0	72.8	73.4
7	74.7		73.0	
8	74.6		72.7	
9	75.3		73.4	
10	75.7		75.0	
11	77.8	75.8	74.6	75.4
12	74.1		74.3	
13	74.6		78.6	
14	76.4		74.9	
15	76.2		74.8	
16	75.2	75.8	74.0	75.9
17	76.0		75.6	
18	76.9		79.6	
19	75.7		75.1	
20	75.3		75.3	
21	75.1	75.0	74.5	74.0
22	77.1		74.5	
23	74.3		73.6	
24	74.5		73.3	
25	74.0		73.8	
Ave.		75.1 %	100.0 %	74.7 %
SD		0.874	—	1.036
CV		1.164 %	—	1.387 %

この結果、混合試料 B の回収率は 100.0 %、変動係数は 1.164 % となり、輸入品 B のカラギーナン割合は 74.7 % となった。

3.2.3 HPLC 法及び灰分法を用いた輸入品 B の定量結果

2.5.3 の方法による原料カラギーナン加水分解物及び輸入品 B 加水分解物のクロマトグラムの一例を Fig. 3-4 に示した。

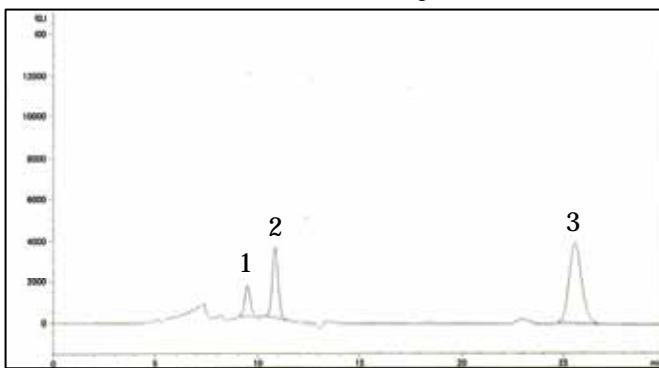


Fig. 3 Chromatogram of a hydrolyzed carrageenan
Peak in order of appearance: 1: gulcose 2: garactose 3: sorbitol

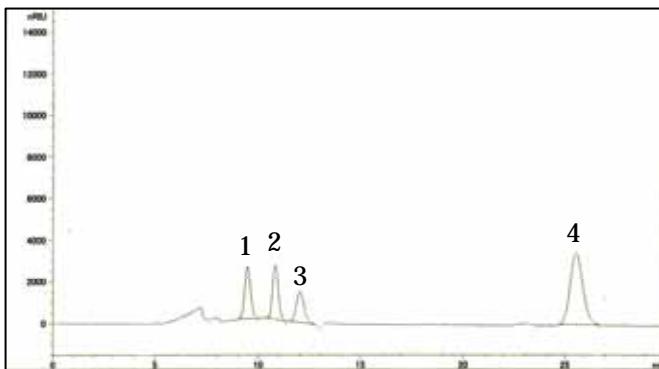


Fig. 4 Chromatogram of a hydrolyzed sample B
Peak in order of appearance: 1: gulcose 2: garactose 3: mannose 4: sorbitol

また、輸入品 B を HPLC 法及び灰分法により定量した結果を Table 4 に示した。

Table 4 Recovery of the model sample B and carrageenan content in the sample B, determined by three different methods

	Recovery of Model Sample B(%)	Concentration of Carrageenan in Sample B(%)
Alcian Blue method	100.0	74.7
HPLC	99.5	75.5
Ash content	99.6	78.3

輸入品 B と同じ割合で混合した混合試料では、いずれの定量法も回収率が 99 % 以上であることから、各々の定量法は、原料が完全に一致する場合は良好な結果が得られる。各々の定量法による輸入品 B のカラギーナン含有量の差異は、原料であるこんにゃく粉 B 及びカラギーナン B の成分が輸入品 B に完全に一致していないことによるものと考えられる。

3.2.4 定量用アルシアンブルー染色液濃度及びカラギーナン濃度の検討結果

カラギーナン B 水溶液を用いて、4 種類のアルシアンブルー染色液濃度 (0.6 %、0.8 %、1.0 %、1.2 %) により作成した検量線を Fig. 5 に示した。

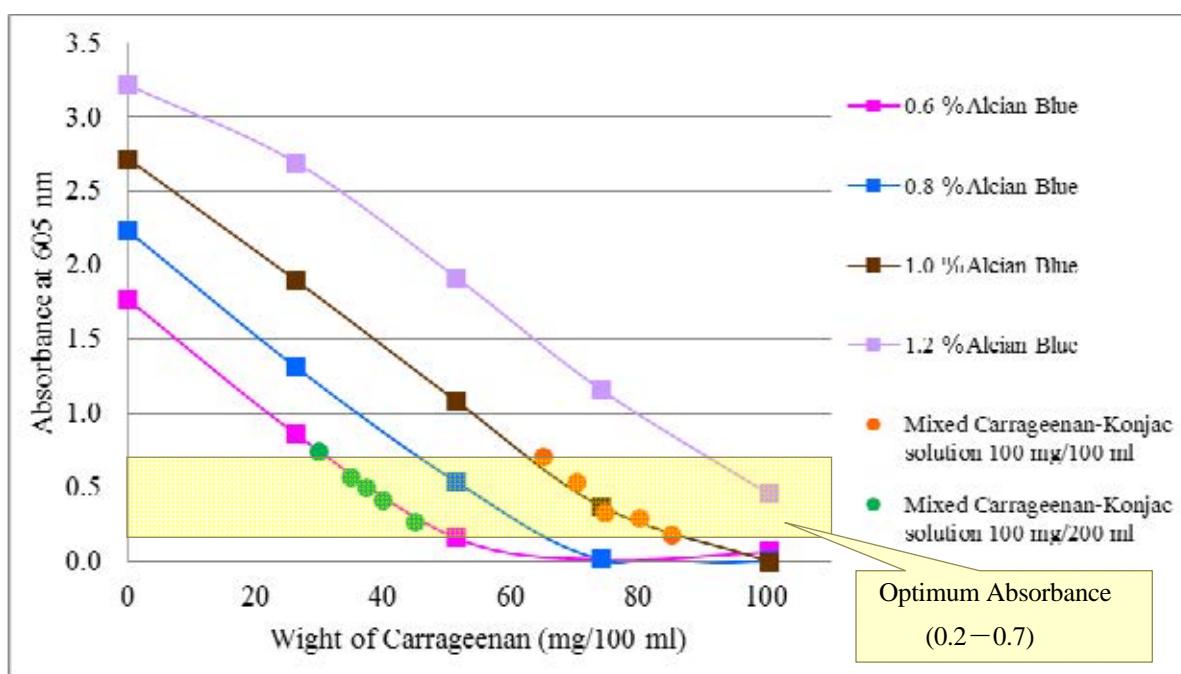


Fig. 5 Calibration curve of carrageenan B (0.6 %, 0.8 %, 1.0 %, 1.2 % Alcian Blue)

一般的には、吸光度は最適測定範囲（0.2～0.7）にあると誤差が少ないとされている⁹⁾。

Fig. 5 の橙色の丸は、3.2.2 で使用した検量線用試料の濃度を 2 倍に変更し（100 mg/100 ml）、アルシアンブルー染色液濃度 1.0 % の検量線であるが、吸光度の最適測定範囲内にあるが直線性がない。また、Fig. 5 の緑色の丸は、3.2.2 で用いた検量線用試料の濃度（100 mg/200 ml）及びアルシアンブルー染色液濃度 0.6 % の検量線であるが、吸光度の最適測定範囲内にあり直線性も良好（相関係数 0.99 以上）である。

これらのことから、比色法によるカラギーナンの定量は、吸光度の最適測定範囲の条件を満たすアルシアンブルー染色液濃度と試料濃度における良好な直線性を示す検量線を選定する必要があることが分かった。

4. 要 約

アルシアンブルー染色液を使用して、こんにゃく粉とカラギーナンからなる混合物中のカラギーナンの識別法及び定量法を検討した。

こんにゃく粉とカラギーナンからなる混合物中のカラギーナンの識別においては、0.05 % 濃度、pH 0.2、50 % エタノール水溶液の条件で作成したアルシアンブルー染色液を用いることで、顕微鏡観察における簡便な識別が可能となった。

こんにゃく粉とカラギーナンの混合試料にアルシアンブルー染色液を添加し、その上澄み液の吸光度とカラギーナンの濃度をプロットして作成した検量線は良好な直線性を示し、検液のカラギーナン濃度に適したアルシアンブルー染色液濃度（0.6 %～1.0 %）を選定することにより良好な定量結果が得られた。このことから、本法は、こんにゃく粉調製品中のカラギーナンの定量を行う際の有効な方法の一つであることが判明した。

文 献

- 1) 舟岡朋子、谷澤俊博、室博之、横野正：分析化学、**56**, 173 (2007)
- 2) 服部学、有田淳哉、田淵照人、小池茂行、中村洋：分析化学、**52**, 259 (2003)
- 3) 佐藤英夫、松原学、渡辺宏、中村祥典、斎藤弘和：農林水産消費安全技術センター調査研究報告、**17**, 1709 (1993)
- 4) 中村文雄、笹谷隆：関税中央分析所報、**40**, 23 (2000)
- 5) 國崎直道、佐野征男：“食品多糖類—乳化・増粘・ゲル化の知識”，P.94 (2001)，(幸書房)。
- 6) 曾根寿明：“分析化学実験”，P.300 (1964)，(化学同人)。