

キャピラリー電気泳動によるこんにゃく粉の定量

倉本 智和*，小曾根一欽*，山崎 光廣*，松崎 隆一*，印出 進*

Determination of Konjac Powder in Konjac Preparation by High Performance Capillary Electrophoresis

Norikazu KURAMOTO*, Kazuyosi KOSONE*, Mitsuhiro YAMAZAKI*

Ryuichi MATSUZAKI and Susumu INDE*

*Tokyo Customs Laboratory

2-56, Aomi, Koto-ku, Tokyo 135-8615 Japan

The determination of Konjac powder in Konjac preparation by high performance capillary electrophoresis (HPCE) was examined. Konjac powder was hydrolyzed under 2N sulfuric acid or 1N hydrochloric acid. After hydrolysis of Konjac powder, 2N sulfuric acid was neutralized with calcium carbonate, or 1N hydrochloric acid was diluted without neutralization. These conditions showed good recovery and reproducibility. The method was compared with determination by high performance liquid chromatography (HPLC), and was shown to be a useful method for determining Konjac powder in Konjac preparation.

1. 緒 言

こんにゃくは、その独特の風合いと食感から、古くから広く日本人に賞味されている伝統的食品である。また、低カロリーで整腸作用などの薬効を持つことから、近年の健康食品ブームに伴って、こんにゃく粉を混合した調製食料品が多く流通するようになった。

先頃、当関において、こんにゃく粉、でん粉、りん酸カルシウム等からなる調製品の分析依頼があり、こんにゃく粉の含有量を定量する必要性があった。

こんにゃく粉調製品中のこんにゃく粉の定量法については、税関分析法 No.113「こんにゃく粉の分析法」に基づき、こんにゃく粉の主成分であるグルコマンナンを2N硫酸で加水分解し、炭酸バリウムで中和後、構成糖の一つであるマンノースを高速液体クロマトグラフィー(以下、HPLC)で定量し、原料こんにゃく粉のマンノース値から、調製品中のこんにゃく粉含有量を算出している。

しかし、定量分析に対する信頼性を確保するためには、今後は複数の方法により分析を行うことが必要となる。

今回は、こんにゃく粉調製品中のこんにゃく粉を定量するための分析方法として、理論段数が高く、イオン性物質が共存しても測定可能なキャピラリー電気泳動法(以下、HPCE法)に

よる分析を試みたので報告する。

2. 実 験

2.1 試料及び試薬

2.1.1 試 料

グルコマンナン(こんにゃく芋製 和光純薬工業製)
こんにゃく粉(輸入品)
こんにゃく粉(国産品)

2.1.2 試 薬

D(+) - Mannose(和光純薬工業製)

D(+) - Glucose(和光純薬工業製)

D(+) - Galactose(純正化学製)

2N硫酸(和光純薬工業製)

1N塩酸(和光純薬工業製)

炭酸ナトリウム(和光純薬工業製)

炭酸カルシウム(和光純薬工業製)

炭酸バリウム(和光純薬工業製)

2.2 装置及び測定条件

2.2.1 キャピラリー電気泳動(HPCE)

装置 : HP3D CE (HEWLETT PACKARD)

カラム : Fused Silica Capillary(50 μ m I.D. \times 72cm)

泳動緩衝溶液 : BASIC ANION BUFFER (Agilent)

試料注入方法：加圧注入法 (50.0mbar × 6sec)

泳動電圧 : 25.0KV (Negative)

検出器 : DAD Sig.350nm , Ref.275nm

恒温槽温度 : 20

2.2.2 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

装置 : HP1090 System (HEWLETT PACKARD)

カラム : Shodex SP0810 (8mmI.D. × 300mm)

移動相 : H₂O

流速 : 1.0ml/min

検出器 : RI (Shodex RI - 71)

注入量 : 20 μl

恒温槽温度 : 80

2.3 実験方法

2.3.1 H P C E 法による測定条件の検討

2.3.1.1 内部標準物質の検討

HPCE 法によりマンノースを定量するための内部標準物質を検討するために, ガラクトース, フコース, キシロース, フルクトース, ラムノース, ラクトース, シューコロース, グルクロン酸, ガラクトロン酸, グルコサミン, ソルビトールの 11 種の糖類について, それぞれ 1000ppm の濃度の水溶液に調製し, HPCE に導入した。

2.3.1.2 試料測定濃度の検討

標準のマンノース, グルコース, 内部標準物質について, それぞれ 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000ppm の濃度の水溶液に調製し, HPCE に導入した。

2.3.2 酸加水分解条件及び中和方法の検討

2.3.2.1 2N 硫酸による加水分解

(1) 炭酸バリウムで中和

50ml 容なす形フラスコに, 試薬のグルコマンナン 500mg を精秤し, 2N 硫酸 10ml 加え, グルコマンナンが壁面に飛散しないように静かに攪拌し, 5 分間静置する。さらに 2N 硫酸 10ml を加え, 空気冷却管を取り付け, 静かに攪拌しながら, 95 の湯浴中で 5 時間加熱し加水分解する。なす形フラスコの内容物を 200ml 容メスフラスコに移し入れ, なす形フラスコの内壁を少量の超純水で数回洗浄し, 洗液はメスフラスコに移し入れる。これに内部標準物質を加えよく混合し定容する。混合液 10ml を 200ml 容三角フラスコに採取し, 1.2g の炭酸ナトリウムを加え, 塩酸を中和したものを, メンブランフィルターでろ過し HPCE に導入した。

(2) 炭酸カルシウムで中和

上記と同様に加水分解を行い, 200ml 容メスフラスコに移し入れ, 内部標準物質を加え定容する。混合液 10ml を 200ml 容三角フラスコに採取し, 1.5g の炭酸カルシウムを加え, 硫酸を中和したものを遠心分離し, メンブランフィルターでろ過したものを HPCE に導入した。

(3) 炭酸ナトリウムで中和

上記と同様に加水分解を行い, 200ml 容メスフラスコに移し入れ, 内部標準物質を加え混合し定容する。混合液 10ml を 200ml 容三角フラスコに採取し, 1.3g の炭酸ナトリウムを加え, 硫酸

を中和したものを, メンブランフィルターでろ過し HPCE に導入した。

(4) 中和を行わず希釈

上記と同様に加水分解を行った後, 200ml 容メスフラスコに移し入れ, 内部標準物質を加え, 中和を行わず超純水で定容したものを, メンブランフィルターでろ過し HPCE に導入した。

2.3.2.2 1N 塩酸による加水分解

(1) 炭酸ナトリウムで中和

50ml 容なす形フラスコに試薬のグルコマンナン 500mg を精秤し, これに 1N 塩酸 10ml 加えグルコマンナンが壁面に飛散しないよう静かに攪拌し, 5 分間静置する。さらに 1N 塩酸 10ml を加え, 空気冷却管を取り付け, 静かに攪拌しながら, 95 の湯浴中で 5 時間加熱し, 加水分解する。なす形フラスコの内容物を 200ml 容メスフラスコに移し入れ, なす形フラスコの内壁を少量の超純水で数回洗浄し, 洗液はメスフラスコに移し入れる。これに内部標準物質を加えよく混合し定容する。混合液 10ml を 200ml 容三角フラスコに採取し, 1.2g の炭酸ナトリウムを加え, 塩酸を中和したものを, メンブランフィルターでろ過し HPCE に導入した。

(2) 中和を行わず希釈

上記と同様に加水分解を行った後, 200ml 容メスフラスコに移し入れ, 内部標準物質を加え, 中和を行わず超純水で定容する。メンブランフィルターでろ過し HPCE に導入した。

(3) 真空凍結乾燥法

上記と同様に加水分解を行った後, 内部標準物質を加え良く混合する。混合液 10ml を真空凍結乾燥機で塩酸を揮発させる。乾燥後 200ml 容メスフラスコに移し入れ, 超純水で定容する。メンブランフィルターでろ過し HPCE に導入した。

2.3.3 グルコマンナンの分解回収率

試薬のグルコマンナン及びこんにゃく粉 2 種類について, 全体から水分, 灰分及び粗たんぱく質を引いたものをグルコマンナンの理論値とし, グルコマンナンの分解回収率を求めた。

2.3.4 模擬試料中のこんにゃく粉の回収率

こんにゃく粉, どうもろこしでん粉及びりん酸ナトリウムを混合し, 模擬試料とした。模擬試料及びこんにゃく粉のマンノースの定量値から, こんにゃく粉の含有量を求め, 模擬試料中の仕込みこんにゃく粉の回収率を求めた。

2.3.5 分析依頼品のこんにゃく粉の定量

実際の分析依頼品及び原料こんにゃく粉のマンノースの定量値から, 分析依頼品中のこんにゃく粉の含有量を求めた。

3. 結果及び考察

3.1 H P C E 法による測定条件

3.1.1 内部標準物質の検討

各々の糖類を一斉分析したフェログラムを Fig. 1 に示す。単糖類の一種であるフコースは, グルコース及びマンノースから分離も良好で, 内部標準物質として理想的と思われたが, 入手が困難であったことから, マンノースと構造的に類似し, 分離が良好であったガラクトースを内部標準物質に選択した。

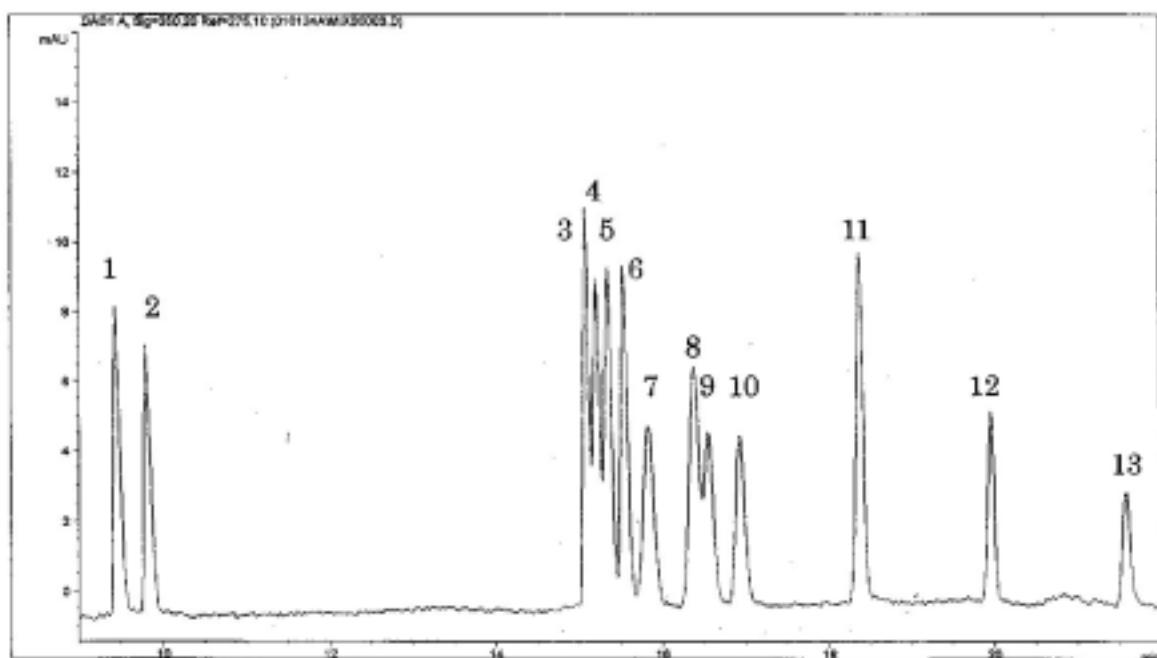


Fig. 1 Electropherogram of standard sugars solution

Peaks in order of appearance: 1, Glucuronic acid 2, Galacturonic acid 3, Mannose 4, Fructose 5, Xylose 6, Rhamnose 7, Glucosamine 8, Glucose 9, Lactose 10, Galactose 11, Fucose 12, Sucrose 13, Surbitol

3.1.2 試料濃度の検討

各々の濃度におけるグルコースとガラクトースのピーク分離度及びマンノースのピーク面積の変動係数を Fig. 2 に示す。分離度は濃度が低いほど良好であるが、逆に変動係数は濃度が低くなると大きくなり、500ppm を境に急激に大きくなる。1000ppm 以上の濃度においては、変動係数が良好であることから、ピーク分離を考慮し、ここでは約1000ppm を測定濃度とした。

3.2 酸加水分解条件及び中和方法の検討

3.2.1 2N 硫酸による条件の検討

2N 硫酸による加水分解物について、炭酸バリウム、炭酸カルシウム及び炭酸ナトリウムによる中和したもの、また、中和を行わず希釈したもののそれぞれのフェログラムを Fig. 3 に示す。炭酸カルシウムで中和したものは、硫酸カルシウムが沈殿し、硫酸イオンが除かれる。更に炭酸カルシウムを過剰に加えた場合には、カルシウムイオンが沈殿せずに共存するが、カルシウムのピークは、マンノース及び内部標準物質の積分に影響を及ぼさず、ベースラインも安定し、ピーク分離も良かった。

炭酸バリウムで中和したものについては、マンノースのピークがバリウムのネガティブピークと重なってしまった。

炭酸ナトリウムで中和したもの及び中和を行わないものについては、ピーク分離は良好ではあったが、溶液中に共存する硫酸イオンの影響で、ベースラインがうねる現象や、みかけの移動度が早まる現象が起き、そのため正確な積分値が得られず、変動係数は良好ではなかった。原因は、硫酸イオンの電気伝導度が緩衝移動相の電気伝導度より高く、また、pH12.1と高アル

カリ条件下に多量存在したためと考える。¹⁾

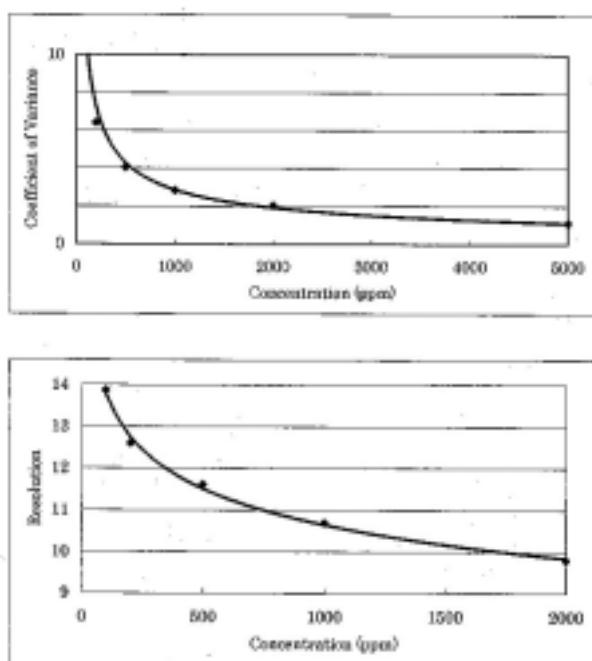


Fig. 2 The effect of concentration on coefficient of variation of peak area Resolution of peaks glucose and galactose

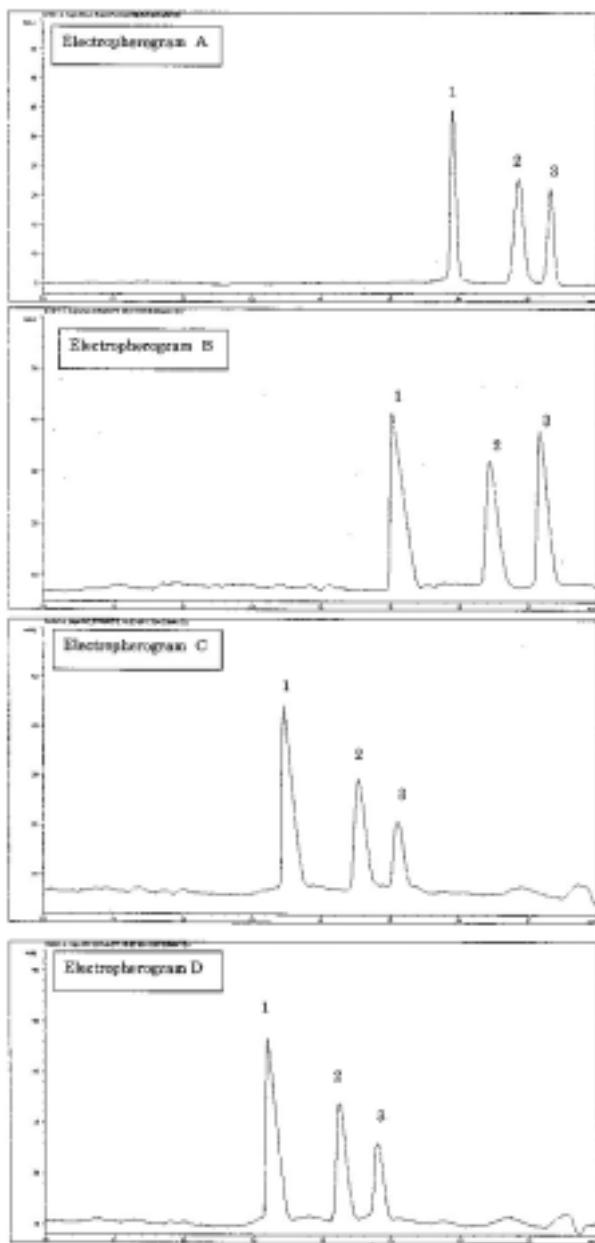


Fig. 3 Electropherogram of Konjac powder hydrolyzed by 2N sulfuric acid

Electropherogram A: Neutralized with calcium carbonate

Electropherogram B: Neutralized with barium carbonate

Electropherogram C: Neutralized with sodium carbonate

Electropherogram D: Diluted without neutralization

Peaks in older of appearance: 1, Mannose 2, Glucose 3, Galactose

3.2.2 1N 塩酸による加水分解条件の検討

1N 塩酸による加水分解物について、炭酸ナトリウムで中和を行ったもの、中和を行わずに希釈したもの及び真空凍結乾燥を行ったもののフェログラムを Fig. 4 に示す。それぞれピーク分

離も良く、ベースラインも比較的安定したフェログラムが得られた。

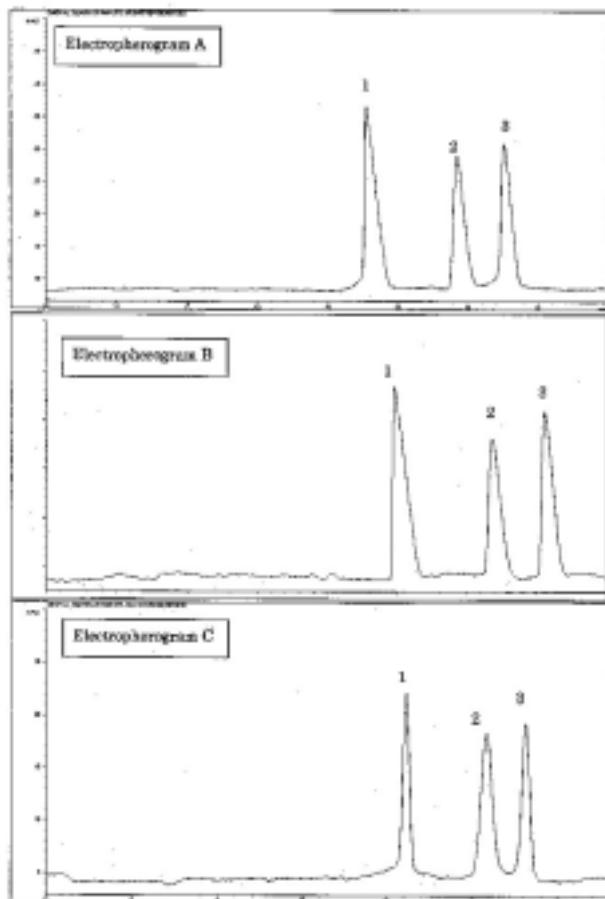


Fig. 4 Electropherogram of Konjac powder hydrolyzed by 1N hydrochloric acid

Electropherogram A: Neutralized with sodium carbonate

Electropherogram B: Diluted without neutralization

Electropherogram C: Freeze Dry method

Peaks in older of appearance: 1, Mannose 2, Glucose 3, Galactose

3.2.3 最適加水分解条件

2N 硫酸による加水分解物については、ベースラインが安定している、再現性が良好であったことから、炭酸カルシウムで中和したものと最適条件とした。

1N 塩酸による加水分解物について、炭酸ナトリウムで中和を行ったもの、中和を行わずに希釈したもの及び真空凍結乾燥により塩酸を揮発させたものは、それぞれベースラインも比較的安定し、良好な分解回収率が得られた。その中で、中和を行わずに希釈したものは、煩雑な中和操作が無く、実験による損失分及び誤差が少ない。したがって、ここでは 1N 塩酸による加水分解物について、中和を行わずに希釈したものを最適条件とした。

3.3 各種こんにゃく粉の分解回収率

上記最適条件で、試薬のグルコマンナン及び2種のこんにゃく粉の分解回収率を求めた結果をTable.1に示す。グルコマンナンの分解回収率は約84~91%で、HPLC法とほぼ同等の分解回収率が得られた。

Table 1 Recovery of hydrolysis

Instrument	HPCE		HPLC
Hydrolysis Condition	2N H ₂ SO ₄	1N HCl	2N H ₂ SO ₄
Std.Glucomannan	84.0%	88.0%	89.4%
Konjac Powder A	90.7%	87.4%	89.1%
Konjac Powder B	85.5%	87.2%	90.7%

3.4 模擬試料によるこんにゃく粉の回収率

上記最適条件で、模擬サンプル中のこんにゃく粉の回収率を求めた結果をTable.2に示す。HPCE法、HPLC法いずれの場合も、仕込んだこんにゃく粉の回収率はほぼ100%で、模擬試料中のこんにゃく粉の含有量は、ほぼ正確に定量できることが確認できた。

Table 2 Recovery of hydrolysis in Model sample

Instrument	HPCE		HPLC
Hydrolysis Condition	2N H ₂ SO ₄	1N HCl	2N H ₂ SO ₄
Model Sample A	96.0%	100.0%	99.0%
Model Sample B	96.0%	100.0%	99.5%

3.5 分析依頼品のこんにゃく粉の定量

上記最適条件で、実際の分析依頼品A、B及びCについて、こんにゃく粉の含有量を定量した結果、HPLC法とほぼ同等の結果が得られた。

4.要 約

HPCE法について、調製品中のこんにゃく粉を定量する場合の最適条件について検討したところ、加水分解条件としては、2N硫酸で加水分解を行い、炭酸カルシウムで中和する条件と、1N塩酸で加水分解を行い、中和を行わず希釈する条件が最も適しており、それぞれ良好な分解回収率が得られた。また、グルコマンナンの分解回収率及び調製品中のこんにゃく粉の回収率について、HPLC法と比較検討したが、同等の回収率及び定量値が得られた。以上から、HPCE法はこんにゃく粉の定量分析に有用と考えられる。

文 献

1) 本田進、寺部茂：“キャピラリー電気泳動 基礎と実際”，P23，(1995)，(講談社)