

アルドニトリル - アセチル誘導体化法を用いたキャピラリーGCによる こんにゃく粉調製品中のこんにゃく粉及び酸性多糖類の定量分析

岡本 健^{*,**}, 田中 佑樹^{*,***}, 杢島 紋子^{*}, 大田 朋規^{*}, 赤崎 哲也^{*}

Compositional analysis of konjac products, consisting of a konjac powder and an acid polysaccharide, by capillary GC with aldonitrile acetate derivatization

Ken OKAMOTO^{***}, Yuki TANAKA^{****}, Ayako MATSUSIMA^{*}, Tomoki OTA^{*} and Tetsuya AKASAKI^{*}

^{*}Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

^{**}Present address: Nagoya Customs Laboratory

2-3-12, Irifune, Minato-ku, Nagoya, Aichi 455-8535 Japan

^{***}Present address: Kobe Customs Laboratory.

12-1, Shinko-cho, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0041 Japan

In this study, sugars in acid hydrolysates of a konjac powder, a carrageenan and an agar powder were analyzed by capillary gas chromatography (GC) with aldonitrile acetate derivatization. A simultaneous analysis of their main constitutional sugars, glucose, mannose and galactose, by GC was supported by good calibration curves with $r^2 = 0.9993$, 0.9999 , and 0.9998 , respectively. Furthermore, pre-testing using mixtures of konjac flour and starch, carrageenan or agar at various ratios proved that their compositions would be estimated based on their mannose and galactose contents determined with our approach, if the raw materials are presented.

1. 緒 言

こんにゃく粉は、サトイモ科のコンニャク芋からつくられる精粉であり、日本の伝統的な食料品であるこんにゃくの原料となる他、その保水性、粘性等の性質から低カロリーで整腸作用を有する健康食品の原料として広く用いられている。

また、調製食品の原料として、こんにゃく粉に増粘剤等を加えたこんにゃく粉調製品（例えば、こんにゃく粉とでん粉、酸性多糖類などの混合物）が広く利用されており、多くの場合、これらは、こんにゃく粉調製品と称して輸入されている。こんにゃく粉調製品は、その成分やこんにゃく粉の混合割合等により、関税率表上の所屬が異なり、関税も異なることから、輸入されたこんにゃく粉調製品の成分割合を把握することは、関税行政を行う上で重要となる。

こんにゃく粉とでん粉からなる混合物中のこんにゃく粉の含有量は、こんにゃく粉の主成分であるグルコマンナンを酸加水分解し、生成したマンノースを配位子交換型カラムによる高速液体

クロマトグラフィー（HPLC）で分離・定量し、原料こんにゃく粉中のマンノース含有量と比較することにより、定量可能とされる¹⁾。

ただし、こんにゃく粉調製品には、こんにゃく粉と紅藻類の海藻に由来する多糖類であるカラギーナンや寒天（これらは、それぞれ、 D -ガラクトース及び $3,6$ -アンヒドロ- D -ガラクトースを、 D -ガラクトース及び $3,6$ -アンヒドロ- L -ガラクトースを構成糖として含有し、いずれも水酸基に硫酸がエステル結合をした構造を持つ粘性多糖類であることから、ゲル化剤、増粘安定剤等の用途で広く使用されている²⁾。）を混合したものもあり、これらの混合物中のこんにゃく粉含有量をHPLC法で定量するには、マンノースとガラクトースのピークを完全に分離するために特殊な条件を必要とする上に、しばしば硫酸化されたガラクトース等が妨害ピークとなり、マンノースの定量を阻害する。

他方、ガスクロマトグラフィーにより単糖を定量する方法として、トリメチルシリル（TMS）化法³⁾⁴⁾、アルジトール-アセテート法⁵⁾、アルドニトリル-アセチル化法⁶⁾⁷⁾が一般的である。TMS

* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

** 現在所屬 名古屋税関業務部 〒455-8535 愛知県名古屋市港区入船 2-3-12

***現在所屬 神戸税関業務部 〒650-0041 兵庫県神戸市中央区新港町 12-1

化法は、1種類の単糖から2種以上のアノマーが生成するために、糖混合物では相互分離が複雑になり、特にピークが重なり合う場合、定量分析には不適当になる場合が多い。アルジトール - アセテート法は、単糖を還元してアルジトールとし、更にアセチル誘導体とする方法であり、アノマーによる複数のピークの問題を解決した定量に優れた方法であるが、誘導体化操作に長時間を要するという問題点がある。アルドニトリル - アセチル化法は、単糖のアルデヒド基をニトリル基に変換することでアノマーによる複数のピークを抑え、かつアセチル化する方法であるため、1種類の単糖から1つのピークが得られることに加え、誘導体化操作が短時間で終了する方法である⁷⁾。

Guerrant ら⁹⁾は、グルコース、マンノース及びガラクトースをアルドニトリル - アセチル化し、GC カラムとして OV-1 カラム (100% dimethylpolysiloxane) を用いて分離できることを報告しているが、これら少糖類の定量分析については検討していない。

本研究では、こんにゃく粉とでん粉、カラギーナン又は寒天からなる混合物及び各原料を酸加水分解後、各々をアルドニトリル - アセチル化し、汎用キャピラリーGC カラム (Agilent HP-5; (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane) を用いて、内標準法で構成糖であるグルコース、マンノース及びガラクトースの同時定量を行い、これらの定量値から上記の混合物中のこんにゃく粉、カラギーナン及び寒天の組成割合を求め、その確度・精度を確認したので報告する。

2. 実 験

2.1 分析試料及び試薬

2.1.1 試 料

こんにゃく粉 (萩野商店)、タピオカでん粉 (日殿化学)、精製カラギーナン (輸入品) 及び寒天粉 (富澤商店) を多糖類試料として用いた。

2.1.2 試 薬

グルコース、マンノース、ガラクトース及びソルビトールは、和光純薬製を用いた。

2.2 分析方法

2.2.1 装置及び条件

GC 測定は、Agilent Technologies 製 7890 を用い、分析用カラム: HP-5 (長さ 30 m × 内径 0.32 mm × 膜厚 0.25 µm)、検出器: 水素炎イオン化検出器 (FID)、キャリアガス: ヘリウムを用いた。測定は、注入量: 1 µl、スプリット比: 1/50、注入口温度: 250、検出器温度: 250、昇温条件: 100 (3分間保持) - 10 /分 - 310 (6分間保持) で行った。

2.2.2 分析試料の酸加水分解と中和¹⁾

試料 250 mg を 200 ml 三角フラスコに正確に量り採り、1 mol/L 硫酸を 20 ml 加えて静かに攪拌し 5 分間静置した。その後、更に 1 mol/L 硫酸を 30 ml 加え、空気冷却管を取り付け、沸騰浴中で 1 時間ごとに緩やかに攪拌ながら 5 時間加熱し、完全に加水分解した。

加水分解後、流水でフラスコを冷却し、2.5%ソルビトール水溶

液 (内標準液) 5 ml を加えた。この溶液約 10 ml をビーカーに分取し、炭酸バリウムで中和した。

2.3 GC を用いた多糖類の定量

2.3.1 標準糖液の調製

単糖 (グルコース、マンノース及びガラクトース (以上和光純薬)) 1g を正確に量り取り、蒸留水で 100 ml に定容し、これを標準原液とした。この標準原液をそれぞれ 2 ml、5 ml、10 ml、15 ml、20 ml 採取し、それぞれに 2.5%ソルビトール水溶液 (内標準液) 5 ml を加えた後、蒸留水で全量を約 80 ml にした。

これら 5 種類の糖液から、それぞれ 0.6 ml を小試験管に採取し、50 で減圧乾固させた。これらの乾燥物に塩化ヒドロキシルアンモニウムのピリジン溶液 (30 mg/ml) 0.6 ml を添加し、90 で 40 分間加温した。その後、無水酢酸 0.9 ml を添加し、更に 90 で 60 分間加温後、冷却したものを標準糖液とした。

2.3.2 酸加水分解物の誘導体化

上記 2.2.2 の中和済みの懸濁液を遠心分離 (6,000 rpm、10 分間) 後、その上澄みを孔径 0.45 µm のメンブランフィルターに通液し、そのうちの 0.6 ml を小試験管に採取し、50 で減圧乾固した。この乾燥物に塩化ヒドロキシルアンモニウムのピリジン溶液 (30 mg/ml) 0.6 ml を添加し、90 で 40 分間加温した。その後、無水酢酸 0.9 ml を添加し、更に 90 で 60 分間加温後、冷却したものを試料溶液とした。

2.3.3 分析試料中の構成糖の定量

上記 2.3.1 の標準糖液を GC に導入し、各成分と内標準物質についての重量比とピーク面積比の関係から検量線を作成した。試料溶液についても同様に GC に導入し、各成分と内標準物質についてのピーク面積値を基に、作成した検量線から各構成糖の重量割合を算出した。

2.3.4 混合試料中の各成分割合の算出

試料中の各多糖類含有割合は、次式により算出した。

こんにゃく粉含有割合 = $(S_m/K_o) \times 100$

S_m : 試料中のマンノース重量割合 (%)

K_o : 原料こんにゃく粉のマンノース重量割合 (%)

カラギーナン含有割合 = $(S_g/K_a) \times 100$

S_g : 試料中のガラクトース重量割合 (%)

K_a : 原料カラギーナンのガラクトース重量割合 (%)

寒天粉含有割合 = $(S_g/A_g) \times 100$

S_g : 試料中のガラクトース重量割合 (%)

A_g : 原料寒天粉のガラクトース重量割合 (%)

3. 結果及び考察

3.1 単糖及びソルビトールの誘導体化物についてのガスクロマトグラム

本研究は、こんにゃく粉とでん粉、カラギーナン又は寒天からなる調製品の各成分についての定量を目的としていることから、まず、これら原料の構成糖であるグルコース、マンノース及びガラクトースの標準品について、2.3.1 の手順に従い誘導体化を行っ

た。各少糖類の誘導体化物のガスクロマトグラムを Fig. 1 に示す。グルコース、マンノース及びガラクトースのピークは、今回使用した汎用の微極性カラム (Agilent HP-5) で、互いに良好に分離することが分かった。

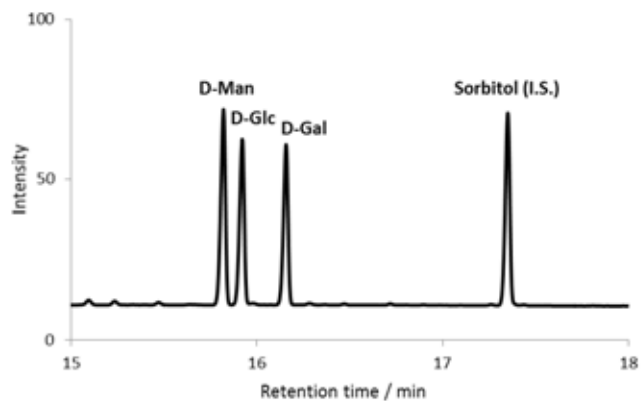


Fig. 1 Gas chromatogram of aldonoitrile acetate derivatives of mannose, glucose, galactose and sorbitol

更に、各誘導体化物についての併行精度を、5 回測定した際の各面積値の変動係数及び内標準物質であるソルビトールと各少糖類の誘導体化物との面積比の変動係数を測定することで評価した。その結果を Table 1 に示す。いずれも変動係数は 0.75 未満となり、良好な再現性を示したことから、グルコース、マンノース及びガラクトースに加え、内標準物質であるソルビトールについても、本条件により完全に誘導体化されたと考えられる。

Table 1 Coefficients of variation regarding the GC peak areas of sugars and a sugar alcohol and the GC peak area ratios of sugars against sorbitol

	C.V.(%) of Peak area (n=5)	C.V.(%) of Peak area ratio (n=5)
Glucose	0.505	0.280
Mannose	0.746	0.145
Galactose	0.713	0.172
Sorbitol (I.S.)	0.607	-

Sorbitol was used as an internal standard (I.S.) for quantitative GC analysis of the above sugars in this research.

3.2 検量線

2.3.1 の手順に従い調製した標準糖液を用い、各少糖類と内標準物質との重量比と GC のピーク面積比から作成した検量線は、グルコースについては、0.01% ~ 0.1% の濃度範囲において、相関式： $y=0.73458x - 0.00231$ (相関係数 $R^2=0.99983$) マンノースについては、0.01% ~ 0.1% の濃度範囲において、相関式： $y=0.81977x + 0.00354$ (相関係数 $R^2=0.99999$) ガラクトースについては、0.01% ~ 0.1% の濃度範囲において、相関式： $y=0.75205x + 0.00465$ (相関係数 $R^2=0.99998$) となり、いずれも原点付近を通る良好な直線性を示した。また、本法による定量下限を FUMI 理論⁸⁾に基づき算出したところ、グルコースで 0.0132 mg/ml、マンノースで 0.0130 mg/ml、ガラクトースで 0.0149 mg/ml であった。

3.3 多糖類の酸加水分解物を誘導体化したもののガスクロマトグラム

こんにやく粉、でん粉、カラギーナン及び寒天を酸加水分解後、それらを誘導体化したもののガスクロマトグラムを Fig. 2 に示す。

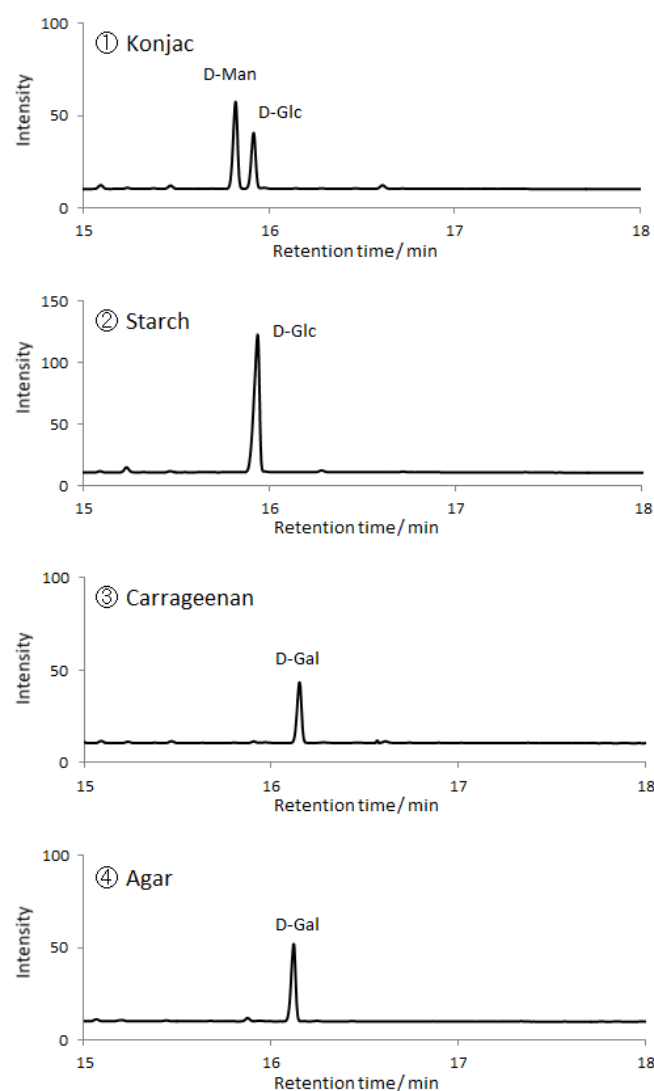


Fig. 2 Gas chromatograms regarding aldonoitrile acetate derivatized acid hydrolysates of (1) Konjac, (2) Starch, (3) Carrageenan, and (4) Agar

こんにやく粉からグルコース及びマンノースが、でん粉からグルコースが、カラギーナン及び寒天からは、ガラクトースが主な構成糖として分離検出され、いずれのガスクロマトグラムにおいても内標準物質であるソルビトールの保持時間 (17.3 分) 付近にピークは検出されなかった。また、硫酸化されたガラクトースを構成糖として含有するカラギーナン及び寒天のガスクロマトグラムに、グルコース、マンノース及びガラクトースの定量を妨害するピークは検出されなかった。

3.4 こんにゃく粉とタピオカでん粉の混合物中のこんにゃく粉の定量及びこんにゃく粉と酸性多糖類の混合物中の各成分の定量

こんにゃく粉とでん粉からなる調製品中のこんにゃく粉の含有割合は、中村ら¹⁾によって、酸加水分解後に、その構成糖であるマンノースを配位子交換型カラム(HPLC法)で分離・定量し、その定量値を同様にして測定した原料こんにゃく粉のマンノース含有量と比較することにより、推定可能であったと報告されている。しかしながら、この方法では、こんにゃく粉と酸性多糖類(例えば、カラギーナンや寒天)からなる調製品については、それらの酸加水分解の際に生じる未同定物質の妨害ピークの影響で、原料由来のグルコース、マンノース及びガラクトースを分離・定量できなかった(data not shown)。

そこで、こんにゃく粉とタピオカでん粉、カラギーナン、又は寒天を任意の割合で混合した模擬試料を作成し、本法の分析条件で、これらのこんにゃく粉調製品についての各成分の定量分析が可能であるかを調査した。なお、カラギーナン及び寒天の定量は、それらの構成糖であるガラクトースを定量することにより算出した。その結果をTable 2～4に示す。各成分の定量結果は、いずれも実際の混合率に近似(5回測定の平均値における誤差1%以下)し、かつ変動係数の小さい良好な結果となった。このことから、本法は、従来のこんにゃく粉とでん粉からなる調製品に加え、こんにゃく粉と酸性多糖類からなる調製品にも対応可能と考えられる。

Table 2 Result of compositional analysis for mixtures of konjac powder and tapioca starch by the GC method with aldononitrile acetate derivatization

Actual konjac powder content (%)	Konjac powder content	
	Measured value (%)	C.V.(%), n=5
25.0	24.5	1.14
50.0	49.8	0.90
75.0	75.1	0.50

The konjac powder contents in the mixtures were calculated by comparing the mannose contents in their hydrolysates with that in the original konjac powder.

Table 3 Results of compositional analysis for mixtures of konjac powder and carrageenan by the GC method with aldononitrile acetate derivatization

Actual composition of mixtures (Konjac powder : Carrageenan)	Konjac powder content ^{a)}		Carrageenan content ^{b)}	
	Measured value (%)	C.V.(%), n=5	Measured value (%)	C.V.(%), n=5
25: 75	25.5	2.58	74.0	0.21
50: 50	50.4	0.79	49.6	2.83
75: 25	74.7	0.85	24.3	2.53

a) The konjac powder contents in the mixtures were calculated by comparing the mannose contents in their hydrolysates with that in the original konjac powder.

b) The carrageenan contents in the mixtures were calculated by comparing the galactose contents in their hydrolysates with that in the original carrageenan.

Table 4 Result of compositional analysis for mixtures of konjac powder and agar powder by the GC method with aldononitrile acetate derivatization

Actual composition of mixtures (Konjac powder : Agar powder)	Konjac powder content ^{a)}		Agar powder content ^{b)}	
	Measured value (%)	C.V.(%), n=5	Measured value (%)	C.V.(%), n=5
25: 75	25.6	1.85	74.2	0.57
50: 50	50.2	1.31	49.0	0.88
75: 25	74.6	1.74	25.1	4.44

a) The konjac powder contents in the mixtures were calculated by comparing the mannose contents in their hydrolysates with that in the original konjac powder.

b) The agar powder contents in the mixtures were calculated by comparing the galactose contents in their hydrolysates with that in the original agar powder.

4. 要 約

こんにゃく粉、カラギーナン及び寒天粉末を酸加水分解後、ソルビトールを内標準物質として加え、アルドニトリル・ベンタアセチル誘導体化を行い、GCで構成糖を分離・定量を試みた。本ケースで主体となるグルコース、マンノース及びガラクトースの同時定量について検討を行った結果、各少糖類の検量線の決定係数は、それぞれ $r^2=0.9993$ 、 0.9999 及び 0.9998 で、精度よく定量できることが分かった。更に、こんにゃく粉とタピオカでん粉、こんにゃく粉とカラギーナン、こんにゃく粉と寒天粉末を任意の割合で混合した模擬試料を調製し、マンノース及びガラクトース含有量から、こんにゃく粉及び酸性多糖類(カラギーナン及び寒天)の含有割合を算出した結果、原料が提示された場合、これら混合物の組成割合を比較的良好な確度及び精度で推定可能であることが分かった。

文 献

- 1) 中村文雄, 笹谷隆: 関税中央分析所報, **40**, 23 (2000)
- 2) “総合多糖類科学 下”, P.296 (1973), (講談社)。
- 3) C.C.Sweeley, R.Bentley, M.Makita, W.W.Wells: *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2497 (1963)
- 4) J.S.Sawardeker, J.H.Sloneker: *Anal. Chem.*, **37**, 945 (1965)
- 5) J.S.Sawardeker, J.H.Sloneker: *Anal. Chem.*, **37**, 1603 (1965)
- 6) G.O.Guerrant, C.W.Moss: *Anal. Chem.*, **56**, 633 (1984)
- 7) SHIMADZU GCMS Technical Report, C146-0261
- 8) “LC/GC Powered Professional Version 2.00”, (Nishikawa Keisoku)