

# キャピラリー電気泳動による豆腐中の グルコノデルタラクトンの定量

肥前昌一郎・中尾朱美・藤本喬

福岡市保健環境研究所保健科学部門

## Determination of Glucono- $\delta$ -Lactone in Tofu by Capillary Electrophoresis

Shoichiro HIZEN, Akemi NAKAO and Takashi FUJIMOTO

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

### 要約

キャピラリー電気泳動装置を用いて、豆腐用凝固剤の一つであるグルコノデルタラクトンの定量法を検討した。アルカリ条件下でグルコン酸に変換し、間接吸光法で測定した。グルコノデルタラクトン 10 ~ 1000  $\mu$ g/mL におけるピーク面積との相関係数は 0.9994 で良好な直線関係が得られた。標準液の定量下限は 10  $\mu$ g/mL で、検体中における定量下限は 0.1g/kg であった。豆腐にグルコノデルタラクトン 10,000  $\mu$ g を添加したときの回収率は 94 % であった。

また、本法を用いて福岡市内に流通する豆腐 32 検体について検査を行ったところ、9 検体から 0.1 ~ 4.1g/kg の範囲でグルコノデルタラクトンを検出した。

**Key Words :** グルコノデルタラクトン Glucono- $\delta$ -Lactone, 豆腐 Tofu, キャピラリー電気泳動 Capillary Electrophoresis, 凝固剤 Coagulant

### はじめに

豆腐用凝固剤として用いられるグルコノデルタラクトンはにがりと比べ取り扱いが簡単で、きめの細かい保水性に富んだ豆腐を作ることができる。また、使用基準の定められていない安全性の高い食品添加物であるが、過剰に使用すると豆腐に酸味を生じる原因となる<sup>1)</sup>。

食品中のグルコノデルタラクトンは、アルカリで加水分解後グルコン酸キナーゼ及び 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素を用いる酵素法により定量する<sup>2)</sup>。しかし、酵素法は煩雑であり、現在市販の酵素法キットも製造中止となっている。

そこで、キャピラリー電気泳動法による豆腐中のグルコノデルタラクトンの定量法を検討し、同時に市販の豆腐についてグルコノデルタラクトンの使用状況を調査した。

### 実験方法

#### 1. 試料

福岡市内に流通する豆腐を用いた。

#### 2. 試薬等

- ・グルコン酸溶液：和光純薬工業(株)製 50%溶液を用いた。
- ・グルコン酸標準液：グルコン酸溶液を適宜蒸留水で希釈して標準液とした。
- ・グルコノデルタラクトン：和光純薬工業(株)製特級試薬を用いた。
- ・グルコノデルタラクトン標準液：グルコノデルタラクトンに蒸留水を加えて 10,000  $\mu$ g/mL 標準液を調製した。うち 5mL を量り取り 2mol/L KOH で pH10 にした後、蒸留水で 50mL とし 1,000  $\mu$ g/mL 標準液を調製した。この溶液を適宜蒸留水で希釈し標準液とした。

- ・超純水：アドバンテック東洋(株)製 PWU-400 で、導電率 18.2M · cm に調整したものをを用いた。
- ・ディスポーザブルディスク:アドバンテック東洋(株) 製0.20 μ mPTFE DISMICフィルターを用いた。
- ・泳動液：2,6-ピリジンジカルボン酸 334mg と臭化セチルトリメチルアンモニウム 18.2mg を超純水 80mL に溶解し、2mol/LKOH で pH12.1 に調整し 100mL とした後、ディスポーザブルディスクでろ過した。
- ・ろ紙：アドバンテック東洋(株)製 No.5C をを用いた。
- ・その他試薬は市販の特級品を用いた。

### 3. 装置

キャピラリー電気泳動装置:Hewlett Packard 社製, HP-3DCE システム G1600 (フォトダイオードアレイ検出器付)

### 4. 測定条件

- ・カラム：Agilent Technologies 社製フューズドシリカキャピラリー (50 μ m I.D. × 有効長 72 cm, 全長 80.5cm )
- ・泳動液：20mmol/L2,6-ピリジンジカルボン酸, 0.5mmol/L 臭化セチルトリメチルアンモニウム (pH 12.1)
- ・電圧：25 kV(negative)
- ・キャピラリー温度：20
- ・注入方法：300mbar · sec
- ・分離モード：キャピラリーゾーン電気泳動
- ・検出波長：Sig.350/20 nm Ref.275/10 nm
- ・コンディショニング：測定毎に泳動液で 5 分間洗浄し、分析終了毎に超純水で 5 分間洗浄した。

### 5. 試験溶液の調製

試料 10g にあらかじめ氷冷した 0.4mol/L 過塩素酸 20 mL を加えてホモジナイズし、3,000 rpm で 10 分間遠心分離後、得られた上清をろ紙でろ過した。同様の抽出操作を繰り返し行ったあと、ろ紙を蒸留水で洗浄し、ろ液とあわせて全量を 80mL とした。この溶液を 2mol/L KOH を用いて pH10 とし、20 分間冷蔵後さらにろ紙でろ過し蒸留水で全量を 100mL としたものを試験溶液とした。

## 実験結果及び考察

### 1. キャピラリー電気泳動の条件

本法はグルコノデルタラク톤をアルカリ条件下で加水分解することによりグルコン酸を生成させて、キャピ

ラリー電気泳動で測定する方法である。グルコン酸は UV 吸収が弱いため、泳動液には強い UV 吸収をもつ 2,6-ピリジンジカルボン酸を用いた。泳動液の界面活性剤に n-ヘキサデシルトリメチルアンモニウムヒドロキシドを用いる有機酸分析の条件<sup>3)</sup>を用いて実験を行ったが、リテンションタイムが遅くピーク形状に問題があった。臭化セチルトリメチルアンモニウムを用いた結果、リテンションタイムが適切となりピーク形状も良好になった。

グルコン酸標準液とアルカリ処理したグルコノデルタラク톤標準液をキャピラリー電気泳動で測定したところ、リテンションタイム及びピーク形状についてはほとんど違いがみられなかったが、ピーク面積については両者で若干の差が認められた。このため、以下の実験においてはグルコノデルタラク톤を標準液として用いることとした。

### 2. 検量線の直線性と定量下限

グルコノデルタラク톤標準液の検量線を図 1 に示す。10 ~ 1000 μ g/mL の範囲で、相関係数 0.9994 と良好な直線関係が得られた。

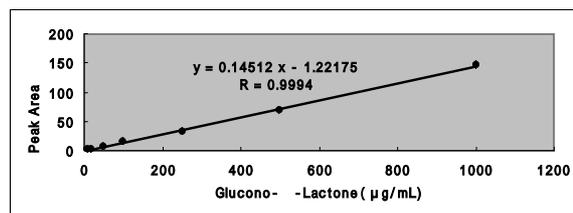


図 1. グルコノデルタラク톤の検量線

また、10 μ g/mL 標準液で繰り返し試験を行った結果、相対標準偏差 3.2% と良好であったため、標準液の定量下限は 10 μ g/mL とした。なお、試料での定量下限は 0.1g/kg に相当する

### 3. 添加回収実験

豆腐 10g にグルコノデルタラク톤 5,000 μ g および 10,000 μ g を添加し、本法に従い回収実験を行った。その結果を表 1 に示す。5,000 μ g 添加で回収率 90 %、相対標準偏差 1.4 %、10,000 μ g 添加で回収率 94 %、相対標準偏差 2.5 % と良好な結果が得られた。

表 1. 豆腐にグルコノデルタラク톤を添加したときの回収率と相対標準偏差 (n=5)

添加量 (μ g/10g)	回収率 (%)	相対標準偏差 (%)
5,000 μ g	90	1.4
10,000 μ g	94	2.5

#### 4. 豆腐中のグルコノデルタラク톤の検査結果

福岡市内に流通する豆腐 32 検体について本法に従い検査を行った。その結果を表 2 に示す。

32 検体中 9 検体からグルコノデルタラク톤を検出した。検出濃度は 0.1g/kg から高いもので 4.1g/kg であった。

表 2. 豆腐中のグルコノデルタラク톤の検査結果

試料 No.	グルコノデルタラク톤 (g/kg)	表示
1	4.1	凝固剤
2	1.3	凝固剤
3	0.5	凝固剤
4	0.4	凝固剤
5	0.4	凝固剤
6	(-)	凝固剤
7	(-)	凝固剤
8	(-)	凝固剤
9	(-)	凝固剤
10	(-)	凝固剤
11	(-)	凝固剤
12	(-)	凝固剤
13	(-)	凝固剤
14	0.7	凝固剤(塩化マグネシウムなど)
15	0.3	凝固剤(塩化マグネシウムなど)
16	(-)	凝固剤(塩化マグネシウム)
17	(-)	にがり(凝固剤)
18	(-)	凝固剤(天然にがり)
19	(-)	にがり
20	(-)	塩化マグネシウム(にがり)
21	(-)	塩化マグネシウム(にがり)
22	(-)	塩化マグネシウム, 硫酸カルシウム
23	0.3	-
24	0.1	-
25	(-)	-
26	(-)	-
27	(-)	-
28	(-)	-
29	(-)	-
30	(-)	-
31	(-)	-
32	(-)	-

- : 包装形態でないもの

また、図 2 に標準液とグルコノデルタラク톤を含まない豆腐から得られたエレクトロフェログラムを示す。定量に支障を与えるような試料由来の夾雑ピークはほとんど見られなかった。

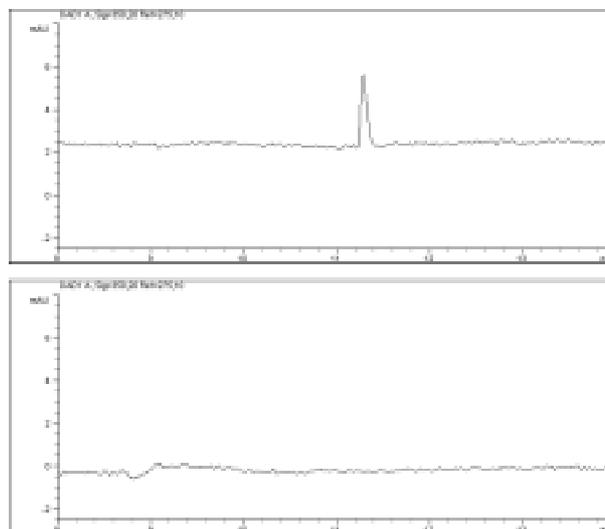


図 2. 標準液(上)とグルコノデルタラク톤を含まない豆腐(下)のエレクトロフェログラム

#### まとめ

グルコノデルタラク톤をアルカリで加水分解しグルコン酸としてキャピラリー電気泳動で測定した。UV 吸収のある泳動液を用いて間接吸光法で測定した。また、市内に流通する豆腐について検査を行ったところ、32 検体中 9 検体からグルコノデルタラク톤を検出した。

グルコン酸化合物はオリブの色調安定剤や母乳代替食品の栄養強化剤としても使用されており、本法はそれらの分析にも適用できるものと思われる。

#### 文 献

- 1) 第 7 版食品添加物公定書解説書, 416 ~ 418, 1999
- 2) 食品衛生検査指針食品添加物編, 303 ~ 308, 2003
- 3) 中嶋昌徳他: キャピラリー電気泳動による食品中の有機酸分析の検討について, 福岡市保健環境研究所報, 24, 48 ~ 52, 1999