

豆腐中のグルコノデルタラクトンの分析

萩野 賀世*, 粕谷 陽子*, 松本 ひろ子*, 坂牧 成恵*, 永山 敏廣*

Determination of Glucono- δ -lactone in Tofu by HPLC

Kayo HAGINO*, Yoko KASUYA*, Hiroko MATSUMOTO*, Narue SAKAMAKI* and Toshihiro NAGAYAMA*

Keywords : 豆腐 tofu, グルコノデルタラクトン glucono- δ -lactone, グルコン酸 gluconic acid, 凝固剤 coagulant
食品添加物 food additives, 高速液体クロマトグラフィー HPLC

緒言

豆腐用凝固剤として、古くから粗製海水塩化マグネシウム及び塩化マグネシウムが、いわゆる「にがり」として使われてきた。近年では、硫酸カルシウムや塩化カルシウムも使われているが、グルコノデルタラクトン（以下GDLと略す）が製造工程での使いやすさや、なめらかできめの細かい製品ができることから、充填豆腐や絹ごし豆腐の製造に多用されている。

一方、自然食品指向やマグネシウム (Mg), カルシウム (Ca) の供給源として、消費者は従来の凝固剤を使った豆腐を求める傾向があり、添加物表示が選択の基準となっている。しかし、豆腐凝固剤の表示、特にGDLについては、使用しながら表示がないものがあるとの情報が寄せられたことから、都内流通品におけるGDLの使用実態調査を行うこととした。

食品中のGDLの分析法としては、GDLをアルカリ性下でグルコン酸に変換した後、酵素法¹⁾ や、ガスクロマトグラフ (GC)²⁾、キャピラリー電気泳動³⁾、高速液体クロマトグラフ (HPLC)⁴⁾ など測定する方法が報告されている。しかし、酵素法、GCによる方法は、操作が煩雑であり、キャピラリー電気泳動で測定する方法は特殊な操作を要し一般的ではない。そこで、今回調査を行うにあたり、操作が簡便なことからHPLCによる方法を採用し、前処理法やHPLC条件について若干改良を行った。

また、凝固剤として、Mg塩及びCa塩が広く使用され、GDLがこれらと併用されていることから、Mg及びCaの含有量調査も行ったので併せて報告する。

実験方法

1. 試料

2004年7月から9月の間に東京都内で市販されていた絹ごし豆腐18検体、充填豆腐8検体、充填絹ごし豆腐4検体、木綿豆腐3検体、総計33検体を用いた。

2. 試薬

1) GDL標準溶液 GDL (純度98%以上、関東化学 (株) 製) 1 gを精秤し、水に溶解して100 mLとし、さらに、この5 mLを分取し、2 mol/L 水酸化カリウム溶液でpH10に調整した後、水で50 mLとしたものを標準原液 (1,000 μ g/mL) とした。これを適宜、水で希釈して標準溶液を調製した。

2) Mg及びCa標準溶液 原子吸光分析用、和光純薬工業 (株) 製、Mg, Ca各標準液 (各100 mg/L) を適宜、硝酸で希釈して標準溶液を調製した。

3) 前処理用カートリッジ Sep-Pak Vac C18 (1 g, Waters 社製) をメタノール 5 mL, 水10 mLで順次洗浄して用いた。

3. 分析装置

1) HPLC装置 Agilent Technologies社製1100シリーズ及び日本分光 (株) 製LC-2000Plusシリーズ

2) 原子吸光光度計 セイコーインスツル (株) 製SAS760

4. 分析法

1) GDL

(1) 試験溶液の調製 試料を均一化し、その5.0 gを秤量し、水約40 mLを加え10分間振とうした後、2 mol/L水酸化カリウム溶液を用いてpH10とした。これを3,000 rpm, 10分間遠心分離し、水で50 mLにメスアップした後、上清をろ紙でろ過した。ろ液10 mLを前処理用カートリッジに負荷し、最初の溶出液4 mLは捨て、その後の溶出液6 mLを分取し試験溶液とした。

(2) HPLC条件 カラム : RSpak KC-811 (6 μ m, 8.0 mm i.d. \times 300 mm, Shodex製), 移動相 : 10 mmol/Lリン酸, 流速 : 0.5 mL/min, 検出波長 : 220 nm, カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C, 注入量 : 20 μ L

(3) 定性、定量及び確認 試験溶液をHPLCに付し、得られたピークの保持時間から定性を行った。また、別途作成した検量線から試料中のGDLの濃度を求めた。標準品と保持時間が一致するピークが検出された場合には、フォトダイオードアレイ検出器 (PDA) を用いてスペクトルを測定し、標準品と比較して確認を行った。

* 東京都健康安全研究センター多摩支所理化学研究科 190-0023 東京都立川市柴崎町3-16-25

* Tama Branch Institute, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-16-25, Shibasaki-cho, Tachikawa, Tokyo 190-0023 Japan

2) Mg及びCa

衛生試験法⁵⁾に準拠して分析した。すなわち、乾式分解により灰化した後、塩酸に溶解しフレイム原子吸光光度法により測定した。

結果及び考察

1. GDL分析法の検討

1) 試料溶液の調製 GDLの試料からの抽出には、水のみで抽出する方法⁶⁾と除タンパク剤として過塩素酸等を添加する方法¹⁾が報告されている。そこで、除タンパク剤添加の有無が回収率に及ぼす影響について比較検討した。豆腐では、過塩素酸よりも水のみの方が回収率が良好であったことから、抽出は水のみで行うこととした。抽出液を水酸化カリウム溶液でアルカリ性とし、GDLをグルコン酸に加水分解したものを試料溶液とした。

2) クリーンアップ 試料溶液をそのままHPLCに付すと、グルコン酸のピークに他成分のピークが重なって定量できない場合があった。そこで、クリーンアップ法について検討したところ、試料溶液をSep-Pak Vac C18カートリッジを通過させるだけで妨害となる夾雑成分を除去できることがわかった。その溶出分画の分取については、Sep-Pak Vac C18カートリッジの保持容量が2 mLあることから、カートリッジを通過させた試料溶液の最初の4 mLは捨て、後の6 mLを分取し、HPLC試験溶液とすることにした。クリーンアップ前後のクロマトグラムとPDAスペクトルを図1に示した。

3) HPLC条件 HPLCでの分離条件は、国民生活センターの報告⁷⁾を参考にし、カラムには、イオン排除、サイズ排除、分配・吸着の混合分離モードのRSPak KC-811を用いた。一般的に、RSPak KC-811で有機酸を分離する場合には、移動相として、過塩素酸あるいはリン酸を用いることが多い⁸⁾ため、1 mmol/L過塩素酸と10 mmol/Lリン酸の本法への適合性を比較検討した。いずれの移動相を用いてもグルコン酸は妨害なく測定でき、ピーク形状やクロマトパターンにも差が認められなかったため、移動相には、扱いやすい10 mmol/Lリン酸を用い、流速は0.5 mL/minで行うこととした。

4) 検量線及び検出限界 検量線はGDL標準溶液1~1,000 µg/mLの濃度範囲で直線性を示した。試料での定量限界は0.01 g/kgであった。

5) 添加回収実験 GDL無添加の絹ごし豆腐にGDLを0.5, 2.0 g/kgとなるように添加し、本法に従って、添加回収実験を行った。回収率 (n=3) はいずれも90%以上と良好な結果が得られた。

2. 市販豆腐製品中のGDL, Mg及びCaの実態調査結果

1) GDL含有量 都内で市販されていた豆腐製品について、GDL使用実態調査を行い、その分析結果を表1に示した。33検体中11検体から0.36~2.3 g/kg, 平均値1.0 g/kgのグルコン酸(GDLとして)が検出された。豆腐製品から検出されたグルコン酸は、GDL無添加の豆腐製品の大部分からはグル

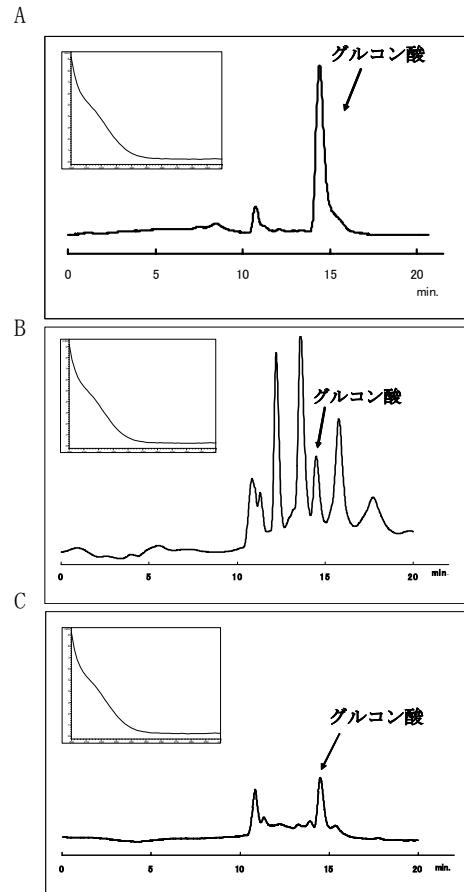


図1. グルコン酸標準溶液, 試料溶液のHPLCクロマトグラム及びPDAスペクトル

A: グルコン酸標準溶液 (100 µg/mL)

B: 試料溶液のC18カートリッジクリーンアップ前

C: 試料溶液のC18カートリッジクリーンアップ後

コン酸が検出されなかったこと、また、表示からもグルコン酸及びグルコン酸塩を添加した形跡は認められないことから、全て添加されたGDLに由来すると判定した。GDLは調査した試料の1/3から検出され、GDLが多用されている実態が明らかになった。この中の1検体は添加表示が無く、また、添加表示があっても検出されないものが1検体あった。

2) Mg及びCaの含有量 市販豆腐製品33検体中のMg及びCaの含有量を表1に示した。

Mgは全ての検体から検出された。その検出量は25~91 mg/100 g, 平均値60 mg/100 gであり、GDLと併用表示のあるものでは、平均値46 mg/100 g, GDLと併用表示のないものでは、平均値67 mg/100 gであった。

また、Caも全ての検体から検出された。その検出量は、3~200 mg/100 g, 平均値39 mg/100 gであり、Ca塩の添加表示があった3検体では、いずれもGDLとの併用表示があり、平均値143 mg/100 gと検出量は高かった。

3. 市販豆腐製品の凝固剤表示

市販されている豆腐製品の凝固剤の組み合わせを表示にしたがって分類し図2に示した。豆腐製品33検体中、30検体 (90%) に塩化マグネシウムの添加表示があり、その

表 1. 市販豆腐製品中のGDL含有量調査

豆腐の種類	No.	GDL		Mg		Ca	
		表示	検出値 (g/kg)	表示	検出値 (mg/100g)	表示	検出値 (mg/100g)
絹ごし豆腐	1	+	2.3	-	29	+	200
	2	+	0.66	+	40	-	15
	3	+	0.59	+	51	+	68
	4	+	0.40	+	59	-	22
	5	+	ND	+	75	-	37
	6	-	0.50	+	25	-	41
	7	-	ND	+	91	-	21
	8	-	ND	+	78	-	16
	9	-	ND	+	77	-	3
	10	-	ND	+	76	-	41
	11	-	ND	+	74	-	26
	12	-	ND	+	73	-	22
	13	-	ND	+	73	-	19
	14	-	ND	+	68	-	28
	15	-	ND	+	66	-	23
	16	-	ND	+	66	-	23
	17	-	ND	+	63	-	15
	18	-	ND	+	34	-	79
充填豆腐	19	+	1.6	+	42	-	21
	20	+	1.5	-	30	-	30
	21	+	1.3	+	39	-	21
	22	+	0.63	+	40	-	36
	23	-	ND	+	86	-	19
	24	-	ND	+	57	-	20
	25	-	ND	+	54	-	16
	26	-	ND	+	51	-	29
充填絹ごし豆腐	27	+	1.1	-	41	-	26
	28	-	ND	+	76	-	33
	29	-	ND	+	68	-	19
	30	-	ND	+	66	-	23
木綿豆腐	31	+	0.36	+	55	+	160
	32	-	ND	+	68	-	92
	33	-	ND	+	78	-	25

+: 表示あり, -: 表示無し ND: <0.01g/kg

うち、22検体（66%）は塩化マグネシウムのみでの表示であり、多くの製品では伝統的な「にがり」が単独で用いられていることがわかった。また、33検体中11検体（33%）にGDLの添加表示があった。GDL単独使用表示は2検体だけであり、9検体はMg塩、またはCa塩、または両方との併用であった。これらの結果から、GDLは凝固剤の主体として使用されているわけではなく、GDLの特徴であるなめらかさや、きめの細かさを出すことを目的に他の凝固剤と混合して使用されていると考えられる。

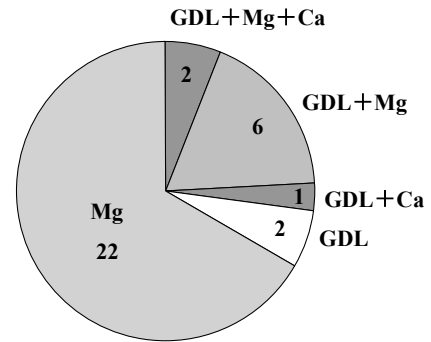


図 2. 市販豆腐製品 33 検体の凝固剤表示

ま と め

豆腐製品中のGDLの使用実態調査を行うにあたり、HPLCによる分析法を検討した。水で抽出したGDLをアルカリ性下でグルコン酸に変換し、Sep-Pak Vac C18カートリッジでクリーンアップし、有機酸分析用カラムRSpak KC-811により定量分析を行った。このクリーンアップ操作により、夾雑ピークを除去でき、良好なHPLCクロマトグラムが得られた。

都内で市販されている各種豆腐製品についてGDL使用実態調査を行ったところ、33検体中11検体から0.36~2.3 g/kg、平均値0.99 g/kgのGDLが検出された。GDLはMg塩やCa塩と併用されていることが多いことがわかった。今回の調査によって、GDLの使用表示のない豆腐からGDLが検出されたことから、各種豆腐中のGDLの使用実態調査を引き続き実施する必要があると考える。

文 献

- 1) 社団法人日本食品衛生協会編：食品衛生検査指針食品添加物編，303-308，2003
- 2) 石田裕，関根展子，橋田修志：食品衛生学雑誌，**25**，198-202，1983
- 3) 肥前昌一郎，中尾朱美，藤本喬：福岡市保健環境研究所報，**29**，136-138，2004
- 4) 小林一良，桜井弘子：農林規格検査所調査研究報告，**12**，36-44，1988
- 5) 日本薬学会編：衛生試験法・注解 2005，169-173，2005
- 6) TSUDA, T, and NAKANISHI H.: JAOAC, **66**, 1532-1534, 1983
- 7) 独立行政法人国民生活センター商品テスト部 No.520 豆腐の品質と衛生，2004
- 8) 昭和電工（株）編：アプリケーションデータ No.10 有機酸分析，1998