報 文

食品中のアルギン酸ナトリウムの定量分析法

(平成10年3月2日受理)

川崎 洋子* 加藤 千晶*
石綿 肇* 山田 隆*

Determination Method for Sodium Alginate in Foods

Yoko KAWASAKI, Chiaki KATO, Hajimu ISHIWATA and Takashi YAMADA

(National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga,
Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan)

An analytical method for the determination of sodium alginate in various foods was developed. Pectin and protein were removed from foods with 1.5 mol/L sulfuric acid and 1 mol/L magnesium sulfate-2.2 mol/L sodium sulfate solution. Pectic substances in foods were removed as a precipitate with 1% sodium hydrogen carbonate solution. Alginic acid in the extract was precipitated as a copper salt, dissolved in 1 mol/L ammonia water, and determined colorimetrically by means of a naphthoresorcinol reaction. The described method was applied to 18 kinds of food. The recovery of sodium alginate spiked at the level of 0.1% was more than 75%, except for soybean flour. The determination limit of the method was 0.002%. Sodium alginate was not detected in 18 kinds of food, but was detected in whipped cream, pudding and noodles at levels of 0.280%, 0.112% and 0.290%, respectively.

(Received March 2, 1998)

Key words: アルギン酸ナトリウム sodium alginate; 比色法 colorimetry; D-マンヌロン酸 D-mannuronic acid; L-グルロン酸 L-guluronic acid; ウロン酸 uronic acid; ペクチン pectin; ペクチン質 pectic substances; ナフトレゾルシノール反応 naphthoresorcinol reaction

緒 言

アルギン酸は褐藻類の細胞壁に含まれ、D-マンヌロン酸とL-グルロン酸からなる直鎖状のポリウロン酸である^{1), 2)}。可溶性食物繊維の一つとして知られており、また、その物性から、増粘安定剤として数多くの加工食品や健康食品に利用されている。

食品衛生検査指針³⁾による食品中のアルギン酸ナトリウム分析法の骨子は、プロテアーゼで除タンパクを行い、ペクチナーゼによりペクチンを除去した後、アルギン酸を銅塩として沈殿させ、ナフトレゾルシノール反応による呈色物をHPLCで測定するものである。ナフトレゾルシノール反応は感度の良いウロン酸の呈色反応⁴⁾であるが、ウロン酸の種類を問わず同じ呈色物を生成す

る^{5)~7)}。特に増粘安定剤として広く利用されているペクチン及び植物体の細胞壁中に多く存在するペクチン質はウロン酸のひとつであるD-ガラクトロン酸が主成分であり、ナフトレゾルシノール反応を用いる定量法においては、前処理でのこれらの除去は必須である。また、末富ら^{*1}は食品衛生検査指針³⁾の方法を用いたアルギン酸塩の一日摂取量調査でウロン酸重合体の妨害が大きいことを報告している。

一方、一定量のアルギン酸ナトリウムを添加し作成した食品を試料とし、抽出したアルギン酸を加水分解後、D-マンヌロン酸とL-グルロン酸をHPLCを用いて定量する分析法⁸⁾も報告されている。しかし、食品由来の夾雑物が多く、市販食品には応用できない。

* 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上野賀 1-18-1

*1 末富良次, 石橋正博, 清水 寧, 村上恵美子, 江口征夫, 城戸浩三: 日本食品化学学会第3回学術大会要旨集 p. 23 (1997) 東京.

そこで食品成分であるペクチン質及びタンパク質並びに添加物として使用されているペクチンの除去法を検討し、各種の食品に適用できる精度の高いアルギン酸ナトリウムの比色定量分析法を開発した。

実験方法

1. 試料

東京都内で市販されていた各種加工食品 21 品目を用いた。

2. 試薬、試液

アルギン酸ナトリウム：和光純薬工業(株)製 (100～150 cP, 300～400 cP, 500～600 cP)。ナカライテスク(株)製 (300 cP, 500 cP, 1,000 cP) 並びに食品添加物の君津化学工業(株)製及び紀文フードケミファ(株)製 (317 cP (D-マンヌロン酸/L-グルロン酸(M/G) 比: 0.4), 305 cP (M/G 比: 0.9)) を用いた。使用に当たりシリカゲルデシケーター中、減圧下において5時間乾燥した。

D-マンヌロン酸ラクトン：シグマ社製

ペクチン (原料：りんご)：和光純薬工業(株)製

その他の試薬は和光純薬工業(株) 特級品を用いた。

1 mol/L 硫酸マグネシウム-2.2 mol/L 硫酸ナトリウム試液：硫酸マグネシウム 7 水和物 24.6 g を 2.5 mol/L 硫酸ナトリウム溶液に溶解し 100 mL にした。

ナフトレゾルシノール試液：1,3-ジヒドロキシナフタレン 100 mg を使用直前に水 25 mL に溶解した。

銅-塩酸試液：濃塩酸 40 mL に 2.5% 硫酸銅溶液 1 mL 及び水 9 mL を加えた。

3. 装置

紫外可視分光光度計：島津 UV-1600 型(株)島津製作所製

4. 試験溶液の調製

4.1. 脱脂

粉末試料は 2.0 g を採り、水 2 mL を加えよく混和した後、その他の試料はそのまま 2.0 g を採り、アセトン 40 mL を加え、かくはん、振とうした。3,500 rpm で 10 分間遠心分離後、アセトン層を除去した。脂肪分の多い試料では沈殿に更に 40 mL のアセトンを加え、同様に操作し、アセトン層を除いた。なお、遠心分離操作は以下、同様の条件で行った。

4.2. アルカリ抽出

沈殿に 1% 炭酸水素ナトリウム溶液 20 mL を加え、60℃の水浴中で 5 分間加温し、かくはん、振とう後、遠心分離した。この操作を更に 1 回繰り返した。上清を集めた。1 mol/L 塩酸で pH 2～3 に調整し、水 40 mL を加えて 1 時間静置した後、遠心分離し上清を除いた。

4.3. 希硫酸処理

沈殿に 1.5 mol/L 硫酸 40 mL を加え 3 分間振とうし、遠心分離後、硫酸層を除去した。この操作を更に 1

Fig. 1. Effect of heating time on color development by the reaction of alginic acid with naphthoresorcinol

One milliliter of 0.4% naphthoresorcinol solution and 2 mL of 8.5 mol/L hydrochloric acid containing 0.05% copper sulfate were added to 1 mL of 50 μ g/mL sodium alginate solution. The reaction mixture was heated in boiling water for 10–120 min. The reaction products were extracted with butyl acetate. Absorbance of the extract was determined at 566 nm.

回繰り返した。

4.4. 除タンパク

沈殿に 3 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加え溶解又は懸濁させ、pH 9～10 に調整した。これに 1 mol/L 硫酸マグネシウム-2.2 mol/L 硫酸ナトリウム試液 1 mL を加え、80℃水浴中で 10 分間加温し、冷後、遠心分離した。必要があれば、ろ紙 No. 5A で上清をろ過した。沈殿に 2.5 mol/L 硫酸ナトリウム溶液 2 mL を加えてよく振り混ぜた後、遠心分離し上清を先の上清に合わせた。

4.5. 銅塩として沈殿

上清を 1 mol/L 塩酸で pH 3～4 に調整し、10% 硫酸銅溶液 3 mL 及び水を加えて全量を 20 mL とした。1 時間静置後、遠心分離し上清を除いた。沈殿をあらかじめ pH 4 に調整した水 10 mL で洗浄後、1 mol/L アンモニア水 1 mL に溶解し、水で 5～50 mL の定容とし試験溶液とした。

5. ナフトレゾルシノール反応による比色定量

試験溶液 1 mL に銅-塩酸試液 2 mL 及びナフトレゾルシノール試液 1 mL を加え、沸騰水浴中で 65 分間加熱した。氷水中で冷却後、酢酸ブチル 4 mL を加え、

Fig. 2. Calibration curves for nine kinds of sodium alginate

■: 100-150 cP, ◆: 300-400 cP, ▲: 500-600 cP, ×: 300 cP, □: 500 cP, ○: 1,000 cP, *: 317 cP (M/G: 0.4), +: 305 cP (M/G: 0.9), △: food additive grade

よく振とうし、遠心分離した。酢酸ブチル層をろ紙 No. 5C でろ過し、566 nm で比色定量した。

結果及び考察

1. ナフトレゾルシノール反応によるアルギン酸の呈色

アルギン酸は分子量 32,000~600,000⁹⁾ のポリマーであり、構成する二つのウロン酸すなわち D-マンヌロン酸と L-グルロン酸の比は原料である海藻の種類、採取場所や時期によって影響を受けることが知られている¹⁰⁾。アルギン酸の種類は多様であるため、ナフトレゾルシノール反応における加熱時間がアルギン酸の発色率に影響を与える可能性が考えられる。300~400 cP のアルギン酸ナトリウム (和光純薬工業(株)製) を用い、ナフトレゾルシノール反応における発色の加熱時間を検討したところ、Fig. 1 に示すように吸光度は加熱後 60 分で最高値に達し、以後、120 分まで一定であることが明らかになった。したがって、60~120 分間の加熱時間であればナフトレゾルシノール反応は完了し、かつ生成した呈色物も安定であると考えられる。そこで、発色の加熱時間は 65 分間とした。

次に、65 分間の加熱時間の条件で 3 社の異なる粘度のアルギン酸ナトリウム 7 製品並びに 1 社の M/G 比の異なる 2 製品について、アルギン酸として 50 µg における呈色物の吸光度を測定した結果良く一致し、変動係数 (CV 値) は 3.4% であった。また、この 9 製品の検量線を作成したところ、いずれも 10~70 µg の範囲で

原点を通るほぼ同一の直線を示した (Fig. 2)。したがって、アルギン酸の粘度またウロン酸の構成比に依らず、沸騰水浴中 65 分間の加熱条件で、市販試薬のどのアルギン酸ナトリウムを標準品として使用してもアルギン酸ナトリウムの定量値への影響はないことが明らかとなった。そこで以後、標準品として和光純薬工業(株)製アルギン酸ナトリウム (300~400 cP) を用いた。

2. 希硫酸処理によるペクチンの除去

酵素によるペクチン除去法^{3), 11)} では、食品中のペクチンの含量により反応時間を調整する必要がある、また、ペクチンは多くの加工食品に広い濃度範囲で使用されている。そこで、分解酵素を使わずに試料中のペクチンを抽出除去する方法を脂肪、タンパク質、糖類に富み、更に、増粘安定剤が多く利用されている乳製品を試料とし検討した。ペクチンはりんごの搾りかす又は、かんきつ類の皮から強酸性溶液で抽出製造される多糖類であり¹²⁾、酸性溶液に溶解するが、アルギン酸は酸性条件でゲル化する。ペクチンを 1% 添加した牛乳並びにペクチン添加の表示のあるプリンを試料とし、1.5 mol/L 硫酸 40 mL でペクチンの抽出を行ったところ、2 回の抽出操作でペクチンは完全に抽出除去されることが明らかになった。

3. 除タンパク剤の検討

アルギン酸は pH 5.8 以下の酸性条件、有機溶媒あるいは 2 価以上の金属塩の存在によってゲル化する。2 価の金属塩のうち、マグネシウム及び水銀塩ではゲルを形成せず、またアルカリ溶液に溶解する¹³⁾。そこで、除タンパク剤として、アルカリ性下で水酸化マグネシウムとなり、効果的な除タンパク作用をもつ硫酸マグネシウム溶液について検討した。まず、0.1% アルギン酸ナトリウム溶液 1 mL に pH 9~10 のアルカリ性下で 1 mol/L 硫酸マグネシウム溶液 1 mL を加え遠心分離した。沈殿に水 2 mL を加えてかくはん後、遠心分離し、上清を合わせた。ナフトレゾルシノール法により上清中のアルギン酸ナトリウムを測定したが良好な回収率は得られなかった。次に、アルギン酸ナトリウムの回収率を向上させるために、一般に多糖類の抽出、分画に用いられる塩溶効果を利用し、アルギン酸がゲル化しない 1 価の金属塩溶液を用い 1 mol/L 硫酸マグネシウム溶液を調製した。同様に操作し、アルギン酸ナトリウムの回収率を検討した。その結果、Table 1 に示すように、硫酸ナトリウム溶液で調製した 1 mol/L 硫酸マグネシウム溶液を用いた場合が最もアルギン酸ナトリウムの回収率が良かった。また、硫酸ナトリウム溶液の濃度を比較したところ、濃度が高くなるに従い、回収率が高くなる傾向が見られた (Table 2)。以上のことから、2.5 mol/L 硫酸ナトリウム溶液で調製した 1 mol/L 硫酸マグネシウム溶液を除タンパク剤とした。

Table 1. Extraction Rates of Sodium Alginate from 1 mol/L Magnesium Sulfate Solution Containing Different Salts

Salt (1 mol/L)	Recovery (%) (mean $\pm$ S.D., $n=3$)
None	49.5 $\pm$ 1.9
NaCl	76.3 $\pm$ 3.8
CH ₃ COONa	52.5 $\pm$ 5.2
KCl	53.3 $\pm$ 7.4
Na ₂ SO ₄	90.7 $\pm$ 0.9

One milliliter of 1 mol/L magnesium sulfate solution or the solutions containing 1 mol/L sodium chloride, 1 mol/L sodium acetate, 1 mol/L potassium chloride or 1 mol/L sodium sulfate solution was added to 1 mL of 0.1% sodium alginate solution in the pH range 9~10. Alginic acid in the supernatant was determined by a naphthoresorcinol method.

4. 食品由来のペクチン質の除去

ココアはアルギン酸ナトリウム添加の表示がなかったが脱脂, 希硫酸処理, 除タンパク後, 銅塩として沈殿させ試験溶液を調製した場合, アルギン酸のナフトレゾルシノール反応による呈色物と同じ吸収スペクトルをもつ呈色物が見られた。そこで, ココアからの抽出物及び標準品アルギン酸ナトリウムの加水分解物について, TLC (条件; 展開溶媒: アセトン-*n*-ブタノール-0.1 mol/L リン酸-ナトリウム (40:25:35), 担体: シリカゲル, 検出: 0.5% ナフトレゾルシノール-10% リン酸-エタノール試液を噴霧し, 120°C, 5分加熱)⁸⁾を行った。その結果, ココアからの抽出物のスポットは標準品アルギン酸ナトリウムのそれと一致しなかった。すなわち, ココア中のウロン酸化合物が希硫酸処理及び除タンパク後にも試験溶液に残存し, ナフトレゾルシノール反応において強酸性下での加熱により加水分解された後, 1,3-ジヒドロキシナフタレンと反応し, 呈色物を生成すると考えられた。そこで, このペクチン質と思われる物質を酸加水分解し, ペクチンとして希硫酸に溶解, 除去する方法を検討した。

ココアをアセトンによる脱脂後, 1.5 mol/L 硫酸 40 mL を加え沸騰水浴中で 10 及び 30 分間加熱した。除タンパク後, 銅塩として沈殿させナフトレゾルシノール反応を行った。10 分間加熱の場合は 0.049% のアルギン酸ナトリウムに相当する呈色物が観察されたが, 30 分間の加熱では検出限界以下であった。しかし, 0.1% 濃度にアルギン酸ナトリウムを添加したココアでの回収率は 10 分間の加熱の場合 56.7%, 30 分間では 23.4% であり, 加熱時間の延長とともに回収率の減少がみられた。したがって, ペクチン質が加水分解され, アルギン酸が分解されないための最適の加熱時間を設定すること

Table 2. Effect of the Concentration of Sodium Sulfate in Magnesium Sulfate Solution on the Extraction Rates of Sodium Alginate

Concentration of Na ₂ SO ₄ (mol/L)	Recovery (%) (mean $\pm$ S.D., $n=3$)
0.5	89.8 $\pm$ 2.1
1.0	90.7 $\pm$ 0.9
1.5	95.5 $\pm$ 1.1
2.0	96.7 $\pm$ 1.1
2.2	99.6 $\pm$ 0.7

One milliliter of 1 mL of 1 mol/L magnesium sulfate containing different concentration of sodium sulfate was added to 1 mL of 0.1% sodium alginate solution in the pH range 9~10. Alginic acid of supernatant was determined by the naphthoresorcinol method.

は困難であった。

次に, アルカリ溶液によるアルギン酸ナトリウムの抽出を検討した。ココアを脱脂後, 1% 炭酸水素ナトリウム溶液 20 mL に懸濁させ, 遠心分離してペクチン質を沈殿物として除去した。その結果, 試験溶液中のアルギン酸様呈色物は検出限界以下であり, アルギン酸ナトリウム 0.1% 添加時の回収率は 81.8 $\pm$ 3.4% と良好であった。よって, ペクチン質を除去するための操作として, 1% 炭酸水素ナトリウムによる抽出が有効であると思われる。

5. 食品中からの添加回収実験

アルギン酸ナトリウム添加の表示のない市販食品 18 品目を試料とし本法によるアルギン酸ナトリウムの定量分析を行った。また, 0.1% となるようにアルギン酸ナトリウムを添加し, 添加回収率を検討した。試験溶液の調製は食品の成分に応じ適宜行った。すなわち, うどん, ラーメン, ハム, ハンバーグ, はんぺん, カレー, フレンチドレッシング, トマトケチャップ, アイスクリーム, ヨーグルト, コーヒーミルク, いちごジャム, フルーツゼリー, ようかんでは脱脂, 希硫酸処理, 除タンパクを行った。豆類の加工品であるココア, きな粉, 味噌は脱脂の後にアルカリ抽出を加えた。また, しょう油は大豆製品ではあるが, 脂肪, タンパク質などは少なく, 水で希釈し, 脱脂, アルカリ抽出, 希硫酸処理, 除タンパクは行わなかった。試料は以上の処理の後, アルギン酸銅塩として沈殿させ, 1 mol/L アンモニア水に溶解し試験溶液とした。その結果, いずれの試料においても食品中の妨害物による呈色は観察されなかった。

また, 添加回収実験においては, きな粉を除く 17 種の食品で 75% 以上の回収率が得られた (Table 3)。き

Table 3. Recoveries of Sodium Alginate from Spiked Foods

Food	Recovery (%), (mean $\pm$ S.D., $n=3$)	Food	Recovery (%), (mean $\pm$ S.D., $n=3$)
Soy sauce	101.1 $\pm$ 3.4	Hamburg steak	86.1 $\pm$ 3.8
Tomato ketchup	74.9 $\pm$ 4.0	Ham	84.6 $\pm$ 3.7
Curry paste	89.3 $\pm$ 5.0	Fish paste	82.9 $\pm$ 3.2
French dressing	74.9 $\pm$ 6.3	Ice cream	95.6 $\pm$ 3.7
Noodle A	79.2 $\pm$ 1.8	Yoghurt	88.2 $\pm$ 2.7
Noodle B	81.5 $\pm$ 0.8	Milk	88.5 $\pm$ 2.2
Soybean paste	75.4 $\pm$ 7.5	Strawberry jam	75.6 $\pm$ 1.0
Cocoa	81.8 $\pm$ 3.4	Fruit jelly	88.6 $\pm$ 2.8
Soybean flour	54.6 $\pm$ 1.2	Sweet bean paste "Yokan"	83.0 $\pm$ 2.8

Samples were spiked with 0.1% sodium alginate.

Table 4. Contents of Sodium Alginate in Foods

Food	Concentration (%)	Food	Concentration (%)
Soy sauce	N.D.	Hamburg steak	N.D.
Tomato ketchup	N.D.	Ham	N.D.
Curry paste	N.D.	Fish paste	N.D.
French dressing	N.D.	Ice cream	N.D.
Noodle A	N.D.	Yoghurt	N.D.
Noodle B	N.D.	Milk	N.D.
Noodle C	0.290	Pudding	0.112
Soybean paste	N.D.	Whip cream	0.280
Cocoa	N.D.	Strawberry jam	N.D.
Soybean flour	N.D.	Fruit jelly	N.D.
		Sweet bean paste "Yokan"	N.D.

N.D. < 0.002%

な粉の回収率は 54.6% と低かったため、試料の採取量を 0.5 g として検討したが回収率の向上はみられなかった。

以上の結果より、簡便な比色法での食品中のアルギン酸ナトリウムの定量が可能であることが明らかとなった。なお、本法の定量限界は試料当たり 0.002% であった。

6. 市販食品中のアルギン酸ナトリウム含量

本法を用い、市販食品中のアルギン酸ナトリウムを比色定量した。アルギン酸ナトリウム使用の表示があったホイップクリームに 0.280%, プリンに 0.112%, そばに 0.290% の濃度でアルギン酸ナトリウムが検出された (Table 4)。

7. ホイップクリームからの抽出物の同定

上記ホイップクリーム中のナフトレゾルシノール反応による呈色物の吸収スペクトルは標準品のアルギン酸ナトリウムの呈色物の吸収スペクトルと一致した。また、ホイップクリームからの抽出物について前述の条件で TLC を行ったところ、 R_f 値 0.52 及び 0.38 にスポットが観察され、これはアルギン酸ナトリウムの加水分解

物の 2 つのスポットと一致し、 R_f 値 0.52 は D-マンヌロン酸のスポットと一致した。以上のことから、ホイップクリームからの抽出物はアルギン酸ナトリウムと同定した。

ま と め

食品中のアルギン酸ナトリウムの定量分析法を検討した。すなわち、食品を脱脂後、1% 炭酸水素ナトリウム溶液、希硫酸及び 1 mol/L 硫酸マグネシウム-2.2 mol/L 硫酸ナトリウム溶液でペクチン質などの妨害物を除去し、アルギン酸銅塩とし、ナフトレゾルシノール反応により比色定量した。今回確立した定量分析法は、各種食品中の妨害物の除去並びに回収率などにおいて良好な結果が得られた。特に、ココアなどの豆製品には希アルカリ溶液による前処理が極めて有効であった。また、食品の種類によって前処理行程を適宜、簡略化することができ、簡便で精度の良い比色法での定量が可能となった。

謝 辞

本研究に当たり、アルギン酸ナトリウムを提供いただきました紀文フードケミファ(株)に深謝いたします。

文 献

- 1) Hirst, E., Rees, D. A.: J. Chem. Soc. (C) **1965**, 1,182～1,187.
- 2) Haug, A., Larsen, B., Smidod, O.: Acta Chem. Scand. **20**, 183～190 (1966).
- 3) 厚生省生活衛生局監修: “食品衛生検査指針 2” p. 104～107 (1989) 日本食品衛生協会.
- 4) 町田誠之: 化学の領域 **7**, 634～637 (1953).
- 5) Momose, T., Ueda, Y., Iwasaki, M.: Chem. Pharm. Bull. **10**, 633～634 (1962).
- 6) Momose, T., Ueda, Y., Iwasaki, M.: *ibid.* **4**, 49～53 (1956).
- 7) Momose, T., Ueda, Y., Iwasaki, M.: *ibid.* **10**, 546～549 (1962).
- 8) Rourke, T. J., Clarke, A. D., Bailey, M. E., Hedrick, H. B.: J. Food Sci. **58**, 973～977 (1993).
- 9) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: “Compendium of Food Additive Specifications” Addendum 3, p. 5～7 (1995) Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- 10) Honya, M., Kinoshita, T., Ishikawa, M., Mori, H., Nishizawa, K.: Nippon Suisan Gakkaishi **59**, 295～299 (1993).
- 11) 豊田正武, 四方田千佳子, 伊藤誉志男, 原田基夫: 食衛誌. **26**, 189～194 (1985).
- 12) 松田和雄: “生物化学実験法 20, 多糖類の分離・精製法”, p. 140 (1989) 学会出版センター.
- 13) 第七改正日本薬局方注解 p. 56～60 (1965) 南江堂.