

菓子類のしよ糖分の定量分析法

この試験方法は、関税定率法別表第17類から第22類に分類される菓子類等で、しよ糖含有量の定量を必要とするものについて適用する。

1. 試験方法の概略 この試験方法は、砂糖菓子、ベーカリー製品、チョコレートその他ココアを含有する製品、ゆであずきなどの菓子類等のしよ糖分を定量する場合に適用するもので、以下の手順により行う。

- ① 分析用検体の調製
- ② 検液の調製
- ③ 高速液体クロマトグラフィー、レイン・エイノン法又はハーネス法によるしよ糖分の定量⁽¹⁾

注1) 滴定分析（レイン・エイノン法及びハーネス法）を実施する場合、直接還元糖分の少ない試料についてはハーネス法の方が適している。

2. 分析用検体の調製 比較的多量の試料を無作為に採取し、その性状に応じて適当な方法（粉碎、摩砕、混合等）により均質化したものを、分析用検体とする。

3. しよ糖分の定量

3.1 高速液体クロマトグラフィー

3.1.1 親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）カラムを使用する場合

3.1.1.1 試薬

(1) 内標準物質溶液⁽²⁾

下記 **3.1.1.3** により選択した内標準物質（いずれも純度 98 % 以上（水和物の場合は、水和物としての純度 98 % 以上））の約 5 % 水溶液を、メスフラスコを用いて調製する。例えば、100 mL を調製する場合は、内標準物質 5 g を 100 mL 容メスフラスコに量り取り、水を加えて定容する。

(2) 標準しよ糖原液

しよ糖（試薬特級）1.5 g を 100 mL 容メスフラスコに量り取り、水を加えて定容する。

(3) カラム再生液

水酸化ナトリウム 2.0 g を、氷冷しながら水 100 mL に溶解する。

注2) 内標準物質溶液の濃度については例示であり、分析試料のしよ糖含有量に応じて適宜変更しても良い。

3.1.1.2 装置 示差屈折率検出器を装備した高速液体クロマトグラフ

3.1.1.3 カラム及び分離条件 しよ糖の定量分析が可能なカラム及び分析条件の例を、下表に示す。このうち、カラム④は HILIC と配位子交換（対イオン：Na⁺）のミックスモードカラムである。

	カラム名 メーカー名 サイズ（内径×長さ（mm））	移動相溶液	カラム 温度	流速 （mL/min）	内標準物質
①	HILICpak VG-50 4E Shodex 4.6 × 250	H ₂ O / CH ₃ COCH ₃ / CH ₃ CN / CH ₃ OH = 6 / 43 / 43 / 8	60 °C	1.0	メソエリトリトール ペンタエリトリトール

②	XBridge BEH Amide Waters 4.6 × 150、粒子径 2.5μm	H ₂ O / CH ₃ COCH ₃ =16 / 84 +0.05 v%トリエチルアミン	85 °C	1.0	キシリトール ラクツロース
③	Asahipak NH2P-50 4E Shodex 4.6 × 250	H ₂ O / CH ₃ COCH ₃ =20 / 80	50 °C	1.0	キシリトール ソルビトール
④	RSpak DC-613 Shodex 6.0 × 150	H ₂ O / CH ₃ COCH ₃ / CH ₃ CN=20 / 56 / 24 +0.05 v%トリエチルアミン	80 °C	1.0	キシリトール ラクチトール

注入量は10μLとし、その他の設定は使用する機器に最適な条件とする。

上記カラムの同等品も使用可能とするが、カラム③のような基材表面をアミノプロピル基で修飾したカラムについては、還元糖（単糖、乳糖、麦芽糖等）とアミノ基が化学的に結合してカラムを劣化させるため、還元糖を含有する試料の分析には使用しない方が望ましい。

内標準物質は、まず候補物質を選択し、濃度0.5%程度となるよう50%アセトニトリルに溶解し、同じく50%アセトニトリルに溶解した分析試料の溶液と共に上記の条件で測定する。次に、得られたクロマトグラムを比較して、内標準物質のピークが分析試料由来のピークと重ならないことを確認してから決定する。その際、しょ糖及び内標準物質とも、他の成分との基線分離度^③が1.5以上であることが望ましく、基線分離度が1未満の場合は、内標準物質又はカラムを変更すること。

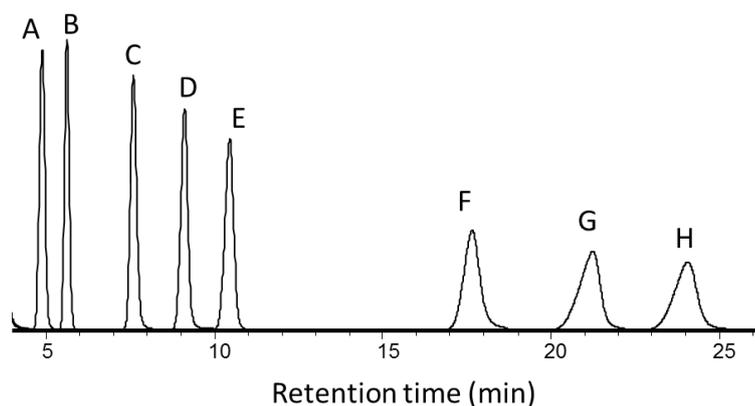
注3) 基線分離度 R_S は以下の式により決定する。

$$R_S = 1.18 \times \frac{(t_2 - t_1)}{(w_1 + w_2)}$$

ただし、 t_1 、 t_2 : 2つのピークの保持時間 (min)

w_1 、 w_2 : 2つのピークの半値幅 (min)

— 参考クロマトグラム (HILICカラム) —



カラム①

A : ペンタエリトリトール

B : メソエリトリトール

C : 果糖

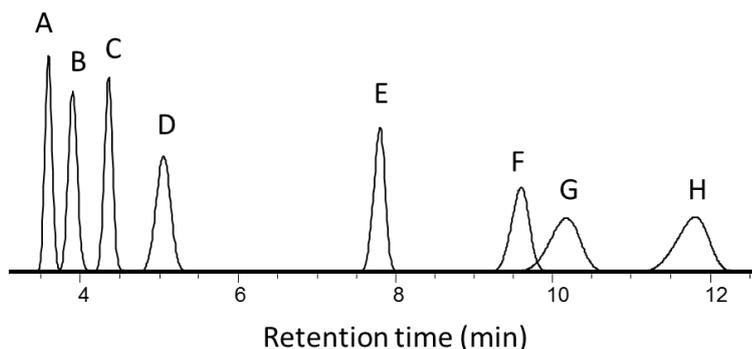
D : ソルビトール

E : ぶどう糖

F : しょ糖

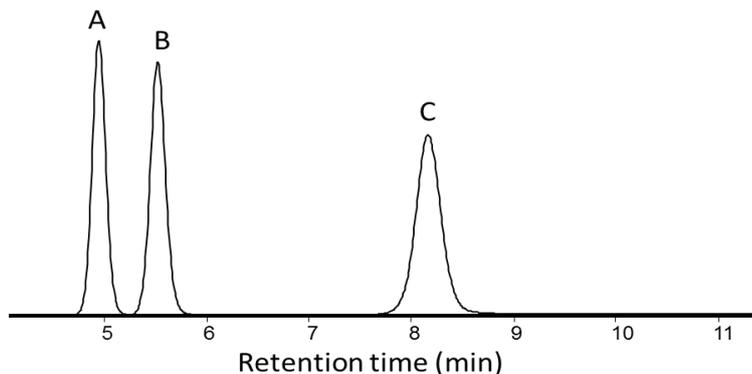
G : 乳糖

H : 麦芽糖



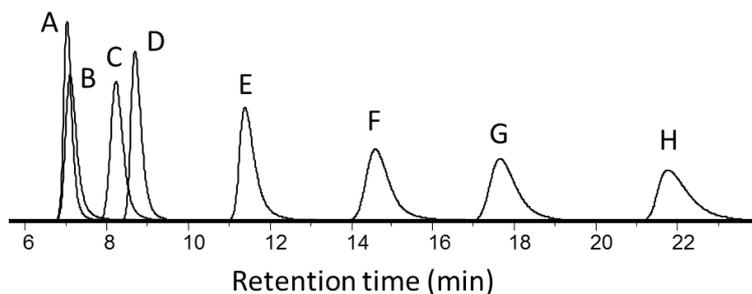
カラム②

- A : キシリトール
- B : 果糖
- C : ソルビトール
- D : ぶどう糖
- E : しょ糖
- F : ラクツロース
- G : 乳糖
- H : 麦芽糖



カラム③

- A : キシリトール
- B : ソルビトール
- C : しょ糖



カラム④

- A : キシリトール
- B : 果糖
- C : ぶどう糖
- D : ソルビトール
- E : しょ糖
- F : 麦芽糖
- G : 乳糖
- H : ラクチトール

3.1.1.4 標準試料の検液の調製 標準しょ糖原液 10 mL、25 mL 及び 40 mL を 100 mL 容メスフラスコ 3 本にそれぞれ正確に量り取り、内標準物質溶液 5 mL を正確に加えた後、全量が約 40 mL となるよう水を加え⁽⁴⁾、さらにアセトニトリル 50 mL を加えた後、水を加えて定容する⁽⁵⁾。

注4) 標準しょ糖原液 40 mL を使用したものについては、水を加える必要はない。

注5) 水にアセトニトリルを加えると、体積が変化し温度も低下するので、アセトニトリル 50 mL を数回に分けてよく混合しながら加えた後、しばらく静置するか温水で加温することにより、溶液の温度を約 20 °C に戻してから定容すること。

3.1.1.5 分析用検体の検液の調製

- (i) 2. で調製した分析用検体を、含有されるしょ糖が約 0.2~0.5 g となるよう、50 mL 容メスフラスコに量り取る。
- (ii) 水約 20 mL を加え、軽く振り混ぜる。このとき、油脂により分析用検体が水に分散しない場合は、(iii) の脱脂操作を行う。脱脂操作を行わない場合は、(iv) へ進む。
- (iii) ヘキサン 20 mL を加えて約 10 分間軽く振り動かしながら脂肪を抽出⁽⁶⁾ した後、しばらく静置し、ヘキサン層を駒込ピペット等で除去する。この操作をもう一度繰り返す。
- (iv) 水 10 mL を加え、50 °C に設定した振とう恒温水槽中に置き、30 分間かくはん抽出する。これを室温に冷

却した後、内標準物質溶液 5 mL を正確に加えたうえで、水を加えて定容する。

- (v) 定量用ろ紙 (JIS P 3801 に規定する 5 種 A、5 種 B 又は 6 種規格) でろ過し、得られたろ液の一部に等量のアセトニトリルを加えてよく振り混ぜる。
- (vi) しばらく静置した後、孔径 0.45 μm のメンブレンフィルターでろ過し、得られたろ液を分析用検体の検液とする。

注 6) 分析試料がチョコレートなど脂質を多く含む場合は、超音波洗浄機等を用いることにより、脂質を確実にヘキサンで抽出する必要がある。

3.1.1.6 測定及びしよ糖分の計算 3.1.1.4 で調製した標準試料の検液から得られたクロマトグラムにより、縦軸に内標準物質のピーク面積値 A_{IS} に対するしよ糖のピーク面積値 A_T の比を、横軸に検液中の内標準物質の重量 C_{IS} (mg) に対するしよ糖重量 C_T (mg) の比をとり、しよ糖の検量線を作成する。

次に、3.1.1.5 で調製した分析用検体の検液⁷⁾ から得られたクロマトグラムにより、内標準物質のピーク面積値 A'_{IS} に対するしよ糖のピーク面積値 A'_T の比を求め、前記の検量線を用いて分析用検体の検液中の内標準物質重量に対するしよ糖の重量比 $C'_{T/IS}$ を算出し、次式により分析試料中のしよ糖分を算出する。数値は、小数点以下第二位を四捨五入する。

$$\text{しよ糖分 (\%)} = \frac{C'_{T/IS} \times M_{IS}}{M_S \times 1000} \times 100$$

ただし、 $C'_{T/IS}$: 検量線より求めた内標準物質重量に対するしよ糖の重量比

M_{IS} : 3.1.1.5 で調製した分析用検体の検液に含まれる内標準物質の総重量 (mg)

M_S : 3.1.1.5 における分析用検体の採取量 (g)

注 7) カラム④を使用する場合は、一連の分析中又は分析後に、再生液の測定を実施すること。

3.1.2 サイズ排除と配位子交換 (対イオン: Ca^{2+}) のミックスモードカラムを使用する場合

3.1.2.1 試薬

- (1) 内標準物質溶液²⁾

ソルビトール、グリセリン等の多価アルコール類 (いずれも純度 98 % 以上) 5 g を 100 mL 容メスフラスコに量り取り、水を加えて定容する。

- (2) 標準しよ糖原液

しよ糖 (試薬特級) 1.5 g を 100 mL 容メスフラスコに量り取り、水を加えて定容する。

- (3) 除たんぱく剤

A 液 : 硫酸亜鉛 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 2 g を水に溶解し、全量を 100 mL とする。

B 液⁸⁾ : 水酸化バリウム [$\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$] 1.8 g を水に溶解し、全量を 100 mL とする。

- (4) カラム再生液

硝酸カルシウム 8.2 g を水に溶解し、全量を 100 mL とする。

注 8) 空気中の二酸化炭素を吸収し、炭酸バリウムの白色沈殿を生じるため、長期保存する際はなるべく口が狭く、密栓することが可能な容器に移し入れること。

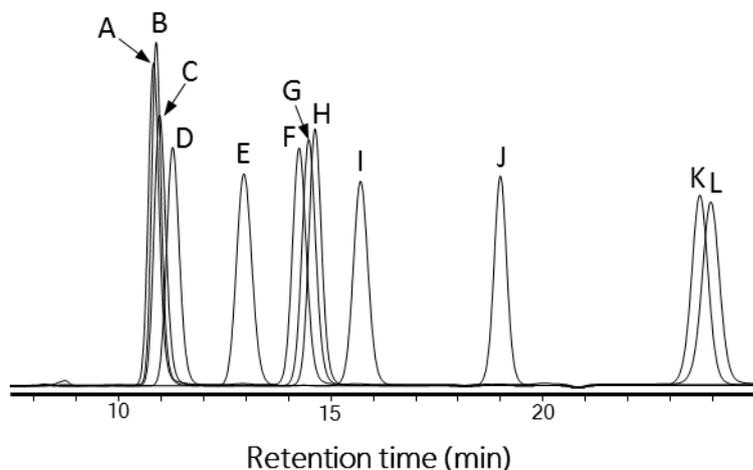
3.1.2.2 装置 示差屈折率検出器を装備した高速液体クロマトグラフ

3.1.2.3 カラム及び分離条件 サイズ排除と配位子交換 (対イオン: Ca^{2+}) のミックスモードカラムで、直径約 8 mm、長さ 250~300 mm、粒子径 8~10 μm 程度のもの。移動相は水で、カラム温度及び流速はカラムメーカーが

提示する一般的な条件とする。また、注入量は10~20 μL の一定量とし、その他の設定は使用する機器に最適な条件とする。

なお、内標準物質は、3.1.1.3と同様、分析試料由来のピークとの分離度を確認のうえ選択すること。

— 参考クロマトグラム（サイズ排除と配位子交換（対イオン： Ca^{2+} ）のミックスモードカラム） —



MCI GEL CK08EC 流速 0.6 mL/min

- A : イソマルトース
- B : しょ糖
- C : 麦芽糖
- D : 乳糖
- E : ぶどう糖
- F : ガラクトース
- G : マルチトール
- H : マンノース
- I : 果糖
- J : グリセリン
- K : キシリトール
- L : ソルビトール

3.1.2.4 標準試料の検液の調製 標準しょ糖原液 10 mL、25 mL 及び 40 mL を 100 mL 容メスフラスコ 3 本にそれぞれ正確に量り取り、内標準物質溶液 10 mL を正確に加えた後、水を加えて定容する。

3.1.2.5 分析用検体の検液の調製

- (i) 2. で調製した分析用検体を、含有されるしょ糖が約 0.2~0.5 g となるよう、100 mL 容メスフラスコに正確に量り取る。
- (ii) 水約 20 mL を加え、軽く振り混ぜる。このとき、油脂により分析用検体が水に分散しない場合は、(iii)の脱脂操作を行う。脱脂操作を行わない場合は、(iv)へ進む。
- (iii) ヘキサン 20 mL を加えて約 10 分間軽く振り動かしながら脂肪を抽出⁽⁹⁾した後、しばらく静置し、ヘキサン層を駒込ピペット等で除去する。この操作をもう一度繰り返す。
- (iv) 水 10 mL を加え、50 $^{\circ}\text{C}$ に設定した振とう恒温水槽中に置き、30 分間かくはん抽出する。これを室温に冷却した後、内標準物質溶液 10 mL を正確に加える。
- (v) 除たんぱく剤 A 液 10 mL を加えてよく混合し、さらに除たんぱく剤 B 液 10 mL を加えてよく混合した後⁽¹⁰⁾、水を加えて定容する。この溶液の一部を孔径 0.45 μm のメンブレンフィルターでろ過し、得られたろ液を分析用検体の検液とする。

注 9) 分析試料がチョコレートなど脂質を多く含む場合は、超音波洗浄機等を用いることにより、脂質を確実にヘキサンで抽出する必要がある。

注 10) 分析試料がたんぱく質をほとんど含有していない場合は、除たんぱく剤を添加する必要はない。

3.1.2.6 測定及びしょ糖分の計算 3.1.2.4 で調製した標準試料の検液から得られたクロマトグラムにより、縦軸に内標準物質のピーク面積値 A_{IS} に対するしょ糖のピーク面積値 A_T の比を、横軸に検液中の内標準物質の重量 C_{IS} (mg) に対するしょ糖重量 C_T (mg) の比をとり、しょ糖の検量線を作成する。

次に、3.1.2.5 で調製した分析用検体の検液⁽¹¹⁾ から得られたクロマトグラムにより、内標準物質のピーク面積値 A'_{IS} に対するしょ糖のピーク面積値 A'_T の比を求め、前記の検量線を用いて分析用検体の検液中の内標準物質重量に対するしょ糖の重量比 $C'_{T/IS}$ を算出し、次式により分析試料中のしょ糖分を算出する。数値は、小数点以下第二

位を四捨五入する。

$$\text{しよ糖分 (\%)} = \frac{C'_{T/IS} \times M_{IS}}{M_S \times 1000} \times 100$$

ただし、 $C'_{T/IS}$: 検量線より求めた内標準物質重量に対するしよ糖の重量比

M_{IS} : 3.1.2.5で調製した分析用検体の検液に含まれる内標準物質の総重量 (mg)

M_S : 3.1.2.5における分析用検体の採取量 (g)

注11) 一連の分析中又は分析後に、再生液の測定を実施すること。

3.2 レイン・エイノン法

3.2.1 試薬

(1) 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH4.6)

酢酸 (純度 98 % 以上) 30 g をビーカーに量り取り、水を加えながら 500 mL 容メスフラスコに移し入れた後、水を加えて定容する。この溶液 100 mL をビーカーに分取し、5 % (w/w) 水酸化ナトリウム水溶液を徐々に加えて pH4.6 に調整した後、1000 mL 容メスフラスコに移し入れ、水を加えて定容する。

(2) インバルターゼ溶液

市販のインバルターゼを、0.1 M 酢酸緩衝液 (pH4.6) 等に分散させ、400 unit/mL の懸濁液を調製する (添付の説明書の規定を満たすよう注意すること)。用時調製すること。

(3) 1 % フェノールフタレイン溶液

フェノールフタレイン 1.0 g を 100 mL 容メスフラスコに量り取り、エタノール 90 mL に溶解させた後、水を加えて定容する。

(4) 4 mol/L 水酸化ナトリウム溶液

水酸化ナトリウム 16.0 g を 200 mL 容三角フラスコに量り取り、氷冷しながら水 100 mL を加えて溶解する。

(5) 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液

水酸化ナトリウム 4.0 g を 200 mL 容三角フラスコに量り取り、氷冷しながら水 100 mL を加えて溶解する。

(6) 標準転化糖溶液

しよ糖 (試薬特級) 4.75 g をビーカー等に量り取り、水 90 mL を用いて 500 mL 容メスフラスコに移し入れて溶解した後、塩酸 (比重 1.18) 5 mL を加え、20~30 °C で 3 日間静置する。これに水を加えて定容し、冷所にて保存する。使用に際してその 50 mL を 200 mL 容メスフラスコに正確に分取し、指示薬として 1 % フェノールフタレイン溶液数滴を加えたうえで、溶液が僅かに赤色を呈するまで 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加えた後、水を加えて定容する。

(7) 1 % メチレンブルー溶液

メチレンブルー 1 g を水に溶解し、全量を 100 mL とする。

(8) フェーリング溶液

A 液 : 硫酸銅 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 34.639 g を水に溶解し、全量を 500 mL とする。これを 2 日間静置した後ろ過して使用する。

B 液 : 酒石酸カリウムナトリウム ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 173 g 及び水酸化ナトリウム 50 g を水に溶解し、全量を 500 mL とする。これを 2 日間静置した後ろ過して使用する。

(9) 除たんぱく剤

A 液 : 硫酸亜鉛 ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) 2 g を水に溶解し、全量を 100 mL とする。

B 液⁽⁸⁾ : 水酸化バリウム [$Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$] 1.8 g を水に溶解し、全量を 100 mL とする。

3.2.2 分析用検体の採取量 分析用検体の採取量は次の表を参考に、滴定による転化糖濃度が 150~250 mg/100 mL 程度となるように決定する。

品名	直接還元糖分 (%)	しよ糖分 (%)	試料採取量	
			直接還元糖分用 (g) (3.2.3 の (C))	全糖分用 (g) (3.2.3 の (D))
(砂糖菓子)				
チューインガム	5~20	40~60	3~8	4~5
キャンデー類	5~30	60~90	2~8	2~3
(ココアの調製品)				
チョコレート	5~15	30~70	4~8	3~6
ココアの調製品	0~20	80~90	3~90	2~3
(ベーカリー製品)				
ビスケット、クッキー類	0.5~10	5~40	5~90	5~40
(あん類)				
ゆであずき	0~2	40~65	20~90	3~5

3.2.3 検液の調製

(A) 多量の油脂を含有する試料の前処理 チョコレートなど多量の油脂を含有する試料については、以下の処理を行った後、下記 (C) の (ii)、(D-1) の (ii) 又は (D-2) の (ii) 以降に従って操作を行う。

- (i) 2. で調製した分析用検体の一定量 (前記 3.2.2 に従うこと) をビーカー等に量り取り、約 200 mL の水を用いて 250 mL 容メスフラスコに移し入れる。
- (ii) ヘキサン 20 mL を加え、約 10 分間軽く振り動かしながら油脂を抽出した後、しばらく静置し、ヘキサン層を駒込ピペット等で除去する。この操作をもう一度繰り返す。

(B) 多量の水不溶分を含有する試料の調製 ビスケット、ゆであずきのように多量の水不溶分を含有する試料については、以下の処理を行った後、下記 (C) の (iii) 又は (D-1) の (iii) 以降に従って操作を行う。

- (i) 2. で調製した分析用検体の一定量 (前記 3.2.2 に従うこと) を 200~300 mL 容ビーカーに量り取り、水約 150 mL を加え、ときどきかき混ぜながら約 1 時間静置する。
- (ii) ろ紙 (JIS P 3801 に規定する 2 種のもの) を用いてろ過⁽¹²⁾、得られたろ液を 250 mL 容メスフラスコ⁽¹³⁾に移し入れる。ビーカー及びろ紙上の残留物を水でよく洗浄し、洗液はメスフラスコ内に合する。

注 12) 遠心分離法により水不溶分を分別してもよい。

注 13) 試料の採取量が多く、残留物の洗浄に多量の水を必要とする場合は、500 mL 容のメスフラスコを使用してもよい。その場合、後記 3.2.4 の (B) 及び (C) において分析用検体の採取量を、実際の採取量の半量として計算する。

(C) 直接還元糖分定量用検液の調製

- (i) 2. で調製した分析用検体の一定量 (前記 3.2.2 に従うこと) をビーカー等に量り取り、約 200 mL の水を

用いて 250 mL 容メスフラスコに移し入れる。

- (ii) メスフラスコを十分に（約 1 時間）振とうしてしょ糖を抽出する。
- (iii) 必要に応じて除たんぱく剤 A 液 20 mL を加えてよく混合し、さらに除たんぱく剤 B 液 20 mL を加えてよく混合した後、水を加えて定容する。
- (iv) 再びよく混合し、約 30 分間静置した後、ろ紙によりろ過し、得られたろ液を直接還元糖分定量用検液とする。

(D) 全糖分定量用検液の調製

(D-1) 酸分解法⁽¹⁴⁾

- (i) 2. で調製した分析用検体の一定量（前記 3.2.2 に従うこと）をビーカー等に量り取り、約 200 mL の水を用いて 250 mL 容メスフラスコに移し入れる。
- (ii) メスフラスコを十分に（約 1 時間）振とうしてしょ糖を抽出する。
- (iii) 必要に応じて除たんぱく剤 A 液 20 mL を加えてよく混合し、さらに除たんぱく剤 B 液 20 mL を加えてよく混合した後、水を加えて定容する。
- (iv) 再びよく混合し、約 30 分間静置した後、ろ紙によりろ過する。
- (v) 得られたろ液 50 mL を 100 mL 容三角フラスコに正確に分取し、25%塩酸 2.5 mL を加え、 (65 ± 1) °C の恒温水浴中で正確に 20 分間加熱し、しょ糖を加水分解する。分解液は直ちに流水中で冷却した後、指示薬として 1%フェノールフタレイン溶液数滴を加えたうえで、分解液が僅かに赤色を呈するまで 4 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加える。
- (vi) 三角フラスコの内容物を 250 mL 容メスフラスコに移し入れ、三角フラスコの内部を水で洗浄し、洗液をメスフラスコに合した後、水を加えて定容したものを、全糖分定量用検液とする⁽¹⁵⁾。

注 14) この酸分解法に規定する加水分解条件を厳守することにより、しょ糖以外に麦芽糖、乳糖などの二糖類を含有する試料の場合も、しょ糖を選択的に加水分解することができる。ただし、ラフィノースを含有する試料の場合、酸分解法及び酵素分解法のいずれによってもラフィノースも加水分解されるが、ラフィノースを含有する菓子類は限定的であり、含有するとしても微量であることが一般的であるため、分析結果に与える影響はほとんどない。

注 15) しょ糖分の多い試料については、上記 (C) で調製した直接還元糖分定量用検液を適当に希釈して、酸分解法による全糖分定量用検液を調製してもよい。

(D-2) 酵素分解法

- (i) 2. で調製した分析用検体の一定量（前記 3.2.2 に従うこと）をビーカー等に量り取り、約 200 mL の水を用いて 250 mL 容メスフラスコに移し入れる。
- (ii) メスフラスコを十分に（約 1 時間）振とうしてしょ糖を抽出する。次にインベルターゼ溶液 2~3 mL（800~1200 単位相当）を加えて混合し、 (37 ± 1) °C の恒温水浴中で 30 分間反応させる。
- (iii) 除たんぱく剤 A 液 20 mL を加えてよく混合し、さらに除たんぱく剤 B 液 20 mL を加えてよく混合した後、水を加えて定容する。
- (iv) 再びよく混合し、約 30 分間静置した後、ろ紙によりろ過する。
- (v) 得られたろ液の 50 mL を 250 mL 容メスフラスコに正確に分取し、水を加えて定容したものを、全糖分定量用検液とする。

3.2.4 滴定操作

(A) フェーリング溶液の力価の標定

フェーリング溶液 A 液及び B 液それぞれ 5 mL を 200 mL 容三角フラスコに正確に量り取り、50 mL 容ビュレットを用いて標準転化糖溶液 19.5 mL を加える。電熱器上で 2 分間沸騰させた後、1 % メチレンブルー溶液 4 滴を加え、煮沸しながら標準転化糖溶液を滴下し、青色が消失したところを終点とする。滴定は沸騰し始めてから 3 分以内に終了する。この滴定を 3 回行い、その平均値を求める⁽¹⁶⁾。

次式により力価を求める。数値は小数点以下第三位を四捨五入し、力価が 1 ± 0.02 の範囲に収まらない場合は、フェーリング溶液を再度調製する。

$$\text{力価} = \frac{20.36}{A}$$

ただし、A：標準転化糖溶液の滴定値 (mL)

注 16) 3 回の滴定値の差は、0.1 mL 以内とする。

(B) 直接還元糖分の滴定操作

フェーリング溶液 A 液及び B 液それぞれ 5 mL を 200 mL 容三角フラスコに正確に量り取り、50 mL 容ビュレットを用いて 3.2.3 の (C) で得られた検液約 15 mL を加えた後、電熱器上で 2 分間沸騰させ、3.2.4 の (A) と同様に滴定し、これを予備滴定とする。

次に上記と同様に操作して、予備滴定で得た滴定値より約 1 mL 少ない量の検液を加えた後、3.2.4 の (A) と同様に滴定する。ここで得た検液の滴定値に力価を乗じ、この数値から 3.2.6 のレイン・エイノン糖類定量表 (転化糖・無し糖) を用いて転化糖濃度 D_S (mg/100 mL) を求め⁽¹⁷⁾、次式により直接還元糖分 (%) を算出する。数値は、小数点以下第三位を四捨五入する。

$$\text{直接還元糖分 (\%)} = \frac{D_S}{S} \times 0.25$$

ただし、S：3.2.3 でひょう量した分析用検体の採取量 (g)

注 17) 直接還元性の糖は転化糖が主成分であるとみなし、転化糖として表す。また、滴定値に力価を乗じた値の小数点以下第一位を四捨五入し、整数としたうえで糖類定量表 (転化糖・無し糖) を用いること。

(C) 全糖分の滴定操作

3.2.3 の (D) で得られた検液を用いて 3.2.4 の (A) と同様に滴定し、ここで得た検液の滴定値に力価を乗じ、この数値から 3.2.6 のレイン・エイノン糖類定量表 (転化糖・無し糖) を用いて転化糖濃度 T_S (mg/100 mL) を求め⁽¹⁷⁾、次式により全糖分 (%) を算出する。数値は、小数点以下第三位を四捨五入する。

$$\text{全糖分 (\%)} = \frac{T_S \times 2.5 \times 5 \times 100}{S' \times 1000} = \frac{T_S}{S'} \times 1.25$$

ただし、S'：3.2.3 でひょう量した分析用検体の採取量 (g)

3.2.5 しょ糖分の計算 3.2.4 の (B) で求めた直接還元糖分及び (C) で求めた全糖分を用いて、次式により算出した値をしょ糖分とする。数値は、小数点以下第二位を四捨五入する。

$$\text{しょ糖分 (\%)} = (\text{全糖分 (\%)} - \text{直接還元糖分 (\%)}) \times 0.95$$

3.2.6 レイン・エイノン糖類定量表(転化糖・無しよ糖)

糖液の 所要量(mL)	転化糖 mg/100 mL	糖液の 所要量(mL)	転化糖 mg/100 mL	糖液の 所要量(mL)	転化糖 mg/100 mL
15	336.0	27	190.4	39	133.3
16	316.0	28	183.7	40	130.1
17	298.0	29	177.6	41	127.1
18	282.0	30	171.7	42	124.2
19	267.0	31	166.3	43	121.4
20	254.5	32	161.2	44	118.7
21	242.9	33	156.6	45	116.1
22	231.8	34	152.2	46	113.7
23	222.2	35	147.9	47	111.4
24	213.3	36	143.9	48	109.2
25	204.8	37	140.2	49	107.1
26	197.4	38	136.6	50	105.1

3.3 ハーネス法

3.3.1 試薬

(1) 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH4.6)

酢酸 (純度 98 % 以上) 30 g をビーカーに量り取り、水を加えながら 500 mL 容メスフラスコに移し入れた後、水を加えて定容する。この溶液 100 mL をビーカーに分取し、5 % (w/w) 水酸化ナトリウム水溶液を徐々に加えて pH4.6 に調整した後、1000 mL 容メスフラスコに移し入れ、水を加えて定容する。

(2) インバルターゼ溶液

市販のインバルターゼを、0.1 M 酢酸緩衝液 (pH4.6) 等に分散させ、400 unit/mL の懸濁液を調製する (添付の説明書の規定を満たすよう注意すること)。用時調製すること。

(3) 1 % 可溶性でん粉溶液

可溶性でん粉 1 g をビーカーに量り取り、約 30 mL の水に分散させ、沸騰している水約 70 mL にかき混ぜながら移し入れる。さらに透明になるまで加熱した後、塩化ナトリウム 5 g を加えて溶解し、冷却する。冷蔵庫にて保存する。

(4) 25 % 塩酸

濃塩酸 35 mL を水で希釈し、全量を 50 mL とする。

(5) 4 mol/L 水酸化ナトリウム溶液

水酸化ナトリウム 8.0 g を 100 mL 容三角フラスコに量り取り、氷冷しながら水 50 mL を加えて溶解する。

(6) 1 % フェノールフタレイン溶液

フェノールフタレイン 1.0 g を 100 mL 容メスフラスコに量り取り、エタノール 90 mL に溶解させた後、水を加えて定容する。

(7) 標準転化糖溶液 (ハーネス法用)

しよ糖 (試薬特級) 380 mg を量り取り、水を用いて 200 mL 容メスフラスコに移し入れ、水を加えて定容する。この 50 mL を 100 mL 容メスフラスコに正確に分取し、25 % 塩酸 5 mL を加えた後、(65±1) °C の恒温水浴中で正確に 20 分間反応させる。反応終了後直ちに流水中で冷却し、指示薬として 1 % フェノー

ルフタレイン溶液数滴を加えたうえで4 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で中和した後、水を加えて定容する。

(8) ハーネス溶液

A 液： フェリシアン化カリウム $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 8.25 g 及び無水炭酸ナトリウム 10.6 g をビーカー等に量り取り、水を用いて 1000 mL 容メスフラスコに移し入れ、水を加えて定容する。

2~3 日間冷暗所に静置した後、ろ紙によりろ過する。褐色瓶に保存し、保存中に沈殿が生じた場合は、ろ過した後使用する。

B 液： よう化カリウム 12.5 g、硫酸亜鉛 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 25 g 及び塩化ナトリウム 125 g をビーカー等に量り取り、水を用いて 500 mL 容メスフラスコに移し入れ、水を加えて定容する。褐色瓶に保存し、保存中に沈殿が生じた場合はろ過した後使用する。

C 液： 酢酸（純度 98 % 以上）5 mL を 100 mL 容メスフラスコに量り取り、水を加えて定容する。

(9) 0.1 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液

チオ硫酸ナトリウム ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 24.82 g をビーカー等に量り取り、水約 500 mL を用いて 1000 mL 容メスフラスコに移し入れ、さらに無水炭酸ナトリウム 2 g 及びイソアミルアルコール 10 mL を加えて溶解した後、水を加えて定容する。使用時に 10 倍に希釈して用いる。

(10) 0.1 mol/L よう素酸カリウム溶液

よう素酸カリウム (KIO_3) を 120~140 °C で 2 時間乾燥した後、デシケーター内で放冷する。その 3.567 g をビーカー等に量り取り、水を加えながら 1000 mL 容メスフラスコに移し入れ、水を加えて定容する。

(11) 除たんぱく剤

A 液： 硫酸亜鉛 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 2 g を水に溶解し、全量を 100 mL とする。

B 液⁽⁸⁾： 水酸化バリウム $[\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}]$ 1.8 g を水に溶解し、全量を 100 mL とする。

3.3.2 分析用検体の採取量 分析用検体の採取量は、糖含有量が 20 % 以下の試料では 5~10 g、糖含有量が 20~50 % の試料では 2 g、これ以上の糖含有量の試料では 1 g 程度とする。

3.3.3 検液の調製 以下の方法で調製するほか、上記 3.2.3 で調製したレイン・エイノン法用の検液を、適当な糖濃度となるように希釈して使用してもよい。

(A) 多量の油脂を含有する試料の前処理 チョコレートなど多量の油脂を含有する試料については、以下の処理を行った後、下記 (B) の (ii) 以降に従って操作を行う。

(i) 2. で調製した分析用検体の一定量（前記 3.3.2 に従うこと）をビーカー等に量り取り、約 150 mL の水を用いて 200 mL 容メスフラスコに移し入れる。

(ii) ヘキサン 20 mL を加え、約 10 分間軽く振り動かしながら油脂を抽出した後、しばらく静置し、ヘキサン層を駒込ピペット等で除去する。この操作をもう一度繰り返す。

(B) ショ糖の抽出

(i) 2. で調製した分析用検体の一定量（前記 3.3.2 に従うこと）をビーカー等に量り取り、約 150 mL の水を用いて 200 mL 容メスフラスコに移し入れる。

(ii) メスフラスコを十分に（約 1 時間）振とうしてショ糖を抽出した後、水を加えて定容する。

(iii) 不溶物を目視により確認できる場合は、(ii) の抽出液をろ紙によりろ過し、得られたろ液を下記 (C) 及び (D) の操作に供し、それ以外の場合は (ii) の抽出液を供する。

(C) 直接還元糖分定量用検液の調製

(i) 上記 (B) で調製した抽出液又はろ液 20 mL を 100 mL 容メスフラスコに正確に分取する。

(ii) 必要に応じて除たんぱく剤 A 液 5 mL を正確に加えてよく混合し、さらに除たんぱく剤 B 液 5 mL を正確

に加えてよく混合した後、水を加えて定容する。

- (iii) 再びよく混合し約 30 分間静置した後、ろ紙によりろ過し、得られたろ液を直接還元糖分定量用検液とする。

(D) 全糖分定量用検液の調製

(D-1) 酵素分解法

- (i) 上記(B)で調製した抽出液又はろ液 20 mL を 100 mL 容メスフラスコに正確に分取し、インベルターゼ溶液 3 mL を加えて混合し、(37±1) °C の恒温水浴中で 30 分間反応させる。
- (ii) 除たんぱく剤 A 液 5 mL を正確に加えてよく混合し、さらに除たんぱく剤 B 液 5 mL を正確に加えてよく混合した後、水を加えて定容する。
- (iii) 再びよく混合し約 30 分間静置した後、ろ紙によりろ過し、得られたろ液を全糖分定量用検液とする。

(D-2) 酸分解法

- (i) 上記(B)で調製した抽出液又はろ液 20 mL を 100 mL 容三角フラスコに正確に分取し、25 % 塩酸 1 mL を加え、(65±1) °C の恒温水浴中で正確に 20 分間加熱し、しょ糖を加水分解する。
- (ii) 分解液は直ちに流水中で冷却した後、指示薬として 1 % フェノールフタレイン溶液数滴を加えたうえで 4 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で中和する。
- (iii) 三角フラスコの内容物を 100 mL 容メスフラスコに移し入れ、三角フラスコの内部を水で洗浄し、洗液をメスフラスコに合する。
- (iv) 必要に応じて除たんぱく剤 A 液 5 mL を正確に加えてよく混合し、さらに除たんぱく剤 B 液 5 mL を正確に加えてよく混合した後、水を加えて定容する。
- (v) 再びよく混合し約 30 分間静置した後、ろ紙によりろ過し、得られたろ液を全糖分定量用検液とする。

3.3.4 滴定操作

(A) 0.1 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液の力価の標定⁽¹⁸⁾

0.1 mol/L よう素酸カリウム溶液 25 mL を 300 mL 容共栓付三角フラスコに正確に量り取り、水 50 mL、よう化カリウム 2 g 及び 3 mol/L 硫酸 5 mL を加え、密栓して 10 分間暗所に静置する。

次に、水 100 mL を加えて遊離したよう素を、標定しようとする 0.1 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液で滴定する。滴定中、三角フラスコをよく振り混ぜながら滴定し、溶液が淡黄白色に変色した時点（滴定の終点近く）で 1 % 可溶性でん粉溶液 3~4 滴を加えてさらに滴定を続け、でん粉による紫色が消失した時点を終点とする。

別に空試験を行い、空試験に要した 0.1 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液の滴定値 (mL) と、よう素酸カリウム溶液に要した滴定値 (mL) との差を M (mL) として、次式により力価を求める。数値は小数点以下第三位を四捨五入する。

$$\text{力価} = \frac{25}{M}$$

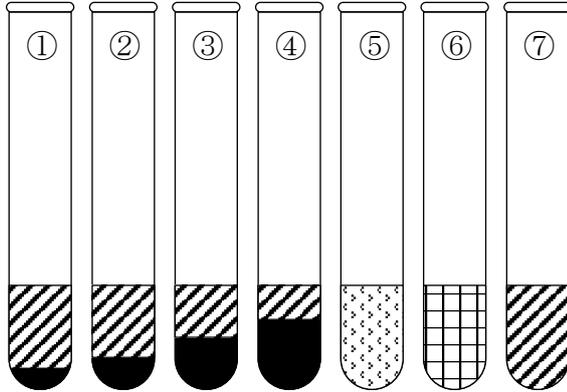
注 18) 全ての検液及び対照液を同一の 0.1 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液で滴定する場合は、力価の標定操作は不要である。その場合、力価は 1 として計算する。

(B) 検液及び対照液の滴定操作

標準転化糖溶液（ハーネス法用）0.5 mL、1 mL、2 mL 及び 3 mL を大型試験管（直径 2.5~3 cm）4 本に正確に量り取った後、いずれも全量が 5 mL となるよう水を加える。これらを検量線用検液とする。

次に、上記とは別に大型試験管 2 本を用意し、一方に直接還元糖分定量用検液 5 mL を、もう一方に全糖分定量用検液 5 mL を、それぞれ正確に量り取る⁽¹⁹⁾。

さらに、上記とは別に大型試験管を用意し、水⁽²⁰⁾ 5 mL を量り取ったものを対照液とする。



	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦
標準転化糖溶液 :	0.5	1	2	3	—	—	—
水 :	4.5	4	3	2	—	—	5 ⁽²⁰⁾
直接還元糖分定量用検液 :	—	—	—	—	5	—	—
全糖分定量用検液 :	—	—	—	—	—	5	—

(単位：mL)

各試験管にハーネス A 液 5 mL を正確に加え、よく混合した後、激しく沸騰している水浴中に置く。これを 15 分間正確に加熱した後、直ちに流水中で冷却する。次に、各試験管にハーネス B 液 5 mL を加えてよく混合し、さらにハーネス C 液 3 mL を加えて混合した後、直ちに 0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液 (0.1 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液を使用時に 10 倍に希釈する) で滴定する。滴定中、試験管をよく振り混ぜながら滴定を続ける。溶液が淡黄白色に変色した時点で 1% 可溶性でん粉溶液 3~4 滴を加えて更に滴定を続け、でん粉による紫色の呈色が消失した時点を終点とする。対照液についても同様に操作する。

注 19) 検液の糖濃度が高い場合には、検液の量を 5 mL 未満に変更してもよいが、その場合は大型試験管内の溶液の全量が 5 mL になるよう水を加える。

注 20) 対照液に用いる水は、除たんぱく剤 A 液及び B 液の濃度差による滴定値への影響を除くために、水を直接還元糖分定量用検液の調製法と同様に処理して、得られたろ液を用いる。

3.3.5 検量線の作成 次式により補正滴定値 C (mL) を算出し、縦軸に補正滴定値を、横軸に大型試験管中の糖量 (mg) をとり、しょ糖の検量線を作成する。

$$C = (T_R - T_I) \times F$$

ただし、 T_I : 標準転化糖溶液に要した 0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液の滴定値 (mL)

T_R : 対照液に要した 0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液の滴定値 (mL)

F : 0.1 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液の力価

3.3.6 しょ糖分の計算 次式により、全糖分定量用検液の補正滴定値 C_T (mL) 及び直接還元糖分定量用検液の補正滴定値 C_D (mL) を算出する。

$$C_T = (T_R - T_T) \times F$$

$$C_D=(T_R-T_D)\times F$$

ただし、 T_D : 直接還元糖分定量用検液に要した 0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液の滴定値 (mL)

T_R : 対照液に要した 0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液の滴定値 (mL)

T_T : 全糖分定量用検液に要した 0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液の滴定値 (mL)

F : 0.1 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液の力価

この数値を基に、前記の検量線を用いて各検液 5 mL 中の転化糖量を算出し、次式により試料中の全糖分、直接還元糖分及びしょ糖分を算出する。数値は小数点以下第二位を四捨五入する。

$$\text{全糖分 (\%)} = \frac{A \times V}{S} \times 100$$

$$\text{直接還元糖分 (\%)} = \frac{A' \times V'}{S'} \times 100$$

$$\text{しょ糖分 (\%)} = (\text{全糖分 (\%)} - \text{直接還元糖分 (\%)}) \times 0.95$$

ただし、 A : 全糖分定量用検液 5 mL 中の転化糖量 (mg)

A' : 直接還元糖分定量用検液 5 mL 中の転化糖量 (mg)

V : 全糖分定量用検液の希釈倍率 (5 (mL) / 大型試験管に分取した液量 (mL))

V' : 直接還元糖分定量用検液の希釈倍率 (5 (mL) / 大型試験管に分取した液量 (mL))

S : 全糖分定量用の試料の採取量 (mg)

S' : 直接還元糖分定量用の試料の採取量 (mg)

4. 参考文献

- (1) 京都大学農学部農芸化学教室編：農芸化学実験書、産業図書（1959）
- (2) 福井作蔵：還元糖の定量法、学会出版センター（1982）
- (3) 日本食品工業学会、食品分析法編集委員会編：食品分析法、光琳（1982）
- (4) L.R.Snyder、J.L.Glajch、J.J.Kirkland: 高速液体クロマトグラフィーの実際、東京化学同人
- (5) AOAC No.9（1960）
- (6) J.H.Lane and L Eynon: J.Soc.Chem Ind Jan.26.1923
- (7) Snell and snell: Colorimetric Methods of Analysis: 3rd Edition Vol.III
- (8) 増田靖子、徳島將光、五十嵐智大、松本啓嗣：関税中央分析所報、**60**, 11（2020）