

砂糖とデキストリンからなる砂糖調製品の還元糖分の定量分析法

この定量分析法は、砂糖とデキストリンからなる砂糖調製品で、関税率表第35類注2に規定されている「ぶどう糖として計算した還元糖の含有量」を求める必要があるものに適用する。

1. 試験方法の概略 この分析法は、砂糖とデキストリン(でん粉分解物)を含有する物品で、デキストリンに含まれているぶどう糖、麦芽糖等の還元糖分をぶどう糖として定量する場合に適用し、次の手順に従う。

- ① 水分の定量
- ② レイン・エイノン法による直接還元糖分の定量
- ③ レイン・エイノン法によるしょ糖分の定量
- ④ デキストリン分の定量
- ⑤ DE の算出

2. 試薬の調製及び力価の標定

2.1 ぶどう糖標準液(検量線用)の調製 ぶどう糖(特級) 約1 g を精ひょう、1,000 mL 容メスフラスコに移し入れ、水を加えて定容する。

2.2 標準ぶどう糖添加溶液の調製 ぶどう糖(特級) 約4 g を精ひょうし、100 mL 容メスフラスコに移し入れ、水を加えて定容する。

2.3 標準転化糖溶液及び試薬の調製

(1) 標準転化糖溶液

しょ糖(試薬) 4.75 g を精秤し、90 mL の水を使用して 500 mL メスフラスコに移し入れる。これに塩酸(比重 1.18) 5 mL を加え、20~30 °C で3日間放置したのち、水を加えて定容し、冷暗所に保存する。

その50 mL を200 mL 容メスフラスコにとり、フェノールフタレインを指示薬として1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で中和したのち、水で定容する。

これを標準転化糖溶液としてフェーリング溶液の力価の標定に用いる。

(2) 1% メチレンブルー溶液

メチレンブルー1 g を水に溶かして 100 mL とする。

(3) 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 を水に溶かして 500 mL とし、2日間放置後ろ過する。

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 を水に溶かして 500 mL とし、2日間放置後ろ過する。

2.4 フェーリング溶液の力価の標定 フェーリング溶液 A 液 5.0 mL 及び B 液 5 mL を 200 mL 容三角フラスコにとり、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分間沸とうさせたのち、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。滴定は沸とうし始めてから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⁽¹⁾。

力価は、次式により求められる。

$$\text{力価}^{(2)} = \frac{20.36}{A}$$

A : 消費した標準転化糖溶液の量(mL)

注 1) 3 回の平均値を滴定値とするが、各滴定値の差は 0.1 mL 以内とする。

注 2) 力価は、小数点以下第 4 位を四捨五入し、 1 ± 0.02 の範囲におさめる。

2.5 緩衝液及び酵素溶液の調製

2.5.1 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.6) 氷酢酸 6 g をビーカーにとり、水 100 mL に溶解する。この溶液を 5% 水酸化ナトリウム水溶液で pH 4.6 に調製後、1,000 mL 容メスフラスコに移し入れ、水で定容する。

2.5.2 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 4.8) 0.2 M 酢酸 80 mL に、0.2 M 酢酸ナトリウム 120 mL を加えて pH 4.8 に調製する。

2.5.3 インペルターゼ溶液 インペルターゼの力価が 1 mL 当たり 400 ユニットになるように 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.6) を用いて溶かす。

2.5.4 デキストリン定量用酵素溶液 グルコアミラーゼ (1,4- α -D-Glucan glucohydrolase EC 3.2.1.3) を力価が 1 mL 当たり 20 ユニット⁽³⁾ 及び α -アミラーゼ (α -1,4-Glucan 4-glucohydrolase EC 3.2.1.1) 80 ユニット⁽⁴⁾ になるように 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 4.8) を用いて溶解する⁽⁵⁾。

注 3) 1 ユニットは、可溶性でん粉を基質として、pH 4.5、40 °C で 30 分間に 10 mg のグルコースを生成する酵素量。

注 4) 1 ユニットは、可溶性でん粉を基質として、pH 6.0、40 °C で 1 分間に 0.18 mg のグルコースに相当する還元糖を生成する酵素量。

注 5) 力価又はユニットの定義の異なる酵素を使用する際には、試薬とうもろこしでん粉 50 mg を用いて、回収率が 100% となることを確認しておくこと。

2.5.5 ぶどう糖定量用キット 酵素反応を利用した市販のぶどう糖定量用キットを用いる。

2.6 除たんぱく剤

(1) A 液：硫酸亜鉛 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 2 g を水 100 mL に溶解する。

(2) B 液：水酸化バリウム ($\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) 1.8 g を水 100 mL に溶解する。

3. 試料の調製 分析試料は、その状態に応じて縮分法等適当な方法により調製する。結晶や粉体の混合物は粉碎機又はミキサー等で粉碎し、ペースト状又は湿ったものは乳鉢で均一にしたものを分析試料とする。いずれの場合も、比較的多量の試料を無作為に採取し、混合、粉碎し、均一にしなければならない。

4. 水分の定量 3. で調製した均一試料 約 2 g をあらかじめ恒量にしたひょう量びんに精ひょうし、減圧乾燥器で 70～75 °C、4 時間乾燥する。デシケーター中で室温まで放冷したのち、重量を量る。更に 1 時間ずつ減圧乾燥を繰り返して、減量が 2 mg 以下になった時を恒量に達したとみなす。

試料中の水分は次式により算出する。数値は小数点以下第 2 位を四捨五入する。

$$\text{水分(\%)} = \frac{W_0 - W_1}{W_0} \times 100$$

W_0 : 試料の採取量 (g)

W_1 : 乾燥後の試料の重量 (g)

5. 検体の調製 3. で調製した均一試料 15 g を精ひょうし、水に溶かして 500 mL 容メスフラスコに移し入れ水を加えて定容する。

6. 直接還元糖の定量

6.1 検液の調製 5. で調製した検体 100 mL を 200 mL 容メスフラスコにとり、更に 2.2 の標準ぶどう糖添加溶液 10 mL を加え、水を加えて定容する。

6.2 ブランク液の調製 2.2 の標準ぶどう糖添加溶液 10 mL を 200 mL 容メスフラスコにとり、しょ糖 約 2.5 g を加え、少量の水を加えてしょ糖を完全に溶かし、水を加えて定容する⁽⁶⁾。

注 6) このしょ糖の添加量は、試料の成分割合が「しょ糖 83%、デキストリン 17%」のときのものである。したがって、成分割合が異なる場合には、試料溶液とブランクのしょ糖濃度がほぼ同程度のように調製する。

6.3 滴定操作 フェーリング溶液 A 液 5.0 mL 及び B 液 5 mL を 200 mL 容三角フラスコにとり、50 mL 容ビュレットを用いて 6.1 で調製した検液 15 mL を加え、2.4 の要領に従って滴定する。これを予備滴定とする。

更に同様にして、予備滴定で得た滴定数よりも約 1 mL 少ない量の検液を加え、2.4 の要領に従って滴定する。

ここで得た検液の消費量にフェーリング溶液の力価を乗じて、実際の滴定量 X を算出する。この滴定量 X から 10. レイン・エイノン糖量表(ぶどう糖)を用いて直接還元糖濃度 D_s (mg/100mL) を求める。同様にブランク液を滴定し、その滴定量 X' から 10. レイン・エイノン糖量表(ぶどう糖)を用いて直接還元糖濃度 D_s' (mg/100mL) を求める。

D_s 及び D_s' から、次式により直接還元糖分(%)を求める。

$$\text{直接還元糖分(\%)} = \frac{D_s - D_s'}{S} \times \frac{500}{100} \times \frac{200}{100} \times 100$$

D_s : 10. レイン・エイノン糖量表(ぶどう糖)を用いて求めた検液 100 mL 中の直接還元糖量(mg)

D_s' : 10. レイン・エイノン糖量表(ぶどう糖)を用いて求めたブランク液 100 mL 中の直接還元糖量(mg)

S : 5. で精秤した試料の重量(mg)

7. しょ糖分の定量

7.1 転化操作 5. で調製した検体 20 mL を 200 mL 容メスフラスコに分取し、インペルターゼ溶液 1 mL を加え、37 °C の恒温槽で 30 分間酵素分解させた後、除たんぱく剤 A 液 5 mL 及び B 液 5 mL を順次加えてよく混合し、水を加えて 200 mL に定容する。これをろ過してしょ糖分の定量用検液とする。

7.2 滴定操作及びしょ糖分の算出 7.1 の検液を 6.3 の操作に準じて滴定し、10. レイン・エイノン糖量表〔転化糖(無しょ糖)〕により転化糖濃度 T (mg/100mL) を求め、次式により転化糖分(%)を求める。

$$\text{転化糖分(\%)} = \frac{T}{S} \times \frac{500}{20} \times \frac{200}{100} \times 100$$

T : 10. レイン・エイノン糖量表〔転化糖(無しょ糖)〕を用いて求めた検液 100 mL 中の転化糖量(mg)

S : 5. で精ひょうした試料の重量(mg)

次に、6.3 で得られた滴定量(X 及び X')より、10. レイン・エイノン糖量表〔転化糖(無しよ糖)〕を用いて、直接還元糖濃度 DRs (mg/100mL) 及び DRs' (mg/100mL) を求め、次式によりデキストリン中の直接還元糖分(転化糖として) A (%) を算出する⁽⁷⁾。

$$A(\%) = \frac{DRs - DRs'}{S} \times \frac{500}{100} \times \frac{200}{100} \times 100$$

DRs : 10. レイン・エイノン糖量表〔転化糖(無しよ糖)〕を用いて求めた検液 100 mL 中の直接還元糖量(mg)

DRs' : 10. レイン・エイノン糖量表〔転化糖(無しよ糖)〕を用いて求めたブランク液 100 mL 中の直接還元糖量(mg)

S : 5. で精秤した試料の重量(mg)

$$\text{しよ糖分}(\%) = \{\text{転化糖分}(\%) - A(\%)\} \times 0.95$$

注7) デキストリン中の直接還元糖分を2種類求めるのは、DE の算出がぶどう糖として算出するのに対し、しよ糖分の測定は転化糖として算出するためである。

8. デキストリン分の定量

8.1 分解操作 5. で調製した検体 2 mL を 100 mL 容メスフラスコにとり、デキストリン定量用酵素溶液 5 mL を加え、37℃ の恒温槽中で2時間酵素分解させたのち、除たんぱく剤 A 液 5 mL 及び B 液 5 mL を順次加えてよく混合し、水を加えて定容する。これをろ過してデキストリン分の定量用検液とする。

8.2 ぶどう糖検量線の作成 100 mL 容メスフラスコに、2.1 のぶどう糖標準溶液を正確に 5 mL、10 mL、15 mL、20 mL 及び 25 mL をそれぞれとり、水を加えて定容し検量線用検液とする。

2.5.5 の市販のぶどう糖定量用キット(例えば、グルコースオキシダーゼーペルオキシダーゼ系のもの)を用いて検量線用検液のぶどう糖濃度(mg/mL)と吸光度の関係から検量線を作成する。なお、検量線の作成は、8.3 の定量操作と同時に行う。

8.3 ぶどう糖の定量及びデキストリン分の算出 2.5.5 のぶどう糖定量用キットを用いて 8.1 で調製した検液のぶどう糖を定量し、8.2 により作成した検量線から試料検液のぶどう糖濃度(mg/mL)を求め、次式によりデキストリン分(%)を算出する^(8, 9)。

$$\text{デキストリン分}(\%) = \frac{\text{ぶどう糖濃度} \times 0.9 \times \text{希釈倍率}}{S} \times 100$$

S : 5. で精ひょうした試料の重量(mg)

注8) デキストリン分は、ぶどう糖(%) × 0.9 とみなし算出する。

注9) デキストリンの値はバランスとして算出してもよいが、この場合、デキストリン分は、次式によって算出する。

$$\text{デキストリン分}(\%) = 100 - \{\text{しよ糖分}(\%) + \text{水分}(\%)\}$$

ただし、添付資料や成分組成表と異なり、疑義がある場合には直接測定する。

9. DE の算出 6.3 及び 8.3 で得られた値を用いて試料の乾燥状態におけるぶどう糖として計算した還元糖の含有率は次式により算出する。数値は、小数点以下第 2 位を四捨五入する。

$$DE = \frac{\text{デキストリン中の直接還元糖分(\%)}}{\text{デキストリン分}} \times 100$$

DE：試料の乾燥状態におけるぶどう糖として計算した還元糖の含有量(%)

10. レイン・エイノン糖量表

糖液 所要量 (mL)	糖類		糖液 所要量 (mL)	糖類	
	転化糖(無し糖) mg/100mL	ぶどう糖 mg/100mL		転化糖(無し糖) mg/100mL	ぶどう糖 mg/100mL
15	336	327	36	143.9	140
16	316	307	37	140.2	136.4
17	298	289	38	136.6	132.9
18	282	274	39	133.3	129.6
19	267	260	40	130.1	126.5
20	254.5	247.4	41	127.1	123.6
21	242.9	235.8	42	124.2	120.8
22	231.8	225.5	43	121.4	118.1
23	222.2	216.1	44	118.7	115.5
24	213.3	207.4	45	116.1	113
25	204.8	199.3	46	113.7	110.6
26	197.4	191.8	47	111.4	108.4
27	190.4	184.9	48	109.2	106.2
28	183.7	178.5	49	107.1	104.1
29	177.6	172.5	50	105.1	102.2
30	171.7	167			
31	166.3	161.8			
32	161.2	156.9			
33	156.6	152.4			
34	152.2	148			
35	147.9	143.9			

11. 参考文献

- (1) 二国二郎監修：澱粉科学ハンドブック，朝倉書店（昭和 52 年）
- (2) 中村道德，貝沼圭二：澱粉・関連糖質実験法，学術出版センター