

## ノート

## ハーネス法によるしょ糖及び還元糖定量用の 除たんぱく剤の選択

関川義明，加藤時信\*

On the Selection of Deproteinizing Agent for Determination of  
Sucrose and Reducing Sugar by Hanes method

Yoshiaki SEKIKAWA and Tokinobu KATO\*

\*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance  
531, Iwase, Matsudo-Shi, Chiba-Ken, 271 Japan

The selection of deproteinizing agent for the determination of sugars coexisting with proteins is very important. In the case of Hanes method using ferricyanide reagent ( $\text{Fe}^{3+}$ ), tungstate have been recommended in the literatures. But, practically, there would be some troublesome regarding to pH region of the test solution since tungstate agent was prepared to just acidic with certain concentrated sulfic acid. Under these circumstances, a part of sucrose was converted into invert sugar.

As contrast above, a deproteinizing agent consisting of zinc sulfate and barium hydroxide had no influence on the determination of sugars at all under the condition of deproteinization. The most efficient deproteinizing ability of this agent was obtained when pH of the test solution was maintained around to neutral, lower concentration of neutral salts in the solution and bulky white precipitation was formed.

It was found that the deproteinizing agent consisting of zinc sulfate and barium hydroxide was useful one for the determination of sugars by Hanes method.

- Received August 2, 1985 -

---

\* 大蔵省關税中央分析所 〒271 千葉県松戸市岩瀬 531

## 1 緒 言

最近、天然物、農産品、加工食品、さらに通称健康食品と呼ばれている健康指向型食品などの輸入量は増加する傾向にあり、特に後者の2つのものはその傾向が強くなっている。これらの商品の関税行政における取扱いは、商品の調製の有無、さらにその程度により異なっている。例えば代表的な一例として、しょ糖の含有量により関税率表上の取扱い及び輸入制度上の取扱いが異なる商品もある。また、ある種の商品では還元糖（乳糖）の含有量により、関税率表上の取扱いが異なっている。

以上のように、輸入される農水産品や食品の適切な関税率表分類及び輸入制度上の取扱いに当たって、しょ糖、乳糖などの少糖類の含有量を正確に把握することは非常に重要である。

輸入される天然物、農産品、食品関連商品には、通常相当量のたんぱく質を含有している場合が非常に多い。一般に、たんぱく質の存在は少糖類の定量操作の妨害となる場合が多いので、適当な方法で予めたんぱく質を除去する必要がある。この際使用する除たんぱく剤は、少糖類の定量操作を妨害しないものを選択する必要がある。

税関分析においては、除たんぱく操作後少糖類の定量をハーネス法<sup>1)</sup>より行うことが多い。本報では、このハーネス法に適した除たんぱく剤の選択を目的として検討した。

今回検討した除たんぱく剤は、タンゲステン酸塩系のもの2種類<sup>2), 3)</sup>及び硫酸亜鉛・水酸化バリウム系<sup>4)</sup>のものである。前者は鉄試薬による少糖類の定量に推奨されている除たんぱく剤である<sup>5)</sup>。特に、タンゲステン酸塩系の除たんぱく剤は硫酸酸性状態になるため、この除たんぱく剤を使用した場合のしょ糖の転化の有無、硫酸亜鉛・水酸化バリウム系の除たんぱく剤はハーネス法による少糖類の定量操作に影響を及ぼすのか、さらにどのような条件にしたら効果的な除たんぱく能が発揮できるのかを中心に基礎的な検討を行ったので報告する。

## 2 実 験

### 2.1 試薬

- ・少糖類：ぶどう糖、果糖、転化糖（しょ糖を希塩酸で加水分解して得たもの）、麦芽糖、乳糖（以上、和光純薬社製）
- ・たんぱく質：カゼイン（ミルク）（和光純薬社製）
- ・ハーネス法試薬：常法<sup>1)</sup>により和光純薬社製の試薬を使用して調製した。

### 2.2 除たんぱく剤

下記の3種類の除たんぱく剤は、和光純薬社製の試薬を使用して調製を行った。

- (1) 10% (W/V) タングステン酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) と 2/3 標定硫酸を 1:1 の割合で各々 5ml を混合して使用する<sup>2)</sup>。
- (2) タングステン酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 7g を 870ml の水に溶かし、88% (W/V) オルトリン酸 0.1ml 及び 1 標定硫酸 70ml を加えて調製<sup>3)</sup>したものを作り 10ml 使用する。
- (3) 2% (W/V) 硫酸亜鉛 ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) と 1.8% (W/V) 水酸化バリウム ( $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ) を 1:1 の割合で各々 5ml を混合して使用する<sup>4)</sup>。

### 2.3 各種除たんぱく剤を使用した場合のハーネス法により求めた糖量と N/100 チオ硫酸ナトリウム消費量の関係

数種の濃度で調製したぶどう糖溶液に、2.2 の除たんぱく剤をそれぞれ使用して、ぶどう糖量とハーネス法による滴定で消費された N/100 チオ硫酸ナトリウム溶液の関係を求めた。

果糖、転化糖、麦芽糖及び乳糖についても同様の関係を求めた。

### 2.4 しょ糖の各種除たんぱく剤による転化の有無

一定濃度のしょ糖溶液に、2.2 の除たんぱく剤をそれぞれ一定量添加して、一定時間毎に一定量を分取してハーネス法により生成した転化糖の定量を行い、しょ糖の分解率を求めた。

## ノート ハーネス法によるしょ糖及び還元糖定量用の除たんぱく剤の選択

### 3 結果と考察

#### 3.1 各種除たんぱく剤を使用した場合のハーネス法により求めた糖量と N/100 チオ硫酸ナトリウム消費量の関係

Table 1 に 2.2 の各種除たんぱく剤を使用した場合の、各種少糖類について、糖量とハーネス法による N/100 チオ硫酸ナトリウム消費量の関係を回帰直線の式と相関係数で示した。なお、除たんぱく剤を含まないもの、つまり糖水溶液についても同様の結果を示した。

いずれの除たんぱく剤を使用した場合も、糖水溶液の場合と同様に各々の少糖類において、回帰直線の式の傾きはほぼ類似しており、ほぼ原点を通る直線で、糖量と N/100 チオ硫酸ナトリウム消費量の間の相関係数(*r*)はいずれもほぼ *r* = 1 で非常に強い相関関係を示した。

鉄試薬による少糖類の定量法における除たんぱく剤として、10% (W/V) タングステン酸ナトリウムと 2/3 規定硫酸を 1:1 の割合で混合して使用することを推奨<sup>5</sup>しているが、硫酸亜鉛・水酸化バリウム系の除たんぱく剤を使用しても、ほとんど影響がない結果が得られた。

今回の実験で使用した 2% (W/V) 硫酸亜鉛・1.8% (W/V) 水酸化バリウム系の除たんぱく剤は、各々 5ml を添加して全量を 100ml に定容し、生成した沈澱をろ過した後、ハーネス法により測定を行った。この際、添加する硫酸亜鉛溶液及び水酸化バリウム溶液の量は、ほぼ化学量論的に反応 ( $ZnSO_4 + Ba(OH)_2 \rightarrow Zn(OH)_2 + BaSO_4$ ) が進行する量である。

あるが、遊離の亜鉛イオンの濃度を原子吸光光度法により求めたところ、27ppm という非常に少ない値が得られた。ハーネス法の基本反応は、アルカリに煮沸条件下でフェリシアネイトが還元糖によりフェロシアネイトに還元され、残存するフェリシアネイトを定量することにより糖量を求める方法である。この際、硫酸亜鉛・水酸化バリウム系の除たんぱく剤を使用した場合、遊離の亜鉛イオンが糖定量誤差の要因にならないかという問題があるが、遊離の亜鉛イオンはフェロシアネイトイオンと反応し、フェリシアネイトイオンには反応しないのでこの際除たんぱく剤はハーネス法による糖定量を妨害しない。

一方、Park - Johnson 法(比色法)<sup>6</sup>は、アルカリ性煮沸条件下でフェリシアネイトが還元糖によりフェロシアネイトに還元され、還元されたフェロシアネイトをブルシアン青に導いて比色定量するものである。フェロシアネイトイオンと亜鉛イオンの条件生成定数は非常に大きく、水に不溶の沈殿性の化合物 ( $Zn_3[Fe(CN)_6]_{\frac{1}{2}}$ ) を生成する。そのため、硫酸亜鉛・水酸化バリウム系の除たんぱく剤を使用した場合、遊離の亜鉛イオンの濃度により誤差の値は変動する。

還元糖の定量法<sup>5</sup> P173 の水酸化亜鉛法(Somogyi 法)の項に記載されている、鉄試薬による還元糖の定量には硫酸亜鉛・水酸化バリウム系の除たんぱく剤を用いてはいけないという原因是、Park - Johnson 法による定量の際には使用してはいけないと解すべきで、ハーネス法には前記した理由及び実験結果より、影響しないといえる。

Table 1 Regression equations and coefficients of correlation of reducing sugars determined by Hanes method using several deproteinizing agents

|   | <u>Glucose</u><br>$Y = ax + b$ | <u>Fructose</u><br>$Y = ax + b$ | <u>Invert sugar</u><br>$Y = ax + b$ | <u>Maltose</u><br>$Y = ax + b$ | <u>Lactose</u><br>$Y = ax + b$ |
|---|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| A | $Y = 0.328x + 0.042$ 0.9999    | $Y = 0.317x + 0.005$ 0.9999     | $Y = 0.322x + 0.026$ 0.9999         | $Y = 0.418x + 0.022$ 0.9999    | $Y = 0.447x - 0.008$ 0.9999    |
| B | $Y = 0.326x + 0.029$ 0.9999    | $Y = 0.316x + 0.013$ 0.9999     | $Y = 0.323x + 0.027$ 0.9999         | $Y = 0.425x + 0.014$ 0.9999    | $Y = 0.442x - 0.024$ 0.9999    |
| C | $Y = 0.287x + 0.065$ 0.9999    | $Y = 0.312x + 0.005$ 0.9999     | $Y = 0.311x + 0.030$ 0.9999         | $Y = 0.401x + 0.022$ 0.9999    | $Y = 0.444x + 0.013$ 0.9999    |
| D | $Y = 0.322x + 0.037$ 0.9999    | $Y = 0.311x + 0.020$ 0.9999     | $Y = 0.314x + 0.035$ 0.9999         | $Y = 0.417x - 0.002$ 0.9999    | $Y = 0.440x + 0.017$ 0.9999    |

A: Sugar solution only

B: Deproteinizing agent [ 2% (W/V)  $ZnSO_4$  : 1.8% (W/V)  $Ba(OH)_2$  = 1:1 ], each 5 ml was added.

C: Deproteinizing agent [ 10% (W/V)  $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$  : 2/3  $NH_2SO_4$  = 1:1 ], each 5 ml was added.

D: Deproteinizing agent [  $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$  0.7g, 88% (W/W)  $H_3PO_4$  0.1 ml in 1  $N H_2SO_4$  70 ml and  $H_2O$  870 ml ], 10 ml was added.

### 3.2 各種除たんぱく剤によるショ糖の転化の有無

選択の対照とした3種類の除たんぱく剤について、ショ糖の転化性の有無を検討した結果をTable2に示した。硫酸亜鉛・水酸化バリウム系の除たんぱく剤を添加した時の液性はほぼ中性であり、ショ糖の転化は認められなかった。2種類のタンゲステン酸塩系の除たんぱく剤は、いずれも硫酸酸性溶液であることから、ショ糖の転化の可能性について検討を行った。いずれの場合も、ショ糖の転化糖への分解率は少ないと、転化される事が明らかになった。

したがって、ショ糖を含有するものについては、タンゲステン酸塩系の除たんぱく剤を使用した場合には、正確なショ糖の含有量を得ることはできない。緒言にも述べたように、関税行政において、輸入される食品関連商品にとって、ショ糖の正確な含有量は非常に重要な要素のひとつであるので、タンゲステン酸塩系の除たんぱく剤の使用は好ましくなく、硫酸亜鉛・水酸化バリウム系の除たんぱく剤を使用することが望ましい。

以後の実験は、硫酸亜鉛・水酸化バリウム系の除たんぱく剤について検討を行った。

Table 2 Rate of decomposition of sucrose in the presence of deproteinizing agents

| Time<br>(hour)* | B<br>(%) | C<br>(%) | D<br>(%) |
|-----------------|----------|----------|----------|
| 1               | 0        | 0.3      | 0.4      |
| 2               | 0        | 0.4      | 0.5      |
| 4               | 0        | 0.9      | 0.7      |
| 6               | 0        | 1.3      | 1.0      |

\*Elapsed hour after mixing deproteinizing agent into sugar solution

B, C and D are same deproteinizing agent cited in Table 1.

### 3.2 硫酸亜鉛・水酸化バリウム系の除たんぱく剤の混合比を変化させた場合の影響

通常は、2% (W/V) 硫酸亜鉛溶液と 1.8% (W/V) 水酸化バリウム溶液を 1:1 (各々 5ml 添加) の割合で混合して使用される。密栓をほどこしても水酸化バリウム溶液は、空気中の炭酸ガスと

反応しやすく、炭酸バリウムとなって沈澱し、水酸化バリウム濃度が変化するので、その影響について検討を行った。

Table 3 は混合比を 1.1:1, 0.9:1 と変え、ぶどう糖を用いて糖量と N/100 チオ硫酸ナトリウム消費量の関係を、回帰直線の式と相関係数を示したものである。なお、除たんぱく剤を含まない糖水溶液のもの及び混合比が 1:1 のものの値も記載した。

Table 3 Regression equation of glucose determined after changing the ratio of zinc sulfate and barium hydroxide

| Ratio | $Y = ax + b$         | r      |
|-------|----------------------|--------|
| 1:1   | $Y = 0.329x + 0.061$ | 0.9999 |
| 1.1:1 | $Y = 0.321x + 0.021$ | 0.9999 |
| 0.9:1 | $Y = 0.325x + 0.021$ | 0.9999 |
| A     | $Y = 0.328x + 0.042$ | 0.9999 |

A is same cited in Table 1.

いずれの混合比の場合も、除たんぱく剤を含まない糖水溶液の場合と同様に、回帰直線の式の傾きはほぼ類似しており、ほぼ原点を通る直線で、糖量と N/100 チオ硫酸ナトリウム消費量の間の相関係数 (r) はいずれもほぼ r = 1 で、非常に強い相関関係を示した。

したがって、わずかの濃度変化、あるいは添加操作を非常に厳密に行わなくても、影響がないものと考えられる。

### 3.3 硫酸亜鉛・水酸化バリウム系の除たんぱく剤の添加量を変化させた場合の影響

2% (W/V) 硫酸亜鉛溶液と 1.8% (W/V) 水酸化バリウム溶液の混合比を 1:1 にして、添加量をそれぞれ 5ml, 10ml, 15ml と変化させた場合の影響について検討を行った。なお、除たんぱく剤を含まない糖水溶液のものの値も記載した。Table4 は、乳糖を用いて実験を行った結果を示した。乳糖は、緒言にも述べたように関税行政上重要な要素のひとつであり、また乳製品のひとつであるホエイの含有量を算出する際に、基準成分のひとつとして使用する場合があるので、乳糖を用いて実験を行つ

### ノート ハーネス法によるショ糖及び還元糖定量用の除たんぱく剤の選択

た。いずれの混合量の場合でも、回帰直線の式の傾きはほぼ類似しており、ほぼ原点を通る直線で、糖量と N/100 チオ硫酸ナトリウム消費量の間の相関係数(*r*)はいずれもほぼ *r* = 1 で非常に強い相関関係を示した。

したがって、たんぱく質の含有量により、2% (W/V) 硫酸亜鉛及び 1.8% (W/V) 水酸化バリウムの添加量を任意に変えて影響しないことが明らかとなった。

Table 4 Regression equation of lactose determined after changing the volumne of zinc sulfate·barium hydroxide agent (ratio = 1:1)

| Volume | $Y = ax + b$         | <i>r</i> |
|--------|----------------------|----------|
| 5 ml   | $Y = 0.442x - 0.025$ | 0.9999   |
| 10 ml  | $Y = 0.430x + 0.021$ | 0.9999   |
| 15 ml  | $Y = 0.429x + 0.022$ | 0.9999   |
| A      | $Y = 0.447x - 0.008$ | 0.9999   |

A is same cited in Table 1.

### 3.5 除たんぱく能の最適条件について

硫酸亜鉛・水酸化バリウム系の除たんぱく剤は、水酸化亜鉛のかさ高い大きな沈殿と副成する硫酸バリウムとで、溶液内に存在するたんぱく質を包みこんで除去するものである。したがって、いかにしてかさ高い大きな沈殿を生成するかが重要な問題である。

そこで、中性塩（塩化ナトリウム）濃度と溶液の液性（pH）について検討を行った。

塩化ナトリウムの濃度を 0.59/100ml から 59/100ml まで段階的に変化させたものに 2% (W/V) 硫酸亜鉛溶液及び 1.8% (W/V) 水酸化バリウム溶液を各々 5ml を添加して沈殿の生成状態を観察した結果、塩化ナトリウムの濃度が高くなるにしたがい、沈殿の生成量が減少していく、それに伴ない沈殿の状態はかさ高さは減少していく。その傾向は、0.59/100ml の濃度から認められた。

溶液の液性（pH）がアルカリ性の場合は、沈殿の生成量は非常に少なく、また沈殿の状態は非常に微粒子であり、沈降速度が非常に遅かった。酸性の

場合は、微粒子で沈降性の非常に悪い（少なくとも 5 時間は全く沈降しなかった）沈殿を生成した。

したがって、硫酸亜鉛・水酸化バリウム系の除たんぱく剤を使用する場合は、溶液中の中性塩濃度を可能な限り低くし、さらに液性をほぼ中性（pH 6~8 程度）に調整することが望ましい。特に、溶液の液性が強く影響するものと考えられる。

### 3.6 繰返し実験結果

Table 5 に硫酸亜鉛・水酸化バリウム系の除たんぱく剤を使用し、たんぱく質を含む場合と不含まない場合について、繰返し実験を行った結果の一例を示した。2% (W/V) 硫酸亜鉛と 1.8% (W/V) 水酸化バリウムを 1:1 の割合で各々 5ml 添加後 100ml に定容し、一定量を分取してハーネス法により測定を行った。なお、溶液中の中性塩（塩化ナトリウム）濃度は零で、たんぱく質を含む場合はカゼインを糖量の約 20 倍量（重量割合）を添加した。

いずれの場合も非常に再現性の良い値が得られ、たんぱく質による影響は認められなかった。これは、除たんぱく効果が十分にあったことを示唆する。

Table 5 Comparison of lactose content determined by Hanes method in the presence of protein using zinc sulfate·barium hydroxide deproteinizing agent

| No.                      | A       | B       |
|--------------------------|---------|---------|
| 1                        | 50.3 mg | 50.1 mg |
| 2                        | 50.1    | 49.6    |
| 3                        | 50.0    | 50.3    |
| 4                        | 49.8    | 50.1    |
| 5                        | 50.2    | 50.4    |
| Average                  | 50.08   | 50.10   |
| Standard deviation       | 0.1721  | 0.2757  |
| Coefficient of variation | 0.3435  | 0.5503  |

lactose taken : 50.0mg

A : In the absence of protein, but deproteinizing treatment was done with  $ZnSO_4 \cdot Ba(OH)_2$  agent.

B : In the presence of protein, which was deproteinized with  $ZnSO_4 \cdot Ba(OH)_2$  agent before determination was carried out.

#### 4 要 約

ハーネス法によるしょ糖及び還元糖を含む場合の，定量の際にどのような除たんぱく剤を選択すべきかを検討した。タンゲステン酸塩系の除たんぱく剤は，試料溶液を硫酸酸性にするのでしょ糖が転化され，正確なしょ糖の含有量が得られない。硫酸亜鉛・水酸化バリウム系の除たんぱく剤は液性がほぼ中性

であるので，しょ糖の転化は認められず，また，数種の還元糖のハーネス法による定量操作には全く妨害しないことが明らかになった。硫酸亜鉛・水酸化バリウム系の除たんぱく剤を使用する場合，溶液中の中性塩濃度を可能な限り低くし，液性をほぼ中性に調整すると非常にかさ高い大きな沈殿が生成し，有効な除たんぱく効果を示すことが判明した。

#### 文 献

- 1) C. S. Hanes : Biochem. J. (London), 23, 99 ( 1929 )
- 2) O. Folin, H. Wu : J. Biol. Chem., 38, 81 ( 1919 )
- 3) 渡辺篤二ら編：食品分析法，P197 . 光琳 ( 1982 )
- 4) M. Somogyi : J. Biol. Chem., 86, 655 ; 87, 339 ( 1930 )
- 5) 福井作蔵：還元糖の定量法，学会出版センター ( 1982 )
- 6) J. T. Park, M. J. Johnson : J. Biol. Chem., 181, 149 ( 1949 )