

第6章

炭水化物及び有機酸

40 でん粉，単糖，二糖

40-1. 高速液体クロマトグラフ法（単糖，二糖）

適用

食品全般に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

高速液体クロマトグラフ：示差屈折率検出器付き（注1）

カラム：アミノプロピル基を結合させたシリカゲルを充填したカラム

超音波洗浄器

ロータリーエバポレーター

遠心分離機

全量フラスコ

遠心管

(2) 試薬

標準品：水分を測定し（注2），無水物に換算する（例：D（+）-グルコース 試薬特級）。

アセトニトリル：高速液体クロマトグラフ用又は残留農薬・PCB 試験用

石油エーテル：特級

50 % (v/v) エタノール：99.5 % (v/v) エタノール（特級）-水（1：1）

10 % (w/v) 水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム（特級）10 g を水で100 mL にしたもの

標準溶液の調製：標準品約100 mg を採取し，水で25 mL に定容する。この液を2, 5及び10 mL 採取して，水で20 mL に定容する（注3）。

(3) 操作

1) 基本操作

容量50 mL ビーカーに試料（0.5～5 g）を正確にはかりとり（*W*），水約30 mL を加え，液性が酸性の場合には10 % (w/v) 水酸化ナトリウム溶液で中和する（注4）。30分間超音波抽出した後，全量を容量50 mL（*V*）全量フラスコに移して水で定容する。不溶物がある場合はろ紙でろ過し，ろ液をメンブランフィルター（0.45 μm）でろ過して試料溶液とする（注5）。

2) たんぱく質又は多糖類を多く含む試料の場合

水の代わりに50 % (v/v) エタノールを用いて1)と同様の操作を行う。ただし，試料溶液はロータリーエバポレーターで減圧乾固した後，水に再溶解したものとする（注6）。

3) 脂質を多く含む試料の場合

容量50 mL 遠心管に試料（0.5～5 g）を精密にはかりとる（*W*）。これに石油エーテル40 mL を加えて，ときどき攪拌しながら15分間放置した後，遠心分離（2000回転/分，10分間）して上澄み液を傾斜法により除去する。この脱脂操作を再度繰り返した後，40℃の水浴中で残存する石油エーテル分を完全に蒸散させる。得られた残留物について，1)又は2)と同様の操作を行う。

4) 高速液体クロマトグラフィー

[操作条件例]

カラム：シリカ系アミノカラム（例えば，Inertsil NH 2，内径3.0 mm，長さ150 mm）（注7）

移動相：アセトニトリル-水（8：2）（注8）

検出器：示差屈折率検出器

流速：0.7 mL/分

温度：室温

注入量：5 μL

(4) 測定

試料溶液を上記条件の高速液体クロマトグラフに注入し，各糖のピーク高さ又は面積を測定する。同様に標準溶液を注入し，検量線を作成する。

(5) 計算

$$\text{糖含量 (g/100 g)} = \frac{C \times V \times D \times 100}{W \times 1000}$$

C：検量線より求めた各糖類の濃度（mg/mL）

V：定容量（mL）

W：試料採取量（g）

D：希釈倍数

注 解

（注1）糖の検出には，示差屈折率検出器のほかに蛍光検出器（蛍光誘導体化が必要）又はパルス電気化学検出器なども利用できる。

（注2）カールフィッシャー法により測定する。標準品が少量の場合は，減圧加熱乾燥法（例えば60℃，5時間）で乾燥したものをを用いる。

（注3）標準溶液の濃度は，使用する検出器の感度を考慮して設定する。

（注4）酸性のまま抽出すると糖が一部分解してしまうおそれがあるため，あらかじめpH 5～7に調整する。また，水酸化ナトリウムの濃度は適宜変更する。

（注5）検量線の範囲内となるように，水で希釈，又はロータリーエバポレーターを用いて濃縮する。

（注6）溶媒の種類はクロマトグラムのピーク高さに影響するので，試料溶液と標準溶液の溶媒を統一する。

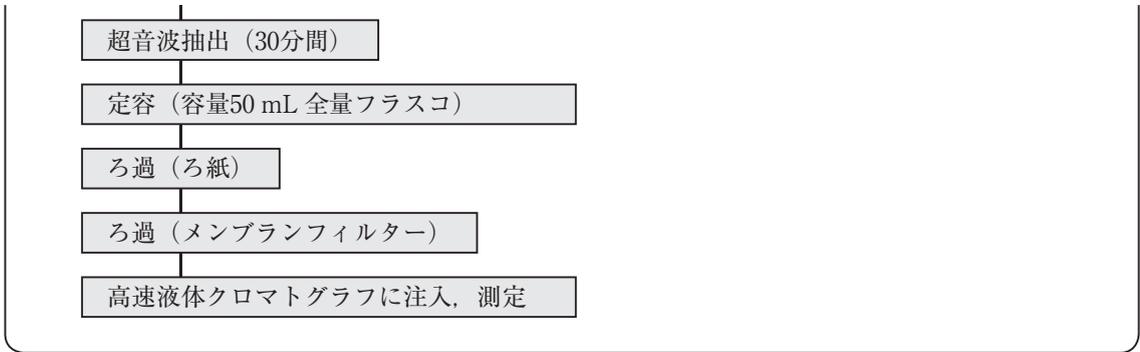
（注7）例えば，Shodex Asahipak NH 2 P-50 4 E，内径4.6 mm，長さ250 mmなどのポリマー系アミノカラムも使用可能。

（注8）シリカ系アミノカラムは徐々に溶出時間が短くなるので，溶出時間をほぼ一定に保つように混合比率を調整する。

単糖，二糖定量法・フローチャート (抽出溶媒が水の例)

試料を容量50 mL ビーカーに採取 (0.5～5 g)

中和：水 約30 mL



40-2. 酵素法 (でん粉)

適用

食品全般に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

分光光度計
遠心分離機
ボルテックスミキサー
沸とう水浴
恒温水槽
全量フラスコ
試験管
マイクロピペット

(2) 試薬

80 % (v/v) エタノール：95 % エタノール (特級) 80 mL を水で95 mL にしたもの。

3-(N-モルホリノ) プロパンスルホン酸緩衝液 (50 mM, pH 7.0)：900 mL の水に, 11.55 g の 3-(N-モルホリノ) プロパンスルホン酸ナトリウム塩 (純度99.5 % 以上) を溶解し, 1 mol/L 塩酸 (容量分析用) を用いて pH 7.0に調整する。0.74 g の塩化カルシウム二水和物 (特級) を加えて溶解し, 水で1 Lにしたもの。

耐熱性アミラーゼ溶液：Total Starch Assay Kit (Megazyme 社製) 付属の Bottle 1 を 3-(N-モルホリノ) プロパンスルホン酸緩衝液で30倍に希釈したもの。

200 mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液：900 mL の水に氷酢酸 (特級) 11.8 mL を加え, 1 mol/L 水酸化ナトリウム (容量分析用) で pH 4.5に調整したもの。

アミログルコシダーゼ溶液：Total Starch Assay Kit 付属の Bottle 2

グルコース標準溶液 (1.0 mg/mL)：Total Starch Assay Kit 付属の Bottle 5

GOPOD 溶液：Total Starch Assay Kit 付属の Bottle 3 を水で1 Lとした溶液に, Total Starch Assay Kit 付属の Bottle 4 を加え溶解したもの。

(3) 操作 (注1)

1) 抽出

試料90~100 mg (W) を試験管に採取し, 80 % (v/v) エタノール10 mL を加え, 80℃で10分間加温する。加温後, 遠心分離 (1000 × g, 10分間) し, 上澄みを除去する。沈澱物に, さらに80 % (v/

v) エタノール10 mL を加え、同様の操作をもう1回繰り返し、上澄みを除去する。

得られた沈澱物に、80 % (v/v) エタノール0.2 mL を加え、試料がよくなじむようにボルテックスミキサーを用いて激しく攪拌する。耐熱性アミラーゼ溶液3 mL を加え、ボルテックスミキサーを用いて攪拌後、直ちに沸とう水浴で2分間加温する。加温後、ボルテックスミキサーで激しく攪拌し、再び沸とう水浴で3分間加温する。加温後、ボルテックスミキサーで激しく攪拌する(注2)。

試験管を50℃の恒温水槽で5分間加温後、200 mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液4 mL 及びアミログルコシダーゼ溶液0.1 mL を加え、ボルテックスミキサーで激しく攪拌する。攪拌後、栓をして50℃の恒温水槽で30分間加温する。加温後、直ちに試験管の内容物を容量100 mL (V) 全量フラスコに移す(注3)。水を用いて試験管内を洗い込み、試験管の内容物を全量フラスコに移し、水で定容する。

全量フラスコの内容物の一部を試験管に移し遠心分離(1000 × g, 10分間)後、上澄みを採取し測定用試料溶液とする。

2) 測定

測定用試料溶液0.1 mL を2本の試験管に分注する。別に、水0.1 mL を2本、グルコース標準溶液0.1 mL を4本、試験管に分注する。GOPOD 溶液3 mL をそれぞれの試験管に加え、50℃の恒温水槽で20分間加温する。水0.1 mL を反応させた液を対照として、510 nm における吸光度を測定する(注4)。

(4) 計算

$$\begin{aligned}\text{でん粉含量 (g/100 g)} &= A \times f \times \frac{V}{0.1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} \\ &= A \times \frac{f}{W} \times \frac{V}{100} \times 90\end{aligned}$$

A : 測定用試料溶液の吸光度 (n = 2) の平均値

f : グルコース (μg) に対する吸光度から求められるファクター、
すなわち、100/グルコース標準溶液の吸光度 (n = 4) の平均値

V : 定容量

V/0.1 : V mL から0.1 mL を採取したことの係数

1/1000 : μg から mg への換算

W : 試料採取量 (mg)

100/W : 試料採取量の100 mg への換算

162/180 : グルコースからでん粉への換算

注 解

(注1) 本試験法は、McCleary B V, Gibson TS, Mugford DC : J AOAC Int 80 : 571-579, 1997を参考としている。

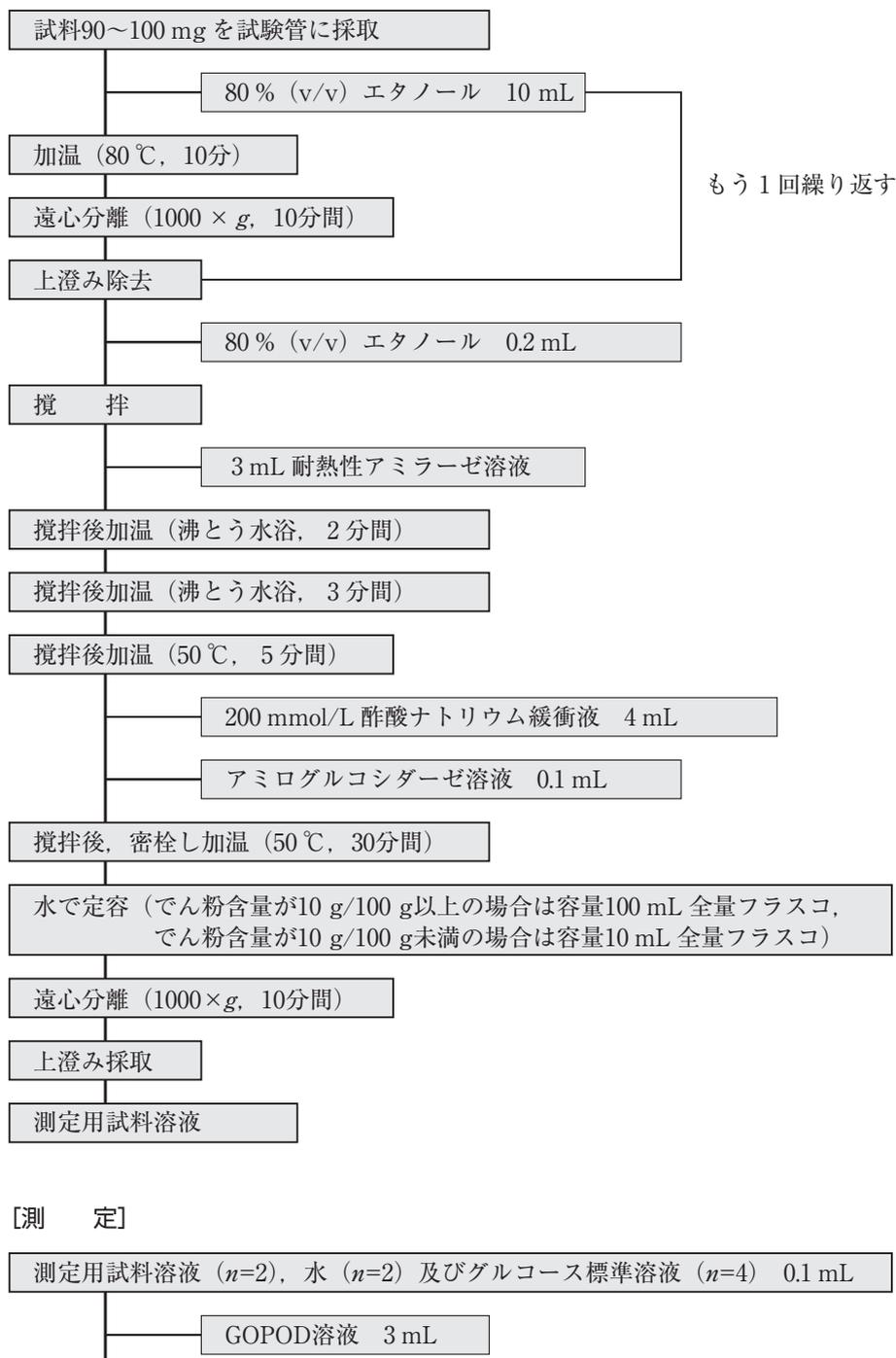
(注2) 試験管の壁に試料が付着することがあるが、この段階では分析に影響しない。

(注3) 試料のでん粉含量が10 g/100 g 未満ならば、容量を10 mL (V) に変更する。

(注4) 測定前に、水0.1 mL を反応させた液2本を用いて、分光光度計の吸光度(510 nm) をゼロと設定して測定を開始する。

でん粉定量法・フローチャート

[測定用試料溶液の調製]



加温 (50 °C, 20分間)

吸光度測定 (510 nm)

41 有機酸

41-1. 高速液体クロマトグラフ法

適用

食品全般に用いる。

測定方法

(1) 装置及び器具

高速液体クロマトグラフ（紫外可視吸光光度検出器付き）

振り混ぜ機

遠心分離機

ホモジナイザー

なす形フラスコ

全量フラスコ

遠心管

金網漏斗

ガラス棒

三角フラスコ

(2) 試薬

5% (w/w) 過塩素酸：60% 過塩素酸（特級）を80 g採取し、水を880 g加える。

0.5% (v/v) 過塩素酸：5% (w/w) 過塩素酸10 mLを水で100 mLにしたもの。

ヘキサン：特級

リン酸水素二ナトリウム：特級

プロモチモールブルー：特級

リン酸：特級

標準溶液（例えばクエン酸標準溶液）

クエン酸三ナトリウム二水和物（特級）0.1531 gを容量100 mL全量フラスコにはかりとり、水で定容する（1.0 mg/mL）。この液を0.01, 0.1, 0.2及び0.5 mg/mLとなるように水で希釈し調製する。

(3) 操作

1) 抽出（注1）

(a) 乾物試料の場合

試料約5 g (*W*)を容量100 mLなす形フラスコにはかりとり、5% (w/w) 過塩素酸5 mL及び水を約20 mL加え、10分間振り混ぜた後、容量50 mL (*V*)全量フラスコに移し、水で定容する。定容後、ろ過したものを測定用試料溶液とする。

(b) 液体試料の場合

試料約5 g (*W*)を容量50 mL (*V*)全量フラスコにはかりとり、5% (w/w) 過塩素酸を5 mL加えた後、水で定容する。定容後、ろ過したものを測定用試料溶液とする。

(c) バターなど油分を多く含む試料の場合

試料約2 g (*W*)を遠心管にはかりとり、0.5% (v/v) 過塩素酸を20 mL (*V*)加えた後、ヘキサン20 mLを加え10分間振り混ぜる。遠心分離（2000回転/分、5分間）後、上層を除去し、上記の操作

(ヘキサン添加～上層除去)を2回繰り返す。最後の層除去後、水層を採取しろ過したものを測定用試料溶液とする。

(d) 肉や野菜など不均質な固形試料の場合

試料約2g (W)を遠心管にはかりとり、0.5% (v/v) 過塩素酸を20 mL (V) 加え、ホモジナイザーで攪拌後、金網漏斗とガラス棒を用いてすりつぶしながら容量100 mL 三角フラスコに移し、ろ過したものを測定用試料溶液とする。

2) 高速液体クロマトグラフィー

[操作条件例]

カラム：内径8.0 mm，長さ300 mm，イオン排除及び逆相型カラム（例えば Shodex RSpak KC-811 を2本連結）

カラム温度：40℃

移動相：3 mmol/L 過塩素酸

反応液：0.2 mmol/L ブロムチモールブルー含有15 mmol/L リン酸水素二ナトリウム溶液

流速：移動相 1.0 mL/分，反応液 1.4 mL/分

測定波長：445 nm

注入量：20 μL

3) 測定

測定用試料溶液を上記条件の高速液体クロマトグラフに注入し、各有機酸のピーク高さを測定する。同様に標準溶液を注入し、検量線を作成する。

(4) 計算

$$\text{有機酸含量 (g/100 g)} = \frac{A \times V \times C}{W \times 1000} \times 100$$

A：検量線より求めた測定用試料溶液中の有機酸濃度 (mg/mL)

V：定容量 (mL)

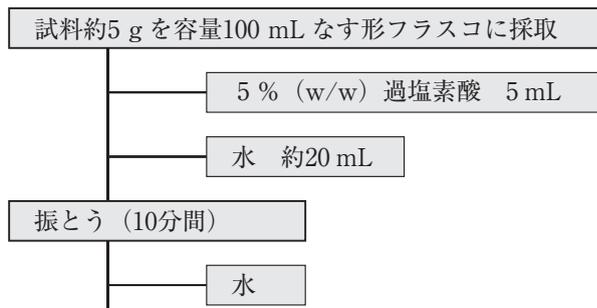
W：試料採取量 (g)

C：希釈倍数

注 解

(注1) 抽出は測定用試料溶液中の過塩素酸終濃度が0.5% となるように行う。ただし、分析対象がシュウ酸の場合は、測定用試料溶液の過塩素酸終濃度が5% となるように行う。

有機酸定量法・フローチャート
(乾物試料の例)



定容（容量50 mL 全量フラスコ）

ろ 過

高速液体クロマトグラフに注入，測定

41-2. 酵素法（グルコン酸）

適 用

食品全般に用いる。

測定方法

（1）装置及び器具

ビーカー

マグネチックスターラー

pH メーター

全量フラスコ

分光光度計

（2）試 薬

5 %（w/w）過塩素酸：60 % 過塩素酸（特級）を80 g はかりとり，水を880 g 加える。

2 mol/L 水酸化カリウム：水酸化カリウム（特級）を66.01 g はかりとり，水で500 mL に定容する。

1 mol/L 塩酸：塩酸（特級）88 mL を水で1000 mL に定容する。

F-キット D-グルコン酸/D-グルコノ-δ-ラクトン（Roche Diagnostics 社製）

グルコン酸標準溶液：グルコン酸ナトリウム（純度>99.0 %）0.1112 g を容量200 mL 全量フラスコにはかりとり，水で定容する（0.5 mg/mL）。この液を0.01，0.05，0.1及び0.2 mg/mL となるように水で希釈し調製する。

（3）操 作

1) 抽 出

試料約5 g（*W*）を容量50 mL ビーカーにはかりとり，5 %（w/w）過塩素酸を5 mL 及び水を約20 mL 加え，マグネチックスターラーで20分間，なじむまで攪拌する（注1）。2 mol/L 水酸化カリウムで，溶液をpH 10以上に調整し，再びマグネチックスターラーで15分間攪拌後（注2），1 mol/L 塩酸でpH 7.5～8.5に調整する（注3）。pH 調整後，マグネチックスターラーで10分間攪拌後，容量50 mL（*V*）全量フラスコに移し，水で定容する。定容後，ろ過したものを測定用試料溶液とする。

2) 測 定

測定用試料溶液及びグルコン酸標準溶液について，F-キット D-グルコン酸/D-グルコノ-δ-ラクトンを用いて酵素反応させた後，分光光度計で340 nm における吸光度を測定する。なお，酵素反応はキットの方法に従い行う。

（4）計 算

$$\text{グルコン酸含量 (g/100 g)} = \frac{A \times V \times C}{W \times 1000} \times 100$$

A : 検量線より求めた測定試料溶液中のグルコン酸濃度 (mg/mL)
V : 定容量 (mL)
W : 試料採取量 (g)
C : 希釈倍数

注 解

(注1) 20分でなじまない場合は、時間を延長してよい。

(注2) 15分間攪拌後、溶液のpHが10以下に下がっていた場合は、2 mol/L 水酸化カリウムでpH 10以上に再調整し、再びマグネチックスターラーで15分間攪拌するところからやり直す。

(注3) 溶液をpH 7.5~8.5に調整する際に、一度でもpH 7.5を下回った場合は、2 mol/L 水酸化カリウムでpH 10以上に再調整し、再びマグネチックスターラーで15分間攪拌するところからやり直す。

グルコン酸定量法・フローチャート

