[農化 第 40 卷, 第 7 号, p. 266~270, 1966]

酵素法による食品中の糖定量に関する研究 (第 2 報)

混合糖中の微量の果糖の定量

小谷 忠男, 高橋 昭次*, 桑田 五郎*

(森永製菓株式会社品質検査部, *森永製菓株式会社堺口工場)

昭和 41 年 1 月 14 日 受理

Studies on Enzymatic Determination of Sugars in Foods Part II. Micro Determination of Fructose in Mixed Sugars

By Tadao KOTANI, Shoji TAKAHASHI* and Goro KUWATA*

Department of Quality Inspection, Morinaga Confectionery Co., Ltd.;

*Tsukaguchi Factory, Morinaga Confectionery Co., Ltd.

As a part of study on the determination of sugars in foods, the determination of micro-amounts of fructose in mixed sugars sample was investigated. Fructose being inhibited by the existence of glucose and sucrose, glucose was changed into gluconic acid by glucose oxidase and sucrose was separated with carbon-column chromatography. After this pre-treatment, 2 ml of fructose sample soln. was mixed with 4 ml of 0.085 w/v % anthrone-sulfuric acid reagent by dry ice method and the mixture was heated for 20 min. at $50 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Optical density at $620\text{ m}\mu$ was measured. The calculation curve could be indicated as a quadratic equation and good results were obtained by using this method.

(Received January 14, 1966)

緒 言

第 1 報のシュクロース, ラクトースに引き続き, 本報ではフラクトースの定量法について検討を行なってみた。

現在一般に行なわれているフラクトースの定量法では, San Yin Wong⁽¹⁾ およびそれを改良した Roe 法⁽²⁾ によるレゾルシン反応, S. van Creveld⁽³⁾ らによるジフェニルアミン法, Z. Dischr^(4,5) らによるシステイン H カルバゾル法が最も一般的に使用されているが, これらは山中⁽⁶⁾によれば, フラクトースの発色を 1 としたとき, グルコースの発色相対感度がレゾルシン反応では 0.014, ジフェニルアミン反応では 0.02~0.03, システイン-カルバゾル法では 0.002~0.03, システイン-硫酸反応では 0.006 となっている。

一般に食品中にはシュクロース, グルコースが多く, しかもフラクトースがそれらの数分の 1 から, 少ないときには数十分の 1 しか存在していないのが普通である。このような微量のフラクトースでも實際上問題になる場合が多いのである。今, かりにグルコースがフラクトー

スの 20 倍存在したと仮定すると, グルコースの共存するフラクトースの定量法では最良とされているシステイン-カルバゾル法でも, フラクトースの定量値が約 30% もの誤差を生ずることになる。

この第 2 報は, 前報の carbohydrase と glucose oxidase を組合せたような酵素法とは異なり, このフラクトースの定量法では, 別の食品中のマルトースの定量を行なう場合の統一性を考え, 酵素法として少し横道に入ったものである。というのは, フラクトースを酵素によって特異的, 選択的に定量する方法は F. H. Schmidt⁽⁷⁾ によって, hexokinase, ATP, glucose-6-phosphate dehydrogenase, TPN 等を使用した定量法があるが, 現在のところ産業分析としてはかなり高価な実験である。

著者らは他の方法について検討を行なってみたが, 適当と思われる方法が今のところ見つからないので少々横道 (酵素法として) である, glucose oxidase とカラム・クロマトグラフィーを併用することにより, フラクトースの定量妨害物質であるグルコースを glucose oxidase

で酸化し、シュクロースをカーボンカラム・クロマトグラフィーで除去することにより、フラクトースをより正確に定量することを試みたところ、一応よい結果を得ることができたので、ここに報告する。

実験方法

1) 試 薬

a) 糖類：フラクトースは The British Drug Houses (Poole, England) 製、グルコースを含まない；グルコース、蔗糖は U. S. Department of Commerce の National Bureau of Standards Washington 25, D. C.).

b) 酵素：Glucose oxidase 長瀬産業製、グルコース定量用。

c) カラム充填剤：活性炭ダルコ G 60 (和光純薬扱)、セライト 545 (和光純薬) は、A. T. James^(8,9) の方法にしたがって精製、すなわち、市販セライト 545 を長さ 18cm の瓶に入れ水中でよく攪拌し、放置した後、3 分間で降下するセライトを取り出し、これを王水で処理して粒子をそろえる。

d) 呈色剤：レゾルシン、アンスロン、Merck 製 (和光純薬扱)。

2) 実験方法

S. J. Patterson⁽¹⁰⁾ らのカーボン、カラム法にしたがい、カラムの直径 18 mm, 長さ 170 mm, 脚 110 mm のものを使用し、これにカラム保温管とカラム上部に目盛付 200 ml の円管型分液ポートを結合させ、減圧法を圧力調整の便利な加圧法に改定した。圧力調整には 2 つの 1 l 下口付試薬瓶により、水の高低により 1 時間に約 100~150 ml 程度の溶出液量になるように調整する。

カラム管には、精製セライト 3.5 g とダルコ G 60 活性炭 (溶出液量が 1 時間 150 ml 以上の粒子) 3.5 g を少量の水で粥状にねり合せたものをカラムに注入する。

フラクトースの比色法は先にも述べたように多くあるが、今回は Roe 法によるレゾルシン反応とアンスロン反応の 2 種類について検討した。レゾルシン反応は試料液 2 ml とレゾルシン 0.1% エタノール溶液 2 ml と濃塩酸 6 ml を混合し、 $80 \pm 1^\circ$ で 8 分間加温を行なった後、冷却し、日立分光光度計 EPU-2 A 型を使用して 480 m μ の波長にて吸光度を測定する。またアンスロン反応はドライアイス法^(11,12)により、試料液 2 ml とアンスロン 85 mg を 100 ml の硫酸に溶解した溶液 4 ml を混合し、 $50 \pm 0.5^\circ$ で 20 分間加温を行なう。この加温のとき、ときどき攪拌を行なうと良い結果を得ることができる。

この呈色液を波長 620 m μ にて吸光度を測定する。

実験結果と検討

1) 比色法の選定

フラクトースの比色にあたり、グルコースの影響の少ないか、またはこの影響を除くような比色法について検討した。現在グルコースが共存する場合のフラクトースの定量法として G. Johnson⁽¹³⁾ の定量法がある。すなわちアンスロン 0.5 g とチオ尿素の 10 g を蒸溜水 340 ml に溶解し、それにゆっくりと硫酸 660 ml を加えた溶液で、この溶液 10 容に対し、試料液 1 容を混合したものを 50° で 20 分間加温を行なう方法であるが、しかし本研究で使用するフラクトース濃度 5~25 γ /ml では、このアンスロン反応の呈色強度が弱いので実際上使用が不可能である。そこで以下のものについて検討した。

a) レゾルシン反応におけるグルコン酸の影響：先にも述べたように、フラクトースは多量のグルコースの存在によって非常に大きな定量妨害を受ける。そこでグルコースを glucose oxidase で酸化してグルコン酸に変化させたとき、グルコン酸がフラクトースの呈色にいかに関与を及ぼすかについて検討してみた。すなわちこの測定法におけるフラクトース最大量 25 γ /ml に、それぞれグルコン酸を、0, 40, 100, 500 γ /ml になるように添加したものについて調べてみた。結果は第 1 表に示す。

第 1 表 レゾルシン反応におけるグルコン酸の影響

グルコン酸	吸	光	度
0 γ /ml	(1)	.311	(5) .306
40	(2)	.309	(6) .305
100	(3)	.310	(7) .304
500	(4)	.306	(8) .301

注：() 内の数字は吸光度の測定順序を示す。

反応液の組成：レゾルシン 0.1% エタノール 2 ml, 濃塩酸 6 ml, 試料液 2 ml (フラクトース濃度 25 γ /ml)

反応温度： $80 \pm 1^\circ$ 反応時間：8 分間

吸光度は 480 m μ で測定。

グルコースを酸化してグルコン酸にすると完全に妨害が除かれている。しかし呈色液が不安定なようである。そこで呈色液の放置温度差と放置時間差による呈色液の褪色を調べたのが第 1 図である。これより呈色液は 0~30 分の間においては放置温度が影響しており、それ以後にはいずれも平行して褪色している。

このようにレゾルシン反応は呈色後の安定性に問題があり、またそれにもまして次のアンスロン反応に比較して、呈色強度が半分程度である。そこでアンスロン反応

第1図 レゾルシン反応呈色物の放置温度差による褪色性について
フラクトース濃度 25 γ /ml
①温水 (40°) ②室温 (23°) ③水
吸光度は 480 $m\mu$ で測定。

について検討を行なうことにする。

b) アンスロン反応におけるグルコン酸の影響 : G. Johnson によるグルコースとフラクトースの分別定量法では感度が低くて使用できないので, レゾルシン法と同様にグルコースを酸化してグルコン酸に変化させたとき, Hall⁽¹¹⁾ と田村⁽¹²⁾ のアンスロン法に, グルコン酸がフラクトースの呈色に, いかに影響を及ぼすかについて検討してみた。試料液はレゾルシン反応同様に, フラクトース 25 γ /ml に, グルコン酸 0, 40, 100, 500 γ /ml を添加したものについて調べてみた。結果は第2表に示す。

グルコースをグルコン酸にすることにより, フラクトースの 20 倍のグルコースが存在しても約 2% 強程度の負の影響のみで定量の可能性がある。またフラクトース

第2表 アンスロン反応におけるグルコン酸の影響

グルコン酸	吸光度
0 γ /ml	(1) .626 (5) .627
40	(2) .629 (6) .629
100	(3) .629 (7) .630
500	(4) .615 (8) .615

注: () 内の数字は吸光度の測定順序を示す。

反応液の組成: アンスロン 85 mg/100 ml H_2SO_4 4 ml,

試料液 2 ml (フラクトース濃度 25 γ /ml)

反応温度: 50 $\pm$ 0.5° 反応時間: 20 分間

吸光度は 620 $m\mu$ で測定。

第2図 アンスロン反応呈色物のグルコン酸による褪色の影響

① フラクトース 25 γ /ml
② { フラクトース 25 γ /ml
グルコン酸 100 γ }
③ { フラクトース 25 γ /ml
グルコン酸 500 γ }
吸光度は 620 $m\mu$ で測定。

25 γ /ml 中のグルコン酸, 0, 100, 500 γ /ml 存在中のアンスロン呈色液の安定性は, 呈色後 1 時間の間はほとんど褪色を起していないが, その後になると褪色が始まっている。しかし, その割合はレゾルシン反応の 1 時間で 3%, 2 時間で 5.8% に比較して, このアンスロン反応は 3 時間で約 2% であるので, 實際上この程度の褪色が生じてはさほど影響はないものと考えられる。結果は第2図に示す。

c) アンスロン反応の検量線について: アンスロン反応の検量線が, いかなる式であるか検討した。結果を第3表に示す。

いま, フラクトース濃度を x とし, その吸光度を y とする。第3表でもわかるように x が増すにしたがって R が増している場合, ふつう $\log y$ について計算した方が望ましいが, しかし, R のすべては 0.001 と 0.0276 (n

第3表 アンスロン反応における日間の繰り返し

繰り返し フラクトース濃度	1	2	3	4	5	6	7	R^*
5 γ /ml	.136	.138	.136	.135	.137	.136	.137	.003
10	.262	.267	.265	.270	.270	.265	.272	.010
15	.382	.390	.390	.393	.390	.392	.395	.013
20	.490	.510	.500	.510	.508	.511	.510	.021
25	.602	.620	.613	.626	.620	.625	.620	.024

反応液の組成: アンスロン濃度 85 mg/100 ml H_2SO_4 4 ml,

試料液 2 ml

反応温度: 50 $\pm$ 0.5° 反応時間: 20 分間

測定値は 620 $m\mu$ における吸光度を以て示す。

* それぞれ濃度の最大値から最小値を引いたもの。

第 4 表 アンスロン反応における日間の繰り返しの分散分析表

要 因	変 動	自由度	不偏分散	分散比
x	1 次	1.010401	1	1.010401
	2 次	993	1	993
	3 次	17	1	17
	4 次	2	1	2
測 定 回	609	6	1015	7.0**
誤 差	348	24	145	
計	1,012370	34		
$F_{24}^{1/4} (0.05) = 4.26 \quad F_{24}^{1/4} (0.01) = 9.82$				
$F_{24}^{9/4} (0.05) = 2.51 \quad F_{24}^{9/4} (0.01) = 3.67$				

=7) の間に全部入るので、一応この値を用いることとした⁽¹⁴⁾。

x の量の y に対する効果は何次の多項式をあてはめるかを検討⁽¹⁵⁾すると、第 4 表のような分散分析表が得られた。この結果より x の 1 次, 2 次および測定回について有意差が認められる。しかし測定回については補助変数がないので補正できないので誤差にくりいれる。また有意差の認められなかった x の 3 次, 4 次も誤差にプールする。

次に適用すべき多項式は、

$$\hat{y} = 0.3835 + 0.0240(x-15) - 0.000128\left\{(x-15)^2 - \frac{25-1}{12} \times 25\right\}$$

となり、もう少し簡単にすると、

$$\hat{y} = -0.000128x^2 + 0.02784x + 0.0011$$

となり、これを x について解いてみると、

$$x = 108.75 - \frac{\sqrt{0.0007745024 - 0.000512y}}{0.000256}$$

となる。この近似的な 95% 信頼区間の幅は、実験計画法下巻⁽¹⁵⁾ (p. 569) に記載されている方法にしたがい計算すると、

x	$n\phi$	信頼区間の幅(95%)
5 または 25 r/ml	7.9	± 0.004
10 または 20 r/ml	9.24	± 0.0037
15 r/ml	14.41	± 0.0029

になる。すなわち $x=15$ で、もっとも精度の良いことを示す。これは 1 次式をあてはめても同様で、平均値が最も精度がよく、これより離れるにしたがって精度が減少する。

なお、先に述べたように x の量が増すに従って、その測定値の R が増大する傾向があったが、これを修正せず解析をしたので、 $x=25$ のときは、これより多少大き

な誤差があると考えておかねばならない。また、 $x=5$ のときは、これより若干小さいかもしれない。これらは分析精度の要求により考慮する必要があるが、大体の場合にはこの必要はない。

2) 混合糖液の分析精度について

予備実験より、カラム保温温度を 40° とし、溶出速度を 100 ml/時間として、フラクトース 2.5 mg では先のカラムで水を溶出剤として 100~150 ml の間で溶出してくることがわかった。

そこで混合糖液について検討を行なってみた。まず、試料液 5 ml と glucose oxidase 100 単位を第 1 報の操作と同様に、直径 30 mm, 長さ 200 mm の試験管に入れ、通気管を取りつけ 37° の恒温水槽に浸して、4 時間通気し、グルコースを glucose oxidase にて酸化して、グルコン酸とした後、カーボンカラムに入れて水にて溶出する。糖組成および定量結果を第 5 表に示す。この実験結果により溶出液量を 150 ml とし、この分析精度についてフラクトース濃度と日間をブロックとした 2 元配置法について実験を行なってみた。結果は第 6 表に示す。

第 5 表 混合糖フラクトースの分析精度 I (溶出量による回収率)

混合糖組成 mg	溶出液量 100 ml		溶出液量 150 ml	
	繰り 返し	回収率 %	繰り 返し	回収率 %
1 { フラクトース 2.5 グルコース 5.0 シュクロース 40.0	1	96.3	1	98.2
	2	97.0	2	98.6
2 { フラクトース 2.5 グルコース 25.0 シュクロース 40.0	1	97.4	1	100.7
	2	100.8	2	101.5
3 { フラクトース 2.5 グルコース 50.0 シュクロース 40.0	1	99.5	1	100.7
	2	101.0	2	102.1

第 6 表 混合糖フラクトースの分析精度 II (糖濃度差による回収率)

混合糖組成	1	2	3
フラクトース	1.5 mg	2.0 mg	2.5 mg
グルコース	50.0	50.0	50.0
シュクロース	40.0	40.0	40.0
繰り返し	回	収	率
1	101.0	99.9	101.5
2	99.9	98.3	99.4
3	100.2	99.3	99.4
4	99.4	98.7	98.9
5	98.2	99.5	98.6

分散分析の結果, フラクトース濃度間には有意差が認められず, 測定日間に危険率5%水準で有意差が出てい
る. 測定精度の95%信頼区間は日間変動をも含めて,

フラクトース	1.5 mg	99.70±0.94%
	2.0 mg	99.14±0.94%
	2.0 mg	99.56±0.94%

となり, 回収率の誤差の95%信頼区間は, 0.67%より
1.55%の間となる.

以上の実験のように, フラクトースの定量は, 先の乳
糖, 蔗糖の定量と同じ程度の分析精度で定量が可能であ
ることがわかった.

要 約

(1) レゾルシン反応において, 呈色液の褪色性は室
温で1時間放置すると約3%, 2時間で5.8%であった.

(2) アンスロン反応において, 呈色液の褪色性は室
温で1時間放置しても, はほとんど褪色を認めないが, そ
の後は徐々に褪色を行ない, 3時間で約2%の褪色が認
められた.

(3) グルコースを glucose oxidase で酸化して, グ
ルコン酸とすることにより, 33倍程度のグルコースが存
在してもフラクトースの安定した比色定量が可能である.

(4) アンスロン反応によるフラクトースの検量線は,
実験計画法より2次式とするのが適当である.

(5) 検量線の多項式および信頼区間が定まったが,
後者はこの実験値から推定する場合のもので, 従ってこ
の曲線を利用して新しい測定値から推定する場合には,
その測定値の誤差が加わることになる.

(6) 検量線の検討で測定回の影響が有意なので, 試
料と同時に標準試料を発色すれば, 上の多項式だけで推
定するより精度を向上すると思われるが, しかし分析す
る人, 使用器具, 試薬等が同一であれば, それほど神経
質にならず, 1本の検量曲線で, ある期間は間に合うの
ではないかと思われる. もちろん必要な精度を考慮した
上である.

(7) グルコースを glucose oxidase で33倍程度の
グルコースが, シュクロースをカラム・クロマトグラフィ

ーで除くことにより, フラクトースを平均 $99.7 \pm 0.94\%$
の精度で定量を行なうことができる.

(8) 本報は食品中の各種糖類の定量の一環として行
なったものであるが, 第1報と異なり, カーボンカラム・
クロマトグラフィーを使用するところから, このクロマ
トグラフィーで水にて溶出してくる糖(主としてグルコ
ース, フラクトース以外の単糖類)が存在する場合は少
し問題がある. しかし現在一般の食品の場合は, そのよ
うな糖が存在することは非常にまれなことと考えられる
(例外としてガラクトース添加食品).

終りに臨み, 本研究の発表を許可された森永製菓株式
会社に深く感謝する.

(昭和40年4月1日, 日本農芸化学会大会において講
演した.)

- (1) San Yin Wong : *Lingnan Sci. J.*, **8**, 619 (1929).
- (2) J. H. Roe : *J. Biol. Chem.*, **107**, 15 (1934).
- (3) S. van Creveld : *Klin. Wochschr*, **6**, 697 (1927).
- (4) Z. Dische, E. Borenfreund : *J. Biol. Chem.*, **192**, 583 (1951).
- (5) 関根隆生, 笹川泰治, 森田蔵広他編 : 生化学領域に於ける光電比色法, 4, 南江堂書店, 1962, p. 9.
- (6) 山中 啓 : 澱粉糖技術研究会報, **26**, 44 (1962).
- (7) H. Schmidt : *Klin. Wochschr*, **39**, 1244 (1961).
- (8) A. T. James, A. J. P. Martin : *Biochem. J.*, **50**, 679 (1950).
- (9) 武内次夫, 高山雄三 : 入門ガスクロマトグラフィー, 南江堂, 1960, p. 65.
- (10) S. J. Patterson, R. I. Savage : *Analyst*, **82**, 812 (1957).
- (11) R. D. Hall : *J. Inst. Brewing*, **62**, 222 (1956).
- (12) 田村太郎 : 分析化学, **10**, 64 (1961).
- (13) G. Johnson, C. Lambert, D. K. Jahnson, S. G. Sunderwirth : *J. Agr. and Food Chem.*, **12**, 216 (1964).
- (14) 日科技連編 : 数値表A, 日本科学技術連盟, 1964, p. 10.
- (15) 田口玄一 : 実験計画法, 下巻, 丸善, 1962, p. 569.