

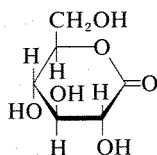
61 グルコン酸及びその化合物

Gluconic Acid and Its Compounds

グルコンデルタラクトン

Glucono- δ -Lactone

別名：グルコンラクトン



$C_6H_{10}O_6$: 178.14

グルコン酸

Gluconic Acid

$C_6H_{12}O_7$: 196.16

グルコン酸亜鉛*

Zinc Gluconate

グルコン酸第一鉄*

Ferrous Gluconate

別名：グルコン酸鉄

グルコン酸カルシウム*

Calcium Gluconate

グルコン酸銅*

Copper Gluconate

*：化学構造が類似している他の用途の食品添加物も、本法の測定対象に含まれる。

1. 試験法の概要

食品中のグルコン酸及びその化合物は、グルコン酸キナーゼ及び6-ホスホグルコン酸脱水素酵素を用いる酵素法によりグルコン酸として定量する。必要があれば分子量比を乗じて、それぞれの化合物の量として求める。食品中には天然のグルコン酸は通常存在しない。したがって、定量値は食品に添加された値である。

2. 試験法（酵素法）

(1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

(2) 試料液の調製

① 液状食品

グルコン酸として3~100mgに対応する、通常、10g以下の試料の量を精密に量る。試料が澄明で着色していないか、着色していても薄い場合は、水70~80mlを加えて試料溶液とする。試料が懸濁している場合は、水を加えて約50~70mlとし、ろ過する。容器及び残留物は

水 20~30ml を用いて数回洗い、ろ液及び洗液を合わせ、試料溶液とする。試料の着色の著しい場合は、試料の量の約 1/10 量のポリアミド末又はポリビニルピロリドンを加え、必要があれば水 20~30ml を加え、激しく振り混ぜ、ろ過する。容器及び残留物は、水 40~50ml を用いて数回洗い、ろ液及び洗液を合わせ、試料溶液とする。

それぞれの方法で得た試料溶液に 2mol/l 水酸化カリウム溶液を加えて pH10 に調整し、5 分間放置した後¹⁾、水を加えて正確に 100ml とし、試料液とする。

② 固体食品

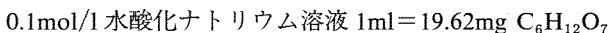
グルコン酸として 3~100mg に対応する、通常、10g 以下の試料²⁾の量を精密に量る。試料が脂肪又はタンパクを含まないかほとんど含まない場合は、ブレンダー容器に入れ、水 10~30ml を加えて 5 分間ホモジナイズした後、ろ過する。容器及び残留物は、水 50~60ml を用いて数回洗い、ろ液及び洗液を合わせ、2mol/l 水酸化カリウム溶液で pH10 に調整した後、5 分間放置し、水を加えて正確に 100ml とし、試料液とする。試料が脂肪又はタンパク³⁾を含む場合は、ブレンダー容器に入れ、氷冷した 0.4mol/l 過塩素酸溶液 10ml を加えて 5 分間ホモジナイズした後、ろ過する。容器及び残留物は、水 50~70ml を用いて数回洗い、ろ液及び洗液を合わせ、2mol/l 水酸化カリウム溶液で pH10 に調整した後、冷蔵庫中に 20 分間放置する⁴⁾。この液をろ過し、更に水を加えて正確に 100ml とし、試料液とする。

(3) 検量線用標準液の調製

グルコン酸液約 4g を精密に量り、水 60ml と混和した後、水を加えて正確に 200ml とし、グルコン酸原液とする。この原液 50ml を正確に量り、2mol/l 水酸化カリウム溶液で pH10 に調整する。5 分間放置した後、水を加えて正確に 250ml とし、標準液とする（この液 1ml はグルコン酸 $4 \times F \text{mg}$ を含む）。

別に、グルコン酸原液 15ml を正確に量り、200ml の三角フラスコに入れ、0.1mol/l 水酸化ナトリウム溶液 40ml を正確に量って加え、振り混ぜ、20 分間放置した後、0.05mol/l 硫酸で過剰のアルカリを滴定する（指示薬フェノールフタレイン試液 3 滴）。別に同様の方法で空試験を行う。

本試験の滴定値と空試験のそれとの差から標準液のファクター (F) を算出する⁵⁾。



用時、標準液 10ml を正確に量り、水を加えて正確に 100ml とし、この液 1ml ずつを正確に量り、それぞれに水を加えて正確に 5, 10, 20, 50ml 及び 100ml とし、検量線用標準液とする（これらの液 1ml は、それぞれグルコン酸 $80 \times F$, $40 \times F$, $20 \times F$, $8 \times F \mu\text{g}$ 及び $4 \times F \mu\text{g}$ を含む）。

(4) 測定法

① 測定条件⁶⁾

分光光度計を用い、波長 340nm における吸光度を測定する。

② 測定⁷⁾

2本のセルを用い、それぞれ A 及び B とする。A、B それぞれにグリシルグリシン緩衝液 1ml、NADP 溶液 0.1ml 及び ATP 溶液 0.1ml ずつをそれぞれ正確に量って加える。次いで A には試料液 1.5ml⁸⁾ を、B には水 1.5ml を正確に量って加える。A、B それぞれに 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素懸濁液 0.05ml ずつを正確に量って加え、混和して 5 分間放置し、A を試料測定液、B を空試料測定液とする。

試料測定液及び空試料測定液は、それぞれ水を対照として、波長 340nm における吸光度、 E_A 及び E_B を測定する。次に、A、B のセルそれぞれにグルコン酸キナーゼ懸濁液 0.01ml ずつを正確に量って加え、混和して 10~15 分間放置した後⁹⁾に再び同条件で吸光度を測定し、 E'_A 及び E'_B とする。

E_A と E'_A の差 ΔE_A 、 E_B と E'_B の差 ΔE_B を求め、更に ΔE_A と ΔE_B の差 ΔE_T を計算する。

③ 検量線

検量線用標準液 1.5ml ずつをそれぞれ正確に量り、②測定における試料液の代わりに、この液を用い、それぞれセル S_1 , S_2 , …… S_5 に入れ、②測定と同様に操作し、それぞれ ΔE_{S1} , ΔE_{S2} , …… ΔE_{S5} を求め、検量線を作成する。

④ 定量

試料液の ΔE_T と検量線から試料液中のグルコン酸濃度 ($\mu\text{g/ml}$) を求め、次式によって検体中のグルコン酸含量 (g/kg) を計算する¹⁰⁾。

$$\text{グルコン酸含量 (g/kg)} = \frac{C}{10 \times W}$$

C : 試料液中のグルコン酸濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

W : 試料の採取量 (g)

$$\text{グルコノデルタラクトン含量 (g/kg)} = \text{グルコン酸含量 (g/kg)} \times 0.9081$$

$$\text{グルコン酸カルシウム含量 (g/kg)} = \text{グルコン酸含量 (g/kg)} \times 2.285$$

試薬・試液

1. アデノシン-5'-三リン酸 (ATP) : 市販品を用いる¹¹⁾。
2. 塩化マグネシウム : (六水塩) [特級]
3. グリシルグリシン : [特級]
4. グリシルグリシン緩衝液 : グリシルグリシン 0.25mol/l, Mg^{2+} 0.017mol/l, pH8.0 の溶液

である。すなわちグリシルグリシン 1.98g 及び塩化マグネシウム 0.21g に再蒸留水 50ml を加えて溶かし、2mol/l 水酸化カリウム溶液約 3.5ml を加えて pH8.0 に調整し、水を加えて正確に 60ml とする。この液は 4℃ で保存するとき、少なくとも 4 週間は安定である。

5. グルコン酸キナーゼ懸濁液：市販品¹²⁾を希釈せずにそのまま用いる。本懸濁液は 4℃ で保存するとき、少なくとも 1 年間は安定である。
6. ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸塩 (NADP-Na₂H)：市販品を用いる¹³⁾。
7. 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素懸濁液：市販品¹⁴⁾を希釈せずにそのまま用いる。本懸濁液は 4℃ で保存するとき、少なくとも 1 年間は安定である。
8. ATP 溶液：アデノシン-5'-三リン酸 (ATP) の約 0.081mol/l の溶液である。すなわち ATP-Na₂H₂ · 3H₂O 250mg 及び炭酸水素ナトリウム 250mg に再蒸留水 5ml を加えて溶かす。この液は 4℃ で保存するとき、少なくとも 4 週間は安定である。
9. NADP 溶液：ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸塩 (NADP-Na₂H) の 0.0115mol/l の溶液である。すなわち NADP-Na₂H · 3H₂O 50mg に再蒸留水 5ml を加えて溶かす。この液は 4℃ で保存するとき、少なくとも 4 週間は安定である。

[注]

- 1) この操作で、5 分以内にグルコノデルタラクトンはグルコン酸に変換される。
- 2) シャーベット、ゼリー、ビスケット、パン等、酸味料、膨脹剤原料として添加される。
- 3) 大豆タンパク、牛乳タンパクの凝固剤としてグルコノデルタラクトンが用いられることがある。畜肉製品については除タンパク操作を行わずに、次の操作法を用いる。
試料約 2g を精密に量り、250ml のビーカーに入れ、水 70ml と混和した後、2mol/l 水酸化カリウム溶液を用いて pH10 に調整し 10 分間放置する。水を加えて正確に 100ml とし、ろ過する。ろ液の最初の 10ml は捨て、あとのろ液を試料液とする。必要があればグルコン酸として 0.03~1.0g/L に希釈する。
- 4) 過塩素酸の結晶等が分離する。
- 5) 標準液のファクターは次式より求める。

$$\text{標準液のファクター (F)} = f \times \frac{a_B - a_S}{b} \times \frac{19.62}{5 \times 4}$$

f : 0.05mol/l 硫酸溶液のファクター

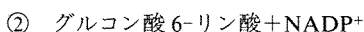
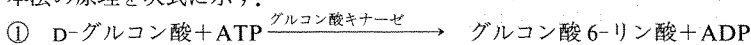
a_B : 空試験での 0.05mol/l 硫酸消費量 (ml)

a_S : グルコン酸原液の場合の 0.05mol/l 硫酸消費量 (ml)

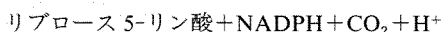
b : グルコン酸原液の採取量 (ml)

上記計算式で 5 で割ってあるのは、最初のグルコン酸原液 (約 2%) を 5 倍希釈して標準液としたためである。

- 6) グルコン酸測定用キットが市販されている。
- 7) 本法の原理を次式に示す。



↓ 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素



生成した NADPH の量はグルコン酸塩の量と等量関係にあるので、NADPH の波長 340nm における吸光度を利用してグルコン酸量を定量する。本法の反応系はグルコン酸のみに対してきわめて特異的であり、他の物質はほとんど基質として利用されない。

- 8) 試料液中のグルコン酸量を推定し、セル中のグルコン酸量が約 20~40 μ g となるような量として 0.1~1.5ml の範囲で正確に量って加える。なお、1.5ml 以下の採取量の場合は、水を加えて正確に 1.5ml がセルに加えられるようにする。
- 9) もし吸光度の漸増がグルコン酸キナーゼ添加 15 分間後でもみられるようであったら、2 分間ごとに吸光度を測定し、それらの吸光度を外挿して E_2 を求める。
- 10) ②測定において試料液 1.5ml 以下を採取 (t ml) した場合は、C を求める際 1.5/t を乗じる。
- 11) 結晶、二ナトリウム三水塩。
- 12) 大腸菌由来のもの、約 40U/mg。3.2mol/l 硫酸アンモニウム溶液に懸濁したもの。
- 13) 結晶、二ナトリウム三水塩。
- 14) 酵母由来のもの、約 12U/mg。