

固定化酵素電極法による乳糖の定量についての検討

津田 美穂*, 長谷川 美来*, 小林 正和*, 八木 潤*, 中山 清貴*

Quantitative analysis of lactose in agricultural products by immobilized enzyme-electrode method

Miho TSUDA*, Miku HASEGAWA*, Masakazu KOBAYASHI*,

Jun YAGI* and Kiyotaka NAKAYAMA*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance 6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

In customs laboratories, lactose contained in milk preparations and animal feed preparations is generally quantitatively analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC), but this method requires extensive pretreatment procedures and measurement times are long. Accordingly, we have studied a simple and rapid analytical method using an immobilized enzyme-electrode, and measured lactose which was simply extracted from the analysis samples by water or hot water. The average recovery of lactose by this method from the model sample containing a known amount of lactose was 100.1%. For a milk preparation containing very little water-insoluble matter, the lactose content determined by the immobilized enzyme-electrode method was close to that determined by HPLC using an amino column and refractive index detector, revealing that this simpler method enables a highly accurate quantitative analysis of lactose. In addition, using the immobilized enzyme-electrode, the method greatly reduced the analysis time.

1. 緒 言

税関分析において、単糖類及び二糖類の分析は、食品分析における代表的な測定項目であり、乳糖の定量分析もその一つに含まれる。

乳糖は哺乳類の乳の中に約5%含まれ¹⁾、乳糖を含有する調製食料品や飼料等が多数輸入されている。当該輸入品は乳糖の含有割合により関税分類が変わることがあり、税率格差も大きいため、迅速かつ正確に定量することが必要となる。

現在、税関における乳糖の定量分析は、高速液体クロマトグラフ（以下HPLCという。）を用いた分析法または市販キットを使用した酵素法により行われているが、脂肪やたんぱく質を含む試料の場合は、どちらの分析法も脱脂や除たんぱく操作などの煩雑な前処理が必要であり、分析終了まで2日程度を要する。

そこで、固定化酵素電極法による乳糖の定量分析に着目した。当法は、酵素反応により消費され、あるいは生成する化学物質を電極で電気化学的に測定し、目的物質を定量する原理に基づいている。固定化酵素電極法の特徴として、基質特異性に優れた酵素を用いる点で選択性に優れており、酵素が固定化されているため繰り返し使用できること、また、着色や濁りの影響を受けないため、煩雑な前処理を必要としない迅速測定が可能という利点がある。この原理を応用した分析法は、医療、環境、食品等の分野で用いられている²⁾。農林水産分野においては、固定化酵素電極法

を利用した分析機器であるバイオケミストリーアナライザー（YSI-2700, YSI 製）を用いた簡易なしょ糖の分析法について報告されている³⁾。

本研究では、バイオケミストリーアナライザーの有用性を評価するために、数種の試料について、水または温水抽出による簡易な前処理のみを行った後、同装置で乳糖の定量を行った。また、少糖類の分析において税関分析で一般的に用いられているアミノ系カラム及び示差屈折率検出器を使用したHPLC法で同一試料の乳糖の定量分析を行い、二法の比較を行ったので報告する。

2. 実 験

2.1 試薬

乳糖一水和物、しょ糖、ソルビトール、エチレングリコール、グリセリン（和光純薬工業製）
ラフィノース五水和物（東京化成工業製）
アセトニトリル（HPLC用・和光純薬工業製）

2.2 試料

犬用飼料（乳糖を含有しないもの；輸入品）
脱脂粉乳（市販品）
ミルク調製品A（輸入品）
ミルク調製品B（輸入品）

上記の犬用飼料は、分析に先立ち、フードプロセッサーで細かく粉碎した。

2.3 分析装置及び分析条件

2.3.1 HPLC 法

装置：LC-20 システム（島津製作所製）

検出器：示差屈折率検出器（島津製作所製）

カラム：Asahipak NH2P-50 4E (4.6 mm I.D. × 250 mm)

（昭和電工製）

ガードカラム：Asahipak NH2P-50G 4A (4.6 mm I.D. × 10 mm)

（昭和電工製）

カラム温度：30 °C

移動相：アセトニトリル/水 = 75/25

流速：0.6 mL/min

注入量：10 µL

2.3.2 固定化酵素電極法

装置：バイオケミストリアナライザー（YSI2900D；YSI 社製）

バッファー：Lactose Buffer（YSI2705；YSI 社製）

キャリブレーション標準液：5.00 g/L 乳糖水溶液
(YSI2783；YSI 社製)

メンブレン：ガラクトースオキシターゼメンブレン
(YSI2702；YSI 社製)

2.4 実験

2.4.1 HPLC 法

2.4.1.1 内標準物質の検討

犬用飼料、脱脂粉乳及びミルク調製品 A, B の各々に蒸留水を加えた後、2%硫酸亜鉛水溶液を加えて混合し、さらに 1.8%水酸化バリウム水溶液を加えて混合し、しばらく静置させて除たんぱくを行った。各溶液の上澄み液をメンブレンフィルター (0.45 µm) でろ過し、ろ液を 2.3.1 の条件で測定し、乳糖及び分析試料に含まれる夾雑物のリテンションタイムを確認した。次にエチレングリコール、グリセリン、ソルビトール及びラフィノースの各々について 0.5%水溶液を調製し、同様の条件で測定し、乳糖及び分析試料に含まれる夾雑物と十分に分離する物質を内標準物質として選択した。

2.4.1.2 検液の調製

(a) 模擬試料検液の調製

粉碎した犬用飼料と標準乳糖を乳糖重量割合が 10.0%かつ検液中の乳糖濃度が 0.5%になるように三角フラスコに量り採り、蒸留水を加えて混和し、一晩静置させた。それにラフィノース（内標準）を 0.5%になるように添加した後、2.4.1.1 の各試料と同様に除たんぱく及びろ過し、ろ液を模擬試料検液とした。

(b) 脱脂粉乳及びミルク調製品検液の調製

脱脂粉乳及びミルク調製品 A, B を検液中の乳糖濃度が 0.2%になるようそれぞれ三角フラスコに量り採り、約 60 °C の蒸留水を加え、乳糖の抽出を行い、それにソルビトール（内標準）を 0.1%になるように添加し、2.4.1.1 と同様に除たんぱく及びろ過し、ろ液を試料検液とした。

2.4.1.3 検量線作成

乳糖定量用の検量線を各分析試料についてそれぞれ作成した。

(a) 模擬試料検液中の乳糖定量用の検量線溶液

ラフィノースを 0.5%含む乳糖水溶液（濃度範囲 0.4–0.6%）を作成し、検量線用の標準液とした。

(b) 脱脂粉乳及びミルク調製品中の乳糖定量用の検量線溶液

ソルビトールを 0.1%含む乳糖水溶液（濃度範囲 0.1–0.4%）を作成し、検量線用の標準液とした。

(a) 及び (b) の標準溶液を 2.3.1 の条件にて測定し、得られたクロマトグラムから乳糖のピーク面積と内標準物質のピーク面積の比をそれぞれ求め、この値に対する乳糖と内標準物質の重量比により各 3 点検量線を作成した。

2.4.1.4 定量操作

2.4.1.2 で調製した各試料検液を 2.3.1 の条件にて各 2 回ずつ測定し、模擬試料についての添加乳糖の回収率及び各分析試料中の乳糖の含有割合を 2.4.1.3 の各検量線を用いて算出した。

2.4.2 固定化酵素電極法

2.4.2.1 検液濃度の検討

0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20 g/L の乳糖水溶液を作製し、それらの溶液を 2.3.2 の条件にて各 3 回ずつ測定した。各測定の相対誤差を求め、最も良好な濃度を以降の試料検液の濃度とした。

2.4.2.2 検液の調製

(a) 模擬試料検液の調製

粉碎した犬用飼料と標準乳糖を乳糖の重量割合が 10.0%かつ検液中の乳糖濃度が 5 g/L になるようにメスフラスコに量り採り、蒸留水を加えて混和した。それを一晩静置後、定容し、ろ紙 (JIS P 3801 [ろ紙 (化学分析用)]) に規定される 1 種のもの) でろ過し、ろ液を模擬試料検液とした。

(b) 脱脂粉乳及びミルク調製品検液の調製

脱脂粉乳及びミルク調製品 A, B を検液中の乳糖濃度が 5 g/L になるようそれぞれメスフラスコに量り採り、約 60 °C の蒸留水を加え、乳糖の抽出を行った後定容し、2.4.2.2 (a) と同様にろ過し、ろ液を試料検液とした。

2.4.2.3 定量操作

2.3.2 の条件によりキャリブレーション標準液 (5.00 g/L 乳糖水溶液) を測定し、測定誤差が 2%以下となったのを確認した後、検液を各 2 回ずつ測定した。測定後は都度メンブレンを洗浄した。測定値から模擬試料についての添加乳糖の回収率及び各分析試料中の乳糖の含有割合を算出した。

3. 結果及び考察

3.1 HPLC 法

3.1.1 HPLC 法における内標準物質の検討

得られたミルク調製品 A, B のクロマトグラムから、同試料のいずれもショ糖を含有することが確認された。2.3.1 の条件におけるショ糖及び乳糖並びに内標準物質の候補として検討したエチレングリコール、グリセリン、ソルビトール及びラフィノースの各クロマトグラムを Fig.1 に示す。エチレングリコール、グリセリン

及びソルビトールは、犬用飼料に含まれる夾雜物ピークと各ピークの保持時間が重なったため、内標準物質として使用できなかつた (Fig.2). それに対してラフィノースは夾雜物ピークと乳糖と良好に分離したため、模擬試料検液の内標準物質としてラフィノースを選択した。また脱脂粉乳及びミルク調製品 A, B については、特段の夾雜物ピークは認められなかつたので、内標準物質としてソルビトールを選択した。

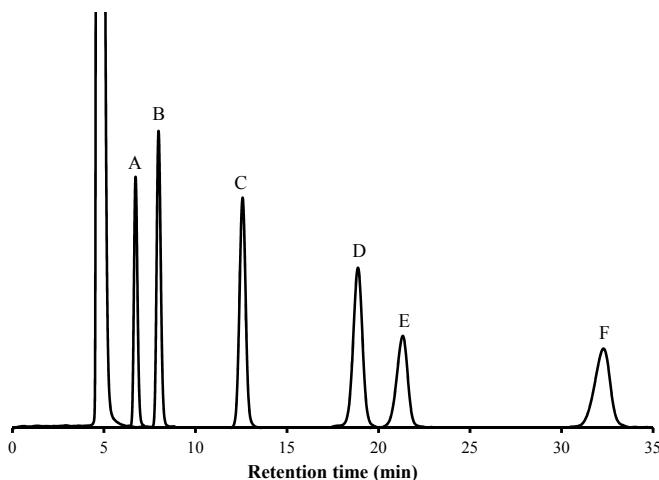


Fig.1 HPLC chromatograms of sucrose, lactose, and possible internal standards.

A: Ethylene glycol; B: Glycerin; C: Sorbitol; D: Sucrose; E: Lactose; F: Raffinose

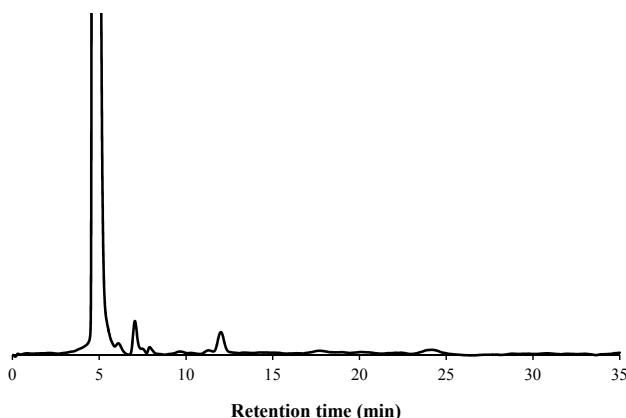


Fig.2 HPLC chromatogram of the dog food sample used in this study.

3.1.2 検量線の直線性

2.3.1 の条件にて標準乳糖溶液を測定し、作成した各検量線について決定係数 (R^2) を求めた。模擬試料検液中の乳糖定量の場合、濃度範囲 0.4 – 0.6%において回帰分析の結果は、 $y = 0.7877x + 0.0380$ ($R^2 = 0.9996$) となつた。また、脱脂粉乳及びミルク調製品 A, B 中の乳糖定量の場合、濃度範囲 0.1 – 0.4%における回帰分析の結果は、それぞれ $y = 0.7290x - 0.0696$ ($R^2 = 0.9990$)、 $y = 0.7127x - 0.0324$ ($R^2 = 0.9998$)、 $y = 0.7705x - 0.212$ ($R^2 = 0.9991$) となり、いずれの場合においても決定係数 0.9990 以上の高い直線性を示した。

3.1.3 模擬試料を用いた添加乳糖の回収試験

模擬試料についての添加乳糖の平均回収率は 99.7% であった (Table 1)。

Table 1 Recovery of lactose by the two methods from a model sample (n = 4)

| method | Recovery (%) | SD (%) |
|------------------------------|--------------|--------|
| HPLC | 99.7 | 0.068 |
| immobilized enzyme-electrode | 100.1 | 0.091 |

SD: standard deviation. The model sample was prepared by mixing 4.50 g of the dog food and 0.50 g of lactose so that the lactose content was 10.0 wt%.

3.1.4 脱脂粉乳及びミルク調製品についての乳糖の定量値及び精度

脱脂粉乳及びミルク調製品 A, B の乳糖の平均含有割合は、それぞれ 49.1%, 11.1% 及び 15.6% であった。また平均相対標準偏差は、それぞれ 1.4%, 2.4% 及び 1.1% であった (Table 2)。

Table 2 Results for the determination of lactose in three different samples by the two methods (n = 4)

| | HPLC | | immobilized enzyme-electrode | |
|--------------------|-------------|---------|------------------------------|---------|
| | Lactose (%) | RSD (%) | Lactose (%) | RSD (%) |
| powdered skim milk | 49.1 | 1.4 | 49.8 | 0.45 |
| milk preparation A | 11.1 | 2.4 | 11.3 | 0.85 |
| milk preparation B | 15.6 | 1.1 | 15.3 | 0.38 |

RSD: relative standard deviation.

3.1.5 検液の濃度についての考察

検液濃度 0.2% 及び 0.5% で測定した模擬試料の場合、平均標準偏差はそれぞれ 0.11% 及び 0.068% であり、S/N 比はそれぞれ 50 及び 120 程度であった。日本薬局方では、検出限界値及び定量限界値はそれぞれ S/N 比 3 以上及び 10 以上に相当すると掲載されている⁴⁾。このことを踏まえると、検液濃度 0.2% においても定量は可能であるが、高精度の定量には検液濃度は 0.5% 程度必要であると考えられる。

3.2 固定化酵素電極法

3.2.1 最適検液濃度の検討

濃度範囲 0.1 – 20 g/L の乳糖水溶液の測定値の相対誤差は、キャリブレーション標準液と同濃度である 5 g/L で最も低くなつたため検液の濃度は 5 g/L とした。

3.2.2 模擬試料を用いた添加乳糖の回収試験

模擬試料についての添加乳糖の平均回収率は 100.1% であった (Table 1)。

3.2.3 脱脂粉乳及びミルク調製品についての乳糖の定量値及び精度

脱脂粉乳及びミルク調製品 A, B の乳糖の平均含有割合は、それぞれ 49.8%, 11.3% 及び 15.3% であった。また平均相対標準偏差は、それぞれ 0.45%, 0.85% 及び 0.38% であった (Table 2)。

3.3 試料検液の調製に関する考察

飲料乳製品に関しては、水で希釈し、ろ過をするのみの前処理で固定化酵素リアクター及び電気化学検出器による乳糖の定量が報告されている⁵⁾。本研究で用いた模擬試料検液、脱脂粉乳及びミルク調製品Aは、水に溶解した際に固形分が認められたため、固形分が定量に影響を及ぼした可能性があると考えられた。一方、ミルク調製品Bは固形分がほとんど認められない均質な分散液となつた。本研究で比較した二法について、模擬試料検液、脱脂粉乳及びミルク調製品Aの様な試料溶液の調製の際に固形物が残存する試料に含有される乳糖の定量について、さらに確度を向上させるためには、試料検液の調製法の再検討を行い、同一試料検液を用いた二法による検証が必要である。

3.4 二法の比較

水に溶解した際、均一な分散液となつたミルク調製品Bは、二法において近似した乳糖の定量値が得られた。

今回の試料についての乳糖含有量測定における相対標準偏差は、HPLC法では1.1–2.4%であるのに対し、固定化酵素電極法では0.38–0.85%と低く、より高精度な定量分析が可能といえる。

また、分析時間においては、検液調製後の機器分析にかかる時

間で比較すると、一検体あたり、固定化酵素電極法では5分間、HPLC法では30分間程度を要する。そのため、HPLC法で2日程度を要している分析が、固定化酵素電極法では1日で終了することが可能となる。

4. 要 約

固定化酵素電極を用いたバイオケミストリーアナライザーによる乳糖の簡易定量分析について検討を行つた。試料から乳糖を水又は温水で簡易抽出し、定容した溶液を、ろ過のみで精製後、定量した結果、犬用飼料に既知の量の乳糖を添加した模擬試料についての乳糖の回収率(4検体平均)は100.1%を示した。また、水中で固形分が殆どなく均質に分散するミルク調製品においては、従来法であるアミノ系カラム及び示差屈折率検出器を使用したHPLC法の定量値に近似する結果が得られ、また本法は、HPLC法に比べ高精度な定量分析が可能であることが示された。さらに、分析時間が大幅に短縮されることから、固定化酵素電極を用いたバイオケミストリーアナライザーによる乳糖の定量分析は、迅速な簡易定量法としての活用が期待できる。

文 献

- 1) 佐々木林治郎 監修：“牛乳・乳製品ハンドブック”，P.2 (1967), (朝倉書店).
- 2) 近藤徹弥：“バイオセンサ・ケミカルセンサ辞典”，P.675 (2007), (中嶋但).
- 3) 桑田主税, 黒田幸浩, 清島浩之, 長谷川誠, 鈴木茂：千葉県農林総合研究センター研究報告, **5**, 125 (2013).
- 4) 日本薬局方解説書編集委員会編：“第十五改正日本薬局方解説書”，P.80 (2006), (廣川書店) .
- 5) 掛本道子, 村上和雄, 原田敏勝, 小川裕康：日本化学会誌, **1992**, 40 (1992).
- 6) 水谷文雄, 浅井道彦：分析化学, **39**, 729 (1990).
- 7) 仁木栄次, 渡辺訓行：油化学, **29**, 201 (1980).
- 8) 坊之下雅夫, 鹿又健：*Chromatography*, **32**, 23 (2011).
- 9) 三浦誠, 上野勝, 三浦徹, 渡邊裕之, 三枝朋樹：関税中央分析所報, **48**, 21 (2008).
- 10) 高野香織, 岡本健, 大嶽秀之, 武藤辰雄：関税中央分析所報, **54**, 57 (2014).