

報 文

チタン(IV)-ポルフィリン錯体試薬を用いる食品中糖類の
フローインジェクション分析横井 祐太*, 松原 チョ^{®**}, 高村喜代子*

(1994 年 12 月 15 日受付)

(1995 年 1 月 24 日審査終了)

吸光分析試薬 Ti-TPyP 試薬を用いる, 糖類のフローインジェクション分析法 (FIA) を確立した. Ti-TPyP 試薬は過酸化水素と反応し, 450 nm に吸収極大を持つペルオキシ錯体を生成する. この吸光度は過酸化水素濃度に比例する. スクロース, マルトース及びラクトースの加水分解酵素リアクターとグルコースオキシダーゼ (GOD) リアクターを流路に組み込み, 各糖から生成した過酸化水素を Ti-TPyP 試薬により測定した. 各酵素リアクターへの流路をバルブによって切り替えて, 3 種の 2 糖類とグルコースを段階的に定量した. 検量線はグルコースでは $0.5 \sim 500 \mu\text{M}$ ($10 \sim 10000 \text{ pmol/test}$), スクロース, マルトース及びラクトースでは $1 \sim 1000 \mu\text{M}$ ($20 \sim 20000 \text{ pmol/test}$) の範囲において良い直線性が得られた. 2 nmol/test における相対標準偏差 ($n=10$) は, 4 種の糖いずれについても 0.8% 以下であった. 一つの試料について 4 種の糖を検出する場合, 1 時間当たり 5 試料の測定が可能であった. 本法を食品中糖類の定量に応用し, 良い結果が得られた.

1 緒 言

食品の品質管理や製造工程管理において, 糖類の分析は欠かせないものとなっている. 特に発酵食品中の糖類の定量は, 製造工程上の発酵の程度を把握するためにも重要である. 糖類の分析法としては, ガスクロマトグラフィー (GC)¹⁾, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)²⁾ などが用いられている. しかし, これらの方法はその選択性が低いこと, 又測定に長時間を必要とするなどの問題点がある. 最近, 基質に対する特異性が高く, 短時間に多数の試料の分析ができるという利点から酵素法が注目されてきた.

現在, 酵素反応によって糖を還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレチド (NADH) に導き, その濃度を測定する食品中糖の分析用キットも市販されている. 又, 酸化酵素の存在下に糖から生成した過酸化水素を, ペルオキシダーゼ法によって吸光度を測定する糖の定量法も繁用されている³⁾. しかし, これらの方法では測定対象の化学種のモル吸光係数が小さいので感度が低く, 測定

値は試料中の還元性物質の影響を受けやすいことが指摘されている. 又, 操作が煩雑なので連続測定が困難なこと, 高価な酵素を使い捨てにすることで 1 検体当たりの分析コストが高いことなど, 日常分析に適した方法とはいえない. そこで, 食品分析分野では, 固定化酵素をカラムとして流路に組み込み, 流れの中で反応を行うフローインジェクション分析法 (FIA) が試みられている⁴⁾⁵⁾. 酵素は固定化により安定性が増し, 繰り返し使用できるという利点がある. 又, FIA は試料の注入から検出までの条件を厳密に制御できるので, 精度が高く, しかも迅速な分析を可能にする. しかし, 流れの中に酵素カラムを組み込んだ FIA は, 簡易迅速な分析法である一方, 多成分を区別して連続的に分析することは困難である.

本報ではこのような問題点を克服するために, FIA の流路に固定化酵素リアクターを並列に組み込み, バルブによって流路を切り替えて数種の糖を連続定量することを可能にした.

グルコースはグルコースオキシダーゼ (GOD) の存在下で酸化されて過酸化水素を定量的に生じる. 又, 二糖類はそれぞれの加水分解酵素によってグルコースを生成する. 従って, グルコースから生成した過酸化水素を測定することによって二糖類とグルコースの定量が可能

* 東京薬科大学薬学部: 192-03 東京都八王子市堀之内 1432-1

** 東京薬科大学生命科学部: 192-03 東京都八王子市堀之内 1432-1

である。そこで、加水分解酵素、GOD 及び過酸化水素の高感度試薬である Ti-TPyP 試薬を組み合わせたグルコース、スクロース、マルトース及びラクトースの連続 FIA を考案した。

Ti-TPyP 試薬はオキソ(5,10,15,20-テトラ-4-ピリジル-ポルフィリン)チタン(IV)錯体 $\{\text{TiO}(\text{tpypH}_4)^{4+}\}$ の酸性水溶液であり、過酸化水素と反応し、ペルオキソ錯体 $\{\text{TiO}_2(\text{tpypH}_4)^{4+}\}$ を生成して発色する⁶⁾。著者らは本試薬を用いる高感度な過酸化水素の FIA を既に報告した⁷⁾。この流路に、3 種の糖の加水分解酵素及びグルコースの酸化酵素を固定化したカラム(固定化リアクター)を組み込み、生成した過酸化水素を測定して 4 種の糖類を定量した。

2 実 験

2.1 試 薬

Ti-TPyP 試薬 (30 μM): オキソ(5,10,15,20-テトラ-4-ピリジル-ポルフィリン)チタン(IV) (東京化成工業製) 20 mg を 5 M 塩酸 2 ml に溶解し、1.0 M 硫酸を加えて全量 1000 ml とした。

グルコース標準溶液 (10.0 mM): D-グルコース (特級, 和光純薬製) 1.802 g を蒸留水に溶解し、全量 100 ml とした。

スクロース標準溶液 (10.0 mM): スクロース (特級, 和光純薬製) 3.423 g を蒸留水に溶解し、全量 100 ml とした。

マルトース標準溶液 (10.0 mM): マルトース (特級, 和光純薬製) 3.603 g を蒸留水に溶解し、全量 100 ml とした。

ラクトース標準溶液 (10.0 mM): ラクトース (特級, 和光純薬製) 3.603 g を蒸留水に溶解し、全量 100 ml とした。

酵素カラム作製時の酵素溶液として、グルコースオキシダーゼ (E.C.1.1.2.4, シグマ製) は 2400 U を、 β -ガラクトシダーゼ (E.C.3.2.1.23, ベーリンガー・マンハイム製) は 300 U を、マルターゼ (E.C.3.2.1.20, シグマ製) は 300 U を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 2 ml にそれぞれ溶解して調製した。

β -フルクトシダーゼ及びムタロターゼ混合固定化カラム作製には、 β -フルクトシダーゼ (E.C.3.2.1.26, ベーリンガー・マンハイム製) 及びムタロターゼ (E.C.5.1.3.3, ベーリンガー・マンハイム製) それぞれ 3000 U 及び 2500 U を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 2 ml に溶解して用いた。

グルコースオキシダーゼ、ムタロターゼ及びカタラー

ゼ (E.C.1.11.1.6, シグマ製) 混合固定化カラム作製には、各酵素それぞれ 2400 U, 2500 U 及び 25000 U を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 2 ml に溶解して用いた。

アスコルビン酸オキシダーゼ溶液はアスコルビン酸オキシダーゼ (E.C.1.1.2.4, シグマ製) 2400 U を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 2 ml に溶解した。

グルタルアルデヒド溶液 (2.5%): 25% グルタルアルデヒド溶液 (一級, 和光純薬製) 1 ml を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 10 ml に溶解した。

2.2 酵素リアクターの作製

グルコースオキシダーゼ、マルターゼ、 β -ガラクトシダーゼ及び β -フルクトシダーゼとムタロターゼの各酵素カラムは、上記酵素溶液を用いて、van Zoonen らの方法によりそれぞれ固定化して作製した⁸⁾。すなわち、アミノプロピル化した多孔性ガラスビーズ 0.1 g に 2.5% グルタルアルデヒド溶液 5 ml を加えて、減圧下 30 分間振り混ぜた後、常温常圧で 1 時間振り混ぜた。水及び 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で洗浄した後、各々の酵素溶液 2 ml を加え、氷冷しながら減圧下 1 時間振り混ぜた。更に 4°C に 12 時間保った後、0.2 M リン酸緩衝液で洗浄し、キャリアー溶液中に保存した。酵素を固定化したガラスビーズをテフロンチューブ (グルコースリアクターでは 3 cm 長さ、スクロース、マルトース及びラクトースリアクターでは 9 cm 長さ、1 mm 内径) に充てんして酵素リアクターとした。

グルコース除去リアクターは、グルコースオキシダーゼ、ムタロターゼ及びカタラーゼを、又アスコルビン酸除去リアクターは、アスコルビン酸オキシダーゼを Matsumoto らの方法により次のように固定化して作製した⁹⁾。CNBr 活性化セファロース 4B 0.2 g を 1 mM 塩酸に 10 分間浸した後、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で洗浄する。グルコースオキシダーゼ、ムタロターゼ及びカタラーゼの混合溶液、あるいはアスコルビン酸オキシダーゼ溶液を加えて、4°C で 24 時間反応させた。得られた固定化酵素をグルコース除去リアクターでは 7 cm 長さ、アスコルビン酸除去リアクターでは 5 cm 長さ (2 mm i.d.) のテフロンチューブに充てんして、それぞれ酵素リアクターとした。

2.3 装置及び測定法

検出器は日本分光製 UV-970 型分光光度計を、ポンプはサヌキ工業製 DMX-2000 FIA 用ダブルプランジャーポンプを用いた。サンプルインジェクターにはレオ

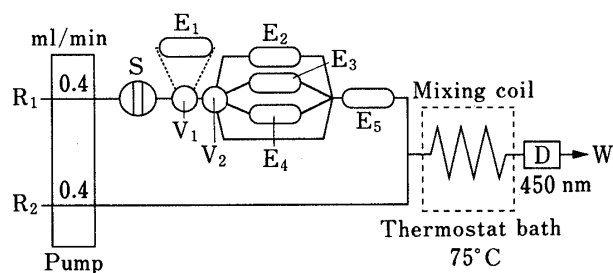


Fig. 1 Flow diagram of the FIA system for sugar determination using immobilized enzyme reactors

R₁: pH 6.6, 0.05 M phosphate buffer containing 1 mM MgCl₂; R₂: 30 μM Ti-TPyP reagent; E₁: glucose eliminating reactor (glucose oxidase, catalase); E₂: sucrose reactor (β-fructosidase, mutarotase); E₃: maltose reactor (maltase); E₄: lactose reactor (β-galactosidase); E₅: glucose reactor (glucose oxidase); V₁, V₂: switching valve; S: sample loop (20 μl); mixing coil: 15 m long, 0.5 mm i.d.

ダイン 8125, バルブにはスーパーセラミックバルブを, 流路は内径 0.5 mm のテフロンチューブを用いた.

FIA システムは Fig. 1 に示すような 2 流路系とした. キャリヤー溶液として 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 6.6) を, 試薬溶液として 30 μM Ti-TPyP 試薬をそれぞれ 0.4 ml/min の流量で送液した. グルコースの定量では, キャリヤー溶液中に注入された試料溶液 (20 μl) をバルブ V₂ により切り替えて, グルコースリアクター (E₅) を通過させた. その間に試料中グルコースは酸化されて過酸化水素を生成した. 又, スクロース, マルトース及びラクトースを定量する場合には, 試料中のグルコースが測定値に正の誤差をもたらすため, あらかじめバルブ V₁ によって流路をグルコース除去リアクターへ切り替えて, 試料溶液中のグルコースを分解除去した. バルブ V₂ によってグルコースを除いた溶液を, それぞれ測定対象となる糖の加水分解リアクターに流し, 試料溶液中 2 糖類を β-D-グルコースに変換した. 生成した β-D-グルコースをグルコースリアクター (E₅) で酸化し過酸化水素とした. 過酸化水素はミキシングコイル (15 m, 75°C) 中で Ti-TPyP 試薬と反応し, 生成した TiO₂(tpypH₄)⁴⁺ 錯体の吸光度 (450 nm) をピーク高さとして検出した.

2・4 試料の前処理

12 種の市販食品を試料として, 糖類濃度を測定した. 試料は適宜希釈 (50~1000 倍) し, メンブランフ

ィルター (孔径 0.45 μm) で濾過したものを試料溶液として注入した.

3 結果及び考察

3・1 定量条件の検討

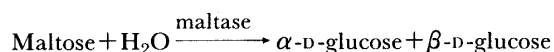
3・1・1 Ti-TPyP 試薬による発色反応⁶⁾ Ti-TPyP 試薬は, 1.0 M 硫酸中で, 次式に示すようにペルオキシ錯体を生成する.



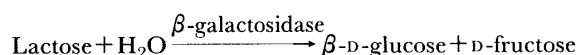
この錯体の 1.0 M 硫酸水溶液は 450 nm に吸収極大を持ち, その吸光度は過酸化水素濃度に比例する. モル吸光係数 (ε) は $1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であり, ポルフィリン骨格に由来する大きな値を示し, 過酸化水素の高感度定量を可能にする. 又, 本発色反応は錯体生成反応であるため, 酸化還元性物質共存の影響を受け難い利点があり, 食品や生体成分関連の分析に適している. しかし, 本錯体は生成反応速度がやや小さいので, 反応促進のために, 本法ではプロトン (1.0 M 硫酸) 溶液中で反応を行わせ, 反応コイルを 75°C に加温した⁷⁾.

3・1・2 酵素反応 3 種の二糖類はそれぞれの酵素リアクターによって β-D-グルコースに変換し, 次いで GOD リアクター内で酸化し過酸化水素とした. マルトースはマルトースリアクターにより α-D-グルコースと β-D-グルコースに分解し, ラクトースはラクトースリアクターにより β-D-グルコースとガラクトースに変換した. 又スクロースは β-フルクトシダーゼにより α-D-グルコースとフルクトースとに分解したが, GOD は β-D-グルコースのみに作用するので, ムタロターゼによって α-D-グルコースを β 体へと異性化した. よって, β-フルクトシダーゼとムタロターゼを組み合わせ, スクロースリアクターとした. これらの酵素反応式を次に示す.

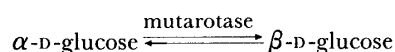
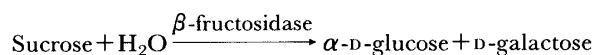
Maltose reactor:



Lactose reactor:



Sucrose reactor:



Glucose reactor:

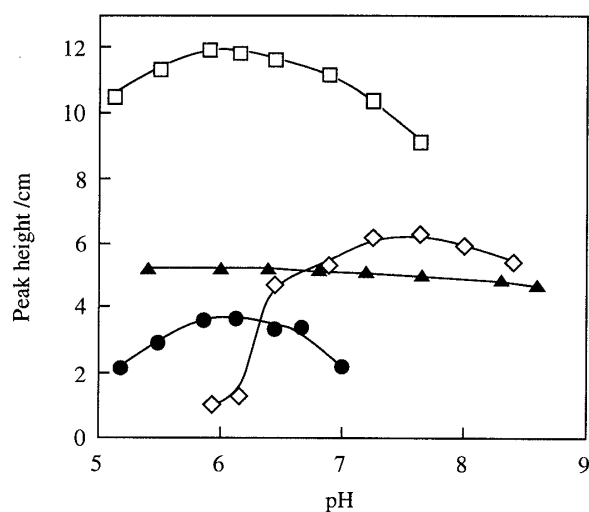
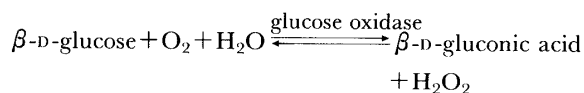


Fig. 2 Effect of pH of carrier solution on peak height

□: sucrose by sucrose reactor; ●: maltose by maltose reactor; ◇: lactose by lactose reactor; ▲: glucose by glucose reactor. Concentration of sugar solution: 1.00×10^{-3} M



3.1.3 FIA 系の設定 一般に酵素は固定化することにより安定性が増し、反応の至適条件も溶液の場合とは異なる。そこで、各酵素カラムの性能に対するキャリアー溶液の pH の影響を調べた。ところで、経済性及び簡便性の点から、より簡単な FIA 系が望まれる。そこで、酵素リアクターごとにキャリアー溶液を替えずに、1 種類の pH 緩衝液を用いることとし、その pH が酵素反応に及ぼす影響を検討した。Fig. 2 に示すように、スクロース及びマルトースリアクターは共に pH 6 付近で最大の活性を示し、ラクトースリアクターでは pH 7.5 付近で最大ピーク値が得られた。又、グルコースリアクターは pH 5.2~8.6 の範囲で、ほぼ一定のピークが得られた。従って、キャリアー溶液は、すべての酵素リアクターが検出に十分な活性を示す pH 6.6 の 0.05 M リン酸緩衝液を用いることとした。ラクトースリアクターに固定化された β -ガラクトシダーゼは、反応溶液中に Mg^{2+} が存在しない場合には、その活性は非可逆的に急激に減少する¹⁰⁾。そこで、 β -ガラクトシダーゼの活性を保つために必要な Mg^{2+} 濃度を検討した。キャリアー溶液中に添加された Mg^{2+} 濃度が、 β -ガラクトシダーゼ活性、すなわち過酸化水素生成量に及ぼす

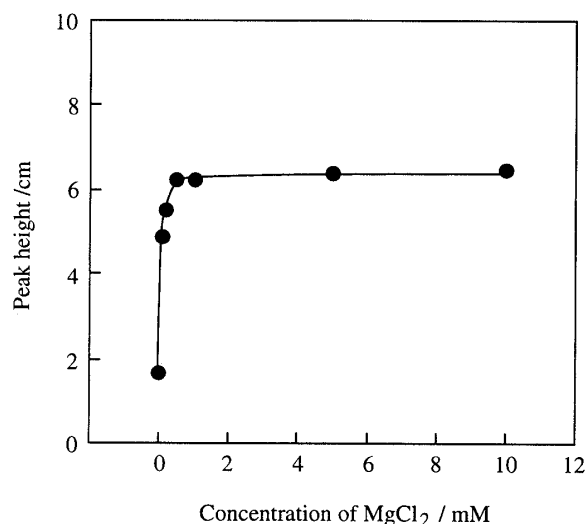


Fig. 3 Effect of MgCl_2 concentration on β -galactosidase activity, i.e., peak height of lactose
Concentration of lactose: 1.00×10^{-4} M

影響を Fig. 3 に示す。0.5 mM 以上の塩化マグネシウム濃度範囲においては、ピーク高さは塩化マグネシウムが不在時のその約 4 倍の一定値を保った。従って、キャリアー溶液には塩化マグネシウムを 1 mM となるように添加した。各々の酵素リアクターの長さがピーク高さに与える影響を検討した (Fig. 4)。リアクターが短すぎると酵素反応時間が短くなり、酵素反応率が低下した。又、長いほど酵素反応率は高くなるが、試料の拡散のためにピーク幅は広がり、ピーク高さの減少を招くとともに単位時間当たりに測定できる検体数が減少した。そこで、ピーク高さが最大かつ一定となるようにスクロース、マルトース及びラクトースリアクターは 9 cm 長さに、又、グルコースリアクターは 3 cm に定めた。なお、固定化リアクターの耐久性については、マルトースリアクターでは 2 週間、スクロース及びラクトースリアクターでは 1 か月、そしてグルコースリアクターについては 6 か月以上の使用が可能であった。以上の条件検討の結果、Fig. 1 に示す FIA 系を構築した。

3.2 検量線及び精度

本法によって得られた定量範囲及び精度を Table 1 に示す。グルコースでは 0.5~500 μM (10~10000 pmol/test)、スクロース、マルトース及びラクトースでは 1~1000 μM (20~20000 pmol/test) の範囲において、いずれも良い直線性 ($r=0.999$) が得られた。一例

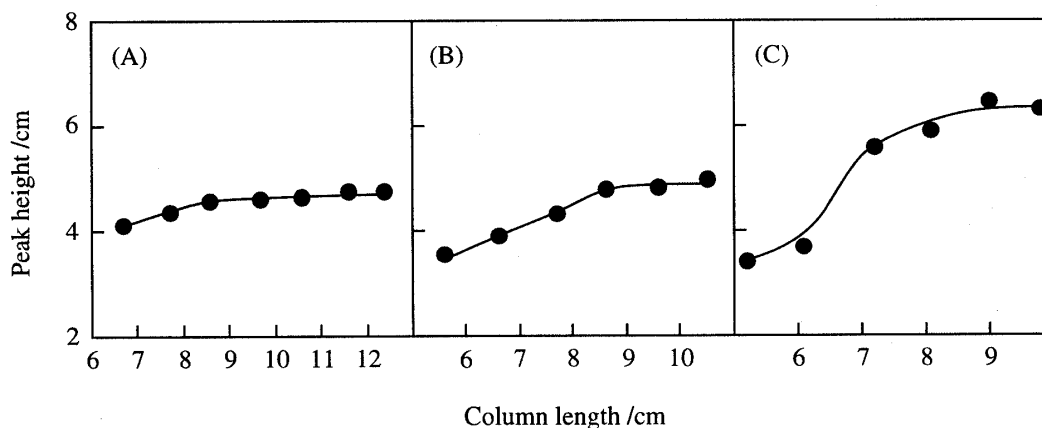


Fig. 4 Effect of enzyme reactor length on peak height of sugars

(A): sucrose reactor; (B): maltose reactor; (C): lactose reactor. Concentration of sugar solutions: 1.00×10^{-4} M

Table 1 Linear range and accuracy for the determination of glucose, sucrose, maltose and lactose

	Linear range/ μM pmol/test	Correlation coefficient	R.S.D., % (100 μM , $n=10$)
Glucose	0.5~500 10~10000 1~1000	0.999	0.74
Sucrose	20~20000 1~1000	0.999	0.75
Maltose	20~20000 1~1000	0.999	0.49
Lactose	20~20000	0.999	0.84

として, 本法によって得られたグルコース標準溶液の FIA シグナルを Fig. 5 に示す. 又, 100 μM 標準溶液を用いたときの繰り返し実験による相対標準偏差 ($n=10$) は, 4 種の糖いづれにおいても 1% 以下であり, 本法の高い信頼性が示された (Table 1).

3・3 共存物質の影響

実際試料への応用に先立ち, 食品中に存在が予想される共存物質について測定値への影響を検討した. グルコース及びスクロースについての結果を Table 2 に, マルトース及びラクトースの場合を Table 3 にそれぞれ示す. 4 種の糖いづれにおいても, Na^+ , K^+ , Ca^{2+} などの無機イオンは糖濃度の 100 倍以上, 又, 酢酸, リンゴ酸, クエン酸など有機物のほとんどが糖濃度の 100 倍以上の共存でも測定値に影響を与えなかった. しかし, マルトースの定量においてその 1/10 濃度以上のス

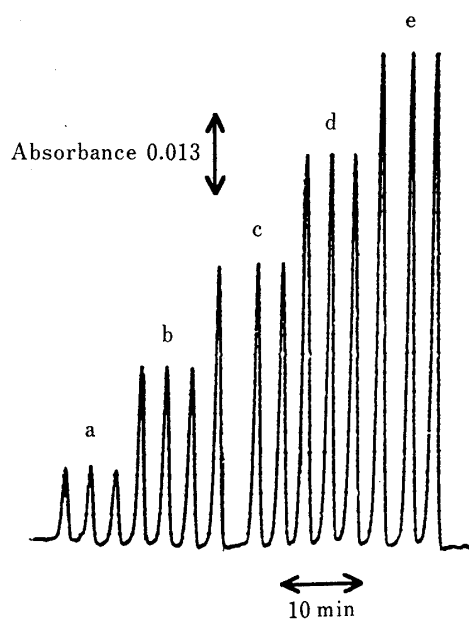


Fig. 5 Typical FIA signals for standard solution of glucose

Glucose concentration (μM): a, 20; b, 40; c, 60; d, 80; e, 100

クロースの共存は, 明らかに正の誤差をもたらした. これは, マルターゼの基質特異性が乏しいために, スクロースに対しても約 35% の割合で反応した. そこで, 実際試料のマルトース定量においては, マルトースリアクター経路にスクロース標準溶液を注入し, 得られたピーク高さからグルコースの反応率を求めた. その値から試料中に存在しているスクロースによって生じるピー

Table 2 Effect of foreign substances on the determination of glucose and sucrose

Substance	Glucose		Sucrose	
	Conc. added in sample/M	Glucose found, % [†]	Conc. added in sample/M	Sucrose found, % ^{††}
NaCl	5.0×10^{-1}	101.6	5.0×10^{-2}	96.3
KCl	5.0×10^{-1}	100.0	5.0×10^{-2}	96.4
MgCl ₂	5.0×10^{-1}	101.4	5.0×10^{-2}	99.0
CaCl ₂	5.0×10^{-1}	101.0	1.0×10^{-2}	99.0
FeCl ₃	1.0×10^{-3}	99.2	1.0×10^{-3}	96.7
Sucrose	1.0×10^{-2}	98.9	—	—
Maltose	5.0×10^{-4}	100.5	1.0×10^{-2}	95.8
Lactose	1.0×10^{-2}	101.4	5.0×10^{-2}	104.3
Fructose	1.0×10^{-2}	101.1	5.0×10^{-2}	96.4
Acetic acid	5.0×10^{-2}	96.4	5.0×10^{-2}	98.6
Malic acid	5.0×10^{-2}	102.4	5.0×10^{-2}	99.0
Citric acid	1.0×10^{-2}	101.4	5.0×10^{-2}	97.7
Formic acid	5.0×10^{-2}	104.6	5.0×10^{-2}	99.8
Tartaric acid	2.5×10^{-2}	103.6	5.0×10^{-2}	102.7
Malonic acid	5.0×10^{-2}	100.4	5.0×10^{-2}	100.0
Ascorbic acid	1.0×10^{-5}	102.1	1.0×10^{-5}	101.8
Riboflavin	1.0×10^{-5}	95.2	1.0×10^{-5}	101.4

† Glucose added: 1.00×10^{-4} M; †† Sucrose added: 1.00×10^{-4} M

Table 3 Effect of foreign substances on the determination of maltose and lactose

Substance	Maltose		Lactose	
	Conc. added in sample/M	Maltose found, % [†]	Conc. added in sample/M	Lactose found, % ^{††}
NaCl	5.0×10^{-2}	98.2	5.0×10^{-2}	99.7
KCl	5.0×10^{-2}	99.4	5.0×10^{-2}	100.8
MgCl ₂	5.0×10^{-2}	103.5	—	—
CaCl ₂	1.0×10^{-2}	96.5	1.0×10^{-2}	103.2
FeCl ₃	1.0×10^{-3}	96.7	1.0×10^{-4}	97.3
Sucrose	1.0×10^{-5}	102.2	1.0×10^{-4}	99.2
Maltose	—	—	1.0×10^{-4}	104.2
Lactose	5.0×10^{-2}	103.5	—	—
Fructose	5.0×10^{-2}	102.9	1.0×10^{-3}	101.4
Acetic acid	5.0×10^{-2}	101.1	5.0×10^{-2}	97.4
Malic acid	5.0×10^{-2}	105.0	5.0×10^{-2}	97.5
Citric acid	5.0×10^{-2}	105.0	5.0×10^{-2}	101.7
Formic acid	5.0×10^{-2}	102.5	5.0×10^{-2}	101.2
Tartaric acid	2.5×10^{-2}	103.8	1.0×10^{-2}	99.3
Malonic acid	5.0×10^{-2}	100.9	5.0×10^{-2}	97.6
Ascorbic acid	1.0×10^{-5}	102.7	5.0×10^{-6}	95.7
Riboflavin	1.0×10^{-5}	101.2	1.0×10^{-5}	102.9

† Maltose added: 1.00×10^{-4} M; †† Lactose added: 1.00×10^{-4} M

ク高さ分を求め、この値をマルトース測定値から差し引いて補正した。この場合、当該系でのスクロースの反応率を求めて補正しているので、その誤差は 0.5% 以下と

考えられ、スクロース含量がマルトースの 20 倍以下であるならば、本法によって信頼性の高い値が得られる。

アスコルビン酸は、ある種の金属錯体により酸化さ

Table 4 Glucose, sucrose, maltose and lactose concentrations in milk, drinks, and alcoholic beverages

Sample	Found(g/100 g ⁻¹)			
	Glucose	Sucrose	Maltose	Lactose
Milk	0.00785	0.00243	N.D.	5.40
Cream powder	1.44	0.589	0.137	46.1
Lactobacilli beverage 1	0.645	7.56	0.93	3.75
Lactobacilli beverage 2	4.20	6.33	1.62	2.40
Milky beverage	3.62	2.88	0.749	3.71
Soft drink	1.30	0.100	0.0548	N.D.
Fruit juice	2.31	1.73	0.0951	N.D.
Malt tea	0.00371	N.D.	0.00667	N.D.
Wine	0.818	N.D.	N.D.	N.D.
Sake	1.42	N.D.	0.0883	N.D.
Beer 1	0.0133	N.D.	0.195	N.D.
Beer 2	0.00775	N.D.	0.171	N.D.

れ, 過酸化水素を生成することが知られている¹¹⁾. Ti-TPyP 試薬も, 高温において過酸化水素生成反応を促進するので, 高濃度にアスコルビン酸を含む試料では測定値に正の誤差をもたらした. そこで, プレカラムとしてアスコルビン酸オキシダーゼ固定化カラムを設置し, その影響を除去した. リボフラビンは食品中の含量が非常に少なく, 本法では測定時に 50~1000 倍希釈するので, 測定時のリボフラビン濃度が 1×10^{-5} M 以上になることはまれである. 従って, 特に除去操作の必要はないと考えられる.

3・4 実際試料への応用

本法によって, 牛乳, 乳酸菌飲料, 麦芽飲料など 8 種の市販食品, 及び 4 種のアルコール飲料中に含まれる糖類濃度を測定した. その結果を Table 4 に示す. 酒類中に含まれる糖類含量は 0.1 ppm オーダーまで, 簡易迅速に定量可能であった. 又, それぞれの試料に, グルコース, スクロース, マルトース及びラクトースの標準溶液を各々 100 μ M 濃度となるように添加したときの回収率を求めた. Table 5 に示すように, 二, 三の例を除いて, いずれの場合も 95~105% の範囲の回収率が得られ, 本法の信頼性が確認された. なお Table 4 及び 5 の定量値と回収率の値は, 4 回の繰り返し測定の平均値であり, そのばらつきは大部分の試料において 3% 以内であった.

本法は, 基質に対して特異的に作用して過酸化水素を生成する酵素反応と, 過酸化水素の高感度試薬 Ti-T-PyP 試薬を組み合わせた FIA であり, パルプの切り替

Table 5 Recovery of added glucose, sucrose, maltose and lactose in samples

Sample	Recovery, %			
	Glucose ^{a)}	Sucrose ^{b)}	Maltose ^{c)}	Lactose ^{d)}
Milk	102.9	99.6	—	97.3
Cream powder	99.7	100.4	95.1	102.6
Lactobacilli beverage 1	97.7	105.1	101.2	100.6
Lactobacilli beverage 2	95.1	101.9	103.5	107.6
Soft drink	103.8	102.8	95.3	—
Fruit juice	96.2	100.7	95.2	—
Malt tea	99.0	—	99.5	—
Wine	97.5	—	—	—
Sake	102.3	—	98.5	—
Beer 1	99.2	—	106.9	—
Beer 2	98.2	—	108.7	—

Concentration of sugars added: a) 1.00×10^{-4} M; b) 1.00×10^{-4} M; c) 1.00×10^{-4} M; d) 1.00×10^{-4} M

えによって, 4 種の糖を高感度に測定できた. 本法は, 種々の酵素カラム系を設置することにより多種類成分の測定を可能にするので, 食品分析や臨床分析分野への応用が期待される.

(1994 年 10 月, 日本分析化学会)
第 43 年会において一部発表

文 献

- 1) G. W. Chapman, Jr., R. J. Horvat: *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 947 (1989).
- 2) J. M. Marioli, P. F. Luo, T. Kuwana: *Anal. Chim. Acta*, **282**, 571 (1993).
- 3) B. Olsson, B. Stalbm, G. Johansson: *Anal. Chim. Acta*, **179**, 203 (1986).
- 4) C. G. D. Marita, A. Townshend: *Anal. Chim. Acta*, **261**, 137 (1992).
- 5) P. Hartmann, S. J. Haswell, M. Grassbauer: *Anal. Chim. Acta*, **285**, 1 (1994).
- 6) C. Matsubara, N. Kawamoto, K. Takamura: *Analyst* (London), **117**, 1781 (1992).
- 7) 松原チヨ, 中道典広, 河本直樹, 高村喜代子: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **42**, 363 (1993).
- 8) P. van Zoonen, I. de Herder, C. Gooijer, N. H. Verthorst, R. W. Frei: *Anal. Lett.*, **19**, 1949 (1986).
- 9) K. Matsumoto, O. Hamada, H. Okeda, Y. Osajima: *Anal. Chem.*, **60**, 147 (1988).
- 10) S. P. Colowick, N. O. Kaplan: "Methods in Enzymology, Volume XLIV", Edited by K. Mosbach, p. 827 (1976), (Academic Press, New York).
- 11) Y. Kirimura, H. Yokota, Y. Muraki: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **54**, 2450 (1981).

**Flow injection analysis for sugars in foods using Titanium(IV)-porphyrin reagent.**

Yuta YOKOI*, Chiyo MATSUBARA** and Kiyoko TAKAMURA* (*School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science, 1432-1, Horinouchi, Hachioji-shi, Tokyo 192-03; **School of Life Science, Tokyo University of Pharmacy and Life Science, 1432-1, Horinouchi, Hachioji-shi, Tokyo 192-03)

A rapid and sensitive flow injection analysis (FIA) with spectrophotometric detection by a titanium(IV)-porphyrin reagent was examined for the continuous determination of glucose, sucrose, maltose and lactose in foods using immobilized enzyme reactors to yield hydrogen peroxide. A sample solution is carried by valve to three hydrolysis enzyme reactors in the flow system. The reagent is an aqueous solution of oxo[5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)porphyrinato]titanium(IV), $\text{TiO}(\text{tpypH}_4)^{4+}$, which reacts with hydrogen peroxide to form a monoperoxo complex, $\text{TiO}_2(\text{tpypH}_4)^{4+}$, having an absorption peak at 450 nm. The hydrogen peroxide produced from each sugar was determined by combining the reactions with glucose oxidase (GOD) and hydrolytic enzyme reactors corresponding to each sugar. Linear relations were observed between the peak heights and sugar concentrations in samples containing 0.5~500 μM (10~10000 pmol/test) glucose, and 1~1000 μM (20~20000 pmol/test) sucrose, maltose and lactose. The relative standard deviations for ten replicate determinations of glucose, sucrose, maltose and lactose were 0.74, 0.75, 0.84 and 0.49%, respectively, for each standard solution of 100 μM . The method permitted analysis of 20 kinds of sugar in samples per hour. This method was applied to determining these four sugars in foods such as milk, soft drinks and wine with satisfactory results.

(Received December 15, 1994)

(Accepted January 24, 1995)

Keyword phrases

Ti(IV)-porphyrin reagent; determination of glucose, sucrose, maltose and lactose; immobilized enzyme reactors; flow injection analysis; hydrogen peroxide.
