ノ ー ト

固定化酵素リアクター及び化学発光検出器を用いた高速液体クロマトグラフィーによるスクロースとグルコースの定量

木羽 信敏[®], 三枝 数也, 古澤 源久*

(1993 年 3 月 25 日受理)

1 緒 言

種々の糖の定量が、食品工業の分野で必要とされている。糖分析には、通常、HPLC で分離した後、示差屈折率検出器 (DRD) で測定する方法が用いられている¹⁾²⁾。しかし、DRD はすべての成分に反応し、感度が低い。

そこで HPLC と固定化酵素リアクターを組み合わせ、選択的かつ高感度に糖を定量する方法が開発された^{3)~8)}。

グルコースの場合は固定化グルコースオキシダーゼ (EC 1.1.3.4, 以下 GOD と略記) が用いられ、GOD により生じた過酸化水素は電気化学検出器^{5)~7)}及び化学発光検出器⁸⁾により検出されている。

グルコースは、水溶液中で α -D-グルコースと β -D-グルコースとが 9:16 の割合で平衡にあり、この割合は溶液の温度、pH、共存イオンにより変化する⁹⁾。GOD は β 体のみに活性を有する。そこで α 体と β 体に等しい反応性を示す酵素としてピラノースオキシダーゼ (EC 1.1.3.10, 以下 PyOD と略記) が見いだされ^{10)~12)}、固定化 PyOD リアクターが作られ、グルコースの定量に用いられた¹³⁾¹⁴⁾。

本研究は固定化酵素を用いた HPLC によりスクロースとグルコースを再現性良く定量することを目的とした。すなわちインベルターゼ (EC 3.2.1.26, 以下 Inv と略記) と PyOD を化学結合により固定化したカラムリアクターを作り、分離カラムの後に接続した。分離カラムで分離したスクロースは Inv によりグルコースとフルクトースに加水分解され、グルコースは次の

PyOD によりグルコソンと過酸化水素になる。この過酸化水素をルミノールを用いる化学発光法により測定した。

2 実 験

2.1 試薬及び装置

試 薬

PyOD: 協和メディクス (*Coriolus versicolor* 由来, 1160 U/ml)

Inv: 東洋紡 (*Candida sp.* 由来, 120 U/mg)

スクロース: 和光純薬 (特級)

固定相: 東ソー TSKgel SCX (ナトリウム型, 5 μ m)

移動相: 0.01 M 酢酸塩緩衝液 (pH 4.5)

F-キット (サッカロース/グルコース): パーリンガー・マンハイム山之内製

その他の試薬はいずれも市販特級品を用いた。

固定化用担体、固定化用試薬及び化学発光試薬は既報²⁾¹⁴⁾と同様なものを使用した。

装 置

試薬溶液及び移動相の送液: 日立 L-6000 型ポンプ

試料注入器: 協和精密 KHP-VI-130A

化学発光検出器: 日音医理科 LF-800

DRD: ウォーターズ R-401

記録計: 東亜電波 FBR-251A

固定化酵素リアクター: 内径 4 mm, 長さ 50 mm 及び 10 mm のステンレス鋼カラム

分離カラム: 内径 7.8 mm, 長さ 300 mm のステンレス鋼カラムを用いた。

測定システムを Fig. 1 に示す。

* 山梨大学工学部化学生物工学科: 400 山梨県甲府市武田 4-3-11

Fig. 1 Diagram of the HPLC system used for the chemiluminometric detection of sucrose and glucose with immobilized enzyme column reactors

A: the mobile phase (0.01 M acetate buffer (pH 4.5)) (0.7 ml/min), B: reagent solution (0.02 M potassium hexacyanoferrate(III) (0.5 ml/min), C: reagent solution (1 mM luminol in 0.4 M carbonate buffer (pH 10.5)) (0.5 ml/min), D: LC pump, E: an injector with a 50 μ l loop, F: water bath (50°C), G: analytical column (300 mm $\times$ 7.8 mm i.d.), H: immobilized Inv reactor (50 mm $\times$ 4 mm i.d.), I: immobilized PyOD reactor (10 mm $\times$ 4 mm i.d.), J: luminescence detector, K: recorder

2.2 酵素固定化法

Inv には 50 mm (長さ), PyOD には 10 mm (長さ) のカラムを用いた。固定化は既報³⁾¹⁴⁾に従い行った。調製した固定化酵素カラムは冷蔵庫に保存した。

2.3 定量操作

清涼飲料水 0.1 ml を 100 ml のメスフラスコにとり水で 100 ml とした。この溶液の 50 μ l を、Fig. 1 に示した HPLC システムに注入してクロマトグラムを測定し、あらかじめ作成した $6.0 \times 10^{-7} \sim 5.0 \times 10^{-4}$ M の検量線より試料中のスクロース、グルコース濃度を求めた。

3 結果及び考察

3.1 固定化酵素の特性

3.1.1 pH 及び温度の影響 移動相の酢酸塩緩衝液の pH を 3.5~6.0 の範囲で変化させて Inv によるスクロースから生じる応答及び PyOD によるグルコースから生じる応答を比較した。Inv 及び PyOD は広い範囲で活性を示し最適 pH はいずれも 4.5 であったので、移動相の酢酸塩緩衝液を pH 4.5 とした。又、固定化酵素の温度を 20~60°C の間で変化させ、その応答を比較した。Inv 及び PyOD は高温になるほど活性が大きくなり 60°C で最高の活性を示した。 1.0×10^{-6} M のスクロースの分解率は 50 及び 60°C でそれぞれ 98, 100% であった。 1.0×10^{-6} M のグルコースの反応率は 50 及

び 60°C でそれぞれ 68, 70% であった。固定化酵素の安定性を考慮して温度を 50°C とした。

3.1.2 安定性 標準溶液 (各 8.0×10^{-5} M) を 15 分おきに 1 日 40 回注入し、0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) で洗浄した後、冷蔵庫中に保存し、ピーク高さの経時変化を測定したところ、グルコースのものでは 6 か月後でも最初の高さの 90% を示したが、スクロースのものは徐々に減少し 1 及び 2 か月後のピークの高さは最初の高さの 93 及び 86% となった。

3.2 分離

移動相の流量 0.7 ml/min, カラム温度 50°C でグルコースとスクロースが完全に分離された。L-アスコルビン酸は清涼飲料水中に添加されていることが考えられ、しかも PyOD により生成した H_2O_2 を消費することから同時分離を試みた。上記条件で、各成分は 14 分以内に分離して溶出され、スクロース (保持時間 8.8 分) とグルコース (同 10.0 分) は L-アスコルビン酸 (同 12.8 分) の妨害なく測定できることが分かった。

3.3 定量

本システムを用いて測定したクロマトグラムを Fig. 2 に示す。スクロース、グルコースの検量線はともに $6.0 \times 10^{-7} \sim 5.0 \times 10^{-4}$ M の範囲で良好な直線性を示した。スクロースとグルコースの検出限界 ($S/N=3$) は

Fig. 2 Chromatogram of the standard solution (1.0 μ M of each compound)

S: sucrose, G: glucose, conditions as in Fig. 1

Table 1 Results for sucrose and glucose in non-alcoholic beverages

Sample	Sucrose		Glucose	
	Present method	F-kit	Present method	F-kit
1	3.3(0.9)	3.3(2.5)	2.0(1.2)	1.9(2.8)
2	2.2(1.0)	2.3(3.1)	5.5(0.9)	5.4(2.2)
3	3.5(0.9)	3.5(2.2)	2.1(1.1)	2.0(2.8)

All values are means (% , w/v) with the relative standard deviations (%) given in parentheses ($n=9$).

それぞれ 2.0×10^{-7} M (3.4 ng/50 μ l), 3.0×10^{-7} M (2.7 ng/50 μ l) であった。

3・4 実試料への応用

本法により市販清涼飲料水中のスクロースとグルコース濃度を測定した結果及び F-キットにより測定した結果を Table 1 に示す。本法では飲料水を 1000 倍に希釈し、その 50 μ l をそのまま HPLC に注入した。本法の結果と F-キットとの結果はよく一致した。

固定化 Inv 及び PyOD は長時間安定であり、これらを組み込んだ化学発光検出 HPLC システムを用いて微量のスクロースとグルコースの選択的かつ再現性の良い定量が可能であった。本法は実際試料の分析に十分応用できることが分かった。

文 献

- 1) 日本分析化学会関東支部編: “高速液体クロマトグラフィーハンドブック”, pp. 372~398 (1985), (丸善).
- 2) H. S. Kwak, I. J. Jeon: *J. Food Sci.*, **53**, 975 (1988).
- 3) N. Kiba, K. Shitara, H. Fuse, M. Furusawa, Y. Takata: *J. Chromatogr.*, **549**, 127 (1991).
- 4) L. A. Larew, D. C. Johnson: *Anal. Chem.*, **60**, 1876 (1988).
- 5) 村上和雄, 掛本道子, 原田敏勝, 山田約瑟: 分析化学, **40**, 125 (1991).
- 6) 掛本道子, 村上和雄, 原田敏勝, 小川裕康: 日化, **1992**, 40.
- 7) 村上和雄, 掛本道子, 原田敏勝, 山田約瑟, 小川裕康: 分析化学, **41**, 343 (1992).
- 8) P. Koerner, Jr., T. A. Nieman: *J. Chromatogr.*, **449**, 217 (1988).
- 9) J. Okuda, I. Miwa: *Anal. Biochem.*, **43**, 312 (1971).
- 10) H. W. Ruelius, R. M. Kerwin, F. W. Janssen: *Biochim. Biophys. Acta*, **167**, 493 (1968).
- 11) F. W. Janssen, H. W. Ruelius: *Biochim. Biophys. Acta*, **167**, 501 (1968).
- 12) Y. Machida, T. Nakanishi: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2463 (1984).
- 13) L. Olsson, C. F. Mandenius, J. Velc: *Anal. Chem.*, **62**, 2688 (1990).
- 14) N. Kiba, F. Ueda, M. Furusawa: *Anal. Chim. Acta*, **269**, 187 (1992).

Determination of sucrose and glucose by HPLC using immobilized enzyme reactors and a chemiluminescence detector. Nobutoshi KIBA, Kazuya SAEGUSA and Motohisa FURUSAWA (Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Faculty of Engineering, Yamanashi University, 4-3-11, Takeda, Kofu-shi, Yamanashi 400)

Immobilized enzymes were used as column reactors in a high-performance liquid chromatographic system for the specific detection of sucrose and glucose. Invertase (EC 3.2.1.26, Inv) and pyranose oxidase (EC 1.1.3.10, PyOD) were immobilized onto porous glass beads. The saccharides were separated on a TSKgel SCX column (30 cm $\times$ 7.8 mm i.d.) with a 0.01 M acetate buffer (pH 4.5) as a mobile phase. Inv was capable of hydrolyzing sucrose nearly quantitatively (98%) to fructose and glucose, which was oxidized to glucosone and hydrogen peroxide by PyOD. The produced hydrogen peroxide was monitored chemiluminometrically. The calibration graph was linear from 6.0×10^{-7} to 5.0×10^{-4} M sucrose or glucose. The detection limits for sucrose and glucose were 2.0×10^{-7} (3.4 ng) and 3.0×10^{-7} M (2.7 ng in a 50 μ l injection), respectively.

(Received March 25, 1993)

Keyword phrases

determination of sucrose and glucose; HPLC with chemiluminometric detection; immobilized invertase reactor; immobilized pyranose oxidase reactor; food analysis.