酸化還元反応を利用した乳糖定量法の検討と 一部の乳製品への適用

土井豊彦・佐藤加代子*・神崎幹雄・松本 清**

An Investigation to Determine Lactose by Using Oxidation- Reduction Reaction and Its Application to Some Kinds of Milk and Milk Products

Toyohiko Doi*, Kayoko SATOH**, Mikio KANZAKI*
and Kiyoshi MATSUMOTO***

* *Engineering Research Center, Morinaga Milk Industry Co., LTD.
4-515 Tateno Higashiyamato-shi, Tokyo 207*

** *Analytical Research Center, Morinaga Milk Industry Co., LTD.
5-1-83 Higashihara Zama-shi, Kanagawa 228*

*** *Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture,
Kyushu University. 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku
Fukuoka-shi, Fukuoka 812*

The Lane-Eynon method is the Japanese official method for measuring lactose in milk products containing sucrose. This method includes titration procedure which must be completed within a definite time at boiling temperature, and the visual detection of its end point is also difficult. To remove these defects an improved method was developed. Sample solution (10 ml) is mixed with an excess amount of copper (II) solution containing strong alkali (5 ml of Fehling's soln. A + 7 ml of Fehling's soln. B), and the mixture is boiled for 2 min. The copper (II) which is equivalent to reducing sugar is reduced to copper (I). After the boiling procedure, an excess amount (4 g) of potassium iodide crystal is added to the mixture. To avoid oxidation of potassium iodide by air, sodium carbonate (40 ml, 4%) and hydrochloric acid (8 ml, 6.7 N) are added successively to the mixture. Carbon dioxide thus liberated is effective in removing oxygen from the solution. The mixture is kept in dark for about 5 min. The liberated free iodine which is equivalent to the remaining copper (II) is titrated with sodium thiosulfate solution (0.05 N) by use of starch as an indicator. The blank test is carried out in the same way by using water as a sample. With the difference between the resulting titre of the sample and that of water, the amount of lactose can be known from a calibration curve which is prepared previously by use of samples containing known amounts of lactose. In this method, the operation was more convenient and the visual detection of the end point was easier than the Lane-Eynon method, since the titration was carried out at room temperature and free from time restriction. The method described here is suitable for practical use judged by reproducibility, recovery and accuracy.

(Received Aug. 13, 1990)

森永乳業(株) (〒189 東京都東大和市立野 4-515)

* 森永乳業(株) (〒228 神奈川県座間市東原 5-1-83)

** 九州大学 (〒812 福岡県福岡市東区箱崎 6-10-1)

蔗糖を含んだ乳製品の定量にはレイン・エイノン法¹⁾が公定法として定められており²⁾、乳製品の糖の測定法として古くから用いられてきた。この方法は、強アルカリ性のもとで2価の銅イオンが還元糖によって還元され1価の銅になる事を利用しており、終点を検出するための指示薬として加えられたメチレンブルーが、全ての銅イオンが還元された後還元され、青色から無色になるのを利用している。この方法の利点は、反応が蛋白質や非還元性の糖など共存物質の影響を受けにくいこと、前処理が比較的簡単で済むことである³⁾。一方、高温でないと反応が進みにくいために煮沸しながら滴定し、しかも糖の分解による誤差を防ぐため一定時間で滴定しなければならない³⁾という不便がある。著者らの経験によると生成物の亜酸化銅の色が濃い暗赤色であること、終点付近の色の変化が微妙で連続的であること、試料によって色合がかなり異なること、煮沸しながらの滴定であることなどのために、終点の判定はかなり難しく、この方法の適用に当たっては、かなりの熟練を必要とし、個人差も相当大きかった。最近、これを改良するために、特殊な電極を使って電位差を測定し、自動的に終点を検出しようとする試みも行なわれている⁴⁾。その他、この方法では、糖の量を算出するときに換算表を用いているが、この表が作成される時採用された終点の色調を再現するのは不可能であるので、終点の色調のずれによる誤差を生じる恐れがある。さらに著者の経験では、この方法による乳糖の測定値はHPLC法による測定値に比べると明らかに低い傾向にある。この様に、この方法は絶対法として不都合な点もいくつか含んでいる。著者らは、これらの欠点を補う為に、Munson-Walker法⁵⁾、Ofner法⁶⁾等を参考にして検討を行なったところ、ほぼ目的にかなう方法を得たので報告する。

実 験 方 法

1. 測定用試料

試料液中の乳糖濃度が150~350 mg/100 mlとなるように、牛乳約15 g、全脂粉乳約1.8 g、加糖れん乳約8 gをイオン交換水で希釈あるいは溶解し200 mlとした。

2. 試薬の調製

強酸溶液：和光純薬工業社製、試薬特級塩酸及び硫酸を使ってそれぞれ6.7規定に調製した。

4 w/v% 無水炭酸ナトリウム溶液：和光純薬工業社製試薬特級を使って調製した。

ヨウ化カリウム：和光純薬工業社製試薬特級をそのま

ま使用した。

1 w/v% デンプン溶液：和光純薬工業社製試薬特級をイオン交換水に加熱溶解し調製した。

フェーリング A 液：和光純薬工業社製試薬特級の硫酸銅5水塩 34.639 gをイオン交換水に溶解し500 mlとした。

フェーリング B 液：和光純薬工業社製試薬特級のロッシェル塩(4水塩) 173 gと同水酸化ナトリウム 50 gを溶解し500 mlとした。

0.1 規定重クロム酸カリウム溶液：和光純薬工業社製容量分析用試薬を使用した。

0.05 規定チオ硫酸ナトリウム溶液：和光純薬工業社製試薬特級のチオ硫酸ナトリウム5水塩 12.4 g 同無水炭酸ナトリウム 100 mg をイオン交換水を使って1 lにした。0.1 規定重クロム酸カリウム液 25 mlをホールビペットで300 ml 容三角フラスコに取り、ヨウ化カリウム結晶 2 g 及び塩酸 5 mlを加え密栓し混合後、暗所に10分間放置後、イオン交換水 100 mlを加えたものを0.05 規定チオ硫酸ナトリウム溶液で滴定し、滴定終了直前にデンプン溶液 3 mlを加えて終末まで滴定し50をチオ硫酸ナトリウム溶液消費量で割ってファクターを決定した。

乳糖標準液：和光純薬工業社製乳糖(1水和物)を用いて0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 gの近くを精秤し、それぞれメスフラスコで200 mlにメスアップし調製した。

3. 測定手順

200 ml 容三角フラスコにフェーリング A 液 5 ml, フェーリング B 液 7 ml, 及び試料液 10 mlを加え直火で2分間煮沸させ、試料液中の還元糖に相当する2価の銅を全て1価の銅に還元する。加熱終了後、ただちに炭酸ナトリウム溶液 40 mlとヨウ化カリウム 4 gを加え良く溶解する。次に6.7 規定塩酸 8 mlを加えた後、アルミホイル等でゆるくふたをし、静かに振とうして二酸化炭素を発生させ酸素を追出す。よくふたをして、暗所に5分間放置後、遊離したヨウ素を0.05 規定チオ硫酸ナトリウム溶液でデンプンを指示薬として滴定する。空試験値として試料液の代わりに同量のイオン交換水を使って実施した滴定値を用いる。

4. 糖含量の算出方法

予め糖量既知の試料を使って測定を行ない、空試験値と試料滴定値の差にチオ硫酸ナトリウム溶液のファクターを掛けてチオ硫酸ナトリウムの正確な消費量を算出し、これと糖量で検量線を作成しておく、実際の測定では、空試験値と試料の測定値の差にチオ硫酸ナトリウム溶液

のファクターを掛けて計算したチオ硫酸ナトリウムの消費量から糖量を算出する。なお、この検量線は、フェーリング A 液やチオ硫酸ナトリウム溶液が替わってもそのまま使用できる。したがってチオ硫酸ナトリウム標準液のファクターは必要であるが、原法のようにフェーリング A 液のファクターは必要無い。

5. HPLC の測定条件

牛乳は 10 倍希釈、粉末コーヒークリーム、インスタント脱脂粉乳、粉末アイスクリームミックスは 1% 溶液、加糖脱脂乳は 5% 溶液とし、ミリポア社製限外濾過膜 UFP 2 LGC 24 で濾過後 HPLC で測定した。カラムは昭和電工社製 Shodex DC 613、移動層は和光純薬工業社製高速液体クロマトグラフ用試薬アセトニトリル 75 容量部と水 25 容量部を混合したものを使用し、カラム温度 70°C、流速 1.2 ml/min、試料注入量 10 μ l で行った。ポンプはトーソー社製 CCPE、脱気装置は昭和電工社製、Shodex KP 25、検出器は昭和電工社製示差屈折計 RISE-61、インテグレーターは島津製作所社製 C-R 3 A、カラム恒温槽はジーエルサイエンス社製を使用した。

実験結果及び考察

1. 測定条件の決定

安定した滴定値を得るための、各試薬の添加量や処理時間を決定するために直交配列表を使った実験を繰り返し実施した。実験はフェーリング A 液を全て 5 ml とし、試料は 0.3% 前後の脱脂粉乳溶液 10 ml を用い、他の条件を種々変化させ滴定値の変化を調べ、反応が十分に行なわれるのに必要な条件（つまり、測定値が低くなる条件）を検索した。

（最適測定条件を求める実験 1）

因子と水準は、フェーリング B 液の量（4 ml と 7 ml）、加熱時間（1 分と 3 分）、ヨウ化カリウムの量（3 g と 4 g）、炭酸ナトリウム溶液の量（40 ml と 60 ml）、酸の種類と量（6.7 規定塩酸 6 ml と 8 ml 並びに 6.7 規定硫酸 6 ml と 8 ml）、暗所放置時間（5 分と 10 分）とし、これを直交表 L_{16} に割付け、16 通りの条件の組合せの測定を 1 回ずつを行なった。その結果、滴定値に有意の効果を与えた要因は、その効果の大きい順に、加熱時間、酸の種類、フェーリング B 液の量、ヨウ化カリウムの量の順で、他の因子及び、交互作用に有意なものは無かった。特に加熱時間の効果は極めて大きく、1 分間では不十分であった。酸の種類は塩酸の方が、フェーリング B 液は 7 ml が、またヨウ化カリウム量は 3 g

の方がそれぞれ反応がよりよく行なわれた。

（最適測定条件を求める実験 2）

1 回目の実験で有意だった因子についてさらに詳しく調べるためと、暗所での放置時間をより短く、炭酸ナトリウム量をよく少なくしてみて、次の実験を行なった。取り上げた因子と水準は、加熱時間（2 分、3 分、4 分）フェーリング B 液の添加量（5 ml、7 ml、9 ml）、ヨウ化カリウム（3 g、1 g）、暗所放置時間（1 分、3 分、5 分）、炭酸ナトリウム溶液量（0 ml、20 ml、40 ml 但し、全量は水を加えて全て 40 ml とした）で、強酸は全て 6.7 規定塩酸 8 ml とした。これを直交表 L_{18} に割付け、各条件で各 1 回、計 18 個の測定を行ない、滴定値と、終点の見易さについて解析を行なった。終点の見易さについては、大変見易い：3、見易い：2、やや見にくい：1、として採点し、この数値を用いて通常の分散分析を行なった。その結果、滴定値に関しては、炭酸ナトリウム溶液の量が極めて有意であり、40 ml に比べ 20 ml さらに 0 ml では滴定値が明確に高く酸素混入による酸化が起きていると考えられた。また、B 液の量も有意であり、5 ml では反応が十分に進んでいないと考えられ 1 回目の実験と一致したが、7 ml と 9 ml では大差無かった。他の因子は有意ではなかった。終点の見易さに関してはヨウ化カリウムの量のみが有意であり、3 g の方が終点が見易かった。

（最適測定条件を求める実験 3）

2 回目の実験の結果の確認と、それらの結果のうちフェーリング B 液量と、炭酸ナトリウム溶液量が強酸の量の影響を受けないかどうかを確認するため実験を行なった。取り上げた因子と水準は、6.7 規定塩酸の量（8 ml と 6 ml）、炭酸ナトリウム溶液量（30 ml と 40 ml）、フェーリング B 液の量（6 ml と 8 ml）、ヨウ化カリウム量（3 g と 4 g）である。これを直交表 L_{16} に割付け 16 個の測定を行ない 2 回目の実験と同様、滴定値と終点の見易さについて解析を行なった。まず、滴定値については、炭酸ナトリウム溶液量とヨウ化カリウム量と塩酸量の間の 3 因子交互作用のみが有意だった。この 3 因子交互作用の内容を調べたところ、塩酸量が 6 ml のとき滴定値がヨウ化カリウムの量によって大きく影響されていた。8 ml ではほとんどヨウ化カリウムの影響は見られなかった。炭酸ナトリウム量は塩酸 8 ml において、30 ml ではやや不足していると考えられた。したがって、この 3 因子の最適水準の組合せは、塩酸 8 ml、炭酸ナトリウム溶液 40 ml、ヨウ化カリウム 3 又は 4 g であった。一方、終点の見易さに関しては、ヨウ化カリウム

表 1 各種試料の反復滴定結果

試 料	採取試料量 (g)*	乳 糖 量 (mg)**
牛乳 1	15.1284	74.4
牛乳 2	15.1375	74.7
コーヒークリーム 1	1.0787	71.0
コーヒークリーム 2	1.0202	68.0
コーヒークリーム 3	1.0286	68.2
全脂粉乳 1	1.7085	70.7
全脂粉乳 2	1.7052	70.5
脱脂粉乳 1	1.2363	69.5
脱脂粉乳 2	1.2240	68.5

* 採取試料を希釈あるいは溶解して 200 ml とし、その 10 ml を用いて測定した。

** 採取試料中の乳糖量 (mg) を示す。

の量が極めて有意であり、4 g の方がよかった。他に、炭酸ナトリウム量とフェーリング B 液量の交互作用が有意であり、フェーリング B 液 8 ml、炭酸ナトリウム溶液 40 ml が最適であった。

以上の実験の結果、得られた最適測定条件はフェーリング A 液 5 ml、試料液 10 ml に対して、フェーリング B 液：7 ml、ヨウ化カリウム：4 g、4% 炭酸ナトリウム液：40 ml、6.7 規定塩酸：8 ml、煮沸時間：2～3 分、暗所放置時間：約 5 分である。

2. 繰り返し精度

求められた条件で測定の反復精度を調べた。試料は乳糖を含む乳製品で牛乳 2 検体、コーヒ用粉末クリーム 3 検体、全脂粉乳 2 検体、脱脂粉乳 2 検体の計 9 検体で、それぞれ同程度の滴定量になる様に試料を調製し 5 回反復滴定した。測定した乳糖量 (mg) を表 1 に示した。これから計算した反復の標準偏差は 0.276 mg であった。

3. 検量線の作成

和光純薬工業社製試薬特級乳糖を使って 10 種の濃度溶液を調製し、各試料について 2～3 回の測定を行った。結果を図 1 に示した。消費量と乳糖量の相関係数は 0.9998 と良好であった。得られた回帰式は次の通りであった。

$$Y = 2.580 X - 0.1350$$

但し、Y は乳糖量 (mg)、X は 0.05 規定チオ硫酸ナトリウム溶液の消費量 (ml) である。

4. 添加回収試験

脱脂粉乳溶液に試薬特級乳糖（前出）を 6 段階の濃度で添加し調製した試料について測定を行ない脱脂粉乳由

図 1 チオ硫酸ナトリウム溶液消費量と乳糖量の相関

来分を差し引いて求めた値と、実際に添加した量から回収率を計算した。測定は各試料について 2 回ずつ行った。その結果、回収率は添加量に依らず 98.3～100.5% で平均 99% の値が得られた。結果を表 2 に示した。この結果は比較の為に同時に行った原法の回収率 92.4～95.8、平均 94% よりかなり良好であった。又、同様の方法で加糖脱脂れん乳を使って行った結果を表 3 に示した。加糖脱脂れん乳の場合、回収率は 98.9～101.7%、平均 100% となり、脱脂粉乳と同様に良好な結果が得られた。

5. 実際のサンプルの測定

乳製品中の乳糖量を原法と本法及び HPLC 法で測定比較した。測定は、HPLC 法以外は 2 連で行った。結果を表 4 に示した。原法と本法間には回収試験で見られた差に相当する差が見られ原法が低い値となった。又、原料配合値から計算した糖含量又は、HPLC 法の値には、本法の方が近かった。

表 2 脱脂粉乳を使った回収実験

試料量*	添加乳糖量 (a)*	分 析 値 (b) (mg)	脱脂粉乳由来分計算値 (c) (mg)	回 収 量 (b-c) (mg)	回 収 率 (100×(b-c)/a) (%)
511.9		287.9	287.9		
		287.9	287.9		
521.4	94.7	386.8	293.0	93.8	99.0
		386.8	293.0	93.8	99.0
496.9	136.5	414.1	279.5	134.6	98.6
		416.5	279.5	137.0	100.5
519.3	202.0	490.8	292.1	198.7	98.4
		490.8	292.1	198.7	98.4
526.5	256.9	547.8	296.1	251.7	98.0
		547.8	296.1	251.7	98.0
499.9	299.3	577.5	281.2	296.3	99.0
		575.1	281.2	293.9	98.2
508.4	407.3	691.5	285.9	405.6	99.6
		689.0	285.9	403.1	99.0

* 200 ml 当たりの試料量 (mg)

表 3 加糖れん乳を使った回収実験

試料量*	添加乳糖量 (a)*	分 析 値 (b) (mg)	加糖れん乳由来分計算値 (c) (mg)	回 収 量 (b-c) (mg)	回 収 率 (100×(b-c)/a) (%)
4763.2		584.8	584.8		
		579.7	579.7		
1044.1	198.1	328.5	127.6	200.9	101.4
		326.0	127.6	198.4	100.2
1048.0	301.9	430.0	128.1	301.9	100.0
		435.1	128.1	307.0	101.7
1031.3	407.5	529.0	126.1	402.9	98.9
		531.5	126.1	405.4	99.5
999.9	510.4	630.5	122.2	508.3	99.6
		630.5	122.2	508.3	99.6

* 200 ml 当たりの試料量 (mg)

表 4 実際の試料での原法と本法の比較

		乳糖 %					
試	料	原法 (a)		本法 (a)		HPLC 法(c)	
						a/c	b/c
粉末コーヒークリーム		60.2	60.1	65.2	65.3	65.5	0.918
脱脂粉乳		50.2	50.3	54.2	54.6	54.8	0.915
インスタント脱脂粉乳		49.6	49.7	54.0	54.0	53.8	0.923
粉末アイスクリームミックス		18.5	18.4	20.7	20.5	20.7	0.891
加糖脱脂れん乳		10.9	10.9	12.3	12.3	12.5	0.872
牛 乳		4.4	4.4	4.8	4.8	4.9	0.898

要 約

糖の定量法として古くから用いられ我国で蔗糖を含む乳製品の糖定量の公定法となっているレイン・エイノン法の欠点を補うため改良を行った。すなわち一定量のフューリング A 液に試料を加え、十分に反応させた後、残った過剰量の 2 価の銅イオンに対し過剰量のヨウ化カリウムを加える。遊離したヨウ素をチオ硫酸ナトリウム標準液で滴定し、試料の代わりにイオン交換水を用いて得られた滴定値との差から、検量線を使って糖の量を算出する方法である。この方法は滴定を常温で行ない、また澱粉指示薬を使うヨウ素滴定法であるので作業性も良く終点も鮮明であった。反復試験も良好であった。さらに、添加回収試験では、同一人が実施した場合の比較で、レイン・エイノン法に比べ改良された。なお、この方法は乳糖以外の還元糖を含む、あるいは操作中に還元糖を

生じる可能性のある試料に適用する場合は、測定値が過大になりすぎるので注意を要する。

文 献

- 1) LANE, J.H. and EYNON, L.: *J. Soc. Chem. Ind.*, 17, 32 (1923).
- 2) 乳及び乳製品の成分規格等に関する省令: 昭和 26 年 12 月 27 日, 厚生省令第 52 号.
- 3) 永原太郎・岩毛裕之・久保障治: 食品分析法 (柴田書店, 東京), p. 130 (1955).
- 4) ALEXANDER, P.W., HARTATI, R.D. and CURTIN J.: *Electroanalysis* 1, 263 (1989).
- 5) 衛生試験法注解, 第 2 版, 日本薬学会 (金原出版, 東京), p. 95 (1973).
- 6) 食品分析ハンドブック, 改訂版, 小原哲二郎・鈴木隆雄・岩尾裕之監修 (建帛社, 東京), p. 220 (1982).

(平成 2 年 8 月 13 日受理)