

# 固定化酵素膜を検出器とした 高速液体クロマトグラフィーによる グルコースとスクロースの同時定量

成田 素子, 村上 和雄  
(平成 16 年 9 月 30 日受理)

## Simultaneous Determination of Glucose and Sucrose by HPLC with an Immobilized Enzyme Membrane Electrode

NARITA, Motoko and MURAKAMI, Kazuo  
(Received on September 30, 2004)

キーワード：バイオセンサー, 酵素反応, 光架橋性樹脂, 過酸化水素

Key words: biosensor, enzyme reaction, photo cross-linked polymer membrane, hydrogen peroxide

### 1. 緒言

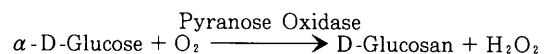
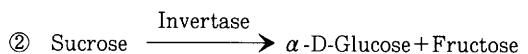
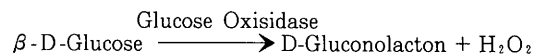
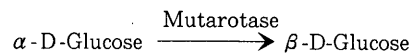
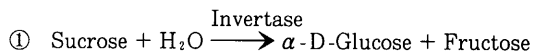
酵素は生体触媒で生体内の反応を円滑に進める作用である分子識別機能と触媒作用を持っている。今回筆者らはβ-D-グルコースが酸化酵素のグルコースオキシターゼによって選択的に過酸化水素を生じ、この過酸化水素を電気化学検出器で検出すると極めて高い感度で検出できることに着目し、酵素反応と電気化学検出器を組み合わせたバイオセンサーについて検討した。酵素は大部分が水溶性であるため、これらをセンサーの識別素子として用いるために固定化技術が必要である。そこで酵素を水不溶性の高分子担体である光架橋性樹脂PVA-SbQ中に包括固定させた高分子膜を素子として用いた。電気化学検出器は電氣的に活性なものみに選択的に高感度に応答し、また酵素の触媒反応で生じる過酸化水素を検出でき、検出感度も高い。酵素の触媒作用で生じる過酸化水素は電気化学的に活性なので検出できる。

現在、清涼飲料水や食品には、甘味料としてブドウ糖、果糖、液糖、砂糖が使用されている。その測定には一般的に示差屈折検出器が利用されているが、試料中に含まれるすべての物質に反応してしまう。そこで本研究では、酵素の分子識別機能と触媒作用を利用し、目的物質である食品中のグルコース、スクロースのみを測定する酵素を利用するバイオセンサーを作成し、それをフローイン

ジェクション分析と高速液体クロマトグラフィーの検出器として応用する方法を検討し、実際の試料の測定に応用した。また従来使用されているような高価な糖カラムを使用せずに移動相に完全な水系を使用できるODS-Wカラムを使用し、グルコース、スクロースの分離についても検討した。

### 2. 酵素反応

今回用いた装置は電気化学検出器の選択性に加え酵素反応の基質特異性が加わり極めて選択性の高い検出器となる。本研究では①の3段階の酵素反応を利用した。②の酵素反応は2段階の反応であるが、Pyranose OxidaseをPVA-SbQに固定化した場合数日で失活してしまうことから①の酵素反応を利用した。



### 3. 実験

#### 3-1 試薬

グルコース；和光純薬製特級，スクロース；和光純薬製特級，ムタロターゼ；シグマ製，インベルターゼ；シグマ製，グルコースオキシダーゼ；シグマ製，光架橋性樹脂ポリビニールアルコールスチルバゾリウム(PVA-SbQ)；東洋合成株式会社，リン酸水素二ナトリウム( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )；和光純薬製特級，リン酸二水素カリウム( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )；和光純薬製特級

#### 3-2 装置

BAS製 LC-4Bポテンシオスタット，Shodex製DS-4 HPLCポンプ，KIPP&ZONEN記録計，Chemco製 CHEMCOBOND ODS-W 4.6×300 カラム

#### 3-3 酵素の固定化

プラスチック板上に3種の酵素：ムタロターゼ 50  $\mu\text{l}$ ，インベルターゼ 0.05 g，グルコースオキシダーゼ 0.05 g をとりリン酸緩衝液 (pH=5) を 0.1 ml で溶解し，そこに 1 ml の光架橋性樹脂 PVA-SbQ をよく混ぜガラス棒で 10 cm 四方の膜を作成する。乾燥後，紫外線ランプを照射，重合させて固定化酵素膜を作成した。

#### 3-4 HPLC検出器用バイオセンサーの作成

バイオット製  $\text{H}_2\text{O}_2$  電極の表面を固定化酵素膜で覆いナイロンメッシュをかぶせてO-リングで止める。この電極をフローセルにセットし，このセルをカラムの排出側に接続する。装置図を図1に示す。

#### 3-5 試料および試料の前処理

市販の清涼飲料水及び乳製品12種類の食品について測定した。各試料を25～100倍に希釈し，0.4  $\mu\text{m}$  フィルターでろ過後，その10  $\mu\text{l}$  を高速液体クロマトグラフィーに導入した。

## 4. 結果および考察

### 4-1 測定条件

#### 4-1-1 pHの影響

固定化酵素の活性は移動相リン酸緩衝溶液のpHに影響される。そこで移動相pHを4.5～7.5まで変化させ，グルコース，スクロースの応答について調べた。図2は

pHと各ピークが最も高いときを1としたときの相対感度を示した。グルコースはpH6.5～7.5のとき，スクロースはpH7のとき最も高い酵素活性を示した。よってグルコース，スクロースの酵素活性の最も良いpH7.0を移動相の最適pHとした。

#### 4-1-2 緩衝溶液濃度の影響

リン酸緩衝溶液を0.05～0.25 Mまで変化させ，スクロースの分離について調べた。酵素活性は一般に塩濃度の増大と共に低下するが，この傾向と一致した。電気化学検出器には支持電解物質となる程度の塩濃度が移動相に必要である。よって0.05 Mにおいて最も高い反応を示したので緩衝溶液濃度は0.05 Mとした。

#### 4-1-3 移動相流量の影響

流量を0.2～1.4 ml/minまで変化させ，グルコース，スクロースの分離について調べた。図4はスクロースの応答と流量の関係を示した。ピーク面積で比較するとある流量までは一定のはずだが流量が多くなるとピークは高くなる。流量が小さいとき，スクロースの酵素膜への浸透量が多く，流量と共に浸透量が減少していくためと考えられる。流量0.8 ml/minでは高い応答を示し，ピークの形状も良かったので流量は0.8 ml/minとした。

#### 4-1-4 電気化学検出器の設定電位

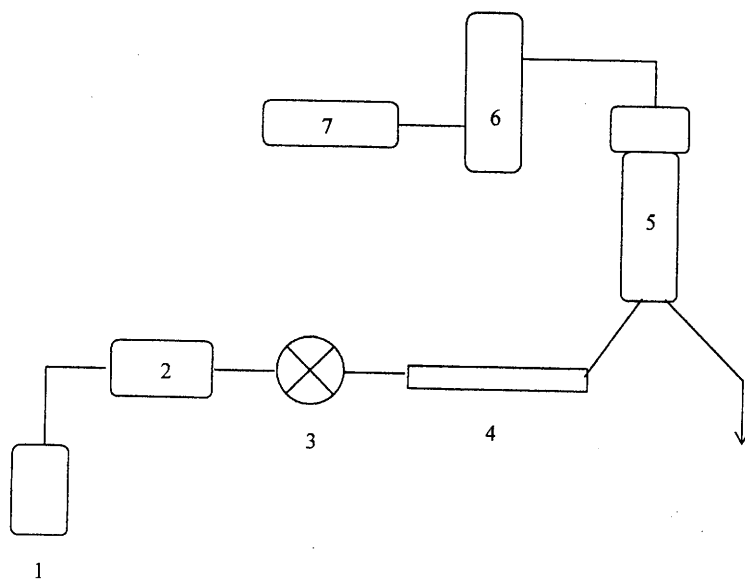
電気化学検出器の設定電位を0.25 V～0.80 Vまで変化させ，グルコース，スクロースの分離について調べた。図6は検出器の設定電位とクロマトグラムのピーク高さから求めたヒドロダイナミックボルタモグラムである。電位の増加とともに感度は増加し+0.50 V以上ではほぼ一定となる。そこで設定電位を+0.50 V vs Agとして測定した。

### 4-2 クロマトグラム

4-1で求めた測定条件によりグルコース，スクロースの分離を行った。図6はグルコース，スクロースの標準物質のクロマトグラムである。

#### 4-3 応答の直線性および最小検出量

電気化学検出器により求めたグルコース，スクロースの検量線は $5 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-6}$ の間で直線性が得られた。グルコースの検量線は $y = 4 \times 10^6 + 0.8686$  相関係数



1: Mobile phase 2: Pump 3: Sample injector 4: Analytical column  
5: Immobilized enzyme reactor 6: Electrochemical detector 7: Recorder  
Fig.1 Apparatus

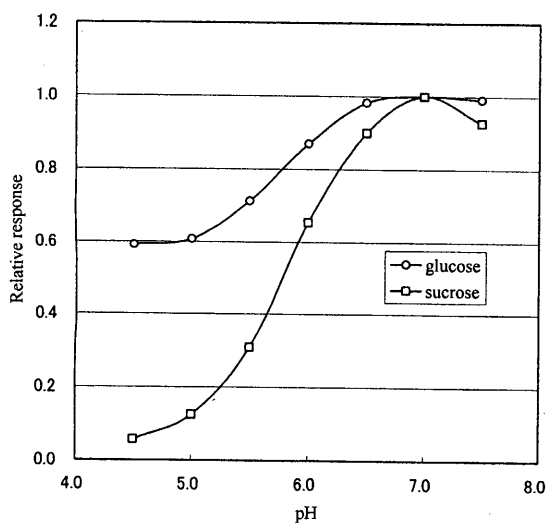


Fig.2 Effect of pH of mobile phase on response

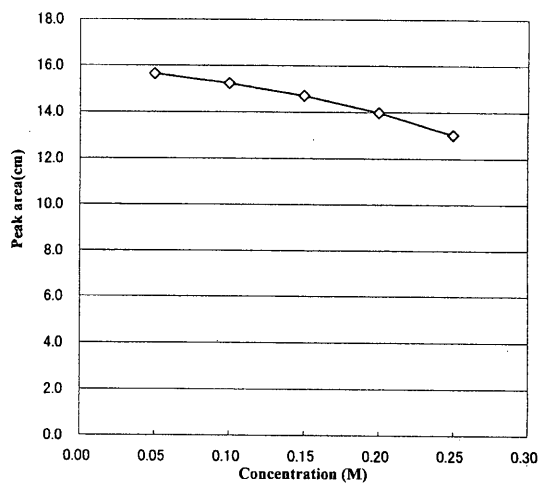


Fig.3 Effect of salt concentration on peak area of sucrose

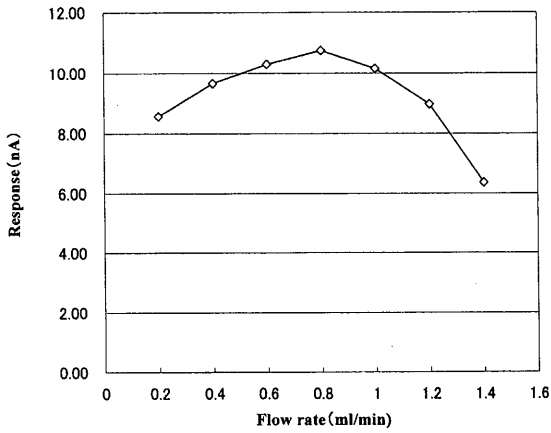


Fig.4 Effect of flow rate on response of sucrose

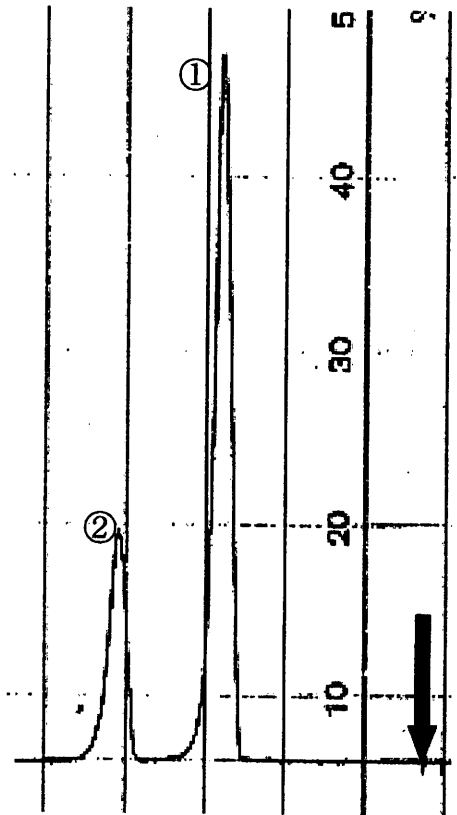


Fig.6 Typical chromatogram of glucose, sucrose.

①glucose ②sucrose

Column: Chemcobond 5-ODS-W 4.6  $\phi$   $\times$  300mm  
 Mobile Phase: 100% H<sub>2</sub>O 0.05M phosphoric acid  
 buffer solution pH=7  
 Flow rate: 0.8ml/min

Detector: Electrochemical detector  
 Working Electrode: Platinum  
 Reference Electrode: Ag/AgCl  
 Counter Electrode: Stainless Steel tube  
 Applied potential: 0.6(VvsAg)  
 Each compound:  $2.0 \times 10^{-4}$ g

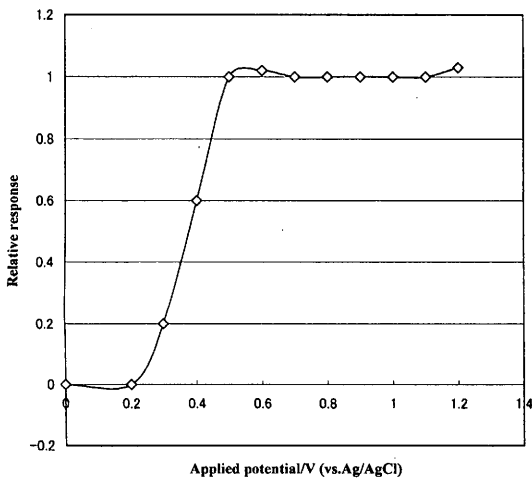


Fig.5 Hydrodynamic voltammogram of  $\beta$ -D-glucose

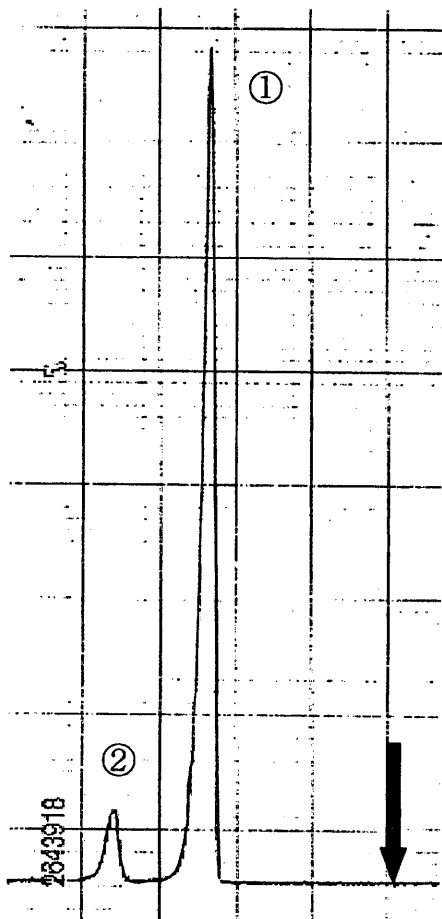


Fig.7 Chromatogram of glucose, sucrose in beverages.  
(Coke(D)) ①glucose ②sucrose

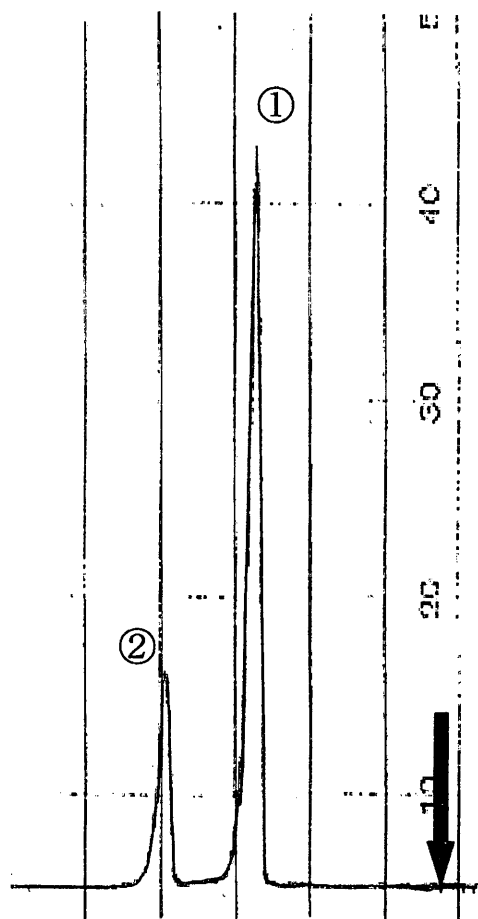


Fig.8 Chromatogram of glucose, sucrose in beverages.  
(Amino acid beverage(L)) ①glucose ②sucrose

Table1. Determination of glucose and sucrose in sample

Sample	Conc. (wt/Vol%)	
	Glucose	Sucrose
Lactic acid beverage(A)	6.1	1.7
Lactic acid beverage(B)	5.2	0.6
Lactic acid beverage(C)	3.3	3.5
Coke(D)	5.2	1.1
Soda(E)	4	0.7
Vanilla ice cream(F)	3	4
Vanilla ice cream(G)	1.4	2.1
Coffee(H)	2.7	0.8
Coffee(I)	2.2	0.3
Café au lait(J)	2.1	0.3
Café au lait(K)	1	1.5
Amino acid beverage(L)	1.1	0.4

$R = 0.997$  またスクロースの検量線は  $y = 1 \times 10^6 + 0.6723$  相関係数は  $R = 0.994$  となり良好な直線性を示した。  $S/N > 3$  の場合の最小検出量はグルコース、スクロースともに  $0.2 \text{ ng}$  であった。

#### 4-4 実試料への応用

市販の清涼飲料水及び乳製品 12 種類の食品中に含まれるグルコース、スクロース濃度の測定に本方法を応用した。各試料を 25~100 倍に希釈し、 $0.4 \mu\text{m}$  フィルターでろ過後、その  $10 \mu\text{l}$  を高速液体クロマトグラフィーに導入する。検量線よりグルコース、スクロースの濃度を求めた。定量した結果を表 1 にクロマトグラムを図 7.8 に示す。

同一の試料を示差屈折率検出器で測定したがほぼ同じ結果が得られた。

#### 5. まとめ

高速液体クロマトグラフィー用バイオセンサー検出器の調製は光架橋性樹脂 PVA-SbQ に酵素を包括固定すれば非常に容易で、極めて選択的で高い感度を示した。

前処理法も試料を希釈し、 $0.4 \mu\text{m}$  フィルターでろ過する簡単な処理法で測定することが出来た。また以前のように高価な糖カラムでなく、移動相に完全な水系を使用できる ODS カラムを用いてもグルコース・スクロースは分離可能で同時に定量ができた。以上より本方法はグルコース、スクロースの分離と同時定量するにおいて非常に有効な方法である。

#### 謝 辞

本研究に協力して頂いた環境情報学科環境分析研究室卒業研究生高橋明子、水書加奈子、島田直美、菅又貴子の諸君に感謝致します。

#### 参考文献

- 1) 掛本道子, 村上和雄, 原田敏勝, 小川裕康, 日本化学会誌, 1992, (1), P. 40~44
- 2) 村上和雄, 掛本道子, 小川裕康, 日本化学会誌, 1995, (5), P. 457~461
- 3) バイオセンシング, 軽部征夫著, 啓学出版

#### Abstract

We studied to apply a biosensor which used enzyme reaction to detector of flow injection and HPLC. Three enzyme reactions of invertase, mutarotase and glucose oxidase were used to detect glucose and sucrose. The methods to immobilized enzymes in photo cross-linked polymer membrane were done as flow. Invertase, mutarotase and glucose oxidase were co-immobilized in a membrane (PVA-sbQ). The co-immobilized enzymes membrane was placed on the Pt anode of an electrochemical detector. The enzymes membrane sensor thus prepared was incorporated with analytical column in HPLC. Analytical column was ODS-W which can 100% water to mobile phase. Glucose and sucrose in the sample employed reacted with invertase, mutarotase and glucose oxidase respectively, to produce hydrogen peroxide, and the product was monitored by electrochemical detector. The lower detection limit of each analyte was  $0.2 \text{ ng}$  ( $S/N > 3$ ). The use of specific enzymatic reaction and electrochemical detector could simplify the pretreatments of sample used. This method was successfully applied for determination of glucose and sucrose in foods.