



乳糖試験法の国際的な整合性についての検討

著方 麻希子・佐川未弥

(公益財団法人日本乳業技術協会 〒102-0073 東京都千代田区九段北 1-14-19)

1 はじめに

生乳の検査精度を高い水準で維持することを目的として、当協会は、国内の生乳検査実施施設の迅速測定機器校正のための試料乳（値付けした校正用試料乳）を毎月定期的に調整配布している。各検査施設は、これを用いて機器の校正や内部精度管理をそれぞれ実施し、技能試験（生乳検査外部精度管理調査、当協会が実施）に参加することによって校正等が適切に実施できているかを確認することができる。校正用試料乳の値付けのための標準法については、ICAR*1等による国際リングテストに参加することにより国際的な整合性を確保している。

値付けのための標準法のうち乳糖の試験法については、乳及び乳製品の成分規格等に関する省令（以下「乳等省令」）の加糖練乳、加糖脱脂練乳等の乳糖試験法であるレイン・エイノン法を用いており、国際リングテストにもこの方法で参加している。一方、国際標準法として「Milk and milk products-Determination of lactose content by high-performance liquid chromatography Reference method ISO22662 IDF198（以下「IDF198」）」¹⁾がある。高速液体クロマトグラフィー（以下「HPLC」）による液状乳の分析法であり、多くの国々はこの方法で国際リングテストに参加している。

[乳及び乳製品の乳糖定量法]

出典	試験法	対象乳製品
乳等省令	レイン・エイノン法	加糖練乳，加糖脱脂練乳，加糖粉乳，濃縮ホエイ
IDF198	HPLCによる乳糖定量法	液状乳，粉乳，クリーム

当協会は国際リングテストにレイン・エイノン法で参加し「良好」の結果を得ているが、改めて国際的な整合性を確認するため、IDF198による方法とレイン・エイノン法で生乳の乳糖定量を行って結果を比較してみた。

2 方法

(1) レイン・エイノン法の概要

フェーリング液に希釈試料を滴下し加熱すると、還元糖の作用によって硫酸銅（ CuSO_4 ）が還元され亜酸化銅（ Cu_2O ）が析出する。さらに希釈試料を滴下し硫酸銅がすべて還元されると、内部指示薬のメチレンブルーが還元され青色が消失する。これを終点とする還元糖の容量式定量法。²⁾

(2) IDF198法の概要

HPLCを用いた乳糖定量法。検量線は、内部標準法により α 乳糖一水和物（ $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ）に内部標準物

*1 ICAR: International Committee for Animal Recording（家畜の能力検定に関する国際委員会）牛群検定の実施方法、海外種雄牛の遺伝的評価等の世界統一の実施方法等を定めている。

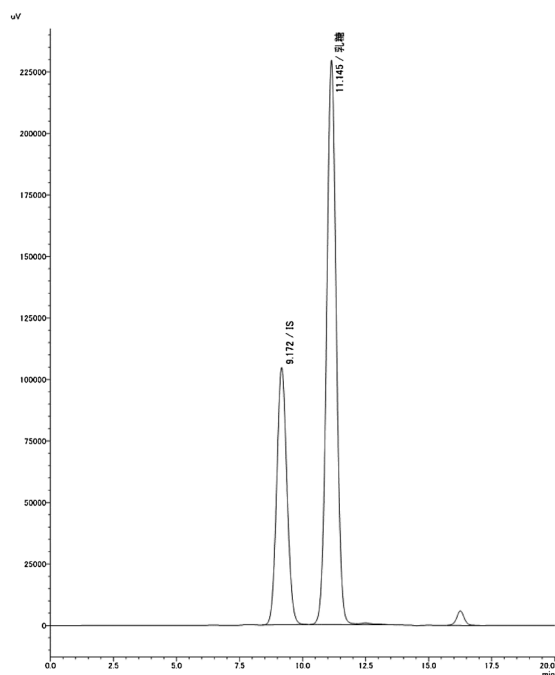


Figure 1 IDF198 (HPLC 法) による乳糖のクロマトグラム IS (内部標準) = メレイトース

質 D(+)-メレイトース一水和物 ($C_{18}H_{32}O_{16} \cdot H_2O$) を添加し、横軸に乳糖と内部標準物質の濃度比をとり、それらのピーク面積を縦軸にプロットして作成する (Figure 1)。試料の調整は、乳試料に内部標準物質を添加し Biggs-Szijarto 水溶液を添加して乳試料中の脂肪とたんぱく質を沈殿させろ過する。測定は HPLC により Pb 型配位子交換カラム*2 を用いて示差屈折率検出器で行う。移動相は超純水 (ISO 3696 グレード 1 の水質³⁾) を用いる。検出した濃度は、検量線に面積比を当てはめて濃度比を求め、その濃度比に内部標準物質濃度を乗じて乳糖濃度を算出する。

(3) 測定条件等

試料：生乳 (乳糖範囲 4.52~4.66%)

校正用試料乳および生乳検査外部精度管理調査試料を試料として用いた。

測定期間：2019 年春季~秋季 (7 ヶ月間)

測定回数：54 回 (27 検体の生乳を 1 検体につき 2 点並行で測定した。)

3 結果および考察

IDF198 により生乳の乳糖定量 (無水乳糖) を行い、レイン・エイノン法による測定値と比較検討した。

IDF198 (HPLC) とレイン・エイノン法による生乳の乳糖測定結果を Table 1 に示す。Table 1 から、IDF198 による測定は IDF 198 11.2 に示された許容誤差の範囲内にあり、室内再現性は良好であると判断した。また、レイン・エイノン法は、日本乳業技術協会の同法生乳測定についての内部品質管理基準 (JIS8402-6 に基づき算出) の範囲内にある。

さらに、これらの分析法による乳糖測定結果の値について相関性を確認した結果、F 検定により分散は異なることが確認できた。また、Figure 2 から同一サンプルにおける 2 測定法の分析値は、有意な正の相関 ($r = 0.771, p < 0.01$) を示し、回帰係数は 1 に近いもの (すなわち $y = x$) となった。

このことから、当協会は国際リングテストにレイン・エイノン法で参加しているが、IDF198 による測定についても国際的な整合性が確保できていると考えられた。

*2 IDF198 では Pb 型配位子交換カラムが選定されている。

配位子交換モードは、充てん剤の対イオンである金属イオン (M+) と糖の水酸基との錯体形成能を利用した分離モード。保持は、主として糖類の水酸基と金属対イオンとの錯体形成に基づくもので、糖類が金属対イオンの水和水と交換して生成した錯体の安定性に関係付けられる。錯体形成能は対イオンである金属イオンの種類によっても異なり、対イオンにおける錯体形成能の強さの順はおおむね次の通り。Ag+ < Li+ < Na+ < Zn2+ < Ca2+ < Ba2+ < Pb2+。Pb2+ が付いた Pb 型配位子交換カラムは最も配位子交換モードが強いため構造の類似した糖同士の分離に威力を発揮する。⁴⁾ この特性から、乳製品中のラクトースの解像度に優れた Pb 型配位子交換カラムが選定されている。

Table 1 The results of IDF198/Lane-Eynon method

Sample No.	Results (%)									
	IDF198 (as anhydrous lactose)					Lane-Eynon				
	1	2	$ 1-2 < 0.06\%$	平均値	標準偏差	1	2	$ 1-2 < 0.03\%$	平均値	標準偏差
1	4.649	4.594	0.055	4.622	0.0389	4.630	4.616	0.014	4.623	0.0099
2	4.596	4.578	0.018	4.587	0.0127	4.630	4.612	0.018	4.621	0.0127
3	4.498	4.544	0.046	4.521	0.0325	4.523	4.520	0.003	4.522	0.0021
4	4.611	4.612	0.001	4.612	0.0007	4.579	4.598	0.019	4.589	0.0134
5	4.575	4.567	0.008	4.571	0.0057	4.566	4.584	0.018	4.575	0.0127
6	4.609	4.611	0.002	4.610	0.0014	4.619	4.625	0.006	4.622	0.0042
7	4.636	4.622	0.014	4.629	0.0099	4.602	4.607	0.005	4.605	0.0035
8	4.660	4.658	0.002	4.659	0.0014	4.620	4.612	0.008	4.616	0.0057
9	4.617	4.587	0.030	4.602	0.0212	4.589	4.595	0.006	4.592	0.0042
10	4.588	4.587	0.001	4.588	0.0007	4.593	4.587	0.006	4.590	0.0042
11	4.657	4.655	0.002	4.656	0.0014	4.624	4.619	0.005	4.622	0.0035
12	4.644	4.654	0.010	4.649	0.0071	4.627	4.602	0.025	4.615	0.0177
13	4.630	4.650	0.020	4.640	0.0141	4.618	4.652	0.034	4.635	0.0240
14	4.580	4.580	0.000	4.580	0.0000	4.607	4.618	0.011	4.613	0.0078
15	4.600	4.590	0.010	4.595	0.0071	4.614	4.605	0.009	4.610	0.0064
16	4.623	4.628	0.005	4.626	0.0035	4.641	4.636	0.005	4.639	0.0035
17	4.633	4.635	0.002	4.634	0.0014	4.646	4.630	0.016	4.638	0.0113
18	4.666	4.654	0.012	4.660	0.0085	4.655	4.646	0.009	4.651	0.0064
19	4.557	4.565	0.008	4.561	0.0057	4.574	4.603	0.029	4.589	0.0205
20	4.613	4.612	0.001	4.613	0.0007	4.650	4.642	0.008	4.646	0.0057
21	4.616	4.618	0.002	4.617	0.0014	4.645	4.642	0.003	4.644	0.0021
22	4.632	4.645	0.013	4.639	0.0092	4.659	4.650	0.009	4.655	0.0064
23	4.597	4.600	0.003	4.599	0.0021	4.633	4.627	0.006	4.630	0.0042
24	4.563	4.543	0.020	4.553	0.0141	4.564	4.566	0.002	4.565	0.0014
25	4.639	4.612	0.027	4.626	0.0191	4.639	4.635	0.004	4.637	0.0028
26	4.629	4.608	0.021	4.619	0.0148	4.657	4.669	0.012	4.663	0.0085
27	4.576	4.569	0.007	4.573	0.0049	4.624	4.624	0.000	4.624	0.0000
			0.013					0.011		

Table 2 F-検定：2 標本を使った分散の検定

	IDF198	Eynone
平均	4.6087	4.6157
分散	0.00118	0.00096
観測数	27	27
自由度	26	26
観測された分散比	1.234894	
P (F < = f) 両側	0.297268	
F 境界値 両側	2.194306	

4 おわりに

今回、この試験結果は、乳糖含量が4.52～4.66%と狭い範囲の生乳を用いたものであるため、今後、さらに多様な生乳を用いて実施すること等を検討してみたい。

この検討にあたっては、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センター 酪農研究領域 朝隈貞樹先生に試験法と機器の

操作、カラムの選定等全般にわたって、何度もご教示をいただきましたことに心より感謝申し上げます。

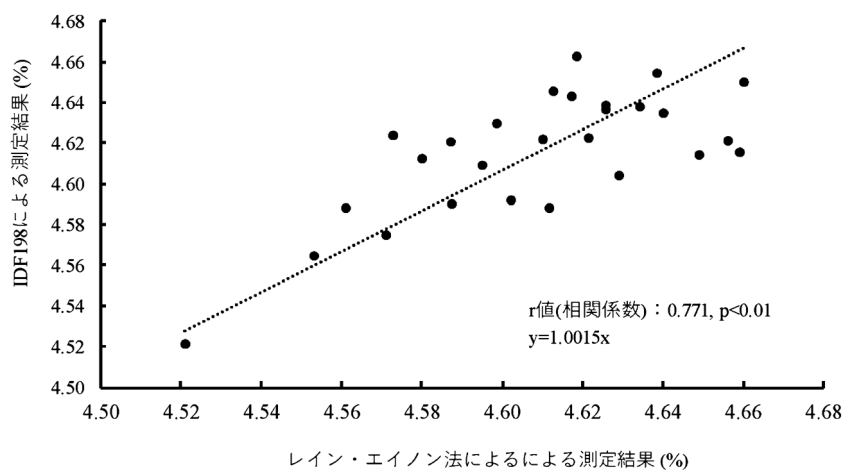


Figure 2 Relationship between IDF198 and Lane-Eynon method in each milk sample.

引用文献等

- 1) Milk and milk products-Determination of lactose content by high-performance liquid chromatography (Reference method) ISO 22662 IDF 198 first edition 2007-09-15
- 2) 足立達：乳等省令にみる主要乳成分定量法の歴史的展望，乳業技術，Vol. 62 (2012)
- 3) Water for analytical laboratory use Specification and test meth ISO 3696
- 4) <https://www.shodex.com/ja/dc/03/0104.html>