

## 新規な糖分析用充填剤の開発と高分離能の検討

High-performance Liquid Chromatographic Separation of Carbohydrates on Stationary Phases  
Prepared from Polystyrene-based Resins and Amines

花田 (増田) 尊子

Takako Masuda Hanada

(東京医科大学 化学教室)

### 1. はじめに

糖は天然に最も多く存在する有機化合物で、生命を支える栄養源としての働きを示すことは古くから知られている。さらに、単糖が結合した鎖状の分子である糖鎖はタンパクや脂質と結合し、細胞膜表面において、細胞の増殖、分化など細胞間認識・識別作用や免疫反応などの細胞情報の受容・伝達などの多彩な機能を持っている<sup>1)</sup>。また、動脈硬化などの成人病予防やガン抑制機能を示す生理活性物質であることもわかってきた<sup>2)</sup>。つまり、生体内における糖の構造を解析する重要性が高まっており、微量で多様な構造の糖を高感度かつ高性能に分析する手法の確立が求められている。

糖の高性能な分析手法に関する研究成果を博士論文としてまとめ、平成15年3月に学位を取得した。その内容を以下に紹介する。

### 2. 本研究の目的

糖は結合の立体異性、位置異性、分岐などの構造特性を持つ。また、生体内での糖鎖は遺伝子情報により直接合成されるわけではなく、酵素を介して作られるため極めて多様な構造を示す。これらの理由から糖鎖の構造を解析するための方法は確立していない。さらに、糖は $\pi$ 電子共役系を持たないため光学的な分析も困難であった<sup>3)</sup>。

近年、糖の水酸基の  $pK$  の差を利用した陰イオン交換型高速液体クロマトグラフィー (HPAE) と電気化学検出法 (ED) を組み合わせた検出法 (HPAE-ED 法) が開発され、前処理や誘導体化の必要のない簡便な分析が可能となっている<sup>4)-6)</sup>。

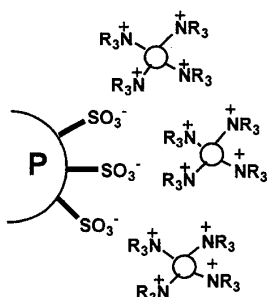


図1 ペリキュラー型

HPAE-ED システムにおい

て、高感度な検出法は確立されているが、分離性能の鍵を握るカラム充填剤は未だ検討が必要となっている。

現在汎用されているカラム充填剤に、ペリキュラー型カラム充填剤がある (図1)<sup>7)</sup>。この充填剤は、ポリマーの表層のみをスルホン化し、その表面に四級アンモニウム塩を持つ粒子を静電的相互作用により固定した充填剤であるとされている。しかし、その構造ならびに合成方法は明らかにされておらず、大変高価であることから、簡便に調製できる高性能な陰イオン交換型糖分析用カラム充填剤の開発が期待されている。

本研究では、糖分析用充填剤として、四級アンモニウム基を結合した様々な陰イオン交換型カラム充填剤を合成し、より高い分離性能を持つ充填剤の開発を目的とした。

### 3. 高性能な四級アンモニウム塩型糖分析用カラム充填剤の開発

#### 3.1 四級アンモニウム塩型糖分析用カラム充填剤の設計・合成

##### (1) 糖分析用カラム充填剤の設計

簡便に調製することができる糖分析用陰イオン交換型カラム充填剤として、基材樹脂であるクロロメチルスチレン-ジビニルベンゼン共重合体担体と様々な三級アミンとの反応により、陰イオン交換基として四級アンモニウム基を導入した四級アンモニウム塩型カラム充填剤を合成することを考えた。これらの充填剤は陰イオン交換基の末端官能基構造によりモノアミン型、ジアミン型、オキシエチレン型の3つに分けることができた (図2)。

- トリメチルアミンなどの三級アミンとの反応により合成する **モノアミン型  $M_n$**
- モノアミン型のメチレン鎖の先にさらにジメチルアミノ基がついた **ジアミン型  $D_n$**

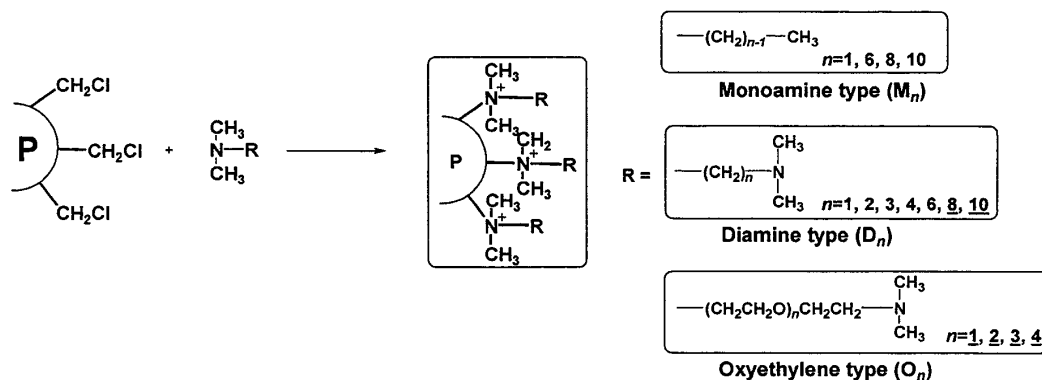


図2 四級アンモニウム塩型糖分析用カラム充填剤の構造

- ・ ジアミン型のメチレン鎖に酸素原子を導入し、オキシエチレン鎖とした充填剤**オキシエチレン型  $O_n$**

本研究のように、末端官能基を様々に変えた充填剤に関する報告はこれまでにない。

## (2) 三級アミン

四級アンモニウム塩型カラム充填剤の合成に用いた三級アミンのうち、 $(\text{CH}_3)_2\text{N}-(\text{CH}_2)_n-\text{N}(\text{CH}_3)_2$  ( $n=8, 10$ ),  $(\text{CH}_3)_2\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$  ( $n=1, 2, 3, 4$ )を合成した<sup>8),9)</sup>。

アルキルハライドとジメチルヒドラジンとの反応によりアンモニウム塩を合成した。次に亜硝酸ナトリウムによって末端アミノ基をジアゾニウム塩とした後、分解して両末端がジメチルアミノ基の三級アミンを得ることができた。質量分析計 (MS) ならびに核磁気共鳴装置 (NMR) により得られた分析値より目的とする三級アミンであることを確認した。合成結果を以下に示した。 $(\text{CH}_3)_2\text{N}-(\text{CH}_2)_n-\text{N}(\text{CH}_3)_2$

$n=8$  収量 3.74g (37%) APCI-MS ( $\text{MH}^+=201$ ).  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=2.21\text{--}2.25$  (m, 8H), 1.42-1.49 (m, 2H), 1.30 (m, 4H).

$n=10$  収量 6.84g (60%) APCI-MS ( $\text{MH}^+=229$ ).  $^1\text{H-NMR}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=2.21\text{--}2.26$  (m, 8H), 1.42-1.49 (m, 2H), 1.28 (m, 6H).

$(\text{CH}_3)_2\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$

$n=1$  収量 5.9 g (73%) APCI-MS: 161 ( $\text{MH}^+$ ).  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=3.54$  (t,  $J=6\text{Hz}$ , 4H), 2.50 (t,  $J=6\text{ Hz}$ , 4H), 2.26 (s, 12H).

$n=2$  収量 6.0 g (58%) APCI-MS: 205 ( $\text{MH}^+$ ).  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=3.62$  (s, 4H), 3.58 (t,  $J=6\text{ Hz}$ , 4H), 2.51 (t,  $J=6\text{ Hz}$ , 4H), 2.26 (s, 12H).

$n=3$  収量 6.3 g (72%) APCI-MS: 249 ( $\text{MH}^+$ ).  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=3.62\text{--}3.64$  (m, 8H), 3.57

(t,  $J=6\text{ Hz}$ , 4H), 2.50 (t,  $J=6\text{ Hz}$ , 4H), 2.26 (s, 12H).  
 $n=4$  収量 4.2 g (49%) APCI-MS: 293 ( $\text{MH}^+$ ).  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta=3.63\text{--}3.65$  (m, 8H), 3.57 (t,  $J=6\text{ Hz}$ , 8H), 2.50 (t,  $J=6\text{ Hz}$ , 4H), 2.26 (s, 12H).

## (3) 糖分析用カラム充填剤の合成

糖分析用カラム充填剤として、クロロメチルスチレン-ジビニルベンゼン共重合体担体 (粒径  $5\mu\text{m}$ , 細孔径  $270\text{\AA}$ ) と様々な三級アミンにより  $60^\circ\text{C}$ , 4 時間の簡便な条件下で反応を行い, 15 種類の四級アンモニウム塩型糖分析用充填剤を合成した。

合成結果として, 元素分析の結果を表 1 に示した。窒素原子の含有率からアミン含有率 (mmol/g) を求めた。アミン含有率は充填剤 1g 当たり結合したジメチルアミノ基 (mmol) を表し,  $0.69\text{--}1.86$  mmol/g の値であった。ジメチルアミノ基が最も多く結合した充填剤はモノアミン型鎖長 1 の  $M_1$ ,

表 1 元素分析結果

充填剤	C (%)	H (%)	N (%)	アミン含有率 (mmol/g)
$M_1$	71.35	8.42	2.61	<b>1.86</b>
$M_6$	76.68	8.25	1.83	<b>1.31</b>
$M_8$	74.23	8.65	1.87	<b>1.33</b>
$M_{10}$	75.11	8.46	1.61	<b>1.15</b>
$D_1$	77.26	8.52	2.70	<b>0.96</b>
$D_2$	74.49	8.19	4.02	<b>1.44</b>
$D_3$	75.63	8.60	3.16	<b>1.13</b>
$D_4$	72.07	8.85	2.98	<b>1.06</b>
$D_6$	70.43	8.72	2.69	<b>0.96</b>
$D_8$	73.60	8.18	2.26	<b>0.81</b>
$D_{10}$	73.96	8.24	2.00	<b>0.71</b>
$O_1$	72.63	8.00	2.55	<b>0.91</b>
$O_2$	71.17	8.20	2.20	<b>0.79</b>
$O_3$	67.36	7.95	2.04	<b>0.73</b>
$O_4$	71.54	8.41	1.93	<b>0.69</b>

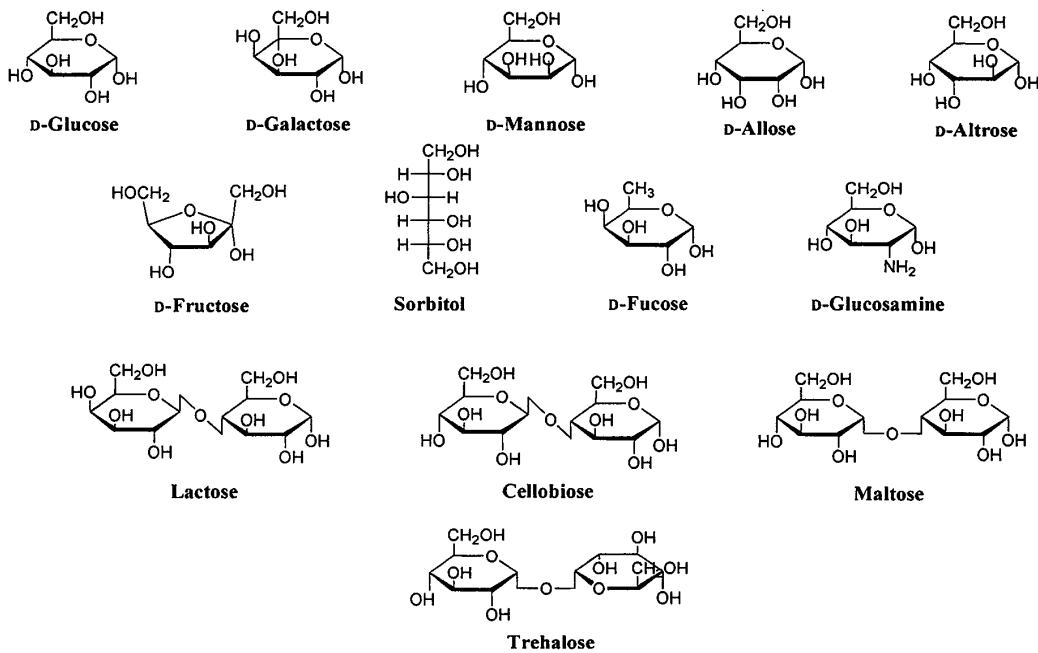


図3 分析した単糖・二糖

方最も少ない含有率はオキシエチレン型鎖長4のO<sub>4</sub>であった。以上の分析値より、アミン含有率は、ジメチルアミノ基から伸びる鎖長が長くなるに従い、低くなる傾向を示すことが明らかとなった。

これらの充填剤を汎用性の高いサイズであるPEEK製カラム(4.6mm×250mm)に充填し、糖の分析実験に用いることとした。

### 3. 2. 糖の分析1：末端官能基構造の効果

合成した15種類の糖分析用カラムを用い、単糖9種(アルドヘキソース：グルコース・ガラクトース・マンノース・アロース・アルトロース、ケトヘキソース：フルクトース、糖アルコール：ソルビトール、デオキシ糖：フコース、アミノ糖：グルコサミン)、二糖4種(還元糖：ラクトース・セロビオース・マルトース、非還元糖：トレハロース)を分析した(図3)。

#### (1) 分析実験

・**溶離液(移動相)の調製方法**：プラスチック容器内に予め調製しておいた50%水酸化ナトリウム水溶液の中層から2.6mLをメスピペットで採り、ヘリウムガスを10分間通気した超純水500mLに加え、さらに10分間ヘリウムガスを通気し、溶離液である100mM水酸化ナトリウム水溶液とした。

溶離液として水酸化ナトリウム水溶液の濃度を変える場合は、この調製方法を基準にして溶離液調製を行うこととした。

・**試料溶液調製**：単糖は糖サンプル25mg、二糖は糖サンプル50mgを50mLメスフラスコ中で水に溶解し、この溶液をマイクロメンブランフィルター(0.45μm)に通し、2mLずつセラムチューブに分注し、冷凍保存した。使用時に解凍して用いた。

混合試料は、単糖あるいは二糖それぞれの調製した試料から等量ずつピペットマンで採取し、セラムチューブに分注、分析に用いた。

・**HPAE-EDシステム分析装置**：陰イオン交換型高速液体クロマトグラフィー(HPAE)に用いた装置には、ポンプ：LC-10ADポンプ(島津製作所(株)製)、電気化学検出器(ED)：CHRATEC VI-501PS(倉橋技研(株)製)、電気化学検出器作用電極：Ni-Ti合金ワイヤー<sup>10)</sup>(Goodfellow Inc.製、0.8mmφワイヤー)を用いた。

・**分析条件**：マイクロシリンジを用い、調製した試料溶液2μLずつ採取し、溶離液：0.1M NaOH、流速：1.0 mL/minの条件下で、HPAE-EDシステムにより分析した。

#### (2) 分析結果と考察—溶出順位と保持特性

代表的な分析結果として、ジアミン型D<sub>10</sub>による単糖、二糖の各クロマトグラムを図4、図5に示した。

溶出順位について、単糖は、糖アルコール(ソルビトール)、デオキシ糖(フコース)、アミノ糖(グルコサミン)、アルドヘキソース(マンノース、ガラクトース、アロース、アルトロース)

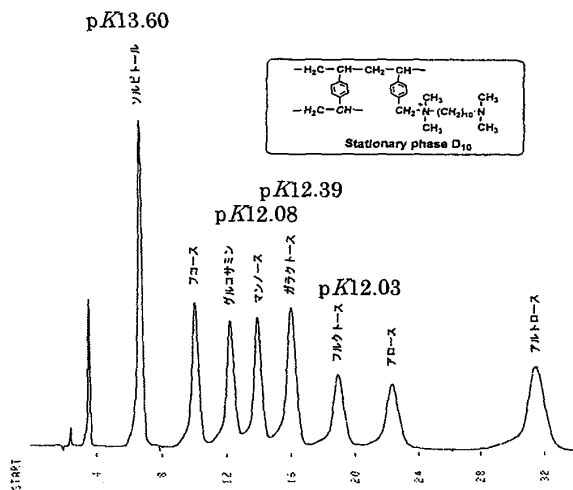


図4 単糖8種の代表的なクロマトグラム (ジアミン型充填剤D<sub>10</sub>)

$$k = \frac{(t_R - t_0)}{t_0} / A$$

$t_0$  : 試料溶媒 (水) の溶出時間 (min)  
 $t_R$  : 分析試料の溶出時間 (min)  
 $A$  : カラム充填剤のアミン含有率 (mmol / g: based on N)

に capacity factor ( $k$ ) が用いられている. capacity factor ( $k$ ) は充填剤自身の保有する試料選択性を比較するのに有効で, 一般に充填剤の試料選択性の評価に広く用いられている. さらに本研究では, 各カラム充填剤の陰イオン交換基となる四級アンモニウム基の数を 1.0 mmol / g として, 構造の異なる末端官能基と保持能との相関を検討する必要がある. そこでカラム充填剤のアミン含有率  $A$  (mmol / g: based on N) を用い, 保持パラメータである capacity factor ( $k$ ) を以下の式より算出した. なお, カラム充填剤のアミン含有率  $A$  (mmol / g: based on N) は表 1 の元素分析結果より求めた値である. 以上の方法より算出した capacity factor ( $k$ ) を表 2 にまとめた.

の順に溶出した. また二糖は, 非還元糖 (トレハロース), 還元糖 (ラクトース, セロビオース, マルトース) の順にそれぞれ効率よく分離することが可能となった.

次に, pK 値による溶出順位に着目する. pK 値の大きい, つまり解離しにくいソルビトール (pK=13.60) は充填剤との相互作用が弱く, 最も早く溶出した. 逆に, pK 値の小さなフルクトース (pK=12.03) は溶出が遅い結果であり, 基本的には pK 値の順に基づいている. しかし, マンノース (pK=12.08) とガラクトース (pK=12.39) のような例外も観察されたことから, pK 値以外の作用も働いていると考えられた.

図 6 に, 末端官能基構造の異なるモノアミン型, ジアミン型, オキシエチレン型の各カラム充填剤の糖 (グルコース) の保持特性の比較を表した. 横軸はカラム充填剤末端官能基の鎖長を, 縦軸は capacity factor ( $k$ ) をとった. この図はどのカラム充填剤がグルコースを保持する性能が高いかを明確に表している.

さらに, 陰イオン交換基の末端官能基構造の異なる各カラム充填剤の持つ保持特性について検討した. 合成した 15 種類のカラム充填剤の糖を保持する能力 (保持能) を比較するには, 充填剤を空カラムに充填する際にできる空隙容量が各カラムにより異なるため, 溶出時間だけで単純に議論することはできない. そこで保持パラメータとして, 異なったカラム充填剤の保持能の比較

モノアミン型, ジアミン型共に末端官能基の鎖長が長くなるに伴い, capacity factor ( $k$ ) が増加している. これは, 四級アンモニウム基から伸びるメチレン鎖が長くなると疎水性が強まるため, 解離した糖が充填剤のイオン交換部に近付きやすいためと考えられた. また, モノアミン型とジアミン型を比べる. 鎖長が 4 までは, モノアミン型が保持が強い. 鎖長が 4 より長くなるとジアミン

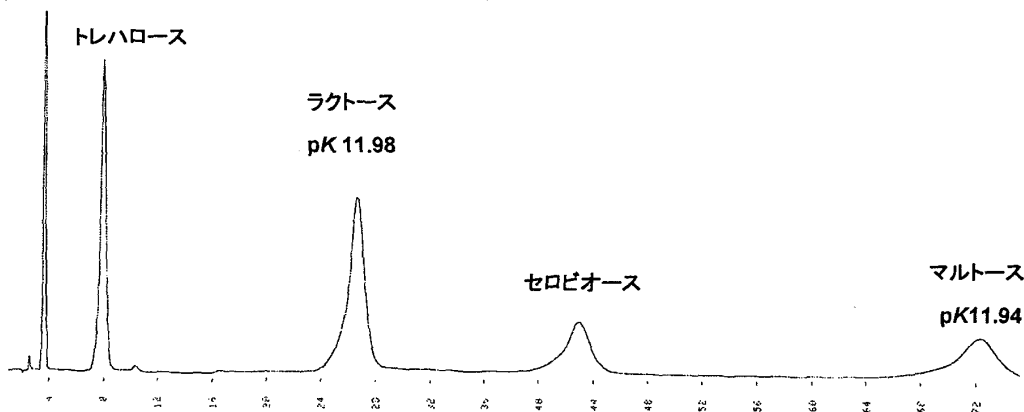


図5 二糖4種の代表的なクロマトグラム (ジアミン型充填剤D<sub>10</sub>)

表 2

Capacity factor ( $k$ ) for various monosaccharides and disaccharides on stationary phases M, D, O<sup>a,b</sup>

Carbohydrate	$pK^c$	Stationary phase														
		M <sub>1</sub>	M <sub>6</sub>	M <sub>8</sub>	M <sub>10</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>	D <sub>6</sub>	D <sub>8</sub>	D <sub>10</sub>	O <sub>1</sub>	O <sub>2</sub>	O <sub>3</sub>	O <sub>4</sub>
Sorbitol	13.60	0.44	0.54	0.55	0.63	0.11	0.22	0.32	0.52	0.74	1.05	1.25	0.88	1.05	0.99	0.98
Fucose		0.99	1.15	1.21	1.49	0.50	0.70	0.72	1.11	1.41	2.20	2.59	1.96	2.19	2.12	2.04
Glucosamine		1.57	1.73	1.75	1.94	0.48	0.72	0.98	1.60	1.88	2.95	3.45	2.39	2.81	2.69	2.79
Mannose	12.08	1.75	1.98	2.04	2.36	0.52	0.73	1.12	2.08	2.58	3.48	4.15	3.32	3.81	3.66	3.64
Glucose	12.28	1.84	2.16	2.31	2.61	0.55	0.78	1.15	2.09	2.84	4.19	4.79	3.63	4.28	4.05	4.03
Galactose	12.39	1.90	2.24	2.40	2.70	0.47	0.82	1.20	2.36	3.08	4.35	5.04	3.81	4.41	4.22	4.14
Fructose	12.03	2.21	2.73	2.78	3.24	0.74	1.02	1.49	2.87	3.86	5.50	6.24	4.49	5.27	5.37	5.18
Allose		2.72	3.21	3.23	3.87		1.17		3.88	4.18	6.52	7.61	5.68	6.66	6.40	6.28
Altrose		3.82	4.60	4.70	5.45		1.60		5.61	6.26	9.56	11.30	8.17	9.63	9.12	9.08
Trehalose		0.67	0.84	0.93	1.16	0.20		0.32	0.80	0.89	1.45	1.74	1.20	1.42	1.20	1.19
Lactose	11.98	3.66	4.13	4.59	6.89	0.52		2.19	3.31	4.25	7.69	8.47	6.30	7.34	8.12	8.13
Cellobiose		4.13	5.09	7.60		1.17		2.99	5.80	7.01	13.16	14.79	10.42	12.38	11.44	10.99
Maltose	11.94		6.86			1.80		4.93	7.51	11.86	22.96	26.26	18.30	21.86	19.83	19.33

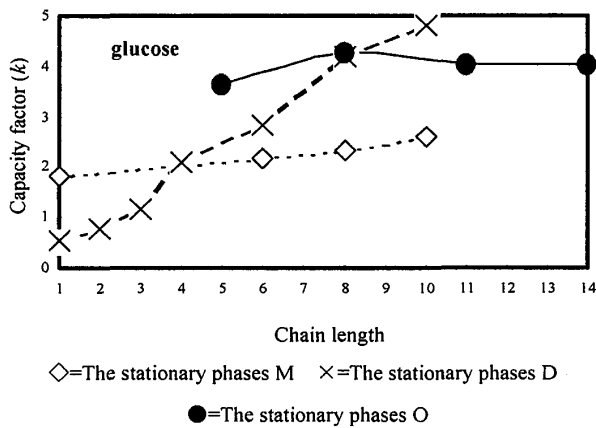
<sup>a</sup> HPLC conditions: eluent, 100 mM NaOH; flow rate, 1.0 ml/min; detection potential, +0.50 V vs Ag/AgCl.<sup>b</sup> The capacity factor is defined as follows:  $k = (V_A - V_0) / V_0$ , where  $V_A$  is the retention volume of the analyte A and  $V_0$  is the void volume of the column. The  $k$  values are normalized to ion-exchange capacity 1.00 mmol/g (based on N).<sup>c</sup> Lange's hand book.

図 6 末端官能基の鎖長と保持特性

型の capacity factor ( $k$ ) が急激に増加してくる、つまり鎖長が 4 より長くなるに従い、メチレン鎖の末端にさらに付いたジメチルアミノ基の存在が保持に影響を及ぼすと考えられた。

次にジアミン型とオキシエチレン型に着目する。オキシエチレン型 O<sub>1</sub> (鎖長 5) は、酸素原子の存在のため、ジアミン型、モノアミン型に比べ保持能が高い。しかし O<sub>2</sub> (鎖長 8) を頂点に O<sub>3</sub> (鎖長 11) から保持能は減少し、O<sub>4</sub> (鎖長 14) ではわずかな減少傾向を示した。この傾向は複数の酸素原子が近づき環状構造を取り、強アルカリ性溶離液中の Na<sup>+</sup> と相互作用する一方で、糖との相互作用が小さくなると考えた。

末端官能基構造と保持能との相関を検討した結果、ジアミン型メチレン鎖長 10 の D<sub>10</sub> の保持能が最も高い傾向を示した。

図 6 ではグルコースのみの各カラム充填剤の

保持特性を表したが、以上の保持傾向は分析した他の単糖、二糖にも共通であった。

### 3. 3 糖の分析 2 : 分離能の評価

合成した 15 種のカラム充填剤のうち高い保持能をもつ充填剤を選択し、これまで分離が難しいとされていた以下の糖類の分離・分析を行い、分離能について検討した。分離能の評価には、各カラムの理論段数・分離係数・capacity factor ( $k$ ) などが関係することから、異なる構造のカラム評価には、最も簡便で有効な視覚的判断によるクロマトグラムを用いた。

#### (1) 極類似構造をもつグルコース・ガラクトース・マンノースの分離

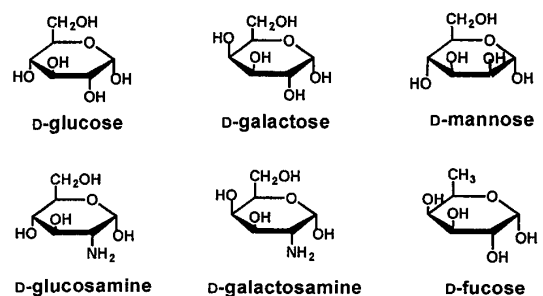


図 7 糖鎖を構成する代表的単糖

本研究において、高い保持能を示したジアミン型カラム充填剤 D<sub>6</sub>, D<sub>8</sub>, D<sub>10</sub> を使い、非常に類似した構造をもつためこれまで分離が難しいと考えられてきたアルドヘキソースのグルコース、ガラクトース、マンノースの分離を試みた。分析試料はグルコース、ガラクトース、マンノースに加え、フコース、ガラクトサミン、グルコサミンの

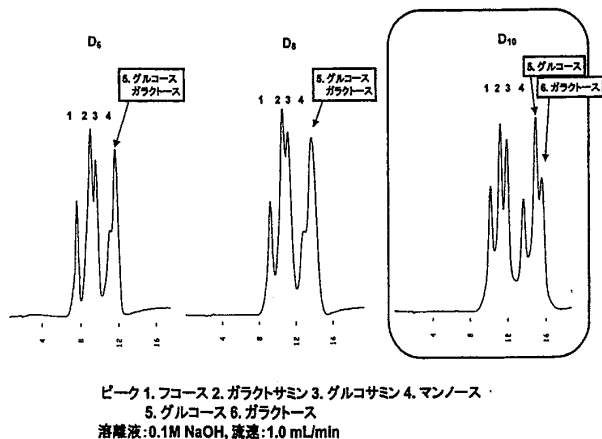


図8 グルコース・ガラクトース・マンノースの分離

6種の単糖を選択した。これら6種の単糖は蛋白とN結合したオリゴ糖を構成する糖であり、簡便な分析条件のもとで分離を可能にすることが必須である<sup>1)</sup>。分析した結果のクロマトグラムを図8に示した。

本研究において開発したジアミン型カラム充填剤では、D<sub>6</sub>、D<sub>8</sub>、D<sub>10</sub>とメチレン鎖長が長くなるに従い、徐々に分離が可能となってきたことがわかる。D<sub>6</sub>、D<sub>8</sub>ではグルコースとガラクトースの分離は不可能であったが、D<sub>10</sub>により分離可能となった。この分離傾向はカラム充填剤末端官能基のメチレン鎖長の効果を表している。

(2)環状糖アルコール *myo*-イノシトールとその異性体の分離

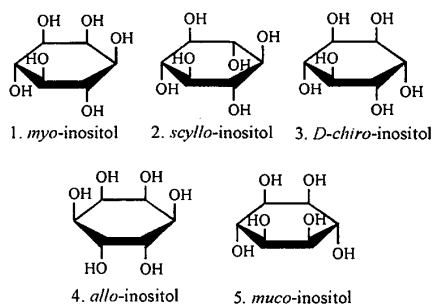


図9 環状糖アルコール *myo*-イノシトールとその異性体

環状糖アルコールである*myo*-イノシトールには理論上9つの異性体が存在し、それらを分離・分析した報告はない。また、*myo*-イノシトールの経口摂取により成人病予防、ガン抑制因子になりうることが報告されている<sup>11)-14)</sup>。様々な物質中の*myo*-イノシトールを同定、定量するためには、*myo*-イノシトールとその異性体の分離を可能とする条件を確認しておかなくてはならない。

本研究では、*myo*-イノシトールと5種の異性体

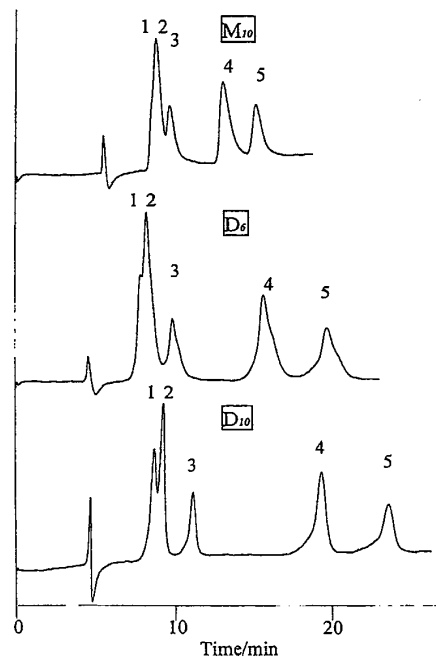


図10 *myo*-イノシトールとその異性体の分離・分析

(*scyllo*-イノシトール、*D-chiro*-イノシトール、*allo*-イノシトール、*muco*-イノシトール)を分離可能にする条件に関して検討した。カラム充填剤は、本研究において設計・合成したモノアミン型カラム充填剤M<sub>10</sub>、ジアミン型カラム充填剤D<sub>6</sub>、D<sub>10</sub>を用いた。

基本的分析条件である溶離液：100 mM NaOH、流速：1.0 mL/min 条件下で分析を行ったところ、*myo*-イノシトールと *scyllo*-イノシトールの分離が難しかった。そこで溶離液、流速の条件に検討を加え、溶離液のアルカリ濃度を低くした 20 mM NaOH、流速：0.4 mL/min 条件の下、ジアミン型カラム充填剤D<sub>10</sub>を用いて分離可能となった。分離結果のクロマトグラムを図10に示した。

(3)分離能の検討

本研究において、設計・合成したモノアミン型、ジアミン型、オキシエチレン型カラム充填剤15種のうち、最も高い保持能を示した充填剤はジアミン型カラム充填剤D<sub>10</sub>であった。

つぎに、これまで分離・分析が難しいとされていた様々な糖の分析実験を行った結果、ジアミン型カラム充填剤D<sub>10</sub>により分離可能となった。

以上より、高い保持能・分離能を共に有する充填剤は、ジアミン型カラム充填剤D<sub>10</sub>であることが明らかとなった。

4. 応用実験：柑橘類中の糖の定量分析

環状糖アルコール構造をもつ *myo*-イノシトールは毒性が極めて低く、動脈硬化などの成人病予防、乳ガン、肝臓ガン、肺ガンなどのガン抑制因子となる物質であるとの研究もあり、注目されている糖である<sup>11)-14)</sup>。そこで本研究で設計・合成したジアミン型カラム充填剤  $D_{10}$  で環状糖アルコールの分離を試みた結果、溶離液：20 mM NaOH、流速：0.4 mL/min 条件下で、*myo*-イノシトールとその異性体 (*scyllo*-イノシトール、*D-chiro*-イノシトール、*allo*-イノシトール、*muco*-イノシトール) の分離が可能となった。

本研究ではさらに、*myo*-イノシトールを含む食品に注目した。H.S. Leeらは逆相系の分離機構に基づいて、基材とするシリカゲルにアミノ基を修飾したカラム充填剤、溶離液にアセトニトリル-水混合溶媒を用い、アメリカ産グレープフルーツ果肉中に *myo*-イノシトールが 1.0 g/L 含まれていると報告した<sup>15)</sup>。

そこで、われわれの生活する日本において多く生産、摂取されている国産柑橘類にも *myo*-イノシトールが存在するか否かに着目した。糖の保持能、分離能共に高く、*myo*-イノシトールとその異性体の分離を可能にしたジアミン型カラム充填剤  $D_{10}$  を用い、国産柑橘類 15 種、輸入柑橘類 12 種の果肉中に含まれる糖について定量分析を行った<sup>16)</sup>。

### (1) 分析試料

・**試料**：国産柑橘類 15 種（ミカン類：青島温州・ポンカン・アンコール・不知火、タンゴール類：伊予柑・天草・清見、晩柑類：甘夏・日向夏・八朔、ポメロ類：土佐文旦・晩白柚・大橘・水晶文旦、レモン類：愛媛レモン）、輸入柑橘類 12 種（スイートオレンジ類：ブラッドオレンジ・バレンシアオレンジ・ネーブルオレンジ、タンゼロ類：ミネオラタンゼロ、タンゴール類：マーコット、ポメロ類：カリフォルニアポメロ、グレープフルーツ類：マスターズホワイト・マスターズルビー・オーチャードホワイト・オーチャードルビー、レモン類：カリフォルニアレモン、ライム類：ライム）

・**試料溶液調製**：柑橘類試料を果肉のみにし、ホモジェナイザーにより均質にした。この溶液を遠心分離 (3000 rpm, 10 min) し、その液層部分を 0.45 $\mu$ m のメンブランフィルターでろ過後、1%水溶液にした。この溶液をセラムチューブに移し、

冷凍保存後、分析時に解凍して使用した。

### (2) *myo*-イノシトールの同定

本実験において、柑橘類果肉中に *myo*-イノシトールが含まれているかを確認することが必要不可欠である。そこで、*myo*-イノシトールとその異性体の分離を可能にした条件、溶離液：20 mM 水酸化ナトリウム水溶液、流速：0.4 mL/min で柑橘類より抽出した分析試料溶液を分析した。国産柑橘類大橘のクロマトグラムを図 10 に示した。

クロマトグラムに示したように、柑橘類分析試料溶液では、30 分以内に一つのピークのみ検出された。これは標準サンプルの *myo*-イノシトールと同じ溶出時間 (8.49 min) であった。この分析条件において他の柑橘類を分析したところ、*myo*-イノシトール以外の異性体は確認されなかった。

しかしこの分析条件では、柑橘類分析試料溶液中の *myo*-イノシトール以外の糖類の検出に 1 時間以上かかるため、溶離液条件を検討した。その結果、溶離液：500 mM NaOH、流速：0.4 mL/min の移動相条件で定量分析を行うこととした。

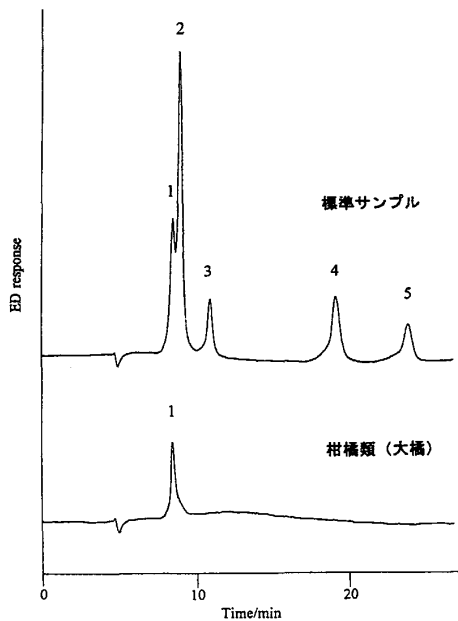
### (3) 定量分析

・**HPAE-ED システムによる分析**：これまでに開発してきたカラム充填剤の中で、最も分離性能が高く、*myo*-イノシトールとその異性体を分離することが出来るジアミン型  $D_{10}$  を用い、溶離液：0.5 M NaOH、流速：0.4 mL/min 条件下において、各試料溶液を 10 $\mu$ L 注入した。

・**再現性**：定量分析実験を行うにあたり、実験に用いる HPAE-ED システムにおける再現性の確認を行った。設計・合成したジアミン型カラム充填剤  $D_{10}$  を用い、*myo*-イノシトール、グルコース、フルクトース、スクロースの標準サンプル水溶液（濃度 0.5  $\mu$ g/mL）をそれぞれ 2  $\mu$ L、10 回繰り返して注入した。その結果を表 3 にまとめた。

溶出時間は、*myo*-イノシトール 7.65 min、グルコース 13.48 min、フルクトース 15.97 min、スクロース 22.08 min であった。さらに、各溶出時間における標準偏差、相対標準偏差を求めた。相対標準偏差は最大で 2.7 % (スクロース) と良好な再現性を得ることができた。スクロースは最も遅い溶出時間を示した。

図 11 に示したように、標準サンプルの溶出時間と柑橘類中の糖の溶出時間とが一致し、同定することができた。



柑橘類に含まれる myo-イノシトールの同定

- 1. myo-イノシトール, 2. scyllo-イノシトール, 3. D-chiro-イノシトール,
  - 4. allo-イノシトール, 5. muco-イノシトール
- (溶離液: 20 mM NaOH, 流速: 0.4 mL/min)

図 1 1 myo-イノシトールの同定

表 3

Repeatability of stationary phase D<sub>10</sub> for a standard solution containing 0.5 µg/mL.<sup>a</sup>

Peak	Carbohydrates	t <sub>R1</sub> (standard)	SD <sup>b</sup>	RSD % <sup>c</sup>
1	myo-inositol	7.65	0.033	0.44
2	glucose	13.48	0.090	0.67
3	fructose	15.97	0.132	0.83
4	sucrose	22.08	0.596	2.70

<sup>a</sup>Eluent; 500 mM NaOH, flow-rate; 0.4 mL/min.

<sup>b</sup>SD=standard deviation.

<sup>c</sup>RSD=relative standard deviation.

・ **検量線**：本研究において定量分析は記録計で自動的に計測されるピーク面積に基づいて行うこととした[7]。ピーク面積を正確に測定するには分析対象成分のピークが隣接するピークとベースライン分離してはならない。本研究により得た柑橘類中の糖の分析結果はすべて、ベースライン分離した良好なクロマトグラムであった。

またピーク面積から試料溶液中の各糖の濃度の算出には、絶対検量線法を用いた。柑橘類中に含まれていると同定した、myo-イノシトール、グルコース、フルクトース、スクロースの標準サンプル水溶液の濃度を段階的に変えて調製し(0.2

~8 mg/mL), HPLC に供してクロマトグラムを得た。得られたクロマトグラムのピーク面積を標準物質の濃度の関数として検量線を作製した。myo-イノシトール, グルコース, フルクトース, スクロースの各検量線の相関係数は R<sup>2</sup>=0.9978~0.9997 の良好な直線性をもった検量線であった。各検量線の結果の式 (myo-イノシトール: y=170384x, グルコース: y=87851x, フルクトース: y=43712x, スクロース: y=32480x)

(4) 定量分析結果

各検量線の相関係数は R<sup>2</sup>=0.9978~0.9997 の良好な直線性をもった検量線であった。各検量線の結果の式 (myo-イノシトール: y=170384x, グルコース: y=87851x, フルクトース: y=43712x, スクロース: y=32480x) と柑橘類試料溶液を分析した結果のクロマトグラムから得たピーク面積値を用い, myo-イノシトール, グルコース, フルクトース, スクロースの各柑橘類果肉中に含まれる濃度 (g/L) を求めた。定量の結果を表4にまとめた。

まずH.S. Leeらはアメリカ産グレープフルーツ果肉中にmyo-イノシトールを1.0±0.1 g/L含んでいると報告していた。アニオン交換型HPLCと電気化学検出器を組み合わせた分析法を用いた本研究においても、グレープフルーツ濃度は報告された値と同等の結果であった。

さらに国産柑橘類, 輸入柑橘類すべて, myo-イノシトール, グルコース, フルクトース, スクロ

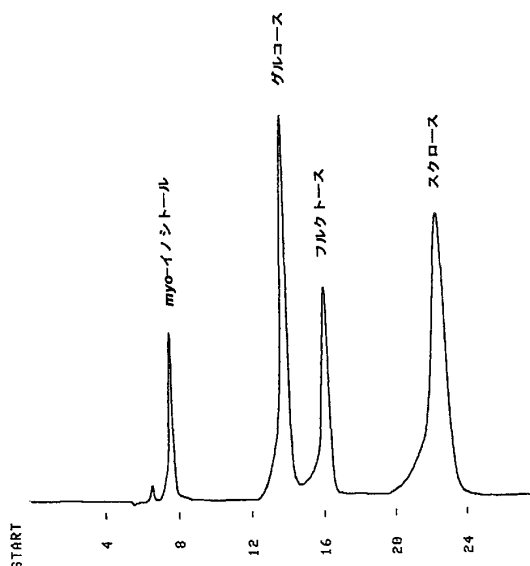


図 1 2 柑橘類果肉に含まれる糖の分析



表4

柑橘類中に含まれる糖質<sup>a,b</sup>

Sample	myo-inositol		glucose		fructose		sucrose		TS <sup>c</sup> g/L
	g/L	%TS <sup>d</sup>	g/L	%TS	g/L	%TS	g/L	%TS	
国産柑橘類									
ミカン類									
・青島温州	1.1±0.3	1.3	9.9±0.3	11.8	16.2±1.2	19.3	56.6±2.4	67.5	83.8±3.6
・ポンカン	1.6±0.2	1.2	23.5±1.1	18.1	29.4±1.1	21.8	76.6±2.4	58.9	130.1±4.4
・アンコール	1.4±0.1	0.9	20.8±0.9	14.1	28.1±1.4	19.0	97.5±1.1	66.0	147.8±3.4
・不知火	1.7±0.1	0.9	35.2±2.3	19.5	46.1±2.9	25.6	97.3±1.9	54.0	180.3±3.4
タンゴール類									
・伊予柑	1.8±0.09	1.5	23.0±1.4	18.8	31.2±2.7	25.4	66.6±2.4	54.3	122.6±6.5
・天草	1.1±0.1	0.7	26.8±2.0	18.3	32.8±2.0	22.3	86.1±2.9	58.7	146.8±6.7
・清見	0.7±0.04	0.9	12.7±0.9	16.4	14.5±2.5	18.8	49.4±3.9	63.9	77.3±7.4
晩柑類									
・甘夏	1.0±0.2	1.3	15.3±0.9	20.5	15.3±1.9	20.5	42.9±3.6	57.6	74.5±4.7
・日向夏	0.9±0.08	1.1	17.1±1.3	20.6	24.3±3.3	29.2	40.9±2.9	48.2	83.2±7.6
・八朔	1.4±0.1	1.3	21.0±2.8	19.2	29.4±2.6	26.9	57.5±1.8	52.6	109.3±3.7
ボモロ類									
・土佐文旦	1.8±0.1	1.9	15.2±2.0	15.7	18.8±0.9	19.4	61.3±2.6	63.1	87.1±5.4
・晚白柚	1.1±0.3	1.0	17.1±1.4	16.2	21.0±1.4	19.9	66.2±2.0	62.8	105.4±5.0
・大橘	2.1±0.2	1.9	16.1±1.4	14.8	21.1±2.8	19.4	69.4±2.4	63.8	108.7±1.6
・水島文旦	1.5±0.1	1.3	21.8±1.3	18.9	30.0±1.4	26.1	61.8±2.0	53.7	115.1±4.8
レモン類									
・豊成レモン	0.9±0.04	2.9	8.4±0.07	27.1	9.9±0.4	31.9	11.8±0.9	38.1	31.0±1.2
輸入柑橘類									
スイートオレンジ類									
・ブラッド	1.3±0.08	1.4	15.9±0.8	17.6	21.7±2.4	24.0	51.4±2.6	56.9	90.3±5.6
・パレンシア	2.3±0.2	2.3	23.2±1.2	22.7	32.5±1.7	31.8	44.1±2.8	43.2	102.1±5.9
・ネーブル	1.4±0.1	1.2	22.0±2.1	19.0	26.1±1.4	22.6	66.2±1.6	57.2	115.7±2.0
タンゼロ類									
・ミネオラ	1.1±0.04	1.0	18.4±2.4	15.9	22.9±2.0	19.8	73.3±5.8	63.4	115.7±9.3
タンゴール類									
・マーコット	0.8±0.01	0.8	19.5±1.0	20.3	23.4±2.4	24.4	52.2±3.0	54.4	95.9±6.4
ボモロ類									
・カリフォルニア	1.3±0.06	1.2	12.6±1.8	11.7	11.3±2.6	10.5	82.1±1.3	76.6	107.2±5.7
グレープフルーツ類									
・マスターズホワイト	0.8±0.1	1.4	14.2±1.3	24.4	18.3±0.5	31.5	24.8±0.8	42.7	58.1±2.7
・マスターズルビー	1.3±0.1	1.5	19.3±0.9	22.7	23.6±1.0	27.7	40.9±2.2	48.1	85.1±2.2
・オーキッドホワイト	1.2±0.1	1.9	18.5±1.1	29.1	17.3±1.2	27.2	26.6±1.1	41.8	63.6±1.0
・オーキッドルビー	1.1±0.2	1.4	17.0±1.4	22.0	22.6±1.2	29.2	36.7±0.9	47.4	77.4±1.5
レモン類									
・カリフォルニア	0.6±0.1	6.7	3.6±0.2	40.4	2.9±0.08	32.6	1.8±0.05	20.2	8.9±0.5
ライム類									
・ライム	0.5±0.05	3.9	4.9±0.04	38.3	4.8±0.5	37.5	2.6±0.2	20.3	12.8±0.3

<sup>a</sup>Column: stationary phase O<sub>2</sub> column, eluent: 500 mM NaOH. flow-rate: 0.4 mL/min.

<sup>b</sup>Data represent the means of three measurements (±SD).

<sup>c</sup>TS=the total sugar, sum of myo-inositol, glucose, fructose, and sucrose.

<sup>d</sup>%TS=percent of total sugar.

ース4種共に含んでいることがわかった。また myo-イノシトール含有は、国産柑橘類の大橘が最も多かった (2.1 g/L)。最も myo-イノシトールが少ない柑橘類は、ライムであった (0.5 g/L)。

糖含有総量に関して、最も多かった柑橘類は国産ミカン類の不知火 (商品名: でこぼん, 180.3 g/L)、最も少ない柑橘類は輸入レモンであった (8.9 g/L)。

27種すべての柑橘類に、myo-イノシトール、グルコース、フルクトース、スクロースの存在が確認され、25分以内で分離・分析が可能となった (図12)。国内産柑橘類の myo-イノシトール量は 0.7 g/L-2.1 g/L であった<sup>18)</sup>。

## 5. 総括

類似した構造、多様な結合位置を示す糖を分離するため、末端官能基構造を変えた四級アンモニウム塩型カラム充填剤を考えた。そのイオン交換部の末端官能基構造により、ジメチルアミノ基からメチレン鎖が伸びたモノアミン型M<sub>n</sub>、モノアミン型のメチレン鎖の先にさらにジメチルアミノ基の付いたジアミン型D<sub>n</sub>、ジアミン型のメチレン鎖の代わりにオキシエチレン鎖を導入したオキシエチレン型O<sub>n</sub>の3つ型を設計し、合成することとした。

四級アンモニウム塩型糖分析用カラム充填剤

の合成は、担体樹脂としてクロロメチルスチレン-ジビニルベンゼン共重合体担体 (粒径5μm) を、イオン交換部として様々な三級アミンを用い、その間の結合反応により15種の四級アンモニウム塩型糖分析用充填剤を60°C、4時間の簡便な方法で合成した。元素分析した結果、アミン含有率は 0.69~1.86 mmol/gであった。

合成した15種の四級アンモニウム塩型カラム充填剤を用い、単糖9種、二糖4種の分析を行い、モノアミン型、ジアミン型、オキシエチレン型の末端官能基構造の効果について検討した。その結果、ジメチルアミノ基から伸びる鎖長が長くなるに従い、疎水性相互作用が強まるためより高い保持能を得ることが可能となった。

さらに、これまで分離が難しいと考えられてきたアルドヘキソースのグルコース、ガラクトース、マンノースの分離について、また、特有な構造である環状糖アルコールmyo-イノシトールと5種の異性体に関する分離実験の結果、ジアミン型カラム充填剤D<sub>10</sub>により分離可能となった。

以上から、モノアミン型、ジアミン型、オキシエチレン型カラム充填剤の中で、保持能・分離能共に良好な充填剤はジアミン型でメチレン鎖長の長いジアミン型D<sub>10</sub>であることがわかった。

次に、クルードな分析試料を用いた分析実験として、柑橘類中に含まれる糖の定量分析を行った。本研究において設計・合成したジアミン型カラム充填剤D<sub>10</sub>を用い、溶離液: 500 mM NaOH, 流速: 0.4 mL/minの移動相条件で、柑橘類中に含まれる myo-イノシトール、グルコース、フルクトース、スクロースを25分以内で良好に分離・分析できた。定量分析の結果、アメリカ産グレープフルーツだけではなく、国産柑橘類にも有効な栄養成分と考えられる myo-イノシトールが0.7~2.1 g/L含まれていることが明らかとなった。

## 6. 参考文献

- 1) 永井克孝編, 糖鎖, 東京化学同人
- 2) A. M. Shamsuddin, 天然抗ガン物質 IP<sub>6</sub> の驚異, 講談社
- 3) S. Honda, *Anal. Biochem.*, **140**, 1 (1984).
- 4) M. F. Chaplin 著, 川寄 敏祐 訳, “糖質分析の実験マニュアル”, 廣川書店 (1995).
- 5) Y. C. Lee, *J.Chromatogr.*, **720**, 137 (1996).

- 6) T. R. I. Cataldi, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **368**, 739 (2000).
- 7) *Technical Note 20*, Dionex, Sunnyvale, CA, 1993.
- 8) T. Masuda, K. Kitahara, Y. Aikawa, S. Arai, *Anal. Sci.*, **17**, 895 (2001).
- 9) T. Masuda, K. Kitahara, Y. Aikawa, S. Arai, *J. Chromatogr. A*, **961**, 89 (2002).
- 10) T. Kuwana, *Anal. Chem.*, **66**, 2775 (1994).
- 11) T. Katayama, *Nutr. Res.*, **14**, 699 (1994).
- 12) L. W. Wattenberg, *Anticancer Res.*, **19**, 3659 (1999).
- 13) H. Hoshino, *Anticancer Res.*, **19**, 3663 (1999).
- 14) R. D. Estensen, L. W. Wattenberg, *Carcinogenesis*, **14**, 1957 (1993).
- 15) H. S. Lee, G. A. Coates, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **23**, 2123 (2000).
- 16) T. Masuda, A. Kawano, K. Kitahara, K. Nagashima, Y. Aikawa, S. Arai, *J. Nutr. Sci. & Vitam.*, **49**, 64 (2003).