



SEPARATION REPORT

高速順相分配クロマトグラフィー用充填剤 TSKgel Amide-80を用いた糖類の分離(2)

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. 3種のアミノ型シリカ系充填剤との比較	1
3. 移動相としての有機溶媒の効果	4
4. 移動相へのアミンの添加	6
5. 高感度分析	7
6. おわりに	10

1. はじめに

糖類は、食品、紙、パルプ、繊維、醱酵製品や医薬品の原料として工業的に重要な物質です。また近年、糖類あるいは複合糖質の糖鎖部分が生体機能に関与することが知られ、糖類は生物化学的にも重要な物質であると注目されています。そのため糖類あるいは糖鎖を効率良く分析できる方法が、工学、農学、理学、薬学、医学等の広範囲にわたって求められています。

高速液体クロマトグラフィーによる糖類の分離方法としては様々な方法があり^(1,2)、ほう酸錯体アニオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、順相クロマトグラフィー、イオン排除クロマトグラフィー、イオンクロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、配位子交換クロマトグラフィー、強アルカリ条件下アニオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等の方法が挙げられます。

数々の方法の中で、順相クロマトグラフィーは、糖の分離が糖の親水性の差によって行われる方法です。糖の親水性は、水酸基の数、方向、位置によって決定され、二糖類以上では単糖間の結合位置も関係します。またオリゴマーの分子量が保持容量から推測できるため、サイズフラクショネーションクロマトグラフィー⁽³⁾とも呼ばれています。

従来、糖類の順相クロマトグラフィー用充填剤としてはアミノ基結合シリカゲル充填剤⁽⁴⁻⁶⁾が良く用いられていました。しかしこれらの充填剤は化学的安定性が悪いこと、還元糖の回収率が低いこと等の欠点を持っていました。これらの欠点を克服するため、アミノプロピル基の代わりにカルバモイル基をシリカゲルに結合させた充填剤(TSKgel Amide-80)が近年開発、上市され、不飽和二糖の分離⁽⁷⁾、配糖体の分離⁽⁸⁾、誘導体化オリゴ糖の分析⁽⁹⁻¹⁵⁾など幅広く応用されています。

当充填剤の基本的性質および実例(アセトニトリル/水を移動相として用い、示差屈折計で検出)については、セパレーションレポートNo.55『高速順相分配クロマトグラフィー用充填剤TSKgel Amide-80を用いた糖類の分析(1)』にて既に紹介しています。本レポートでは、TSKgel Amide-80と他のシリカ系充填剤との比較、移動相有機溶媒の効果、アミン添加効果および糖の誘導体化による高感度分析例について紹介します。

2. 3種のアミノ型シリカ系充填剤との比較

2-1 化学的安定性

図-1にアセトニトリル/水=75/25を溶離液として、連続的に送液した時のトレハロースの容量比(k')の変化を示します。ただしTSKgel Amide-80では、還元糖のアノマー分離を抑えるため、分析を80℃で行っています。3種類のアミノ型シリカ系充填剤では200時間の連続送液により容量比(k')が送液開始時の(A)66.0%(C)67.3%(D)78.5%とひどく低下したのに対してTSKgel Amide-80では(B)96.2%と化学的に安定であることが分かります。

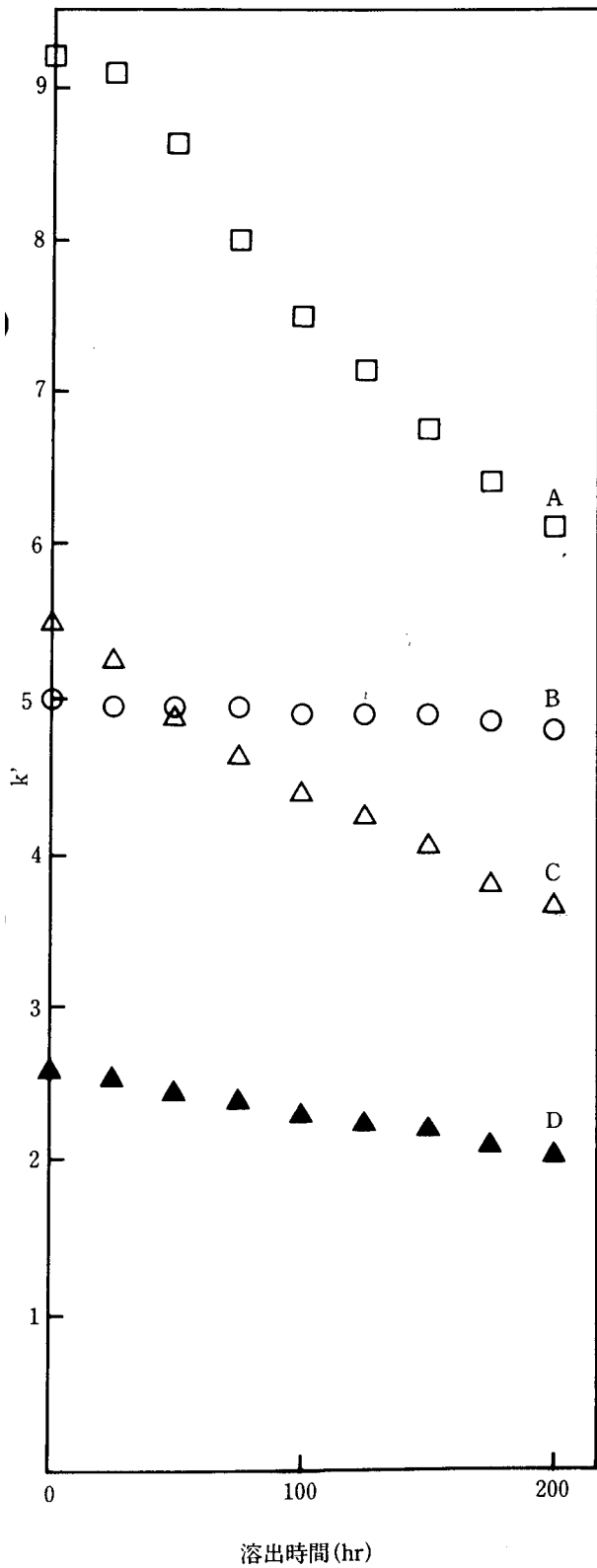


図-1 化学的安定性

カラム; A: A社アミノ型シリカ系カラム(4.6mmI.D.×25cm)

B: TSKgel Amide-80(4.6mmI.D.×25cm)

C: B社アミノ型シリカ系カラム(4.6mmI.D.×25cm)

D: C社アミノ型シリカ系カラム(4.6mmI.D.×25cm)

カラム温度; A、C、D: 25°C、B: 80°C

溶離液; アセトニトリル/水=75/25

流速; 1.0ml/min

検出; RI

試料; トレハロース(1mg/ml)、20 μ l

2-2 単糖類の定量回収性

図-2に3種類の糖を分離した際のカラムへの注入量とクロマトグラム上のピーク面積の関係を示します。TSKgel Amide-80(○)において、1種類の非還元糖(マンニトール)および2種類の還元糖(グルコース、キシロース)とも1.25から10 μ gまで直線的な関係が得られています。一方、3種類のアミノ型シリカ系充填剤ではグルコースの場合で、1.25 μ g、キシロースの場合で、10 μ g以下の範囲で直線性が見られず回収率が悪くなっていると考えられます(データはA社カラムのみ示しました)。これは、充填剤のアミノプロピル基と還元糖がグリコシルアミン結合を作るためと考えられます。TSKgel Amide-80ではアミノプロピル基の代わりにカルバモイル基を導入しているためグリコシルアミン結合の形成が起こりません。したがって、微量の還元糖でも定量的な回収が行えます。

以上の様にTSKgel Amide-80は従来のアミノ型シリカ系充填剤に比べて化学的安定性、回収率に優れており特に連続分析、微量分析に有用であることが分かります。

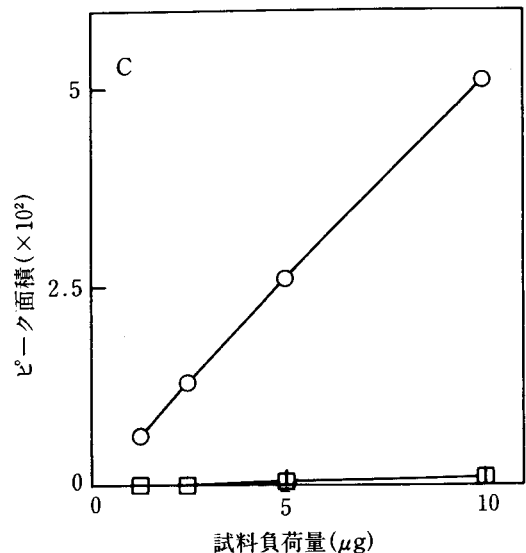
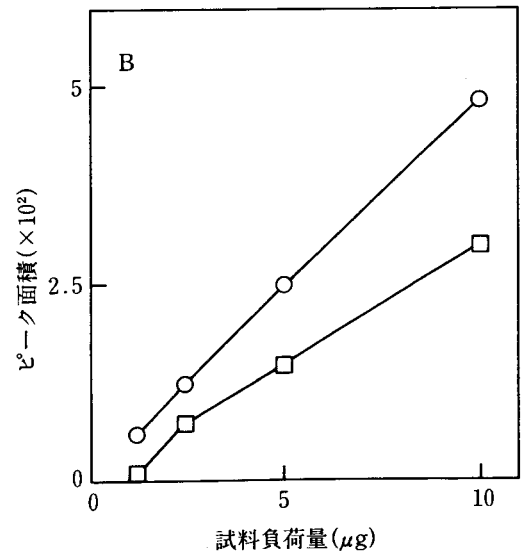
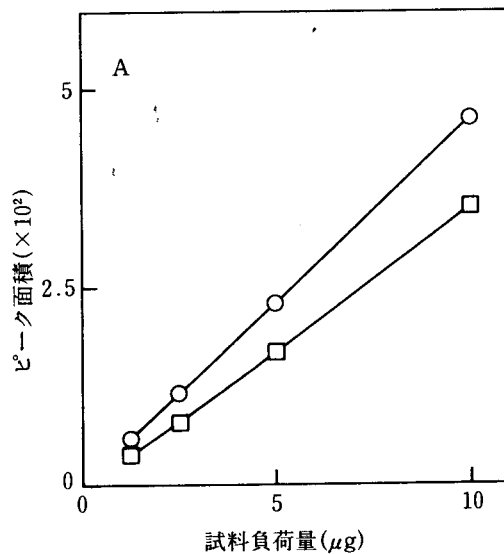


図-2 単糖類の定量回収性

カラム; ○ TSKgel Amide-80 (4.6mm I.D. \times 25cm)

□ A社アミノ型シリカ系カラム
(4.6mm I.D. \times 25cm)

溶離液; アセトニトリル/水=75/25

流速; 1.0ml/min

検出; RI

カラム温度; ○: 80°C, □: 25°C

試料; A: マンニトール、B: グルコース、

C: キシロース

3. 移動相としての有機溶媒の効果

3-1 保持力

TSKgel Amide-80において4種類の有機溶媒を移動相に用いた場合の糖アルコールの保持容量を図-3に示します。同一溶媒濃度(75%)では用いた有機溶媒のプロトン受容体溶解パラメーターが小さいほど(A<B<C<D)、糖の保持時間は長くなりました。エタノールはかなり保持力が弱く図に示したように95%にしないと単糖類の分離には使用できませんでした。これらの中ではアセトニトリル、アセトンが取扱いやすいと思われます。

3-2 選択性

表-1に、TSKgel Amide-80における移動相組成のアノマーの分離係数(α)に及ぼす影響を示します。またアセトニトリルおよびアセトンを溶離液に用いた β -シクロデキストリン加水分解物の分離を図-4に示します。またシクロデキストリン(3種)の分離を図-5に示します。図-6には、アセトン系での糖混合物の分離を示します。これら表-1、図-4、図-5より、アセトニトリルとアセトン溶媒では試料の溶出時間をほぼ同じにした場合、①アセトン系の方がアノマー分裂が大きいこと(表-1、図-4)②アセトニトリル系の方が α -、 β -シクロデキストリンの分離が良いこと(図-5)③アセトン系の方がマルトースとラクトースの分離が良いこと(図-6)等の選択性の違いが有ることが分かります。したがって、分析対象により溶媒を選択して使用されることをお勧めします。また、食品などの精製に使用する際は精製物中の残存溶媒の問題を考慮すると毒性の少ないアセトン系が好ましいと思われます。

表-1 移動相組成のアノマーの分離係数(α)に及ぼす影響

移動相	分離係数(α)			
	グルコース	キシロース	マルトース	ラクトース
アセトニトリル/水				
80/20	1.07	1.15	1.09	1.05
75/25	1.05	1.11	1.07	1.03
70/30	1.03	1.10	1.04	—
60/40	—	1.05	—	—
アセトン/水				
85/15	1.09	1.20	1.14	1.11
75/25	1.03	1.11	1.08	1.04

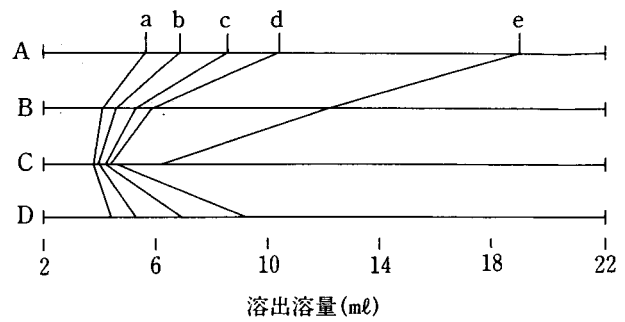


図-3 TSKgel Amide-80における溶離液組成とポリオール(糖アルコール)の保持容量の変化

カラム; TSKgel Amide-80(4.6mmI.D.×25cm)

溶離液; A: アセトニトリル/水=75/25

B: アセトン/水=75/25

C: 1,4-ジオキサン/水=75/25

D: エタノール/水=95/5

流速; 0.3ml/min

温度; 25°C

検出; RI

試料; a. グリセリン、b. エリスリトール、c. キシリトール、d. マンニトール、e. イノシトール

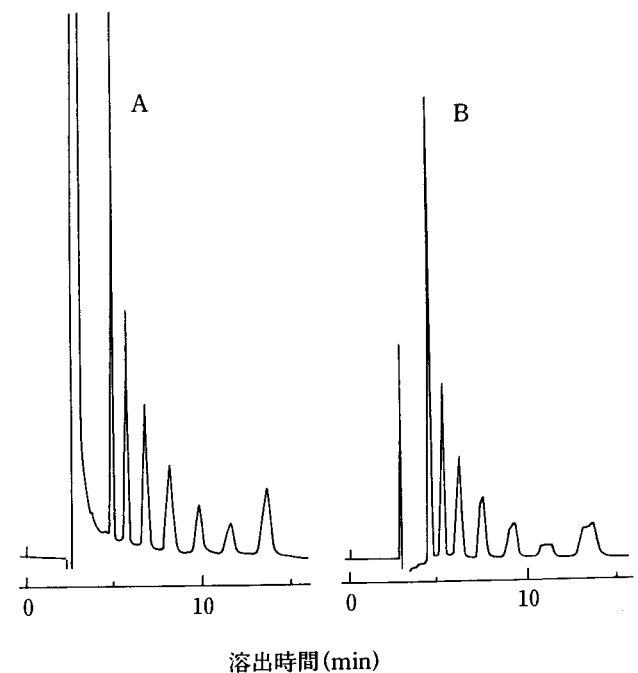


図-4 β -シクロデキストリンの加水分解物の分離

カラム; TSKgel Amide-80(4.6mmI.D.×25cm)

溶離液; A: アセトニトリル/水=60/40

B: アセトン/水=65/35

流速; 1.0ml/min

温度; 25°C

検出; RI

試料; β -シクロデキストリン加水分解物

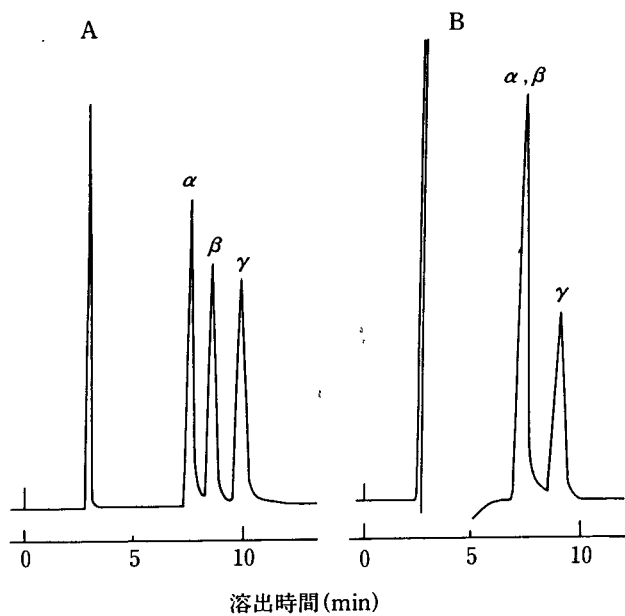


図-5 α 、 β 、 γ -シクロデキストリンの分離

カラム；TSKgel Amide-80(4.6mmI.D.×25cm)

溶離液；A：アセトニトリル/水=60/40

B：アセトン/水=65/35

流速；1.0ml/min

温度；25°C

検出；RI

試料； α 、 β 、 γ -シクロデキストリン

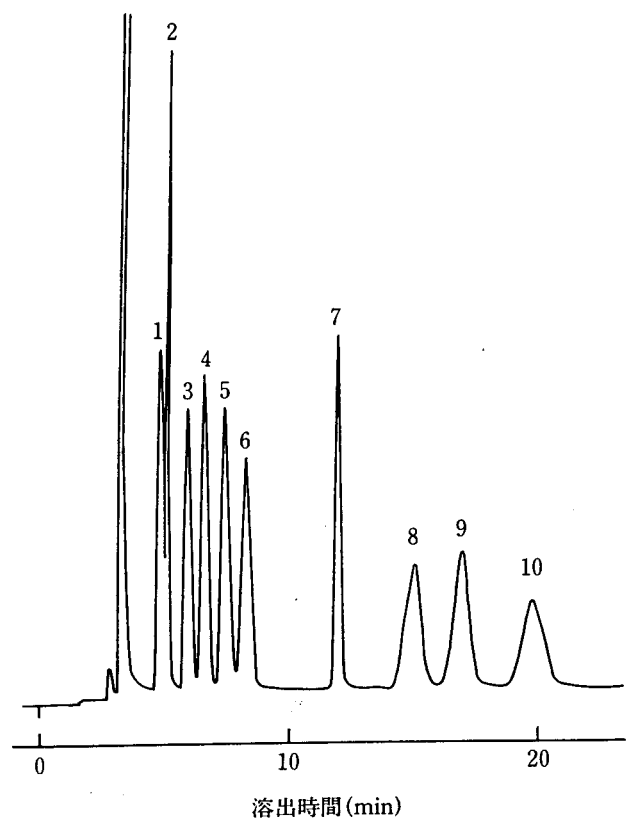


図-6 糖混合物の分離

カラム；TSKgel Amide-80(4.6mmI.D.×25cm)

溶離液；アセトン/水=82/18

流速；1.0ml/min

温度；80°C

検出；RI

試料；単糖類 10mmol/l、二糖類 5mmol/l、20 μ l

- | | |
|------------|-------------|
| 1. ラムノース | 2. リボース |
| 3. キシロース | 4. フルクトース |
| 5. マンノース | 6. グルコース |
| 7. シュークロース | 8. マルトース |
| 9. ラクトース | 10. イソマルトース |

4. 移動相へのアミンの添加

4-1 理論段高さ(HETP)への影響

アセトニトリル/蒸留水の移動相では最少のHETPを得るには、非還元糖で0.5~1.5ml/minの流速範囲、還元糖では80°Cにおいて0.25ml/min以下の流速範囲であることをセパレーションレポートNo.55で述べました。還元糖の最小HETPが得られる流速が非還元糖に比べてかなり低いのは、アノマー変換速度がカラムへの分配速度より遅い為と考えられます。

表-2にアセトニトリル/蒸留水=75/25の移動相に、5種類の20mM有機アミンを加えた時のTSKgel Amide-80における4種類の糖のHETPをまとめました。HETPを改善する効果および市販試薬の純度を考慮するとトリエチルアミン、ジエチルアミノエタノールが実用的と思われる。

図-7にトリエチルアミン添加濃度におけるHETPの影響を示します。図に示したようにトリエチルアミンの添加濃度が上昇するにつれて糖のHETPが減少していくのが分かります。この減少は、添加した有機アミンが還元糖のアノマー転換速度を早める為と考えられます。

図-8に100mMトリエチルアミンを含んだ移動相での10種類の糖の分離例を示します。25°Cでの分析にもかかわらず還元糖のアノマー分離が観測されませんでした。したがってアミンを添加した移動相を用いれば、測定温度を80°Cにすることなく、室温で還元糖の分離が行えます。

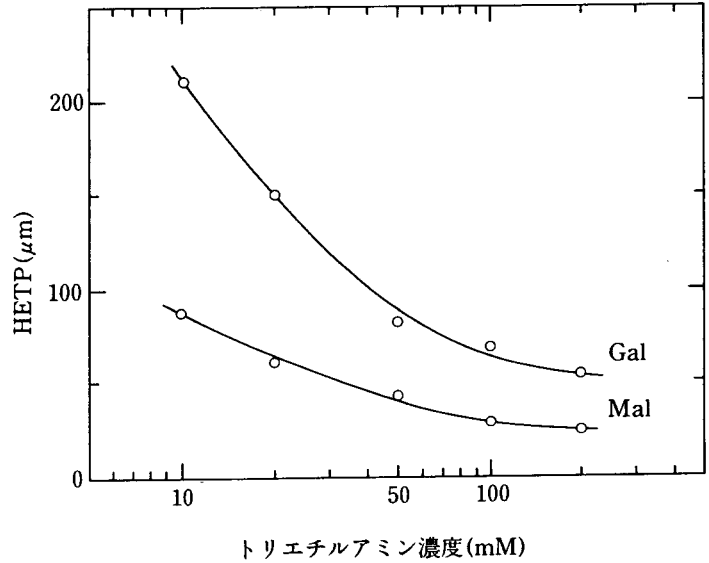


図-7 移動相へのトリエチルアミン添加量のHETPへの効果

表-2 TSKgel Amide-80を用いた糖の分離におけるアミンの添加効果

アミン(20mM)	25°Cでの糖のHETP(μm)			
	グルコース	ガラクトース	マルトース	ラクトース
トリス*	88	532	142	n.d.**
エタノールアミン	n.d.**	n.d.**	42	27
トリエチルアミン	n.d.**	150	59	28
トリブチルアミン	69	252	103	39
ジエチルアミノエタノール	51	283	72	41

*: トリスヒドロキシメチルアミノメタン

** : 肩のあるピークのため計算不可能

5. 高感度分析

5-1 プレラベル高感度分析

高感度分析の利点は微量の成分を分析できることです。特にピリジルアミノ化法では、次の様な利点があります。

- ①高感度である。
- ②ピリジルアミノ化誘導体が化学反応に比較的安定である為、様々な処理が可能となる。
- ③逆相クロマトグラフィーにおける分離が可能になる。

実際に糖をピリジルアミノ化して分離した例の一つを示します。図-9はデキストラン加水分解物を2-アミノピリジンでピリジルアミノ化後分析した例です。糖加水分解物は5量体から25量体まで分子量にしたがいほぼ完全に分離され、またピリジルアミノ誘導体化糖は1 pmol以下でも高感度で蛍光検出できるので、高感度分析により糖分析の適用範囲が広がることが考えられます。

次に糖タンパク質の糖鎖構造研究への応用例を示します。二次元マッピング(糖鎖マッピング)⁽⁹⁻¹⁵⁾と呼ばれるこの応用例は、未知オリゴ糖の糖鎖構造の推定に役立ちます。

その手法は、まず図-9のように、ピリジルアミノ(PA)化デキストラン加水分解物(標準サンプル)を逆相クロマトグラフィーおよび順相クロマトグラフィーにより分離します。次に既知オリゴ糖をPA化し、両クロマトグラフィーで分離し、その溶出位置から標準サンプルの溶出位置と比較し、グルコースオリゴマー単位を推定します。推定したグルコースオリゴマー単位(溶出位置)を二次元座標軸上にプロットすることでその試料特有の座標点を求めることができます。そして、未知試料をPA化して両クロマトグラフィーを行い、同様に座標点を求め、既知のオリゴ糖の座標点を比較することによって、未知試料の構造を推定することができます。

このように二次元マッピングは、PA-オリゴ糖を用いて、糖鎖の大きさと構造を高感度に分析できる手法であり、生体中の微量糖鎖の構造解析に有用であると考えられています。またHPLCでの分離後、引き続いてNMR等の解析で、糖鎖の正確な構造の決定を行なうこともできます。

図-10にPA-オリゴ糖の逆相および順相クロマトグラフィーによる分離例を示します。また6種類のPA-オリゴ糖について、その溶出位置から推定されるグルコースオリゴマー単位を表-3に示します。

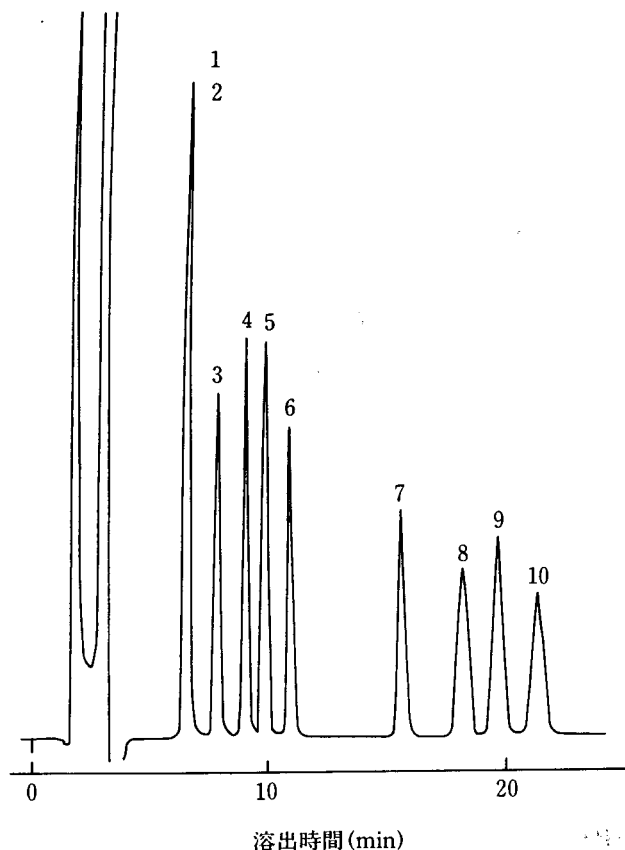


図-8 糖混合物の分離

溶離液組成；100mM トリエチルアミン含有アセトニト

リル/水(75/25)

カラム温度；25°C

その他の条件；図-6と同じ

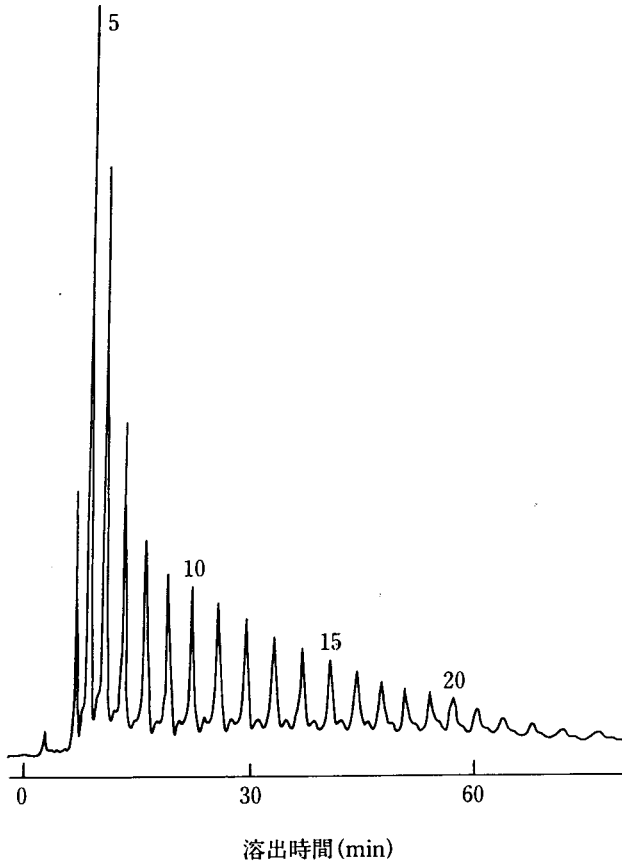
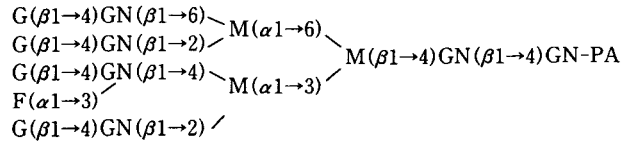


図-9 デキストラン加水分解物のピリジルアミノ化誘導体の分離

カラム ; TSKgel Amide-80 (4.6mmI.D.×25cm)
 溶離液 ; A : 3%酢酸-トリエチルアミン (pH7.3) /
 アセトニトリル=35/65
 B : 3%酢酸-トリエチルアミン (pH7.3) /
 アセトニトリル=50/50
 A→B(50分リニアグラジエント)

流速 ; 1.0ml/min

温度 ; 40°C

検出 ; FS (Ex.320nm, Em.400nm)

試料 ; デキストラン加水分解物のピリジルアミノ化誘導体 0.5g / 1.1μl

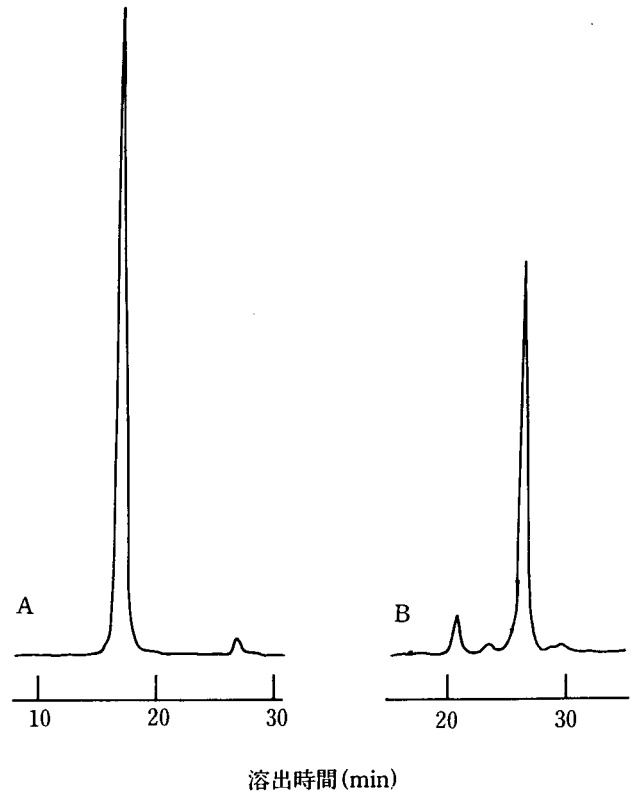


図-10 TSKgel ODS-80T_MとTSKgel Amide-80によるオリゴ糖のピリジルアミノ化誘導体の分析

カラム ; A : TSKgel ODS-80T_M (4.6mmI.D.×15cm)
 B. TSKgel Amide-80 (4.6mmI.D.×25cm)
 溶離液 ; A : a : 10mMリン酸緩衝液 (pH3.8)
 b : a+0.5% n-ブタノール
 a/b (80/20) → (40/60) リニアグラジエント (80分)

B : 条件は図-9 に同じ

流速 ; 1.0ml/min

温度 ; A : 55°C、B : 40°C

検出 ; FS (Ex.320nm, Em.400nm)

試料 ; PA-オリゴ糖

表-3 TSKgel Amide-80およびTSKgel ODS-80T_Mでのピリジルアミノ化オリゴ糖の保持時間

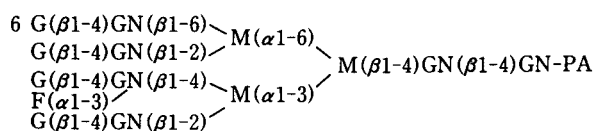
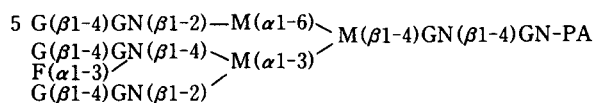
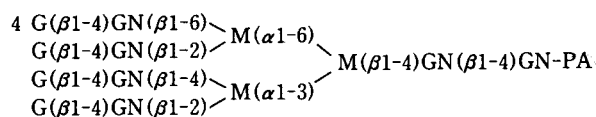
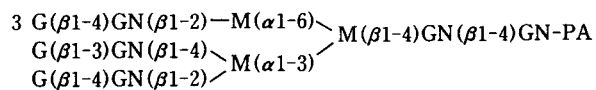
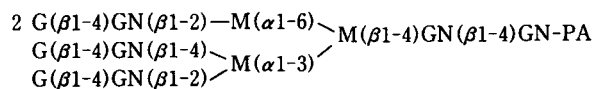
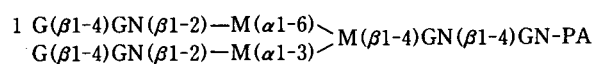
糖鎖	TSKgel Amide-80			TSKgel ODS-80T _M	
	保持時間 (ml) ¹⁾	換算グルコース単位 測定値 ²⁾ 文献値 ³⁾		保持時間 (ml) ¹⁾	換算グルコース単位 測定値 ²⁾
1	13.7	6.9	7.0	15.3	9.6
2	17.9	8.3	8.3	25.8	12.3
3	17.5	8.2	8.2	26.7	12.6
4	23.5	9.9	9.9	17.7	10.3
5	20.6	9.1	9.0	24.4	11.9
6	26.2	10.6	10.5	16.9	10.1

1) : Elution volume

2) : glucose unit calculated

3) : glucose unit referred from the literature⁹⁾

PA-オリゴ糖鎖の構造



6. おわりに

TSKgel Amide-80は、従来のアミノ型シリカカラムの欠点を克服した順相クロマトグラフィー用充填剤です。TSKgel Amide-80は、単糖、二糖類のみならず、オリゴ糖の分離に優れた分離を示します。

尚、TSK-GELには、糖分析用充填剤、充填カラムとしてTSKgel SugarAXシリーズ(ホウ酸錯体アニオン交換法)、TSKgel SCX (H⁺型)(イオン排除法)、TSKgel PW、PW_{XL}シリーズ(ゲル濾過法)、TSKgel NH₂-60(アミノ型-順相分配法)が揃っていますので、併せてご利用下さい。

文献

- 1) S. C. Churms, *J. Chromatogr.*, 500, 555(1990)
- 2) S. Honda, *Anal. Biochem.*, 140, 1(1984)
- 3) S. Hase, S. Koyama, H. Daiyasu, H. Takemoto, S. Hara, Y. Kobayashi, Y. Kyogoku and T. Ikenaka, *J. Biochem. (Tokyo)*, 100, 1(1986)
- 4) M. T. Yang, L. P. Milligan and G. W. Mathison, *J. Chromatogr.*, 209, 316(1981)
- 5) R. E. A. Escott and A. F. Tayler, *J. HRC & CC.*, 8, 290(1985)
- 6) 栗原幸忠、佐藤孝、海野益郎、東洋曹達研究報告、24(2), 35(1980)
- 7) Y. Nomura, *Agric. Biol. Chem.*, 53, 3313(1989)
- 8) Y. Fujii et al., *J. Chromatogr.*, 508, 241(1990)
- 9) N. Tomiya et al., *Anal. Biochem.*, 171, 73(1988)
- 10) H. Oku et al., *Anal. Biochem.*, 185, 331(1990)
- 11) H. Higashi et al., *Anal. Biochem.*, 186, 355(1990)
- 12) R. Jefferis et al., *Biochem. J.*, 268, 529(1990)
- 13) M. Hayashi et al., *Eur. J. Biochem.*, 191, 287(1990)
- 14) N. Takahashi et al., *J. Biol. Chem.*, 265, 7793(1990)
- 15) N. Tomiya et al., *Anal. Biochem.*, 193, 90(1991)