



TOSOH

# SEPARATION REPORT

## 高速順相分配クロマトグラフィ用充填剤 TSKgel Amide-80を用いた糖類の分離 (1)

### —— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. 糖類の溶出挙動	2
3. 分離条件の選択	6
4. 分離例	7
5. 測定上の留意点	8
6. おわりに	9

## 1. はじめに

糖類は、極めて基本的な物質です。糖類は、単にそれのみの単独で存在するだけでなくタンパク質や脂質と複合体を形成して様々な生理活性を発現します。これら糖類や複合糖質中の糖鎖の分析は、食品分野のみならず医学、医療分野でも重要視されています。

糖類の分析は、今迄に様々な手法で行なわれてきました。高速液体クロマトグラフィ法による糖類の分析法も種々の分離モードによる方法があります。糖類には、その重合度、縮合度の違いにより単糖類、二糖類、オリゴ糖及び多糖類等に大別することができます。

単糖類及び二糖類を分離する手法として、一つには、これらの糖類が、ホウ酸存在下でアニオン性の糖-ホウ酸錯体を形成する性質を利用するアニオン交換クロマトグラフィによる方法<sup>1)</sup>、第二として、順相分配クロマトグラフィによる方法<sup>2)-6)</sup>、第三として、配位子交換クロマトグラフィ<sup>7)</sup>、第四として、強アルカリ性下でのアニオン交換クロマトグラフィ<sup>8)</sup>等の方法が使用されています。

オリゴ糖を分離する手法として、ゲル濾過クロマトグラフィ<sup>9)</sup>、順相分配クロマトグラフィ<sup>2),5),6),10)</sup>、逆相分配クロマトグラフィ<sup>11),12)</sup>が一般的に用いられています。又、多糖類を分離する手法は、殆んどの場合、ゲル濾過クロマトグラフィです。

試料を分離する時には、これらの各種分離モードの特性を理解し、目的の試料に最も適した分離モードを選択することが重要です。

この中の順相分配クロマトグラフィによる分離法では、適切な条件下において、糖類等の多価アルコール類を選択的に保持し、その他、極性の低い物質や一価のアルコールは、余り保持されずにV<sub>0</sub>付近に溶出します。又、この場合、糖同士の分離能も比較的良好で分析時間も割合短いために示差屈折計と組合せたシステムは、早い時期から行われています。しかしながら、この方法に、使用されてきた充填剤は、殆んどの場合、イオン交換樹脂<sup>2),10)</sup>やアミノアルキル基を化学結合したシリカゲル<sup>3),4),6)</sup>でした。これらの充填剤は、物理的、化学的安定性において必ずしも満足できるものではありませんでした。TSK-gel Amide-80は、シリカゲルに非イオン性のカルバモイル基を含む有機固定相を化学結合した充填剤です。アミノアルキル基化学結合型充填剤に比べ、固定相が非イオン性のため化学的安定性に非常に優れています。固定相のNH結合部は、水酸基やカルボニル基の酸素原子と水素結合する性質があり、水溶性有機溶媒と水との混合溶液中では、水を強く保持し、極性分配相を形成しているために、順相分配モードでの分離が可能になります。糖類やその他のポリオール類を良く保持し、非イオン性ジオール結合シリカゲルよりも、より実用的な溶離条件下で使用できます。

このレポートでは、TSKgel Amide-80の基本的な性質及び中性単糖類、糖アルコール、それにオリゴ糖の分離に使用した若干の応用例について紹介します。

## 2. 糖類の溶出挙動

### 2-1 分離機構及び温度の影響

TSKgel Amide-80は、アセトニトリル/水等含水有機溶媒系移動相中で糖類やポリオール等の極性化合物を保持します。分離例として、図-1に糖アルコール類のクロマトグラムを示します。基本的には、水酸基の数が多い物質程、良く保持されます。又、同じく6個の水酸基を持っているマンニトールとイノシトールの保持力を比較してみると環状で移動相（アセトニトリル/水系）への溶解度のより低いイノシトールの方がより強く保持されているのが分ります。この保持力の強さは、移動相の極性に大きく影響を受け、図-2に示すように移動相の含水率が低下するのに伴って保持力は逆に強くなる傾向を示します。これらの傾向は、糖アルコールに限らず、

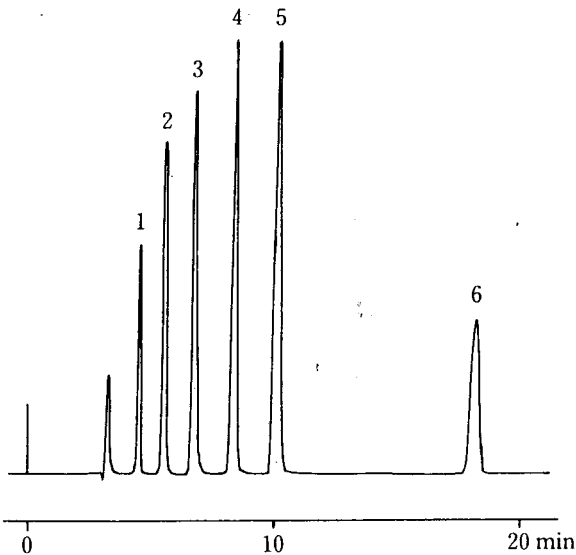


図-1 ポリオール類の分離

カラム；TSKgel Amide-80

4.6mm ID×25cm

溶離液；アセトニトリル/水=75/25

流速；1.0ml/min

温度；25°C

検出；RI

1. エチレングリコール
2. グリセリン
3. エリスリトール
4. キシリトール
5. マンニトール
6. イノシトール

単糖類、二糖類、オリゴ糖にも共通した現象です。単糖類に注目してみると、ペントース、ヘキソースの順に溶出する傾向にあり、同様なヘキソースの中でもそれぞれの分子構造の違いにより、選択性が僅かずつ異ってくるために、各々を分離することができる訳です。

オリゴ糖分析においては、単糖類を分離する際の移動相では、保持力が強すぎるので含水率を20~30%増加する必要があります。更に、還元糖の場合を考えると、その分子構造は常に単一のものでは無く、 $\alpha$ 、 $\beta$ 型構造、ピラノース、フラノース構造等をとっていることは良く知られていることですが、一般に溶液状態では、その状態での平衡状態になるまで変換を繰り返しています。このことを変旋光といいます。

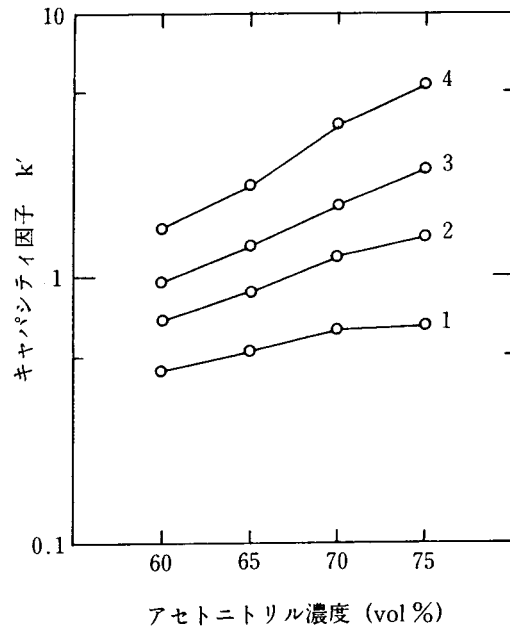


図-2 ポリオール類の保持力への溶離液中のアセトニトリル濃度の影響

カラム；TSKgel Amide-80

4.6mm ID×25cm

溶離液；アセトニトリル/水

流速；1.0ml/min

温度；25°C

検出；RI

1. エチレングリコール
2. キシリトール
3. マンニトール
4. イノシトール

例えば、ある一つの糖分子に着目した場合、常に一定の確立で分子構造が変換していることとなります。その変換速度は、中性で室温付近では一般に遅く、このような条件下では、種類の糖でも、二つ以上のピークとして分離検出されます。図-3にTSKgel Amide-80により、D-グルコースを分離した時のクロマトグラムへの温度の影響を示します。60°C以下では、分子構造の相違により、二本以上のピークに分かれていることが分かります。

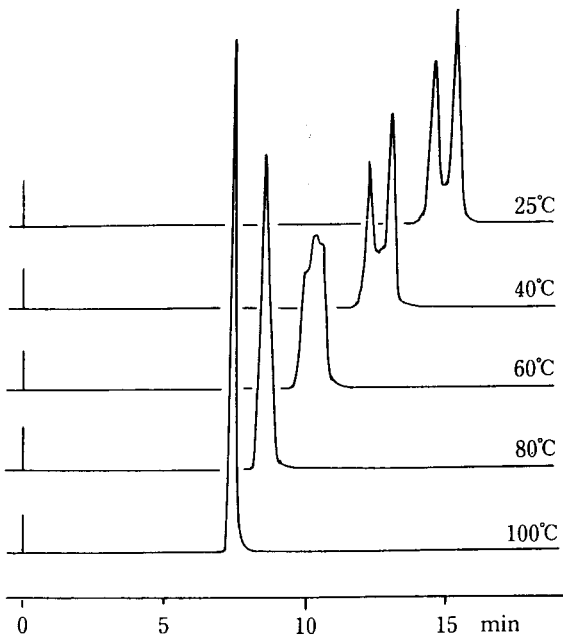


図-3 D-グルコースのクロマトグラムへのカラム温度の影響

カラム；TSKgel Amide-80

4.6mm ID×25cm

溶離液；アセトニトリル/水=80/20

流速；1.0ml/min

検出；RI

D-グルコースの場合では、カラム温度を70°Cにすれば、図-3に示す条件下では、単一ピークとして検出されます。単一ピークとなる温度は、還元糖の種類により異なりますが、80°C以上であれば何れの糖も単一ピークとして検出できます。

図-4に、分離への温度の影響について示しています。温度以外の溶離条件が一定の時、一般には、温度を上昇させると溶出は早くなります。

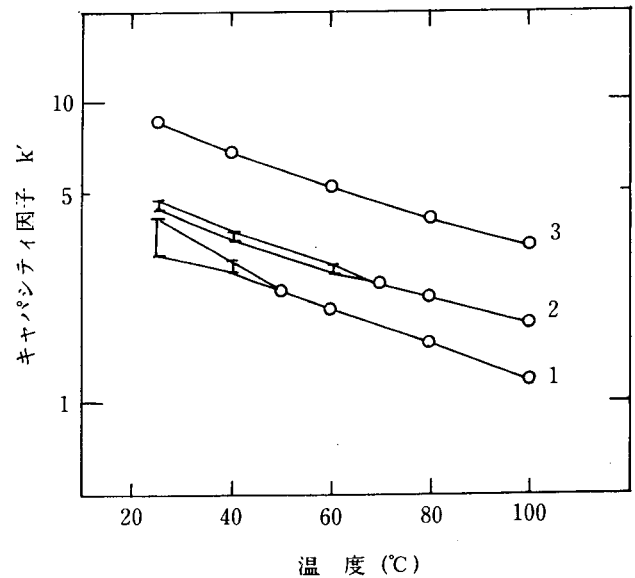


図-4 保持力へのカラム温度の影響

カラム；TSKgel Amide-80

4.6mm ID×25cm

溶離液；アセトニトリル/水=80/20

流速；1.0ml/min

検出；RI

1. フルクトース

2. グルコース

3. シュクロース

## 2-2 理論段高さ (HETP)

理論段高さ (HETP) の流速依存性を図-5 に示します。室温 (25°C) でマンニトールを試料とした場合は、0.15ml/min~0.3ml/minの間で理論段高さが最小となり、その時の理論段数としては、約80,000TP/mとなります。しかし、実用的な流速としては、0.5~1.0ml/minが適当と思われます。

又、図-6 に示すように、カラム温度が80°Cの時マンニトールやシュクロースのような非還元糖では0.5~1.5

ml/minで最小の理論段高さを示しますが、D-グルコースのような還元糖では、測定流速範囲では0.25ml/minで最小の理論段高さを示し、最高値は、それ以下と推測されます。この現象は、試料のカラムへの分配平衡化速度に比べ糖の構造変換速度が遅いため、ピークが広がっているものと推定されます。しかし、このTSKgel Amide-80は、シリカゲルを基材とする充填剤のため含水溶媒系で、これ以上の高温で使用することはカラムの寿命の点で好ましくないとされます。

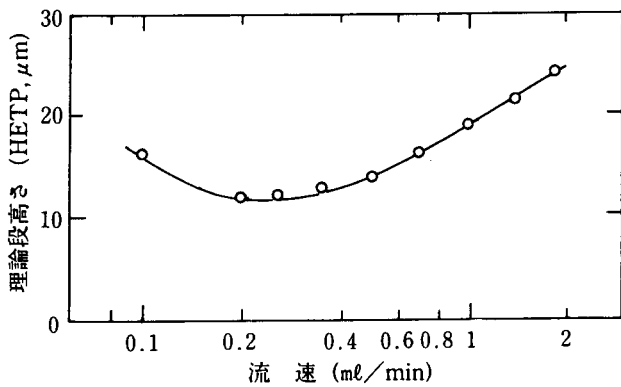


図-5 理論段高さへの流速の影響1 (室温)

カラム; TSKgel Amide-80

4.6mm ID×25cm

溶離液; アセトニトリル/水=75/25

温度; 25°C

検出; RI

試料; マンニトール

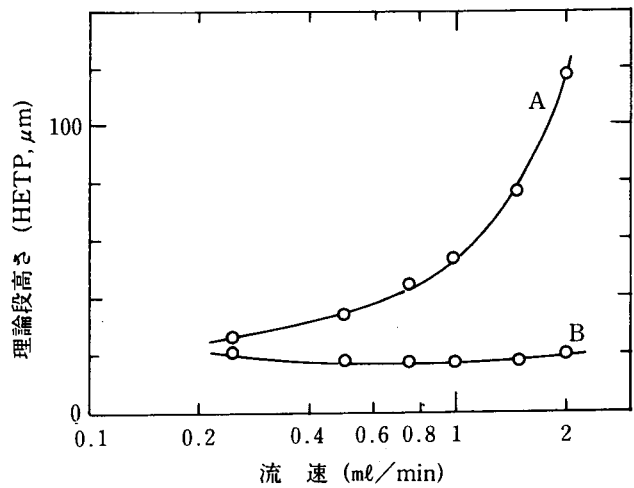


図-6 理論高さへの流速の影響2 (80°C)

カラム; TSKgel Amide-80

4.6mm ID×25cm

溶離液; アセトニトリル/水=80/20

温度; 80°C

検出; RI

試料; A: グルコース

B: マンニトール

### 2-3 試料負荷量

図-7に、移動相の組成を変えて試料負荷量について測定した結果を示しました。この結果より、最大試料負荷量\*は、移動相の組成に依存することが示されています。即ち、移動相の極性の増加に伴い、試料負荷量も増加します。例えば、単糖類や二糖類の分析条件下では、一成分当り20 $\mu$ g以下、オリゴ糖の条件下では、一成分当り200 $\mu$ g以下が一回の適正注入量です。これは、ODSカラムを用いた逆相分配クロマトグラフィと全く逆の傾向を示します。又、一回の注入容積は、50 $\mu$ l以下が適切と思われる。

#### \*最大試料負荷量

一回の試料注入によって、各成分の拡がりを最小限のまま負荷できる、最大試料量と定義します。

もちろん、最大試料負荷量以上の試料を一度に注入してもカラムを劣化させることはありませんが、当然のことながら各成分間の分離能は適正な時に比べ、低くなると思われます。

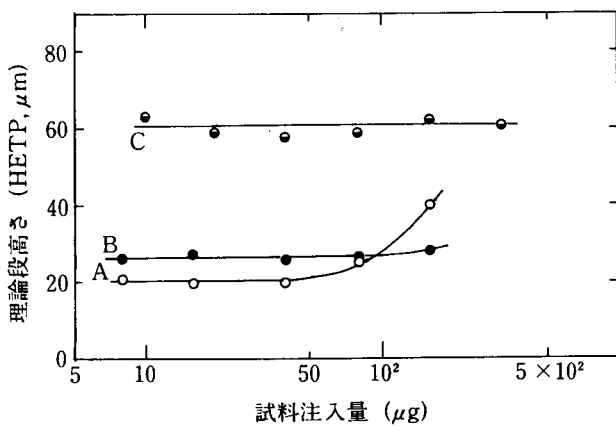


図-7 試料負荷量

カラム；TSKgel Amide-80

4.6mm ID×25cm

溶離液；A：アセトニトリル／水=75／25

B：アセトニトリル／水=65／35

C：アセトニトリル／水=55／45

流速；1.0ml/min

温度；25°C

検出；RI

試料；A, B：○, ● マンニトール

C：● マルトペンタオース

### 2-4 定量性

アミノアルキル型充填剤の場合、還元糖と固定相とが反応し、シッフ塩基を形成することが知られています。溶出中に還元糖の一部が失われて、回収率が低下したり、ピークが大きくテーリングしたりすることが良く起こります。

一方、TSKgel Amide-80は、このような反応が起こらないために、微量試料でも非常に良い定量性を示します。図-8に、注入量と示差屈折計によるピーク面積の関係を示しましたが、非常に良好な直線性を示しています。

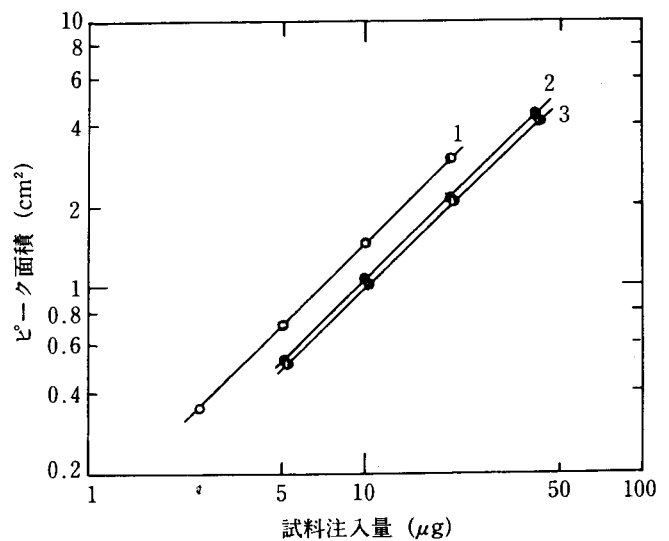


図-8 試料注入量とピーク面積の関係

カラム；TSKgel Amide-80

4.6mm ID×25cm

溶離液；アセトニトリル／水=80／20

流速；1.0ml/min

温度；80°C

検出；RI

1. —○— エリスリトール

2. —●— グルコース

3. —●— キシロース

### 3. 分離条件の選択

前項で述べたように、良好な分離能を再現性良く得るためには、各種の条件に適切に選択する必要があります。以下に選択する項目及び選択法の目安を紹介します。

#### 3-1 溶出容量及び溶出順序に影響する因子

##### (1) 移動相中の有機溶媒と水の比率

基本的な考え方は、2-1項に示しています。図-2及び分離例として図-9、図-10を参照してください。

##### (2) 移動相中の有機溶媒の種類

一般には、アセトニトリル、アセトンが有効です。オリゴ糖等の分離には、低級アルコール類も適用できま

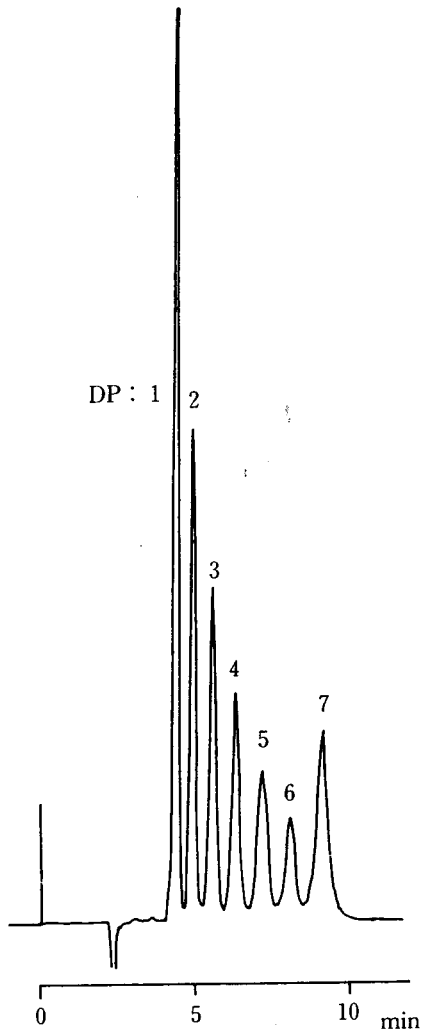


図-9  $\beta$ -シクロデキストリン 酸加水分解物の分離

カラム；TSKgel Amide-80

4.6mm ID×25cm

溶離液；アセトニトリル/水=55/45

流速；1.0ml/min

温度；25℃

検出；RI

す。

##### (3) 移動相のpHや塩濃度

塩基性試料の溶出には、pH3.0位に下げるか、10~20mM程度の塩の添加が必要です。

##### (4) カラム温度

2-1項に、基本的な考え方を示しました。図-3、図-4にクロマトグラム及びキャパシティ因子への影響について調べた結果を示しています。

#### 3-2 ピークの拡がりに影響する因子

##### (1) 移動相の流速

2-2項に、流速の影響については、理論段高さに関して既に述べています。図-5、図-6をご参照ください。

##### (2) カラム温度

2-1項、2-2項に温度が、クロマトグラム、理論段高さに与える影響について述べています。図-3、図-5、図-6をご参照ください。

##### (3) 充填剤の粒子径

TSKgel Amide-80は、5 $\mu$ m粒子を使用しているため、高いカラム効率が得られます。

##### (4) 試料溶液の組成

5-1項で、後述します。

##### (5) 試料負荷量及び注入容積

2-3項に示しました。図-7をご参照ください。

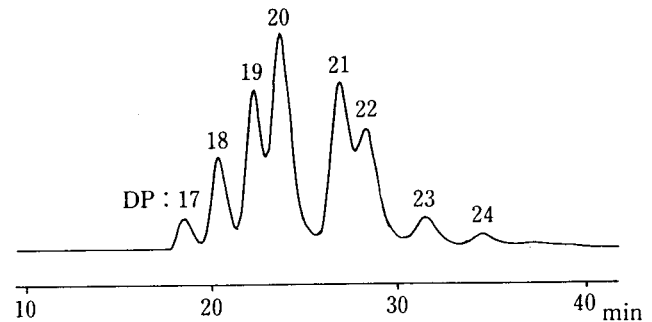


図-10 シクロソホランの分離

カラム；TSKgel Amide-80

4.6mm ID×25cm

溶離液；アセトニトリル/水=57/43

流速；1.0ml/min

温度；室温

検出；RI

(このクロマトグラムは、三重大学農学部久松先生のご厚意により掲載します)

## 4. 分離列

### 4-1 オリゴ糖( $\beta$ -シクロデキストリン 酸加水分解物)の分離

図-9に示す通り、10分間以内でグルコースから7量体(開環 $\beta$ -シクロデキストリン)までがほぼ完全に分離されています。尚、未分解の $\beta$ -シクロデキストリンそのものが存在する場合、この条件下では、4量体の位置に溶出します。

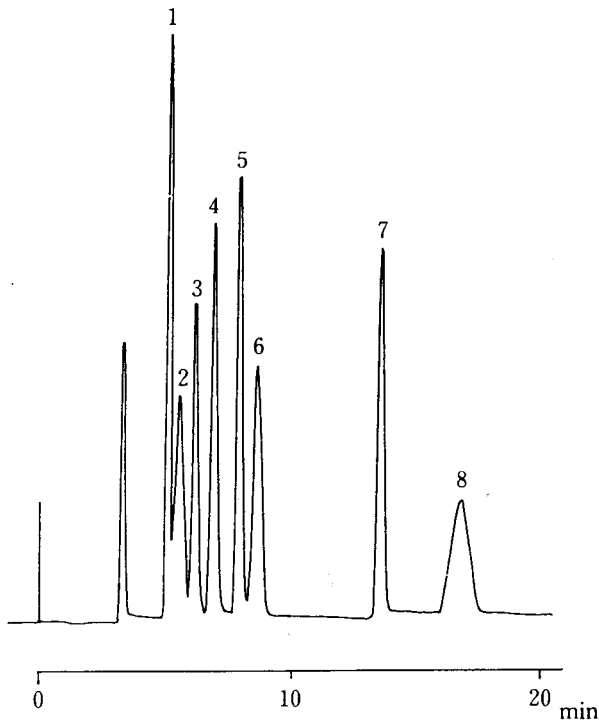


図-11 単糖類及び二糖類の分離

カラム; TSKgel Amide-80

4.6mm ID×25cm

溶離液; アセトニトリル/水=80/20

流速; 1.0ml/min

温度; 80°C

検出; RI

1. ラムノース
2. フコース
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. シュクロース
8. マルトース

### 4-2 オリゴ糖(シクロソホラン:環状 $\beta$ -1,2-グルカン)の分離

図-10に示す通り、重合度17より24までが分離されています。

### 4-3 単糖類及び二糖類混合物の分離

図-11にクロマトグラムを示しました。還元糖を含む糖類の分離は、このクロマトグラムの条件のように、カラム温度80°Cで行うことをお奨めします。

### 4-4 配糖体(粗ステビオサイド)の分離

図-12にクロマトグラムを示しました。このようにTSKgel Amide-80を用いると、逆相分配クロマトグラフィでは測定し難い極性不純物の測定が、容易に行えることと思います。

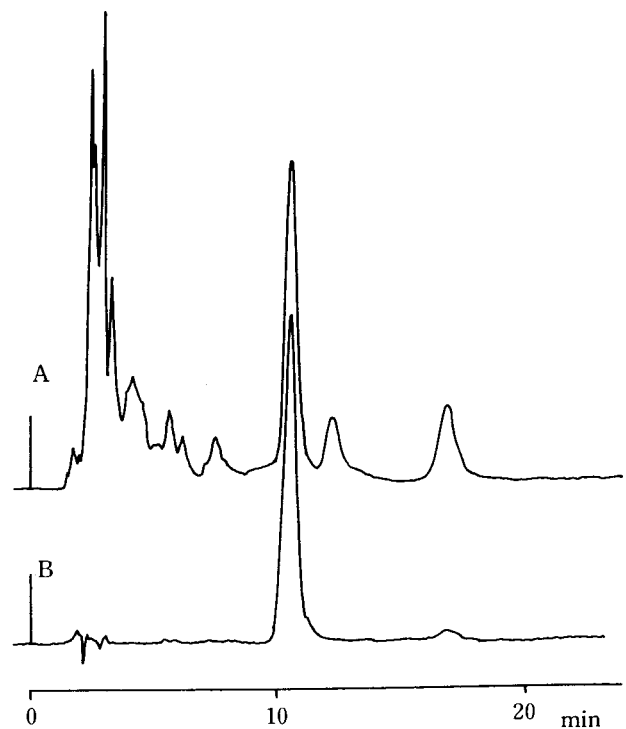


図-12 粗及び精製ステビオサイドのクロマトグラム

カラム; TSKgel Amide-80

4.6mm ID×25cm

溶離液; アセトニトリル/水=80/20

流速; 1.0ml/min

温度; 25°C

検出; UV (210nm)



## 5. 測定上の留意点

### 5-1 サンプル溶媒

順相分配クロマトグラフィの場合、一般にサンプル溶媒の極性が、ピークの拡がりに大きな影響を及ぼします。一つの実験結果を表-1に示します。

これより、サンプル溶媒の極性が移動相より高い（即ち、溶出力が大きい）場合、ピークの拡がりを大きくします。従って、乾燥サンプルならば、サンプルを移動相に溶解して、又、水溶液サンプルならば、そのサンプルを移動相に用いている有機溶媒で移動相組成近くまで希釈して、注入することが好ましく思われます。サンプル溶媒と移動相との組成が異なる場合は、当然のことながら、その注入容積量に応じて、その影響は大きくなることも推測されます。

### 5-2 溶離液組成と圧力損失

TSKgel Amide-80カラムの充填剤の性質上、一定流速下でかかる圧力損失は、移動相の粘度及び組成（極性）に依存します。即ち移動相中の含水率の増加に伴って急

速に圧力が高くなりますのでご注意ください。通常、アセトニトリル/水系であれば、水を60%以上にしない方が良く、水含有率の高い条件では流速を低くして使用して下さい。

### 5-3 カラム恒温槽と注入バルブ

TSKgel Amide-80を用いて還元糖を分析する場合、カラム恒温槽を80℃前後に保って使用しますが、サンプル溶媒は、一般に沸点が100℃以下の有機溶媒を主成分とする場合が多いと思います。この時、注入バルブが恒温槽内蔵型のものを用いれば、溶媒の膨張や蒸発によって定量性が悪くなりがちです。注入バルブは室温の所に固定して、バルブとカラム間は内径0.2mmのステンレスチューブで接続して使用することをお奨めします。

### 5-4 吸着現象と洗浄法の例

#### (1)極性物質（中性多糖等）の除去

TSKgel Amide-80の場合、電荷のない疎水性物質が吸着することは殆んどありません。吸着し易い物質は多糖

表-1 サンプル溶媒組成の影響

サンプル溶媒 アセトニトリル/水(v/v)	マンニトール		シュクロース	
	溶出容量(ml)	理論段数(TP/カラム)	溶出容量(ml)	理論段数(TP/カラム)
75/25	10.34	14,807	15.00	13,850
60/40	10.32	12,190	14.96	11,738
45/55	10.25	5,510	14.89	5,331
0/100	10.22*	—	14.86*	—

\*ショルダのあるピークでした。最もピークの高い点を溶出容量としています。

#### 測定条件

カラム；TSKgel Amide-80 4.6mm ID×25cm

溶離液；アセトニトリル/水=75/25(v/v)

流速；1.0ml/min

検出；RI

温度；25℃

試料；マンニトール、シュクロース各々2.0mg/ml、20μl

類などです。これを除去するには、例えば、アセトニトリル/水 (45/55, v/v) 系で流速0.5ml/minで3時間程度流せば通常は十分です。又、一般に測定用移動相より5%ほど含水率の高い溶媒で測定前にカラムを洗浄しておくことにより、ベースラインの安定化が速やかに行えます。

#### (2)イオン性吸着物質(カチオン性物質)の除去

TSKgel Amide-80は、シリカゲルを基材としているため、充填剤表面には微量のシラノール基が残存し、中性下では、マイナスに荷電しているためカチオン性物質と結合します。カチオン性物質を溶出させるためには、移動相に微量の塩を加えることにより除去することができます。例えば、アセトニトリル/50mMリン酸緩衝液 pH6.0 (50/50) を洗浄液として流速0.5ml/minで3時間程度流せば、通常の場合除去できます。

## 6. おわりに

TSKgel Amide-80は、高速液体クロマトグラフィ法により、糖に代表されるポリオール類を迅速且つ簡便に分析するために開発された高速順相分配クロマトグラフィ用充填剤です。従来の順相分配クロマトグラフィ用充填剤の弱点を克服し、高い精度と良好な再現性が得られるようになりましたので、充填剤の特徴、使用法を十分ご理解の上、ご使用いただければ必ずお役に立てるものと確信しています。

尚、TSK-GELには、糖類分析用充填剤、充填カラムとしてTSKgel Sugar AXシリーズ(アニオン交換法—糖・ホウ酸錯体形成利用)、TSKgel SCX (H<sup>+</sup>型)、水溶媒系ゲル透過クロマトグラフィ用充填カラムTSK-GEL PWタイプ(含PW<sub>xL</sub>シリーズ、オリゴ糖・多糖類分離用)、順相分配クロマトグラフィ用アミノプロピル化学結合型シリカゲルTSKgel NH<sub>2</sub>-60等が、揃っていますので、併せてご利用ください。

## 文 献

- 1) R. B. Kesler, *Anal. Chem.*, **39**, 1416(1976)
- 2) E. Martinsson and O. Samuelson, *J. Chromatogr.*, **50**, 429(1970)
- 3) M. T. Yang, L. P. Milligan and G. W. Mathison, *ibid*, **209**, 316(1981)
- 4) R. E. A. Escott and A. F. Tayler, *J. HRC&CC*, **8**, 290(1985)
- 5) M. Abbou and A. M. Siouffi, *J. Liquid Chromatogr.*, **10**(1), 95(1987)
- 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) G. Bonn, *J. Chromatogr.*, **322**, 411(1985)
- 8) R. D. Rocklin and C. A. Pohl, *J. Liquid Chromatogr.*, **6**(9), 1577(1983)
- 9) K. Tanaka, T. Kitamura, T. Matsuda, H. Yamasaki and H. Sasaki, *Toyo Soda Kenkyu Houkoku*, **25**(2), 21(1981)
- 10) J. Havlicek and O. Samuelson, *Anal. Chem.*, **47**, 1954(1975)
- 11) N. W. H. Cheetham, P. Sirimanne and W. R. Day, *J. Chromatogr.*, **207**, 439(1981)
- 12) B. Porsch, *J. Chromatogr.*, **320**, 408(1985)