

平成 30 年 5 月 6 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07458

研究課題名(和文) 糖光学分割のための新規キラル場の構築とL-糖の探索

研究課題名(英文) Enantioseparation of aldohexoses and aldopentoses with L-tryptophanamide for detecting L-monosaccharides by reversed phase HPLC using HPLC

研究代表者

小玉 修嗣 (Kodama, Shuji)

東海大学・理学部・教授

研究者番号：70360807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：自然界に存在する糖はD-グルコースを代表とする、いわゆるD-糖が大半を占めている。L-糖は存在しないのだろうか？これまで単糖類を一斉に光学異性体分析する方法が報告されていない。本研究課題では単糖類を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により、3種類の六単糖と3種類の五単糖を一斉に光学異性体分析できる方法を開発した。今回はL-ガラクトースに焦点を絞り、この方法を用いて8種類の野菜を分析した。HPLC分析の結果、コマツナにL-ガラクトースと思われる小さなピークを検出することができた。このピークが本当にL-ガラクトースであるか否かを今後明らかにする必要がある。

研究成果の概要(英文)：D-Monosaccharides are distributed widely in nature, but it is not clarified whether L-monosaccharides, such as L-galactose, present in nature. We developed a novel reversed phase high-performance liquid chromatography for simultaneous enantioseparation of aldohexoses and aldopentoses derivatised with L-tryptophanamide. Using the above method, we tried to detect L-galactose in 8 vegetables. As a result, a small peak in only komatsuna sample was detected at the retention time of L-galactose. It is necessary to identify whether the peak is L-galactose in future.

研究分野：食品分析化学

キーワード：光学異性体 単糖 高速液体クロマトグラフィー 野菜

1. 研究開始当初の背景

近年、天然には微量にしか存在しない希少糖が注目されている。希少糖は大きく2つのグループに分けられる。一方には希少なD-糖があり、D-アロースやD-ブシコースなどの合成法や生理作用などの研究が行われ (Izumori, K., *J. Biotechnol.*, 2006, **124**, 717-722)、商品化されている。もう一方の希少糖であるL-糖については、その存在や生理的意義に関する知見は限られている。近年、ビタミンC合成経路の解明が進み、L-ガラクトースが中間体となっていることが報告された (Mieda, T. et al., *J. Biol. Chem.*, 2004, **45**, 1271-1279)。また、L-グルコース資化微生物が発見され、L-グルコースの代謝経路が明らかにされた (Shimizu, T. et al., *J. Biol. Chem.*, 2012, **287**, 40448-40456)。これらの研究では、酵素法やイオン排除型の高速度液体クロマトグラフィー (HPLC法) によってL-糖が測定されている。しかし、用いられた酵素法は基質特異性が低く、また、HPLC法ではL-グルコースを基質とした酵素反応産物の旋光度を測定しただけであり、精密な分析はされていない。

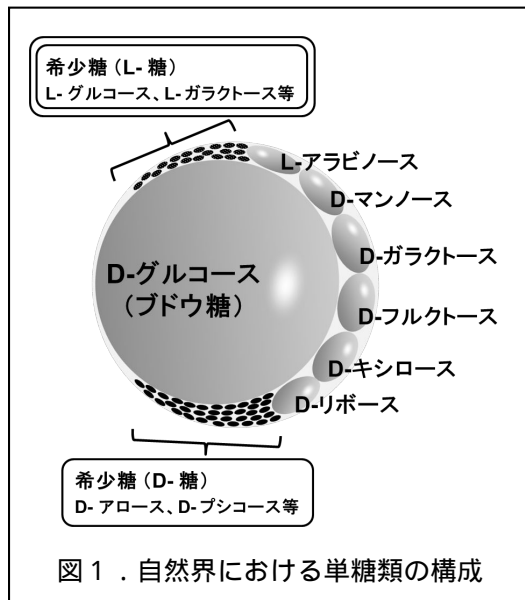


図1. 自然界における単糖類の構成

単糖類は親水性が高く紫外吸収に乏しいため、一般的な糖分析では様々な糖の誘導体化法が開発され、HPLC法やキャピラリー電気泳動法(CE法)で分析されている。しかし、糖の光学異性体分析法は限られた報告例しかなく、しかも標準溶液だけの分析に限定されている。誘導体化単糖のCE法による光学異性体分析例としては、シクロデキストリンを用いるStefanssonらの方法や、申請者らが行ったホウ酸を中心イオンに用いるキラル配位子交換法などがある。しかし、CE法では分析感度が高くないこと、及びL-糖の

位置にピークが検出された場合、本当にL-糖であるのかを確認することは困難である。

一方、HPLC法は高感度分析が可能であり、さらにピーク画分を分取して質量分析やNMR分析することによりピークの同定が可能である。しかし、HPLC法により単糖類の光学異性体は分離されているものの、単糖間の分離(エピマー分離)は未だ達成されていない(図2)。

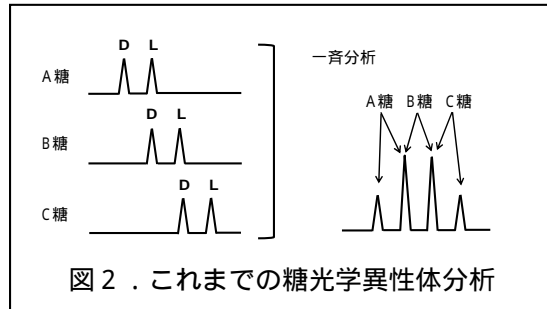


図2. これまでの糖光学異性体分析

2. 研究の目的

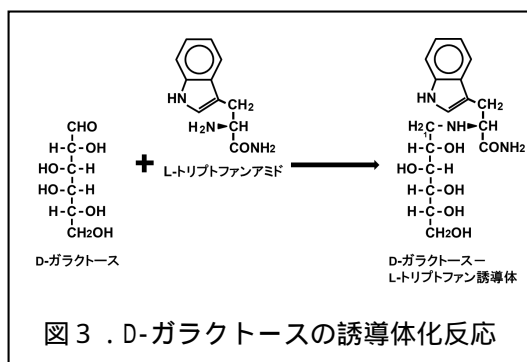
本研究課題は、L-アミノ酸などの光学活性物質を用いてDおよびL体の単糖類を誘導体化させ、その誘導体とホウ酸イオンや金属イオンとの錯体形成を利用した逆相HPLC法により、実試料分析が可能な単糖類光学異性体の一斉分析法の確立を目的とする。自然界の糖類はD-グルコースを代表とする、いわゆるD-糖から構成されると思われており、L-糖などの希少糖についてはほとんど研究されていない。この原因は、糖の種類が多く、それらの光学異性体分析が困難なことによる。糖の光学異性体分析法を確立して様々なL-糖を検出できれば、L-糖の分布、代謝過程や生理的意義の解明が進み、L-糖の薬理的応用研究への発展が期待される。

- (1) L-アミノ酸の他、そのアミドも含めた関連化合物の誘導体化法を検討する。また、分離条件や分離カラムの検討を行う。特に分離条件については、誘導体化単糖とホウ酸との相互作用を利用する方法の他、金属イオンとの相互作用を利用する分離についても検討する。単糖類の光学異性体の一斉かつ高感度な分析法を構築することを第一の目標とする。
- (2) 植物や食品試料から抽出された単糖類を高感度に分析するため、できるだけ精製する必要がある。市販の固相抽出カートリッジを使っても煩雑な操作が増える割には精製度が不十分なため、簡便に実試料を分析できる充填剤、たとえばホウ酸固定化樹脂を開発し、簡便かつ効率的な前処理法を確立する。

3. 研究の方法

- (1) 単糖類光学異性体分析法

申請者らがこれまで行ってきた光学異性体分析法 (Anal. Sci., 2014, 30, 739-743) を基盤とし、キラル誘導体化試薬として用いてきた L-トリプトファンを L-トリプトファンアミドに変えて還元アミノ化法により誘導体化を行った (図 3)。



(2) HPLC 分析条件

InertSustainSwift C18 カラム (4.6 x 150 mm) を用い、1.5 mM ブチルポロン酸と 5% アセトニトリルを含む 180 mM リン酸緩衝液 (pH 7.6) を移動相とし、220 nm の吸光度を測定した。

(3) 試料前処理法

8 種類の野菜 (キャベツ、ホウレンソウ、チンゲンサイ、ヤーコン、コマツナ、ダイコン菜、カブ及びカラシナ) を収穫後、1 時間以内に加熱処理し、使用するまで冷凍保存した。野菜を細切してホモジュネートした後、遠心分離により上清を得た。この上清を 3 種類のカートリッジ (疎水性化合物を吸着する C18 カートリッジ、陰イオン性化合物を吸着する陰イオン交換カートリッジ及び陽イオンを吸着する陽イオン交換カートリッジ) を通して、非吸着画分を得た。この画分をロータリーエバポレーターで乾固させ、少量の精製水で溶解した後、糖分析カラムによりガラクトースの画分を得た。その後、上記(1)に記載した誘導体化を行い、その後 HPLC により分析した。

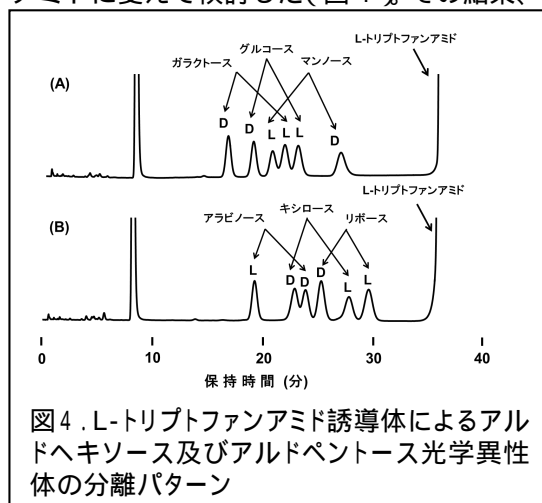
4 . 研究成果

(1) 単糖類光学異性体分析法の確立

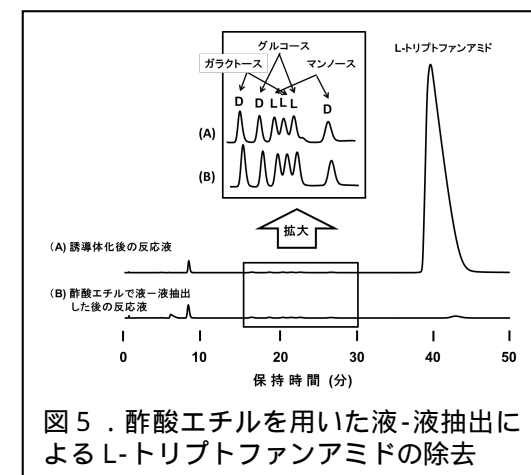
これまでの研究により、L-トリプトファンで還元アミノ化により誘導体化したグルコース、ガラクトース及びマンノースの各光学異性体 6 種類を逆相 HPLC 法により分離可能なことを報告してきた。この分離は糖とホウ酸との錯体形成を利用した塩基性条件下で行っている。しかし、この方法では各ピークの分離が十分でないこと、ピーク検出後の 19 分 ~ 20 分にかけて未反応の L-トリプトファン

の大きなピークがあり、分析 window が狭

いことが課題となっていた。そこで、誘導体化試薬を L-トリプトファンアミドに変えて検討した (図 4)。



ラクトース及びマンノース) と 3 種類のアルドペントース (アラビノース、キシロース及びリボース) の各光学異性体は十分に光学異性体分離されていることが分かった。未反応の L-トリプトファンアミドを除去するために、誘導体化後の反応液をヘキサン、クロロホルムや酢酸エチルを用いた液-液抽出をこころみたところ、酢酸エチルを用いた液-液抽出法により未反応の酢酸エチル除去効果が認められた (図 5)。



導体化単糖のピークに比べて未反応の L-トリプトファンアミドのピークは高かった。なお、この液-液抽出では、L-トリプトファンは除去できないことも分かった。

これまでの HPLC 分析において、塩基性の移動相を用いてきたが、中性の移動相を用いることにより誘導体化単糖と L-トリプトファンアミドの溶出順が逆転することを見いだした。さらに、移動相にブチルポロン酸を加えることにより、3 種類のアルドヘキソースと 3 種類のアルドペントースを一斉に分離することが可能となった (図 6)。

単糖の光学異性体 (D, L) はアルデヒド基から最も遠い不斉炭素原子の配位によって決められて

出順は、アルデヒド基から最も近い不斉炭素原子の立体配置によることが分かった。

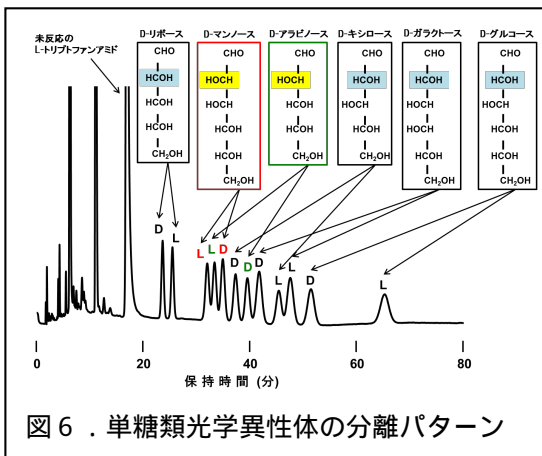


図6．単糖類光学異性体の分離パターン

(2) 野菜中ガラクトースの光学異性体分析

上記(1)で確立した分析法を用いて、L-糖の探索を試みた。今回は植物の葉のビタミンC合成経路の中間体として挙げられているL-ガラクトース (Mieda *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2004**, *45*, 1271-1279) に焦点を絞った。8種類の野菜を栽培し、収穫後1時間以内に加熱処理した後、精製水を加えてホモジナイズして単糖類を抽出した。その後、クロロホルムを加えて液-液分配し、水相を3種類のカートリッジに通して不純物を吸着させ、単糖が含まれる非吸着画分を得た。この画分には大量のD-グルコースが含まれるため、他の単糖類のピークは著しく小さくなるため、糖分析用カラムでガラクトース画分を分取した(図7)。糖分析でもガラクトースを単独で分離

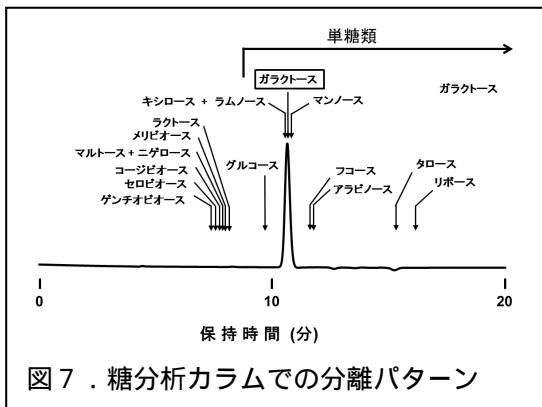


図7．糖分析カラムでの分離パターン

することは困難であるが、大部分のグルコースを除去できた。キャベツ、チンゲン菜、ヤーコン、大根の葉にはガラクトースに相当する位置にピークはなかった。ほうれん草、小松菜、かぶ、からし菜にはガラクトースの部分にピークがあったためそのピークを回収し、誘導体化した。その結果、小松菜だけ僅かにL-ガラクトースに相当する位置にピークが認められた(図8)。このピークがL-ガラクトースのピークであることを確認するには、ピークを分取して質量分析やNMR解析を行う必要がある。しかし、ピークがあま

りにも小さく、分取は困難であった。

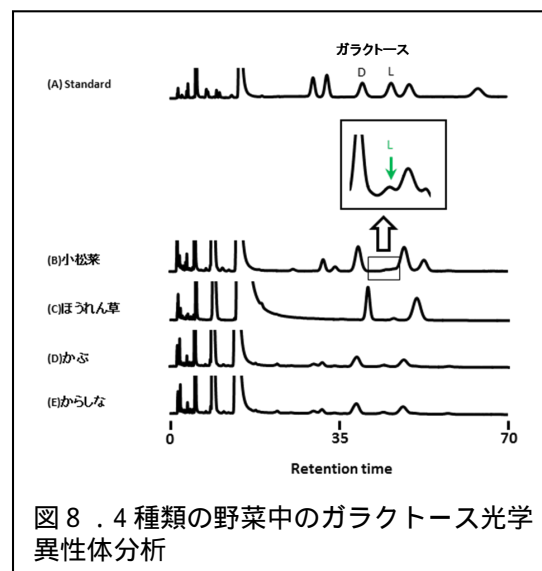


図8．4種類の野菜中のガラクトース光学異性体分析

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)

- (1) Kemmei, T., Kodama, S., Yamamoto, A., Inoue, Y., Hayakawa, K. Reversed phase ion-pair chromatographic separation of sugar alcohols by complexation with molybdate ion. *J. Chromatogr. A*, **2018**, *1547*, 71-76.
- (2) Yamamoto, R., Sawada, M., Yamato, N., Yamamoto, A., Kodama, S. High-performance liquid chromatography with fluorescence detection of ochratoxin A in cereal, coffee, and wine: Effective pretreatment with bovine serum albumin-immobilized adsorbent. *Sep. Sci. Plus*, **2018**, *1*, 196-201.
- (3) Tanaka, S., Dohi, T., Aizawa, S., Kemmei, T., Terashima, H., Taga, A., Yamamoto, A., Kodama, S. Simultaneous determination of alcohols including diols and triol by HPLC with ultraviolet detector based on the formation of complex with copper(II) ion. *J. Sep. Sci.*, **2017**, *40*, 4168-4175.
- (4) Okada, M., Yamamoto, A., Aizawa, S., Taga, A., Terashima, H., Kodama, S. HPLC Separation of Sulforaphane Enantiomers in Broccoli and Its Sprouts by Transformation into Diastereoisomers Using Derivatization with (S)-Leucine. *J. Agric. Food Chem.*, **2017**, *65*, 244-250.
- (5) Kemmei, T., Kodama, S., Yamamoto, A., Inoue, Y., Hayakawa, K. Determination of hexitols by reversed phase liquid chromatography using on-line complexation

with molybdate ion. *Anal. Chim. Acta*, **2017**, 958, 71-76.

- (6) Kodama, S., Nakajima, S., Ozaki, H., Takemoto, R., Itabashi, Y., Kuksis, A. Enantioseparation of hydroxyecosatetraenoic acids by hydroxypropyl- γ -cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. *Electrophoresis*, **2016**, 37, 3196-3205.
- (7) Kemmei, T., Kodama, S., Yamamoto, A., Inoue, Y., Hayakawa, K. Reversed phase liquid chromatographic determination of organic acids using on-line complexation with copper(II) ion. *Anal. Chim. Acta*, **2015**, 886, 194-199.
- (8) Arai, K., Terashima, H., Aizawa, S., Taga, A., Yamamoto, A., Tsutsumiuchi, K., Kodama, S. Simultaneous determination of trigonelline, caffeine, chlorogenic acid and their related compounds in instant coffee samples by HPLC using an acidic mobile phase containing octanesulfonate. *Anal. Sci.*, **2015**, 31, 831-835.
- (9) Shou, M., Terashima, H., Aizawa, S., Taga, A., Yamamoto, A., Kodama, S. Simultaneous enantioseparation of aldohexoses and aldopentoses derivatized with L-tryptophanamide by reversed phase HPLC using butylboronic acid as a complexation reagent of monosaccharides. *Chirality*, **2015**, 27, 417-421.

〔学会発表〕(計 18 件)

- (1) 小玉修嗣 他、ビール中のイソキサントフモール及び 8-プレニルナリンゲニンの光学異性体分析、日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月 25 ~ 28 日、石川県立音楽堂 他
- (2) 田中壮平 他、柑橘類中シネフリンの光学異性体分析、日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月 25 ~ 28 日、石川県立音楽堂 他
- (3) 健名智子 他、モリブデン酸添加移動相を用いる無機陰イオン分析、日本分析化学会第 66 年会、2017 年 9 月 9 ~ 12 日、東京理科大学葛飾キャンパス
- (4) 田中壮平 他、ブロッコリー中グルコラファニンのジアステレオマー分離条件の検討、日本分析化学会第 66 年会、2017 年 9 月 9 ~ 12 日、東京理科大学葛飾キャンパス
- (5) 土肥巧 他、コーヒー生豆の産地判別分析 ~ 苦味、酸味成分およびアミン類による検討 ~ 苦み成分、酸味成分およびアミン類による検討 ~、日本分析化学会第 66 年会、2017 年 9 月 9 ~ 12 日、東京理科大学葛飾キャンパス
- (6) 岡田真希子 他、野菜中のガラクトース光学異性体分析、日本分析化学会第 66 年会、2017 年 9 月 9 ~ 12 日、東京理科大学葛飾キャンパス
- (7) 健名智子 他、モリブデン酸錯体形成を

利用した糖アルコール分析 - イオンペア HPLC 法の検討 -、第 77 回分析化学討論会、2017 年 5 月 27 ~ 28 日、龍谷大学深草学舎

- (8) 土肥巧 他、コーヒー生豆の産地判別法の検討 ~ 苦み成分と酸味成分の産地判別能 ~、第 77 回分析化学討論会、2017 年 5 月 27 ~ 28 日、龍谷大学深草学舎
- (9) 岡田真希子 他、スルフォラファンの光学異性体分析 ~ ブロッコリーの花蕾と茎中の光学異性体比の検討 ~、第 77 回分析化学討論会、2017 年 5 月 27 ~ 28 日、龍谷大学深草学舎
- (10) 大和樹 他、有機溶媒を用いないカビ毒オクラトキシン A の分析法、日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 24 ~ 27 日、仙台国際センター 他
- (11) 健名智子 他、モリブデン酸添加移動相を用いたイオンペア HPLC-UV 法による糖アルコール分析、日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 24 ~ 27 日、仙台国際センター 他
- (12) 岡田真希子 他、単糖類の光学異性体分析、日本分析化学会 65 年会、2016 年 9 月 14 ~ 16 日、北海道大学工学部
- (13) 健名智子 他、モリブデン酸添加移動相を用いた HPLC-UV 法による糖アルコール分析、日本分析化学会 65 年会、2016 年 9 月 14 ~ 16 日、北海道大学工学部
- (14) 土肥巧 他、コーヒー生豆の産地判別法の検討 ~ トリゴネリン、クロロゲン酸、カフェインの産地判別能、日本分析化学会 65 年会、2016 年 9 月 14 ~ 16 日、北海道大学工学部
- (15) 岡田真希子 他、ブロッコリー中のスルフォラファンの光学異性体分析、日本分析化学会 65 年会、2016 年 9 月 14 ~ 16 日、北海道大学工学部
- (16) 健名智子 他、銅添加移動相を用いた有機酸の逆相液体クロマトグラフィーによる分析、第 75 回分析化学討論会、2015 年 5 月 23 ~ 24 日、山梨大学甲府キャンパス
- (17) 健名智子 他、オンライン金属錯体形成を利用した糖類の液体クロマトグラフィーによる分析、日本分析化学会第 64 年会、2015 年 9 月 9 ~ 11 日、九州大学伊都キャンパス
- (18) 翔美怜 他、L-アミノ酸誘導体化単糖の光学異性体分離、日本分析化学会第 64 年会、2015 年 9 月 9 ~ 11 日、九州大学伊都キャンパス

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://kodamaken.wixsite.com/kodama>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小玉 修嗣 (KODAMA SHUJI)
東海大学・理学部・教授
研究者番号：70360807

(2) 研究分担者

山本 敦 (YAMAMOTO ATSUSHI)
中部大学・応用生物学部・教授
研究者番号：60360806

(3) 研究分担者

會澤 宣一 (AIZAWA SEN-ICHI)
富山大学・理工学研究部・教授
研究者番号：60231099

(4) 研究分担者

多賀 淳 (TAGA ATSUSHI)
近畿大学・薬学部・准教授
研究者番号：20247951

(5) 連携研究者

()

研究者番号：

(6) 研究協力者

()