

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19550095

研究課題名 (和文) 高性能な糖分析用充填剤の開発と糖鎖関連糖類分析への応用

研究課題名 (英文) High-performance liquid chromatographic separation of carbohydrates by the anion-exchange stationary phase

研究代表者

花田 尊子(増田 尊子) (HANADA TAKAKO (MASUDA TAKAKO))

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：50229374

研究成果の概要：

本研究では、HPLC を用いた糖類のより高性能な分析法を確立するため、クロロメチル化スチレン-ジビニルベンゼン共重合体 (粒径 5 μ m) と様々な三級アミン類との反応により四級アンモニウム塩型充填剤を開発し、分離と三級アミンの構造との相関、さらに糖の構造と充填剤との相互作用を検討することを目的としている。

開発する四級アンモニウム塩型充填剤の分離性能の比較には、それぞれのイオン交換容量 (mmol/g) を正確に求めることが必要となる。平成 19 年度の研究では、沈殿滴定の一つである銀滴定 (Mohr 法) で充填剤のカウンターイオン Cl⁻ の定量を行い、その定量結果をもとにイオン交換容量を算出した。その結果、Mohr 法により求めたイオン交換容量は、元素分析値 (N%) から求めたイオン交換容量とほぼ一致した。四級アンモニウム塩型充填剤のイオン交換容量測定には、カウンターのイオン Cl⁻ を定量する Mohr 法が有効な方法であることを明らかにした。

平成 20 年度では、クロロメチル化スチレン-ジビニルベンゼン共重合体と *N,N,N',N'*-1,6-ジアミノヘキサンから調製した四級アンモニウム塩型カラム充填剤を用い、アルドペントース (ribose, arabinose, xylose, lyxose)、アルドヘキソース (glucose, galactose, allose, altrose, mannose, gulose, idose, talose) の分離を目的に実験を行った。さらに、移動相である NaOH 水溶液濃度の変化が各糖の溶出挙動に及ぼす効果についても詳細に検討した。NaOH 濃度を 100 mM ~ 10 mM まで変化させ分離を試みた結果、NaOH 濃度を低くするとともに、アルドペントース、アルドヘキソースの溶出時間はすべて増加する傾向を示した。また、移動相：20 mM NaOH、流速：1.0 ml/min において、アルドペントース 4 種、アルドヘキソース 8 種が分離可能となった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：クロマトグラフィー

1. 研究開始当初の背景

エネルギー源として広く知られる糖は、糖鎖として、細胞の外内に存在し、細胞同士の接着の仲介や調節、情報伝達などの大切な生理機能を発揮している。このような、生命現象の重要な役割を担う糖鎖の構造解析をはじめとして、糖の機能を解明する重要性が高まっている。しかし、糖鎖は、さまざまな単糖で構成され、非常に類似した構造の単糖同士がお互いに複雑な形で結合しているため、その解析は難しい。

近年、定性・定量分析を可能とする陰イオン交換型高速液体クロマトグラフィー (HPAE) と電気化学検出器 (ED) を組み合わせた糖分析用 HPAE-ED システムにより、糖質の高感度検出は可能となっている。しかし、このシステムで用いるカラム充填剤は発展途上にある。単糖・二糖・オリゴ糖のより高性能な分析法を確立するため、新規な糖分析用充填剤を開発する。

これまでの研究で、糖分析用充填剤として、クロロメチル化スチレン - ジビニルベンゼン共重合体 (粒径 $5\mu\text{m}$) に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開発した。その結果、四級化した窒素原子を一つ有するモノカチオン型充填剤、なかでも、長いメチレン鎖 (n) の末端にさらにジメチルアミノ基が結合した充填剤 D_n が比較的高い分離性能を示すことを明らかにした。

しかし、糖の構造の多様性を考えるとさらに高性能な充填剤が求められるため、これまでの研究成果を展開し、新たな四級アンモニウム塩型充填剤を開発する。開発した充填剤を用い糖類を分離・分析した結果から、充填剤の構造と分離能との関連性、構造・配列・結合位置の異なる二糖・オリゴ糖などの糖質と充填剤との相互作用を明らかにすることを目的とする。

2. 研究の目的

本研究では、HPAE-ED 法による糖類のより高性能な分析法を確立するため、これまでの研究成果を展開し、イオン交換部を増やしたジカチオン型充填剤 D_nC_m を合成する。次に、新たに開発した充填剤を用いて、単糖・二糖をはじめ、生体に関連した様々な糖類の分離・分析を試みる。得られた多様な糖類の分析結果を比較・検討することにより、分離能と充填剤の構造との関連性、すなわち構造・配列・結合位置の異なる二糖・オリゴ糖などの糖質と充填剤との相互作用を明らかにする。

3. 研究の方法

<平成 19 年度>

Mohr 法は、塩化銀が難溶である性質を利用して、 Cl^- を Ag^+ で滴定する手法である。 Cl^- 溶液に指示薬として KCrO_4 を加え、 Ag^+ 溶液を滴下し、赤褐色の Ag_2CrO_4 の沈殿生成により終点を検知する。試料溶液の pH が低いと、 CrO_4^{2-} の一部は HCrO_4^- 、 $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ になり Ag_2CrO_4 の沈殿を生成しない。また、pH が高いと Ag^+ は Ag_2O 沈殿として消費される。したがって、試料溶液の pH は 6.5 ~ 10.5 に保つ必要がある。

本実験では、 AgNO_3 標準溶液と NaCl 標準溶液の濃度を変化させ、モノカチオン型充填剤 D_6 のイオン交換容量 (mmol/g) を求める実験条件について検討した。

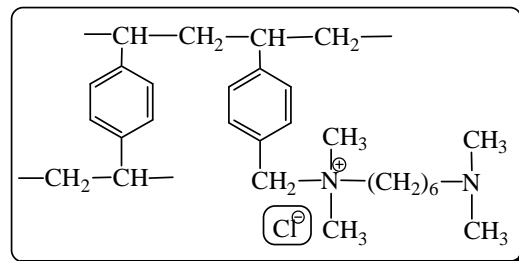


図 1 モノカチオン型 D_6

(1) 試料溶液の調製

モノカチオン型充填剤 D_6 (図 1) を秤量後、メタノール 10 ml を加え、10 秒間超音波をかけて膨潤後、ろ過した。次に 0.1 M NaOH を用いてろ過を行い、カウンターイオンである Cl^- を OH^- に交換した。ろ液に HNO_3 を用いて中和した後、500 ml メスフラスコに調製し、試料溶液とした。

(2) AgNO_3 標準溶液の調製と標定

秤量瓶に AgNO_3 を秤量し、500 ml メスフラスコに調製した。容量分析用の NaCl 標準溶液 ($f=1.000$) 10 ml をコニカルビーカーに正確に採取し、2% KCrO_4 指示薬を加え滴定を行った。その滴定量の平均値から AgNO_3 標準液のファクター (f) を算出した。

(3) 未知濃度の試料溶液の定量

(1) で調製した試料溶液をコニカルビーカーに正確に 10 ml を分取し、2% KCrO_4 指示薬を加え、 AgNO_3 標準液で 3 回滴定を行った。 AgNO_3 滴定量の平均値を用いてろ液中の NaCl 濃度を求め、イオン交換容量 (mmol/g) を算出した。

<平成 20 年度>

分析対象物質（アルドペントース：ribose, arabinose, xylose, lyxose, アルドヘキソース：glucose, galactose, allose, altrose, mannose, gulose, idose, talose）並びに内部標準物質（2-deoxygalactose）を含む標準溶液を調製し、移動相（水酸化ナトリウム水溶液）の濃度を様々に変えた条件で分析した。

分析条件は、分析カラム：モノカチオン型充填剤 D₆ を充填したカラム、移動相：100 mM ~ 10 mM 水酸化ナトリウム水溶液、流速：1.0 ml/min を用いた。

各濃度における溶出時間の比較に、分析対象物質の溶出時間と内部標準物質の溶出時間との比を用いることとした。

4. 研究成果

<平成 19 年度>

開発する充填剤の分離性能の比較には、それぞれの正確なイオン交換容量 (mmol/g) を求めることが必要となる。しかし、四級化した窒素原子を二つ有するジカチオン型充填剤の場合、元素分析 (N%) では正確なイオン交換容量を求めることは難しい。

そこで、平成 19 年度の研究では、開発したモノカチオン型充填剤のイオン交換容量を算出するため、沈殿滴定の一つである銀滴定 (Mohr 法) で充填剤のカウンターイオン Cl⁻ の定量を行った。Mohr 法により求めたイオン交換容量は、AgNO₃ 標準溶液と NaCl 標準溶液の濃度をともに 0.01 M にすると、平均 0.93 mmol/g と求められ、元素分析値 (N%) から求めたイオン交換容量 0.94 mmol/g とほぼ一致した。

以上の結果から、四級アンモニウム塩型充填剤のイオン交換容量測定には、0.01 M の AgNO₃ 標準溶液と NaCl 標準溶液を用いた Mohr 法でカウンターイオン Cl⁻ を定量する方法が有効であることが明らかとなった。

この研究成果に関して、第 13 回 LC テクノプラザ (平成 20 年 1 月 31 日、東京理科大学) において発表した。

<平成 20 年度>

クロロメチル化スチレン - ジビニルベンゼン共重合体 (粒径 5 μ m) と N,N,N',N'-1,6-ジアミノヘキサンから調製した四級アンモニウム塩型カラム充填剤を用い、アルドペントース (ribose, arabinose, xylose, lyxose)、アルドヘキソース (glucose, galactose, allose, altrose, mannose, gulose, idose, tarose) の分離を目的に実験を行った。

本実験では、移動相である水酸化ナトリウム水溶液濃度を 100 mM ~ 10 mM まで変化させ、分離を可能とする分析条件を検討した。

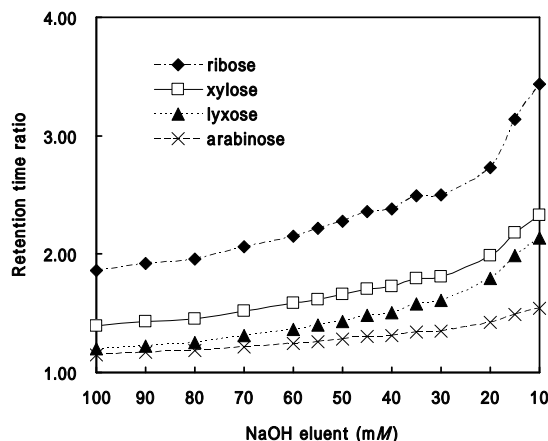


図 2 アルドペントース 4 種の溶出挙動

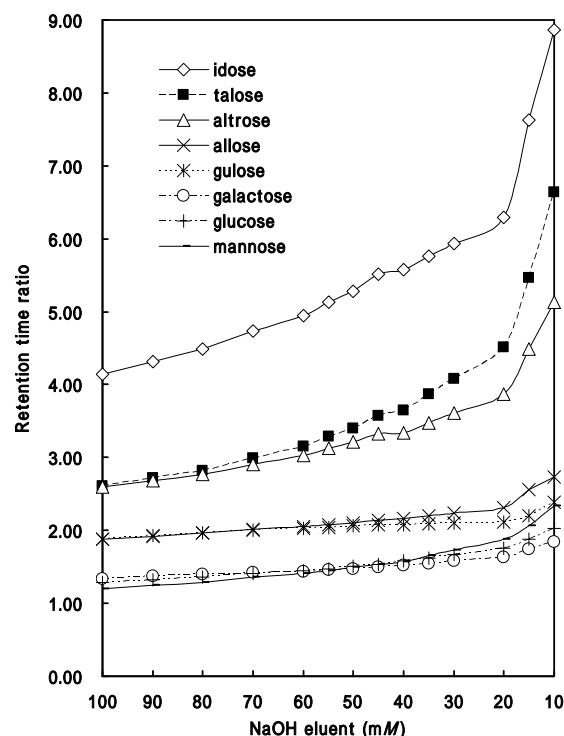


図 3 アルドヘキソース 8 種の溶出挙動

また、移動相の濃度変化が各糖の溶出挙動に及ぼす効果についても詳細に調査した。

移動相濃度の変化に伴うアルドペントース、アルドヘキソースの溶出挙動を図 2、図 3 に示した。縦軸は分析対象物質の溶出時間と内部標準物質の溶出時間から算出した比、横軸は移動相である水酸化ナトリウム水溶液の濃度を表している。図 2、図 3 共に、NaOH 濃度を低くするにともなって、アルドペントース、アルドヘキソースの溶出時間はすべて増加する傾向を示した。

陰イオン交換モードによる糖分析では、各糖類は、 pK_a 値の高いものから順に溶出すると

考えられている。一方、本研究では、移動相:100 mM ~ 10 mM でアルドペントースは arabinose (pK_a 12.34) < lyxose (pK_a 12.11) < xylose (pK_a 12.15) < ribose (pK_a 12.11)、アルドヘキソースは移動相: 100 mM ~ 60 mM で mannose (pK_a 12.08) < glucose (pK_a 12.28) < galactose (pK_a 12.35) と pK_a 値の順とは異なる溶出順位であった。一般に、単糖はピラノース形・フラノース形の環状構造の平衡で存在し、その割合は各糖で異なる。本研究で得たアルドースの溶出特性から、陰イオン交換モードによる糖の溶出順位には、 pK_a 値だけでなく、各糖の環状構造特性も関係すると考えられた。

また、アルドペントース 4 種・アルドヘキソース 8 種の分離実験において、移動相: 20 mM NaOH・流速: 1.0 ml/min で、それぞれ分離可能となった。アルドペントースのクロマトグラムを図 4、アルドヘキソースのクロマトグラムを図 5 に示す。

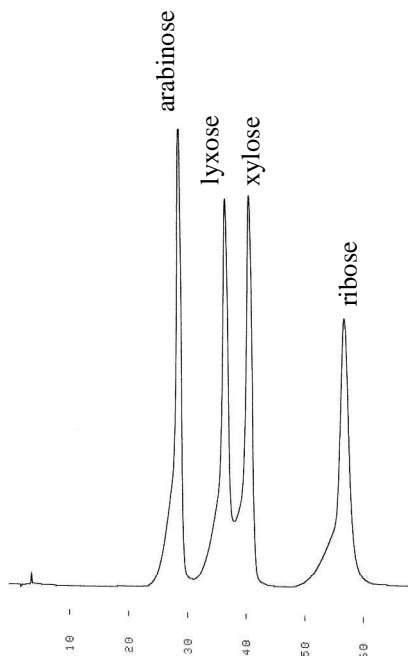


図 4 アルドペントースの分離・分析

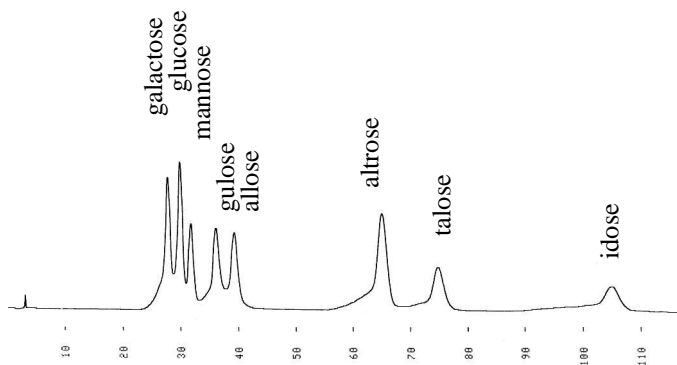


図 5 アルドヘキソースの分離・分析

これらの研究成果について、第 28 回日本糖質学会年会（平成 20 年 8 月 18 日、つくば国際会議場）HPLC Kyoto 2008（平成 20 年 12 月 4 日、京都大学）で報告した。

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）

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 花田(増田)尊子、北原恵一、荒井貞夫、四級アンモニウム塩型陰イオン交換樹脂のイオン交換容量測定法の確立、第 13 回 LC テクノプラザ、平成 20 年 1 月 31 日

2. 花田(増田)尊子、北原恵一、荒井貞夫、四級アンモニウム塩型充填剤を用いた HPAE-ED 法による単糖類の分析、第 28 回日本糖質学会年会、平成 20 年 8 月 18 日

3. Takako MASUDA HANADA, Kei-ichi KITAHARA, Sadao ARAI, The effect of NaOH eluent concentration on the separation of monosaccharides with an anion-exchange stationary phase prepared from polystyrene-based resin and a diamine, HPLC Kyoto 2008, 2008.12.4.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

花田 尊子(増田 尊子)

(HANADA TAKAKO (MASUDA TAKAKO))

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号: 50229374

(2)研究分担者

無

(3)連携研究者

無

