

機関番号：83201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580148

研究課題名（和文） 植物及び食品中におけるL-糖の探索

研究課題名（英文） Enantioseparation of DL-galactose in plants and foods

研究代表者

小玉 修嗣（KODAMA SHUJI）

富山県衛生研究所・化学部・主幹研究員

研究者番号：70360807

研究成果の概要（和文）：自然界では糖類はD-グルコースを代表とする、いわゆるD-糖から構成されているが、L-糖は存在するのだろうか？これまでのところ、糖の光学異性体分析が困難であるため、L-糖の存在を解明しようという研究は報告されていない。本研究課題では、身近な植物や食品を分析対象として、L-糖が存在するか否か、を検討した。

研究成果の概要（英文）：D-Monosaccharides are distributed widely in nature, but it is not clarified that free L-monosaccharides, such as L-galactose, L-glucose and L-mannose, present. We tried to enantioseparate galactose in vegetables and processed foods by chiral ligand-exchange capillary electrophoresis. And also, epimerization of galactose was studied.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：食品分析化学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

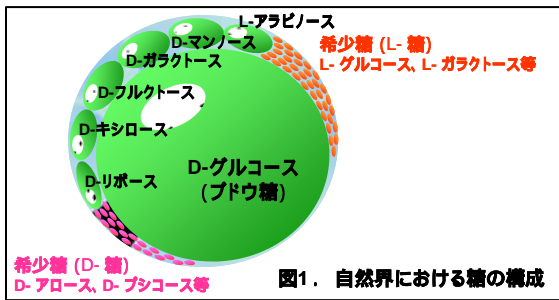
キーワード：キャピラリー電気泳動・光学分割・単糖・L-糖・配位子交換

## 1. 研究開始当初の背景

糖類は重要な食材料であるにもかかわらず、糖に関する知見は栄養学的な面に留まっていた。近年、糖のもつ様々な生理作用が少しずつ明らかにされ、糖鎖構造の解析や天然には微量しか存在しないと言われている希少糖が注目されている。特に希少糖に関しては、知的クラスター創生事業として希少糖研究開発プロジェクトにより、一部分ではあるが、希少糖の合成法や生理作用などの研究が行われてきた。しかし、天然に存在するL-糖などの希少糖の存在や生理的意義に関する

知見は限られたものである。

我々の身近に存在する糖は、D-グルコースを代表とするD-糖から構成されている（図1）。D-グルコースに代表されるアルドヘキソースの場合、16種類の異性体が存在する。この異性体のうち、半数の8種類はD-糖であるが、残りの8種類はL-糖である。一般に知られているL-糖にはL-アラビノースがあるが、逆にD-アラビノースはある種の細菌が産生するだけである。また、L-ガラクトース誘導体やL-フコースは、ある種の褐藻類に存在することが知られている。



これまでのところ、単糖類の一斉分析法は研究されてきたが、糖の光学異性体分析が困難であるため、L-糖の存在を網羅的に解明しようという研究は報告されていない。たとえば、約 10 年前に植物のアスכולピン酸の合成経路が明らかになった(図 2)。そのうちの主経路では、L-ガラクトースが中間体となっている。しかし、L-ガラクトースが植物内にどのように分布し、どのくらいの濃度で存在するのか、また、アスכולピン酸合成経路の中間体以外に何らかの作用をしているのかは、全く解明されていない。



## 2. 研究の目的

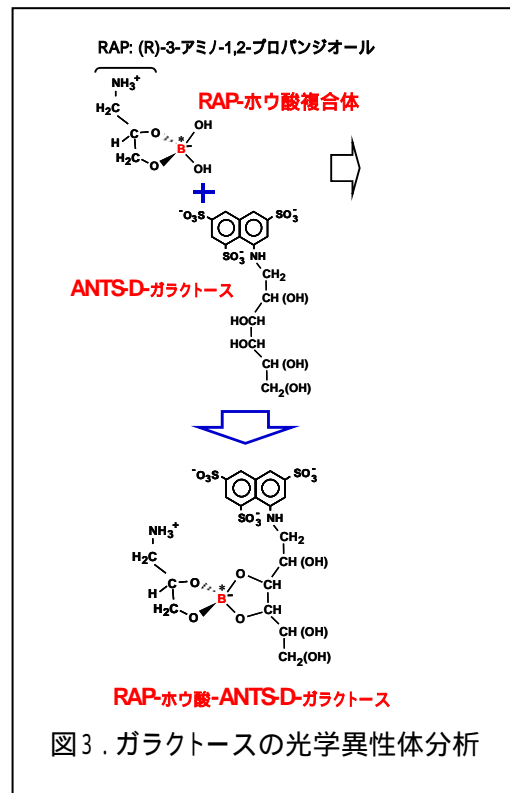
- (1) アルドヘキソースの 16 種類の異性体のうち、ガラクトースの D-体 及び L-体について、加熱処理により、メイラード反応やカラメル化などの反応過程で異性化がどの程度起こるのかを明らかにする。
- (2) 植物、発酵食品あるいは加熱処理を伴う加工食品など、身近な環境中に L-ガラクトースが存在するのか? という問題を解明する。
- (3) 単糖類の光学異性体分析法で用いているキラル配位子交換法のメカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

- (1) 光学異性体分析法に関しては、これまで

研究してきた単糖類の光学異性体分析法 (*Electrophoresis*, 28 (2007) 3930-3033) を基盤とし、我々が開発した高再現性かつ短時間分析可能なスルホン化キャピラリーカラム (*Electrophoresis*, 26 (2005) 4070-4078) を用いたガラクトースの光学異性体分析法により行った。

加熱処理による異性化実験では、糖の光学異性体濃度を 40 mM とし、20 mM の各種緩衝液 (pH 2~pH 12) 中、50 °C ~ 100 °C で加熱した。その後、精製水で希釈し、ANTS (8-アミノナフタレン-1,3,6-トリスルホン酸) で誘導体化し、キャピラリー電気泳動法で分析した (図 3)。



- (2) 試料の前処理方法については、種々多様なマトリックス成分を考慮し、抽出過程、カートリッジを用いたイオン性や疎水性の違いに基づく精製過程、及びオリゴ糖や多糖類との分別過程を経る。特に問題となるのは、一部の二糖類のピークが単糖類のピークと重なることをすでに確認している。このため、この分別過程が重要となる。L-ガラクトースの確認については、carbosep-620 カラムによりガラクトース画分を分取した後、キャピラリー電気泳動により L-ガラクトースを分析した。
- (3) 本研究で用いる光学異性体分析法はキラル配位子交換に基づくが、そのメカニズムは未だ明らかではない。そこで、広く用いられている金属イオンを中心イオンに用いたキラル配位子交換の原点に戻り、そのメカニズ

ムの解明を試みた。

#### 4. 研究成果

##### (1) ガラクトースの異性化

ガラクトース水溶液を各条件下で加熱した。pH 2~pH 7の範囲では100℃、1時間の加熱ではガラクトースの異性化は起こらなかった。pH 8~pH 12では、pHの上昇と共に異性化率が増加し、D-及びL-ガラクトースからそれぞれD-及びL-タロースが生成した。同様に、D-及びL-タロースの加熱はそれぞれD-及びL-ガラクトースの異性化をもたらした。このとき、タロースからガラクトースの生成量に比べて、ガラクトースからタロースの生成量は少なかった(図4)。このことは、立体構造的にガラクトースの方がタロースに比べて安定であると推定された。また、本

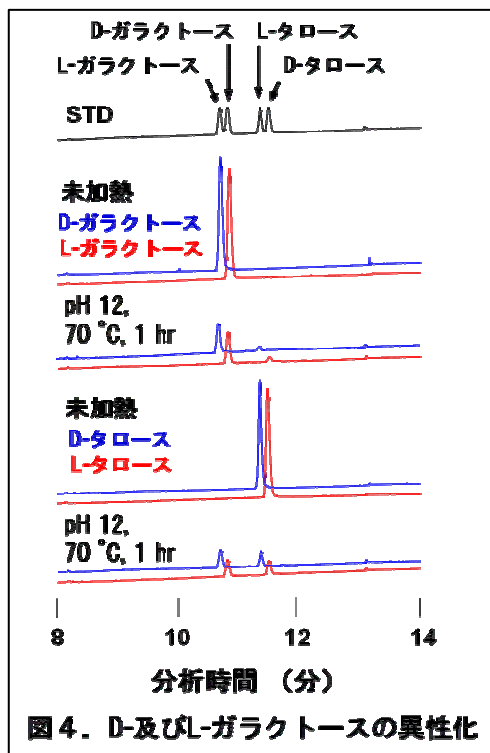


図4. D-及びL-ガラクトースの異性化

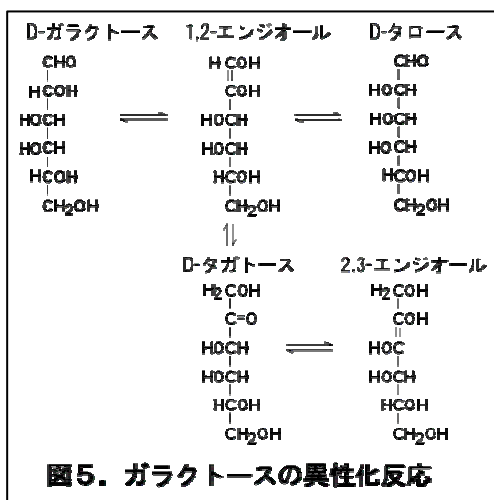


図5. ガラクトースの異性化反応

分析法では、タガトースは誘導体化されないため、図3ではピークとして検出されないが、D-及びL-タガトースをアルカリ条件下で加熱すると、それぞれD-ガラクトース・D-タロース及びL-ガラクトース・L-タロースが生成した(図5)。

##### (2) 植物及び食品中のガラクトースの光学異性体分析

野菜のうちビタミンC含有量の高いパセリ、小松菜及び大根菜、加工食品のうちガラクトース含量の高いインスタントコーヒー及びヨーグルトについて検討した。いずれの試料からもD-ガラクトースが検出されたが、L-ガラクトースは検出されなかった。本研究で用いた前処理操作を加えた検出下限値が10 mg/kgであり、今後、蛍光検出器を用いたより高感度での検出が必要と思われた。

##### (3) キラル配位子交換の分離メカニズム

配位子交換キャピラリー電気泳動法での配位子濃度依存のエナンチオマー泳動順の逆転現象

これまで報告されてきた配位子交換法では、銅(II)イオンとキラル配位子(例えばR-体)を1:1あるいは1:2のモル比で泳動緩衝液を調製している。このような系で分析すると、分析対象化合物エナンチオマーの泳動順は固定される。キラル配位子をもう一つのエナンチオマー(例えばS-体)にすると、上記の泳動順は逆転する。

銅(II)イオンを10 mMに固定すると、配位子であるD-キナ酸濃度が10~30 mMでは

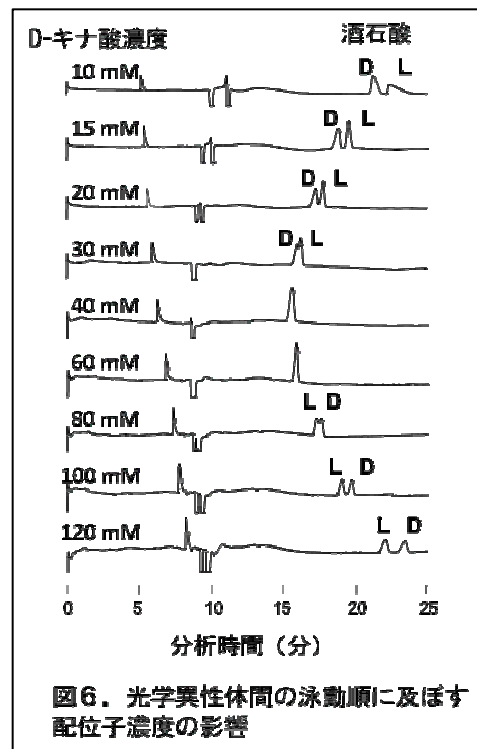


図6. 光学異性体間の泳動順に及ぼす配位子濃度の影響

酒石酸は光学分割され、泳動順は D-体、L-体の順であった。D-キナ酸濃度が 40～60 mM では光学分割されなかったが、80～120 mM D-キナ酸では再び光学分割がみられ、泳動順は L-酒石酸、D-酒石酸の順で逆転することを見いだした(図 6)。Cu(II)イオンは二座配位子と 1:1、1:2 及び 1:3 の複合体を取りうることから、現在、その構造を解析中である。

#### 中心イオンとしての金属イオン種の検討

キラル配位子交換キャピラリー電気泳動法では、中心イオンに銅(II)イオンあるいは亜鉛(II)イオンが用いられてきた。

配位子に D-キナ酸を用いてイソクエン酸を光学異性体分析するときの中心イオンとしての金属イオン種の影響を検討した(図 7)。6種類の金属イオンのうち、マンガン(II)イオンを除く5種類の金属イオンで、光学異性体分離が可能であることが分かった。この結果は、キラル配位子交換法の応用範囲を広げる可能性を示唆する。

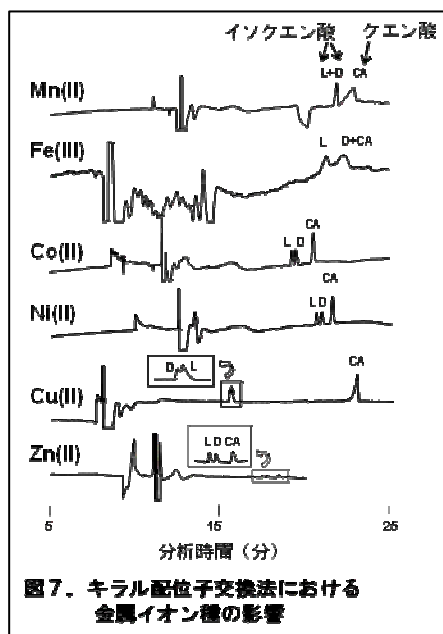


図7. キラル配位子交換法における金属イオン種の影響

#### 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 12 件)

- (1) Kodama, S., Taga, A., Yamamoto, A., Ito, Y., Honda, Y., Suzuki, K., Yamashita, T., Kemmei, T., Aizawa, S. Enantioseparation of DL-isocitric acid by a chiral ligand exchange capillary electrophoresis with Ni(II) - D-quinic acid system. *Electrophoresis*, **31**, 3586-3591 (2010). 査読有
- (2) Taga, A., Satoh, R., Ishiwata, S., Kodama, S., Sato, A., Suzuki, K., Sugiura R. In vitro assay of the interaction between Rnc1 protein and Pmp1 mRNA by affinity capillary electrophoresis with a carboxylated capillary. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **53**, 1332-1337 (2010). 査読有
- (3) Iwamuro, Y., Iio-Ishimaru, R., Chinaka, S., Takayama, N., Kodama, S., Hayakawa, K. Analysis of phosphorus-containing amino acid-type herbicides by capillary electrophoresis/ mass spectrometry using a chemically modified capillary having amino groups. *J. Health Sci.*, **56**, 606-612 (2010). 査読有
- (4) Kodama, S., Aizawa, S., Taga, A., Yamashita, T., Kemmei, T., Suzuki, K., Honda, Y., Yamamoto, A. Metal(II)—Ligand molar ratio dependence of enantioseparation of tartaric acid by ligand exchange capillary electrophoresis with Cu(II) and Ni(II)—D-quinic acid systems. *Electrophoresis*, **31**, 1051-1054 (2010). 査読有
- (5) Iwamuro, Y., Iio-Ishimaru, R., Chinaka, S., Takayama, N., Kodama, S., Hayakawa, K. Reproducible chiral capillary electrophoresis of methamphetamine and its related compounds using a chemically modified capillary having diol groups. *Forensic Toxicol.*, **28**, 19-24 (2010). 査読有
- (6) Tsukamoto, T., Yasuma, M., Yamamoto, A., Hirayama, K., Kihou, T., Kodama, S., Inoue, Y. Evaluation of sulfobetaine-type polymer resin as an SPE adsorbent in the analysis of trace tetracycline antibiotics in honey. *J. Sep. Sci.*, **32**, 3591-3595 (2009). 査読有
- (7) Kodama, S., Morikawa, A., Nakagomi, K., Yamamoto, A., Sato, A., Suzuki, K., Yamashita, T., Kemmei, T., Taga, A. Enantioseparation of nicotine alkaloids in cigarettes by capillary electrophoresis using sulfated  $\beta$ -cyclodextrin as a chiral selector and a capillary coated with amino groups. *Electrophoresis*, **30**, 349-356 (2009). 査読有
- (8) Kemmei, T., Kodama, S., Muramoto, T., Fujishima, H., Yamamoto, A., Inoue, Y., Hayakawa, K. Study of solid-phase extraction for the determination of sequestering agents in river water by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1216**, 1109-1114 (2009) 査読有
- (9) Kodama, S., Ito, Y., Taga, A., Nomura, Y., Yamamoto, A., Chinaka, S., Suzuki, K., Yamashita, T., Kemmei, T., Hayakawa K. A fast and simple analysis of glyphosate in tea beverages by capillary electrophoresis with

on-line copper(II)-glyphosate complex formation. *J. Health Sci.*, **54**, 602-606 (2008) 査読有

- (10) Yamamoto, A., Kawai, M., Miwa, T., Tsukamoto, T., Kodama, S., Hayakawa, K. Determination of adulteration in apple juice by HPLC with novel optical rotation detector. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 7302-7304 (2008) 査読有
- (11) Taga, A., Kita, S., Nishiura, K., Hayashi, T., Kinoshita, M., Sato, A., Suzuki, K., Kodama, S., Kakehi, K. Analysis of an antibody pharmaceutical, tocilizumab, by capillary electrophoresis using a carboxylated capillary. *J. Sep. Sci.*, **31**, 853-858 (2008) 査読有
- (12) Yamamoto, A., Kawai, M., Sakamoto, M., Kodama, S., Hayakawa, K. An optical rotatory detector for high-performance liquid chromatography using polarization modulation. *Anal. Sci.*, **24**, 361-364 (2008) 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

- (1) 小玉修嗣 他、還元糖光学異性体の加熱による異性化、日本分析化学会第 59 年会、2010 年 9 月 15 - 17 日、東北大学川内北キャンパス
- (2) 小玉修嗣 他、キラル配位子交換キャピラリー電気泳動によるイソクエン酸の光学異性体分析、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 28 - 30 日、岡山県桃太郎アリーナ
- (3) 岩室嘉晃 他、アミノ基導入化学修飾キャピラリーを用いたキャピラリー電気泳動/質量分析 (CE・MS) 法による含リンアミノ酸系農薬の分析、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 28 - 30 日、岡山県桃太郎アリーナ
- (4) 三輪俊夫 他、回折格子一次光の遅相測定 - 新規旋光度検出器の感度に及ぼす遅相の影響、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 28 - 30 日、岡山県桃太郎アリーナ
- (5) 岩室嘉晃 他、キャピラリー電気泳動/質量分析法の法科学分析への有効利用 - 化学修飾キャピラリーによる迅速性と再現性の向上 -、第 29 回キャピラリー電気泳動シンポジウム、2009 年 11 月 17-19 日、
- (6) 小玉修嗣 他、配位子交換キャピラリー電気泳動法での配位子濃度依存的エナンチオマー泳動順の逆転現象、日本分析化学会第 58 年会、2009 年 9 月 24-26 日、北海道大学高等教育機能開発総合センター
- (7) 三輪俊夫 他、新規旋光度検出器を用いた光学純度測定 ~ マツタケオールにお

ける溶媒増感効果 ~、日本分析化学会第 58 年会、2009 年 9 月 24-26 日、北海道大学高等教育機能開発総合センター

- (8) 小玉修嗣 他、中心イオンに Ni(II) イオンを用いたキラル配位子交換キャピラリー電気泳動法、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 26-28 日、国立京都国際会館
- (9) 多賀淳 他、キャピラリー電気泳動法によるメープルシロップおよびメープルシュガー中の還元糖の分析、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 26-28 日、国立京都国際会館
- (10) 三輪俊夫 他、キラル検出器による抗真菌薬イトラコナゾールの光学分割、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 26-28 日、国立京都国際会館
- (11) 野村陽子 他、河川水中のグリホサートおよびアミノメチルリン酸の簡易分析、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 26-28 日、国立京都国際会館
- (12) 小玉修嗣 他、オンライン銅錯体形成を利用した茶飲料混入グリホサートの迅速キャピラリー電気泳動分析、日本分析化学会第 57 年会、2008 年 9 月 10-12 日、福岡大学七隈キャンパス
- (13) 三輪俊夫 他、新規旋光度検出器の開発 - CD 検出器との比較 -、日本分析化学会第 57 年会、2008 年 9 月 10-12 日、福岡大学七隈キャンパス
- (14) 中島康夫 他、食品分析におけるダイアリシス前処理 信頼性の確認、日本分析化学会第 57 年会、2008 年 9 月 10-12 日、福岡大学七隈キャンパス

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
小玉 修嗣 (KODAMA SHUJI)  
富山県衛生研究所・化学部・主幹研究員  
研究者番号：70360807
- (2) 研究分担者  
健名 智子 (KEMMEI TOMOKO)  
富山県衛生研究所・化学部・副主幹研究員  
研究者番号：60416089
- (3) 分担研究者  
山本 敦 (YAMAMOTO ATSUSHI)  
中部大学・応用生物学部・教授  
研究者番号：60360806
- (4) 分担研究者  
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)
- (5) 分担研究者

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