

# タウリン-過ヨウ素酸試薬を用いた高速液体クロマトグラフィーによる糖類の蛍光分析

加藤 武彦<sup>®</sup>, 木下 俊夫\*

(1986 年 5 月 21 日受理)

HPLC を用い、発蛍光試薬としてタウリン-メタ過ヨウ素酸ナトリウム試薬による糖類の高感度検出法を検討した。その結果、従来高感度検出が困難であった非還元糖の微量分析が可能となった。又、同時にこの分析法は還元糖にも有効であった。定量操作はホウ酸緩衝液を移動相として陰イオン交換カラムにより分離された糖に  $640 \text{ mol m}^{-3}$  タウリン- $2 \text{ mol m}^{-3}$  メタ過ヨウ素酸ナトリウム試薬を加え、混和した後  $140^\circ\text{C}$  の加熱反応槽で発蛍光させ、いったん冷却後その強度を測定した。一方、発蛍光試薬に  $100 \text{ mol m}^{-3}$  タウリン- $6 \text{ mol m}^{-3}$  メタ過ヨウ素酸ナトリウム試薬を用いることにより、中性溶液中で非還元性オリゴ糖及びグリコシドの高感度検出が可能となった。最適条件下で  $\alpha$ -メチル-D-グルコシド、スクロース、ラフィノース及びスタキオースの検量線は、 $0.1 \text{ nmol}/10 \mu\text{l}$  から  $75 \text{ nmol}/10 \mu\text{l}$  の幅広い範囲で直線となった。この方法は糖鎖が長くなるに従い、蛍光強度は増大した。

## 1 緒 言

最近、HPLC による糖類の発蛍光試薬<sup>1)~6)</sup> が盛んに報告されているが、その多くは還元糖に対する分析であり、非還元糖への適用<sup>7)</sup> は少ない。それゆえ、現在主に示差屈折計が非還元糖の検出に用いられている。しかし検出感度が低く、選択性も乏しいため微量分析には適さない。

ところで、従来の過ヨウ素酸と発色試薬による糖の検出法<sup>8)</sup> は、発色反応に酸化と発色の2段階を要するため、操作が煩雑となる。今回著者らが開発したタウリン-過ヨウ素酸試薬は1種類の試液で非還元糖の高感度分析を可能にした。又、本発蛍光試薬は還元糖も検出でき、更に発蛍光反応条件を検討することにより、非還元性オリゴ糖及びグリコシドなどを高感度に分析することもできた。

## 2 実 験

### 2.1 試 薬

タウリンは東京化成工業製特級試薬、ホウ酸、ホウ酸カリウム、水酸化カリウム及びメタ過ヨウ素酸ナトリウムは和光純薬工業製特級試薬、各種単糖及びオリゴ糖は和光純薬工業製試薬を用いた。

### 2.2 装 置

ポンプ：溶離液、発蛍光試薬の送液は共に LC-3A 型インジェクター：SIL-1A 型  
検出器：蛍光光度計 FLD-1 (励起光源：FLD-1 付属 360 nm 用ランプ、2 次フィルター：FLD-1 付属 EM-4, フローセル：セル容量  $50 \mu\text{l}$ )  
記録計：R-11 型  
以上島津製作所製を用いた。  
カラム：Dow Chemical 製 Aminex A-27 (ホウ酸塩型  $30 \text{ cm} \times 4 \text{ mm i.d.}$ )、島津製作所製 ISA07/S2504 ( $25 \text{ cm} \times 4 \text{ mm i.d.}$ ) 及び日立製作所製 3013N ( $25 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm i.d.}$ )

カラム温度制御：Grant Instrument 製 JB-2 型恒温槽

加熱反応槽：大洋科学工業製 サーモユニット、ミンダー H 型 (シリコンオイル使用、使用温度範囲は室温  $+5^\circ\text{C}$  ~  $180^\circ\text{C}$ 、温度精度は  $\pm 0.2^\circ\text{C}$ )

### 2.3 定量操作

#### 2.3.1 定量操作 1 (還元糖及び非還元糖の分析)

Fig. 1 のフローダイアグラムに従い、移動相として  $0.5 \sim 0.7 \text{ mol dm}^{-3}$  のホウ酸 (水酸化カリウム粒で pH 8.7 に調整) を用い、流量  $1.5 \text{ ml/min}$  で送液する。インジェクターより糖試料溶液を注入し、陰イオン交換カラム Aminex A-27 又は ISA07/S2504 (いずれもカラム温度  $78^\circ\text{C}$ ) で分離後、発蛍光試薬の  $640 \text{ mol m}^{-3}$  タウリン- $2 \text{ mol m}^{-3}$  メタ過ヨウ素酸ナトリウム試液を流量  $0.5$

\* 北里大学薬学部：108 東京都港区白金 5-9-1

ml/min で加え、 $140^{\circ}\text{C}$  の加熱反応槽 ( $20\text{ m} \times 0.5\text{ mm}$  i.d. のステンレス管内蔵) を通して発蛍光させ、いったん冷却管 ( $20\text{ cm} \times 2\text{ cm}$  i.d. のリービッヒ管内に  $2\text{ m} \times 0.3\text{ mm}$  i.d. のステンレス管をらせん状に固定し、リービッヒ管内に流水を通す) を通過させた後、その蛍光強度を測定する。

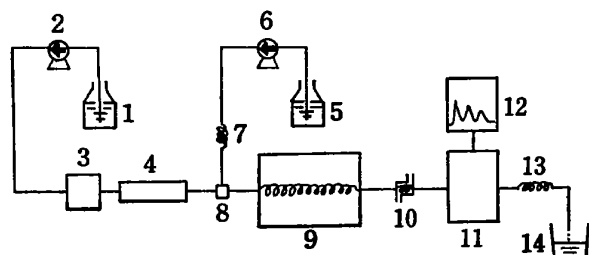


Fig. 1 Flow diagram of the HPLC equipment

1: mobile phase reservoir; 2, 6: pump; 3: injector; 4: column; 5: fluorescence reagent; 7, 13: damper; 8: mixing T-piece; 9: heating bath; 10: cooling tube; 11: detector; 12: recorder; 14: waste

**2.3.2 定量操作 2 (非還元性オリゴ糖及びグリコシドの分析)** 移動相として、 $0.1\text{ mol dm}^{-3}$  ホウ酸 (水酸化カリウム粒で pH 7 に調整) を用い、流量  $1.0\text{ ml/min}$  で送液する。インジェクターより糖試料を注入し、日立ゲル 3013N カラム (カラム温度  $30^{\circ}\text{C}$  又は  $78^{\circ}\text{C}$ ) で分離後、発蛍光試薬の  $100\text{ mol m}^{-3}$  タウリン- $6\text{ mol m}^{-3}$  メタ過ヨウ素酸ナトリウム試液 (ホウ酸カリウムで pH 6.8 に調整) を流量  $0.3\text{ ml/min}$  で加え、混和した後  $130^{\circ}\text{C}$  の加熱反応槽を通し、以下定量操作 1 と同様に行った。

### 3 結 果

#### 3.1 還元糖及び非還元糖の分析

**3.1.1 励起蛍光スペクトル** 定量操作 1 によって発蛍光させた D-ソルビトール ( $0.5\text{ }\mu\text{g}/10\text{ }\mu\text{l}$ ) の励起及び蛍光スペクトルを Fig. 2 に示す。これより励起極大  $336\text{ nm}$ 、蛍光極大  $445\text{ nm}$  であった。

**3.1.2 発蛍光試薬濃度の影響** 標準試料 D-ソルビトール ( $0.5\text{ }\mu\text{g}/10\text{ }\mu\text{l}$ ) を用い、発蛍光試薬中のタウリンとメタ過ヨウ素酸ナトリウム濃度と蛍光強度の関係を Fig. 3 に示す。タウリンは濃度が増すに従い蛍光強度は増大するが、タウリンの溶解性を考慮して  $640\text{ mol m}^{-3}$  とした。又メタ過ヨウ素酸ナトリウム濃度は  $2\text{ mol m}^{-3}$  が最大の蛍光強度を示した。

**3.1.3 発蛍光反応温度の影響** 発蛍光反応温度と蛍

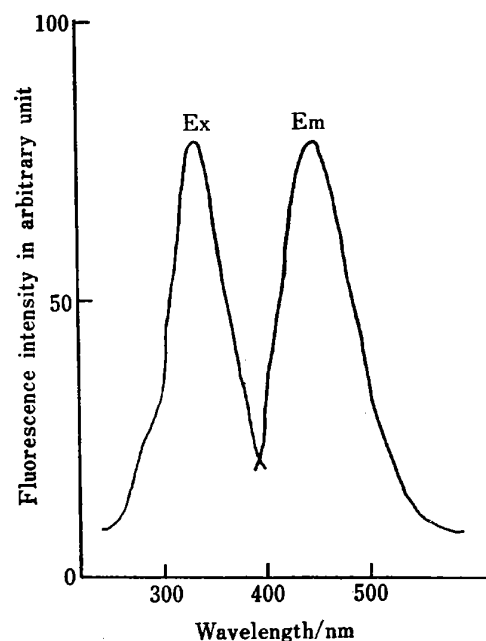


Fig. 2 Excitation and emission spectra for D-sorbitol

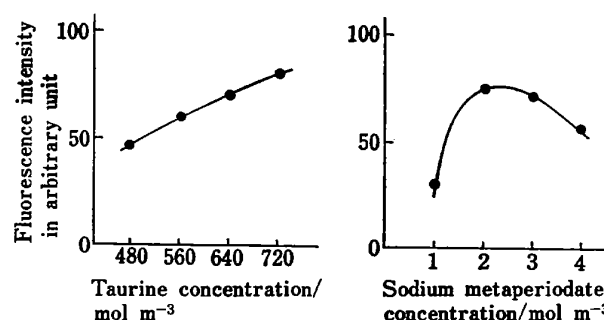


Fig. 3 Effects of taurine and sodium metaperiodate concentrations

光強度の関係を Fig. 4 に示す。蛍光強度は  $110^{\circ}\text{C}$  から徐々に増大し  $140^{\circ}\text{C}$  において最大となった。なお、加熱反応槽内のステンレス管の内径と長さについては、分析所要時間及び検出感度を考慮して内径  $0.5\text{ mm}$ 、長さ  $20\text{ m}$  とした。

**3.1.4 標準試料の分析** 定量操作 1 によって Aminex A-27 カラムを用いて分離したスクロース、ラクトース、D-リボース、D-フルクトース、D-ソルビトール、D-マンニトール及び D-グルコース (各  $2.67\text{ nmol}/10\text{ }\mu\text{l}$ ) のクロマトグラムを Fig. 5 の (A) に示す。又、ISA07/S2504 カラムによって分離したメレジトース、セドヘプツロサン、D-アドニトール及びサリシン (各  $5.33\text{ nmol}/10\text{ }\mu\text{l}$ ) のクロマトグラムを Fig. 5 の (B) に示す。

**3.1.5 検量線及び検出限界** Fig. 5 の (A) におけ

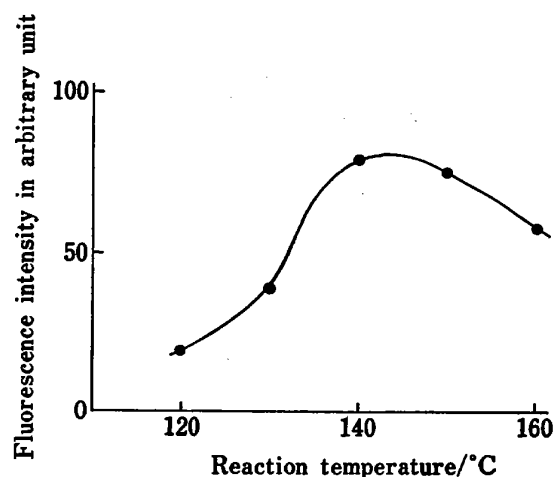


Fig. 4 Effect of reaction temperature

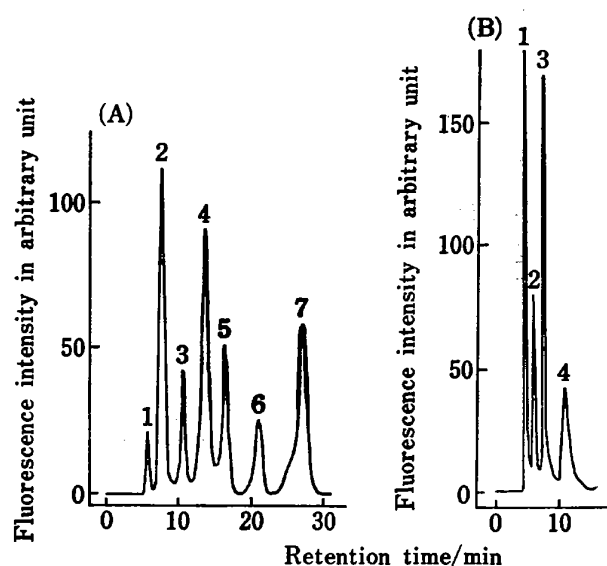


Fig. 5 Chromatograms of standard samples

(A) Column: Aminex A-27 (30 cm×4 mm i.d.), column temp.: 78°C, mobile phase: 0.65 mol dm<sup>-3</sup> borate (pH 8.7), flow rate: 2.0 ml/min, peaks: 1 sucrose, 2 lactose, 3 D-ribose, 4 D-fructose, 5 D-sorbitol, 6 D-mannitol, 7 D-glucose. (B) Column: ISA07/S2504 (25 cm×4 mm i.d.), column temp.: 78°C, mobile phase: 0.5 mol dm<sup>-3</sup> borate (pH 8.7), flow rate: 2.0 ml/min, peaks: 1 melizitose, 2 sedoheptulosan, 3 adonitol, 4 salicin

る各糖の検量線は 0.27 nmol/10 μl から 26.7 nmol/10 μl の範囲で原点を通る直線が得られた。又, 検出限界は 0.13 nmol/10 μl ( $S/N=3$ ) であった。なお, 再現性は D-ソルビトール 2.7 nmol/10 μl を 10 回繰り返し注入したときの相対標準偏差 1.1% で精度も良好であった。

**3.1.6 相対蛍光強度** Table 1 に D-グルコースを 100 として各糖の相対蛍光強度を示す。これより還元

Table 1 Relative fluorescence intensities for various carbohydrates

| Carbohydrate        | Relative fluorescence intensity | Carbohydrate             | Relative fluorescence intensity |
|---------------------|---------------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| D-Arabinose         | 62                              | N-Acetyl-D-glucosamine   | 78                              |
| D-Lyxose            | 83                              | N-Acetyl-D-galactosamine | 49                              |
| D-Ribose            | 38                              | 2-Deoxy-D-ribose         | 17                              |
| D-Xylose            | 128                             | 2-Deoxy-D-glucose        | 59                              |
| D-Fructose          | 113                             | L-Fucose                 | 39                              |
| D-Galactose         | 122                             | L-Rhamnose               | 58                              |
| D-Glucose           | 100                             | Dulcitol                 | 19                              |
| D-Mannose           | 83                              | Erythritol               | 5                               |
| L-Sorbose           | 141                             | Inositol                 | 31                              |
| Cellobiose          | 72                              | Mannitol                 | 28                              |
| Gentiobiose         | 121                             | Sorbitol                 | 42                              |
| Lactose             | 66                              | Xylitol                  | 7                               |
| Maltose             | 97                              | DL-Glyceraldehyde        | 2                               |
| Isomaltose          | 98                              | D-Glucuronolactone       | 3                               |
| α-Melibiose         | 94                              | α-Methyl-D-glucoside     | 2                               |
| Sucrose             | 11                              | Ascorbic acid            | 0                               |
| Trehalose           | 8                               | Glycerin                 | 0                               |
| Maltotriose         | 73                              | Ethylene glycol          | 0                               |
| Raffinose           | 9                               | Formaldehyde             | 0                               |
| Stachyose           | 24                              | Acetaldehyde             | 0                               |
| D-Glucosamine·HCl   | 18                              |                          |                                 |
| D-Galactosamine·HCl | 53                              |                          |                                 |
| D-Mannosamine·HCl   | 19                              |                          |                                 |

糖, 非還元糖及び糖アルコールなどの検出感度が既報<sup>6)</sup>に比べて大幅に増大したことが分かる。しかし非還元性オリゴ糖及びグリコシドの感度は本分析条件では不十分であったので, 更に発蛍光反応条件の検討を行った。

### 3.2 非還元性オリゴ糖及びグリコシドの分析

**3.2.1 励起及び蛍光スペクトル** 定量操作 2 によって発蛍光させたスクロース (0.5 μg/10 μl) の励起及び蛍光スペクトルを Fig. 6 に示す。これより励起極大 340 nm, 蛍光極大 434 nm であった。

**3.2.2 発蛍光試薬濃度の影響** 標準試料 α-メチル-D-グルコシド, スクロース, ラフィノース及びスタキオース (各 3.33 nmol/10 μl) を用い, 発蛍光試薬中のタウリン及びメタ過ヨウ素酸ナトリウム濃度と蛍光強度の関係を Fig. 7 に示す。タウリン濃度は 40 mol m<sup>-3</sup> から 160 mol m<sup>-3</sup> の範囲で検討したところ, 100 mol m<sup>-3</sup> が最大であった。又, メタ過ヨウ素酸ナトリウム濃度は 4 mol m<sup>-3</sup> から 8 mol m<sup>-3</sup> の範囲で検討したところ, 5 mol m<sup>-3</sup> 以上ではほぼ一定値を示した。しかし 7 mol m<sup>-3</sup> 以上ではベースラインに若干の乱れを生じたので, 本法では 6 mol m<sup>-3</sup> を用いた。

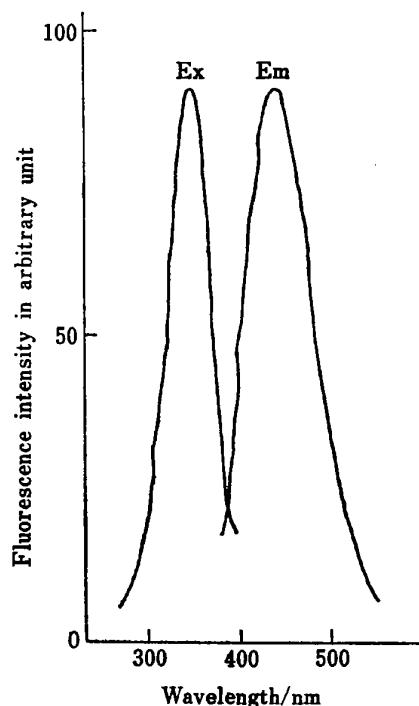


Fig. 6 Excitation and emission spectra for sucrose

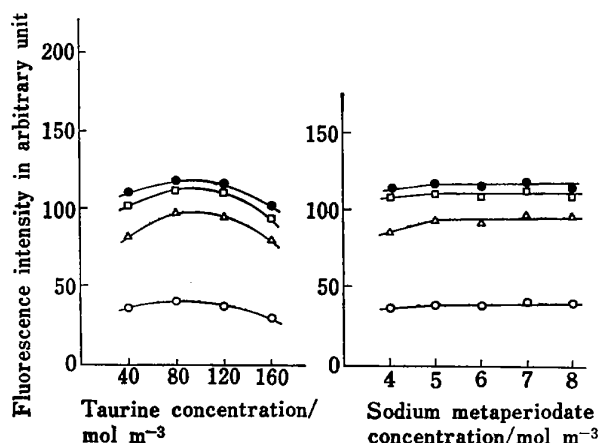


Fig. 7 Effects of taurine and sodium metaperiodate concentrations

○ :  $\alpha$ -methyl-D-glucoside,  $\triangle$  : sucrose,  $\bullet$  : raffinose,  $\square$  : stachyose

**3.2.3 発蛍光反応の pH 及び温度の影響** 発蛍光反応における pH 及び反応温度と蛍光強度の関係を Fig. 8 に示す. pH は 6.0 から 8.0 の範囲で検討したところ, 7.5 から徐々に蛍光強度は減少したので, 本法ではほぼ中性の 6.8 を用いた. 又, 反応温度は  $130^{\circ}\text{C}$  が最大となり, 更に温度を高くすると蛍光強度の減少とベースラインの乱れを生じた.

**3.2.4 標準試料の分析** 定量操作 2 によって日立ゲル 3013 N カラムを用いて分離した  $\alpha$ -メチル-D-グルコシド, スクロース, ラフィノース及びスタキオース (各

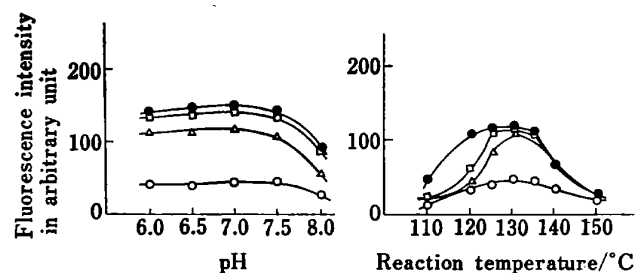


Fig. 8 Effects of pH and reaction temperature

○ :  $\alpha$ -methyl-D-glucoside,  $\triangle$  : sucrose,  $\bullet$  : raffinose,  $\square$  : stachyose

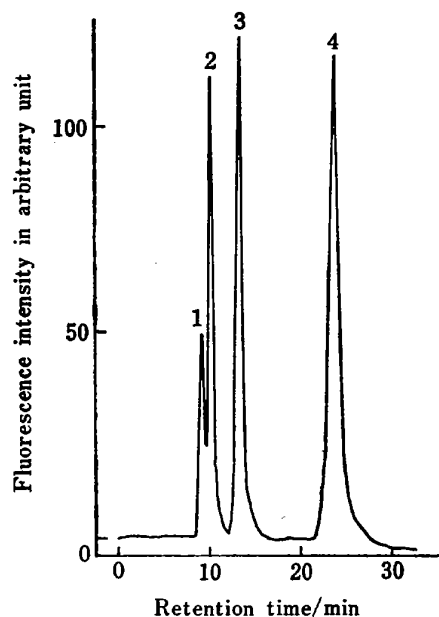


Fig. 9 Chromatogram of standard samples

Column : Hitachi gel 3013N (25 cm $\times$ 6 mm i. d.), column temp. :  $78^{\circ}\text{C}$ , mobile phase : 0.1 mol dm $^{-3}$  borate (pH 7), flow rate : 1.3 ml/min, peaks : 1  $\alpha$ -methyl-D-glucoside, 2 sucrose, 3 raffinose, 4 stachyose

3.33 nmol/10  $\mu\text{l}$ ) のクロマトグラムを Fig. 9 に示す.

又,  $\alpha, \beta, \gamma$ -シクロデキストリン (0.84 nmol/10  $\mu\text{l}$ ) のクロマトグラムを Fig. 10 に示す.

**3.2.5 検量線及び検出限界** Fig. 9 における 4 種類の糖の検量線は, 0.1 nmol/10  $\mu\text{l}$  から 75 nmol/10  $\mu\text{l}$  の幅広い範囲で原点を通る直線が得られ, その検出限界は  $\alpha$ -メチル-D-グルコシドが 60 pmol/10  $\mu\text{l}$ , スクロース, ラフィノース及びスタキオースが 30 pmol/10  $\mu\text{l}$  であった. 又,  $\alpha, \beta, \gamma$ -シクロデキストリンの検出限界は 80 pmol/10  $\mu\text{l}$  である. なお, 再現性はいずれも良好であった.

**3.2.6 相対蛍光強度** Table 2 に  $\alpha$ -メチル-D-グル

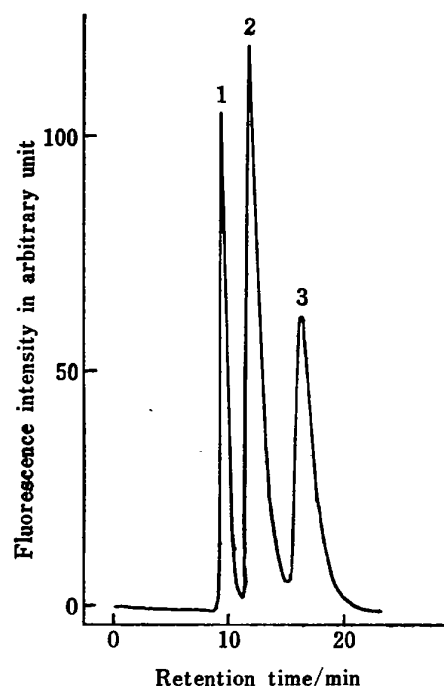


Fig. 10 Chromatogram of standard samples

Column: Hitachi gel 3013N (25 cm×4.6 mm i. d.), column temp.: 30°C, mobile phase: 0.1 mol dm<sup>-3</sup> borate (pH 7), flow rate: 1.3 ml/min, peaks: 1 α-cyclodextrin, 2 γ-cyclodextrin, 3 β-cyclodextrin

Table 2 Relative fluorescence intensities for various carbohydrates

| Carbohydrate           | Relative fluorescence intensity |
|------------------------|---------------------------------|
| α-Methyl-D-glucoside   | 100                             |
| β-Methyl-D-glucoside   | 63.6                            |
| α-Methyl-D-galactoside | 136                             |
| β-Methyl-D-galactoside | 72.0                            |
| α-Phenyl-D-glucoside   | 89.2                            |
| β-Phenyl-D-glucoside   | 58.4                            |
| Salicin                | 117                             |
| D(+)-Trehalose         | 208                             |
| Sucrose                | 245                             |
| Melezitose             | 381                             |
| Raffinose              | 538                             |
| Stachyose              | 847                             |
| α-Cyclodextrin         | 74.0                            |
| β-Cyclodextrin         | 149                             |
| γ-Cyclodextrin         | 322                             |

コシドを 100 として, 各種グリコシド及び非還元性オリゴ糖の相対蛍光強度を示す。これよりグリコシドでは β 置換体より α 置換体のほうが蛍光強度が大きい。又, 非還元性オリゴ糖では糖鎖が長くなるに従い強度の増大が見られた。

**3.2.7 実試料の分析** 定量操作 2 の応用として, 原

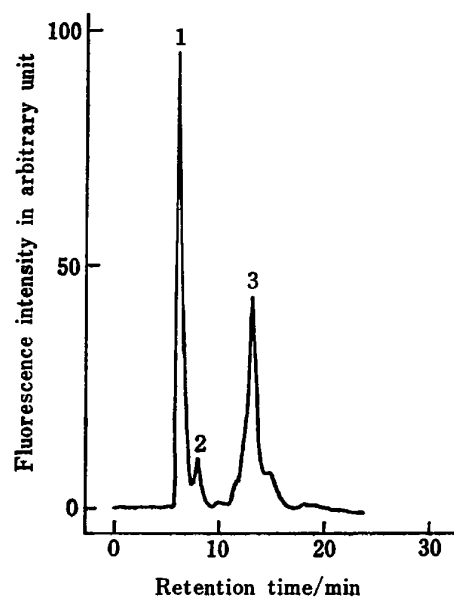


Fig. 11 Chromatogram of soybean milk

Column: Hitachi gel 3013N (25 cm×4.6 mm i. d.), column temp.: 78°C, mobile phase: 0.1 mol dm<sup>-3</sup> borate (pH 7), flow rate: 1.8 ml/min, peaks: 1 sucrose, 2 raffinose, 3 stachyose

豆乳を分析したクロマトグラムを Fig. 11 に示す。これよりスクロース, ラフィノース及びスタキオースのピークが観察された。原豆乳成分ピークの同定は, 原豆乳に標準試料を添加して, 保持時間の一致とピーク高さの増大より行った。

以上, 従来の過ヨウ素酸酸化と発色反応の組み合わせによる糖の検出法は操作上煩雑であるが, 1 種類の試液で発色する本分析法は簡便迅速である。本法のタウリン-メタ過ヨウ素酸ナトリウム試液は室温で長時間安定である。特に定量操作 1 では還元糖, 非還元糖及び糖アルコールなどが高感度に検出されるが, グリコシドや非還元性オリゴ糖の検出感度は低い。しかし定量操作 2 を用いればこの問題点は解決される。それゆえ定量操作 1 及び 2 を適宜使用することにより糖類一般の分析が可能となり種々の分野でその応用が期待される。

## 文 献

- 1) T. Kato, T. Kinoshita: *Anal. Biochem.*, **106**, 238 (1980).
- 2) S. Honda, Y. Matsuda, M. Takahashi, K. Kakehi, S. Ganno: *Anal. Chem.*, **52**, 1079 (1980).
- 3) S. Honda, M. Takahashi, K. Kakehi, S. Ganno: *Anal. Biochem.*, **113**, 130 (1981).
- 4) H. Mikami, Y. Ishida: *Bunseki Kagaku*, **32**, E207 (1983).

- 5) T. D. Schlach, J. Robinson : *J. Chromatogr.*, **282**, 169 (1983).
- 6) 加藤武彦, 飯沼文夫, 木下俊夫 : 日化, **1982**, 1603.
- 7) K. Mopper : *Anal. Chem.*, **52**, 2018 (1980).
- 8) S. Honda, K. Kakehi : *J. Chromatogr.*, **152**, 405 (1978).

☆

**Fluorometry of saccharides by HPLC using taurine-periodate reagent.** Takehiko KATO and Toshio KINOSHITA (School of Pharmaceutical Science, Kitasato University, 5-9-1, Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108)

A highly sensitive method for fluorometric detection and determination of reducing and nonreducing saccharides by HPLC was developed using taurine-periodate reagent by heating in a neutral solution. Moreover, nonreducing oligosaccharides and glycosides gave enhanced fluorescence under a mild optimum condition. The mixture of reducing and nonreducing saccharides was separated with  $0.5\sim 0.7$  mol dm<sup>-3</sup> borate (pH 8.7) as mobile phase through an anion exchange Aminex A-27 or ISA07/S2504 column. The eluate was added with 640 mol m<sup>-3</sup> taurine-2 mol m<sup>-3</sup> sodium metaperiodate solution and heated at 140°C and the fluorescence intensity was measured with a detector. Standard

curves for reducing and nonreducing saccharides were linear in the range from 0.27 nmol/10 μl to 26.7 nmol/10 μl. Detection limit ( $S/N=3$ ) of D-sorbitol was 0.13 nmol/10 μl. On the other hand, the separation of nonreducing oligosaccharides and glycosides was carried out with 0.1 mol dm<sup>-3</sup> borate (pH 7) as mobile phase on a Hitachi gel 3013N column. The postcolumn fluorescence reagent consisted of 100 mol m<sup>-3</sup> taurine-6 mol m<sup>-3</sup> sodium metaperiodate (pH 6.8 with K<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>) was added. After mixing, the eluate was heated at 130°C to give fluorescence. Standard curves for α-methyl-D-glucoside, sucrose, raffinose and stachyose were linear in the wide range from 0.1 nmol/10 μl to 75 nmol/10 μl. Detection limit of α-methyl-D-glucoside was 60 pmol/10 μl and those of sucrose, raffinose and stachyose 30 pmol/10 μl. The relative fluorescence intensities of these saccharides increased with the increase in the length of an oligosaccharide chain.

(Received May 21, 1986)

### Keyword phrases

fluorometric detection and determination of reducing and nonreducing saccharides; HPLC; taurine-periodate reagent; nonreducing oligosaccharides and glycoside.