

HPLC/APCI-MSを用いた糖類の分析

Analytical Studies of Monosaccharide with HPLC/APCI-MS

高井信治*・玉井美紀*・金沢秀子**・内山秀文*
Nobuharu TAKAI, Miki TAMAI, Hideko KANAZAWA and Hidefumi UCHIYAMA

脂質、糖質およびタンパク質は、生物体の主要構成物質として知られている。これらの物質は分子量が大きくそれぞれ、より小さな分子の組み合わせによって多種多様な機能を持っている。たとえばタンパク質は、限られた数のアミノ酸から成っているが、その配列の仕方により無限に近い異なった性質のタンパク質として存在している。

糖質は、より少ない限られた数の単糖類の組み合わせであるが、タンパク質ほど系統的に研究されておらず、タンパク質と比較して、不明な部分が多い。

この最も大きな理由の一つとして、タンパク質は、1950年代にすでにアミノ酸分析計が、自動化され、タンパク質の構成アミノ酸が特殊なテクニックを用いなくても世界中でほぼ同じデータが得られることに基因する。

その後、エドマン法が開発され、タンパク質、ペプチドのアミノ酸配列を明らかにする方法が発明され、これを基に、再構築の方法も併せて開発されて、ペプチド合成が行われるようになった。

その後遺伝子組換えや、DNAを用いた転写の技術により、新しいタンパク質やペプチドが作られるようになったが、アミノ酸分析の重要度は変わらない。

しかし、糖質については、タンパク質と比較して、分析の自動化は進んでいないと考えられる。古くから単糖類混合物の分析には、イオン交換樹脂を用いた、液体クロマトグラフィーが行われているが、他の物質のような特異性を持つ高感度検出器は少ない。またプレラベル法やポストラベル法についても、極微量の検出は、むずかしい。さらに、ガスクロマトグラフィーを用いる方法は、一般に前処理を必要とする。

そこで、特別な前処理をしないうで、高感度に単糖類を分離分析する方法として、LC/MSの検討を行った。LC

は、通常のHPLCのシステムを用いMSは、イオン化にコロナ放電を使用するAPCI-MS (日立M-1000)を用いたところ、ngオーダで分離定量のできる事が明らかとなった。また今までに得られなかった構造情報などについても新たな知見を得ることができた。

実 験

この実験に使用したMSは、日立M-1000である。HPLCは、同様に日立L-6000と検出器は日立L-4200、カラムは日立ゲル3056# (4φ×150mm)を使用した。単糖類には、Glucose, Fructose, L(-)-Sorbitose, Galactose, D(+)-Mannose (いずれも和光純薬)を選んだ。2単糖にはSucrose, Lactose (和光純薬製)を使用した。

HPLCの溶離液はCH₃CN/H₂O (60:40)、流速は1 ml/minに固定して測定した。MSの条件は、Vaporization temp. 240°C, Drift voltage 110Vに固定して行った。装置の概要を図1に示す。

結 果

この研究で、いくつかの興味ある現象を見ることができた。

まず、試料に使用したすべての単糖類および蔗糖、乳糖は、このHPLC/APCI-MSで、検出することができ

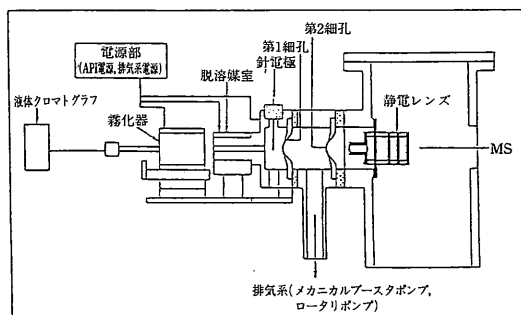


図1 LC/APCI-MSの概略図

*東京大学生産技術研究所 第4部

**共立薬科大学

研究 速 報

GLUCOSE
SAMPLE NO.: 981 SCAN NO.: 8 * 10-6 TIME(MIN): 0.2

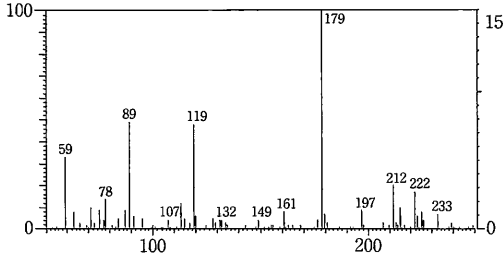


図 2

D(+)-MANNOSE
SAMPLE NO.: 1011 SCAN NO.: 6 * 8-4 TIME(MIN): 0.2

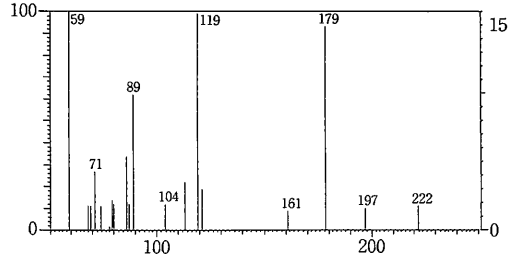


図 6

FLUCTOSE
SAMPLE NO.: 983 SCAN NO.: 8 * 10-6 TIME(MIN): 0.2

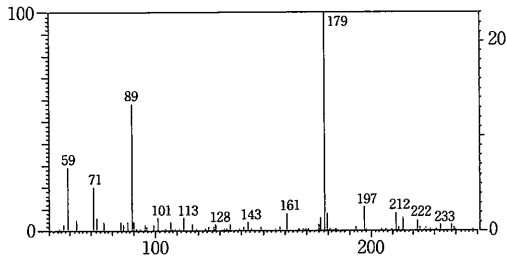


図 3

LACTOSE
SAMPLE NO.: 982 SCAN NO.: 7 * 9-4 TIME(MIN): 0.2

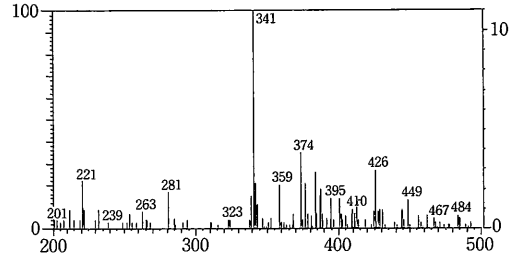


図 7

L-SORBOSE
SAMPLE NO.: 1009 SCAN NO.: 6 * 8-4 TIME(MIN): 0.2

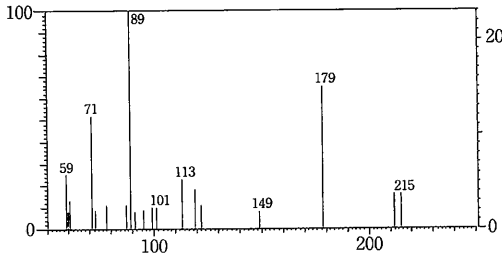


図 4

SACCHAROSE
SAMPLE NO.: 984 SCAN NO.: 8 * 10-5 TIME(MIN): 0.2

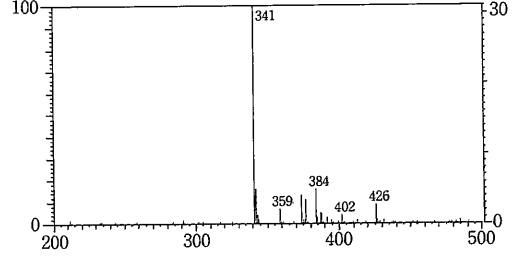


図 8

GALACTOSE
SAMPLE NO.: 1010 SCAN NO.: 6 * 8-4 TIME(MIN): 0.2

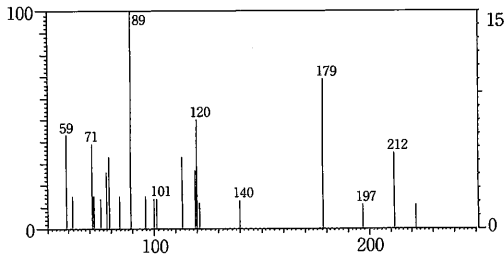


図 5

GLUCOSE FLUCTOSE
SAMPLE NO.: 1040 SCAN NO.: 7 * 9-5 TIME(MIN): 0.2

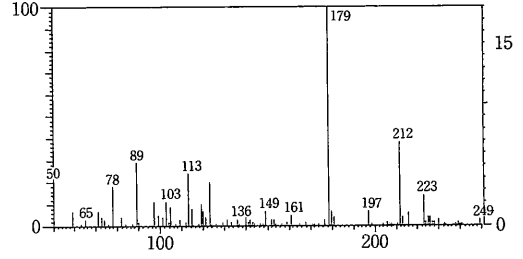


図 9



研 究 速 報

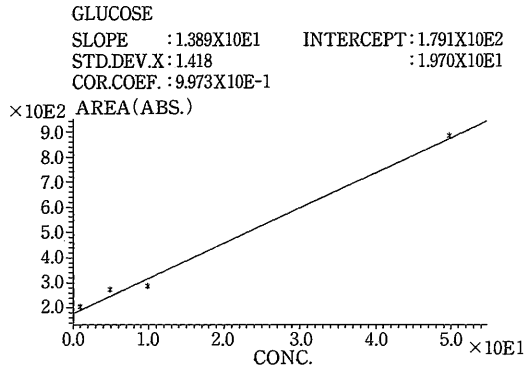


図10

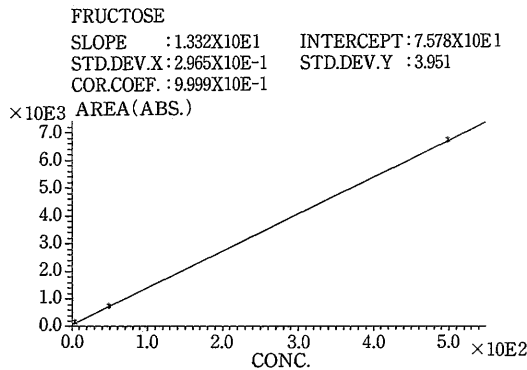


図11

た。結果を図2～図6に示す。

また、単糖類とのちがいをみる目的で使用した、蔗糖および乳糖の結果を図7～図8に示す。

この結果から、単糖類、と蔗糖、乳糖について、それぞれ、分子量を正確に得ることができた。したがって、単糖類は、すべて親ピークのマスナンバーは同じであり、蔗糖と乳糖の親ピークマスナンバーも同じであった。しかし、興味あることに、親ピークのマスナンバーは、同一でも、おのおのの単糖類のフラグメントは、それぞれ少しずつ異なり、この結果に関する限り区別できることが明らかとなった。

このことは、将来単糖類を区別して認識できる可能性を含んでいるので、今後もう少し詳細に検討して行きたい。

また、単糖類の混合物についても検討を行ったが、図9のMSデータから、おのおのの成分の定性、定量をすぐ

行うことは困難で、将来、パターン認識により数学的に解析をすれば、可能性が出てくるものと思われる。

したがって、アミノ酸等に比較して、単量体の種類も少ないので現在はHPLCで完全に、分離するのが最も良い方法と考えられる。

検出限界および定量性をglucoseおよびFructoseについて検討を行った結果を図10～図11に示す。両者共良い直線性を示し、検出限界は、この実験では3 ng～5 ngであった。溶媒系を工夫すれば、さらに高感度に検出できるものと考えられる。

(1991年8月5日受理)

参 考 文 献

- 1) G. O. Aspinall (Editor), The polysaccharides, Academic Press New York Vol 1-3, 1982-1984
- 2) H. Bjorndal, B. Lindberg and S. Svensson Carbohydr Res., 5 (1987) 433
- 3) S. Honda, S. Suzuki, M. Takahashi; and Ganno Anal, Biochem, 281 (1983) 340
- 4) D. Garozzo, M. Giuffrida, G. Impallomeni, A. Ballistreri, and G. Montaudo, Anal, chem, 62 (1990) 279
- 5) M. A. Moseley, L. J. Deterding, J. S. M de Wit, B. Tomer, R. T. Kennedy, N. Bragg and J.W. Jorgenson. Anal, chem, 61 (1989) 1577
- 6) J. Deutsch J. org, Mass spectrom 15 (1980) 240
- 7) M. L. Coates and C. L. Wilkins Anal, chem 22 (1987) 6
- 8) C. Fenselau, D. J. Liberato J. A. Yergey R. J. Cotter and A. L. Yergey, Anal, chem. 56 (1984) 2759
- 9) M. Sakairi and H. Kambara Anal. chem. 61 (1981) 1159
- 10) Y. Kato, S. Takahashi, H. Hirose, M. Sakairi and H. Kambara, Biomed, Environ, Mass Spectrom, 16 (1988) 331
- 11) M.M. Bursley, C.E. Parker, R. W. Swit and S. J. Gaskell, Anal. chem. 57 (1985) 2597
- 12) H. Budzikiewicz, Mass spectrom. Rev. 5 (1986) 345
- 13) T. R. Covey, A.P. Bruins and J. D. Henion, Anal. chem., 58 (1986) 1451A
- 14) H. P. Tannenbaum, J. D. Roberts and R. C. Dougherty, Anal. chem., 47 (1975) 49
- 15) J. Hine, J. Am. chem Soc., 72 (1950) 2438
- 16) W. V. E. Doering, J. Am chem. Soc 73 (1954) 6162
- 17) K. J. Light, D. B. Kassel and J. Allison. Biomed. Environ. Mass spectrom 18 (1989) 177
- 18) E. C. Horning, M. G. Horning, D. I. Carroll and R. N. Stillwell Anal. chem 45 (1973) 936
- 19) Y. Kato, Y. Numajiri, J. chromatog. 562 (1991) 81