

TSK—GEL LS—450 NH₂の高速液体クロマト グラフィによる糖類の分離への応用

栗 原 幸 忠
佐 藤 孝 孝
海 野 益 郎

Application of TSK—GEL LS—450 NH₂ to the Separation of Saccharides by High Performance Liquid Chromatography

Yukitada KURIHARA
Takashi SATOH
Masuo UMINO

The elution behaviors of saccharides on TSK—GEL LS—450 NH₂ were studied by high performance adsorption-partition chromatography. The gel obtained by introducing propylamine to the surface of silica gel exhibited higher adsorptivity to saccharides than TSK—GEL LS—170 STARCH. The effects of water-miscible organic solvents as well as their concentration on the elution volume of saccharides are discussed and the applications of this gel to the separation of sugar syrup, crude stevioside, and alcohols are described.

1. はじめに

糖の分析手段として薄層クロマトグラフィ (TLC)¹⁾, ガスクロマトグラフィ (GC), そして高速液体クロマトグラフィ (HPLC) が汎用されているが, 水溶性である糖の分離法としては, 迅速性, 前処理の容易さ, そして試料負荷量の優位性等の点から, さらに, 充てん剤^{2)~8)}, 検出方法^{9)~13)}の進歩も相俟って, HPLC が適した方法と思われる。HPLC における糖類の分離モードには, 分子サイズで分離するゲル浸透クロマトグラフィ¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾, ホウ酸緩衝液系でのイオン交換クロマトグラフィ法²⁾³⁾⁴⁾, そして, 充てん剤との分配及び吸着により分離する分配吸着クロマトグラフィ法^{6)~8)17)~21)}等があげられる。分配吸着クロマトグラフィ法用充てん剤として使用されている TSK—GEL LS—170 STARCH は, 担体がでんぷんであるために糖の保持力の点では優れているが, 溶離液組成の変化による膨潤, 収縮性の点で使いにくい面もあり, より高性能の充てん剤の開発を必要としていた。

新しいタイプの充てんの開発が行なわれた。シリカ

ゲルにプロピルアミノ基を導入した化学結合型充てん剤⁶⁾⁸⁾ TSK—GEL LS—450 NH₂ である。LS—450 NH₂ は, 担体がシリカゲルであるために, 溶離液組成の変化による膨潤, 収縮による体積変化がほとんど認められなく, 糖の保持力の点でも期待できる充てん剤である⁶⁾⁸⁾¹⁹⁾²¹⁾。今回単糖類を中心にして LS—450 NH₂ の糖類への応用性について検討を行なったので報告する。

2. TSK—GEL LS—450 NH₂ について

主に分配吸着による糖の分離に用いられてきた充てん剤には大別して, シリカゲルを中心とした無機系充てん剤, 架橋デキストラン等ででんぷん系充てん剤, そして, 主としてスチレン系イオン交換樹脂¹⁸⁾¹⁹⁾があるが, 高速化の時代の到来とともに糖の保持力に優れ, 高圧に耐え得る膨潤収縮による体積変化のない充てん剤が要求されるようになってきた。シリカゲルは, それ自体では糖の保持力の点で, イオン交換樹脂は, 膨潤収縮による体積変化及び対イオンの安定性等の点で不満である。カチオン交換樹脂を用いた場合, その対イオンの種類により糖の溶出挙動が変化することが知られており¹⁹⁾²⁰⁾, さらに

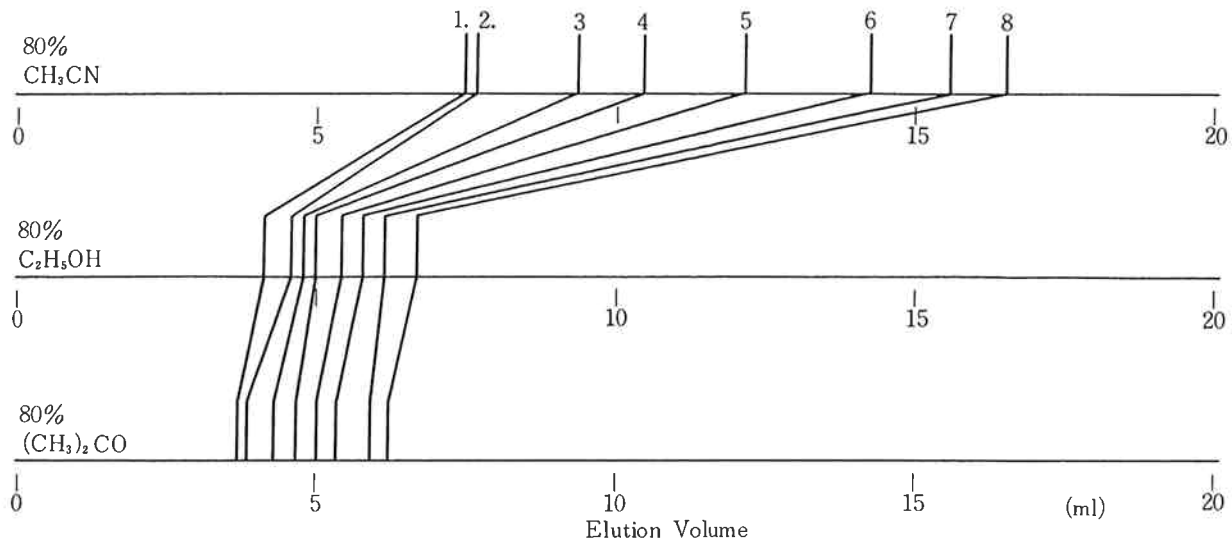


Fig. 1 Influence of water soluble organic solvents on elution volume of mono saccharides
column: TSK-GEL LS-450 NH_2 (4 mm. d. \times 30 cm),
sample: 1 : Rhamnose, 2 : Ribose, 3 : Xylose, 4 : Arabinose, 5 : Fructose,
6 : Mannose, 7 : Glucose, 8 : Galactose

シリカゲルを用いて溶離液にアミン類を添加することにより糖が強く保持されるようになる²¹⁾ことも明らかとなっている。従ってシリカゲルに種々の官能基を導入することにより糖への保持力を強めることが可能と思われる。一般に、プロピルアミノ基を結合した報告が多いが、その結合量と保持力との関係についても研究されている⁹⁾。従って、種々の孔径、あるいは、表面状態を持つシリカゲルにプロピルアミノ基を導入して検討した結果、TSK-GEL G 2000 SW に使用しているシリカに化学結合したものが、保持力、及び、理論段数においても良好な結果が得られた。この化学結合型シリカ (LS-450 NH_2) についての検討結果を報告する。

3. 実 験

〔1〕 装置 東洋曹達工業製高速液体クロマトグラフ HLC-803 A に同社製示差屈折計 RI-8 を接続した。

〔2〕 試薬 糖類は主に東京化成製を水溶性有機溶媒は和光純薬製特級品を用いた。

〔3〕 充てん剤 ステンレス管 (4 mm. d. \times 30 cm, 4 mm. d. \times 60 cm) にスラリー法にて充てんした。TSK-GEL LS-450 NH_2 をメタノールにて3回以上洗浄後スラリー濃度が15%になるように調製後、流速 4 ml/min. にて充てんを行なった。検定はベンゼンで行ない理論段数 6,000 TP/30 cm のものを実験に使用した。

〔4〕 試料の調製 糖類は 1 mg/ml となるように溶離液に溶解して用いた。糖類が溶離液に溶解しない場合は、できるだけ少量の水を加えて溶解した。試料溶解液の水の濃度が高くなる程、ピークブロードになる傾向が

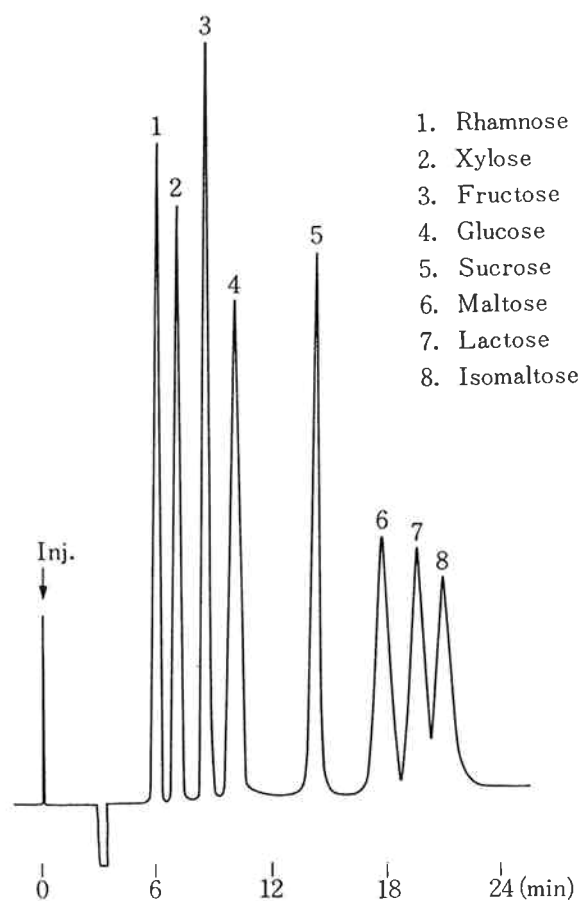


Fig. 2 Separation of mono-, di-saccharides with acetonitrile

mobile phase: 75% acetonitrile in water, column: LS-450 NH_2 (4 mm. d. \times 30 cm), flow rate: 1 ml/min, detector: differential refractometer (RI-8), 32×10^{-8} RIU, sample size: 50 μg

あるので注意が必要である。

4. 実験結果及び考察

(1) 水溶性有機溶媒の選択

水溶性である糖の水への溶解度は水溶性有機溶媒の添加により小さくなるが、添加する有機溶媒の濃度及び種類により溶解度は変化すると思われる。すなわち充てん剤との作用も変化することが期待できる。従って、アセトニトリル、エタノール、そして、アセトンについて検討を行なった。同一濃度での糖の保持容量に及ぼす各溶媒の影響を示したのが Fig. 1 である。溶離液の選択は、分離に及ぼす要因(粘度、保持力)のみならず検出方法との関係も考慮する必要がある。示差屈折計を用いる場合は、屈折率が糖の屈折率と差がある程有利であり、UV 検出器を用いる場合は¹²⁾、低波長まで使用できる溶媒が必要であり、反応型を用いる場合は、反応系の妨害にならず、かつ、ノイズレベルの小さくなる溶媒を選ぶべきであろう。Fig. 1 より明らかなように、アセトニトリルを使用した場合の方が、各糖類が強く保持されており分離の点で有利と思われる。さらにアセトニトリルは屈折率及び低波長での透過率の点で良好であり、粘度が低い点も考慮すると糖の分配吸着クロマトグラフ法に適した溶媒と思われる。アセトニトリルが75%の時の測定結果

を Fig. 2 に、エタノールが90%の時の測定結果を Fig. 3 に示す。図から明らかなように、単糖類、二糖類の短

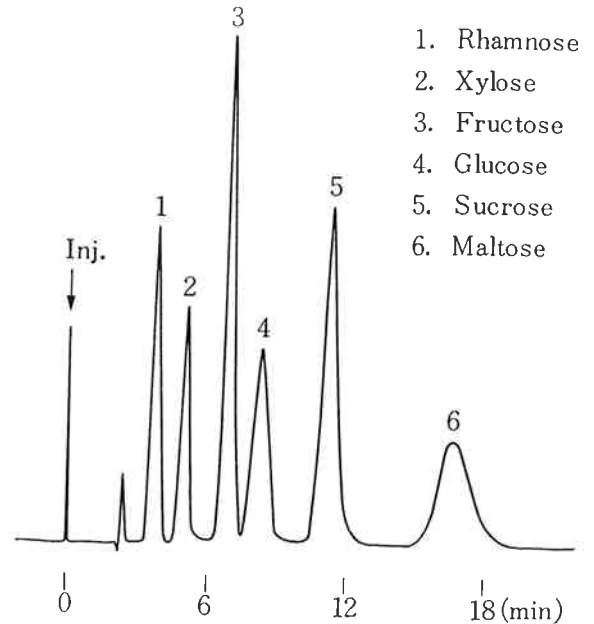


Fig. 3 Separation of mono-, di-saccharides with ethylalcohol
mobile phase: 90% ethylalcohol in water, column: LS-450 NH₂ (4 mmi. d. × 30 cm), flow rate: 1 ml/min, detector: RI-8, 16 × 10⁻⁸ RIU sample size: 25 μg

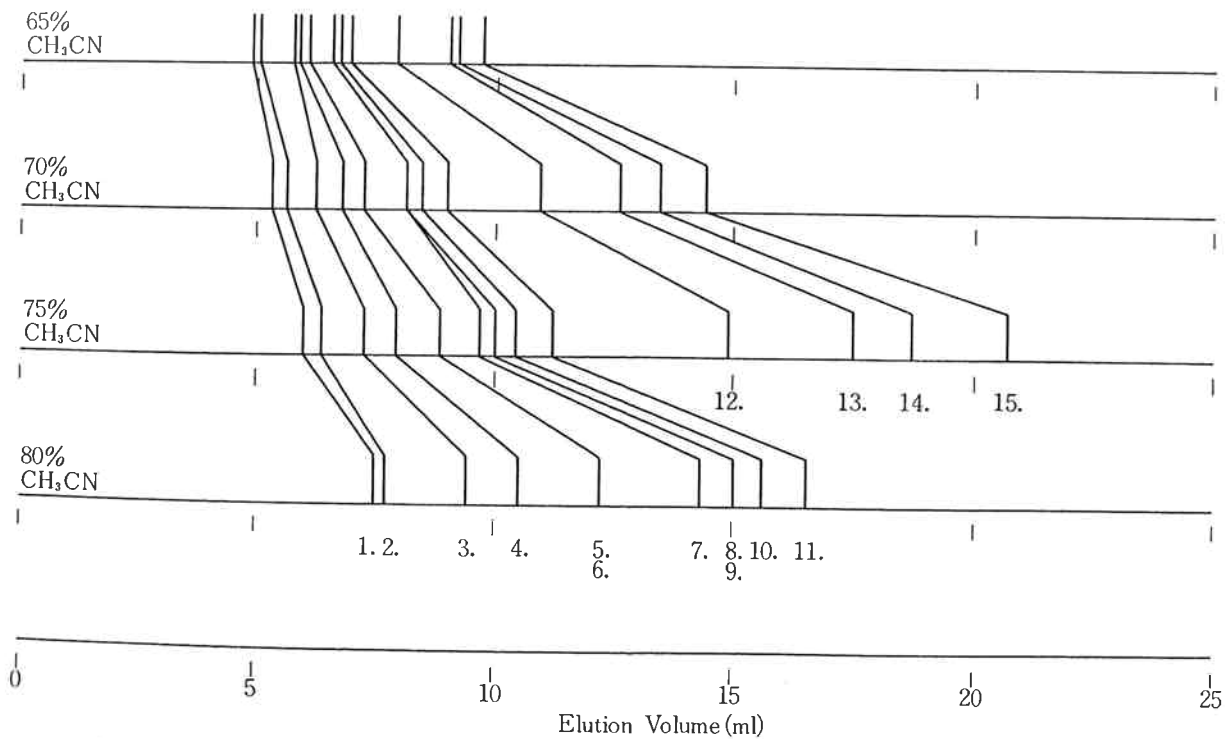


Fig. 4 Influence of acetonitrile concentration on elution volume of mono-, di-saccharides
column: LS-450 NH₂ (4 mmi. d. × 30 cm), sample: 1 : Rhamnose, 2 : Ribose, 3 : Xylose, 4 : Arabinose, 5 : Fructose, 6 : Sorbose, 7 : Mannose, 8 : Sorbitol, 9 : Mannitol, 10 : Glucose, 11 : Galactose, 12 : Sucrose, 13 : Inositol, 14 : Maltose, 15 : Lactose

時間での分離にはアセトニトリルが適していると思われる。アセトニトリルの場合、水の濃度が25%と高いためにさらに炭素数の少ない単糖類の相互分離についても期待できると思われる。すなわち水の濃度の高い条件で糖を強く保持させるような溶媒の方が、適応範囲が広いと言える。さらに糖を強く保持できる充てん剤が開発されるならば、試料負荷量の点から、分析用としてのみならず分取用充てん剤としても期待できると思われる。今回は、テトラヒドロフランについては、詳細に検討を行な

っていないが、エタノール及びアセトンと同様な傾向を示していた。しかし、テトラヒドロフランは、LS-450 NH₂ のようなアミノ基を持つ充てん剤に対してシッフ塩基結合を生じる酸性物質を含有していることが考えられるために、充てん剤の保持力の低下²¹⁾について考慮する必要があると思われる。

[2] 試料溶解液の水濃度の影響

糖の溶出容量に及ぼすアセトニトリル濃度の影響を Fig. 4 に示した。単糖類と二糖類の混合試料の場合、単

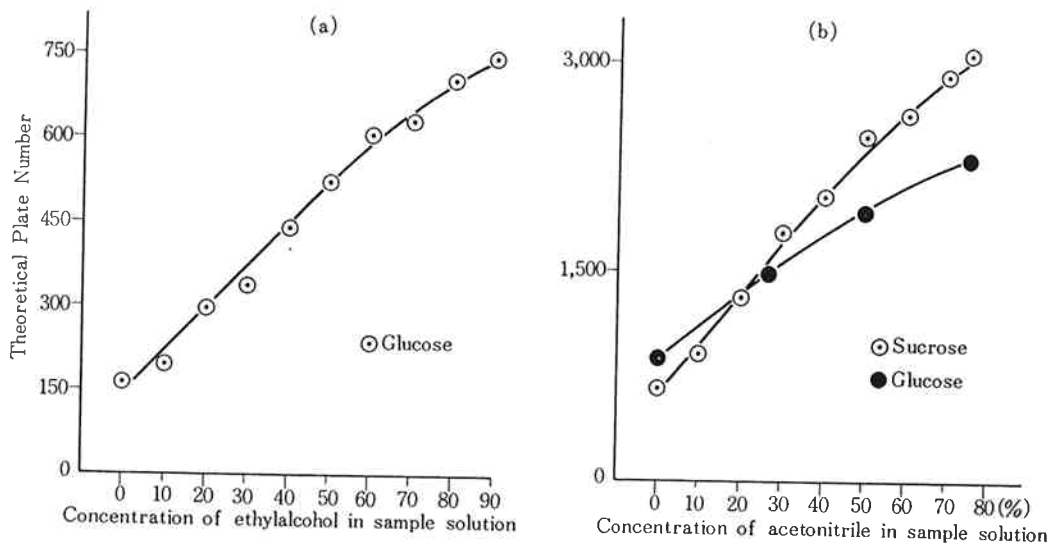


Fig. 5 Influence of organic solvent concentration of sample solution on Theoretical Plate Number of Glucose or Sucrose

mobile phase: (a)90% ethylalcohol in water; (b)75% acetonitrile in water, column: LS-450 NH₂ (4 mm i. d. × 30 cm), sample; ○ : Glucose, ● : Sucrose

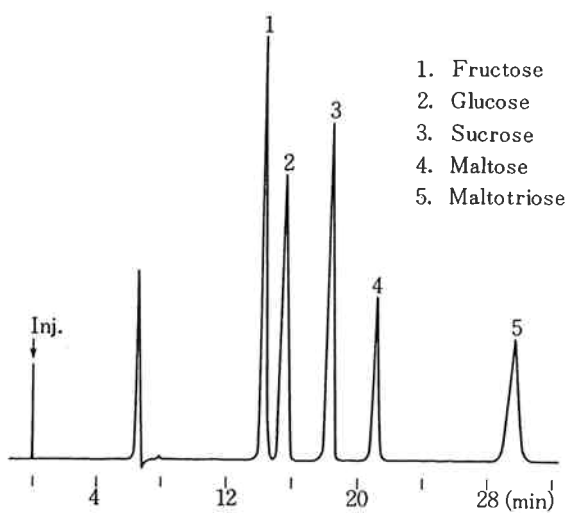


Fig. 6 Separation of mono-, di- and tri-saccharides mobile phase: 65% acetonitrile in water, column: LS-450 NH₂ (7.5 mm. d. × 30 cm), flow rate: 1.5 ml/min, detector: R 1-8, 32 × 10⁻⁸ RIU, sample size: 50 μg

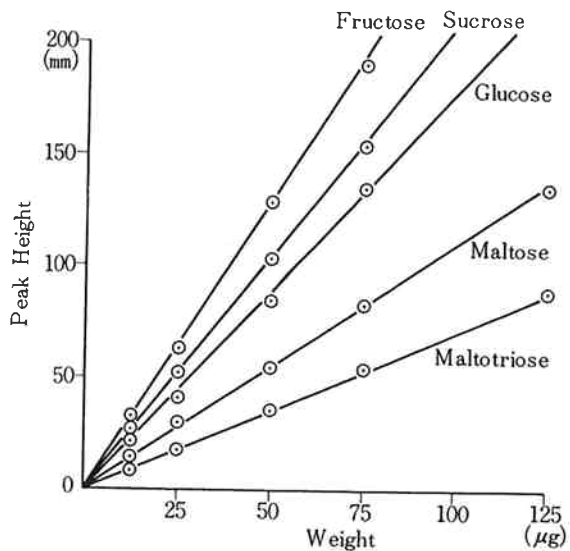


Fig. 7 Calibration curves of saccharides mobile phase: 65% acetonitrile in water, column: LS-450 NH₂ (7.5 mm. d. × 30 cm), detector: RI-8, 32 × 10⁻⁸ RIU

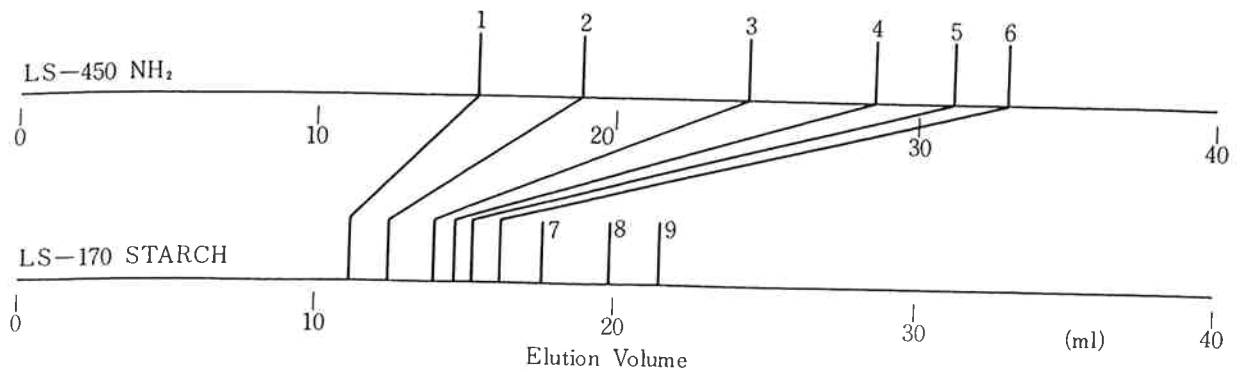


Fig. 8 Comparison of retention volume of mono, di-saccharides between LS-450 NH₂ and LS-170 STARCH mobile phase: 80% acetonitrile in water, column size: 4 mm. d. × 60 cm, sample; 1 : Ribose, 2 : Xylose, 3 : Fructose, 4 : Mannose, 5 : Glucose, 6 : Galactose, 7 : Sucrose, 8 : Maltose, 9 : Lactose

糖類を分離する条件においては、二糖類の溶出容量が大きくなるためにピークが低くなり、検出感度の点で考慮する必要がある。反応型を用いる場合、溶離液組成を変化させるグラジエント溶出法の適応により溶出位置の調整が、すなわち、ピークを高くできるが、RI 検出器の場合、グラジエント溶出法の適応が困難であるために、試料濃度を高くする必要がある。試料が溶離液に溶解しない場合、水を加えるが、この際、溶解液の水の濃度と溶離液の水の濃度に差が生じるが、その影響について検討した結果が Fig. 5 である。ピーク形状が、試料溶解液の水の濃度の影響を受けている点、試料の調整については注意が必要である。すなわち、特に試料が水溶液の場合、有機溶媒を加えて溶離液に近づけることは、検出感度の点だけでなく、分離においても重要な問題と考えられる。Fig. 6 に、単糖、二糖、そして、三糖類の測定例を Fig. 7 に同条件で得られる検量線を示した。

〔3〕 実試料への応用

LS-450 NH₂ は、開発されて日が浅いため実試料への応用例が少ない。従って、現在市販され、データの蓄積も多いでんぶん系充てん剤 (LS-170) との比較を行なった。アセトニトリルを用いて、糖類の溶出挙動について比較を行なった結果が Fig. 8 である。図から明らかなように、糖の保持力において優れており、他の点を考慮すると、良好な分配吸着クロマトグラフ用充てん剤と思われる。従って、実試料についても検討を行なった。粗ステビオサイドの測定例を Fig. 9 に、Fig. 10 にシロップの測定例を示す。参考のために、ゲル浸透クロマトグラフ法によるシロップの測定例を Fig. 11 に示した。分離モードの違いにより異なる情報が得られることは、よく経験することである。特に高分子側のパターン認識においては、ゲル浸透クロマトグラフ法が優れていると思われる。反応型 (オルソノール・硫酸法) を用いて酒類

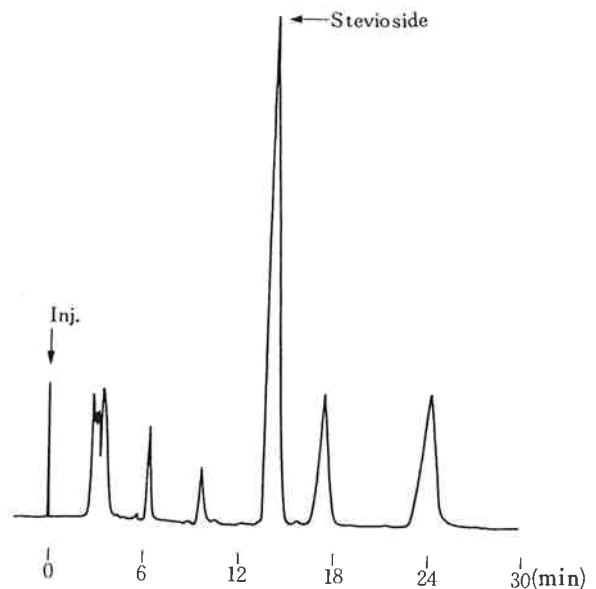


Fig. 9 Application of LS-450 NH₂ to crude stevioside mobile phase: 80% acetonitrile in water, column size: 4 mm. d. × 30 cm, detector: RI-8, 32 × 10⁻⁸ RIU, sample size: 100 μg

を測定した結果を Fig. 12 に示す。検出方法を変えることにより、グラジエント溶出法が可能となる点、オリゴ糖の測定には有利と思われる。

〔4〕 結語

糖類の分配吸着クロマトグラフィにおいては、今回検討したプロピルアミン化学結合型他種々の方法が報告されているが、化学結合型 HPLC 充填剤作成に適するよう設計されているシリカゲルに、10%以上の多量のプロピルアミンを導入することにより、良好な分離を得ることができた。又、ポーラスポリマー型のデンプン系充填剤 (TSK-GEL LS-170) に比較し、膨潤収縮も少なく、pH 範囲に制限 (pH 2~9) があるとは言え、糖類の

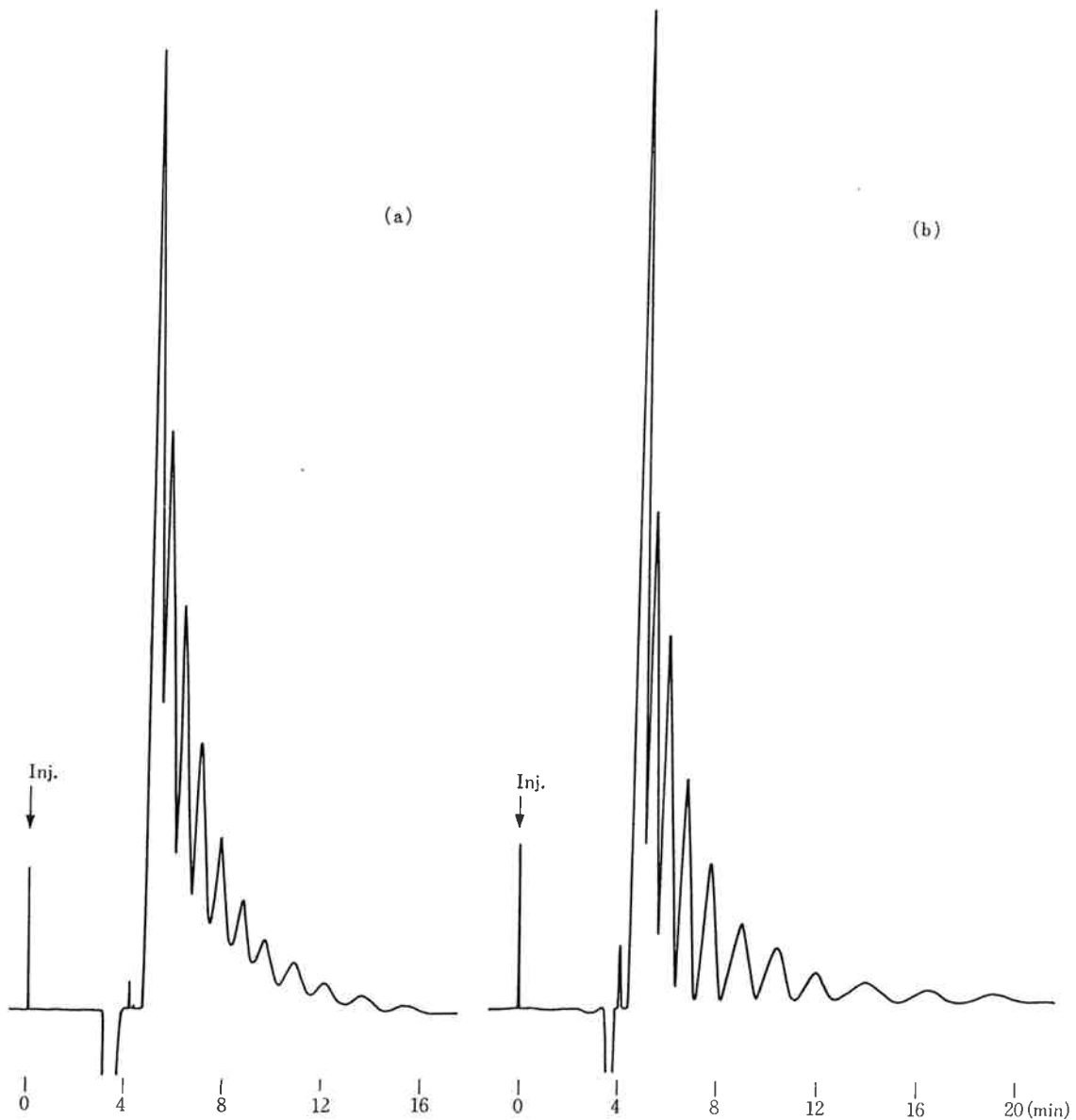


Fig. 10 Application of LS-450 NH_2 to sirup
 mobile phase: (a)50% acetonitrile in water; (b)65% ethylalcohol in water, column size: 4 mm.
 d. \times 30 cm, flow rate: 1 ml/min, detector: RI-8, 32×10^{-8} RIU, sample size: 250 μg

分離においては常用範囲に妨害はなく、極めて使い易い充填剤と思われる。これらの結果から、今後デンプンゲルとして市販されている TSK-GEL LS-170 STARCH は、発展的に解消されるであろう。膨潤収縮のより少ない、かつ目的とする物質に対し親和力の強い充填剤の開

発は HPLC にとり不可欠のものであり、より適するよう設計されたシリカゲルに、均一多量に目的分配層を化学結合し、かつ他の干渉効果のない（シラノールによるイオンの効果など）充填剤の開発が、今後共必要であろう。

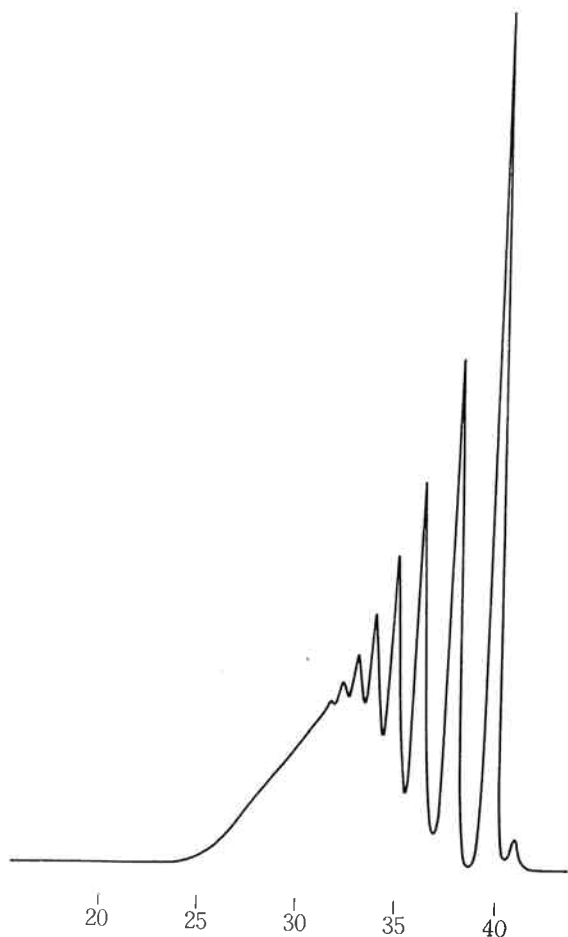


Fig. 11 Measurement of sirup on TSK-GEL G2000PW mobile phase: water, column size: 7.5 mm i. d. \times 120 cm, flow rate: 1 ml/min, detector: RI-8 32×10^{-8} RIU

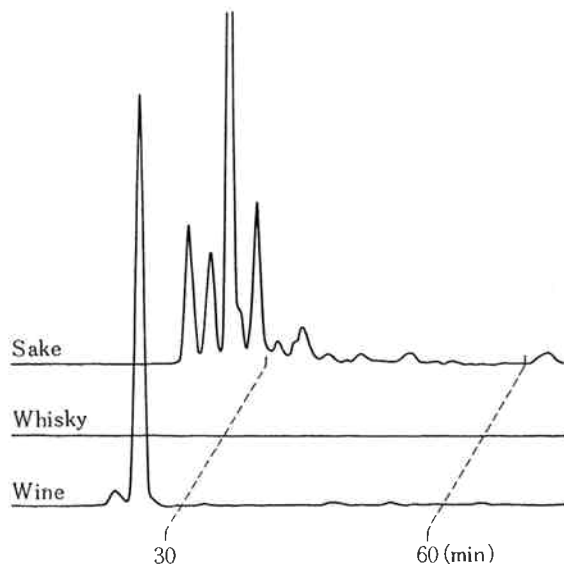


Fig. 12 Application of LS-450 NH₂ to alcohols instrument: HLC-805 (TOYO SODA) mobile phase; step wise gradient from 70% ethylalcohol in water to water [70/30 (2 min), 60/40 (45 min), 30/70 (10 min), 0/100 (30 min)], column size: 7.5 mm i. d. \times 30 cm, flow rate: 0.7 ml/min, detector: Vis. 420 nm, 1.0 AUFS, reaction reagent: sulfuric acid-orsinol, reaction temperature: 100°C, reaction coil: 0.5 mm i. d. \times 9 m

文 献

- 1) M. Ghebregzabher, S. Rufini, G. M. Sapia. M. Lato; *J. Chromatogr.*, **180**, 1 (1979).
- 2) M. H. Simatupang; *J. Chromatogr.*, **178**, 588 (1979).
- 3) L. A. Th. Verhaar, M. J. M. Van Der Aalst, J. A. W. Beenackers, B. F. M. Kuster; *J. Chromatogr.*, **170**, 363 (1979).
- 4) P. Vrátný, O. Mikeš, J. Farkas, P. Trop, J. Copíková, K. Nejeplínská; *J. Chromatogr.*, **180**, 39 (1979).
- 5) S. Katz, S. R. Dinsmore, W. W. Pitt, Jr.; *Clin. Chem.*, **17**, 731 (1971).
- 6) A. D. Jones, I. W. Burns, S. G. Selling, J. A. Cox; *J. Chromatogr.*, **144**, 169 (1977).
- 7) F. D. Rabel, A. G. Caputo, E. T. Butts; *J. Chromatogr.*, **126**, 731 (1976).
- 8) R. Schwarzenbach; *J. Chromatogr.*, **117**, 206 (1976).
- 9) E. F. Walborg, Jr., L. E. Kondo; *Anal. Biochem.*, **37**, 320 (1970).
- 10) P. B. Kesler; *Anal. Chem.*, **39**, 1416 (1967).
- 11) Y. Takata, G. Mutto; *Anal. Chem.*, **45**, 1864 (1973).
- 12) H. Binder; *J. Chromatogr.*, **189**, 412 (1980).
- 13) S. Katz, W. W. Pitt, Jr., J. E. Mrochek, S. Dinsmore; *J. Chromatogr.*, **101**, 193 (1974).
- 14) R. Oshima, Y. Kurosu, J. Kumanotani; *J. Chromatogr.*, **179**, 376 (1979).
- 15) C. G. Biliaderis, D. R. Grant, J. R. Vose; *Cereal Chem.*, **56**, 475 (1979).
- 16) 東洋曹達技術資料 *PW Type Column*.
- 17) H. van Olst, G. E. H. Joosten; *J. Liquid Chromatogr.*, **2**, 111 (1979).
- 18) P. Jonnson, O. Samuelson; *Anal. Chem.*, **39**, 1156 (1967).
- 19) J. G. Lawrence; *Chimica*, **29**, 367 (1975).
- 20) J. S. Hobbs, J. G. Lawrence; *J. Chromatogr.*, **72**, 311 (1972).
- 21) K. Aitvetmiiller; *J. Chromatogr.*, **156**, 354 (1978).