

ガスクロマトグラフィーによる複合糖質の中性糖 及びアミノ糖の同時分離定量法

中川 浩毅・山口 邦子*・榎本 則行

(食糧管理化学研究室)

昭和54年10月30日 受理

A Gas Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Neutral and Amino Sugars in Complex Carbohydrates

Hiroki NAKAGAWA, Kuniko YAMAGUCHI and Noriyuki ENOMOTO

(Laboratory of Food Hygienic Chemistry)

Received October 30, 1979

Summary

A purification procedure for borohydride-reduced neutral and amino sugars using a small Dowex 1 (borate) column was devised to remove borate and some impurities resulting from the borohydride and sample. In addition, a hydrolysis condition which released both neutral and amino sugars quantitatively from complex carbohydrate was examined.

On the basis of the results obtained, a gas chromatographic method for simultaneous determination of neutral and amino sugars was established as follows. About 1 mg of complex carbohydrate is hydrolyzed in 1 ml of 2 N trifluoroacetic acid in an evacuated, sealed tube at 100°C for 15 hr. To the hydrolysate are added 100 µg of xylose and 200 µg of mannosamine as internal standards, and the mixture is evaporated to dryness under reduced pressure. The residue is dissolved in 1 ml of distilled water, and about 10 mg of sodium borohydride is added to reduce the sugars. After standing at 5°C for 2 hr, the mixture is adjusted to pH 5 with 1 N acetic acid to destroy the excess borohydride, and evaporated to dryness, followed by repeated evaporation with methanol. The residue is dissolved in 1 ml of 5 mM potassium borate, and the mixture is passed through a column (5×26 mm) of Dowex 1-X8 (200–400 mesh, borate). After washing with 2 ml of distilled water, the alditols adsorbed on the column are eluted with 2.5 ml of a mixture of conc. hydrochloric acid-methanol (1:11, v/v), and the eluate is evaporated to dryness, followed by repeated evaporation with methanol. To the residue are added 100 µg of freshly redistilled tetrahydrofuran and 50 µl of trifluoroacetic anhydride. The mixture is sonicated in an ultrasonic bath for 20 sec, and allowed to stand for 5 min in an ice bath. A 1-µl aliquot of the reaction mixture is analyzed on a glass column (0.4×200 cm) packed with 2% XF-1105 (nitrile silicone) on acid-washed, silanized Celite 545 in a gas chromatograph equipped with a hydrogen flame ionization detector or electron capture detector.

By the present method, a mixture of ribose, arabinose, mannose, glucose, galactose, glucosamine and galactosamine was separated and determined satisfactorily.

* 九州大学農学部

糖のガスクロマトグラフィー (GLC) は、糖質研究において重要な微量分析法である。糖の GLC のために、種々の揮発性糖誘導体とカラム液相との組み合わせが考案され、それぞれ特徴のある糖分析法となっている^{1,2)}。

一般に、単糖の揮発性誘導体は GLC において異性体に基づく2~3個のピークを与えるので、数個の単糖を含む試料ではピークの重なりが生じ、定量分析が困難である。それゆえ複合糖質の構成糖分析では、単糖を水素化ホウ素ナトリウムで還元して異性体のない糖アルコールにかえた後、これをアセチル誘導体として GLC を行う方法がもっぱら使われている。しかし、実際には水素化ホウ素ナトリウムから生成するホウ酸塩や、試料に由来するアミノ酸などの夾雑物のために、試料によっては揮発性糖誘導体の生成率が低く、分析値に再現性が乏しい場合がしばしばある。

そこで著者らは、中性糖及びアミノ糖を水素化ホウ素ナトリウムで還元後、ホウ酸塩や夾雑物を除去して糖アルコールを定量的に精製する方法を考案し、その精製糖アルコールのトリフルオロアセチル誘導体を GLC で分析して中性糖及びアミノ糖を同時に分離定量する方法を確立した。

中性糖及びアミノ糖の同時分離定量法 1~2 mg の複合糖質試料に 1 ml の 2N トリフルオロ酢酸を加えて減圧封管し、これを 100°C、15時間加水分解する。これに、内部標準物質として 100 µg の xylose 及び 200 µg の mannosamine を加え、減圧下で濃縮乾固する。乾固物を 1 ml の水に溶解し、10 mg の水素化ホウ素ナトリウムを加えて 5°C、2時間還元する。つぎに、1N 酢酸で pH 5 に調整して過剰の水素化ホウ素ナトリウムを分解した後、濃縮乾固し、乾固物にメタノールを加えて再び濃縮乾固する。これを 1 ml の 5 mM ホウ酸カリウムに溶解し、Dowex 1-×8 カラム (200-400 mesh, ホウ酸塩形, 5×26 mm) に通して糖アルコール-ホウ酸錯化合物を吸着させる。カラムを 2 ml の水で洗浄後、2.5 ml の 1N 塩酸-メタノール (濃塩酸:メタノール=1:11, v/v) で溶出し、溶出液を濃縮乾固する。乾固物をメタノールに溶解して濃縮乾固する操作を3回繰り返す。ホウ酸をホウ酸メチルとして除去する。得られた精製糖アルコールに 100 µl のテトラヒドロフラン (特級試薬を蒸留したもの) 及び 50 µl のトリフルオロ無水酢酸を加え、20秒間超音波処理 (溶解を促進させるため) をした後、氷水中に5分間放置してトリフルオロアセチル化^{3,4)}する。0.5~2 µl の反応液を次の条件でガスクロマト分析する。カラム: 酸洗浄及びシラン化処理をした Celite 545 (80~100 mesh) に XF1105 (nitrile silicone) を2%コーティングしたものを充填したガラスカラム (0.4×200 cm)。キャリアーガス: 窒素, 50 ml/min。カラム温度: 中性糖 125°C, アミノ糖 155°C, galactitol ピークの出現後, 125°C から 155°C へ昇温する。機器: 水素炎イオン化検出器または電子捕獲検出器付ガスクロマトグラフ。

実験方法

クジラ鼻軟骨ケラタン硫酸 イワシクジラ (*Balaenoptera borealis*) の鼻軟骨から既報⁵⁾の方法により調製した。

ウシ角膜ケラタン硫酸 ウシ角膜から Bhavanandan ら⁶⁾の方法により調製した。

Galactitol の定量 1 mol の D-galactitol を過ヨウ素酸ナトリウムで酸化すると 2 mol のホルムアルデヒドが生成するので、このホルムアルデヒドをクロモトロブ酸試薬⁷⁾で定量して galactitol 量を算出した。0.5 ml の糖アルコール溶液 (0.1~0.8 µmol/0.5 ml) に 0.5 ml の 0.04 M 過ヨウ素酸ナトリウムを加え、室温、暗所で30分間酸化した。0.3 ml の反応液に 0.5 ml の 0.2 M 亜ヒ酸ナトリウムを加え、室温、暗所に30分間放置後、4 ml のクロモトロブ酸試薬を加え、100°C、30分間加熱して発色させた。流水で冷却後、570 nm で吸光度を測定した。ホルムアルデ

ヒドの検量線はD-glucitolを同様に処理して作成した。

Glucosaminitolの定量 ニンヒドリン反応⁸⁾によって定量した。標準 glucosaminitol 塩酸塩は次の方法で調製した。500 mg の N-acetyl- α -D-glucosamine を 10 ml の水に溶解し、200 mg の水素化ホウ素ナトリウムを加え、5°C で一夜還元した後、Dowex 50- \times 8 カラム (200-400 mesh, H⁺ 形, 1.2 \times 7 cm) で Na⁺ を除去し、流出液を濃縮乾固した。これに、メタノールを加えて濃縮乾固する操作を繰り返し、ホウ酸を除去した。この乾固物を 3 N 塩酸で 100°C, 3 時間加水分解して脱アセチル化を行い、濃縮乾固後、水-エタノールから結晶化した。この結晶は、m. p. 160°C, $[\alpha]_D^{20}$ 0° であった。

実験結果

galactose 及び glucosamine の水素化ホウ素ナトリウム還元・Dowex 1 カラム精製後における galactitol 及び glucosaminitol の回収試験 galactose 及び glucosamine をそれぞれ本法の条件で、水素化ホウ素ナトリウムで還元し、Dowex 1 カラムで処理した。流出液及び洗液は濃縮乾固後一定量の水に溶解した (流出液画分)。溶出液は 1 ml ずつ順次 3 回分取し、それぞれホウ酸を除去して乾固物とした後、一定量の水に溶解した (溶出液 I, II 及び III)。得られた 4 つの画分について、Park-Johnson 法⁹⁾ で還元力を、過ヨウ素酸酸化後クロモトロープ酸試薬で galactitol 量を、ニンヒドリン反応で glucosaminitol 量を測定し、結果を Table 1 に示した。各画分とも還元力を示さず、ほとんど全部の galactose 及び glucosamine が溶出液 I 及び II に糖アルコールとして回収された。この結果から、本法の条件で、アミノ糖及び中性糖が定量的に糖アルコールに変わり、中性糖アルコールと同様にアミノ糖アルコールもホウ酸錯化合物となって負に荷電し、Dowex 1 カラム (ホウ酸塩形) に吸着されることが確認された。また、これらの糖アルコールは 1 N 塩酸-メタノールでカラムからほとんど同時に溶出されることが判明した。

Table 1. Recoveries of galactose and glucosamine as their alditols after borohydride reduction followed by Dowex 1 treatment

Fraction	Galactitol μ mol	Glucosaminitol μ mol	Reducing sugar
Effluent	ND*	ND	ND
Euate I	5.9	6.8	ND
Euate II	7.0	5.7	ND
Euate III	ND	ND	ND

Each (14 μ mol) of galactose and glucosamine was reduced with sodium borohydride, and treated with Dowex 1 columns as described in the present method.

* Not detected.

標準糖混合物のガスクロマトグラム Fig. 1 は、fucose, ribose, arabinose, xylose, mannose, glucose, galactose, glucosamine, galactosamine 及び mannosamine から成る標準糖混合物を、本法で分析して得られたガスクロマトグラムである。生体中に広く見出されるこれらの糖が良好に分離された。

トリフルオロ酢酸によるケラタン硫酸の加水分解 複合糖質の中性糖及びアミノ糖を同時に分離定量するためには、これらの糖を定量的に遊離させる加水分解条件を確立する必要がある。トリフルオロ酢酸は、強い加水分解力を有し、また遊離された糖をほとんど破壊しないと考えら

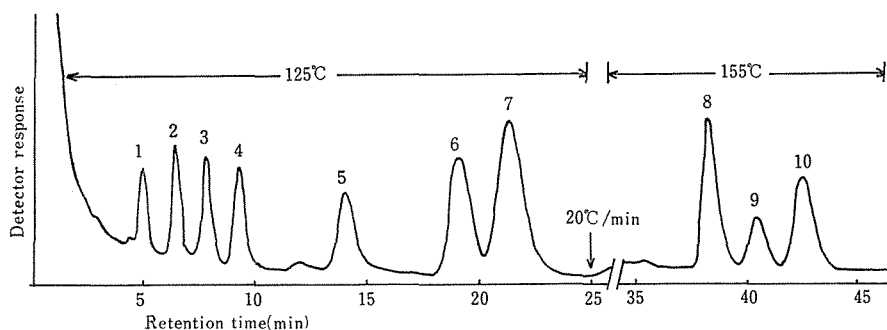


Fig. 1. Gas chromatogram of alditol trifluoroacetates derived from a mixture of neutral and amino sugars.

1, fucitol; 2, ribitol; 3, arabinitol; 4, xylitol; 5, mannitol; 6, glucitol; 7, galactitol; 8, glucosaminitol; 9, galactosaminitol; 10, mannosaminitol.

The mixture was consisted of 30 μg of fucose, 80 μg of ribose, 80 μg of arabinose, 80 μg of xylose, 100 μg of mannose, 200 μg of glucose, 300 μg of galactose, 300 μg of glucosamine, 150 μg of galactosamine and 240 μg of mannosamine.

れる^{10,11)} ので、これを用いてクジラ鼻軟骨ケラタン硫酸の加水分解条件を調べた。すなわち、ケラタン硫酸を 2 N トリフルオロ酢酸中で 100°C, 4~20 時間加水分解し、遊離された糖を本法で定量して各糖の遊離曲線を求めた。Fig. 2 に示したように、galactose 及び mannose は 12 時間で最高値に達し、その後は遊離糖の破壊がわずかに認められた。glucosamine 及び galactosamine は 15 時間で最高値に達し、その後は遊離糖の破壊は認められなかった。fucose は 4 時間ですでに最高値に達し、その後の測定値は減少の一途をたどった。これらの結果から、ケラタン硫酸の加水分解条件は 2 N トリフルオロ酢酸中、100°C, 15 時間が至適であると考えられた。

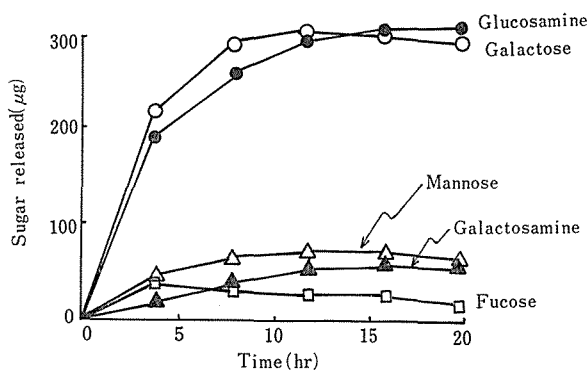


Fig. 2. Time course of release of component sugars from whale cartilage keratan sulfate by hydrolysis with 2 N trifluoroacetic acid.

Keratan sulfate (1.5 mg) was hydrolyzed with 1 ml of the acid at 100°C for various times in an evacuated, sealed tube, and analyzed by the present method.

各糖の検量線 galactose, mannose, fucose, glucosamine 及び galactosamine から成る各種濃度の糖混合物を本法で分析し、各糖の内部標準物質に対する重量比とピーク面積比との関係を求めた。Fig. 3 に示したように、各糖の検量線は原点を通る直線であった。

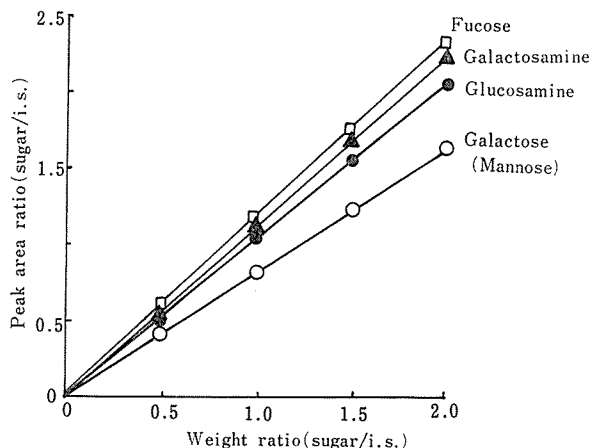


Fig. 3. Calibration curves for galactose, mannose, fucose, glucosamine and galactosamine.

Various mixtures of these sugars were treated with 2 N trifluoroacetic acid at 100°C for 15 hr in evacuated, sealed tubes, and analyzed by the present method. Peak areas and weight ratios were calculated by using xylose for neutral sugars and mannosamine for amino sugars as internal standards (i.s.). The curve of mannose coincides with that of galactose.

実際の定量に際しては、試料の分析に続いて標準用糖混合物（例えば mannose 150 μ g, galactose 150 μ g, glucosamine 200 μ g 及び galactosamine 200 μ g を含む糖混合溶液）を本法で分析し、次式を用いて計算すると便利である。

$$w = \frac{A_i}{A} \times \frac{a}{a_i} \times \frac{w_i}{W_i} \times W$$

w : 試料中の定量したい糖の量 (μ g).

a : 試料のガスクロマトグラムにおける定量したい糖のピーク面積.

w_i : 試料中の内部標準物質の量 (μ g).

a_i : 試料のガスクロマトグラムにおける内部標準物質のピーク面積.

W : 標準用糖混合物中の定量したい糖の量 (μ g).

A : 標準用糖混合物のガスクロマトグラムにおける定量したい糖のピーク面積.

W_i : 標準用糖混合物中の内部標準物質の量 (μ g).

A_i : 標準用糖混合物のガスクロマトグラムにおける内部標準物質のピーク面積.

添加された糖の回収試験 分析値の信頼度を確かめるために、クジラ鼻軟骨ケラタン硫酸に galactose, mannose, fucose, glucosamine 及び galactosamine を添加して本法で分析し、添加された各糖の回収率を求めた (Table 2). mannose, galactose, glucosamine 及び galactosamine の回収率は、加水分解中の糖の破壊などを考慮すれば満足すべき値であった。fucose の低い回収率は、加水分解中の fucose の破壊に起因するものである。

ケラタン硫酸の中性糖及びアミノ糖の分析 クジラ鼻軟骨ケラタン硫酸及びウシ角膜ケラタン硫酸を本法で分析し (内部標準糖なし)、得られたガスクロマトグラムを Fig. 4 に示した。軟骨ケラタン硫酸では、galactose, mannose, fucose, glucosamine 及び galactosamine が検出され

Table 2. Recoveries of the added sugars from the hydrolysate of a mixture of whale cartilage keratan sulfate and sugars

	Fucose	Mannose	Galactose	Glucosamine	Galactosamine
Added	50 μ g	100	100	150	150
Found	35 \pm 3.0	94 \pm 2.3	95 \pm 2.1	144 \pm 3.1	143 \pm 3.2
Recovery	70%	92	95	96	95

To 1 mg of keratan sulfate were added 100 μ g of galactose, 100 μ g of mannose, 50 μ g of fucose, 150 μ g of glucosamine and 150 μ g of galactosamine. The mixture was hydrolyzed, and analyzed by the present method. Values are the mean \pm standard deviation of five separate experiments.

One mg of keratan sulfate contained 206 μ g of galactose, 45 μ g of mannose, 17 μ g of fucose, 207 μ g of glucosamine and 37 μ g of galactosamine.

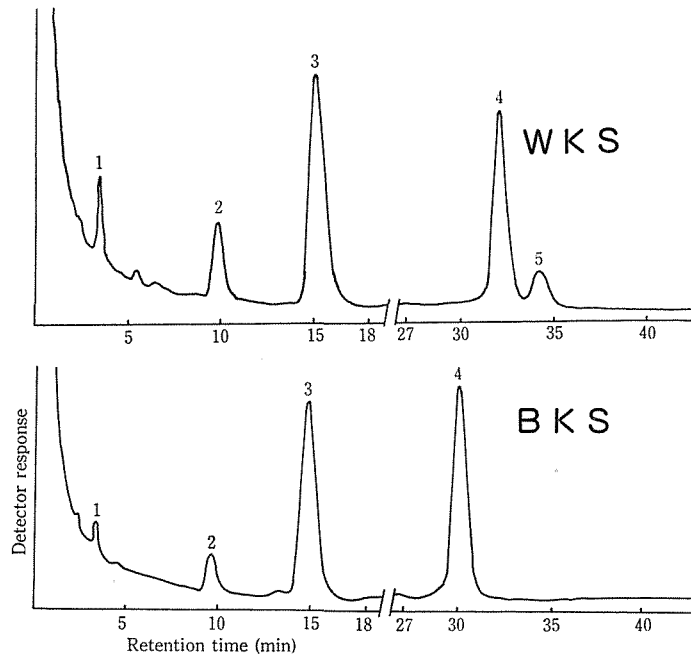


Fig. 4. Gas chromatograms of alditol trifluoroacetates derived from whale cartilage keratan sulfate (WKS) and bovine corneal keratan sulfate (BKS).

1, fucitol; 2, mannitol; 3, galactitol; 4, glucosaminitol; 5, galactosaminitol.

た。ウシ角膜ケラタン硫酸では、galactose, mannose, fucose 及び glucosamine は検出されたが、galactosamine は検出されなかった。これらのケラタン硫酸の構成糖を本法で定量し、その結果を比色分析によって得られた結果と共に Table 3 に示した。アンスロン法¹²⁾では、galactose 及び mannose は共に同一の発色率を与え、fucose はほとんど発色しないので、その分析値は galactose 及び mannose に基づくものとみなすことができる。本法による中性糖の分析値 (galactose+mannose) はアンスロン法による分析値に比べて10%程度低かった。また、本法による glucosamine 及び galactosamine の分析値は、Dowex 50 カラムクロマトグラフィー¹³⁾によってこれらのアミノ糖を分別した後、Elson-Morgan 反応¹⁴⁾で分析して得られた値に比べて5%程度低かった。

Table 3. Neutral and amino sugar contents of whale cartilage keratan sulfate (WKS) and bovine corneal keratan sulfate (BKS)

Sample	Method	Galactose	Mannose	Fucose	Glucos- amine	Galactos- amine
WKS	GLC ^{a)}	20.6%	4.46%	1.73%	20.7%	3.66%
	Elson-Morgan ^{b)}				21.3	3.85
	Anthrone		27.9*			
BKS	GLC ^{a)}	24.9	3.12	0.44	25.7	ND**
	Elson-Morgan ^{b)}				27.5	trace
	Anthrone		31.2*			

a) The present method.

b) After the sample was hydrolyzed in 2 N hydrochloric acid at 100°C for 16 hr, amino sugars were separated on a Dowex 50 column according to Gardell's method,¹³⁾ and determined by Elson-Morgan reaction.¹⁴⁾

* As galactose. ** Not detected.

考 察

複合糖質の構成糖を GLC で分析するには、まず酸加水分解によって単糖を遊離させた後、濃縮乾固して酸を除去しなければならない。一般に、加水分解剤には塩酸が使用されているが、加水分解及び濃縮乾固中に遊離糖の一部が破壊される¹⁵⁾。この破壊は、アミノ糖では無視できる程度であるが、中性糖では数10%にも及ぶ場合がある。酸加水分解において、中性糖のペントシド結合及びヘキソシド結合は切れやすいが、アミノ糖のヘキソサミニド結合は切れ難い。従って、中性糖及びアミノ糖の同時分離定量には、アミノ糖を定量的に遊離させると共に、中性糖の破壊を最小限にとどめる加水分解条件が必要である。ケラタン硫酸の加水分解における構成糖の遊離曲線 (Fig. 2) から、トリフルオロ酢酸は、塩酸に匹敵する加水分解力でアミノ糖を遊離させ、そのうえ fucose 以外の中性糖をほとんど破壊しないことが確認された。このことから、トリフルオロ酢酸は複合糖質の加水分解剤として現在のところ最適のものと思われる。軟骨ケラタン硫酸は、一般の複合糖質に見出されるヘキソサミニド結合及びヘキソシド結合を有する¹⁶⁾ ので、本法で採用した加水分解条件は他の複合糖質にも適用できると考えられる。しかし、より正確な分析結果を期待する場合には、個々の試料に最適の加水分解条件を求めることが望ましい。

糖アルコールの精製過程において、Dowex 1 カラムに吸着された糖アルコールを定量的に溶出するためには、1 N 塩酸では 5 ml を要したが、1 N 塩酸—メタノールでは 2.5 ml で十分であった。この効果は、メタノールが糖アルコール—ホウ酸錯化合物を部分的に分解するためであろう。この塩酸—メタノールの使用によって、溶出液の濃縮乾固が著しく容易になった。

糖を GLC で分析するには、まずトリメチルシリル化、アセチル化などによって糖を揮発性誘導体にしなければならない。アミノ糖誘導体のカラム中での安定性は、中性糖誘導体と比較して劣る傾向がある¹⁷⁾。また、本法では、中性糖は 125°C、アミノ糖は 155°C で分析されるので、内部標準物質には適当な中性糖及びアミノ糖（試料に含まれていないもの）がそれぞれ必要である。これらの内部標準物質は試料の加水分解液に加えておくと、以後の濃縮、精製過程における定量性が保持されて好都合であった。

加水分解における糖の破壊をも反映させた回収試験結果 (Table 2) から、fucose 以外の糖の分析値の信頼度は良好であることが確認された。fucose は、加水分解時間を短縮して別に分析す

る必要がある。

GLC における糖アルコールの分離については、トリメチルシリル誘導体に対して良好な分離を示すカラム液相が見当らない。しかし、アセチル誘導体は液相として ECNSS-M¹⁸⁾, EGS-EGA-XE 60¹⁹⁾ 及び Poly A-103²⁰⁾ を用いれば、また、トリフルオロアセチル誘導体は XF-1105⁴⁾ を用いれば良好な分離が得られる。

Fig. 1 に示したように、トリフルオロアセチル誘導体—XF-1105 の組合わせは、複合糖質の構成糖から誘導されるすべての糖アルコールを良好に分離した。このほかトリフルオロアセチル誘導体の利点としては、トリフルオロ無水酢酸が反応性に富むので誘導体の調製が容易であること、トリフルオロアセチル誘導体は、揮発性がすぐれているのでアセチル誘導体に比べて 50～60°C 低温で分析できること、また、電子捕獲検出器を使用すれば ng 単位の分析が可能であることなどをあげることができよう。

摘 要

中性糖及びアミノ糖から成る複合糖質の構成糖を、ガスクロマトグラフィーによって同時に分離定量する方法を考案した。

本法は、トリフルオロ酢酸を用いて試料を加水分解し、つぎに遊離した中性糖及びアミノ糖を水素化ホウ素ナトリウムで還元して糖アルコールとし、これを Dowex 1 (ホウ酸塩形) カラムによって定量的に精製した後、トリフルオロアセチル誘導体として XF-1105 カラムを用いるガスクロマトグラフィーで分析するものである。

文 献

- 1) R. A. Laine, W. J. Esselman and C. C. Sweeley, *Methods in Enzymology*, Vol. **28**, 159 (1972).
- 2) F. Eisenberg, Jr., *ibid.*, Vol. **28**, 168 (1972).
- 3) M. Matsui, M. Okada, T. Imanari and Z. Tamura, *Chem. Pharm. Bull.*, **16**, 1383 (1968).
- 4) Z. Tamura, T. Imanari and Y. Arakawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **16**, 1864 (1968).
- 5) H. Nakagawa and K. Satake, *Bull. Japan. Soc. Sci. Fisheries*, **37**, 919 (1971).
- 6) V. P. Bhavanandan and K. Meyer, *J. Biol. Chem.*, **242**, 4352 (1967).
- 7) D. A. MacFadyen, *J. Biol. Chem.*, **158**, 107 (1945).
- 8) E. W. Yemm and E. C. Cocking, *Analyst*, **80**, 209 (1955).
- 9) J. T. Park and M. J. Johnson, *J. Biol. Chem.*, **181**, 149 (1949).
- 10) Y. C. Lee, G. S. Johnson, B. White and J. Scoocca, *Anal. Biochem.*, **43**, 640 (1971).
- 11) L. Hough, J. V. S. Jones and P. Wusteman, *Carbohydr. Res.*, **21**, 9 (1972).
- 12) E. W. Yemm and A. J. Willis, *Biochem. J.*, **57**, 508 (1954).
- 13) S. Gardell, *Acta Chem. Scand.*, **7**, 207 (1953).
- 14) L. Svennerholm, *Acta Soc. Med. Upsaliensis*, **61**, 287 (1956).
- 15) R. D. Marshall and A. Neuberger, "Glycoproteins", Elsevier Publishing Co., 1972, p. 224.
- 16) H. Nakagawa and K. Satake, *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, **17**, 75 (1972).
- 17) C. C. Sweeley, W. W. Wells and R. Bentley, *Methods in Enzymology*, Vol. **8**, 95 (1966).
- 18) W. Niedermeier, *Anal. Biochem.*, **40**, 465 (1971).
- 19) L. J. Griggs, A. Post, E. R. White, J. A. Finkelstein, W. E. Moeckel, K. G. Holden, J. E. Zarembo and J. A. Weisbach, *Anal. Biochem.*, **43**, 369 (1971).
- 20) W. Niedermeier and M. Tomana, *Anal. Biochem.*, **57**, 363 (1974).