

技術論文

糖類の液体クロマトグラフィー/質量分析に用いる鉛型配位子交換カラムの開発

蒲生 啓司^{®1}, 中尾千予視¹, 菱田 勝巳², 和田 啓男²

著者らは、先に単糖及びオリゴ糖の高感度分析を目的として、質量分析計による検出を可能にすべく、配位子交換モード用スルホン酸型ポリスチレン系カチオン交換樹脂 (Ca 型) セミマイクロカラム (ULTRON PS-80C/10S) を開発し、それを用いた液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) 法を検討した。水を移動相として、エレクトロスプレーイオン化法による質量分析条件を検討した結果、単糖及びオリゴ糖 13 種を 12 分以内に分離し、すべての単糖及びオリゴ糖から負イオン化モードにより $[M-H]^-$ イオンを最適イオン種として検出した。更に、これらのイオン化効率の向上をねらって、カラム分離後の溶出液にアンモニア水を添加するポストカラム法を用い、検出感度が格段に向上する方法を考案した。このような分析法の開発により、単糖及びオリゴ糖の分離及び検出において、従来と比較すると格段の向上が見られた。本研究では、単糖及びオリゴ糖分析の更なる分離の向上を目指して、配位子交換モード用スルホン酸型ポリスチレン系カチオン交換樹脂 (Pb 型) セミマイクロカラム (ULTRON PS-80P/5S) を新たに開発し、分析に用いた。最適カラム温度を検討し、各分析条件を最適化して糖類 13 種類の分析を行った結果、全成分を 16 分で溶出した。また、以前には相互分離が困難であった成分の分離に成功するなど、成分分離において大きな改善が見られた。検出下限は各糖によって異なるが、マルトトリオースを除く 12 種類の糖類において、Ca 型配位子交換セミマイクロカラムよりもわずかながら高感度検出が可能であることが確認された。このカラムの開発により、誘導体化を行わない単糖及びオリゴ糖の LC/MS 法による高感度分析が可能になり、従来の示差屈折率検出法を上回る分析法として技術的に貢献できるものと思われる。

1 緒言

今日、タンパク質や核酸に次ぐ第三の生命高分子として糖鎖分子が注目されており、タンパク質の機能高度化に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。現在では糖鎖分子が細胞表層のタンパク質や脂質と連結している様子が明らかになり、こうした分子が細胞に与える影響や役割が医療や薬学等の分野で注目されている。糖鎖研究を行う上で糖鎖分子の構造解析は必要不可欠で、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による多次元マッピングや電気泳動¹⁾、質量分析法 (MS) や多次元核磁気共鳴法 (NMR) 等を用いた解析法が確立されつつあり²⁾、生体内の糖タンパク質の解析に関する研究も幾つか報告されている³⁾⁴⁾。一方で、天然にもセルロースやペクチンなどの多糖類が存在しており、植物から抽出したペクチンの構成糖の分析による構造解析の研究等が幾つか報告されている⁵⁾⁶⁾。しかしながら、糖鎖分子の構造や機能性ははまだ

明らかにされていない点が多く、糖鎖研究を行うに当たって、糖類の簡便かつ高感度な分析法の開発及び改良が今なお求められている。

HPLC による糖分析では、分離法として主に配位子交換法、順相分配法及び陰イオン交換法が用いられており、検出法として主に示差屈折率検出法や電気化学検出法、更には 2-アミノピリジンをを用いるプレラベル法⁷⁾⁸⁾やアルギンを用いるポストラベル法⁹⁾などの蛍光検出法が使われてきた。また、それ以外にも逆相クロマトグラフィーによる単糖の分析¹⁰⁾や、誘導体化法を用いたガスクロマトグラフィー (GC) による分析¹¹⁾も行われているが、誘導体化のための前処理が煩雑であるなどの問題点が指摘されている。順相や逆相のカラムを用いた MS による糖分析の報告例も幾つかあり¹²⁾¹³⁾、いずれの方法も分離と検出の選択性という点において特徴があるが、MS による糖分析はいまだ例が少ない。

著者らは、先に単糖及びオリゴ糖の質量分析計による簡便かつ高感度な分析法の開発を目的として、配位子交換カラム (Ca 型) のセミマイクロ化を行い、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法に基づく液体クロマトグラフィー/

¹ 高知大学教育学部理科教育講座: 780-8520 高知県高知市曙町 2-5-1

² 信和化工株式会社: 612-8307 京都府京都市伏見区景勝町 50-2

質量分析法 (LC/MS) の有用性を報告した¹⁴⁾。すなわち、糖分離及び検出のための質量分析条件の最適化を行うとともに、分離後の溶出液に添加するアンモニアがイオン化効率を向上させることを見だし、アンモニア濃度の検出感度に与える影響についても検討した。しかしながら、セミマイクロ化した Ca 型配位子交換カラムにおいても、基本的に糖の分離が必ずしも十分ではないので、更に改良が必要である。市販されている配位子交換カラムには、Ca 型以外に Pb 型や Zr 型が知られているが、セミマイクロカラムの十分な評価がなされているとは言えない。本研究では、Ca 型を Pb 型に換えた新たな配位子交換セミマイクロカラムを開発することで糖類の分離の問題を解決しようと考へ、その結果を先の Ca 型セミマイクロカラムと比較することで、糖分析における Pb 型配位子交換 LC/MS 法の有用性を実証した。

2 実 験

2・1 試 薬

本研究では、糖類として D(+)-グルコース、ガラクトース、D(+)-マンノース、D(-)-フルクトース、D(+)-キシロース、D(-)-アラビノース、 α -L(+)-ラムノース、サッカロース、ラクトース、D(+)-セロビオース、マルトース、D(+)-ラフィノース、マルトトリオーシ (いずれも和光純薬製) を分析に用いた。これらの糖類はすべて 100 mM の水溶液として調製後、適宜希釈してその 10 μ L をカラムに注入した。アンモニア水 (25%) は市販の試薬特級を使用し、水は Milli-Q システムにより精製したものをを用いた。

2・2 LC/MS 装置及び分析条件

移動相送液部に、PU-980 (日本分光製) を用い、カラム恒温槽として NANOSPACE SI-1/2004 (資生堂製) を用いた。検出器には質量分析計 (VG Quattro II, Micromass 製) を接続して用いた。配位子交換モードの分離カラムとして、スルホン酸型ポリスチレン系カチオン交換樹脂 (Pb 型、平均粒子径 5 μ m) を、高圧スラリー法によりステンレス管 (2.0 mm i.d. \times 250 mmL) に充填したセミマイクロカラムを新たに開発 (ULTRON PS-80P/5S, 信和化工製) し、実験に用いた。移動相として水を用い、流量を 0.05 mL/min とした。更にもう 1 台の送液ポンプを用いて、ポストカラム的に 12% アンモニア水溶液を送液し、カラム分離後の移動相との流量比を 5:1 に設定して合流させ、移動相との合流後最終的なアンモニア濃度が 2% になるように 2 流路系を設定した。質量分析計のイオン化法として ESI 法を用い、ESI 法におけるイオン源温度を 90 $^{\circ}$ C、コーン電圧を 20 V、キャピラリー電圧を 3.5 kV に設定した上で、負イオン化モードでマススペクトルを記録

した。マススペクトルの測定には全イオンモニタリング (TIM) モードを用い、測定質量範囲は m/z 100~700、スキャン時間を 1 秒とした。また、選択イオンモニタリング (SIM) モードによる定量下限の測定では、すべての単糖及びオリゴ糖から、負イオン化モードによって得られる $[M-H]^{-}$ を最適イオン種とするマスクロマトグラムより算出した。以上の分析条件によって得られた糖類 13 種類に対する分離能及び検出感度の結果を、既に報告した Ca 型配位子交換セミマイクロカラムによって得られた分析結果と比較した。

3 結果及び考察

3・1 カラム温度の最適化

樹脂系のカラムでは、カラム温度が分離に影響を及ぼす重要なパラメーターの一つとなる。そこで、本 Pb 型配位子交換セミマイクロカラムの温度特性を把握するために、糖類の分離に最適なカラム温度の検討を行った。糖類の標準試料 13 種それぞれの単独分析を行い、その際のカラム温度を 65~90 $^{\circ}$ C の間で設定したときの保持時間を比較した。カラム温度ごとの保持時間を Fig. 1 に示した。その結果、カラム温度が 70 $^{\circ}$ C 以下になると、二糖及び三糖の保持時間の差がほとんどなくなってしまい、特にマルトトリオーシの保持時間が大幅に長くなって、数種類の二糖よりも更に遅れて検出されるという現象が観察された。逆にカラム温度が高くなると、全体的に保持時間は短くなる傾向があった。ほとんどの成分の分離の傾向において大きな違いはなかったものの、マンノース及びフルクトースにおいては保持時間の差が小さくなり、この 2 成分の分離が困難になるという結果が現れた。

先の研究で、Ca 型配位子交換セミマイクロカラムで分析を行った際、カラム温度の違いが、成分分離だけでなく検出感度にも影響を及ぼすことを報告した¹⁴⁾。そこで本 Pb 型配位子交換セミマイクロカラムについても、カラム温度の違いが検出感度に与える影響について観察した。その結果を、カラム温度ごとの 13 種の糖のピーク面積値について、それぞれの最大ピーク面積値を 1 としたときの相対値として Fig. 2 に示した。ほとんどの糖類では、カラム温度を 70 $^{\circ}$ C に設定した場合に最も検出感度が高かった。それ以外に最も検出感度が高かったカラム温度では、三糖及びガラクトースは 65 $^{\circ}$ C、ラムノース及びマルトースでは 80 $^{\circ}$ C のときが最も検出感度が高かった。しかしながら、三糖以外ではカラム温度 70 $^{\circ}$ C での分析結果と大きな差はなかった。

以上のように、成分分離及び検出感度の 2 点から考へて、本研究における Pb 型配位子交換セミマイクロカラムの最適温度を 70 $^{\circ}$ C として設定した。

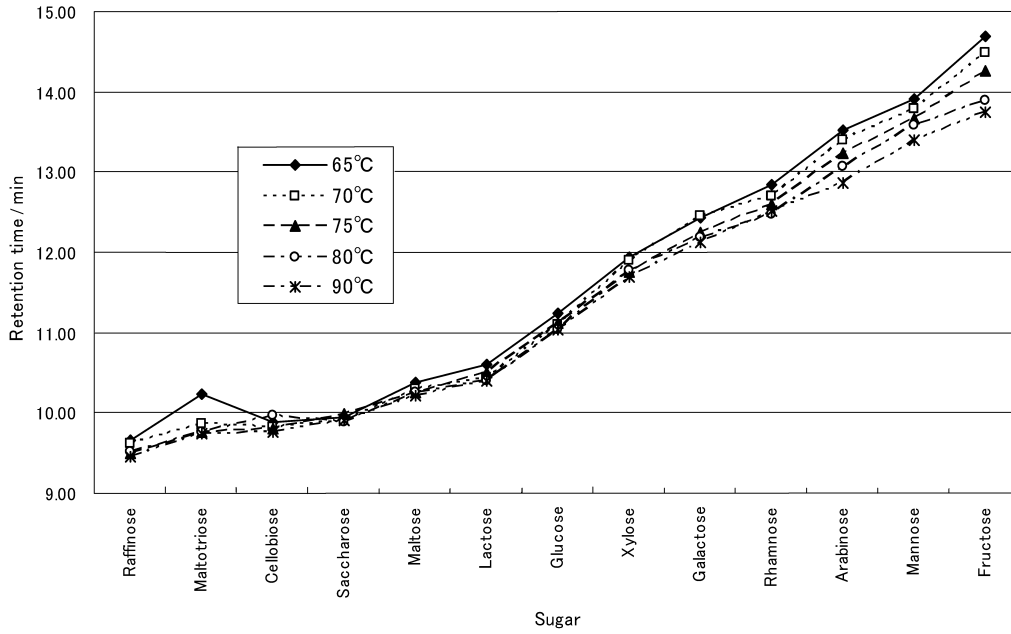


Fig. 1 Effect of column temperature on retention time of the base peak of each saccharide
 LC conditions—Column: ULTRON PS-80P/5S; mobile phase: H₂O; flow rate: 0.05 mL/min.
 MS conditions—source temperature: 90°C; capillary voltage: 2.5 kV; cone voltage: 20 V.
 Sample concentration: 100 μM each; injection volume: 10 μL.

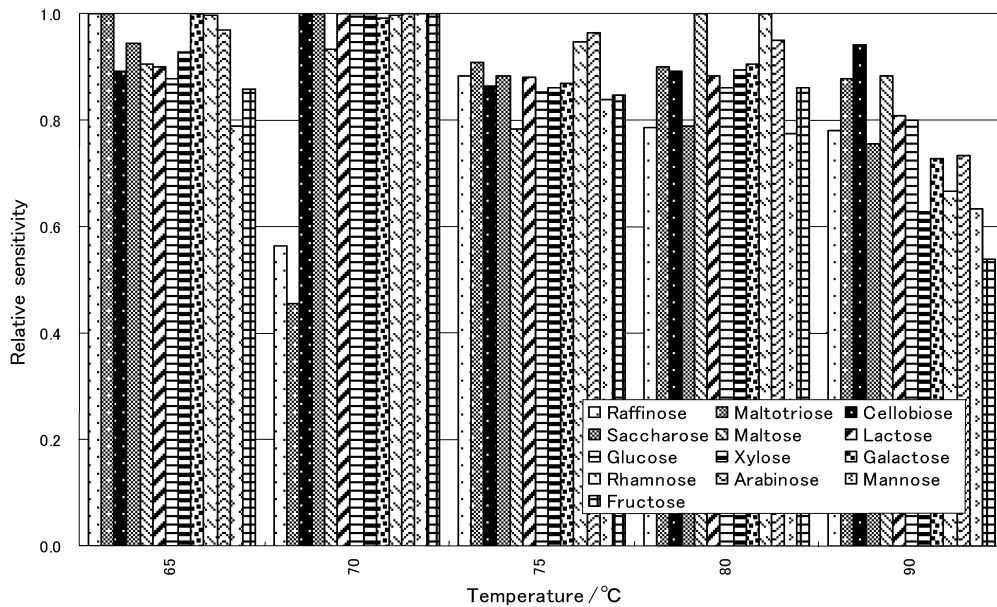


Fig. 2 Relative intensities of the base peak of each saccharide at the different column temperature
 LC and MS conditions were the same as Fig. 1.

3・2 マスクロマトグラムによる分離能の比較

先の Ca 型配位子交換セミマイクロカラムを用いた糖類 13 種の一斉分析の結果, 単糖においてはほとんどの成分を分離することができたが, 二糖及び三糖, あるいはガラクトース及びマンノースの分離が困難であるという課題が残された. それらの課題が新たに開発した Pb 型配位子交換セミマイクロカラムで解決できるのかを観察した. 負イオン化

モードを用いて糖類 13 種の標準試料それぞれの単独分析を行い, その結果得られた [M-H]⁻のマスクロマトグラムを得, その結果を Ca 型カラムで得られたマスクロマトグラムの結果と併せて Fig. 3 に示した. それに基づいて, Pb 型カラムにおける糖類の保持時間及び分離係数の結果を Table 1 に示した. 併せて比較のため, Ca 型カラムから得られた糖類の保持時間及び分離係数を Table 2 に示

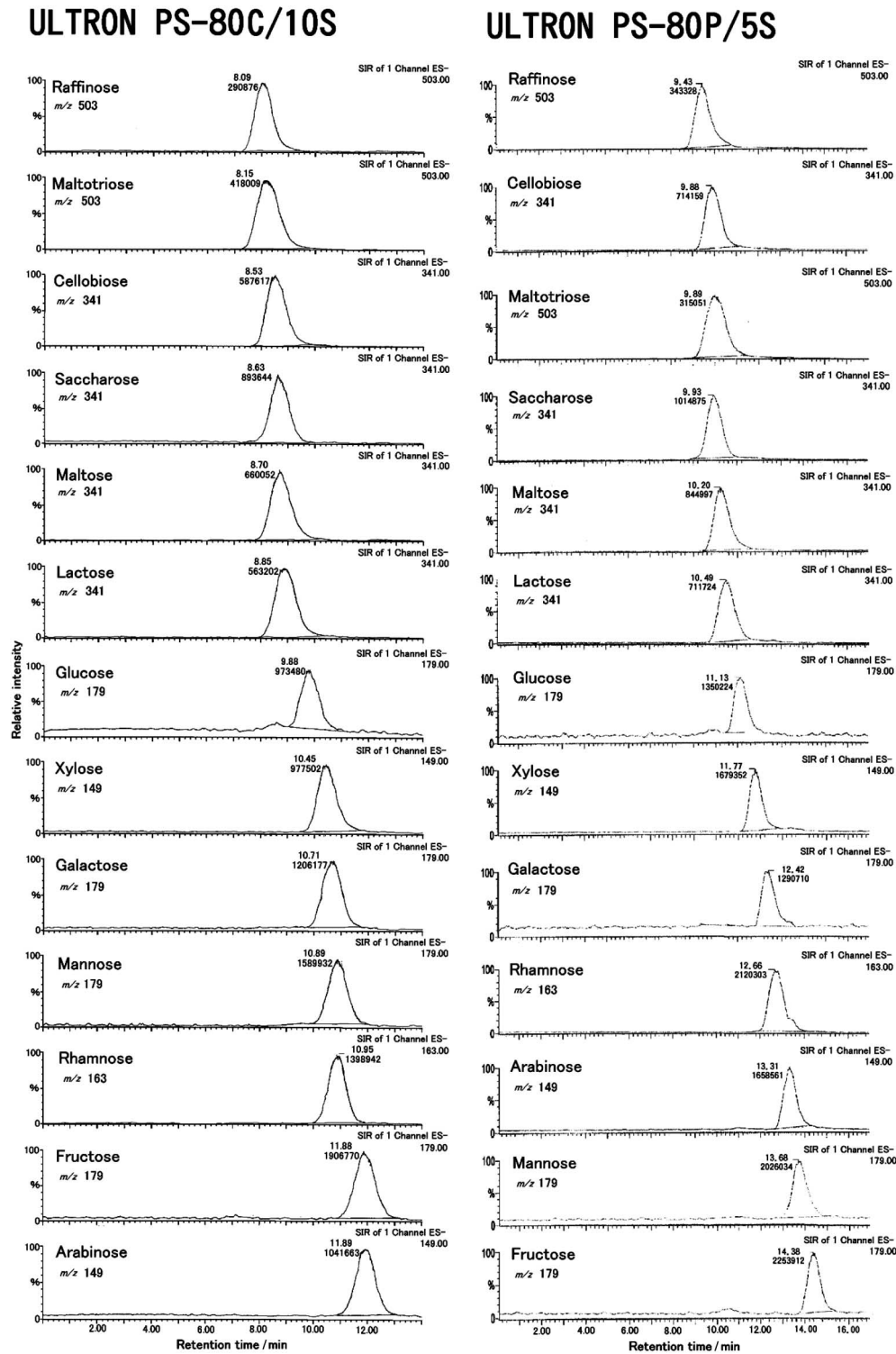


Fig. 3 Mass chromatograms of 13 saccharides on negative ESI

LC conditions—Column: ULTRON PS-80C/10S and ULTRON PS-80P/5S; column temperature: 70°C; mobile phase: H₂O; flow rate: 0.05 mL/min. MS conditions—source temperature: 90°C; capillary voltage: 2.5 kV; cone voltage: 20 V. Sample concentration: 100 μM each; injection volume: 10 μL

Table 1 Retention time, capacity factor (k') and separation factor (α) of saccharides using ULTRON PS-80P/5S

Saccharide	Monitoring ion (m/z)	Retention time/min	k' ($t_0 = 3.94$)		α
Raffinose	[M-H] ⁻ (503)	9.43	k'_1	1.393	
Cellobiose	[M-H] ⁻ (341)	9.88	k'_2	1.508	k'_2/k'_1
Maltotriose	[M-H] ⁻ (503)	9.89	k'_3	1.510	k'_3/k'_2
Saccharose	[M-H] ⁻ (341)	9.93	k'_4	1.520	k'_4/k'_3
Maltose	[M-H] ⁻ (341)	10.20	k'_5	1.589	k'_5/k'_4
Lactose	[M-H] ⁻ (341)	10.49	k'_6	1.662	k'_6/k'_5
Glucose	[M-H] ⁻ (179)	11.13	k'_7	1.825	k'_7/k'_6
Xylose	[M-H] ⁻ (149)	11.77	k'_8	1.987	k'_8/k'_7
Galactose	[M-H] ⁻ (179)	12.42	k'_9	2.152	k'_9/k'_8
Rhamnose	[M-H] ⁻ (163)	12.66	k'_{10}	2.213	k'_{10}/k'_9
Arabinose	[M-H] ⁻ (149)	13.31	k'_{11}	2.378	k'_{11}/k'_{10}
Mannose	[M-H] ⁻ (179)	13.68	k'_{12}	2.472	k'_{12}/k'_{11}
Fructose	[M-H] ⁻ (179)	14.38	k'_{13}	2.650	k'_{13}/k'_{12}

LC conditions—Column: ULTRON PS-80P/5S; column temperature: 70°C; mobile phase: H₂O; flow rate: 0.05 mL/min. MS conditions—source temperature: 90°C; capillary voltage: 2.5 kV; cone voltage: 20 V. Sample concentration: 100 μM each; injection volume: 10 μL

Table 2 Retention time, capacity factor (k') and separation factor (α) of saccharides using ULTRON PS-80C/10S

Saccharide	Monitoring ion (m/z)	Retention time/min	k ($t_0 = 3.89$)		α
Raffinose	[M-H] ⁻ (503)	8.09	k'_1	1.080	
Maltotriose	[M-H] ⁻ (503)	8.15	k'_2	1.095	k'_2/k'_1
Cellobiose	[M-H] ⁻ (341)	8.53	k'_3	1.193	k'_3/k'_2
Saccharose	[M-H] ⁻ (341)	8.63	k'_4	1.219	k'_4/k'_3
Maltose	[M-H] ⁻ (341)	8.70	k'_5	1.237	k'_5/k'_4
Lactose	[M-H] ⁻ (341)	8.85	k'_6	1.275	k'_6/k'_5
Glucose	[M-H] ⁻ (179)	9.88	k'_7	1.540	k'_7/k'_6
Xylose	[M-H] ⁻ (149)	10.45	k'_8	1.686	k'_8/k'_7
Galactose	[M-H] ⁻ (179)	10.71	k'_9	1.753	k'_9/k'_8
Rhamnose	[M-H] ⁻ (163)	10.89	k'_{10}	1.799	k'_{10}/k'_9
Mannose	[M-H] ⁻ (179)	10.95	k'_{11}	1.815	k'_{11}/k'_{10}
Fructose	[M-H] ⁻ (179)	11.88	k'_{12}	2.054	k'_{12}/k'_{11}
Arabinose	[M-H] ⁻ (149)	11.89	k'_{13}	2.057	k'_{13}/k'_{12}

LC conditions—Column: ULTRON PS-80C/10S; column temperature: 70°C; mobile phase: H₂O; flow rate: 0.05 mL/min. MS conditions—source temperature: 90°C; capillary voltage: 2.5 kV; cone voltage: 20 V. Sample concentration: 100 μM each; injection volume: 10 μL

した。

Ca 型カラムでは、全成分が 12 分で溶出したのに対し、Pb 型カラムでは 16 分で溶出した。全体的に Pb 型カラムのほうが保持時間が長くなっていることから、保持力が強いことが分かる。分離係数については、カラムの違いによる大きな差はなかった。溶出される順序を見ると、Ca 型カラムでは三糖の 2 種類が溶出されてから二糖が溶出されていたのに対し、Pb 型カラムでは、二糖のセロビオースが三糖のマルトトリオースよりも先に溶出された。また単糖においても、Ca 型カラムではガラクトースに続いてマンノース、ラムノース、フルクトース及びアラビノースの順で溶出されていたのが、Pb 型カラムではラムノース、アラビノース、マンノース及びフルクトースと溶出順位の逆転が観察された。この結果は、Ca と Pb に基づく各糖の配位能の差が現れた結果であると考えられるが、各糖の構造の違いに基づく配位能の差を詳細に説明できるまでには至っていない。

二糖及び三糖については、各々の成分の分離は困難であったものの、Ca 型カラムに比べると、Pb 型カラムのほうが各成分の保持時間の差が比較的大きくなることが観察されたために、この点はやや改善されたのではないかと考えられる。セロビオースとマルトトリオース間の分離は、保持時間及び分離係数から見てもかなり困難であり、混合物試料の場合や更にそれらの濃度比が異なるような場合に分離は不可能に近いと思われるが、これについては、何度かカラムの充填をし直してもこれ以上分離が改善されることはなかった。またサッカロース、マルトース及びラクトース間の分離においても、完全分離には至っていないが、Ca 型カラムとの比較においては明らかに分離が向上した。更に Ca 型カラムに比べて Pb 型カラムで大きく改善された点は、ガラクトース及びマンノースの分離が可能となり、単糖 7 種の分離が大きく改善された点である。その分マンノースとフルクトースの保持時間が近くなったが、カラム温度が 70°C 以下ならば分離が可能であることが分

Table 3 Limits of detection of saccharides

Saccharide	SIM/ pmol	
	Pb type ^{a)}	Ca type ^{b)}
Raffinose	2.00	2.40
Cellobiose	1.00	1.20
Maltotriose	2.00	1.20
Saccharose	0.50	0.60
Maltose	0.80	1.00
Lactose	1.00	1.20
Glucose	0.50	0.65
Xylose	0.40	0.50
Galactose	0.50	0.50
Rhamnose	0.25	0.40
Arabinose	0.40	0.40
Mannose	0.30	0.30
Fructose	0.25	0.50

a) LC and MS conditions were the same as Table 1. b) LC and MS conditions were the same as Table 2.

かった。したがって、単糖 7 成分の一斉分析を行っても各成分の分離が可能となったことから、単糖の分離についての課題は克服されたのではないかと考えられる。

3・3 糖類の定量性及び検出限界

各分析条件を最適化した上で、負イオン化モードによる各糖類の定量性及び検出限界を測定した。本 Pb 型配位子交換セミマイクロカラムを用いて、糖類 13 種類についてそれぞれ個別に分析し、検量線を作成したところ、ほとんどの糖類において 5~1000 pmol の範囲で直線性の高い検量線（相関係数：0.951~0.999）が得られた。また、100 pmol での各糖類の保持時間及びピーク面積の再現性は、それぞれ 0.66~1.20% ($n=5$) 及び 0.96~2.86% ($n=5$) であった。この結果は、先の Ca 型カラムを用いた結果とほぼ同様であった。

検出下限 ($S/N=3$) については、すべての糖類において $[M-H]^-$ を選択し、SIM モードにおける試料の注入絶対量でまとめ、Ca 型カラムでの結果とともに Table 3 に示した。ラフィノース及びマルトトリオースで 2.00 pmol、セロビオース及びラクトースで 1.00 pmol であり、その他の糖類については 0.25 から 0.80 pmol の範囲で検出可能であることが分かった。これらの結果からは、マルトトリ

オースを除く 12 種類の糖類において、Ca 型配位子交換セミマイクロカラムよりもわずかながら高感度検出が可能であることが確認された。Pb 型カラムと Ca 型カラムとで移動相及びポストカラム法が同一条件なので、検出感度に大きな差が出ることはないと予測されるものの、Pb 型配位子交換セミマイクロカラムの開発によって、最も簡便な糖類の高感度分析法の有効性が示されたと考えられる。

以上、本研究において、新たに開発した Pb 型配位子交換セミマイクロカラムを用いた糖類の分析を行い、以前開発した Ca 型配位子交換セミマイクロカラムと比較実験を行うことによって、糖類の分離能及び検出感度における改善点を明らかにし、Pb 型配位子交換セミマイクロカラムが、糖類の分析に有用性が高いことを実証した。今後は、二糖及び三糖の分離改善を見いだすべく更なる配位子交換カラム特性の検討及び開発を行い、糖類の高分離・高感度分析を目指す予定である。

文 献

- 1) 戸井田敏彦: ぶんせき (*Bunseki*), **2005**, 504.
- 2) 戸井田敏彦: ファルマシア (*FARUMASHIA*), **40**, 313 (2004).
- 3) N. Kawasaki, S. Itoh, M. Ohta, T. Hayakawa: *Anal. Biochem.*, **316**, 15 (2003).
- 4) N. Kawasaki, M. Ohta, S. Itoh, M. Hyuga, S. Hyuga, T. Hayakawa: *Biologicals*, **30**, 113 (2002).
- 5) M. Fuchigami: *J. Food Science*, **55**, 739 (1990).
- 6) H. Garna, N. Mabon, B. Wathelet, M. Paquot: *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.*, **68**, 297 (2003).
- 7) S. Suzuki, K. Kakehi, S. Honda: *Anal. Chem.*, **68**, 2073 (1996).
- 8) J. Yuan, N. Hashii, N. Kawasaki, S. Itoh, T. Kawanishi, T. Hayakawa: *J. Chromatogr. A*, **1067**, 145 (2005).
- 9) S. Honda: *J. Chromatogr. A*, **720**, 183 (1996).
- 10) D. B. Gomis, D. M. Tamayo, J. M. Alonso: *Anal. Chim. Acta*, **436**, 173 (2001).
- 11) 常定 健, 竹原淳彦, 光石一太, 井原俊英: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **49**, 437 (2000).
- 12) E. Buriova, M. Medova, F. Macasek, P. Bruder: *J. Chromatogr. A*, **1034**, 133 (2004).
- 13) M. Ramm, J.-L. Wolfender, E. F. Queiroz, K. Hostettmann, M. Hamburger: *J. Chromatogr. A*, **1034**, 139 (2004).
- 14) C. Nakao, K. Gamoh, K. Hishida, H. Wada: *J. Mass Spectr. Jpn.*, **54**, 49 (2006).

Preparation of a Pb-Type Ligand Exchange Column for Liquid Chromatography/Mass Spectrometric Analysis of Saccharides

Keiji GAMOH¹, Chiyomi NAKAO¹, Katsumi HISHIDA² and Hiroo WADA²

¹ Faculty of Education, Kochi University, 2-5-1, Akebono-cho, Kochi-shi, Kochi 780-8520

² Shinwa Chemical Industry Ltd., 50-2, Kagekatsu-cho, Hushimi-ku, Kyoto-shi, Kyoto 612-8307

(Received 28 March 2007, Accepted 26 June 2007)

A ligand-exchange liquid chromatography/mass spectrometric (LC/MS) analysis of mono- and oligo-saccharides has been developed. The successful separation and detection of a mixture of seven monosaccharides, four disaccharides and two trisaccharides was performed using an improved ligand-exchange column, which was a semi-rigid styrene-divinylbenzene copolymer-based Pb-type cation-exchange resin (ULTRON PS-80P/5S), and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). Water was used as a mobile phase to separate the above-mentioned saccharides within 12 min. The ESI interface was used in a negative-ion mode for LC/MS, which produced reasonable signals from their negative ions ($[M-H]^-$). The effect of aqueous ammonia, which was used as an additive to the eluent, was also examined. An increase of the detection sensitivities of the saccharides was observed when aqueous ammonia was used as the additive at a concentration of 2% (v/v). The effects of the separation and ionization parameters, column temperature and cone voltage on the sensitivity and linearity were examined. Linear plots of the peak area versus the concentration were obtained for MS detection over the range of 5~1000 μM ($r^2 = 0.951 \sim 0.999$) for each saccharide. The detection limits of the target saccharides, calculated at $S/N = 3$, ranged from 0.25 to 2.00 pmol. The reproducibility of the retention times and the peak areas were 0.66~1.2% and 0.96~2.86%, respectively. Then, those results were compared with the results by using a Ca-type ligand-exchange column, which confirmed the usefulness of the Pb-type ligand-exchange LC/MS analysis of mono- and oligo-saccharides.

Keywords : mono- and oligo-saccharide; electrospray ionization; liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS); semimicro column; ligand exchange mode.