高速液体クロマトグラフィーによるショ糖を結合した 水飴中のオリゴ糖の定量について

岡田 茂孝*・北畑寿美雄*・吉川 恵温**・吉田 幹彦**

(昭和 53 年 6 月 22 日受理)

Determination of Maltooligosylsucrose by High Performance Liquid Chromatography

Shigetaka OKADA,* Sumio KITAHATA,* Shigeharu YOSHIKAWA**
and Mikihiro YOSHIDA**

* Osaka Municipal Technical Research Institute
(2-1-1, Ōgimachi, Kita-ku, Osaka, Japan)

** Hayashibara Biochemical Laboratories, Incorporated
(1-2-3, Shimoishii, Okayama, Japan)

Recently we prepared a new syrup from the mixture of starch and sucrose by the action of cyclodextrin glycosyltransferase. This syrup contained mainly sucrose (GF) and oligosaccharides, such as glucosylsucrose (G2F), maltosylsucrose (G3F) and maltotriosylsucrose (G4F) terminated sucrose at the reducing end. In addition, this syrup contained a small amount of maltooligosaccharides, such as glucose (G), maltose (G2) and maltotriose (G3).

In this report, we tried to analyze the sugar composition in this syrup by High Performance Liquid Chromatography. Various sugars, such as fructose (F), G, GF, G2, G2F, G3, G3F were separated and quantitatively determined under the following conditions: column, μ BONDAPAK/Carbohydrate (4×300 mm); solvent system, water/acetonitrile=20/80; flow rate, 2 ml/min or 4 ml/min. Because of less solubility of the oligosaccharides larger than G2F in this solvent system, it was difficult to analyze these oligosaccharides.

緒 言

最近 cyclodextrin glycosyltransferase(α -1,4-glucan 4-glycosyltransferase, cyclizing, EC 3.2.1.19, CGTase) をショ糖と澱粉の混液に作用させ、ショ糖にマルトオリゴ糖を結合させた水飴状物質が開発された^{1,2)}。

* 大阪市立工業研究所 (530 大阪市北区扇町 2 丁目 1 番 1 号)

** (株)林原生物化学研究所 (700 岡山市下石井1-2-3)

*** G2F, O- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-fructofuranoside; G3F, O- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-fructofuranoside.

この水飴は甘味を示すだけではなく、末端にショ糖を含むために還元性を示さず、蛋白質と加熱しても変色が少ないなどの特徴をもっている。そのうえ、ショ糖に比べて口腔内細菌によるデキストランの形成量が少なく、虫歯になりにくいことが判明し、幼児用食品の素材として注目されている³⁾。

本水飴を含む各種の食品が製造、市販され、わが国の虫歯予防に役立つことは非常に喜ばしいことであるが、この場合各種食品中での本水飴の定量法を確立しておくことはぜひ必要である。これまで本水飴中の有効成分と考えられる G2F***, G3F*** の定量はペーパークロマトグラフィー (PPC) により分離抽出後、全糖量ならびにフラクトース量を定量して行われてきたが、この方法

は PPC の展開に数日を要し、とうてい迅速さを要求される食品分析には採用することができない。このため種々の方法を検討中であるが、高速液体クロマトグラフィーによる定量が比較的良好な成績を与えたのでここに報告する。

実験材料および方法

1. 使用糖質

G(グルコース), GF(シュクロース), F(フラクトース)は市販品を, G2(マルトース)は林原 KK 製 HHH 標品を, G3(マルトトリオース), β -CD(β -サイクロデキストリン)は林原 KK 製を使用した。標準 G2F, G3F は研究室保存標品を使用した²⁾。

2. 酵素類

CGT-ase は *Bacillus megaterium* No.5 株を培養して得た培養液を既報のように¹⁾, 澱粉吸着により精製したものを使用した。 β -amylase は大豆より福本らの方法により精製した標品⁴⁾, glucoamylase は研究室保存の精製品⁵⁾, 酵母の saccharase は市販品を用いた。また酵素活性はそれぞれの酵素について既報の活性測定法により測定し^{1,6)}, 表示することとした。

3. 糖の定量と検出

全糖の定量には Anthrone-硫酸法⁷⁾を使用した。糖の分離には *n*-ブタノール, ピリジン, 水(6:4:3, v/v) の溶媒を用いて PPC を行い(上昇法, 4回), 還元糖の検出には硝酸銀浸漬法⁸⁾, フラクトースの検出にはフロログルシン発色法⁹⁾を使用した。

4. 標準カップリングシュガー

馬鈴薯澱粉(液化度 16%) 20 g を 100 ml の水に溶解し, ショ糖 10g, CGT-ase(400 u/ml, 1 ml)を加え, 40°C で 1 夜反応後, 90°C 10 分間加熱処理したものを使用した。以下本物質をカップリングシュガーとよぶ。

5. 高速液体クロマトグラフ (HPLC)

日本ウォーターズ社製高速液体クロマトグラフ(pump, 6000-A 型; detector, 示差屈折計 R 401 型; injector,

U6K; column, μ BONDAPAK/Carbohydrate 4 mm ID $\times$ 30 cm)を使用し, レコーダーはナショナル製 10 mV full scale で用いた。

分析に供する糖質はそれぞれ一定量の水に溶解し, その水溶液 0.8 ml に対してアセトニトリル (CH_3CN) 3.2 ml を加え, 沈澱の生じる場合は沈澱を除去し, 上清を 10~500 μ l マイクロシンジで取り, HPLC により分析した。この際糖質は各成分 100~400 μ g 程度を含むことを目安として行った。

実験結果

1. G2F, G3F の調製

β -CD 10 g, ショ糖 10 g を 100 ml の水に混合懸濁し, CGT-ase 1.0 ml (400 u/ml)を加え, 40°C 4 時間反応を行うと, CD は開環し, ショ糖への転移反応がおこる¹⁰⁾。この転移生成物に β -amylase(200 u)を加え, 40°C 30 分間反応させる。この作用により G4F 以上の高分子のオリゴ糖は大部分分解を受け, それだけ G2F, G3F の濃度は上昇する。反応生成物をそれぞれ PPC により分離定量した結果を示す(Table 1)。

直径 6 cm, 長さ 70 cm のカラムに 1N 塩酸で洗浄したクロマトグラフィー用活性炭 1.5 l をつめ, 7%ブタノール 30 l, つぎに純水 50 l で洗浄して活性炭カラムとした。このカラムに β -amylase で処理した上記転移生成物の混液 150 ml (濃度約 13%) を負荷し, 溶媒を変えながら, 溶出速度 1,000 ml/hr で溶出した。溶媒としては, 0.05% *n*-ブタノール 50 l, 0.4% *n*-ブタノール 110 l, 0.9% *n*-ブタノール 80 l を順次添加した¹¹⁾。溶出液を各 1 l ずつ分画し, 各画分について PPC により糖の種類を調べ, 全糖を定量した。G2F, G3F に対応する区分を集め PPC により分析した結果を Table 2 に示す。

なお分離した G2F は glucoamylase, saccharase により消化すると, それぞれ G と GF, および G2 と F を与えた。また G3F からは G と GF および G3 と

Table 1. Sugar composition in sucrose-coupled sugars before and after β -amylase treatment

β -Amylase treatment	F	G	GF	G2	G2F	G3	G3F	G4	G4F and G5 $\leq$
Before treatment (%)	0.9	0.8	17.8	2.5	19.4	2.1	15.3	1.4	39.7
After treatment (%)	1.2	0.9	19.3	22.9	26.9	2.9	20.6	1.4	3.9

F, fructose; G, glucose; GF, sucrose; G2, maltose; G2F, glucosylsucrose; G3, maltotriose; G3F, maltosylsucrose; G4, maltotetraose; G4F and G5 $\leq$, oligosaccharides larger than maltotriosylsucrose and maltopentaose.

Fig. 1. Separation of various oligosaccharides by High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Conditions: column, μ BONDAPAK/Carbohydrate (4×300 mm); solvent, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}=20/80$; flow rate, (A) 2 ml/min, (B) 4 ml/min; detector, RI (401).

Abbreviations are the same as in Table 1.

Table 2. Analysis of glucosylsucrose and maltosylsucrose preparation by the method of paper chromatography

Sample	G2	G2F	G3	G3F	G4
G2F	0.7	99.3	0	0	0
G3F	0	0.6	0.1	96.6	2.7

Abbreviations are the same as in Table 1.

Fが生成した。そのほか PPC により研究室保存の標準 G2F, G3F と R_f 値が一致したので、それぞれ G2F, G3F と確認した。以下の研究には本実験で調製した G2F, G3F を使用した。

2. 各種オリゴ糖の HPLC による分離

G, F, GF, G2, G2F, G3, G3F をそれぞれ 5~6mg を含む溶液 0.8 ml を CH_3CN 3.2 ml に混合し、その 100 μl を HPLC により分析したところ、Fig. 1-A に示すように、いずれの糖も比較的良好に分離可能であることが判明した。しかし G2F, G3F, G3 については、やや peak が広がりすぎるので、流速を 2 倍にして分析すると Fig. 1-B のようになった。この場合、G2F, G3, G3F は比較的すどい peak を与えたが、F, G の peak はやや重なる傾向があった。すなわち上記の糖をそれぞれ分離するには、F, G, GF, G2 については 2 ml/min の流速で分析を行い、それ以上のオリゴ糖の場合は 4 ml/min の流速が良いといえる。

つぎに糖の peak の高さを測定することにより定量が

Fig. 2. Calibration curve of various oligosaccharides.

(A), Analysis at the flow rate of 2 ml/min; (B), analysis at the flow rate of 4 ml/min. Abbreviations are the same as in Table 1.

可能か否かを検討する目的で、約 2 mg/ml の G と F の混合液について、 $\times 1$, $\times 3.5$, $\times 6$, $\times 10$ 倍に溶媒 ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}=80/20$) で希釈し、いずれの場合も F 166 μg , G 165 μg ずつを注入した結果、糖含量が同じである場合、液量が 300 μl までの間では検出される peak の高さには、ほとんど差がなかった。なお、400 μl 以上では peak の高さは漸次低くなる傾向 (peak の幅は広がる) を示したが、同一の液量を注入し、分離後、その高さを測定して標準曲線を作成すれば定量することができる。

G, F, G2, GF, G3, G2F, G3F のそれぞれの糖について 50~400 μg の標品を 100 μl の溶媒 ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}=80/20$) に溶解し、HPLC により分析し、その peak の高さを測定し表示すると Fig. 2-A および 2-B のようになった。すなわち F, G, GF, G2 では 200 μg 以下の

Table 3. Applicability of HPLC method for determining various oligosaccharides

	A*				B**				
	F	G	GF	G2	GF	G2	G2F	G3	G3F
Calc. (μg)	164	161	163	75.4	81.6	75.4	87.0	86.2	98.6
Found (μg)	163	162	165	75.1	82.7	74.9	87.1	84.8	99.9
Error (%)***	-0.6	+0.3	+1.2	-0.4	+1.3	-0.7	+0.1	-1.6	+1.3

* A, Analysis at the flow rate of 2 ml/min; ** B, Analysis at the flow rate of 4 ml/min;

*** Error(%), (Found/Calc. -1) $\times$ 100.

Abbreviations are the same as in Table 1.

Table 4. Analysis of various oligosaccharides in the coupling sugar

Sample concn. (%)	Contents (%)							
	F	G	GF	G2	G2F	G3	G3F	G4 and G4F* $\leq$
0.4	2.6	7.4	9.6	6.5	10.4	4.4	6.0	53.1
0.2	2.4	6.5	10.6	7.5	13.0	5.5	8.9	45.6
0.1	2.3	7.2	10.9	7.4	14.4	6.5	9.6	41.7

* These values were calculated by subtracting the amount of F, G, GF, G2, G2F, G3, G3F from total sugar.

Abbreviations are the same as in Table 1.

範囲で、また G2F, G3, G3F については、400 μg 以下の範囲で、それぞれ比較的良好な直線性を示し、この方法により定量できることが判明した。

3. オリゴ糖混合液の分析

各オリゴ糖を適量混合した組合せを2種類作り、溶媒に溶解し HPLC により分析した結果を Table 3 に示す。実測値と理論値は非常によく一致し、誤差は $\pm 2.0\%$ 以内であった。

4. カップリングシュガー中のオリゴ糖の定量

カップリングシュガー中のオリゴ糖を定量するため、その 2.0, 1.0, 0.5% 水溶液 0.8 ml に CH_3CN 3.2 ml をそれぞれ加え、生ずる沈澱を除去した。カップリングシュガー 0.5% の溶液の場合、 CH_3CN を加えても生ずる沈澱は微量であったが、2.0% の場合は肉眼的にも認められる白濁を生じた。

上清 300~500 μl をとり HPLC により分析し、G3F 以下の重合度のオリゴ糖を定量した。Table 4 は全糖量 (もとの水溶液中での濃度) に対する比率を計算して示したものである。また全糖値から G3F 以下のオリゴ糖の含有量を差引いたものを G4F, G4 $\leq$ として表示した。

三者の分析値のうち F, G, GF, G2 では比較的良好な一致が見られたが、G2F, G3, G3F では試料濃度が高いとやや低い含有率を示した。使用した溶媒にこれらオ

リゴ糖が十分に溶解しないことが原因の一つと考えられる。

考 察

F, G, GF, G2, G2F, G3, G3F の分離定量に HPLC を使用したが、Fig. 1 と 2 の結果から見ると、流速 2 ml/min では GF 以下の低分子オリゴ糖は定量できるが、G2F, G3, G3F の peak の幅がやや広がる傾向がある。一方流速を2倍にすると G2F, G3F の peak の幅はせまくなるが、G と F の分離がやや不十分となる。今回はプログラマーを連結していない HPLC を使用したので、2回に分けて分析したが、プログラマーを使用して流速を漸次上昇させるように工夫すれば、1回の操作でより正確に定量できると考えられる。

HPLC によりカップリングシュガーの定量を行う場合、一番大きな問題点は、使用する分離用カラムとして、どのような性質をもつものをえらぶかである。本研究では 80% CH_3CN を移動相とする逆相分配用カラムを使用した。この場合 G3F 以下の低分子オリゴ糖の相互分離はほぼ満足すべき結果を得た。しかし溶媒である 80% CH_3CN に G3F 以上のオリゴ糖が十分に溶解しない。このため高濃度に溶解した試料を少量注入することができず、高分子オリゴ糖の分析にはやや問題があると思わ

れる。試みに 2.0% カップリングシュガー 0.8 ml に CH_3CN 3.2 ml を加え、沈澱する物質を分別し、沈澱物を水に再溶解して PPC で分析すると G2F 以下のオリゴ糖は検出されなかったが、G3F 以上の重合度の糖が見出された。この結果から G2F、G3F などのオリゴ糖を定量する場合には、定量可能の範囲で十分に希釈し、 CH_3CN と混合して 300 μl 程度の液量をマイクロシリンジで HPLC に注入し、分析するのがもっとも良いのではないかと考えられる。なお水系の分析用カラムも予備実験では使用したが、この場合は G2F と G3、GF と G2 を十分に分離することができなかった。

今後ショ糖の代替品としてカップリングシュガーが各種の食品に混入使用される場合があると考えられるが、それらの食品には糖質以外脂質や蛋白質が含まれているので、HPLC を使用して分析する際はできるだけ完全にこれらの物質を除去しておく必要がある。このための技術を確立してはじめて食品中の G2F、G3F の定量が可能となるといえる。また逆相分配系カラムを使用する HPLC では G4F 以上のオリゴ糖の定量は困難であるので、さらに検討をつづける必要がある。

要 約

高速液体クロマトグラフィーを用いて、マルトオリゴ糖やマルトオリゴシルシュクロースの分離定量法について検討した。その結果、逆相分配用カラム $\mu\text{BONDAPAK}$ (糖質分析専用) (4 $\times$ 300 mm) を使用し、溶媒：水/アセトニトリル=20/80、流速 2 ml/分ないしは 4 ml/分の条件で、目的の物質を分離定量できることがわかった。この方法により、グルコース、マルトース、マルトトリオース、フラクトース、シュクロース、グルコシルシュクロース (G2F)、マルトシルシュクロース (G3F) を約 20 分で分析でき、測定感度は 30 μg であることがわかった。

しかし、G2F 以上のオリゴ糖は、溶媒である 80% アセトニトリルに難溶性であるため、定量にはさらに分析条件の検討が必要である。

本実験を行うにあたり、種々ご討論いただいた大阪市立工業研究所所長 辻阪好夫博士、また高速液体クロマトグラフィーの操作についてご指導いただいた当所所員 奥村晋氏、ならびに逆相分配用カラム $\mu\text{BONDAPAK}$ をお貸しいただいた日本ウォーターズリミテッド 末光孝雄氏に深謝いたします。

なお本報の要約は昭和52年“虫歯と Coupling Sugar”第3回研究会議 (1977.7.16) で発表した。

文 献

- 1) S. KITAHATA, N. TSUYAMA and S. OKADA: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 387 (1974).
- 2) 岡田茂孝, 北畑寿美雄: 食品工誌, **27**, 420 (1975).
- 3) 荒谷真平 編: 虫歯と Coupling Sugar, 第1回研究会議報告書 (1975.11.15), 第2回研究会議報告書 (1976.7.16), 国立予防衛生研究所.
- 4) 福本寿一郎, 辻阪好夫: 科学と工業, **28**, 282 (1954).
- 5) Y. TSUJISAKA, J. FUKUMOTO and T. YAMAMOTO: *Nature*, **181**, 94 (1958).
- 6) 福本寿一郎, 岡田茂孝: 醸工誌, **41**, 427 (1967).
- 7) S. P. COLOWICK and N. O. KAPLAN: in "Methods in Enzymology," Vol. III, Academic Press, p. 84 (1957).
- 8) N. E. WELKEL and L. L. CAMPBELL: *J. Bacteriol.*, **86**, 681 (1963).
- 9) I. SMITH: in "Chromatographic Techniques" (William Hinemann ed.) Medical Books, p. 168 (1958).
- 10) D. FRENCH, M. L. LEVINE, J. H. PAZUR and E. NARBERG: *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 353 (1949).
- 11) 小林昭一, 斎藤敏一, 貝沼圭二, 鈴木繁男: 澱工誌, **18**(4), 10 (1971).