高速液体クロマトグラフィーによる 米麴中のグルコサミンの定量

古川恵司・家村芳次・古川彰久・川崎 恒
(菊正宗酒造<株>研究所)

平成2年9月27日受理

Determination of Glucosamine in Rice-koji by High Performance Liquid Chromatography

Keiji FURUKAWA, Yoshitsugu IEMURA,
Akihisa FURUKAWA
and Tsuneshi KAWASAKI

(Research Laboratories of Kiku-Masamune
Sake Brewing Co., Ltd., 1-8-6 Uozaki-
Nishimachi, Higashinada-ku,
Kobe-shi 658)

A useful method was devised for the determination of glucosamine in rice-koji by using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The method was more convenient than colorimetric determination usually employed.

Glucosamine in the sample and galactosamine added as an internal standard were changed to phenylthiocarbamyl derivatives, which were stable at least for a week, and analyzed by reverse-phase HPLC and detection with absorbance at 254 nm.

Results of linearity, reproducibility and recovery test of glucosamine determination showed that this method could be sufficiently applied to estimation of mycelial weight in rice-koji.

Key words: 高速液体クロマトグラフィー・麴菌体量・グルコサミン

緒 言

米麴中の麴菌体を定量するには、一般に酸分解によって麴菌細胞壁より遊離するグルコサミンを比色定量する方法が用いられる^{1,2)}。このときグルコサミン定量に先だってアミノ酸や糖などの発色妨害となる物質をイオン交換樹脂によって除去することが必要であるが、この操作は煩雑であるばかりか定量誤差を招く一因となる。

一方、五味ら³⁾によって報告されている酵素法は簡便

で優れた方法であるが、何より麴菌細胞壁中のキチンを完全に分解できる酵素が不可欠であり、対象とする麴菌株も当該酵素によって分解できるものであることが前提となる。

そこで酸分解によって遊離したグルコサミンを妨害物質の除去操作を行うことなく、HPLC (High Performance Liquid Chromatography) によって定量することを試み、測定しうることを認めたので報告する。

実 験 方 法

1. 米麴消化残渣の調製及び分解

米麴の消化及び残渣の洗浄は五味ら³⁾の方法により行った。洗浄残渣は真空凍結乾燥機で一晩乾燥させた後、米麴 2 g 当たり 4 N-塩酸 4 ml を添加し、大内ら¹⁾の方法に従って 110°C で 5 時間分解した。分解液は No. 5 C 濾紙で濾過し濾液をグルコサミン定量試料とした。

2. グルコサミンの定量

1) 試料の誘導体化⁴⁾

標準試料または米麴消化残渣分解液 (以後麴分解液と称する) は内部標準としての 1 mM ガラクトサミン (シグマ社製) と 1 : 1 で混合し、その 20 μ l を 2 ml 容ガラス製チューブにとった。これを乾燥後、洗浄液 (メタノール : 蒸留水 : トリエチルアミン = 2 : 2 : 1) 10 μ l を添加し再び乾燥後、反応剤 (メタノール : 蒸留水 : トリエチルアミン : イソチオシアン酸フェニール = 7 : 1 : 1 : 1) 20 μ l を添加し室温で 20 分間反応させ PTC (フェニールチオカルバミル) 化した。これを再び乾燥させ、希釈液 (アセトニトリル 2% を含む pH 7.4 リン酸緩衝液) 400 μ l を添加した。

なお、乾燥は真空凍結乾燥機中でそれぞれ 20, 10 及び 60 分間行った。

2) HPLC による誘導体の分離定量

PTC 誘導体は HPLC 逆相クロマトグラフィーにより、以下の条件で分離定量した。所定のピーク溶出後、アセトニトリル : 蒸留水 = 6 : 4 を 7 分間送液し、カラム内に残存する他の成分を溶出させた。

カラム ; 資生堂 CAPCELL PAK C 18 SG-type 4.6 ϕ $\times$ 250 mm

カラム温度 ; 38°C

流速 ; 1.3 ml/min.

移動層 ; pH 6.40, 0.14 M 酢酸緩衝液 (トリエチルアミン 0.5 ml/l, アセトニトリル 18 ml/l を含む。)

検出 ; 254 nm

注入量 ; 20 μ l

3. 装 置

送液用ポンプは Waters 社製 600 E, 検出器は Wa-

ters 社製 484 を使用した。

実験結果及び考察

1. グルコサミン及び内部標準の溶出

標準試薬及び麴分解液のクロマトグラムをそれぞれ Fig. 1 (A) 及び Fig. 1 (B) に示す。標準試薬及び麴分解液いずれにおいても、グルコサミンと内部標準の分離は良好であった。また麴分解液中には誘導体化する以前に 254 nm に吸収をもつ物質の混在が考えられるが、麴分解液を PTC 化せずに HPLC に注入したところ、Fig. 1 (C) に示すようにこれらの物質は内部標準が溶出するまでに溶出してしまうため、定量を妨害することはない。

2. 直線性及び再現性

0~896 mg/l のグルコサミン溶液を調製し、それぞれについて内部標準法により分析した。

Fig. 1 Liquid chromatograms of typical samples.

Peaks 1. internal standard, 2. glucosamine

Retention time (min.) 1. 13.3, 2. 15.3

(A) authentic glucosamine derivatized, (B) *koji*-hydrolyzate derivatized, (C) *koji*-hydrolyzate without PTC-derivatization.

Fig. 2 に示すように、グルコサミン濃度とグルコサミンと内部標準のピーク面積比との間に、高い直線性が認められた。先に示した方法によって通常の米麴を分解した場合、分解液中の濃度は約 370 mg/l となり直線性の高い範囲で測定が可能である。

また、この値をもとに米麴乾物 1 g 当たりのグルコサミン量を算出すると 1,050 μ g となり、大内ら¹⁾や五味ら²⁾が既に報告している値とほぼ一致することから、本法は米麴中の菌体量を定量するのに有効であると考えられる。

さらに麴分解液中のグルコサミン定量において、内部標準との混合以降の操作を 20 回行ったところ、Table 1 に示すように変動係数 2.1% となり、再現性良く分析できることが認められた。

3. 標準添加試験

米麴消化乾燥残渣及びそれに標準グルコサミン 287 mg/l を添加した試料をそれぞれ分解し、グルコサミンを定量したところ、Table 2 に示すように回収率は 103 % と良好であった。

4. 誘導体化試料の安定性

誘導体化試料の安定性をみるため、1 mM 標準グルコサミンと内部標準を混合後 PTC 化し、これに希釈液を添加した状態（溶液状態）あるいは添加する前の状態（乾固状態）で -20°C、4°C 及び 25°C で 5~168 時間

Fig. 2 Standard curve for glucosamine.

Table 1 Reproducibility in the determination of glucosamine in *koji*-hydrolyzate.

Number of analysis	20
Average (mg/l)	369
Coefficient variation (%)	2.1

Koji-hydrolyzate was mixed with the internal standard, galactosamine, derivatized, and analyzed by HPLC. The analysis was repeated 20 times.

Table 2 Recovery of glucosamine in *koji*.

Present (mg/l)	352
Added (mg/l)	287
Measured (mg/l)	647
Recovery (%)	103

2g of *koji* was hydrolyzed with and without addition of standard glucosamine with 4 ml of 4 N-HCl at 110°C for 5 hr.

The hydrolyzates were analyzed by HPLC to examine the recovery of added glucosamine.

放置し HPLC 分析を行った。

PTC 化直後の内部標準との面積比を基準にしてそれぞれのグルコサミン含量を求めたところ、25°C では、Fig. 3 に示すように、いずれの条件下でも少なくとも 168 時間（1 週間）は定量値は一定であった。また図示しなかったが、-20°C、4°C においても同様に安定であった。

従って、実際の定量に当たっては、一度に PTC 化を行って順次 HPLC 分析することが可能である。また、溶液状態でも安定であることからオートサンプラーによる分析も可能である。

要 約

米麴中の麴菌体を定量するために、米麴消化残渣塩酸分解液中のグルコサミンの高速液体クロマトグラフィーによる定量を試みた。

グルコサミン及び内部標準のガラクトサミンは PTC 誘導体化後、逆相クロマトグラフィーにより分離し、254 nm で検出した。各々のピークの分離は良好であり

Fig. 3 Stability of glucosamine determination.

PTC-derivatives of authentic glucosamine were incubated at 25°C. Glucosamine content was calculated on the basis of ratio of peak height of glucosamine to internal standard in 0 h.

—○—: incubation with diluent

--●--: incubation without diluent

直線性、再現性、安定性及び回収試験における結果から、本法が麴菌体定量のための簡便法として有効であることが示唆された。

文 献

- 1) 大内弘造, 石戸輝雄, 菅間誠之助, 野白喜久雄: 醸協, 62, (9) 1029 (1967)
- 2) K. ARIMA, T. UOZUMI: *Agric. Biol. Chem.*, 31, 119 (1967)
- 3) 五味勝也, 岡崎直人, 田中利雄, 熊谷 知栄子, 井上 博, 飯村 稔, 原 昌道: 醸協, 82, (2) 130 (1987)
- 4) 日本生化学会編: タンパク質の化学 (上); p 120 東京化学同人 (1987)