単糖およびオリゴ糖の配位子交換モードによる 液体クロマトグラフィー/質量分析法

Ligand Exchange Liquid Chromatography/Mass Spectrometry of Mono- and Oligosaccharides

中尾千予視¹・蒲生啓司^{1*}・菱田勝巳²・和田啓男²

Chiyomi NAKAO,¹ Keiji GAMOH,^{1*} Katsumi HISHIDA,² and Hiroo WADA²

¹ 高知大学教育学部理科教育講座 *Faculty of Education, Kochi University, Kochi, JAPAN*

² 信和化工株式会社 *Shinwa Chemical Industry Ltd., Kyoto, JAPAN*

A technique was developed for ligand-exchange liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) of mono- and oligosaccharides. A mixture of seven monosaccharides, four disaccharides, and two trisaccharides was successfully analyzed by using an improved ligand-exchange column comprising a semi-rigid styrene-divinylbenzene copolymer-based Ca-type cation-exchange resin (ULTRON PS-80C/10S) in conjunction with electrospray-ionization mass spectrometry (ESI-MS). Water was used as a mobile phase to separate the saccharides within 12 min. The ESI interface was used in negative-ion mode for LC/MS and produced reasonable signals from negative molecular ions ($[M-H]^-$) of the saccharides. The effect of aqueous ammonia used as an additive in the eluent was also examined. The detection sensitivities of the saccharides increased when aqueous ammonia was used as an additive at a concentration of 2 vol%. The effects of separation and ionization parameters, column temperature, and cone voltage on the sensitivity and linearity were examined. Linear plots of peak area *versus* concentration were obtained for MS detection over the range 5–1000 μ M ($r^2=0.951-0.999$) for each saccharide. The detection limits of the target saccharides calculated at a signal-to-noise ratio of 3 ranged from 3.7 to 17.1 ng. The reproducibility of the retention times was 0.66–1.2% and that of the peak areas was 0.96–2.86%. A comparison of these results with those obtained with a normal-phase semimicro aminopropyl column confirmed the usefulness of ligand-exchange LC/MS of mono- and oligosaccharides. The newly developed method was applied in the determination of mono- and oligosaccharides extracted from seaweed and hydrolyzed by a hydrothermal reaction.

(Received September 30, 2005; Accepted January 16, 2006)

1. 序 論

近年、核酸やタンパク質に次ぐ第三の鎖状生命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。かつて糖は、主にエネルギーや組織を形成する要素ととらえられていたが、現在では糖鎖分子が細胞表面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などの分野で注目されてきている。糖鎖研究を行ううえ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⁾、質量分析や多次元核磁気共鳴 (NMR) など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いくつか報告されている^{3), 4)}。一方で、天然には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などがいく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いまだ明らかにされていない点が多く、糖鎖研究を行うにあたって、糖類の簡便かつ高感度な分析法の開発および改良が早急に求められている。

糖は水酸基を多くもつ構造のため、ガスクロマトグラフィー (GC) 法での分析の際には、メチル化などの誘導体化の処理が必要となる⁷⁾。HPLC 法での糖分析においては、糖の高感度検出が容易ではないため、分離法とともに検出法にさまざまな方法が用いられてきた。従来から糖分析に用いられている分離法には、主として配位子交換、順相分配および陰イオン交換法などがあるが、糖類を誘導体化した後に逆相分配法で分析している報告もある⁸⁾。検出法としては、主として示差屈折率、電気化学および蛍光検出法などが用いられてきた。さらに最近では、検出感度の向上

* Correspondence to: Keiji GAMOH, *Faculty of Education, Kochi University, 2-5-1 Akebonocho, Kochi 780-8520, JAPAN*, e-mail: kgamoh@cc.kochi-u.ac.jp
蒲生啓司, 高知大学教育学部理科教育講座, 〒780-8520 高知市曙町 2-5-1

を目的として、液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) 法を用いた分析も行われており、糖類の微量分析法として注目されている。誘導体化法と LC/MS 法を組合せた方法では、例えば Suzuki らは、2-アミノピリジン (2-AP) をはじめとする数種類の試薬でオリゴ糖の誘導体化を行い、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法または高速電子衝撃イオン化 (FAB-LC/MS) 法による検出感度を比較し、数十～数百 pmol の検出下限を得ている⁹⁾。また Kawasaki らは、2-AP の同位体を内部標準として用いることによって、さらなる高感度検出を可能にしている¹⁰⁾。さまざまな誘導体化物質を用いた糖類のポストカラム法については、Honda によって総括されている¹¹⁾。

一方 Fox らは、糖類の誘導体化を行わずに $[M-H]^-$ を直接測定する、HPLC-ESI タンデム質量分析 (MS/MS) 法を用いた中性糖の分析を報告しており、誘導体化法と比較すると高感度検出は難しいが、数 μg ～数百 ng 程度の検出下限が得られている¹²⁾。また Matthews らは、ギ酸アンモニウムを加えた移動相を用いることにより、糖類にギ酸イオンの付加した分子量関連イオンを検出し、誘導体化を行わない糖類の検出を可能にしている¹³⁾。さらに Buriova らによる移動相内の Na^+ を利用した $[M+\text{Na}]^+$ を直接測定する方法¹⁴⁾、Rogatsky らによる Cs^+ を移動相に添加することにより $[M+\text{Cs}]^+$ を直接測定する方法など¹⁵⁾、誘導体化を行わない糖類の高感度検出を可能にしている。特に後者は、数 pg オーダーの高い検出感度が得られている。

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、試薬コストの問題、誘導体化や試薬添加などの手間とそれらを使用することによる環境負荷の問題がある。また、糖の分離についてはいまだ改善されていない点も残っており、検出感度の向上とともに分離の向上も糖分析における課題である。本研究では、単糖およびオリゴ糖の LC/MS 法による簡便かつ高感度な分析法の開発を目的として、配位子交換カラムのセミマイクロ化を行い、ESI 法に基づく LC/MS 法の有用性を検討した。順相分配やイオン交換モードなどの分離カラムを用いた LC/MS 分析法の例は多くあるが、配位子交換モードによる LC/MS 法の報告はほとんどない。配位子交換モードの分離は、糖の構造異性体の分離に有用であることは知られているので、そのセミマイクロカラム化を達成することで LC/MS 法による糖分析に用いた。さらに糖分離後の溶出液に添加するアンモニアが、イオン生成効率を格段に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することによって、質量分析条件の最適化を行った。配位子交換カラムでは移動相に水のみしか使用することができないが、カラム分離後の溶出液に合流する 2 流路系を設定することにより、アンモニアを添加することを可能にした。また、それらの結果を従来の順相分配法による検出感度と比較することで、配位子交換 LC/MS 法の有用性を確認した。さらに、ここで開発した分析法を用いて、海藻から抽出した糖類の分析を行った。すなわち海藻の一種であるスジノリを用いて、水熱反応によって得られる多糖類の

抽出、つづく加水分解によって得られる単糖およびオリゴ糖を本法を用いて分析した。この実験によって数種類の単糖が高い濃度で検出され、本分析法を用いた実試料中の糖類の定性および定量が可能であることを実証した。

2. 実験

2.1 試薬

多重周回飛行時間型質量分析計のモデルを Fig. 1 に示す。このモデルは反射型飛行時間型質量分析計に周回飛行部が付いたものである。

本研究では、単糖およびオリゴ糖として、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、マルトリオース (いずれも和光純薬工業(株)製) を分析に用いた。これらの単糖およびオリゴ糖はすべて 100 mM の水溶液として調製後、適宜希釈してその 10 μL をカラムに注入した。アンモニア水 (25%) およびアセトニトリルはいずれも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 装置および分析条件

LC の送液部に、PU-980 (日本分光(株)製) を用い、恒温槽として NANOSPACE SI-1/2004 ((株)資生堂製) を用いた。検出器には、質量分析計 (VG Quattro II, micro-mass 社製) 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 (Ca 型) (平均粒子径 10 μm) を、高圧スラリー法によりステンレス管 (2.0 mm i.d. $\times$ 250 mmol) に充填したセミマイクロカラム (ULTRON PS-80C/10S, 信和化工(株)製) を新たに開発し、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。一方、比較実験を行うための順相分配モードの分離カラムとして、アミノプロピルシリカ (平均粒子径 5 μm) を、高圧スラリー法によりステンレス管 (2.0 mm i.d. $\times$ 250 mmol) に充填したセミマイクロカラム (ULTRON NH2/5S, 信和化工(株)製) を用いた。移動相として 75% (v/v) アセトニトリルを用い、流量を 0.2 mL/min とした。いずれの分離モードの場合にも、もう 1 台の送液ポンプを用いて 12% アンモニア水溶液を送液し、カラム分離後の移動相と合流させるため、移動相との流量比を 5:1 に設定して、移動相に対する最終的なアンモニア濃度が 2% になるような 2 流路系を設定した。質量分析計のイオン化法としてエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法を用い、ESI 法におけるイオン源温度を 90°C、キャピラリー電圧を 2.5 kV に設定したうえで、負イオン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質量範囲は m/z 50~700、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、すべての単糖およびオリゴ糖から負イオン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キロマトグラムより算出した。

2.3 海藻中の糖類の分析

本分析法の応用例として、海藻から水熱抽出によって得られた糖類を分析の対象とした。水熱反応容器（容量 20 mL）にスジノリ 0.2 g と水 10 mL を入れ、反応条件を設定したオープン内で処理した。すなわち、昇温 50°C/min、反応時間 30 min に設定し、反応温度は 100~300°C の範囲で 50°C 間隔で変化させて設定した。その後、反応液をろ過してろ液を回収し、これに酢酸エチルを加えて水層と有機層とに分離した後、水層部を分析に供した。

3. 結果および考察

3.1 糖の分離とイオンモードの選択

LC/MS 法では、各糖類がどのようなイオン形態で検出され、またどのようなイオン種をベースピークとするのか

という基本的な情報が必要である。本カラムを用いて、各糖それぞれの ESI 法における正イオンモードで質量スペクトルを測定したところ、イオン量が非常に少なく、ベースピークとなるイオン種が特定できないことがわかった。一方、負イオンモードで質量スペクトルを測定したところ、 $[M-H]^-$ が分子量関連イオンとして検出されることがわかった。例として、負イオンモードを用いて分析して得られた三糖のラフィノース、二糖のサッカロース、および単糖のグルコースのマススペクトルを Fig. 1 に示した。図からわかるように、 $[M-H]^-$ をベースピークとするシンプルなスペクトルが得られた。すべての糖類についてのマススペクトルを測定した結果を、検出イオン種の相対強度とともに Table 1 にまとめた。単糖はすべて $[M-H]^-$ をベースピークとするシンプルなスペクトルが得られた

Fig. 1. Mass spectra of raffinose, saccharose, and glucose on negative ESI. 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, 20V. Sample concentration, 100 μ M each.

Table 1. Relative Intensities of the Negative-Ions in ESI Mass Spectra of the Saccharides

Sugar	m/z [relative intensity (%)]				
	$[M-H]^-$	$[2M-H]^-$	$[Z_1-2H]^-$	$[Y_1]^-$	$[Y_2]^-$
Trisaccharides					
Raffinose	503 (100)			179 (4.5)	341 (4.5)
Maltotriose	503 (98)		161 (100)	179 (28)	341 (58)
Disaccharides					
Saccharose	341 (100)	683 (20)			
Cellobiose	341 (15)	683 (16)	161 (100)	179 (32)	
Maltose	341 (38)	683 (20)	161 (100)	179 (43)	
Lactose	341 (49)	683 (18)	161 (100)	179 (33)	
Monosaccharides					
Glucose	179 (100)	359 (15)			
Xylose	149 (100)	299 (13)			
Galactose	179 (100)	327 (9.3)			
Mannose	179 (100)	359 (17)			
Rhamnose	163 (100)	359 (19)			
Arabinose	149 (100)	299 (14)			
Fructose	179 (100)	359 (10)			

LC conditions: column, ULTRON SP-80C/10S; column temperature, 70°C; mobile phase, H₂O; flow rate, 0.05 mL/min; detection, MS detection using ESI-MS interface in the negative mode; source temperature, 90°C; capillary voltage, 2.5 kV; cone voltage, 20 V; sample concentration, 100 μ M each.

が、サッカロース以外の二糖およびマルトトリオースでは、イオン源内でグリコシド結合が開裂して生じたと思われるフラグメントイオン (m/z 161, 179, 341) が強い強度で観察され、 $[M-H]^-$ の強度は相対的に低かった。オリゴ糖の開裂によって生じるフラグメントイオンの表記の仕方は、Costello らによって示された命名法¹⁶⁾ を参考にした。その開裂の図を Fig. 2 に示した。三糖ではいずれも $[M-H]^-$ をほぼベースピークとするが、マルトトリオースでは $[Z_1-2H]^-$ のフラグメントイオン (m/z 161) の強度が最も高かった。以上のことから、構成糖の違いによるイオン化のパターンに違いがあることが明らかになった。理由は明らかになっていないが、構成糖の違いが、オリゴ糖がイオン化する際の分解のしやすさにかかわっているのではないかと考えられる。

糖類 13 種の試料について、負イオンモードを用いて詳細な保持時間がわかるように単独分析を行い、その結果得られたマスキロマトグラムを Fig. 3 に示した。単糖はそのほとんどが異なる保持時間で検出され、マスキロマトグラム上区別して検出することが可能であった。しかしながら、ガラクトースおよびマンノースは異なる保持時間で検出されたものの、その差は小さく、試料中に混合して存在している場合にはマスキロマトグラムでも区別することが難しい。また、二糖および三糖においても同様に、保持時間は異なるものの、混合液中での各々の分離は難しかった。この結果は、従来の汎用型 Ca 型配位子交換カラムでも同様に観察されてきた結果であり、セミマイクロ化したことによって格段に解決するものではなかった。このように、分離上の課題はいくつか残ったものの、14 分以内で全成分を溶出することができた。

3.2 移動相添加物の最適化

配位子交換クロマトグラフィーの最大の特徴は、移動相

Fig. 2. Types of di- and tri-saccharides fragmentation.¹⁶⁾

として水しか使用できないことである。そのため、イオン化効率の向上やポストカラム誘導体化を目的として移動相に溶媒や試薬などを添加することができない。しかしなが

Fig. 3. Mass chromatograms of 13 saccharides on negative ESI. LC and MS conditions were the same as Fig. 1. SIR: selected ion recording.

ら、移動相自身のイオン化も抑えられるためバックグラウンドが低く、目的物質のイオン化効率に基づいた検出ができる。糖分子は、水を移動相として負イオンモードで一定量の感度を保持できるが、さらにイオン化効率を向上させ検出感度を向上させることを目的として、糖分離後直ちに質量分析部に導く流路と溶出液にアンモニア水を添加して合流する2流路系を設定した。また、添加したアンモニアによる検出感度の向上を確認するため、メタノールおよびアセトニトリルを用いて同様の実験を行い、添加物の種類や濃度が糖のイオン化効率に与える影響について、グルコースを用いて検出感度を比較した。

アンモニア、メタノール、およびアセトニトリルの移動相添加後の濃度を、アンモニアの場合は1, 2, 5%(v/v)、メタノールおよびアセトニトリルの場合は1, 2, 5, 10, 15, 30%(v/v)とそれぞれ設定して分析した場合の、グルコースの検出感度を比較した (Fig. 4)。その結果、アンモニア濃

Fig. 4. Effect concentration of MeOH, AcCN or ammonia added to mobile phase on the ion intensity of $[M-H]^-$ of glucose. LC conditions: column, flow injection analysis; mobile phase, H_2O ; flow rate, 0.01 mL/min. MS conditions were the same as Fig. 1.

度を2%とした場合に最も検出感度が高く、それ以上濃度を高くしても感度は上昇しなかった。また、メタノールやアセトニトリルを加えた場合には、若干の感度向上は見られたものの、アンモニアを添加した場合のほうが、はるかに検出感度が高かったため、本研究では移動相およびアンモニア水の流量比を5:1に設定し、合流後のアンモニア濃度を2%とした。アンモニア濃度によって検出感度に極大値をもつ理由としては、アンモニアの添加により OH^- が試料分子から脱プロトンすることによって負イオン効率が向上するが、アンモニアが一定濃度を超えると $[M-H]^-$ 量の生成が飽和に達するためではないかと考えられる。

3.3 カラム温度の最適化

樹脂系のカラムでは温度が分離に影響を及ぼすパラメータの一つであるため、カラム温度を変化させることによって、成分分離の向上を試みた。カラム温度を65～75℃の間で5℃間隔に設定したときの保持時間を比較したが、いずれのカラム温度においても各成分の保持時間の変

Fig. 5. Effect of column temperature on the ion intensity of $[M-H]^-$ of each saccharides. LC and MS conditions were the same as Fig. 1 except for column temperature.

Fig. 6. Effect of cone voltage on the ion intensity of $[M-H]^-$ of each saccharides. LC and MS conditions were the same as Fig. 1 except for cone voltage.

化に大きな差は見られなかった。しかしながら、検出感度について、Fig. 5 に示すように若干ながら感度差をもたらすことがわかったので、本研究ではカラム温度を 70℃とした。この理由は現段階では不明であるが、70℃という温度は逆相系のカラムなどを使用する温度よりは高く、むしろイオン源温度に近い。このような結果が現れた要因としては、カラム温度が試料の MS でのイオン化効率の向上と何らかの関係があることが考えられるため、イオン源導入時での移動相温度の違いがイオン化効率にどの程度影響を与えるものか、今後検討すべき課題である。

3.4 コーン電圧の最適化

ESI におけるイオン化効率の最適化にかかわる MS 条件のパラメーターはいくつか存在するが、ここではイオン化効率に特に影響を与えるコーン電圧について検討を行った。コーン電圧を 10~80 V の範囲で 10 V 間隔で設定し、糖類 13 種類の $[M-H]^-$ の相対強度を比較した。その結果ほとんどの糖類で、コーン電圧を 20 V に設定したときに最も検出感度が高くなることがわかった。Fig. 6 に、マルトトリオース、マルトース、グルコース、ラムノース、アラビノースの 5 種類を用いた結果を示した。これ以外の他の糖類も、これら 5 種類と同様の結果が得られたことか

Table 2. Limits of Detection of Saccharides

Sugar	SIM (pmol)
Raffinose	0.05
Maltotriose	0.25
Cellobiose	1.25
Saccharose	0.50
Maltose	0.50
Lactose	1.25
Glucose	2.50
Xylose	1.25
Galactose	2.50
Mannose	2.50
Rhamnose	1.00
Fructose	2.50
Arabinose	1.25

LC/MS conditions were shown in Table 1.

Table 3. Retention Time and Separation Factor of Saccharides Using ULTRON PS-80C/10S

Sugar	MW	Monitoring ion (m/z)	Retention time (min)	k ($t_0=6.09$)	α
Raffinose	504.44	$[M-H]^-$ (503)	8.09	k_1	0.328
Maltotriose	504.44	$[M-H]^-$ (503)	8.15	k_2	0.338
Cellobiose	342.30	$[M-H]^-$ (341)	8.53	k_3	k_3/k_2 1.184
Saccharose	342.30	$[M-H]^-$ (341)	8.63	k_4	0.417 k_4/k_3 1.041
Maltose	342.30	$[M-H]^-$ (341)	8.70	k_5	0.429 k_5/k_4 1.028
Lactose	342.30	$[M-H]^-$ (341)	8.85	k_6	0.453 k_6/k_5 1.057
Glucose	180.16	$[M-H]^-$ (179)	9.88	k_7	0.622 k_7/k_6 1.373
Xylose	150.13	$[M-H]^-$ (149)	10.45	k_8	0.716 k_8/k_7 1.150
Galactose	180.16	$[M-H]^-$ (179)	10.71	k_9	0.759 k_9/k_8 1.060
Rhamnose	164.16	$[M-H]^-$ (163)	10.89	k_{10}	0.788 k_{10}/k_9 1.039
Mannose	180.16	$[M-H]^-$ (179)	10.95	k_{11}	0.798 k_{11}/k_{10} 1.013
Fructose	180.16	$[M-H]^-$ (179)	11.88	k_{12}	0.951 k_{12}/k_{11} 1.191
Arabinose	150.13	$[M-H]^-$ (149)	11.89	k_{13}	0.952 k_{13}/k_{12} 1.002

LC/MS conditions were shown in Table 1.

ら、本研究ではコーン電圧を 20 V に設定することとした。

3.5 単糖およびオリゴ糖の定量性および検出限界

以上の検討結果より、LC/MS 条件を最適化したうえで、負イオンモードによる各単糖およびオリゴ糖の定量性および検出限界を測定した。すべての単糖およびオリゴ糖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、いずれも 5~1,000 pmol の間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 での各糖の保持時間およびピーク面積の再現性は、それぞれ 0.66~1.20% および 0.96~2.86% 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た。それを Table 2 に示した。単糖ではいずれも数 pmol のオーダーで検出が可能であり、オリゴ糖では数百 fmol のオーダーで検出が可能であった。この値は、

Fig. 7. Comparison of relative sensitivities of $[M-H]^-$ of each monosaccharides obtained by ligand exchange and normal phase LC/MS method. LC conditions for ligand exchange mode: column, ULTRON PS-80C/10S; column temperature, 70℃; mobile phase, H₂O; flow rate, 0.05 mL/min. LC conditions for normal phase mode: column, ULTRON NH2/5S; column temperature, ambient; mobile phase, 75% AcCN; flow rate, 0.2 mL/min. MS conditions were the same as Fig. 1.

Fig. 8. Saccharides in seaweed, *Ulva prolifera*, which were extracted and hydrolyzed by hydrothermal reaction. LC and MS conditions were the same as Fig. 1.

従来の誘導体化法を用いた LC/MS 法による糖分析と比較して、同等レベルか少し高い値が得られており、本法が誘導体化法と比べて簡便な方法であることから、単糖およびオリゴ糖の高感度分析法として有効であることが示された。

3.6 順相分配モードとの比較

順相分配モードは従来から糖分析に広く用いられている分離モードであり、早くからセミマイクロカラムの開発も行われているので、ここでは、本法で用いた配位子交換セミマイクロカラムの有用性を実証するうえで、2 種のカラムを用いて分離および検出感度の比較を行った。各セミマイクロカラムで分析条件をそれぞれ最適化した後、各モードにおける保持時間および分離係数を求めた。本法の配位子交換セミマイクロカラムでの保持時間および分離係数を、Table 3 にまとめた。両モードの保持時間および分離係数について比較したところ、いずれも大きな差は見られなかったが、配位子交換モードのほうがピーク形状はよく理論段数も高かった。検出感度について比較したところ、すべての単糖において、配位子交換モードのほうが順相分配モードよりも高い検出感度を得られることがわかった。単糖 7 種について、各分離モードで検出された面積値を成分ごとに相対的に表示した (Fig. 7)。その相対比は成分によって多少異なるが、約 10~20 倍の感度差が観察された。その理由としては、4.2 項で検討したように、移動相組成に基づくイオン化効率が要因であると考えられる。配位子交換モードでは、移動相の水に加えてアンモニアの添加によって OH^- による試料分子からのプロトン脱離が起きやすく、 $[\text{M}-\text{H}]^-$ の生成が効率的にうながされることによって検出感度を上昇させたが、順相モードではアセトニトリルを用いるため、糖のイオン量としては相対的に減少したと考えられる。

3.7 海藻中の単糖およびオリゴ糖の分析

本法の実試料に対する有効性を確認するための応用例として、海藻の水熱処理によって得られる試料中の単糖およ

びオリゴ糖の測定を行った。水熱反応の温度を常温および 100~300°C の間で 50°C 間隔に設定し、それぞれの条件で生成する中性糖の生成量を測定した。海藻にはスジノリ (*Ulva prolifera*) を用いた。分析の結果を Fig. 8 に記した。図からわかるように、二糖および三糖はほとんど検出されず、グルコースをはじめとした単糖が大量に検出された。さらにグルコースに関しては、200°C 以上で水熱反応を行った場合、反応温度の上昇とともに生成量も上昇していくことが観察されたことから、反応温度と生成量との間に明らかな相関性があると考えられる。最終的には、海藻中に含まれる多糖類の水熱加水分解によって、生成量や生成糖を明らかにしていくことが目的であるが、現段階では、水熱反応の条件によって生成する単糖の種類や濃度変化の追跡が本法によって可能であったことから、本法が実試料に対して十分に適用できることを確認できた。

以上本研究では、配位子交換モードのセミマイクロカラムの開発とアンモニア添加法によって、単糖およびオリゴ糖に対する ESI-LC/MS 分析法を確立し、検出感度および定量性の面から実用的に応用可能であることが示唆された。分離上はいまだ課題が残されているが、ESI 法によって単糖およびオリゴ糖のいずれの場合でも $[\text{M}-\text{H}]^-$ として検出することが可能であり、さらに実試料分析に対してもその有用性が確認できたことから、定量性のある分析法として技術的に貢献できるものと思われる。

文 献

- 1) 戸井田敏彦, ふんせき (*Bunseki*), **369**, 504 (2005).
- 2) 戸井田敏彦, ファルマシア (*FARUMASHIA*), **40**, 313 (2004).
- 3) N. Kawasaki, S. Itoh, M. Ohta, and T. Hayakawa, *Anal. Biochem.*, **316**, 15 (2003).
- 4) N. Kawasaki, M. Ohta, S. Itoh, M. Hyuga, S. Hyuga, and T. Hayakawa, *Biologicals*, **30**, 113 (2002).
- 5) M. Fuchigami, *J. Food Sci.*, **55**, 739 (1990).
- 6) H. Garna, N. Mabon, B. Wathelet, and M. Paquot, *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.*, **68**, 297 (2003).

- 7) 常定 健, 竹原淳彦, 光石一太, 井原俊英, 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **49**, 437 (2000).
- 8) D. B. Gomis, D. M. Tamayo, and J. M. Alonso, *Anal. Chim. Acta*, **436**, 173 (2001).
- 9) S. Suzuki, K. Kakehi, and S. Honda, *Anal. Chem.*, **68**, 2073 (1996).
- 10) J. Yuan, N. Hashii, N. Kawasaki, S. Itoh, T. Kawanishi, and T. Hayakawa, *J. Chromatogr. A*, **1067**, 145 (2005).
- 11) S. Honda, *J. Chromatogr. A*, **720**, 183 (1996).
- 12) D. S. Wunschel, K. F. Fox, A. Fox, M. L. Nagpal, K. Kim, G. C. Stewart, and M. Shahgholi, *J. Chromatogr. A*, **776**, 205 (1997).
- 13) M. Ramm, J.-L. Wolfender, E. F. Queiroz, K. Hostettmann, and M. Hamburger, *J. Chromatogr. A*, **1034**, 139 (2004).
- 14) T. S. McIntosh, H. M. Davis, and D. E. Matthews, *Anal. Biochem.*, **300**, 163 (2002).
- 15) E. Rogatsky, H. Jayatilake, G. Goswami, and V. Tomuta, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **16**, 1805 (2005).
- 16) B. Domon and C. E. Costello, *Glycoconj. J.*, **5**, 397 (1988).

Keywords: Mono- and oligosaccharide, Electrospray ionization, Liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS), Semimicro column, Ligand exchange mode