論文特集「糖質の化学」

(日本化学会誌, 1982, (10), p.1603~1608)

© 1982 The Chemical Society of Japan

タウリン-ホウ酸試薬を用いる薄層および高速液体
クロマトグラフィーにおける糖類の蛍光分析

(1982年3月2日受理)

加藤 武彦*・飯沼 文夫**・木下 俊夫

タウリンを発蛍光試薬として、糖類の薄層および高速液体クロマトグラフィーを検討し、簡便、迅速、高感度な分離分析法を確立した。糖類はタウリン試薬と中性付近の pH で加熱されると短時間で強い蛍光を発する。使用したタウリンは安価で安定性のよい試薬であり、かつ試薬自身にはほとんど蛍光がないのでより実用的な試薬である。本発蛍光反応は還元糖に対して特異的である。しかしながら還元糖のうちオリゴ糖は単糖にくらべて、やや感度が低くなる。薄層クロマトグラフィーにおける D-グルコースの検出限界は 0.1 nmol/spot で従来法より高感度である。また再現性は D-グルコース 0.5 μ g/spot において変動係数 3.6%($n=10$) であった。つぎに高速液体クロマトグラフィーにおける D-グルコースの検出限界は、0.27 nmol/10 μ l で従来の強酸性下での検出感度にくらべて 100 倍の感度を有する。また再現性は D-グルコース 1 nmol/10 μ l で変動係数 1.8%($n=10$) であった。

1 緒 言

糖は、アミノ酸、タンパク質とならんで重要な生体成分であり、その分析は、生化学、臨床化学の各分野において大きな重要性をもち、古くから糖尿病などの疾病の診断をはじめ種々の応用がなされてきている。しかし、生体内の糖は種類も多く、これらの変動を同時に把握する必要性から、糖の分離分析、とくにクロマトグラフィーがさかんに研究されるにいたった¹⁾。とくに、最近の高分離能を有する薄層クロマトグラフィー（以下 TLC と略記する）および高速液体クロマトグラフィー（以下 HPLC と略記する）の進歩は目ざましく、迅速性と前処理の簡便性の面では、以前から糖にしばしば利用されてきたペーパークロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィーを凌駕しつつある。

さらに、TLC, HPLC は幅広い検出試薬を選択することができ、特色があり、検出の手がかりとなる官能基の種類に乏しい糖類には適した方法である。このような糖の検出試薬は数多く報告されているが、以前から用いられてきた呈色反応は、強酸中での加熱など苛酷な条件のものが多く、感度が十分でない上、副反応の増大や環境汚染を招きやすい点に問題がある。こうした観点から、最近、糖の TLC, HPLC 用蛍光検出試薬が工夫されつつある。

TLC 用の試薬としては、Iwakawa ら²⁾が、10%エチレンジアミン硫酸塩-メタノール溶液を用いて糖を蛍光検出している。検

出限界は 0.05 μ g 程度である。また Bounias ら³⁾は、N-1-ナフチルエチレンジアミン塩酸塩の硫酸-メタノール溶液を用い、1 nmol レベルで検出できる方法を報告している。

HPLC 用の試薬としては、ブレおよびポストラベル用の 2 種類がある。このうち、辻ら⁴⁾によりダンシルヒドラジンをを用いるブレラベル法が開発され、糖を高感度で蛍光検出している。また、Alpenfels⁵⁾らによっても同様にダンシルヒドラジンをを用いる方法が報告されている。今日、糖のブレラベル化試薬は数の上では少ないが、すぐれた分離能をもつ充填剤が開発され、かつ特異性の高い高感度な検出器が利用できるようになれば、さらにブレラベル法による分析は発展するであろう。

つぎに、ポストラベル化試薬としては、従来、5-ヒドロキシ-1-テトラロン⁶⁾を初めとして、レソルシノール⁷⁾、アントロン⁸⁾、o-アミノチオフェノール⁹⁾、セリウム(III)イオン¹⁰⁾など、種々の蛍光試薬が開発されてきたが、いずれも強酸中で反応させるため、一般的な分析法としては普及していない。これに対して著者ら¹¹⁾はすでに中性付近の緩やかな条件下で糖とすみやかに反応して

- 3) M. Bounias, *Anal. Biochem.*, 106, 291(1980).
- 4) 武田素子, 前田昌子, 辻 章夫, 日本薬学会第 100 年会講演要旨集, p.567(1980).
- 5) W. F. Alpenfels, *Anal. Biochem.*, 114, 153(1981).
- 6) T. Momose, Y. Ohkura, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 4, 209(1956).
- 7) C. J. Rogers, C. W. Chambers, N. A. Clarke, *Anal. Chem.*, 38, 1851(1966).
- 8) 平山 宏, 平木敬三, 西川泰治, 分析化学, 20, 1435(1971).
- 9) 中野三郎, 谷口寛一, 御子紫和雄, 薬誌, 93, 350(1973).
- 10) S. Katz, W. W. Pitt, J. E. Mrocheck, S. Dinsmore, *J. Chromatogr.*, 101, 193(1974).
- 11) T. Kato, T. Kinoshita, *Anal. Biochem.*, 106, 238(1980).

北里大学薬学部, 108 東京都港区白金

** 帝京大学薬学部, 199-01 神奈川県津久井郡相模湖町寸沢嵐

1) 辻 章夫, ぶんせき, 4, 231(1982).

2) J. Iwakawa, H. Kobatake, I. Suzuki, H. Kushida, *J. Chromatogr.*, 193, 333(1980).

強い蛍光を発する 2-アミノエタノール-ホウ酸試薬を見だし、これを HPLC におけるポストラベルに利用して、単糖、オリゴ糖を含む還元糖の簡便、迅速、高感度な分析法を確立した。これは HPLC の溶離液に 2-アミノエタノール-ホウ酸試薬を送液して加熱するのみで、強い蛍光を示すものである。

最近、本田ら¹²⁾は、シアノアセトアミド試薬が、ホウ酸緩衝液中で還元糖と反応して強く発蛍光することを見だし、この方法を糖類の HPLC の検出に応用して高感度な分析法を報告している。しかし、この試薬は安定性が悪いので、高濃度の試薬水溶液とリン酸-ホウ酸緩衝液を二つのポンプで送液し、反応直前に混合する必要がある。また各種単糖の間で発蛍光率に差が大きい。また Mopper ら¹³⁾はエチレンジアミンをホウ酸錯イオンによる糖のイオン交換クロマトグラフィーのポストラベル検出法に利用している。しかし、この方法は発蛍光反応にやや時間を要するので、多成分を分析する場合、検出時間が長くなる欠点がある。検出限界は、1 nmol 程度で吸光度法による検出法と同程度であった。

著者ら¹⁴⁾は一方タウリンもホウ酸緩衝液中で糖と反応して強い蛍光を示すことを見だし、これによる糖の微量分析法をも発表した。タウリンはきわめて安定で、固体状態でも、また HPLC 用試薬として調製したのちも、長時間の使用に耐える。また各種単糖間の発蛍光率に差が少ないことも利点である。さらに、前回著者らが発表した 2-アミノエタノールが使用前に蒸留を要するのにくらべ、市販品をそのまま利用できる点も、きわめて実用性が高いので、これを糖の HPLC に応用した。またタウリンは糖の TLC においても、きわめて高感度な試薬であることを明らかにした。

2 実 験

2.1 薄層クロマトグラフィー

2.1.1 試薬：1-ブタノール、エタノール、リン酸一カリウム、ホウ酸ナトリウムは和光純薬社製特級試薬、タウリンは半井化学薬品社製特級試薬、各種単糖、オリゴ糖類は和光純薬製試薬を用いた。薄層板は無蛍光性 Silicagel 60 precoated plate (Merck, 5 cm×20 cm) を 105°C で 30 分間乾燥したのちデシケーター中で保存する。

2.1.2 装置：スポット用キャピラリーは MODULOHM I/S 製 VITREX Micro pipettes、展開槽は矢沢円筒型 (直径 120 mm、高さ 240 mm)、加熱反応槽はいすず製作所製、恒温乾燥器、デンストメーターは常光産業社製、蛍光スキャニングメーター、DENSITRON FR-1 (励起光源 330 nm、蛍光フィルター 440 nm) を使用した。

2.1.3 分離および検出：糖標準原液 (1 mg/ml) を調製し、適宜希釈して、その 1 μ l を薄層板の下端から 2 cm のところにスポットし、室温で新調製の展開溶媒、1-ブタノール：エタノール：水 (5:3:2) を用いて展開する。のちに風乾した薄層板に噴霧試薬の 0.05 mol·dm⁻³ ホウ酸ナトリウムと 0.1 mol·dm⁻³ リ

Fig. 1 Flow diagram of the HPLC equipment

ン酸一カリウム (pH 7.5) の緩衝液に 8% タウリンを含む水溶液を 10 秒間噴霧し、加熱反応槽中 130±1°C で 10 分間加熱して発蛍光させる。放冷後、常光産業株式会社製蛍光スキャニングメーター DENSITRON FR-1 で蛍光強度を測定する。

2.2 高速液体クロマトグラフィー

2.2.1 試薬：ホウ酸、ホウ酸ナトリウム、水酸化カリウム、および水酸化ナトリウムは和光純薬特級試薬、各種単糖、オリゴ糖類は和光純薬製試薬を用いた。タウリンは半井化学薬品社製特級試薬、アセトニトリルは和光純薬高速液体クロマトグラフィー用を用いた。

2.2.2 装置：ポンプは溶離液と発蛍光試薬の送液ともに島津製作所製 LC-3A 型、カラムはダウケミカル社製 Aminex A-27 (ホウ酸塩型 30 cm×4 mm i. d.)、または Merck 社製 Lichrosorb-NH₂ (30 cm×4 mm i. d.)、インジェクターは島津製作所製 SIL-1A 型、カラムの温度制御は Grant Instrument 社製 JB-3 型恒温槽、加熱反応槽は大洋科学工業社製、シリコンオイル槽 Thermo Unit Minder H 型 (使用温度範囲、室温+5~180°C、温度精度 ±0.05~0.2 deg.)、検出器は島津製作所製蛍光光度計、FLD-1 (励起光源は FLD-1 付属 360 nm 用ランプ、二次フィルターは FLD-1 付属 EM-4、フローセルは感度を増大させるためにセル容量 50 μ l を用いた)、記録計は島津製作所製 R-11 型を使用した。

2.2.3 分離および検出

(1) Lichrosorb-NH₂ カラムを用いる逆相分配クロマトグラフィー：溶離液としてアセトニトリル-水 (80:20) を用い、流速 1.5 ml/min で送液する。図 1 のフローダイアグラムにしたがい、インジェクターから糖試料溶液を 10 μ l 注入する。つぎに Lichrosorb-NH₂ カラム (カラム温度は室温) で分離したのち、発蛍光試薬の 8% タウリンを含む 0.05 mol·dm⁻³ ホウ酸ナトリウム (水酸化ナトリウム粒で pH 8.7 に調整) 水溶液を流速 0.5 ml/min で加え、150°C の加熱反応槽を通して発蛍光させ、冷却管 (内径 2 cm、長さ 20 cm の Liebig 管内に内径 0.3 mm、長さ 2 m のステンレススチールチューブをラセン形に固定し、Liebig 管内に流水を通す) を通過させたのち、その蛍光強度を測定する。

(2) Aminex A-27 カラムを用いるイオン交換クロマトグラフィー：溶離液として 0.5 mol·dm⁻³ ホウ酸 (水酸化カリウム粒で pH 8.7 に調整) を用い、流速 2.0 ml/min で送液する。インジェクターから糖試料溶液を 10 μ l 注入する。Aminex A-27 カラム (カラム温度 61°C) で分離したのち、発蛍光試薬の 8% タウリン水溶液を流速 0.5 ml/min で加え、150°C の加熱反応槽を通して発蛍光させ、冷却管 (同上) を通過させたのち、そ

12) S. Honda, Y. Matsuda, M. Takahashi, K. Kakehi, S. Ganno, *Anal. Chem.*, **52**, 1079(1980).

13) K. Mopper, R. Dawson, G. Liebezeit, H. P. Hansen, *ibid.*, **52**, 2018(1980).

14) T. Kato, T. Kinoshita, *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 1291 (1978).

Fig. 2 Excitation and emission spectra

Fig. 3 Effect of taurine concentration

の蛍光強度を測定する。

3 結 果

3.1 薄層クロマトグラフィー

以下の条件検討は D-グルコース (0.3 $\mu\text{g}/\text{spot}$) を標準試料として行なった。

図2に薄層上で D-グルコースをタウリン試薬で発蛍光させたときの励起、蛍光スペクトルを示す。励起極大波長 330 nm, 蛍光極大波長 416 nm であった。

図3に噴霧試薬中のタウリン濃度と蛍光強度との関係を示す。タウリン濃度 6% から蛍光強度はほぼ一定となったので、本法では 8% を用いることにした。つぎに図4に噴霧試薬中の pH と蛍光強度の関係を示す。pH は 7.4 から 8.0 まで検討し、pH 7.4 から 7.6 の範囲で最大の蛍光強度を与えたので、本法では pH 7.5 を用いた。

図5に反応温度と蛍光強度の関係を示す。反応温度は 115°C から 135°C まで検討したところ、125°C から 135°C の範囲で蛍光強度がほぼ一定となったので本法では 130 $\pm$ 1°C を用いた。

図6に発蛍光における加熱時間と蛍光強度の関係を示す。加熱温度 130 $\pm$ 1°C において、加熱時間を 3分から 15分まで検討したところ、9分からはほぼ一定となったので本法では 10分間加熱した。

Fig. 4 Effect of pH

Fig. 5 Effect of reaction temperature

Fig. 6 Effect of reaction time

図7に本定量操作にしたがって作成した。おもな糖の検量線を示す。D-キシロースは 0.05 $\mu\text{g}/\text{spot}$ から 0.5 $\mu\text{g}/\text{spot}$ の範囲で、D-リボース、D-グルコース、D-ガラクトースでは 0.05 $\mu\text{g}/\text{spot}$ から 1.0 $\mu\text{g}/\text{spot}$ の範囲で、ラクトースでは 0.1 $\mu\text{g}/\text{spot}$ から 1.0 $\mu\text{g}/\text{spot}$ の範囲で原点を通る直線関係が成立した。また D-グルコース 0.5 $\mu\text{g}/\text{spot}$ における再現性は変動係数 3.6% ($n=10$) であった。

表1に本法における各種糖類の検出限界を示す。各単糖類の検出限界は 0.1 nmol/spot ないし 0.2 nmol/spot 程度である。しかしオリゴ糖は単糖にくらべて、やや感度が低い。本法は還元糖

Table 1 Limit of detection

Carbohydrate	nmol/spot	Carbohydrate	nmol/spot
D-Arabinose	0.2	Cellobiose	0.8
D-Xylose	0.2	Lactose	0.3
D-Ribose	0.2	Maltotriose	0.3
D-Glucose	0.1	Glucuronolactone	0.2
D-Galactose	0.2	N-Acetyl-	
D-Mannose	0.2	D-glucosamine	0.3
L-Sorbose	0.1	D-Mannitol	—
D-Fructose	0.1	D-Sorbitol	—
L-Rhamnose	0.2	α -Methyl	
Maltose	0.3	D-glucoside	—

Silica gel plate (5 cm $\times$ 20 cm) n -BuOH : EtOH : H₂O = 5 : 3 : 2

Fig. 7 Standard curves for reducing sugars

Fig. 8 Excitation and emission spectra

に特異的であり、糖アルコールやグリコンドは発蛍光しない。さらに、薄層板上のバックグラウンドは小さく、これも微量検出には有利である。

3.2 高速液体クロマトグラフィー

以下の条件検討はカラムに Lichrosorb-NH₂、標準試料に D-グルコース (9.6 μ g/10 μ l) を用いて行なった。

図 8 に本法の操作にしたがって発蛍光させた D-グルコースの励起、蛍光スペクトルを示す。励起極大波長 368 nm、蛍光極大波長 446 nm であった。

図 9 に発蛍光試薬中のタウリン濃度と蛍光強度の関係を示す。発蛍光試薬としては 0.05 mol $\cdot$ dm⁻³ のホウ酸ナトリウム水溶液に 8% になるようにタウリンを溶解し、のちに水酸化ナトリウム粒で pH を 8.7 に調整したものが最大の蛍光強度を与えた。

Fig. 9 Effect of taurine concentration

Fig. 10 Effect of pH

Fig. 11 Effect of reaction temperature

図 10 に発蛍光試薬の pH と蛍光強度の関係を示す。8% タウリンを含む 0.05 mol $\cdot$ dm⁻³ ホウ酸ナトリウム水溶液を水酸化ナトリウム粒で pH を調整して、pH 8.1 から 9.2 まで検討したところ、pH 8.7 が最大の蛍光強度を与えた。

図 11 に発蛍光反応温度と蛍光強度の関係を示す。加熱反応槽内のステンレススチールチューブは内径 0.5 mm、長さ 20 m のものを用いた。反応温度は 110°C から徐々に蛍光強度は増大し、150°C から 160°C の範囲でほぼ一定の蛍光強度になったので、本法では 150°C の反応温度を用いた。

図 12 に Lichrosorb-NH₂ カラムを用いて D-グルコース、マルトオリゴ糖 (各 0.96 μ g/10 μ l) を分析したクロマトグラムを

Table 2 Fluorescence intensity of various carbohydrates

Carbohydrate	Relative fluorescence intensity	Carbohydrate	Relative fluorescence intensity
D-Glucose	100	Maltose	58
D-Galactose	68	Maltotriose	63
D-Mannose	89	Lactose	53
D-Arabinose	47	Cellobiose	28
D-Lyxose	147	N-Acetyl-	
D-Ribose	71	D-glucosamine	18
D-Xylose	137	2-Deoxyl-D-ribose	0
L-Rhamnose	100	D-Sorbitol	0
L-Fucose	37	α -Methyl	
D-Fructose	47	D-glucoside	0
L-Sorbose	116	Sucrose	0
D-Glucosamine-HCl	110	D-Raffinose	0
		Stachyose	0
		Amylose	0

Fig. 12 Chromatographic separation of reducing sugars

示す。このときの D-グルコースの検量線は 0.27 nmol/10 μ l から 5.3 nmol/10 μ l の範囲で原点を通る直線となった。また D-グルコース (1 nmol/10 μ l) における再現性は変動係数 1.8% ($n=10$) であった。

表 2 に Lichrosorb-NH₂ カラムを用いて D-グルコースを 100 としたときの各糖 (5.3 nmol/10 μ l) における相対蛍光強度を示す。これから各種単糖の間には蛍光強度に大きな差が見られない。また TLC の場合と同様、糖アルコール、グリコシドは蛍光せず、D-リボースの 2-デオキシ体も蛍光は見られない。つぎにオリゴ糖は単糖にくらべて蛍光率は低くなるが、重合度が大きくなるにしたがい蛍光は減少する。またスクロースのような非還元糖は蛍光しない。

図 13 に Aminex A-27 カラムを用い、単糖、二糖類 (各 27 nmol/10 μ l) を分析したクロマトグラムを示す。

図 14 に Aminex A-27 カラムで分離された単糖、二糖類の検量線を示す。各糖は 2.7 nmol/10 μ l から 27 nmol/10 μ l の範囲で、それぞれ原点を通る直線となった。またこのときの再現性

Fig. 13 Chromatographic separation of reducing sugars

Fig. 14 Standard curves for reducing sugars

は D-グルコース (10 nmol/10 μ l) でその変動係数は 2.4% ($n=10$) であった。

4 考察および結論

糖類はアミノ酸と加熱されると、かつ変反応物を生成することはよく知られている。このかつ変反応物中には、青色の蛍光を発する物質が含まれている。著者らは種々のアミノ酸について糖類との反応による蛍光を検討した結果、 β -アミノ酸の一種であるタウリンの強度が大きく、かつ安定な蛍光を与えるので、これを糖類の TLC および HPLC に応用した。

TLC に用いた噴霧試薬の液性は、ほぼ中性であり、糖類との反応も緩やかな条件下で蛍光するので、これは従来、苛酷な条件を用いていた検出法の問題点を一挙に解決するものである。また人体に対する安全性も高く、実験室などの汚染もないので応用範囲も広い。

つぎに HPLC においては、従来の強酸性試薬に用いる方法と異なり、耐酸性装置の必要性がなく、また分析後の廃液の処理も容易である。本法はポストラベル法を用いているので試料の前処理に時間を要せず、かつ検出における反応条件、たとえば試薬濃度、または pH などを少し変えることにより、分配、吸着、イオン交換、分子ふるいクロマトグラフィーなど、種々の分離モードと直結できるので応用範囲も広い。

本法の一つの特長としては、高い蛍光収率を短時間で得るために、蛍光反応温度を高くした。これにより全体の分析時間が短

縮され、多種類の成分からなる試料の分析に、とくに有効である。また高温にするとピーク幅の減少が見られ、より鋭いクロマトグラムが得られた。しかしながら高温の流出液が直接、検出器に入ると、セルのテフロンパッキングの損傷と、温度消光による検出感度の低下が起こるので、本法では、加熱反応槽と検出器の間に冷却管を配した。さらに加熱反応槽内のステンレススチールチューブ内に気泡が発生するので、その気泡のセル進入を防ぐために、検出器のセルの後に細いテフロンチューブを接続し、逆圧

をかけた。本法における単糖類の検出限界は 0.27 nmol 程度で、各種単糖の間の蛍光強度にバラツキが少ない。

以上、著者らはタウリン試薬を用いる糖類の TLC および HPLC を検討し、簡便、迅速、高感度な蛍光定量法を確立した。この方法により、簡単に試料の前処理をするだけで、生体中の微量な糖類が妨害成分の影響を受けることなく、一斉分析できる。今後、生化学、臨床化学などの分野で応用が期待される。

(1979 年 10 月、日本分析化学会第 28 年会(一部)発表)

Special Articles on Carbohydrate Chemistry

Fluorometric Detection and Determination of Carbohydrates in Thin-layer Chromatography and High-Performance Liquid Chromatography Using Taurine-Borate Reagent

Takehiko KATO*, Fumio IINUMA** and Toshio KINOSHITA

School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University; Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108 Japan

*** School of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University; Suzarashi Sagamiko-cho, Tsukui-gun, Kanagawa 199-01 Japan*

Highly sensitive fluorometric detection and determination of carbohydrates in thin-layer chromatography (TLC) and high-performance liquid chromatography (HPLC) have been developed using taurine-borate reagent which gives intense fluorescence on reaction with carbohydrates by heating in neutral or slightly alkaline media.

The fluorescence development on thin-layer plate was performed by spraying an 8% taurine solution in $0.05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ - $0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ buffer, pH 7.5, on a thin-layer plate which was then heated at 130°C for 10 min and by measuring the fluorescence intensity with a scanning fluorophotometer. Detection limits for reducing sugars were in the range between 0.1 nmol and 0.2 nmol. Standard curves for glucose and galactose were linear in the range from $0.05 \mu\text{g/spot}$ to $1.0 \mu\text{g/spot}$ and for lactose from $0.1 \mu\text{g/spot}$ to $1.0 \mu\text{g/spot}$.

HPLC was carried out by eluting a sample solution through an anion exchange Aminex A-27 column or a reversed phase Lichrosorb- NH_2 column, heating the eluate after mixing with an 8% taurine solution or an 8% taurine solution containing $0.05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ borate adjusted to pH 8.7 with NaOH pellets and measuring the fluorescence intensity with a fluorometer. The present method facilitated excellent separation of mono- and oligosaccharide mixtures within a remarkably short period. Since this reaction proceeds without the use of strong acid or alkali, the chromatographic methods do not require acid or alkali resistant equipments.