

## 高速液体クロマトグラフィーによる ガラクトン酸とオリゴガラクトン酸の分析

畑中千歳・横引敬一・松橋信平

(広島大学生物生産学部)

1986年9月16日受理

Analysis of Galacturonic Acid and Oligogalacturonic Acids by  
High-Performance Liquid Chromatography  
Chitoshi HATANAKA, Keiichi YOKOHIKI, and Shinpei MATSUHASHI  
*Laboratory of Enzyme Chemistry, Faculty of Applied Biological  
Science, Hiroshima University, Fukuyama*

糖を対象とした液体クロマトグラフィーも、最近、ようやく高速、高性能時代を迎え、迅速微量分析に類する報告が多数見受けられるようになった<sup>1)</sup>。しかし、それらの大半はガラクトース、グルコース、フコース、アラビノースなどの糖タンパク質の糖鎖を構成する中性糖の分析であり、酸性糖を対象に60分以内で分析した報告は数例にすぎない<sup>1)</sup>。とりわけ、著者らが研究対象としているペクチン系のガラクトン酸やオリゴガラクトン酸については、迅速分析例は非常に少なく、例えば、ガラクトン酸とほかのuron酸との分離例<sup>2,3)</sup>を除くと、わずかにHEYRAUDとROCHAS<sup>4)</sup>及びVORAGENら<sup>5)</sup>の報告があるだけである。HEYRAUDとROCHASはWatersのDextropakカラムを用いて約15分でガラクトン酸とオリゴガラクトン酸を分析している。一方、VORAGENらはMerckのLiChrosorb 10 NH<sub>2</sub>など陰イオン交換樹脂を主体に数種のカラムを用いて、uron酸類と飽和及び不飽和オリゴガラクトン酸の分離条件を詳細に検討している。分析所要時間は15~30分である。

本研究はペクチン酸の酵素分解物の迅速分析を目的として行われたものである。酵素としてエンドポリガラクトナーゼ(EC 3.2.1.15, 以下endo-PG)を選び、そのペクチン酸分解物(ガラクトン酸とオリゴガラクトン酸)を糖分離用充填カラム(Shodex SUGAR SH1821)を用いて分析し、満足できる結果を得たので以下に報告する。

### 実験材料及び方法

#### 1. 試薬

ガラクトン酸とグリセロールはそれぞれ半井化学薬品の特級試薬を用いた。高速液体クロマトグラフィー(以下HPLC)用の溶離液には同社の定量分析用1N硫酸を脱塩蒸留水で0.005Nに希釈したものを使用した。その他の試薬は断りのない限りすべて市販特級品を用いた。

#### 2. ジ、トリ及びテトラガラクトン酸の調製

かんきつペクチン(半井化学薬品, 化学用)を0.05N水酸化ナトリウム, 0°C, 90分の条件<sup>6)</sup>でアルカリけん化してペクチン酸を調製し、その1%溶液(pH 4.5, 2l)に約30単位<sup>7)</sup>のendo-PGを加え、35°Cで約16時間分解した。分解液は沸とう湯浴中で約20分間加熱して酵素を失活後冷却し、15%硫酸銅溶液(約1/10容)を加え、1N水酸化ナトリウムでpHを4.5に調整してから一夜冷蔵した。生じたオリゴガラクトン酸(銅塩)の沈澱を集め、冷水で一度洗浄してから水にけん濁し、Amberlite IR-120で銅イオンを除去した。溶液は1N水酸化ナトリウムで中和後減圧濃縮し、99%エタノール(2倍容)を加えてオリゴガラクトン酸(ナトリウム塩)を沈澱させ、エタノールとアセトンで順次洗浄後室温で乾燥した。収量は約48%、平均重合度は約3.5であった。

次にこのオリゴガラクトロン酸（10% 溶液, 50 ml）を NAGEL と WILSON<sup>9)</sup> の方法に準じて Dowex 1 X 8（200～400 mesh）のカラム（2×30 cm）で処理してジ、トリ及びテトラガラクトロン酸を得た。なお、溶出は VORAGEN<sup>9)</sup> の pH 6 の酢酸ナトリウム緩衝液の直線勾配溶離（0.2→0.8 M, それぞれ 800 ml）によった。分画後はそれぞれストロンチウム塩として沈澱分離<sup>9)</sup>, 常法に従ってナトリウム塩にしてからエタノールで沈澱させ、乾燥した。得られたジ、トリ及びテトラガラクトロン酸画分は、それぞれペーパークロマトグラフィー<sup>10)</sup> で単一スポットを示し、また Rf 値及びガラクトロン酸残基数と還元基数から求めた重合度<sup>10)</sup> も妥当なものであったので、以下の実験ではこれらを標準試料として使用した。なお、各標準溶液の濃度はカルバゾール法<sup>11)</sup> で求めたガラクトロン酸含量を基にして無水物として表わした。

### 3. Endo-PGの調製

グルコース 5%, リン酸一アンモニウム 0.2%, リン酸一カリウム 0.2%, 硫酸マグネシウム 0.1% 及び乾燥酵母エキス（半井化学薬品, 培地用）0.4% を含む培地（pH 5, 200 ml）をルービン（500 ml 容）に分注し、*Kluyveromyces fragilis* を接種して 27°C で 3 日間静置培養した<sup>12)</sup>。培養液（約 600 ml）は除菌後 0.02 M 酢酸緩衝液（pH 5.0）に対して 2 日間透析後、同じ緩衝液で平衡化した Amberlite CG-50（Type I）のカラム（2×10 cm）に加えて目的酵素を吸着させ、同じ緩衝液で十分洗浄後 1 M 酢酸ナトリウム溶液で酵素を溶出した。活性区を集め、Amicon の限外濾過器（濾過膜 YM 10）で約 50 ml に濃縮し、同時に溶媒を 0.1 M 酢酸緩衝液（pH 5.0）に置換した。以下の実験ではこの濃縮液を精製酵素として使用した。

### 4. HPLCの条件

高速液体クロマトグラフは日本分光工業の TRI ROTAR-VI を、検出器は同社の高感度示差屈折計（RID-300 型）を用いた。分析カラムは昭和電工の Shodex SUGAR SH1821（8×300 mm）を保護カラム（Shodex SUGAR SH1011P, 6×50 mm）を連結して使用した。カラム温度は 40°C, 溶離液は 0.005 N 硫酸を用い、流速は特に断りのない限り 1.0 ml/min とした。インテグレーターは SIC 社の Chromatocorder 11 を使用した。

### 5. 標準試料（モノ～テトラガラクトロン酸）の分析

試料はそれぞれ 0.5% 溶液とし、10  $\mu$ l を分析に用いた。検出器の減衰率は  $6.4 \times 10^{-5}$  RIU とした。モノ～テトラガラクトロン酸のモデル混合物の分析には、各糖 0.125% を含む溶液 10  $\mu$ l を用い、検出器の減衰率は  $1.6 \times 10^{-5}$  RIU とした。

### 6. 検量線の作成と定量精度の検定

検出器の減衰率  $1 \times 10^{-6} \sim 6.4 \times 10^{-5}$  RIU で 0.5～50  $\mu$ g のガラクトロン酸を分析し、ピーク高から検量線を作成した。分析液量は 10  $\mu$ l とし、3～5 回の繰返し測定を行った。定量精度を調べるために、低濃度（0.5～4  $\mu$ g）のガラクトロン酸の測定値について標準偏差と変動係数を求めた。

### 7. ベクチン酸の endo-PG 分解物の分析

ベクチン酸 0.2%, pH 5.0 の酢酸緩衝液 0.05 M, endo-PG 0.05 単位/ml, グリセロール（内部標準物質）0.1% を含む反応液を 35°C に保ち分解経過を追跡した。反応開始後 5, 10, 15, 30 及び 60 分後に、それぞれ反応液 0.5 ml を 1 N 硫酸 25  $\mu$ l を予め分注したエッペンドルフ管（2 ml 容）にとり反応を停止した。停止液は水冷後遠心分離（13,000 回転, 5 分）し、上澄はさらに Millipore の Molecut II GC（分画分子量 10,000）で限外濾過した。その濾液 10  $\mu$ l を分析に使用した。なお、反応時間 40 時間の分解液は硫酸による反応停止を省略して直ちに限外濾過した。また限外濾過膜（Molecut II GC）は予め水洗してグリセロールを除去したものを使用した。

## 実験結果

### 1. ガラクトロン酸とオリゴガラクトロン酸の分離

標準試料の分離状態を Fig. 1 に示した。ジ、トリ及びテトラガラクトロン酸の試料は、それぞれペーパー

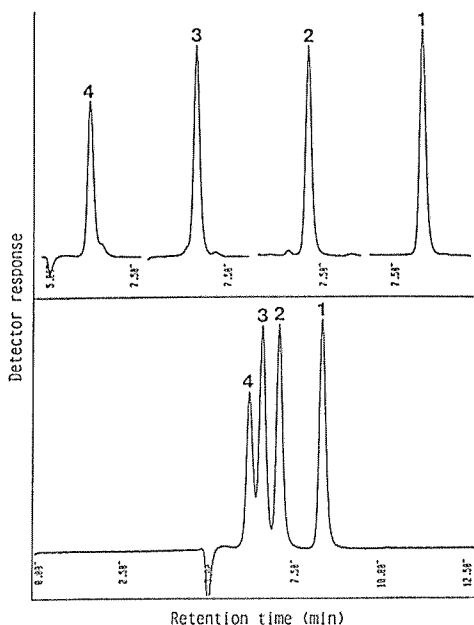


Fig. 1. HPLC chromatograms of mono-~tetragalacturonic acid standards.  
 Operations: column, Shodex SUGAR SH1821, 8 × 300 mm; pre-column, Shodex SUGAR SH1011P, 6 × 50 mm; mobil phase, 0.005 N sulfuric acid; column temperature, 40 °C; flow rate, 1.0 ml/min; chromatograph, Jasco TRI ROTAR-VI; detector, Jasco RID-300; attenuation; 6.4 × 10<sup>-5</sup> RIU (upper), 1.6 × 10<sup>-5</sup> RIU (lower); recorder, SIC Chromatocorder 11; chart speed, 10 mm/min.  
 Sample: upper, standard solution, 50 μg; lower, model mixture, 12.5 μg of individual standards; injection, 10 μl.  
 Peak identity: 1, monomer; 2, dimer; 3, trimer; 4, tetramer.

クロマトグラフィーで単一スポットを示したので高純度であると考えていたが、HPLCのクロマトグラムから微量の他成分を含んでいることがわかった。モデル混合物のクロマトグラムでは、トリガラクトロン酸とテトラガラクトロン酸間の分離がやや不十分であったが、流速を下げるとピーク間の重なりも減り、さらに良好な結果が得られた。一例として流速 500 μl/min の場合のクロマトグラムを Fig. 2 に示した。

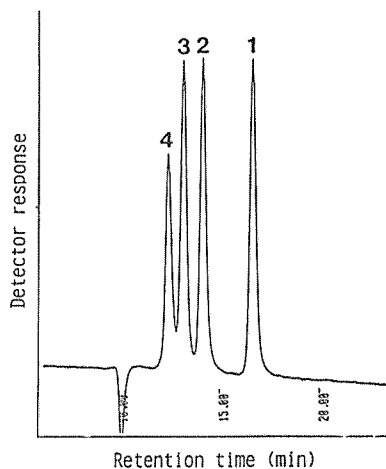


Fig. 2. HPLC chromatogram of a model mixture of standards.  
 Operating conditions: flow rate, 500 μl/min; detector attenuation, 1.6 × 10<sup>-5</sup> RIU; chart speed, 5 mm/min.  
 For other details see Fig. 1.

Table 1. Retention times and peak responses of galacturonic acid and oligagalacturonic acids at flow rates of 500 and 1,000 μl/min.

Galacturonates	Flow rate (μl/min)			
	500		1,000	
	Retention time (min)	Peak height (mm)	Retention time (min)	Peak height (mm)
Monomer	16.7	77.9	8.4	66.8
Dimer	14.5	77.4	7.3	65.2
Trimer	13.3	76.5	6.7	65.0
Tetramer	12.6	53.3	6.3	45.4
Pentamer*	12.0	—	6.1	—

\* The values were obtained from the results shown in Fig. 5.  
 All the values present the average of five determinations.

また参考のために流速 1.0 ml/min と 500  $\mu$ l/min の場合の各試料の保持時間とピーク高を Table 1 に示した。なお、ペンタガラクトロン酸の保持時間はペクチン酸の endo-PG 分解物の分析結果によった (Fig. 5 参照)。

## 2. 検量線と定量精度

Fig. 3 に検出器の減衰率を  $8 \times 10^{-6}$  ~  $6.4 \times 10^{-5}$  RIU の 4 段階に変えた場合のガラクトロン酸の検量線を示した。なお、本実験ではピーク高から検量線を作成したが、ピーク面積を用いても良好な検量線が得られた。各減衰率で測定可能なガラクトロン酸のおおよその濃度範囲は、 $8 \times 10^{-6}$  RIU で 0.5 ~ 10  $\mu$ g,  $1.6 \times 10^{-5}$  RIU で 1 ~ 20  $\mu$ g,  $3.2 \times 10^{-5}$  RIU で 1 ~ 40  $\mu$ g,  $6.4 \times 10^{-5}$  RIU で 2 ~ 80  $\mu$ g であり、Fig. 3 から明らかなように、直線性はいずれの場合も良好であった。また減衰率を  $8 \times 10^{-6}$  RIU 以下にして 4  $\mu$ g 以下のガラクトロン酸を測定した場合も、検量線は示さなかったが良好な結果が得られた (Table 2 と Fig. 4 参照)。結果は示さなかったが、ジテトラガラクトロン酸の検量線についてもガラクトロン酸の場合とほぼ同様に良好な結果が得られた。

定量精度を調べる目的で、4  $\mu$ g 以下のガラクトロン酸の測定値について標準偏差と変動係数を求めた。Table 2 に示したように、減衰率  $1 \times 10^{-6}$  ~  $4 \times 10^{-6}$  RIU の範囲で、ガラクトロン酸 0.5 ~ 4.0  $\mu$ g に対する 5 回の繰返し測定の標準偏差はいずれも 1 以下であった。また変動係数も値が大きな場合 (減衰率  $1 \times 10^{-6}$  RIU, ガラクトロン酸 0.5  $\mu$ g;  $2 \times 10^{-6}$  RIU, ガラクトロン酸 1.0  $\mu$ g;  $4 \times 10^{-6}$  RIU, ガラクトロン酸 1.0  $\mu$ g) でも約 2% であり、定量精度は非常に良好であることがわかった。

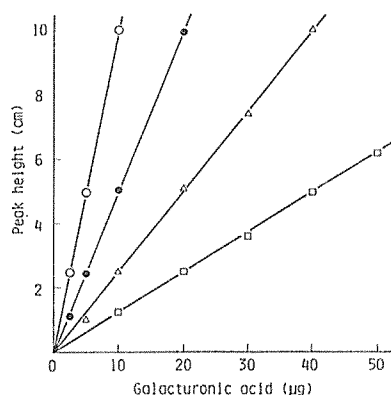


Fig. 3. Standard curves for galacturonic acid. Detector attenuation: ○,  $8 \times 10^{-6}$  RIU; ●,  $1.6 \times 10^{-5}$  RIU; △,  $3.2 \times 10^{-5}$  RIU; □,  $6.4 \times 10^{-5}$  RIU. The data represent the average of three determinations. For other details see Fig. 1.

Table 2. Reproducibility of determination of galacturonic acid (n=5).

Detector attenuation (RIU)	Galacturonic acid ( $\mu$ g)	Peak height (mm)	Standard deviation	Coefficient of variation (%)
$1 \times 10^{-6}$	0.5	41.8	0.95	2.3
"	1.0	84.4	0.97	1.1
$2 \times 10^{-6}$	1.0	41.6	0.86	2.1
"	2.0	83.4	0.96	1.2
$4 \times 10^{-6}$	1.0	20.8	0.42	2.0
"	2.0	41.3	0.44	1.1
"	4.0	83.4	0.60	0.7

## 3. 検出限界

減衰率を  $1.6 \times 10^{-5}$  から  $1 \times 10^{-6}$  RIU の範囲で変化させた際のベースラインの状態を Fig. 4 に示した。減衰率を  $1 \times 10^{-6}$  RIU に下げるとポンプの脈動に起因すると思われるノイズがかなり大きくなったが、Table 2 にも示したように、0.5  $\mu$ g 程度のガラクトロン酸でも高精度で測定可能であり、またこのときのピーク高が約 40 mm であることから類推すると、おそらく 0.1  $\mu$ g (100 ng) 前後のガラクトロン酸は容易に検出できると思われる。従って 1 nmol ( $10^{-9}$  mol, 194 ng) 程度のガラクトロン酸はかなり良い精度で測定できると思われる。

## 4. ペクチン酸の endo-PG 分解物の分析

ペクチン酸に endo-PG を作用させた際の反応初期から終期に至る分解経過を追跡した結果を Fig. 5 に示した。図中の保持時間 5 分付近の鋭いピークは反応停止に用いた硫酸 (最終濃度 0.05 N) のピークである。また保持時間 10 分付近の 2 つのピークは内部標準として加えたグリセロール (10.7 分) と緩衝液の酢酸 (11.7 分) のピークである。

反応時間 5 分では、微量のジガラクトン酸と少量のトリガラクトン酸、及びかなり多量のテトラ以上の一連のオリゴガラクトン酸が認められた。しかし、この段階では分解液に硫酸を加えて氷冷すると白濁するので、反応液中には酸不溶性ペクチン酸以上の高分子の部分分解物が相当量残存しているものと思われる。反応 10 分では、テトラ～ヘキサガラクトン酸が主成分であったが、ヘプタ以上のオリゴ糖も若干含まれていることがわ

かった。ジガラクトン酸のピークは明瞭であったが、ガラクトン酸はまだ痕跡程度にしか認められなかった。反応時間が 15 分になると分解物の組成はかなり単純になり、ダイマーからヘキサマーまでの一連のオリゴ糖が含まれ、主成分はテトラガラクトン酸であったがペンタガラクトン酸とトリガラクトン酸も多量に蓄積していることがわかった。反応 30 分では、15 分の場合と同じく主成分はテトラガラクトン酸であったが、ガラクトン酸のピークが明確になり、ヘキサマー以上のオリゴ糖は消失した。反応 60 分では、さらにペンタガラクトン酸も消失し、テトラガラクトン酸とトリガラクトン酸が大半を占めた。最後に、40 時間の反応液は、分解は既に最終段階に達していることが明らかであったので、硫酸処理は省略し、そのまま限外濾過して分析に用いた。従って保持時間 5 分付近の硫酸の鋭いピークは認められなかった。主成分はトリガラクトン酸であり、テトラ以上のオリゴ糖は認められなかった。またガラクトン酸がジガラクトン酸とともに相当量生成していることがわかった。

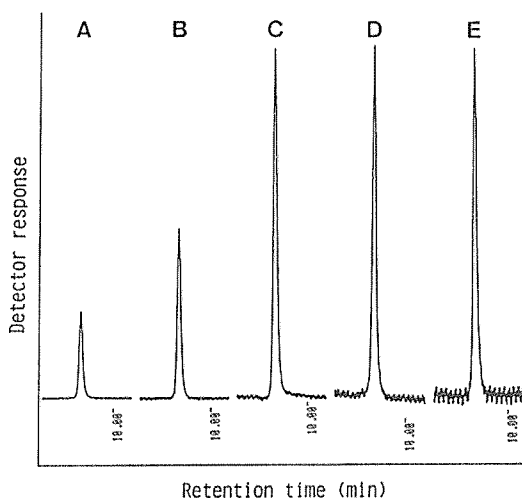


Fig. 4. Detector responses to the small amounts of galacturonic acid at various attenuations. Attenuation (RIU): A,  $1.6 \times 10^{-6}$ ; B,  $8.0 \times 10^{-6}$ ; C,  $4.0 \times 10^{-6}$ ; D,  $2.0 \times 10^{-6}$ ; E,  $1.0 \times 10^{-6}$ . Sample: A, 4  $\mu$ g; B, 4  $\mu$ g; C, 4  $\mu$ g; D, 2  $\mu$ g; E, 1  $\mu$ g; injection; 10  $\mu$ l. Chart speed: 5 mm/min. For other details see Fig. 1.

## 考 察

流速 1.0 ml/min では重合度の高いオリゴガラクトン酸は分離しにくいことがわかったが、モノ～テトラガラクトン酸間の分離状態は、この程度であれば通常の分析には問題はないと思われる。分析精度を上げたい場合は、流速を 500  $\mu$ l/min あるいはそれ以下に下げるとよい。しかし、分析所要時間は流速に反比例して増加する。例えば、1.0 ml/min では約 9 分であったが、500  $\mu$ l/min では約 18 分であった。Fig. 1 と 2 の結果を比較するとわかるように、流速を下げるとピークレスポンスはかえって増大した (Table 1 参照)。また、流速を 500  $\mu$ l/min に下げた場合でも分析時間は 20 分以内であるので、一連のオリゴガラクトン酸を別々に定量したい場合は、500  $\mu$ l/min 付近の流速で分析するとよい。

VORAGEN<sup>5)</sup> は不飽和オリゴガラクトン酸 (235 nm 付近の波長を吸収) の分析には吸光度法を採用し、各糖 0.005～0.1% 溶液を 20  $\mu$ l 使用している。しかし、特定波長を吸収しない飽和オリゴガラクトン酸の分析には、検出器として示差屈折計を用い、感度が低いので試料濃度を 0.1% 以上にする必要があると述べている。分析には 20  $\mu$ l を使用しているので、試料は少なくとも 20  $\mu$ g 以上必要ということになる。本実験では、ガラクトン酸の場合 0.5  $\mu$ g 以上あれば高い精度で測定できたが、この量は VORAGEN

らの吸光度法による不飽和オリゴガラクトン酸の分析量 (0.005%, 20  $\mu$ l) に匹敵する。Shodex カラムによる本法の検出限界はガラクトン酸で約 0.1  $\mu$ g であり, 1 nmol ( $10^{-9}$  mol) 程度のガラクトン酸はかなり高い精度で測定可能であると思われる。一般に, 示差屈折計の感度は吸光度法のそれよりも相当低いために, 検出限界は  $10^{-7}$  mol 付近とされているが<sup>10)</sup>, 今回の結果は感度的には 2 桁も高いことになる。

HPLC によってペクチン酸の酵素的な分解経過が手軽に追跡できることがわかった。分解液中のウロン酸組成の時間的変化は, そのクロマトグラムから一目瞭然であり, 種類の異なる酵素ばかりでなく, 類似の酵素間においても, それらの作用様式の比較検討などに非常に有効な分析手段になると思われる。分解生成物の測定を容易にするためにグリセロールを内部標準に用いたが, その主な理由は, ペクチン系の中性糖のほとんどがガラクトン酸とグリセロールの間に溶離するので, 中性糖共存下でも内標として使用できるからである。結果は示さなかったが, グリセロールのピーク高に対して同濃度のガラクトン酸のピーク高は 1.29 倍であったので, この値

とガラクトン酸に対するジ及びトリガラクトン酸のピーク高比 (それぞれ 0.976 及び 0.973, Table 1) を用いて, 反応 40 時間の分解液中の各ウロン酸量を算出してみた。反応に用いたペクチン酸量に対して, モノ, ジ及びトリガラクトン酸の量は, それぞれ 13, 16 及び 63% であった。従って, 全体では用いたペクチン酸の 92% が低分子物に分解されたことになる。残りの 8% 相当のガラクトン酸は, ペクチン酸分子の中ではラムノガラクトン酸区分にあって, ラムノース残基にはさまれた形で散在し, またアラビナンやガラクトナンなどの長い中性糖側鎖に囲まれた形で存在するために, endo-PG では分解されないで高分子画分中に残ったものと思われる。この 8% という値は, かんきつペクチン酸の endo-PG 分解物について著者らの一人が別の方法で得た結果<sup>10)</sup> と近似している。

今回用いた Shodex SUGAR SH1821 カラムはポリスチレン-ジビニルベンゼン系の強酸性陽イオン交換樹脂 ( $H^+$  型) であり, 分離機構は分子サイズとイオン排除によるものである。これに対し, VORAGEN ら<sup>5)</sup> の用いたカラムは強塩基性 (Nucleosil 10 SB, Zorbax SAX) と弱塩基性 (LiChrosorb 10  $NH_2$ )

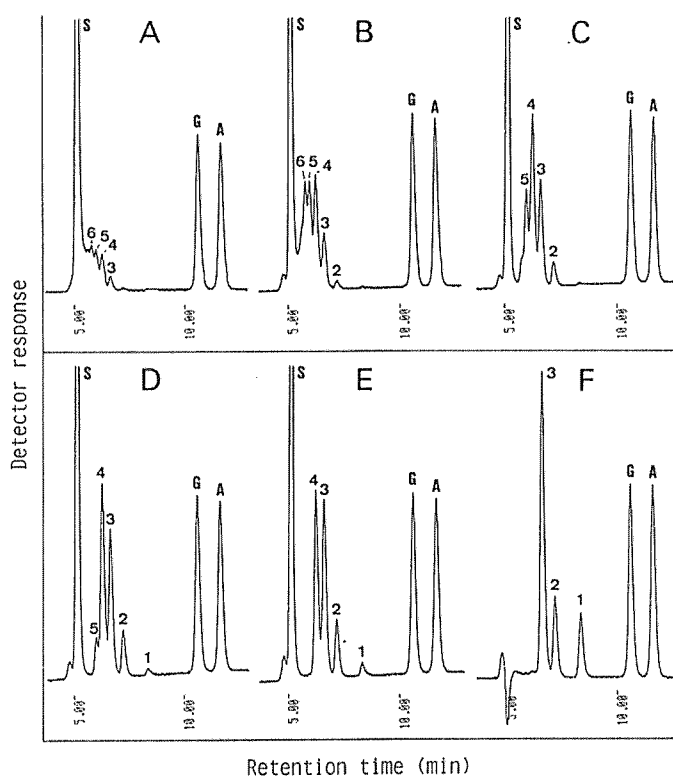


Fig. 5. HPLC chromatograms of hydrolysis products of pectic acid by *Kluyveromyces fragilis* endo-PG. Reaction mixture: pectic acid, 0.2%; acetate buffer, pH 5, 0.05 M; endo-PG, 0.05 U/ml; glycerol (internal standard), 0.1%; incubation, at 35°C. The sample solutions for injection were prepared as follows: Aliquots (0.5 ml) of the reaction mixture were taken after a definite time of incubation into a small Eppendorf tube containing 25  $\mu$ l of 1 N sulfuric acid and cool in ice, followed by centrifugation. Then the supernatant solutions were filtered on a Millipore Molcut II GC apparatus. The resulting filtrates (10  $\mu$ l) were used for injection. Only in the case of a 40-hr incubation period, the reaction mixture was filtered immediately on the Molcut II GC and the filtrate (10  $\mu$ l) was used for injection. Incubation period: A, 5 min; B, 10 min; C, 15 min; D, 30 min; E, 60 min; F, 40 hr. Peak identity: 1, monomer; 2, dimer; 3, trimer; 4, tetramer; 5, pentamer; 6, hexamer; S, sulfuric acid; G, glycerol; A, acetic acid. For other details see Fig. 1.

陰イオン交換樹脂、及び逆相カラム (LiChrosorb 10 RP-18) である。HEYRAUD と ROCHAS<sup>4)</sup> の用いた Dextropak も逆相カラムである。著者らが用いたカラム以外はいずれもシリカ系のカラムであり、分離機構は逆相分配、あるいはそれにイオン交換が加わったものである。分離機構が異なれば分離状態にも相違が認められて当然であるが、Shodex カラムとほかのシリカ系カラムの最も大きな相違点は、前者では分子ふるい効果が働くために重合度の大きいオリゴガラクトロン酸が速く溶離するのに対し、後者ではそれが逆転することである。VORAGEN らは溶離液として Nucleosil 10 SB と LiChrosorb 10 NH<sub>2</sub> にそれぞれ 0.3 M (pH 5.4) と 0.11 M (pH 7.5) の酢酸ナトリウム緩衝液を用いているが、分離状態は溶離液の濃度と pH によって大きく左右され、濃度あるいは pH を下げると、いずれの場合も保持時間は増大している。テトラ以上のオリゴガラクトロン酸ではピーク幅が広がる傾向があるので、保持時間が増すとこの傾向はさらに強まると思われる。HEYRAUD と ROCHAS<sup>4)</sup> の Dextropak カラムでは明らかにそうである。HEYRAUD らはガラクトロン酸とオリゴガラクトロン酸の同時分析を行っているが、保持時間の長いオリゴマーではかなり強いテーリング傾向が認められる。分離時間を短縮するような溶離条件を用いると、溶離しやすいガラクトロン酸の測定は無理のようである<sup>4)</sup>。VORAGEN ら<sup>5)</sup> はガラクトロン酸とオリゴ糖の同時分析については検討していない。VORAGEN らはシリカ系の陰イオン交換カラム (Nucleosil 10 SB や LiChrosorb 10 NH<sub>2</sub> など) は耐用性において問題があると指摘している。そのために溶離液の濃度と pH を下げる必要があると述べているが、そうするとテトラ以上のオリゴガラクトロン酸の保持時間はますます増大するので、迅速分析とは言えなくなるおそれがある。今回の実験に用いた Shodex SUGAR SH1821 カラムは、VORAGEN や HEYRAUD らのカラムよりもガラクトロン酸とオリゴガラクトロン酸の同時分析用としては適しているようである。

いずれにせよ、今回の結果から、本法も含めて HPLC はペクチン酸の酵素分解物の分析や各種ペクチナーゼの作用様式の検討、あるいはペクチン質の構造研究において、今後、ますます不可欠な迅速微量分析手段となることが予測される。

## 要 約

ペクチン酸の酵素分解物の迅速分析を目的として、ガラクトロン酸とオリゴガラクトロン酸の HPLC による分析について検討した。

分子サイズとイオン排除を分離機構に持つ強酸性陽イオン交換樹脂の Shodex SUGAR SH1821 カラムを用い、0.005 N 硫酸を溶離液としてモノ～テトラガラクトロン酸の分離状態を調べた。カラム温度 40°C、流速 1.0 ml/min で、トリガラクトロン酸とテトラガラクトロン酸間に部分的な重なりはあったが、ほぼ満足な結果を得た。分析所要時間は約 9 分であった。流速を 500  $\mu$ l/min に下げるとさらに良好な分離が得られた。このときの分析所要時間は約 18 分であった。

標準試料 (モノ～テトラガラクトロン酸) の検量線は広い濃度範囲で良好な直線性を示した。本法による検出限界は、ガラクトロン酸ではおおよそ 0.1  $\mu$ g であり、少なくとも 0.5  $\mu$ g 以上のガラクトロン酸が定量的に精度よく測定できることがわかった。定量精度を検定するために、ガラクトロン酸 0.5～4  $\mu$ g に対する測定値 (n=5) について標準偏差と変動係数を求めたが、前者はいずれの場合も 1 以下であり、後者も 1～2% と低い値を示し、精度は非常に良好であることがわかった。

*Kluyveromyces fragilis* の endo-PG によるペクチン酸の分解経過を反応初期から終期に至る段階について追跡調査した。流速 1.0 ml/min の条件で、モノからヘキサまでの一連のオリゴガラクトロン酸が区別でき、またそれらの量的変化の追跡も容易なことから、本法が、ペクチン酸の酵素分解物の分析や分解経過の追跡に非常に有効な分析手段であることを確認した。本法は、ペクチナーゼの作用様式やペクチン質の構造研究において、今後、ますます有用になるものと思われる。

## 引用文献

- 1) HONDA, S.: *Anal. Biochem.*, **140**, 1-47 (1984).
- 2) OSHIMA, R., KUROSU, Y., and KUMANOTANI, J.: *J. Chromatogr.*, **179**, 376-380 (1979).
- 3) CHEN, C. C. and MCGINNIS, G. D.: *Carbohydr. Res.*, **122**, 322-326 (1983).
- 4) HEYRAUD, A. and ROCHAS, C.: *J. Liq. Chromatogr.*, **5**, 403-412 (1982).
- 5) VORAGEN, A. G. J., SCHOLS, H. A., De VRIES, J. A., and PILNIK, W.: *J. Chromatogr.*, **244**, 327-336 (1982).
- 6) 畑中千歳・小沢潤二郎: 農化, **40**, 421-428 (1966).
- 7) INOUE, S., NAGAMATSU, Y., and HATANAKA, C.: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 633-640 (1984).
- 8) NAGEL, C. W. and WILSON, T. M.: *J. Chromatogr.*, **41**, 410-416 (1969).
- 9) VORAGEN, A. G. J.: Doctoral Thesis, Wageningen (1972).
- 10) 畑中千歳・小沢潤二郎: 農化, **46**, 417-420 (1972).
- 11) GALAMBOS, J. T.: *Anal. Biochem.*, **19**, 119-132 (1967).
- 12) 小沢潤二郎・岡本賢一・林哲吾: 農学研究, **47**, 105-110 (1959).
- 13) 南原利夫・池川信夫編著: 最新高速液体クロマトグラフィー, 応用編 I, 14, 広川書店 (1983).
- 14) 畑中千歳・小沢潤二郎: 農化, **42**, 698-702 (1968).

## SUMMARY

A mixture of mono- ~ tetragalacturonic acid standards was separated by both size and ion exclusion mechanisms on a strong cation-exchange column (8 x 300 mm) of Shodex SUGAR SH1821 with 0.005 N sulfuric acid as eluent. Each separation was complete in 9 min at a flow rate of 1.0 ml/min.

The relationship between the peak response and concentration was strictly linear throughout the entire concentration range studied (0.5  $\mu\text{g}/\text{sample}$  to 50  $\mu\text{g}/\text{sample}$  of individual standards); a differential refractometer was used as detector. At an attenuation of  $1 \times 10^{-6}$  RIU, the coefficients of variation of the peak height for repeated injections ( $n = 5$ ) were 2.3 and 1.1% for 0.5 and 1.0  $\mu\text{g}/\text{sample}$  of galacturonic acid, respectively. The detection limit of the uronic acid was estimated to be 0.1  $\mu\text{g}$ .

The method was applied to follow the course of hydrolysis of pectic acid by an endopolygalacturonase, and proved to be a very powerful tool for studying the mechanism of action of pectic enzymes. A series of oligogalacturonic acids having chain lengths of two to six units could be distinguished from each other in the digest at an early stage of the hydrolysis (10 min after the start); the major products were tetra-, penta-, and hexagalacturonic acids. At a final stage (40 hr after the start), only three components of mono-, di-, and trigalacturonic acids were detected in the digest; the major product was trigalacturonic acid, amounting to 63% of the total pectic acid used. A total of 92% of the original pectic acid was recovered in the three components.