(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2011 年 11 月 3 日(03.11.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/136165 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 30/84 (2006.01) *G01N 30/74* (2006.01)
G01N 21/78 (2006.01) *G01N 30/88* (2006.01)
G01N 30/26 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2011/060040

(22) 国際出願日: 2011 年 4 月 25 日(25.04.2011)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2010-104324 2010 年 4 月 28 日(28.04.2010) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本ケミカルリサーチ株式会社 (JCR PHARMACEUTICALS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒6590021 兵庫県芦屋市春日町三番十九号 Hyogo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 横山 哲雄 (YOKOYAMA, Tetsuo) [JP/JP]; 〒6512241 兵庫県神戸市西区室谷２－２－１０ 日本ケミカルリサーチ株式会社内 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 早坂 巧 (HAYASAKA, Takumi); 〒5410041 大阪府大阪市中央区北浜２丁目５番１３号 北浜平和ビル７階 早坂・三嶋国際特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

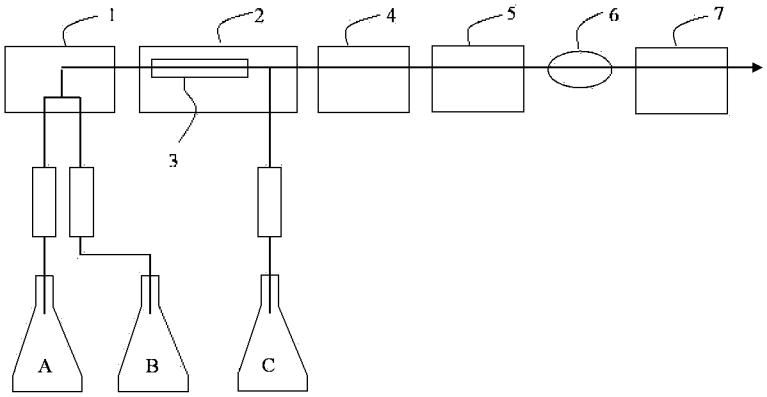
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

[続葉有]

(54) **Title**: SUGAR ANALYSIS DEVICE AND ANALYSIS METHOD

(54) 発明の名称 : 糖類の分析装置及び分析方法

[図1]



(57) **Abstract**: Disclosed are a separation method and an analysis device which improve the analysis sensitivity in the analysis of reducing sugar by a postcolumn fluorescence detection / borate complex anion exchange method. Said separation analysis method uses a reducing sugar postcolumn fluorescence detection / borate complex anion exchange method, and involves arranging a back pressure generator in a flow path between a fluorescence detector and a heater which heats and reacts a sample solution, which has been separated by column chromatography, together with basic amino acids.

(57) 要約: ポストカラム蛍光検出－ホウ酸錯体陰イオン交換法による還元糖の分析における解析感度を向上させた分離方法及び分析装置が開示されている。当該方法は，還元糖のポストカラム蛍光検出－ホウ酸錯体陰イオン交換法を用いた分離分析方法であって，カラムクロマトグラフィーで分離した試料溶液を塩基性アミノ酸とともに加熱して反応させる加熱器と，蛍光検出器の間の流路に，背圧発生器を配置することを含んでなるものである，分離分析装置。

WO 2011/136165 A1

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

明　細　書

発明の名称 ： 糖類の分析装置及び分析方法

技術分野

[0001] 本発明は，ポストカラム蛍光検出－ホウ酸錯体陰イオン交換法を用いた還元糖の分離分析装置及びこれを用いた分離分析方法に関し，特にカラムクロマトグラフィーで分離した試料溶液を塩基性アミノ酸とともに加熱して反応させる加熱器と，蛍光検出器の間の流路に，背圧発生器を配置することを含む，ポストカラム蛍光検出－ホウ酸錯体陰イオン交換法による還元糖の分離分析装置に関する。

[0002] 還元糖の分析法として，還元糖を含む試料を，ホウ酸を含有する水性溶液を移動相として用いる液体クロマトグラフィーに付して溶離し，流路中で，溶出液にアルギニン等の塩基性アミノ酸を含有するホウ酸水溶液を加え，加熱反応を行った後冷却し，この反応液に励起光を照射し蛍光強度または吸光度を測定する方法が知られている（特許文献１）。ここで用いられる装置は，液体クロマトグラフィーの流出路を延長し，この流路に塩基性アミノ酸を含有するホウ酸水溶液の供給経路を接続し，次いで加熱装置，冷却装置，励起光の照射装置，及び蛍光強度等の測定装置を取り付けたものである。この方法では，液体クロマトグラフィーからの溶出液に，塩基性アミノ酸を含有するホウ酸水溶液を加えて反応させるための供給経路を設けておく必要がある。

[0003] また，上記方法の改良型として，還元糖を含む試料を，ホウ酸及び反応試薬であるアルギニン等の塩基性アミノ酸を含有する移動相を用いる液体クロマトグラフィーに付して溶離し，流路中で，溶出液を加熱して反応試薬と還元糖を反応（加熱反応）させた後冷却し，この反応液に励起光を照射し蛍光強度または吸光度を測定することによる方法が知られている（特許文献２）。この方法では，液体クロマトグラフィーの移動相として塩基性アミノ酸を含有するホウ酸水溶液が用いられることから，塩基性アミノ酸を含有するホウ酸水溶液を溶出液に後から加えるための供給経路を設ける必要がない。こ

れらの還元糖分析法は，ポストカラム蛍光検出－ホウ酸錯体陰イオン交換法と呼ばれている。

[0004] 上記の還元糖分析法は共に，還元糖が，ホウ酸存在下にアルギニン等の塩基性アミノ酸と加熱反応により強い発蛍光誘導体を生成することを，カラムから溶出してきた還元糖の検出に利用している（非特許文献１）。この発蛍光誘導体は，還元糖とアミノ化合物である塩基性アミノ酸との加熱反応（メイラード反応）により生じた褐色を呈するメラノイジンであり，これは，励起光として波長320ｎｍの光の照射を受けると，波長430ｎｍの光を放射する。またこれらの還元糖分析法は，還元糖がホウ酸と容易に結合してアニオン性錯イオンを生成する性質を有すること，及びこのアニオン性錯イオンが陰イオン交換カラムクロマトグラフィーに保持されることを利用している。

[0005] ポストカラム蛍光検出－ホウ酸錯体陰イオン交換法では，移動相として，0.01～5%の濃度の塩基性アミノ酸と0.05～0.5Mの濃度のホウ酸とを含有する水溶液（ｐＨ７～10）が用いられる。このとき使用される塩基性アミノ酸は，アルギニン，リジン，ヒスチジン等である。更に，最近では，液体クロマトグラフィーの移動相として，0.1Mホウ酸緩衝液及び0.4Mホウ酸緩衝液によるグラジエントを用いて糖の分離を行うことも知られている（特許文献３，４）。

[0006] ポストカラム蛍光検出－ホウ酸錯体陰イオン交換法では，液体クロマトグラフィーにおける試料の溶離は，室温～70℃の温度で行われ，また加熱反応（メイラード反応）は140～180℃で行われる（特許文献２）。溶離と反応をこのような高温下に高いホウ酸濃度で行うことから，熱による移動相の膨張，移動相内での対流等が生じる。これらの現象はポストカラム蛍光検出－ホウ酸錯体陰イオン交換法において蛍光検出器で検出される蛍光のノイズの原因となり，ひいては検出感度を低下させる原因となり得る。したがって，同方法により，還元糖の分析，特にその定量分析を行う場合には，検出結果を専用のソフトウェアを用いて補正するの必要があった。

[0007] ポストカラム蛍光検出－ホウ酸錯体陰イオン交換法で分析できる還元糖は

，塩基性アミノ酸とメイラード反応を起こすものであり，グルコース，マンノース，ガラクトース，果糖，ラムノース，フコース等の単糖類，マルトース，マルトトリオース等のオリゴ糖類，グルコサミン，ガラクトサミン等のアミノ糖類，グルクロン酸等のウロン糖類等を含む。

[0008] 同法の分析対象として，糖タンパク質の糖鎖に由来する還元糖が挙げられる。糖タンパク質の糖鎖を構成する還元糖には，マンノース，ガラクトース，フコース等の単糖類，ガラクトサミン等のアミノ糖類等がある。糖鎖にはまた，マンノースー６ーリン酸（Ｍ６Ｐ）が含まれる場合がある。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：特開昭５８－２１６９５３号公報

特許文献2：特開昭６１－２５０５９号公報

特許文献3：特開２００６－１８４１３１号公報

特許文献4：特開２００８－２４５５５０号公報

非特許文献

[0010] 非特許文献1：Mikami H. et. Al., Bunseki Kagaku (1983) 32, E207

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 上記背景の下で，本発明の目的は，ポストカラム蛍光検出－ホウ酸錯体陰イオン交換法において，流路を加熱，冷却することにより生じる蛍光検出器で検出される蛍光のノイズを除去し，検出感度を高めることである。

課題を解決するための手段

[0012] 上記目的に向けた研究において，本発明者らは，ポストカラム蛍光検出－ホウ酸錯体陰イオン交換法において，カラムクロマトグラフィーで分離した試料溶液を塩基性アミノ酸とともに加熱して反応させる加熱器と，蛍光検出器との間の流路に，背圧発生器を配置することを試みた。その結果，背圧発生器を配置させることにより，蛍光検出器で検出される蛍光のノイズを除去

でき，検出感度を高めることができることを見出した。

本発明は，これらの発見に基づいて完成されたものである。

[0013] すなわち，本発明は以下を提供する。

１．試料溶液中に含まれる還元糖のカラムクロマトグラフィーを用いた分離分析装置であって，該試料溶液中に含まれる還元糖を分離するための陰イオン交換樹脂カラムと，該カラムからの溶出液中に含まれる還元糖を塩基性アミノ酸と反応させるための加熱器と，該加熱器で反応後の該溶出液に励起光を連続的に照射して該溶出液から放射される蛍光の強度を測定する蛍光検出器と，該加熱器と該蛍光検出器の間に設置した背圧発生器とを含む，還元糖の分離分析装置。

２．該加熱器と該背圧発生器との間に，更に冷却装置を設置した，上記１の還元糖の分離分析装置。

３．還元糖を含む試料溶液を陰イオン交換樹脂カラムに負荷し，所定濃度のホウ酸を含有する水溶液である第１の移動相の十分量を該カラムに通すことによりカラムを洗浄し，

該カラムに，第１の移動相に比してホウ酸又は水溶性無機塩の濃度を高めたホウ酸水溶液である第２の移動相を，所定の流速で連続的に供給して還元糖をこれにより溶離させ，

該カラムからの溶出液を連続的に流路中に導き，

該溶出液に少なくとも１種の塩基性アミノ酸を所定速度で連続的に添加し，

該添加後の溶出液をして，該流路の所定温度の加熱器内を所定時間かけて通過させることにより，該混合溶液を加熱し，

該加熱後の混合溶液を，背圧発生器に通した後，

該混合溶液を蛍光検出器にかけることにより測定された蛍光強度を記録することを含んでなる，

上記１または２の装置を用いた，還元糖の分離分析方法。

４．還元糖を含む試料溶液を陰イオン交換樹脂カラムに負荷し，所定濃度

の少なくとも１種の塩基性アミノ酸と所定濃度のホウ酸を含有する水溶液である第１の移動相の十分量を該カラムに通すことによりカラムを洗浄し，

該カラムに，第１の移動相に比してホウ酸又は水溶性無機塩の濃度を高めたホウ酸水溶液である第２の移動相を，所定の流速で連続的に供給して還元糖をこれにより溶離させ，

該カラムからの溶出液を連続的に流路中に導き，

該溶出液をして，該流路の所定温度の加熱器内を所定時間かけて通過させることにより，該溶出液を加熱し，

該加熱後の溶出液を，背圧発生器に通した後，

該溶出液を蛍光検出器にかけることにより測定された蛍光強度を記録することを含んでなる，

上記１または２の装置を用いた，還元糖の分離分析方法。

５．還元糖がマンノースー６ーリン酸を含むものである上記３または４の方法。

発明の効果

[0014] 本発明は，ポストカラム蛍光検出ーホウ酸錯体陰イオン交換法による還元糖の分析において，ノイズを除去させることにより，検出感度を高めることができる。したがって，本発明の分離分析装置又は分離分析方法によれば，検出結果を専用のソフトウェアを用いて補正すること等が不要でそのまま利用することが可能となり，簡便であるばかりでなく，正確な検出を可能とするものである。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]実施例における装置の配置及び流路を模式的に示す図。

[図2]背圧発生器を設置しなかった場合の，還元糖標準溶液の分析結果を示すクロマトグラム。縦軸は蛍光強度，横軸は還元糖標準溶液負荷完了後の経過時間（分）を示す。ａ～ｄのピークはそれぞれ，ａ：マンノース，ｂ：フコース，ｃ：ガラクトース，ｄ：Ｍ６Ｐに対応する。

[図3]背圧発生器を設置した場合の，還元糖標準溶液の分析結果を示すクロマ

トグラム（１）。縦軸，横軸及びａ～ｄのピークについては同上。溶液Ｂの調製に用いた水溶性無機塩は，塩化ナトリウム。

[図4]背圧発生器を設置した場合の，還元糖標準溶液の分析結果を示すクロマトグラム（２）。縦軸，横軸及びａ～ｄのピークについては同上。溶液Ｂの調製用いた水溶性無機塩は，塩化ナトリウム（Ｎａ：破線）及び，塩化カリウム（Ｋ：実線）。

発明を実施するための形態

[0016] 本発明において，「ホウ酸水溶液」の語は，ｐＨを適宜調整するために水酸化ナトリウム（又はホウ酸ナトリウム）等のような，少量のｐＨ調整剤としての塩基又は塩基性塩が添加されたものも包含する。

[0017] 本発明において，ホウ酸水溶液について，「ホウ酸濃度」というときは，当該水溶液中のホウ素をホウ酸（H_3BO_3）に換算したときの濃度をいう。従って，（ホウ酸ナトリウム等のような）塩の形で添加されたホウ酸も含む。

[0018] 本発明において，ポストカラム蛍光検出－ホウ酸錯体陰イオン交換法の条件は，上記先行技術文献に記載のものも含め，還元糖が分離分析できる限り特に限定なく設定することができ，例えば表１および表２に示した条件（Ｉ法およびＩＩ法）で行うことができる。Ｉ法では無機塩（塩化ナトリウム）の濃度が，ＩＩ法ではホウ酸の濃度が経時的に高められる。分析すべき還元糖にＭ６Ｐが含まれる場合には，表１に示したＩ法又はこれに準じた方法でＭ６Ｐを特に良好に分離分析することができる。

[0019] [表1]

表１　ポストカラム蛍光検出－ホウ酸錯体陰イオン交換法における諸条件（I法およびII法）

	Ｉ法	II法
検出方法（蛍光）	励起光320nm，蛍光430nm	励起光320nm，蛍光430nm
溶液Ａ	100mMホウ酸（pH9.0）	100mMホウ酸（pH8.0）
溶液Ｂ	100mMホウ酸， 200mM NaCl（pH9.0）	400mMホウ酸（pH9.0）
移動相流速	0.3mL／分	0.6mL／分
カラム温度	65℃	65℃
反応試液	1w／v%ホウ酸， 3w／v%dl－アルギニン	1w／v%ホウ酸， 3w／v%dl－アルギニン
反応試液注入速度	0.2mL／分	0.5mL／分
加熱器内温度	150℃	150℃

[0020] [表2]

表２　移動相における溶液Ｂの比率及び該移動相をカラムに流す時間

移動相の種類	I法		II法	
	時間(分)	溶液Ｂ（v/v%）	時間(分)	溶液Ｂ（v/v%）
第１の移動相	0-35	10	0-5	0
第２の移動相	35-60	10→75	5-50	0→100
第２の移動相	60-70	100	50-70	100
第１の移動相	70以降	10	70以降	0

（注）時間は試料の負荷完了時を基準（0分）とする。

[0021] 本発明において，混合してまたは単独で移動相をなす溶液Ａおよび溶液Ｂはともに水溶液である。溶液Ｂの比率を高めるには，連続的に高めても，断続的に高めてもよいが，好ましくは連続的に高められ，また特に好ましくは，直線的に（すなわち，一定の速度で連続的に）高められる。溶液Ｂの比率の上昇は，分析の対象である還元糖が溶出するまで行えばよい。

本発明において，第１の移動相は，試料の負荷完了後クロマトグラフィーを開始する時の最初の移動相である。第１の移動相は，所定濃度のホウ酸を含有する水溶液であり，所望により，所定濃度の水溶性無機塩を含有してもよい。第１の移動相におけるホウ酸の濃度としては，50～150ｍＭの範囲が好ましい。第１の移動相における水溶性無機塩の濃度としては，0～30ｍＭの範囲が好ましい。第２の移動相は，カラムに第１の移動相を通した後に，カラムから還元糖を溶離させるためにカラムに通す移動相であって，第１の移動相と比較してホウ酸の濃度又は水溶性無機塩の濃度を高めた移動相（上記表２においては，溶液Ｂの比率を上昇させた移動相）である。単に「移動相」というときは，第１の移動相及び第２の移動相を区別することなく包含する。

[0022] 本発明において，上記Ｉ法のように移動相の無機塩（Ｉ法では塩化ナトリウム）の濃度を上昇させる場合，第２の移動相の無機塩の濃度は200ｍＭ付近まで上昇させれば十分である。またこのとき用いる無機塩は，水溶性の無機塩（但しホウ酸塩を除く）であれば特に限定はないが，水に溶解したときに

中性を示す中性塩が好ましく，特に塩化ナトリウム，塩化カリウムが好ましい。

[0023] 本発明において，上記Ｉ法のように第２の移動相の無機塩の濃度を上昇させる場合，当該移動相のホウ酸濃度は，還元糖の分析，例えば，その目的に応じた中性還元糖又はＭ６Ｐ等の分析ができる限り限定はないが，好ましくは50～150ｍＭの範囲であり，より好ましくは75～125ｍＭであり，特に好ましくは約100ｍＭである。また，そのときの当該移動相のｐＨは好ましくは７．５～９．５の範囲であり，特に好ましくは約９である。

[0024] 本発明において，上記ＩＩ法のように第２の移動相のホウ酸濃度を上昇させる場合，当該移動相のホウ酸濃度を100ｍＭから400ｍＭに上昇させればよいが，その範囲は分析する対象の還元糖の種類に応じて適宜変更することができる。また，このときの溶液Ａのｐ Ｈは好ましくは７．５～８．５の範囲，特に好ましくは約８であり，溶液Ｂのｐ Ｈは好ましくは８．５～９．５の範囲，特に好ましくは約９である。

移動相の流速は，使用する分析機器，分析対象の還元糖の種類等に応じて，分析結果が良好となるように適宜調整されるべきものであり，一般に0.1～1mL ／分に調整されるが，分析機器の特性等によっては，移動相の流速は0.1mL ／分未満，または1mL ／分を超える流速に調整してもよい。

[0025] 本発明における陰イオン交換カラムクロマトグラフィーに用いる陰イオン交換樹脂としては，弱陰イオン交換樹脂及び強陰イオン交換樹脂のいずれをも用いることができるが，好ましくは強陰イオン交換樹脂が用いられる。また，陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによる溶離は，室温で行ってもよいが，カラムをカラムオーブン等で加熱して行うことが好ましい。但し，その場合の加熱温度は約70℃までであり，好ましくは約65℃である。

[0026] 本発明において使用する塩基性アミノ酸としては，特に限定はないが，好ましくはアルギニン，リジン，ヒスチジンであり，特に好ましくはアルギニンである。塩基性アミノ酸は何れかを単独で用いても，複数のものを混合物として用いてもよい。また塩基性アミノ酸は，これを含有する水溶液を反応

試液として，流路中を流れるカラムからの溶出液に注入することによって添加することができる。塩基性アミノ酸の注入速度は，一回の分析の間一定に保たれる限り適宜であってよい。通常は，流路内でカラムからの溶出液と混合した後の濃度（終濃度）が0.1～2ｗ／ｖ％となるように注入すればよく，0.5～1.8ｗ／ｖ％となるように注入するのが好ましく，1.0～1.5ｗ／ｖ％となるように行うのがより好ましい。塩基性アミノ酸の添加は，例えば，これを含有するホウ酸水溶液の形で流路に注入する方法により行うことが好ましい。その場合，当該水溶液中のホウ酸濃度は，移動相のホウ酸濃度と一致させてもよいが，ある程度異なっていても差し支えない。塩基性アミノ酸はまた，反応試液として後から流路に添加する代わりに，予め所定濃度で移動相に添加し溶解させておいてもよい。そうすることで，塩基性アミノ酸を含有する反応試液を後から溶出液に添加する場合に必要な供給経路を省略することができる。またこの場合，移動相中の塩基性アミノ酸の濃度は0.1～2ｗ／ｖ％に調整すればよく，0.5～1.8ｗ／ｖ％となるように調整するのが好ましく，1.0～1.5ｗ／ｖ％となるように調整するのがより好ましい。

[0027] 本発明において，カラムからの溶出液（カラムからの溶出液に塩基性アミノ酸を添加する場合は該添加後の溶出液）に含まれる還元糖と塩基性アミノ酸とを加熱器内で加熱して反応（加熱反応）させるときの反応温度は，140～180℃とすることができ，好ましくは約150℃である。またこのときの反応は，糖分子中の還元基と塩基性アミノ酸が反応して褐色物質（メラノイジン）を生ずるメイラード反応である。加熱器は流路中の溶液を所定の時間，所定の温度にまで加熱するための加熱区域を備えた装置であり，そのような加熱区域を有するものであれば，加熱器として特に限定なく用いることができる。加熱器内での加熱時間は，メイラード反応を起こさせるに十分なものであれば特に限定はないが，一般に１～２０分である。

[0028] 本発明において，蛍光検出器で検出される蛍光のノイズをさらに低減するため，加熱反応後の溶出液を冷却装置に通過させて冷却することが好ましい。冷却後の溶出液の温度は，その後の蛍光強度の測定に支障がなければ特に

制限はないが，15℃～70℃が好ましい。また，このときの冷却は，流路を冷却装置により空冷，水冷等することにより行うことができる。空冷は，例えば流路にファンで送風することにより行える。水冷する場合は水道水をそのまま利用してもよい。この他，例えば，流路を冷却槽（図１における５）内に通すことにより加熱反応後の溶出液をカラムオーブン内の温度にまで冷却することもできる。

[0029] 本発明において使用する背圧発生器は，流路内に設置され，それより上流側の流路内の溶液の圧力（背圧）を高めるためのものである。背圧発生器は，ポストカラム検出法において蛍光検出器で検出される蛍光のノイズを低減させる効果を有する。背圧発生器は，背圧を発生させることができるものであれば特に限定なく使用できる。背圧は，例えば，背圧発生器の内部で流路を細くすることにより発生させることができる。背圧発生器として，市販のバックプレッシャーレギュレーター(1/16フランジタイプユニット(4 x 1.3cm)，SSI社製)，バックプレッシャーレギュレーター(BACK PRESSURE REGULATOR ASSEMBLY, WITH P-763(100 PSI) CARTRIDGE, No. U-607, Upchurch Scientific製)は，本発明において好適に使用することができる。これらのバックプレッシャーレギュレーターは，一般に検出器出口に取り付け検出器内に一定の背圧を与えるための装置として用いられているものである。

[0030] 本発明において，背圧発生器は，加熱器と蛍光検出器の間の流路に設置されるが，加熱器の下流に冷却装置を設置する場合は，当該冷却装置の下流に設置することが好ましい。

[0031] 本発明で分析することのできる糖類は，塩基性アミノ酸とメイラード反応を起こす還元糖である。例としては，グルコース，マンノース，ガラクトース，果糖，ラムノース，フコース等の単糖類，マルトース，マルトトリオース等のオリゴ糖，グルコサミン，ガラクトサミン等のアミノ糖，グルクロン酸等のウロン酸，及びマンノース－６－リン酸等のリン酸化糖等が挙げられ，特に，マンノース，ガラクトース，フコース等の単糖類及びマンノース－６－リン酸等のリン酸化糖が挙げられる。分析すべき糖類は，試料溶液，す

なわち予め所定の媒質に所定の濃度に溶解させたものとして調製される。このとき用いる上記所定の媒質は水性媒質，好ましくは純水若しくは第１の移動相と同一組成の溶液である。

実施例

[0032] 以下，実施例を参照して本発明を更に詳細に説明するが，本発明が実施例に限定されることは意図しない。

[0033] 〔標準溶液の作成〕

Ｄ（＋）－マンノース300ｍｇ，Ｌ（－）－フコース100ｍｇ及びＤ（＋）－ガラクトース300ｍｇを純水に溶かして100ｍＬとした。この水溶液を純水で20倍に希釈したものを中性還元糖混合物標準溶液とした。マンノース－６－リン酸ナトリウム塩10ｍｇを純水に溶かして5ｍＬとしたものをＭ６Ｐ標準原液とした。中性還元糖混合物標準溶液18ｍＬとＭ６Ｐ標準原液2.5ｍＬを混合し，純水を加えて50ｍＬとしたものを，還元糖標準溶液とした。

[0034] 〔移動相用の溶液の作成〕

ホウ酸6.2ｇを純水に加えて溶かし，２Ｎ水酸化ナトリウムを用いてｐＨ9.0に調整した後，純水を加えて全量を1000ｍＬとし，0.22μｍのメンブレンフィルターを用いて吸引ろ過した。得られた溶液を溶液Ａ（100ｍＭホウ酸溶液（ｐＨ9.0））とした。またホウ酸6.2ｇ及び塩化ナトリウム11.7ｇを純水に加えて溶かし，２Ｎ水酸化ナトリウムを用いてｐＨ9.0に調整した後，純水を加えて全量を1000ｍＬとし，0.22μｍのメンブレンフィルターを用いて吸引ろ過した。得られた溶液を溶液Ｂ（100ｍＭホウ酸－200ｍＭ塩化ナトリウム溶液（ｐＨ9.0））とした。

[0035] 〔反応試液の作成〕

Ｌ－アルギニン30ｇとホウ酸10ｇを純水に加えて溶かし，全量を1000ｍＬとし，0.22μｍ以下のメンブレンフィルターを用いて吸引ろ過し，得られた溶液を反応試液とした。

[0036] 〔実施例１〕ポストカラム蛍光検出－ホウ酸錯体陰イオン交換法による糖分析

（１）装置

島津HPLCシステムLC-10Avp（還元糖分析システム，島津製作所）に陰イオン交換カラムであるShim-pack ISA-07/S2504（4.0mmI.D.×250mm，基材：ポリスチレンゲル，固定相：第４級アンモニウム基，島津製作所）をセットし，更にこのカラムを加熱するカラムオーブンとしてShim-pack ガードカラムISA（4.0mmI.D.×50mm，島津製作所）をセットした。また，カラムの流出口の下流に加熱器としてヒートブロック（ALB-221，旭テクノグラス製）をセットした。カラムオーブンでカラムを65℃に加熱するとともに，ヒートブロックを150℃にセットした。また，ヒートブロックの下流に冷却槽（室温で水道水を満たした槽）を設置し，その下流に背圧発生器としてバックプレッシャーレギュレーター（エムエス機器：U-607）を設置した。更にその下流に蛍光検出器を設置し，バックプレッシャーレギュレーター通過後の溶液に，励起光として波長320ｎｍの紫外線を照射し，波長430nmの蛍光を検出するようにした。装置の配置及び流路を模式的に図１に示した。

[0037] （２）操作手順

還元糖分析システムのオートサンプラーに，溶液Ａと溶液Ｂをセットし，更に，カラムの流出口の下流（ヒートブロックの上流）から，反応試液が供給されるようにセットした（図１参照）。溶液Ａと溶液Ｂを90：10の体積比率で混合して製した第１の移動相（従って，ホウ酸100ｍＭ，塩化ナトリウム20ｍＭ）でカラムを平衡化した後，還元糖標準溶液をカラムに負荷した。

[0038] カラムに還元糖標準溶液を負荷した後，第１の移動相を，0.3ｍＬ／分の流速で35分間カラムに流した後，同一流速で25分かけて溶液Ａと溶液Ｂの体積比率を25：75まで直線的に高め（従って，ホウ酸100ｍＭ，塩化ナトリウムは150ｍＭまで高まる），更に10分間溶液Ｂの体積比率を100％（従って，ホウ酸は100ｍＭ，塩化ナトリウムは200ｍＭ）として同一流速で流し，その後は，第１の移動相の場合と同様に溶液Ａと溶液Ｂを90：10の体積比率（従って，ホウ酸は100ｍＭ，塩化ナトリウムは20ｍＭ）で同一流速で流した。また，反応試液は，カラムの流出口の下流においてカラムからの溶出液と混合する

ように，0.2ｍＬ／分の流速で流路に供給した。従って，混合後の溶液中におけるアルギニン濃度は，3×0.2／(0.3 + 0.2)＝1.2ｗ／ｖ％であった。このときのポストカラム蛍光検出－ホウ酸錯体陰イオン交換法における諸条件を表３に示した。

[0039] [表3]

表３ ポストカラム蛍光検出－ホウ酸錯体陰イオン交換法における諸条件（実施例）

検出方法（蛍光）	励起光320nm，蛍光430nm
溶液Ａ	100mMホウ酸（pH9.0）
溶液Ｂ	100mMホウ酸， 200mM NaCl（pH9.0）
移動相流速	0.3mL／分
カラム温度	65℃
反応試液	1w／v%ホウ酸， 3w／v%dl－アルギニン
反応試液注入速度	0.2mL／分
加熱器内温度	150℃

[0040] 〔比較例１〕ポストカラム蛍光検出－ホウ酸錯体陰イオン交換法による糖分析

背圧発生器を使用しないこと以外は，上記実施例１と同じ装置及び同じ操作手順により，還元糖標準溶液を分析した。

[0041] 〔分析結果の評価〕

背圧発生器を設置しなかった場合の，還元糖標準溶液の分析結果（すなわち，比較例１の分析結果）では，蛍光検出器で検出された蛍光の測定曲線にノイズが認められ，そのノイズは各ピークの面積（AUC）の正確な算出に支障をきたす程度であった（図２）。一方，背圧発生器を設置した場合の分析結果（すなわち，実施例１の分析結果）では，各ピークの面積（AUC）が正確に算出できる程度にノイズが除去された滑らかな測定曲線が得られた（図３）。

[0042] 〔実施例２〕ポストカラム蛍光検出－ホウ酸錯体陰イオン交換法による糖分析

実施例１と同じ条件により，還元糖標準溶液分析した。次いで，溶液Ｂに

加える無機塩類を，200ｍＭの塩化ナトリウムに代えて200ｍＭの塩化カリウムとして溶液Ｂを調製すること以外は上記実施例１と同じ条件により還元糖標準溶液を分析し，両者の結果を比較した。

[0043] 〔分析結果の評価〕

溶液Ｂに加える無機塩類を，200ｍＭの塩化ナトリウムに代えて200ｍＭの塩化カリウムとした場合でも，背圧発生器を設置することにより，200ｍＭの塩化ナトリウムを用いた場合と同様に，各ピークの面積（AUC）が正確に算出できる程度にノイズが除去された滑らかな測定曲線が得られた（図４）。

産業上の利用可能性

[0044] 本発明は，ポストカラム蛍光検出－ホウ酸錯体陰イオン交換法において，蛍光検出器で検出される蛍光のノイズを除去することができ，還元糖の高感度の分析装置として使用することができる。

符号の説明

[0045] １：オートサンプラー

２：カラムオーブン

３：カラム

４：加熱器（ヒートブロック）

５：冷却槽

６：背圧発生器

７：蛍光検出器

Ａ：溶液Ａ

Ｂ：溶液Ｂ

Ｃ：反応試液

請求の範囲

[請求項1] 試料溶液中に含まれる還元糖のカラムクロマトグラフィーを用いた分離分析装置であって，該試料溶液中に含まれる還元糖を分離するための陰イオン交換樹脂カラムと，該カラムからの溶出液中に含まれる還元糖を塩基性アミノ酸と反応させるための加熱器と，該加熱器で反応後の該溶出液に励起光を連続的に照射して該溶出液から放射される蛍光の強度を測定する蛍光検出器と，該加熱器と該蛍光検出器の間に設置した背圧発生器とを含む，還元糖の分離分析装置。

[請求項2] 該加熱器と該背圧発生器との間に，更に冷却装置を設置した，請求項１の還元糖の分離分析装置。

[請求項3] 還元糖を含む試料溶液を陰イオン交換樹脂カラムに負荷し，所定濃度のホウ酸を含有する水溶液である第１の移動相の十分量を該カラムに通すことによりカラムを洗浄し，

該カラムに，第１の移動相に比してホウ酸又は水溶性無機塩の濃度を高めたホウ酸水溶液である第２の移動相を，所定の流速で連続的に供給して還元糖をこれにより溶離させ，

該カラムからの溶出液を連続的に流路中に導き，

該溶出液に少なくとも１種の塩基性アミノ酸を所定速度で連続的に添加し，

該添加後の溶出液をして，該流路の所定温度の加熱器内を所定時間かけて通過させることにより，該混合溶液を加熱し，

該加熱後の混合溶液を，背圧発生器に通した後，

該混合溶液を蛍光検出器にかけることにより測定された蛍光強度を記録することを含んでなる，

請求項１または２の装置を用いた，還元糖の分離分析方法。

[請求項4] 還元糖を含む試料溶液を陰イオン交換樹脂カラムに負荷し，所定濃度の少なくとも１種の塩基性アミノ酸と所定濃度のホウ酸を含有する水溶液である第１の移動相の十分量を該カラムに通すことによりカラ

ムを洗浄し，

該カラムに，第１の移動相に比してホウ酸又は水溶性無機塩の濃度を高めたホウ酸水溶液である第２の移動相を，所定の流速で連続的に供給して還元糖をこれにより溶離させ，

該カラムからの溶出液を連続的に流路中に導き，

該溶出液をして，該流路の所定温度の加熱器内を所定時間かけて通過させることにより，該溶出液を加熱し，

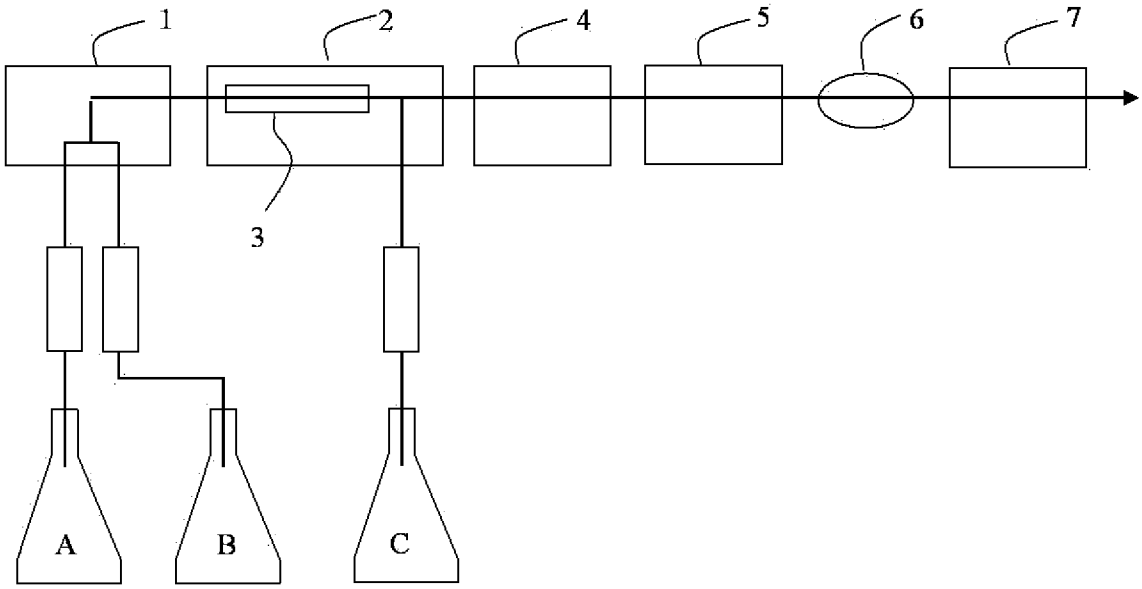
該加熱後の溶出液を，背圧発生器に通した後，

該溶出液を蛍光検出器にかけることにより測定された蛍光強度を記録することを含んでなる，

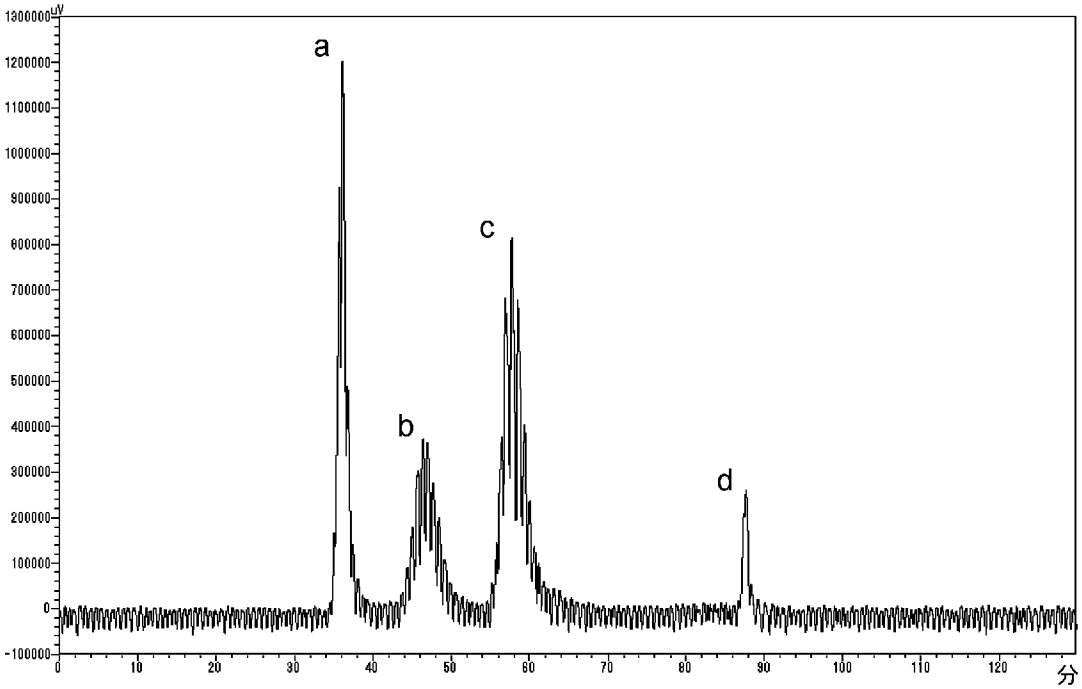
請求項１または２の装置を用いた，還元糖の分離分析方法。

[請求項5] 還元糖がマンノースー６ーリン酸を含むものである請求項３または４の方法。

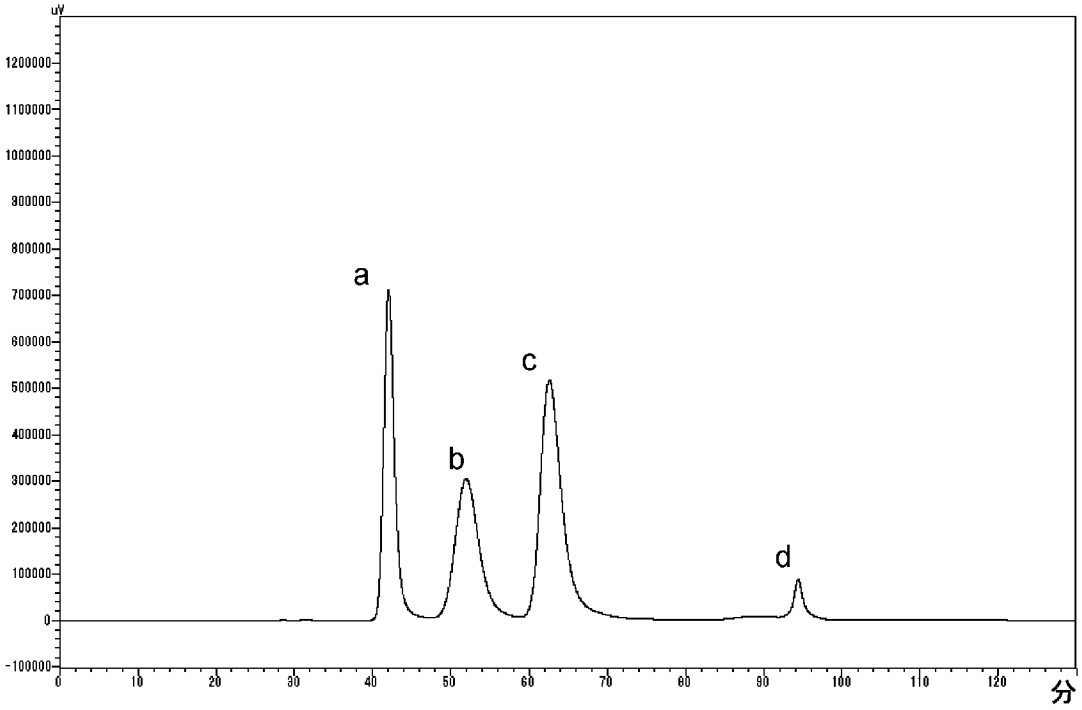
[図1]



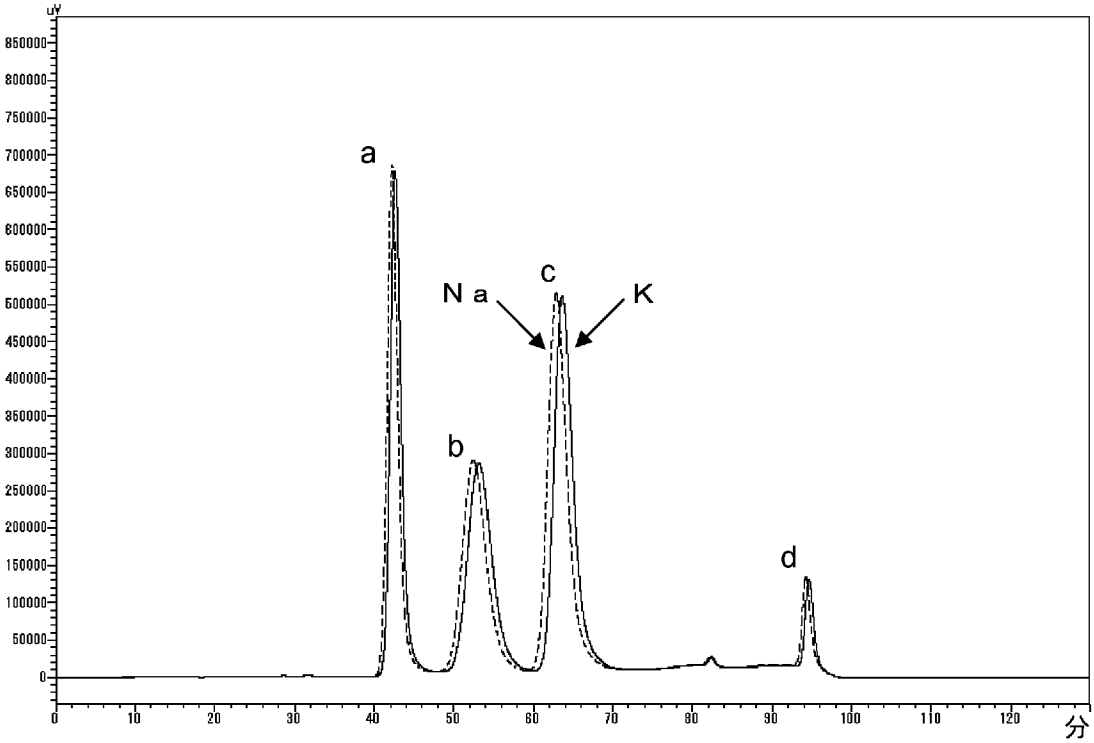
[図2]



[図3]


uV
1200000
1100000
1000000
900000
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
-100000
a
b
c
d
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
分

[図4]


uV
850000
800000
750000
700000
650000
600000
550000
500000
450000
400000
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
a
N a
c
K
b
d
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
分

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2011/060040

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N30/84(2006.01)i, *G01N21/78*(2006.01)i, *G01N30/26*(2006.01)i, *G01N30/74*(2006.01)i, *G01N30/88*(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N30/84, G01N21/78, G01N30/26, G01N30/74, G01N30/88

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2007-120972 A (JASCO Corp.), 17 May 2007 (17.05.2007), paragraphs [0038] to [0047]; fig. 1 (Family: none)	1-5
A	JP 2002-131326 A (Shimadzu Corp.), 09 May 2002 (09.05.2002), paragraphs [0011] to [0014]; fig. 1, 2 (Family: none)	1-5
A	JP 2003-194791 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 09 July 2003 (09.07.2003), paragraph [0037]; fig. 2 & US 2003/0129761 A1 & EP 1324039 A2	1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
07 July, 2011 (07.07.11)	19 July, 2011 (19.07.11)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2011/060040

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2009-036685 A (Shimadzu Corp.), 19 February 2009 (19.02.2009), paragraph [0011]; fig. 1 (Family: none)	1-5
A	JP 59-111059 A (Funakoshi Yakuhin Kabushiki Kaisha), 27 June 1984 (27.06.1984), page 2, lower right column, line 2 to page 3, upper left column, line 19; fig. 2 (Family: none)	1-5
A	Michael V.Pickering, "Assembling an HPLC Postcolumn System: Practical Considerations", LC GC, 1988.11, Vol.6, No.11, P.994, 996-997	1-5
A	Hirohisa Mikami, and Yasuo Ishida, "Post-Column Fluorometric Detection of Reducing Sugars in High Performance Liquid Chromatography Using Arginine", Journal of Japan Society for Analytical Chemistry, 1983.06.05, Vol.32, No.6, P.E207-E210	1-5

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１１／０６００４０

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　G01N30/84(2006.01)i, G01N21/78(2006.01)i, G01N30/26(2006.01)i, G01N30/74(2006.01)i, G01N30/88(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　G01N30/84, G01N21/78, G01N30/26, G01N30/74, G01N30/88

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１１年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１１年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１１年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	JP 2007-120972 A（日本分光株式会社）2007.05.17, 段落【００３８】－【００４７】, 図１（ファミリーなし）	1-5
A	JP 2002-131326 A（株式会社島津製作所）2002.05.09, 段落【００１１】－【００１４】, 図１, 図２（ファミリーなし）	1-5

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 ０７．０７．２０１１	国際調査報告の発送日 １９．０７．２０１１
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　２Ｊ　３７０８ 河野　隆一朗 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３２５２

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	JP 2003-194791 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2003.07.09, 段落【００３７】, 図２ & US 2003/0129761 A1 & EP 1324039 A2	1-5
A	JP 2009-036685 A (株式会社島津製作所) 2009.02.19, 段落【００１１】, 図１ （ファミリーなし）	1-5
A	JP 59-111059 A (フナコシ薬品株式会社) 1984.06.27, 第２ページ右下欄２行目～第３ページ左上欄１９行目, 第２図 （ファミリーなし）	1-5
A	Michael V.Pickering, "Assembling an HPLC Postcolumn System: Practical Considerations", LC GC, 1988.11, Vol.6, No.11, P.994,996-997	1-5
A	Hirohisa Mikami, and Yasuo Ishida, "Post-Column Fluorometric Detection of Reducing Sugars in High Performance Liquid Chromatography Using Arginine", 分析化学, 1983.06.05, Vol.32, No.6, P.E207-E210	1-5