

助成番号 0742

## クロマトグラフ手法を用いた塩とオリゴ糖の結合定数の算出

安達 修二

京都大学大学院農学研究科

**概要** 【目的】陽イオン交換樹脂を用いた糖の分離は、配位子交換クロマトグラフィーと呼ばれ、分析の目的のみならず、工業的な分離法としても広く用いられている。樹脂相と外液相の溶質濃度の比で定義される見掛けの分配係数は、分離の成否を支配する大切なパラメータである。著者らは、樹脂内外での溶質の化学ポテンシャル、樹脂相での対イオンと溶質との結合(配位子交換反応)および樹脂相での電気的中性の条件から、見掛けの分配係数を記述する式を提案している<sup>1,2)</sup>。この式はパラメータとして、樹脂の膨潤圧  $\Pi$  および対イオンと溶質との結合定数  $B$  を含む。本研究では、クロマトグラフ手法を用いて架橋度の異なる樹脂に対する各種溶質の見掛けの分配係数を測定し、その結果に基づいて  $\Pi$  と  $B$  を同時に推算する方法を提案する。

**【方法】** 架橋度が 4%、6% または 8% の  $\text{Na}^+$  形陽イオン交換樹脂を充填したカラムにおける各種溶質の溶出挙動(25°C)を異なる流速で測定した。使用した溶質は、8種のペントース、6種のヘキソース、16種の二糖および5種の三糖である。各クロマトグラムを数値積分することにより規格化された一次絶対モーメントを算出し、それを空塔滞留時間に対してプロットすることにより、その直線の傾きから見掛けの分配係数  $K_{app}$  を求めた。また、ベッド空隙率は分子量が大きく樹脂内に浸透できない Dextran T-70 のクロマトグラムから算出した。

**【結果と考察】** 架橋度の異なる3種の樹脂について、上述した35種の糖の見掛けの分配係数を測定した。また、固定イオン濃度、気孔率(細孔率)などの樹脂の特性値を別に測定した。まず、既往の研究<sup>1,2)</sup>で  $\text{Na}^+$  と複合体を形成し難いことが知られているグルコースの  $K_{app}$  より、結合定数  $B$  がゼロであると仮定して、各樹脂の膨潤圧  $\Pi$  の近似値を得た。この値を用いて各溶質と対イオンとの結合定数  $B$  の近似値を算出し、Microsoft Excel<sup>®</sup> のソルバー機能を用いて、これらの値の相対標準偏差が最小になるように  $\Pi$  の値を最適化し、より信頼性の高い  $B$  値を得た。

本研究では、各種溶質と  $\text{Na}^+$  との複合体形成の結合定数を算出したが、ここで提案した方法は他の対イオンとの結合定数の推算にも適用できる汎用的な方法である。

- 1) Adachi, S. *et al.* (1999). Estimation of the binding constant of a saccharide to sodium-ion using cation-exchange resins with different divinylbenzene contents. *J. Chem. Eng. Japan*, 32, 678-683.
- 2) Adachi, S. *et al.* (1989). Role of swelling pressure on the distribution coefficient of maltooligosaccharide in a cation-exchange resin. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 3203-3208.

## 1. 研究目的

糖の液体クロマトグラフ分離は、分析の目的のみならず工業的な分離法としても広く採用されている。逆相クロマトグラフィーを用いる方法もあるが<sup>1)</sup>、糖の種類によっては試料の誘導体化が必要である。そのため、糖の分離・分析には、溶離液として水ができる陽イオン交換樹脂を用いた方

法が用いられることが多い。この分離法は、対イオンと溶質との配位子交換の強弱により分子量の同じ溶質でも分離でき、配位子交換クロマトグラフィーと呼ばれる。配位子交換クロマトグラフィーによる糖の分離は、分析やその精度の向上<sup>2-4)</sup>とともに、擬似移動層型連続クロマトグラフィーなどの操作法を適用した工業的な目的にも用いられて

いる<sup>5,6)</sup>。

配位子交換クロマトグラフィーでは、イオン交換樹脂の対イオンと溶質との相互作用の違いにより分離が達成される。相互作用の強弱は、一般には安定度比と呼ばれるパラメータで評価されることが多い<sup>7-9)</sup>が、この値は樹脂の架橋度に依存する。

一方、著者らは、溶質の外水相から樹脂相への分配と樹脂相内での対イオンとの複合体形成を個別に扱い、溶質の樹脂への見掛けの分配係数を記述するモデルを提案している<sup>10,11)</sup>。しかし、対イオンと溶質との複合体形成の結合定数を推算する方法にはまだ検討の余地がある。そこで本研究では、このモデルに基づいて、樹脂の膨潤圧と対イオンと溶質との複合体形成の結合定数を同時に推算する方法を提案し、各種ペントース、ヘキソースおよび2分子または3分子のヘキソースからなるオリゴ糖のNa<sup>+</sup>イオンとの結合定数の算出に適用した。

## 2. 実験方法

### 2.1 実験材料

ジビニルベンゼン(DVB)を架橋剤とするスチレンとの共重合体に硫酸基を導入した強酸性Na<sup>+</sup>形陽イオン交換樹脂 UBK510L(平均直径 320 μm, DVB 含有率 4%)、UBK530(220 μm, DVB 6%)および UBK550(220 μm, DVB 8%)は三菱化学(株)(東京)より供与いただいた。ベッド空隙率の測定には、GE ヘルスケア社(GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire, England)より購入した Dextran T-70(重量平均分子量 約 70,000)を使用した。溶質として、D-キシロース、D-アラビノース、D-リボース、D-リキソース、L-キシロース、L-アラビノース、L-リボース、L-リキソースの8種類のペントース、D-グルコース、D-マンノース、D-フルクトース、D-ガラクトース、L-ソルボース、L-グルコースの6種類のヘキソース、マルトース、トレハロース、イソマルトース、セロビオース、ゲンチオビオース、ネオトレハロース、コウジビオース、ニゲロース、スクロース、ラクトース、パラチノース、ツラノース、ロイクロース、マルツロース、ラクツロース、メリビオースの16種類の二糖、イソマルトトリオース、マルトトリオース、メジトース、パノース、ラフィノースの5種類の三糖を使用した。これらの糖類は、和光純薬工業(株)(大阪)、東京化成工業(株)(東京)、ナカライテスク(株)(京都)、Sigma-Aldrich(MO, USA)、(株)林原生物化学研究

所(岡山)またはFluka(Buchs, Switzerland)より購入した。

### 2.2 陽イオン交換樹脂の特性

定法に従いH<sup>+</sup>形に調整した樹脂を10 mL量りとりカラムに充填した。そこに2 mol/Lの塩酸を空間速度40 h<sup>-1</sup>で1.5時間通流したのち、純水を空間速度50 h<sup>-1</sup>で通流して流出液のpHが中性になるまで洗浄した。つぎに、4% (w/v)の塩化ナトリウム水溶液を空間速度16.7 h<sup>-1</sup>で1.5時間通流し、流出液の全量を500 mL容の三角フラスコに貯留した。貯留液中の水素イオンの量をメチルレッド・メチレンブルー混合指示薬を用いて、1 mol/Lの水酸化ナトリウム標準溶液(力価  $f_{\text{NaOH}} = 1.002$ )で滴定した。このときの滴定量Aより、次式によりH<sup>+</sup>形陽イオン交換樹脂のイオン交換容量 $\bar{C}_{\text{E,H}^+}$ を求めた。

$$\bar{C}_{\text{H}^+} = Af_{\text{NaOH}} / 10 \quad (1)$$

H<sup>+</sup>形陽イオン交換樹脂をカラムに充填したときの層高Z<sub>H</sub>を測定し、後述する方法によりベッド空隙率 $\varepsilon_{\text{b,H}}$ を求めた。つぎに、上述の方法でNa<sup>+</sup>形に変換したベッドの層高Zとベッド空隙率 $\varepsilon_{\text{b}}$ を求めた。これらの値から、次式によりNa<sup>+</sup>形陽イオン交換樹脂の固定イオン濃度 $\bar{C}_{\text{E}}$ を算出した。

$$\bar{C}_{\text{E}} = \frac{1 - \varepsilon_{\text{b,H}^+}}{1 - \varepsilon_{\text{b}}} \frac{Z_{\text{H}^+}}{Z} \quad (2)$$

湿潤樹脂の見掛け密度 $\rho_{\text{app}}$ はピクノメータを用いて測定した。乾燥したピクノメータの重量 $a_1$ を測定し、これに純水を満たしたときの重量との差を水の密度 $\rho_{\text{w}}$ (0.997 g/mL, 25°C)で除してピクノメータの正確な体積Vを求めた。つぎに、ピクノメータに湿潤樹脂を入れて重量 $b_1$ を測定したのち、これに純水を満たして重量 $c_1$ を測定した。これらの値より次式により $\rho_{\text{app}}$ を算出した。

$$\rho_{\text{app}} = \frac{b_1 - a_1}{V - (c_1 - b_1) / \rho_{\text{w}}} \quad (3)$$

湿潤および乾燥樹脂の重量( $a_2$ および $b_2$ )を測定し、次式により樹脂の気孔率(細孔率) $\varepsilon_{\text{p}}$ を推算した。

$$\varepsilon_{\text{p}} = (a_2 - b_2) / (a_2 / \rho_{\text{app}}) \quad (4)$$

### 2.3 溶質のモル体積

純水を用いて容積を測定したメスフラスコに適当量の糖

を入れ、その重量を測定した。このメスフラスコに純水を加えてメスアップし、そのときの純水の重量を測定した。これらの値から糖のモル濃度  $C'_S$  と水のモル濃度  $C'_W$  を算出した。式 (5) に従い、 $C'_S$  と  $C'_W$  をプロットして得られた直線の傾きから糖のモル体積  $v_S$  を算出した。なお、モル体積の値が報告されている糖についてはそれらの値を使用した<sup>10)</sup>。

$$C'_W = 1/v_W - (v_S/v_W)C'_S \quad (5)$$

ここで、 $v_W$  は水のモル体積 (0.01807 L/mol) である。

### 2.4 見掛けの分配係数

内径 1.58 cm のジャケット付きガラスカラムに、層高が約 26 cm になるように所定の架橋度の Na<sup>+</sup> 形陽イオン交換樹脂を充填した。ジャケットに恒温水を循環して、ベッドの温度を 25°C に保った。カラム出口に示差屈折計 (YRU-833, (有)シマムラテック, 東京) および定量送液ポンプ (MP-3N, 東京理化器械 (株), 東京) をその順に接続した。ベッド上部に 0.5 mL の 1% (w/v) 糖水溶液を負荷し、純水で溶出した。カラム流出液中の糖濃度は示差屈折計で測定し、記録計 (Chromatopac C-R8A, 島津製作所 (株)) を用いて 0.5 秒ごとに記録した。

クロマトグラムの規格化された一次絶対モーメント  $\mu_1'$  は式 (6a) で定義され、見掛けの分配係数  $K_{app}$  と式 (6b) の関係がある<sup>12,13)</sup>。

$$\mu_1' = \int_0^\infty tC(Z)dt / \int_0^\infty C(Z)dt \quad (6a)$$

$$= (Z/u_0)[\varepsilon_b + (1 - \varepsilon_b)K_{app}] \quad (6b)$$

ここで、 $C(Z)$  は溶出液中の溶質の濃度、 $t$  は時間、 $u_0$  は空塔流速、 $Z$  はカラム長、 $\varepsilon_b$  はベッド空隙率である。示差屈折計の応答強度  $H$  は濃度  $C$  に比例するので、式 (6a) の積分では濃度  $C$  の代わりに応答強度  $H$  を用いた。なお、式 (6a) の積分は Simpson 法によった。

まず、分子量が大きく樹脂内に浸透できない Dextran T-70 ( $K_{app} = 0$ ) のクロマトグラムを測定し、 $\mu_1'$  を  $Z/u_0$  に対してプロットしたときの直線の傾きからベッド空隙率  $\varepsilon_b$  を算出した。つぎに各溶質について、異なる流量で得られた  $\mu_1'$  の値を空塔滞留時間  $Z/u_0$  に対してプロットし、原点を通る直線の傾きから  $\varepsilon_b + (1 - \varepsilon_b)K_{app}$  の値を算出した。上記で

得られた  $\varepsilon_b$  の値を用いて、各溶質の陽イオン交換樹脂に対する見掛けの分配係数  $K_{app}$  を得た。

## 3. 結果および考察

### 3.1 陽イオン交換樹脂の特性値

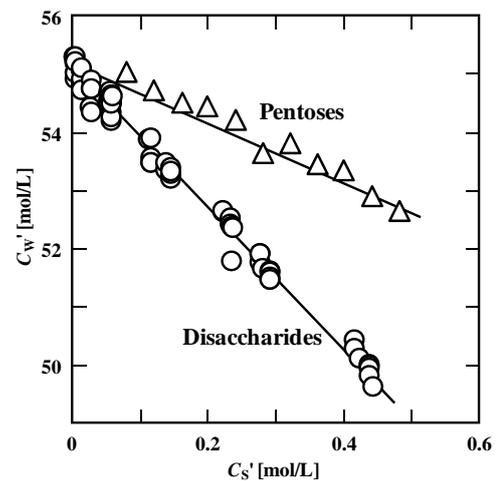
架橋度 (DVB 含有率) が 4%、6% および 8% の Na<sup>+</sup> 形陽イオン交換樹脂の粒径や交換容量 (固定イオン濃度) などの諸特性値 (室温) を Table 1 に示す。ここで、架橋度および粒径はカタログ値である。樹脂の架橋度が大きくなると、見掛け密度と交換容量が大きくなり、樹脂の気孔率は小さくなった。

**Table 1.** Properties of cation-exchange resins in sodium-ion form

DVB content [%]	4	6	8
Particle diameter [ $\mu\text{m}$ ]	320	220	220
Apparent density [g/mL]	1.123	1.180	1.217
Porosity	0.774	0.699	0.619
Exchange capacity [equiv./L]	1.175	1.769	1.984

### 3.2 溶質のモル体積

各種ペントースおよび二糖の  $C'_S$  と  $C'_W$  の関係を Fig. 1 に示す。



**Fig. 1.** Estimation of molar volumes of pentoses and disaccharides at 25°C. Pentoses used were D-xylose, D-arabinose, D-ribose, D-lyxose, L-xylose, L-arabinose, L-ribose and L-lyxose, and disaccharides used were maltose, trehalose, cellobiose, isomaltose, gentiobiose, sucrose, lactose, palatinose, luecrose and turanose.

ペントースおよび二糖のそれぞれは、糖の種類に依存せず、すべてのプロットが1本の直線で表され、それらの直線の傾きからペントースおよび二糖のモル体積はそれぞれ0.0978 L/molと0.220 L/molと算出された。なお、各種ヘキソースのモル体積は文献値<sup>10)</sup>の0.114 L/molを使用した。三糖のうち、マルトトリオースとラフィノースのモル体積はそれぞれ0.338 L/molと0.325 L/mol<sup>10)</sup>とし、他の三糖のモル体積は両者の平均値である0.332 L/molを用いた。

### 3.3 各種糖類の陽イオン交換樹脂に対する見掛けの分配係数

いくつかの溶質について、架橋度が4%のNa<sup>+</sup>形陽イオン交換樹脂を充填したカラムで得られた規格化された一次絶対モーメント $\mu_1'$ の空塔滞留時間 $Z/u_0$ に対するプロットをFig. 2に示す。それぞれの溶質はいずれも原点を通る直線を与えた。Dextran T-70に対する直線の傾きからベッド空隙率 $\varepsilon_b$ を算出し、各溶質に対する直線の傾きからその溶質のイオン交換樹脂に対する見掛けの分配係数 $K_{app}$ を算出した。架橋度が4%、6%および8%のNa<sup>+</sup>形陽イオン交換樹脂充填層で測定したクロマトグラムについて、すべての溶質で同様のプロットを行い、各樹脂に対する $K_{app}$ を算出した。その結果をTable 2に示す。

### 3.4 糖とNa<sup>+</sup>の結合定数の推算

溶質Sの陽イオン交換樹脂への分配で生起すると考えられる現象をFig. 3に模式的に示す。

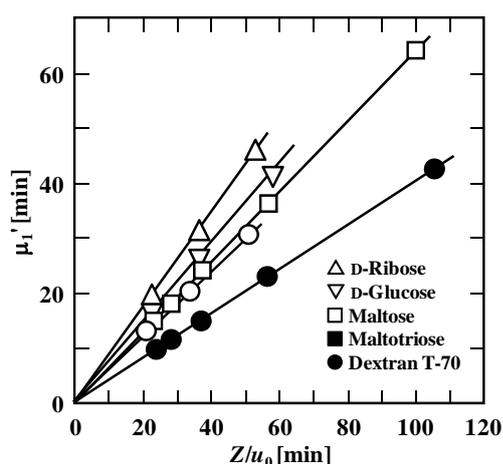


Fig. 2. Plots of normalized first-order absolute moment  $\mu_1'$  versus superficial residence time  $Z/u_0$  for some solutes. The bed was packed with the cation-exchange resin which had the DVB content of 4% and conditioned in sodium-ion form.

樹脂相と外液相での化学ポテンシャルが等しくなるように、溶質Sは樹脂相に分配する。このときの分配係数を真の分配係数 $K$ と表すと、 $K$ は樹脂の膨潤圧 $\Pi$ を考慮して、次式で表される<sup>11,14,15)</sup>。

$$K = \frac{\bar{C}_S}{C_S} = \gamma_0 \exp\left(-\frac{\Pi}{RT} \bar{v}_S\right) \quad (7)$$

ここで、 $C_S$ は外液相の溶質濃度、 $\bar{C}_S$ は樹脂相の溶質濃度、 $\bar{v}_S$ は溶質の部分モル体積、 $R$ は気体定数、 $T$ は絶対温度である。また、 $\gamma_0$ は樹脂内外での溶質の活動度係数の比と樹脂内で溶質が利用できる体積分率に関するパラメータである。

溶質(糖)は分子内に電子の局在があり、樹脂内では、溶質の負に帯電した領域と対イオンが相互作用(配位子交換)すると考えられる<sup>7,11)</sup>。すなわち、溶質Sが対イオン $M^+$ と結合して複合体 $M^+S$ を形成する。このときの結合定数 $B$ は質量作用の法則に基づいて式(8)で表される。

$$B = \frac{\bar{C}_{M^+S} / \varepsilon_p}{(C_S / \varepsilon_p)(\bar{C}_{M^+} / \varepsilon_p)} \quad (8)$$

ここで、 $\bar{C}_{M^+S}$ は糖と対イオンとの複合体の濃度、 $\bar{C}_{M^+}$ は対イオン濃度である。なお、 $\bar{C}_{M^+S}$ 、 $\bar{C}_{M^+}$ および $\bar{C}_S$ はいずれも樹脂相の体積基準の濃度である。しかし、溶質またはその対イオンとの複合体は樹脂骨格部分には入り込めな

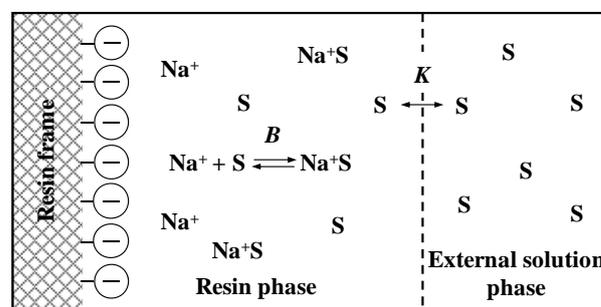


Fig. 3. Illustration of a model for explaining the apparent distribution coefficient of a solute to a cation-exchange resin

**Table 2.** Apparent distribution coefficients  $K_{app}$  and intrinsic distributions coefficient  $K$  of various saccharides to cation-exchange resins in sodium-ion form, and binding constants  $B$  of various saccharides to sodium ion

Saccharides	$K_{app}$			$K$			$B \times 10^4$ [m <sup>3</sup> /mol]				
	DVB 4%	DVB 6%	DVB 8%	DVB 4%	DVB 6%	DVB 8%					
Pentose	D-Xylose	0.574	0.362	0.282			0.90				
	D-Arabinose	0.662	0.457	0.356			2.06				
	D-Ribose	0.773	0.603	0.512			3.95				
	D-Xylose	0.606	0.389	0.304	0.505	0.303	0.211	1.27			
	L-Xylose	0.571	0.362	0.276				0.86			
	L-Arabinose	0.666	0.448	0.394				2.23			
	L-Ribose	0.801	0.604	0.517				4.10			
	L-Lyxose	0.615	0.391	0.304				1.32			
D-Glucose	0.514	0.310	0.220						0.69		
D-Mannose	0.583	0.364	0.279						1.63		
D-Fructose	0.610	0.402	0.310	0.470				0.264	0.177	2.12	
D-Galactose	0.582	0.366	0.273		1.60						
L-Sorbose	0.519	0.310	0.237		0.81						
L-Gulose	0.586	0.359	0.272		1.57						
Maltose	0.394	0.178	0.093				2.32				
Trehalose	0.361	0.139	0.060				0.97				
Disaccharide	Isomaltose	0.396	0.180	0.091			2.32				
	Cellobiose	0.351	0.143	0.072			1.17				
	Gentiobiose	0.353	0.134	0.068			1.00				
	Neotrehalose	0.349	0.139	0.068			1.03				
	Kojibiose	0.386	0.160	0.086			1.91				
	Nigerose	0.385	0.159	0.089	0.296	0.107	0.055	1.94			
	Sucrose	0.375	0.151	0.085				1.69			
	Lactose	0.400	0.168	0.086				2.11			
	Palatinose	0.357	0.153	0.079				1.47			
	Turanose	0.377	0.161	0.085				1.83			
	Leucrose	0.421	0.199	0.115				3.19			
	Maltulose	0.398	0.184	0.109				2.72			
	Lacturose	0.459	0.230	0.146				4.44			
	Melibiose	0.391	0.172	0.104				2.43			
Trisaccharide	Isomaltotriose	0.331	0.108	0.027				0.182	0.041	0.016	4.66
	Maltotriose	0.337	0.116	0.032				0.177	0.039	0.015	5.76
	Melezitose	0.267	0.079	0.016				0.182	0.041	0.016	2.25
	Panose	0.308	0.101	0.021				0.182	0.041	0.016	3.77
	Raffinose	0.283	0.079	0.020				0.187	0.044	0.017	2.35

いので、その効果を樹脂の気孔率  $\varepsilon_p$  で補正した。

さらに、樹脂相では電気的中性の条件が成立する。

$$\bar{C}_{M^+} + \bar{C}_{M^+S} = \bar{C}_E \quad (9)$$

陽イオン交換樹脂に対する溶質の見掛けの分配係数  $K_{app}$  は、樹脂相に存在する溶質の濃度と外液相のそれとの比であるので、式 (10a) で定義され、その値は式 (7)、式 (8) および式 (9) より式 (10b) で表される。

$$K_{app} = \frac{\bar{C}_S + \bar{C}_{M^+S}}{C_S} \quad (10a)$$

$$= K \left( 1 + \frac{B \bar{C}_E / \varepsilon_p}{1 + B K C_S / \varepsilon_p} \right) \quad (10b)$$

溶質の濃度  $C_S$  が十分低いとき、式 (10b) は次式のように近似できる。

$$K_{app} = K(1 + B \bar{C}_E / \varepsilon_p) \quad (11)$$

対イオンと溶質との結合定数  $B$  は膨潤圧、すなわち樹脂の架橋度には依存しない値である。一方、樹脂の膨潤圧  $\Pi$  は架橋度のみ依存し、ある架橋度の樹脂についてはいずれの溶質に対しても共通の値である。これらの点を踏まえて、まず架橋度が 4%、6% および 8% の樹脂の膨潤圧を仮定して、式 (11) に基づいて各溶質の見掛けの分配係数  $K_{app}$  から結合定数  $B$  を算出し、それらの相対標準偏差が最小になるように、Microsoft Office Excel<sup>®</sup> 2007 のソルバー機能を用いて、膨潤圧を最適化した。なお、膨潤圧の初期値は、グルコース(Glc)は  $Na^+$  イオンと複合体を形成し難く  $B_{Glc} = 0$  と仮定<sup>14)</sup>して算出した。また、各溶質の部分モル体積はモル体積と等しいと近似した。さらに、三糖については  $K_{app}$  が小さいため、最適化に対するデータとしては用いなかった。

このようにして得られた架橋度が 4%、6% および 8% の樹脂の膨潤圧はそれぞれ 10.8 MPa、21.2 MPa と 27.2 MPa であった。これらの値とモル体積から算出した真の分配係数  $K$  と各溶質の  $Na^+$  イオンに対する結合定数  $B$  の値を Table 2 に示す。また、ここで推算した樹脂の膨潤圧は、樹脂に対する水の吸着等温線から算出した値<sup>16)</sup> とほぼ同等であり、提案した膨潤圧および溶質と対イオンとの結合定

数を同時に推算する方法の妥当性を支持する。

#### 4. 結論

架橋度の異なる各種陽イオン交換樹脂に対する溶質の見掛けの分配係数  $K_{app}$  の値から、各樹脂の膨潤圧  $\Pi$  および溶質と対イオンとの結合定数  $B$  を同時に推定する新たな方法を提案した。本法で推算した各樹脂の膨潤圧は既往の値と同程度であり、また結合定数の値は同一分子量の溶質の溶出順序を適切に反映しており、提案法の妥当性が支持された。

ここで提案した方法は  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  形などのいずれの対イオン形の樹脂にも適用でき、それらの対イオンと溶質との結合定数が算出できる。今後、種々の対イオンと溶質との結合定数の値を蓄積すれば、樹脂の物性のみから各溶質の見掛けの分配係数が推定できる。また、結合定数  $B$  と相関する溶質(糖)の特性値を見出すことができれば、任意の溶質の見掛けの分配係数が予測できる。さらに、ここでは平衡パラメータである見掛けの分配係数のみを取り扱ったが、クロマトグラムの広がりに関与する各溶質の樹脂内での拡散係数と樹脂充填層での軸方向混合拡散係数を推算する方法を開発すれば、陽イオン交換樹脂を用いた糖の分離プロセスが合理的に設計できると期待される。

#### 引用文献

- 1) Gomis, D. B., Tamayo, D. M. and Alonso, J. M. (2001). Determination of monosaccharides in cider by reversed-phase liquid chromatography, *Anal. Chim. Acta*, **436**, 173-180.
- 2) Qian, W. L., Khan, Z., Watson, D. G. and Fearnley, J. (2008). Analysis of sugars in bee pollen and propolis by ligand exchange chromatography in combination with pulsed amperometric detection and mass spectrometry, *J. Food Comp. Anal.*, **22**, 78-83.
- 3) Caseiro, A., Marr, I. L., Claeys, M., Kasper-Giebl, A., Puxbaum, H. and Pio, C. A. (2007). Determination of saccharides in atmospheric aerosol using anion-exchange high-performance liquid chromatography and pulsed-amperometric detection, *J. Chromatogr. A*, **1171**, 37-45.
- 4) 中尾千予視, 蒲生啓司, 菱田勝巳, 和田啓男 (2006).

- 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, *J. Mass Spectro. Soc. Japan*, **54**, 49-56.
- 5) Adachi, S. (1994). Simulated moving-bed chromatography for continuous separation of two components and its application to bioreactors. *J. Chromatogr. A*, **658**, 271-282.
- 6) 橋本健治編著 (2005). “クロマト分離工学”, 培風館, 東京.
- 7) Goulding, R. W. (1975). Liquid chromatography of sugars and related polyhydric alcohols on cation exchangers. The effect of cation variation. *J. Chromatogr.*, **103**, 229-239.
- 8) Caruel, H., Rigal, L. and Gaset, A. (1991). Carbohydrate separation by ligand-exchange liquid chromatography. Correlation between the formation of sugar-cation complexes and the elution order. *J. Chromatogr.*, **558**, 89-104.
- 9) Stefansson, M. (1993). Selective complex formation of saccharides with europium (III) and iron (III) ions at alkaline pH studied by ligand-exchange chromatography. *J. Chromatogr.*, **630**, 123-128.
- 10) Adachi, S. and Matsuno, R. (1997). Effect of eluent composition on the distribution coefficient of saccharides on to a cation-exchange resin in sodium-ion form. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1296-1301.
- 11) Adachi, S., Yoshino T. and Matsuno, R. (1999). Estimation of the binding constant of a saccharide to sodium-ion using cation-exchange resins with different divinylbenzene contents. *J. Chem. Eng. Japan*, **32**, 678-683.
- 12) Kucera, E. (1965). Contribution to the theory of chromatography. Linear non-equilibrium elution chromatography. *J. Chromatogr.*, **19**, 237-248.
- 13) Nakanishi, K., Yamamoto, S., Matsuno, R. and Kamikubo, T. (1977). Analysis of dispersion mechanism in gel chromatography. *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 1465-1473.
- 14) Adachi, S., Watanabe, T. and Kohashi, M. (1989). Role of swelling pressure on the distribution coefficient of maltooligosaccharide in a cation-exchange resin. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 3203-3208.
- 15) Adachi, S., Mizuno, T., and Matsuno, R. (1995). Concentration dependence of the distribution coefficient of maltooligosaccharides on a cation-exchange resin. *J. Chromatogr. A*, **708**, 177-183.
- 16) Helfferich, F. (1962). “Ion-Exchange”, McGraw-Hill, New York, pp. 100-125.

No. 0742

## Estimation of the Binding Constant of Oligosaccharide to Cation by Chromatographic Method

Shuji Adachi

Graduate School of Agriculture, Kyoto University

### Summary

Chromatographic separation of saccharides using cation-exchange resin has been widely used in food industry as well as for analytical purpose. The separation is based on a ligand-exchange reaction between a solute and a counter-ion of cation-exchange resin. The adsorption isotherm of a solute onto a resin has been assumed to be linear in a wide concentration range of the solute. The linear isotherm is true at low solute concentrations, but usually not at high concentrations. The linear isotherm is characterized by the apparent distribution coefficient of the solute onto the resin. The coefficient is defined as the ratio of the solute concentration in resin phase to that in external solution phase. We have proposed an expression for describing the apparent distribution coefficient of the solute to the resin. The coefficient contains the swelling pressure of the resin  $\Pi$  and the binding constant between the solute and the counter-ion  $B$  as parameters. The  $\Pi$  value depends on the resin type but does not on the solute type. On the other hand, each solute has an intrinsic value to a specific ion and the value is common for the resins with various cross-linkages, which are usually expressed by the divinylbenzene (DVB) contents.

In this study, a method was proposed for estimating the  $\Pi$  and  $B$  values simultaneously from the apparent distribution coefficients of some solute onto cation-exchange resins with different DVB contents. In the method, swelling pressures of resins are assumed at approximate values, which might be obtained from the distribution coefficients of glucose because of its low affinity to sodium ion, and the  $B$  values of the solutes are estimated from the apparent distribution coefficients and the assumed  $\Pi$  values. Then, the  $\Pi$  values are optimized to minimize the relative standard deviations for the  $B$  values using Solver of Microsoft Excel<sup>®</sup>. The optimization enables us to get best estimates for both the  $\Pi$  and  $B$  values. The method was successfully applied to estimation of the  $\Pi$  of cation-exchange resins in sodium-ion form with the DVB contents of 4, 6 and 8%, and the  $B$  values of 8 pentoses, 6 hexoses, 16 disaccharides and 5 trisaccharides.