

HPIC-IPAD法による糖類の分析 (1)

一分離ー

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

キーワード

電気化学検出器、単糖、オリゴ糖、イオン交換カラム

はじめに

糖類の分離・検出方法にはいくつかの組み合わせがあります。配位子カラムやGPCカラムと示差屈折検出 (RI) の組み合わせ、ODSカラムとUV検出 (ポストカラム発色)、ODSと蛍光検出 (プレ誘導体化) などの組み合わせがあります。食品の分野では糖類の種類が少なく濃度も比較的高い試料の場合、アミノカラムと示差屈折検出の組み合わせが、一番使用されている組み合わせです。製薬、原薬研究などでは、抽出、加水分解精製など前処理工程が加わるので、主要成分、微量成分などの分析には高感度な分析が求められます。イオン交換カラムと電気化学検出器の組み合わせは高い選択性と、応答性の高い検出器による高分離・高感度の分析が行えます。この組み合わせの分析手法の特長は、糖類が強アルカリ性液中で解離してイオン性化合物になる性質を用いて分離すること、イオン性化合物は電気化学活性種で電気化学検出器を用いて検出できることにあります。

表1: 糖類の解離定数 (25°C 水における)

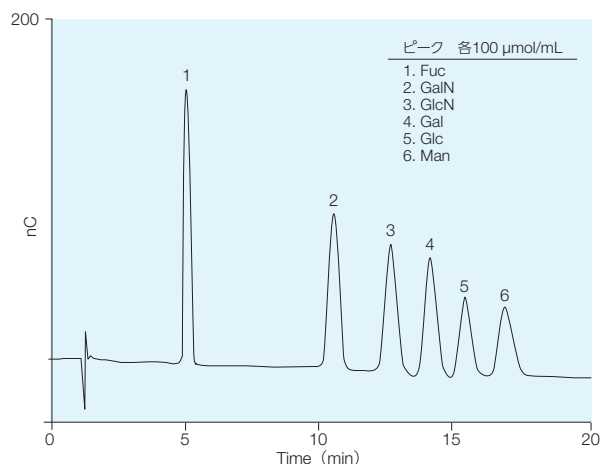
糖類	pK _a
フルクトース	12.03
マンノース	12.08
キシロース	12.15
グルコース	12.28
ガラクトース	12.39
ズルシトール	13.43
ソルビトール	13.60
α-メチルグルコシド	13.71

糖類を分離する

糖類を分離するモードは幾つかあります。代表的なカラムは-NH₂アミノ基をシリカベースに修飾したカラム、アミノカラムです。このカラムのモードはHILICモードと呼ばれる親水性相互作用を利用した分離モードです。糖類の水酸基と金属対イオンが錯体を形成し、その金属錯体の安定性の差異により分離する配位子交換カラムがあります。他にサイズ排除カラムが糖類の分離に用いられます。このカラムは、糖類の分子の大きさによりカラム内の迷路因子と、高分子化合物は充填樹脂の孔子から排除される現象で分離されます。

イオン交換カラムで糖類を分離する利点は高い選択性にあります。糖類は単糖類、二糖類、オリゴ糖類、多糖類などに分類されます。単糖類では、炭素数でC3からC7の炭素があり、アルデヒド基 (-CHO)、ケトン基 (>C=O) のいずれかの官能基を持っています。そして、ヒドロキシ基とアルデヒド基またはケトン基を持った直列構造を示します。安定的な構造として、自己のヒドロキシ基とアルデヒド基がグルコシド結合により環状アセタール、ケトン基を有する場合、環状ケタールの環状構造をとります。環状構造の単糖は、他の単糖とグリコシド結合をすると二糖、三糖となります。糖類は、2から20の単糖が結合したものをオリゴ糖と呼びます。さらに結合した糖類を多糖類と呼びます。環状構造の単糖は平面的であり重合する場合、上下に出ている-ヒドロキシ基と-ヒドロキシ基で縮合してグルコシド結合を形成します。下向きの-OHと結合するとα結合と呼び、上向きのヒドロキシ基と結合するとβ結合と表されます。例えば、Glc α 1-4Glc (マルトース)、Glc β 1-4Glc (セロビオース) と表し、結合状態により糖の種類が変わります。このような差異を認識して、イオン交換カラムでは分離が可能になります。その原理は糖類が強アルカリ条件下でイオン性物質、イオン化することが上げられます。表1に示すように、単糖類はアルカリ性水溶液中で解離して、イオン化することがわかります。強アルカリ条件下で表1にある糖類の解離定数から、α-メチルグルコシドから順番にフルクトースが一番遅く溶出することが予想できます。

イオン交換カラムは、イオンもしくはイオン性成分を交換基に保持し、イオン交換樹脂と目的イオン、溶離液との静電的相互作用で分離を行います。イオン化していない、またイオン化し難い物質は保持されにくくなっています。グルコースはpH 12.28以上でイオン化し、ソルビトースは13.60以上のpH域でイオン化するので、Thermo Scientific™ Dionex™ CarboPac™ カラムを用いた分離では、解離定数の大きいものから溶出されます。解離定数が大きい糖は、それだけ高pHでなければイオン化に進みません。ズルシトールやソルビトールはグルコースやガラクトースに比べ、保持され難い糖類といえます。代表的な単糖類のクロマトグラムを図1に示します。N-リンク糖タンパク質の糖鎖部分を酵素や加水分解にて単糖にし、構成糖を調べるときに用いられる条件です。



IC 装置	Dionex ICS-5000 ⁺
カラム	Dionex CarboPac PA1 (G), 4 × 50 mm Dionex CarboPac PA1 (S), 4 × 250 mm
カラム温度	室温
溶離液	16 mmol/L NaOH
流量	1.0 mL/min.
検出器	Int-PAD, Au 作用電極 (disposable)
試料注入量	25 μL

図1: 糖タンパク質構成糖の分析例

糖タンパク質構成糖は、アセチル基が付いたN-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミンが構成糖ですが、加水分解のときに脱アセチル反応により、グルコサミン、ガラクトサミンのアミノ糖に分解されます。脱アセチル化は定量的に起こるので、構成糖の濃度を測ることに問題はありませぬ。この条件では水酸化ナトリウムや水酸化カリウムの濃度が16 mmol/L濃度と低いですが、解離定数に沿った溶出順序を示しています。

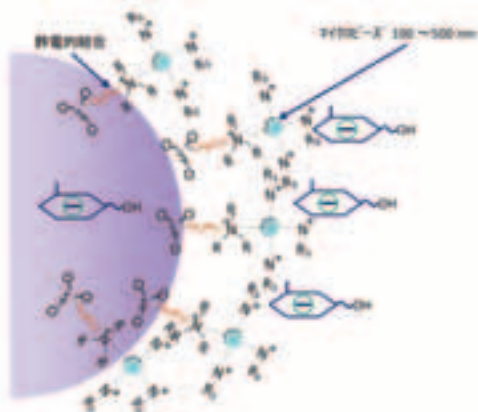


図2: 糖類のイオン交換模式図

グルコース、ガラクトース、マンノースは同じ分子量180.2でヒドロキシ基の数も同じですが、短い時間で分離をしていることがわかります。これはカラム、イオン交換樹脂の選択性が高いことを示しています。もう一つ、アミノ基を持つ糖はアミノ基を持たない中性糖よりも早く溶出しています。これは分子内のヒドロキシ基を一つ失っており、また分子内に電子供与基であるアミノ基があるために、排除的效果によるものと考えられます。しかしながら、カラムは少しの差異によって分離することができ、選択性の高いことを示しています。中性単糖とアミノ糖を同時に分離できることは、イオン交換カラムのもう一つの特徴といえます。

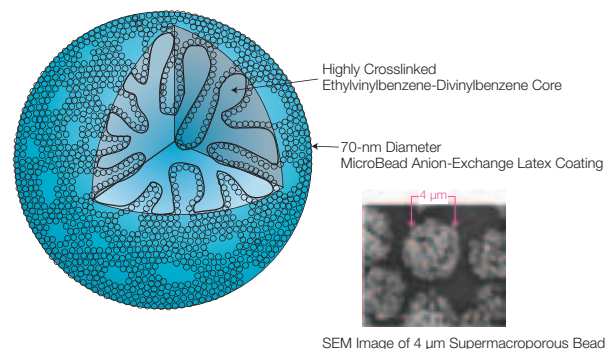
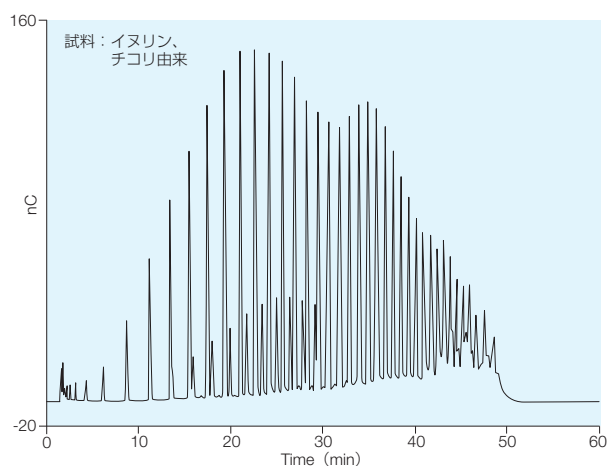


図3: イオン交換樹脂イメージ図

イオン交換基とイオン化した糖類のイオン交換反応のほかに、樹脂との疎水性相互作用のような分離機構が加わった少し複雑な分離機構であることが報告されています。イオン交換基の種類と基材の疎水性度が大きく影響をしていることは確かです。重合度の高いオリゴ糖類は、溶離液で使用するアルカリ水溶液濃度では、イオン化しないと考えられています。しかし、イオン性を増した化合物になると考えられます。このことで、イオン交換樹脂上の官能基と樹脂そのものとの疎水性相互作用が組み合わせられ、図4に示すようなオリゴ糖類、多糖類までも分離できるようになります。いくつかのイオン交換カラムによる分離例を紹介していきます。

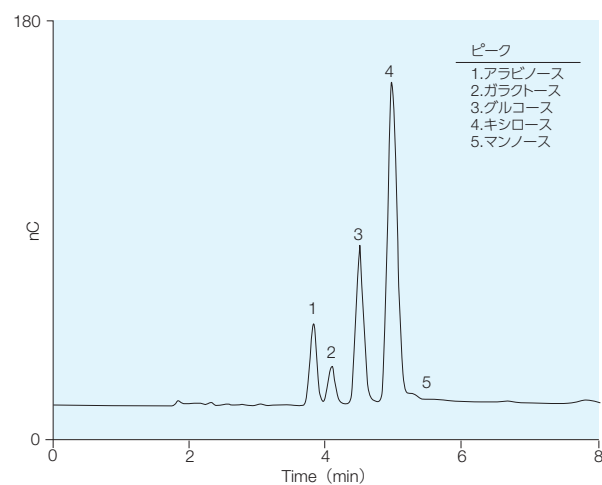


Dionex ICS-5000⁺ HPICシステム



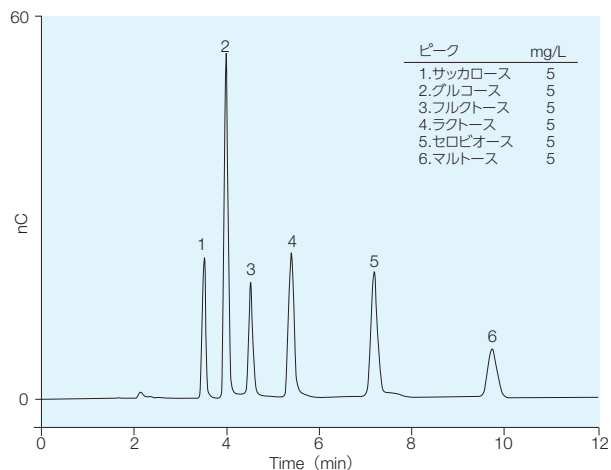
IC 装置	Dionex ICS-5000 ⁺		
カラム	Dionex CarboPac PA200, 3 × 50 mm Dionex CarboPac PA200, 3 × 250 mm		
カラム温度	室温		
溶離液	#1: 100 mmol/L #2: 100 mmol/L / 1.0 mol/L NaOAc		
グラジエント	Time (min)	0	40
	#2 (%)	12	32
流量	PA200 0.5 mL/min		
検出器	Int-PAD, Au 作用電極 (disposable)		
試料注入量	25 μ L		

図4：チコリ由来のイヌリンのパターン分析



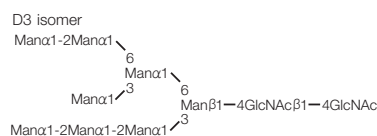
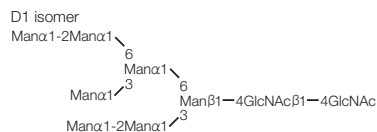
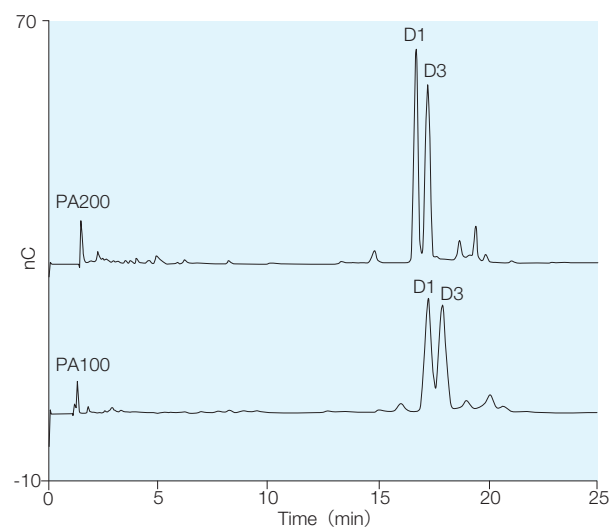
IC 装置	Dionex ICS-5000 ⁺		
カラム	Dionex CarboPac SA10, 2 × 50 mm Dionex CarboPac SA10, 2 × 250 mm		
カラム温度	45 °C		
溶離液	1 mmol/L KOH EGC-KOH (溶離液ジェネレータ使用)		
流量	0.38 mL/min.		
検出器	Int-PAD, Au 作用電極 (disposable)		
試料注入量	2.5 μ L		

図5：コーンスターチ加水分解物



IC 装置	Dionex ICS-5000 ⁺		
カラム	Dionex CarboPac SA10-4 μ m (2 X 50 mm) Dionex CarboPac SA10-4 μ m (2 X 250 mm)		
カラム温度	40 °C		
溶離液	12 mmol/L KOH EGC-KOH (溶離液ジェネレータ使用)		
流量	0.38 mL/min		
検出器	Int-PAD, Au 作用電極 (disposable)		
試料注入量	2.5 μ L		

図6：一般的に食品に含まれる糖質



IC 装置	Dionex ICS-5000 ⁺		
カラム	Dionex CarboPac PA100, 4 × 250 mm Dionex CarboPac PA200, 3 × 250 mm		
カラム温度	室温		
溶離液	#1: 100 mmol/L #2: 100 mmol/L / 1.0 mol/L NaOAc		
流量	PA100 1.0 mL/min. PA200 0.5 mL/min.		
検出器	Int-PAD, Au 作用電極 (disposable)		
試料注入量	25 μ L		

図7：糖タンパク質の糖鎖分析

まとめ

イオン交換カラムを特徴づける要素は、イオン交換基の種類とイオン交換容量、交換基を含む樹脂の疎水性が大きくかわってきます。通常のイオン分析では、樹脂の疎水性は分析目的のイオン種にもよりますが、保持の弱いイオン種は疎水性が高いカラムの方がよい分離を示します。保持の強いイオン種は疎水性の低いカラムの方が分離、分析時間共によい結果を得ることが多くあります。それに対し、糖類の分析では、カラムの疎水性は単糖、オリゴ糖においても重要な要素といえます。疎水性が

高すぎるといずれの糖もイオン交換分離モードよりも疎水性相互作用が強く働き、疎水性が低いとイオン交換分離モードが強く働くようになります。カラムの疎水性は高い方がよい結果となります。糖類の種類、重合状態はいくつも組み合わせがあり、一つのカラムで分析することは難しく、選択肢を多く持つことが必要です。イオン交換カラムも疎水性の若干の違い、それに加えてイオン交換容量、樹脂の大きさなども考慮し、カラムを選ぶ必要があります。

オーダーインフォメーション

糖類分析用カラム	カラム情報	製品番号	対象	カラム説明
Dionex CarboPac PA1	2 X 250 mm MicroBore column	057178	単糖からオリゴ糖類	糖タンパク構成単糖類の分離
	2 X 50 mm MicroBore column	057179		
	4 X 250 mm Analytical column	035391		
	4 X 50 mm Analytical column	043096		
	9 X 250 mm Semipreparative column	039686		
	9 X 50 mm Semipreparative column	063501		
	22 X 250 mm Semipreparative column	SP2866		
Dionex CarboPac PA10	0.4 X 250 mm Capillary Column	082320	単糖からオリゴ糖類	糖タンパク構成単糖類の分離、対有機溶媒（一般的 HPLC 溶媒）に高い耐性
	0.4 X 50 mm Capillary Column	082321		
	2 X 250 mm MicroBore column	057800		
	2 X 50 mm MicroBore column	057181		
	4 X 250 mm Analytical column	046110		
	4 X 50 mm Analytical column	046115		
	9 X 250 mm Semipreparative column	SP4216		
Dionex CarboPac PA20	0.4 X 150 mm Capillary Column	072072	単糖	単糖分析専用カラム、Ram と Ara の分離、Xly と Man の分離、EG システム対応
	0.4 X 35 mm Capillary Column	072073		
	3 X 150 mm MicroBore column	060142		
	3 X 30 mm MicroBore column	060144		
Dionex CarboPac PA100	2 X 250 mm Analytical Column	057182	オリゴ糖	二糖類からオリゴ糖類の分離用に設計
	2 X 50 mm Guard Column	057183		
	4 X 250 mm Analytical Column	043055		
	4 X 50 mm Guard Column	043054		
	9 X 250 mm Semipreparative column	SP2089		
	22 X 250 mm Semipreparative column	SP2667		
Dionex CarboPac PA200	3 X 250 mm Analytical Column	062896	オリゴ糖から多糖類	オリゴ糖から多糖類の分離に長けている
	3 X 50 mm Analytical Column	062895		
Dionex CarboPac MA1	4 X 250 mm Analytical Column	062896	糖アルコール類、単糖	糖アルコール類は解離定数が大きく、13 以上を示し、濃度の非常に高い強アルカリ水溶液を用いて分析する
	4 X 50 mm Analytical Column	062895		
Dionex CarboPac SA10	2 X 250 mm MicroBore Column	082322	糖アルコール類、単糖	溶離液ジェネレーターを利用できる、単糖迅速分離カラム
	2 X 50 mm MicroBore Column	082323		
	4 X 250 mm Analytical Column	074641		
	4 X 50 mm Analytical Column	074902		
Dionex CarboPac SA10-4 μ m	2 X 250 mm MicroBore Column	088235	糖アルコール類、単糖	微粒子化による高速高分離カラム
	2 X 50 mm MicroBore Column	088236		
	4 X 250 mm Analytical Column	088233		
	4 X 50 mm Analytical Column	088234		

©2014 Thermo Fisher Scientific K.K. 無断複写・転載を禁じます。

ここに掲載されている会社名、製品名は各社の商標、登録商標です。
ここに掲載されている内容は、予告なく変更することがあります。

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社
分析機器に関するお問い合わせはこちら

 TEL 0120-753-670 FAX 0120-753-671
〒221-0022 横浜市神奈川区守屋町3-9

E-mail: Analyze.jp@thermofisher.com
www.thermoscientific.jp

Thermo
SCIENTIFIC
A Thermo Fisher Scientific Brand

E1406