

HPIC-IPAD法による糖類の分析 (2)

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、酸化反応、IPAD

はじめに

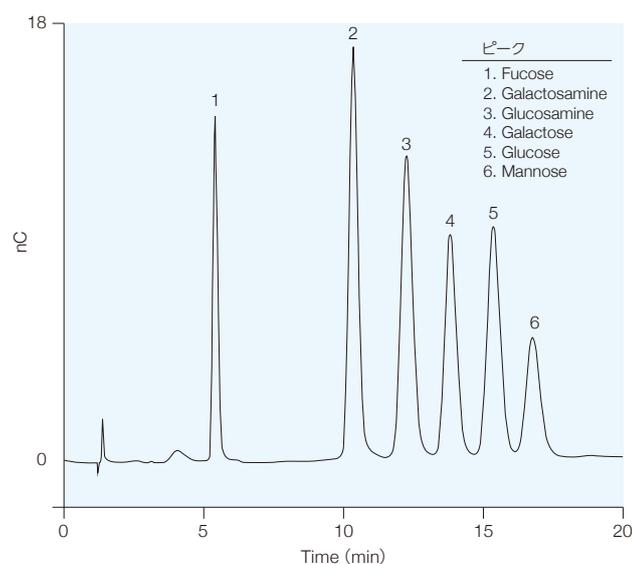
糖類の分離と検出方法には相性のよし悪しがあります。Application Note IC14006では分離について説明し、イオン交換カラムの分離特性を示しました。このイオン交換カラムを用いた場合、もっとも良い組み合わせは電気化学検出器 (ECD) と言えます。糖類は、強アルカリ条件下ではイオン化してイオン交換カラムで分離し、電気化学活性種である糖類はECDで感度よく検出されます。陰イオン交換カラムHPACと電気化学検出器ECDの組み合わせは相性の良い組み合わせと言えるでしょう。

糖類を検出する

糖類を検出する方法はいくつか知られていますが、それぞれに長所と短所があります。

示唆屈折検出器は糖類を誘導体化することなく直接的に検出できるものの、感度の面で問題が残るうえに、グラジエント条件を設定することができません。蛍光検出器は高感度でグラジエント条件を設定できますが、糖類を誘導体化する必要があり、これには煩雑な作業を伴います。

電気化学検出器は酸化還元反応を利用した検出器です。糖類は電気化学活性種であることが以前から知られていました。ECDは酸化還元反応で生じる電流量をモニターしている検出器です。その代表的な糖類を分析したクロマグラムを図1に示します。この酸化還元反応で生じる反応生成物が作用電極面を覆ってしまい、感度の変化をもたらすことから、ECDは実使用に適さない検出器だとこれまで言われてきました。サーモフィッシャーサイエンティフィックでは作用電極表面をクリーニングする印加電位を供給することで感度低下を防いでいます。



カラム	Dionex CarboPac PA10
溶離液	16 mM NaOH
流量	1 mL/min
検出	Int.Pulsed Amp., AU電極 4電位プログラム

糖質の解離定数 (25°C, pH=7, 水中)

糖質	pKa
Fucose	??
Galactose	12.39
Glucose	12.28
Mannose	12.08

図1：単糖の分析

ECDセルを図2に示します。糖類の酸化還元反応は作用電極のAu電極表面で起こります。Au電極に糖類を酸化する電位を印加しておき、ある一定量の糖類が酸化され、カウンター電極へ電子の流れが生じます。作用電極とカウンター電極間の電流変化を常に一定電圧を起電している参照電極値と比較されて電流量変化として読み取られ、これがクロマトグラムとして記録されます。参照電極はAg-AgCl電極が一般的に用いられます。

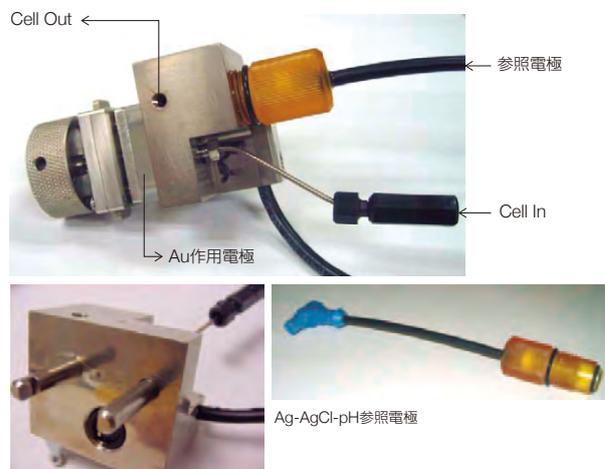
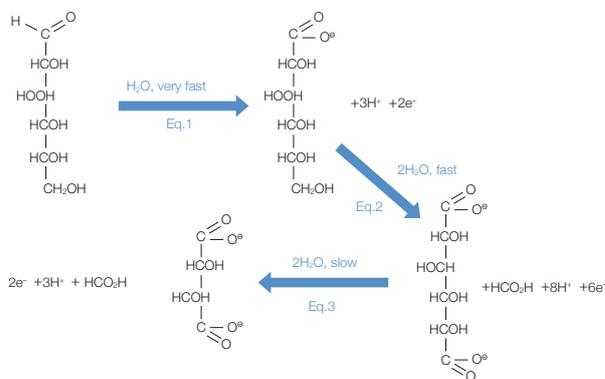


図2：IPADセル

図3はグルコースを例にAu電極表面で起こる酸化反応を見たものです。いくつかの段階を経て、最終的に水と炭酸ガスにまで酸化分解されていることがわかります。ECDセル内では、最初の段階の酸化反応で電流の変化をモニターしています。ECDは破壊検出器で、その量は定量でなければなりません。サーモフィッシャーサイエンティフィックのECD検出器は、導入した目的糖の数%が定量的に検出に寄与されます。

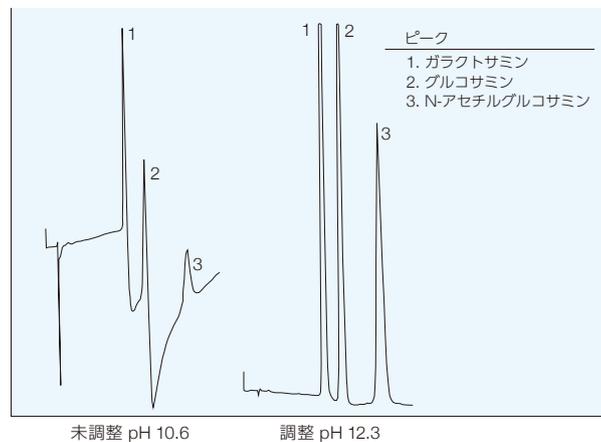


From : Johnson, D.C. and La Course, W.R. Liquid chromatography with pulsed electrochemical detection at gold and platinum electrodes. Analytical Chemistry (1990) 62, 589A-597A

図3：グルコースの酸化反応

検出時におけるpH

糖類はAu作用電極表面に吸着し、酸化されて初めて定量されます。Au電極に一定量の糖類が吸着するためにはpHが12以上の溶液である必要があります。糖類のイオン性が高い状態になっているとAu電極表面への吸着量が安定するからです。溶離液の濃度、pHによってはポストカラム法でpHを調整する必要があります。図4にpH調整をした場合としなかった場合のクロマトグラムを示します。



カラム	Dionex CarboPac PA1 Guard Dionex CarboPac PA1 (内径4 mm)
溶離液	10mmol/L NaOH

図4：検出に必要なpH調整

サプレッサーによるpH調整

サプレッサーを使用する最大の利点は、分離後の体積変化が非常に少ないことです。通常、ポストカラム手法ではカラムからの流量とポストカラム液が合わさりpHを変化させ、併せて体積の変化も生じます。サプレッサーを用いる方法は陽イオンをイオン交換膜により、一方から他方へアルカリ金属類をイオン交換してpHを高める方法です。2枚の陽イオン交換膜に挟まれたスクリーン上にpHの低い液、溶離液を流し、その外側には高濃度のアルカリ水溶液を流します。膜を仕切りにそれぞれ逆方向に流れるようにしておきます。陽イオン交換膜を介して、内と外のアルカリ濃度が同じになると陽イオンが交換されます。その結果、サプレッサーから流出してくる液は高pH溶液となり液量に変化がないため、カラム分離した糖類のポストカラム液による拡散がありません。

印加電位プログラム

糖類をECDで検出する分析では、条件によっては一成分の検出後に感度変化をもたらす場合もあります。いかに安定した応答性を得るかで分析法の良し悪しが決まります。サーモフィッシャーサイエンティフィックでは、4段階の電位変化をAu作用電極に加えることで反応生成物による感度の変化を抑制し、再現性の良い高感度な糖類の検出を実現しています。その印加電位プログラムを図5に示します。このように作用電極にパルス状の電位変化を加えることから、Integrated Pulsed Amperometry Detector: IPAD法と呼ばれています。この印加電位プログラムは図6に示すサイクリックボルタムグラムにより決められます。このサイクリックボルタムグラムに示すように、ある条件下で金電極に電位を加えると容易に酸化物を作ります。そして適当な逆の電位を加えると還元され金に戻ります。金は簡単にAuOxを作り、この時に反応生成物も酸化され電極表面からはがされます。酸化とは逆の電位を加えることでAuOxは還元されてAuに戻り、電極表面のクリーニングが完了します。このAuを酸化してAuOxへ、還元してAuへと短いスパンで繰り返すプログラムにより、安定した感度を実現しています。IPADでの糖類の検出には、活性が高い還元末端が酸化され検出されます。しかし、還元末端を持たない、サッカロースも検出されます。IPAD法では、1位、4位、6位の順に反応性が高いと考えられていて、還元末端を持たない糖類も検出することができます。蛍光ラベル化された糖類は、酸化反応部位があっても検出することが困難になります。それはラベル化されたことで、電気化学活性種でなくなり、印加している電位では酸化されにくくなっているためと考えられます。

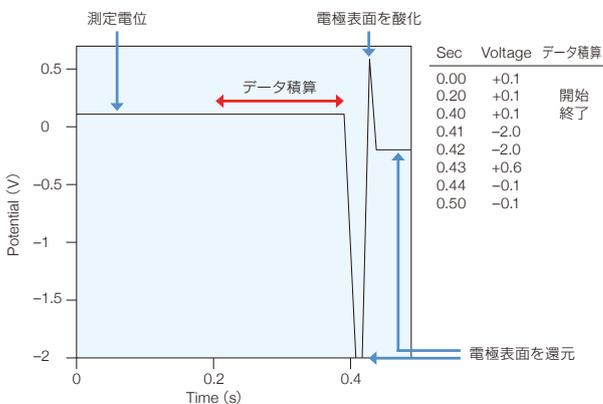


図5：糖質分析用4電位プログラム

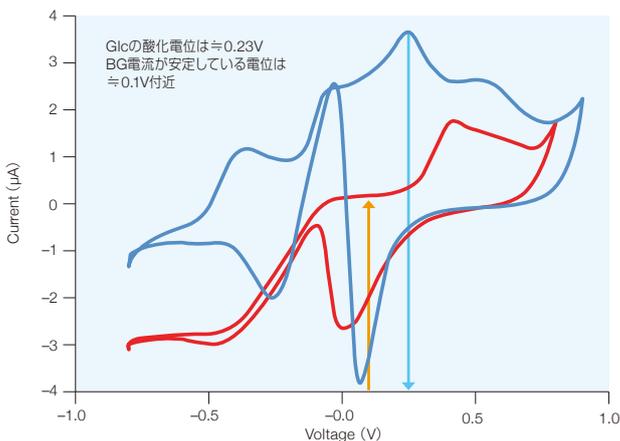


図6：サイクリックボルタムグラム（電位変化の重ね書き）

検出に影響する化合物への対応

糖の検出設定条件で鈍い感度がある化合物があり、このような化合物の直後に検出されるような糖類は影響を受ける場合があります。代表的な物質がシステインやシスチンです。これらはIPADで鈍い感度を示します。酸化電位で十分に酸化されず、電極表面に反応生成物残渣が残り、クリーニングプログラムでも残渣が生じてしまいます。そのため、次の検出サイクルに影響を与えます。シスチン直後の糖の感度は半減し感度低下を招きます。印加電位プログラムは0.5秒に1サイクルと短い時間で酸化、還元、クリーニングを行っているため、数回このサイクルがAu電極に印加されると、電極表面に残っていた反応生成物残渣も取り除かれます。

イオン交換分離モードカラムでは、樹脂の性質を変えて特定の化合物を強く保持するようなカラムを作ることができます。検出に影響する化合物を取り除くのではなく、目的成分の検出に影響しない位置にカラム溶出させる特殊なカラム、Aminoトラップカラムを取り付けることで対応しています。Aminoトラップカラムを取り付けて分析を行ったクロマトグラムを図7に示します。糖タンパク質を酸加水分解処理した試料には必要になります。

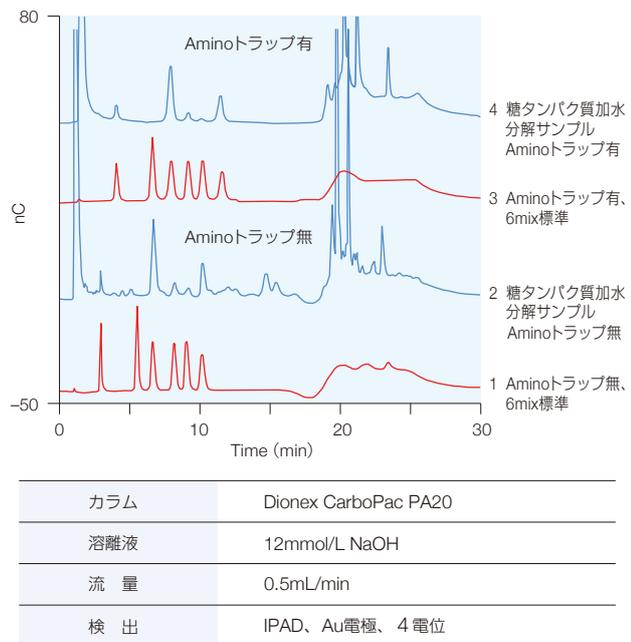


図7：Aminoトラップ効果

まとめ

陰イオン交換カラムと電気化学検出器の組み合わせは、多様な糖類をアルカリ濃度、溶離剤の塩の種類を変えることで、オリゴ糖類から多糖類の分離ができます。なおかつ、糖類を直接検出、プ

レ誘導体化もしくはポストカラム誘導体化することなく、示唆屈折検出器に比べ100倍以上の感度が得られ、誘導体化する煩雑な手間がなく、必要最小限の前処理で分析できます。

オーダーインフォメーション

Electrodes	製品番号
Disposable Electrodes for Carbohydrates, Pack of six Au (Polyester), two 0.002" gaskets	60139
Disposable Au (PTFE) Electrodes for Carbohydrates, Pack of six Au (PTFE), four, 0.002" gaskets	66480
Polypropylene Support Block, ED cell for use with Disposable Electrodes	62158
Gaskets, (PTFE) for Disposable Electrode 0.001" Pack of two	72117
Gaskets, (PTFE) for Disposable Electrode 0.002" Pack of four	60141
Gaskets, (ULTEM) for Disposable Electrodes 0.001" Pack of four	69339
Gasket, (HDPE) for Disposable Electrodes 0.015"	57364
Gasket, (UHMW PE) for Disposable Electrodes, 0.062"	75499
Polypropylene Support Block, for use with 0.062" gasket, ED Cell, for Disposable Electrodes	75501
ED Kit with 62 mil gasket, Polypropylene Support Block, for use with Disposable Electrodes	75502

Hardware	製品番号
ED Electrochemical Detector (without cell)	072042
ED Cell (no reference electrode or working electrode)	072044
pH, Ag/AgCl Reference Electrode	061879
Palladium Hydrogen Reference Electrode (for Capillary IC only)	072075
ED Detector Conventional Working Electrodes	
ED Electrode, Au, with Gasket and Polishing Kit	079850
ED Electrode, Pt, with Gasket and Polishing Kit	079851
ED Electrode, GC, with Gasket and Polishing Kit	079854
ED Electrode, Ag, with Gasket and Polishing Kit	079856
ED Electrode, AAA, with Gasket and Polishing Kit	063722
pH, Ag/AgCl Reference Electrode	061879
AAA-Direct Installation Kit	059539
3-mm Gold Working Electrode with Gasket and Polishing Kit	063723
Disposable Working Electrode for ED	
Disposable Electrodes for Amino Acids, Pkg of 6 with 2 Gaskets	060082
Disposable Electrodes for Amino Acids, Pkg of 24 with 8 Gaskets	060140
Disposable Electrodes for Carbohydrates, Pkg of 6 with 2 Gaskets	060139
Disposable Electrodes, Gold on Polyester, Pkg of 24 with 8 Gaskets	060216
Gaskets, (PTFE) for Disposable Electrode 0.002" Pack of four	060141
Silver Disposable Electrodes, Pack of 6 with Two 0.002" gaskets	063003
Platinum Disposable Electrodes, Pack of 6 with 2, 0.002" Gaskets	064440
Carbohydrate Removal Accessory Kit for ICS-2500	063522
Carbohydrate Removal Accessory Kit for ICS-3/5000 DP	064418
Carbohydrate Removal Accessory Kit for ICS-3/5000 SP	070510
Carbon on PEEK Disposable Electrode (6 pack)	069336
Disposable Au (PTFE) Electrodes for Carbohydrates, Pack of six Au (PTFE), four, 0.002" gaskets	066480
Disposable Electrodes for Carbohydrates, Pack of six Au (Polyester), two 0.002" gaskets	060139
Polypropylene Support Block, ED cell for use with Disposable Electrodes	062158
Gaskets, (PTFE) for Disposable Electrode 0.001" Pack of two	072117
Gaskets, (ULTEM) for Disposable Electrodes 0.001" Pack of four	069339
Gasket, (HDPE) for Disposable Electrodes 0.015"	057364
Gasket, (UHMW PE) for Disposable Electrodes, 0.062"	075499
Polypropylene Support Block, for use with 0.062" gasket, ED Cell, for Disposable Electrodes	075501
ED Kit with 62 mil gasket, Polypropylene Support Block, for use with Disposable Electrodes	075502

©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

CP1406 10000

Thermo
SCIENTIFIC

A Thermo Fisher Scientific Brand