

溶離液ジェネレーターシステムを用いた陰イオン交換カラムによる希少糖の分析

キーワード

イオンクロマトグラフィー、糖分析、電気化学検出、溶離液ジェネレーターシステム、パラジウム水素 (PdH) 参照電極、Thermo Scientific Dionex CarboPac PA210 -Fast-4 μm

はじめに

希少糖は、自然界での存在量が少ない単糖、二糖類およびそのアルコール体を指し、60種類ほどが知られています。近年、食品分野などでは、食後血糖値上昇抑制作用・脂肪蓄積抑制作用・動脈硬化予防作用・血圧上昇抑制作用・抗酸化作用など数々の有用な生理機能が報告されており、メタボリックシンドローム対策に期待される新たな機能性素材として注目されています。

イオンクロマトグラフを用いた糖類の分析は、イオンクロマトグラフィーが発表されて間もなく、陰イオン交換カラム (HPAEx) を用いて分離する手法が示されました。検出は、電気化学検出器を改良して印加電位を3電位や4電位と変化させて測定を行う、インテグレートッドパルスドアンペロメトリー検出 (IntPAD) により多くの糖類を分離・検出することが可能になりました。本アプリケーションノートでは、HPAEx-IntPAD法を用いた、希少糖類の分析例をご紹介します。

分析条件

装置：Thermo Scientific™ Dionex™ ICS-5000⁺システム

オートサンプラー：Thermo Scientific Dionex AS-AP

ガードカラム：Dionex CarboPac™ PA210G-Fast-4 μm

分離カラム：Dionex CarboPac PA210-Fast-4 μm

カラム温度：20℃

流量：0.8 mL/min

溶離液：0.5 ~ 65 mmol/L 水酸化カリウム
(溶離液ジェネレーター使用)

グラジエント条件：表1参照

ポストカラム液：500 mmol/L 水酸化ナトリウム

検出器：IntPAD、波形 糖質4電位、Au作用電極 PdH参照電極

コンパートメント温度：20℃

試料注入量：5 μL

表1：グラジエント条件

時間 (min)	濃度 (mmol/L)
0	0.5
19	0.5
38	65
38.1	65
45	0.5
50	0.5

ポストカラムシステム

IntPAD法では検出する糖のイオン化を促進するために溶液のpHは12以上が望ましいといわれています。また、グラジエント分析時のベースラインドリフトを抑えるためにポストカラムシステムを用いてアルカリ添加を行いました。ポストカラムシステムを含むイオンクロマトグラフの配管図を図1に示します。

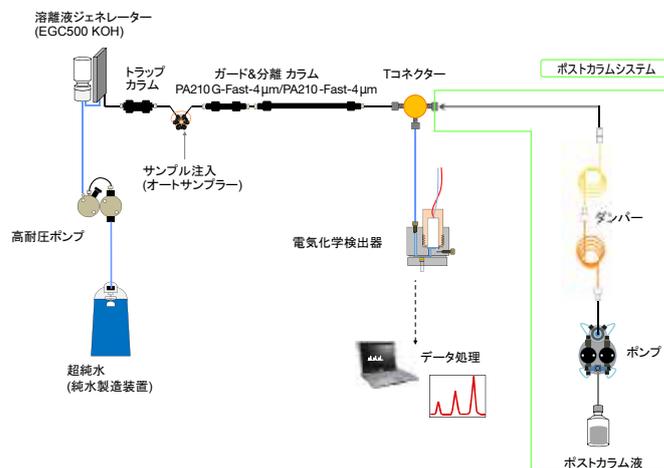


図1：イオンクロマトグラフの配管図

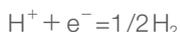
Dionex CarboPac PA210-Fast-4µm

Dionex CarboPac PA210-Fast-4µmは、溶離液ジェネレーターシステム (EG-KOH) を搭載した Regent Free Ion Chromatography (RFIC) システムで使用するように設計されたカラムです。イオン交換分離では溶離液に水酸化ナトリウムや水酸化カリウムを用います。糖分析を行う際、よく問題となるのが、溶離液に混入する炭酸イオンのコンタミネーションです。RFICシステムでは、超純水を送液してインラインで水酸化カリウム溶離液を生成し、目的の糖類を分析します。インラインで溶離液を生成するため、炭酸イオンの溶離液へのコンタミネーションを最小限にすることができます。グルコース、ガラクトース、フルクトース、スクロース、マンノース、スタキオース、ラフィノース、ベルバスコースなどの糖類を20分以内に分析できます。小粒子径の4 µmイオン交換体カラムの特長は、高分離能、高速分析に対応している点です。イオン交換体がカラムに密に充填できるため、イオン交換サイトへの吸着と分配が短い移動距離で可能になり、高分離能、高速分析を実現します。

パラジウム水素 (PdH) 参照電極

PdH参照電極は、水溶液に浸されたパラジウムとプラチナの電極で構成されています。二つの電極の間に印加される電位により、パラジウムは陰極として、プラチナは陽極として使用されます。電位が印加されると、パラジウム電極では水素ガス、プラチナ電極では酸素ガスが発生します。

酸素ガスは溶離液が流れるとセルから除去されますが、水素ガスの一部はパラジウム金属に捕捉されます。液相の水素分子とパラジウムの吸着水素の間で平衡状態が生じます。以下の反応によって、パラジウム水素電極が参照電極になります。



ここで、水素は次のプロセスによって供給されます。



したがって、PdH参照電極は、ヒドロニウムイオンと分子水素の間の同じ反応に基づく標準的な水素電極と似ているといえます。ただし、いくつか異なる点もあります。例えば、電極における反応の触媒として、パラジウムはプラチナほど優れていないため、同一の条件下では、パラジウム水素電極の基準電位と標準的な水素電極の基準電位との間に一定の差異が生じます。さらに、ヒドロニウムイオンが基準反応に関与するため、PdH電極の電位はpHに依存します。

PdH参照電極を用いる利点は、起電力が安定しているため、使用前の校正が不要な点です。

結果と考察

カラム温度と分離

今回、自然界に多く存在する糖類6種 (グルコース、フルクトース、スクロース、マンノース、ガラクトース、アラビノース) と希少糖6種 (エリスリトール、トレハロース、タガトース、アロース、ソルボース、プシコース) の分離条件を検討しました。カラム温度を変化させたときの標準試料のクロマトグラムを図2に示します。カラム温度が高くなると、保持時間は早くなる傾向にありますが、15℃ではグルコース、タガトース、スクロースの分離が悪くなりました。また、システム圧力も4500 psiを超えて負荷が大きいため、分離状態と圧力を考慮してカラム温度は20℃を選択しました。

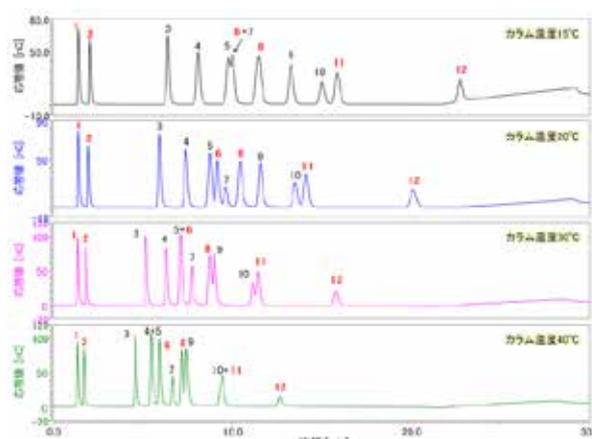


図2: 標準試料のクロマトグラム

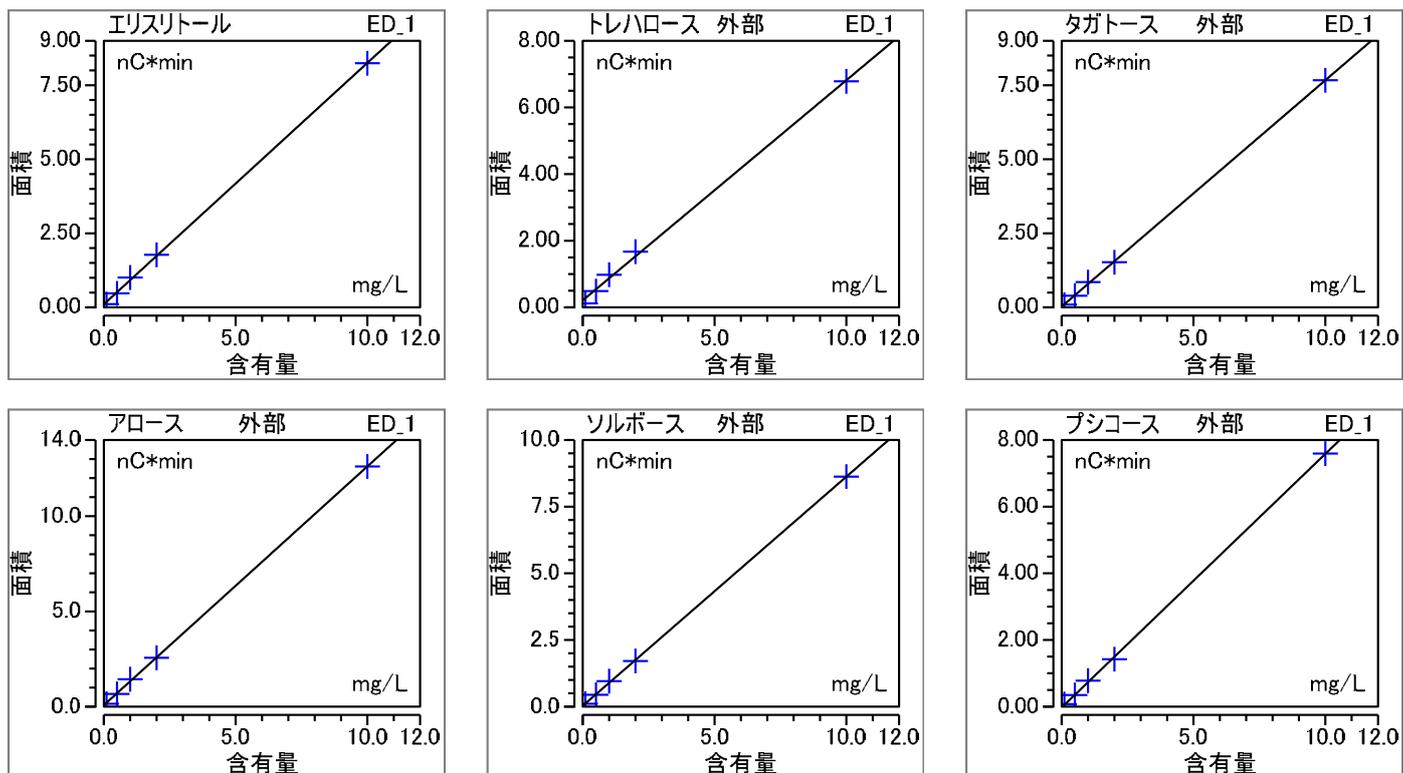
表2: 標準試料の成分名

番号	成分名	番号	成分名
1	エリスリトール	7	スクロース
2	トレハロース	8	アロース
3	アラビノース	9	マンノース
4	ガラクトース	10	フルクトース
5	グルコース	11	ソルボース
6	タガトース	12	プシコース

赤字が希少糖に該当

添加検量線の直線性

希少糖6成分の検量線結果を図3に示します。いずれの成分においても0.1～10 mg/Lの範囲で良好な直線性が得られました。



ピーク名	定量基準	近似法	校正点数	オフセット (C0)	スロープ (C1)	カーブ (C2)	決定係数 (%)
エリスリトール	面積	直線、原点無視	5	0.105	0.815	0.000	99.96
トレハロース	面積	直線、原点無視	5	0.212	0.660	0.000	99.80
タガトース	面積	直線、原点無視	5	0.029	0.764	0.000	99.99
アロース	面積	直線、原点無視	5	0.075	1.254	0.000	99.98
ソルボース	面積	直線、原点無視	5	0.032	0.859	0.000	99.99
プシコース	面積	直線、原点無視	5	-0.026	0.761	0.000	99.98

図3：希少糖6成分の検量線結果

食品分野への適用

今回、希少糖を含む食品を入手し、分析しました。実サンプルの前処理方法を表3に、分析結果を図4に示します。

表3：サンプルの前処理方法

サンプル	前処理
白だし	① 超純水で200倍希釈 ② Dionex OnGuard II Ag/H を用いてハロゲンを除去 ③ 孔径0.45 μmのフィルターでろ過
はちみつシロップ	① 超純水で1000倍希釈 ② 孔径0.45 μmのフィルターでろ過
ピーチキャンディ	① 0.1 gを量りとり、超純水10 mLに溶解 ② 超純水で10倍希釈
大根生姜キャンディ	③ 孔径0.45 μmのフィルターでろ過

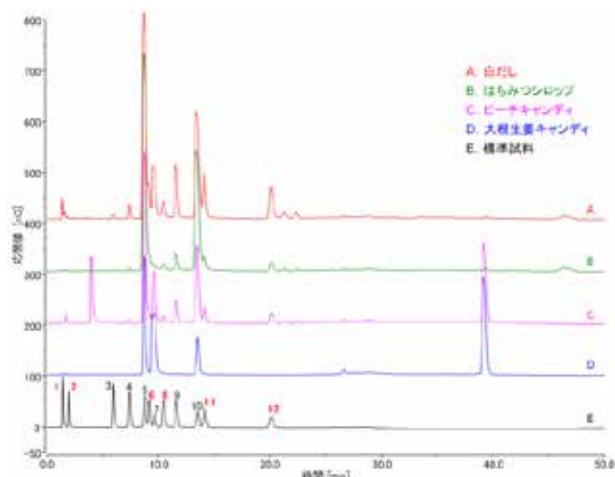


図4：実サンプル中の糖分析

まとめ

HPAEx-IntPAD法では、糖類を誘導体化することなく直接検出するため、希少糖のような量の少ない糖類を分析するのに有効であることが確認できました。また、EG-KOHシステムのグラジエント再現性と高分離能カラムの組み合わせにより、グルコースやフルクトースなどの高濃度成分との分離に有効性を見出すことができました。



図5: イオンクロマトグラフ Dionex ICS-5000⁺

© 2017 Thermo Fisher Scientific K.K. 無断複写・転写を禁じます。
ここに記載されている会社名、製品名は各社の商標または登録商標です。
ここに記載されている内容は予告なく変更することがあります。

IC145_A1702SO

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

Analyze.jp@thermofisher.com

facebook.com/ThermoFisherJapan

@ThermoFisherJP

www.thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC