

TSK gel Amide-80 / ポストカラム蛍光誘導体化による還元糖の分析

TSK gel Amide-80はシリカゲルにカルバモイル基を有する官能基を化学結合させた順相分配クロマトグラフィー用充填カラムで、糖類の分離に広く用いられています。ここではポストカラム蛍光検出法によるベンズアミジンを用いた還元糖の選択的高感度検出について紹介致します。

測定条件を下に、システムの構成図をFig. 1に示します。

反応温度について調べたところ、糖種により最適な温度が異なることがわかりました (Fig. 2) が、ここでは各糖について良好な感度の得られる90℃にて測定することと致しました。Fig. 3に標準試料 (1 μg/ml)、Fig. 4にリンゴジュース (前処理フィルターW-13-5にて濾過後、溶離液にて10000倍に希釈) におけるクロマトグラムを示します。本条件における検出下限は、S/N=3でラムノース2.9、キシロース2.3、フルクトース2.0、マンノース2.5、グルコース2.5、マルトース18 ng/ml (絶対量でそれぞれ58、46、40、50、50、36 pg) でした。

測定条件

カラム : TSK gel Amide-80 (4.6 mm ID × 25 cm)

溶離液 : CH₃CN/H₂O = 8/2

流速 : 0.8 ml/min

カラム温度 : 80℃

反応液 : A液 ; 1M 水酸化カリウム

B液 ; 100 mM ベンズアミジン (溶媒 ; CH₃CN/H₂O = 2/8)

反応液流速 : A液 ; 0.6 ml/min

B液 ; 0.6 ml/min

反応温度 : 90℃

注入量 : 20 μl

検出 : 蛍光検出 励起波長288nm 蛍光波長470nm

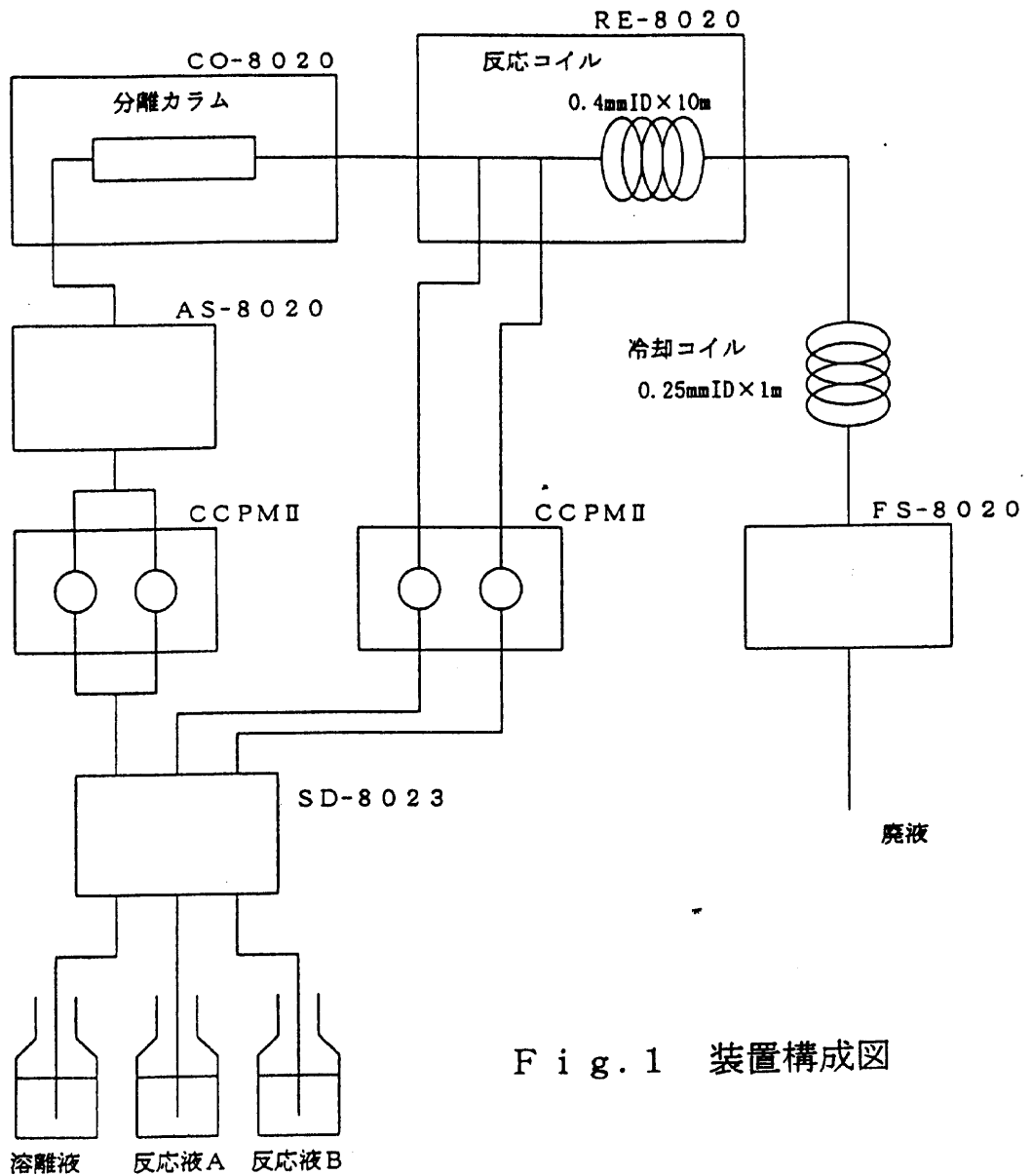


Fig. 1 装置構成図

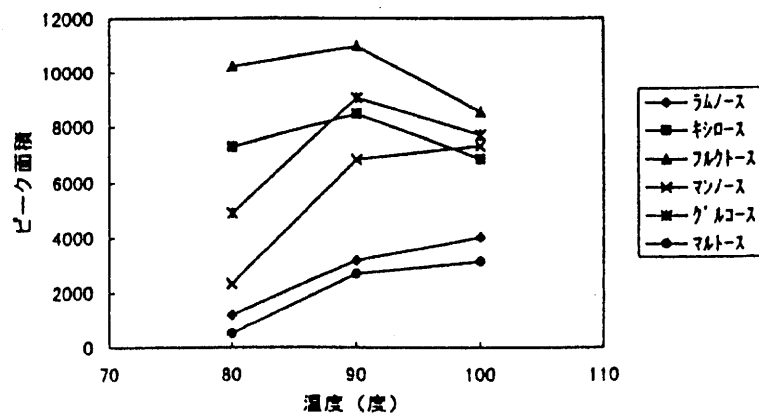
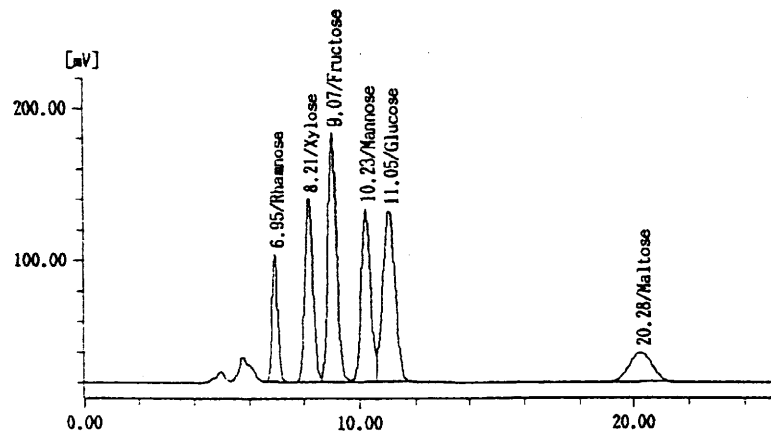


Fig. 2 ピーク面積に対する反応温度の影響

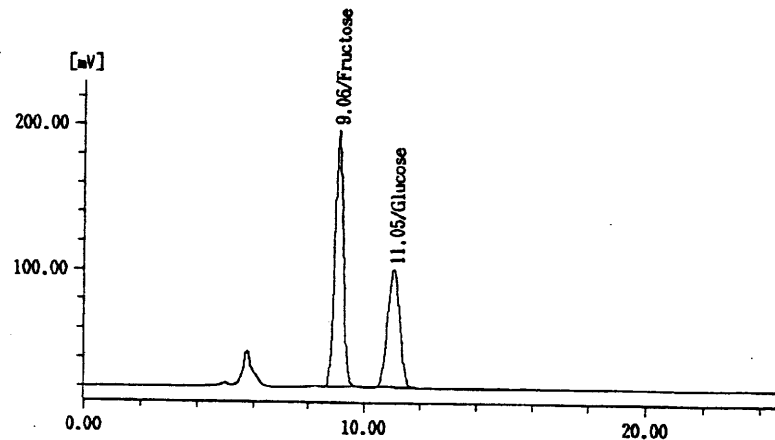


Ch No. : データ解析 Ch. 1 計算方法 : 絶対検量線法
 カップ番号 : 007 サンプル名 : STD(1µg/ml)
 シリアル番号 : 0052 希釈率 : 1.000
 保存名 : AAAA0052

*** 計算結果 ***

No.	ピーク名	保持時間 [min]	高さ [mV]	面積* [mV*sec]	ug/ml	ug/ml	マーク	複合判定
1	Rhamnose	6.953	84.68	1.24365x10 ³	10.000	10.000	B	
2	Xylose	8.207	120.56	2.59541x10 ³	10.000	10.000	B	
3	Fructose	9.067	164.12	3.40645x10 ³	10.000	10.000	V	
4	Mannose	10.227	113.96	2.54859x10 ³	10.000	10.000	V	
5	Glucose	11.053	112.50	3.53516x10 ³	10.000	10.000	V	
6	Maltose	20.283	19.18	1.14667x10 ³	10.000	10.000	B	
合計				1.44759x10 ⁴	60.000	60.000		

Fig. 3 標準試料(1µg/ml)のクロマトグラム



Ch No. : データ解析 Ch. 1 計算方法 : 絶対検量線法
 カップ番号 : 008 サンプル名 : JUCE(1/10000)
 シリアル番号 : 0054 希釈率 : 1.000
 保存名 : AAAA0054

*** 計算結果 ***

No.	ピーク名	保持時間 [min]	高さ [mV]	面積* [mV*sec]	ug/ml	mg/ml	マーク	複合判定
1	Rhamnose							
2	Xylose							
3	Fructose	9.063	177.07	3.68048x10 ³	10.804	108.044	B	
4	Mannose							
5	Glucose	11.053	81.30	2.52591x10 ³	7.145	71.451	B	
6	Maltose							
合計				6.20639x10 ³	17.950	179.495		

Fig. 4 リンゴジュース(10,000倍希釈)のクロマトグラム