



SEPARATION REPORT

TSKgel Sugar AXカラムによる糖類の分析

—— 目 次 ——

	ページ
1 はじめに	1
2 TSKgel Sugar AXの性質	1
3 糖類の溶出挙動	2
4 分析条件の選択	5
5 分離例	6
6 測定上の留意事項	8
7 おわりに	8

1. はじめに

糖などポリオール類はホウ酸と容易に結合し、アニオン性錯イオンを生成する性質（図-1参照）がありますが、糖の分子構造の相違によって錯イオンの生成し易さに差が生じます。この性質を利用して糖類をイオン交換クロマトグラフィによって分離することができます¹⁾。この方法が公表された当時は数種の糖を分離できるだけでしたが、その後分離能が改良され、その他の中性糖の分離法に比較して、分離能および再現性の点で優れた方法であることが判りました²⁾。しかし、グルコースまでの十分な分離を得るには5時間以上の分析時間を必要としていました。

また、この目的に使用されているアニオン交換樹脂は、対イオンの交換、移動相の塩濃度やpHの変化による膨潤収縮が比較的大きく、充填カラムとして市販されている例は少ないようです。

TSKgel Sugar AXシリーズは、充填剤の改良、カラムサイズの適正化を計ることにより、イオン交換クロマトグラフィ法の特徴を生かし、従来の1/4以下の分析時間で分析することを可能にしました。もちろんこの分析には市販の高速液体クロマトグラフィ装置を組合せて使用でき特殊な専用装置は必要ありません。

2. TSKgel Sugar AXの性質

TSKgel Sugar AXカラムに使用されている充填剤は化学的に安定なポリマゲルを基材として、これに第4級アンモニウム基を導入したアニオン交換樹脂です。特に中性単糖類の分離用に適する高いイオン交換容量（図-2参照）と適切な細孔径分布をそなえています。しかし、この充填剤も従来のアニオン交換樹脂と同様移動相の変化による膨潤収縮はさけられず、pH、塩濃度、対イオンの種類、水溶性有機溶媒の含有等により容積変化を起こします。

（移動相の許容範囲はカラムの取扱説明書に記載していますのでご参照ください。）

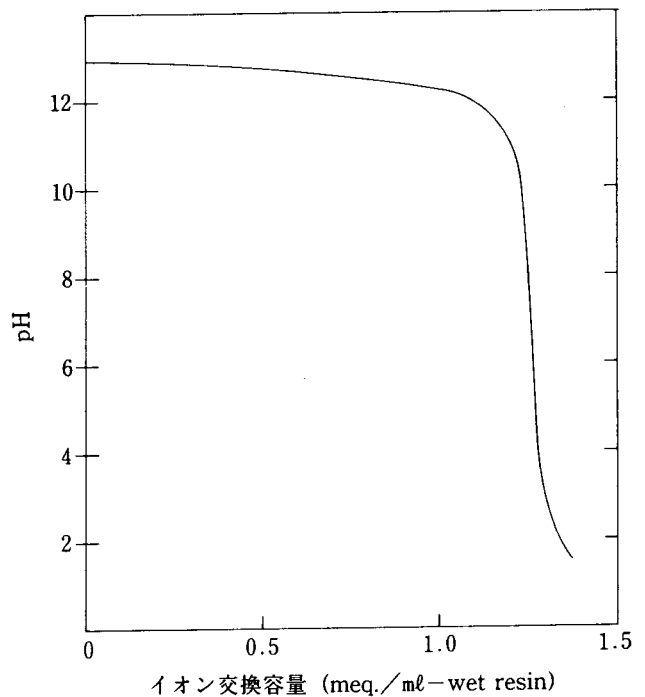
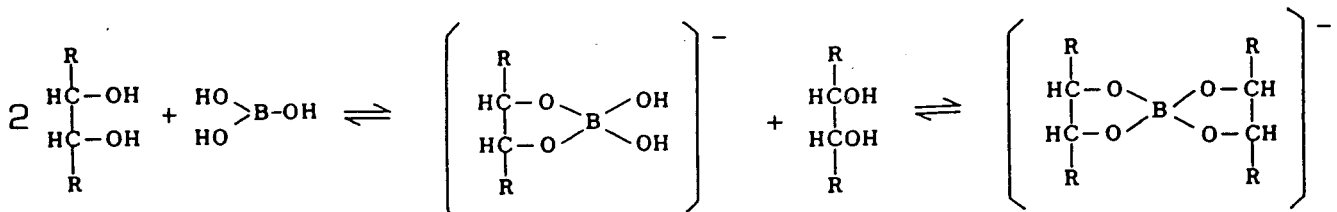


図-2 滴定曲線

図-1 糖-ホウ酸錯体イオンの推定式



3. 糖類の溶出挙動

糖を分離するにあたり、まず第一に各成分の溶出量を把握することが大切です。ここで示す糖分離方法は上述のように糖-ホウ酸錯体のアニオン交換クロマトグラフィによる分離法です。したがって、糖類の溶出容量は糖-ホウ酸錯体の安定性、移動相のイオン強度および糖-ホウ酸錯体と樹脂の選択性などによって決まります。

これらの項目に影響する因子は、おもに移動相のpHやホウ酸イオン濃度、温度などであることが知られています。それぞれの因子に対する糖類の溶出容量変化を図-3~5に示します。

図-3に示したように、pHの上昇に伴ない二糖類の溶出がおくれ、一方単糖は一般には早くなる傾向を示します。しかしデオキシ糖やマンノースは変化が少なく、pH変化によって溶出順序が逆転することがあります。

図-4にはホウ酸塩濃度とキャパシティー因子の関係を示しますが、イオン交換クロマトグラフィの公式通りの影響です。また溶出容量の多い糖ほど塩濃度変化に対する傾きが大きく、より安定なホウ酸錯体を形成していることが推定できます。図-5には温度の影響を示します。温度の上昇に伴ってこのとき測定したすべての糖は溶出がおくれ、ピークもより鋭くなり、分離能は向上しています。

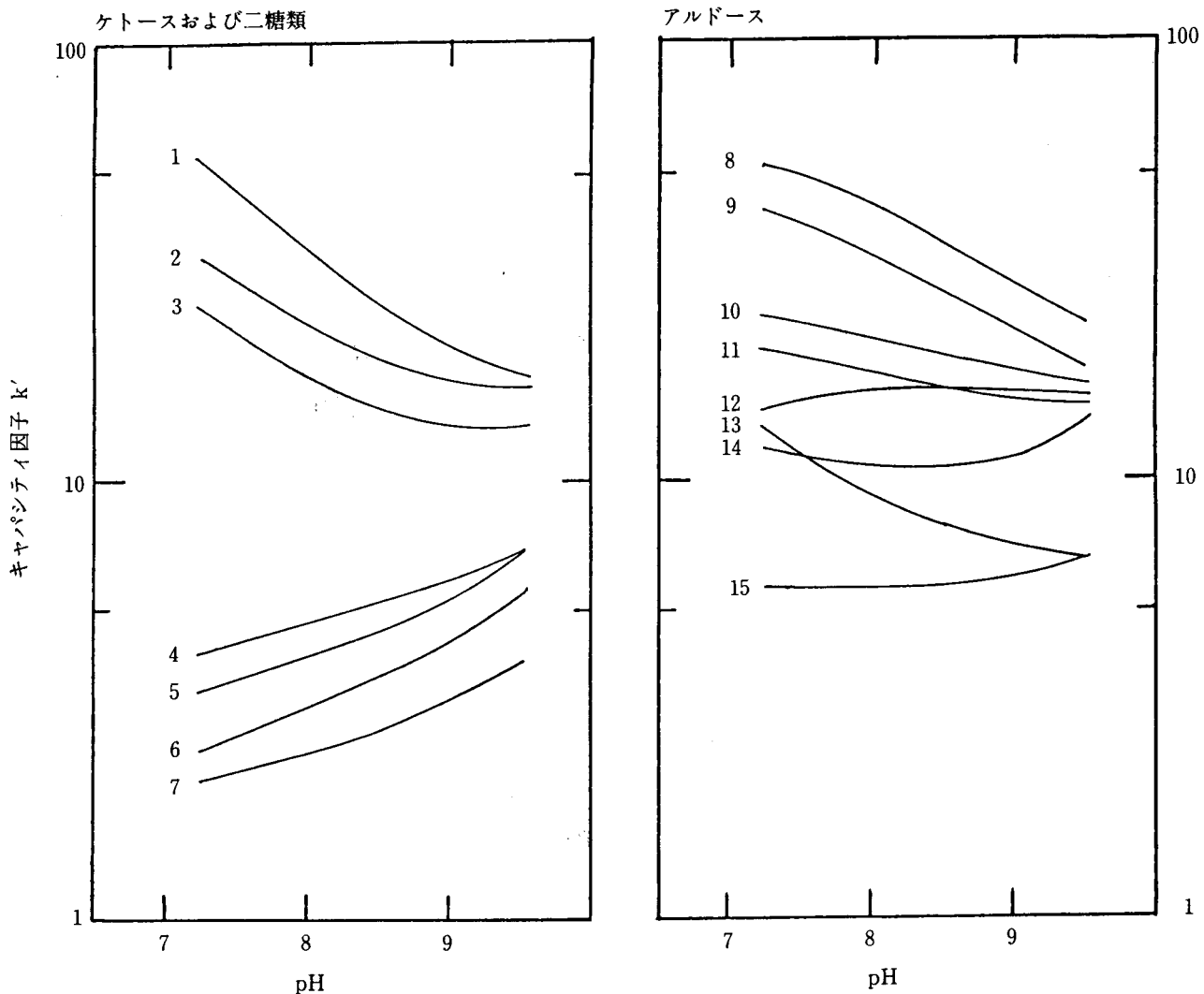


図-3 溶出容量への移動相pHの影響

カラム; TSKgel Sugar AXI (4.6mmID×15cm)

溶離液; 0.5Mホウ酸緩衝液

温度; 60°C

- 1. ソルボース 2. タガトース 3. フルクトース
- 4. ラクトース 5. マルトース 6. セロビオース
- 7. スクロース 8. グルコース 9. キシロース
- 10. ガラクトース 11. アラビノース 12. フコース
- 13. ソボース 14. マンノース 15. ラムノース

次にクロマトグラフィにおいて高分離能を得るために重要なことは各分析成分のバンドの拡がりをできるだけ少なくすることです。すなわち鋭いピークとして検出できるようにする必要があります。この項目に影響する因子はおもに、移動相の流速、充填剤の粒子径、カラム温度および試料負荷量があげられます。

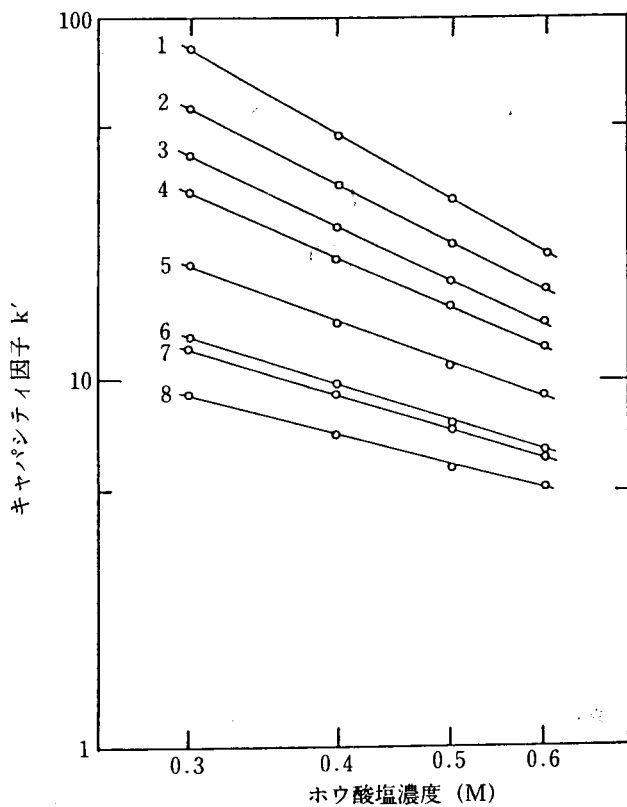


図-4 溶出容量へのホウ酸塩濃度の影響

カラム；TSKgel Sugar AXI (4.6mmID×15cm)

溶離液；ホウ酸緩衝液pH8.7

温度；60°C

1. グルコース 2. キシロース 3. ガラクトース
 4. アラビノース 5. マンノース 6. リキソース
 7. リボース 8. ラムノース

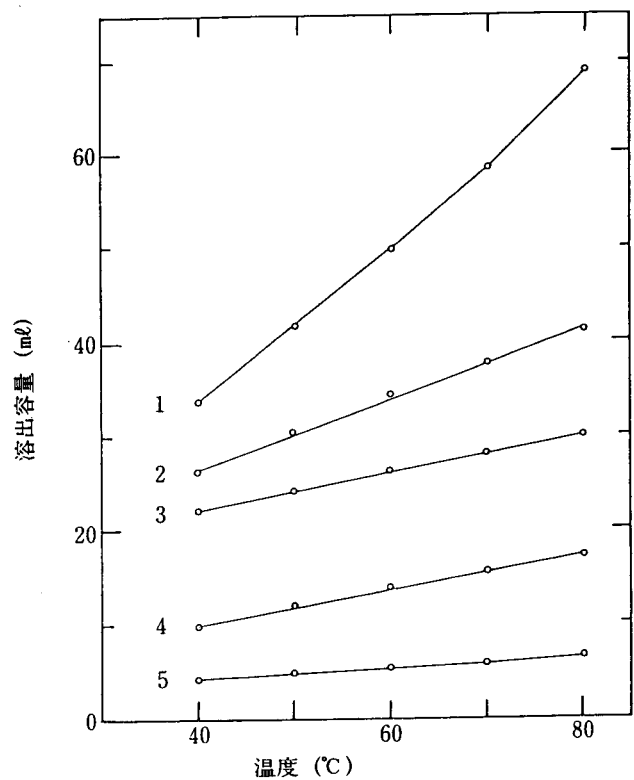


図-5 溶出容量へのカラム温度の影響

カラム；TSKgel Sugar AXG (4.6mmID×15cm)

溶離液；0.3Mホウ酸緩衝液pH8.7

1. グルコース 2. キシロース 3. ガラクトース
 4. マンノース 5. マルトース

図-6に、流速に対する糖ピークの理論段相当高さの変化をSugar AXI (粒径8 μ m)とSugar AXG (粒径10 μ m)について示します。このように流速は遅い方がすなわち分析時間を長くした方が高分離能を示すことが判ります。

またアイソクラティック溶出法の場合は充填剤の粒子径が小さい方が高分離能を示します。

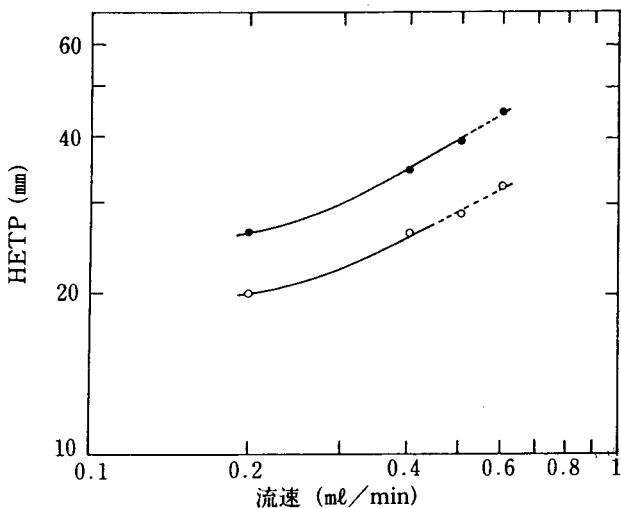


図-6 HETPへの流速の影響

カラム；—○— TSKgel Sugar AXI (4.6mmID×15cm)

—●— TSKgel Sugar AXG (4.6mmID×15cm)

試料；グルコース 1 μ mol/ml、20 μ l

溶離液；0.5Mホウ酸緩衝液pH8.7

温度；60 $^{\circ}$ C

カラム温度に関しては図-7に示した測定範囲内においては温度は高いほど糖のピークの拡がりは少なくなります。(図-7参照) また、図-5に示したように温度上昇により各糖の溶出容量が増加するため分離能はますます改善されます。しかし、このような加熱されたアルカリ性条件下においては、化学変化を受け易い種類の糖があります。この実験においてもフルクトースは図-7の条件中、70 $^{\circ}$ C以上では徐々にそのピーク高さの減少とフルクトースのピークの近傍のベースラインの乱れが観察されましたので、糖の分解が起こらない温度に抑える必要があります。最大試料負荷量*に関しては、各成分を含む混合試料を注入し示差屈折計にて各糖のバンドの広がり調べた結果を図-8に示します。図より単一成分としてはマルトース以外は0.1~0.2 μ mol程度の最大試料負荷量*であることがわかります。

*注) 1回の試料注入によって各成分のバンドの広がりを最小限のまま負荷できる最大試料量と定義します。もちろん、最大試料負荷量以上の試料を1度に注入してもカラムを劣化させることはありません。ただし各糖間の分離能が低下することが予想されます。

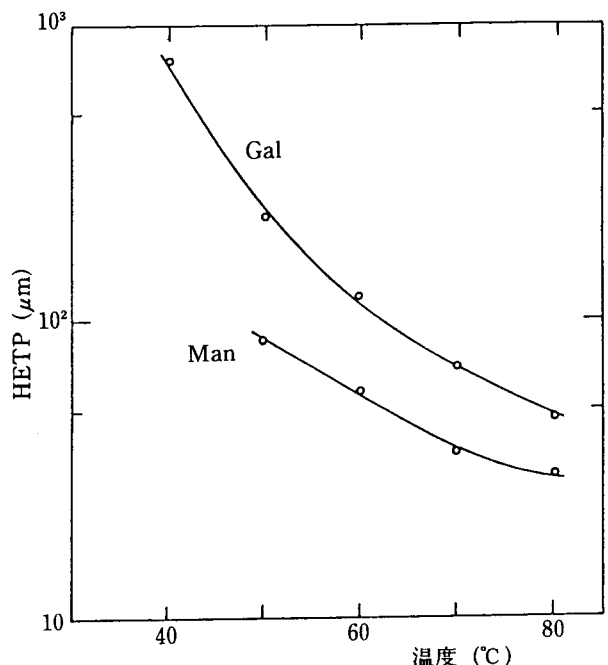


図-7 HETPへのカラム温度の影響

カラム；TSKgel Sugar AXG (4.6mmID×15cm)

試料；5 μ mol/ml、20 μ l

移動相；0.3Mホウ酸緩衝液pH8.7

流速；0.5ml/min

温度；40-80 $^{\circ}$ C

Gal ガラクトース、Man マンノース

4. 分析条件の選択

4-1 分離条件

前項、3糖類の溶出挙動で述べたように、高分離を再現性よく得るためには各種の条件を適切に選択する必要があります。

以下にその項目を列挙します。

1) 溶出容量や溶出順に影響する因子

- ・移動相のpH
- ・移動相の塩濃度
- ・カラム温度

2) ピーク幅に影響する因子

- ・移動相の流速
- ・充填剤の粒子径
- ・カラム温度
- ・試料負荷量

4-2 検出法

糖-ホウ酸錯体のイオン交換クロマトグラフィにおいて、実用的に使い易い検出法は示差屈折計、ポストカラムラベル化後の紫外、可視吸光計または蛍光検出計を用

いる方法でしょう。示差屈折計の場合、反応等が不用ですから、カラム外でのピークの拡がり少なく、使用する装置も少ない利点の一方、乾燥試料を溶離液で溶解して注入できない試料の場合のゴーストの発生と、感度的に微量分析には不向きなことおよびグラジエント溶出法で分離する場合は使用できない欠点もあります。

ポストカラムラベル化法は示差屈折計を用いる場合に述べたこととまったく対照的なことが言えます。

その他にポストカラムラベル化法の場合のおもな留意点は以下の2点です。

- 対象試料と反応試薬の選択性
- 定量再現性のよい反応条件の把握

すなわち、反応試薬には、オルシノール-硫酸²⁾(可視吸収)のように糖全般に有効な方法、エタノールアミンとホウ酸の複合体³⁾やベンズアミジン⁴⁾など(蛍光検出)還元糖に有効な方法、2-シアノアセトアミド⁵⁾(蛍光検出および紫外吸収)のようにアルドースに有効な方法などがあり目的に応じて使い分ける必要があります。

次に代表的な分離例を示します。

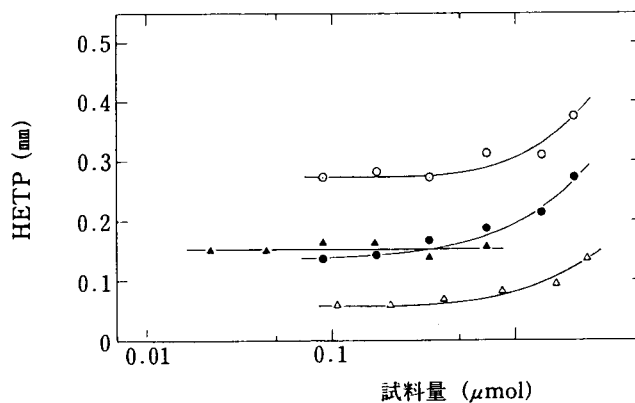


図-8 HETPへの試料負荷量の影響

カラム; TSKgel Sugar AXI (4.6mmID×15cm)

試料; 20μl

溶離液; 0.5Mホウ酸緩衝液pH8.7

流速; 0.4ml/min

温度; 60°C

検出; 示差屈折計

- フルクトース、—●— ガラクトース
- ▲— マルトース、—△— キシロース

5. 分離例

5-1 ポリオール類の分離 (示差屈折検出法)

図-9にクロマトグラムを示します。このように比較的分離度の大きな成分の分離は溶離液の塩濃度をあげて短時間で分析することができます。図中の約20分に現れる負方向のピークはシステムピークと呼ばれるもので試料を溶解した溶媒と溶離液の組成が異なるとき示差屈折計では常に発生します。

溶離液で試料を溶解すれば感知でき難いほどに小さくできます。それが出来ない試料で測定試料のピークと重なる場合は、溶離液のpHまたは塩濃度をすこし変化させることにより、重なりを防ぐこともできます。

検出限界は物質に依存しますが、この条件下ではグルコースで2.0nmol程度です。

5-2 アイソクラティック溶出法による糖類の分離 (蛍光検出法)

複雑な糖混合物の微量分析は塩濃度も0.5M程度で時間をかけて分離する必要があります。また検出はポストカラム反応後、蛍光検出計で測定することにより、検出限界も向上します。図-10では反応試薬として非腐蝕性試薬のベンズアミジン溶液を用いる方法を示します(セパレーションノートNo21参照)。なお検出限界はグルコースで1 nmol程度です。

反応条件の制御は高速液体クロマトグラフィ装置を組合せて、容易に再現性のよい結果が得られます。図-11に糖の注入量に対するレスポンスの直線性を示します。

なお図-10に示す分析法の詳細については、別の資料がありますのでご請求ください。

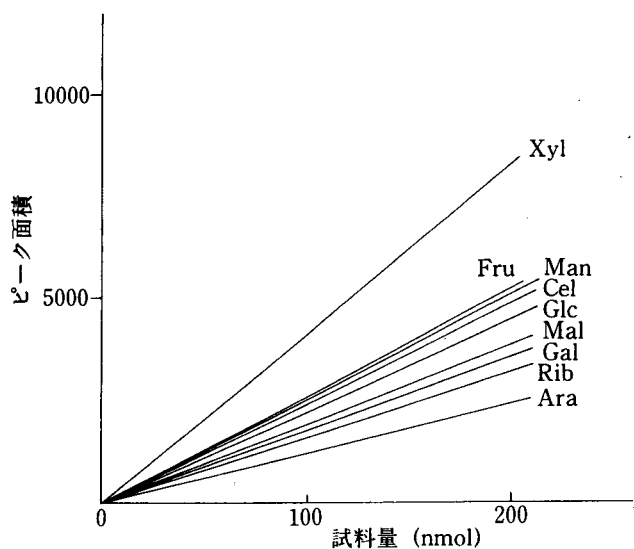


図-11 注入量とピーク面積の関係

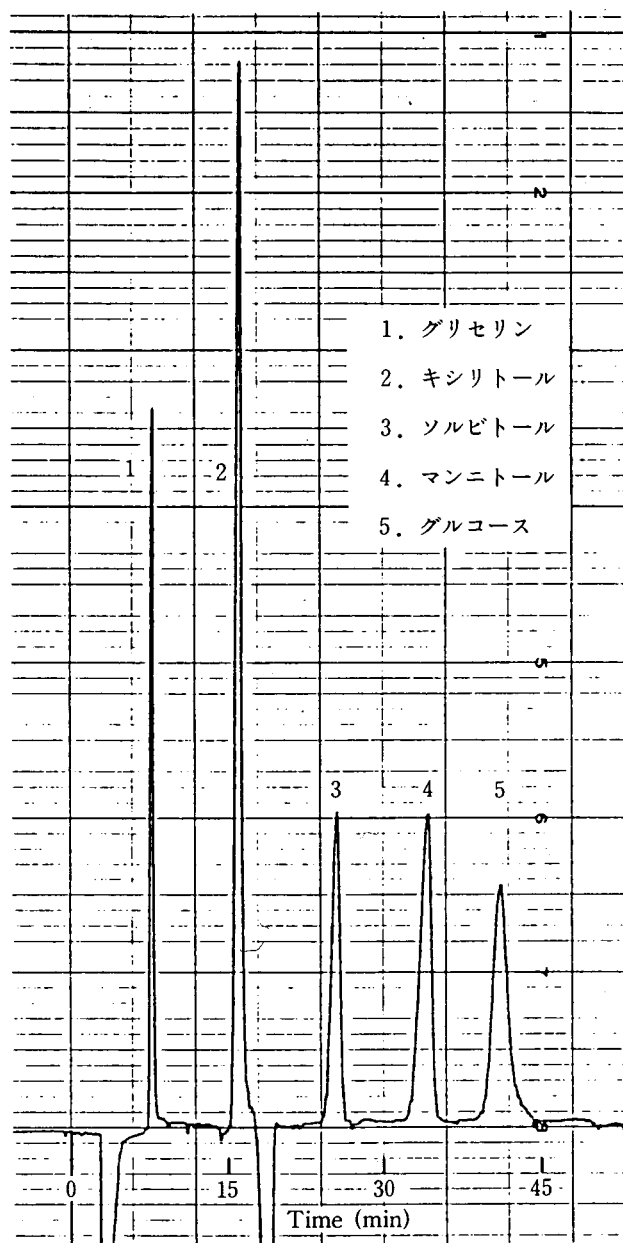


図-9 ポリオール類の分離

測定条件

カラム; TSKgel Sugar AXG (4.6mmID×15cm)

試料; 10 μ mol/ml, 20 μ l

溶離相; 0.7Mホウ酸緩衝液pH8.7

流速; 0.4ml/min

圧力; 16kg/cm²

カラム温度; 65 $^{\circ}$ C

検出; 示差屈折計

5-3 グラジエント溶出法によるアルドース類の分離 (蛍光検出法)

図-12にクロマトグラムを示します。このようにグラジエント溶出法を用いると複雑な混合物でも比較的短時間で分析が完了します。ここでは対象試料がアルドース類のみであるため、反応試薬は2-シアノアセトアミドを用いました。反応試薬は2-シアノアセトアミドに限らず反応条件により糖類との反応性が異なります。図のようにpHのグラジエントがあるときなどは他の反応条件が一定でも蛍光のレスポンスは時々刻々と変わりますので、カラム出口にアルカリや緩衝液を注入しながらpHを安定化し反応性を均一にして検量線を作成します。

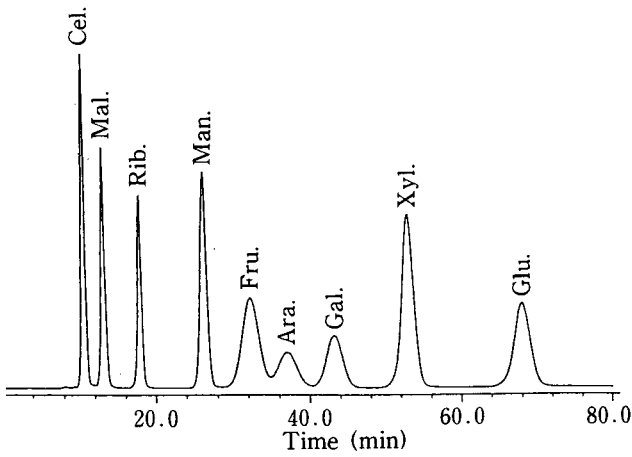


図-10 糖類の分離(I)

カラム; TSKgel Sugar AXG (4.6mmID×15cm)

試料; 各々 1 μmol/ml、20 μl

溶離液; 0.5Mホウ酸緩衝液 (pH8.7)

流速; 0.4ml/min

検出; 蛍光検出計 (ポストカラム反応法)

ex. 287.5nm em. 470nm

反応試薬; 100mMベンズアミジン溶液

反応チューブ; 0.4mmID×10m

温度; カラム60°C、反応槽110°C

Cel セロビオース、Mal マルトース、Rib リボース、

Man マンノース、Fru フルクトース、Ara アラビノース

Gal ガラクトース、Xyl キシロース、Glu グルコース

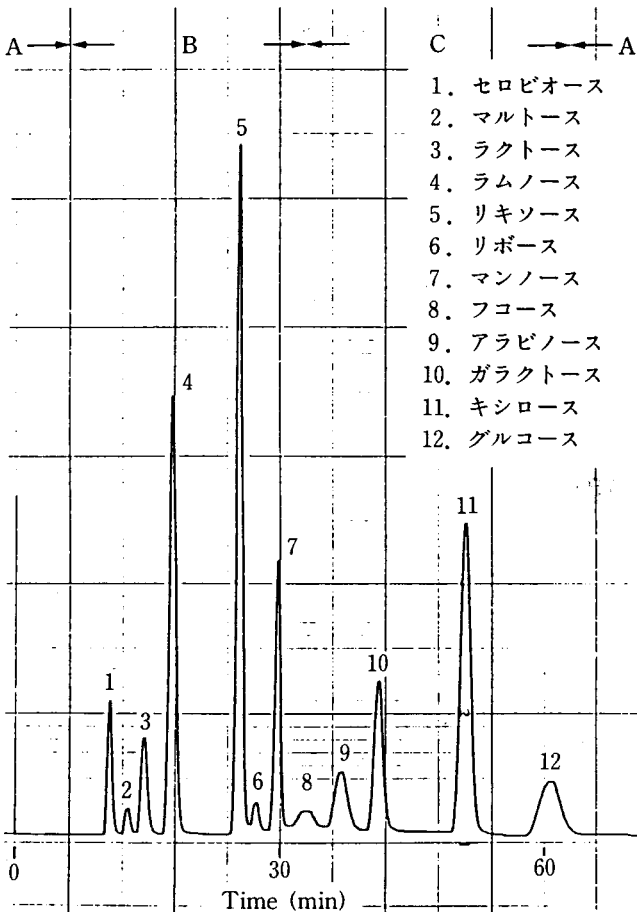


図-12 糖類の分離(II)

カラム; TSKgel Sugar AXG (4.6mmID×15cm)

試料; 二糖類25n mol/ml、単糖類50n mol/ml
20 μl

溶離液; 三液ステップワイズグラジエント溶出

A液 0.6Mホウ酸緩衝液pH7.7

B液 0.7M " pH7.25

C液 0.7M " pH8.7

流速; 0.4ml/min

圧力; 16kg/cm²

検出; 蛍光検出計 (ポストカラム反応法)

ex. 331nm, em. 383nm

反応試薬; 2.5% 2-シアノアセトアミド溶液

流速(試薬); 0.4ml/min

温度; カラム70°C、反応槽100°C

反応チューブ; 0.5mmID×10m

冷却チューブ; 0.4mmID×1m

6. 測定上の留意事項

6-1 溶離液調製法

ホウ酸緩衝液は、一般的に決まった調製法がありません。便宜上以下の処方調製しています。

0.5Mホウ酸緩衝液pH8.5 (対イオン:Na⁺)の場合

ホウ酸30.9gと固形の水酸化ナトリウム1~2gを900mlの蒸留水に溶解後固形の水酸化ナトリウムをさらに加えて、pH8.5とし純水を加えて全量を1.0ℓとします。

6-2 日常の送液ポンプの保守

TSKgel Sugar AXシリーズは一般に比較的高塩濃度溶離液を使用します。したがって溶離液用ポンプのプランジャ部に塩が析出し易く、これを放置しておくと、プランジャシールの消耗を早める結果となります。

プランジャシールの交換頻度を少なくするためには、毎日装置の始動前と停止後にはプランジャ部を水洗することが有効です。

6-3 吸着現象と洗浄法の例

a) イオン性吸着 (アニオン性物質の除去)

ホウ酸イオンは比較的低溶出力の弱いイオン種です。したがって硫酸イオン等が多量にカラムに注入された場合、見かけのイオン交換容量が減少して糖-ホウ酸錯体の溶出が早くなってくる場合があります。この場合は高濃度のホウ酸緩衝液でしばらく洗浄する必要がありますので下記の方法で洗浄してください。

洗浄法: 0.8Mホウ酸緩衝液pH8.5流速0.2ml/min (カラム温度60°C) で1晩 (16hr) 洗浄する。

b) 疎水性吸着 (疎水性物質の除去)

充填剤はイオン交換容量も多く、非常に極性が高くなっているため単なる非極性物質の吸着はほとんど問題になりません。むしろ疎水部をもつアニオン性物質が吸着し易く、除去し難い物質です。この場合は、下記の方法で洗浄してください。

洗浄法: 10%アセトニトリル含有0.5Mホウ酸緩衝液 (pH8.5) 流速0.2ml/min (カラム温度60°C) で一晩 (16hr) 洗浄する。

7. おわりに

TSKgel Sugar AXシリーズは複雑な糖混合物を同時分析するために適した分離カラムです。その他糖分析に使われるカラムとしては比較的少い種類の糖混合物の分析には短時間分析に適したTSKgel SCX (H⁺) 型、オリゴ糖多糖類には水系GFC用カラムTSKgel PWシリーズ等が揃っていますのでご利用下さい。

参考文献

- 1) J. X. Khym and L. P. Zill, J. Amer. Chem. Soc., 74, 2090 (1952)
- 2) R. B. Kesler, Anal. Chem., 39, 1416 (1967)
- 3) T. Kato and T. Kinoshita, Anal. Biochem., 106, 238 (1980)
- 4) M. Kai, K. Tamura, M. Yamaguchi and Y. Ohkura, Anal. Sci., 1, 59 (1985)
- 5) S. Honda, Y. Matsuda, M. Takahashi and K. Kakehi, Anal. Chem., 52, 1079 (1980)