

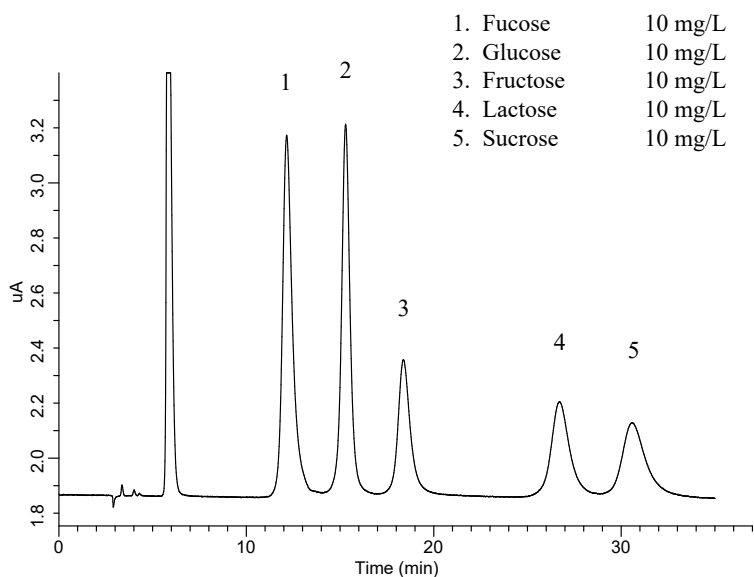
糖类的分析方法有很多，在以前的技术指南中也介绍过几种，比如柱后荧光衍生法(No.6)以及示差折射率检测器的分析法(No.91)。

した。

这次，我们将介绍使用电化学检测器的糖类分析方法，该方法具有系统简单，灵敏度高和定量的优点。

(C. Aoyama)

标准液测定例

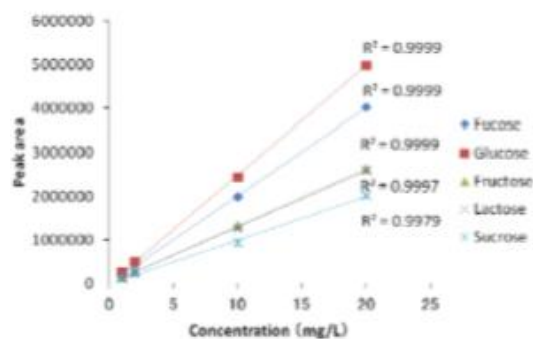


HPLC条件

系统 : LC800 system with ECD
色谱柱 : InertSphere Sugar-1
 (5 μ m, 150 \times 4.6 mm I.D.)
流动相 : 100 mM NaOH*
流速 : 0.5 mL/min
色谱柱温度 : 25 $^{\circ}$ C
检测器 : ECD Pulse Mode (ED723, Gold)
 E1: 150 mV t1: 600 ms
 E2: -1500 mV t2: 50 ms
 E3: 600 mV t3: 50 ms
 E4: -200 mV t4: 100 ms
 ts: 50 ms
注入量 : 10 μ L

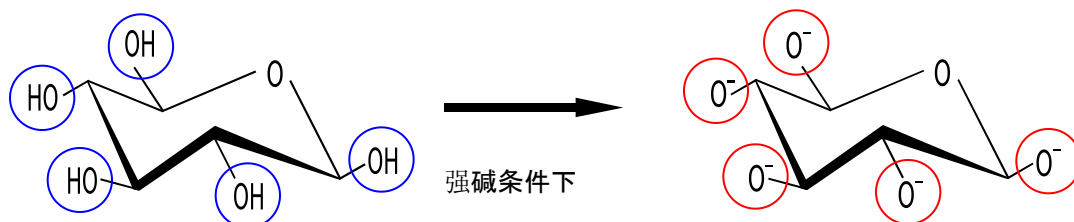
* 使用了带有捕集CO₂小柱的溶剂瓶

Calibration curves



使用此方法分离的原理

糖在强碱条件下被离子化。因此，可以使用碱性水溶液作为流动相在阴离子交换柱上保留和分离糖。



糖类的检测方法

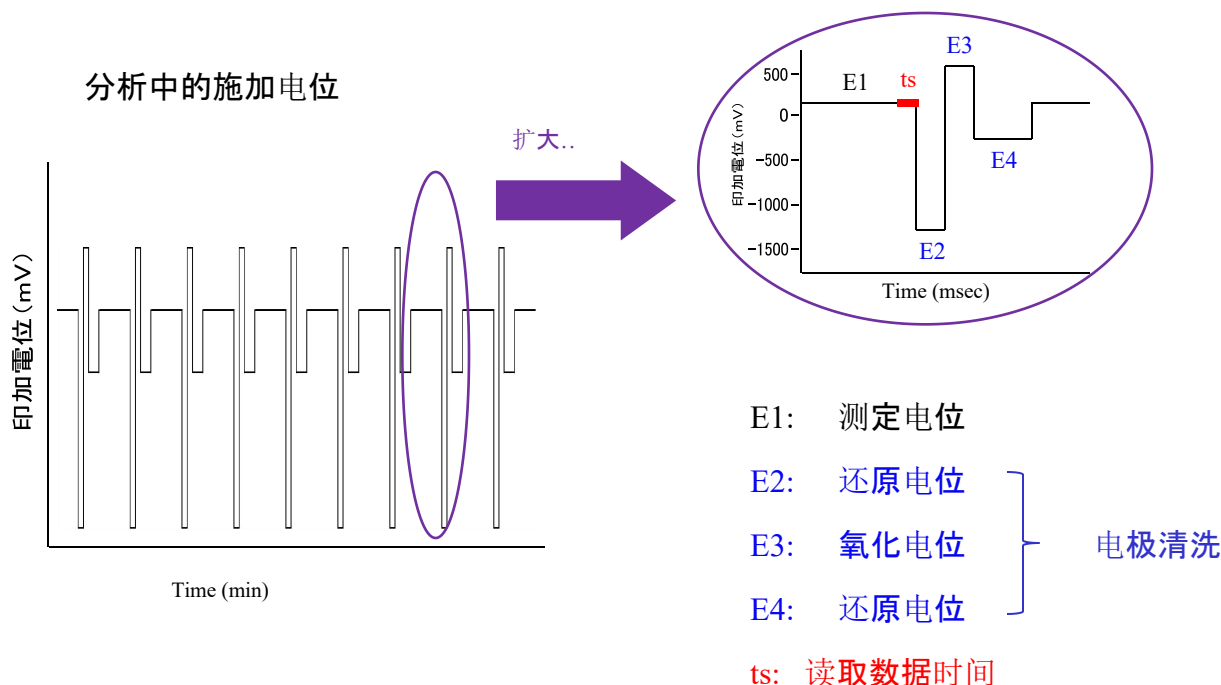
因为糖类不具有双重结合和苯环等，所以使用UV检测器和荧光检测器的话，必须进行衍生化法。另一方面，使用电化学检测器(ECD)进行糖类分析不需要任何衍生化，因为糖是通过在工作电极表面上氧化碳水化合物和监测产生的电流来检测的。外，由于它比不需要衍生化的差示折射率检测器灵敏三个数量级，因此电化学检测器是一种非常好的糖分析检测器。

使用检测器	灵敏度(约)	备注
电化学检测器(ECD)	10 ng 程度	如果耐碱没有问题的话，通常的系统就OK
荧光检测器(FL, 柱后衍生化)	10 ng 程度	需要追加衍生化用的泵和反应单元
折射率检测器(RI)	10 μ g 程度	不能进行梯度洗脱
蒸发光散射检测器(ELSD)	1 μ g 程度	不能使用非挥发性洗脱液，校准曲线为曲线

电极表面的清洗和脉冲电位模式

通过氧化糖类进行测量的电化学检测器，在该电极表面上附着了糖类的反应生成物。随着附着量的增加，检测器的灵敏度可能会改变，因此电极表面是周期性的清洁是必要的。

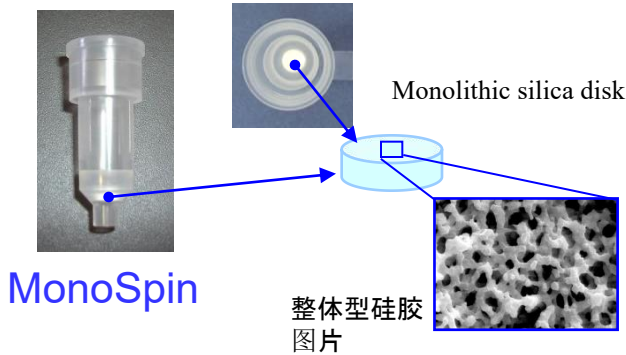
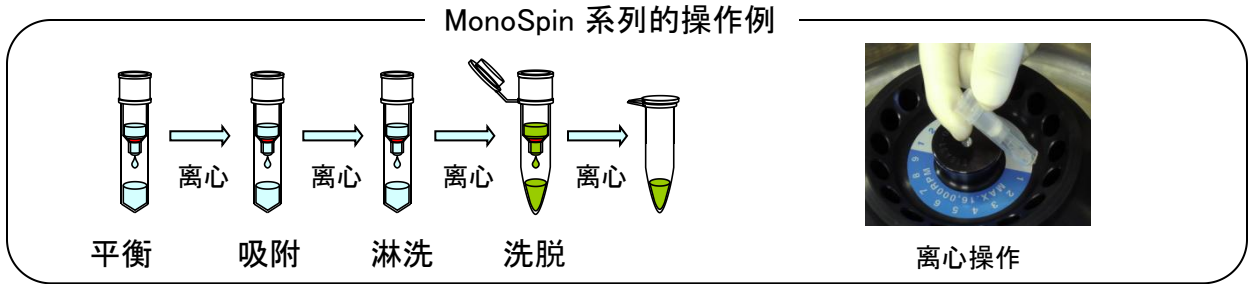
这个时候可以使用我公司的电化学检测器ED723设置脉冲电位模式。比如，设置成以下模式的话，每次的数据取得之后会施加强大的氧化/还原电位。通过这样做，除去了在施加电极洗涤可能性的同时附着的糖类的反应产物，并且可以始终保持良好的电极表面



用MonoSpin C18净化血清样品

MonoSpin系列是使用具有均匀连续孔的二氧化硅整体型硅胶的小柱。通过使用具有高孔隙率的二氧化硅整体材料作为载体，可以使用离心机通过简单且短的操作来纯化和浓缩样品。

此次使用的MonoSpin C18，是在硅胶表面键合了十八烷基作为官能团，可以有效保留疏水性化合物。由于不保留糖类，所以可以通过将血清过MonoSpin C18，以简单的方式去除杂质成分。



进行前处理需准备的東西

血清样品: 向血清中加入3倍量的乙腈后, 将其离心, 得到的上清液过MonoSpin C18

步骤

将废液管接在MonoSpin C18上

↓ + 甲醇 200μL

离心*

↓ + 水 200μL

离心

接到回收管上

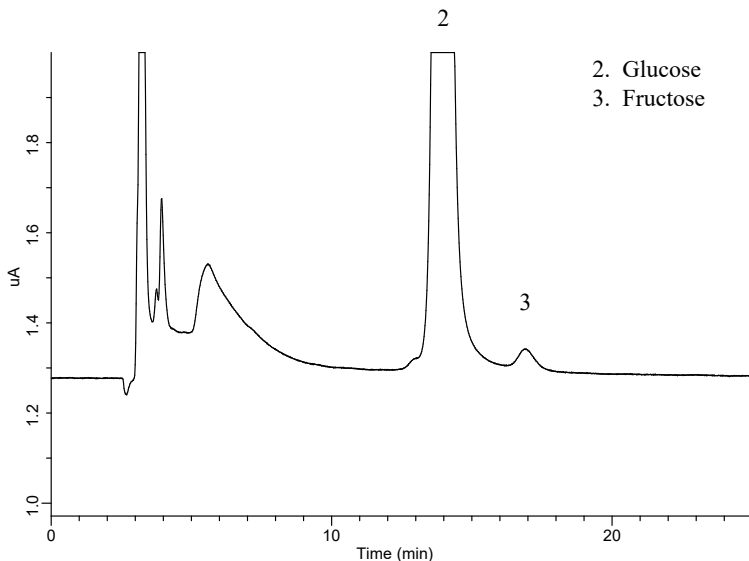
↓ + 血清样品 200μL

离心

用水将回收液稀释5倍后, 注入HPLC

* 所有的离心以1分钟10,000 g操作

使用MonoSpin C18清洗后从血清样品中获得的色谱图



尽管已知血清中果糖浓度比葡萄糖低100倍, 但ECD不仅可以检测血清中较高浓度的葡萄糖(空腹时为70~110mg/dL), 而且可以检测出高灵敏度的果糖。