

固相抽出前処理を用いた LC/MS によるグルコース分析法

南部浩孝・小川綾子

Method for LC/MS Analysis of Glucose using Solid Phase Extraction

Hiroataka NANBU, Ayako OGAWA

1. はじめに

湖沼の水質浄化や生物多様性保全の観点から、本県では、ヨシを植栽した浮礁や渚護岸の整備に取り組んでいる。水生植物による水質浄化の十分な効果を得るためには、富栄養化の原因物質である窒素・リンを吸収して成長した植物体を刈り取り、窒素・リンを系外除去する必要がある。

当センターでは、平成 20～22 年度の 3 か年計画で、「ヨシ群落を利用した湖沼の水質改善とヨシ等の有効利用技術（バイオマスエタノール等）に関する研究」¹⁾を行っているが、硫酸加水分解による糖生成条件の効率化等を検討する上でグルコース生成量の正確な測定法の確立が必要である。そこで、LC/MS によるグルコース分析法²⁾について検討を行ったところ、若干の知見を得たので報告する。

2. 実験方法

2.1 試薬

標準物質は、シグマアルドリッチ製の単糖標準品（グルコース、マンノース、ガラクトース、キシロース、アラビノース）を用いた。固相カートリッジは、GL Science 製の InertSep (CN, NH₂, FL, Si, 2OH) 500mg/6mL を使用した。グルコースのスクリーニング分析には、和光製のグルコース C II-テストワコーを用いた。

2.2 固相抽出前処理の検討

LC カラムは、単糖類が分離可能な Shodex SUGAR SP0810 を用いた。ただし、当カラムは耐酸性および耐塩性がないため、固相抽出カートリッジを用いて硫酸除去等の前処理を検討した。

なお、各種固相カートリッジのグルコース保持を確認するため、10mg のグルコース標準物質を 98%アセトニトリル水溶液 1mL に溶解したものを通液（10mL/分）後、各種濃度のアセトニトリル水溶液 10mL を用いて順次溶出させ、スクリーニング分析によりグルコースを検出した。

2.3 装置および分析条件

【固相抽出条件】

精製水およびアセトニトリル各 10mL を用いて順次コンディショニングした固相カートリッジに、試料 0.1mL にアセトニトリルを加えて 5mL としたものを通液（10mL/分）後、アセトニトリル 10mL で洗浄（10mL/分）した。さらに、空気を 10 分間吸引して乾燥した後に、水 10mL で溶出した。

【LC/MS 条件】

(LC) 使用機種：Waters 製 Alliance 2695、カラム：Shodex SUGAR SP0810 (8.0×300mm)、移動相：水、流量：0.5mL/min、カラム温度：60℃、注入量：10μL

(MS) 使用機種：Waters mass ZQ、ESI-negative：Source Temp (120℃)、Desolvation Temp (350℃)、Desolvation Gas：400L/h、Cone Gas：50L/h、Cone 電圧：20V、モニターイオン：149(M-H)⁻、179(M-H)⁻

3. 結果と考察

3.1 固相抽出前処理の検討

各種固相カートリッジのグルコース保持を検討した結果を表 1 に示す。

その結果、最もグルコースの保持が強かったのは NH₂ カートリッジであった。したがって、NH₂ カートリッジを用いて 2.3 の固相抽出を行ったところ、グルコース溶出画分には硫酸は検出されなかった。

表 1 各種固相カートリッジのグルコース保持

CH ₃ CN 濃度	95 %	90 %	85 %	80 %	75 %	70 %	65～5 %	水
CN	-	70% 溶出	30% 溶出	-	-	-	-	-
NH ₂	-	-	-	-	80% 溶出	20% 溶出	-	-
FL	-	-	-	-	-	-	-	-
Si	30% 溶出	-	-	-	-	-	-	-
2OH	-	-	-	-	-	-	-	-

3.2 LC/MS 分析による 5 種の単糖分離

ヨシ・ヒシの硫酸加水分解によって生成する可能性のある 5 種の単糖（グルコース、マンノース、ガラクトース、キシロース、アラビノース）の標準品を混合し、各 20 mg/L 濃度の水溶液に調製したものについて分析したチャート

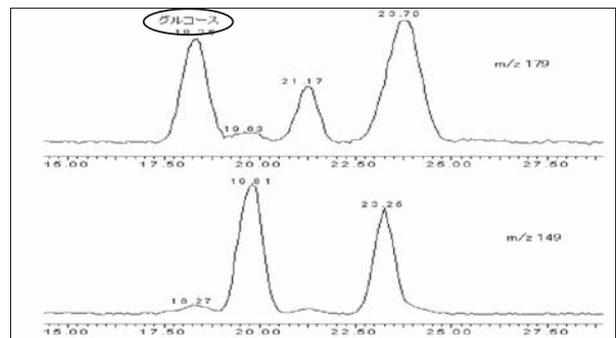


図 1 LC/MS による 5 種の単糖の分離

を図1に示す。

このように、5種の単糖とも分離よく検出することができた。

3.3 グルコース標準物質による検量線

グルコース標準物質を用いて20、40、60mg/L濃度の水溶液を調製し、検量線を作成したところ、図2のとおり良好な直線性 ($R^2=0.9851$) が得られた。

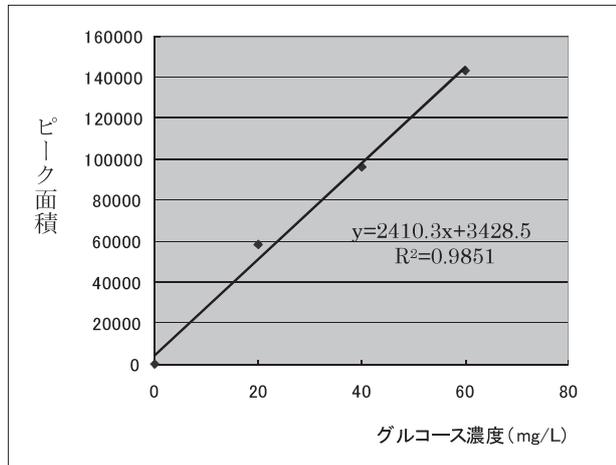


図2 グルコース標準物質による検量線

3.4 固相抽出前処理におけるグルコースの回収率

20mg/Lのグルコース標準水溶液を用いて、固相抽出前処理を行ったものと、行わなかったものについてそれぞれ6回ずつLC/MSで繰り返し分析し、固相抽出前処理操作におけるグルコース回収率を求めたところ、表2に示すように回収率はすべて90%以上であり、良好な結果を示した。

表2 固相抽出前処理におけるグルコース回収率

	固相抽出なし (レスポンス)	固相抽出あり (レスポンス)	グルコース 回収率 (%)
1回目	58491	53421	91.3
2回目	58832	54291	92.2
3回目	58332	52945	90.7
4回目	59342	53554	90.2
5回目	57342	54021	94.2
6回目	58302	54001	92.6

4. まとめ

固相抽出前処理を用いたグルコースのLC/MS分析を検討したところ、5種の単糖をそれぞれのピークに分離できた。グルコース標準物質による検量線を作成したところ、良好な直線性 ($R^2=0.9851$) を示した。また、固相抽出前処理におけるグルコースの回収率はすべて90%以上 ($n=6$)であった。

本研究は「ヨシ群落を利用した湖沼の水質改善とヨシ等の有効利用技術 (バイオマスエタノール等) に関する研究 (同所報に記載)」¹⁾ に活用した。

参考文献

- 1) 南部浩孝他：ヨシ群落を利用した湖沼の水質改善とヨシ等の有効利用技術 (バイオマスエタノール等) に関する研究 (第2報), 福井県衛生環境研究センター年報, 8, 58~60 (2009)
- 2) Waters : 糖のLC/MS分析 (Application Note No.2005020007J)