

薄層クロマトグラフィーによる 3種の糖質の分析に関する研究

長 谷 川 成 子
 福 島 美 保 子
 加 藤 保 子
 小 島 信 夫
 友 松 滋 夫

1906年に Tswett が植物色素の溶液を炭酸カルシウム末を充填したガラスカラムの中へ流し込んで色素を吸着させた後、有機溶媒を流下させると数種の色素が分離してくる現象を発見し、クロマトグラフィーと呼んで以来本法が分析の手段として多くの学者によって追試、応用されてきた。1944年には Consden-Gordon-Martin はろ紙片を保持体とするペーパー分配クロマトグラフィーによりアミノ酸の分析をおこなった。その2年後に Partridge により糖質の分析に応用された。更に遅れて1956年に Stahl が薄層クロマトグラフィーの実用性を立証した。本法はその高い分離能、高感度、迅速な展開などのすぐれた特性により、ペーパークロマトグラフィーに代わり使用されるようになってきた。

私どもも果実の糖質の分析時に、多くの指導書に示されている、ペーパークロマトグラフィーによっては近似な Rf 値を有する複数の糖質の分離が困難なため、薄層クロマトグラフィーによる分離を各種の方法について小実験を試みた。また、糖質の検出法も多くの方法が示されているが、各種検出法の優劣はあまり論ぜられておらず、この点についても検討した結果、興味ある結果を得たので報告する。

実験材料および方法

まず実験1において糖質の検出法についての実験を行い、実験2においてセルロース薄層クロマトグラフィーによる3種の糖質の分離を行い、実験3においてシリカゲル薄層クロマトグラフィーによる3種の糖質の分離を行い実験4において多重展開法を試みた。

実験1 糖質の検出法の比較実験

検出試薬は、ナフトレゾルシン・リン酸試薬、アンモニア性硝酸銀、アニリン水素フタル酸試薬、過マンガン酸カリウム試薬、ベンジジン試薬、ジフェニルアミン・アニリン試薬の6種を用いた。各試薬の調整、発色法は次の如くである。

• ナフトレゾルシン・リン酸試薬¹⁾

0.2%ナフトレゾルシン・エタノール溶液100mlと H_3PO_4 10mlの混液を噴霧し、105°Cで5分間加熱した。

• アンモニア性硝酸銀試薬²⁾

$\frac{N}{10}$ 硝酸銀溶液と $\frac{N}{5}$ アンモニア水の等量混液を噴霧し、105°Cで10分間加熱した。

• アニリン水素フタル酸試薬³⁾

アニリン0.93g (0.91ml) とフタル酸1.66gを水飽和ブタノール100mlに溶かした液を噴霧し、110°Cで5分間加熱した。

• 過マンガン酸カリウム試薬⁴⁾

2%の炭酸ナトリウム水溶液に0.1%過マンガン酸カリウム溶液を噴霧後100°Cで数分間加熱した。

• ベンジジン試薬⁵⁾

ベンジジン0.5g, 酢酸10ml, 40%トリクロル酢酸10mlをエタノール80mlに溶解した液を噴霧し、120°Cで10分間加熱した。

• ジフェニルアミン・アニリン試薬⁶⁾

ジフェニルアミン2g, アニリン2mlをアセトン100mlに溶かし80% H_3PO_4 10mlを混和した試薬を噴霧後80°Cで4分間加熱した。

糖質試料として市販の特級ブドウ糖, 果糖, ショ糖を使用した。これら3種の糖質の1%溶液をろ紙片上にそれぞれ1滴ずつ滴下し、80°Cで10分間乾燥した後、6種の検出試薬によりそれぞれ発色させたものを肉眼的に観察した。

実験 2 セルロース薄層クロマトグラフィーによる3種の糖質の分離

セルロース薄層：巾2.5cm, 長さ17cmのガラス板上に, Avicel20gに蒸溜水90mlを加え乳鉢ではげしく攪拌したものをアプリケーターにて厚さ250 μ に塗布し薄層をつくりこれを80°Cで30分間加熱乾燥後室温にて放冷して使用した。

糖液：実験1に使用したブドウ糖, 果糖, ショ糖の3種を蒸溜水100mlにそれぞれ1gずつ加えて糖の混合液をつくった。

展開溶媒：酢酸エチル：ピリジン：酢酸：水の酢酸エチルとピリジンの混合割合を変えたもの, 即ち, 2:8:1:3, 3:7:1:3, 4:6:1:3, 5:5:1:3, 6:4:1:3, 7:3:1:3, 8:2:1:3の7種の混合液と, フェノール:1%アンモニア水の混合割合を変えたもの, 0:9, 2:7, 3:6, 4:5, 5:5, 5:4, 6:3, 7:2, 9:0の9種の混合液, 合計16種の展開溶媒を使用した。

上記セルロース薄層の下端より2.5cmを原点として糖液をスポットし, 乾燥後, 下端を展開溶媒中に浸し, 上昇法により約12cm展開した。展開終了後80°Cで20分間加熱し溶媒を除去した。この展開のすんだセルロース薄層を, 実験1で比較的良い糖の検出結果をみた, ジフェ

ニルアミン・アニリン試薬法によって検出を試みた。

実験 3 シリカゲル薄層クロマトグラフィーによる 3 種の糖質の分離

シリカゲル薄層：巾2.5cm，長さ17cmのガラス板上に，ワコーゲル B-10を25gと0.02M酢酸ナトリウム50mlをよく混合したものをアプリケーターにて厚さ 250 μ に塗布し室温に 30分間放置して薄層をつくり，これを110°Cで30分間加熱乾燥後放冷して使用した。

糖液：実験1に使用したブドウ糖，果糖，ショ糖の3種を蒸留水100mlにそれぞれ1gずつ加えて糖の混合液をつくった。

展開溶媒：第1群でクロロフォルム：メタノールの混合割合を変えたもの，即ち，0：10，2：8，3：7，4：6，5：5，6：4，10：0の7種の混合液を使用した。第2群でその他の糖質の分離に一般的に使用するもの即ちn-ブタノール：ピリジン：水（6：4：3），n-ブタノール：アセトン：水（4：5：1），n-ブタノール：酢酸：水（4：1：1），メタノール：アセトン：水（4：5：1），クロロフォルム：メタノール：酢酸（8：1：1）および比較のため，前群に用いたクロロフォルム：メタノール（4：6）についても第2群で使用し，以上6種の混合液を用いた。

上記シリカゲル薄層の下端より2.5cmを原点として糖液をスポットし，乾燥後，下端を展開溶媒中に浸し，上昇法により約12cm展開した。展開終了後80°Cで20分間加熱し溶媒を除去した。この展開のすんだシリカゲル薄層を，実験1で比較的良い糖の検出結果をみた，ジフェニルアミン・アニリン試薬法によって検出を試みた。

実験 4 シリカゲル薄層による 3 種の糖質の多重展開

実験3の方法により作成したシリカゲル薄層及び糖液を用いて1～4回多重展開を試みた。展開溶媒としてクロロフォルム：メタノール（4：6）を使用した。

シリカゲル薄層の下端より2.5cmを原点として糖液をスポットし，乾燥後，下端を展開溶媒中に浸し，上昇法により約12cm展開した。展開終了後80°Cで20分間加熱し溶媒を除去した。

これを第1回とし，次に第2回としては1度溶媒を除去したプレートを再び溶媒中に浸し，第1回目と同じ高さに上がるまで展開を行ない展開終了後80°Cで20分間加熱し溶媒を除去した。以下3回，4回と同じ方法を繰り返した。この展開のすんだシリカゲル薄層を，実験1で比較的良い糖の検出結果をみたジフェニルアミン・アニリン試薬法によって検出を試みた。

実 験 結 果

実験 1 糖質の検出法の比較実験による結果は第1図に示す如くであった。

ナフトレゾルシン・リン酸試薬法：ブドウ糖，果糖，ショ糖の3種の糖はいずれも呈色を示さなかった。

アンモニア性硝酸銀試薬法：ブドウ糖および果糖は茶褐色の呈色を示したが，ショ糖は呈色

がみられなかった。またろ紙自体が淡褐色を呈した。

アニリン水素フタル酸試薬法：ブドウ糖および果糖は淡褐色に，シヨ糖は微淡褐色の呈色を示した。

過マンガン酸カリウム試薬法：ブドウ糖および果糖は微淡黄褐色を呈したが，シヨ糖は呈色がみられなかった。またろ紙自体が淡赤紫色の顆粒状に呈色した。

ベンジジン試薬法：ブドウ糖は茶褐色に，果糖は淡黄褐色に，シヨ糖は淡茶褐色の呈色を示した。

ジフェニルアミン・アニリン試薬法：ブドウ糖は灰褐色に，果糖は淡褐色に，シヨ糖は緑褐色の呈色を示した。

実験 2 セルロース薄層による 3 種の糖質の分離実験の結果は，次の如くであった。

セルロース (Avicel) は均質の薄層を作成することが極めて困難で，水との攪拌時に種々努力を試みたが，乾燥したセルロース薄層は表面が顆粒状を呈した。

このような薄層を用いて糖液の展開を，展開溶媒として酢酸エチル：ピリジン：酢酸：水の混合割合を変えたもの 7 種，フェノール：1%アンモニア水の混合割合を変えたもの 9 種，合計 16 種によって試みた。その結果，何れの展開溶媒も 3 種の糖質を分離することができず，1 つのスポットとしてしか認められなかった。また糖質の検出時に，薄層プレート自体が発色剤によって濃青色を呈するので，スポットの観察をするのに極めて困難であった。

実験 3 シリカゲル薄層による 3 種の糖質の分離実験の結果は第 2，3 図に示した。

シリカゲル (ワコーゲル B-10) は 0.02M 酢酸ナトリウム溶液を添加した後長時間経過すると硬化してくるので，手際よくアプリケーターに入れ，ガラス板上に速かに塗布する必要があった。このように速かな処理を必要としたが，シリカゲル薄層はガラス板に比較的均質に塗布できた。

このシリカゲル薄層を用いて糖液の展開を展開溶媒として第 1 群ではクロロフォルム：メタノールの混合割合を変えたもの 7 種について，第 2 群ではその他の糖質の分離に一般的に使用するもの 6 種について試みた。その結果，第 1 群では，第 2 図に示す如く，メタノールの含有量が多いほど糖質の展開距離が長く，クロロフォルムの含有量が多いほど展開距離が短くなった。なおこの場合の糖質の分離はクロロフォルム：メタノールが 3：7，4：6，5：5，6：4 の割合のものにみられたが，その中でも，4：6 の展開溶媒を用いた時に比較的分離が良い結果をえた。この分離した糖質の呈色は，ブドウ糖，シヨ糖は褐色，果糖は茶褐色を示した。第 2 群の実験結果は第 3 図に示す如くで，第 1 群で用いたクロロフォルム：メタノール (4：6) のみが 3 つのスポットとなって分離を示したが，その他の糖質の分離に一般的に使用する展開溶媒 n-ブタノール：アセトン：水 (4：5：1)，n-ブタノール：酢酸：水 (4：1：1)，メタノール：アセトン：水 (4：5：1)，クロロフォルム：メタノール：酢酸 (8：1：1) では 3 種の糖質は分離を示さず，1 つの長いスポットとなった。n-ブタノール：ピ

リジン：水（6：4：3）は糖質が全体に流れスポットとしては全くみられなかった。

実験 4 シリカゲル薄層による3種の糖質の多重展開の結果は第4図に示す如く1, 2, 3と回を重ねるに従って分離は悪くなり、テーリングもおこりやすくなった。特に4回におけるテーリングは著しく糖質の判定は困難となった。

考 察

糖質の分析には薄層クロマトグラフィーが応用されるようになってからその高い分離能、高感度、迅速性などの上に比較的簡便であり増々広く活用されてきており、多くの方法が次々と案出されつつある。しかし実際に用いた場合、その報告の記載通りの結果を出すのは、なかなか容易なものではない。また各方法にはそれぞれ特徴もあり、各実験に用いて最良の結果をうるためにはいかなる方法を用いよいか確かではない。私どもは果実中の糖質の検索時に少しでも分析能率の高い方法を知るために、ブドウ糖、果糖、ショ糖について、その検出法、薄層クロマトグラフィーの固定相および展開溶媒、多重展開法について比較検討を試みた。

はじめに実験1で6種の検出法について比較をした結果、ナフトレゾルシン・リン酸試薬法ではケトースは赤色、アルドースとウロン酸は青色、アミノ糖は橙赤色のスポットとして検出し、特にケトースに対する検出感度が高く、ケトース含有非還元オリゴ糖もすみやかに赤色を呈するとされているが、¹⁾3種の糖質は呈色がみられなかった。アンモニア性硝酸銀試薬法は還元糖は薄い褐色地に暗褐色のスポットとして検出されるとしているが、²⁾ブドウ糖、果糖が茶褐色を呈したが、ショ糖は呈色しなかった。アニリン水素フタル酸試薬法では、アルドペントースは赤色、他の多くの還元糖は黄褐色に、ケトヘキソース、オリゴ糖、非還元性糖は呈色しにくく、アルドースのみ検出する目的に適するとしているが³⁾3種の糖質とも呈色を示したが、ブドウ糖、果糖は淡褐色に、ショ糖は微淡褐色であった。過マンガン酸カリウム試薬法では赤紫色地に黄色のスポットとして検出され、還元糖のほかアルドン酸や糖アルコールの検出によく用いられるが退色はやいのが欠点とされている。⁴⁾ブドウ糖、果糖は淡赤紫色地に淡黄色のスポットとして呈色を示したが、ショ糖は示さなかった。ベンジジン試薬法ではペントースとウロン酸は赤褐色、他は黄褐色のスポットとして検出されるとしているが、⁵⁾ブドウ糖は茶褐色に、果糖は淡黄褐色に、ショ糖は淡茶褐色の呈色を示した。ジフェニルアミン・アニリン試薬法ではアルドヘキソースは灰褐色、ケトヘキソースは黄色、ペントースは緑色、メチルペントースは橙色、ヘプトースは紫青色、ウロン酸は赤褐色を呈する。しかしこれはろ紙またはセルロース薄層の場合でシリカゲルまたはキーゼルゲル薄層では一般にペントースは褐紫色、アルドヘキソースは青紫色、ケトヘキソースは黄赤色、メチルペントースは黄緑色、ウロン酸は紫褐色を呈し、各種の糖にそれぞれ特異的な多様な呈色は、Rf値が接近した場合に糖の同定を確実にするためにも役立つとしているが、本方法ではブドウ糖は灰褐色、果糖は淡褐色に、ショ糖は緑褐色の呈色を示した。以上述べてきたように、私どもの実験結果と多くの報告の間に

はかなりの差異の認められるものもあったが、その中でもベンジジン試薬法とジフェニルアミン・アニリン試薬法は3種の糖質に対して呈色も色調が比較的濃いため、スポットが認め易いことがわかった。この2つの検出法の中でもジフェニルアミン・アニリン試薬法は糖によってそれぞれ特異的な色調を示すことがわかった。以後、実験2, 3, 4ではこの検出法を用いることにした。

次に、実験2でセルロース薄層による3種の糖質の分離を試みた。セルロース以外の薄層では、これに匹敵するものは見いだせない位糖質の分離には完璧な方法とされているが展開に使用する前に検出試薬でセルロース薄層自体が濃青色の呈色を示すので、展開後検出処理をしてもスポットの観察が非常に困難であり、この Avicel の発色の原因を明確にしこの問題を解決しない限り、実際に本方法の使用はむづかしいものと考えられた。

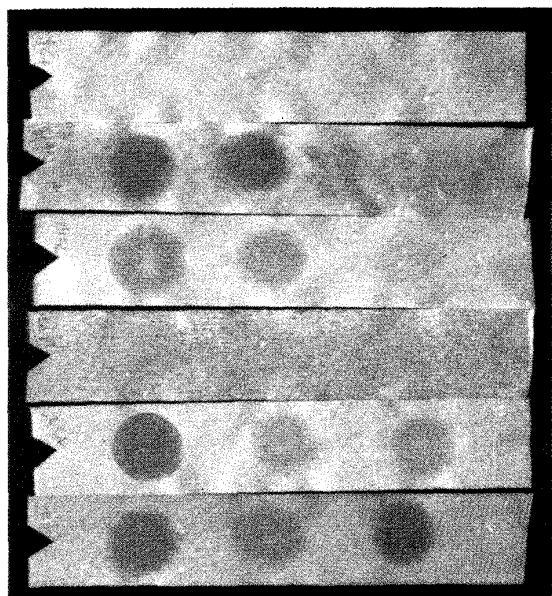
続いて、実験3でシリカゲル薄層による3種の糖質の分離を試みた。シリカゲルは単糖およびオリゴ糖の分離のほか、糖誘導体の薄層クロマトグラフィーの固定相としても広く使用されている。そこでここでは、ワコーゲルB-10を用いた。展開溶媒には先ず、クロロフォルムとメタノールを種々の割合に変えた混合溶媒を用いて展開した。その結果、その割合がクロロフォルム：メタノール（4：6）のときに3種の糖質は完全に分離を示す比較的良好な展開結果がえられたが、Pifferi⁸⁾が良いとしている6：4の割合では展開距離が短かく、またブドウ糖と果糖のスポットが重なるので、混合割合は4：6の方が優れていると考えられた。次に、糖質の分離に一般的に用いる展開溶媒6種について糖質の分離を試みた。その結果の示す如く、n-ブタノール：ピリジン：水（6：4：3）は糖質は全体に流れ、スポットとして現れなかった。n-ブタノール：アセトン：水（4：5：1） n-ブタノール：酢酸：水（4：1：1）、メタノール：アセトン：水（4：5：1）、クロロフォルム：メタノール：酢酸（8：1：1）は3種の糖質の分離ができず、単に一つのスポットとしてしか示さず、クロロフォルム：メタノール（4：6）の分離能におよぶものはみられなかった。

更に比較的良好な分離を示した、この方法で多重展開を試みたが、展開を重ねるほどスポットは不鮮明となる傾向がみられ、分離が良くなるという結果はえられず、このクロロフォルム：メタノール（4：6）による展開では、特に展開を重ねる必要性は考えられなかった。

結 論

1. 糖質の検出法6種、ナフトレゾルシン・リン酸試薬法、アンモニア性硝酸銀試薬法、アニリン水素フタル酸試薬法、過マンガン酸カリウム試薬法、ベンジジン試薬法、ジフェニルアミン・アニリン試薬法の呈色比較実験を行った。その結果ベンジジン試薬法とジフェニルアミン・アニリン試薬法は3種の糖質に対して比較的鮮明な呈色を示した。その中でも後者は糖によってそれぞれ特異的な色調を示した。
2. セルロース薄層による3種の糖質の分離実験を行った。展開溶媒として酢酸エチル：ピリ

第1図 各種検出法による呈色結果



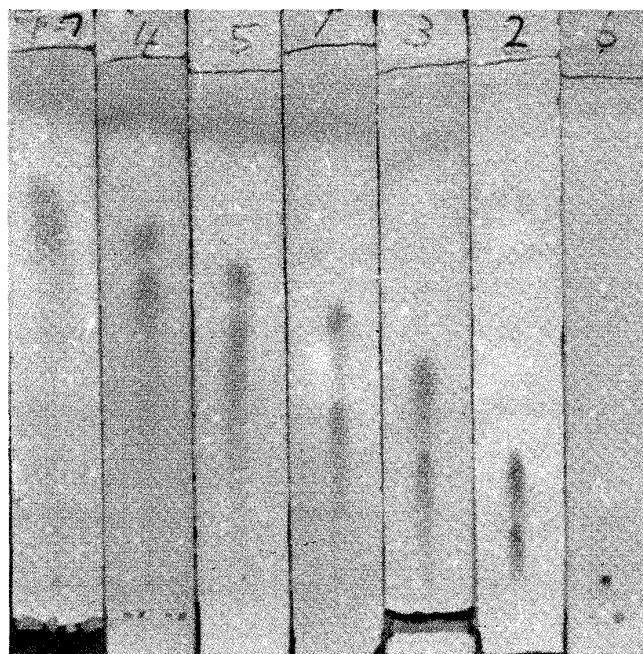
呈色方法

- ① ナフトレゾルシン・リン酸試薬法
- ② アンモニア性硝酸銀試薬法
- ③ アニリン水素フタル酸試薬法
- ④ 過マンガン酸カリウム試薬法
- ⑤ ベンジジン試薬法
- ⑥ ジフェニルアミン・アニリン試薬法

呈色スポットは左からブドウ糖、果糖、ショ糖の順である。

第2図 シリカゲル薄層を用いて

クロロフォルム：メタノールによる展開結果

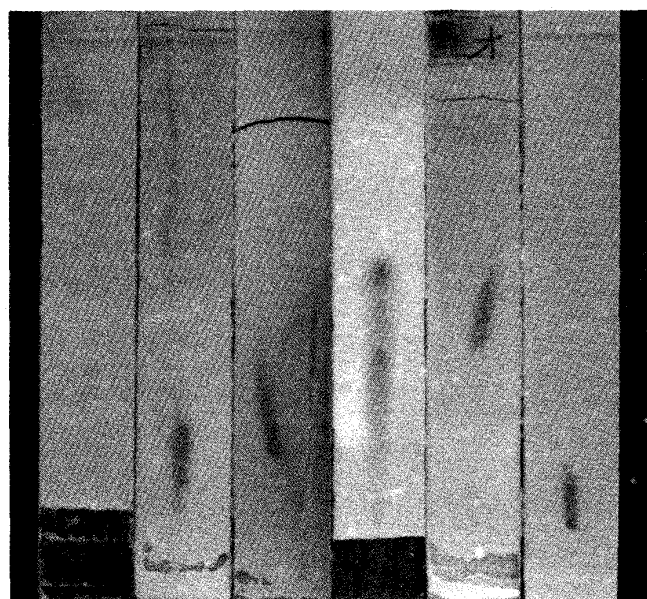


クロロフォルム	0	2	3	4	5	6	10
メタノール	10	8	7	6	5	4	0

(表中の数字はクロロフォルム：メタノールの割合を示すものである。)

スポットは上からブドウ糖、果糖、ショ糖の順である。

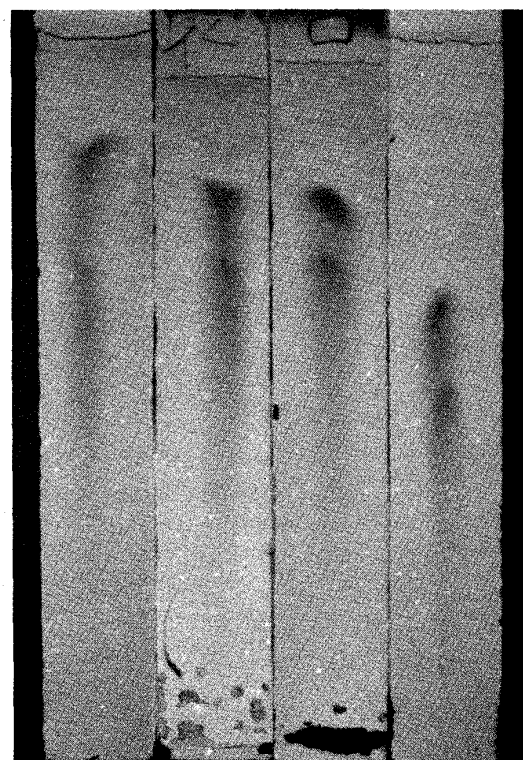
第3図 シリカゲル薄層を用いての 各種展開溶媒による展開結果



N ブ タ ノ ール	ビ リ : ジ : 水	N ブ タ ノ ール	ア セ : ト : 水	N ブ タ ノ ール	酢 : : 水	ク ロ ロ フ ォ ル ム	メ タ ノ ール	メ タ ノ ール	ア セ : ト : 水	ク ロ ロ フ ォ ル ム	メ タ ノ ール	酢 : : 水	
6	4	3	4	5	1	4	6	4	5	1	8	1	1

第4図 シリカゲル薄層を用いての

多重展開法による分離実験の結果



展開数(回) 4 3 2 1

スポットは上からブドウ糖、果糖、ショ糖の順である。

ジン：酢酸：水の酢酸エチルとピリジンの混合割合を変えたものを使用した。その結果、セルロース薄層自体が濃青色の呈色を示すので、展開後検出処理をしてもスポットの観察が非常に困難であった。

3. シリカゲル薄層による3種の糖質の分離実験を行った。始めに展開溶媒にクロロフォルムとメタノールを種々の割合に変えた溶媒を用いて展開した。次に糖質の分離に一般的に用いる溶媒6種について展開を行った。その結果、シリカゲル薄層による展開には、種々の展開溶媒の中でもクロロフォルムとメタノールの割合が4：6の溶媒にすぐれた分離能がみられた。
4. シリカゲル薄層による3種の糖質の多重展開を、展開溶媒にクロロフォルム：メタノール（4：6）を用いて行った。その結果、展開を重ねるほどスポットは不鮮明となる傾向がみられ、またこの展開溶媒では特に多重展開の必要性はみられなかった。

文 献

1. V. Rrey, H. Berbalk, M. Kausz : *Mikrochim. Acta*, 1961, 968
2. S. M. Partridge : *Biochem. J.*, 42, 238 (1948)
A. A. Benson, J. A. Bassham and M. Calvin et al : *J. Biol. Chem.*, 196, 703 (1952)
W. E. Trevelyan, D. P. Procter and J. S. Harrison : *Nature*, 166, 444 (1950)
3. S. M. Partidge : *Nature*, 164, 443 (1949)
4. E. Pascu, T. P. Mora, P. W. Kent : *Science*, 110, 446 (1949)
5. J. S. D. Bacon, J. Edelman : *Biochem. J.*, 48, 114 (1951)
6. R. W. Bailey, E. J. Bourne : *J. Chromatog.*, 4, 206 (1960)
J. L. Buchan, R. I. Savage : *Analyst*, 77, 401 (1952)
7. 友田正司：別冊蛋白質核酸酵素，共立出版 30 (1968)
8. P. G. Pifferi : *Anal. Chem.*, 37, 925 (1965)