糖類の一新定量法, TLC-gallic acid 法

Determination of Free Sugars —The Method of TLC-Gallic acid—

(昭和 45 年 10 月 23 日 受 理)

山 添 義 隆*
(Yoshitaka Yamazoe)

The method of thin layer chromatography was investigated as a possible means of separating and determining free sugars.

The best results were obtained with cellulose powder (Avicel SF) as carrier and ethyl acetate, pyridine, acetic acid, water (5:5:1:3) as mobile solvent.

Sugars were determined by the new quantitative method of measuring the color produced by reaction with 0.1% gallic acid at 550 m μ in conc. sulfuric acid.

The method of TLC-gallic acid was comparable to Wolf from's method.

糖類の薄層クロマトグラフィー (TLC) による分離定量についての研究論文は多く、遊離糖のような水溶性の高い物質の分離には固定相として cellulose, Kieselgur が適当といわれる。cellulose の場合は結合剤を必要としない点、調製された薄層が極めて安定であるし扱い易いという利点がある。したがって糖類への分析応用例は多い^{1)~6)}。著者も微結晶 cellulose Avicel SF を用いて遊離糖の分離検出を試み、これが極めて分離能の良いことを確かめた。とくに糖含有量の比較的少ない食品、例えば魚肉などについては Avicel SF を 1% ホウ酸水溶液で処理懸濁して調製した TLC により好成績を得ることができる。

糖類の定量法としてはフェノール硫酸法など多くの方法が確立されている。近年、TLC で分離したのちこれを抽出し、抽出液を発色させ比色定量する方法が試みられ成果をあげている。Vomhof ら⁷⁾は微結晶 cellulose を用いて分離したのちアンスロン法により定量し、Wolf from ら⁸⁾も微結晶 cellulose を水素化ホウ素ナトリウムで還元した担体により分離したのち比色定量を行なっている。

Loewus⁹⁾は cellulose MN 300 で分離し、この呈色部を 90% アセトンで溶出したのちアンスロン・硫酸法で定量している。Wilson¹⁰⁾は Avicel で分離したのちアニリンフタレート試薬で発色させ、この呈色部を削りとりさらにアニリンフタレート試薬を加え加熱処理したのちアセトン・濃塩酸で抽出し、その抽出液について比色定

量している。アニリンフタレート試薬を加え抽出後比色定量するものとしていくつかの報告^{11)~13)}もある。

著者も糖類がかなりの低濃度でも gallic acid とよく反応し呈色することを認めた¹⁴⁾。

微結晶 cellulose Avicel SF による TLC により分離した糖を試験管にとり水を加え攪拌器で 1~5 分攪拌することにより定量的に回収することができた。この抽出液を gallic acid と反応させ生ずる呈色液を比色し定量する方法を試み回収率 90% 以上の精度で測定することができた。本法によれば Loewus 法、Wilson 法に比べ比較的簡便に、Wolf from 法と同程度の精度で定量することができる。

実 験 方 法

試料ならびに検液調製：標準糖液として L-アラビノース、D-フルクトース、D-ガラクトース、D-グルコース、D-ラクトース、マルトース、マンノース、L-ラムノース、シュクロースおよび D-キシロースの 10 種 (和光純薬、特級) でそれぞれ 1% 水溶液および 1% ホウ酸水溶液を調製し必要に応じてその 2 μ l, 5 μ l, 10 μ l および 20 μ l を採取した。

魚肉からの糖の抽出：魚肉 (ムツゴロウは背肉部、ワラスボ素干品は頭部、尾部を除く全体) の一定量を取りこれに倍量の水を加えホモジェナイズし 3,500 r.p.m., 15 min 遠心分離する。生じた沈澱は水で 2 回洗浄し遠心分離する。合した上澄に 7% 水酸化バリウム水溶液、5% 硫酸亜鉛水溶液のそれぞれを抽出に用いた水の 1/4 量順に加える。よく攪拌したのち遠沈する。生じた沈澱は水

* 長崎女子短期大学栄養化学研究室

で2回洗浄し、上澄は合してイオン交換樹脂 IR-120 を詰めたカラム (2×10cm) および Duolite A₄ を詰めたカラム (2×10cm) を順に通過せしめ糖を捕集する。溶出液は減圧濃縮して TLC 用液とする。

薄層の調製：固定相として微結晶 cellulose, Avicel SF (旭化成 KK) を使用。調製は (1) Avicel SF 10 g を水 28ml に懸濁する。(2) Avicel SF 10 g に 1% ホウ酸水溶液 28ml を加え懸濁する。薄層は 0.25mm の厚さとし、30分間風乾のち 60~80°C で20分乾燥したのち使用した。別に Chromatogram sheet (東洋紙KK) と TLC Aluminum sheet (Kiesel F₂₅₄, Merck) を用いた。

展開後比色定量までの処理：試料糖液の 2 μ l, 5 μ l, 10 μ l および 20 μ l をそれぞれ塗布する。展開後一夜風乾し、更に 60~80°C で2時間乾燥し溶媒を蒸発させる。発色剤としてアニリン・フタレート試薬⁹⁾ を噴霧し 110~120°C, 15分で発色させる。次に発色部を削りとり小型遠心分離管に入れ 5 ml の水を正確に加え攪拌器で 80~160r.p.m., 1~5分振盪する。攪拌器はケミスター MD90 (東京理化工KK) を使用した。この型の攪拌翼は最小のもので13 ϕ である。小型の遠心管には使用不可能であったので、この攪拌器の軸にポリエチレン管を取りつけ先端に、深く切り込みを入れ羽根を付け使用し

た。この溶出液を比色定量用液とする。着色のはなはだしい時は極く少量の活性炭を加え4,000r.p.m., 15分遠心分離しその上澄を使用する。糖は活性炭に吸着されるので遠心分離後の活性炭を集め水 5 ml を加え再び攪拌器で振盪溶出する。

gallic acid による定量：比色定量用液 0.5ml を採りこれに gallic acid (0.1%水溶液) 1 ml を加える。この混合液の入った試験管を冷水中に浸し管壁に添って濃硫酸 4 ml を静かに注ぐ。これを 140°C の油浴中10分加熱発色させる。生じたピンク呈色液の 550m μ における吸光度を測定する。ブランクとして TLC の発色部以外の発色剤の噴霧された部分を削りとり定量操作と同様の処理をする。

実験結果および考察

分離溶媒と各糖類の R_f 値：Avicel SF を担体として一般にペーパークロマトグラフィーで用いられる展開剤を使用しその分離検出を試みた。結果は Table 1 に示す通りである。展開時間、分離能および発色剤による呈色斑の明瞭度などを考慮して溶媒 ①, n-ブタノール, 酢酸, 水 (3:1:1) を最適溶媒として選定した。また、種々の条件によって単位時間展開の R_f 値に変動が認められるので2重および5重展開を行なった。すなわち、

Table 1. R_f values of sugars

Adsorbent	Avicel S F												F-254*	Sheet*
Solvent	④	④	①	①	①	②	③	⑤	⑥	①	④	④	④	④
	Standards									Mutugoro			Standards	
Development	1	3	1	2	5	1	1	1	1	1	1	3	1	1
arabinose	0.40	0.76	0.23	0.32	0.59	0.28	0.38	0.31	0.45				0.42	
fructose	0.35	0.73	0.29	0.43	0.73	0.25	0.35	0.33	0.42	0.26	0.34	0.74	0.39	0.28
galactose	0.30	0.69	0.20	0.27	0.57	0.16	0.30	0.20	0.23	0.20	0.28	0.68	0.34	
glucose	0.32	0.70	0.25	0.34	0.61	0.17	0.26	0.25	0.30	0.23	0.31	0.71	0.30	
lactose	0.14	0.48	0.05				0.24	0.14	0.30				0.28	
maltose	0.23	0.56					0.24	0.15	0.26				0.26	
mannose	0.37	0.72	0.27	0.39	0.71	0.15	0.31	0.30	0.42				0.35	0.33
rhamnose	0.55	0.88	0.40	0.25		0.20	0.45	0.51	0.84				0.50	0.34
sucrose	0.17	0.66	0.15		0.42		0.25	0.17	0.29	0.17			0.29	
xylose	0.46	0.89	0.32				0.36	0.34	0.60		0.48	0.90	0.40	

- Solvent ① BuOH, AcOH, H₂O (3:1:1)
 ② AcOH, acetone, MeOH, benzen (5:5:20:70)
 ③ EtOAc, iso-PrOH (65:35)
 ④ EtOAc, pyridine, AcOH, H₂O (5:5:1:3)
 ⑤ phenol, 1% NH₄OH (2:1)
 ⑥ EtOAc, pyridine, H₂O (40:11:6)

* Kieselgel F₂₅₄ (Merck),

** Chromatogram sheet (Toyo Roshi Co.)

標準糖液としてのガラクトース、フルクトース、マンノース、グルコース、シュクロースの各1%水溶液およびこの5種の糖の混合液を5重展開したものである。本法による糖の確認検出限度はシュクロースを除き0.1 γ で定量に際しては5 γ 以上で無理なく行なえる。

さらに糖とホウ酸の錯化合物をつくることにより、その分離能を高めるために、1%ホウ酸水溶液で処理した Avicel SF を担体とする TLC による分離を行なった。すなわち、標準糖液のそれぞれを5 μ l あて TLC 板に帯状に塗布し、溶媒①により上昇法で展開した。結果を Table 2 に示す。予期に反して Rf 値は低く、とくに著者が目的とする魚肉組織中に存在することが予想される糖類グルコース、ガラクトースおよびフルクトースなどの分離能はよくない。そこで溶媒④いわゆる Fisher-Nevel の溶媒⁹⁾による展開を試みた。この結果も Table 2 に示した。すなわちホウ酸未処理の TLC で溶媒①による2重展開よりも高い Rf 値が得られ分離能もよい。3重展開では溶媒①による5重展開よりもよい成績が得られる。ホウ酸未処理の TLC を用い溶媒④により展開してもかなりよい結果が得られる。このようにして微結晶 cellulose Avicel SF を1%ホウ酸水溶液で懸濁処理した TLC 板と展開溶媒として酢酸エチル、ピリジン、酢酸、水 (5:5:1:3) を用いることにより良好な分離像を得ることができた。実例として半鹹水性魚類 (ハゼ科のムツゴロウとワラスポ) の TLC を行ないフルクトー

Table 2. Rf values of sugars

Adsorbent	Avicel S F Sheet*					
Suspension	1 % H ₃ BO ₃					
Solvent	①	④	④	④	④	④
	Standards			Mutu-goro	Wara-subo	Standards
Development	1	1	3	3	3	1
arabinose	0.09	0.43	0.78			0.46
fructose	0.05	0.38	0.74	0.76	0.76	0.52
galactose	0.04	0.34	0.70	0.70		0.55
glucose	0.05	0.37	0.72	0.72		0.50
lactose	0.02	0.17	0.50			
maltose	0.03	0.25	0.58			0.56
mannose	0.04	0.40	0.75			
rhamnose	0.02	0.57	0.91			
sucrose	0.03	0.20	0.67			
xylose	0.05	0.47	0.81	0.80		0.57

Solvent ① BuOH, AcOH, H₂O (3:1:1)

④ EtOAc, pyridine, AcOH, H₂O (5:5:1:3)

* Chromatogram sheet (Toyo Roshi Co.)

ス (Rf 0.76), ガラクトース (Rf 0.70), グルコース (Rf 0.72) およびキシロース (Rf 0.80) の4種の遊離糖を分離検出した。

溶出: リボースとグルコースをPPCで分離し、アニリン・フタレート試薬で発色させ、この呈色部を酢酸で抽出し480m μ で比色定量する Jones¹⁵⁾の方法に従いグルコースを用いて追試したところ回収率は76~80%であった。これは濾紙上の発色スポットが完全に酢酸に移行しない結果であろう。

そこで発色後のスポットを削りとり試験管に入れ、これにアニリン・フタレート試薬を0.5ml加え、105~110°C 1時間加熱し、冷却後アセトン・濃塩酸 (100:4) 4mlを加え、1時間放置後3,000r.p.m., 15分で遠沈しその上澄を比色する Wilson¹⁰⁾の方法により糖の溶出効果をみた。Table 3に示すような結果を得た。このWilson法では発色剤として2度にわたりアニリン・フタレートを使用しており、しかも発色スポットからの溶出から比

Table 3. Absorption coefficient of TLC-gallic acid method, Wilson's method and Wolfrom's method (glucose 20 γ)

Methods	at 550 m μ		
	TLC-gallic a	Wilson	Wolfrom
H ₂ O+gallic acid+H ₂ SO ₄	0.00	0.00	0.00
non color spot of area	0.01	0.06	0.01
color sopt area	0.16	0.14	0.17
glucose (20 γ)	0.30 ₀	0.28	0.32

色定量までの操作に3時間を必要とする。しかし、TLC-gallic acid法では2時間以内で終了する。また、発色スポットからの糖の溶出に際して有機溶媒を必要とせず冷水、温水で目的が達せられる。糖の溶出効果をみたところ、80~160r.p.m., 1~5分攪拌器で攪拌振盪することによって90%以上の溶出が可能であった。Table 3は TLC-gallic acid法、Wilson法およびWolfrom法による溶出効果を吸光度で示したものである。すなわち、発色部を削りとりWilson法では20分間に5回攪拌振盪し、Wolfrom法とTLC-gallic acid法では80~160r.p.m., 3分攪拌振盪後、吸光度を測定したものである。TLC-gallic acid法はWilson法に比べ成績はよくWolfrom法に比べても劣るものではない。

吸収曲大の測定: 各糖の0.1%水溶液0.01mlを試験管にとりこれに0.1% gallic acid 1mlを加えよく混和し10分室温放置する。次に冷水中にこの混液を入れた試験管を浸し管壁に添って静かに4mlの濃硫酸を徐々に

Fig. 1. Absorption curves of sugars

Fig. 2. Absorption curves of sugars (1% H_3BO_3 sol.)

注ぐ。この添加処理如何によって吸収曲大に変動がみられることがあるので注意を要する。これを $140^{\circ}C$ の油浴中 20 分反応させてのち 30 分室温放置または冷水にて急冷し、その呈色液（ピンクまたは紫紅色）を日立 101 型分光光度計で比色測定する。Fig. 1 に示すように 4 糖共に $550m\mu$ に吸収曲大が認められる。この吸収曲大は沸騰水中で処理すると $470m\mu$ 付近にずれる。呈色も薄茶色となる。Fig. 2 は糖の 1% ホウ酸水溶液についての吸収曲大を示したもので変動は認められない。

硫酸量および gallic acid 濃度の検討：糖液を発色させるについての濃硫酸量と gallic acid の濃度について

Fig. 3. Relation to color and sulfuric acid (glucose, 10γ)

Table 4. Effect of administration of conc. sulfuric acid and gallic acid on the color of sugars

glucose	conc. H_2SO_4 (ml)	gallic acid (0.1% ml)	color	O. D. at $550 m\mu$
100	4	1.0	pink	1.50
	4	0.5	"	1.30
	6	1.0	violet	0.80
	6	0.5	yellow	0.42
50	4	1.0	pink	0.65
	4	0.5	"	0.50
	6	1.0	yellow	0.33
	6	0.5	"	0.14
10	4	1.0	pink	0.25
	4	0.5	"	0.16
	6	1.0	yellow	0.11
	6	0.5	"	0.04
5	4	1.0	pink	0.10
	4	0.5	"	0.07
	6	1.0	yellow	0.05
	6	0.5	"	0.02

time 10 min., temp. $140^{\circ}C$

検討した。 $140^{\circ}C$ 、10 分油浴中で加熱反応させた結果は Table 4 に示される。 Fig. 3 はグルコース 10γ について硫酸量と発色との関係をみたものである。濃硫酸 4ml に対し、0.1% gallic acid 1ml を用いたとき最大の発色を示す。 Table 4 に示したようにその他の条件では本来の呈色を示さず適当でないことがわかる。 Table 5 は TLC 処理の後発色スポットを削りとり 5 ml の水で抽出しその抽出液を種々の濃度の gallic acid により発色さ

Table 5. Effect of administration of gallic acid on the color of sugars

gallic acid	fructose	glucose	sucrose	galactose	mannose	rhamnose	arabinose	xylose
0.05% 0.5ml	0.080	0.070	0.040	0.080	0.040			
0.1 % 0.5ml	0.250	0.220	0.200	0.227	0.172	0.023	0.080	0.080
0.1 % 1.0ml	0.260	0.225	0.232	0.320	0.175	0.050	0.100	0.120
1.0 % 0.5ml	0.140	0.100	0.090	0.102	0.080	0.010	0.010	0.040
1.0 % 0.1ml	0.125	0.090	0.060	0.100	0.050			

O. D. at 550 m μ , time 10 min., temp. at 140°C, conc. H₂SO₄ 4 ml

Fig. 4. Effect on color development with time and temperature (fructose)

せたものの吸光度である。その結果、0.1% gallic acid で最も高い吸光度を示す。

発色時間および発色温度の検討：各糖液の 0.1% 水溶液 0.01ml に 0.1% gallic acid 1 ml と濃硫酸 4 ml を加え反応時間と温度について検討したのが Fig. 4~8 である。140°C, 30 分加熱することにより最大の発色を示し、かつ吸光度は直線的となる。吸光度測定に使用した日立 101-C03 型分光光度計の測定精度は吸光度 0~0.5 の範囲で最適とされる。よって 140°C, 10 分の加熱処理を最適条件とした。

この発色の機構は gallic acid と glycoaldehyde の反応において前者 1 g は水の 87mg にとけ、この水溶液は CH₂OH, CHO と反応しピンクを呈する。また, methylen digallic と CHO, OH とが反応して glucogalline (glucogallic acid) を形成し、ピンクまたは紫紅色を呈する。

本研究における糖と gallic acid との反応も上記と同じく配糖体をつくることによりピンクに呈色するものと

Fig. 5. Effect on color development with time and temperature (galactose)

考えられる。

標準曲線：各糖の 0.01mg/ml, 0.05mg/ml, 0.1mg/ml および 0.2mg/ml の水溶液を調製し、0.1% gallic acid 1 ml と特級濃硫酸 4 ml を冷水中で静かに加え、140°C の油浴中 10 分加熱反応させ生じた呈色液を比色する。原点を通る直線が得られる。

呈色液の安定度：糖含量 5 r, 10 r および 50 r の水溶液を用い呈色液の安定度をみたのが Fig. 9 である。油浴中 10 分加熱し反応終了後 30 分室温放置（または、加熱処理後急冷してのち）してから 30 分間は安定であることがわかる。

発色阻害物質：gallic acid とアミノ酸およびいくつかの有機酸との発色度合を調べたところ、50 r/ml までは全く反応阻害が認められない。500 r/ml では有機酸のうち α-ケトグルタル酸とオギザロ酢酸、酒石酸などが 0.100~0.322 の吸光度を示した。しかし、これらの物質は糖本来のピンクでなくブルーに呈色する。しかも、TLC によって糖類とは分離することが可能である

Fig. 6. Effect on color development with time and temperature (glucose)

Fig. 7. Effect on color development with time and temperature (sucrose)

し、定量におよぼす影響はない。

ホウ酸の発色におよぼす影響：TLC を行なうのにホウ酸懸濁 Avicel SF を調製使用するの、とくにホウ酸の発色におよぼす影響について検討してみた。その結果ホウ酸 100 γ 含有液の 550m μ における吸光度は 0.021 で障害は認められない。

回収率の検討：各糖の 1% 水溶液を用いその 1 μ l, 5

Fig. 8. Effect on color development with time and temperature (xylose)

Fig. 9. Stability of color (glucose)

μ l, 10 μ l および 20 μ l を Avicel SF による TLC 板に塗布、展開後乾燥し 5 ml の水で抽水したものについて回収率をみた。結果を Table 6 に示す。回収率は 90~100% である。また、グルコース、ガラクトースについて本法、Wilson 法および Wolfrom 法について検討したところ Table 7 のような結果を得た。すなわち、本法は Wilson 法に比べ操作も比較的簡便であり回収率も高く、Wolfrom 法に近い精度で定量できることが認められ、食品分析に利用できる。

Table 6. Recovery of free sugars

Sample (1%, sol.)	galactose		fructose		glucose		sucrose*		xylose	
	A. V. (r)**	recovery (%)	A. V. (r)	recovery (%)	A. V. (r)	recovery (%)	A. V. (r)	recovery (%)	A. V. (r)	recovery (%)
1 μ l (10 r)	8.8	88	9.2	92	9.2	92	9.0	90	9.1	91
5 μ l (50 r)	45	90	48	96	45	90	44.5	89	47	90
10 μ l (100 r)	100	100	92	92	95	95	94	94	96	96
20 μ l (200 r)	178	89	180	90	180	90	200	100		

* non H₃BO₃ sol.

O.D. at 550m μ

** analytical value

Table 7. Recovery of sugars

	TLC-gallic acid		Wilson's method		Wolfrom's method	
	A.V.* (r)	recovery (%)	A.V. (r)	recovery (%)	A.V. (r)	recovery (%)
glucose (10 r)	9.5	95	8.2	82	9.7	97
galactose (10 r)	8.8	88	8.0	80	9.2	92

* analytical value

O.D. at 550m μ

要 約

Avicel SF を用いた TLC による糖の分離を行ない、分離した糖を gallic acid と加熱反応させて生ずる呈色液を 550m μ で比色定量する糖の一新定量法を試み、精度よく定量することができた。

(1) 担体としてホウ酸処理した Avicel SF を用い、展開溶媒に酢酸エチル、ピリジン、酢酸、水 (5:5:1:3) を使用することにより10種の糖の分離、検出を行なった。

(2) (1)により分離した糖を0.1%の gallic acid と加熱反応させ、生ずる発色液を 550m μ の波長で比色定量する。回収率は90%以上であった。

(3) PPC法においてのアニリン・フタレート試薬による発色斑からの糖類の回収率は悪く定量法としては適当でないが、本法では PPC よりも比較的容易に回収でき Wilson法に比べ簡便であり回収率も高く Wolfrom法と同程度の精度であった。

本研究において有意義なご助言を賜った長崎大学医学部生化学教室松田源治教授に深謝致します。また、試料の採取に協力して頂いた佐賀短大石井勝三講師、本学

川副都助教授およびクロマトグラフィーを一部担当して頂いた本学中島靖子講師に感謝致します。

文 献

- 1) Vomhof, D. W., Tucker, T. C.: *J. Chromatog.*, **17**, 300 (1965)
- 2) Schweiger, A.: *ibid.*, **9**, 374 (1962)
- 3) Dyatlovistskaya, E. V., Voronkova, V. V., Bergelson, L. D.: *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, **145**, 325(1962); *Chem. Abst.*, **57**, 157806 (1962)
- 4) Gunther, H., Schweiger, A.: *J. Chromatog.*, **17**, 602 (1965)
- 5) Esser, K.: *ibid.*, **18**, 414 (1965)
- 6) 友田正司: 薬学雑誌, **87**, 207 (1965)
- 7) Vomhof, D. W., Truitt, J., Toker, C. T.: *J. Chromatog.*, **21**, 335 (1966)
- 8) Wolfrom, M. L., Rosa, M., de Lederkermer, Schwab, G.: *J. Chromatog.*, **22**, 474 (1966)
- 9) Loewus, F.: *Anal. Chem.*, **24**, 219 (1952)
- 10) Wilson, C. M.: *Anal. Chem.*, **31**, 1191 (1959)
- 11) Blass, J., Macheloeuf, M., Nanez, G.: *Bull. Soc. Chem. Biol.*, **32**, 130 (1956)
- 12) Schaefer, W. C., Van Cleve, J. W.: *Anal. Chem.*, **28**, 1290 (1956)
- 13) Jones, N. R.: *Analyst*, **85**, 111 (1960)
- 14) 山添義隆, 津村江美代: 日本栄養・食糧学会西日本支部大会 (第20回) 講演
- 15) Jones, N. R.: *Biochem. J.*, **68**, 704 (1958)