ワラビ (*Pteridium aquilinum* var. *latiusculum* Und.) および
ヤマドリゼンマイ (*Osmundastrum cinnamomeum* var.
fokiense Tagawa) の遊離糖類について**

中村秀子*, 渡部賢二, 水谷純也
(*北海道教育大学, 北海道大学農学部農芸化学科)

昭和 46 年 11 月 22 日 受理

The Free Sugars of the Warabi (*Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*
Und.) and Yamadori-zenmai (*Osmundastrum cinnamomeum*
var. *fokiense* Tagawa) [Note]
(Taste Substances in Foods Part II)

By Hideko NAKAMURA,* Kenji WATANABE and Junya MIZUTANI
*Hokkaido University of Education; Department of Agricultural Chemistry,
Faculty of Agriculture, Hokkaido University

As taste substances in Warabi (*Pteridium aquilinum* var. *latiusculum* Und.) and Yamadori-zenmai (*Osmundastrum cinnamomeum* var. *fokiense* Tagawa), free sugars were examined. The sugars were extracted by conventional means, tentatively identified by thin-layer chromatography, and were converted to O-trifluoroacetyl-sugars, which were then quantitatively analyzed by gas chromatography on Silicone DC QF-1.

The linear temperature-programmed procedure was used to separate an authentic mixture of rhamnose, arabinose, xylose, fructose, galactose, mannose, glucose, sucrose, maltose, lactose and inositol into each component. Linearity of area ratio (sugar/inositol) versus molar ratio (sugar/inositol) was confirmed with arabinose, fructose, glucose and sucrose, respectively.

Glucose and fructose were detected, and glucose was the major component (70~80%) of free sugars of Warabi and Yamadori-zenmai. (Received November 22, 1971)

前報⁽¹⁾において、食品成分とそれらの呈味効果を明らかにするために、タラの芽およびグリーンアスパラガス中の遊離アミノ酸の中性、酸性区分について検討し、標準アミノ酸で再現した各区分の呈味性について官能検査を行ない、報告した。

本報では、食品中の糖類も呈味成分として重要な働きをしていると考えられるので、タラの芽およびグリーンアスパラガスと同時に研究を進めているワラビとヤマドリゼンマイを試料として、遊離糖類の定量を試みた。

これまで食品中の遊離糖類の分別定量については、イ

オン交換樹脂、カラム、ペーパー、薄層などの各種クロマトグラフ法と、比色法や酵素法との組合せで行なわれていたが、それらはいずれも非常に煩雑な操作を含み、時間とテクニックを要するものであった。近年、それらにかわる迅速な定量法として、ガスクロマトグラフィーによる分析が種々検討されてきた⁽²⁾。Sweely ら⁽³⁾によって確立された糖類のトリメチルシリル (TMS) 誘導体による分析方法は、いろいろな分野で今日広く応用されている。最近、Mason and Slover⁽⁴⁾ は、糖をオキシムにしてから TMS 化を行ない、還元糖が数本のピークを生じるという難点を解決し、小麦やその加工品中の糖類の定量を報告している。

** 食品の呈味成分に関する研究 (第 2 報)。文献 (1) 参照。

TMS 基とともに, アミノ基の保護基として注目されていたトリフルオロアセチル (TFA) 基を糖類に用いることは, Vilkas ら⁽⁶⁾や上野ら⁽⁶⁾によってなされ, また Shapira⁽⁷⁾ は糖を還元してアルディトールとし, それらを TFA 化して分離を試みている. TFA 基は大きな極性を有し, それまでの TMS 誘導体よりも, はるかに低温で分析でき, その誘導体は安定で普通のステンレスカラムでも容易にピークがえられるなどの利点があり, 食品成分研究の分野への応用が待たれていた. ここでは, Vilkas らの方法をもとに, 糖類の TFA 化の条件, えられた TFA 誘導体のガスクロマトグラフィーにおける

定量性について検討した.

薄層クロマトグラフィー (TLC) により, Fig. 1, Table I の結果をえた. ワラビおよびヤマドリゼンマイには, グルコースとフラクトースが確認された. また, ワラビ中に, ラクトースの R_f 値とはほぼ一致するが, 発色剤の呈色の異なるスポットが認められた. Fig. 2 は, ガスクロマトグラフィー (GLC) において, 内部標準として使用したイノシトールの TFA 誘導体を, 上野らの方法で合成したものの MS と IR である. このものと, われわれの方法で TFA 化したイノシトールの GLC における保持時間, および GC-MS のフラグメンテーションは完全

Fig. 1. Two-dimensional Thin-layer Chromatograms of Sugars Obtained from Warabi and Yamadori-zenmai.

1: fructose, 2: glucose, 3: unknown.

Fig. 2. Mass Spectrum and IR Spectrum (KBr disk) of Hexa-O-TFA-inositol.

Table I. Relative *R_f* Values and Color Reactions of Standard Sugars and Qualitative Determination of Sugars

Sugar	<i>rR_f</i> (glucose)		Color reaction		Warabi	Yamadori-zenmai
	B-A-W ¹⁾	P-E-A-W ²⁾	A-P ³⁾	B-T-A ⁴⁾		
Rhamnose	1.62	1.76	yellow	yellow		
Arabinose	1.14	1.18	reddish brown	brown		
Xylose	1.15	1.43	reddish brown	chocolate		
Galactose	0.91	0.84	brown	brown		
Glucose	1.00	1.00	brown	brown	≡	≡
Fructose	1.08	1.18	brown	yellow	+	+
Mannose	1.13	1.36	brown	brown		
Lactose	0.77	0.47	yellow	brown		
Maltose	0.89	0.68	brown	brown		
Sucrose	0.84	0.54	brown	brown		
Unknown	0.77	0.46	reddish brown	brown	+	

¹⁾ Solvent system : *n*-butanol-acetic acid-water (4:1:5, v/v, upper layer), ²⁾ solvent system : pyridine-ethyl acetate-acetic acid-water (4:1:5:5, v/v), ³⁾ spray reagent : aniline-phthalate, ⁴⁾ spray reagent : benzidine-trichloroacetic acid.

に一致した。

Fig. 3 は, 標品糖類の TFA 誘導体のガスクロマトグラムで, 各ピークは 10^{-8} モルに相当している。それらのうち, α -D-グルコースとマンノースの保持時間は, 全く一致した。マルトースは, α と β によると思われるピークを生じ, 標品マルトースの純度の問題があると考えられたので, マルトースの定量性についての検討は行な

Table II. Relative Molar Response of O-TFA-Sugars¹⁾

Sugar	RMR ²⁾				
	1	2	3	4 ³⁾	<i>A_v</i>
Rhamnose	0.646	0.657	0.666	0.626	0.649
Xylose	0.585	0.564	0.566	0.572	0.572
Arabinose	0.570	0.581	0.583	0.593	0.582
Inositol	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Fructose	0.542	0.540	0.555	0.536	0.543
Galactose	0.616	0.614	0.633	0.625	0.622
Mannose	0.639	0.613	0.598	0.650	0.625
Glucose	0.722	0.713	0.709	0.698	0.709
Sucrose	1.070	1.167	1.144	1.118	1.118
Lactose	0.816	0.853	0.860	0.822	0.822

¹⁾ Relative molar response (RMR) of inositol assigned a value of 1.000.

²⁾ $RMR = \frac{A_{\text{sugar}}}{\text{moles}_{\text{sugar}}} / \frac{A_{\text{inositol}}}{\text{moles}_{\text{inositol}}}$
 A_{sugar} = area in counts of sugar peak.
 $\text{moles}_{\text{sugar}}$ = moles of sugar.

³⁾ Each value represents an independent determination.

わなかった。Table II に, マルトース以外の標品糖類の RMR を示した。それらの糖のうち, アラビノース, フラクトース, グルコース, シュクロースについて, モル比をかえてその定量性を確認したのが, Fig. 4 である。なお, グルコースと示したのは, α -D-グルコースを用いて求めたものである。

ワラビやヤマドリゼンマイから調製した試料液中で, グルコースは α と β が平衡状態で存在しているため, これを濃縮乾固して TFA 化を行なうと, α と β の二つのピークを生じる。その割合は, 濃縮乾固時の条件により一定しない

が, 今回は二つのピーク面積を合計したものから, グルコースの定量を行なった。なお, α -D-グルコースの一定量を水溶液として平衡させた後, 誘導体化を行なって生じた二つのピーク面積の合計から求めた RMR は, α -D-グルコースを直接 TFA 化して求めた値と一致することは確認した。

フラクトースを同様に水溶液としてから誘導体化を行なうと, 126°C に主要なピークとともに, 128°C に小さいピークを生じる。この小さい方のピークは, 水溶液を濃縮乾固後, 無水エタノールとベンゼンで乾固を繰り返

Table III. Retention Temperature (rTemp.) of O-TFA-Sugars and Quantitative Determination of Sugars of Warabi and Yamadori-zenmai

Sugar	rTemp. (°C)	Warabi mmole/100 g	Yamadori-zenmai mmole/100 g
Rhamnose	98		
Xylose	102		
Arabinose	105		
Inositol	122		
Fructose	126	1.075	0.905
Galactose	128		
Mannose	130		
Glucose	130	4.870	2.785
Sucrose	195		
Maltose	200		
Lactose	205

Fig. 3. Gas Chromatograms of Standard O-TFA-Sugars.

- (A) 1: arabinose, 2: inositol, 3: α -glucose, 4: β -glucose, 5: sucrose.
 (B) 1: xylose, 2: inositol, 3: fructose, 4: mannose, 5: maltose.
 (C) 1: rhamnose, 2: inositol, 3: galactose, 4: lactose.

してから TFA 化を行なうと消え, 126°C のピークのみがえられた。

Fig. 5 は, ワラビおよびヤマドリゼンマイの糖類のガスクロマトグラムである。ワラビ中に認められた未知のスポットは, フラクトースの次にピークが認められたが, これについては目下検討中である。定量の結果は Table III に示した。これらの値は, 試料液の Somogyi 変法による定量によっても確認された。なお, これら糖類と呈味性との関係については, 他の呈味成分の検討と

Fig. 4. Response Linearity of Arabinose, Fructose, Glucose and Sucrose.

Fig. 5. Gas Chromatograms of O-TFA-Sugars Obtained from Warabi and Yamadori-zenmai.

- 1: inositol (I. S.), 2: fructose, 3, 4: glucose.

相まって追求する予定である。

実 験

試料は, 昭和 46 年, 北海道岩見沢市近郊産のワラビ (*Pteridium aquilinum* var. *latiusculum* Und.) とヤマドリゼンマイ (*Osmundastrum cinnamomeum* var. *fokiense* Tagawa) の可食部を 50g ずつ用いた。TLC および GLC の標品糖類として, いずれも市販の試薬特級あるいは 1 級品を使用した。D-アラビノース, D-キシ

ロース, L-ラムノース, D-フラクトース, D-ガラクトース, α および β -D-グルコース, D-マンノース, シュクロース, ラクトース, マルトース, イノシトール.

なお, イノシトールは GLC の内部標準として用い, アラビノースは合成品の D 型を使用した.

糖類の抽出 試料を細断し, 2 倍量の水を加えて 3 分間煮沸し, 放冷後ミキサーに 5 分間かけ, 抽出液を濾別した. 残留物には, さらに水を加えて攪拌し, Molisch 反応が陰性になるまで繰り返した. 抽出液と洗液を合し, エタノールを加えて 70% エタノール濃度とし, 1 夜静置後生じた沈殿物を濾去し, 濾液を 50°C 以下で減圧濃縮して, 50 ml に定容したものを試料液とした.

糖類の TFA 誘導体の調製 試料液の一定量を取り, 減圧乾固後, 無水エタノールおよびベンゼンで乾固し, デシケーター中で 1 夜乾燥させたものに, 以下の処理を行なった. なお標品物質は, そのまま一定量を取り, TFA 化を行なった.

摺合せ栓つきナス型フラスコに糖 (3~5 mg) をとり, 内部標準のイノシトールを加え, ついでトリフルオロ酢酸ソーダ 2 mg, アセトニトリル 0.2 ml, 無水トリフルオロ酢酸 0.2 ml を順次加え, フラスコの栓をワイヤークランプで止め, 70~80°C で 1.5~2 時間加熱した. この間ときどき振盪すると, 1 時間ほどで糖は完全に溶解した. 放冷後, 反応液にメチルエチルケトンを加えて一定量にし, GLC の供試料とした.

薄層クロマトグラフィー (TLC) 吸着剤としてアビセル SF (旭化成 KK 製) を用い, 常法どおり薄層とした. 展開剤は, *n*-ブタノール-酢酸-水 (4:1:5, v/v, 上層) と, ピリジン-酢酸エチル-酢酸-水 (4:1:5:5,

v/v) を用い, 上昇法二重展開で 1 次元および 2 次元展開を行なった. 発色剤は, アニリンフタレートおよびベンジジソートリクロロ酢酸のアルコール溶液⁽⁸⁾を用いた.

ガスクロマトグラフィー (GLC) 柳本ガスクロマトグラフ 550-FP (FID) を使用した. カラムは 0.3×150 cm ステンレスカラム, 1.5% Silicone DC QF-1 (酸洗クロモソルブ W, 60~80 メッシュ) を用いた. キャリヤーガス (N_2) 23 ml/min, H_2 20 ml/min, 空気 0.9 l/min, 昇温条件は 80°C (5 分間定温) → 240°C (4°C/min), 注入口温度 200°C で行なった.

終りに, 試料植物の同定をしていただきました北大農学部農業生物学科伊藤浩司助教授に御礼申し上げます.

本報は, 昭和 46 年 10 月, 日本農芸化学会北海道支部学術講演会において発表した.

- (1) 中村秀子, 渡部賢二, 水谷純也, 小幡弥太郎: 農化, **45**, 222 (1971).
- (2) 上野民夫: 化学と生物, **8**, 114 (1970).
- (3) C. C. Sweely, R. Bentley, M. Makita and W. W. Welles: *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**, 2497 (1963).
- (4) B. S. Mason and H. T. Slover: *J. Agr. Food Chem.*, **19**, 551 (1971).
- (5) M. Vilkas, H. I. Jan, Mme G. Bossae and Mme M. C. Bonnard: *Tetrahedron Letters*, **14**, 1441 (1966).
- (6) T. Ueno, N. Kurihara and M. Nakajima: *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 1189 (1967).
- (7) J. Shapira: *Nature*, **222**, 792 (1969).
- (8) J. B. Bacon and J. Edelman: *Biochem. J.*, **48**, 115 (1951).