

反応熱検出自動記録液体クロマトグラフ によるショ糖の分離定量

出 来 三 男

反応熱検出型自動液体クロマトグラフによるショ糖の分離定量について検討し、その結果測定条件を次のように定めた。すなわち、固定相担体：Dawex I×8 (100～200 メッシュ) ホウ酸型、分離カラム：0.8 × 50cm、検出カラム：0.8 × 10cm、展開溶剤：0.04 M ホウ酸カリウムに 0.04 M ホウ酸を含むもの (pH8.8)、流速：0.63ml/min、記録速度 1cm/10min、検出感度：±001 ° cfs、分離カラム、および検出カラムの温度：30、室温：20 ± 0.1 ショ糖濃度と検出ピークの振巾の間に直線関係が成立した。この方法をはちみつ中のショ糖の定量に応用した。

1. 結 言

還元性、非還元性あるいはケトースとアルドースなどのように、僅かに性質の異なる糖類は、化学的な方法により分離定量できるが、化学的性質の類似した数種以上の糖類混合物になるとそれぞれの糖類を分画した後でなければ充分な定量はできない。微量の糖類を分離するのに、ペーパークロマトグラフィーはすぐれた方法であるが、定量性に問題があることから専ら定性的方面の利用が多い。Sweeley ら¹⁾は、糖類をトリメチルシリル誘導体としてガスクロマトグラフィーで分離しているが、誘導体の調製が複雑であり、且つ色々な糖アノマーが生成するので定量にあたっては厳密な条件が要求される。

これに対して、液体クロマトグラフィーによる分離は試料調製が容易であり、また多量の試料が使用できることから広く分離手段として用いられてきた。

糖類の液体クロマトグラフィーに関する研究は、溶出時間の短縮や分離性状の向上など、充填剤や展開溶洗剤の

改良を中心とした多くの報告がみられる。Khym ら²⁾は強塩基性イオン交換樹脂を固定相として、ホウ酸塩を展開溶剤に用いると糖類はホウ酸塩複合体として分離されることを認めており、Green³⁾はこの方法を発展させて 15 種の糖類混合物を約 12 時間で分離したと述べている。

最近 Moore ら⁴⁾によつて開発されたアミノ酸分析の自動化は、自動液体クロマトグラフの改良と共に、ガスクロマトグラフィーで分析困難な不揮発性物質への応用を促進し、分離分析に広く利用されるようになった。

Samuelson⁵⁾は光電比色方式のテクニコン・オートアナライザーを用いて糖類の分析時間短縮と自動化について検討しておりさらに Kesler⁶⁾はこの自動液体クロマトグラフによりパルブ分解液中のオリゴ糖類をホウ酸塩を展開溶剤として約 4 時間で分析している。

直野ら⁷⁾は試料成分が固定相を移動していくときにおける吸脱着に伴なつておこる熱の交換反応を高感度サー

反応熱検出自動記録液体クロマトグラフによるショ糖の分離定量

ミスターにより温度変化としてとらえ、これを擬似微分曲線として記録する方法を開発した。この熱検出方式は試料成分を処理することなしに検知できるので、糖類のように紫外領域に吸収を持たず、また発色操作の自動化の困難なものの分離検出に適した方法である。

ここでは、熱検出型自動液体クロマトグラフによるショ糖の分離のための基礎条件と、定量への諸条件を検討し、これを天然はちみつ中のショ糖の定量に応用し二、三の知見を得たので報告する。

2. 実験方法

2. - 1 試 薬

2. - 1 - 1 固定相担体：強塩基性イオン交換樹脂 Dowex1×8(100~200)をピーカーにとり、2N 水酸化ナトリウムを加えて攪拌する。漏過、水洗した後 2N 塩酸で再び処理し、塩素イオンがなくなるまで水洗する。つぎに 0.5M ホウ酸カリウムで処理してホウ酸型にかえる。SephadexG10 (200 メッシュ) は展開溶剤に予め浸漬して完全に膨潤したものをを使用した。活性炭(セライトを等量混合)は 2N 塩酸で処理した後塩素イオンがなくなるまで水洗した。

2. - 1 - 2 展開溶剤：10%エタノール水溶液、或いは各種濃度のホウ酸塩を使用した。展開溶剤を調製する水は、予め煮沸したものをを用いた。

2. - 1 - 3 アンスロン試薬：アンスロン 2g を濃硫酸 1l に溶解する。この試薬は用時に調製する。

2. - 1 - 4 糖類：ショ糖、ブドウ糖、麦芽糖、果糖はいずれも試薬 1 級以上を用いた。

2. - 2 装 置

液体クロマトグラフは反応熱検出型の日本電子 KK 製 JLC - 2A 型自動記録装置を用いた。

分光光度計 (日立製 139)

2. - 3 試料の調製

標準糖類は展開溶剤に溶解した。はちみつは、その約 10g を精秤し、展開溶剤に溶解して 50ml に定容し

た後漏過或いは遠心に分離して透明液体として用いた。除蛋白質操作は行わなかった。

2. - 4 操 作

展開溶剤に分散させた担体を検出カラムと分離カラムに均一に充填する。つぎに定流量ポンプで展開溶剤を送液しながら、検出カラムの補償側、分離カラムついで検出カラムの試料側と順次連結する。送液パイプやカラムのなかに気泡が混入しないように注意しなければならない。パイプを連結した後圧力調整弁を加減してバッファータンクの圧力を一定にする。カラムの温度や圧力が一定になると記録計のベースラインは安定して直線になるので、予め展開溶剤に溶解した試料を特殊試料注入口より 1ml 注入する。

2. - 5 測定条件

主として次の条件で測定した。

検出カラム 0.8 × 10cm 分離カラム 0.8 × 50cm
検出部温度 30 分離カラム温度 30 感度 ± 0.01 °
cfs・記録計感度 10mv フルスケール、試料 5~40mg
室温 20 ± 0.1

3. 結果と考察

3. - 1 固定相担体の選択

糖類の液体クロマトグラフィーに用いられている充填剤は、主として活性炭とイオン交換樹脂である。活性炭はセライトと等量混合したものが使用されており、植物組織、澱粉加水分解物およびはちみつなどの糖組成の分析に広く使われている。一方イオン交換樹脂を充填剤としたものでは、中性糖類がそのまゝの形では吸着されないため 糖類を予めホウ酸塩複合体として分離するのが一般的である。反応熱検出型の自動液体クロマトグラフィーでも、充填剤の良否は、分離能に影響を及ぼすことが考えられるが、従来のカラム充填剤がそのまゝ使用できるかの基礎的条件の検討は少ない。そこで これまで糖類の分離に用いられてきた二、三の充填剤について検討した。

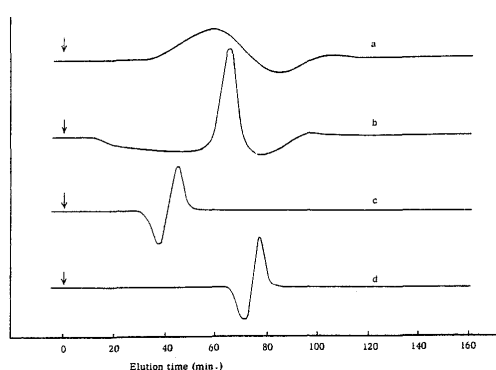


Figure 1. Detection curves of sucrose

Curve a: Dowex 1 x 8, eluent: 0.02 M $K_2O_7 + 0.02$ M H_3BO_3
 b: Active carbon, eluent 10% ethanol solution
 c: Sephadex G 10, eluent 0.02 M $K_2O_7 + 0.02$ M H_3BO_3
 d: Separation column Sephadex G 10; detection column Dowex 1 x 8, eluent 0.02 M $K_2O_7 + 0.02$ M H_3BO_3
 Sensitivity $\pm 0.01^\circ$ cfs, flow rate 0.63 ml/min., chart speed 1 cm/min., sucrose 20 mg/ml.

反応熱検出では、成分ピークは対称性の微分曲線として記録されるが、Fig・1 から判るように活性炭では検出曲線は非対称性となっている。この現象は充填剤に対する糖類の吸着が強く、10%エタノール水溶液では容易に溶出できないことを示しているものと考ええる。また活性炭粒子は極めて微細なためカラム層が密になりそのためバツファータンクの圧力は非常に高くなり、展開溶剤の送液量を落しても容易に圧力を低下させることはできなかつた。漏過助剤の混用率を高めることにより圧力をさげることができるが、そのため糖の分離能は低下すると思われる。セファデックス G10 では、ショ糖は約 30 分で溶出し、かなりシャープな微分曲線を書くが同じモル濃度の糖類の検出感度に比較して強度が小さい。分離カラムを Dowex 1×8 にし、検出カラムをセファデックスにした混合カラムを用いると、ピーク形状はセファデックスのみを用いた場合と同じであるが、溶出時間は、2 倍近く遅くなり、ショ糖の溶出に約 60 分を要した。また検出曲線の位相が逆転しているが、これは熱交換反応が逆転していることを示すものである。

さらに、Fig・2 に示したように、セファデックス G10 は分子量の異なる糖類の分離はよいが、同じ分子量

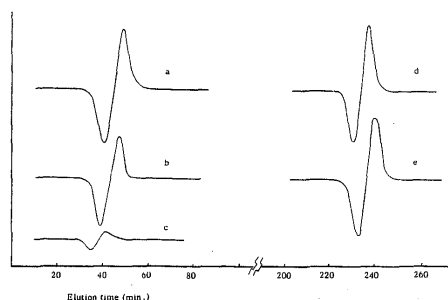


Figure 2. Detection curves of each sugars on Column with Sephadex G10

Analytical conditions are same as Figure 1.

Each sugars are used 20 mg/ml.

a: Maltose, b: Sucrose, c: Trehalose, d: Glucose, e: Fructose.

の糖類相互の分離は不充分であり、セファデックス G10 では分子篩としての効果のみを示すにすぎない。Kesler⁹⁾は pH のことなる緩衝液を段階的に用いて約 6 時間で 17 種の糖類を分離している。著者も Dowex 1×8 のホウ酸塩型の担体を用いて、シヨ糖、マルトース、グルコースおよびフルクトースを約 4 時間で分離できた。その結果を Fig.3 に示す。

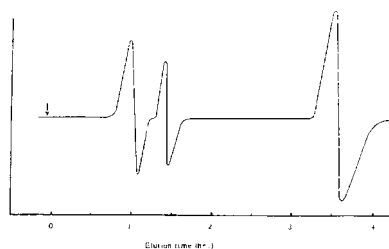


Figure 3. Separation of sucrose, maltose, glucose and fructose from each other using a borate buffer on the column with Dowex 1x8 in borate form

Eluent: 0.04 M $K_2B_4O_7 + 0.04$ M H_3BO_3 , flow rate: 0.63 ml/min., separation column 0.8φ x 50 cm., detection column: 0.8φ x 10 cm., temperature 30°C, sugar: 20 mg/ml.

Fig.3 で示したように、ショ糖に続いてマルトースが溶出しており、この両者はほとんど重複しないことは

微分曲線を積分曲線に書きなおすと明らかである。グルコースとフラクトースは、二糖類よりかなり遅れて溶出するので完全に分離できるが、両者の分離はこの条件では分画できなかつた。しかし、Samuelson らも指摘しているように、展開溶剤と展開温度を適当に選択することにより、グルコースとフラクトースの分画も可能と考えられるが、この条件において、シヨ糖の分離に他の糖類の重なりは全くないことがわかつた。

3. - 2 展開溶剤の影響

糖ホウ酸塩複合体は負に荷電しているので容易にイオン交換される。Zill ら⁸⁾は、チビニールベンゼン系アニオン交換樹脂を充填剤とし濃度や pH の異なるホウ酸塩緩衝液を段階的に用いて糖類を分離しているが、糖類の分離溶出に 60 時間という長時間を要している。Kesler この欠点を改良するため展開溶剤について検討し、食塩を含んだホウ酸塩を用いて 5 種類のペントースとヘキソースを約 5 時間で分離している。Fig 1 の結果から、この実験に適しているホウ酸型 Dowex1×8 を充填剤として、シヨ糖の溶出に対するホウ酸塩濃度の影響をしらべた。Fig 4 にその結果を示す。

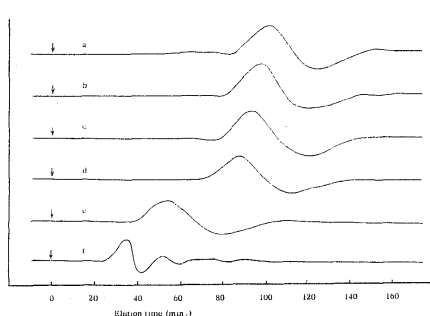


Figure 4. Influence of the borate buffer concentration upon the separation of 20 mg sucrose

Analytical conditions were same as in Figure 1.

- a: 0.005 M $K_2B_4O_7$, b: 0.01 M $K_2B_4O_7$, c: 0.05 M $K_2B_4O_7$,
 d: 0.1 M $K_2B_4O_7$, e: 0.04 M $K_2B_4O_7$ + 0.04 M H_3BO_3 ,
 f: 0.02 M $K_2B_4O_7$ + 0.04 M H_3BO_3 contained 1 N NaCl.

Fig. 4 から明らかなように、0.005M から 0.1M までの濃度範囲のホウ酸カリウム(pH10.0 ~ 10.4)はシヨ糖の溶出速度に殆んど影響を及ぼさない。しかし、最終濃度が 0.04M になるように調製したホウ酸カリウムとホウ酸混合の緩衝液(pH8.8 ~ 9.0)では溶出時間が半分に短縮され、シヨ糖は 60 分で溶出してくる。このことからシヨ糖の溶出速度はホウ酸塩の濃度より、むしろ pH に影響されることがわかる。ホウ酸塩緩衝液(pH8.8)に 1 N 食塩を添加したもので溶出速度はさらに早くなり、シヨ糖は約 30 分で溶出してくる。熱検出型では展開溶剤を段階的に変えて溶出することは、切換による機械的ショックや展開溶剤の濃度変化が記録されたりするので好ましい方法ではない。

3. - 5 溶出曲線

前述したように、反応熱検出型では、僅かなショックや不純物がすべてピークとして検知されたり、定流量ポンプによる送流量が変化したりまたバツプアータンクの圧力が変るとピーク出現の時間が変動することから、ピークの定性的意味は弱い。そこで、溶出液をフラクションコレクターで分取し、これをアンスロン試薬と 15 分加熱して発色させ、出現ピークと溶離曲線との関係をしらべた結果を Fig.5 に示す。

検出カラムの出口から排出口までの容量を補正すると検知ピークと比色法により求めた糖の溶出曲線はよく一致している。Fig. 5 からわかるように、シヨ糖が完全に溶出するまでに約 60 分を要しており、これは溶離帯がかなり広い巾をもつて移動していることを示すもので多数の糖類混合物を分画するためにはできるだけ狭い分離帯をもつようにしなければならない。この分離帯の巾は、充填剤の粒度や展開溶剤の流速に関係するので今後検討したい。

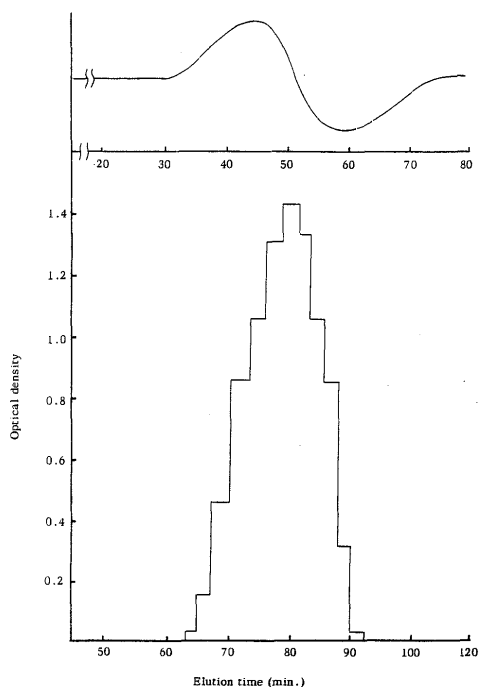


Figure 5. Elution curves of sucrose on the column with Dowex 1x8 in borate form

Analytical conditions were same as in as Figure 1.

3. - 7 検量線の作成

Dowex 1×8 (ホウ酸塩型) を充填剤とし、分離カラム: 0.8 × 50cm、検出カラム: 0.8 × 10cm、展開溶剤 0.04M ホウ酸カリウムに 0.04M のホウ酸を含む緩衝液 (pH8.8)、カラム温度: 30 展開溶剤の流速: 0.63ml/min、検出感度: ±0.01 fs、記録感度: 10V ~ 20V の条件により展開溶剤に溶解した各種濃度の標準シヨ糖液 1ml を注入して展開した。出現した微分曲線の振巾をピーク高としてシヨ糖の濃度に対してプロットすると、Fig.6 に示すように原点を通る直線となり、シヨ糖濃度とピーク振巾の間に比例関係が成り立つことがわかる。検出限界は記録計の感度に左右されるが、10mv スケールで 2mg であった。

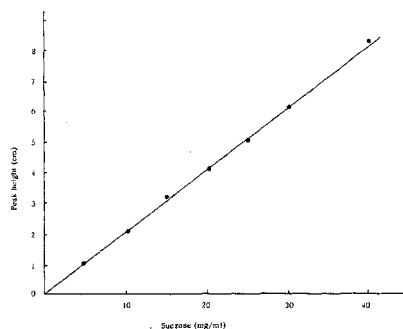


Figure 6. Quantitative calibration curve of sucrose by peak height

Analytical conditions are cited in the section 3-5 of this report.

3. - 8 応 用

輸入天然はちみつ 10g を展開溶剤に溶解し、50ml に定容する。漏過或いは遠心分離して不溶分を除去した透明液 1ml を特殊試料注入口より注入し、検量線作成の条件で展開した。ピークは Fig.7 に示した。

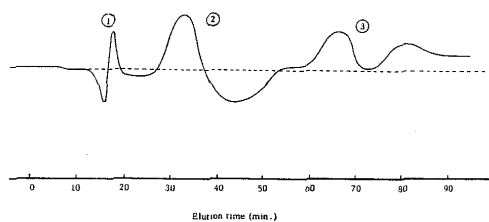


Figure 7. Separation of various sugars in honey

Analytical conditions are same as in Figure 1.

Fig 7 から明らかなように、この濃度のはちみつから 4 個のピークを検出した。ピーク 2 はシヨ糖、ピーク 3 は麦芽糖、ピーク 4 はブドウ糖と果糖が重なったものがある。ピーク 1 については同定していない。ピーク 2 の振巾を測り、前記検量線よりシヨ糖量を求めると、シヨ糖 4.71% となる。この値は、化学的に測定した値 6.83% より低い値を示している。これは、レイン・エイノン法で定量した値が非還元性糖類の総和として求められるための誤差と考えられる。

反応熱検出自動記録液体クロマトグラフによるシヨ糖の分離定量

4. 総 括

反応熱検出型自動液体クロマトグラフによるシヨ糖の分離定量について基礎的条件を検討した。カラム充填剤として活性炭を用いるとベースラインの安定性が悪く、検出ピークはテーリング現象を起した。分子篩としてのセファデックス G10 では、分子量の異なる糖類の分離は良好であるが、シヨ糖とマルトースのように同じ分子量をもつものの分離は悪い。Dowex 1×8 はホウ酸塩型に

して用いると糖の種類によつて伝異なつた親和性を示し、糖類混合物からの分離は良好であつた。Dowex 1×8 を充填剤として、展開溶剤について検討したところホウ酸塩の濃度はシヨ糖の溶出に著しい影響を与えなかつたが、ホウ酸塩緩衝液はこの実験で良好な展開溶剤であることを知つた。検出ピークの振巾とシヨ糖の濃度との間に直線関係が認められた。この方法を用いてはちみつ中のシヨ糖を分離定量することができた。

文 献

- 1) C.C.Sweeley,R.Bentley,M.Makita and W.W.Wells:J.Am.Chem.Soc., 85,2497 (1963)
- 2) J.X.Khym,and L.P.Zjll:J.Am.Chem Soc.,74,2090 (1952)
- 3) Green:"The development of Zoadl Centrifuge" P.447 (1966)
- 4) D.H.Spaekman,W.H.Stein and S.Mo ore:Anal.Chem.30,1198 (1958)
- 5) O.Samuelsen,L - 1.Larsson and O.Ramnas:"Automation in Analytical Chemistry" P.169 (1966)
- 6) R.B.Kesler:ibid,P.174 (1965)
- 7) 直野豊彦:“液体クロマトグラフィー”第2集 P.11 化学の領域増刊 (1965) 南江堂
- 8) L.P.Zill,J.X.Khym.and G.M.Chmial:J.Am.Chen.Soc.,75,1339 (1953)
- 9) R.B.Kesler:Anal.Chem.,79,1416 (1967)

Quantitative Determination of Sucrose by Automatic Recording Liquid Chromatograph with Thermal Detection Unit

Fractionation and determination of sucrose by automatic recording liquid chromatograph with thermal detection unit is described.

A linear function between sucrose concentration and peak height of detection curves were obtained by following the analytical conditions : adsorbent Dowex 1×8 (100 to 200 mesh) in the borate form, separation column 0.8 × 50cm., detection column 0.8 × 10cm., flow rate 0.63 ml / min., chart speed 10 mm / 10 min., detection sensitivity ± 0.01 ° cfs. temperature of separation and detection column 30 ° , room temperature 20 ± 0.1 ° , concentration range of sucrose 5 to 40 mg per ml.

出 来 三 郎

The effluent buffer were made by mixing with equal volume of 0.08 M K₂B₄O₇ and 0.08 M H₃BO₃ respectively.

The method mentioned above was applied to the analysis of sucrose in honey, and the sucrose was completely separated from other sugars under this experiment which was taken by above conditions.

(Received 31.Jan.1968)

MITSUO DEKI
Central Couston Laboratory 531
I wase Matsudo City,
Chiba Pref.Japan