

ノート

薄層クロマトグラフィーによる各種糖質の分離

山 崎 光 廣, 佐 藤 宗 衛, 宮 崎 博*

Thin Layer Chromatographic Method for the Separation of Sugars.

Mitsuhiro YAMAZAKI, Soei SATO and Hiroshi MIYAZAKI*

*Tokyo Customs Laboratory

5-5-30, Konan, Minato-ku, Tokyo, 108 Japan

Thin layer chromatographic methods for the separation and identification of various sugars in the imported foods were examined.

The samples used in this experiment are mono, di, tri and oligosaccharides, glycosides, sugar alcohols and amino sugars. This separation was achieved by using suitable solvent system according to the composition of sugars. Where several sugars were lying close together, the colour of the spot could be also used for the identification of sugars.

This chromatographic method was used for the separation and identification of mono, di, tri and oligosaccharides in the imported foods such as milk preparation and alimentary foods.

It was shown that this chromatographic method is applicable to the analysis of sugars in the imported foods consist of various sugars.

- Received June 2, 1987 -

1 緒 言

最近我が国に輸入される調製食料品は、需要の多様化を反映して非常に複雑な組成からなっている。なかでも糖質成分は、しょ糖、ぶどう糖、乳糖、マルトデキストリンなどの各種の糖質が複雑に混合されている。これらの糖質成分の種類とその量は関税率表のみならず輸入制度とも関連することがあるため、税関分析においては重要な分析項目になっている。

これまで、糖質の分離法として、ペーパークロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーなどの各種クロマトグラフィーが用いられてきた¹⁾。この中で、薄層クロマトグラフィーは特別な装置を必要としない簡易かつ迅速な分離法であることから、税関分析でもこれまで最も広く用いられてきた。糖質の種類に応じた各種の分離条件が報告されている²⁾³⁾が、これまで報告されている分離条件を最近の複雑な調製食料品中の糖

*東京税関輸入部分析室 〒108 東京都港区港南5 5 30

質成分の分離に適用したところ、必ずしも満足すべき結果が得られない場合があった。

ここでは、調製食料品中の複雑な混合糖質成分を良好に分離する条件を選択するために、各種糖質の分離挙動を検討したので報告する。

2 実 験

2.1 試 料

試料として、単糖類、二糖類、三糖類、オリゴ糖、コーンシロップ、糖酸、糖アルコール、アミノ糖、配糖体等の各種糖質を用いた。また、応用例として数種の輸入品を用いた。

2.2 器具・試薬

薄層板：シリカゲル 60 F₂₅₄ 5 × 10cm, 0.25mm

厚（メルク社 5714）

シリカゲル 60 F₂₅₄ 10 × 20cm, 0.25mm

厚（メルク社 5729）

シリカゲル 60 F₂₅₄ 20 × 20cm, 0.25mm

厚（メルク社 5715）

展開液：クロロホルム - メタノール - 水

(30 : 20 : 4 V / V)

" - " - "

(30 : 15 : 3 V / V)

n - ブタノール - 酢酸 - 水 (8 : 3 : 2
V / V)

イソプロパノール - 酢酸 - 水 (4 : 1 : 1
V / V)

アセトニトリル - 水 (85 : 15 V / V)

発色剤：ジフェニルアミン - アニリン - アセトン - 80%

リン酸 (2g - 2ml - 100ml - 15ml)

0.2% ニンヒドリン (エタノール溶液)

0.1N KMnO₄ - Na₂CO₃ (100ml - 2g)

2.3 方 法

各種糖質の 0.5 ~ 1% 水溶液を薄層板の下端から 1.5cm の位置に 0.5 μl スポットし、上昇法により原点から 15cm 展開した。展開終了後、薄層板を 120 ~ 130 の恒温乾燥器中で十分に乾燥して展開液を完全に除去し、発色剤を均一に噴霧後、120 ~ 130 の恒温乾燥器中で 10 分間 (0.1 N KMnO₄ - Na₂CO₃ 試薬の場合には

1 分間) 加熱して発色させた。

3 結果及び考察

シリカゲルを吸着剤とする薄層クロマトグラフィーでは、アセトニトリル - 水系の展開液が用いられている²⁾。しかし、アセトニトリルを含む展開液は有害で、しかも分離能を向上させるためには多重展開が必要である。そこで、他の溶媒を用い、短時間で良好に分離するための条件について検討した。

3.1 クロロホルム - メタノール - 水系の展開液

クロロホルム - メタノール - 水系の展開液は、配糖体の一種であるステビオサイドの分離に用いられている⁴⁾。この展開液を糖質の分離にも応用できるかどうか検討した。

クロロホルム - メタノール - 水 (30 : 20 : 4 V / V) を展開液としたときの各種糖質のクロマトグラムを Photo. 1 に、各糖質の R_f 値を Table 1 に示した。

全体的傾向として、中性糖の場合には単糖類、二糖類、三糖類の順に R_f 値が小さくなっている。また、単糖類のなかで五炭糖と六炭糖を比較すると、だいたい五炭糖の方が R_f 値が大きいが、六炭糖のラムノース、フコースのように五炭糖のリボース、キシロースよりもむしろ R_f 値が大きい場合もあり、必ずしも炭素数が少ない糖質の方が R_f 値が大きいとは限らない。

この展開液を用いたとき、アミノ糖の一種であるグルコサミン、ガラクトサミンや糖酸の一種であるガラクトン酸の場合には、ほとんど展開されず原点付近にとどまっているため、これらの糖質の分離には適当でない。また、コーンシロップやシクロデキストリンのようなオリゴ糖の場合には、R_f 値が小さく相互の分離が不十分で、これらの糖質の分離にも適当でない。

3.2 発色剤による呈色

3 種類の発色剤を用いたときの各種糖質の呈色反応を Table 2 に示す。

中性糖、糖酸、糖アルコール、アミノ糖、配糖体の場合には、ジフェニルアミン - アニリン - アセトン - 80% リン酸試薬で検出できたが、糖アルコールの場合には発色しなかった。そこで、糖アルコールの場合には、0.1 N KMnO₄ - Na₂CO₃ 試薬⁵⁾を発色剤として用いた。

ノート 薄層クロマトグラフィーによる各種糖質の分離

Table 1 Rf values of sugars

TLC plate ; silica gel 60 F₂₅₄ (Merck art No.5715)

solvent system ; chloroform-methanol- (30 : 20 : 4)

Sample	Rf value	Sample	Rf value
[saccharide]		[dextrin]	
2-deoxy-D-ribose	0.70	α -cyclodextrin (n = 6)	0.01
L-rhamnose	0.62	β " (n = 7)	0.03
L-fucose	0.57	[amino sugar]	
D-ribose	0.52	D-glucosamine	0.02
D-xylose	0.51	D-galactosamine	0.01
L-arabinose	0.45	[saccharic acid]	
D-mannose	0.39	D-galacturonic acid	0.07
D-fructose	0.39	[sugaralcohol]	
D-glucose	0.36	mannitol	0.30
D-galactose	0.32	sorbitol	0.19
sucrose	0.26	inonitol	0.12
maltose	0.23	[glycoside]	
palatinose	0.22	steroids	0.62
cellobiose	0.22		
trehalose	0.21		
lactose	0.18		
maltotriose	0.16		
isomaltose	0.15		
maltotriose	0.12		
raffinose	0.11		

Table 2 Color reaction of sugars by spraying reagent

Sample	Spraying reagent		
	diphenylamine-anilin -acetic acid-80% H ₂ PO ₄	0.2 % ninhydrin	KMnO ₄ -Na ₂ CO ₃
[saccharide]			
D-xylose	violet - blue	—	yellow
L-arabinose	" " "	—	"
D-ribose	" " "	—	"
2-deoxy-D-ribose	red - violet	—	—
D-glucose	violet - blue	—	—
D-mannose	gray "	—	"
D-galactose	blue	—	—
D-fructose	orange-red	—	—
L-rhamnose	gray - green	—	"
L-fucose	" " "	—	"
sucrose	brown	—	"
palatinose	red - brown	—	"
maltose	blue	—	"
isomaltose	"	—	"
lactose	"	—	"
cellobiose	"	—	"
trehalose	green - blue	—	"
maltotriose	brown	—	"
raffinose	"	—	"
[dextrin]			
α -cyclodextrin	blue	—	"
β "	"	—	"
corn syrup	"	—	"
[amino sugar]			
D-glucosamine	yellow - brown	pink - red	"
D-galactosamine	" " "	orange - red	"
[saccharic acid]			
D-galacturonic acid	violet - blue	—	"
[sugaralcohol]			
sorbitol	—	—	"
mannitol	—	—	"
inonitol	—	—	"
[glycoside]			
steroids	violet - blue	—	"

また、アミノ糖の場合には、ジフェニルアミン - アニリン - アセトン - 80%リン酸試薬でも検出できるが、スポットが不明瞭な場合があるので、0.5%ニンヒドリン（エタノール溶液）を発色剤として用いた。

ジフェニルアミン - アニリン - アセトン - 80%リン酸試薬を発色剤として用いたとき、中性糖の場合には青～青紫色系の呈色を示すものが多いが、なかにはデオキシリボースの赤紫色、ラムノース、フコースの灰緑色、フルクトースの橙赤色、シュクロースの茶褐色などのように特徴的な呈色を示すものがあり、Rf 値とともにこれらの呈色反応から得られる知見が糖質の種類同定の役に立つことがわかった。

3.3 溶媒組成による分離挙動

輸入食料品中に通常よく見掛けるフルクトース、グルコース、シュクロース、マルトース、ラクトースの5種類の糖質について、クロロホルム - メタノール - 水系の展開液の溶媒組成を変えたときの分離挙動を模式的に示すと、Fig. 1 のようになった。

Fig. 1 に示したように、クロロホルム - メタノール - 水（30 : 20 : 4v/v）を展開液としたときは、シュクロース、マルトース、ラクトースの3種の糖質については比較的良好に相互の分離ができるが、グルコースとフルクトースについては Rf 値が近似して相互の分離がしにくい場合がある。そこで、溶媒の種類を変えずに組成比だけを変えたときの分離挙動について検討した。

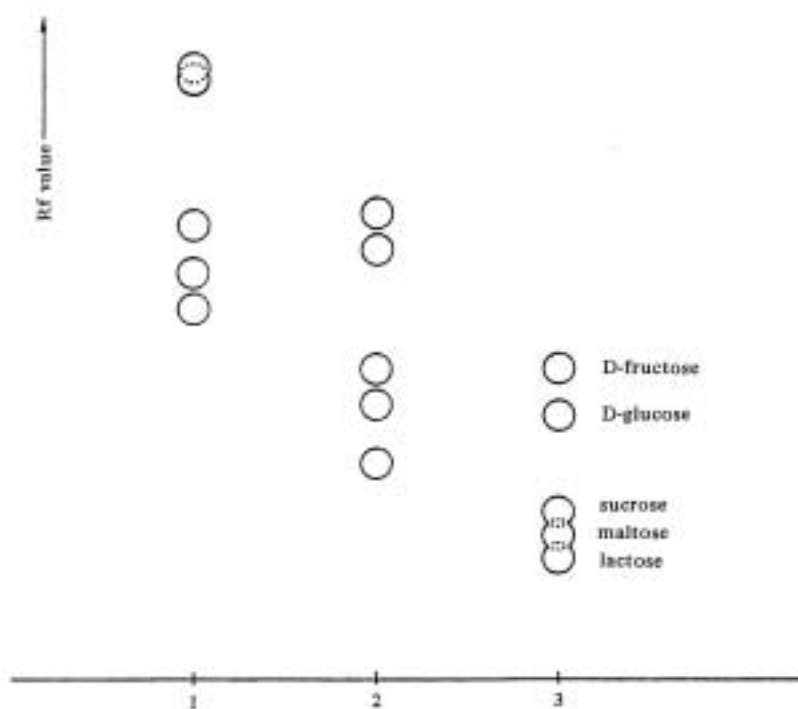


Fig. 1 Separation of five sugars by thin layer chromatographic method
TLC plate ; silica gel 60 F₂₅₄ (Merck art No.5715)
Solvent system ; chloroform-methanol-water

- 1 . 30 : 25 : 5
- 2 . 30 : 25 : 4
- 3 . 30 : 25 : 3

メタノールと水の割合を多くしていくと、全体的に Rf 値が大きくなるが、グルコースとフルクトースの Rf 値が接近し、相互の分離が悪くなった。逆にメタノールと水の割合を減らしていくと全体的に Rf 値が小さくなり、シュクロース、マルトース、ラクトースの Rf 値が接近するが、グルコースとフルクトースの Rf 値の差が大きくなり相互の分離は良好であった。

このように、試料中の糖質組成に応じて展開液を選択することにより、糖質相互の分離を改善することが可能であることがわかった。

3. 4 n - ブタノール - 酢酸 - 水系の展開液

前述したように、クロロホルム - メタノール - 水系の展開液は、アミノ糖、糖酸、オリゴ糖の分離には適当でないことがわかった。そこで、ペーパークロマトグラフィーによる糖質の分離に用いられている n - ブタノール - 酢酸 - 水系の展開液⁹⁾を、薄層クロマトグラフィーにも応用できるかどうか検討した。

n - ブタノール - 酢酸 - 水 (8 : 3 : 2 v/v) を展開

液としたときの各種糖質のクロマトグラムを Photo. 2 に、各糖質の Rf 値を Table 3 に示した。

クロロホルム - メタノール - 水系の展開液の場合と同様に、中性糖の場合には単糖類、二糖類、三糖類の順に Rf 値が小さくなっている。各糖質を Rf 値の大きい順に並べると、クロロホルム - メタノール - 水系の展開液の場合とほぼ同様の順序になるが、一部に順序が逆転しているものが見られる。

n - ブタノール - 酢酸 - 水系の展開液を用いることにより、クロロホルム - メタノール - 水系の展開液では分離できなかったアミノ糖、糖酸の分離が可能になった。また、比較的重合度の小さいオリゴ糖の分離もある程度可能であった。しかし、グルコースの 4 量体以上のものについては、相互の分離が不十分であった。

3. 5 オリゴ糖の分離

前述したように、n - ブタノール - 酢酸 - 水系の展開液ではオリゴ糖を十分に分離できないことがわかった。そこで、試料として直鎖状のオリゴ糖 (グルコースの

Table 3 Rf values of sugars by TLC

TLC Plate ; silica gel 60 F₂₅₄ (Merck art No. 5715)

solvent system ; n-butanol acetic acid-water (8 : 3 : 2)

Sample	Rf value	Sample	Rf value
[saccharide]		[dextrin]	
L-rhamnose	0.60	α-cyclodextrin (n = 6)	0.09
2-deoxy-D-ribose	0.59	β- " (n = 7)	0.07
D-xylose	0.53	[amino sugar]	
L-fucose	0.49	D-glucosamine	0.32
D-ribose	0.45	D-galactosamine	0.28
D-mannose	0.44	[saccharic acid]	
D-glucose	0.42	D-galacturonic acid	0.24
L-arabinose	0.42	[sugaralcohol]	
D-fructose	0.41	sorbitol	0.35
D-galactose	0.37	mannitol	0.32
sucrose	0.34	inositol	0.24
palatinose	0.31	[glycoside]	
cellobiose	0.31	stevioside	0.49
maltose	0.31		
trehalose	0.31		
isomaltose	0.28		
melezitose	0.26		
lactose	0.25		
maltotriose	0.23		
raffinose	0.20		

重合体), シクロデキストリン及び数種類のコーンシロップを用い, n -ブタノールのかわりに他のアルコールを用いてアルコールの種類による分離挙動の違いについて検討した。

エタノール - 酢酸 - 水 (4 : 1 : 1 v/v) を展開液とすると, 全体的に R_f 値が大きくなるが, オリゴ糖相互の分離が悪く, テーリング現象もかなり顕著に見られた。

そこで n -ブタノールとエタノールの中間的アルコールである n -プロパノールを用い, n -プロパノール - 酢酸 - 水 (4 : 1 : 1 v/v) を展開液とすると, わずかにテーリング現象が見られるが, グルコースの 8 量体程度まではほぼ良好な分離能を示した。

n -プロパノールのかわりにイソプロパノールを用い, イソプロパノール - 酢酸 - 水 (4 : 1 : 1 v/v) を展開液としたときの直鎖状のオリゴ糖, シクロデキストリン及びコーンシロップのクロマトグラムを Photo. 3 に, オリゴ糖及びシクロデキストリンの R_f 値を Table. 4 に示した。

イソプロパノールを用いたときには, n -プロパノールを用いた場合とほぼ同様の傾向を示す。スポットの間隔がいくらか接近するが, グルコースの 9 量体程度まではほぼ良好な分離能を示した。

直鎖状のオリゴ糖では, 重合度の大きいものほど R_f 値が小さい。この傾向は, 環状のオリゴ糖 (シクロデキストリン) でも同様である。一方, 直鎖状のオリゴ糖と環状のオリゴ糖を比較すると, 同じ重合度のものでは直鎖状のオリゴ糖の方が R_f 値が小さい。これは,

両者の構造の違いによるものと思われる。

3. 6 輸入試料への応用

クロロホルム - メタノール - 水 (30 : 20 : 4 v/v) とイソプロパノール - 酢酸 - 水 (4 : 1 : 1 v/v) を展開液とする分離条件を実際の輸入試料に応用し, その結果の一例を Photo. 4 に示した。

Sample(イ)は, 自然はちみつの例である。グルコース, フルクトースの明瞭なスポットと, シュクロース, マルトース, メレチトースのやや微弱なスポットが見られる。

Sample(ロ)は, 砂糖, 脱脂粉乳, マルトデキストリンからなる調製食品の例である。シュクロース, ラクトース, マルトデキストリンのスポットが見られる。

Sample(ハ)は, アメリカ産のヤマモミジの樹皮のアルコール抽出物の例である。コーンシロップと類似したパターンが見られる。これは, 植物組織中でのん粉が抽出過程で分解したものと考えられる。

Sample(ニ)は, アラビアゴムとして申告された淡黄色の粉末の例である。コーンシロップと同様なパターンが見られ, アラビアゴムにコーンシロップあるいはマルトデキストリンを添加して調製された物品と考えられる。

このように, 本法は, 輸入試料に応用した結果, 各種糖質の分離同定法として有用であることがわかった。

Table 4 R_f values of oligosaccharide and cyclodextrin
TLC plate ; silica gel 60 F₂₅₄ (Merck art No. 5715)
solvent system ; isopropanol-acetic acid water (4 : 1 : 1)

Sample	R_f value	Sample	R_f value
G - 1 (D-glucose)	0.66	α -cyclodextrin ($n = 6$)	0.40
G - 2 (maltose)	0.59	β - " ($n = 7$)	0.37
G - 3 (maltotriose)	0.53		
G - 4	0.46		
G - 5	0.41		
G - 6	0.36		
G - 7	0.32		

* G-n = (D-glucose) n

ノート 薄層クロマトグラフィーによる各種糖質の分離

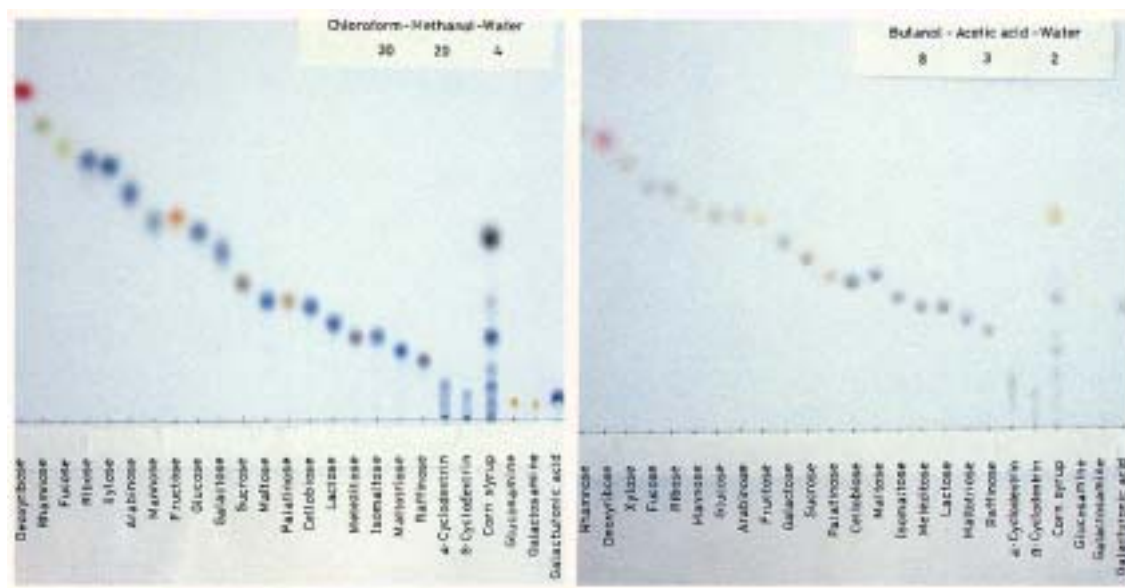


Photo 1 , Chromatogram of sugars on TLC silica gel
60 F₂₅₄ plate

(Merck art No. 5715)

Solvent system ; chloroform - methanol -
water

(30 : 20 : 4)

Spraying reagent ; diphenylamine - anilin
- acetone - 80% H₃PO₄

(2g : 21ml : 100ml : 15ml)

Sample ; 1 deoxyribose, 2 rhamnose,
3 fucose, 4 ribose, 5 xylose,
6 arabinose, 7 mannose,
8 fructose, 9 glucose,
10 galactose, 11 sucrose,
12 maltose, 13 palatinose,
14 cellobiose, 15 lactose,
16 melezitose, 17 isomaltose,
18 maltotriose, 19 raffinose,
20 - cyclodextrin,
21 - cyclodextrin,
22 corn syrup (D.E.value = 61.6)
23 glucosamine,
24 galactosamine,
25 galacturonic acid

Photo 2 . Chromatogram of sugars on TLC silica gel
60 F₂₅₄ plate

(Merck art No. 5715)

Solvent system ; n - butanol - acetic acid
- water

(8 : 3 : 2)

Spraying reagent ; diphenylamine - anilin
- acetone - 80% H₃PO₄

(2g : 2ml : 100ml : 15ml)

Sample ; 1 rhamnose, 2 deoxyribose,
3 xylose, 4 fucose, 5 ribose,
6 mannose, 7 glucose,
8 arabinose, 9 fructose,
10 galactose, 11 sucrose,
12 palatinose, 13 cellobiose,
14 maltose, 15 isomaltose,
16 melezitose, 17 lactose,
18 maltotriose, 19 raffinose,
20 - cyclodextrin,
21 - cyclodextrin,
22 corn syrup (D.E. value = 61.6)
23 glucosamine,
24 galactosamine,
25 galacturonic acid

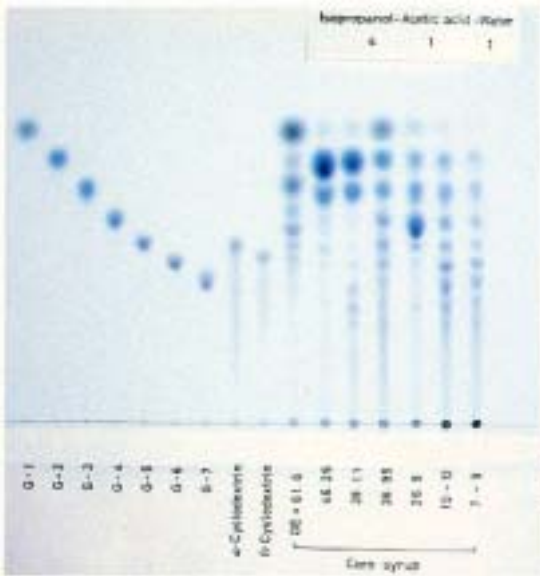


Photo 3. Chromatogram of oligosaccharide, cyclodextrin and corn syrup on TLC silica gel 60 F₂₅₄ Plate
(Merck art No.5715)
Solvent sysem ; isopropanol - acetic acid - water
(4 : 1 : 1)
Spraying reagent ; diphenylamine - anilin - acetone - 80% H₃PO₄
(2g : 2ml : 100ml : 15ml)
Sample ; 1G - 1 (glucose)
2G - 2 (maltose)
3G - 3 (maltotriose)
4G - 4
5G - 5
6G - 6
7G - 7
8 - cyclodextrin (n = 6)
9 - " (n = 7)
10 corn syrup (D.E.value = 61.6)
11 " (" = 46.29)
12 " (" = 39.11)
13 " (" = 36.95)
14 " (" = 26.9)
15 " (" = 10 ~ 12)
16 " (" = 7 ~ 9)

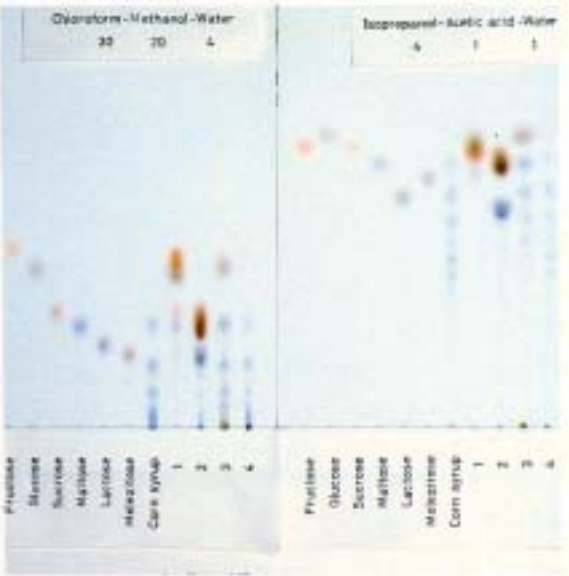


Photo 4 Chromatogram of several imported sample on TLC silica gel 60 F₂₅₄ plate
(Merck art No.5729)
Solvent system ; chloroform - methanol - water
(30 : 20 : 4)
isopropanol - acetic acid - water
(4 : 1 : 1)
Spraying reagent ; diphenylamine - anilin - acetone - 80% H₃PO₄
(2g : 2ml : 100ml : 15ml)
Sample ; 1 fructose, 2 glucose, 3 sucrose, 4 maltose, 5 lactose, 6 melezitose, 7 corn syrup (D. E. value = 61.6)
(I) natural honey
(II) sugared lait mixed powder
(III) solid extract mountain maple
FR
(-) gum arabic

4 要 約

薄層クロマトグラフィーによる各種糖質の分離挙動を検討した結果、次のような知見が得られた。

- (1) 単糖類，二糖類，三糖類，配糖体の分離条件として，クロロホルム - メタノール - 水 (30 : 20 : 4v / v) または n - ブタノール - 酢酸 - 水 (8 : 3 : 2v / v) が適当である。
- (2) グルコースとフルクトースの相互分離には，クロロホルム - メタノール - 水 (30 : 15 : 3v / v) が適当である。

(3) オリゴ糖の分離条件として，イソプロパノール - 酢酸 - 水 (4 : 1 : 1v / v) が適当である。

(4) 糖酸，糖アルコール，アミノ糖の分離条件として，n - ブタノール - 酢酸 - 水 (4 : 1 : 1v / v) が適当である。

以上のように，試料の糖質組成に応じた適切な展開液及び発色剤を選択することにより，各種糖質の相互分離，同定が可能であった。本法は，輸入試料に応用した結果，各種糖質の分離同定法として有用であることが明らかになった。

文 献

- 1) 小原哲二郎ら編：食品分析ハンドブック，P191 建帛社 (1969)
- 2) R. Gauch, U. Leuenberger and E. Beumgarpner : J. Chromatog., 174, 195 - 200 (1979)
- 3) E. Stahl, U. Kaltenbach : J. Chromatog., 5, 351 (1961)
- 4) 坂本征則，神田博史，村上国子，田中治：薬学雑誌，95, 12, 1507 - 1510 (1975)
- 5) E. Pacsu, T. P. Mora and P. W. Kent : Science, 110, 446, (1949)
- 6) G. W. Hay, B. A. Lewis and F. Smith : J. Chromatog., 11, 479 - 486 (1963)