

## ノート

# 自動液体クロマトグラフによる糖質の分離定量 (第2報) 比色法によるしょ糖の分離定量について

加藤時信, 出来三男

## 1. 緒 言

前報<sup>1)</sup>において反応熱検出型自動液体クロマトグラフによるしょ糖の分離定量について検討した。しかし反応熱検出による場合, 外因の温度変化及び混在する脂質や蛋白質などが出現ピークに影響を与え, 天然物のように複雑な成分の混合物からしょ糖を分離定量するには前処理を必要とする。

これらの欠点を克服するために本報では自動液体クロマトグラフで分離した糖質を, 糖質に特異的な呈色試薬を用いて発色させ、自動的に比色する方法によりしょ糖を分離定量することについて検討した。

本報ではとくにしょ糖の分離定量の基礎的条件として, 固定相担体, 展開溶剤及び呈色試薬に対する影響について検討し, これを天然はちみつ中のしょ糖の分離定量に応用し, 二, 三の知見を得たので報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 装置

液体クロマトグラフは光電比色計を接続した日本電子 KK 製 JLC-3C 型自動記録装置を用いた。

### 2.2 試薬及び樹脂の調製

#### 2.2.1 固定相担体

a) 強塩基性イオン交換樹脂 AG1×8 (100~200 メッシュ): 樹脂をビーカーにとり, 2 標定水酸化ナトリウムを加えて攪拌する。これをろ過, 水洗したのち 2 標定塩酸で処理し, ろ過, 水洗する。これらの操作を 2 回繰返し, 最後の塩酸処理後塩素イオンがなくなるまで充分に水洗する。つぎに 0.5M ホウ酸カリウムで処理してホウ酸型にする。b) 球状の強塩基性イオン交換樹脂 LC-R-3 (700~800 メッシュ): a) と同様に処理してホウ酸型にする。

大蔵省関税中央分析所, 千葉県松戸市岩瀬 531

出来三男, 関税中央分析所報, 6, 1(1968)

「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」を第 1 報とする。

### 2.2.2 展開溶剤

pH6.0(0.1M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), pH7.0(0.1M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), pH8.0(0.15M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), pH9.0(0.25M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) 及び pH9.5(0.3M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) のホウ酸緩衝液。緩衝液の pH は pH メーターを用い, 1 標定水酸化ナトリウムにより調製した。

### 2.2.3 呈色試薬

液体クロマトグラフィーにおける糖質の呈色にはオルシノール 硫酸<sup>2)</sup>, アンスロン 硫酸, フェノール 硫酸及びリン酸 アニリン<sup>3)</sup>などが一般に用いられている。これらのうちアンスロン 硫酸は展開溶剤にホウ酸緩衝液を用いた場合反応槽で混合されるさいに沈澱を生じ, 送液パイプに詰まる危険がある。またフェノール 硫酸は試薬の安定性が悪く定量性に欠けている。オルシノール硫酸を呈色試薬とした場合各糖質に対する呈色は良好であり, この試薬は着色びんに保存することにより約 1 週間の使用に耐える。オルシノール 硫酸はオルシノール 1.5 g を 90% 硫酸 1 l に溶解して調製した。フェノール 硫酸はフェノール 50 g を 1 l の濃硫酸に溶解して調製した。オルシノール, フェノール及び硫酸はいずれも試薬特級を用いた。

### 2.2.4 標準糖質

しょ糖, ラフィノース, 麦芽糖, 乳糖, 果糖及びぶどう糖はいずれも試薬 1 級以上を用い, pH8.0 のホウ酸緩衝液に溶解した。

### 2.3 試料の調製

はちみちはその約 200mg を精秤し, pH8.0 のホウ酸緩衝液に溶解して 100ml に定容した。

### 2.4 測定条件

主として次の条件で測定した。分離カラム 0.8 × 15 cm, カラム温度 50°C, 展開溶剤流量 0.42 ml/min., 呈色試薬流量 0.56 ml/min., 反応槽温度 95°C, 反応管の長さ 15 m, 光路長 2 mm, 記録計フルスケール 100~70% (透過率), チャートスピード 6 cm/hr.

### 3. 結果と考察

#### 3・1 固定相担体の選択

前報<sup>1)</sup>において、単糖類及びオリゴ糖類の分離に強塩基性イオン交換樹脂Dowex1×8は良好な分離能を示すことを明らかにしたが、とくにしょ糖と麦芽糖及び

乳糖の分離を高めるため、さらに二、三のカラム充填用担体について検討を加えた。すなわち Dowex1×8 とほぼ同様な分離能を有する AG1×8 (ホウ酸型)<sup>4)</sup> 及び LC-R-3 (ホウ酸型) により各種糖類を分離した結果を Fig.1 に示した。

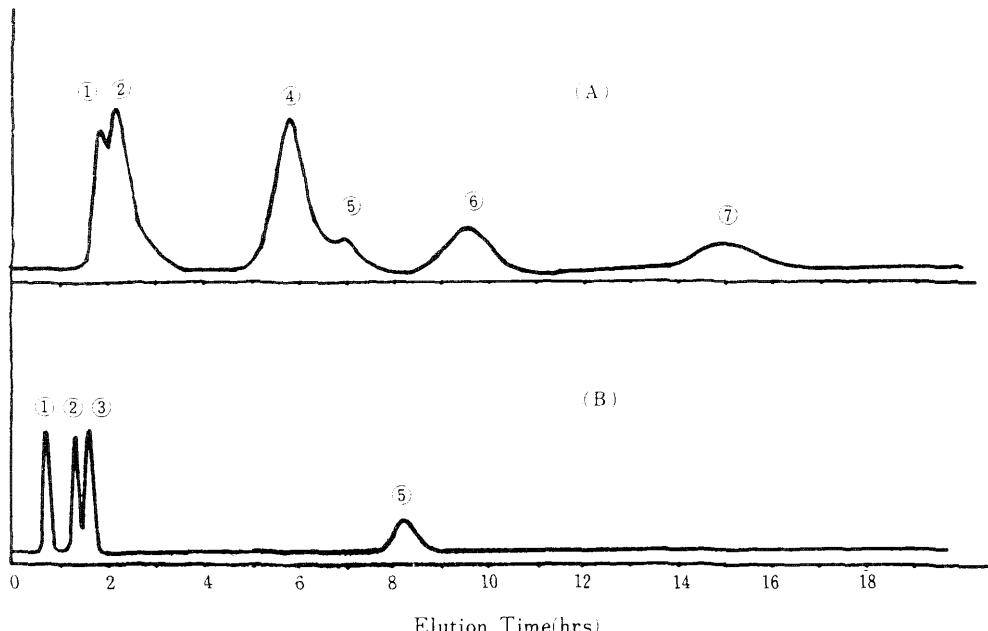


Fig. 1 Chromatograms of Sugars

(A) Stationary Phase : AG1×8, Mobile Phase : pH8.0 (0.15M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), Column Size : 0.8×50cm, Column Temperature : 50°C

(B) Stationary Phase : LC-R-3, Mobile Phase : pH8.0 (0.15M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), Column Size : 0.8×15cm, Column Temperature : 50°C

(Reagent : Phenol-Sulfuric Acid)

- |           |            |             |
|-----------|------------|-------------|
| ① Sucrose | ② Maltose  | ③ Lactose   |
| ④ Mannose | ⑤ Fructose | ⑥ Galactose |
| ⑦ Glucose |            |             |

Fig.1 からわかるように AG1×8 では単糖類と 2 糖類の分離は良いがしょ糖と麦芽糖のように 2 糖類相互の分離は良好でなく、Dowex1×8 の分離能とほぼ類似している。一方 LC-R-3 をカラム充填剤とした場合、しょ糖と他の二種類との分離は完全であり、また麦芽糖と乳糖の分離もよく、しかもテーリングのないシャープなピークが得られる。

このように AG1×8, Dowex1×8 と LC-R-3 の分離能の相違は、そのイオン交換樹脂の粒度に極めて強く依存していることを示している。

#### 3・2 緩衝液の pH と溶出速度

ホウ酸緩衝液を用い、緩衝液の pH の違いによる各種糖質の溶出時間への影響を検討した結果を Fig.2 に示した。

pH9.5 では麦芽糖と乳糖の分離は困難であるが、各糖類の溶出速度は早く、最も溶出の遅いブドウ糖も 5 時間で溶出する。pH が中性に近づくにつれて相対的に各糖質の溶出速度は遅くなるが、しょ糖と他の二糖類及び二糖類相互間の分離はよくなる。Fig.3 に示したように pH7.0 ではしょ糖、ラフィノース、麦芽糖及び乳糖の分離は良好である。しかし、単糖類の溶出速度は遅れ、ぶどう糖で約 20 時間を要する。天然産品のように各種の糖質を含む混合糖質からしょ糖を分離定量

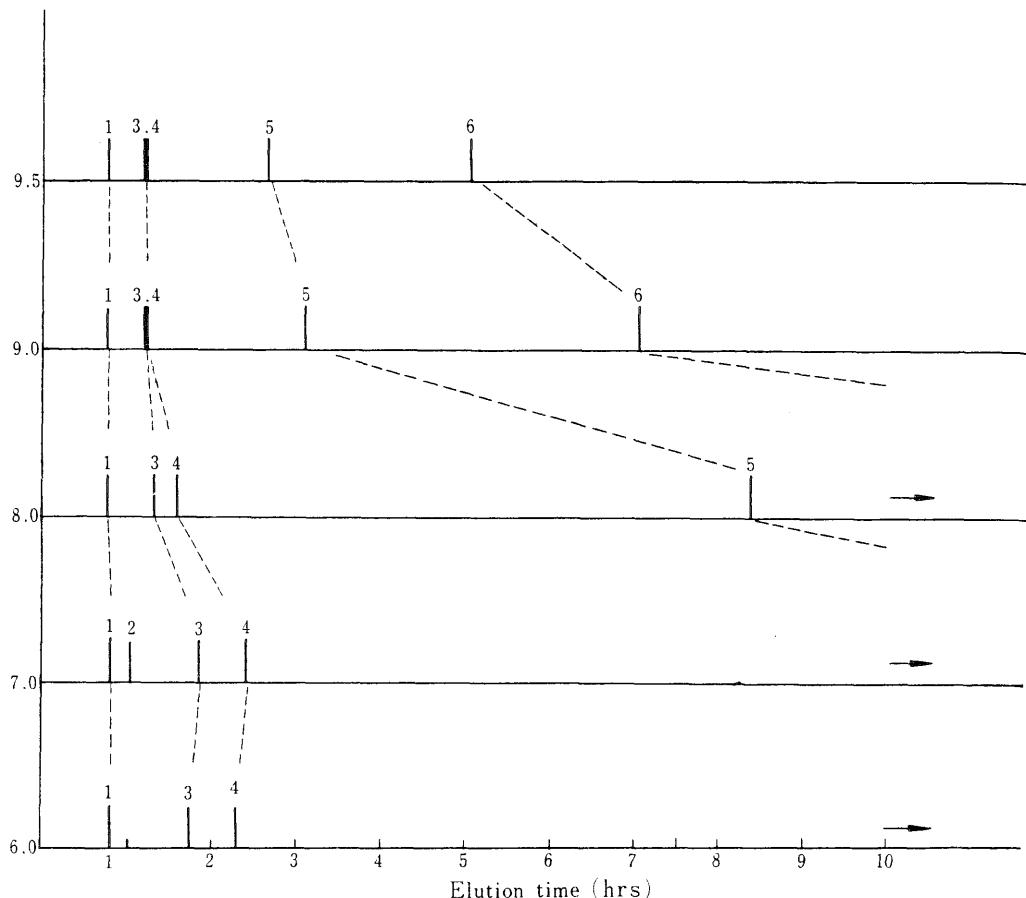


Fig. 2 Effect of Eluant of pH on Sugars elution.

Analytical conditions are cited in Table 1.

- |           |             |           |
|-----------|-------------|-----------|
| ① Sucrose | ② Raffinose | ③ Maltose |
| ④ Lactose | ⑤ Fructose  | ⑥ Glucose |

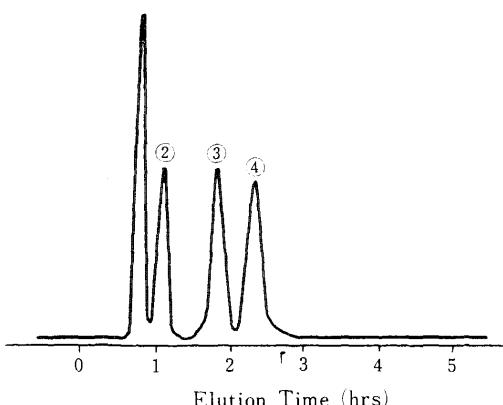


Fig. 3 Chromatogram of Sugars used pH7.0 of

Borate Buffer.

- |           |             |
|-----------|-------------|
| ① Sucrose | ② Raffinose |
| ③ Maltose | ④ Lactose   |

する場合, pH7.0 の緩衝液を用いるしょ糖の分離能は良好であるが, ぶどう糖など溶出の遅い单糖類を含むような試料では分析操作に長時間を要することになり, 分析の迅速化の障害となる。

一方, Fig.2 に示したように, pH9.5 の緩衝液では二糖類相互の分離は悪いが, ぶどう糖, 果糖などの单糖類の溶出が短時間で行なわれるため, 分析時間の短縮を目的として pH7.0 と pH9.5 の緩衝液を組合せて分離溶出することを試みた。すなわち, pH7.0 の緩衝液を通液し, 試料を注入後しょ糖が完全に溶出する 1 時間後に pH9.5 の緩衝液に切り換えて溶出させた。その結果は Fig. 4 に示したようにしょ糖と他の糖類との分離に影響を与えずに分析時間を短縮できた。

### 3・3 測定条件の設定

3・1 及び 3・2 の検討結果を含めてしょ糖の分離

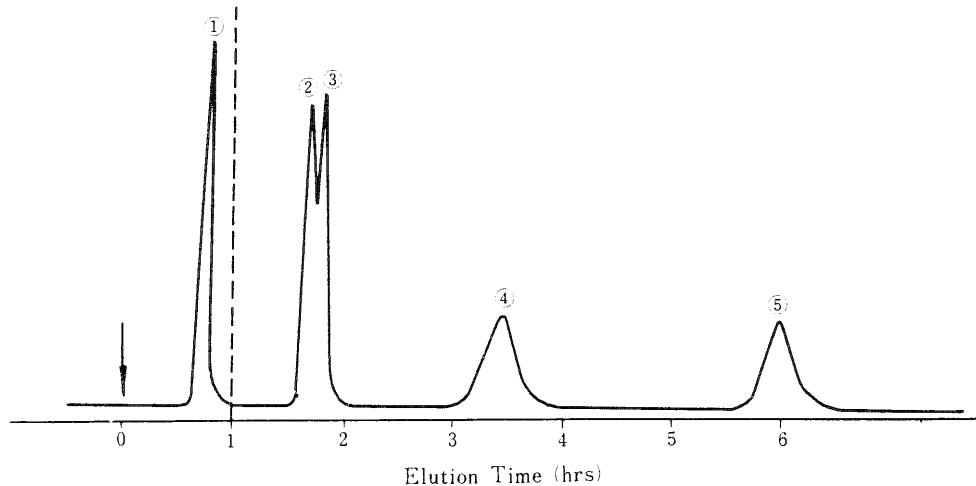


Fig. 4 Chromatograms of Sugars by Gradient Elution

..... Buffer Change (pH 7.0 → pH 9.5)

- |            |           |           |
|------------|-----------|-----------|
| ① Sucrose  | ② Maltose | ③ Lactose |
| ④ Fructose | ⑤ Glucose |           |

定量のための測定条件を Table 1 のように定めた。

Table 1 Analytical conditions

Stationary Phase :		
first buffer	pH 7.0 (0.1M)	
second buffer	pH 9.5 (0.35M)	
buffer change time	1 hr.	
Flow rate :		
buffer solutions	0.42 ml/min.	
reagent solutions	0.56 ml/min.	
Column :		
size	0.8 × 15 cm.	
temp.	50°C	
Reaction bath temp.		
Reaction tube length	15 m.	
Light path length	2 mm.	
Wave length	440 mm.	
(orcinol sulfuric acid)		
Chart speed	6 cm/hr.	

## 3・4 検量線の作成

3・3 の測定条件により各種濃度のしょ糖を用いて定量した。得られたクロマトグラムのピークの高さをしょ糖の濃度に対してプロットして求めた検量線は Fig.5 に示したとおりである。しょ糖の濃度 20 ~ 200 の範囲でピークの高さとの間に直線関係が成り立つ。

## 3・5 応用例

3・3 に示した測定条件に従って天然はちみつ中のしょ糖を分離測定した。

用いたはちみつの薄層クロマトグラフによる糖組成を Fig.6 に示した。

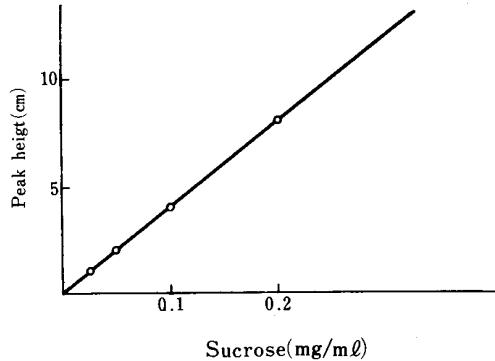


Fig. 5 Quantitative calibration curve of sucrose by peak height.

Analytical conditions are cited in the Table 1.

液体クロマトグラフにより得られたクロマトグラムは Fig.7 に示したとおりであり、ほぼ薄層クロマトグラフに対応するピーク数を示している。

ピークの高さからしょ糖を算出すると 1.7% となる。なお、こののはちみつ中のしょ糖分を化学的な方法 (レイン・エイノン法) により定量した値は 3.1% であり、本報の方法による定量値より高い値を示している。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。このように本報の液体クロマトグラフ法を用いることにより混在する他の糖質の影響を極めて小さくしてしょ糖を分離定量することができた。

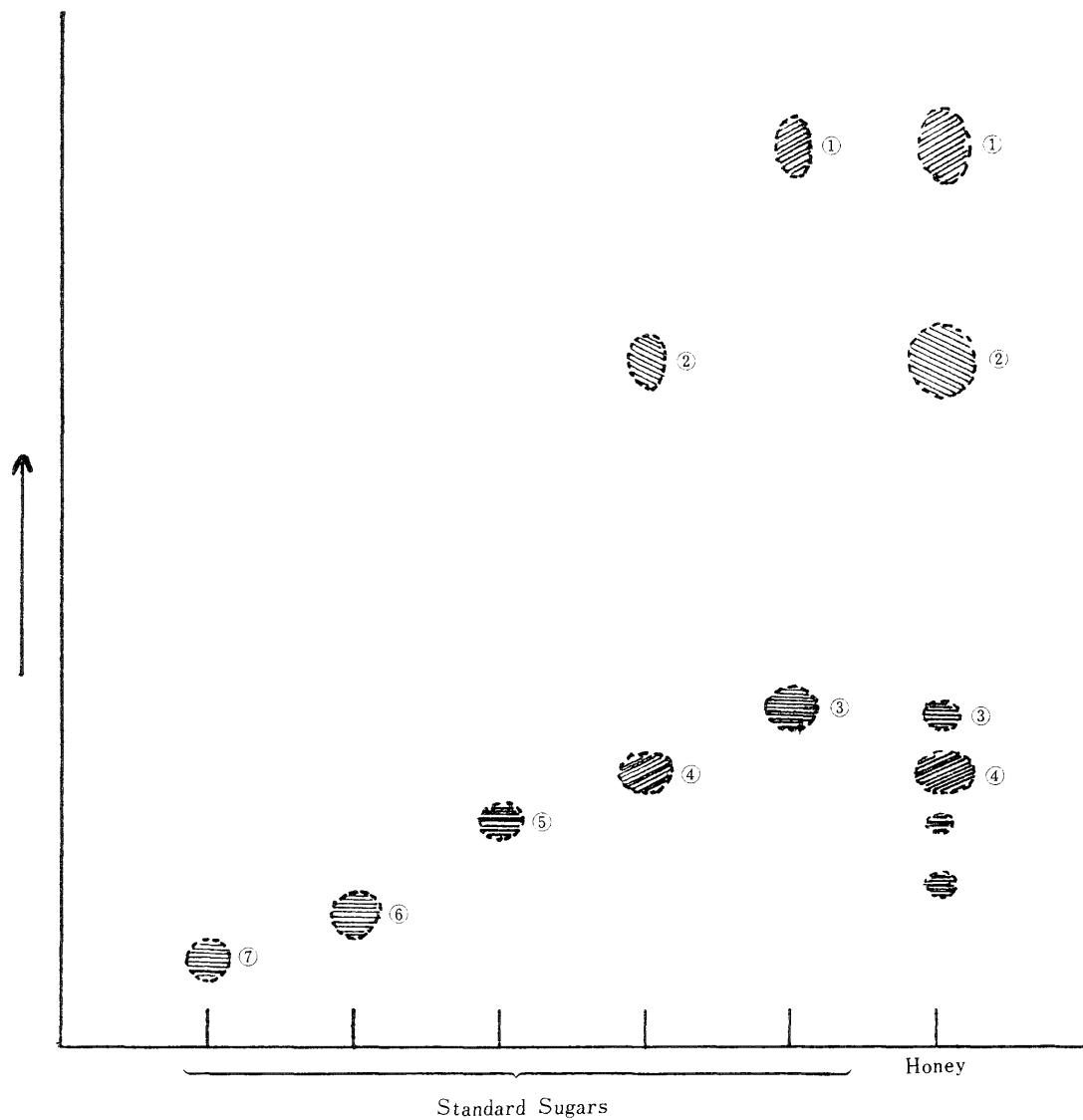


Fig. 6 Thin-layer chromatograms of honey

Solvent : Ethylacetate/isopropanol (50%) (35/65)

Stationary phase : Silicagel treated with 0.02M Sodium Acetate.

Spray agent : Anilin hydrogen phthalate

- |             |             |             |
|-------------|-------------|-------------|
| ① Fructose  | ② Glucose   | ③ Sucrose   |
| ④ Maltose   | ⑤ Treharose | ⑥ Melibiose |
| ⑦ Raffinose |             |             |

#### 4. 総括

自記光電比色計を接続した自動液体クロマトグラフによるしょ糖の分離定量について基礎的条件を検討した。すなわち、二糖類及び单糖類相互の分離能は強塩

基性イオン交換樹脂の粒度に影響され、粒子が少ないと糖質相互の分離は良く、LC-R-3(ホウ酸型)は混合糖質の分離に優れた性能を有する。展開溶剤としてpH7.0とpH9.5のホウ酸緩衝液を段階的に使用することによりしょ糖の分析時間を短縮できた。オルシノ

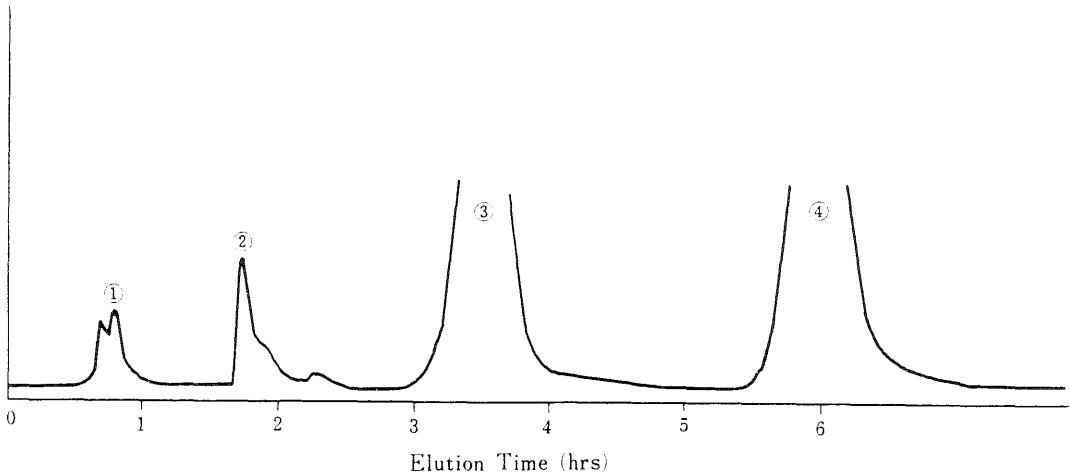


Fig. 7 Chromatogram of Sugars in Honey

Analytical conditions are cited in the Table 1 .

Origin flower : Chainease milk vetch.

① Sucrose      ② Maltose      ③ Fructose      ④ Glucose

ール 硫酸を呈色試薬とした場合、しょ糖の濃度とピークの高さとの間にしょ糖 20 ~ 200 の範囲濃度において直線関係が得られた。この方法をはちみつ中のしょ糖の分離定量に応用し良好な結果が得られた。

## 文 献

- 出来三男, 関税中央分析所報, 6, 1 (1968)
- P. B. Kesler : " Automation Analytical Chemistry " : P.174 London Oct. 12(1965)
- 千田孝之, 藤原喜延, 鷹野重威 : The Hitachi Scientific Instrument News, vo1. 12, 719 (1969)
- R. Syamanada, R. C. Staples, R. J. Black : Contrib. Boyce Thompson Inst. 21, 363(1962)

## Automatic Analysis of Sugars by Liquid Chromatography. (2)

### Determination of Sucrose by the Colorimetric Method.

Tokinobu KATO

Mitsuo DEKI

Central Customs Laboratory, 531, Iwase, Matsudo, Chiba.

Received Apr. 10, 1970