

ペーパークロマトグラフィーに依る糖類の定量

野 路 末 吉
神 田 睦 夫

Quantitative determination of Sugars by paper-Chromatography.

Sueyoshi NOZI, Mutuo KANDA

We measured the R_f values of the Glucose, Fructose, Maltose, Lactose and Sucrose by paper-chromatography. The quantity of the Sugars on the filter paper has been determined by means of A photo-electric-Colorimetry, the accuracy being about 95% of the theoretical value.

緒 言

ペーパークロマトグラフィー（以下P・Cと略す）は古く 1861 年 capillary Analysis として始まり、約 80 年後 Gordon, Mastin 及 Synge 等が現今行はれている二次元の P・C に発展させ今日の隆盛を見るに至つたのである。この分析法は分離効果が非常に良く、複雑な混合物も容易に分離出来、又少量の試料を室温で操作することが出来るから 熱に不安定の微量の物質も分離定量し得る。又実験装置、資材は有り合せのガラス瓶、濾紙等其の他の数種の溶剤を必要とするのみである。

P・C 用には東洋濾紙 No.50, 51 等が販売されているがこれを使用して見ると、溶媒の滲透速度は溶媒により異なり、例へばブタノール系の場合では上昇法を用いると、25Cm 上昇するに No.50 では約 7 時間を要し、定性濾紙では約 5 時間を要するのみであるので本実験では大形の定性濾紙を必要の寸法に切取つて使用することにした。

呈色法としては一般に還元糖は 1% のアンモニア性硝酸銀水溶液を薄く霧吹で吹きつけ、100~103°C で処理すると糖存在部の黒褐色を見るのであるがこれはビタミン C や、還元性のない蔗糖等も呈色する、しかし試薬のかけすぎや、加熱の工合によつて濾紙全体が呈色して R_f 測定が困難になり、得られたクロマトグラフは保存に耐えない等の缺点がある。又二次元法で得られる 40Cm×40Cm 程度の広さの濾紙に硝酸銀水溶液を一樣に吹きかける事、及び、一樣に加熱する操作をはかなり困難で相当の熟練を要する。この他過マンガン酸カリ法、芳香族アミン法、 β -ナフトール法等種々あるが、過マンガン酸法は濾紙全体が速かに一樣に黄変（呈色）してしまふので R_f が不明になり、 β -ナフトール法では濾紙が磷酸、或は硫酸等に侵されボロボロになつてしまふので保存に耐えない、そこで、次の様に呈色させて保存のきくクロマトグラフを得た。

即ち 0.1N-硝酸銀水溶液 50CC + アセトン 100CC の混液に既に展開を終了しよく乾燥した濾紙を浸して乾かし、これに 1% アルコール性カリ液を吹きかけると糖存在部が先ず呈色するからよ水洗して乾燥すると明瞭なクロマトグラムが得られる。

次に定量法は試料の展開分離を終つた濾紙を呈色させ、各物質存在部の呈色面積をプランメーター等で測定し、試料採取量との関係を図表に表し、これを基準にして定量する法（面積法）、光電管法、抽出滴定法、抽出比色法等がある。

面積法は呈色範囲が不鮮明であるから精密に面積の測定が出来ず、従がつて定量には不向きであるが、同一濾紙上で 2-3 の既知量の試料と比較して見れば、その目分量の面積色調等により大体の目安をつけ得るので大変便利である。

その他、光電管法、抽出容量法があるが今回は抽出比色法を採用した。先ず定量用標準グラフを后述の如くして作り、これを今後の定量実験の基準とした。比色法は Lewis-Benedict 氏のピクリン酸法により、既知濃度の試料を呈色させ、光電比色計で光線透過率を測定し、一連の関係を片対数グラフに表はした。

尙、近来電気泳動法と P・C 法を併用した電気移動 P・C が発案され金属イオン溶液を定量的に連続分離する法が発達しつつあるから本実験等にもこれを応用すれば一層興味ある事と思はれる。

以上により著者等は糖類の分離定量の基礎的実験を行つた。

実験の部

1) 糖の分離について (一次元法による)

2cm×40cm の濾紙の一端より 5cm の所に鉛筆で線を引き、この線上に約 10% の試料水溶液を附し風乾燥後支柱にさし込み密閉ガラス円筒中で上昇法により 25~27°C で 6~10hr 展開し次式により Rf を求めた。

$$Rf = \frac{\text{物質の分離された位置迄の距離}}{\text{展開に伴ふ溶質の移動距離}} = \frac{\text{出発点から溶媒が濾紙中を移動した距離}}{\text{展開に伴ふ溶質の移動距離}}$$

この実験結果は第一表の通りである。

第一表 糖の Rf 値

| 糖 | 溶媒 | | フェノール ¹⁾ | | コリジン ²⁾ | | ブタノール ³⁾ | |
|--------|------|------|---------------------|------|--------------------|------|---------------------|--|
| | A | 実測値 | B | 実測値 | C | 実測値 | | |
| グルコース | 0.39 | 0.39 | 0.39 | 0.39 | 0.18 | 0.14 | | |
| フラクトース | 0.51 | 0.51 | 0.42 | 0.42 | 0.23 | 0.19 | | |
| ラクトース | 0.38 | 0.38 | 0.24 | 0.24 | 0.09 | 0.05 | | |
| マルトース | 0.36 | 0.36 | 0.32 | 0.32 | 0.11 | 0.06 | | |
| 蔗糖 | 0.39 | 0.39 | 0.40 | 0.40 | 0.14 | 0.11 | | |

1) フェノール 50gr, 28% アンモニア水 2gr, 水 50gr
 2) Syn-コリジン 50gr, 水 25gr
 3) n-ブタノール 40gr, 氷醋酸 10gr, 水 25gr
 A, B, C D²⁾

上表に表す通り、溶媒としてフェノール、コリジンを使用した場合は従来の報告に見られる Rf と実験値はよく一致したがブタノールの場合にはかなり異なつた値が得られた。

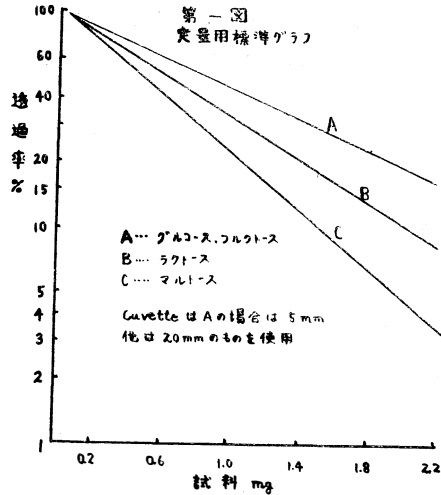
一般に溶媒中の水、アルコール、酸の含量を増すと Rf は増大すると云はれている。

2) 標準グラフの作製

定量用標準グラフは次の如くして作る。即ち、12.5 c.c. の目盛試験管に糖の既知量を取り水を加へて 4c.c. とし、4c.c. の Pic-rate-picric acid [36gr のピクリン酸に 500c.c. の 1% 苛性ソーダ水溶液と 400c.c. の水を加へてとかし 1L にする] と 1c.c. の 20% 炭酸ソーダ水溶液を加へて 10分間沸湯中に浸して後急冷し、12.5c.c. の目盛まで水を加えて得られた赤色溶液を、試料を

加えずに同様構作して得られた黄色溶液を基準にして光電比色計で比色する。フィルターは緑を使用し、透過率を読む。2~3の既知濃度の試料についてこれを行えば Lambert-Beer の法則により透過率と試料採取量との片対数図表は直線になる。

各種の糖につきこれを行ひ第一図を得た。



次にこの標準グラフに基き実際の抽出液について検討した。即ち 25cm×25cm の濾紙の下端より 6cm の所に線を引き相当間隔を置いて糖溶液を差級数的に附ける。両端には特に他とはなして附し丸めて上端をクリップでとめて密閉容器中で展開し、乾燥後両端を切取つて呈色させ、これを基準にして他の部を切取り温水で抽出し比色した。結果は第二表の通りである。

第二表

| 糖 類 \ 実験結果 | 試料採取量 mg | 検 出 量 mg | 差 mg |
|-------------|-------------|-------------|---------|
| グ ル コ ー ス | 2.08 | 2.16 | +0.08 |
| | 1.72 | 1.79 | +0.07 |
| | 1.14 | 1.12 | +0.02 |
| | 0.55 | 0.58 | +0.03 |
| フ ル ク ト ー ス | 1.98 | 2.04 | +0.06 |
| | 1.64 | 1.67 | +0.03 |
| | 0.87 | 0.91 | +0.04 |
| | 0.43 | 0.42 | -0.01 |
| ラ ク ト ー ス | 2.32 | 2.38 | +0.06 |
| | 1.66 | 1.80 | +0.14 |
| | 0.95 | 1.08 | +0.13 |
| | 0.61 | 0.60 | -0.01 |
| マ ル ト ー ス | 2.14 | 2.09 | -0.05 |
| | 1.62 | 1.55 | -0.07 |
| | 0.94 | 0.98 | +0.04 |
| | 0.57 | 0.59 | +0.02 |

上記の結果より抽出液についての実験値は大体94~95%で標準グラフに一致することを知った。

3) 糖混合溶液の分離定量

グルコース、マルトース、ラクトース、フラクトースの混合水溶液を P. C. 法で分離定量した。第一表より容易に推察される如し、一種類の溶媒では単糖と重糖、又はヘキソースとペントースの様に炭素数の異なる種族間の分離は可能であるが、異性体相互の分離は困難であるので二次元法によつた。

40cm×40cm の濾紙の一隅に+印を書き原点とし、混合試料を滴下しこれを円筒形にまきガラス支持に巻込んで先ずクエノールで次にコリジンで互に直角方向に展開する。これは数枚の濾紙で併行して行い、一枚を呈色させて濾紙切抜の場合の参考とする。抽出は温水にて行い比色は標準グラフの場合と同様にし第三表の結果を得た。

第三表 糖混合溶液の分離定量

| 混 合 成 分 | 記 算 値 mg | 実 験 値 mg | 差 mg |
|-------------|----------|----------|-------|
| グ ル コ ー ス | 1.01 | 1.07 | +0.06 |
| ラ ク ト ー ス | 0.975 | 0.977 | +0.02 |
| マ ル ト ー ス | 1.14 | 1.08 | -0.06 |
| フ ラ ク ト ー ス | 1.01 | 1.04 | +0.03 |

結 言

- 1) クロマト用濾紙を用いなくても、普通の定性用濾紙で行ふことが出来る。
- 2) P. C. の実験の際は、Rf 既知の物質でも、溶媒により Rf が相当異なるか、一応確認して置く必要がある。
- 3) 糖混合物の分離定量では2次元法を利用して94~95%の正確さである。

参 考 文 献

- 1) Jermijin, Isherwood ; Biochem. J, 44, 403 (1949)
- 2) 佐竹一夫, クロマトグラフ, 共立全書, 27年発行,
- 3) Bull等, J,Am. Chem.soc, 71, 550 (1949)
- 4) Hirst, J Chem, Soc.,1949, 928, 1659,
- 5) Flood, Hirst, Jones: ibid, 160, 86 (1947)
- 6) Flood, Hivst, Johes,J,Chom, soc,1948, 1679