

糖 類 の 分 離 分 析 に つ い て

糖といえばまず子供の好きなお砂糖が思い出されるが、糖類はその種類が非常に多く蛋白質とともに廣く生物體の重要成分として存在しており、これに關聯をもつ工業も多くあるわけ、これを分離したり分析したりすることは學術的に興味があるばかりでなくいろいろの意味で重要なことである。

中 村 亦 夫

1 ま え が き

糖類には単糖類二糖類多糖類があり、またアルドースありケトースのあることは今さら説明の要もないことであらう。とにかく木炭糖のアルドースだけでも1分子中に不燃炭素が4ヶ存在するので16種類（天然にはd-グルコース、d-マンノース、d-ガラクトース、l-ガラクトースの4種類あるといつた次第で糖類程その組成が非常に簡単でこんなにいろいろな異性體のあるものは他に少ないであらう。このためにまた性質の非常に似たものが多いわけで分離分析がむづかしいのである。

また糖類は常溫で生物體内にいろいろな酵素の作用をうけながらできてきており、或るものは纖維素のように體の構成物質となりまた蔗糖澱粉のようにエネルギー貯蔵物質となり、それが體內で酵素の作用で分解して行くといつた生命に關聯をもつものだけに非常にデリケートな物質であつて分離分析には無理をすると他のものに變化したり、分解したりするのでやつかいである。

また糖類はOH基をその特性として非常に多く有しているために分子量の小さな三單糖などは別とし、大體は融點が高くかつその溫度程度で分解するものであるから蒸溜は眞空蒸溜でもそのまゝでは不可能である。以上のような理由で糖類の分離分析には、なかなかの困難をともなうのである。

2 分離して分析することについて

無機陽イオンの定性分析を行う時に第一屬から第六屬までわけて、それをまた分離してイオンを一つ一つとり出してその性質をしらべて行くように、糖の分析でも各成分を單離して分析して行くことができれば理想的であらう。

有機物の分離には蒸溜による方法、溶解度差による方法、クロマトグラフによる方法などが考えられる。糖の分離では蒸溜による方法はどんな高度眞空蒸溜によつても前述したよう-OHに基の關係では不可能であつて、糖を沃化メチルと酸化銀を用いたりしてメチル化して、-OH基を-CH₃基に入替えれば高度眞空(0.7 mm)で蒸溜することができ分離が可能となる。しかし沃化も高度眞空蒸溜もなかなか厄介な仕事である。溶解度の差

を用いる方法ではアルコール、水の混合の割合で簡単にかなりの程度分離ができる。例えば果糖は90% エチルアルコールには可溶であるがブドウ糖や麦芽糖や澱粉などは不溶であるのでこの混合物から分離することができる。しかしこのアルコールを用いる方法もあまり眞能的とは思われない。

だいたい糖類は分子量の大きな澱粉や纖維素のようなものをぞけば水によく溶けるのであるが、あまり溶けやすいので分離したり結晶させたりすることが困難であつて、フェニールヒドラジン等を作作用させて難溶性なものに變えて後分離し結晶させて分析する方法もある。

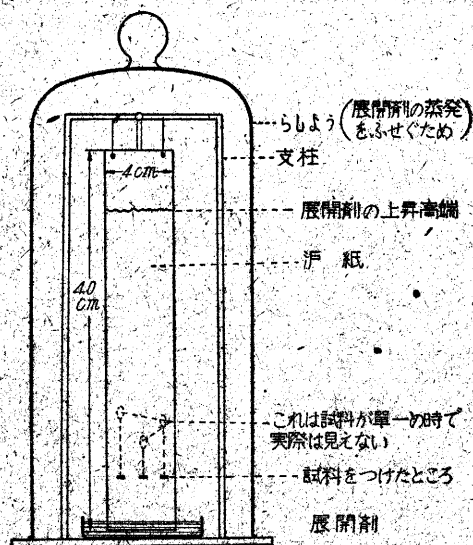
ところが最近いろいろな分離分析にさかんに用いられるようになってきたクロマトグラフ法はやはり糖類にも最良の分離分析方法であるらしい。それでこの方法について少し例を引いて説明して見よう。これには英國等にさかに行われているペーパークロマトグラフの方法とWolfson氏が行つているマグネソールを用いた方法等がある。

3 ペーパークロマトグラフ

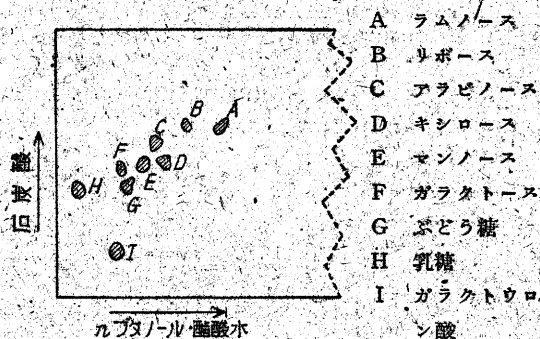
この方法は蛋白質の分解物であるアミノ酸の分離に用いると同様にして行うもので、一次元的に行うものと二次元的に行うものがある。一次元的に行うにはまず長さ40 cm位の細長い濾紙の一端を石炭酸(水分15%)か、またはn-ブタノール・醋酸・水(4:1:1)等のような展開劑を入れた皿に浸す。その液面より7 cm位上のところから分離しようとする糖液を少量つけておく、さて展開劑である溶劑は毛細管現象でどんどん濾紙面上を上つて行く、その時糖を一しよに上の方に異動させる。この速度が糖によつて異なるために糖が分離するのである。

こうして異なる位置にきた糖のしみに對してアンモニア性AgNO₃液やKMnO₄液やアニリン・フタル酸の水飽和n-ブタノール液等の着色劑を霧吹でふきかけてやると着色するために糖の異動した位置がわかつてくる。この異動する速度は糖によつて異なる、また着色劑等によりそれぞれ異なつた色になるので分離分析が可能になつてくるのである。例えば着色劑に⁽¹⁾ アニリン0.93 g フタル酸1.66 g 水飽和 n-ブタノール100 ccといつた試薬を使用すればキシロース・アラビノースは赤褐色、葡萄糖、果糖、ガラクトースは黄褐色、麦芽糖

は黄色となる。しかしこの一回の分離で不充分である場合には一邊 40 cm 位の正方形の濾紙を用いて二次元的に行う。すなわちこの濾紙の一邊を展開剤例えば石炭酸の液に浸し、糖液は液面より少し上方の側方につけておく、すると展開剤は下方より一様に紙面上を上方に展開



第1圖 一次元クロマトグラフィーの例



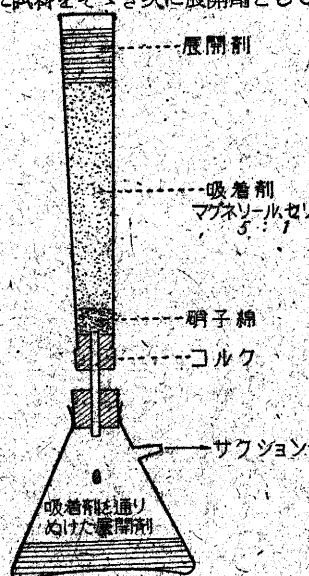
第2圖 二次元クロマトグラフィーの一例

して行き糖は横へは擴がらず一次元の時と同様に上方へのみ展開する。そこで第一次の展開が終わったならば濾紙を乾かし、こんどは前と直角に糖が展開している線を下にして、第二の展開剤例えば n-ブタノール-酢酸-水にひたす。第一次で分離した糖はさらに二段の分離をうけて紙面いつばいに展開することになる。まず二回の精溜を行つたようなものである。

やはりこの時も適當なる着色剤を噴霧してその位置、その色から糖を分析するわけである。このペーパークロマトグラフ法は非常に少量の試料ですみまた試料の糖をアセチレーションやメチレーション等面倒な前処理をすることもなく、非常な分離能力を有しているが何しろ紙についた、しみ程度の量であるため、これを溶出してその融點や旋光度を見る等ということは不可能でありまた正確な定量分析を行うには不適當である。

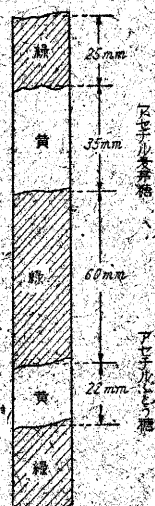
4. マグネソールを用いるクロマトグラフ分離分析法

この方法は米國で Wolfson 氏⁽²⁾が提唱した方法でこの分析しようとする糖類はまず糖類と酢酸ソーダ、無水醋酸を用いるか、ピリジン・無水醋酸を作用させたりしてアセチル化糖類とする必要がある。そして長さ 30 cm 位の少し太い管をもつた筒に *マグネソール・セリット 5:1 の混合粉末をサクシオンを利用して均一に充填する。この上に少量のベンゾールに溶かしたアセチル化した試料をそぎ次に展開剤として 1/100~1/200 程度の



第3圖 マグネソールを用いるクロマトグラフの装置

NaOH 2.5 N の溶液を着色剤として注射器等を用いてかけてやると KMnO_4 が還元されて緑色となり糖の吸着しているところは黄色になる。この色で糖の吸着されている位置がわかり、まだこの緑色をバックにした黄色の發色までの時間はブドウ糖ならば 30 秒二糖類であれば 30 秒~12 秒といったように異なるのである。このようにして糖の吸着された位置がわかつたらその部分を切離してアセトンで溶出し室温で放置すれば揮發しやすしいアセトンはなくなり分離された美しく結晶したアセチル化糖が得られる。



第4圖 つき出した吸着剤に着色剤を噴霧した一例

* マグネソール……合成した活性マグネシウム、シリケートで石油類の精製等に用いる品で Westvaco chlorine Products Co. の製品。セリット……造炭土を精製して作られ非常に白い軽い粉末で良質の濾過材である。John-Manville Co. の製品。

この単離した糖の融點やその他の性質をしらべることができのみならずアセチル化した試料に對して 95 % 程度に各成分が回收されるので重量分析的に定量分析を行うことができる。ただし試料をアセチル化する時に 100 % 反應が進まぬことが重量分析的に行う場合の難點となるが、糖の分離能力は非常に優秀である。

5 酵素を利用する分析法

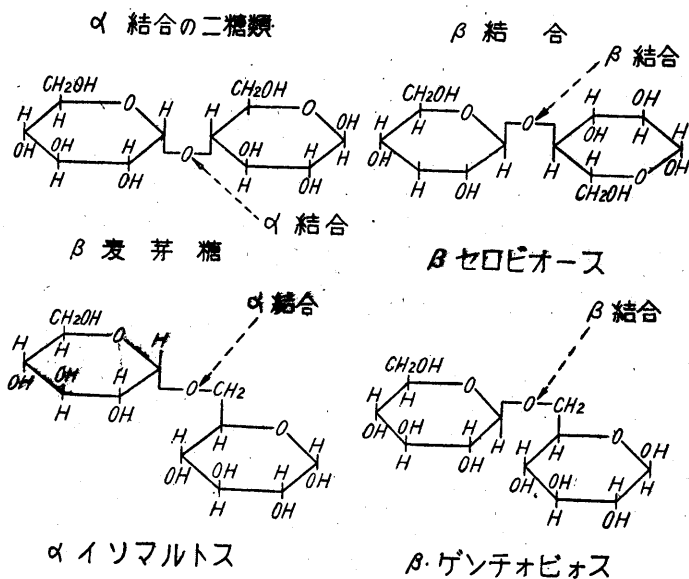
まえがきで述べたように糖類は生物體內でそのもついろいろな酵素で、合成されまたは分解されているものであるが、このデリケートな性質を有する糖類の分析に酵素を用いることは考え方からして非常に面白い。よくいはれているように酵素はその作用する物質すなわち基質との関係は鍵と錠のような関係があるのであつて、或る酵素はある基質にしか働かないといふ性質をもっている。そこで或る種の糖の分析を行わおとする時にその糖に働らく酵素を使用することができれば鍵で錠を開けるように、その糖を分析することができる。さてこの方法には酵素としてとり出したものを使用する方法と酵素を持った微生物をそのまま使用する方法とがある。例をとつて説明して見よう。まづ前者の例として都築⁽³⁾・山名兩氏により發表されたゲンチオビオスのエムルシンによる定量法を上げることができる。ゲンチオビオスは粗製ブドウ糖の苦味の成分であつて、澱粉から酸糖化によつてブドウ糖を作るときにできてきたブドウ糖の一部が反轉してできた二糖類であつてその結合はβ結合である。エムルシンとは杏・苦扁桃の中にある酵素でβ結合をした糖を分解する力を有している。それで或る溶液にゲンチオビオスが入っている時にエムルシンを加えればゲンチオビオスは分解して二分子のブドウ糖を生ずるのでその結果としてエムルシンを加える前と後では旋光度や還元力が變化してくる。この變化量はゲンチオビオスの量に比例するからその量がわかる。このとき溶液の中に麦芽糖等のα結合の糖があつてもエムルシンは作用しないのでゲンチオビオスだけを定量することができるのである。

6 微生物を利用する分析

同様に酵素を用いて分析するのであるが前述のエムルシンの場合のように酵素として分離したものを用いずに特定酵素を有する微生物を使用して行く方法である。一例として麦芽糖の分析⁽⁴⁾を説明してみよう。今試料にデキストリンと麦芽糖とブドウ糖およびペントースが混合している時に麦芽糖の量を定量する場合、麦芽糖とブドウ糖の二つを食うパン酵母とブドウ糖だけ

しか食べない酵母 *Saccharomyces marxianus*, *S. anomalus*, および *S. exigus* の兩種を用いる。まず試料の糖を適當の濃度とし、酵母汁を加え、オートクレープで殺菌して後兩種の純粹培養の酵母を加えてやると、パン酵母の方は麦芽糖とブドウ糖を食べつくし後者の酵母はブドウ糖のみを食べる。そこで發酵する前の還元力と發酵後の還元力を測定してみると最初の還元力はペントースと麦芽糖・ブドウ糖の還元力の和であり、パン酵母による發酵後は非發酵性糖であるペントースのみの還元力であり *Saccharomyces exiguus* 等による發酵後の還元力は麦芽糖とペントースの還元力であるそれで麦芽糖の量は兩種の酵母の發酵後の還元力の差がその還元力にあたるわけである。これで同時にブドウ糖の量もペントースの量も定量できるわけである。麦芽糖の分析の場合、最大還元糖の量を測定する時のように 2 % HCl を 100°C にて 2 時間作用させて麦芽糖をブドウ糖に分解させてその還元力増加量から測定しようと試みても、麦芽糖だけがブドウ糖になるのではなくデキストリンも分解してブドウ糖となるので定量ができないのみならず、ブドウ糖もこの時かなり崩壊を起すためにたとえデキストリンがない場合でも定量の結果は不正確となることは止むを得ない。だから上記微生物を用いる分析方法はすぐれた方法と思われるのである。

もう一例を上げれば、アラビノース⁽⁵⁾の定量分析を行う場合 *H. suaveolens* (NRRL No. 838) *C. Guilliermondii* (NRRL No. 488) を用いて分析する。前者は d キシロースだけを利用するのに對して、No. 488 は n-キシロースと l アラビノースの兩方を利用する性質を有しているので前の麦芽糖の例と同様に發酵前後の還元力の差を利用してそれ等を定量してゐるのである。以上酵素を用いる分析は非常によい方法と思われるが、た



第 5 圖

だそうした酵素や酵素をもつた微生物を発見したり作製したりすることが大變である。そしてよほどよい酵素を用いなくとも安物の錠が別な錠でも開くことがあるようにそれが作用してはこまる基質に作用して分析の精度を落すうれいがある。

7 比色法を用いる方法

分析に比色法を用いることはつきつものであるが糖はそのまゝでは可視部に吸収部をもたないために無色であるが赤外部には吸収部があるのでこれを利用して定性や定量を行つている。しかし大體糖には反應性に富むアルデヒド基かケトン基があるのでこれにアミノ酸等含窒素化合物がフェノール類等と適當に作用させて無色の糖類にいろいろ獨特な發色を行わさせて分析して行く。

まずフェノール系化合物の例をあげよう。Pyrocatechol⁽⁶⁾ によるブドウ糖分析の場合にはブドウ糖 0.1mg~1mg を含有する試料を 85% 磷酸 1cc と湯煎で 30 分間加熱する。しかしこの際着色はなく Pyrocatechol 2% をふくんだ 85% 磷酸を 4cc 加えてさらに 15 分間熱すると發色する。マンノース・果糖・アラビノース・等大體の糖類は磷酸と 30 分間煮ただけで着色するのでブドウ糖とは區別される。ガラクトース・乳糖およびメリビトース等は磷酸と煮ただけでの發色は非常に弱くブドウ糖と似ているが、Pyrocatechol との着色した色が全然異なるのでブドウ糖との區別がつくのである。そして硝酸鹽やトリプトファン等はこの分析の邪魔になるがかなりの夾雜物があつても分析が可能である。次の例として Anthrone⁽⁷⁾ による澱粉および纖維素の定量法では或る條件の下では試料の懸垂液に 0.1% の Anthrone をふくむ濃硫酸を加えることによつて生ずる綠色は、試料に比例した濃さを有しているので比色定量ができる。色の吸収の最高點は 625 mμ にあるからそのところで測定する。このような測定の範圍は 10~20γ であつて 2γ 位から定色する。

その他フェノール系の例としては濃硫酸中の石炭酸による果糖の定量、thymol を用いる方法、アルコール液中における 5 dinitro salicylic acid による果糖の定量などがある。

次に窒素化合物を用いた分析であるが、醤油の色の成分であるメラニン色素が糖とアミノ酸の結合してできたものであることは既知の事實であるが、その他の窒素化合物ともよく結合して着色する。その例として Carbayole⁽⁸⁾ による六炭糖の比色法であるが、その方法は Carbayole 1% 含有の無水アルコール 10cc を 84% 硫酸 300cc に加えて試薬とする。9cc の試薬を氷水中の瓶に入れ、1cc の試料を加え攪拌して湯煎で 15 分間加熱して氷水中で冷やしてから比色を行う。ブドウ糖は 50~150γ の範圍で 2~5% の誤差範圍で測定でき

る。ただブドウ糖、ガラクトース、果糖、マンノースというものの色調による識別は困難である。アミノ酸を利用した例では⁽⁹⁾ 五炭糖の cysteine による比色法がある。80% 硫酸に糖を加えそして cysteine を室溫で加えると、その糖類に應じ 375~410 mμ の範圍でピークを有する吸収帯があるものとなる。そして糖により發色の時間も異なるので適當な條件の下で行うことにより識別や定量が可能になるのである。

その他ケトースの amino-guanidine による比色法 β-indoleacetic acid および indoleprotonic acid による糖の定色分析 triphenyltetrayolium chloride を用いる還元糖の分析、糖分析に果糖—尿素の反應を利用したもの、lysine glycine arginine 等をいろいろの條件で反應させて分析する方法等がある。

フェノール系および窒素化合物を利用したもの、他にモリブデン青色反應を比色法に用いて分析したり黃血鹽を使用したもの、シッフの試薬やフェリング液を比色法に使用した分析法等がある。

8 あとがき

要するに糖は不揮発素の數が多い等のため性質の非常に近い異性體が多いけれどもクロマトグラフ法の發達により、この分離分析も可能となつた。そしてまた糖類が生物の生産物だけに生物の生命である酵素により分析できることはおもしろいことである。比色法の發達は糖の分析においてもそれを容易にし微量の檢出を可能とした。

文 献

- (1) 市川、聯衆工學 28, 182 (1950)
- (2) Wolfson J.A.C.S. 527 (1948)
- (3) 紅橋、山名、科學 18, 419 (1948)
- (4) Davis & Darsh Ang. Chem. 27, 118 (1914)
- (5) Auerhelmer, Wickerham & Schn epp Anal. Chem. 876 (1948)
- (6) Hestrin & Magee Anal. Chem. 1932 (1947)
- (7) Viles & Silverman Anal. Chem. 950 (1949)
- (8) Holzman, Allister & Nitzmann J. Biol. Chem. 171, 27 (1947)
- (9) D. sche J. Biol. Chem. 181, 359 (1949)

高 速 度 鋼

小 柴 定 雄 著

A 5 版 250 頁
定 價 250 圓
千 35 圓

— 誠文堂新光社發行 —