

ガスクロマト法による糖類の定量

宮 崎 信⁽¹⁾ ・ 高 橋 敏⁽²⁾

古 屋 信 子⁽³⁾ ・ 島 田 謹 爾⁽⁴⁾

緒 言

著者らは、リグニン-炭水化物複合体(lignin-carbohydrate complexes, LCC)の研究で、その炭水化物構成糖の分析にガスクロマトグラフィーの手法をもちいるため、分析法の検討をおこなったが、ここではその結果について報告する。

植物体の化学組成を研究するにあたって、遊離状あるいは加水分解によって生成する糖類を定性、定量することがしばしば要求される。その目的のために、ペーパークロマトグラフィーによる分析手法が糖化学の分野にとりいれられ、微量試料中の構成糖がかなりの精度で測定できるようになり、大きな貢献をしている。また最近では、ペーパークロマトグラフィーの変法である薄層クロマトグラフィーを併用して、前者の欠点のひとつである長時間を要する分析所要時間の短縮をすることができるようになった。

しかし、現在急速な進歩をみているガスクロマトグラフィーをこれらのかわりに採用できれば、分析法の容易なこと、精度が高いことの点で大きな効果を期待しうるであろう。その意味で、最近そのころみが多数みられるようになった。しかしこの方法による場合は、糖類が不揮発性であるから、まず揮発性の誘導体にかえる必要があり、そのため糖類をメチル化、アセチル化、あるいはトリフルオルアセート¹⁾にして供試料とする。

最近、SWEETLEY ら²⁾が提案した糖の trimethylsilyl ether(TMSE) 誘導体をガスクロマトグラフィーにかけける方法は、誘導体の調製がいちじるしく容易であり、またクロマトグラム上での分離がよいこと、分析時間が短いことなどの特質があつて、注目すべきものであつた。すなわち、C₂ (glycolaldehyde) から C₂₄ (stachyose) にいたる多数の糖とその関連物質のTMSEを、主として silicon(SE-52)、および polyethylene glycol succinate(EGS)-Chromosorb W をつかつて分析し、定量として不十分ではあつたが大きな成果があつた。その後、RICHEY ら³⁾は EGS カラムをつかい、methyl- α -D-galactopyranoside を内部基準に pentose, hexose, deoxyhexose などの定量をこころみたが、誤差が10%におよんだ。SAWARDEKER⁴⁾らは、carbowax 20M で、methyl- α -D-mannopyranoside を内部基準にして、arabinose, ribose, xylose, fucose, rhamnose, galactose, glucose, mannose などを定量し、 $\pm 1\%$ 誤差で分析できるとしたが、arabinose と mannose が共存する場合、glucose と xylose が共存するような場合など、正確な値がえられない。そのほか、WULFF⁵⁾、ALEXANDER⁶⁾らは、silicon grease DC あるいは SE-52 をつかい定量化をこころみているが、前者では誤差が2~5%、後者は glucose のみの定量をおこなっている。今年にな

1) 林産化学部林産化学第2科リグニン研究室長・農学博士

2) 林産化学部林産化学第2科リグニン研究室

3) 4) 林産化学部林産化学第3科パルプ研究室

って、BROWER⁷⁾ は EGS または SE-52 をつかい、木材加水分解生成糖に関連の深い arabinose, xylose, mannose, galactose, glucose 混合糖を対象として定量し、また木材セルロース加水分解物のように多量の glucose をふくむ試料の分析をも意図した。

しかしこれら多くの報告のほかに、最近、BETHGE⁸⁾ らによって提案された方法は、とくに注目に値するものであろう。

本来、糖は溶液中で理論的に5種類の anomer(α -, β -furanosides, α -, β -pyranosides, linear form) をとりうるが、実際にはうち4つが問題になり、事実ガスクロマトグラム上にも相当するそれぞれのピークをあたえる。そしてこれら形態の量比は、溶媒の種類、温度などによってもことなるので、ピーク面積を測定して定量する際は、つねに一定の割合になる条件のもとで試料調整をおこなうことが、正確な、また再現性のある結果をうる上に必要であらう。すなわち、一定条件のもとで平衡状態にある糖溶液について測定すれば、いくつかの形態の割合に相当する面積をもったピークを求めることができ、さらにピーク1つをえらんで全ピークの面積を算出するはずである。BETHGE は、糖類がピリジン溶液中で微量の過塩素酸リチウムの存在下で単時間に平衡になることを利用し、この平衡液から TMSE を調製して、arabinose, xylose, fucose, mannose, glucose, galactose の混合糖を、誤差 $\pm 2\%$ 以下の精度で定量することができた。

著者らは、LCC 構成糖の分析でこの方法を参照した。しかし、カラム充填剤がかれらのものとことなっており、そのため以下にのべるように、まず各種の糖の標品およびそれらの混合糖をつかつての基礎的な検討を必要とした。

ガスクロマトグラフィー分析条件

日立製KKガスクロマトグラフィー装置 KGL-2B 形(恒温式)を使用した。カラム: $0.4 \times 200\text{cm}$, U 字形ステンレス製。充填剤: 液相 EGS, 担体 Chromosorb W (80~100mesh, acid washed), 添着量 15%。キャリアーガス: N_2 , 流量: 65ml/min 。気化室温度: 180°C 。カラム温度 180°C 。検知器: 水素炎検知器。

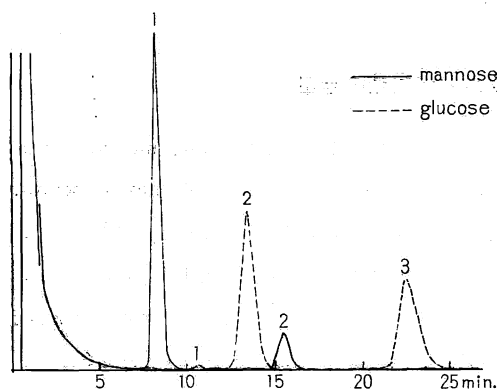
また、えられたクロマトグラムのピーク面積は、重量法で測定した。

試料調整

実験の部でのべるように、D-arabinose, D-glucose, D-xylose, D-galactose, D-mannose, L-rhamnose, D-ribose の7種の標品について、BETHGE の方法にしたがってピリジン中でまず平衡にし、つづいて TMSE を調整、n-hexane に溶解して試料とした。

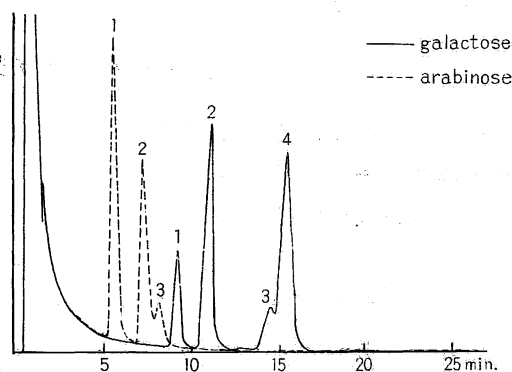
単糖類のクロマトグラム

上記7種の単糖のクロマトグラムを Fig. 1~4 にしめた。ピークの形はほとんどの場合鋭く、また対称形で、ガスクロマトグラムとしてすぐれている。しかし galactose, arabinose, ribose などにみられるように、ピークのなかには隣接するものとの分離が不完全なものもある。このようなときは両者をあわせてままで面積測定をおこなった。ピーク面積の割合は、数回の実験の結果ほとんど一定値をしめた。なお各糖とも図示した以上に時間をかけても、新たにピークをみとめなかったが、これは TMSE 調整時のエーテル化が完全であったことをしめすものであろう。Table 1 にそれぞれのピーク面積の100分率と、



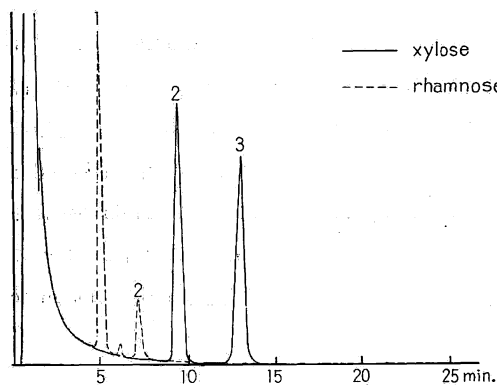
第1図 mannose および glucose TMSE のクロマトグラム

Fig. 1 Chromatograms of TMSE derivatives of mannose and glucose.



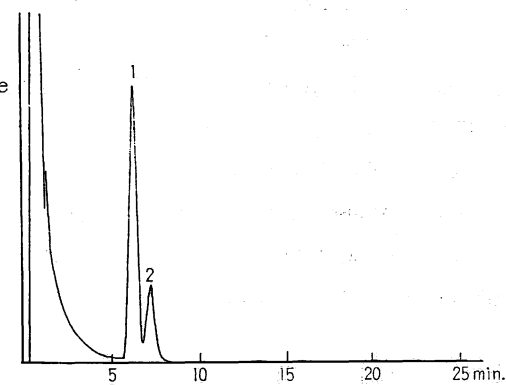
第2図 galactose および arabinose TMSE のクロマトグラム

Fig. 2 Chromatograms of TMSE derivatives of galactose and arabinose.



第3図 xylose および rhamnose TMSE のクロマトグラム

Fig. 3 Chromatograms of TMSE derivatives of xylose and rhamnose.



第4図 ribose TMSE のクロマトグラム

Fig. 4 Chromatogram of TMSE derivative of ribose.

第1表 平衡時における単糖類 anomer ピークの retention time と面積割合

Table 1. Equilibrium compositions. Peaks are numbered in the order of the increasing retention time.

Sugars	Peak no.	Retention time min. sec.	% to total area	Sugars	Peak no.	Retention time min. sec.	% to total area
glucose	1	10.40	1.6	xylose	1	6.10	4.4
	2	13.20	48.6		2	9.30	45.8
	3	22.20	49.8		3	12.55	49.8
mannose	1	8.20	83.1	arabinose	1	5.40	53.6
	2	15.20	16.9		2	7.20	46.4
galactose	1	9.10	14.1		3	8.10	
	2	11.10	34.4	rhamnose	1	5.00	84.3
	3	14.30	51.6		2	7.20	15.7
	4	15.30		ribose	1	6.20	(80.4)
			2		7.10	(19.6)	

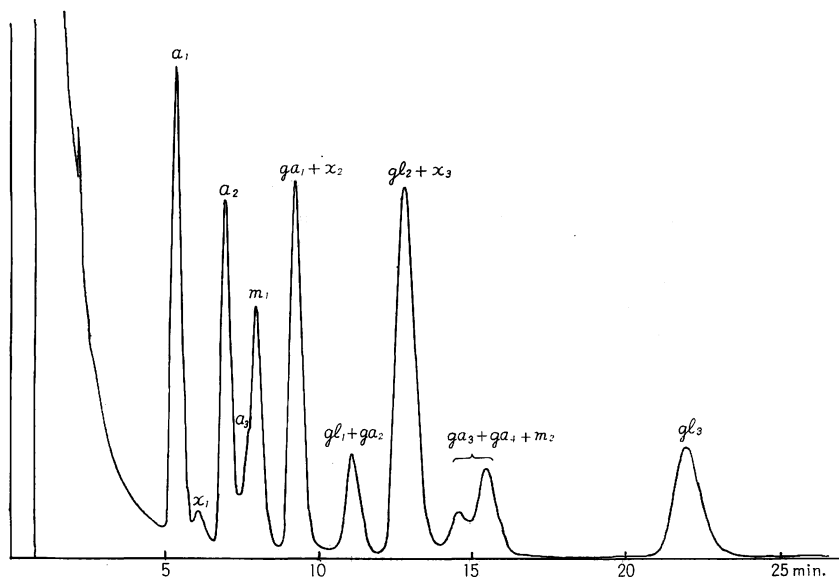
retention time をとりまとめた。

混合糖のクロマトグラムと構成糖の定量

材中の炭水化物は大部分高分子化合物で、加水分解すると最終的には glucose, xylose, mannose, galactose, arabinose などの hexose, pentose 類や、ウロン酸類などの糖関連物質をあたえる。hexose, pentose の TMSE 誘導体は構造が類似し、かつ C 含有量がそれぞれ 46.62%, 46.52% でほとんど差がないので、両者が共存するときにもクロマトグラム上のピーク面積は事実上両者の実在量に比例する。したがって、材の糖成分研究手法に本法を採用する際、クロマトグラムの複雑な多数のピークについて明確な帰属ができ、さらに Table 1 の面積割合をつかって個々の糖が定量できれば、はなはだ好つごうといえる。

そこで上記 5 種類の単糖の既知量を混合し、分析をこころみた。Fig. 5 はえられたクロマトグラムの 1 例である。ピークの帰属は、Fig. 1~4 および Table 1 をつかっておこなったが、きわめて容易に解明できた。しかし、一見 1 成分からなるようにみえる鋭いピークも、2, 3 の要素が重なっているものがあり、また裾の部分で隣接ピークと重なるものもみられる。

面積の算出はつぎのようにしておこなった。このクロマトグラムの特徴として、glucose のピーク 3 (以下 gl_3 と書く。他の糖についても同じ) は単独成分でしかもまったく孤立しており、ピーク面積の測定は容易である。これより glucose の全面積の算出が可能である。またピーク gl_1+ga_2 中の gl_1 の量が算出できるので、galactose の全面積が算出される。一方ピーク gl_2+x_3 をつかえば x_3 の面積がもとめられ、全 xylose の面積が求められる。別法として xylose は ga_1+x_2 から求める。arabinose は 2 つのピーク a_1 , x_1 の面積から x_1 を差し引くことで a_1 を求め、これより算出できる。この場合ピーク a_1 の裾に x_1 が重なっているが、 a_1 が鋭い形なのでこのピークのみをもちいても概算値を求める。mannose



第5図 glucose, mannose, galactose, xylose, arabinose 混合糖 TMSE のクロマトグラム

Fig. 5 Chromatogram of TMSE derivatives of five sugars mixture (glucose, mannose, galactose, xylose and arabinose).

はピーク a_2 , a_3 , m_1 の計から a_2 , a_3 を差し引くことで m_1 を求め, これから全 mannose を算出する。別法として, ピーク $ga_3+ga_4+m_2$ から ga_3+ga_4 を差し引いて m_2 を求め, これからも mannose の量を出すことができる。計算の 1 例をしめせばつぎのようである。

$$\begin{aligned} \text{glucose} &= gl_3 \times \frac{100}{49.8}; \text{galactose} = (gl_1 + ga_2 - gl \times 0.016) \times \frac{100}{34.4}; \text{xylose} = (x_2 + ga_1 - ga \times 0.141) \\ &\times \frac{100}{45.8} \text{ または } \text{xylose} = (x_3 + gl_2 - gl \times 0.486) \times \frac{100}{49.8}; \text{arabinose} = (a_1 + x_1 - x \times 0.044) \times \frac{100}{53.6}; \\ \text{mannose} &= (a_2 + a_3 + m_1 - a \times 0.464) \times \frac{100}{83.1} \text{ または } \text{mannose} = (m_2 + ga_3 + ga_4 - ga \times 0.516) \times \frac{100}{16.9} \end{aligned}$$

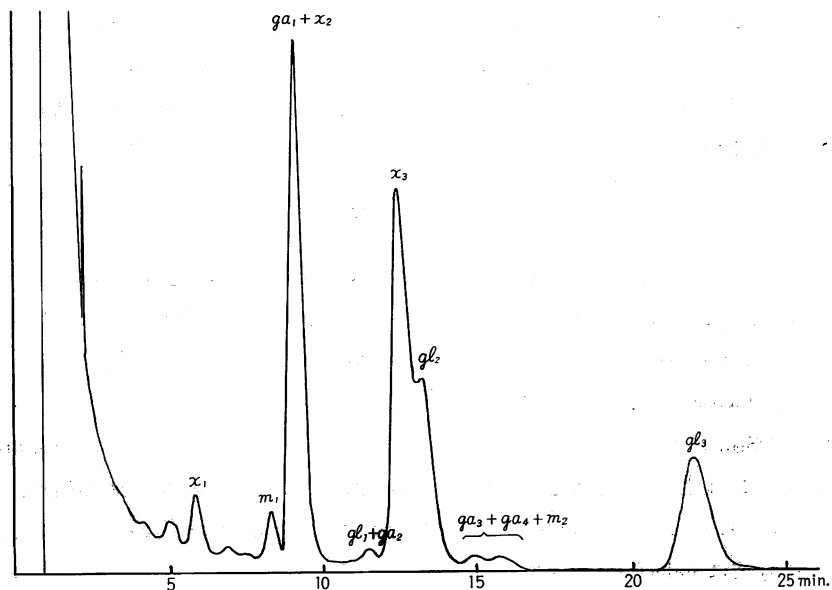
第 2 表は Fig. 5 のクロマトグラムのピーク面積から構成糖の 100 分率を求め, それと実際の秤取量の

第 2 表 5 種類の単糖混合試料の分析結果

Table 2. Analyses of five component sugars mixtures.

* Values were calculated from a chromatogram in Fig. 5.

Sugar	glucose	mannose	galactose	xylose	arabinose
Theoretical %	10.3	6.6	16.5	29.8	36.8
Observed %	10.0	8.9	15.4	29.7	36.0
Difference	-0.3	2.3	-1.1	-0.1	-0.8
Theoretical %	20.3	10.5	14.9	28.1	26.1
Observed % *	20.5	10.4	13.2	28.7	27.1
Difference	0.2	-0.1	-1.7	0.6	1.0



第 6 図 コナラ辺材から調製した Björkman LCC の酸加水分解糖のクロマトグラム

Fig. 6 Chromatogram of sugars in acid hydrolyzates of Björkman's LCC prepared from sap wood of *Quercus serrata*. Content values among xylose, glucose, galactose and mannose were calculated as 62.4, 33.2, 1.2 and 3.1%, respectively.

100 分率とを比較したものと、図示しなかったが、他のおなじような例とをあわせしめたもので、両者とも理論値と測定値がよく一致している。

しかしこれら5種の糖に rhamnose を加えた場合は、 a_1 , r_1 および a_3 , r_2 のピークがかさなって、2者を区別して定量することができなかった。またこの方法でグルクロン酸の定量をおこなったが、相当するピークがえられなかった。

Fig. 6はコナラ *Quercus serrata* 辺材部から調製したいわゆる Björkman LCC を、酸加水分解してえた糖液を分析した際のクロマトグラムである。今までの標準試料のときとことなり、若干の未知成分が共存してベースラインにやや明確を欠くが、xylose, glucose, mannose, galactose の相互の量比についてはかなりの精度で定量できる。なお LCC の加水分解については別の機会にとりまとめて報告する。

実験の部

標準試料 10mg をふくむ糖水溶液を減圧下に蒸留して水をのぞき、さらに少量のベンゼンアルコール (1:4) 混液を加え、2回減圧で根跡の水をのぞく。過塩素酸リチウム 2% をふくむピリジン 1ml をくわえ、40°C で2時間放置。hexamethyldisilazane 0.2ml, trimethylchlorosilane 0.1ml をくわえ5分間40°C にたもち、その後45°C、減圧でピリジン留去、さらに少量のベンゼンをくわえて減圧蒸留しピリジンをのぞく。残渣に n-ヘキサン 1ml をくわえ、不溶物は傾斜でのぞき、ガスクロマトの試料とした。

混合糖の場合は、それぞれ任意量の糖を秤取して混合水溶液とし、これから糖量が 10mg になるようとりわけ、上記方法にしたがって試料調製をした。

コナラ LCC の調整は Björkman 法⁹⁾でおこなった。エーテル、アセトン可溶部をのぞいた辺材木粉を定法にしたがって処理し、まずMWLを調製、その際えられる残部を、50日間時々振盪してジメチルホルムアミドに浸せし、溶出した LCC を文献どおり精製した。えられた粉末状 LCC 約 50mg について、KLASON リグニン定量と同じ方法で加水分解、リグニンを濾過してのぞいた濾液のうち、糖量約 10mg に相当する部分を炭酸バリウムで中和後、減圧下に濃縮し、以下上記の方法で試料調製をした。

考 察

本研究では、カラムに polyethyleneglycol succinate—Chromosorb W をつけた。したがって BETHGE らの場合とことなり、それぞれの糖についてのピーク数, retention time にかなりちがった結果をえた。たとえば arabinose では3つのピークをえるが、XF₁₁₂ のときには分離が不完全ながらも4つえられおり、また glucose では2つの主要なピークのほかに小さなピーク1つがみとめられたのに対し、XF₁₁₀₅, XF₁₁₁₂, OS₁₃₈, BDS などでは2つのピークがみられるのみである。しかしこのことが、arabinose や glucose の定量値に直接大きな影響をあたえるものではない。またピークのあらわれる順序も、たとえば XF₁₁₁₂ とくらべると、xylose, mannose などとことなっている。glucose も gl_8 は単独で最後にあらわれるが、XF₁₁₁₂ では galactose とかさなっている。

他方、平衡状態になった anomer の量は、ガスクロマト分析条件、ピーク数と分離の様子がことなるため、えられた結果を厳密に比較することがむずかしいが、一応対比してみると、glucose をのぞいて両者のあいだに大差がみとめられない。glucose について著者らのえた値は、混合糖中の glucose を定量する際に適用して理論値と一致した値がえられている。

ガスクロマト分析時間は、著者らの場合25分あれば十分で、大幅な分析所要時間の短縮が可能となった。

混合糖の分析でしめたクロマトグラムからもわかるように、このカラムは糖の TMSE 誘導体の定性定量に適したものであり、とくに木材加水分解で一般に生成する糖類の分析につかって有効であると考えられる。しかし既述したようにウロン酸の分析には適切な結果がえられておらず、今後検討すべき点であるといえよう。

文 献

- 1) VILKAS, M., Hiu-I-JAN, Mme G. BOUSSAC *et* Mme M.—C. BONNARD: Tetrahedron Letters (14), 1441, (1966)
- 2) SWEELY, C. C., Ronald BENTLEY, M. MAKITA and W. W. WELLS: J. Am. Chem. Soc., **85**, 2497, (1963)
- 3) RICHEY, Jane M., Herman G. RICHEY Jr. and Rosemary SCHRAER: Anal. Biochem., **9**, 272, (1964); C. A., **61**, 16415C, (1964)
- 4) SAWURDEKER, Jawahar S. and James H. SLONEKER: Anal. Chem., **37**, 945, (1965)
- 5) WULFF, G.: J. Chromatog., **18**, 285, (1965)
- 6) ALEXANDER, R. J. and J. T. GARBUTT: Anal. Chem., **37**, 303, (1965)
- 7) BROWER, H. E., J. E. JEFFERY and M. W. FOLSOM: Anal. Chem., **38**, 362, (1966)
- 8) BETHGE, Per Olof, Christer HOLMSTRÖM and Siv JUHLIN: Svensk Papperstidn., **69**, 60, (1966)
- 9) BJÖRKMAN, Anders: *ibid.*, **60**, 243, (1957); Ind & Eng. Chem., **49**, 1395, (1957)

Quantitative Gas Chromatography of Sugars.

Makoto MIYAZAKI, Satoshi TAKAHASHI, Nobuko FURUYA and Kinji SHIMADA.

(Résumé)

The Present paper deals with studies on quantitative analyses of simple sugars and their mixtures using gas chromatography.

Analyses of sugars as their trimethylsilyl ether derivatives have been demonstrated by many workers, and the method reported by Per Olof BETHGE *et al.* among them is important from the point of view that it involves equilibration of the different forms of sugars in pyridine solution by adding lithium perchlorate as catalyst.

In these studies, we adopted the pretreatment in preparation of sugars TMSE, and analysed these derivatives by gas chromatography under the conditions, which differ from those of BETHGE'S.

Apparatus. Hitachi KGL-2B isothermal gas chromatograph equipped with hydrogen flame ionization detector was used.

Column. A 0.4×200cm, U shaped stainless steel column packed with 15% polyethyleneglycol

succinate on Chromosorb W washed with acid was employed.

Operating condition. The column and the injector ovens were heated at 180°C. Flow rate of nitrogen gas was 65 ml/min.

The Chromatograms of seven simple sugars, mannose, glucose, galactose, arabinose, xylose, rhamnose and ribose, are illustrated in Fig. 1~4, and the equilibrium compositions calculated from the peak area and the respective retention time are summarized in Table 1.

Analyses of mixture of five component sugars which are often found in wood hydrolyzates, were also carried out. In this case, calculation of sugar ratio in the sample was made by using the values in Table 1. Analytical results thus obtained were accurate within 2%, as shown in Table 2. A typical chromatogram is also given in Fig. 5, for example.

A chromatogram of sugars obtained by acid hydrolysis of lignin-carbohydrate complexes prepared from sap wood of *Quercus serrata* is shown in Fig. 6. In this case, a small amount of unidentified components lie on the base line and the chromatogram is somewhat less clear as compared with those of pure sugars, but available values of content ratio among xylose, glucose, galactose and mannose could be calculated in the same way.