

果実及蔬菜中の糖の

ペーパークロマトグラフ法に依る検出, I.

林 義男, 多田孝子

Detection of Sugars in Fruits and Vegetables

by Partition Paper Chromatography, I.

YOSHIO HAYASHI and ATSUKO TADA.

PARTRIDGE^{1) 2)} が糖の検出に濾紙クロマト法を創立してから多数の研究者が広く之を応用し、幾種かの多量の糖の中に夾雑する量の他の糖の検出に利用する価値のあることが分り、種々の生物体中の糖の検出とその種類の判別に迄発展した。

又 HAWTHORNE³⁾ は同法による糖の微量定量法を案出している。

PARTRIDGE¹⁾ は展開溶剤としてフェノール、コリヂン、ブタノール等を、発色剤としてアンモニア性硝酸銀を spray しているのである。

その後展開溶剤及び発色剤については多数の研究者に依り種々のものが考案され、多種類が挙げられるが著者達は展開溶剤に一次元ではブタノール (n) の水飽和液が最も簡便で糖検出に適切であり、二次元法に於てはフェノール水を併用することに依り良結果を得る事も知り専ら之等を展開溶剤とした。

発色剤としてはベンゼン-トリクロール 醋酸⁴⁾ が各種の糖に対する発色範囲の広いために吾々の糖検出に採用した。

然し尚将来之等の試薬について更に検討してみたいと考えている。

而して本実験は従来多くの研究結果を基盤とし、広く生物体中に於ける各種の糖の分布とその動向に応用し、生物体中の糖の生理機構の一端を明かにせんとして行ったものである。本報告はその第一報として糖の一次元並に二次元⁵⁾ の展開及び糖の検出限界量も検索し、数種の果実及び蔬菜につき研究した結果をまとめた。

実 験

実験に当り諸種の試薬、装置の使用法並に注意すべき事柄は以下のようである。

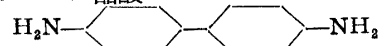
(1) 展開溶剤

一次元用には専ら水飽和-n-ブタノールを用い、二次元用には之と 15~20% 水飽和-フェノールを順次用いた。n-ブタノール、フェノールは市販品を再溜して用いた。

ここに水飽和-n-ブタノールは完全に水を飽和した溶液であって以下の結果の示すように各種の Rf 値が従来の報告と割合によく一致するので、水の量を変更したり、NH₃ を添加するような方法は用いなかった。

但し Rf は濾紙の性質等に依り必ずしも一致せぬ惧れもあるので生物体を検索する場合に必ず已知の糖を併用して比較決定した。

(2) 発色剤

ベンゼン-トリクロール 醋酸
0.5g のベンゼン H₂N——NH₂ を 10ml. の氷醋酸に溶し、更に 40% (W/V) のトリクロール 醋酸溶液 10ml. を加え、これに酒精 80ml. を追加して作る。常に冷暗所に保存した。

此の発色剤は後に記述するように諸種の糖を広く発色せしめるが遊離及び結合型の Glucose に特に鋭敏であり、還元力を有しない蔗糖でも極めて明瞭に分る。果糖に対しては黄色に発色する。

(3) 濾 紙

東洋濾紙 No. 50 を使用した。而して一次元用には 2×40~2×50 (cm) 二次元用には 45×45 (cm) 40×45 (cm) の大きさのものを用了。又常に対照として已知の糖を併用する場合には稍硬質に近い定性濾紙でも糖の検出に用いて好結果を得る。

(4) 使用した已知の糖と果実及蔬菜

糖は基礎的な検討もあったために麦芽糖、乳糖、蔗糖、葡萄糖、果糖、アラビノーズ、キシロースの各市販品 (純化学用) 2.5%, 0.5%, 0.25% の濃度の水溶液とし約 5 μl. の original spot として用いた。

従来 1%⁶⁾ 前後が適当とされているが濃度の高低に依り発色の程度と限界と斯かる実験に好ましくない Tailing の有無をも知るために之らの濃度の液を比較した。

その結果 Tailing は何れの濃度でも殆んど起らず従って Rf 値もよく定まった。又ペーパークロマトグラフイーを遂行することに依って之らの市販の糖が各々 検出

できる不純の糖を含有していなかった事も知り得た。

果実はみかん、りんご、蔬菜は白菜、小松菜の茎葉別の夫々の抽出液であって、汁液も多く糖含量の多いものは搾汁そのまま用いた場合もある。又水抽出液を醋酸鉛、硫化水素で処理し、濃縮して用いた例もある。此の濃縮の程度は現在は糖の定性確認に供するだけであるので生物体の種類により原存する糖濃度の稀薄なため充分濃縮したに過ぎないのであって糖の濃度は定量しなかった。

(5) 装置

高さ 50 cm 内径 17 cm のガラス円筒の上下を硝子板で閉じ、上昇法に於ては大型硝子皿、下降法に於ては出来るだけ高くした木製の台を置きその上に小型の硝子皿を置いた。

尚使用前に展開溶剤の蒸気で器内を飽和しておくことに努めた。

(6) 展開時間と温度

展開溶剤の移動速度は溶剤の種類と濾紙の性質及び温度に依り左右されるが、Rf 値に大きな影響を与えない。

又一定温度に保持する装置もなく、比較対照の糖を併用するから、その時々室温中で展開した。

吾々の場合前記の大きさの濾紙を用いて下降法では約 15 時間、上昇法では一方向に 30~48 時間を要して完了した。

(7) 展開を終了した濾紙の乾燥

已に報告されている所に依れば通常室内気流中に乾燥する場合は 5~12 時間放置してその目的を達するというが殊にフェノールは濾紙に残溜し易く、二次展開に支障を来す結果も生じることを知ったので約 65°C の瓦斯乾燥器にて 10~15 分間乾燥することにした。此の程度の乾燥にて糖の検出には支障は無い。

(8) 発色剤噴霧後の加熱

発色剤を異にするに従って、噴霧後の加熱操作が多少相違することは各研究者の報ずる所であるが一般に 100°C、3~5 分の加熱に依り呈色はよく完了することを知った。

結 果

第一表 種々の糖濃度と発色剤との関係

発 色 剤	糖の種類 濃度	Glucose	Fructose	Sucrose	Maltose	Arabinose	Xylose	備 考
		①	2.5 %	茶褐色	薄淡褐色の輪状	—	淡橙色	
アンモニア性-硝酸銀	0.5 %	淡橙茶色	不明瞭	—	—	薄淡褐色	薄褐色	
	0.25 %	薄淡橙茶色(不明瞭)	—	—	—	淡茶色(やゝ不明瞭)	淡茶色(やゝ不明瞭)	
レゾルチン-塩酸	2.5 %	—	帯赤黒色	薄帯赤黒色	ピンク色(不明瞭)	淡帯黒青色	帯黒青色	濾紙全体が淡い小豆色
	0.5 %	—	濃小豆色	小豆色	—	淡青色(不明瞭)	淡青色(不明瞭)	
	0.25 %	—	小豆色	小豆色	—	—	薄青色(不明瞭)	
アニリン-フタル酸	2.5 %	帯灰黄色	濃黄色	やゝ濃い黄色	淡黄色(不明瞭)	淡縁青色	縁青色	
	0.5 %	帯灰黄色(不明瞭)	黄色	黄色	淡黄色(不明瞭)	淡白青色	淡縁青色	
	0.25 %	帯灰黄色(不明瞭)	淡黄色	淡黄色	痕跡	淡白青色(不明瞭)	淡縁青色	
m-フェニレンジアミン-(塩酸塩)-酒精	2.5 %	帯黄褐色	黄色	やゝ濃い黄色	—	帯黄褐色	やゝ濃い帯黄褐色	紫外線照射
	0.5 %	薄帯黄褐色	黄色(やゝ不明瞭)	黄色(不明瞭)	—	淡帯黄褐色	帯黄褐色	
	0.25 %	—	—	—	—	—	帯黄褐色	
フロログルシントリクロール醋酸	2.5 %	—	卵色	薄淡卵色	—	—	—	
	0.5 %	—	卵色	薄淡卵色	—	—	—	
	0.25 %	—	薄淡卵色(不明瞭)	不明瞭	—	—	—	
ベンチデン-トリクロール醋酸	2.5 %	濃褐色	やゝ茶色がかった黄色	黄褐色	褐色	黒褐色	濃褐色	濾紙全体が淡い黄褐色
	0.5 %	淡褐色	黄色	薄黄褐色	薄黄褐色	褐色	褐色	
	0.25 %	薄黄褐色	黄色	薄黄色	薄黄褐色	薄褐色	薄白褐色	

註 本表は濾紙 2×20 cm に表中に示す濃度の各糖を 5 μl につけた original spot に対する発色呈度を示す。又

original spot に於ける糖量は 2.5%, 0.5%, 及び 0.25% に於て夫々 125r, 25r, 12.5r となる。又表中一は呈色反応のなかつたことを示す。

此の表に於て知ることはベンゼン-トリクロール醋酸が呈色度も最も強く、多種類のに広く応用できることである。又同発色剤が吾々の用いた糖の最低濃度 12.5r/5 μ l に於ても尚よく他の発色剤より勝っていることである。

次に果実蔬菜についての結果を見ると以下の様である。

§ りんごについて

第二表 りんご果汁の糖の Rf 値 (室温)

展開溶剤: 水飽和-n-ブタノール
濾紙: 2 \times 40 (cm) 6枚, 下降法

	S.	Gl.	Fr.	Ma.	Ar.	Xy.
りんご 1	0.040	0.085	0.11	—	—	—
りんご 2	0.038	0.086	0.12	—	—	—
対 照	0.038	0.094	0.107	—	—	—

註 表中 S. Gl. Fr. Ma. Ar. Xy. は夫々蔗糖, 葡萄糖, 果糖, 麦芽糖, アラビノーズ, キシロースを表わし, 以下の表及び本文に於いても之を用いた。

りんご 1: りんご可食部に蒸留水を加えて搗磨, 搾汁し, 更に水にて約 2 倍に稀釈せるもの。

りんご 2: 同上の搾汁を Na₂CO₃ にて中和し, 醋酸鉛, 硫化水素処理の後, 濾過し, 少量に濃縮す。

第三表 りんご果汁の糖の Rf 値 (室温)

展開溶剤: 水飽和-n-ブタノール
濾紙: 40 \times 40 (cm) 上昇法 (24時間)

	S.	Gl.	Fr.	Ma.	Ar.	Xy.
りんご 1	0.024	0.067	0.098	—	—	—
りんご 1	0.026	0.067	0.097	—	—	—
平 均	0.025	0.067	0.098			
りんご 2	0.024	0.065	0.097	—	—	—
りんご 2	0.025	0.065	0.095	—	—	—
平 均	0.025	0.065	0.096			
対 照	0.025	0.066	0.092	0.011	0.11	0.12

註 りんご 1: りんごの可食部を搗磨搾汁して得た液。

りんご 2: 第二表の 2 と同じ。各 original spot の間隔は約 4cm である。

第四表 りんご果汁の糖の Rf 値 (室温)

展開溶剤: 水飽和-n-ブタノール
濾紙: 40 \times 50 (cm) 上昇法 (48時間)

	S.	Gl.	Fr.	Ma.	Ar.	Xy.
りんご 1	0.035	0.07	0.10	—	—	—
りんご 1	0.036	0.078	0.10	—	—	—
平 均	0.036	0.074	0.10			
りんご 2	0.034	0.074	0.10	—	—	—
りんご 2	0.037	0.072	0.11	—	—	—
平 均	0.036	0.073	0.105			
対 照	0.04	0.071	0.11	0.024	0.11	0.14

註 りんご 1: 第三表 1 を水にて約 2 倍に稀釈せるもの。

りんご 2: 第三表と同じ。

各 original spot の間隔は約 4cm である。

第二表~第四表の結果からりんご果汁中の糖は葡萄糖, 果糖, 蔗糖の三種であつて他の spot はみられなかつた。

§ みかんについて

第五表 みかん果汁の糖の Rf 値 (室温)

展開溶剤: 水飽和-n-ブタノール
濾紙: 2 \times 40 (cm) 6枚, 下降法

	S.	Gl.	Fr.	Ma.	Ar.	Xy.
みかん 1	0.03	0.084	—	—	—	—
みかん 2	0.035	0.084	—	—	—	—
みかん 3	0.028	0.075	—	—	—	—
対 照	0.046	0.084	0.11	0.022	0.13	0.15

註 みかん 1: みかん可食部に水少量を加えて搗磨, 搾汁し, Na₂CO₃ にて中和したもの。

みかん 2: 1 の一部を醋酸鉛, 硫化水素にて処理し, 濾過したもの。

みかん 3: 2 の 1 部を減圧濃縮したもの。

第六表 みかん果汁の糖の Rf 値 (室温)

展開溶剤: 水飽和-n-ブタノール
濾紙: 40 \times 50 (cm) 上昇法

	S.	Gl.	Fr.	Ma.	Ar.	Xy.
みかん 1	0.0303	0.067	0.08	—	—	—
みかん 2	0.025	0.057	?	—	—	—
みかん 3	0.022	0.059	0.094	—	—	—
対 照	0.03	0.061	0.091	0.014	0.10	0.12

(註) みかん 1, 2, 3 は第五表の場合と同じである。

§ 小松菜について

第七表 小松菜の茎、葉部の糖の Rf 値 (室温)
その I展開溶剤: 水飽和-n-ブタノール
濾紙: 40×50 (cm) 上昇法

	S.	Gl.	Fr.	X	Ma.	Ar.	Xy.
葉	—	—	—	0.026	—	—	—
茎	—	—	—	0.051	—	—	—
対照	0.04	0.072	0.105		0.019	0.11	0.13

(註) X: 葉茎に於ける未決定の糖とする. 葉, 茎を搗磨し, 水にて抽出し, 中和後, 醋酸鉛, 硫化水素にて順次処理した後極めて少量に濃縮した所, 葉の抽出液は褐色に, 茎は淡黄色に着色していた.

第八表 小松菜の茎、葉部の糖の Rf 値 (室温)
その II展開溶剤: 水飽和-n-ブタノール
濾紙: 2×50 (cm) 8枚 下降法

葉	茎	S.	Gl.	Fr.	Ma.	Ar.	Xy.
0.024	0.046	0.038	0.076	0.10	0.015	0.103	0.15

葉茎共にその着色濃縮液を活性炭にて脱色熱水にて洗条後充分濃縮する. 何れも淡黄色である.

第七, 八表の結果小松菜の茎葉に含まれる糖は何であるかが決定出来なかった.

対照に用いた糖の種類が少かったため比較し得なかった結果とも思われるが不明の条件のため蔗糖がここに止ったのではないかと考える.

第九表 小松菜の茎葉部の糖の Rf 値 (室温)
その III展開溶剤: 同 前
濾紙: 40×50 (cm) 上昇法 (48時間)

茎	葉	S.	Gl.	Fr.	Ma.	Ar.	Xy.
0.105	0.032	0.062	0.032	0.062	0.088	0.022	0.088

(註) original spot に用いた茎葉の液は第八表に同じである.

第九表に於て葉は S. Gl. の位置に spot を得, 一応その両者の存在が知られるが, 茎では明かではなく Xy. とも考えられるが第七, 八表も併せて尚今後の解決に期し度いと考える.

§ 白菜について

第十表 白菜の茎葉部の糖の Rf 値 (室温)

展開溶剤: 水飽和-n-ブタノール
濾紙: 2×40 (cm) 8枚 下降法

茎	葉	S.	Gl.	Fr.	Ma.	Ar.	Xy.
0.08	0.05	0.019	0.0684	0.038	0.062	0.128	0.011

(註) 茎, 葉は共に白菜一株を両者に分け, 夫々搗磨し, 抽出液を得ること小松菜の場合と同様であって, 濃縮した抽出液は二種共淡黄色であった.

第十表の結果葉に於ては Gl. の Rf に殆んど一致し, spot は大きかったが之を単一とみなした結果である. 茎では三種と見られる spot が相連続して出現したため夫々の濃厚な中心点を取り, Rf を定めたものである. 然しその Rf 値からは糖の種類は断定し得ない.

§ 白菜の茎、葉部抽出液の糖の二次元展開

第十一表

展開溶剤: 第一次水飽和-n-ブタノール
第二次フェノール水
濾紙: 40×50 (cm) 上昇法 (室温, 96時間)

	茎 (Rf)		葉 (Rf)	
	ブタノール水	フェノール水	ブタノール水	フェノール水
a	0.077	0.44	0.079	0.47
b	0.047	0.264	0.047	0.29

(註) 茎, 葉の抽出液は白菜の第十表の場合のものを使用した. a, b はベンゼンにより明確な spot を与えた二種の糖である.

第十一表の結果を見るに従来発表された Rf 値と照合して糖の種類を直ちに断定することは困難である. 然し a は恐らく Gl. であると推定する.

考 察

第一表に於て糖の呈色度並にその限界度を検定したが糖濃度が 12.5r/μl. の程度に於て優劣の差が大きく認められた.

その結果現在の所ベンゼン-トリクロール 醋酸が最も適当したものと考えられる.

此の他にも種々検討されている^{10) 11)}. 尚発色剤としてアルカリ性過マンガン酸カリ¹⁰⁾, フェノール-HCl¹⁰⁾, ナフトレゾルシン-HCl¹¹⁾, β-ナフチールアミン¹²⁾ 等があるが他の機会にその適否を検討したいと思っている.

果実, 蔬菜類に関する糖の検定は実験例が少く決定的なことは云えないが spot の発色並にその Rf 値から S. Gl. Fr. が認められる. 之に就いては尚詳細に検討する必要がある. 尚又かような実験の場合に, Rf が種々の

条件により異なる場合も予想して已知の数種の糖を対照として同時展開をした訳であるが之により生物材料中の糖が略何であるかを推定するに役立つ。此の対照とした糖の種類は少なかったが spots の発現数の常に二三に留った事から只単に多くの種類の糖を配した所で、已報の Rf 値から考えて却って材料による spots の判定を混乱におちいらしめるに過ぎないとも考える。

然し一面に於て本報告に於ては定性的結果を求めるのが目的であったため材料より抽出された糖の濃度が如何程であるかを明かにしておかなかったのは対照に使用した糖濃度に対比してよくあらゆる糖の spot を発現し得たか否かを定める根拠が無かったのは失敗だと思う。糖の簡易微量定量法も実験中であるので今後は両方面連関せしめてもっと結果を明かにし度い。

又第一表“註”に記したように材料によっては対照の糖が発現する呈色 spot ほど確然と分離しない現象がある。その場合色調の濃淡から spot の境界を定め各 spot に分割して後その濃厚部分の中心を以て Rf を算出した。之は original spot の糖濃度が展開に適當であるかどうか、又抽出液中に介在する糖以外の物質により影響されるものであるか否かも検索する必要があると思われる。

又糖を paper chromatography したときの発色程度と之を展開しない同じ糖の spot が original point に於て発色する時とを比べると後者の方が少々淡色に見える場合のあるのは単に back ground の色調に影響された視差とも思えない。此の点に関して今迄記述した論文は見当らない。

此の点ももっと確める必要があるが若し正しいとするならば展開中に発色するまでに至らない量又は形態でその spot 以外の処にて留り損失している結果ではあるまいか。

糖のペーパークロマトグラフィーに依る微量定量も¹³⁾よく研究されつつある折柄例えば展開溶剤などに¹⁴⁾まだ考えるべき問題があると思われる。

要 約

1. 蔗糖, 麦芽糖, 葡萄糖, 果糖. アラビノーズ, キシロースの6種の糖を 2.5%, 0.5%及び0.25%の水溶液とし此の 5 μ l. を夫々別個の original spot として

種々の発色剤を spray し, 発色剤の有効範囲と糖濃度との関係を求めた. その結果ベンゼン-トリクロール酢酸が最も有効であることを知った.

2. 展開溶剤は一次元用には水飽和ブタノールを, 二次元用には更に 15~20%水添加フェノールを用いた.
3. 果実はみかん, りんご. 蔬菜は小松菜, 白菜について実験した.
4. 之等の抽出液を展開する際上記の各種 (2.5%) を同一又は同質の濾紙に spot し同時に展開した.
5. りんご, みかんでは果糖, 葡萄糖, 蔗糖の三種が発見され, 之以外の糖は存在しない.
6. 小松菜に於て実験を繰返した結果第九表に示すように葉の抽出液に於て葡萄糖, 蔗糖を認めた. 茎の抽出液については糖の種類は不明であった.
7. 白菜については第十, 第十一表の示すように, 葡萄糖があることは略確実であるが尚不明な他の一, 二の spot を見た.

文 献

- 1) PARTRIDGE, S. M., *Nature*, **158**, 270 (1946).
- 2) PARTRIDGE, S. M., *Biochem. J.*, **42**, 238 (1948).
- 3) HAWTHORNE, J. R., *Nature*, **160**, 714 (1947).
- 4) BACON, J. S. D., EDELMAN, J., *Biochem. J.*, **48**, 115 (1951).
- 5) PARTRIDGE, S. M. *Nature*, **164**, 443 (1949).
- 6) FORSYTH, W. G. C., *Nature*, **161**, 239 (1948).
- 7) CHORGOFF, LEVINE, GREEN, *J. Biol. Chem.*, **175**, 67 (1948).
- 8) HORROCKS, R., MANNING, H., *Lancet*, (1949), 1042.
- 9) PASCU, MORA, KENT, *Science*, **110**, 446 (1949).
- 10) 平瀬進, 荒木長次: *化学の領域* **5**, 392 (1951).
- 11) 佐竹-夫: *クロマトグラフ* (共立出版会社) (昭, 27)
- 12) NOVELLIE, L., *Nature*, **116**, 745 (1950).
- 13) FLOOD, A. E., HIRST, E. L. & TONES, J. K. N., *J. Chem. Soc.*, 1679 (1948).
- 14) ZAIDLAW, R. A., REID, S. G., *Nature*, **116**, 476 (1950).

(1953年1月10日受理)