

技術報告

薄層クロマトグラフィーによる糖質の分離挙動と
食品試料への応用山崎 光廣，宮崎 博*，佐藤 宗衛^{®**}

(1988年6月20日受理)

シリカゲルを吸着剤とする TLC により加工食品に含まれる各種糖質類を分離するために、種々の展開液の組成並びに発色方法について検討し、次のような知見が得られた。①単糖類、二糖類、三糖類、配糖体の分離条件として、クロロホルム-メタノール-水 (30:20:4 v/v) が適当であった。②フルクトースとグルコースの相互分離は、クロロホルム-メタノール-水 (30:15:3 v/v) の展開液を用いることにより良好な分離能が得られた。③アミノ糖、糖酸の分離条件として、1-ブタノール-酢酸-水 (8:3:2, v/v) が適当であった。④オリゴ糖の分離条件として、2-プロパノール-酢酸-水 (4:1:1 v/v) が適当であった。これらの分離条件並びに発色方法を適宜組み合わせることにより、広範囲な糖質の分離同定が可能であることが明らかになった。本法は、輸入加工食品の糖質の分離同定法として有用であり、又食品加工の面での品質管理並びに食品衛生管理における糖質の分離定性法としても用いられるものと考えられる。

1 緒 言

最近の調製加工食品は、消費者の需要の多様化を反映して非常に複雑な組成から成る物品が多くなっている。なかでも、糖質成分は従来の単なるし好的価値を付与するための甘味料としての役割だけでなく、生理機能を考慮した新たな甘味料が開発され、食品添加物として利用されるケースも見られる。従って、我が国に輸入される調製食品も、そのような要請に基づいた非常に複雑な糖質成分を含有する場合がある。これらの糖質成分の種類とその量を知ることは、輸入商品の関税分類としての要請のみでなく、食品の衛生管理の立場からも重要な分析項目になっている。

これまで、糖質の分離法として、各種クロマトグラフィーが用いられてきた¹⁾。この中で、TLC は特別な装置を必要としない簡易かつ迅速な分離法であることからこれまで最も広く用いられており、糖質の種類に応じた各種の分離条件が報告されている²⁾³⁾。しかし、これらの分離条件を最近の複雑な調製食品中の糖質成分の分離に

適用したところ、糖質組成によっては必ずしも十分な結果が得られない場合があった。

本研究では、種々の分離条件に基づいた各種糖質成分の分離挙動を検討することにより、調製食品中の複雑な混合糖質成分を良好に分離するための条件を検討したので報告する。

2 実 験

2.1 試 料

試料として、単糖類、二糖類、三糖類、鎖状及び環状のグルコースオリゴマー、コーンシロップ、糖酸 (塩)、糖アルコール、アミノ糖、配糖体などの各種糖質を用いた。又、応用例として、数種の輸入食品を用いた。

2.2 器具及び試薬

薄層板：シリカゲル 60F₂₅₄ (メルク製, No. 5714, 5715, 5729)

展開液：クロロホルム-メタノール-水 (30:20:4 v/v)、クロロホルム-メタノール-水 (30:15:3 v/v)、1-ブタノール-酢酸-水 (8:3:2 v/v)、2-プロパノール-酢酸-水 (4:1:1 v/v)

発色剤：①ジフェニルアミン-アニリン-アセトン-80%リン酸 (2 g-2 ml-100 ml-15 ml)。

② 0.2% ニンヒドリン (エタノール溶液)。

* 東京税関輸入部分析室：108 東京都港区港南 5-5-30

** 東京税関相談官室：108 東京都港区港南 5-5-30

③ 0.1 M 過マンガン酸カリウム-炭酸ナトリウム (100 ml-2 g)

2.3 方法

糖質の 0.5~1% 水溶液を薄層板の下端から 1.5 cm の位置に 0.5 μ l スポットし、上昇法により原点から 15 cm 展開した。展開終了後、薄層板を乾燥器中で乾燥して展開液を完全に除去し、発色剤を噴霧後、80~90 °C で 10~15 分間 (過マンガン酸カリウム-炭酸ナトリウム試薬の場合のみ 1 分間) 加熱して発色させた。

3 結果及び考察

シリカゲルを吸着剤とする TLC では、糖質を分離するための展開液としてアセトニトリル-水系の展開液が

一般的に用いられている²⁾。しかし、アセトニトリルは有害なことや良好な分離能を得るのに多重展開が必要であることから、他の溶媒系を用い短時間で良好に分離するための条件について検討した。

3.1 発色剤による発色反応

3 種類の発色剤を用いたときの各種糖質の発色反応を Table 1 に示した。

中性糖、糖酸、アミノ糖、配糖体は、ジフェニルアミン-アニリン-アセトン-80% リン酸試薬により検出することができた。しかし、アミノ糖の場合は、発色が不鮮明なことがあるので、0.5% ニンヒドリン (エタノール溶液) を発色剤として用いた。又、糖アルコールの場合は、これらの試薬で発色しなかったが、0.1 M 過マン

Table 1 Color development of sugars by coloring reagents

Sample	Coloring reagent		
	Diphenylamine-aniline-acetone-80% H ₃ PO ₄	0.2% ninhydrin	0.1 M KMnO ₄ -Na ₂ CO ₃
[Saccharide]			
D-Xylose	violet-blue	—	yellow
L-Arabinose	" - "	—	"
D-Ribose	" - "	—	"
2-Deoxy-D-ribose	red-violet	—	"
D-Glucose	violet-blue	—	"
D-Mannose	gray - "	—	"
D-Galactose	blue	—	"
D-Fructose	orange-red	—	"
L-Rhamnose	gray-green	—	"
L-Fucose	" - "	—	"
Sucrose	brown	—	"
Palatinose	red-brown	—	"
Maltose	blue	—	"
Isomaltose	"	—	"
Lactose	"	—	"
Cellobiose	"	—	"
Trehalose	green-blue	—	"
Melezitose	brown	—	"
Raffnose	"	—	"
[Dextrin]			
α -Cyclodextrin	blue	—	"
β - " "	"	—	"
Corn syrup	"	—	"
[Amino sugar]			
D-Glucosamine	yellow-brown	pink-red	"
D-Galactosamine	" "	orange- "	"
[Acidic sugar]			
D-Galacturonic acid	violet-blue	—	"
[Sugar alcohol]			
Sorbitol	—	—	"
Mannitol	—	—	"
Inositol	—	—	"
[Glycoside]			
Stevioside	violet-blue	—	"

ガン酸カリウム-炭酸ナトリウム試薬⁴⁾により検出することが可能であった。

ジフェニルアミン-アニリン-アセトン-80% リン酸試薬を発色剤として用いたとき, 中性糖の場合は青~青紫色系の発色を示すものが多いが, なかにはデオキシリボースの赤紫色, ラムノース, フコースの灰緑色, フルクトースのとう赤色, シュクロースの茶褐色, パラチノースの赤褐色などのように特徴的な発色を示すものがある。又, 0.5% ニンヒドリンを発色剤として用いたとき, アミノ酸は赤色系の発色を示すが, その種類によって色調が異なり, グルコサミンは桃赤色, ガラクトサミンはとう赤色の発色を示す。このような発色反応の色調の差違が, R_f 値と共に糖質の同定に有用であることが分かった。

3.2 中性糖の分離条件

糖質のような極性の強い物質を分離するには, 通常メタノール-水系の強極性の溶媒系が用いられるが, 分離の迅速化を図るには極性の程度が弱い溶媒との混合系が

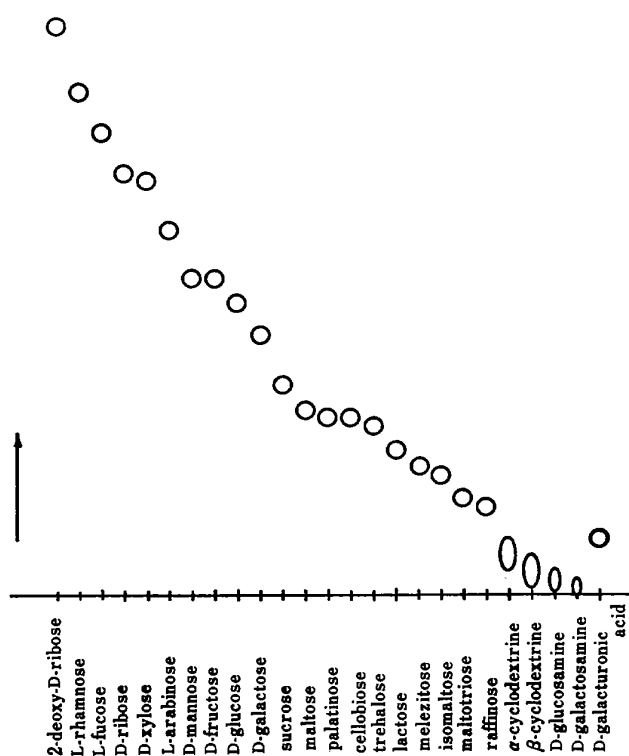


Fig. 1 Chromatogram of sugars on TLC Silica gel 60F₂₅₄ plate (No. 5715)

Solvent system : CHCl₃-CH₃OH-H₂O(30 : 20 : 4, v/v); Coloring reagent : diphenyl amine-aniline-acetone-80% H₃PO₄ (2 g : 2 ml : 100 ml : 15 ml). Spot development was carried out by heating at 80°C for about 15 min in a heating oven.

必要となる。中島ら⁵⁾は, 人工甘味料の一種として広範囲に用いられているパラチノース (G-1, 6-F) 及びその構成糖並びに関連オリゴ糖の分離同定に, クロロホルム-メタノール-水系の溶媒系を用いている。又, この溶媒系は, ステビオサイド系配糖体の分離にも利用されている⁶⁾。この展開液がより広範囲の種類の糖質の分離にも応用できるかどうか検討した。

クロロホルム-メタノール-水 (30:20:4, v/v) を展開液に用いたときの各種糖質類のクロマトグラムを Fig. 1 に, 各糖質の R_f 値を Table 2 に示した。

Table 2 R_f values of sugars

Sample	R_f value	Sample	R_f value
[Saccharide]		[Dextrin]	
2-Deoxy-D-ribose	0.70	α -Cyclodextrin (n=6)	0.05
L-Rhamnose	0.62	β -Cyclodextrin (n=7)	0.03
L-Fucose	0.57	[Amino sugar]	
D-Ribose	0.52	D-Glucosamine	0.02
D-Xylose	0.51	D-Galactosamine	0.01
L-Arabinose	0.45	[Acidic sugar]	
D-Mannose	0.39	D-Galacturonic acid	0.07
D-Fructose	0.36	[Sugar alcohol]	
D-Glucose	0.32	Mannitol	0.30
Sucrose	0.26	Sorbitol	0.29
Maltose	0.23	Inositol	0.12
Palatinose	0.22	[Glycoside]	
Cellobiose	0.22	Stevioside	0.62
Trehalose	0.21		
Lactose	0.18		
Melezitose	0.16		
Isomaltose	0.15		
Maltotriose	0.12		
Raffinose	0.11		

TLC plate : Silica gel 60F₂₅₄ (Merck art No. 5715); Solvent system : chloroform-methanol-water (30 : 20 : 4)

全体的傾向として, 中性糖の場合は, 単糖類, 二糖類, 三糖類の順に R_f 値が小さくなっている。又, 単糖類の中で五炭糖と六炭糖を比較すると, ほぼ五炭糖のほうが R_f 値が大きい傾向を示すが, 六炭糖のラムノース, フコースのように五炭糖のリボース, キシロースよりもむしろ R_f 値が大きい場合もある。このことは, 分離要因として分子量のみではなく構造的要因も反映することを示している。

一般に調製加工食品に比較的多く利用される中性糖としては, フルクトース, グルコース, シュクロース, マルトース, ラクトースなどがある。クロロホルム-メタ

ノール-水 (30:20:4, v/v) を展開液としたとき、シュクロース、マルトース、ラクトースの3種の糖質は比較的良好な相互分離が可能であるが、フルクトースとグルコースの R_f 値は近接し両者の量的関係により相互分離が困難な場合がある。そこで、クロロホルム-メタノール-水系の展開液の溶媒組成を変えてこれらの糖質の分離挙動を検討し、その結果を Fig. 2 に示した。

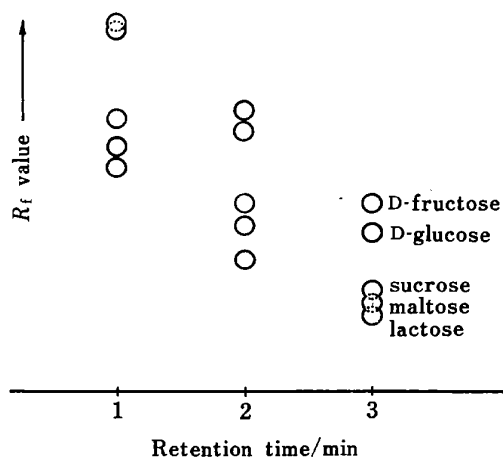


Fig. 2 Separation behavior of sugars with solvent systems on TLC Silica gel 60F₂₅₄ plate (Merck art No. 5715)

Solvent system : CHCl₃-CH₃OH-H₂O=1. 30 : 25 : 5(v/v), 2. 30 : 20 : 4(v/v), 3. 30 : 15 : 3 (v/v). The coloring reagent and the development of spot are same to the condition cited in Fig. 1.

メタノールと水の割合を多くしていくと、全体的に R_f 値が大きくなる傾向が見られるが、フルクトースとグルコースの R_f 値は更に近接し、相互の分離が悪くなった。逆にメタノールと水の割合を減らし、溶媒組成をクロロホルム-メタノール-水 (30 : 15 : 3, v/v) にすると、全体的に R_f 値が小さくなり、シュクロース、マルトース、ラクトースの R_f 値が近接するが、フルクトースとグルコースの R_f 値の差が大きくなり相互の分離が良好になった。

従って、中性糖の場合は、試料の糖質組成に応じてクロロホルム-メタノール-水系の展開液の組成を選択することにより、相互の分離が可能となった。

一方、アミノ糖の一種であるグルコサミンやガラクトサミン、糖酸の一種であるガラクトン酸はこの展開液ではほとんど展開されず原点付近にとどまっていること、又コーンシロップやデキストリンのようなオリゴ糖の場合は R_f 値が小さく相互の分離が十分でないことか

ら、これらの糖質の分離には適していないことが分かった。

3.3 糖酸、アミノ糖の分離条件

前述したように、クロロホルム-メタノール-水系の展開液は、アミノ糖、糖酸、オリゴ糖の分離には適していないことが分かった。そこで、これらの糖質を良好に分離するために、ペーパークロマトグラフィーによる糖質の分離で一般的に用いられている 1-ブタノール-酢酸-水系の展開液⁷⁾が、TLC にも応用できるかどうかを検討した。

1-ブタノール-酢酸-水 (8:3:2, v/v) を展開液に用いたときの各糖質の R_f 値を Table 3 に示した。

Table 3 R_f values of sugars

Sample	R_f value	Sample	R_f value
[Saccharide]		[Dextrin]	
L-Rhamnose	0.60	α -Cyclodextrin (n=6)	0.09
2-Deoxy-D-ribose	0.59	β -Cyclodextrin (n=7)	0.07
D-Xylose	0.53	[Amino sugar]	
L-Fucose	0.49	D-Glucosamine	0.32
D-Ribose	0.45	D-Galactosamine	0.28
D-Mannose	0.44	[Acidic sugar]	
D-Glucose	0.42	D-Galacturonic acid	0.24
L-Arabinose	0.42	[Sugar alcohol]	
D-Fructose	0.41	Sorbitol	0.35
D-Galactose	0.37	Mannitol	0.32
Sucrose	0.34	Inositol	0.24
Palatinose	0.31	[Glycoside]	
Cellobiose	0.31	Stevioside	0.49
Maltose	0.31		
Trehalose	0.31		
Isomaltose	0.28		
Melezitose	0.26		
Lactose	0.25		
Maltotriose	0.23		
Raffinose	0.20		

TLC plate : Silica gel 60F₂₅₄ (Merck art No. 5715); Solvent system : 1-butanol-acetic acid-water (8 : 3 : 2)

中性糖の場合は、クロロホルム-メタノール-水系の展開液を用いたときと同様に単糖類、二糖類、三糖類の順に R_f 値が小さくなっており、ほぼ同じような傾向が見られた。

アミノ糖、糖酸の場合は、クロロホルム-メタノール-水系の展開液では十分に分離できなかったが、1-ブタノール-酢酸-水 (8:3:2, v/v) の展開液を用いることにより良好に分離することができた。

一方、コーンシロップやデキストリンのようなオリゴ

糖の場合は, グルコースの3量体 (マルトトリオース) まではこの溶媒系で相互の分離が可能であるが, 4量体以上のものの相互分離には更に条件の検討が必要であることが分かった。

3.4 オリゴ糖の分離条件

オリゴ糖類相互の良好な分離条件を得るために, 試料として鎖状のグルコースオリゴマー (グルコースの1~7量体), 環状のグルコースオリゴマー (α -及び β -シクロデキストリン) 及び数種類のコーンシロップを用い, 1-プロパノールの代わりに他のアルコールを展開液に用いて, アルコールの種類による分離挙動の違いを検討した。

エタノール-酢酸-水 (4:1:1, v/v) を展開液とすると, 全体的に R_f 値は大きくなるが, オリゴ糖相互の分離は悪く, テイリング現象も顕著になる傾向が見られた。

次に, 1-プロパノール-酢酸-水 (4:1:1 v/v) を展開液

に用いて分離すると, わずかにテイリング現象も見られるが, グルコースの8量体程度まではほぼ良好に分離することができた。

又, 2-プロパノール-酢酸-水 (4:1:1, v/v) を展開液に用いて分離すると, 1-プロパノールを用いたときと比較してオリゴ糖相互の R_f 値がやや近接するが, グルコースの9量体程度まで良好に分離することができた。

2-プロパノール-酢酸-水 (4:1:1 v/v) を展開液としたときのオリゴ糖のクロマトグラムを Fig. 3 に, それぞれのグルコースオリゴマーの R_f 値を Table 4 に示した。又, グルコースの重合度と R_f 値の関係を Fig. 4 に示した。鎖状のグルコースオリゴマーでは, グルコースの重合度と R_f 値の対数値との間にはほぼ直線関係が見られた。この関係を利用することにより, 未知試料中のグルコースオリゴマーの重合度の同定が可能と考えられる。一方, 鎖状のグルコースオリゴマーと環状のグルコースオリゴマーを比較すると, 同じ重合度のものでは鎖状のグルコースオリゴマーのほうが R_f 値が

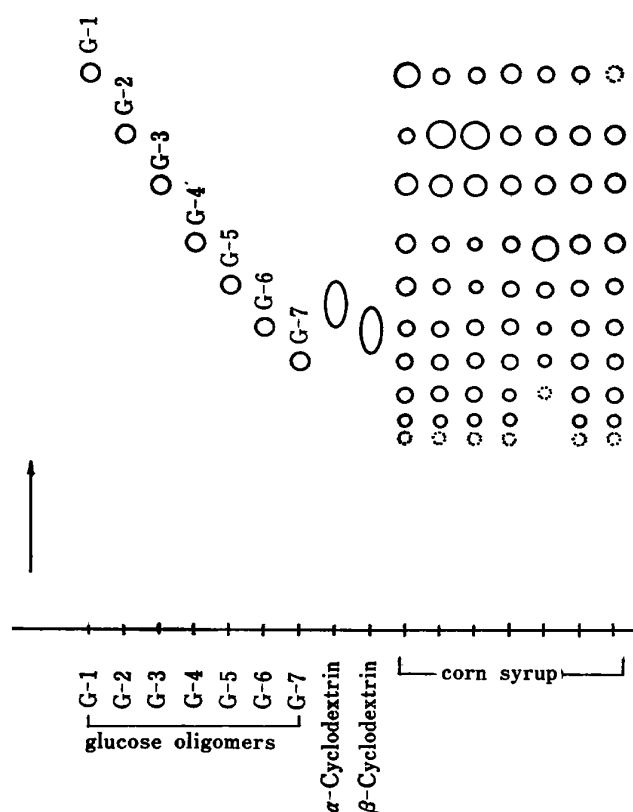


Fig. 3 Chromatogram of glucose oligomers, cyclodextrins and corn syrup on TLC Silica gel 60F₂₅₄ plate (Merck art No. 5715)

Solvent system : *iso*-C₃H₇OH-CH₃COOH-H₂O (4:1:1). The coloring reagents and the conditions for spot development are as cited in Fig. 1.

Table 4 R_f values of oligosaccharides and cyclodextrins

Sample	R_f value	Sample	R_f value
G-1 (D-glucose)	0.66	α -cyclodextrin	
G-2 (maltose)	0.59	($n=6$)	0.40
G-3 (maltotriose)	0.53	β -cyclodextrin	
G-4	0.46	($n=7$)	0.37
G-5	0.41		
G-6	0.36		
G-7	0.32		

G- n =(D-glucose) $_n$; TLC plate : Silica gel 60F₂₅₄ (Merck No. 5715); Solvent system : 2-propanol-acetic acid-water (4:1:1, v/v)

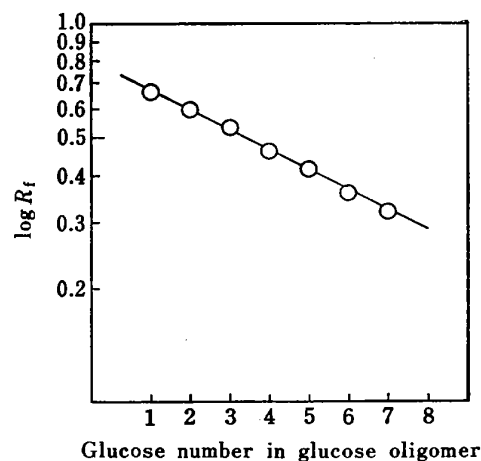


Fig. 4 Relationship between the $\log R_f$ value and glucose number in glucose oligomers

小さかった。これは、両者の構造的な差違に起因している。

展開液に 1-プロパノールを用いた場合と 2-プロパノールを用いた場合では、ほぼ類似した分離挙動を示すが、2-プロパノールを用いた場合にはより重合度の大きいオリゴ糖の分離が可能である。従って、オリゴ糖の分離には、2-プロパノール-酢酸-水系の展開液が最も適しているものと考えられた。

3.5 輸入試料への応用

クロロホルム-メタノール-水 (30:20:4, v/v) 及び 2-プロパノール-酢酸-水 (4:1:1, v/v) を展開液とする分離条件を実際の輸入試料に応用し、その結果の幾つかを Fig. 5 に示した。

試料 1 は、天然はちみつ例である。フルクトース、グルコースの明りょうなスポット、シュクロース、マル

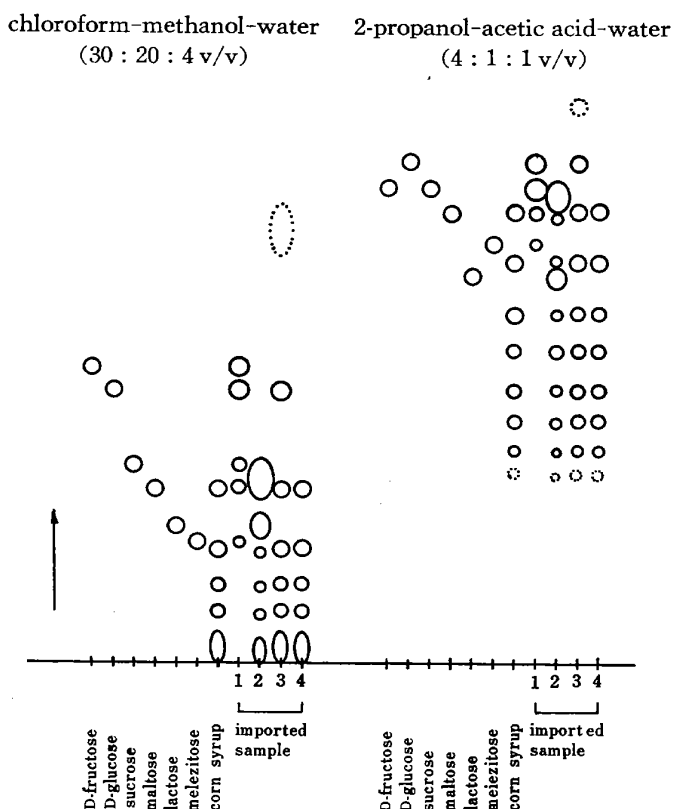


Fig. 5 Chromatogram of several prepared foods on TLC Silica-gel 60F₂₅₄ plate (Merck art No. 5715)

Solvent system : $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{COOH-H}_2\text{O}$ (30 : 20 : 4, v/v) and $\text{iso-C}_3\text{H}_7\text{OH-CH}_3\text{COOH-H}_2\text{O}$ (4 : 1 : 1, v/v); 1 : natural honey, 2 : imported sample (A), 3 : imported sample (B), 4 : imported sample (C). The coloring reagents and the conditions for spot development are as cited in Fig. 1.

トースの小さなスポットのほかに、D-グルコース 2 分子と D-フルクトース 1 分子から成るメレチトース (G-1, 2-F-3, 1-G) の微弱なスポットが検出された。これらはいずれも天然はちみつに由来する糖質で、試料が合成はちみつではなく天然はちみつであることを判定する方法として有用であることが分かった。

試料 2 は、砂糖、脱脂粉乳及びマルトデキストリンから成る調製食品を本法により分離した例である。この試料からは、シュクロース、ラクトース及びマルトリオースなどのマルトデキストリン (グルコースオリゴマー) に由来するスポットが検出された。グルコースオリゴマーのスポットを Fig. 4 の関係を利用して同定すると、3~7 量体程度のグルコースオリゴマーが主要成分であることが分かった。

試料 3 は、アメリカ産のヤマモミジの樹皮のアルコール抽出物を分離した例である。このものから、グルコース、マルトースのほかにグルコースオリゴマー及びその高重合体によるスポットが検出された。これらのスポットは、植物組織中のデンプン又はセルロースなどの多糖質の組織中での分解物か、あるいは抽出過程での分解物と考えられる。従って、添加した糖質は含有されていないことが判明した。又、試料 4 は、多糖質の一種であるアラビアゴムの粉末にコーンシロップが加えられた調製品を分離した例である。本法はこのように、起源植物に由来する糖質か、添加した糖質かを判別する方法としても有用である。

以上のように、本法は輸入加工食品の糖質の分離同定法として有用であり、又食品加工の面での品質管理並びに食品衛生管理における糖質の分離定性法としても用いられるものと考えられる。

文 献

- 1) 小原哲二郎, 鈴木隆雄, 岩尾裕之編 : “食品分析ハンドブック”, p. 191 (1969), (建帛社).
- 2) R. Gauch, U. Leuenberger, E. Beumgarpner : *J. Chromatogr.*, **174**, 195 (1979).
- 3) E. Stahl, U. Kaltenbach : *J. Chromatogr.*, **5**, 351 (1961).
- 4) E. Pacsu, T. P. Mora, P. W. Kent : *Science*, **110**, 446 (1949).
- 5) 中島良和, 高岡正行, 太田功正, 高添一郎 : 精糖技研誌, **34**, 58 (1985).
- 6) 坂本征則, 神田博史, 村上国子, 田中 治 : 薬誌, **95**, 12, 1507 (1975).
- 7) G. W. Hay, B. A. Lewis, F. Smith : *J. Chromatogr.*, **11**, 479 (1963).

☆

Separation behavior of sugars by TLC and its application to food analysis. Mitsuhiro YAMAZAKI, Hiroshi MIYAZAKI* and Soei SATO** (*Tokyo Customs Laboratory; **Office of Customs Counselor, Tokyo Customs, 5-5-30, Kohnan, Minato-ku, Tokyo 108)

To establish the suitable conditions for separating sugars in prepared foods, their separation behavior on TLC was examined. The relationship between the R_f values and the type of sugars (difference in molecular weight and chemical structure) was also discussed. Sugars used in this experiment are various sugars of about 30 kinds such as mono, di and tri saccharides, glucose oligomers (linear type and cyclic type), sugar alcohols, acidic sugars, amino sugars and glycosides. Good separation of these sugars was achieved by using suitable solvent systems according to the composition of sugars, as follows: (1) for the separation of samples containing mono-, di- and tri-saccharides, and glycosides, $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-H}_2\text{O}$ (30 : 20 : 4 v/v); (2) for the mutual separation of glucose

and fructose, $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-H}_2\text{O}$ (30:15:3 v/v); (3) for the separation of oligosaccharides, $\text{iso-C}_3\text{H}_7\text{OH-CH}_3\text{COOH-H}_2\text{O}$ (4 : 1 : 1 v/v); (4) for the separation of samples containing acidic sugars, sugar alcohols and amino sugars, $n\text{-C}_4\text{H}_9\text{OH-CH}_3\text{COOH-H}_2\text{O}$ (8 : 3 : 2 v/v). On the other hand, when several sugars were positioned close together, the color development of the spot could be also used for identification. This chromatographic method was applied to the separation and identification of mono-, di-, tri- and oligosaccharides in the prepared foods such as milk preparations and alimentary foods containing various sugars with good results.

(Received June 20, 1988)

Keyword phrases

separation behavior of sugars on TLC; sugars; TLC of imported foods; practical application.