

糖類の薄層クロマトグラフィーに

おける呈色剤について

柏 田 豊

緒 言

糖類の薄層クロマトグラフィー（以下、**TLC**）における呈色剤の処法はこれまでに数種発表され、それらの中¹⁾では現在のところ、アニスアルデヒド²⁾処法、ナフトレゾルシン²⁾処法などが多く実用に供されている。**TLC**よりも十数年の古い歴史をもつ糖類の濾紙分配クロマトグラフィー（以下、**PPC**）では、更にはるかに多数の呈色剤処法が考案され実用化されて来た。糖類の**PPC**ではそれぞれ特異な呈色をする2、3の処法を組合せ使うことがむしろ特長の一つであるともいえる。

糖類の**TLC**を行うにあたり、呈色剤としてかつて**PPC**で使われた処法を流用するか、または**TLC**の特長の一つのふ蝕性試薬が使用できる点を利用して、主剤はそのままで、**PPC**における酢酸、磷酸などの添加酸を硫酸などの強酸に置き換えた処法を適用するということは当然の手段として考えられる。既報の糖類の**TLC**呈色剤のうち、アニリンフタレート³⁾剤、アニンジンフタレート⁴⁾剤、アンモニア硝酸銀³⁾剤、テトラゾリウム³⁾剤、ベンジジン³⁾剤、ナフトレゾルシン²⁾剤などはこの部類に属する呈色剤とみなされる。しかし、すでに知られているように、**PPC**で成績のよかった呈色剤がすべて**TLC**でも良好であるとは限らない。その反面、**PPC**ではあまり有効ではないが、**TLC**では良好な成績を示すものもある。前記のアニスアルデヒド処法はこれに属するとみられる。

著者はかつて糖類の**PPC**による一連の実験を行うにあたり、既知の数種の処法の外に新しく考案した2、3^{5) 6)}の呈色剤についても比較試験を行い発表した。その概要は次のとおりである。糖の種類による発色度の強弱（感度）、色調の多様性（色調変化度）、濾紙生地の着色性、保存性（発色ずみのスポットの色の放置による変色、退色度、濾紙生地着色の増加度および調合呈色剤の安定度

など）、ならびに薬品の価額、保存性などの諸条件について比較検討の結果、糖類の**PPC**呈色剤としてスルファニル酸剤は従来のベンジジン剤、アニリン塩酸塩剤などとともに最も良好である。スルファニルアミド剤の外フェニレンジアミン変法なども良好である。レゾルシンなどのフェノール類主剤に添加酸として低濃度の過塩素酸を使う処法が良好であるなどであった。

今回、**PPC**において良好な成績を示したこれらの試薬を中心にして、各種の糖類の**TLC**の呈色剤の効力の比較試験を行った結果について報告する。関係のある**TLC**および**PPC**呈色剤の処法は第2表に示した。

材料と方法

（吸着剤担体）はシリカゲリに属するワコーゲルB 5（固形剤の硫酸カルシウム5%含有）を用いた。0.02Mの酢酸ナトリウム水溶液と混和し、通常の方法でガラス板に薄層をつくり、100°で乾燥させ、1%水溶液に調製した各種純糖液の定量を独立に並べてスポットしたテスト板をつくる。これを材料にしそれぞれの呈色剤を噴霧し一定温度、一定時間（5～10分間）加熱、発色したものを観察調査した。調査項目は、発色処理直後における各スポットの色の種類、強弱、生地の着色および発色温度時間などの状態ならびに1～2月間放置による変化状態などである。

スタキオースについてはサンプルの関係上、ほぼ1%程度と思われる水溶液について一部試験した。また、主な呈色剤については、純糖および蔬菜類の糖分抽出液を上記の板にスポットし、ブタノール——ピリジン——水で展開したものについても試験した。

実験結果と考察

各種呈色剤の試験結果および処法の主なものについて次に示す。一部について行ったスタキオースの色調、感度などはラフィノースにほぼ等しかったので表から省略した。

第 1 表 主 要 呈 色 剤 の 性 能 比 較 試 験
(発色直後の糖類と生地の色)

主 剤 添 加 剤	AP	MP	AH	KH	DS			TS	UA	生地
	(AR) (XY)	(RH)	(GL GA MN)	(FR)	(LA)	(MA)	(SC)	(RA)	(GU)	
アニスアルデヒド 硫 酸	青緑	緑	。 緑	青紫	青緑	青紫	青紫	青緑	青紫	桃紫
ア ニ シ ジ ン フ タ ル 酸	。 茶	。 黄土	黄土	淡黄	黄土	淡黄	淡黄	微黄	淡茶	淡土
ア ニ シ ジ ン 硫 酸	緑茶	黄土	淡茶	黄緑	緑茶	淡緑	緑	緑茶	黄土	クリーム
ア ニ リ ン フ タ ル 酸	淡茶	黄土	微	微	微	微	微	—	淡茶	白
テトラゾリウム カセイソーダ	橙赤	橙赤	橙赤	橙赤	橙赤	橙赤	橙	—	橙赤	白
ナフトレゾルシン 硫 酸	。 青	青	青	小豆	青紫	紫	。 小豆	。 小豆	青	淡橙
レ ゾ ル シ ン 硫 酸	灰紫	土紫	赤紫	。 赤紫	黄紫	黄紫	。 赤紫	。 青紫	紫	黄赤
フロログルシン 硫 酸	青紫	茶	茶紫	。 茶紫	青紫	茶紫	。 茶紫	。 茶紫	青紫	黄
オ ル シ ン 硫 酸	青紫	茶	紫	土	紫	紫	茶紫	茶紫	灰紫	クリーム
ピロガロール 硫 酸	青土	黄土	土	紫土	土	土	紫土	土	紫土	淡紫
α ナフトール 硫 酸	。 青紫	赤紫	淡紫	淡紫	淡紫	淡紫	。 紫	。 紫	灰紫	淡茶
β ナフトール 硫 酸	。 青	淡青	橙青	橙緑	橙青	淡茶	橙緑	橙緑	淡茶	橙
α ナフチルアミン 硫 酸	灰茶	黄土	灰緑	カーキ	カーキ	灰緑	カーキ	カーキ	淡茶	白
β ナフチルアミン 硫 酸	茶	黄土	茶	黄土	茶	淡茶	茶	淡茶	茶	黄
ペンジジン トリクロル酢酸	茶	黄茶	茶黄	黄土	黄土	黄土	黄土	黄土	焦茶	白
ジフェニルアミン 硫 酸	灰紫	黄土	茶灰	茶灰	土	灰	土	土灰	灰紫	白
スルファニル トリクロル酢酸	橙	黄土	淡茶	黄土	淡茶	淡茶	淡茶	黄土	茶	淡黄
硫 酸	灰	黒黄	茶灰	濃灰	黒	灰	濃灰	灰	灰	白
リ ン 酸	。 土	。 黄土	茶	黄土	茶	茶	茶	茶	焦茶	白
過 塩 素 酸	灰	黄土	茶	濃灰	黒	灰	灰	灰	茶灰	白
スルファニルアミド トリクロル酢酸	橙赤	茶	濃茶	淡茶	茶	淡茶	茶	淡茶	淡茶	淡黄
硫 酸	灰	。 黄	茶灰	黄土	黄土	黄土	黄土	黄土	。 灰	白
リ ン 酸	。 茶	茶	茶	黄土	茶	茶	茶	茶	。 焦茶	白
過 塩 素 酸	灰	黄	灰茶	黄土	灰	灰	灰	灰	灰	淡灰

AP…アルドペントース
KH…ケトヘキソース
UA…ウロン酸
RH…ラムノース
MN…マンノース
MA…マルトース
GU…グルクロン酸

MP…メチルペントース
DS…2糖類
AR…アラビノース
GL…グルコース
FR…フラクトース
SC…シクロロース
。……呈色の強いもの

AH…アルドヘキソース
TS…3糖類
XY…キシロース
GA…ガラクトース
LA…ラクトース
RA…ラフィノース

第2表 糖類のTLCおよびPPC呈色剤処法

(第1表で使用したものの中の主なもの、または論義に関係あるもの)

(1) アニスアルデヒド剤

これを主剤にした呈色剤は数種類発表されているが、本試験には Weill 氏による次の処法を用いた。

アニスアルデヒド……0.5 Weill 1)

エタノール……………9

濃 硫 酸……………0.5

(2) ナフトレゾルシン剤

数種の処法中、次の処法を用いた。

ナフトレゾルシン……0.2 Pastuska 2)

エタノール……………100

硫酸 (20%) ……………100

(3) レゾルシン, オルシン, クロログルシン, ピロガロール剤

フェノール性各主剤…0.2

エタノール……………100

硫酸 (20%) ……………100

(4) スルファニル酸剤

○ PPCにおける処法 柏田 5) 6)

スルファニル酸……………1 100~120°, 5~10分

($\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{SO}_3\text{H}$)

トリクロル酢酸……………5~10

水……………100

エタノール……………100

主剤の1%水溶液をつくり、同量のエタノールを加え、トリクロル酢酸を溶解する。1955年発表のものとは薬剤用量を一部変更した。

○ TLCにおける処法

PPCの処法をそのまま流用するか、または上記の主剤 0.5%, 50%エタノール溶液 5~6部に使用時に20%硫酸1部を添加する。または、硫酸を同量の磷酸か過塩素酸に置き換える。加熱条件105~115°, 5~10分

(5) スルファニルアミド剤

○ PPCにおける処法 柏田 5) 6)

スルファニルアミド…1 90~110°, 5分

($\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{SO}_2\text{NH}_2$)

トリクロル酢酸……………5~10

エタノール……………100

○ TLCにおける処法

上記のPPCの処法をそのまま、流用するか、または次の処法にする。

スルファニルアミド…0.5~1 } 5~6部
エタノール……………100 }

20%硫酸 (磷酸, 60%過塩素酸) 1部

加熱条件 105~115°, 5~10分

酸類は使用時に添加する方が薬剤の保存性がよい。

(6) フェノール類 (ナフトレゾルシン, レゾルシン, オルシン, フロログルシン, ピロガロール) —過塩素酸剤

○ PPCにおける処法 柏田 5) 6)

フェノール類……………0.2~0.5 80~90°, 5~10分

過塩素酸 (60%) ……………2

エタノール……………100

アニスアルデヒド剤はすべての糖の発色状態がすぐれ、良好な成績を示した。その中でもアルドヘキソース類の呈色が強い傾向がみられた。しかし、生地が桃紫色に強く着色することが欠点と思われる。

アニリン剤, アニジジン剤はペントース類の発色はやや良好であるが、その他の糖類、特にオリゴ糖類の発色が弱い傾向がみられた。退色も早い。別に行った。アニリン塩酸塩剤も結果がよくなく、PPCで優秀であったこの処法もTLCでは実用性がうすいと思われる。

テトラゾリウム剤はPPCにおけると同様に単調な赤色系呈色を示し、特にペントース類は噴霧後室温で発色するほどに発色温度が低く速いが、高温加熱でもその割には色が濃くならず、スタキオース, ラフィノースの発色が極めて悪く、サッカロースその他の2糖類の発色も劣る傾向がみられた。退色も比較的早い。オリゴ糖の発色の劣ることはテトラゾリウム剤, アニリン剤およびアニジジン剤の共通な欠点であって、総合的にみてこの3者はアニスアルデヒド剤には及ばないと認められた。

ナフトレゾルシン剤は各糖の発色度, 生地着色性などの点で良好であった。PPCにおけると同様に良好な呈色剤と認められた。しかし、PPCにおけるほどの色調の豊富さはみられなかった。色調変化の豊富さの点ではいずれの処法ともにPPCがTLCにまさっていた。ナフトレゾルシンが高価であることは欠点の1つである。同じくフェノール類に属するレゾルシン, オルシン, フロログルシン, ピロガロールなどはPPCにおいて良好な呈色剤であった。特にこれらにトリクロル酢酸を加えることによりケトースおよびこれを含むオリゴ糖だけの分別呈色剤になるという独特の効果が認められていた。これらフェノール剤に硫酸を添加した試験結果は第1表のとおりであって、いずれもTLC呈色剤として良好な発色を示した。発色感度などではナフトレゾルシン剤に全くおとらないが、ナフトレゾルシン剤を含めてフェノール類は退色がやや早く、発色温度が高すぎると生地の着色度が急増する欠点がみられた。従って、特にレゾルシン剤, フロログルシン剤など加熱に注意を要するが、

価額の点を考えればナフトレゾルシン剤よりも実用性が高いと考えられる。また、PPCの場合とは異り硫酸添加の処法ではすべての糖が呈色するので、ケトースおよびそのオリゴ糖だけの分別呈色剤とはならないが、やはりこれらの糖の感度が高いことが認められた。

α —, β —ナフトール剤, ジフェニルアミン剤など呈色度についてはある程度の有効性が認められたが, 発色直後や放置後に生地着色度の比較的高いものが多かった。スルファニル酸およびスルファニルアミドを主剤にした処法はいずれもすべての糖に対する感度が高く, 良好であった。生地も, トリクロル酢酸添加の場合だけわずかに淡黄に着色するが, 硫酸, 燐酸では全く着色せず, 一般的に着色度は極めて少い。また, 1~2月の放置では, 糖スポットは退色せず, 生地の着色度も変化がみられず, 発色済サンプルの保存性も高い。薬品およびその調製品の保存性も良好である。以上総合して, スルファニル酸剤およびスルファニルアミド剤は良好な呈色剤と認められた。PPCでもスルファニルアミド剤は使用できるが, 発色性その他の点でスルファニル酸剤がはるかに優っていたが, TLCではほとんど差がみられない。ただ, スルファニル酸はアルコール溶解度が低く, 水の多い処法をとる関係から, 過量に噴霧したり, 十分に細い霧にしないと発色後の糖のスポットがにじむ場合があり, 噴霧に注意を要する。従って, TLC呈色剤としては, スルファニルアミド—硫酸—エタノール処法が最も実用的であると考えられる。硫酸を燐酸またはトリクロル酢酸に置き換えても良好である。

PPCでは前述のように低濃度の過塩素酸の添加が良好な成績を示したので, TLCでもスルファニル酸, スルファニルアミドその他の薬剤にこれを添加して試験したところ, 硫酸などの他の酸を添加したものとは異なる色調の発色を示すが, 過塩素酸のための特別な長所はみられなかった。過塩素酸はPPCで第2表に示した程度の添加では, 濾紙生地を損傷せず, 糖の発色度が高いという特長があったが, TLCではもともと生地損傷のおそれがないため, この酸が硫酸などにまさるほどの特性が現れないものと考えられる。

摘 要

(1) シリカゲルを担体とした糖類のTLCにおける呈色剤処法として, スルファニルアミド剤が最も良好な結果を示した。

(2) PPCにおいては糖類の呈色剤として, スルファニル酸剤が特にまさっていたが, TLCにおいても呈色性はスルファニルアミドにおとらない。

(3) 従来の処法中では, アニスアルデヒド剤, ナフトレゾルシン剤が良好であったが, 後者はフロログルシン, オルシンおよびレゾルシンなどのフェノール類と置き換えても実用性が高いと思われた。

本報告に際し, 実験に助力された榎木展嬢に謝意を表します。

文 献

- 1) C.D, Weill, P. Hanke (1962) : Anal. Chem. 34, 1736
- 2) G. Fastuska (1961) : Z. anal. Chem., 159, 42
- 3) E. Stahl (1962) : Dünnschicht-Chromatographie, 473, Springer-Verlag
- 4) A. Schweiger (1962) : J. Chromat., 9, 374
- 5) 柏 田 豊 (1955) : 日本蚕糸学雑誌, 24, 5—6, 310
- 6) (1962) : 兵庫県立蚕業試験場報告 18. 8

橋 本 庸 平 : 薄層クロマトグラフィー
広川書店

鈴 木 郁 生 : 薄層クロマトグラフィーの実際
広川書店

石川, 古谷, 原, 中沢 : 薄層クロマトグラフィー
南山堂

原, 田中, 滝谷 : 薄層クロマトグラフィー, 第1集
第2集, 南江堂