

# ガスクロマトグラフによる糖類の定量法

窪 田 実

権物体の化学的組成の研究，また利用を意図した際に，遊離状あるいは加水分解によって生成される糖類を定性，定量することがしばしば要求され，分離，定量に関する多くの報告が見られる。そのなかで最近注目されているガスクロマトグラフを用いた定量法について紹介する。

## 1. 諸言

従来，木質物の加水分解により得られる主な5種類の糖，アラビノース，マンノース，キシロース，グルコース，ガラクトース等の分離定量は，主としてペーパークロマトグラフ法<sup>1),2)</sup>によって行なわれていたが，この方法は長時間を要し，操作が煩雑で定量誤差が生じやすく，より簡単で正確な定量法が望まれた。そこで最近広く応用されているガスクロマトグラフ（以下GLCと略記）による定量法<sup>3)-10),12)</sup>が多く試みられている。

GLC法による糖類の定量においては，加水分解等の処理によって得られる単糖類から簡単な操作により，定量的に揮発性誘導体を得るための誘導体，およびその処理条件の選定，また得られた誘導体を十分分離し得るGLC条件，即ち装置，カラム充填剤，GLC操作条件等の選定が重要な事項となる。

最近までに報告された定量法は，その使用する誘導体により大きく2つの方法に分けられる。1つは単糖類をトリメチルケイ素誘導体（以下TMSE誘導体と略記）として定量する方法，他はアルデヒド・アセテート誘導体とする方法である。

糖をTMSE誘導体として分離する方法は，まず，Sweeley等<sup>3)</sup>によりなされた。彼等は，100種類の糖およびその関連物質につき詳細な分析方法を報告し，アラビノース，キシロース，ガラクトース，グルコース等は Chromosorb W にコーティングしたEGSまたは SE-52カラムにより分離できると述べている。その後，Richey<sup>4)</sup>，Alexander<sup>5)</sup>，Sawardeker<sup>6)</sup>等により定量法として発展されたが，いずれも5つの糖より得られる誘導体混合物を十分分離できず，Richey

等は，マンノース，ガラクトース，グルコースの定量誤差は10%と大きく，Sawardeker等の方法は，グルコースとキシロースまたはアラビノースとマンノースが混在する場合には正確な定量ができないと述べている。次いで，Bethge<sup>7)</sup>，Brower<sup>8)</sup>等により，さらに詳しくTMSE誘導体生成条件，GLC分離条件が検討され，木質物構成糖の定量法として比較的満足できる結果が得られた。これ等はいずれもTMSE誘導体を用いた方法であるが，糖は溶液中で - ， - フラノース型，ピラノース型およびアルデヒド型と数種の異性体を生じ，これ等がそのままトリメチルケイ素化され，クロマトグラム上にピークとして現われる。従って，数種類の糖が混在する試料では，完全な分離が困難であり，また多数のピークが生じるためピークの解析が面倒である。そこで1つの糖より1つの誘導体が定量的に生成されるアルデヒド・アセテートによる方法が検討された。この方法は，まず異性化の根源である糖中のアルデヒド基を還元して水酸基とし，次いでアセチル化することにより揮発性化する方法である。

Sawardeker等<sup>9)</sup>は，10種類の単糖類につき，そのアルデヒド・アセテートの分離条件および定量法を検討し，GasChromQに3%ECNSS-Mをコーティングしたカラムによれば，これら10種類の糖は十分分離され，シャープなピークが得られると述べている。またCrowell等<sup>10)</sup>は，木材パルプの加水分解により得られる糖につき，誘導体生成条件およびGLC分析条件を検討し，満足し得る定量方法を報告した。

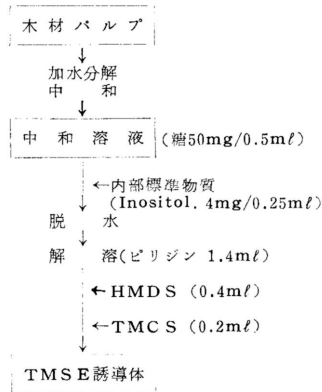
以下，木材構成糖の大部分を占めるキシロース，マンノース，ガラクトース，グルコース，アラビノース

混合物の上記2種類の誘導体を用いた定量法を紹介する。

## 2. TMSE誘導体による定量法

### (1) TMSE誘導体の調製法

無水状態で、糖にHMDS [(CH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>Si<sub>6</sub>] および TMCS [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>ClSi] を添加することにより、容易に、かつ定量的にTMSE誘導体は生成される。木材パルプより得られた糖のTMSE誘導体調製法を第1図<sup>8)</sup>に示す。



第1図 TMSE誘導体調製法

HMDSとTMCSの配合割合についてSweeley等<sup>3)</sup>が検討した結果、1者だけはほとんど反応せず、10mgの糖類を1mlのピリジンに溶解し、HMDS 0.2ml (1.0mmoles), TMCS 0.1ml (0.8mmoles)を加えたさい最も良い結果が得られ、また安定性も良く、密栓容器中で数日間安定であった。

調製時に最も注意しなければならない点は、糖異性体の量比が、溶媒の種類、温度などにより異なるため、乾燥した糖をピリジンで溶解後トリメチルケイ素化までの時間、温度等の条件により、各異性体のTMSE誘導体生成割合に変化をきたす。従って、これら条件を常に一定にする必要があることである。

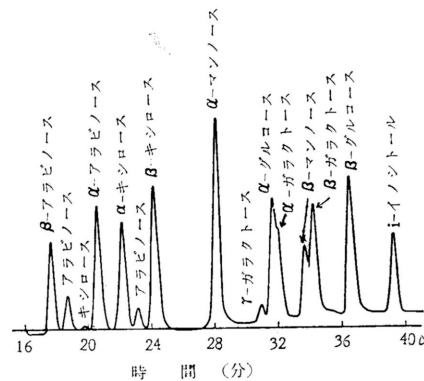
Bethge等<sup>7)</sup>は、過塩素酸リチウム0.2%含有するピリジンにより糖を溶解し、40℃で2時間放置してもはや平衡値が変化しなくなってから誘導体生成処理を行なっている。しかし、Brower等<sup>8)</sup>によれば、ピリジンに溶解後2~3分以内にHMDS, TMCSを添

加すれば、平衡値にはほとんど相異が認められなかったと述べている。また誘導体生成反応中に生成される塩化アンモニウムは、速やかに沈澱し、反応混合物を直接GLCに注入しても定量に妨害を与えないと述べている。

### (2) GLC条件および定量法

糖をTMSE誘導体として定量する試みは多くなされているとはいえ、5つの糖の異性体を含めたTMSE誘導体を完全に分離したGLC条件はまだ報告されていない。しかし、一定条件で平衡状態にある糖溶液につき測定すれば、一定割合に分割されたピークが得られるはずである。従って、全ピークが分離されなくとも、1つの糖につき1つの異性体が完全に分離されれば定量は可能となる。

数種類の糖が混在する試料の分析用液相としては、EGS (polyethylene glycol succinate), SE-52 (methyl phenyl silicone), Carbowax 20M, XF 1112 (nitrile silicone) 等が報告されているが、15% Carbowax20M - Chromosorbw (80~100mesh) カラム<sup>6)</sup>は等温ガスクロを用い、グルコース、ガラクトース、マンノース混分物の定量に適し、また5% XF1112 - Chromosorbw カラム<sup>7)</sup>により、アラビノース、キシロース、マンノース、ガラクトース、グルコース混合物を±2%の誤差で定量されるが、分離が不完全でチャートの解析および計算が複雑である。EGSカラムは第2図<sup>8)</sup>に示す如く、比較的良く糖のTMSE誘導体を分離する。図-2のGLC条件は、



第2図 TMSE誘導体のガスクロマトグラム

Column : 15%EGS - Chromosordw . 8feet ,  
 5mmi . d .  
 ColumnTemp : 110 ~ 190 2 /min  
 InjectTemp : 300  
 He flow : 140ml /min (内28ml /minはdetectorに)  
 H2 flow : 35ml /min  
 air flow : 310ml /min  
 Detector : FID

装置については、溶媒、試薬のテーリングによる妨害の除去、流出時間の短縮、シャープなピークが得られる等の点で、昇温ガスクロが秀れ、またペントース、ヘキソースは炭素含量がそれぞれ46.52%、46.62%と等しく、FIDを用いれば多くの検量線を作る必要がなく有利である。

定量は内部標準法によるが、糖のTMSE誘導体は2~4コの異性体を生じ、数種の糖が混在する場合、これらすべてが分離されるわけではないから、単に内部標準物質との高さ比一重量比より計算することができない。そこで、次のように計算される。図において、アラビノース、キシロースのTMSE誘導体はすべて分離されているから、これら各々のピーク高を合計して内部標準物質（イソイノジトール）のピーク高との比より定量される。また、完全に分離されていないグルコース、マンノース、ガラクトースは、分離されている異性体、 $\alpha$ -グルコース、 $\beta$ -マンノース、 $\alpha$ -ガラクトースがこれらの水溶液中における平衡値（第1表<sup>3)</sup>に示す）60.2%、72.0%、62.6%に相当するものとして計算される。

第1表 水溶液中における各種単糖類異性体の平衡値 (%)

単糖類	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
アラビノース	50.8	43.8	5.4
キシロース	41.3	55.2	3.4
ガラクトース	31.9	62.6	5.4
グルコース	26.4*	63.1*	10.5
マンノース	39.8*	60.2*	—
	72.0	28.0	—

\* 文献 8

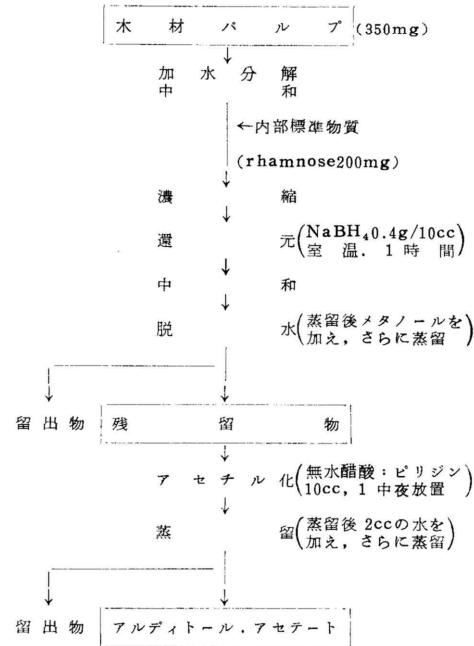
### 3. アルディトール・アセテート誘導体による定量法

糖のトリメチルケイ素化は簡単で、かつ定量的に行なわれるとはいえ、多数の異性体が生じ、これらを完

全に分離することが困難であり、また、データの解析がやっかいである。そこで異性化の根源である糖中のアルデヒド基を $\text{NaBH}_4$ により還元して水酸基となし、生成される糖アルコールを無水酢酸 - ピリジンでアセチル化することによって揮発性誘導体を作り、GLCによって分離定量する方法である。

#### (1) 試料の調製

試料の調製法<sup>10)</sup>を第3図に示す。



第3図 アルディトール・アセテート調製法

#### ( ) 還元

糖中のアルデヒド基は $\text{NaBH}_4$ により定量的に還元される。Swardeker等<sup>9)</sup>は $\text{NaBH}_4$ による糖の還元時間を3時間としているが、室温での還元速度は用いられる $\text{NaBH}_4$ 量に比例すること<sup>11)</sup>から、 $\text{NaBH}_4$ の添加量を多くすることにより還元時間は短縮されるはずである。Crowell等<sup>10)</sup>はアラビノース、グルコース混合物に $0.4\text{gNaBH}_4$ を加え、還元時間を0.5~3時間と変化させ、フェーリング溶液で未還元糖の測定を行なったところ、1時間の還元時間で十分であることを認めている。

#### ( ) アセチル化

純粋な糖アルコールは、無水酢酸 - ピリジン (1 : 1) により短時間で完全にアセチル化されるが、還元

試薬を含む試料の室温でのアセチル化は完全に行なわない(例えば、グルコースの場合10時間以上アセチル化処理を行ない、97%がアセチル化)。これは、還元後の中和処理によって生成されるホウ酸によりアセチル化が妨害されるものと思われる。

Crowell 等<sup>10)</sup>は、ホウ酸をCH<sub>3</sub>-HCl処理により揮発性のホウ酸メチルにし、蒸溜することを試み、満足できる結果を得たが、蒸溜のさい、高濃度化する塩酸により糖アルコールの分解、またはアセチル化の妨害が誘発するため、蒸溜中、常にメタノール量を一定に保つ必要があり、また時間も2~4時間要し、多数の試料を定量する際には得策とはいえない。そこで、アセチル化時間を十分長く取り、定量目的物質と内部標準物質とを同時にアセチル化し、そのアセチル化割合が等しいものとして定量を行なっている。

(iii) GLC用試料の調製

アセチル化後の試料を直接装置内に注入すると、試薬および溶媒のテーリングが生じ、安定したベースラインを得ることができない。これは昇温ガスクロマトグラフによれば防ぐことができるが、定温ガスクロマトグラフ装置による場合、注入前にアセチル化試薬とアルデイトール・アセテートとの分離が必要である。

Crowell 等<sup>10)</sup>は、アセチル化反応液を氷上に注ぎ、アルデイトール・アセテートを沈澱させる方法、また、アセチル化試薬を蒸溜によって除く方法につき検討したが、前者は各糖が選択的に沈澱するため適当でなく、後者の方法により良い結果を得たと報告している。即ち、まずピリジンを蒸溜し、水を加えてさらに蒸溜して酢酸を除き、乾固したアルデイトール・アセテートを塩化メチルに溶解し、これをGLC注入用試料とする方法である。

(2) GLC条件および定量法

アルデイトール・アセテート類の分離用液相として、Swardeker等<sup>9)</sup>は、いずれもケイソウ土系担体に添着したCarbowax20M, XE - 60 (Nitrilsilicone) ECNSS - M (Ethylene glycol succinate と シアノエチル形シリコンを化学的に結合させたもの) につき、10種類の単糖類を用いて検討を行なった結果、TMS

E誘導体と異なり、ある程度極性を有するアルデイトール・アセテートは、極性の弱すぎる液相 (XE - 60) または強すぎる液相 (Carbowax20M) では分離が不完全で、これ等の中間的極性を有する液相 (ECNSS - M) が秀れた分離を示す。

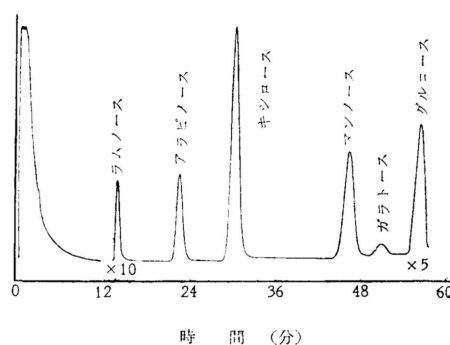
ECNSS - Mカラムを用いたアルデイトール・アセテート混合物のクロマトグラムを第4図<sup>10)</sup>に示す。分離条件は、

- Column : 3% ECNSS - M - GasChromQ ,  
6feet .
- Column Temp : 180
- Inject Temp : 250
- Detector Temp : 290
- He flow : 90ml / min
- Detector : FID .

定量は内部標準物質法による。得られたクロマトグラムより試料中の多糖類の割合を計算するには次式により行なわれる。即ち、

$$\text{多糖類}\% = \frac{A \times W_s \times C}{A_s \times W \times K} \times 100$$

- A<sub>s</sub>およびA : 内部標準物質および定量目的物質のピーク面積
- W<sub>s</sub> : 内部標準物質添加量
- W : 試料量
- K : 検量線より得られる係数
- C : 単糖類より多糖類への換算係数  
(ペントース0.88, ヘキソース0.90)



第4図 アルデイトール・アセテート誘導体のガスクロマトグラム

#### 4. 総括

以上、木材主要構成糖の定量法としてGLC法を紹介したが、ペパークロマトグラフ法と比較すると、一操作、即ち、GLC用試料の注入操作によって数種の糖を同時に定量し得る利点を有する。

GLC分析を行なう際、カラム充填剤、操作条件等の選定が重要であることは当然であるが、GLC用試料の調製方法、即ち、各種糖類の揮発性誘導体を調製することがGLC分析を可能とさせる必須条件である。既述した如く、2種類の誘導体調製方法が報告されており、TMSE誘導体とするさいには数種の異性体が生じること、またアルデイトール・アセテート誘導体とするさいは、アセチル化妨害物質の存在することなどに留意しなければならないが、第2表に示す如く、一応、両方法ともそれぞれ満足すべき結果が得られているようである。

置によっては、試料の調製方法が煩雑化する場合もあるようであるが、木材質を化学的観点より研究、利用することを意図した際には、木材質あるいは生成物の構成糖類を迅速に、かつ正確に定量する一方法として有用であろう。

#### 文 献

第2表 各手法による糖の定量値

定 量 法	定 量 値 (%)			文 献
	Glucose	Mannose	Xylose	
アルデイトール・アセテート法	95.4	2.5	2.0	10
TMSE誘導体法	96.0	1.9	2.1	7
ペパークロマトグラフ法	95.3	2.5	2.2	2

注 試料はいずれもStandardpulpICC-4

しかし、ウロン酸などの糖関連物質の分析に適切な結果を与えた例はみあたらず、研究目的によっては、さらに検討すべき点を残しており、また使用GLC装